

## 나일틸라피아 임파조직내 Melanomacrophage center의 形成過多에 따른 形態 및 機能變化에 관한 病理學的 研究

한규식 · 김지영 · 정현도 · 허민도

부산수산대학교 어병학과

임파조직내에 MMC가 과다축적될 경우 형태학적 또는 기능학적인 손상가능성의 유무를 알기 위하여, 틸라피아 복강내에 *V. anguillarum* FKC 를 단독으로 투여하거나(제 1 MMC 유도군) 또는 이 세균입자항원과 함께 콜로이드 탄말액을 반복투여함으로써(제 2 MMC 유도군) 비장 및 두신내에 인위적으로 MMC 형성을 유도하였다. 제 1유도군에서는 대조군에 비하여 MMC 형성증가가 있었으나 현저하지 않았고, 제 2유도군에서는 MMC가 비장 및 두신의 대부분을 점유할 정도로 과다하게 형성되었다. 모든 실험군에서, 비장조직에서는 주로 동정맥벽내나 유초동맥에 밀집하여 형성되었고, 특히 제 2유도군에서는 동정맥벽내가 아닌 곳의 MMC는 그 중심 또는 변연에 유초동맥으로 인정되는 얇은 내피만 남은 내강이 자주 인정되었다. 두신에서도 임파구가 밀집한 임파구 영역내에 주로 형성되었으나 혈관벽과의 관계는 불분명하였다. 이러한 MMC의 밀집에도 불구하고 조혈조직실질의 조직학적 변성소견은 인정할 수 없었다. 한편, 방어기능손상의 유무를 알기 위하여 제 2유도군에 대하여 *E. tarda* 생균으로 공격하였으나 감염감수성의 증가는 없었으며 오히려 현저한 감소를 보였다. 또한 동 세균 FKC를 투여한 후 혈청항체가의 변동을 경시적으로 추적하였다. 그러나 항체생산능에 손상가능성은 전혀 없었을 뿐 아니라 두 MMC 형성유도군에서 모두 1주째부터 대조군에 비해 4배 내지 8배의 높은 항체가를 나타내었으며 이 경향은 4주째까지 지속되었다. 또한 조혈기능 손상여부와 관련하여 말초혈액내 혈구조성을 경시적으로 조사하였으나 유의한 변화가 인정되지 않았다. 따라서 틸라피아에서 MMC는 유초동맥을 포함한 혈관벽과 밀접하여 또는 이들 주위로 형성되나, 이들의 과다형성으로 임파조직의 형태학적 및 기능적 손상을 야기하지 않으며, 균체항원의 주사 또는 탄말에 의한 MMC 형성량의 차이는 어체 방어계의 활성화와 밀접한 관련성이 있는 것으로 사료되었다.

Key words : MMC, Lymphomyeloid tissues, Defense system, Challenge, Antibody titre

MMC(Melanomacrophage center)란 어류중 특히 경골어류의 조직내에서 관찰되는 특징적인 대식세포 집합체를 지칭한다(Agius, 1980; Zapata, 1983). MMC의 형태 및 크기는 매우 다양하며 황색 내지 흑갈색의 각종 색소를 함유하고 있다. MMC를 구성하는 대식세포가 주로 적혈구 파괴산물을 함유한 일종의 색소세포로서 인정된 이래(Jolly, 1923),

1971년에 Edelstein은 이 세포를 Melanomacrophage라 하였으며 멜라닌을 직접 생산하는 멜라닌 아세포(Melanoblast) 또는 멜라닌세포(Melanocyte)가 아닐 뿐 아니라, 멜라닌이 Melanosome 상태로 세포질내에 존재하면서 체내외적 요인에 반응하여 색변화를 야기하는 색소포(Melanophore)의 일종도 아니라고 하였다. 이후 Roberts(1975)는 이 Me-

lanomacrophage가 전자현미경적 구조에 있어 일반 대식세포와 유사하였다는 점, 높은 색소함량 그리고 서로 응집하여 두드러진 결절양구조(Nodular structure)를 형성하는 경향 때문에 이 대식구집단을 Melano-macrophage centre 라고 명명하기에 이르렀다. 그러나 이 집단내에 색소를 반드시 함유하지 않는 경우도 있기 때문에 단순히 Macrophage aggregate(MA)라고도 불리고 있다. 대부분의 보고에서 Melano-macrophage centre 로 기술하고 있기 때문에 본 논문에서도 이를 따르기로 하였다. 이 대식세포에 Melanin 을 붙인 것은 Edelstein(1971)의 정의에 따른 것이지만 멜라닌 생성세포(Melanin-producing cell)의 것과는 달라 주로 지방유래 수용성 색소인 세로이드(Ceroid)와 리포푸신(Lipofuscin)으로 알려져 있으며 여기에 헤모글로빈 유래 색소도 확인되어 있다(Agius and, Agbede, 1984). 경골어류에서는 MMC가 주로 비장과 신장내에 형성되며 연어과(Salmonids)를 제외한 거의 모든 진골어류에서의 MMC는 임파구성 요소와 연관하여 형성된다. 이들은 섬세한 호은성의 섬유성 피막(Argyrophilic capsule)으로 둘러싸인 경우가 종종 있으며 주로 각종 크기의 혈관벽과 관련하여 위치하는 것으로 알려져 있다(Agius, 1980). 경골어류에 있어 대식세포는 복강내연조직, 간의 문맥공간, 관상동맥에 연한 심근세포 간극 등에 다수로 분포하기 때문에 이와 관련한 장소에서도 MMC가 형성될 수 있다(Graf and Schlins, 1979). MMC 구성세포가 대식세포인 사실로 미루어 주로 비특이적 방어계 활성을 표현하는 구조물로서 인식되어 왔고, 최근 들어 특이적 면역계와 관련성이 있는 것으로도 알려져 있다. 고등척추동물에서는 체내에 도입된 이물성 입자들이 초기에 임파여포주위역(Perifollicular areas) 내에 분포하거나 이곳에 분포하는 대식세포내에 축적되지만, 그 이후의 처리과정은 항원성 입자와 불활성 입자 사이에 서로 다른 것으로 알려져 있다. 탄분(Carbon particle) 과 같은 불활성 입자들은 적색수(Red pulp) 내와 백색수(White pulp)의

가장자리 구역(Marginal zone)에 분포한 대식세포내에 축적되나(Van Rooijen and Roeterink, 1980), 항원성 입자는 종자중심(Germinal centres) 내에 축적하여 오랫동안 정체된다고 한다(Nossal and Ada, 1971; Tew *et al.*, 1980). 따라서 종자중심은 면역반응조절을 위한 중요한 장소가 됨을 뜻한다(Tew *et al.*, 1980; Kunkl and Klaus, 1981; Klantz, 1989). 이에 반하여 경골어류에서는 항원성 입자와 불활성 입자간의 구별없이 초기에는 비장의 유초동맥(Ellipsoids) 벽의 대식세포와 체신 및 두신의 세망내피세포(Reticuloendothelial cells)에 의해 탐식되고 최종적으로 MMC 내에 축적이 일어난다고 알려져 있다(Roberts, 1975). 따라서 경골어류에 있어서는 MMC를 면역학적인 관점에서 고등척추동물 임파장기내의 종자중심(Geminal center)과 기능적으로 대응관계에 있는 것으로 보고 있으며 종자중심의 미분화적 구조물(Primitive analogue)일 수 있다는 가설이 제시되어 있다(Secombes *et al.*, 1982; Lamers and Parmentier, 1985). MMC는 각종 생물학적 질병(Grover, 1968; Yu *et al.*, 1971; Roberts, 1975; Palmer *et al.*, 1992), 비타민 E 결핍 또는 산패사료의 급여(Blazer and Wolke, 1983), 기아(Agius, 1979b; Agius and Roberts, 1981; Agius, 1983; Agius and Couchman, 1986; Micale and Perdichizzi, 1990), 연령증가(Brown and George, 1985) 등과 같은 각종 병리학적 또는 생리학적 조건하에서 그 분포량이 많아지며, 형태, 출현수 및 크기와 같은 형태학적 소견 및 함유내용물에 있어 많은 다양성을 보이는 것으로 알려져 있다. 그럼에도 불구하고 MMC의 출현수, 크기, 색소의 침착정도 등 각종 형태학적 변화를 근거로, 수질의 새로운 생물학적 오염지표(Biomarker)로서 그 활용가능성을 시도하는 연구가 최근의 관심사가 되고 있다(Wolke *et al.*, 1985; Macchi *et al.*, 1992; Wolke, 1992). 이와 같이 MMC의 면역학적 조절기능과의 관련성 및 수질오염지표로서의 활용가능성을 구체화하기 위하여는 앞으로도 MMC의 출현에 관련하여 많은

형태학적 및 기능학적 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다. 지금까지 각종 생리학적 및 병리학적 조건에서 MMC 자체의 출현량 변화에 관한 연구는 다수에 이르나 MMC가 임파조혈실질과 형태 및 기능학적으로 서로 어떠한 연관성을 갖는 지에 관한 연구는 전혀 없다. 본 연구는 어체조직내 MMC 분포의 의의를 규명하는 목적의 일환으로 수행하고자 하였으며, MMC가 주로 조혈 및 방어기구와 깊은 연관성을 갖는 임파조혈장기에 축적하며 그 축적량도 아주 다양하다는 점에 착안하여 이들이 과다할 정도로 많이 형성될 경우 해당 장기의 형태 및 고유키능에 변화를 야기하는지의 유무를 알고자 하였다. 이를 위하여 인위적으로 과다한 MMC 형성을 유도하고 이에 따른 임파조혈장기내 MMC의 분포형태를 기술하고 조직학적 변성변화의 유무를 조사하였으며 생리학적 및 면역학적 방법을 사용하여 고유키능의 손상유무를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험어

나일틸라피아(Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*)는 병력(病歷)이 없고 임상적으로 건강한 개체를(체중, 50~70g) 부산수산대학교 부속양어장에서부터 분양받아, 600L 순환여과식 수조에서(수온, 25-26°C) 2 주일간 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 사료는 순치기간 및 실험기간 동안 급여하지 않았다.

### 2. 콜로이드 탄말액 및 불활화 균체항원의 조제

콜로이드 탄말액의 조제는 시판되는 Indian ink 액을 원액으로 하여 생리식염수에 5배로 희석 멸균하여 4°C에 냉장보관하면서 이하의 각 실험에 사용하였다. 한편 균체항원(Formalin-Killed Cell, FKC)의 조제는 야의 분리균주인 *Vibrio anguillarum*과 *Edwardsiella tarda* H-4 를 부산수산대학교 어병학과 진단생화학 실험실에서 분양받아 사용하

였다. 각 세균의 FKC는 2ml TSB(Tryptic Soy Broth) 배지에서 26°C, 24시간 동안 예비배양을 거친 후 250ml의 TSB 배지에 재접종하여 26°C, 24 시간 동안 진탕배양하였다. 진탕배양한 배양액은 포르말린원액(37% formaldehyde)을 0.5%가 되도록 한후, 24시간 동안 실온에서 불활화시켰다. 이 불활화한 균액은 30분간 원심분리(4°C, 10,000g) 한 후, 멸균생리식염수로 3회 세척하고, 다시 동식염수를 가하여 100mg/ml의 균체농도가 되도록 현탁하여 투여용 균체항원으로 사용하였다. 보존제로써 Sodium azide(NaN<sub>3</sub>)를 0.05%가 되게 첨가하여 4°C에서 냉장보관하면서 실험에 사용하였다.

### 3. MMC 형성유도

실험군은 실험군 2군(MMC 형성실험군 1, 2)과 대조군을 포함하여 3군에서 실시하였고, 인위적으로 MMC를 형성시키기 위한 처치방법은 Fig. 1에 나타내었다. MMC 형성실험군 1과 2는 각각 4회에 걸쳐 *V. anguillarum* FKC를 어체당  $1 \times 10^8$  cells( $0.1 \text{ ml} 10^9$  cells/ml)로 주사하고 MMC 형성실험군 1에는 생리식염수를 그리고 MMC 형성실험군 2에는 콜로이드 탄말액을 반복주사하였다.

즉, *V. anguillarum* FKC 주사시작일을 0일째로 하여 2일 간격으로 MMC 형성실험군 1에 대하여는 멸균생리식염수를 반복주사하였고 MMC 형성실험군 2에 대하여는 전술한 방법으로 미리 조제한 콜로이드탄말액을 어체당 0.2ml 씩 5회에 걸쳐 반복주사하였다. 또한 총 5회중 3회째 주사시에는 MMC 형성실험군 1에 대하여는 *V. anguillarum* FKC를 생리식염수와, MMC 형성실험군 2에 대하여는 콜로이드 탄말액과 동시 투여하였다. 생리식염수와 콜로이드탄말액을 5회째 주사한 후 2주간 투여를 중지하였는데, 이는 Herraez와 Zapata(1986)의 연구결과와 본 연구실의 경험(Park and Huh, 1994)에 근거하여 이 기간을 대식세포가 집합체를 형성하여 완전한 MMC 형태를 형성하게 하는 1차 응집기를 두었다. 1차 응집기간인 2주가 경과한

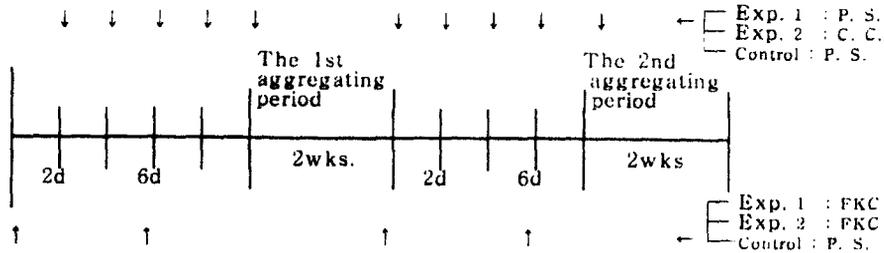


Fig. 1. The injection schedule of physiological salin(P.S) or colloidal carbon(C.C), and *V. anguillarum* antigen(FKC) for inducing overcrowded MMCs within the lymphomyeloid organs.

시점에서, 전술한 동일한 수순으로 주사를 반복하였으며, 총 10회째 투여가 종료된 후 다시 2주간 방치함으로써 이기간을 대식세포의 2차 응집기로 하였다. 대조군에 대하여는 동일한 수순에 따라 멸균생리식염수만을 주사하였다. 2차 응집기를 거친 실험군에 대하여는 각각 MMC 형성대조군(Control), MMC 형성군 1(Group 1) 및 MMC 형성군 2(Group 2)로 하여 각각의 실험을 진행하였다.

4. 조직학적 검사

대조군 및 실험군의 조직학적 검사는 2차 응집 기간중 12일째에 5마리를 부검하여 MMC의 형성 상태 및 임파조직실질의 변성변화를 관찰하였다. 대조군 및 각 실험군의 비장 및 두신을 적출하여 10% 중성포르말린액에 고정하고 상법에 따라 조직절편을 제작하였다. 각 조직절편은 통상적인 Hematoxylin-Eosin으로 염색하는 한편, 임파조직내 섬유성 세망구조를 보다 세밀히 관찰하기 위하여 Azan-Heidenhain's Aniline Blue 로 결합조직 염색을 하여 광학현미경(Olympus CH-2, Olympus optical Co., Ltd.)으로 관찰하였다.

5. MMC 형성유도군에 대한 조절기능활성에 관한 실험

(1) Hematocrit(Ht)치 측정 및 적혈구 계수 (RBC count)

MMC 형성대조군 및 MMC 형성군 1과 2에 대

하여 제 2차응집기간 완료시점 이후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 9주째에 각 군당 5개체씩 Ethyl amino-benzoate 100ppm으로 마취한 후 1회용 멸균 주사기로 채혈하였다. 혈액은을 헤파린 처리된 Capillary pipett으로 신속히 흡인한 후 3,000rpm에서 30분간 원심분리하여 Ht치(%)를 기록하였다.

한편 적혈구 계수는 동일 개체로 부터 헤파린 처리된 1회용 멸균주사기를 사용하여 채혈하여 혈구희석용 피펫(RBC diluting pipette or melangeur)을 사용하여 생리식염수로 200배 희석한 후, 혈구계산판(Hemocytometer chamber)에 적하하여 광학현미경하에서 적혈구를 계수하고 1mm<sup>3</sup>당 적혈구 수로 환산하였다.

(2) 백혈구 분별계수

백혈구 분별계수를 위한 혈액은 상기한 방법 5(1)과 동일한 개체로 부터 취한 것이며, 백혈구로는 호중구(Neutrophil), 임파구(Lymphocyte) 및 단핵구(Monocyte)를 선택하였다. 채혈한 혈액은 혈액도말표본으로 제작하고, May-Giemsa 액으로 염색한 다음 광학현미경하에서 적혈구 5,000세포당 각 해당 세포수를 계수하였다.

6. MMC 형성유도군에 대한 방어기능활성 검사법

(1) 항원처치 및 응집항체가 측정

2차 응집기간이 종료된 시점에서 *E. tarda* H-4 FKC를 MMC 형성대조군 및 MMC 형성군별 30개체에 대하여 어체당 1×10<sup>8</sup> cells 씩 복강내 주

사하였다. 주사 후 1, 2, 3, 4, 및 6주째 각각 5개체를 Ethyl aminobenzoate 100ppm으로 마취시킨 후, 1회용 멸균주사기로 채혈한 다음 5,000g 에서 5분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후, *E. tarda* H-4 FKC 10mg/ml 와 반응시켜 응집항체가를 측정하였다.

### (2) *E. tarda* H-4 를 사용한 공격실험

공격실험은 MMC 형성대조군 및 MMC 형성군 2의 각각 10개체에 대하여 제 2차 응집기간이 종료된 시점에서 *E. tarda* H-4 균  $10^9$  cells/ml을 개체당 0.1ml씩 복강주사한 후 7일간의 누적폐사율을 기록하였다.

### (3) 통계학적 분석

대조군 및 각 실험군 간의 실험 결과에 대한 유의성 검정은 Student's *t* test를 실시하였다며 p 값이 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 1. 대조군 및 MMC 형성실험군의 비장과 두신의 조직학적 소견

생리식염수만을 투여한 대조군의 비장에서 관찰된 MMC는 바깥윤곽이 대체적으로 원형에 가까웠고, MMC 내부에는 대식세포 집합상이 치밀하였으며 흑색멜라닌이 함유되어 있었다. 대부분의 MMC는 유초동맥 주위나 기타 동정맥벽내에 형성되어 있었고 MMC에 따라서는 단층의 섬유성피막으로 얇게 피복되어 있는 경우가 많았다(Photo 1a). 한편 두신의 경우는 MMC가 두신실질의 전반에 고르게 분포하고 있었으며, 비장에서와 같이 두신에서도 MMC는 대부분 원형을 나타내었다. MMC에 따라서 근처에 임파구들이 밀집해 있거나 또는 MMC를 완전히 피복한 듯이 침윤하여 있었다(Photo 1b). *V. anguillarum* FKC를 총 4회 주사하고 생리식염수를 반복투여한 MMC 형성실험군 1에서는, 대조군에 비하여 비장 및 두신의 MMC 수 및 크기는 현저한 증가를 보였다. 비장조직내의 MMC 분포

위치는 대조군의 경우와 유사한 경향을 나타내었으나, MMC는 많은 수가 동정맥혈관벽내 보다 유초동맥에 밀접하게 분포하였다(Photo 1c). 한편, 두신의 MMC는 주로 임파구 영역 또는 그 근처에 분포하였고, 임파구집단과 별개로 위치한 MMC는 크기가 대체적으로 컸을 뿐 아니라, MMC 내 세로이드 축적량도 현저하였다. 또한 거의 모든 MMC의 윤곽이 대조군에 비해 원형에 가까웠으며 크기도 컸다(Photo 1d).

MMC 형성실험군 2에서는, MMC 형성실험군 1에 비하여 아주 대조적으로 비장과 두신에서 모두 각 해당조직의 거의 전역을 차지할 정도로 다량의 탄말이 축적되어 있었고, 이들은 기존 MMC 내에 축적해 있거나 새로운 MMC를 형성해 집합되어 있었다. 기존 또는 새로운 MMC의 형성위치는 대조군이나 MMC 형성실험군 1에서와 같이 비장의 유초동맥을 포함한 혈관계를 중심으로 일어나 있었다(Photo 2a). 이러한 다량의 탄말이 축적된 MMC들은 MMC 형성실험군 1에 비해 더욱 컸고 그 수도 현저히 많았다. 유초동맥 사이에 위치한 MMC들 중에, MMC의 중심부나 변연부에 거의 혈관내피만 인정되는 혈관이 종종 관찰되었으며 이는 유초동맥인 것으로 생각되었다(Photo 2b). 한편 두신에서도 탄말입자는 기존 MMC 내 또는 그 주위로 탄말입자가 치밀하게 축적하여 MMC 형태를 이루고 있었고, 비장에서와 같이 MMC 형성실험군 1보다 대형이며 많은 수의 MMC가 관찰되었다(Photo 2c).

MMC들은 주위 조직구성성분과 경계가 분명하였으며 윤곽은 원형에 가까운 길쭉한 형태였다. 또한 MMC는 얇은 임파구성 세포층으로 대부분 피복되어 있었다(Photo 2d).

이상과 같이 MMC의 분포수 및 크기 등에 있어서 대조군과 실험군간 또는 MMC 형성실험군 1과 2 사이에서 다양한 차이를 보였지만, 이들 MMC의 형성과 관련하여 실질조직에 어떠한 형태학적 변형소견은 야기하지 않았다.

2. 대조군 및 MMC 형성유도군에 대한 말초혈액 혈구조성의 경시적 변화

1) Hematocrit(Ht)치 및 적혈구수

MMC 형성대조군을 포함한 두 MMC 형성군에 대한 Ht 치 및 적혈구수를 Table 1에 나타내었다. MMC 형성대조군 및 MMC 형성군의 Hematocrit 치는 19.1~21.5%로 유의한 차가 인정되지 않았다. 또한 적혈구 계수의 측정치는 102.8~126.6 로 유의한 차가 인정되지 않았다(P>0.05).

2) 백혈구 조성비

MMC 형성대조군을 포함하여 두 MMC 형성군에 있어 호중구, 임파구 및 단핵구수의 경시적인 변화를 Table 2에 나타내었다. MMC 형성대조군 및 MMC 형성군의 호중구수 및 임파구수의 범위는 각각 2.0~4.3과 72.5~90.17로 MMC 형성대조군과 MMC 형성군 그리고 MMC 형성군 1과 2 사이에 유의한 차가 없었고, 단핵구수에 있어서도 MMC 형성대조군과 MMC 형성군 간의 유의한 차가 인정되지 않았다(P>0.05).

Table 1. Antibody(1:)measured from serum of tilapias with artificially induced overcrowded MMCs.

Days after challenge (Week)	Control (n=3)	Croup 1 <sup>2</sup> (n=3)	Group 2 <sup>3</sup> (n=3)
1	32	128	256
2	32	128	256
3	32	32	128
4	16	32	256
6	128	128	128

<sup>1</sup>: Saline with *V. anguillarum* FKC, <sup>2</sup>: Saline with *V. anguillarum* FKC. <sup>3</sup>: Colloidal carbon with *V. anguillarum*.

Table 2. Cumulative death rates of tilapias artificially induced overcrowded MMCs after the challenge with *E. tarda* H-4 ( $1 \times 10^8$  cells/fish).

Days after Challenge (Day)	Numbers of Dead Individuals	
	Control <sup>1</sup>	Croup 2 <sup>2</sup>
1	0(0) <sup>3</sup>	0(0)
2	2(20)	1(10)
3	4(40)	1(10)
4	2(20)	0(0)
5	1(20)	0(0)
6	1(10)	1(10)
7	0(0)	0(0)
21	0(0)	0(0)
	10(100)	3(30)

<sup>1</sup>: Saline only, <sup>2</sup>: Colloidal carbon with *V. anguillarum* FKC, <sup>3</sup>: Numbers in parenthese represent cumulative death rates as percentages.

3. MMC 형성군에 대한 항원처치 후 그 응집항체의 경시적 추이

2차 응집기를 완료한 MMC 형성대조군을 포함한 각 MMC 형성군에 대하여 입자항원인 *E. tarda* H-4 FKC를 주사한 후 6 주째까지 주별로 경시적 응집항체의 변동추이를 Table 3에 나타내었다. MMC 형성대조군에서는 *E. tarda* 항원주사 후 1 주째에 항체가가 32였으며 이후 4주째까지 큰 변동을 보이지 않았으나, 그러나 6주째에는 128로 현저히 증가하였다. 그러나 MMC 형성군 1과 2에서는 1 주째부터 대조군에 비해 유의하게 높은 항체가를 나타내었다. 즉, MMC 형성군 1에서의 항체가는 2주째까지 128이었으며 3 및 4주째에 32로 다시 감소하였지만 6주째에는 128로 증가하는 경향을 보였다. MMC 형성군 2에서는 1주째에 항체가가 256을 나타내었고 4주째까지 높게 유지되었으나 6 주째의 항체가는 다시 대조군과 제 1유도군에서 동일한 128로 감소하였다.

4. MMC 형성대조군 및 MMC 형성군 2에 대한 *E. tarda* H-4 공격실험 결과

MMC 형성대조군의 경우 공격 후 2일째부터

폐사가 일어나기 시작하여 6일째에는 누적폐사율이 100%에 달하였다. MMC 형성군 2의 경우에는 공격 후 2일째부터 폐사가 일어나기 시작하여 6일째의 누적폐사율은 30%이었고, 이후 3주째까지 임상소견을 보이거나 빈사 및 폐사한 예는 더 이상 관찰할 수 없었다(Table 4).

고 찰

금붕어(*Carassius auratus*)에 면양 적혈구를 2회 복강주사함으로써 임파조직(비장, 두신 및 체신) 내에 MMC의 크기 및 수적 증가가 있었다는 이전의 보고예(Herraez and Zapata, 1986)에 근거하여 면양 적혈구 대신 *V. anguillarum* FKC를 총 4회 걸쳐 주사하거나, 4회의 동 FKC와 함께 콜로이드 탄말액을 총 10회에 걸쳐 반복주사함으로써 MMC 형성을 유도하였다. MMC 형성후 12일 째의 조직소견에서 MMC 형성실험군 1에서도 MMC 형성량이 다소 증가하였으나 특히 MMC 형성실험군 2에서는 비장 및 두신의 전역을 매울 정도로 과다한 MMC 형성이 유도되었다. 이러한 MMC의 과다형성 소견에도 불구하고 임파조직 실질의 조직학적 변성변화는 야기되지 않았다. MMC의 과다형성

Table 3. Hematocrits and RBC counts and in tilapias with artificially induced overcrowded MMCs.

Week*	Hematocrits(%)			RBC( $\times 10^4$ cells/ml)		
	Control <sup>1</sup>	Group 1 <sup>2</sup>	Group 2 <sup>3</sup>	Control	Group 1	Group 2
1	19.3 $\pm$ 3.0	19.2 $\pm$ 2.0	21.5 $\pm$ 2.5	102.8 $\pm$ 22	102.5 $\pm$ 15	126.6 $\pm$ 17
2	21.2 $\pm$ 1.0	21.5 $\pm$ 1.0	21.8 $\pm$ 1.3	126.5 $\pm$ 12	129.5 $\pm$ 8	125.5 $\pm$ 10
3	20.6 $\pm$ 2.5	20.7 $\pm$ 3.0	20.4 $\pm$ 0.7	115.2 $\pm$ 21	115.2 $\pm$ 11	114 $\pm$ 20
4	ND	20.8 $\pm$ 0.7	19.4 $\pm$ 1.0	111.3 $\pm$ 8	114.6 $\pm$ 5	107.1 $\pm$ 11
5	20.5 $\pm$ 1.7	20.2 $\pm$ 2.0	21.1 $\pm$ 0.9	118.7 $\pm$ 13	116.3 $\pm$ 5	122.5 $\pm$ 5.0
6	20.3 $\pm$ 5.0	21.6 $\pm$ 2.0	21.3 $\pm$ 2.0	116.1 $\pm$ 20	115.5 $\pm$ 16	122.8 $\pm$ 19
7	21.5 $\pm$ 0.2	21.2 $\pm$ 0.5	21.1 $\pm$ 1.3	125.7 $\pm$ 1	128.5 $\pm$ 7	123.3 $\pm$ 15
9	20.1 $\pm$ 0.5	20.0 $\pm$ 0.1	19.1 $\pm$ 3.1	111.3 $\pm$ 32	113.5 $\pm$ 9	100.83 $\pm$ 11

<sup>1</sup>: Saline only <sup>2</sup>: Saline *V. anguillarum* FKC <sup>3</sup>: Colloidal carbon with *V. anguillarum* FKC \*: Weeks elapsed from the day(day 0) being the 12th day after the final injection of materials for inducing the overcrowded MMCs. ND: Not tested.

Table 4. Neutrophil, lymphocyte and monocyte per 5,000 erythrocytes in tilapias with artificially induced overcrowded MMCs.

Weeks*	Neutrophil			Lymphocyte			Monocyte		
	Control <sup>1</sup>	Group 1 <sup>2</sup>	Group 2 <sup>3</sup>	Control	Group 1	Group 2	Control	Group 1	Group 2
1	2.0±1.3	3.4±1.0	3.5±0.5	80.3±26	78.6±20	79.1±7	2.2±11	2.3±1.5	ND
2	3.0±0.7	3.3±2.0	3.5±0.2	72.5±17	81.3±11	82.0±10	2.0±0.8	1.6±1.0	ND
3	2.0±1.0	2.0±0.7	3.7±1.0	78.3±8	92.5±7	87.9±1	2.6±1.3	2.7±1.2	2.5±1.2
4	2.0±0.5	3.3±0.5	2.1±0.7	82.7±12	90.5±16	90.1±12	3.0±1.2	1.3±0.6	4.7±1.8
5	4.3±2.0	3.0±2.0	2.7±1.3	79.3±17	82.4±3	79.9±2	1.5±1.1	2.0±0.8	4.3±2.0
6	2.4±1.2	2.6±0.2	2.3±3.0	78.7±15	79.3±9	89.3±8	2.5±1.1	2.1±0.9	3.3±2.0
7	2.0±0.2	2.5±0.3	3.6±2.0	79.5±20	81.5±4	81.6±8	ND	1.7±1.0	5.3±2.2
9	2.0±1.0	3.3±0.5	3.4±0.3	NC	NC	NC	NC	NC	NC

<sup>1</sup>: Saline onyl, <sup>2</sup>: Saline *V. anguillarum* FK, <sup>3</sup>: Colloidal carbon with *V. anguillarum* FK, \*: Weeks elapsed from the day(day 0) being the 12th day after the final injection of materials for inducing the overcrowded MMCs. NC: Not conted, ND: Not detected.

에 기인한 조직학적 변성변화의 유무는 MMC가 조직의 어느 부위에 형성되는가에 따라 크게 달라질 수 있다. 조직학적 변성이 초래되지 않았다는 것은 MMC가 임파조직실질과 해부학적으로 분리되어 독립된 별개의 기능적 구조물일 가능성이 높다. 지금까지 임파조직내에서 MMC가 형성되는 정확한 조직학적 부위에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 비장의 경우 Kranz와 Gercken (1987)은 MMC가 실질내에 형성된다고 하였으나 정확한 조직학적 연구결과가 제시되지 않았고, 기타 MMC에 관한 다수의 보고예들에서도 정확한 형성장소를 언급한 경우는 없었다. 다만 콜로이드탄말을 사용한 대부분의 연구에서(Ellis, 1980; Mori, 1980; Lamers and Parmentier, 1985), 초기에 비장의 유초동맥벽에 탄말이 축적이 되고 이후에 기존 MMC 내에 축적되거나, 유초동맥을 떠나 새로운 장소에 MMC를 형성한다고 하였다. 본 연구결과에서 비장내 MMC는 비교적 벽이 두꺼운 대형의 혈관과 밀접하여 형성되어 있었으며 그 대부분은 혈관외막(Tunica externa) 섬유성결합조직으로 둘러싸여 있었다. 그러나 유초동맥에 인접한 MMC는 결합조직성 피

막이 결여되어 있었을 뿐 아니라 MMC의 윤곽도 불규칙하여 혈관벽과의 관계가 매우 불분명하게 보였다. 그러나 특히 MMC 형성실험군 2의 결과에서 MMC의 중심 또는 변연에 거의 내피만 남은 유초동맥이 자주 인정되었다. 이는 MMC가 유초동맥 주위로 형성됨을 시사하며, MMC가 가자미(Turbot, *Scophthalmus maximus*) 비장내에서 세포성 또는 비세포성 피막으로 둘러싸여 주위 임파요소와 분리되고 전자현미경적으로 MMC를 피복하는 섬유성분이 유초동맥벽의 것과 연속성을 갖는다는 Ferguson(1976)의 보고를 뒷받침하는 소견이라 할 수 있다. 한편, 두신내에 형성된 거의 모든 MMC는 임파구성 영역내에 위치하고 있었고, 결합조직성 피막이 결여로 혈관벽과의 연관성이 분명하지 않았다. 두신조직내 임파구성 영역은 혈관을 중심으로 형성되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 비장에서와 같이 두신내의 MMC도 혈관을 중심으로 하여 형성된 것으로 생각되었다. 일반적으로 두신내의 MMC는 정맥동과 혈관 주위에 형성되는 것으로 보고하고 있으나(Imagawa *et al.*, 1990), 본 연구결과에서 대부분의 MMC가 임파구성 영역내에

위치하였기 때문에 실질에 해당하는 정맥동 보다는 혈관과 밀접하여 형성되는 것으로 사료되었다. 두신조직은 전체적으로 실질내 세망섬유를 제외하고는 결합조직성분이 거의 없고 주행혈관도 결합조직성 외막발달이 좋지 않다(Lamers and De Hass, 1985). 특히 MMC 형성실험군 2에서 MMC가 원형에 가까운 길쭉한 형태를 취하고 있었음은 이와 같은 두신내 혈관벽의 조직학적 특성을 반영한 소견으로 생각되었다. MMC의 과다형성 조건에서 임파조혈 실질에 형태학적 변성변화를 야기하지 않은 것은 비장 및 두신에서 MMC 형성은 임파조혈실질이 아닌 혈관주위의 결합조직성 기질영역에 한정되었기 때문인 것으로 사료되었다. 장기의 기능적 이상이 형태학적 이상을 반드시 수반한다고 할 수는 없기 때문에 MMC 형성군에 대한 임파조혈기능 활성변화 유무를 조사하였다. 조혈기능 활성변화를 알기 위하여 말초혈액내 혈구조성을 조사하였으나 유의한 변화를 인정하지 못하였다. 한편 면역기능과 관련하여 *E. tarda* 균 공격후 누적 폐사율의 차이와 항체가의 경시적 추이를 조사하여 그 활성저하의 유무를 알고자 하였다. MMC 형성군 2에서 공격후 MMC 형성대조군에 비하여 폐사율이 현저하게 낮았으며, 응집항체가 있어서는 대조군에서는 4주째까지 변동이 없었던 반면, MMC 형성군 1과 2에서 1주째부터 각각 4배 및 8배에 가까운 높은 항체를 나타내었고 6주째까지 지속되었다. 따라서 MMC의 과다형성으로 면역활성 저하를 초래하기 보다는 오히려 활성증가와 관련성이 있는 것으로 나타났다.

어류에서 항원성 물질과 불활성 물질의 처리방식에 대한 많은 보고들(Ellis *et al.*, 1976; Mori, 1980; Lamers and De Hass, 1985) 이나 임파조혈장기내에서의 항원이동 및 분포에 관한 많은 연구결과들(Nossal and Ada, 1971; Secombes and Manning, 1980; Tew *et al.*, 1980; MacArthur *et al.*, 1983; Tatner and Manning, 1985; Herraez and

Zapata, 1987; Kranz, 1989) 은 MMC가 면역계와 많은 관련성을 시사하고 있지만 그 본포의의에 대하여는 불명확한 상태에 있다. 게다가 임파조혈장기에 MMC가 과다하게 형성될 경우 임파조혈기능에 미칠 수 있는 영향에 대해서도 평가한 연구예가 없다. 본 연구의 목적이 MMC와 면역계의 활성증가와의 연관성을 밝히는 데 있지 않으나, 본 실험에서의 결과로부터 MMC 형성증가는 어체의 방어계의 활성증가와 깊은 관련성이 있는 것으로 나타났다. 공격실험에 사용한 틸라피아가 *E. tarda*에 의한 감염경력이 없었음에도 불구하고 MMC 형성군 2와 MMC 형성대조군 사이에 폐사율의 차이는 MMC가 비특이적 면역계와의 깊은 관련성이 있음을 시사하고 있다. 어류의 특이적 면역계는 고등척추동물의 경우에 비하여 분화성이 낮은 것으로 알려져 있어 (Carr, 1976; Weir, 1977; Oliver *et al.*, 1986; Secombes and Fletcher, 1992), 각종 질병에 있어 비특이적 면역계의 역할을 더욱 강조하고 있다. 그러나 세균공격에 따른 방어력이나 혈청항체가에 대한 차이가 MMC 형성량 차이에 기인한 것이 아니라 MMC 형성군에 적합한 *V. anguillarum* FKC가 지속적으로 비특이적 면역계를 활성상태에 있게 한 결과일 수도 있다. 그러나 MMC 형성군 1과 2사이에 항체가의 차이로 보아 그럴 가능성은 매우 희박하다. 경골어류에서 대식세포집단으로서 인식되는 MMC는 반드시 임파조혈장기에 한정되어 형성되는 것이 아니며 MMC 내에 포획된 활성 또는 비활성 물질의 순환 및 제거과정의 변화와 이에 따른 대식세포의 비특이적 활성상태 변화(Kranz and Gercken, 1987) 등을 고려하면, 비록 MMC 형성량 차이에 기인하였다고 할지라도 방어력 및 항체가의 변화에 대한 구체적인 기전은 더욱 복잡할 것으로 생각된다. 따라서 MMC 형성 차이에 따른 방어력 증강 및 항체가 변동에 관하여는 보다 많은 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Agius, C. : The role of melano-macrophage centers in iron storage in normal and diseased fish. J. Fish Dis., 2 : 337-343, 1979 b.
- Agius, C. : Phylogenetic development of melano-macrophage centers in fish. J. Zool. Lond., 191 : 11-31, 1980.
- Agius, C. : On the failure to detect haemosiderin in the melanomacrophages of dogfish *Scyliorhinus canicula* (Linnaeus) after prolonged starvation. *Experientia*, 39 : 64-66, 1983.
- Agius, C. and Agbede, S. A. : An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haematopoietic tissues of fish. J. Fish Biol., 24 : 471-488, 1984.
- Agius, C. and Couchman, W. : Induction of alkaline phosphatase activity in the melano-macrophage centres of *Oreochromis aureus* (Steindachner) through starvation and vaccination. J. Fish Biol., 28 : 87-92, 1986.
- Agius, C. and Roberts, R. J. : Effects of starvation on the melano-macrophage centers of fish. J. Fish Biol., 19 : 161-169, 1981.
- Blazer, V. S. and Wolke, R. E. : Ceroid deposition, retinal degeneration and renal calcium oxalate crystals in cultured clown fish, *Amphiprion ocellaris*. J. Fish Dis., 8 : 135-138, 1983.
- Brown, C. L. and George, C. J. : Age dependent accumulation of macrophage aggregates in the yellow perch, *Perca fluviatilis* (Mitchell). J. Fish Dis., 8 : 135-138, 1985.
- Carr, I. : The RES and the mononuclear phagocyte system. In the Reticuloendothelial System in Health and Disease, eds., Richard, S. M., Escobar, M. R. and Friedman, H., Plenum Press, New York, pp. 3-9, 1976.
- Edelstein, L. M. : Melanine : A unique biopolymer. In Pathobiology annual, ed., Joachim, H.L., pp. 309-324, 1971.
- Ellis, A. E. : Antigen-trapping in the spleen and Kidney of the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). J. Fish Dis., 3 : 413-426, 1980.
- Ellis, A. E., Munroe, A. L. S. and Roberts, R. J. : Defence mechanisms in fish 1. A Study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). J. Fish Biol., 8 : 67-78, 1976.
- Ferguson, H. W. : The relationship between ellipsoids and melano-macrophage centers in the spleen of turbot (*Scophthalmus maximus*). J. Comp. Path., 86 : 377-380, 1976.
- Graf R. and Schlus J. : Ultrastructural and histochemical investigation of terminal capillaries in the spleen of carp (*Cyprinus carpio* L.). Cell Tissue Res., 196 : 289-306, 1979.
- Grover, J. H. : Haemosiderins in bluegill spleens. Trans. Am. Fish. Soc., 97 : 48-50, 1968.
- Herraez, M. P. and Zapata, A. : Structure and function of the melano-macrophage centers of the goldfish, *Crassius auratus*. Vet. Immunopathol., 12 : 117-126, 1986.
- Herraez, M. P. and Zapata, A. : Trapping of intraperitoneal-injected *Yersinia ruckeri* in the lymphoid organs of *Carassius auratus* : the role of melano-macrophage centres. J. Fish Biol., 31 (Supplement A) : 235-237, 1987.
- Imagawa, T., Hashimoto, Y. and Sugimura, M. : Vascularization and related distribution of leucocytes in carp, *Cyprinus carpio* L., head kidney. J. Fish Biol., 37 : 357-366, 1990.

- Jolly, J. : "Traite technique d'hematologie". A. Maloine et Fils, Paris, 1923.
- Kranz, H. : Changes in splenic melano-macrophage centres of the dab *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. Dis. Aqua. Org., 6 : 167-173, 1989.
- Kranz, H. and Gercken, J. : Effects of sublethal concentration of potassium dichromate on the occurrence of splenic melano-macrophage centres in juvenile plaice, *Pleuronectes platessa*, L. J. Fish Biol., 31 (Supplement A) : 75-80, 1987.
- Kunkl, A. and Klaus, G. G. B. : The generation of memory cells. 4. Immunization with antigen-antibody complex accelerates the development of B-memory cells, the formation of germinal centres and the maturation of antibody affinity in the secondary response. Immunology, 43 : 371-378, 1981.
- Lamers, C. H. J. and De Hass, M. J. H. : Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*). Cell tissue Res., 242 : 491-489, 1985.
- Lamers, C. H. J. and Parmentier, H. K. : The fate of intraperitoneally injected carbon particles in cyprinid fish. Cell Tissue Res., 242 : 499-503, 1985.
- MacArthur, J. L., Fletcher, T. C. and Thomson, A. W. : Distribution of radiolabelled erythrocytes and the effect of temperature on clearance in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). J. Reticuloendothel. Soc., 34 : 13-21, 1983.
- Macchi, C. J., Romano, L. A. and Christiansen, H. E. : Melano-macrophage centres in the whitemouth croaker, *Micropogonias furnieri*, as biological indicators of environmental changes. J. Fish Biol., 40 : 971-973, 1992.
- Micale, V. and Perdichizzi F. : A quantitative and histochemical study on melano-macrophage centres in the spleen of the teleost fish *Diplodus annularis* L. J. Fish Biol., 37 : 191-197, 1990.
- Mori, M. : Studies on the phagocytic system in goldfish-8. Phagocytosis of intraperitoneally injected carbon particles. Fish Path., 15(1) : 25-30, 1980.
- Nossal, G. J. V. and Ada, G. L. : Antigen, lymphoid cells and the immune response. Academic Press, New York, 1971.
- Oliver, G., Eaton, C. A. and Campbell, N. : Interaction between *Aeromonas salmonicida* and peritoneal macrophages of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Vet. Immun. Immunopath., 12 : 223-234, 1986.
- Palmer, R., Soutar, R. H., Branson, E. J., Southgate, P. J., Drivan, E., Richards, R. H. and Collins, R. O. : Mortalis in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L., associated with pathology of the melano-macrophage and haemopoietic systems. J. Fish Dis., 15 : 207-210, 1992.
- Park, J. H. and Huh, M. D. : Histopathological studies on melano-macrophage centers (MMCs) in spleen and head kidney of immuno-modified tilapia, *Oreochromis niloticus*. J. Fish Path., 7(2) : 127-149, 1994.
- Roberts, R. J. : Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. In The Pathology of fishes, eds., Ribelin, W. E. and Migaki, G., University of Wisconsin Press, Madison, WI, pp. 399-428, 1975.
- Secombes, C. J. and Fletcher T. C. : The role of phagocytes in the protective mechanism of fish. Annual Rev. of Fish Dis., : 53-71, 1992.
- Secombes, C. J. and Manning, M. J. : Comparative

- studise on the immune system of fishes and amphibians : antigen localization in the carp *Cyprinus carpio* L. J. Fish Dis., 3 : 399-412, 1980
- Secombes, C. J., Manning, M. J. and Ellis, A. E. : The effect of primary and secondary immunization on the lymphoid tissues of carp, *Cyprinus carpio* L. J. Exp. Zool., 220 : 277-287, 1982.
- Tatner, M. F. and Manning, M. J. : The ontogenetic development of the reticulo-endothelial system in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Dis., 8 : 35-41, 1985.
- Tew, J. G., Phipps, R. P. and Mandel, T. E. : The maintenance and regulation of the humoral response : Persisting antigen and the role of follicular antigen binding dendritic cells as accessory cells. Immunol. Rev., 53 : 95-165, 1980.
- Van Rooijen N. Roeterink C. H. : Phagocytosis and lymphocyte migration : evidence that lymphocytetrapping in the spleen following carbon injection is not due to directlymphocyte-macrophage adherence. Immunology, 39 : 571-576, 1980.
- Weir, D. M. : Immunology. An outline for students of medicine and biology, 4th ed., Churchill Livingstone, New York, 1977.
- Wolke, R. E. : Piscine macrophage aggregates; Annual Rev. of Fish Dis., pp. 91-108, 1992.
- Wolke, R. E., Murchelano, R. A., Dickstein, C. D. and Georgye, C. J. : Pigmented macrophage aggregates(MA) as fish health monitors. Bull. Environ. Contamin. Toxicol., 35 : 222-227, 1985.
- Yu, M. L., Kiley, C. W., Sarot, D. A. and Perlmutter, A. : Relation of hemosiderin to erythropoiesis in the blue gourami, *Trichogaster trichopterus*. J. Fish. Res. Broad Can., 28 : 47-48, 1971.
- Zapata, T. : Phylogeny of the fish immune system. Bull. Inst. Pasteur, 81 : 165-186, 1983.

## Legends of figure

Photo 1. Spleen and head kidney in control(Saline) and the MMC-induction group 1(FKC) (The 2nd aggregation period, H-E. stain,  $\times 400$ ).

- a. Spleen in control. A round and densely packed MMC containing a large amount of black melanin is seen closely associated with wall of a small-sized blood vessel(arrow). Ellipsoid(e).
- b. Head kidney in control. No marked findings are found in the structure of MMC itself except for slight increase in both number and size with more rounded outline.
- c. Spleen in the MMC-induction group 1. Densely packed MMC is located just around the ellipsoid(e).
- d. Head kidney in the MMC-induction group 1. A MMC with lymphocytic sheath(l) shows a round shape with obvious demarcration to the surrounding tissue components.

Photo 2. Spleen and head kidney in the MMC-induction group 2 (FKC+colloidal carbon) (The 2nd aggregation period, H-E. stain).

- a. Spleen. Most of splenic tissue are occupied with overcrowded MMCs. Carbon laden macrophages are densely accumulated within and just around preexisting MMCs and are further organized to form new MMCs. Within the MMCs, small blood vessel wall(arrow) are occasionally found. Ellipsoid(e).( $\times 100$ )
- b. Spleen.. Magnification of Photo-2a No degenerative changes are recognized in association with markedly compact MMCs. Ellipsoid(e).( $\times 400$ )
- c. Spleen in the MMC-induction group 1. Densely packed MMC is located just around the ellipsoid(e).
- d. Head kidney. Magnification of Photo-2c. No histological changes are found in the parenchymal area intimately associated with the large MMCs. ( $\times 400$ )

132 나일틸라피아 입과조직내 Melanomacrophage center의 形成過多에 따른 形態 및 機能變化

PHOTO 1.

PHOTO 2.

## Pathological studies on the morphological and functional changes of lymphomyeloid tissues overpopulated with melano-macrophage centers in tilapia, *Oreochromis niloticus*

Kyu-Sik Han, Ji-Young Kim, Hyun-Do Jeong, Min-Do Huh

*Department of Fish Pathology, College of Fisheries Science,  
National Fisheries University of Pusan 608-737, Korea*

To induce an overpopulated melanomacrophage centers(MMCs) within spleen and kidney in tilapias, two methods were applied through the intraperitoneal inoculation of *V. anguillarum* FKC with a repeated dose of saline(the 1st induction group), and of colloidal carbon (the 2nd induction group). In the 1st group, both number and size of MMCs were slightly increased in spleen and head kidney. However in the 2nd group the two hemopoietic tissues were nearly occupied with quite a large number of MMCs. Regardless of induction groups, many of MMCs were confined within the walls of blood vessels in the spleen. Especially in the 2nd group, the MMCs without fibrous capsules often had concentrically or eccentrically located, thin-walled lumens of vessels, which strongly suggests to be ellipsoids. In head kidney, nearly all MMCs were located within or just around the lymphocytic areas but the precise relationship to blood vessel wall was not obvious. Despite of such overpopulated MMCs, no histopathological degenerative findings in hemopoietic parenchymas of both organs were recognized. To evaluate the effect on defensive function, tilapias of the 2nd group were challenged with *E. tarda*. Susceptibilities to *E. tarda* were never increased but rather significantly decreased compared to control. Weekly antibody titres in sera were determined for all induction groups, in which the titres in the 1st and 2nd groups were 4 or 8 times higher than in the control, and then remained high until the 4th week. Also with the hemopoietic function, cellular compositions of peripheral blood were analyzed at weekly intervals but no significant changes resulted. From those results, it is suggested that overcrowding of MMCs would not lead to any morphological as well as functional deteriorations of spleen and head kidney but have an intimate association with enhancement of protective immune system in tilapias.

---

Key words : MMC, Lymphomyeloid tissues, Defense system, Challenge, Antibody titre