

넙치의 면역반응에 수온이 미치는 영향

방종득 · 박수일*

국립수산진흥원 동해수산연구소 증식과

*부산수산대학교 어병학과

넙치의 면역반응에 수온이 미치는 영향을 조사하기 위하여 넙치에 포르말린 사균 *Edwardsiella tarda* 로 주사면역시킨 후 수온변화에 따른 체액성면역반응을 관찰하였다. 저수온 (12, 15°C) 에서 항체는 면역 2~3 주 후에 나타났으며 최대 항체가는 각각 16 과 32 이었다. 그러나 고수온 (20, 23°C) 에서는 면역 1 주후에 나타났으며 최대 항체가는 약 2,048 로 높았다. 그리고 한번 형성된 항체는 수온의 변화에 민감하게 반응하였고 자연조건에서도 유사한 경향을 보였으며 면역지속기간은 19 개월 이상으로 나타났다.

Key Words : *Paralichthys olivaceus*, Formalin killed *Edwardsiella tarda* Antibody, Agglutination titer

어류의 면역반응은 백신의 종류, 백신 투여방법, 백신 처리기간, 어체의 크기, 백신 투여농도, 수온, 백신 투여전 약품처리 및 백신 투여부위 등에 따라 달라진다. 환경요인 중에서는 수온이 가장 중요한 요인이 된다고 하며 (Snieszko and Friddle 1949; Paterson and Fryer 1974; Ellis 1982) 또한 어류를 침지면역시킬 때 수온은 방어면역성의 증강에 많은 영향을 미치며, 연어과 어류의 경우 10°C 보다는 18°C 에서 면역성이 증강되나, 4°C 에서는 백신처리 후 40 일까지도 면역성이 인정되지 않는다고 한다 (Amend and Johnson, 1981). 수온은 어류의 체온과 병원체의 세대기간 (generation time) 이 온도와 관계되어 있기 때문에 중요하다. 또한 Muroga 와 Egusa (1969) 는 뱀장어의 항체가가 16~19°C 에서는 뚜렷하게 나타나지만 7~11°C 에서는 항체가 형성되지 않으며 잉어는 15°C 이하에서 면역반응이 일어나지 않는다고 Avtalion 등 (1976) 은 보고하였다. 이와 같이 어류는 어종에 따라 면역반응수온이 달라진다고 볼 수 있다.

어류의 성장 적수온 범위내에서 백신투여가 방어 면역성을 유도하는데 효과적일 것으로 생각되나, 실험실 시험이 아닌 양식현장에서 백신을 처리할 경우 어체의 크기, 양식장 여건 등에 따라 적수온이 아닌 계절에 면역처리를 하게 되는 경우가 있다. 또한 예방학적인 측면에서 볼 때 어류가 질병에 감염되어 있지 않는 상태에서 면역처리가 되어야 하기 때문에 종묘생산지에서 백신투여가 되어야 효과적이며 경제적인 측면에서도 유리하다고 볼 수 있다.

넙치의 경우 종래의 종묘생산 시기는 5~6 월경이었으나, 최근에 와서는 양식종묘 및 성어의 수요 증가에 따라 조기 종묘생산이 요구되어 저수온기인 12월부터 채란하여 종묘를 생산하여 분양하고 있는 실정이다. 조기종묘를 생산하는 양식장에서는 가온 사육시설이 되어 있기 때문에 종묘를 적정수온 범위내에서 백신처리는 가능하다. 그러나 장기간 성장을 시키지 않고 종묘크기 (전장 5 cm 이상) 가 되면 분양을 해야되는 실정이기 때문에, 종묘생산지에서 백신처리하여 총

분한 항체가 형성된 후에 일반 육성어양식장에 분양하게 되면 보다 효과적일 것이다. 그러나 때에 따라서는 저수온 상태에서 면역을 시켜야 할 경우가 있으므로 자연상태의 저수온기에서 면역시켰을 때 면역성이 어떻게 변하는지에 대해서도 검토할 필요가 있다.

재료 및 방법

1. 실험어 및 온도조절

본 실험에서는 계절별시험과 온도조건별 시험으로 구분하여 실험하였다. 먼저 계절별항체가 변화양상 및 항체지속기간을 알아보기 위하여 저수온기에 면역시킨 동절기 시험구와 고수온기에 면역시킨 하절기 시험구로 나누었다. 동절기 저수온시험구는 평균체중 110 g 되는 양식산 넙치 10 마리를 공시어로 사용하였다. 실험기간은 1991년 1월 4일부터 1992년 8월 4일까지 이었으며, 실험시작시 수온은 12.1°C 이었다. 하절기 고수온 시험구에서는 당년생 넙치로서 평균체중 56 g 되는 것을 10 마리 사용하였다. 실험기간은 1991년 8월 2일부터 1992년 8월 2일까지 이었으며, 실험시작시 수온은 22.5°C 이었다. 두 시험구의 사육탱크는 300 ℓ FRP 수조를 사용하여 유수식으로 사육수를 공급하고 공기공급장치도 시설하였다. 온도조건별 시험구는 크게 두가지로 나누어 실시하였다. 첫째는 면역후 수온조건을 일정하게 유지시키면서 면역반응시험을 행한 시험구와, 둘째는 면역 후 수온조건을 변화시키면서 수온변화에 따른 면역반응시험을 행한 시험구이다. 먼저 수온조건을 일정하게 조절한 시험구는 수온조건을 4 개의 시험구로 구분하고 각 시험구별 시험어의 크기는 평균체중 85 g 되는 것을 10 마리씩 사용하였다. 사육탱크는 계절별 시험에서와 동일한 크기의 FRP 수조를 사용하여 자동온도조절기를 사용하여 가온하였고

공기공급장치도 시설하였다. 주수량은 1.2 ℓ/min 으로 흘려주고 매일 저면의 배설물 및 사료 찌꺼기를 제거해 주었다. 모든 시험구의 사료는 시판되는 넙치용 pellet 사료를 사용하여 1 일 1 회 투여하였다. 온도조건별 시험은 수온조건을 23°C, 20°C, 15°C, 12°C 로 시험구를 나누어 면역 8 주째까지 시험하였다. 그리고 수온변화에 따른 면역반응 시험에서는 수온변화 방법을 달리한 2 개의 시험구를 두었다. 즉, 20°C 에서 면역시킨 후 항체가 상승하여 안정이 된 후에 다시 저수온 (13°C) 으로 수온을 하강시키는 시험구와, 13°C 에서 면역시킨 후 항체가 상승하여 안정이 된 후에 다시 고수온 (20°C) 으로 수온을 상승시키는 시험구를 설정하였다. 온도조건별 시험에서 수온조절은 공시어를 사육탱크에 수용한 후 1 일 1~2°C 씩 상승 또는 하강시켜서 온도변화로 인한 스트레스를 적게 하였으며, 수온이 안정된 후에 실험용백신을 시험어의 복강에 주사법으로 투여하였다.

2. 시험어 면역

면역항원제작에 사용한 균주는 방 등 (1991) 이 넙치에서 분리한 *E. tarda* FSW-910410 로서 BHI 배지에 25°C, 48 시간 증균배양 후 포르말린을 0.5% 농도되게 처리하여 24 시간 정치한 후 만든 포르말린 사균 (formalin killed cell, FKC) 을 면역항원으로 하였다. 넙치에 대한 투여방법은 제작한 항원을 멸균 생리식염수에 4.5×10^{10} cells/ml 되게 농도를 조절하여 시험어의 복강에 0.1 ml 씩 주사한 후 300 ℓ 수조에 수용하여 관리하였다.

3. 응집항체가 조사

면역어의 면역반응 효과측정을 위한 항체가변화 조사는 면역주사 후 8 주까지는 1 주일 간격으로 면역어로부터 채혈하여 응집항체를 조사

하였으며, 8 주 이후는 1 개월 간격으로 채혈하였다. 채혈은 시험구당 5 마리씩 무작위로 채집하여 MS-222 (3-aminobenzoic acid ethylester, Sigma) 로 마취시킨 후 시험어의 미병부로부터 주사기로 채혈하여 2 시간 실온에서 정치시키고, 4°C 의 인큐베이터에 넣어 하룻밤을 넘긴 후 원심분리하여 항체가측정에 사용하였다. 항체가측정 방법은 U 형 multimicro plate (Corning) 를 사용하여 microtiter 법으로 응집항체를 측정하였으며 이때 사용한 균현탁액의 농도는 5 mg/ml 이었다.

결 과

1. 계절별 면역반응

동절기인 저수온기에 면역처리 하였을 때 넙치의 체액성 면역반응을 조사한 결과는 Fig. 1 과 같다. 최초 면역 후 3 주까지는 항체가 형성되지 않았으며 이후 4 주째의 항체가는 4 정도였다. 면역어는 주사 1 개월 후부터 서서히 증가하여 수온상승기 직전까지는 8 정도의 낮은 항체가를 나타내다가, 4 월초 이후 수온상승기부터는 항체가가 다시 증가되기 시작하여 고수온기인 8~9 월에 가서 항체가는 128 로 최고치를 나타내었다. 11 월부터는 다시 항체가가 떨어지기 시작하여 이듬해 4 월에 접어들면서 항체가는 최저치 (16) 를 보이다가 수온의 상승과 더불어 다시 증가하는 경향을 보였다.

고수온기인 하절기에 면역처리 하였을 때 넙치의 체액성 면역반응 조사 결과는 Fig. 2 와 같다. 하절기에 면역처리한 넙치는 면역후 1 주째부터 항체가가 나타났으며 이후 항체가가 급격히 증가하여 면역 3 주째에 최고치를 나타냈다. 이 같은 높은 항체가는 11 월까지 지속되었으며 그 이후 동절기에 접어들면서 떨어지기 시작하여, 이듬해 5 월초에 가서는 최저치의 항체가 (64)

를 보였다. 이후 수온상승과 더불어 항체가는 다시 증가하는 경향을 보였다.

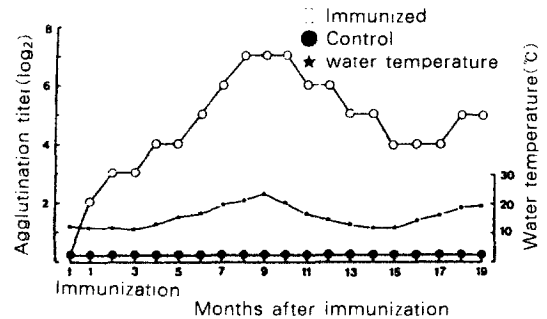


Fig. 1. Changes of agglutination titer after immunization at low water temperature. Fish were injected intraperitoneally with FKC of *E. tarda* (6.7×10^9 cells/fish) at January 4, 1990 and were cultured in natural condition.

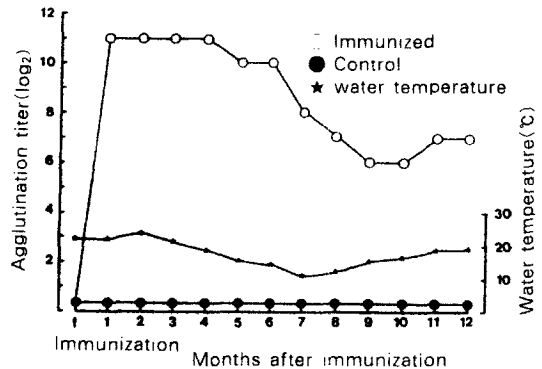


Fig. 2. Changes of agglutination titer after immunization at high water temperature. Fish were injected intraperitoneally with FKC of *E. tarda* (4.6×10^9 cells/fish) at August 2, 1991 and were cultured in natural condition.

2. 수온조건별 면역반응

수온을 23°C, 20°C, 15°C 및 12°C 로 조정 한 상태에서 FKC 로 면역시킨 후 일자 경과별 항체가의 변화는 Fig. 3 과 같다. 23°C 시험구에서 항체가는 면역 1 주째에 256 의 항체가를 나타내다가 면역 2 주째에 최고에 달했으며 그때의 항체가는 2,048 이었다. 이같은 높은 항체가는 8

주째까지 지속되었다. 20℃ 시험구의 항체가는 23℃ 보다 늦게 (4 주) 최고치에 달하였으며 그 때의 항체가는 23℃ 구 보다는 약간 낮았다. 15℃ 시험구에서는 항체가 면역 2 주째부터 나타나기 시작하였으며 이후 서서히 증가하여 면역 4 주째에 32 로 최고치를 나타냈다. 12℃ 시험구에서는 면역 3 주째 부터 항체가가 형성되기 시작하여 면역 5 주째에 16 으로 낮은 항체가를 보였다. 4 개의 온도시험구에서 항체가는 각각 최고치에 달한 후 8 주째까지 별 변화없이 지속되는 경향을 나타내었다.

시험어를 면역시킨 후 사육수온에 변화를 주었을 때 실험결과를 보면, 먼저 20℃ 에서 면역시킨 후 4 주 경과하여 항체가가 안정된 다음 13℃ 로 하강시켰을 때의 항체가 변화는 Fig. 4 와 같다. 항체가는 면역 1 주 후부터 나타나기 시작하여 면역 3 주만에 1,024 로 최고치를 나타내었으며, 면역 4 주 경과 후에 수온을 13℃ 로 하강시켰을 경우 항체가는 서서히 떨어져서 수온하강 2 주 후에 128 을 나타내고 이후 항체가는 별 변화 없이 8 주째까지 지속이 되었다. 수온이 13℃ 일 때 시험어를 면역시켰을 경우에는 Fig. 5 와 같이 항체의 출현이 늦어서 3 주 경과 후부터 항체가가 서서히 나타나기 시작하여 면역 5 주째에 가서 16 정도의 낮은 항체가로 안정 수준에 달했다. 그러나 면역 6 주 후에 수온만을 20℃ 로 높여주었을 때에는 항체가의 급격한 증가현상이 나타나서, 수온을 상승시킨지 2 주만에 256 까지 증가하여 최고치의 항체가에 달하였다 (Fig. 5).

3. 면역지속성

넙치에 FKC 항원으로 면역을 시켰을 때 면역 지속기간은 Fig. 1 에 나타나 있는 것과 같이, 면역 후 19 개월 이상 지속되는 것으로 나타났다. 그리고 저수온기에 면역을 시킬 경우 항체의 형성이 늦을 뿐 아니라 항체가도 높지 않지만

(Fig. 1), 고수온기에 면역을 시킬 경우 항체의 형성은 저수온에 비해 항체출현 시기가 2 주 정도 빨랐으며 항체가도 저수온기에 비하여 높게 나타났다.

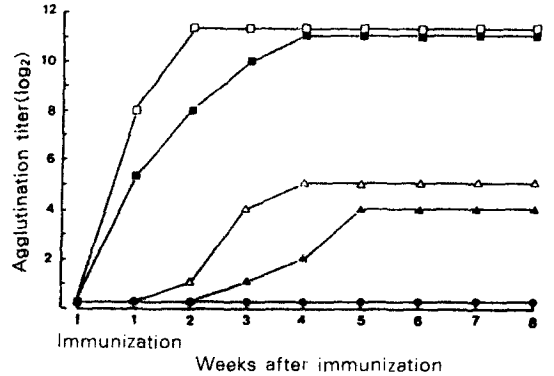


Fig. 3. Changes of agglutination titer of flounder in different rearing water temperature for 8 weeks. □, ■, △, ▲, agglutination titer of immunized with FKC of (6.5×10^9) cells/fish at 23℃, 20, 15℃ and 12℃ respectively; ●, agglutination titer of non immunized flounder at 20℃.

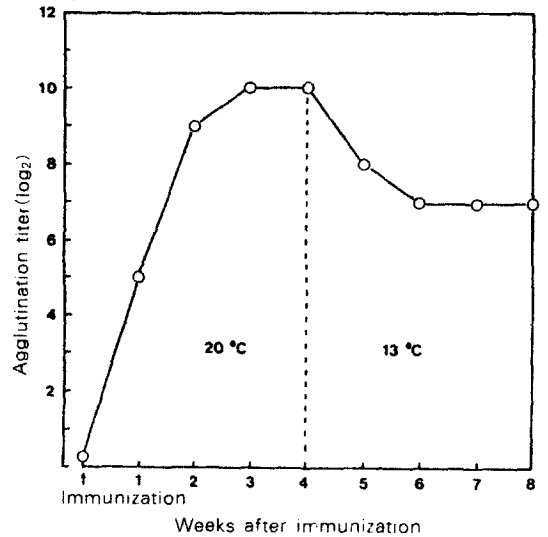


Fig. 4. Effects of abrupt water temperature decreasing from 20℃ to 13℃ on the production of agglutinin.

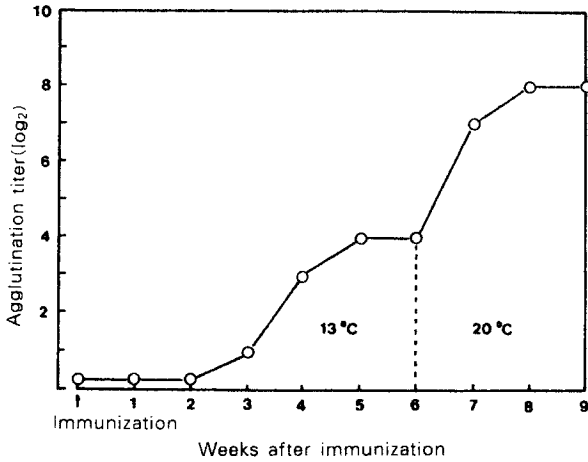


Fig. 5. Effects of abrupt water temperature increasing from 13°C to 20°C on the production of agglutinin.

고 찰

어류의 면역처리는 어종별 혹은 양식장의 형편에 따라서 다르겠지만 종묘 생산 시기를 감안하여 봄 때 동절기 또는 하절기에 실시하는 것이 편리할 경우가 많으리라 예상된다. 그리고 백신 투여 시기를 성장수온 범위를 벗어난 저수온기에 실시할 경우 경제적인 측면에서 가온에 의한 백신처리의 타당성을 검토해야 할 필요가 있다. 이러한 관점에서 봄 때 백신처리시 수온조건에 따른 자료는 어종별로 많을수록 좋다고 할 수 있다. 넙치의 경우 백신처리 시기를 결정할 때 고려해야 할 사항으로서 어체의 크기별 즉, 종묘크기 (전장 5 cm 이상) 때 할 것인가 아니면 중간 종묘크기 (체중 50 g)에서 할 것인가도 중요하겠지만, 또한 어체 크기의 선택에 따라 사육시기가 달라짐으로써 결국 어체의 크기별 수온조건도 달라지므로 수온의 영향은 중요한 요소가 될 것이다. 본 연구에서 볼 수 있듯이 수온에 따라 면역 처리된 넙치의 면역반응은 다양하게 나타나고 있

다. 수온조건별 면역반응시험에서 고수온면역시험구 (20°C, 23°C) 에서는 항체형성시간이 빠르고 항체가도 높게 나타났으며, 저수온면역구 (12°C, 15°C) 에서는 항체형성이 늦고 항체가도 낮게 나타났다. 이러한 결과는 넙치의 성장적수온 범위 (15~24°C) 에서 수온이 높을 수록 항체가 빨리 형성되고 항체가도 높게 나타남을 알 수 있는데, 이같은 결과는 어류의 면역반응이 성장수온 범위내에서 저수온에서는 늦고 고수온에서는 빠르며 그 크기도 크다고 보고한 Ellis (1988) 와 일치하며, 은어에 포르말린사균백신을 주사면역시켰을 때 수온이 높을수록 항체가 높다는 Salari (1988) 의 보고와도 유사한 경향을 보였다. 또한 고수온상태 (20°C) 에서 면역시켜 항체형성이 최고 (2,048) 로 된 후 저수온으로 변경시키면 상승하였던 항체가는 서서히 떨어졌으며, 저수온상태 (13°C) 에서 면역시켜 항체형성이 최고 (16) 로 된 후 고수온으로 변경시키면 항체가 급속도로 증가하였다 (Fig. 4, Fig. 5). 이러한 현상은 南田 (1962) 가 뱀장어에 포르말린사균 *Edwardsiella tarda* 항원을 수온별로 주사면역시킨 후 수온을 상승 및 하강시켰을 때 항체가 변한다는 보고와 일치하였다.

자연적인 조건에서 면역시켰을 때 면역반응을 알아본 결과 동절기인 저수온기 (12.1°C) 에 면역처리하였을 때 항체가 20°C 시험구에 비하여 늦게 (면역 3 주 후) 나타났고 그 역가도 낮았다 (항체가, 4). 그리고 일차 경과에 따른 항체의 증가폭도 작았으며 저수온기의 항체는 16 정도 밖에 상승하지 못하였다. 그러나 일차가 경과하여 이듬해 해동기 이후 수온이 상승하면서 낮았던 항체가 증가하기 시작하여 하절기인 고수온기에는 항체가 128 을 나타내었다. 저수온기의 최초 백신투여시 항체의 형성이 늦게 진행되는 것은 저수온으로 인한 넙치의 체내 면역기능이

활성화되지 못하여 면역반응이 지연되는 것으로 사료되며, 수온상승과 더불어 항체가 증가하는 것은 어체내의 면역기능이 활성화됨으로써 항체가 증가하는 것으로 생각된다. 고수온기에 면역을 시켰을 경우 항체는 저수온에 처리한 것에 비하여 비교적 빨리 (면역 1 주 후) 나타났고 항체수도 높았으며 (64) 3 주만에 최고치 (2,048) 를 나타냈다. 그러나 수온이 하강하면서 항체수도 작은 폭으로 떨어지기 시작하여 64 정도까지 떨어졌다가, 다시 수온이 상승하면 증가하는 경향을 보였다. 이와 같이 넘치는 백신투여시의 수온이나 사육수온의 변화에 따라 항체수도 같이 변하는 경향을 나타내었으며 12°C 까지의 저수온에서도 면역반응이 일어나 넘치의 경우 저수온기에 면역처리하여도 어느 정도의 방어효과를 기대할 수 있음을 시사하고 있다. 그리고 백신을 투여한 넘치의 면역상태 지속기간은 저수온 및 고수온기에 항체가 변화에서 볼 수 있는 바와 같이 (Fig. 1, 2) 항체수가 실험기간에서 조사한 19 개월까지 지속되고 있었다. 따라서 넘치의 경우 일반적으로 상품 크기까지 육성시키는데 18 개월 정도의 기간이 소요되므로 치어기에 단 1 회의 백신투여로 상품크기까지 면역력이 지속되는 것으로 나타났다.

면역 지속기간중에 면역넘치의 항체가 변화추이를 보면 고수온기에 높게 형성된 항체는 저수온기가 되면서 수온의 하강에 따라 떨어지고 저수온기에 낮게 형성된 항체는 고수온기가 되면서 수온상승과 더불어 증가하였다. 이러한 현상은 수온조건별시험에서와 같이 수온의 변화에 따라 항체가 변한 결과로 볼 수 있다.

참 고 문 헌

- Ammend, D. F. and Johnson, K. A. : Current status and future needs of *Vibrio anguillarum* bacterins. *Developments in Biological Standardization. Symposium on Fish Biology : Serodiagnostics and Vaccines*, 49, 403-417, 1981.
- Avtalion, R. R., Weiss, E. and Moalem, T. : Regulatory effects of temperature upon immunity in ectothermic vertebrate. *In Comparative immunology*. Marchalonis, J. J., Blackwell scientific publication, Oxford, pp. 227-238, 1976.
- 方鍾得·田世圭·朴守一 : 養殖넙치에서 分離된 *Edwardsiella tarda* 의 生化學的 및 血清學的 特性에 關한 研究. *韓國魚病學會*, 5(1) : 29-35, 1992.
- Ellis, A. E. : Optimizing Factors for Fish Vaccination. *In Fish Vaccination*, Academic Press, pp. 32-46, 1988.
- Ellis, A. E. : Differences between the immune mechanisms of fish and higher vertebrate. *In Immune mechanisms in fish and higher vertebrate*, Roberts, R. J., Academic press, pp. 1-28, 1982.
- 楠田理一 : ウナギの免疫應答に關する研究(養殖ウナギのハロコロ病に關する免疫學的研究), *高知大學農學部*, 18-22, 1962.
- Muroga, K. and Egusa, S. : Immune response of the Japanese eel to *Vibrio anguillarum*. 1. Effects of temperature on agglutinating antibody production in starved eels. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 35 : 868-874, 1969.
- Paterson, W. D. and Fryer, J. L. : Effect of temperature and antigen dose on the antibody response of juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* to *Aeromonas salmonicida* endotoxin. *J. Fish. Res. Board*

- Can., 31(11) : 1743-1749, 1974.
- Salati, F., Kawai, K. and Kusuda, R. :
Immune response of ayu against *Vibro anguillarum* lipopolysaccharide. Nippon Suisan Gakkaishi, 55(1) : 45-49., 1988.
- Snieszko, S. F. and Friddle, S. B. :
Prophylaxis of furunculosis in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by oral immunization and sulfamerazine. Prog. Fish Cult., 11 : 161-168, 1949.

Effect of water temperature on the immune response of flounder, *Paralichthys olivaceus*

Jong-Duek Bang and Soo-Il Park*

*Aquaculture Division, East Sea Fisheries Research Institute, National
Fisheries Research & Development Agency,
Kyung Buk 790-110, Korea*

**Department of Fish pathology, College of Fisheries Sciences,
National Fisheries University of Pusan,
Pusan 608-737, Korea*

To investigate effects of water temperature on immune response of flounder, *Paralichthys olivaceus*, against *Edwardsiella tarda*, fish were immunized with formalin killed *E. tarda* antigen, and humoral immune response of these fish were observed. At lower water temperature (12 and 15 °C), the antibody appeared 2 to 3 weeks after injection of formalin killed *E. tarda* antigen and the maximum agglutination titer was 16 and 32, respectively. However at higher water temperature (20 and 23°C), the antibody appeared one week after injection and the maximum agglutination titer was about 2,048. Once produced agglutination titer was sensitively responded to variation of water temperature and showed that this phenomenon had also a similar tendency under natural condition. And it showed that agglutination titer of flounder immunized with formalin killed *E. tarda* maintained above 19 months.

Key Words : *Paralichthys olivaceus*, Formalin killed *Edwardsiella tarda* Antibody, Agglutination titer