

다양한 농도의 에드워드 백신액에 대한 넘치, *Paralichthys olivaceus*의 침지 투여 효과

권문경[†] · 방종득
국립수산과학원 동해수산연구소

Effects of Immersion Vaccination in different Concentration of Edwardsiellosis Vaccine on Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Mun-Gyeong Kwon[†] and Jong Deuk Bang

East Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development

This study was performed to investigate the effects of prolonged immersion vaccination in a dilute vaccine on the farmed olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Juvenile olive flounders were immersed in the several diluted (10^0 , 10^1 , 10^2 and 10^3) commercial edwardsiellosis bacterins ($5\text{mg}/\ell$) for 2min (short immersion, SI) and 24 h (prolonged immersion, PI). After immunization, fish were analyzed to investigate on non-specific (serum lysozyme and bactericidal activity), specific immune responses (antibody agglutinin titer) and resistances against *Edwardsiella tarda* infection. The PI of the commercial vaccine diluted with 10^1 and 10^2 showed better results over the untreated control in terms of serum lysozyme, bactericidal activities and resistance against *E. tarda* infection. These results suggest that the prolonged treatments of the diluted vaccine might be a new approach improving the vaccination potential.

Key words : *Edwardsiella tarda*, Vaccine, Immune response, Immersion, Olive flounder

넘치는 우리나라 해산어 양식 생산량의 약 48%를 차지하는 양식 대상으로 중요한 위치를 차지하고 있으나 (해양수산부, 2003), 이와 함께 질병 발생에 의한 피해도 증가하는 실정이다. 넘치의 주요 세균성 질병 중의 하나인 에드워드병이 발생하면 주로 치료에 의존하고 있으나 부적절한 투약 방법으로 내성균의 출현, 특히 다제내성균의 증가로 투약 효과가 잘 나타나지 않은 경우가 많다 (Aoki *et al.*, 1987).

이에 대한 대책으로 효과적인 에드워드병 예방을 위한 백신의 개발이 요구되고 있으며 최근에 침지법에 의한 효과적인 백신이 개발되었다 (방 등, 2000). 침지 처리 시 백신의 효과는 백신

의 농도와 침지액의 pH, 염분 농도 및 수온 등의 영향을 받으며, 또한 백신 처리가 어류에 미치는 stress와 어체 크기 등에 따라서도 그 효과에 차이가 있어 (Tatner and Horne, 1983; Thune and Plumb, 1984; Tatner, 1987; Ototake and Nakanishi, 1992a, 1992b; Ototake *et al.*, 1996) 효과적인 처리 방법에 대해서 지속적으로 연구되고 있다.

백신 처리법 중 침지법에는 고농도의 백신 현탁액에 단시간 처리하는 방법과 저농도 현탁액에서 장시간 처리하는 방법이 있다 (Newaman, 1993). 백신의 저농도 장시간 약욕법이 백신 처리에 소요되는 경비 및 노동력 면에서 볼 때 양

[†]Corresponding Author : Mun-Gyeong Kwon, Tel.: 033-661-8504, Fax : 033-661-8514, E-mail : shellk@hanmail.net

식 현장에서 유리한 점도 많으나 현재까지는 대부분 고농도 침지법 위주로 백신의 효과 시험이 이루어져서 저농도 장시간 처리 효과에 대해서는 자료가 부족한 실정이다.

본 연구는 2000년 국립수산물과학원에서 개발(방 등, 2000)한 후 산업체에 기술 이전한 에드워드 백신을 대상으로 하여 고농도 단시간 처리에 따른 투여 방법상의 문제에 대한 해결 방안을 찾고자 경제적이고 효과적인 백신 투여 방법에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

실험어 및 사육 관리

실험어는 260 l 용량의 FRP 수조에 평균 전중 45.5g의 넙치를 30마리씩 수용하고, 수온 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 인 사육수를 분당 4 l로 유수되도록 조정하였으며, 사료 투여는 상업용 펠렛 사료를 이용하여 1일 2회 투여하였다. 모든 실험은 3반복으로 수행하였다.

실험용 백신 및 백신 처리

국립수산물과학원에서 개발하고 녹십자(주)에서 제조하여 시판 예정인 상업용 불활화 넙치 에드워드 백신을 이용하여 침지법으로 처리하였다. 즉, 백신 원액인 5mg/l의 농도에서 2분간 침지하는 상법에 따른 침지와 이 백신 원액을 10^1 (500 $\mu\text{g}/\text{l}$), 10^2 (50 $\mu\text{g}/\text{l}$) 및 10^3 (5 $\mu\text{g}/\text{l}$)로 희석한 다음 각각 2분과 24시간 약육하는 저농도 약육 투여법을 시험하였으며, 2주 후 같은 방법으로 booster 처리하였다.

혈청 분리

실험에 사용한 혈청은 실험어를 아미노산식향산 에틸 50ppm에서 5분간 마취시킨 후 미부 정맥에서 일회용 주사기로 채혈하여 분리하였다. 즉, 채취한 혈액을 60분간 실온에 방치한 후 4°C 에서 1시간 정도 두어 혈병을 수축시킨 다음

8,000rpm, 10분간 원심 분리로 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다.

혈청 라이소자임의 활성

라이소자임 활성은 Parry *et al.* (1965)의 turbidimetric method를 이용하여 측정하였다. 즉, *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/ml) 현탁액 (pH 6.2) 950 μl 와 혈청 50 μl 를 혼합하여 25°C , 30초 및 4분 30초 반응시킨 후 530nm에서 흡광도를 측정하였다. 라이소자임 활성은 units/ml로 나타내었으며, 1 unit는 흡광도 값이 0.001/min 감소한 값으로 표시했다.

보체 살균능

혈청 내 보체에 의한 살균능은 유 등 (1992)에 따라 측정하였다. 즉, 각 혈청을 GVB²⁺ (Gelatin veronal buffer: VB 200ml, 0.03M CaCl₂-2H₂O 5ml, MgCl₂-6H₂O 5ml, 2% gelatin 50ml, DW 740ml, pH 7.4)로 2배 희석한 후 실험에 사용하였다. 살균의 변화 정도를 알기 위하여 시험용 균주인 *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922를 Tryptic Soy agar (TSA)에 25°C , 24시간 배양하여 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 맞춘 후 희석 혈청과 1:1로 혼합한 다음 20°C 진탕배양기에서 반응시키면서 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 TSA에 배양 용액을 단계 희석하여 접종한 다음 27°C , 36시간 배양 후 세균 집락수를 계수하였다.

응집 항체가

백신 처리 후 2주 간격으로 채혈하여 분리된 혈청을 이용하여 microtiter법으로 응집항체를 조사하였다.

세균 공격 시험

백신 투여 효과를 조사하기 위하여 booster 처리 후 4주째 *Edwardsiella tarda* FSW910410 균주로 공격 시험을 실시하였다. 시험 균주는 TSA 배지에서 27°C , 24시간 배양한 후 집균하여, 멸

균 생리식염수로 1×10^6 cfu/ml와 1×10^8 cfu/ml 되도록 현탁하여 시험균액을 준비하였다. 시험균액은 넙치의 복강에 0.1 ml씩 주사하여 저농도와 고농도 감염을 하였으며, 고농도 감염 시험구는 7일간, 저농도 시험구는 14일간 폐사율을 관찰하였다.

통계 처리

시험 결과의 통계처리는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 SPSS Version 10 (SPSS, Michigan Avenue, Chicago, IL, USA, 1997) program을 사용하여 95%수준에서 검정하였다.

결 과

라이소자임 활성

백신 처리 후 2주 간격으로 라이소자임 활성을 조사한 결과, 상업용 백신 (5mg/l)의 상법에 따른 2분 처리구, 10^1 로 희석하여 24시간 시험구 및 10^2 로 희석하여 24시간 시험구에서 대조구에 비하여 유의적으로 높은 활성을 나타내었

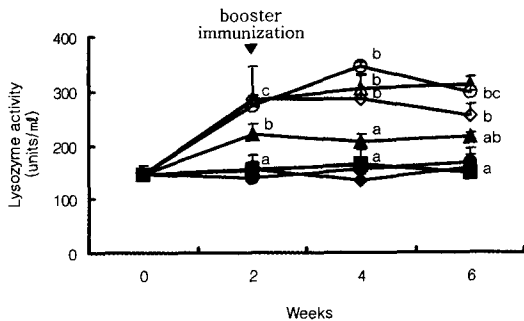


Fig. 1. Changes of the serum lysozyme activity in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* treated with vaccine with various methods. Fish were immunized by immersion for 24h (prolonged immersion, PI) with 10^1 (△), 10^2 (○) and 10^3 (□) diluted bacterin or by immersion for 2min (brief immersion, BI) with 10^0 (5mg/l, ◇), 10^1 (▲), 10^2 (●) and 10^3 (■) times diluted bacterin. Control group(◆) was immersed in rearing water for 2 min. Superscripts indicate statistic significances between treatments(p<0.05).

으며 (p<0.05), 24시간 약육한 시험구는 상법에 따른 2분 침지구에 비하여 개체차가 적어 높은 활성을 나타내었다(Fig. 1).

보체 살균능

넙치 혈청 중 보체의 살균능을 조사한 결과, 백신 처리 전에는 시험구 간에 차이가 없이 반응 3시간 이후 세균수가 증가하는 경향을 나타내었으나, 백신 처리 6주째는 상업용 백신의 상법에 따른 2분 시험구, 10^1 희석 24시간 시험구, 10^2 희석 24시간 시험구에서 유의적인 차이는 없지만(p>0.05) 다른 시험구 및 대조구에 비하여 높은 살균능을 나타내었다 (Fig. 2).

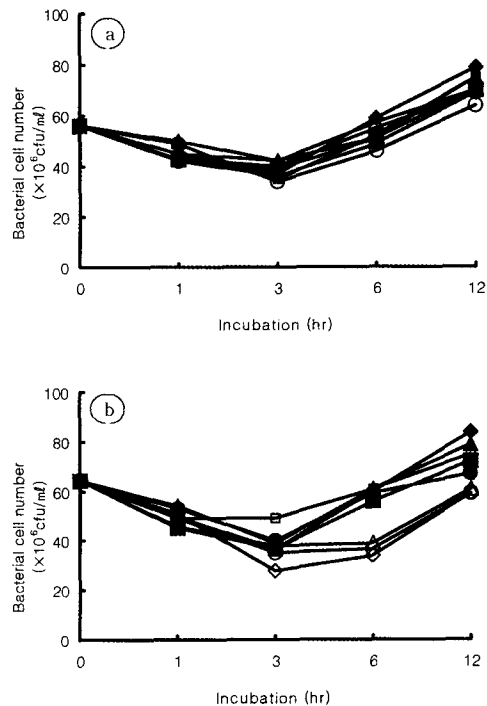


Fig. 2. Change of serum bactericidal activity (a, 0 week after immunization; b, 6 weeks after immunization) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish were immunized by immersion for 24h (prolonged immersion, PI) with 10^1 (△), 10^2 (○) and 10^3 (□) diluted bacterin or by immersion for 2min (brief immersion, BI) with 10^0 (5mg/l, ◇), 10^1 (▲), 10^2 (●) and 10^3 (■) times diluted bacterin. Control group(◆) was immersed in rearing water for 2 min.

응집 항체가

백신 처리 후 2주 간격으로 응집 항체를 측정 한 결과, 상업용 백신 (5mg/l)의 사용 방법에 따른 2분 시험구, 10¹ 희석액 2분 및 24시간 시험구, 10² 희석액 24시간 시험구에서 대조구에 비하여 지속적으로 높은 응집 항체를 나타내었다. 또한 항체가 형성된 백신 시험구 중 10¹와 10² 희석액 24시간 처리한 시험구에서 다른 시험구에 비하여 유의적으로 높은 응집항체를 나타내었으며 ($p < 0.05$), 2분 시험구에 비하여 개체차도 적었다. 그러나 10³ 희석액 24시간 처리 시험구에서는 투여 효과를 관찰할 수 없었다 (Fig. 3).

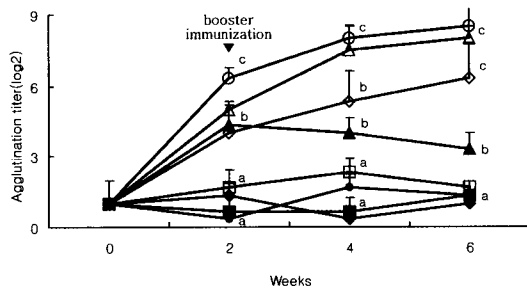


Fig. 3. Change of agglutinin titer of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish were immunized by immersion for 24h (prolonged immersion, PI) with 10¹(Δ), 10²(\circ) and 10³(\square) diluted bacterin or by immersion for 2min (brief immersion, BI) with 10⁰(5mg/l, \diamond), 10¹(\blacktriangle), 10²(\bullet) and 10³(\blacksquare) times diluted bacterin. Control group(\blacklozenge) was immersed in rearing water for 2 min. Superscripts indicate statistic significances between treatments ($p < 0.05$).

세균 공격 실험

백신 처리 6주째 백신의 투여가 방어력에 미치는 효과를 조사하기 위하여 세균 공격 시험균액을 고농도(10⁸ cfu/ml)와 저농도 (10⁶ cfu/ml)의 두 가지 조건으로 공격실험을 한 후 누적폐사율을 조사하였다. 고농도 시험구의 접종 후 7일간 누적폐사율을 관찰한 결과, 상업용 백신 2분 시험구, 10¹ 및 10² 희석액 24시간 침지 시험구에서 각각 70%, 60% 및 65%로 대조구의 100% 폐

사에 비하여 현저하게 낮은 폐사율을 나타내었다. 또한, 저농도 시험구에서는 14일간 누적폐사율이 대조구에 비해 낮은 폐사율을 보였으며, 폐사 발생 시기도 대조구의 주사 2일째에 비하여 8일과 11일째로 늦어 병원성 세균에 대한 방어능을 높이는 것으로 나타났다 (Fig. 4).

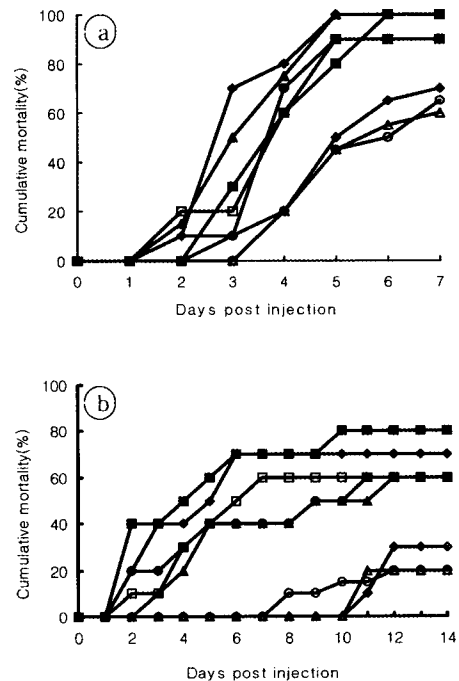


Fig. 4. Cumulative mortality of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, challenged with 1.0×10^8 cfu/ml(a) or 1.0×10^6 cfu/ml(b) *Edwardsiella tarda* at 6 weeks after immunization. Fish were immunized by immersion for 24h (prolonged immersion, PI) with 10¹(Δ), 10²(\circ) and 10³(\square) diluted bacterin or by immersion for 2min (brief immersion, BI) with 10⁰(5mg/l, \diamond), 10¹(\blacktriangle), 10²(\bullet) and 10³(\blacksquare) times diluted bacterin. Control group(\blacklozenge) was immersed in rearing water for 2 min.

고 찰

어류의 백신 투여 방법에는 여러 종류가 있으며 크게 주사, 경구 및 침지법 등으로 나눌 수 있다. 경구 투여법은 처리 방법은 간편하나 효과를 나타낸 예를 보기 힘들며, 주사 투여법은 높

은 효과로 전 세계적으로 활용되고 있으나 (Moore *et al.*, 1998), 많은 노동력이 필요할 뿐만 아니라 어류에 과다한 스트레스를 주어, 혈액학적 성상 변화 (Barton and Iwama, 1991)와 어체의 생리 기능 약화로 면역능 억제를 유발하여 특정 병원체 외의 질병에 대한 저항력을 저하시킬 수 있다. 침지 투여법은 병원체의 침입 경로를 통하여 면역계를 자극하는 방법으로 적은 노동으로도 대량 처리가 가능하며 주사 처리법에 비하여 어류에 미치는 스트레스가 적어서, 양식현장의 활용성이 높다 (Moore *et al.*, 1998).

침지 투여법은 Amend and Fender (1976)에 의해 처음 보고된 방법으로 백신의 흡수 경로와 방어 기전에 대하여 불명확한 점이 많다. 침지 처리 시 백신은 측선 (Amend and Fender, 1976), 피부 (Smith, 1982; Tatner *et al.*, 1984), 아가미 (Smith, 1982; Tatner *et al.*, 1984; Zapata *et al.*, 1987; Kawahara and Kusuda, 1988)와 일부는 구강 (Tatner, 1987; Robohm and Koch, 1995)을 통하여 흡수되어, 혈행을 통해 2차면역기관으로 이동하며 (Ototake *et al.*, 1996), 백신의 효과는 처리 농도 및 시간 등 투여 조건에 따라 많은 영향을 받는다 (Nakanishi and Otake, 1997).

침지 처리의 흡수 기전 및 저농도 장시간 침지의 효과를 조사하기 위하여 Moore *et al.* (1998)은 무지개송어에 1 μ m의 BSA (bovine serum albumin) conjugated fluorescent microsphere를 침지한 결과, 양식현장에서 이용되고 있는 고농도 단시간 침지법에 비하여 저농도에서 24시간 침지 처리 시 조직 중에서 많은 입자를 관찰하였다. Kusuda *et al.* (1980)은 *Vibrio anguillarum*을 300배 희석하여 은어에 5시간 침지 처리 시 희석하지 않은 백신에서 30초간 처리한 것에 비하여 높은 방어력을 관찰하였다. 또한, Tatner and Home (1985)는 *Yersinia ruckeri* 백신을 2,000배 희석하여 brown trout에 6시간 침지 처리 시 효과를 확인하였으며, Otake *et al.* (1999)은 무지개송어에 비브리오 백신을 1,000배 희석하여 24시간 처리 시, 투여 6개월째까지 고농도

짧은 시간 처리한 구에 비하여 높은 생존율을 나타내었다고 보고하였다. 본 연구에서도, 10¹과 10²로 희석하여 24시간 침지 처리 시 상업용 백신 원액으로 (5mg/l) 2분간 투여한 방법에 비하여 비특이적 면역계인 라이소자임과 보체 활성이 높아졌을 뿐 아니라 특이적 면역계도 활성화시켜 높은 항체가를 나타내었다. 에드워드드균으로 공격 시험한 결과, 면역 활성이 높았던 백신 투여 시험구에서 높은 방어능을 나타내어 백신 투여가 면역 활성을 높이고 병원성 세균에 대한 방어능도 증강시키는 것을 알 수 있었다. 또한, 본 연구에서 상업용 백신을 10²로 희석 (50 μ g/l)한 시험구에서도 백신 효과를 볼 수 있었으며, 10³로 희석 (5 μ g/l) 시험구에서는 면역활성 및 방어능에서 대조구와 차이를 나타내지 않았지만, 보다 상세한 농도 구간에서 백신 투여 효과에 대한 검토가 필요할 것으로 생각된다.

저농도 장시간 침지 처리법은 양식장의 여건에 따라서 사육 수조에 직접 저농도로 백신을 살포함으로써 어류에 미치는 스트레스를 감소시켜 면역 기능 저하를 최소화 하는 장점 (Pickering, 1989)이 있으므로, 단시간 처리 방법에 비하여 백신 흡수에서 개체차가 적어 효과를 높일 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 백신 처리 시 노동력이 적게 소요되어 여러 가지 유용성이 기대되므로 금후 침지 면역의 적정 조건에 대해서 보다 깊이 있는 연구가 더 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*에서 희석 백신의 장시간 처리 효과를 조사하였다. 넙치에 상업용 에드워드드 백신 (5mg/l)을 10⁰, 10¹, 10² and 10³로 희석하여 2분 (short immersion, SI)과 24시간 (prolonged immersion, PI) 침지한 다음 시험어의 비특이적 면역계 (혈청 라이소자임, 살균능)와 특이적 면역계 (응집항체)의 활성과 *Edwardsiella tarda* 공격에 대한 방

어력의 변화를 조사하였다. 그 결과 에드워드 백신을 10^1 과 10^2 로 희석하여 장시간 침지 투여 시험구가 고농도 백신의 단시간 침지 시험구에 비하여 혈청 라이소자임 활성과 보체의 살균능이 높았으며 에드워드균 감염에 대한 방어력도 높았다. 따라서 희석 백신을 장시간 침지 처리하는 방법은 백신 효과를 높일 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Amend, D.F. and Fender, D.C. : Uptake of bovine serum albumin by rainbow trout from hyperosmotic infiltration : a model for vaccinating fish. *Science*, 192 : 793-794, 1976.
- Aoki, T., Sakaguchi, T. and Kitao, T. : Multiple drug-resistant plasmids from *Edwardsiella tarda* in eel culture ponds. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53 : 1821-1825, 1987.
- Barton, B.B. and Iwama, G.K. : Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1 : 3-26, 1991.
- Duncan, D.B. : Multiple-range and multiple F tests. *Biometrics*, 11 : 1-42, 1955.
- Kawahara, E. and Kusuda, R. : Location *Pasteurella piscicida* antigen in tissue of yellowtail *Serola quinquireadiata* vaccinated by immersion. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 : 1101-1105, 1988.
- Kusuda, R., Kawai, K. and Itami, T. : Efficacy of bath-immunization against vibriosis in cultured ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 46 : 1053, 1980.
- Miles, A.A. and Misra, S.S. : The estimate of the bactericidal power of the blood. *J. Hygiene*, 38 : 873-885, 1938.
- Moore, J.D., Ototake, M. and Nakanishi, T. : Particulate antigen uptake during immersion immunization of fish : The effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill. *Fish Shellfish Immunol.*, 8 : 393-407, 1998.
- Nakanishi, T. and Ototake, M. : Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In "Fish vaccinology" (ed. by Gudding, R., Alillehaug, A. and Midtlying, P.J.) : Developments in Biological Standardization, 90 : Kager, Basel, 59-68.
- Newman, S.G. : Bactericidal vaccines of fish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 145-185, 1993.
- Ototake, M., Iwama, G. and Nakanishi, T. : The uptake of bovine serum albumin by the skin of bath-immunised rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.*, 6 : 321-333, 1996.
- Ototake, M. and Nakanishi, T. : Kinetics of bovine serum albumin in fish plasma after hyperosmotic infiltration treatment : Comparison between marine and freshwater fish. *Aquaculture*, 103 : 229-240, 1992a.
- Ototake, M. and Nakanishi, T. : Effects of water temperature on kinetics of bovine serum albumin in the plasma of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* after bath administration. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58 : 1301-1305, 1992b.
- Ototake, M., Moore, J.D. and Nakanishi, T. : Prolonged immersion improve the effectiveness of dilute vibrio vaccine for rainbow trout. *Fish Pathol.*, 34(3) : 151-154, 1999.
- Parry, R.M., Chandau, R.C. and Shahani, R.M. : A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 119 : 384-386, 1965.
- Pickering, A.D. : Stress responses and disease resistance in farmed fish. In: *Aqua Nor* 87, con-

- ferences 2 and 3, Trondheim, Norway, 35-49, 1989.
- Robohm, R.A. and Koch, R.A. : Evidence for oral ingestion as the principal route of antigen entry in bath-immunized fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 5 : 137-150, 1995.
- Smith, P.D. : Analysis of the hyperosmotic and bath methods for fish vaccination comparison of uptake of particulate and non-particulate antigen. *Dev. Comp. Immunol.*, 2 : 181-186, 1982.
- Tatner, M.F. : The quantitative relationship between vaccine dilution, length of immersion time and antigen uptake, using a radiolabeled *Aeromonas salmonicida* bath in direct immersion experiments with rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 62 : 173-185, 1987.
- Tatner, M.F. and Horne, M.T. : Factors influencing the uptake of ¹⁴C-labelled *Vibrio anguillarum* vaccine in direct immersion experiments with rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 22 : 585-591, 1983.
- Tatner, M.F. and Horne, M.T. : The effects of vaccine dilution, length of immersion time, and booster vaccinations on the protection levels induced by direct immersion vaccination brown trout, *Salmo trutta* with *Yersinia ruckeri*(ERM) vaccine. *Aquaculture*, 46 : 11-18, 1985.
- Tatner, M.F., Johnson, C.M. and Horne, M.T. : The tissue localization of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following three methods of administration. *J. Fish Biol.*, 25 : 95-108, 1984.
- Thune, R.L. and Plumb, J.A. : Evaluation of hyperosmotic infiltration for the administration of antigen to channel catfish(*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 36 : 1-8, 1984.
- Zapata, A.G., Torroba, M., Alvarez, F., Anderson, D.P., Dixon, O.W. and Wisiniewski, M. : Electron microscopic examination of antigen uptake by salmonid gill cells after bath immunization with a bacterin. *J. Fish Biol.*, 31 : 209-217, 1987.
- 방종득, 류호영, 이주, 김봉석, 이주석 : 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 에드워드 백신 침지 면역 시 Booster 효과. *수진연구보고*, 58 : 33-39, 2000.
- 유병화, 박수일, 전세규 : 어류 혈청의 보체에 의한 살균 작용. *한국어병학회지*, 5 : 9-18, 1992.
- 해양수산부 : 해양수산통계연보, 2003.

Manuscript Received : January 14, 2004

Revision Accepted : June 22, 2004

Responsible Editorial Member : Jin-Woo Kim
(National Fisheries Research and Development Institute)