

조피볼락(*Sebastes schlegeli*)에 대한 비정형 *Aeromonas salmonicida* 포르말린 사균 백신의 효과

김위식 · 이현호 · 오명주 · 한현자*†

전남대학교 수산생명의학과, *국립수산과학원 병리연구과

Effect of formalin killed vaccine of atypical *Aeromonas salmonicida* for black rockfish (*Sebastes schlegeli*)

Wi-Sik Kim, Hyeon-Ho Lee, Myung-Joo Oh, Hyun-Ja Han*†

Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea
*Pathology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

Atypical furunculosis caused by atypical *Aeromonas salmonicida*, is an emerging problem of farming of rockfish (*Sebastes schlegeli*) in Korea. In this study, protection against atypical furunculosis was compared in rockfish vaccinated with *A. salmonicida* formalin killed cell (FKC) and adjuvant containing FKC. The formalin inactivated *A. salmonicida* vaccine provided a low protection of 20% and 10% relative percent survival (RPS) at 44 and 58 days post vaccination. However, addition of adjuvant (squalene and aluminum hydroxide) into inactivated *A. salmonicida* vaccine clearly enhanced the level of protection showing 70% and 50% RPS at 44 and 58 days post vaccination.

Key words: Atypical *Aeromonas salmonicida*, Black rockfish, Formalin-killed vaccine, Adjuvant

조피볼락(*Sebastes schlegeli*)은 양볼락목 양볼락과에 속하는 해산어종으로서 우리나라 전 연안에 분포하며, 남해안의 자연 수온에서도 월동이 가능하여 해면 가두리 양식에 적합하고 방류 사업을 통하여 연안 자원을 조성할 수 있어, 양식 대상어종으로 널리 사용되고 있다(국립수산과학원 2007). 2017년도 조피볼락의 양식 생산량은 22,344톤으로 국내 어류 양식 생산량의 23.9%를 차지하는 주요 양식 품종이다(KOSIS, 2017).

조피볼락에 발생하는 질병으로는 바이러스성 질병인 림포시스티스병, 세균성 질병인 활주세균

증, 연쇄구균증, 비브리오팀, 에로모나스병, 기생충성 질병인 아가미흡충증, 피부흡충증, 백점충증 등이 보고되어 있다(전세규 2000, 국립수산과학원 2007). 에로모나스병을 제외한 이들 질병들은 주로 여름철 고수온기에 발생하고 겨울철 저수온기에는 발생하지 않는다고 알려져 있다(전세규 2000).

*Aeromonas salmonicida*는 1894년, Emmerich와 Weibel에 의하여 독일의 송어 치어에서 처음 보고된 이후, 높은 밀도로 양식되는 연어류에서만 발병되는 것으로 생각되었다. 그러나 이후의 연구에서 연어류에서 절창병(부스럼병)을 일으키는 *A. salmonicida*는 다섯 가지의 아종 중, subsp. *salmonicida*의 정형(typical type)으로, 주로 연어류에서 절창병을 일으키며, 다른 네 가지 아종 subsp. *achromo-*

†Corresponding author: Hyun-Ja Han
Tel: +82-51-720-2482, Fax: +82-51-720-2498
E-mail: hjhan77@korea.kr

genes, subsp. *masoucida*, subsp. *smithia*, subsp. *pectinolytica*의 비정형(atypical type)은 50여종이 넘는 어류에서 질병을 일으킨다고 보고되었다. 또한 초기에 비정형 *A. salmonicida*는 주로 소하성 어류에서 발견되는 것으로 알려졌으나, 최근에는 백장어, shotted halibut, 터봇, common wolffish, 넙치, 늑대고기 등 다양한 담수어류와 해산어류에 질병을 일으키고 있다. 보다 넓은 범위의 어종에서 감염증을 발생시키는 비정형 *A. salmonicida*는 정형 *A. salmonicida*와 같이 비운동성, 통기 혐기성의 간균으로, 22~25°C에서 최적으로 자라는 그람 음성균이다. 그러나 비정형 *A. salmonicida*는 정형 *A. salmonicida*와 비교하여 성장이 느리고, 갈색색소를 형성하지 않는 아종도 존재하는 것으로 알려져 있다.

조피볼락의 비정형 *A. salmonicida* 감염은 2008년 12월 거문도에 위치한 조피볼락 양식장에서 처음으로 확인되었으며(Han *et al.*, 2011), 그 후 매년 저수온기에 남해안 일대 뿐만 아니라 서해안 태안 등의 조피볼락 양식장에서 에로모나스병으로 인한 대량폐사가 발생하고 있다(Kim *et al.*, 2013). 국내의 조피볼락에서 분리되는 *A. salmonicida*는 그 유전적인 특성이 비정형의 *A. salmonicida* subsp. *masoucida*와 가장 근연한 것으로 밝혀진 바 있다(Han *et al.*, 2011). 국내의 조피볼락에서 분리되는 비정형 *A. salmonicida*에 감염된 조피볼락은 체표에 궤양이 생기고, 입, 아가미 뚜껑, 눈 및 장 주위에 출혈 등의 임상증상을 나타내며 폐사한다(Han *et al.*, 2011). 그리고 눈강달이, 멸치, 전어 등과 같은 생사료로 사용되는 어류를 통하여 감염되는 것을 확인되었다(Kim *et al.*, 2013). 연어류에서 절창병을 유발하는 *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 대한 백신이 개발되어 상용화되어 있으나, 그 외 어종에서 발생하는 비정형의 *A. salmonicida* 감염증 예방 백신 연구는 많이 되어 있지 않는 상태이다(Wiklund & Dalsgaard, 1998; Lund *et al.*, 2002).

본 연구에서는 조피볼락에 발생하는 비정형 *A. salmonicida*에 대한 감염을 예방하기 위하여 *A. salmonicida*에 대한 포르말린 사균 백신(formalin killed cell; FKC) 및 보조제인 aluminum hydroxide과 squalene 첨가 백신을 제작하여 백신을 접종하고,

인위감염 실험을 통하여 그 효능을 평가하였다.

재료 및 방법

시험어는 *A. salmonicida*의 감염이력이 없는 건강한 조피볼락(평균 체중: 20.3 g, 평균 길이: 10.9 cm)을 선정하여 실험에 사용하였다. 시험용 수조는 약 600 L 순환 수조를 사용하여 시험구당 100미씩 수용하여 관리하였다. 수온은 15±1°C로 유지하고, 시판용 배합사료를 3일에 1회 공급하였다.

2015년 1월 여수에 위치한 조피볼락 양식장에서 분리된 *A. salmonicida* KACC000P 균주를 백신제조에 사용하였다. 순수 분리된 세균 집락은 NaCl이 1% 함유된 brain heart infusion agar (BHIA)에 접종하여 15°C에서 3일간 배양하였으며, 멸균생리식염수에 세균 집락을 현탁한 후에 포르말린(37% formaldehyde)을 최종적으로 1% 농도가 되도록 처리하여 실온에서 2시간 반응시킨 후(30분 간격 vortex) 4°C에서 24시간 동안 두어 FKC를 제작하여 항원으로 사용하였다. FKC는 원심분리를 통해(12,000 rpm, 10분) 멸균생리식염수를 이용하여 3회 세척한 후 균체를 수거하여 10 mg/ml 농도로 현탁하여 백신 접종하였다. 추가적으로 보조제를 섞은 백신을 제조하기 위해, 200 ml 기준으로 dulbecco minimum essential medium (DMEM) 48 ml (24%), glycerol 40 ml (20%), squalene 10 ml (5%), aluminum hydroxide 1 ml (0.5%), Tween 80 1 ml (0.5%), 백신 100 ml (농도: 20 mg/ml) (50%) 비율로 합성하여 보조제를 첨가한 백신을 제조하였다.

백신 접종은 시험용 수조에 사육중인 조피볼락 3 그룹으로 나누어, 각각 FKC 보조제가 첨가된 백신 및 멸균생리식염수(대조구)를 투여하였다. 시험 백신을 어체당 0.1 ml씩 근육(포르말린 사균 백신) 및 복강(보조제가 첨가된 백신)에 주사하였으며 최종 농도가 1 mg/fish가 되도록 하였다. 시험 백신의 방어 효과를 조사하기 위하여 백신 접종 후 44일과 58일째 공격 실험을 실시하였으며, BHIA에서 배양한 *A. salmonicida* KACC000P 균주를 5×10⁵ 및 6.5×10⁵ colony forming unit (CFU)/ ml 농도로 조정하여 2개의 백신처리구와 대조구의 조피볼락에 각각 0.1 ml 씩 복강 주사하였다. 각 실험

구당 10마리씩 주사하였으며, 인위감염 후 2주 동안 누적폐사율을 조사하였다(Fig. 1). 인위감염 시험 후에 폐사어의 경우, BHIA 배지를 사용하여 세균 재분리하여 배양된 균을 확인하였다.

결과 및 고찰

시험백신을 접종한 후 44일째 5×10^4 CFU/fish의 농도로 *A. salmonicida* 균을 인위 감염 시험한 결과, 백신을 처리하지 않은 대조구(Cont)에서는 3일째부터 폐사어가 관찰되기 시작하였으며, 감염실험 후 6일째 100%의 누적폐사율을 나타내었다. 포르말린 사균 백신처리구(Vac)의 경우, 4일째부터 폐사어가 관찰되었고, 실험 종료일인 14일째 까지 80%의 누적폐사율을 보였다. 보조제가 첨가된 백신처리구(Vac+Adj)에서는 4일째 30%가 폐사된 후 14일째까지 폐사어가 관찰되지 않아 30%의 누적폐사율을 나타내었다. *A. salmonicida*를 접종하지 않은 백신처리구와 대조구에서는 폐사어가 관찰되지 않았다. 폐사어는 공통적으로 두부출혈, 아가미 및 내장기관 출혈의 증상을 나타내었고, 신장, 비장 및 간 조직에서 다수의 *A. salmonicida*가 분리되었다(Data not shown). 이상의 결과, 대조구보다 백신처리구에서 *A. salmonicida*에 의한 폐사율이 낮게 나타나는 것으로 보아 백신 미처리구(대조구): 100%, 포르말린 사균백신: 80%, 보조제가 첨가된 백신: 30%), 본 연구에서 제작된 백신은 *A. salmonicida*에 대한 방어 효능이 있는 것으로 확인되었다. 특히, 보조제가 첨가된 백신의 경우는 대

조구에 비해 70%의 상대생존율을 나타내는 것을 나타냈다(Fig. 2).

시험백신을 접종한 후 58일째 *A. salmonicida*로 6.5×10^5 CFU/fish로 인위감염을 실시한 결과, 백신을 처리하지 않은 대조구(Cont)에서는 3일째부터 폐사어가 관찰되기 시작하였고 감염실험 후 5일째 100%의 누적폐사율을 나타내었다. 포르말린 사균 백신처리구(Vac)의 경우, 4일째부터 폐사어가 관찰되었고, 실험 종료일인 14일째 까지 90%의 누적폐사율을 보였다. 보조제가 첨가된 백신처리구(Vac+Adj)에서는 6일째 50%가 폐사된 후 14일째까지 폐사어가 관찰되지 않아 50%의 누적폐사율을 나타내었다(Fig. 3). 비록 보조제가 첨가되지 않은 백신처리구(Vac)에서 인위감염 실험 후 높은 폐사율을 나타내었으나, 보조제 첨가 유무에 관계없이 백신을 처리하였을 때 대조구보다 *A. salmonicida*의 인위감염에 의한 폐사율이 낮게 나타나는 것으로 보아 본 연구에서 제작된 백신은 포르말린 불활화 *A. salmonicida* 백신에 대한 방어 효능이 있을 것을 판단된다. 그러나 본 연구에서 결과처럼 *A. salmonicida* 불활화 백신의 효능과 지속성을 높이기 위해서는 보조제가 꼭 필요할 것으로 판단된다. 본 연구에서 사용되는 혼합한 백신 보조제는 aluminum hydroxide는 가장 일반적으로 사용하는 동물용 백신 보조제로써, 단백질 항원을 흡착하여 천천히 방출함으로써 면역증강을 유도하는 것으로 알려져 있다(Gudding *et al.*, 2014). squalene은 유상액(emulsion) 형태의 면역보조제로 항원제시세포를 활성화시켜 항원흡수를 증가시키는 역할을 하

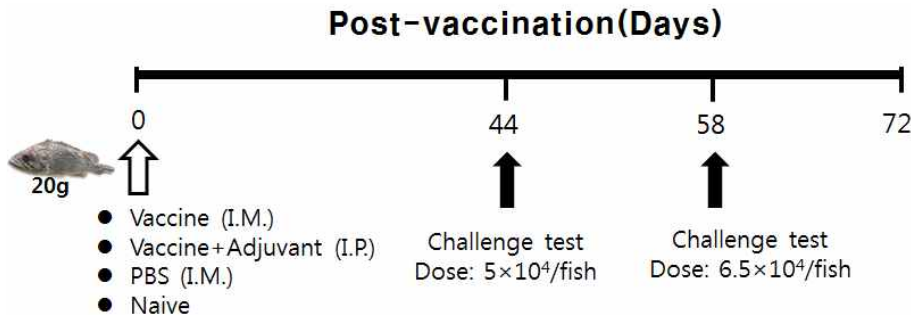


Fig. 1. The scheme of determination for protective efficacy of the formalin-killed *Aeromonas salmonicida* vaccine in rockfish. I.M.: intramuscular injection, I.P.: intraperitoneal injection.

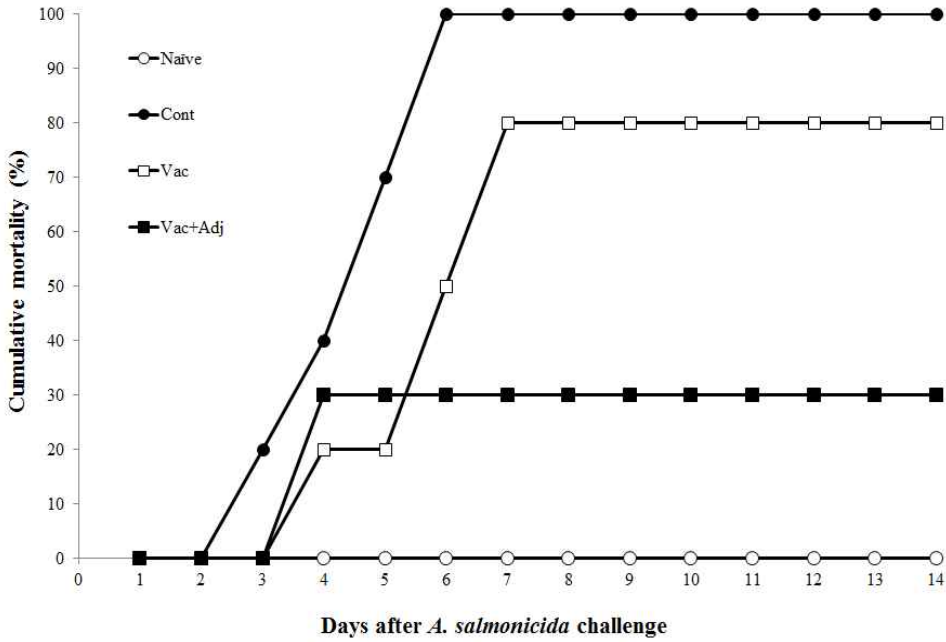


Fig. 2. Protective effect against infection. Cumulative mortality of rockfish vaccinated with *Aeromonas salmonicida* vaccine challenged with 5×10^4 cfu per fish at 44 days post-vaccination. Four groups: Naive, Cont; PBS, Vac; *A. salmonicida* FKC vaccine, Vac+Adj; *A. salmonicida* FKC vaccine with adjuvant.

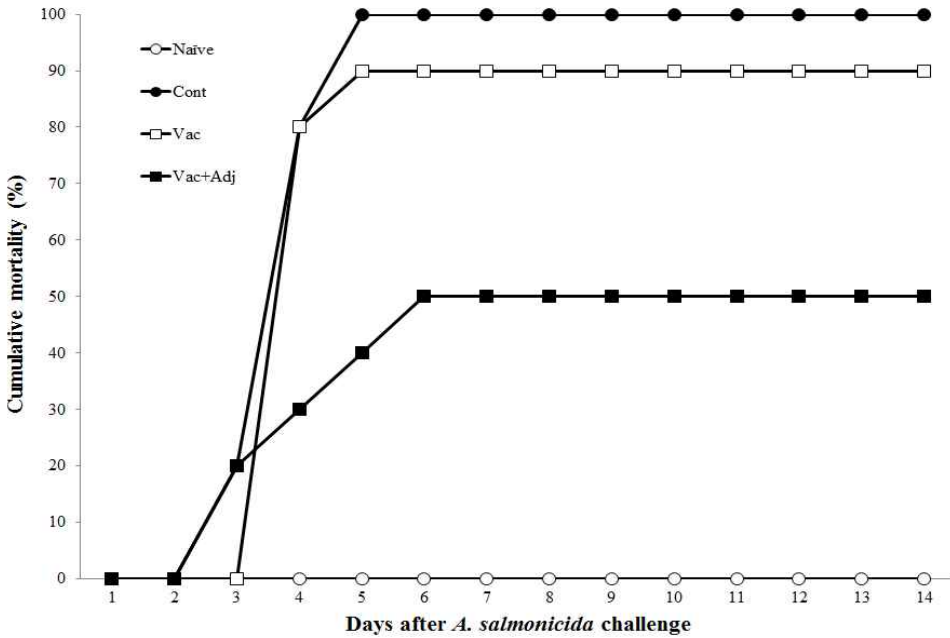


Fig. 3. Protective effect against infection. Cumulative mortality of rockfish vaccinated with *A. salmonicida* vaccine challenged with 6.5×10^4 cfu per fish at 58 days post-vaccination. Four groups: Naive, Cont; PBS, Vac; *A. salmonicida* FKC vaccine, Vac+Adj; *A. salmonicida* FKC vaccine with adjuvant.

는 것으로 보고되어 있으며, 넙치의 바이러스성출혈성패혈증 대한 불활화 백신 보조제로써 squalene과 aluminum hydroxide 혼합하여 사용하였을 때 백신을 접종한지 10일 후 인위감염실험 하면, 백신을 단독으로 사용하였을 때보다 대조구와 비교한 상대생존율(relative percentage survival; RPS) 2배 정도 높아지는 것으로 확인되었다(Vinay *et al.*, 2013). 본 연구에서도 squalene과 aluminum hydroxide 보조제를 사용한 실험구의 RPS가 백신 접종 후 44일째 70%, 58일째 50%로 나타나 보조제가 백신의 효능을 증진시키고, 지속성을 높여 주는 것으로 판단되었다. 일반적으로 squalene과 같이 유제를 활용한 면역보조제의 경우 과도한 면역반응과 독성이 있는 것으로 알려져 있으나, 본 연구에서 사용한 보조제의 경우 조피볼락의 독성은 없는 것으로 확인되었다.

현재까지 조피볼락에 대한 백신 개발 연구로는 김 등(2000) 아가미흡충인 *Microcotyle sebastis*에 대한 백신 연구가 시도된 이후에 관련 연구가 이루어지지 않는 상태이다. 일반적으로 조피볼락과 같이 가두리에서 사육하는 어종의 경우 육상 양식어종에 비해 백신 주사 접종의 어려움이 있다. 본 연구를 기점으로 하여 향후 조피볼락 등 가두리 어종에 대한 백신 연구와 개발이 지속적으로 이루어지기를 바란다.

사 사

본 연구는 2017년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행되었습니다 (수산동물 바이러스 전염병 진단용 항체 생산).

References

- Han, H.J., Kim D.Y., Kim, W.S., Kim, C.S, Jung, S.J., Oh, M.J. and Kim, D.H.: Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in the black rockfish, *Sebastes schlegeli* Hilgendorf, in Korea. *J. Fish Dis.*, 34: 47-55, 2011.
- Kim, D.H., Choi, S.Y., Kim, C.S., Oh, M.J. and Jeong, H.D.: Low-value fish used as feed in aquaculture were a source of furunculosis caused by atypical *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 408-409, 2013.
- Kim, K.H., Hwang, Y.J., Cho, J.B. and Park, S.I.: Immunization of cultured juvenile rockfish *Sebastes schlegeli* against *Microcotyle sebastis* (Monogenea). *Dis. Aquat. Org.*, 40, 29-32, 2000.
- Lund, V., Arnesen, J.N. and Eggset, G.: Vaccine development for atypical furunculosis in spotted wolffish *Anarhichas minor* O.: Comparison of efficacy of vaccines containing different strains of atypical *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 33-44, 2002.
- Korean statistical information service (KOSIS). 2017. Fishery production survey: Statistics by type of fishery and species.
- Standard manual of black rockfish culture. 2007. National Institute of Fisheries Science.
- Gudding R., Lillehaug A. and Evensen.: Chapter 7 Adjuvants in fish vaccines, *Fish vaccination*. 2014. 68-81.
- Vinay, T.N., Kim, Y.J., Jung, M.H., Kim, W.S. and Jung, S.J.: Inactivated vaccine against viral hemorrhagic septicemia (VHS) emulsified with squalene and aluminum hydroxide adjuvant provides long term protection in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Vaccine* 31, 4603-4610, 2013.
- 양식어류의 질병(해산어편). 2000. 전세규

Manuscript Received : May 17, 2018

Revised : May 24, 2018

Accepted : May 24, 2018