

Poly lactide-co-glycolic acid (PLGA)에 캡슐화된 *Edwardsiella tarda* 포르말린 사멸백신의 이스라엘 잉어(*Cyprinus carpio*)에 있어서의 효능

장태원 · 양은총 · 김재훈 · 최상훈[†]

국립군산대학교 해양바이오특성화대학 수산생명의학과

Efficacy of poly lactide-co-glycolic acid (PLGA) microparticle encapsulating *Edwardsiella tarda* formalin killed cell (FKC) vaccine in Israeli carp (*Cyprinus carpio*)

Tae Won Jang, Eun Chong Yang, Jae Hoon Kim and Sanghoon Choi[†]

Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology,
Kunsan National University, 558 Daehak-ro, Gunsan-si, Jeonbuk, Korea

This study evaluated the effectiveness of poly lactide-co-glycolic acid (PLGA) as a vaccine delivery vehicle in fish. Israeli carp were immunized with a formalin-inactivated *Edwardsiella tarda* vaccine (PLGA-FKC) encapsulated in PLGA microparticles using the W/O/W emulsion method, administered both orally and via intraperitoneal (I.P.) injection. Immune responses were analyzed, including antibody titers, cytokine expression, and antibacterial activity. Results showed that PLGA-FKC maintained antigenicity longer than FKC, with elevated antibody titers and immune responses at weeks 8 and 10. The PLGA-FKC vaccine demonstrated enhanced pathogen resistance, with survival rates of 60% for oral and 70% for i.p. administration. As results, the study confirms that both oral and i.p administration of PLGA-FKC vaccines in adult carp elicit immune enhancement and pathogen resistance. These results support the need for further studies on PLGA-encapsulated oral vaccines targeting various pathogenic microorganisms, including bacteria like *E. tarda* and viruses.

Key words: formalin-inactivated vaccine, poly lactide-co-glycolic acid, agglutination, immune-related genes.

서 론

최근 우리나라 양식장의 규모가 확대됨에 따라
밀집 사육으로 인한 수질 악화로 어류의 질병 발생

률이 급격하게 증가하고 있다. 발생된 질병을 치료
하기 위해서는 항생제가 사용되지만, 잦은 사용 및
무분별한 오남용으로 인해 내성균이 발생하고 있
다(Dubey *et al.*, 2016). 그람 음성 박테리아인
Edwardsiella tarda (*E. tarda*)는 잉어, 틸라피아, 장
어, 메기, 송어 등 다양한 양식 어종에서 종종 수질
악화와 스트레스에 따른 전신 패혈증을 유발 시키

[†]Corresponding author: Sanghoon Choi
Tel: +82-63-469-1886, Fax: +82-63-463-9493
E-mail: shchoi@kunsan.ac.kr

며 심각할 경우 대량 폐사를 초래한다(Mohanty and Sahoo, 2007). 또한 *E. tarda*는 양서류, 조류, 파충류 및 인간을 포함한 포유류와 같은 고등 척추동물에서도 질병을 일으키며(Park *et al.*, 2012) 약제에 대한 내성까지 보인다(Xu and Zhang, 2014). 최근 계통 발생학적 조사에 따르면 *E. tarda*로 분류된 박테리아는 유전적으로 구별되며 *E. tarda*, *E. piscicida* 그리고 *E. anguillarum*로 분류되며 숙주마다 다양한 병원성을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다(Reichley *et al.*, 2017). 이와 같은 내성균 문제를 피하고 건강한 식품으로 어류를 양식하기 위해 각종 병원성 미생물에 대한 백신의 개발과 사용이 적극적으로 이루어지고 있다(Kim, 2007). 어류의 최초 백신은 1942년 *Aeromonas salmonicida*를 포르말린으로 불활화한 백신을 시작으로 *Vibrio anguillarum* 백신도 개발되어 1976년 미국에 이어 1980년부터 우리나라의 어류 양식에도 적용되었고 이후 다양한 어류용 백신이 개발되면서 상용화되고 있다(Mukhtar *et al.*, 2014). 또한 백신은 상업적으로 허가받기 위해 안정성 및 효능이 검증되어야 한다(Kwon *et al.*, 2014).

어류의 백신 사용 목적은 항원에 대한 면역 반응을 유도하여 결과적으로 기억 세포에 의해 오랜 기간 동안 면역 반응을 지속시키는 것으로 치료의 수단보다는 예방의 수단이다(Song, 2020). 우리나라에서 주로 사용되는 백신 투여법은 주로 주사 투여로, 적은 양의 백신으로도 경구 및 침지 투여법에 비해 높은 면역 반응 효과를 보이는 장점이 있으나 상대적으로 크기가 큰 성어에게만 각 개체별로 투여할 수 있으며, 치어 및 자어에는 사용이 어렵다는 단점이 있다. 또한 주사 투여법은 어류에게 큰 스트레스를 유발하기 때문에 장기간 사용될 수 없다(Gudding and Van Muiswinkel, 2013). 따라서 어류에게 투여 시 스트레스를 최소화할 수 있고 질병 예방에 효과적인 백신 제형의 개발이 필요하다.

Poly lactide-co-glycolic acid (PLGA)는 일반적으로 음전하를 띠고 균질한 표면의 구형 입자를 생성하며 소수성의 특성을 지니기 때문에 water-in-oil-in-water (W/O/W)의 다중 에멀전 방법으로 제조되는 것으로 알려져 있다(Behera and Swain, 2013).

또한 미국 식품의약국(FDA)에 의해 승인된 물질로 생체 적합성, 생분해성 및 생물학적 유체 및 보관에서의 높은 안정성을 지닌 물질로 인체에 암 백신 제형으로도 활용(Hamdy *et al.*, 2011)될 뿐만 아니라 약물 전달 시스템 분야(Ge *et al.*, 2002)에서도 응용되고 있다. 이러한 PLGA의 우수한 특성을 이용하여 인체는 물론 다양한 가축을 대상으로 하는 백신 개발 연구가 활발히 진행되고 있다(Dwivedi *et al.*, 2013).

본 연구에서는 PLGA를 백신의 전달 시스템으로 활용하기 위해 포르말린으로 사멸시킨 *E. tarda* (formalin killed cell, FKC)에 PLGA를 첨가하여 캡슐화(PLGA-FKC)하였다. 본 연구에서 사용된 *E. tarda*는 Korean Collection for Type Culture (KCTC, 12267)에서 분양된 인체 유래의 균주이지만 실험실 내에서 주요 숙주인 넙치, 뱀장어는 물론 잉어와 틸라피아에도 지속적인 감염 독성을 보였기에(Yang *et al.*, 2023) 기존 백신에 미치는 PLGA의 효능에 초점을 맞추고자 관리하기 수월하고 내병성이 강한 어종의 모델로 이스라엘 잉어를 선택하였다(Lee *et al.*, 2015). 이후 이스라엘 잉어(*Cyprinus carpio*)를 대상으로 PLGA-FKC 및 FKC를 설정한 기간에 따라 각각 구강(Oral administration, Per Os, P.O.) 및 주사(Intraperitoneal administration, I.P.) 투여한 후 각 백신 면역원성의 변화 추이에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

실험어 및 실험수조

실험어로서 체중 400~450 g의 이스라엘 잉어(*Cyprinus carpio*) 300미를 전북 전주시 소재의 양식장에서 구매한 뒤 약 2주간 실험 수조에 순치하였다. 실험에 사용된 수조는 사각 유리수조(900×450×450 mm)로 수심을 400 mm만큼 채운 후 수온은 25±1°C로 유지하였으며 순환 여과식 사육법을 사용하였다. 본 실험은 한국실험동물협회(Korean Association For Laboratory Animals)의 실험동물 사용관리 등에 관한 교육 수료 후 실시하였다(제22-1550).

병원성 균주 및 불활화 백신의 준비

실험에 사용된 병원성 균주는 *E. tarda*로 KCTC (12267)에서 분양받은 후 -80°C 에서 보관한 균주를 사용하였다. 실험 전 균주를 해동하여 Brain heart infusion (BHI, BD, New Jersey, US) broth에 접종하고 25°C 에서 24시간 배양 후 *Salmonella shigella* (SS, BD, New Jersey, US) agar로 계대 배양하였다. 이후 형성된 흑색 집락을 취하여 BHI broth로 계대 배양하고, 배양된 박테리아는 $120 \times \text{g}$ 에서 10분간 원심 분리하여 2회 PBS로 세척을 한 뒤 1×10^8 CFU/ml로 만들어 포르말린 1%에 25°C 에서 24시간 후 SS배지에 도말하여 집락이 형성되지 않아 사멸을 확인하였다.

Poly lactide-co-glycolic acid (PLGA) 백신의 준비

Water-in-oil-in-water (W/O/W)의 다중 에멀전 용매 증발 방법으로 FKC를 함유한 PLGA (MW 66,000–107,000, Sigma, USA) microparticles (MPs)를 제조하였다(Pérez *et al.*, 2002). 제조는 PLGA 210 mg을 3 ml Dichloro methane에 vortex mixer으로 용해하고 이후 FKC 500 μl 를 상온에서 1분 동안 13,500 rpm의 균질기(Ultr a Turrax T25 Stirrer, Janke & kunkel, Staufen)에서 혼합 및 유화시킨 후 1차 water-in-oil (W/O)의 단일 에멀전을 형성시켰다. 이를 50 ml의 4% Poly vinyl alcohol (PVA, MW 89,000–98,000, Sigma, USA) 용액에 넣고 9,500 rpm에서 1분 동안 균질화하였다. 에멀전은 유기 용매가 증발할 수 있도록 300 rpm으로 상온에서 8시간 더 교반하였다. 그 후 PLGA MPs를 PBS (pH 7.4)로 2회 세척하고 $5,000 \times \text{g}$ 에서 10분간 원심 분리하였다. 회수한 MPs는 실험에 사용되기 전까지 4°C 에 보관하였다.

고분해능 전계 방사형 주사 전자현미경(Ultra High FE-SEM)

균질화 후 캡슐이 잘 형성되었는지를 확인하기 위하여 PLGA MPs를 커버 슬라이드에 고정하여 ethanol series로 탈수한 후 현장 방출 주사 전자 현미경(Hitachi; SU8220, Japan)으로 MP 표면 및 단면의 형태를 관찰하였다.

백신 접종 및 혈청 수집

이스라엘 잉어를 대조군, FKC 실험군 및 PLGA 실험군으로 나누는 후 각 실험군 50 마를 대상으로 대조군은 PBS를 FKC와 PLGA-FKC는 백신을 구강 및 복강으로 1회 100 μl 씩 접종하였다. 이후 0, 2, 4, 6, 8 및 10주 차의 혈청 수집을 위해 이스라엘 잉어의 미병부에서 26G needle을 부착한 1 ml 주사기로 채혈하였다. 채취한 혈액은 4°C 에서 overnight한 후 $1,200 \times \text{g}$ 로 10분간 원심 분리하여 혈청을 수집하였으며 실험에 사용할 때까지 -20°C 에 보관하였다.

RNA extraction and reverse transcription PCR (RT-PCR)

이스라엘 잉어의 total RNA를 분리하기 위해 적출된 두신을 homogenizer로 분쇄한 후 Tri reagent (Sigma, USA)를 처리하고 실온에 5분간 두었다가 chloroform (CHCl_3 , Sigma, USA)을 첨가하여 교반한 뒤 실온에 3분간 방치하였다. 그 후 4°C 에서 $12,000 \times \text{g}$ 로 15분간 원심 분리하여 얻어진 투명한 층을 새로운 eppendorf tube에 옮겨 Isopropyl alcohol ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$, Mallinckrodt, UK)을 넣은 다음 교반하여 10분간 방치 후 동일 조건에서 원심 분리하였다. 원심 분리한 상층액은 모두 제거하고 75% ethyl alcohol을 넣어 4°C 에서 $7,500 \times \text{g}$ 로 5분간 원심 후 상층액은 모두 버리고 실온에 15분간 건조시켰다. 이후 Diethyl pyrocarbonate (DEPC) water를 50 μl 넣고 RNA pellet이 완전히 풀어지도록 교반하였다. RNA의 농도와 순도는 spectrophotometry (Infinite M200, TECAN)를 이용하여 측정하였고 1% agarose gel을 이용한 전기영동으로 RNA의 quality를 확인하였다. 얻어진 RNA를 M-MULV cDNA Synthesis kit (Enzynomics, Korea)의 방법에 따라 cDNA를 제작하였다.

Quantitative PCR(qPCR)

Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-10, tumor necrosis factor- α (TNF- α), IgM, T cell receptor (TCR), MHC class II 및 β -actin의 gene expression 분석은 ExicyclerTM96 (Bioneer, Korea)을 이용하여 확인하였다. Total volume이 20 μl 가 되도록 cDNA 2 μl , Accu

Power® 2X GreenStar™ qPCR Master mix (Bioneer, Korea) 10 µl, forward primer와 reverse primer를 1 µl씩 총 2 µl, 그리고 DEPC water 6 µl를 혼합하였다. qPCR은 95°C (10분) 그리고 95°C (30초), 60°C (30초), 72°C (30초)의 조건으로 40 cycles을 실시하였다. PCR이 끝난 뒤 melting curve를 분석하여 단일 산물이 생성되었음을 확인하였으며 각각의 target gene expression은 β-actin gene expression으로부터 보정하여 2^{-ΔΔCt} method로 측정하였다. qPCR에 사용된 primer는 Table 1에 제시하였다.

균응집 실험

FKC와 PLGA-FKC를 백신으로 접종 후 0, 2, 4, 6, 8 및 10주 차에 각각 채취한 혈청을 PBS로 2배씩 최대 1:128까지 단계 희석하여 96 well plate에 well 당 100 µl 씩 분주하였다. 그 후 균 응집을 확인하기 위해 FKC를 well 마다 100 µl 씩 1:1 비율로 넣어 준 후 25°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 이후 육안으로 항체의 응집 역가를 관찰하였다.

Challenge test

항균능 평가에 사용된 균주는 *E. tarda*로 공격 접종 전 SS agar에서 형성된 흑색 집락을 취하여

10 ml의 BHI broth에 계대배양하고 이후 25°C에서 24시간 배양하였다. 공격 접종은 1 × 10⁸ CFU/ml 균주를 100 µl씩 복강 내 주사하였다. 접종 이후에는 각 군 별로 10일 간 생존한 이스라엘 잉어의 개체수를 생존율로 환산하였다.

통계분석

실험을 통해 얻은 데이터를 평균과 표준편차 (mean±S.D.)로 표현하고 각 그룹 간의 유의성 검정을 위해 ANOVA로 분석 후 Tukey 검정을 사후 비교로 사용하였다. 유의성의 판단 기준은 $p < 0.05$ 로 판정하였다.

결과 및 고찰

본 연구는 어류용 백신의 효과적인 전달 방법 및 면역증강제로서의 PLGA 물질에 대한 효과를 검증하기 위해 포르말린으로 불활화 시킨 *E. tarda*를 이용하여 이스라엘 잉어를 대상으로 수행되었다. 백신의 주사 투여법은 접종된 백신의 소실이 전혀 없고 또한 효과를 신속하게 확인할 수 있다는 장점이 있다(Lee *et al.*, 2012). 그러나 백신접종 시 치어나 자어 등과 같은 어린 물고기에는 적용이

Table 1. Primers used for amplification of specific transcripts by quantitative PCR.

Target		Sequence(5' to 3')	Product size (bp)	Accession number
TNF-α	F	TGTGTGGTGTCTGCTGG	169	AJ311800
	R	TGAAAAGACACCTGGCTGTA		
IL-1β	F	CTGGAGCAATGCAATACAAA	206	AB010701
	R	AGGTAGAGGTTGCTGTTGGAA		
IL-6	F	GATTGGTACAACGAAGAAGA	256	AY102633
	R	GCATGACCCATATATGACCCA		
IL-10	F	GCTGTCACGTCATGAACGAG	132	AB110780
	R	CCCGCTTGAGATCCTGAAATAT		
IgM	F	GATGCCCCGATTGGCTATGA	181	AB004105
	R	GGGTCATCGGTTACCCCTTT		
TCR	F	ACATGGACCCTTGAGACAA	269	AB430330
	R	GCCAATTCATCCACTGTGC		
MHC classII	F	TCTGAATAACTGTAATGGC	239	EU203666
	R	CAGAGAGATTAATTG		
β-actin	F	GCTATGGGCTCTTGACTTCGA	85	M24113
	R	CCGTCAGGCAGCTCATAGCT		

사실상 불가능하며 어류에 가해지는 핸들링 스트레스가 심하기 때문에 부스팅을 통한 면역증강 효과를 기대할 수 없다는 단점이 있다(Heppl and Davis, 2000). 이러한 점을 충족시키기 위해서는 단회 투여로도 특이적 면역 반응이 장기간 지속되고 부스팅 효과까지 얻을 수 있는 면역증강제가 요구되고 있으며 또한 구강을 통한 백신 투여가 어류에게서 스트레스를 최소화할 수 있는 가장 이상적인 방법으로 평가되고 있다(Park *et al.*, 2010).

PLGA는 다양한 의료 응용 분야에서 힘줄 수리, 인대 재건, 관절 교체 및 척추 융합과 같은 정형외과 시술에 사용되었으며 생분해성 고분자로서 약물 전달 시스템으로 사용되고 있다(Yoon, 2008). 본 연구에서는 백신의 효과적인 전달체로서 PLGA를 이용하여 W/O/W 에멀전 방법으로 PLGA-FKC백신을 제조하였다. 또한 제조된 PLGA-FKC백신을 사료에 첨가하여 투여하는 대신 구강 면역에 대한 기초 자료를 확보하고자 *zonde*를 이용하여 경구 투여 하였으며 동시에 복강으로 투여된 방법과의 면역 반응 차이를 확인하고자 하였다. 백신 투여 후 나타나는 면역 반응의 차이를 분석하고자 선천성 및 후천성 면역에 연관된 유전자들의 발현, 특이적 항체의 역가를 확인하기 위한 균 응집 반응과 항균능에 대한 면역 지표를 각각 평가하였다.

W/O/W 방법으로 에멀전화 한 단독 PLGA와 PLGA-FKC 백신을 SEM을 통해 관찰한 결과로서 FKC의 유무와는 상관없이 동일한 구형의 형태로 확인되었다. 또한 에멀전화 한 PLGA-FKC 백신 내

FKC가 정상적으로 봉입 되었는지 확인하기 위해 살아 있는 *E. tarda*를 동일한 방법으로 에멀전화 한 후 배지에 도말하였다. 그 결과 *E. tarda*의 집락이 형성되었으며 이러한 결과는 PLGA-FKC가 정상적으로 제조되었다는 사실을 암시하고 있다(Fig. 1).

Fig. 2는 FKC와 PLGA-FKC 백신을 구강 및 복강으로 투여한 후 염증성 사이토카인의 일종인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6, 그리고 항염증성 사이토카인의 일종인 IL-10에 대한 유전자 발현을 보여주고 있다. 염증성 사이토카인은 림프구를 직접 활성화(Huttenhuis *et al.*, 2006)하거나 대식세포, 자연 살해 세포(NCC) 및 다른 사이토카인의 활성화와 방출을 유도함으로써 면역 반응을 자극한다고 알려져 있다(Low *et al.*, 2003). 염증성 사이토카인의 발현 양상을 보면 FKC군 및 PLGA-FKC군 TNF- α 에서 2주차 및 4주차에 최고점을 보이며 6주차부터 감소하는데, PLGA-FKC군이 FKC군 대비 완만하게 감소하는 양상을 보이고 있다. 이러한 결과는 FKC 자체의 항원이 에멀전화 없이 직접 투여되어 단시간 내에 면역반응이 급격히 일어났으며 시간이 지남에 따라 항원성이 급격히 감소한다는 사실을 암시해 주고 있다. 한편 PLGA로 에멀전화 된 PLGA-FKC의 경우 단시간 내에는 FKC와 동등한 항원성을 보이지만 시간이 지남에도 불구하고 FKC에 비해 항원성이 유의성 있게($p < 0.05$) 지속되었다. 이러한 결과를 고려해 볼 때 PLGA에 봉입된 FKC 항원이 PLGA의 적절한 체 내의 생분해 과정을 거쳐 2차 면역기관들에 지속적으로 자극 되었을 것

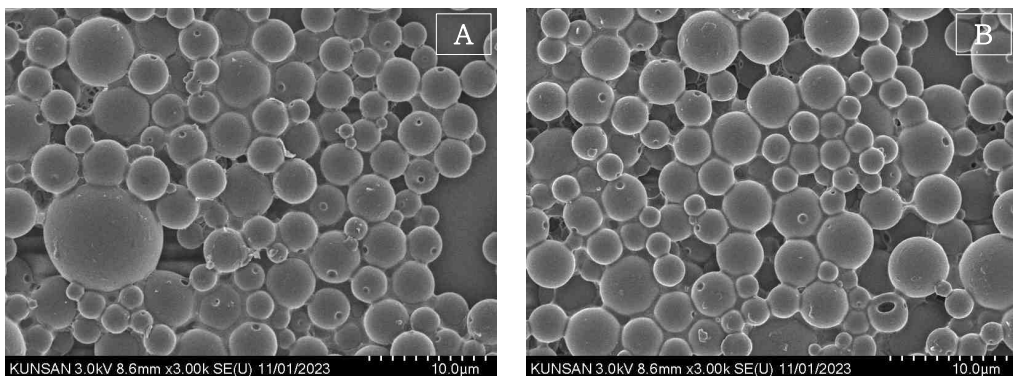


Fig. 1. Scanning electron micrograph of PLGA microparticles encapsulating *E. tarda* formalin-killed cells (A). Scanning electron micrograph of PLGA microparticles encapsulating non-*E. tarda* formalin-killed cells (B).

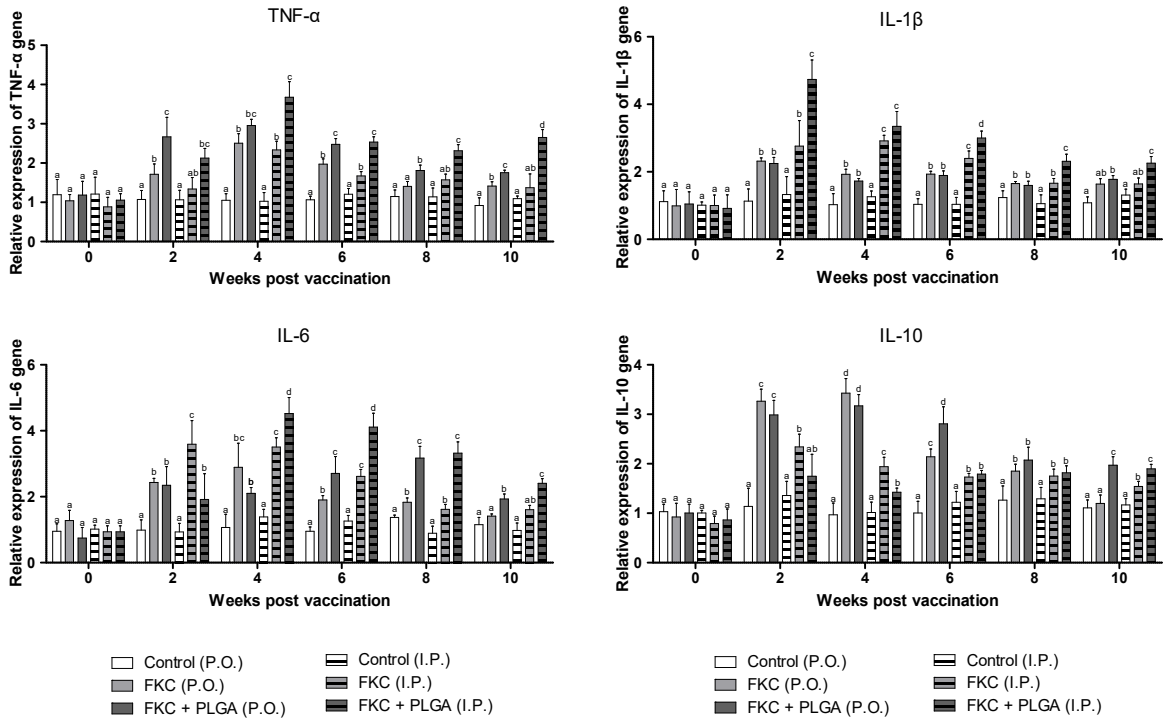


Fig. 2. Effects of FKC and PLGA-FKC on relative mRNA gene expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10 in Israeli carp. I. carp were P.O. and I.P. administered by FKC or PLGA-FKC (n=4). Bars represent means \pm standard errors of the mean ($p < 0.05$).

으로 추정된다.

항염증성 사이토카인의 일종인 IL-10은 활성화된 대식세포와 조절 T세포에 의해 생성되는데 대식세포의 기능을 억제하는 것으로 보고되고 있다 (Fiorentino *et al.*, 1991). 비록 염증성 사이토카인들이 IL-10의 발현량에 비해 상대적으로 낮았지만 2주 차 및 4주 차에 염증성 사이토카인이 최고점의 발현량을 보일 때 IL-10도 동시에 급상승하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 항염증성 사이토카인과 염증성 사이토카인과의 상대적인 길항작용에 의한 것으로 해석될 수 있다(Zhang and An, 2007). PLGA-FKC군에서는 구강 및 복강 접종에 상관없이 10주 차에 모든 사이토카인들의 발현이 대조군 대비 유의성 있게 증가($p < 0.05$)하였다.

백신의 후천성 면역효과를 알아보기 위해 IgM, TCR 및 MHC class II에 대한 유전자 발현을 분석한 결과 모두 6주 차까지는 상승하였으나 8주 차부터는 하락하는 양상을 보였다(Fig. 3). 그럼에도 불구하고

하고 PLGA-FKC군에서는 8주 차 및 10주 차 모두에서 대조군 대비 유의성 있는 증가($p < 0.05$)가 관찰되었다. 도움 T세포의 TCR은 항원제시세포가 제시하는 외부 항원 펩타이드와 결합된 MHC분자와 결합함으로써 도움 T세포 자체가 활성화되어 면역체계의 중추적 역할을 수행한다. 또한 보조 T세포는 면역 세포를 활성화시키는 사이토카인을 분비하며, 이는 다시 B세포의 분화, 세포독성 T세포 및 대식세포와 같은 면역 세포의 활성화에 도움을 주는 역할을 수행한다. 활성화된 B세포는 다시 형질세포(plasma cell)로 분화되어 최종적으로 항체인 IgM을 분비한다(Punt *et al.*, 2018). 그러므로 IgM, TCR 및 MHC class II 유전자 발현이 동반 상승 되었을 것으로 추정된다.

Fig. 4는 *E. tarda*에 대한 어체 내의 항체 역가를 기간별로 확인하기 위해 수행된 균 응집반응에 대한 결과를 보여주고 있다. 전체적으로 FKC군 및 PLGA-FKC군 모두 대조군 대비 유의성 있는($p <$

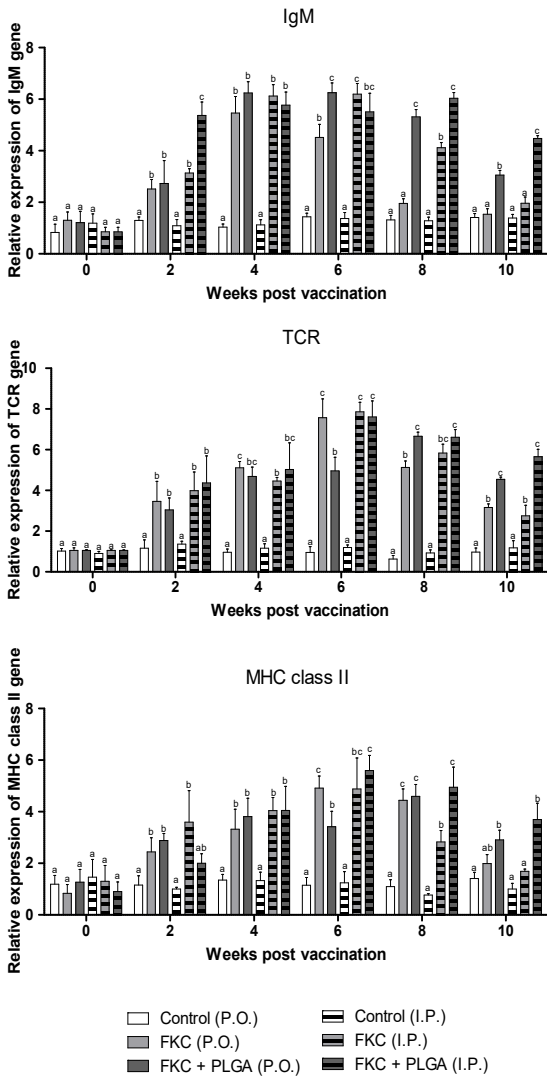


Fig. 3. Effects of FKC and PLGA-FKC on relative mRNA gene expression of IgM, TCR and MHC classII in *I. carp*. *I. carp* were P.O. and I.P. administered by FKC or PLGA-FKC (n=4). Bars represent means \pm standard errors of the mean ($p < 0.05$).

0.05) 차이를 보여주었지만, 10주 차의 경우 유의성이 감소된($p < 0.05$) FKC군에 반해 PLGA-FKC군에서 대조군 및 FKC군 대비 유의적인 차이($p < 0.05$)가 관찰되었다. 이와 같은 결과는 PLGA의 항원 캡슐화 작용을 이용한 백신이 기존 방식인 FKC 백신보다 면역 관련 유전자의 발현도가 높으며 (Kunugi and Yamaoka, 2012), 지속 기간 또한 오래

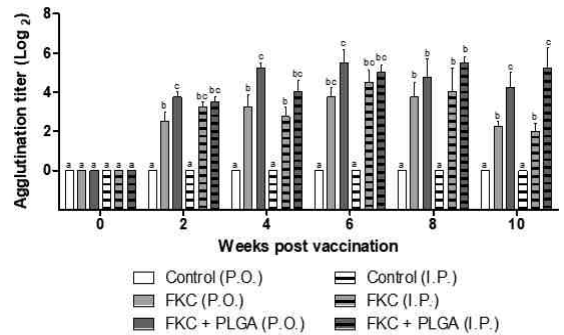


Fig. 4. Agglutination titer of *I. carp* serum against *E. tarda* (n=4). Bars represent means \pm standard errors of the mean ($p < 0.05$).

유지될 수 있기에 추가적인 부스팅 없이 단 회 투여만으로도 우수한 효과성을 지녔다고 판단된다.

FKC 및 PLGA-FKC 백신을 투여한 후 4주 차 및 10주 차, 총 2회에 걸쳐 공격 실험을 진행한 후 4주 차에서 FKC 및 PLGA-FKC군에서 비슷한 상대 생존율을 보였으나 10주 차에는 PLGA-FKC군에서만 구강 점종의 경우 60%, 복강 점종에서는 70%의 높은 상대 생존율이 관찰되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 10주 차까지 유지되는 면역지표와도 상당한 연관이 있으며, 우리나라 수산용 백신의 60%의 상대 생존율 기준(Moon *et al.*, 2009)도 충족하였기에 PLGA는 어류 백신에 있어 뛰어난 면역 반응 유도에 충분히 적합하고 유망한 면역자극제로 사용될 수 있음을 시사한다.

PLGA의 항원 방출 기간 연구(Corrigan and Li, 2009)에서 보고되었던 바와 같이 PLGA로 항원을 코팅한 캡슐화 백신은 오랜 기간 지속적으로 항원을 방출하여 면역 세포를 활성화 시킨다. 본 연구의 실험 결과에서도 PLGA-FKC 백신이 FKC 백신 대비 면역 관련 유전자의 발현이 유의성($p < 0.05$)있게 높게 나타나는 것으로 확인되었으며, 이는 면역계의 산물인 기억 세포의 형성과 그 수의 증가에 의한 것으로 해석할 수 있다. 또한 *E. tarda* 공격 실험에서 나타난 상대 생존율을 고려해 볼 때 PLGA-FKC 백신은 동일한 항원에 다시 노출되었을 때 기존 FKC 백신보다 매우 높은 생존율을 유지하는 것으로 추정할 수 있다.

결과적으로 본 연구에서 성어를 대상으로 PLGA-

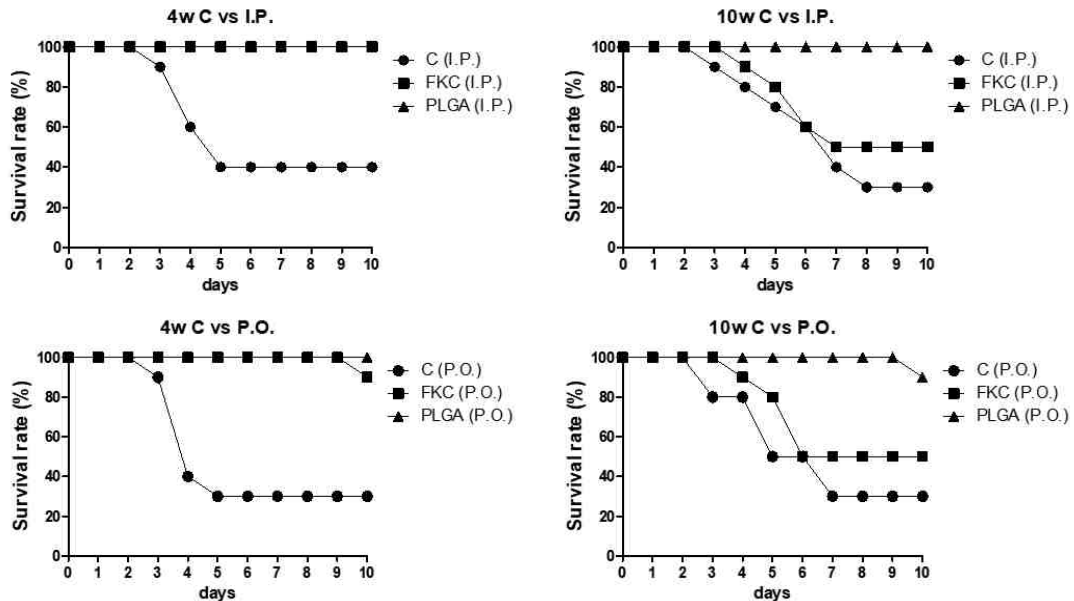


Fig. 5. Survival rates of I. carp for 10 days following *E. tarda* (1×10^8 CFU/ml) challenge. I. carp were P.O. or I.P. administered by FKC, PLGA-FKC or PBS.

FKC 백신의 복강 투여는 물론 구강 투여에 있어서도 면역증강으로 인한 항 병원성 효과가 입증되었기에 추후 *E. tarda*와 같은 세균 및 바이러스와 같은 다양한 병원성 미생물을 항원으로 한 구강 면역 PLGA 캡슐화 백신에 대한 후속적인 연구가 요구된다.

References

- Behera, T. and Swain, P.: Alginate-chitosan-PLGA composite microspheres induce both innate and adaptive immune response through parenteral immunization in fish, *Fish Shellfish Immunol*, 35(3): 785-791, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.012>
- Mohanty, B. R. and Sahoo, P. K.: Edwardsiellosis in fish: a brief review, *J. Biosci*, 32: 1331-1344, 2007. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0143-8>
- Corrigan, O. I. and Li, X.: Quantifying drug release from PLGA nanoparticulates, *EUFEPS*, 37(3-4): 477-485, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.04.004>
- Dubey, S., Avadhani, K., Mutalik, S., Sivadasan, S. M., Maiti, B., Girisha, S. K., Venugopal, M. N., Mutoloki, S., Evensen, Ø., Karunasagar, I. and Mweemba Munang'andu, H.: *Edwardsiella tarda* OmpA Encapsulated in Chitosan Nanoparticles Shows Superior Protection over Inactivated Whole Cell Vaccine in Orally Vaccinated Fringed-Lipped Peninsula Carp (*Labeo fimbriatus*), *Vaccines*, 4(4): 40, 2016. <https://doi.org/10.3390/vaccines4040040>
- Dwivedi, V., Manickam, C., Binjawadagi, B. and Renukaradhya, G. J.: PLGA nanoparticle entrapped killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine helps in viral clearance in pigs, *Vet. Microbiol*, 166(1-2): 47-58, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.029>
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M. and O'Garra, A.: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages, *J Immunol*, 147(11): 3815-3822, 1991. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.147.11.3815>
- Ge, J., Byung, H. W., Feirong, K., Jagdish, S. and Patrick, P. D.: Assessment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres, *J Control Release*, 79(1-3): 137-145, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00533-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00533-8)
- Gudding, R. and Van Muiswinkel, W. B.: A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture, *Fish Shellfish Immunol*, 35(6): 1683-1688, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.031>
- Hamdy, S., Haddadi, A., Hung, R. W. and Lavasanifar, A.: Targeting dendritic cells with nano-particulate PLGA cancer vaccine formulations, *Adv Drug Deliv*

- Rev, 63(10-11): 943-955, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.05.021>
- Heppell, J. and Davis, H. L.: Application of DNA vaccine technology to aquaculture, *Adv Drug Deliv Rev*, 43(1): 29-43, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00075-2)
- Huttenhuis, H. B., Taverne-Thiele, A. J., Grou, C. P., Bergsma, J., Saeij, J. P., Nakayasu, C. and Rombout, J. H.: Ontogeny of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune system, *Dev Comp Immunol*, 30(6): 557-574, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.08.001>
- Kim, G. K.: Food-related Hazardous Materials Domestic and Foreign Management Trends, *Bulletin of Food Technology*, 20(2): 13-68, 2007.
- Kunugi, S. and Yamaoka, T. (Eds.): *Polymers in nanomedicine*, part of Springer Nature, 31-64, 2012.
- Kwon, M. G., Hwang, J. Y. and Jung, S. H.: The Efficacy and Safety on Combination Vaccines : *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae* and *S. parauberis*, in Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, *KSFME*, 26(6): 1193-1200, 2014. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2014.26.6.1193>
- Lee, D. G., Yang, Y. S., Park, S. W., Cha, B. J., Xu, G. C. and Kim, J. R.: Development of a vaccine automation injection system for flatfish using a template matching, *J Kor Soc Fish Mar Edu*, 48(2): 165-173, 2012. <https://doi.org/10.3796/KSFT.2012.48.2.165>
- Lee, G. H., Harwanto, D., Park, S. M., Choi, J. S., Kim, M. R. and Hong, Y. K.: Hot water extract of leather carp (*Cyprinus carpio nudus*) improves exercise performance in mice, *Prev Nutr Food Sci*, 20(4): 246, 2015. [10.3746/pnf.2015.20.4.246](https://doi.org/10.3746/pnf.2015.20.4.246)
- Low, C., Wadsworth, S., Burrells, C. and Secombes, C. J.: Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet, *Aquaculture*, 221(1-4): 23-40, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00022-X)
- Moon, J. S., Kim, J. Y., Joh, S. J., Kim, M. J., Son, S. W. and Jang, H.: Evaluation on efficacy of β -hemolytic *Streptococcus iniae* vaccine on olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Korean J. Vet. Res*, 47(3): 291-298, 2009.
- Mukhtar, Y., Shimels, T. and Tesfaye, B.: Present status and future prospects of fish vaccination: a review. *J Vet Sci Technol*, 7.2: 1000299, 2016. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7579.1000299>
- Park, E. J., Kim, M. N., Park, J. Y., Cha, J. H. and Chung, H. J.: Edible vaccine for aquacultured fish: present and prospect. *J. Plant Biotechnol*, 37(3): 269, 2010. <https://doi.org/10.5010/JPB.2010.37.3.269>
- Park, S. B., Aoki, T. and Jung, T. S.: Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish, *Am J Vet Res*, 43: 1-11, 2012, <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-67>
- Pérez, C., Jesús, P. D. and Griebenow, K.: Preservation of lysozyme structure and function upon encapsulation and release from poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres prepared by the water-in-oil-in-water method, *Int. J. Pharm*, 248(1-2): 193-206, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00435-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00435-0)
- Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P. and Owen, J. A.: *Kuby Immunology*, p.421, 8nd ed., W. H. Freeman and Company, New York, 2018.
- Reichley, S. R., Ware, C., Steadman, J., Gaunt, P. S., García, J. C., LaFrentz, B. R., Thachil, A. and Griffin, M. J.: Comparative phenotypic and genotypic analysis of *Edwardsiella* isolates from different hosts and geographic origins, with emphasis on isolates formerly classified as *E. tarda*, and evaluation of diagnostic methods, *J Clin Microbiol*, 55(12): 3466-3491, 2017. <https://doi.org/10.1128/jcm.00970-17>
- Song, S. H.: Eine nochmalige Prüfung des Aufbaus der Systeme n der Produzierung sowie des Vorats und der Anschaffung des Medikam en ts für die Heilung der Infektionskrankheit sowie die Prävention*76) -Um das Vakzin(das Vakzinsmittel) über das RNA-Virus(=RNA virus), *The Law Research institute of Hongik Univ*, 21(2), 473-512, 2020.
- Xu, T. and Zhang, X. H.: *Edwardsiella tarda*: an intriguing problem in aquaculture. *Aquaculture*, 431: 129-135, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.001>
- Yang, E. C., Choi, J. H., Jung, S. M., Jang, T. W., Kim, J. H., Hwang, Y. J., Jung, H. I., Lee, C. H. and Choi, S. H.: Effects of lactobacillus fermented brewer's yeast by-products on growth performance, innate immunity and antibacterial activity in Carp, *Cyprinus carpio*, *J.Fish Pathol*, 36(2): 323-336 2023. <https://doi.org/10.7847/jfp.2023.36.2.323>
- Yoon, T. R.: *Biomaterials for Orthopaedic Surgery*, *KIMS*, 20(1): 25-39, 2008.
- Zhang, J. M. and An, J.: Cytokines, inflammation, and pain, *Int Anesthesiol Clin*, 45(2): 27-37, 2007. [10.1097/AIA.0b013e318034194e](https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e)