

## H-6

# *Edwardsiella tarda* 불활화백신의 실험동물에서의 안전성 및 면역원성 시험

오진식, 강보규, 이상선, 윤용덕, 권문경\*, 이운호\*, 박상언\*, 문영봉\*, 방종득\*,  
김봉석\*

녹십자수의약품(주) · \*국립수산과학원

## 서론

넙치 양식장에 세균성 질병의 일종인 에드워드병으로 인한 피해가 점차 증가되어 여러 연구자들에 의해 *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) 불활화 백신에 대한 연구가 수행되어 백신의 효능, 효과, 안전성, 보존성 및 야외효능효과가 이미 확인되었다.

본 시험에서는 *E. tarda* 불활화 백신을 대량생산하였을 때의 품질관리기법을 위하여 목적동물인 넙치를 대체할 수 있는 실험동물을 선발하고자 대체 실험동물에 대한 안전성, 면역원성 및 방어효과시험을 수행하였으며 그 결과를 분석하였다.

## 재료 및 방법

본 시험에 사용한 균주는 국립수산진흥원 동해수산연구소에서 분양받은 균주로 *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) FSW 910410을 시험에 사용하였다.

또한 시험에 사용한 백신은 녹십자수의약품(주)에서 생산한 넙치 에드워드 불활화 시험백신을 공시하였다. 시험백신생산은 동해수산연구소에서 분양받은 종균을 1.5% NaCl이 첨가된 BHI broth(pH7.2)로 30°C에서 48시간 동안 배양한 후 포르말린으로 불활화하였으며 총균체 중량이 200g/ℓ 되게 Saline으로 부유하였다.

시험동물은 체중 13~15g ICR 마우스, 350~400g Hartley 기니피그를 공시하였다.

마우스에 대한 시험백신의 안전성 시험은 시험백신을 희석하고 각 희석배수별로 10마리의 마우스에 0.2ml씩 복강접종한 후 10일간 폐사유무를 조사함으로써 수행하였다. 공격접종용 균체는 마우스에서의 minimum lethal dose(MLD)를 측정하여 결정하였으며 공격접종 당일 호흡도와 생균수를 측정하였다.

마우스에서의 방어효과 시험은 시험백신의 마우스에 대한 안전성 시험결과를 토대로 결정하였으며 각 희석배수별로 0.2ml씩 10마리의 마우스에 2주 간격으로 2회 복강접종하였다. 공격접종은 2차 접종 10일 후 2MLD/0.5ml의 *E. tarda*균으로 실시하고 10일간 폐사수를 관찰하였다.

기니픽에서의 면역원성 시험은 시험백신을 PBS로 10배 희석하여 0.2ml씩 근육접종하고 2주후 동량을 2차 접종하였다. 항체가의 변화는 매주별로 cold agglutination test법으로 실시하였다. Cold agglutination test측정은 96well plate 모든 well에 PBS를 50 $\mu$ l씩 분주한 후 첫 번째 well에 혈청 50 $\mu$ l를 넣고 2-fold serial dilution하고 항원을 첨가하여(2.5mg/ml) 4 $^{\circ}$ C에서 overnight한 후 항체가를 측정하였다.

## 결과 및 요약

시험백신의 마우스에 대한 안전성을 확인한 결과, 10배 희석 접종군부터 이상없이 생존하였다. 또한 마우스 MLD를 측정한 결과, 생균수가  $5.06 \times 10^{10}$ /ml인 균액을 접종하였을 때 원액과 5배 희석액의 경우 100% 폐사하여 *E. tarda*의 마우스 MLD가  $5.06 \times 10^9$ CFU/0.5ml임을 확인하였다. 또한 1 MLD 균체의 12배 희석한 균액은 0.745의 흡광도(410nm)를 나타내어 공격접종용 균 부유액의 농도를 조정할 수 있었다.

시험백신의 마우스에 대한 방어효과 시험결과, 시험백신 10배 희석의 경우 90%, 20배 및 30배 희석의 경우 70%, 40배 희석의 경우 60%의 생존율을 보였다.

기니픽에 대한 면역원성 시험결과, 접종전 평균 2배 이하의 항체가가 1차 접종 2주 후에는 평균 41.6배, 2차 접종 1주 후에는 448배, 2차 접종 2주 후에는 409.6배, 2차 접종 3주 후에는 224배의 평균 항체가를 보였다.

위의 결과를 종합하였을 때 넵치에드워드병 불활화 백신의 시험동물에 대한 품질관리기준은 다음과 같이 규정하는 것이 적절하다고 생각된다.

1. **마우스 안전시험** : 체중 13~15g의 건강한 마우스에 백신을 10배 희석하여 0.2ml씩 복강접종하고 7일간 관찰하였을 때 이상없이 생존하여야 한다.

2. **마우스 역가시험** : 체중 13~15g의 건강한 마우스에 백신을 10배 희석하여 0.2ml를 2주 간격으로 2회 복강에 접종하고, 2차 접종 10일 후에 *E. tarda* 2MLD/0.5ml를 공격접종하여 10일간 생존여부를 관찰하여 80%이상 생존하여야 한다.

3. **기니픽 역가시험** : *E. tarda* 항체음성인 350~400g의 건강한 기니픽에 10배 희석한 백신을 0.2ml씩 2주 간격으로 2회 근육접종하고 접종 10일 후에 cold agglutination test로 측정하였을 때 평균 항체가가 1:400 이상이어야 한다.

## 참고문헌

방종득 · 이주석. 1995. 넵치의 *Edwardsiella tarda* 백신에 대한 방어효과. 국립수산진흥원 연구보고 50:67-76.

방종득 · 류호영 · 이주 · 김봉석 · 이주석. 2000. 넵치의 에드워드백신 침지면역시 Booster효과. 국립수산진흥원 연구보고 58:39-46.