

Vibrio菌에 대한 뱀장어 (*Anguilla japonica*)의 免疫反應

田 世 圭·金 鎮 禹

釜山水產大學 養殖學科
(1985년 7월 10일 수리)

Immune Response of the Japanese Eel(*Anguilla japonica*) to *Vibrio anguillarum*

Seh-Kyu CHUN and Jin-Woo KIM

Department of Aquaculture, National Fisheries University of Pusan.

Nam-gu, Pusan 608, Korea.

(Received July 10, 1985)

Some eels *Anguilla japonica*, ranging from 16 to 23 g in their weight(average: 20 g), were sampled at the private eel farming company equipped with water recycling system, located at Kimhae city, Kyungnam Province, Korea.

Three kinds of vaccine were prepared with *Vibrio anguillarum* (EPM-8406) isolated at National Fisheries University in Korea for the immune response experiment against eels; those vaccines were made by inactivating the strain with 0.3% formalin for 24 hrs at 25°C, heating for 3 mins or for 15 mins at 121°C, respectively.

The various optimal vaccination conditions for the control of vibriosis in the fish were investigated based on the cultivation temperature, vaccination concentration and booster effect.

The maximum titer rapidly increased with higher temperature up to 23°C, but there were little differences between 23°C and 28°C.

The formalin-killed vaccine showed good efficacy at the injection concentration of above 10⁸ cells per fish and little effect at the below 10⁷ cells.

The booster effect on the vaccination showed good efficacy above twice-injections with little difference between the numbers of injection.

緒 論

vibrio病은 海産 및 汽水産 魚類에 兇猛적인 피해를 입히는 疾病으로, 그 原因菌인 *Vibrio anguillarum* 은 1909年 Bergmann에 의해 報告된 이래 Hoastein 과 Holt (1980), Nishibuchi와 Muroga (1980), Fukumori等(1983)等에 의해서 生化學的 性狀, 病原性, 形態學的 特徵, 血清學的 研究 등이 報告되어 왔다. 이들의 報告에 의하면, 鹽分濃度 0.1~4% (optimum range 1~2%), pH 6~10, 水溫 18~39°C에서 잘 발생되는 이 疾病은 외관상 별이상 없이 단기간에

大量斃死가 일어나는 急性과 아가미와 體表에 심한 出血을 일으키는 亞急性, 體表에 潰瘍狀 형성되는 慢性 等으로 나누어진다고 했다. 유럽에서는 오래전 부터 red pest 혹은 red disease로 잘 알려져 있는 vibrio病은 뱀장어 외에도 연어, 송어, 방어, 은어 등의 主要養殖魚種에 산업적으로 큰 피해를 입히기 때문에 이 疾病을 퇴치하기 위해서 Oppenheimer (1955), Munn (1977), Novotny (1978)等에 의해서 항생제에 의한 治療方法이 研究되어져 왔으나, Kusuda等(1978)에 의하면 耐性因子的 出現으로 대부분의 항생제는 vibrio病에 대한 治療效果가 거의 없

Vibrio菌에 대한 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 免疫反應

는 것으로 報告되었다. 그래서 豫防對策의 일환으로서 vibrio vaccine에 대한 研究가 活潑히 進行되어져 왔는데, Muroga와 Egusa (1969)는 抗體生産에 미치는 溫度의 影響을 報告했고, Antipa와 Amend (1978)는 接種效果에 대한 報告를 했으며, 그 외에도 Fletcher와 White (1978), Gould等 (1978), Nichibuch (1979), Itami와 Kusuda (1980), Kawai와 Kusuda (1982) 등의 많은 報告가 있다. 그러나 vibrio vaccine을 실제 産業적으로 利用하기 위해서는 vaccine의 제조단가, 대상어종의 市場가격 등의 社會·경제적 여러 조건과 水溫, 사육 system, 魚類의 營養 등을 고려한 사육조건에 따라 많은 차이가 있기 때문에 우리나라 실정에 맞는 條件조건을 찾는 것이 절실히 요구된다. 그래서 本實驗에서는 뱀장어의 免疫獲得에 影響을 미치는 溫度, 接種濃度, booster 效果 등을 조사하여 가장 效果의인 條件들을 찾아 vibrio 病에 대한 피해를 최소한으로 줄여 실제 魚類 養殖에 도움이 되고자 하였다.

材料 및 方法

本 實驗은 84年 12月 4일부터 85年 4月 30일까지 釜山水産大學 水族病理實驗室內에서 실시되었으며, 各種 實驗方法은 다음과 같다.

1. 實驗魚

경남 김해 養魚場에서 飼育되는 平均體重 20g(16~23g)인 뱀장어(*Anguilla japonica*)를 使用했으며 本實驗室內에 설치된 180ℓ의 순환여과수조에 7일간 馴致한 후 40ℓ 水槽에 옮겨 實驗을 하였다. 馴致 도중 健康이 좋지 않은 뱀장어는 實驗에서 제외시켰고, aeration시키면서 전기 heater를 使用하여 하루 2°C씩 상승시켜 實驗水溫에 맞추었고, 飼育水는 本實驗室內의 飼育用水로 쓰이고 있는 지하수를 使用했으며, 이틀에 한 번씩 5ℓ를 換수했다. vibrio 病에 대한 事前免疫獲得과 感染 여부를 알기 위해 實驗 시작 직전에 水溫을 20°C로 상승시켜 本實驗에 사용된 *Vibrio anguillarum* strain과 凝集力價를 調查했다.

2. vaccine의 제조

釜山水産大學에서 分離한 *Vibrio anguillarum* EPM-8406 strain을 Brain Heart Infusion (BHI) broth에 培養하여 Fig. 1에 나타난 方法으로 만들었다.

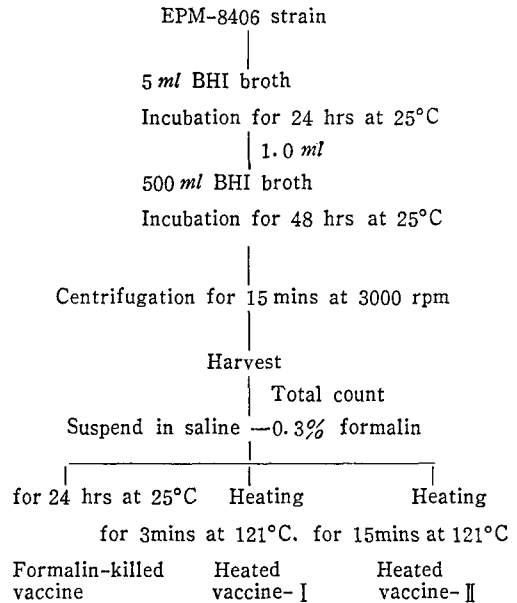


Fig. 1. Scheme of preparation of the vaccine used.

3. 接種

vaccine의 製法에 따른 免疫能力 測定을 제외한 實驗에서는 기본 vaccine으로 formalin-killed vaccine을 1回用 주사기(26-gauge)로 1尾當 0.1 ml (10⁹ cells/ml)씩 注射했으며 魚類는 注射 직전에 FA-100 (200 ppm)을 使用하여 마취시켰다. 溫度 차이에 따른 免疫獲得 能力을 測定하기 위한 實驗 에는 水溫을 20°C로 유지시켰다. vaccine의 濃도에 따른 免疫獲得 test에서는 尾當 10⁸ cells, 10⁶ cells, 10⁷ cells, 10⁸ cells, 10⁹ cells로 接種시켰으며, booster 效果測定實驗에서는 1回接種이 끝난 일주일 후에 1回接種區와 같은 方法으로 再接種시켰고, 3回接種區는 2回接種이 끝난 일주일 후에 다시 接種시켰다. vaccine의 種類에 따른 免疫能力測定實驗에서는 formalin-killed vaccine, heated vaccine-I, heated vaccine-II를 皮下에 1回 接種 하였는데, 接種濃度를 10⁸ cells/尾, 10⁹ cells/尾로 나누어 接種했다.

4. 抗體生成 測定

抗體生成을 測定하기 위해서 血漿에서 형성된 凝集力價를 調查하였다. 血液은 實驗魚를 4~5尾씩 無作為 추출하여 꼬리動脈을 절단하여 採血했으며 그것을 3000 rpm에서 15分間 원심분리시킨 뒤 上層液을 pipetting하여 抗血清으로 使用하였다. 凝集力價 測定은 microtiter 法에 의해서 실시했고 生理食鹽水

로 血清을 연속적으로 희석시킨 뒤, 같은 量의 生菌 浮遊液을 混合하여 凝集力價를 기록했다.

5. 感染實驗

免疫效果를 測定하기 위하여 抗體生成實驗과 동시에 感染實驗도 실시하였다. BHI broth에서 增菌시킨 *V. anguillarum* EPM-8406 strain을 接種後 일정기간이 지난 뒤 鰻장어에 注射하여 生存率을 구했다.

結 果

1. 實驗魚의 vibrio 病에 대한 病歷與否

實驗 開始前과 實驗 期間中の 鰻장어를 4~5尾 無作爲 抽出하여 凝集力價測定을 한 結果, Table 1에 나타난 바와 같이 *Vibrio anguillarum*에 대한 特異한 凝集反應이 없었다.

2. 水溫이 抗體生成에 미치는 영향

Fig. 2에서 나타난 것과 같이 水溫 15°C에서는 抗體生成이 늦을 뿐더러 最大凝集力價도 현저하게 낮게 나타났고, 水溫을 18°C, 23°C로 상승시킴에 따라 最大凝集力價도 水溫에 比例해서 높게 나타났다.

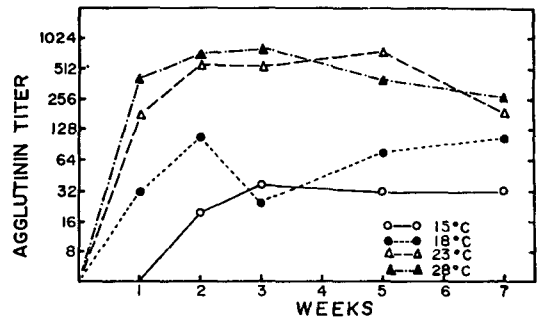


Fig. 2. Effect of temperature on the production of agglutinin titer against *V. anguillarum*.

그러나 水溫을 28°C로 상승시켜도 最大凝集力價의 증가는 보이지 않았다. 接種後 7일째 되는 날 각 區別로 4~5尾를 꺼내어 3일 동안 20°C로 온도 순화를 시킨 뒤 感染實驗을 한 결과를 Table 2에 나타내었다. 10°C는 대조區와 마찬가지로 100% 死亡率을 나타냈고, 15°C부터 效果를 나타내기 시작하여, 18°C이상부터는 100% 生存率을 나타내었다.

3. Vaccine의 接種濃度

vaccine의 接種濃度에 따른 魚類의 防禦能力을 調査하기 위해서 1回 接種時 10일 뒤에 感染實驗을 한 結果를 Table 3에 나타내었다. 이 實驗에서 尾當

Table 1. Results of serum-agglutination test of *Vibrio anguillarum* on eels

Number of fish tested	Mean body weight(g)	Date of test	Result of serum-agglutination test
4	20 (16~23)	20, Dec. 1984	All negative
5	21 (18~23)	24, Feb. 1985	All negative
6	21 (17~23)	14, Mar. 1985	All negative

Table 2. Viable cell challenge* of eels vaccinated at various water temperatures

Group	Water temperature	Number of death /tested fish number	Time to death for 20 days observation
Immunized**	10°C	5/5	3~5
	15°C	2/5	4
	18°C	0/4	0
	23°C	0/5	0
	28°C	0/5	0
Control***	20°C	5/5	3~7

* Fish were injected intramuscularly with viable 10^8 cells per fish tested a 10 day after the vaccination. The water temperature at challenge was 20°C.

** Injected with 10^8 cells of formalin-killed vaccine tested fish.

*** Injected with formalin-saline under the same schedule as the above.

Table 3. Efficacy of the vaccine dosed at 5 concentrations for the control

Group	Dosage of vaccine	Number of death/tested fish number	Total mortality (%)	Time to death for 20 days observation
*Immunized	10 ⁵ cells	18/(20)**	90	3~9
	10 ⁶ cells	17/(19)	90	3~7
	10 ⁷ cells	14/(20)	70	5~9
	10 ⁸ cells	****1/(20)	5	4
	10 ⁹ cells	0/(20)	0	
***Unvaccinated control		17/20	85	3~9

* Fish were injected intramuscularly with formaline-killed vaccine.

** Challenged fish were injected with 10⁸ viable cells per tested fish a 10 day after vaccination.

*** Injected with formalin-saline under the same schedule as the above.

**** V. anguillarum was not reisolated.

10⁵ cells, 10⁶ cells, 10⁷ cells를 接種했을 때 死亡率이 각각 90%, 90%, 70%로 사실상의 免疫應答反應은 나타나지 않았고 死亡魚는 전형적인 *Vibrio anguillarum* 증상을 나타내었다. 10⁸ cells과 10⁹ cells에서의 死亡率은 5%, 0%였고 10⁸ cells에서 斃死된 뱀장어에서는 *Vibrio anguillarum*은 검출되지 않았다.

4. Booster 再抗原接種

接種回數에 따른 뱀장어의 免疫獲得能力을 Fig. 3과 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 3은 마지막 接種시킨 뒤 30日 후에 生菌感染시킨 結果인데, 1回 接種시킨 區는 生存率이 70%로 나타났으나 2回 接種區와 3回 接種區는 모든 生存率이 90%로서 1回 接種區보다는 높았다. 그러나 2回 接種區와 3回 接種區의 效果의 차이는 나타나지 않았다. 마지막 接種後 45日이 경과하여 生菌感染을 시킨 結果를 Fig. 4에 나타내었다.

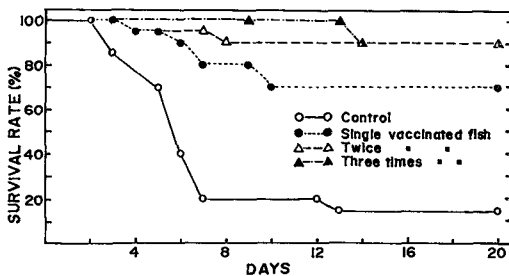


Fig. 3. Effect of booster administration and its duration. Fish were injected intramuscularly with viable 10⁸ cells per fish tested a 30 day after the vaccination.

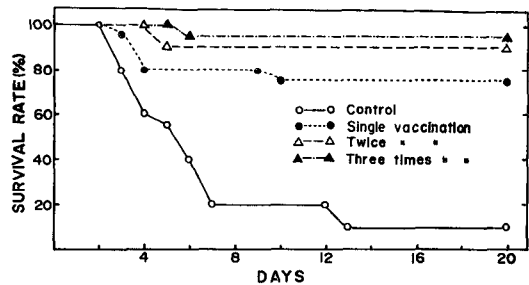


Fig. 4. Effect of booster administration and its duration. Fish were injected intramuscularly with viable 10⁸ cells per fish tested a 45 day after the vaccination.

Fig. 4에서 나타난 결과도 Fig. 3에서 나타난 결과와 비슷하게 1回 接種만의 生存率(75%)보다는 2回 接種(90%), 3回 接種(95%)의 生存率이 높게 나타났다.

5. Vaccine의 種類

vaccine의 種類에 따른 免疫獲得能力을 Table 4와 Table 5에 나타내었다. 10⁸ cells/尾로 接種했을 때 formalin-killed vaccine의 生存率은 100%였으나 heated vaccine-I과 heated vaccine-II의 生存率은 각각 20%, 30%로 저조하였다(Table 1). 그러나 接種濃度를 10⁹ cells/尾로 높혔을 때는 heated vaccine-I과 heated vaccine-II의 生存率은 각각 85%, 70%로 10⁸ cells/尾로 接種했을 때보다 生存率이 증가되었다.

Table 4. The effects of 3 kinds of *Vibrio anguillarum* vaccine on the survival rates of fish challenged with 10^8 viable cells a 10 day after vaccination

Group	Number of death/tested fish number	Survival rate (%)	Time to death for 20 days observation
Formalin-killed vaccine	0/20*	100	—
121 °C-3 mins heated vaccine	16/20*	20	1~4
121 °C-15 mins heated vaccine	14/20*	30	2~3
Control**	19/20	5	2~4

* Fish were injected intramuscularly with vaccine dosage of 10^8 cells concentration.

** Injected with formalin-saline under the same schedule.

Table 5. The effects of 3 kinds of *Vibrio anguillarum* vaccine on the survival rates of fish challenged with 10^8 viable cells a 10 day after vaccination

Group	Number of death/fish tested number	Survival rate (%)	Time to death for 20 days observation
Formalin-killed vaccine	0/20*	100	—
121° C-3 mins heated vaccine	3/20*	85	2~4
121° C-15 mins heated vaccine	6/20*	70	2~9
Control**	20/20	0	2~4

* Fish were injected intramuscularly with vaccine dosage of 10^8 cells concentration.

** Injected with formalin-saline under the same schedule as the above.

考 察

魚類의 免疫獲得에 큰 영향을 미치는 飼育水溫은 免疫効果와 밀접한 관계가 있기 때문에 다른 研究者에 의해서 많은 報告가 있었다. Avatation 等(1976, 1980)은 잉어에서는 15°C 이하에서 전혀 免疫이 형성되지 않는다고 報告했으며, Muroga 와 Egusa(1969)는 *Vibrio anguillarum* 을 merzonine (0.01%)에 不活性化시킨 vaccine 을 鯉장어에 接種했을 때 11°C 이하에서 전혀 免疫能力이 형성되지 않는다고 報告했다. 本實驗에서도 10°C에서는 鯉장어가 免疫能力을 전혀 獲得하지 못했고 15°C 이상부터 免疫효과가 나타나기 시작했지만 15°C에서의 凝集力價는 18°C, 23°C나 28°C보다 낮았으며 免疫反應도 늦게 일어났다(Fig. 2). Rijeker 等(1980)은 緬羊의 赤血球를 잉어에 注射했을 때 8~23°C의 水溫 범위에서 抗體를 生産한다고 報告했으며, Azzolina (1978)는 금붕어에 polymerized flagellar antigen (POL)을 接種했을 때 4°C나 22°C에서 抗體形成量에 별다른 차이가 없다고 報告했다. 일반적으로 魚類는 生存可能水溫限界에서 水溫이 높을수록 抗體生産이 높게 나타난다고 했으나 本實驗에서는 生存上限水溫보다 훨씬 낮은 23°C에서 最大凝集力價가 나타났다. 그래서 抗體生産量은 飼育水溫의 절대치에 關聯되는 것이 아

니라 antigen의 種類, 魚種, 魚類의 成長段階에 따라 많은 차이가 있는 것으로 추정되나 平均體重 20g의 鯉장어의 경우는 接種時의 高水溫(23°C)이 低水溫(18°C, 15°C)보다 상당히 높은 凝集力價를 형성하는 것을 볼 수 있었다. vaccine의 接種濃度는 接種經費와 밀접한 관계를 가지고 있기 때문에 大規模 養魚業者들은 疫種濃도에 많은 관심을 가지고 있다. Kusuda 等(1978)은 은어 (*Plecoglossus altivelis*)에 *Vibrio anguillarum*의 formalin 死菌 4×10^8 cells/魚體 100g을 2주일간 먹이에 섞어 먹인 결과, 큰 효과를 얻었지만 10^8 cells/魚體 100g을 먹인 결과는 별다른 효과를 얻지 못했다고 報告했었다. Fryer 等(1976)은 chinook salmon에 2×10^8 cells/魚體 20g을 注射하여 좋은 효과를 얻었다고 발표했었으나, 本實驗에서는 그 濃度の 半(10^8 cells/20g)에서도 좋은 효과를 나타내었다. 그러나 Rijeker 等(1980)은 booster 効果는 接種經路, antigen의 量, 2차와 3차 接種의 時期 等に 따라 크게 차이가 나타난다고 報告했고, Trizio 等(1978)은 1回 注射했을 時의 少量을 注射하더라도 2차 接種 時에 나타나는 免疫反應의 效果가 매우 크다는 것을 금붕어의 實驗에서 밝혔다. 本實驗에서도 1차 接種後 일주일 뒤에 같은 量의 vaccine을 2차 接種했을 時의 booster 效果는 vaccine을 1回만 注射하는 것보다는 生存率이 훨씬 높았다

文 獻

(Fig. 3, 4). 2回接種後 일주일 뒤에 같은 量을 3回 接種했을 때의 生存率은 2回와 別 차이가 없었다. vaccine을 1回 또는 2~3回 接種할 것인가의 여부는 경제적인 타당성과 魚類의 stress, 接種效果 등을 고려해서 실시하는 것이 좋은 것으로 생각된다. 本實驗에서 使用된 vaccine 中 formalin-killed vaccine의 免疫效果가 가장 높게 나타났고 heated vaccine-I, heated vaccine-II에서도 免疫效果를 나타내는 것으로 보아(Table 4) 耐熱性 抗原이 感染防禦에 어떤 역할을 수행하는 것으로 보인다. 그러나 *Vibrio anguillarum*의 抗原성이 모두 耐熱性이라고는 보기 어렵고 여러가지가 複合的으로 작용하여 抗體生産에 관계되는 것으로 생각된다.

要 約

경남 김해 명지 養魚場에서 飼育中이던 뱀장어(平均體重 20g)에 *Vibrio anguillarum* vaccine을 注射하여 일정기간이 경과한 뒤 生菌을 感染시켜 뱀장어의 免疫效果를 調査하였다. 이 實驗에서 使用된 vaccine은 25°C로 조절된 0.3%의 formalin에 24시간 방치하여 死菌化시킨 formalin-killed vaccine, 121°C에서 3分 및 15分間 가열한 vaccine等 3種類의 vaccine이다. 이 3種類의 vaccine을 接種했을 때 效果의 차이와 formalin-killed vaccine의 接種時 溫度와 接種濃度에 따른 效果를 조사했으며 booster 接種의 必要與否도 검토했다. 1984年 12月 4일부터 85年 4月 30일까지 실시한 연구 결과는 다음과 같다.

1. 水溫 15°C에서 23°C의 범위까지 抗體生産에 의한 凝集力價는 水溫이 높을수록 높게 나타났고, 23°C와 28°C에서는 凝集力價는 別 차이가 없었다.
2. 死菌 vaccine 接種量을 10⁷cells/尾로 注射하면 免疫能力이 아주 미비하였고, 10⁸ cells/尾에서 強한 免疫能力을 獲得했다. 그러나 10⁹ cells/尾로 증가시켜도 10⁸ cells/尾 때와 유사하였다.
3. 10⁸ cells/尾를 2回 接種시켰을 때 1回만 接種시켰을 때보다 效果가 훨씬 좋았으나 3回 接種시켰을 때는 2回 接種區와 免疫效果의 차이가 없었다.
4. formalin으로 처리된 死菌 vaccine이 完全免疫을 나타내었으며 121°C로 열처리한 vaccine의 경우는 免疫效果가 약했다.

Antipa, R. and D. F. Anend. 1978. Comparison of intraperitoneal injection and hyperisotonic infiltration of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* bacterins. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 44(1), 21-25.

Avtalion, R.R., E. Weiss and T. Moalem. 1976. Regulatory effects of temperature upon immunity in ectothermic vertebrate. In "Microbial Disease of Fish" (Ed. A. E. Ellis) 1-29.

Avatation, R.R., A. Wishvsky and D. Katz. 1980. Regulatory effect of temperature on specific suppression and enhancement of the humoral response in fish. In "Immunological Memory" (Ed. M. Manning) 113-121.

Azzolina, L. S. 1978. Antigen recognition and Immune response in gold fish *Carassius auratus* of different temperatures. Developmental and Comparative Immunology 2, 77-86.

Fletcher, T.C. and A. White. 1973. Antibody Production in the Place (*Pleuronectes platessa L*) after Oral and Parenteral Immunization with *Vibrio anguillaum* Antigens. Aquaculture 1, 417-428.

Fukumori, F., F. Nagayama and S. Horie. 1983. Lytic and Lethal Effect of Culture Supernatant of *Pseudomonas* sp. against Fish Pathogenic *Vibrio angillarum*. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 49(7), 1109-1116.

Gould, R. W., P. J. O'Leary., R. L. Garrison., J. S. Rohovec and J. L. Fryer. 1978. Spray Vaccination: A Method for the Immunization of Fish. Fish Pathology 13(1), 63-68.

Hoastein, T. and G. Holt. 1972. The occurrence of vibrio disease in wild Norwegian fish. J. Fish Biol. 4, 33-37.

Itami, T. and Kusuda 1980. Studies on Spray Vaccination against Vibriosis in Cultured Ayu-1. Effect of Bentonite and pH on Vaccination Efficacy. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 46(5), 533-536.

Kawai, K. and R. Kusuda. 1983. Efficacy of the

- Lipopolysaccharide Vaccine against Vibriosis in Cultured Ayu. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 49(4), 511—514.
- Kusuda, R., K. Kawai., Y. Jo., T. Akizuki., M. Fukunaga and N. Kotake 1978. Efficacy of Oral Vaccination for Vibriosis in Cultured Ayu. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 44(1), 21—25.
- Munn, C. B. 1977. Vibriosis in fish and its control. Fish Magazine 8, 11—15.
- Muroga, K. and S. Egusa 1969. Immune Response of the Japanese Eel to *Vibrio angillarum*-1. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 5(9), 868—872.
- Muroga, K., M. Nishibuchi and Y. Jo 1976. Pathogenic *Vibrio* Isolated from Cultured Eels-Ⅱ. Physiological Characteristics and Pathogenicity. Fish Pathology 11(3).
- Nishibuchi, M., K. Muroga., J. R. Seidler and J. L. Fryer. 1979. Pathogenic *Vibrio* Isolated from Cultured Eels-Ⅳ Deoxyribonucleic Acid Studies. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 45(12), 1469—1473.
- Nishibuchi, M. and K. Muroga 1980. Pathogenic *Vibrio* Isolated from Cultured Eels-V. Pathology 14(3), 117—124.
- Novotny, A. J. 1978. Vibriosis and furunculosis in marine cultured salmon in Puget Sound, Washington. Mar. Fish. Rev. 40, 52—55.
- Oppenheimer, C. H. 1955. The Effect of marine bacteria on the development and hatching of Pelagic fish egg, and the control of such bacteria by antibiotics. Copeia 1, 43—49.
- Rijkers, G. T., E. M. H. Frederix-Wolters and W. B. Muiswinkelvan. 1980. The immune system of cyprinid fish: Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (*Cyprinus carpio*). Immunology 41, 91—97.