

넙치에서의 *Vibrio vulnificus* 오염 방지를 위한 백신 연구

손상규 · 김명석* · 박준호** · 유민호*** · 정현도****
 국립수산진흥원 진해내수면연구소, *국립수산진흥원 청평내수면연구소
 국립수산물품질검사원 통영지원, *부경대학교 수산생명의학과

Bacterins to Prevent the Contamination of *Vibrio vulnificus* in the Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Sang-Gyu SOHN, Myoung Sug KIM*, Jun-Hyo PARK**
 Min Ho YOO*** and Hyun Do JEONG****

Jinhae Inland Fisheries Research Institute, National Fisheries R & D Institute,
 Jinhae 645-806, Korea
 *Cheongpyong Inland Fisheries Research Institute, National Fisheries R & D Institute,
 Kyoung-gi 477-815, Korea
 **National Fisheries Products Quality Inspection Service, Tongyeong Branch,
 Tongyeong 650-080, Korea
 ***Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University,
 Pusan 608-737, Korea

To study the increased resistance in fish against *Vibrio vulnificus* known as an important agent of vibrio septicemia in human, we analyzed specific and nonspecific immune response in flounder after administration of *V. vulnificus* bacterins by oral route. It contained the comparison of antibody concentrations in the sera of flounder after oral administration by two different protocols with uncoated heat killed bacterin of *V. vulnificus* (UHKB, 20 mg/kg body weight), i.e., 4 weeks continuously (group 4W) and taking 2 weeks resting period between the 1st and last week of administration (group 1-2-1W). Even though, 1-2-1W group showed significantly increased level of specific antibody in serum, it did not reach to that of 4W group. Certainly, flounder vaccinated twice a week for four weeks (20 mg/kg b.w.) showed increased concentration of specific antibody against *V. vulnificus* at week 2 after last administration by oral route and maintained throughout the experimental period. It also was confirmed by the increased numbers of specific antibody secreting cells (SASC) in the leukocytes isolated from the splenocytes of the flounder of 4W group at week 1 after last administration until the end of experimental period. However, enteric, acid-resistant film coated heat killed bacterin (ECHB) did not show both greater immune reaction for antibody production and faster elimination of a challenge dose of *V. vulnificus* compared with those of the UHKB. These results suggested that UHKB administered by oral route was very effective method to prevent the contamination of *V. vulnificus* in flounder, and did not show the increased antigenicity by coating the surface with acid-resistant film.

Key words: *Vibrio vulnificus*, Flounder, Antibody secreting cells, Enteric coated bacterin, Immune reaction

서 론

*Vibrio*속에는 30종 이상의 균들이 있으며 특히 *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* 등은 사람에게 병원성이 있는 종으로 알려져 있다 (박, 1996). 이 중 *V. vulnificus*는 기수 및 연안에 분포하는 그람 음성균으로 상처부위가 해수와 접촉하거나 *V. vulnificus*가 들어 있는 어패류를 날 것으로 섭취하였을 때 사람에게 감염되어 치명적인 패혈증을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Blake et al., 1979; Stelma et al., 1992; Oliver et al., 1991; Depaola et al., 1994). *V. vulnificus*는 비록 예외적으로 biotype 2가 뱀장어에서 질병을 일으킨다는 보고가 있지만 (Amoro et al., 1995), 이 균은 대부분의 근해에 사는 어패류에 서식은 하되 어패류의 질병을 유도하지는 않는다. 그리고 생태학적인 측면에서 보면 물, 침전물, 굴, 갑각류보다는 유영어류에서 균 밀도가 높고, 특히 저

서어류의 창자 (10^8 cells/100 g) 등에서 높은 밀도를 보이고 (박, 1996) 플랑크톤이나 다른 고기를 먹고사는 고기에서의 균 밀도 (10^5 cells/100 g)는 굴, 침전물, 계 등과 비슷하다 (Depaola et al., 1994). *V. vulnificus*에 의한 패혈증은 우리 나라에서는 비브리오 패혈증이란 이름으로 더욱 잘 알려져 있으며, 특히 어패류를 생식하는 우리 나라의 식생활 특성상 발병 가능성이 높은 것으로 우려되고 있다. *V. vulnificus*를 제거하기 위한 방법으로는 자외선 소독 (Tamplin and Casper, 1992), 오존 처리 (Schneider et al., 1991) 등과 Generally Recognized as Safe (GRAS) 화합물 (Sun and Oliver, 1994), Chelating agent (정 등, 1989) 등을 처리하는 방법이 보고되어 있다. 이외에 수온을 15°C로 낮추어 균 증식을 억제하는 수온 조절 방법이 보고 (Tamplin and Casper, 1992) 되어 있으나, 이 역시 수온을 인위적으로 조절할 시에 어패류가 받는 stress와 저수온으로 인한 성장 저해 등의 문제로 사용하기에 어려운 방법이다. 최근에 다당질-단백질 배합체 (polysaccharide-protein conjugate)가 다른 헤파막이 있는 병원성 균을 방어한다는 데 근거를 두고 사람에게 사용하기 알맞은 *V. vulnificus* capsular

* Corresponding author: jeonghd@pknu.ac.kr

polysaccharide (VVPS) 배합체 백신을 Devi et al. (1995)이 합성하는데 성공하였으나 비브리오 패혈증에 대한 인지 부족으로 실제로 사람이 백신을 접종받는 경우는 드문 실정이다. 비브리오 패혈증에 대한 적극적인 대책의 일환으로 어류용의 *V. vulnificus* 백신을 투여하여 이 세균을 가지고 있지 않는 활어를 생산함으로써 *V. vulnificus*에 의한 패혈증의 source를 차단한다는 것은 국민보건 건강이나 양식어민의 경제적인 소득 증대를 위해 꼭 필요하다고 생각된다. 본 연구에서는 우리 나라에서 가장 많이 양식하고 있는 어종인 넙치에 *V. vulnificus* 백신을 여러 가지 다른 농도와 투여 기간으로 경구 및 복강 투여하여 최적의 vaccination 조건을 찾고자 하였다. 이를 위하여 *V. vulnificus* 백신을 여러 가지 다른 농도와 투여 기간으로 경구 투여한 후 혈청 내 *V. vulnificus* 특이 항체량과 B 세포의 수적 변화에 대한 상관 관계를 비교 검토하여 최적의 vaccination 조건을 찾고, 제조방식이 다른 백신을 제조하여 최적화 된 백신 투여방법을 적용함으로써 *V. vulnificus*에 의한 패혈증에 가장 효과적인 백신 처리 조건을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

실험어

본 실험에서는 넙치를 동해와 남해 연안의 양식장에서 직접 분양 받아, 외관상 질병의 증세가 나타나지 않는 건강한 개체들을 사용하였다. 실험실로 이송된 어체중 (body weight, b.w.) 100 g의 넙치는 실험실의 800 L 순환여과식 수조에서 수온을 22°C로 유지하여 3주 이상 순치시킨 후 실험에 사용하였다.

실험균주

실험균주는 제일제당(주)의 협조로 감염 환자로부터 분리한 *V. vulnificus* CJVV 004 균주를 분양받아 실험에 이용하였다. 실험균은 1% NaCl이 첨가된 trypticase-soy broth (TSB) 배지에서 37°C, 18시간 동안 전 배양하고 다시 TSB 배지에서 8시간을 재배양하여 항원제작과 공격 실험에 사용하였다. 실험균은 보존을 위해 50% skim milk를 첨가하여 동결건조한 후 -70°C에 보존하면서 필요시 꺼내어 사용하였다.

백신

V. vulnificus CJVV 004를 1% NaCl이 첨가된 TSB 배지에서 배양한 후 100°C에서 2시간 동안 끓인 후 0.9% 생리식염수로 세척하였다. 원 배양액의 1/12 용량으로 0.2 µm filter (Sartocon II system, Sartorius, Germany)를 사용하여 농축한 후 동결건조하여 이를 uncoated heat killed bacterin (UHKB)로 하였다. Coated heat killed bacterin (ECHB)은 준비된 50 g의 UHKB를 500 mL의 증류수에 혼합한 후 10,000 psi의 조건에서 M-110 EH Microfluidizer (Microfluidics Corp., Newton, MA, U.S.A.)에 두 번 통과시키고 20% hydroxypropyl methylcellulose (Pharmacoat 9603, Pharmacia, Piscataway, NJ, U.S.A.)에 혼합하였다. 혼합된 것은 과립상으로 하기 위하여 corn starch와 함께 8.5 mL/min의 속도로 분사하였다. 이때 투입온도는 70~80°C, 과립형성온도는 25~30°C,

그리고 rotor의 속도는 300 rpm으로 조정하였다. 과립의 enteric coating은 6% hydroxypropyl methylcellulose phthalate 55 (Shin-Etsu Chemical Co., Japan)를 사용하여 granulator (SPIR-A-FLOW, Freund Industrial, Japan)에서 실시하였다.

백신 투여의 최적화

복강을 통한 *V. vulnificus* 백신 투여는 0.1 mL의 phosphate buffered saline, pH 7.2 (PBS)에 30분간 수화시킨 UHKB와 formalin killed cells (FKC)을 1회 복강주사하여 실시하였다. 이때 각각의 백신현탁액은 습증량으로 각각 20 mg/mL로 하였다. 백신의 경구투여는 UHKB를 습증량으로 하여 4, 8, 20 mg/kg b.w.의 농도로 실시하였다. 실험은 4주 동안 연속 백신을 투여하는 group (4W)과 1주 투여하고 2주 동안 투여하지 않다가 다시 1주 투여하는 group (1-2-1W)으로 나누어 실시하였다. 백신의 경구 투여는 넙치를 쉽게 토해내지 못하도록 pH 7.2, PBS에 0.2% agarose와 함께 혼합하여 gel 상태로 한 후 존대를 사용하여 식도 후부에 0.1 mL 씩 1주에 2회씩 강제투여하는 방법으로 실시하였다. ECHB의 투여는 40 mg/kg b.w.의 농도 (ECHB 무게의 약 30%가 UHKB로 분석되었음)로 4주 연속 투여하였다. 최종 투여 후 1, 2, 4, 8주째에 각각의 group들로부터 혈청 내 특이 항체와 항체 생성 세포를 검출하여 백신의 투여 효과를 확인하였다.

혈청내 항체량의 변화

V. vulnificus 백신이 투여된 넙치에서 형성된 *V. vulnificus* 특이 항체는 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)로서 검출하였으며, 방법은 본 연구실에서 발표한 Ha et al. (1999)의 방법을 따랐다. 이때 면역 넙치로부터 채취한 항혈청을 1:80으로 희석하여 사용하였고, 항원으로서 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) extracted *V. vulnificus* antigen (50 µg/mL in PBS)를 사용하였다.

Enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT-assay)

Solid-phase로서는 punched nitrocellulose (N.C) sheet를 PBS 완충용액에서 충분히 침지시킨 다음 예리한 forcep을 이용하여 96 well plate의 각 well로 transfer 시켜 N.C sheet coated plate로서 준비하였다. Specific antibody secreting cell (SASC)의 검출을 위하여 EDTA extracted *V. vulnificus* antigen (50 µg/mL in PBS) 100 µL씩을 well에 가한 다음 37°C에서 3.5시간 동안 반응시켰다. PBS-T (0.05% Tween 20 in PBS)으로서 well 각각을 3회 세척한 후 3%의 bovine serum albumin (BSA)으로서 2시간 동안 masking을 실시하여 nonspecific binding을 blocking하였다. 면역넙치의 전신세포를 51% Percoll (Sigma) gradient를 사용하여 적혈구를 제거하고 100 IU penicillin/mL, 100 µg streptomycin/mL 그리고 5%의 fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 L-15 배지 (Sigma)에 10⁶ cells/mL의 농도로 현탁한 후 0.1 mL을 취하여 well에 가하고 22°C 습윤기에서 0.5~5시간 동안 antibody secretion을 실시하였다. PBS-T로서 조심스럽게 membrane위의 세포들을 제거한 후, 배양하는 동안 유출되어 membrane에 부착된 항체를 분석해 내기 위하여 20 µg/mL의 biotin-conjugated anti-flounder immunoglobulin을

75 μ L씩 가하여 37°C에서 45분간 반응시켰다. 이 후 1:1,000으로 희석된 ExtrAvidin-alkaline phosphatase (Sigma)를 75 μ L씩 가하여 biotin-avidin binding을 37°C에서 45분간 진행시켰으며 최종적으로 substrate인 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT, Sigma) 용액을 100 μ L 가하여 실온에서 10분간 발색 후 증류수로 세척한 다음 형성된 청색의 spot을 stereomicroscope로 관찰하였다.

식세포의 활성 산소 측정

L-15 세포 배양 배지에 전신조직을 단일 세포로 현탁 (10⁷ cells/mL) 한 후 100 μ L씩 triplicate로 well에 첨가하여 CO₂ incubator (5% CO₂)에서 3시간 동안 배양하여 식세포를 부착시켰다. Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma)으로 washing하여 미 부착된 식세포를 제거하고 zymosan (Sigma, 2 mg/mL)이 첨가된 NBT (1 mg/mL) 용액을 100 μ L씩 첨가하여 22°C에서 30분 동안 배양하여 식세포를 자극시켰다. HBSS으로 2회 세척한 후 식세포를 100% methanol로 고정시키고 70% methanol로 세척한 후 plate를 자연 건조시켰다. 각 well에 dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma) 140 μ L와 2 M KOH 용액 120 μ L를 첨가하여 나타난 발색 반응을 630 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 판별 지수는 ((positive O.D. - negative control O.D.) / negative control O.D.) × 100의 방법으로 결정하였으며 판별지수가 50% 이상일 때 positive로 판정하였다.

*V. vulnificus*의 소멸을 비교

V. vulnificus 백신의 최종 투여 후 3주 째에 *V. vulnificus* (1 × 10⁸ CFU/mL) 생균을 실험구와 PBS를 투여한 대조구의 복강에 주사하고 7일 후 혈액을 채취하여 duplicate로 brain heart infusion agar (BHIA, Gifco)에 도말한 후 37°C에서 24시간 배양하여 나타난 세균집락을 계수하였다. 이 때 식작용에 의하여 백혈구내에 함유되어 있으나 사멸되지 않은 세균까지 검출하기 위하여 Earlix et al. (1996)의 방법에 따라 0.5% Triton X-100을 채취된 혈액에 처리하여 백혈구를 용해시킨 후 실험에 사용하였다. 판별지수는 1 mL의 혈액내에 있는 ((대조구의 집락수 - 실험구의 집락수) / 실험구의 집락수) × 100으로 하여 계산하였다.

결 과

백신의 경구투여와 효과분석

UHKB를 20 mg/kg b.w.의 농도로 경구로 넙치에 4주 연속 투여하였을 때 혈청내 항 *V. vulnificus* 항체가는 PBS를 투여한 대조구에 비교하여 명백한 증가를 보여 주었다 (Fig. 1). 즉 20 mg/kg b.w. 4W group은 최종 투여 2주째에 채취한 혈청을 1:80으로 희석하여 항 *V. vulnificus* 항체가를 ELISA로 분석하였을 때 흡광도가 0.78을 기록하여 실험구 중에서 최고 수치를 보여 주었다. 그리고 20 mg/kg b.w. 1-2-1W group은 흡광도가 0.58을 나타내어 20 mg/kg b.w. 4W group의 level에는 이르지 못하였으나 대조구에 비해서는 뚜렷한 증가를 나타내었다. 그러나 투여 bacterin의 양을

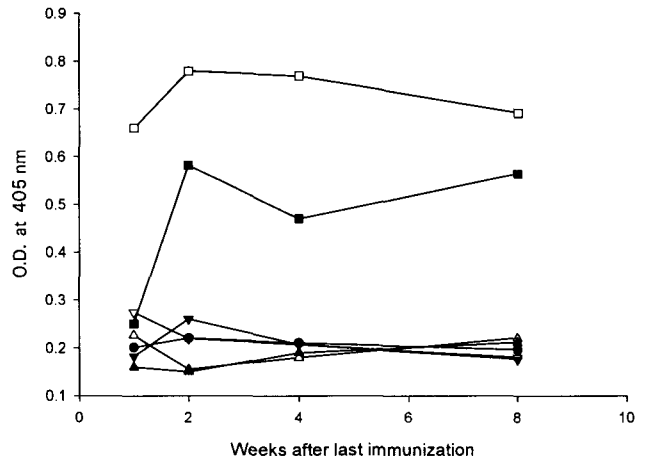


Fig. 1. Antibody levels measured with ELISA in the serum of flounder, *Paralichthys olivaceus*, after oral administration of UHKB with different protocols. Antibody production is expressed as optical density (O.D) values at fixed serum dilutions of 1:80. ▽, 4 mg 4W; ▼, 4 mg 1-2-1W; △, 8 mg 4W; ▲, 8 mg 1-2-1W; □, 20 mg 4W; ■, 20 mg 1-2-1W; ●, control. Each value is the mean of 5 fish.

더욱 감소시켜 4 mg/kg b.w.와 8 mg/kg b.w.로 하였을 때는 투여 방법에 상관없이 모두 혈청 내 특이 항체량의 생성량에 있어서 대조구와 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았다.

항체 생성의 주체인 B세포의 수를 ELISPOT-assay 기법을 이용하여 단일세포수준에서 조사한 결과 ELISA 법으로 분석된 혈청내 특이항체량의 생성결과와 유사하게 20 mg/kg b.w. 4W group에서 가장 많은 수가 검출되었다 (Fig. 2). 이러한 특이적 B 세포수의 증가경향은 20 mg/kg b.w. 1-2-1W group에서도 관찰되었으나 20 mg/kg b.w. 4W group에서 나타난 숫자에는 미치지 못하였다. 투여 bacterin의 양을 감소시킨 4, 8 mg/kg b.w.의 농도에서는 혈청내 특이 항체량의 변화와 유사하게 투여 방법에 상관없이 모두 대조구와 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았다. 그러므로 4, 8 mg/kg b.w.의 농도로 경구투여된 *V. vulnificus*의 bacterin은 넙치의 면역 반응을 유도시키기에 부족한 것으로 생각되었다.

두신과 비장에서 검출된 20 mg/kg b.w. 4W group의 특이항체 생성 세포수는 모두 유사한 것으로 나타나 장기에 따른 항체 생성 세포의 수는 뚜렷한 차이가 없는 것으로 분석되었다 (data not shown).

제조 방식이 다른 bacterin의 효능 분석

UHKB와 ECHB를 각각 20 mg/kg b.w.와 40 mg/kg b.w.의 농도로 4주 연속 경구로 투여하여 제조 방식이 다른 bacterin이 어류의 혈청내 특이 항체 생성에 미치는 영향을 분석하였다. UHKB를 경구로 4주 연속 투여한 실험구는 백신을 복강으로 주사한 실험구의 level에는 도달하지 못하였으나 투여 3주 째부터 특이 항체량이 증가하기 시작하여 최종 투여 후 2주 째에 최고치에 도달한 후 8주 째까지 유지되어졌다. 그러나 ECHB를 투여한 실험구에서

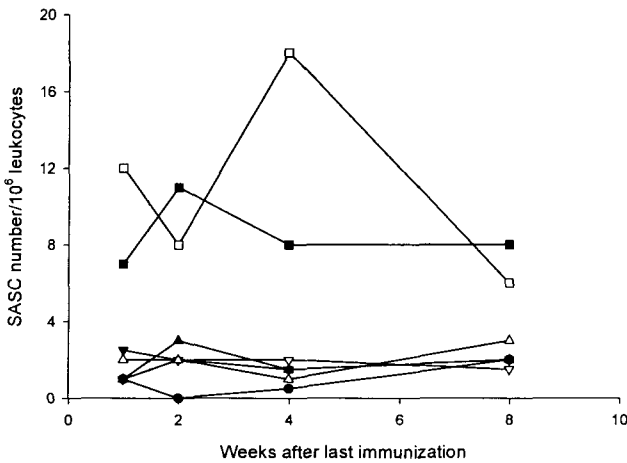


Fig. 2. Mean numbers of specific antibody secreting cells (SASC) against *V. vulnificus* in leukocytes of the head kidney following last immunization of flounder, *Paralichthys olivaceus*, with different protocols. ▽, 4 mg 4W; ▼, 4 mg 1-2-1W; △, 8 mg 4W; ▲, 8 mg 1-2-1W; □, 20 mg 4W; ■, 20 mg 1-2-1W; ●, control. Each value is the mean of 3 fish.

는 투여 2주 후에 항체가 증가하였으나 곧 감소하기 시작하여 최종 투여 후 2주 제부터는 대조구 수준으로 감소하였고 항체량의 증가가 관찰되지 않았다 (Fig. 3).

V. vulnificus 백신을 투여한 넙치의 비특이적 면역반응을 분석하기 위하여 두신에서 분리한 macrophage의 활성 산소생성능을 조사한 결과 UHKB와 ECHB를 투여한 두 group 모두에서 최종 투여 후 1주 후에 판별지수 100% 이상의 증가된 활성을 보여주

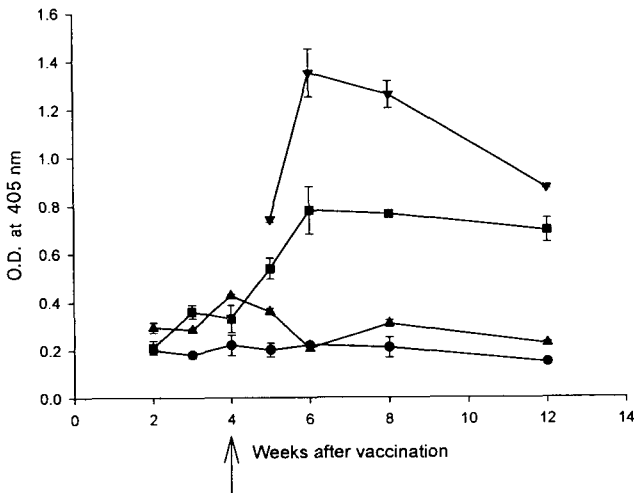


Fig. 3. A comparison of produced antibody concentration in the serum of flounder, *Paralichthys olivaceus*, after intraperitoneal injection or oral administration of different *V. vulnificus* bacterins. ▼, UHKB (i.p.); ■, UHKB (oral); ▲, ECHB (oral); ●, control. Each value is the mean of 5 fish. ↑, end point of oral immunization/start point of i.p. immunization.

었으며 실험 전 기간에 걸쳐 대조구에 비하여 평균 50% 이상의 차이가 관찰되어 유의성이 인정되었다 (Fig. 4). 그러나 UHKB와 ECHB를 투여한 두 group의 넙치에 *V. vulnificus* 생균 (1×10^8 CFU/kg b.w.)을 인위 감염시킨 후 어체내에서의 감염균 소멸율을 분석한 결과 UHKB를 투여한 실험구는 대조구에 비해 감염균을 650% 정도 더 많이 소멸시킨 것으로 나타나 780%의 소멸율을 나타낸 복강주사 group과 유사하게 나타났으나 ECHB를 투여한 group에서는 뚜렷한 감염균 소멸 효과를 관찰 할 수 없었다 (Fig. 5).

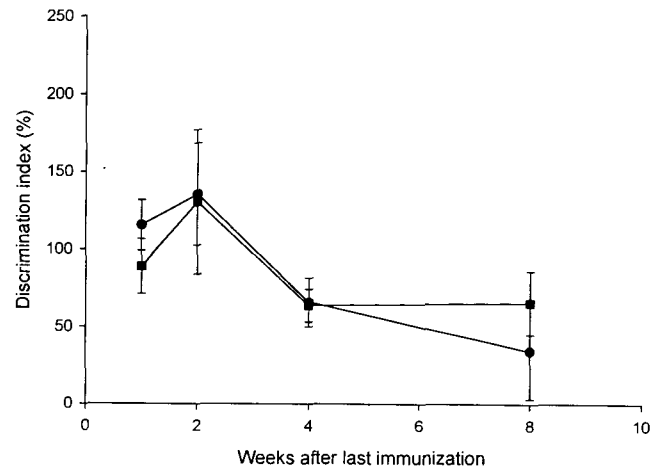


Fig. 4. The reduction of NBT by macrophages in the head kidney following last immunization of flounder, *Paralichthys olivaceus*, with different bacterins. ■, UHKB (oral); ●, ECHB (oral). Each value is the mean of 3 fish.

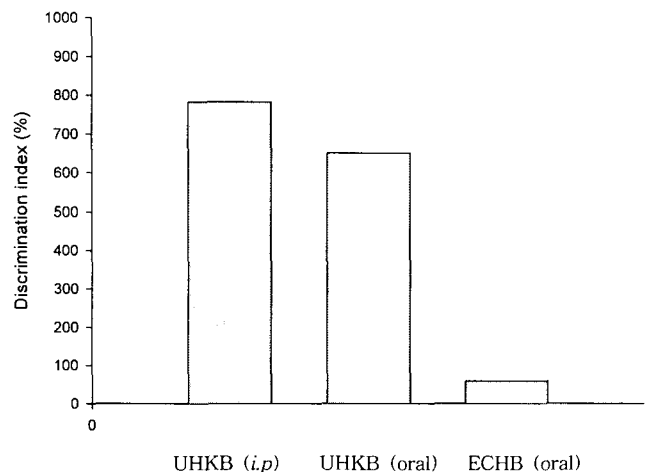


Fig. 5. Discrimination index for the changed numbers of *V. vulnificus* in the blood of flounder, *Paralichthys olivaceus*, vaccinated with different bacterins. Fish in each group were injected with 1×10^8 CFU/kg body weight after 3 weeks of the last vaccination. Each value is the mean of 3 fish.

고 찰

매년 여름에 발생하는 비브리오 패혈증은 수산물의 안전성을 위협하여 양식생물의 소비를 억제함으로써 양식어가의 소득을 억제하는 주범의 하나로서 인식되어 왔다. 그러나 비브리오 패혈증의 대책에 대한 방안은 여름철이면 어패류를 생식하지 않고 상처를 통한 기회 감염의 위험을 예방하는 지극히 소극적인 방법으로 일관됨으로서 비브리오 패혈증을 방지하는 계기가 되어왔다. 따라서 본 연구에서는 안정적인 수산물 공급을 위해서 비브리오 패혈증의 원인균인 *V. vulnificus*의 감염을 예방하기 위하여 *V. vulnificus* bacterin을 이용한 백신의 개발과 그 효능을 확인하는 실험을 실시하였다.

백신의 투여 기간과 농도를 달리하여 넙치에 20 mg/kg b.w.의 농도로 경구로 투여하였을 때 Fig. 1과 같이 혈청내 특이 항체의 검출은 4W의 실험구가 가장 좋은 결과를 보였지만 1-2-1W 실험구도 대조구에 비하여 좋은 항체생성효과를 보여 주어 투여 백신의 총양을 줄일 수 있는 투여 방법을 제시하고 있다 할 수 있다.

이러한 체액성 면역반응의 분석을 단일세포수준에서 보다 구체적으로 실시하기 위하여 항체 생성 세포 (antibody secreting cell)를 검출하고자 하였다. 항체 생성 세포를 검출하는 기법으로는 hemolytic plaque assay와 ELISPOT-assay 법을 이용한 방법이 있다. Hemolytic plaque assay를 이용한 방법은 잉어 (Rijkers et al., 1980), 미꾸라지 (Williams and Hoole, 1992), 무지개송어 (van Muiswinkel et al., 1985) 등에서 보고가 되어 있으나, natural haemoglobin에 대한 back ground가 크고 실험전에 미리 감각의 대상인 sheep red blood cell을 항원으로 coating 해야 한다는 실험상의 불편함, 그리고 정제된 2차 항체를 사용하지 않음으로 발생하는 back ground에 의하여 실험 data의 신뢰성이 부족하다는 점 때문에 현재는 항체와 항원, 효소와 기질의 특이적 결합을 이용한 ELISPOT-assay 법이 많이 사용되어 지고 있다. ELISPOT-assay 법은 Secombes et al. (1991)에 의해 어류에 적용되어지기 시작한 항체 생성 세포 검출 방법으로, 기존의 hemolytic plaque assay 보다 감도가 훨씬 뛰어나고 2차 항체를 이용함으로써 hemolytic plaque assay에서 발생하는 back ground의 문제점을 해소함으로써 현재 많이 이용되어 지고 있는 방법이다. 그러나 본 방법은 dab (Secombes et al., 1991), roach (Altonen et al., 1994), rainbow trout (Davidson et al., 1992), channel catfish (Waterstrat and Ainsworth, 1991) 등에서 적용한 예가 있으며 우리나라의 주요한 해산어 양식 어종인 넙치에서는 Ha et al. (1999)이 보고한 바 있다.

본 연구에서 UHKB를 농도와 투여 기간을 달리하여 넙치에 경구로 투여하였을 때, Fig. 2에서와 같이 가장 많은 항체 생성 세포가 검출된 실험구는 20 mg/kg b.w. 4W이었지만 혈청내 특이 항체 생성과는 다른 동력학적인 경향을 보여주었다. 이러한 결과는 Waterstrat et al. (1991)과 Altonen et al. (1994)의 보고에서와 같이 항체 생성 세포와 혈청내 특이 항체량의 변화가 정확한 비례 관계에 있는 것은 아니지만 궁극적으로 항체 생성 세포의 수를 단일 세포 수준에서 계측한다면 어체가 외부 항원에 의하여 반

응한 면역 상태를 판명할 수 있는 중요한 기준을 제공할 수 있을 것이다.

Fig. 1, 2에서와 같이 UHKB를 4 또는 8 mg/kg b.w.의 농도로 넙치에 투여하였을 때는 혈청내 특이 항체량과 항체 생성 세포 수의 검출 모두에서 대조구와 유의성있는 차이가 발견되지 않았다. 이러한 결과로 볼 때, 저농도의 *V. vulnificus* bacterin을 경구로 투여하였을 때는 B 세포를 항체 생성 세포로 분화시켜 혈청내 항체량 증가를 유도하기에는 미약한 것으로 나타났다.

경구투여한 백신의 효능을 최대화 할 수 있는 방안의 하나는 항원 즉 백신을 장용성으로 제작하여 장내에까지 안전하게 도달, 흡수되게 하는 것이다. Nagai and Fujino (1995)는 cellulose acetate phthalate microcapsule로 coating된 BSA를 뱀장어에 경구로 투여하여 uncoated 백신에 비하여 증가된 면역반응에 대해 보고한 바 있으나, 이후 Lillehaug (1989)가 acid-resistant film으로 coating한 비브리오 백신을 무지개송어에 경구 투여하여 그 효능을 분석한 결과 uncoated 백신에 비해 오히려 효능이 감소됨을 보고하여 Nagai and Fujino (1995)의 연구 결과와 상반되게 나타났다.

본 연구에서는 formalin 처리로 만들어지는 백신에 비하여 훨씬 편리하고 안전하며 또한 대량생산이 가능한 UHKB와 여기에 다시 hydroxypropyl methylcellulose phthalate를 사용하여 enteric coating 시킨 장용성 백신 (ECHB)을 넙치에 경구투여하여 그 효능을 비교하였다. 이때 ECHB에 함유되어 있는 항원자체의 양은 충분한 면역반응을 보이는 UHKB의 양보다 낮게 사용하여 면역반응의 증강을 보다 쉽게 보고자 하였다. 그 결과 UHKB와 ECHB를 각각 20 mg/kg b.w.와 40 mg/kg b.w.의 농도로 4주 연속 경구 투여하였을 때, UHKB를 투여한 실험구는 최종 투여 후 2주 째에 가장 많은 항체가 생성되어 8주 째까지 항체량이 유지되었으나 ECHB를 투여한 실험구에서는 Fig. 3과 같이 오히려 낮은 항체 생성을 나타내어 Nagai and Fujino (1995)의 결과 보다는 Lillehaug (1989)의 연구와 유사한 것으로 확인되었다. 이것은 아마도 ECHB를 과립 (granule)으로 한 본 연구의 제조 방법, coating에 사용했던 polymer, 항원의 종류, 투여대상 어종 등의 차이와 관련이 있는 것으로 추정된다.

외부 물질의 어체내 침입에 대한 어류의 초기 방어 기작에서, 활성화된 식세포는 방어력 증강에서 중요한 역할을 수행하게 된다. UHKB와 ECHB로 면역된 넙치의 두신에서 macrophage의 활성을 조사한 Fig. 4를 보면, 두 group 모두에서 최종 투여 1주 째부터 증강되어 8주 째까지 대조구에 비해 높은 활성을 나타내었다. 이러한 것은 최 (1998)가 β -1,3/1,6-linked glucan을 넙치에 경구로 투여하여 동일한 방법으로 macrophage의 NBT 환원능을 관찰하였을 때 7주 째까지 높은 활성이 나타났다고 보고한 것과 같은 결과를 나타내었다. 그러나 ECHB로 면역된 넙치에서 인위적으로 감염시킨 *V. vulnificus*의 소멸율에 있어서는 Fig. 5에서와 같이 대조구에 비해 유의성있는 차이가 없는 것으로 나타나 비 특이 면역반응의 증가와 함께 특이적 면역 반응의 증가가 상승적으로 작용할 때 더욱 뚜렷한 방어력의 증가로 이어지는 것으로 추정된다. 비록 명확하지는 않지만 ECHB를 투여한 실험구에서 macro-

phage의 활성이 증가된 것은 과립형태로 제작된 ECHB 자체의 입자 크기, coating에 사용된 polymer에 의한 직접적인 자극 등에 의하여 macrophage의 식작용이 증가되었을 수는 있을 것이다. 그러므로 lipopolysaccharide 등의 여러 형태의 백신 또는 장용성화를 위한 다른 polymer 등을 조합하여 이러한 효과에 대한 분석이 있다면 흥미있는 결과가 나올 수도 있을 것이다.

결론적으로 실험 전 기간에 걸쳐 UHKB의 경구투여 실험구에서 항체 생성이 높았고 백신 최종 투여 3주 후에 방어력 증강여부를 확인한 실험에 있어서도 대조구보다 훨씬 증강된 방어력을 보여주었으나 ECHB를 투여한 실험구는 항체량과 방어력 모두에서 UHKB에 비해 낮은 경향을 나타내었다. 향후 사람이 섭취하는 부위인 어류의 근육 내에서의 *V. vulnificus* 소멸에 대한 분석이 이루어져 사람의 건강 관리를 위한 백신의 직접적인 효능 확인이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

비브리오 패혈증의 원인균인 *V. vulnificus*에 대한 어류의 저항성을 증강시키기 위한 연구로써, 비브리오 백신이 경구로 투여된 넙치에서의 특이 또는 비특이적 면역반응을 조사하였다. 넙치에 대하여 UHKB (uncoated heat killed bacterin of *V. vulnificus*)를 20 mg/kg b.w.의 농도로 경구를 통하여 4주 연속 투여 (4W) 또는 1주 동안 투여하고 2주 동안 투여하지 않다가 다시 1주 동안 투여 (1-2-1W) 하는 두 가지 방법으로 실시한 후 형성된 혈청내 특이 항체량을 비교한 결과 1-2-1W group은 4W group에는 도달하지 못하였지만 명백히 증가된 특이 항체량을 보여주었다. UHKB를 1주일 2회씩 4주 연속 투여한 실험구가 최종 투여 후 2주째부터 가장 높은 항체량을 보여 주었고 이러한 경향은 전 실험기간 동안 계속 유지되었다. 이러한 실험 결과는 단일세포수준에서 분석된 특이항체 생성세포 (SASC) 수의 계측에서도 확인되었는데 백신의 최종 경구투여 후 1주째부터 대조구에 비하여 증가를 보인 실험구의 SASC 수는 최종 투여 후 8주째까지 유지되었다. 그러나 내산성으로 제조된 백신 (ECHB)은 *V. vulnificus*에 대한 항체생성 면역반응 그리고 인위 감염시킨 *V. vulnificus* (1×10^8 CFU/kg b.w.) 생균의 체내 제거능력 분석 양쪽 모두에서 UHKB에 비하여 낮은 결과를 보여 주었다. 그러므로 넙치에 경구 투여된 UHKB는 *V. vulnificus*의 오염을 억제 할 수 있는 효과적인 방법으로 확인되었으나 내산성으로 제조된 ECHB는 면역반응 증가를 유도하지 못하는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구 (1998-023-H00016)는 1998년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 수행되어졌습니다. 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Altonen, T.M., E.I. Jokinen and E.T. Valtonen. 1994. Antibody syn-

- thesis in roach (*Rutilus rutilus*); analysis of antibody secreting cells in lymphoid organs with ELISPOT-assay. Fish & Shellfish Immunol., 4, 129~140.
- Amoro, C., E.Z. Biosca and B. Fouz. 1995. Evidence that water transmits *V. vulnificus* biotype2 infection to eels. Appl. Environ. Microbiol., 61, 1133~1137.
- Blake, P.A., H. Merson and R.E. Weaver. 1979. Disease caused by a marnie *Vibrio*; clinical characteristics and epidemiology. N. Engl. J. Med., 300, 1~5.
- Davidson, G.A., A.E. Ellis and C.J. Secombes. 1992. An ELISPOT assay for the quantification of specific antibody secreting cells to *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis., 15, 85~89.
- Depaola, A., G.M. Casper and D. Alexander. 1994. Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from the U.S. Gulf Coast. Appl. Environ. Microbiol., 60, 984~988.
- Devi, S.J.N., U. Hayat and C.E. Frasch. 1995. Capsular polysacchride-protein conjugate vaccines of carbotype. 1. *V. vulnificus*: construction, immunogenicity, and protective efficacy in a murine model. Infect. Immunol., 61, 2906~2922.
- Earlix, D., J.A. Plumb and W.A. Rogers. 1996. Isolation of *Edwardsiella ictaluri* from channel catfish by tissue homogenation, filtration and enzyme linked immunosorbent assay. Diseases of Aquatic Organisms, 27, 19~24.
- Ha, J.Y., J.H. Park, M.S. Kim, J.K. Chung and H.D. Jeong. 1999. Study on the production and management of aquatic animal: application of ELISPOT-assay for the detection of antibody secreting cells in flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Korean Fish. Soc., 32, 420~426.
- Lillehaug, A. 1989. Oral immunization of rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), against vibriosis with vaccines protected against digestive degraditive degradation. J. Fish Dis., 12, 579~584.
- Nagai, A. and Y. Fujino. 1995. Application of enteric-coated microcapsule in oral administration of bovine serum albumin into eel. Fish. Sci., 61, 796~799.
- Oliver, J.D., L. Nilsson and S. Kjelleberg. 1991. Formation of non-culturable *Vibrio vulnificus* and its relationship to starvation state. Appl. Environ. Microbiol., 57, 2640~2641.
- Rijkers, G.T., E.M.H. Fredrix-Wolters and W.B. van Miuswinkel. 1980. The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (*Cyprinus carpio*). Immunology, 41, 91~97.
- Schneider, K.R., F.S. Steslow and F.S. Sierra. 1991. Ozone depuration of *Vibrio vulnificus* from the southern quahog clam, *Mercenaria campechiensis*. J. inverteb. Pathol., 57, 184~190.
- Secombes, C.J., A. White, T.C. Fletcher and D.F. Houlihan. 1991. The development of an ELISPOT assay to quantify total and specific antibody-secreting cells in dab *Limanda limanda* (L.). Fish & Shellfish Immunol., 1, 87~97.
- Stelma, G., A. Reyes and J. Peeler. 1992. Virulence characteristics of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. Appl. Environ. Microbiol., 58, 2776~2782.
- Sun, Y. and J.D. Oliver. 1994. Antimicrobiol action of some GRAS compounds against *Vibrio vulnificus*. Food Additives Contaminants, 11, 549~558.
- Tamplin, M. L. and G.M. Casper. 1992. Persistence of *Vibrio vulni-*

- ficus* in tissue of Gulf coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected with UV light. Appl. Environ. Microbiol., 58, 1506~1510.
- van Muiswinkel, W.B., D.P. Anderson, C.H.J. Lamers, E. Egberts, J.J. A. van Loon and J.P. Ijssel. 1985. In *Fish Immunology*, M.J. Manning and N.F. Tatner, eds. Academic Press, London, pp. 1~8.
- Waterstrat, P.R. and A.J. Ainsworth. 1991. Use of an ELISA-based assay for the detection of antibody-secreting cells in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). J. Fish Dis., 14, 669~675.
- Williams, M.A. and D. Hoole, D. 1992. Antibody response of the fish *Rutilus rutilus* to the metacystode of *Ligula Intestinalis*. Diseases of Aquatic Organisms, 12, 83~89.
- 박석돈. 1996. 비브리오 볼니피쿠스 감염증, 고려의학, 288pp.
- 정선식, 양한모, 이준행. 1989. *Vibrio vulnificus*의 패혈증의 예방을 위한 효과적인 살균 방법의 모색에 관한 연구. 살균적 osmotic shock 및 이에 관한 chelating agent의 강화 효과. 대한의학회지, 32, 272~282.
- 최종욱. 1998. 넙치의 면역반응에 대한 β -1,3/1,6-linked glucan의 투여 효과. 석사 학위 논문, 부경대학교, 59pp.

2001년 4월 25일 접수

2001년 12월 10일 수리