

## 계란난황항체의 *Edwardsiella tarda*에 대한 효능

김영대 · 오명주 · 정성주\*

전남대학교 수산생명의학과

Efficacy of Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) against *Edwardsiella tarda* Infection. Young-Dae Kim, Myung-Joo Oh and Sung-Ju Jung\*. *Department of Aquaculture Medicine, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea*

**Abstract** The present study evaluated effect of egg yolk immunoglobulin (IgY) from the hen immunized with *Edwardsiella tarda*. The purification of anti-*E. tarda* IgY was performed by polyethylene glycol (PEG). Purified IgY had heavy chain of 64 kDa and light chain of 27 kDa size. The IgY was instable against olive flounders digestive factors and artificially modulated pH 2 and 3. Nevertheless, some activity of IgY appeared in intestine. IgY was orally administered with viable *E. tarda* to the olive flounders and the efficacy of protection against *E. tarda* infection was evaluated. Orally administered IgY at a dose of 20 mg/fish delayed infection period of *E. tarda* cannulated at  $10^{6-8}$  CFU/fish to small size (30~40 g) and middle size (110~120 g) flounder. Moreover, orally administered IgY at dose of 20 mg/fish inhibited the penetration of *E. tarda* cannulated at  $10^8$  CFU/fish into the liver, kidney, spleen and gill via intestine. The fish orally administered with IgY showed increased survival rate. These results suggest that egg yolk containing anti-*E. tarda* IgY is effective in preventing edwardsiellosis.

**Key words :** Egg yolk immunoglobulin (IgY), *Edwardsiella tarda*, survival rate, efficiency

## 서 론

*Edwardsiella tarda*는 전 세계적으로 다양하게 양식되는 해산어류와 담수어류에서 에드워드병을 유발하는 원인균으로[4], 우리나라의 주요 양식 어종인 뱀장어와 넙치에서 그 피해가 연중 발생하고 있다. 에드워드병에 걸린 뱀장어는 지느러미와 복부가 붉게 변하고 신장, 간, 비장과 심장에 농양과 궤양 병소가 형성되는 특징을 보인다. 넙치의 경우 채색 흑화, 복부팽만, 탈장 등의 증상이 나타나며, 종묘 생산장에서 양성장애 이르기까지 거의 모든 크기의 연령군에 감염된다. 이 질병은 항생제와 화학요법제의 처리로 치료되고 있지만 내성균의 출현으로 그

문제점이 커지고 있다[1]. 또한 다양한 백신에 대한 몇몇 연구는 성공을 거두었지만 실용적 가치가 낮았기 때문에 에드워드병에 대한 효과적인 치료 방법은 여전히 요구되고 있다.

뱀장어에서 *E. tarda*[2,3]와 무지개송어에서 *Yersinia ruckeri*[5]에 대한 IgY의 경구투여를 실시하였으며, 모두 병원 세균에 대한 수동면역 효과를 나타내었다. 이러한 연구들은 IgY가 어병 세균에 대한 대책으로도 사용될 수 있다는 가능성을 시사해주고 있다. 본 연구에서는 생산한 IgY의 넙치 위에서의 안정성을 평가하고, *E. tarda* 감염에 대한 IgY의 효과를 감염실험을 통해 평가하였다.

\* Corresponding author

Phone: +82-61-659-3175, Fax: +82-61-659-3175

E-mail: sungju@chonnam.ac.kr

## 재료 및 방법

### IgY의 제작과 정제

넙치에서 분리된 *E. tarda* YSF-9805를 사용하여 닭에 2주 간격으로 총 5회 다리에 근육주사하여 면역하였고, Polson 등이 기술한 방법[6]에 따라 PEG법으로 IgY를 정제하였다. 정제한 IgY의 SDS-PAGE상은 Fig. 1에 나타내었다.

### 위에서의 IgY의 안정성

항체 투여는 사료 혼합물 400 mg당 IgY의 함량이 20 mg이 되도록 준비하였다. 넙치는 (110~120 g) 60 L 해수를 포함하는 수조에 7마리를 수용하였으며, 한 마리는 사료 공급 이전에 해부하여 위의 pH를 측정하였다. 나머지 6마리의 넙치는 FA-100으로 마취시킨 후 준비한 혼합물을 한 마리당 400 mg씩 cannulation 하였다. 혼합물 투여 후, 넙치는 매 시간 해부하여 위와 장을 적출하여 위의 pH를 측정하였고, 위와 장에서 IgY의 항체를 ELISA로 측정하였다.

### pH에 대한 안정성

IgY (pH 7.2)는 PBS (pH 7.5)와 1:10으로 희석하였으며, 이 때 pH가 2, 3, 4, 5와 6이 되도록 HCl과 NaHCO<sub>3</sub>로 맞추었다. 반응은 23°C에서 교반 배양하였으며, 매 시간 ELISA로 IgY의 항체를 측정하였다.

### 넙치 치어에서의 효능

감염 실험에 사용된 넙치 (30~40 g)는 60 L 해수를 포함하는 수조에 14마리씩 수용하였고, 8개의 수조를 준비하였으며, 수온은 23°C를 유지하였다. 항체는 사료 혼합물 400 mg당 IgY의 함량이 0, 4, 20

mg이 되도록 준비하였다. 준비된 혼합물의 투여는 넙치를 FA-100으로 마취시킨 후, 항체의 농도에 따라 2 수조씩 한 마리당 400 mg으로 각각 공격 감염 3시간 전에 cannulation하였다.

공격 감염에 사용된 *E. tarda*는 500 ml의 BHI broth에 20시간 동안 교반 배양한 후 원심분리 (1500×g, 5분)하여 멸균된 PBS에 부유하여 준비하였다. 준비된 *E. tarda*와 사료 혼합물 400 mg은 *E. tarda*의 농도가  $3.3 \times 10^8$  CFU/fish와  $5.7 \times 10^6$  CFU/fish로 각각 준비되었다. 준비된 혼합물은 같은 농도의 IgY로 투여된 2개의 수조에 대하여 항체 투여와 같은 방법으로 각각의 농도를 투여하였다.

IgY 혼합 사료의 추가 공급은 공격 감염 다음날부터 2일에 걸쳐 2차례 추가로 투여하였다. 또한 나머지 2개의 수조는 대조구로서 공격감염을 실시하지 않고, 상업사료 만을 실험구와 같은 방법으로 투여하였다. 16일 동안 생존률을 관찰하였으며, 죽은 개체는 해부하여 신장, 비장에서 균을 분리, 동정하였다.

### 넙치 성어에서의 효능

감염 실험에 사용된 넙치는 (110~120 g) 60 L 해수를 포함하는 수조에 10마리씩 수용하여, 4개의 수조를 준비하였다. 모든 실험은 넙치치어 실험과 같은 조건으로 실시하였으며, *E. tarda* 감염 농도는  $2.4 \times 10^8$  CFU/fish만으로 하였다. 공격감염 후 21일 동안 생존률을 관찰하였다.

### 조직 내 *E. tarda* 감염 수 측정

모든 실험은 IgY의 효능 실험과 같이 실시하였으며, 넙치는 (110~120 g) 40 L의 해수를 포함하는 수조에 6마리씩 수용하여 3개의 수조를 준비하였다. *E. tarda*의 감염 농도는  $2.4 \times 10^8$  CFU/fish로 하였다. 공격감염 후 3, 5와 7일째에 수조 당 2마리씩 취하여 아가미, 위, 간, 신장, 비장, 전장, 후장을 분리하였다. 분리된 장기는 PBS 1 ml에 희석하여 마쇄하였고, PBS로 연속적으로 한계희석한 후, SS agar (Difco, USA)에 농도별로 접종하고 집락을 계수하였다.

## 결 과

### 넙치의 위산에 대한 안정성

사료 공급 후 넙치 위의 pH 변화는 2시간째에 pH

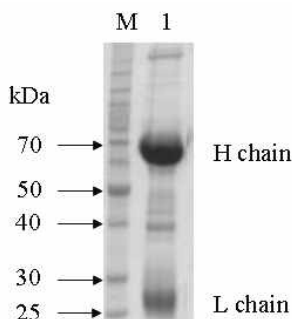


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of egg yolk antibody (IgY) purified by PEG (A) method. Heavy and light chains are indicated. M; Marker; lane 1, IgY 10  $\mu$ l.

3.4, 3시간째에 pH 2.4로 낮아졌으며, 그 이후로는 위의 사료가 모두 장으로 이동하였기 때문에 pH가 상승하였다. 위에서 IgY의 항체가 실험 결과 위의 pH가 3.4인 2시간째까지 IgY의 항체가 급속하게 낮아졌으며, 그 이후로는 거의 나타나지 않았다. 반면, 장에서는 처음 항체 투여시 보다 낮으나, IgY의 항체가 관찰되었다 (Fig. 2).

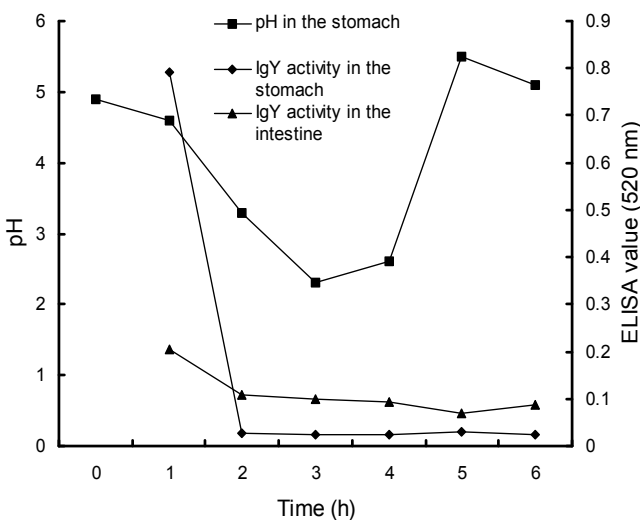
**pH에 대한 안정성**

정제된 IgY를 인위적으로 조절된 pH 2, 3, 4, 5와 6에 노출시킨 결과 IgY는 pH 4, 5와 6에서는 비교적 안정적이었으나, pH 2와 3에서는 낮은 ELISA 항체가를 나타내었다 (Fig. 3).

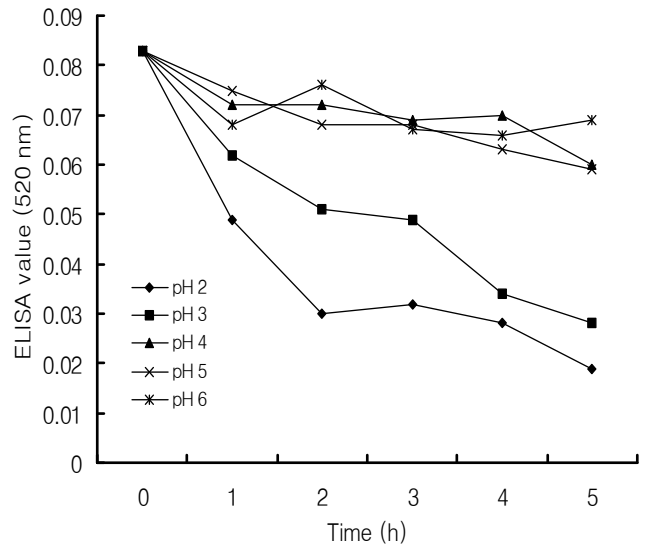
**넙치 치어에서의 효능**

평균어체중 30~40 g의 넙치에 IgY 함유 사료를 경구 투여한 결과 *E. tarda*를  $3.3 \times 10^8$  CFU/fish로 공격 감염한 실험구에서 20 mg의 IgY 투여구는 0 mg 투여구에서 보다 높은 생존율을 나타내었으며, 폐사 시기가 연장되었다. 그러나, 4 mg의 IgY 투여구는 0 mg 투여구와 생존율에 있어서 차이를 보이지 않았다. 또한, 공격감염 후 상당한 시간이 지난 15일 이후에는 모든 실험구에서 생존률의 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 4).

*E. tarda*를  $5.7 \times 10^6$  CFU/fish로 공격 감염한 실험구 역시 유사한 결과가 나타났으며, IgY 투여구에서 폐



**Fig. 2.** Changes of pH and IgY activity in digestive tract after feeding.

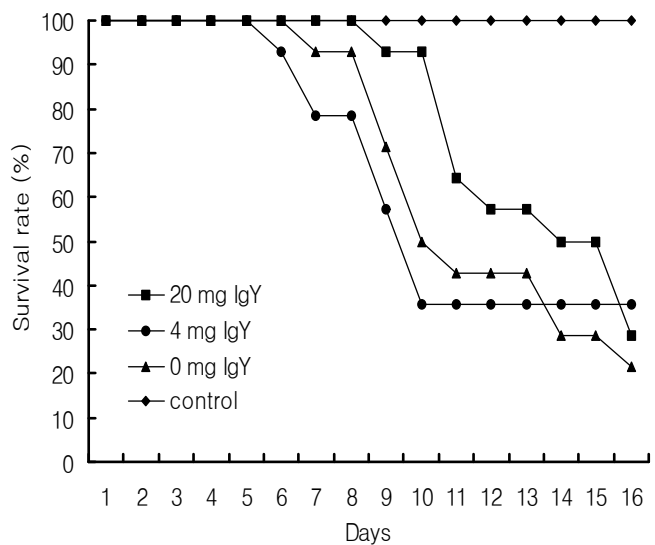


**Fig. 3.** Antibody stability following digestion with pH at 2, 3, 4, 5, 6 for 5 h at 23°C.

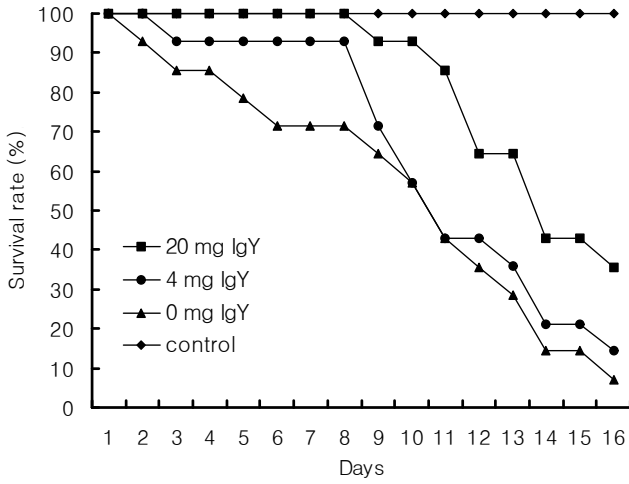
사시기가 늦춰지는 것을 확인하였다 (Fig. 5).

**넙치 성어에서의 효능**

평균 체중이 110~120 g 되는 넙치에 IgY 함유 사료를 경구 투여한 결과 20과 4 mg의 IgY 투여구는 0 mg 투여구에 비해 높은 생존율을 나타내었으며, 폐사시기 또한 연장되었다. 모든 실험에서 대조구는



**Fig. 4.** Survival rate for small size (30~40 g) flounder following challenge with live *E. tarda* at a dose of  $3.3 \times 10^8$  CFU/fish. Fish were passively immunized orally with mixed diet (400 mg/fish) containing 20, 4, 0 mg of IgY and control (0 mg of IgY, non-challenge), respectively.

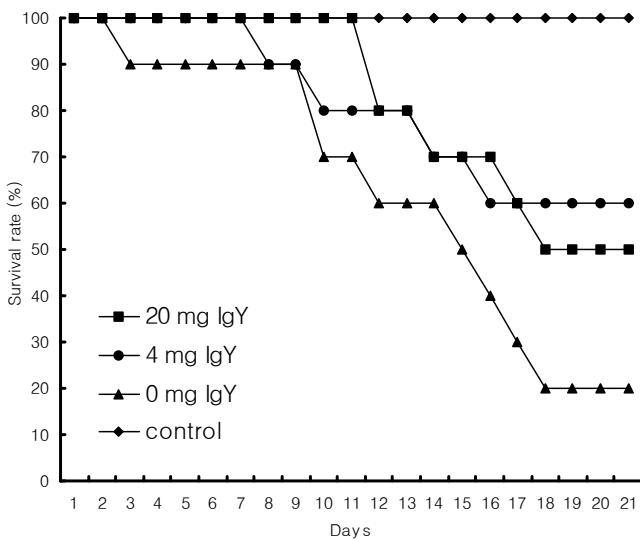


**Fig. 5.** Survival rate for small size (30~40 g) flounder following challenge with live *E. tarda* at a dose of  $5.7 \times 10^8$  CFU/fish. Fish were passively immunized orally with mixed diet (400 mg/fish) containing 20, 4, 0 mg of IgY and control (0 mg of IgY, non-challenge), respectively.

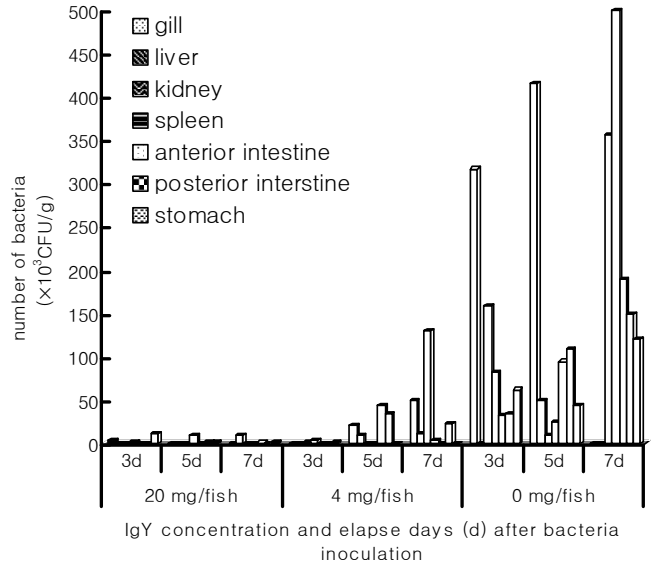
100%의 생존율을 보였다 (Fig. 6).

**조직 내 *E. tarda* 감염 수 측정**

*E. tarda* 감염의 확산에 대한 IgY의 역할을 알아보기 위한 조직 내 감염 수 측정 결과 20과 4 mg의 IgY를 투여한 넙치의 아가미, 간, 신장, 비장을 포함



**Fig. 6.** Survival rate for Middle size (110~120 g) flounder following challenge with live *E. tarda* at a dose of  $2.4 \times 10^8$  CFU/fish. Fish were passively immunized orally with mixed diet (400 mg/fish) containing 20, 4, 0 mg of IgY and control (0 mg of IgY, non-challenge), respectively.



**Fig. 7.** Survey of bacteria numbers in organs of olive flounder challenged with live *E. tarda* at a dose of  $2.4 \times 10^8$  CFU/fish after 3, 5 and 7 days. Fish were passively immunized orally with mixed diet (400 mg/fish) containing IgY of 20, 4 and 0 mg.

하는 모든 장기에서는 0 mg 투여한 실험구에서 보다 적은 수의 균이 검출이 되었다 (Fig 7). 이는 비록 낮은 농도이기는 하지만 장으로 이동한 IgY가 장을 경유하여 전신 감염을 일으키는 *E. tarda*의 감염 경로를 차단하는 것으로 보여진다.

**고 찰**

정제된 IgY를 어류에 경구 투여함에 있어서 가장 중요하게 생각되는 것들 중 하나는 위산에 대한 IgY의 안정성이다. Shimizu 등[7]은 IgY와 토끼 IgG에 대하여 pH, 열 등에 대한 안정성을 비교하였다. IgY는 pH 3.5에서부터 활성이 감소하였으며, pH 3에서는 완전하게 활성을 잃었으며, pH 12에서 역시 활성의 감소를 보고하였다. 본 연구에서 역시 IgY는 위산과 pH에 대하여 pH 3과 pH 2에서 대부분의 활성을 상실하는 것을 확인하였다. 이러한 IgY의 안정성 확보를 위해 이전에 보고된 어류 적용 연구에서는 IgY를 대량으로 공급하는 방법과 encapsulation 방법을 적용하였으나, 본 연구에서는 순수한 IgY의 적정량만을 적용하였다.

이전에 실시된 계란난황항체의 수동면역을 통한 어류 적용 연구는 뱀장어의 *E. tarda*[2], 무지개송어

의 *Y. ruckeri*[5]에서 보고되었다. Gutierrez 등의 보고 [2]에 따르면 정제된 IgY가 뱀장어의 소화액에 안정적이었으며, 경구로 공급된 400 mg의 IgY는 약  $10^{5-6}$  CFU/fish로 접종된 *E. tarda*를 24시간 안에 제거하였다. 또한 손상된 장을 경유하여 간과 신장으로 확산되는 *E. tarda*의 침투를 억제하여 폐사율을 감소시켰다. 이 연구에서 사용된 IgY의 농도는 0.93 mg/ml였으며, 응집항체가는 1:128이었다. Lee 등[5]은 위산에 대한 안정성을 위해 IgY를 encapsulation하였으며 경구로 투여된 50 mg의 IgY는  $10^8$  CFU/ml로 침지된 *Y. ruckeri*에 의한 폐사를 감소시켰다고 보고 하였으며 이때 IgY의 농도는 10 mg/ml였으며, 응집항체가는 1:32였다. 수동 면역에 의한 어류 질병의 치료에 있어서 항체의 응집항체가는 중요하게 작용될 수 있다. 본 연구에서 정제된 20 mg/ml의 IgY는 그 응집가가 512로 이들의 보고에서 보다 높았다.

현재의 연구에서 감염 실험 결과 어류의 크기에 상관없이 20 mg의 IgY를 투여한 실험구에서는 0과 4 mg 투여구에 비해 높은 생존율을 나타내었다. 그러나 공격감염 후기 (치어, 14일째; 성어, 18일째)에는 IgY 투여구 역시 50%이하로 생존율이 낮아졌다. 이는 IgY의 공급과정에 있어서 스트레스를 최소화하고자 감염 초기에만 3차례 공급을 실시하였기 때문으로 사료된다. 실험실 조건에서 어류의 자발적인 먹이 섭이 활동은 매우 중요한 요소이나, 모든 어류에 대한 일괄적인 IgY의 공급 또한 고려되어야 한다. 그러므로 어류에 IgY를 공급하기 위한 cannulation법은 좋은 자료를 얻기 위한 효과적인 공급 방법이었다.

비록 본 연구에서 IgY는 위산에 의해 활성이 낮아진 상태로 장으로 이동하였으나, 조직 내 *E. tarda* 감염 수 측정 결과 IgY 투여구는 IgY를 투여하지 않은 실험구에서 보다 모든 장기에서 적은 수의 균이 검출되었다. 이는 IgY가 장에서 *E. tarda*의 감염을 분명하게 차단하여, 폐사시기를 상당기간 연장시키는 것을 보여주는 좋은 근거이다.

현재의 연구에서 정제된 IgY의 효능은 이전에 보고된[2,5]효과만큼 우수하지는 않았다. 이는 IgY의 양적인 측면과 안정성 확보에 있어서의 차이로 생각된다. Lee 등은[5] 위산에 대한 IgY의 안정성 확보를 위해 microbial transglutaminase (Ajinomoto Co. Ltd., Japan)을 사용하여 microencapsulation을 실시하였다. 이 보고에 따르면 microencapsulation된 IgY는 pH 2

에서 2시간 이상 안정하였으며 항체 활성을 유지하였다. 또한, Shimizu 등은[8] egg lecithin/cholesterol liposome을 이용하여 탈수-재수화 방법으로 IgY를 encapsulation 하였으며, 소화관에서의 안정성을 보고하였다. 이러한 IgY의 소화관내에서 안정성 확보는 IgY의 단백질 변성과 불활성을 막음으로서 경구 투여에 있어서 IgY의 효과를 증대시킬 것이다.

앞으로의 연구는 넓치에 감염을 일으키는 *E. tarda*에 대한 IgY의 효능을 증가시키기 위한 지속적인 IgY의 투여에 따른 연구와 위산에 대한 IgY의 안정성 확보를 위한 encapsulation 등의 연구가 요구 된다.

## 요 약

어류의 세균성질병 원인체인 *Edwardsiella tarda* 감염의 예방과 치료에 *E. tarda*로 면역한 계란으로부터 얻어진 난황항체 (IgY)의 잠정적인 사용을 평가하였다. PEG법으로 정제된 IgY는 64 kDa의 heavy chain과 27 kDa의 light chain을 가지고 있었다. IgY는 사료 공급 후 위의 pH가 3.4로 낮아지는 2시간째에는 대부분의 활성을 상실하였으나, 장내에서는 IgY의 활성이 나타났다. IgY의 효능 실험 결과 감염 초기에 IgY를 20 mg/fish로 공급한 그룹은 모든 실험에서 대조 그룹에 비해 높은 생존율을 나타내었으며, 장기 내에서 균의 감염 정도 역시 낮았다. 그러나 감염 후기에서는 생존율에 있어서의 유의적인 차이를 확인하기 힘들었다. 이는 넓치의 위에서 대부분의 IgY가 활성을 잃어 낮은 농도만이 장으로 이동하기 때문일 것으로 사료되며, 이 농도에서 IgY는 *E. tarda*에 대한 뚜렷한 예방이나 치료의 효과 보다는 감염시기를 어느 정도 연장시키는 역할을 하는 것으로 추정된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 연구비(KRF2001-041-H00007)에 의하여 지원되었음.

## 참 고 문 헌

1. Aoki, T., Arai, T. and Egusa, S. 1977. Detection of R plasmids in naturally occurring fish pathogenic bacteria, *Edwardsiella tarda*. *Microbiol. Immunol.* **21**, 77-83.
2. Gutierrez, M. A., Miyazaki, T., Hatta, H. and Kim, M.

1993. Protective properties of egg yolk IgY containing anti-*Edwardsiella tarda* antibody against paracolo disease in the Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel. *J. Fish Dis.* **16**, 113-122.
3. Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M., Yamamoto, T. and Ebina, T. 1993. Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 1077-1081.
  4. Kusuda, R. and Salati, F. 1993. Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Ann. Rev. Fish Dis.* **3**, 69-85.
  5. Lee, S. B., Yoshinori, M. and Roselynn, M. W. 2000. Effects of hen egg yolk immunoglobulin in passive protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 110-115.
  6. Polson, A., Von Wechmar, M. B. and Van Regenmortel, M. V. H. 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Invest.* **9**, 475-493.
  7. Shimizu, M., Nagashima, H., Sano, K., Ozeki, M. Tsuda K. and Hatta, H. 1992. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 270-274.
  8. Shimizu, M., Miwa, Y., Hashimoto, K. and Goto, A. 1993. Encapsulation of chicken egg yolk immunoglobulin G (IgY) by liposomes. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1445-1449.