

β-용혈성 *Streptococcus iniae* 불활화백신의 넘치에 대한 효능 평가

문진산* · 장 환 · 김지연 · 조성준 · 김민정 · 손성완

국립수의과학검역원

(계재승인: 2007년 8월 30일)

Evaluation on efficacy of β-hemolytic *Streptococcus iniae* vaccine on olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Jin-San Moon*, Hwan Jang, Ji-Yeon Kim, Seong-Joon Joh, Min-Jeong Kim, Seong-Wan Son

National Veterinary Research and Quarantine Service, MAF, Anyang 430-824, Korea

(Accepted: August 30, 2007)

Abstract : Olive flounder, *Paralichthys olivaceus* is one of the most important cultured fish in Korea, its farming has been negatively impacted by viral, bacterial and parasitic diseases. Streptococcal infection was considered as a serious problem because of significant economic losses in olive flounder farm industry. The development and evaluation of vaccine for protection against infection by this agent were required. We evaluated the safety and efficacy of β-hemolytic *Streptococcus (S.) iniae* vaccine on olive flounder. Three hundreds of flounders (weight 119.8 ± 20.7 g, body length 22.6 ± 1.4 cm) were reared in 0.5 tons aquaria in land-marine tank system. Seawater was provided from the sea of Incheon in Korea, and water temperature was set to 22°C and 25°C in the vaccination and challenge test, respectively. We used the formalin-inactivated β-hemolytic *S. iniae* (F2K) vaccine (M VAC INIAE; Kyoritsu seiyaku, Japan) originated in Japan. The vaccine was intraperitoneally administered to fish. Both of vaccinated group and control group were challenged with intraperitoneally injection by virulent *S. iniae* SI-36 isolates with 1.0×10^7 CFU/fish at 3 weeks after vaccination. Difference on mortality of control and vaccinated group (90.0 and 15.0%, 76.5 and 8.0% respectively) at two trials were found significant ($p < 0.05$), and relative percent survival were 83.4% and 89.5%, respectively. The dead fishes were showed dark pigmentation of skin, abdominal extension, hemorrhagic ascites, and liver necrosis, and isolated the *S. iniae* strain from ascites, liver and kidney. We confirmed the safety and efficacy of β-hemolytic *S. iniae* vaccine by determinations of the optimal management condition and artificial challenge test in olive flounder.

Key words : olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Streptococcus iniae*, vaccine

서 론

어류에 대한 양식이 전세계적으로 확대되고 있는 가운데 국내에서도 1965년부터 어류양식이 시작된 이래 해수 어종에서는 넙치, 돔 등이, 담수어종에서는 뱀장어, 송어류 등이 주로 사육되고 있다. 국내 어류 양식 생산량은 해마다 지속적으로 증가하고 있으며, 2005년 양식 수산물의 총생산량은 104만톤이었고 생산금액은 1조 3,483억원이

었다. 이 중 넙치는 양식어류 총생산량 대비 49.2%(약 4만톤), 3,535억원으로 생산금액의 26.2%를 차지하여 생산량과 부가가치가 양식어류 중 가장 높은 어종이다 [12].

그리하여 양식 사육 규모가 점차적으로 대형화되고, 사육환경 변화 등에 의한 어류의 질병 양상도 다양해지고 발생율도 해마다 증가하고 있는 추세이다. 또한, 감염된 어류는 감염초기에 식욕감퇴로 인해 사료 섭취량이 급격히 감소하기 때문에 사료에 항생제를 첨가하여 사

*Corresponding author: Jin-San Moon

National Veterinary Research and Quarantine Service, MAF, Anyang 430-824, Korea
[Tel: +82-31-467-1735, Fax: +82-31-467-1740, E-mail: moonjs@nvrqs.go.kr]

용할 경우 치료에 한계가 있다 [9, 14]. 특히, 최근에는 항생제 오·남용에 의한 내성균 출현증가에 따른 치료 효율 저하 및 항생제 오·남용 방지를 위한 항생제 사용량 감소 요구에 의하여 기존의 약물에 의한 치료위주의 방역대책에서 질병 예방을 위한 백신 개발의 필요성이 제기되고 있다 [8].

한편, 노르웨이 등 북유럽 수산 선진국에서는 1990년 초부터 항생제의 사용을 과감히 줄여나가고 백신으로 이들 질병을 통제하고 있다. 현재 노르웨이, 영국, 미국, 캐나다, 일본 등에서는 은어 및 연어과 어류, 찬넬메기, 참돔, 방어 등 주로 양식어종에 대해서 비브리오 백신 등 다양한 종류의 백신이 개발되어 시판되고 있다 [1, 5, 10].

*Streptococcus(S.) iniae*는 전 세계의 다양한 어종에 패타 용혈성 연쇄구균증을 유발하는 전염성 질병의 원인체로서 병원성도 비교적 강하여 이로 인한 경제적 손실이 높은 병원체로 알려져 있다. 양식 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 연쇄구균증 감염에 대한 최초 연구보고는 Nakatsugawa [22]에 의해서 *S. iniae*로 보고 되었으며, 감염된 넙치는 체색변화, 안구이상(백탁, 출혈, 돌출), 아가미 퇴색, 출혈이 나타나며, 중증어에서는 복수의 저류에 의한 복부 팽만, 신장과 비장의 종대와 더불어 폐사된다. 국내에서 이 질병은 해수 어류 양식장에서 대체로 수온이 18°C 이상으로 상승하는 6월에서부터 10월까지의 고수온기에 주로 집단적으로 발병하여 50% 이상의 급성 폐사 또는 만성 폐사를 일으킨다 [3, 6, 7, 13, 14].

이렇게 양식 넙치의 질병 문제, 치료에 있어서 항생제 내성 증가, 내성전이에 의한 안전성의 불확실성, 국내에서 양식넙치가 차지하는 생산 규모나 경제규모 그리고 고품질의 안전수산물에 대한 소비자들의 욕구 등 다각적인 차원에서 볼 때 양식 넙치의 예방백신 사용은 매우 절실한 실정이다 [9].

그리하여 국내에서는 2003년과 2006년에 넙치 에드워드병과 연쇄구균증 백신이 각각 승인된 바 있으며, 향후 수산시장 확대로 어류백신 검정 수요증가가 예상됨에 따라 어류백신의 안전성, 효능, 및 안정성 등에 대한 전문적인 검정체계 구축이 필요하다. 어류백신 검정시에는 세균, 바이러스, 기생충에 의한 질병, 부적절한 사육환경, 폐사 등으로 인한 검정성적의 오차 발생을 방지하기 위한 적절한 사육 및 체계적인 질병관리가 수반되어야 할 것이다.

따라서 본 연구에서는 실험실 조건에서 넙치 연쇄구균증 백신의 안전성 및 유효성 평가를 위한 적절한 사육조건을 설정하고, 일본에서 이미 승인되어 널리 사용되고 있는 베타용혈성 연쇄구균 백신을 이용하여 국내에 존재하는 베타용혈성 *S. iniae*에 대한 방어능력을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

실험어

실험어로는 2007년 1월과 3월에 제주도 넙치 양어장에서 어체의 체중이 124 ± 23.3 g(체장 22.3 ± 1.5 cm)와 113.8 ± 32.1 g(체장 23.0 ± 3.8 cm)인 것을 2회에 걸쳐서 300수 정도를 구입하여 액화산소를 채운 비닐 팩 25 리터 용량에 20수씩을 넣어서 이송하여 실험에 사용하였다. 구입된 넙치는 *S. iniae* 균에 대한 항체가 없고 사료 섭취, 체중, 유영 등 임상적으로 건강한 것으로서 구입 전 1개월까지 항균물질 등 시험에 영향이 있는 물질을 투여하지 않고, 2주일간의 예비사육기간 중에 폐사가 나타나지 않은 개체를 선별하였으며, 기생충 구제를 위하여 포르말린으로 처리한 다음 실험에 사용하였다.

사육조건과 사육관리

시험용 수조는 원형의 500리터 용량의 FRP 수조를 사용하여 시험구당 40마리씩 수용하였으며, 해수 순환 여과식 및 저수식으로 관리하였다. 저수식은 1일 2회 해수를 250리터 전체를 교환해주는 방식으로 0.5톤 크기의 수조 5개와 2.0톤 크기의 1개 수조를 갖추었으며, 순환여과식은 0.5톤 5개와 2.0톤 1개로 구성되어 있으며, 미생물여과조와 자외선 살균장치, 단백질 등 유기물 제거를 위해 스키머(삼지테크)를 설치하였다. 또한 수조에 산소 공급을 위하여 수조당 4개의 전기기포 발생기를 설치하였으며, 수온은 가온 히터를 사용하여 조정하였다. 사육수는 인천 연안부두의 자연해수를 이용하였으며, 자연수 여과는 20 µm 프리필터를 사용하였다. 사육수온은 백신 투여 후부터 공격 전일까지는 22°C로 유지하였으며, 그리고 공격 접종 전일부터는 25°C로 설정하였다. 사육수의 염도, 용존산소(DO)는 Multi water quality analyzer CX-742(Sechang instrument, Korea) 기기로 매일, NH₃-N, NO₂-N 농도는 매주 1회 Multi parameter photometer C-200(Hanna instruments, Italy)기기를 이용하여 측정하였다. 넙치 사료는 상염용 EP(extrusion pellet) 사료(Woosung, Korea)를 넙치 체중의 1% 정도의 양을 1일 2회 나누어 급여하였으며, 남은 사료가 있는 경우에는 수시로 제거해 주었다.

실험백신 접종 및 항체가 측정

실험 백신으로는 일본에서 상용화되고 있는 베타용혈성 연쇄구균(*S. iniae* F2K) 불활화백신(M VAC INIAE; Kyoritsu seiyaku, Japan)을 사용하였다. 대조 약제로는 멸균된 PBS(Phosphate Buffered Saline, pH 7.4)를 사용하였다. 역가시험을 실시할 경우에 백신과 PBS는 넙치 복강 내에 0.1 ml를 주사하였으며, 안전성 시험을 실시할

경우에는 백신 권장량의 2배를 접종하였다. 혈중 항체가를 조사하기 위하여 백신전후에 각 실험구에서 5마리를 선발하여 미정맥에서 채혈하여 혈청을 분리한 다음 응집반응을 실시하였다. 즉, 96 well microplate well (Corning, USA)에서 넘치로부터 분리한 혈청을 PBS로 단계 희석한 후 실험백신을 항원으로 사용하여 동량씩 반응시킨 후 24시간 후 응집괴 형성 유무를 관찰하여 판단하였다.

공격접종 균주 및 균주치사량(lethal dose; LD₇₀) 측정

본 실험에서 사용한 공격접종용 균주로는 제주도 연쇄구균증이 만연된 넘치 양식장에서 분리한 고병원성 *S. iniae*, SI-36 균주이다. 공격접종을 위하여 우선 동결 보존된 균주를 혈액배지에 접종하여 27°C 항온기에서 24시간 배양하였다. 그 후 배양된 균을 식염수로 부유시켜 수집한 다음 3,500 rpm에서 10분간 원심 처리(2회 반복)한 후에 상층액을 버리고 균을 식염수로 다시 부유시켜서 MaFarland standard No 5(1×10^9 CFU/ml)에 맞추어서 10배씩 단계 희석하여 Spectrophotometer에서 O.D 농도를 측정하고, Todd-Hewitt agar(Becton Dickinson, USA)에 배양하여 균수를 확인하였다. 10배씩 단계 희석(10⁹, 10⁸, 10⁷, 10⁶)액을 넘치의 복강에 0.1 ml씩 주사하여 14일간 누적폐사율을 조사하여 수온 25°C에서 넘치 폐사율 70% 이상을 나타내는 균주의 치사량(LD₇₀)을 측정하였다.

공격접종 및 결과 판정

백신군 및 대조군 실험어를 대상으로 LD₇₀이 설정된 공격균주를 50 ml 원심튜브에 분주한 후 수액세트와 자동연속주사기를 이용하여 복강내에 0.1 ml를 주사하였다. 공격접종이 완료된 백신군과 대조군 넘치를 각각 0.5톤 크기의 저수식 수조에 넣은 후에 25 ± 1°C 수온에서 사료 급여를 중단하면서 1일 2회 해수를 교환해주면서 2주 동안 임상증상 및 폐사 여부를 관찰하였다. 폐사된 넘치는 이차 오염을 예방하기 위하여 신속하게 수조에서 제거시켰다. 공격 접종 후 폐사어의 수를 기록하여

그룹별 폐사율을 조사하여 대조군의 누적폐사율이 최소 60%의 폐사율을 보일 때 아래 방정식에 따라 백신군의 상대생존율(Relative Percent Survival; RPS)을 산출하였다. $RPS(\%) = \{1 - (\text{백신군의 폐사율} / \text{대조군의 폐사율})\} \times 100$. 이때 폐사어는 전형적인 연쇄구균증 증상을 보이거나 공격접종균이 분리되어야 하며, 백신군의 상대생존율이 60% 이상일 때 백신의 방어효과가 있는 것으로 인정하였다. 그리하여 폐사된 넘치는 Todd-Hewitt agar를 사용하여 27°C에서 24-48시간 배양하였으며, 균의 발육을 확인한 후 혈액배지에서의 용혈성 소견과 *S. iniae* 항혈청과의 슬라이드 응집반응을 실시하였다.

자료의 정리 및 통계처리

실험어의 체중 및 길이는 평균과 표준편차로 표기하였고, 공격접종 균주의 넘치에 대한 균주 치사량(lethal dose; LD₇₀)은 Probit법을 이용하여 산출하였다 [20]. 또한, 백신군과 대조군 사이의 폐사율에 대한 유의성은 Student's *t*-test로서 $p < 0.05$ 의 수준에서 검증하였다.

결 과

시험기간 중의 사육수 상태

면역기간 중의 넘치 사육 수온은 22.0-22.5°C 내외였으며, 공격 실험후 2주간의 수온은 25.7 ± 0.4°C이었다 시험기간 중의 용존산소(DO)는 7.46-7.64 mg/l 범위였으며, pH는 8.16-8.25 범위였다. 염도(Salinity), NH₃-N, NO₂-N 농도는 어류 사육에 영향을 미치는 수치는 나타나지 않았으며 양호한 수질을 유지하였다(Table 1).

공격 접종균주의 LD₇₀ 설정

제주도 양식장에서 도입된 동일한 넘치를 대상으로 제주에서 분리한 공격접종 균주 의 병원성을 높이기 위하여 1×10^8 CFU/ml 배양액을 넘치의 복강내에 0.1 ml씩 주사하여 폐사어 또는 병변을 나타내는 어체의 신장으로부터 균을 재분리하여 3회 반복 어체 통과시험을 실시하였다. 그리고, *S. iniae* 배양액을 10⁹부터 10⁶까지

Table 1. Comparison on conditions of water quality

Items	Weekly changes of water quality				
	Period of vaccination			Period of challenge	
	1	2	3	4	5
pH	8.17 ± 0.02	8.25 ± 0.04	8.16 ± 0.02	8.23 ± 0.04	8.22 ± 0.03
DO (mg/l)	7.46 ± 0.25	7.54 ± 0.17	7.61 ± 0.18	7.61 ± 0.15	7.64 ± 0.12
NH ₃ -N (mg/l)	0.22	0.23	0.24	0.23	0.25
NO ₂ -N (mg/l)	0.28	0.27	0.27	0.29	0.26
Salinity (ppt)	30.7	30.4	30.8	30.2	29.9

10배씩 단계 희석하여 LD₇₀를 측정하기 위해서 10마리 넙치의 복강에 0.1 ml씩 주사하여 14일간 누적폐사율을 조사하였다. 그 결과 Table 2에서와 같이 1×10^8 CFU/fish 농도에서 접종 2일째부터 폐사하기 시작하였으며, 이 때 감염어는 체색흑화, 복수, 장탈, 안구 돌출 및 아가미 주변에 출혈의 순서로 임상 증상이 관찰되었다. 또한, 폐사어의 신장, 비장, 간, 복수에서 β -용혈성 균이 분리되었으며, 분리균주는 *S. iniae* 항혈청과의 슬라이드 응집반응에서 양성을 확인할 수 있었다. 넙치에 대한 공격적접종 균주의 LD₇₀ 농도는 1×10^7 CFU/fish(550 nm O.D 1.2)로 나타났다.

백신의 안전성 및 유효성 평가

안전성시험 결과 백신 권장 용량의 2배를 접종한 후 백신균을 비롯하여 대조군 모두에서 주사 후 2주 동안 이상반응 및 폐사는 발생하지 않았다. 실험종료 후에 생존 개체에 대하여 미생물학적, 그리고 병리조직학적 검사를 실시한 결과 특이 할 만한 변화는 관찰되지 않았다.

유효성시험 결과는 Table 3에서와 같이 대조군에서는 접종 2일째부터 장탈, 아가미 주변부위에 출혈 등의 임상 증상을 나타내면서 폐사가 관찰되어 12일까지 모두 25수가 폐사되어 누적폐사율이 62.5%를 나타내었다. 백신군에 있어서는 대조군과 유사한 증상을 나타내면서 접종 2일부터 9일까지 총 14수가 폐사되어 35.0%의 누적폐사율을 나타냄으로써 상대생존율은 44.0%로서 백신의 유효성을 판별하는 60%의 기준을 충족하지 못하였다. 하지만 동일한 실험어에 대하여 5주간의 순치기간을 둔 2차 실험에 있어서는 대조군 누적폐사율이 90.0%에 이르렀지만 백신군의 누적폐사율이 15.0%로서 대조군과는 유의적인 차이($p < 0.05$)를 나타냄으로써 상대생존율은 83.4%로 조사되어 백신의 유효성을 판별하는 60%의 기준을 크게 상회하였다.

MP(moist pellet) 사료에서 EP 사료로의 변경에 따른 백신의 유효성 차이를 확인하기 위하여 제주도의 양어장에서 EP 사료를 급여한 넙치를 추가적으로 도입하여 시중에서 구입한 EP 사료를 급여하면서 3주 정도의 순

Table 2. Minimum lethal dose of Olive flounder, *Paralichthys olivaceus* after intraperitoneally injection with *Streptococcus iniae* SI-36 strain

Concentration of inoculum (CFU/fish)	Cumulative death per day after challenge											Mortality (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12	14	
1.0×10^8	0	3	4	2	1	-	-	-	-	-	-	10/10 (100)
1.0×10^7	0	1	2	3	0	1	0	0	0	0	0	7/10 (70)
1.0×10^6	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	4/10 (40)
1.0×10^5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1/10 (10)

Table 3. Comparison of cumulative mortality and relative percent survival (RPS) of the formalin-inactivated β -hemolytic *Streptococcus iniae* vaccinated olive flounder, *Paralichthys olivaceus* introduced from farm reared with moist pellet feed after challenge with *Streptococcus iniae* SI-36 strain

Trial*	Period of adaptation	Treatment group	No. of daily dead fish by challenge** at 3 weeks after vaccination											Mortality (%)	RPS (%)
			1	2	3	4	5	6	7	8	10	12	14		
1st	3 weeks	Vaccinated	0	1	3	4	3	2	1	0	0	0	0	14/40 (35.0)	44.0
		Control (PBS)	0	1	4	6	4	3	2	1	2	2	0	25/40 (62.5)	
2nd	5 weeks	Vaccinated	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	3/20 (15.0)	83.4
		Control (PBS)	0	3	9	2	2	0	0	0	0	0	0	18/20 (90.0)	
3rd	3 weeks	Vaccinated	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2/25 (8.0)	89.5
		Control (PBS)	0	3	7	1	0	0	1	1	0	0	0	13/17 (76.5)	

* Olive flounder were purchased from fish farm reared with moist pellet (first and second trial) and extrusion pellet feed (third trial) in Jeju island

** Olive flounder were challenged with intraperitoneally injection by *Streptococcus iniae* SI-36 isolates with 1.0×10^7 CFU/fish at 3 weeks after vaccination

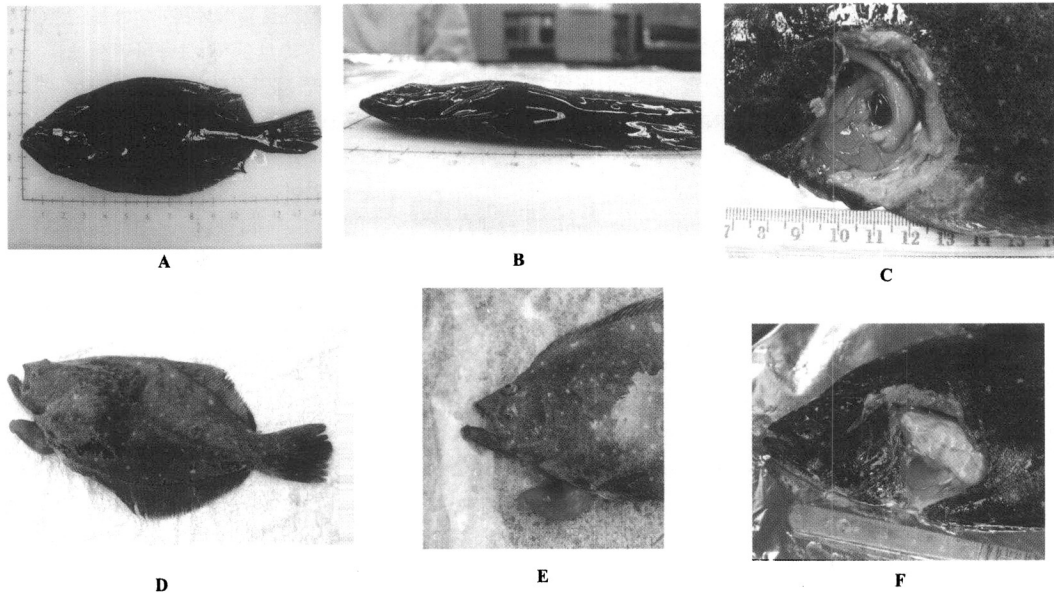


Fig. 1. Clinical signs, exterior and anatomical lesions of dead fish after challenge with virulent *Streptococcus iniae* SI-36 isolates. dark pigmentation of skin (A), abdominal extension (B), hemorrhagic ascites (C), hernia of intestine and abdominal extension (D), exophthalmia with opaque eye and facial hemorrhagic (E), and liver necrosis (F).

치기간을 거친 다음 백신의 유효율을 재평가하였다. 그 결과 대조군에서의 누적폐사율은 76.5%, 백신군에서의 누적폐사율은 8.0%로 나타냄으로써 상대생존율(RPS)은 89.5%로 조사되어 2차 시험의 결과와 유사한 양상을 나타내었다.

본 시험에서 대조군과 백신군을 포함한 모든 폐사어와 생존어에 대하여 임상증상 및 조직학적 소견, 그리고 균분리 여부를 조사하였다. 그 결과 대조군 폐사어의 대부분은 어체 병원성 획득 실험과 공격균주의 치사량(LD₇₀) 측정시험에서와 거의 유사하게 인공감염 2일째에 체색흑화를 보인 뒤 즉시 폐사하거나(Fig. 1A), 2일째부터 체색흑화 증상이외에 복수저류에 의한 복부 팽만, 장탈의 증상을 보인 다음 5일 이내에 폐사되거나(Fig. 1 B-D), 5일째부터 체색흑화, 복수, 장탈의 증상없이 안구 돌출과 안구 및 아가미 주변 부위의 출혈을 보이는 임상증상을 나타내면서 폐사되는 양상을 보였다(Fig. 1E). 그리고 전반적으로 인공감염 2-4일 사이에 높은 폐사율을 보이면서 7일 이내에 폐사하였으며, 연쇄구균증의 가장 큰 특징적인 임상소견은 복수저류에 의한 복부 팽만, 장탈로 조사되었다.

폐사된 어체에 대하여 부검 소견에서는 복수저류, 신장과 간 조직의 종대 및 괴사의 병리학적 증상을 관찰할 수 있었다(Fig. 1F). 또한, 폐사되거나 생존한 어체의 복수, 신장, 간, 비장 내용물을 Todd-Hewitt 한천 배지에 접종한 결과 모두에서 *S. iniae* 균이 배양되었으며, 혈액

배지에서도 베타용혈성 집락을 나타내었고, 혈청학적으로는 38(+)형으로 실험한 공격균주와 100% 일치하였다.

이에 반하여 백신군에 있어서 정상적인 유효율을 나타낸 경우에는 15% 이하의 폐사율을 보였으며, 이들은 모두 인공감염 3일부터 5일 사이에만 폐사되었고 그 이후에는 폐사되지 않았다. 또한, 임상증상도 복수저류, 장탈의 임상증상과 신장종대의 부검 소견만이 관찰되었으며, 폐사된 어체의 장기에서 동격 접종한 균주가 100% 분리되었다. 이러한 결과로 볼 때 어류검정 사육수조 환경하에서 1, 2차 시험군 모두 *S. iniae* 공격실험이 양호하게 진행되었고, 백신의 유효율을 판정함에 있어 실증적 뒷받침을 하고 있음을 확인할 수 있었다.

한편, 본 실험에서 실험어의 MP 사료에서 EP 사료로의 변동, 실험실에서의 순치기간에 의하여 백신의 유효율에 있어서 차이를 나타내어 이러한 원인을 규명하기 위하여 실험에 사용하고 남은 넘치 5마리를 대상으로 혈중 항체가를 비교 분석하였다. 그 결과, 백신전 모든 넘치에서 *S. iniae* 백신에 대한 특이항체가 생성되지 않았지만 정상적인 유효율을 나타낸 백신군의 대부분의 넘치에 있어서는 백신 후 3주 뒤에는 백신전과 대조군(2배 이하의 항체가)에 비하여 3단계 정도 높은 8배 이상의 높은 항체가를 나타내었다. 이에 반하여 1차 시험에서 백신의 상대생존율이 44.0%를 보인 실험군의 경우에는 2배에서부터 8배까지의 낮은 항체가를 나타내었다.

고 찰

양식 어류의 연쇄구균증은 세균성 질병 중에서 피해 규모가 매우 큰 질병으로서 사육어종이 다양하고 병원체가 기회감염성을 나타내어 숙주가 다양하다. 또한 숙주 특이성으로 인해 관련된 병원체가 비교적 다양하여 이 질병의 원인체로는 *S. iniae*, *S. parauberis*, *S. diffcilis*, *S. shiloi*, *Lactococcus garvieae*, *L. piscicum*, *Vagococcus salmoninarum* 등으로 보고되고 있다 [14-18, 21]. 그리하여 최근에는 *S. iniae*에 의한 연쇄구균증의 예방을 위하여 백신 개발 연구가 폭넓게 진행되어 2006년 하반기에 국내에서 처음으로 국내 제조회사에서 동물용 의약품으로 승인 받았으며, 2007년 상반기에는 수입 및 제조회사 3개 업체에서 이 백신을 승인받았다. 그리하여 이러한 백신에 대한 품질관리 차원에서 국가 검정이 필요한 실정이다.

일본에서 허가된 넙치 연쇄구균증 불활화백신과 참돔 이리도바이러스감염증불활화 백신 등 어류 백신의 효능을 평가하기 위한 검정법으로 대상 동물에게 침지 또는 복강 주사에 의한 공격접종법으로 상대생존율을 조사하고 있다 [4]. 국내에서도 넙치 에드워드병 백신에 대해서는 복강주사를 통한 공격접종법을 국가검정 기준으로 정하고 있다 [2]. 또한, 혈중 항체가의 개체 차이와 방어력과의 상관성이 낮아 혈청학적인 방법으로 판정하기 어려워 미국의 Code Federal Regulation, European Pharmacopoeia 및 일본의 국가검정 기준의 대부분이 공격접종에 의한 임상증상 방어율로 백신의 효능을 평가하고 있다 [4, 11, 19, 23]. 따라서 국립수의과학검역원에서는 이러한 국내의적인 상황을 고려하여 넙치 연쇄구균증 백신에 대한 국가검정기준을 마련하였다. 즉, 백신을 투여한 넙치를 대상으로 3주후에 복강주사에 의하여 공격접종을 실시하고 2주간의 관찰기간을 통하여 대조군과 백신군과의 상대생존율이 60% 이상일 때 백신의 유효성이 있는 것으로 설정하였다 [2].

따라서 본 실험에서는 이러한 국가검정방법에 기초하여 안전성 및 유효성 평가를 위하여 일본에서 이미 승인되어 널리 사용되고 있는 포르말린으로 처리된 메타용혈성 연쇄구균증 백신을 이용하여 2005년 9월 제주도 양식넙치 양식장 중 메타용혈성 연쇄구균증이 만연된 양식넙치에서 분리된 메타용혈성 *S. iniae* 균주에 대하여 실험실 수준에서 실제적인 방어력을 조사하였다. 우선 넙치의 복강에 시험백신의 권장 용량의 2배를 접종하여 2주 동안의 안전성 시험에서 백신접종에 의한 염증 증상 등의 이상반응 및 폐사는 발생하지 않아 백신으로서 안전성을 확인할 수 있었다.

또한, 시험백신의 방어력을 확인하기 위하여 제주도

의 양식장에서 MP 사료를 급여한 넙치를 22°C의 수온에서 저수식 사육시스템에서 사육하면서 넙치 상임용 EP 사료를 급여하면서 3주간의 순치기간 후에 백신을 접종한 다음 3주후에 공격시험을 실시하였다. 그 결과 PBS 투여 대조군에서의 누적폐사율이 62.5%를 나타내었지만 백신군에 있어서는 35.0%의 누적폐사율을 나타냄으로써 상대생존율은 44.0%를 보였다. 하지만 동일한 실험어에 대하여 5주간의 순치기간을 둔 2차 실험에 있어서는 상대생존율이 83.4%로 조사되었다. 그리하여 사료 변경요인에 따른 백신의 유효성 차이를 확인하기 위하여 EP 사료를 급여한 넙치에 대하여 3주 정도의 순치기간을 거친 다음 백신의 유효율을 재평가한 결과 상대생존율은 89.5%로 조사되어 본 실험에 사용한 백신이 넙치 면역계의 항원으로 인식하여 백신항원에 대한 일정 수준의 특이항체를 형성하여 60% 이상의 적절한 방어효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 조등 [8]이 국립수산과학원 병리연구팀에서 개발하여 산업체에 기술 이전한 연쇄구균증 불활화백신의 산업화를 위하여 녹십자수의약품(주)에서 제작한 시험백신을 사용하여 실험실 수준에서 위와 동일한 방법으로 조사한 방어효과 실험에서 제조후 0, 6, 12, 15개월을 보존한 백신에서 각각 83.0%, 62.5%, 72.0%, 75.0%의 상대생존율을 보인 성적과 유사하였다.

한편, 본 연구에서 실험어의 사료 급여의 변동에 따른 순치기간의 차이에 의하여 백신의 상대생존율에서 큰 차이를 나타내었는데 이러한 차이는 사료급여의 변동에 따른 stress와 더불어 사료 섭취 부족에 의한 영양상태 저하로 인하여 백신의 면역형성이 억제되어 방어력의 감소를 가져온 것으로 사료된다. 이러한 결과는 본 실험에서 백신전의 2배 이하의 낮은 항체가를 나타낸 넙치가 백신 후 3주 뒤에는 3단계 정도 높은 8배 이상의 높은 항체가를 나타내어 정상적인 방어효과를 나타내었지만 MP사료에서 EP사료로의 변경에 따른 stress를 받고 3주간의 순치기간을 가진 백신군의 넙치에서 2배에서부터 8배까지의 낮은 항체가를 나타내어 정상보다도 낮은 방어효과를 보인 사실을 뒷받침 해주는 좋은 결과로 사료된다.

본 연구에서 나타난 바와 같이 일본에서 *S. iniae* F2K 균주를 이용하여 백신제조에 사용한 메타용혈성 연쇄구균증 백신은 국내 넙치 양식장에서 분리된 *S. iniae* 균주를 이용한 공격접종시험에서 백신군이 대조군에 비해 메타용혈성 연쇄구균증의 발생 및 폐사율을 저하시킴으로써 백신의 유효성이 인정되었으며, 이러한 결과는 국립수의과학검역원의 어류검정시설이 백신의 유효성을 평가하는데 있어서 적절한 시설 및 사양관리시스템이 확립되어 있음을 간접적으로 제시해 주고 있다. 또한, 적

절한 어류 백신 검정을 위해서는 무엇보다도 건강한 넙치를 선별하여 사료 급이 및 사양관리에 있어서 stress를 최소화하고, 사육시설 및 환경 변화에 적응할 수 있는 적당한 순치기간을 둠으로써 면역력을 강화시키는 것이 필요할 것으로 판단된다. 향후에도 적절한 어류 백신 검정을 위해서 백신의 유효성에 영향을 미치는 다양한 실험 조건들을 고려한 지속적인이고 체계적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

넙치 연쇄구균 백신의 국가검정을 위하여 어류검정시설 및 사양관리 시스템을 완비하고, 일본에서 이미 승인되어 널리 사용되고 있는 베타용혈성 연쇄구균 백신과 국내 제주도의 넙치 양식장에서 분리한 *S. iniae* 균주를 이용하여 실험실 조건에서 연쇄구균 백신의 유효성을 검증하였다. 백신을 넙치 복강내에 면역 주사한 3주 후에 넙치의 복강내에 주사하여 공격시험을 실시한 결과 PBS 투여 대조군에서는 접종 2일째부터 체색흑화, 복부 팽만, 탈장, 아가미 주변 부위 출혈 등의 임상 증상을 나타내면서 폐사되어 대조군의 누적폐사율은 각각 90.0%와 76.5%였고 백신군의 누적폐사율은 각각 8.0%와 15.0%로서 대조군과 백신군의 누적폐사율에 있어서 유의적인 차이($p < 0.05$)를 나타내었다. 그리하여 상대 생존율이 각각 83.4%와 89.5%로서 유효성 판단의 기준인 60%를 매우 크게 상회하였다. 또한, 폐사된 넙치의 복수, 비장, 간, 신장에서 공격 집종균이 재분리됨으로써 백신 투여군이 대조군에 비해 *S. iniae*에 의한 베타 용혈성 연쇄구균증의 발생 및 폐사율을 저하시킴으로써 백신의 유효성이 인정되었다.

감사의 글

본 실험을 위하여 넙치 양식장으로부터 실험어와 공격집종 균주를 제공해 주신 제주대학교의 허문수 교수님과 베타용혈성 연쇄구균(*S. iniae* F2K) 백신을 제공해 주신 유한양행 관계자에게 감사를 드립니다.

참고문헌

1. 국립수산물품질관리원 어류방역센터. 백신개발 현황. 2005.
2. 국립수의과학검역원. 국가검정동물용의약품 검정기준. 2006.
3. 이창훈, 하동수. 양식 넙치의 연쇄구균증. 한국어병학회지 1991, 4, 71-77.
4. 일본 농림수산성 동물의학품검사소. 동물용생물학적 제제 검정기준. 2007.
5. 일본 농림수산성. 일본에서의 어류백신 등록 현황. 2005.
6. 전세규. 담수어의 연쇄구균증. 한국어병학회지 1989, 2, 31-35.
7. 정용욱, 강봉조, 박근태, 허문수. 16S-23S rRNA intergenic spacer region을 이용한 어류 병원성 *Streptococcus iniae*의 분자생물학적 동정. 한국어병학회지 2004, 17, 91-98.
8. 조미영, 이덕관, 이주석, 도정완, 김명석, 최미영, 김이청, 강보규, 윤용덕, 김진우. 넙치에 대한 β-용혈성 연쇄구균 불활화백신의 안전성과 효능. 한국어병학회지 2006, 19, 165-172.
9. 조미영, 이주석, 이덕관, 최희정, 김진우. β-용혈성 *Streptococcus iniae* 포르말린 불활화 사균 백신에 대한 넙치의 면역반응. 한국어병학회지 2006, 19, 73-82.
10. 中西照幸. 일본의 어병 대책과 백신개발 현황. 건강 어류 생산을 위한 어병 예방 및 치료 대책. pp. 167-185, 국립수산물진흥원, 부산, 2000.
11. 한명국, 이오수, 김재홍. 닭 전염성후두기관염 생독백신의 안전성과 효능. 대한수의학회지 2002, 42, 241-251.
12. 해양수산부. 어업생산통계연보. 2005.
13. 허문수, 송춘복, 이재희, 여인규, 전유진, 이정재, 정상철, 이기완, 노섬, 최광식, 이영돈. 제주산 양식넙치 (*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리된 β-용혈성 연쇄구균(*β-Streptococcus* spp.)의 특성. 한수지 2001, 34, 365-369.
14. Bercovier H, Ghittino C, Eldar A. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. Dev Biol Stand 1997, 90, 153-160.
15. Doménech A, Fernández-Garayzábal JF, Pascual C, Garcia JA, Cutuli MT, Moreno MA, Collins MD, Dominguez L. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. J Fish Dis 1996, 19, 33-38.
16. Eldar A, Bejerano Y, Bercovier H. *Streptococcus shiloi* and streptococcus difficile: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. Curr Microbiol 1994, 28, 139-143.
17. Eldar A, Ghittino C. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. Dis Aquat Organ 1999, 36, 227-231.
18. Eldar A, Horovitz A, Bercovier H. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Vet Immunol Immunopathol 1997, 56, 175-183.
19. European Pharmacopoeia Commission. Vaccines. In: European Pharmacopoeia. vol. 5.0. 5th ed. 2005.
20. Finncy DJ. Probit Analysis. 3rd ed. p. 333, Cambridge university Press, Cambridge, 1971.
21. Múzquiz JL, Royo FM, Ortega C, Blas ID, Ruiz I,

- Alonso JL.** Pathogenicity of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): dependence on age of diseased fish. Bull Eur Assoc Fish Pathol 1999, **19**, 114-119.
22. **Nakatsugawa T.** A streptococcal disease of cultured flounder. Fish Pathol 1983, **17**, 281-285.
23. **Office of the Federal Register National Archives and Records Administration.** Code of Federal Regulations: Animal and Animal products. pp. 587-715, Washington, 2002.