

뱀장어(*Anguilla japonica*)에 대한 *Edwardsiella tarda* 불활화 백신의 침지 및 경구 투여 효과

정승희[†] · 권문경 · 서정수 · 황지연
(국립수산과학원)

Effect of Immersion and Oral Vaccination using Formalin-killed *Edwardsiella tarda* against Eel *Anguilla japonica*

Sung-Hee JUNG[†] · Mun-Gyeong KWON · Jung-Soo SEO · Jee Youn HWANG
(National Fisheries Research and Development Institute)

Abstract

Edwardsiellosis has become a serious diseases problem in cultured eels for many years. This study was performed to investigate possibility of vaccination against edwardsiellosis caused by *Edwardsiella tarda*. We conducted a immersion and/or oral vaccination using formalin-killed *E. tarda* in eel *Anguilla japonica*. Three groups of fish (26.8±1.2 g, 7.1±0.7 g and 2.2±0.4 g) were used in this study. The protection (relative percentage survival, RPS) and serum antibody response (agglutination titer) were evaluated in the vaccinated fish. No correlation between agglutination titer and survival rate was observed in vaccinated fish. However, there was a satisfactory protective (RPS>50%) in vaccinated fish. Immersion (10 mg/mL, 1 hr) and immersion (10 mg/mL, 1 hr) plus oral (10 mg/g, 10 days) of 26.8±1.2 g, immersion (10 mg/mL, 1 hr) plus oral (10 mg/g, 10 days) of 7.1±0.7 g showed RPS of 62.6%, 52.2% and 56.8%, respectively.

Key words : Immersion, Oral, Formalin-killed vaccine, *Edwardsiella tarda*, *Anguilla japonica*, Eel

I. 서론

국내 뱀장어(*Anguilla japonica*) 양식은 2000년에 들어 실용적인 고밀도 순환여과식 시스템의 도입으로 안정적인 양식기술이 보편화 되었고, 뱀장어 전용사료 및 사료첨가제 등이 개발되면서 지속적으로 생산되어왔다. 하지만 실뱀장어 채포량 감소, 사료비, 유류비, 인건비 상승 등으로 양식비용이 증가하고 있어 양식경영에 어려움을 겪고 있다(Son Maeng Hyun et al. 2011). 이러한 현상은 지난 6년간 국내에서 뱀장어 생산량을 통해

가능할 수 있는데, 2008년 6,575톤, 2009년 6,766톤, 2010년 8,021톤, 2011년 7,257톤, 2012년 4,365톤, 2013년 5,217톤이었다(Ministry of Oceans & Fisheries 2014). 따라서 인공종묘생산 기술력을 확보하여 장기적으로 안정적인 종묘를 공급하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Kim Dae-Jung et al. 2013).

뱀장어 양식기술의 발달과 함께 양식 생산량에 커다란 영향을 미치는 요소는 실뱀장어 채포량의 변동에 따른 종묘 입식량과 여전히 문제시 되고 있는 질병으로 인한 대량폐사라고 본다.

[†] Corresponding author : 051-720-2470, immu@korea.kr

* 본 연구는 국립수산과학원(RP-2015-AQ-12)의 지원에 의해 운영되었음.

*Edwardsiella tarda*가 감염되어 발병하는 에드워드병(Edwardsiellosis)은 전 세계의 양식 해산어류와 담수어류에 있어 막대한 경제적인 손실을 초래하는 gram-negative, intracellular 병원체로 잘 알려져 있다(Xu, Tingting & Zhang, Xiao-Hua 2014). 국내 양식 뱀장어에 있어 만성적으로 질병을 일으키는 에드워드병은 어체의 크기 및 계절에 관계없이 연중 발생하고, 양만장의 사육조건 및 사육수의 변화로 인하여 발생시기가 일정하지 않아 언제든지 감염이 될 수 있는 고질적인 질병이었다(Park Soo-Il 1989). 2000~2010년까지 전국에서 가장 많은 양만장이 위치한 지역인 전라남도과 전라북도에서 사육하고 있는 뱀장어를 대상으로 병원체 감염현황을 조사하였더니 세균성 질병 가운데 *Edwardsiella* sp.에 의한 감염률이 가장 높았으며(Kim Wi-Sik et al. 2011), 에드워드병에 의한 피해율(29.39%)이 가장 높다고 보고되었다(Kim Jin Woo et al. 2012).

뱀장어의 에드워드병 발생을 예방하기 위하여 대만(Song Yen-Ling & Kou, Guang-Hsiung 1981)과 일본(Salati Fulvio et al. 1983, 1984; Salati Fulvio & Kusuda Riichi 1985, 1986; Salati Fulvio et al. 1991)에서는 수산용 백신으로 피해를 줄이는 기초 연구가 선행되었다. 선행 연구자들은 뱀장어에 *E. tarda*의 whole cells FK(C formalin-killed cells), LPS(lipopolysaccharide), crude LPS, pure LPS, lipid A의 다양한 항원을 제작하여 주사, 침지 및 경구 투여로 면역시킨 후, 응집항체가 조사와 *E. tarda* 공격에 따른 질병 방어력을 확인하였다. 국내에서는 뱀장어 에드워드병의 백신 개발을 위하여 FK(C, HKC(heat killed cells), crude LPS로 면역시킨 주사법(Park Soo-Il et al. 1993)에 관한 연구가 있을 뿐, 뱀장어 양식장에서 최근까지도 만연하고 있는 에드워드병의 예방 백신에 대한 연구는 매우 부족하다. 본 연구는 뱀장어 에드워드병의 효과적인 백신 개발에 대한 가능성을 찾고자, 에드워드균 불활화백신(FKC)을 제작한 후, 뱀장어에 침지와 경구 투여함으로써 특이

적 면역계(혈청 응집항체가)의 활성과 생균의 접종공격에 의한 방어력을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어류

전남 영광에 위치한 양만장에서 사육중인 뱀장어(*Anguilla japonica*)를 크기별로 구입하여 국립수산물연구원 내수면양식연구센터 생물사육실로 운반하였다. 이들은 200L FRP 수조(26±1°C)에 수용하여 시판 뱀장어용 분말사료를 반죽해서 제작한 사료를 1일 1회 공급하면서, 크기에 따라 평균체중이 26.8±1.2 g, 7.1±0.7 g 및 2.2±0.4 g의 3개 그룹으로 분류하였다.

2. 시험백신 제작

전남 순천의 양만장에서 질병으로 폐사한 뱀장어로부터 분리한 *Edwardsiella tarda*를 동결건조한 후 주식회사 대성미생물연구소에 분양하여 생산한 FK(C)를 시험 백신으로 사용하였다. 대성미생물연구소에서 제작한 시험 백신의 공정과정은 다음과 같다.

가. Seed 계대

1.5% NaCl이 첨가된 BHI agar(중류수 100 mL)에 동결건조한 종균(*E. tarda*)은 도말하고 30°C에서 26시간 정도 배양하였다.

나. Seed 배양

BHI agar에서 배양된 순수집락 2~3개를 선택하여 1.5% NaCl이 첨가된 BHI broth(중류수 1,000 mL)에 접종하고 30°C에서 26시간 정도 배양하였다. 배양된 종균은 API 20E 진단 Kit(BioMerieux, France)를 이용하여 *E. tarda*의 표준균주인 ATCC 15947을 대조균주로 각 형질의 반응도를 체크하여 생화학 특성의 상동성(4744000)을 확인하였다.

다. 본배양

본배양은 연구소 내 600 L 용량의 퍼멘터를

이용하여 배양하였는데, 사용 1일전에 퍼멘터를 세척한 후, 증류수 400 L를 채운다음 BHI broth를 14,800 g, NaCl 6,000 g을 넣고 배지가 충분히 녹을 때 까지 교반하면서 pH는 7.2로 맞추었다. 이어서 배양액을 121℃에서 15분간 증탕 멸균 후 배양액 온도를 낮추기 위해서 하룻밤 정치하였다. 다음날 배양액이 완전히 식은 것을 확인 후 seed 배양액을 본배양 배지량의 1%가 되도록 집중하고, 150 rpm속도로 교반하면서, 필터를 통해 산소를 공급하면서 36시간 배양하였다.

라. 배양액의 불활화

배양종료 후 배양액의 균수시험과 순수시험을 실시하기 위해 소량의 배양액을 무균적으로 채취한 다음, 배양균액에 포르말린 0.3% 농도를 첨가하여 12시간 이상 하룻밤 정치하며 불활화하였다.

마. 농축 및 원심

불활화 완료 후 1/10의 양으로 농축한 다음, 대용량 원심기를 이용하여 7,000 rpm에서 30분간 원심하여 침전 균체를 수거하였다.

바. Bulk 시험 및 보관

수거된 균체는 총량을 측정하여 기록한 다음 0.15% formalin첨가 PBS액에 넣어 bulk 상태로 보관하면서 상온화된 BL agar를 이용하여 불활화 유무를 확인하였다. 이때 보관은 5℃ 이내에서 냉장보관하였다.

사. 분병

Bulk상으로 보관 중인 *E. tarda* 불활화 항원을 상업용 면양혈청 평판배지에 도말한 후, 배양하여 균과 곰팡이의 배양여부 등을 통해 이상이 없음을 확인하였다. *E. tarda* 불활화 항원은 교반기를 이용하여 잘 희석한 다음, 0.15% formalin첨가 PBS액 1,000 mL당 항원습증량 200 g을 소분하고 봉전하였다.

아. 무균시험 및 방부제 정량시험

시험용 백신의 분병을 완료한 후, 백신을 이용

하여 무균시험 및 불활화 확인시험, 방부제 정량 시험을 실시하였다. 이때 무균시험 및 불활화 확인시험에 사용된 배지는 각각 10 mL의 nutrient agar, nutrient broth, fluid thioglycollate medium을 사용하였으며, 방부제 정량시험은 포르말린 함량 측정기를 사용하였다.

자. 출고

무균시험 및 불활화 확인시험, 방부제 정량시험을 통해 제품에 이상이 없음을 확인한 다음 시험백신으로 출고하였다.

3. 백신의 투여방법

가. 실험 설계 1

크기가 26.8±1.2 g 및 7.1±0.7 g인 그룹을 대상으로 백신의 용량과 투여방법에 따라 6개 실험구를 설정하였다(<Table 1>). 그룹별로 각 실험구마다 80마리씩 백신처리에 사용하였다. ① 백신 5 mg/mL 농도에 1시간 동안 침지 투여(immersion, 5 mg/mL), ② 백신 10 mg/mL 농도에 1시간 동안 침지 투여(immersion 10 mg/mL, 1 hr), ③ 백신을 사료 10 mg/g되게 조정하여 1일 1회, 10일간 경구 투여(oral 10 mg/g, 10 days), ④ 백신 5 mg/mL 농도에 1시간 동안 침지 투여한 후, 백신을 사료 10 mg/g되게 조정하여 1일 1회, 10일간 경구 투여(immersion 5 mg/mL, 1 hr + oral 10 mg/g, 10 days), ⑤ 백신 10 mg/mL 농도에 1시간 동안 침지 투여한 후, 백신을 사료 10 mg/g되게 조정하여 1일 1회, 10일간 경구 투여(immersion 10 mg/mL, 1 hr + oral 10 mg/g, 10 days), ⑥ 대조구(control)로 하였다. 침지 투여는 사육수 mL당 백신의 최종 용량이 5 mg과 10 mg이 되도록 FRP 수조에다 백신 원액을 현탁한 후에 실험어를 수 용하였으며 처리하는 동안 산소를 공급하였다. 경구 투여는 뱀장어용 분말사료 g당 백신의 최종 용량이 10 mg이 되도록 조정하였으며 매일 새롭게 만들어서 공급하였다. 대조구는 백신을 처리하지 않았다. 이들 6개 실험구는 백신처리가 완

료된 후, 별도 수조로 옮겨서 30일 동안 사육하면서 응집항체가 측정 및 공격접종에 의한 백신 방어효능을 조사하였다.

나. 실험 설계 2

크기가 2.2±0.4 g인 그룹을 대상으로 시험백신의 용량과 투여방법에 따라 4개의 실험구를 설정하였다(<Table 2>). 그룹별로 각 실험구마다 200마리씩 백신처리에 사용하였다. ① 백신 25mg/mL 농도에 30분 동안 침지 투여, ② 백신 25 mg/mL에 30분 동안 침지한 후, 2주째 백신 25 mg/mL에 30분 동안 침지, ③ 백신 25 mg/mL에 30분 동안 침지한 후, 백신을 사료 25 mg/g되게 조정하여 1일 1회, 4주 동안 경구 투여, ④ 대조구로

하였다. 침지 투여는 사육수 mL당 백신의 최종 용량이 25 mg이 되도록 FRP 수조에다 백신 원액을 현탁한 후에 실험어를 수용하였으며 처리하는 동안 산소를 공급하였다. 경구 투여는 뱀장어용 분말사료 g당 백신의 최종 용량이 25 mg이 되도록 조정하였으며 매일 새롭게 만들어서 공급하였다. 대조구는 백신을 처리하지 않았다. 이들 4개 실험구는 백신처리가 완료된 후, 별도 수조로 옮겨서 8주 동안 사육하면서 응집항체가 측정 및 접종공격에 의한 백신 방어효능을 조사하였다.

4. 응집항체가 조사

백신을 투여한 후 실험 1은 10일, 20일, 30일이

<Table 1> Vaccine methods on the size of 26.8±1.2 g and 7.1±0.7 g in eel, *Anguilla japonica* against *Edwardsiella tarda* FK

Vaccine mode (con.)	Vaccine treatment (N=80)
Immersion (5 mg/mL)	FKC 5 mg/mL of water for 1 hr
Immersion (10 mg/mL)	FKC 10 mg/mL of water for 1 hr
Oral (10 mg/g)	FKC 10 mg/g of feed for 10 days
Immersion (5 mg/mL) + Oral (10 mg/g)	(1st) FKC 5 mg/mL of water for 1 hr plus (2nd) 10 mg FKC/g of feed for 10 days
Immersion (10 mg/mL) + Oral (10 mg/g)	(1st) FKC 10 mg/mL of water for 1 hr plus (2nd) 10 mg FKC/g of feed for 10 days
Control	Not vaccinated

FKC : formalin-killed cell

<Table 2> Vaccine methods on the size of 2.2±0.4 g in eel, *Anguilla japonica* against *Edwardsiella tarda* FK

Vaccine mode (con.)	Vaccine treatment (N=200)
Immersion (10 mg/mL)	FKC 25 mg/mL of water for 30 min
Immersion (25 mg/mL) + Immersion (25 mg/mL)	(1st) FKC 25 mg/mL of water for 30 min plus (2nd) FKC 25 mg/mL of water for 30 min after 2 weeks
Immersion (25 mg/mL) + Oral (25 mg/g)	(1st) FKC 25 mg/mL of water for 30 min plus (2nd) 25 mg FKC/g of feed for 4 weeks
Control	Not vaccinated

FKC : formalin-killed cell

경과한 다음 실험구별로 10마리씩 미병부의 혈관에서 주사기로 채혈하여 상법에 따라 혈청을 분리하였으며, microtiter법으로 응집항체를 측정하였다. 실험 2는 4주째와 8주째 실험구별로 30마리씩 채혈(3~5마리씩 pooled)하여 실험 1과 같은 방법으로 응집항체를 측정하였다. 응집항체가 분석에 사용된 뱀장어를 제외하고 남은 실험어를 대상으로 접종공격 실험에 제공하였다.

5. 접종공격에 의한 방어력 조사

시험 백신이 방어력에 미치는 효과를 조사하기 위하여 실험 1은 백신을 투여한 후 30일째 실험구별로 그리고 실험 2는 백신을 투여한 후 8주째 실험구별로 예비 병원성 시험으로 얻어진 감염농도인 2.0×10^6 CFU/fish를 복강 내 주사하여 상대생존율을 조사하였다. 상대생존율(Relative percent survival, RPS)은 $RPS(\%) = [1 - (\text{백신 접종군 누적 폐사율} / \text{대조군 누적 폐사율})] \times 100$ 의 산출식으로 구하였다.

6. 통계분석

응집항체가의 분석 자료는 one-way ANOVA-test를 실시하여 유의적인 차이가 있으면, Tukey's multiple range test로 평균간의 유의성($P=0.05$)을 분석하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 응집항체가 조사

뱀장어 크기별로 백신 농도를 달리하여 침지법과 경구법으로 에드워드균의 불활화 예방백신(FKC)을 처리한 후, 혈청 내 응집항체를 조사함으로써 뱀장어에 면역이 처리되었는지 조사하였다. 실험 1(26.8 ± 1.2 g, 7.1 ± 0.7 g)은 30일이라는 비교적 짧은 기간 동안 투여한 경우이며, 6개 실험구별 백신을 처리하여 면역시킨 후 10일, 20일,

30일이 경과한 다음, 혈청 내 응집항체를 측정한 결과는 <Table 3>과 <Table 4>에 나타내었다. 26.8 ± 1.2 g 그룹에서는 모든 실험구에서 응집항체가의 유의적인 차이가 나타나지 않았다(<Table 3>). 7.1 ± 0.7 g 그룹에서는 백신처리 후 20일째에 침지(5 mg/mL) 실험구의 응집항체가는 $2^{5.0 \pm 0.6}$ 을 나타내어 유의적으로 높았으며, 30일째까지 $2^{4.8 \pm 0.7}$ 의 높은 값으로 유의적인 차이가 있었다(<Table 4>). 실험 2(2.2 ± 0.4 g)는 8주라는 비교적 장기간 동안 투여한 경우이며, 4개 실험구별 백신을 처리하여 면역시킨 후 4주, 8주가 경과한 다음, 혈청 내 응집항체를 측정한 결과는 <Table 5>에 나타내었다. 2.2 ± 0.4 g 그룹에서는 백신 처리 후 4주째에 침지(25 mg/mL)+경구(25 mg/g) 실험구의 응집항체가가 $2^{4.1 \pm 0.5}$ 를 나타내어 유의적으로 높았으나, 8주째까지 지속되지 못하였다. 반면에 침지(25 mg/mL)+침지(25 mg/mL) 실험구가 $2^{4.7 \pm 1.0}$ 의 유의적인 높은 값을 보였다(<Table 5>).

2. 공격접종에 의한 방어력 조사

뱀장어 크기별로 백신 투여방법과 농도에 따라 면역시킨 후 에드워드균에 대한 방어력을 조사하였다. 실험 1(26.8 ± 1.2 g, 7.1 ± 0.7 g)에서 백신투여 후 30일째 그리고 실험 2(2.2 ± 0.4 g)에서 백신투여 후 8주째 각각 2.0×10^6 CFU/fish로 에드워드균의 생균을 접종공격한 결과는 <Table 6>, <Table 7> 및 <Table 8>에 나타내었다. 26.8 ± 1.2 g 그룹에서는 침지(10 mg/mL) 실험구에서 상대생존율이 62.6%로 가장 높게 나타났으며, 침지(10 mg/mL)+경구(10 mg/g) 실험구는 상대생존율이 52.2%로 나타났다(<Table 6>). 7.1 ± 0.7 g 그룹에서는 침지(10 mg/mL)+경구(10 mg/g) 실험구가 상대생존율이 56.8%로 가장 높게 나타났다(<Table 7>). 2.2 ± 0.4 g 그룹에서는 침지(25 mg/mL)+경구(25 mg/g) 실험구가 상대생존율이 47.1%로 가장 높게 나타났다(<Table 8>).

뱀장어(*Anguilla japonica*)에 대한 *Edwardsiella tarda* 불활화 백신의 침지 및 경구 투여 효과

<Table 3> Serum antibody response of eel, *Anguilla japonica* (26.8±1.2 g) vaccinated by formalin-killed *Edwardsiella tarda*

Treatment group (n=10)	Average agglutination titer (log ₂)		
	10 days	20 days	30 days
Control	2.4±0.5	2.4±0.5	2.4±0.5
Immersion (5 mg/mL)	2.8±0.7	3.4±0.5	3.2±0.7
Immersion (10 mg/mL)	2.4±0.5	3.0±0.6	3.0±0.6
Oral (10 mg/g)	2.8±0.4	2.6±0.5	2.8±0.7
Immersion (5 mg/mL) + Oral (10 mg/g)	3.0±0.6	2.8±0.4	3.0±0.9
Immersion (10 mg/mL) + Oral (10 mg/g)	3.2±0.4	2.4±0.5	2.6±0.5

<Table 4> Serum antibody responses of eel, *Anguilla japonica* (7.1±0.7 g) vaccinated by formalin-killed *Edwardsiella tarda*

Treatment group (n=10)	Average agglutination titer (log ₂)		
	10 days	20 days	30 days
Control	2.6±0.5	2.6±0.5 ^a	2.6±0.5 ^a
Immersion (5 mg/mL)	3.8±0.4	5.0±0.6 ^{ab}	4.8±0.7 ^{ab}
Immersion (10 mg/mL)	3.4±0.5	3.6±1.0 ^a	3.4±1.0 ^a
Oral (10 mg/g)	3.0±0.6	4.0±0.6 ^a	3.6±1.0 ^a
Immersion (5 mg/mL) + Oral (10 mg/g)	2.8±0.4	3.6±1.0 ^a	3.4±0.8 ^a
Immersion (10 mg/mL) + Oral (10 mg/g)	3.2±0.7	3.4±0.8 ^a	3.8±0.4 ^a

<Table 5> Serum antibody responses of eel, *Anguilla japonica* (2.2±0.4 g) vaccinated by formalin-killed *Edwardsiella tarda*

Vaccinated group (n=30)	Agglutination titer (log ₂)	
	4 weeks	8 weeks
Control	2.8±0.4 ^a	2.8±0.4 ^a
Immersion (25 mg/mL)	3.3±0.5 ^a	3.5±0.5 ^a
Immersion (25 mg/mL) + Immersion (25 mg/mL)	3.3±0.8 ^a	4.7±1.0 ^b
Immersion (25 mg/mL) + Oral (25 mg/g)	4.1±0.5 ^b	3.4±0.7 ^a

<Table 6> Cumulative mortality (%) and relative percent survival (RPS) of eel, *Anguilla japonica*, challenged with 2.0×10⁶ CFU/fish of *Edwardsiella tarda* at the 4th weeks of post-vaccination against formalin-killed *E. tarda*

Vaccinated Group (26.8±1.2g, n=50)	Cumulative mortality (%)	RPS (%)
Control	67.4	-
Immersion (5 mg/mL)	64.1	4.8
Immersion (10 mg/mL)	25.2	62.6
Oral (10 mg/g)	58.5	13.2
Immersion (5 mg/mL) + Oral (10 mg/g)	65.1	3.4
Immersion (10 mg/mL) + Oral (10 mg/g)	32.2	52.2

<Table 7> Cumulative mortality (%) and relative percent survival (RPS) of eel, *Anguilla japonica*, challenged with 2.0×10^6 CFU/fish of *Edwardsiella tarda* at the 4th weeks of post-vaccination against formalin-killed *E. tarda*

Vaccinated Group (7.1±0.7g, n=50)	Cumulative mortality (%)	RPS (%)
Control	85.2	-
Immersion (5 mg/mL)	76.2	10.6
Immersion (10 mg/mL)	60.6	28.9
Oral (10 mg/g)	84.2	1.2
Immersion (5 mg/mL) + Oral (10 mg/g)	78.8	7.5
Immersion (10 mg/mL) + Oral (10 mg/g)	36.8	56.8

<Table 8> Cumulative mortality (%) and relative percent survival (RPS) of eel, *Anguilla japonica*, challenged with 2.0×10^6 CFU/fish of *Edwardsiella tarda* at the 4th weeks of post-vaccination against formalin-killed *E. tarda*

Vaccinated group (2.2±0.4 g, n=140)	Cumulative mortality (%)	RPS (%)
Control	91.5	-
Immersion (25 mg/mL)	64.6	29.4
Immersion (25 mg/mL) + Immersion (25 mg/mL)	75.4	17.6
Immersion (25 mg/mL) + Oral (25 mg/g)	48.4	47.1

IV. 고 찰

전 세계에서 양식 산업을 지속적으로 발전시키기 위해서는 질병의 발생을 막는 것이 필수적이며, 백신은 질병과 싸우는 가장 효과적인 방법으로 이미 유효한 백신이 상용화되었다. 어류에 백신을 투여하는 방법으로 주사(injection), 침지(immersion) 및 경구(oral)가 가장 보편적이지만, 주사백신은 효능 측면에서 침지와 경구에 비하여 월등히 우수하여 미국, 노르웨이, 영국, 캐나다, 일본, 한국 등 상용화된 백신을 접종하고 있는 나라에서 우위를 차지하고 있다 (Sommerset Ingunn et al. 2005; Brudeseth et al. 2013). 국외 수산용 백신은 노르웨이를 중심으로 유럽, 칠레, 미국, 캐나다, 일본에서 연어류에 대한 백신이 널리 상용화되었으며, 차벌메기, 무지개송어, 방어류, 농어, 참돔, 틸라피아에 대한 상업용 백신도 일부 시판되었다(Sommerset

et al. 2005; Takahashi et al. 2011; Brudeseth et al. 2013; National Fisheries Research & Development Institute 2014). 국내 수산용 백신은 지금까지 넙치의 연쇄구균병(*Streptococcus iniae*, *S. paraubaris*) 2종과 함께 에드워드병(*E. tarda*)을 예방하기 위하여 3종이 혼합된 주사백신(FKC)이 선도적으로 개발되어 상용화되었다(National Fisheries Research & Development Institute 2014). 현재 우리나라에서 생산하는 양식 어종의 종류는 다양하여 지금까지 개발된 넙치 중심의 백신에서 탈피하여 다양한 백신이 현실적으로 필요하다. 실험백신의 효능을 알아보기 위해서는 대상어종에서 면역 시스템의 발달을 파악할 필요가 있겠으나, 뱀장어의 면역 체계에 관해서는 거의 연구되지 못하였으므로 본 연구에서는 실험어를 3개 그룹(26.8±1.2 g, 7.1±0.7 g, 2.2±0.4 g)으로 설정하였다. 또한, 백신 투여농도는 선행 연구자들의 보고를 참고하

였지만 예비실험을 통해 임의로 결정하였다.

뱀장어(150 g)에 에드워드균을 FKC+고염분(5.32% NaCl)을 침지 투여하여 면역반응을 조사한 연구에서 응집항체는 1주째 2⁶을 보였으며 7주째에도 2⁶ 이상을 유지하였다(Song Yen-Ling & Kou Guang-Hsiung 1981). 에드워드균을 FKC로 주사 투여한 후 뱀장어(90~95 g)에서 면역반응을 조사한 결과, 응집항체는 7일째 2⁹~2¹¹(대조구 2²~2³), 3주째부터 2¹² 이상으로 높게 나타났다(Salati Fulvio et al. 1983; Salati & Kusuda 1986). 또한 뱀장어(20~50 g)에 FKC로 주사백신을 처리한 경우, 응집항체가 1주째부터 2⁷(대조구 <2) 이었고 6주째까지 2⁷으로 높게 유지하였다(Park Soo-IL et al. 1993). 에드워드균을 FKC로 제작한 백신을 침지투여하고 면역반응을 조사한 넙치(평균 45.5 g)에서 응집항체는 2주째 2⁴~2⁶을 나타내었고 6주째까지 2⁸ 이상으로 형성되었으며(Kwon Mun-Gyeong & Bang Jong Deuk 2004). 또한 넙치(64~75 g)에 에드워드균의 FKC로 주사백신을 처리하였을 때 응집항체는 2주째부터 2¹¹ 이상으로 높게 나타났고 8주 이후에도 2⁸ 이상으로 형성되었다(Kim Myoung Sug et al. 2009). 틸라피아(10~40g)에 에드워드균의 FKC로 주사백신을 처리한 후 8주까지 면역반응을 조사한 보고(Lee Joo-Seok & Park Soo-IL 1992)에 따르면, 응집항체는 1주째 2⁵(대조구 2), 2주째에 2⁹으로 가장 높았으며, 3~4주째까지 2⁸을 유지하였고 8주째에도 2⁶을 형성하였다. 따라서 뱀장어, 넙치 및 틸라피아의 사례에서 볼 때 에드워드균의 FKC는 주사백신이 침지백신보다 높은 면역반응을 유도하는 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서 뱀장어로부터 얻어진 높은 응집항체인 2^{4.7±1.0}~2^{5.0±0.6}(대조구 2^{2.4±0.5}~2^{2.8±0.4})에 비하여 월등히 높은 값을 보였다.

실험실 규모로 백신을 제조하고 기본적 이론에 근거하여 제조한 백신의 효능을 증명하는 것은 비교적 간단할 수 있다. 하지만 효능이 확인된 실험 백신이 양식장에서 상용화되기까지는 국가

별 표준화된 검정기준을 통과해야만 한다. 혈청학적 방법으로 백신의 효능을 평가하기는 어렵기 때문에 백신 검정 기준의 보편적인 방법으로는 미국의 Code of Federal Regulation (CFR), European Pharmacopeia 및 우리나라의 국가 검정 기준에서 공격접종에 의한 임상 증상 방어율로 백신의 효능을 평가하고 있다(Han Myoung-Guk et al. 2002). 국내 수산용 백신의 국가 검정기준은 병원균에 따라서 차이가 있으며, *S. iniae* 및 *E. tarda*는 상대생존율이 60% 이상, *S. paraubris*는 상대생존율이 50% 이상이어야 한다(National Fisheries Research & Development Institute 2014). Salati Fulvio et al.(1991)은 에드워드균의 FKC의 부유액에다 glass beads를 넣고 초음파로 처리한 시험백신을 뱀장어(0.1 g)에 경구 투여한 후, 공격접종으로 조사한 방어력에서 30% 이하의 낮은 생존율을 보고하였다. 에드워드균으로부터 제작한 FKC를 뱀장어에 주사 및 침지백신을 처리한 후 공격접종에 따라 조사한 앞선 보고에서도 상대생존율은 10~30%, 누적폐사율은 65%를 나타내어 매우 낮은 방어력을 나타내었다(Song Yen-Ling & Kou Guang-Hsiung 1981; Salati Fulvio et al. 1983; Salati & Kusuda 1986; Park Soo-IL et al. 1993). 본 연구에서는 뱀장어에 주사백신을 상업적으로 적용하는 것에 많은 문제점이 있다고 생각하여 침지와 경구를 이용하여 백신의 가능성을 찾아보고자 하였으며, 국내 백신 검정기준에 근거하여 상대생존율이 50% 이상이면 방어력이 있는 것으로 최종 평가하였다. 그 결과, 침지(10 mg/mL), 침지(10 mg/mL)+경구(10 mg/g), 침지(5 mg/mL)의 총 3개 실험구에서 뱀장어에 면역 처리한 FKC 백신이 에드워드균에 대하여 공격할 수 있는 방어력이 만족할 만한 수준이었다(상대생존율 50% 이상).

수산용 백신의 효능은 응집항체가, 보체의 용혈능, 라이소자임 활성, 식세포의 탐식능 등 항체의 면역반응과 공격접종(challenge test)에 따른 방어력으로 평가하는데, 어류는 개체별로 차이가

심하기 때문에 면역반응과 방어력이 항상 상관성을 가지지 못한다(Palm Jr. et al. 1998; Kim Myoung Sug 2009). 이는 개체별 혈중 항체 수준이 방어력과 관련성이 낮기 때문으로 추정된다. 뱀장어에 에드워드균을 다양한 방법(FKC, HKC, crude LPS, pure LPS, lipid A, culture filtrate, sonicated products)으로 침지백신(Song Yen-Ling & Kou Guang-Hsiung 1981), 주사백신(Salati Fulvio et al. 1983; Salati Fulvio et al. 1984; Salati Fulvio & Kusuda Riichi 1985, 1986; Park Soo-Il et al. 1993) 처리한 결과, 높은 면역반응과 일정 수준의 생존율은 확인되었으나 양쪽이 뚜렷한 상관성을 나타내지 못하였다. 특히 생존율은 면역반응의 결과에 비하여 상대적으로 낮은 효과를 보였다. 본 연구의 결과에서도 실험에 사용한 뱀장어의 모든 그룹에서 응집항체가와 방어력은 서로 연관성이 없어 앞선 연구자들의 결과와 잘 일치하였다.

본 연구에서는 기본적인 백신 제작방법인 에드워드균의 FKC로 경구와 침지 투여함으로써 응집항체가의 증가와 일정한 수준의 방어력을 얻었으므로, 향후 경구백신은 nano, microparticles, 식물 발현시스템 등의 첨단기술(Park Eun-Joon et al. 2010), 침지백신은 ultrasound, combined immersion/puncture 등의 기술(Plant Karen P. & LaPatra Scott E. 2011), 또한 백신의 효능을 높이기 위하여 면역 보조제(adjuvant)와 면역 증강물질(immunostimulants)에 대하여 추가적인 연구(Tafalla et al. 2013)가 필요하다고 생각한다.

V. 요약

본 연구는 뱀장어 양식에서 오랜 기간 문제시되고 있는 에드워드병(Edwardsiellosis)에 대한 효과적인 백신 투여 방법의 가능성을 알아보고자 하였다. 뱀장어 유래의 *Edwardsiella tarda*로부터 포르말린 불활화백신(FKC)을 제작하여, 크기가

다른 3개 그룹의 뱀장어(26.8±1.2 g, 7.1±0.7 g, 2.2±0.4 g)에 침지 및 경구 투여를 실시하였다. 그리고 혈청 응집항체가의 활성과 *E. tarda* 공격접종에 대한 방어력(상대생존율, RSP)의 변화를 조사하였다. 모든 그룹에서 응집항체가와 공격접종에 의한 방어력은 상관성이 없었다. 그러나 26.8g±1.2 g 그룹의 경우, 침지(10 mg/mL)와 침지(10 mg/mL)+경구(10 mg/g) 실험구에서 RSP는 각각 62.6% 및 52.2%를 나타내었으며, 7.1±0.7 g 그룹의 경우, 침지(10 mg/mL)+경구(10 mg/g) 실험구에서 RSP는 56.8%로 나타나서 방어력(RPS>50%)이 확인되었다.

References

- Brudeseth, B. E. · Wiulsrød, R. · Fredriksen, B. N. · Lindmo, K. · Løkling, K. E. · Bordevik, M. · Steine, N. · Klevan, A. & Gravningen, K.(2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish & Shellfish Immunology* 35, 1759~1768.
- Han, Myoung-Guk · Lee, O-Soo & Kim, Jea-Hong (2002). Safety and efficacy of modified-live infectious laryngotracheitis vaccines. *Korean Journal Veterinary Research* 42(2), 241~251.
- Kim, Dae-Jung · Kim, Kyung-Kil · Kim, Eung-Oh · Son Maeng Hyun & Seong, Ki-Baik(2013). Effects of estradiol-17β on the feminization of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Journal of Life Science* 23(8), 998~1003.
- Kim, Jin Woo · Lee, Han Na · Jee, Bo Young · Woo, Sung Ho · Kim, Young Jae & Lee, Mu Kun(2012). Monitoring of the mortalities in the aquaculture farms of South Korea. *Journal of Pathology* 25(3), 271~277.
- Kim, Wi-Sik · Ok, Ha-Na · Kim, Do-Hyung · Kim, Heung-Yun & Oh, Myung-Joo(2011). Current status of pathogen infection in cultured eel *Anguilla japonica* between 2000 and 2010. *Journal of Pathology* 24(3), 237~245.
- Kwon, Mun-Gyeong & Bang Jong Deuk(2004). Effects of immersion vaccination in different

- concentration of *edwardsiellosis* vaccine on olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Journal of Fish Pathology 17(3), 171~177.
- Lee, Joo-Seok & Park, Soo-Il(1992). The effects of adjuvants and vaccine against *edwardsiellosis* in tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of Fish Pathology 5(1), 19~27.
- Ministry of Oceans & Fisheries(2014). Major Statistics of Oceans and Fisheries. 11-1192000-000226-10, 385pp.
- National Fisheries Research & Development Institute(2014). Manual of fish vaccination. 11-1192266000072-01, 88pp.
- Palm, Jr. R. C. · Landolt, M.L. & Busch, R.A.(1998). Route of vaccine administration: effects on the specific humoral response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Diseases of Aquatic Organisms 33, 157~166.
- Park, Eun-Joon · Kim, Mina · Park, Ju Young · Cha Jae Ho & Chung Hwa-Jee(2010). Edible vaccine for aquacultured fish: present and prospect. Journal of Plant Biotechnology 37, 269~274.
- Park, Soo-Il(1989). Studies on immuno-responses of eel, *Anguilla japonica*-I. Serological studies on *Edwardsiella tarda*. Journal of Fish Pathology 2(2), 83~90.
- Park, Soo-Il · Choi, Yoon-Jeong & Lee, Joo-Seok (1993). Immuno response of eel against fish pathogen, *Edwardsiella tarda*. Journal of Pathology 6(1), 11~20.
- Plant, Karen P. & LaPatra, Scott E.(2011). Advances in fish vaccine delivery. Developmental and Comparative Immunology 35, 1256~1262.
- Salati, F. · Kawai, K. & Kusuda, R.(1983). Immunoresponse of eel against *Edwardsiella tarda* antigens. Fish Pathology 18(3), 135~141.
- Salati, F. · Kawai, K. & Kusuda, R.(1984). Immune response of eel to *Edwardsiella tarda* lipopolysaccharide. Fish Pathology 19(3), 187~192.
- Salati, F. & Kusuda, R.(1985). Vaccine preparation used for immunization of eel, *Anguilla japonica* against *Edwardsiella tarda* infection. Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries 51(8), 1233~1237.
- Salati, F. & Kusuda, R.(1986). Immune response of eel to *Edwardsiella tarda* lipid. Fish Pathology 21(3), 201~205.
- Salati, F. · Ono, K. & Kusuda, K.(1991). Oral vaccination of glass eel of *Anguilla japonica* against *Edwardsiella tarda* infection. Fish & Shellfish Immunology 1, 309~310.
- Sommerset, I. · Krossøy, B. · Biering, E. & Frost, P.(2005). Vaccines for fish in aquaculture. Expert review of vaccines, 4(1), 89~11.
- Son, Maeng Hyun · Kim, Kang-Woong · Kim, Kyoung-Duck & Kim Shin-Kwon(2011). State of aquaculture management for optimal rearing of eel *Anguilla japonica*. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 44(4), 359~365.
- Song, Y. L. & Kou, G. H.(1981). The immuno-responses of eel (*Anguilla japonica*) against *Edwardsiella anguillimorifera* as studied by the immersion method. Fish Pathology 15(3/4), 249~255.
- Tafalla, Carolina · Bøgwald, Jarl & Dalmo, Roy A.(2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. Fish & Shellfish Immunology 35, 1740~1750.
- Tskahashi, Y. · Fukuda, K. · Kondo, M. · Yasumoto, S. · Hirono, I. & Aoki, T.(2011). Bacterial diseases of marine fish and development of vaccine in japan. Journal of National Fisheries University 60(1), 51~56.
- Xu, Tingting & Zhang, Xiao-Hua(2014). *Edwardsiella tarda*: an intriguing problem in aquaculture. Aquaculture 431, 129~132.

-
- Received : 06 March, 2015
 - Revised : 13 April, 2015
 - Accepted : 16 April, 2015