한국어병학회지 제34권 제1호 (2021)
J. Fish Pathol., 34(1) : 099~104

www.ksfp.org
pISSN 1226-0819, eISSN 2233-5412
http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2021.34.1.099

단 보

바리과 어류 3종(능성어 *Hyporthodus septemfasciatus*, 붉바리 *Epinephelus akaara*, 자바리 *Epinephelus bruneus*)에 대한 신경괴사증바이러스(Nervous Necrosis Virus, NNV)의 생백신 처리 효과

김시우[1,4] · 박정준[2] · 홍창기[3] · 오명주[1†]

[1]전남대학교 수산생명의학과, [2]국립수산과학원 전략양식부 양식관리과,
[3]국립수산과학원 남해수산연구소, [4]경상북도 어업기술센터

Efficacy of live NNV immersion vaccination in three grouper species (Seven band grouper *Hyporthodus septemfasciatus*, Red spotted grouper *Epinephelus akaara*, Long tooth grouper *Epinephelus bruneus*)

Si-Woo Kim[1,4], Jung-Jun Park[2], Chang-Gi Hong[3] and Myung-Joo Oh[1†]

[1]Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea
[2]Aquaculture Management Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea
[3]A South Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Yeosu 59780, Korea
[4]Gyengsangbuk-do Fishery Technology Center, Pohang 37556, Korea

In this study, we investigated safety and efficacy of a low temperature immunization protocol with NNV in red spotted grouper, *Epinephelus akaara* and long tooth grouper, *Epinephelus bruneus* and seven band grouper, *Hyporthodus septemfasciatus*. Further, growth rate between immunized and naïve fish was evaluated during the experiment to check side effect of immunization. Three grouper species were immunized by immersion method with live NNV at $10^{5.0}$ $TCID_{50}$/mL at 16.5°C for 30 min and reared for 120 days at natural sea water temperature. To evaluate growth rate, total length and wet weight was measured 7 times after immunization. Immunized three grouper species were challenged by intramuscular inoculation with NNV at $10^{4.2}$ $TCID_{50}$/100 μL/fish. Immunization at low temperature with live NNV did not show any clinical symptoms of infection, mortality and inhibition of growth. After challenge, cumulative mortality of naïve seven band grouper, red spotted grouper, long tooth grouper were 45, 10, 20 %, respectively. However no mortality was observed at immunized groupers. Thus, it was demonstrated that immunization at low temperature with live NNV are able to protect three different species of groupers without inhibition of growth.

Key words: Seven band grouper, Red spotted grouper, Long tooth grouper, Nervous necrosis virus, Live vaccine, Water temperature

†Corresponding author: Myung-Joo Oh
Tel: +82-61-659-7173, Fax: +82-61-659-7179
E-mail: ohmj@jnu.ac.kr

바리과 어류는 동남아시아, 일본 및 우리나라에서 양식 되는 고급 해산 어류이다. 국내에서는 2000년대에 들어와서 양식산업 및 관련 어업인의 소득 증대를 목적으로 능성어(*Hyporthodus septemfasciatus*), 붉바리(*Epinephelus akaara*) 및 자바리(*Epinephelus bruneus*)의 품종개량, 생산성 향상 등의 연구가 시작되었고, 그 중에서 능성어는 국내 남해안 및 제주도 연안에서 2003년 인공 종묘 생산에 성공했으나 낮은 종묘생산 효율에 따른 안정적 종묘 수급의 한계 및 질병에 의한 치어의 대량 폐사 등의 이유로 양식산업 활성화에 어려움을 겪었다 (Hong et al., 2015; Kim and Kim., 2015). 능성어에서 발생하는 대표적인 질병으로 노다바이러스(nodaviridea)에 속하는 nervous necrosis virus(NNV) 감염증이 여름철 고수온기에 유행하여 종묘생산 단계의 자어에서부터 성어에 이르기까지 광범위하게 발생해 높은 누적 폐사율을 발생시키는 것으로 알려져 있다 (Munday et al., 2002; Oh et al.,2005). NNV의 감염은 전 세계적으로 광범위한 지역에서 발생하고 적어도 25종 이상의 어류에서 감염이 보고되고 있으며, 친어를 통한 수직감염 및 감염어와 오염된 사육수를 통한 수평감염에 의한 피해가 확인되어 양식 현장에서 적용할 수 있는 예방 및 치료법의 구축 필요성이 절실한 상황이다 (Watanabe et al., 2000; Kai et al., 2010; Kim and Kim., 2015). 국내에서의 능성어에 대한 NNV 감염은 1989년 남해안 양식장에서 최초 보고되었으며, 약 80%의 높은 폐사율이 확인되었다 (Sohn et al., 1991). 감염어는 뇌 및 척수에 바이러스가 감염됨에 따라 선회 유영, 척추 만곡 및 체색 흑화와 같은 외부 증상을 특징적으로 나타나고, 조직병리학적으로는 뇌와 안구 망막의 신경조직 괴사 및 공포화가 주된 증상으로 관찰되는 것으로 알려져 있다 (Nguyen et al., 1996; Nopadon et al., 2009). 지금까지 수행된 일련의 연구들을 통하여 사육 수온이 NNV의 감염과 매우 밀접한 관련성을 가지는 것으로 알려져 있으며, 해당 사실을 근거로 사육 수온 조절을 이용한 생백신 처리법의 질병 예방 가능성이 보고되었다 (Nishizawa 2012; Oh et al., 2013; Kim et al., 2021). 본 연구에서는 능성어, 붉바리 및 자바리, 3종의 바리과 어류를 대상으로 NNV 침지 생백신 처리에 따른 감염 저항성 획득 효과를 확인하고, 성장에 대한 영향 유무를 확인 함으로써, 이들 바리과 어류 생산에 생백신 적용가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

2015년 전남 무안의 한 양식장에서 생산된 능성어 (13.6±0.7 cm, 54.3±10.4 g), 붉바리 (9.7±1.0 cm, 14.4±4.4 g)와 자바리 (14.6±1.2 cm, 42±8.9 g) 치어를 2016년 4월 전남 여수의 시설로 이송 후 16°C에서 2주간 순치 후 실험에 사용하였다. 실험에 앞서 실험어의 NNV 무감염 여부를 판단하기 위해 능성어, 붉바리, 자바리의 뇌를 무균적으로 적출하여 Kim et al. (2017)의 nested RT-PCR법을 사용하여 NNV 검출을 실시하였으며, striped snakehead fish 유래의 SSN-1 주화세포로 바이러스 배양을 통한 감염가를 확인하였다. 실험에 사용된 바이러스는 2008년 여수 거문도에 위치한 능성어양식장의 NNV감염어 뇌조직에서 분리한 NNV Yeosu08을 사용하였다 (Kim et al., 2012). 바이러스는 SSN-1 주화세포를 이용하여 배양하였으며, 세포 배양액은 10% (V/V) fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml penicillin G, 100 ug/ml streptomycin을 첨가한 Leibovitz`s L-15 medium(L-15)을 사용하였고, 25°C에서 10일간 배양하면서 세포변성 효과(cytopathic effect, CPE)를 관찰하였다. 바이러스 배양액은 8,000 rpm으로 10분간 원심분리를 실시하여 세포 조직 파편을 제거하였으며, 실험에 사용하기 전까지 -80℃에 보관하였다. 능성어(n=40), 붉바리(n=40), 자바리(n=40)에 대한 생백신 처리는 Kim et al., (2021)의 방법에 따랐다. 간단히 설명하면, NNV 비감염 수온인 16.5°C에서 NNV (stock $10^{8.7}$ $TCID_{50}$/mL)를 $10^{5.0}$ $TCID_{50}$/mL 농도로 해수에 희석하여 30분간 침지하는 방법으로 생백신처리를 실시하였다. 대조군으로 fetal bovine serum (FBS)을 포함하지 않은 Leibovitz'L-15배양액 ($L\text{-}15_0$)에 30분간 침지한 바리과 3종 어류 각 40마리를 동일 조건에서 사육하였다. 대조군 및 생백신처리 능성어, 붉바리, 자바리는 300L 수조에 각각 분산 수용하여 유수식으로 (5회전/1일) 사육하였다. 사육수는 모래여과 후

사용하였으며, 배출수는 염소 소독을 실시하여 수중의 NNV를 모두 불활화 시킨 후 배출하였다. 실험어는 사육기간 중 인위적인 수온 조절 없이 계절 변화에 따른 자연 수온 조건에서 사육하였다. NNV 생백신 처리법이 어체 성장에 영향을 주는지를 확인하기 위해 생백신을 처리한 바리과 3종 실험어와 생백신 처리 하지 않은 바리과 3종 대조군을 대상으로 전장과 습중량을 생백신 처리전 1회 그리고 사육 기간 중 7회 측정하였다. 바리과 3종의 어종별 실험군과 대조군은 개별 수조(300L)에 20마리씩 수용하여 유수식(5회전/1일)으로 사육하였고, 사육기간 중 어체중 1%에 해당하는 부상 사료를 1일 2회 급이하였다. 성장도 측정때 마다 각 수조에 수용되어 있는 20마리 어체를 전수 측정하였다. 생백신 처리 어종별 감염 저항성 획득을 확인하기 위하여, 처리 후 120일째 사육 수온이 26℃에 도달한 시점에 NNV 바이러스를 $10^{4.2}$ $TCID_{50}$/100 μL/fish의 조건으로 근육주사법을 이용하여 인위감염시켰다. 마찬가지로 생백신 미처리 능성어, 붉바리, 자바리 각 20 마리에도 동일한 방법으로 감염을 실시하였다. 인위 감염 이후 30일간 생백신 처리 및 생백신미처리 바리과 3종의 누적폐사율을 관찰하고, 내부, 외부 증상 및 기타 특이사항을 모니터링 하였다.

결과 및 고찰

실험 기간 동안 인위적인 수온 조절 없이 자연 해수를 이용하여 사육을 행하였으며, 실험 기간 중의 수온 변화는 Fig. 1과 같다. 생백신 처리시 16.8℃였던 사육 수온은 이후 점차적으로 상승하여 생백신 처리 120일 후 최고 수온 28.5℃를 기록하였고, 이후 점차적으로 하락하였다. 생백신 처리 이후 2달 정도를 경과하면서부터 NNV의 감염이 가능한 것으로 알려진 수온 25℃ 이상의 조건에 도달하였고 이후 인위 감염 실험을 행한 120일째 까지 감염 가능 수온 유지 기간이 53일을 경과 하였음에도 불구하고 생백신 처리 사육 실험어에서는 NNV의 감염특징인 체색흑화, 선회유영 등의 증상을 나타내지 않았으며 바이러스에 의한 폐사 또한 관찰되지 않았다. 생백신처리어의 체내 바이러스의 증식에 의한 발병은 확인되지 않았다.

감염성 질병은 감염된 어류의 폐사 뿐만 아니라 성장 저해를 유발하여 사육어의 생산성에 악영향을 미치는 요인으로 작용한다 (Damsgård et al., 1998; Midtlyng et al., 1998; Liu et al., 2018). 본 연구에서는 활성이 있는 바이러스를 어체에 적용하는 생백신 침지 처리가 사육어의 성장에 영향을 미치는 가를 평가하였다. Fig. 2는 생백신을 처리한 능성어, 붉바리, 자바리 실험어와 생백신처리를 하지 않은 대조군의 어류를 여름부터 동절기까지 약 250일간 사육하면서 전장과 습중량을 8회에 걸쳐 측정한 결과이다. 실험군 및 대조군 모두 사료섭이 활동은 왕성하였으며, NNV 감염수온에서도 NNV 자연 감염에 의한 폐사, 증상 및 기타 특이사항은 관찰되지 않았다. 능성어의 경우 최초 전장

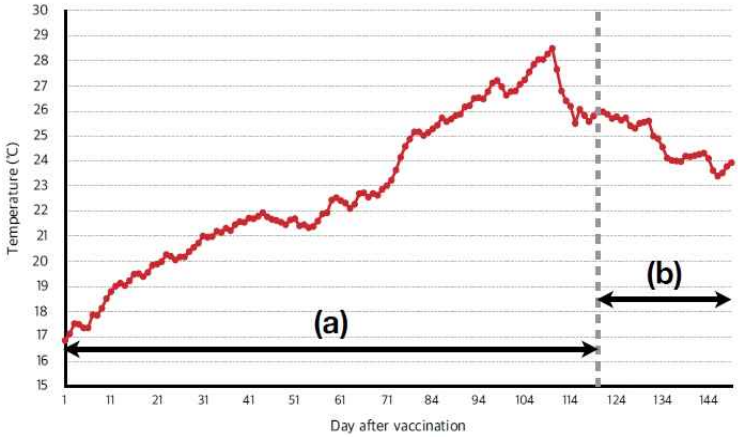

Fig. 1. Natural sea water temperature during the experiment. (a) Water temperature after NNV live-vaccination, (b) Water temperature after NNV infection.

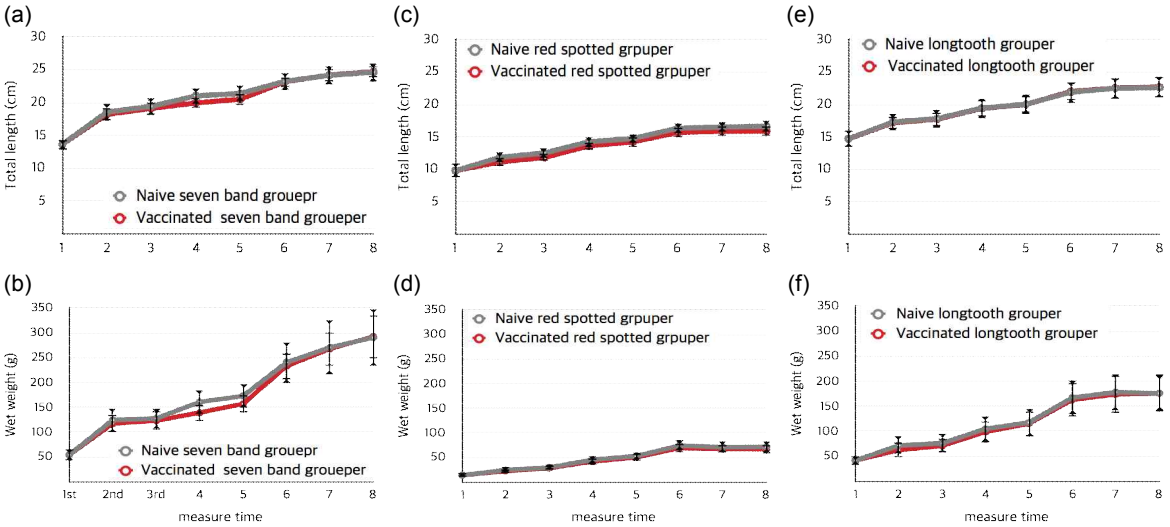

Fig. 2. Comparison of growth between live-vaccinated and naive fish. (a) Total length of seven band grouper, (c) Total length of red spotted grouper, (e) Total length of longtooth grouper, (b) Wet weight of seven band grouper, (d) Wet weight of red spotted grouper, (f) Wet weight of longtooth grouper.

13.6±0.7 cm, 습중량 54±10 g에서 마지막 8회차 측정시 생백신 처리 능성어는 전장 24.6±0.9 cm, 습중량 291±42 g과 naïve 능성어는 전장 24.5±1.4 cm, 습중량 290±57 g으로 유의미한 차이는 확인되지 않았다. 붉바리의 경우 최초 전장 9.7±1.0 cm, 습중량 14±4 g에서 마지막 8회차 측정시 생백신 처리 붉바리는 전장 15.8±0.7 cm, 습중량66±7 g과 naïve 붉바리는 전장 16.6±0.7 cm, 습중량 71±11 g으로 오차범위 내에서 naïve 붉바리의 성장이 미미하게 더 높게 나타났다. 자바리의 경우 최초 전장 14.6±1.2 cm, 습중량 42±8 g에서 마지막 8회차 측정시 생백신 처리 자바리는 전장 22.6±1.7 cm, 습중량 175±37 g과 naïve자바리는 전장 22.5±1.6 cm, 습중량 175±39 g으로 유의미한 차이는 확인되지 않았다. 어종별로 비교하면 능성어의 성장이 최초 평균 54 g에서 290 g으로 가장 높은 증가를 보였고, 그 다음으로 자바리가 평균 42 g에서 175 g, 마지막으로 붉바리가 평균 14 g에서 71 g으로 성장하여 가장 낮은 성장을 나타냈다. 추가로 3종 모두 여름 고수온 시기인 7월에서 10월에 성장이 가장 활발하였다. 다만 능성어의 경우 10월(사육수온 22℃)에 측정한 6번째 측정 이후 여름에 비해 정도는 낮아졌지만 7차(사육수온 17℃)와 8차(사육수온 9.5℃) 까지 지속적인 평균 습중량의 증가가 나타난데 비해 붉바리와 자바리의 경우 6차 측정 이후 7차와 8차 측정시 성장이 미미하거나 줄어드는 경향을 보였다.

생백신을 처리한 능성어, 붉바리, 자바리 실험군과 생백신 처리를 하지 않은 능성어, 붉바리, 자바리 대조군에 $10^{4.2}$ $TCID_{50}$/100 µL/fish 농도로 NNV를 근육주사한 후 나타난 누적폐사율을 Fig. 3에 나타내었다. 대조군인 생백신 미처리 능성어의 경우 NNV감염 후 5일차에 특징적인 이상 유영 증상

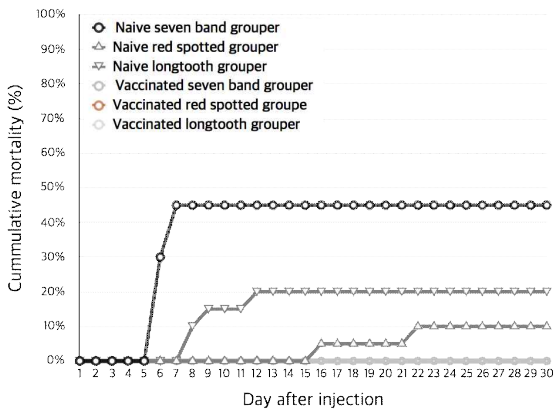

Fig. 3. Cumulative mortality after intramuscular injection of NNV.

이 관찰되었으며, 접종 후 6일차 6마리, 7일차 3마리 폐사가 발생하여 접종 후 7일만에 45%의 누적 폐사가 발생하였다. 생백신 미처리 붉바리는 NNV 감염 후 7일차에 이상 유영 증상을 시작으로, 접종 8일 후에는 5마리에서 균형을 완전히 소실하여 복부가 수면을 향하는 전형적인 NNV의 증상이 관찰되었다. 접종 13일차에 이상 유영 증상을 보이는 개체는 8마리로 늘어났지만 폐사는 관찰되지 않았다. 접종 16일차에 최초 폐사가 발행하였고, 22일차까지 2마리 폐사하였고 (누적폐사율 10%), 유영력을 상실한 증상어 5마리가 관찰되었다. 생백신 미처리 자바리의 경우 NNV감염 후 7일차에 이상 유영 증상이 나타났고, 이후 산발적인 폐사가 발생하여 최종적으로 20%의 누적폐사가 발생하였다. 능성어, 붉바리, 자바리 폐사체는 Nested RT-PCR과 뇌 조직마쇄액을 SSN-1 주화세포에 접종하여 바이러스 배양을 실시하였는데, 294bp의 특이 밴드와 공포를 형성하는 CPE를 확인할 수 있었다(data not shown). 이와는 대조적으로, 생백신을 처리한 능성어, 붉바리, 자바리 실험군은 NNV 감염 이후 이상유영을 포함한 기타 특이점은 관찰되지 않았고, 폐사 또한 발생하지 않았다. 앞선 연구 (Nishizawa 2012; Oh et al., 2013; Kim et al., 2021)에서 보고되어진 생백신 처리어의 감염 저항성 획득 결과와 마찬가지로, 본 실험의 능성어, 붉바리 및 자바리의 경우에서도 비감염 온도조건에서의 NNV 생백신 처리법이 NNV 감염에 대해 효과인 저항성을 획득함을 확인할 수 있었다.

사 사

본 논문은 2021년도 국립수산과학원 수산시험연구사업 “주요 양식품종 모니터링(R2021003)의 지원으로 수행된 연구입니다.

References

Damsgård B, Mortensen A, Sommer A. 1998. Effects of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) on appetite and growth in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquaculture 163, 185-193.

Hong CG, Cho JK, Park JY, Son MH, Park JM, Han KH and Kang HW. 2015. Ovulation Induction Effect of Sevenband Grouper, *Epinephelus septemfasciatus* by Treating Hormones. Journal of Fisheries and Marine Sciences Education 27, 981-989.

Kai YH, Su HM, Tai KT and Chi SC. 2010. Vaccination of grouper broodfish (*Epinephelus tukula*) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus. Vaccine 28, 996-1001.

Kim CS, Kim WS, Nishizawa T and Oh MJ. 2012. Prevalence of viral nervous necrosis (VNN) in sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* farms. J Fish Pathol 25(2), 111-116.

Kim SW, Kim WS, Seo HG, Kim KM and Oh MJ. 2017. Monitoring of nervous necrosis virus (NNV) in the broodstock of sevenband grouerp *Hyporthodus septemfasciatus*. Korean Journal of Fisheries Aquatic Sciences. 50, 527-533.

Kim SW, Kim SJ, Oh MJ. 2021. Efficacy of live NNV immersion vaccine immunized at low temperature in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Virus research. 292, 198227

Kim WS and Kim JO. 2015. Prevention Strategies for Viral Nervous Necrosis (VNN) in Sevenband Grouper *Epinephelus septemfasciatus* Aquaculture Farms. Korean J Fish AquatSci 48, 403-410.

Liu X, Jiao C, Ma Y, Wang Q and Zhang Y. 2018. A live attenuated *Vibrio anguillarum* vaccine induces efficient immunoprotection in Tiger puffer (*Takifugurubripes*). Vaccine 36, 1460-1466.

Midtlyng PJ, Lillehaug A. 1998. Growth of Atlantic salmon Salmo salar after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. Dis Aquat Org 32, 91-97.

Munday BL, Kwang J and Moody N. 2002.Betanoda virus infections of teleost fish: a review. J Fish Dis 25, 127-142.

Nguyen HD, Nakai T andMuroga K. 1996. Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranxdentex* larvae. Dis Aquat Organ 24, 99-105.

Nishizawa T, Gye HJ, Takami I and Oh MJ. 2012. Potentiality of a live vaccine with nervous necrosis virus(NNV) for sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* at a low rearing temperature. Vaccine. 30, 1056-1063.

Nopadon P, Aranya P, Tipaporn T, Toshihiro N, Takayuki K, Masashi M and Makoto E. 2009. Nodavirus associated with pathological changes in adult spotted coralgroupers (*Plectropomusmaculatus*) in

Thailand with viral nervous necrosis. Res Vet Sci 87, 97-101.

Oh MJ, Jung SJ and Kitamura SI. 2005. Comparison of the coat protein gene of nervous necrosis virus (NNV) detected from marine fishes in Korea. J World Aquac Soc 36, 223-227.

Oh MJ, Gye HJ and Nishizawa T. 2013. Assessment of the sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* with a live nervous necrosis virus (NNV) vaccine at natural seawater temperature. Vaccine. 31, 2025-2027.

Sohn SG, Park MA, Lee SD and Chun SK. 1991. Studies on the mass mortality of the cultured grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. J Fish Pathol 4, 87-94.

Watanabe KI, Nishizawa T and Yoshimizu M. 2000. Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. Dis Aquat Organ 41, 219-223.

Manuscript Received : Feb 17, 2021
Revised : Mar 19, 2021
Accepted : Mar 24, 2021