

# 스쿠티카충 *Miamiensis avidus* 주사백신용 미생물유래 면역보조제의 평가

정명화 · 정성주<sup>1\*</sup>

한서대학교 해양바이오수산생명의학과, <sup>1</sup>전남대학교 수산생명의학과

## Assessment of Microorganism-derived Adjuvants for Scuticociliate *Miamiensis avidus* Vaccine

Myung-Hwa Jung and Sung-Ju Jung<sup>1\*</sup>

Department of Marine Bio and Medical Sciences, Hanseo University, Seosan 31962, Korea

<sup>1</sup>Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

Microorganism-derived compounds, such as peptidoglycan, lipoteichoic acid, and  $\beta$ -glucan were supplemented in the scuticociliate *Miamiensis avidus* (*M. avidus*) vaccine to verify the specify component contribution to the adjuvant effect. Vaccine was formulated with the inactivated *M. avidus* antigen (YS2,  $4.44 \times 10^5$  cells/fish) in combination with either peptidoglycan (10  $\mu$ g and 100  $\mu$ g/fish), lipoteichoic acid (5  $\mu$ g and 50  $\mu$ g/fish), or  $\beta$ -glucan (10  $\mu$ g and 100  $\mu$ g/fish). Olive flounder injected with peptidoglycan supplemented vaccine (10  $\mu$ g and 100  $\mu$ g/fish) exhibited significant protection, and the relative percent survival (RPS) was 55% and 65% at 4 weeks post vaccination (wpv), respectively, at the corresponding doses. The vaccine groups with added lipoteichoic acid (5  $\mu$ g and 50  $\mu$ g/fish) exhibited RPS of 40% and 5%, respectively. Additionally, the group with added  $\beta$ -glucan (100  $\mu$ g/fish) exhibited RPS of 35%, but no effect was observed in the group with added 10  $\mu$ g/fish  $\beta$ -glucan. At 8 wpv, olive flounder injected with peptidoglycan and lipoteichoic acid supplemented vaccines exhibited protection with RPS range of 11/11% and 5/21%, respectively, at the respective doses. *M. avidus* vaccine containing 10  $\mu$ g and 100  $\mu$ g/fish of  $\beta$ -glucan exhibited the RPS of 32% and 37%, respectively. Conclusively, peptidoglycan contributed in high protection of the *M. avidus* vaccine, and thus, it can be used as an effective adjuvant in the *M. avidus* vaccine.

Keywords: *Miamiensis avidus*, Vaccine, Adjuvant, Peptidoglycan, Lipoteichoic acid

## 서 론

스쿠티카충은 Oligohymenophore강 Scuticociliatia아강에 속하는 기생성 원충류이다. 크기는 약 31.5 (21-37)  $\mu$ m  $\times$  18.5 (11-28)  $\mu$ m이며, 장축을 따라 8-12개의 섬모열과 꼬리 끝부분에 1개의 긴 섬모가 있다(Jung et al., 2007). 전 세계적으로 농어 (*Dicentrarchus labrax*; Dragesco et al., 1995), southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* (Munday et al., 1997), 터봇(*Scophthalmus maximus*; Dyková and Figueras, 1994; Iglesias et al., 2001; Puig et al., 2007), 넙치(*Paralichthys olivaceus*; Kim et al., 2004a; Jung et al., 2005) 및 silver pomfret *Pampus argenteus* (Azard et al., 2007) 등 다양한 수산생물에 감염되고 있

다. 국내에서는 지난 1990년대 초반 넙치에서 스쿠티카충에 의한 감염 사례가 처음으로 보고되었으며(Lee et al., 1994), 이후 해마다 대량폐사를 통한 경제적 손실을 유발하고 있다. 넙치에 감염을 유발하는 스쿠티카충은 *Uronema marinum*, *Pseudocohnilembus persalinus*, *Miamiensis avidus* (= *Philasterides dicentrachi*) 등의 3종이며(Jee et al., 2001; Kim et al., 2004a, 2004b; Jung et al., 2007), 이들 중 *M. avidus* 가 넙치에 강한 병원성을 보이고 있다(Song et al., 2009). 스쿠티카충에 감염된 어류는 병소에 출혈을 동반한 궤양이 형성되고, 섭이 저하, 체색 흑화, 안구돌출의 증상이 나타난다(Jung et al., 2007). 스쿠티카충은 아가미와 피부를 통해 체내로 빠르게 침투하여 증식함으로써 내장기관 및 뇌 조직까지의 심부 감염을 유발하기 때문에

\*Corresponding author: Tel: +82. 61. 659. 7175 Fax: +82. 61. 659. 7179

E-mail address: sungju@chonnam.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0652>

Korean J Fish Aquat Sci 54(5), 652-659, October 2021

Received 1 September 2021; Revised 2 October 2021; Accepted 18 October 2021

저자 직위: 정명화(교수), 정성주(교수)

일반적인 화학요법(formalin, pyrimethamine, salicylanilides niclosamide, oxytetracycline 등)으로는 스쿠티카충을 완전히 구제하는데 어려움이 있다(Iglacias et al., 2001). 이에, 미네랄 오일을 면역보조제로 이용한 불활화 *Philasterides dicentrachi*에 대한 백신(Jesús et al., 2008; Sanmartín et al., 2008) 및 면역자극제(CpG ODN) 투여에 의한 *M. avidus* 제어 방안들이 제시되었다(Lee and Kim, 2009; Kang et al., 2013; Kang et al., 2014; Kang and Kim, 2015). 전 세계적으로 스쿠티카 백신은 2020년 처음으로 우리나라에서 상용화를 성공했으며 면역보조제가 첨가되지 않고 2회 접종하는 *M. avidus* 단일 주사백신(녹십자수의약품)과 *M. avidus*와 *Tenicibaculum maritimum*에 스쿠알렌 면역보조제가 첨가된 다가백신(씨티씨백)이 품목허가를 받았다(NIFS, 2020).

면역보조제는 백신 제조 시 항원과 함께 면역 반응을 향상시키기 위한 첨가 물질로서 항체 생산 및 세포성 면역을 강화하는 기능을 지닌다(Thim et al., 2012). 최근에 들어, 넙치에서 발생하는 바이러스성 출혈성 패혈증(viral hemorrhagic septicemia, VHS)을 대상으로 불활화된 바이러스에 스쿠알렌 면역보조제를 첨가한 백신이 개발되고 상용화됨으로써(Vinay et al., 2013; NIFS, 2020), 면역보조제의 중요성이 극대화되는 계기가 되었다. 이러한 이유로, 선행연구에서는 다수의 면역보조제를 대상으로 *M. avidus* 백신 효능성에 대한 연구를 수행하였다. 그 중 불활화된 *Sterptococcus parauberis*의 첨가에 의하여 *M. avidus* 백신의 효능이 상승하는 결과를 얻을 수 있었다(Kim, 2013). 이는 *S. parauberis*의 특정성분이 면역보조제로서 기능을 하여 백신의 효능을 향상시켰음을 의미한다. *S. parauberis*는 그람양성균으로 이들의 세포벽 구성성분인 peptidoglycan, lipoteichoic acid는 대식세포 활성화를 유도하여 다수의 면역세포 분비 및 식균작용의 촉진 등 선천면역 반응을 유도한다고 알려져 있다. 따라서, 그람양성균인 *S. parauberis*의 세포벽 성분이 면역 담당 세포를 활성화시키는 작용을 함으로써 *M. avidus* 백신의 효능을 향상시키는 것이라 추측하였다.

본 연구에서는 *S. parauberis*가 *M. avidus*의 면역보조제로 작용하였음에 착안하여 그람양성균의 세포벽성분과 유사한 성분들을 면역보조제 후보군으로 선정하였고, 이들을 *M. avidus* 백신에 첨가하여 효능을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어

스쿠티카충에 감염된 이력이 없는 넙치를 완도 종묘장에서 구입 후 전남대학교 수산과학연구소에서 사육하였다. 지속적으로 산소공급과 해수교환이 이루어지는 10톤의 해수가 수용된 수조에 사육하였으며, 감염 실험에 사용한 실험어는 감염시절로 옮겨서 실험을 수행하였다.

### 면역보조제 및 독성

본 실험에 사용한 면역보조제는 시판되고 있는 *Bacillus subtilis* 유래의 peptidoglycan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), *Bacillus subtilis* 유래의 lipoteichoic acid (Sigma-Aldrich) 및 *Euglena gracilis* 유래의  $\beta$ -glucan (Sigma-Aldrich)을 선정하였다.

면역보조제 투여에 의한 치사율, 섭식, 체색 변화, 유영 및 행동 변화 등 급성독성 평가를 수행하였다. 각 그룹은 10마리(22.1±1.5 g, 13.1±0.5 cm)씩 구성하였고, 100  $\mu$ L DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)에 peptidoglycan (10  $\mu$ g, 100  $\mu$ g), lipoteichoic acid (5  $\mu$ g, 50  $\mu$ g),  $\beta$ -glucan (10  $\mu$ g, 100  $\mu$ g)을 첨가하여 복강 주사하였다. 20 L의 해수가 수용된 수조에 23°C의 조건으로 20일간 독성의 급성 징후, 행동변화, 폐사 여부를 관찰하였다.

### 스쿠티카충 배양

본 실험에 사용한 스쿠티카충은 *M. avidus* 종으로, 2005년에 여수에서 분리한 YS2를 사용하였다(Jung et al., 2005). YS2는 chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* embryo 세포(CHSE-214)에 접종한 후 20°C에 배양하였으며, 25 cm<sup>2</sup> 세포 배양용 플라스크(Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China)에 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Amarillo, TX, USA), penicillin-streptomycin (100 U/mL; Gibco), streptomycin (50  $\mu$ g/mL; Gibco, USA)를 첨가한 DMEM (Gibco, USA)을 사용하였다.

### 백신 제조

CHSE-214 세포에서 YS2를 5일간 배양하여 먹이공급원으로 사용한 CHSE-214 세포가 현미경관찰로 보이지 않는 것을 확인한 후 15°C에서 10분간 1,500 rpm으로 원심분리하여 -80°C에 2일간 냉동보관하여 불활화 시켰으며, 이를 백신의 항원으로 사용하였다. 현미경 검경을 통해 스쿠티카충의 움직임 및 생존 여부 등으로 완벽하게 불활화된 것을 확인하였다.

백신은 넙치 한 마리당 불활화된 스쿠티카 항원을 4.44 × 10<sup>6</sup> cells/fish가 되도록 고정하고 여기에 면역보조제를 2가지 농도로 첨가하여 마리당 100  $\mu$ L를 접종할 수 있도록 DMEM으로 최종 용량을 맞추었다. 면역보조제 농도는 마리당 각각 i) peptidoglycan (10  $\mu$ g, 100  $\mu$ g), ii) lipoteichoic acid (5  $\mu$ g, 50  $\mu$ g), iii)  $\beta$ -glucan (10  $\mu$ g, 100  $\mu$ g)이 되도록 조절하였다 (Table 1).

### 면역보조제 및 불활화 스쿠티카충의 단독 투여

면역보조제(peptidoglycan, lipoteichoic acid,  $\beta$ -glucan) 및 불활화 스쿠티카충의 단독 투여에 의한 효능 여부를 평가하기 위해 각 실험어(23.5±1.5 g, 14.0±0.5 cm) 그룹은 50마리씩 구성하였다. Peptidoglycan 투여 그룹은 i) peptidoglycan (10  $\mu$ g), ii) peptidoglycan (100  $\mu$ g)으로 구성하였다. Lipoteichoic acid 투여 그룹은 i) lipoteichoic acid (10  $\mu$ g), ii) lipoteichoic acid (100  $\mu$ g)으로 구성하였다.  $\beta$ -glucan 투여 그룹은 i)  $\beta$ -glucan

(10 µg), ii) β-glucan (100 µg)으로 구성하였다. 대조구의 경우 i) 불활화 스크티카 항원(YS2,  $4.44 \times 10^5$  cells/fish), ii) DMEM 투여구(control), iii) 비투여구(naïve)로 구성하였다. 실험어는 22-23°C의 수온 범위에 해수 150 L가 수용된 수조에서 사육하였다. 투여 4주 후  $7.2 \times 10^5$  cells/100 µL의 스크티카충을 감염시켰다.

#### 면역보조제 첨가 백신 투여

면역보조제의(peptidoglycan, lipoteichoic acid, β-glucan) 적정 농도에 따른 백신의 효능 여부를 평가하기 위해 각 실험어 (24.8±1.9 g, 15.2±0.4 cm) 그룹은 50마리씩 구성하였다. Peptidoglycan 투여 그룹은 i) peptidoglycan (10 µg)+불활화 스크티카 항원(YS2,  $4.44 \times 10^5$  cells/fish), ii) peptidoglycan (100 µg)+불활화 스크티카 항원(YS2,  $4.44 \times 10^5$  cells/fish)으로 구성하였다. Lipoteichoic acid 투여 그룹은 i) lipoteichoic acid (10 µg)+불활화 스크티카 항원(YS2,  $4.44 \times 10^5$  cells/fish), ii) lipoteichoic acid (100 µg)+불활화 스크티카 항원(YS2,  $4.44 \times 10^5$  cells/fish)으로 구성하였다. β-glucan 투여 그룹은 i) β-glucan (10 µg)+불활화 스크티카 항원(YS2,  $4.44 \times 10^5$  cells/fish), ii) β-glucan (100 µg)+불활화 스크티카 항원(YS2,  $4.44 \times 10^5$  cells/fish)으로 구성하였다. 대조구의 경우 i) DMEM 투여구(control), ii) 비투여구(naïve)로 구성하였다. 실험어는 22-23°C의 수온 범위에 해수 150 L가 수용된 수조에서 사육하였다. 백신 투여 후 4주 및 8주가 경과한 시점에서 스크티카충을 100 µL

씩 복강으로 감염시켜 백신의 효능을 평가하였다. 각 그룹은 20마리씩으로 25 L의 해수가 수용된 수조에서 23°C의 조건을 유지시켰다. 백신 투여 후 4주 그룹은(33.2±4.1 g, 15.9±0.6 cm)  $7.2 \times 10^5$  cells/100 µL의 스크티카충을 감염시켰고, 8주 그룹은(35.6±3.1g, 16.1±0.5 cm)  $7.1 \times 10^5$  cells/100 µL의 스크티카충을 감염시킨 후 21일간 폐사율을 관찰하였다(Table 1). 감염실험의 스크티카충 농도는 사전실험을 통해 90-100%가 폐사에 이르는 구간을 선정하였다.

#### 통계분석 및 상대생존율(relative percentage survival, RPS)

통계분석은 Graph pad prism 5 software (Version 5.02)를 이용하여 long rank (mantel-cox) test로 하였다. 상대생존율(relative percentage survival, RPS)은 다음의 수식을 활용하여 산출하였다(Amend, 1981).

$$RPS = [1 - (\% \text{ mortality of vaccinated group} / \% \text{ mortality in control})] \times 100$$

#### 결 과

##### 면역보조제에 의한 급성독성

본 연구에서 후보군으로 선정한 3종의 면역보조제(peptidoglycan, lipoteichoic acid, β-glucan) 투여 시 이상 유영, 섭이불

Table 1. Results of the vaccine efficacy test at 4 and 8 weeks post vaccination

	Groups	Concentration in 100 µL			Mortality (%)	RPS (%)	P value
		Antigen dose (cells)	Adjuvant (µg)	Infection dose (cells)			
4 weeks post vaccination	Naïve				-	-	-
	Control			$7.2 \times 10^5$	100	-	-
	<i>M. avidus</i> +PG 10	$4.44 \times 10^5$	10	$7.2 \times 10^5$	45	55	<0.0001
	<i>M. avidus</i> +PG 100	$4.44 \times 10^5$	100	$7.2 \times 10^5$	35	65	<0.0001
	<i>M. avidus</i> +LTA 5	$4.44 \times 10^5$	5	$7.2 \times 10^5$	60	40	0.0007
	<i>M. avidus</i> +LTA 50	$4.44 \times 10^5$	50	$7.2 \times 10^5$	95	5	0.4363
	<i>M. avidus</i> +β-glucan 10	$4.44 \times 10^5$	10	$7.2 \times 10^5$	100	0	0.3151
	<i>M. avidus</i> +β-glucan 100	$4.44 \times 10^5$	100	$7.2 \times 10^5$	65	35	0.0177
8 weeks post vaccination	Naïve				-	-	-
	Control			$7.1 \times 10^5$	95	-	-
	<i>M. avidus</i> +PG 10	$4.44 \times 10^5$	10	$7.1 \times 10^5$	85	11	0.8707
	<i>M. avidus</i> +PG 100	$4.44 \times 10^5$	100	$7.1 \times 10^5$	85	11	0.5103
	<i>M. avidus</i> +LTA 5	$4.44 \times 10^5$	5	$7.1 \times 10^5$	90	5	0.2366
	<i>M. avidus</i> +LTA 50	$4.44 \times 10^5$	50	$7.1 \times 10^5$	75	21	0.3585
	<i>M. avidus</i> +β-glucan 10	$4.44 \times 10^5$	10	$7.1 \times 10^5$	65	32	0.1560
	<i>M. avidus</i> +β-glucan 100	$4.44 \times 10^5$	100	$7.1 \times 10^5$	60	37	0.0400

RPS, relative percent survival; PG, peptidoglycan from *Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich); LTA, lipoteichoic acid from *Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich); β-glucan, β-glucan from *Euglena gracilis* (Sigma-Aldrich).

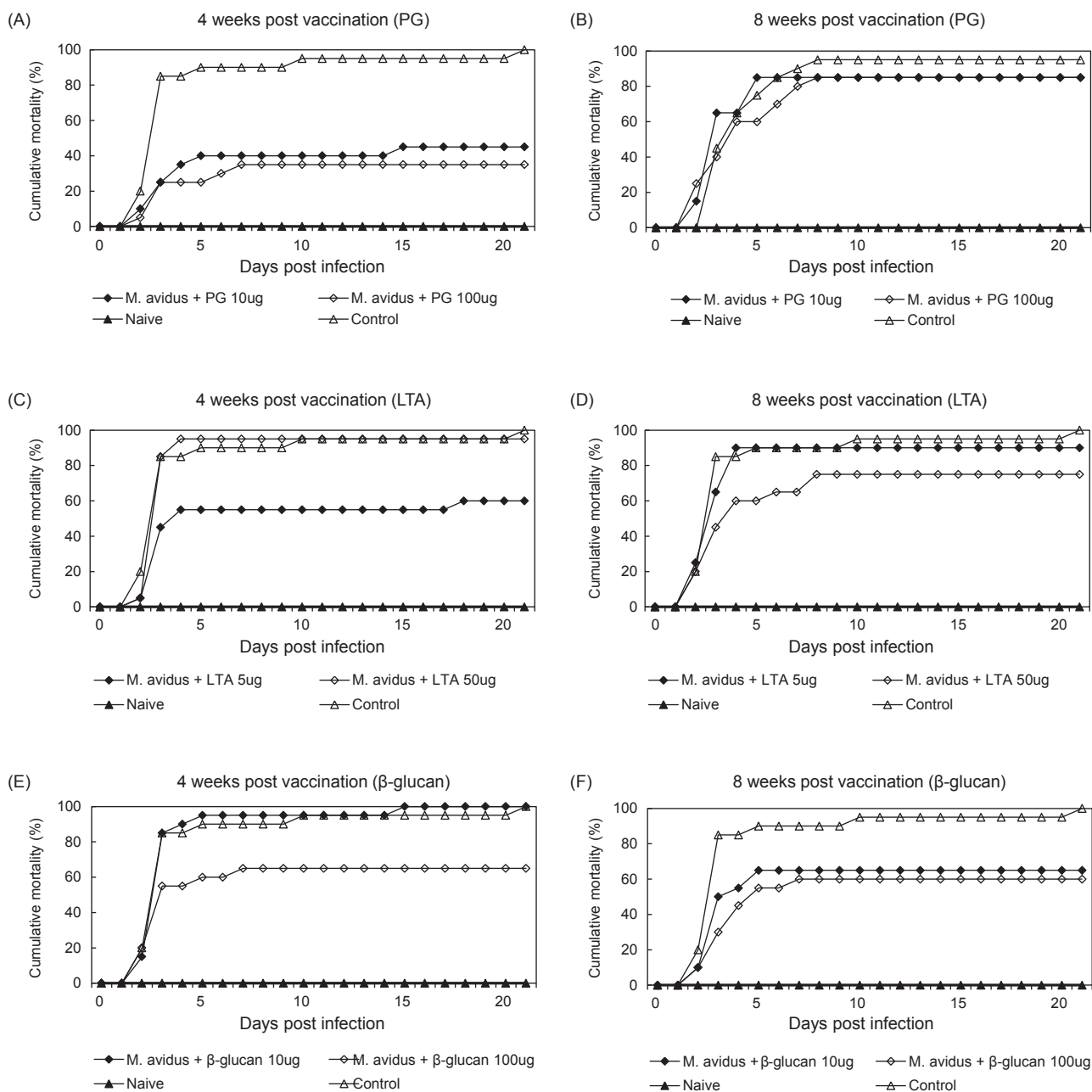


Fig. 1. Cumulative mortality of olive flounder vaccinated with *Miamiensis avidus* vaccine formulated with 3 different microorganism-derived compounds. Fish were challenged at 4 and 8 weeks post vaccination (wpv) by intraperitoneal injection with *M. avidus*  $7.2 \times 10^5$  cells/fish and  $7.1 \times 10^5$  cells/fish, respectively. *M. avidus* vaccine formulated with peptidoglycan 10  $\mu$ g and 100  $\mu$ g then challenged at 4 wpv (A) and 8 wpv (B), vaccine formulated with lipoteichoic acid 5  $\mu$ g and 50  $\mu$ g then challenged at 4 wpv (C) and 8 wpv (D), and vaccine formulated with  $\beta$ -glucan 10  $\mu$ g and 100  $\mu$ g then challenged at 4 wpv (E) and 8 wpv (F).

량, 체색변화, 폐사 등은 관찰되지 않았다.

면역보조제 및 불활화 스쿠티카충의 단독 투여에 의한 생존율

본 연구에서 선정한 3종의 면역보조제(peptidoglycan, lipoteichoic acid,  $\beta$ -glucan) 및 불활화 스쿠티카충의 단독 투여에 의한 낚치의 상대생존율은 10-20% 범위로 확인되었다(결과 미 표시). 이들의 단독투여는 스쿠티카충 감염으로부터 낚치에 방

어력을 제공할 수 없는 것으로 결론지었으며, 이러한 이유로 면역보조제와 불활화 스쿠티카충을 혼합한 형태의 백신에 대한 효능을 평가하였다.

### Peptidoglycan 첨가 백신

Peptidoglycan 첨가 백신투여 4주 후 *M. avidus*를 감염 시, 10 µg의 peptidoglycan이 포함된 그룹(PG 10)은 45%, 100 µg의 peptidoglycan이 포함된 그룹(PG 100)은 35%의 최종폐사율을 기록하였고, 각 그룹의 RPS는 각각 65, 55%였다(Fig. 1, Table 1). 대조구 그룹은 감염 후 4일에 임상적인 증상의 동반과 함께 특이적인 폐사가 발생하여, 감염 16일에 전량 폐사에 이르렀다.

백신투여 8주 후 그룹의 경우, *M. avidus* 대조구 그룹은 95%의 누적폐사가 보여졌고, peptidoglycan을 첨가한 그룹은 3일째부터 폐사가 발생하여 10 µg과 100 µg을 첨가한 그룹 모두 85%의 최종폐사율을 나타내었으며, 각 그룹의 RPS는 11%로 확인되었다. 백신 투여 8주 그룹은 백신 투여 4주가 경과한 실험구와 비교 시 그 효능은 감소하는 것으로 보여졌다(Table 1).

### Lipoteichoic acid 첨가 백신

Lipoteichoic acid를 면역보조제로 첨가한 백신을 투여한 후 4주가 경과한 그룹의 경우, 5 µg의 lipoteichoic acid가 첨가된 그룹은 19일째까지 60%의 폐사율을 보였고, 50 µg의 lipoteichoic acid가 포함된 그룹은 감염 후 5일째에 실험어의 95%가 폐사에 이르는 급격한 양상을 보였다(Fig. 1). 50 µg의 lipoteichoic acid 그룹은 5%의 RPS를 보임으로써, 40%의 상대생존율을 보인 5 µg의 lipoteichoic acid 그룹보다 효능이 낮았다(Table 1). 대조구 그룹은 감염 3일째부터 폐사가 발생하였고 95%가 폐사에 이르렀다. 백신 투여 8주 그룹은, 5 µg의 lipoteichoic acid가 첨가된 백신의 경우 90%, 50 µg의 lipoteichoic acid가 첨가된 백신은 75%가 폐사에 이르면서, 각 그룹의 RPS는 각각 5%, 21%로 확인되었다(Table 1).

### β-glucan 첨가 백신

β-glucan이 포함된 백신 투여 4주 경과 시, β-glucan이 10 µg 또는 100 µg 첨가된 백신을 투여한 실험구는 각각 100%와 65%의 최종폐사율을 나타내었으며, RPS는 각각 0%와 35%로 확인되었다(Fig. 1, Table 1). 백신 투여 8주 후 실시한 감염실험의 결과 β-glucan 10 µg 그룹에서의 상대생존율은 32%로 백신 투여 4주째 실시한 감염실험의 결과보다 높았으며, β-glucan 100 µg 그룹은 백신 투여 4주째 감염실험과 유사하게 37%의 상대생존율이 보여졌다(Table 1).

## 고 찰

스쿠티카충은 기생성 섬모충으로 세계 각국의 해산 양식 어류에 중요한 조건성 병원체로 알려져 있다(Cheung et al., 1980). 선행연구에서는 -80°C에서 불활화된 *M. avidus* 항원과 면역보

조제로서 포르말린에 불활화된 *S. parauberis*를 혼합한 *M. avidus* 백신을 넙치에 투여하였을 때, *M. avidus* 항원만을 단독 투여한 그룹보다 *S. parauberis*와 *M. avidus* 항원을 혼합한 그룹이 *M. avidus* 감염으로부터 높은 상대생존율을 나타내었다(Kim, 2013). 이에 본 연구에서는 그람양성균의 세포벽 구성물질인 peptidoglycan과 lipoteichoic acid 그리고 이와 유사한 기능을 지닌 β-glucan이 *M. avidus* 백신의 효능을 증강시키는지 알아보려고 하였다. 이들 물질은 선천면역과 후천면역반응을 연결하는 TLR (toll-like receptor)를 자극하는 물질들로 주로 TLR2와 TLR4를 자극하여 후천면역의 증가에 기여할 수 있음이 밝혀져 있다(Michelsen et al., 2001).

본 실험에서는 *M. avidus* 항원에 시판되고 있는 그람양성균의 세포벽 구성물질인 peptidoglycan (10 µg, 100 µg), lipoteichoic acid (5 µg, 50 µg)와 β-glucan (10 µg, 100 µg)을 면역보조제로 첨가한 백신을 넙치에 투여한 후 *M. avidus* 감염에 대한 효능을 입증하고자 하였다. Peptidoglycan을 마리당 10 µg과 100 µg을 첨가한 그룹 상대생존율이 각각 55%와 65%로 대조구와 비교하여 현저한 차이를 나타내었다( $P < 0.0001$ ). 세균 세포벽의 주요한 구성성분인 peptidoglycan은 CD14, Toll-like receptor 2 (TLR 2), nucleotide oligomerization domain (Nod)-containing proteins 등을 유도하여 식작용과 보체활성 및 lysozyme을 유발하는 등 선천면역 기능을 높이거나 직접적인 항균제 효과를 가진다(Dziarski and Gupta, 2005). 따라서, 세균성 질병에 대하여 다양한 해양생물의 저항력을 향상시키는데 효과적인 면역자극제로 사용되었다. Peptidoglycan을 투여한 무지개송어에서는 *Vibrio anguillarum*에 대하여 방어력이 향상되었고(Matsuo and Miyazano, 1993), *Enterococcus seriolicid*에 대한 방어력도 증강시키는 것으로 보고되었다(Itami et al., 1996). 본 연구에서는 peptidoglycan이 *M. avidus* 백신의 효능을 증가시키는 작용이 있는 것을 확인하였는데 peptidoglycan의 선천성면역반응 자극이 백신의 효능증대에 기여했을 것으로 생각되었다. 그러나 백신투여 8주 후에는 상대생존율이 11%로 낮아 장기 면역기억에는 기여하지 못하는 것으로 생각되었다.

Lipoteichoic acid는 CD14와 TLR 2의 활성을 유도하여 표적 세포에 결합한 후 항체와의 상호작용을 촉진시킴과 동시에 보체를 활성화시켜 면역 반응의 상승을 유발하는 것으로 보고되었다(Isaac, 2002). Lipoteichoic acid를 첨가한 백신 그룹에서 백신 투여 4주째에 5 µg를 첨가한 저농도 그룹이 40%의 RPS를 나타내었으나( $P=0.0007$ ) 50 µg을 추가한 고농도 그룹에서 상대생존율이 5%로 낮았고, 백신 투여 8주째에도 5%와 21%로 낮은 상대 생존율을 보여 lipoteichoic acid가 *M. avidus*에 대해서는 강력한 면역보조제로서의 효능을 가지지 못하는 것으로 판단하였다.

β-glucan 투여 시 원충류 또는 세균의 감염에 대한 어류의 방어능력을 증가시키는 결과물에 대해서는 다수의 선행연구 사례가 보고 되었고, β-glucan을 투여 시 어류가 질병에 대한 저

항능력이 증가되는 것은 식세포에 의한 것임이 밝혀져 있다 (Robertson et al., 1990; Nikl et al., 1993; Siwicki et al., 1994; Yoshida et al., 1995). 본 연구에서  $\beta$ -glucan을 첨가한 그룹은, 100  $\mu$ g 첨가 시 백신 투여 4주째에 35%, 8주째에 37%의 상대 생존율로 대조구에 비해서는 유의한 생존율의 증가를 보였다 ( $P < 0.05$ ). 그러나 이보다 낮은 농도인  $\beta$ -glucan을 10  $\mu$ g 첨가한 실험구에서는 백신접종 4주와 8주후 모두 P 값이 0.1이상으로 대조구와 차이를 보이지 않았다. 그러므로  $\beta$ -glucan은 면역 4주후 어느 정도의 백신효능을 증가시킬 수는 있으나  $\beta$ -glucan 단독으로 *M. avidus*의 면역보조제로 사용하기는 어려울 것으로 생각된다.

방어력의 지속기간과 관련하여 실험에 사용한 선천성 면역을 증가시키는 면역보조제들이 면역지속기간을 연장시키는 효능을 가지지는 못하였으며 백신접종 8주 후  $\beta$ -glucan을 100  $\mu$ g 첨가한 그룹 이외의 모든 그룹에서 생존율의 개선을 보이지 않았다. 따라서, 효능을 장기간 지속시킬 수 있도록 항원을 천천히 유리시키는 오일성분의 면역보조제에 대한 추가 연구가 요구된다. *M. avidus* 항원과 peptidoglycan을 첨가한 백신에 적용하기에 적합한 오일성분의 면역보조제의 종류와 유화제 및 백신조성에 대한 연구가 필요할 것이다.

이상의 결과를 종합하면 본 연구에서 사용한 peptidoglycan, lipoteichoic acid와  $\beta$ -glucan 중 *M. avidus* 백신의 면역보조제로 peptidoglycan을 첨가한 백신이 백신접종 4주째에 55%와 65%의 상대생존율을 나타내어 가장 효능이 높았으므로 이후 peptidoglycan을 *M. avidus* 백신개발을 위한 면역보조제의 강력한 후보물질로 사용할 수 있을 것이다. 선천성 면역을 증가시키는 물질들이 모든 병원체의 백신에 대하여 방어력을 증강시키는 효과를 나타내는 것은 아니므로 병원체의 특성과 발병기전에 따라 특정 병원체에 적합한 면역보조제를 선별해야 한다. 따라서, 본 연구에서 선별한 면역보조제를 첨가로 제조한 백신이 *M. avidus*에 대한 방어력을 증강시키는 작용을 입증한 결과물은 *M. avidus* 백신 개발에 있어 중요한 성과라고 할 수 있을 것이다.

## 사 사

이 논문은 2021년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구입니다(스마트 수산양식 연구센터). 본 연구를 수행함에 있어 스쿠티카 층의 배양과 사육 실험에 도움을 주신 김 경 연구원께 감사사를 표합니다.

## References

Amend DF. 1981. Potency testing of fish vaccines. International symposium in fish biologics: serodiagnosis and vaccines. Dev Biol Stand 49, 447-454.  
Azard IS, Al-Marzouk A, James CM, Almatar S and Al-Ghar-

abally H. 2007. Scuticociliatosis-associated mortalities and histopathology of natural infection in cultured silver pomfret (*Pampus argenteus Euphrasen*) in Kuwait. Aquaculture 262, 481-491. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.033>.  
Cheung PJ, Rigrelli RF and Ruggieri GD. 1980. Studies on the morphology of *Uronema marinum* Dujardin (Ciliata: Uronematidae) with a description of the histopathology of the infection in marine fishes. J Fish Dis 3, 295-303. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1980.tb00400.x>.  
Dragesco A, Dragesco J, Coste F, Gasc C, Romestand B, Raymond J and Bouix G. 1995. *Philasterides dicentrarchi* n. sp. (Ciliophora, Scuticociliatida), a histophagous opportunistic parasite of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1785), reared marine fish. Eur J Protistol 31, 327-340. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(11\)80097-0](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(11)80097-0).  
Dykova I and Figueras A. 1994. Histopathological changes in turbot *Scophthalmus maximus* due to a histophagous ciliate. Dis Aquat Organ 18, 5-9.  
Dziarski R and Gupta D. 2005. Peptidoglycan recognition in innate immunity. J Endotoxin Res 11, 304-310. <https://doi.org/10.1177/09680519050110050801>.  
Iglesias R, Paramá A, Álvarez MF, Leiro J, Fernandez J and Sanmartín ML. 2001. *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain). Dis Aquat Organ 46, 47-55. <https://doi.org/10.3354/dao046047>.  
Isaac Ginsburg. 2002. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. Lancet Infect Dis 2, 171-179. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00226-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00226-8).  
Itami T, Kundo M, Uozu M, Suganuma A, Abe T, Nakagawa A, Suzuki N and Takahashi Y. 1996. Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolicida* infection in yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Temminck and Schlegel), by irak administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. J Fish Dis 19, 185-187.  
Jee BY, Kim YC and Park MS. 2001. Morphology and biology of parasite responsible for scuticociliatosis of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Dis Aquat Organ 47, 49-55. <https://doi.org/10.3354/dao047049>.  
Jesús L, Sanmartín ML, Paramá AI, Castro R, Cabaleiro S, Ruiz De Ocenda MV, Barja JL and Leiro J. 2008. Optimization of an inactivated vaccine against a scuticociliate parasite of turbot: Effect of antigen, formalin and adjuvant concentration on antibody response and protection against the pathogen. Aquaculture 278, 22-26. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.015>.  
Jung SJ, Kitamura SI, Song JY, Joung IY and Oh MJ. 2005. Complete small subunit rRNA gene sequence of the scuticociliate *Miamiensis avidus* pathogenic to olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Dis Aquat Organ 65, 159-162. <https://doi.org/10.3354/dao064159>.

- Jung SJ, Kitamura SI, Song JY and Oh MJ. 2007. *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) causes systemic infection of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and is a senior synonym of *Philasterides dicentrarchi*. Dis Aquat Organ 73, 227-234. <https://doi.org/10.3354/dao073227>.
- Kang YJ, Kim DS and Kim KH. 2013. Protective potential of CpG 1668 motif-harboring plasmids against *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) infection in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquac Res 45, 934-939. <https://doi.org/10.1111/are.12020>.
- Kang YJ, Choi SH and Kim KH. 2014. Preventive and therapeutic effects of auxotrophic *Edwardsiella tarda* mutant harboring CpG 1668 motif-enriched plasmids against scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Exp Parasitol 144, 34-38. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.06.007>.
- Kang YJ and Kim KH. 2015. Immunochemotherapy with doxycycline and CpG-ODN 1668 for treatment of scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture 435, 143-145. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.024>.
- Kim SM, Cho JB, Kim SK, Nam YK and Kim KH. 2004a. Occurrence of scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus* by *Phiasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida). Dis Aquat Organ 62, 233-238. <https://doi.org/10.3354/dao062233>.
- Kim SM, Cho JB, Lee EH, Kwon SR, Kim SK, Nam YK and Kim KH. 2004b. *Pseudocohnilembus persalinus* (Ciliophora: Scuticociliatida) is an additional species causing scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Dis Aquat Organ 62, 239-244. <https://doi.org/10.3354/dao062239>.
- Kim YJ. 2013. Adjuvant for scuticociliate *Miamiensis avidus* vaccine. M.S. Thesis. Department of Aqualife medicine, Chonnam National University, Gwangju, Korea.
- Lee EH and Kim KH. 2009. CpG-ODN increases resistance of olive flounder *Paralichthys olivaceus* against *Phiasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida) infection. Fish Shellfish Immunol 26, 29-32. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.10.001>.
- Lee NS, Park JH, Han KS and Huh MD. 1994. Histopathological changes in fingerlings of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, with severe scuticociliatosis. J Fish Pathol 7, 151-160.
- Matsuo K and Miyazano I. 1993. The influence of long-term administration of peptidoglycan on diseases resistance and growth of juvenile rainbow trout. Nippon Suisan Gakkaishi 59, 1377-1379. <https://doi.org/10.2331/suisan.59.1377>.
- Michelsen KS, Aicher A, Mohaupt M, Hartung T, Dimmeler S, Kirschning CJ and Schumann RR. 2001. The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs): peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. J Biol Chem 276, 25680-25686. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011615200>.
- Munday BL, O'Donoghue PJ, Watts M, Rough K and Hawkeston K. 1997. Fatal encephalitis due to the scuticociliate *Uronema nigricans* in sea-caged, southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*. Dis Aquat Organ 30, 17-25. <https://doi.org/10.3354/dao030017>.
- National Institute of Fisheries Science. 2000. Aquatic medicine catalog. Retrieved from [https://www.nifs.go.kr/distantwater/skin/doc.html?fn=20210118101351712\\_0.pdf&rs=/distantwater/preview/nifs\\_newsletter/#](https://www.nifs.go.kr/distantwater/skin/doc.html?fn=20210118101351712_0.pdf&rs=/distantwater/preview/nifs_newsletter/#) on Jun 23, 2021.
- Nikl L, Evelyn TPT and Albright LJ. 1993. Trials with an orally and immersion-administered  $\beta$ -1,3 glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. Dis Aquat Organ 7, 191-196.
- Puig L, Traveset R, Palenzuela O and Padrós F. 2007. Histopathology of experimental scuticociliatosis in turbot *Scophthalmus maximus*. Dis Aquat Organ 76, 131-140. <https://doi.org/10.3354/dao076131>.
- Robertsen B, Rorstad G, Engstad R and Raa J. 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. J Fish Dis 13, 391-400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1990.tb00798.x>.
- Sanmartín ML, Paramá A, Castro R, Cabaleiro S, Leiro J, Lamas J and Barja JL. 2008. Vaccination of turbot, *Psetta maxima* (L.), against the protozoan parasite *Philasterides dicentrarchi*: effects on antibody production and protection. J Fish Dis 31, 135-140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00876.x>.
- Siwicki AK, Anderson DP and Rumsey GL. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protects against furunculosis. Immunol Immunopathol 41, 125-139. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)90062-0](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)90062-0).
- Song JY, Kitamura SI, Oh MJ, Kang HS, Lee JH, Tanaka SJ and Jung SJ. 2009. Pathogenicity of *Miamiensis avidus* (syn. *Philasterides dicentrarchi*), *Pseudocohnilembus persalinus*, *Pseudochonilembus hargisi* and *Uronema marinum* (Ciliophora, Scuticociliatida). Dis Aquat Organ 83, 133-143. <https://doi.org/10.3354/dao02017>.
- Thim HL, Iliev DB, Christie KE, Villoing S, McLoughlin MF, Strandskog G and Jørgensen JB. 2012. Immunoprotective activity of a salmonid alphavirus vaccine: Comparison of the immune responses induced by inactivated whole virus antigen formulations based on CpG class B oligonucleotides and poly I: C alone or combined with an oil adjuvant. Vaccine 30, 4828-4834. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.05.010>.
- Vinay TN, Kim YJ, Jung MH, Kim WS, Kim DH and Jung SJ. 2013. Inactivated vaccine against viral hemorrhagic septicemia (VHS) emulsified with squalene and aluminum hydrox-

ide adjuvant provides long term protection in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Vaccine* 31, 4603-4610. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.036>.

Yoshida T, Kruger T and Inglis V. 1995. Augmentation of non-specific protection in african catfish *Claria gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. *J Fish Dis* 18, 195-198. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1995.tb00278.x>.