

# 알지네이트 코팅 *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) 경구백신의 넘치(*Paralichthys olivaceus*)에 대한 효능평가

신수미 · 정성주<sup>†</sup>

전남대학교 수산생명의학과

## Efficacy of alginate microsphere oral vaccine against *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Su-Mi Shin and Sung-Ju Jung<sup>†</sup>

Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea

The efficacy of the alginate microsphere (Alginate MS) oral vaccine against *Miamiensis avidus* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) was confirmed through challenge infections by both immersion and injection routes. In trial 1, the formalin-inactivated *M. avidus* coated with alginate, designated as 'IMa+Alginate MS' group, and the IMa group were administered with vaccines mixed with feed, with a total antigen dose of  $3.75 \times 10^6$  cells/fish. When challenged with immersion infection at five weeks post vaccination, the relative percent survival (RPS) in the IMa+Alginate MS group was 50% (immersed in 50% seawater) and 37.5% (immersed in 100% seawater). The group that received only IMa showed a low survival rate. In trial 2, the antigen was fed mixed with feed at a total dose of  $2.38 \times 10^6$  cells/fish for 5 days. Two weeks after oral vaccination, fish were intraperitoneally injected for infection. The RPS in the IMa+Alginate MS group was 30.8%, while the IMa-only group showed no vaccine efficacy. At five weeks post vaccination, when subjected to challenge infection by immersion in 50% seawater, the IMa+Alginate MS group recorded a RPS of 42.9%, whereas the IMa group had a RPS of 14.3%. The results of this study indicate that coating *M. avidus* antigen with alginate can provide higher protection in olive flounder compared to administering the antigen alone.

**Key words:** *Miamiensis avidus*, Scuticoiliate, Oral vaccine, Olive flounder, Alginate

### 서 론

스쿠티카충은 Oligohymenophore강 Scuticociliatida아강에 속하며 크기는 약 31.5 (21-37)  $\mu\text{m} \times 18.5$  (11-28)  $\mu\text{m}$ 이고, 장축을 따라 8-12개의 섬모열과

꼬리 부분에 1개의 긴 섬모를 가진 기생성 원충류이다(Jung et al. 2007). 국내에서는 지난 1990년대 초반 넘치(*Paralichthys olivaceus*)에서 첫 감염사례가 보고되었으며, 이후 넘치양식어가에 지대한 경제적 손실을 유발하는 주요 병원체 중 하나이다(Lee et al. 1994). 스쿠티카충에 감염된 어류는 출혈을 동반한 체표 궤양, 체색흑화, 안구돌출이 주요 증상이며, 아가미와 피부를 통해 체내로 침투하

<sup>†</sup>Corresponding author: Sung-Ju Jung  
Tel: +82-61-659-7175, Fax: +82-10-659-7179  
E-mail: sungju@chonnam.ac.kr

여 증식함으로써 내장기관 및 뇌조직까지 전신감염을 유발한다. 국내에서 감염을 유발한다고 알려진 스쿠티카는 *Uronema marinum*, *Pseudocohnilembus persalinus*, *Miamiensis avidus* (= *Philasterides decentrarchi*) 이며(Jee et al., 2001; Kim et al., 2004a; 2004b; Jung et al., 2007), 이중 *M. avidus*가 넙치에 강한 병원성을 일으킨다고 알려져 있다(Song et al., 2009). 스쿠티카충 구제를 위한 방법으로는 일반적으로 포르말린, pyrimethamine, salicylanilides niclosamide, oxyclozanide 등을 이용한 화학요법을 이용하지만 이러한 방법으로 충을 완벽하게 구제할 수 없다(Iglesias et al., 2002). 이러한 이유로 mineral oil 을 면역보조제로 사용하여 *Philasterides decentrarchi* 에 대한 불활화 백신(Lamas et al., 2008; Sanmartin et al., 2008) 및 면역자극제(CpG ODN)를 활용한 스쿠티카충 제어를 위한 방안들을 제시하고 있다(Lee and Kim, 2009; Kang and Kim, 2015). 2020년 세계적으로 최초로 우리나라에서 *M. avidus* 백신이 상용화에 성공하였고, 면역보조제가 첨가되지 않고 2회 접종하는 *M. avidus* 단일주사백신(녹십자의약품)과 스쿠알렌보조제에 *M. avidus* 및 *Tenacibaculum maritimum* 이 포함된 다가백신(씨티씨백)이 품목허가를 받았다(NIFS, 2020).

*M. avidus*충에 대한 백신은 대부분 주사백신의 형태로 이러한 백신은 항원에 대한 장기적인 면역형성을 제공하지만, 20 g미만의 작은 어류에는 적용하기 힘든 형태의 백신이다. 스쿠티카충은 연중 발생하는 질병이며, 초기 자어부터 출하직전의 넙치까지 발병하는 질병이기 때문에 스쿠티카충에 대응하기 위해서는 어체의 크기에 관계없이 적용 가능한 백신이 필요하다. 어류에 백신을 투여하는 방법으로는 주사, 침지와 경구가 있는데 그 중 경구경로가 스트레스가 적고 경제적 측면에서 효율적인 방법으로 모든 크기의 어류에 적용할 수 있는 이상적인 백신 방법이다(Rombout et al., 1986). 이러한 장점에도 불구하고 위산에 의한 위의 산성환경에서 항원이 파괴되지 않고 위장관 면역계(GALT; gut-associated lymphoid tissue) 까지 도달하게 하는 것이 매우 까다롭기 때문에 개발이 제한적이다(Russell-Jones, 2000).

Alginate microsphere는 다른 생분해성 물질들에

비해 점막 접착 특성, 단백질 분해 및 산성 조건에 대한 안정성, 비교적 쉬운 겔 형성 조건, 생분해성, 낮은 독성, 가용성 및 높은 경제성과 같은 장점을 가지고 있어 많이 사용되는 백신 코팅제 중 하나이다(Bowersock et al., 1999; Martins et al., 2007). 또한 Alginate는 그 자체로 어류 질병에 대한 면역 반응을 향상시킬 수 있다는 다양한 보고가 있으며(Fujiki et al., 1994; Romalde et al., 2004; Huttenhuis et al., 2006), 이러한 특성을 이용하여 최근 논문에서 다양한 항원에 대한 Alginate microsphere 기반 경구백신을 개발하고 있다(Tian et al., 2008; Behera et al., 2013; Ballesteros et al., 2015). 따라서 본 연구에서는 Alginate microsphere (Alginate MS) 를 기반으로 한 *M. avidus* 경구백신을 제작하고 넙치에 면역하여 경구백신의 효능을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어

스쿠티카충에 감염된 이력이 없는 넙치를 충청남도 태안군 소재 종묘생산장에서 구입 후 전남대학교 해양수산교육연구지원센터에서 사육하였다. 지속적으로 산소공급과 해수교환이 이루어지는 2톤의 해수가 수용된 수조에 사육하였으며, 감염 실험에 사용한 실험어는 감염시설로 옮겨서 실험을 수행하였다. Trial 1에 사용한 넙치 치어는 평균  $5.8 \pm 1.2$ g로 수온 20°C가 유지되는 순환여과식 수조(200L)에서 사육하였다. Trial 2는 같은 그룹의 넙치를 키워서 사용하였다.

### 스쿠티카 충 배양 및 항원 준비

본 실험에서 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 10°C에서 배양하면서 2달 간격으로 계대 배양하여 사용하였다. CHSE-214세포의 배양에는 25 cm<sup>2</sup> 세포 배양용 플라스크(Thermo Fisher Scientific, China)에 10%의 소태아혈청(Gibco, USA)과 penicillin-streptomycin (Gibco, USA)를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM; Gibco,

USA)을 사용하였다. CHSE-214 세포에서 *M. avidus* YS2를 15°C에서 5일간 배양하여 먹이공급원으로 사용한 CHSE-214세포가 현미경으로 보이지 않는 것을 확인한 후 포르말린 불활화를 진행하였다. 포르말린 불활화는 YS2가 포함된 배양액에 포르말린을 500 ppm농도로 첨가한 후 4°C에서 교반하였다. 이어서, 134 × g에서 10분 동안 원심분리하여 *M. avidus*를 수확하고 현미경으로 섬모를 관찰하여 완전히 불활성화 된 것을 확인하였다. 그 후 불활성화된 항원 용액을 소태아혈청이 포함되지 않은 DMEM를 사용하여 10분 동안 134 × g로 원심분리하여 2회 세척한 후 Phosphate Buffer Saline (PBS, pH 7.2)으로 원하는 항원 농도를 맞추어 사용하였다. 경구백신의 1회 제작에는 75 cm<sup>2</sup> 플라스크 45개 분량(≈4 × 10<sup>8</sup> cells)의 총을 사용하였고 포르말린으로 불활화한 항원은 이후 IMa (inactivated *M. avidus*)로 나타내었다.

#### Alginate microsphere (Alginate MS) 경구백신 제작

Alginate MS는 Tian et al. (2008) 연구에서 설명한 방법을 변형하여 제작했다. 15 ml의 증류수에 Alginate (Sigma-Aldrich, USA)를 넣어 12시간 실온에서 용해시켜 0.3% Alginate 수용액을 만들었다. 이후 15 ml의 alginate 수용액을 포르말린으로 불활화한 *M. avidus* 항원(IMa) 3 ml (≈4 × 10<sup>8</sup> cells)와 섞은 후 혼합을 위해 1500 rpm에서 5분 동안 교반하였다. Alginate와 IMa 항원의 혼합물(W)을 4.5 ml Span-80 (sorbitan monolaurate, Sigma-Aldrich, USA)이 들어 있는 600 ml의 paraffin oil (O)에 첨가한 후, 1500 rpm에서 10분간 교반하여 water in oil (W/O) 제형을 형성하였다. 1차 W/O 용액에 0.15M CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, USA)를 15 ml 넣어 교반기 (1000 rpm)에서 2시간 동안 교반하였다. 이후 1000 × g에서 10분간 원심분리한 후 침전물은 70% 알코올로 두 번 세척하여 흡수드 안에서 24시간 이상 건조하여 무게를 잰 후 g당 들어있는 항원의 양을 계산하였다. 건조한 백신은 4°C에서 밀봉하여 보관하다가 사료에 혼합할 때 PBS에 녹여 사용하였다.

#### 침지감염법 확립

경구백신은 점막면역 경로를 자극하는 방법으로 점막면역이 존재하는 피부와 장관을 통한 공격 감염이 주사공격감염보다는 더 효과적이므로 *M. avidus*의 침지감염법을 확립하고자 하였다. 침지감염은 Takagishi et al. (2009)의 방법을 변형하여 사용하였고, 5.8 ± 1.2 g과 7.8 ± 1.64 g의 두 가지 크기의 넙치를 사용하였다. 침지감염은 해수의 농도를 30%, 50% 및 100%로 설정한 3가지의 조건으로 수행하였다. 침지감염은 3가지 농도의 해수 1L에 10마리의 넙치를 수용하고 *M. avidus* (1.12 × 10<sup>7</sup> cells) 배양액을 넣고 1시간 에어레이션하면서 침지시킨 후 각각의 염분농도로 맞춘 해수를 20L씩 추가하였다. 침지감염 이후 사육수를 3일간은 설정한 해수농도로 절반씩 환수하였고 그 이후는 일반해수로 환수하였다.

#### 주사감염법 확립

주사감염은 복강감염으로 진행하였고 5.8 ± 1.2 g의 실험어에는 한 마리 당 1 × 10<sup>4</sup>, 5 × 10<sup>3</sup> 및 1 × 10<sup>3</sup> cells/100ul의 농도로, 7.8 ± 1.64 g의 실험어에는 1.2 × 10<sup>5</sup>, 5.3 × 10<sup>4</sup> 및 1.2 × 10<sup>4</sup> cells/100ul의 농도로 접종하였다. 실험어는 25L의 UV 처리된 해수가 들어있는 수조에 10마리씩 수용하고, 수온은 인위감염 시점부터 종료일까지 20-21°C로 유지하였다. 폐사는 28일 동안 매일 관찰하여 기록하였으며, 폐사어의 복강과 뇌를 검경하여 스쿠티카에 의한 폐사를 확인하였다.

#### 침지감염을 통한 효능평가(Trial -1)

Trial-1에서는 침지공격감염으로 Alginate MS의 효능 검증을 진행하였다. 면역은 총 120마리의 넙치 치어(5.8 ± 1.2 g)를 무작위로 4개 그룹(IMa+Alginate MS, IMa, 감염대조군, 비 감염대조군)으로 나누어 30마리씩 수용하고 경구로 투여하였다 (Table 1). IMa+Alginate MS 그룹과 IMa 그룹은 어체중의 1%에 해당하는 사료에 백신을 섞어 5일간 나누어 투여하였으며, 5일간 투여한 항원의 총량이 실험어 1마리 당 3.75 × 10<sup>6</sup> cells이 되도록 하였다. 감염 대조군과 비 감염대조군은 백신그룹과 동일한 양의 일반 사료를 투여하였다.

경구투여 종료일로부터 5주 후 그룹당 30마리의 넙치를 15마리씩 나누어 수용하고 50% 해수와 100% 해수 조건에서  $1.12 \times 10^7$  cells/1L/tank의 농도로 위에서 기술한 방법과 동일한 방법으로 침지로 감염시켜 경구백신의 효능을 확인하였다(Table 1). 침지감염 후 20°C에서 사육하면서 28일 동안 매일 관찰하여 기록하였으며, 폐사어의 피부 궤양부위와 뇌를 검경하여 스쿠티카충을 확인하였다.

### 주사감염과 침지감염을 통한 효능평가(Trial -2)

Trial 1에서는 침지감염으로 백신의 효능을 평가하였으나 침지감염은 주사감염보다 10배에서 20배 많은 양의 충을 배양해야 하는 어려움이 있어 주사감염으로도 침지감염과 동일한 정도의 효능을 나타내는지 확인하고자 하였다. 또한 침지감염을 추가로 실시하여 IMA+Alginate MS 백신이 trial 1과 동일한 효능을 나타내는지 확인하고자 하였다. 이를 위하여 trial 2는 주사감염과 침지감염의 2가지 방법을 사용하여 공격감염을 실시하였다. 총 192마리의 넙치 치어( $7.8 \pm 1.64$  g)를 4개의 실험구(n = 24)로 나누어 20-21°C로 유지하여 사육하였다(Table 1). 경구백신은 어체중의 1%에 해당하는 사료에 백신을 섞어 5일간 나누어 투여하였고, 5일간 투여한 항원의 양이 실험어 1마리 당  $2.38 \times 10^6$  cells이 되도록 하였다. 감염 대조구와 비 감염대조구는 백신그룹과 동일한 양의 일반 사료를 투여하였다. 공격감염실험은 면역 종료일로부터 2주 후에는 복강감염으로, 5주 후에는 침지감염으로 진행하였다(Table 1). 먼저 경구 면역 종료일로부터 2주 후, 25L의 해수가 들어있는 4개의 수조에 14마리씩 수용하고 *M. avidus*를  $5.7 \times 10^4$  cell/fish/100ul의 농도로 복강 주사로 감염시켰다. 수온은 20-21°C로 유지하면서 28일간 폐사를 관찰하였다.

침지감염은 경구 면역 종료일로부터 5주 후, 1리터의 50% 해수가 들어있는 4개의 수조에 넙치를 10마리씩 수용하고 *M. avidus*를  $1.12 \times 10^7$  cell/1L에서 한 시간 침지 후 20L의 50% 해수를 첨가하였다. 이후 과정은 Trial 1과 동일하게 수행하였다.

### 통계분석

통계분석은 Graph pad prism 5 software (Version

5.02)를 이용하여 log rank (mantel-cox) test로 하였다. 상대생존율(relative percentage survival, RPS)은 다음의 수식을 활용하여 산출하였다(Amend, 1981).

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

### 실험동물의 관리

본 실험은 전남대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인 하에 표준작업 지시서와 허가사항에 따라 수행하였다(CNUIACUC-YS-2019-8).

## 결 과

### 침지감염

평균  $5.8 \pm 1.2$  g ( $8.57 \pm 1.48$  cm) 크기의 실험어에서는 30%와 50% 해수에서 모두 폐사하였고 100% 해수에서는 90%가 폐사하였다(Fig. 1A). 반면  $7.8 \pm 1.64$  g ( $9.3 \pm 0.96$  cm) 실험어에서는 30% 해수에서는 모두 폐사하였으나 50%와 100% 해수에서는 각각 40%와 30%가 폐사하였다(Fig. 1B). 두 가지의 넙치 크기 그룹 모두에서 담수의 비율이 높을수록 폐사는 빠른 시기에 나타났다. 침지감염으로 폐사한 넙치는 피부의 궤양과 출혈 및 지느러미가 결손되는 임상증상을 보였다(Fig. 1C). 또한 궤양 및 지느러미가 결손된 부위를 현미경으로 검경했을 때 스쿠티카충을 확인 할 수 있었다.

### 주사감염

$5.8 \pm 1.2$ g의 실험어에 한 마리 당  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  및  $1 \times 10^3$  cells/100ul의 농도로 복강주사하였을 때 각각 86.6%, 33.3% 및 13.3%의 누적폐사율을 나타내었다(Fig. 1D).  $7.8 \pm 1.64$  g의 실험어에  $1.2 \times 10^5$ ,  $5.3 \times 10^4$  및  $1.2 \times 10^4$  cells/100ul로 복강감염한 그룹에서는 66.6%, 33.3% 및 26.6%가 폐사하였다(Fig. 1E). 폐사어는 복부팽만이 주증상으로 피부의 궤양은 감염 2주 후에 약하게 보이는 개체가 있었다(Fig. 1F). 해부하면 출혈성의 복수가 차 있고 복수에는 활발하게 움직이는 스쿠티카충을 관찰할 수 있었다.

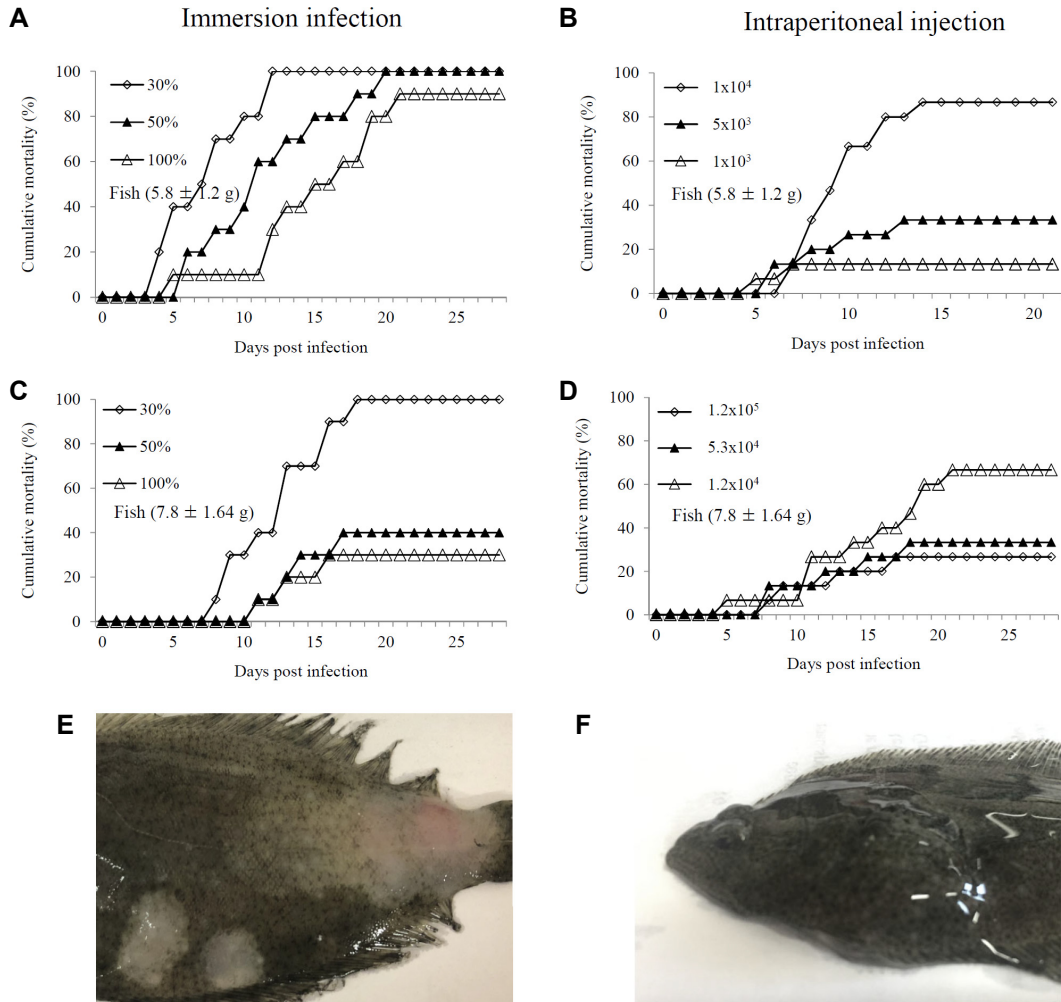


Fig. 1. Cumulative mortality and clinical signs of olive flounder infected by immersion (A-C) and intraperitoneal injection (D-F). Fish in two weight groups, 5.8 ± 1.2 g (A) and 7.8 ± 1.64 g (B), were maintained at 30%, 50% and 100% of seawater then immersion infected with *M. avidus* concentration of  $1.12 \times 10^7$  cells/L for 1 hour. Olive flounder infected by immersion exhibited white patches, typical ulcers, and hemorrhages on the skin (C). In addition, fish were intraperitoneally injected with three different concentrations of *M. avidus*,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  and  $1 \times 10^3$  cells/fish/100ul into 5.8 ± 1.2 g (D) and  $1.2 \times 10^5$ ,  $5.3 \times 10^4$  and  $1.2 \times 10^4$  cells/100ul into 7.8 ± 1.64 g (E) of fish. *M. avidus* injected fish exhibit distended abdomen due to hemorrhagic ascites (F).

**침지감염을 통한 효능평가(Trial -1)**

침지로 감염시켰을 때 IMA+Alginate MS그룹이 가장 높은 효능을 보였고 상대생존율은 50% 해수 감염에서 50%, 100% 해수 감염에서 37.5%였다 (Table 1, Fig. 2). IMA만 투여한 그룹에서는 두 그룹 모두 58.8%의 폐사율을 기록하여 감염대조군의 폐사율(50%와 66.6%)과 차이가 없었다 (Table 1,

Fig. 2).

**주사감염과 침지감염을 통한 효능평가(Trial -2)**

경구백신 투여 종료 2주 후 복강으로 주사감염을 진행한 경우 IMA+Alginate MS투여구의 상대생존율은 30.8%였으며 Alginate로 항원을 코팅하지 않은 IMA투여구는 백신의 투여효과가 전혀 없었

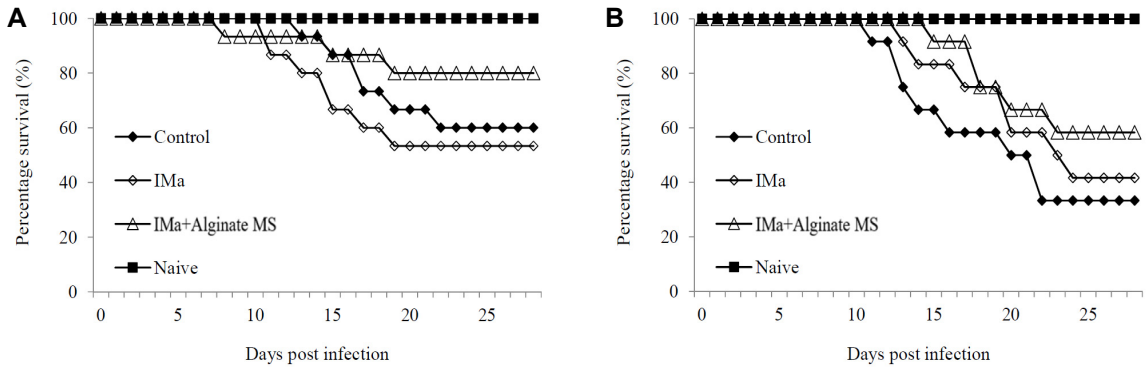


Fig. 2. Survival curves of experimental trial-1. Fish were orally immunized with *M. avidus* antigen dose  $3.75 \times 10^6$  cells/fish and subsequently immersion infected with *M. avidus* at a concentration of  $1.12 \times 10^7$  cells/L for 1 hour. The immersion infection was carried out in 50% seawater (A) and 100% seawater (B). IMA+alginate MS ( $\triangle$ ), IMA ( $\diamond$ ), control ( $\blacklozenge$ ) and naive ( $\blacksquare$ ) groups.

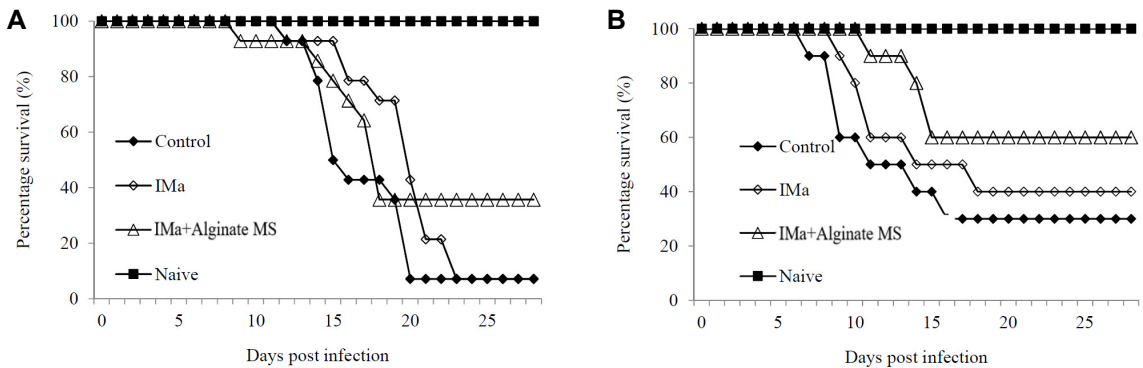


Fig. 3. Survival curves of experimental trial-2. Fish were orally immunized with *M. avidus* antigen dose of  $2.38 \times 10^6$  cells/fish and subsequently fish were intraperitoneally injected with  $5.7 \times 10^4$  cells/fish/100ul (A) and immersion infected with  $1.12 \times 10^7$  cells/L in 50% seawater (B). IMA+alginate MS ( $\triangle$ ), IMA ( $\diamond$ ), control ( $\blacklozenge$ ) and naive ( $\blacksquare$ ) groups.

다(Table 1, Fig 3). 경구백신 투여 종료 5주 후 침지 감염으로 공격감염 한 경우 IMA+Alginate MS의 상대생존율은 42.9%, IMA 투여구는 상대생존율은 14.3%를 기록하였다(Table 1, Fig. 3).

### 고 찰

스쿠티카증은 연중 발생하는 질병이며, 초기 자어부터 출하직전의 넙치까지 발병하는 질병이기 때문에 스쿠티카증에 대응하기 위해서는 사이즈에 관계없이 적용가능 한 백신이 필요하다. 특히 작은 크기의 치어에서 주사 투여 방식의 백신 투여

가 불가능하기 때문에 모든 크기의 어류에 백신을 쉽게 전달하고 백신 접종 어류에서 기생충 감염에 대한 보호 면역을 유도 할 수 있는 경구백신의 개발이 필요하다. 그러나 경구로 투여한 항원은 장의 면역 세포를 자극하기 전에 소화되므로 위 분해로부터 항원을 보호하여 장까지 전달할 방법이 필요하다(Somamoto and Nakanishi, 2020). 이러한 관점에서 Alginate는 낮은 독성, 생분해성, 생체적합성, 뛰어난 점막 접착 특성을 가지므로 microsphere의 기반 물질로 사용되어왔다(Lee et al., 2012; Popov et al., 2018). 본 연구는 Alginate microsphere (Alginate MS) 를 활용해 *M. avidus* 항원을 캡슐화한 후 사료

Table 1. Summary of vaccine efficacy trial—1 and 2

Trial	Group	Experimental fish			Immunisation			Challenge study			
		Fish size (initial)	Number of fish/group	Period	Antigen dose (cells/fish)	Infection route	Infection dose	Mortality (%)	RPS (%)	Log-rank ( <i>p</i> value)	
Trial-1	IMA+Alginate MS										
	IMA					Immersion (50% seawater)	25	50.0	0.1622		
	Control						58.33	-16.7	0.7102		
	Naive	5.8±1.2 g (8.6±1.5 cm)	15	5 weeks	3.75×10 <sup>6</sup>	1.12×10 <sup>7</sup> cells/1L/1h	0.0				
Trial-2	IMA+Alginate MS					Immersion (100% seawater)	41.67	37.5	0.0796		
	IMA						58.33	12.5	0.4811		
	Control						66.67				
	Naive						0.0				
Trial-2	IMA+Alginate MS					Intraperitoneal injection	64.29	30.8	0.1911		
	IMA						92.86	0.0	0.0668		
	Control						92.86				
	Naive	7.8±1.64 g (9.3±1.0 cm)	14	2 weeks	2.38×10 <sup>6</sup>	5.7×10 <sup>4</sup> cells/fish	0.00				
Trial-2	IMA+Alginate MS					Immersion (50% seawater)	40.00	42.9	0.1015		
	IMA						60.00	14.3	0.4821		
	Control						70.00				
	Naive						0.00				

RPS, relative percent survival

에 섞어 넙치에 투여하고, Alginate MS 의 항원 운반체로서 효능을 평가하였다.

먼저 경구백신의 효능을 검증하기 위해 침지감염법을 시도하였다. 효과적인 경구백신을 개발하기 위해서는 백신의 캡슐화 방법과 함께 백신의 효능을 평가하기 위한 병원체에 적합한 공격감염 모델을 선택하는 것이 중요하다(Somamoto and Nakanishi, 2020). 백신의 경구투여가 전신 면역보다는 점막 면역을 자극하며, 또한 침지가 주사보다 자연 감염과 유사한 감염경로이므로 침지감염으로 백신의 효능을 확인하고자 하였다. 선행연구에서 스쿠티카충을 침지경로로 감염시키면 어체의 크기에 따라 폐사율의 차이가 낮으며 크기가 큰 넙치에서는 폐사율이 낮거나 감염이 성립되지 않았다. Paramá et al. (2003)도 피부에 상처를 낸 후에야 침지감염이 가능하였고, Takagishi et al. (2009)은 저염분에서 일반해수보다 침지감염이 잘 일어난다고 보고하고 있다. 그러므로 본 연구에서는 경구백신을 투여한 넙치를 사용하여 침지감염이 확실하게 일어나는 조건을 확인한 후 그 조건에서 침지감염으로 백신의 효능을 평가하고자 Takagishi et al. (2009)가 사용한 낮은 염도의 조건을 추가하여 침지감염을 실시하였다. 그 결과  $1.12 \times 10^7$  cells/tank로 침지감염 시켰을 때 30%의 해수에서는 모두 폐사하였고 100% 해수에서  $5.8 \pm 1.2$  g은 90%,  $7.8 \pm 1.64$  g에서는 30%가 폐사하였으며 어체의 크기가 작을수록, 낮은 염분농도일수록 폐사가 더 발생하는 것을 확인하였다. 이는 본 연구에서 인용한 Takagishi et al. (2009)의 연구결과와도 유사하다. 본 연구에서는 백신의 효능을 평가하기 위하여 50%와 100%의 해수조건을 사용하였는데 이는 30%의 해수에서는 다른 두 그룹에 비하여 사육수에 거품이 많이 생기는 것으로 보아 어체에 가해지는 스트레스가 강한 것으로 생각되었기 때문이다. 유사하게 Park and Min (2018)은 10, 15, 20 및 25 psu (약 28.5%, 42.8%, 57.1% 및 71.4%해수)의 염분에 넙치를 사육하면 저염분인 10과 15 psu에서 24 시간 노출시켰을 때 혈장의 코티졸과 글루코코르티코이드가 상승하여 넙치가 저염분에서 급격한 스트레스의 영향을 받는 것을 보고하였다. 그러므로 본 연구에서는 넙치에 가해지는 스트레스의 영향이 적은

50% 해수와 100% 해수 조건에서 침지감염을 실시하여 경구백신이 효능을 평가하였다.

Trial 1에서 IMA+Alginate MS 그룹은 *M. avidus*에 대해 37.5-50%의 상대생존율을 나타내었다 (Table 1, Fig. 1). 그러나 IMA만 투여한 그룹의 경우 감염대조구와 비슷한 폐사율을 나타내었다. 이는 IMA만 투여한 그룹의 경우 *M. avidus*에 대한 면역이 충분히 생성되지 않으며 Alginate로 항원을 코팅함으로써 경구백신의 효능이 증가함을 의미한다. 50% 해수와 100% 해수에서 침지감염에 의한 대조구의 폐사율은 각각 50%와 66.67%로 저염분 스트레스에서도 *M. avidus*감염에 의한 폐사의 증가는 없었다. 또한 상대생존율에서도 차이가 없었으므로 50% 해수와 100% 해수 감염의 조건이 백신의 상대생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 생각되었다.

Trial-2에서 경구백신 투여 종료 2주 후 복강으로 주사감염 했을 때 IMA+Alginate MS 투여구의 상대생존율은 30.8%였고, IMA투여구는 0%였다. 경구백신 투여 종료 5주 후 50%의 해수에서 침지감염했을 때 IMA+Alginate MS 투여구의 상대생존율은 42.9%였고, IMA투여구는 14.3%였다. 즉, 주사감염과 침지감염 모두에서 IMA+Alginate MS 투여구가 IMA단독 투여구보다 높은 상대생존율을 보임으로써 Alginate로 코팅한 그룹에서 경구백신이 효능이 향상됨을 알 수 있다. 또한, 경구백신은 경구 경로를 통해 점막면역을 자극하는 백신이므로 점막경로로 감염시키는 침지감염을 적용함으로써 상대생존율의 개선효과를 기대하였으나 주사감염과 침지감염 모두 유사한 상대생존율을 나타내었다. 이는 본 연구에 사용한 경구백신에 의하여 전신면역과 점막면역이 모두 향상되었기 때문일 것으로 생각된다. 또한, *M. avidus* 경구백신의 효능을 평가하기 위한 감염모델로써 주사감염이 침지감염보다 적은 수의 충이 필요하고 비교적 크기가 큰 넙치에도 안정적으로 감염이 가능하므로 주사백신이 더 적합한 것으로 생각된다.

*M. avidus* 경구백신에 대한 연구로는 본 연구인 Alginate MS 기반과 선행연구인 Chitosan MS 기반의 연구가 있다(Shin et al., 2023). 선행연구에서 Chitosan MS 기반 *M. avidus* 경구백신의 상대생존



율은 41.7-53.3%로 Alginate MS 기반의 *M. avidus* 경구백신보다 유사하거나 조금 더 높은 효능을 보인다. 제조법에 있어서는 Alginate는 상온에서 금방 녹는데 비하여 Chitosan은 강한 산에서 24시간 이상 녹여야 하므로 Alginate MS가 제조공정이 단순하여 대량생산시에 편리한 이점이 있다.

Alginate MS를 기반으로 한 경구백신에 대한 연구로 연어(*Oncorhynchus mykiss*)에서 Alginate MS를 기반으로 IHNV (Infectious Hematopoietic Necrosis Virus)에 대한 DNA 백신의 효능을 검증한 연구에서 21-45%의 상대생존율을 유도하는 것으로 보고되었으며(Ballesteros et al., 2015), 초어(*Ctenopharyngodon idella*)의 GCRV (Grass Carp Reovirus) antigenic epitopes 를 이용한 Alginate microsphere 기반 경구백신은 면역 2주 후 52%의 상대생존율을 나타내었다(Xu et al., 2022). 결과적으로 본 연구에서 개발한 Alginate MS 경구백신은 *M. avidus*에 대해 기존에 보고된 연구들과 유사한 수준의 효능을 입증하였고, 더하여 상기의 microsphere 제조 방법의 단순성과 안전성은 본 연구에서 사용한 Alginate MS 기반 경구백신에 추가적인 이점으로 작용한다고 할 수 있을 것이다.

## 요 약

*Miamensis avidus*에 대한 alginate Microsphere (Alginate MS) 경구백신의 넙치에 대한 효능을 침지와 주사경로의 공격감염으로 확인하였다. Trial 1에서는 불활화 *M. avidus* (IMa)와 IMa를 alginate로 코팅한 IMa+Alginate MS를 사료와 혼합하였으며 총 5일 동안  $3.75 \times 10^6$  cells/fish의 농도로 먹였다. 경구백신 투여 5주 후 침지로 공격감염했을 때, IMa+Alginate MS 그룹의 상대생존율 (RPS)은 50% (50% 해수 침지감염)와 37.5% (100% 해수 침지감염)였다. IMa 단독투여 그룹은 낮은 생존율을 보였다. Trial 2에서는 항원을  $2.38 \times 10^6$  cells/fish의 농도로 5일간 나누어 먹였다. 경구백신 투여 2주 후에는 복강주사로 효능을 평가하였고, IMa+Alginate MS 투여구의 상대생존율은 30.8%였으며 IMa 단독투여 그룹은 백신의 투여효과가 전혀 없었다. 경구백신 투여 종료 5주 후 50% 해수에서

침지감염으로 공격감염 한 경우 IMa+Alginate MS 투여구의 상대생존율은 42.9%, IMa 단독투여 그룹의 상대생존율은 14.3%를 기록하였다. 본 연구의 결과는 Alginate로 *M. avidus*항원을 코팅함으로써 *M. avidus*항원을 단독으로 투여하는 것보다 넙치에 높은 방어력을 제공할 수 있음을 나타낸다.

## 감사의 글

이 논문은 2023년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임 (넙치 SPF 특정 병원체 무감염 증자생산 기술개발)

## References

- Amend, D. F.: Potency testing of fish vaccines. International symposium in fish biologics: serodiagnostics and vaccines. Developments in Biological Standardization, 49: 447-454, 1981. <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci.57.83>
- Ballesteros, N. A., Alonso, M., Saint-Jean, S. R. and Perez-Prieto, S. I.: An oral DNA vaccine against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) encapsulated in alginate microspheres induces dose-dependent immune responses and significant protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 45(2): 877-888, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.045>
- Behera, T. and Swain, P.: Alginate-chitosan-PLGA composite microspheres induce both innate and adaptive immune response through parenteral immunization in fish. Fish and Shellfish Immunology, 35(3): 785-791, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.012>
- Fujiki, K., Matsuyama, H. and Yano, T.: Protective effect of sodium alginates against bacterial infection in common carp, *Cyprinus carpio* L. Journal of Fish Diseases, 17(4): 349-355, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1994.tb00230.x>
- Huttenhuis, H. B., Ribeiro, A. S., Bowden, T. J., Van Bavel, C., Taverne-Thiele, A. J. and Rombout, J. H.: The effect of oral immuno-stimulation in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.). Fish and Shellfish Immunology, 21(3): 261-271, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.12.002>
- Iglesias, R., Paramá, A., Álvarez, M. F., Leiro, J. and Sanmartín, M. L.: Antiprotozoals effective *in vitro*

- against the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 49(3): 191-197, 2002. <https://doi.org/10.3354/dao049191>
- Jee, B. Y., Kim, Y. C. and Park, M. S.: Morphology and biology of parasite responsible for scuticociliatosis of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 47(1): 49-55, 2001. <https://doi.org/10.3354/dao047049>
- Jung, S. J., Kitamura, S. I., Song, J. Y. and Oh, M. J.: *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) causes systemic infection of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and is a senior synonym of *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73(3): 227-234, 2007. <https://doi.org/10.3354/dao073227>
- Kang, Y. J. and Kim, K. H.: Immunotherapy with doxycycline and CpG-ODN 1668 for treatment of scuticociliatosis in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 435: 143-145, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.024>
- Kim, S. M., Cho, J. B., Kim, S. K., Nam, Y. K. and Kim, K. H.: Occurrence of scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus* by *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Diseases of Aquatic Organisms*, 62(3): 233-238, 2004a. <https://doi.org/10.3354/dao062233>
- Kim, S. M., Cho, J. B., Lee, E. H., Kwon, S. R., Kim, S. K., Nam, Y. K. and Kim, K. H.: *Pseudocohnilembus persalinus* (Ciliophora: Scuticociliatida) is an additional species causing scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62(3): 239-244, 2004b. <https://doi.org/10.3354/dao062239>
- Lamas, J., Sanmartín, M. L., Paramá, A. I., Castro, R., Cabaleiro, S., de Ocenda, M. V. R., Barja, J. L. and Leiro, J.: 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(1-4): 22-26, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.015>
- Lee, E. H. and Kim, K. H.: CpG-ODN increases resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida) infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 26(1): 29-32, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.10.001>
- Lee, K. Y. and Mooney, D. J.: Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1): 106-126, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- Lee, N. S., Park, J. H., Han, K. S. and Huh, M. D.: Histopathological changes in fingerlings of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, with severe scuticociliatosis. *Journal of Fish Pathology*, 7(2): 151-160, 1994.
- Martins, S., Sarmento, B., Souto, E. B. and Ferreira, D. C.: Insulin-loaded alginate microspheres for oral delivery—effect of polysaccharide reinforcement on physicochemical properties and release profile. *Carbohydrate Polymers*, 69(4): 725-731, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.02.012>
- National Fishery Products Quality Management Service <https://www.nfqs.go.kr/apms/search/goodsList.ad> on November 23, 2023.
- Paramá, A., Iglesias, R., Álvarez, M. F., Leiro, J., Aja, C. and Sanmartín, M. L.: *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida): experimental infection and possible routes of entry in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 217: 73-80, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00523-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00523-9)
- Park, H. J. and Min, B. H.: Stress Responses of Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) to Salinity Changes. *Korean Journal of Ichthyology*, 30(1): 1-8, 2018.
- Popov, A. L., Popova, N., Gould, D. J., Shcherbakov, A. B., Sukhorukov, G. B. and Ivanov, V. K.: Ceria nanoparticles-decorated microcapsules as a smart drug delivery/protective system: protection of encapsulated *P. pyralis* luciferase. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(17): 14367-14377, 2018. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b19658>
- Romalde, J. L., Luzardo-Alvarez, A., Ravelo, C., Toranzo, A. E. and Blanco-Méndez, J.: Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture*, 236: 119-129, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.02.028>
- Rombout, J. W., Blok, L. J., Lamers, C. H. and Egberts, E.: Immunization of carp (*Cyprinus carpio*) with a *Vibrio anguillarum* bacterin: indications for a common mucosal immune system. *Developmental and Comparative Immunology*, 10(3): 341-351, 1986. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.02.028>
- Russell-Jones, G. J.: Oral vaccine delivery. *Journal of Controlled Release*, 65: 49-54, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00231-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00231-X)
- Sanmartín, M. L., Paramá, A., Castro, R., Cabaleiro, S., Leiro, J., Lamas, J. and Barja, J. L.: Vaccination of turbot, *Psetta maxima* (L.), against the protozoan

- parasite *Philasterides dicentrarchi*: effects on antibody production and protection. *Journal of Fish Diseases*, 31(2): 135-140, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00876.x>
- Shin, S. M., Kole, S., Lee, J., Choi, J. S. and Jung, S. J.: Formulation of chitosan microsphere-based oral vaccine against the scuticociliate parasite *Miamiensis avidus*: Evaluation of its protective immune potency in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 142: 109159, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.109159>
- Somamoto, T. and Nakanishi, T.: Mucosal delivery of fish vaccines: Local and systemic immunity following mucosal immunisations. *Fish and Shellfish Immunology*, 99: 199-207, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.01.005>
- Song, J. Y., Kitamura, S. I., Oh, M. J., Kang, H. S., Lee, J. H., Tanaka, S. J. and Jung, S. J.: Pathogenicity of *Miamiensis avidus* (syn. *Philasterides dicentrarchi*), *Pseudocohnilembus persalinus*, *Pseudocohnilembus hargisi* and *Uronema marinum* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Diseases of Aquatic Organisms*, 83(2): 133-143, 2009. <https://doi.org/10.3354/dao02017>
- Takagishi, N., Yoshinaga, T. and Ogawa, K.: Effect of hyposalinity on the infection and pathogenicity of *Miamiensis avidus* causing scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86(2): 175-179, 2009. <https://doi.org/10.3354/dao02116>
- Tian, J. Y., Sun, X. Q. and Chen, X. G.: Formation and oral administration of alginate microspheres loaded with pDNA coding for lymphocystis disease virus (LCDV) to Japanese flounder. *Fish and Shellfish Immunology*, 24(5): 592-599, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.01.009>
- Xu, C., Qiao, M., Huo, X., Liao, Z. and Su, J.: An oral microencapsulated vaccine loaded by sodium alginate effectively enhances protection against GCRV infection in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Frontiers in Immunology*, 13: 848958, 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.848958>

---

Manuscript Received : Nov 26 2023

Revised : Dec 08 2023

Accepted : Dec 11 2023