

톨트라주릴(Toltrazuril)을 이용한 제주도 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 점액포자충성 여윌증에 대한 치료법 연구

강미래 · 김예지 · 전려진 · 김승민* · 김성현** · 한소리** · 정준범†

제주대학교 해양생명과학과, *국립수산물과학원 해조류연구센터, **피쉬케어연구소

Therapeutic study of myxosporean emaciation disease of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju using toltrazuril

Mi-Rae Kang, Ye-Ji Kim, Lyu Jin Jun, Seung Min Kim*, Sung-Hyun Kim**, Sori Han** and Joon Bum Jeong†

Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

*Seaweed Research Center, National Institute of Fisheries Science (NIFS), Mokpo 58746, Republic of Korea

**Fishcare laboratory, Jeju 63625, Republic of Korea

In order to search candidates for the treatment of myxosporean emaciation disease of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, *in vitro* and *in vivo* experiments were conducted using products such as Coxi-stop, Coxiclin, and BLEAN80. In the case of Coxi-stop, whose major component is toltrazuril, *in vitro* experiment using BF-2 cells showed a tendency of reducing the activity of myxosporea and did not exhibit cytotoxicity such as cell lysis. In the *in vivo* activity measurements, the experimental group immersed with Coxi-stop showed a lower cumulative mortality rate than the control group, this result is similar to the previous report that toltrazuril has a therapeutic effect on parasitic fish disease. This study suggests that toltrazuril is a potential candidate for the treatment of emaciation disease of olive flounder.

Key words: Emaciation, Olive flounder, Myxosporean sp. Toltrazuril

서 론

우리나라 양식 산업에 있어 넙치는 양식어류 생산량 중 약 56%의 높은 비중을 차지하고 있으며 2017년부터 2019년 상반기까지를 기준으로 우리나라의 넙치생산량 중 58.8% (11,660톤)가 제주도에 생산된 것으로 보고되었다(Korean statistical information service, KOSIS, 2019). 그러나 2007년부터

제주 넙치양식장에서 20cm 전후 크기의 넙치에서 복부팽만, 눈의 함몰 및 두개골의 돌출, 어체중 감소 등의 증상을 보이다가 폐사에 이르는 여윌증이 발생하고 있으며, 2016-2017년에는 제주넙치가 폐사한 원인 중 여윌증에 의한 폐사가 10.3%를 차지했다는 보고가 있었다(Shim *et al.*, 2019). 이러한 여윌증을 일으키는 원인체에 관한 연구가 다양하게 진행되고 있으며(Kim *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2012; Sekiya *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2015a, 2015b, 2017; Kim and Jeong, 2018; Shin *et al.*, 2018), Kim *et al.* (2015a)에 따르면 국내에서 발생하는 여윌증

†Corresponding author:

Tel: +82-64-754-3426, Fax: +82-64-756-3493

E-mail: jeongjb@jejunu.ac.kr

원인체를 분석한 결과, *Parvicapsula* sp. (accession number: KT321705)로 동정하여 이를 진단할 수 있는 PCR 방법을 개발하였고, Kim *et al.* (2018)은 2014년부터 2015년까지 제주도 60개소의 넙치양식장을 대상으로 정기적인 여윌증 모니터링을 실시하여 여윌증상 넙치로부터 *Parvicapsula* sp.가 공통적으로 검출된다는 것을 보고하였다. 또한, Sekiya *et al.* (2016)에 의하여 *Enteromyxum leei*도 여윌증상 넙치에서 다수 검출되는 것을 확인하였다. 그러나 현재 국내에서 여윌증상을 유발하는 점액포자충에 대한 예방대책 및 치료제 개발에 대한 연구는 미비한 실정이다. 본 연구에서는 1980년대에 처음 개발되어 현재까지 소, 돼지, 가금류, 양 등의 기생충성 질병 치료에 효과가 있으며, 특히 축산분야에서 점액포자충에 의한 콕시듐증의 치료 및 예방 목적으로 이용되고 있는 톨트라주릴 (Toltrazuril) (EMA, 1998; Greif G, 2000; Joachim *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2010; Maes *et al.*, 2007; Olsen *et al.*, 2012; Vanparijs *et al.*, 1989)을 사용하여 넙치내 점액포자충에 의한 여윌증 치료에도 효과가 있는지 알아보기 위해 실험을 진행하였다. 톨트라주릴은 점액포자충의 한 종류인 콕시듐 원충의 세포 내 기생단계에서 세망내피계와 골지체의 종대와 비정상적인 핵 주위공간을 유발하여 원충의 구조변화를 일으켜 원충을 사멸하게 하며, 원충의 호흡기관에서 효소의 감소를 유도하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Poultry Research, 2014). 톨트라주릴은 독성이 강한 제제로서, 사람이 직접적으로 섭취할 경우에 부작용을 일으킬 수도 있어 (Ai *et al.*, 2011), EU (European union)에서는 동물에 대하여 최대허용기준(Maximum residue limits, MRLs)을 설정하였으나, 수산물에 대한 잔류허용기준은 없는 상황이다. 그러나 최근에 양식 넙치에 발생하는 기생충성 질병의 치료제로서 평가연구를 할 수 있도록 시험법에 관한 분석이 진행되었으며(Hong *et al.*, 2019), 이전의 연구들에서 톨트라주릴 성분이 어류의 기생충성 질병 치료제로써 효과를 보인다고 보고하였다(Athanassopoulou *et al.*, 2009; Iglesias *et al.* 2002; Schmahl and Mehlhorn, 1988). 그리고 톨트라주릴을 주성분으로 하여 생산되는 Coxi-stop (5% toltrazuril), Coxiclin (2.5%

toltrazuril) 제품을 시험제제로 사용하여 여윌증상 넙치에 치료 효과가 있는지 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험어

여윌증상을 보이며 대량 폐사가 발생하고 있는 제주도 소재 넙치양식장으로부터 넙치(평균 체장 23.8±0.2 cm, 평균 체중 104 ± 14.1 g) 45마리를 운반 용기에 10마리 이하가 되도록 나누어 밀봉한 뒤, 제주대학교 해양과학대학에 위치한 실험수조에 옮겼다. 수조는 80 L의 플라스틱 수조에 해수 60 L를 유지하며 매일 환수하였고, 공기를 주입해 주었으며 수온은 15±0.5℃로 유지하였다. 모든 실험군은 Coxi-stop, Coxiclin, BLEAN80 및 대조군(control group)으로 나누어, 각 그룹당 총 10마리를 5마리씩 2개의 수조로 나누어 실험을 진행하였다. Kim *et al.* (2015a)의 방법대로 여윌증상이 있는 넙치 중 5마리를 임의로 선택한 후 신장과 장 조직을 적출하여, 여윌증 원인체로 알려진 *Parvicapsula* sp. 및 *E. leei*에 의한 감염유무를 PCR (Polymerase chain reaction) 방법으로 검사하였고, 두 종류의 점액포자충에 복합 감염되어 있는 것을 확인하였다.

시험제제

본 연구에서는 톨트라주릴 성분이 함유된 Coxi-stop (WooGene B&G. Co., Ltd), Coxiclin (WooGene B&G. Co., Ltd) 제품과 양식현장에서 혼합성 단미 사료로 사용되고 있는 BLEAN80 (주대명산업) 제품을 시험제제로 사용하였다. 각 시험제제들에 대한 성분 함량 표는 다음과 같다(Table 1).

In vitro 상에서의 시험제제 투여

본 연구에서는 어류주화세포에 점액포자충을 넣어준 후, 시험제제를 접종하였을 때, 세포의 변화와 점액포자충에 대한 억제 효과를 관찰하고자 하였다. 먼저, 여윌증 감염이 확인된 넙치의 신장을 적출하여 1% antibiotic-antimycotic (Gibco, BRL)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA)으로 세척한 후 5% fetal bovine serum (FBS)과 1% antibiotic-antimycotic을 첨

Table 1. Test formulation used in the experiment

Test formulation	Ingredient	Content (1 L)
Coxi-stop	Toltrazuril	50 g
	Sodium docusate	2.5 g
	Sodium propionate	1.8 g
	Sodium benzoate	1.8 g
	Simethicone	0.5 g
	Citric acid anhyous	4 g
Coxiclin	Toltrazuril	25 g
	Triethanolamine	300 g
	Polyethylene glycol	suitable amount
BLEAN80	Sodium chloride	0.79% ≥
	Magnesium sulfate	0.54% ≥
	Potassium sulfate	0.88% ≥
	Copper sulfate	0.11% ≥
	Zinc sulfate	0.64% ≥
	Manganese(II) sulfate	1.80ppm ≥
	Ferrous sulfate	33.92ppm ≥

가한 DMEM 5 mL이 들어 있는 petri dish에 두고 30분간 반응시키며 점액포자충이 유리되도록 하였다. 부유액 1 mL씩을 80% cell frequency로 배양 중인 bluegill fin (BF-2) cell에 접종하였다. 점액포자충을 접종한 각각의 BF-2 cell에 Coxi-stop, Coxiclin은 원액으로 100 μ L, BLEAN80은 원액으로 200 μ L를 넣고 25°C에서 반응시켰고, 대조군에는 어떤 시험제제도 접종하지 않았다. 시험제제 접종 후 2 시간, 4시간, 24시간째에 시험제제 투여에 따른 세포 반응을 광학현미경을 통하여 관찰하였다.

In vivo 상에서의 시험제제 투여

In vivo 상에서 여윌증상 넙치에 대한 Coxi-stop, Coxiclin 및 BLEAN80의 치료 효과를 조사하고자 하였고, 그 방법은 다음과 같다. *Parvicapsula* sp. 및 *E. leei*에 의하여 복합적으로 감염된 것이 확인된 넙치를 8개의 80 L 수조에 각각 5마리씩 되도록 넣어주었고, 2개의 수조가 한 group이 되도록 하여 시험제제를 투여처리하였다. Coxi-stop, Coxiclin은 각각 0.3 mL/L씩, BLEAN80은 0.6 mL/L의 농도가 되도록 약욕 처리하였다. 대조군에는 어떤 시험제제도 처리하지 않았다. 약욕은 16일간 매일 1시간 동안 진행하였고, 이후 모든 실험군과 대조군의 해

수는 모두 환수해 주었다. 16일간의 약욕은 16일 동안 진행되었으며기간 동안 매일 폐사를 확인하였고 실험기간 동안의 누적폐사율을 분석하였다. 실험기간 중 폐사한 넙치와 실험 종료 후 살아남은 넙치는 모두 신장과 장을 적출하여 DNA 분리 후 PCR 분석에 사용하였다.

DNA 분리

폐사한 넙치와 살아남은 넙치로부터 신장과 장 조직을 적출하여 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 total DNA를 분리하였다. 먼저 각 조직 30 mg에 ATL buffer 180 μ L와 proteinase K 20 μ L를 첨가하여 56°C에서 조직이 녹을 때까지 반응시켰다. 반응 후, AL buffer 200 μ L를 섞은 다음 ethanol 200 μ L를 더하여 spin column에 옮겨 6,000 $\times$ g (gravity)로 1분간 원심 분리하였다. Column을 새로운 tube로 옮긴 후 AW1 buffer와 AW2 buffer 500 μ L를 이용하여 세척 과정을 거친 후, AE buffer 200 μ L를 첨가하여 total DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 실험 전까지 -20°C에 보관하였다.

PCR

두 종류의 점액포자충이 복합 감염된 넙치로부터 각 병원체를 검출하기 위하여, *Parvicapsula* sp.의 검출을 위한 EM-F/R primer set (812 bp) 및 *E. leei*의 검출을 위한 EL-F/R primer set (1,468 bp)를 각각 사용하여 PCR을 실시하였으며(Table 2), PCR은 microtube에 1 μ M의 각 primer, 2.5 mM의 각 dNTP, 10 $\times$ G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq DNA polymerase (Gene Pro Thermal Cycler Cosmo, Korea) 및 template DNA로서 추출된 핵산을 첨가한 후 distilled water로 PCR 혼합물의 최종 volume이 20 μ L가 되게 하였다. PCR 조건은 95°C에서 3분간 pre-denaturation시킨 후, 95°C에서 30초 denaturation, 55°C에서 30초 annealing, 72°C에서 30초 extension의 반응을 1회로 하여, 35회 반복하여 반응시켰다. 그리고 72°C에서 7분간 post-extension시켰다. PCR 후 증폭 산물은 1 $\times$ TAE buffer를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.1 μ L/mL SYBR® Safe DNA gel stain이 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동한

Table 2. PCR primers used in this study

Primer	Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	Expected size	Target	Reference
EM-F	CAACCGCAATGTGTTTACTC	812 bp	<i>Parvicapsula</i> sp.	Kim et al. (2015a)
EM-R	CCAAACAACCTGCCACAATG			
EL-F	GATGAAACTGCGAAGCGCTC	1,468 bp	<i>Enteromyxum leei</i>	in this study
EL-R	CACAAGTTGATGACTTGCGC			

후, UV 검출기를 이용하여, ultraviolet 상에서 검출되는 산물의 크기를 관찰하였다.

결 과

In vitro 상에서 시험제제의 효과

감염 넙치의 신장으로부터 유리시킨 점액포자충을 BF-2 cell에 넣어주고, Coxi-stop, Coxiclin 및 BLEAN80과 대조군으로 나누어 각각의 시험제제를 접종한 후, 세포와 점액포자충의 변화를 관찰하였다. 시험제제와 점액포자충을 첨가하지 않은 음성대조군에서는 BF-2 cell의 어떤 변화도 관찰되지 않았다(Fig. 1A). 시험제제를 첨가하지 않고 점액포자충만 접종시킨 양성대조군에서는 점액포자충의 움직임이 매우 활발하게 나타났고, 접종 후 4시간째부터는 BF-2 cell의 모양이 조금씩 변화하기 시작하였으며(Fig. 1B), 접종 후 24시간째에는 점액포자충의 움직임이 처음보다 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다(data not shown). Coxiclin을 첨가한 실험군의 경우, 시험제제 접종 2시간 이후부터 cell lysis 현상이 관찰되기 시작하여 대조군에 비하여 높은 세포독성이 확인되었고, cell lysis 현상과 함께 점액포자충의 움직임이 감소하는 것이 관찰되었다(Fig. 1D). Coxi-stop은 Coxiclin과 마찬가지로 주성분은 톨트라주릴이지만, 용매의 차이로 인하여 Coxiclin이 투명한 것과는 다르게 Coxi-stop은 불투명한 하얀색을 띄고 있었다. Coxi-stop을 첨가한 실험군의 경우, 시험제제 접종 2시간째부터 점액포자충의 움직임과 수가 감소하기 시작하여 반응 4시간째에 확연하게 감소하는 것이 관찰되었고(Fig. 1C), Coxiclin 실험군과는 달리 접종 후 24시간째까지도 cell lysis 현상이 관찰되지 않는 것으로 보아 실험에 사용한 농도에서의 세포독성은 거의

없는 것으로 확인되었다(data not shown). BLEAN80을 첨가한 실험군의 경우, 접종 후 2시간째에 점액

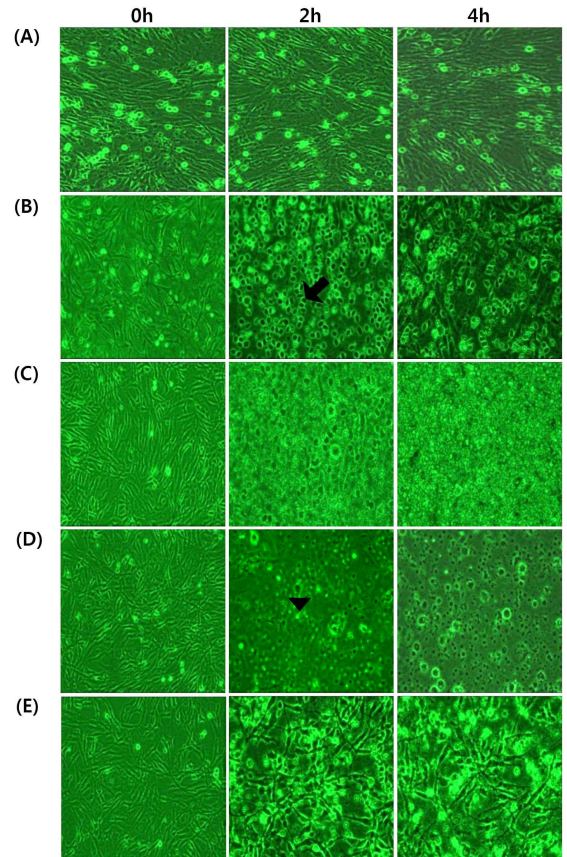


Fig. 1. Observation of BF-2 cell change at 2 h and 4 h after inoculation of Coxi-stop, Coxiclin or BLEAN80. Arrow, myxosporea; Arrow head, BF-2 cell lysis (A), Normal BF-2 cell; (B), BF-2 cell inoculated by myxosporea isolated from emaciated olive flounder; (C), BF-2 cell inoculated by myxosporea and Coxi-stop; (D), BF-2 cell inoculated by myxosporea and Coxiclin; (E), BF-2 cell inoculated by myxosporea and BLEAN80.

포자충의 움직임에는 변화가 없었고, 접종 후 4시간 이후부터 점액포자충의 움직임이 조금씩 감소하였으며(Fig. 1E), 시간의 경과에 따라 cell lysis 현상이 일부 관찰되었다.

In vivo 상에서 시험제제의 효과

두 종류의 점액포자충이 복합 감염된 여윌증상 넙치에 각 시험제제들을 처리하였을 때 넙치의 누적폐사율에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여, 시험제제를 16일간 매일 약욕하며 발생하는 누적폐사율을 조사하였다(Table 3). Coxi-stop을 사용하여 약욕한 실험군의 경우, 실험이 진행되는 동안 약욕 9일째에 한 마리만 폐사한 것으로 나타났다. 또한, BLEAN80을 사용하여 약욕한 실험군에서는 약욕 3, 4일째에 3마리가 폐사하였고 그 이후에는 폐사가 일어나지 않았다. 시험제제를 처리하지 않은 대조군에서는 약욕실험을 시작한지 2일째부터 폐사가 나타나기 시작하여 실험기간 동안 10마리 중 6마리가 폐사하였다. *In vitro* 실험에서 세포독성을 보였던 Coxiclin을 사용한 실험군에서는 2일째부터 폐사가 나타나기 시작하였고, 실험 기간 동안 8마리의 누적폐사가 발생하였다. 각 시험제제를 사용한 약욕실험이 종료된 후, 각 그룹에 따라 누적폐사율을 보았을 때 대조군에서는 60%의 누적폐사율을 보였고, Coxi-stop, BLEAN80을 사용한 실험군에서는 각각 10%, 30%로 대조군에 비해 낮은 누적폐사율이 나타났다. Coxiclin을 사용한 실험군에서는 대조군에 비해 더 높은 80%의 누적폐사율을 나타내었다. 실험기간이 종료된 후, 각 시험제제를 투여한 실험군의 살아있는 넙치들을 육안으로 관찰하였을 때, 대조군의 넙치에 비하여 여

윌증상이 일부 완화되었으며 좀 더 활동적인 행동 양상을 나타내었다. 또한, 실험기간 동안 폐사한 넙치, 실험 종료 후 살아있는 넙치를 대상으로 PCR 검사를 실시하였을 때 대부분의 검체에서 *Parvicapsula* sp.가 검출되었으며, *E. leei*의 검사에서도 양성 반응을 확인할 수 있었다. *Parvicapsula* sp.는 신장에서 97.5%, 장에서 62.5%, *E. leei*는 신장에서 47.5%, 장에서 87.5% 검출되었으며(Fig. 2., Table 3), 이를 통해, *Parvicapsula* sp.는 주로 신장, *E. leei*는 장이 주요한 감염 표적장기라는 것을 확인할 수 있었다.

고 찰

최근 양식 산업에서 질병으로 인한 피해가 해마다 증가하고 있으며, 양식장에서 발생하는 감염성 질병은 경제적 손실의 원인이 되고 있다(Walker and Winton, 2010). 또한, 이전에 발생한 사례가 없었던 새로운 질병으로 인한 피해가 가중되는 경우, 새로운 질병이 발생한 후에는 예방대책이 부족한 실정이므로 대량폐사로 이어질 수 있어(Cho *et al.*, 2019) 이에 대한 연구가 필요하다. 양식넙치의 경우 2000년 중반 이후부터 여윌증이 발생하기 시작하여 2016-2017년에는 여윌증에 의한 제주 넙치의 폐사율이 10.3%로 그 피해가 높게 나타났으며(Shim *et al.*, 2019), 여윌증상을 보이는 넙치를 대상으로 한 원인체 연구를 통하여 *Parvicapsula* sp., *E. leei* 등의 점액포자충이 검출되는 것을 확인하였다(Kim *et al.*, 2015a, 2018; Sekiya *et al.*, 2016). 그러나 아직 여윌증 발병에 대한 예방대책 및 치료법 등에 대한 연구는 부족하며 이에 대한 연구가 필요한

Table 3. Comparison of the numbers of survived fish and PCR results in emaciated olive flounder after immersion treatment of Coxi-stop, Coxiclin and BLEAN80

Group	Total no.	No. of dead fish	No. of Survived fish	PCR result			
				<i>Parvicapsula</i> sp.		<i>Enteromyxum leei</i>	
				Kidney (positive/total)	Intestine (positive/total)	Kidney (positive/total)	Intestine (positive/total)
Coxi-stop	10	1	9	9/10	7/10	8/10	9/10
Coxiclin	10	8	2	10/10	5/10	3/10	10/10
BLEAN80	10	3	7	10/10	6/10	6/10	8/10
Control	10	6	4	10/10	7/10	2/10	8/10

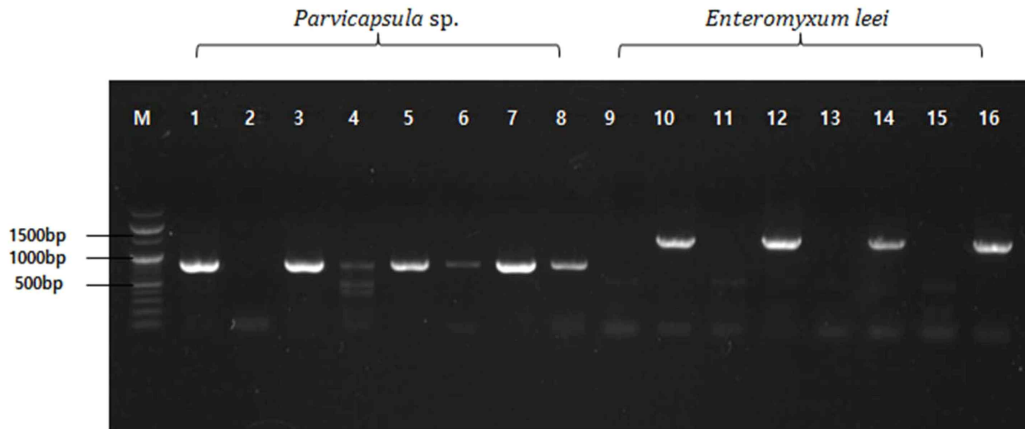


Fig. 2. PCR amplification using EM-F/R primer set for detection of *Parvicapsula* sp. (Lane 1-8) and EL-F/R primer set for detection of *Enteromyxum leei* (Lane 9-16) from total nucleic acids of kidney (Lane 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 and 15) and intestine (Lane 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16) of emaciated olive flounder. Lane 1, 2, 9 and 10, Immersion treatment of Coxiclin; Lane 3, 4, 11 and 12, Immersion treatment of Coxi-stop; ; Lane 5, 6, 13 and 14, Immersion treatment of BLEAN80; Lane 7, 8, 15 and 16, Non-treatment (Control); M, 100 bp DNA ladder.

상황이다. 주로 축산분야에서 점액포자충성 질병의 치료제로 사용되고 있으며, 어류의 기생충성 질병 치료제로써 연구가 진행되었던(Athanassopoulou *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2019; Iglesias *et al.* 2002; Schmahl and Mehlhorn, 1988) 톨트라주릴 성분이 함유된 기생충 구제제를 사용하여, 점액포자충 감염에 의한 여윌증상 낫치에 대한 치료효과 연구를 진행하였다. 본 연구에서는 Coxi-stop, Coxiclin 및 BLEAN80 등의 제품이 여윌증에 대한 치료 후보 제제로서 가능성이 있는지를 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통하여 조사하였다. 심각한 여윌증상을 보이며, *Parvicapsula* sp. 및 *E. leei*의 복합감염이 확인된 낫치를 대상으로 각 시험제에 대한 약육실험을 실시하였고, Coxi-stop과 BLEAN80을 사용하여 약육한 실험군은 실험 기간 동안의 누적폐사율이 각각 10%, 30%로 조사되었고, 누적폐사율이 60%로 나타난 대조군에 비해 낮은 수치를 보였다. 특히, Coxi-stop의 경우, *in vivo* 실험에서 약육 시의 누적폐사율이 대조군에 비해 매우 낮게 나타났고, *in vitro* 실험에서 시험제제를 첨가하지 않고 점액포자충만 접종시킨 양성대조군(Fig. 1B)과 비교하였을 때 cell lysis 현상이 나타나지 않아 자체 세포 독성도 낮은 것으로 확인되었으며, 시간이 경과함에 따라 점액포자충의 움직임과 충의 수가 감소하

는 것이 관찰되었다. 이는 어류에 톨트라주릴을 사용하여 약육하였을 때 기생충이 감소하는 효과를 보인다는 Schmahl and Mehlhorn(1988)의 보고와 유사한 결과이며, 점액포자충성 여윌증에 대한 치료 효과의 가능성을 보여준다. Coxiclin의 경우, Coxi-stop과 마찬가지로 주성분은 톨트라주릴로 동일하지만, 다른 용매를 사용하여 생산된 제품으로 이러한 용매의 차이에 의하여 *in vitro* 실험에서 cell lysis와 같은 세포 독성 현상과 *in vivo* 실험에서 대조군보다 높은 누적폐사율 결과를 보인 것으로 사료된다. BLEAN80의 경우, *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 대조군에 비하여 점액포자충 활성 억제와 누적폐사율이 감소하는 차이가 나타나긴 했지만, 그 차이가 크지 않아 향후 치료 효과를 입증하기 위해서는 추가적인 실험이 뒤따라야 할 것이다. Coxi-stop의 주성분인 톨트라주릴(Toltrazuril)은 *Myxobolus* sp., *Henneguya* sp., *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina* spp., *Apiosoma* spp.와 같은 어류의 기생충성 질병에 치료효과가 있는 것으로 보고되었으며(From *et al.*, 1992; Mehlhorn *et al.*, 1988; Schmahl *et al.*, 1989a, 1989b, 1991), 본 연구에서 점액포자충에 의한 낫치의 여윌증 치료에도 유사한 효과가 있는 것으로 확인되었다. 본 연구에서는 점액포자충에 의해 발생한 낫치의 여윌증 치료에 대한 후보

물질로서 톨트라주릴 성분의 사용 가능성을 제시하였으며, 본 연구결과는 향후 여윌증 치료제 개발에 기초자료로 활용 가능할 것이다.

국문초록

본 연구에서는 점액포자충에 의한 넙치의 여윌증 치료 후보물질을 탐색하기 위하여, Coxi-stop, Coxiclin 및 BLEAN80 등의 제품을 사용하여 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 실시하였다. 톨트라주릴이 주성분인 Coxi-stop의 경우, BF-2 cell을 사용한 *in vitro* 실험에서 점액포자충의 활성을 감소시키는 결과를 보였고, cell lysis와 같은 세포 독성 현상이 나타나지 않았다. *In vivo* 실험에서 Coxi-stop을 사용하여 약육한 실험군은 대조군에 비하여 누적폐사율이 낮게 나타났으며, 이것은 톨트라주릴이 어류 기생충성 질병에 치료 효과가 있다는 기존의 보고와 유사한 결과이다. 본 연구에서는 톨트라주릴이 넙치의 여윌증 치료제로서 가능성이 있는 후보 물질이라는 것을 제시한다.

감사의 글

이 논문은 2019학년도 제주대학교 교원성과지원사업에 의하여 연구되었음.

References

- Ai, L., Sun, H., Wang, F., Chen, R. and Guo, C.: Determination of diclazuril, toltrazuril and its two metabolites in poultry tissues and eggs by gel permeation chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromato. B.*, 879: 1757-1763, 2011.
- Athanassopoulou, F., Bitchava, K. and Pappas, I.S.: An overview of the treatments of parasitic disease in Mediterranean aquaculture. *Options Méditerr Ser A.*, 86: 65-83, 2009.
- Cho, M.Y., Kim, K.I., Min, E.Y. and Jung, S.H.: Global outbreaks and strategies to control the emerging diseases in aquaculture farms in Korea. *Ocean Policy Research.*, 34(1): 67-88, 2019.
- Choi, H.S., Jun, L.J., Kim, S.M., Jeong, H.D., Kim, Y.K., Lim, H.Y., Yeo, I.K. and Jeong, J.B.: Clinical features of fish with parhogens isolated from emaciated olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish pathol.*, 25(2): 67-76, 2012.
- EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit). Committee for veterinary medicinal products, toltrazuril, Summary report (1). EMA/MRL/314/97-FINAL., London, U.K., 1988.
- From, J., Karas, N. and Vordermncier, T.: Trials with toltrazuril against *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12(4): 137-138, 1992.
- Grief, G.: Immunity to coccidiosis after treatment with toltrazuril. *Parasitol Res.*, 86: 787-790, 2000.
- Hong, D.H., Kim, A.H., Lee, K.J., Yoon, M.C., Son, K.T., Kim, M.S., Kim, N.Y., Jung, S.H. and Jo, M.R.: Determinations of Toltrazuril and Toltrazuril Sulfone Levels in Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* Samples Using Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Fish Aquat Sci.*, 52(5): 461-467, 2019.
- Iglesias, R., Parama, A., Alvarez, M.F., Leiro, J. and Sanmartin, M.L.: Antiprotozoals effective in vitro against the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms.*, 49: 191-197, 2002.
- Joachim, A., Guerra, N., Hinney, B., Hodžić, A., Karembé, H., Shrestha, A and Sperling, D.: Efficacy of injectable toltrazuril-iron combination product and oral toltrazuril against early experimental infection of suckling piglets with *Cystoisospora suis*. *Parasites & Vectors.*, 12: 272, 2019.
- Kim, K.R., Kim, Y.M., Lee, E.W., Lee, D.S. and Lee, M.S.: Screening of Antiviral Activity from Natural Plants against Feline Calicivirus. *Journal of Life Science.*, 19(7): 928-933, 2009.
- Kim, M.S., Lim, J.H., Hwang, Y.H., Park, B.K., Song, I.B. and Yun, H.I.: Plasma disposition of toltrazuril and its metabolites, toltrazuril sulfoxide and toltrazuril sulfone, in rabbits after oral administration. *Vet Parasitol.*, 169: 51-56, 2010.
- Kim, S.M., Jun, L.J., Park, M.A., Jeong, H.D. and Jeong, J.B.: Characterization of the myxosporean parasite isolated from emaciated olive flounders *Paralichthys olivaceus* on Jeju island. *J. Fish Aquat Sci.*, 48(3): 337-345, 2015a.
- Kim, S.M., Jun, L.J., Park, M.A., Jung, S.H., Jeong, H.D. and Jeong, J.B.: Monitoring of emaciation disease in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Jeju (2010-2013), Korea. *J. Fish Aquat Sci.*, 48(5):

- 719-724, 2015b.
- Kim, S.M., Jun, L.J., Lee, D.W., Park, H.K., Kim, J.S. and Jeong, J.B.: Hematological Analysis and Non-specific Immune Responses of Emaciated Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. JFMSE., 29(6): 1758-1767, 2017.
- Kim, S.M. and Jeong, J.B.: Quantitative analysis of a myxosporean parasite, *parvicapsula* sp. detected from emaciated olive flounder, *paralichthys olivaceus* in Korea. J. Fish Pathol., 31(2): 101-107, 2018.
- Kim, S.M., Jun, L.J., Lee, D.W., Park, H.K., Jeong, H.D., Kim, J.S. and Jeong, J.B.: Monitoring of emaciation disease in culture *Paralichthys olivaceus* of Jeju island during 2014-2015. Fish Aquat Sci., 21(17): 1-7, 2018.
- Kim, Y.K., Jeong, J.B., Lee, M.K., Park, S.I., Park, M.A., Choe, M.K. and Yeo, I.K.: Pathophysiology for olive flounder *Paralichthys olivaceus* suffering from emaciation. J. Fish Pathol., 24(1):11-18, 2011.
- KOSIS. http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_1EZ0008&vw_cd=MT_ZTITLE&list_id=F38&seqNo=&lang_mode=ko&language=kor&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=MT_ZTITLE. 2019.
- Maes, D., Vyt, P., Rabaey, P. and Gevaert, D.: Effects of toltrazuril on the growth of piglets in herds without clinical isosporosis. Vet. J., 173: 197-199, 2007.
- Mehlhorn, H., Schmahl, G. and Haberkorn, A.: Toltrazuril effective against a broad-spectrum of protozoan parasites. Parasitol. Res., 75:64-66, 1988.
- Olsen, J., Björklund, E., Krogh, K.A. and Hansen, M.: Development of an analytical methodology for the determination of the antiparasitic drug toltrazuril and its two metabolites in surface water, soil and animal manure. Analytica Chimica Acta., 755:69-76, 2012.
- Poultry Research. It is necessary to improve productivity through the management of coccidiosis. Prevention of spawning MG infection. Retrieved from http://cavac.co.kr/info/info02_view.asp?no=922#. 2014.
- Schmahl, G. and Mehlhorn, H.: Treatment of fish parasites. 4. Effects of sym. triazinone (toltrazuril) on monogenea. Parasitol. Res., 75:132-143, 1988.
- Schmahl, G., Mehlhorn, H. and Taraschewski, H.: Treatment of fish parasites. 5. The effects of sym. triazinone (toltrazuril) on skin parasitic Ciliophora (*Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet 1876, *Glossatella amoeba* Grenfell, 1884, and *Trichodina* sp. Ehrenberg, 1831. Eur. J. Protistol., 24:152-161, 1989a.
- Schmahl, G., Mehlhorn, H. and Taraschewski, H.: Treatment of fish parasites. 7. Effects of sym. triazinone (toltrazuril) on developmental stages of *Myxobolus* sp. Butschli, 1882 (Myxosporea myxozoa): A light and electron microscopic study. Eur. J. Protistol., 25: 26-32, 1989b.
- Schmahl, G., Senaud, J. and Mehlhorn, H.: Treatment of fish parasites. 8. Effects of sym triazinone (toltrazuril) on developmental stages of *Henneguya* sp. (Myxosporea, Myxozoa). light and electronmicroscopic study. Arch. Protistenkd., 140:83-94, 1991.
- Sekiya, M., Setsuda, A., Sato, H., Song, K.C., Han, J.K., Kim, G.J. and Yeo, I.K.: *Enteromyxum leei* (Myxosporea: Bivalvulida) as the cause of myxosporean emaciation disease of farmed olive flounders(*paralichthys olivaceus*) and a turbot(*Scophthalmus maximus*) on Jeju Island, Korea. Parasitol. Res., 115: 4229-4237, 2016.
- Shim, J.D., Hwang, S.D., Jang, S.Y., Kim, T.W. and Jeong, J.M.: Monitoring of the mortalities in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) farms of Korea. J. Fish Pathol., 32(1): 29-35, 2019.
- Shin, S.P., Jin, C.N., Sohn, H.C. and Lee, J.H.: *Parvicapsula curvatura* n. sp. in cultured olive flounder *paralichthys olivaceus* and phylogenetic characteristics of the genus *Parvicapsula*. Diseases Of Aquatic Organisms Dis Auat Org., 130:199-207, 2018.
- Vanparijs, O., Marsboom, R. and Desplenter, L.: Diclazuril, a new broad spectrum anticoccidial drug in chickens.: 1. Dose titration studies and pilot floor pen trials. Poult. Sci, 68:489-495, 1989.
- Walker, P.J. and J.R. Winton.: Emerging viral diseases of fish and shrimp. Veterinary Research., 41(6):51, 2010.

Manuscript Received : Jun 1, 2020

Revised : Jun 14, 2020

Accepted : Jun 17, 2020