

양식어류(이스라엘 잉어, 넙치)에 대한 항균물질 pefloxacin의 효능 및 안전성에 관한 연구

허강준 · 김정호

충북대학교 수의과대학 수의학과 어류질병학연구소
(1993년 12월 16일 접수)

A study on efficacy and safety of antibacterial(pefloxacin methanesulfonate) to
cultured fish, *Cyprinus caprio* and *Paralichthys olivaceus*

Gang-joon Heo · Jeong-ho Kim

Laboratory of Aquatic Animal Disease,
Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine
Chungbuk National University

(Received Dec 16, 1993)

Abstract: A study on quinolone antibacterial (pefloxacin methanesulfonate) was performed to use for the drug of fisheries. Pefloxacin was proved excellent in antibacterial activity and resistance against fish pathogens when compared with the existing antibacterials. And any side effect was not observed during the period of indicated use.

An outline of MIC(Minimal Inhibitory Concentration) was 1.6~6.4 $\mu\text{g/ml}$, $\text{TLm}_{48\text{h}}$ value were 380~420 ppm in Israeli carp(*Cyprinus caprio*) and 2100~2300 ppm in flounder(*Paralichthys olivaceus*). The residual time of fish body was less than 15 days.

So we can treat some bacterial disease of fish by the dosage of 100 g/day/ton of fish body weight for 3 days and pefloxacin is thought to be used effectively and widely against most bacterial fish pathogens.

Key words : pefloxacin methanesulfonate, efficacy, safety, Israeli carp(*Cyprinus caprio*), flounder(*Paralichthys olivaceus*)

서 론

70년대 후반부터 일기 시작한 내수면양식의 성장에 힘입어 우리나라의 양식업은 비약할 만한 발전을 하였으나, 현재의 양식현황을 돌이켜 보면, 여러가지 문제점이 있음이 지적되고 있다. 그 중에서도, 부적절한 예방투약이나 발병시 감수성을 고려하지 않은 투약 등의 무절제한 수산용 의약품의 사용, 특히 항생물질의 남용은 어류 질병을 일으키는 세균에 있어서 그 내성을 증가시켜 어병에 의한 막대한 경제적 손실과 항균제의 효력 감소는 물론, 어체에 항생물질이 잔류되어 공중위생

학상 크게 문제시 되고 있다.³ 이러한 예로서, 최근 병어로부터 분리된 어병 세균이 테트라사이클린, 클로람페니콜, 옥소린산 등의 기존의 항생물질 및 퀴놀론계통의 항균제에 대해 전혀 감수성을 나타내지 않고 있음을 들 수 있다.^{8,16,22,23} 일부에서는 감수성검사를 실시하여 감수성이 있는 항균제를 사용하고 있으나, 위와 같은 이유로 해서 적절한 항균제를 선택할 수 없어 양어가들이 큰 곤란을 겪고 있다.

그러므로, 이러한 현실을 감안하여 우리나라의 양식현실과 어종에 맞는 적절한 항생물질을 개발해야 할 필요성이 절실하다고 하겠다. 이러한 시점에서 1984년도

에 개발되어, 인체의약품으로 널리 사용되고 있으며, 그 효능이 우수하다고 인정된 페플로삭신 (pefloxacin)을 수산용의약품에 적용시켜 붉은 아주 흥미있는 과제라고 할 수 있겠다.

pefloxacin은 분자량 465.50으로 물에 잘 녹고 알코올에 녹기 어려우며, 클로로포름에는 거의 녹지 않는 $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$, $2\text{H}_2\text{O}$ 화학구조식을 갖는 유백색의 결정성 분말의 항균물질이다. 이는 원핵세포에만 존재하는 DNA gyrase를 불활성화하여 미생물의 핵산합성을 저해하는 살균적(bactericidal) 작용을 갖는 항균물질이다.²⁴ pefloxacin은 광범위한 항균범위를 가지며, 특히 그람 음성균에 대해 높은 항균력을 가져, 그람음성균이 대부분인 어병세균에 탁월한 항균력을 나타내리라고 사료된다. 또한, 다른 계통의 항균제와는 교차내성이 없으며, 체내에서의 이행이 용이하다.

이러한 특징으로 하여, 양식어류에 있어서 질병 진단 시 감수성검사 등을 통한 본 제제의 적절한 선택과 사용을 하게 된다면, 어병에 의한 폐사를 감소, 내성균의 감소, 그리고 저항력의 증가로 인해 국내 양식업의 생산성 향상과 발전을 꾀할 수 있으리라고 생각되어, 본 연구에서 pefloxacin의 각종 양식 어류 질병에 대한 효능 및 효과를 검토하고, 본 제제의 어류에 대한 독성병리와 안전성에 대한 검사를 하여 수산용 의약품으로서의 적용 여부를 알아 보았다.

재료 및 방법

공시약제(성분 및 함량) : 본 연구의 공시약제로서, 1kg 중 pefloxacin methanesulfonate 100g(10%)과 부형제로 glucose가 잔량 포함하는 항균제제를 사용하였다.

공시동물 : 이스라엘잉어(*Cyprinus caprio*, 평균체장 4.0-6.0 cm, 평균체중 3.5-4.2g)와 넙치(*Paralichthys olivaceus*, 평균체장 6.1-7.3 cm, 평균체중 6.5-7.6g)의 건강한 치어를 매회 무작위로 100마리씩 채집하여, 실험실에서의 검사에 공시하였다. 그리고, 양식현장에서의 효능 및 안전성검사에는 양식장의 한 어군(가두리)에 대하여 실험을 행하였다.

사육수조 및 장치 : 각 어종의 공시어는 20-50 마리씩을 한 군으로 하여, 그 사용목적과 크기에 따라, 공기주입장치, 순환여과장치, 그리고 조명장치 등이 설치된 각기 크기가 다른 수조(30,50,100 리터)에서 사육하였다. 사육수는 수도수와 해수를 사용하였으며, 사육기간 동안 수조의 수온은 이스라엘잉어는 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 넙치는 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며, 사료는 1일 2회 투여하였다.

공시균주 : 주요 세균성질병의 원인균인 6균종을 선택하여, 외국균주 6주와 국내 분리균주 6주를 공시균주로 사용하였다. 공시된 균종은, 비브리오병의 *Vibrio anguillarum*(=*Listonella anguillarum*), 케양병의 *Aeromonas salmonicida*, 에드와드병의 *Edwardsiella trada*, 에로모나스증의 *Aeromonas hydrophila*, 연쇄구균증의 *Streptococcus* sp. (= *Enterococcus seriolicida*), 그리고 슈도모나스증의 *Pseudomonas fluorescens*로 계 6균종 12균주를 사용하였다.

본 연구에 공시된 각 균주의 분리년도 및 지역, 그리고 어종은 Table 1과 같다.

항균물질 감수성감사: 공시약제의 원료성분인 pefloxacin methanesulfonate를 각 1,5,10 μg 을 함유한 감수성 disc(직경 6mm)를 만들어, 각 공시균종을 접종한 TSA 배지(Tryptic soy agar)위에 놓고 발육적정온도($23 \pm 2^\circ\text{C}$)에서 24시간 배양한 후, 각 어병세균의 공시균주에 대한 시험약제의 감수성 여부(항균제 발육억제대, zone of antimicrobial inhibition)를 측정하였다.^{9,10,13,23}

또한 기존의 항생물질 또는 항균제제들과의 감수성을 비교, 측정하기 위하여 일반적으로 수산용 의약품으로 사용되고 있는 항생제를 포함한 대표적인 항균제들을 함유한 disc를 사용하여 시험약제와의 항균력을 비교, 측정하였다.

최소발육억제농도의 측정 : 각 어병세균에 대한 최소 발육억제농도(MIC; Minimum Inhibitory Concentration)는 다음과 같이 측정하였다.^{14,15,17,18}

(1) 배양접종물의 준비 : 공시균종 6종(*Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella trada*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus* sp., *Vibrio anguillarum*)을 사용하여 TSA배지(단, *P. fluorescens*, *V. anguillarum*은 2% NaCl을 첨가한 TSA배지)에서 24시간 정도 25°C 에서 배양시켰다. 배양 후 형성된 콜로니 5개를 불꽃에 살균한 백금으로 따서 Mueller-Hinton 배양액에 접종시켰다. 이후 배양액을 다시 25°C 에서 24시간 정도 배양시킨 것을 실험에 사용하였다.

(2) 세균수의 측정 : 배양액의 탁도를 측정하기 위해 McFarland standard No.5를 알려진 방법에 따라 제조하였다. McFarland Standard No.5는 대략 ml 당 세균수 10^6 개를 나타내며 위의 세균접종액과 McFarland standard No.5용액을 각각 같은 크기의 시험관에 동일한 양을 넣고 stirrer로 잘 부유시켜 Spectrophotometer로 흡광도를 비교, 측정하였다. 흡광도가 표준용액과 같지 않을 경우에는 세균부유액을 희석하는 배지로서 BSG(Buffered Saline with Gelatin)를 제조하여 사용하였으며 제조법은 일본화학요법학회(日本化學療法學

Table 1. Bacterial strains used in this study

Species	Strains	Year	Source fish	Country
<i>Vibrio anguillarum</i>	HEO926	1992	eel	Korea
	PB15*	1987	ayu	Japan
<i>Aeromonas salmonicida</i>	HEO923	1992	Israeli carp	Korea
	NCMB1102*	1985	carp	Japan
<i>Streptococcus sp.</i>	FPC311*	1988	yellowtail	Japan
	HEO933	1993	flounder	Korea
<i>Edwardsiella tarda</i>	E22*	1972	eel	Japan
	HEO931	1993	flounder	Korea
<i>Aeromonas hydrophila</i>	A10*	1976	gold fish	Japan
	HEO928	1992	Israeli carp	Korea
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	FPC96*	1973	gold fish	Japan
	HEO912	1991	gold fish	Korea

*Supplied by H. Wakabayashi, University of Tokyo, Japan.

會)에서 정한 방법에 의하여 행하였다.¹⁴

(3) 시험약제 회석액의 준비 : 최종적인 최고 농도를 배양액 ml당 100µg을 용해시킨 것으로 하였고, 이후 2단계 회석법을 이용하여 최저농도를 0.01µg/ml 및 <0.01µg/ml로 정하였다.

(4) MIC의 측정 : microplate well을 이용하여 각 well당 시험약제 회석액 100µl에서부터 0.1µl 이하의 농도까지 단계적으로 2배수 희석한 시험세균부유액을 각각 100µl씩 접종하였다. well중 일부는 시험세균부유액을 접종하지 않은 채 시험약제 회석액만을 접종하여 무균대조군(sterility control)으로 하였으며, 일부는 세균부유액만을 접종하여 성장대조군(growth control)으로 하였다. 각 well에 모두 접종한 후에는 뚜껑을 덮어 25℃에서 24시간 동안 배양한 후에 육안으로써 결과를 판독하되 세균이 육안적으로 보아 발육하지 않은 최소의 항균농도를 MIC로 정하였다.

인위감염실험 : 약 50리터의 실험수조에 공시어를 50마리씩 넣어 적응을 시킨 후에, 이스라엘잉어에서는 에로모나스증의 원인균인 *Aeromonas hydrophila*, 넙치에서는 에드워드병의 원인균인 *Edwardsiella tarda*가 배양된 Tryptic soy broth를 30ml(세균농도 3.6×10^6 CFU/ml) 넣어 현탁시켰다. 약 5시간 정도 방치시킨 후, 50 리터의 사육수로 환수하였다. 인위감염 후, 공시어의 외부증상과 부검소견으로 질병의 발생을 확인하고, 본 제제를 3일간 경구투여하여, 대조군과의 폐사율을 비교하였다. 실험기간 동안, 수온은 이스라엘잉어는 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 넙치는 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지하였고, 사료는 1일 2회 투여하였다. 또한, 사육수조는 공기주입을 하면서 3일간격으로 환수를 반복하였다. 폐사어는 발견 즉시 제거하였다.

공시약제의 용법 및 용량검사 : 실험실에서 감염실험에 의하여 질병이 발생하였음을 확인한 후, 본 약제의

각 단계별 용량(물 톤당 10, 50, 100, 200g)을 1일 1회 3일간 약용하여 질병의 치유효과와 폐사율 등을 분석하여 권장용량을 결정하였다. 또한, 현장에서 질병이 발생하였을 경우, 같은 방법으로 본 약제를 경구투여하여 권장용량과 그 효능을 비교하였다.

현장효능검사 : 이스라엘잉어와 넙치의 양식현장에서 검사대상의 질병이 발생하였을 경우, 병성감정과 실험실 진단을 통하여 질병을 확진진단한 후, 발생초기에 본 약제의 권장용량(용량결정 시험에서 계산된)을 경구투여 또는 약용하였다. 본 약제를 투여하지 않은 어군을 따로 결정하여 대조군으로 하였으며, 실험군과 동일하게 사육하였다. 일정한 기간 동안 본 약제를 투여한 후, 대조군과의 폐사율 및 외관소견, 그리고 부검소견과 병리조직학적인 소견을 비교, 측정하였다.

급성독성검사 : 본 약제의 10배 희석계열의 용량을 호석한 수조에 공시어 20마리씩을 넣어 48시간 동안 사육하여, 다도르프법에 의하여 반수생존농도(TLm₅₀ : median tolerance limit=LC₅₀)를 결정하였다. 또한, 공시어 50마리씩을 넣은 5개의 수조를 준비하여, 4군은 본 약제를 권장용량의 5, 10, 20, 50, 100, 200배 용량으로 희석하여 48시간 동안 사육하였으며, 나머지 1군은 무투약 대조군으로 하여, 공시어의 외관소견 및 폐사상황, 그리고 부검소견과 병리조직학적 관찰을 행하여, 비교 조사하였다.^{2,12}

아만성독성검사 : 본 약제의 권장용량의 10배 용량(물 톤당 1000g)을 공시어 50마리를 넣은 사육수조에 희석한 후, 무투약 대조군과 일개월간 섭이, 성장, 폐사상황 등을 관찰하고, 질병의 발생유무, 수질의 변화 등을 관찰하여 비교, 조사하였으며, 물갈이 후에는 공시약제를 넣어 항상 일정농도를 유지하였다. 실험 후에는 살아있는 물고기를 해부하여 병리조직학적 검사 등을 통하여, 그 안전성을 검토하였다.¹²

휴약기간의 설정(EEC4-plate법) : 물 톤당 300g의 약제를 투여한 수조에 건강한 공시어를 무작위로 가려 내어 50마리씩 넣은 후, 1일 1회 격일로 3회 약육을 시켰다. 물은 이틀에 1회씩 갈아 주었으며 항상 일정한 농도를 유지하도록 하였다. 일주일째 되는 날 수조를 철저히 깨끗이 세척한 후 약제를 투여하지 않은 물로 바꾼 후에, 그 다음날부터 매일 1개체씩 채집하였으며, 방혈을 하지 않고 번호를 붙여 즉시 -75℃의 냉동고에 보존하였다. 20일째 되는 날까지는 매일 1개체씩 잡고 그 이후부터는 이를 간격으로 1개체씩 잡아 40일째 되는 날까지 채집을 계속하였다.

예비실험을 통하여 본 약제에 가장 민감한 것으로 판정된 어병세균(*A. hydrophila*, *E. tarda*, *P. fluorescens*)를 Nutrient Broth에 접종하여 25℃에서 24시간 정도 배양을 시킨 후, 이 배양액을 3000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 균액을 모았다. 이를 1.2ml 정도의 0.85% 생리식염수로 부유시켜 단계적으로 10배 희석한 것을 일정량 TSA배지에 접종한 후 glass wool로 고르게 도말한 후 생성된 콜로니를 계산하여 단계적인 희석을 통해 세균농도를 10⁶ CFU/ml로 조정하였다.

상기와 같이 보존하고 있던 샘플을 시험에 쓰기 전에 꺼내어 실온에서 해동시켰다. 완전히 해동된 후에 시험 개체의 구간부의 근육과 복부를 절개하여 disc(직경 10mm; Toyo)를 그 사이에 끼워 30분정도 흡습시킨 후 꺼내어 사용하였다.

TSA배지에 위에서 만들어 놓은 세균부유액을 glass wool로 도말하여 disc를 올려놓은 후, 25℃에서 24시간 배양하여 세균발육억제대의 크기를 측정하였다. 세균의 발육억제대가 disc 밖으로 1mm 정도 나타나면, 일반적으로 항균물질이 체내에서 검출한계치인 0.1ppm 이하로 잔류하는 것으로 간주하였다.⁴

현미경에 의한 병리조직학적 관찰 : 시험 후, 공시어를 두경부 절단법에 의하여 죽살한 후, 어체의 구간부와 복부를 횡절단(transverse section)하여 3등분하였다. 이를 10% 포르말린 완충용액에 24시간 고정한 후, 8% 개미산 수용액(formic acid : HCOOH)을 사용하여 산탈회 처리를 하였다. 에틸알코올을 탈수과정을 거쳐 파라핀 포매한 후, 4-5µm의 파라핀 조직절편을 제작하여, hematoxylin and eosin(H & E) 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.²⁵

결 과

급성독성 : 약제투여 후 시간이 지남에 따라 수조내

의 물은 혼탁해졌으며 흰색침전이 농도와 비례하여 증가되었다. 그리고 공시어는 활동이 완만해지고 점액분비가 증가하는 경향을 보였다. 시험약제의 농도에 따라 아가미와 체표에서의 점액분비량은 증가하는 경향이 있었으며, 농도와 활동상황과는 별다른 상관관계를 보이지는 않았다. 대조군과 비교하여 호흡속도가 점차 완만해졌으며 외부조건으로는 아가미가 약간 창백해지는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 넙치에서는, 대조군과 시험군 모두 전체적으로 바닥에 대한 부착성이 점차 감소하는 경향을 띠었다. 폐사시의 상황은 별다른 특징없이 생존개체와 동일하게 수조저면에 가라앉아 있는 상태로 폐사하였으며, 넙치의 경우 일부 개체에서 뒤집혀 사망하는 경우도 있었다. 폐사어에 있어서의 부검소견은 아가미 내부에 점액과 함께 본 약제의 흰색침전물이 묻혀있는 것 이외에는 모두 정상적인 소견을 보였다.

다도로프법에 의한, 본 공시약제에 대한 이스라엘잉어의 TLM_{48h} 값은 3.8-4.2g/l(원료성분의 TLM_{48h} 값은 380-420 ppm)이었으며 넙치는 21-23 g/l(원료성분의 TLM_{48h} 값은 2,100-2,300 ppm)이었다.

또한, 본 약제를 권장용량의 5, 10, 20, 50, 100, 200배 용량으로 희석하여 48시간 동안 사육하여 무투약 대조군과 공시어의 폐사상황을 비교한 결과, Table 2와 같다.

이스라엘잉어에 있어서, 본 약제를 권장용량의 20배(물 톤당 2kg) 투여하였을 경우, 1마리의 폐사어가 관찰되었고, 50배에서는 반수이상, 그리고 100배 이상에서는 공시어 모두가 48시간 이내에 사망하였다. 넙치의 경우도, 권장용량의 100배에서 2마리가 사망하였고, 200배에서는 투여 후 48시간 이내에 11마리의 폐사가 인정되었다.

본 공시약제의 권장용량의 농도에서는, 모든 공시어의 아가미와 신장, 간장 등의 장기에서 모두 정상적인 소견이 인정되었다(이스라엘잉어: Photo 1,2,3, 넙치: Photo 4,5,6). 그러나 TLM_{48h} 값 농도 이상에서 폐사한 공시어의 병리조직학적 소견으로서는, 먼저 아가미의 경우를 들면 새박관 기저부의 주의할 만한 증생소견

Table 2. Mortality of pefloxacin exposed Israeli carp and flounder after 48 hours

Dosage of treatment(g/ton)	No. of dead fish	
	Israeli carp	Flounder
0	0	0
500	0	0
1000	0	0
2000	1	0
5000	12	0
10000	20	2
20000	20	11

Table 3. Susceptibility test of pefloxacin methanesulfonate to fish pathogens(zone diameter; ϕ mm)

Bacterial strains	Concentration of disc(μ g/ml)		
	1	5	10
<i>A. hydrophila</i> HEO928	15.0	20.0	22.0
<i>A. salmonicida</i> HEO923	18.0	19.5	21.0
<i>E. tarda</i> FPC470	17.0	22.5	22.5
<i>E. tarda</i> HEO931	18.0	21.5	22.0
<i>P. fluorescens</i> HEO912	25.0	34.0	++
<i>Streptococcus.sp.</i> HEO933	11.0	11.0	13.0
<i>V. anguillarum</i> HEO926	13.0	16.5	23.5

* ++ : very effective

Table 4. Sensitivity test of some antimicrobials and antibiotics to fish pathogens(zone diameter; ϕ mm)

Strains	Animicrobials and antibiotics											
	AM	C	CF	E	GM	K	P	S	T	SXT	Te	Ox
<i>A. hydrophila</i> HEO928	.	27.5	.	13	14	15	.	13	16	21.5	12	17
<i>A. salmonicida</i> HEO923	12.5	17.5	11	21	17.5	18.5	22	17	19	27	17	12
<i>E. tarda</i> HEO931	11.8	12	9	11	12	13	9	.	11	.	11	18
<i>P. fluorescens</i> HEO912	6	12
<i>Strepto. sp.</i> HEO933	12.1	12	21	13	12	13	19	.	26	.	10	.
<i>V. anguillarum</i> HEO926	.	.	17	14	22	10	.	18	30	10	4	13

* AM:Ampicillin(10 μ g), C:Chloramphenicol(30 μ g), CF:Cephalothin(30 μ g)E:Erythromycin(15 μ g), GM:Gentamicin(10 μ g), K: Kanamycin(30 μ g)P:Penicillin(10 μ g), S:Streptomycin(10 μ g), Te:Tetracycline(30 μ g)SXT:Sulfamethoxazole-Trimethoprim(23.75/1.25 μ g), T:Tylosin(50 μ g)Ox:Oxolinic acid(2 μ g)**Table 5.** Minimum inhibitory concentration of pefloxacin methanesulfonate to fish pathogens

Strains	MIC(μ g/ml)
<i>A. hydrophila</i> HEO928	3.2
<i>A. salmonicida</i> HEO923	6.4
<i>E. tarda</i> FPC470	6.4
<i>E. tarda</i> HEO931	1.6
<i>P. fluorescens</i> HEO912	3.2
<i>Streptococcus. sp.</i> HEO933	6.4
<i>V. anguillarum</i> HEO926	3.4

(Photo 7)을 제외하고는 특징적인 소견은 볼 수 없었으며, 농도가 증가할수록 증생 정도는 약간 증가하는 경향을 보였다. 또한 체표의 점액분비세포가 비대화되는 경향을 보였다. 그리고 일부 공시어에서는, 신장에서 세뇨관강내 상피세포의 부종 및 세포의 용해(Photo 8)와 간장 실질조직의 간세포 용해 등의 세포병변이 관찰되었으나 유의할 만한 소견은 아니었다.

아만성독성 : 본 공시약제의 권장용량의 10배의 농도에서는, 무투약 대조군과 비교하여 일개월간 섭이 및 성장과, 수질의 변화에 있어서 유의할만한 차이는 인정

되지 않았으며, 폐사된 공시어는 관찰되지 않았다. 또한 실험 후에 공시어를 해부하여 병리조직학적 검사를 행한 결과, 모든 공시어의 아가미와 신장, 간장 등의 장기에서 모두 정상적인 소견이 인정되었다.

항균물질 감수성검사 : 각 어병세균의 공시균주에 대한 본 공시약제의 감수성을 측정한 결과, 항균제 발육 억제대(zone of antimicrobial inhibition)는 다음과 같다(Table 3). 본 약제는 어류의 세균성 질병의 주요 원인균인 모든 공시균종에서 높은 감수성을 나타내었다. 또한, 감수성 disc에 함유된 약제의 농도가 높을수록 발육억제대는 더욱 커지는 경향을 보였다.

다른 항생제 및 항균제들과의 항균력 비교에 있어서도 5 μ g/ml의 원료성분을 함유한 시험약제의 disc를 기준으로 하여 측정된 결과로 볼 때, 모든 공시균주에 대하여 탁월한 항균력을 나타냄이 입증되었다(Table 4). 특히 일부 공시균주들이 몇몇 항생제들에 대하여 이미 내성을 가지고 있음이 이 실험을 통하여 증명되었으며 시험약제와 같은 quinolone계통의 약제인 oxolinic acid와 비교해 보아도 항균력이 월등히 높은 사실을 알

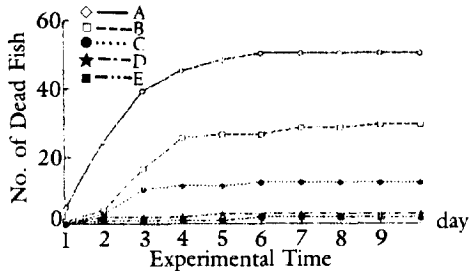


Fig 1. The cumulative mortality after pefloxacin treatment by staged dose in Israeli carp, after inducing *Aeromonas hydrophila* infection.

- A: The non-treated group
- B: The treated group using 10 g pefloxacin per ton of water
- C: The treated group using 50 g pefloxacin per ton of water
- D: The treated group using 100 g pefloxacin per ton of water
- E: The treated group using 200 g pefloxacin per ton of water

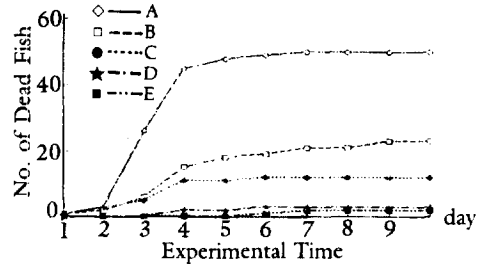


Fig 2. The cumulative mortality after pefloxacin treatment by staged dose in flounder, after inducing edwardsiellosis.

- A: The non-treated group
- B: The treated group using 10 g pefloxacin per ton of water
- C: The treated group using 50 g pefloxacin per ton of water
- D: The treated group using 100 g pefloxacin per ton of water
- E: The treated group using 200 g pefloxacin per ton of water

Table 6. Effect of pefloxacin treatment to bacterial fish diseases in aquatic farms

Diseases	Fish	Cumulative mortality(%) for 5 days after treatment	
		Non-treated group	Treated group
Ulcer disease	Gold fish	31	7
Streptococcal infection	Flounder	25	9
Vibriosis	Eel	28	6.5
Pseudomonas disease	Carp	19	4

수 있다.

최소발육억제농도 : Table 5에서와 같이, 공시된 어병세균에 대하여 본 약제의 원료성분인 pefloxacin methansulfonate의 최소발육억제농도는 평균 1.6-6.4µg/ml의 값을 나타내었다. 이는 본 약제가 어병세균에 대하여 유의할 만한 항균성을 보이고 있음을 나타낸다고 할 수 있다.

용법 및 용량결정시험 : 이스라엘잉어에 있어서 감염 실험을 통하여 에로모나스증을 유발한 후, 본 시험약제를 물 1톤당 10, 50, 100, 200g을 1일 1회 3일간 투여한 결과, 공시어의 폐사율은 다음과 같았다(Fig 1).

즉, 대조군에서는 질병 발생 후, 일주일 이내에 모든 공시어가 폐사한 데 반하여, 시험군에서는 정도의 차이는 있으나, 약제 투여 후, 4군 모두 폐사율의 저하가 인정되었다. 또한 200g/t 투여군의 폐사율이나 질병억제 효과는 100g/t 군과 별다른 차이를 보이지 않았다. 따

라서 물 톤당 100 g/t 이상의 용량을 사용하면 에로모나스증의 치료에 효과가 있음이 실험적으로 입증되었다.

그리고 넙치에 있어서도, 감염실험을 통하여 에드와드병을 유발한 후, 본 시험약제를 어체중 1톤당 10, 50, 100, 200g을 1일 1회 3일간 경구투여한 후의 각 어군의 생존율은 다음과 같았다(Fig 2). Fig 2에서와 같이, 에드와드병에서도 물 톤당 100g 이상의 용량을 사용하면 폐사율의 저하가 탁월함이 실험적으로 입증되었다.

현장검사 : 이스라엘잉어와 넙치의 양식장에서 에로모나스증과 에드와드병이 발생하였을 경우, 본 약제를 사료와 혼합하여 경구투여한 결과, 실험실검사에서의 같은 결과가 나타났다(Fig 3,4). 즉, 어체중 톤당 10, 50, 100, 200g을 1일 1회 3일간 용량별로 투여한 결과, 톤당 10g에서 폐사율의 저하가 나타나기 시작하였으며, 톤당 100g이상에서 완전한 치료효과를 나타냈다.

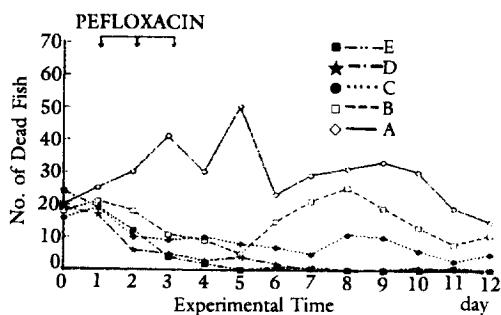


Fig 3. The daily mortality after pefloxacin treatment by staged oral dose for 3 days in the flounder farm where the edwardsiellosis had occurred.

- A: The non-treated group
- B: The treated group using 10 g pefloxacin per ton of fish body weight
- C: The treated group using 50 g pefloxacin per ton of fish body weight
- D: The treated group using 100 g pefloxacin per ton of fish body weight
- E: The treated group using 200 g pefloxacin per ton of fish body weight

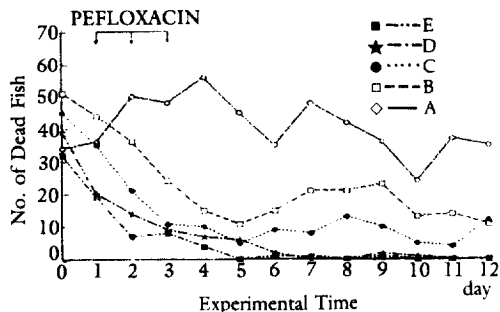


Fig 4. The daily mortality after pefloxacin treatment by staged oral dose for 3 days in the Israeli carp farm where the *Aeromonas hydrophila* infection had occurred.

- A: The non-treated group
- B: The treated group using 10 g pefloxacin per ton of fish body weight
- C: The treated group using 50 g pefloxacin per ton of fish body weight
- D: The treated group using 100 g pefloxacin per ton of fish body weight
- E: The treated group using 200 g pefloxacin per ton of fish body weight

Table 7. Zone diameters of antimicrobial inhibition after pefloxacin treatment for 40 days by EEC 4-plate method

Days after treatment	Zone diameter(ϕ ;mm)					
	Israeli carp			Flounder		
	A*	B*	C*	A*	B*	C*
1	22.0	19.0	30.5	19.5	22.5	28.5
2	20.0	17.0	25.5	17.0	19.0	23.5
3	18.5	16.5	20.0	16.0	16.0	18.5
4	16.5	16.0	18.0	15.5	16.0	17.0
5	15.5	15.5	17.5	14.5	15.5	15.5
6	15.0	14.0	15.0	14.0	15.0	15.0
7	14.0	14.0	14.5	14.0	14.0	14.5
8	13.5	13.0	14.0	13.5	13.0	14.0
9	13.0	13.0	13.5	13.5	13.0	13.0
10	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0
11	12.5	13.0	12.0	12.0	12.0	12.5
12	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.5
13	11.0	12.0	11.0	11.0	12.0	12.0
14	10.0	11.0	10.0	11.0	11.0	12.0
15	10.0	10.0	10.0	10.0	11.0	11.0
16	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	11.0
17	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
.
.
.
40	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0

* A : *Aeromonas hydrophila*.
 B : *Edwardsiella tarda*
 C : *Pseudomonas fluorescens*

또한, 본 약제는 공시한 모든 어종의 세균성질병에 있어서, 폐사율 저하 등의 뛰어난 치료효과를 보임이 인정되었다(Table 6). 즉, 에드워드병, 켈양병, 에로모나스증, 슈도모나스증, 연쇄구균증, 비브리오병 등에 본 약제를 어체중 톤당 100g씩 1일 1회 3-5회 투여한 결과, 대조군이 계속적인 폐사(투여 후 5일간 19-31%의 누적폐사율을 나타냄)를 보인데 반하여, 시험군은 대략 일주일 이내에 폐사가 멈추고(누적폐사율 4-9%), 외부증상이나 병리조직학적으로 질병이 치유되었음이 확인되었다.

항균물질의 잔류성검사 : EEC 4-plate 법에 의하여, 본 약제 투여 후 40일간 어체내에서의 잔류기간을 측정된 결과, 이스라엘잉어와 넙치에 있어서의 잔류기간은 Table 7과 같이 나타났다.

Table 7에서와 같이, 이스라엘잉어는 13일 이후부터, 그리고 넙치는 14일 이후부터 항균제 발육억제대가 disc 밖으로 1mm 이하가 되었다. 따라서, 이 기간 후에는 본 약제의 잔류량이 어체내에서 검출한계치 이하로 존재한다고 측정되었다. 그러므로 본 약제는 발육억제대가 전혀 나타나지 않은 시점을 기준으로 하여, 이스라엘잉어와 넙치에 있어서, 반드시 약제투여 후 15일 이상의 휴약기간을 설정함이 타당하다.

고 찰

급성 독성시험 결과, 이스라엘잉어에서는 1.9g/l, 넙치에서는 8g/l 이하의 공시약제 농도에서는 아가미를 비롯한 모든 장기에서 별다른 병리학적 소견이 관찰되지 않았으며, 특히 본 약제의 권장용량의 농도(물 또는 어체중 톤당 100g)에서는 아가미와 신장, 간장 등의 장기에서 모두 정상적인 소견이 인정되었다.

또한, 다량(사용량의 100배 이상 용량의 경우)의 본 약제를 사육수에 희석할 경우, 본 약제의 아가미에 대한 독성작용 외에도 녹지않고 가라앉은 침전물이 아가미에 물리적인 자극을 줌과 동시에 호흡을 방해하여 그 결과 호흡곤란으로 폐사에 이르게 한 것으로 사료된다.¹⁸

독성시험에서 폐사한 공시어의 병리조직학적 소견으로서, 먼저 아가미의 경우를 들면 새박판 기저부의 주의할 만한 증생소견을 제외하고는 특징적인 소견은 볼 수 없었으며, 농도가 증가할수록 증생 정도는 약간 증가하는 경향을 보였다. 따라서, 폐사의 원인은 시험 약제의 침전에 의한 아가미에 대한 물리적 자극과 새박판 상피세포의 증생으로 인한 호흡면적의 감소로 인한

호흡곤란으로 사망한다고 사료된다. 또한 체표의 점액 분비세포가 비대화되는 경향을 보였다. 그러나 신장과 간장에서는 별다른 병리조직학적 변화가 인정되지 않았으며, 일부 공시어에서 약한 정도의 간장일부의 공포화소전과 신장 세뇨관 상피세포의 융해가 관찰되었다.

만성독성에 있어서는, 과도한 용량의 투여로 인해 폐사된 어체의 병리조직학적 소견은 아가미를 비롯한 대부분 장기에서 급성독성의 경우와 유사하였다. 즉, 아가미의 증생소견과 그로 인한 호흡곤란으로 사망하였다고 사료된다. 또한 일부 공시어에서는 그 밖의 간장과 신장 등의 장기에서 약간의 세포독성 병변이 관찰되었으나 유의할만한 소견은 아니었다. 그리고, 그 이하의 약제를 투여한 공시어에서는 폐사와 유의할만한 병리 소견이 관찰되지 않았다.

이상에서 적정량의 50-200배 이상의 반수생존농도 이상의 약제를 투여한 경우 아가미 및 신장, 간장 등에 세포독성을 일으켜, 대사장애로 인한 사망이 폐사의 원인으로 사료된다. 또한 본 약제가 반수생존농도 이상의 용량으로 투여되었을 경우, 비교적 산소요구량이 많고 운동성이 활발한 어종(무지개송어, 잉어, 방어 등)의 경우는 넙치나 뱀장어와 같은 저생성의 어종에 비하여 10배 정도 본 약제에 대한 독성이 높을 것으로 사료된다.¹⁹

본 공시약제를 이용한 어병세균에 대한 감수성시험에서는 모든 공시균주에서 높은 감수성을 나타내었다. 감수성 disc에 함유된 시험약제의 농도가 높을수록 감수성대는 더욱 증가하는 경향을 보였다.¹³ 현재 사용되고 있는 대부분의 항균물질은 과도한 남용과 부적절한 사용에 의해, 어병 세균이 내성을 나타내어 감수성이 매우 낮거나 거의 없는 경우가 많음을 알 수 있고, 따라서 본 시험약제는 각 어병 세균에 대하여 감수성이 매우 높아, 내성을 나타내지 않고 있다고 사료된다.^{3,20,21}

또한, 본 약제는 공시한 모든 어종의 세균성질병에 있어서, 뛰어난 치료효과를 보임이 인정되었다. 즉, 슈도모나스증, 비브리오병, 연쇄구균증, 에드워드병, 켈양병, 에로모나스증 등에 본 약제를 투여한 결과, 대조군이 계속적인 폐사를 보인데 반하여, 시험군은 대략 일주일 이내에 폐사가 멈추고, 외부증상이나 병리조직학적으로 질병이 치유되었음이 확인되었다. 이는 본 약제가 다른 어종에 있어서도, 여러 세균성 질병의 치료에 매우 유효함을 시사한다고 하겠다.

현장과 실험실에서의 본 약제의 실제 사용 결과, 본 시험약제의 어병의 치료에 대한 권장용량으로, 투약방법에 관계없이, 경구투여 혹은 지중살포(약육법)에 의한 경우, 어체중 또는 물 톤당 100g을 사용할 경우 충

분한 질병치료 효과가 있음이 인정되었다. 즉, 어종과 질병의 종류에 관계없이, 대회 어체중 톤당 100g을 1일 1회씩 2-3회 투여함이 바람직하고, 약욕법의 경우에는 물 톤당 100g씩 24시간 정도 3회 투여하면 치료 효과가 충분히 인정되었다. 그러나 어종에 따라, 혹은 사용 시의 환경에 따라 용량의 가감을 하는 것이 바람직한 물론이다.¹

잔류성에 있어서는 어종에 따라 약간의 차이가 있으나 대체적으로 어체내에서 15일 정도 잔류하는 것으로 사료된다. 세균의 발육억제제가 disc 밖으로 1 mm 정도 나타나면, 일반적으로 항균물질이 체내에서 검출한 체치인 0.1 ppm 이하로 잔류하는 것으로 간주되므로, 따라서 본 약제는 발육억제제가 전혀 나타나지 않은 시점을 기준으로 하여, 반드시 약제투여 후 15일 이상의 휴약기간을 두어야 하지않으면 안된다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 본 시험약제는 어병세균이 기존의 수산용 항균제에 대하여 상당한 내성을 보이는데 반하여, 탁월한 감수성을 나타내고 있음이 인정되었으며, 여러 어종의 질병에 있어서도 시험적으로 사용해본 결과, 기존의 항균제와 비슷한 용량에서 폐사율의 현저한 저하등이 관찰되었다. 이러한 점에서, 본 약제는 대부분의 어병세균에 대하여 광범위한 항균력을 갖는, 양식어류의 세균성 질병에 치료 효과가 우수한 약제로서 이용되리라라고 전망된다.^{5,6,7}

결 론

본 실험은 pefloxacin methanesulfonate의 수산용 의약품의 적용 가능성여부를 밝히는 데 그 목적이 있으며 이를 수행하기 위해 항균력과 급성독성시험, 아만성독성시험과 현장효능검사 및 체내 잔류성 검사 등을 시험

하였다. 결과는 다음과 같다.

1. 항균력에 있어서 pefloxacin methanesulfonate는 일반적으로 사용되고 있는 다른 수산용 항생제 및 항균제와 비교하였을 때 항균력이 월등하게 뛰어났으며 특히 기존의 이미 내성을 발현하고 있는 항생제 및 항균제 들과는 달리 전 실험기간에 걸쳐 전혀 내성을 나타내지 않았다.

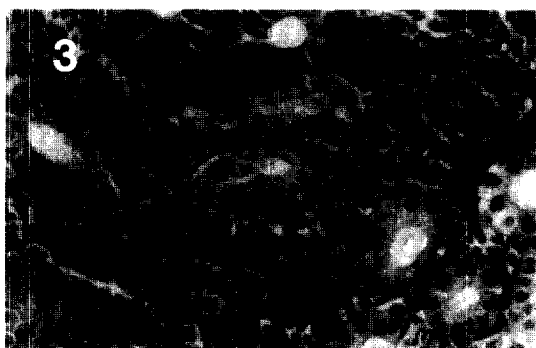
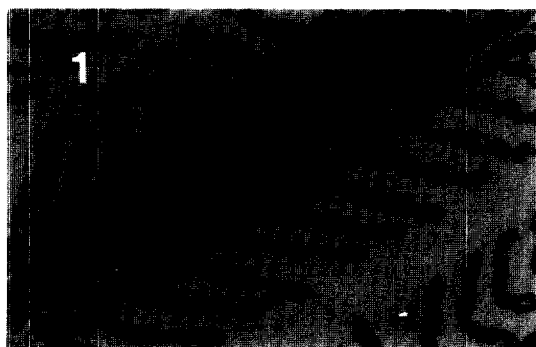
2. 급성독성시험에서 결정된 반수생존농도(TLm_{48h})의 값은 이스라엘잉어가 380-420 ppm 이었고, 넙치는 2100-2300 ppm 이었다. 또한 급성독성 및 아만성독성 시험에서, 본 약제의 권장용량 농도에서는 아가미의 새박관 기저부세포의 증생 및 세포의 점액분비세포의 증생과 비대를 제외하고는 기타 장기에 있어서 정상적인 소견을 나타내었으며, 사망원인은 수중에 공시약제가 녹을 수 있는 한계 이상으로 녹음으로서 일어난 침전물들의 물리적인 자극과 새박관 상피세포의 증생으로 인한 호흡곤란으로 생각된다.

3. 현장검사와 실험실검사에서 직접 어군에 질병이 발생하였을 경우, 본 약제를 물 또는 어체중 톤당 100g씩 1일 1회 3회정도 투여함으로써 현저한 폐사율 저하 등의 우수한 치료효과를 나타내었으며, 체내 잔류성 검사에서는 투약 중지후 15일 정도 경과하면 체내에서 약제가 분해, 배출되어 어체내에 검출한체치 이상으로 잔류하지 않음을 확인할 수 있었다.

결론적으로 pefloxacin methanesulfonate는 우수한 항균력을 가지면서도 내성의 문제가 어체에 미치는 독성에 있어서 문제점이 없으며, 또한 체내 잔류성 문제에 있어서도 약제가 비교적 빨리 배출되어 체내에 존재하지 않으므로 남용과 오용으로 인한 내성균이 많이 증가하고 있는 수산용 의약품의 사용현실을 생각해 볼 때 어병의 치료에 효과적으로, 안전하게 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

Legends for photographs

- Photo 1. Histological appearance of gill of the Israeli carp raised in water diluted by pefloxacin (100 g/t) for 2 days, ×400, H & E stain
 Photo 2. Histological appearance of liver of the Israeli carp raised in water diluted by pefloxacin (100 g/t) for 2 days, ×200, H & E stain
 Photo 3. Histological appearance of kidney of the Israeli carp raised in water diluted by pefloxacin (100 g/t) for 2 days, ×200, H & E stain
 Photo 4. Histological appearance of gill of the flounder raised in water diluted by pefloxacin (100 g/t) for 2 days, ×200, H & E stain
 Photo 5. Histological appearance of liver of the flounder raised in water diluted by pefloxacin (100 g/t) for 2 days, ×200, H & E stain
 Photo 6. Histological appearance of kidney of the flounder raised in water diluted by pefloxacin (100 g/t) for 2 days, ×100, H & E stain
 Photo 7. Histological appearance of gill of the Israeli carp raised in water diluted by pefloxacin (5kg/t) for 2 days. The remarkable hyperplasia of the epithelial cells of the gill lamella is observed. ×200, H & E stain
 Photo 8. Histological appearance of kidney of the flounder raised in water diluted by pefloxacin (20kg/t) for 5 days. The swelling and lequefaction of the epithelial cells of the renal tubules are observed. ×400, H & E stain



참 고 문 헌

1. O'Grady P, Moloney M, Smith PR. Bath administration of the quinolone antibiotic flumequine to brown trout *Salmo trutta* and Atlantic salmon *S. Salar*. *Dis. Aquat. Org.* 1988; 4:27-33.
2. U.S., EPA(Environmental Protection Agency). Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. EPA, 3rd ed. 1985; EPA/6004-85/013
3. Heo GJ, Shin GS, Lee MH. Diseases of aquaculture animals and prevention of drug residues. *Kor. J. Food Hygiene* 1992; 7(2,3):S7-S19.
4. Nishino T, Takahata M, Otsuki M. *In vitro* and *in vivo*. antibacterial activities of T-3262, a new synthetic antimicrobial agent. *Chemotherapy* 1988; 36(Suppl.9):68-88.
5. Monk JP, Campoli-Richards DM. Ofloxacin-a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* 1987; 33:346-391.
6. Stamm JM. *In vitro* resistance by fish pathogens to aquacultural antibacterials, including the quinolones difloxacin(A-56619) and sarafloxacin(A-56620). *J. Aquat. Ani.Health* 1989; 1:135-141.
7. Tsoumas A, Alderman DJ, Rodgers CJ, *Aeromonas salmonicida*; development of resistance to 4-quinolone antimicrobials. *J. Fish Dis* 1989; 12:493-507.
8. Aoki T, Kitao T, Fukudome M. Chemotherapy against infection with multiple drug resistant strains of *Edwardsiella tarda* in cultured eels. *Fish Pathology* 1989; 24(3):161-168.
9. Tanasomwang M, Muroga M. Effects of tetracycline and sodium nifurstyrenate and tetracycline on the bacterial flora of rotifers(*Brachionus plicatilis*). *Fish Pathology* 1989; 24(1):29-35.
10. Grimm H. Interpretive criteria for the agar diffusion susceptibility test with ofloxacin. *Drugs* 1987; 34(Suppl.1):14-19.
11. Palmer R, Kawai K, Kusuda R. *In vitro* activity of quinolone antibacterials against selected fish pathogens. *Gyobyu Kenkyu* 1992; 27(3):131-142.
12. Amdur MO, Doull J, Klassen CD. CASARETT and DOULL'S Toxicology. Pergamon Press, New York, 4th ed. 1981; 693-694.
13. Elmer W, Koneman, Stephen D, Allen *et al.* Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed., J.B. Lippincott Company 1992.
14. 日本化学療法學會. 最小發育阻止濃度(MIC) 測定法再改訂について. *Chemotherapy* 1981; 29:76-79.
15. 家畜の耐性菌研究會. 家畜由来の細菌に對する抗生物質等の藥劑の最小發育阻止濃度測定法について. *日獸會誌* 1976; 29:90-92.
16. Endo T, Ogishima K, Hayasaka H, kaneko S, Ooshima S. Oxolinic acid as a therapeutic agent against infection in fish-1. Its antibacterial activity, therapeutic effect and excretion on fish body. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1973; 39:165-171.
17. Japanese Society of Antimicrobials for Animals. Determination method of minimum inhibitory concentrations of antibiotics against bacteria from livestock. *Nichijuunkaishi* 1976; 29:90-92.
18. 福田芳生外 共著. 水生動物疾病學. 朝倉書店. 1988:90-96.
19. Takashima N, Aoki T, Kitao K. Epidemiological surveillance of drug resistant strains of *Pasteurella piscicida*. *Fish Pathol* 1985; 20:209-217.
20. Endo T, Onozawa M. Effects of pH and temperature on the uptake of oxolinic acid by goldfish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1987; 53:551-555.
21. Kusuda R, Inoue K. Study on application of ampicillin as a marine drug against pseudotuberculosis in cultivated yellowtails. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1976; 42:969-973.
22. Chun SK. Detection and control of bacterial diseases of cultured fishes in Korea. *Bull. Korean Soc. Fish Pathology* 1988; 1(1):5-30.
23. Lee HK. Isolation and antimicrobial susceptibility testing of *Edwardsiella tarda* from *Channa argus* in Korea. *Bull. Korean Soc. Fish Pathology* 1988; 1(2): 95-101.
24. Gukje Pharmacia Co. Ltd edition, Broad spectrum the 3rd generation first injectable quinolone(*in vitro* activity of pefloxacin). 1993.
25. Heo GJ. Induction of hepatic tumors in teleost (*Oryzias latipes*) after treatment with urethane:brief communication. *Korean J. of Lab. Ani. Sci* 1991; 7(2):71-75.