



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0047992
(43) 공개일자 2015년05월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/4164 (2006.01) A61K 31/60 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0128142

(22) 출원일자 2013년10월25일

심사청구일자 2013년10월25일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

주식회사 고려비엔피

충청남도 예산군 신암면 추사로 235-9

(72) 발명자

정태성

경남 진주시 진양호로239번길 13, 203동 202호 (평거동, 평거하우스토리아파트)

노성원

경남 진주시 진주대로404번길 10-9, 104호 (가좌동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

한윤호, 양기혁, 이인행, 김남식

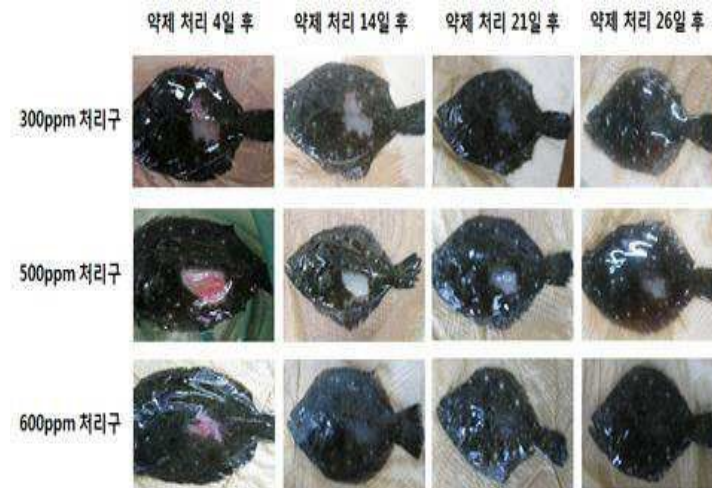
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 넙치 양식 어류 스쿠치카병 방제용 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 스쿠치카병 방제용 및 치료용 조성물에 관한 것으로 더 상세하게는 4급 암모늄염(quaternary ammonium salt) 및 브로노폴(bronopol, 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol)을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 어류의 원충성 질병 치료용 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

차인석

경남 진주시 금산면 중천로 82, 109동 1606호 (금
산아이파크)

장호빈

경남 진주시 가좌안골길21번길 5, 105동 905호 (가
좌동, 제일풍경채아파트)

박성빈

경남 양산시 변영로 441, 2동 409호 (소주동, 세신
아파트)

유종언

부산 영도구 함지로 8, 101동 805호 (동삼동, 함지
그린아파트)

김영규

경남 진주시 호탄길9번길 4-1, 405 (호탄동)

페르난도 파구타오

경남 진주시 가호로 26, 207동 808호 (가좌동, 가
좌주공2아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

점액제거제를 포함하는 제1조성물; 및

항미생물제를 포함하는 제2조성물을 포함하는 어류의 원충성 질병 치료용 키트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1조성물은 상기 점액제거제가 정제수에 용해되고, 상기 제2조성물은 상기 항미생물제가 정제수에 용해된 용액인, 키트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 점액제거제는 계면활성제인, 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 계면활성제는 음이온성 계면활성제 또는 양이온성 계면활성제인, 키트.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 양이온성 계면활성제는 4급 암모늄염인, 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 4급 암모늄염은 벤잘코늄염 및 디알킬 디메틸 암모늄염의 혼합물인, 키트.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 제2조성물은 색소를 추가적으로 포함하는, 키트.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 항미생물제는 항원생생물 제제(antiprotozoan agent), 항세균제(antibacterial agent) 또는 항진균제(antifungal agent)인, 키트.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 항원생생물 제제는 메트로니다졸(metronidazole), 에플로르니틴(eflornithine), 푸라졸리돈(furazolidone), 멜라르소프롤(melarsoprol), 오르니다졸(ornidazole), 피리메타민(pyrimethamine), 티니다졸(tinidazole), 파로마이신 설페이트(paromycine sulfate), 히드록시클로로퀸(hydroxychloroquine), 이오도퀴놀(iodoquinol), 또는 펜타미딘(pentamidine)인, 키트.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 항세균제는 테트라사이클린, 페니실린, 독시사이클린, 시프로플로사신, 아지트로마이신, 에리트로마이신,

스트렙토마이신, 젠타마이신, 반코마이신, 세팔로스포린, 클로람페니콜, 또는 브로노폴(bronopol)인, 키트.

청구항 11

점액제거제를 어류 사육 수조에 처리하여 어류 아가미의 점액질을 제거하는 점액질 제거단계; 및

상기 어류 사육 수조에 항미생물 제제를 처리하는 단계를 포함하는 원생생물 제거단계를 포함하는, 어류의 원충성 질병의 치료 및 예방방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 점액질 제거단계 이후 상기점액질 제거제를 수조에 처리한 후 물을 교환하여 상기 점액질 제거제를 제거하는 단계가 추가되는, 어류의 원충성 질병의 치료 및 예방방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 원생생물 제거단계 이후 물을 교환하여 상기 항미생물 제제를 제거하는 단계를 추가적으로 포함하는, 어류의 원충성 질병의 치료 및 예방방법.

청구항 14

상기 어류는 수쿠치카(Scutica) 원충에 감염 된 것인, 어류의 원충성 질병의 치료 및 예방방법.

청구항 15

브로노폴(bronopol)을 유효성분으로 함유하는 어류의 원충성 질병의 치료 및 예방용 조성물.

청구항 16

약학적으로 유효한 양의 브로노폴을 수조에 처리하는 단계를 포함하는 어류의 원충성 질병의 치료 및 예방방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 스쿠치카병 방제용 조성물에 관한 것으로 더 상세하게는 넙치 양식 어류 스쿠치카병 방제용 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

스쿠치카증은 육상 수조에 양식하고 있는 넙치에 주로 발병하고, 1990년대 들어와 국내 넙치 양식에 있어 가장 심각한 피해를 유발하며, 원인체는 스쿠티카충으로서, 스쿠티카충이 넙치의 상피세포(하층)에 기생하여 궤양을 일으켜 주로 발생하는 질병이다. 최근 약 20여종의 스쿠치카충에 의해서 스쿠치카증이 발생 가능하고, 특히 국내 양식 넙치에서 문제시 되고 있는 종은 *Philasterides dicentrarchi*, *Miamiensis avidus*, 및 *Uronema marinum*등으로 알려져 있다. 감염된 넙치는 빈혈, 체중감소, 체색변화, 장염, 점액질 과다 분비, 비늘손실, 출혈 혹은 깎아진 흰색반점, 피부괴사 그리고 폐사등으로 이어진다. 감염된 넙치는 감염 장기, 즉 뇌, 눈, 근육, 아가미, 간, 신장, 장, 위 등의 장기 특이적인 병리학적인 반응을 보이다가 치사로 이어진다. 스쿠치카충은 원생동물의 섬모충 막구목에 속한다. 이 충은 물방울 모양으로써, 그 크기는 20~40 μ m로 전신에 섬모를 가지며, 수중에서 활발히 운동한다. 충체의 한쪽 끝에 세포구가 있다. 이 충은 원래 기생생활을 하는 것이 아니라 수조의 못바닥이나 벽에 상존하는 원생동물인데, 종묘생산시 먹이를 많이 투여하거나 과밀도 사육시에 대량 번식하여 넙치를 대량 폐사시킨다. 이 충은 어류의 체표와 지느러미에서 유발될 뿐만 아니라, 신장, 혈관 및 뇌조직에서도 다양하게 유발되며, 어류의 기생충과의 달리 혈관을 통하여 뇌조직까지 침입하여 기생하기 때문에 감염시 치료가 어렵다. 대부분 소성결합 조직의 파괴를 통하여 넙치를 폐사시킨다고 보고된다. 발생시기는 4월에서 6월 말까지 주로 치어기에 많이 발생한다. 감염이 발생하면, 밀식을 피하고, 유기물질이 수조 밑바닥에 남지 않도록

제거시켜 주는 것이 우선적인 대책이며, 스쿠치카충이 체표나 아가미 및 지느러미와 같은 외부에 기생했을 때는 100~150 ppm 포르말린으로 1시간 약욕시키면 쉽게 구제시킬 수 있으나, 뇌에 기생된 것은 구제할 수 없는 것으로 알려져 있다. 또한, 포르말린의 독성 성분으로 인해 사용이 금지되었다. 상기의 질병을 막기 위해 포르말린 외에 과산화수소, 안정화 염소, 말라카이트 그린, 포름알데히드, 황상동과 같은 유독성 혹은 자극성 물질 등으로 약욕을 실시하였으나 소비자 및 어류의 안전성에 있어 문제를 일으킨다. 따라서, 최근 이러한 문제를 해결하기 위한 방안으로 독성이 약한 성분들을 이용한 스쿠티카충 살충제에 관한 연구가 이루어지고 있다.

[0003]

종래의 방법으로는 한국등록특허 제0823558호(어류의 스쿠치카충 살충제), 한국등록특허 제0937037호(안정성 및 수용성이 향상된 비타민B1을 함유하는 항 스쿠티카충 제제 및 어병유발 미생물에 대한 항균 조성물), 한국등록특허 제0784917호(안정성 및 수용성이 향상된 비타민B1을 함유하는 항 스쿠티카충 제제 및 어병유발 미생물에 대한 항균 조성물), 일본등록특허 제4820662호(천연 식물 추출 물건을 이용한 어류 기생충 구충용 조성물), 한국등록특허 제0373147호(스쿠치카충 감염증의 치료제), 일본등록특허 제3882939호(물고기의 스쿠치카충 치료방법 및 예방방법) 등이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004]

그러나, 아직까지 스쿠치카병 방제용 및 치료용 조성물은 초기단계에 있다. 이에 본 발명은 넙치 양식 어류 스쿠치카병 방제용 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 넙치에 기생하여 질병을 유발하는 섬모충(ciliates)의 일종인 스쿠치카 충에 대한 방제용 조성물 및 방제방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0005]

본 발명의 일 관점에 따르면, 점액제거제를 포함하는 제1조성물; 및

[0006]

항미생물제를 포함하는 제2조성물을 포함하는 어류의 원충성 질병 치료용 키트가 제공된다.

[0007]

상기 키트에 있어서, 상기 제1조성물은 상기 점액제거제가 정제수에 용해되고, 상기 제2조성물은 상기 항미생물제가 정제수에 용해된 용액인, 키트일 수 있다.

[0008]

상기 키트에 있어서, 상기 점액제거제는 계면활성제인, 키트일 수 있다.

[0009]

상기 키트에 있어서, 상기 계면활성제는 음이온성 계면활성제, 양이온성 계면활성제 또는 비이온성 계면활성제일 수 있다.

[0010]

상기 키트에 있어서, 상기 양이온성 계면활성제는 4급 암모늄염일 수 있다.

[0011]

상기 키트에 있어서, 상기 4급 암모늄염은 벤잘코늄염 및 디알킬 디메틸 암모늄염의 혼합물일 수 있다.

[0012]

상기 키트에 있어서, 상기 제2조성물은 색소를 추가적으로 포함하는, 키트일 수 있다.

[0013]

상기 키트에 있어서, 상기 항미생물제는 항원생생물 제제(antiprotozoan agent), 항세균제(antibacterial agent) 또는 항진균제(antifungal agent)인, 키트일 수 있다.

[0014]

상기 키트에 있어서, 상기 항원생생물 제제는 메트로니다졸(metronidazole), 에플로르니틴(eflornithine), 푸라졸리돈(furazolidone), 멜라르소프롤(melarsoprol), 오르니다졸(ornidazole), 피리메타민(pyrimethamine), 티니다졸(tinidazole), 파로마이신 설페이트(paromycine sulfate), 히드록시클로로퀸(hydroxychloroquine), 이오도퀴놀(iodoquinol), 또는 펜타미딘(pentamidine) 일 수 있다.

[0015]

상기 키트에 있어서, 상기 항세균제는 테트라사이클린, 페니실린, 독시사이클린, 시프로플로사신, 아지트로마이신, 에리트로마이신, 스트렙토마이신, 젠타마이신, 반코마이신, 세팔로스포린, 클로람페니콜, 또는 브로노폴(bronopol) 일 수 있다.

[0016]

본 발명의 일 관점에 따르면, 점액제거제를 어류 사육 수조에 처리하여 어류 아가미 및 피부 등의 점액질을 제거하는 점액질 제거단계; 및 상기 어류 사육 수조에 항미생물 제제를 처리하는 단계를 포함하는 원생생물 제거 단계를 포함하는, 어류의 원충성 질병의 치료 및 예방방법을 제공한다.

[0017]

상기 치료 및 예방방법에 있어서, 상기 점액질 제거단계 이후 상기점액질 제거제를 수조에 처리한 후 물을 교환

하여 상기 점액질 제거제를 제거하는 단계가 추가되는 어류의 원충성 질병의 치료 및 예방방법일 수 있다.

[0018] 상기 치료 및 예방방법에 있어서, 상기 원생동물 제거단계 이후 물을 교환하여 상기 항미생물 제제를 제거하는 단계를 추가적으로 포함하는 어류의 원충성 질병의 치료 및 예방방법일 수 있다.

[0019] 또한 상기 치료 및 예방방법에 있어서, 상기 어류는 스쿠치카(Scutica) 원충에 감염 된 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면, 브로노폴(bronopol)을 유효성분으로 함유하는 어류의 원충성 질병의 치료 및 예방용 조성물이 제공된다.

[0021] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면, 약학적으로 유효한 양의 브로노폴을 수조에 처리하는 단계를 포함하는 어류의 원충성 질병의 치료 및 예방방법이 제공된다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 조성물은 어류가 서식 중인 수조에 투입되거나, 감염된 어류로의 경구투여 또는 환부로 국부투여를 통해 투여될 수 있다.

[0023] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물의 약학적으로 유효한 양은 감염된 어류의 종류, 월령, 증상의 정도에 따라 달라질 수 있으나, 약 1 내지 2000 ppm일 수 있고, 10 내지 1000 ppm일 수 있으며, 50 내지 500 ppm일 수 있다.

[0024] 본 발명자들은 난치성 어류 질환의 원인충인 스쿠치카의 방제가 어려운 원인이, 이들 스쿠치카 섬모충이 어류의 아가미 및 체표의 표면을 덮고 있는 점막층에 서식하여, 항미생물 제제가 이들 스쿠치카 섬모충에 제대로 전달 되지 않기 때문일 것이라는 가설을 수립하였다.

[0025] 이에, 상기 가설을 입증하기 위해, 본 발명자들은 우선 어류의 아가미 및 체표 표면의 점막층을 제거할 수 있는 계면 활성제의 일종인 4급 암모늄 수용액(으로 스쿠치카충이 감염된 어류가 들어 있는 수조에 1차 처리하고, 일정 기간 경과 후 상기 4급 암모늄 수용액을 제거한 후(제1단계), 스쿠치카 섬모충을 제거할 수 있는 항미생물 제제의 일종인 브로노폴 수용액을 상기 수조에 처리하고, 일정 기간 경과 후 상기 브로노폴 수용액을 제거하였으며(제2단계), 이를 하루에 한 차례씩 수일간 반복한 결과, 스쿠치카충에 감염된 어류의 상처를 완치시킬 수 있음을 확인하였다.

[0026] 따라서, 본 발명에 의한 점액질 제거제를 1차 처리하여 어류 아가미 및 체표의 점막층을 제거하고, 이어 항미생물 제제를 2차 처리함으로써 감염성 원생동물을 제거하는 2단계 처리방법은 스쿠치카충을 포함한 어류의 점막층에 서식하는 감염성 미생물에 의한 질병의 치료 및 예방에 매우 효과적임을 알 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 실시 예에서는 비록 상기 점액질 제거제로 염화벤잘코니움 및 염화디알킬디메틸암모늄과 같은 특정 4급 암모늄염 및 항미생물제제로 브로노폴만을 사용하였으나, 이들 외에도 점막제거제로 다른 2급 아민, 3급 아민, 4급 아민, 소디움라우릴설페이트(SDS), Triton X-100, NP-40, 폴리옥시에틸렌 글리콜(polyoxyethylene glycol), 폴리옥시프로필렌 글리콜(polyoxypropylene glycol), 직쇄 알킬벤젠설포산염, 알파올레핀설포산염, 알킬황산에스테르염, 폴리옥시에틸렌 알킬에스테르황산염, 2급 알칸설포산염, 알파설포지방산에스테르염 디알킬디메틸암모늄염, 이미다졸리움염, 알킬 디메틸벤질 암모늄염, 폴리옥시에틸렌알킬에테르, 알킬 디메틸 아민옥사이드, 지방산 알카놀아마이드, 알킬폴리글루코사이드, 리옥시에틸렌알킬폴페닐에테르, 알킬 베테인, 알킬설포베테인 등 다양한 계면활성제 그리고, 붕산, 클로로헥시딘 클루코네이트(chlorohexidine gluconate), 폴리헥사나이드(polyhexanide), 비포나졸, 부토코나졸, 알바코나졸, 벤조산(benzoic acid), 시클로피록스(ciclopirox), 또는 플루시토신(flucytosine) 등의 다양한 저독성 항미생물 제제가 대체물로 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0028] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면 스쿠치카 감염 어류의 사망률을 효과적으로 감소시킬 수 있어, 본 발명은 스쿠치카 감염증의 예방 및 치료용 조성물 및 방법으로 매우 유용하다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 벤잘코늄클로라이드를 포함하는 치료 약제 A용액에 대한 안정성시험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 브로노폴을 포함하는 치료 약제 B용액에 대한 안정성시험 결과를 나타낸 그래프이다.

도3은 브로노폴을 포함하는 치료 약제 A 및 B용액에 대한 유효성시험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 브로노폴을 포함하는 치료 약제 B용액의 유효성시험에 대한 B용액 처리에 따른 스쿠치카의 형태 관찰한 사진이다.

도 5는 스쿠치카 감염 넙치를 이용한 치료 약제 A용액과 함께 치료 약제 B용액 처리에 따른 일자 경과별 스쿠치카 감염 증상이 완화된 넙치의 사진이다.

도 6은 스쿠치카 감염 넙치를 이용한 치료 약제 B용액 단독 처리에 따른 일자 경과별 스쿠치카 감염 증상이 완화된 넙치의 사진이다.

도 7은 실제로 양식장에서 스쿠치카에 감염된 벤잘코늄클로라이드를 포함하는 치료 약제 A용액 및 브로노폴을 포함하는 치료 약제 B용액을 처리한 후 11일 동안 시간 경과에 따른 사망률을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

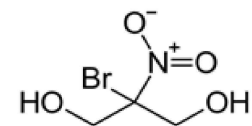
용어의 정의:

4급 암모늄염(quaternary ammonium salt): 질소원자에 수소 대신 네 개의 기능기가 부착된 암모늄염($\text{NR}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4\text{A}^-$)을 의미하고(상기 식에서 R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 알킬 또는 아릴기를 의미하고 A^- 는 음이온을 의미한다), 상기 A^- 음이온은 할로겐 이온일 수 있고, 상기 할로겐 이온은 불소이온(fluoride), 염소이온(chloride), 브로마이드(bromide) 또는 요오드이온(iodide)일 수 있다. 주로 세척제로 사용된다.

디알킬 디메틸 암모늄염(dialkyl dimethyl ammonium salt): 상기 4급 암모늄염의 일종으로 질소원자에 두 개의 메틸기와 두 개의 알킬기가 부착된 암모늄염으로서 상기 알킬기는 통상적으로 탄소수 10개를 갖는다

벤잘코늄염(benzalkonium salt): 알킬 디메틸 벤질암모늄염(alkyl dimethyl benzyl ammonium salt)로서 4급 암모늄염의 일종으로서 질소원자에 벤질기 하나, 메틸기 두 개 그리고 통상 탄소수 8 내지 18개의 알킬기가 하나 부착된 형태를 띤다. 인체에 대한 독성이 적은 항균제 기능을 갖는 것으로 알려져 있다.

브로노폴(bronopol): $\text{C}_3\text{H}_5\text{BrNO}_4$ 의 화학식을 갖고 하기와 같은 구조식을 갖는 화합물로서, IUPAC 명명법에 따르면 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol이며, 통상적으로 항균제 및 보존제로 사용되어 오고 있다:



발명의 구체적인 실시태양:

이하, 실시예 및 실험예를 통해 발명을 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전히 알려주기 위해 제공되는 것이다.

실시예 1: 치료 약제의 A 및 B용액의 구성

본 발명에서 스쿠치카병의 치료 약제는 각각의 다른 두 약물(A 및 B 용액)을 사용하여 시너지 효과를 내면서 스쿠치카충을 사멸하도록 디자인되어 있다.

1-1: 치료 약제 A용액

치료 약제 A용액은 어류의 아가미의 점액질층을 제거하기 위한 용도로 제조되었다. 상기 점액질층을 제거하기 위한 점액질 제거제로 다양한 종류의 계면활성제가 사용되는데, 본 발명의 일 실시예에서는 항균 활성(antiseptic activity)도 가지고 있는 4급 암모늄염(quaternary ammonium salt)를 포함시켰으며, 상기 4급 암모늄으로 염화디알킬디메틸 암모늄 및 염화 벤잘코늄을 사용하였다. 상기 4급 암모늄염은, 일반적으로 청소 혹은 소독제 목적으로 사용된다. 특히 *Flexibacter* sp., 같은 활주세균에 감염되어 발생하는 세균성 아가미 질병의 치료에 사용된다. 이 질병에 감염되면 세균은 아가미가 점액질 필름에서 증식하게 되고, 아가미 상피세포층의 이러한 자극은 점액질분비를 더 증가시키는 것으로 알려져 있다.

1-2: 치료 약제 B용액

치료 약제 B용액은 점막층인 스쿠치카충의 제거를 위해 고안한 것으로서, 본 발명의 일 실시예에서는 새로운 친

환경적인 화학제인 브로노폴(Bronopol, 영국약전 수제)을 사용하였다. 상기 브로노폴은 종래에 그람음성 세균에 대한 억제능력이 있는 것으로 보고됐고, 상대적으로 인체에 큰 독성이 없는 것으로 알려져, 샴푸, 액성 의약품 등의 생활용품에 대한 보존제(preservative), 곰팡이에 대한 소독제로 사용되어 왔는데, 특히, *Amyloodinium ocellatum*에 의한 Velvet 감염증에서 장시간 노출시켰을 경우 피낭체(tomonts)가 쌍편모자(dinospores)로 발생하는 것을 멈추게 하고, *Ichthyophthirius multifiliis*의 감염으로 발생하는 담수어의 백점병에서 자유 유영기의 유생[피낭체(tomonts), 낭자(cysts) 및 침입자충(theronts)]에 강력한 살충/세포독성효과를 보이는 것으로 알려져 있다. 고농도 투약농도인 20, 50 및 100 mg/L에서 단시간 처리(약 30분)하였을 때, 자유 유영기의 유생(피낭체, 낭자 및 침입자충)이 현저히 죽거나 성충으로 발생하는 경우가 현저히 늦어졌다. 반면에 저농도(e.g. 1 mg/L)로 장시간 투여 하였을 경우 감염성 유충인 침입자충(theronts)의 생존이 현저히 감소되었다.

[0044]

본 발명자들은 스쿠치카충의 주요 감염부위가 아가미 및 체표 이고, 아가미에 감염된 스쿠치카충의 방제가 가장 어렵다는 점으로부터 넙치 아가미 및 체표 의 점액질이 스쿠치카충을 둘러싸서 보호하는 역할을 수행할 것이라는 가설을 수립하였다. 이에, 우선 넙치 아가미의 점액질을 제거할 수 있는 상기 약제 A용액을 선처리하여 넙치 아가미에 존재하는 점액질을 제거한 후, 스쿠치카충을 사멸시키거나 성충으로의 발생을 억제할 수 있는 약제 B 용액을 후처리할 경우, 스쿠치카충 감염증의 치료 및 예방이 가능할 것으로 예측하였다. 이에 상기 약제 A용액과 약제 B용액의 순차처리 방법이 실제 스쿠치카충 감염증의 치료 및 예방에 효과적인지 이후 실험예를 통해 검증하였다.

[0045]

실험예 1: 안정성(LCt50) 시험

[0046]

본 발명에서 안정성시험(LCt₅₀, LCt: Lethal Concentration time)을 위하여 표 1에서 나타난 바와 같이 10~15 g의 체중, 8~12 cm의 체장의 질병이 발생하지 않은 건강한 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 9~10 마리를 각 실험 조건에 따라 총 76마리를 사용하였다. 어류의 사양조건은 동일하며, 30 L의 해수가 포함된 수조에서 수행하였다.

표 1

[0047]

안정성시험을 위한 넙치마리수 및 용액의 처리용량

시험군	처리 용량	마리(미)수
치료 약제 A용액 안전성	30ppm	10
	50ppm	10
	100ppm	10
A 대조군	무처리	10
치료 약제 B용액 안전성	300ppm	9
	600ppm	9
	1,000ppm	9
B 대조군	무처리	9
계		76

[0048]

표 2에서 나타난 바와 같이, 치료 약제 A용액에 대한 넙치 안정성 실험의 결과를 살펴보면, A용액은 30 ppm에서는 15시간까지 모두 살았고, 50 ppm에서는 12시간 및 13시간 경과 후에 1마리 죽었고, 14시간 및 14.5시간 경과 후에 5마리, 15시간 경과 후에는 나머지 미수 전부 죽었다. 100 ppm에서 6시간 경과 후 4마리가 죽고 8시간이 경과한 후에는 나머지 미수 모두 폐사하였다. 대조군인 A용액의 무처리군에서는 폐사가 없었다. 도 1은 치료 약제 A용액에 대한 안정성시험에 대한 결과를 나타내는 그래프로서, A 용액을 각 용량별로 처리시 시간 경과에 따른 생존 넙치의 마리수를 나타낸 그래프이다.

표 2

[0049]

A용액의 처리용량과 시간 경과에 따른 생존 넙치의 마리수

경과시간(hr) 처리농도	초기	2 hr	4 hr	6 hr	6.5 hr	7 hr	8 hr	12 hr	13 hr	14 hr	14.5hr	15 hr
A-30 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
A-50 ppm	10	10	10	10	10	10	10	9	9	5	5	0
A-100 ppm	10	10	10	6	6	1	0	0	0	0	0	0
무처리	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

[0050] 표 3에서 나타난 바와 같이, 치료 약제 B용액에 대한 넙치 안정성 실험의 결과를 살펴보면, B용액은 300 ppm에서는 28시간 경과 후에 1마리 죽었고, 600 ppm에서는 18시간 경과 후에 1마리 죽었고, 22시간 경과 후에 8마리, 26시간 경과 후에 4마리, 28시간 경과 후에 6마리 죽었다. 1000 ppm에서는 14시간 및 15시간 경과 후에 2 리 죽었고, 18시간 경과 후에 8마리 죽었고, 20시간 경과 후에 나머지 미수 전부 죽었다. 대조군인 B용액의 무처치군에서는 폐사가 없었다. 도 2는 B용액을 각 처치 용량별로 시간 경과에 따른 생존 넙치의 마리수를 나타낸 그래프이다. 폐사되는 농도의 치료 약제 A용액 및 B용액을 각각의 처치 용량군에 대하여 처치한 후 LCt₅₀를 구한다.

[0051] 종래의 방법을 이용하여 LCt₅₀를 확인한 결과, 치료 약제 A용액은 50 ppm에서 14시간 LCt₅₀, 100ppm에서는 6시간 40분 LCt₅₀으로 계산되었다(Reed *et al.*, *Am. J. Epidemiol.* 27(3):493-497, 1938).

표 3

[0052] B용액의 처치용량과 시간 경과에 따른 생존 넙치의 마리수

경과시간(hr) 처치농도	초기	2hr	4hr	6hr	7hr	8hr	12hr	13hr	14hr	15hr	18hr	20hr	21hr	22hr	26hr	28hr
B-300 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9
B-600 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	8	6	4
B-1,000 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	8	8	2	0	0	0	0	0
무처치	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

[0053] 치료 약제 B용액은 600 ppm에서는 27시간 LCt₅₀, 100 ppm에서는 16시간 40 분 LCt₅₀을 보였다.

[0054] 실험예 2: 유효성시험

[0055] 2-1: 스쿠치카 충의 활성 비교

[0056] 본 발명에서 B용액의 유효성시험에 일환으로, 점액과 스쿠치카 혼합에 따른 B용액의 유효성을 확인하였다. 넙치의 점액(mucus)은 스쿠치카충을 쌓아서 보호할 것이므로 B용액을 통해 스쿠치카를 효과적으로 박멸하기 전에 점액이 스쿠치카충을 감싸고 있으므로 점액의 B용액에 대한 저해 효과로 인하여 스쿠치카충의 활성의 영향을 확인하였다. 24 웰 플레이트를 사용하여 넙치에서 채취된 점액질을 해수와 1:1로 혼합하여 스쿠치카를 10⁴/ml 되게 접종하여 검사하였다. 넙치의 점액질이 없는 처리구 및 점액질이 있는 처리구는 각각 3회씩 반복 수행하였다. B 용액을 이용하여 넙치의 점액질 처리에 따른 스쿠치카의 활성을 확인해 본 결과, 넙치의 점액질이 없는 처리구에서는 B용액 80 ppm처리에서 스쿠치카에 대한 활성을 보이는 반면에, 넙치의 점액질이 혼합된 처리구에서는 B용액을 156 ppm 처리시 스쿠치카 활성을 보이는 것으로 나타났다.

[0057] 2-2: 스쿠치카 감염 넙치를 이용한 A 및 B용액 처리에 따른 유효성 확인

[0058] 본 발명의 B 용액의 유효성시험을 위하여 표 5에서 나타난 바와 같이 총 66마의 스쿠치카 감염된 넙치를 사용하였고, 10~15 g의 체중, 8~12 cm의 체장이며, 약제 처리 기간은 8일이었다. 약제 처리 방법은 하기와 같은 방법으로, 먼저 해수 30 L가 포함된 각각의 수조에서 넙치 9 마리를 넣고 6시간 안정화 후, 약제를 농도 별로 처리하고, 처리 1시간 후에 수조의 해수를 교환하였으며, 이후 대조군을 제외한 수조는 해수를 순환처리 하였으며, 8일 동안 매일 약제를 처리하였다.

표 4

[0059] 유효성시험을 위한 넙치마리수 및 용액의 처치용량

시험군	처치 용량	마리(미)수
A용액 유효성	20ppm	
	30ppm	10
	50ppm	10
B용액 유효성	300ppm	9
	500ppm	9
	600ppm	9
대조군	무처치	9

계	66
---	----

[0060]

본 발명에서 치료 약제 A용액 및 B용액을 각각의 처치 용량군에 대하여 처치한 후 유효성을 검증하였다. 투여당 일은 투여 후 1시간에서 6시간까지는 매시간 일반상태를 관찰한다. 투여 익일부터 14일까지는 매일 1회씩 일반상태의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유무를 관찰하였다. 행동(고아분, 선회, 무리이탈, 수명유영, 수직유영, 장지, 문지름, 섭이불량 등), 체형(복부팽만, 편헤드, 야윌, 휘어짐 등), 체색(흑화, 백화, 점액분비 등), 안구(돌출, 함몰, 백탁, 출혈 등), 아가미(빈혈, 퇴색, 출혈, 결손 등), 내장(복수, 출혈, 울혈, 농양, 결절, 백색, 위축, 비대, 변색, 염증 등)에 대한 일반검사를 실시하였다. 모든 실험동물에 대하여 투여 직전과 투여 후 7일과 14일에 체중을 측정하였다. 치사 시 아가미 및 피부 등에서 스쿠치가 검사 및 세균감염 의심 시 미생물학적 검사(병원성분리, 동정, 및 병원성)를 실시하여 시험군과 대조군을 비교한다. 부검의 경우, 관찰기간 중 사망한 녀치는 방혈치사 시켜 내부장기의 육안적 이상 유무를 상세히 관찰하였고, 육안적으로 이상이 있는 장기는 10% 중성 포르말린액에 고정하여 보관하였다.

표 5

[0061]

유효성시험에 따른 용액의 처치용량 및 생존 녀치마리수

	대조군	300ppm	500ppm	600ppm
초기	9	9	9	9
1일	9	6	8	7
2일	8	5	8	6
3일	7	5	8	6
4일	6	4	8	6
5일	5	4	8	6
6일	3	4	8	6
7일	1	4	8	6
8일	0	4	8	6

[0062]

도 3에 나타난 바와 같이, 대조군은 실험 1일째 후에는 매일 폐사가 발생하여 실험 8일째 모두 폐사하였고, 300 ppm 처리군에서는 실험 1일째 3마리, 실험 2 및 3일째 1마리, 실험 4일째 1마리 폐사 후, 살아남은 4마리는 치유되었다. 500 ppm 처리군에서는 실험 1일째 1 마리 폐사 후, 전부 살아남아 치유되었다. 600 ppm 처리군에서는 실험 1일째 2마리, 실험 2일째 1 마리 폐사 후, 6 마리가 살아남아 치유되었다. 도 4는 치료 약제 B용액의 유효성시험에 대한 B용액 처리에 따른 스쿠치카의 형태 관찰한 사진이다. 스쿠치카에 치료 약제 B용액 처리 후 형태를 관찰한 결과, 처리 초기에는 움직임의 둔화를 보이다가(A) 시간이 경과되면 스쿠치카 표면에서 수포(화살표 ①)가 관찰되거나, 모양이 둥글게 변형되면서 수포(화살표②)가 관찰되어진다. 이렇게 형태가 변형된 스쿠치카는 처리 30분이 지나면 막이 완전히 터진 상태(변형되지 않은 상태로 죽음-화살표③, 변형된 상태로 죽음-화살표④)로 죽게 된다. 도 5는 스쿠치카 감염 녀치를 이용한 치료 약제 B용액 처리에 따른 유효성 확인을 나타내는 녀치의 사진이다. 도 5에 나타난 바와 같이, 300 ppm 처리 어체는 중정도 패양을 보였으나 처리 후 26일째 완전 치유가 되었음을 보이고, 500 ppm 처리 어체는 상당히 심한 패양을 보였으나, 처리 후 26일 패양이 사라지고 거의 완전치유가 되고 있음을 보이고, 600 ppm 처리 어체는 300 ppm 어체와 비슷한 정도 패양을 보였으나, 처리후 14일부터 거의 완전 치유가 되었음을 보였다. 스쿠치카 감염 녀치를 이용한 B용액 처리에 따른 유효성 확인을 위하여, 녀치의 폐사 및 폐사 녀치의 스쿠치카 감염을 조사하였다. 본 발명의 일실험예에 따른 스쿠치카 감염 녀치를 이용한 B용액 처리에 따른 유효성 확인 결과는 하기와 같다. 치료 약제 B용액 처리 후, 녀치의 폐사 및 폐사 녀치의 스쿠치카 감염을 조사하였다. 치료 약제 B용액 처리 1일째 폐사한 녀치의 스쿠치카 감염을 확인해본 결과, 대조군을 포함한 모든 실험군에서 아가미, 지느러미 및 피부/근육에서 스쿠치카의 감염을 확인할 수 있었으며, 지느러미 및 근육피사가 심한 일부 녀치에서는 뇌에서도 스쿠치카의 감염을 확인할 수 있었다. 처리 2일째에는 대조군과 300 ppm 처리군에서 스쿠치카 감염을 확인할 수 있었으며, 500 ppm과 600 ppm 처리군에서는 스쿠치카 감염이 확인되지 않았다. 대조군의 경우 처리 8일째 모두 폐사하였으며, 스쿠치카 감염을 확인할 수 있었다. 300 ppm 처리군의 경우 처리 4일째 폐사한 녀치에서 지느러미 및 근육피사는 관찰되었으나, 스쿠치카 감염은 확인되지 않았다. 유효성시험에 대한 평가 방법은 감염부위를 긁어 살아 있거나 죽어있는 스쿠치카 총체 유의성 있는 감소, 체중측정 및 폐사 미수 측정함으로 확인하였다(표3, 도 4, 도 5).

[0063]

2-3: 스쿠치카 감염 녀치를 이용한 B용액 단독 처리에 따른 유효성 확인

[0064]

본 발명의 B 용액을 단독투여한 후 유효성시험을 위하여 10~15 g의 체중, 8~12 cm의 체장의 스쿠치가 감염된 넙치를 사용하였다. 해수 30 L가 포함된 각각의 수조에서 넙치 9 마리를 넣고 6 시간 안정화 후, 치료 약제 B용액을 600 ppm로 처리하고, 처리 1시간 후에 수조의 해수를 교환하였으며, 이후 대조군을 제외한 수조는 해수를 순환처리 하였으며, 8일 동안 매일 약제를 처리하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, 상기와 같이 자연 감염된 넙치에 치료 약제 B용액을 단독으로 투여하여 스쿠치카 감염이 치유됨을 보였다. 그러나 치료 약제 B용액을 단독 처리한 경우 치료 약제 A용액 및 치료 약제 B용액을 순차 처리한 경우에 비해 회복 속도가 더디게 나타났다.

[0065]

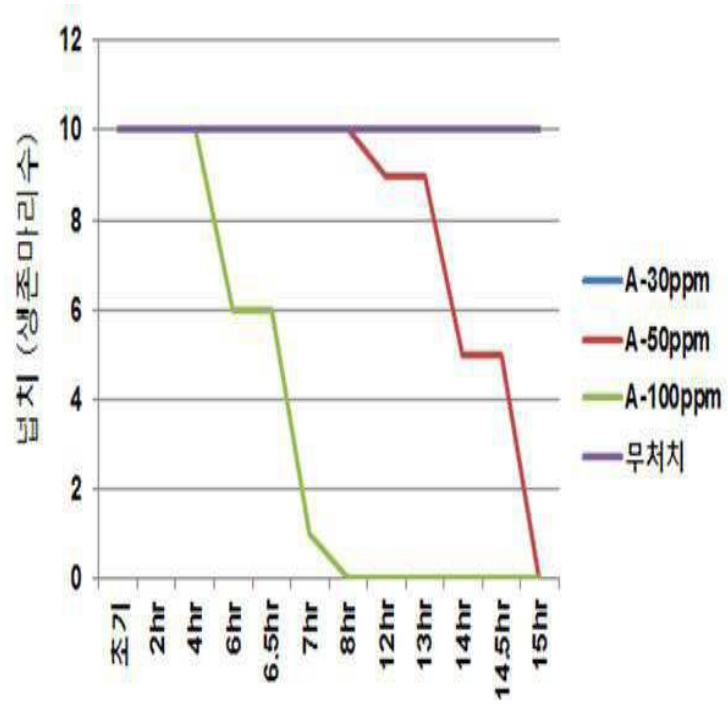
실험예 3: 현장 효능시험

[0066]

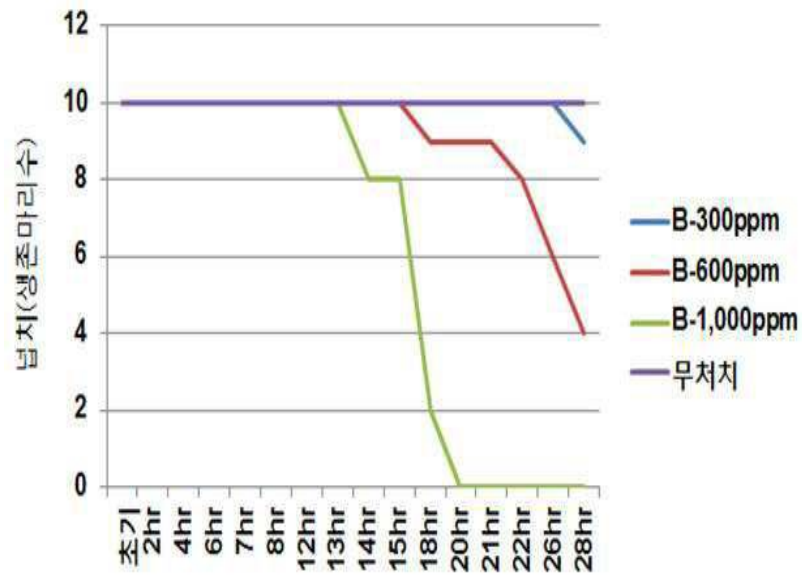
본 발명의 현장 효능시험은 2012년 8월 7일부터 23일까지 울레수산(제주, 한국)에서 이루어졌으며, 100~150 g 크기의 넙치에 치료 약제 A용액은 50 ppm, 30분을 처리하였고, B용액은 500 ppm, 1시간 ~ 1시간 30분을 처리하였다. 넙치사양 현장시험에서는 자연 감염된 평균체중 30~200 g의 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 시험군(임상 투여용량 n=10000마)과 대조군(n=10000마)을 공시동물로 사용하였다. 투여방법은 다음과 같다. 치료 약제 A용액과 B용액을 순서대로 1일 1회, 5일간 처리하였다. 즉, 수조에서 A용액을 최대 50 ppm 이내로 약 30분 이내로 처리 후 물을 교환하였다. 그 후, 연속적으로 동일한 수조에서 B용액을 최대 500~600 ppm 이내로 약 2~3 시간 동안 처리 후 물을 교환한다. 관찰 기간은 2주 동안 하였다. 투여 후 유효성 평가는, 투여당일은 투여 후 1시간에서 6시간까지는 매시간 일반 상태를 관찰한다. 투여 익일부터 14일까지는 매일 1회씩 일반상태의 변화, 중독 증상 및 사망동물 유무를 대조군과 시험군 간에 관찰하였다. 관찰기간 중 치사한 넙치는 미생물학적인 검사와 방혈치사 시켜 내부장기의 육안적 이상 유무를 상세히 관찰하였고, 육안적으로 이상이 있는 장기는 10% 중성 포르말린액에 고정하여 보관하였다. 평가 종료 후에는 모두 살처분한 후 장기무게를 측정하였다. 본 발명의 일실�험예의 결과는, 스쿠치카에 감염된 어류만 모아 놓은 병어수조에서 실험을 실시한 결과 치료 기간에는 치료 약제 A와 B 용액을 모두 처리한 수조에서 초기 일주일 동안에 많은 폐사가 발생하였으나, 약제 처리 이후에는 약제처리 수조가 대조군으로 처리하지 않은 수조에 비교하여 폐사미수가 적음을 알 수 있다. 이는 약욕 기간 동안 약욕 제제가 스트레스를 유발하여 약화된 개체를 초기 폐사시키는 결과를 초래하는 것으로 보인다. 그러나 약욕 제제 후 7일이 지난 시점부터 폐사가 현격하게 감소함을 보이는 것을 확인하였다. 도 7의 경우 치료 약제 A 및 B 용액을 처리한 후 11일 동안 시간 경과에 따른 사망률을 나타낸 그래프이다. 도 7의 그래프에서 빨간색선은 약제를 처리한 군을 나타내며, 파란색선은 약제를 처리하지 않은 군을 나타낸다. 도 7에 나타난 바와 같이, 치료 약제 A와 B 용액을 모두 처리한 경우, 스쿠치카의 감염기간을 줄이는 데 일조할 수 있음을 기대한다.

도면

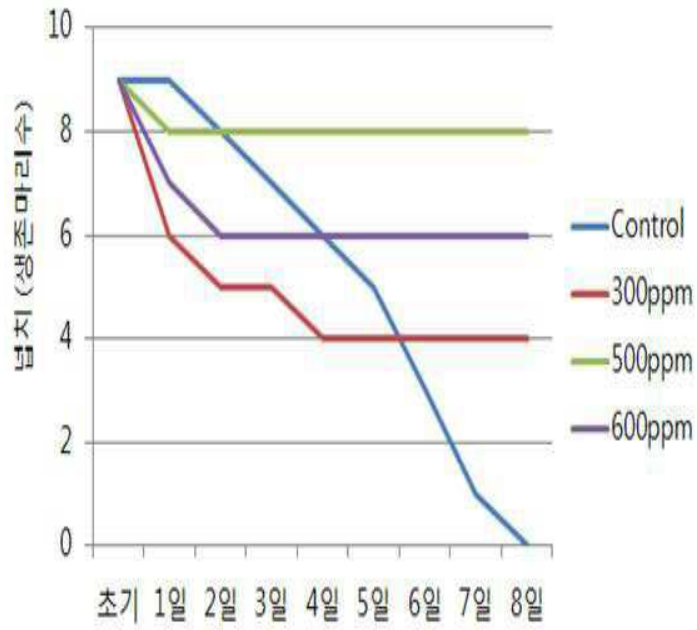
도면1



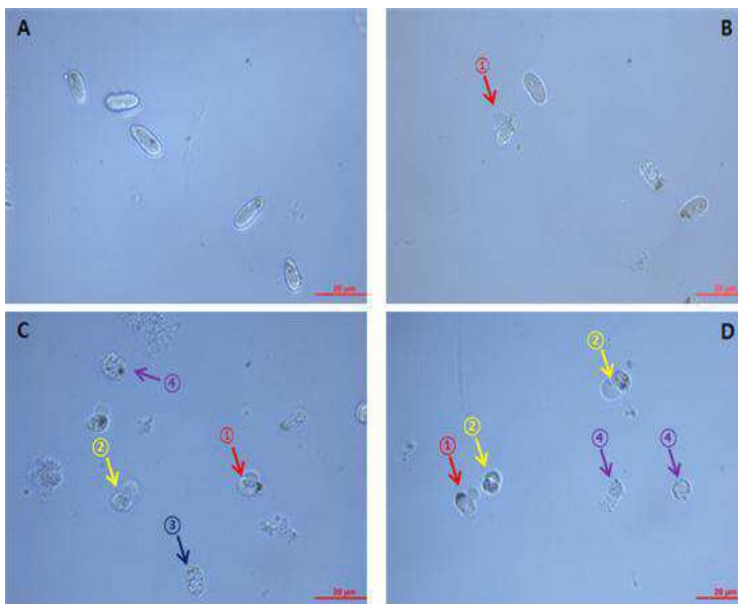
도면2



도면3



도면4



도면5



도면6



도면7

