

이학석사 학위논문

수온의 변화가 넙치, *Paralichthys olivaceus*의
면역 반응과 VHSV 감염에 미치는 영향

2006년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

어 병 학 과

김 은 전

이학석사 학위논문

수온의 변화가 넙치, *Paralichthys olivaceus*의
면역 반응과 VHSV 감염에 미치는 영향

지도교수 박 수 일

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2006년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

어 병 학 과

김 은 전

김은전의 이학석사 학위논문을 인준함

2006년 2월 일

주 심 이 학 박 사 정 현 도 (인)

위 원 농 학 박 사 허 민 도 (인)

위 원 농 학 박 사 박 수 일 (인)

목 차

목 차	i
Abstract	iii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 시험어	4
2. 바이러스와 <i>cell line</i>	4
3. 바이러스 감염가 측정법	4
4. 바이러스 검출용 RT-PCR	5
4.1. Total RNA 분리	5
4.2. RT-PCR	5
5. VHSV의 온도 감수성	6
5.1. <i>Cell line</i> 에서의 적정 증식 온도 시험	6
5.2. 해수 중 바이러스 생존능 시험	6
5.3. 온도별 넙치에 대한 VHSV의 어체내 생존 기간	7
5.4. 온도별 넙치에 대한 VHSV의 공격시험	7
6. 온도별 넙치의 면역인자 발현 조사	7
6.1. 시험어와 온도 조건	7
6.2. 넙치의 항바이러스성 면역 자극	8
6.3. RT-PCR 법을 이용한 면역 인자 발현량 조사	8
7. 넙치의 <i>Nonspecific cytotoxic cells</i> (NCCs) 동정	8
7.1. 넙치 두신 백혈구의 분리	8
7.2. 비부착 세포와 부착세포의 준비	8
7.3. 두신 백혈구의 조성	9
7.4. 비부착 세포와 부착세포의 <i>Nk cell receptor gene</i> 발현량 조사	9
7.5. Trypan blue exclusion 시험	9
7.5.1. Effector cells의 준비	9

7.5.2. <i>Target cells</i> 의 준비	9
7.5.3. <i>Cytotoxic activity</i> 세포 조사	10
8. 온도별 <i>Cytotoxic activity</i> 조사	10
8.1. <i>Effector cells</i> 와 <i>target cells</i> 의 준비	10
8.2. <i>Cytotoxicity</i> 측정법	10
9. 통계 처리	12
III. 결 과	18
1. 넘치 감염성 VHSV의 온도 감수성	18
1.1. <i>Cell line</i> 에서의 적정 증식 온도	19
1.2. 해수 중 바이러스 생존능	19
1.3. 온도별 넘치에 대한 VHSV의 어체내 생존 기간	20
1.4. 온도별 넘치에 대한 VHSV의 병원성	22
2. 온도별 넘치의 면역인자 발현 조사	24
3. 넘치의 <i>Natural cytotoxic cells</i> (NCCs) 동정	27
3.1. 두신의 백혈구 세포 조성	27
3.2. 세포에 따른 <i>Nk cell receptor gene</i> 의 발현	27
3.3. <i>Trypan blue exclusion</i> 시험	27
3.4. <i>Cytotoxic activity</i> 를 보이는 세포	27
4. 온도별 <i>cytotoxic activity</i>	33
4.1. <i>Effector : Target cells ratio</i> 에 따른 <i>cytotoxic activity</i>	33
4.2. 수온에 따른 <i>cytotoxic activity</i>	32
4.3. <i>Poly I:C</i> 농도에 따른 <i>cytotoxic activity</i>	35
4.4. <i>Poly I:C</i> 자극 시 수온에 따른 <i>cytotoxic activity</i>	35
IV. 고 찰	38
V. 요 약	45
VI. 감사의 글	46
VII. 참고 문헌	48

*Effect of water temperature on the immune response and
the VHSV infection in olive flounder, *Paralichthys olivaceus**

Eun Jeon KIM

*Department of fish pathology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

Viral haemorrhagic septicemia (VHS) is a serious viral disease of farmed olive flounder, *Paralichthys olivaceus* when the water temperature is low (10~12°C). Clinical signs of VHSV-diseased fish are darkened body color, extended abdomen with ascites. VHSV isolated from olive flounder, replicated optimally at 10 to 20°C but not 25°C. VHSV showed high pathogenicity (100% mortality) when VHSV were injected 10^5 TCID₅₀/fish to interperineal cavity of olive flounder at below 15°C but not at 18°C. Viability of VHSV maintained in sea water at 4 to 20°C but rapidly decreased at 25°C. When VHSV were injected 10^5 TCID₅₀/fish, viability of VHSV was 10^8 TCID₅₀/fish from olive flounder at 12°C but VHSV wasn't detected at 20°C

Common immune genes such as IL 8, lysozyme C and galectin are expressed in the head kidney of olive flounder at 12 and 20°C. When olive flounder was injected with Poly I:C, antiviral immune genes such as Nk cell receptor, IFN, IRF, IFN α inducible protein and Mx protein are expressed at 20°C but not at 12°C. Lymphocyte-like cells, isolated on Percoll density gradients from head kidney of olive flounder, appeared to be responsible for the *in vitro* cytotoxic activity.

In this study the spontaneous *in vitro* cytotoxic activity to tumour cell lines (L1210) by unstimulated and Poly I:C-stimulated olive flounder leucocytes at 12°C and 20°C were examined by lactate dehydrogenase release assay. When E:T ratio was 100:1, cytotoxic activity of olive flounder was detected higher represented $15.29 \pm 6.12\%$ at 20°C than $1.24 \pm 0.45\%$ at 12°C.

VHSV showed increased pathogenicity to olive flounder below 12°C but the activity of the non-specific immune system of olive flounder was weakened at lower water temperature around 10~12°C.

I. 서 론

우리 나라 양식 넙치에서 겨울철에 복부 팽만, 탈장, 간 출혈 등의 증상을 나타내며 폐사하는 *Viral hemorrhagic septicemia virus* (VHSV) 질병이 발생하고 있다. 저수온기에 넙치의 치어에서 성어까지 크기에 상관없이 발병하며 수온 15℃ 이하의 겨울동안 폐사하여 경제적 손실이 심각하다. Kim (2004)에 의하면 이 질병은 9~13℃에 주로 발병하며 수온 12℃ 전후에서는 폐사율이 높고 질병의 진행 속도도 빠른 반면 수온이 15℃만 되어도 폐사율이 급격히 떨어지고 18℃로 수온이 상승하면 질병의 발생 현상을 관찰할 수 없게 되는 것으로 보고하고 있다.

VHSV는 Family *Rhabdoviridae*, Genus *Novirhabdovirus*에 속하는 바이러스로 *single-stranded RNA*를 갖고 있다. 무지개송어를 비롯한 담수산 연어과 어류에서 가장 심각한 바이러스성 질병을 야기하는 것으로 잘 알려져 왔으나 최근에 와서 담수 및 해수 어류 모두에 질병을 유발하는 병원체라는 것이 밝혀졌다 (Mortensen *et al.*, 1999; Smail, 1999). VHSV에 감염된 넙치는 체색 흑화, 복수, 탈장과 같은 뚜렷한 외부 증상을 나타내며 간출혈, 신장 및 비장 종대 등의 내부 증상을 나타내었다(Kim, 2003).

바이러스에 의한 감염은 양식 넙치에 막대한 피해를 야기시킬 뿐 아니라 환경 중에서 또는 바이러스에 감염된 다른 개체로부터 바이러스에 감염되어 질병으로 전개된다. 어류의 체내에서 감염을 성립시키기 위해 바이러스는 세포 표면에 부착하고 세포막을 통해 세포내로 들어간 다음 복제한다. 바이러스가 침입하면 어류의 체내에서는 자연살해세포 (*nonspecific cytotoxic cells*, NCCs), 보체, 라이신 및 인터페론 등 다양한 선천성 방어 기구 및 면역글로불린 등의 체액성 인자가 바이러스의 제거에 관여하는 것으로 보고되고 있다(Ellis, 2001;

Desvignes et al., 2002). 선천성 면역은 숙주 방어의 첫 단계로서 특정 바이러스만을 인식하지 않고 모든 바이러스에 대해 비특이적인 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.

*Polyinosinic polycytidylic acid (Poly I:C)*는 *synthetic double-stranded RNA polymer*로 항바이러스 활성을 유도할 수 있는 자극 물질로서 바이러스 dsRNA 구조와 유사하여 바이러스에 대한 면역 반응 시험에 널리 이용되고 있다.

Christopher (2005)는 넙치의 주화세포에 인터페론 유도 물질을 넣은 상정액을 통해 type I 인터페론이 존재한다고 보고했다. 그리고 넙치 주화 세포를 Poly I:C로 자극하여 *polyclonal antibody*를 통해 약 71 kDa Mx protein을 확인하였고 최대 Mx mRNA 전사와 단백질 발현은 48시간 후에 나타났으며, Mx mRNA 전사와 단백질이 72시간까지 유지된다고 보고했다(Lin et al., 2005).

경골어류에서 *leucocyte*의 *cytolytic activity*는 NCCs의 다양한 *effector cells*이 관여하는 것으로 보인다(Evans et al., 1998). NCCs의 세포 독성 특성은 포유류의 *natural killer (NK) cells*과 비교할 수 있는데, NCCs는 포유류의 NK cells에 대해 진화학적으로 선구세포이며 하등 척추동물의 것과 같다고 표현할 수 있다(Evans et al., 1984; Jaso-Friedmann et al., 2001). NCCs는 차넬메기(Graves et al., 1985), 자리돔(Mckinney et al., 1994), 무지개송어(Greenlee et al., 1991)와 잉어(Suzumura et al., 1994)를 포함한 여러 어종에서 보고된 바 있다. *Nonspecific cytotoxic activity*는 어류 방어에서 중요한 역할을 한다. 이 활성은 포유류의 NK cells과 유사한 기능을 하는 NCCs에 의한 것이다(Evans et al., 1988).

본 연구의 목적은 겨울철에 발생하는 양식 넙치의 질병 원인체인 VHSV 감염에 의한 질병 발생과 관련하여 수온이 끼치는 영향을 파악하고자 하였다. 그리고 수온이 병원체뿐만 아니라 넙치의 면역 기능에 미치는 영향을 밝혀 이 질병

에 대한 예방 대책을 수립하는데 필요한 기초 자료를 얻고자 하였다.

이를 위하여 본 연구에서는 사육 적정 수온과 저수온 조건에서 순치한 넙치에 대해 *Poly I:C*로 비특이 면역을 유도하여 항바이러스 활성 및 특성을 조사하고자 하였다.

먼저 VHSV의 병원성과 수온의 관계를 조사하였다. 그리고 온도에 따른 넙치의 면역능을 조사하였다. 넙치의 면역기관인 두신에 존재하는 다양한 면역 인자의 발현을 *reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)*을 통해 분석하였다. 항바이러스 인자 중 넙치의 두신으로부터 백혈구를 분리하여 NCCs를 동정한 다음 *in vitro*에서 *cytotoxic activity*를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험어

실험에 사용한 넙치, *Paralichthys olivaceus*는 포항의 육상 수조식 양어장으로부터 분양받았으며 시험의 목적에 따라 크기를 달리하였다. 질병에 감염된 병력이 없는 건강한 넙치를 사용하였다. VHSV의 공격시험에 사용한 넙치는 평균 전장 $13 \pm 1.2\text{cm}$, 평균 체중 $35 \pm 7.5\text{g}$ 이었다. 시험용 넙치는 사육 시험실로 운반 후 1주일간 순치를 하였으며 수온은 $18 \sim 20^\circ\text{C}$ 이었다. 사육 기간 동안 매일 절대량의 상업용 부상사료를 넙치에 공급하였으며 실험 기간 동안 먹이를 공급하지 않았다.

2. 바이러스와 cell line

시험에 사용한 VHSV 주는 2001년 12월부터 2002년 4월까지 경북 동해안 지역의 넙치 양식장에서 VHSV 감염증에 감염된 넙치로부터 분리한 것으로서 시험용 바이러스에 대한 정보는 Table 1에 나타내었다(Kim and Park, 2004).

단층 배양된 EPC에 바이러스 접종액을 $200\mu\text{l}$ 씩 접종하고 실온에서 30분 흡착시킨 후, 5% FBS와 1% *antibiotic- antimycotic* (GibcoBRL)을 첨가한 MEM을 넣고 15°C 에서 7일간 배양하면서 바이러스에 의한 *cytopathic effect* (CPE)를 관찰하였다. EPC cell line에 감염어 유래의 바이러스 접종액을 접종하고 CPE가 확인되면 -80°C 에 동결하여 이를 다시 녹힌 후 $0.45\mu\text{m}$ membrane filter로 여과하여 대량 배양에 사용하였다.

3. 바이러스 감염가 측정법

바이러스 titer는 96 well microplate에 $1 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ 의 단층 배양된 EPC로

50% *tissue culture infectious dose* (TCID₅₀)로 측정하였다. 병원성 시험에는 접종 원액을 FBS가 첨가되지 않은 MEM으로 10fold 단계 희석하여 사용하였다.

바이러스 생존능 시험에서는 End point 방법으로 96 well microplate에 1×10^6 cell/ml의 단층 배양된 EPC로 TCID₅₀을 측정하였다. 각 시험 원액을 MEM으로 10fold 단계 희석하여 사용하였다.

4. RT-PCR을 통한 바이러스 검출

4.1. Total RNA 분리

넙치의 간, 비장, 신장, 심장과 뇌를 무균적으로 적출하여 정량한 다음, 멸균한 유발에 마쇄하였다. Total RNA의 분리는 *acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform* 추출 방법에 기초하여 시판하는 Trizol (GibcoBRL)을 사용하였다. 시험어의 두신을 무균적으로 절취한 다음, 20-30mg 씩 넣은 후, 상법에 따라 RNA를 분리하여 건조시키고 15 μ l의 RNase free water (0.1% DEPC treated H₂O)에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

4.2. RT-PCR

Total RNA를 RNase free water에 100배 희석하여 spectrophotometer로 농도를 구하고 5 μ g과 0.5 μ g Oligo(dT)₁₅ primer, 1 μ l PowerScript™ Reverse Transcriptase (Clontech)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성시 시약 조성은 Table 2와 같다.

바이러스 검출을 위해 Kim (2003)이 제작한 VHSV 검출 primer를 사용하여 Table 4와 같은 조건으로 PCR하였다. Forward primer는 5'-gcactgtccgtacttctct-3'이며 reverse primer는 5'-aagagattccatgcacaga-3'로 Product size는 567bp이다. PCR에는 Accupower PCR primix® (Bioneer)를 사용하였고, 이에 대한 정보는

Table 3에 나타낸 것과 같다. Thermal cycler (Perkin-Elmer 2400)를 사용하여 유전자를 증폭시켰다. PCR 증폭 산물은 1.5% agarose gel (in TBE buffer, 0.045M Tris-borate, 0.001M EDTA)를 사용하여 전기 영동한 후 UV transilluminator 상에서 전기 영동상을 확인하였다.

5. VHSV의 온도 감수성

5.1. Cell line에서의 적정 증식 온도 시험

EPC cell line을 25cm² tissue culture (T/C) flask에 단층 배양한 다음 바이러스를 접종(MOI=0.01)하고 10, 15, 20, 25℃에 배양하면서, 접종 후 7일간 매일 배양 상정액을 무균적으로 덜어내어 바이러스 titer (TCID₅₀)를 측정하였다.

5.2. 해수 중 바이러스 생존능 시험

대량 배양한 KVHS02-1에 0.2μm membrane filter로 여과한 해수를 1:9로 넣어 4, 10, 20, 25℃ incubator에 접종 0, 1, 3, 5, 7일간 배양하면서 바이러스 titer를 TCID endpoint로 측정하였다. 각 시험용 virus액을 96 well microplate에 1×10⁶cell/ml의 단층 배양된 EPC에 10fold 단계 희석하여 20℃에서 7일간 배양했다. 배양액을 제거하고 HBSS로 세척한 후 1% crystal violet (in 50% ethanol)을 각 well 당 100μl씩 분주하여 20분간 방치하였다. 각 well에서 염색액을 제거한 후 수돗물로 3회 세척하여 여분의 염색액을 모두 제거하고 자연 건조하였다. 각 well 당 70% ethanol을 100μl씩 분주하여 세포에 염색되어 있는 crystal violet을 용출시켜 ELISA reader를 이용하여 595nm에서 OD 값을 측정하였다. 대조구와 비교하여 80% 이상 CPE가 나타난 well의 희석단계를 Log TCID로 표시하였다.

5.3. 온도별 넙치에 대한 VHSV의 어체내 생존 기간

대량 배양한 KVHS 02-1을 12℃와 20℃에 각각 순치한 넙치를 대상으로 10^5 TCID₅₀/fish로 복강주사하였다. 주사 전, 주사 직후, 1, 3, 5, 7, 14일 경과 후 즉시 -80℃에 넣어 동결 보관하면서 실험에 사용하였다. 각 샘플의 간, 비장, 신장, 심장과 뇌를 무균적으로 적출하여 정량한 다음 Eagle's minimum essential medium (EMEM, Sigma)을 1:20의 비율로 넣어 마쇄한 후, 4℃에서 1,500×g, 15분 동안 원심 분리하였다. 바이러스 titer는 96 well microplate에 1×10^6 cell/ml의 단층 배양된 EPC로 TCID₅₀을 구하였다.

5.4. 온도별 넙치에 대한 VHSV의 공격시험

사육 수온을 10, 12, 15, 18℃로 조절한 사육 수조에 넙치 (평균 체중 37.5 ± 7.5 g)를 10마리씩 넣고 각각의 수온별 시험어에 10^3 , 10^5 TCID₅₀/fish로 각각 복강 주사하였다. 대조구는 MEM만 복강 주사하였다. 수온에 따른 병원성의 변화를 누적폐사율로 조사하였다.

6. 온도별 넙치의 면역인자 발현 조사

6.1. 시험어와 온도 조건

VHSV의 병원성 시험에는 평균 전장 16.6 ± 1.2 cm, 평균 체중 37.5 ± 7.5 g의 넙치를 사용하였다. 시험용 넙치는 실험 개시 전, 4주간 12℃와 20℃의 실험 수온에 순치하였다.

6.2. 넙치의 항바이러스성 면역 자극

12℃와 20℃에서 각각 4주간 순치시킨 넙치에 2구간의 시험구를 두어 Poly I:C (Sigma) 100ug/fish 복강주사하였다. 대조구에는 MEM을 주사하였다. 주사 3일 후에 모두 채포하여 즉시 -80℃에 넣어 동결 보관하면서 면역인자의 특성 변화

시험에 사용하였다.

6.3. RT-PCR법을 이용한 면역 인자 발현량 조사

시험 넵치의 두신을 이용하여 4.2와 같은 방법 RT-PCR을 실시하였다. Table 5의 비특이 면역 유전자 primer를 가지고 Table 4과 같은 조건으로 PCR하였다.

7. 넵치의 *Nonspecific cytotoxic cells* (NCCs) 동정

7.1. 넵치 두신 백혈구의 분리

넵치의 두신 백혈구는 Kamenade *et al.*(1995)에 따랐다. 즉 두신을 적출한 후 5% FBS, 100 μ g/ml penicillin, 100 μ l/ml streptomycin 및 heparin 10 units/ml 이 첨가된 RPMI-1640 배지에서 teasing한 다음 nylon mesh에 통과시켜 세포 현탁액을 만들었다. 이 세포 현탁액을 34% 및 51% percoll gradient에 중층하여 500 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 30분간 원심 분리로써 백혈구층을 분리하였다.

7.2. 비부착 세포와 부착 세포의 준비

분리된 백혈구는 2% FBS가 첨가된 RPMI-1640 배지로 2회 세척한 다음 0.1% trypan blue로 생존 세포 수를 관찰한 후 95% 이상 세포가 살아 있을 경우 시험을 시행하였다. 2×10^6 cells/ml의 농도로 조정하여 microculture well에 분주한 다음 20 $^{\circ}$ C에서 2시간 부착시켜 준비하였다. 부착 후, 비부착 세포를 수거하여 1000 $\times$ g, 5분간 원심 분리한 후 계수한 후에 사용하였다. 부착 세포는 비부착 세포를 수거한 다음 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640으로 3번 세척한 후에 scrapper로 긁어 부착세포를 수거한 다음 1000 $\times$ g, 5분간 원심 분리하여 사용하였다.

7.3. 두신 백혈구의 조성

각 수온별 넙치의 두신에서 얻은 부착, 비부착 세포를 1×10^6 cells/ml로 조정하여 $150 \mu\text{l}$ 씩 *Cytocentrifuge*로 1000rpm, 10분간 원심 분리하여 *slide glass*에 세포를 부착시켜 *May-Giemsa stain*과 *PAS stain*을 시행하였다.

7.4. 비부착 세포와 부착 세포의 Nk cell receptor gene 발현량 조사

부착세포와 비부착 세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 조정하여 $1000 \times g$, 5분간 원심 분리하여 *pellet*을 만들어 상정액은 버리고 4.2와 같은 방법으로 RT-PCR을 실시하였다. Nk cell receptor primer sets는 GenBank 등재 자료를 기초로 본 연구에서 직접 design한 것이며 그 정보는 Table 6과 같다.

7.5. Trypan blue exclusion 시험

7.5.1. Effector cells의 준비

넙치의 effector cells 분리는 7.1과 7.2와 같고 비부착 세포를 이용했다.

7.5.2. Target cells의 준비

Target cells는 한국 세포주 은행 (KCLB, Korean Cell Line Bank)으로부터 L1210 cell line (mouse leukaemia-derived cell line, lymphoblast)을 분양받아 37°C 에서 5% CO_2 로 계대하면서 유지하였다. 실험 당일, 실험 6시간 전에 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640 배지에 계대한 후 사용하였다.

7.5.3. Cytotoxic activity 세포 조사

Cytotoxic activity 세포 확인을 위해 Effector cell을 1×10^4 cells/ml과 L1210 target cells 1×10^5 cells/ml를 $12 \times 75 \text{mm glass tube}$ 에 분주하여 $200 \times g$, 5분간 원

심 분리하고 4℃에서 1시간 배양하였다. *Pellet*은 재부유시켜 *cytocentrifuge*로 1000rpm에서 10분간 원심 분리하여 *slide glass*에 세포를 부착시켜 *Giemsa* 염색과 *May-Giemsa* 염색을 하였다. *Target cell*의 살해를 확인하기 위해 E:T ratio를 5:1로 두어 면역세포와 *target cell*을 혼합하고 20분 경과 후, *trypan blue*를 배지에 0.01%가 되도록 분주하였다. 반응액의 샘플은 *slide glass*에 도말하여 현미경으로 검경하였다.

8. 온도별 *cytotoxic activity* 조사

8.1. *Effector cells*와 *target cells*의 준비

넙치의 *effector cells* 분리 7.1과 7.2와 같고 비부착 세포를 이용했다. 또한 부착 전에 두신 백혈구 1×10^7 cells/ml에 Poly I:C 50 μ g/ml, 25 μ g/ml, 5 μ g/ml, 2.5 μ g/ml로 농도가 되도록 첨가시켜 2시간동안 자극시켰다. 대조구로는 RPMI-1640 배지를 사용하였다. *Target cell*은 7.5.2와 동일하다.

8.2. *Cytotoxicity* 측정법

*Cytotoxicity assay*는 lysed *target cells*로부터 방출되는 *lactate dehydrogenase* (LDH) activity의 검출에 기초한 *cytotoxic detection Kit* (Promega)를 사용하여 시행했다(Korzeniewski & Callewaert, 1983). *Lactate dehydrogenase* (LDH)는 모든 포유동물 세포내에 존재하는 효소이며 세포막에 damage가 있을 때 방출된다.

Effector:target cell ratio (E:T ratio)는 200:1, 100:1, 50:1 및 25:1로 하였다. 96 wells microplate (U-shaped plate)를 사용하여 *effector cell*을 2×10^7 cells/ml, 1×10^7 cells/ml, 5×10^6 cells/ml로 조정하여 50 μ l/well로 각 6well씩 분주하였다. *target cells*는 5% FBS가 첨가된 RPMI-1640 배지로 1000 $\times$ g, 3분간 원심 분리하

여 2×10^5 cells/ml로 조정하여 각 3well에 $50\mu\text{l}$ 씩 분주하였다. *target cells*이 들어가지 않은 well에는 배지를 $50\mu\text{l}$ 씩 분주하여 *total volume*이 $100\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. plate는 $250 \times g$, 4분간 원심 분리하고 20°C 에서 4시간 배양하였다. 배양을 한 후 *cytotoxicity*를 보이는 well에는 LDH가 방출 되어 젖산이 *pyruvate*로 바뀌고 NADH가 생성된다. 배양 후 조심스럽게 각 well 당 $50\mu\text{l}$ 씩 취해서 96 wells microplate (flat-bottom plate)에 분주하고 Reconstitute Substrate Mix를 각 well당 $50\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 빛을 차단시켜 30분간 실온에 방치하였다. Reconstitute Substrate Mix에는 diaphorase가 함유되어 NADH를 NAD^+ 로 전환시켜 붉은 색의 formazan을 생성한다. 30분 후에 Stop solution을 $50\mu\text{l}$ 씩 well에 첨가하여 반응을 정지시켜 490nm에서 값을 측정하였다.

OD에서 나타난 수치로부터 *cytotoxicity* (%)는 다음과 같은 식으로 산출하였다.

(%) *Cytotoxicity*

$$= \frac{\text{Experimental-Effector Spontaneous-Target Spontaneous}}{\text{Target Maximum} - \text{Target Spontaneous}} \times 100$$

모든 실험구의 면역세포는 검경 시 95% 이상 세포가 살아 있을 때 실험을 실시하였다. Poly I:C 로 자극한 *effector cells*는 E:T ratio를 50:1로 하였으며 나머지는 동일한 방법으로 시행하였다.

9. 통계 처리

유의성 검증은 *Student's t-test*를 이용하였으며, 모든 결과에 대하여 $P < 0.05$ 일 때 유의차가 있는 것으로 판정하였다.

Table 1. Source of the viral isolates from the diseased olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea

<i>Virus isolates</i>	<i>Location</i>	<i>Date</i>	<i>Sample size (g)</i>	<i>Typical signs</i>	<i>Water temp(°C)</i>	<i>CPE</i>
KVHS01-1	<i>Pohang</i>	<i>Dec. 2001</i>	12	<i>D,E,A,R</i>	13	+
KVHS02-1	<i>Pohang</i>	<i>Mar. 2002</i>	28	<i>D,E,A</i>	10	+

Virus isolates were obtained by Kim and Park (2004).

D, darkened body coloration; E, extended abdomen; A, ascites; R, rectal hernia.

Table 2. Reagents for reverse transcription

Reagent	Concentration	Working concentration
<i>Oligo(dT)₁₅ primer</i>	500 ng	1 $\mu\ell$
<i>RNA sample</i>	500 ng/ $\mu\ell$	1 $\mu\ell$
<i>RNase free water</i>	-	
<i>5$\times$ First-Strand Buffer</i>	-	4 $\mu\ell$
<i>dNTP mix</i>	<i>each</i> 10 mM	2 $\mu\ell$
<i>DTT</i>	100 mM	2 $\mu\ell$
<i>PowerScript RTase</i>	-	1 $\mu\ell$

Table 3. Reagents for PCR

Reagent	Concentration	Working concentration
<i>Template DNA</i>	1 $\mu\text{g}/\mu\ell$	1 $\mu\ell$
<i>Primer(forward, reverse)</i>	10 pmol/ $\mu\ell$	<i>each</i> 1 $\mu\ell$
<i>Taq polymerase</i>	1 U	
<i>dNTP mix</i>	<i>each</i> 0.25 mM	
<i>Tris-HCl</i>	10 mM	premix
<i>KCl</i>	40 mM	
<i>MgCl₂</i>	1.5 mM	
<i>stabilized dye</i>	-	
<i>DNA free water</i>		to 20 $\mu\ell$

Table 4. Condition of reaction steps and PCR cycles

PCR step	Temperature(°C)	Reaction Time	Cycle(s)
<i>Pre-denaturation</i>	94	5 min	1
<i>Denaturation</i>	94	30 sec	
<i>Annealing</i>	55	30 sec	30
<i>Extention</i>	72	30 sec	
<i>Post-extension</i>	72	7 min	1

Table 5. Primer sets used for non-specific immune gene of *Paralichthys olivaceus*

Non-specific immune gene	Primer sequence (name)	Products size (bp)
Coagulation factor XIII	5'-ggaactggagcgggtgactac-3'	550
	5'-acgtgagtgcggttcacttt-3'	
Interleukin 1 receptor, type II	5'-gcgcttctgtgtgttttca-3'	553
	5'-gagttgaggctggtgtcgt-3'	
Interleukin 8	5'-atgatgagcagcagatcatcgtt-3' ^b	325
	5'-ttaaacggcttctgacccatctc-3' ^b	
Lysozyme C	5'-ctctgggtggttctgctctc-3'	550
	5'-gcaggaacagggtgaactcag-3'	
Lysozyme G	5'-ctgtaccaaactgccacct-3'	564
	5'-ccactcctcataggaatgc-3'	
Complement 3	5'-tgaaactccagcacaagggtg-3'	550
	5'-gtaggacggagcaggcttg-3'	
Galectin	5'-aaggtcggacagacatgac-3'	551
	5'-aggcaccttcaagggaaca-3'	
Transferrin	5'-gacacacctagggtggaaga-3'	551
	5'-gatgagaccattgggatg-3'	
NK, Kupffer cell receptor	5'-aagaacacggtaactggagaaca-3'	550
	5'-atgacacaatggctgagggtg-3'	
Tumor necrosis factor	5'-tccaccgactggatgtgtaa-3'	558
	5'-cccgggctaacacacttcta-3'	
Interferon	5'-tccatgatcagaagtactaactcca-3'	404
	5'-aaaactaccgaagcaacacca-3'	
Interferon α -inducible protein	5'-ggcagatgagaggagcagac-3'	550
	5'-gagcctcgtcgtatggaaat-3'	
IFN regulatory factor 1	5'-tgtgtccaggatgaggatga-3'	551
	5'-caggggtggaaagtcaaaa-3'	
Mx 1 protein	5'-ctgccaaaggaaaaaggcat-3'	550
	5'-cttcttcagggtggatgacct-3'	
β -actin	5'-actacctatgaagatcctg-3' ^a	510
	5'-ttgctgatcccatctgcctg-3' ^a	

a, According to Katagiri et al. (1997).

b, According to Lee et al. (2001).

Table 6. Non-specific immune gene of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from NCBI

<i>Classification</i>	<i>Gene name</i>	<i>Locus</i>
Non-specific immune gene related genes	<i>Coagulation factor XIII</i>	AU090807
	<i>Interleukin-1 receptor, type II</i>	AU091129
	<i>Interleukin 8</i>	AF216646
	<i>Lysozyme C</i>	AB050469
	<i>Lysozyme G</i>	AB050590
	<i>Complement 3</i>	AB021653
	<i>Galectin</i>	AF220550
	<i>Transferrin</i>	AF219997
	<i>NK, Kupffer cell receptor</i>	AU050783
	<i>Tumor necrosis factor</i>	AU040449
	<i>Interferon</i>	D13040
Antiviral immune gene	<i>Interferon α-inducible protein</i>	AB076708
	<i>IFN regulatory factor 1</i>	AB005883
	<i>Mx 1 protein</i>	AB110446

III. 결 과

1. 넙치 감염성 VHSV의 온도 감수성

1.1 Cell line에서의 적정 증식 온도

넙치에서 분리한 VHSV의 배양 온도에 따른 바이러스 증식 속도를 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. 바이러스를 EPC cell line에 배양하였을 때, 10~20℃ 범위 내에서는 빠르게 증식하지만 25℃에서는 증식 현상을 관찰할 수 없었다. 바이러스 증식 속도는 20℃의 배양 조건에서 가장 빨랐으나 바이러스 역가는 15℃에서 가장 높았다. 10℃의 배양 조건에서는 증식 속도가 다소 느렸지만 최종 7일째 바이러스 역가는 15℃나 20℃와 동일한 수준에 도달하였다.

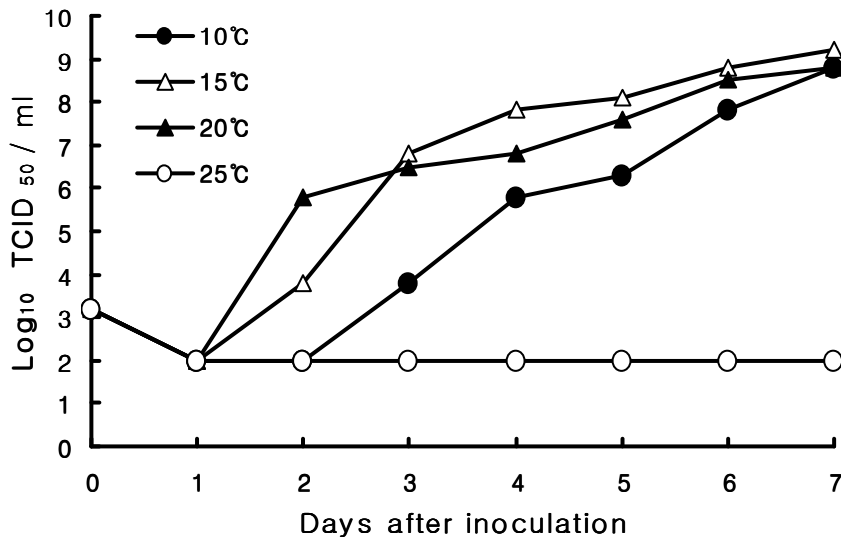


Fig. 1. Replication of VHSV isolate (KVHS01-1) in EPC cell line incubated under the different temperature conditions.

1.2. 해수 중 바이러스 생존능

해수에서 VHSV의 배양 온도에 따른 바이러스 세포 변성 효과 (CPE)를 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. 시험 바이러스를 EPC cell line에 배양한 결과, 4℃ 시험구의 경우 7일이 경과해도 시험 바이러스의 역가가 그대로 유지되었다. 10℃와 20℃ 시험구의 경우 역시 7일 경과 하였을 때, 생존 역가가 동일했다. 이와 달리 25℃ 시험구에서는 0일째 이후로 5일째까지 시험 바이러스의 역가가 점차적으로 감소하여 7일째는 5일째와 동일한 수준을 나타냈다. 30℃ 시험구의 경우는 0일째 이후 1일째까지 급격하게 역가가 감소하여 배양 3일 이후에는 검출 한계 이하로 조사되었다.

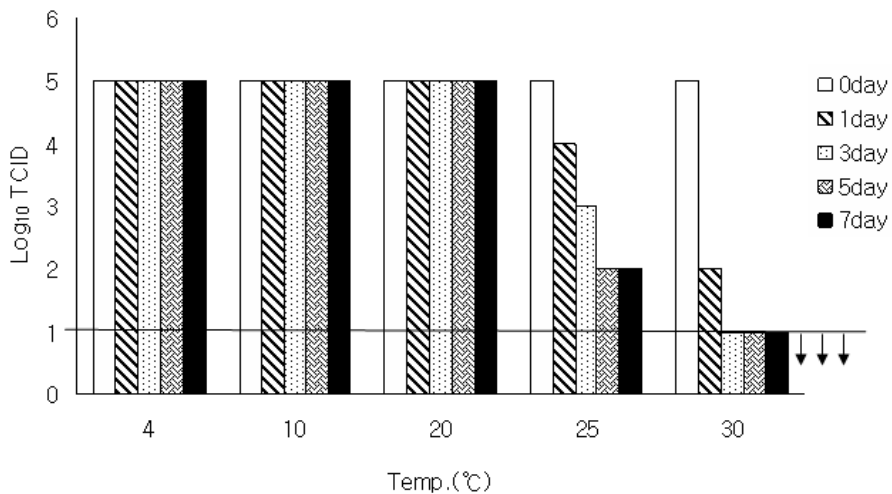


Fig. 3. Effects of different incubation temperature conditions on VHSV (KVHS 01-1) viability in the sterile sea water.

1.3. 온도별 넘치에 대한 VHSV의 어체 내 생존 기간

VHSV의 넘치에 대한 인위 감염 시험으로 사육 수온에 따른 어체 내 VHSV의 생존을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 수온 20℃에서는 어체 당 10^5 TCID₅₀의 농도로 복강 주사한 후, 시간이 지남에 따라 역가가 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 3일째까지는 ECP cell line에 CPE를 관찰 할 수 있었으나 5일째 이후에서는 CPE가 관찰되지 않았다. 12℃에서는 VHSV 접종 후 1일 째에 역가가 감소하였으나, 3일 째 이후 바이러스가 증식하여 접종 역가보다 높은 TCID₅₀을 나타내었다. 모든 구간에 대해 VHSV 검출을 위해 RT-PCR을 실시한 결과 20℃에서는 검출되지 않았으나 12℃ 시험구에서는 주사 직후인 0일째를 제외하고 모든 구간에서 바이러스를 검출했다.

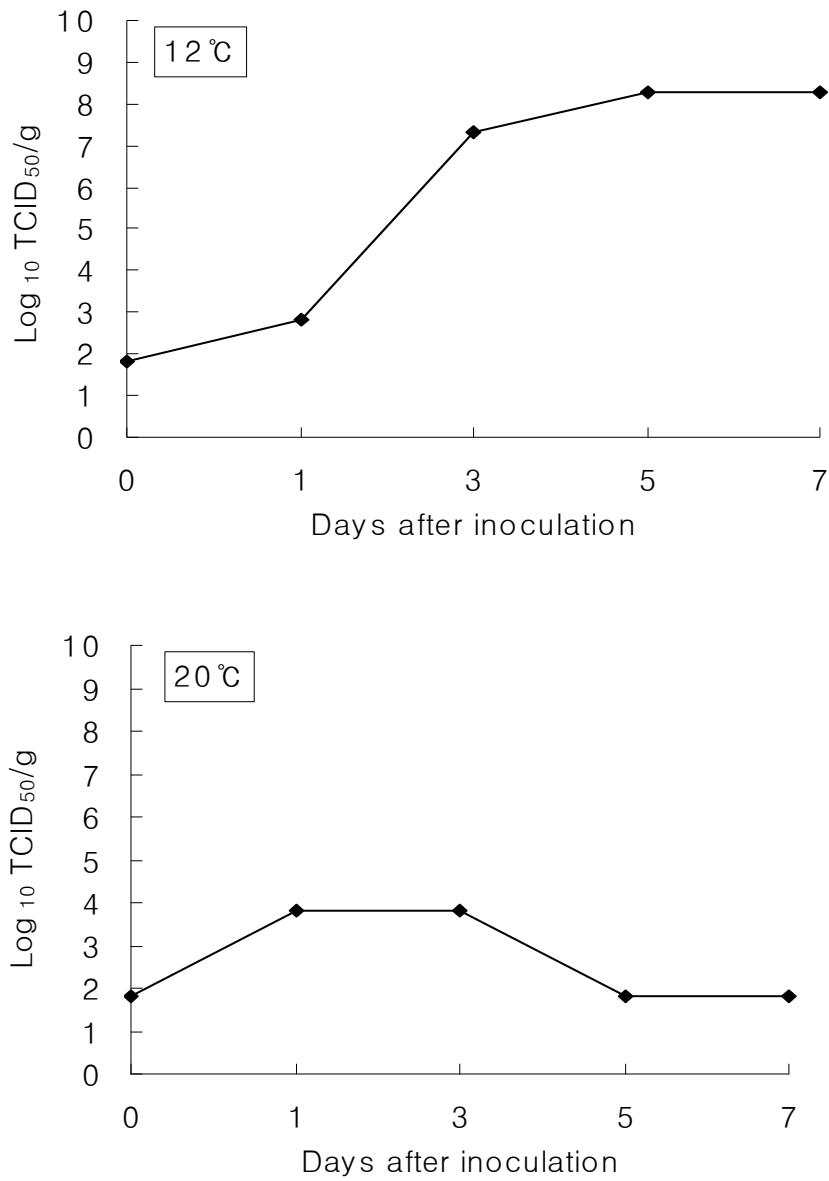
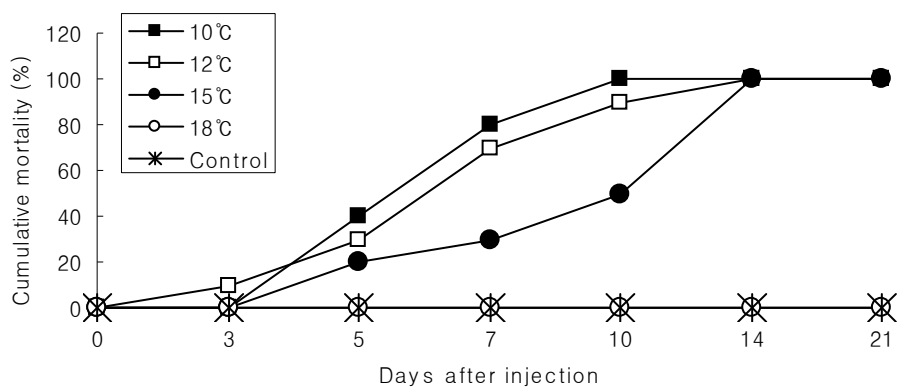


Fig. 5. Replication of VHSV isolate (KVHS01-2) in EPC cell line of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* infected by VHSV 10^5 TCID₅₀/fish intraperitoneally injection under different temperature conditions.

1.4. 온도별 넙치에 대한 VHSV의 공격시험

다양한 수온에 순치한 넙치를 대상으로 인위 감염 시험한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 10^5 TCID₅₀/fish로 주사한 결과 10, 12, 15℃에서 14일 이내에 모두 폐사했다. 15℃보다 낮은 수온인 10, 12℃에서는 증상이 천천히 나타났다. 10^3 TCID₅₀/fish로 복강 주사한 결과, 21일째까지 10℃에서는 90%, 12℃에서는 80% 그리고 15℃에서는 40%의 폐사를 나타냈다. 폐사어에서 내외부 증상은 자연 감염어의 증상과 유사하였다. 반면에 대조구와 18℃의 시험구에서는 실험 기간 동안에 어떤 폐사도 확인되지 않았다.

High dosage (10^5 TCID₅₀ fish⁻¹)



Low dosage (10^3 TCID₅₀ fish⁻¹)

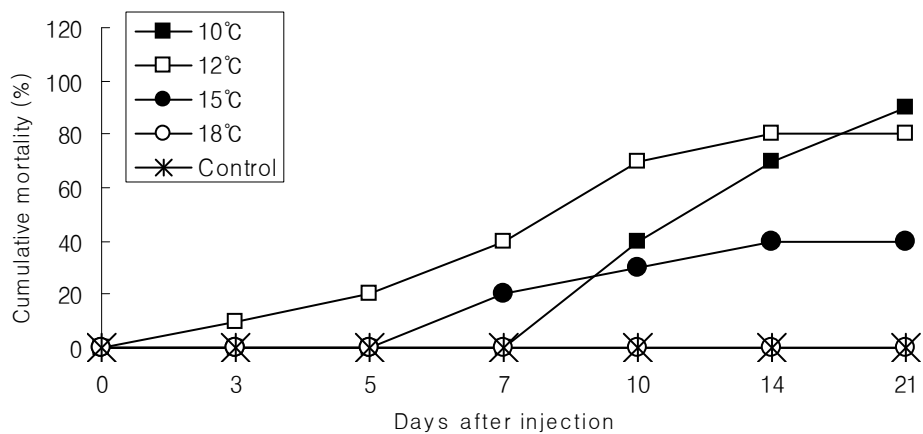


Fig. 4. Pathogenicity of VHSV (KVHS01-1) on the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* under the various temperature conditions by intraperitoneal injection with 10^5 and 10^3 TCID₅₀/fish. No mortality occurred in control groups of each experimented temperature conditions.

2. 온도별 넙치의 면역인자 발현 조사

12℃와 20℃ 시험구의 비특이 면역 유전자 발현을 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. 12℃와 20℃ 시험구에서 본 시험에 사용한 비특이 면역 유전자 *Interferon (IFN) α-inducible protien*, *IFN regulatory factor (IRF) 1*, *IL 8*, *Lysozyme*, *Galectin*, *Transferrin*이 발현하였다. 12℃ 시험구에서는 발현하지 않은 *NK*, *Kupffer cell receptor*가 20℃ 시험구에서는 발현하였다.

항바이러스 면역을 유도하기 위해 *Poly I:C* 100μg/ml로 복강 주사한 넙치에서 20℃ 시험구에서 발현하지 않은 *Coagulation XIII*과 *IL 1 receptor, type 2*와 *Tumor necrosis factor (TNF)*, *IFN*, *C3*, *Mx 1 protein*이 발현하였으며 *Poly I:C* 투여 했을 때 *IL 8*를 제외하고 시험에 사용한 유전자의 발현양이 모두 증가했다. 12℃에서 *Poly I:C* 투여구와 대조구의 발현량은 차이가 없었다.

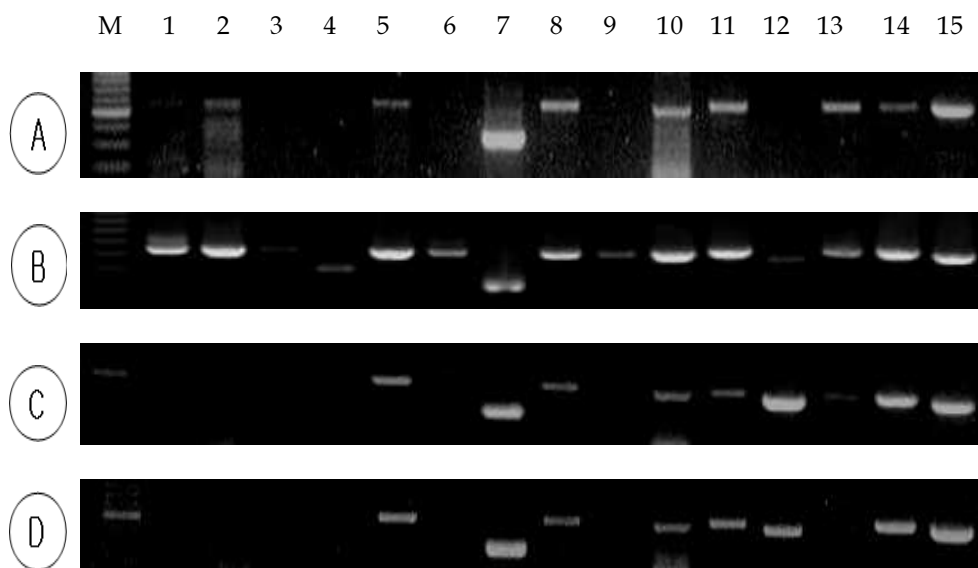


Fig. 6. Detection of non-specific immune gene from head kidney of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* for 3 day after injection by RT-PCR using Table 5 primer.

(A), MEM injection at 20°C; (B), Poly I:C 100µg/ml injection at 20°C; (C), MEM injection at 12°C; (D), Poly I:C 100µg/ml injection at 12°C

M, 100bp ladder; lane 1, Coagulation factor XIII, lane 2, NK, Kupffer cell receptor; Lane 3, TNF; Lane 4, IFN; Lane 5, IFN α -inducible protein; lane 6, IL 1 receptor, type II; Lane 7, IL 8; Lane 8, IRF 1; Lane 9, Mx 1 protein; Lane 10, Complement 3; Lane 11, Lysozyme C; land 12, Lysozyme G; Lane 13, Galectin; Lane 14, Transferrin; Lane 15, β -actin.

Table 7. Detection of non-specific immune gene from head kidney of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Classification	Gene name	Expression			
		20°C		12°C	
		Control ^a	Poly I:C ^b	Control ^a	Poly I:C ^b
Common immune gene	Coagulation factor XIII	-	+	-	-
	Interleukin-1 receptor, type II	-	+	-	-
	Interleukin 8	++	+	+	+
	Lysozyme C	+	++	+	+
	Lysozyme G	+	++	+	+
	Complement 3	-	+ ^w	++	++
	Galectin	+	+	+ ^w	-
Antiviral immune gene	Transferrin	+ ^w	+	+	+
	NK, Kupffer cell receptor	+ ^w	++	-	-
	Tumor necrosis factor	-	+ ^w	-	-
	Interferon	-	+	-	-
	Interferon α-inducible protein	+ ^w	++	+	+
	IFN regulatory factor 1	+	+	+	+
	Mx 1 protein	-	+	-	-

a, MEM 100μℓ I.P. injection

b, Poly I:C 100μg I.P. injection

3. 넙치의 *Nonspecific cytotoxic cells*(NCCs) 동정

3.1. 두신의 백혈구 세포 조성

넙치의 두신 백혈구를 분리하여 2시간 정치 배양하고 부착과 비부착 세포로 나누어 May-Giemsa 및 PAS 염색을 통해서 검정한 결과 대다수가 *monocyte*이며 *lymphocyte*와 *neutrophil*도 소수로 존재하였다(Fig. 7). 온도별 넙치의 부착과 비부착 백혈구의 조성은 Table 8과 같다. 12℃와 20℃의 비부착 백혈구 중 *monocyte-like* 세포가 약 80%를 이루며 *lymphocyte-like* 세포가 20℃ 시험구에서 14.1%이며 12℃ 시험구에서 7.9%를 차지하였다.

3.2. 세포에 따른 *NK cell receptor gene* 발현

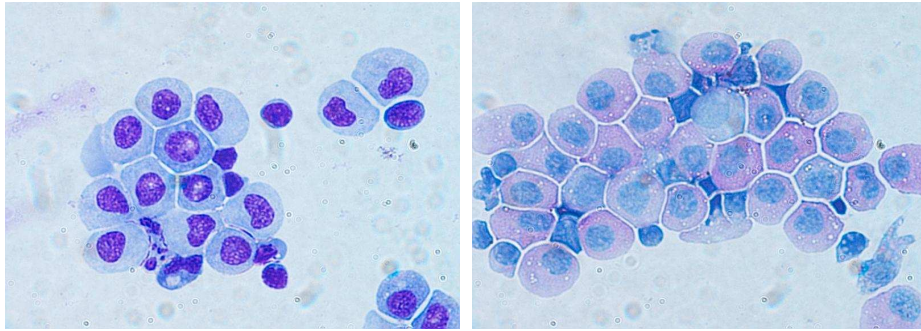
두신 백혈구를 분리하여 2시간 정치 배양 후, 부착과 비부착 백혈구로 나누어 1×10^6 cells/ml의 농도로 조정하여 NCC 유전자를 조사한 결과, Fig. 8과 같이 비부착 세포의 20℃ 시험구에서는 모두 발현하였으나 12℃ 시험구에서는 발현량이 다소 적었다. 부착 세포의 모든 시험 구간에서 *Nk cell receptor* 유전자의 발현은 보이지 않았다.

3.3. Trypan blue exclusion 시험

Cytotoxicity 시험을 통해 *cytotoxic activity*를 보이는 *effector cells*을 확인할 수 있었으며 *target cell* 주위로 *effector cells*이 다수 존재하였다(Fig. 9).

3.4. Cytotoxic 활성을 보이는 세포 확인

Conjugation을 통해 *target cell*에 contact을 하고 있는 세포의 길이를 측정한 결과 평균 길이가 $8.71\mu\text{m}$ 이었다. Cytotoxic activity observation의 세포 길이와 염색 결과를 토대로 *lymphocyte* 계열의 세포임을 확인할 수 있었다(Fig. 9).



(A)

(B)

Fig. 7. Leucocyte population of head kidney from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* used for NCC activity assay. Olive flounders were kept at 20°C for 4 weeks.

(A), Monocyte and lymphocyte from non-adherent leucocyte. May-Giemsa stain, $\times 1000$.

(B), Monocyte and lymphocyte from non-adherent leucocyte. PAS stain, $\times 1000$.

Table. 8. Head kidney leucocyte population of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* at 12°C and 20°C

	20°C		12°C	
	Non-adherent	Adherent	Non-adherent	Adherent
Monocyte-like cells	431 (81.6%)	401 (80.2%)	429 (82.3%)	448 (92.1%)
Lymphocyte-like cells	52 (14.1%)	45 (9%)	41 (7.9%)	22 (4.6%)
Others	30 (4.25%)	54 (10.8%)	51 (9.8%)	16 (3.3%)
Total cells	513	500	521	486

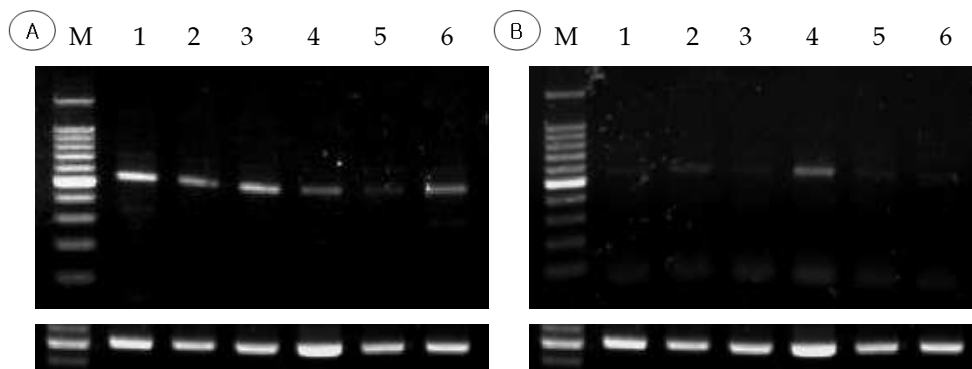


Fig. 8. Detection of NK cell receptor gene from head kidney of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by RT-PCR using NK cell receptor primer (550 bp).

(A), 1×10^6 cells/ml of non-adherent leucocytes; (B), 1×10^6 cells/ml of adherent leucocytes. M, 100bp ladder; lane 1~3, olive flounder was kept 20°C. lane 4~6, olive flounder was kept 12°C. lane 1 and 4, injection MEM medium; lane 2 and 5, Poly I:C 100 μ g/fish; lane 3 and 6, injection VHSV $10^{6.7}$ TCID₅₀/ml; lane 7, positive control using a β -actin primer (510 bp).

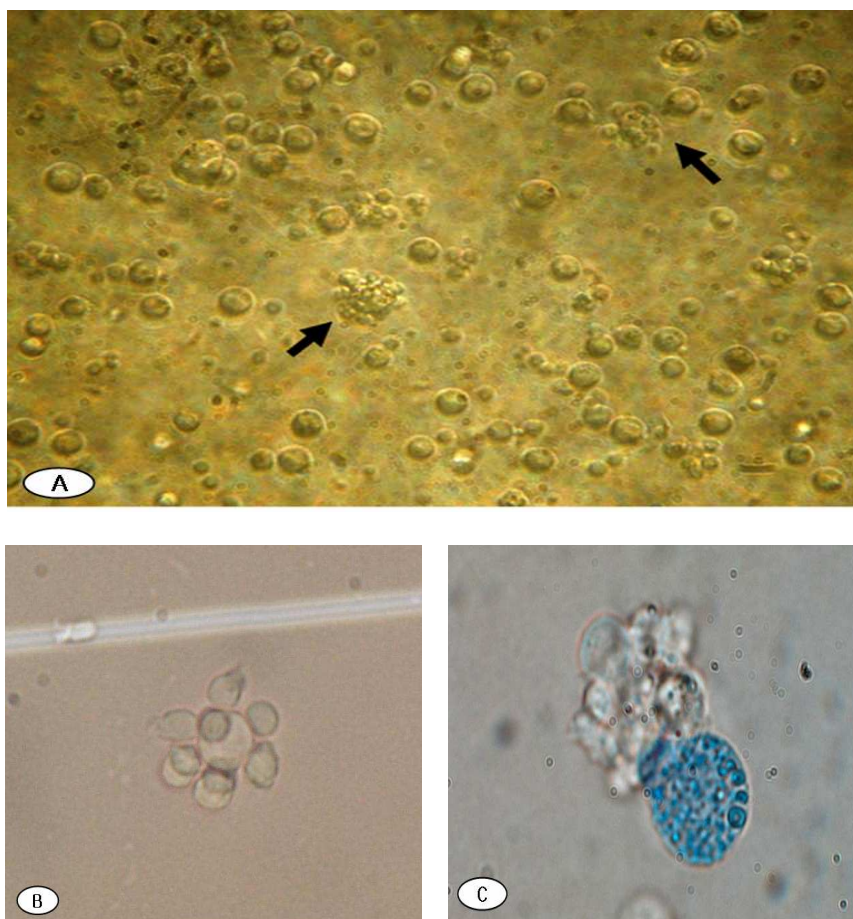


Fig. 9. Microscopic observation of cytotoxic activity of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* effector cells against L1210 tumor cell. E:T ratio=5:1

(A) Living cells observed through Nomarski differential interference contrast optics. Arrow, Effector cells forming conjugate with L1210 cell. $\times 400$

(B)~(C), Cells observed through light microscopy.

(B), Effector/target close contact (30min), $\times 400$.

(C), Effector/target close contact in the presence of trypan blue (2hr). Dead target cell is stained blue, $\times 1000$.

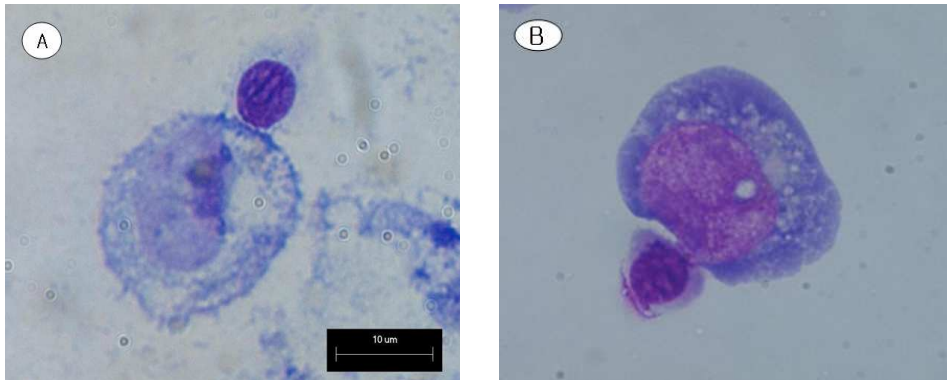


Fig. 10. Microscopic observation of cytotoxic activity of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* effector cells against L1210 tumor cell. E:T ratio=1:10.

(A), Lymphocyte-like cell forming conjugate with L1210 cells; stained with Giemsa, $\times 1000$.

(B), stained with May-Giemsa stain, $\times 1000$.

4. 온도별 *Cytotoxic activity* 조사

4.1. Effector : Target cells ratio에 따른 *cytotoxic activity*

20℃에 순치한 넙치의 두신 백혈구를 2×10^7 cells/well, 1×10^6 cells/well, 5×10^5 cells/well, 2.5×10^5 cells/well의 농도로 조절한 다음 E:T ratio가 200:1, 100:1, 50:1, 25:1로 하여 target cells과 반응시켜 lactate dehydrogenase release 법으로 조사한 결과 Fig. 11에 나타난 바와 같이 각각 6.51 ± 0.55 , 15.29 ± 6.12 , 6.70 ± 2.60 , $2.00 \pm 0.43\%$ 으로 나타나 E:T ratio가 100:1 인 경우 가장 효과적인 것으로 나타났다. 12℃에 순치한 넙치의 경우 E:T ratio가 200:1, 100:1, 50:1, 25:1인 경우 각각 0.20 ± 0.10 , 4.8 ± 2.23 , 1.24 ± 0.45 , $1.4 \pm 1.27\%$ 으로 나타나 12℃ 역시 100:1인 경우 가장 효과적인 것으로 나타났다. Effector cell의 수가 많을수록 *cytotoxic activity*가 높아지지만 200:1에서는 오히려 감소했다.

4.2. 수온에 따른 *cytotoxic activity*

12℃와 20℃에 순치한 넙치 두신의 비부착 백혈구를 분리한 후 E:T ratio별로 *cytotoxic activity*를 조사한 결과는 Fig. 9와 10에 나타내었다. E:T ratio의 모든 시험구간이 12℃보다 20℃에서 유의적 ($P < 0.05$)으로 높게 나타났다.

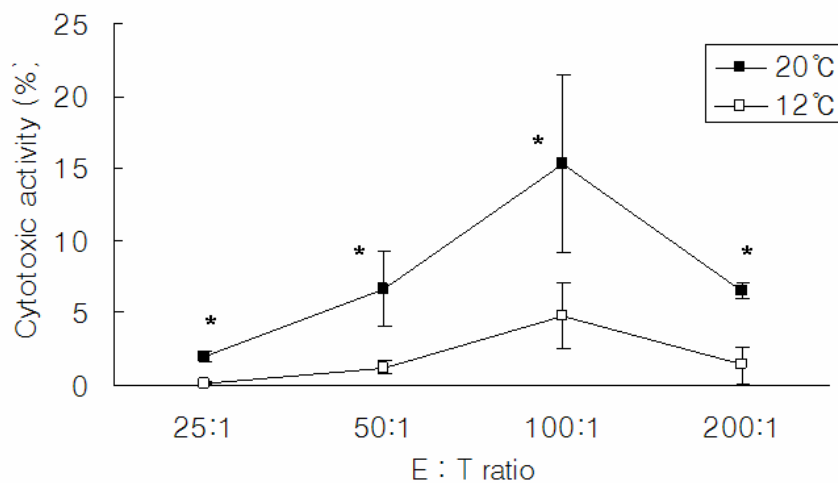


Fig. 11. Effect of water temperatures on the cytotoxic activity by olive flounder, *Paralichthys olivaceus* head-kidney leucocytes against L1210 tumor target cells. Olive flounders were kept at 12°C and 20°C, respectively for 4 weeks. Asterisks showed all tested groups at 20°C were significantly different from all tested groups at 12°C.

4.3. Poly I:C 농도에 따른 *cytotoxic activity*

넙치의 두신 비부착 백혈구를 분리하여 Poly I:C를 0, 2.5, 5, 25 및 50 μ g/ml 농도로 처리하여 *target cells*에 대한 *cytotoxic activity*를 조사한 결과, 20 $^{\circ}$ C 순치 넙치는 Fig. 11와 같이 각각 6.29 $\pm$ 1.29%, 11.44 $\pm$ 0.19, 11.58 $\pm$ 0.25, 17.39 $\pm$ 1.26 및 5.42 $\pm$ 1.67%로 나타나 Poly I:C 25 μ g/ml이 가장 효과적인 것으로 나타났으며, Poly I:C 2.5, 5, 25 μ g/ml 투여구가 대조구보다 유의적 ($P<0.05$)으로 높게 나타났다. 12 $^{\circ}$ C 순치 넙치는 Fig. 12와 같이 Poly I:C 0, 2.5, 5, 25 및 50 μ g/ml 시험 구간에서 *cytotoxic activity*이 각각 1.2, 3.75 $\pm$ 1.06, 7.0 $\pm$ 0.57, 4.24 $\pm$ 0.90, 1.24 $\pm$ 0.37%로 나타나 Poly I:C 5 μ g/ml이 가장 효과적이었다. Poly I:C 5, 25 μ g/ml 투여구가 대조구보다 유의적 ($P<0.05$)으로 높게 나타났다.

4.4. Poly I:C 자극 시 수온에 따른 *cytotoxic activity*

Poly I:C 처리 구간 및 대조구의 모든 시험 구간에서 20 $^{\circ}$ C가 12 $^{\circ}$ C보다 *cytotoxic activity*가 높았다. Poly I:C 50 μ g/ml 처리구를 제외하고 나머지 구간에서 20 $^{\circ}$ C가 12 $^{\circ}$ C보다 유의적 ($P<0.05$)으로 높게 나타났다.

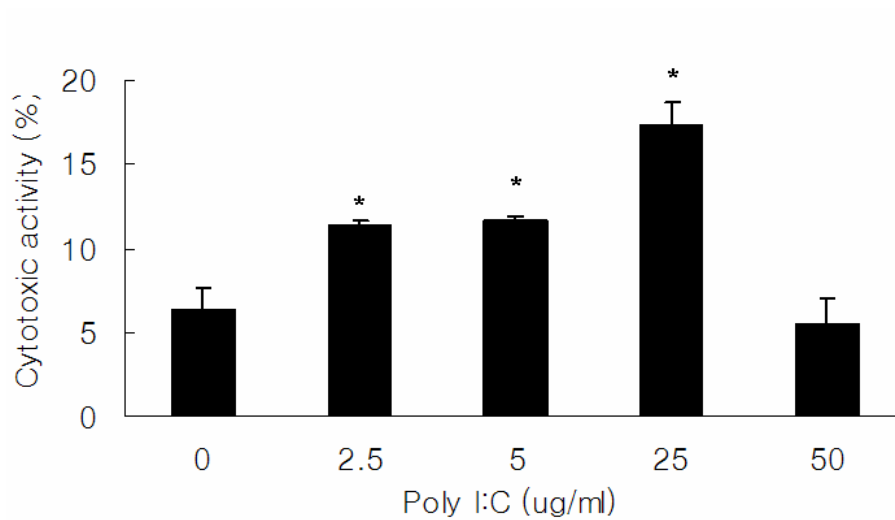


Fig. 12. Cytotoxic activity of leucocytes from head kidney of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* stimulated with different concentrations of Poly I:C by LDH assay

Olive flounders were kept at 20°C for 4 weeks. Results are shown as means of triplicate reading results (E:T=50:1). Asterisks showed significant difference from the untreated control.

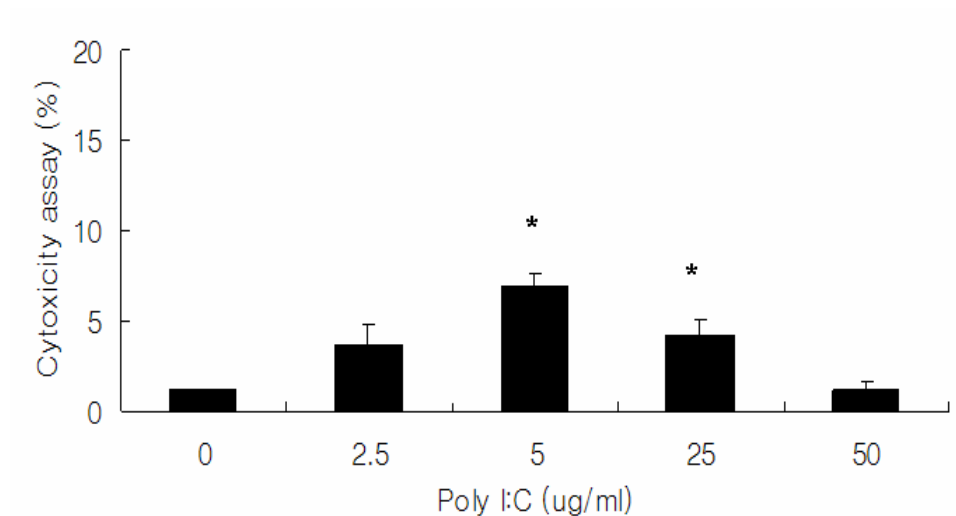


Fig. 13. Cytotoxic activity of leucocytes from head kidney of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* stimulated with different concentrations of Poly I:C by LDH assay.

Olive flounders were kept at 12°C for 4 weeks. Results are shown as means $\pm$ SE of triplicate reading (E:T=50:1). Asterisks showed significant difference from the untreated control.

IV. 고 찰

VHSV는 우리 나라 양식장에서 해마다 겨울철에 나타나는 질병으로 넙치의 크기에 상관없이 발병하여 생산성을 떨어뜨려 막대한 경제적 손실을 가져오고 있다. 특히 겨울부터 초봄까지 계속적인 폐사를 유발한다. 본 연구는 저수온기에 대량 폐사를 일으키는 VHSV를 수온과 관련하여 여러 가지 요소로 조사하였으며 특히 저수온기에 나타나는 원인을 넙치의 비특이 면역능과 관련시켜 그 원인을 찾아보고자 하였다.

수온의 변동에 따라 VHSV의 특성을 조사한 결과 10~20℃ 범위 내에서는 빠르게 증식하지만 25℃에서는 증식하지 않는 것을 알 수 있었다. Ken (1988)은 VHSV의 증식 범위가 4~20℃이며 10~15℃를 적온이라고 보고한 바 있으며 20℃ 이상 되면 감염력을 잃지만 혈청이 포함된 배지에서 4℃ 혹은 더 낮은 온도에서도 수개월 동안 감염력이 유지된다고 보고했다. 담수어종인 *rainbow trout*, *tench*와 *white bream*에서 분리된 VHSV가 수돗물에서는 14℃에서 24시간 이상 10℃에서는 4주 이후에도 감염력을 가지며 세포 배양 배지에서 30℃에서는 24시간 이내에 그리고 4℃에서는 수개월 동안 감염력을 가진다고 보고한 바 있다 (Jorgensen, 1974; Ahne, 1982).

본 연구에서는 해수에서 VHSV의 배양 온도에 따른 바이러스 CPE를 조사한 결과 4℃, 10℃ 및 20℃의 경우 해수에 접종 후 7일째까지 CPE가 나타났다. 하지만 25℃에서는 0일째 이후로 5일째까지 역가가 점차적으로 감소하였으나 7일째에도 약하게 활성을 나타냈다. 30℃의 경우는 0일째 이후 3일째까지 급격하게 역가가 감소하였으며 3일째 이후부터는 검출한계 이하로 나타났다. 결국, 4~20℃까지는 해수에서 바이러스 증식이 가능지만 수온이 상승하여 25℃ 혹은 그

이상의 수온이 유지되면 감염력을 상실할 것으로 여겨진다. MacAllister and Wanger (1977)는 VHSV의 증식에 필요한 RNA-dependent RNA polymerase를 가지며, 이 효소는 *in vitro*에서 바이러스 적정 증식 온도가 15℃이며 이 온도는 또한 바이러스 전사의 적정 온도라고 보고한 바 있다. 이러한 결과는 온도가 바이러스 증식에 밀접한 관련이 있으며 20℃ 이상의 온도에서 바이러스가 존재하지만 활성이 약한 것으로 사료된다.

수온별 감염력 시험에서 각각의 다른 수온으로 순차시킨 넙치에 VHSV를 10^5 TCID₅₀/fish로 주사했을 때 15℃ 이하의 수온에서는 시간이 경과함에 따라 100% 폐사가 나타났으나 18℃에서는 폐사가 없었다. 10^3 TCID₅₀/fish로 주사했을 때는 10~12℃에서 100% 폐사가 나타나지만 15℃ 시험구는 40% 폐사가 발생하며 폐사진행도 늦어졌다. 18℃ 시험어로 바이러스 검출을 시도했으나 바이러스가 검출되지 않았으며 바이러스가 제거된 것으로 추측된다. 15℃ 이상 수온에서는 넙치의 항바이러스성 비특이 면역이 반응하여 바이러스를 제거하는 것으로 여겨진다. VHSV의 어체 내 생존기간에 대한 조사 결과, 10^5 TCID₅₀/fish로 복강주사했을 때 12℃ 시험구의 경우 주사 1일 이후부터 VHSV가 각 장기에서 나타나며 14일 이후까지 증식하였으나 20℃의 시험구에서는 주사 1일과 3일째 EPC에 CPE가 형성되었으나 5일째 이후로는 검출 한계 이하로 CPE가 형성되지 않았으며 RT-PCR 결과 바이러스가 검출되지 않았다. 이는 VHSV 주사 후 20℃ 시험구에서 1일과 3일째 바이러스는 존재하나 감염력이 없는 것으로 사료된다. Ahne (1973) and Bachmann (1974)는 같은 *rhabdovirus*과의 SVC를 20℃의 FHM에 주입했을 때 4~6시간 내에 progeny virus가 합성되어 8~10시간 내에 one growth cycle이 되었으며 10~22시간 사이에 cell과 cell-free virus가 peak titer에 도달하였다고 보고했다. Bjorklund et al. (1997)는 36시간 후에는 SVCV에 감염된 EPC에서 apoptotic bodies를 형성하여 40시간 후에는 SVCV에 감염

된 70% 이상의 세포에서 *apoptosis*가 형성되어 바이러스가 세포 밖으로 나오게 된다고 발견했다고 보고했다. 하지만 본 연구에서 20℃의 시험구의 각 장기에서 3일째 CPE는 형성했으나 5일째에는 CPE가 형성되지 않았으며 RT-PCR 결과에서도 각 장기에서 바이러스가 검출되지 않았다. 그러므로 넙치의 항바이러스 비특이 면역 반응에 의해 *virus* 혹은 *virus* 감염 세포가 제거될 수 있는 가능성을 시사하는 것으로 생각된다.

어류는 변온 동물이므로 수온이 변하면 신진 대사의 활성화도 함께 변하게 되므로 어류가 생존하는 조건에는 수온이 절대적인 요인이 된다. 물론, 어종에 따라 적정 수온 범위가 다르므로 특정 온도역도 다양하다. 예를 들면 대서양 연어와 같이 주로 해수에서 생활하는 어종은 서식 범위가 1~20℃이지만, 담수에서만 생활하는 잉어는 서식 수온 범위가 1~35℃나 되는 것처럼 대체로 해수어가 담수어보다 협온성으로 알려져 있다. 넙치, *Paralichthys olivaceus*는 적정 수온이 15~25℃로 알려져 있다. 그리고 어류에 있어서 두신은 다양한 면역세포의 중요한 근원이며(Bayne, 1986; Kurobe et al., 2005), 2차 림프기관의 역할을 한다(Press et al., 1999).

바이러스 침입 시 면역 조절에 관여하는 유전자와 단백질을 활성화시켜 세포 내 환경을 바이러스의 증식에 적합하지 못한 상태로 전환시킨다. IFN은 바이러스 감염 초기에 생성되어 세포로 하여금 바이러스의 증식을 억제하는 단백질을 합성하게 하는 *cytokine*으로 IFN에 의해 유도된 항바이러스 활성화는 여러 종류의 바이러스에 대해서 방어력을 나타내는 것으로 알려져 있다(Eaton, 1990). IFN은 바이러스, 세균 및 기생충의 대사산물에 의해 생성되며 VHSV, Poly I:C 등이 인터페론 또는 인터페론과 유사한 사이토카인의 생성을 자극하는 것으로 보고되고 있다(Lampson et al., 1981). Poly I:C로 주사해서 24h 이내에 IFN 유도가 가능하며 IFN은 Mx protein 생성을 유도하고(Lin et al., 2005) Mx protein

은 바이러스 감염에 대항한다고 보고되어 있다(Staeheli, 1990). 또한 IRF는 IFN 활성을 조절한다고 알려져 있다(Collet and Secombes., 2002). 본 연구에서 12℃와 20℃에서 IL 8은 강하게 발현하였는데 수온에 영향을 받지 않고 발현되는 것으로 여겨진다. 그 밖에 항바이러스 면역 유전자 외에도 *lysozyme C* 및 *Galectin*이 20℃ 시험구에서 강하게 발현했는데 *Poly I:C*가 영향을 주는 다른 자극으로 보인다. 라이소자임은 선천성 면역의 주요한 인자로서 주로 대식세포, 호중구 및 호염기성 과립구에 분포하며(Fletcher and White, 1976; Sveinbjörnsson et al., 1996), 조직 중에서는 두신 조직이 *plasma lysozyme*의 주요 공급 장소로 알려져 있다(Paulsen et al., 2002). Cho (2005)에 따르면 잉어에 *Poly I:C*를 투여했을 때 혈청 라이소자임 활성이 증가하였다고 보고한 바 있다.

Ainsworth et al. (1991)은 10℃의 *channel catfish*는 두신의 림프구 수가 감소하였으며 식작용도 유의적으로 감소하였다고 보고했으며, Bly and Clem (1991)은 "winter kill" syndrome라 불릴 정도로 저수온기의 어류는 면역능이 낮아져 있는 상태라고 보고한 바 있다. 낮은 수온은 어류에서 체액성 면역(Avtalion et al., 1970)과 세포성면역(Cuchens and Clem, 1977; Verlhac et al., 1990)의 다양한 면역 반응을 억제시키는 것으로 알려져 있다(Bly and Clem, 1992). 수온에 의한 면역 반응의 조절 상태와 바이러스의 증식 조건에 따라 질병의 성립이 좌우될 수 있다(Avtalion et al., 1970; Morvan et al., 1998).

본 연구에서 온도에 따른 비특이 면역 유전자의 발현을 비교했을 때, NK, *kupffer cell receptor*, IRF 1, *lysozyme*, *galectin*의 유전자가 12℃ 시험구보다 20℃ 시험구에서 발현량이 증가했다. *Poly I:C*로 항바이러스 상태로 유도했을 때, 20℃ 시험구에서 항바이러스 유전자의 발현량이 증가했고 20℃에 순치한 넙치에 *Poly I:C*를 투여했을 때 다양한 항바이러스 면역 유전자의 발현량이 증가

하였다. 이것은 항바이러스 상태가 *cytokine*을 통해서 서로에게 영향을 주는 것으로 여겨진다. 하지만 12℃ 시험구는 대조구와 발현량에서 차이가 없었다. 저수온에서는 *Poly I:C*로 항바이러스 비특이 면역이 유도되지 않으므로 바이러스가 침입했을 때에 감염될 수 있을 것으로 여겨진다.

포유류의 NK cells는 *large granular lymphocyte*로 알려져 있으며 사람의 경우 비장 *lymphocyte*의 5%정도가 NK cell로 존재한다고 보고된 바 있다(Koren and Herberman, 1983; Yoder, 2004). 어류의 NCCs는 두신, 비장, 혈액, 복강 내 삼출물에 존재하며 두신에서 *leucocyte*의 15-20%정도 존재한다고 보고된 바 있다(Evans et al., 1984). 어류의 NCCs의 type이 어종마다 다르다. 잉어 두신은 *percoll* 1.09g/ml density에서 90%이상이 *neutrophilic granulocyte*로 이루어져 있으며(Kurata et al., 1995) *channel catfish*는 *small agranular lymphocyte*이고, *sea bass*와 *sea bream*은 *agranular monocyte-like*와 *lymphocyte-like* 형태의 세포가 *cytotoxic activity*를 보인다고 알려져 있다(Shen et al., 2002; Mulero et al., 1994). 본 연구에서 넙치의 두신 백혈구 층에 대다수가 *monocyte*로 구성되어 있었으나 *target cell*과 *conjugation*을 이루며 *cytotoxic activity*을 보이는 세포가 *lymphocyte-like cell*로 관찰되었다.

*Cytotoxic activity*는 어종 뿐 아니라 사료(Kiron et al., 1993), 수온(Lemorvan-Rocher et al., 1995), fish strain (Ristow et al., 1995), 스트레스(Cuesta et al., 2003)에도 영향을 받는다. 특히 수온이 낮거나 미성숙 개체에서 특히 면역능이 상대적으로 약할 때 *Cytotoxic activity*는 특히 중요하다.

*Poly I:C*는 포유류에 있어 *type I interferons*의 생산을 유도하여 먼저 NK cells의 활성을 증가시킨다(Collier & Pruette, 2000; Djeu, 1979). 그러나 *Poly I:C*는 IL-12와 같은 다른 *cytokine*을 유도해서 NK cells의 활성을 증가시키기도 한다(Manetti et al., 1995; Verdijk et al., 1999). 포유류의 *macrophage*는 in

*vitro*에서 Poly I:C로 유도한 NK cells의 활성화에 반드시 필요로 한다(Reynolds *et al.*, 1981). Poly I:C로 유도한 NK cells의 *cytotoxic activity*에서 2가지 주요 *cell type*이 있는데 하나는 NK cells이고 다른 cell은 *macrophage*로 예상되며, *macrophage*는 NK cell을 활성화시키는 *cytokine*을 생성한다고 보고된 바 있다 (Hebert & Pruett, 2002). 어류의 NCCs가 *target cells*을 살해하는 기작은 아직 잘 알려져 있지 않으나 포유류의 NK cells에 따르면, 먼저 *conjugation*을 형성하고 *target cell*과 접한 부위에 Golgi apparatus와 cytoplasm의 granule exocytosis로 인해 *cytolytic activity*가 발생한다고 하였다(Iwana & Nakanishi, 1996). 어류의 NCCs와 포유류의 NK cells와는 형태학적으로 차이가 있으며 어종 간에도 *cytotoxic activity*를 보이는 세포가 차이가 있으므로 *cytotoxic activity*의 기작이 같다고는 볼 수 없으나 유사한 pattern을 가지고 있을 것으로 사료된다.

Morvan-Rocher *et al.* (1995)에 따르면 잉어의 경우 20℃보다 12℃에서 *cytotoxic activity*가 높지만 *peripheral blood leukocytes* 증식 정도는 20℃에서 더 높게 나타났으며 실험 시작보다 28시간째 유의적으로 높게 나타나 낮은 수온에서 비특이 면역능을 강화시킨다고 보고한 바 있다. 그러나 본 연구에서 *cytotoxic activity* 결과, 20℃에서 E:T ratio가 50:1일 때 6.7%의 활성을 나타내며 Poly I:C 25µg/ml로 처리했을 때 약 17%로 유의적으로 높게 나타났으며 12℃에서는 1.2%로 활성이 매우 낮았고 Poly I:C 25µg/ml로 처리했을 때 약 4.2%로 대조구보다 유의적으로 높게 나타나지만 20℃ 대조구보다 낮은 수치를 나타냈다. 넙치의 *cytotoxic activity*가 무지개송어(Ristow *et al.*, 1995), 차넬 메기(Graves *et al.*, 1984), 틸라피아(Jaso-Friedmann & Evans, 1999) 등의 담수 어종에 비해 낮으며, gilthead sea bream (Cuesta *et al.*, 2002), sea bass (Cammarata *et al.*, 2000), sea bream (Cuesta *et al.*, 2002)과는 유사하거나 낮았

다. 저수온기에 바이러스 감염 시 *cytotoxic cells*의 활성이 약한 것으로 여겨지며 바이러스 감염 시, 어류의 비특이 면역의 초기 방어에서 NCCs가 바이러스 증식을 억제시키지 못해 발병의 한 요인이 될 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 보면, VHSV는 *in vitro*에서 4~20℃의 수온일 때 증식이 가능하지만 *in vivo*에서 15℃ 이상의 수온에서는 감염력이 떨어지고 18℃에서는 바이러스의 병원성이 사라졌다. 본 연구에서 사용한 넙치의 비특이 면역능 유전자가 12℃보다 20℃에서 발현량이 증가했으며 20℃와 12℃ 수온의 넙치에 바이러스 감염과 유사한 상태를 위해 Poly I:C 투여했을 때, 항바이러스 면역 유전자가 20℃ 시험구에서만 발현했으며 특히 온도에 다른 Nk cell receptor의 발현이 뚜렷하게 나타났다. 바이러스 초기 면역 반응의 *cytotoxic activity*가 12℃ 시험구에서 나타났으나 20℃ 시험구보다 활성이 유의적으로 낮았다.

저수온기 VHS가 발병하는 것은 VHSV가 다른 수온에 비하여 상대적으로 높은 감염력을 가지고 넙치의 비특이 면역능이 약해져 있기 때문인 것으로 사료되며 VHSV 감염에 대한 예방 대책에 대한 보다 다양하고 깊이 있는 연구가 이루어져야 할 것이다. 또한 본 연구에서 제작하여 사용한 비특이 면역 유전자는 발현과 *in vivo*에서 나타나는 면역능의 정도를 밝혀 비특이 면역 유전자를 통한 넙치의 면역계 *screening*에 사용 가능할 것으로 사료된다.

V. 요약

VHS는 수온이 10~12℃의 저수온기인 겨울과 봄에 걸쳐 나타나는 바이러스성 질병으로 체색 흑화, 복수 저류로 인한 복부 팽만, 탈장과 같은 외부 증상을 나타낸다. VHS가 저수온기에 나타나는 원인을 구명하기 위해 VHSV와 수온과의 관계, 수온과 넙치면역력과의 관계를 밝히고 예방을 위한 기초 자료를 얻고자 하였다.

VHSV는 EPC cell line에서 10~20℃에서 증식한다. VHSV의 수온에 따른 해수 내의 생존 기간을 조사한 결과 4~20℃에서 생존하며 25℃ 이상의 해수에서는 접종 후에 급격하게 비리온이 감소하였으나 약하게 활성을 나타냈다. 넙치에 감염을 일으키는 VHSV가 15℃ 이하의 수온에서는 감염력이 강하지만 18℃에서는 감염력이 나타나지 않았으며 바이러스도 검출되지 않았다. 수온별 어체내 생존 기간 조사 시험 결과, 20℃에서는 3일째 이후로 CPE가 관찰되지 않았으며, 12℃에서는 1일째부터 CPE가 나타나 3일째는 접종 역가보다 높은 TCID₅₀을 나타내며 어체내에서 7일째 이후까지 높은 virus titer를 나타냈다.

수온 변화에 따른 넙치의 비특이 면역력을 조사하기 위해 비특이 면역 유전자를 RT-PCR을 통해 발현량을 비교하였고 Polyinosinic polycytidylic acid (Poly I:C) 투여로 항바이러스 면역을 유도하였다. Poly I:C를 주사했을 때 NK cell receptor, TNF, IFN, IFN α -inducible protein, IRF 1 및 Mx 1 protein과 같은 항바이러스 비특이 면역 유전자의 발현이 증가하였으며, Nk cell receptor 유전자가 온도의 영향을 받아 뚜렷한 차이를 보였다.

넙치 두신 백혈구의 부착과 비부착 세포의 조성은 유사했으나 부착세포에 비해 비부착 세포에 lymphocyte-like 백혈구가 다소 많이 존재했다. 그리고 부착

세포에서 *Nk cell receptor* 발현이 없었으나 비부착세포에서 많았다. *Target cell* 과 *conjugation*을 일으키는 *effector cell*은 *lymphocyte-like cell*로 넙치의 NCCs 가 *lymphocyte-like cell*로 여겨진다.

바이러스 감염 시 넙치의 비특이 면역 중 *cytotoxic activity*가 *effector:target cell ratio*가 100:1일 때 20℃ 시험구에서 15.29±6.12%이며 12℃ 시험구는 4.8±2.23%이며 12℃보다 20℃가 유의적으로 증가하였다.

이상의 결과를 종합해 보면, 우리 나라 VHSV 감염증은 저수온기(10-12℃)에 강한 병원성을 나타내며, 이와는 달리 넙치는 비특이적 면역능이 약해지는 것이 겨울철 넙치의 VHSV 감염증 발생과 관련이 깊을 것으로 생각하였다.

VI. 감사의 글

이 논문이 완성될 수 있도록 많은 가르침과 사랑으로 지도해주신 박수일 교수님께 감사드립니다. 바쁘신 와중에도 논문 심사를 위해 애쓰신 정현도 교수님과 격려말씀을 해주신 허민도 교수님께 감사드립니다. 많은 지식을 주시고 항상 관심을 가져 주신 정준기 교수님, 김기홍 교수님, 강주찬 교수님께 감사드립니다.

동해수산연구소 방종득 소장님, 국립수산물품질관리원 병리연구팀 김진우 팀장님과 어류연구센터 김이청 장장님 바쁜 연구업무에도 불구하고하시고 항상 관심을 가져 주셔서 감사합니다. 함께 일할 수 있는 기회가 주어져 많은 배움을 주신 최혜승, 지보영, 권문경 연구사님과 내수면양식연구소 이주석 연구사님께 감사드립니다. 4학년 졸업 무렵, 진해에서부터 많은 가르침을 주신 조미영 연구사님께 감사드립니다. 어려운 시기에 실험어를 구해주시며 연구에 대한 조언해주신 강명석 선배님과 해양수산사무소의 이재일 선배님 감사드립니다. 항상 안부 물어 주시며 걱정 해주신 박헌식, 황미혜 선배님, 국립수산물품질검사원에서 일하면서도 항상 관심을 가져주신 이상운, 손영찬, 강민진, 성명희 선배님께도 감사드립니다. 여러모로 걱정해주시며 조언 해주신 경상대 해양생명과학과 박찬일 교수님과 활력을 불어 넣어준 엔나 사모님께 감사드립니다.

5년 동안 연구실 생활동안 큰 힘이 되어준 어병예방학연구실 가족들에게 정말 감사드립니다. 논문을 시작할 수 있게 해주고 대학원 생활에서 많은 힘이 되어준 김수미 박사님께 정말 감사드립니다. 학부 때부터 많은 가르침을 주신 이덕찬 선배님, 웃음을 잃지 않게 해 주신 우승호 선배님, 저보다 더 큰 웃음으로 항상 밝은 모습을 보여주신 원경미 선배님, 먼 타지에서 격려해주셨던 김도형 선배님, 항상 이쁘게 봐 주신 한현자 선배님께 감사드립니다. 그리고 힘들 때 많은 조언과 충고를 아끼지 않은 최현숙 선배님께 감사드립니다. 철부지 학부 시절에 많은 도움을 주신 홍미주 선배님, 김진희 선배님, 장연화 선배님께 감사

드리고 외국에서 격려해주셨던 김현정 선배님께 감사드립니다. 그리고 즐겁게 대학원 생활을 할 수 있게 해주고 한편으로 미안한 최광진 선배님과 황성돈 학형님께 감사드립니다. 실험하는 동안 궂은 일을 마다 않고 함께 해준 최정현 후배님께 감사드리며 정영은, 김수현, 문정현, 김승훈, 이준희 후배님께도 감사의 말을 드립니다. 그리고 힘들게 다시 학문의 길로 들어선 손새봄 후배님과 지금은 다른 길을 걷고 있는 김은미 후배님, 김윤희, 김유정 후배님께도 감사드리고 힘을 북돋아 주고 싶습니다.

실험어를 위해 많은 도움을 주신 양식세상의 정경호 소장님께도 감사드립니다. 어려울 때 서슴없이 도움을 주신 어패류 병리학 연구실의 이무근 선배님과 송나영 학형님, 그리고 진단생화학 연구실의 정준범, 전려진 선배님, 수권환경학 연구실의 민은영 선배님과 이 논문의 진행에 도움을 주신 미생물학과의 김영주 선배님께 감사드립니다. 석사과정 2년 동안 함께 수고하며 서로 힘이 되었던 박신후 선배님, 김형준 선배님, 류지효 후배님, 이현정 후배님, 이옥현 후배님, 김나영 후배님께 수고하셨다는 말과 감사의 말을 전합니다.

대학 생활 때 친구로서 나보다 더 나를 걱정해준 김성미, 최원희, 차진희, 정지영, 김영주와 10년지기 문수경, 문언희, 강미옥, 강시영에게도 진심으로 감사드립니다. 그리고 일본 단기 유학생할 때 많은 가르침을 주신 坂田泰造 교수님과 山本 淳 교수님께 감사드립니다. 많은 도움이 된 김윤미, 신윤주, 田岡洋介, 平田 真由美, 小川 智恵子, 築地新에게도 감사드립니다.

마지막으로 항상 걱정만 끼쳐드려 마음 고생 많으신 부모님과 친구와 다름없는 동생 은주와 장난꾸러기 은선이에게 진심으로 감사의 말을 올립니다. 제 인생에 있어 커다란 관문을 통과하는데 수많은 가르침과 관심으로 더 나은 제가 될 수 있게 해주신 모든 분에게 감사드리며, 제가 살아가는 모습으로 보답하고 싶습니다. 감사합니다.

VII. 참고 문헌

- Ahne, W.H. Mahnel and P. Steinhagen (1982). Isolation of pike fry rhabdovirus from tench, *Tinca tinca* L., and white bream, *Blicca bjoerka* (L). J. Fish Dis., 5, 535-537.
- Bayne, C.J. (1986). Pronephric leucocytes of *Cyprinus carpio* : isolation, separation and characterization. Vet Immunol Immunopathol., 12(1-4), 141-151.
- Bly, J.E. and L.W. Clem (1991). Temperature-mediated processes in teleost immunity : in vitro immunosuppression induced by in vivo low temperature in channel catfish. Vet. Immunol. Immunopathol., 28(3-4), 365-377.
- Bly, J.E. and L.W. Clem (1992). Temperature and teleost immune functions. Fish Shellfish Immunol., 2(3), 159-171.
- Caipang, C.M., I. Hirono and T. Aoki. (2005). Induction of antiviral state in fish cells by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, interferon regulatory factor-1. Fish Shellfish Immunol., 19(1), 79-91.
- Cammarata, M., M. Vazzana, M. Cervello, V. Arizza and N. Parrinello (2000).

Spontaneous cytotoxic activity of eosinophilic granule cells separated from the normal peritoneal cavity of *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol.*, 10, 143-154.

Collet, B. and C.J. Secombes (2002). Type I-interferon signalling in fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 12(5), 389-97.

Cuesta, A., M.A. Esteban and J. Meseguer (2002). Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by vitamin C. *Fish Shellfish Immunol.*, 13, 97-109.

Cuesta, A., M.A. Esteban and J. Meseguer (2002). Natural cytotoxic cells of gilthead seabream : maximum percentage of lysis. *Fish Shellfish Immunol.*, 12, 111-118.

Cuesta, A., M.A. Esteban and J. Meseguer (2003). Effects of different stressor agents on gilthead seabream natural cytotoxic activity. *Fish Shellfish Immunol.*, 15(5), 433-41.

Cuchens, M.A. and L.W. Clem (1977). Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. II. Differential effects of temperature on fish T-like and B-like cells. *Cell Immunol.*, 34(2), 219-230.

Desvignes, L., C. Quentel, F. Lamour and A. LeVen (2002). Pathogenesis and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr experimentally

infected with salmon pancreas disease virus (SPDV). Fish Shellfish Immunol., 12, 77-95.

Eaton, W.D. (1990). *Anti-viral activity in four species of salmonids following exposure to poly inosinic : cytidylic acid. Dis. Aquat. Org., 9, 193-198.*

Ellis, A.E. (2001). *Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Dev. Comp. Immunol., 25, 827-839.*

Evans, D.L., R.L. Carlson, S.S. Graves and K.T. Hogan (1984). *Nonspecific cytotoxic cells in fish (Ictalurus punctatus). IV. Target cell binding and recycling capacity. Dev. Comp Immunol., 8, 823-833.*

Evans, D.L., K.T. Hogan, S.S. Graves, J.R. Carlson, R.L. Floyd and E. Dawe (1984). *Nonspecific cytotoxic cells in fish (Ictalurus punctatus): III. Biophysical and biochemical properties affecting cytolysis. Dev. Comp. Immunol., 8, 599-610.*

Evans, D.L., L. Jaso-Friedmann, E.E. Smith, A.S. John, H.S. Koren and D.T. Harris (1988). *Identification of a putative antigen receptor on fish nonspecific cytotoxic cells with monoclonal antibodies. J. Immunol., 141, 324-332.*

Fletcher, T.C. and A. White (1976). *The lysozyme of the plaice Pleuronectes*

platessa L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55, 207-210.

Graves, S.S., D.L. Evans and D.L. Dawe (1984). Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). I. Optimum requirements for target cell lysis. *Dev. Comp. Immunol.*, 8, 293-302.

Graves, S.S., D.L. Evans and D.L. Dawe (1985). Mobilization and activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) infected with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 8(1), 43-51.

Greenlee, A.R., R.A. Brown, and S.S. Ristow (1991). Nonspecific cytotoxic cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kill YAC-1 targets by both necrotic and apoptotic mechanisms. *Dev. Comp. Immunol.*, 15, 153-164.

Iwana, G. and T. Nakanishi (1996). *The Fish Immune System Organism, Pathogen, and Environment*. Academic press., 67-91.

Jaso-Friedmann, L., III. Leary and D.L. Evans (1997). The non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1): molecular organization and signaling properties. *Dev. Comp. Immunol.*, 25, 701-711.

Jorgensen, PEV (1974). *A study of viral diseases in danish rainbow trout, their diagnosis and control*. Carl. Fr. Mortensen, Copenhagen, 101.

- Katagiri, T., I. Hirono and T. Aoki (1997). Identification of cDNA for medaka cytoskeletal β -actin and construction for reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) primers. *Fish. Sci.*, 63, 73-76.
- Kim S.M. (2003). Infection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* PhD thesis, University of Pukyong, Busan, Korea.
- Kim, S.M. and S.I. Park (2004). VHSV (Viral hemorrhagic Septicemia Virus) infection of culturing olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. *J. Ocean Science technol.*, 1(2), 95-100.
- Koren, H.S. and R.B. Herberman (1983). Natural killing present and future. *J. Nat. Cancer Inst.* 62, 1341.
- Kurobe, T., M. Yasuike, T. Kimura, I. Hirono, and T. Aoki (2005). Expression profiling of immune-related genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* kidney cells using cDNA microarrays. *Dev. Comp. Immunol.*, 29(6), 515-523.
- Lampson, G.P., A.K. Field, A.A. Tytell and M.R. Hilleman (1981). Poly I:C/Poly-L-Lysin : potent inducer of interferons in primates. *J. Interferon Res.*, 1(4), 539-549.
- Lee, E.Y., H.H. Park, Y.T. Kim and T.J. Choi (2001). Cloning and sequence

analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceus*).
Gene, 274(1-2), 237-243.

Morvan, L.C., D. Truttaud and P. Deschaux (1998). Differential effects of
temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *J. Exp.*
Biol., 201(2), 165-168.

Morvan-Rocher, L.C., D. Truttaud and P. Deschaux (1995). Effects of
temperature on carp leukocyte mitogen-induced proliferation and
nonspecific cytotoxic activity. *Dev. Comp. Immunol.*, 19(1), 87-95.

Lin, O.E., T. Ohira, I. Hirono, T. Saito-Taki, and T. Aoki (2005).
Immunoanalysis of antiviral Mx protein expression in Japanese flounder
(*Paralichthys olivaceus*) cells. *Dev. Comp. Immunol.*, 29(5), 443-455.

McAllister, P.E., J.L. Fryer and K.S. Pilcher (1974). Virion RNA polymerases
of two salmonid rhabdoviruses. *J. Virol.*, 22, 839-843.

McKinney, E.C. and M.C. Schmale (1994). Damselfish with neurofibromatosis
exhibit cytotoxicity toward tumor targets. *Dev. Comp. Immunol.*, 4,
305-313.

Morvan-Rocher C.L., D. Trout and P. Deschaux (1995). Effects of temperature
on carp leukocyte mitogen-induced proliferation and nonspecific cytotoxic

activity. *Dev. Comp. Immunol.*, 19(1), 87-95.

Mulero, V., M.A. Esteban, J. Munoz and J. Meseguer (1994). Non-specific cytotoxic response against tumor target cells mediated by leucocytes from seawater teleosts, *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* : an ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.*, 57(4), 351-358.

Paulsen, S.M., H. Lunde, R.E. Engstad and B. Robertsen (2002). In vivo effects of β -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish shellfish Immunol.*, 12, 1-16.

Press, C.M. and Φ . Evensen (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol.*, 9, 309-318.

Ristow S.S., D.G. Leslie, A.W. Paul, J.P. David and H.T. Gary (1995). Arlee line of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exhibits a low level of nonspecific cytotoxic cell activity. *Dev. Comp. Immunol.*, 19(6), 497-505.

Shen, L., T.B. Stuge, H. Zhou, M. Khayat, K.S. Barker, M.A. Quiniou, M. Wilson, E. Bengten, V.G. Chinchar, L.W. Clem and W.M. Norman (2002). Channel catfish cytotoxic cells : a mini-review. *Dev. Comp. Immunol.*, 26, 141-149.

- Suzumura, S., O. Kuata, N. Okamoto, Y. Ikeda (1994). Characteristics of natural killer-like cells in carp. *Fish Pathol.*, 29, 199-203.
- Sveinbjørnsson, B., R. Olsen and S. Paulsen (1996). Immunocytochemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granular cells (EGCs) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 19, 349-355.
- Verlhac, V., M. Sage and P. Deschaux (1990). Cytotoxicity of carp (*Cyprinus carpio*) leucocytes induced against TNP-modified autologous spleen cells and influence of acclimatization temperature. *Dev. Comp. Immunol.*, 14(4), 475-480.
- Yoder, J.A. (2004). Investigating the morphology, function and genetics of cytotoxic cells in bony fish. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 138, 271-280.