

잉어류 바이러스성전신괴사증바이러스 (VSNCV) 백신 투여에 대한 잉어의 면역반응

조미영[†] · 손상규^{*} · 김이청^{**} · 김진우^{**} · 오명주^{***} · 정성주^{****} · 박수일^{****}
진해내수면연구소, *국립수산과학원 양식환경연구소,
^{**}국립수산과학원 병리연구과, ^{***}여수대학교, ^{****}부경대학교

Immune responses to the vaccines of viral systemic necrosis of carp virus (VSNCV) of common carp, *Cyprinus carpio* L.

Mi-Young Cho[†], Sang-Kyu Sohn^{*}, Yi-Cheong Kim^{**}, Jin-Woo Kim^{**},
Myung-Joo Oh^{***}, Sung-Ju Jung^{***} and Soo-Il Park^{****}

Jinhae Inland Fisheries Research Institute, National Fisheries R & D Institute
^{*}Aquaculture and Environment Institute, NFRDI
^{**}Pathology Division, National Fisheries R & D Institute
^{***}Department of Fish Pathology, Yosu National University
^{****}Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University

VSNC is a viral disease causing significant economic losses in cultured carp *Cyprinus carpio* L. in Korea. Carps were immunized with prepared vaccines against VSNCV and examined specific and nonspecific immune responses. Carps were injected by 0.2ml of formalin-killed vaccine (FKV), heat-killed vaccine (HKV) or E-MEM, respectively and dealt with boost with same way two weeks later. The lysozyme activity of serum and chemiluminescent responses of head-kidney leucocytes showed increased responses during 2~7 days post-first injection (pfi) and post-boost (pb) in the vaccinated fish, and then decreased to the level of control. As measured by ELISA, vaccinated groups showed a significant increase in VSNCV-specific serum antibodies between 2 weeks pfi and 6weeks pb with a peak at 2 weeks pb. Results of the virus challenge showed that the fish vaccinated with FKV have induced protective immunity, while HKV injection hardly provided protection.

Key word : VSNCV, Serum antibody, Lysozyme, Chemiluminescent reponse

잉어류 양식은 우리 나라의 양식 어종 중에서 가장 오랜 역사를 가지고 있으며 그 기술도 널리 보급되어 내수면 양식 어종 중에서 큰 비중을 차지하고 있다 (노 등, 1997). 그러나, 1998년부터 1999년까지 가두리 양식장을 중심으로 양식 잉어류에서 점액의 과다분비, 아가미부식 및 내부 장기의 광범위한 괴사 등의 증상으로 인해 대량폐사가 발생하였으며, 가두리 양식장뿐만 아니라 지수식 양식장 및 육상 시설 양식장 등

에서 지속적인 피해를 유발하고 있다. 이 질병은 감염어의 신장 및 비장 조직에서 원인 바이러스로 추정되는 직경 70~80nm 크기의 virion이 검출되었으며, 바이러스 배양액을 건강한 잉어에 인위감염 시킨 결과 80% 이상의 높은 폐사율을 나타내어 바이러스에 의한 감염증으로 확인되었다 (Oh et al., 2001). 그러나, 현재까지 원인 바이러스에 대한 정확한 동정 및 방역 대책이 마련되지 못하고 있다. 바이러스가 침입하면

[†]Corresponding author : Mi-Young Cho, Tel : 055-546-3521,
Fax : 055-546-6292, E-mail : mycho@nfrda.re.kr

어류의 체내에서는 NCC (non-specific cytotoxic cells), 보체, 비특이적 라이신 및 인터페론 등 다양한 선천성 방어기구 및 면역글로불린 등의 체액성 인자가 바이러스의 제거에 관여하는 것으로 보고되고 있다 (Ellis, 2001; Desvignes *et al.*, 2002). 그러나, 어류의 항바이러스 기작에 대한 연구는 대부분이 연어과 어류를 대상으로 연구된 결과들로서 바이러스 감염으로 인해 잉어류의 체내에서 일어나는 면역반응에 대한 연구는 부족한 실정이다. 본 연구는 양식 잉어류에서 심각한 피해를 야기하고 있는 잉어류 바이러스 성전신괴사증 (viral systemic necrosis of carp: VSNC)의 예방대책에 대한 기초자료를 얻고자, 원인 바이러스로 백신을 제작하여 잉어에 투여한 후 leucocytes의 phagocytic activity, 혈청내 라이소자임의 활성 및 항체를 조사하고, 이들이 방어력에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

실험어

실험어는 진해내수면연구소에서 종묘생산하여 사육한 건강한 잉어를 사용하였다. 먼저, 미감염 친어를 선별하기 위해 사육중인 친어 (♂ : 5마리, ♀ : 5마리)의 지느러미를 잘라 표지한 후 혈청을 채취하여 ELISA법으로 VSNCV에 대한 항체 존재 유무를 확인하였다. 선별된 미감염 친어는 별도로 수용한 후 지하수를 사용하여 사육하였으며, 수정란은 povidone iodine 100ppm 및 malachite green 1ppm으로 소독한 후 지하수를 이용하여 부화, 사육하였다. 실험 실시 전에 최종적으로 실험어의 VSNCV에 대한 감염 여부를 ELISA법으로 확인한 후 6주 동안 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 실험어는 두 group으로 나누었으며, 먼저 백신의 종류별 효과시험을 위해 각 시험구별로 300 l FRP 수조에 60 마리씩 (평균체장, 10.2±1.0cm) 수용하였다. 또, 비특이적 면역반응을 조사하기 위하여 4 ton 용량의

FRP 수조 안에 1 ton 크기의 가두리를 2개씩 설치하여 각 시험구별로 30 마리씩 (평균체장, 14.5±0.8cm) 수용하였다. 시험기간 동안 사육수온은 22±1°C로 일정하게 유지하였으며, 유수식으로 사육하였다.

바이러스 정제 및 백신제작

바이러스 (VSNCV)는 여수대학교에서 제공받은 CVJ-2001 주 (전북지역 양어장 분리)를 사용하였다. 75F flask에 단층 배양한 FHM (fathead minnow) 세포에 바이러스를 접종하여 20°C에서 15일간 배양하였다. CPE (cytopathic effect)를 확인한 뒤 배양 상층액을 모아 4,000rpm, 4°C, 30분간 2회 원심분리하여 세포잔유물을 제거하고, 상층액을 다시 28,000rpm, 4°C, 2시간 동안 원심분리하여 얻어진 바이러스 pellet을 HBSS (Gibco)에 현탁하여 백신실험에 사용하였다. 포르마린처리백신 (formalin-killed vaccine, FKV)은 10^{5.5}TCID₅₀ 농도의 바이러스액에 0.4% 포르마린 처리하여 4°C에서 하루동안 방치하여 사용하였으며, 가온처리백신 (heat-killed vaccine, HKV)은 동일한 농도의 바이러스액을 60°C에서 1시간동안 가열 처리하여 사용하였다.

백신투여 및 공격실험

백신 종류에 따른 면역효과를 조사하기 위하여 실험어를 아미노산식향산에틸로 마취시킨 후 FKV와 HKV를 각각 0.2 ml씩 복강주사하고 2주 후 동일한 방법으로 boost 처리하였다. 대조구에는 동일한 방법으로 E-MEM (Eagle's minimum essential medium, Gibco)을 주사하였다. Boost 처리 후 2주째 각 시험구에서 20 마리씩 따로 수용하여 10⁴TCID₅₀ 농도의 VSNCV로 인위감염하여 2주 동안 누적폐사율을 조사하였다. 비특이적 면역반응을 조사하기 위해 FKV, HKV 및 E-MEM을 각각 0.2 ml씩 복강주사하고 2주 후 동일한 방법으로 boost 처리하였다. 또한, boost 처리가 비특이적 면역반응에 미치는 영향

을 조사하기 위해 각 백신을 1회 투여한 실험구를 boost 처리한 실험구의 대조구로 두었다.

비특이적 면역능 조사

백신투여 후 2일, 1, 2주 째 및 2차 백신투여 (boost) 후 2일, 1, 2주 째 채혈하여 혈청내 라이소자임의 활성을 조사하고 두신조직에서 대식세포를 분리하여 chemiluminescent (CL) response 를 조사하였다.

Lysozyme activity

혈청 라이소자임 활성은 실험어의 미부정맥으로부터 채혈하여 혈청을 분리한 다음 Ellis (1990)의 방법에 따라 Turbidimetric assay로 조사하였다. 즉, *Micrococcus lysodeikticus* (0.1mg/ml) 현탁액 950 μ l와 혈청 50 μ l를 혼합하여 25°C에서 30초 및 4분 30초 동안 반응시킨 후 530nm에서 흡광도를 측정하였다. 라이소자임 활성은 흡광도 값이 0.001/min 감소한 값을 1 unit로 표시하였다.

Leucocyte phagocytic activity

Leucocytes의 활성산소량 측정을 위해 잉어 두신조직에서 34/51% Percoll density gradient를 사용해 식세포를 분리하였으며, 잉어혈청으로 감작한 zymosan과 luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine-dione, Sigma)을 사용하였다. 분리한 세포는 1×10^6 cells/ml 농도로 조정하여 polypropylene tube에 400 μ l씩 분주하였으며 700 μ l의 luminol solution을 첨가하여 10분간 반응시킨 후 감작 zymosan을 300 μ l씩 첨가하여 automatic photoluminometer (BioOrbit 1251, Finland)로 측정하였다.

항체가 조사

백신 투여 후 1, 2주, boost 처리 후 2, 4, 6주 째 각 시험구별로 10마리씩 채혈하여 항체가를 측정하였다. 항체가는 여수대학교에서 VSNCV

에 대한 잉어 단클론항체를 분양 받아 측정하였으며, ELISA법은 상법에 따라 실시하였다. 먼저 ELISA plate에 coating buffer (pH 9.6)로 10배 희석한 바이러스액 (CVJ-2001) 100 μ l를 처리하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBS-Tween 20 (PBS-T, 0.05%, Bio-Rad)로 5회 세척하였다. 10%(w/v) skimmed milk로 1시간 동안 blocking하고 PBS-T로 5회 세척한 후 PBS로 100배 희석한 잉어혈청 100 μ l로 1시간 반응시켰다. PBS-T로 5회 세척한 후 단클론 잉어 IgM 50 μ l로 1시간 반응시키고 PBS-T로 다시 5회 세척하고 secondary antibody (anti-mouse IgG peroxidase conjugate) 50 μ l로 상온에서 1시간 반응시켰다. PBS-T로 세척한 뒤 발색액 (H₂O₂-ortho-phenylenediamine substrate) 50 μ l로 10분간 발색시키고 stop solution (1M H₂SO₄)을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 microtiter plate reader (Molecular device, U.S.A.)로 492nm에서 측정하였다.

통계처리

대조구와 각 실험구 사이의 유의성은 Student's *T*-test를 실시하였으며, 각 시험구간의 통계적 처리는 ANOVA test를 실시하여 P<0.05의 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

Activities of plasma lysozyme

FKV와 HKV를 투여한 결과 대조구에 비해 혈청 라이소자임 활성이 증가하였다. Fig. 1에서 나타낸 것과 같이 라이소자임의 활성은 대조구의 경우 조사기간 동안 20.25~23.6 U/ml의 범위로 나타난 반면, FKV 및 HKV 투여구에서는 조사 후 2일째부터 1주 째까지 각각 30.0~30.25 U/ml, 27.0~27.6 U/ml로 증가하였다가 2주 째에 대조구 수준으로 감소하였다. Boost 처리구의 경우 2차 투여 후 2일째 다시 대조구 및 1회 투여구에 비해 유의성 있게 증가하였으며, HKV 투

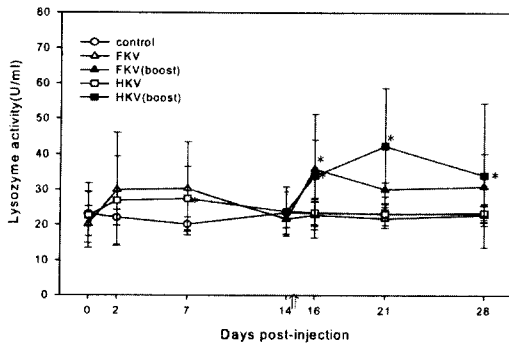


Fig. 1. Lysozyme activity in plasma of carp after intraperitoneal injection of formalin-killed vaccine (FKV), heat-killed vaccine (HKV) or E-MEM. The vaccinated fish were boosted with same vaccines after 2 weeks (↑) of the first injection. The unit of enzyme activity (U) is defined as the amount of sample causing a decrease in absorbance of 0.001min⁻¹. Vertical bars indicate standard deviation. * Significant difference from control (P < 0.05).

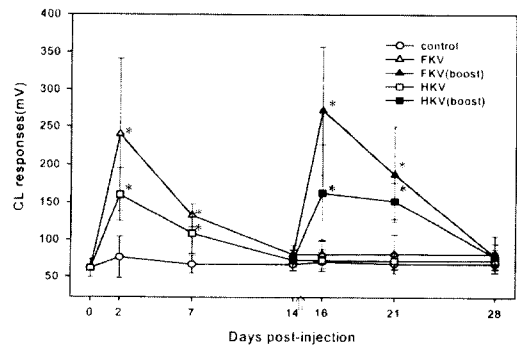


Fig. 2. Chemiluminescent responses (CL) in head-kidney leucocytes of carp after the intraperitoneal injection of two different vaccines or E-MEM against opsonized zymosan. The vaccinated fish were boosted with same vaccines after 2 weeks (↑) of the first injection. Data show mean peak responses of CL. Vertical bars indicate standard deviation. * Significant difference from control (P < 0.05).

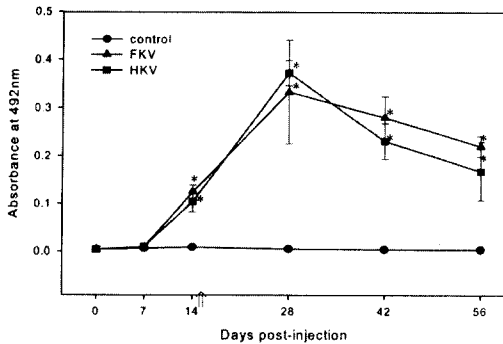


Fig. 3. Mean values of carp immune response to VSNCV measured by ELISA for anti-VSNCV antibodies. Fish were vaccinated with intraperitoneal injection of FKV, HKV or E-MEM and boosted with same vaccines after 2 weeks(↑) of the first vaccination. Response was measured the absorbance at 492nm using the 1:100 diluted carp sera. Vertical bars indicate standard deviation. * Significant difference from control (P < 0.05).

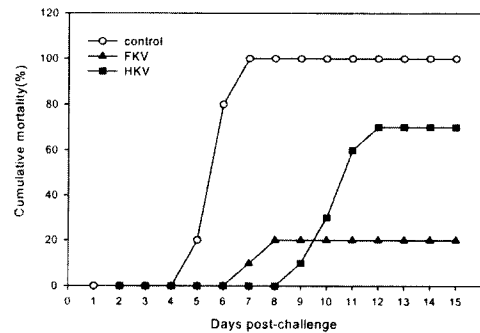


Fig. 4. Changes of cumulative mortality in vaccinated carps followed challenge with VSNCV. Fish were vaccinated by injection(i.p.) of FKV, HKV or E-MEM. All fish were boosted with same vaccine after 2 weeks of the first vaccination. Challenge was performed at 2 weeks post boost vaccination.

여구에서는 boost 처리 후 2주 쯤까지 유의적인 증가가 나타났다. 그러나, 각 백신의 boost 처리에 의한 상승효과에는 유의성이 없는 것으로 나타났다(ANOVA test).

Head-kidney leucocytes (HKLs)의 phagocytic activity

백신 투여 후 HKLs의 CL responses를 조사한

결과 대조구의 경우 조사기간 동안 61.8 ~ 76.55mV의 범위로 나타났으며, FKV와 HKV 투여구에서는 백신 투여 후 2일째 각각 240.0mV, 160.18mV로 대조구에 비해 유의성 있게 증가하였다. 이후 1주 쯤까지 유의적인 차이를 나타내었으나, 2주 쯤 대조구와 유사한 수치로 감소하였다. 각 백신의 boost 처리구에서

boost 처리 후 2일째부터 1주 쯤까지 대조구 및 1회 투여구에 비해 CL response가 유의성 있게 증가하였다. 또한, boost 처리 후 2일째 FKV 투여구는 272mV, HKV 투여구에서는 162.78mV로 HKV 투여구에 비해 FKV 투여구에서 CL response가 높게 나타났다. 그러나, 각 백신의 boost 처리에 의한 상승효과에는 유의성이 없는 것으로 나타났다 (ANOVA test).

항체가

VSNCV 백신을 투여한 후 잉어 혈청내 항체가의 변화를 ELISA법으로 조사하였다. 각 실험구별로 10마리씩 채혈하여 항체가를 조사한 결과, 주사 후 1주 쯤부터 2주 쯤까지 분석한 수치에서는 실험어의 57%에서 양성 수치가 나타났으며, 이후 boost 처리 후 6주 쯤까지 실험어의 71.4% 이상에서 양성 수치가 나타났다. 각 실험구별 항체가는 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 FKV와 HKV 투여구 모두 백신투여 후 2주 쯤부터 boost 처리 후 6주 쯤까지 대조구에 비해 유의성 있게 증가하였으며, 그 중에서도 boost 처리 후 2주 쯤에 최고치를 나타내었다.

방어력

boost 처리 후 2주 쯤 VSNCV로 인위감염 시킨 후 2주 동안 누적폐사율을 관찰하였다. 그 결과 FKV 투여구에서는 20%, HKV 투여구에서는 70%의 누적폐사율이 나타났으며, 따라서 HKV 투여구에 비해 FKV 투여구의 방어효과가 높은 것을 알 수 있었다 (Fig. 4).

고 찰

선천성 면역 (innate immunity)은 수산동물의 생체방어에서 다양한 병원생물의 침입에 대한 숙주의 첫 번째 방어선으로서 매우 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 라이소자임은 선천성 면역의 중요한 인자로서 주로 대식세포, 호중구 및 호염기성 과립구에 분포하며 (Fletcher and White, 1976; Sveinbjörnsson *et al.*, 1996),

조직 중에서는 두신 조직이 plasma lysozyme의 주요 공급 장소이다 (Paulsen *et al.*, 2002). 특히, 라이소자임은 살균 및 항염증성 성질(Alexander and Ingram, 1992), 옹소닌 및 항기생충 작용 뿐만 아니라 항바이러스 작용 등에 관여함으로써 생체의 방어작용에서 다양한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Jolles and Jolles, 1984). Desvignes *et al.* (2002)은 Atlantic salmon에 salmon pancreas disease virus를 인위감염한 결과 대조구에 비해 항체가, 식세포능, 라이소자임과 보체의 활성이 모두 증가하였다고 보고하였다. 본 연구 결과에서도 백신 투여구의 경우 투여 후 초기반응에서 대조구에 비해 혈청 라이소자임의 활성이 빠르게 증가하였으며, HKV 투여구에서는 boost 처리 후 2주 쯤까지 유의성 있게 증가한 것으로 나타났다. 또한, 라이소자임의 주요 공급 조직이며, NK cells 및 NCC의 주요 분포조직으로 알려져 있는 두신에서 leucocytes를 분리하여 백신 투여에 대한 CL responses의 변화를 측정된 결과, 라이소자임과 마찬가지로 백신 투여 후 초기반응에서 대조구에 비해 CL response가 급격히 증가한 것을 알 수 있었다. 따라서, 본 연구의 결과들은 잉어의 plasma lysozyme 및 HKLs가 바이러스에 대한 초기 방어에 관여하고 있음을 시사하는 것으로 사료된다. 본 실험에서 VSNCV에 대한 체액성 면역으로서 FKV 및 HKV를 잉어에 투여하여 항체가의 변화를 조사한 결과 백신 투여 후 VSNCV에 대한 특이항체가 유의성 있게 증가한 것으로 나타났다. 그러나, HKV를 투여한 실험구의 경우 높은 항체가와 방어력이 일치하지 않았다. 바이러스 감염에 대한 어류의 면역반응에서 항체의 역할에 대해서는 아직 많은 의문점이 있다. Agneil (1975)은 송어류의 경우 IPNV에 대한 방어력에서 체액성 면역이 중요한 역할을 담당한다고 보고하였으며, Yamamoto (1975)도 무지개송어의 항체가가 체내 바이러스의 감소와 관련이 있다고 하였으나, 다른 연어과 어류에서는 연관성이

없는 것으로 보고되고 있다 (Reno, 1976; Smail & Munro, 1985). 또한 Bootland *et al.* (1995)은 brook trout를 불활성화 시킨 IPNV로 면역시킬 경우 높은 항체가 검출되었으나 공격실험한 결과 방어력을 나타내지 않았다고 보고하였다.

고등척추동물의 경우 백신의 종류 및 처리방법에 따라 방어력에 차이가 있으며, 이러한 방어력의 차이에는 활성화된 특정한 leucocytes가 중요한 인자로서 관여한다고 알려져 있다 (Khakpour and Murphy, 1987; Buchanan and Murphy, 1993; Yoan *et al.*, 1997; Murphy *et al.*, 1998). 본 연구에서도 혈청 라이소자임의 활성은 FKV 투여구에 비해 HKV 투여구에서 높게 나타났으나 CL responses는 FKV 투여구에서 더 높게 나타났다. 따라서, 두 인자 중 혈청 라이소자임 보다 HKVs가 방어력에 관여하는 것으로 판단된다. 또한, HKV 투여구에서 항체와 방어력이 일치하지 않은 원인으로서는 FKV 및 HKV가 서로 다른 T 세포군을 자극하였을 것으로 추정되며, 이러한 항원성의 차이는 HKV에서 VSNCV에 대한 면역유발인자 중 heat-labile agent의 파괴에 기인한 것으로 추정된다. 결론적으로 본 연구에서 잉어류의 VSNCV 백신 투여로 특이항체의 유도 뿐만 아니라 비특이적 면역 반응 중 HKVs와 라이소자임의 활성이 증가하는 것을 알 수 있었으나, 어류 선천성 면역인자 중 바이러스 감염시 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있는 인터페론의 활성 및 방어력에 관여하는 세포성 면역인자의 특성에 대해서는 추후 계속적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

양식 잉어류에서 심각한 피해를 야기하고 있는 VSNCV에 대한 백신을 제작하여 잉어에 투여한 후 특이적 및 비특이적 면역반응을 조사하였다. 백신은 포르마린처리백신 (FKV)과 가온처리백신 (HKV)를 제작하여 건강한 잉어에 0.2 ml씩 복강주사 하였으며, 2주 후 동일한 방법으

로 boost 처리하였다. 백신 투여 후 비특이적 면역반응 중 혈청 라이소자임 활성과 대식세포의 chemiluminescent (CL) responses은 1차 주사 후 및 boost 처리 후 2일째부터 7일째까지 유의적인 증가를 나타내었으며, 이후 대조구 수준으로 감소하였다. ELISA법으로 항체를 조사한 결과 대조구를 제외한 FKV와 HKV 투여구에서 주사 후 2주 째부터 boost 처리 후 6주 째까지 유의적으로 증가하였으며, 그 중에서도 boost 처리 후 2주 째 최고치를 나타내었다. 각 시험구별로 boost 처리 후 2주 째에 VSNCV로 공격 실험한 결과 FKV 투여구에서는 20%의 누적폐사율을 나타내어 방어력이 인정 되었으나, HKV 투여구에서는 70%의 누적폐사율이 나타나 방어효과가 거의 없는 것으로 나타났다.

사 사

본 연구를 위해 VSNCV 단클론 항체를 제공하여 주신 여수대학교의 오명주 교수님께 감사의 마음을 전합니다.

참 고 문 헌

- 노용길, 이배익, 김광석, 강언중, 김이청, 손재경 : 내수면 양식의 개요, pp. 3-7. 진해내수면 연구소, 1997.
- Agneil, L. D. : An assessment of passive transfer of immunity to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in trout. *M. S. thesis.* American University, Washington, D. C., 1975.
- Alexander, J. B. and Ingram, G. A. : Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 2:249-280, 1992.
- Bootland, L. M., Dobos, P. and Stevenson, R. M. W. : Immunization of adult brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchell), fail to prevent the infectious pancreatic necrosis virus

- (IPNV) carrier state. *J. Fish Dis.* 18:449-458, 1995.
- Buchanan, K. L. and Murphy, J. W. : Characterization of cellular infiltrates and cytokine production during the expression phase of the anticryptococcal delayed-type hypersensitivity response. *Infect. Immun.* 61:2854-2865, 1993.
- Desvignes, L., Quentel, C., Lamour, F. and LE Ven. A. : 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, 2002.
- Ellis, A. E. : Lysozyme assays. In *Techniques in fish immunology*. Stolen, J. S. Flecher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and van Muiswinkel, W.B., eds., pp. 101-103, Fair Haven, NJ:SOS Publication, 1990.
- Ellis, A. E. : Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.*, 25:827-839, 2001.
- Fletcher, T. C. and White, A. : The lysozyme of the plaice *Pleuronectes platessa* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55:207-210, 1976.
- Jolles, P. and Jolles, J. : What's new in lysozyme research? Always model system, today as yesterday. *Mol. Biochem.*, 63:165-189, 1984.
- Khakpour, F. R. and Murphy, J. W. : Characterization of a third-order suppressor T cell(Ts3) induced by cryptococcal antigen(s). *Infect. Immun.*, 55:1657-1662, 1987.
- Murphy, J. W., Schafer, F., Casadevall, A. and Adesina, A. : Antigen-induced protective nonprotective cell-mediated immune components against *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.*, 66(6):2632-2639, 1998.
- Oh, M.J., Jung, S. J., Choi, T. J., Kim, H. R., Rajendran, K. V., Kim, Y. J., Park, M. A. and Chun., S. K. : A viral disease occurring in cultured carp in Korea. *Fish Pathol.*, 36:147-151, 2001.
- Paulsen, S. M., Lunde, H., Engstad, R. E. and Robertsen, B. : *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, 2002.
- Reno, P. W. : Qualitative and quantitative aspects of the infectious pancreatic necrosis virus (IPN) carrier state in trout. *Ph. D. thesis*. University of Guelph, Ontario, Canada, 1976.
- Smail, D. A. and Munro, A. L. S. : Infectious pancreatic necrosis virus persistence in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). In *Fish and Shellfish Pathology*. A. E. Ellis, ed., pp.277-288. London : Academic Press, 1985.
- Sveinbjørnsson, B., Olsen, R. and Paulsen, S. : Immunocytochemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granular cells (EGCs) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 19:349-355, 1996.
- Yamamoto, T. : Infectious pancreatic necrosis (IPN) virus carriers and antibody production in a population of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Microbiol.* 21:1343-1347, 1975.
- Yoan, R., Casadevall, A., Oh, J. and Scharff, M. D. : T cells cooperate with passive antibody to modify *Cryptococcus neoformans* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:2483-2488, 1997.

Manuscript Received : August 17, 2003

Revision Accepted : November 16, 2003

Responsible Editorial Member : Sang-Hun Choi
(Kunsan Univ.)