

갑성돔 (*Acanthopagrus schlegeli*) 유래의 주화세포의 확립과 확립된 세포의 특성

임은영 · 강민수 · 오명주 · 정태성* · 정성주†
여수대학교 수산생명의학과, *경상대학교 수의학과

Establishment and characterization of new cell line derived from black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*)

Eun-Young Im, Min-Sue Kang, Myung-Joo Oh, Tae-Sung Jung* and Sung-Ju Jung†

Department of Aqualife Medicine, Yosu National University, Yeosu 550-749, Korea

*College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

A stable cell line, BSBS (black seabream spleen), was established from the cells in spleen of black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*, and characterized. Subculture maintained more than 60 passages and morphologically, BSBS cell was epithelioid cell. The cells grew optimally at 20°C in Leibovitz's L-15 medium supplemented with 10% fetal bovine serum with incubation temperature of 20°C. BSBS cells supported the growth of marine birnavirus (MABV Y-6), chum salmon reovirus (CSV), spring viremia of carp virus (SVCV) and hiram rhabdovirus (HIRRV). Thus, the new cell line may be useful for studying wide range of fish viruses.

Key words : New cell line, Black seabream, BSBS, Virus susceptibility

우리나라 해산양식의 대상이 되는 어종은 다양하며 질병의 발생 양상도 다양하다. 이전에는 세균이나 기생충에 의한 질병이 주였으나 1990년대 이후로는 바이러스성 질병에 의하여 대량 폐사 하는 경우가 증가하고 있다(Jung and Oh, 1999; Oh *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2002). 또한, 새로운 바이러스성 질병들이 계속 보고되고 있으며 그 중에는 기존의 확립된 주화세포로는 배양이 불가능한 상피증생증바이러스 (flounder herpesvirus, FHV) (Iida *et al.*, 1989; Iida *et al.*, 1991), 적혈구괴사바이러스 (erythrocytic necrosis virus) (Reno *et al.*, 1978; Smail and Egglestone, 1980)와 적혈구봉입체증후군바이러스 (erythrocytic inclusion body syndrome) (Holt and Rohovec., 1984) 등이 있으며 그 중에서 FHV는 우리나라에서도 발생되고 있다.

바이러스는 살아있는 세포에서만 살 수 있으며 숙주특이성이 강한 특성상 바이러스성 질병의 연구에 있어서 주화세포는 질병의 원인 바이러스의 연구에 필수적인 요소이다. 어류 바이러스 연구의 역사가 오래된 구미에서는 대부분 연어과 어류에 대한 주화세포가 확립되어왔다 (Lannan *et al.*, 1984). 우리나라는 다양한 해산어류가 양식되므로 이들 어종에 발생하는 바이러스성 질병에 대처하기 위해서는 우리의 양식대상이 되는 어종에서 유래한 주화세포의 확립이 필요하다. 해산어류에서 유래한 주화세포는 34종 이상이며 (Chi *et al.*, 1999) 바이러스성신경괴사증 (viral nervous necrosis, VNN), 해산어의 이리도바이러스병 (red sea bream iridoviral disease, RSIVD)등 어류에 피해가 큰 바이러스성 질병이 발생하면서 이들 바이러스의 배양을 목적으로

†Corresponding author : Sung-Ju Jung, Tel : 061-659-3175,
Fax : 061-659-3175, E-mail : sungju@yosu.ac.kr

하는 해산어유래의 주화세포가 계속 개발되고 있다 (Chi *et al.*, 1999; Iwamoto *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2003).

본 연구실에서는 우리나라의 주요 양식대상어 종에 대한 주화세포의 개발을 계속해 오고 있으며, 본 연구에서는 그 중 감성돔의 비장에서 BSBS 세포주를 확립하고 확립된 세포의 특성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

초대배양

2001년 10월 남해 종묘 배양장에서 사육중인 감성돔 치어들을 샘플링 하였고 모든 실험은 무균실 내에서 이루어졌다. 어류의 피부를 70% 알코올로 소독한 후 멸균된 해부용 가위와 핀셋을 사용하여 피부, 지느러미, 신장, 비장의 각 조직을 분리하고 고농도의 항생제 (500 IU/ml의 페니실린과 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 스트렙토마이신, GIBCO, USA) 가 든 Leibovitz's L-15 배지 (L-15, GIBCO, USA)에서 3분간 2회 세척하였다. 그 후 각 조직을 스틸 메시에 넣고 마쇄한 후 25cm² 초대배양용 플라스크 (NUNC, Denmark)에 옮겨 20°C 배양기에 배양하였다. 초대배양 후 10일 간 매일 배지를 1/3씩 교환해 주었고 그 이후는 플라스크바닥에서 박리되어 죽은 세포의 양이 많아졌을 때 배지를 교환해 주었다. 세포가 monolayer를 형성하였을 때 계대배양을 해 주었으며, 초대배양에서 10대 계대배양까지는 L-15 배지에 200 IU/ml의 페니실린, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 스트렙토마이신과 20%의 fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 것을 사용하였고, 그 이후의 계대배양에는 L-15 배지에 100 IU/ml의 페니실린, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 스트렙토마이신과 10%의 FBS를 첨가한 것을 사용하였다.

계대 배양 및 유지

플라스크에 세포의 monolayer가 형성되면

0.02% EDTA-PBS(-)에 세척 하고 0.25% trypsin 용액으로 박리시킨 후 L-15배지에 재부유를 시켜 20°C 배양기에 배양하였다. 처음에는 10일 간격으로 계대 배양하였고, 계대 배양 10회 이후에는 일주일에 한번 계대 배양하였다.

염색체 수 분석

염색체 수는 계대 배양 47회 때 Freshney의 방법(1994)에 의해 실시하였다. 75cm² 세포배양용 플라스크에 배양한 세포의 상층액을 제거한 후, 세포분열을 유사분열 중기로 정지시키기 위해서 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 demecolcin (Sigma, solution in HBSS, USA)을 첨가하여 20°C에서 24시간 유지하였다. 그 후 0.25% 트립신용액으로 세포를 플라스크바닥에서 떨어뜨리고 800 g에서 10분 원심 분리하여 세포를 얻었다. 상층액을 제거하고 0.075M KCl 저장액에 부유시킨 후 20분 실온에 두었다. 저장된 세포는 메탄올과 acetic acid를 3:1로 섞은 카노이 고정액을 첨가하여 흔든 다음 800 g에서 10분 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 교반하면서 카노이 고정액 넣어 얼음에 10분 동안 방치한 후 800 g에서 10분 원심 분리하였다. 상층액은 버리고 카노이 고정액 200 μl 를 넣어 세포를 부유시켰다. 그 후 알코올에 넣어 냉동실에서 차게 한 슬라이드글라스에 떨어뜨려 5% Giemsa 염색액 (Sigma, MO, USA)에 30분 염색하였다. 현미경으로 염색체를 관찰하였고 사진을 찍은 다음 인화한 사진을 이용하여 염색체의 수를 세었다.

성장에 대한 연구

세포의 온도에 대한 영향을 알아보기 위해서 계대 배양 47회 때 25cm² 세포배양용 플라스크에 계대하여 5, 10, 15, 20과 25°C에서 배양하였다. 3일, 7일, 10일 후에 각각의 배양온도에서 2개씩의 플라스크를 트립신 용액으로 처리하여 혈구 계산판으로 세포의 수를 세어 평균수를 계산하였다. 위와 동일한 방법으로 세포의 FBS 농도에

따른 증식을 2, 5, 10, 15와 20%의 FBS 농도에서 검사하였고, 이때 세포는 20°C에서 배양하여 분석하였다.

바이러스 감수성

확립된 세포의 어류 바이러스에 대한 감수성은 3종의 DNA바이러스와 8종의 RNA바이러스에 대해 실시하였다 (Table 1). FHV는 조직학적 검사와 전자현미경 검사로 감염이 확인된 넙치를 -80°C에 저장한 것을 지느러미만 잘라 사용하였다. Red seabream iridovirus (RSIV)와 nervous necrosis virus (NNV)는 조직학적검사와 PCR로 양성임을 확인한 후 -80°C에 저장해 두었던 감염어의 비장조직과 뇌조직을, 림포시스 티스병바이러스(lymphocystis disease virus, LCDV)는 감염 넙치의 종양부위를 떼어 -80°C에서 저장하던 것을 사용하였다. 그 이외의 바이러스는 배양세포에서 배양한 후 -80°C에서 저

장하던 바이러스 배양액을 사용하였다. 샘플을 한계희석하여 96 well microtiter plate에 접종한 후 NNV과 RSIV는 25°C 배양기에서 배양하였고 그 외의 다른 바이러스는 20°C 배양기에서 배양하였다. 적어도 10일 이상 세포변성효과 (cytopathic effect, CPE)를 관찰하였고, tissue culture infective dose (TCID₅₀) 방법으로 바이러스 감염가를 측정하였다.

결 과

초대배양 및 계대배양

감성돔 자어의 비장 조직에서 monolayer가 형성되었고 세포를 얻을 수 있었다. 다른 조직의 경우 플라스크 바닥에 부착한 세포는 다수 관찰되었으나 시간이 경과함에 따라 세포가 죽어 플라스크바닥에서 박리되거나 형태가 변형되었고 계대하는 동안 세포는 전부 소실되었다. 비장에서

Table 1. Sources of fish viruses used to test the virus susceptibility of BSBS cells

virus	Abbreviation (and virus type)	Source (or original reference) ¹⁾
Flound herpesvirus	FHV	Fin tissues of flounder
Red sea bream iridovirus	RSIV	Spleen and kidney pool of red sea bream
Lymphocystis disease virus	LCDV	Isolated from flounder in our laboratory
Viral nervous necrosis virus	NNV	Brain tissue of flounder
Marine birnavirus	MABV Y-6	Kusuda <i>et al.</i> (1993)
Infectious pancreatic necrosis virus	IPNV Sp	M. Yoshimizu
Chum salmon virus	CSV	Winton <i>et al.</i> (1981)
Spring viremia of carp	SVCV	B.J. Hill
Hirame rabdovirus	HIRRV CA-9703	Oh & Choi (1998)
Eel virus of Europe X	EVEX	T. Sano
Infectious hematopoietic necrosis virus	IHNV ChAb	Yoshimizu <i>et al.</i> (1989)

¹⁾ If the author of the original reference was also the source, the reference is noted. IPNV Sp, SVCV and EVEX were kindly provided from M. Yoshimizu, B.J. Hill and T. Sano respectively.

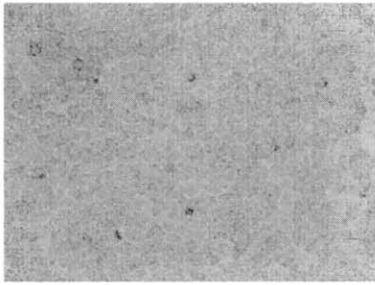


Fig. 1. Monolayer of cell line derived from black seabream spleen (BSBS) at passage 50.

유래한 세포는 2001년 10월에 처음 계대배양하여 60회 이상 계대배양을 유지하고 있으며, 세포는 7일에서 10일 간격으로 1:4 비율로 계대배양하였다. 이 세포는 BSBS로 명명하였으며 형태학적으로 상피성 세포로 관찰되었다 (Fig. 1).

염색체 수 분석

BSBS세포의 염색체 수는 30개에서 96개 사

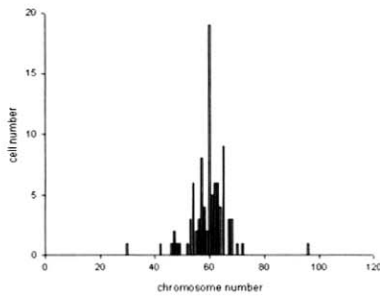


Fig. 2. Chromosome number distribution of the BSBS cells at passage 47 (n=93 cell).



Fig. 3. Gimsa-stained metaphase chromosomes of BSBS cells.

이에서 곡선의 분포를 보였으며 modal chromosome 수는 60개였다 (Fig 2, Fig 3).

증식에 대한 연구

BSBS 세포의 온도에 따른 증식은 Fig. 4에 나타내었으며 15°C 및 20°C에서 잘 증식했지만 10°C 및 25°C에서는 잘 증식하지 않았다. 최적 증식 온도는 20°C이었다.

FBS 농도에 따른 증식실험 결과 2% 및 5%의 농도에서는 낮은 증식을 보였고 10% 이상의 농도에서는 고농도로 갈수록 빠른 증식을 보였다 (Fig. 5).

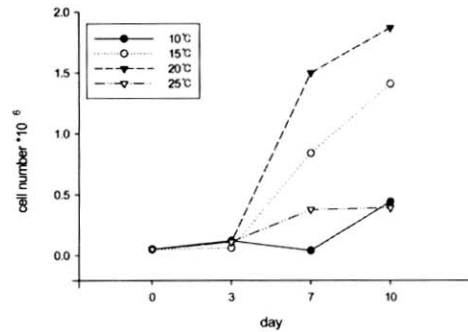


Fig. 4. Influence of incubation temperatures on growth of BSBS cells.

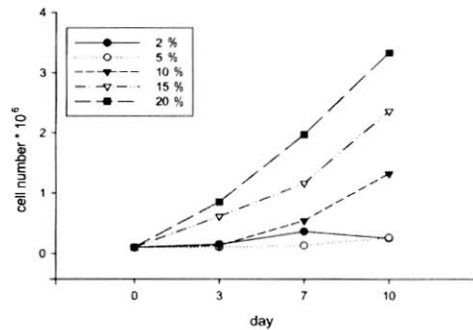


Fig. 5. Effect of different concentration of FBS on growth of BSBS cells.

바이러스 감수성

BSBS 세포의 바이러스에 대한 감수성과 바이러스 감염가 조사 결과를 Table 2에 요약했다.

Table 2. Comparison of virus susceptibility and virus titers (\log_{10} TCID₅₀ mL⁻¹) in BSBS cells

Virus	Titer(\log TCID ₅₀ /ml)	Incubation temperature
FHV	-	20°C
RSIV	-	25°C
LCDV	-	20°C
NNV	-	25°C
MABV Y-6	3.75	20°C
IPNV Sp	-	20°C
CSV	3.5	20°C
SVCV	5.5	20°C
HIRRV	5.5	20°C
EVEX	-	20°C
IHNV	-	20°C

* - ; No CPE was found.

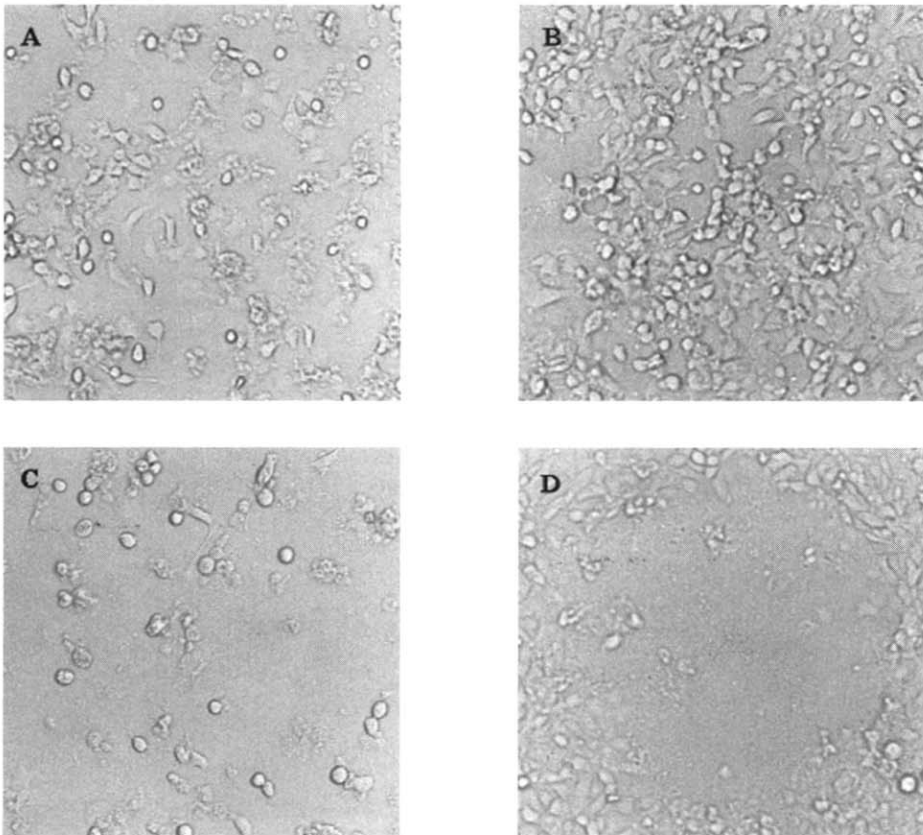


Fig. 6. The CPE of BSBS cell at subculture 50 to the different fish viruses. BSBS cells were infected with MABV (A), SVCV (B), HIRRV (C) and CSV (D).

해양버나바이러스 (marine birnavirus, MABV Y-6)를 접종한 세포에서는 접종 초기에 세포의 구형화가 관찰되었고, 접종 5일 후에는 세포의 용해가 관찰되었다 (Fig. 6A). 잉어의 봄바이러스병 바이러스 (spring viremia of carp virus, SVCV)를 접종한 세포는 구형화되어 포도송이 형태로 관찰되었다 (Fig. 6B). 넙치의 랍도바이러스 (hirame rhabdovirus, HIRRV)는 접종 초기에 세포가 구형화 형태를 띠다가 접종 후반부에는 세포의 용해가 관찰되었다 (Fig. 6C). 연어바이러스 (chum salmon reovirus, CSV)는 세포질이 서로 융합되어 다핵거대세포를 형성하였다 (Fig. 6D). 그 외 다른 바이러스들에 대해서는 감수성을 나타내지 않았다.

고 찰

1962년 처음으로 어류 주화세포가 문헌으로 보고되었고 (Wolf and Quimby, 1962), 적어도 150여종의 주화세포가 확립되었지만 (Fryer and Lannon, 1994a) 상대적으로 해산어의 주화세포 수는 30여종으로 많지 않다 (Chi *et al.*, 1999).

현재 어류 주화세포는 대부분 바이러스성 질병과 리켓치아에 의한 질병의 진단을 위한 배양 목적으로 사용하고 있다 (Fryer *et al.*, 1990; Fryer and Lannon, 1994b). 또한 주화세포는 독성학, 발암, 유전학적 조절, 발현의 연구에 있어서 중요한 역할을 하고 있다 (Bols and Lee, 1982; Bachich and Borenfreund, 1991).

이번에 만든 새로운 BSBS 세포는 형태학적으로 상피성 세포이며 2년 이상 60회 이상의 계대 배양을 유지하고 있으므로 주화세포로 확립된 것으로 보아진다. 염색체 수는 감성돔의 고유의 염색체 수인 48개와는 차이를 보였으며 60개의 염색체를 가진 세포가 많이 존재하였다. 주화세포가 고유의 어종의 염색체 수와 다른 염색체 수를 가지는 경우는 여러 주화세포에서 보고되고 있으며 (Tung *et al.*, 1991; Fernandez *et al.*, 1993; Fernandez-Puentes and Figueras, 1995; Tong

et al., 1998; Chi *et al.*, 1999; Lai *et al.*, 2003) 이는 세포가 시험관내의 배양조건에 맞도록 유전자의 변이를 일으킨 것을 반영하는 것으로 생각된다 (Hsu, 1973).

BSBS 세포주의 최적 증식 온도는 20°C였으며 이는 아마도 처음 초대배양부터 계대 배양까지 계속 20°C에서 배양, 유지되었기 때문이라고 생각된다. 또한 BSBS세포는 10%이상의 FBS가 함유된 배지에서 빠른 증식을 나타내었으며 저농도의 FBS에서는 계대배양을 계속하기는 어려웠으므로 어류 주화세포의 배양을 위해서 일반적으로 사용되는 10%의 FBS가 함유된 배지를 사용하는 것이 적절한 것으로 사료되었다.

바이러스의 생물학적 특성 연구와 대량배양을 위해서는 바이러스를 배양할 수 있는 주화세포가 필수적으로 필요하며 최근 해산어 유래의 새로운 주화세포가 개발되고 있다. NNV는 여러 해산어류의 치어에 치명적이며 70-90%의 폐사를 나타내는 질병의 원인 바이러스로 1992년 Mori *et al.*에 의해 nodavirus로 분류되었다. NNV의 배양이 가능한 주화세포가 처음 개발된 것은 1999년 Chi *et al.*에 의해서이며 그 후 Iwamoto *et al.*(2000)와 Chang *et al.*(2001), Lai *et al.* (2001, 2003)에 의해 다양한 주화세포가 개발되어져 그 배양이 가능해 졌다. RSIV의 경우도 처음 보고되어 졌을 때에는 높은 감염가의 바이러스를 배양할 수 있는 주화세포가 없었으나 (Inoue *et al.*, 1992), 그 후 Lai *et al.*(2000, 2003)에 의해 10^6 - $10^{8.5}$ TCID₅₀의 바이러스를 배양할 수 있는 grouper 유래의 GF 등의 세포가 확립되었다. LCDV의 경우, blue gill 유래의 LCDV가 blue gill 유래의 BF-2와 largemouth bass 유래의 LBF-1세포에서 분리되었으나 (Wolf *et al.*, 1966) 종 특이성이 강하여 그 이후 분리보고는 없다. 그 후, 넙치의 LCDV를 배양할 수 있는 세포가 Kasai and Yoshimizu(2001)에 의해 보고되고 있다. 넙치치어의 지느러미 기부의 상피의 증식을 일으키는 FHV는 아직 분리가능한 주화세포가 없다 (Iida *et al.*, 1991). 본 연구에서 확립된 BSBS세포

는 RSIV, NNV, LCDV와 FHV에 대해 감수성을 보이지 않았다. 이들 바이러스는 우리나라에서 보고되고 있으며 특히 RSIV와 LCDV는 감성돔에도 질병을 일으키므로 이들 바이러스의 분리에 사용할 수 있을 것으로 기대하였으나 불행히도 이들 바이러스를 분리할 수가 없었다. 그러나 우리나라의 넙치에서 빈번하게 질병을 일으키고 있는 MABV와 HIRRV을 비롯하여 SVCV와 CSV에 감수성을 나타내므로 이들 바이러스의 분리, 배양을 위한 목적으로는 사용할 수 있을 것이다. 또한, 근년 해산어에서 바이러스에 의한 질병이 계속 보고되고 있으므로 앞으로 발생하는 바이러스성 질병의 연구에 본 세포주가 사용될 것을 기대하고 있다.

요 약

감성돔 (*Acanthopagrus schlegeli*)의 비장에서 주화세포인 BSBS를 확립하고 세포의 특성을 검사하였다. BSBS세포는 60회 이상의 계대배양이 가능하였고 형태학적으로는 상피성 세포였다. 세포는 20°C, 10%의 FBS가 든 L-15배지에서 배양하는 조건에서 잘 자랐다. BSBS세포는 해양버나바이러스 (MABV Y-6), 잉어의 봄바이러스병바이러스 (SVCV), 넙치의 랍도바이러스 (HIRRV)와 연어바이러스 (CSV)를 접종했을 때 세포변성효과가 나타났다. 새로 확립된 주화세포는 앞으로 많은 바이러스병의 연구에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 국제공동연구 (F01-2001-000-20016-0) 지원으로 수행되었음

참 고 문 헌

Bahich, H. and Borenfreund, E.: Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells:

a review. *Toxicol. In Vitro*, 3: 91-100, 1991.

Bols, N.C. and Lee, E.L.J.: Technology and uses of cell cultures from tissues and organs of bony fish. *Cytotechnology*, 6: 163-187, 1991.

Chang, S.F., Ngoh, G.H., Kueh, L.F.S., Qin, Q.W., Chen, C.L., Lam, T.J. and Sin, Y.M.: Development of a tropical marine fish cell line from Asian seabass (*Lates calcarifer*) for virus isolation. *Aquaculture*, 192: 133-145, 2001.

Chi, S. C., Hu, W.W. and Lo, B. J.: Establishment and characterization of continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV)., *J. Fish Dis.*, 22: 173-182, 1999.

Fernandez-Puentes C. and Figueras A.: Epithelial cell line from turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 32: 391-393, 1995.

Fernandez, R.D., Yoshimizu, M., Kimura, T., Ezura, Y., Inouye, K. and Takami, I.: Characterization of three continuous cell line from marine fish. *J. Aquat. Anim. Health*, 5: 127-136, 1993.

Freshney R.I.: Culture of animal cells. In: Freshney, R.I. (ed.) *A manual of basic technique*, Wiley-Liss, New York, pp. 387-389, 1994.

Fryer J.L. and Lannan C.N: Three decades of cell culture: a current listing of cell lines derived from fishes. *J. Tissue Cult. Methods*, 10: 57-94, 1994a.

Fryer J.L. and Lannan C.N: Rickettsial and chlamydial infections of freshwater and marine fishes, bivalves, and crustaceans. *Zool. Stud.*, 33: 95-107, 1994b.

Fryer, J.L., Lannan, C.N., Garces, L.H., Larenas, J.J. and Smith, P.A.: Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho

- salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. Fish Pathol., 25: 107-114, 1990.
- Holt, R. and Rohovec, J.: Anaemia of coho salmon in Oregon. Fish Health Section. Am. Fish Soc. Newsletter, 12: 4, 1984.
- Hsu, T.C.: Karyology of cells in culture. In: P.K. Kruse., Jr. and M.K. Patterson, Jr (ed.) Tissue culture methods and applications, Academic Press, New York, pp. 764-767, 1973.
- Iida, Y., Masumura, K., Nakai, T., Sorimachi, M. and Matsuda, H.: A viral disease in larvae and juveniles of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. J. Aquat. Anim. Health, 1: 7-12, 1989.
- Iida, Y., Nakai, T., Sorimachi, M. and Matsuda, H.: A viral disease of larvae and juveniles of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Dis. Aquat. Org., 10: 59-63, 1991.
- Inouye, K., Yamano, Y., Maeno, Y., Nakajima, K., Matsuoka, M., Wada, Y. and Sorimachi, M.: Iridovirus infection of cultured red seabream *Pagrus major*. Fish Pathol., 27: 19-27, 1992.
- Iwamoto, T., Nakai, T., Mori, K., Arimoto, M. and Furusawa, I.: Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. Dis. Aqua. Organ., 43: 81-89, 2000.
- Jung, S.J. and Oh, M.J.: Iridovirus-like infection of striped beakperch *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel) associated with high mortality in a south coastal area of the Korean peninsula. J. Fish Dis., 23: 223-226, 1999.
- Kasai, H. and Yoshimizu, M.: Establishment of two Japanese flounder embryo cell lines. J. Fac. Fish. Sci. Hokkaido Univ., 52: 67-70, 2001.
- Kusuda, R., Nishi, Y., Hosono, N. and Suzuki, S.: Serological comparison of birnavirus isolated from several species of marine fish in south west Japan. Fish Pathol., 28: 91-92, 1993.
- Lai, Y-S., John, J.A.C., Lin, C-H., Guo, I-C., Chen, S-C., Fang, K., Lin, C-H. and Chang, C-Y.: Establishment of cell lines from a tropical grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), and their susceptibility to grouper Irido- and nodaviruses. J. Fish Dis., 26: 31-42, 2003.
- Lai, Y-S., Murali, S., Chiu, H-C., Ju, H-Y., Lin, Y-S., Chen, S-C., Guo, I-C, Fang, K. and Chang, C-Y. Propagation of yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) in a new nodavirus-susceptible cell line from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), brain tissue. J. Fish Dis., 24: 299-309, 2001.
- Lai, Y-S., Murali, S., Ju, H-Y., Wu, M-F., Guo, I-C., Chen, S-C., Fang, K. and Chang, C-Y. Two iridovirus-susceptible cell lines established from kidney and liver of grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), and partial characterization of grouper iridovirus. J. Fish Dis. 23: 379-388, 2000.
- Lannan, C.N., Winton, J.R. and Fryer J.L.: Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. In vitro, 20: 107-114, 1984.
- Mori, K., Nakai, T., Muroga K., Arimoto, M., Musiake, K and Furisawa, I.: Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in striped jack, *Pseudocaranx dentex*, with nervous necrosis. Virology. 187: 368-371, 1992.
- Oh, M.J. and Choi, T.J.: A new rhabdovirus (HRV-like) isolated from cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 11: 129-136, 1998 (Korean).
- Oh, M.J., Jung, S.J., Choi, T.J., Kim, H.R., Rajen-

- dran, K.V., Kim, Y.J., Park, M.A., and Chun, S.K. A viral disease occurring in cultured carp *Cyprinus carpio* in Korea. *Fish Pathol.*, 36: 147-152, 2001.
- Oh, M.J., Jung, S.J., Kim, S.R., Rajendran, K.V., Kim, Y.J., Choi, T.J., Kim, H.R., and Kim, J.D.: A fish nodavirus associated with mass mortality in hatchery-reared red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 211: 1-7, 2002.
- Reno, P.W., Philippon-Fried, P.H. and Nicholson, B.L.: Ultrastructural studies of piscine erythrocytic necrosis(PEN) I Atlantic herring (*Clupea harengus*) *J. Fish Res. Board Can.*, 35: 148-154, 1978.
- Smail, D.A. and Egglestone, S.I.: Virus infections of marine fish erythrocytes: electron microscopical studies on the blenny virus. *Fish Dis.*, 3: 47-54, 1980.
- Tong, S.L., Miao, H.Z. and Li, H.: Three new continuous fish cell lines of SPH, SPS and RSBF derived from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) and red sea bream (*Pagrosomus major*). *Aquaculture*, 169: 143-151, 1998.
- Tung L-C., Chen S-N. and Kou G-H.: Three cell lines derived from spleen and kidney of black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*). *Fish Pathol.*, 26: 109-117, 1991.
- Winton, J.R., Lannan, C.N., Fryer, J.L. and Kimura, T.: Isolation of a new reovirus from chum salmon. *Fish Pathol.*, 15: 155-162, 1981.
- Wolf, K., Gravell, M. and Malsberger, R.G.: Lymphocystis virus: isolation and propagation in centrarchid fish cell lines. *Science*, 151: 1004-1005, 1966.
- Wolf, K. and Quimby, M.C.: Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science* 135: 1065-1066, 1962.
- Yoshimizu, M., Nomura, T., Awakura, T., Ezura, Y. and Kimura, T.: Prevalence of pathogenic fish viruses in anadromous masu salmon (*Oncorhynchus masou*) in the northern part of Japan, 1976-1987. *Physiol. Ecol. Jpn. (Special Volume)* 1: 559-576, 1989.

Manuscript Received : July 8, 2003

Revision Accepted : November 11, 2003

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