

## 스쿠티카충 *Miamiensis avidus*에 대한 넙치의 면역반응

정성주<sup>†</sup> · 키타무라 신이치 · 아오야마 마사토 · 송준영 · 김병관 · 오명주  
전남대학교 수산생명의학과

# Immune Response of Olive flounder *Paralichthys olivaceus* against *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida)

Sung-Ju Jung<sup>†</sup>, Shin-Ichi Kitamura, Masato Aoyama, Jun-Young Song,  
Byeong-Kwan Kim and Myung-Joo Oh

Department of Aquaculture Medicine, Chonnam National University, Chunnam 550-749, Korea

*Miamiensis avidus* is a scuticociliate causing mortality in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. To evaluate immune response of olive flounder against *M. avidus*,  $2.6 \times 10^6$  cells/fish of Formalin killed cell (FKC) was intraperitoneally (i.p.) injected, and  $2.4 \times 10^6$  cells/ml of sonicated FKC was immersion immunized to 14.9 cm (26.8g) fish. Fish were immunized 2 times with 2 weeks intervals. Antiserum from immunized fish caused agglutination and immobilization of the ciliates. In ELISA test, immunized group exhibited higher titers than control group. In addition, i.p. immunized fish showed higher phagocytic ratio, phagocytic index and chemotaxic activity. To evaluate *in vivo* efficacy of FKC on fish,  $1.43 \times 10^5$  cells/fish was i.p. injected, and  $2.2 \times 10^5$  cells/ml of sonicated cell was immersed into 8.6cm (6.3g) fish. After 2 times immunization with 2 weeks intervals, fish were infected with  $2.0 \times 10^4$  and  $2.0 \times 10^3$  cells/ml of live ciliates by immersion. After 3 weeks, cumulative mortality was lower in the i.p. immunized group and mortality was delayed in immersion immunized group. In conclusion, specific immune response of olive flounder against *M. avidus* was elevated after immunization and these immune response may prevent and/or delay for the *M. avidus* infection to olive flounder.

**Key words:** *Miamiensis avidus*, Scuticociliatida, Vaccine, Phagocytosis, Chemotaxic activity

스쿠티카충은 넙치에 발생하는 질병 중 가장 문제시되는 질병의 하나이며 치료대책이 없고 폐사율이 높아 넙치양식에서 경제적인 손실이 큰 기생충성 질병이다. 스쿠티카충은 아가미, 체표와 지느러미에 기생하여 조직이 붕괴되며, 증상이 진행되면 근육이 노출되고 뇌와 각종 내장 기관에까지 침투하여 조직의 괴사를 일으킨다. 우리나라의 넙치에서 보고된 스쿠티카충은 *Uronema marinum* (Jee et al. 2001), *Pseudocohnilembus persalinus* (Kim et al. 2004), *Philasterides dicentrarchi* (Kim et al. 2004)와 *Miamien-*

*sis avidus* (Jung et al. 2005)의 4종으로 이들은 모두 폐양을 일으키는 넙치로부터 분리되고 있다. 이들 중 *Miamiensis avidus*가 넙치에 질병을 일으키는 주요한 종으로 생각되는 것으로 보고하고 있다 (Jung et al. 2005).

어류질병의 치료목적으로 사용되는 약제와 약품의 인체에의 안정성과 환경오염이 문제시되면서 어류 스스로의 면역체계를 이용한 백신의 개발과 사용에 대한 관심과 필요성이 대두되고 있다. 어류에 기생하는 기생충에 대한 백신은 *Ichthyophthirius multifiliis*, *Amyloodinium ocella-*

<sup>†</sup>Corresponding Author : Sung-Ju Jung, Tel : 061-659-3175,  
Fax : 061-659-3175, E-mail: sungju@chonnam.ac.kr

*tum* 과 *Cryptobia salmositica*에 대하여 연구가 진행되고 있으며 그 효과가 긍정적인 것으로 평가되고 있다 (Woo, 1997; Chin and Woo, 2005). 백신의 효능을 연구하기 위해서는 백신에 의한 폐사율의 경감효과가 있는지와 더불어 처리한 백신이 생체에 어떠한 면역반응을 유발했는지를 알아야한다. 본 연구는 우리나라에서 주요 스쿠티카충의 원인인 *M. avidus*에 대한 불활화백신을 제작하고 충에 대한 넙치의 면역반응을 측정하여 어류의 섬모충이 어류의 체내에 유발하는 면역반응을 연구하여 넙치가 충체에 대해 방어력을 획득하는 메카니즘을 밝히기 위하여 행했다.

## 재료 및 방법

### *Miamiensis avidus*의 배양

1999년 넙치에서 분리된 YS1 strain을 Chinook salmon embryo (CHSE-214) 세포에 접종하여 20°C에서 배양하고 충이 CHSE-214 세포를 전부 섭취하여  $2\sim 5 \times 10^6$  cells/ml의 농도가 되었을 때 시험재료로 사용하였다.

### Formalin killed cell (FKC)의 제작

배양액에 0.3%가 되도록 포르말린을 첨가하여 24시간 후, 1000 g에서 10분간 원심분리한 후 PBS (phosphate buffered saline, 0.12 M phosphate, 0.04 M NaCl, pH 7.2)로 현탁한 후 혈구계산판으로 계수하였다.

### 면역반응 측정을 위한 면역

포르말린 불활화 처리된 스쿠티카충을  $2.6 \times 10^6$ /fish 그리고  $2.4 \times 10^6$ /ml 농도로 평균 크기 14.9 cm (26.8 g)의 넙치에 각각 복강 주사와 침지에 의해 면역하였다. 침지면역을 위해서는 포르말린 불활화 처리된 스쿠티카충을 30초간 5회 초음파처리하여 lysate를 제작하였다. 1차 면역 2주 후에 같은 양으로 2차 면역을 실시하였

으며, 면역하지 않은 그룹을 대조구로 사용하였다. 2차 면역 1주 후에 면역한 실험구와 대조구의 넙치에서 미부 정맥으로부터 혈청과 신장의 두신으로부터 백혈구를 분리하여 면역학적 분석에 사용하였다.

### 감염실험을 통한 *in vivo* 효과 검증을 위한 면역

4개의 실험구로 나누어 각각의 실험구에 20마리의 넙치를 사용하였다. 포르말린 불활화 처리된 스쿠티카충을  $1.43 \times 10^7$ /fish 와  $2.2 \times 10^7$ /ml 농도로 평균 크기 8.6 cm (6.3 g) 넙치에 각각 복강 주사와 침지로 면역을 실시하고 2주 후에 같은 농도로 2차 면역을 실시하였으며, 다른 하나의 실험구는 면역을 하지 않았다.

### 감염실험

2차 면역 2주 후에 4 L의 해수에 스쿠티카충을  $2.0 \times 10^3$  그리고  $10^4$  ciliates/ml의 각각의 농도로 침지 방법을 통해 공격감염을 하였고 공격감염 45분 후에 수조 내 해수를 20 L 까지 채웠다. 그리고 면역과 공격감염하지 않은 그룹을 대조구로 사용했다. 공격감염 2주 동안 매일 폐사어와 증상을 관찰하였다.

### 혈청의 충체에 대한 반응

혈액은 취하여 원심분리로 혈청만을 취하고, 혈청을 96 well에서 단계 희석한 후  $10^4$  cells의 스쿠티카충을 한 well에 첨가한 후 스쿠티카충의 형태와 움직임을 현미경으로 관찰하였다.

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

*M. avidus*의 초음파처리액을 coating buffer (0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6)로 희석하여 100  $\mu$ l 씩 well에 첨가하여 실온에서 한 시간 방치한 후에 0.05% Tween 20이 첨가된 PBS로 세정하였다. 10%의 skim milk (Difco)로 blocking하고 여기에 면역시킨 넙치에서 얻은 혈청을 100배 희석하여 반응시켜 세정한 후에,

anti-flounder Ig M monoclonal antibody (L chain 인식) hybridoma 배양액과 반응시켰다. 세정 후, 2,000배 희석한 peroxidase conjugated anti-mouse IgG (H+L) goat IgG를 첨가하여 1시간 실온에서 반응시켜 세정 후, 발색시약 (0.04% O-phenylenediamine dihydrochloride, 0.124% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1 M citric acid monohydrate, 0.2 M Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)으로 발색시켜 492 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

#### 탐식능 측정

커버글라스 (13 × 13 mm)에 DMEM (GIBCO)에 부유시킨 두신 백혈구 (2 × 10<sup>7</sup> cells/ml)를 얹어 습윤상자에서 30분간 부착시킨 후 부유세포는 MEM으로 씻어내었다. 10%의 FBS가 든 DMEM에 0.3%의 polystyrene latex beads (NUNC)와 10%의 복강면역, 침지면역, 대조구의 넙치혈청을 섞어 한 시간 습윤상자에서 반응시켰다. 커버글라스는 DMEM으로 씻어내고 건조시켜 메틸알코올로 고정 후, 김자(Giemsa) 염색액으로 염색하였다. 200개의 세포를 현광현미경으로 관찰하여 phagocytic ratio (총 세포중 latex beads를 탐식한 세포의 %)와 phagocytic index (하나의 탐식세포가 탐식한 latex beads의 수)를 계산하였다.

#### 주화성분석

주화성분석을 위하여 50 mg의 zymozan A (SIGMA)를 10 ml의 증류수가 든 유리원심관에 넣고 한시간 끓였다. Zymozan 부유액을 1 ml씩 polystyrene 튜브에 넣고 8000 × g에서 2분 원심 분리하였다. 침전을 3회 PBS로 씻어내고 1 ml의 정상넙치혈청을 첨가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 총은 1.5 × 10<sup>6</sup> cells/ml를 정상넙치혈청과 반응시켰다.

주화성 분석은 blind well chemotaxis chamber (Neuro Probe)를 이용하여 Boyden 등 (1962)의 방법으로 실험하였다. Well의 바닥에 200 μl의 zymozan과 흡소닌처리한 충체를 두고 pore가 5 μm의 필터를 끼웠다. 필터의 상층에는 면역된 넙치 신장의 두신으로부터 분리된 백혈구 부유액 2.0 × 10<sup>7</sup> cells/ml를 각각 더하고 20°C에서 3시간 반응 시켰다. 반응 후 필터를 제거하고 PBS 수세 후, 메탄올로 고정하고 Giemsa 염색하고 광학현미경으로 1,000배에서 10시야를 관찰하여 백혈구수의 평균을 구하였다. 각 실험구에서 5마리를 취해 실험에 사용하였다.

#### 호흡폭발(respiratory burst) 측정

각 실험구에서 취한 백혈구를 phenol red-free의

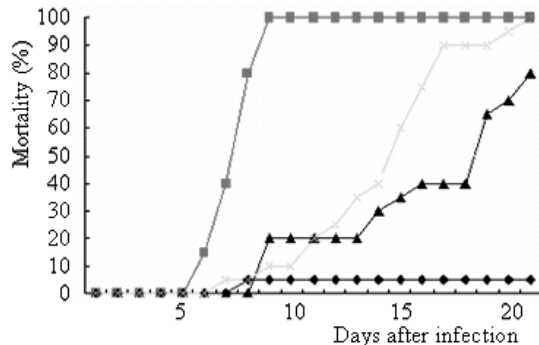


Fig. 1. Mortality of olive flounder immunized by intraperitoneal injection (-▲-), immersion (-×-) and non-immunized control (-■-) challenged with  $2.0 \times 10^3$  cells/ml of *Miamiensis avidus*. Not-challenged control (-◆-).

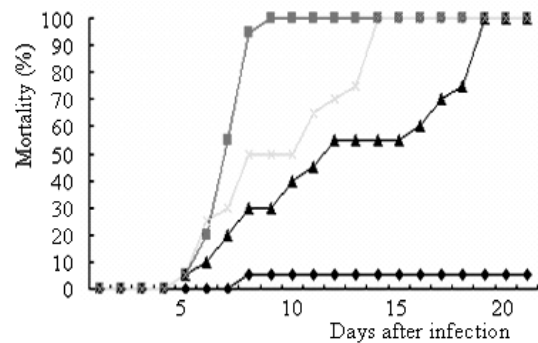


Fig. 2. Mortality of olive flounder immunized by intraperitoneal injection (-▲-), immersion (-×-) and non-immunized control (-■-) challenged with  $2.0 \times 10^4$  cells/ml of *Miamiensis avidus*. Not-challenged control (-◆-).

HBSS에 희석하여 96well plate에 넣어 1시간 방치한 후에 plate의 바닥에 부착한 혈구세포만을 취하기 위하여 HBSS로 가볍게 3회 세정하였다. 그 후, 100  $\mu$ l의 PMA (phorbol myristate acetate)/SOD (superoxide dismutase)를 첨가하여, 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포내  $O_2^-$ 의 측정을 위해서는 96well에 위의 방법으로 혈구를 부착시킨 후, 1 mg의 NBT (nitroblue tetrazolium)와 1  $\mu$ g의 PMA를 HBSS 1 ml 당 첨가하여 만든 액을 well당 100  $\mu$ l 넣은 후 실온에서 방치하였다. 그 후 메탄올로 고정하여 건조시켜 각 well에 120  $\mu$ l의 2 M KOH와 140  $\mu$ l의 DMSO를 섞은 액을 넣어 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.  $H_2O_2$ 의 측정을 위해서는 세포를 부착시킨 96 well에 100  $\mu$ l의 0.02%의 phenol red와 0.01%의 horseradish peroxidase를 첨가한 HBSS를 100  $\mu$ l 첨가하여 반응시킨 후, 10  $\mu$ l의 1N NaOH로 반응을 종결시켜 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 통계처리

탐식능, 주화성, 호흡폭발은 Student's *t*-test에 의하여 유의성을 분석하였으며 유의수준은  $P < 0.05$ 로 하였다.

## 결 과

### 백신효능

스쿠티카충을  $2.0 \times 10^3$  cell/ml로 공격감염한 2주후의 누적폐사율은 주사면역구가 30%, 침지면역구가 40%, 면역하지 않은 구가 100%였으나 이후 폐사가 지속되어 실험종료 21일째는 주사면역구가 80%, 침지면역구와 대조구는 100%의 폐사를 나타내었다.  $2.0 \times 10^4$  cell/ml로 공격감염한 경우는 2주후 면역시키지 않은 대조구와 침지면역구의 폐사율이 100%, 주사면역한 구가 50%의 폐사율을 보였으나 실험종료 21일째는 모두 폐사하였다. 감염시키지 않은 실험구에서는 한 마리가 폐사하여 폐사율은 5%였다. 충체 감염구의 폐사어는 체표에 심한 궤양병소가 형성되어 있었으며 궤양부위, 아가미, 뇌에서 다수의 충체를 확인 할 수 있었다.

### 충체에 대한 혈청의 반응

포르말린으로 불활화된 스쿠티카충으로 면역하지 않은 대조구의 혈청은 1/4 희석농도에서 충체의 움직임이 없어지고 (immobilization) 충체들이 서로 덩어리를 형성하는 응집현상 (agglutination)이 관찰되었다. 충체들이 서로 덩어리지는 응집현상은 1/16 희석 농도까지 관찰되었다. 면역된 넙치의 혈청은 1/16 희석농도에서는 immobilization과 agglutination 모두 관찰되었으며, 1/64의 희석 농도까지 immobilization이 관찰되었다 (Table 1).

**Table 1.** Effect of i.p. immunized and normal serum against *Miamiensis avidus*

Dilutions \ Serum	Immunized	Normal
1/4	Immobilization Agglutination++	Immobilization Agglutination
1/16	Immobilization Agglutination+	-*
1/64	Immobilization	-
1/128	-	-

-\*: No change

### ELISA 항체가

각 실험구에서 10 마리의 개체를 ELISA에 사용하였으며 면역시키지 않은 넙치의 흡광도보다 높은 수치를 보인 것은 복강면역구가 6마리 침지면역구가 4마리였다. Fig 3에 데이터의 일부를 나타내었다.

### 탐식능

Phagocytic ratio는 주사면역구가 46.4%, 침지면역구가 26.5%, 면역하지 않은 구는 21.4%였다

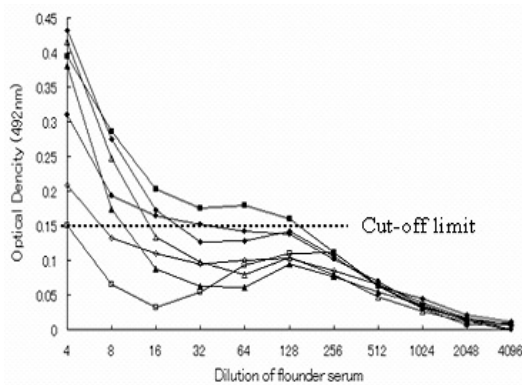


Fig. 3. ELISA analysis of olive flounder serum immunized (above cut-off limit) and non-immunized (under cut-off limit) group.

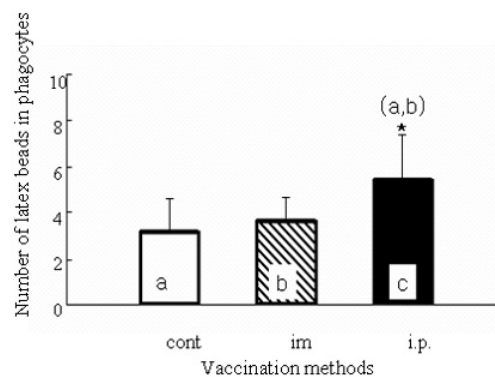


Fig. 5. Phagocytic index of olive flounder leucocytes with latex beads (number of fish = 12). Asterisks indicate significant differences ( $*P < 0.05$ ) with respect to the groups indicated in bracket. cont: control, im: immersion immunization, i.p.: intraperitoneal injection.

(Fig. 4). Phagocytic index는 주사면역구가 5.38, 침지면역구가 3.65, 면역하지 않은 구가 3.14였다(Fig. 5).

### 주화성

혈청을 처리한 zymozan 과립에 대한 신장백혈구의 주화활성은 복강면역구가 105.5, 침지면역구가 45.5, 대조구가 57.4였다 (Fig 6). 또한 초음파처리한 충에 대한 신장백혈구의 migration index는 복강면역구가 58.3, 침지면역구가 32.5,

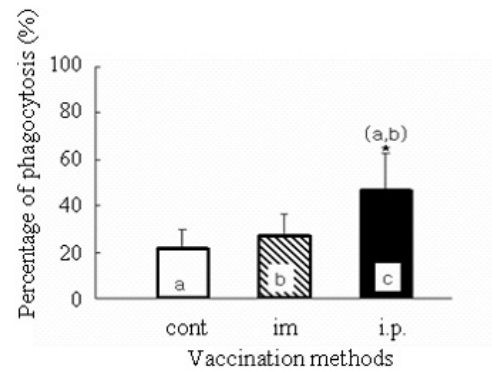


Fig. 4. Phagocytic ratio of olive flounder leucocytes with latex beads (number of fish = 12). Asterisks indicate significant differences ( $*P < 0.05$ ) with respect to the groups indicated in bracket. cont: control, im: immersion immunization, i.p.: intraperitoneal injection.

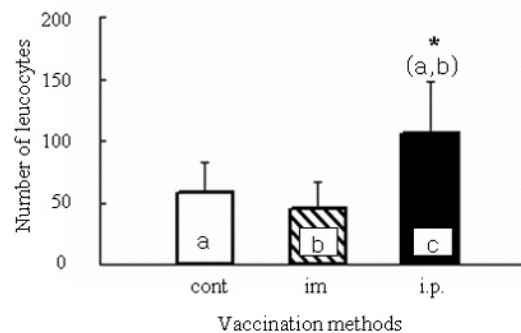


Fig. 6. Chemotaxis activity of olive flounder leucocytes with Zymozan treated serum (number of fish = 5). Asterisks indicate significant differences ( $*P < 0.05$ ) with respect to the groups indicated in bracket. cont: control, im: immersion immunization, i.p.: intraperitoneal injection.

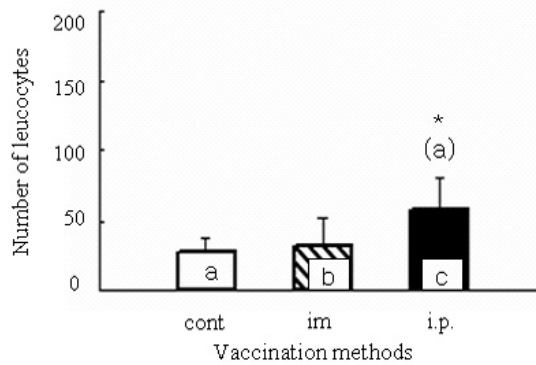


Fig. 7. Chemotaxis activity of olive flounder leucocytes with sonicated ciliates (number of fish = 5). Asterisks indicate significant differences ( $*P < 0.05$ ) with respect to the groups indicated in bracket. cont, control; im, immersion immunization; i.p., intraperitoneal injection.

대조구가 28.2였다 (Fig 7). 복강 주사 면역한 실험구와 면역하지 않은 대조구와 유의적인 차이가 확인되었다. 반면 침지 면역한 실험구는 대조구 그리고 복강주사 면역한 실험구와 유의적인 차이를 보이지 않았다.

#### 호흡폭발

복강주사와 침지 면역된 넙치 두신 백혈구의  $O_2$  그리고  $H_2O_2$ 의 측정 결과 면역하지 않은 실험구와 면역한 실험구의 유의적인 차가 보이지 않았다.

## 고 찰

기생충에 감염된 적이 있는 어류는 동일한 기생충에 다시 감염이 되었을 때 빠른 항체의 상승과 함께 재감염이 일어나지 않는 경우가 보고되고 있다. 일단 감염되었다가 회복된 어류는 면역기억이 존재하여 병원체의 공격에 대하여 빠르게 면역반응이 일어난다 (Sin *et al.*, 1992). 본 연구에서는 *M. avidus*의 FKC를 복강에 주사하고 FKC를 초음파처리한 것을 침지의 방법으로 면역시켰더니 항체가 생성되었으며 감염실험에서 폐사율이 경감되는 효과를 보였다. 섬모충에

속하는 백점충 *I. multifiliis* 백신에 대한 폐사율 경감효과가 있으며 백신처리에 의해 특이항체의 생성과 세포성면역반응이 증강되는 것으로 보고되고 있다 (Clark *et al.*, 1995). *I. multifiliis*의 세포표면에 존재하는 48 kDa과 60 kDa의 i-항원은 충체의 움직임을 둔화시키고 충체가 덩어리지는 현상을 유발하는 하며, i-항원에 대한 단클론항체를 어체에 주사하면 감염방어효과가 있으므로 i-항원에 대한 특이항체가 숙주의 방어에 중요한 기능을 하는 것으로 보고하고 있다 (Dickerson *et al.*, 1989; Lin *et al.* 1994). *I. multifiliis*을 면역한 무지개송어에서 희석배수 1:50까지 immobilization이 일어났으며 이는 본 연구의 1:64와 유사한 수준이다 (Dickerson *et al.*, 1989). 항체 성분에 의한 immobilization은 섬모충의 항체성분의 부착을 도와주고, 보체를 활성화시켜 섬모충을 직접 죽이는 역할을 함으로써 생체방어에 작용하는 것으로 생각된다. *C. salmositica*의 200 kDa의 세포표면을 인식하는 단클론항체를 어체에 주사하면 약한 수동면역의 효과가 있는 것으로 보고하고 있어 항체성분이 방어작용에 관여하는 증거를 보여주고 있다 (Feng and Woo, 1997). 본 연구에서 면역한 넙치의 혈청에서 immobilization과 agglutination이 관찰되었으므로 immobilization과 agglutination이 *M. avidus*의 방어에 역할을 했을 것으로 추측된다. 흥미있는 결과로 면역하지 않은 넙치의 고농도의 혈청 성분도 immobilization을 유발했으므로 항체이외의 agglutinins 성분이 스쿠티카의 감염방어작용에 관여하고 있으며, 기생충의 감염방어에 작용하는 비특이 방어물질에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

*I. multifiliis*와 *C. salmositica*를 감염시킨 후에 무지개송어의 혈청에 항체가 생성되어 있음을 ELISA 방법으로 확인하였다 (Sigh and Buchmann 2001; Verity and Woo, 1996). 본 연구의 결과 ELISA에 의해 *M. avidus*에 대한 항체가 생성되어 있었으나 침지면역구에서 4마리 복강주사면역구에서 3마리는 면역을 시키지 않은 어류와

동일한 흡광도치를 나타내어 모든 개체에서 항체가 생성되지는 않았다. 어체내에 생성된 항체의 양과 획득된 방어력의 강도와와의 관련성에 대한 연구가 더 필요할 것이다.

탐식작용은 항원입자를 둘러싸는 옵소닌과 탐식세포의 표면에 존재하는 특이 수용체가 결합하여 항원입자를 탐식세포의 세포질내로 끌어들이는 반응으로 보체와 특이항체가 존재할 경우 탐식능은 증가하게 된다. 스쿠티카충에 속하는 *P. dicentrarchi*의 FKC를 어체에 면역시켰을 때 탐식능이 현저히 증가한 보고가 있다 (Leiro *et al.* 2004). 본 연구에서 침지면역과 주사면역 모두 대조구와 비교하여 유의적으로 phagocytic ratio와 phagocytic index가 증가하였으며 주사면역구에서 가장 뚜렷한 증가를 보였다. 그 결과 면역한 실험구의 혈청성분내에 탐식작용이 *M. avidus*의 방어작용에 중요하게 작용하고 있음을 알 수 있었다.

Chemokine은 분비단백질로 백혈구들을 유인하는 작용을 하는 물질로 염증반응, 항원제시, 혈구세포의 분화, 상처회복 등에 관여한다. 본 연구에서 복강 면역한 넙치에서 취한 혈청을 처리한 zymosan 과립에 대하여 신장백혈구의 주화성이 증가된 경향을 보였다. 또한 복강 면역한 넙치에서 취한 신장백혈구는 초음파처리한 충체로의 주화성이 유의적으로 증가하여 면역에 의하여 넙치의 백혈구들이 적극적으로 충체가 존재하는 부위로 이동하여 충체에 대한 방어작용을 하고 있음을 알 수 있었다.

호흡폭발은 백혈구가 생성하는 활성기산소를 측정하는 것으로 탐식능이 증가한 백혈구에서는 호흡폭발도 증가하는 경향이 있다. 그러나 본 실험에서는 각 면역구에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. *P. dicentrarchi*를 백신 처리한 터봇에서 터봇의 혈청이 첨가되지 않은 경우에는 호흡폭발이 증가되지 않으며, 면역한 터봇의 혈청을 첨가하면 정상의 터봇의 혈청을 첨가한 것보다 호흡폭발이 현저히 증가하는 것으로 보고하고 있다. 저자들은 그 원인으로 C3a와 같은

보체의 존재가 중요한 것으로 고찰하고 있다 (Leiro *et al.*, 2004). 본 연구에서 *M. avidus*의 호흡폭발이 유의적으로 증가하지 않는 이유에 대하여 보체나 충체가 분비하는 항산화 물질의 관여에 대한 연구가 더 필요한 것으로 생각된다.

본 연구의 결과로 넙치의 스쿠티카충의 원인인 *M. avidus*의 불활화백신이 넙치에 면역기억을 유발하며 방어면역을 생성하는 것을 알 수 있었다.

## 요 약

*Miamiensis avidus*는 넙치에 폐사를 일으키는 스쿠티카 섬모충이다. *M. avidus*에 대한 넙치의 면역반응을 측정하기 위하여 FKC (formalin killed cell)를 마리당  $2.6 \times 10^6$  cells을 복강주사하고 FKC를 초음파처리한 것을  $2.4 \times 10^6$  cells/ml로 14.9 cm (26.8 g)의 넙치에 2주 간격으로 두 번 면역하였다. 면역한 넙치의 항체는 충체의 운동성둔화 (immobilization)와 응집 (agglutination)을 유발하였다. 면역한 그룹은 면역하지 않은 그룹보다 높은 ELISA 항체가를 나타내었다. 또한 복강주사로 면역한 넙치에서 유의적으로 높은 phagocytic ratio, phagocytic index와 주화활성을 나타내었다. FKC의 면역방어효과를 검증하기 위하여 8.6 cm (6.3 g)의 넙치에 마리당  $1.43 \times 10^5$  cells을 복강주사면역하고  $2.2 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 침지면역했다. 2주 간격으로 두 번 면역하고  $2.0 \times 10^4$ 과  $2.0 \times 10^3$  cells/ml 농도로 침지 공격 감염시킨 후 폐사율을 관찰하였다. 감염시킨 3주 후 폐사율은 복강주사구에서 감소하였고 침지면역구는 폐사가 지연되었다. 위의 결과로부터 *M. avidus*의 불활화백신을 넙치에 면역하면 충체에 대한 특이면역이 증강되며 증강된 면역반응이 방어력을 제공했을 것으로 생각되었다.

## 감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 연구비 (2003-003-F00031)에 의해 지원되었습니다.

### 참 고 문 헌

- Boyden, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp Med.*, 15: 453-463, 1962.
- Buchmann, K., Sigh, J., Nielsen, C.V. and Dalgaard, M.: Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Vet. Parasitol.*, 100: 105-116, 2001.
- Burkart, M.A., Clark, T.G. and Dickerson, H.W.: Immunization of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, against *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet): killed versus live vaccines. *J. Fish Dis.*, 13: 401-410, 1990.
- Chin, A. and Woo, P.T.K.: Innate cell-mediated immune response and peripheral leukocyte populations in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to a live *Cryptobia salmositica* vaccine. *Parasitol. Res.*, 95: 299-304, 2005.
- Clark, T.G., Lin T.L. and Dickerson, W.: Surface immobilization antigens of *Ichthyophthirius multifiliis*: their role in protective immunity. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 5: 113-131, 1995.
- Dickerson, H.W. and Clark T.G.: Immune response of fishes to ciliates. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 6: 107-120, 1996.
- Feng, S. and Woo, P.T.K.: Therapeutic and prophylactic effects of a protective monoclonal antibody (Mab-001) against the pathogenic haemoflagellate *Cryptobia salmositica*. *Dis. Aquat. Org.*, 28: 211-219, 1997.
- Jee, B.Y., Kim, Y.C. and Park, M.S.: Morphology and biology of parasite responsible for scuticociliatosis of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Dis. Aquat. Org.*, 47: 49-55, 2001.
- Jung, S.J., Kitamura, S.I., Song, J.Y., Joung, I.Y. and Oh, M.J.: Complete small subunit rRNA gene sequence of the scuticociliate *Miamiensis avidus* pathogenic to olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Dis. Aquat. Org.*, 64: 159-162, 2005.
- Kim, S.M., Cho, J.B., Lee, E.H., Kwon, S.R., Kim, S.K., Nam, Y.K. and Kim, K.H.: Occurrence of scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus* by *Phiasterides dicentrarchi* (Ciliophora: scuticociliatida). *Dis. Aquat. Org.*, 62: 233-238, 2004a.
- Kim, S.M., Cho, J.B., Lee, E.H., Kwon, S.R., Kim, S.K., Nam, Y.K. and Kim, K.H.: *seudocohnilembus persalinus* (Ciliophora: Scuticociliatida) is an additional species causing scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Dis. Aquat. Org.*, 62: 239-244, 2004b.
- Leiro, J., Arranz, J.A., Iglesias, R., Ubeira, F.M. and Sanmartin, M.L.: Effects of the histiophagous ciliate *Philasterides dicentrarchi* on turbot phagocyte responses. *Fish Shellfish Immunol.*, 17: 27-39, 2004.
- Lin, T.L., Clark, T.G. and Dickerson, H.: Passive immunization of Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) against the ciliated protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis* by use of murine monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, 64: 4085-4090, 1996.
- Sigh, J. and Buchmann, K.: Comparison of immobilization assays and enzyme linked immunosorbent assays for detection of rainbow trout antibody titers against *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876. *J. Fish Dis.*, 24: 49-51, 2001.
- Sin, Y.M., Ling, K.H. and Lam, T.J.: Protection against velvet disease in goldfish recovered



- from ichthyophthiriasis. *Aquaculture*, 102: 187-191, 1992.
- Verity, C.K. and Woo, P.T.K.: Characterization of a monoclonal antibody against the 47kDa antigen of *Cryptobia salmositica* Katz and its use in an antigen-capture enzyme-linked immunisorbent assay for detection of parasite antigen in infected rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 19: 91-109, 1996.
- Woo, P.T.K.: Immunization against parasitic diseases of fish. *Dev. Biol. Stand.*, 90: 233-241, 1997.
- 
- Manuscript Received : June 8, 2006  
Revision Accepted : July 18, 2006  
Responsible Editorial Member : Tae-Sung Jung  
(Gyeongsang Univ.)