

항원의 투여방법 및 사육환경 변화에 따른 넙치의 특이항체 반응

김위식 · 한중석 · 장민석* · 서한길* · 정성주* · 박정준** · 김석렬** · 오명주*†

전남대학교 수산과학연구소, *전남대학교 수산생명의학과, **국립수산과학원 병리연구과

The specific antibody response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* to route of antigen administration and change in environmental conditions

Wi-Sik Kim, Jong-Seok Han, Min-Seok Jang*, Han-Gil Seo*, Sung-Ju Jung*, Jung Jun Park**, Seok-Ryel Kim** and Myung-Joo Oh*†

The Fisheries Science Institute, Chonnam National University, Yeosu 556-901, Korea

**Department of Aqualife Medicine, College of Fisheries and Ocean Science, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea*

***Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea*

The specific antibody response of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* to change in rearing-environmental conditions post immunization with antigen (bovine serum albumin, BSA) and different routes of antigen administration were investigated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). To test the effect of routes of antigen administration, flounder were injected intraperitoneally or intramuscularly with 1 mg of BSA. In addition, to test the effect of change in environmental condition post immunization, flounder were injected intraperitoneally with 1 mg of antigen, and then were exposed to acute thermal change (the water temperature (WT) was decreased from 21°C to 15°C within 30 min and maintained at 15°C for 3 h), handling (fish were caught and subsequently held out of water for 1 min) or heavy oil (76 g/ 200 L for 2 days). Consequently, there was no significant difference between intraperitoneal (IP) and intramuscular (IM) injections except at 10 days post-immunization. With these results, it suggests that both IM and IP injections may be used as route of vaccination. Furthermore, no significant difference was observed in the antibody response among the groups exposed to heavy oil, handling, sudden drop of WT and positive control except at 10 days post-immunization. From these results, it was confirmed that specific antibody response was not affected by the above mentioned rearing-environmental conditions, suggesting that vaccination can be employed at changing rearing-environmental conditions.

Key words : Antibody response, Enzyme-linked immunosorbent assay, Olive flounder, Vaccine, Administration, Rearing-environment, Water temperature, Handling, Heavy oil

†Corresponding Author: Myung-Joo Oh

Tel : +81-61-659-7173 Fax : +81-61-659-7173

E-mail : ohmj@chonnam.ac.kr

넙치 (*Paralichthys olivaceus*)는 우리나라 해산어 양식 생산량의 약 40% 이상을 차지하는 양식 어종으로 산업적 측면에서 매우 큰 비중을 차지하고 있으나 양식기간 중에 바이러스, 세균 및 기생충 등의 감염성 질병으로 인해 경제적으로 큰 피해를 입고 있다 (오와 최, 1998; 조 등, 2007/2008; Kim *et al.*, 2009). 감염성 질병에 대한 치료 방법에는 수산용 약제를 사용하는 방법이 있으나 내성균의 출현으로 인해 치료효과가 나타나지 않는 경우가 있으며, 바이러스 질병의 경우 현재까지 뚜렷한 치료법이 없어 질병의 예방대책으로 백신 개발이 요구되고 있다.

어류 백신 연구는 다양한 어종 및 병원체를 대상으로 실시되어 백신을 면역시킨 어류는 특이 항체를 생산하며, 또한 병원체에 노출되어도 저항성을 나타냄이 증명되었다 (Newman, 1993; Vinitanharat *et al.*, 1999). 국내에서는 넙치의 감염성 질병을 예방하기 위해, 다양한 백신 연구가 수행되어 백신의 안전성과 효능이 확인되었고 넙치의 성장에 미치는 영향에 대해서도 확인된 바 있다 (권과 방, 2004; 조 등, 2006; Seo *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2007; 김 등, 2009). 그러나 백신을 넙치 양식 현장에 적용하는 데 있어 투여시기와 방법, 투여농도 및 처리기간 등에 대해서는 현재까지 불명확한 상태이며, 또한 어류는 사육환경 (수온, 수질, 스트레스 자극 등)에 따라 면역 반응이 달라짐에도 불구하고 (Hrubic *et al.*, 1996; Le Morvan *et al.*, 1998; Engelsma *et al.*, 2003; Nakayama *et al.*, 2008) 사육환경 변화에 따른 백신의 영향을 조사한 연구는 부족한 실정이다.

양식장에서의 사육환경의 변화는 어류에게 있어 스트레스로 작용하여 생리적 변화를 유발시키며, 면역능을 저하시키기도 한다 (Barton and Iwama, 1991; Iwama *et al.*, 1997). 어류가 주로 받는 환경변화에 의한 스트레스로는 수온, 수질, 염분, 사육밀도 등의 환경적

요인과 handling, 수송 및 약제투여 등의 인위적 요인이 있다. 이중, 사육수온의 급격한 변화는 어체의 생리조건을 변화시키거나 체내 항상성을 붕괴시키며 (Barton and Iwama, 1991; Pickering, 1992; 장 등, 1999), 어류의 선별 및 사육과정에서 발생하는 handling은 성장을 지연시키거나 면역능을 저하시킨다 (Barton and Iwama, 1991). 중유 (bunker C), 카드뮴 등의 독성물질의 유입으로 인한 수질의 변화는 생리적인 변화를 유도하며, 면역능을 저하시킨다 (Snieszko, 1974; 변 등, 2001; Nakayama *et al.*, 2008).

본 연구에서는 백신을 넙치 양식 현장에 적용하기 위한 기초연구로서 항원의 투여방법 및 사육환경 변화에 따른 넙치의 항체 반응에 대한 영향을 확인하기 위하여, 항원으로서 bovine serum albumin (BSA)을 복강 및 근육 주사한 후 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 BSA에 대한 특이 항체가의 변화를 조사하였으며, 또한 BSA를 면역시킨 넙치에 사육수온 변화, handling 및 중유에 노출시킨 후 항체가의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

실험어

실험어는 전라남도 여수시에 위치한 전남대학교 수산과학연구소에서 사육 중인 넙치 (체중: 140~200 g)를 실험에 사용하였다. 각각의 넙치는 개체별로 구별할 수 있게 tagging 하였으며, 해수 200 L가 들어 있는 FRP 사각수조 7개에 각 5마리씩 수용하였다. 사육수는 분당 5 L로 유수되도록 조정하였고 공기공급 장치를 통해 산소를 공급하였으며, 사료 투여는 시판 사료 (경원사료, 한국)를 사용하여 1일 2회 반복 공급하였다. 80일간의 실험기간 동안 사육수온은 21°C에서 8°C로 천천히 낮아졌다 (Fig. 1).

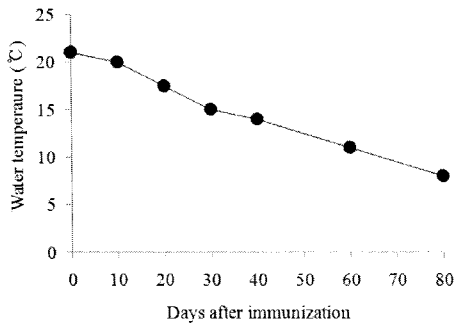


Fig. 1. Changes in water temperature during this study.

항원 (BSA) 투여

항원의 투여방법에 따른 넙치의 특이 항체 반응을 조사하기 위해, 복강 및 근육 주사법을 통해 BSA (Sigma, USA)를 넙치에 투여하였다. 실험구는 BSA를 1 mg/ 200 µl 농도로 넙치의 복강 및 근육에 주사하였으며, 대조구는 위와 동일한 방법으로 PBS를 200 µl씩 주사하였다. 면역에 사용된 항원의 농도는 상업적으로 시판되고 있는 넙치의 연쇄구균 백신 (대성미생물연구소, 한국)의 사용 농도를 기준으로 설정하였으며, 또한 김 등 (2011)의 연구에서 BSA에 대한 특이 항체가 넙치에서 생성되는 농도로 설정하였다.

사육환경 변화

사육환경 변화에 따른 넙치의 특이 항체 반응에 대한 영향을 조사하기 위하여, 넙치에 1 mg BSA/ 200 µl 농도로 조정하여 복강에 주사한 후 2일째부터 수온변화, handling 및 증유 노출을 통해 사육환경을 변화시켰다. 수온변화 실험구는 유수되는 물을 정지시킨 후 21°C의 사육수온을 30분 만에 15°C로 급하강시켜 3시간 유지시킨 후 사육수를 다시 유수시키는 방법으로 2일간 2회 실시하였다. Handling 실험구는 넙치를 뜰채로 포획하여 공기 중에 1분간 노출시킨 후 실험수조에 다시 수용하는 방법으로 2일간 2회

실시하였다. 증유노출 실험구는 유수되는 물을 정지시킨 후 200 L의 사육수에 증유 76 g 넣어 넙치를 2일간 사육한 후, 무처리 사육수로 유수시켰다. 양성 대조구는 넙치에 1 mg BSA/ 200 µl 농도로 조정하여 복강에 주사하였으며, 음성 대조구는 넙치의 복강에 PBS를 200 µl 주사하였다.

혈청 분리

실험구 및 대조구의 넙치로부터 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80일째 미부정맥에서 채혈하여 원심분리 (6000 rpm, 4°C, 20 min)를 통해 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 실험에 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였다.

항체가 측정

BSA에 대한 특이 항체기를 측정하기 위하여 Kim *et al.* (2007)과 김 등 (2009)의 방법에 준해 항체검출 ELISA를 실시하였다. ELISA plate (Nunc, Denmark)에 5 µg BSA/ 50 µl를 각 well에 분주한 후, 37°C에서 overnight하여 항원을 coating 하였다. Tween-20이 0.05% 포함된 PBS (T-PBS)로 3번 세척하였고 5% skim milk를 380 µl씩 넣어 20°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 1차 항체로는 넙치 혈청을 5% skim milk로 희석 (100배)하여 1시간 반응시킨 후, 시료 당 2개의 well에 50 µl씩 분주하였고, 2차 항체로서는 5% skim milk로 10배 희석된 항 넙치 immunoglobulin M (IgM) monoclonal antibody (M7C3-4, Shin *et al.*, 2007)를 50 µl씩 분주하였으며, 3차 항체로서 5% skim milk로 1000배 희석된 peroxidase conjugated 항 마우스 IgG 돼지 혈청 (DakoCytomation, Denmark)을 50 µl씩 분주하였다. 각각의 항체 반응은 20°C에서 1시간 동안 반응하였다. T-PBS로 5번 수세하였고 ELISA 발색액 (100 mM Na₂HPO₄, 50 mM citric acid, 1 mg/ mL *o*-phenylenediamine, 0.03% H₂O₂)을 각 well에 50 µl씩

분주한 후 20°C에서 15분 동안 발색하였다. 각 well에 2N H₂SO₄를 50 μ l씩 넣어 발색 반응을 중지시킨 후 ELISA plate reader (Spectra max 340, USA)로 492 nm에서 OD값을 측정하였다.

통계 분석

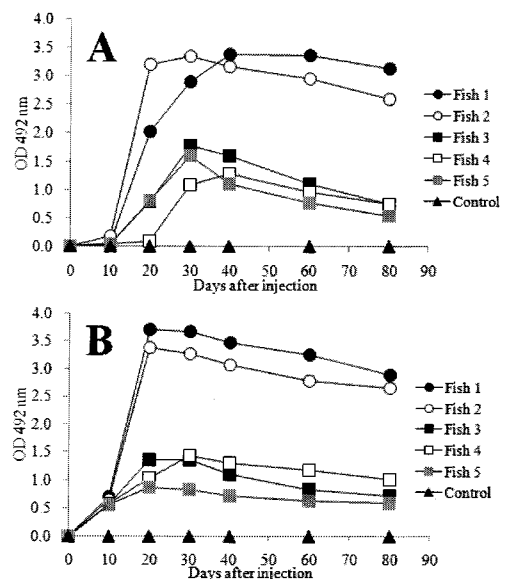
항체 검출 ELISA로 얻은 결과는 SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Ver. 18) 프로그램을 이용하여 ANOVA를 시행하였고, 사후분석으로 수온구간별 시간경과에 따른 항체가의 유의적인 차이를 확인하기 위해 Tukey test를 실시하였다 ($p < 0.05$).

결과 및 고찰

넙치 양식장에서 백신의 사용은 감염성 질병을 예방함에 있어 유용한 방법이지만 현재까지 백신의 투여시기와 방법, 투여농도 및 처리기간 등에 대해서는 불명확한 상태이며, 또한 사육환경 변화에 따른 백신의 영향을 조사한 연구는 부족한 실정이다. 본 연구에서는 백신을 넙치 양식 현장에 적용하기 위한 기초연구로서 항원의 투여방법 및 사육 환경 변화에 따른 넙치의 특이 항체 반응에 대한 영향을 검토하였다.

항원의 투여방법에 따른 항체 반응을 조사하기 위해 BSA를 넙치의 복강 및 근육에 주사 한 후 주기적으로 혈액을 취해 BSA에 대한 항체가를 측정하였다 (Fig. 2). 복강주사의 경우, 개체별로 차이를 보였으나 BSA 접종 후 10일째부터 특이 항체가를 나타내는 개체가 확인되었고 (OD값: 0.18), 30일~40일에는 모든 개체 (5개체)에서 가장 높은 항체가 (OD값: 1.29~3.38)가 관찰되었다 (Fig. 2A). 그 후 항체가는 천천히 떨어지기 시작하여 면역 80일째는 OD값이 0.53~3.13로 감소되었다. 근육주사의 경우, 모든 개체에서

면역 10일째부터 특이 항체가가 관찰되었고 (OD값: 0.55~0.7), 20일~30일에 가장 높은 항체가 (OD값: 0.87~3.67)가 관찰되었다 (Fig. 2B). 항체가는 20일과 30일을 기점으로 천천히 떨어지기 시작하였으며, 면역 80일째는 OD값이 0.59~2.89로 감소되었다. 대조구의 넙치에서는 모든 개체에서 BSA에 대한 항체가가 검출되지 않았다 (Fig. 2A, 2B). 복강주사와 근육주사 실험구를 대상으로 시간경과에 따른 항체가를 ANOVA로 분석한 결과에서는 항체형성 초기시점인 10일째에 서로 간에 유의적인 차이가 관찰되었으나 ($p < 0.05$), 20일 경과 후에는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다 ($p > 0.05$) (Fig. C). Ellis (1998)는 근육 주사법은 복강 주사법보다 약간 높은 항체가를 유도한다고 보고하였다. 본 연구에서도 근육 주사법이 복강 주사법보다 항체형성 초기시점에서 약간 높은 항체가를 나타냈으나 그 이후의 항체 반응에는 유의적인 차이가 관찰되지 않아, 넙치 양식 현장에서 백신을 투여하는 방법으로 근육 주사법뿐만 아니라 복강 주사법도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.



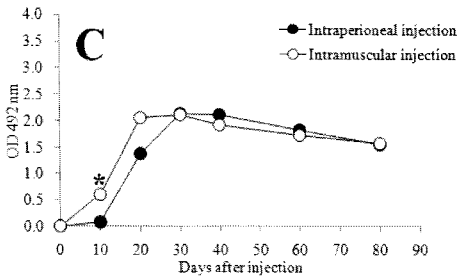


Fig. 2. Antibody titer of olive flounder against bovine serum albumin (BSA), immunized intraperitoneally (A) and intramuscularly (B) with 1 mg of BSA. Comparison of anti-BSA antibody titer between intraperitoneal injection and intramuscular injection (C) (mean; n=5). * significant difference ($p < 0.05$).

사육환경 변화에 따른 항체반응의 영향을 조사하기 위해 BSA를 면역시킨 넙치에 사육수온 변화, handling 및 중유에 노출시킨 후 주기적으로 혈액을 취해 BSA에 대한 항체가를 측정하였다 (Fig. 3). 급격한 수온하강의 경우, 1개체를 제외하고는 양성 대조구 (Fig. 2A)와 유사한 패턴의 항체가가 관찰되었다 (Fig. 3A). 면역 10일째부터 BSA에 대한 특이 항체가가 관찰되었고 (OD값: 0.26~0.31), 30일~40일에 가장 높은 항체가 (OD값: 1.84~3.62)가 나타났으며, 항체가는 약 40일을 기점으로 천천히 떨어지기 시작하여 면역 80일째는 0.94~3.16의 OD값이 관찰되었다. Handling의 경우, 모든 개체에서 면역 10일째부터 특이 항체가가 관찰되었고 (OD값: 0.35~0.84), 20일~40일에 가장 높은 항체가 (OD값: 2.5~3.74)가 관찰되었다 (Fig. 3B). 항체가는 약 30일을 기점으로 천천히 떨어지기 시작하였으며, 면역 80일째는 OD값이 1.97~3.42로 감소되었다. 중유에 노출된 경우는 면역 10일째까지 0.09 이하의 OD값이 관찰되었으나 30일~40일에는 가장 높은 항체가 (OD값: 0.95~2.98)가 관찰되었다 (Fig. 3C). 항체가는 약 30일을 기점으로 천천히 떨어지기 시작하였으며, 면역 80일째는 OD값이 0.65~1.75로

감소되었다. PBS를 면역시킨 대조구의 넙치에서는 모든 개체에서 항체가가 관찰되지 않았다 (Fig. 3A, 3B, 3C). 위의 실험구와 양성대조구를 대상으로 시간 경과에 따른 항체가를 ANOVA로 분석한 결과에서는 항체형성 초기시점인 10일째에 양성대조구와 수온하강 실험구 및 양성대조구와 handling 실험구의 항체가에 유의적인 차이가 관찰되었으나 ($p < 0.05$), 20일 경과 후에는 모든 실험구에서 유의적인 차이는 관찰되지 않았다 ($p > 0.05$) (Fig. 3D).

사육수온의 급격한 변화 및 중유에 노출된 넙치는 면역반응이 저하된다고 보고되어 있다 (Nakayama et al., 2008; Song et al., 2008; Yoon et al., 2010). Yoon et al. (2010)은 22°C에 사육중인 넙치에 포르말린으로 불활화시킨 *Edwardsiella tarda*를 면역시킨 후 12°C에서 사육한 결과, 특이 항체생성 세포 (specific antibody secreting cell)의 수가 급격히 감소하므로 고수온에서의 항체생성은 저수온에 노출됨에 따라 저하된다고 보고하였다. Nakayama et al. (2008)은 넙치에 중유를 노출 (3일 동안 3.8 g/L의 농도로 노출시킴)시킨 후 면역유전자의 발현을 조사한 결과, 중유는 면역반응과 관련된 유전자 (immunoglobulin light chain, CD45, major histocompatibility complex (MHC) class II antigens, macrophage colony-stimulating factor precursor)의 발현을 억제하므로, 중유에 노출된 넙치는 항체생성이나 항원제시 과정과 같은 면역 기능이 저하된다고 보고하였다. 또한 Song et al., (unpublished data)의 연구에 따르면 0.38 g/L의 중유에 2일간 노출된 넙치는 노출 초기에 immunoglobulin M의 유전자 발현이 감소하며, 혈청 내 항 세균 활성이 저하된다고 보고하였다. 넙치에서 handling 자극에 따른 항체반응에 대한 연구 결과는 현재까지 보고된바 없으나, handling에 의한 자극은 넙치에게 스트레스로 작용하여 체내 코티졸, 적혈구 용적 및 적혈구수가 증가한다고 보고

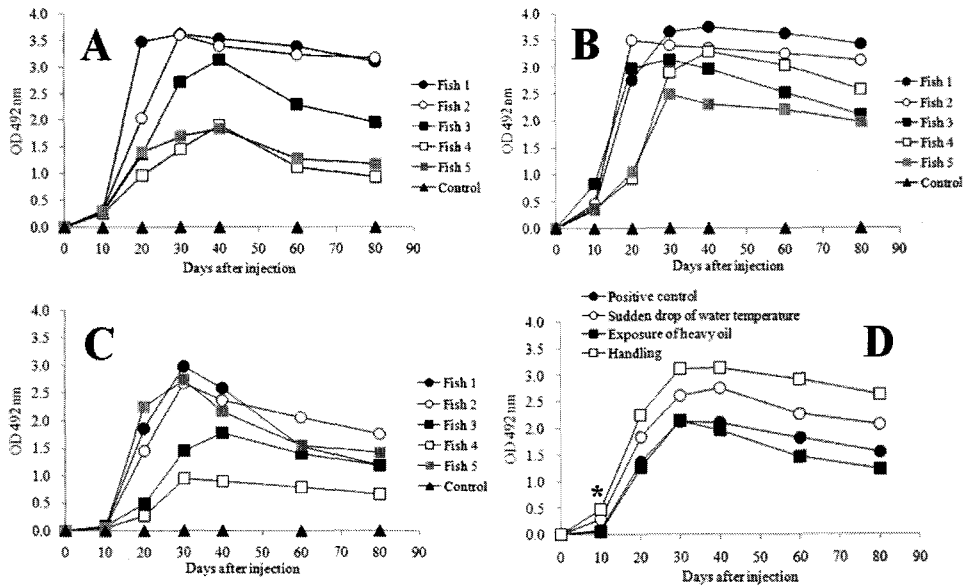


Fig. 3. Antibody titer of olive flounder exposed to different environmental conditions. Post immunizations with bovine serum albumin (BSA), fish were exposed to low water temperature (A), handling (B) and heavy oil (C). Comparison of anti-BSA antibody titer among above mentioned groups (D) (mean; n=5). * significant difference between positive control and sudden drop of water temperature or handling ($p < 0.05$).

되어 있어 (허 등, 2001), handling 자극은 면역능을 저하시킬 것으로 생각된다. 이와 같이 사육환경의 변화는 넙치의 면역능을 저하시킬 수 있다. 그러나 본 연구의 결과에서는 항체형성 초기시점에서 수온변화 및 handling 실험구에서 약간 높은 항체가 나타났으나 그 이후의 항체 반응에는 유의적인 차이가 관찰되지 않아, 본 연구에서 설정된 환경변화는 넙치의 특이 항체반응에 영향을 거의 끼치지 않는 것으로 확인되었다. 이상의 결과, 넙치 양식현장에서 백신은 일시적인 수온변화, 중유노출 및 handling에 의한 환경변화에서도 유용하게 사용 될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 백신을 넙치 양식 현장에 적용하기 위한 기초연구로서 항원의 투여방법 및 항원 투여

후 사육환경 변화에 따른 넙치의 특이 항체 반응에 대한 영향을 조사하였다. 항원의 투여방법에 따른 항체 반응을 조사하기 위해 넙치에 BSA를 복강 및 근육 주사한 후 주기적으로 혈액을 취해 BSA에 대한 항체를 측정하였다. 근육 주사법이 복강 주사법보다 항체형성 초기시점에서 약간 높은 항체를 나타냈으나 그 이후의 항체 반응에는 유의적인 차이가 관찰되지 않아, 백신을 투여하는 방법으로 근육 주사법뿐만 아니라 복강 주사법도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료되었다. 사육환경 변화에 따른 백신의 영향을 조사하기 위해 BSA를 면역시킨 넙치에 사육수온의 급하강, handling 및 중유에 노출시킨 후 항체를 측정하였다. 수온변화 및 handling 실험구가 양성 대조구보다 항체형성 초기시점에서 약간 높은 항체를 나타냈으나, 그 이후의 항체 반응에는 서로간의 유의적인 차이는 관찰되지 않아, 위의 환경

변화는 넙치의 특이 항체반응에 영향을 거의 끼치지 않는 것으로 확인되었다. 이상의 결과, 넙치 양식현장에서 백신은 일시적인 수온변화, 중유노출 및 handling에 의한 환경변화에서도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 2009년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원 (NRF-2009-351-F00019) 과 농림수산식품부 (과제번호20100643)의 지원을 받아 수행되었습니다.

참고문헌

- Barton, B.A. and Iwama, G.K.: Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 1: 3-26, 1991.
- Ellis, A.E.: *Fish Vaccination*, Academic Press, London, pp. 32-46, 1998.
- Engelsma, M.Y., Hougee, S., Nap D., Hofenk, M., Rombout, J.H.W.M., van Muiswinkel, W.B. and Lidy Verburg-van Kemenade, B.M.: Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish Shellfish Immunol.*, 15: 397-410, 2003.
- Hrubec, T.C., Robertson, J.L., Smith, S.A. and Tinker, M.K.: The effect of temperature and water quality on antibody response to *Aeromonas salmonicida* in sunshine bass (*Morone chrysops*×*Morone saxatilis*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 50: 157-166, 1996.
- Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P. and Schreck, C.B.: *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge University Press, New York, 1997.
- Kim, W.S., Kim, S.R., Kim, D.W., Kim, J.O., Park, M.A., Kitamura, S.I., Kim, H.Y., Kim, D.H., Han, H.J., Jung, S.J. and Oh, M.J.: An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Aquaculture*, 296: 165-168, 2009.
- Kim, W.S., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M.: Non-specific adsorption of fish immunoglobulin M (IgM) to blocking reagents on ELISA plate wells. *Dis. Aquat. Org.*, 78: 55-59, 2007.
- Kwon, S.R., Lee, E.H., Nam, Y.K., Kim, S.K. and Kim, K.H.: Efficacy of oral immunization with *Edwardsiella tarda* ghosts against edwardsiellosis in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 269: 84-88, 2007.
- Le Morvan, C., Troutaud, D. and Deschaux, P.: Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *J. Exp. Biol.*, 201: 165-168, 1998.
- Nakayama, K., Kitamura, S.I., Murakami, Y., Song, J.Y., Jung, S.J., Oh, M.J., Iwata, H. and Tanabe, S.: Toxicogenomic analysis of immune system-related genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to heavy oil. *Marine Poll. Bull.*, 57: 445-452, 2008.
- Newman S.G.: Bacterial vaccines for fish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 3: 145-185, 1993.
- Pickering, A.D.: Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture*, 100: 125-139, 1992.
- Seo, J.Y., Kim, K.H., Kim, S.G., Oh, M.J., Nam, S.W.,

- Kim, Y.T. and Choi, T.J.: Protection of flounder against hirame rhabdovirus (HIRRV) with a DNA vaccine containing the glycoprotein gene. *Vaccine*, 24: 1009-1015, 2006.
- Shin, G.W., Kim, Y.R., Shin, Y.S., Lee, E.G., Oh, M.J., Yoshida T. and Jung, T.S.: Purification of two different immunoglobulins (Igs) from olive flounder *Paralichthys olivaceus* and analysis of *Lactococcus garvieae* antigens by the Igs. *Fish Pathol.*, 42: 19-28, 2007.
- Snieszko, S.F.: The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish Biol.*, 6: 197-208, 1974.
- Song, J.Y., Nakayama, K., Murakami, Y., Jung, S.J., Oh, M.J., Matsuoka, S., Kawakami, H. and Kitamura, S.I.: Does heavy oil pollution induce bacterial diseases in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*?. *Marine Poll. Bull.*, 57: 889-894, 2008.
- Vinitancharat, S., Gravningen, K. and Greger, E.: Fish vaccines. *Adv. Vet. Med.*, 41: 539-550, 1999.
- Yoon, S.H., Hong S.H., Jeong, J.B. and Jeong, H.D.: Influence of temperature shifts on the kinetics of the specific antibody secreting cells in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 23: 9-16, 2010.
- 권문경, 방종득: 다양한 농도의 에드워드드 백신액에 대한 넙치 *Paralichthys olivaceus*의 침지 투여 효과. *한국어병학회지*, 17: 171-177, 2004.
- 김명석, 김경덕, 김강웅, 박명애, 김진우: 넙치 *Paralichthys olivaceus*에 투여된 *Edwardsiella tarda*와 *Streptococcus iniae*에 대한 혼합백신의 예방효과와 성장에 미치는 영향. *한국어병학회지*, 22: 327-334, 2009.
- 김위식, 장민석, 김종오, 김두운, 정성주, 김석렬, 박명애, 오명주: 넙치 혈청의 보존 조건이 ELISA 결과에 미치는 영향. *한국어병학회지*, 22: 167-172, 2009.
- 김위식, 장민석, 정성주, 김석렬, 박명애, 이정호, 명정인, 오명주: 수온에 따른 넙치의 특이 항체 반응. *한국어병학회지*, 24: 39-45, 2011.
- 변주영, 유민호, 전려진, 이형호, 정현도: Cadmium이 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 면역 반응에 미치는 영향. *한국어병학회지*, 14: 97-102, 2001.
- 오명주, 최태진: 양식산 넙치로부터 HRV-like Rhabdovirus의 분리. *한국어병학회지*, 11: 129-136, 1998.
- 장영진, 박명룡, 강덕영, 이복규: 양식넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 생리조건에 미치는 연속적인 수온 급강하의 영향. *한국수산학회지*, 32: 601-606, 1999.
- 조미영, 김명석, 권문경, 지보영, 최혜승, 최동림, 박경현, 이창훈, 김진도, 이주석, 오윤경, 이덕찬, 박신후, 박명애: 2005년부터 2006년 사이 우리나라 양식 넙치 *Paralichthys olivaceus*의 세균성 질병에 대한 역학조사. *한국어병학회지*, 20: 61-70, 2007.
- 조미영, 김명석, 최혜승, 박경현, 김진우, 박미선, 박명애: 양식 넙치 *Paralichthys olivaceus* 질병에 대한 통계적 고찰. *한국어병학회지*, 21: 271-278, 2008.
- 조미영, 이주석, 이덕찬, 최희정, 김진우: β -용혈성 *Streptococcus iniae* 포르말린 사균 백신에 대한 넙치의 면역 반응. *한국어병학회지*, 19: 73-82, 2006.
- 허준욱, 장영진, 임한규, 이복규: 양식어류의 선별과정중 수심감소와 어류의 수조이동에 따른 스트레스 반응. *한국수산학회지*, 34: 465-472, 2001.

Manuscript Received : March 10, 2011

Revised : July 28, 2011

Accepted : July 29, 2011