

# 톨트라주릴 합성유도체, *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide 근육 주사에 따른 넙치의 자연살해세포 (Natural killer cell) 활성 검사

박상협\*<sup>‡</sup> · 김정희\*<sup>‡</sup> · 도정완\*\* · 김아란\*\* · 김이경\*<sup>‡</sup>

\*강릉원주대학교 수산생명의학과, \*\*국립수산과학원 병리연구과

## Natural killer cell activity of olive flounder *Paralichthys olivaceus* following intramuscular injection of toltrazuril derivative *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide

Sang Hyup Park\*<sup>‡</sup>, Jung Eui Kim\*<sup>‡</sup>, Jeong-wan Do\*\*,  
Ah Ran Kim\*\* and Yi Kyung Kim\*<sup>‡</sup>

\*Department of Aquatic Life Medicine, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea

\*\*Pathology Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

This study assessed the impact of the toltrazuril derivative *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide on natural cytotoxic cell (NCC) activity of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* spleen. Five groups of fifteen olive flounder, comprising non-treatment and vehicle control groups, were randomly assigned. *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide was injected intramuscularly at doses of 120, 150 and 200 mg/kg body weight; a total of ten injections were given over the course of 30 days. The NK activity of flounder splenic cells was evaluated against YAC-1, mouse lymphoma cells or HINAE cells with a choice of co-cultivation times of 4 or 18 hrs. In case of YAC-1 co-culture we observed a significant increase in cytotoxicity at a dose of 200 mg/kg, up to 3.06 times more than that of the control group. Only the trial with the 4 hrs co-culture produced a significant difference in the HINAE cell experiment; the experimental group at the 200 mg/kg dose exhibited the maximum cytotoxicity, demonstrating 2.3 times more cytotoxicity than the control group. Furthermore, the expression level of IL-12b was markedly induced in the group with 200 mg/kg, which was 6.62 times greater than that of the control group. In terms of the altered NK cell activity, the repeated high doses of *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide can cause changes in the normal performance of immune function.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*, toltrazuril, NK cell activity

<sup>‡</sup>Corresponding author: Yi Kyung Kim  
Tel: +82-33-640-2409, Fax: +82-33-640-2955  
E-mail: yikyung1118@gwnu.ac.kr  
<sup>‡</sup>These authors contributed equally

## 서 론

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 중국, 일본 및 한국과 같은 국가에 널리 서식하며, 높은 경제적 가치와 빠른 성장으로 인하여 동아시아 국가의 양식 산업에서 가장 인기 있고, 상업적으로 중요한 어종이다(Alam et al., 2000; Kang et al., 2008; Li et al., 2019). 국내에서는 1990년대부터 본격적인 넙치의 양식 산업이 활성화되어 왔으며, 국내 넙치의 연간 양식 생산량은 1990년에 1,037 ton에서 2023년 약 40,000 ton으로 가파르게 증가하였다(KOSIS, 2023). 넙치 수요의 증가로 넙치 양식업이 빠르게 활성화되면서, 이전보다 더욱 높은 밀도의 양식장 환경이 조성되어 다양한 병원체의 발생이 증가하였으며, 이는 질병 발생의 결과로 이어졌다(Kim and Seung, 2020; Persson et al., 2022; Oh and Lee, 2024; Singh et al., 2024). 결과적으로 국내 양식 넙치는 질병으로 인한 폐사가 발생하며, 그 수치는 매년 총 양식 넙치 생산량의 25~30 %를 차지한다(Cho and Baik, 2023).

현재까지 쿠도아속(Genus *Kudoa*) 점액포자충은 95종이 보고되었고, 어류의 골격근, 뇌를 포함하여 거의 모든 조직에 기생한다(Sandeep et al., 1986; Mansour et al., 2013; Eiras et al., 2014). 이러한 점액포자충은 'jelly fish', '근육 용해' 상태로 알려진 숙주의 근육 점액화를 일으키고, 막대한 경제적 손실을 초래한다(Giulietti et al., 2022). 점액포자충 중에서도 *Kudoa septempunctata*에 의해 감염된 국내 양식 넙치가 일본으로 수출된 후 일본에서 식중독을 일으키는 원인으로 확인되었으며, 인체에 직접적인 병원성을 나타내는 것으로 보고되었다(Matsukane et al., 2010; Kawai et al., 2012).

톨트라주릴은 쥐, 닭, 토끼 등과 같은 대부분의 동물에서 효과적인 콕시디움증 치료제로 사용되어 왔으며, 현재도 가축들의 콕시디움증의 치료 및 예방에 널리 사용되고 있다(Haberkorn et al., 1983; Balicka-Ramisz, 1999; Maes et al., 2007; Mundt et al., 2007). 톨트라주릴은 점액포자충이 세포 내에 기생하는 생활사 단계에 작용하여 치료 효과를 보이며, 이 화학물질은 *K. septempunctata*를 포함한 다양한 점액포자충에 효과를 보이는 것으로 보고

되고 있다(Mehlhorn et al., 1984; Haberkorn, 1987; Mehlhorn et al., 1988; Athanassopoulou et al., 2004). 체내에 흡수된 톨트라주릴은 빠른 속도로 중간 대사산물인 톨트라주릴 설폭사이드(toltrazuril sulf-oxide)로 산화된 후, 톨트라주릴 설포(toltrazuril sulfone)으로 전환된다(Furr and Kennedy, 2000). 포나주릴(ponazuril)이라고도 불리는 이 톨트라주릴 설포는 기생충에서 미토콘드리아의 확장 및 소포체의 증가를 유도한다(Mehlhorn et al., 1984).

가축에서 효율적인 콕시디움증 치료제인 톨트라주릴은 큰가시고기(*Gasterosteus aculeatus*)와 같은 어류에서도 기생충 치료제로써 효과적인 것으로 보고되고 있다(Schmahl and Mehlhorn, 1989). 하지만 귀족 도미(*Sparus aurata*)를 대상으로 톨트라주릴을 경구 투여한 경우 간 조직의 괴사, 세뇨관 상피 세포 퇴화 및 사구체 확장 등의 조직병리학적 변화가 관찰되었고, 톨트라주릴이 기생충뿐 아니라 숙주인 어류에도 강한 독성을 나타내었다(Athanassopoulou et al., 2004). 이전 연구에서는 수생 생물인 넙치를 대상으로 하여 톨트라주릴의 독성을 감소시키고 점액포자충 치료제로 사용할 수 있는 효과적인 신규 합성 유도체를 개발하는 것이 필요하다고 판단하였고, 톨트라주릴 합성 유도체인 *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide를 합성하게 되었다(Korea. Patent No. 10-2234530, 2021). 이후 이 신규 화합물을 *K. septempunctata*에 처리하여 점액포자충 치료제로써의 효과를 검토하였고, 그 결과 포자의 생존율은 대조군과 비교하였을 때 31.2~46.9%의 수치를 보여 점액포자충 치료제로서의 가능성을 보여주었다(Korea. Patent No. 10-2234530, 2021).

중양 세포 및 바이러스에 감염된 세포를 죽일 수 있는 자연살해세포(Natural killer cell; NK cell)는 포유류 및 어류 세포주에 대하여 그 활성이 보고되었다(Meazza et al., 2011; Wang et al., 2015; Fang et al., 2017). NK cell은 항원 비특이적 반응을 일으켜 면역 체계의 중요한 역할을 하며, 질병으로부터 보호하기 위하여 직·간접적으로 여러 방어 메커니즘을 유도한다(Wendel et al., 2021). 일반적으로 NK cell은 major histocompatibility complex (MHC) 분자와 상관없이 표적 세포에 독성을 나타

낼 수 있는 과립 림프구로 알려져 있다(Thielens et al., 2012; Uzhachenko and Shanker, 2019). 또한 NK cell은 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor; TNF) 및 first apoptosis signal (FAS) pathway 등을 통하여 CD56 및 CD16 단백질의 발현을 유도함으로써 표적 세포를 제거한다(Cretney et al., 2002; Screpanti et al., 2005; Grudzien and Rapak, 2018). 이러한 작용 외에도 NK cell은 수지상 세포 및 T cell과 상호작용하여 면역반응을 나타내기도 한다(Moretta, 2002; Brandstadter and Yang, 2011; Waggoner et al., 2012; Jost and Altfeld, 2013; Cerwenka and Lanier, 2016). 뿐만 아니라 다양한 면역계 반응을 조절하는 인터페론 감마(interferon  $\gamma$ ; IFN -  $\gamma$ )를 분비한다(Schroder et al., 2004). IFN -  $\gamma$ 는 NK cell에 의해 분비되는 사이토카인으로, 분비된 이후 IFN -  $\gamma$ 는 다시 NK cell의 활성화 및 세포 독성을 촉진시키는 역할을 하며 feedback loop를 형성한다(Lehmann et al., 2001; Konjević et al., 2019; Lin et al., 2021).

수산용 동물용의약품등의 독성시험지침에는 수산용 동물용의약품 등의 제조 및 품목허가신청 등의 목적으로 실시되는 안전성 평가를 위한 독성 시험에 대하여 표준적인 실시방법이 제시되어 있다. 수산용 동물용의약품 등의 아급성 혹은 만성독성시험 결과 면역반응 이상이 의심되거나 수산용 동물용의약품이 생체 내에서 항원으로 작용할 수 있는 경우 면역계에 미치는 영향을 검사해야 하며, 이 중 하나가 면역독성시험이다(수산용 동물용의약품등 독성시험지침, 2021). 이전 마우스를 대상으로 새롭게 개발된 톨트라주릴 합성유도체 N-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide의 독성시험을 실시한 결과 독성을 나타내는 것으로 보고되었다(unpublished data). 본 연구는 N-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide의 넙치에 대한 독성을 평가하고, 안전성의 근거를 마련하기 위한 목적으로 진행되었다. 톨트라주릴 합성유도체에 대한 넙치의 면역독성시험의 9번째 항목인 면역독성검사 중 비특이적 세포매개성 면역시험을 진행하기 위해 30일간 넙치에 10회의 주사 투여한 후 NK cell의 활성화도 검사를 실시하였다. 또한 수산용 동물용 의약품 독성시험 지침서에 의하면 표적세포를 chromium-51 ( $^{51}\text{Cr}$ )로 표지 후 세포 용

해 시 방출되는 방사선량을 측정하여 NK cell의 활성을 검사하는  $^{51}\text{Cr}$  - release assay를 실시한다고 명시되어 있지만, 현재는 방사선 동위원소를 이용한 실험방법은 여러 제약이 따른다(수산용 동물용의약품등 독성시험지침, 2021). 이를 대체할 수 있는 방법으로 세포질 내에서 세포가 죽거나 세포막이 손상된 경우 세포 밖으로 유출되는 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase; LDH)를 측정하는 방법을 선택하였다. LDH - release assay는 민감도가 높은 실험방법이기에 충분히  $^{51}\text{Cr}$  - release assay를 대체할 수 있는 방법으로 통용되고 있으며, 어류를 대상으로 하는 세포독성 연구에서도 사용되는 실험방법이다(Broussas et al., 2013; Figueiredo et al., 2021; Małaczewska et al., 2021).

본 연구는 N-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide을 반복투여한 넙치의 비장으로부터 분리한 세포와 쥐의 임파종 cell인 YAC-1 cell 혹은 넙치 HINAE cell과 공배양하여, 서로 다른 유래의 표적세포에 대한 NK cell의 독성 및 차이를 분석하였고, 수생동물의 면역독성시험 분석방법을 제안하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

충청남도 태안군의 개인 양식장에서 구매된 넙치( $78.53 \pm 4.6$  g,  $21.63 \pm 0.5$  cm)는 강릉원주대학교 해양과학교육원으로 옮겨져 우수식 수조(7.5 ton)에 약 2주간 적응시켰다. 적응이 끝난 넙치는 총 20개의 수조(40 L)에 각각 7마리씩 옮겨졌으며 실험에는 총 140마리의 넙치가 사용되었다. 실험이 진행되는 동안 수온은  $20.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$ , 용존 산소는  $8.1 \pm 0.3$  mg/L였고 사료는 시판되는 넙치용 사료(Suhyp, Korea)를 하루에 1번 어체중의 1%로 공급하였다. 본 실험은 강릉원주대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인 하에 실시하였다(Approval No. GWNU-2023-10).

### 시험용량 설정 및 처치

실험에 사용한 N-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methyl-

phenyl) acetamide 투여 용량은 *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide의 급성독성시험(unpublished data; 넙치를 대상으로 *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide를 근육주사한 결과, lethal dose LD<sub>10</sub> = 112.565 mg/kg, LD<sub>50</sub> = 216.114 mg/kg) 및 Park et al. (2023)의 실험방법을 근거하여, FDA 가이드라인에 준하여 임상 반응의 시작 용량인 LD<sub>10</sub> 값에 준한 5개의 대조군 및 실험군을 설정하였다[무처치군, 용매 대조군, 투여 실험군 (120, 150, 200 mg/kg)]. *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide는 dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA)에 녹여 사용하였으며, 용매 대조군은 실험군과 동량의 DMSO를 주사투여하였다. 용매 대조군 및 실험군은 각각 DMSO 및 *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide 100 µl를 1 ml 주사기(Kovax, Korea)로 복강 주변 근육 2곳에 나누어 근육주사 투여하였다. 주사 투여 시 어류가 받을 수 있는 스트레스를 최소화하기 위하여 100 µl/L 농도의 2-phenoxyethanol (JUNSEI, Japan)을 이용하여 마취시킨 후 진행하였다.

*N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide 투여 후 넙치의 NK cell 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 40 L 수조 20개에 무작위로 7마리씩 나누어 실험을 진행하였고, 3일에 1회, 30일 동안 총 10회의 주사를 투여하였다. 투여 종료 24시간 후 넙치는 100 µl/L 농도의 2-phenoxyethanol을 이용하여 마취시켰고 무균적으로 비장을 적출하였다. 적출한 비장은 Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Gibco, USA), 0.1% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, USA), 0.1% antibiotic-antimycotic (Gibco, USA)를 혼합한 배지에 넣어 분석 전까지 4°C에 보관하였다.

Real-time PCR 분석을 위하여 비장을 적출한 동일 개체로부터 두신 조직을 적출하였고, 분석 전까지 -80°C에서 보관하였다.

## 표적 세포 배양

### 1) 표적세포

본 연구에서 표적세포로 YAC-1 cell 및 HINAE cell 2가지를 사용하였고, 각 cell은 한국세포주은행(Korea Cell line Bank, Korea)과 국립수산과학원

에서 분양받았다.

### 2) 배지

YAC-1 cell은 액체질소 탱크에 보관 후 실험을 진행하기 5일 전에 배양을 시작하였다. 배지는 RPMI 1640에 1% FBS와 0.1% Penicillin-Streptomycin (Gibco, USA)를 혼합하여 사용하였으며 CO<sub>2</sub> 배양기(Panasonic Healthcare Co., Japan)에서 5%의 CO<sub>2</sub>를 공급하여 37°C에 배양하였다. 배양된 YAC-1 cell은 멸균된 phosphate buffer saline (PBS) (Gibco, USA)로 세척한 후 계대 배양을 진행하였다. HINAE cell은 Leibovitz's L-15 (Gibco, USA)와 10% FBS 그리고 1% antibiotic-antimycotic (Gibco)를 혼합한 배지를 사용하여 저온 배양기(Sanyo, Osaka, Japan)에서 20°C에 배양하였다. 배양된 세포들은 Myco Alert Mycoplasma Detection kit (Takara, Japan)를 사용하여 cell의 오염 여부를 확인하였다.

### 비장세포의 분리 및 배양

*N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide 주사 투여 종료 후 24시간 되는 시점에서 구간당 무작위로 3마리를 선별하여 비장을 적출하였다. 비장은 Cell Strainer 40 µm (SPL, Korea)을 이용하여 균질화하였다. 이어서 적혈구를 제거하기 위해 1 × RBC Lysis buffer (Invitrogen, USA)를 첨가하여 상온에 5분 동안 반응한 후 멸균된 PBS로 세척하였다. 비장 세포는 phenol red-free RPMI 1640에 0.1% FBS와 0.1% antibiotic-antimycotic이 포함된 배지에 현탁하고 0.4% Trypan blue solution (Gibco, USA)로 세포의 생존 정도를 확인한 후 2 × 10<sup>6</sup> cell/ml로 희석되었다. 희석된 비장 세포들은 96 well cell culture plate (SPL, Korea)에 100 µl씩 분주한 후 1시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기(Panasonic)에서 5%의 CO<sub>2</sub>를 공급하며 22 °C에 배양되었다. HINAE cell과 배양할 비장 세포는 상기와 동일 조건에서 균질화되어 Leibovitz's L-15에 2% FBS와 1% antibiotic-antimycotic를 혼합한 배지에 희석하고 저온 배양기(Sanyo, Japan)에 20°C에서 1시간 동안 배양되었다.

### 넙치의 NK cell 세포독성

NK cell의 세포독성 여부를 확인하기 위하여 NK

cell이 암세포의 일종인 YAC-1 cell을 공격하여 파괴된 YAC-1 cell로부터 유리된 LDH를 측정하는 방법(modified lactate dehydrogenase [LDH] release assay)를 이용하였다. 표적세포로 사용할 YAC-1 cell과 HINAE cell은 세포 수가  $4 \times 10^4$  cell/ml 되도록 조정하고 준비한 비장세포와 같이 배양하였다. 최종적으로 effector-to-target 세포 비율이 50:1이 되도록 하였다. 배양 시간과 배양 온도는 수산용 동물용의약품 독성시험 방법 및 문헌(Sandra et al., 2000; Heichler and Wolf, 2022)를 근거하여 각각 4시간 및 18시간, 20~22°C에서 진행하였다. 비장세포와 YAC-1 cell 공배양은 22°C, 5%의 CO<sub>2</sub>가 포함된 CO<sub>2</sub> 배양기(Thermo Scientific, USA)에, HINAE cell을 사용한 공배양은 저온 배양기에서 20°C에서 배양하였다. 배양이 완료된 후 LDH release assay는 Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA)를 사용하여 진행하였으며 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, USA) 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 다음과 같은 공식을 사용하여 세포독성의 백분율로 나타내었다.

% Cytotoxicity

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

### Real-time PCR analysis

본 연구에서는 N-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide를 투여한 후 넙치의 두신 조직에서 NK cell 활성을 증가시키는 사이토카인, Interleukin-12b (IL-12b) 발현을 평가하기 위하여 real-time PCR을 실시하였다. 넙치의 두신에서 total RNA를 추출하기 위해 RNAiso Plus (Takara, Japan)을 사용하였고, Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific, USA)으로 total RNA를 정량하여, 모든 샘플의 2 µg total RNA로부터 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara, Japan)을 사용하여 cDNA로 역전사하였다.

Real-time PCR은 TB Green qPCR Premix (Takara, Japan)과 Thermal Cycler Dice real-time System II (Takara, Japan)를 사용하여 두신에서의 유전자 발현량을 확인하였고, 다음과 같은 프라이머를 사용

하였다: IL-12b FW, 5'-CCATTTACAGACGTTTGC-3'; IL-12b RV, 5'-GTCAAATGTTTGGATCCTCG-3'; EF1α FW, 5'-CGTGAGCGTGGTATCACCAT-3'; EF1α RV, 5'-AGCCGATCTTCTTGATGTAG-3'. Real-time PCR 조건은 초기 변성으로 95°C 30초간 1cycle, 95°C 5초, 60°C 30초로 40 cycles로 진행하였다. 각 유전자의 Ct 값은 Livak and Schmittgen (2001)이 사용한  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  방법으로 분석하였다. 이때 reference gene은 elongation factor 1α (EF1α)를 사용하였다.

### 통계분석

본 연구에서 통계분석은 SPSS 25.0 software (SPSS Inc., USA)를 사용하여 분석하였다. 모든 실험의 데이터는 mean ± standard error로 나타내었고, 대조군 및 실험군 사이의 유의미한 차이는 사후 분석을 위한 one-way ANOVA test 및 Tukey's HSD를 사용하여 결정하였다( $p < 0.05$ ).

## 결과 및 고찰

공배양 4시간 후 표적세포인 YAC-1 cell에서 유리된 LDH로 분석한 비장 세포의 NK cell 세포독성 능력은 무처치군에서 11.1%, 용매대조군에서 27.8%, 120 mg/kg 실험군에서는 14.6%, 150 mg/kg에서 6.3%의 세포독성을 보였다(Fig. 1-A). 그리고 가장 높은 용량 실험군인 200 mg/kg 용량 실험군에서는 29.9%로 무처치군과 비교하였을 때 약 2.7배 높은 세포 독성을 나타내었다. 비장세포와 YAC-1 cell을 18시간 동안 공배양한 경우 4시간 배양 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 가장 높은 용량인 200 mg/kg 실험군에서 75.4%로 무처치군과 비교하여 3.06배 높은 세포독성을 나타내었다(Fig. 1-B). HINAE cell을 target cell로 사용하여 4시간 동안 공배양 후 무처치군은 27.1%, 용매대조군과 2개의 실험군은 37.5% 및 39.6% 수치를 나타내었으며 200 mg/kg 실험군에서는 62.5%로 무처치군과 비교하여 2.3배 높은 세포독성을 보였다(Fig. 1-C). HINAE cell을 사용하여 18시간 공배양한 경우는 모든 대조군 및 실험군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 1-D).

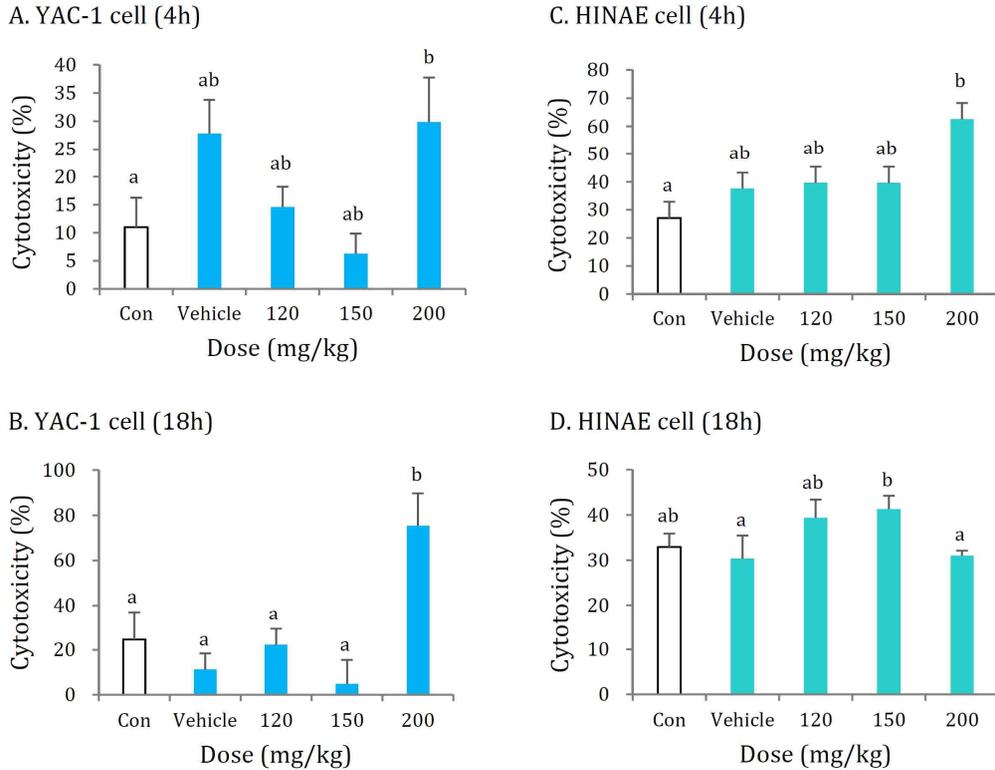


Fig. 1. The percentage of splenic NK cells with cytotoxic activity in flounder showed that the values are dependent on the *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide injection dose. Olive flounder was treated with *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide or DMSO once every three days for 30 days. Spleens were isolated after 24 h from the last injection and cocultured with YAC-1 or HINAE target cells to assess NK cell cytotoxicity using LDH release assay. A bar graph was used to demonstrate the differences in cytotoxicity level when splenic NK cells were cocultured with YAC-1 or HINAE target cells in a ratio of 50:1. Data represent mean  $\pm$  standard error ( $n = 3$ ); means with the same or different letter are not significantly ( $p > 0.05$ ) or are significantly ( $p < 0.05$ ) different, respectively.

본 연구에서는 마지막 주사 투여 후 24시간 시점에서 *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide의 LD<sub>50</sub> 유사 값인 200 mg/kg 용량 실험군이 배양 시간과 관계 없이 가장 높은 세포 독성을 나타내었다. 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)에 레바미졸이 첨가된 사료(50, 100, 300 mg/kg)를 12일간 급이하고, 그 이후에는 일반 사료를 급이한 결과 100 및 300 mg/kg 투여군에서 쥐의 임파종 세포인 L-1210에 대한 NK cell의 활성이 12일간의 급이 종료 후 즉시 증가하였고, 이는 8주차까지도 유지되었다(Park et al., 2012). 잉어(*Cyprinus carpio*)에 중금속인 MnCl<sub>2</sub>를 40, 80, 120  $\mu$ g/g의 용량으로 복

강 내 단회 투여하였을 때, 80 및 120  $\mu$ g/g 투여군에서 YAC-1 cell에 대한 NK cell의 활성이 유의하게 증가하였다(Ghanmi et al., 1990). 귀족 도미(*S. aurata*)를 대상으로 하여 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/ml의 viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)를 복강 내 주입한 후 NK cell의 활성을 평가하였고, 그 결과 대조군과 비교하여 바이러스가 주입된 48시간이 경과된 시점에서 쥐의 임파종 세포인 L-1210에 대한 높은 NK cell 활성이 보고되었다(Esteban et al., 2008). 마우스를 대상으로 카드뮴에 대한 NK cell의 활성을 평가하기 위하여 식수에 카드뮴을 10 ppm 농도로 희석하여 3개월간 섭취시켰고, 표적세포로는

YAC-1 cell, 쥐의 폐암종 세포인 3LL cell, 쥐의 흑색종 세포인 B16-F10 cell, 쥐의 대장암 세포인 CT26 cell을 사용하였다. 결과 카드뮴을 섭취한 실험군에서 YAC-1 cell을 포함하여 실험에 사용된 모든 표적 세포에 대한 NK cell의 활성이 유의하게 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 카드뮴이 JAK3/STAT5 신호 전달을 증가시켜 NK cell 활성을 자극했다고 보고하였다(Zhang et al., 2023).

NK cell은 면역 방어기전에 중요한 부분을 차지하며 특별한 항원에 의한 면역기전에 관여하는 T 림프구와 B 림프구와 달리 병원체에 감염된 세포들을 자발적으로 공격하는 세포독성을 나타내 표적세포를 살해하여 개체를 보호하는 역할을 한다. 포유류 NK cell은 급성 스트레스에 의하여 그 활성이 증가하고, 만성 스트레스에 의해서는 그 활성이 반대로 감소한다(Kiecolt-Glaser et al., 1992; Whiteside and Friberg, 1998; Sato et al., 2002). 본 연구와 이전 연구 결과에서는 어류에서 급성 및 만성 스트레스에 대해 NK cell의 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Ghanmi et al., 1990; Esteban et al., 2008; Park et al., 2012). 톨트라주릴 합성유도체인 N-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide의 투여로 인해서 어류 NK cell을 포함한 초기 선천성 면역체계가 이에 반응하였다는 것을 보여주는 것으로 판단된다.

IL-12는  $\alpha$  사슬과  $\beta$  사슬로 구성되어 있는 이종 이량체(heterodimer) 사이토카인으로, 주로 항원제시세포(antigen presenting cell)에 의해 생성된다(Wang et al., 2014). IL-12는 일반적으로 T 세포와 NK cell을 자극하여 IFN- $\gamma$ 를 생산하는 단백질로 알려져 있어, NK cell활성을 뒷받침하는 지표 중 하나로 사용된다(Kim et al., 2013; Parihar et al., 2002; Norouzinia et al., 2018; Shemesh et al., 2022). 또한 IL-12는 어류 선천 면역계의 중요한 구성요소이며, 면역 반응의 많은 부분을 조절하는 중요한 역할을 한다(Vignali and Kuchroo, 2012).

본 연구에서 넙치 두신 조직 내의 IL-12b 유전자 발현량을 비교·분석하였다. 150 mg/kg 및 200 mg/kg 실험군에서 대조군 및 실험군과 비교하여 유의적인 증가를 나타내었으며 (Fig. 2). 특히, 200 mg/kg 실험군의 경우 대조군과 비교하였을 때 6.62배

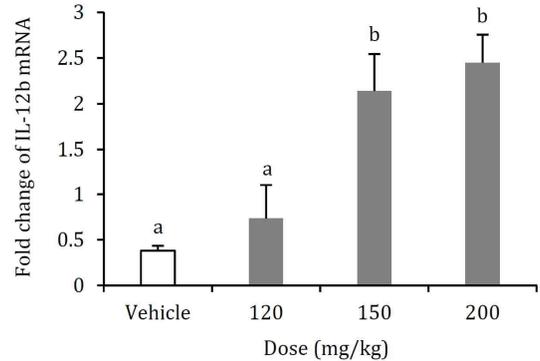


Fig. 2. Real-time PCR analysis of cytokine (IL-12b) mRNA expression in the head kidney of control and N-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide-treated (120, 150, 200 mg/kg) olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Gene expression levels are presented relative to EF1 $\alpha$  mRNA expression. Data represent mean  $\pm$  standard error (n = 3); means with the same or different letter are not significantly ( $p > 0.05$ ) or are significantly ( $p < 0.05$ ) different, respectively.

높은 발현량을 나타내었다. 귀족 도미(*S. aurata*)를 대상으로 하여 장내에 인위적으로 기생충(*Enteromyxum leei*)을 감염시킨 경우 IL-12b mRNA의 발현량이 대조군과 비교하여 유의하게 증가하는 것을 확인하였고, IL-12b의 상향 조절은 비특이적 세포 독성 세포(NK cell)의 활성화를 통하여 외부 항원에 대한 초기 세포 반응을 나타낸 것이라고 보고하였다(Pérez-Cordón et al., 2014). 또한 *Vibrio harveyi*에 감염시킨 점농어(*Lateolabrax maculatus*)의 두신에서 IL-12b의 발현량이 증가하였고, 이는 IL-12b에 의하여 박테리아 감염에 대한 보호 작용이 일어난 것이라고 보고하였다(Chen et al., 2018). 본 실험의 real-time PCR 결과는 이전 연구 보고와 일치하며, 넙치 내에서 N-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide에 대한 면역반응으로 IL-12b에 의하여 NK cell의 활성화가 유도된 것이라고 판단하였다.

수산용 동물용의약품 등의 제조 및 품목허가신청 등의 목적으로 실시되는 안전성 평가에서 아급성 혹은 만성독성시험 결과 면역반응 이상이 의심되거나 생체 내에서 항원으로 작용할 수 있는 경우 면역계에 미치는 영향을 검토해야한다고 게재되

어 있다(수산용 동물용의약품등 독성시험지침, 2021). 본 연구에서는 톨트라주릴 합성유도체인 *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide에 대한 넙치의 면역독성시험 중 비특이적 세포매개성 면역시험을 진행하기 위해 주사 투여한 후 NK cell의 활성화도 검사를 실시하였다. 실험을 진행하는 기간 동안 무처치군, 용매대조군 및 모든 실험구간에서 폐사하는 개체는 발생하지 않았다. 실험에 사용한 YAC-1 cell 및 HINAE cell 모두 고용량의 *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide에 의하여 NK cell의 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 추가적으로 넙치의 두신 조직 내에서 T 세포와 NK cell을 자극해 IFN- $\gamma$ 를 생성하는 단백질로, NK cell 활성화의 biomarker 중 하나인 IL-12b도 고용량인 200 mg/kg 실험군에서 높은 발현량을 보였다. NK cell은 선천면역을 담당하는 주요세포로서 표적세포(종양세포)를 인지하여 결합을 유도하고 독성과립들을 표적세포에 전달하여 종양세포의 세포 사멸을 유도하거나 다른 면역세포의 활성화에 기여한다(Biron et al., 1999). 또한, NK cell의 활성화는 생체외물(xenobiotics)뿐 아니라 스트레스, 신경 전달 물질 등에 영향을 받아 체내 면역 반응을 조절하게 된다(Cederbrant et al., 2003; Capellino et al., 2020). 결론적으로 LD<sub>50</sub> 값인 200 mg/kg 용량의 *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide의 연속적인 투여로 인하여 넙치의 NK cell이 활성화되어 종양세포인 YAC-cell 혹은 HINAE cell을 사멸시킨 것으로 판단되었다.

본 연구에서는 수산용 동물용의약품 등의 독성 시험 지침에 면역독성시험, 비특이적 면역반응시험을 수행할 결과 넙치의 비장 세포를 YAC-1 cell과 18시간 공배양한 실험과 HINAE cell과 4시간 공배양 한 실험에서 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 수산용 동물용의약품에 대한 면역독성시험을 시행할 경우는 NK cell의 활성을 측정하기 위한 target cell로서 YAC-1 cell 뿐 만 아니라 실험에 사용되는 동물과 동일 종 유래 세포를 사용하는 것을 제안하고자 하며, 연구자들은 수산동물 실험 모델의 특성에 맞춰 최적의 조건을 설정할 수 있고, 이는 연구 결과의 신뢰성과 일관성을 향상시킬 것으로 기대된다.

## 요 약

본 연구에서는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서 *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide 주사 투여에 따른 넙치 비장의 NK cell 활성을 평가하기 위하여 120, 150, 200 mg/kg 용량으로 설정하고 3일에 1회, 30일 동안 총 10회의 주사를 투여하였다. 표적세포(Target cell)로는 쥐의 임파종 세포인 YAC-1 cell과 넙치의 HINAE cell을 사용하였고, 넙치 비장의 NK cell과의 공배양 시간은 4시간과 18시간을 선정하여 실험을 실시하였다. YAC-1 cell을 사용하여 실험의 경우 4시간과 18시간 공배양 실험 모두 200 mg/kg 용량 구간의 실험군에서 가장 높은 세포독성을 대조군 대비 최대 3.06배 높은 세포독성을 보였다. HINAE cell을 사용한 실험의 경우 4시간 공배양한 실험에서만 유의적인 차이를 보였으며, YAC-1 cell과 마찬가지로 200 mg/kg 용량 구간의 실험군에서 가장 높은 세포 독성을 보여 대조군 대비 2.3배 높은 세포독성을 보였다. 추가적으로 넙치의 두신 조직에서 IL-12b의 발현량을 확인하였고, 세포독성 실험과 일치하는 결과를 보였고, 200 mg/kg 용량 구간의 실험군에서 가장 높은 발현량을 보여 대조군과 비교하여 6.62배 높은 수치를 보였다. 이러한 결과는 *N*-(4-(4-Fluorophenoxy)-3-methylphenyl) acetamide가 넙치의 NK cell 활성화에 영향을 줄 수 있다는 것을 보여준다.

## 사 사

이 논문은 국립수산과학원(P2023202, 넙치쿠도 아충 저감화 연구)의 지원에 의해 진행되었음.

## References

- Ai, L., Sun, H., Wang, F., Chen, R. and Guo, C.: Determination of diclazuril, toltrazuril and its two metabolites in poultry tissues and eggs by gel permeation chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B*, 879 (20), 1757-1763, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jchr.omb.2011.04.021>.
- Alam, M.S., Teshima, S.I., Ishikawa, M. and Koshio, S.: Methionine requirement of juvenile Japanese

- flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31(4), 618-626, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2000.tb00911>.
- Athanassopoulou, F., Karagouni, E., Dotsika, E., Ragias, V., Tavla, J., Christofiloyanis, P. and Vatsos, I.: Efficacy and toxicity of orally administrated anticoccidial drugs for innovative treatments of *Myxobolus* sp. infection in *Puntazzo puntazzo*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62(3), 217-226, 2004. <https://doi.org/10.3354/dao062217>.
- Balicka-Ramisiz, A.: The influence of coccidiostats on the course of coccidiosis and production results in an industrial rabbit farm. *Wiadomosci Parazytologiczne*, 45(2), 193-198, 1999.
- Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P. and Salazar-Mather, T.P.: Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual review of immunology*, 17(1), 189-220, 1999. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.189>.
- Brandstadter, J.D. and Yang, Y.: Natural killer cell responses to viral infection. *Journal of innate immunity*, 3(3), 274-279, 2011. <https://doi.org/10.1159/000324176>.
- Broussas, M., Broyer, L. and Goetsch, L.: Evaluation of antibody-dependent cell cytotoxicity using lactate dehydrogenase (LDH) measurement. *Glycosylation Engineering of Biopharmaceuticals: Methods and Protocols*, 305-317, 2013. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-327-5\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-327-5_19).
- Cerwenka, A. and Lanier, L.L.: Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nature Reviews Immunology*, 16(2), 112-123, 2016. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.9>.
- Chen, X., Wang, P., Zhao, C., Yan, L., Lin, H. and Qiu, L.: Molecular characterization and functional analysis of IL-12p40 from Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*) under biotic and abiotic stresses. *Fish & shellfish immunology*, 83, 373-385, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.038>.
- Cho, K.W. and Baik, R.: Performance Analysis of Deep Learning-based *Paralichthys Olivaceus* Disease Symptom Classification Model. *The Journal of the Korea Contents Association*, 23(12), 96-106, 2023. <https://doi.org/10.5392/JKCA.2023.23.12.096>.
- Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J.J. and Smyth, M.J.: Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *The Journal of Immunology*, 168(3), 1356-1361, 2002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.3.1356>.
- Eiras, J.C., Saraiva, A. and Cruz, C.: Synopsis of the species of *Kudoa* Meglitsch, 1947 (Myxozoa: Myxosporaea: *Multivalvulida*). *Systematic Parasitology*, 87, 153-180, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11230-013-9461-4>.
- Giulietti, L., Nedberg, H.J., Karlsbakk, E., Marathe, N.P., Storesund, J.E., Mæhle, S. and Levsen, A.: Distribution of *Kudoa* thrypsites (Cnidaria, Myxozoa) myoliquefactive stages in Northeast Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) inferred from qPCR and histology. *Parasitology Research*, 121(8), 2325-2336, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07575-8>.
- Esteban, M.Á., Meseguer, J., Tafalla, C. and Cuesta, A.: NK-like and oxidative burst activities are the main early cellular innate immune responses activated after virus inoculation in reservoir fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(4), 433-438, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.07.001>.
- Fang, F., Xiao, W. and Tian, Z.: NK cell-based immunotherapy for cancer. In *Seminars in immunology* (Vol. 31, pp. 37-54). Academic Press, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.07.009>.
- Figueiredo, N., Matos, B., Diniz, M., Branco, V. and Martins, M.: Marine fish primary hepatocyte isolation and culture: new insights to enzymatic dissociation pancreatin digestion. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(4), 1380, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijerph18041380>.
- Furr, M. and Kennedy, T.: Cerebrospinal fluid and blood concentrations of toltrazuril 5% suspension in the horse after oral dosing. *Veterinary therapeutics: research in applied veterinary medicine*, 1(2), 125-132, 2000.
- Grudzien, M. and Rapak, A.: Effect of natural compounds on NK cell activation. *Journal of Immunology Research*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4868417>.
- Haberhorn, A.: Studies on the activity spectrum of toltrazuril, a new anticoccidial agent. *Veterinary Medical Review*, 1, 22-32, 1987. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1988.tb00478.x>.
- Haberhorn, A., Friis, C.W., Schulz, H.P., Meister, G. and Feller, W.: Control of an outbreak of mouse coccidiosis in a closed colony. *Laboratory animals*, 17(1), 59-64, 1983. <https://doi.org/10.1258/002367783781070803>.
- Heichler, C., and Wolf, P.: DETERMINE THE OPTIMAL AMOUNT OF CELL-TAK TO IMMOBILIZE

- SUSPENSION CELLS FOR FURTHER ANALYSIS ON THE CYRIS® PLATFORM., 2022.
- Jost, S. and Altfeld, M.: Control of human viral infections by natural killer cells. *Annual review of immunology*, 31, 163-194, 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100001>
- Jung, S.H.(2021). Korea. Patent No. 10-2234530. Busan: National Institute of Fisheries Science.
- Kang, J.H., Kim, W.J. and Lee, W.J.: Genetic linkage map of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *International Journal of Biological Sciences*, 4(3), 143, 2008. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4.143>.
- Kawai, T., Sekizuka, T., Yahata, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y. and Ohnishi, T.: Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. *Clinical Infectious Diseases*, 54(8), 1046-1052, 2012. <https://doi.org/10.1093/cid/cir1040>.
- Kiecolt-Glaser, J.K., Cacioppo, J.T., Malarkey, W.B. and Glaser, R.: Acute psychological stressors and short-term immune changes: What, why, for whom, and to what extent?. *Psychosomatic medicine*, 54(6), 680-685, 1992. <https://doi.org/10.1097/00006842-199211000-00008>.
- Kim, D., Beck, B.R., Heo, S.B., Kim, J., Kim, H.D., Lee, S.M. and Song, S.K.: Lactococcus lactis BFE920 activates the innate immune system of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), resulting in protection against *Streptococcus iniae* infection and enhancing feed efficiency and weight gain in large-scale field studies. *Fish & shellfish immunology*, 35(5), 1585-1590, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.008>.
- Kim, D.H. and Seung, C.K.: Economic contributions of wild fisheries and aquaculture: A social accounting matrix (SAM) analysis for Gyeong-Nam Province, Korea. *Ocean & coastal management*, 188, 105072, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2019.105072>.
- Konjević, G.M., Vuletić, A.M., Martinović, K.M.M., Larsen, A.K. and Jurišić, V.B.: The role of cytokines in the regulation of NK cells in the tumor environment. *Cytokine*, 117, 30-40, 2019.
- KOSIS. Korean Statistical Information Service. Daejeon, Korea, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.02.001>.
- Lehmann, C., Zeis, M. and Uharek, L.: Activation of natural killer cells with interleukin 2 (IL-2) and IL-12 increases perforin binding and subsequent lysis of tumour cells. *British journal of haematology*, 114(3), 660-665, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.02995.x>.
- Li, Y., Yang, Y., Zheng, W. and Cheng, J.: Genetic parameters and genotype by environment interactions for growth traits and survival of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in recirculating aquaculture system and flow-through system. *Aquaculture*, 510, 56-60, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.043>.
- Lin, Q., Rong, L., Jia, X., Li, R., Yu, B., Hu, J. and Huang, J.D.: IFN- $\gamma$ -dependent NK cell activation is essential to metastasis suppression by engineered Salmonella. *Nature communications*, 12(1), 2537, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22755-3>.
- Maes, D., Vyt, P., Rabaeys, P. and Gevaert, D.: Effects of toltrazuril on the growth of piglets in herds without clinical isosporosis. *The Veterinary Journal*, 173(1), 197-199, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.07.002>.
- Małaczewska, J., Kaczorek-Lukowska, E. and Kazań, B.: High cytotoxicity of betulin towards fish and murine fibroblasts: Is betulin safe for nonneoplastic cells?. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 198, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02905-x>.
- Mansour, L., Thabet, A., Chourabi, K., Harrath, A.H., Gtari, M., Al Omar, S.Y. and Ben Hassine, O.K.: *Kudoa azevedoi* n. sp.(Myxozoa, *Multivalvulida*) from the oocytes of the Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* (Perciformes, Carangidae) in Tunisian coasts. *Parasitology Research*, 112, 1737-1747, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3332-4>.
- Matsukane, Y., Sato, H., Tanaka, S., Kamata, Y., & Sugita-Konishi, Y.: *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea: *Multivalvulida*) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. *J. Parasitol. Res.*, 107, 865-872, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1941-8>.
- Meazza, R., Azzarone, B., Orenzo, A. M. and Ferrini, S.: Role of common-gamma chain cytokines in NK cell development and function: perspectives for immunotherapy. *BioMed Research International*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/861920>.
- Mehlhorn, H., Ortmann-Falkenstein, G. and Haberkorn, A.: The effects of sym. Triazinones on developmental stages of *Eimeria tenella*, *E. maxima* and *E. acervulina*: a light and electron microscopical study. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 70, 173-182, 1984. <https://doi.org/10.1007/bf00942219>.

- Mehlhorn, H., Schmahl, G. and Haberkorn, A.: Toltrazuril effective against a broad spectrum of protozoan parasites. *Parasitology research*, 75(1), 64-66, 1988. <https://doi.org/10.1007/bf00931192>.
- Moretta, A.: Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nature Reviews Immunology*, 2(12), 957-965, 2002. <https://doi.org/10.1038/nri956>.
- Mundt, H.C., Mundt-WRstenberg, S., Dausgchies, A. and Joachim, A.: Efficacy of various anticoccidials against experimental porcine neonatal isosporosis. *Parasitology research*, 100, 401-411, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0314-9>.
- Norouzinia, M., Chaleshi, V., Alinaghi, S., Keramatnia, A. and Nourian, M.: Evaluation of IL-12A, IL-12B, IL-23A and IL-27 mRNA expression level genes in peripheral mononuclear cells of inflammatory bowel disease patients in an Iranian population. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 11 (Suppl 1), S45, 2018.
- Oh, S. and Lee, S.: Fish Welfare-Related Issues and Their Relevance in Land-Based Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Farms in Korea. *Animals*, 14(11), 1693, 2024. <https://doi.org/10.3390/ani14111693>.
- Parihar, R., Dierksheide, J., Hu, Y. and Carson, W.E.: IL-12 enhances the natural killer cell cytokine response to Ab-coated tumor cells. *The Journal of clinical investigation*, 110(7), 983-992, 2002. <https://doi.org/10.1172/jci200215950>.
- Park, K. H., Yoon, J. M. and Choi, S.: Effect of Levamisole on Enhancing Natural Cytotoxic Cell Activity in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45(6), 675-678, 2012. <https://doi.org/10.5657/kfas.2012.0675>.
- Park, S.H., Kim, C.H., Do, J.W., Choi, H.S. and Kim, Y.K.: Effects of amprolium hydrochloride on expression of drug metabolizing enzyme genes in olive flounder *Paralichthys olivaceus*, *The Korean Society of Fish Pathology*, 36(2), 337-348, 2023. <http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2023.36.2.337>.
- Pérez-Cordón, G., Estensoro, I., Benedito-Palos, L., Calduch-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A. and Pérez-Sánchez, J.: Interleukin gene expression is strongly modulated at the local level in a fish-parasite model. *Fish & shellfish immunology*, 37(2), 201-208, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.01.022>.
- Persson, D., Nødtvedt, A., Aunsmo, A. and Stormoen, M.: Analysing mortality patterns in salmon farming using daily cage registrations. *Journal of Fish Diseases*, 45(2), 335-347, 2022. <https://doi.org/10.1111/jfd.13560>.
- Sandeep, B.V., Kalavati, C. and Narasimhamurti, C.C.: *Kudoa atropi* sp. n. (Myxosporidia: Multivalulida) a myxosporidian parasite from the gills of *Atropus atropus*. *Vestn. Cesk. Spol. Zool*, 50, 132-135, 1986.
- Ristow, S., Evans, D. L. and Jaso-Friedmann, L.: *Analyzing nonspecific cytotoxic cells in fish. Natural Killer Cell Protocols: Cellular and Molecular Methods*, pp 347-357 1st edition 347-357. 2000. <https://doi.org/10.1385/1-59259-044-6:347>.
- Kerry S. Campbell and Marco Colonna., Humana Press, New Jersey, 2000.
- Ghanmi, Z., Rouabhia, M., Alifuddin, M., Troutaud, D., and Deschaux, P.: Modulatory effect of metal ions on the immune response of fish: In vivo and in vitro influence of MnCl<sub>2</sub> on NK activity of carp pronephros cells. *Ecotoxicology and environmental safety*, 20(3), 241-245, 1990. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(90\)90003-n](https://doi.org/10.1016/0147-6513(90)90003-n).
- Sato, N., Kikuchi, S. and Sato, K.: Quantifying the Stress Induced by Distress in Patients With Lumbar Disc Herniation in Terms of Natural Killer Cell Activity Measurements: Chromium Release Assay: Versus: Multiparameter Flow Cytometric Assay. *Spine*, 27 (19), 2095-2100, 2002. <https://doi.org/10.1097/00007632-200210010-00004>.
- Schmahl, G. and Mehlhorn, H.: Treatment of fish parasites: 6. Effects of sym. triazinone (toltrazuril) on developmental stages of *Glugea anomala*, Moniez, 1887 (microsporidia): A light and electron microscopic study. *European journal of protistology*, 24 (3), 252-259, 1989. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(89\)80062-8](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(89)80062-8).
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T. and Hume, D.A.: Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leucocyte Biology*, 75(2), 163-189, 2004. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>.
- Screpanti, V., Wallin, R.P., Grandien, A. and Ljunggren, H.G.: Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Molecular immunology*, 42(4), 495-499, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.033>.
- Shemesh, A., Pickering, H., Roybal, K.T. and Lanier, L.L.: Differential IL-12 signaling induces human natural killer cell activating receptor-mediated ligand-specific expansion. *Journal of Experimental Medicine*, 219(8), e20212434, 2022. <https://doi.org/10.1084/jem.20212434>.
- Singh, G.G., Sajid, Z. and Mather, C.: Quantitative anal-

- ysis of mass mortality events in salmon aquaculture shows increasing scale of fish loss events around the world. *Scientific Reports*, 14(1), 3763, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54033-9>.
- Singh, G. G., Sajid, Z. and Mather, C.: Quantitative analysis of mass mortality events in salmon aquaculture shows increasing scale of fish loss events around the world. *Scientific Reports*, 14(1), 3763, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54033-9>.
- Thielens, A., Vivier, E. and Romagné, F.: NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Current opinion in immunology*, 24(2), 239-245, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.01.001>.
- Uzhachenko, R.V. and Shanker, A.: CD8+ T lymphocyte and NK cell network: circuitry in the cytotoxic domain of immunity. *Frontiers in immunology*, 10, 461621, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01906>.
- Vignali, D.A. and Kuchroo, V.K.: IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature immunology*, 13(8), 722-728, 2012. <https://doi.org/10.1038/ni.2366>.
- Wagoner, S.N., Cornberg, M., Selin, L.K. and Welsh, R.M.: Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. *Nature*, 481(7381), 394-398, 2012. <https://doi.org/10.1038/nature10624>.
- Wang, T., Husain, M., Hong, S. and Holland, J.W.: Differential expression, modulation and bioactivity of distinct fish IL-12 isoforms: Implication towards the evolution of Th1-like immune responses. *European journal of immunology*, 44(5), 1541-1551, 2014. <https://doi.org/10.1002/eji.201344273>.
- Wang, W., Erbe, A.K., Hank, J.A., Morris, Z.S. and Sondel, P.M.: NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 6, 155000, 2015. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00368>.
- Wendel, P., Reindl, L.M., Bexte, T., Künnemeyer, L., Särchen, V., Albinger, N. and Ullrich, E.: Arming immune cells for battle: a brief journey through the advancements of T and NK cell immunotherapy. *Cancers*, 13(6), 1481, 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13061481>.
- Whiteside, T.L. and Friberg, D.: Natural killer cells and natural killer cell activity in chronic fatigue syndrome. *The American journal of medicine*, 105(3), 27S-34S, 1998. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(98\)00155-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(98)00155-7).
- Zhang, Y., Zhao, Y., Zhai, Y., He, J., Tang, M., Liu, Y. and Zhang, Y.: Cadmium impairs the development of natural killer cells and bidirectionally modifies their capacity for cytotoxicity. *Chemosphere*, 311, 137068, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137068>.
- 국가법령정보센터. 수산용 동물용의약품등 독성시험지침[시행 2021.3.1] [국립수산물품질관리원고시 제2021-16호, 2021.2.24., 일부개정]. <https://law.go.kr/LSW/admRulLsInfoP.do?admRulSeq=2100000198545>. 2024.6.10. 접속.

---

Manuscript Received: May 23, 2024

Revised: Jun 11, 2024

Accepted: Jun 12, 2024