

연어과 어류에서 분리한 전염성 조혈기 괴사 바이러스(Infectious Hematopoietic Necrosis Virus) 질병에 관한 연구

박명애 · 정영기

동의대학교 자연과학대학 미생물학과

1980년대 이후 우리나라 어류 양식산업이 급격히 발전함에 따라 과밀양식으로 인한 수질 환경 악화와 어병의 발생 빈도가 점차 증가하고 있으며, 이로 인해 대량폐사도 빈번히 발생하고 있다.

어류의 대량폐사 원인은 여러가지가 있을 수 있는데 가장 중요한 것 중의 하나가 바이러스 감염에 의한 것이다.

최근 들어 북미 지역으로부터 난을 수입했거나 어류간의 교류가 있었던 캐나다, 일본(Sano, 1976; Wolf, 1988), 대만(Chen et al., 1985), 이태리(Bovo et al., 1987) 그리고 프랑스(Hattenberger-Baudony and Kinkelin, 1988)등의 세계지역에서 Infectious Hematopoietic Necrosis Virus(IHNV)에 의한 질병이 발생하여 연어, 송어 등의 양식에 큰 피해를 입히는 것으로 보고되고 있다.

우리나라 송어 양식의 경우, 바이러스성 질병에 의한 대량폐사가 발생하여 매년 수천만마리의 치어가 폐사되어 왔는데 이 질병의 원인을 조사한 결과, 전염성 췌장 괴사 바이러스(Infectious Pancreatic Necrosis Virus; IPNV)와 전염성 조혈기 괴사 바이러스(Infectious Hematopoietic Necrosis Virus; IHNV)가 분리되어 이들이 대량 폐사의 병원체임을 밝혀내었다(이 등; 1991).

우리나라에서의 어류 바이러스 연구는 1982년부터 시작되었는데 IPNV는 이미 여러종류의 어류에서 분리되어 혈청학적 특성을 보고한 바 있으며(Hah et al., 1984; Hedrick et al., 1985; Park et al., 1989), IHNV에 관한 연구는 바이러스 분리(이 등, 1991), 병리조직학적 특성(손 등, 1991) 및 혈청형(Park et al., 1993)에 관한 보고가 있다.

따라서 본 총설에서는 연어과 어류중 양식 대상종인 무지개송어 양식시 전염성과 병원성이 강해 치어기에 들어 대량폐사를 유발시키는 IHNV에 대해 최근 연구 결과를

중심으로 바이러스 분리 및 동정, 신속진단, 바이러스 백신 기초 기술 개발순으로 기술하고자 한다.

1. 바이러스의 분리 및 동정

가. 세포배양 및 바이러스

IHNV의 숙주세포로서 CHSE-214, RTG-2, FHM, 및 BF-2 cell line을 사용하였다. 세포는 fetal bovine serum이 10% 첨가된 minimum essential medium(MEM)을 사용하여 pH 7.4로 조정하여 20°C에서 배양하였다.

바이러스 분리는 강원도에 위치한 무지개송어 양식장을 대상으로 The American Fisheries Society: Fish Health Section(1975)의 방법에 따라 시도하였다. 바이러스 감염 증세가 나타나는 치어 5미를 한 단위로 하여 멸균한 유발에 넣고 같은 다음, MEM을 1:10 비율로 넣어 희석한 후 1,500×g에서 15분간 원심분리하여 상층액만 취해 500µg/ml streptomycin과 500µg/ml gentamycin을 넣고 4°C에서 16시간 정도 방치하여 세균을 사멸시켰다. 이어 25cm² tissue culture bottle에 단층배양시킨 CHSE-214 세포에 시료 마쇄액 0.5ml를 넣고 1시간 동안 흡착시킨 후, MEM-2로 16°C에서 7일간 배양하면서 세포변성효과(cytopathic effect)를 관찰하였다.

조사한 양어장 중 4개 지역에서 IHNV가 분리되었으며(Fig. 1) 그 결과는 Table 1에 나타내었다.

나. 바이러스의 순수분리

숙주세포인 CHSE-214에 바이러스를 접종한 후 세포가 모두 파괴되었을 때(바이러스 접종 후 약 7일 제) 배양액을 모았다. 배양액을 4000×g, 4°C에서 10분간 원심분

Table 1. Isolates of IHNVs

Isolates	Host	Geographic area	Year
OSV	<i>Oncorhynchus nerka</i>	Oregon, U. S. A.	1958
SRCV	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	California, U. S. A.	1966
RB	<i>Salmo gairdneri</i>	Oregon, U. S. A.	1976
ChAb	<i>Salmo gairdneri</i>	Japan	
PRT	<i>Salmo gairdneri</i>	Pyongchang, Korea	1991
YRT	<i>Salmo gairdneri</i>	Yongwol, Korea	1991
MRT	<i>Salmo gairdneri</i>	Myungju, Korea	1991
SCS	<i>Oncorhynchus masu</i>	Samchuk, Korea	1991

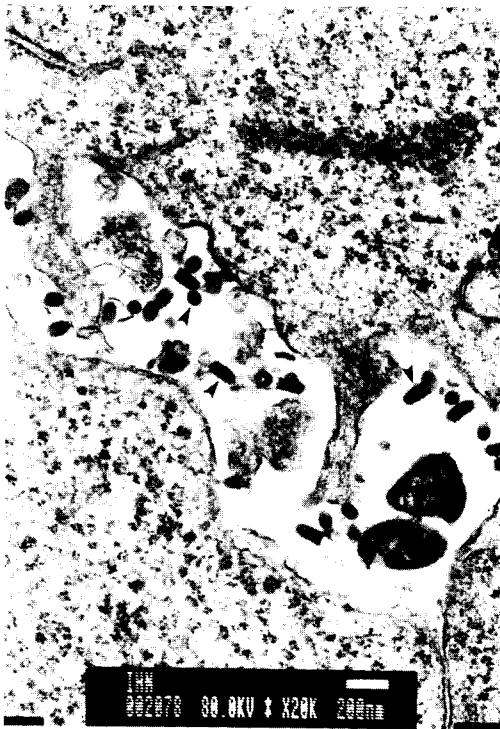


Fig. 1. Electron micrograph of IHNV in CHSE-214 cell. Virions like bullet are shown in CHSE-214 cells infected with IHNV(Uranyl acetate stain, x20,000).

리를 하여 cell debris를 제거한 후 PEG-6000을 7%(W/V)되게 첨가 하였다. 이 용액을 4°C에서 16시간 동안 stirring한 다음 6000×g, 4°C에서 30분간 원심분리하여 침

전물을 모았다. 소량의 TNE buffer(0.01M Tris, pH 8.0, 0.1M NaCl, 0.001M EDTA)를 사용하여 침전물을 녹인 후 sucrose step gradient(50%, 35%, and 20% sucrose-TNE)상에서 80000×g, 90분간 원심분리를 하였다. 20%와 35%의 sucrose층 사이에 존재하는 바이러스 밴드를 취하여 115000×g에서 30분간 원심분리를 하여 바이러스를 침전시켰다. 침전된 바이러스를 소량의 TNE buffer로 재현탁 시킨 후 sucrose continous gradient(5%~30%)상에서 48000×g, 30분간 원심분리를 하여 형성된 바이러스 밴드를 취한 후 115000×g, 30분간 재원심분리하여 침전시켰다. 침전된 바이러스는 소량의 TNE buffer에 재현탁시킨 다음 실험에 사용하거나 -20°C에 보관하였다.

다. 면역효소항체법(ELISA)을 이용한 신속진단

건강해 보이는 어류의 혈청을 취한 뒤 ELISA를 사용하여 혈청내의 항 IHNV 혈청의 양을 측정함으로써 양식 연어류에서의 IHNV에 의한 질병을 조기에 진단하고자 하였다.

면역효소항체법은 먼저 coating buffer(0.5M carbonate-bicarbonate, pH 9.6)에 IHNV가 1µg/ml되게 준비한 후 ELISA용 96well plate에 넣어 4°C에서 16시간 coating하고 나서 plate를 PBS로 씻고 1% BSA-PBS용액을 첨가하여 상온에서 blocking시켰다. 이어서 plate를 PBS-Tween 20으로 세척한 후 각 well에 단계별로 희석된 무지개송어 혈청을 넣고 상온에서 반응시킨 후 2차 항체인 goat-rabbit Ig G conjugated with alkaline phosphate를 첨가하여 2시간 동안 반응시키고 나서, p-nitrophenyl

phosphate용액을 넣고 1M NaOH로 반응을 중지시켜 405nm에서 O. D. 값을 측정하였다.

육안적으로 이상증상을 나타내지 않은 무지개송어에서도 혈액 중에 높은 역가의 IHNV 항체를 유지하고 있었고, 친어의 경우에도 보관되어 있어 이들 보관친어들이 배설물을 통해 사육수로 바이러스를 수평적으로 전염시키거나 난 또는 정액을 통해 바이러스를 수직적으로 전염시키고 있음을 예측할 수 있다.

2. 분리 바이러스의 serotype

IHNV는 핵산으로서 ssRNA를 지니며 envelope가 있는 family Rhabdoviridae에 속하는 바이러스이다(Murphy & Kingsbury, 1990). 이 바이러스는 1960년대 처음으로 분리되어(Wingfield et al., 1969) IHNV로 명명된(Amend et al., 1969) 이래 북미 서부지역에 널리 분포하며 매년 연어 및 송어치어에 큰 피해를 입히는 것으로 알려져 있다(Pilcher & Fryer, 1980).

IHNV의 경우 공식적으로 인정되는 표준형질형은 아직까지 정해진 바가 없다. 그러나, Pilcher & Fryer(1981)는 여러 지역에서 분리된 IHNV들의 병원성이 각각 다를 것을 발견하고 여러 type의 IHNV가 있을 수 있음을 시사하였다. 그 후 IHNV의 구조단백질이 5종류이고 이들 각각의 분자량이(L, polymerase, 150~190 Kd; G, surface glycoprotein, 67~80 Kd; N, nucleocapsid, 38~40 Kd; M1, matrix protein, 22 Kd; M2, matrix protein, 17~20 Kd) 확인되면서(McAllister & Wagner, 1975; Leong et al., 1981), 구조단백질의 분자량의 차이로부터 IHNV를 grouping하고자 하는 시도가 있었다. 그 결과 Hsu 등(1986)이 SDS-polyacrylimide gel 상에서 IHNV 구조단백질 G와 N의 분자량 차이를 기준으로하여 세계 여러지역에서 분리된 71종류의 IHNV들을 5types(electropherotypes)으로 분류하였고 Winton 등(1988)은 중화역가가 있는 2종류의 monoclonal Ab를 사용하여 IHNV의 혈청형을 알아 보려고 하였다. 그 결과 세계 여러지역에서 분리된 12가지의 IHNV들을 4종류의 group으로 분류할 수가 있었는데, 역시 역에 따라 서로 다른 group이 존재함이 밝혀졌다.

우리나라에서 양식 무지개송어 및 산천어에서 분리된 4

종류의 IHNV들을 미국 및 일본에서 분리된 IHNV들과 비교를 하기 위하여 전기영동을 한 후 바이러스의 단백질 종류 및 그 크기를 비교하여 보았다(Fig. 2). 그 결과 lane 2, 3, 4는 미국에서 분리된 것들이고 lane 6, 7, 8, 9, 10들은 한국에서 분리된 IHNV들이다.

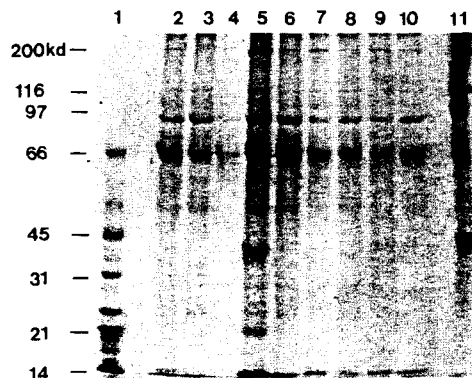


Fig. 2. Analysis of structural protein of IHNVs by SDS-PAGE.

The gel was stained by 1% coomassie blue R-250.

lane 1 : low marker Protein, lane 2 : PRT,
lane 3 : MRT, lane 4 : SCS,
lane 5 : YRT, lane 6 : PRT,
lane 7 : ChAb, lane 8 : RB,
lane 9 : SRCV, lane 10 : OSV,
lane 11 : high marker protein.

먼저 미국 및 일본에서 분리된 IHNV의 단백질 pattern을 보면 gel상에서 다른 단백질들의 수 및 각각의 크기는 동일하나 약 40Kd의 단백질(N protein)은 조금씩 그 크기가 달랐다. 미국에서 분리된 것들 중 SRCV의 N 단백질 크기가 가장 컸으며 다음으로 OSV가, 그리고 RB의 N단백질과 그 크기가 유사하였다. 이 결과로 부터 미국에서 분리된 세종류의 IHNV는 서로 다른 종류의 N 단백질을 지니고 있음을 알 수 있고 일본에서 분리된 바이러스는 미국에서 분리된 RB와 유사한 것임을 알 수 있었다.

다음으로 우리나라에서 분리된 IHNV들은 SDS-PAGE 상에서 N단백질을 비롯한 모든 단백질들이 유사한 양상

을 보였는데 외국에서 분리된 IHNV들과 비교해보면 우리나라에서 분리된 IHNV들의 N단백질은 미국에서 분리된 OSV의 그것과 크기가 비슷하였다.

이상과 같이 SDS-PAGE 상에서의 바이러스 단백질 수 및 각각의 크기를 기준하여 보았을 때 우리나라에 분포하고 있는 IHNV는 미국에서 분리된 OSV와 유사한 것임을 알 수 있다.

3. 바이러스 백신 기초 기술 개발

현재 IHNV에 의한 질병을 control하기 위하여 많은 연구를 하고 있으나 아직까지 이용 가능한 치료제나 백신은 개발되지 않고 있다. 치료제로서 Guanine-7-oxide(Hasobe & Saneyoshi, 1985), TCDD(2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzi-p-dioxin), Aroclor 1254(Spitsberger et al., 1988), 그리고 Amantadine(Hudson et al., 1988) 등의 여러 화학물질을 사용하여 실험한 결과 항바이러스의 효과에 대하여 보고된 바가 있다. 그러나 이들은 실제로 사용되지 않고 있으며 또한 바이러스 질병의 특성상 치료제로는 완전한 control이 불가능하기 때문에 백신의 개발에 더 주력하고 있는 실정이다.

IHNV백신의 개발은 어류가 IHNV에 대하여 중화항체를 만든다는 보고(Anebd & Smith, 1974)가 나온 이후 활발하게 진행되었다. 그 첫 시도로서 독성을 약화시킨(attenuated) IHNV를 백신으로 사용하고자 하였다(Fryer et al., 1976; Kato et al., 1983). 그 결과 IHNV에 대한 면역효과는 있었으나 실제 양식에 사용하기에 적합하지 못하였다. 그 이유로서 첫째 IHNV는 돌연변이가 잘 일어나는 RNA virus로서, 돌연변이로 인하여 병독성이 있는 virus로 변할 가능성이 있고 둘째로 virus배양에 비용이 많이들어 경제적인 면에서 적당하지 못하였다. 또 다른 방법으로 β -propiolactone(Amend, 1976), 그리고 formalin(Nishimura et al., 1985) 등의 화학약품을 사용하여 IHNV를 죽인 후 이를 백신으로 사용하고자 하였다. 이들 백신 역시 IHNV에 대한 면역효과는 있었으나 경제적인 면에서 적당하지 못하였다. 따라서, 최근에는 IHNV 구조단백질중 중화 epitope를 coding하는 유전자를 cloning한 후 E. coli 등의 미생물에서 비교적 저렴하게 대량생산을 할 수 있는 subunit 백신을 개발하고자 시도하고 있다.

이 방법을 사용한 백신의 개발에 가장 앞선 나라가 미국이다. 미국에서 분리된 한 strain(RB/76)의 glycoprotein gene을 cloning하여(Kurath et al., 1985; Koener et al., 1987) E. coli에서 발현시킨 후 이 lysate를 물고기에 면역시킨 결과 IHNV에 대한 중화항체가 형성됨을 확인하였다(Gilmore et al., 1988; Engelking & Leong, 1989). 또한 이 glycoprotein에 항체유도에 관여하는 epitope가 적어도 3개 이상 존재함도 밝혀내어 미국에서 분리된 IHNV를 사용한 백신의 개발은 거의 완성단계에 있는 것으로 보고되고 있다(Xu et al., 1991).

우리나라에서 양식되는 여러종류의 물고기에서 여러번에 걸쳐 IPNV를 분리하여 양식어류, 특히 무지개송어의 대량폐사 원인체로 규명한 바 있다. 또한 이들 분리된 IPNV의 혈청학적 특성을 밝혀내어 우리나라에 주로 존재하는 혈청형의 IPNV를 사용하여 IPNV의 백신을 만들고자 하는 단계에 있다(Hah et al., 1984; Hedrick et al., 1985; Park et al., 1989; Lee et al., 1989). 따라서, IPNV에 의한 무지개송어의 대량폐사는 곧 control 할 수 있는 것으로 보인다. 그런데 최근들어 대량폐사된 무지개송어에서 IHNV가 분리됨으로서 IHNV도 우리나라에서 매년 발병하는 무지개송어 대량폐사의 원인체 임이 확인되어(Park et al., 1993) 바이러스에 의한 salmonids의 대량 폐사를 막기 위하여는 IHNV의 백신개발도 시급한 상황이다. 비록 미국에서 이미 IHNV의 백신개발이 완성 단계에 있지만(Gilmore et al., 1988; Engelking & Leong, 1989; Xu et al., 1991)이 백신이 미국에서 분리된 한 strain(RB/76)을 사용하여 개발하였고 또한 IHNV가 지역에 따라 서로 다른 특성을 보인다는 점과(Pilcher & Fryer, 1981; Hsu et al., 1986; Winton et al., 1988) 실제 우리나라에서 분리된 IHNV가 미국에서 분리된 것들과 혈청학적 특성 및 구조단백질의 size가 다르다는 점(Park et al., 1993)을 감안할 때 미국에서 개발한 백신이 우리나라에 분포하고 있는 IHNV에 대하여 백신으로서의 높은 효과를 기대하기 어렵다. 따라서, 우리나라에서 분리된 IHNV를 사용한 백신의 개발이 필요한 상황이다. 그리하여 백신개발 기초실험으로 Monoclonal항체와 Polyclonal 항체를 사용하여 IHNV의 면역유도단백질을 확인하였다. IHNV에 대한 단일클론 항체를 만들기 위하여 먼저 순수분리된 IHNV를 Balb/c mouse에 면역을 시킨 다

을 spleen cell을 취하여 SP-2/O myeloma 세포와 fusion 시킴으로서 hybridoma를 만들었다(Fig. 3). 이중 IHNV에 대한 항체를 분비하는 hybridoma를 찾아 cloning과정을 거쳐 monoclon을 만들었다. 이렇게 하여 4개의 clone을 만들어 이들로부터 단일클론 항체를 준비하였다. Western blotting방법을 사용하여 이들 항체가 IHNV의 구조단백질들중 어느것에 대한 항체인지를 확인하였다. 그 결과, 두개의 단일클론 항체는 G단백질에 대한 항체이었고 나머지 2개는 G보다 조금 큰 size의 단백질에 대한 항체이었다. 이 결과로부터 IHNV의 5 구조단백질중 G, 그리고 G와 비슷한 크기의 단백질이 면역유도단백질이 확인되었다(Fig. 4).

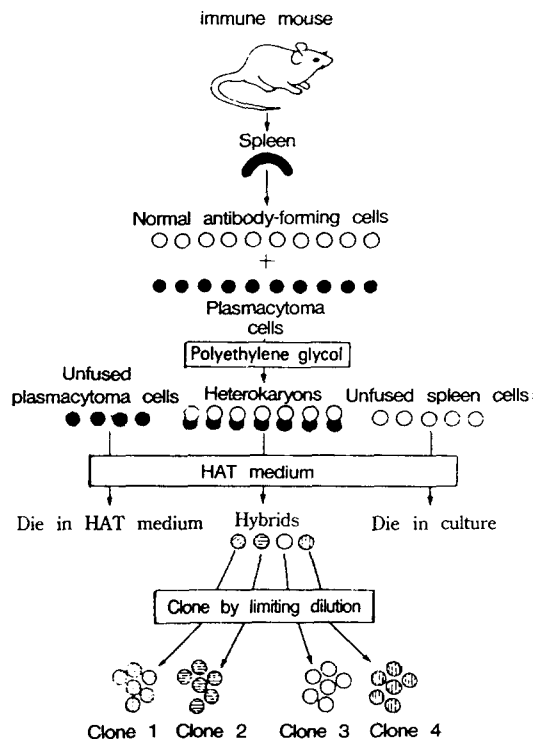


Fig. 3. Scheme for the production of hybridoma cells.

다음으로 IHNV에 감염된 무지개송어에서 생성되는 polyclonal 항체를 사용하여 western blotting함으로써 실제 무지개송어가 인지하는 IHNV의 면역유도단백질을 알아보았다. 그 결과, 무지개송어는 L과 N단백질을 제외한

나머지 3 종류의 단백질에 대하여 항체를 생성하였다. 즉, 무지개송어에서는 G, M1 그리고 M2가 면역유도특성을 지녔는데, G보다는 M1이, M1보다는 M2가 더 많은 항체를 유도하였다. 그리고, IHNV의 G단백질보다 조금 크거나 작은 단백질에 대하여도 항체가 생성되었는데, 그 양이 G에 대한 것보다 많았다. 이상의 결과로부터 IHNV의 5 종류 구조단백질중 G, M1, M2 그리고 G보다 조금 크거나 작은 것들이 면역유도의 특성을 지니는 단백질들임을 알 수 있었고, 이들 면역유도단백질들 중 M2의 항원성이 가장 높았고 다음으로 M1, G보다 조금 큰 것, 마지막으로 G단백질의 항원성이 가장 낮음을 알 수 있었다. 이 결과를 앞의 monoclonal 항체를 사용하여 얻은 결과와 비교하여 볼 때 G나 G보다 조금 큰 것이 면역유도단백질이라는 점은 일치한다. 그러나, monoclonal 항체를 사용하였을 때

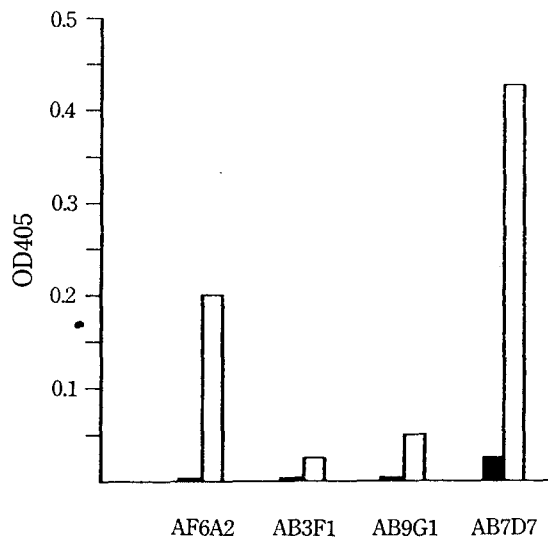


Fig. 4. Identification of the class of monoclonal antibody. Four kinds of monoclonal antibodies were coated onto ELISA plate and incubated with goat anti-mouse IgM(■) and goat anti-mouse IgG(□) conjugated with alkaline phosphatase. Then PNPP substrate was added and the OD405 was measured.

는 나타나지 않던 M1와 M2가 polyclonal 항체를 사용하

였을 때 면역유도의 특성이 있는 것으로 나타난 사실은 두 실험 결과가 일치하지 않는다. 먼저 두 실험 결과가 일치하는 두 단백질의 경우, IHNV PRT strain의 G단백질이 면역유도단백질이라는 결과는 G단백질이 IHNV의 최외곽 성분인 envelope에 존재하는 glycoprotein이라는 사실로부터 당연한 결과로 생각되어지며 IHNV의 다른 strain의 경우에서도 G단백질이 면역유도단백질로서 역할을 한다는 보고가 있었다. 그런데 G보다 조금 큰 size의 단백질이 면역 유도단백질이라는 결과는 특이하였다. 지금까지의 보고에 따르면 이 위치에 IHNV의 구조단백질로서 보고된 것이 없었고 따라서 이 단백질이 면역유도의 특성이 있다는 사실이 보고된 바가 없었다. 그러나 두 실험 모두에서 같은 결과가 나온 것으로 보아 IHNV를 이루는 단백질임이 확실하다고 생각된다. 이 단백질이 정확히 어떤 특성의 것인지는 현재로서는 알수가 없지만 G단백질의 precursor일 가능성이 높은 것으로 생각된다. 다음으로 monoclonal 항체를 사용한 실험에서는 나타나지 않다가 polyclonal 항체를 사용하였을 때만 면역유도특성이 나타난 M1과 M2의 경우 이와같은 결과가 나타난 이유는 다음의 두 가지가 있을 수 있다. 첫째, mouse와 무지개송어의 면역 체계, 즉 항원을 인지하는 특이성에 약간의 차이가 있어 그 결과 무지개송어는 M1과 M2를 인지하는데 반하여 mouse는 인지하지 못하기 때문일 수가 있다. 실제 많은 경우에 있어서 같은 항원을 주사하였을 경우 중에 따라 반응하는 정도가 다름이 발견되고 있다. 두 번째의 이유로 mouse도 M1, M2를 항원으로 인지를 하여 면역반응을 보였는데, 실험에서 선택한 4종류의 hybridoma에는 이들 단백질을 인지하는 것이 없었기 때문일 수가 있다. 이것이 맞는지의 여부는 현재로서는 알 수가 없고 이를 확인하기 위하여는 더 많은 hybridoma를 만들어 조사를 해 보아야 한다. 위의 두 가지 이유 중 어느 것이 되었는지 물고기는 M1, M2를 항원으로 인지를 하였고 이들의 항원성은 G 단백질 보다 더 높음을 나타내었다. 실제 IHNV로부터 살아남은 다른 사람들의 보고에서도 G 이외에 M1에 대한 항체가 생성되어 있음이 발견되기도 하였다(Mourich & Leong, 1991; Ristow et al., 1992). 이러한 결과는 앞으로 IHNV에 대한 백신을 개발하고자 할 때 중요한 정보를 제공하여 주는 것인데, G, M1, M2 그리고 G보다 조금 큰 단백질 등이 백신개발 가능한 단백질이며 이들

가운데 M1, M2 그리고 G보다 조금 큰 단백질 등이 백신개발 가능한 단백질이며 이들 가운데 M1, M2가 유력한 후보가 될 수 있음을 말하여 주는 것이다. 이전까지 IHNV백신의 개발은 G단백질을 대상으로만 이루어져 왔는데(Kurath et al., 1985; Koener et al., 1987; Gilmore et al., 1988; Engelking & Leong, 1989; Xu et al., 1991), 본 실험의 결과에 따르면 M1 혹은 M2를 대상으로 하여 백신을 개발하는 것이 바람직하리라고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Amend, D. F., W. T. Yassutake and R. W. Mead, *Trans. Am. Fish. Soc.*, **98**, 796~804(1969).
2. Amend, D. F., and L. Smith, *J. Fish. Res. Board Can.*, **31**, 1371~1378(1974).
3. American Fisheries Society : Fish Health Section, *U. S. Fish and Wild. Ser.* (1975).
4. Bovo, G., G. Giorgetti, P. E. V. Jorgensen and N. J. Olesen, *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **7**, 124(1987).
5. Chen, S. N., G. H. Kou, R. P. Hedrick and J. L. Fryer, In : 'Fish and shellfish pathology, A. E. Ellis Eds, Academic Press, New York(1985).
6. Engelking, H. M. and J. C. Leong, *Virus Res.*, **13**(3), 213~230(1989).
7. Fryer, J. L., J. S. Rohovec, G. L. Tebbit, D. S. Manning and J. C. Leong, *Bio Technology*, **6**(3), 295~300(1988).
8. Hah, Y. C., S. W. Hong, M. H. Kim, J. L. Fryer and J. R. Winton, *Korea. Kor. J. Microbiol.*, **22**(2), 85~90(1984).
9. Hattenberger-Baudouy, A. M. and P. de Kinkelin, *Abstract, International Fish.*
10. Health Conference, Vancouver, B. C., July 19~20, P. 6(1988).
11. Hedrick, R. P., W. D. Eaton, J. L. Fryer, Y. C. Hah, J. W. Park and S. W. Hong, *Fish Pathol.*, **20**(4),

- 463~468(1985).
12. Hudson, J. B., E. A. Graham and M. F. Simpson, *Antiviral Res.*, **9**(6), 379~385(1988).
 13. Hsu, Y. L., H. M. Engelking and J. C. Leong, *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 1353~1361(1986).
 14. Kato, N., Fukuda, and T. Sano, *Ann. Meet. Japan. Soc. Fish Pathol.*, p. 12(1983).
 15. Koener, J. F., and J. C. Leong, *J. Virol.*, **64**(1), 428~430(1990).
 16. Kurath, G., K. G. Ahern, G. D. Oearson and J. C. Leong, *J. Virol.*, **53**(2), 469~476(1985).
 17. 李生東, 田世圭, 金東秀, 孫相奎, 朴明愛, 方種得, 崔樂重, 農林水產部, PP. 9~30(1991).
 18. Lee, J. J. J. W. Park, Y. C. Hah and G. Jeong, *Kor. J. Microbiol.*, **27**(3), 231~236(1989).
 19. Leong, J. C., Y. L. Hsu, H. M. Engelking and D. Mulcahy, *Dev. Biol. Stand.*, **49**, 43~55(1981).
 20. McAllister, P. E. and R. P. Wanger, *J. Virol.*, **15**, 733~738(1975).
 21. Mourish, D. V., and J. C. Leong, *Proceeding of the 2nd Int. Symposium on viruses of lower vertebrates Oregon State Univ.* (1991).
 22. Murphy, F. A. and S. W. Kingsbury, "Fields virology, Vol 1" 2nd ed., B. N. Field D. M. Knipe Eds., Raven Press, New York. p. 17(1990).
 23. Nishimura, T., H. Sasaki, M. Ushiyama and T. Sano, *Fish Pathol.*, **20**(2/3), 435~443(1985).
 24. Park, J. W., J. J. Lee, G. Jeong and Y. C. Hah, *Kor. J. Microbiol.*, **27**(3), 225~230(1989).
 25. Pilcher, K. S. and J. L. Fryer, *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, **7**, 287~364(1980).
 26. Park, M. A., S. G. Sohn, S. D. Lee, S. K. Chun, J. W. Park, J. L. Fryer and Y. S. Hah, *J. Fish Dis.*, **16** (1993).
 27. Ristow, S. S., J. de Avila, S. E. Lapatra and K. A. Lauda, *Dis. Aquatic Organisms*(1992).
 28. Sano, T., *Fish Pathol.*, **10**, 221~226(1976).
 29. 孫相奎, 朴明愛, 李生東, 韓國魚病會誌, **4**(2), 79~85(1991).
 30. Wingfield, W. H., J. L. Fryer and K. S. Pilcher, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **130**, 1055~1059(1969).
 31. Winton, J. R., C. K. Arakawa, C. N. Nannan and J. L. Fryer, *Dis. Quat. Org.*, **4**, 199~204(1988).
 32. Wolf, K., *Correll Univ. Press, Ithaca, New York*, pp 83~114(1988).
 33. Xu, L., D. V. Mourich, H. M. Engelking, S. Ristow, J. Arnzen and J. C. Leong, *J. Virol.*, **65**(3), 1611~1615(1991).