

## F-5

# ISH (*in situ hybridization*)법 및 일반 조직학적 수법을 통한 돌돔의 이리도바이러스 감염증의 추이

이남실 · 도정완 · 김이청\* · 김진우  
국립수산과학원 병리연구팀, \*어류연구센터

## Introduction

이리도바이러스는 1990년부터 일본 참돔양식장에서 유행하여 참돔이리도바이러스 (Red sea bream iridovirus:RSIV)로 잘 알려져 있으나, 그 이전부터 유사질병이 다른 어종에서도 발생하였던 것으로 보인다. 1997년 이후 돌돔 및 감성돔의 사육량의 증가와 함께 질병 발생율도 증가하고 있는데, 특히 돌돔에 있어 이리도바이러스에 의한 폐사는 다른 어종에 비하여 심각한 것으로 나타나고 있다.

본 연구에서는 형태학적 방법 (조직학적 방법)과 분자생물학적 방법을 접목하여 이리도바이러스에 감염된 돌돔의 각 장기 내에서의 바이러스 감염세포 분포를 조사하고 세포변성을 관찰함으로써 바이러스 표적세포를 추적하여 질병예방과 치료를 위한 기초자료를 확립하고자 한다.

## Materials & Methods

돌돔이리도바이러스 (Rock Bream Iridovirus:RBIV)의 118 ORF 가운데 ATPase 일부 (230bp)와 Major capsid protein (MCP)일부 (311bp)를 합성할 수 있는 Primer 세트를 각각 제작하여 ISH와 일반 PCR에 사용하였다. ISH에는 두 종류의 products를 Multiplex PCR로 합성하여 실험에 사용하였다. 이리도바이러스 감염개체로부터 고정된 각종 장기 (간, 비장, 신장, 위 장관, 아가미, 심장, 뇌 및 근육)의 조직표본에 Hybridization 시키고 기질을 처리하여 발색시켜 관찰하였으며, 같은 조직절편의 serial section에 대해서 일반조직염색 (H&E 또는 PAS)을 실시하여 비교함으로써 감염조직 내에서의 감염세포의 위치, 반응의 정도 및 감염세포를 추적, 분석하였다. ISH 반응을 관찰한 개체 중 일부는 일반PCR을 통하여 각 장기 내에서 viral DNA양을 비교하였다.

## Results & Discussion

ISH 감수성 정도를 알아본 결과, 감염세포에 대하여 특이적으로 명확한 반응을 나타내는 것을 알 수 있었으며, 특히 비장, 신장에서 반응세포의 수가 많이 관찰되었다. 비장, 신장과 같은 조혈기관의 조직 내에서 뿐만 아니라 간 (liver), 심장 (heart), 소화관 (intestine), 아가미 (gill), 근육 (muscle) 조직에서도 ISH 반응세포가 나타났으며, 뇌 (brain)에서도 드물게 관찰되었다. 반응세포의 분포 위치는 주로 혈관 내 또는 혈관주위이며, 혈관이 다수 분포하는 결합조직에서 그 반응이 뚜렷하게 관찰되었다. 특수결합조직의 하나인 지방조직 (눈, 소화관, 심장 주위)에서도 다수의 반응세포를 관찰할 수 있었다. 간의 경우, 조직 내의 미세혈관인 동양혈관 (sinusoids) 내 또는 연결하여 ISH 반응세포가 관찰되었다.

또한 돌돔의 말초혈액의 도말표본에 ISH 반응시켜 반응세포를 관찰 할 수 있었다. 이러한 경향들을 볼 때, 바이러스 감염세포는 순환혈액에도 존재하며 각 장기 조직 내로 이주 할 수 있는 이주세포임을 알 수 있었다. 이리도바이러스 감염으로 나타나는 이형비대세포는 조혈조직 (신장, 비장)에서 대다수 관찰된다. 신장, 비장의 변성변화는 조혈기능의 이상으로 연결되며, 이로 인한 이상혈구 (적혈구 및 백혈구)의 계속적인 생산은 빈혈증상과 연결된다. 이러한 생리적 변화는 수표에 힘없이 유행하는 이상행동으로 나타나며 Sudthong C. (2002) 등은 이리도바이러스에 감염된 grouper의 경우를 "Sleepy disease"라고 말하고 있다.

이후, 이들 ISH 반응세포의 기원세포의 정확한 추적을 위한 새로운 방법을 모색하여 감염세포를 명확히 할 필요가 있을 것이다.

## References

- Chao C. B., Chen C. Y., Lai Y. Y., Lin C. S. & Huang H. T. (2002) Histological, ultrastructural, and *in situ* hybridization study on enlarged cells in grouper *Epinephelus hybrid* infected by grouper iridovirus in Taiwan (TGIV). *Disease of Aquatic Organisms*, **58**, 127-142.
- Do J. W., Moon C. H., Kim H. J., Ko M. S. & 14 others. (2004) Complete Genomic DNA Sequence of Rock Bream Iridovirus. *Virology*, **325**, 351-363.
- He . G, Wang S. P, Zeng K., Huang Z., J. and Chan S. M. (2000) Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarinfish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China. *J. Fish Dis.* **23**, 219-222.
- Jung S. J., Miyazaki T., Miyata M., Danayadol Y., Tanaka S. (1997) Pathogenicity of iridovirus from Japan and Thailand for the red sea bream *Pagrus major*, *Fish Sci.* **63**:735-740.
- Sterra M. A., Bernabe A., Mozos E., Mendez A. & Jover A. (1987) Ultrastructure of the liver in pigs with experimental African Swine Fever. *Veterinary Pathology* **24**, 460-462.
- Siwicki A., Pozet F., Morand M., Terech-Majewska E. & Bernard D. (2001) Pathogenesis of iridovirus: *In vitro* influence on macrophage activity and cytokine-like protein

- production in fish. *Acta. Vet. Brno.* **70**, 451-456.
- Sudthongkong,C., Miyata,M. and Miyazaki,T. (2002)Viral DNA sequences of genes encoding the ATPase and the major capsid protein of tropical iridovirus isolates which are pathogenic to fishes in Japan, South China Sea and Southeast Asian countries. *Arch. Virol.* **147**, (11), 2089-2109.
- Masayuki Imajoh, Hidehiro Sugiura, and Oshima Syun-ichirou. (2004). Morphological changes contribute to apoptotic cell death and are affected by caspase-3 and caspase-6 inhibitors during red sea bream iridovirus permissive replication. *Virology*, **322**, 220-230.
- Tsai Chih-Tung, Jing-Wen Ting, Ming-Hsien Wu, Ming-Feng Wu, Ing-Cherng Guo, and Chi-Yao Chang. (2005). Complete genome sequence of the Grouper Iridovirus and comparison of genomic organization with those of other Iridoviruses. *J. Virology*, **79**, 2019-2023.