

魚類疾病의 研究技法과 臨床檢査(II)

허 강 준*

4. 病理組織學的 檢査

19세기 중엽부터 현미경을 이용하여 조직세포 내를 관찰하는 것이 시작된 이래 의학과 수의학의 분야에 있어서 여러 질병의 진단방법으로서 활용되어 왔으며 현재에는 새로운 조직학적 기술이 개발되어 병리진단 없이는 질병을 파악할 수 없을 정도라고까지 알려져 있다. 한편 어병의 病理組織診斷은 의학이나 수의학의 기술을 흉내내어 연구하는 정도까지는 왔으나 아직도 충분한 기초가 확립되어 있지 않다. 조직절편을 만들 때에는 신선한 조직을 사용하지 않으면 안되며 특히 어류의 경우는 變溫動物이고, 自己融解가 매우 빠르기 때문에 退行性變化가 일어나, 신선한 조직을 사용하지 않는 경우, 신뢰할 수 있는 진단을 할 수가 없다. 따라서 어병의 병리 조직진단에 처리를 신속히 하는 것은 매우 중요하다.

1) 試料採取法

조직학적 표본으로서 만족할 수 있는 것은 신선한 물고기나 죽기전의 물고기 뿐이다.

(1) 外蟲部

경골어류의 표피는 박리하기 쉽기 때문에 물고기를 잡을 때 주의를 해야 한다. 가장 좋은 표본을 작성하기 위해서는 물고기를 갈고리나 눈금이 작은 그물로 건져올린 뒤 재빨리 적당한 마취제를 넣은 용기에 넣던가 또는 두부를 절단한다. 이 경우 물고기는 핀셋으로 다룬다. 물고기가 큰 경우는 검사대상이 아니라고 생각되는 부위, 꼬리, 지느러미 등을 잡고 환부를 떼어낸

다. 표본 전체를 보존하는 경우는 고정액을 빨리 침투시키기 위해서는 입부분에서 꼬리까지 평행으로 칼로 그어서 근육내로 침투시키거나 주사기로 고정액을 주입하는 것이 필요하다.

(2) 內患部

환부가 체내에 있는 경우나 물고기 전체를 보존하는 경우는 복강의 길이만큼 절개하는 것이 필요한데 보통 정중선을 따라서 자르며 내장과 부레는 주의깊게 적출하며, 고정액을 최대한 침투시키기 위해서 적어도 1회는 각 장기를 절개해야 한다. 이상적인 방법은 연구대상의 장기나 환부를 어체로부터 주의깊게 잘라내어 1.0cm³ 이하의 블록으로하여 적어도 조직 용적의 20배의 고정액에 넣어두는 것이 좋다.

2) 固定液

고정액에는 여러 종류가 있으며 각각 장점과 단점을 갖고 있다. 일반적으로 많이 사용되는 고정액은 formaldehyde(HCHO; formalin)이다. formaldehyde는 수용성의 기체로서, 중량 40%로 농축한 형태로 판매되고 있다. 겨울철 기온이 낮아지면 보존중에 paraformaldehyde가 생성되어 하얗게 되는 경우가 가끔 있는데 이러한 경우에는 소량의 NaOH를 넣으면 백탁이 없어진다. formaldehyde는 농축된 그대로의 형태로 고정에는 사용할 수 없으므로 수돗물 등을 사용하여 10%로 희석해서 사용한다. 포르말린 고정액 외에도 Heidenhain의 SUSA액, Bouin액, Carnoy액 등이 있다. 그 조성을 각각 살펴보면 다음과 같다.

① Phosphate-buffered formalin

40% formaldehyde	100ml
tap/distilled water	900ml

* 충북대학교 농과대학 수의학과

NaH₂PO₄ H₂O······4g
 NaH₂PO₄······6g

② Heidenhain's SUSA'

Mercuric chloride······45g
 Sodium chloride······5g
 Trichloroacetic acid······20g
 Acetic acid······40ml
 Formalin······200ml
 Distilled water······800ml

③ Bouin's fluid

Saturated aqueous picric acid······75ml
 Formalin······25ml
 Acetic acid······5ml

④ Carnoy's fluid

Absolute alcohol······60ml
 Chloroform······30ml
 Acetic acid······10ml

3) 脱灰

포유류의 조직학에 있어서 탈회법은 널리 이용되고 있으나 어류연구에 있어서는 일반적이지 않다. 탈회의 주된 목적은 표본의 骨成分으로부터 다른 성분을 손상하지 않고 calcium ion만을 제거하는 것이다. 그 결과 切片作業이 용이하게 된다. 탈회법은 필연적으로 어느 정도의 세포의 손상을 일으켜 그후의 염색에 해로운 영향을 준다. 이는 탈회용 시약에 조직을 얼마만큼 침지 했는가에 의해 생기는 경우와 그 조직 자체에 원인이 있는 경우가 있다. 어류의 뼈는 치밀하고 非骨髓性이므로 주위의 조직보다 필연적으로 耐藥性이 높다.

만족할 수 있는 탈회를 하기 위해서 가장 중요한 조건은 조직을 탈회액에 담그기 전에 정확히 고정을 해야만 하는 것이다. 산탈회중의 조직은 신선한 조직보다 4배나 손상이 크다고 알려져 있다.

탈회방법은 고정법과 같이 여러 방법이 있으나 모든 면에 있어서 이상적인 방법은 없다. 주로 사용되는 방법은 8% 개미산수용액을 사용하는 酸脱灰法과, 킬레이트제인 EDTA(ethylenediamine-tetra-acetic acid)를 사용하는 킬레이트법이 있다. 킬레이트법에 사용되는 EDTA 탈회액의 조성은 다음과 같다.

EDTA······250g
 Distilled water······1750ml

4) 病理標本作成 順序

고정후 처리를 한 후 탈수, 투명화, 파라핀의 침투와 포매과정의 순서를 밝히며 병리조직표본을

표 1. 어류 조직의 병리조직표본 작성순서

A. 손으로 처리하는 경우

1. 조직의 고정
2. 물로 씻는다
3. 70% alcohol에 4~8시간 담금
4. 90% alcohol에 24시간 담금
5. 100% alcohol I에 2시간 담금
6. 100% alcohol II에 3시간 담금
7. 100% alcohol III에 3시간 담금
8. Chloro form에 24시간 담금
9. Parafin wax I에 2시간 담금
10. Parafin wax II에 2시간 담금
11. Parafin wax III에 2시간 담금

B. 자동처리하는 경우(automatic fissul processor)

1. 50% alcohol에 1시간 담금
2. 80% alcohol에 2시간 담금
3. 80% phenol methylalcohol I에 2시간 담금
4. 80% phenol methylalcohol II에 2시간 담금
5. 80% phenol methylalcohol III에 2시간 담금
6. 100% alcohol I에 2시간 담금
7. 100% alcohol II에 2시간 담금
8. Chloroform I에 1시간 담금
9. Chloroform II에 2시간 담금
10. Parafin wax I에 2시간 담금
11. Parafin wax II에 3시간 담금
12. Parafin wax III에 3시간 담금

※ 이 처리법은 어류의 피부와 같은 다루기 곤란한 조직에 있어서 특히 유효하다.

C. 급속히 손으로 처리하는 경우

1. Carnoy's fluid에서 30~60분간 고정
2. 100% alcohol I에 30분간 담금.
3. 100% alcohol II에 30분간 담금.
4. 100% alcohol III에 30분간 담금.
5. 조직이 투명하게 보일때까지 Xylene에 담금.
6. Parafin wax I에 30분간 담금.
7. Parafin wax II에 30분간 담금.
8. Parafin wax III에 30분간 담금.

작성한다. 그 순서는 표 5-7에 나타내었다.

5) 染色

염색 조작에 들어가지 전에 절편을 Xylene에 각각 5~10분씩 2회 침지하여 완전히 parafin을 제거하지 않으면 안된다. 다음에 absolute alcohol중에 2~5분간 담구어 xylene을 제거한 후 alcohol 농도를 90%, 70%, 50% 순으로 서서히 낮추어 절편을 물로 옮겨간다. 이렇게 함으로써 절편이 슬라이드 글라스로부터 벗겨지는 것을 방지한다. 다음은 조직학 일반에 걸쳐 주로 사용되는 hematoxylin and eosin염색법의 순서를 적었다.

① 위와 같이 절편을 수돗물에 넣어 필요할 만큼 人工의色素를 제거한다.

② 염색액의 상태에 따라 5~20분간 hematoxylin으로 염색한다.

③ 흐르는 물로 2분간 씻는다.

④ 수초간 0.5%, acid-alcohol로 분별한다.

⑤ 핵이 충분히 염색된 경우, 2% potassium acetate로 5분간 씻는다.

⑥ 물로 절편을 씻는다.

⑦ 1% alcoholic eosin으로 3~5분간 염색한다.

⑧ absolute alcohol에서 절편을 씻어, 여분의 eosin을 제거한다.

⑨ 대비염색을 조사하여, xylene으로 충분히 처리한다.

⑩ 합성수지로 봉입한다.

염색결과 핵은 청색으로 염색되며 세포질, 결합조직 그리고 적혈구와 근육은 적색 또는 담홍색으로 염색된다.

5. 바이러스 檢査法

1) 바이러스 감염증의 진단

바이러스 감염이 실제로 질병을 일으킨 것일까 아닐까를 알기 위해서는 임상적 검사나 병리조직학적 검사를 동시에 하지 않으면 안된다. 임상적으로 증상을 나타내고 있는 물고기로부터 바이러스를 분리하였다 하더라도 그 바이러스가 질병을 일으켰음을 의미하는 것은 아니다.

몇 가지 방법이 바이러스 감염증의 실험실 진단으로 쓰여지고 있다.

① 조직배양증의 바이러스의 증식과 그 후의 분리주의 동정이 현재 가장 유효하게 널리 사용되고 있다. 그러나 보통 3일에서 늦으면 20일 이상 시간이 소요된다.

② 감염된 조직의 전자현미경적 검사에 의한 바이러스의 직접검출

③ 혈청학적 방법 : 바이러스를 중화하는 특이 항체 또는 면역형광검사법이나 겔내확산법에 의한 특이항원의 숙주내에 있어서의 증명

초기의 바이러스 연구에는 혈청증이나 다른 자연 조직액중에서 배양된 조직 전체가 사용되었다. 그러나 어류바이러스학의 커다란 자극이 되었던 것은 Wolf 등에 의해 초대 단층 배양이 개발되어 후에 무지개송어 생식선 섬유아세포주인 RTG-2가 확립된 것이다. 현재 많은 어류 연구 세포주가 이용되고 있으며 많은 바이러스를 어류로부터 분류하고 있다.

2) 組織培養

물고기 조직의 배양 세포주는 바이러스를 분리하려고 하는 어종에서 유래하는 것을 사용하여야만 한다. 그러나 아직 연구가 되지 않은 종류를 취급하는 경우에는 初代培養이 중요하다. 세포는 배양액중에서 증식하며 유리나 플라스틱 용기의 벽면에 單層이라고 불리우는 1개의 세포 두께로 자라난다. 배양액은 염류, 아미노산류, 비타민류, 포도당, 혈청을 함유하며 세균이나 진균의 증식을 억제하기 위하여 항생물질을 사용하기도 한다. 바이러스가 포함되어 있다고 생각되는 사료를, 배양기의 벽면을 대략 60~80% 정도 증식한 상태의 세포에 接種한다.

(1) 어류로부터의 세포배양

a. 외부조직

① 외부조직은 수돗물로 씻은 후 멸균한 BSS중에서 행군다.

② 목적하는 조직을 떼어 BSS중에서 행군고 멸균한 용기에 넣는다. 아가미와 같은 조직은 완전히 세정하는 것은 어렵고, 가끔 Gram 양성 세균에 오염될 수 있다.

b. 내부조직

① 건강하다고 생각되는 어체가 취급하기 쉽

표 2. 日常使用되는 魚類由來의 繼代培養細胞

魚 種	細胞 略記號
무지개 송어(<i>Salmo gairdneri</i>)	RTG-2
Fathead minnow(<i>Pimephales promelas</i>)	FHM
Grunt 기(<i>Haemulon sciurus</i>)	GF
Bluegill(<i>Lepomis macrochirus</i>)	BF-2
Brown bullhead(<i>Ictalurus nebulosus</i>)	BB
大西洋産 연어(<i>Salmo salar</i>)	AS
금붕어(<i>Carassius auratus</i>)	SJU
Steeihead trout 胚體(<i>Salmo gairdneri</i>)	STE-137
King salmon-胚體(<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	CHSE-'14
Red swordtail 胚體(<i>Niphophorus helleri</i>)	SWT
Muskellunge 립프 肉腫(<i>Esoc masquinongy</i>)	-
무지개 송어 稚魚(<i>Salmo gairdneri</i>)	RTF-1

다. 외부 표면은 해부하기 전에 철저히 소독하여 두어야 한다. 70% ethanol로 씻은 후 benzalkonium chloride의 1/1000용액을 사용한다.

② 조직을 떼어낸다.

(2) 初代細胞培養

① 조직은 4℃에서 48시간 사용가능하지만 이상적으로는 신선한 것을 사용해야만 한다.

② 조직을 BSS나 PBS중에서 잘게 절단한다.

③ 0.25% trypsin을 함유하는 pH 7.2~7.4의 PBS로 소화시킨다. 소화는 고온(15~20℃)에서 비교적 단시간 또는 저온(4~6℃)에서 장시간 행한다.

④ 消化는 현탁액중에 세포나 細胞塊가 나타날 때 까지 행한다. 소화되지 않은 세포피를 모아서 trypsin을 첨가하여 더욱 작용시킨다.

⑤ 소화후에는 배양하는 세포를 200g로 10분간 원심분리하여 모은다. 이 단계에서의 열손상에 의한 위험은 원심전에 시료를 차게하여 감소시킨다.

⑥ 초대배양을 하기 위한 세포분산밀도가 배양을 확립하는 데 있어 매우 중요한데 정량적 회석법을 사용한다. 즉, 4℃에서 10분간, 200g 1회의 원심분리를 행하여, 얻어진 세포원액을 400~600배로 희석하여(1~3×10⁵ cells/ml)세포를 부유시킨다.

⑦ 분산은 화학적 방법에 의해 행하는 것이 가장 좋다. 기계적 방법으로 행하는 경우도 있

지만 이 방법으로는 세포가 감소되기 쉽다. 배양액을 버리고 EDTA(1:5000 EDT와 0.25% trypsin)로 세포단층을 덮는다. 8~10분후 소량의 칼슘을 넣어 작용을 멈춘다. 또 세포단층의 단면을 피펫으로 세게 불어 분산시킨다. 이 방법에 의한 생존률은 95% 전후이다.

(3) 魚類株化細胞(RTG-2)의 배양

RTG-2 세포는 10% 牛胎兒血清을 첨가하고 pH 7.2~7.4에서 완충시킨 Eagle의 MEM에서 증식한다. 세균과 진균의 증식을 억제하기 위해 배지 1ml당 penicillin 100IU와 streptomycin 100μg, nystain 25IU를 첨가한다.

숙주조직의 삼투압과의 관계는 별로 중요하지 않으나 고장액보다도 저장액이 약간 내성이 있다. 담수성 경골어의 경우는 조정이 필요없으나 해수성 경골어에서는 100ml당 0.45g의 NaCl을 첨가한다.

대부분의 어종은 0℃에서 37℃의 범위내의 각 온도에서 육성하지만, 변온동물의 세포의 온도 내성은 보통 15~22℃이다.

3) 바이러스의 分離

분리한 숙주조직으로부터 바이러스를 조직배양을 통해 바이러스를 증식시키고 적당한 방법에 의해 바이러스의 존재를 증명함을 의미한다.

바이러스가 세포에 감염한 경우 보통 새로운 바이러스입자를 연속적으로 방출시켜서 세포를 파괴한다. 이 과정중에 세포의 기본적인 형태는

여러가지로 변화하는데 이를 細胞病變效果(CPE)라고 부른다(그림 5~7). 예를 들면 Egtved virus에서는 감염을 받은 세포는 괴사하기 전에 球形化하는데 반해, IPN virus에서는 그 특징적인 가늘고 긴 형태를 유지한다.

또 봉입체는 바이러스가 감염된 세포에 잘 나타나서 특징이다. 몇가지 바이러스에서는 핵이나 세포질에 세포의 것과는 다른 염색을 나타내는 변화가 생긴다. 이는 바이러스성 단백질의 축적, 세포파편이 복제부위의 흔적이다. 일반적으로 herpes나 adenovirus에서는 세포질내 봉입체를 산생한다. 어류바이러스에 의해 산생되는 가장 현저한 봉입체는 lymphocystis virus에 감염된 섬유아세포의 세포질내에서 관찰된다.

(1) 시료의 처리

분리하는 재료는 바이러스가 존재함이 알려져 있거나 존재한다고 생각되는 부위나 환부로 부터 얻어진다. 죽기직전의 물고기나 이상한 행동을 나타내는 물고기를 고른다. 검사실에서 재료를 얻을 수 있는 최선의 방법은 살아있는 물고기를 갖고 오는 것이다. 이것이 불가능할 경우 시료는 동결하지 않고, 얼음에 채워서 보낸다. 몇몇의 바이러스는 동결에 의해 不活化되기 때문이다. 이 상태에서의 운반은 24시간을 넘지 않아야 한다. 시료가 도착을 하면 바로 처리하는데 조직의 자기 용해가 바이러스의 감염성을 파괴하기 때문이다. IPN 바이러스를 glycerin으로 보존하는 것과 같은 특별한 방법은 바이러스의 정체를 알고 있는 경우에만 가능하다.

검사실에서는 감염된 조직을 잘게 부수어 희석하고, 세포의 잔해를 제거하기 위해 원심분리를 하고, 세균의 오염을 막기위해 여과를 한다. 항생물질은 가끔 조직배양액 중에서 세균이나 진균의 증식을 막기위해 넣어진다.

(2) 조직배양에서 바이러스분리에 의한 IPN의 진단

어떤 어류바이러스는 분리에 있어서도 그 기본적인 원리는 같다. 검사해야 할 재료로부터 어떤 바이러스를 유리시키기 위해 재료를 분쇄하고 여과하여 세균이나 진균의 오염을 방지한다. 그리고 그 바이러스를 증식시켜 CPE를 생기도록 하기 위해 감수성이 있는 세포에 접종한다.

사용되는 정확한 조작방법은 검사를 하려는 재료의 상태에 따라 크게 좌우된다. 대부분의 경우 재료는 급성의 유행병에 의한 죽기 직전 또는 직후의 치어이다. 그러나 검사가 늦어질 경우에는 50% glycerin에 차게하여 보존해야만 한다.

4) 바이러스 증식의 확인

바이러스의 증식은 CPE로서 알려지는 세포의 외관의 병적변화에 의해 확인된다. CPE의 특징은 바이러스에 의해 어느정도 특이적이다. 세포의 구형화에 뒤따른 세포의 붕괴와 유리나 플라 스틱 용기벽으로부터의 박리가 일어나거나 또는 세포의 수축이나 팽창과 같은 다른 변성이 생기는 경우도 있다. 조직배양 중에서 증식하는 몇가지의 바이러스는 세포의 융합을 일으켜 syncytia(합포체)를 형성한다. 그렇지만 조직배양 중에서는 증식하지만 명백한 CPE를 형성하지 않는 바이러스도 있는데 이러한 경우 바이러스의 존재는 다른 방법으로 검출하지 않으면 안된다.

6. 眞菌의 分離

*Saprolegnia*속의 진균종은 물고기의 질병에 관계되는 곰팡이중에서 가장 널리 관찰되는 것이다. 일반적으로 진단은 용이하여 형태학적기준에 근거하여 행하지만 자세한 분류학적 또는 병원성의 연구에는 분리 배양이나 생화학적 방법이 사용된다. 이들 진균은 어류에 가끔 유행하는 질병과 관계가 있으나 분리 배양 조작이 필요하게 되는 경우는 매우 드물어 *Saprolegnia*의 표준적인 방법만을 기술한다.

菌系體의 부분을 세정하고 여과지로 수분을 흡수한뒤 적당한 한천배지의 중앙에 놓는다. *Saprolegnia*속은 보통 어떤 세균보다도 급속히 증식한다. 한천의 표면에 증식하고 있는 콜로니의 한끝으로부터 주의깊게 균사의 선단을 잘라내어 새로운 한천 평판으로 옮긴다. 여러 오염은 막기 위해서는 이식을 반복하여야 할 필요가 있다. 그러나 세균오염이 없는 콜로니는 보통 1~2회의 이식으로 얻어진다. 遊走子囊으로부터 발생하는 孢子를 모으기 위해서는 마이크로 피펫을 사용한다. 포자 부유액을 배지의 중앙에 부분적으로 담구어 놓은 유리輪(glass ring)안에 넣

는다. 유리輪의 외측까지 성장한 뒤에 군사의 선단을 잘라낸다. 1개의 포자를 분리하기 위해서는 마이크로 피펫으로 한천평판 배지위를 분획한다. 포자가 성장을 시작하면(6~12시간), 즉시 발아한 군사체를 분리한다. 세균오염이 계속 될 경우 항생물질을 배지에 첨가하거나 배지를

자외선으로 조사하는 것이 유효하다.

배지는 보통 glucose-glutamate 배지, cornmeal 한천배지 그리고 (Gys)-tellurite 한천 또는 (Yps-s)-tellurite 한천배지가 水生菌科의 증식에 사용된다. 보존은 자주 계대배양을 하든가 mineral oil에 의한 보존법을 사용한다.

“Veterinarian Oath”



“따뜻한 가슴을 가진 의사”

살아있음을 느낍니다
따뜻한 체온으로,
힘찬 심장의 박동으로...

그리고 나는 쓰러진 가축을 일으켜 세우는
수의사임으로 서칼세를 처방합니다.
함께 일어서서 푸른 미래를 향하고자...



수의사의 권위와 품위를 존중하는
주식 과학축산
수신자부담
전화서비스 080-023-2361

