

## 능성어, *Epinephelus septemfasciatus*의 바이러스성 신경괴사증 바이러스의 병원성 연구

손상규<sup>†</sup> · 전세규\*

국립수산진흥원 병리과 · \*한국어병연구소

능성어의 바이러스성 신경괴사증 바이러스(fish nodavirus)의 병원성을 능성어 및 다른 해산어류를 대상으로 인위감염법에 의해 조사한 결과, 능성어 바이러스성 신경괴사증 바이러스는 능성어에서는 소형어(27 g)부터 대형어(104 g)까지 폐사를 일으켜 강한 병원성을 나타냈지만, 실험에 사용한 크기의 방어(537 g), 참돔(207 g), 돌돔(43 g), 넙치(41 g), 자주복(27 g) 및 조피볼락(94 g)에는 폐사를 일으키지 않아 병원성을 나타내지 않았다. 그리고 사육수온별 능성어에 대한 바이러스의 병원성은 수온 15°C에서는 병원성을 나타내지 않았고, 수온 20~28°C에서는 수온이 높을 수록 병원성을 강하게 나타냈다. 그리고 바이러스는 근육주사, 복강주사 및 경구감염뿐만 아니라 침지감염과 혼합사육감염에 의해서도 쉽게 능성어에 감염이 되지만, 감염 후 생존한 능성어에 대해서는 바이러스를 재감염시켜도 폐사가 일어나지 않았다.

**Key words** : Fsh nodavirus, Sevenband grouper, Pathogenicity, VNN

종묘생산시기의 해산어류의 뇌와 안구망막의 신경조직을 병리학적으로 vacuolation or spongiosis 시키는 특징이 있는 바이러스성 신경괴사증(viral nervous necrosis: VNN)은 크기가 25~34 nm인 unenveloped spherical RNA virus로서 Nodaviridae에 속하는 fish nodavirus 감염에 의한 것으로 알려져 있다(Mori *et al.*, 1992; Comps and Bonami, 1994; Munday *et al.*, 1994; Nishizawa *et al.*, 1994).

그런데, 최근에는 sevenband grouper(Fukuda *et al.*, 1996; Sohn *et al.*, 1998), shy drum(Pavoletti *et al.*, 1998), European sea bass(LeBreton *et al.*, 1997)과 같은 해산어류에서는 성어도 대량폐사를 일으킴으로 인해 바이러스성 신경괴사증 바이러스는 감염어종에 따라 병원성에 큰 차이가 있는 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 우리나라 남해안 일원 해상가두리 양식장에서 1989년 이후부터 매년 고수온기만 되면 양식산 능성어를 대량폐사 시키는 바이러스성 신경괴사증 바이러스에 대한 병원성을 규명하기 위해 바이러스성 신경괴사증에 감염된 능성어의 장기 마쇄여과액을 이용하여 어종별, 어체 크기별, 사육수온별,

감염방법별 병원성을 조사한 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 시험어

능성어의 바이러스성 신경괴사증 바이러스(fish nodavirus)의 병원성을 조사하기 위해 능성어 *Epinephelus septemfasciatus*(평균체중, 82 g), 방어 *Seriola quinqueradiata*(평균체중, 537 g), 참돔 *Chrysophrys major*(평균체중, 207 g), 돌돔 *Oplegnathus fasciatus*(평균체중, 43 g), 넙치 *Paralichthys olivaceus*(평균체중, 41 g), 조피볼락 *Seabastes schlegelii*(평균체중, 94 g) 및 자주복 *Takifuge rubripes*(평균체중, 29 g)을 사용하였다.

#### 시험어 사육

병원성 시험에는 여과 및 자연해수가 분당 7.8 l 씩 공급되는 F.R.P 유수식 원형수조(φ80×60cm, 순수량 250 l)를 사용하였으며, 시험어는 시험기간 동안 넙치용 배합사료를 매일 소량씩 급여하였다.

#### 바이러스액 제조

1990~1992년 남해안 일원 해상가두리 양식장

<sup>†</sup>Corresponding author

에서 바이러스성 신경괴사증(Sohn *et al.*, 1998)으로 대량폐사하여 냉동보관(-85°C)한 감염능성어의 장기조직(뇌, 안구, 간, 신장, 심장, 비장) 약 50 g을 멸균한 유발에 넣고 소량의 규사와 penicillin 1,000 I.U./ml와 streptomycin 1,000 µg/ml로 조정된 DMEM(Dubelco's minimal essential medium)을 9배량 첨가해서 저온상태에서 잘 마쇄한 후, 4°C에서 원심분리(5,000rpm, 2분)하고 상등액을 여과(0.45 µm membrane filter)해서 4°C에서 12시간 정치한 후 바이러스액(장기 마쇄여과액)을 제조하여 냉동보관(-85°C)하면서 각종실험에 사용하였다.

### 어종에 대한 병원성 시험

방어, 참돔, 능성어, 돌돔, 조피볼락, 자주복 및 넙치 각 10마리씩의 등근육에 바이러스액을 어체 크기에 따라 방어는 0.3 ml씩, 참돔은 0.2 ml씩, 나머지 어종은 0.1 ml씩을 접종한 후, 방어는 3,000 I.F.R.P 유수식 원형수조에, 나머지 어류는 250 I.F.R.P 유수식 원형 수조에 수용하고 수온 23.3±0.5°C에서 20일 동안 방어는 모이스트펠렛을, 나머지 어류는 넙치용 배합사료를 소량씩 급여하면서 바이러스의 병원성을 폐사유무로 관찰하였다.

### 농성어에 대한 병원성 시험

#### 1)어체크기별 시험

평균체중 104 g, 54 g 및 29 g인 능성어 각 10마리씩의 등근육에 바이러스액 0.1 ml씩을 접종하여 수온 23.6±0.7°C에서 15일동안 폐사유무를 관찰하여 병원성을 확인하였다.

#### 2)사육수온별 시험

사육수온을 28±0.2°C, 25±0.5°C, 20±0.7°C, 15±0.3°C로 조정된 사육수조에 수용중인 능성어 10마리씩의 등근육에 바이러스액 0.1 ml씩을 접종하고, 15일동안 폐사유무를 관찰하여 병원성을 확인하였다.

#### 3)감염방법별 시험

근육 및 복강주사 감염시험은 능성어 10마리씩의 등근육과 복강에 바이러스액 0.1 ml씩을 각각 주사하였고, 경구 감염시험은 바이러스액 0.1 ml씩을 넙치용 배합사료 분말에 흡착시켜 젤라틴 캡셀에 넣고 능성어 10마리에 강제로 경구투여하였으며, 침지 감염시험은 23°C로 조정된 여과해수 5 l에 바이러스액 5 ml를 넣고 능성어 10마리를 1시간동안 침지한 후 250 I.F.R.P 유수식 원형수조에 수용하였으며, 혼합 감염시험은 바이러스액 0.1 ml씩을 등근육에 주사한 능성어 10마리와 건강한 능성어 10마리를 혼합 수용한 후, 감염 시험구 모두 수온 23±0.5°C에서 23일동안 폐사유무를 관찰하여 병원성을 확인하였다.

### 바이러스 재감염시험

바이러스 인위감염(근육 및 복강주사, 경구 및 침지감염)후 3, 9개월동안 생존한 능성어 10마리씩에 바이러스액 0.1 ml씩을 등근육에 재주사하여 수온 24.5±0.5°C에서 30일동안 사육하면서 바이러스 감염후 생존한 능성어에 대한 능성어 바이러스성 신경괴사증 바이러스의 재감염성을 폐사유무로 관찰하였다.

**Table 1.** Pathogenicity of the fish nodavirus, a causative virus of sevenband grouper viral nervous necrosis on the cultured marine fishes

Species	B.W.(g)	Dosage of inoculum (ml/fish)	No. of fish tested	No. of fish died	Percent mortality in 20 days
Yellowtail	537 ± 86	0.3	10	0	0
Red seabream	207 ± 50	0.2	10	0	0
Rock bream	43 ± 15	0.1	10	0	0
Flounder	41 ± 13	0.1	10	0	0
Tiger puffer	29 ± 6	0.1	10	0	0
Rockfish	94 ± 15	0.1	10	0	0
Grouper	82 ± 9	0.1	10	8	80

Fish were intramuscularly inoculated with homogenate of sevenband grouper infected with VNN.

**결 과**

**어종에 대한 병원성**

능성어의 바이러스성 신경과사증 바이러스(fish nodavirus)의 어종에 대한 병원성을 확인하기 위해 능성어 외에 방어, 참돔, 돌돔, 넙치, 자주복 및 조피볼락에 인위감염시켜 폐사유무를 관찰한 결과, Table 1에서 처럼 능성어 감염구에서는 바이러스 접종후 5, 6일째 각 4마리씩 폐사하여 시험종료 20일째까지 8마리가 폐사하여 누적폐사율이 80% 였으나, 방어, 참돔, 돌돔, 넙치, 복어 및 조피볼락 감염구에서는 시험기간동안 전혀 폐사가 일어나지 않았다.

**능성어 크기에 대한 병원성**

능성어의 바이러스성 신경과사증 바이러스를 크기가 다른 능성어에 인위감염시킨 후 병원성을 확

인한 결과, Table 2에서 처럼 크기가 작은 소형어 (평균체중, 29±3g)는 감염후 5일째 5마리, 6일째 3마리가 폐사하여 시험기간동안 누적폐사율이 80% 였으며, 중형어(평균체중, 54±7g) 및 대형어(평균 체중, 104±10g)는 감염후 5일째 및 6일째 각각 4 마리씩 폐사하여 시험기간동안 누적폐사율이 80% 으로 나타났다.

**사육수온에 대한 병원성**

사육수온에 따른 능성어의 바이러스성 신경과사 증 바이러스의 병원성을 확인하기 위해 바이러스 를 능성어에 인위감염시킨후 수온 28°C, 25°C, 20°C 및 15°C에 사육한 결과, Table 3에서 처럼 수온 28°C 시험구에서는 3일째 1마리가 폐사한 후 4일째 9마리가 전량 폐사하여 시험기간동안 누적 폐사율이 100%으로 나타났고, 수온 25°C 시험구 에서는 감염후 4일째 2마리, 5일째 3마리, 6일째

**Table 2.** Pathogenicity of the fish nodavirus by sizes of sevenband grouper

Experiment group	B.W. (g)	No. of fish tested	No. of fish died	Percent mortality in 15 days
IF <sup>1)</sup>	104 ± 10	10	8	80
	54 ± 7	10	8	80
	29 ± 3	10	8	80
CT <sup>2)</sup>	101 ± 13	10	0	0
	55 ± 8	10	0	0
	27 ± 7	10	0	0

<sup>1)</sup>Fish were intramuscularly inoculated with homogenate of sevenband grouper infected with VNN.

<sup>2)</sup>Fish were intramuscularly inoculated with DMEM as control.

**Table 3.** Pathogenicity of the fish nodavirus in different water temperatures

Experiment group	W.T. (°C)	B.W. (g)	No. of fish tested	No. of fish died	Percent mortality in 15 days
IF <sup>1)</sup>	28 ± 0.2	52 ± 10	10	10	100
	25 ± 0.5	53 ± 7	10	9	90
	20 ± 0.7	58 ± 2	10	7	70
	15 ± 0.3	54 ± 6	10	0	0
CT <sup>2)</sup>	28 ± 0.2	55 ± 7	5	0	0
	25 ± 0.5	51 ± 8	5	0	0
	20 ± 0.7	49 ± 12	5	0	0
	15 ± 0.3	59 ± 3	5	0	0

<sup>1)</sup>Fish were intramuscularly inoculated with homogenate of sevenband grouper infected with VNN.

<sup>2)</sup>Fish were intramuscularly inoculated with DMEM as control.

**Table 4.** Pathogenicity of the fish nodavirus by infection methods

Experiment group	B.W. (g)	No. of fish tested	No. of fish died	Percent mortality in 23 days
IF <sup>1)</sup>	54 ± 7	10	8	80
IP <sup>2)</sup>	49 ± 11	10	5	50
DP <sup>3)</sup>	45 ± 10	10	6	60
OR <sup>4)</sup>	50 ± 9	10	6	60
CH <sup>5)</sup>	48 ± 4	10	9	90
CT <sup>6)</sup>	51 ± 8	5	0	0

<sup>1)</sup>Fish were intramuscularly inoculated with homogenate of sevenband grouper infected with VNN.

<sup>2)</sup>Fish were intraperitoneally inoculated with homogenate of sevenband grouper infected with VNN.

<sup>3)</sup>Fish were dipped in 5 l sea water contained homogenate of sevenband grouper infected with VNN for 1 hour.

<sup>4)</sup>Fish were forced to feed gelatin capsules which were filled with the mixture of moistfeed containing homogenate of sevenband grouper infected with VNN.

<sup>5)</sup>Fish were cohoused with fish which were intramuscularly inoculated with homogenate of sevenband grouper infected with VNN.

<sup>6)</sup>Fish were intramuscularly inoculated with DMEM as control.

4마리가 폐사하여 누적폐사율이 90%였으며, 수온 20°C 시험구에서는 감염후 10일째 6마리, 11일째 1마리가 폐사하여 누적폐사율이 70%로 나타났다. 그러나 수온 15°C 시험구에서는 시험기간동안 폐사가 일어나지 않았으며 바이러스 감염증상도 육안적으로 전혀 관찰되지 않았다.

### 감염방법에 대한 병원성

감염방법에 따른 능성어의 바이러스성 신경괴사증 바이러스의 병원성을 확인하기 위해 바이러스를 능성어에 등근육주사감염, 복강주사감염, 경구투여감염, 침지감염 및 혼합사육감염을 실시한 결과, Table 4에서 처럼 등근육주사 감염시험구에서는 감염후 5, 6일째 각 4마리씩 폐사하여 시험기간동안 누적폐사율이 80%로 나타났고, 복강주사 감염시험구에서는 감염후 7일째 1마리, 9일째 2마리, 10일째 1마리, 15일째 1마리가 폐사하여 누적폐사율이 50%로 나타났으며, 경구투여 감염시험구에서는 감염후 19일째 1마리, 20일째 3마리, 21일째 2마리가 폐사하여 누적폐사율이 60%로 나

**Table 5.** Susceptibility of the survival sevenband grouper after infection with the fish nodavirus on the virus reinfection

Experiment group	B.W. (g)	No. of fish tested	No. of fish died	Percent mortality in 30 days
LF <sup>1)</sup>	55 ± 5	10	1	10
SF <sup>2)</sup>	49 ± 6	10	0	0
NF <sup>3)</sup>	53 ± 8	10	9	90

<sup>1)</sup>Fish which had been alive for 9 months after the first VNN infection were intramuscularly reinfected with homogenate of sevenband grouper infected with VNN.

<sup>2)</sup>Fish which had been alive for 3 months after the first VNN infection were intramuscularly inoculated with homogenate of sevenband grouper infected with VNN.

<sup>3)</sup>Fish which had never been infected were intramuscularly infected with homogenate of sevenband grouper infected with VNN.

타났다. 그리고 침지 감염시험구에서는 감염후 6일째 1마리, 7일째 2마리, 10일째 1마리가 폐사하여 누적폐사율이 60%로 나타났고, 바이러스에 인위감염시킨 능성어와 혼합사육한 시험구에서는 감염후 22일째 5마리, 23일째 3마리, 24일째 1마리가 폐사하여 시험기간동안 누적폐사율이 90%로 나타났다.

### 감염후 생존어에 대한 감수성

능성어의 바이러스성 신경괴사증 바이러스에 감염된 후 생존한 능성어에 대해서 바이러스를 재감염시킨 결과, Table 5에서 처럼 바이러스 감염후 9개월간 생존한 시험구에서는 재감염후 6일째 1마리가 폐사하여 시험기간동안 누적폐사율이 10%였으나, 3개월간 생존한 시험구에서는 시험기간동안 전혀 폐사가 일어나지 않았다. 그러나 대조구로서 바이러스에 감염되지 않은 능성어는 감염후 4일째 2마리, 5일째 3마리, 6일째 4마리가 폐사하여 누적폐사율이 90%로 나타났다.

## 고 찰

바이러스성 신경괴사증(viral nervous necrosis: VNN)은 해산어류의 larval and juvenile stage에 대량폐사를 일으키는 질병으로 알려져 왔으나, 최근에는 sevenband grouper, shy drum 및 European sea bass는 치어 뿐만 아니라 성어에서

도 폐사가 일어나 바이러스성 신경괴사증은 어종에 따라 병원성에 큰 차이가 있는 것으로 생각된다. 그래서 본 실험에서는 우리나라 남해안 일원 해상가두리 양식장에서 발병하여 매년 많은 폐사를 일으키는 능성어의 바이러스성 신경괴사증 바이러스(fish nodavirus)를 이용하여 해산어류에 병원성을 조사한 결과, Table 1에서와 같이 실험에 사용한 크기의 방어, 참돔, 돌돔, 넙치, 자주복 및 조피볼락에서는 병원성이 없었지만, 능성어에서는 Table 2와 같이 크기에 관계없이 병원성이 강하게 나타나 능성어의 신경괴사증 바이러스는 어종에 따라 병원성에 많은 차이가 있는 것을 알 수 있다.

그리고 본 실험결과에 의하면 능성어의 바이러스성 신경괴사증 바이러스는 실험에 사용한 크기(치어~성어)의 방어, 참돔, 돌돔, 넙치 자주복 및 조피볼락에는 병원성이 없었지만, 넙치(Nguyen *et al.*, 1994)나 자주복(Nakai *et al.*, 1994)의 larvae and juvenile에 바이러스성 신경괴사증이 발병한 사례가 있음을 감안하면, 능성어의 바이러스성 신경괴사증 바이러스도 방어, 참돔, 돌돔, 넙치, 자주복 및 조피볼락의 larvae and juvenile에 병원성을 나타낼 가능성을 전혀 배제할 수 없기 때문에 이에 대한 연구가 추후 수행되어야 할 것으로 생각된다.

일반적으로 바이러스성 신경괴사증은 해산어류의 larvae and juvenile에 대량폐사를 일으킴으로 인해 age-dependent 질병이라고 하지만, 본 실험에 의하면 능성어의 바이러스성 신경괴사증은 발병요건이 능성어 크기보다는 사육수온에 의해 좌우되며, 병원성은 사육수온이 높을수록 강하게 나타나기 때문에 능성어의 바이러스성 신경괴사증 바이러스는 고수온성 바이러스 인 것으로 사료된다.

그리고 능성어의 바이러스성 신경괴사증 바이러스는 인위감염실험에 의하면 다양한 경로를 통해 능성어에 감염이 이루어 짐을 알 수 있었는데, 특히 침지감염이나 감염어와 혼합사육에서도 감염이 된다는 것은 능성어의 바이러스성 신경괴사증 바이러스가 사육수를 통해 수평감염이 된다는 것을 의미하므로 이러한 수평감염이 해상가두리 양식장에서 양식능성어를 집단적으로 단기간내에 대량폐사 시키는 주요한 감염원으로 생각된다. 따라서 현실적으로 능성어 신경괴사증에 대한 치료약제가 없는 점을 감안하면 바이러스성 신경괴사증으로 인한 피해를 최소화 하기 위해서는 가두리 양식장으로

부터 감염어를 신속히 제거하여 바이러스 감염 확산을 방지해야 하지만, 보다 근원적으로 피해를 방지하기 위해서는 신경괴사증 바이러스에 감염되지 않은 건강한 능성어 종묘를 생산할 수 있는 기술을 시급히 개발해야 할 것으로 생각된다.

그리고 현지 능성어 양식장에서 바이러스성 신경괴사증에 의해 폐사가 일어난 후 생존한 능성어는 신경괴사증에 재감염되어도 대량폐사가 일어나지 않는다는 점을 감안하여 신경괴사증에 인위적으로 감염시킨 후 생존한 능성어를 대상으로 재감염시험을 실시한 결과, Table 5에서와 같이 신경괴사증에 감염된 후 생존한 능성어는 감염후 상당한 기간동안 재감염이 이루어지지 않았는데, 이러한 사실을 미루워 보면 신경괴사증 바이러스 감염에 의해 능성어가 방면면역성을 획득한 것으로 생각되지만, 이에 대한 연구를 보다 심도있게 수행한다면 능성어 신경괴사증에 대한 예방백신도 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

### 참고문헌

Comps, M., Pepin, J. F. and Bonami, J. R.: Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 123: 1-10, 1994.

Fukuda, Y., Nguyen, H. D., Furuhashi, M. and Nakai, T.: Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol.*, 31-3: 165-170, 1996.

Le-Breton, A., Grisez, L., Sweetman, J. and Ollevier, F.: Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus Labrax* L.: *J. Fish Dis.*, 20-2: 145-151, 1997.

Mori, K., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake K. and Furusawa, I.: Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack, *Pseudocaranx dentex* with nervous necrosis. *Virology*, 187: 368-371, 1992.

Munday, B. L., Nakai, T. and Nguyen, H. D.: Antigenic relationship of picorna-like virus of larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch, to the nodavirus of larval striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch and Schneider). *Australian Veterinary J.*, 71: 384, 1994.

Nakai, T., Nguyen, H. D., Nishizawa, T., Muroga, K., Arimoto, M. and Ootsuki, K.: Occurrence of viral nervous necrosis in kelp grouper and tiger grouper. *Fish Pathol.*, 29 : 211-212, 1994.

Nguyen, H. D., Mekuchi, T., Imura, K., Nakai, T., Nish-

- izawa, T. and Muroga, K.: Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish Sci.*, 60-5: 551-554, 1994.
- Nishizawa, T., Mori, K., Nakai, T., Furusawa, I. and Muroga, K.: Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquatic Organisms*, 18: 103-107, 1994.
- Pavoletti, E., Prearo, M., Ghittino, M. and Ghittino, C.: Cases of viral nervous necrosis (VNN) in shy drum, *Umbrina cirrosa* with description of clinical symptomatology and anatomo-histopathological features. *Bull. Soc. Ital. Pathol. Ittica.*, 10-23: 24-33, 1998.
- Sohn, S. G., Park, M. A., Oh, M. J. and Chun, S. K.: A fish nodavirus isolated cultured sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *J. Fish Pathol.*, 11-2: 97-104, 1998.

## Pathogenicity of the fish nodavirus causing viral nervous necrosis of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*

Sang-Gyu Sohn and Seh-Kyu Chun\*

*Pathology Division, National Fisheries and Development Institute, Pusan 619-600, Korea*

*\*Korean Fish Disease Laboratory, Pusan 608-032, Korea*

The pathogenicity of the fish nodavirus causing viral nervous necrosis (VNN) of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* was examined in sevenband grouper and other marine fish by intramuscular injection. Sevenband groupers of 27~104 g in body weight were highly susceptible to the fish nodavirus, but yellowtail (537 g in body weight), red seabream (207 g), rock bream (43 g), flounder (41 g), tiger puffer (27 g) and rockfish (94 g) of the sizes used to this experiment were not. The pathogenicity of the viral agent to the sevenband grouper was high without regard to fish sizes at rearing water temperature over 20°C, but not at 15°C. Therefore, susceptibility of sevenband grouper to the viral agent causing VNN was thought to be water temperature-dependent rather than fish size (age-dependent). Compared to the infectivity of the viral agent to sevenband grouper with artificial infection methods, fish were successfully affected by intramuscular, intraperitoneal, oral, dipping and cohabitation administrations although there were slight differences in mortalities among infection methods. And survival sevenband grouper after infection with the fish nodavirus was resistant to the reinfection for a long time.

---

*Key words* : Fish nodavirus, Sevenband grouper, Pathogenicity, VNN