

# 새우양식업을 위협하는 신종 바이러스질병과 대책



박재학

서울대학교 수의과대학 실험동물학 및 어병학교실

## 서론

1993년부터 서해안 및 남해안에서 양식하고 있는 대하에 90%가 넘는 높은 폐사율을 나타내는 바이러스성 질병이 발생하였다. 새우가 호지의 주변에서 가만히 정체하고 있다가 폐사를 하기 시작하는데, 죽기 시작하면 2-3일 이내에 같은 호지의 모든 새우가 폐사한다. 체색이 붉은 색을 띠고 손으로 새우를 잡을 수 있을 정도로 활력을 소실한다. Carapace 안쪽에 하얀 반점이 생기는 것이 이 질병의 특징적인 육안소견으로 나타나기 때문에 White spot disease라고도 불리는 이 질병은 태국, 대만, 일본, 중국, 미국, 인도에서도 발생이 보고되었다. 이 질병의 원인체는 대만에서 white spot syndrome baculovirus (WSBV)로, 일본에서 rod shaped nuclear virus in Penaeus japonica로, 태국에서는 systemic ectodermal and mesodermal baculovirus로 명명되었다. 국내에서는 본 연구실에서 전자현미경과 PCR법으로 원인체를 연구한 결과 대만이나 일본에서 발생하고 있는 baculovirus와 유사한 것을 밝혀

대한수의학회지 (1996년)와 Disease of Aquatic Organism (1998)에 발표하였다. 그러나 아직까지 이 질병의 확실한 예방법이나 치료법은 알려져 있지 않아 금년에도 강화도를 비롯하여 영종도 조암 등지에서 새우 양식에 많은 피해를 입고 있는 실정이다. 본고에서는 새우양식 중 가장 심각한 피해를 주는 질병인 White spot disease에 대하여 본 실험실에서 연구한 내용을 중심으로 소개하고자한다.

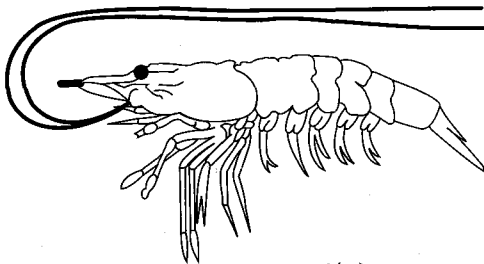
## 1. 국내양식새우 현황

국내의 새우양식은 서해안의 강화도로부터 남해안에 이르기까지 간석지를 이용하고 있는데, 대하(왕새우)와 보리새우를 양식하고 있다. 양식새우는 배합사료로만 투여하면서 4월부터 10월까지 약 6개월간에 출하가 가능하여 큰 질병 없이 사육한다면 어떠한 양식 어종보다도 부가가치가 큰 수산자원 중의 하나이다. 대하는 중국의 북부와 우리 나라의 서해안에

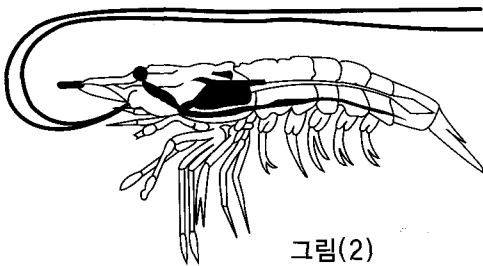
서식하는 대형 종의 새우로서 분류학상으로는 보리새우과의 보리새우속에 속한다.

① 새우의 형태

새우는 외견적으로는 크게 두흉부와 복부로 나뉜다. 두흉부는 갑피로 싸여있고 그속에는 간췌장, 위, 생식기 및 lymphoid organ 등이 있다. 또한 두흉부쪽에 있는 다리는 걸어다니는데 사용되며, 복부쪽에 있는 다리는 유영하는데 이용된다 (그림 1, 2)



그림(1)



그림(2)

② 생활환경

대하는 전북에서 충남연안에 이르는 수역에서 5-6월에 산란하여 8월까지 연안에서 성장하고, 9월부터 외해로 이동, 남하하여, 2-3월까지 월동장에서 월동한다. 3월 하순에 다시 북상하여 4월부터는 서해의 연안에서 잡히기 시

작한다. 대하는 자웅 이체로 11월까지 교미를 끝내 저정낭에 정충을 저장하고 있다. 양식을 하기 위해서는 4-5월에 연안에서 잡히는 대형새우 중 어미새우를 선별하여야한다. 포획한 어미새우를 사육 수온보다 2-3도 온도를 올려주면 2-3일 사이에 80-90%가 방란을 한다. 이때 방란과 동시에 자성 생식보조기에 의하여 정자가 방출되어 알은 수정된다. 부화는 수온에 따라 틀리지만 19°C에서 수정 후 35시간 이내에 완료된다.

부화된 후 유생은 3-4일만에 5회의 탈피를 하는데 이 시기를 Nauplius stage라하고, 다음 6회의 탈피를 마치면 Zoea stage (0.5mm)로 되고, 다시 3회의 탈피를 마치면 Mysis stage로 된 다음 또 3회의 탈피를 거쳐 Post larva로 된다. 먹이의 섭취는 Zoea stage기가 되면서 시작한다. 양식장은 강화도를 시작으로 영종도, 조암, 태안, 남해안까지 해안의 간석지에 3000평에서 1만여평의 호지를 만들어 사육하고 있다. 수심은 1-2m 정도이다. 새우는 산소를 많이 소모하므로 수면에 수차를 교반하여 산소를 공급한다.

새우도 다른 양식 어종과 마찬가지로 환경관리가 무엇보다도 중요하다. 특히 수질개선 및 일정한 수질환경유지가 감염성질병의 예방에 무엇보다 중요하다. 새우의 감염성 질병에는 바이러스성 질병으로 Baculovirus 감염증 등 12종류의 바이러스 감염증이 있으며, 세균성 질병으로는 비브리오팀이 대표적인 질병이다. 진균성 질병에는 아가미가 검게 변하는 흑색병이 있고 그 이외에 기생충성 질병 중에는 섬모충의 감염이 새우의 내부 및 외부에 기생한

다. 밀집 새우 양식은 고도의 생산성을 기대할 수 있지만 필연적으로 질병의 발생과 전파를 초래한다. 이러한 질병들의 가장 중요한 병원체는 높은 이환율과 치사율을 가지는 바이러스일 것이다.

본고에서는 최근에 새우양식업에 있어서 막대한 피해를 주고 있는 Baculovirus에 의한 White spot disease에 대하여 본 실험실에서 연구한 실적을 보고하고자 한다. 현재까지 조직학적인 방법이나, 전자현미경에 의한 신속한 진단, PCR을 이용한 유전자검색 등 진단법을 확립하였다. 그러나 아직 본 바이러스의 치료법이나 예방법에 대해서는 세계적으로도 알려진 바가 없으며 많은 연구진들이 개발하고자 하는 목표이다.

## 2. White spot disease의 진단

### ① 감염실험

건강한 새우를 병든 새우와 함께 동거시키거나 분리한 바이러스를 새우에 직접 주사한다. 사육수는 사육수를 이용하든지 또는 인공해수를 만들어서 사육한다. 수조는 acryl제 87×52 30m<sup>3</sup>의 크기가 적당하며, 바닥에 5cm의 모래를 깔고 산소공급기를 부착한다. 사료는 신선 사료등에서 시판되는 것을 이용하며 1일 2회 충분한 양을 투여한다. 사육수의 온도는 25-28℃로 조정한다

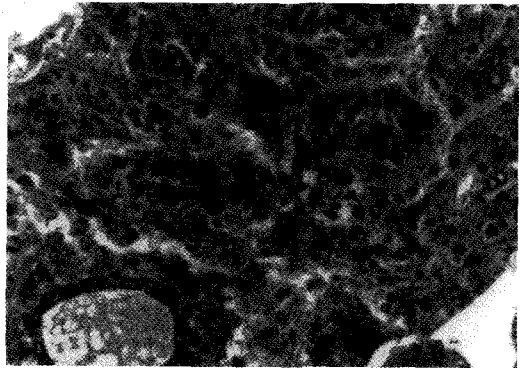
### ② 감염 새우의 임상증상 및 육안 병변

자연 감염된 새우는 호지의 주변부에서 활력을 잃고 정체해 있다. 실험적으로 감염된 새우는

감염 후 36-65 시간만에 임상증상을 나타내기 시작하는데, 특징적으로 S-shape swimming pattern, 쇠약, opaque musculature 및 laterally recumbent posture를 나타내며 건드려도 반응하지 않는다. 실험 감염을 해보면 감염 후 72 시간 이내에 죽거나 폐사 직전의 상태를 보인다. 자연 감염된 새우와 실험 감염된 새우 모두 임상증상이 유사하다.

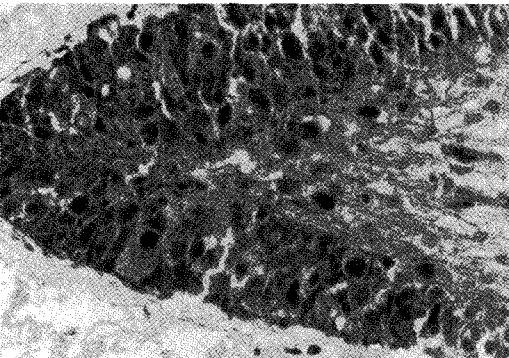
자연감염 및 실험 감염된 새우는 두흉부 carapace 안쪽에 하얀 반점이 보이며 몸이 붉게 변색되는 특징을 보인다. 그 밖의 장기에서는 어떠한 육안적 변화도 인지되지 않는다.

### ③ 감염 새우의 병리조직학적 병변



조직학적 관찰을 위해 새우를 Davidson's fixative에 1주일간 고정한다. 고정할때는 갑피를 제거할 필요는 없으며 두흉부의 복측을 가위로 조금 잘라 고정액이 잘 들어 가도록 한다. 또는 주사기로 고정액을 두흉부에 주입한 다음 고정액에 담그어 두어도 좋다. 고정 후, 두흉부를 입부터 두흉부의 끝까지 4절편으로 잘라 파라핀에 포매한다. 포매된 조직을 3μm로 자른 뒤 H&E염색을 하는데 Lymphoid organ이 나오도록 고정한다. 감염새우의 조직

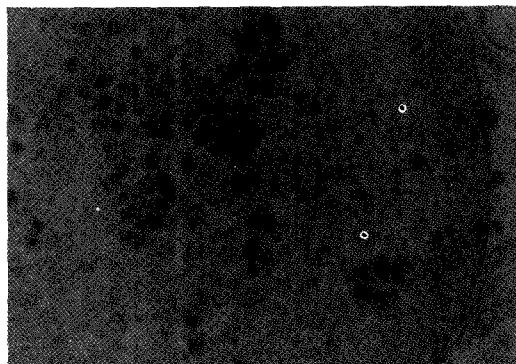
학적 변화는 lymphoid organ, 표피의 상피, 아가미 및 위에서 관찰된다. Lymphoid organ의 stromal cell은 대량괴사가 관찰되고, Tubule의 상피 역시 괴사가 일어나 tubular structure가 파괴된다(그림 3). 표피의 상피는 변성 또는 괴사되는데 변성된 상피에서 많은 수의 원형의 amphophilic 또는 basophilic 핵내봉입체가 관찰된다. 봉입체를 가진 핵은 핵막과 봉입체 사이에 공간이 존재하며 nucleoplasm은 핵막 쪽으로 밀려있다. 핵내봉입체를 가진 세포 및 변성된 세포는 세포질에 basophilic minute granules을 가지고 있다. 핵내봉입체는 아가미와 위 상피에서도 관찰이 된다(그림 4). 변성 또는 괴사된 세포 주위에 조혈세포의 침윤은 관찰되지 않으며 간체장의 상피에는 변화가 인지되지 않으나 간체장의 일부 간질세포에는 amphophilic한 핵내봉입체가 관찰된다.



④ 전자현미경관찰

신속한 진단법으로 감염새우의 Lymphoid organ을 Negative staining을 하여 관찰하는 방법이 있다. 본 연구실에서는 조직학적 또는 PCR법등을 이용기전에 Negative staining으로 1시간 이내에 진단하고 있다. 그러나 바이러스

입자가 관찰 되었지만 발병하지 않는 경우도 보고되어 있다. 따라서 조직학적인 진단을 병용하여 확정적인 진단을 하는 것이 바람직하다. 조직학적으로 병변이 관찰 된 부분을 전자현미경으로 관찰하여 바이러스 입자를 확인 하는 방법이 가장 확실한 진단방법이지만 시간이 많이 소요된다. 전자현미경으로 관찰하기 위하여는 새우의 간체장을 잘라 4℃에서 2.5% glutaraldehyde에 4-5시간 고정한다. 세척 후, 샘플을 osmium tetroxide에 100분간 고정하고 Epoxy 812에 포매하여 박절하여 관찰한다. 보다 신속하게 진단하기 위하여는 H&E으로 염색된 조직절편중 핵내 봉입체가 관찰 된 부분을 Epoxy 812에 포매하고 diamond knife를 사용하여 70nm로 절편을 작제한다음 Uranium과 Lead로 이중 염색하여 JEOL 100CX 전자현미경으로 관찰하기도 한다. 전자현미경상에서는 간체장의 일부 간질세포에 막대기 모양의 envelope을 가진 virus particle을 핵 내에 가지고 있다. 바이러스의 크기는 375 × 167nm로, nucleocapsid의 크기는 290 × 75nm이다(그림 5). Virus particle은 lymphoid organ의 여러 세포의 핵에서 관찰이 된다.



⑤ PCR을 이용한 viral DNA의 증폭

새우를 TE buffer(10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6)로 세척하고 두흉부를 extraction buffer (10mM HEPES, 0.4 N NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1mM DTT, 2.5 mM phenylmethyl-sulfonylfluoride, 1 $\mu$ g/ml leupeptin, 1.6 $\mu$ g/ml pepstatin)에 담그고 bead beater를 이용하여 마쇄한다 (20 times of 20 s pulse and 20 s rest). Homogenate을 5000 $\times$ g로 10분간 원심을 돌리고 상층액을 채취하여 0.45 $\mu$ m membrane(cellulose acetate, Gelman Sciences)으로 filtering하였다. Filterate을 4 $^{\circ}$ C에서 100,000 $\times$ g로 1시간 원심을 돌리고 Pellet을 소량의 TE buffer(pH 8.0)에서 하룻밤 보관한다. Pellet을 부드럽게 재부유시킨 후 10% 와 50% discontinuous sucrose gradient에 에서 100,000 $\times$ g로 1시간 원심을 돌리고 Viral band를 피펫으로 채취하여 TE buffer에 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 100,000 $\times$ g로 원심을 한다. 원심 후 10%와 50% sucrose gradient 사이에 band가 형성되어 이를 채취한다. 이로부터 Genomic DNA를 추출한다.

즉, 바이러스를 0.5% (W/V) SDS, 1mM EDTA, 1mg/ml proteinase K가 들어있는 TE buffer에 넣고 5 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응을 시킨후 Phenol-chloroform으로 추출하고 ethanol precipitation을 한다. 일본에서 확인한 RV-PJ의 643 bp를 증폭시키기 위하여 sense orientation의 primer (5' GACA-GAGATATGCACGCCAA3' )와 antisense orientation의 primer (5' ACCAGT GTTTCGTCATGGAG 3' )를 이용한다.

Reaction tube는 2 $\mu$ g의 viral genomic DNA, 각

각의 primer 100 pM, 각각의 dNTP 200 $\mu$ M, 10mM Tris-Cl(pH 8.8), 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100, Vent DNA polymerase (New England Biolabs, Inc. U.S.A.) 1U로 구성한다. Reaction tube를 1분간 95 $^{\circ}$ C로 가열하여 DNA를 denature 시키고 다시 55 $^{\circ}$ C (annealing temperature for the remaining 30 cycles)로 식혀(annealing temperature for the first two cycles) 2분간 식힌 후, reaction tube를 72 $^{\circ}$ C로 가열하여 2분간 incubation시키고 마지막 cycle 후에 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 extension시킨다. 총 32 cycle의 증폭을 실시한다.

WSBV의 1447 bp를 증폭시키기 위하여 대만에서 보고가 된 oligonucleotide primer를 사용한다. Reaction buffer는 RV-PJ에 사용하였던 것과 동일하게 한다. 증폭은 94 $^{\circ}$ C 4분, 50 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 3분 1 cycle과 94 $^{\circ}$ C 4분, 50 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 3분 32 cycles 그리고 마지막으로 40 cycle 후에 72 $^{\circ}$ C에서 5분간의 extension으로 구성한다. PCR 산물을 0.8% agarose gel에 전기영동을 실시하여 분석한다.

⑥ In situ hybridization.

조직내에서 바이러스의 유전자를 신속하게 확인하여 HE염색결과의 확인 수단으로 이용한다. 포르말린으로 고정하고 파라핀에 포매한 조직을 5 $\mu$ m로 잘라 "superFrost/plus" slides(Fisher Scientific, USA)에 붙이고 실온에서 저장한다. 전처리과정을 거쳐 denature된 biotin labeled probe(50 $\mu$ l)를 조직 절편 위에 놓고 in situ hybridization 동안 probe의 손실을 막기 위해 Easiseal(Hybaidd, UK)로 봉한다.

Biotin-labeling은 1 $\mu$ g 의 DNA가 들어있는 Recation mixture를 Biontin-chem-link kit(Boehringer Mannheim, Germany)을 사용하여 실시한다.

조직 절편에서 target DNA를 denature하기 위해 각각의 slide를 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하고 in situ PCR machine (Touchdown, Hybaid, UK)으로 45 $^{\circ}$ C에서 하루동안 hybridization한다. 다음날 slide를 실온에서 5분간 4 $\times$  SCC로 2회, 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 2 $\times$ SCC로 2회, 실온에서 5분간 2 $\times$  SCC 및 0.2 SCC로 2회 연속적으로 철저히 세척한다. Signal을 ABC kit(Vectastatin, USA) 및 DAB kit(Vector Laboratories, USA)로 detection한다.

Baculovirus에 자연감염 및 실험감염된 새우로부터 얻은 조직 절편은 In situ hybridization에서 biotin-labeled probe에 반응한다. Positive signal은 lymphoid organ, foregut, 상피 및 아가미 등 감염새우의 mesoderm 또는 ectoderm에서 유래한 여러 조직의 핵에서 detection된다. Foregut의 안쪽과 함께 상피의 대부분의 핵에서 강한 positive signal이 관찰되지만 Hematopoietic cell과 간질세포에서는 약간의 positive signal 만이 보인다. 아가미와 표피의 상피에서도 약간의 positive signal이 보인다.

### 3. 대책

지금까지 penaeid shrimp에서 다섯 개의 주요 species-Parvoviridae, Baculoviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae 및 Togaviridae-를 포함하는 12

개 이상의 virus가 알려져 있다(Wang and others 1997). 이들 바이러스 가운데 baculovirus가 가장 흔한 병원체인 것으로 밝혀졌으며 이는 새우 양식에 넓게 분포되어 있다(Wang and others 1997).

Penaid shrimp에서 Baculovirus에 의해 발생하는 새우 질병은 Baculovirus Penaeid infection, Monodon baculovirus disease, Baculoviral mid-gut gland necrosis 그리고 Yellow head virus infection 등이다. 이러한 질병들의 표적기관은 Yellow head virus를 제외하고는 모두 간췌장이다. Yellow head virus는 lymphoid organ의 심한 괴사와 더불어 놓은 폐사율을 가지며 세포질에서 RNA 증식을 한다.

1993년부터 국내에 발생하기 시작하여 새우 양식업에 큰 피해를 주고 있는 WSDV는 태국, 일본 및 대만에서도 발생되었다. 일본에서는 이 질병이 Penaeus japonica에 감염되어 크나 큰 경제적 손실을 가져왔다. 전자현미경 관찰에서 lymphoid organ에 non-occluded bacilliform virus가 관찰되었다. 따라서 그 형태를 따서 이것을 rod-shaped nuclear virus of P. japonica (RV-PJ)라 명명하였다. 태국에서는 기둥모양 또는 난원형의 바이러스가 전자현미경적 관찰로 보여졌으며 systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) 라 명명하였다. 이 바이러스는 P. monodon, P. orientalis, P. merguensis, P. indicus, P. vannamei, P. japonica 등에 감염된다. SEMBV와 유사한 질병이 태국에서 보고되어 carapace 안쪽에 하얀 반점을 형성하는 특징을 따서 Baculovirus associate-

white spot syndrome (WSBV)이라 명명되었다. 이 바이러스는 spindle 또는 막대기 형이었으며 70-150×250-380nm의 크기로 150kbp의 double stranded DNA를 가졌다. 우리는 병든 새우의 간체장에서부터 막대기 모양의 바이러스를 찾아내었다. 간체장은 대부분의 새우 바이러스의 표적기관이다. 바이러스의 크기(167×375nm)는 일본에서 발견된 RV-PJ(83×275nm) 보다 컸다. 형태학적 특징, 형태 및 크기로 볼 때 이 바이러스는 대만의 WSBV와 유사하게 보였다. 그러나 WSBV가 아닌 RV-PJ specific primer를 사용한 PCR은 RV-PJ와 동일한 크기와 DNA sequence를 가진 PCR 산물을 생산하였다.

지금까지 본 실험실에서 연구한 결과를 보면, 실험 감염된 새우는 자연 감염된 새우와 동일한 임상증상 및 조직병리학적관찰 결과를 보였으며, 전자현미경 관찰에서 baculovirus의 존재를 확인할 수 있었다. 가장 현저한 조직병리학적 변화를 나타낸 기관은 lymphoid organ이었다.

자연 감염된 새우와 실험 감염된 새우 모두에서 in situ hybridization 과 PCR을 통해 viral DNA를 detection할 수 있었다. 각각의 slide마다 나타나는 signal의 강도가 다르긴 했지만, RV-PJ의 DNA sequence에 대한 양성반응을 나타내는 흑갈색 침전물의 존재는 조직상에서 감염세포의 봉입체 존재 여부와 일치하였다. 우리의 연구결과는 in situ hybridization의 결과가 조직병리학적 관찰로부터 얻은 결과와

동일함을 보여주었다. Hematoxylin and eosin staining section과 동일한 조직 샘플의 비교는 대부분의 positive cell은 Lymphoid organ 및 표피의 상피에 분포함을 보여주었다.

현재 WSD는 전세계적으로 발생하여 양식새우에 많은 피해를 주고 있는 실정이지만 뚜렷한 대책이 없다. 새우의 면역체계는 척추동물과는 틀려서 백신의 개발에도 어려움이 있다. 새우의 면역체계에 관한 문헌이나 정보를 입수하는 것도 어려움중의 하나이다. 대부분의 척추동물에 감염하는 병원체는 숙주의 항체생성과 더불어 쇠퇴기를 맞이하다가 다시 창궐하는 양상을 보이지만 WSD에 대한 저항성을 갖는 새우가 나타났다는 보고는 아직도 없다.

국내에서도 Glucan제제를 사료에 첨가하여 면역능력을 향상시키도록하고 염소소독제로 새우의 입식전에 호지를 소독하여 바이러스를 소멸시키기도 하지만 뚜렷한 효과를 보지 못하고 있다. 양식업에 큰 피해를 주고 있는 WSD와 같은 급성바이러스성 질병은 빠르고 정확한 진단법을 확립하는 것이 무엇보다도 중요하며 이러한 진단법을 바탕으로 철저한 방역대책을 확립하여 적절한 예방법 및 치료법을 찾는 것이 바람직하다. 병원성을 보이지 않는 유전적으로 조작된 신종 WSDV의 작제, WSDV에 저항성을 보이는 신품종의 새우육성, 새우의 면역체계를 이해하고 면역력을 증강시킬 수 있는 방법의 모색등이 앞으로 풀어나가야 할 숙제로 생각된다.