

양식 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서 발생한 램도바이러스성 질병의 병리조직학적 특징

이남실[†] · 강형길 · 최희정* · 전세규** · 박남규*** · 허민도

부경대학교 수산과학대학 수산생명의학과, *국립수산과학원 병리연구과, **한국어병연구소,

***부경대학교 수산과학대학 생물공학과

Histopathology of a rhabdoviral disease of farmed flounder, *Paralichthys olivaceus*

Nam-Sil Lee[†], Hyung-Gil Kang, Hee-Jung Choi*, Se-Kyu Chun**,

Nam-Kyu Park***, Min-Do Huh

Department of Aquatic Life Medicine, College of Fisheries Science,
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

*National Fisheries Research and Development Institute, Pathology Division, Busan 619-900, Korea

**Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University

***Laboratory of Fish Disease, Busan, Korea.

On April of 2000 and February of 2001, a disease characterized by darkening, ascites and enlargement of the spleen occurred in flounder, *Paralichthys olivaceus*, farmed near northern and eastern coasts of Korea. Various degree of necrosis including liquefactive-type was observed mainly in hemopoietic tissue of spleen and kidney. Certain tissue such as branchial soft tissue including epithelium showed a similar necrotic findings. But some tissues such as intestine had several necrotic clusters of wandering cells, being possibly leukocytes. Necrotic evidences of blood cells were evident in various tissues including hemopoietic tissues. Necrobiotic bodies were frequently encountered in blood smear preparations. Bullet type-virions were detected in the splenic cells. Each virion was about 50 nm in diameter and 170 nm in length. From these results, this disease was thought to be a rhabdoviral disease.

Key words : Darkening, Ascite, Necrotic degeneration in hemopoietic tissue, Leucocyte, Rhabdovirus

2000년 4월 초순, 우리나라 남해안 및 동해안의 일부 넙치 양식장에서 체색흑화, 복수저류 및 비장종대를 특징으로 하는 질병이 육상수조 양식 넙치에서 발생하였다. 이 질병은 10% 이상의 누적 폐사율을 나타내었다. 경북 구룡포 소재 넙치양식장에서도 유사 질병이 발생하였으며, 2001년 2월 말경부터 높은 폐사율을 나타내기 시작하여 4월 중순까지도 폐사가 지속되는 상황에 있었다.

일반 세균 및 기생충 검사에서 음성이었으며

로, 바이러스성 질병일 가능성을 중심으로 추적하였다. 넙치에서 복수증상을 동반하는 바이러스성 질병으로는 바이러스성 복수증(Sorimachi and Hara, 1985)과 램도바이러스 감염증(Kimura, et al., 1986; Oseko, et al., 1988)이 알려져 있다. 본 질병예의 경우 복수 뿐 아니라 비장 및 신장을 위주로 하는 조혈조직의 심한 괴사적 손상이 특징이었기 때문에 램도바이러스에 의한 감염증의 하나로 의심되었다.

어류질병을 일으키는 램도바이러스에는 infec-

[†]Corresponding Author

tious hematopoietic necrosis virus (IHNV), spring viraemia of carp virus(SVCV), viral haemorrhagic septicaemia virus(VHSV), hirame rhabdovirus infection(HRV)이 잘 알려져 있다. 그 외에도 eel virus American(EVA), pike fry rhabdovirus(PFRV), 그리고 eel virus European unknown(EVEX)등이 있다(Wolf, 1988; Woo and Bruno, 1999). 그러나 이 바이러스들은 대상 숙주나 임상적 특징 등에서 서로 차이를 보이는 것으로 되어 있다.

본 증례는 발생환경, 어종, 임상소견 및 조직학적 소견에 있어 HRV와 매우 유사하였다. 그러나 HRV를 포함한 rhabdovirus성 질병에서 흔하고 특징적인 충혈 내지 출혈성 병소가 확인되지 않았으므로 HRV와는 다른 질병일 가능성이 생각되어 병리조직학적 검사를 중심으로 세밀한 검토를 실시하였고, 그 결과를 토대로 이미 보고되어 있는 HRV의 소견과 비교·분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 임상검사 및 부검

2000년 4월 초순에는 남해 및 동해안의 육상 넙치 양식장에서, 2001년 2월에는 동해안에서 발병한 넙치의 임상적 관찰을 실시하고, 공통적으로 체색흑화 및 복부팽창 소견을 보이는 전형적인 병어를 채집하였다. 병어의 크기는 10~15 cm였으며, 매 해 20마리 이상을 검사하였다.

채집 병어는 실험실로 신속히 운반되었다. Benzocaine 포화액을 적당량 희석하여 마취한 후 기생충 검사를 위한 피부 및 아가미 생검(biopsy)을 실시하였다. 미병부(caudal peduncle)로부터 멸균 주사기를 사용하여 무균적으로 채혈하였으며, 채혈한 혈액은 세균검사용 평판배지 3종(Brain heart infusion agar, SS agar, TCBS agar, Difco)에 적하하여 도말하였다. 남은 혈액은 혈액 도말표본 제작과 hematocrit 측정에 사용하였다.

병어를 개복하여 내부 장기를 노출시킨 후 비장을 무균적으로 절취하여 절단면을 배지에 도말하여 세균감염을 확인하였다. 혈액 도말표본은 하루 동안 실온에서 건조시킨 후 May-Grunwald Giemsa(이하 May-Giemsa) 또는 PAS 염색을 실시하여 백혈구의 분별계수, 혈구의 형태학적 이상 유무에 대하여 조사하였다.

2. 병리조직학적 검사

각 장기에 대한 육안적 검사를 실시하는 동시에 각 장기(간, 비장, 두신, 체신, 소화관, 아가미, 뇌)를 절취하여 Bouin's solution에 전고정(prefixation)하였다. 24시간 후 각 장기를 세절한 다음 상기와 동일 고정액에 후고정(postfixation)을 실시하였다. 고정이 완료된 조직편을 70%에서 100%까지 순차농도의 에탄올 수용액 내에서 탈수하고 자일렌(xylene)으로 투명화하여 파라핀을 침투시켜 포매하였다. Rotary형 microtome(Richert-Jung 820, Leica)으로 4~5 μ m 두께의 박편을 제작하여 Harris' hematoxyline-eosin(HE) 염색하여 광학현미경(BX50F4, Olympus)하에서 관찰하였다.

전자현미경적 관찰을 위하여 병어의 비장 조직편을 취하여 2.5% glutaraldehyde액에 4 $^{\circ}$ C, 하루 밤 전고정하였다. 0.1M phosphatic buffer(pH 7.0~7.4)에 10분간 3회 수세한 다음 4 $^{\circ}$ C에서 1% osmium tetroxide에 2시간 동안 후고정하였다. Buffer로 세번 수세하고, 50%~100% 순차농도의 에탄올 내에서 탈수과정을 거쳤다. Propylene oxide(PO)에서 치환 후 PO : Epon혼합비에 따라 순차적으로 침투과정을 행한 후, 침투 완료된 조직편은 Epon 혼합물과 함께 holder에 넣어 포매하고 40 $^{\circ}$ C에서 12시간, 60 $^{\circ}$ C에서 48시간, 열중합시켰다. Ultramicrotome(MT-7000, RMC, USA)으로 초박편(ultrathin section)을 얻어 grid에 올리고 uranyl acetate 와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경(JEM 2010, Jeol)을 사용하여 관찰하였다.

결 과

1. 발생상황, 임상 및 부검 소견

병어의 발생은 2000년 4월 및 2001년 2월, 모두 저수온기에 발생하였다. 당시의 수온은 7~13°C로 기록되었다. 발병어는 전형적인 체색 흑화를 나타내었으며, 전반적으로 복부가 팽만하였다(Fig. 1). 치어 및 성어에 관계없이 본 질병의 발생이 확인 되었다. 해부학적 조사 결과, 복강 내에 모두 맑은 복수가 확인되었으며, 비장의 종대 외에는 내부장기에 육안적으로 특기할만한 병변이 관찰되지 않았다. 생체 표본 시료의 현미

경 관찰을 통한 기생충 검사 및 세균검사(혈액 및 비장)결과에서 모두 음성으로 나타났다.

2. 혈액학적 검사 결과

Hematocrit치는 모두 11개체의 병어를 대상으로 측정한 결과, 평균치는 약 20%로 나타났다. 그 범위는 9~29%로 심도 내지 중등도의 빈혈 소견을 나타내었다. 도말표본 관찰 결과 monocytosis와 neutrophilia 소견을 나타내었으며(Fig. 2), 변성 백혈구로 여겨지는 다수의 necrobiotic body가 관찰되었다. 괴사 혈구로 의심되는 핵붕괴 세포도 관찰되었다(Fig. 3).

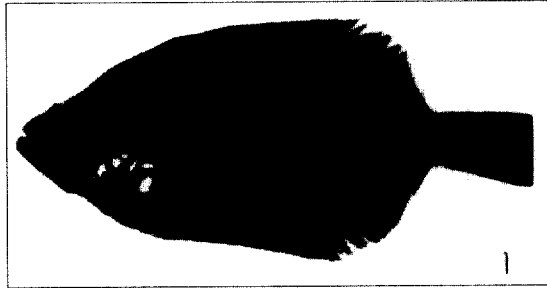


Fig. 1. External feature of the diseased fish. Note darkening of body and distension of abdominal region.

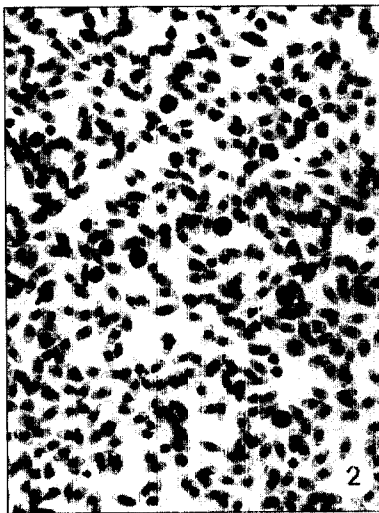


Fig. 2. Blood smear sample showing increase of monocyte and neutrophil (May-Giemsa, $\times 100$).

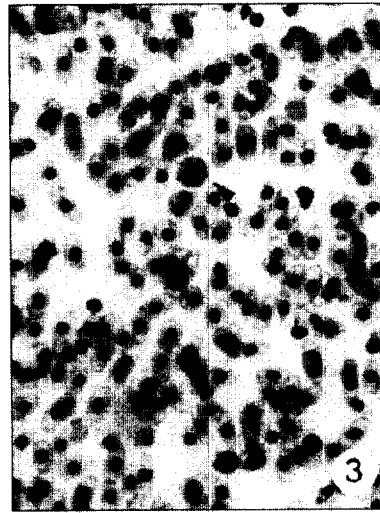


Fig. 3. Necrobiotic body (arrow head) formation in blood smear sample (May-Giemsa, $\times 200$).

3 병리조직학적 소견

주로 비장, 전신 및 후신의 조혈 영역을 중심으로 괴사 병변이 확인되었다. 괴사병변은 조혈 조직 전반에 걸쳐 괴사세포가 분포하는 미만적 괴사 형태와 용해성의 한국성 괴사소 형태로 확인되었다. 일부 건락성 괴사의 형태를 나타내는 괴사소도 관찰되었다. 조사된 전 개체의 비장은 그 협조직(ellipsoids)들이 비후되어 있었고

괴사 소견을 보였다(Fig. 4). 협조직 사이 영역, 소위 비수(parenchyma)에서도 미만 괴사가 인정되었다(Fig. 5).

후신 및 전신의 조혈영역 내 한국성 용해괴사소 내에는 괴사 melanomacrophage 유래로 생각되는 미세한 멜라닌 과립이 각종 괴사세포와 함께 산재하였다(Fig. 6, 7). 이외의 조혈조직 전역에 다수의 괴사세포가 산재하고 있었으나 세망



Fig. 4. Spleen. Ellipsoidal enlargement and necrotic focus adjacent to ellipsoids (HE, $\times 200$).

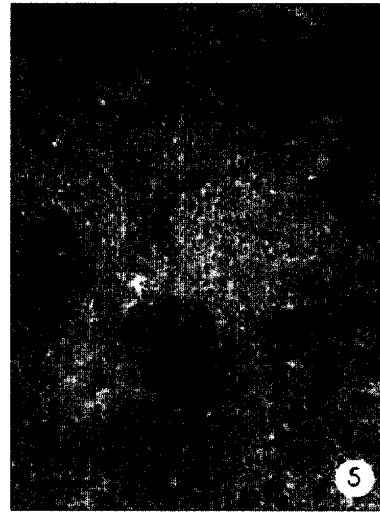


Fig. 5. Spleen. Severe necrotic degeneration is shown at splenic pulp and internal region of ellipsoids (HE, $\times 100$).

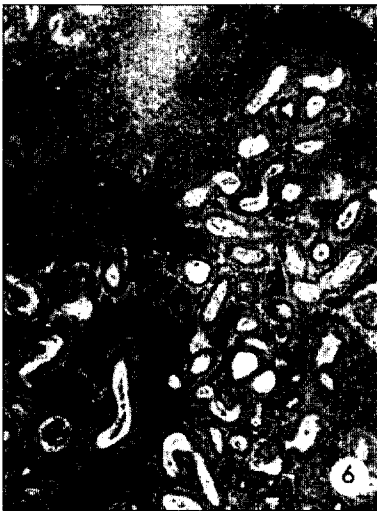


Fig. 6. Body kidney. Formed liquefactive necrotic foci at haemopoietic region (HE, $\times 100$).

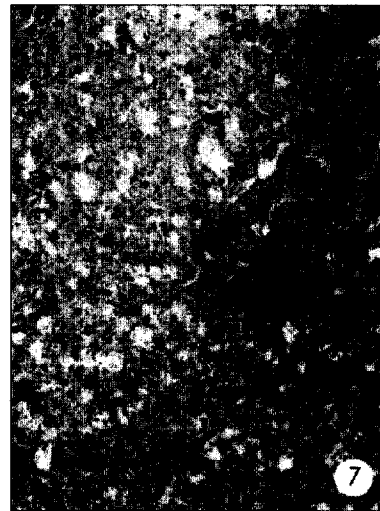


Fig. 7. Head kidney. Showing diffuse necrosis in the haemopoietic tissue (HE, $\times 200$).

구조에는 큰 변화가 없었다. 이러한 영역에 분포하는 신세뇨관에도 병변이 야기되지 않았다. 따라서 이들 영역 내 괴사 세포의 대부분은 유주성 백혈구로 의심되었다.

아가미의 새궁 상피 및 상피하 조직에서 미만적인 괴사영역이 확인되었다(Fig. 8). 이 외에도 이차새변 상피를 포함하여 혈관 내에서까지도 괴사세포가 확인되었다. 그리고 위의 위선부에

국소적으로 괴사세포 집단이 확인되었으며(Fig. 9). 위선부 조직 자체에 손상이 없는 것으로 미루어 위선부를 구성하고 있는 고정세포가 아닌 유주 중의 세포, 주로 백혈구들인 것으로 추정되었다.

일부 개체의 간에서는 동양혈관(sinusoid) 및 간채장과 인접한 결합조직 영역에 괴사세포 또는 그 집단이 확인되었다.



Fig. 8. Gill. Infiltration of lymphocytes and necrotic cells are shown at connective tissue of sub-epithelial region of gill arch (HE, $\times 100$).



Fig. 9. Stomach. Infiltration of necrotic cells at marginal gastric gland region and lamina propria (HE, $\times 200$).



Fig. 10. Ultramicroscopic feature of spleen. Bullet shaped virions are shown at the cytoplasm of degenerated cell (bar is 100 nm).

근육조직을 포함한 그 외 다른 부위의 조직에서는 특기할 만한 조직변성은 관찰되지 않았다.

병어의 비장 조직에 대한 전자현미경 관찰에서, 변성세포의 하나로 생각되는 세포의 세포질 내에서 탄환모양의 바이러스 입자가 관찰되었다. 바이러스 입자의 크기는 직경 54.3 ± 4.9 nm, 길이 173.1 ± 20.28 nm ($n=10$)로 측정되었으며, rhabdovirus와 그 형태가 유사한 것으로 생각되었다(Fig. 10).

고 찰

본 질병의 경우, 일반 세균 및 기생충 검사에서 음성이었고 복수 뿐 아니라 비장 및 신장을 위주로 하는 조혈조직의 괴사 병변이 특징적이었기 때문에 바이러스성 질병으로 추정하였다. 발생 당시 사육 수온이 $7 \sim 13^{\circ}\text{C}$ 로 낮은 시기였고, 병어의 임상 소견이나 조직변성 소견이 rhabdovirus 감염의 경우와 유사하였을 뿐만 아니라, 비장 내 변성세포의 전자현미경적 관찰에서 탄환형의 바이러스 입자가 확인되었다.

넙치의 감염원으로 확인되어진 rhabdovirus로는 hirame rhabdovirus(HRV)와 viral haemorrhagic septicaemia virus(VHSV)(Castric and Kinklein, 1984)가 알려져 있다. 따라서 이 두 가지 바이러스성 질병 중 하나에 이환되었을 가능성을 생각할 수 있었다.

HRV는 1984년, 일본 혼슈에서 처음 분리·보고되었으며, 1985년 북해도에서도 발생 보고가 있었다(Kimura *et al.*, 1986). 한편, VHSV의 경우, HRV보다 이전인 1960년대 초에 덴마크에서 빈번한 발생이 보고되었고, viral hemorrhagic septicemia라는 병명은 1963년 Altara(1963)의 보고에서 처음 나타나고 있다. 또한, 이 두 바이러스를 분자생물학적으로 서로 다른 바이러스인 것으로 구분하고 있다(Nishizawa *et al.*, 1991a,b). 우리나라에서는 Oh and Choi(1998)가 양식산 넙치에서 HRV-like 랩도바이러스의 분리를 보고하고 있는데, 외부증상의 경우 HRV와 매우 유

사한점을 나타내고 있으나 바이러스학적 성상은 약간의 차이점을 나타내어 새로운 랩도바이러스일 가능성을 시사하고 있다.

HRV 발병 넙치에서는 생식소, 체측근, 그리고 조혈조직을 포함한 내부 각 장기에서의 총·출혈 소견이 큰 특징의 하나인 것으로 기술하고 있다(Oseko *et al.*, 1988). 본 질병의 경우도 병리학적 소견에 있어 HRV와 많은 유사성을 가지는데 불구하고 HRV는 물론 VHSV에서 거의 공통적으로 나타나는 소견인 총·출혈 병변이 어느 예에서도 확인되지 않았다는 것이 매우 흥미로웠다. 또한 간 조직의 변성이 뚜렷하지 않은 점에서 VHSV의 가능성도 배제할 수는 없었다.

또 한가지 흥미로운 것은 이 바이러스의 표적세포(target cell)에 관한 것이다. HRV의 경우, 조혈조직의 괴사를 기술하고 있지만, 그 표적세포가 구체적으로 무엇인지에 대하여는 구체적으로 언급이 없었던 것으로 보인다. 조혈조직 내, 특히 신장 내 괴사상은 두가지로 확인되었는데, 그 하나는 조혈영역 전반에 걸친 세망구조의 큰 파괴없이 관찰되는 미만적 괴사상이며, 또 하나는 주로 원형의 용해 괴사소 소견이다. 조혈조직이 아닌 아가미의 새궁, 위선부에서도 괴사세포가 출현하지만, 특기할만한 조직학적 변성이 동반되지 않는다. 이러한 사실은, 혈관 내 괴사세포 출현, 혈액도말 표본 내에 다수의 necrotic body 출현 등과 함께 본 바이러스의 표적세포가 유주 백혈구일 가능성을 뒷받침하는 형태학적 소견으로 생각되었다.

조직표본 뿐만 아니라 혈액 도말표본에서도 괴사 적혈구로 생각되는 다수의 호산성 세포질에 핵농축을 동반한 세포가 동시에 관찰되어 적혈구계 세포도 표적세포에 포함될 가능성을 시사하였다. 낮은 hematocrit치는 주로 조혈조직의 괴사적 손상에 따른 재생 불량성 빈혈을 암시하지만, 말초의 성숙 적혈구 파괴에 의한 영향도 배제할 수 없었다.

이상의 결과로 미루어 저수온기 넙치에서 발생한 본 질병은, rhabdovirus성 질병의 하나일

것으로 생각되었으며, 출혈성 병변이 확인되지 않았다는 점에서 또 다른 종류의 rhabdovirus에 의한 질병의 가능성을 의심해 볼 수 있었다. 또한 HRV와 같이 표적 장기가 주로 조혈조직일 것으로 생각되지만, 그 표적세포가 주로 유주 중의 백혈구일 가능성을 제시하는 형태학적 증거가 다수 확보되었기에 앞으로 본 증과 HRV에 대한 보다 상세한 병리조직학적 정보가 필요한 것으로 사료되었다.

요약

2000년 4월경부터 (수온 7-13°C) 우리나라 동해와 남해안 육상 수조에서 사육되던 넙치에서 체색흑화, 복수저류, 비장종대의 육안적 소견을 보이는 질병이 발생하여 대량폐사를 불러왔다. 병리조직학적 소견으로, 비장과 신장의 조혈조직에서 괴사병변이 주로 나타났다. 비장과 신장의 간질조직에서 괴사소가 관찰되었으며, 임파구, 괴사세포의 침윤이 나타났다. 비장 조직의 전자현미경적 관찰에서 변성혈구 내 세포질에서 탄환형의 바이러스 입자가 관찰되었는데 직경과 길이가 각각 약 50nm, 170nm였다. 이상의 결과로 본 질병은 rhabdovirus에 의한 질병으로 판단되었다.

참고 문헌

Castric, J. and de Kinklein, P. : Experimental study of the susceptibility of two marine fish species, sea bass(*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*), to viral haemorrhagic septicaemia. *Aquaculture*, 41: 203-212, 1984.

- Kimura, T., Yoshimizu, M. and Corie, S. : A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame (Japanese flounder), *Paralichthyes olivaceus*, and ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.*, 1: 209-217, 1986.
- Oh, M. J. and Choi T. J. : A new rhabdovirus(HRV-like) isolated in Korea from cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.* 11: 129-136, 1988.
- Nishizawa, T., Yoshmizu, M., Winton, J., Ahne, W. and Kimura, T. : Characterization of structural proteins of hirame rhabdovirus, HRV. *Dis. Aquat. Org.* 10: 167-172. 1991(b).
- Nishizawa, T., Yoshmizu, M., Winton, J.R and Kimura, T. : Comparison of genome size and synthesis of structural proteins of hirame rhabdovirus, infectious hematopoietic necrosis virus, and viral hemorrhagic septicemia virus. *Gyobyo Kenkyu*, 26 : 77-81, 1991(a).
- Oseko, N., Yoshimizu, M., Dorie S. and Kimura T. : Histopathological study in diseased hirame (Japanese flounder; *Paralichthys olivaceus*) Infected with *Rhabdovirus olivaceus* (Hirame rhabdovirus; HRV). *Fish Pathol.*, 23: 117-123, 1988.
- Sorimachi, M., and Hara, T. : Characteristics and pathogenicity of a virus isolated from yellowtail fingerlings showing ascites. *Fish Pathol.*, 19: 231-238, 1985.
- Wolf, K. : Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University, 1988.
- Woo, P.T.K. and Bruno, D.W. : Fish diseases and disorders., Vol.3 Viral, Bacterial and Fungal Infections., CAB International, 57-244 pp, 1999.