

양식산 터봇, *Scophthalmus maximus*에서의 Irido-like virus 감염

김위식 · 김기홍 · 김춘섭 · 김영진 · 정성주 · 정태성* · 키타무라 신이치 ·
요시미즈 마모루** · 오명주†

여수대학교 수산생명의학과, *경상대학교 수의학과, **북해도 대학 수산학부

The infection of irido-like virus in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*)

Wi-Sik Kim, Ki-Hong Kim, Choon-Sup Kim, Young-Jin Kim, Sung-Ju Jung,
Tae-Sung Jung*, Shin-Ichi Kitamura, Mamoru Yoshimizu** and Myung-Joo Oh†

Department of Aqualife Medicine, Yosu National University, Korea

*College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

**Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Japan

The high mortality of cultured juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* occurred in Gochang on June, 2003. The diseased fish was lethargic with reduced feed intake. Grossly, these fish showed pale body, abdominal extension and exophthalmia. The dominant internal gross features of diseased fish were severely enlarged spleen, pale gills and/ or liver. Diseased fish histologically showed basophilic enlarged cells in the kidney, spleen, gill, heart, stomach, intestine, liver, pancreas and adipose tissue. Transmission electron microscopy (TEM) revealed hexagonal virions in the cytoplasm of necrotic cells. The viral particles had a central electron-dense core and an electron translucent zone, and were 136~159 nm in diameter. These results suggest that the virus belonging to the Iridoviridae was responsible for the mortality of cultured juvenile turbot.

Key words : Turbot, *Scophthalmus maximus*, Enlarged cell, Iridovirus-like

터봇, *Scophthalmus maximus*은 대서양 연안에 분포하며 터키 연안과 지중해에도 서식하는 어종으로서, 스페인과 프랑스의 주요 양식어종이다. 또한 포르투갈, 네덜란드 및 중국 등의 여러 나라에서 양식되고 있으며, 우리나라에서도 양식 신품종으로 외국에서 난을 도입하여 제주도 및 거제 등의 일부 지역에서 양식이 이루어지고 있다.

터봇에 질병을 일으키는 바이러스로는 rhabdovirus에 속하는 viral haemorrhagic septicaemia virus(VHSV) (Castric and De Kinkelin, 1984; Snow and Smail, 1999), birnavirus에 속하는

infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) (Castric *et al.*, 1987), reovirus에 속하는 turbot aquareovirus (TRV) (Rivas *et al.*, 1996)가 있다. 그 밖에 뇌척수염을 일으키는 picorna-like virus (Bloch *et al.*, 1991)와 자어 시기에 전신성 감염을 일으키는 irido-like virus (Bloch and Larsen, 1993) 등이 보고되어 있다.

2003년 6월 전북 고창에서 사육중인 turbot 치어에서 선별 후 50~70%의 누적폐사가 발생하였다. 이 turbot은 프랑스에서 난을 수입하여 종묘 생산하던 것이었다. 병어는 기생충 검사, 세균 검사 및 주화세포를 이용한 바이러스 검사에

†Corresponding Author : Myung-Joo Oh, Tel : 061-659-3173,
Fax : 061-659-3173, E-mail : ohmj@yosu.ac.kr

서 특히 병원체가 분리되지 않았지만, 병리학적 검사에서 red sea bream iridovirus (RSIV) 감염에서와 유사한 비대 세포가 조혈조직과 다양한 장기에서 관찰되었다. 따라서, 본 연구에서는 병리조직학적으로 RSIV 감염증과의 유사성을 검토하고, 전자현미경적으로 바이러스 입자를 확인함으로써 iridovirus의 감염임을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 채집 및 샘플처리

시료는 2003년 6월초 전북 고창에서 육상 수조식으로 사육중인 turbot 치어 (체중 9.0 ± 1.9 g, 체장 7.9 ± 0.5 cm)로서 사료를 먹지 않으며, 힘없이 유명하다 폐사되는 개체를 채집하여 실험에 사용하였다. 샘플처리는 상법에 따라 스탬프 표본을 제작하고 기생충 및 세균 검사를 행하였다. 바이러스 검사를 위하여 신장과 비장 조직을 오 등 (2001)의 방법에 의해 HBSS로 1:9(0.5g / 4.5 ml)가 되게 처리하여 마쇄하고, 그 마쇄액을 HA filter (0.45 μ m pore size)로 여과하여 시험 샘플을 제작하였고, 어류 주화세포인 chinook salmon embryo cell line (CHSE-214), fat-head minnow caudal trunk cell line (FHM), rainbow trout gonad cell line (RTG-2)에 접종하여 20 $^{\circ}$ C에 배양하면서 세포변성효과 (Cytopathic effect, CPE)를 관찰하였다.

병리조직학적 검사

터봇 (n=6)의 내장 조직을 10% 중성 포르말린액에 고정한 후 상법에 따라 조직 절편을 만들어 hematoxylin-eosin (H-E) 및 Feulgen 염색을 실시하여 광학현미경으로 병리조직학적 관찰을 실시하였다.

전자현미경 관찰

병어의 비장조직을 세절하여 2.5% glutaralde-

hyde 용액 (pH 7.4, 0.1M cacodylate buffer, 4 $^{\circ}$ C)에서 2시간 고정하고 상법에 따라 epoxy-resin으로 포매한 후, semi-thin section 절편을 제작하여 1% toluidine blue로 염색한 다음 광학현미경으로 관찰하였다. 그리고 8~10 nm의 초박 절편을 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 후 투과전자현미경 (H-7500, Hitachi)으로 관찰하였다.

결 과

발병상황 및 샘플처리

양식산 터봇 치어 30만 마리 중 선별 후 50~70%의 대량폐사가 발생하였다. 사육 수온은 20~21 $^{\circ}$ C로 유지되고 있었으며, 병든 터봇은 사료섭취가 저하되고 힘없이 유명하다 폐사되었다. 죽기 직전의 어류는 복부가 팽만되고 안구가 돌출되며 체색이 얼어지는 증상을 보였다. 해부학적 조사 결과, 아가미 빈혈과 간이 퇴색되어 있었으며, 특히 비장조직이 심하게 비대되어 있었다 (Fig. 1).

병원체 검사결과, 트리코디나의 경미한 기생을 확인할 수 있었으며, 모든 개체에서 세균은 분리되지 않았고 바이러스 검사에 사용된 CHSE-214, FHM, RTG-2 주화세포 모두에서 CPE는 관찰되지 않았다.

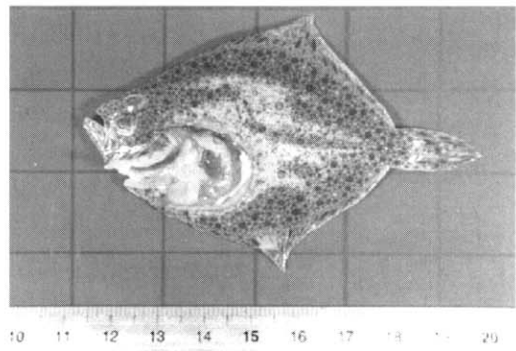


Fig. 1. Diseased turbot, *Scophthalmus maximus* shows enlarged spleen, pale gills and liver.

병리조직학적 관찰

비대세포를 특징으로 하는 특이 병변이 모든 개체에서 관찰되었다. H-E 염색에서 호염기성을 보이며, Feulgen 염색에 양성반응을 보이는 비대 세포들은 주로 신장과 비장의 조혈조직에서 다수 관찰되었으며, 아가미, 심장, 위, 장, 간, 횡장 및 지방 조직에서도 관찰되었다. 이러한 세포들의 핵은 주로 확대되어 있었고 핵의 소실 및 크로마틴이 가장자리에 관찰되는 등의 다양한 형태를 보였다. 세포질은 다수의 공포를 형성하고 있

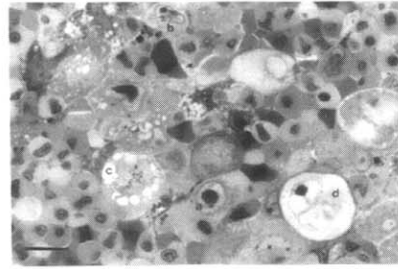


Fig. 2. Turbot spleen. Enlarged cells with either enlarged (a) or fragmented nuclei (b), with either granular (c) or clear cytoplasm (d). (Toluidine blue, bar=10 μ m).

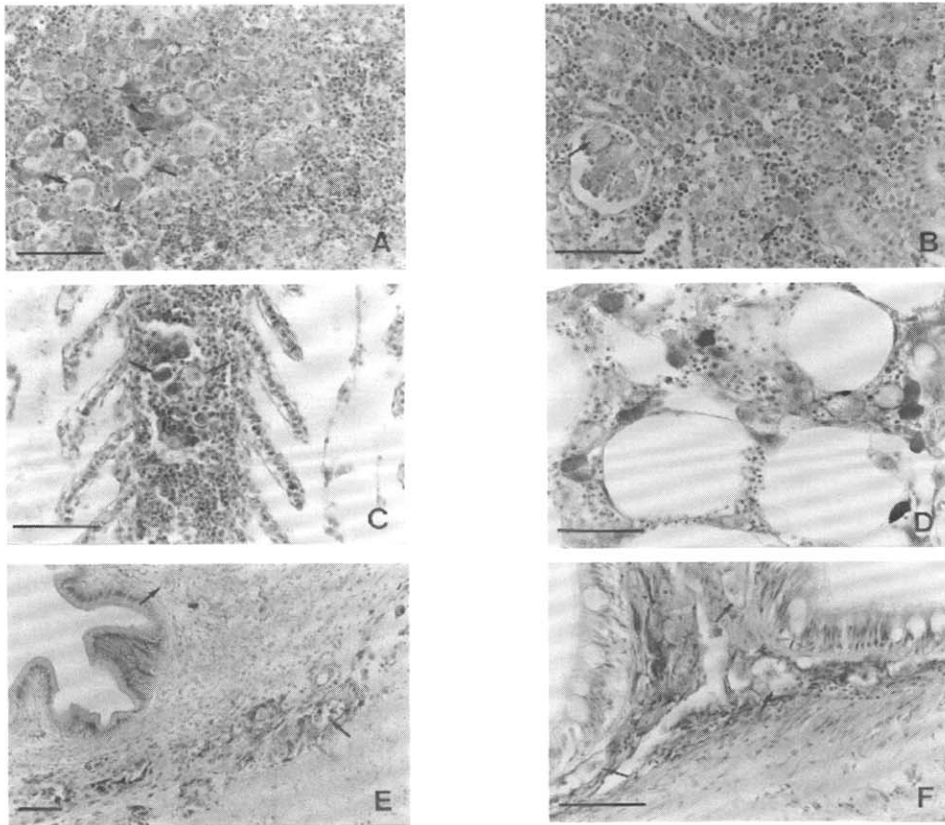


Fig. 3. Histopathology of turbot infected with irido-like virus. (H-E, bar=50 μ m).

- A. Spleen. Enlarged cells appeared diffusely with homogeneously stained (arrow head) and granularly stained cytoplasm (arrow) by hematoxylin.
- B. Kidney. Enlarged cells (arrows) observed in the glomerulus and hematopoietic tissues.
- C. Gill. Enlarged cells (arrows) found in the branchial artery.
- D. Adipose tissue. Enlarged cells observed around the blood vessels of the fatty tissue.
- E. Stomach. Enlarged cells (arrows) and inflammatory cells in the lamina propria and submucosa.
- F. Intestine. Enlarged cells (arrows) observed in the lamina propria and submucosa.

었고 또한 호염기성으로 동질하게 염색되는 세포질과 하얗게 보이는 세포질을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2, 3A). 병변이 심한 세포는 파괴되어 세포성 잔해들이 흩어져 있었다.

신장에서 다수의 비대 세포와 염증성 세포들이 조혈조직에서 관찰되었고 조혈조직이 괴사되어 있었다 (Fig. 3B). 또한 사구체에서도 비대 세포들이 관찰되었으며, 세뇨관의 변성과 사구체 벽이 비후되어 있었다.

비장은 비대 세포가 주로 협조직 주위와 비수 내에서 관찰되었으며, 출혈과 광범위한 괴사를 보였다 (Fig. 3A). 병변이 심한 개체에서는 비장 피막하층에서 다수의 비대 세포가 관찰되었고 전반적으로 심한 괴사를 보였다.

아가미에서는 비대 세포가 아가미 동맥과 새판의 모세혈관 내에서 관찰되었을 뿐만 아니라 (Fig. 3C), 새엽의 실질조직과 새파에서도 확인되었다. 새엽은 충혈과 함께 괴사 병변이 관찰되었고 새파는 염증성 세포가 침윤되어 있었으며, 괴사되어 있었다.

피부에서는 근섬유 사이로 염증성 세포가 관찰되었으며, 지방세포 주위로 다수의 비대 세포가 관찰되며, 전반적으로 염증성세포의 침윤과 국소적 괴사를 보였다 (Fig. 3D).

위는 비대 세포가 점막고유층, 점막하층, 근육층 및 장막에서 관찰되며 (Fig. 3E), 일부 개체에서는 위선에서도 관찰되었다. 점막고유층과 점막하층은 염증성세포가 침윤되어 있었으며, 괴사되어 있었고 중주근층과 장막에서는 혈관주위로 염증성세포가 침윤되어 있었다.

장에서는 점막고유층과 점막하층에서 염증성 세포의 침윤과 괴사가 관찰되며, 점막상피가 파괴되기도 하였다. 일부개체에서는 많은 수의 비대 세포가 점막고유층과 점막하층에서 분포하고 있었다 (Fig. 3F).

심장은 비대 세포가 심실, 심방, 동맥구 및 심내막 밸브에서 관찰되었고 심근의 괴사가 보이는 개체가 있었으며, 심외막에 염증성 세포가 침윤되어 있었다.

간에서는 소수의 비대 세포가 관찰되었고 지방변성을 보였다. 또한 전반적으로 국소적 괴사를 보이며, 염증성 세포들이 혈관주위와 실질세포 사이에서 관찰되었다.

췌장은 소수의 비대 세포가 선세포 주위에서 관찰되었고 선세포의 국소적 괴사가 확인되었다.

맥락막에서는 염증성 세포의 침윤과 괴사를 확인할 수 있었지만 비대 세포는 관찰되지 않았다. 뇌와 피부조직에서는 비대 세포 및 특이 병변이 관찰되지 않았다.

전자현미경 관찰

전자현미경 관찰 결과, 비장조직에서 나타나는 호염기성 또는 Feulgen 양성 반응을 보이는 비대 세포에서 많은 수의 바이러스 입자들이 관찰되었다. 바이러스 입자들은 비교적 전자밀도가

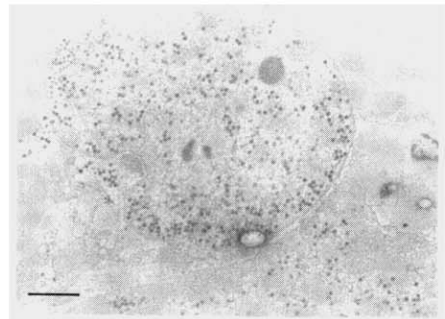


Fig. 4. Iridovirus-like particles in the cytoplasm of enlarged spleen cells of turbot. (bar=2 μ m).

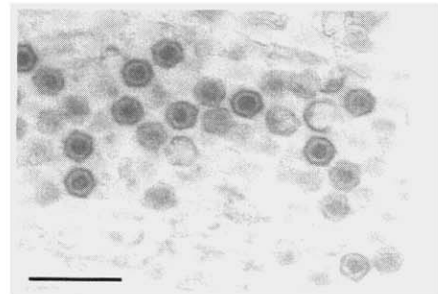


Fig. 5. Hexagonal virus particles range in size from 136 to 159 nm in edge-to-edge diameter. (bar=400 nm).

낮은 세포질내에서 육각형으로 관찰되었으며 (Fig. 4), 뉴클레오캡시드는 106~122 nm, 직경은 136~159 nm로 Iridovirus-like 바이러스임을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

고 찰

조직내에 비대 세포의 형성을 특징으로 하는 이리도바이러스감염증은 산업적으로 중요한 여러 양식 어종에 질병을 일으키고 있다 (Matsuo-ka *et al.*, 1996; Kawakami and Nakajima, 2002). 이는 1992년 Inouye *et al.*에 의해 일본에서 보고된 이래, 대만 (Wang *et al.*, 2003), 싱가포르 (Chua *et al.*, 1994), 태국 (Kasornchandra *et al.*, 1997), 홍콩 (Miyata *et al.*, 1997) 등에서 보고되어 있으며, 우리나라에서는 Jung & Oh (2000)에 의해 돌돔에서의 발생이 보고되어졌고, 그 이후 Kim *et al.* (2002)은 참돔, 조피볼락 등에서도 분리되어지는 것으로 보고하고 있다. 감염어의 병리학적 변화는 주로 신장과 비장조직에 호염기성의 비대 세포들이 특이적으로 나타나며, 괴사병변이 관찰된다. 또한 이러한 비대 세포들은 다양한 장기에서도 관찰되었고 (Weng *et al.*, 2002; Sano *et al.*, 2002; McGrogan *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 1997), 전자현미경 관찰시, 많은 수의 이리도바이러스 입자들이 비대 세포의 세포질 내에서 관찰된다고 보고되어 있다 (Inouye *et al.*, 1992; Jung *et al.*, 1997)

본 연구에서의 병리조직학적 관찰 결과, 병어는 비대 세포들이 주로 신장과 비장의 조혈조직에서 확인되었으며, 아가미, 심장, 위, 장, 간, 췌장, 지방 조직에서 관찰되었다. 그리고 전자현미경적 관찰 결과, 비대세포의 세포질 내에서 육각형의 지름 136~159 nm인 바이러스 입자를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 이전에 다양한 해산 양식어종에서 보고된 것과 같은 이리도바이러스의 감염증이 양식산 turbot에서 발생되었던 경우로 판단되어진다.

Wang *et al.* (2003)에 의하면 참돔 치어에서 이

리도바이러스의 감염은 수온변화와 서로 연관되어 발생하며, 수온이 상승하는 시기에 역학적으로 폐사가 발생한다고 보고하였으며, Weng *et al.* (2002)과 Jung and Oh (2000)는 역학적으로 수온이 25°C 이상에서 이리도바이러스에 의해 대량폐사가 발생한다고 보고하였다. 본 연구에서는 사육수온이 20~21°C로 이리도바이러스 질병의 발생 수온보다 낮았지만 turbot에서의 이리도바이러스 감염증을 확인할 수 있었다. Turbot은 적정 성장 수온이 15~19°C이고 20°C 이상부터 먹이를 먹지 않으며, 23°C 이상부터는 폐사가 발생한다. 따라서 turbot 치어의 대량폐사 원인은 어체가 스트레스를 느끼는 사육수온과 선별 후 비대세포를 특징으로 하는 폐사개체가 관찰되었고, 기타의 다른 특이 병원체가 검출되지 않은 점에서 미루어, 선별에 의한 스트레스 그리고 irido-like virus의 감염이 서로 밀접한 관련성을 가진 것으로 추정된다.

Bloch and Larsen (1993)는 덴마크에서 양식중인 turbot 자어에 감염되는 Iridovirus-like에 대해 보고하였다. 병어는 70%의 폐사량을 보이며, 초기증상으로 먹이 섭취능 저하, 혼수상태, 꼬리와 지느러미의 체색흑화를 보이고, 비정상적인 유행과 발작증상을 나타내었다고 하며, 전자현미경적으로 지름이 170 nm인 irido-like virus가 아가미, 지느러미, 비장, 신장, 간, 심장 및 뇌조직에서 관찰되는 전신성 감염을 나타내었다고 한다. 그러나 지느러미의 표면과 가장자리가 융기되어 작은 회색 또는 흰 반점이 관찰되는 특이 증상이 보이는 점, 조직내에 비대 세포가 관찰되지 않은 점, 바이러스 입자들이 세망세포 외에 섬유모세포, 상피세포에서 관찰되었던 점에서 본 바이러스와는 다른 것으로 생각되었다.

본 연구는 장기에서 비대 세포의 형성을 특징으로 하는 이리도바이러스 감염증이 turbot에서 발생한 첫 번째의 보고로서, 새로운 양식대상으로 부각되는 turbot에서의 irido-like virus의 감염에 의한 피해에 향후 특별한 주의가 필요한 것으로 생각된다. 앞으로 양식산 turbot의 정확한

폐사원인 구명을 위한 병원성 실험이 실시되어야 하며, 면역학적 및 분자생물학적 연구를 통해 중요 양식 어종에서 감염되는 iridovirus와의 연관성이 조사되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 병리조직학적 및 전자현미경적 방법을 통해 양식산 turbot에서 발생하는 irido-like virus의 감염증을 소개하고자 한 것이다. 2003년 6월 전북 고창 소재 육상수조에서 양식중인 turbot 치어에서 50~70%의 대량폐사가 발생하였다. 병어는 사료섭취가 저하되고 힘없이 유명하다 폐사되었으며, 죽기 직전의 어류는 복부가 팽만되고 안구가 돌출되며 체색이 옅어지는 증상을 보였다. 해부학적 조사 결과, 아가미 빈혈과 간이 퇴색되어 있었으며, 특히 비장조직이 심하게 비대되어 있었다. 병어에 대한 조직학적 검사에서 비대 세포를 특징으로 하는 특이 병변이 주로 신장과 비장의 조혈조직에서 관찰되었으며, 아가미, 심장, 위, 장, 간, 횡장, 지방 조직에서도 관찰되었다. 그리고 전자현미경적 관찰 결과, 비대 세포의 세포질내에서 육각형의 지름이 136~159 nm인 Irido-like virus를 관찰할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Bloch, B. and Larsen, J.L. : An iridovirus-like agent associated with systemic infection in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* fry in Denmark. Dis. Aquat. Org., 15: 235-240, 1993.
- Bloch, B., Gravningen, K. and Larsen, J.L. : Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. Dis. Aquat. Org., 10: 65-70, 1991.
- Castric, J. and De Kinkelin, 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.
- Castric, J., Baudin-Laurencin, F., Coustans, M.F. and Auffret, M. : Isolation of Infectious Pancreatic Necrosis Virus, Ab Serotype, from an epizootic in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*. Aquaculture, 67: 117-126, 1987.
- Chua, F.H.C., Ng, N.L., Ng, K.L., Loo, J.J. and Wee, J.Y. : Investigation of outbreaks of a novel disease, 'sleepy grouper disease', affecting the brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. J. Fish D., 17: 417-427, 1994.
- Inouye, K., Yamano, K., Maeno, Y., Nakajima, K., Matsuoka, M., Wada, Y. and Sorimachi, M. : Iridovirus infection of cultured Red Sea Bream, *Pagrus major*. Gyobyo Kenkyu, 27(1): 19-27, 1992.
- Jung, S.J. and Oh, M.J. : Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. J. Fish Dis., 23: 223-226, 2000.
- Jung, S.J., Miyazaki, T., Miyata, M., Danayadol, Y. and Tanaka, S. : Pathogenicity of Iridovirus from Japan and Thailand for the red sea bream *Pagrus major* in Japan, and histopathology of experimentally infected fish. Fish. Sci., 63(5): 735-740, 1997.
- Kasornchandra, J. and Khongpradit, R. : Isolation and preliminary characterization of a pathogenic iridovirus agent in nursing grouper, *Epinephelus malabaricus*, Disease in Asian Aquaculture III (ed. by T.W. Flegel & I.H. MacRae), pp. 61-66. FHS/AFS, Manila.
- Kawakami, H., and Nakajima, K. : Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral

- disease from 1996 to 2000. Fish Pathol., 37(1): 45-47, 2002.
- Kim, Y.J., Jung, S.J., Choi, T.J., Kim, H.R., Rajendran, K.V. and Oh, M.J. : PCR amplification and sequence analysis of irido-like virus infecting fish in Korea. J. Fish Dis., 25: 121-124, 2002.
- Matsuoka, S., Inouye, K. and Nakajima, K. : Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1991 to 1995. Fish Pathol., 31(4): 233-234, 1996.
- McGrogan, D.G., Ostland, V.E., Byrne, P.J., Ferguson, H.W. : Systemic disease involving an iridovirus-like agent in cultured tilapia, *Oreochromis niloticus* L. J. Fish Dis., 21: 149-152, 1998.
- Miyata, M., Matuno, K., Jung, S.J., Danayadol, Y. and Miyazaki, T. : Genetic similarity of iridoviruses from Japan and Thailand. J. Fish Dis., 20: 127-134, 1997.
- Oh, M.J., Jung, S.J., Choi, T.J., Kim, H.R., Rajendran, K.V., Kim, Y.J., Park, M.A. and Chun, S.K. : A viral disease occurring in cultured carp *Cyprinus carpio* in Korea. Fish Pathol., 36(3): 147-151, 2001.
- Rivas, C., Bandin I., Noya, M., Cepeda, C., Barja, J.L. and Dopazo, C.P. : *In vitro* and *in vivo* replication of turbot aquareovirus (TRV) in turbot tissues. Dis. Aquat. Org., 25: 217-223, 1996.
- Sano, M., Minagawa, M. and Nakajima, K. : Multiplication of red sea bream iridovirus (RSIV) in the experimentally infected grouper *Epinephelus malabaricus*. Fish Pathol., 37(4): 163-168, 2002.
- Snow, M. and Smail, D.A. : Experimental susceptibility of turbot *Scophthalmus maximus* to viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from cultivated turbot. Dis. Aquat. Org., 38: 163-168, 1999.
- Wang, C.S., Shih, H.H., Ku, C.C. and Chen, S.N. : Studies on epizootic iridovirus infection among red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel), cultured in Taiwan. J. Fish Dis., 26: 127-133, 2003.
- Weng, S.P., Wang, Y.Q., He, J.G., Deng, M., Lu, L., Guan, H.J., Liu, Y.J. and Chan, S.M. : Outbreaks of an iridovirus in red drum, *Sciaenops ocellata* (L.), cultured in southern China. J. Fish Dis., 25: 681-685, 2002.

Manuscript Received : July 10, 2003

Revision Accepted : October 17, 2003

Responsible Editorial Member : Joon-Ki Chung
(Pukyong Univ.)