

N-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine 노출에 따른 바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 상피조직의 병리조직학적 반응

이무근 · 허민도[†]

부경대학교 수산생명의학과

Histopathological changes of epithelium following the exposure of *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*

Mu Kun Lee and Min Do Huh[†]

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

To understand responses of bivalve tissues to various injurious agents, histopathological observation was done in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, during 240 hours after an intramuscular injection of *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG). Some histopathological changes were observed with the epithelia of stomach, midgut, hindgut, digestive diverticula and gonads after injecting MNNG. The earliest degenerative changes were recognized in the epithelium of midgut 12 hours after the injection. Partial or complete, epithelial destruction was constantly accompanied by the massive infiltration of a mononuclear, necrotic cell group including hemocytes. At 144 hours later, gonads showed the necrotic desquamation of their germinal epithelia. Nearly all of the infiltrated cells within the destructive epithelium were suggested to be hemocytes, from the binding property with a hemocyte-specific lectin, *Ricinus communis* (RCA-1). From these results it was concluded that the epithelium of digestive system is vulnerable to parenteral MNNG and hemocytes might be deeply involved in this MNNG-induced destruction of the digestive epithelium.

Key words : Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, Hemocyte, Histopathology, *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine

이매패류의 대량폐사는 바이러스, 세균, 진균 및 기생충 등 생물학적 감염인자와 각종 화학적 오염원들이 관련하는 것으로 알려져 왔다. 생물학적 인자중 기생성 원충에 속하는 *Perkinsus*와 *Haplosporidium* 등은 서구에서 오래 전부터 이들의 대량폐사를 직접 야기하는 인자로 주목을 받아 왔다 (Andrews, 1988; Haskin and Andrews, 1988; Perkins, 1993; Sparks, 1993). 또한, 이매패

류는 저서정착성 생물로 환경수 및 저질로부터 영양물질을 여과섭식을 하며, 각종 산업적 및 생활 오염물질의 유입이 쉬운 연안에 서식하기 때문에 생물학적 오염원이외에 화학물질에 의한 영향을 받을 가능성도 매우 높다 (Pipe and Coles, 1995). 게다가, 고밀도 양식으로 인하여 서식 환경 내에 유기물 축적량이 과다해지고 있을 뿐 아니라, 인간 활동의 부산물인 각종 화학물질

[†]Corresponding Author : Min Do Huh, Tel : 051-620-6144,
Fax : 051-628-7430, E-mail : mindo@pknu.ac.kr

로 인한 환경오염이 심해짐에 따라 이매패류의 폐사 내용을 화학물질의 직·간접적인 역할과 관련하여 적극적으로 검토하고 있다 (Cheng, 1993; Pipe and Coles, 1995).

세균, 바이러스, 기생충과 같은 생물학적 유해인자나 화학적 오염물질의 영향을 이매패류의 폐사 원인과 관련하여 병리학적 견지에서 평가 또는 추적하고자 할 경우에는, 이매패류의 정상해부, 조직 및 생리화학적 기초적 지식정보를 바탕으로, 이들 유해인자에 대한 이매패류 조직의 병리화학적 반응 특성에 관하여 숙지하여 해석할 필요성이 있다. 그러나, 지금까지 이매패류에 대한 기초적 지식정보가 많은 부분 결여되어 있을 뿐 아니라, 병리조직학적인 연구 정보는 그 양 및 내용의 수준에 있어 매우 빈약한 상황에 있고 대부분 병변의 단순한 나열에 그쳐, 문제 병변의 발생과정 및 그 의의에 대한 해석이 담보 상태에 머물러 있다고 할 수 있다. 예를 들면 척추동물의 간장조직은 동맥과 문맥으로 부터, 이중혈류 공급을 받고 있기 때문에, 전신으로 흡수된 유해물질에 노출될 수 있는 기회가 매우 높아 간장의 병리학적 변화는 어떤 화학물질에 대한 상해내용을 평가하는데 중요한 것으로 되어 있다. 따라서, 이매패류의 경우에도 척추동물의 간장에 해당하는 소화맹장이 알려져 있고 이 조직의 형태학적 변화에 많은 관심의 대상이 되어 온 것은 사실이다 (Couch, 1985; Lowe and Clarke, 1989; Weinstein, 1997). 그러나 개방 순환계를 갖는 이매패류는 조직의 유해물질에 의한 노출 유형, 유해물질의 처리과정 및 처리장소에 관하여 폐쇄 순환계를 갖는 척추동물과는 매우 다를 수 있다. 따라서 척추동물의 간장에 해당하는 소화맹장의 기능 및 형태학적 변화 내용에 반드시 집착할 필요성은 없는 것으로 생각된다. 더구나 이매패류의 조직학적 변화는 생리화적으로 섭이 주기 및 생식주기와 밀접히 관련되어 있기 때문에 그 병변의 해석에는 세심한 주의가 필요한 것으로 생각된다 (장, 1991; Syasina et al., 1997).

최근 Lee 등 (2001)이 한국 남해안 지역 바지락에서 발생한 병리조직학적 병변을 정리한 바에 따르면 *Perkinsus* sp.에 의한 육아중성 반응, 소화상피의 위축, 각종 조직 내의 혈구 침윤이 유의할 만한 병변으로 보고되었다. 특히 소화상피의 위축과 조직 내의 혈구의 침윤소견은 각종 화학물질을 비롯한 환경인자에 의해서 발생하는 것으로 보고되고 있는 바, 우리나라 연안에서 오염물질을 위시한 유해 환경인자에 의한 이매패류의 폐사와 관련하여 이들 병변의 의의를 재고할 필요가 있다.

이매패류의 상피는 수중의 유해인자에 쉽게 노출될 수 있어 유해인자에 대한 물리학적 및 생리학적 저항성이 육상의 고등 척추류와 비교하여 크거나 최소한 크게 다를 것으로 짐작된다. 이매패류의 상피에는 외투막을 포함한 외피, 소화관, 소화맹장 상피가 주로 포함된다. 이들 상피에도, 고등동물과 같이 상피에 점액세포를 가지기는 하나, 고등동물에서 보이는 상피의 방어와 관련한 임파구를 비롯한 백혈구의 액성 및 세포성 활동이 이매패류에서는 혈구를 통하여 이루어 질 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 각종 유해 인자에 대한 이매패류의 형태학적 반응양식을 구체화하기 위한 연구의 일환으로 수행되었으며, 바지락에 조직반응 유발인자로서 알려져 있는 *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)를 투여하여 상피에 미치는 병리조직학적 영향을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

바지락의 사육 및 유지 조건

각장 30~40 mm의 경상남도 남해산 바지락 (*Ruditapes philippinarum*)을 구입하고 80 l 들이 정치식 수조에 수용하여 지속적으로 에어레이션하면서 3일간 순치한 후 실험에 사용하였다. 순치 및 실험기간동안 1일 1회 전량 환수하였으며 이 기간 동안 사육 수온은 14~17°C를, 염분

은 30~31%을 유지하였다. 국립수산과학원에서 분양 받은 규조류 *Chaetoceros calcitrans*를 3,000~5,000 cells/ml의 농도로 Conway배지에 접종한 후 조도 3000~4000 lux에서 5일간 정치 배양하였다. 매일 환수 후 배지와 함께 먹이를 주었다.

N-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)의 조제 및 투여, 농도 결정

예비실험으로서 *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (Fluka Ltd. Lot No. 68051)을 여과멸균한 해수에 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0 mg/0.1 ml의 농도로 녹여 실험에 사용하였다. 개각기를 사용하여 바지락의 패각을 일부 개각하여 개체당 0.1 ml를 즉부 근육에 주사하였고 대조군에는 여과멸균해수만을 동량 주사하였다. 이후 예비 실험을 통하여 가장 뚜렷한 병리조직학적인 반응을 나타내었고, 약 30%의 폐사율을 기록한 개체당 1.0 mg의 농도를 설정하여 동일한 방법으로 본 실험에 임하였다.

조직학적 검사

MNNG 주사후 3, 6, 24, 72, 144, 240시간에 각 구당 10마리의 바지락을 채취하여 패각을 제거하고 15분간 Bouin액에 전고정시킨 후 배복으로 절개하여 소화맹낭, 위, 중장, 생식소, 아가미 등이 포함된 부분과 심장, 신장, 후장 등이 포함된 조직을 재고정하였다. 재고정이 완료된 후 70%에서 100%까지 순차 농도의 에탄올 수용액에 탈수하였다. Xylene으로 투명화하여 파라핀 친화시키고, 파라핀을 침투시켜 포매한 후 rotary형 microtome (Reichert-Jung 820, Leica Ltd.)을 사용하여 5~6 µm 두께의 박편을 얻어 Harris' hematoxyline-eosin 염색을 실시하여 광학현미경으로 검경하였다.

콜로이드 탄말 주사 및 MNNG 투여

MNNG 주사후 혈구의 동태를 가시화하기 위해 먼저 콜로이드 탄말을 주사하여 혈구로 하여금 포식하게 한 다음 MNNG를 주사하고자 하였다. 콜로이드 탄말액은 시판되는 indian ink액을 원액으로 하여 여과해수에 20배로 희석 멸균하여 조제하였으며, 바지락의 위심강을 통해 개체당 0.1 ml씩 주사하였다. 120시간이 경과한 후 MNNG 단독 투여구와 같은 농도와 방법으로 MNNG를 주사하였다. 대조군은 여과·멸균 해수만을 동량으로 주사하였다. 바지락의 사육조건과 MNNG의 조제 및 투여, 병리조직학적 검사과정은 MNNG 단독 주사의 경우와 동일하게 진행하였다.

Lectin 조직화학

바지락 혈구와 특이적으로 결합하는 lectin류를 찾아 반응시킴으로써 MNNG 주사 후 혈구의 동태를 확인하고자 하였다. 우선, 정상적인 바지락을 사용하여 7종의 biotinylated lectin (Vector laboratories Ltd., Table 1)에 대한 혈구 결합특이성을 스크리닝하였다. 절편을 탈파라핀 과정을 거쳐 함수시키고, 32°C에서 3% 과산화수소수로 내인성 peroxidase를 제거하였다. 1% bovine serum albumin을 사용하여 비특이적 결합을 blocking하고 난 후 PBS를 사용하여 세척하고 triton-X 100을 사용하여 lectin의 결합성을 증가시켰다. Biotinylated lectin을 4°C에서 48시간 배양한 후 avidin-biotin peroxidase complex (Vector laboratories Ltd.)를 30분간 처리하였다. 0.01% diaminobenzidine로 30분 발색시켜 Mayer's hemotoxyline으로 대조염색하였다. 염색이 완료된 절편은 광학현미경하에서 아가미의 혈관과 소화맹낭의 간질 결합조직, 생식소의 간질 결합조직, 소화관의 기저 결합조직층 등에 존재하는 혈구의 lectin 결합성을 조사하였다.

이후 혈구와 가장 강한 결합력을 보인 *Ricinus communis* (RCA- I)를 사용하여 MNNG 단독 투여 실험군에 대해서 조직화학 염색을 실시하였다. 또한, 2가지의 음성대조절편을 동시에 염색

Table 1. Lectins used for the differentiation of Manila clam hemocytes

Lectin (Abbr.)	Major sugar specification	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
<i>Concanavalin ensiformis</i> (ConA)	α -D-Man> α -D-Glc	0.2
<i>Glycine max</i> (SBA)	D-GalNAc>D-Gal	5.0
<i>Triticum vulgare</i> (WGA)	(β -GlcNAc)>NeuNAc	0.5
<i>Dolichos biflorus</i> (DBA)	(α -D-GalNAc)	100.0
<i>Ulex europaeus</i> (UEA-I)	α -L-fucose	5.0
<i>Ricinus communis</i> (RCA-I)	β -D-Gal	1.0
<i>Arachis hypogea</i> (PNA)	Gal- β -(1-3)-GalNAc	1.0

Gal=galactose; GalNAc=N-acetyl-galactosamine; Man=mannose; Glc=glucose; GlcNAc=N-acetyl-glucosamine; NeuNAc=Acetyl-neuraminic acid

하였다. 즉, RCA- I의 blocking sugar인 lactose 0.2M을 lectin 반응액과 동량으로 혼합한 후 실온에서 1시간 동안 방치시켜 lectin 대신에 반응시켰으며, 다른 하나는 lectin 반응액 대신에 HEPES buffer를 반응시켜 반응의 특이성을 검증하였다.

결 과

MNNG 주사 후 경시적인 조직학적 소견

주사 후 3시간째와 6시간째의 개체에 있어서는 대조군 (Fig. 1, 2) 및 MNNG 주사군에서 모두 특기할 만한 조직학적 변화는 관찰되지 않았다.

12시간째 대조군의 중장상피에서는 기저막 근처에 소수의 혈구가 침윤하고 있었으나, 정상적인 원주형 상피를 확인할 수 있어 주사 직전 및 6시간째의 것과 비교하여 큰 차이가 없었다. 하지만, MNNG 주사군에 있어서 중장상피에서 기저막을 중심으로 혈구와 함께 단핵의 변성세포가 침윤하여, 2~3층의 세포층이 형성되어 있었다. 이로 인해 대부분의 상피는 기저막과 분리되어 상피층이 경미하게 비후되어 있었고, 경미한 상피 파괴소견도 인정되었다. 침윤한 세포의 대부분은 혈구로 추정되었으나, 많은 세포가 세포

질의 경계가 불명확하고 염색성이 다양하였으며, 상당수가 변성·괴사소견을 보여 이들 세포 모두가 혈구일지에 대해서는 불분명하였다.

24시간째의 MNNG 주사군에서는 중장을 위시한 전 소화관과 소화맹낭 상피에 조직학적 변화가 인정되었으며, 특히 중장상피에서는 혈구와 함께 단핵의 변성세포가 광범위하게 침윤하여 기저로부터 7~10세포층을 형성하여 있었으며, 중장상피의 고유배열과 기저막은 유지되어 있었지만, 상피와 기저막사이의 세포침윤으로 상피는 비후되어 보이고 일부의 상피는 파괴소견을 보였다. 침윤세포의 대부분은 변성 및 괴사소견을 보였으며, 중장의 내강에는 상피조직 탈락물로 보이는 세포 또는 세포괴가 다수 확인되었다 (Fig. 3). 소화맹낭의 경우 MNNG 투여군 24시간째에 일부개체에서 이차세관의 호산성 흡수세포로 보이는 세포탈락물이 관강 내에서 소수 확인되는 동시에 이차세관의 구조가 경미하게 왜곡되어 있었다.

72시간째의 MNNG 주사군에서는 중장상피의 대부분이 파괴되어 그 배열구조가 대부분 사라지고 기저막마저 불분명해져 있었으며 상피영역이었던 부위는 대부분 괴사세포들로 채워져 있었다. 일부 상피의 구조가 확인되는 부위에서

도 미세융모 및 기저막은 인정되지 않았으며 상피 내에는 혈구와 함께 단핵의 괴사세포군이 대량 침윤하여 있었다. 또한 내강에는 괴사소견의

세포들이 다수 확인되었으며 일부개체에서는 이들 세포가 집괴를 형성하여 있었다 (Fig. 4). 72시간째부터 중장의 일부에서 짙은 호염성의

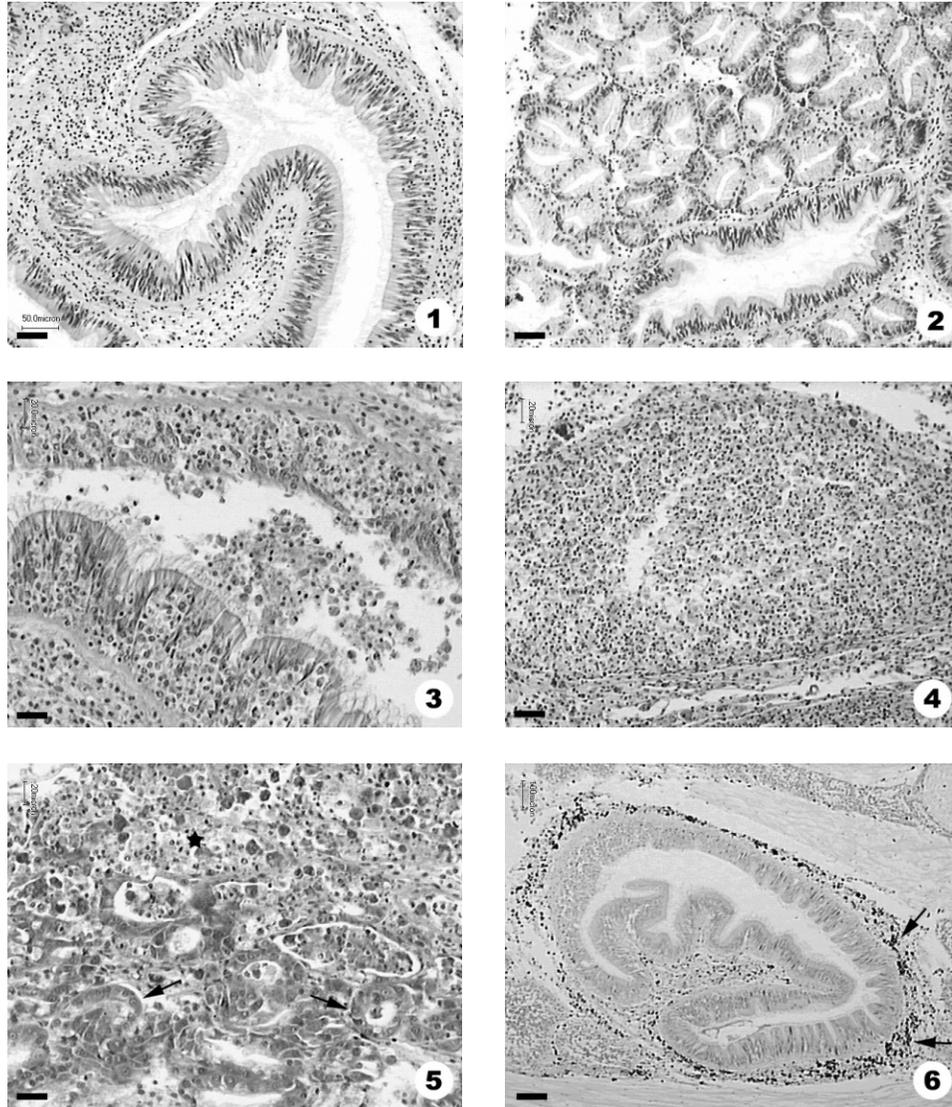


Fig. 1-6. Histological features of digestive system in control and experimental groups. H&E. 1: Midgut in control group. bar=40 μ m., 2: Digestive diverticula in control group. bar=40 μ m., 3: Midgut 24 hrs. after MNNG injection. A great number of necrotic cells including hemocytes are extensively and massively infiltrated into the destructive epithelium. bar=20 μ m., 4: Midgut 72 hrs. after MNNG injection. Most of the epithelium are completely destroyed and packed with a great number of necrotic cells. bar=20 μ m., 5: Digestive diverticula 72 hrs. after MNNG injection. Secondary tubules are severely destroyed and necrotized (★). Even remaining tubules are severely atrophied (arrows) and their lumens are filled with necrotic cellular debris. bar=20 μ m., 6: Midgut 120 hrs. after colloidal carbon injection. Carbon-laden hemocytes are accumulated underneath the basal lamina (arrows). bar=100 μ m.

세포질을 갖는 편평 또는 입방상피 형태의 재생 상피가 특징적으로 확인되었다. 그러나 이 재생 상피 내에도 세포침윤은 지속되었다. 소화맹낭에서는 맹낭 가장자리를 중심으로 이차세관 상피가 심하게 파괴되어 세관 및 그 배열구조를 거의 확인할 수 없었다. 아직 구조가 확인되고 있는 세관의 경우에도 상피는 심하게 위축되어 대부분 호염성 세포로 대체되어 있었고, 내강에는 다수의 탈락세포가 확인되었다 (Fig. 5). 한편, MNNG 주사군의 위 상피내에도 혈구와 함께 단핵의 변성세포가 경미하게 침윤하여 있었고, 세포침윤이 비교적 심한 일부의 상피는 내강쪽으로 파열이 일어나 있었다. 내강에는 다수의 탈락 괴사세포가 확인되었다. 비록 경미하기는 하였으나 후장의 상피에서도 유사한 소견을 인정할 수 있었다.

144시간째의 MNNG 주사군의 중장상피는 완전히 붕괴되어 그 원래구조를 확인할 수 없었으며, 괴사세포가 상피영역 및 관강내부를 거의 점유하고 있었다. 상피영역과 기저 결합조직층의 구분이 불가능할 정도로 기저막과 기저 결합조직이 모두 소실되어 있었다. 소화맹낭의 경우, 상피세포의 괴사 및 파괴소견이 광범위하게 확인되었으며, 일부 남아 있는 이차세관의 상피도 72시간째보다 더욱 심한 위축소견을 나타내었고, 그 고유형태 및 기능 모두를 상실한 것으로 생각되었다. 일차세관은 중장상피와 유사하게 단핵성 괴사세포군이 광범하게 침윤하고 심한 상피 파괴소견을 보였다. 위와 후장상피에서는 72시간째와 유사한 세포의 침윤 및 상피 파괴소견을 보였다. 144시간째의 MNNG 주사군에서는 정소에서도 조직변화가 야기되었다. 정세관의 Sertoli cell과 정조세포가 괴사·탈락되고, 발달과정 중에 있던 정모세포도 괴사소견을 보였다. 정세관의 전체적 구조는 크게 왜곡되지 않았지만, 정세관내에 포상구조의 세포가 침윤해 있었고 이들 세포의 일부는 세포질 내에 호염성의 물질이 확인되어 혈구로 의심되었다.

240시간째 MNNG 주사군의 중장에서는 기저

결합 조직층을 포함한 벽구조를 확인할 수 없을 정도로 괴사세포가 전 영역을 차지하고 있었고, 전체적으로 호염성을 나타내었다. 주변 생식소도 함께 파괴되어 있었으며, 생식소와의 경계도 불분명하였다. 소화맹낭은 144시간째와 거의 유사한 소견을 보였지만 난소의 경우, MNNG 주사군에서 난모세포의 일부가 괴사되고, 발달과정 중에 있는 난포도 변성·괴사소견을 보였다.

콜로이드 탄말 주사군의 조직학적 소견과 lectin 조직화학

콜로이드 탄말 주사 120시간 후 소화관 상피 하 기저 결합조직층, 생식소 간질 결합조직, 소화맹낭의 간질결합조직 등에 탄말을 포식한 혈구가 다수 분포하고 있었다. 일부 아직 과립상태로 존재하는 탄말도 있었지만, 대부분 혈구에 포식되어 있었다 (Fig. 6). 또한, MNNG 주사 후에는 소화관, 소화맹낭 및 생식소에서 MNNG를 단독으로 주사했을 때와 유사한 소견이 경시적으로 재현되었고, 혈구를 포함한 단핵의 괴사세포군의 침윤을 동반한 중장상피 파괴소견이 초기부터 출현하여 주요한 병변으로 인정되었다. 그러나, 이러한 세포침윤이 현저한 중장상피 및 위, 후장의 상피에서도 탄말을 포식한 혈구는 관찰되지 않았다. 다만, 144시간이후로 기저막이 완전 소실되어 기저결합조직층과 상피의 구분이 사라지는 단계에 이르러서는 괴사된 상피 구성세포와 탄말을 포식한 혈구가 혼재해 있었다. 또한, 정모세포의 괴사소견을 보이는 정세관내에서도 탄말을 포식한 혈구는 관찰되지 않았다.

한편, 7종의 biotinylated lectin을 사용하여 정상적인 바지락 혈구의 lectin 결합특이성을 확인한 결과, 혈구는 SBA, WGA 및 PNA lectin에 경미한 반응을 보였고, RCA-I에 강한 양성반응을 보였다 (Fig. 7).

이후 MNNG 주사군에 대해 RCA-I 조직화학을 실시한 결과 중장 및 위, 후장의 상피 내에 침윤한 단핵의 괴사세포군이 대부분 강한 양성반응을 보였다. 특히, 세포침윤을 동반하여 상피

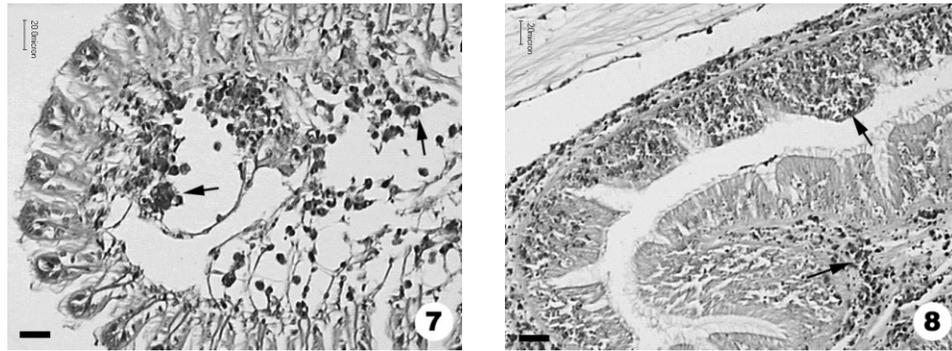


Fig. 7-8. Lectin histochemical stain of gill and midgut. 7: Normal gill with RCA- I . Hemocytes showing strong positive response to RCA- I are clearly recognizable (arrows). Counter-stained with Mayer's hematoxyline. bar=20 μ m., 8: Midgut 24 hrs. after MNNG reacted with RCA- I . Most of infiltrated cells in the epithelium show strong positive response to RCA- I (arrows). Counter-stained with Mayer's hematoxyline. bar=20 μ m.

과피소견이 현저한 중장상피에서는 상피 전부가 RCA- I 양성 세포로 채워져 있었다 (Fig. 8). 또한, 소화관 내강에 출현한 괴사세포 탈락물에서도 강한 양성반응을 확인할 수 있었다. 144시간째부터 확인할 수 있었던 정세관에 침윤한 포상의 세포군도 강한 양성반응을 보여주었으며, 세포질 내에서 호염성의 세포성 물질을 뚜렷이 인정할 수 있었다.

고 찰

지금까지 화학적 오염물질에 의한 이매패류의 병리조직학적 반응에 관한 연구들은 주로 오염지역 내 서식하는 개체들을 대상으로 이루어져 왔고 오염의 지표가 될 수 있는 형태학적 병변 및 생화학적 조성변화를 찾아내는 데 집중되어 있다. Bayne 등 (1980)은 화학적 오염물질에 의한 영향을 모니터하는 데 활용될 수 있는 병리조직학적 변화로서, 이매패류의 아가미 결합조직의 초자적 변성, 아가미의 점액과다 분비, 기생충 감염, 생식소 및 혈구의 종양성 변화, 육아종성 병변, 조직 내 혈구 침윤, 소화맹낭의 파괴 등을 제시하였다. Couch (1985)는 소화맹낭 상피의 위축과 조직 내 비정형 혈구의 침윤을 화학적 오염물질과 관련 깊은 소견이라고 하였으며,

이후 많은 연구자들이 오염지역을 평가하거나 인위적인 화학적 오염물질 노출실험을 수행할 때 대부분 소화맹낭의 위축성 변화를 오염물질에 의한 스트레스성 반응으로서 주목하였다 (Lowe and Clarke, 1989; Marigomez *et al.*, 1990; Weinstein, 1997; Syasina *et al.*, 1997). 전자현미경적 수준에서는 이차소화맹낭 흡수세포 내 lysosome막 구조의 변화에 대해 많이 연구가 되어 있다 (Lowe and Pipe, 1994; Krishnakumar *et al.*, 1995). 그러나 소화맹낭은 섭이활동이나 산란주기 등의 생리학적 요인에 의하여도 위축성 변화를 동반하기 때문에 어떤 화학물질의 영향에 따른 병변으로 인정하기는 쉽지 않을 것으로 생각된다 (Syasina *et al.*, 1997). 또한 이매패류의 소화맹낭은 척추동물의 간장과 유사한 기능을 수행하지만 폐쇄순환계 내에서의 간장과 개방순환계내의 소화맹낭을 동일시하기 어렵고, 오염물질의 노출기회, 처리과정 및 능력 등에 있어 많은 차이가 예상된다. 대부분의 연구자들이 척추동물의 병리학 이론을 그대로 여과 없이 적용함으로써 특정병변의 성격 및 그 영향에 관하여 왜곡될 가능성이 높다. 따라서 이매패류 특이의 해부생리학적 특성을 충분히 고려한 병리조직학적 연구정보가 매우 시급하다.

본 실험에서 선택한 유해성 화합물인 MNNG

는 일종의 *N-nitroso* 화합물로서 연체동물에 직접적인 독성을 미친다고 보고되어 있고 (Montesano and Bartsch, 1976) 실제로 Rasmussen 등 (1983a, 1983b, 1985)은 MNNG를 포함한 몇몇 *N-nitroso* 화합물의 이매패류에 대한 영향을 병리조직학적으로 검토하였기 때문에 이매패류의 조직반응을 명확히 야기할 수 있는 화학물질의 하나로 선택하였다.

본 실험에서 MNNG에 의한 바지락의 병리조직학적 반응은 위, 중장 및 후장, 소화맹낭 및 생식소에서 확인할 수 있었으며 이외의 조직에서는 특기할 변화가 확인되지 않았다. MNNG주사 후 가장 먼저 조직학적 변화가 야기된 곳은 중장의 상피조직으로 혈구와 함께 단핵성 괴사세포가 심하게 침윤하는 동시에 상피구조가 현저하게 파괴되어 있었다. 중장 상피 내에 대량으로 축적된 세포들은 대부분 변성·괴사소견을 보였으며, 일부 아직 변성변화가 경미한 세포의 형태는 혈구와 매우 유사하였다. 만일 이들 세포들이 혈구라면 기저결합 조직층으로부터 유주하였을 가능성이 있으므로 혈구로 하여금 탄말을 포식하게 한 후 MNNG에 주사하여 중장상피의 변성변화에 따른 탄말입자 또는 탄말포식세포의 상피 내 이동유무를 확인하였으나 상피 내 대량 침윤한 세포 중 탄말을 포식한 세포는 관찰되지 않았다.

Lectin은 세포의 특이당과 선택적으로 결합하는 당단백으로서, lectin을 이용한 조직화학염색은 특이세포의 동정 및 동태파악에 활용가치가 높은 방법으로 알려져 있다 (Leathem and Atkins, 1983; Thorndike *et al.*, 1992). Hemocyte에 대한 lectin 결합성을 스크리닝하고, 혈구에 특이적으로 결합하는 lectin으로 밝혀진 RCA-I으로 MNNG 투여 실험구에 대해 조직화학염색을 실시한 결과, 중장 상피 내 축적된 괴사세포가 거의 균일하게 양성반응을 보여 이 괴사세포군이 그 유래에 대하여는 불명확하지만 대부분 혈구임을 강하게 시사하고 있었다.

Hemocyte가 비정상적으로 조직 내에 침윤하

는 현상은 각종 스트레스요인에 의한 반응으로서 알려져 있다. 패각손상 (Bubel *et al.*, 1977), 수온의 상승 (Feng, 1965) 및 탄화수소류 오염 (Aufferent, 1988a; Weinstein, 1997)에 의해서 각종 내장 결합조직에 혈구가 침윤한다고 보고되고 있다. 그러나, 소화관 상피 내로 혈구침윤은 보고된 바는 거의 없다. 소화관 병변과 관련된 보고로서는 Sunila (1988)가 오염이 심한 발틱해 연안의 진주담치 (*Mytilus edulis*)에서 소화관의 궤양성 병변을 확인하였다고 보고하였고, Brown (1992)는 원유 누출이 있었던 해역의 우럭 (*Mya arenaria*)에서 소화관 상피 내 혈구 침윤 및 소화관 확장을 확인하였다. 그러나, 이들 보고는 단순한 병변의 기술에 그치고 있으며 화학적 오염물질과의 상관관계와 병변으로서의 중요성에 대하여는 전혀 언급이 없다. 그러나 본 실험에서는 소화관 상피 내 혈구를 포함한 단핵성 세포군의 침윤 및 괴사를 동반한 상피파괴 소견이 MNNG 주사 초기부터 출현하기 시작하여, MNNG에 의한 주 병변의 하나로 인정되었다.

Hemocyte가 소화상피 내에 대량으로 침윤하는 현상에 대한 기전과 혈구의 유래에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 이매패류의 혈구는 광범위한 생리학적 기능에 관여하여 소화 및 배설기능 뿐만 아니라 각종 세포성, 체액성 면역기작에 관여하는 것으로 밝혀져 있다 (Auffret, 1988b). 배설기능과 관련하여 혈구는 패체 내 각종 오염물질 및 이물질의 제거에 적극 참여하고, 소화상피로도 유주 및 이물질 배출을 하는 것으로 보고되어 있어 (Stauber, 1950), 본 실험에서 바지락의 혈구가 MNNG의 제거에 참여하여 소화관으로 대량 유주하는 것으로 볼 수도 있다. 또한, 이매패류의 염증반응에 대해서 아직 정보가 부족하지만, MNNG에 의한 소화상피의 화학적 손상으로 인한 염증성 반응과 유사한 기전으로 생각할 수도 있을 것이다. Hemocyte의 유래는 소화관 기저결합조직층에 존재하는 혈구일 가능성이 많으나, 탄말을 함유한 혈구는 침윤에 참여하지 않아 상피 내에 존재하는 혈구의 germ cell의 분

화로 생각할 수도 있으며, 포식성이 약한 것으로 알려져 있는 hyalinocyte군의 세포일 수도 있을 것이다. 아울러 탄말을 포식한 혈구가 상피내에서 확인되지 않으므로 포식을 완료한 혈구는 유주성을 상실하고 나머지 혈구가 침윤하는 것으로 볼 수도 있다.

한편, 중장 상피조직 내에 침윤한 혈구의 변성 및 괴사 상황을 설명할 수 있는 오염물질에 대한 혈구의 반응에 대한 연구는 거의 없다. 다만 Rasmussen (1983b)은 MNNG를 투여했을 때 각종 염증반응에 동원된 혈구는 공포화 및 핵농축을 일으키며, 세포 내적으로는 lysosome의 붕괴를 확인할 수 있다고 하였으며 Giamberini와 Pihan (1997)는 중금속에 노출된 혈구의 lysosome이 커지고 수적으로 증가하였다고 보고하였다. 본 실험에서는 혈구의 초미세구조를 확인하지는 못했지만, MNNG에 의한 lysosome막의 붕괴를 의심해 볼 수 있다.

위와 후장에서도 혈구를 포함한 단핵의 괴사 세포의 침윤과 함께 경미한 상피파괴가 인정되었지만, 중장에 비하면 병변의 심도가 경미한 수준이었으며, 출현 시기가 늦어 소화관 상피 중 중장 상피가 가장 민감하게 반응함을 알 수 있었다. 이매패류의 중장은 영양성 물질의 흡수 및 세포내 소화를 담당한다고 알려져 있어, MNNG와 같은 각종 유해인자에 대해서도 매우 민감하게 반응하리라 사료되며, 상피구조의 파괴가 이매패류에 상당한 생리학적 악영향을 줄 수 있을 것이다.

소화맹낭의 병변은 중장 상피의 병변보다 늦은 72시간째부터 본격적으로 출현하였으며, 이차 소화맹낭부터 상피가 대량으로 괴사되었으며, 잔존한 상피도 심한 위축소견을 보이거나, 상피 내 혈구양 세포군이 대량 침윤하고 있었다. Rasmussen 등 (1983b)은 MNNG에 의해 유사한 병변을 야기했지만, 특징적으로 지적한 호산성 과립을 가진 혈구의 대량 침윤은 본 실험에서 확인할 수 없었다. 이러한 소화맹낭의 변화는 오염물질로 인한 이매패류의 병리조직학적

반응양식 중 가장 많이 언급되고 있는 병변이다. 다양한 화학적 오염물질에 의해 이차 소화맹낭 흡수상피의 위축 (Couch, 1984; Lowe and Clarke, 1989; Tripp *et al.*, 1984; Weinstein, 1997) 및 호염성 세포의 수적 증가 (Cajaraville *et al.*, 1990; Syasina *et al.*, 1997)가 보고되었으며, 오염물질에 대한 이매패류의 반응양식으로서 주목받는 소견으로 자리잡고 있다. 하지만, 소화맹낭의 반응은 그 해석에 있어 많은 생리적 요건을 검토해야 한다. 소화맹낭은 소화주기에 따라서 다양한 형태적 변이를 할 수 있으며, 생식주기와도 밀접하게 관련되어 변화한다고 알려져 있다 (Syasina *et al.*, 1997; 장, 1991). 본 실험에서 확인된 소화맹낭의 위축 및 파괴 소견은 비록 양성 반응으로 인정할 수 있지만, 이러한 소화맹낭의 변화는 바지락의 생리학적 수준의 면밀한 검토가 따라 주어야 할 것으로 본다.

생식소에서는 비교적 늦은 144시간째부터 생식상피의 괴사와 함께 생식소 내에 혈구의 생식모세포 포식을 확인할 수 있었다. 생식상피의 괴사 및 혈구에 의한 생식모세포의 포식은 오염지역의 이매패류에서 많이 보고되고 있으며 (Sunila, 1988), 이매패류 생산량과도 밀접히 관련되어 있어, 의미 깊은 병변이라 할 수 있다. 하지만, 타 상피조직의 변화보다는 늦게 출현하는 경향을 보여주고 있었다.

오염지역에 서식하는 이매패류의 신장에서 선조직 증생 및 공포화, 세포탈락, 호산성화, 종양성 병변, cyst 형성 등의 병변이 출현한다고 보고되고 있으며 (Brown *et al.*, 1992; Sunila, 1989), 아가미에서는 형태 왜곡, 증생, 혈구 침윤 등의 병변이 보고되고 있다 (Brown *et al.*, 1992; Sunila, 1988). 본 실험에서 신장과 아가미 및 기타 장기에서는 어떠한 병변도 확인되지 않아 이 장기들이 MNNG의 급성 노출 시에는 변화를 보이지 않거나, 조직 특이성이 없는 장기로 사료된다.

이상의 결과에서 MNNG의 급성 노출에 따른 병리조직학적 변화는 위, 중장 및 후장, 생식소에 한정되어 일어났으며, 특히 중장상피의 혈구

를 포함한 단핵 괴사세포군의 침윤을 동반한 상피의 파괴소견은 MNNG 노출 후 가장 빠르게 나타나는 병변이었다. RCA- I lectin 조직화학에서 소화관 상피에 침윤한 이들 세포군이 혈구임을 강하게 시사하고 있었고, 중장상피의 파괴과정에는 이러한 혈구가 깊게 관련되어 있는 것으로 사료되었다.

요 약

이때패류의 각종 화학적 유해인자에 대한 반응특성을 이해하기 위한 연구의 일환으로 화학적 오염물질의 하나인 *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)을 바지락에 개체당 1.0 mg씩 단회 주사한 후 240시간 동안 조직손상의 과정을 경시적으로 추적하였다. MNNG에 의하여 조직변화를 보인 곳은 위, 중장 및 후장, 소화맹낭, 생식소로 한정되어 있었다. MNNG를 주사한 후 가장 먼저 변성변화를 보인 조직은 중장상피였으며, 주사 후 12시간째부터 조직학적 변화를 인정할 수 있었다. 소화관 상피 내에는 혈구 (hemocyte)를 포함한 단핵성 괴사세포가 상피에 대량으로 침윤하는 동시에 부분적이거나 완전한 상피파괴 소견이 실험종료까지 확인되었다. 가장 마지막으로 조직학적 변화를 보인 장기는 생식소였으며, 주사 후 144시간째부터 생식상피의 괴사성 탈락을 인정할 수 있었다. 또한, 혈구에 특이적으로 결합하는 *Ricinus communis* (RCA- I) lectin으로 조직화학염색을 실시한 결과에서 이들 소화상피에 침윤하는 세포가 대부분 혈구임이 강하게 시사되었다. 이상의 결과에서, 소화기계가 MNNG의 비경구적 노출에 의해 손상받기 쉬우며, MNNG에 의해 야기되는 소화상피 파괴에는 혈구가 깊이 관여하는 것으로 사료되었다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 부경대학교발전기금재단

의 지원에 의하여 연구되었음을 밝힙니다.

참 고 문 헌

- Auffret, M.: Histopathological changes related to chemical contamination in *Mytilus edulis* from field and experimental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46: 101-107, 1988a.
- Auffret, M.: Bivalve hemocyte morphology. In *Disease processes in marine bivalve molluscs*, pp. 169-177, Fisher, W. S., American Fisheries Society, Maryland, 1988b.
- Andrews, J. D.: Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. In *Disease processes in marine bivalve molluscs*, pp. 47-63, Fisher, W. S., American Fisheries Society, Maryland, 1988.
- Bayne, B. L., Brown, D. A., Harrison, F. and Yevich, P. P.: Mussel health. In *The International Mussel Watch*. pp. 163-235, National Academy of Sciences, Washington DC, 1980.
- Brown, R. P., Cristini, A. and Cooper, K. R.: Histopathological alternations in *Mya arenaria* following a #2 fuel oil spill in the Arthur Kill, Elizabeth, New Jersey. *Mar. Environ. Res.*, 34: 65-68, 1992.
- Bubel, A., Moore, M. N. and Lowe, D.: Cellular response to shell damage in *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 30: 1-27, 1977.
- Cajaraville, M. R., Diez, G., Marigomez, I. A. and Angulo, E.: Responses of basophilic cells of the digestive gland of mussels to petroleum hydrocarbon exposure. *Dis. Aquat. Org.*, 9: 221-228, 1990.
- Cheng, T. C.: Noninfectious diseases of marine molluscs. In *Pathobiology of marine and estuarine organisms*, pp. 289-318, Couch, J.

- A. and Fournie, J. W., CRC press, Florida, 1993.
- Couch, J. A.: Atrophy of diverticular epithelium as an indicator of environmental irritants in the oyster, *Crassostrea virginica*. Mar. Environ. Res., 14: 525-526, 1984.
- Couch, J. A.: Prospective study of infectious and noninfectious diseases in oysters and fishes in three Gulf of Mexico estuaries. Dis. Aquat. Org., 1: 59-82, 1985.
- Feng, S. Y.: Pinocytosis of proteins by oyster leucocytes. Biol. Bull., 129: 95-105, 1965.
- Giamberini, L. and Pihan, J. C.: Lysosomal changes in the hemocytes of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* experimentally exposed to lead and zinc. Dis. Aquat. Org., 28: 221-227, 1997.
- Haskin, H. H. and Andrews, J. D.: Uncertainties and speculations about the life cycle of the eastern oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni* MSX. In *Disease processes in marine bivalve molluscs*, pp. 5-22, Fisher, W. S., American Fisheries Society, Maryland, 1988.
- Krishnakumar, P. K., Casillas, E. and Varanasi, U.: Effects of chemical contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washington. II. Cytochemical detection of subcellular changes in digestive cells. Mar. Biol., 124: 251-259, 1995.
- Leathem, A. J. C. and Atkins, N. J.: Lectin binding to paraffin sections. In *Techniques in immunocytochemistry*. pp. 39-70, Bullock, G. R. and Petrusz, P., Academic Press, New York, 1983.
- Lee, M. K., Cho, B. Y., Lee, S. J., Kang, J. Y., Jeong, H. D. and Huh, M. D.: Histopathological lesions of Manila clam, *Tapes philippinarum*, from Hadong and Namhae coastal areas of Korea. Aquaculture, 201: 199-209, 2001.
- Lowe, D. M. and Clarke, K. R.: Contaminant-induced changes in the structure of the digestive epithelium of *Mytilus edulis*. Aquat. Toxicol., 15: 345-358, 1989.
- Lowe, D. M. and Pipe, R. K.: Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an *in vitro* study. Aquat. Toxicol., 30: 357-365, 1994.
- Marigomez, I. A., Cajaraville, M. P. and Angulo, E.: Histopathology of the digestive gland-gonad complex of the marine prosobranch *Littorina littorea* exposed to cadmium. Dis. Aquat. Org., 9: 229-238, 1990.
- Montesano, R. and Bartsch, H.: Mutagenic and carcinogenic *N*-nitroso compounds: possible environmental hazards. Mutat. Res., 32: 179-228, 1976.
- Perkins, F. O.: Infectious diseases of molluscs. In *Pathobiology of marine and estuarine organisms*, pp. 255-287, Couch, J. A., Fournie, J. W., CRC press, Florida, 1993.
- Pipe, R. K. and Coles, J. A.: Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. Fish Shellfish Immunol., 5: 581-595, 1995.
- Rasmussen, L. R. D., Hage, E. and Karlog, O.: Light and electron microscopic studies of the acute and chronic toxic effects of *N*-nitroso- compounds on the marine mussel, *Mytilus edulis* L. I. *N*-nitrosodimethylamine. Aquat. Toxicol., 3: 285-299, 1983a.
- Rasmussen, L. R. D., Hage, E. and Karlog, O.: Light and electron microscopic studies of the acute and chronic toxic effects of *N*-nitroso compounds on the marine mussel, *Mytilus edulis* L. II. *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. Aquat. Toxicol., 3: 301-

- 311, 1983b.
- Rasmussen, L. R. D., Hage, E. and Karlog, O.: Light and electron microscopic studies of the acute and long-term toxic effects of *N*-nitroso-dipropylamine and *N*-methylnitrosurea on the marine mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar. Biol.*, 85: 55-65, 1985.
- Sparks, A. K.: Invertebrate disease--An overview. In *Pathobiology of marine and estuarine organisms*, pp. 245-253, Couch, J. A., Fournie, J. W., CRC press, Florida, 1993.
- Stauber, L. A.: The fate of India ink injected intracardially into the oyster, *Ostrea virginica*. *Biol. Bull.*, 98: 227-241, 1950.
- Sunila, I.: Pollution-related histopathological changes in the mussel *Mytilus edulis* L. in the Baltic Sea. *Mar. Environ. Res.*, 24: 277-280, 1988.
- Sunila, I.: Cystic kidneys in copper exposed mussels. *Dis. Aquat. Org.*, 6: 63-66, 1989.
- Syasina, I. G., Vaschenko, M. A. and Zhadan, P. M.: Morphological alterations in the digestive diverticula of *Mizuhopecten yessoensis* Bivalvia: Pectinidae from polluted areas of Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Mar. Environ. Res.*, 44: 85-98, 1997.
- Thorndike, J. M., Bach, P. H. and Moore, M. N.: Lectin binding sites in the digestive gland of mussel. *Mar. Environ. Res.*, 34: 69-74, 1992.
- Tripp, M. R., Fries, C. R., Craven, M. A. and Grier, C. E.: Histopathology of *Mercenaria mercenaria* as an indicator of pollutant stress. *Mar. Environ. Res.*, 14: 521-524, 1984.
- Weinstein, J. E.: Fluoranthene-induced histological alterations in oysters, *Crassostrea virginica*: Seasonal field and laboratory studies. *Mar. Environ. Res.*, 43: 201-218, 1997.
- 장영진: 가리비, *Pationpecten yessoensis* 소화맹낭의 계절변화. *한국양식학회지*, 4: 19-30, 1991.

Manuscript Received : March 06, 2005

Revision Accepted : August 20, 2005

Responsible Editorial Member : Ju-Chan Kang
(Pukyong Univ.)