

***Megalocytivirus* 감염 해산 어류에서 나타나는 임상증상의 정량적 변화 분석**

진지웅 · 조혜진* · 김광일 · 정준범** · 박경현*** · 정현도†

부경대학교 수산생명의학과, *수산자원연구소 민물고기 연구센터,
제주대학교 해양의생명과학부, *수산자원사업단

Quantitative analysis of the clinical signs in marine fish induced by *Megalocytivirus* infection

Ji Woong Jin, Hye Jin Cho*, Kwang Il Kim, Joon Bum Jeong**, Gyeong Hyun Park*** and Hyun Do Jeong†

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, South Korea

**Fisheries Resources Institute, Miryang 627-812, South Korea*

***School of Marine Biomedical Sciences, College of Ocean Science & Marine and Environmental
Research Institute, Jeju National University, Jeju-do 690-756, South Korea*

****Fisheries Resources Agency, Busan 612-020, South Korea*

In quantitative studies of clinical signs, rock bream of adults and juveniles infected with *Megalocytivirus* IVS-1 isolated from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) in Korea showed average 4.49 ± 1.13 and 4.85 ± 1.06 of spleen index respectively. In challenge experiments, *Megalocytivirus* IVS-1 induced 100% cumulative mortality in both adult and juvenile rock bream. However we found 60% cumulative mortality in juvenile red sea bream (*Pagrus major*) even after 30 days of injection, which contradicted with the results of other laboratories. Interestingly, IVS-1 infected red sea bream of the same juvenile size with rock bream showed lower spleen index compared to that of rock bream. In real-time PCR, there was continuous increasing of the numbers of viral copies (2.03×10^7 copies/mg) in the spleen of juvenile rock bream infected, which were different from those in adult rock bream showing plateau level after reaching to the peak level. Moreover, enlarged cell numbers in the infected spleen were also increased continuously in the juvenile but not in adult of rock bream, even decreased after reaching to peak level. Consequently, significant differences in clinical signs : cumulative mortality, spleen index and viral copy number were found between rock bream and red sea bream, but not between adult and juvenile rock bream. Certainly quantitative expression of clinical sign as in this study may be a way to compare the progression of megalocytiviral disease more accurately in different species or physiological conditions.

Key words : *Megalocytivirus*, Rock bream, Red sea bream, Spleen index, Real-time PCR

†Corresponding Author: Hyun Do Jeong

Tel : +82-51-629-5941 Fax : +82-51-629-5938

E-mail : jeonghd@pknu.ac.kr

Iridoviridae family는 1990년, 일본의 red sea bream (*Pagrus major*)로부터 red sea bream iridovirus (RSIV)가 처음으로 분리된 후 (Inouye *et al.*, 1992), infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) iridovirus (RBIV), grouper (*Cromileptes altivelis*) sleepy disease virus (GSDIV), largemouth bass (*Micropterus salmoides salmoides*) virus (LMBV), RBIV IVS-1, African lampeye (*Aplocheilichthys normani*) iridovirus (ALIV) 그리고 Dwarf gourami (*Colisa lalia*) iridovirus (DGIV) 등 다양한 어종에서 iridoviruses의 분리가 보고되고 있다. 이렇게 어류로부터 분리된 iridoviruses는 *Iridoviridae* family의 5개 genus 중 하나인 megalocytivirus에 속하며 양식산업에서 심각한 경제적 손실을 야기 시키고 있다 (He *et al.*, 2000; Do *et al.*, 2004; Mahardika *et al.*, 2004; Hanson *et al.*, 2001; Jeong *et al.*, 2006; Sudthongkong *et al.*, 2002).

Megalocytivirus에 감염된 어류는 유영력의 상실, 심한 빈혈, 아가미 점상출혈, 비장 및 신장 비대증상을 나타낸다. 조직병리학적으로는 비장, 심장, 신장, 간, 아가미 조직 등에 비정형비대세포를 형성하는 것이 임상적으로 특징적인 현상이며, 비정형비대세포의 세포질 내에서 다수의 virion의 존재를 전자현미경으로 확인 할 수 있다 (Inouye *et al.*, 1992). 그러나 이러한 조직병리학적인 변화에 대한 것은 모두 정상적 표현에 의존 하고 있었으며, 지금까지 megalocytivirus 감염 어류에서 나타나는 병리적 현상을 정량적이고 수치적인 비교 분석을 실시한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다.

한편 megalocytivirus의 신속진단법으로는 단클론 항체를 이용한 immunofluorescence (IF) test (Nakajima and Sorimachi, 1994)와 같은 면역학적 기법과 분자생물학적 진단법 특히, 초기에 바이러스를 검출 할 수

있는 polymerase chain reaction (PCR) 기법이 보편화 되어 사용되고 있다 (He *et al.*, 2001; Kurita *et al.*, 1998; Oshima *et al.*, 1998, Jeong *et al.*, 2006). 최근에는 형광 부착 probe 또는 double-stranded DNA에 결합하는 형광색소를 이용한 real-time PCR 기법의 개발로 기존의 진단법보다 더 정확하고 효율적으로 megalocytivirus를 정성적·정량적으로 진단 할 수 있게 되었다 (Goldberg *et al.*, 2003; Nerland *et al.*, 2007; Pallister *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006). 하지만 이러한 기법들은 megalocytivirus의 검출 유무 및 정량적 분석을 위하여 사용되었을 뿐 감염어 조직 내의 바이러스 농도와 병리적 조직의 변화에 대한 정량적 평가에 사용하여 질병 진단의 유용한 지표로서 또는 지표간의 정량적 비교에 대한 기준으로서의 연구는 되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 megalocytivirus를 돌돔과 참돔에 인위 감염시켜 감염어의 비정형비대세포의 수와 비장중대의 수준을 수치적으로 표시한 spleen index를 정량적으로 표시로 하고, 감염조직에서 나타나는 바이러스농도의 동역학적 변화와의 상관관계를 비교, 분석하여 megalocytivirus 감염어류에서 나타나는 임상적 특성의 정량화를 이루고, 새로운 megalocytivirus 질병의 진단 과정에 대한 새로운 접근을 이루어 나가고자 하였다.

재료 및 방법

바이러스

2000년 9월 국내 남해안의 양식장에서 megalocytivirus 감염증상을 나타내는 돌돔의 비장으로부터 분리한 megalocytivirus IVS-1 strain을 돌돔 치어에 복강 주사하여 활성화 시킨 후 감염조직을 사용하였다 (Jeong *et al.*, 2006). 감염조직은 사용 전까지 -80°C에서 보관하였다.

실험어

돌돔성어 (b.w. 130.0±10.0 g), 돌돔치어 (b.w. 8.0±1.0 g) 그리고 참돔치어 (b.w. 10.0±1.0 g)를 남해안의 양식장에서 구입하여 실험에 사용하였다. 각 어류는 실험하기 전 5마리씩 무작위로 채집하여 megalocytivirus 감염 여부를 Kurita *et al.* (1998)에 의해 보고된 ATPase (Adenosine triphosphatase) 부위의 3F/3R primer set를 이용하여 megalocytivirus의 음성을 확인하고 실험에 사용하였다. 모든 어류는 매일 사료를 먹이고 매일 사육수를 환수 시켰으며, 사육수온은 25°C를 유지하였다.

바이러스의 핵산 분리

감염어의 비장 또는 다른 장기 조직 10 mg으로부터 AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 최종 50 µl의 elution buffer를 사용하여 바이러스핵산을 준비하였다. 분리한 DNA는 실험 전까지 -20°C에서 보관하였다.

PCR

PCR은 microtube에 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (w/v) gelatin, 0.5% Tween-20, 200 µM의 각각의 dNTP, 1 µM의 각각의 primer, 1.25 U AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) 및 주형 DNA로서 추출된 핵산을 첨가한 후 증류수로 PCR 혼합물 최종량이 50 µl가 되게 하였다. PCR amplification은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer)를 사용하였으며, PCR 조건은 94°C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C 30초 denaturation, 55°C 30초 annealing, 72°C 30초 extension의 반응을 1 cycle로 하여 30 cycles를 반응시켰다. 그 후 72°C에서 7분간 post-extension 시켰다. 증폭된 산물은 0.5 µg/ml ethidium bromide

(EtBr)가 첨가된 1% agarose gel을 완충액 0.5X TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)에 넣어 전기영동을 실시한 후 Ultraviolet (UV)에서 나타나는 특이적 band를 관찰하였다.

Real-time PCR

Real-time PCR을 위한 primer set는 MCP (Major capsid protein) 부위로부터 제작하였다 (Table 1). Megalocytivirus DNA의 정량을 위해 Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, AUS)을 사용하였다. 0.2 ml microtube에 SensiMixPlus SYBR (Quantace, USA) 10 µl, 1 µM의 각각의 primer, 주형 DNA로서 plasmid DNA 또는 추출된 핵산을 첨가한 후 증류수로 PCR 혼합물 최종량이 20 µl가 되게 하였다. Real-time PCR의 조건은 95°C에서 10분간 반응한 후 95°C 10초, 55°C 15초, 72°C 20초의 반응을 1 cycle로 하여 40 cycles를 반응시켰다. 마지막 cycle 후에는 모든 반응물에 대하여 72°C부터 95°C까지의 영역에서 용융점 (melting temperature, *T_m*) 분석을 실시하였다.

표준검량곡선을 작성하기 위해 megalocytivirus IVS-1의 genomic DNA를 주형으로 하여 MC1F/MC1R primer set (Table 1)를 사용하여 PCR을 실시하였고 생성된 PCR 결과물을 pGEM-T Easy vector (Promega, USA)에 ligation 하여 *E. coli* DH5α 균주에 cloning시킨 후 plasmid DNA를 분리하였다. Plasmid DNA의 copy 수를 정량하기 위해 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 plasmid DNA의 copy 값을 계산하였으며, 10¹~10⁹ copies/µl로 10배씩 단계 희석하여 real-time PCR 시 표준검량곡선을 구하는데 사용하였다. plasmid DNA는 실험할 때마다 새로 희석하여 사용하였으며, 같은 plasmid DNA에 대하여 3번씩 수행하였다.

Table 1. PCR primers used in this study

Genomic region	Primers	Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	Expected size of amplicons	Object	Reference
ATPase	3F	caaaccacagcgcgcaagt	563 bp	Detection	Kurita <i>et al.</i> (1998)
	3R	gccaaagcggcacataatt			
MCP	MC1F	gaagtggatgcgcacctc	163 bp	Quantification	In this study
	MC1R	caagatgattggcatgcg			

광학현미경의 표본제작

정상어와 감염어의 장기를 적출하여 부완액 (Bouin's solution)에 전고정한 후 2차 고정은 1차 고정 후 24시간 후 동일 고정액을 사용하여 실시하였다. 2차 고정 후 24시간이 지난 다음 수세하고, 70%에서 100% 순차 농도 에탄올에 탈수를 하였다. 자일렌 (xylene)을 이용하여 투명화 한 후 파라핀 친화를 시키고, 파라핀 포매 후 microtome (Reichert-Jung 820, Leica)을 사용하여 박편을 얻었다. 이를 슬라이드 글라스에 올려 건조기에서 파라핀을 녹이고, Hematoxyline-eosin (HE) 염색을 실시한 후 Malinol액으로 봉입하여 광학현미경으로 정상 세포와 megalocytivirus의 특징인 비정형비대세포를 관찰하였다. 또한 Image-Pro Plus™ 프로그램을 이용하여 조직표본 10장의 1 mm² 당 존재하는 비정형거대세포의 평균수를 도출하여 cells/mm² 단위로 나타내었다.

Spleen index

어류의 어체중 (g)을 측정하고 곧바로 회복하여 비장을 적출한 다음 미량저울을 이용하여 비장무게 (mg)를 측정하였다. Spleen index는 아래의 식과 같이 비장 무게 (g)를 어체중 (g)으로 나눈 후 1000을 곱해 주어 비장 무게를 mg 단위로 환산하여 산출하였다.

$$\text{Spleen index} = \frac{\text{spleen weight (g)}}{\text{body weight (g)}} \times 1000$$

공격실험

IVS-1에 감염된 돌돔의 비장조직 마쇄액 (1 mg/ml)을 100 µl씩 돌돔성어, 돌돔치어 그리고 참돔치어 20마리씩에 각각 복강주사한 후 채집 그룹으로 지정하였고, 관찰그룹은 폐사율을 관찰하기 위한 그룹으로 동일한 방법으로 10마리에 복강주사 하였다. 음성 대조군으로는 동일량의 멸균된 PBS (pH 7.2)를 복강주사한 후 폐사율을 관찰 하였다.

동역학적 분석을 위해 돌돔성어와 치어는 채집그룹 20마리 중 각각 3, 7, 10, 12일째 되는 시점과 5, 7, 9, 10일째 되는 시점에서 살아있는 실험어 중에서 무작위로 3마리씩 채집하여 spleen index 측정, 조직병리학적 관찰 및 real-time PCR을 실시하였다. 참돔치어는 공격실험 후 빈사상태의 어류만 선별하여 3F/3R primer set를 사용한 conventional PCR 결과 양성을 보이는 조직만 사용하여 spleen index 측정, 조직병리학적 관찰 및 real-time PCR을 실시하였다. 10마리의 관찰그룹은 20일간 매일 폐사정도를 확인하였다. 모든 폐사어는 즉시 사육수조에서 제거하여 어체중 (g)과 비장 무게 (mg)를 측정하였고, 조직병리학적 관찰과 PCR을 이용하여 megalocytivirus의 감염여부를 확인하였다.

결 과

어류 연령 및 어종이 megalocytivirus 감염과 폐사에 미치는 영향

돌돔성어와 치어 그리고 참돔치어에 megalocytivirus IVS-1을 사용하여 공격실험을 실시하였다. 돌돔성어의 폐사는 주사 후 11일째부터 일어나기 시작하였으며, 13일째 100%의 누적폐사율을 보였다 (Fig. 2). 돌돔치어의 경우 주사 후 8일째 폐사가 시작되어 10일째 100% 누적폐사율을 보여, 성어에 비해 폐사가 빠르게 진행됨을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3). 그러나 참돔치어의 경우에는 돌돔치어의 폐사가 시작된 시기보다 3일 늦은 주사 후 11일째부터 폐사가 일어나기 시작하였으며, 폐사기간 또한 비교적 길어 주사 후 19일까지 폐사가 진행되었고, 이후 30일까지 관찰하였으나 더 이상의 폐사는 나타나지 않았다 (Fig. 4). 참돔치어의 최종 누적폐사율은 60%로 나타나 100%의 누적폐사율을 보인 돌돔치어 또는 돌돔성어에 비하여 낮은 누적폐사율을 보였다.

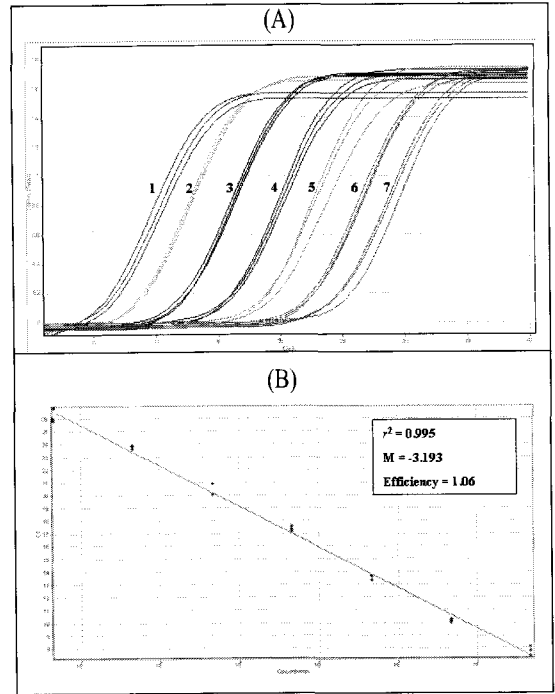
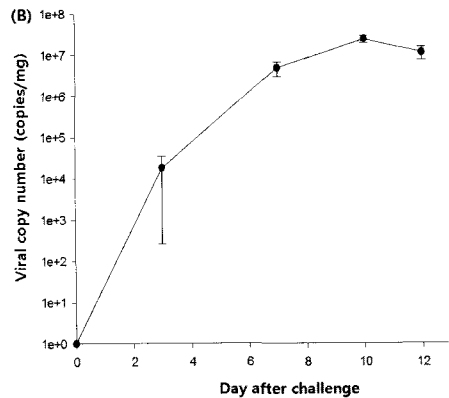
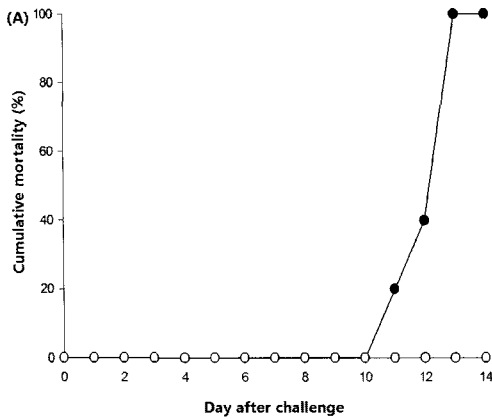


Fig. 1. (A) Amplification plot of real-time PCR of the positive plasmid DNA with different copy number. (B) Standard curve showing a linear relationship between positive plasmid concentration and cycle threshold number.



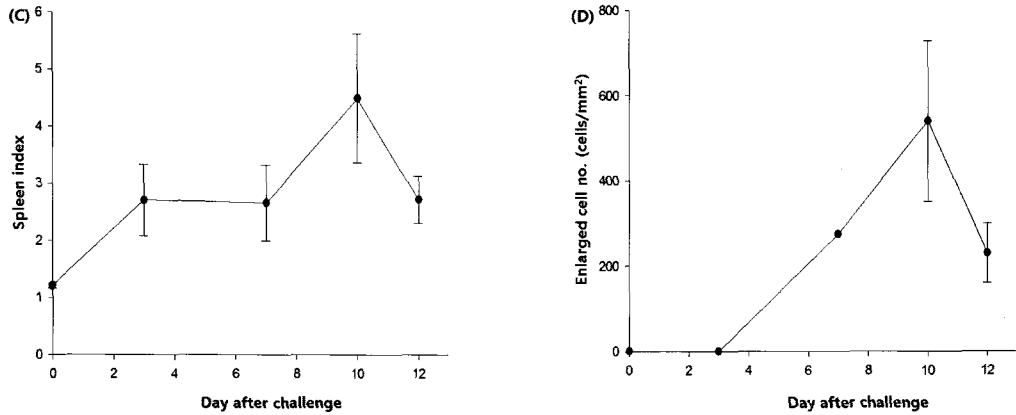


Fig. 2. Kinetics of the clinical signs in adult rock bream (*Oplegnathus faciathus*) challenged with megalocytivirus IVS-1. (A) cumulative mortality (●, challenged with IVS-1; ○, negative control fish) (B) viral copy numbers in infected spleen, (C) spleen index, (D) enlarged cell number in infected spleen.

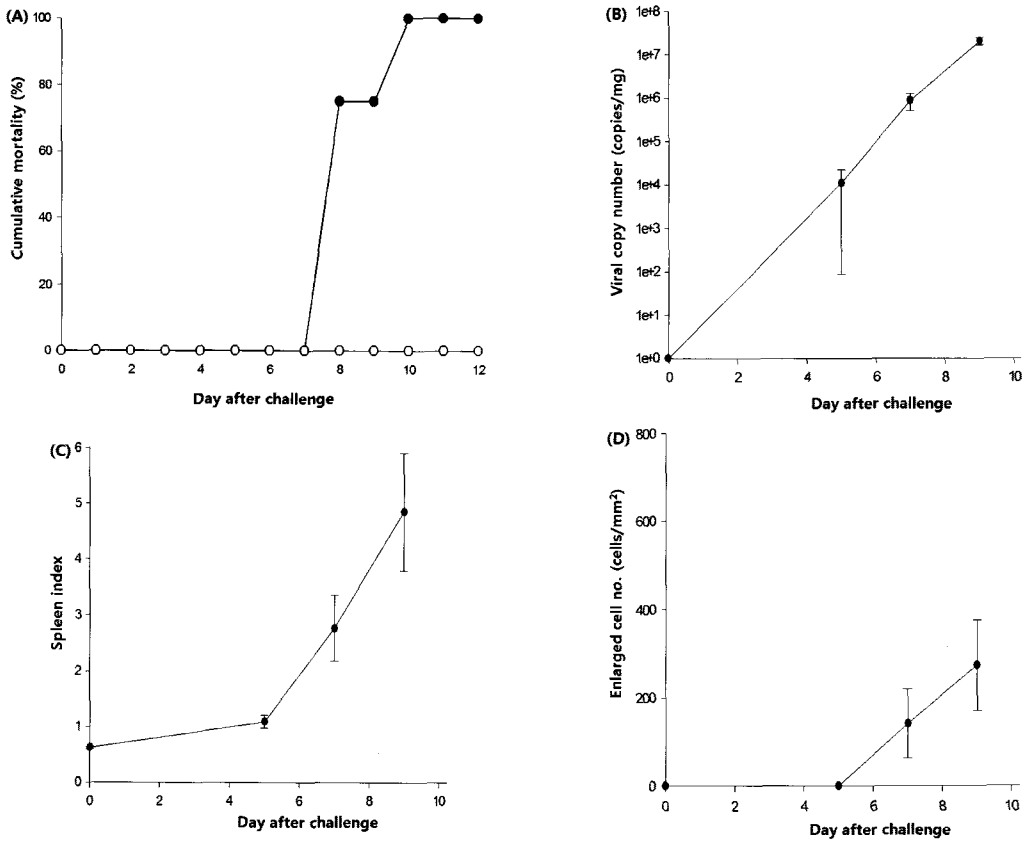


Fig. 3. Kinetics of the clinical signs in juvenile rock bream (*Oplegnathus faciathus*) challenged with megalocytivirus IVS-1. (A) cumulative mortality (●, challenged with IVS-1; ○, negative control fish) (B) viral copy numbers in infected spleen (C) spleen index, (D) enlarged cell number in infected spleen.

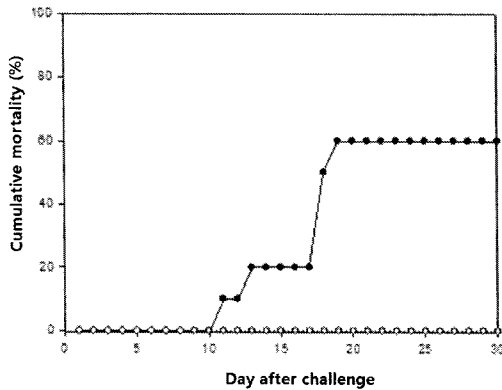


Fig. 4. Cumulative mortality of red sea bream (*Pagrus major*) challenged with megalocytivirus IVS-1. ●, challenged with IVS-1; ○, negative control fish.

감염조직 내 바이러스 농도의 동역학적 변화

돌돔성어와 치어 그리고 참돔치어에 megalocytivirus IVS-1을 주사한 후 돌돔성어는 3, 7, 10, 12, 13일째 그리고 돌돔치어는 5, 7, 9, 10일째 되는 시점에 무작위로 3마리씩 채집한 비장조직 10 mg으로부터 핵산을 분리하였고, real-time PCR을 이용하여 바이러스 농도를 측정하였다 (Fig. 2-3). 이때 megalocytivirus의 MC1F/MC1R 부위가 포함된 plasmid를 이용한 표준 검량곡선에서 plasmid DNA의 copy 수와 threshold cycle (C_T) 값 사이의 상관관계 계수인 r^2 은 0.99로 나타났다 (Fig. 1). 참돔치어는 빈사상태의 어류만 채집하여 ATPase 유전자부위를 목표로 한 conventional PCR에서 양성결과를 보이는 개체만을 취하여 조직 내 바이러스농도를 확인함으로써 병의 진전이 이루어지고 있는 감염 개체에 대한 분석이 이루어지게 하였다 (Table 2).

먼저 돌돔성어는 비장 조직은 10일째에 평균 2.40×10^7 copies/mg으로 가장 높은 수치를 나타내었으며, 12일째도 비슷한 수치를 나타내었다 (Fig. 2). 돌돔치어의 경우 감염 후 10일째 모두 폐사하였으며, 비장 조직 내 바이러스 농도는 계속 증가하는 경향

Table 2. Clinical signs of juvenile rock bream, adult rock bream and juvenile red sea bream at moribund stage with infection of megalocytivirus IVS-1

Clinical signs	Species		
	rock bream Adult	rock bream Juvenile	red sea bream
Viral copy number (copies/mg)	2.40×10^7	2.03×10^7	2.06×10^6
Spleen index	4.49 ± 1.13	4.85 ± 1.06	1.47 ± 0.87
Enlarged cell number (cells/mm ²)	575 ± 205	274 ± 102	220 ± 160

을 보여, 주사 후 9일째의 감염어에서의 평균 바이러스 농도는 2.03×10^7 copies/mg으로 나타나 감염된 돌돔성어의 결과와 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3). 빈사상태의 참돔치어는 평균 2.06×10^6 copies/mg 정도의 바이러스농도를 나타내어, 같은 빈사상태의 돌돔성어와 치어에 비해 약간 낮은 viral copy number를 나타내었다 (Table 2). 또한 주사 12일 이후 감염어는 더 이상의 폐사를 보이지 않았고 30일까지 살아남은 생존어의 경우 MCP (MC1F/MC1R)와 ATPase (3F/3R) 두 유전자에 대한 PCR에서도 음성으로 나타났다 (data not shown).

Spleen index 및 비정형비대세포의 동역학적 조사

돌돔성어는 주사 3일후 부터 비장증대라는 명확한 병리적 증상에 의하여 spleen index가 3.7 ± 1.8 을 보였으며, 이러한 비장증대는 10일째까지 계속 진행되어 최대 spleen index가 4.49 ± 1.13 까지 이르렀고, 이후 약간의 감소를 보여 감염초기에 비장증대가 빠르게 이루어짐을 확인 할 수 있었다. 이러한 spleen index의 변화와 함께 광학현미경에 의하여 계수된 감염조직 내의 비정형비대세포수도 주사 후 10일째 575 ± 205 cells/mm²으로 최대를 보였으나 이후 약간 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 2). 돌돔치어는 주사 3일

후 부터 spleen index가 증가하기 시작하여 100% 폐사할 때 까지 지속적으로 증가해 9일째 spleen index가 4.85 ± 1.06 까지 이르렀으며, 비정형비대세포 수 역시 지속적으로 증가해 274 ± 102 cells/mm²으로 9일째 최고치를 보였다 (Fig. 3). 빈사상태의 참돔치어의 spleen index는 1.47 ± 0.87 로 나타나 비감염참돔의 spleen index인 0.69 ± 0.18 에 비해 약 2배 정도 높은 값을 보였다. 반면 돌돔성어와 치어의 대조구의 경우 spleen index가 각각 1.01 ± 0.19 과 1.21 ± 0.29 으로 나타나 감염어와 약 3배정도의 차이를 보여, 참돔의 경우 돌돔에 비해 더 낮은 spleen index를 보임을 확인할 수 있었다. 또한 비정형비대세포수는 220 ± 160 cells/mm²으로 나타났다 (Table 2).

고찰

본 연구에서는 megalocytivirus 감염어의 조직내 바이러스의 양적 증가 변화와 특징적으로 나타나는 병리적 특성의 정량화에 의한 질병의 수치적 진단상태의 상관관계에 대한 분석을 실시하였다. 이를 위하여 먼저 우리나라 주요 양식 해산어종인 돌돔과 참돔에 megalocytivirus를 인위감염시켰을 때 나타나는 특징적인 증상인 비장증대의 수준을 수치화하고, 비정형비대세포수의 정량화를 실시하였으며, 그리고 이들 수치가 감염어 조직 내 존재하는 바이러스농도의 증가와 어떠한 상관관계를 나타내는지를 비교 분석하였다.

감염어의 조직을 주사한 돌돔성어는 11일째부터 폐사가 일어나기 시작하여, 13일째 100% 폐사하였으며, 반면 돌돔치어는 8일째부터 폐사가 시작되어 10일째 100%폐사하였다 (Fig. 2). 실제 무작위로 채집한 살아 있는 감염어의 비장조직 내 바이러스농도는 돌돔성어의 경우 10일째에 평균 2.40×10^7 copies/mg으

로 가장 높은 수치를 나타내며, 12일째도 비슷한 수치를 나타내었다 (Fig. 2). 돌돔치어의 경우 10일째 100% 폐사하여 그 이후는 확인할 수 없었지만 바이러스농도가 감염 9일째까지 지속적으로 증가하여 2.03×10^7 copies/mg까지 이르렀고 이후 10일째 100% 폐사하였다 (Fig. 3). 결과적으로 빈사상태에 이르른 돌돔성어와 치어의 조직 내 바이러스 농도는 유사하였으며, 다만 최고 농도에 이른 후에도 성어는 치어와 달리 저항성을 지님을 확인할 수 있었다.

이러한 감염조직 내 바이러스농도의 변화와 함께 spleen index라는 정량적 개념을 도입하여 감염어에서 가장 전형적으로 나타나는 병리적 특성인 비장증대의 수준을 정상어의 비장에 대비하여 어느 정도 증대화가 이루어졌는가를 수치화하여 비교할 수 있게 하였다. 돌돔성어의 spleen index는 감염 후 지속적으로 증가하여, 10일째 4.49 ± 1.13 으로 가장 높은 값을 나타내었지만 12일째는 오히려 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 반면 돌돔치어는 9일째 4.85 ± 1.06 으로 100% 폐사할 때 까지 지속적으로 증가하였다 (Fig. 3). 돌돔성어에서의 12일째 spleen index의 감소는 아마도 돌돔성어는 돌돔치어보다 megalocytivirus에 대한 더 높은 저항성으로 10일 이후에 비대해진 세포가 용해가 진행되어 오히려 감소한 것으로 생각되어진다.

Spleen index는 조직 전체의 변화를 수치적으로 표현한 것이지만 실질적으로 비장증대의 한 원인이 되는 비정형비대세포의 수적 변화와 그리고 바이러스농도와 어떤 연관관계를 가지고 있는지를 분석하기 위하여 감염비장 내 비정형비대세포의 수를 계수하였다. 이러한 계수는 지금까지 정성적인 분석으로 그 존재 유무만으로 megalocytivirus 질병을 정성적으로 진단하는 종전의 분석에서 한 걸음 더 나아간 정량적 분석이라고 할 수 있다. 그 결과를 살펴보면 돌돔성어의 비정형비대세포의 수는 10일째 최대를 보였

으나 이후 약간 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 2). 한편 돌돔치어는 감염 직후 지속적으로 증가하여 9일째 최고치를 나타내었다 (Fig. 3). 비정형비대세포는 spleen index의 변화와 비슷한 동력학적 양상을 보여 주었으므로 비록 간접적이지만 비정형비대세포의 증가가 비장증대의 한 원인이 된다는 것을 확인할 수 있었다.

돌돔성어는 치어와는 달리 감염조직 내 바이러스 농도를 포함한 2가지의 병리적 특징인 spleen index와 비정형비대세포수 모두 주사 후 감염어가 폐사에 이르는 동안 계속 증가하였다. 그것은 감염에 의한 병의 진행기간이 성어에 비하여 짧기 때문이거나 또는 감염민감도에 있어서 성어보다 높기 때문일 것으로 추정된다. 그러나 변화의 차이에 대한 정확한 이유는 면역반응을 포함한 다양한 연구결과가 있어야 할 것이다.

최초의 megalocytivirus 질병발현 어종인 참돔치어의 경우 돌돔치어의 폐사 출현 시기보다 3일 늦은 주사 후 11일째부터 폐사가 나타나기 시작하였다. 폐사기간 또한 비교적 길어 주사 후 20일까지 폐사가 진행되었으며, 그 기간 중 60%의 누적폐사율을 보여 주어 100%의 누적폐사율을 보여주는 돌돔치어 또는 성어에 비하여 낮은 누적폐사율을 나타내었다 (Fig. 4). 따라서 참돔치어의 경우 폐사로 이어질 감염어와 회복될 감염어가 혼합되어 있으므로 빈사상태의 참돔치어 중 PCR로 양성반응을 보이는 시료에 대해서만 감염어로서의 분석을 실시하였다. 그 결과 spleen index, 비정형비대세포수는 각각 1.47 ± 0.87 , 220 ± 160 cells/mm²으로 나타났으며 바이러스농도는 2.06×10^6 copies/mg으로 나타났었다 (Table 2). 또한 30일까지 살아남은 참돔치어는 PCR 분석결과 음성을 나타냈다. 이러한 결과는 조직 내 비정형비대세포수는 빈사상태의 돌돔치어와 비교했을 때 통계적으로 유의적 차

이를 보이지는 않았지만 돌돔에 비하여 낮은 spleen index와 낮은 viral copy number는 참돔의 낮은 폐사율 또는 감염에 대한 민감성 차이에 대한 간접적 증거가 될 수 있을 것이다. 그러므로 참돔은 자연적인 megalocytivirus 감염에 대한 내성화가 돌돔에 비하여 빠르게 이루어지고 있다고 추정되고 있으며 이에 대한 면역학적인 분석과 함께 지속적인 조사가 필요할 것으로 보인다.

Chao *et al.* (2002)는 grouper iridovirus in Taiwan (TGIV)를 돌돔에 감염시켰을 때 2일째부터 PCR을 통해 바이러스를 검출할 수 있으며, 3일째부터 비정형비대세포가 나타났고, spleen index와 같은 개념인 tissue-to-body weight ratio (%)는 5일째까지 계속적으로 높아진다고 보고하였다. 이 결과는 본 실험의 돌돔치어의 spleen index나 비정형비대세포 검출과 경향이 같았다. 또한 Chao *et al.* (2004)는 megalocytivirus 감염의 특징인 비정형비대세포 즉 enlarged cell의 수를 *in situ* hybridization 방법을 통해 계수하여 kinetically 비정형비대세포수의 변화를 관찰하였다. 그 결과 비장에서는 6일째 가장 높은 수치를 나타내어 본 연구결과와 비슷한 양상의 그래프를 보였다. 다른 보고에서 megalocytivirus의 조직 내의 바이러스농도는 LYCIV와 LMBV의 경우 각각 $10^{6.84}$ copies/mg와 $10^{6.45}$ copies/mg 라고 보고하여 (Wang *et al.*, 2006; Goldberg *et al.*, 2003), 본 실험의 결과보다 낮은 조직 내 바이러스농도를 보여 주고 있다. 이러한 결과는 아마도 바이러스의 특성 그리고 숙주의 차이가 감염 조직 내 바이러스농도에 영향을 미치고 있는 것으로 보여진다.

본 실험에서 공격 실험어에 대한 동력학적인 임상 증상과 감염조직내의 바이러스농도 분석은 공격실험 중에 생존해 있는 개체를 대상으로 한 분석으로 공격실험 도중의 폐사어에 대한 분석은 이루어지지

않았다. 그러나 돌돔치어에 대한 공격실험에서 각기 다른 시기에 발생한 폐사어는 조직 내 바이러스농도는 폐사시기와 무관하게 감염 10일째의 생존한 돌돔성어의 조직 내 바이러스농도와 유사하게 나타났다. 폐사어간의 비정형비대세포의 비교는 폐사어의 조직상태가 좋지 않아 정량적 비교는 못하였으나 개요적 관찰에서 뚜렷한 차이를 발견할 수 없어 폐사어간의 동역학적 증상변화 차이는 크지 않을 것으로 추정된다. 그러므로 본 분석의 결과가 증상 진전의 변화에 대한 감염어의 개별적 차이에 의한 요소가 어느 정도 투영되어 있을 것이라는 것을 배제할 수는 없지만 증상 발현 후 폐사에 이르는 기간이 짧아 개체 간의 차이에 의한 영향은 크지 않았을 것으로 보인다.

결론적으로 본 연구는 megalocytivirus에 감수성을 보이는 두 어종인 참돔과 돌돔을 인위 감염시켜 감염어의 비정형비대세포의 수와 spleen index 그리고 real-time PCR을 이용하여 바이러스농도의 동역학적 변화를 비교, 분석함으로써 megalocytivirus의 진단과 정량적 분석에 대한 새로운 접근을 이루어 나가고자 하였다.

요 약

Megalocytivirus 감염 시 나타나는 임상적 증상의 정량적인 분석을 위하여, 돌돔에서 분리된 megalocytivirus IVS-1을 돌돔성어와 치어에 인위 감염시켰다. 그 결과 spleen index가 각각 4.49 ± 1.13 와 4.85 ± 1.06 로 나타났다. 이것은 정상어에 비해 3배 이상 증가한 값이었다. 폐사율은 돌돔성어와 치어에서 모두 100% 폐사한 반면 참돔치어는 30일이 지나도 60%의 폐사만 나타나 돌돔폐사율에 비해 낮은 폐사율을 나타냈다. 또한 IVS-1을 감염시킨 빈사상태의 참돔치어는 spleen index가 동일 크기의 돌돔치어 보다 낮은

1.47 ± 0.87 을 보였다. Real-time PCR을 이용하여 감염의 진행에 따른 바이러스 농도를 측정 한 결과, 돌돔치어와 성어의 감염 조직 내 바이러스 최고 농도는 각각 2.03×10^7 copies/mg과 2.40×10^7 copies/mg으로 비슷하였으나 돌돔성어에서 먼저 최고치에 도달하였다. 더구나 비장의 비정형비대세포의 수 역시 돌돔치어의 경우 지속적으로 증가한 반면 돌돔성어의 경우 최고치에 도달 후 오히려 감소하는 경향을 보였다. 본 연구에서는 megalocytivirus 감염 시 조직의 형태적 변화와 조직 내의 바이러스 농도와 같은 임상적인 증상을 정량적인 분석을 통해 나타내었고 이러한 정량적인 수치와 megalocytivirus 감염의 진행 정도와의 상관관계에 대해 조사하였다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단 (구 한국학술진흥재단) 의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2008-313-F00079).

참고문헌

- Chao, C.B., Yang, S.C., Tsai, H.Y., Chen, C.Y., Lin, C.S. and Huang, H.T.: A nested PCR for the detection of grouper iridovirus in Taiwan (TGIV) in cultured hybrid grouper, giant scaperch, and largemouth bass. *J. Aquatic animal health*, 14: 104-113, 2002.
- Chao, C.B., Chen, C.Y., Lai, Y.Y., Lin, C.S. and Huang, H.T.: Histological, ultrastructural, and *in situ* hybridization study on enlarged cells in grouper *Epinephelus hybrids* infected by grouper iridovirus in Taiwan (TGIV). *Dis. Aqua. Org.*, 58: 127-142, 2004.

- Do, J.W., Moon, C.H., Kim, H.J., Ko, M.S., Kim, S.B., Son, J.H., Kim, J.S., An, E.J., Kim, M.K., Lee, S.K., Han, M.S., Cha, S.J., Park, M.S., Park, M.A., Kim, Y.C., Kim, J.W. and Park, J.W.: Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. *Virology*, 325: 351-363, 2004.
- Hanson, L.A., Petrie-Hanson, L., Meals, K.O., Chinchar, V.G. and Rudis M.: Persistence of largemouth bass virus infection in a northern Mississippi reservoir after a die-off. *J. Aqua. Anim. Health*, 13: 27-34, 2001.
- Goldberg, T.L., Coleman, D.A., Grant, E.C., Inendino, K.R. and Philipp D.P.: Strain variation in an emerging iridovirus of warm-water fishes. *J. Virol.*, 77: 8812-8818, 2003.
- He, J.G., Deng, M., Weng, S.P., Li, Z., Zhou, S.Y., Long, Q.X., Wang, X.Z. and Chan, S.M.: Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, 291: 126-139, 2001.
- He, J.G., Wang, S.P., Zeng, K., Huang, Z.J. and Chan, S.M.: Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China. *J. Fish Dis.*, 23: 219-222 (Short communication), 2000.
- Inouye, K., Yamano, K., Maeno, Y., Nakajima, K., Matsuoka, M., Wada, Y. and Sorimachi, M.: Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, 27: 19-27 (in Japanese with English abstract), 1992.
- Jeong, J.B., Kim, H.Y., Kim, K.H., Chung, J.K., Komisar, J.L. and Jeong, H.D.: Molecular comparison of iridoviruses isolated from marine fish cultured in Korea and imported from China. *Aquaculture*, 255: 105-116, 2006.
- Kurita, J., Nakajima, K., Hirono, I. and Aoki, T.: Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fish Pathol.*, 33: 17-23, 1998.
- Mahardika, K., Zafran, Yamamoto, A. and Miyazaki, T.: Susceptibility of juvenile humpback grouper *Cromileptes altivelis* to grouper sleepy disease iridovirus (GSDIV). *Dis. Aqua. Org.*, 59: 1-9, 2004.
- Nakajima, K. and Sorimachi M.: Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, 29: 29-33, 1994.
- Nerland, A.H., Skaar, C., Eriksen, T.B. and Bleie, H.: Detection of nodavirus in seawater from rearing facilities for Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae. *Dis. Aqua. Org.*, 73: 201-205, 2007.
- Oshima, S., Hata, J., Hirasawa, N., Ohtaka, T., Hirono, I., Aoki T. and Yamashita, S.: Rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using the polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, 32: 87-90, 1998.
- Pallister, J., Gould, A., Harrison, D., Hyatt, A., Jancovich, J. and Heine, H.: Development of real-time PCR assays for the detection and differentiation of Australian and European ranaviruses. *J. Fish Dis.*, 30: 427-438, 2007.
- Sudthongkong, C., Miyata, M. and Miyazaki, T.: Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami. *Dis. Aquat. Org.*, 48: 163-173, 2002.

Wang, X.W., Ao, J.Q., Li, Q.G. and Chen, X.H.: Quantitative detection of a marine fish iridovirus isolated from large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*, using a molecular beacon. J. Virol. Methods, 133: 76-81, 2006.

Manuscript Received : April 6, 2011

Revised : July 14, 2011

Accepted : July 14, 2011