

자연산 조피볼락, *Sebastes schlegeli*의 소화관에 기생하는
Hysterothylacium sp.와 *Anisakis simplex*
(Nematoda: Anisakidae)의 형태학적 비교 및 숙주의
조직병리학적 반응

박정준, 박명애, 최혜승, 김석렬*

국립수산과학원 병리연구과

Morphological Comparison *Hysterothylacium* sp. and
Anisakis simplex (Nematoda: Anisakidae) from
Wild Black Rockfish, *Sebastes schlegeli*, and
Histopathological Host Reaction

Jung Jun Park, Myoung Ae Park, Hye Sung Choi, Seok-Ryel Kim*

Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

(Received September 6, 2011; Revised September 20, 2011; Accepted September 21, 2011)

ABSTRACT

Numerous anisakids were parasitic near the digestive tract of the black rockfish, *Sebastes schlegeli* and some anisakids observed on the liver of the host. Anisakids in the host were identified three species (*Hysterothylacium* sp., *Anisakis simplex*, *A. pegreffii*) and *Hysterothylacium* sp. was the high occurrence of anisakid worms in the host. *Hysterothylacium* sp. was shorter and thinner than *A. simplex*. Both of anisakids observed lip, mouth, nerve ring, excretory pore and excretory duct in the anterior portion. In the mid portion, anisakids had esophagus, ventriculus and intestine and especially, *Hysterothylacium* sp. had intestinal caecum and ventricular appendage. There was conical nodulose apex at the end of the posterior portion in *Hysterothylacium* sp. and spine in *A. simplex*. SEM examination revealed that there was three lip near the mouth of *Hysterothylacium* sp. Dorsal lip was approximately 65 μm and paried lateroventral lip were approximately 60 μm in the width. All lips were found double papilla (approximately 8 μm in the width). The body width of the *Hysterothylacium* sp. and *A. simplex* was approximately 480 μm and 900 μm respectively. The hight of the lateral alae was about 7 μm and width of papilla on the cornical nodulose apex was about 3.3 μm in *Hysterothylacium* sp. The hight of spine was approximately 20 μm in *A. simplex*. There was mainly *Hysterothylacium* sp. in the intestinal lumen of the host. The nematod worms were parasitic near the mucosal fold and in the submucosal. In the mucosal epidermal layer, it was increased mucous cells by the infection of the parasites.

Keywords : *Hysterothylacium* sp., *Anisakis simplex*, SEM

본 연구는 2011년 국립수산과학원의(수산동물질병 역학 및 진단연구 : RP-2011-AQ-085) 지원에 의해 수행되었습니다.

* Correspondence should be addressed to Dr. Seok-Reyl Kim, Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea.
Ph.: (051) 720-2483, Fax: (051) 720-2481, E-mail: ksr0914@nfrdi.go.kr

서 론

1960년 Van Thiel 등이 장내 기생하는 anisakis 유충에 의해서 복통을 일으킨 환자를 처음으로 보고한 이래 많은 연구자들이 anisakiasis 및 anisakis의 분류에 관한 연구들을 보고하였다 (Ishii et al., 1989; Ohraki & Ohraki, 1989; Kagel & Isogaki, 1992).

Anisakiasis는 선형동물문(phylum Nematoda)에 속하는 기생충이 척추동물의 소화관에 기생하는 질병으로서 이들은 일반적으로 아니사키스 또는 고래회충(anisakid)이라고 불린다. 선형동물문은 개체수가 가장 많은 동물 분류군 중 하나이다 (Bongers & Ferris, 1999). 선형동물을 분류하는 방법으로는 호흡생화학, 면역학, 분자생물학, 계통발생학 등이 이용되고 있지만 (Nadler & Hudspeth, 2000), 추가적으로 외부형태와 생활사 등을 이용하여 superfamily 수준에서의 분류가 이루어지고 있다 (Fagerholm, 1991). 이들의 분류는 일반적으로 Hartwich (1974)와 Fagerholm (1991)에 의해서 정립된 분류체계를 이용한다. Hartwich (1974)는 한 개의 과(family Anisakidae)로 분류하고 있지만, Fagerholm (1991)는 두 개의 과로 나누었다 (families: Anisakidae, Raphidascarididae). 충체의 일반적인 형태는 길고 좌우대칭이며, 양쪽 끝으로 가면서 몸이 가늘어진다. 자웅이체로서 일반적으로 암컷이 수컷보다 크다 (Molnár et al., 2006).

해산어류와 담수어류는 아니사키스의 중간숙주으로써 (Noga, 2000), 대부분의 어류들은 아니사키스의 다른 중간숙주인 갑각류를 먹고 감염되는데, 200여 종의 어류와 25종의 갑각류에서 아니사키스 유충이 발견되었다 (Abollo et al., 2001; Klimpel et al., 2004). 아니사키스의 생활사는 종마다 다르지만 일반적으로 수중에서 1~2기 혹은 3기까지의 유충단계를 지내고 2기 혹은 3기에서 갑각류에 감염되며, 어류에서 발견되는 단계는 3단계 유충이다. 하지만 몇몇 종들은 어류에서 성체로 발달한 후 생활사가 끝나기도 한다. 이후 사람에게 감염되어 4단계 유충과 성충의 단계로 발달한다 (Lymbery & Cheah, 2007).

아니사키스에 감염된 어류의 경우에는 성장이 저하되고, 건강상의 문제가 발생하여 폐사에 이르기도 한다 (Choudhury & Cole, 2008). 일반적으로 사람이나 어류에서 많이 발견되는 anisakiasis의 원인은 *Anisakis simplex* 유충과 *A. physeteris* 유충이다. 하지만 *Hysterothylacium aduncum*의 경우에는 사람에게서 많이 발견되지 않는다 (McClelland, 2005). 따라서 *A. simplex*의 경우에는 많은 연구자들이 형태, 생활사 및 분포에 관하여 보고하였지만 (Smith & Wooten, 1978; Kagel & Isogaki, 1992; Klimpel et al., 2004), *Hysterothylacium* sp.에 관한 연구는 미흡하며, 특히 전자현미경을 이용한 이종의 형태에 관한 연구는 찾아보기 힘들다.

따라서 본 연구의 목적은 조피볼락에 기생한 *A. simplex*와 *Hysterothylacium* sp.의 형태를 관찰하여 이들의 발달단계를 확인하고, 두 종의 형태를 비교하며, 숙주에 미치는 영향을 조직병리학적 방법으로 알아보고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험종

2011년 충청남도 무창포 인근 연안에서 자연산 조피볼락, *Sebastes schlegeli*을 어획하였다. 어획된 어류는 모두 20개 체였으며, 크기는 평균 전장 32.4 ± 4.9 cm였다. 어획된 어류 중 12개체의 복강내에서 아니사키스를 확인하고, 내부기관의 표면과 소화관내에서 아니사키스들을 적출하였다.

2. 유전학적 분석

조피볼락에서 적출한 아니사키스 45개체는 유전학적 동정을 위하여 각 개체의 일부분을 DNA 분리에 사용하였다. DNA 분리는 High pure PCR template preparation kit (Roche, Germany)를 이용하여 제조사에 제공된 매뉴얼에 따라 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA를 주형으로 하여 universal 18S rRNA primer (F: 5'-AGATTAAGCCATGCATGCGT-3', R: 5'GCAGGTTACCTACGGAAA-3')를 이용하여 PCR을 실시한 후 product의 염기서열을 분석하여, NCBI web site (www.ncbi.nlm.nih.gov)에 등재되어 있는 *Hysterothylacium* sp. AM706344, *Hysterothylacium aduncum* HQ270427, *Hysterothylacium auctum* AF115571, *Contracaecum* sp. JN005755, *Pseudanisakis rajae* JN392470, *Anisakis paggiae* EU624345, *Anisakis physeteris* AY826721, *Anisakis simplex* AY827623, *Anisakis pegreffii* EU718479 및 *Anisakis ziphidarum* EU718473와 상동성을 GENETYX-WIN (Ver. 5.1.1) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

3. 현미경적 관찰

투명화 작업을 통하여 내부기관을 관찰하기 위하여 숙주에서 적출한 아니사키스들은 PBS (phosphate buffered saline) 용액에 담그고 4°C 냉장상태에서 실험실로 운반하였다. 이후 시료들은 glycerin, phenol, lactic acid, distilled water를 각각 2:1:1:1의 비율로 섞은 용액으로 24시간 동안 실온에서 반응시켰다.

파라핀 절편을 이용한 조직학적인 방법을 시행하기 위해 아니사키스들과 숙주의 소화관을 10% 중성포르말린에 24시간 동안 고정하였다. 이후 시료들은 Drury & Wallington (1980)의 방법에 따라 24시간 동안 흐르는 물에 수세 후 ethanol

을 이용하여 단계별 탈수하고, paraplast (McCormick, USA)에 포매하였다. 포매된 시료는 microtome (RM2165, Leica, Germany)을 이용하여 3 µm의 두께로 조직절편을 제작하였다. 조직절편들은 기관계의 일반적인 구조를 관찰하기 위한 Mayer's hematoxylin-eosin (H-E) 염색과 alcian blue-periodic acid and Schiff's solution (pH 2.5) 반응을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다. AB-PAS (pH 2.5) 반응에서 나타나는 점액물질들은 Pantone® formula guide; solid coated (Pantone Inc. USA)를 이용하여 해당되는 고유번호를 ()안에 표기하였다.

주사전자현미경 (SEM) 관찰을 위한 시료들은 현장에서 1.0 % glutaraldehyde로 고정 후 실험실로 옮겨와 2.5% glutaraldehyde로 재고정 하였다. 이후 0.1 M phosphate buffer로 수세한 후 1% osmium tetroxide (OsO₄)로 후고정 하였다. 고정된 시료들은 에탄올을 이용하여 단계적으로 탈수시키고, amyl acetate로 치환하였다. 이들 시료들은 CO₂ 가스를 이용하여 건조 및 금이온 증착하였고, SEM (JSM-7500F, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

Table 1. The organs size of the anisakids

Species	Organs of the anisakid	Size (µm)
<i>Hysterothylacium</i> sp.	Papilla width in lips	12.88
	Dorsal lip width	64.71
	Lateroventral lip width	60.56
	Papilla width on conical nodulose apex	3.31
	Lateral alae height	7.35
	Body width	475.80
	<i>Anisakis simplex</i>	Body width
Spine height		20.61

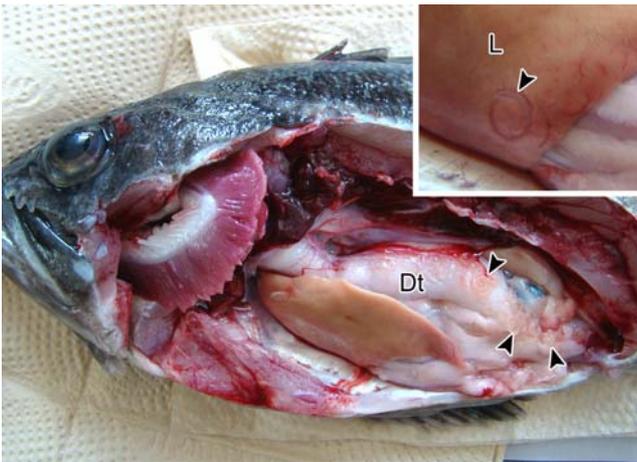


Fig. 1. Anisakiasis of the black rockfish, *Sebastes schlegeli*. The host infected anisakids, showing the assemblages of anisakids (arrowhead) near the digestive tract (Dt) and note the circularity anisakids (arrowhead) on the liver (L) (insert).

4. Image 정량분석

아니사키스의 각 부위별 크기를 측정하기 위해 SEM상에서 촬영된 영상들을 Image analyzer (Innerview 2.0, Innerview Co. Ltd., Korea)를 이용하여 측정하였다.

결 과

1. 아니사키스의 기생부위

아니사키스가 기생한 조피볼락은 외형상으로는 특이적인 증상이 나타나지 않았다. 하지만 해부하여 개복하였을 때 아니사키스들은 소화관 주변에서 쉽게 관찰 할 수 있었다. 이들은 원형으로 말려있었으며, 속주의 조직 및 지방과 연결되어 분리가 어려웠다. 몇몇 개체들은 소화관 주변뿐만 아니라 간의 표면에서도 관찰되었는데, 간의 표면에서 관찰되는 아니사키스 또한 말려있었으며 충체의 반은 속주의 간에 묻혀 있었다. 특히 간에서 관찰되는 아니사키스는 간과 함께 얇은 막으로 덮혀 있었다(Fig. 1).

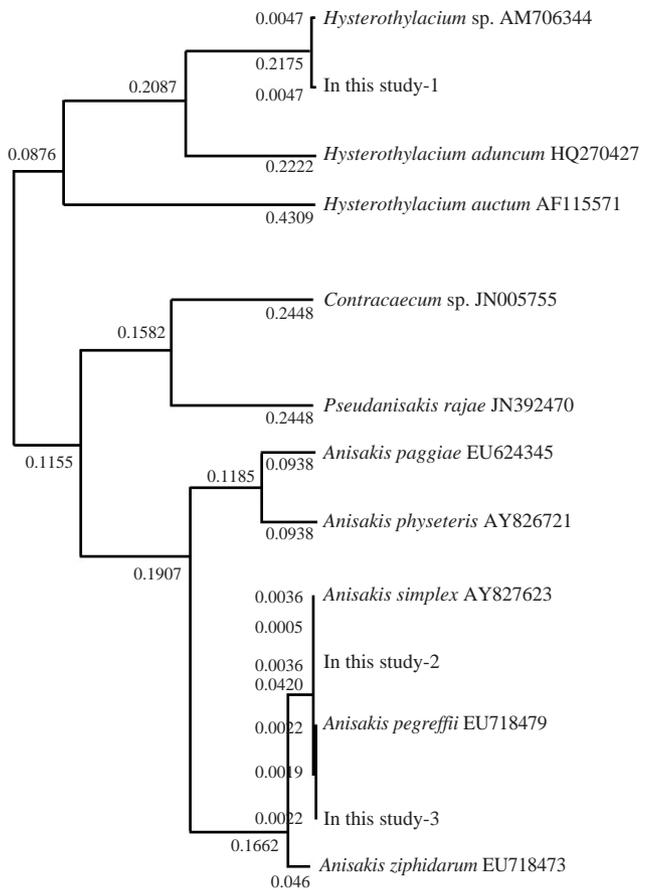


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 18S rRNA of isolated (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA). The number indicates the GenBank accession number.

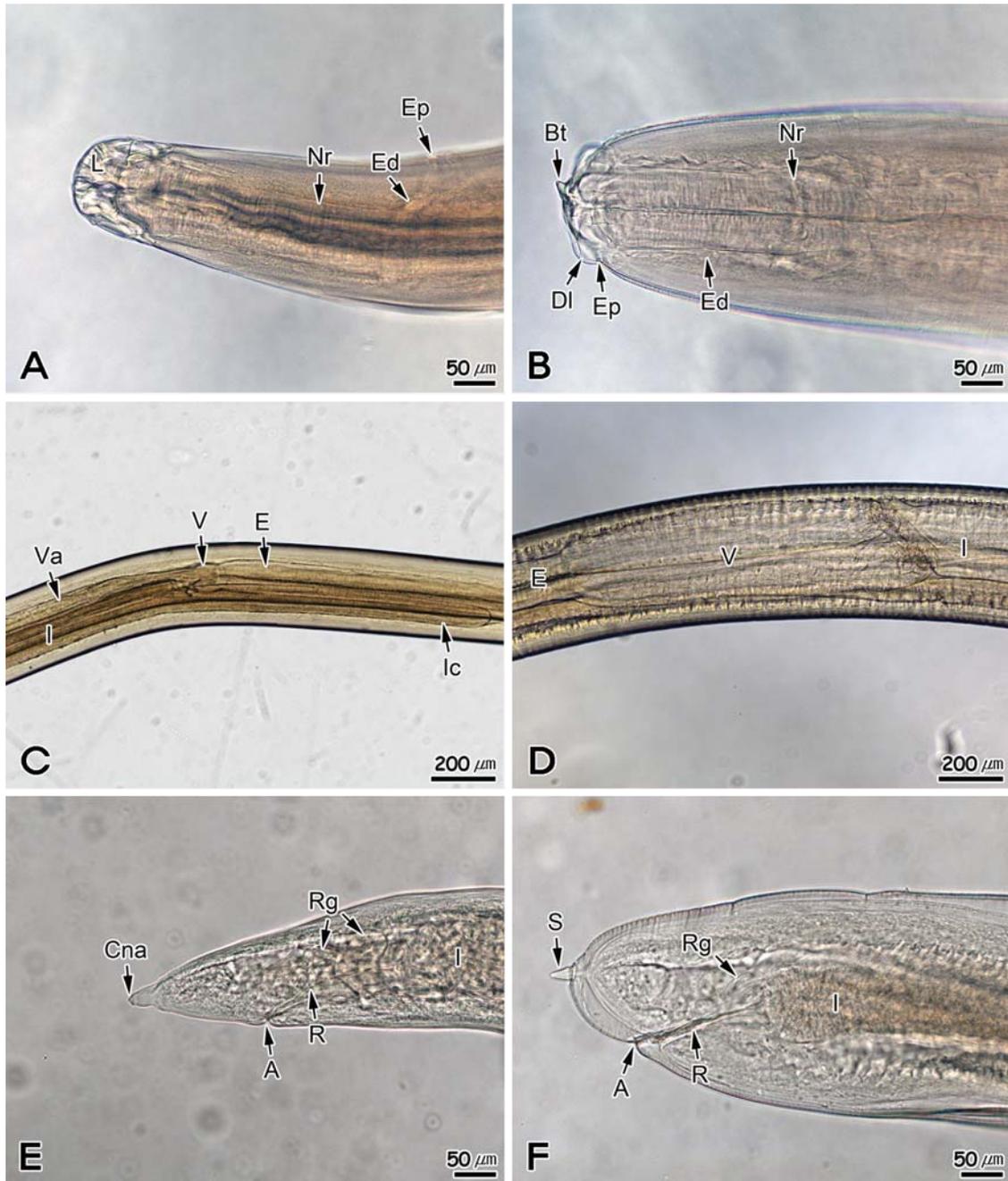


Fig. 3. The morphology of cleared anisakids. A: Anterior portion of *Hysterothylacium* sp., showing the lip (L) on the mouth, nerve ring (Nr) surrounding the esophagus and excretory pore (Ep) connected with excretory duct (Ed) slightly posterior to nerve ring. B: Anterior portion of *Anisakis simplex*, showing the boring tooth (Bt) and dorsal lip (Dl) on the cephalic, connected with excretory duct excretory pore under the dorsal lip and nerve ring surrounding the esophagus. C: Digestive tract of *Hysterothylacium* sp., showing the Intestinal caecum (Ic) and ventricular appendage (Va). D: Digestive tract of *Anisakis simplex*, showing the esophagus (E), ventriculus (V) and intestine (I). E: Posterior portion of *Hysterothylacium* sp., showing the conical nodulose apex (Cna), rectum (R) connective with intestine, anus (A) at the end of rectum and oblong rectal glands (Rg). F: Posterior portion of *Anisakis simplex*, showing the long conical formed spine (S), rectum, rectal glands and anus.

2. 유전학적 분석을 이용한 분류

조피볼락에서 채집된 45개의 아니사키스충의 18S-rRNA 를 분석한 결과 아니사키스 과의 3종 *Hysterothylacium* sp.,

Anisakis simplex 및 *A. pegreffii*와 근연종으로 확인되었다 (Fig. 2). 이들의 분포율은 *Hysterothylacium* sp.는 24개체 (53.3%), *A. simplex*는 17개체 (37.8%), *A. pegreffii*는 4개체 (8.9%)로 나타났다.

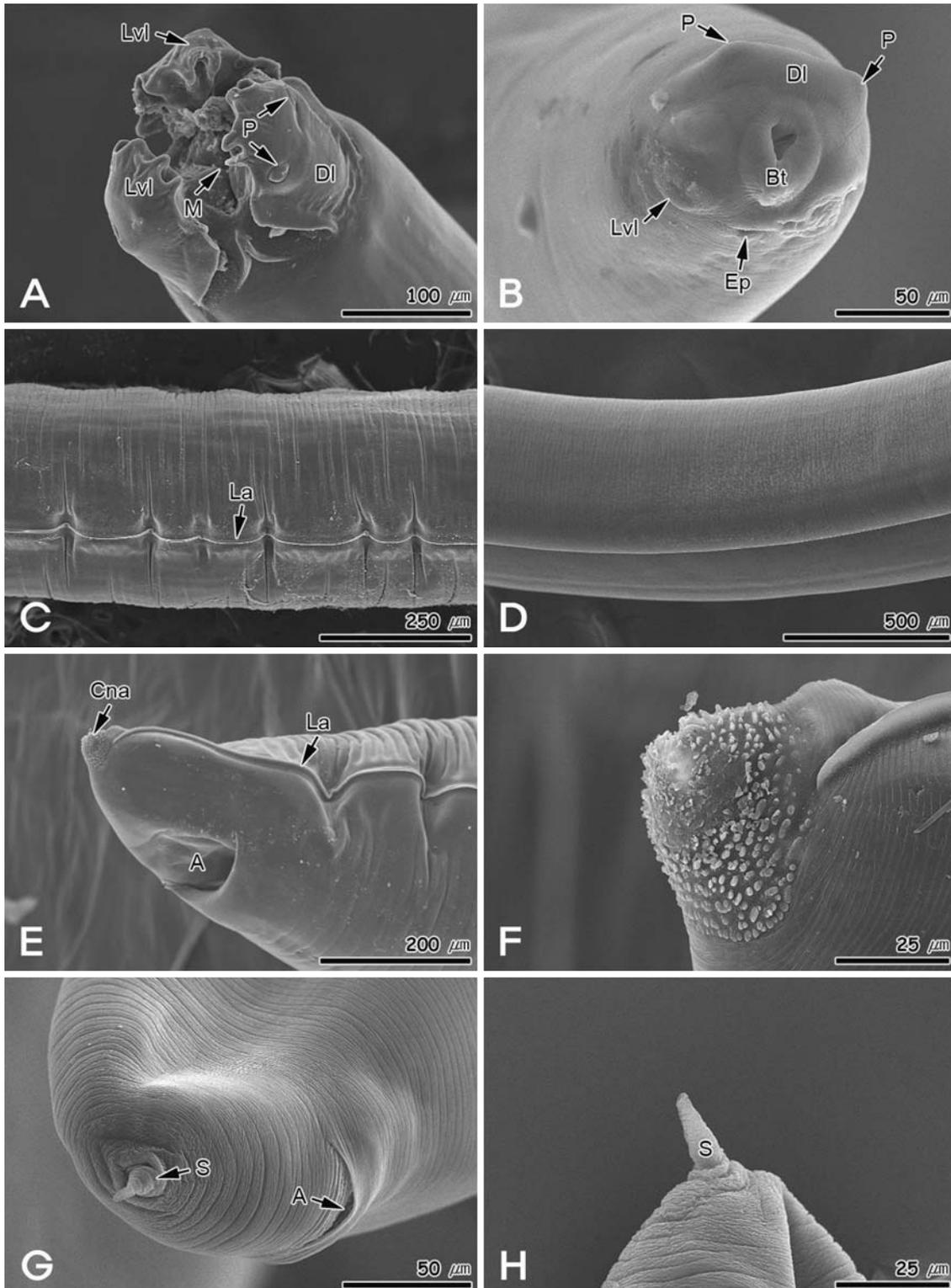


Fig. 4. Scanning electron microscopy of the anisakids. A: Cephalic extremity of *Hysterothylacium* sp., showing the dorsal lip (DI) with two papillae (P) and lateroventral lip (Lvl) surrounding the mouth (M). B Cephalic extremity of *Anisakis simplex*, showing the boring tooth (Bt), dorsal lip (DI) and lateroventral lip (Lvl) on the tip of the cephalic. C: Body tegument of *Hysterothylacium* sp., showing the lateral alae (La) on the side of body. D: Body tegument of *Anisakis simplex*, note the slender wrinkles with fine lines on the surface of the tegument. E: Posterior portion of *Hysterothylacium* sp., note the bulge-like formed conical nodulose apex (Cna). F: Detail view of the conical nodulose apex of *Hysterothylacium* sp., showing the numerous conical codulose. G: Posterior portion of *Anisakis simplex*, showing the spine (S) and anus (A). H: Lateral view of the posterior portion of *Anisakis simplex*, showing the raising up spine.

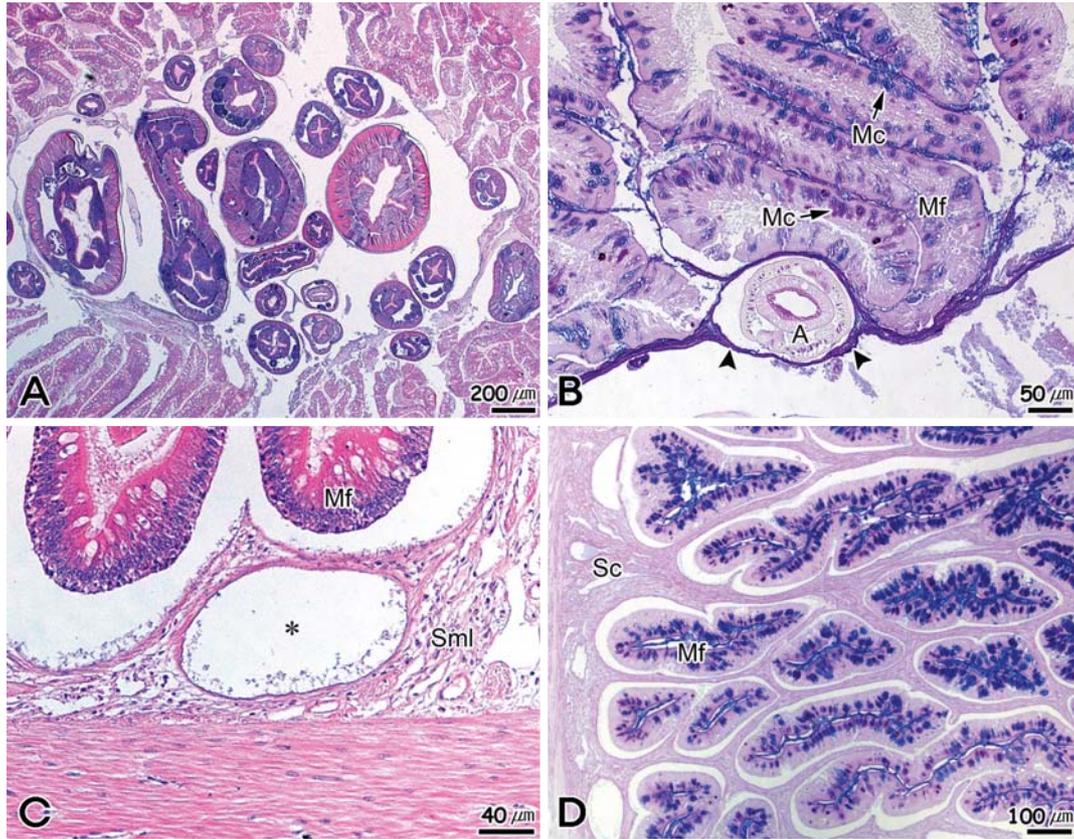


Fig. 5. Histopathological light microscopy of the intestine of black rockfish, *Sebastes schlegeli*. A: Intestinal lumen, showing the numerous anisakids. H-E stain. B: Near the mucosal fold, note the encapsulated anisakid (A) by the intestinal tissue of the host (arrowhead) with mucosubstance. AB-PAS (pH 2.5) reaction. C: Submucosal layer, showing the fibrotic connective tissue capsule (asterisk) in the loosed submucosal layer (Sml). H-E stain. D: Mucosal fold (Mf), note the increased AB-PAS (pH 2.5) positive mucous cells. AB-PAS (pH 2.5) reaction. Mc, mucous cell.

3. 광학현미경적 관찰

Hysterothylacium sp.는 *A. simplex*보다 가늘고 짧았으며, 길이는 3.0 cm 미만으로 측정되었다. 총체의 가운데 부분이 가장 두꺼웠으며, 양쪽으로 갈수록 뾰족하고 가늘어졌다. *A. simplex*의 길이는 8.0 cm 미만으로 가운데 부분이 가장 두꺼웠으며, 양쪽으로 갈수록 가늘어졌다.

숙주에서 적출한 아니사키스들을 외형상으로 두부가 존재하는 전방부분, 몸체로 구성된 중간부분 그리고 꼬리가 존재하는 후방부분으로 나눌 수 있었다. *Hysterothylacium* sp.는 전방부분에 lip, 입, 신경환(nerve ring), 분비공(excretory pore), 분비관(excretory duct)이 관찰되었다. Lip은 입주위에 존재하고 있었으며, 신경환은 식도를 둘러싸고 있었다. 신경환 하단에는 분비관이 관찰되었는데, 분비관의 외부끝에는 분비공이 존재하고 있었다(Fig. 3A). *A. simplex*의 전방부분은 끝에 뾰족한 boring tooth가 존재하고 있었으며, 그 주변에 lip이 관찰되었다. Lip의 하단에는 분비공이 관찰되었으며, 식도를 따라 분비공과 연결된 분비관이 관찰되었다. 신경환은 식도를 둘러싸고 있었다(Fig. 3B). *Hysterothylacium*

sp.와 *A. simplex*의 가운데 부분은 각각 식도, 위, 장이 연결되어 있었지만, *Hysterothylacium* sp.는 intestinal caecum과 ventricular appendage가 관찰되었으며(Fig. 3C), *A. simplex*의 위는 식도보다 두껍고 짧았다. *A. simplex*에서 ventricular appendage는 존재하지 않았다(Fig. 3D). *Hysterothylacium* sp.의 후방부분에는 끝에 conical nodulose apex가 관찰되었으며, 장과 연결된 직장 그리고 직장 주변에는 rectal gland가 존재하고 있었다. 직장의 끝에는 외부로 개방된 항문이 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 3E). *A. simplex*의 후방부분에는 끝에 spine이 돌출되어 있었으며, *Hysterothylacium* sp.와 마찬가지로 장, rectal gland, 직장, 항문이 관찰되었다(Fig. 3F).

4. 전자현미경적 관찰

SEM 사진 상에서 측정된 *Hysterothylacium* sp.와 *A. simplex* 각 기관들의 크기는 Table 1에 설명하였다. *Hysterothylacium* sp.의 정단부분 끝에는 세 개의 lip이 입을 둘러싸고 있었다. Lip은 위치에 따라서 dorsal과 두 개의 lateroventral lip으로 구분되었는데, dorsal lip은 크기가 같은 한 쌍의 유두

돌기(papillae)를 가지고 있었다. 유두돌기의 지름은 13 μm 내외로서 lateroventral lip도 각각 한 쌍의 유두돌기를 가지고 있었지만 한 개는 dorsal lip의 유두돌기와 크기가 비슷한 반면 다른 한 개는 매우 작았다. Dorsal lip의 넓이는 65 μm 내외였으며, lateroventral lip은 넓이 60 μm 내외로 lateroventral lip의 폭이 약간 좁았다(Fig. 4A). *A. simplex*의 정단부분 끝에는 삼각형으로 열린 boring tooth에 둘러싸인 입이 관찰되었다. Boring tooth의 상부에는 넓은 dorsal lip이 존재하고 있었으며, 미발달된 두 개의 유두돌기가 dorsal lip 상부에서 관찰되었다. Boring tooth의 하단에는 두 개의 lateroventral lip이 존재하고 있었으며, 이들의 사이에는 분비공이 관찰되었다(Fig. 4B). *Hysterothylacium* sp.와 *A. simplex*의 총체 넓이는 각각 480 μm 와 900 μm 내외로 측정되었다. *Hysterothylacium* sp.의 총체에는 양옆에 높이 7 μm 내외의 lateral alae가 cornical nodulose apex의 기저부까지 발달되어 있었다(Figs. 4C, D). *Hysterothylacium* sp.의 후방부분에는 다수의 돌기를 가지는 cornical nodulose apex가 관찰되었는데, 돌기의 지름은 약 3.3 μm 내외로 측정되었다(Figs. 4E, F). *A. simplex*의 후방부분 끝에는 원뿔모양의 spine이 존재하고 있었는데, 이들 spine의 높이는 약 20 μm 였다(Figs. 4G, H).

5. 숙주 소화관의 조직병리학적 관찰

조피볼락 장의 내강에는 다수의 아니사키스들이 관찰되었다. 이들 아니사키스의 크기는 다양하였으며, 내강에서 관찰되는 아니사키스들은 lateral alae가 뚜렷하게 관찰되는 *Hysterothylacium* sp.였다(Fig. 5A). 조피볼락 장의 점막주름 주위에 존재하는 *Hysterothylacium* sp.는 점액물질을 함유하는 숙주 조직에 의해 둘러싸여 있었다(Fig. 5B). 이들 아니사키스에 인접한 점막주름의 상피세포들은 총체에 의해서 압박되어 변형 및 괴사되었으며, 상피층에 존재하는 점액세포가 감소하였다. 또한 고유층 및 점막상피층 하단의 기저막은 파괴되었다(Figs. 5A, B). 아니사키스들은 점막하층에도 기생하였다. 점막하층에 기생한 아니사키스는 결합조직에 의한 섬유성 결합조직막이 형성되었다(Fig. 5C). AB-PAS (pH 2.5) 반응 결과 조피볼락 장의 점막상피층에는 점액세포가 증가하였으며, 이들 세포에 의해서 점막 고유층에는 다량의 점액 물질들을 함유하고 있었다. 이들 점액세포들은 산성점액물질(2597C, 2735C)과 산성과 중성이 혼합된 점액물질(527C, 2665C)로 구성되었다(Fig. 5D).

고 찰

Hysterothylacium sp. 혹은 *Anisakis simplex*에 감염된 해산 어류는 대서양 대구, *Gadus morhua* (Aspholm, 1995), 무지개 송어, *Oncorhynchus mykiss* (González, 1998), 독가시치, *Siganus*

fuscescens (Shih & Jeng, 2002), 유럽가자미, *Platichthys flesus* (Dezfuli et al., 2007), 대구, *Gadus macrocephalus*, 명태, *Theragra chalcogramma*, 망치고등어, *Scomber australasicus* (Quiazon et al., 2008), 날새기, *Rachycentron canadum* (Shih et al., 2010) 등이 있으며, 모두 숙주의 소화관에서 발견되었다.

아니사키스들은 종에 따라서 다양한 어류의 기관들(뇌, 눈, 피부, 근육, 간, 췌장, 소화관, 생식소, 부레, 심장 등)에 기생한다(Choudhury & Cole, 2008). *Hysterothylacium* sp.와 *A. simplex*는 대부분 소화관 주변 및 내강안에 기생하지만 경우에 따라서는 간의 표면에서도 관찰된다(Margolis, 1970; Elarifi, 1982; Berland, 1987; Sindermann, 1990; Vázquez Núñez et al., 2004). 본 연구에서는 대부분의 아니사키스들이 소화관의 주변 및 소화관 내에서 관찰되었지만 몇몇 개체들은 간의 표면에 기생하고 있었으며, 부레 및 비장표면에는 기생하지 않았다.

아니사키스의 입 주위에는 두드러진 lip이 존재하고 있으며, 일반적으로 lip의 개수는 세 개이다. Lip은 후기 유생기(3, 4기)에 두드러지게 발달하고, 종에 따라서는 입안에 이빨을 가지고 있다. *A. simplex*에서 관찰되는 boring tooth는 숙주의 소화관 조직을 파고들 때 이용한다. 유두돌기는 감각 기관 및 화학적수용기로서 대부분의 아니사키스에서 발견된다. 이들 돌기들은 신경환과 연결되어 있기 때문에 총체의 전방 혹은 후방부분에 분포하고 있다(Molnár et al., 2006; Choudhury & Cole, 2008). *Hysterothylacium* sp.에서 관찰되는 lateral alae는 숙주의 소화관 내강을 자유롭게 유행할 수 있게 도와주는 운동기관이다.

*Hysterothylacium*은 과거 *Contraecaecum*과 같은 종으로 분류되었다(Deardorff & Overstreet, 1981). 하지만 *Hysterothylacium*의 경우 분비공이 신경환 하단에 존재하는 반면에 *Contraecaecum*은 lip 근처에 존재한다(Deardorff & Overstreet, 1980). 또한 *Hysterothylacium*은 어류가 최종숙주이지만 *Contraecaecum*은 어류가 중간숙주이며, 조류 혹은 포유류가 최종숙주이다(Deardorff & Overstreet, 1980).

Ishii et al. (1989)은 SEM을 이용하여 *A. simplex* 3기와 4기 유충의 형태를 비교하였다. 3기 유충은 입 주변에 높이가 낮은 세 개의 lip을 가지며, 삼각형의 boring tooth가 존재한다. 또한 두 개의 lateroventral lip 사이에는 가로로 찢어진 형태의 분비공이 존재한다. 총체의 표면에는 완전히 이어지지 않은 얇은 가로홈이 존재하고 있다. 총체의 꼬리 부분에는 원뿔모양의 spine이 관찰된다. 4기 유충은 3기보다 발달된 세 개의 뚜렷한 lip이 존재하고 있으며, lateroventral lip에는 한 개의 유두돌기가 관찰된다. 총체의 표면에는 길게 이어져 있는 뚜렷하고 굵은 가로홈이 존재한다. 꼬리 부분에는 함몰된 spine이 관찰되며, 주변에는 구형의 돌기들이 산재해 있다. 따라서 본 연구에서 발견된 *Hysterothylacium* sp.는 성충이며, *A. simplex*는 3기 유충이다.

3기 유생단계에서 *A. simplex*와 *A. pegreffii*의 형태적인 차이를 구별하는 것은 매우 어렵다(Quiazon et al., 2008). 본 연구에서도 유전학적인 분석을 통해서 *A. simplex*와 *A. pegreffii*를 구분하고 분포비율을 측정하였지만 현미경 상에서 이들을 구별할 수는 없었다. 하지만 3기 유생단계부터 성체까지 몸의 길이가 길어지면서 충체가 발달하는 동안 위의 길이는 변하지 않기 때문에 충체의 길이와 위의 길이 비율을 이용하여 두 종의 아니사키스를 구별하기도 한다. *A. pegreffii* (0.50~0.78 mm)는 *A. simplex* (0.90~1.50 mm)보다 위의 길이가 짧기 때문에 식도와 위의 비율은 *A. pegreffii*가 더 높게 측정된다(Quiazon et al., 2008). 하지만 이런 방법은 개체간의 변이가 심하고 충체를 투명화 처리하여도 식도의 길이를 정확히 측정하기 어렵기 때문에 두 종의 분류방법으로 적당하지 못하다. 또 하나의 방법은 SEM 상에서 *A. simplex*와 *A. pegreffii*의 항문주위에 나타나는 유두돌기의 개수 차이를 이용하는 방법인데, 이런 방법은 어류에서 발견되는 3기 유충단계 및 *in vitro* 상에서 성장시킨 4기 유충 단계에서는 유두돌기가 나타나지 않으며, 오직 수컷에서만 나타나기 때문에 확인할 수 있는 시료의 양이 적다는 단점이 있다(Quiazon et al., 2008).

*A. simplex*가 기생한 대구, *G. macrocephalus*의 간은 간세포가 파괴되었으며, 간의 크기가 작아졌다(Margolis, 1970). *Merlangius merlangus*의 경우에는 *Anisakis* sp.와 *Hysterothylacium*으로 추정되는 *Contracaecum* sp.가 간에 기생하여 멜라닌이 침착되었으며, 백혈구와 섬유아세포가 숙주의 간 조직에 침투되었다. 또한 간조직 사이에 존재하는 충체들은 숙주의 결합조직에 의해서 피막(encapsulation)이 형성되었다(Elarifi, 1982). 본 연구에서도 *A. simplex*가 숙주의 간 표면에 기생하였지만 간조직내로 깊숙이 파고들지는 않았으며, 충체가 기생한 부위의 간세포가 다소 변형되었을 뿐 간의 다른 부위는 병변을 보이지 않았다. 대구, *G. macrocephalus*의 소화관에 기생한 *Anisakis* sp.는 숙주의 조직에 의해서 피막을 형성하고 있었으며, 위조직에서는 케양이 관찰되었다(Sindermann, 1990). *H. aduncum*이 기생한 무지개송어, *O. mykiss*는 특이한 조직병리학적 증상을 보이지 않았지만 숙주가 폐사하였으며(Berland, 1987), *Ariopsis guatemalensis*와 *Eleotris picta*의 소화관에 기생한 *Hysterothylacium* sp.는 점막하층과 근육층에 침투하여 숙주조직의 섬유화와 괴사를 유발하였다(Vázquez Núñez et al., 2004).

본 연구 결과 *A. simplex*는 소화관 외부에서 숙주 조직에 둘러싸인 상태로 기생하고 있었으며, 소화관의 내강에서는 몇몇 개체만 관찰되었다. 조피볼락의 소화관 내강에는 주로 *Hysterothylacium* sp.가 기생하고 있었지만 이들은 소화관 외부에서도 *A. simplex*와 함께 존재하고 있었다. 또한 *Hysterothylacium* sp.는 점막주름 근처에서 피막을 형성하였으며, 충체가 점막하층에 기생한 흔적을 관찰할 수 있었다. *A. simplex*

는 boring tooth를 이용하여 숙주의 조직을 파고들어 기생한다. *Hysterothylacium* sp.는 어류의 근육층에 침투하였지만(Vázquez Núñez et al., 2004), *R. canadum*에 기생한 *A. simplex*는 근육층을 제외한 소화관 주변, 내강, 점막 고유층에서만 발견되었다(Shih et al., 2010). 본 연구에서도 조피볼락의 소화관을 광학현미경으로 관찰한 결과 소화관의 근육층과 점막주름에서는 기생한 흔적을 발견할 수 없었다. 위와 장 같은 어류의 소화관 내강에서 발견되는 아니사키스들은 먹이를 통해서 유입되지만(Abollo et al., 2001; Klimpel et al., 2004), 어류의 복강내 소화관 주변에서 관찰되는 아니사키스들의 침입 경로는 아직까지 확실하게 규명되지 않았다(Shih et al., 2010). 광학현미경 관찰 결과 조피볼락 소화관 내강에서 점막주름의 손상 및 점막상피세포의 파괴는 주로 *Hysterothylacium* sp.에 의한 것으로 생각되며, 아니사키스가 기생한 조피볼락의 소화관에서 점액세포가 증가하는 것은 숙주조직과 점액물질로 충체에 피막을 형성하여 숙주 조직을 방어하기 위한 기작으로 생각된다.

본 연구에서는 *Hysterothylacium* sp.와 *A. simplex*를 암컷과 수컷으로 구분하지 못했다. 따라서 추후에는 이들 아니사키스들의 암컷과 수컷의 크기, 형태, 분포비율과 같은 기초적인 분석과 *Hysterothylacium* sp.의 종 수준까지의 분류를 시행할 것이다. 또한 조피볼락의 복강에 기생하는 아니사키스들의 침입경로를 규명할 것이다.

참 고 문 헌

- Abollo E, Gestal C, Pascual S: *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective. *Parasitol Res* 87 : 492-499, 2001.
- Aspholm PE: *Anisakis simplex* Rudolphi, 1809, infection in fillets of Barents sea cod *Gadus morhua* L. *Fish Res* 23 : 375-379, 1995.
- Berland B: Helminth problems in sea-water aquaculture. In: Stenmark E, Malmberg G, eds, *Parasites and diseases in natural waters and aquaculture in Nordic countries*, pp. 56-62, Zoo-tax, Stockholm, 1987.
- Bongers T, Ferris H: Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Tren Evol Ecol* 14 : 224-228, 1999.
- Choudhury A, Cole RA: Chapter 17: Phylum nematoda. In: Eiras JC, Segner H, Wahli T, Kapoor BG, eds, *Fish diseases*, pp. 1063-1113, Science Publishers, Enfield, 2008.
- Deardorff TL, Overstreet RM: Review of *Hysterothylacium* and *Itheringascaris* (both previously=*Thynnascaris*) (Nematoda: Anisakidae) from the northern Gulf of Mexico. *Proc Biol Soc Wash* 93 : 1035-1079, 1980.
- Deardorff TL, Overstreet RM: Larval *Hysterothylacium* (= *Thynnascaris*) (Nematoda: Anisakidae) from fishes and invertebrates in the Gulf of Mexico. *Proc Helminthol Soc Wash* 48 : 113-126,

- 1981.
- Dezfuli BS, Pironi F, Shinn AP, Manera M, Giari L: Histopathology and ultrastructure of *Platichthys flesus* naturally infected with *Anisakis simplex* S.L. larvae (Nematoda: Anisakidae). *J Parasitol* 93 : 1416-1423, 2007.
- Drury RAB, Wallington EA: Carleton's histological technique. Oxford University Press, Oxford, pp. 1-520, 1980.
- Elarifi AO: The histopathology of larval anisakid nematode infections in the liver of whiting, *Merlangius merlangus* (L.), with some observations on the bolld leucocytes of the fish. *J Fish Dis* 5 : 411-419, 1982.
- Fagerholm HP: Systematic implications of male caudal morphology in ascaridoid nematode parasites. *Syst Parasitol* 19 : 215-228, 1991.
- González, L: The life cycle of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in Chilean marine farms. *Aquaculture* 162 : 173-186, 1998.
- Hartwich G: Keys to genera of the Ascaridoidea. In: Anderson RC, Chabaud AG, Willmott S, eds, CIH keys to the Nematode Parasites of Vertebrates, pp. 1-15, Farnham Royal, Commonwealth Agricultural Bureaux, 1974.
- Ishii Y, Fujino T, Weerasooriya MV: Morphology of anisakine larvae. In: Ishikura H, Namiki M, eds, Gastric anisakiasis in Japan, pp. 19-29, Springer, Tokyo, 1989.
- Kagel N, Isogaki H: A case of abdominal syndrome caused by the presence of a large number of *Anisakis* larvae. *Int J Parasitol* 22 : 251-253, 1992.
- Klimpel S, Palm HW, Rückert S, Piatkowski U: The life cycle of *Anisakis simplex* in the Norwegian Deep (northern North Sea). *Parasitol Res* 94 : 1-9, 2004.
- Lymbery AJ, Cheah FY: Anisakid nematodes and anisakiasis. In: Murrell KD, Fried B, eds, World class parasites: Volume 11, Food-borne parasitic zoonoses; fish and plant-borne parasites, pp. 185-207, Springer, New York, 2007.
- Margolis L: Nematode diseases of marine fishes. In: Snieszko SF ed, A symposium on diseases of fishes and shellfishes, Special publication. *Am Fish Soc* 5: 190-208, 1970.
- McClelland G: Chapter 3. Helminth parasites; Nematoda (roundworms). In: Rohde K, ed, *Marine Parasitology*, pp. 104-115, CSIRO Publishing, Collingwood, 2005.
- Molnár K, Buchmann K, Székely C: Phylum nematoda. In: Woo PTK, ed, *Fish diseases and disorders*, Volume 1: Protozoan and metazoan infections, second edition, pp. 417-443, CABI, Wallingford, 2006.
- Nadler SA, Hudspeth DSS: Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypothesis of structural and sequence variation. *J Parasitol* 86 : 380-393, 2000.
- Noga EJ: Chapter 17; problems 56. In: *Fish disease; diagnosis and treatment*. pp. 166-170, Blackwell Publishing, Iowa, 2000.
- Ohraki H, Ohtaki R: Clinical manifestation of gastric anisakiasis. In: Ishikura H, Namiki M, eds, *Gastric anisakiasis in Japan*, pp. 37-46, Springer, Tokyo, 1989.
- Quiazon KMA, Yoshinaga T, Ogawa K, Yukami R: Morphological differences between larvae and in vitro-cultured adults of *Anisakis simplex* (sensu stricto) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae). *Parasitol Int* 57 : 483-489, 2008.
- Shih H-H, Jeng M-S: *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) infecting a herbivorous fish, *Siganus fuscescens*, off the Taiwanese coast of the northwest Pacific. *Zool Stud* 41 : 208-215, 2002.
- Shih H-H, Ku C-C, Wang C-S: *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) third-stage larval infections of marine cage cultured cobia, *Rachycentron canadum* L in Taiwan. *Vet Parasitol* 171 : 277-285, 2010.
- Sindermann CJ: *Principal diseases of marine fish and shellfish*, Vol 1, Second edition, pp. 1-521, Academic Press, London, 1990.
- Smith JW, Wooten R: Anisakis and anisakiasis. In: Lumsden WHR, Muller R, Baker Jr, eds, *Advances in Parasitology*, Vol. 16. pp. 93-63, Academic Press, London, 1978.
- Vázquez Núñez V, Ramírez Lezamo J, Osorio Sarabia D, Chávez Suriano LA, Constantino Casas F: Lesions caused by helminths of the digestive tract in estuarine fishes from the Tres Palos Lagoon, Guerrero, Mexico. *Vet Mex* 35 : 369-378, 2004.

< 국문 초록 >

조피볼락, *Sebastes schlegeli* 소화관 주변에는 다수의 아니사키스가 기생하고 있었으며, 몇몇 개체들은 간의 표면에 존재하고 있었다. 유전학적 결과 조피볼락에 기생한 아니사키스는 3종으로 분석되었으며, *Hysterothylacium* sp.가 가장 많이 분포하고 있었다. *Hysterothylacium* sp.는 *Anisakis simplex*보다 짧고 가늘었다. 두 종 모두 전방부분에는 lip, 입, 신경환, 분비공, 분비관이 관찰되었다. 두 종 모두 중간부분에는 식도, 위, 장이 존재하고 있었지만, intestinal ceacum과 ventricular appendage는 *Hysterothylacium* sp.에서만 관찰되었다. *Hysterothylacium* sp.의 후방부분 끝에는 conical nodulose apex이 관찰되었지만, *A. simplex*의 후방부분 끝에는 spine이 관찰되었다. SEM으로 관찰한 결과 *Hysterothylacium* sp.의 입 주위에는 3개의 lip이 존재하고 있었는데, dorsal lip은 넓이 65 µm 내외였고, 한쌍의 lateroventral lip은 넓이 60 µm 내외였다. Lip의 표면에는 넓이 8 µm 내외의 유두돌기 한쌍이 존재하고 있었다. *Hysterothylacium* sp.와 *A. simplex*의 총체 넓이는 각각 480 µm와 900 µm 내외로 측정되었다. *Hysterothylacium* sp.의 lateral alae는 높이 7 µm 내외였으며, cornical nodulose apex에 존재하는 돌기는 지름 약 3.3 µm였다. *A. simplex*의 후방부분 끝에는 높이 약 20 µm의 spine이 관찰되었다. 조피볼락 장의 내강에 존재하는 아니사키스들은 대부분 *Hysterothylacium* sp.였고, 점막주름 근처 혹은 점막하층에 기생하고 있었다. 아니사키스의 기생으로 인하여 숙주의 점막상피에는 다수의 점액세포가 증가하였다.