

## 제주도 여윌증상 넙치(*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리한 점액포자충의 특성 분석

김승민 · 전려진<sup>1</sup> · 박명애<sup>2</sup> · 정현도<sup>3</sup> · 정준범\*

제주대학교 해양의생명과학부, <sup>1</sup>제주대학교 수산백신연구센터, <sup>2</sup>국립수산과학원 수산생물방역과, <sup>3</sup>부경대학교 수산생명의학과

### Characterization of the Myxosporean Parasite Isolated from Emaciated Olive Flounders *Paralichthys olivaceus* on Jeju Island

Seung Min Kim, Lyu Jin Jun<sup>1</sup>, Myoung Ae Park<sup>2</sup>, Hyun Do Jeong<sup>3</sup> and Joon Bum Jeong\*

Faculty of Marine Biomedical Science, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

<sup>1</sup>Fish Vaccine Research Center, Jeju National University, Jeju 695-814, Korea

<sup>2</sup>Aquatic Life Disease Control Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-705, Korea

<sup>3</sup>Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

To investigate the causes of emaciation in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. We performed histological examinations and polymerase chain reaction (PCR) with a new primer set. In most cases, the most severe emaciation was observed in the abdominal area. Using PCR on extracted livers, kidneys, spleens, gills, brains, and intestines, we found that areas around the kidneys and intestines were as almost always positive. In significantly emaciated fish, PCR was positive in all internal organs except the gills. In addition, the homology of 812-bp nucleotide sequences of the 28S rRNA gene was more than 99% in emaciated fish. Partial homology with *Myxobolus* spp. and *Cystodiscus axonis*, whose data were obtained from GenBank was 86% and 88%, respectively. Histological examinations detected spores in kidneys and intestines but not in other organs. We also performed cohabitation experiments to determine whether infections could be exchanged among species or only within species. Uninfected olive flounder and red sea bream, *Pagrus major*, cohabitating with emaciated olive flounder showed 100% and 0% cumulative mortality, respectively. Thus the cause of emaciation in cultured olive flounder of Korea is likely due to a new parasite.

Key words: Emaciation disease, Olive flounder, PCR, Spore, Cohabitation experiment

### 서 론

여윌증은 1990년 일본의 자주복(*Takifugu rubripes*) 양식장에서 처음 발견되었으나, 최근에는 해산 양식 어류인 참돔(*Pagrus major*), 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*), 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 등에서도 여윌 증상을 보이는 질병이 확인되어, 양식어민들에게 많은 피해가 발생하고 있다. 이 질병에 감염된 어류는 안구함몰, 두부돌출 및 어체중 감소 등의 증상을 나타내다가 폐사에 이르게 된다고 보고하였다(Tun et al., 2000). Tun et al. (2002)의 연구에 따르면, 이러한 여윌 증상을 나타내는 어류의 장에서 3종의 점액포자충이 발견되었으며, *Enteromyxum fugu*, *Enteromyxum leei* 및 *Leptotheca fugu*인 것으로 보고

하였다. 여윌 질병의 원인은 명확하게 밝혀지지 않았지만, 앞서 동정된 점액포자충들이 한 종 또는 두 종 이상이 감염되었을 때 동일한 증상이 나타나는 것으로 확인되었다(Ogawa and Yokoyama, 2001). Yasuda et al. (2005)은 조직병리학적 분석을 통해 장 상피세포에서 다량의 포자를 관찰하였고, 상피의 탈락 및 파괴를 초래한다고 조사하였으며, 3종의 점액포자충에 대한 primers를 제작하여 PCR 방법을 사용하여 원인체를 진단하였다.

제주 양식산업의 대표적 품종인 넙치는 전국 양식넙치 생산량의 50% 이상을 차지하고 국내 전체 넙치 수출량의 95%를 점유하고 있는 실정이다. 그러나 제주 양식 넙치의 질병에 의한 연간 피해액이 700억 원대에 이르며 해마다 급증하고 있다. 대

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0337>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 48(3) 337-345, June 2015

Received 23 February 2015; Revised 1 June 2015; Accepted 8 June 2015

\*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3426 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: jeongjb@jejunu.ac.kr

표적인 폐사 원인으로는 바이러스성 질병인 viral hemorrhagic septicemia (VHS)와 기생충성 질병인 Scuticociliate가 높은 비율을 차지하고 있으며, 세균성 질병인 연쇄구균병과 에드워드 병 외에도, 원인불명으로 인한 폐사가 심각한 수준인 것으로 밝혀졌다.

국내의 여윌증은 2007년부터 제주도 넙치 양식장에서 약 20 cm전후 크기의 넙치에서 발생하고 있으며, 1-3주 동안 발병하여 폐사를 야기시키고 있다. 일본의 자주복과는 달리, 국내 넙치의 여윌증 발병에 대한 원인은 아직 보고되어 있지 않은 상황이며, 원인불명 질병에 의한 피해를 최소화 하기 위해 신속한 진단 방법을 마련하여 질병이 확산되는 것을 미연에 방지하는 것은 매우 중요한 점이라 할 수 있다.

본 연구에서는 제주지역에서 여윌증상을 보이는 넙치를 대상으로, 여윌증의 원인을 밝혀내기 위해 분자생물학적 분석 및 조직병리학적 분석을 실시하였으며, 또한 cohabitation test를 통하여 동일한 어종 및 타 어종으로의 전이가 발생하는지를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어

여윌증 연구를 위한 시료는 2010년(E03), 2011년(E06), 2012년(E03) 및 2013년(E12)에 제주지역의 넙치 양식장으로부터 수집하였다. 채집된 넙치는 광학현미경을 이용하여 기생충 검경을 실시하였고, 세균을 분리하기 위하여 tryptic soy agar (Difco Co., USA), thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (Difco), Salmonella-Shigella (Difco) 배지에 각각 병어의 간, 비장, 신장 조직을 도말한 후, 25℃에서 배양하였다. Cho et al. (2007)의 방법에 따라 viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), viral nervous necrosis virus (VNNV), hiram rhabdovirus (HRV) 및 red seabream iridovirus (RSIV) 등 4종의 바이러스에 대하여 PCR 방법으로 감염여부를 확인하였다.

### DNA추출

여윌증상을 보이는 넙치로부터 간, 비장, 신장, 장, 뇌 및 아가미 조직을 적출하였고, DNA를 분리하기 위하여 DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen Hilden, Germany)를 사용하였다.

먼저 각 조직의 10 mg에 ATL buffer 180 µL와 proteinase K 20 µL를 첨가하여 56℃에서 조직이 녹을 때까지 반응시켰다. 반응 후, AL buffer 200 µL를 넣어 섞은 다음 ethanol 200 µL를 더 하여 spin column에 옮겨 6,000 g에서 1분간 원심분리하였다. Column을 새로운 tube로 옮긴 후 AW1 buffer 500 µL와 AW2 buffer 500 µL를 이용하여 세척과정을 거친 후, AE buffer 50 µL를 첨가하여 최종적으로 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 실험 전까지 -20℃에 보관하였다.

### Primer 제작

여윌증상을 보이는 국내의 넙치를 대상으로 여윌증의 원인을 분석하기 위하여, 일본에서 여윌증의 원인체로 보고된 *E. leei*의 small subunit ribosomal DNA gene (SSU rDNA)으로부터 제작된 MM18Sf/MM18Sr primer set (1,589 bp)를 동일하게 제작하였고(Table 1) 국내의 여윌증상 넙치의 장 조직으로부터 DNA를 분리하여 PCR 실험을 실시한 결과, 모두 PCR 음성반응을 나타내었다. 본 연구진은 GenBank (NCBI, USA)에 등록된 점액포자충(*Myxidium* sp.)의 염기서열로부터 degenerated primers를 제작하였고, 여윌증상 넙치로부터 DNA를 분리하여 PCR을 실시한 결과 양성 반응을 확인하였으며, DNA sequencing을 통한 염기서열 분석 후 국내 넙치의 여윌증 진단을 위한 새로운 EM-F/EM-R primer set를 제작하였다(Table 1).

### PCR 및 DNA sequencing

PCR은 microtube에 1 µM의 각 primer, 2.5 mM의 각 dNTP, 10 × G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq DNA polymerase (Gene Pro Thermal Cycler Cosmo, Korea) 및 template DNA로서 추출된 핵산을 첨가한 후 distilled water로 PCR 혼합물의 최종 volume 이 20 µL가 되게 하였다. PCR 조건은 95℃에서 3분간 pre-denaturation시킨 후, 95℃에서 30초 denaturation, 55℃에서 30초 annealing, 72℃에서 30초 extension의 반응을 1 cycle로 하여, 35 cycles를 반응시켰다. 그리고, 72℃에서 7분간 post-extension시켰다. PCR 후 증폭 산물은 1 × TAE buffer (40 Mm Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 µg/µL ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기 영동한 후, UV 검출기에서 band를 관찰하였다. PCR 증폭 산물은 gel purification kit (Bioneer, Korea)를 이용하여

Table 1. PCR primers used for the detection of new pathogen

Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Expected sizes	Function
MM18S-F	CTGGTTGATCTGCCAGTGGTC	1,589 bp	Detection of <i>E. leei</i> (Palenzuela et al., 2002)
MM18S-R	CGGTACTAGCGACGGGCG		
28S-F	CTAGGGGAATCCGACTGT	313 bp	House keeping gene (28S ribosomal RNA)
28S-R	ATCAAAGTCAAGC		
EM-F	CAACCGCAATGTGTTTACTC	812 bp	Detection of new pathogen (in this study)
EM-R	CCAAACAACCTGCCACAATG		

회수한 후, ToPo TA cloning<sup>®</sup> kit (Invitrogen, USA)로 cloning 하여 염기서열 분석을 의뢰하였다(Solgent, Korea).

### 조직병리학적 분석

조직병리학적 분석을 위해 여嬴 증상을 보이는 넙치로부터 간, 비장, 신장, 장, 뇌, 아가미 조직을 적출하여 Bouin's solution 에 24시간 동안 고정한 후 70% EtOH를 사용하여 탈수하였다. 이후 파라핀 침투를 시키고(Leica EG 1150HC, Germany) 포매기(Leica Jung 820, Germany)를 사용하여 포매를 실시하였다. 이 후 마이크로톰으로 4-5  $\mu\text{m}$  두께의 절편을 잘라 유리 슬라이드에 부착시켜 건조시켰다. 제작된 조직표본은 haematoxylin과 eosin (H&E)으로 염색을 실시한 후 광학현미경(Zeiss LT60, Germany)으로 검정하였다.

### 어류 간의 전이실험

감염어로부터 물을 통한 감염이 가능한지를 확인하기 위하여 Ishimatsu et al., (2007)의 방법을 사용하여 cohabitation 실험을 실시하였다. 먼저 PCR에 의해 여嬴증 감염이 확인된 넙치를 donor group으로 하였고, 음성으로 판정된 넙치 및 참돔을 recipient group으로 지정하여 두 가지 실험을 실시하였다. 첫 번째 실험에서는 여嬴증에 걸린 넙치( $16.3 \pm 0.4$  cm,  $40 \pm 5.23$  g) 15마리와 여嬴증이 감염되지 않은 넙치( $16.7 \pm 0.9$  cm,  $53.4 \pm 8.47$  g) 15마리를 이용하여 cohabitation 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 넙치는 100 L 플라스틱 수조에 recipient group의 꼬리 지느러미를 조금 잘라내어 구별하였다. 두 번째 실험에서는 넙치 외 타 어종인 참돔으로 여嬴증의 전이가 이루어지는지를 조사하고자 하였다. 참돔이 잡아먹히는 것을 방지하기 위하여 100 L 수조 내에 플라스틱 그물망을 사용하여 구역을 나누는 후, 여嬴증 감염이 확인된 넙치 10마리와 여嬴증 음성 판정이 확인된 참돔( $6.5 \pm 0.5$  cm,  $3.5 \pm 0.7$  g) 10마리를 이용하여 cohabitation 실험을 실시하였다. 실험기간 동안의 사육 수온은  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지시켜 주었으며 1일 1회씩 상업용 사료를 공급한 후, 사육수를 환수시켰다. 매일 폐사 정도를 확인하였고, 폐사어는 조직병리학적 관찰 및 PCR 방법을 사용하여 여嬴증 감염 여부를 확인하였다.

## 결 과

### 여嬴증의 원인체 검출

여嬴증에 감염된 넙치의 대부분은 복부 부위가 심각하게 여嬴하는 것으로 관찰되었고, 일부 체색흑화 및 해부 시 간 출혈 등의 증상이 관찰되었으나, 일본의 자주복에서 보고되었던(Tun et al., 2000) 안구함몰이나 두부돌출과 같은 증상은 보이지 않았다(Fig. 1A, 1B). 현미경을 통해 기생충 검정을 실시한 결과, 신장 및 장에서 길이 5-8  $\mu\text{m}$ , 폭 7-9  $\mu\text{m}$ 의 둥근 형태의 포자가 관찰되었고(Fig. 2), 심각한 폐사를 보이는 일부 넙치양식장의

경우, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio harveyi* 및 *Streptococcus* sp. 등과 같은 세균성 질병과의 복합감염 증상이 나타나기도 하였다. Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), viral nervous

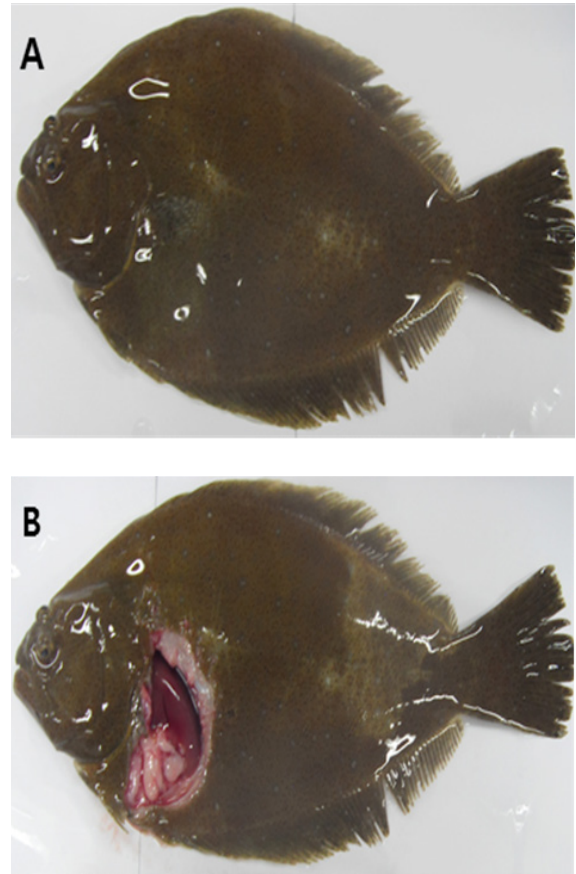


Fig. 1. The external (A) and internal (B) signs of the emaciated olive flounder *Paralichthys olivaceus*.

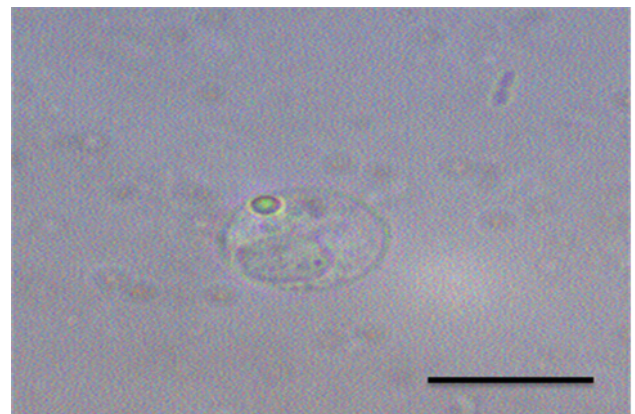


Fig. 2. The spore from the intestine of emaciated olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Bar=10  $\mu\text{m}$ .

necrosis virus (VNNV), hiramе rhabdovirus (HRV) 및 red seabream iridovirus (RSIV) 등 4종의 viruses는 모든 조사대상 양식장에서 검출되지 않았다(data not shown).

제주도 넙치 양식장에서 여壼 증상을 보이는 넙치를 대상으로 새롭게 제작한 EM-F/EM-R primer set를 이용하여 PCR을 실시한 결과(Table 1), 일본의 여壼증에 대한 연구에서는 원인체가 주로 장에서 검출되는 것으로 보고하였으나, 본 연구에서는 넙치의 장에서 뿐만 아니라 신장에서도 모두 양성 결과를 나타낸다는 것을 확인하였다(Fig. 3). 여壼증에 감염된 다양한 넙치를 대상으로 PCR을 수행한 결과, 여壼증 원인체의 검출 정도가 신장, 장, 비장의 순서로 높은 것을 확인하였으며, 병원체의 주요 감염 표적장기는 신장 및 장 부위인 것으로 추정되었다. 또한, 심각한 여壼 증상을 보이는 넙치에서는 아가미를 제외한 모든 검사대상 조직에서 PCR 양성 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

검출된 PCR products에 대한 유전자 염기서열을 분석한 결과, 다른 시기에 제주도의 다양한 양식장의 여壼증상 넙치로부터 검출된 병원체들 간의 유전자 상동성은 서로 99% 이상인 것으로 나타났고, 제주도의 넙치양식장에서 발생하는 여壼증의 원인체는 대부분 동일한 기생충 종인 것으로 추정되었다(Fig. 4). GenBank database를 활용한 유전자 비교 분석을 실시한 결과, 일부 염기서열인 150 bp가 *Myxobolus* sp. (Accession No. JN616264.1) 및 *Cystodiscus axonis* (Accession No. JN977605.1)와 부분적으로 86% 및 88%의 유사성을 각각 나타내었으며, 아직 GenBank에 등록되지 않은 미등록 종인 것으로 조사되었다.

조직병리학적 검사

각 장기의 조직 절편을 광학현미경으로 관찰한 결과, 여壼증에 감염된 넙치의 신장과 장 부위에서 원형 또는 난원형의 포자가 다수 관찰되었고, 장 부위에서보다 신장 부위에서 더욱 많은

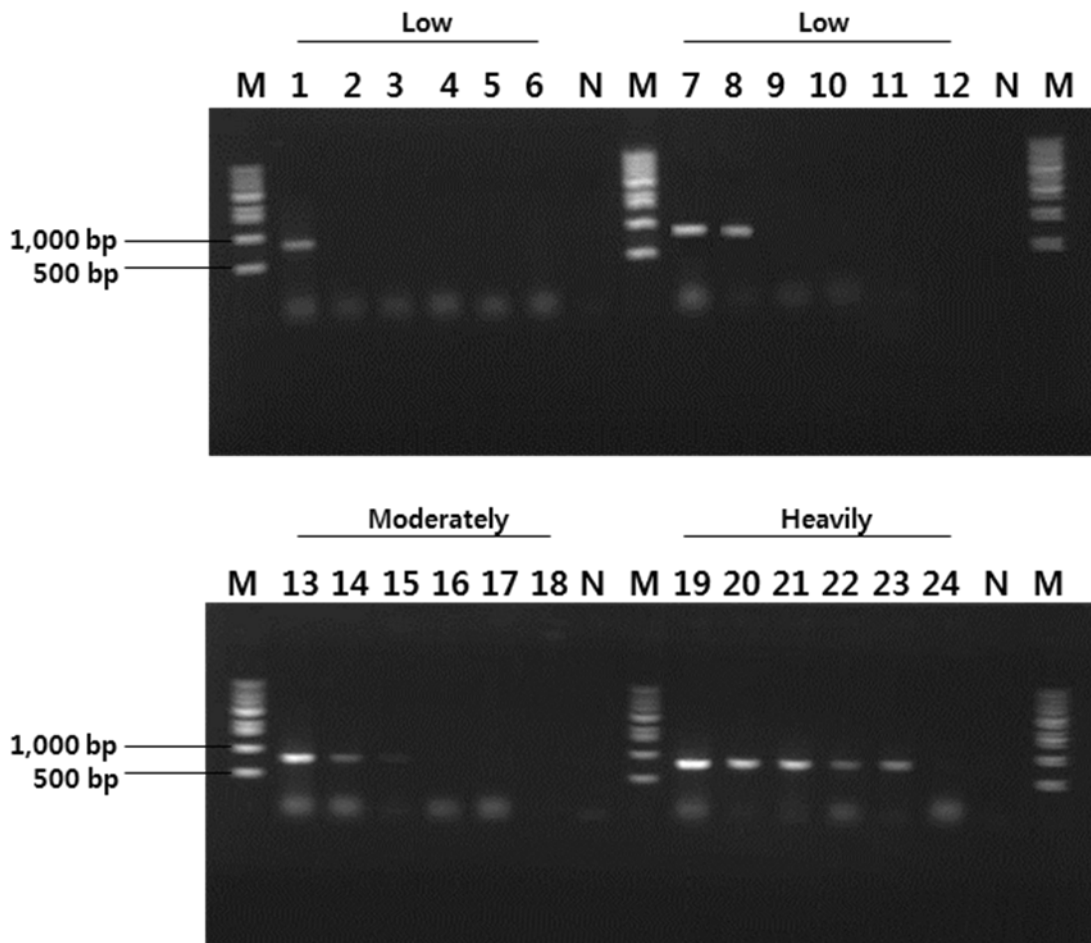


Fig. 3. PCR amplification from nucleic acids of internal organs from the emaciated olive flounder *Paralichthys olivaceus* in the level stages of infection. Lanes 1, 7, 13 and 19, Kidney; lanes 2, 8, 14 and 20, Intestine; lanes 3, 9, 15 and 21, Spleen; lanes 4, 10, 16 and 22, Liver; lanes 5, 11, 17 and 23, Brain ; lanes 6, 12, 18 and 24, Gill; M, 1 kb DNA ladder.

	EM-F →		
2010-E03	CAACCGCAATGTGTTACTCTTAGTACTACAACAAACACAAATATTGTAGGAAGTGTAGTGTAACTACGTGGACGGTCAGTCAGCAATGATTGGCCGG	100	
2011-E06	.....G.....	100	
2012-E03	.....	100	
2013-E12	.....	100	
2010-E03	ACTGCACACAGCGTGAAGCTGTTGCAAGACCCAGCTGGAGTTTGACTGAGCAGGCAACTGCTTGTGATGAACAGTGTGGAATAATGTTGGATACATGTT	200	
2011-E06	.....A.....	200	
2012-E03	.....T.....	200	
2013-E12	.....	200	
2010-E03	GGTCGACATAATGTAGTAATATATATATATTTATTGACGCTGACAAACAAACAAACAACTGTTAACGGTGGATCACTCGGTTCGTGTGTCGAT	300	
2011-E06	.....	300	
2012-E03	.....	300	
2013-E12	.....T.....	300	
2010-E03	GAAGAAGTGGCAAAATGCGATAATTAATGCGATTGCAATGCCTTGTGAGTCATTGAACTTTGAATGCAAAATGGCGCGGACTTTTAGTCGTGCATGT	400	
2011-E06	.....G.....	400	
2012-E03	.....	400	
2013-E12	.....	400	
2010-E03	TGGTTGAGAGTCATAAATCTATCGAGTATTTATAACAATACTGTAGCCCGCTTGTTCACAAACGGGTGATGAAATGTGACGCGTGGCGCTGTGAT	500	
2011-E06	.....	500	
2012-E03	.....T.....A.....A.....A.....	500	
2013-E12	.....	500	
2010-E03	GTTTACTTGTAAACATTTGCAGACATCAACGTATTGTCTAACAATACTTTATGCGAACAATGCAATGTTAATGATTGATGTGTGGCTGTGTCGCAAAC	600	
2011-E06	.....	600	
2012-E03	.....C.....	600	
2013-E12	.....A.....	600	
2010-E03	GACAAGTCTGTCATGATGGTTTGGAAACAATTGGTCTTTGTAGGCATCATTAGTTTGTATGCATACAAACAAGTCTATTGGTACGTTGGTCTCTTA	700	
2011-E06	.....	700	
2012-E03	.....	700	
2013-E12	.....	700	
2010-E03	TGGGATAGACAAAGCTGATAGTGAGTTTGGTGTGTGCAAGATTGGTGGTGTTCGCAATGTGTCTCTGACGCTAACTTTGGTTACATTGTGG	800	
2011-E06	.....	800	
2012-E03	.....T.....	800	
2013-E12	.....	800	
	← EM-R		
2010-E03	CAGGTTGTTTGG	812	
2011-E06	.....	812	
2012-E03	.....	812	
2013-E12	.....	812	

Fig. 4. Comparison analysis of the DNA nucleotide sequences of pathogens detected from the emaciated olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Primers used in PCR are in boxes.

수의 포자가 관찰되었으며, 기부골질, 사구체, 핵 등의 파괴와 변형체(plasmodium)가 일부 관찰되었다(Fig. 5A and 5B). 감염된 장 상피 부위에서는 포자가 관찰되었지만 변형체는 관찰되지 않았으며, 심한 경우 조직의 탈락 및 파괴가 나타났다(Fig. 5C and 5D). 신장 및 장을 제외한 다른 조직장기 부위에서는 포자가 관찰되지 않았으며, 특이적인 조직학적 이상소견도 관찰되지 않았다(data not shown).

### 어류 간의 전이실험

여임증에 대한 PCR음성 결과가 확인된 넙치 및 참돔을 이용하여 병원체의 전이에 대한 실험을 실시한 결과, 실험 기간 중 2 groups의 donor 넙치는 3일째에 100% 폐사하였고, recipient 넙치에서는 12일째에 100% 누적 폐사율이 관찰되었다(Fig. 6A). 감염어로부터 유출된 병원체에 의해 감염된 recipient group에서의 폐사는 donor group에서 보다 7일 정도 후에 나타나기 시작하였으며, 폐사가 일어난 recipient group의 넙치를

PCR법으로 확인한 결과, 73.3%의 감염률이 관찰되었고(Table 2), 조직학적 검사 결과 신장, 장 부위에서 donor fish와 동일한 형태의 포자가 관찰되었다(Fig. 7). 참돔으로의 병원체 전이에 대한 실험 결과, 실험 기간 중 3일째에 donor group에서 100% 누적폐사율이 관찰되었고, recipient group에서는 실험 종료일까지 폐사가 발생하지 않았으며(Fig. 6B), PCR검사 결과에서 모두 음성인 것으로 판명되었다(Table 2). 조직학적 검사 결과에서도 모든 참돔의 조직 부위에서 포자가 관찰되지 않았다(data not shown).

### 고 찰

본 연구에서는 일본의 여임증에 대한 연구 방법 및 결과들을 국내의 여임증 연구를 위하여 적용해 보았고, 우리나라의 여임증 원인체는 일본에서 보고된 여임증 원인체와 형태학적으로는 유사하지만, 분자유전학적으로는 전혀 다른 종이라는 것을

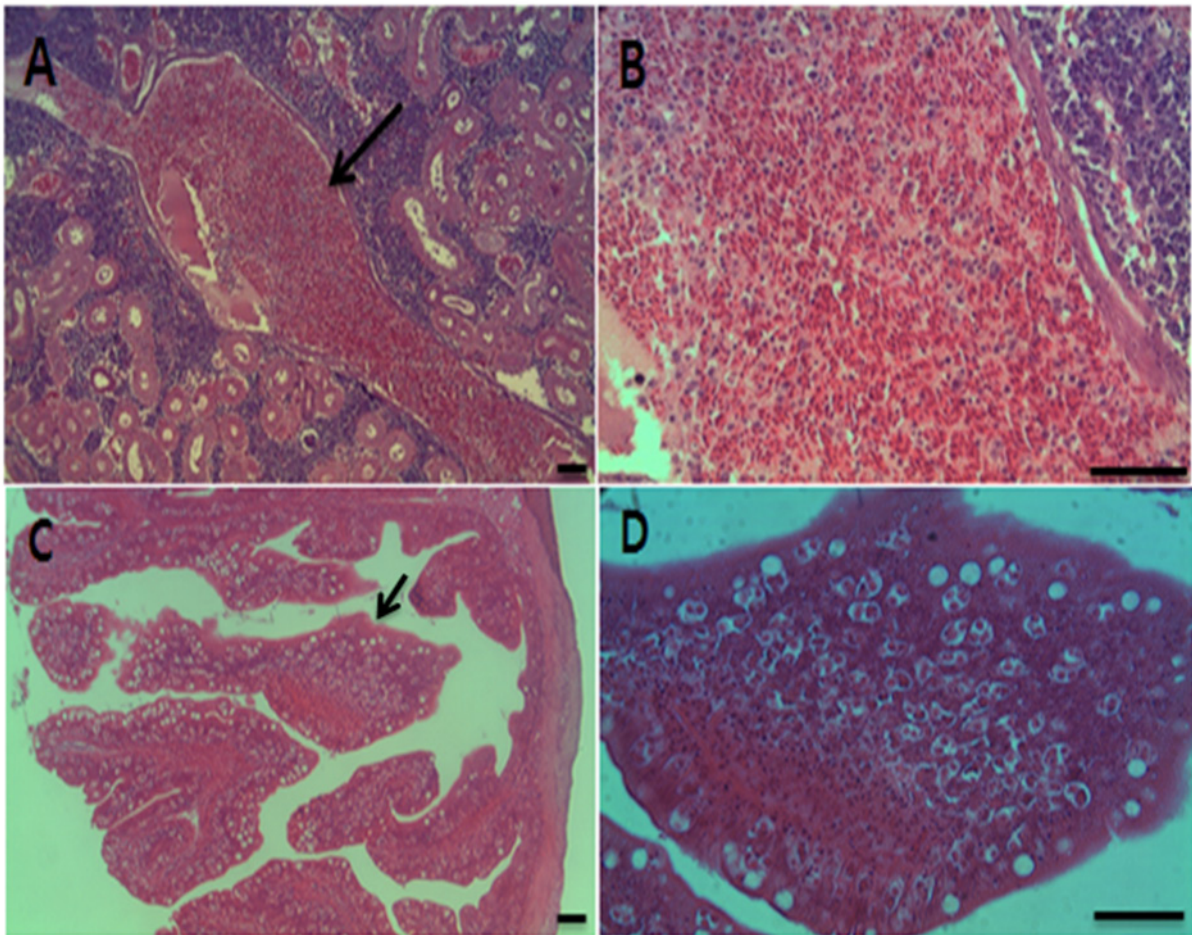


Fig. 5. Histological findings of kidney (A,  $\times 200$  and B,  $\times 400$ ) and intestine (C,  $\times 200$  and D,  $\times 400$ ) from the emaciated olive flounder *Paralichthys olivaceus*. H & E stain. Bar = 20  $\mu$ m.

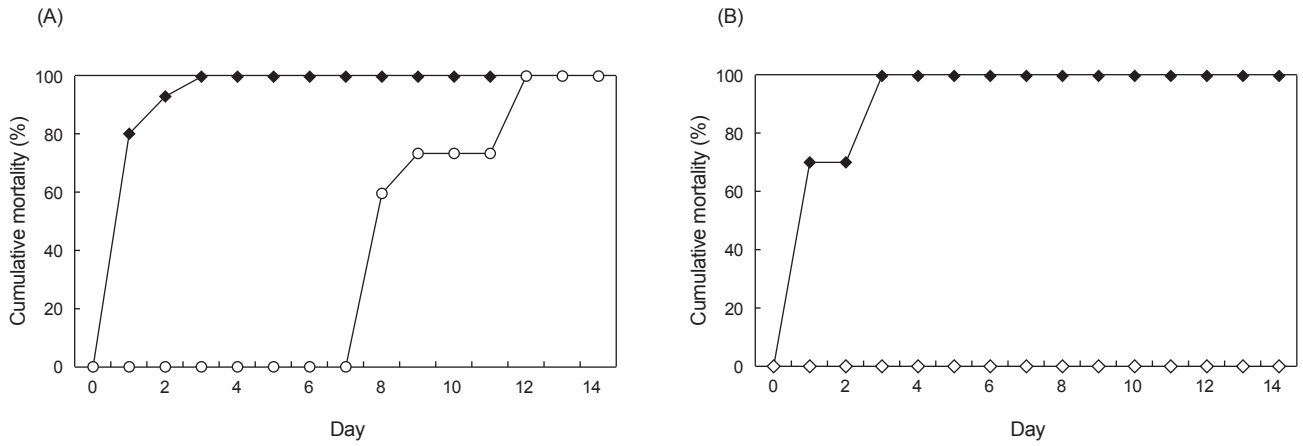


Fig. 6. Cumulative mortality (%) of olive flounder *Paralichthys olivaceus* (A) and red seabream *Pagrus major* (B) after cohabitated with the emaciated olive flounder. ◆, emaciated olive flounder; ○ and ◇, cohabitated olive flounder and red sea bream, respectively.

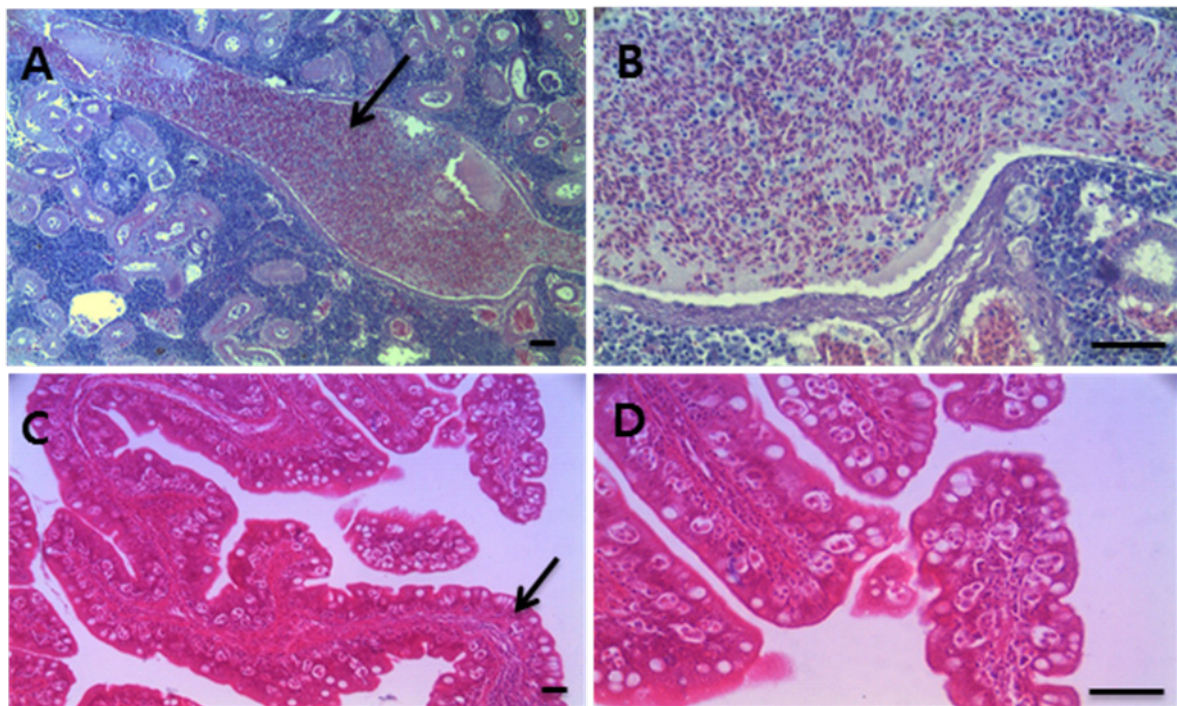


Fig. 7. Histological findings of kidney (A,  $\times 200$  and B,  $\times 400$ ) and intestine (C,  $\times 200$  and D,  $\times 400$ ) from the recipient olive flounder *Paralichthys olivaceus* cohabitated with the emaciated olive flounder. H & E stain. Bar=20  $\mu\text{m}$ .

Table 2. Infection rate (%) of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and red seabream *Pagrus major* after cohabitated with the emaciated olive flounder

	Donor fish (olive flounder)	Recipient fish (olive flounder)	Donor fish (olive flounder)	Recipient fish (red seabream)
PCR Positive	100% (15/15)	73.3% (11/15)	100% (10/10)	0% (0/10)

밝혀내었다. 감염 넙치에 대한 분석 결과, 대부분은 복부 부위에 심각한 여임이 관찰되었으며, 감염 넙치가 감염되지 않은 넙치보다 체중이 30-40% 정도 낮은 것으로 관찰되었고(data not shown), 간혹 육안상 복부부위가 여위지 않은 넙치에서도 감염이 발생하여 감염 후 여위는 것으로 판단된다. Choi et al. (2012)은 제주도 넙치 양식장에서 발병하는 여임증 넙치에서 *E. tarda*, *V. harveyi*와 같은 세균성 질병이 복합감염되는 경우에 대하여 보고하였으나, 감염 넙치에서 공통적으로 분리되지 않아 여임증의 원인은 아닌 것으로 추정하였다. 현미경을 통해 기생충 검정을 실시한 결과, 길이 5-8  $\mu\text{m}$ , 폭 7-9  $\mu\text{m}$ 의 둥근 형태의 포자가 관찰되었고(Fig. 2), 이것은 일본의 자주복에서 발생한 여임증 원인의 포자와 유사한 형태인 것으로 조사되었다(Tetsuza et al., 2004).

일본의 자주복에서 처음 발견된 여임증은 Tun et al. (2002)의 연구에서 *E. fugu*, *E. leei*와 *L. fugu*가 원인체인 것으로 의심되었다. 여임증에 대한 분자생물학적 진단 방법을 적용하고자 SSU rDNA gene의 MM18Sf/MM18Sr primer set (Palenzuela et al., 2002; Yasuda et al., 2005)를 제작한 후 여임증상 넙치의 신장과 장을 이용하여 PCR을 실시하였지만 음성 반응을 나타내었다. 이러한 결과는 Choi et al. (2012)의 보고와 일치하였으며, 우리나라에서 발병하는 넙치의 여임증 원인은 일본에서 보고된 primer set를 사용한 PCR에서는 검출되지 않는다는 것을 확인하였다. 본 연구에서는 국내 양식넙치의 여임증 진단을 위한 primer set (EM-F/EM-R)를 처음으로 개발하였고(Table 1), 여임증상을 나타내는 넙치를 대상으로 한 PCR 실험에서 명확한 band가 나타나는 것을 확인하였으며(Fig. 3), 향후 국내의 넙치에서 여임증의 감염 진단이 필요한 경우, 이와 같은 방법이 유용하게 활용될 것으로 판단된다. 병원체의 염기서열을 분석한 결과, 국내 넙치의 여임증 원인체들 간의 DNA nucleotide sequences의 상동성은 99% 이상인 것으로 나타났다(Fig. 4). 그리고, GenBank에 등록된 *Myxobolus* sp. 및 *Cystodiscus axonius*의 일부 염기서열과 80% 정도의 상동성이 있는 것으로 확인되어 아직 GenBank database에 등록되지 않은 미등록 기생충 종인 것으로 판명되었다. 향후, 이 병원체에 대해서는 DNA walking과 같은 분자생물학적 분석을 통하여 더욱 세부적인 연구가 뒤따라야 할 것이다.

이전 연구들에서는 sharpnose sea bream *Puntazzo puntazzo*, red sea bream *Pagrus major*, red drum *Sciaenops ocellatus*이 *Myxidium leei*에 감염되었을 때 공통적으로 장 조직에서 포자를 관찰할 수 있었다고 보고하였다(Le Breton and Marques, 1995; Diamant, 1998; Athanassopoulou et al., 1999). 또한, Myxosporea에 감염된 스페인의 turbot, *Scophthalmus maximus*에서도 포자를 소화관이나 장에서 확인할 수 있었으며 이러한 결과는 turbot의 성장에 영향을 미쳤을 것이라 제시하였다(Beaman et al., 1999). Bartholomew et al. (1989)은 *Ceratomyxa shasta*에 감염된 연어과 어류에서도 포자형태의 기생

충을 장 조직에서 관찰할 수 있었다고 보고하였는데 이와 같이 유럽의 여러 연구결과에서 점액포자충에 감염된 어류는 주로 장에서 감염이 이루어지는 것으로 보고되었다. 또한, 일본에서 발생하는 여임증의 원인 기생충도 장과 담낭에서 확인되었다고 보고하였다(Tun et al., 2002). 이러한 결과는 우리나라 여임증과 조직학적으로 유사한 경향을 보여주고 있으며, 여임증에 심하게 감염된 넙치의 경우, 전 장관의 상피, 점막고유층, 근층 등에서 포자가 관찰되는 부분과도 일치하였다. 그러나, 감염 부위에 있어서 유럽 및 일본에서는 장 조직을 주요한 감염 조직으로 보고하였지만, 본 연구결과에서 국내 넙치의 여임증 원인은 장 조직보다 신장 조직에서 더욱 높게 감염되는 것으로 조사되어, 주요 감염 표적장기는 외국에서의 보고와 차이가 있는 것으로 판단된다.

일본에서는 여임증의 원인체로 알려진 *E. leei*에 감염된 어류를 donor fish로 사용하여 같은 어종 및 다른 어종을 대상으로 cohabitation 실험을 실시하였으며 그 결과, 같은 어종 및 다른 어종으로 *E. leei*의 전이가 이루어졌다고 보고하였다(Diamant, 1997; Yasuda et al., 2002). 본 연구에서는 여임증의 원인체를 동일한 어종인 넙치로 전이시켰을 때 여임증상이 나타났으나 다른 어종인 참돔으로의 전이는 일어나지 않아 일본의 연구 결과와는 대조적인 것으로 나타났으며(Table 2), 감염여부를 확인하기 위해 실시한 조직학적 검사 및 PCR 검사에서도 모두 동일한 결과가 확인되었다.

본 연구에서는 국내의 양식넙치에서 발생하는 여임증에 대하여 분석하였으며, 기존에 일본에서 보고된 결과와 비교했을 때, 장 조직에서 형태학적으로 유사한 포자가 관찰된 것은 동일하지만, 병원체의 분자생물학적인 분석 및 cohabitation 실험에서는 다른 결과를 보였고, 아직 GenBank에 미등록된 새로운 기생충 종인 것으로 조사되었다. 그리고, 국내의 넙치 양식장에서 많은 문제를 야기시키는 여임증에 대한 진단법을 처음 개발하여 제시하였고, 이것은 여임증에 대한 다양한 연구에 있어서 중요한 기반이 될 수 있을 것이며, 향후에는 원인 기생충의 동정에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

## 사 사

이 논문은 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임 (수산백신연구센터).

## References

- Athanassopoulou F, Prapas T and Rodger H. 1999. Diseases of *Puntazzo puntazzo* cuvier in marine aquaculture systems in Greece. *J Fish Dis* 22, 215-218.
- Bartholomew JL, Smith CH, Rohovec JS and Fryer JL. 1989. Characterization of a host response to the myxosporean parasite, *Ceratomyxa shasta* (Noble), by histology, scanning electron microscopy and immunological techniques.



- J Fish Dis 12, 509-522. <http://dx.doi.org/j1365-2761.1989.tb00561.x>.
- Beaman HJ, Speare DJ, Brimacombe M and Daley J. 1999. Evaluating protection against *Loma salmonae* generated from primary exposure of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), outside of the xenoma-expression temperature boundaries. J Fish Dis 22, 445-450. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00194.x>.
- Cho MY, Kim MS, Kwon MG, Jee BY, Choi HS, Choi DL, Park GH, Lee CH, Kim JD, Lee JS, Oh YK, Lee DC, Park SH and Park MA. 2007. Epidemiological study of bacterial diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from 2005 to 2006 in Korea. J Fish Pathol 20, 61-70.
- Choi HS, Jun LJ, Kim SM, Jeong HD, Kim YK, Lim H, Yeo Ik and Jeong JB. 2012. Clinical features of fish with pathogens isolated from emaciated olive flounder *Paralichthys olivaceus*. J Fish Pathol 25, 67-76.
- Diamant A. 1997. Fish-to-fish transmission of a marine myxosporean. Dis Aquat Org 30, 99-105.
- Diamant A. 1998. Red drum *Sciaenops ocellatus* (Sciaenidae), a recent introduction to Mediterranean mariculture, is susceptible to *Myxidium leei* (Myxosporea). Aquaculture 162, 33-39. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00307-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00307-4).
- Ishimatsu A, Hayashi M, Nakane M and Sameshima M. 2007. Pathophysiology of cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* suffering from the myxosporean emaciation disease. Fish Pathol 42, 211-217.
- Le Breton A and Marques A. 1995. Occurrence of a histozoic *Myxidium* infection in two marine cultured species: *Puntazzo puntazzo* C and *Pagrus major*. Bull Fish Pathol 15, 210-212.
- Ogawa K and Yokoyama H. 2001. Emaciation disease of cultured tiger puffer *Takifugu rubripes*. Bull Aquacult Suppl 5, 65-70.
- Palenzuela O, Redondo MJ and Alvarez-Pellitero P. 2002. Description of *Enteromyxum scopthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. Parasitology 124, 369-370. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182001001354>.
- Tetsuya Y, Yoshinori N, Takeshi K, Yutaka F, Hiroshi Y and Kazuo O. 2004. Molecular and Morphological Redescriptions of Enteric Myxozoans, *Enteromyxum leei* (formerly *Myxidium* sp. TP) and *Enteromyxum fugu* comb.n.(syn, *Myxidium fugu*) from cultured Tiger puffer. J Fish Pathol 39, 137-143.
- Tun T, Yokoyama H, Ogawa K and Wakabayashi H. 2000. Myxosporeans and their hyperparasitic microsporeans in the intestine of emaciated tiger puffer. J Fish Pathol 35, 145-156. <http://dx.doi.org/10.3147/jsfp.35.145>.
- Tun T, Ogawa K and Wakabayashi H. 2002. Pathological changes induced by three myxosporeans in the intestine of cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck and Schlegel). J Fish Pathol 25, 63-72. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00333.x>.
- Yasuda H, Ooyama T, Iwata K, Tun T, Yokoyama H and Ogawa K. 2002. Fish-to-fish transmission of *Myxidium* sp. (Myxozoa) in cultured tiger puffer suffering from emaciation disease. J Fish Pathol 37, 29-33. <http://dx.doi.org/10.3147/jsfp.37.29>.
- Yasuda H, Ooyama T, Nakamura A, Iwata K, Palenzuela O and Yokoyama H. 2005. Occurrence of the myxosporean emaciation disease caused by *Enteromyxum leei* in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol, 40, 175-180.