

〈Original article〉

# PCR (polymerase chain reaction)법과 조직학적 방법을 통한 넙치 조직에서의 *Kudoa septempunctata* (Myxosporea: Multivalvulida)의 분석에 관한 연구

도정완 · 조미영 · 정승희 · 이남실\*

국립수산과학원 병리연구과

## A Study About Analysis Results for *Kudoa septempunctata* (Myxosporea: Multivalvulida) in Tissue at Olive Flounder, using PCR (polymerase chain reaction) and Histological Methods

Jeong Wan Do, Miyoung Cho, Sung Hee Jung and Nam-Sil Lee\*

Fish Pathology Division, National Institute of Fisheries Sciences, Busan 46083, Republic of Korea

**Abstract** - This study is for the consideration of the existence tendency of *Kudoa septempunctata* in olive flounder. In general, muscle has shown a strong PCR positive reaction in spores containing tissues rather than non-containing tissues. However, blood PCR results showed opposed tendency. In various organs of the tested fish containing spores in muscle tissue, heart had shown positive reaction along with muscle at PCR analysis. Muscle fiber necrosis was observed at the histological observation, and this degeneration was common in both samples. The one sample was the PCR positive muscle containing spore and the other was the PCR positive muscle non-containing spore. Both of muscle tissues indicated a positive reaction at ISH (in-situ hybridization) against *K. septempunctata*.

**Keywords** : *Kudoosis*, molecular analysis, histological examination, flounder, muscle

### 서 론

점액포자충류(Myxosporeans)는 어류에서 종종 발견되는 기생충류로, 생활사는 명확하지 않지만 숙주를 바꾸어가며 다양한 형태로 생존하고 있음을 알 수 있다(Alvarex-Pellitero and Sitjà-Bobadilla 1993; Kristomundsson and Freeman 2014; Yokoyama *et al.* 2016). 일본에서 2010년에 발생한 원인불명의 식중독 원인을 조사하는 과정에서 일

본 후생노동성(Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan)에서는 넙치의 근육을 날것으로 섭취함으로써 발생한 식중독임이 확인되었고, 그 원인체로 점액포자충의 일종인 *Kudoa septempunctata* (Myxosporea: Multivalvulida)가 드러나게 되었다(Kawai *et al.* 2012; Yokoyama *et al.* 2015). 본 점액포자충에 의한 식중독과 관련하여 일본 자국 내에서 역학조사, 원인체 분석, 발병기작 등 병인과 그 병원성에 대한 연구가 매우 활발히 이루어져 왔다(Kawai *et al.* 2012; Yoshiko *et al.* 2014; Takeuchi *et al.* 2016). 그 결과 구역질, 설사, 구토 등의 증상과 관련하여 쿠도아충의 섭취량은 개인별 차이는 있지만 약  $7.2 \times 10^7$ 개/인(Yoshiko *et al.* 2014)

\* Corresponding author: Nam-Sil Lee, Tel. 051-720-2488, Fax. 051-720-2498, E-mail. nslee90@naver.com

을 섭취하였을 때 식중독의 병적증상을 보이는 것으로 보고 있다. 쿠도아포자충이 장상피에 도달하여 극사를 방출하고, 포자원형질 (sporoplasm)이 장상피에 침입하여 병증을 유발하는 것으로 실험적으로 밝혀져 있다 (Yoshiko *et al.* 2014; Shin *et al.* 2015; Ohnishi *et al.* 2016).

현재 쿠도아충에 관한 연구는 인체에 대한 영향에 집중되어 있어 넙치 체내에서의 포자충의 형태와 분포에 대한 연구는 찾아보기 힘들다. 실질적으로 PCR 검사를 통하여 근육 내 양성밴드를 확인할 수 있는 검체는 다수 있으나 그중에서 인체에 영향을 주는 형태인 포자의 형태로 근육 내 존재할 확률은 급격히 낮아진다. *K. septempunctata*의 생활사가 명확히 밝혀져 있지는 않지만, 넙치의 근육 내 기생하는 형태는 포자 이외의 다른 형태로도 관찰될 것으로 보이며, 넙치의 근육 내에서 포자의 형태로 다량 증식하기 위해서는 숙주와 환경의 영향이 크게 관여할 것으로 보인다 (Chun 2006). 본 연구는 포자충의 숙주 가운데 하나인 넙치에서의 기생형태를 알아보기 위한 기반연구로 넙치의 근육조직 및 혈액을 이용하여 분자생물학적, 조직학적 분석을 위하여 쿠도아 점액포자충에 대한 PCR 검사를 실시하였으며, 포자가 검출된 개체에서의 각 장기별 PCR 검사에 대한 결과 및 조직학적 관찰 내용에 관해 검토해보고자 하였다.

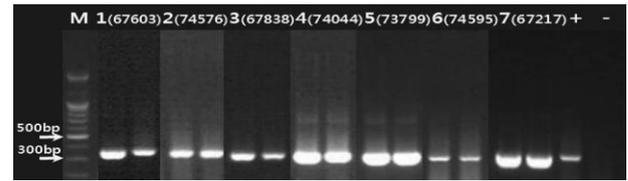
## 재료 및 방법

### 1. 실험어

양식 넙치로부터 쿠도아포자충이 검출될 확률은 매우 낮고 (Song *et al.* 2014) 양식환경에 따라 더 낮아질 수 있으며, 사육 중 폐사발생을 감안하여 양성체 확보를 위한 초기 실험어의 개체수를 수용이 가능한 최대한으로 설정하여 500마리로 하였다. 실험에 사용된 넙치, *Paralichthys olivaceus* (체장  $40.47 \pm 1.59$  cm, 체중  $705.2 \pm 96.3$  g)는 양어장에서 활어 상태로 본 연구시설에 수송하여 우수식 3톤 (ton) 원형수조에 나누어 수용하면서 2주일 순치시킨 후, 개체구분을 위해 동물용 chip을 전용주사기를 사용하여 후두부 근육에 이식하고 같은 주사기를 사용하여 미부 앞쪽에 근육 두께가 깊은 부위를 찌러 근육조직을 적출한 후 약육하고 2개월간 순치하였다.

### 2. 양성체 선별

칩 이식용 주사기로 넙치가 살아있는 상태에서 소량의 근육 (약 0.02 g)을 적출하고 이 근육조직은 멸균증류수 (Ultra Pure Distilled Water, Invitrogen)로 마쇄하여 PCR 검사와 포



**Fig. 1.** KS-PCR products loading image at gel electrophoresis of the live muscle tissue. M: marker, 1-7: sample number, (0000) is chip number, +: positive control (356 bp), -: negative control.

자유무확인을 위한 염색에 사용하였다 (Live 검사). DNA Mini kit (QIAGEN)를 사용하여 근육조직으로부터 genomic DNA를 추출하고, 이 DNA를 주형으로 하여 쿠도아 28S rDNA를 검사부위로 하여 356 bp를 합성하는 PCR 검사법 (이하 KS-PCR 검사) (Grabner *et al.* 2012)으로 일본 후생노동성의 제시방법에 따랐다. 본 실험실에서는 상기의 방법에 사용된 KSf 5'-gtgtgtgatcagacttgatg-3'와 KSr 5'-aagcaaaa ctgctggccattt-3'의 primers를 포함시켜 사전 주문제작한 customized Hotstart PCR premix (Bioneer, Korea)를 사용하여 annealing 온도 55°C에서 35 cycles로 하여 한 샘플에 대하여 2회 반복 PCR을 실시하였다. 겔 전기영동에서 확인되는 양성밴드의 명암 정도를 보고 개체 (No. 1~7, Fig. 1)를 선별하였다. 2회의 PCR 결과가 차이가 나거나 비교적 약한 밴드로 확인되는 개체로 으깬 조직을 슬라이드에 도말하여 100% 에탄올로 고정된 후 Methylene blue (MB)로 염색하였을 때 포자가 보이지 않는 4개체와, 2회의 PCR 결과가 모두 밝고 두꺼운 밴드로 확인되면서 염색하여 포자가 확인되는 3개체, 총 7개체를 이후 실험에 사용하도록 하였다.

### 3. 순치 2개월 후 샘플링

상기의 선별된 7개체의 실험어는 순치 2개월 후, 칩 리더기 (Chip reader)를 사용하여 선별하였으며, 혈액을 채취하여 DNA blood & tissue kit (QIAGEN)를 사용하여 혈액으로부터 DNA를 추출하여 상기의 KS-PCR 검사를 실시하였다. 근육에서의 PCR 검사는 채혈 후 부검하면서 10% 중성 포르말린 (Sigma)에 고정된 체측근을 사용하였다. 고정된 근육조직을 멸균 증류수로 수차례 수세하여 고정액 성분을 제거한 후 DNA Mini kit (QIAGEN)를 사용하여 DNA를 추출하고 KS-PCR 검사를 실시하였다. 7개체 가운데 전기영동에서 밴드가 명확하게 검출되고, MB 염색에서 포자가 확인된 한 개체 (chip #74044)를 선택하여 간, 비장, 신장, 심장, 위, 소장, 근육을 샘플링하고, DNA Mini kit (QIAGEN)를 사용하여 각 장기별로 DNA를 추출하여 근육조직과 같은 방법으로 KS-PCR 검사를 실시하였다.

#### 4. 조직학적 관찰

10% 중성포르말린에 고정된 근육조직과 장기에 대한 조직처리는 다음과 같다. 조직표본 제작을 위해 세절(약 8×2 mm 전후)하여 10% 중성포르말린에 2차고정하고 18~24 h 이내에 수세(3 h)한 후 단계별 알콜(60~100%)에 탈수하고, Xylene에 투명화 과정을 거친 후 파라핀 침투시켜 파라핀 조직블럭을 제작한다. 마이크로톰(Leica)으로 4 μm의 조직절편을 잘라 슬라이드글라스에 부착하고 건조시킨 후(45~50°C), H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색을 실시하여, 봉입한 후 광학현미경(Axio ImagerA1, ZEISS)으로 관찰하면서 영상촬영 시스템(Zen2012, ZEISS)을 사용하여 이미지를 캡처하였다.

#### 5. 분자조직학적 관찰(In-situ hybridization: ISH법)

ISH를 위한 Dig labeling probe의 합성에는 본 연구실에서 디자인한 *K. septempunctata*의 5.8S~ITS2 (GeneBank accession No. LC028894)의 일부분인 185 bp에 대한 primer set (Left 5'-agttactgagtgatccgcga-3', Right 5'-caagcgtcaacacaccta-3')를 사용하였다. *K. septempunctata* 양성 genomic DNA를 주형으로 Ex Taq polymerase-HS (Hot start Version)와 2.5 mM dNTP mixture set (TAKARA)를 사용하여 annealing 온도 59°C로 하여 1차 PCR을 실시하고, 여기서 얻어진 생성물을 주형으로 다시 같은 polymerase와 Dig labeling mix<sup>PLUS</sup> (Roche)를 사용하여 2차 PCR을 실시하여 Dig labeling PCR product를 제작하였다. 조직절편은 상법에 따라 포르말린 고정된 근육조직으로 파라핀 절편을 제작하여 기지의 방법(Lee *et al.* 2009; Do *et al.* 2013)에 따라 Hybridization을 실시한 후, glycerol로 봉입하여 광학현미경(Axio ImagerA1, ZEISS)으로 관찰하면서 영상촬영 시스템(Zen2012, ZEISS)을 사용하여 이미지를 캡처하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 근육과 혈액의 KS-PCR 검사 결과

500마리의 근육조직에 대한 *K. septempunctata*의 28S rDNA에 대한 KS-PCR 검사 결과를 확인하고, Fig. 1과 같은 겔 전기영동 결과와 MB염색결과를 통하여 7개체를 선별하였다. No. 1, 2, 3, 6번 샘플은 MB염색으로 포자가 관찰되지 않았으며 No. 4, 5, 7번 샘플은 포자를 관찰할 수 있었던 개체이다. 순치 2개월 후 이들 개체의 혈액으로부터 KS-PCR 검사를 실시한 결과, 1, 2, 3, 6번 샘플에서는 밴드의 밝기는

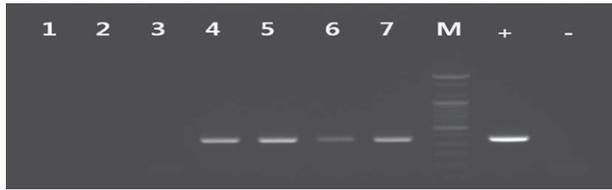


Fig. 2. KS-PCR products loading image at gel electrophoresis of the blood, M: marker, 1-7: sample number. +: positive control (356 bp), -: negative control.

각각 다르지만 양성이었으며, 4, 5번 샘플은 음성이었다. 7번 샘플은 포자는 확인되었지만 매우 약한 양성밴드가 확인되었다(Fig. 2).

지금까지 H&E 염색과 같은 일반 조직염색이나 Methylene blue와 같은 단염색을 통하여 포자의 존재 또는 형태를 확인하거나, 이들의 전자현미경적 미세구조를 관찰한 보고(Matsukane *et al.* 2010; Ohnishi *et al.* 2013a)는 있으나 본 연구와 같이 포자가 관찰되지 않으면서 KS-PCR 검사에서 양성밴드가 확인되는 경우의 조직표본을 관찰한 예는 없었다. 혈액의 KS-PCR 검사의 경우도 혈액검사를 통하여 검사가 가능하다는 보고(Yokoyama *et al.* 2015)만 있었을 뿐, 일반 근육조직에 대한 검사결과와의 차이에 대하여 비교한 예는 없었다. 혈액에 대한 KS-PCR 검사의 결과를 비교해 보면 근육에서의 겔 전기영동 패턴과 다른 것을 알 수 있다. 즉, 근육 내 포자가 다수 관찰되는 경우는 KS-PCR에서 근육조직에서는 양성밴드가 뚜렷하였으나 혈액에서의 결과는 음성이었다. 이에 반해 근육 내 포자가 관찰되지 않거나 적은 수로 관찰되는 개체의 혈액은 KS-PCR에서 양성밴드가 관찰되었다. 혈액에서보다 근육에서의 양성밴드가 검출되는 강도는 월등하게 강하지만 검출과 비검출의 경향으로 살펴보면 근육조직과 혈액의 KS-PCR 검사결과가 반대라는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 성숙포자가 형성되기 이전에 *K. septempunctata*의 변형체(plasmodium)가 혈액 내에 포자가 형성되기 이전 단계의 형태로 유주하거나 혈구나 조직세포 가운데 식작용을 하는 세포들이 이들을 탐식하여 KS-PCR 검사에서 검출되었을 가능성이 있다. 혈액 내 변형체가 유주할 가능성도 배제할 수 없지만, 식세포의 식작용(Phagocytosis)이 각 조직 내 병원체 혹은 세포 잔체(cell debris)를 제거하는 주기능이라 본다면(Esteban *et al.* 2015) 식세포 내의 유전자가 검출될 가능성도 클 것으로 생각된다. 이후 혈액표본의 형태학적 추가 분석이 이루어져야 할 것이다.

고정근육으로부터 KS-PCR 검사를 실시한 결과, 1, 2, 3번 샘플은 음성, 4, 5, 6, 7번 샘플은 양성으로 확인되었다(Fig. 3). 포르말린 고정된 근육조직을 대상으로 KS-PCR 검사를



**Fig. 3.** KS-PCR products loading image at gel electrophoresis of the formalin fixed muscle tissue. M: marker, 1-7: sample number, +: positive control (356 bp), -: negative control.

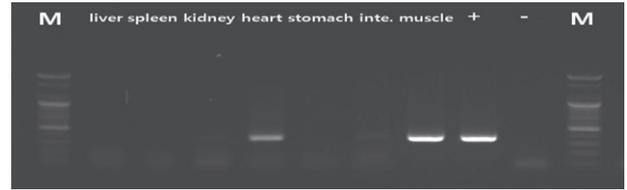
실시했을 때는 포자가 관찰되었던 4, 5, 7번에서 양성밴드가 확인되었으며, 포자가 확인되지 않은 6번 개체에서도 약한 밴드가 확인되었다. 나머지 포자가 확인되지 않았던 1, 2, 3번 개체에서는 양성밴드가 확인되지 않았다. 7개체 모두 초기 생체 근육조직 샘플에서 모두 양성밴드가 확인된 샘플들이지만 고정샘플로부터 KS-PCR 검사를 하였을 때 결과가 달라진 것은 포르말린에 의한 유전자독성(Mert *et al.* 2015)이 근육 내의 변형체나 원형질체에서 작용하였을 것으로 추정한다.

**2. 각 장기에서의 KS-PCR 검사 결과**

MB염색에서 포자가 뚜렷하게 확인된 대표개체(#74044)의 각 장기(간, 비장, 신장, 심장, 위, 소장, 근육)에 대한 KS-PCR 검사 결과, 간, 비장 그리고 위 조직에서는 음성이었으며 신장과 소장에서는 매우 약한 양성밴드가, 그리고 심장과 근육에서 비교적 명확한 양성밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이전 보고(Yokoyama *et al.* 2015)에서도 근육, 혈액과 함께 심장에서의 KS-PCR 검사결과에 대하여 언급하였다. 그러나 심장 조직 내에서 포자가 관찰되는지에 관해서는 검토하지 않았다. 본 연구에서 조직표본의 관찰 결과 근육에 포자가 존재하여도 심장조직에서는 포자가 관찰되지 않는 것을 확인하였다. KS-PCR 검사에서 비교적 강한 양성반응이 나타난 것은 심장 내 혈구세포가 풍부하기 때문이며 혈액분석에 대한 고찰과 일치하는 내용이 적용될 것으로 생각된다. 또한 소장과 신장에서 약한 양성밴드가 확인된 것은 이들 장기의 조직 내에 *K. septempunctata*의 변형체나 원형질체를 탐식한 유주성의 대식세포가 위치할 가능성이 있기 때문으로 여겨진다.

**3. 조직학적, 분자조직학적 관찰 결과**

H&E 염색을 실시하여 관찰한 결과, 근육조직 이외의 다른 장기에서는 포자의 형성이나 조직변성이 관찰되지 않았다. 근육조직의 경우, KS-PCR 검사에서 연한 양성밴드로 확



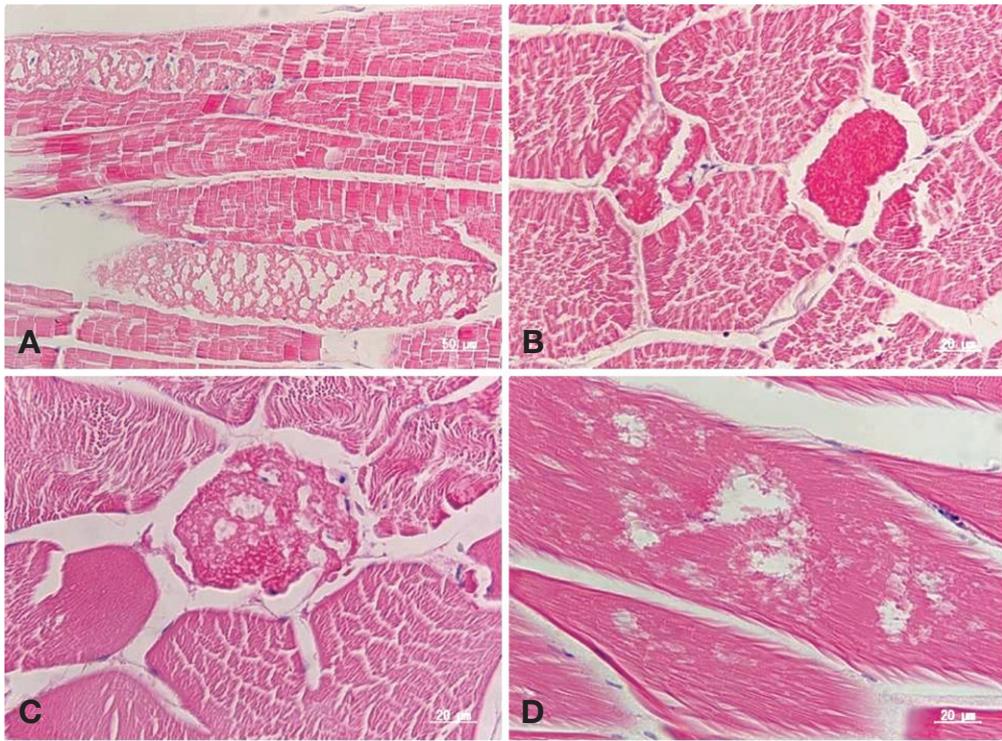
**Fig. 4.** KS-PCR products loading image at gel electrophoresis of the various organs of #74044. M: marker, inte.: intestine, +: positive control (356 bp), -: negative control.

인되면서 포자가 확인되지 않는 개체의 경우, 근섬유의 괴사로 인해 근섬유 다발이 용해된 것과 같은 조직변성이 관찰된다(Fig. 5). 겔 전기영동에서 명확한 양성밴드가 확인되면서 포자가 확인되는 개체의 경우는 근섬유 내에 포자가 성숙되기 전의 중간단계로 보이는 세포들과 근섬유 괴사부위가 관찰되거나 성숙포자의 집락인 슈도시스트(pseudocyst)가 명확히 확인된다(Fig. 6). 같은 근육조직을 사용하여 ISH를 실시한 결과(Fig 7), 근섬유에서 공포가 관찰되면서 명확한 포자가 관찰되지 않는 경우는 Fig. 7A와 같이 괴사부위에서 발색반응을 관찰할 수 있었으며, 명확한 포자가 확인되는 경우는 Fig. 7B와 같이 슈도시스트에서 강한 발색반응이 확인되었다.

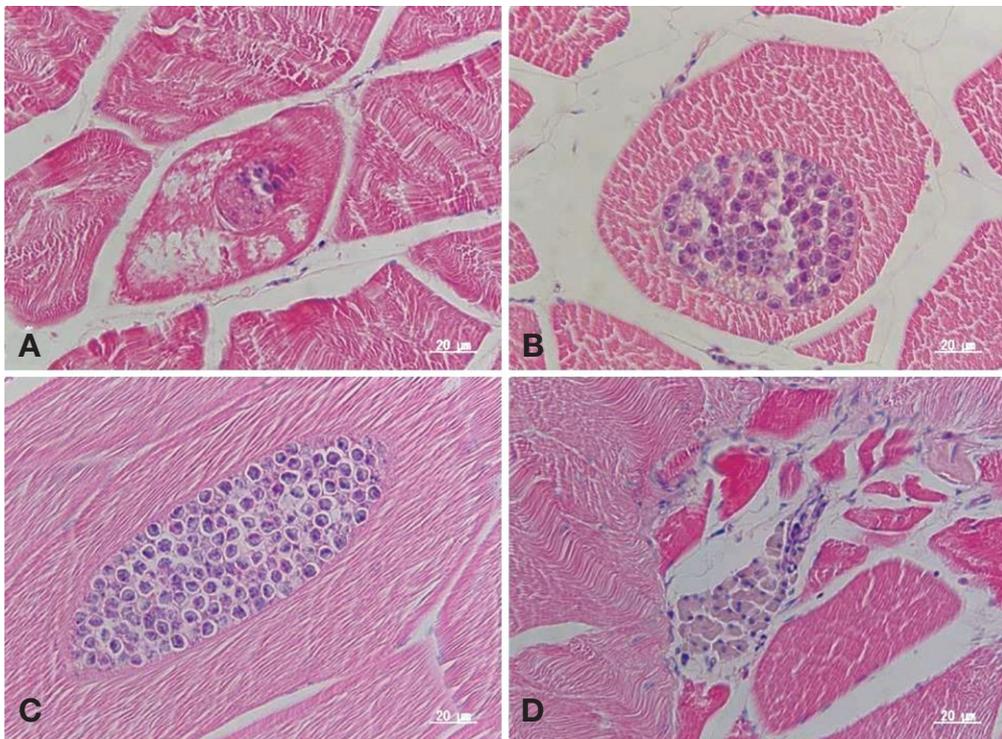
근육조직에 대한 H&E 염색의 조직학적 관찰 결과, 모든 개체에서 외관상에 이상은 없었으나 KS-PCR 검사에서 양성인 근육에 포자가 관찰되지 않는 개체의 근육조직에서, 진행 정도는 다르지만 근섬유 단위로 괴사가 관찰되었으며(Fig. 5A, B). 간혹 이 괴사된 근육조직 사이로 포자의 전 단계로 추측되는 세포가 관찰되기도 하였다(Fig. 5C, D). KS-PCR 검사에서 양성인 포자가 관찰되는 개체의 경우, 근섬유의 괴사와 함께 괴사된 근육의 조직 내에서 포자가 형성되고 있는 것이 관찰되었으며(Fig. 6A) 성숙포자가 pseudocyst를 형성하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6B, C). 간혹 근육조직 내 대식세포(macrophage)의 집락이 관찰되기도 한다(Fig. 6D). 이것은 조직 내에서 포자를 형성하기 이전 단계의 변형체나 괴사세포를 대식세포가 탐식하기 위한 조직세포의 움직임을 보여주는 것으로 생각된다.

근조직의 괴사가 있거나 슈도시스트가 있는 조직표본에 대하여 ISH를 실시하였을 때도 양성반응이 괴사부위와 슈도시스트에서 모두 관찰되었다(Fig. 7). 근섬유 다발의 괴사부위 내에 *K. septempunctata*의 변형체 혹은 미성숙포자가 분포하는 것으로 판단되었다. 그러나 이들 세포의 종류와 수에 따라 유전자가 양적으로 적을 때는 ISH의 반응성이 약해, 관찰이 어려운 경우도 있다.

이상의 실험개체에 대한 검사결과를 각 개체의 체장, 체중



**Fig. 5.** H&E stain for muscle tissue showed KS-PCR positive bands and non-containing spore. A: Muscle tissue of #67603 (bar = 50  $\mu$ m), B: Muscle tissue of #67603 (bar = 20  $\mu$ m), C: Muscle tissue of #67603 (bar = 20  $\mu$ m), D: Muscle tissue of #74595 (bar = 20  $\mu$ m).



**Fig. 6.** H&E stain for muscle tissue showed clear KS-PCR positive bands and containing spores. A: Muscle tissue of #67217 (bar = 20  $\mu$ m), B: Muscle tissue of #73799 (bar = 20  $\mu$ m), C: Muscle tissue of #67217 (bar = 20  $\mu$ m), D: Muscle tissue of #73799 (bar = 20  $\mu$ m).

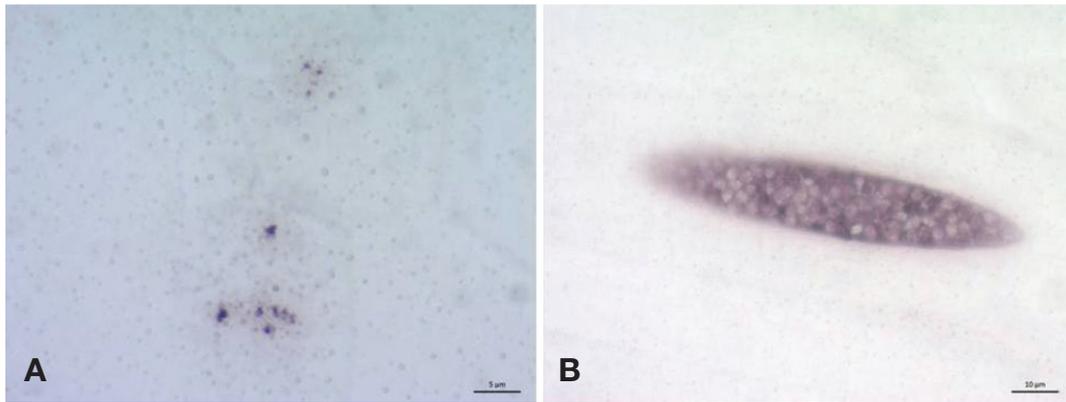


Fig. 7. A: ISH reaction about muscle tissue of #74595 (bar = 5 µm), B: ISH reaction about muscle tissue of #73799 (bar = 20 µm).

Table 1. The individuals (7 fishes) information and the results of KS-PCR and MB stain

No.	Chip #	TL (cm)	BW (g)	Live muscle KS-PCR	MB stain	Blood KS-PCR	Fixed muscle KS-PCR
1	67603	41.5	685	++	N	+	-
2	74576	40.5	652	++	N	week +	-
3	67838	40	687	+	N	very week +	-
4	74044	40	634	++++	Y	-	++
5	73799	41.5	450	++++	Y	-	++
6	74595	41	605	+	N	week +	+
7	67217	41.5	652	+++	Y	very week +	++
P				+		+++	+++

N: spores not detected, Y: spores detected, P: positive control

과 함께 Table 1에 요약하여 정리하였다.

대부분 *Kudoa*속의 점액포자충은 근육을 포함한 장기에 시스트(cyst)를 형성하는 조직기생성(histozoic)이며, 일부 종에서는 근섬유 내에 슈도시스트(pseudocyst)를 형성하여 근육액화(myoliquefaction)를 나타내기도 한다(Moran *et al.* 1999; Matsukane *et al.* 2010; Yokoyama 2016). *K. septempunctata*는 근육조직 내 pseudocyst를 형성하지만 숙주의 염증반응을 유도하거나, 넙치에 외관상 병적증상을 나타내지 않는 것으로 보고하고 있다(Matukane 2010). 인체에 해를 미치는 것은 그 포자로부터 나오는 포자의 원형질(sporoplasm)이 사람의 장상피에 침입하여 장조직을 자극하므로써 복통, 구역질, 구토, 설사 등의 식중독 증세를 유발하는 것으로 알려져 있다(Ohnishi *et al.* 2013b). 실질적으로 6~7개의 극낭을 가지는 포자의 집락인 pseudocyst가 넙치의 근육에 큰 자리를 차지하고 있는 단계는 *K. septempunctata*의 생활사에서 매우 안정적으로 장기간 숙주(넙치) 조직 내 기생하기 위한 단계라고 보이며 이 단계 이전의 다른 형태로도 당연히 숙주 내에서 존재할 것으로 생각하였다. 그러나 *K. septempunctata*가 사람에게 피해를 주는 단계는 넙치 근육조직 내에서 10<sup>6</sup>개/g 이상의 포자를 함유하고 있을 때라는 것이 실

험적으로 보고되어(Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan) 감염에 대한 확인이 식중독 유발 한계치의 확인에 대한 검사에 초점을 맞추고 있다. 즉, KS-PCR 검사를 실시하였을 때 양성밴드가 확인되지만 포자가 검출되지 않는 개체의 경우는 논외가 되는 경향이다. *K. septempunctata*의 감염으로 근육 내 염증반응이 외부증상으로 인식될 만큼 심하게 진행되는 경우는 없으나 근육 내 포자가 형성되면 근육의 질적 영향을 미치므로 식품으로써 가치가 하락하게 된다. 이후 혈액과 근섬유 내에서 *K. septempunctata*의 변형체가 ISH로 확인되는지, 쿠도아 변형체(plasmodium)에 대한 식작용(phagocytosis)과의 관련성에 관한 더욱 면밀한 조사를 해 보아야 할 것이다.

## 적 요

*Kudoa septempunctata*에 대한 PCR 검사에서 양성으로 확인된 개체를 조직 내 포자가 확인된 개체(3마리)와 포자가 확인되지 않은 개체(4마리)를 선별하여 순치 후 혈액과 조직검사를 실시하였다. 혈액에 대하여 PCR 검사를 실시하여

포자가 명확하게 확인되었던 2개체에서는 음성이 확인되었으며, 다른 5개체는 감도는 각각 차이는 있었지만 양성으로 확인되었다. 포자가 확인된 개체의 각 장기(간, 비장, 신장, 심장, 위, 소화관, 근육)에 대하여 PCR 검사를 실시한 결과, 심장과 근육에서 명확한 양성이 나타났다. 근육조직의 H&E 염색과 ISH를 실시하여 *K. septempunctata*의 감염으로 근섬유에 괴사가 발생하고, 이 부위에 포자의 슈도시스트가 형성되는 것을 확인하였으나 심한 염증반응을 유도하지는 않는 것이 확인되었다. 이후 혈액에 대한 더욱 면밀한 조사가 필요할 것으로 보이며, 연구내용은 넙치양식에서의 쿠도아감염증의 예방과 구제를 위한 기반자료가 될 것으로 기대된다.

## 사 사

이 논문은 2017년도 수산과학연구사업(R2017064) 지원을 받아 수행되었습니다.

## REFERENCES

- Alvarez-Pellitero P and A Sitjà-Bobadilla. 1993. Pathology of Myxosporidia in marine fish. *Dis. Aqua. Org.* 17:229-238.
- Chun SK. 2006. 5. Myxosporidiosis. In *Fish Parasitology*. pp. 123-178. SUSANTIMES (in Korean).
- Do JW, NS Lee, SH Jung, KK Kim, HS Choi, JW park and YC Kim. 2013. Histopathologic characterization of viral pathogens in cultured Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, using in-situ hybridization methods. *J. Fish Pathol.* 26:163-171.
- Esteban MÁ, A Cuesta, E Chaves-Pozo and M José. 2015. Phagocytosis in Teleosts. Implications of the new cells involved. *Biology* 4:907-922.
- Grabner DS, H Yokoyama, S Shirakashi and R Kinami. 2012. Diagnostic PCR assay to detect and differentiate *Kudoa septempunctata*, *K. thyrssites* and *K. lateolabracis* (Myxozoa, Multivalvulida) in muscle tissue of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 338:36-40.
- Kawai T, T Sekizukak, Y Yahata, M Kuroda, Y Kumeda, Y Lijima, Y Kamata, Y Sugita-Konishi and T Ohnishi. 2012. Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. *Clin. Infect. Dis.* 54:1046-1052.
- Kristmundsson Á and MA Freeman. 2014. Negative effects of *Kudoa islandica* n. sp. (Myxosporidia: Kudoidae) on aquaculture and wild fisheries in Iceland. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 3:135-146.
- Lee N-S, JW Do, YC Kim and JW Park. 2009. Characterization of virus distribution in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*; Temminck and Schlegel) infected with Megalocytivirus. *J. Comp. Pathol.* 141:63-69.
- Matuskane Y, H Sato, S Tanaka, Y Kamata and Y Sugita-Konishi. 2010. *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporidia: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. *Parasitol. Res.* 107:865-872.
- Mert R, A Çağlan Karasu Benili and G Aslan. 2015. Determination of histological and genotoxic effects of formalin on Nile tilapia (*Preochromis niloticus* L.). *Aquac. Res.* 46:2798-2807.
- Ministry of Health, Labor and Welfare, [http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/120607\\_01](http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/120607_01)
- Moran JDW, DJ Whitaker and ML Kent. 1999. A review of the myxosporean genus *Kudoa* Meglitsch, 1947, and its impact on the international aquaculture industry and commercial fisheries. *Aquaculture* 172:163-196.
- Ohnishi T, M Fujiwara, A Tomaru, T Yoshinari and T Sugita-Konishi. 2016. Survivability of *Kudoa septempunctata* in human intestinal conditions. *Parasitol. Res.* 115:2519-2522.
- Ohnishi T, H Furusawa, T Yoshinari, A Yamazaki, K Hori-kawa, Y Kamata and Y Sugita-Konishi. 2013a. Electron microscopic study of *Kudoa septempunctata* infecting *Paralichthys olivaceus* (Olive flounder). *Jpn. J. Infect. Dis.* 66:348-350.
- Ohnishi T, Y Kikuchi, H Furusawa, Y Kamata and Y Sugita-Konishi. 2013b. *Kudoa septempunctata* invasion increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer. *Foodborne Pathog. Dis.* 10:137-142.
- Shin SP, K Zenke, H Yokoyama and T Yoshinaga. 2015. Factors affecting sporoplasm release in *Kudoa septempunctata*. *Parasitol Res.* 114:795-799.
- Song JY, MJ Kim, Choi, H-S Choi and SH Jung. 2014. Monitoring *Kudoa septempunctata* in Cultured Olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Different Regions in Korea in 2013. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* 47:611-621.
- Takeuchi F, Y Ogasawara, K Kato, T Sekizuka, T Nozaki, Y Sugita-Konishi, T Ohnishi and M Kuroda. 2016. Genetic variants of *Kudoa septempunctata* (Myxozoa: Multivalvulida), a flounder parasite causing foodborne disease. *J. Fish Dis.* 39:667-672.
- Yokoyama H, M Lu, K Mori, J Satoh, T Mekata and T Yoshinaga. 2015. Infection dynamics of *Kudoa septempunctata* (Myxozoa: Multivalvulida) in Hatchery-produced Olive

- flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol. 50:60–67.
- Yokoyama H, N Funaguma and S Kobayashi. 2016. In vitro inactivation of *Kudoa septempunctata* spores infecting the muscle of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Food-borne Pathog. Dis. 13:21–27.
- Yokoyama H. 2016. Kudoosis of Marine Fish in Japan. Fish Pathol. 51:163–168.
- Yoshiko S, S Hiroshi and O Takahiro. 2014. Novel foodborne disease associated with consumption of raw fish, Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Food Safety 2:141–150.

Received: 13 September 2017

Revised: 18 October 2017

Revision accepted: 19 October 2017