

뱀장어 *Pleistophora* 症의 感染實驗과 病理組織學的 研究

徐壯雨 · 田世圭

釜山水產大學 · 水族病理學科

The Infection Experiment of *Pleistophora* to eels, *Anguilla japonica* and the Histopathological Investigation of the Infection Development

Jang-Woo SUH, Seh-Kyu CHUN

Department of Fish Pathology

National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-023, Korea

Pleistophora disease is well known as microsporidiosis at eel cultural farms in Korea in recent years.

Major objects of this study were to undertake the induction of *Pleistophora* infection experimentally and to carry out histopathological investigation from December 1984 to June 1986.

Experimental infection of *Pleistophora* spores into young eels was carried out by oral and immersed administration.

Both methods induced the same symptom successfully as that in naturally occurring diseased fish.

Remarkable whitish lesions developed mainly on the body surface around the abdomen when orally administered. On the other hand, they were scattered over the whole body when administered through immersion.

Histopathological investigation revealed that some cysts in the muscle were observed 21 days after administration.

Spores were developed within the cyst. Each sporont has undergone several nuclear divisions to form a pair of multinucleate cells (Sporoblasts) enclosed within a common coat (Pansporoblast).

All stages were surrounded by cyst. The cysts were destroyed and mature spores were scattered in the muscle.

緒 論

우리나라 내수면 養殖魚類中 뱀장어는 高級 蛋白質 供給源으로서 重要한 養殖魚類이다. 이 뱀장어 養殖은 近來 全國的으로 盛行하고 있지만, 國內需要의 增加로

供給이 不足한 實情이다. 그러한 가운데서도 뱀장어 養殖에 따른 疾病의 擴散으로 말미암아 斃死量이 增加하여 供給의 不足은 加重되어 蛋白質供給的인 面에서나 養殖業者의 收入面에서 큰 損害를 입고 있다. 그 中에서도 不治의 病으로 알려진 孢子蟲類인

Pleistophora 症은 全國養鰻場에 流行되고 있으며 그 被害는 대단히 크다. 이 病은 *Pleistophora* 屬의 微孢子蟲이 魚體筋肉에 寄生하여 筋肉이 融解되고 體表面에 明白한 凹凸現象이 나타나며 當年生이나 2年生 鰻장어에 發生하는데 商品價値가 떨어지고 먹이를 먹지 않기 때문에 致命的인 被害를 받는다.

이와같은 微孢子蟲 *Pleistophora* 病에 對한 詳細한 研究가 아직 이루어져 있지 않은 實情이므로 本 研究는 感染方法과 感染量, 感染率의 關係, 病理組織學의 變화를 밝히고, 나아가 治療 및 豫防을 위한 基礎 研究로서 行한 實驗을 報告하는 바이다.

材料 및 方法

本 實驗은 1984年 12月 24日부터 1986年 6月 24日 까지 釜山水產大學 魚病診斷研究室에서 行하였으며 實驗方法은 다음과 같다.

實驗魚: 實驗에 使用한 鰻장어(*Anguilla japonica*)는 魚病診斷研究室에서 飼育中이던 未感染된 鰻장어(平均體重 1.6g)를 使用하였다.

感染實驗用 孢子: 感染實驗에 使用한 孢子는 여러 養鰻場에서 *Pleistophora* 病症狀이 뚜렷한 鰻장어의 筋肉患部를 切取하여 筋肉患部속의 cyst에서 孢자를 多量얻었고 筋肉組織을 除去하기 위하여 生理食鹽水를 加한 後 가아제로 濾過하였다. 이 濾過液을 3,000 rpm, 10分間 遠心分離하여 沈澱된 孢子蟲體에 生理食鹽水를 加한 後 冷藏庫(5°C)에 保存하면서 感染實驗에 使用하였다. 孢子數는 形態上 成熟孢子로 보이는 個體만을 헤아려 求하였다. 本 實驗에 使用한 孢子들 中에서 小孢子에 해당하는 것은 觀察되지 않았고, 成熟된 大孢자의 形態는 Hoshina(1951)가 報告한 것과 同一하였으며 크기는 5.0~10.5×3.5~6.0μm로서 약간의 차이가 있었다.

感染方法: 感染實驗에는 經口感染과 沈澱感染의 2가지方法을 使用하였다.

① 經口感染

平均體重 1.6g의 鰻장어를 20마리 收容한 60×30×45cm(물 70ℓ)크기의 水槽에 魚體重의 1~2%에 해당하는 飼料로 孢子混合飼料(1.0×10⁶, 5.0×10⁴, 2.5×10³ cells/ 魚體重 1~2%의 飼料(g))를 만들어 投與하여 感染시켰다.

② 沈澱感染

孢子數를 1×10³, 5×10³, 2×10³, 1×10⁴, 2×10⁴, 5×10⁴, 1×10⁵, 2×10⁵70ml가 되도록 段階別로 懸濁시킨 水槽에 鰻장어 치어를 收容하여 感染시켰다. 感染

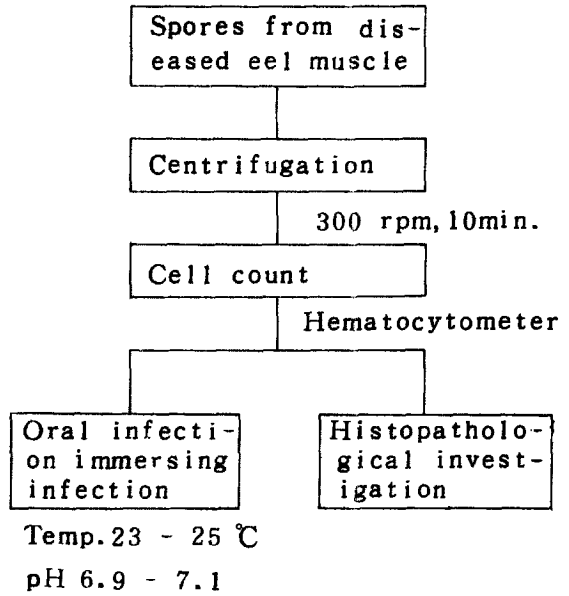


Fig.1. Scheme for *Pleistophora* infection of *Anguilla japonica*.

Table 1. Comparison of microspore size

Spore	Mean size(μm)
<i>Pleistophora anguillarum</i> (Hoshina, 1951)	
macrospore	6.7-9×3.3-5.3
microspore	2.8-5×2-2.9
Present spore	5.0-10.5×3.5-6.0

試驗用 水槽(60×30×45cm, 물 70ℓ)에는 孢子가 通過할 수 있는 循環濾過裝置를 設置하여 平均 1.6g의 鰻장어 치어를 100尾씩 넣었다. 水温은 23~25°C로 유지시켰고, pH는 6.9~7.1이었다. 飼育期間中 換水는 하지 않았다.

感染魚의 判定: 感染狀態의 確認은 肉眼的 및 病理組織學의 方法을 利用하였다. 즉, 感染實驗開始 後 7日부터 77日까지의 實驗期間 中 肉眼的으로 體表에 된 病變部가 나타나지 않는 個體中에서도 病理組織學의 變화를 觀察하여 1個의 cyst라도 보이는 個體는 感染魚로 判定하였다.

病理組織學의 觀察: 病理組織學의 變화過程을 調査하기위하여 使用된 感染鰻장어는 60日동안에 7日間 隔으로 2마리씩 10% 中性 formalin에 固定하고 常法

에 따라 4 μ m paraffin 切片을 만든후 Hematoxylin-Eosin stain 染色하여 檢鏡하였다.

結 果

1. 感染方法和 感染率

經口感染實驗 結果는 Table 2에 나타낸 바와 같이 投與한 孢子數가 2.5 $\times 10^3$ ~1.0 $\times 10^6$ cells/魚體重[1~2%의 飼料(g)]범위에서는 3實驗區 모두 100%의 感染率을 보였다. 經口感染魚는 孢子가 感染된 後 20日傾부터 腹部筋肉에 흰 病變部를 形成하였고, 이런 症狀은 投與孢子數가 增加함에 따라 많은 個體에서 나타났고, 症狀이 나타나는 時間도 1.0~10 $\times 10^6$ cells 投與區는 20日傾, 2.5 $\times 10^3$ cells 投與區는 30日傾에 나타났다.

Table 2. Infection test by oral administration of *Pleistophora anguillarum* spores to ell

*No. of spores administrated	No. of fish tested	Rate of infection(%) (30 days after administration)
1.0 $\times 10^6$	20	100
5.0 $\times 10^4$	20	100
2.5 $\times 10^3$	20	100
Control ^b	20	0

Note : Administrated orally one time the first day of the experiment.

* : Mixed with feed of 1-2% body weight.

沈漬感染實驗 結果는 Fig. 2에 나타낸 바와 같다. 2 $\times 10^5$ ml 孢자를 懸濁시킨 水槽의 鰻장어는 7日以内に 100% 感染되었고, 14日以内に 100% 斃死되었다. 1 $\times 10^6$ ml 孢자를 懸濁시킨 水槽의 鰻장어는 7日以内に 80%가 感染되었고, 14日以内に 100% 斃死되었다. 2 $\times 10^4$ ml 孢자를 懸濁시킨 水槽의 鰻장어는 7日과 14日以内に 各各 50%, 90%의 感染率을 보였고 21日以内に 100% 斃死되었다. 1 $\times 10^4$ ml 孢자를 懸濁시킨 水槽의 鰻장어는 7日, 14日, 21日以内に 各各 50%, 90%, 100%의 感染率을 보였고 28日以内に 100% 斃死되었다. 2 $\times 10^2$ ml 孢자를 懸濁시킨 水槽의 鰻장어는 21日, 28日, 35日, 42日以内に 各各 5%, 25%, 80%, 100%의 感染率을 보였다. 그리고 49日以内に 100% 斃死되었다. 5 $\times 10^2$ ml 되도록 孢자를 懸濁시킨 水槽의 鰻장어는 49日, 56日, 63日以内に 各各 40%, 60%, 100%의 感染

率을 보였고 77日以内に 100% 斃死되었다. 1 $\times 10^2$ ml 되도록 孢자를 懸濁시킨 水槽의 鰻장어는 49日, 56日, 63日以内に 各各 20%, 20%, 100%의 感染率을 보였고 77日以内に 100% 斃死되었다.

2. 病理組織學的 觀察

孢자를 感染시킨後 鰻장어 病理組織學的인 變化過程과 肉眼的 觀察結果를 보면 다음과 같다.

感染 後 21日째의 個體의 筋肉에서는 侵入한 *Pleistophora anguillarum* 孢자와 核分裂이 일어난 球形, 方錘形의 初期schizont(多核性 分裂全體) 및 分裂成長中인 schizont를 觀察할 수 있었다(Fig. 3, 4). 이 때 鰻장어의 游泳能力은 조금씩 低下됨과 同時に 바닥에 停滯하여 있는 個體가 增加하였다.

感染 後 28日傾이 되면, 鰻장어의 體表面에 흰 病變部가 생기는 個體가 나타나기 시작하게 되는데, 病理組織標本에서는 筋肉組織內에 求刑 또는 卵形의 pansporoblast膜이 形成되고 그 內部에는 schizont로부터 核分裂과 增員生殖過程을 거쳐서 生成된 多數의 sporont(孢子 母細胞)가 들어있었다(Figs. 5, 6).

感染 後 42日이 經過하면 鰻장어의 筋肉組織內에서는 cyst가 더욱더 크게 자라게 되고 cyst內部는 大部分 sporoblast(孢子細胞)와 孢자로 차있었다. 그리고 cyst는 크기는 40~50 μ m 정도에 이르렀다(Fig. 7). 흰 病變部의 筋肉組織은 變形되어 橫紋이 不分明해지고 홀으러졌으며 硝子變性을 일으키는 것도 있었다. 寄生狀態가 더 진행되면 흰 病變部는 全表皮로 擴散되면서 몸통筋肉 곳곳에 不規則한 陸起部分이 생기기 시작하였다. 이런 部分의 筋肉의 cyst의 成熟으로 인하여 崩壞되었으며 孢자가 分散되어 周圍의 大部分의 筋肉組織을 融解시켰고 遊走細胞의 浸潤現象도 볼 수 있었다. 이러한 症狀을 나타내는 鰻장어는 죽기 시작하였는데 그 斃死比率은 時間의 經過와 함께 增加되어 56日이 經過하였을 때는 150尾中 13尾(8.6%)만 살아남았다. Cyst內部에는 成熟된 孢자가 充滿되어 肥大하게 되고 큰 cyst는 70~80 μ m에 달하는 것도 觀察되었다(Fig. 8). 이런 症狀이 惡化되면 먹지도 잘 먹지 않았으며 등부위가 굽어지는 個體도 생겼다. 重病의 個體는 筋肉組織이 完全히 崩壞되었고 이 때부터 힘없이 非正常的인 游泳을 하게 되었다. 그리고 經口的으로 感染시킨 個體에서는 腹部周邊에 cyst를 많이 形成한 반면, 沈漬感染시킨 個體에서는 自然感染魚와 같이 全身에서 cyst를 觀察할 수 있었다.

考 察

本 實驗에 使用하기 위하여 *pleistophora*症에 感染

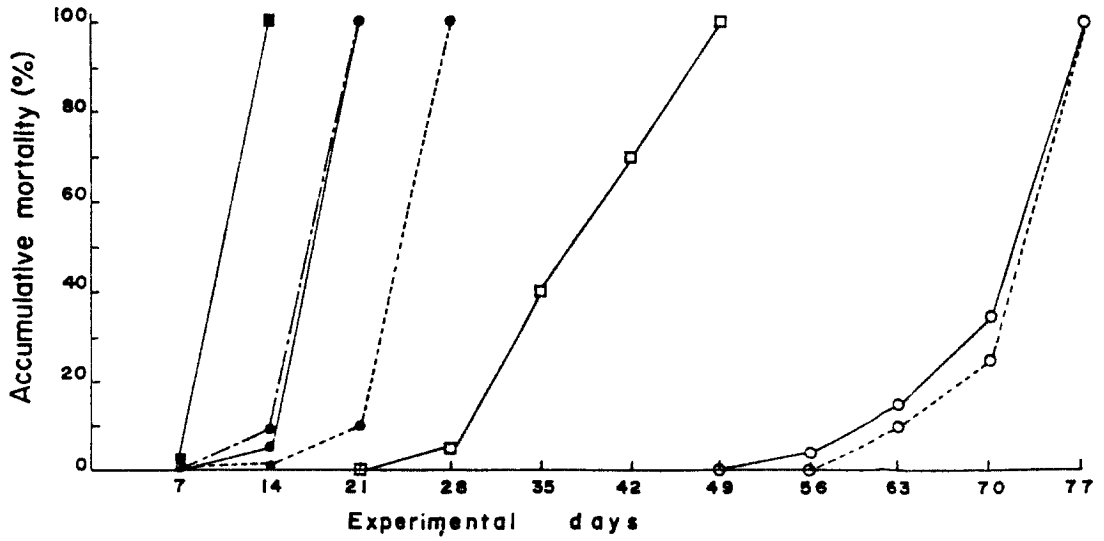
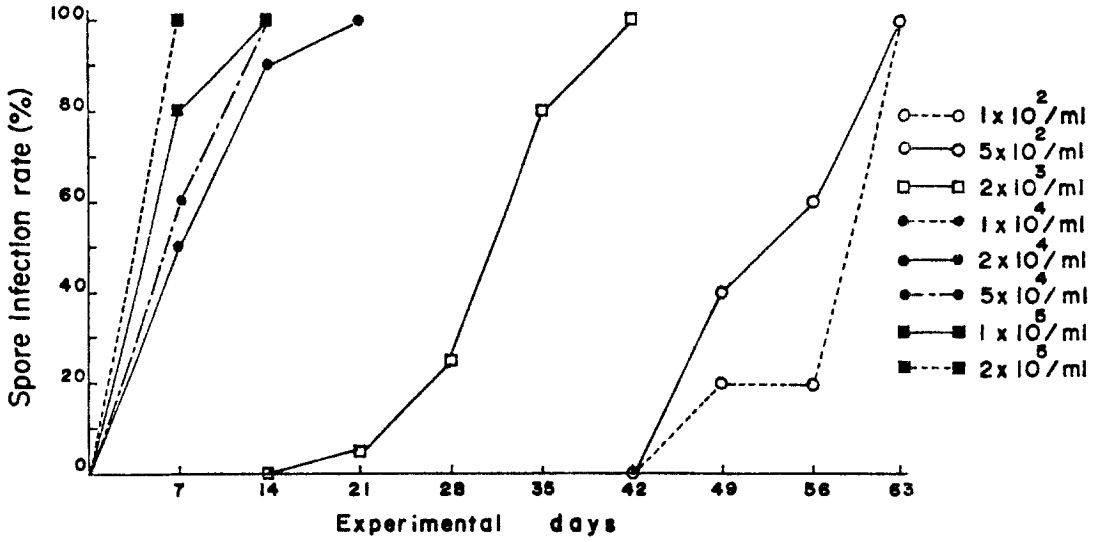


Fig. 2. Spore infection rate and accumulative mortality of infected eel by water-borne method.

된 뱀장어에서 分離한 胞子の 크기(5.0~10.5×3.5~6.0 μ)는 Canning(1980) 등이 報告한 *Pleistophora typicalis*(7.5×3.0 μ m), Hoshina(1951)가 報告한 *Pleistophora anguillarum*(6.7~9×3.3~5.3 μ m)의 胞子크기와 비슷하였고 胞子形態는 Fig.1에 나타난 바와 같이 Hoshina(1951)와 Hashimoto(1976)가 報告한 것과 같은 모양이었다.

잘 알려진 胞子蟲에는 잉어의 아가미에 寄生하는 *Myxobolus* sp., 뱀장어의 表皮에 寄生하는 *Myxidium* sp. 등이 있으나, 뱀장어의 筋肉內에 寄生하는 *pleistophora* 胞子蟲과는 寄生하는 場所와 胞子の 形態 등으로 구별이 可能하였다.

Pleistophora 胞子は 水温에 따라 發育狀態가 달라서 15℃以下 일 때는 거의 發育, 發病되지 않고, 15~30℃에서는 發育하여 症狀가 나타난다. 그리고, 水温이 높을수록 빠르게 나타나며, 水温이 25℃ 前後일 때는 感染 20日頃에 肉眼으로 볼 수 있는 症狀가 나타나서 高水温性으로 알려져 있다. 그런데, 대부분의 뱀장어 養殖은 加温循環濾過式이므로 年中 發病하기 때문에 본 感染實驗에서도 實驗水温을 23~25℃에서 行하였다. 이것은 加納(1982) 등이 *Pleistophora* 胞子發生, 成長, 繁殖의 過水温을 20℃라고 報告한 内容에 符合한다고 할 수 있다.

經口感染이나 沈漬感染의 實驗結果에 의하면 두 方法으로 모두 感染이 成立되었다. 經口的 感染浦口數 2.5×10³/魚體重 1~2%의 飼料(g)과 沈漬感染胞子數 1×10³ml에서도 100% 感染되었다.

Hoshina(1951)가 밝힌 胞子形成課程과 이번 病理組織學的 實驗結果는 거의 비슷하였다. *Pleistophora* 胞子の 增殖課程은 筋肉組織內에서 核이 여러번 分裂한 無性生殖期の 繁殖體인 schizont가 形成되었고, 이 schizont는 2分裂에 依하여 多數의 單核體를 形成하고 그 各各이 sporont로 되는 發育課程을 거쳤다. Sporont는 그 核이 分裂하여 16個以上の sporoblast로 만들어지고 宿主細胞內에 形成된 pansporoblast內에서 spore가 形成되었다.

Pleistophora 症의 代表的인 症狀中의 하나인 筋肉이 울퉁불퉁해지는 現象은 cyst가 筋肉을 大部分 崩壞시켜 正常的인 筋肉組織이 거의 融解되었을때 肉眼的으로 나타나는 症狀이었고 이 症狀는 表皮에 흰 病變部가 생긴 後 나타났다. 울퉁불퉁해지는 症狀가 더 惡化되었을때 表皮에 潰瘍을 形成하였는데 이 潰瘍을 통하여 成熟된 胞子が 外部로 배출되었으므로 養鰻場에서 胞子の 擴散을 막기 위해서는 *Pleistophora* 症에 感染된 뱀장어는 곧 除去하는 것이 有益하다고 생각된다.

病理組織學的 實驗에서 胞子が 形成되는 全體的인

進行課程은 加納(1982) 등이 實驗한 것과 거의 같이 나타났다.

앞으로 *Pleistophora* 症의 藥劑治療實驗이 實施되어야 하겠으며 免疫에 對한 研究도 아울러 檢討되어야 할 課題이다.

要 約

全國養鰻場에 *pleistophora* 胞子蟲이 寄生하여 상당한 被害를 입고 있는 實情이다. *Pleistophora* 症에 關한 基礎研究로서 感染方法和 感染量, 感染率의 關係 및 病理組織學的 觀察를 檢討한 것으로 結果는 다음과 같다.

1. *Pleistophora anguillarum* 胞子를 經口感染시키거나 沈漬感染시킨 結果, 모두 感染이 成立되었다. 經口感染의 경우 胞子數 2.5~10³/魚體重 1~2%의 飼料(g) 以上에서, 沈漬感染의 경우 胞子數 1×10³ml 以上에서 感染시킨 個體는 100% 感染되었다.

2. 病理組織學的 實驗結果, 胞子感染後 21日頃부터 筋肉속에서 cyst를 觀察할 수 있었다. 筋肉組織內에서 胞子が 筋肉을 融解시켜 cyst를 形成하고 cyst는 成熟하여 崩壞되었고, cyst內의 胞子는 分散되었다. 그리고, 健康한 筋肉組織에 侵入하여 組織을 崩壞하는 課程이 進行됨에 따라 病魚는 徐徐히 죽게 되었다.

3. *Pleistophora anguillarum* 胞子를 實驗적으로 感染시킨 뱀장어는 時間的인 差異는 있으나 모두 斃死되었다.

文 獻

- Canning, E. U. & J. P. Nicholas(1980) : Genus *Pleistophora* (phylum Microspora) : Redescription of the type species, *Pleistophora typicalis* Gurley, 1893 and ultrastructural characterization of the genus. J. Fish Diseases 3, 317~338.
- 田世圭(1985) : 魚病學(原蟲病). 第一文化社, pp. 187-190.
- 江草周三(1978) : 魚의 感染病. 恒星社 厚生閣, pp. 424~434.
- 橋本康平·佐佐木幸夫·瀧澤弘(1976) : ウナギに寄生する *Pleistophora anguillarum* 胞子の極小彈出條件, 日本志 42, 837-845.
- 橋本康平·瀧澤弘(1976) : ウナギに寄生する *Pleistophora anguillarum* 胞子の電子顯微鏡的觀察. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. (4), 411~9.
- 保料利一(1972) 臺灣產種苗ノナギに見らたる *Pleistophora anguillarum* の感染. 魚病研究 6(2), 120.

- Hoshina, K. (1952): Notes on some myxosporidian parasites on fishes of Japan. J. Tokyo Univ. Fish. 39, 68-89.
- 猪木正三(1981): 原生動物圖鑑, 講談社アユのグルギア, pp. 581-589.
- 加納熙正・福井晴朗(1982): ウナギの プリスユトホラ病に 關する研究-I.

- 實驗的感染法の検討とフマジリンの効果について魚病研究 16(4), 193-200.
- Richard, R. Kudo (1971): Protozoology. CHARLES C THOMAS Publisher. pp. 807-826.
- 高橋誓・江草周三 (1977): アユの グルギア病に關する研究-III. グルギア病と水温の 關係. 魚病研究11, 195-200.

EXPLANATION OF PLATE

- Fig. 1. Fresh spores of *Pleistophora anguillarum* prepared for administration (x400).
- Fig. 2. The spores in the muscle at 21 days after administration (x400).
- Fig. 3. Schizonts with several nuclear divisions at 21 days after administration (x400).
- Fig. 4. Multinuclear schizonts in the muscle at 21 days after administration (x400).
- Fig. 5. Small cysts in the muscle at 28 days after administration (x400).
- Fig. 6. Cysts containing schizonts, sporonts at 28 days after administration (x400).
- Fig. 7. Panspotoblasts in the muscle containing sporoblasts, spores at 42 days after administration (x600).
- Fig. 8. Well developed cysts containing spores at 56 days after administration (x400).
- Fig. 9. Disintegrating cysts at 56 days after administration showing the degenerative muscle fibres and the scattered spores (x200).

