

酸化된 飼料에 의한 잉어의 病理組織學的 症狀과 glutathione 添加效果

閔應植 · 田世圭

釜山水產大學校 魚病學科

Effect of Glutathione on the Histopathological Changes Caused by Oxidized Diets in the Carp, *Cyprinus carpio*

Eung-Shik MIN, Seh-Kyu CHUN

Department of Fish Pathology, National Fisheries
University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

Nutritional ceroidosis accompanied with histopathological changes such as myopathy and visceral ceroidosis, was experimentally induced by feeding the oxidized feed with the peroxide value of 98meq/kg, to common carp resulting in some mortalities of carp.

To see the effect of treatment survivors of the above fish were orally administered by feeding diets containing daily doses of 3mg and 6mg of glutathione per kg fish for 10 days or 20 days.

While control and 3mg dosage group retained visceral ceroidosis and showed evidence myopathy histo pathologically, the fish treated with 6mg of glutathione for 20days showed obvious reduction of macrophages of ceroid in the viscera.

緒 論

최근 몇년 사이에 댐호나 저수지 등지의 잉어 또는 향어 가두리 養殖이 盛해짐에 따라 配合飼料의 수요가 急增하고 있다. 이로 因하여 配合飼料 中の 主蛋白質源인 白色魚粉의 供給量이 絶對적인 不足으로 褐色魚

粉을 原料로 하여 生産되는 정어리등을 많이 利用하게 되었다. 이와같이 配合飼料를 長期間 保管한 것이나 酸化된 것을 投與하게 되면, 잉어는 成長이 둔하되거나 停止되면서 體色이 검어져 한 두마리씩 죽게 된다.

이러한 현상이 나타나는 原因을 Ferguson *et al.* (1990), Roald and Armstrong(1981), Smith(1979), Yo-

82 Effect of glutathione

kote(1970) 등은 飼料속에 含有된 脂質의 過酸化물이 生成되는데 이것은 魚類에 有毒하며, 이때 生成된 hydroperoxide(HPO)의 有毒作用으로 잉어의 各 臟器에 ceroid가 蓄積되어 ceroid症으로 進行되는 것을 볼 수 있다. 그러나 일단 魚類의 臟器에 形成된 ceroid症은 魚類 스스로 除去시킬 수 없으므로 養殖 現場에서는 酸化 飼料의 投與로 인한 經濟的 손실이 많으므로 이에 대한 對策이 절실히 要求되고 있는 실정이다.

本 研究에서는 잉어의 내장에 形成된 ceroid를 除去하는 方法을 研究하기 위하여 飼料에 glutathione (商品名: Atomorate powder 1kg 中 glutathione 20g 含有)을 添加한 후 잉어에 먹임으로서 나타나는 治療 效果를 觀察하였다.

材料 및 方法

Ceroid症을 發生시키는데 사용할 酸化飼料는 다음과 같은 方法으로 製作하였다. 즉, 市販되는 잉어용 配合飼料 4號 pellet를 2個月間 常溫에서 放置하였다가 넓은 판자에 펴두고 선풍기로 24 시간 通風하면서 酸化시켜 過酸化物價를 98 meq/kg으로 增加시켰다.

酸化飼料 中の 過酸化物價는 二和油脂株式會社의 分析室에 依頼하여 測定하였으며 그 課程은 다음과 같다. 즉, 酸化飼料의 過酸化物은 속실흔으로 抽出한 抽出油를 試料로 하여 調査하였으며, 試料 약 10 mg을 精密히 달아 溶劑 50 g에 完全히 溶解시킨 後 指示藥 1-2 방울을 加한 後 30 秒間 持續적으로 粉紅色이 될

때까지 N/10-KOH· ETOH를 標準液으로 適定하였다. 이때, 使用한 溶劑는 benzene과 ethanol을 1:1의 比率로 混合한 것이며, 指示藥은 1% Phenolphthalein 이었다.

$$\text{過酸化物價} = \frac{5.611 \times F \times A}{\text{試料의 무게(g)}}$$

A : N/10-KOH 標準液의 消費 ml

F : N/10-KOH· ETOH의 factor

그리고, ceroid症의 誘發 對象인 잉어(30 g 내외) 30 마리를 室內 循環濾過式水槽(30×90×45 cm)에 각각 10 마리씩 收容하였으며, 上記한 酸化飼料를 4個月間 投與하여 ceroid症을 發生시켰다.

Ceroid症이 確認된 향어에 대해서는 glutathione을 添加한 配合飼料를 投與하여, 魚體內에 沈着된 ceroid症의 變化 課程을 調査하였다.

즉, ceroid症이 發生된 향어를 上記한 水槽別로 各各 10 마리씩 收容하고 glutathione (Atomorate powder)을 3 mg(0.05%)/kg fish/day 및 6 mg(0.1%)/kg fish/day가 되도록 Table I에 나타낸 성분조성의 配合飼料에 添加하여 10日間, 20日間 投與하였다. 이때 使用된 配合飼料는 良好한 것으로 過酸化物價는 25.1meq/kg이었으며, 日間飼料投與量은 魚體重의 3% 이었고 飼育 水溫은 26±1°C이었다.

酸化飼料를 投與한 향어의 ceroid症 發生 與否를 確認하는데에는 肝臟, 脾臟 및 腎臟을 檢査 試料로 하여 病理組織學的 方法을 利用하였다. 그리고 glutathione의

Table 1. Composition of the diet on the experimental diets

	diet		
	control	1	2
Crude protein	42.0	42.0	42.0
Crude fat	3.0	3.0	3.0
Calcium	1.6	1.6	1.6
Phosphate	1.6	1.6	1.6
Crude cellulose	4.0	4.0	4.0
Ash	17.0	17.0	17.0
Vitamin complex	1.0	1.0	1.0
Glutathione(Atomorate powder)	0	3mg(0.05%)	6mg(0.1%)
POV(meq/kg)	25.1	25.1	25.1

投與 效果를 알아보기 위해서는 glutathione 投與 10日 後 및 20日 後에 各各 아래와 같이 內臟의 病理組織學的 檢査 및 循環血液의 血液學的인 分析을 實施하였다.

採血 後 魚體로부터 肝臟, 脾臟 및 腎臟을 절취하여 10% formalin 液에 고정하였으며 常法에 따라 5 μ m 파라핀 切片을 만들어 Hamatoxylin-Eosin 染色을 하여 光學顯微鏡으로 觀察하였다.

採血 하루 前은 絶食시켰으며 痲酔한 處理 注射器와 無處理 注射器를 使用하여 對照群, 3mg 또는 6mg의 glutathione을 投與한 魚의 尾部靜脈에서 痲酔시키지 않고 採血하였다. 血清 分解用 血液은 室溫에 30分間 放置한 後 3,000rpm 15分間 원심분리하여 血清을 分離하였으며 4°C에 保管하였다.

그리고 分離 血清은 4時間 以內에 生化學 實驗에 使用하였다. 또한 血液의 性狀을 알아보기 위하여 RBC의 수 및 Hematocrit를 測定하였다.

結 果

Ceroid症을 發生시키기 위하여 實驗魚에 過酸化物 價가 높은 酸化飼料를 4個月간 投與한 後, 內臟의 病變을 病理組織學的으로 調査한 結果는 Plate I의 1-6에 나타난 것과 같다. 調査한 組織內에서는 뚜렷한 ceroid의 沈着을 볼 수 있었으나, 內臟別로는 肝臟의 경우 ceroid가 微細한 粒子狀으로 實質細胞內에 沈着되어 있어서 量의 比較가 힘든 반면, 脾臟이나 腎臟에는 褐色, 또는 黑色의 沈着物이 큰 덩어리로 組織內에 形成되어 있으므로 쉽게 그 量을 알 수 있었다.

Plate I의 1-3은 各各 다른 魚의 脾臟 組織標本으로서 脾臟內의 ceroid 沈着이 뚜렷한 것을 알 수 있는데, 이 정도의 ceroid 沈着은 養殖場에서 斃死되고 있는 魚體에서 볼 수 있는 量에 해당된다고 할 수 있다.

Plate I의 4-6은 各各 다른 魚의 腎臟 組織標本으로서 ceroid量은 脾臟에 비하여 적지만 褐色 또는 黑色의 덩어리가 組織 사이에 沈着되고 있는 것으로 나타났다.

이상에서 본 바와 같이 酸化飼料를 投與한 魚의 脾臟이나 腎臟에 많은 ceroid가 沈着된 것을 確認하고 이들을 實驗魚로 使用하여 glutathione의 治療試驗을 實施하였다.

對照 試驗區

良好한 配合飼料에 glutathione을 3mg 添加하여 10日間 投與한 結果는 Plate II(1-6)와 같다.

Plate II의 1-3에 나타난 各各의 魚의 脾臟에는 褐色의 ceroid 덩어리가 크게 나타나고 있으나 Plate I의 對照群에 比하면 縮小되고 있으며, 가장자리에 얇은 膜이 形成되어 있는 것을 볼 수 있었다.

Plate II의 4-6에서 볼 수 있는 魚의 腎臟 組織標本에서도 ceroid 沈着은 보이나 Plate I의 對照群에 比하여 減少된 것을 알 수 있다.

1. 實驗區

良好한 配合飼料에 glutathione을 6mg 添加하여 10日間 投與한 結果는 Plate III(1-6)과 같다.

Plate III의 1-3의 脾臟에는 黃褐色 ceroid가 沈着되고 있으나 그 量이 減少되었으며, 脾臟組織의 變性도 찾아 볼 수 없었다.

Plate III의 4-6의 脾臟組織에 있어서도 散發的으로 ceroid 粒子가 沈着되어 있음을 알 수 있었다.

2. 實驗區

良好한 配合飼料에 glutathione을 6mg 添加하여 20日間 投與한 結果는 Plate IV(1-6)과 같다.

Plate IV의 1-3은 脾臟이며, ceroid는 散發的으로 少量만 分布되어 있으며 큰 덩어리는 觀察되지 않아서 正常에 가까운 것으로 보였다.

腎臟組織인 Plate IV의 4-6에도 微粒子의 ceroid는 觀察되었으나 큰 덩어리는 觀察되지 않았다. 脾臟組織의 ceroid가 血管으로 移行되는 것이 觀察되었다.

이상과 같이 glutathione을 配合飼料에 6mg 添加하여 20日間 投與한 實驗區의 結果가 病理組織學的으로 보아 가장 有效한 것으로 나타났다 (Table 2).

配合飼料에 glutathione을 一定量 添加한 後 10日間 投與한 各 實驗區의 血液 性狀을 調査한 結果는 Table 3과 같다.

Hematocrit 값은 모든 實驗區에서 27.5-30.5%의 範圍를 나타내어 큰 差는 없었다. 總蛋白質量도 2.5-2.6mg/dl로서 實驗區 사이의 큰 差異가 나타나지 않았다. 總 cholesterol量은 112.7mg/dl로서 glutathione을 添加하지 않은 對照 試驗區에서는 높은 값을 나타내었으나 1 및 2 實驗區와 같이 glutathione을 添加한 魚體에서는

84 **Effect of glutathione**

Table 2. Summary of histopathological findings in carp

group	control			1			2 ¹⁾			3 ²⁾		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Ceroidosis												
liver	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
kidney	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+
spleen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+
Melanosis												
liver	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
kidney	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-	-	-
spleen	+++	+++	+++	++	++	++	-	+	-	-	+	-

¹⁾Feeding for 10 days

²⁾Feeding for 20 days

- : no change, + : mild, ++ : moderate, +++ : severe

Table 3. Hematological condition and serum constituents of the fish fed experimental diets for 10 days

	Normal (池田 등, 1986)	control	1	2
Hematocrit (%)	28.9±3.9	27.5	30.5	28.0
Total protein (mg/dl)	3.5±0.3	2.6	2.5	2.5
Total cholesterol (mg/dl)	163±37	112.7	92.3	97.6
Glucose (mg/dl)	46.3±9.8	25.4	25.4	31.6
GOT	52.0±3.8	90.0	57.0	46.5
GPT	11.0±7.9	35.5	30.0	23.0

各各 92.3-97.6mg/dl로서 若干 減少한 것을 알 수 있다.

Glucose 값은 對照 實驗區가 25.4mg/dl, 1 實驗區는 25.8mg/dl, 2 實驗區가 31.6mg/dl로서 glutathione을 많이 添加한 것이 正常에 가까운 값을 나타내었다.

GOT 活性은 glutathione을 添加하지 않은 對照 實驗區에서는 90.0 單位로서 높은 값을 나타내었으나, 1 實驗區는 57 單位였고, 2 實驗區는 46.5 單位로 對照 實驗區에 비하여 減少되었다.

GPT 活性도 glutathione을 添加하지 않은 對照 實驗區는 35.5 單位로 높았으나, glutathione을 添加한 1 實驗區는 30.0 單位로서 減少되었고 2 實驗區도 23.0 單位로서 對照 實驗區에 비하여 많이 減少되었다.

Glutathione을 配合飼料에 添加한 後 20日間 먹인 各 實驗區의 血液性狀을 調査한 結果는 Table 4와 같다.

Ht 값은 對照 實驗區가 27.5, 1 實驗區가 30.0, 2

實驗區가 28.0이어서 서로 類似한 것으로 나타났다.

總蛋白質量은 對照 實驗區가 2.6mg/dl, 1 實驗區가 2.7mg/dl, 2 實驗區가 2.4mg/dl로서 類似한 값을 나타내었다. 總 choloesterol 값도 對照 實驗區가 120.9mg/dl, 1 實驗區가 122.4mg/dl, 2 實驗區가 111.6mg/dl로서 2 實驗區에서 다른 實驗區에 비하여 若干 減少하였으나 큰 差를 나타내지는 않았다.

Glucose 값은 對照 實驗區에 있어서 32.0mg/dl였고, 1 實驗區에서는 27.5mg/dl, 2 實驗區가 33.0mg/dl로서 서로 類似한 값을 나타냈다.

GOT 活性을 보면 對照 實驗區에서 71.5 單位였고, 1 實驗區가 64.0 單位로 減少되었으며, 2 實驗區는 더욱 減少되어 49.0으로 正常値와 같았다.

GPT 活性도 對照 實驗區가 39.0 單位, 1 實驗區가 33.5, 2 實驗區가 18.5 單位를 나타내어 glutathione의

添加量에 따라서 큰 差異를 볼 수 있었다.

考 察

최근 잉어용 配合飼料에 널리 使用되고 있는 정어리 魚粉에는 酸化되기 쉬운 高度不飽和 脂肪酸이 많이 含有되어 있으므로 魚體 養殖時 有意해야 할 問題點이 많다. 왜냐하면 高度化 不飽和 脂肪酸이 酸化되어 形成된 過酸化 脂質은 魚類에 毒性을 나타내기 때문에, 잉어의 myopathy症(官崎와 窪田, 1981), 잉어의 seko-keosis(Yokote, 1970) 또는 大西洋 연어의 ceroidosis(Roald and Armstrong, 1981)를 誘發시키고 있다. 그리고 油脂의 酸化 程度는 過酸化物價(POV)로써 表現하는데, 이들의 各種 分解產物이 魚類에 毒性을 나타내므로써 各 臟器의 機能 障害를 일으킨다(Smith, 1979; 坂口와 浜口, 1979; Ferguson et al., 1990).

本 實驗에 있어서도 酸化된 配合飼料를 4個月間 投與한 結果 향어의 肝腸, 脾臟이나 腎臟에 많은 量의 ceroid가 沈着되어 있었으나 解剖하여 보면 肉眼的으로 뚜렷한 病變 部位를 찾아 볼 수 없다. 그러나 病理 組織標本을 觀察하게 되면 脾臟이나 腎臟에 큰 덩어리로 ceroid가 細胞 사이에 또는 細胞內에 沈着되어 있으며, 部分的인 實質細胞의 壞死나 組織의 病變이 나타난데 반하여 肝腸에는 微粒子の ceroid가 細胞 사이에 또는 細胞內에 分布되고 있었으며 重症인 境遇에는 肝 實質細胞內에 顆粒狀으로 沈着되고 있었다.

이와 같이 脾臟이나 腎臟에서는 ceroid가 덩어리 모양으로 沈着되는데 비하여, 肝臟에서의 ceroid 沈着 狀態는 顆粒狀의 散在型으로 存在하는 것은 肝臟의 ceroid 沈着 程度가 脾臟이나 腎臟보다 떨어진다고 하기

보다는 臟器別 機能狀 조직구나 macrophage 등과 같이 ceroid의 食食役割을 하는 細胞의 數에 差異가 나는 것도 關係가 있을 것으로 생각된다.

血液 性狀 檢查의 結果인 Table 3에서 볼 수 있는 바와 같이 對照 實驗區 GOT의 값이 90.0으로서 正常值인 52.0에 비하여 월등히 높았고, 또한 GPT의 값도 對照區가 35.5인데 비하여 正常值는 11.0에 不過하였다. 그러므로 肝臟에서의 ceroid 沈着이 散在型으로 出現한다고 하여도 坂口와 浜口(1979)의 見解와 같이 機能狀으로는 相當한 障害를 받고 있는 것으로 判斷된다.

Glutathione 添加 飼料를 投與한 實驗 結果를 보면 Table 3에서와 같이 10日間 投與했을 때에는 各 實驗區 모두에서 큰 效果를 볼 수 없었으나 Table 4에 나타날 것과 같이 20日 投與群에서는 상당히 效果가 있는 것을 볼 수 있었다. 특히 glutathione 6mg을 20日間 投與한 實驗區에서는 各 臟器도 正常值에 가까운 값을 나타내었다.

따라서 酸化飼料의 投與로 인하여 향어에 나타나는 病變은 病理組織學的 檢查 結果 ceroid症으로 나타났으며, 이의 除去 또는 治療에는 glutathione 6mg을 20日 以上 投與한 것이 效果적인 것으로 思料되었다. 그러나 glutathione의 實際 使用時에는 抗生物質과의 병용으로 인한 問題點(高와 陣, 1988)등에 관하여 檢討가 進行되어야 할 것으로 생각된다.

要 約

平均體重 30 g의 향어에 過酸化物價 98 meq/kg된 配合飼料를 4個月間 投與한 結果 이들 향어의 肝臟,

Table 4. Hematological condition and serum constituents of the fish fed experimental diets for 20 days

	Normal (池田 등, 1986)	control	1	2
Hematocrit (%)	28.9±3.9	27.5	30.5	28.0
Total protein (mg/dl)	3.5±0.3	2.6	2.7	2.4
Total cholesterol (mg/dl)	163±37	120.9	122.4	111.6
Glucose (mg/dl)	46.3±9.8	32.0	27.5	33.0
GOT	52.0±3.8	71.5	64.0	49.0
GPT	11.0±7.9	39.0	33.5	18.5

86 *Effect of glutathione*

脾臟, 腎臟에는 많은 ceroid가沉着되었다.

이를除去하기 위하여 glutathione을添加한飼料를投與하여 그治療效果를實驗하였다. 향어 1kg당 glutathione 有效成分을 1日 3mg 및 6mg 섭취시키고 10日 및 20日 後에 檢査한 結果 20日間 投與하면 治療效果가 뚜렷함을 알았다.

Glutathione을 6 mg, 20日間 投與한 향어의 血液性狀은 hematocrit 값, 總蛋白質量, 總 cholesterol量, glucose 값이 正常과 近似하였으며 非正常值였던 GOT, GPT 값은 正常值로 향하여 減少되었다.

參 考 文 獻

Ferguson, H. W., T. Poppe and D. J. Speare(1990)
: Cardiomyopathy in farmed Norwegian salmon. Dis. Aquat. Org. 8, 225-231.

고창순, 진 강(1988) : Medical index. 제 5 판. 한국
메디칼 인덱스사.

池田彌生·尾崎久雄·瀬崎啓次郎(1986) : 魚類 血液
圖鑑. 録書房.

官崎照雄·窪田三朗(1981) : 養殖魚の營養性ミオパ
チホー症候群に關する研究-V. 變敗蠶躡投與
によるユイの背こけ症狀. 三重大水産研報 8,
117-129.

Roald, S. O. and D. Armstrong(1981) : Histochemical,
fluorescent and electromicroscopical appear-
ance of hepatocellular ceroidosis in the Atlantic
salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis. 4, 1-14.

坂口宏海·浜口 章(1979) : 養殖マダいの生理學的研
究-II. 酸化油投與が血液, 肝すい臓成分など
に與える影響. 日本誌 45, 449-453.

Smith C. E. (1979) : The prevention of liver lipid
degeneration(ceroidosis) and microcytic anae-
mia in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richard-
son fed rancid diet : a preliminary report. J.
Fish Dis. 2, 429-437.

Yokote M. (1970) : Sekoke disease, spontaneous dia-
betes in carp, *Cyprinus carpio*, found in fish
farms I. Pathological study. Bull. Fre. Fish. Res.
Lab. 20(1) 39-72.

Explanation of Plates

Plate I

1, 2, 3 : Spleen in an advanced case.

Ceroid-laden macrophages appeared in the hematopoietic tissue. The formation of masses of macrophages. Phagocytiazing ceroid, lipoprotein, hemosiderin and melanin in the spleen. H & E stain×400

4, 5, 6 : Kidney in an advanced case.

Ceroid-laden macrophages appeared in the hematopoietic tissue. The formation of masses of macrophages. Phagocytiazing ceroid, lipoprotein, hemosiderin and melanin in the renal hematopoietic tissue. H & E stain×400

Plate II

1, 2, 3 : Spleen in an advanced case (exp. I).

Ceroid-laden macrophages appeared in the splenic pulp(arrows). H & E stain×400

4, 5, 6 : Kidney in an avanced case(exp. I).

Ceroid-laden macrophages appeared in the hematopoietic tissue. (arrows). H & E stain×400

Plate III

1, 2, 3 : Spleen in a moderate case(exp. II).

Masses of ceroid-laden macrophages decrease in number in the splenic pulp (arrows). H & E stain×400

4, 5, 6 : Kidney in a moderate case(exp. II).

Masses of ceroid-laden macrophages decrease in number in the hematopoietic tissue (arrows). H & E stain×400

Plate IV

1, 2, 3 : Spleen in a mild case(exp. III).

Ceroid-laden macrophages decrease in number in the splenic pulp (arrows). H & E stain×400

4, 5 : Kidney in a mild case(exp. III).

Ceroid-laden macrophages decrease in number in the hematopoietic tissue (arrows). H & E stain×400

6 : Kidney in a mild case (exp. III).

Ceroid-laden do not appear in the renal tubule.

Plate I

Plate II

Plate III

Plate IV