

## 어류 전염성췌장괴사증의 면역조직화학적 진단

김순복

경상대학교 수의과대학 동물의학연구소

### Immunohistochemical diagnosis of infectious pancreatic necrosis

Soon-Bok Kim

Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

**Abstract.** This experiment was carried out to establish the immunohistochemical diagnostic method for infectious pancreatic necrosis in the monolayers of CHSE-214 cell cultures and paraffin-embedded tissue sections from rainbow trout infected with infectious pancreatic necrosis virus(IPNV). Specific identification of IPNV antigens was often demonstrated in the pancreatic exocrine cells, and less in the intestinal mucous epithelia and the renal hemopoietic tissues by the use of monoclonal antibodies against capsid protein VP2. The specific reaction was seen as a distinct red cytoplasmic color, often as small granules of various sizes. The result showed that streptavidin alkaline phosphatase immunohistochemistry specifically identified IPNV antigens in both infected cell cultures and tissue sections.

*Key words:* Immunohistochemistry, infectious pancreatic necrosis

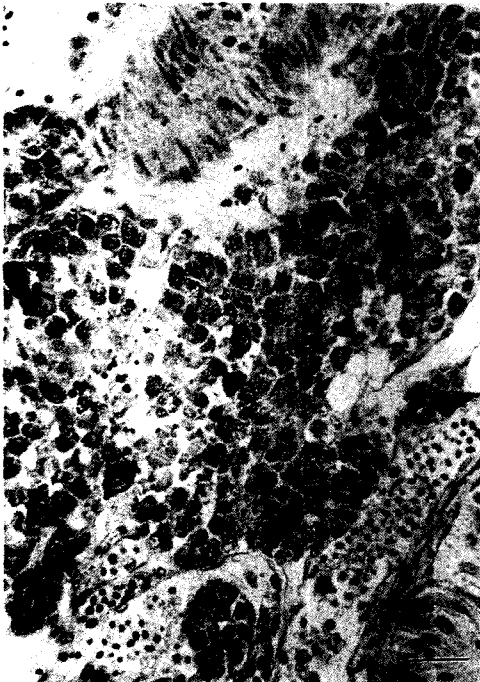
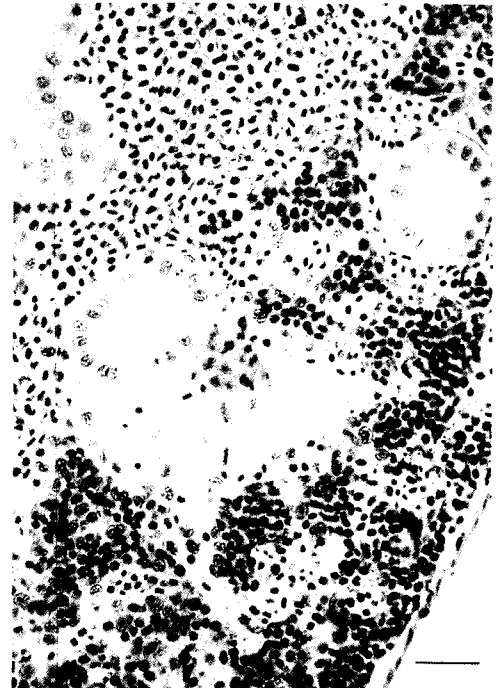
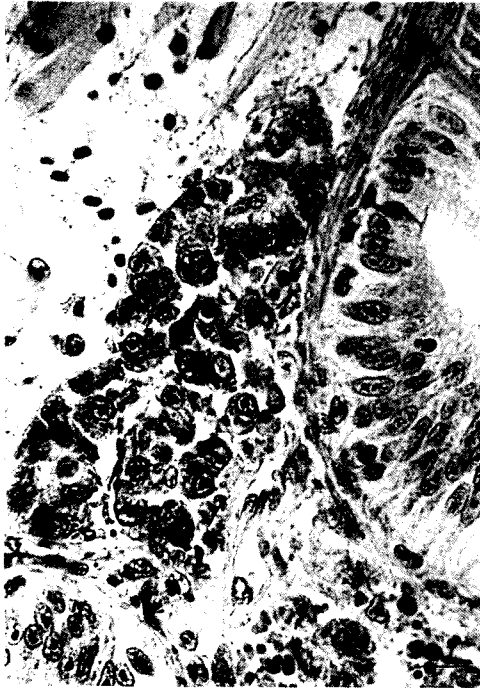
### 서론

어류양식업은 삼면이 바다로 둘러싸인 우리나라의 지리적인 여건과 불포화지방을 많이 함유하는 어육 소비량의 증가추세 및 국민의 높은 기호도 등을 감안할 때, 성장 잠재력이 매우 높다고 생각된다. 그러나 국내 어류질병연구는 양식산업의 성장속도에 비해 극히 부진하여 양식업 발달의 큰 저해요인으로 작용하고 있으며, 앞으로 어병연구에 수의학자들의 많은 참여가 요구된다.

전염성췌장괴사증은 급성카달성장염과 췌장의 괴사를 특징으로 하는 전염성 질환으로서 송어를 비롯한 내수면양식어종과 해수면의 연어에 피해가 많으며 갑각류에도 발생한다고 알려져 있다.<sup>1,3</sup> 전염성췌장괴사증바이러스(infectious pancreatic necrosis; IPNV)는 동남아는 물론 북미주와 유럽

등지에 광범위하게 분포되어 있으며<sup>11</sup> 우리나라에서도 오래전부터 상재하여 양식어장에 많은 피해를 일으키는 것으로 알려지고 있다.<sup>6</sup>

폐사율은 바이러스 혈청형, 숙주 및 환경요인 등에 따라 10% 미만에서부터 90% 이상에 이르기 까지 차이를 보이는데<sup>12</sup> 처음 이 병이 발생하는 양식장에서는 사료를 먹기 시작해서 2개월이 되지않은 치어에서 특히 높은 폐사율을 보이며, 감염개체에서는 임상적으로 피부착색, 심한 복부 팽대 및 나선상으로 돌면서 헤엄을 치는 증상을 관찰할 수 있다. 이 병은 수계를 통한 수평감염과 알을 통한 수직감염을 통해 전파되며 이병율이 대단히 높고 효과적인 치료법이나 예방백신이 개발되어 있지 않기 때문에 발병초기에 신속하게 진단하여 대책을 수립하는 것이 특히 요구되는 질병이다.<sup>3</sup>



**Fig. 1.** A inclusion body(an arrow) in the pancreatic exocrine cell. H&E. Bar=55 $\mu$ m.

**Fig. 2.** Hemopoietic necrosis and massive hemorrhages in the kidney. H&E. Bar=110 $\mu$ m.

**Fig. 3.** Positive reaction in the CHSE-214 cells inoculated with IPNV. Streptavidin alkaline phosphate immunostain and hematoxylin counterstain. Bar=110 $\mu$ m.

**Fig. 4.** Positive reaction in the pancreatic exocrine cells. Streptavidin alkaline phosphate immunostain and hematoxylin counterstain. Bar=110 $\mu$ m.

조직절편내에서 바이러스항원을 검출하여 단 시간내에 신속하게 확진할 수 있는 면역조직화학적 진단기법을 확립할 목적으로, IPNV를 접종한 CHSE24 단층배양세포와 자연감염송어의 파라핀포매 각종 장기조직절편에서 alkalinephosphatase 면역염색법<sup>7,10</sup>으로 IPNV항원을 검출하였다.

## 재료 및 방법

CHSE-214 세포를 Complete RPMI 배지에서 monolayer 를 형성되도록 슬라이드글라스위에 배양한 다음, IPNV(ATCC VR-1322,  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml) 접종하여 실온에서 1시간 감작한 후, 15°C에서 18-31시간 배양하여 면역염색에 사용하였다.

그리고 IPNV/VR299 감염이 확인된 20-30일령의 무지개송어(*Onchorhynchus mykiss*, Dr. Ristow, Washington State Univ.) 치어 2수와 본 병이 의심되는 국내발생에 5수를 공시하였으며, 4% phosphate buffered formalin 에 15시간 이상 고정된 후 파라핀포매 절편을 제작하고 통상방법에 의한 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였다.

배양세포의 면역조직화학적 염색을 위해서는 먼저 배양액을 버리고 PBS(0.1M sodium phosphate buffer solution) 로 1회 세척한 다음, 95% ETOH : glacial acetic acid(3:1) 용액에다 10분간 고정하여 건조 수세한 후, 4°C에 저장하면서 면역염색에 사용하였다. 포르말린에 고정된 감염조직은 통상방법에 의한 3-4um 두께의 파라핀절편을 제작하여 면역 염색하였다. 먼저 block 용액(Super Block TM, blocking buffer in PBS, No.37515, Pierce)으로 30분간 전처리하여 수세한 다음, 1차항체로서 2종의 항VP2 단클론성항체<sup>11</sup>를 dilution buffer(PBS+0.2% bovine serum albumin)에 100배 희석하여 1시간 감작시킨 후 10분간 수세하였다. 연결항체로서 biotinylated antimouse 면역혈청(DAKO LSAB 2 kit)을 10분간 처리한 다음, streptavidin alkaline phosphatase 으로 10분 감작하여 fast red 로 발색하였고, hematoxylin 으로 대조염색한 후에 glycerol mounting medium(DAKO No. C563) 으로 mounting 하였다.

## 결과 및 고찰

IPNV는 채장선상피에서 주로 복제되어 카탈 성장염과 채장선상피의 괴사를 주로 일으키며 감염치어는 움직이기를 싫어하고 피부색갈이 검게 변하면서 옆으로 눕거나 나선상으로 헤엄치기도 하며 종종 바닥에 가라앉기도 한다.<sup>3,5</sup> 본 실험예의 부검조건에서 피부의 착색과 장점막의 점액성 삼출을 관찰할 수 있었으며 장내에 내용물이 거의 없는 것으로 보아 사료를 잘 먹지 못한 것 같다. 병리조직학적으로는 채장 선상피세포의 지방변성과 핵농축, 붕괴, 용해 등의 괴사성변화를 흔히 관찰할 수 있었으며, 괴사부위는 한국성 또는 범발성으로 다양하였고, 괴사부위는 시간이 경과함에 따라 망상구조 대체되었고 종종 대식구와 다형핵백혈구 침윤이 관찰되었다. 그리고 채장 선상피 세포 절내에서는 종종 호염기성 A형 붕입체를 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 장점막에서는 점액성 내지는 출혈성 삼출과 장상피세포의 괴사 및 탈락을 흔히 관찰할 수 있었고 장의 과립세포층에서는 호산성 과립세포가 증가하였다. 신장에서는 증식성사구체 신염과 신장조혈소의 괴사와 출혈(Fig. 2)을 가끔 볼 수 있었으며, 이상의 결과는 일반적으로 전염성채장괴사증에서 관찰되는 병리학적 소견과 일치하였다.

면역조직화학적염색에서 IPNV를 접종한 CHSE214 단층배양세포에서 바이러스 항원의 존재를 나타내는 적색의 양성반응세포를 관찰할 수 있었으며(Fig. 3), 바이러스를 접종하지 않은 대조군 배양세포에서는 양성반응을 볼 수 없어 특이성이 높음을 확인할 수 있었다. 채장의 선상피 세포에서 적색으로 염색되는 바이러스 항원양성 반응세포를 많이 관찰할 수 있었으며(Fig. 4), 장 상피세포와 신장에서도 가끔 양성세포를 볼 수 있었다. 양성반응은 주로 변성되거나 괴사된 세포의 세포절내에서 많이 관찰되었으며, 흔히 다양한 크기의 미세한 과립상으로 보일 때가 많았다. 때로는 이러한 양성반응들이 세포 밖에서도 관찰되었으며 이는 괴사세포로부터 터져나온 바이러스항원이라고 생각된다. 그리고 건강한 대조군 치어로 부터 절취한 조직표본에서는 특이적인 양성반응을 관찰할 수 없었다. 본 실험에서 사용한 streptavidin alkaline phosphatase 면역염색법은 세포내 IPNV 항원을 검출하는데 있어 특이적

인 양성반응을 나타내었으며 전염성췌장괴사증 진단기법으로, 기존의 장기간을 요하는 바이러스 분리 동정법 대신에 널리 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 바이러스 항원양성반응세포의 분포는 인공감염 연어의 결과와 유사하였다.<sup>4</sup>

Birnavirus 에 속하는 IPNV는 알, 수정액, 분변을 통해 전파되며 야생어류에 바이러스가 존재하기도 한다. 성어는 생식기에서 바이러스가 잠복하고 있으면서 무증상 경과할 수 있으며, 알을 통해서 흔히 다른 양식장으로 전파된다. 최근에는 비오리(mergance)와 갈매기가 멀리 떨어진 강에까지 바이러스를 전파시키는 것으로 알려져 있다.<sup>1,2,8,9</sup> 우리나라에서 본 병에 의한 전반적인 피해실태가 보고된 것은 없지만, 냉수대 양식어종으로 국내에서 많이 양식되고 있는 무지개송어에서 피해가 큰 것으로 알려지고 있으며<sup>6</sup> 치어의 부화 및 유통단계의 엄격한 위생검사를 통한 전파경로의 차단이 절실히 요구된다고 하겠다

## 감사의 글

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

- Biering E, Bergh O. Experimental infection of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., yolk-sac larvae with infectious pancreatic necrosis virus: detection of virus by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Fish Dis* **19**:405-413, 1996.
- Bootland LM, Dobos P, et al. Experimental induction of the carrier state in yearling brook trout: a model challenge protocol for IPNV immunization. *J Immunol Immunopathol* **12**:365-372, 1986.
- Bruno DW, Poppe TT. A Color Atlas of Salmonid Disease. pp28-29. Academic Press, London, 1996.
- Evensen O, Rimstad E. Immunohistochemical identification of infectious pancreatic necrosis virus in paraffin-embedded tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Vet Diagn Invest* **2**:288-293, 1990.
- Ferguson HW. Systemic Pathology of Fish. 3rd ed., p139. Iowa State Univ Press, Ames, 1995.
- 진화영, 소병재 등. 국내 무지개송어의 전염성 췌장괴사증. *농사시험연구논문집(가축위생편)* **32**(3) : 57-63. 1990.
- 김순복, 서정향 등. 소결핵균의 면역세포화학적 동정. *대한수의학회지* **33**(1):119-123, 1993.
- Knott RM, Munro ALS. The persistence of infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic Salmon. *Vet Immunol Immunopathol* **12**:359-364, 1986.
- Lee MK, Blake SL, et al. Genomic variation of aquatic birnaviruses analyzed with restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol* **62**(7):2513-2520, 1996.
- 문운경, 김순복 등. 오제스키병의 생체 조기 진단을 위한 면역세포화학, in situ hybridization 및 전자현미경적 연구. *대한수의학회지* **36**(4):845-858, 1996.
- Plumb JA. Major diseases of striped bass and redbass. *Vet Hum Toxicol* **33**(suppl 1):34-39, 1991.
- Rimstad E, Poppe T, et al. Inoculation of infectious pancreatic necrosis virus serotype Sp did not cause pancreas disease in Atlantic Salmon(*Salmo salar* L.). *Acta Vet Scand* **32**: 503-510, 1991.
- Roberts RJ, Shepherd CJ. Handbook of Trout & Salmon Diseases. 3rd ed., p80. Blackwell Science, Oxford, 1997.
- Tarrab E, Berthiaume L, et al. Antigenic characterization of serogroup 'A' of infectious pancreatic necrosis virus with three panels of monoclonal antibodies. *J*

Gen Virol 74:2025-2030, 1993.

Request reprints from Dr. Soon-Bok Kim, Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju, Republic of Korea, 660-701. Tel. 0591)751-5816, Fax. 0591)751-5803, E-mail: sbk@nongae.gsnu.ac.kr