

양식대하(*Penaeus chinensis*) 감염 White Spot Baculovirus(WSBV)의 병원성 및 병리조직학적 특성

허문수[†] · 손상규*

제주대학교 해양생산과학부, *국립수산진흥원 진해내수면연구소

Pathogenicity and Histopathological Characteristics of White Spot Baculovirus(WSBV) in Cultured Shrimp, *Penaeus chinensis*

Moon-Soo Heo[†] and Sang-Gyu Sohn*

Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Cheju 690-756

*Chinhae regional Inland Fisheries Research Institute, NFDRI, Chinhae

The pathogenicity of the extracted WSBV from the hepatopancreas, the lymphoid organ, the stomach and the heart of infected shrimps was examined after artificial infection in shrimps(*Penaeus chinensis*). In terms of the infection route, the strength of the pathogenicity of WSBV was in the order of intramuscular, oral and dipping method. The influence of rearing water temperature on the pathogenicity of WSBV was the strongest in the order of 30°C, 25°C, 20°C, and 15°C. The isolated WSBV from the diseased shrimps showed very high pathogenicity regardless of their sizes, even though there was difference in time to reach 100% mortality. Degenerated cells characterized by hypertrophied nuclei were found in various tissues such as the lymphoid organ, the hematopoietic tissue and the epidermis in the stomach.

key word : WSBV, Intramuscular infection, Hypertrophied nuclei

1993년 초여름부터 발생한 양식 대하의 WSBV에 의한 대량 폐사가 1996년에는 폐사율이 거의 75%에 이를 정도로 피해가 많이 발생하였다(허등., 2000). WSBV에 감염된 새우는 두흉갑과 체표에 흰반점 증상이 나타나므로 병명을 일반적으로 white spot syndrome disease(WSSD)라고 하고 원인 바이러스를 WSBV라 일반적으로 명명하고 있고 이와 같은 증상으로 인한 새우의 대량 폐사는 아시아 전역에서 일어나고 있다(Chou *et al.*, 1995; Inouye *et al.*, 1996). 이 원인 병원체에 대하여 일본에서는 처음에는 RV-PJ(rod-shaped nuclear virus of *Penaeus japonicus*) 감염증이라 하였으나, 그 후 보리새우류의 급성 바이러스 혈증(penaetid acutes viremia:PAV)이라 하고 폐사 원인 바이러스를 PRDV(penaetid rod-shaped DNA virus)이라 하였으며(Inouye *et al.*, 1996), 중국에서는 이와 같은 새우 질병을 explosive epidemic disease이라 하고, 폐사 원인 바이러스를 HHNBV(hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus)라 하였다(Huang *et*

al., 1994). 따라서 본 연구에서는 양식 대하를 대량 폐사시키는 WSBV의 병원성과 병리조직학적 관찰을 하고자 하였다.

재료 및 방법

WSBV분리, 용액 제조 및 병원성

WSBV에 감염된 대하의 두흉부 조직중 간체장, 림프기관, 위 그리고 심장부위를 적출하여 유발에 넣고 10배량의 Tris-NaCl buffer(20 M Tris, 0.4 M NaCl, pH 7.4)를 첨가해서 저온 상태에서 마쇄한 후 7,000×g에서 15분간 원심분리(Sorvall, RC5C)하여 상층액을 수획하였다. 수획한 상층액은 20,000×g에서 2시간 초원심분리(Beckman L7)하여 Pellet을 만든 다음 3배량의 TN buffer로 재현탁해서 Sucrose(20~50% w/w)농도구배에서 200,000×g로 3시간동안 초원심분리하여 바이러스를 분리하였다. WSBV액의 제조는 상기 바이러스 감염 대하의 두흉부 조직을 적출하여 유발에 넣고 10배량

[†]Corresponding Author

의 멸균해수를 첨가해서 마쇄한 후, 7,000×g에서 원심분리하여 상층액을 수확하였다. 수확한 상층액은 0.45 μm membrane filter(Corning, Co. Ltd)로 여과해서 -85°C에 냉동보관하면서 침지 감염에 사용하였다.

주사 감염에서는 WSBV에 미감염된 대하(평균 체중 15 g) 10미의 복부근육 3절과 4절 사이에 냉동제조 보관한 WSBV액 0.1 ml/씩을 주사한 다음 150 l F.R.P.수조에 수용하고 새우 배합 사료를 급여 하면서 폐사 유무를 관찰하였다. 시험 기간 동안 사육 수온은 25±0.5°C로 유지하고 유수식으로 사육수를 1일 3~5회전 환수하였다. 대조구는 WSBV액 대신 멸균한 해수 0.1 ml를 주사하였다.

침지 감염에서는 WSBV에 미감염된 대하(평균 체중 15g) 10미를 150 l F.R.P.수조에 수용하고 WSBV액 5 ml/씩을 3일간 첨가하고 새우배합사료를 급여 하면서 폐사 유무를 관찰하였다. 시험 기간 동안 사육 수온은 25±0.5°C로 유지하고 사육수는 WSBV액을 첨가하여 2시간이 경과한 후부터 유수하여 1일 3~5회전 환수하였다. 대조구는 WSBV액을 첨가하지 않고 시험하였다. 경구 감염에서는 WSBV에 미감염된 대하(평균체중 15g) 10미를 150 l F.R.P.수조에 수용하고 WSBV에 감염된 대하의 두홍부 조직을 1일 3회씩 2일간 먹이고 난 후 새우 배합 사료를 급여하면서 폐사유무를 관찰하였다. 시험 기간 동안 사육 수온은 25±0.5°C로 유지하고 유수식으로 사육수를 1일 3~5회전 환수하고 대조구는 WSBV에 미감염된 대하의 두홍부조직을 1일 3회씩 2일간 급여하였다.

사육 수온별 병원성에서는 WSBV에 미감염된 건강한 대하(평균체중 15g) 10미를 150 l F.R.P.수조에 수용하고 히타로 수온을 가온해서 사육 수온을 15, 20, 25, 30°C로 조정된 후 경구 감염법으로 WSBV에 감염된 대하의 두홍부 조직을 1일 3회씩 2일간 먹인 다음 새우 배합 사료를 계속 급여하면서 사육 수온별 폐사율을 관찰하였다. 시험 기간 동안 유수식으로 사육수를 1일 3~5회전 환수하였으며, 대조구는 WSBV에 미감염된 대하의 두홍부 조직 대신 새우 배합 사료를 급여하면서 사육 수온별로 시험하였다.

대하 크기별 병원성에서는 사육 수온을 25±0.5°C로 조정된 150 l F.R.P.수조에 평균 체중 7, 13, 20 g인 건강한 대하 10미씩을 수용하고 경구 감염

법으로 WSBV에 감염된 대하의 두홍부 조직을 1일 3회씩 2일간 먹인 다음 새우배합 사료를 계속 급여하면서 새우 크기별로 폐사율을 관찰하였다. 시험 기간 동안 유수식으로 사육수를 1일 3~5회전 환수하였으며, 대조구는 WSBV에 감염된 대하의 두홍부 조직 대신 새우 배합 사료를 급여하면서 새우 크기별로 시험하였다.

WSBV감염 대하 병리조직

서해안 대하 양식장에서 WSBV에 감염된 대하를 채집하여 Davidson액에 고정하여 자연 감염된 시료로 사용하였고, 인위 감염의 시료로는 WSBV에 미감염된 건강한 대하(평균체중 8.7g) 20미를 150 l F.R.P.수조에 수용하고 사육 수온을 25±0.5°C로 조정된 후 WSBV에 감염된 대하의 두홍부 조직을 1일 3회씩 2일간 먹이로 투여한 다음 새우 배합 사료를 연속해서 투여하면서, 시험 기간중 새우의 유영 상태와 외부 증상을 육안적으로 매일 관찰하고 폐사 직전의 새우를 Davidson액에 고정하여 병리조직 시험에 사용하였다. 자연 감염된 대하와 인위 감염된 대하의 조직을 상법에 따라 조직 절편을 만들어서 hematoxyline-eosin 및 Giemsa염색을 실시하여 광학현미경으로 병리조직학적 관찰을 실시하였다.

결과 및 고찰

WSBV의 병원성

WSBV의 병원성을 감염 방법에 따라 비교하기 위해 시험한 결과, Fig. 1에서 처럼 WSBV액을 주사한 시험구에서는 감염후 2일째부터 폐사가 일어나기 시작하여 감염후 5일째 까지 전량 폐사하였으나, WSBV액 대신 멸균해수를 주사한 대조구에서는 시험 기간 동안 전혀 폐사가 일어나지 않았다. 이는 보리새우에서 보고된(Nakano *et al.*, 1994) WSBV의 병원성 시험에서는 1일째부터 폐사가 일어나 병원성이 본 바이러스에 감염된 것 보다 빠르게 병원성이 나타남을 보여주었고 전체 폐사되는 시점도 약간 지연됨을 볼 수 있었다. 이는 시험조건이나 새우의 종이 다름으로 기인한 것으로 여겨진다. WSBV에 감염된 두홍부 조직을 먹이로 투여한 경구 감염 시험구에서는 감염후 4일째부터 서서히 폐사가 일어나 감염후 10일째 전량 폐사하였으나,

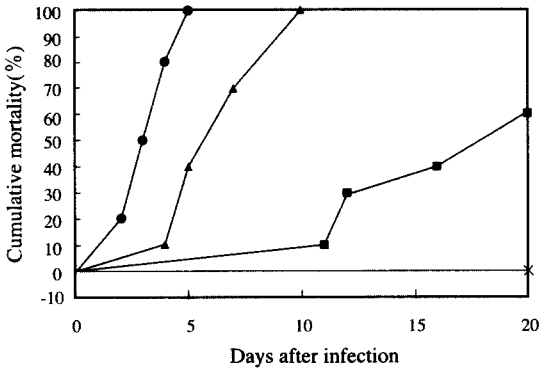


Fig. 1. Mortality of freshly shrimp by artificial infections with WSBV.

● : intramuscular, ▲ : oral. ■ : dipping, ★ : control.

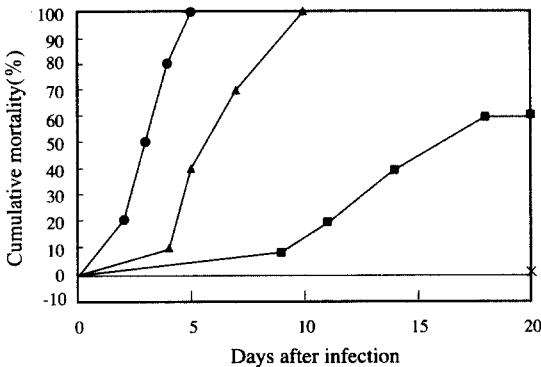


Fig. 2. Mortality of freshly shrimp infected with WSBV by water temperature.

● : 30°C, ▲ : 25°C, ■ : 20°C, ★ : 15°C and control(30, 25, 20, 15°C).

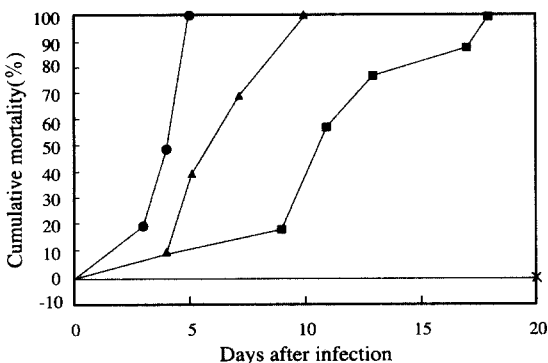


Fig. 3. Mortality of freshly shrimp infected with WSBV by body weight.

● : 7g, ▲ : 13g, ■ : 20g, ★ : control(7, 13, 20g).

WSBV에 미감염된 대하의 두홍부 조직을 먹이로 투여한 대조 시험구에서는 시험 기간 동안 전혀 폐사가 일어나지 않았다. WSBV에 미감염된 대하의 두홍부 조직을 먹이로 투여한 대조 시험구에서는 시험 기간 동안 전혀 폐사가 일어나지 않았다. WSBV액을 첨가한 침지 감염구에는 11일째부터 폐사가 일어나기 시작하였으나 시험기간동안 폐사율은 50%에 불과하였고 WSBV액을 첨가하지 않은 대조 시험구에서는 폐사가 전혀 일어나지 않았다. 따라서 WSBV의 병원성은 인위 감염 시험 결과에 의하면 주사 감염구가 가장 높게 나타났지만, WSBV에 감염된 병어의 두홍부를 먹이로 급이한 경구 감염구나 WSBV액을 사육수에 첨가한 침지 감염구에서도 감염이 쉽게 된다는 것은 본 바이러스 질병이 수평적으로도 전염이 가능한 것으로 생각된다. 사육수온에 따른 WSBV의 병원성을 확인하기 위해 본 바이러스에 미감염된 건강한 대하를 수온 15, 20, 25, 30°C에 순치, 사육한 후 WSBV에 감염된 대하의 두홍부 조직을 먹이로 경구 투여해서 사육 수온별 누적 폐사율을 관찰한 결과, Fig. 2에서와 같이 수온 15°C 시험구에서는 시험기간동안 전혀 폐사가 일어나지 않았으나, 수온 20°C 시험구에서는 감염후 8일째부터 폐사가 일어나기 시작하여 감염 20일째 까지 폐사율이 60%였으며, 수온 25°C 시험구에서는 감염후 4일째 폐사하기 시작하여 10일째 전량 폐사 하였고, 30°C 시험구에서는 감염후 2일째부터 폐사가 급격히 일어나 5일째 전량폐사하였다. 수온 20°C 이상에서는 수온이 높을수록 병원성이 높게 나타남을 알 수 있었다. 이는 브리새우에서 보고된(Inouye *et al.*, 1994) 고수온기에 WSBV의 병원성이 높은 것을 보여주는 것과 일치함을 볼 수 있었다. 따라서 이러한 실험결과는 실제 새우 양식장에서 바이러스 감염에 의한 새우 폐사가 수온 20°C를 상회하는 7월초순부터 일어나기 시작하여 고수온기인 8~9월에 대량 폐사가 일어나는 사실을 뒷받침해 주고 있다.

대하 크기에 따른 본 바이러스의 병원성을 확인하기 위해 평균체중 7, 13, 20 g인 WSBV 미감염 건강한 대하에 WSBV에 감염된 대하의 두홍부 조직을 먹이로 경구 투여해서 새우 크기별로 누적 폐사율을 관찰한 결과, Fig. 3에서 처럼 평균 체중 7g인 대하는 감염 후 3일째부터 급성적인 폐사를 일으켜 감염후 5일째 전량 폐사하였으며, 평균 체중

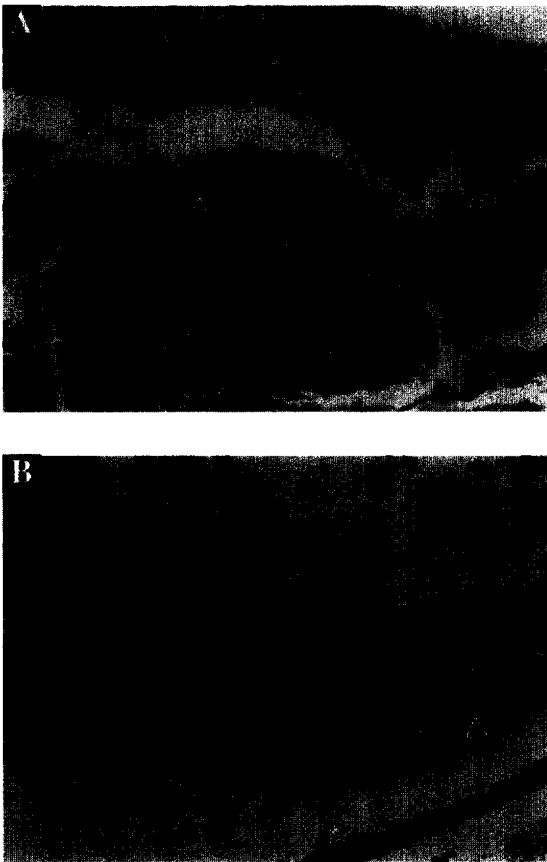


Fig. 4. Photomicrographs of hypertrophied nuclei in the tissues of naturally infected freshwater shrimp. H-E stain. $\times 200$.
A : Lymphoid organ. B : Stomach.

13 g인 대하는 감염 후 4일째부터 폐사하기 시작하여 10일째 전량 폐사하였다. 그리고 평균체중 20 g인 대하는 감염 후 8일째 폐사가 일어나 후 11일째부터 급성적인 폐사를 일으켜 19일째 전량 폐사하였다. 이와같이 새우 바이러스의 병원성은 새우 크기에 따라 폐사시기는 차이가 있지만 크기에 관계없이 강한 병원성을 나타내었다.

WSBV감염 대하 병리조직

WSBV병에 감염된 대하의 병리조직학적 이상은 큐티클층하의 상피세포층, 결합조직, 림프조직, 조혈조직 등 다양한 조직이나 기관에서 세포핵의 비대나 무구조화가 특징적인 병변으로 나타나고(Fig. 4), 이들 병변은 병리조직학적 실험에 사용한 새우의 감염 정도에 따라 차이가 있었지만 자연감염

된 새우나 인위감염된 새우에서 차이가 없었다. 이는 보리새우에서 보고된(Momoyama *et al.*, 1994) 병리조직의 병변과 일치함을 볼 수 있었다. 그리고 병변세포의 이상핵(異常核)의 중심부에는 hematoxylin에 진하게 염색되는 과립상 물질이 모여 있는 현상도 가끔 관찰되지만, 이상핵의 비대정도나 염색성 등은 세포종류에 따라서 상당한 차이가 있다. 이상핵이 관찰되는 조직중에서도 그 출현빈도와 비대정도가 가장 심한 곳은 위상피 세포층이며, 림프기관에서는 세포핵의 비대나 무구조화가 비교적 적은데 비해 림프기관 고유의 구조인 초구조가 붕괴되거나 혈구 침윤현상이 일어났다.

Baculovirus의 중요한 분류기준이 될 수 있는 봉입체(inclusion body)는 병변세포의 핵이나 세포질 내에서 전혀 확인할 수 없었다. 지금까지 보리새우속 새우류에는 14여종의 바이러스가 보고되고 있다(Lightner *et al.*, 1992 ; Nadala *et al.*, 1992 ; Boonyaratpalin *et al.*, 1993). 이들중 세포병리학적으로 세포핵 비대증상을 초래하는 바이러스는 BP(Couch, 1974), BMNV(Sano *et al.*, 1981), MBV(Lighter *et al.*, 1993) 및 PBV(Lester *et al.*, 1987)가 알려져 있으나 이들 baculovirus는 병변조직이나 기관과는 차이가 있으며, 또한 IHHNV(Lighter *et al.*, 1983)도 주요 피하조직과 조혈조직에 피사를 일으키며 감염된 세포의 비대핵내에는 eosin호성의 Cowdry type A라 불리는 봉입체가 형성되기 때문에 본 바이러스 질병과는 차이가 있다. 그리고 최근에 홍다리얼룩새우(*P. monodon*)를 대량폐사시키는 YBV(Boonyaratpalin *et al.*, 1993)는 병리조직학적으로는 본 연구와 아주 유사한 병변증상을 나타내고 있지만 감염세포의 세포질내에서 Feulgen 양성반응을 나타내는 봉입체가 관찰되기 때문에 본 바이러스 질병과는 차이가 있다. 그러나 1993년부터 일본에서 보리새우에 치명적인 피해를 일으키는 RV-PJ(Inouye *et al.*, 1994)는 감염된 보리새우의 두흉갑 및 체표 큐티클층에 흰반점을 형성하고 병리학적으로 중배엽성 유래조직인 큐티클 상피세포층, 결합조직, 림프기관, 촉각선, 조혈조직, 신경조직 등의 세포에서 핵 비대나 무구조화 증상을 특징적으로 나타내고 감염된 세포의 핵과 세포질 내에서 봉입체가 형성되지 않기 때문에(Monoyama *et al.*, 1994) 병리조직학적으로나 외부증상이 본 바이러스 감염증과 아주 유사하였다.

요 약

WSBV에 감염된 대하의 간체장, 림프기관, 위 그리고 심장으로부터 바이러스를 분리하여 바이러스액을 제조하였다. 수확된 바이러스액을 이용하여 병원성 시험을 실시하였다. 감염 방법에서는 주사 감염, 경구감염, 침지감염순으로 병원성이 높게 나타났다. 수온별 병원성에서는 30°C, 25°C, 20°C, 15°C순으로 병원성이 높게 나타났다. 크기별 감염시험에서는 크기에 따라 폐사시기는 차이가 있지만 크기에 관계없이 강한 병원성을 나타냈다. 병리조직학적 관찰에서는 림프조직, 조혈조직, 위상피 등에서 세포핵의 비대화를 관찰할 수 있었다.

사 사

본 연구는 1996년 농림수산부에서 시행한 현장 애로과제의 연구비 지원으로 수행되었으므로 감사의 마음을 전합니다

참고문헌

- Boonyaratpalin, S., K. Supamattaya, J. Kasornchandra, S. Direkbusaracom, U. Aekpanithanpong and C. Chantanachooklin. : Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow head disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Pathol., 24 : 311-331, 1993.
- Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. H. Wang, H. C. Chiang and C. F. Lo. : Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Dis. Aquat. Org., 23 : 165-173, 1995.
- Couch, J. A. : An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp : ultrastructure, prevalence, and enhancement. J. Invert. Pathol., 24 : 311-331, 1974.
- Huang, J. X., J. Yu. Song and C. Yang. : Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis pathology of the shrimp explosive epidemic disease. Yellow Sea Fishery Research Institute, Qingdao, P. R. China, 16 : 1-10, 1994.
- Inouye, k., S. Miwa, N. Oseko, H. Nakano and T. Kimura. : Mass mortalities of cultured kuruma shrimp in Japan in 1993 : electron microscopic evidence of the causative virus. Fish Pathol., 29 : 149-158(in Japanese), 1994.
- Inouye, K., K. Yamano, N. Ikeda, T. Kimura, H. Nakano, K. Momoyama, J. Kobayashi and S. Miyajima. : The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes Penaeid Acute Viremia (PAV). Fish Pathol., 31(1) : 39-45, 1996.
- Lester, R. G. J. L. Paynter, S. K. Sambhi and J. G. Atherton. : Light and electron microscopic evidence of baculovirus infection in the prawn *Penaeus plebejus*. Dis. Aquat. Org., 3 : 217-219, 1987.
- Lighter, D. V., B. T. Poulos, L. Bruce, R. M. Redman, J. Mari and J. R. Bonami. : New development in penaeid virology : Application of biotechnology in the research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas. In "Proceedings of the Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States" (ed. by W. Fulks and K. L. Main). The Oceanic Institute, 234-253, 1992.
- Lighter, D. V., R. M. Redman and T. A. Bell. : Observations on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon* Fabricus. Aquaculture, 32 : 209-233, 1993.
- Momoyama, K., M. Hiraoka, H. Nakano, H. Koube, K. Inouye and N. Oseko. : Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993 : histopathological studies. Fish Pathol., 29 : 141-148(in Japanese), 1994.
- Nadala, E. C. Jr., Y. Lu. P. Loh and J. A. Brook : Infection of *Penaeus stylirostris* (Boone) with a rhabdovirus isolated from *Penaeus* spp. Fish Pathol., 27 : 143-147, 1992.
- Nakano, H., H. Koube, S. Umezawa, K. Momoyama, M. Hiraka. K. Inouye and N. Oseko. : Mass mortalities of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan: Epi-zootiological survey and infection trials. Fish Pathol., 29(2) : 135-139, 1994.
- Sano, T., T. Nishmura, K. Oguma, K. Momoyama and N. Takeno. : Baculovirus infection of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan. Fish Pathol., 15 : 185-191, 1981.
- 허문수, 손상규, 심두생, 김진우, 박명애, 이주석, 최동립, 정승희, 김영진, 오명주. : 양식새우 (*Penaeus chinensis*) 에서의 white spot baculovirus의 분리 및 특성. 한국어 병학회지, 13 : 7-13, 2000.