

홍민어 *Sciaenops ocellatus*에서의 바이러스성 신경괴사증 viral nervous necrosis

김진도* · 김석렬 · 정성주 · 김영진 · 정태성** · 최태진*** · 박성우**** · 오명주†

여수대학교 수산생명의학과, *국립수산진흥원 여수종묘시험장, **경상대학교 수의학과,
부경대학교 미생물학과, *군산대학교 해양생명의학과

Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae

Jin-Do Kim,* Sok-Ryul Kim, Sung-Ju Jung, Young-Jin Kim, Tae-Sung Jung,**
Tae-Jin Choi,*** Sung-Woo Park**** and Myung-Joo Oh†

Department of Fish Pathology, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

*Yosu Hatchery, National Fisheries Research and Development Institute, Yosu 556-905, Korea

**College of Veterinary Medicine, Kyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

***Department of Microbiology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

****Department of Marine Biomedical Science, Kunsan National University, Kusan 573-702, Korea

Mass mortalities occurred among red drum larvae, 20 to 30 days old, culturing at hatcheries on southern coastal area. No specific external signs were observed except abnormal swimming and spinal deformity. It was, however, suspected as a viral etiology due to high mass mortalities so that histopathological and molecular biological study was performed to evaluate the agent. Both vacuoles and necrosis were observed on nerve cells of brain and eye by H-E staining, and viral particles were observed on electronmicroscopic examination. On the other hand, DNA fragment, approximately 426 bps, was amplified with RT-PCR. The above results were able to diagnosis the etiological agent of mass mortalities in red drum larvae as VNN (viral nervous necrosis) virus.

서 론

국내 해산어 양식은 지난 20여년 동안 급격히 확대되고 증가되었지만, 질병 발생 증가도 동반되었다. 이 중에서 바이러스성 질병은 양식생산물의 생산량에 큰 손실을 야기하는 경우가 종종 발생하고 있고, 또한 이러한 바이러스 질병은 많은 수가 보고되어 있다 (Oh & Choi, 1998; Sohn et al., 1998; Oh & Jung, 1999).

이 중 바이러스성 신경괴사증(viral nervous necrosis)은 종묘생산단계의 자어부터 성어까지 광범위하게 발생하는 바이러스성 질병으로 높은 누적폐사율을 나타내며, VNN에 감염된 어체는 신경세포 이상으로 인한 척추 만곡, 이상유형, 체색흑화 등의 외견적 증상과 조직학적으로 뇌와 망막에 공포와

괴사의 형성이 관찰된다 (Mori et al., 1992; Munday & Nakai 1994; Nishizawa et al., 1994).

VNN은 일본, 대만, 노르웨이, 프랑스, 인도네시아 등 다양한 국가 및 어종들에서 보고되고 있다 (Watanabe et al. 2000, Zafran et al. 2000, Bovo et al. 1999, Pavoletti et al. 1998, Tanaka et al. 1997, Fukuda et al. 1996, Nishizawa et al. 1994). 그렇지만 국내에서는 1990년 및 1991년 남해안 일원 능성어의 해상 가두리 양식장에서 등아 휘고 체색이 탁해지며 80%까지 폐사를 일으킨 원인체가 바이러스임을 지적인 예와(Shon et al. 1991), 이들 바이러스의 특징을 관찰한 결과 일본에서 보고된 SJNNV와 유사한 어류 nodavirus임을 보고하였다 (Shon et al. 1998). 또한 이들 감염어의 감염조직 마쇄액을 이용한 기타 해산어에 대한 감수성 연구에서 능성어를 대상

†Corresponding Author. E-mail: ohmj@yosu.ac.kr

으로 하였을 경우 어체의 크기에 관계없이 폐사를 일으켰지만 방어, 참돔, 돌돔, 넙치 및 자주복에서는 폐사가 관찰되지 않았다는 보고(Shon & Chun 1998)가 있다.

1999년 10월에서 11월 사이에 남해안 일대의 홍민어 종묘 생산장에서 20-30일령의 치어가 척추만곡 및 이상유영을 하며 대량 폐사하였다. 병어는 세균 검사 및 현미경하에서의 기생충 검사에서 특이 병원체를 발견하지 못하였고, 병어의 외부 증상과 3~5일간 70% 이상의 높은 누적폐사량이 바이러스 질병으로 의심되어, 병어를 대상으로 그 원인을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

병어 채집 및 샘플처리

병어는 1999년 11월에 남해안 A, B, C 지역 일대의 홍민어 종묘생산장에서 이상유영 및 척추만곡 개체를 일으키며 대량폐사한 개체(평균 1-1.8cm)를 현장에서 채집하여 실험에 사용하였다. 실험실로 옮겨진 시료는 일상적인 방법에 따라 세균 및 기생충 관찰을 행하고, 바이러스 검사를 위해 whole body를 HBSS와 1:9로 희석 후 균질화하여 5000 rpm에서 20분간 원심하여 상등액을 취한 후, 0.45 μ m membrane filter (Satorius co.)를 사용하여 여과 후 -80°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

병리학적 관찰

병리조직학적 관찰을 위해 10% 중성 포르말린에 고정 후 탈수, 포매, 박절 및 H-E염색하여 광학현미경하에서 검경하였고, 일부는 5% Glutaraldehyde에 고정 후 alcohol과 acetone series로 탈수와 치환시켜 에폭시레진으로 포매하여 초박절편을 만들었다. 초박절편은 우라닐아세테이트와 구연산납으로 2중 염색하여 Hitachi H-750 전자 현미경으로 관찰하였다.

바이러스 배양

감염어류의 체내 바이러스의 분리를 위하여 어류 유래의 주화세포인 CHSE-214 (chinook salmon embryo), FHM (fat head minnow) 및 RTG-2 (rainbow trout gonad)를 사용하였다. 이들 세포의 배양을 위하여 100 IU/ μ l의 penicillin, 100 μ g/ml의 strepto-

mycin (GibcoBRL, Co.)과 FBS (Fetal Bovine Serum, GibcoBRL, Co.)가 2%가 되게 첨가된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GibcoBRL, Co.)을 사용하였다. 각각의 세포주는 트립신 처리를 통하여 24well plate에 2.5×10^5 cell/ml로 계대 한 후, 15°C에서 6시간 plate에 부착시키고, 바이러스 분리 조사를 위하여 미리 제작한 감염어 조직 여과액을 접종하여 20°C에서 배양하면서 CPE의 발현을 관찰하였다. 접종 14일 후 10% 포르말린으로 세포를 고정하고 0.1% 크리스탈 바이오텍으로 염색하여, 각 well 내의 세포에서 CPE(세포변성효과) 발현 유무를 확인하였다.

RNA 분리 및 PCR

바이러스 분리용으로 제작한 감염어 조직 여과액을 high pure RNA isolation kit (Roche, co)을 사용하여 RNA를 분리하고, Nishizawa 등(1994)이 제시한 SJNNV의 부분 RNA 서열로부터 디자인된 primer (Fig.1)를 사용하여 RT-PCR을 행하였다. 추출된 RNA를 70°C에서 10분간 변성시킨 후 즉시 얼음위에서 냉각시키고, 여기에 Oligo(dT)15 primer와 reverse transcription mixtuer를 넣어 전체 20 μ l내의 조성을 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 10 mM DTT, 10 units reverse transcriptase (GibcoBRL Co.)가 되게 하였다. 역전사 반응은 42°C에서 50분간 실시하였고 70°C에서 15분간 처리하여 잔존 효소활성을 제거하였으며, 이와 같은 처리로 얻어진 cDNA를 PCR의 주형으로 이용하였다 (Fig 2). PCR 반응은 100 pM의 각 primer, 0.2 mM dNTPs, 1 U Taq DNA polymerase, 2.5 mM MgCl₂이 포함된 혼합물에 합성된 cDNA 1 μ l를 첨가하여 실시하였다. 반응조건은 우선 95°C에서 5분간 predenature 시킨 후 95°C 1분간 denature, 58°C 1분간 annealing, 72°C 1분간 extension 반응을 30 cycles를 진행시키고, 72°C 5분간 postextension을 시키고, 여기서 얻은 PCR product는 1.5% agarose gel을 이용하여 확인하였다.

결과 및 고찰

대량 폐사가 발생한 모든 홍민어 종묘생산장 현장은 수온을 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 가온 유지하고 있었으며,

PCR Primer set (Designed by Nishizawa et al 1995)

1 step primers

F 1

5' - GGA TTT GGA CGT GCG ACC AA - 3'

R 1

5' - GGT CGA AGT GGT CAG AAC AG - 3'

2 step primers

F 2

5' - CGT GTC AGT CAT GTG TCG CT - 3'

R 3

5' - AGA AGT GGG CAC AAC TGA GC - 3'

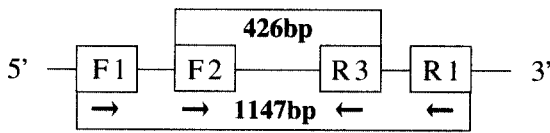


Fig. 1. Schematic illustration of the PCR amplification for NNV gene detection.

각 종묘장마다 거의 모든 생산 개체가 폐사하여 누적폐사율은 90% 이상으로 높게 나타났다. 또한 폐사 직전의 개체들은 힘없이 유영하다 수면에서 순간 정지한 상태를 유지한 이 후, 몇 바퀴 회전하며 바닥에 가라앉는 형태의 폐사전 행동을 나타내었다. 사육수 중의 병어는 척추만곡, 이상유영 및 체색흑화 등의 외부증상을 나타내었고, 두부의 해부를 통하여 뇌출혈이 확인되어졌다 (Fig. 3a, Table 1).

조직학적 연구에서 폐사한 개체의 조직을 H-E 염색하여 관찰한 결과 대뇌, 소뇌, 연수 및 뇌실 주변부에서 공포와 괴사를 나타내었다 (Fig. 3b). 또한 안구의 망막과 척수에서도 공포와 괴사세포를 관찰할 수 있었다 (Fig. 3c,d). 전자현미경관찰에서는 감염어의 안구와 뇌의 세포질에서 직경이 25-30 nm 이고, 외막을 가지고 있지 않은 구형의 바이러스 입자를 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

바이러스 분리를 위한 주화세포를 이용한 배양 실험에서, 마쇄 여과된액을 CHSE-214, FHM, RTG-2 cell line들에 접종 후 14일간 관찰하였으나, 이들 세포에서는 어떠한 CPE도 관찰되지 않았고, 이들 세포 상등액을 1 pass 한 후에도 CPE를 관찰할 수 없었다 (Table 2).

감염어 whole body와 HBSS를 1:9로 처리하여 제작한 여과액에서 분리된 RNA를 역전사 시켜

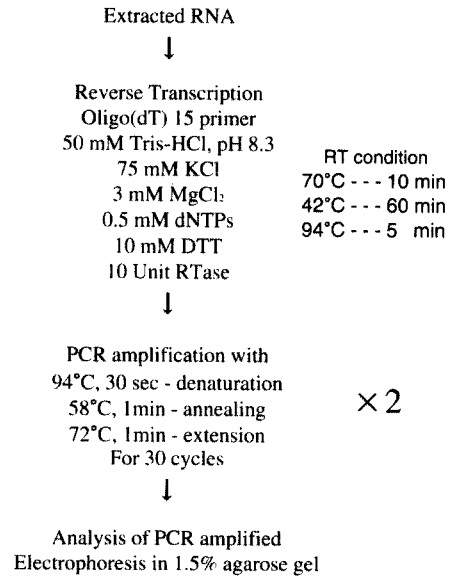


Fig. 2. Procedures of PCR for the detection of NNV gene.



Fig. 3. Microscopic photograph showing the vacuolation and necrosis in brain (a) and eye (b) of infected fish. (Scale bar=500um).



Fig. 4. Electron micrograph showing virions in the brain (▼) of infected fish. (Scale bar=100nm).

cDNA를 제작 후, Nishizawa 등(1994)이 보고한 RNA2의 coat protein T4 region 증폭용인 F2와 R3(Fig. 1)을 토대로 PCR을 행한 결과 426 bp의 DNA 단편이 확인되었다(Fig. 5). 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 본 실험의 연구 대상이었던 홍민어 대량폐사는 SJNNV와 연관되는 어류 nodavirus의 일종에 의해 발생되어졌으며, 그 감염병은 바이러스성 신경괴사증(viral nervous necrosis, VNN)으로 판단할 수 있었다.

NNV는 다양한 숙주역을 가지고 있고, 지금도 계속해서 새로운 숙주가 보고되고 있는 추세이며(Zafran *et al.* 2000), 또한 Thiery 등(1999)에 의하면 같은 종의 어종에서 병리학적 증상은 비슷하지만 기존에 사용하던 PCR primer로 검출이 되지 않는 변이종이 출현되고 있음이 보고되고 있는 해산어에 있어 대표적인 바이러스성 질병 중의 한 종류이다. 하지만 지금까지 국내에서는 이 질병의 숙주체로서 능성어 1종만이 보고되어져 있으며(Shon *et al.* 1991; Shon *et al.* 1998), 이를 이용한 해산어류 대상 감염실험 결과, 능성어를 제외한 다른 어류에서

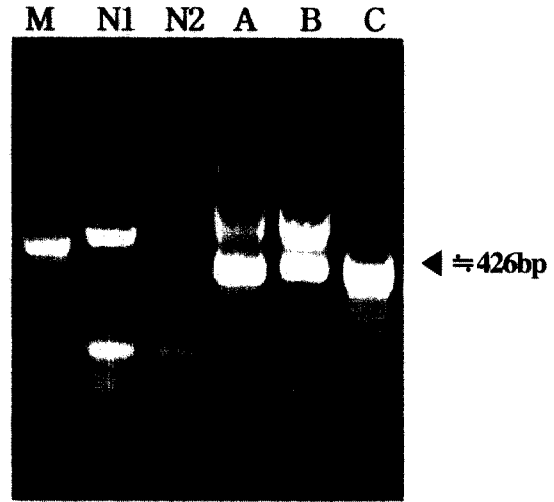


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis pattern of PCR amplified products. (Lane M, DNA molecular weight marker; N1 & N2, non infected samples; A, B, C, affected red drum sampled from different places.)

병원성을 확인하지 못하였다. 본 연구에서 능성어 이외의 해산어종 이면서 근년에 외국으로부터의 유입되어지기 시작한 어종인 홍민어에 강한 병원성을 발하는 것으로 확인되어진 NNV가 기존의 보고된 NNV인지 아니면 유입어류를 통하여 새롭게 국내로 유입되어진 바이러스 종인지를 확인하여야 할 필요성이 높은 것으로 생각된다.

요 약

1999년 10월에서 11월 사이에 남해안 일대의 홍민어 종묘 생산장에서 20-30일령의 치어가 척추만곡 및 이상유영을 하며 대량 폐사하였다. 병어는 특이 외부 증상이 없었고, 높은 누적폐사량이 바이러스 질병으로 의심되어, 조직학적 및 분자생물학적인 검사를 행하여 폐사원인을 확인하였다. 폐사 개체의 조직을 H-E 염색하여 관찰한 결과 뇌와 안구의 신경세포에서 공포와 괴사가 관찰되었고, 전자현미경관찰에서는 안구와 뇌에서 바이러스 입자가 관찰되었다. RT-PCR 결과에서는 ≈ 426 bp의 DNA 단편을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 홍민어에서 발생한 대량폐사는 바이러스성 신경괴사증(VNN)으로 진단하였다.

참고 문헌

- Bovo, G., Nishizawa, T., Maltese, C., Borghesan, F., Mutinelli, F., Montesi, F. and De Mas, S.: Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus Res.*, 63, 1-2, 143 - 146, 1999.
- Fukuda, Y., Nguyen, HD., Furuhashi, M. and Nakai, T.: Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol.*, 31, 3, 165-170, 1996.
- Galeotti, M., Beraldo, P., Patarnello, P., Sarli, G. and Volpatti, D.: Viral encephalopathy-retinopathy (VER - VNN) with absence of cellular vacuolization in juveniles of sea bass, *D. labrax* L.. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica*, 11, 27, 45-56, 1999.
- Grotmol, S., Nerland, AH., Biering, E., Totland, GK. and Nishizawa, T.: Characterisation of the capsid protein gene from a nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design of an optimal reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. *Dis. Aquat. Org.*, 39, 2, 79-88, 2000.
- Le Breton, A., Grisez, L., Sweetman, J. and Ollevier, F.: Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Fish Dis.*, 20, 2, 145-151, 1997.
- Mori, K-I., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K. and Furusawa, I.: Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack, *Pseudocaranx dentex* with nervous necrosis. *Virology*, 187, 1, 368-371, 1992.
- Munday, B.L. and Nakai, T.: Some diseases of economic significance in Australian finfish aquaculture. International symposium on aquatic animal health: Program and abstracts., Univ. of California, School of Veterinary Medicine, Davis, CA (USA), p. W-22.6 1994.
- Mushiake, K., Nishizawa, T., Nakai, T., Furusawa, I. and Muroga, K.: Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.*, 29, 3, 177-182, 1994.
- Nakai, T.: Viral nervous necrosis, in "Summary of fish diseases"(ed. by K. Muroga and S. Egusa), Krseisa Koseikaku, Tokyo, pp36, 1996.
- Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai, T. and Muroga, K.: Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4, 1633-1636, 1997.
- Nishizawa, T., Mori, K., Nakai, T., Furusawa, I. and Muroga, K.: Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Org.*, 18, 2, 103-107, 1994.
- Oh, M. J. & Choi, T. J. : A new rhabdovirus (HRV-Like) isolated in Korea from cultured japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. fish path.*, 11, 2, 129-136, 1998.
- Oh, M. J. and Jung, S. J.: Viral diseases of fish in Korean marineculture. In: "Proceeding of the fifth international symposium on the efficient application and preservation of marine biological resources. p 25-32. 1999.
- Oh, M. J., Jung, S. J. and Kim, H. R.: Biological and serological characteristics of birnavirus isolated from cultured Japanese flounder in 1999. *J. Fish Pathol.*, 12(1), 56-62. 1999.
- Pavoletti, E., Prearo, M., Ghittino, M., Ghittino, C.: Cases of viral nervous necrosis (VNN) in shy drum, *Umbrina cirrosa* with description of clinical symptomatology and anatomo-histopathological features. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica*, 10, 23, 24-33, 1998.
- Sohn, S. G., M. A. Park, S. D. Lee and S. K. Chun: Studies on the mass mortality of the cultured grouper, *Eponephelus septemfasciatus*. *J. Fish. pathol.* 4(2), 87-94, 1991.
- Shon, S.G., Park, M. A., Oh, M. J. and Chun, S. K., : A fish nodavirus isolated from cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *J. Fish Pathol.*, 11-2:97-104, 1998
- Tanaka, S., Aoki, H. and Nakai, T.: Pathogenicity of the nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathol.*, 33, 1, 31-36, 1998.
- Thiery R., Arnauld C. and Delsert C.: Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *J. Fish Dis.*, 22, 2, 201-207, 1999.
- Watanabe, K., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M.: Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 41, 3, 219-223, 2000.
- Zafran, Koesharyani, I., Johnny, F., Yuasa, K., Harada, T. and Hatai, K.: Viral nervous necrosis in humpback grouper *Cromileptes altivelis* larvae and juveniles in Indonesia. *Fish Pathol.*, 35, 2, 95-96, 2000.