

In-situ hybridization 법을 사용한 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 바이러스 감염 질병 특성 고찰

도정완 · 이남실* · 정승희 · 김경길* · 최혜승 · 박정우** · 김이침***†

국립수산과학원 병리연구과, *국립수산과학원 전략연구단,
울산대학교 생명과학부, *국립수산과학원 동해연구소 해역산업과

Histopathologic Characterization of Viral Pathogens in Cultured Olive Flounder, *Paralichthys Olivaceus*, using in-situ Hybridization Methods

Jeong Wan Do, Nam-Sil Lee*, Sung Hee Jung, Kyung-Kil Kim*,
Hye Sung Choi · Jeong Woo Park** and Yi Cheong Kim***†

Pathology Division, National Fisheries Research & Development Institute (NFRDI), Busan 619-902, Republic of Korea

*New Strategy Research Center, NFRDI, Busan, 619-902, Republic of Korea

**Department of Biological Sciences, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Republic of Korea

***Aquaculture Industry Division, East Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Gangneung 210-861, Republic of Korea

Polymerase chain reaction (PCR) is the most rapid and widely used method to detect viral pathogens. However, this method does not provide histopathologic nature of the virus. In situ hybridization (ISH) with oligonucleotide probes is attractive because it is a rapid method for detection and identification of viral pathogens at sites of tissue infection. In order to understand the histopathologic characteristics of Red sea bream iridovirus (RSIV), viral-hemorrhagic septicemia (VHS) virus and viral nervous necrosis (VNN) virus to cultured olive flounder, we here applied ISH method to various kinds of olive flounder tissues with PCR-positive for these three viruses. We found that these viruses showed different tissue tropism and were detected from different cell types. Our results suggest that ISH is useful not only in rapid detection of viral pathogens but also in understanding the histopathologic characters of specific viral pathogens.

Key words : Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, RSIV, VHSV, VNN, In-situ hybridization.

우리나라 양식넙치에서 자주 나타나는 바이러스성 질병에는 참돔이리도바이러스종의 원인바이러스인 RSIV (Red sea bream iridovirus), 림포시스티스병의 원인바이러스인 lymphocystiviruses, 상피증생종의 원인으로 알려진 Herpesvirus과 같은 DNA 바이러

스에 의한 감염증과 VHS (viral-hemorrhagic septicemia) virus, HRV (Hirame rhabdovirus), VNNV (viral nervous necrosis virus), MABV (Marine birnavirus) 등과 같은 RNA바이러스에 의한 감염증이 알려져 있다 (전, 2005; 국립수산과학원 2012). 통계보고에 따르면 2005년에서 2007년 사이에 우리나라 양식넙치에 발생하는 바이러스성 질병으로 VNNV, VHSV, RSIV 등에 의한 질병들이 보고되어 있으며 세균성질병과

†Corresponding author: Yi Cheong Kim

Tel: +82-33-660-8541, Fax: +82-33-661-8514

E-mail: yckim550@korea.kr

혼합성으로 빈번히 나타나 피해를 증가시키고 있는 실정이다 (Cho *et al.*, 2010).

현재 이러한 바이러스성 질병은 PCR (Polymerase chain reaction) 검사를 통해 신속하고 높은 정확도로 진단하고 있으며, 조기대책을 마련하기 위해 백신개발이나 어체 건강관리에 노력을 다하고 있다 (Yamashita *et al.*, 2005). 바이러스에 의한 감염증은 감염어의 조직 일부를 이용하여 PCR 진단을 통해 확정진단이 신속하게 이루어지지만 그 이전에 임상적으로 외형관찰이나 부검을 통한 육안적 소견으로도 추정진단하고 있으며 이러한 질병의 특징을 각종 자료나 논문을 통하여 기술하고 있다.

각 질병에 따라 나타나는 외관상 혹은 해부시의 특이한 소견은, RSIV (Megalocytivirus)의 경우 참돔이나 그루퍼에서 주로 보고되고 있으며 (Inouye 1992; Kawakami and Nakajima, 2002; Mastuoka *et al.*, 1996) 넙치에서는 발병 예가 흔하지 않지만 우리나라에서는 비교적 잦은 빈도로 검출되고 있으며, flounder iridoviruses (FLIVs)로 보고된 발병어의 경우 빈혈, 아가미의 점상출혈, 복부팽만, 비장, 신장과 같은 조혈기관의 비대가 육안적으로 관찰된다 (Do *et al.*, 2005). VHS는 넙치에서는 1999년에 자연산 모니터링에서 처음 보고된 이후 (Takano *et al.*, 2000) 지속적으로 발병하고 있으며, HIRRV (hirame rhabdovirus)와 그 증상이 매우 유사하여 진단에 혼돈을 가져오기도 한다 (Kimura *et al.*, 1986, 1989). VHSV 감염은 최근 양식 넙치에서 매우 문제시 되고 있는 바이러스성 질병으로, 중증의 경우 아가미빈혈, 근육 내 출혈로 인한 점상 출혈이 특징적이며, 해부시 소화관 및 각종 내장기관의 비대와 충혈증상이 관찰되며, 복강 내 염증성 복수의 저류가 관찰된다 (Isshiki *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2009). 이에 반해 VNN은 VER (viral encephalopathy and retinopathy)로도 불리며 자·치어에서 주로 영향을 나타내고 체색흑화 이외의 특별한 외부증상은 관찰되지 않으며, 경우에 따라 발광적인

이상행동으로 가두리 그물에 쏠려 체표에 상처가 나타나는 개체도 있다 (Nguyen *et al.*, 1994; Tanaka, 2004). 이러한 증상은 숙주에 대한 바이러스의 특이적 감염으로 인해 나타나며 육안적으로 관찰 가능한 증상이라 할 수 있다.

본 보고내용은 양식넙치에서 발생하는 주요 바이러스 감염증 가운데 우리나라 양식넙치에서 최근 빈번히 발생하는 3종 (RSIV, VHSV, VNNV)을 대상으로 각 바이러스 유전자의 일부에 해당하는 probes를 제작하여 in-situ hybridization (ISH)법을 진단법으로 적용하였으며, 발병어의 어떤 내부기관에 어느 정도 특이적으로 반응을 잘 나타내는지에 관하여 조사하고 그 결과를 바탕으로 이들 바이러스가 어떤 조직의 어떤 세포에서 증식하는지에 대한 정보를 제시하였다.

재료 및 방법

Samples preparation

2003년부터 2005년에 걸쳐 국립수산과학원 병리연구과의 해산 양식어류 질병모니터링에서 RSIV (Red sea bream iridovirus, Megalocytivirus), VHS 그리고 VNN으로 진단된 넙치를 대상으로 실험을 수행하였다. 각 조직 (간, 비장, 신장, 심장, 뇌, 소화관, 그리고 아가미)에 대한 PCR (polymerase chain reaction)법의 적용은 진단과 동시에 사전실험을 통하여 결과를 얻었으며, 10% 중성완충포르말린 (Sigma-Aldrich)에 고정된 이들 조직을 48시간 이내에 재고정, 수세한 후 단계별 알코올 탈수, Xylene 투명화, 파라핀 침투과정을 거친 후 파라핀 블록을 제작하여 4 μ m 두께로 박절하여 표면처리 된 poly prep slides (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA)에 준비하여 50°C 오븐에 하룻밤 건조시킨 후 바로 ISH 반응에 제공하거나, 반응 전까지 4°C에 보관하였다.

Digoxigenin (DIG) labeling probe preparation

실험에 사용된 Digoxigenin(DIG)이 붙여진 probes 는 Lee et al (2009)을 참고하여 합성하였으며, 각 질병에 대하여 사용된 프라이머에 대한 정보는 다음과 같다: RSIV ATPase (GenBank accession no. AY532614, PCR 산물 크기 230 bp): 5'-GTAGTGATATCGGGCTCCGA-3', 5'-CCGTTCTTGAACAGGTCCAT-3'; VNN (GenBank accession no. AF445800, PCR 산물 크기 542bp): 5'-GACGTCCATCTCACGGGTAT-3', 5'-GCG AGG GAA TCG TTG TAG AG-3'; VHSV G (GenBank accession no. DQ401191, PCR 산물 크기 302bp): 5'-TCACAGTCACTCGCATGAT-3', 5'-ATTGGATCAAGACCGACCTG-3'. VHSV, VNN 바이러스, 그리고 RSIV 의 각 유전자가 cloning 되어 있는 Plasma DNA를 주형으로 DNA probes를 합성하였으며, 합성조건은 RSIV의 경우 Lee et al. (2006)의 조건에 따랐으며, VHSV와 VNN의 경우 annealing온도를 60°C로 하고 다른 조건은 RSIV와 동일한 조건으로 합성하였다.

In situ hybridization (ISH)

조직절편이 부착된 슬라이드의 파라핀 제거를 위하여 Xylene에 10분, 3회 처리 후 100% 에탄올에 5분, 2회를 거쳐 건조시켰다. 0.1M Tris(pH8.0) buffer로 농도조절 된 proteinase K(10µg/ml) 용액에 37°C, 30분 처리한 후 Tris buffer(TB)로 세척 후, 95%, 100% 에탄올에 순차적으로 1분씩 처리하여 탈수 시켰다. 슬라이드를 실온 건조시킨 후, Hybridization buffer(50% formamide, 10% dextran sulfate, 4 xSSC, 250µg/ml yeast tRNA, 1 xDenhart's solution) 를 준비하여 합성된 probe와 1:1배합하여 조직에 얹어 커버슬립으로 봉한 후 95°C에서 5분간 denaturation시켰다. 반응시간이 끝나면 바로 냉각시켜 반응을 정지시키고 RSIV의 경우는 42°C에서 18-20시간, VHS와 VNN의 경우는 55°C에서 같은 시간 반응시킨 후, Wash and Bloc

Buffer Set (Roche, German)을 사용하여 세척하였으며, 이후 Alkaline phosphatase가 부착된 DIG에 대한 항체반응은 Lee et al. (2009)의 방법과 동일하게 실시하였다. 본 연구에서 사용한 실험방법에 대한 개요를 그림으로 나타내었다(Fig. 1).

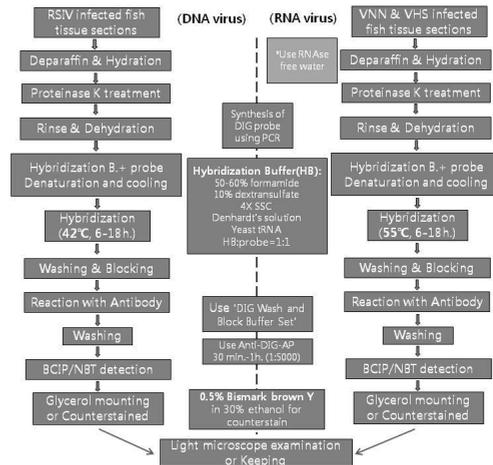


Figure. 1. Diagram for in-situ hybridization methods used in this study.

Light microscopic examination

ISH반응 후 그대로 중성 Glycerol로 봉입하여 광학 현미경 (Zeiss Axio Imager A1, Germany) 즉시 관찰하거나, Bismark brown Y로 분별염색을 실시하고 단계별 알코올로 탈수 후, Xylene 친화과정을 거친고 봉입제로 봉입하여 건조시켜 보관하거나 관찰하였다. 광학현미경 관찰을 통한 사진촬영은 현미경에 부착된 사진촬영장치 (Carl Zeiss Axio Cam MRC5) 와 소프트웨어(Axiovs40, v. 4.6.3.0) 를 활용하였다.

결 과

본 연구에서는 PCR 진단법을 통하여 RSIV, VHSV 그리고 VNNV 등의 감염이 확인된 넙치 조직들을 대상으로 ISH법을 적용하였다. 먼저 PCR양성시료를

Table 1. Efficacy of virus detection by ISH methods

	Total sample No. =PCR positive sample No.(A)	ISH positive sample No. (B)	Cross detection rates(%) (B/A) × 100
RSIV	8	7	87.5
VHSV	6	6	100
VNNV	5	4	80

Table 2. Detection of RSIV, VHSV and VNNV from organs of cultured flounder by PCR and ISH methods.

		Liver	Spleen	Kidney	Heart	brain	Intestine	Gill
RSIV	PCR	+	+++	+++	++	±	++	+
	ISH	+	+++	++	++	-	+	+
VHSV	PCR	±	+++	+++	+++	±	++	+
	ISH	-	++	++	+++	-	++/-*	+
VNNV	PCR	-	±	±	-	+++	-	-
	ISH	-	-	-	-	+++	-	-

PCR: +; shown with thin linear band on agarose gel, ++; same thick band with positive control, +++; more thick band than positive control, ±; indistinct linear band, -; no band. ISH: +; not exceeding 10 positively reacted cells at one view (×200) or a corresponding reaction. ++; not exceeding 50 positively reacted cells at one view (×200) or a corresponding reaction. +++; over 50 positively reacted cells at one view (×200) or a corresponding reaction, -; no reacted cell, *: ++ at pancreatic tissue and no reaction at digestive tube

중 ISH방법에서 양성인 시료들을 확인한 결과, VHSV 양성시료의 경우 6개 모든 시료에서 ISH 방법으로 바이러스가 검출되었으며, RSIV 및 VNNV 양성 시료들의 경우 각각 1개씩을 제외한 나머지 모든 시료들에서 ISH양성반응이 나왔다(Table 1). 또한 여러 종류의 장기들을 대상으로 세 종류 바이러스를 검출한 결과, PCR방법으로 바이러스 양성이 명확하게 확인된 개체의 각 부위별 PCR검사에서 검출 감도에 차이를 관찰하였으며 유사한 양성반응 경향을 ISH에서도 관찰되었다(Table 2). 이상의 결과들은 어류조직에 감염된 바이러스 검출에 있어 ISH가 PCR과 비슷한 민감도 및 특이성을 보임을 보여준다. 다음으로 PCR법 만으로는 관찰 할 수 없는 바이러스에 감염된 조직학적 특성을 ISH법을 사용하여 관찰하였다.

RSIV detection

RSIV에 감염된 넙치의 in-situ hybridization에 대한 양성반응으로 확인되는 조직상의 특징적인 형태는 짙은 보라색의 비대해진 구형세포이다. 간, 비장, 신장, 심장, 피부, 아가미 모든 조직에서 양성반응세포가 관찰되었으나 특히 비장, 신장의 조혈조직 내 그 수가 월등히 많이 나타나는 것을 알 수 있으며, 간에서는 정맥 주위로 소수의 이상비대세포가 짙게 염색되어 관찰되었다(Fig.2A). 비장에서는 비대세포가 다수 분포하는 것을 확인할 수 있다(Fig.2B). 신장에서도 비장에서와 유사하게 조혈조직 내에 이형비대세포가 다수 관찰되었다(Fig.2C). ISH에 대한 양성반응으로 나타나는 바이러스의 분포 특징은 비대해진 구형세포 내에 한정적으로 존재하는 것을 알 수 있다.

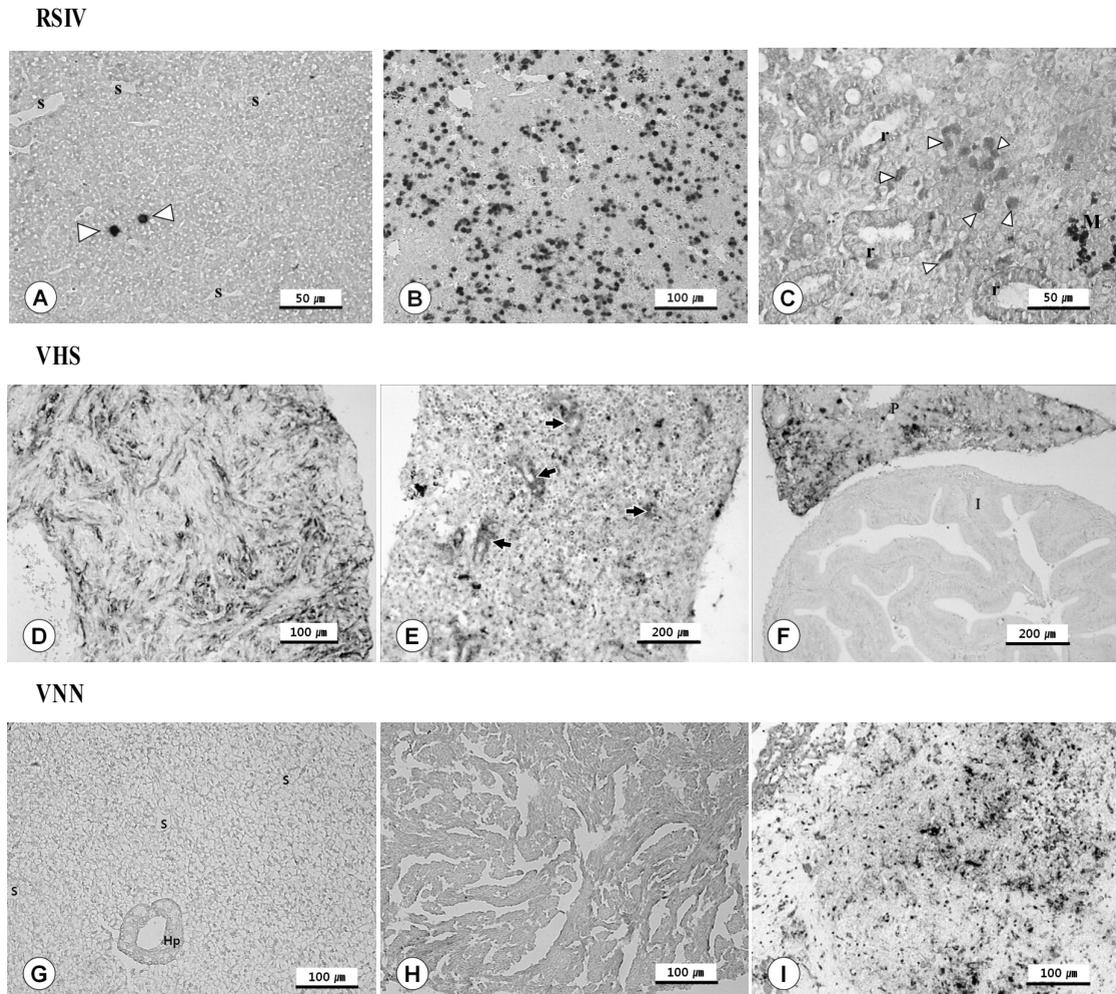


Figure 2. Detection of RSIV (red sea bream iridovirus), VHS (viral haemorrhagic septicaemia) virus, and VNN (viral nervous necrosis) virus in infected olive flounder tissues by in-situ hybridization. Various kinds of tissues were collected from virus-infected fish and sections were made from paraffin-fixed tissues. In situ hybridization was performed using digoxigenin-labeled probes to detect virus RNAs as described in Methods. A-C, Detection of RSIV. A. Liver; A few of ISH positive cells (arrowheads) are detected around sinusoids(S), B. Spleen; Many ISH positive cells throughout the whole of spleen. C. Kidney; ISH positive cells (arrow heads) in parenchymal tissue. r, renal tubule, M; cluster of melano-macrophages. D-F, Detection of VHSV. D. Heart; ISH positive reactivity is shown in myocardium. E. Spleen; ISH positive reaction is shown at ellipsoids (arrows). F. Pancreas; ISH positive reactivity is revealed at necrotic macrophages and acinar cells. There is no reactivity in intestine adjacent the pancreas. D, E, and F are counterstained. G-I, Detection of VNN virus. G. Liver; There is no reactivity. Hp, hepatopancreas, S; sinusoid. H. Heart; There is no reactivity. I. Brain; ISH positive reactivities showing dip-blue or bluish purple are necrotic part of nervous cells. (I is counterstained).

VHSV detection

VHSV 감염 넙치에 대한 in-situ hybridization에 대한 양성반응은 주로 비장, 신장, 횡장조직 그리고 심

장에서 나타났다. 비장과 신장에서는 조직 내 분포하는 대식세포 (macrophage) 에서 관찰 되었는데, 비장에서는 혈조직(ellipsoids) 주위로 둘러싸는 대식세포

에서, 그리고 신장에서는 MMC(Melano-macrophage center)와 같은 대식세포가 집중적으로 분포하는 영역에서 뚜렷하게 관찰되었다(Fig.2D). 소화관과 함께 박절된 췌장조직에서는 소화관에서는 반응성이 전혀 관찰되지 않는 반면 췌장조직의 대식세포와 선세포(acinar cell)에서 강한 양성반응이 확인되었다(Fig.2E). 특히, 심장에서는 심근전반에서 보라색의 짙은 양성반응이 관찰되는 것이 특징적이었다(Fig.2F).

VNNV detection

RSIV 나 VHS virus가 조혈기관, 심장, 췌장 등의 내장기관에서 다양하게 나타나는 반면, VNN감염조직의 경우, 간, 비장과 같은 소화기계 관련(Fig.2G), 심장과 같은 순환기계 관련 기관(Fig.2H)에서는 반응성이 관찰되지 않았지만, 뇌, 연수와 같은 신경조직에서는 강한 양성반응이 나타났다(Fig.2I).

고 찰

병원 바이러스의 종류에 따라 특이적으로 표적세포가 존재하는 경우가 있으며, 이러한 특징은 특정 조직이나 기관에서 주 감염증상을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 각 바이러스의 주요 감염장기에서의 조직 병변에 따라 외형적으로나 해부시 관찰되는 병증의 특징이 나타난다. 바이러스성 질병의 진단에 자주 쓰이는 세포배양의 경우, 바이러스의 종류에 따라 배양조건에 적합한 세포주가 존재하는 것은 이미 잘 알려진 사실이다.

VNN의 경우 중추신경계(Central nervous system)와 안구의 망막주위 시신경의 공포화(vacuolization)가 병리조직학적 주요증상이라 볼 수 있다. ISH반응에서도 나타난 것처럼, 반응이 신경조직에 한정되어 나타나므로 조직의 일부를 이용하여 바이러스를 분리할 경우에도 뇌나 연수가 아닌 다른 기관에서 분리는 어렵다. VNN 바이러스 분리를 위해 사용하는 배

양세포의 경우 일반적으로 쓰이는 다종의 세포주, 예를 들어 ECP, CHSE-214, RTG-2, FHM, BF-2로는 배양이 힘들어 새로이 만들어진 SSN-1 또는 이 세포주에서 다시 클론을 배양하여 만들어진 E-11 그리고 GF-1과 같은 세포주를 사용하여야만 배양이 가능하며 계대 후 일정기간이 지나면 바이러스의 존속유무를 확인하여야만 하므로 세포주를 이용한 인공적인 배양이 어려움을 알 수 있다(Iwamoto *et al.*, 2000). 이들 세포주가 지느러미 조직에서 클론배양한 것이지만 신경조직세포와 유사성을 가진 세포일 가능성도 있을 것으로 보인다.

VHS 바이러스는 전신감염으로 이어지는 경우가 대부분이어서 비장이나 신장의 조혈조직 이외에도 심장, 소화관 그리고 근육까지 대부분의 장기에서 증상을 나타낸다. 자연 감염어에 관한 보고에 따르면 체색 흑화, 복부팽만과 복수, 아가미 빈혈, 심강 내 체액저류, 간 울혈, 신장과 비장비대를 설명하고 있다. 특히 외부적으로는 근육 출혈이 특징적으로 관찰되는데 조직학적으로는 심근을 비롯하여 각 내장기관과 소화관의 대소 혈관을 중심으로 조직세포의 괴사, 변성이 관찰된다(Isshiki *et al.*, 2001). 본 연구의 결과에서도, 감염된 바이러스는 혈액을 통하여 전신적으로 이동하는 것으로 보이며 각 부위의 근육세포를 선호하여 이러한 세포로 구성되는 기관이나 조직에서 바이러스의 증식이 이루어져 병어의 주요 증상이 관찰되는 것으로 추정되며, 특히 심장에 대한 영향이 관찰되었다.

RSIV감염도 중증의 경우 VHSV 감염증과 유사한 증상으로 관찰되지만 바이러스가 혈구세포에서 증식하여 비대혈구세포를 형성하는 것이 특징이며, 감염된 혈구는 조혈림프조직은 물론 어체 전신을 통하여 대식세포나 유주세포가 분포하는 각 장기 내 결합조직에서도 관찰된다(Lee *et al.*, 2006, 2009).

표1에서 본 연구에 사용된 검체수와 반응양성에 대한 결과를 나타내었으며, 표2에서는 각 장기에 대

한 반응의 결과도 PCR법을 통한 결과와 비교하였다. VHSV의 경우 PCR법에서 양성으로 판정되었던 것은 ISH법에서도 모두 양성반응을 확인할 수 있었으며, RSIV와 VNNV에서도 80% 이상의 교차양성반응을 확인하였다. 실질적으로 검체수를 더 많이 늘려서 확인이 가능하였다면 교차반응의 비율이 높아질 가능성을 배제할 수 없을 것으로 보며, 표2에 나타난 각 장기에 대한 반응도 PCR법보다 탁월한 민감도를 얻어내진 못했지만 이에 상응할 만한 결과를 얻어 바이러스성 질병에 대한 진단을 위한 방법으로 활용도가 높을 것으로 생각된다.

지금까지 항원-항체반응과 형광항체법을 활용한 조직관찰에 대한 보고는 있었으나 in-situ hybridization 법을 활용한 보고는 Megalocytivirus나 Herpesvirus와 같은 DNA-DNA hybridization법 이외에는 없었다 (Lee *et al.*, 2009, 2012). RNA에 대한 in-situ hybridization법 활용의 경우도, 특정 단백질의 조직 내 발현을 관찰하기 위해 RNA-RNA hybridization법을 활용한 실험 예는 많지만 본 연구에서처럼 VHS나 VNN과 같은 병원성 바이러스의 확인을 위해 RNA-DNA hybridization법을 활용한 경우는 없었다. 일반적인 In-situ hybridization법의 경우, DNA-DNA, RNA-RNA hybrid반응을 기본으로 하지만 RNA-DNA의 hybrid도 hybridization buffer에 따라 매우 안정적인 것으로 이미 보고되고 있다 (Casey J and Davidson N, 1977, Thomas *et al.*, 1976). 상용 kit을 이용하여 DIG을 표지한 DNA probe 제작이 용이하며, 감염바이러스가 DNA바이러스인지 RNA바이러스인지에 상관없이 RNA 작업을 위한 다른 실험 라인 없이도 실험실에서 준비된 양성 플라스미드를 주형으로 대상바이러스에 대한 표식probe를 제작하여 바로 병어조직에 반응시켜 확인할 수 있다는 점에서 신속진단에 유용하다. 단, RNA바이러스인 경우는 감염어 조직내의 바이러스 RNA를 대상으로 반응시키므로 반응 전까지 조직 내에서 RNA 상태를 잘 보존할 수 있도록

하는 것이 중요하며 in-situ hybridization적용에 있어 RNase free water를 사용하는 것이 추천된다. 예를 들면 시료를 고정할 시기가 과도하게 경과한 것이거나 냉동절편을 제작할 경우 냉동전이나 냉동 박절 후 처리에 따라 RNA의 소실 정도가 달라질 수 있으므로 주의가 필요할 것으로 보인다.

본 연구에서는 포르말린에 고정된 조직을 이용하였지만 신선조직을 이용하여 동결절편에 적용하면 더욱 빠르게 확인 가능할 것이라 생각되며, 포르말린 고정시료의 경우에도 보관이 오래되지 않았다면 질병발생 이후 재검사를 위해 유용한 방법으로 여겨진다. 특히 RSIV감염증과 같은 DNA바이러스로 감염 조직 보존기간이 조금 지나더라도 조직 내 보존상태가 양호한 편으로 보였으며 파라핀표본 상태로 오래 보관된 샘플에서도 in-situ hybridization 반응이 확인되었다 (Lee *et al.*, 2012). 질병진단에 있어 신속성, 정확성은 매우 중요하다. PCR법은 신속하지만 확정 진단을 위해서는 염기서열 분석 또한 진행되어야 하며, 오류의 위험도 있으므로 명확한 진단을 위해 다른 진단법이 동반되어야 한다. 이러한 때 신속하게 병어 조직을 이용하여 바로 확인 가능한 방법이 in-situ hybridization 법으로 생각된다. 본 검사법의 표준화된 활용을 위한 연구로 시료 보관상태, 보관기간, RNA, DNA 바이러스의 반응에 대한 질적, 양적 차이 등에 관한 세부적인 검증이 필요할 것으로 보이지만 검증이 이루어지면 실제로 활용하기에 유리할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 국립수산과학원 연구과제: 수산생물질병특성연구 (RP-2013-AQ-179)의 일환으로 수행되었습니다.

요약

PCR (polymerase chain reaction) 법은 신속하고 정확하게 바이러스성 질병진단을 위해 널리 사용되지만 조직병리학적 정보를 제공하지 못한다. 반면에 in-situ hybridization (ISH) 법을 사용하면 바이러스를 빠르게 검출할 수 있을 뿐 아니라 조직에서의 분포도 알 수 있다. 본 연구에서는 RSIV, VHSV, 그리고 VNN 바이러스들의 조직내 분포 및 조직 병리학적 특성을 확인하기 위하여 이 바이러스들에 감염된 에 감염된 양식 넙치의 어류의 다양한 조직들을 대상으로 ISH 법을 적용하였다. 그 결과 이들 세 종류의 바이러스가 각각 다른 조직 및 세포들에 감염함을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과는 ISH법이 어류 병원성 바이러스의 신속 검출 뿐 아니라 조직 병리학적 특성 확인에도 유용함을 제시한다.

참고문헌

- Casey, J. and Dacidson, N.: Rate of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. *Nucleic Acid Res.*, 4:1539-1552, 1977.
- Cho, M.Y., Park, G.H., Ji, B.Y. and Kim, J.W.: Statistical data on fish virus of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from 2005 to 2007. *J. Fish Pathol.* 23:155-162, 2010.
- Do, J.W., Cha, .S.J., Kim, J.S., An, E.J., Lee, N.S., Choi, H.J., Lee, C.H., Park, M.S., Kin, J.W., Kim, Y.C. and Park, J.W.: Phylogenetic analysis of the major capsid protein gene of iridovirus isolates from cultured flounders *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Dis. Aquat. Org.* 64:193-200, 2005.
- Inoue, S., Nam, B.-H., Hirono, I. and Aoki, T.: A survey of expressed genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) liver and spleen. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 6:378-382, 1997.
- Isshiki, T., Nagano, T., Kanehira, K. and Suzuki S.: Distribution of marine birnavirus in cultured marine fish species from Kagawa Prefecture, Japan. *J. Fish Dis.*, 27:89-98, 2004.
- Isshiki, T., Nishizawa, T., Kobayashi, T., Nagano, T. and Miyazaki, T.: An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis. Aquat. Org.*, 47:87-99, 2001.
- Iwamoto, T., Nakai, T., Mori, K., Arimoto, M. and furusawa, I.: Cloning of the fish cell line SSN-1 for pisxine nodavirus. *Dis. Aquat. Org.* 43:81-89, 2000.
- Iwamoto, R., Hasegawa, O., LaPatra, S. and Yoshimizu, M.: Isolation and characterization of the Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Lymphocystis Disease Virus. *J. Aquat. Anim. Heal.* 14:114-123, 2002.
- Kim, W.S., Kim, S.Y., Kim, D.W., Kim, J.O., Park, M.A., Kitamura, S.I., Kim, H.Y., Kim, D.H., Han, H.J., Jung, S.J. and Oh, M.J.: An outbreak of VHSV(viral hemorrhagic septicaemia virus) infection in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Aquaculture*, 296:165-168, 2009.
- Kimura, T., Yoshimsu, M. and Gorie, S.: A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame(Japanese flounder) *Paralichthys olivaceus* and ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.*, 1:209-217, 1986.

- Kimura, T., Yoshimizu, M., Oseko, N. and Nishizawa, T.: Rhabdovirus olivaceus (Hirame rhabdovirus). In: Ahne W, Kurstak E(eds) Viruses of lower vertebrate. Springer Verlag, Berlin, p 388-395. 1989
- Lee, N.S., Do, J.W., Kim, Y.C. and Park, J.W.: Characterization of virus distribution in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*; Temminck and Schlegel) infected with Megalocytivirus. J. Comp. Pathol. 141:63-69, 2009.
- Lee, N.S., Jung, S.H., Park, S.W. and Do, J.W.: In situ hybridization detection of Koi Herpesvirus in Paraffin-embedded tissue of Common Carp *Cyprinus carpio* collected in 1998 in Korea. Fish Pathol. 47:100-103, 2012.
- Munday, B.L., Kwang, J. and Moody, N.: Betanodavirus infections of teleost fish: a review. J. Fish Dis., 25:127-142, 2002.
- Nguyen, H.D., Mekuchim, T., Imura, K., Nakai, T., Nishizawa, T. and Muroga, K.: Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Science, 60:551-554, 1994.
- Takano, R., Nishizawa, T., Arimoto, M. and Muroga, K.: Isolation of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 20:186-193. 2000.
- Tanaka, S., Takagi, M. and Miyazaki, T.: Histopathological studies on viral nervous necrosis of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunber, at the grow-out stage. J. Fish Dis. 27: 385-399, 2004.
- Thomas M., White R. L. and Davis R.W.: Hybridization of RNA to double-stranded DNA: formation of R-loops. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73:2294-2298, 1976
- Yamashita, H., Fujita, Y., Kawakami, H. and Nakai, T.: The efficacy of inactivated virus vaccine against viral nervous necrosis (VNN). Fish Pathol. 40:15-21, 2005.
- 전세규(2005) 넙치의 질병과 치료, chapter 3 바이러스성 질병, p41-82.
- 국립수산과학원(2012) 어류질병현장 가이드북

Manuscript Received : July 29, 2013

Revised : August 24, 2013

Accepted : September 26, 2013