제주지역 양식 넙치(Paralichthys olivaceus)의 점액포자충 감염조직에 대한 병리조직학적 관찰

이남실 · 김아란 · 서한길¹ · 최혜승 · 조미영^{2*}

국립수산과학원 양식산업연구부 병리연구과, '국립수산과학원 남해연구소 양식산업과, '국립수산과학원 연구기획과

Histopathological Examination of Myxosporean-Infected Olive Flounders Paralichthys olivaceus, Cultured in Jeju Island, South Korea

Nam-Sil Lee, Aran Kim, Han-Gil Seo¹, He Sung Choi and Miyoung Cho^{2*}

Pathology Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea ¹South Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Yeosu 59780, Korea ²Research Planning Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

In recent years, myxosporean infection from the cultured olive flounders Paralichthys olivaceus, have been frequently observed in Jeju island, South Korea. This study aimed to compare histopathological and molecular-biological methods of examining myxosporean infection from these flounders. Samples were obtained from affected individuals exhibiting emaciation or abdominal distention and a polymerase chain reaction (PCR) indicative of Parvicapsular anisocaudata, Enteromyxum leei and Kudoa septempunctata were initiated. Histopathological examination were conducted with H&E stained tissue sections, and then *in-situ* hybridization (ISH) reaction were processed with selected sections using *P. anisocaudata, E. leei, K. septempunctata* and Scuticociliate probes. Renal and intestinal tissue degeneration were common symptoms associated with all samples. Sever glomerular and renal tubular degeneration were evident, as were intestinal epithelial desquamation and spore formation in the epithelial cells. The results of conventional PCR analysis and ISH reactions revealed differences, and we suspect that various microparasites may have been associated with the symptoms manifested.

Keywords: Histopathology, ISH (in-situ hybridization), Myxosporean, Paralichthys olivaceus

론 서

해산어류에서 나타나는 점액포자충류는 크게 6개의 분류군 (clade)으로 나누고 있는데, Myxidium clade, Kudoa clade, Enteromyxum clade, Ceratomyxa clade, Zschokkella subclade 그리고 Parvicapsula subclade가 그것이다(Dyková et al., 2013). 최근 양식넙치에서도 다양한 점액포자충 감염 발 생이 보고되고 있고 이들의 지속적인 발병과 생산에 미치 는 영향을 우려한 목소리가 높아짐에 따라 다양한 연구가 진 행되고 있다. Kudoa clade에 속하는 Kudoa septempunctata (Myxosporea:Multivalvulida)는 넙치의 근육 내 기생하는 것으 로 잘 알려져 있으며 6-7개의 극낭을 가지는 점액포자충으로,

*Corresponding author: Tel: +82. Tel: +82. 51. 720. 2820 Fax: +82. 51. 720. 2828 E-mail address: mycho69@korea.kr

 \odot (cc) BY NC

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Licens (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

감염 초기에 현미경적으로도 명확하게 관찰되지 않고, 감염이 진행되면 근섬유 다발 내에 pseudocvst를 형성하지만 육안적으 로 관찰되는 시스트 혹은 근육 궤양 같은 병변이 뚜렷하게 나타 나지 않아 양식어민들의 양식어 관리에 어려움을 주는 기생체 이다(Matsukane et al., 2010; Yoshiko et al., 2015; Takeuchi et al., 2016). Enteromyxum clade에 속하는 Enteromyxum leei의 경우, 1990년대 중·후반부터 복어 여윔증의 원인체로 보고된 점 액포자충 가운데 하나이다. 소화관 내에서 포자의 증식과 장상 피 괴사 또는 탈락으로 어체의 대사작용에 영향을 미치는 것으 로 알려졌고(Tun et al., 2002; Yasuda et al., 2005; Yanagida, 2017), 국내 양식넙치에서는 여윔증과 관련하여 지속적으로 연 구되어왔다(Kim et al., 2011, 2015, 2018). Sekiya et al. (2016)

https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0660 Korean J Fish Aquat Sci 54(5), 660-667, October 2021 Received 20 July 2021; Revised 18 August 2021; Accepted 27 August 2021 저자 직위: 이남실(연구원), 김아란(연구사), 서한길(연구사), 최혜승(과장), 조 미영(연구관)

은 양식 터봇과 함께 넙치 여윔병의 원인으로 *E. leei*를 지칭 하였다. Zschokkella subclade와 Parvicapsula subclade는 Marine urinary clade로 해산어의 방광에서 검출되는 점액포자충 류로 어류를 포함한 다수의 해양생물에서 이들 점액포자충의 감염이 확인되고 있다(Fiala, 2006; Kodadkova et al., 2014). 국내 양식넙치에서는 Parvicapsula subclade에 속하는 점액포 자충으로 *Parvicapsular anisocaudata*의 감염이 신장의 세뇨관 내에서 보고되었다(Cho and Kim, 2004; Cho et al., 2005). 방 광과 소화관에서도 몇몇 유사종이 검출되었고 이 또한 넙치에 유해한 점액포자충으로 인지되어 유전학적 분석 등 다양한 방 법을 통한 연구가 이루어지고 있다. 최근에는 Zschokkella subclade의 *Sinuolinea capsularis*가 방광에서 분리된 내용이 발표 되기도 하였다(Shin et al., 2019a).

K. septempunctata가 근육에 한정되어 감염되고 넙치의 폐사 에 직접적인 영향을 미치지는 못하는 반면(Matsukane et al., 2010; Yoshiko et al., 2015; Takeuchi et al., 2016), E. leei와 Parvicapsular sp.의 감염은 소화관, 신장 또는 방광에서 다량 검 출되고 어체의 대사에 영향을 미치는 것으로 보이며(Kim et al., 2011, 2015, 2018; Shin et al., 2018a, 2018b), 감염어가 폐사에 이르는 경우도 관찰되어 점액포자충의 감염은 양식넙치에서는 간과할 수 없는 병원체가 되었다.

이러한 점액포자충에 의한 다양한 감염 증상이 단일 감염에

Table 1. Information about sampled fish in the present study

의한 증상인지에 대한 의문이 생기던 중, 여윔증 증상을 나타내 는 넙치 병어의 병리조직학적 검사에서 점액포자충의 감염과 함께 다량의 섬모충이 관련조직 내에서 관찰되었다. 이러한 소 견은 점액포자충(myxozoa)의 감염으로 의심되는 증상들에 대 하여 원생생물(protozoa)과 같은 다른 미세기생체(microparasites)의 복합적인 관여가 의심되어 병리조직학적 관찰과 함께 분자조직학적 분석을 실시하였으며, 그 내용과 지금까지의 결 과를 정리하였다.

재료 및 방법

실험어

제주 연안의 넙치 양어장 가운데 어류 질병의 원인 세균 혹은 바이러스는 검출되지 않았으나 외관상 마르거나 복부가 팽창되 는 개체가 나타나는 양어장 8 (A-H)곳에서 각 한 수조를 선택하 여(단, D와 E는 2개 수조)에서 3-5마리씩 채취하여 총 40마리 의 넙치를 대상으로 체장, 체중을 계측하고, 육안적 소견과 부검 소견을 기록하였다. Table 1에 그 내용을 정리하였다.

분자생물학적 검사(conventional PCR)

양어장 혹은 수조 별 검출 유무 판별을 위해 샘플 대상 개체의 신장과 소화관을 개체 별로 구분하여 채취한 후 수조 별로 3-5

Farm	Evg. TL (cm)	Evg. TW (g)	External signs	Internal signs
A	38.83	552.67	LE (2/3), SE (1/3)	-
В	40.83	596.03	LE (2/3), SE (1/3)	-
С	28.13	241.80	LE (2/3), AD (1/3)	abdominal walls hemorrhage, ascites (1/3)
D1	28.23	199.47	LE (1/3), SE (1/3)	-
D2	28.83	181.23	LE (1/3), SE (1/3)	-
E1	35.76	481.54	LE (2/5), SE (1/5)	liver congestion (1/5)
E2	34.24	434.36	LE (1/5), SE (1/5)	-
F	38.40	553.26	LE (2/5), SE (2/5)	serous fluid (1/5)
G	44.22	834.12	SE (5/5)	white nodule in kidney (1/5)
H	37.36	507.02	SE (4/5)	-

TL, total length; TW, total weight; AD, abdominal distention; LE, light emaciation; SE, severe emaciation.

Table 2.	Primer s	sets i	information	for	conventional	PCR	in	the	present	study	y
----------	----------	--------	-------------	-----	--------------	-----	----	-----	---------	-------	---

Target agent	Primer name	Sequence (5'-3')	Target region, product size	Reference	
Danviaanaularan	PANMF	AGGAACGTTACATAGCCGGCA	190 500 hr	Shin et al. (2018b)	
Parvicapsular sp.	MyNMR	GACGGTATCTGATCGTCTTCGA	185, 502 bp		
Enterom www.loci	ELNMF	CGGTGACGCCAATCCGTG	199 100 hr	Chip et al. (2019h)	
Enteromyxum leel	MyNMR	GACGGTATCTGATCGTCTTCGA	185, 192 bp	Shin et al. (2018b)	
Kudaa aantamayunatata	KSf	GTGTGTGATCAGACTTGATATG	000, 050 hr		
	KSr	AAGCCAAAA CTGCTGGCCATTT	203, 350 DP		

PCR, polymerase chain reaction.

Target agent	Primer name	Sequence (5'-3')	Target region, product size	Reference	
Danviaanaular aniaaaaudata	Parvi-F CGATAGCAGAACGCCGG		19a 175 ba	Lab designed	
raivicapsulai allisocauuala	Parvi-R	GAGCAGGCCTGCTCTAACATGTA	105, 175 bp	Lab. designed	
Enteromynum logi	ELNMF	CGGTGACGCCAATCCGTG	19a 102 ha	Shin et al. (2018b)	
Enteromyxum teer	MYNMR	GACGGTATCTGATCGTCTTCGA	165, 192 bp		
Coutioopiliato	PSSU1 forward	GAGAAACGGCTACCACATCTA	19a 250 ha	Rosste-uscher et al. (2008)	
Scullcociliale	PSSU2 reverse	CAAGGTAAAGAGCCTACTCCA	168, 350 bp		
Kudaa aantampupatata	kudoa-ISH2L	AGCGCCTAGTGAGTCATTGA	E 00 ITO0 105 hr	Lee et al.	
	kudoa-ISH2R	ATCCAACACAACTGCCGAAC	5.65-1152, 165 bp	(2019)	

Table 3. Primer pairs used for ISH (in-situ hybridization) probe synthesis in the present study

마리의 신장과 소화관의 조직을 각각 pooling하고 DNA extraction kit (QIAmp[®] DNA mini kit; QIAZEN, Hilden, Germany) 를 이용하여 DNA를 추출하였다. Table 2에 나타낸 primer sets 을 사용하여 점액포자충의 18S rRNA의 일부를 합성하는 PCR (polymerase chain reaction)검사를 통하여 밴드를 확인하고 염 기서열 분석을 통하여 종을 확인하였다.

병리조직학적 검사(H&E stain)

부검 시 병리조직학적 검사를 위한 조직슬라이드표본 제작 을 위해, 중성완충포르말린에 각 개체의 신장(후신)과 소화관 (후장)을 고정하고 표본 제작을 위한 수세, 탈수, 투명화, 파라 핀 침투의 일련의 과정을 거쳐 파라핀 블럭을 만들고, Rotary 형 마이크로톰(HistoCore MULTICUT; Leica, Nussloch, Germany)을 사용하여 조직을 박절하였다. 슬라이드글라스에 부착 시켜 건조시킨 후 Hematoxylin and Eosin 염색을 실시하였다.

Table 4. The results of PCR analysis about *Parvicapsular anisocaudata, Enteromyxum leei* and *Kudoa septempunctata* for tissue samples at 8 farms

	*Detected sample no./ Total sample no. (Detected farm no./Total farm no.)							
Farm	P. anisc	caudata	Ε.	leei	K. septempunctata			
	К	I	К	I	K	I		
A	+	-	-	+	-	-		
В	+	-	-	-	-	-		
С	+	-	-	+	-	-		
D1	+	-	-	-	-	+		
D2	+	-	-	+	-	-		
E1	+	-	-	+	-	-		
E2	+	-	-	+	-	-		
F	+	-	-	+	-	-		
G	+	-	+	+	-	-		
Н	+	-	-	+	-	-		
Rate*	6/10	(5/8)	8/10	(7/8)	1/10	(1/8)		
K kidney:	I intesti	ne						

K, kidney; I, intestine.

제작된 표본은 광학현미경(Axio A1; Carl ZEISS, Goettingen, Germany)으로 관찰하고 당사 소프트웨어로 이미지를 얻어 정 리하였다(ZEN 2.3 blue edition; Carl ZEISS, Goettingen, Germany).

ISH (*in-situ* hybridization)

H&E (Hematoxylin and Eosin)염색하여 관찰한 슬라이드표 본과 같은 조직에 해당하는 슬라이드 절편에 *P. anisocaudata*, *E. leei*, Scuticociliate 그리고 *K. septempunctata*에 특이적으 로 결합 반응하도록 Dig DNA labeling mix (Roche)를 사용하 여 Dig이 부착된 PCR product를 200bp내외의 크기로 합성하 였고, 이 합성물을 probe로 하여 조직 절편과 hybridization 반 응시켜 광학현미경으로 발색 반응 여부를 확인하였다. ISH (*insitu* hybridization)반응시켜 관찰하는 전반의 제작과정은 Lee et al. (2009)을 참고하였다. Probe 합성에 사용된 Primer sets의 정보는 Table 3에 나타내었다.

결 과

분자생물학적 검사(conventional PCR)

통상적으로 실시하는 PCR을 통한 분자생물학적 검사결과, P. anisocaudata는 8개소 10개 모든 신장조직 시료에서 검출되었으며, 소화관 조직에서는 검출되지 않았다. E. leei는 7개소 8개 소화관 시료에서 검출되었으며 신장에서는 1개소 1개 시료에 서 검출되었고, K. septempuctata는 1개소 1개 시료의 소화관 조직에서만 검출되었다(Table 4).

병리조직학적 검사(H&E stain)

개체 별 신장(후신)과 소화관(후장)의 H&E 염색표본 관찰 결과, 공통적으로 나타나는 소견으로 신장의 세뇨관과 사구체 의 조직 변성(degeneration of glomerulus and renal tubules, DeGR; Fig. 1A), 세뇨관 내강에 포자충의 원형질체(plasmodium) (plasmodium in renal tubules, Prt; Fig. 1B)가 채워져 있는 형태가 양어장에 따라 그 정도가 다르게 관찰되었다. 소 화관은 내강의 상피세포의 변성과 박리 현상(desquamation of



Fig. 1. Common finding about kidney and intestine sections of olive flounder have pathognomonic symptoms. G, glomerulus; Rt, renal tubule; white arrow, plasmodium; white circle, degenerate of glomerulus; black arrow, myxospore; black circle, desquamation of epithelial cells (H&E stain); A&B, kidney of C farm (bar, 50 μm); C&D, intestine of C farm (bar, 100 μm).



Fig. 2. Protozoan cells in uro-genetic tissue of D1 farm sample (bar,100 µm). A, mass of protozoan cells in intratesticular coelome; B, ciliates in coelome adjacent to urinary bladder; C, testis tissue after ISH reaction with scuticociliate probe. Arrows, protozoan cells (=ciliates); ISH, *in-situ* hybridization.

epithelial cells, Dep; Fig. 1C)이 공통적으로 나타나며, *E. leei* 감염 개체의 경우 소화관 내 상피세포에 구형의 포자형성이 관 찰되었다(myxospore in epithelial layer, Mep; Fig. 1D). 이 같 은 소견은 A, C, D와 G양어장에서 뚜렷하게 관찰되었으며 개 체에 따라 세뇨관 내 칼슘 성분의 침착물로 인해 호염성 염색 물 질이 진하게 관찰되는 calcinosis 증상도 관찰되었다. 특히 D1 의 경우 신장 조직의 말단과 함께 적출되어 조직표본이 제작된 생식소(정소) 조직 내강에 섬모충으로 보이는 원생생물이 군집 을 이루어 다수 관찰되었으며(Fig. 2A), 요관 내에서도 유사한 형태의 미동정 충체가 소수 관찰되었다(Fig. 2B). 소화관(후장) 내피세포에서 포자가 관찰되지 않는 경우에도 장상피 변성과 박리는 개체에 따라 정도를 달리하며 관찰되었다. 각 양어장의 신장과 소화관의 증상은 그 정도를 나타내어 Table 5에 정리하 였다. H 양어장의 경우 세포변성의 정도로 자가융해(autolysis) 가 진행되었을 가능성이 의심되었다.

ISH 반응

H&E염색에서 세포변성이 명확히 관찰된 A, C, D1, D2 그리 고 G 조직표본에 대하여 *P. anisocaudata*, *E. leei*, Scuticociliata 그리고 *K. septempunctata*에 대한 ISH반응을 실시하였으며 그 결과, 신장조직 내에서는 *P. anisocaudata*에 대한 ISH반응이 뚜



Fig. 3. Kidney and intestine tissue after ISH. A, kidney of A farm after ISH with *Parvicapsular anisocaudata* probe (bar=100 μm); B, kdney of D1 farm after ISH with *Enteromyxum leei* probe (bar=50 μm); C, intestine of D2 farm after ISH with *E.leei* probe (bar=100 μm); D, intestine of D2 farm after ISH with *P. anisocaudata* probe (bar=100 μm); Arrows, positive reacted cells; ISH, *in-situ* hybridization.

렷하게 관찰되었으나 *E. leei*에 대한 반응은 대부분 나타나지 않 았고, A, C, D 그리고 G의 경우 신장에서도 *E. leei*에 대한 반응 이 관찰되었지만 반응세포수는 현저히 적은 것을 알 수 있었다 (Fig. 3A, 3B, 3C).

반면 소화관에서는 *E. leei*의 반응이 우세하게 관찰되었다. 장 상피 내에 포자 형성이 명확하게 관찰되는 조직표본에서 *E. leei* 에 대한 ISH반응 또한 명확하게 관찰된다(Fig. 3A, 3B, 3C). 소 화관 조직에서 *P. anisocaudata*에 대한 양성반응을 나타낸 세포 가 관찰된 개체는 없었지만 D2의 한 개체에서 장상피 점액세포 내에서 양성반응이 관찰되었다(Fig. 3D).

D1의 생식소 조직에서 관찰된 다량의 원생생물은 Scuticociliate에 대하여 ISH반응을 나타내었다(Fig. 2C). *K. septempuctata*에 대한 ISH반응은 모두 음성으로 확인되었다.

고 찰

양식 넙치에서 다양한 점액포자충 감염이 나타나는 가운데 이 들에 대한 형태학적 또는 분자학적인 다양한 방법을 통한 연구 가 지속되고 있다. 2004년과 2005년에 국내 양식넙치의 비뇨계 조직에서 *Parvicapsular anisocaudata*를 비롯한 다른 미동정 점 액포자충의 감염이 보고되었으며(Cho and Kim, 2004; Cho et al., 2005), 같은 시기에 일본 미야자키현 양식넙치에서 점액포 자충에 의한 여윔병의 원인을 *Enteromyxum leei*로 설명하였다 (Yasuda et al., 2005). 초기에는 질병의 발생과 형태학적 연구에

치우쳤으나 최근에는 원인체의 분자학적 분석에 집중하고 있다 (Kim et al., 2015; Sekiya et al., 2016). 지금까지의 연구에서는 양식넙치에서 나타나는 여윔병의 원인을 E. leei로 설명하는 보 고들과 함께, 이와 별개로 P. anisocaudata의 비뇨계 조직 내에 서 관찰된 내용을 주로 보고하고 있었지만, 이들 점액포자충의 복합감염에 관한 내용은 찾아보기 힘들다. 이러한 가운데 최근 Metagenomic analysis 또는 Multiplex PCR과 같은 분자진단 기법을 활용하여 여윔 증상이 있는 넙치에서 검출되는 기생체 를 구분하고 점액포자충감염과 관련요소들과의 상관관계에 관 하여 연구한 연구에서는 여윔 증상이 심한 개체일수록 소화관 에서 E. leei가 검출되는 비율이 높았지만 방광에서는 여윔 증 상과 관계없이 P. anisocaudata가 많은 비율 검출되었다(Shin et al., 2018b). 물론 여윔 증상이 심한 개체에서는 방광에서도 E. leei가 비교적 높은 비율 검출되어 여윔 증상과 E. leei와의 상관 관계는 설명되었지만 E. leei만의 감염으로 여윔증이 나타나는 것인지에 관한 의문이 남는다

최근 양식넙치에서 여윔 증상이 나타나는 경우뿐 아니라 복 강 내 복수가 저류되는 증상을 보이며 폐사하는 예가 빈번하여 원인분석을 실시한 결과, 부검시 육안적으로 방광과 요관 및 생 식관에 심한 염증과 체액고임 현상, 복강 내 복수고임도 동반되 어 복부팽만 증상이 나타나고 신장의 조직변성도 함께 나타났 다. 현미경으로 방광 내 고인 액체를 관찰하였을 때, 종을 구분 하지 못한 *Parvicalpsular* sp. 와 다양한 형태로 관찰되는 점액 포자충류의 plasmodium이 관찰되었다. 최근 한국의 양식 넙치 방광 내에서 관찰된 점액포자충과 관련한 보고에서 Parvicapsular 좋은 포자의 형태와 위치, 숙주 특이성과 분자학적 특징을 바탕으로 *P. curvatura*로 설명하고 있지만 다른 점액포자충(*P. anisocaudata, Sinuolinea* sp., *Myxodavisia* sp., 그리고 *Ortholinea* sp.)의 co-infection에 관하여 언급하고 있으며, 최근에는 *Myxodavisia jejuensis*라는 새로운 종의 동정 결과를 보고하였 다(Shin et al., 2018a, 2019b).

본 연구의 병리조직학적 검사에서 신장에서의 조직변성이 심 한 개체는 장상피 변성 혹은 장상피에서 E. leei의 포자증식상 이 관찰되었다. PCR검사에서는 신장에서만 P. anisocaudata가 검출되었지만, ISH 반응검사에서는 D2를 제외하고 신장에서 P. anisocaudata와 함께 E. leei가 반응세포수는 적었지만 모두 검출되었다. 또한 모든 소화관에서 P. anisocaudata가 검출되지 않은 가운데 D2의 소화관 점액세포 내에서 반응 양성이 확인되 어 이후 추가적인 조사가 필요할 것으로 보인다(Table 4, Table 5, Table 6). 최근에 양식 넙치에서 보고된 Parvicapsular 종 가 운데 P. curvature에 대한 추가 실험과 염기서열 분석으로 신 장조직에서는 2개소 3개 시료에서 검출되었으나 소화관에서는 역시 검출되지 않았다(data not shown). PCR검사에서 K. septempunctata가 D1수조의 소화관 조직에서 검출되었지만 ISH 반응에서는 K. septempunctata에 대한 반응은 모든 샘플에서 음성으로 나타나 앞으로 더 많은 감염 개체를 대상으로 분석이 필요할 것으로 생각된다.

이처럼 지금까지의 보고에서는 물론 본 연구에서도 다양한 점 액포자충이 신장, 소화관에서 검출되고 있음이 확인되었다. *K. septempunctata*는 근육조직에서, *E. leei*는 장상피조직에서 포 자가 명확히 관찰되고, *P. anisocaudata*는 방광액에서 유주형 의 포자충이 다량 관찰된다. 그러나 본 연구에서 관찰한 결과, plasmodium의 경우 신장조직 내에 *P. anisocaudata*가 우세하지 만 *E. leei*도 검출되었으며, PCR검사에서 소화관 조직에서 *K. septempunctata*가 검출된 예도 있다. H&E 염색을 통한 신장 조직의 관찰에서는 다양한 형태의 영양체(trophic stage)가 관 찰되어 본 연구에서 동정되지 않은 점액포자층의 감염도 의심 되었다. 또한 plasmodium보다 그 크기가 큰 원생생물이 생식소 에서 관찰되어 ISH로 확인한 결과 Scuticociliate인 것으로 확인 되어 점액포자층 만이 아니라 섬모층도 복합감염 되어 있었다. Scuticociliate는 지금까지 넙치의 체표와 아가미에서 감염증 상을 주로 관찰할 수 있으며 증상이 진행되면 근육과 신경조직 인 뇌로 이동하여 나타나는 것으로 알려져 있지만(Moustafa et al., 2010), 최근 분자학적 검사에서 장과 신장에서도 검출되는 것이 보고되었다(Kim et al., 2019). 본 연구 결과에서 주목할만 한 점은 스쿠티카층의 감염이 확인된 D1수조는 다른 수조들에

비해 신장 병변이 약하고 소화관 상피내 포자형성이 나타나는 개체가 없어 본문의 넙치에서 나타나는 병적 증상과 관련한 직 접적 연관성을 설명하기 어렵다. 따라서, 생식소의 scuticociliate 감염에 관해서는 더 많은 관찰과 고찰이 필요할 것으로 생 각된다.

넙치의 비뇨생식관이 체외부로 연결되는 말단에서 합류하는 특성상 요관과 생식관을 통해 신장조직 또는 생식소에 포자충 류의 감염이 이루어질 수 있다. 신장의 세뇨관 혹은 요관 내 포 자충의 증식과 사구체의 변성은 신장기능의 이상을 가져올 수 있으며, 요관 말단의 확장부인 방광에서의 염증 발생과 방광 내 염증성 체액이 고이는 증상은 신장의 조직변성과 괴사로 이어 져 어체의 체액 발란스를 무너뜨리는 결정적인 요인이 될 수 있 고, 이것은 어체의 폐사로 이어 질 수 있을 것으로 보인다.

연어과 어류에서는 *Parvicapsular* sp.의 신장 감염이 신장 부 종은 물론 사구체(glomeruli)와 세뇨관(renal tubule)상피에 영 양체(trophozoites)가 잔류하며 조직에 영향을 미치는 예를 보

Form	Histopathological findings						
Farm	Kidney	Intestine					
A	DeGR (++,3/3), Prt (++,2/3), calcinosis (1/3)	Dep (++,3/3), Mep (++,2/3)					
	DeGR (+,1/3), Prt (-)	Dep (-), Mep (-)					
С	DeGR (+++,3/3), Prt (+++,3/3)	Dep (+++,3/3), Mep (++,3/3)					
D1	DeGR (+,3/3), Prt (+,3/3), clacinosis(1/3) Ciliates in gonad* and the coelom (+++,1/3)	Dep (++,2/3), Mep(-,0/3)					
D2	DeGR (++,3/3), Prt (+,2/3), calcisosis(1/3)	Dep (+,2/3), Mep (++,2/3)					
E1	DeGR (+), Prt (-)	Dep (+), Mep (-)					
E2	DeGR (+), Prt (-)	Dep (+), Mep (-)					
F	DeGR (+,2/2), Prt (-), calcinosis (1/2)	Dep (+, BI), Mep (+)					
G	DeGR (+++,5/5), Prt(+,2/5), calcinosis(1/5)	Dep (+++,5/5), Mep (++,4/5)					
Н	DeGR (++,4/4), Prt (++,2/4)**	Dep (++,4/4)**, Mep (++,3/4)					

DeGR, degeneration of glomerulus and renal tubules; Prt, plasmodium in renal tubules; Dep, desquamation of epithelial cells; Mep, microspore in epithelial layer; BI, bacterial infection; *, gonad removed with the end of kidney tissue; **, this tissue was doubtful of autolysis.

Torrack accent	Α	С	D-1	D-2	G	
larget agent	ΚI	ΚI	ΚI	ΚI	ΚI	
Parvicapsular anisocaudata	+ -	+ -	+ -	+ +	+ -	
Enteromyxum leei	+ +	+ +	+ -	- +	+ +	
Scuticociliate			+ -			
Kudoa septempunctata						

Table 6. The result of ISH (*in-situ* hybridization) reaction against 4 kinds of probe

K, kidney; I, intestine.

고하였으며(Jones et al., 2004a, 2004b), PKD (prolifeative kidney diseae)는 *Tetracapsuloides bryosalmonae*가 원인이지 만 어종과 연령에 따라 증상의 정도도 달라지며 발생 시기도 정해져 있는 것으로 설명하고 있다(Stephen and Matt, 2006).

양식 넙치에서 최근 여윔 증상을 비롯한 복부 팽창 등 그 증상 에 대한 원인을 한가지의 병원체로 단정짓기 어려운 질병의 발 생이 매년 지속되고 있는 상황에서 점액포자충이 가장 유력한 원인으로 지목되고 있다. 그러나 아직 원인으로 크게 거론되지 않는 Scuticociliate와 같은 섬모충의 생식소 내 감염과 동정되 지 않은 점액포자충류의 검출은 의외의 다양한 미세기생충이 복합적으로 관여하여 발병할 가능성을 고려해 보아야 하는 것 은 아닐까 생각된다. 관련 병증의 발생 조건에 대한 정확한 데이 티베이스를 기반으로 예방할 수 있는 방법에 대한 연구도 집중 적으로 이루어져야 할 것이며, 또한 이후 유사 병증이 나타나는 경우에 비뇨생식계의 분자생물학적, 병리조직학적인 계획적인 검토는 물론 혈액 성분의 분석도 추가적으로 실시해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다. 본 연구를 통하여 넙치양식장의 연안에 서 발생하는 해양미생물이 양식 환경에 미치는 영향에 대하여 조금 더 고민해 보아야 할 것으로 여겨진다.

사 사

본 논문은 국립수산과학원 "수산생물질병 특성연구(R2021 065)" 연구개발비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Cho JB and Kim KH. 2004. Light and electro microscopical observation of *Parvicapsula anisocaudata* (Myxosporea: Parvicapsulidae) from urinary system of cultured olive flounder *Paralichtys olivaceus*. J Fish Pathol 17, 179-189.
- Cho JB, Lee MK, Huh MD and Kim KH. 2005. Co-infection of two myxosporean parasites-*Parvicapsula anisocaudata* and an unidentified myxosporean-in the kidney of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. J Fish Pathol 18, 119-124.
- Dykov I, Kodádkov A, Buron I, Fiala I and Roumillat WA. 2013. Sinuolinea infections in the urinary system of Cynoscion

species (Sciaenidae) and phylogenetic position of the type species of *Sinuolinea* Davis, 1917 (Myxozoa:Myxosporea). Int J Parasitol Parasites Wildl 2, 10-17. https://doi. org/10.1016/j.ijppaw.2012.11.004.

- Fiala Ivan. 2006. The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. Int J Parasitol 36, 1521-1534. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.06.016.
- Grabner DS, Yokoyama H, Shirakashi S and Kinami R. 2012. Diagnostic PCR assay to detect and differentiate *Kudoa sep-tempunctata*, *K. thyrsites* and *K. lateolabracis* (Myxozoa, Multivalvulida) in muscle tissue of olive flounder *Parali-chthys olivaceus*. Aquaculture 338-341, 36-40. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.022.
- Jones SRM, Prosperi-Porta G, Dawe SC and Barnes DP. 2004a. Distribution, prevalence and severity of *Parvicapsular minibicornis* infections among anadromous salmonids in the Fraser River, Britich Columbia, Canada. Dis Aquat Org 54, 49-54. https://doi.org/10.3354/dao054049.
- Jones SRM, Prosperi-Porta G, Dawe SC, Blackbourn J, Taylor K, Lowe G and Osborn A. 2004b. Proliferative renal myxosporidiosis in adult coho salmon *Oncorhynchus kisutch* in British Columbia and Washington. Folia Parasitologica 51, 221-227. https://doi.org/10.14411/fp.2004.027.
- Kim H, Baek KW, Kim A, Luan MT, Lim Y, Roh HJ, Kim N, Kim DH, Choi YH, Kim S, Kim HS, Ock MS and Cha HJ. 2019. Genome based quantification of *Miamiensis avidus* in multiple organs of infected olive flounder *Paralichthys olivaceus* by real-time PCR. Genes Genomics 41, 567-572. https://doi.org/10.1007/s13258-019-00792-z.
- Kim SM, Jun LJ, Lee DW, Park HK, Jeong HD, Kim JS and Jeong JB. 2018. Monitoring of emaciation disease in cultured *Paralichthys olivaceus* of Jeju island during 2014-2015. Fish Aquat Sci 21, 17. https://doi.org/10.1186/s41240-018-0094-z.
- Kim SM, Jun LJ, Park MA, Jeong HD and Jeong JB. 2015. Characterization of the myxosporean parasite isolated from emaciated olive flounder *Paralichthys olivaceus* on Jeju Island. Korean J Fish Aquatic Sci 48, 337-345. https://doi. org/10.5657/KFAS.2015.0337.
- Kim YK, Jeong JB, Lee MK, Park SI, Park MA, Choe MK and Yeo IK. 2011. Pathophysiology of olive flounder *Paralich-thys olivaceus* suffering from emaciation. J Fish Pathol 24, 11-18. https://doi.org/10.7847/jfp.2011.24.1.011.
- Kodadkova A, Dykova I, Tyml T, Ditrich O and Fiala I. 2014. Myxozoa in high arctic: Suvey on the central part of Svalbard archipelago. Int J Parasitol Parasites Wildl 3, 41-56.
- Lee NS, Do JW, Park JW and Kim YC. 2009. Characterization of virus distribution in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*; Temminck and Schlegel) infected with Megalocytivirus. J Comp Path 141, 63-69. https://doi.org/10.1016/j. jcpa.2009.03.008.

- Lee NS, Do JW, Kim MS, Won K, Cho M and Jung SH. 2019. Examination about Infection form of *Kudoa septempunctata* in muscle of olive flounder *Paralichthys olivaceus* using molecular and morphological methods. J Kor Fish Mar Edu 31, 154-162. https://doi.org/10.13000/JFMSE.2019.2.31.1.154.
- Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y and Yoshiko SK. 2010. *Kudoa septempunctata* n.sp.(Myxosporea:Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* imported from Korea. Parasitol Res 107, 865-872. https:// doi.org/10.1007/s00436-010-1941-8.
- Moustafa EMM, Tange N, Shimada A and Morita T. 2010. Experimental scuticociliatosis in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* infected with *Miamiensis avidus*: Pathological study on the possible neural routes of invasion and dissemination of the scuticociliate inside the fish body. J Vet Med Sci 72, 1557-1563. https://doi.org/10.1292/jvms.10-0214.
- Rossteuscher S, Wenker C, Jermann T, Wahli T, Oldenberg E and Schmidt-Posthaus H. 2008. Severe scuticociliate *Philasterides dicentrarchi* infection in population of sea dragons (*Phycodurus eques* and *Phyllopteryx taemidlatus*). Vet Pathol 45, 546-550. https://doi.org/10.1354/vp.45-4-546.
- Sekiya M, Setsuda A, Sato H, Song K, Han JK, Kim GJ and Yeo IK. 2016. Enteromyxum leei (Myxosporea:Bivalvulida) as the cause of myxosporean emaciation disease of farmed olive flounders Paralichthys olivaceus and a turbot Scophthalmus maximus on Jeju Island, Korea. Parasitol Res 115, 4229-4237. https://doi.org/10.1007/s00436-016-5200-5.
- Shin SP, Jin CN, Sohn HC and Lee J. 2018a. Parvicapsula curvatura n. sp. in cultured olive flounder Paralichthys olivaceus and phylogenetic characteristics of the genus Parvicapsula. Dis Aquat Org 130, 199-207. https://doi.org/10.3354/ dao03276.
- Shin SP, Jin CN, Sohn HC and Lee J. 2019a. Sinuolinea capsularis (Myxosporea:Sinuolineidae) isolated from urinary bladder of cultured olive flounder Paralichthys olivaceus. Korean J Parasitol 57, 127-134. https://doi.org/10.3347/ kjp.2019.57.2.127.
- Shin SP, Jin CN, Sohn HC, Yokoyama H and Lee J. 2019b. A new species *Myxodavisia jejuensis* n. sp. (Myxosporea: Sinuolineidae) isolated from cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* in South Korea. Parasitol Res 118, 3105-3112. https://doi.org/10.1007/s00436-019-06454-z.
- Shin SP, Sohn HC, Jin CN, Kang BJ and Lee J. 2018b. Molecular diagnostics for verifying an etiological agent of emaciation disease in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. Aquaculture 493, 18-25. https://doi. org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.041.
- Stephen WF and Matt L. 2006. Phylum Myxozoa. In: Fish disease and disorder Vol.1 Protozoan and Metazoans infections. P.T.K. Woo, ed. CAB International., London, U.K., 231-296.

Takeuchi F, Ogasawara Y, Kato K, Skizuka T, Nozaki T, Yoshi-

ko SK and Ohnish T. 2016. Genetic variants of *Kudoa sep-tempunctata*_(Myxozoa:Multivalvulida), a flounder parasite causing foodborne disease. J Fish Dis 39, 667-672. https://doi.org/10.1111/jfd.12395.

- Tun T, Ogawa K and Wkabayashi H. 2002. Pathological changes induced by three myxosporeans in the intestine of cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* (Temminck and Schlegel). J Fish Dis 25, 63-72. https://doi.org/10.1046/ j.1365-2761.2002.00333.x.
- Yanagida T. 2017. Myxosporean emaciation disesease. Fish Pathol 52, 63-67. https://doi.org/10.3147/jsfp.52.63.
- Yasuda H, Ooyama T, Nakamura A, Iwata K, Palenzuela O and Yokoyama H. 2005. Occurrence of the myxosporean emaciation disease caused by *Enteromyxum leei* in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol 40, 175-180. https://doi.org/10.3147/jsfp.40.175.
- Yoshiko SK, Fukuda Y, Mori K, Mekata T, Namba T, Kuroda M, Yamazaki A and Ohnishi T. 2015. New validated rapid screening methods for identifying *Kudoa septempunctata* in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Jpn J Infect Dis 68,145-147. https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2014.133.