양식 동남아산 뱀장어, *Anguilla bicolor*의 *Anguillid herpesvirus-1* (AngHV-1) 감염증

박성우[†] · 정은빈* · 김동완**

군산대학교 수산생명의학과, *농림수산검역검사본부 원도사무소, **동경미생물

Outbreak of Anguillid herpesvirus-1 (AngHV-1) infection in cultured shortfin eel (*Anguilla bicolor*) in Korea

Sung-Woo Park[†], Eun-Bin Jung*, and Dong-Wan Kim**

Department of Aquatic life Medicine, Kunsan National University, Kunsan, 573-701, Korea,

*Wando District Office, Animal, Plant & Fisheries Quarantine and Inspection Agency. Wando, Chunnam 537-801, Korea,

**Dongkyung Microbial Technology & Development Company, Iksan, Chunbuk 570-912, Korea

Diseased eel (*Anguilla bicolor*) displayed severe hemorrhages in the gills, and congestion and swelling in the liver. During the epizootic, the water temperature was 28°C and the mortality rates were about 5%. No parasites were found on the gills and skin. Bacteria were not cultured from any internal organs using TSA or SS agar at 28°C for 48 hrs.

Histopathologically, the gills showed epithelial hyperplasia in the base of secondary gill lamellae and hemorrhages in the capillaries. Some cells in the proliferated interlamellar epithelia exhibited marginal hyperchromatosis. And severe vacuolated changes in the parenchymal cells and congestion in the central veins were observed in the liver.

The specific amplicon (396 bp) was detected from gills and opercula of affected eel PCR using *Anguillid herpesvirus-1* (AngHV-1) -specific primer sets HVAPOLVPSD (5'-GTG TCG GGC TTT GTG GTG C-3') and HVAPOLOOSN (5'-CAT GCC GGG AGT CTT TTT GAT-3'). Sequencing analysis of the amplicon demonstrated that this gene was 99% homologous to the AngHV-1 sequence deposited in GenBank. This is the first report of AngHV-1 outbreak in the farmed shortfin eels (*A. bicolor*) in Korea.

When diseased fish were maintained for 10 days at water temperatures of 32°C and 35°C, the cumulative mortalities were 100% and 10%, respectively. Even though the AngHV-1 genome in the gills from the eel kept at 35°C was detected using PCR, the structure of gill filaments was similar with that of normal fish. Increasing the water temperature to 35°C was an effective way to diminish the mortality of AngHV-1 affected eel.

Key words : *Anguilla bicolor*, AngHV-1, Treatment.

2011년 극동 지방에서의 *Anguilla japonica* 실패장어의 체포량은 대만이 약 900-1,000kg, 일본이 50-60kg

및 중국이 200-300kg에 불과하였다. 이 때문에 *A. japonica* 실패장어의 수요량에 비해 공급량이 절대적으로 부족하여, 실패장어 가격 또한 마리당 약 2,800원으로 kg당 가격은 약 30,000,000원을 호가하고 있을 뿐만 아니라 실패장어의 구입이 불가능하여 폐업

[†]Corresponding author : Sung-Woo Park

Tel : +82-63-469-1884

E-mail : psw@kunsan.ac.kr

하는 뱀장어 양식장도 증가하고 있다. 그럼으로 뱀장어 양식업체에서는 한 마리 당 실뱀장어 가격이 약 300-400원 (kg당 2,000,000-2,500,000원) 으로 상대적으로 저렴한 동남아시아산 뱀장어 (*Anguilla bicolor*) 또는 아프리카산 실뱀장어 (*Anguilla mosambica*) 를 구입하여 사육하는 양식업자의 수가 증가하였다. 그러나 국산 실뱀장어 대신에 입식한 동남아산 실뱀장어의 양식법에 관한 자료가 전무한 관계로 기존의 국산 뱀장어 사육 방식으로 사육하고 있지만, 양식의 성패는 아직 미지수이다.

*A. bicolor*는 두부가 짧고, 주둥이가 넓으며, 아래턱이 명확하지 않고, 두부의 눈과 눈 사이의 간격이 넓고, 등지느러미가 항문 위에서 시작되며, 체색은 등쪽은 진한 올리브색이며, 배쪽은 노란색을 띠는 등 *A. japonica*와는 형태적으로 차이가 나지만, 생활사는 거의 유사한 것으로 보고되어 있다 (Marine Fisheries Information Service, 1980).

동남아산 뱀장어의 사육 중 발생하는 질병에 관한 자료는 Dorairaj (1984) 가 보고한 수생균, *Aeromonas* 병, *Flavobacterium* 감염에 의한 부식병, 가스병 및 *Heterosporis*가 알려져 있지만, 이는 유수식 양식장에서 발병한 질병이다. Wang *et al.* (2006) 은 대만에서 수입한 동남아산 뱀장어와 호주산 뱀장어 (*Anguilla australis*, 600-750g) 를 동시에 사육 중 지방조직의 위축, 위의 장막의 점상출혈 등을 나타내는 개체에서 *Anisakis* sp.와 *Eustrongyloides* sp, *Tetrahynchidea* sp., *Lepidopus caudata* 및 *Brachyphallus crenatus* 등 5종의 기생충이 검출되었다고 보고하였다. 한편 태국에서 자연 서식하는 *A. bicolor*의 소화관에는 *Procamallanus anguillae* (= *Spirocamallanus anguillae*) 와 *Physalopteridae* gen. sp.와 *Anisakis* sp.가 감염되는 것으로 보고되었다 (Moravee *et al.*, 2006).

본 연구는 종래 *A. japonica*를 사육하였던 수조에

서 사육중인 *A. bicolor*치어에서 아가미와 간장의 충혈을 주 증상으로 하는 질병의 원인, 병리조직학적 성상 및 치료 방법에 관하여 검토한 결과를 보고한다.

재료 및 방법

병어

2011년 12월 인도네시아에서 수입한 동남아산 뱀장어 (*A. bicolor*) 실뱀장어를 충남 소재의 순환여과식 양식장 (15m×15m×0.5m) 에 수용하여 사육 중 아가미의 충혈과 간장의 발적 종대를 주된 증상으로 하는 평균 체장 9.7 cm (8.6-10.3cm) 의 병어 12마리를 시료로 사용하였다.

병어의 신장, 비장, 간장 및 혈액을 tryptic soy agar (TSA, Difco) 및 *Salmonella-Shigella* (SS) agar (Difco) 에 접종하여 25℃에서 48시간동안 배양 후 원인균의 분리를 시도하였다. 또한 피부의 점액 및 아가미를 절취하여 기생충의 존재 유무를 현미경으로 검정하였다.

조직병리학적 관찰

병어의 아가미뚜껑, 아가미, 간장, 비장 및 신장을 Bouin액에 24시간 동안 고정하였다. 고정 후, 알코올 탈수계열을 거쳐 파라핀으로 포매한 다음 5 μm의 절편조직을 만들어 Mayer hematoxylin-eosin 염색을 실시하여 검정하였다.

PCR을 통한 AngHV-1의 확인

아가미, 아가미뚜껑 및 간장의 일부를 절취하여 시판용 DNA 추출 kit (Bioneer Co, Korea) 를 이용하여 DNA를 추출하였다. 바이러스 감염 여부 조사를 위해 Anguillid herpesvirus-1 (AngHV-1) 의 특이적 primers 인 HVAPOLVPSD (5'-GTG TCG GGC TTT GTG GTG

C-3') 와 HVAPOLOOSN (5'-CAT GCC GGG AGT CTT TTT GAT-3') (Rijsewijk *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2012) 을 사용하였으며, PCR 조건으로는 10분/94℃ (initial denaturation), 30초/94℃ (denaturation), 45초/65℃ (annealing), 60초/72℃ (elongation), 7분/72℃ (final elongation) 로서 총 40회 DNA증폭을 실시하였다. 증폭된 DNA 16 µl를 TAE electrophoresis buffer (40mM Tris, 20 mM acetate, 2 mM EDTA) 에 용해시킨 1.5% agarose gel상에서 전기영동하여 자외선 하에서 394 bp의 특이 밴드를 확인하였다.

병어의 승온 사육

발병한 양어장에서 전형적인 아가미 뚜껑의 발적을 나타내는 병어 20마리를 별도로 입수하여 수량 0.25t의 플라스틱 사각 수조에 수용하여 수온을 32℃와 35℃로 조정하였다. 사육기간 중 먹이는 투여하지 않았으며, 매일 1/3사육수를 같은 온도로 미리 조정

한 신선한 물로 교환하면서 폐사 미수를 계수하였다. 또 경시적으로 각각 임의의 6마리를 채집하여 아가미의 변화와 PCR에 의한 AngHV-1의 검출을 보기 위하여 각각 3미씩을 사용하였다. 사육 중 폐사한 개체로부터의 AngHV-1 검출유무는 PCR로 확인하였으며, 아가미의 도말표본을 만들어 아가미의 상태를 비교하였다.

결과 및 고찰

발병 양식장의 사육 수온은 32℃, 사료 (백자사료) 의 일간투여량은 어체중의 약 8%, 환수량은 1일 80% 였다. 발병 뱀장어는 뱀장어 전용 입물임사료 (Nisshin, Japan) 로 1 5 일간 먹이 불임하여, 백자사료 (Nisshin, Japan) 로 전환한 13일 (입물임부터 28 일) 째에 처음 발병이 확인되어 시료채취일 (입물임부터 43일) 에도 증상이 나타나고 있었다. 병어는

Fig. 1. Diseased fish showing hemorrhages in the operculum (A-B) and abdominal wall (C), redness and swelling of the liver, and accumulation of water in the stomach (D). Moribund (A & B) and dead (C & D) fish.

체색이 검어지며 물 표면을 힘없이 헤엄치지만 질병이 경과함에 따라 체색은 회백색으로 변화되면서 폐사가 발생하였다. 병어는 먹이 섭취는 가능하지만, 먹이 섭취량이 많으면 많을수록 폐사량은 증가하는 경향이였다.

외부 증상은 육안으로 관찰하면 아가미의 충혈에 의해 아가미 뚜껑에 발적(發赤)이 있는 것처럼 보이는 것이 가장 현저한 증상이다. 또한 간장 부근의 복부에 출혈이 생기며 두부가 종창된 느낌이다. 내부 증상은 간장의 발적 또는 퇴색이 현저하지만, 다른 장기에 이상은 없으며, 처음 발생부터 시료 채취일까지 15일 동안의 누적폐사율은 4.5%였다. 또 폐사 후 시간이 경과된 개체는 위가 확장되어 있었다. 한편 신장, 비장 및 간장 등의 내부를 TSA 및 SS agar에 도말하여 25°C에 48시간 배양한 후에도 세균의 발육은 확인되지 않았으며, 피부와 아가미의 표본에서도 기생충은 발견되지 않았다.

병어의 이러한 증상은 *A. japonica*의 AngHV-1의 증상과 매우 유사하였지만 (Lee et al. 1999; Kim et al., 2012), 가슴지느러미의 발적과 아가미 뚜껑의 부식이 없거나 뚜렷하지 않은 반면 복부의 출혈이 있는

것이 차이가 났다. 또한 Haenen et al. (2002) 는 *A. anguilla*에서는 두부, 아래턱, 아가미 뚜껑 및 지느러미의 출혈, 피부 궤양, 아가미의 출혈과 울혈, 간의 퇴색과 출혈, 부레의 종창 및 복수가 생긴다고 보고하였다. 그러나 *A. bicolor*에서는 지느러미의 출혈, 피부 궤양, 부레의 종창과 복수가 발생하지 않는 점에서 차이가 났다.

병리조직학적으로 병어는 아가미 2차 새변 기부의 상피세포의 증식에 의한 새변의 유착과 2차 새변의 모세혈관의 출혈 및 호흡상피의 박리가 관찰되었다 (Fig. 2A). 또한 2차 새변 사이에 증생된 상피세포의 감염세포는 핵막과염상을 띄는 세포가 관찰되었다. 병어를 육안적으로 관찰하면 아가미에 출혈이 있는 것처럼 보였지만, 조직학적으로 아가미 뚜껑 내부에서는 출혈이 관찰되지는 않았고, 바깥쪽의 상피세포가 증생되어 두터워지면서 주름이 형성되고, 그 아래의 결합조직에도 주름이 형성되어 연골에서 이탈되는 변화가 관찰되었다. 간장에서는 간장의 실질세포의 현저한 공포화와 중심정맥 내의 충혈이 현저하였다 (Fig. 2B). 또한 간장 부위의 복부가 적색으로 보이는 것도 아가미 뚜껑의 변화와 마찬가지로

Fig. 2. A: gills showing epithelial hyperplasia in the base of secondary gill lamellae and hemorrhages in the capillaries. Inset: some cells in the proliferated interlamellar epithelia exhibiting marginal hyperchromatism. B: severe vacuolation in the parenchymal cells and congestion in the central veins in the liver. HE. Bar=100 μ m Inset=20 μ m

간장의 색깔이 반영된 것으로 복벽에는 조직학적 변화는 발견되지 않았다.

아가미에서의 조직학적 변화는 한국산 뱀장어의 변화 (Kim et al. 2012) 와 새변의 충혈과 붓기를 주요 변화로 하는 기존의 보고 (Lee et al. 1999a; van Nieuwstadt et al. 2001; Rijsewijk et al. 2005) 와 일치하였다. 그러나 아가미 뚜껑에서는 출혈과 괴사 등의 변화는 관찰되지 않고 단지 상피세포의 증생에 의한 주름 형성으로 하부의 연골에서 분리되는 변화만이 발견되었다. 이는 *A. bicolor*의 경우에는 종묘 크기의 어류에 발생하였기 때문에 아가미 뚜껑에 AngHV-1의 감염에 의해 상피세포가 증생된 다음에 출혈 및 괴사 등의 변화가 일어나기 전에 폐사가 유발된 것으로 추정된다.

AngHV-1의 polymerase gene을 표적으로 한 특이 primer sets를 사용하여 PCR반응한 결과는 Fig. 3에 나타난 것처럼 아가미, 아가미 뚜껑을 시료한 경우에는 Kim et al. (2012) 의 결과와 마찬가지로 394 bp의 특이 밴드가 형성되었다. 그러나 신장, 비장 및 간장을 시료로 하였을 때는 특이밴드가 형성되지 않았다. Jakob et al. (2009) 는 북부독일의 야생 *A. anguilla*의 AngHV-1의 보균상태를 PCR로 조사한 결과 아가미에서만 검출되고 신장, 비장 및 간장에서는 검출되지 않았다는 결과와 일치하고 있다.

van Beurden et al. (2010) 은 AnHV-1은 Alloherpesviridae 과에 속하는 바이러스의 게놈분석을 통하여 2개의 clades로 구분하였다. 즉 AnHV-1과 잉어류의 herpesvirus (Cyprinus herpesvirus 1, CyHV-1; Cyprinus herpesvirus 2, CyHV-2; Cyprinus herpesvirus 3, CyHV-3) 가 속하는 것과 *Ictalurid herpesvirus 1* (IcHV-1) 과 개구리의 herpesvirus (ranid herpesviruses 1 & 2, RaHV 1, RaHV 2) 가 속하는 것으로 뱀장어류에 발병하는 AngHV-1은 잉어과의 Herpesvirus와 유사한 특성을 가진 종으

로 분류되고 있다. 국내에서 뱀장어의 Herpesvirus 감염은 Kim et al. (2012) 의 보고뿐이었지만, 새로운 양식종으로 사육이 시도되고 있는 *A. bicolor*에도 AngHV-1이 주요한 질병으로 작용할 가능성이 있음을 본 연구에서 처음으로 제시하였다.

Fig. 3. The amplicons of *Anguillid herpesvirus-1* (AngHV-1) DNA polymerase genes (394 bp) from the gills (A), kidney and spleen (B), and liver (C), operculum (D) of diseased eel by PCR using species-specific primer sets, HVAPOLVPSD (5'-GTG TCG GGC TTT GTG GTG C-3') and HVAPOLOOSN (5'-CAT GCC GGG AGT CTT TTT GAT-3'). E: Negative control (only primer). F: Positive control. Gills from *Anguilla japonica* (Kim et al, 2012). M: Molecular marker.

폐사율을 줄이기 위해 병어를 32°C와 35°C로 온도를 올려서 사육하였을 때, 사육 초기에는 대부분의 어류가 사육 수조 표면 또는 중층에서 유영하였다. 1일이 경과하면 35°C에서는 수조의 바닥에서 헤엄치는 개체가 증가하였지만, 32°C에서는 변화가 없었다. 또한 35°C에서는 체색이 검은 상태로 유지되지만, 32°C에서는 희게 퇴색되는 개체가 나타나 이러한 개체는 대개 폐사하였다. 예비 실험에서 36°C에서 사육하였을 때는 1일 이내에 모두 폐사하였다. 10일간 승온 처리한 다음 아가미를 절취하여 검경하면, 35°C처리어는 새변이 긴 강어의 구조와 비슷하지만, 32°C처리어는 새변이 출혈과 유착된 상태로 남아 있었다 (Fig. 4).

Fig. 4. Photographs of the gills from eel kept at 35°C (A) or 32°C (B) for 10 days. Wet preparation. Bar=100 μ m

10일 동안의 사육기간 동안의 누적 폐사율은 Fig. 5에 표시한 것처럼 35°C에서는 10%에 불과하였지만, 32°C에서는 전 사육기간 지속적으로 폐사하여 10일 후에는 20미 모두 새변의 증생과 유착 증상을 나타내면서 폐사하였다. 폐사어의 아가미를 시료로 하여 PCR로 AnHV-1의 존재 유무를 조사한 결과 32°C에서의 모든 폐사어는 모두 양성으로 나타났다. 또한 35°C에서 사육한 생존어의 아가미에서도 PCR법으로 조사하였을 때, AnHV-1는 양성임에도 불구하고 폐사는 발생하지 않아 보균상태로 전환하는 것으로 생각되었다.

바이러스성질병은 약제의 의한 치료 방법이 없기 때문에 사육환경을 개선함으로써 폐사율을 감소시키는 방법이 채택되고 있다. 즉 잉어과 어류에서 Cyprinid herpesvirus-1의 감염에 의한 pox병은 사육수온을 25-30°C (Fijan, 1976) 로, Cyprinid herpesvirus-3의 감염에 의한 Koi herpesvirus병은 수온을 30-32°C로 사육하는 방법 (Ronen et al., 2003; 根本 등, 2011)에 의해 폐사를 감소시키고 있다. 이는 어류와 병원체의 수온에 따른 활성의 변화를 활용한 시도로 뱀장어의 AngHV-1의 감염도 수온을 35°C로 상승시켜 사육함으로써 어체내에 바이러스는 존재하지만 폐사는 발

생하지 않는 것으로 생각된다.

Fig. 5. Cumulative mortalities of AnHV-1-infected *A. bicolor* kept at different water temperatures of 32°C and 35°C for 10 days.

요 약

양식 동남아산 뱀장어 *Anguilla bicolor*에 아가미의 출혈 및 간장의 충혈을 특징으로 하는 질병의 원인을 조사한 결과 Anguillid herpesvirus (AngHV-1)의 감염이 확인되었다. 병어는 병리조직학적으로 아가미의 상피세포의 증생과 모세혈관의 출혈, 간장의 공포변성 및 중심정맥의 충혈이 관찰되었다.

병어를 35°C에 10일간 승온 사육한 결과 아가미의 형태가 건강어의 아가미와 유사한 형태로 회복되었으며, 폐사율도 10%로 승온 처리가 폐사율 감소에 효과적인 것으로 나타났다.

사 사

본 연구는 군산대학교 수산과학연구소의 연구비 지원에 의한 대어민 질병 상담업무의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Dorairaj, K.: Some observations on the disease of the short finned eel, *Anguilla bicolor bicolor* McClelland. Proc. Symp. Costal Aquaculture. 3: 906-909, 1984.
- Fijan, N.: Diseases of cyprinids in Europe. Fish Pathol., 10: 129-132, 1976.
- Haenen, O. L. M., Dijkstra, S. G., van Tulden, P. W., Davidse, A. D., van Nieuwstadt, A. P., Wagenaar, F., and Wellenberg, G. J.: *Herpesvirus anguillae* (HVA) isolations from disease outbreak in cultured European eel, *Anguilla anguilla* in the Netherlands since 1996. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 22: 247-257, 2002.
- Jakob, E., Neuhaus, H., Steinhagen, D., Luckhardt, B., and Hanel, R.: Monitoring of *Herpesvirus anguillae* (HVA) infections in European eel, *Anguilla anguilla* (L.), in northern Germany. J. Fish Dis., 32: 557-561, 2009.
- Kim, H. J., Yu, J-H., Kim, D-W., Kwon, S. R., and Park, S-W.: Molecular evidence of anguillid herpesvirus-1 (AnHV-1) in the farmed Japanese eel, *Anguilla japonica*, Temminck & Schlegel, in Korea. J. Fish Dis., 35: 312-319, 2012.
- Lee N.S., Kobayashi J. & Miyazaki T.: Gill filament necrosis in farmed Japanese eel, *Anguilla japonica* (Temminck et Schlegel), infected with *Herpesvirus anguillae*. J. Fish Dis., 22: 457-463, 1999.
- Marine Fisheries Information Service: Technical and extension series No 23. Eel culture in India. Central Marine Fisheries Research Institute, Cochin, India. 1980.
- Moravee, F., Taraschewski, H., Anataphruti, M. T., Maipanich, W., and Laoprasert, T.: *Procamallanus* (*Spirocamallanus*) *anguillae* sp. n. (Camallanidae) and some other nematodes from the Indonesian shortfin eel *Anguilla bicolor* in Thailand. Parasitol. Res., 100: 69-75, 2006.
- Rijsewijk, F., Pritz-Verschuren, S., Kerkhoff, S., Botter, A., Willemsen, M., van Nieuwstadt, A., and Haenen, O.: Development of a polymerase chain reaction for the detection of Anguillid herpesvirus DNA in eels based on the herpesvirus DNA polymerase gene. J. Virol. Methods, 124: 87-94, 2005.
- Ronen, A. A., Perelberg, A., Abramowitz, J., Hutoran, M., Tinman, S., Bejerano, I., Steinitz, M., and Kotler, M.: Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. Vaccine, 21: 4677-4684, 2003.
- Wang, W.-S., Hung, S.-W., Lin, Y.-H., Shih, C.-W., Tu, C.-Y., Tung, K.-C., Chen, B.-R., and Ooi, H.-K.: Parasitosis of short-finned eel *Anguilla australis schmidt*, in Taiwan. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.,

- 26: 106-111, 2006.
- van Beurden, S. J., Bossers, A., Voorbergen-Laarman, M.
H. A., Haenen, O. L. M., Peters, S., Abma-Henkens,
M. H. C., Peeters, B. P. H., Rottier, P. J. M.,
and Engelsma, M. Y.: Complete genome sequence
and taxonomic position of anguillid herpesvirus
1. J. Gen. Virol., 91: 880-887, 2010.
- 根本孝, 中谷仁崇, 荒井将人, 野内孝則 昇温処理したコ
イヘルペスウイルス感染魚のKHV感染水
域での長期飼育観察 茨城内水試研報, 44: 13
~17, 2011.
-
- Manuscript Received : October 6, 2012
Revised : November 26, 2012
Accepted : November 27, 2012