

## 서해안 양식 뱀장어(*Anguilla japonica*) 병원체 모니터링 및 초대배양세포 기술에 의한 바이러스 감수성 분석

계현정 · 서한길 · 강희웅\* · 정현미†  
국립수산과학원(연구사 · \*†연구관)

### Pathogen Monitoring in Cultured Eel (*Anguilla japonica*) of West Coast Region of Korea and Virus Susceptibility Analysis Using Primary Culture Cell

Hyun Jung GYE · Han-Gill SEO · Hee Woong KANG\* · Hyun Mi JUNG†

National Institute of Fisheries Science(researcher · \*†senior researcher)

#### Abstract

Eel (*Anguilla japonica*) are the leading freshwater fish species with the highest nutritional value and added value, and are important fish species in the freshwater industry, accounting for 37% of freshwater fish production and 73% of production (KOSIS). Diseases occurring in domestic eels include bacterial pathogens such as *Edwardsiella* sp. and *Vibrio* sp. and parasitic pathogens such as *Pseudodactylogitus* sp. and *Trichodina* sp. In particular, cases of damage caused by JEECV (Japanese eel endothelial cell infection virus) and AngHV1 (Jang et al., 2021; Kim et al., 2023), which are viral diseases that cause great damage to eels, have been reported recently. In the case of viral diseases, there are no effective drugs or vaccines, so fish farms are complaining of difficulties. In this study, we intend to contribute to the research and development of viral disease prevention in eels by monitoring pathogen infections in eel farms and constructing established fish cell line and primary cell line from eel's fin. As a result of monitoring for pathogen infection, parasites were not detected, and bacterial diseases were mainly detected as *Edwardsiella*, and viral diseases were mainly detected as eel AngHV1. In addition, in farms where mass mortality was observed, the bacterial pathogen *Edwardsiella* sp. and the viral pathogen AngHV1 were most frequently detected as complex infections. Therefore, it is expected that virus and bacterial complex infections are likely to be involved in mass mortality, so care should be taken in disease management. In addition, no sensitivity was observed as a result of performing AngHV1 sensitivity tests using fish cell lines (BF-2, FHM, EPC, SSN-1) and established cell in eel's fin. In the future, it is considered that further research on fish cell lines should be conducted to prevention of viral diseases.

**Key words** : *Anguilla japonica*, AngHV1, Eel, JEECV

#### I. 서론

뱀장어(*Anguilla japonica*)는 영양가치 및 부가가치가 가장 높은 대표적인 담수 양식어종이며,

국내 양식산업에서 중요한 품종으로 내수면 어류 생산량의 37%, 생산금액은 73%를 차지하고 있다 (KOSIS, 2021). 우리나라에서는 1980년대에 국민 소득이 향상되면서 양질의 단백질 수요가 급증함

† Corresponding author : 32-745-0740, jeonghm@korea.kr

\* 이 논문은 2024년도 해양수산부 국립수산과학원 수산시험연구사업(R2024054)의 지원으로 수행된 연구입니다.

에 따라 본격적인 뱀장어 양식산업이 발전하게 되었다. 1990년대 중간 종자생산 단계에서 지수식 양식법에 의한 성만 생산체제로 바뀌었고 2000년대에 들어서 순환여과식 양식방법을 도입하였다(NIFS, 2017).

국내 양식 뱀장어에 발생하는 질병 중에서 세균성 질병의 병원체는 *Edwardsiella* sp., *Vibrio* sp. 등이 보고되어져 있으며, 기생충성 질병의 병원체는 *Pseudodactylogytus* sp., *Trichodina* sp. 등이 보고되어 있다(Kim et al., 2011; Kim et al., 2019). 또한 양식 현장에서는 척추만곡증으로 인한 뱀장어의 골격 기형으로 성장이 늦고 상품가치가 떨어져 양식 어가에 경제적 손실을 가져오고 있어 많은 어려움을 호소하고 있다. 특히 최근에는 뱀장어에 큰 피해를 입히는 바이러스성 질병의 병원체 JEECV (Japanese eel endothelial cell-infecting virus)와 AngHV1 (Herpesvirus anguillae)에 의한 피해사례가 보고되어 있다(Jang et al., 2021; Kim et al., 2023). 뱀장어의 바이러스성 질병은 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 문제가 되고 있으나 현재까지 효과적인 치료제나 백신이 개발되어 있지 않다.

바이러스는 살아있는 세포에서만 증식이 가능하며 특정한 숙주에서 증식이 가능한 숙주특이성을 이용한 세포배양법이 널리 이용되고 있는데 이 방법은 바이러스 자원을 대량 확보가 가능하고 바이러스의 감염력 확인 등 병원체 특성연구가 가능하다. 바이러스 배양에 주로 사용되는 방법은 감수성이 있는 동물에 바이러스를 직접 접종하여 감염시킨 후 감염조직에서 바이러스를 재분리하는 방법과 닭의 유정란을 이용하는 방법, 동물의 조직을 플라스크에서 배양하는 방법 등이 있다. 그러나 동물을 이용한 바이러스 배양법은 숙주동물의 면역반응에 의한 바이러스의 증식저해, 바이러스 잠복과 같은 문제가 발생할 수 있다.

국내 뱀장어 양식장에 큰 피해를 일으키는 뱀장어의 바이러스성내피세포괴사증(viral endothelial cell necrosis of eel, VECNE)의 원인체인 JEECV와

뱀장어허피스바이러스병(Herpesvirus anguillae disease)의 원인체인 AngHV1에 의한 피해저감을 위해 다양한 세포를 이용한 연구들이 진행되고 있다. 뱀장어허피스바이러스(AngHV1)의 경우 기존에 확립된 어류 주화세포인 EK-1 (Chen et al., 1982), CHSE-214 (Lannan et al., 1984), CHH-1 (Lannan et al., 1984), RTG-2 (Wolf and Quimby, 1962), BB (Wolf and Quimby, 1969), BF-2 (Wolf et al., 1966), FHM (Gravell and Malsberger, 1965), EPC (Fijan et al., 1983)에서 감수성이 확인되었다. 하지만 뱀장어 바이러스 연구는 대부분 연어과 어류 유래의 주화세포가 확립되어 있다. 본 연구에서는 뱀장어 바이러스성 질병 예방을 위해 백신개발에 사용할 고품질의 바이러스액을 확보하기 위하여 뱀장어 유래 주화세포를 개발하여 기존 감수성이 보고된 주화세포들과 뱀장어 유래 주화세포의 감수성을 비교·분석하고자 하였다.

본 연구에서는 서해안 지역 뱀장어 육상양식장의 질병 예방대책 기초자료를 확보하고자 국내 뱀장어 양식 생산량 절반 이상을 차지하고 있는 전남, 전북, 경기, 인천을 대상으로 2022년부터 2024년까지 양식 뱀장어 병원체 감염 모니터링을 실시하였다. 또한 최근 국내외로 문제시되고 있는 뱀장어의 바이러스성 질병 예방법 개발 및 병원체 특성연구를 위해 실험뱀장어를 대상으로 초대배양세포를 개발하여 기존에 감수성이 보고된 어류 주화세포와 감수성 비교·분석을 하고자 하였다.

## II. 연구 방법

### 1. 시료 채집

2022년부터 2024년까지 인천광역시 강화, 경기도 파주, 전라북도 정읍, 전라남도 영암과 영광 지역의 뱀장어 양식장 20개소를 대상으로 사육 중인 뱀장어 241마리를 무작위로 채집하여 (<Table 1>) 병원체 모니터링을 실시하였다. 시료는 비닐봉지 산소포장하여 차량을 이용해 살아있

는 상태로 실험실로 운반하였다.

초대배양세포 개발을 위해 경기도 파주 소재의 뱀장어 양식장에서 2023년에 입식 후 3개월간 양성한 실험뱀장어 지느러미(평균 전장 10cm, 평균 체중 5g)를 이용하여 그 해에 초대배양세포를 제작하였다.

## 2. 기생충 검사

기생충 검사는 시료의 아가미를 떼어내어 액침 표본을 제작하여 광학현미경을 통해 실시하였다.

## 3. 세균 및 16s rRNA sequence 분석

세균 분석은 시료의 간, 비장, 신장, 아가미 조직을 무균적으로 채취하여 brain heart infusion (BHI, Difco)와 salmonella-shigella (SS, Difco)의 한천평판배지에 도말한 후 25℃에서 1일간 배양하였다. 한천평판배지에서 우점한 콜로니를 대상으로 세균을 분리하였고, 다시 BHI 한천평판배지에서 순수배양된 세균을 대상으로 27F (5'-AGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-TACGGYTACCTGTACGAC TT-3') primer를 사용하여 16s rRNA 유전자를 PCR로 염기서열을 분석하였다(<Table 2>). 그 결과는 GenBank의 정보를 대상으로 기존에 보고된 세균 종과 비교하였다.

## 4. 바이러스 분석

뱀장어의 바이러스성내피세포괴사증 (viral endothelial cell necrosis of eel)의 병원체 JEECV와 뱀장어허피스바이러스병 (herpesvirus anguillae disease)의 병원체 AngHV1을 확인하기 위하여 뱀장어의 신장, 비장, 아가미를 무균적으로 적출하여 Lysing kit (Percellys, France)를 이용하여 마쇄하였다. 마쇄 후 Patho gene-spin DNA/RNA extraction kit (Intron, Korea)를 이용하여 DNA를 추출한 후 PCR을 수행하였다. JEECV 분석을 위

하여 PCR 진행 primer는 A1F와 A2R (270bp)를 이용하였고 AngHV1 분석을 위하여 APOLVPSDF와 APOLOOSNR (394bp)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR primer 및 조건은 <Table 2>에 표기하였으며 PCR 산물의 유무 및 크기는 전기영동을 통해 확인하였다. 이후 증폭된 시료로 염기서열을 분석하고 MEGA X program를 이용하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공하는 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 통해 기존에 등록된 유전자와의 상동성을 확인하였다.

## 5. 바이러스 분리

바이러스 배양액은 2023년 경기도 소재 뱀장어 양식장에서 뱀장어허피스바이러스병에 감염된 뱀장어의 신장조직을 이용하여 바이러스액을 제작하였다. 4℃에서 20분 동안 12,000rpm으로 원심분리 후 상층액을 분리하여 -80℃에 보관하였다.

뱀장어허피스바이러스병에 감염된 개체는 PCR 분석을 통해 394bp 크기의 밴드를 확인하였다. 또한 이후 증폭된 시료로 염기서열을 분석하고 MEGA X program를 이용하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공하는 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 통해 기존에 등록된 유전자와의 상동성을 확인 후 각 유전자의 계통발생학적 분석을 위하여 Clustal W에서 multiple alignment 방법으로 염기서열을 정렬하였다. MEGA X의 neighbor-joining을 이용하여 계통수를 작성하였으며, 계통수의 branch는 1,000 bootstrap resampling을 통해 결정하였다 ([Fig. 1]).

## 6. 초대배양세포 제작

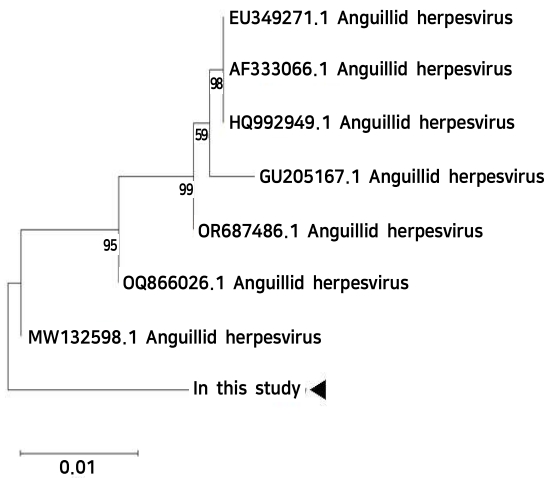
뱀장어 육상 양식장에 입식 후 3개월간 양성한 실험뱀장어(평균 전장 10 cm, 평균 체중 5 g)의 지느러미 조직을 무균적으로 채취하여 povidone iodine solution 100 ppm 농도로 10분간 소독하였고,

서해안 양식 뱀장어(*Anguilla japonica*) 병원체 모니터링 및 초대배양세포 기술에 의한 바이러스 감수성 분석

<Table 1> Sampling location and date of *Anguilla japonica* used in this study

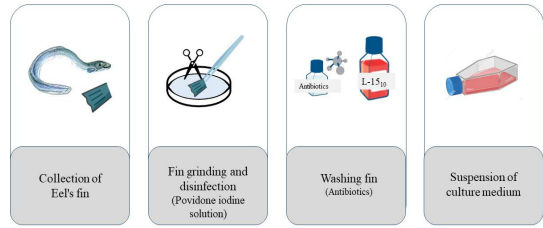
Place	Date	Farm	Fish weight(g)	Single Infectious pathogens (detection no./total no.)			Mixed Infectious pathogens (no. of detection/ no. of total)	Remark
				Bacterium	Virus			
					JEECV	AngHV1		
Incheon	'22.01.	A	180	E (2/10)	-	-	-	
	'22.07.	A	340	-	2/15	2/15	E, JEECV, AngHV1 (2/15) E, AngHV1 (1/15) JEECV, AngHV1 (1/15) Mortality (10%)	
Gyeong-gi	'22.05.	A	210	-	1/10	-	-	
		A	225	-	1/10	-	-	
		B	150	E (1/3)	-	1/3	-	
		C	268	-	-	-	E, AngHV1 (2/3)	
		D	89	E (1/5)	-	-	-	
Jeon-buk	'22.06.	E	69	-	-	2/5	-	
		F	40	-	-	1/4	-	
		G	20	-	-	1/5	-	
		H	234	E (2/5)	-	-	-	
		I	228	-	-	2/5	-	
		J	145	-	-	-	E, AngHV1 (1/5)	
		K	247	-	-	-	E, AngHV1 (1/3)	
		L	357	E (1/3)	-	1/3	-	
Incheon	'23.03.	A	350	-	-	9/14	-	
		A	200	-	-	1/2	E, JEECV, AngHV1 (1/2) Mortality (10%)	
	'23.06.	A	362	A (1/7)	-	3/7	-	
		A	362	-	-	2/5	A, AngHV1 (3/5) Mortality (5%)	
	'23.08.	B	349	A (3/4)	-	-	-	
Gyeong-gi	'23.04.	A	5	-	-	-	Glass Eel	
	'23.05.	A	5	-	-	-	Glass Eel	
Jeon-buk		A	220	-	-	-	E, AngHV1 (1/3) / E, JEECV, AngHV1 (2/3)	
	'23.04.	B	344	-	1/2	-	E, JEECV, AngHV1 (1/2)	
		C	230	E (1/2)	-	-	JEECV, AngHV1 (1/2)	
		D	10	-	-	2/4	-	
		E	120	-	1/4	2/4	JEECV, AngHV1 (1/4)	
	'23.09.	F	5	-	5/5	-	Mortality (5%)	
	'23.04.	A	116	-	3/13	1/13	A, AngHV1 (2/13) / A, JEECV (1/13) / JEECV, AngHV1 (2/13) A, JEECV, AngHV1 (2/13)	
Jeon-nam	'23.06.	B	142	-	-	4/20	E, AngHV1 (10/20) / E, A (1/20) / E, P (1/20) / E, A, AngHV1 (1/20) / P, AngHV1 (1/20) Mortality (40%)	
	'24.02.	C	170	-	2/6	-	E, AngHV1 (3/6) / JEECV, AngHV1 (1/6)	
	'24.04.	D	302	-	1/6	-	E, JEECV (4/6) / JEECV, AngHV1 (1/6)	
	'24.04.	E	220	-	2/10	-	A, JEECV, AngHV1 (2/10) A, JEECV (4/10)/A, AngHV1 (2/10) Mortality (8%)	
Total		average		4.9%	7.9%	14.1%	22.8%	
		191.3g		(12/241)	(19/241)	(34/241)	(55/241)	

\* Pathogens: E; *Edwardsiella* sp., A; *Aeromonas* sp., P; *Pseudomonas* sp., -: Not detected.



[Fig. 1] The phylogenetic tree constructed using the neighbor-joining method, using of MEGA software (version X; <http://www.megasoftware.net>). All reference sequences were acquired from the GenBankdatabase (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). The numbers indicate the percentages of bootstrap support from 1000 replicates. Bar, 0.50 substitutions per site.

이후 1,000 U/mL penicillin-streptomycin (Gibco) 가 포함된 Leibovitz's L-15 medium (Gibco)로 3번 세척하였다. 소독된 지느러미 조직을 채취하여 가위로 잘게 마쇄한 후 2 ml의 20% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco)가 포함된 L-15 배지에 재현탁하였다. 잘게 마쇄된 조직이 포함된 현탁액을 25 cm<sup>2</sup> flask (Corning)에 옮긴 후 28°C에서 배양하였으며, 배양액은 매주 교체하여 세포배양액에 포함된 불순물을 제거하였다. 세포의 단층형성이 관찰된 후 versene-trypsin solution [136.8 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 mM EDTA, 0.1% (w/v) trypsin]와 L-15<sub>20</sub> 배지액을 이용하여 계대배양을 실시하였다. 추가로 48번의 계대배양(1차 배양으로부터 1년간 계대배양) 후에 뱀장어 유래의 초대배양세포를 제작하였다([Fig. 2]).



[Fig. 2] Primary cell line from eel (*Anguilla Japonica*) fin reared at farms in Gyeong-gi province of Korea.

## 7. 바이러스 감수성 검사

AngHV1 감수성 검사는 어류 주화세포인 SSN-1 (Striped snakehead *Channa striata*), FHM (Fathed minnow, *Pimephalus promelas*), EPC (*Cyprinus carpio*), BF-2 (Bule gill, *Ictalurus nebulosus*)와 본 연구에서 확립한 실뱀장어 지느러미 유래 주화세포(EP-24)를 이용하여 바이러스 감수성 검사를 진행하였다. 주화세포가 단층으로 형성된 25 cm<sup>2</sup> flask에 바이러스배양액 100 uL을 각각 접종한 뒤 다양한 배양온도(20°C, 25°C, 30°C, 35°C)에서 10일간 배양한 후 세포변성효과 (CPE) 확인을 통해 감수성 검사를 진행하였다.

## Ⅲ. 연구 결과

### 1. 뱀장어 병원체 모니터링

본 연구는 2022년부터 2024년까지 서해안 5개 지역의 뱀장어 육상양식장 20개소를 대상으로 병원체 모니터링을 실시한 결과는 다음과 같다. 뱀장어 양식장 대부분의 연중 평균 수온은 27~31°C의 고수온을 유지하고 있었다.

기생충 병원체는 뱀장어 아가미 조직을 현미경 검경하였으나 불검출되었다 (data not shown).

세균 병원체는 뱀장어 총 241마리 중 10마리에서 *Edwardsiella* sp.와 *Aeromonas* sp.가 검출되었으며 임상증상으로는 *Edwardsiella* sp.가 검출된 뱀장어는 공통적으로 간출혈이 관찰되었지만 일

부 개체에서는 지느러미 출혈 등 다른 임상증상도 관찰되었다(<Table 2>).

바이러스 병원체는 총 241마리 중 JEECV는 19마리, AngHV1은 34마리에서 검출되었다. 바이러스 단독감염의 경우 JEECV 감염어는 공통적으로 간출혈과 체표에 출혈반점이 관찰되었으며 종종 무증상의 개체도 있었다. AngHV1 감염어는 공통적으로 간출혈과 지느러미 출혈 등이 관찰되었다. 바이러스 단독감염의 경우 폐사 없이 단순 검출만 되는 경우도 존재하였다(<Table 2>).

한편, 대량폐사가 일어난 뱀장어 양식장은 대

부분 세균과 바이러스의 복합감염이 관찰되었으며 검출률 또한 22.8%로 가장 높았다. 일부 시료에서는 병원체가 불검출되기도 하였으며, 특히 입식 후 3개월간 양성한 실뱀장어(평균 체중 5g)의 경우 병원체가 불검출되었으며 추후 지속적인 병원체 모니터링이 필요할 것으로 사료된다.

이상의 결과로 본 연구에서는 뱀장어의 세균성 질병은 에드워드병, 바이러스성 질병은 뱀장어허피스바이러스병, 이 밖에 복합감염은 세균성 병원체 *Edwardsiella* sp.와 바이러스성 병원체 AngHV1가 가장 많이 관찰되었다(<Table 2>).

<Table 2> PCR primer sets and amplification profiles used in this study

Pathogen (Disease)	Primer/Product size(bp)	Nucleotide sequence	PCR profile	Reference
Viral endothelial cell necrosis of eel (Japanese eel endothelial cell necrosis of eel, JEECV)	A1F / 270	5'-GACGGTCCTAAACATGAACGGTGAAATGTC-3'	95°C for 30s, 65°C for 30s, 72°C for 60s (70 cycles)	Mizutani et al. (2011)
	A2R / 270	5'-GGTATTTTGTACTCATTTCATAGTGGCAATC-3'		
Herpesvirus anguillae disease (Anguillid Herpesvirus 1, AngHV1, HVA)	APOLVPSDF/394	5'-GTGTCGGGCCTTTGTGGTGA-3'	94°C for 30s, 65°C for 45s, 72°C for 60s (40 cycles)	Rijsewijk et al. (2005)
	APOLOSNR/394	5'-CATGCCGGGAGTCTTTTGAT-3'		
Bacteria 16S rRNA	27F	5'-AGAGTTG ATCCTGGCTCAG-3'	95°C for 30s, 55°C for 30s, 72°C for 60s (30 cycles)	Weisburg et al. (1991)
	1492R	5'-TACGGYTACCTTGTTACGAC TT-3'		

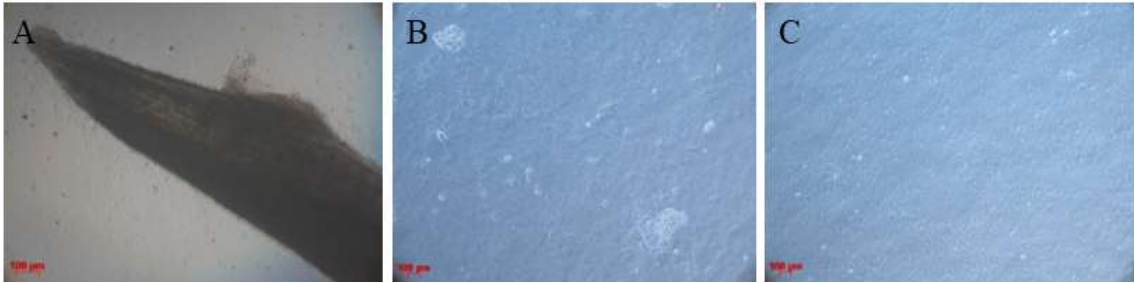
<Table 3> Fish cell line used in this study

Name	Tissue and fish species	Reference
SSN-1	Striped snakehead <i>Channa striata</i>	Frerichs et al. (1996)
FHM	Fathed minnow ( <i>Pimephalus promelas</i> )	Gravell and Malsberger (1965)
EPC	Carp ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Fijan et al. (1983)
BF-2	Bule gill ( <i>Ictalurus nebulosus</i> )	Wolf et al. (1966)
Eel's fin	Eel ( <i>Anguilla japonica</i> ) fin	In this study (2024)

## 2. 바이러스 감수성 검사

국내 뱀장어 육상양식장에 큰 피해를 일으키는 JEECV와 AngHV1에 의한 피해저감을 위해 다양한 세포를 이용한 연구들이 진행되고 있다. 본

연구에서는 AngHV1을 대상으로 기존에 확립된 BF-2, FHM, EPC 어류 주화세포와 실뱀장어 지느러미 유래 초대배양세포를 제작하여 뱀장어 분리 AngHV1에 대한 감수성 검사를 비교진행하고자



[Fig. 3] Development of the *Anguilla Japonica* eel fin cell line. (A) The primary explant culture and cell migration, (B) The monolayer of EP-24 cells at passage 10 times, (C) The monolayer of EP-24 cells at passage 30 times. Scale bars: 100 um

하였다(<Table 3>). 이를 위하여 실뱀장어 지느러미 유래 초대배양세포를 제작하고자 2023년 경기도 소재의 뱀장어 양식장에서 당해년도 3월에 입식한 실뱀장어(평균 체중 5g)를 이용하였다([Fig. 3A]). 그 후 10번과 30번의 계대를 통해 지느러미 유래 초대배양세포를 확립하였다([Fig. 3]). 이 세포주는 L-15<sub>10</sub> 배지에서 안정적으로 성장하였다. 세포의 형태는 전형적인 표피 세포의 형태를 나타내었다(EP-24).

본 연구는 기존에 확립한 BF-2, FHM, EPC 및 뱀장어 지느러미 유래 초대배양세포(EP-24)를 이용하여 AngHV1의 감수성 검사를 진행하였다. 그 결과 안타깝게도 다양한 배양온도(20℃, 25℃, 30℃, 35℃)에서 기존에 감수성이 보고된 어류주화 세포 BF-2, FHM, EPC 및 실뱀장어 지느러미 유래 초대배양세포(EP-24)에서 바이러스 대상 감수성은 관찰되지 않았다.

#### IV. 결론

뱀장어 병원체 검출률은 기생충 불검출, 세균은 *Edwardsiella* sp. 와 *Aeromonas* sp.의 경우 3.3% 및 1.6%로 각각 관찰되었으며, JEECV와 AngHV1의 경우 7.9% 및 14.1%로 각각 관찰되었다. 한편, 대량폐사가 일어난 뱀장어 양식장은 대부분 세균과 바이러스의 복합감염이 관찰되었으며 검출률 또한 22.8%로 가장 높았다. 주로

*Edwardsiella* sp.와 AngHV1의 복합감염으로 총 241마리 중 20마리에서 검출되어 전체 개체의 8.3%로 높은 비중을 차지였으며, 그 외 *Edwardsiella* sp.와 JEECV, AngHV1 복합감염이 2.4%, *Edwardsiella* sp.와 JEECV 복합감염이 1.6%, JEECV와 AngHV1 복합감염이 2.4%로 관찰되었다. 또한 세균간의 복합감염도 관찰되었는데 *Edwardsiella* sp.와 *Aeromonas* sp., *Edwardsiella* sp.와 *Pseudomonas* sp.가 각각 1마리씩 복합감염이 나타났지만 특이임상증상과 폐사는 관찰되지 않았다. 본 연구결과에서 도출된 병원체 간 복합감염이 뱀장어의 대량폐사와 직접적인 원인이라고 단정하기에는 어렵지만 전체 시료 중에서 22.8%로 높게 관찰되었으며 대량폐사한 경우 대부분 복합감염이 관찰되었다(<Table 1>). 따라서 바이러스와 세균 복합감염이 대량폐사에 관여할 가능성이 높을 것으로 예상되어 질병 관리에 주의를 요한다.

국내 양식 뱀장어에서 검출된 병원체 현황을 살펴보면 감염성 질병으로 아가미흡충감염증, 선충감염증, 에로모나스병, 에드워드병, 아가미부식병, 바이러스성내피세포괴사증, 뱀장어허피스바이러스병이 보고되어 있다(Chun, 1988; Han et al., 2000; Joh et al., 2007; Jang et al., 2021). Kim (2019)에 의하면 2004년부터 2017년까지 병원체 모니터링 결과 세균성 질병이 41%로 가장 많이 검출되었으며 가장 많이 검출된 병원체는

*Edwardsiella* sp.와 *Aeromonas* sp. 순이었다. 바이러스성 질병 중에서는 AngHV1가 가장 많이 검출되었다. 또한 Kim (2011)에 의하면 2000년부터 2010년까지 병원체 모니터링 결과 *Edwardsiella* sp.에 의한 감염이 만연하고 있었으며 그 밖에 AngHV1의 감염 병원체의 혼합감염에 대한 언급도 하였다. 본 연구에서도 *Edwardsiella* sp.와 AngHV1를 비롯한 혼합감염이 관찰되어 뱀장어의 질병진단 시 다각적인 분석이 필요하며 이에 대한 효과적인 예방대책이 필요하다고 사료된다.

한편, 국내 뱀장어 육상양식장에 큰 피해를 일으키는 바이러스성 병원체 중 AngHV1에 의한 피해저감을 위해 기존에 CPE 관찰이 보고된 BF-2, FHM, EPC 어류 주화세포와 실뱀장어 지느러미 유래 초대배양세포를 제작하여 뱀장어 분리 AngHV1에 대한 감수성 검사를 비교진행하였다(<Table 3>). 그 결과 안타깝게도 다양한 배양온도(20℃, 25℃, 30℃, 35℃)에서 기존에 감수성이 보고된 어류주화세포 및 실뱀장어 지느러미 유래 초대배양세포에서 감수성은 관찰되지 않았다. 본 연구에서 제작한 뱀장어 유래 주화세포 이용 시 감수성은 관찰되지 않았지만 어류 세포주는 다양한 연구에서 중요한 역할을 하며(Baksi and Frazier, 1990; Bols, 1991; Kohlpoth et al., 1999; Shuilleabhaina et al., 2006), 바이러스성 질병 연구를 위한 기초자료로 이용되기 때문에 본 연구에서 제작한 실뱀장어 유래 주화세포 개발에 기초 자료를 제공했다고 사료된다.

일반적으로 바이러스 감염은 바이러스 표면 단백질(Epitope)이 숙주세포의 특이적인 수용체(N-glycan)에 부착하여 이루어진다. N-glycan(N-linked glycosylation)은 세포 표면에 존재하며 바이러스 부착과 감염에 관한 역할을 한다(Miller et al., 2021). 따라서 추후에는 감수성 세포 표면의 N-glycan과 비감수성 세포 표면의 N-glycan 비교 분석 및 분리를 통해 뱀장어의 바이러스성 질병의 항바이러스 치료법 및 예방법 개발에 기여할 것이다.

또한 어류 감염성 바이러스를 어류주화 세포에 접종 후 감수성이 관찰되지 않았음에도 불구하고 세대배양하는 동안 지속적으로 배양액 내에서 바이러스 생성하는 것이 보고되어 있다(Oh et al., 2016). 이러한 원인은 대부분의 세포에서 바이러스 항원의 지속적인 존재 및 동종 바이러스에 의한 중복감염에 대한 저항 등이 보고되어 있다(Rima and Martin, 1976; Hedrick and Fryer, 1982). 따라서 향후 지속적으로 감염된 세포주에 대한 추가연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구결과로 서해안 지역 뱀장어 육상 양식장의 병원체 검출현황을 알아보았고 이는 뱀장어의 감염성 질병 예방관리에 매우 중요한 기초자료라 생각된다. 본 연구를 통해 혼합감염이 22.8%로 가장 많이 관찰되었으며, 단독감염의 경우 AngHV1 검출률이 14.1%로 가장 높아 이에 대한 예방대책이 필요하다. 이에 대한 예방대책으로 본 연구에서는 실뱀장어 지느러미 유래 초대배양세포를 개발하였으나 안타깝게도 감수성은 관찰되지 않았다. 추후 숙주세포의 특이적인 수용체(N-glycan) 및 지속감염된 세포주에 대한 추가연구로 바이러스성 질병 예방 대책을 마련하고자 한다.

## References

- Baksi SM and Frazier JM(1990). Isolated fish hepatocytes model systems for toxicology research. *Aquatic Toxicology* 16, 229~256.  
[https://doi.org/10.1016/0166-445X\(90\)90039-R](https://doi.org/10.1016/0166-445X(90)90039-R)
- Bols NC(1991). Biotechnology and aquaculture: the role of cell cultures. *Biotechnol Adv* 9, 31~49.  
[https://doi.org/10.1016/0734-9750\(91\)90403-I](https://doi.org/10.1016/0734-9750(91)90403-I)
- Chen SN, Ueno Y and Kou GH(1982). A cell line derived from japanese eel (*Anguilla japonica*) kidney. *Proc Natl Sci Council B, ROC* 6, 93~100.
- Chun SK(1988). Detection and control of bacterial diseases of cultured fishes in Korea. *J Fish Pathol* 1(1), 5~30.
- Fijan N, Sulimanovic D, Bearzotti M, Muzinic D,



- Zwillenberg LO, Chilmonezyk S, Vautherot JF and Kinkelin Pde(1983). Some properties of the epitheliosum cyprinid (EPC) cell line from carp, *Cyprinus carpio*. Ann Virol 1134E, 202~207.  
<https://doi.org/10.11233/aquaculturesci1953.47.97>
- Frerichs GN, Rodger HD and Peric Z(1996). Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. J Gen Virol 77, 2067~2071.  
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-9-2067>
- Gravell M and Malsberger RG(1965). A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Ann NY Acad Sci 126, 55~565.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1965.tb14302>
- Han JJ, Park SW and Kim YG(2000). Studies on monogenean trematodes classification from cultured freshwater fishes in Korea. Monogenean Trematodes from *Anguilla japonica* and *Parasilurus asotus*. J Fish Pathol 13(2), 75~86.
- Hedrick RP and Fryer JL(1982). Persistent infections of salmonid cell lines with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV): a model for the carrier state in trout. Fish Pathology 16, 163~172.  
<https://doi.org/10.3147/jfsfp.16.163>
- Jang MH, Lee MY, Cho MY and Song JY(2021). A study on the status and characteristics of JEECV (japanese eel endothelial cell-infecting virus) and AngHV (anguillid herpesvirus 1) infection in domestically farmed eels (*Anguilla japonica*, *Anguilla bicolor* and *Anguilla marmorata*). Kor J Fish Sci 54(5), 668~675.  
<https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0668>
- Joh SJ, Kwon YK, Kim MC, Kim MJ, Kwon HM, Park JW and Kwon JH(2007). Heterosporis anguillarum infections in farm cultured eels (*Anguilla japonica*) in Korea. J Vet Sci 8, 147~149. <https://doi.org/10.4142/jvs.2007.8.2.147>
- Kim HK, Jang MH and Jung SJ(2023). Monitoring of japanese eel (*Anguilla japonica*) diseases from 2021 to 2023(2023). significance of japanese eel endothelial cells-infecting virus (JEECV) and *edwardsiella anguillarum*. J Fish Pathol 36(2), 239~250.  
<http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2023.36.2.239>
- Kim DH, Lee HG, Lim BS and Park SW(2019). Present status of diseases detected from cultured eel, *Anguilla japonica* in Chungcheong and Jeolla provinces during 2004~2017 JFMSE 31(3), 884~892.  
<https://doi.org/10.13000/JFMSE.2019.6.31.3.884>
- Kim WS, Ok HN, Kim DH, Kim HY and Oh MJ (2011). Current status of pathogen infection in cultured eel *Anguilla japonica* between 2000 and 2010. J Fish Patho, 24(3), 237~245.  
<https://doi.org/10.7847/jfp.2011.24.3.237>
- Kohlpoth M, Rusche B and Nusse M(1999). Flow cytometric measurement of micronuclei induced in a permanent fish cell line as a possible screening test for the genotoxicity of industrial waste waters. Mutagenesis 14, 397~402.  
<https://doi.org/10.1093/mutage/14.4.397>
- KOSIS (Korean Statistical Information Service)(2021). Fishery production trend survey. retrieved from [https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT\\_1EW0001&vw\\_cd=MT\\_ZTITLE&list\\_id=K2\\_7&scrId=&seqNo=&lang\\_mode=ko&obj\\_var\\_id=&itm\\_id=&conn\\_path=MT\\_ZTITLE&path=%252FstatisticsList%252FstatisticsListIndex.do](https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_1EW0001&vw_cd=MT_ZTITLE&list_id=K2_7&scrId=&seqNo=&lang_mode=ko&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=MT_ZTITLE&path=%252FstatisticsList%252FstatisticsListIndex.do) on Aug 1, 2022.
- Lannan CN, Winton JR and Fryer JL(1984). Fish cell lines: Establishments and characterization of nine cell lines from salmonids. In Vitro 20, 671~676.
- Miller NL, Clark T, Raman R and Sasisekharan R (2021). Glycansin Virus-Host Interactions: A structural perspective. Front Mol Biosci 8, 666756.  
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.666756>
- Mizutani T, Sayama Y, Nakanishi A, Ochiai H, Sakai K, Wakabayashi K, Tanaka N, Miura E, Oba M, Kurane I, Saijo M and Morikawa S(2011). Ono novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica* Virology 412, pp. 179~187.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.057>
- NIFS (National Institute of Fisheries Science) (2017). Aquaculture Manual for Eel. NIFS, Busan, Korea, [https://www.nifs.go.kr/distantwater/skin/doc.html?fn=20230105103706735\\_0.pdf&rs=/distantwater/preview/Board0027/](https://www.nifs.go.kr/distantwater/skin/doc.html?fn=20230105103706735_0.pdf&rs=/distantwater/preview/Board0027/)
- Oh SY and Nishizawa T(2016). Multiple passages of grunt fin cells persistently infected with red seabream Iridovirus (RSIV) at 15°C or 30°C to yield uninfected cells. J Aqua Ani Heal 28, 214~221.  
<https://doi.org/10.1080/08997659.2016.1208120>

- Rima BK and Martin SJ(1976). Persistent infection of tissue culture cells by RNA viruses. *Medi Micro Immun* 162, 89~118.
- Rijsewijk F, Pritz-Verschuren S, Kerkhoff S, Botter A, Willemsen M, Nieuwstadt T and Haenen O(2005). 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.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.11.007>
- Shuilleabhaina Ni, Mothersill S, Sheehan C, O'Brien D, O'Halloranc NM, Peltc J, Kilemadec FV and Davorena M(2006). Cellular responses in primary epidermal cultures from rainbow trout exposed to zinc chloride. *Ecotoxicol Environ Saf* 65, 332~341.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.08.004>
- Wolf K and Quimby MC(1962). Established eurythermic line of fish cell in vitro. *Sci* 135, 1065~1066.  
<https://doi.org/10.1126/science.135.3508.1065>
- Wolf K and Quimby MC(1969). Fish cell and tissue culture. In: "Fish Physiology", pp. 253~305. Academic Press, New York and London.
- Wolf K, Gravell M and Malsberger RG(1966). Lymphocystis virus: isolation and propagation in centrachid fish cell lines. *Sci* 151, 1004~1005.  
<https://doi.org/10.1126/science.151.3713.1004>
- Weisburg WG, Barns SM and Pelletier DA(1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173, 697~703.  
<https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- 
- Received : 26 August, 2024
  - Revised : 07 October, 2024
  - Accepted : 14 October, 2024