

## 넙치에 기생하는 쿠도아 점액포자충(*Kudoa septempunctata*)의 활성 확인을 위한 염색법의 비교

도정완 · 문선화 · 김민지 · 조미영 · 정승희 · 이남실†  
(국립수산과학원 병리연구과)

### A Distinguishing Staining Methods for Vitality of *Kudoa (Kudoa septempunctata)* spores in Muscle of Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Jeong-Wan DO · Sun Hwa MOON · Min Ji KIM · Mi-Young CHO · Sung Hee JUNG · Nam-Sil LEE†  
(Pathology Division of National Institute Fisheries Science)

#### Abstract

Consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish have been reported as the cause of outbreaks of food-born illness, and *Kudoa septempunctata* in muscle of *Paralichthys olivaceus* was suggested with the causative agent. For this reason, distinguish of vital and dead spore is important to study survivability of *Kudoa septempunctata* in human intestinal condition and in vitro inactivation of *Kudoa septempunctata*. In this reports, we suggest NR & MB (Neutral red and Methylene blue) staining method that is easier and simpler than the previously described HO & PI (Hoechst33342 and Propidium iodide) method according to a experimental condition.

**Key words :** *Kudoa septempunctata*, *Paralichthys olivaceus*, Vital staining, Neutral red and methylene blue

#### I. 서론

*Kudoa septempunctata*는 점액포자충(myxozoa)의 일종으로 5~7개의 극낭을 가지는 포자(spore)의 형태로 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 근육에 분포하면서 육안적으로 관찰 가능한 시스트를 형성하지 않고 넙치에서는 외관상 병적 증상을 나타내지 않는 *Kudoa* sp.의 신종으로 보고되었으며, 그 유전형에 관한 연구도 활발하게 진행되고 있다 (Matsukane Y et al. 2010; Sugita-Konishi Y et al, 2015; Takeuchi F et al, 2016). 본 종에 대한 논란

은 2011년 6월 공식적으로 설사, 복통 등의 유증 사례의 원인으로 본 종에 감염된 넙치회를 언급한 이후(Kawai T et al. 2012), 넙치의 양식과 소비가 활발한 일본과 한국에서 다양한 연구가 이루어지고 있으며(Kawai T et al. 2012; Iwashita Y 2013; Sugita-Konishi Y et al. 2014; Song Jun-Young et al. 2013; 2014; Kim Wi Sik et al. 2015; Yokoyama H et al. 2015), 일본 내에서 발생하는 식중독 사례 중 매년 50건 이상이 쿠도아 점액포자충에 감염된 넙치를 날것으로 섭취한 이후 발생하였음을 보고하고 있어(Ministry of

† Corresponding author : 051-720-2487 nslee90@naver.com

\* 이 논문은 국립수산과학원 양식수산물 전략품목육성 연구개발사업 및 수산과학연구사업(R2016065)의 지원으로 수행되었음

Health, Labour and Welfare, Japan 2016) 식중독과 관련하여 식품안전상의 위해성 유무에 관해 논란이 되고 있다.

쿠도아 점액포자충의 생활사는 아직 명확히 밝혀져 있지 않지만 알려진 다른 쿠도아 점액포자충과 유사할 것으로 판단되며(El-Matbouli M and Hoffmann RW 1998; Yokoyama H 2004), *K. septempunctata*의 경우 넙치 근육 내 다량의 포자(spores) 형태로 존재하는 단계에서 넙치를 회와 같은 날것으로 섭취했을 때 설사, 구토 및 복통 등의 식중독 증상을 일으키며, 이것은 쿠도아 점액포자충이 살아있는 상태에서 장내 도달했을 때 나타나는 현상일 것으로 추정하고 있다. 보고에 따르면 *K. septempunctata*가 인체에 포자의 형태로 장내에 도달하면 포자는 포자원형질(sporoplasms)을 방출한다. 포자원형질은 장의 단층세포층에 도달하여 손상을 주고 이 포자원형질이 식중독 증상을 유발하는 원인체로 작용할 것으로 해석하고 있다(Ohnishi T et al. 2013; 2016; Shin San Phil et al. 2015). 그러나 이러한 증상은 발생한지 24시간 이내에 호전되었다고 한다.

따라서 *K. septempunctata*에 의한 식중독은 활성을 가진 포자원형질이 넙치의 근육 내에 얼마나 존재하는지가 문제시되며 포자가 활성을 가진 상태인지 비활성 상태인지를 파악하는 것이 식중독 관련연구에 있어 중요한 부분이다. 이를 확인하기 위한 방법을 모색하기 위해 생체조직을 대상으로 세포의 활성상태를 확인하는 방법으로 사용되는 Hoechst33342(또는 SYTO<sup>®</sup>9)와 Propidium iodide를 사용한 방법이 제시되었다(Yokoyama H et al. 2016). 본 방법은 형광현미경을 통하여 확인 가능한 방법으로 결과의 정확도는 높으나 실험적 환경이 그에 적합하지 않을 때, 즉 형광현미경과 같은 관찰에 필요한 장비가 갖추어져 있지 않은 상황에서 확인할 수 있는 방법이 없어 일반적으로 사용하는 광학현미경을 이용할 수 있는 방법을 모색하던 중 Neutral red와 Methylene blue를 혼합하여 사용한 염색법(Freshney R 1987;

Georges K 1935)이 실용성이 있어 본 방법에 대한 유용성을 알아보려고 하였다.

본 보고에서는 live cell과 dead cell을 간단히 구분하는 trypan blue 염색법과 vital staining법의 한가지인 Neutral red 염색의 변형인 Neutral red와 Methylene blue를 혼합하여 사용하는 염색법(이후 NR & MB 염색법), 그리고 이미 쿠도아 점액포자충의 활성을 확인하는 방법으로 사용되고 있는 Hoechst33342 & Propidium iodide법(이후 HO & PI 법)을 비교하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험어 및 포자액 준비

실험에 사용한 감염어는 쿠도아 진단 매뉴얼의 Live검사법에 따라(쿠도아 진단 매뉴얼, 2014) 근육 1g 당 10<sup>6</sup>개의 *Kudoa septempunctata* 포자를 가진 것으로 확인 된 감염넙치(체중 약 500g)를 실험실로 이송하여 근육부분만 채취하여 실험에 사용하였다. 이전 쿠도아포자충의 특성에 관한 연구보고(MAFF, 2016)와 실험실내 사전실험 결과를 바탕으로 활성을 가진 live 쿠도아 점액포자충은 이송 즉시 혹은 냉장보관 24시간 이내에, 그리고 비활성포자인 dead 쿠도아 점액포자충은 초저온(-80℃) 냉동하여 24시간이 지난 근육을 균질화 하였다. 균질화된 근육 1g 정량한 후 PBS와 혼합하여 pore size 100 $\mu$ m 메쉬(cell strainer, BD Falcon)에 1차적으로 거른 후 다시 이 액을 pore size 40 $\mu$ m 메쉬(cell strainer, BD Falcon)에 2차로 걸러 점액포자충액을 준비한다. 이 액을 1.5ml 마이크로튜브에 나누어 1500rpm, 10분간 원심하고 상등액을 버리고 PBS를 가하여 침전을 희석하고 5ml가 되도록 하여 실험용 포자액으로 사용하였다.

### 2. 염색법 비교

Trypan blue는 0.4% trypan blue stain (Gibco)액

을 사용하여 포자액과 염색액을 5:1의 비율로 상온 또는 30°C에서 10~15분간 반응시켜 관찰하였다. NR & MB(Neutral red & Methylene blue)염색법은 0.05% neutral red액과 0.05% methylene blue액을 1:1로 섞어 이액을 포자액과 다시 1:1로 35°C, 10분간 반응시켜 관찰하였다. HO & PI법은 Hoechst33342(Sigma)는 28µg/ml, Propidium iodide(Sigma)는 1µg/ml 로 상온에서는 30분, 35°C에서는 15분 반응시켜 형광현미경(Axio Imager, Zeiss)으로 관찰하였다.

### III. 결과

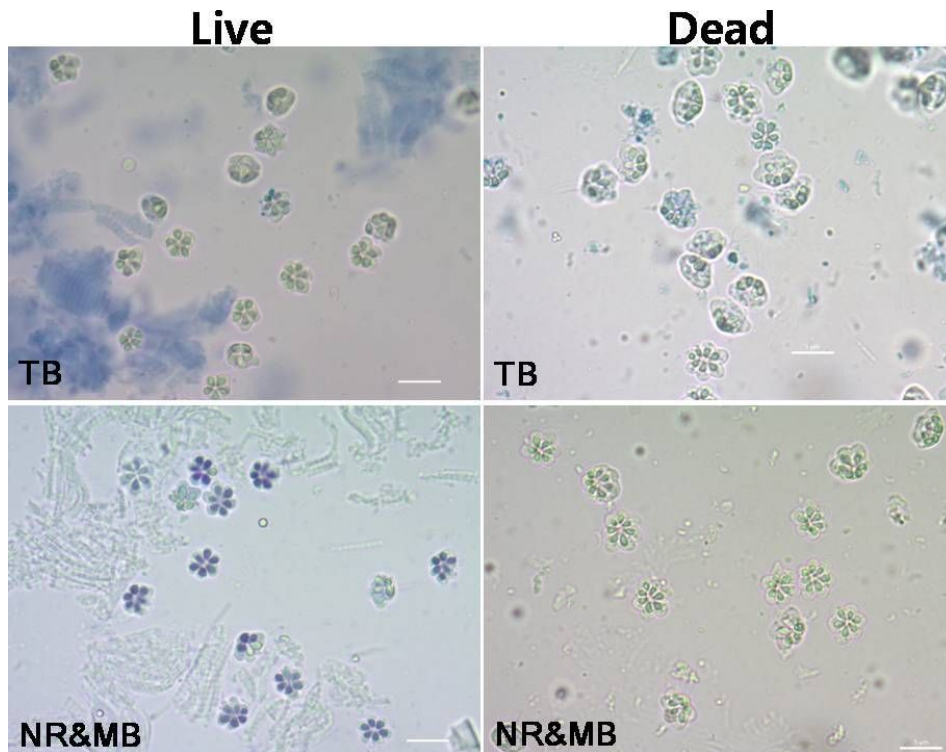
#### 1. Trypan blue와 NR & MB 염색법

Trypan blue로 염색한 경우 활성을 가진 살아있는 쿠도아포자는 염색성을 띄지 않지만 비활성

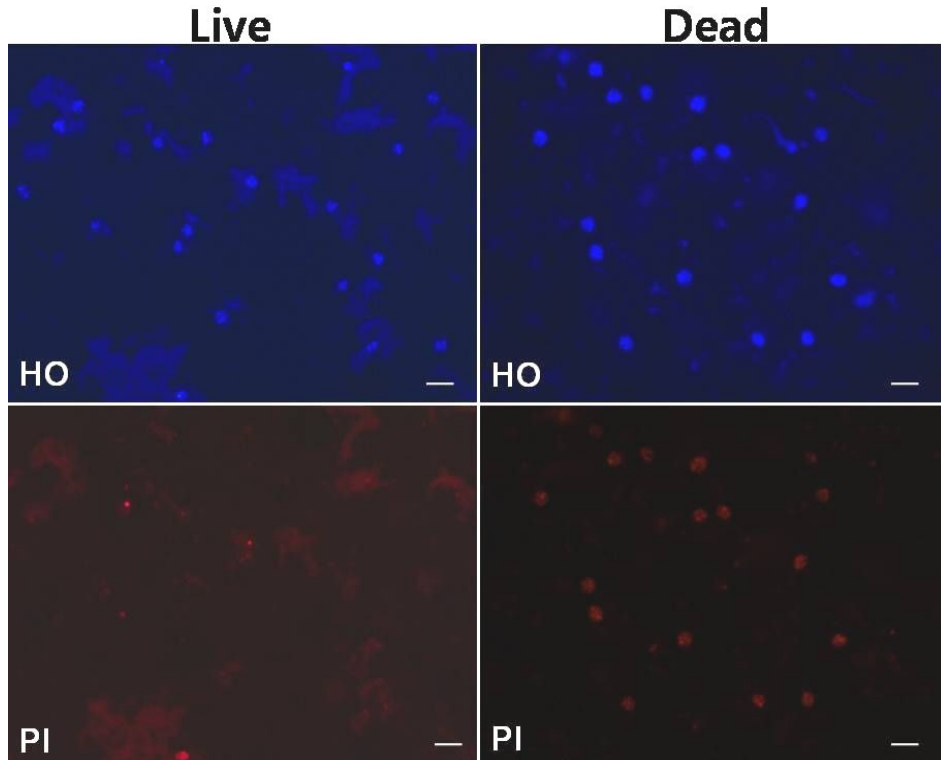
의 죽은 포자는 극낭에 푸른 염색성을 약하게 나타낸다. 이에 반해 NR & MB 염색을 실시한 쿠도아 포자는 활성을 가진 경우는 포자의 극낭에 자색 혹은 보라색의 진한 염색성이 뚜렷하게 관찰되며 비활성 포자의 경우는 극낭에 염색성을 나타내지 않는 것으로 관찰되었다 [Fig. 1].

#### 2. HO & PI 법

HO & PI법을 실시한 경우, 활성을 가진 쿠도아 점액포자충은 Hoechst33342와 결합하여 푸른색으로 형광반응이 뚜렷하게 나타나지만, 같은 관찰상에서 붉은색으로 관찰되는 Propidium iodide에는 형광반응을 나타내지 않았다. 이에 반해 비활성 포자의 경우 푸른색의 형광반응과 붉은색의 형광반응이 거의 동일한 포자에서 모두 반응하는 것을 확인할 수 있었다 [Fig. 2].



[Fig. 1] Comparison of Trypan blue(TB) stain and Neutral red & Methylene blue(NR & MB) stain against live and dead *Kudoa spetmpunctata* spores. (bar=5µm)



[Fig. 2] HO & PI(Hoechst33342 & Propidium iodide) stain against live and dead *Kudoa septempunctata* spores. (bar=20 $\mu$ m)

#### IV. 고 찰

생물학적 연구에 있어 vital cell(활성세포)과 dead cell(비활성세포)의 구분은 자주 활용되는 연구법으로, *Kudoa septempunctata*의 사람에 대한 영향조사에서도 유용하게 활용되고 있다(Yokoyama et al. 2016). Vital staining(생체염색)의 원리는 세포의 식작용(phagocytosis)능력과 세포막에서의 투과성(permeability)을 이용한 방법이 가장 기본적이며(Georges K, 1935), 최근에는 세포의 DNA에 형광물질을 반응시킴으로써 반응성에 따라 형광현미경이나 유세포분석기 등을 활용하여 세포의 활성상태를 확인하는 방법이 많이 활용되고 있다(Francis B et al. 1994). 실험실 조건에서는 오래전부터 가장 일반적으로 죽은 세포를 염색하는 trypan blue에 의한 염색법이나 살아있는 세포를 염색하는 aniline 계열의 염색,

neutral red나 methylene blue와 같은 단염색법이 사용되었으나, 최근 실험기기의 발달로 대량의 시료를 육안적인 관찰 없이 세포에 대한 형광반응을 디지털적으로 계측, 확인할 수 있는 방법들이 널리 활용되고 있다.

쿠도아 점액포자충의 활성도 확인에 있어서도 형광현미경을 이용한 HO & PI법이 활용되고 있지만(Yokoyama H et al. 2016), 실험환경에 따라 이러한 편리한 실험기기들이 모든 연구시설에 갖추어져 있는 것은 아니며 소량의 시료들을 간편한 방법으로 처리하여 광학현미경을 이용하여 확인할 수 있는 방법이 요구되었다. 이에 세포의 활성유무를 확인하는데 사용되는 몇 가지 염색법을 쿠도아 점액포자충에 적용해 본 결과, trypan blue 염색의 경우 비활성 포자에 염색성을 가지기는 하지만 그 반응성이 약하여 활성포자와의

광학현미경적 구분이 명확하지 않았다. Neutral red 염색은 활성세포의 lysosomes에 결합하여 선택적으로 염색성을 나타내어 세포의 활성 및 독성 평가에 활용도가 높은 염색법으로 이미 잘 알려져 있지만(Guillermo R et al. 2008) 쿠도아 점액포자충의 염색에는 광학현미경상에 명확한 색 구분을 위한 채도에 부족함이 확인되었다.

Methylene blue 단염색의 경우도 세포 배양 시 세포성장의 관찰과 세포의 계수에 더 민감하고 유용하다는 보고도 있지만 살아있는 세포와 죽은 세포의 구분에는 Neutral red 염색법이 이점을 가지는 점에서(Elliott W M and Auersperg N 1993) Neutral red와 Methylene blue를 함께 사용하는 NR & MB 염색법을 활용하였다. 본 방법은 포자의 극낭을 자주색으로 염색시켜 가시적으로 뚜렷한 염색상을 나타내어 광학현미경상의 관찰에 매우 유용하였다. 다양한 배율에서 포자의 형태적 관찰에도 용이하여, 한 번의 염색으로 한 시야에서 포자의 활성유무와 형태관찰에 모두 활용할 수 있다는 점에서 편리하다. 또한 활성세포의 구분에 있어서도 HO & PI에서의 반응성과 큰 차이를 확인할 수 없을 정도로 활성과 비활성 쿠도아의 구분에 좋은 결과를 나타내었다.

5~7개의 극낭을 가지는 *Kudoa septempunctata*의 경우 활성을 가지는 포자는 극낭이 모두 자주색 혹은 보라색으로 염색되어 관찰되는데, 경우에 따라 한 개 포자의 5~7개 극낭 중에서 염색되는 극낭과 염색이 되지 않는 극낭이 관찰되어 포자의 활성도를 염색된 극낭의 개수로도 짐작할 수 있을 것으로 사료되었다.

간단한 염색법을 통하여 형광염색을 위한 시약과 형광현미경 없이도 활성포자와 비활성포자를 구분할 수 있다는 것은 쿠도아 점액포자충의 연구를 매우 편리하게 해 줄 것으로 보이며, 이 후, 활성포자와 비활성포자의 비율적인 구분을 두거나, 포자액의 액성(pH 등)에 따라 NR & MB 염색과 HO & PI 법을 동시에 실시하여 계수를 통하여 염색성의 차이를 명확하게 나타낼 수 있도

록 추가적인 확인이 필요할 것으로 보이며, 쿠도아 포자충의 생활사와 관련하여 형태적인 연구에 필요한 다양한 염색법에 관한 고찰이 이루어져야 할 것으로 보인다.

## References

- Elliott W Mark & Auersperg Nelly(1993). Comparison of the neutral red and methylene blue assays to study cell growth in culture. *Biotechic & Histochemistry* 68(1), 29~35.
- El-Matbouli M and Hoffmann RW(1998). Light and electron microscopic studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosorean stage in *Tubifex tubifex*. *Int J Parasitol* 28, 195~217.
- Francis Belloc, et al(1994). A flow cytometric method using Hoechst33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* 17, 59~65.
- Freshney R(1987). *Culture of Animal cells: A manual of basic technique*, p.117, Alan R. Liss, In., New York.
- Georges Knaysi(1935). A microscopic method of distinguishg dead from living bacterial cells. *Journal of Bacteriology* 30(2), 193~206.
- Guillermo Repetto, Ana del Peso & Jorge L Zurita(2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell vability/cytotoxicity. *Nature Protocols* 3, 1125~1131.
- Iwashita Yoshiaki(2013). Food Poisoning associated wity *Kudoa septempunctata*. *The Journal of Emergency Medicine*, 44(5), 943~945.
- Kawai Takai et al.(2012). Identification of *Kudoa septempunctata* as the Causative Agent of Novel Food Poisoning Outbreaks in Japan by Consumption of *Paralichthys olivaceus* in Raw Fish. *Clinical Infectious Diseases* 54(8), 1046~1052.
- Kim, Wi-Sik et al.(2015). A survey of *Kudoa septempunctata* in olive flounder(*Paralichthys olivaceus*) hatcheries in the southwestern coast of Korea between 2014 and 2015, *Journal of Fish Pathology* 28(2), 109~112.
- Kudoa* Diagnostic Manual; government publications 11-1192000-000227-01, NIFS(National institute of

- fisheries science) publications SP-2014-AQ-0005  
MAFF(Ministry of Agriculture, Fisheries and Food), Japan (2016).  
[http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk\\_analysis/priority/pdf/160531\\_kudia.pdf](http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/pdf/160531_kudia.pdf) (in Japanese)
- Matsukane Yuuki et al.(2010). *Kudoa septempunctata* n.sp.(Myxosporidia:Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder(*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. Parasitology Research 107(4), 865~872.
- MHLW(Ministry of Health, Labour and Welfare), Japan. (2016). Annual statistics of food-poisoning <http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/112-1.html> (in Japanese)
- Ohnishi Takahiro et al.(2013). *Kudoa septempunctata* invasion increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer. Foodborne Pathogens and Disease 10(2). 137~142.
- Ohnishi Takahiro et al.(2014). Inactivation of *Kudoa septempunctata* in olive flounder meat by liquid freezing. Biocontrol Science 19(3), 135~138.
- Ohnishi Takahiro et al.(2016). Survivability of *Kudoa septempunctata* in human intestinal conditions. Parasitology Research. 115, 2519~2522.
- Shin, Sang Phil et al(2015), Zenke K, Yokoyama H, Yoshinaga T. Factors affecting sporoplasm release in *Kudoa septempunctata*. Parasitology Research 114. 795~799.
- Song, Jun-Young et al.(2013). Monitoring of *Kudoa septempunctata* in Cultured Olive flounder and Wild Fish in Jeju Island during 2012. Journal of Fish Pathology 26(3), 129~137.
- Song, Jun-Young et al.(2014). Monitoring *Kudoa septempunctata* in cultured Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* in different regions of Korea in 2013. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 47(5). 611~621.
- Sugita-Konishi Yoshiko et al.(2015). New validated rapid screening methods for identifying *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Japanese Journal of Infectious Disease 68(2) 145~147.
- Sugita-Konishi Yoshiko·Sato Hiroshi & Ohnishi Takahiro(2014). Novel foodborne disease associated with consumption of raw fish, Olive flounder(*Paralichthys olivaceus*). Food Safety 2(4) 141~150. October 27 online released.
- Takeuchi Fumihiko et al.(2016). Genetic variants of *Kudoa septempunctata*(Myxozoa:Multivalvulida), a flounder parasite causing foodborne disease. Journal of Fish Diseases. 36, 667~672.
- Yokoyama Hiroshi(2004). Life cycle and evolutionary origin of myxozoan parasites of fishes. Jpn J Protozool 37, 1~9.
- Yokoyama Hiroshi·Funaguma Naoko & Kobayashi Shoko(2016). In vitro inactivation of *Kudoa septempunctata* spores infecting the muscle of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Foodborne Pathogens and Disease 13(1), 21~27.
- Yokoyama Hiroshi et al.(2015). Infection Dynamics of *Kudoa septempunctata*(Myxozoa:Multivalvulida) in Hatchery-produced Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*, Fish Pathology 50(2). 60~67.
- 
- Received : 20 September, 2016
  - Revised : 17 November, 2016
  - Accepted : 25 November, 2016