

Kudoa septempunctata genotype ST3 포자의 ddY suckling mice 투여 시 영향

장영환¹ · 안미정² · 방효진³ · 원승환¹ · 강봉조¹

¹제주특별자치도 해양수산연구원, ²제주대 의학전문대학원, ³제주대 수의과대학

I. 서 론

양식 수산업 생산품은 전 세계 많은 사람들의 영양원으로 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 이러한 제품들이 적절한 위생 처리가 되지 않는다면 소비자들은 식품 속에 포함되어 있는 미생물 즉, 세균, 바이러스, 기생충 그리고 biotoxin 등에 의한 식중독 위험에 노출되게 된다(FAO, 2009).

점액포자충인 90여종의 *Kudoa* 속은 해양 척추동물의 근육, 생식소, 장 등에 감염되는 것으로 보고되고 있으며(Eiras et al., 2014; Mansour et al., 2013, Yurakhno et al., 2007), 일부 쿠도아 종은 근육에 감염되어 있는 cysts에 의해 근육이 용해되어 상품가치를 떨어뜨리는 “jelly meat”를 초래하여 수산식품 산업에 심각한 경제적 손해를 나타내고 있다(Moran et al., 1999).

또한, 점액포자충은 일반적으로 인체에 무해한 것으로 고려되지만 일부 *Kudoa* 종은 사람에게 알려지 반응을 일으키는 원인이 되기도 한다(Martínez et al., 2008).

Kudoa septempunctata 포자는 2010년 Matsukane 등에 의해 6개 또는 7개의 shell valve와 polar capsule로 구성되는 것으로 알려져 있으며 (Matsukane et al., 2010), 넙치에서 분리된 *K. septempunctata* 포자는 ddY suckling mice에 설사를 일으키는 것으로 의심되고 있다 (Kawai et al., 2012). 이러한 감염 메커니즘은 *Kudoa* 포자로부터 sporoplasm이 방출되어 사람의 장에 도달하게 되며, sporoplasm이 인체 장세포 막을 침입한 후 심각한 상처를 야기시킨다고 보고되고 있다(Ohnishi et al., 2013).

*K. septempunctata*는 3가지 형태인 ST1, ST2, ST3 genotype으로 구분되며, ST1과 ST2 type은 대부분 일본에서 분리되고, ST3 type은 한국에서 일본으로 수출된 넙치에서 확인되고 있다(Takeuchi et al., 2015).

*K. septempunctata*의 mitochondrial genome은 분류학적으로 중요한 2개의 유전자인 cytochrome c oxidase subunit rRNA (*cox 1*)와 large subunit rRNA gene (*rnl*)을 포함하

며, *cox 1*과 *rnl* 유전자는 6개와 2개의 single -nucleotide polymorphism 차이를 나타낸다 (Takeuchi et al., 2015). 이러한 genotype ST1은 *cox 1-1*과 *rnl-1*, ST2는 *cox 1-2*과 *rnl-2* 그리고 ST3는 *cox 1-3*과 *rnl-2*를 포함하고 있다.

추가로 *K. septempunctata* genotype ST3 포자를 투여한 adult BALB/c mice는 정상적인 분변 상태를 보였으며, 분변에서 Real-time PCR을 이용한 검사 시 *K. septempunctata* 18S rDNA gene이 검출되었다. 이는 *Kudoa* 포자가 마우스의 gastrointestinal tract를 통과한 후 배출되는 동안 마우스는 어떤 병리학적 변화도 보이지 않았음을 알 수 있었다(Ahn et al., 2015).

또한, 최근에는 점액포자충인 *Myxobolus honghuensis* 포자를 BALB/c suckling mice에 투여한 결과 설사 증상 및 fluid accumulation (FA) 증가를 보이지 않았으며, 이러한 결과는 *M. honghuensis* 포자가 BALB/c suckling mice에 병원성을 일으키는 않는 것을 확인하였다(Guo et al., 2015).

Protozoan 기생충은 숙주에 감염 시 초기 면역 반응 인자인 tumour necrosis factor (TNF), interleukin 1 (IL-1)과 IL-6의 반응을 유도하며 (Stadnyk et al., 1991), 이들 cytokine들은 specific T cell과 항체 생산으로 기생충의 생존을 막는 역할을 한다(Titus et al., 1991).

기생충의 감염과 관련된 실험에서는 임상 증상인 설사와 fluid accumulation (FA) ratio의 증가를 신속하게 보여주는 suckling mice를 이용한 연구가 되어왔으며(Dean et al., 1972), Kawai 등은 ddY suckling mice를 이용하여 *K. septempunctata* 포자의 병원성과 일본에서의 식중독과의 관계에 대한 연구를 수행하였다(Kawai et al., 2012). 또한, Takeuchi 등은 *K. septempunctata*의 세 개의 다른 유전형은 인체에 다른 병원성을 나타내는 것으로 분류하였다.

본 연구에서는 제주도 넓치에 우점인 *K. septempunctata* genotype ST3의 병원성 규명을 위해 ddY suckling mice를 이용한 조직학적 분석, 장내 독소 검사, 면역 유전자 반응 및 대변 검체의 현미경 검경을 이용하여 병원성을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

Animal model and ethics

Specific-pathogen-free (SPF) ddY mice를 Inasa Production Facility (SLC, Hamamatsu, Japan)에서 구입하였으며, Laboratory Animal Facility at Jeju National University에서

사육하였다. 또한, 모든 실험 동물은 Jeju National University Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Permit Number: 2015-0013)에 따라 수행하였다.

Spore preparation

*K. septempunctata*에 감염된 넙치 샘플들은 제주도에 위치한 양식장으로부터 채집되었고, 이들 넙치들은 400배 배율을 이용한 현미경 검경과 Real-time PCR을 이용해 *Kudoa* 포자 감염을 확인하였다(Kawai et al., 2012).

K. septempunctata 포자의 genotype 분석을 위해 conventional PCR을 이용하여 두 개의 mitochondrial gene인 cytochrome c oxidase subunit I (*cox I*)과 large subunit rRNA (*rnl*)을 증폭하였으며(Takeuchi et al., 2015), 유전자 증폭의 오염 여부를 확인하기 위해 Negative controls을 사용하였다. PCR product는 ABI 3730XL DNA analyser로 염기서열 분석 후 MEGA v. 5.1.을 통해서 최종 확인하였다.

현미경 검경 결과 10^5 포자/ g 이상 감염 농도가 확인된 경우 Ahn 등의 방법에 따라 포자 분리를 실시하였으며 (Ahn et al., 2015), haematoxylin-eosin staining (H-E염색)을 위해 formalin에 감염 조직을 고정하였다. 분리된 *Kudoa* 포자는 phosphate-buffered saline (PBS)를 이용하여 5×10^6 , 5×10^7 포자/ 100 μ l 농도로 조절한 후 일부 쿠도아 포자액은 95 $^{\circ}$ C로 10분간 가열하였으며, 또한 분리된 포자는 trypan blue exclusion test를 통해 viability를 측정하였다(Strober, 1991).

Suckling mouse experimental design

Kudoa septempunctata 포자 감염 실험은 165 마리 ddY suckling mice (4-5일령)를 사용하였으며, 4개의 그룹인 100 μ l의 PBS (n = 60), 5×10^6 heat-treated *Kudoa* 포자/ 100 μ l (n = 35), 5×10^6 *Kudoa* 포자/ 100 μ l (n= 60), 5×10^7 *Kudoa* 포자/ 100 μ l (n= 10)로 구분하였다.

모든 마우스는 oral injection needle을 이용해 *Kudoa* 포자를 위 내로 직접 투여한 후 5일 동안 25 $^{\circ}$ C로 유지하였다.

Fluid accumulation (FA) ratio

접종 후 0, 1.5, 3, 6, 9, 12, 24시간 동안 고농도의 살아 있는 *Kudoa* 포자를 투여한 그룹을 제외한 그룹에서 5마리씩 경추과열법을 이용하여 위장관을 샘플링하였으며, FA ratio는 weight of stomach plus intestines/(total body weight weight of stomach plus intestines)을 이용하여 측정하였다(Baselski et al., 1977).

Bowel movements

K. septicum 포자의 영향에 의한 suckling mice의 bowel movements는 heat-treated 포자를 투여한 그룹을 제외한 그룹에서 10마리씩 측정하였다. 실험 마우스는 filter paper 위에서 25°C를 유지 시킨 후 24시간 동안 관찰하였으며, 시간에 따른 Bowel movements 측정을 위해 faecal 수의 비율과 stool 형태를 기록하였다. 또한 수집된 faecal에서 *Kudva* 포자를 확인하였다(Guo et al., 2015).

Quantitative PCR and immune gene expression analysis

면역 반응 분석을 위한 조직 채취는 PBS와 5×10^6 *Kudva* 포자를 투여한 그룹에서 6, 12, 24, 48, 72, 120시간 마다 5마리의 마우스로부터 small intestine을 채취하였으며, RNA 추출과 cDNA 합성은 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)과 Superscript III Reverse Transcriptase (RT; Invitrogen, Waltham, MA, USA)를 사용하였다.

Proinflammatory (TNF α , IL-6) cytokine gene은 SYBR Green qPCR을 이용하여 측정하였으며, internal control gene으로는 b-actin을 사용하였다(Packiam et al., 2010). 면역 발현 측정 결과 분석은 MX Pro-Mx3000P Multiplex Quantitative PCR System software (Stratagene, La Jolla, CA, USA)와 $2^{\Delta\Delta Ct} = 2^{(\Delta Ct_{(test)} - \Delta Ct_{(b-actin)})}$ 를 사용하였다(Livak et al., 2001).

qPCR detection of *K. septicum*

K. septicum 18S ribosomal DNA 검출은 Real-time qPCR을 이용하였으며(Kawai et al., 2012), DNA 추출은 PBS와 5×10^6 *Kudva* 포자를 투여한 그룹의 5마리로부터 여러 내부 기관과 stool을 현탁한 후 필터하여 시료로 사용하였다. QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)로 추출된 DNA는 TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)와 Kawai 등이 사용했던 primer를 이용하여 측정하였다(Kawai et al., 2012). 또한 *K. septicum*의 gene copy number는 standard curve method를 사용하여 계산하였다.

Histological studies

조직학적 분석을 위해 모든 실험 동물 조직을 10% neutral buffered formalin에 고정 한 후 paraffin embedding 과정을 실시하였으며, paraffin-embedded

조직은 rotary microtome (Leica, Germany)을 이용하여 5 μ m의 두께로 절단하였다.

절단된 조직은 haematoxylin과 eosin을 이용해 염색한 후 조직학적 관찰을 실시하였다.

Statistical analyses

각 그룹의 분석된 parameter의 mean $\pm$ SD를 측정하였으며, Two-sample Student's t-tests을 사용하여 각 experimental 그룹과 control 그룹과의 차이를 비교하였다. 또한, 두 그룹간의 차이는 $P < 0.05$ 에서 유의한 것으로 간주되었다.

III. 결과 및 고찰

*Kudoa septempunctata*는 제주지역 넙치 양식장에서 채집된 근육조직에서 분리한 후 현미경 검경과 염기서열 분석을 통해 strain을 결정하였다. Fig. 1은 *K. septempunctata*에 감염된 넙치 조직으로 섬유증이나 염증 등 어떠한 증상도 보이지 않았다. 또한, 분리된 *Kudoa* 포자는 6 또는 7개의 shell valve와 polar capsule (Fig. 4A)을 가지고 있음을 확인 할 수 있었으며, 선행 연구 보고와 일치함을 확인할 수 있었다(Ahn et al., 2015). 그리고, 분리된 *K. septempunctata*의 mitochondrial gene인 *cox 1*과 *rnl* 분석 결과 *cox 1-3*, *rnl-2*에 속하는 것으로 확인되어 제주지역에서 분리된 *K. septempunctata*는 ST3 genotype임을 확인하였다(Takeuchi et al., 2015).

Kudoa 포자를 3개 그룹에 경구 투여한 후 24시간 동안 모니터링한 결과 FA ratio는 유의성을 보이지 않았으며 (Fig. 2), 그 값은 active *Kudoa* 포자를 투여한 그룹은 0.060 ± 0.003 , inactivated *Kudoa* 포자를 투여한 그룹은 0.062 ± 0.003 마지막으로 PBS를 투여한 그룹은 0.061 ± 0.002 로(Fig. 2) FA ratio가 0.070 보다 작으면 음성으로 판정된다는 선행 연구 보고에 따라 *Kudoa* 포자는 bowel movements에 영향을 주지 않았음을 확인하였다(Dean et al., 1972). 이러한 FA ratio는 어떤 enterotoxin을 경구 투여한 후 나타나는 설사 반응을 직접적으로 평가할 수 있으며, infant mice를 이용한 선행 연구에서도 cholera strains의 설사 유발을 확인하였다(Baselski et al., 1977).

Bowel movements 확인 결과 모든 그룹의 마우스에서 0.8 (PBS과 higher -dose spores)과 0.9(lower-dose live spores)(Table 1; Fig. 3)를 나타내었고, watery stool 등의 설사 증상은 확인되지 않아 기존에 보고된 점액포자충인 *Myxobolus honghuensis*를 suckling mice에 투여한 결과와 일치함을 확인하였다 (Guo et al., 2015).

선행 연구에서 보고되었던 *K. septempunctata* 포자로부터 sporoplasm이 방출됨으로써 세포에 독성을 일으킨다는 메커니즘과는 달리 개별 마우스에서 수집된 faeces를

wet smear 제작 후 현미경 검경 결과 live *Kudoa* 포자를 투여한 그룹에서 완전한 형태의 *K. septempunctata* 포자가 확인되었으며 (Fig. 4B), *Kudoa* 포자의 현미경 검경과 18S ribosomal DNA gene의 qPCR 검출은 경구투여 후 6시간(Ct value: 37.74)부터 24시간 (Ct value: 43.68)까지 faecal에서만 확인 되어, 기존 보고와 일치함을 확인하였다 (Ahn et al., 2015).

Suckling mice의 small intestine 조직의 현미경 검경 결과 inflammation과 necrosis 등의 병리학적인 변화는 없었으며(Fig. 5), 본 연구를 통해 *K. septempunctata* 포자가 ddY suckling mice에 어떠한 병리학적 변화도 일으키지 않았음을 확인할 수 있었다.

proinflammatory cytokine인 TNFa와 IL-6 발현은 real-time PCR로 측정하였으며 (Fig. 6), TNFa, IL-6는 두 개의 측정 그룹에서 투여 후 6시간에서 7시간 동안 상승을 하였으나, 24시간째는 낮아지는 결과를 확인 할 수 있었다. 이들 결과는 마우스에 *Trichinella spiralis* 감염 시 감염 농도에 따라 면역 발현을 보인다는 결과 (Frydas et al., 1996)와 반대로 *Kudoa* 포자가 suckling mice 투여해도 마우스의 면역 반응에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다.

종합적으로 볼 때 본 연구에서는 제주지역 양식넙치에서 분리된 *K. septempunctata* strain ST3는 ddY suckling mice에 설사를 일으키지 않았으며, 인체에 병원성을 유발할 수 있는 *K. septempunctata* strain ST1과 ST2에 대한 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

Table 1. Phosphate-buffered saline (PBS), 5×10^6 , 5×10^7 spores/mouse 농도의 *K. septempunctata* 투여 24시간 후 suckling mice의 Bowel movements 결과

Group	Body weight (g)	No. feces/ Tested mice	FA ratio	Watery stool form/ Inoculated mice
PBS	2.789 $\pm$ 0.355	0.8 (8/10)	0.061 $\pm$ 0.002	0/10
5×10^6 spores/mouse	2.744 $\pm$ 0.364	0.9 (9/10)	0.062 $\pm$ 0.003	0/10
5×10^7 spores/mouse	2.597 $\pm$ 0.287	0.8 (8/10)	0.060 $\pm$ 0.003	0/10

FA ratio: fluid accumulation ratio, calculated from all of the tested animals in each group. Hpi: hours post-ingestion.

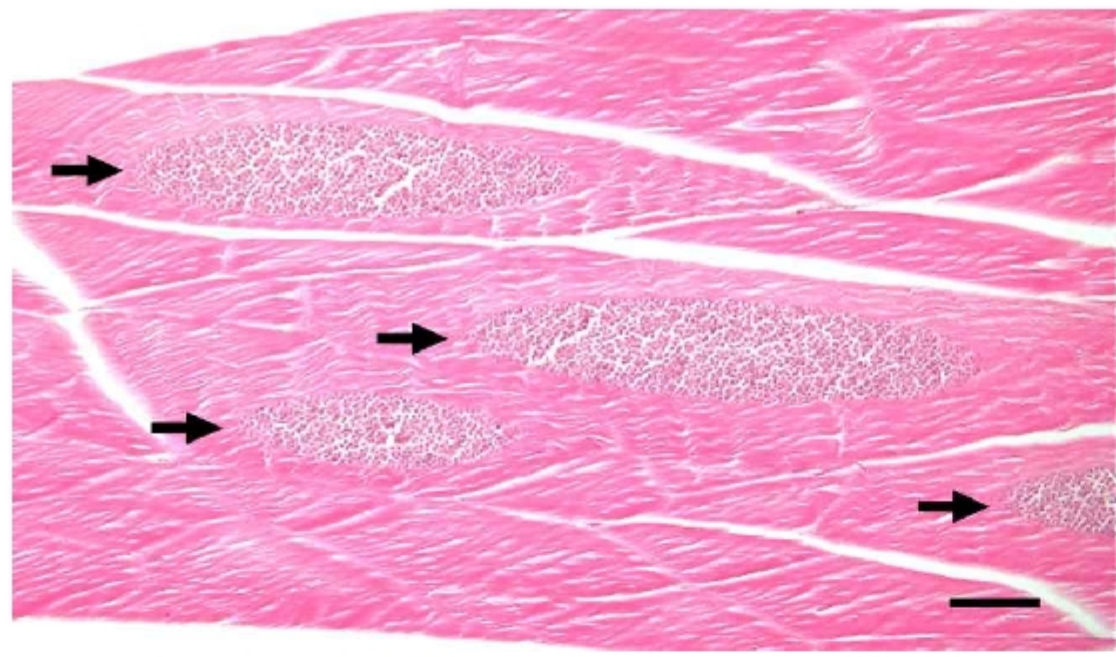


Figure 1. 녀치의 근육 조직 내 감염되어 있는 *Kudoa* 포자.
Arrows indicate infection with *K. septempunctata* spores. Haematoxylin and eosin staining. Scale bar = 100 μ m.

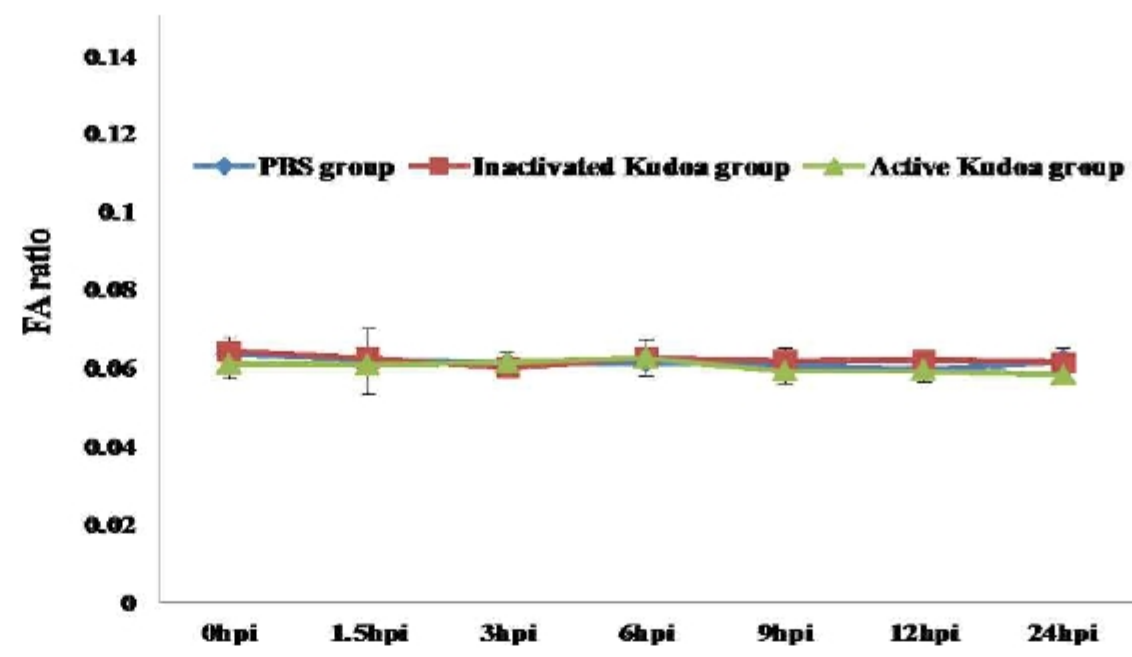


Figure 2. Phosphate-buffered saline, 5×10^6 inactivated spores/mouse, 5×10^6 active spores/mouse 투여 시 ddY suckling mice의 fluid accumulation (FA) ratio 변화. Means of FA ratios $\pm$ standard deviation for five mice are shown. No significant differences ($P < 0.05$) were found at any time interval. Hpi: hours post-ingestion.

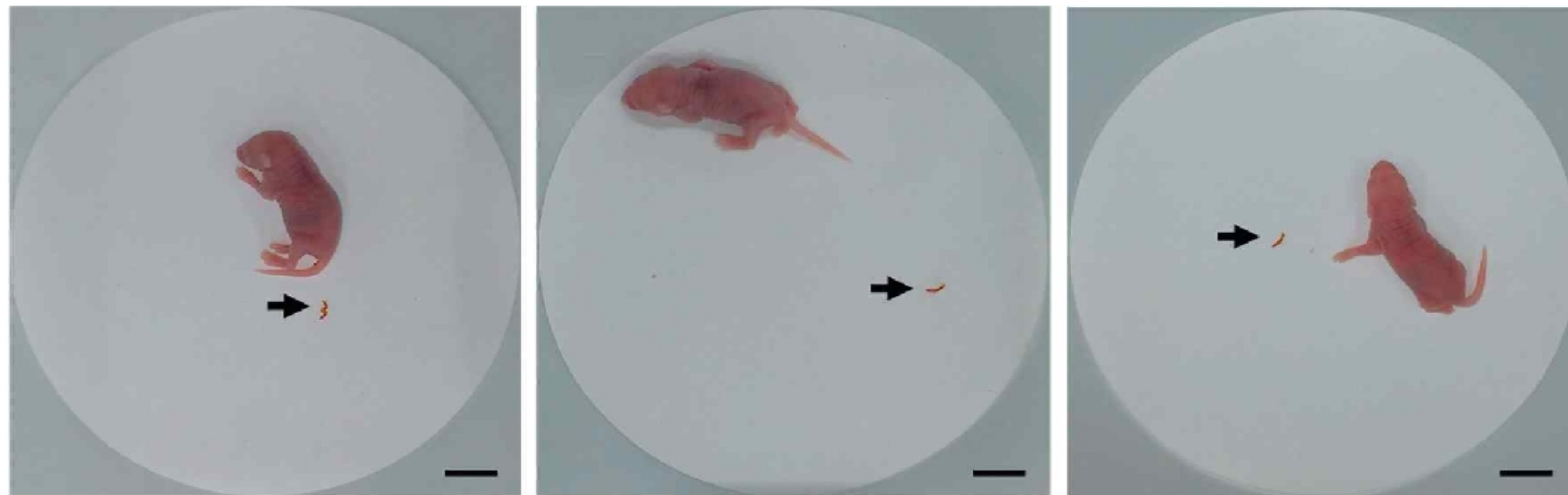


Figure 3. PBS (A)와 live *Kudoa* 포자 투여 24시간 (25°C) 후 suckling mice의 bowel movements (B and C).
Each arrow represents faeces. Scale bars = 10 mm.

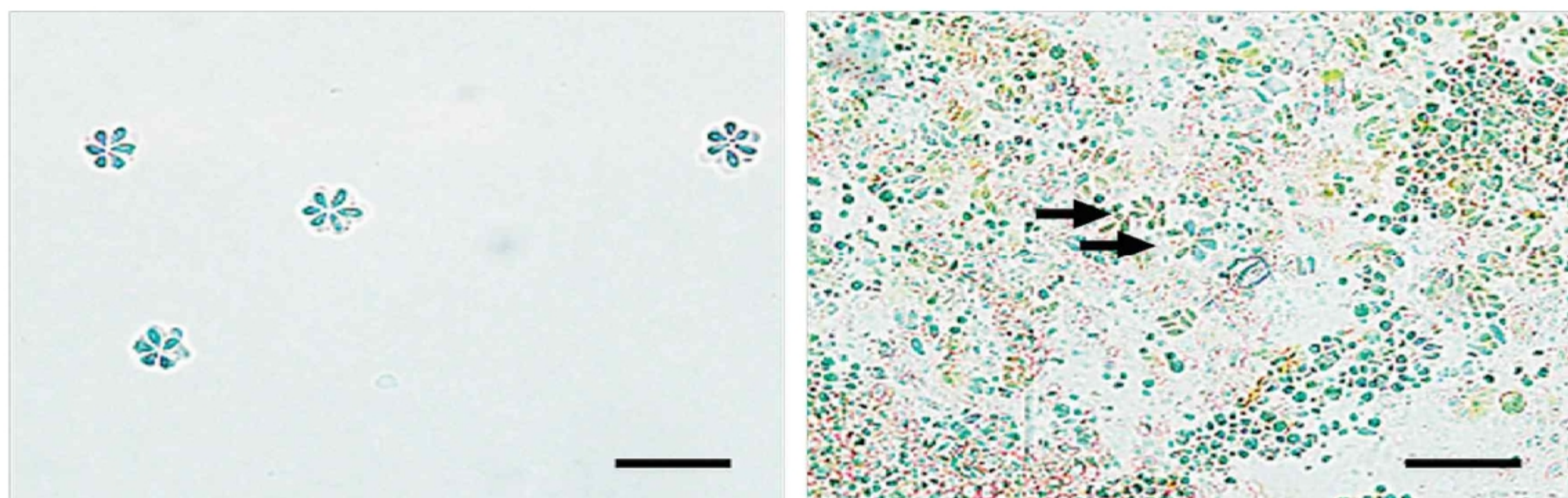


Figure 4. *K. septempunctata* 포자를 투여한 그룹의 suckling mice로부터 수집된 faecal wet smear(unstained) 내 *Kudoa* 포자. (A) 경구 투여 용액 내 *K. septempunctata* 포자. (B) 경구 투여 12 시간 후 faeces 내 *Kudoa* 포자. Scale bar = 20 μ m.

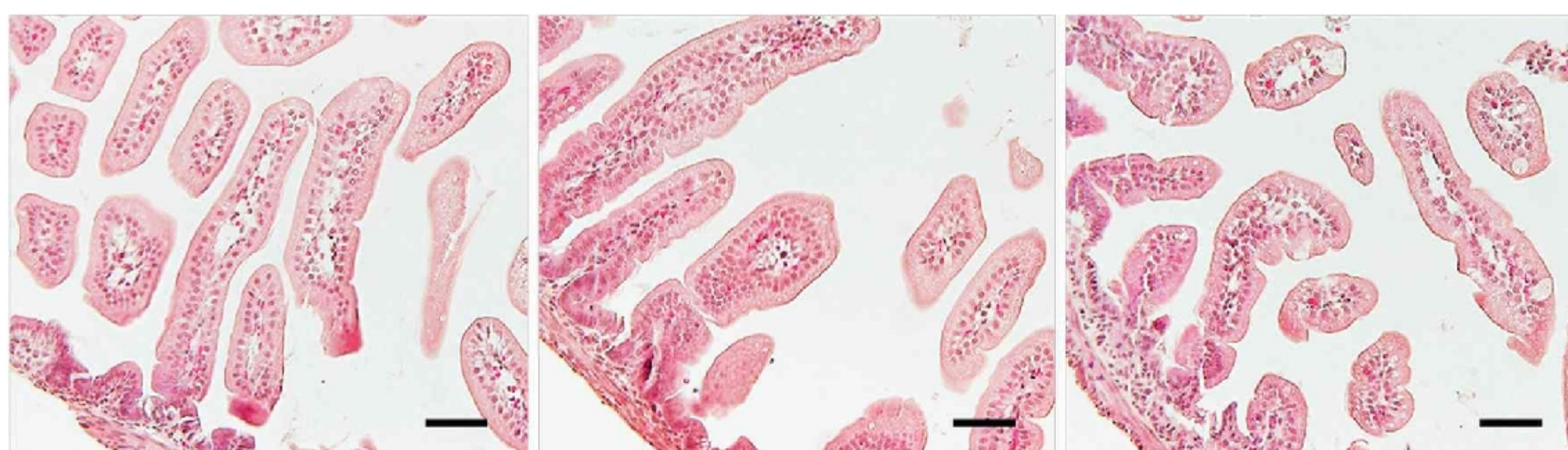


Figure 5. Phosphate-buffered saline 투여 24 시간 후 suckling mice의 small intestines 조직 (A), 5×10^6 *K. septempunctata* 포자/mouse 투여 시 suckling mice의 small intestines 조직 (B) 5×10^7 *K. septempunctata* 포자/mouse 투여 시 suckling mice의 small intestines 조직 (C). A-C: Haematoxylin and eosin staining. Scale bars = 50 μ m.

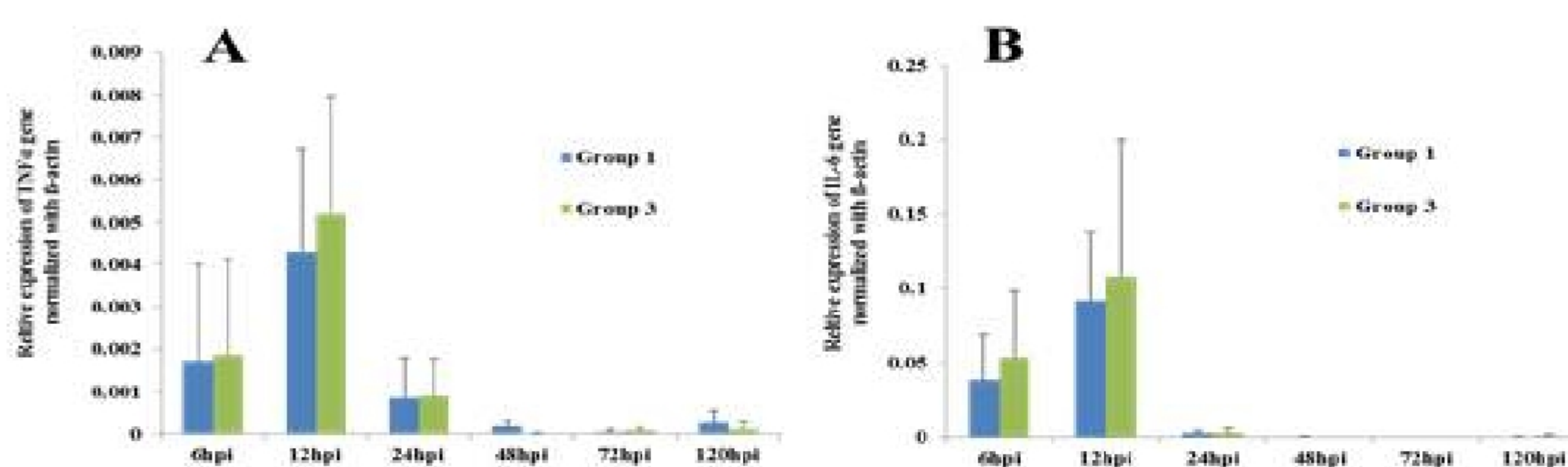


Figure 6. Phosphate-buffered saline, 5×10^6 *K. septempunctata* 포자/mouse 투여 시 suckling mice의 proinflammatory cytokine 발현. Tumour necrosis factor (TNF α) (Fig. 6A)와 interleukin 6 (IL-6) (Fig. 6B)의 발현 정도는 SYBR green quantitative polymerase chain reaction으로 측정하였으며, b-actin을 internal control로 사용함.

면역 유전자의 상대적인 mRNA 발현은 $2^{\Delta Ct}$ method를 이용하여 측정함 (the Ct value of the target immune gene minus the Ct value of the b-actin gene).

Relative levels of immune gene mRNA were analysed by the $2^{\Delta Ct}$ method (the Ct value of the target immune gene minus the Ct value of the b-actin gene). Data are presented as means $\pm$ standard deviation.

IV. 참고문헌

- Ahn MJ, Woo HC, Kang BJ, Jang YH, Shin TK. 2015. Effect of oral administration of *Kudoa septempunctata* genotype ST3 in adult BALB/c mice. *Parasite*, 22, 35.
- Baselski V, Briggs R, Parker C. 1977. Intestinal fluid accumulation induced by oral challenge with *Vibrio cholerae* or cholera toxin in infant mice. *Infection and Immunity*, 15, 704-712.
- Dean AG, Ching YC, Williams RG, Harden LB. 1972. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *Journal of Infectious Disease*, 125, 407-411.
- Eiras JC, Saraiva A, Cruz C. 2014. Synopsis of the species of *Kudoa* Meglitsch, 1947 (Myxozoa: Myxosporea: Multivalvulida). *Systematic Parasitology*, 87, 153-180.
- Food and Agriculture Organization. 2009. Guidelines for riskbased fish inspection, FAO Food and Nutrition paper 90, Rome.
- Frydas S, Karagouni E, Dotsika E, Reale M, Barbacane RC, Vlemmas I, Anogianakis G, Conti P. 1996. Generation of TNF alpha, IFN gamma, IL-6, IL-4 and IL-10 in mouse serum from trichinellosis: effect of the anti-inflammatory compound 4-deoxypyridoxine (4-DPD). *Immunology Letters*, 49(3), 179-184.
- Guo Q, Jia L, Qin J, Li H, Gu Z. 2015. Myxozoans and our dinner table: pathogenicity studies of *Myxobolus honghuensis* (Myxosporea: Bivalvulida) using a suckling mice model. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12, 653-660.
- Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, Kuroda M, Kumeda Y, Iijima Y, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T. 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 Disease*, 54, 1046-1052.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25, 402-408.
- Mansour L, Thabet A, Chourabi K, Harrath AH, Gtari M, Omar SY, Hassine OKB. 2013. *Kudoa azeve n. sp.* (Myxozoa, Multivavulida) from the oocytes of the Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* (Perciformes, Carangidae) in Tunisian coast. *Parasitology Research*, 112, 1737-1747.

- Martínez de Velasco G, Rodero M, Cuéllar C, Chivato T, Mateos JM, Laguna R. 2008. Skin prick test of *Kudoa* sp. antigens in patients with gastrointestinal and/or allergic symptoms related to fish ingestion. *Parasitology Research*, 103, 713–715.
- Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y. 2010. *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. *Parasitology Research*, 107, 865–872.
- Moran JDW, Whitaker DJ, Kent ML. 1999. A review of the myxosporean genus *Kudoa* Meglitsch, 1947, and its impact on the international aquaculture industry and commercial fishery. *Aquaculture*, 172, 163–196.
- Ohnishi T, Kikuchi Y, Furusawa H, Kamata Y, Sugita-Konishi Y. 2013. *Kudoa septempunctata* invasion increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10, 137–142.
- Packiam M, Veit SJ, Anderson DJ, Ingalls RR, Jerse AE. 2010. Mouse strain-dependent differences in susceptibility to *Neisseria gonorrhoeae* infection and induction of innate immune responses. *Infection and Immunity*, 78, 433–440.
- Strober W. 1991. Trypan blue exclusion test for cell viability, in *Current Protocol in Immunology*. Coligan JE, Kruisbeek AM, Shevach DH, Strober W, Editors. Wiley: New York. p. A.3.3–4.
- Stadnyk AW, Gauldie J. 1991. The acute phase protein response during parasitic infection. *Immuno-Parasitology Today*, 12, A7–A12.
- Takeuchi F, Ogasawara Y, Kato K, Sekizuka T, Nozaki T, Sugita-Konish Y, Ohinishi T, Kuroda M. 2015. Genetic variants of *Kudoa septempunctata* (Myxozoa: Multivalvulida), a flounder parasite causing foodborne disease. *Journal of Fish Diseases*, in press, DOI: 10.1111/jfd.12395.
- Titus RG, Sherry B, Cerami A. 1991. The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. *Immunology Today*, 12, A13–A16.
- Yurakhno VM, Ovcharenko AS, Holzer AS, Sarabeev VL, Balbuena JA. 2007. *Kudoa unicapsula* n. sp. (Myxosporea: Kudoidae) a parasite of the Mediterranean mullets *Liza ramada* and *L. aurata* (Teleostei: Mugilidae). *Parasitology Research*, 101, 1671–1680.