

이학석사 학위논문

양식 숭어(*Mugil cephalus*)의 간 거대
세포증에 대한 병리조직학적 관찰

지도교수 허 민 도

이 논문을  제출함

2003 년 8 월

부 경 대 학 교 대 학 원

어 병 학 과

강 효 주

강효주의 이학석사 학위논문을 인준함

2003 년 6 월 24 일

주 심 이학박사 강 주 찬



위 원 농학박사 박 수 일



위 원 농학박사 허 민 도



목 차

Abstract.....	i
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법.....	3
1. 승어의 채집 및 실험어의 유지.....	3
2. 간조직에 대한 병리조직학적 검사.....	3
3. 광학 및 전자현미경 표본 제작.....	3
(1) 광학현미경적 표본 제작.....	3
(2) 전자현미경적 표본 제작.....	4
III. 결과.....	5
1. 간장의 육안적 소견.....	5
2. 간장의 병리조직학적 소견.....	5
(1) 광학현미경적 소견.....	5
(2) 전자현미경적 소견.....	7
3. 녹색조 착색 부위와 비녹색조 부위의 병리조직학적 소견.....	8
(1) 광학현미경적 소견.....	8
IV. 고찰.....	10
V. 요약.....	16
VI. 그림 및 그림설명.....	17
VII. 감사의 글.....	33
VIII. 참고문헌.....	34

A histopathological observation of hepatic megalocytosis in cultured gray mullet, *Mugil cephalus*

Hyo-Ju Kang

Department of Fish Pathology, Graduate School

Pukyong National University

Abstract

In order to characterize hepatomegalocytic lesion naturally occurred in gray mullet, *Mugil cephalus*, and to assume the possible cause, a series of histopathological studies were carried out. The lesions were found only from the liver of individuals suffering from green liver disease and characterized by a wide distribution of megalocytic hepatocytes showing great pleomorphism in their size, and numbers of their nuclei and nucleoli as a main component, which was nearly the same in hepatomegalocytoses already reported from other species of fish. Megalohepatocytotic lesions were nearly always confined to that part of liver discolored with green and/or deep green. These histopathological results strongly suggest that the hepatomegalocytotic lesion in gray mullet might be due to the chronic toxic effect by a certain component of bile juice on hepatic parenchyma.

Key word : Mullet · *Mugil cephalus* · liver · megalocytosis · hepatic megalocytosis

I. 서 론

간장은 각종 영양분의 중간 대사, 혈장 단백질 합성, 빌리루빈 대사, 담즙 성분 배설, 약물 대사와 독성물질의 해독과 같은 다양한 기능을 담당하는 주요 대사 기관이다. 어류의 간장은 환경수에서 유입되는 xenobiotics와 접촉이 잦으므로, 수질 오염과 관련하여 종양을 중심으로 한 각종 병변이 다수 보고되고 있다(Myers et al., 1987, Peters et al., 1987).

본 연구의 대상어종인 숭어는 광범위한 온도, 염분, 용존산소 범위를 가지는 등 양식조건이 다른 어종에 비해 용이하기 때문에 양식량이 증가하고 있는 어종중의 하나이다. 지금까지 정상적인 숭어 간장의 조직학적 정보를 얻고자 정기적인 sampling을 시행하였으나, 정상 간장을 보이는 예가 많지 않고 오히려 녹색조의 간장 소견을 보이는 예를 상당수 접하였다. 간장의 육안적인 녹색 정도는 부분적으로 녹색조를 보이는 것부터 심한 경우에 간장 전표면에 걸쳐 녹색조가 보이기도 하였다. 이러한 간장을 광학 현미경하에서 관찰 결과 각종 크기의 크게 비대된 간세포들이 다수 확인되었다.

거대간세포를 특징으로 하는 유사 간장 병변이 이미 다른 어종에서 보고되어 있고 (Stephen et al. 1993, Kent et al. 1988, Groff et al. 1992, Kent. 1990), 이 병증은 megalocytosis로 불리워 왔다(Wales 1967, Sinnhuber et al., 1977). Megalocytosis는 대개 natural toxin을 포함하여 발암물질을 포유류와 어류에 실험적으로 투여하여 종양을 유도하고 주로 간장에서 나타나는 다양한 병변 중의 하나로써 기술되었다. 오염 지역에 서식하는 어류에서도 보고됨에 따라(Hinton 1978, Eller 1971, Stanton 1965,

Ashley & Halver 1968, Wales 1967, Hendricks et al., 1981), megalocytosis가 독성물질 또는 발암성 인자에 의한 노출 진단지표의 하나로서 주로 이용되고 있다.

거대간세포증은 채집된 양식 송어의 일부개체에서 확인되었고, 이들 개체 모두 간장이 육안적으로 녹색조를 보였다. 송어의 녹간증 발생에 관하여는 본 연구실에서 이미 조사한 바 있다(이, 2002). 그러나, 이때에는 거대간세포를 확인하지 못하였고, 주로 지방변화와 위축소견을 보이는데 그쳐 녹간증 발생과 간장 손상과의 유의한 관계를 찾지 못하였다.

따라서, 본 연구에서는 거대간세포 출현을 특징으로 하는 송어 간장의 병변을 병리조직학적으로 동정하고, 이미 보고된 거대간세포증예와 비교함으로써 그 유사성 정도를 분석하는 동시에, 거대간세포 출현 부위를 구체화하여 녹간 현상과의 관련성을 찾고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 송어의 채집 및 실험어 유지

2002년 4-5월 경남 하동지역 가두리 양식장에서 사육되고 있는 체장 약 15cm의 송어(*Mugil cephalus*) 약 30마리를 실험실로 수송하여 순환여과식 수조에 수용하여 다음 날 바로 실험에 제공하였다.

2. 간 조직에 대한 병리조직학적 조사

송어의 모든 간장을 절취하여 광학 및 전자현미경 표본을 위한 고정을 실시하는 한편 부검을 통하여 녹간 소견을 갖는 개체를 선별하고 특히 부분녹간 소견을 보이는 개체에 대하여 녹색조 착색부 간장과 비착색부 간장을 분리, 고정하였다. 또한 상기 송어의 간장을 광학 현미경적으로 관찰한 결과, 정상 구조의 간장을 찾지 못하였기에 녹간증 소견을 보이지 않았던 체장 약 5cm 치어 10마리를 사용하여 대조 간장으로 사용하였다. 광학 및 전자현미경 표본 제작법은 아래와 같다.

3. 광학 및 전자현미경 표본 제작

(1) 광학현미경적 표본 제작

송어의 모든 간장조직을 Bouin's 고정액에 전고정하고 24시간만에 동일 고정액으로 후고정 하였다. 후고정 후 24시간에 수세하고 70%에서 100% 순차농도 알코올에 탈수 하였다. Xylene으로 투명화하여 파라핀 친화시키고, 파라핀 포매 후 microtome (Reichert-Jung 820, Leica)을 사용하여 4 μ m두께의 박편을 얻었다. 이를 H&E염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 간장 조직내 각종 구성성분들을 가시화하기 위해 PAS, Modified Heidenhein's Azan stain, Gomori's methenamine silver method등의 특수

염색법을 적용하였다.

(2) 전자현미경적 표본 제작

승어 간장을 냉장온의 2.5% glutaraldehyde내에서 약 1mm의 크기로 세절하고 동액에 4℃, over night 전고정하여, 0.1M phosphate buffer(pH 7.2)에 20분씩 세 차례 수세하였다. 4℃에서 1% osmium tetroxide solution에 2시간 후고정하고 0.1M phosphate buffer(pH 7.2)에 세 차례 각 20분씩 수세한후 50%에서 100%까지 순차농도 에틸알콜에서 탈수하였다. Propylene oxide(PO)에서 치환 후 PO : Epon혼합물에서 포매하여 Epon혼합물과 함께 열중합 holder에 넣어 oven내에서 열중합시켰다. 700 nm두께의 준초박절편(Semithin)을 1% toluidine blue 단염색하여 필요한 부위를 선별·삭정하고, 초박절하여 얻은 절편을 uranyl acetate와 lead citrate 이중염색(二重染色) 후 투과전자현미경(JEM 1200, JEOL LTD.)으로 관찰하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 간장의 육안적 소견

송어 간장은 녹색조의 착색을 보였고, 착색 부위는 부분적이거나 전체에 걸쳐 그 정도가 다양하였다. 일부 개체의 간장은 녹색조가 거의 나타나지 않았으며 지방간의 유백색을 띠는 개체가 많았다(Fig. 1).

2. 간장의 병리조직학적 소견

1) 광학현미경적 소견

송어 정상 간장은 고전적 간소엽 구조를 나타내지 않았고, 포유류 간장에서 보여지는 간삼조(portal triad), 즉 portal vein, hepatic artery, bile duct로써 명확하게 나타난 않았지만, 유사한 구조를 확인하였다. 송어 간장은 혈관계와 담관계가 간 실질 전반부에 걸쳐 산재해 있었다. 횡단면(cross section)에서 간세포판색(hepatic cell cord)은 많게는 10개까지 방사상으로 배열되어 있었고, 동양혈관축(sinusoidal axis)에 평행하게 절단된 면에서는 간세포판색이 1-2층으로 배열되어 있었다(Fig. 2-1).

그러나, 본 실험 개체의 송어 간장은 이러한 정상적인 간 실질 구조를 보이지 않고 배열이 상당히 어그러져 있었고, 저배율로 관찰시 다양한 크기의 간세포가 간 실질 전반부에 걸쳐 산재 분포하고 있었다(Fig. 2-2). 간세포의 크기와 형태는 매우 다양하게 나타났으며 핵과 세포질 모두 비대된 것이 특징이었다. 비대된 간세포 사이에 비교적 정상에 가까운 세포들이 관찰되었으나, 이들의 세포질 영역은 HE 염색에 밝게 나타났으며, 둥글고 명확한 공포가 다수 관찰되었다.

정상적인 간세포는 뚜렷한 핵소체를 가지는 하나의 둥근 핵을 가졌으나, 때로 핵소체가 두 개이거나 핵이 두 개인 것도 관찰되었다. 그러나 본 송어 간장의 핵은 다양

한 크기로 나타나며, 2개 이상의 핵을 가지는 간세포도 다수 확인하였다. 핵내에 다수의 뚜렷한 핵소체가 관찰되는 경우가 많았고, 이들 또한 크기와 형태가 일정하게 나타나지 않았다(Fig. 3-1).

핵내에 1-2개의 다양한 크기와 모양의 inclusion이 관찰되었다. 이들 inclusion은 호염기성의 염색성을 가지고, 막으로 확실히 경계지워져서 나타나기도 하지만, 일부는 그런 막성 경계부없이 세포질과 연결성을 보이는 부분도 관찰할 수 있었다(Fig. 3-2). 일부 핵내에는 이러한 호염기성의 inclusion 이외에도 osmophilic하고 명확한 경계를 지니는 다수의 지방적이 관찰되기도 하였다.

Semithin 절편으로 관찰시(Fig. 6) 핵막은 세포질과의 경계가 매끄럽지 못하고, 왜곡된 구조로써 다수의 주름이 확인되었다. 또한 핵내 공간에 불규칙적으로 분포되어 있는 염색질 덩어리들이 다수 관찰되었으며, 핵막의 경계부를 따라 분산 분포하고 있는 것들도 관찰하였다.

세포질은 비교적 호산성의 염색성으로 균질하게 나타났다. 그러나 일부 세포질은 핵 주위 부분은 미세한 과립상의 물질로 채워져 있고 호산성의 염색성을 나타내었으나, 상대적으로 세포질 경계부쪽은 HE 염색상에 밝은 영역으로 공포가 다수 관찰되기도 하였다. 이들 공포는 하나 혹은 다수가 합쳐진 형태로서 비교적 주위와의 경계가 명확하게 나타남에 따라 지방적이 있던 자리라고 여겨진다(Fig. 4-2). 세포질 내에 몇가지 종류의 inclusion이 관찰되었다. 호산성 과립상의 물질이 세포질내 경계가 지워져서 나타나거나(Fig. 3-4), 호염기성의 균질한 물질이 세포질내 포함되어 있었다(Fig. 3-3). 하나 혹은 다수의 밝은 갈색 과립 또한 관찰되었다. 이들 과립은 혈관 주위에 존재하는 MMC(Fig. 4-2)의 일부 과립상과 유사한 염색성과 크기, 형태를 보이고 있었으며, 담관의 상피세포내 혹은 담관 내강에서도 확인할 수 있었다.

소담관과 담관 상피세포가 다수 증생되어 있었다. 담관 상피세포가 불완전한 내강

을 형성하거나, 내강없이 한줄로 늘어서서 배열되어 있는 경우 주위 간세포와 그 형태가 매우 유사하게 나타났다. 그러나, 담관 상피세포는 호산성의 염색성을 띠고 핵이 편심해서 위치하는 경우가 많으므로, 거대간세포 사이에 존재하는 호염기성의 중심핵을 가지는 간세포와 구별이 가능하였다(Fig. 4-1). 그러나, 이러한 세포집단이 재생성 간세포인지, 혹은 비대 간세포에 의해 원래 주위에 있던 간세포가 위축된 형태로 나타난 것인지 명확하게 구별하기는 용이하지 않았다. 담관 주위에 임파구들이 다수 침윤되어 있었고, 갈색의 과립을 함유하고 있는 MMC 또한 관찰되었다(Fig. 4-3). 혈관이나 담관 주위에 형성된 MMC 내에 존재하는 일부 과립이 PAS에 양성 반응을 나타내었으며, 이들은 주위 비대된 간세포내에 존재하는 일부 과립과 유사한 염색성을 나타냈다(Fig. 5-1, 2). 담관 내강에 갈색 또는 녹색의 담즙이 저류되어 있었고, 담관 상피세포에서도 다수의 담즙 색소가 관찰되었다(Fig. 4-3, 4). Gomori's methenamine silver 염색시 혈관과 담관을 구성하고 있는 세망섬유와 담관 내강면이 양성 반응을 나타냈다. 담관 내강내 물질 뿐만 아니라 담관 내강 상피 역시 양성반응을 보임에 따라 그 부위의 이상 여부를 추정해 볼 수 있었다(Fig.5-3, 4). 일부 괴사된 간세포와 담관도 관찰하였다.

2) 전자현미경적 소견

정상적인 간세포는 뚜렷한 핵소체를 가지는 하나의 둥근 핵이 있으며 때로 두 개의 핵이 관찰되기도 하였다. 세포질에는 각종 소기관들이 잘 발달되어 있었다.

본 송어 개체의 간세포는 정상보다 핵과 세포질 모두 매우 비대되어 있고, 다양한 형태와 크기를 나타내는 것이 특징적이었다(Fig. 7). 두 개 혹은 그 이상의 핵이 다수 관찰되었으며 뚜렷한 하나에서 다수의 핵소체를 포함하고 있었다. 정상적인 핵은 대체로 진정염색질을 나타내나, 본 실험개체에서는 다수의 이질염색질 덩어리들이 핵내

공간과 핵막의 경계부를 따라 관찰되기도 하였다(Fig. 7-1).

핵내 막으로 완전히 둘러싸인 봉입체를 관찰하였고, 이들은 형질내세망(ER)을 포함하고 있었다(Fig. 8-1). ER은 정상적인 구조에 비해 짧고 확장된 소낭 형태를 띠고 있었다. 핵막의 경계는 고르지 못하고 많은 주름이 접혀 있으며(Fig. 7-2, 3), 일부는 핵안쪽으로 만입된 형태도 관찰되었다(Fig. 8-1, 3). 만입된 영역에는 지방적과 ER과 같은 세포질 소기관이 분포하고 있으므로, 핵내에 형성된 봉입체는 세포질 소기관들이 핵안쪽으로 만입되어 완전히 분리된 것으로 보여진다. 또한 주위와의 경계가 명확하고 중등도의 전자밀도를 가지는 다수의 지방적은 세포질을 포함하여 핵내에서도 관찰되었는데, 이들은 서로 합쳐져 커다란 지방적을 형성하기도 하였다(Fig. 8-2, 3).

정상에 비해 본 실험 개체에서는 상대적으로 글리코젠 분포가 풍부하지 않으며, 반대로 다수의 지방적이 관찰되었다. 세포질 전반에 걸쳐 짧은 소낭형태의 확장된 ER이 상당수 존재하고 있었으며(Fig. 8-4), 이들 주위에는 부착된 리보솜이 관찰되지 않음에 따라 무과립형질내세망(sER)이라고 여겨진다.

간세포관 사이에 동양혈관이 있어 간세포와의 물질교환이 일어난다. 동양혈관과 간세포 사이에 디세포공간(space of Disse)이라는 간극이 있으며, 연결한 간세포에서 돌출한 다수의 미세융모(microvilli)가 대부분의 공간을 차지하고 있었다. 본 개체에서는 동양혈관 구조가 명확히 확인되지 않고, 비대된 간세포에 의해 주위 영역은 위축되어 나타났다.

3. 녹색조 착색 부위와 비녹색조 부위의 병리조직학적 소견

1) 광학 현미경적 소견

녹색조 착색 부위에서는 정상적인 간실질 구조와 간세포가 거의 관찰되지 않았고, 앞서 기술했던 비대화된 핵과 세포질을 가지는 거대세포들이 다수 출현하였다. 이외

에도 핵과 핵소체의 크기 및 수가 다양하게 나타났으며, 혈관과 담관 주위의 임파구 침윤, MMC 형성, 간세포내 다수의 inclusion, 소담관의 증식과 같은 병리조직학적 소견이 확인되었다.

비녹색조 부위에서는 거대간세포가 관찰되지 않았고, 세포 크기 또한 정상적인 간세포와 유사하였다. 그러나 세포질 영역이 밝게 관찰됨으로써, 다수의 지방적을 포함하거나 지방변화 소견을 보이는 개체가 많았다.

IV. 고 찰

녹간 발생 개체군 송어 간장에서 정상에 비해 매우 비대화된 핵과 세포질을 특징적으로 하는 거대간세포를 다수 확인하였으며, 이들은 매우 다형태를 지니고 있었다. Megalocytosis는 유사분열시 분열이 제대로 일어나지 않아 다배체의 간세포가 형성된 것으로써 일반적으로 세포분열의 장애로 해석되고 있다(Wales 1967, Sinnhuber et al. 1977). Megalocytosis는 어류를 포함한 다수의 포유류에서 hepatocarcinogen toxicity에 의한 병변으로서 보고되었고, 이러한 carcinogenic agent로는 polychlorinated biphenyl (Hinton 1978), endrin(Eller 1971), nitrosamine(Stanton 1965, Ashley & Halver 1968)등이 있다. Natural toxin인 aflatoxin과 pyrrolizidine alkaloids(PAs) 역시 어류(Wales 1967, Hendricks et al. 1981)와 포유류(Butler 1964, Peters et al., 1987)에서 megalocytosis를 유도하는 것으로 알려져 있다. 이밖에 오염지역에 서식하는 어류에서도 유사한 병변이 형성되는 것으로 보고되었다(Myers et al. 1987, Peters et al. 1987).

이들은 대부분 발암물질을 실험적으로 어류에 노출시켜 종양과 관련한 병변들을 유도하였고, 그 중의 하나로서 magalocytosis를 보고하였으나, 본 연구의 송어 간장에서는 이를 제외한 종양의 특징적인 다른 병변들이 관찰되지 않음에 따라 carcinogenic agent에 의한 종양과의 관련성은 거의 없는 것으로 생각된다. 오염지역에 서식하는 flat fish(Malins et al., 1984, Myers et al., 1987)나 English sole(Myers et al., 1987)에서 자연발생예가 보고되었다. 이들 어종은 오염된 바닥의 저질과 직접 접촉할 기회가 잦은 저서성 어류인 반면, 본 실험 개체인 송어는 이들과는 생활환경이 다르므로, 수질 오염에 대한 가능성은 배제할 수 있다.

Megalocytosis라는 용어는 pyrrolizidine alkaloids(PAs) 독성에 의한 핵과 세포질 변화를 기술하기 위해 처음 사용되었다(Kelley 1985). PAs는 다수 식물에 존재하는 구성성분으로써 DNA 합성은 저해하지 않지만, 세포분열은 저지하여 간세포의 핵과 세포질이 비대화되는 것으로 보고되었다(McLean 1970, Maddocks 1986). Hendricks et al.(1981)은 PAs를 실험적으로 무지개 송어에 투여하여 megalocytosis를 비롯한 다수의 병리조직학적 변화를 유도하였으며 이들은 본 연구에서 나타난 간장 병변과 유사성을 지닌다. 그러나 지금까지 PAs는 육상식물에만 존재하는 것으로 수서 환경에서는 보고된 적이 없다.

Chinook salmon(Stephen et al. 1993), Atlantic salmon(Kent et al. 1988), Striped bass(Groff et al. 1992), Salmonid fish(Kent. 1990)에서 megalocytosis의 자연발생이 보고되었다. 거대간세포를 특징으로 하는 간장 병변은 대개 비슷하게 나타났다. 원인인자는 명확하게 밝혀지지 않았으나, Kent 와 Stephen이 보고한 연어와 어류의 경우 대부분 여름에 집중적인 폐사율을 보임에 따라 그러한 병변은 여름철 빈번히 발생한 조류 독성에 의해 유도되었을 것이라고 하였다. 또한 가을에는 폐사율이 현저하게 감소하고, 살아남은 개체들은 이듬해 2월경에 거의 간장병변이 치유되는 것으로 보고하였다. 그러나 그것과는 대조적으로 본 연구는 수온이 낮아지는 늦가을부터 녹간이 발생하기 시작하여 겨울에 최대발생치를 나타내고, 폐사는 주로 이른봄 3-4월경부터 발생하기 시작하였다. 따라서 본 경우의 간장 병변을 조류 독성에 의한 것이라고 결론짓기에는 무리가 있을 것으로 생각된다. 본 연구의 송어 간장에서 보여지는 병변은 Striped bass에서 관찰된 병변과 거의 모두 일치하였으나, 줄무늬 농어의 경우는 간장 병변 이외에 췌장 변화도 관찰되었고, 복수를 동반한 복부팽만과 안구돌출을 외부증상으로 하고 있었으며, 간장은 비대되고 옅은 갈색조를 띠고 있었다. 명확한 인자가

밝혀지지 않음에 따라 잠정적인 독성물질에 의한 영향이라고 결론지었으며, 줄무늬 농어가 다른 어종에 비해 독성물질에 좀더 민감한 어종이라고 하였다.

지금까지 megalocytosis에 대한 보고는 대부분 독성물질과 관련한 것이다. Kent는 megalocytosis를 나타내던 개체를 깨끗한 사육수로 옮긴 후 대부분의 병변이 회복하는 것으로 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 약 5-6개월가량 실험실 순환여과식 수조 내에 순치시키고 있는 송어 간장에서도 여전히 거대간세포가 다수 관찰됨에 따라 조류 독성과 같은 물질에 의한 병변과의 연관성은 별로 설득력이 없어 보인다. 한가지 유의할 점은 이들 개체는 수개월동안 섭이를 하지 않은 상태로 부검시 담낭은 매우 팽대되어 있었고, 녹색조가 간장에 침착되어 있었다. 조직학적 관찰 결과 거대간세포가 다수 출현하고 있었다. 그러므로 megalocytosis의 한가지 원인으로서는 녹간과의 상관성을 고려해 볼 수 있다.

이에 부분 녹간을 보이는 개체의 간장을 녹색조를 띠는 부분과 유백색을 띠는 부분을 절취하여 따로 조직블럭을 만들어 관찰한 결과, 녹간과 비녹간 부분은 현저한 병리조직학적 소견 차이를 보였다. 즉 녹간 부분은 nuclear pleomorphism 과 더불어 거대간세포가 간실질 전반부에 걸쳐 산재해 있었다. 이에 반해 비녹간 개체의 유백색 혹은 밝은 갈색을 띠는 간은 대개 지방적을 다수 함유하고 있었으며 간혹 거대간세포가 관찰되기도 하였다.

녹간은 담즙정체(cholestasis), 담즙 배설의 장애에 의해 담즙성분이 간내에 침착되는 현상으로써, 담즙성분이 담세관으로 분비되지 못하거나, 담관 폐쇄로 담즙의 흐름이 차단될 때, 혹은 용혈성 빈혈로 인해 적혈구 파괴가 증가하여 담즙이 과다 생성되어 나타날 수 있다.

포유류에서 나타나는 황달과 관련한 병리조직학적 소견으로는 간세포의 괴사, 담관 증생, 섬유화등이 있다(Cameron et al, 1958, Slott et al., 1990, Frzza et al., 1993). 반면 어류에서는 현재까지 녹간, 황달과 관련한 간장의 병리조직학적 소견을 보고한 예는 없으며, 주로 담즙 색소의 침착과 생화학적 조사에만 국한되어 있다.

녹간이 심한 개체의 간장에서 담관의 상피세포내, 내장에서 밝은 갈색의 과립을 관찰함에 따라 담즙정체의 증거를 확인할 수 있었다. 이러한 과립은 간실질에 걸쳐 다수 축적되어 있었고, 혈관주위 MMC 내에서도 관찰됨에 따라 담즙이 disse강과 모세 혈관으로 새어나온 것을 멜라닌 함유 포식세포가 이를 포식하여 혈관주위에 MMC를 형성한 것이라 여겨진다. 또한 다수의 간세포 내에서도 과립색소가 축적되어, 담즙성분이 간세포에 직접적인 변성변화를 야기했을 가능성이 제시된다.

담즙은 빌리루빈, 담즙산, 콜레스테롤, 레시틴, 기타 인지질 등을 함유하고 있으며, 장에서의 지질유화작용에 관여한다. 일반적으로 담즙은 세포독성효과를 가지는 것으로 알려져 있다(Kaplan 1994). 이러한 세포독성의 기전은 대부분 포유류에서 연구되어 있으며, 담즙 성분인 빌리루빈과 담즙산에 의해 미토콘드리아 기능 장애(Schaffner et al., 1971, Krahenbuhl et al., 1992, Gores et al., 1998, Rolo et al., 2000)가 일어나고, 지질 과산화가 자극(Sokol et al., 1993)된다고 하였다. 세포막은 다량의 고도불포화 지방산을 함유하고 있는데, 산화가 발생하면 세포막 투과성이 증가하고 lipid peroxidative chain reaction이 연쇄적으로 발생한다(Weiss 1986). 이때 새로 형성된 radical이 protein 이나 DNA와 같은 고분자 물질과 반응하여 광범위한 세포손상을 일으키고 결국은 세포사를 초래한다(Freeman et al., 1982).

황달을 가지는 포유류의 간장에서 lipoperoxide level은 매우 높은 것으로 보고되었

고, 이로 인한 지질과산화는 간세포의 기능(Arthur et al., 1985, Bacon et al., 1985)과 DNA 합성(Foschi et al., 1993, Gokora et al., 1992)에 영향을 미친다고 하였다. 또한 어류에서도 지질 과산화에 따른 산화적 스트레스가 황달의 발생 기전에 관여할 가능성이 제시되었다(Sekiya et al., 1994, Sakai et al., 1989, Ito et al., 2000).

DNA 합성과 peroxidation level에 대한 연구 결과 황달 초기에는 담관 폐색에 따른 간손상을 보상하기 위해 DNA 합성이 증가하나, 황달이 지속될수록 DNA 합성은 감소한다고 하였다(Mikio et al., 1996). 이에 반해 peroxidation level은 초기에는 자연적으로 생성되는 free radical scavengers와 antioxidants에 의해 낮은 수치를 나타낸다. 그러나 시간이 경과하여 항산화제의 수치가 낮아짐에 따라 peroxidation level은 증가한다고 하였고 이것이 DNA 합성과 세포분열을 억제할지도 모른다고 하였다(Foschi et al., 1993, Freeman et al., 1982, Player et al., 1979).

담즙 성분의 하나인 담즙산은 포합형과 비포합형으로 나뉜다. 이들은 세포독성효과가 다르며, 일반적으로 포합형이 비포합형에 비해 덜 유독하다고 알려져 있다(Sarbu et al., 2001). 또한 모든 담즙이 세포독성효과를 가지는 것은 아니라고 하였으나(Scholmerich et al., 1984) 현재까지 승어의 담즙 성분을 분석한 조사는 없는 실정이다. 한편 담즙정체가 일어나 담즙이 간세포 내에 축적된다 할지라도 세포막의 용해도와 파괴를 유도할 만큼 담즙이 충분한 수치에 다다른지의 의문이 제기되기도 하였다(Attili et al., 1986).

본 승어의 경우 간세포로 직접 스며든 담즙의 독성작용에 대하여 간세포에서는 DNA 합성이 활발히 일어나지만, 녹간이 지속됨으로써 peroxidation level은 상승하고, 이들이 유사분열을 억제시킴과 동시에 세포막이나 미토콘드리아의 기능 장애 등을 유

도하여 간세포 손상을 야기한다고 추측해 볼 수 있다. 그러나 포유류의 경우 황달 초기에 유사분열상이 활발히 관찰되지만, 간세포 자체의 크기 변화는 관찰되지 않은 반면, 본 송어개체에서는 다수의 거대세포를 확인하였다. 어류는 포유류에 비해 특히 불안정하여 쉽게 산화되는 불포화지방산을 다량 함유하고 있으므로 지질 산화에 더욱 민감하고, 녹간이 오랫동안 지속됨으로써, 담즙 독성이 간세포 손상을 더욱 가중시키는 것으로 생각된다. 이전에 송어 녹간을 조사한 결과 녹간 정도가 심한 개체에서도 거대간세포는 관찰되지 않고 위축성 변화만이 나타났었다. 이것은 녹간이 발생한 초기에 관찰한 결과로써, 담즙이 간세포에 대하여 아직 독성영향을 나타내지 않은 상태라고 여겨진다. 이에 녹간의 발생과 거대간세포 출현이 직접적인 관련이 있다고 보기는 어려우며 지속되는 기간에 따라 담즙의 독성영향이 나타난다고 할 수 있다.

송어 외에 참돔, 돌돔에서도 녹간이 발생하였고, 조직학적 조사를 실시한 결과 거대간세포는 관찰되지 않았다. 녹간은 주로 담즙 성분 중 bilirubin보다는 포유류에는 거의 존재하지 않는 biliverdin에 의한 녹색조의 침착에 의해 유도되는 것이다. 유사한 담즙성분이 간세포에 침착된다 하더라도 어종에 따라 그 독성효과는 다르게 나타나며, 송어가 다른 어종에 비해 간세포가 담즙에 더욱 민감하게 반응하는 것으로도 생각해 볼 수 있다.

그러나, 녹간에 따른 간장 손상을 명확히 증명하기 위해서는 녹간 개체에 담즙배설을 인위적으로 유도할 수 있는 약물을 투여하여 녹간 정도가 제거가 되고 간세포가 정상으로 회복되는지 혹은 반대로 정상개체에 담즙정체를 유발하는 약물을 투여하여 담즙정체로 인해 녹간이 유발되고 더불어 거대세포가 출현하는지 실험적으로 재현해 볼 필요가 있으며 이를 위한 추가 실험이 이루어져야 할 것이다.

V. 요 약

양식 송어에서 자연발생한 간 거대세포증(megalocytosis)의 병변 특성을 동정하고, 가능 원인을 추정하기 위하여 일련의 병리조직학적 연구를 수행하였다. 이 간장의 병변은 녹간증을 보이는 개체에 국한하여 관찰되는 소견이 다른 어종에서 보고된 거대간세포증(megalocytosis)과 매우 유사하였고, 송어에서의 거대간세포증(megalocytosis)의 병리조직학적 소견은 세포, 핵과 핵소체의 크기 및 수에 있어서 다양성을 보이는 거대간세포의 분포가 병변의 특징이었다. 이와 같은 소견은 녹색 또는 짙은 녹색조를 나타내는 간장 조직 부위에 한정되어 있었다. 따라서 이상과 같은 병리조직학적 소견에 미루어 양식 송어에서의 거대간세포증(megalocytosis)은 담즙성분이 간실질에 미치는 만성적인 독성 영향에 따른 결과로 사료된다.

표제어 : 송어 · *Mugil cephalus* · 간 · 거대세포증 · 거대간세포증

VI. 그림 및 그림 설명

Fig. 1. A gray mullet showing partially green colored liver.
Green part(arrow), whitish part(arrowhead)of liver.

Fig. 1.



Fig. 2. Normal liver and liver showing megalocytosis

Fig. 2-1. Histologic features of normal liver. Note the regularly arranged hepatic cords throughout the parenchyma. C: Central vein, HP: Hepatic parenchyma. HE, $\times 400$.

Fig. 2-2. A histologic section of liver showing megalocytosis. Various kinds of pleomorphic cells (arrows) including megalocytes are evenly distributed throughout the severely altered parenchyma. C: Central vein, BD: Bile duct. HE, $\times 200$

Fig. 2.

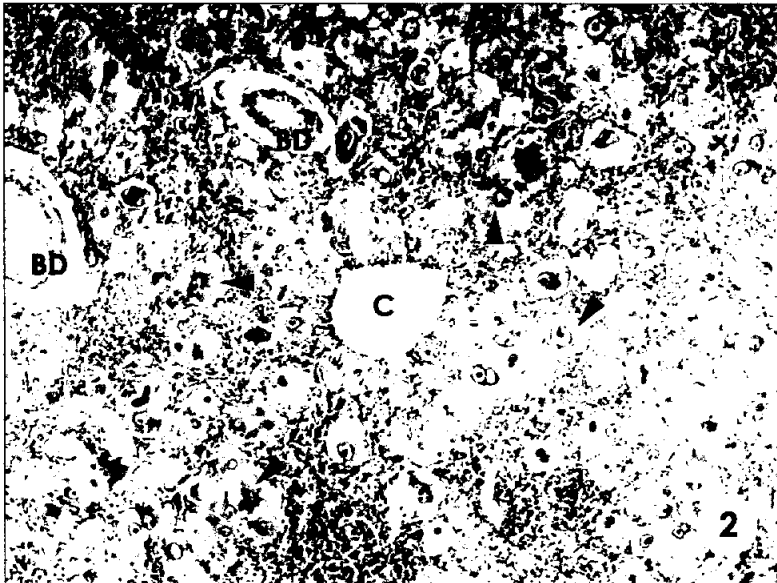
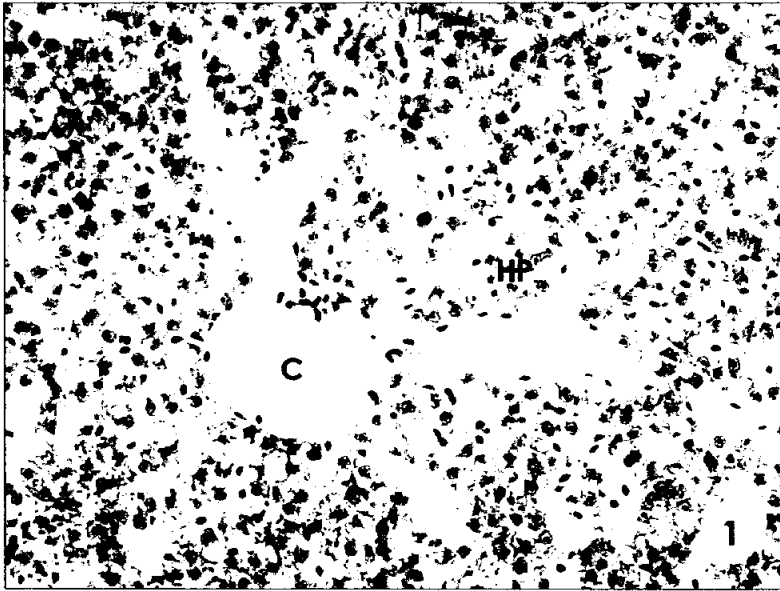


Fig. 3. Various histologic areas of liver suffering from megalocytosis.

Fig. 3-1. An area showing extremely hypertrophied hepatocytes with their enlarged nuclei and nucleoli. HE, $\times 400$.

Fig. 3-2. A hypertrophied cell containing 2 nuclei with one of them invagination. HE, $\times 400$.

Fig. 3-3. Clearly isolated eosinophilic cytoplasmic(arrows) and basophilic inclusions (arrowhead). HE, $\times 400$.

Fig. 3-4. Quite large eosinophilic intracytoplasmic inclusion(arrows) isolated by clear space. HE, $\times 400$.

Fig. 3.

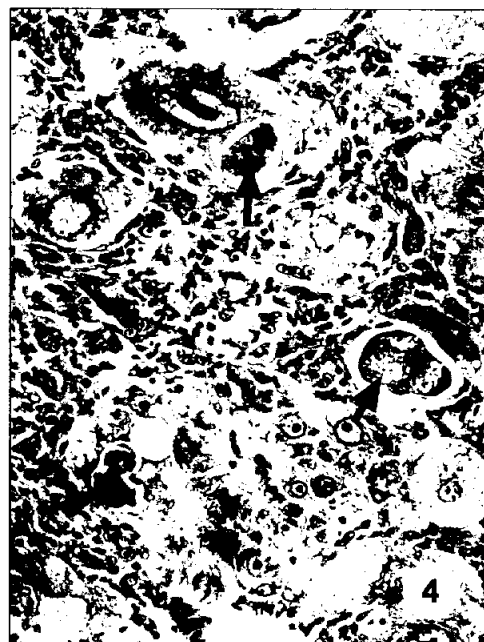
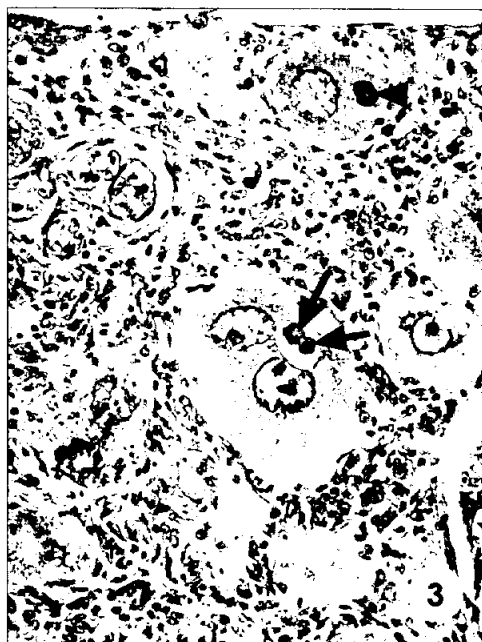
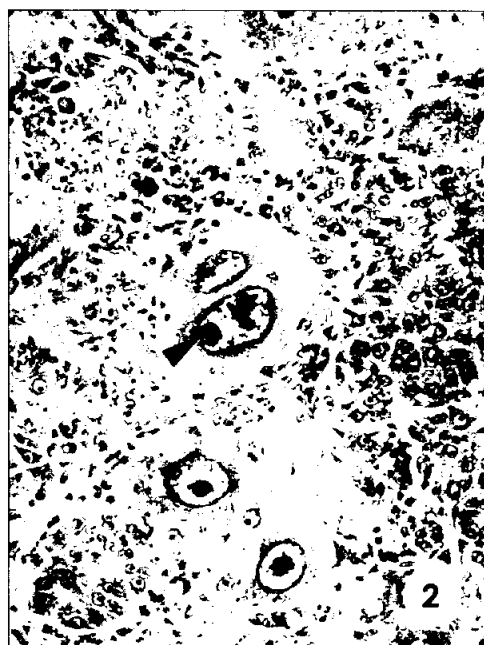


Fig. 4. Histologic areas except for megalohepatocytes

Fig. 4-1. Small hepatocytes(circle) with small, oval, concentric nuclei and bile preductular cells(arrowhead) with eosinophilic, eccentric nuclei grouped amongst megalohepatocytes. HE, $\times 400$.

Fig. 4-2. Melano macrophage centers (MMC) located mainly around blood vessels. HE, $\times 400$.

Fig. 4-3. Inflammatory cell infiltration and MMC around bile duct. HE, $\times 400$.

Fig. 4-4. Pigment of bile in the lumen of bile duct(arrows) and within basal cytoplasm of bile duct epithelial cells. HE, $\times 400$.

Fig. 4.

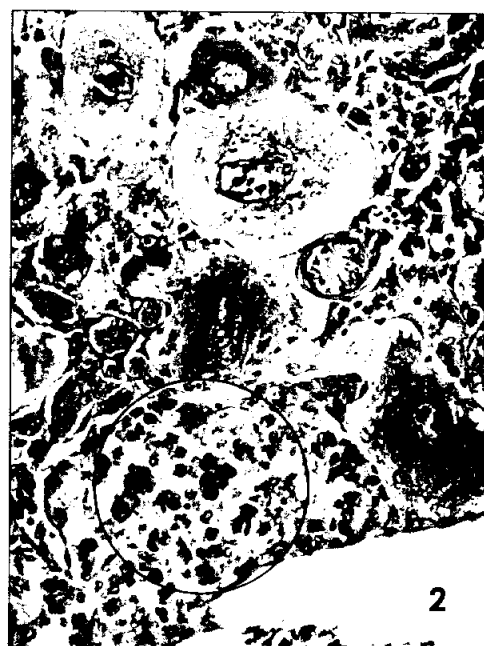
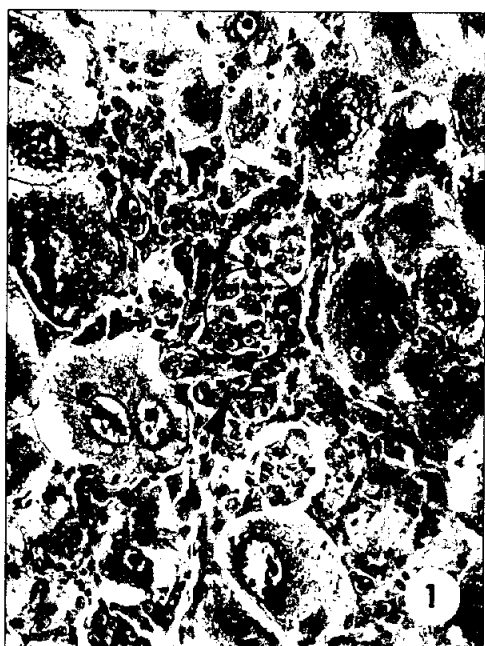


Fig. 5. Various histologic sections of liver viewed by special stainings.

Fig. 5-1. Connective tissue around the bile duct and material plugging the lumen of bile duct were PAS positive. PAS, $\times 400$.

Fig. 5-2. PAS positive some pigments within a MMC and within cytoplasm of the adjacent megalohepatocytes. PAS, $\times 400$.

Fig. 5-3. Gomori's methenamine silver positive material within the lumen of bile ducts. $\times 400$.

Fig. 5-4. Presumed bile preductular cells are also differentiated with gomori's methenamine silver stain. $\times 400$.

Fig. 5.

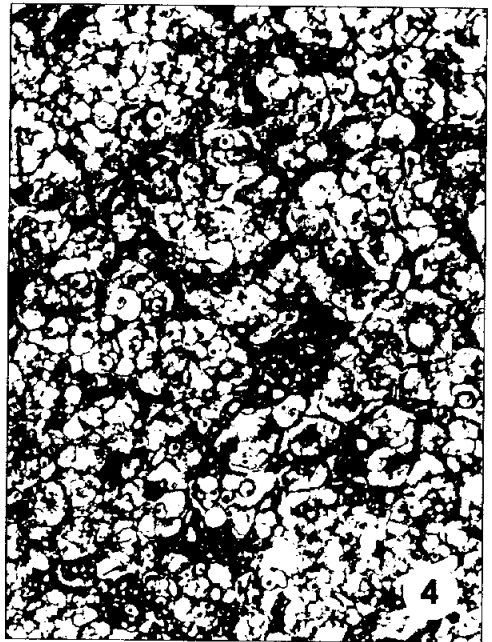
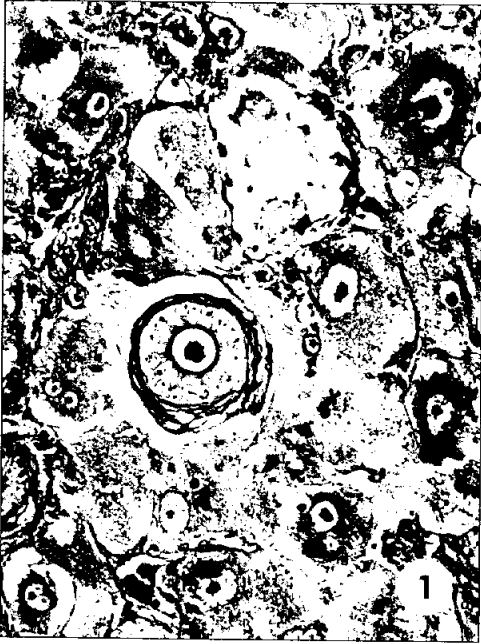


Fig. 6. Histologic features of liver with hepatic megalocytosis on semi-thin section.

Fig. 6-1. An extremely enlarged hepatocyte. Toluidine blue, $\times 400$.

Fig. 6-2. Multi-nucleoli in megalo hepatocytes. Toluidine blue, $\times 400$.

Fig. 6-3. An osmophilic intranuclear inclusion in a megalohepatocyte (arrow). Toluidine blue, $\times 400$.

Fig. 6-4. Numerous intracytoplasmic and intranuclear lipid droplets in megalohepatocytes. Toluidine blue, $\times 400$.

Fig. 6.

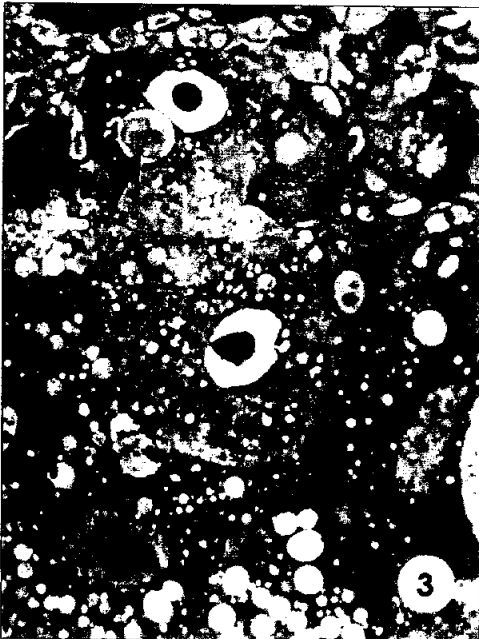


Fig. 7. Transmission Electron Microscopy I for megalohepatocytes.

Fig. 7-1. Atypical distribution of chromatin within frayed nuclei of megalohepatocytes(Circles). NO: nucleoli.

Fig. 7-2. A nucleolus with extremely frayed border(arrows) of a megalohepatocyte. NO: nucleoli.

Fig. 7-3. Marked elongated nucleus and its nucleolus(arrow).

Fig. 7.

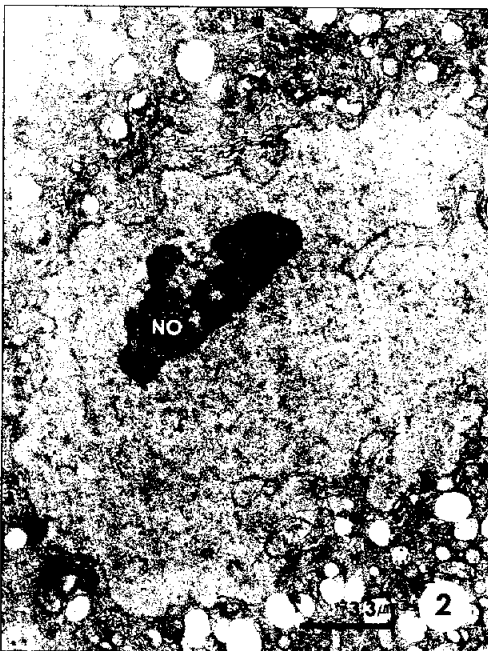
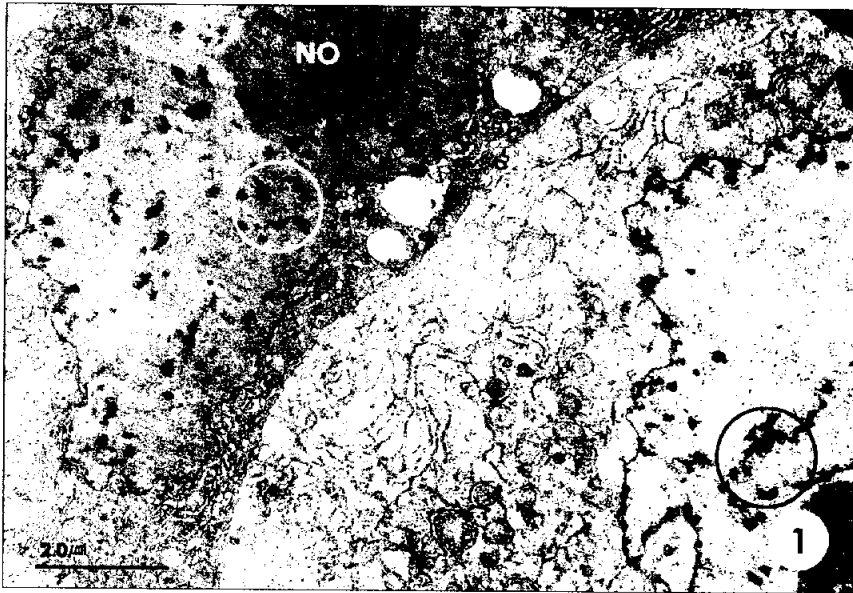


Fig. 8. Transmission Electron Microscopy II for megalohepatocytes.

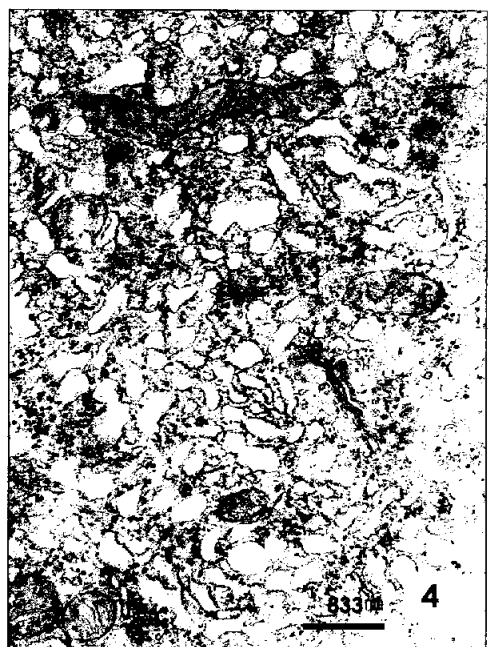
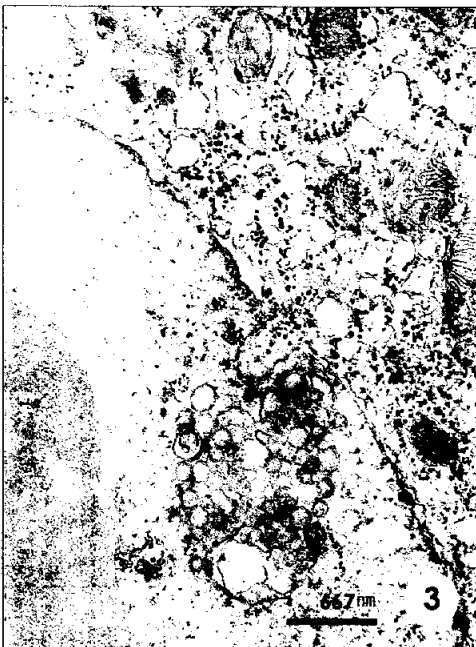
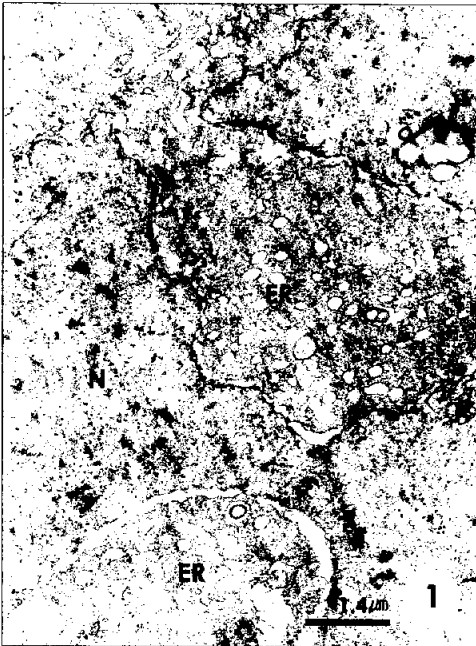
Fig. 8-1. Vesiculated swollen numerous ER group invaginated into the nucleus. N: nucleus, ER: endoplasmic reticulum.

Fig. 8-2. Various types of lipid droplets in the nucleus.

Fig. 8-3. Lipid droplets flooded into the nucleus of a megalohepatocyte.

Fig. 8-4. Shortened swollen ER in the cytoplasm of a megalohepatocyte.

Fig. 8.



VII. 감사의 글

뒤돌아 보면 참으로 아쉬움이 많이 남는 시간이었던 것 같습니다. 부족한 논문이지만, 많은 분들의 도움이 있었기에 이 자리까지 올 수 있었다고 생각합니다.

학문에 대한 대단한 열의로써 제자들에게 늘 훌륭한 본보기가 되시는 지도 교수님 이신 허민도 교수님 정말 고개숙여 감사의 말씀을 전해드립니다. 부족한 논문에 대하여 조언을 아끼지 않으시고, 관심을 기울여주신 박수일 교수님, 강주찬 교수님 정말 감사드리고, 많은 가르침을 주셨던 정준기 교수님, 정현도 교수님께도 감사의 말씀을 전합니다.

실험어인 승어를 흔쾌히 분양해 주신 남해 양식장 조필태 사장님, 하동효 사장님께 감사드립니다. 논문을 완성하는데 많은 부분 도와주셨던 월라 언니께도 정말 감사합니다. 전자현미경적 결과를 이끌어내는데 무척 도움을 많이 주시고, 자신감을 심어주신 전자현미경실의 강순배 선생님께도 감사합니다.

6년동안의 실험실 생활동안 가장 오랜시간, 가장 가까운 곳에서 힘이 되어준 형길 선배, 갑민 선배 정말 고생 많이 하셨고, 감사드립니다. 실험실 선배로서 많은 것을 가르쳐 주시고, 관심 보여주신 병열 선배에게도 감사드리고, 병리학 실험실원들에게도 감사의 말씀 전합니다. 9호관 2층에서 열심히 실험하며 바쁜 와중에도 관심 가져준 96동기들, 정수 선배, 재범 선배를 비롯한 여러 선후배님께도 감사의 말씀 전합니다. 오랜시간 곁에서 때로는 동기처럼 때로는 선배처럼 많은 힘이 되어준 동기 현자에게도 감사의 말씀을 전합니다. 일본에서의 박사생활도 잘 해낼 수 있을거라 믿어 의심치 않습니다. 많은 우여곡절이 있었지만, 지금껏 힘이 되어준 석형 선배에게도 감사드립니다. 어떤 일을 하든 소신을 가지고 열심히 생활하는만큼 앞으로는 좋은 일만 가득하길 바랍니다.

늘 인색한 저에게 따뜻함과 사랑을 베풀어주시는 우리 가족들에게 정말 고개숙여 감사의 말씀 전합니다. 정말로 부족함이 많은 딸이지만, 한결같이 듬직한 맏딸로써 믿음을 가지고 지켜봐 주신 우리 부모님.. 엄마, 아빠, 그리고 동생 인구 정말로 사랑합니다. 그리고 감사합니다.

VII. 참고문헌

- Arthur MJP, Bantley IS, Tanner AR, Saunders PK, Millward-Sadler GH, Wright R (1985) Oxygen-derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology*. 89: 1114.
- Ashley LM, Halver JE (1968) Dimethylnitrosamine-induced hepatic cell carcinoma in rainbow trout *J Natl Cancer Inst*. 41: 531-553.
- Attili AF, Angelico M, Cantafora A, Alvaro D, Capocaccia L (1986) Bile acid-induced liver toxicity: Relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Med Hypotheses*. 19: 57-69.
- Bacon BR, Park CH, Brittenham GM, O'Neill R, Tavill A (1985) Hepatic mitochondrial oxidative metabolism in rats with chronic dietary iron overload. *Hepatology*. 5: 789-797.
- Butler WH (1964) Acute toxicity of aflatoxin B in rats. *Br J Cancer*. 18: 756-762.
- Cameron GR, Hasan M (1958) Disturbances of structure and function in the liver as the result of biliary obstruction. *J Pathol Bacteriol*. 125: 333.
- Eller LL (1971) Histopathological lesions in cutthroat trout(*Salmo clarki*) exposed chronically to the insecticide endrin. *Am J Path*. 64: 321-336.
- Freeman BA, Crapo JD (1982) Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest*. 47: 412-426.
- Frzza EE, Gerunda GE, Plebani M, Galligioni A, Giacomini A, Nei D, Faccioli AM, Tiribelli C (1993) Effect of ursodeoxycholic acid administration on bile duct proliferation and cholestasis in bile duct ligated rat. *Dig Dis Sci*. 38: 1291-

1296.

- Foschi D, Castoldi L, Lesma A, Musazzi M, Benevento A, Trabucchi E (1993) Effects of ischemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur J Surg.* 159: 393-398.
- Gokora N, Gundogdu S, Aricioglu A, Erabas D, Durmus O, Turkozkan N (1992) The effect of epidermal growth factor on liver lipid peroxidation and glutathione levels in lobectomized rats. *Biochem Cell Biol.* 70: 259-262.
- Gores GJ, Miyoshi H, Botla R, Aguilar HI, Bronk SF (1998) Induction of the mitochondrial permeability transition as a mechanism of liver injury during cholestasis: a potential role for mitochondrial proteases. *Biochim Biophys Acta.* 1366: 167-175.
- Groff JM, Hinton DE, McDowell TS, Hedrick RP (1992) Progression and resolution of megalocytic hepatopathy with exocrine pancreatic metaplasia in a population of cultured juvenile striped bass *Morone saxatilis*. *Dis aquat Org.* 13: 189-202.
- Hendricks JD, Sinnhuber RO, Henderson MC, Buhler DR (1981) Liver and kidney pathology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to dietary pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. *Expl mol Path.* 35: 170-183.
- Hinton DE, Klaunig JE, Lipsky MM (1978) PCB-induced alterations in teleost liver : A model for environmental disease in fish. *Mar Fish Rev.* 40: 47-50.
- Ito T, Kera A, Murata H, Yoshida T, Sakaki T, Yamauchi K, Yamasaki Y, Yamaguchi T, Ukawa M (2000) Experimentally induced bacterial hemolytic jaundice of yellowtail and oxidative stress. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 66: 50-54.

- Kaplan M (1994) Primary biliary cirrhosis—a first step in prolonging survival. *New Engl J Med.* 330: 1368-1387.
- Kelley WR (1985) The liver and biliary system. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (eds) *Pathology of domestic animal Vol II*, 3rd edn. Academic Press, Orlando. 239-312.
- Kent ML (1990) Netpen liver disease(NLD) of salmonid fishes reared in sea water: species susceptibility, recovery, and probable cause. *Dis aquat Org.* 8: 21-28.
- Kent ML, Myers MS, Hinton DE, Eaton WD, Elston RA (1988) Suspected toxicopathic hepatic necrosis and megalocytosis in pen-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Puget Sound, Washington, USA. *Dis aquat Org.* 4: 91-100.
- Komura M, Chijiwa K, Naito T, Kameoka N, Yamashita H, Yamaguchi K, Kuroki S, Tanaka M (1996) Sequential changes of energy charge, lipoperoxide level, and DNA synthesis rate of the liver following biliary obstruction in rats. *J Surg Res.* 61: 503-508.
- Krahenbuhl S, Stucki J, Reichen J (1992) Reduced activity of the electron transport chain in liver mitochondria isolated from rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 15: 1160-1166.
- Maddocks AR (1986) *Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids.* Academic Press, Hardcourt Brace Jovanovich, Montreal
- Malins DC, McCain BB, Brown DW, Chan SL, Myers MS, Landahl JT, Prohaska PG, Friedman AJ, Rhodes LD, Burrows DG, Gronlund WD, Hodgins HO (1984) Chemical pollutants in sediments and diseases of bottom-dwelling fish in Puget Sound, Washington. *Environ Sci Technol.* 18: 705-713.

- McLean EK (1970) The toxic actions of pyrrolizidine(*Senecio*) alkaloids. *Pharmacol. Rev.* 22: 429-483.
- Myers MS, Rhodes LD, McCain BB (1987) Pathologic anatomy and patterns of occurrence of hepatic neoplasms, putative preneoplastic lesions, and other idiopathic hepatic conditions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *J Natl Cancer Inst.* 78: 333-363.
- Peters N, Köhler A, Kranz H (1987) Liver pathology in fishes from the Lower Elbe as a consequence of pollution. *Dis aquat Org.* 2: 87-97.
- Player TJ, Mills DJ, Horton AA (1979) Lipid peroxidation of the microsom fraction and extracted microsomal lipids from DAB-induced hepatomas. *Br J Cancer.* 39: 773-778.
- Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJM, Palmeira CM (2000) Bile acids affect liver mitochondrial bioenergetics: possible relevance for cholestasis therapy. *Toxicol Sci.* 57: 177-185.
- Sakai T, Murata H, Endo M, Shimomura T, Yamauchi K, Ito T, Yamaguchi T, Nakajima H, Fukudome M (1998) Severe oxidative stress is thought to be a principal cause of jaundice of yellowtail(*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture.* 160: 205-214.
- Sarbu C, Kuhajada K, Keveresan S (2001) Evaluation of the lipophilicity of the bile acids and their derivatives by thin-layer chromatography and principal component analysis. *J Chromatogr A.* 917: 361-366.
- Schaffner F, Bacchin PG, Hutterer F, Scharnbeck HH, Sarkozi LL, Denk H, Hopper H (1971) Mechanisms of cholestasis 4. Structural and biochemical

- changes in the liver serum in rats after bile duct ligation. *Gastroenterology*. 60: 888-897.
- Scholmerich J, Becher MS, Schmidt K, Schubert R, Kremer B, Feldhaus S, Gerok W (1984) Influence of hydroxylation and conjugation of bile salts on their membrane-damaging properties: studies on isolated hepatocytes and lipid membrane vesicles. *Hepatology*. 4: 661-666.
- Sekiya T, Murata H, Sakai T, Yamauchi K, Endo M, Shimomura T, Ugawa M (1994) Effect of dietary fish meal qualities on 2-thiobarbituric acid values and alpha-tocopherol contents of yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 60: 505-508.
- Sinnhuber RO, Hendricks JD, Wales JH, Putnam GB (1977) Neoplasms in rainbow trout, a sensitive animal model for environmental carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 298: 389-408.
- Slott PA, Liu MH, Tavoloni N (1990) Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in rat. *Gastroenterology*. 99: 466.
- Sokol RJ, Devereaux M, Khandwala R, O'Brien K (1993) Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology*. 17: 869-881.
- Stanton MF (1965) Diethylnitrosamine-induced hepatic degeneration and neoplasia in the aquarium fish *Brachydanio rerio*. *J Natl Cancer Inst*. 43: 117-134.
- Stephen C, Kent ML, Dawe SC (1993) Hepatic megalocytosis in wild and farmed chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* in British Columbia, Canada. *Dis aquat Org*. 16: 35-39.
- Wales JH (1967) Degeneration and regeneration of liver parenchyma accompanying

hepatogenesis In: Halver JD, Mitchell IA (eds) Trout hepatoma research conference papers, research report 70. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, Washington, DC. 56-59.

Weiss SJ (1986) Oxygen, ischemia and inflammation Acta Physiol Scand Suppl. 548: 9-37.

이월라 (2002) 참승어(*Mugil cephalus*) 녹간증례에 대한 임상병리. 부경대학교. 석사 학위 논문.