

산천어의 바이러스성 질병에 관한 연구 - II

- 산천어 치어에서 IHNV 분리 -

손상규 · 박명애 · 박정우*

국립수산진흥원 병리과, *울산대학교 미생물학과

1. 1990년 2월 강원도 삼척군에 소재한 송어양식장에서 전염성 조혈기 괴사증 증상으로 산천어 자·치어가 대량폐사하였다.
2. 폐사한 산천어 치어로부터 세포배양법에 의해 전염성 조혈기 괴사증 바이러스가 분리되었다.
3. 분리된 바이러스는 구조단백의 크기와 항원성에 있어 미국에서 분리된 RB-76 바이러스주(electropherotype 1)와 유사하였다.

Key Words : *Oncorhynchus masou*, IHNV, SDS-PAGE, RB-76

전염성 조혈기 괴사증 바이러스(infectious hematopoietic virus)는 연어과 어류치어에서 난치성 전염병을 일으키는 중요한 병원체로 널리 알려져 있다.

전염성 조혈기 괴사증 바이러스는 Wingfield et al. (1969)이 sockeye salmon에서 처음 분리하여 oregon sockeye virus(OSV)라고 하였으나, 본 바이러스 감염증이 조혈기 조직에 광범위한 괴사를 일으키는 특성으로 인해 Amend et al.(1969)이 infectious hematopoietic necrosis virus(IHNV)라 명명하였다.

전염성 조혈기 괴사증은 북미지역에서 자연산 및 양식산 연어과 어류치어에 많은 피해를 일으키는 질병으로 알려져 왔으나(Pilcher and Fryer, 1980), 북미지역으로부터 어류나 난을 수입하였거나 어류간의 교류가 있었던 일본(Sano et al., 1977), 대만(Chen et al., 1985), 이태리(Bovo et al., 1987) 및 프랑스(Hattenberger-Baudouy and de Kinkelin, 1988) 등에서도 본 바이러스 질병으로 인한 피해가 널리 보고되고 있다. 이처럼 전염성 조혈기 괴사증은 전세계적으로 점차 확산되고 있는데, 우리나라의 경우에도 미국이나 일본으로부터 연어과 어류 발안난(연어 및 송어류)을 여러번 도입한 적이 있고, 또한 동해안에 회귀해 오는 연어가 북태평양에서 미국과 일본에서 부화방류한 연어와 섞여 지내다 온다는 사실을 미루어 볼 때 국내 양식산이나 자연산 연어과 어류는 이미

전염성 조혈기 괴사증 바이러스에 감염되어 있을 가능성이 매우 높았다.

그래서 본 연구에서는 1990년 2월 초순 강원도 삼척군에 소재한 송어양식에서 산천어 자·치어가 전염성 조혈기 괴사증 증상을 나타내면서 대량폐사되어(Sohn et al., 1991), 바이러스 분리를 시도한 결과 전염성 조혈기 괴사증 바이러스가 분리됨에 따라 이에 대한 실험결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험어

1990년 2월 강원도 삼척군에 소재한 송어양식장에서 채색흑화, 안구돌출, 복부팽대 및 체표출혈증상을 나타내며 힘없이 사육지 바닥에 정지하고 있다가 갑작스런 이상유영운동을 하면서 폐사하는 산천어 치어(평균체장, 0.2g)를 채집하여 바이러스 분리용 실험어로 사용하였다.

2. 바이러스 분리

바이러스 분리는 The American Fisheries Society : Fish Health Section(1975) 방법에 준해, 실험어 5미를 1 pool로 하여 멸균한 유발에 넣고 저온상태에서 유봉으로 잘 같은 다음, DMEM(Gibco)으로 100배 희석시

켜 1,500×g에서 15분간(4°C) 원심하여 상층액을 0.45µm membrane filter(Corning)로 여과하였다. 이어서 단층 배양된 CHSE-214(ATCC CRL, 1981) 어류주화세포에 여과시료를 접종하고 DMEM₁₀으로 16°C에서 배양하면서 세포변성효과(cytopathic effect; CPE)에 의한 바이러스 분리를 실시하였다.

3. 바이러스 정제

바이러스 접종후 세포변성효과가 완전히 일어날 때 배양액을 수확하고 4,000×g에서 10분간(4°C) 원심하여 세포잔사를 제거한 후, PEG-6000(Sigma)을 7% (W/V) 되게 첨가해서 교반(16시간)하고 6,000×g에서 30분간 원심하여 침전물을 모았다.

침전물은 소량의 TNE buffer(0.01 M Tris, pH 8.0, 0.1 M NaCl and 0.001 M EDTA)로 녹인 후, 20, 30 and 50% discontinuous sucrose gradient에서 80,000×g (Beckman, SW 50.1 rotor)로 원심하여 바이러스를 수확하였으며, 수확된 바이러스는 다시 TNE buffer로 녹여서 5~30% continuous sucrose gradient에서 48,000×g로 원심하여 바이러스를 취한 후, 115,000×g에서 재 원심하여 바이러스를 정제하였다.

4. 바이러스 입자

바이러스 접종 후 세포변성효과가 약간 일어날 때 접 종세포를 모아 2,000×g에서 15분간 원심하여 세포 pellet을 수확했다. 수확된 세포 pellet은 2.5% glutaraldehyde(pH 7.2)와 osmium tetroxide(pH 7.2)로 각각 고정하고 ethylalcohol 계열로 탈수시켜 epon mixture로 포 매하였다. 포매시료는 ultramicrotome(CKB)로 박절하여 2% uranyl acetate and lead citrate로 염색하고 투과전자현미경(Jeol, 1200 EX-2)로 바이러스를 관찰하였다.

5. 중화시험

본 실험에서 분리한 IHNV주(SCS strain로 칭함)와 참조주인 RB-76 및 SRCV(미국 오레곤주립대학에서 분양 받음)와의 혈청학적 유연성은 Winton(1988)이 제조한 RB/B5 및 SRCV/A4의 monoclonal antibodies를 이

용하여 Okamoto(1983) 방법에 따라 실시하였다.

6. 전기영동

분리 바이러스는 Laemmli(1970)의 방법에 준해 동량의 SDS-sample buffer(2.3% SDS; 10% glycerol(W/V); 5% 2-mercaptoethanol)에 넣고 2분간 끓은 후 10% separating gel과 2.5% stacking gel에서 6시간(100V) 동안 전기영동(LKB)하여 silver stain을 하고, 참조 바이러스주인 RB-76 및 SRCV와의 구조단백을 비교하였다.

결 과

1. 바이러스

접종세포는 배양 후 4일째부터 세포가 원형화되기 시작하여 6일째에는 포도송이 형태로 심한 세포변성효과를 일으켰고(Fig. 1), 접종세포의 세포질내에는 크기가 80~90×160~180nm인 탄환형 모양을 한 바이러스 입자가 무수히 관찰되었다(Fig. 2).

2. 중화역가

실험에 사용한 monoclonal antibodies는 중화역가가 높지는 않았지만 실험 바이러스주간에 뚜렷한 차이를 나타냈으며, 국내 산천어 치어에서 분리된 바이러스(SCS)에 대한 monoclonal antibodies의 중화역가는 SRCV/A4가 0.7, RB/B5가 2.6으로 나타나 분리 바이러스는 혈청학적으로 SRCV(type 3)보다 RB-76(type 1)에 유사하였다(Table 1).

Table 1. Neutralizing test for IHNV isolates with two monoclonal antibodies.

virus		monoclonal antibody	
source	strain	SRCV/A4	RB/B5
Korea	SCS	0.7	2.6
U.S.A	SRCV	1.3	1.7
U.S.A	RB-76	0	4.5

Neutralizing titre of the monoclonal antibodies were expressed as the log₂ value of the reciprocal of the highest dilution of antisera protecting 50% of the cells inoculated.

Fig. 1. Cytopathic effect in CHSE-214 cells

A. Normal CHSE-214 cells($\times 40$)

B. Cytopathic effect produced by IHNV, 6 days after incubation($\times 40$)

Fig. 2. Electron micrographs of IHNV in CHSE-214 cells

A. Virions like bullet are shown in CHSE-214 cells($\times 20,000$)

B. Magnification($\times 50,000$)

3. 바이러스 구조단백

전기영동상에서 glycoprotein(G), polymerase(L), matrix protein 1(M₁) 및 matrix protein 2(M₂)의 크기는 실험에 사용한 바이러스주간에 차이는 없었지만, nucleocapsid protein(N)은 차이가 있었는데 국내에서 분리된 전염성 조혈기 괴사증 바이러스(SCS)의 nucleocapsid protein(N) 크기는 RB-76와 유사하였다(Fig. 3).

Fig. 3. Electrophoretic profile of IHNV proteins.

Virus particles were purified by ultracentrifugation on sucrose gradients(20, 35 and 50% step gradient; 5~30% continuous gradient). Purified virions were separated by SDS-PAGE on a 10% acrylamide gel. The proteins were stained with silver nitrate.

고 찰

1990년 2월 강원도 삼척군에 위치한 송어양식장에서 대량폐사한 산천어 치어로부터 바이러스가 세포배양법에 의해 분리되었는데, 분리된 바이러스는 CHSE-214

어류주화세포에서 포도송이 모양의 세포변성효과를 일으켰고, 전자현미경적으로 감염세포의 세포질내에서 크기가 80~90×160~180nm이며 탄환형 모양을 하고 있었다.

이와같이 감염세포에서 세포변성효과의 특징과 바이러스 입자모양은 이미 Sohn et al.(1991)이 보고한 바 있는 병리조직학적 검토 등과 함께 고려해 보면 산천어 치어로부터 분리된 바이러스는 전염성 조혈기 괴사증 바이러스임을 알 수 있었다.

그리고 냉수성 어류에서 분리되고 있는 전염성 조혈기 괴사증 바이러스는 지금까지 전 세계적으로 표준형이 정해져 있지 않고 있지만, Pilcher et al.(1980)이 각국에서 분리된 전염성 조혈기 괴사증 바이러스는 지역적으로 병원성에 차이가 있음을 보고하였고, Hsu et al.(1986)도 SDS-PAGE상에서 nucleocapsid protein(N) 및 envelope glycoprotein(G)의 분자량 차이에 의해 IHNV를 five electropherotypes으로 분류한 바 있으며, 또한 Winton et al.(1988)이 three monoclonal antibodies를 이용하여 twelve IHNV isolates를 four groups으로 구분하였기 때문에, 본 실험에서도 Winton et al.(1988)이 제조한 two monoclonal antibodies(SRCV/A4 and RB/B5)를 이용해서 중화시험과 더불어 Hsu et al.(1986)에 의해서 electropherotype 1로 분류된 RB-76과 electropherotype 2로 분류된 SRCV를 이용해서 SDS-PAGE 상에서의 구조단백질을 분석한 결과, 국내 산천어 치어에서 분리된 전염성 조혈기 괴사증 바이러스(SCS strain)는 RB-76 strain에 유사하였다.

참 고 문 헌

- Amend, D. F., W. T. Yasutake, and R. W. Mead : A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. Trans. Am. Fish. Soc. 98, 796~804, 1969.
- American Fisheries society, Fish Health Section : Suggested procedures for the detection and identifi-

- cation of certain infectious diseases of fish. U. S. Fish and Wild. Ser. 1975.
- Bovo, G., G. Giorgetti, P. E. V. Jorgensen, and N. J. Olesen** : Infectious hematopoietic necrosis : first detection in Italy. *Bull. Eur. Ass. Fish pathol.*, 7, 124, 1987.
- Chen, S. N., G. H. Kou, R. P. Hedrick, and J. L. Fryer** : The occurrence of viral infection of fish in Taiwan, P. 313~319. In A. E. Ellis(ed). *Fish and shellfish pathology*. Academic press. Inc. New York. 1988.
- Hattenberger-Baudouy, A. M., and P. Kinkelin** : Serological evidence for infectious hematopoietic necrosis in rainbow trout from an outbreak in France. Abstract : International Fish Health Conference, Vancouver, B. C., July. 19~20, p. 6, 1988.
- Hsu, Y. L., H. M. Engelking, and J. C. Leong** : Occurrence of different types of infectious hematopoietic necrosis virus in fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1353~1361, 1986.
- Laemmli, U. K.** : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*(London), 227, 680~685, 1970.
- Okamoto, N., R. P. Hedrick, and J. L. Fryer** : Antigenic relationships of selected strains of infectious pancreatic necrosis virus(IPNV) and eel virus european(EVE). *J. Fish Dis.*, 6, 19~25, 1983.
- Pilcher, K. S. and J. L. Fryer** : The viral diseases of fish : a review through 1978. Part I : Diseases of proven viral ethiology. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 7, 287~364, 1980.
- Sano, T., T. Nishimura, N. Okamoto, T. Yamazaki, H. Hanada, and Y. Watanabe** : Studies on viral diseases of Japanese fishes. VI. Infections hematopoietic necrosis(IHN) of salmonids in the mainland of Japan. *J. Tokyo Univ. Fish.*, 63, 81~85, 1977.
- Sohn, S. G., M. A. Park, and S. D. Lee** : Studies on a viral disease of masu salmon, *Oncorhynchus masou*-I. A histopathological study on masu salmon fry. *J. Fish pathol.*, 4(2), 79~85, 1991.
- Wingfield, W. H., J. L. Fryer, and K. S. Pilcher** : Properties of the sockeye salmon virus(Oregon strain). *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, 130, 1055~1058, 1969.
- Winton, J. R., C. K. Arakawa, C. N. Lannan, and J. L. Fryer** : Neutralizing monoclonal antibodies recognize antigenic variants among isolates of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 4, 199~204, 1988.

Studies on Viral Disease of masu salmon, *Oncorhynchus masou*-II
Isolation of infectious hematopoietic necrosis virus from masu salmon fry

Sang-Gyu SOHN, Myoung-Ae PARK and Jeong-Woo PARK*

National Fisheries Research and Development Agency, Kyounghnam 626-900, Korea.

**Department of Microbiology, College of Natural Science, University of Ulsan, Kyounghnam
600-749, Korea.*

In February of 1990, an epizootic disease to masu salmon, *Oncorhynchus masou* cultured at the hatchery of trout in Samchuk, Kwangwondo have broken out and induced heavy mortality.

An infectious hematopoietic necrosis virus(IHNV) was isolated from diseased masu salmon fry by the use of fish cell line, CHSE-214.

This IHNV isolated from masu salmon was compared with USA isolates of IHNV, SRCV and RB-76 by analysis of virion proteins in sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and neutralization tests with two monoclonal antibodies raised against SRCV(MAb SRCV/A4) and RB-76(MAb RB/B5).

In the antigenicity and the size of structural proteins, this IHNV, SCS strain was similar to RB-76 belonged to the electropherotype 1 proposed by Hsu et al.(1986).