

양식산 넙치로부터 HRV-like Rhabdovirus의 분리

오명주[†] · 최태진*

여수대학교 어병학과, *부경대학교 미생물학과

1997년 3월 전라남도 및 경상남도의 해산어 육상 및 가두리 양식장에서 양성 중이던 넙치가 HRV (hirame rhabdovirus, *Rhabdovirus olivaceus*) 감염증과 유사한 증상을 나타내어 그 원인을 조사한 결과 새로운 rhabdovirus가 분리되었다. 분리 바이러스(DF-9708)는 RTG-2 및 EPC 세포주에서 15°C로 배양하였을 때 램도바이러스 특유의 세포변형효과(CPE)를 나타내었으나 CHSE-214에서는 증식되지 않았다. 투과전자현미경으로 감염 세포내의 바이러스 입자 형태를 관찰해본 결과 bullet-shape의 크기 70 nm × 100~150 nm으로 인벨롭을 가진 바이러스였다. 분리바이러스는 pH 3 및 diethyl ether의 처리 조건에서는 감염성을 상실하였고, 열(50°C 5 min, 60°C 1 min)에도 약한 성상을 나타내었다. DNA 저해제인 IUdR 10⁻⁴ M 처리에 의해서는 바이러스 감염가에 영향을 받지 않았다. 분리 바이러스는 Anti-HRV (8401-H) rabbit serum에 의해서만 중화되었고, 전염성 조혈기 괴사증 바이러스(IHNV), 연어과 레오바이러스(CSV), 바이러스성 선회병 바이러스(RVS) 및 전염성 췌장괴사증 바이러스(IPNV) 등의 국내에서 분리되어지는 바이러스 항체로는 중화되지 않았다. 초원심법으로 정제한 분리 바이러스를 전기영동한 결과 polymerase(L), glycoprotein(G), nucleoprotein(N) 및 2개의 matrix proteins(M1 및 M2)으로 구성되어져 있었으며, 각 단백질의 분자량은 L, 160 kDa; G, 55 kDa; N, 45 kDa; M1, 26 kDa; M2, 22 kDa의 크기로 계산되었다. 새롭게 분리된 바이러스는 외부증상으로는 기존의 HRV 감염과 유사한 점을 나타내었으나 그 바이러스학적 특성에 있어 약간의 차이점이 있어 본 분리바이러스를 우선 Nubchi rhabdovirus (NRV)(HRV-like)로 부르기로 한다.

Key words: Rhabdovirus, HRV-like, NRV, Flounder, Virus isolation

1980년대에 들어 각종 해산 어패류의 종묘생산 및 양식이 성해짐에 따라 새로운 바이러스성 질병이 발견되어지고있다. 그 중에서 RNA 바이러스 감염증의 한가지로 HRV(hirame rhabdovirus, *Rhabdovirus olivaceus*)를 원인으로 하는 바이러스 감염증이 알려져 있다. HRV는 1984년 일본에서 대량으로 폐사된 양식 넙치에서 발견되어진 바이러스로서 감염된 병어는 체표나 아가미에 충출혈, 복부 팽만, 근육 내출혈 등의 증상을 나타내며, 넙치, 돔 등의 해산어와 일부의 연어과 어류에 병원성을 가진다고 보고되어지고 있다(Kimura *et al.*, 1986). 이 바이러스는 국내에서 아직 보고되어 있는 않지만 많은 양식 현장에서 그 유사한 발병의 징후가 나타나고 있고 특히 늦가을철 이후의 저수온기 넙치 양식장에 피해를 입히고 있다.

1997년 3월 전라남도에 소재한 넙치 양식장 및 경상남도에 소재한 넙치 양식장의 사육어 중에서 근육층의 출혈을 수반하고, 내부 장기에서도 심한 출혈을 나타내는 병어가 발견되었다. 병어의 증상으로 보아 바이러스성 질병으로 생각되어져 바이러스 분리 및 배양을 행하고, 이미 1986년 일본에서 분리 배양되어 보고되어진 HRV와의 연관성을 확인하기 위하여 바이러스학적 성상을 조사하였다.

재료 및 방법

Viruses

실험에 사용한 바이러스주는 전라남도 넙치 양식장에서 채집한 병어에서 분리한 바이러스주(DF-9701에서 DF-9708) 중에서 DF-9708을, 경상남도의 넙치양식장에서 채집한 병어에서 분리한 바이

[†]Corresponding author

러스주(CF-9701에서 CF-9705) 중에서 CF-9701을 사용하였다. 표준 및 대조 바이러스주로서는 HRV(8401-H), IHN(HV-1), CSV(ToKs-7801), IPNV(VR-299), RVS(BrCo-9221)를 사용하였다. 바이러스 검사용 시료는 Oh *et al.*(1995a)에 따라 준비하였고, 미리 준비한 세포에 10배 희석액의 바이러스 검사용 시료를 접종하고 CPE의 발현을 관찰했으며, 배양 후 10일째에 포르말린으로 고정하여 염색한 후 바이러스 감염가를 TCID₅₀법으로 계수하였다. 정상 실험을 위한 바이러스는 7일간 배양하여 세포변성이 충분히 진행되었음을 확인한 후 2,100×g로 4°C에서 20분간 원심분리하여 세포 잔유물 등을 제거하고 상층액을 밀리포어필터 HA(0.45 μm)로 여과한 후 -80°C에서 실험 사용 때까지 보존하였다.

Cell line

Rainbow trout gonad cell line(RTG-2) 및 epithelioma papulosum cyprini(EPC) 세포를 사용하여 바이러스의 분리 및 성장조사를 행했으며, 분리 바이러스의 세포 친화성을 비교하기 위하여 chinook salmon embryo cell line(CHSE-214)을 추가로 사용하였다. 세포배양액은 100 IU/ml의 penicillin, 100 μg/ml의 streptomycin, 10% FBS(Fetal bovine serum) 첨가 MEM(Eagle's minimum essential medium, Gibco)을 사용하였다.

Antisera

항혈청은 항 HRV(8401-H), 항IHN(HV-1), 항 CSV(ToKs-7801), 항IPNV(VR-299) 및 항RVS(BrCo-9221)(ND₅₀ = 1:160, 1:3500, 1:160, 1:4200, 1:2400) rabbit serum을 사용하였다. 항혈청의 제공은 HRV, CSV, IPNV는 Dr. M. Yoshimizu로부터, IHN는 Ministry of Agriculture and Fisheries, Japan 으로부터 제공받았고, 항 RVS serum은 본 연구실에 보관중인 것을 사용하였다.

바이러스 assays

분리 바이러스 성장조사 및 혈청학적조사는 96-well cell culture plate를 이용한 TCID₅₀법으로 행하였다. 각 well에 10배 희석법에 의해 희석된 각각의 바이러스액을 50 μl씩 접종하고, 15°C에서 7일간 배양한 후 CPE의 발현을 확인하고 10%의

포르말린으로 세포를 고정하여 0.1% 크리스탈 바이올렛으로 염색하고, 각 well 내의 세포를 관찰하였다. 각각의 바이러스 특유의 세포변성을 확인하고, Reed and Muench(1938)의 방법으로 TCID₅₀치를 계산하였다.

에테르 감수성 실험

바이러스 감염 RTG-2세포 배양액을 여과한 배양 여과액 4 ml에 1 ml의 디에틸에테르를 첨가하여 4°C에서 18시간 반응시킨 후 질소가스로서 에테르를 제거하고 바이러스 감염가의 변화를 측정하였다. 대조실험구는 Hanks' balanced salt solution (HBSS)을 에테르 대신 첨가하여 실험하였다.

산 감수성 실험

pH 3으로 조정된 MEM에 분리 바이러스액을 가하여 15°C에서 3시간 반응시킨 후 바이러스 감염가의 변화를 확인하였다. 대조실험구는 pH 7.2의 MEM10에 동일한 처리를 행하여 감염가를 측정하였다.

열 안정성

바이러스액을 50 및 60°C로 water bath로 조정된 수중에 5분 및 1분간 반응시킨 후 신속히 냉각시켜 바이러스 감염가의 변동을 확인하였다.

5-iododeoxyurine(IUDR)에 의한 증식저해 실험

RTG-2 세포에 50 μg/ml의 IUDR을 첨가한 MEM 10 및 HBSS를 분리 바이러스에 반응시켜 15°C에서 10일간 배양하여 바이러스 감염가의 변동을 조사하였다.

Neutralization test

HBSS로 희석한 항IHN(HV-1 1:80), 항CSV(ToKs-7801 1:80), 항IPNV(VR-299 1:100), 항RVS(BrCo-9221 1:120), 항HRV(8401-H 1:100) rabbit serum에 100 TCID₅₀/ml의 분리 바이러스액(DF-9708)을 15°C에서 30분간 반응시킨 후, RTG-2세포에 접종하여 바이러스 감염가를 관찰하였다. 바이러스 대조로서는 IHN(HV-1), CSV, IPNV, RVS(BrCo-9221)를 사용하였다. 교차중화반응은 96 well cell culture plate를 사용하여 100 TCID₅₀/

0.05 ml/well로 조정된 DF-9708 바이러스, IHNV, CSV, RVS 및 IPNV 50 μ l를 넣고 각각 회석 조정된 항HRV, IHNV, CSV, RVS 및 IPNV rabbit serum을 50 μ l 섞어 15°C에서 60분간 반응시킨 후, 각 well에 0.1 ml씩의 RTG-2세포(2.0×10^5 cells/ml)를 첨가하고 15°C에서 10일간 배양하여 CPE를 관찰하여, 100 TCID₅₀/well의 바이러스를 증화시키는 50% 종말회석점(ND₅₀)을 구했다. 감염세포 내의 바이러스 항원 검출은 Oh and Yoshimizu (1996)의 형광항체법에 준하여 행하였다.

전자현미경적 관찰

Multiplicity of infection(MOI)가 0.1되게 DF-9708을 감염시킨 후 15°C에서 24시간째 배양한 RTG-2 세포를 scraper로 수확하고 1000 \times g에서 15분간 원심하여 얻은 펠렛을 2 ml의 고정액(0.05 M cacodylate buffer, 0.02% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde)에 넣고 15초간 조사하여 고정시킨 후, 세척용 buffer(0.2 M cacodylate buffer, pH 7.0)로 3회 세척(2 min, 15,000 \times g)하고, 에탄올 탈수를 거쳐 LR white 수지(EMS)에 넣어 microwave를 이용하여 포매하였다. LKB ultramicrotome으로 초박질편을 제작하여 5% uranyl acetate 및 0.04% lead citrate으로 중염색하여 투과전자현미경(TEM, Hitachi 7000)하에서 관찰하였다.

바이러스 정제

75F 세포배양용 플라스크에 RTG-2 세포를 단층배양하여 분리 바이러스를 접종하고 15°C 7일간 배양하여 cell이 완전히 lysis된 것을 확인한 뒤, 4000 \times g 20분간 원심분리하여 세포잔유물을 제거하고, 7% polyethylene glycol(PEG-6000) 처리하여 4°C에서 overnight한 후 Nishizawa *et al.*(1991)의 방법으로 바이러스 농축을 행했다. 바이러스 농축액(in TNE buffer: 0.01 M Tris Cl, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA)을 20, 30, 50%의 sucrose discontinuous gradient에서 80,000 \times g 90분간 초원심분리하여 20과 30%의 경계 지점에 형성된 바이러스 밴드를 수확 하였다. 얻어진 바이러스액을 TNE 완충액에 녹혀 115,000 \times g에서 1시간 원심분리법으로 세척하여 정제된 바이러스 펠렛을 얻었다. 얻어진 바이러스 펠렛은 TNE 완충액에 회석시

켜 실험에 사용할 때 까지 -80°C에 보관하였다.

전기영동에 의한 바이러스 구성단백질의 분석

정제된 분리 바이러스 DF-9708을 100°C 5분간 열처리하여 비동화 시킨 후 Nishizawa *et al.*(1991)의 방법에 따라 SDS-PAGE(12.5% acrylamide separating gel, 2.5% acrylamide stacking gel, 20 mA, 1.5 hours)를 행하였다. 전기영동 종료 후 coomassie blue로 겔을 염색하여 standard molecular weight maker(Bio Rad)의 이동 거리와 비교하여 바이러스 단백질 구조 및 각 분자량을 결정하였다.

결과 및 고찰

감염어 및 감염세포

1997년 3월 전라남도에서 소제한 넙치 양식장에서 발병한 병어 및 경상남도에서 소제한 넙치 성어 양식장의 병어를 대상으로 해부학적 검사를 행한 결과 HRV 특유의 근육층의 출혈, 내부 장기 출혈을 수반한 패혈증상을 나타내고 있었다. 세균분리 실험 결과 병원세균의 분리는 되지 않았으며, 상법으로 준비한 바이러스 검사용 시료를 RTG-2 세포 및 EPC 세포에 접종한 결과 세포의 구형화를 특징으로 하는 CPE가 관찰되었다(Fig. 1A). 감염세포에 항HRV(8401-H) rabbit serum을 사용하여 형광항체법으로 항원 검출을 행한 결과 Fig. 1B와 같이 감염 세포질 내에서 HRV 항체와 양성으로 반응하는 항원이 확인되었다. 감염 넙치의 해부학

Fig. 1. Cytopathic effects produced in a rainbow trout gonad cell line (RTG-2) by the isolated virus strain DF-9708 (A) and the HRV virus antigen detected by FAT in cytoplasm of infected EPC cells (B).

적 및 세균학적 실험과 감염세포에서의 세포변성 효과의 형태적 특징으로 보아 감염 원인체는 세균이나 기생충 이외의 여과성 병원체임을 생각할 수 있었고, 넓치 램도바이러스의 polyclonal 항체와의 반응 결과 항원 양성의 반응물이 감염세포의 세포질내에서 확인 되어진 것으로 부터 HRV의 유관성을 생각할 수 있었다.

생화학적 및 생물학적 성상

양식넙치에서 분리한 DF-9708 및 CF-9701의 생화학적 및 생물학적 성상 조사 결과를 Table 1에 나타내었다. 분리 바이러스주는 양자 모두 에테르 처리에 의해 급격하게 감염가를 상실하여 대조군인 HBSS 처리구의 $10^{6.05} \sim 10^{6.30}$ TCID₅₀/ml를 나타내던 바이러스 감염가가 에테르 처리에 의해 $10^{1.8}$ TCID₅₀/ml 이하의 감염가로 떨어졌다. 이러한 에테르에 대한 강한 감수성으로부터 본 바이러스는 지질을 함유하는 인벨롭을 보유함을 확인할 수 있었다. 산에 대한 저항성 및 열에 대한 안정성 실험 결과 분리 바이러스는 산에 비교적 안정적이었고, 열에 대하여는 매우 불안정한 상태를 나타내었다. DNA 저해제인 IUdR의 처리에 따른 감염가의 변화를 관찰해 본 결과 분리 바이러스의 증식에 영향을 주지 못함이 확인되어 분리 바이러스의 보유 핵산은 DNA가 아닌 RNA임을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 본 분리 바이러스가 인벨롭을 가진 RNA 바이러스에 포함됨을 확인할 수 있었다.

분리 바이러스를 RTG-2, CHSE-214 및 EPC 세포주에 적용하여 세포변성효과의 발현 유무 및 바이러스의 배양 가능성을 비교하여 본 결과, 분리 바이러스주는 RTG-2 및 EPC 세포주에서는 전형

적인 램도바이러스 감염에 의한 세포변성을 나타내었고 배양 또한 가능하였으나, CHSE-214 세포주의 경우 바이러스의 증식에 의한 세포변성이 확인되지 않았고 감염가의 증가도 확인되지 않았다. Kimura and Yoshimizu(1986)는 FHM, EPC, BF-2, STE-137, HF-1, BB, YNK, CCO, EK-1, CHH-1, CHSE-214 및 KO-6와 같은 어류 유래 주화세포를 대상으로 HRV의 배양가능 세포를 선발하였고 그 배양 적온을 조사하였다. 그 결과에 따르면 CHH-1, CHSE-214 및 KO-6세포주를 제외한 기타 세포주에서는 HRV의 증식이 확인되어졌고, 그 증식 가능 온도 범위는 5-25°C이고 증식적온은 15-20°C로 보고하고 있는데, DF-9708주의 경우 배양온도 15°C에서의 one-step growth 실험에서 배양 6일째에 배양액중 감염가가 $10^{6.3}$ TCID₅₀/ml로 최대 감염가를 나타내는데 비하여 CHSE-214 세포주의 실험에서는 검출한계이하를 유지하여(Data not shown) 어류주화세포에 대한 유사한 배양선택성을 나타내고 있었다.

전자현미경적 성상

감염세포를 TEM으로 관찰한 결과 탄환형 바이러스입자를 확인할 수 있었다(Fig. 2A, B). 바이러스 입자의 크기는 직경이 약 70 nm이었고 길이는 100-150 nm로 측정되어졌다. 입자의 표면은 spike를 가진 인벨롭으로 덮여져 있었으며 내부는 나선형구조를 가진 nucleocapsid가 관찰되어졌다. Franki *et al.*(1991)에 의하면 rhabdovirus는 무척추동물이나 척추동물에 유래하는 종은 bullet-shape이며 식물유래의 경우는 bacilliform의 형태를 가지고 그 크기는 길이 100-430 nm이고 직경 45-100 nm의 범위라고 하였다. Kimura *et al.*(1986)는 HRV의 전자현미경적 관찰 결과 길이 180-200 nm, 직경 80 nm의 바이러스 입자를 확인하였다고 하였다. 본 연구에서 분리한 바이러스주 DF-9708는 Kimura 등(1986)의 HRV에 비하여 약간 작은 크기를 가지고 있었으나 전체적인 형태적 특징 및 세포 외부로의 budding 등의 특징으로 보아 램도바이러스의 일종임을 확인할 수 있었다.

혈청학적 성상

분리 바이러스주 DF-9708을 1:100으로 조정한

Table 1. Biochemical and biophysical characterization of the isolated virus

Characteristics	Log TCID ₅₀ /ml	
	DF-9708	CF-9701
Control	6.05	6.30
Ether treatment (5°C, 18h)	<1.80	<1.80
pH 3.0, 3h	5.05	5.30
50°C, 5 min	<0.80	<0.80
60°C, 1 min	<0.80	<0.80
IUdR (50 µg/ml)	6.05	6.05

Fig. 2. Electron micrograph of an ultrathin section showing large numbers of bullet-shaped virus particles in rainbow trout gonad (RTG-2) cells infected with the isolated virus (A and B).

Table 2. Cell line susceptibility of the isolated virus

Cell line	DF-9708		IHNV (HV-1)	
	CPE*	Titer (LogTCID ₅₀ /ml)	CPE	Titer (LogTCID ₅₀ /ml)
RTG-2	+	6.30	+	5.80
CHSE-214	-	-	+	6.55
EPC	+	6.55	+	7.05

*cytopathic effect

Table 4. Cross-neutralization test with HRV, IHNV, CSV and IPNV

Virus (titer TCID ₅₀ /well)	Anti-sera (ND ₅₀)*						
	HRV 8401-H	IHNV HV-1	CSV ToKo-7801	RVS BrCo-9221	IPNV VR-299		
DF-9708	2.00	80	<17	ND	ND	ND	ND
IHNV (HV-1)	1.80	<17	160	ND**	ND	ND	ND
CSV (ToKs-7801)	2.00	<17	ND	40	ND	ND	ND
RVS (BrCo-9221)	2.30	<17	ND	ND	180	ND	ND
IPNV (VR-299)	2.00	<17	ND	ND	ND	112	

*ND₅₀ = 50% neutralization titers

**Not determined

항HRV, IHNV, CSV, RVS 및 IPNV rabbit serum 과 반응 시켜 그 감염가의 변동을 확인하여 본 결과 항HRV 8401-H rabbit serum과의 반응 실험구에서만 그 감염가의 감소가 확인 되었을 뿐, 그 외의 바이러스 항혈청과의 반응 실험구에서는 감염가의 변화가 나타나지 않아 분리 바이러스주 DF-9708은 램도바이러스의 일종인 기존의 HRV와 혈청학적으로 유사성을 갖는 종류로 판정되었다 (Table 3). 교차중화반응의 결과에서도 분리 바이러스주 DF-9708은 HRV 8401-H homologous antiserum의 ND₅₀인 1 : 160에 비하여 2배 정도 낮은 중화 항체가인 1 : 80의 ND₅₀를 나타내었다. 다른 종류의 어류 유래 바이러스와의 교차 중화 결과 서로간에 관련성을 가지는 종류는 인정되지 않았다 (Table 4). Kimura *et al.* (1986)에 의하면 넙치 및 은어에서 분리되어진 HRV는 IHNV, IPNV, OMV, VHSV, SVCV, PFRV, EVA 및 EVEX와의 중화 반응 실험에서 감염가에 영향을 미치는 종류를 찾을 수 없었고, HRV로 제작한 polyclonal 항체와의 교차중화 반응 결과 기타의 어류 유래 램도바이러스 (EVA, PFRV, IHNV, SVCV)와도 교차성이 없

Table 3. Neutralization test with HRV, IHNV, CSV, RVS and IPNV

Virus*	Anti-sera				
	HRV**	IHNV	CSV	RVS	IPNV
	1:100	1:80	1:80	1:120	1:100
DF-9708	+	-	-	-	-
IHNV(HV-1)	-	+	-	-	-
CSV(ToKs-7801)	-	-	+	-	-
RVS(BrCo-9221)	-	-	-	+	-
IPNV(VR-299)	-	-	-	-	+

*100 TCID₅₀/ml

**Anti HRV 8401-H rabbit serum

는 것으로 확인하였는데, 이는 본 연구에서 분리한 바이러스주를 사용하여 행한 실험의 결과와 일치하였다. 따라서 분리 바이러스주 DF-9708은 Kimura *et al.*(1986)이 보고하였던 HRV 8401-H와 동일하지는 않으나 유사한 혈청학적 특성을 가진 종으로 판단되어졌다.

바이러스 구성단백질

분리 바이러스 DF-9708의 구성단백질을 SDS-PAGE로서 분석한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 분리 바이러스는 5개의 구성 단백질인 160 kDa의 L gene, 55 kDa의 G protein, 45 kDa의 N protein, 26 kDa의 M1 protein, 22 kDa의 M2 protein으로 구성되어 있었다. 어류 랩도바이러스로서 IHNV와 VHSV가 널리 알려져 있고 그외 pike fry rhabdovirus(PFRV), spring viremia of carp virus(SVCV) 등이 알려져 있으며 그 구성 단백질 등의 특성에서 IHNV 및 VHSV는 lyssavirus형으로 PFRV와 SVCV는 vesiculovirus형으로 구분되어 진다(Nish-

izawa, 1996). Nishizawa *et al.*(1991)에 의하면 HRV는 직경 약 80 nm 길이 약 160-180 nm의 포환형으로 large protein(L protein; 156 kDa), glycoprotein(G protein; 68 kDa), nucleocapsid protein(N protein; 46.4 kDa) 및 2종류의 matrix protein(M1 protein; 26.4 kDa, 및 M2 protein; 19.9 kDa)의 5종류의 구성단백질과 길이 약 10.7 kbs의 single stranded RNA로 구성되어져 있으며 IHNV 및 VHSV와 같은 lyssavirus형에 속하는 것으로 보고되어져 있다. 본 실험에서 확인되어진 분리 바이러스구조 단백질의 전기 영동 패턴에서 볼때 Kimura *et al.*(1986) 및 Nishizawa *et al.*(1991)의 HRV와 그 구성에 있어서는 동일하지만 각각의 구성 단백질이 갖는 분자량에 있어 차이점이 있는 점으로 부터 PFRV, SVCV, EVA 및 EVEX 등과 같은 vesiculovirus속의 바이러스가 아닌 HRV, IHNV, VHSV가 속하는 lyssavirus속에 포함되는 다른 종류의 바이러스로 판단되어진다. Nishizawa *et al.*(1995)에 의하면 각 구조 단백질의 항원성에 있어서 HRV는 vesiculovirus형의 어류랩도바이러스와는 교차반응하지 않고, G protein에서는 IHNV 및 VHSV와 N 및 M2 protein에서는 IHNV와 각각 공통항원을 가진다고 하였으며, M2 protein의 항원성은 HIRRV, IHNV 및 VHSV 각각이 독립된 항원성을 나타낸다고 하였는데, 앞으로 분리 바이러스주 DF-9708의 분자생물학적 접근에 의한 추가연구로 기타의 lyssavirus속에 포함되는 어류 유래 바이러스와의 분류학적 비교가 필요하다고 생각되어진다.

분리 바이러스주 DF-9708은 감염어의 증상, 바이러스의 생화학적 특성, 세포배양특성 및 바이러스 구성단백의 종류 등에서는 기존의 HRV와 유사한 특성을 나타내었으나, 바이러스의 크기, 혈청학적 특성, 바이러스구성 단백질의 크기 등에 약간의 차이점이 확인되어 HRV-like virus로서 인정하고, 우선 Nubchi rhabdovirus(NRV)로 부르기로 한다. 본 바이러스는 국내에서 최초로 분리되어진 해산어 랩도바이러스이다.

사 사

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

Fig. 3. Analysis of the structural proteins of the isolated virus using a 12.5% polyacrylamide gel. The polymerase (L), glycoprotein (G) nucleoprotein (N) and matrix proteins (M1, M2) were observed with SDS-PAGE. Coomassie blue staining. M: molecular markers; P: viral proteins.

참고문헌

- Franki, R., Fauquet, C. Kundson, D. and Brown, F.: Classification and nomenclature of viruses. Springer-Verlag Press, New York, 1991.
- Kimura, T., Yoshimizu, M. and Gorie, S.: A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame and ayu. *Dis. Aquat. Org.*, 1: 209-217, 1986.
- Kimura, T. and Yoshimizu, M.: Isolation of a new rhabdovirus from cultured hirame in Japan. In "First Asian Fisheries Forum" Eds, J. L. Maclean, L. B. Dizon, and L. V. Hosillos, Manila, pp. 323-326, 1986.
- Kimura, T., Yoshimizu, M., Oseko, N. and Nishizawa, T.: Rhabdovirus olivaceus (hirame rhabdovirus). In "Viruses of Lower Vertebrates" Eds. W. Ahne and E. Kurstak, Springer, Berlin, pp. 388-395, 1989.
- Nishizawa, T., Yoshimizu, M. and Kimura, T.: Buoyant density of hirame rhabdovirus (HRV) in cesium chloride and sucrose. *Fish Pathol.*, 26: 47-48, 1991.
- Nishizawa, T., Kurath, G. and Winton, J. R.: Nucleotide sequence of the two matrix protein genes (M1 and M2) of hirame rhabdovirus (HRV). *Vet. Res.*, 26: 408-412, 1995.
- Nishizawa, T.: Marine fish pathogenic ssRNA viruses. *Virus*, 46(1): 67-72, 1996.
- Oh, M.-J., Yoshimizu, M., Kimura, T. and Ezura, Y.: A new virus isolated from salmonid fish. *Fish Pathol.*, 30(1), 23-32, 1995.
- Oh, M.-J. and Yoshimizu, M.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of RVS (Retrovirus of salmonid). *J. Fish Pathol.*, 9(2): 169-176, 1996.
- Reed, J. L. and Muench, H.: A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27, 493-497, 1938.
- Wagner, R. R.: "The rhabdoviruses" Ed. R.R. Wagner, Plenum Press, New York, pp. 99-128, 1987.

A New Rhabdovirus (HRV-like) Isolated in Korea from Cultured Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*

Myung-Joo Oh and Tae-Jin Choi*

Department of Fish Pathology, Yosu National University

**Department of Microbiology, Pukyung National University*

In March 1997, a new rhabdovirus was isolated from moribund cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in sea water tank and cage culture systems in Kyung-Nam and Chun-Nam province, Korea. At temperature 15°C the virus replicated and induced cytopathic effects (CPE), which progressed to eventual cytolysis, in susceptible cell lines, including RTG-2 and EPC. The CHES-214 cell line was refractory. Virus particles were bullet-shaped and measured 70 nm × 100 to 150 nm in size. The isolate was sensitive to pH 3, to diethyl ether, and to heat (50°C 5 min, 60°C 1 min). Viral replication was not inhibited by 10⁻⁴ M 5-iododeoxyuridine. Virus infectivity was reduced by anti-HRV (8401-H) rabbit serum, but can not reduced by antisera against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), chum salmon reovirus (CSV), retrovirus of salmonid (RVS) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). HRV virus antigen was detected by fluorescent antibody test (FAT) in the cytoplasm of infected EPC cell. Purified isolates virions were composed of: polymerase (L), glycoprotein (G), nucleoprotein (N) and 2 matrix proteins (M1 and M2). Based upon their relative mobilities, the estimated molecular weights of the proteins were: L, 160 kDa; G, 55 kDa; N, 45 kDa; M1, 26 kDa; and M2, 22 kDa.

Key words: Rhabdovirus, HRV-like, NRV, Flounder, Virus isolation