

## 어류병원바이러스에 대한 해산 송사리 *Oryzias dancena*의 감수성

김위식 · 오소영\* · 오명주\*†

전남대학교 수산과학연구소, \*전남대학교 수산생명의학과

### Susceptibility of marine medaka *Oryzias dancena* to fish pathogenic viruses

Wi-Sik Kim, So-Young Oh\*, Myung-Joo Oh\*†

The Fisheries Science Institute, Chonnam National University, Yeosu 556-901, Korea

\*Department of Aqualife Medicine, College of Fisheries and Ocean Science,

Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

The susceptibility of marine medaka, *Oryzias dancena* to fish pathogenic viruses (infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), hirame rhabdovirus (HIRRV), infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), and lymphocystis disease virus (LCDV)) was investigated. The cumulative mortalities of fish immersed with IPNV (experimental condition: 15°C sea water (SW)), VHSV (15°C SW), HIRRV (15°C fresh water (FW)) were 30%, 40% and 60%, respectively. In the fish immersed with IPNV (15°C FW, 18°C FW and SW), VHSV (15°C FW, 18°C FW and SW), HIRRV (15°C SW), IHNV (15°C FW and SW), LCDV (15°C FW and SW, 18°C FW and SW), and mock-challenged group, mortality rate was less than 10%. IPNV, VHSV and HIRRV were re-isolated from the dead fish. These results suggest that marine medaka is susceptible to IPNV, VHSV and HIRRV, although their susceptibility depends on the environmental conditions.

*Key words* : *Oryzias dancena*, Fish viruses, Susceptibility

송사리는 동갈치목 송사리과에 속하는 어류로서 한국, 일본, 중국, 인도, 필리핀 등의 다양한 지역에서 서식하고 있으며, 종에 따라서는 담수, 기수 그리고 해수에서 서식하는 것으로 보고되어 있다 (Robert, 1998; Parenti and Soeroto, 2004; Nelson, 2006).

송사리류는 실험실 내 사육이 용이하고 생활사가 짧으며, 많은 수의 유전자 정보가 밝혀져 있어 생태독성학, 유전체학, 발생유전학, 약리학 등의 연구에서 시험생물로서 널리 이용되고 있다 (Naruse *et al.*, 1993; Chen and Cooper, 1999; Ishikawa, 2000; Wittbrodt

*et al.*, 2002). 최근 어류질병 연구 분야에 있어서도 위의 장점으로 인해 시험생물로서 담수 송사리, *Oryzias latipes*가 평가되고 있다 (Furusawa *et al.*, 2006). 그러나 담수 송사리의 경우는 해수에서의 생존율, 산란력, 수정률, 부화율 등이 현저히 떨어진다 고 보고되어 있어 (Inoue and Takei, 2003; Kang *et al.*, 2008) 해수환경에서의 실험에는 사용하는데 한계가 있다.

본 연구에서는 기수에 주로 서식하면서도 염분 농도에 대한 내성이 강한 광염성 어류로 알려진 바다 송사리 *Oryzias dancena*를 대상으로 어류병원바이러스의 감수성을 조사하여 어병연구용 시험생물로서의 사용 가능성을 평가하고자 하였다.

†Corresponding Author : Myung-Joo Oh

Tel and Fax: 061-659-7173

E-mail: ohmj@chonnam.ac.kr

## 재료 및 방법

바이러스는 송어 유래의 infectious pancreatic necrosis virus (IPNV, strain: VR-299)와 infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV, RtGu01) (Kim *et al.*, 2007), 넙치, *Paralichthys olivaceus* 유래의 viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV, FYoesu05) (Kim *et al.*, 2009), hirame rhabdovirus (HIRRV, CA-9703) (Kim *et al.*, 2005), lymphocystis disease virus (LCDV) 를 실험에 사용하였다. IPNV는 일본 북해도대학의 Dr. Yoshimizu로부터 분양 받았으며, LCDV는 2009년에 LCD에 걸린 양식 넙치로부터 분리하였다. 림포시스티스 조직은 Hanks' balanced salt solution (HBSS, Gibco)로 1:9가 되게 처리하여 마쇄하고, 그 마쇄액을 3,500×g로 30분간 원심분리한 후 상층액을 취해 실험에 사용하였다. IPNV, IHNV, VHSV 및 HIRRV는 chinook salmon embryo cell line (CHSE-214), fathead minnow cell line (FHM) 또는 epithelioma papulosum cyprini cell line (EPC)를 사용하여 배양한 후 실험에 사용하기 전까지 -80°C에 보관하였다.

감염 실험에 사용된 바다 송사리는 부경대학교에서 연구 목적으로 사육중인 송사리를 분양 받았으며, 실험 전 기생충, 세균 및 바이러스 검사를 실시하여 음성반응을 확인하였다. 감염실험은 담수 및 해수에서 실시하였으며, 실험어는 1주일간 순치시킨 후 사용하였다. 수온 15±1°C와 18±1°C로 유지된 2.5 L 수조에 바다 송사리를 20마리씩 수용한 후, 10<sup>5.8</sup> TCID<sub>50</sub>/ml 농도의 IPNV와 VHSV, 1000배 희석농도의 LCDV 마쇄액 (2.5 ml LCDV 마쇄액/ 2.5 L 사육수)으로 각 3시간 동안 침지시켰다 (Table 1). HIRRV와 IHNV의 감염실험은 15±1°C의 사육수온에서 10<sup>5.05</sup> TCID<sub>50</sub>/ml 농도로 위와 동일 방법으로 실시하였다. 대조구는 1000배 희석농도의 HBSS (2.5 ml HBSS/ 2.5 L 사육수)로 3시간 침지시켰다. 침지 후 실험어

는 새로운 2.5 L 사육수조로 옮긴 후 폐사율을 16-20일간 관찰하였으며, 폐사어와 생존어를 대상으로 바이러스 검사를 실시하였다.

바이러스 검사는 폐사어 및 생존어로부터 근육부위를 제거한 후 HBSS로 1:9가 되게 처리하여 마쇄하고, 그 마쇄액을 0.45 µm syringe filter로 여과하여 CHSE-214, FHM 또는 EPC에 접종한 후 15°C에서 14일간 배양하면서 세포변성효과 (cytopathic effect, CPE)를 확인하였다. LCDV 실험구의 경우는 바이러스 검사 대신 실험어의 체표와 지느러미를 해부 현미경으로 관찰하여 림포시스티스의 형성 유무를 조사하였다.

## 결과 및 고찰

본 연구에서는 바다 송사리를 담수 및 해수에 사육하면서 어류병원바이러스에 대한 감수성을 조사하였다. IPNV의 경우, 15°C 해수에서 3일째부터 폐사어가 나타나기 시작하였고 16일 동안 30%의 누적폐사율이 관찰되었다 (Table 1). 이에 반해 15°C 담수, 18°C 해수 및 담수에서는 5% 이하의 폐사율을 나타내었다. VHSV의 경우, 15°C 해수에서 8일, 13일, 14일째 각각 4마리, 2마리, 2마리가 폐사하여 총 40%의 누적폐사율을 보였다 (Table 1). 15°C 담수에서는 10%의 누적폐사율을 보였고, 18°C 해수 및 담수에서는 폐사어가 관찰되지 않았다. HIRRV 침지실험에서는 15°C 해수에서 폐사어가 관찰되지 않았으나 15°C 담수에서 10일째부터 폐사어가 나타나기 시작하여 20일 동안 60%의 누적폐사율을 보였다 (Table 1). IHNV와 LCDV 침지 그룹에서는 담수와 해수 모두 폐사어가 관찰되지 않았다. 대조구에서는 5% 이하의 폐사율이 관찰되었다. 이상의 결과, 바다 송사리는 IHNV와 LCDV에 노출시 폐사되지 않으나 IPNV (실험조건: 15°C 해수), VHSV (15°C 해수) 및 HIRRV (15°C 담수) 침지에 의해 폐사됨이 확인되었다.

Table 1. Cumulative mortality and virus detection rates in marine medaka immersed with fish pathogenic viruses

Virus	Fish weight (g)	Dose of virus immersion (TCID <sub>50</sub> /ml)	Water types /temperature	Cumulative mortality (%)	Fish condition (No. dead or survivor/ total fish)	Isolation of virus	
						detection rate (No. positive/ tested)	
IPNV	0.06±0.01	10 <sup>5.8</sup>	Fresh water	15±1 °C	0	survivor (0/20)	survivor: 100% (3/3)
				18±1 °C	5	dead (1/20)	dead: 100% (1/1), survivor: 100% (4/4)
			Sea water	15±1 °C	30	dead (6/20)	dead: 100% (5/5), survivor: 100% (2/2)
				18±1 °C	0	survivor (0/20)	survivor: 100% (4/4)
VHSV	0.06±0.01	10 <sup>5.8</sup>	Fresh water	15±1 °C	10	dead (2/20)	NT
				18±1 °C	0	survivor (0/20)	survivor: 0% (0/10)
			Sea water	15±1 °C	40	dead (8/20)	dead: 100% (3/3)
				18±1 °C	0	survivor (0/20)	survivor: 0% (0/10)
HIRRV	0.08±0.01	10 <sup>5.05</sup>	Fresh water	15±1 °C	60	dead (12/20)	dead: 80% (4/5), survivor: 75% (3/4)
			Sea water	15±1 °C	0	survivor (0/20)	survivor: 20% (1/5)
IHNV	0.08±0.01	10 <sup>5.05</sup>	Fresh water	15±1 °C	0	survivor (0/20)	survivor: 0% (0/10)
			Sea water	15±1 °C	0	survivor (0/20)	survivor: 0% (0/10)
LCDV	0.05±0.01	10 <sup>-3</sup> dilution	Fresh water	15±1 °C	0	survivor (0/20)	NT
				18±1 °C	0	survivor (0/20)	NT
			Sea water	15±1 °C	0	survivor (0/20)	NT
				18±1 °C	0	survivor (0/20)	NT
Control	0.04-0.09		Fresh water	15±1 °C	0	survivor (0/20)	survivor: 0% (0/5)
				18±1 °C	5	dead (1/20)	dead: 0% (0/1), survivor: 0% (0/4)
			Sea water	15±1 °C	0	survivor (0/20)	survivor: 0% (0/5)
				18±1 °C	0	survivor (0/20)	survivor: 0% (0/5)

NT: not test

감염실험에서 생존한 개체와 폐사 개체를 대상으로 바이러스 검사를 실시한 결과, IPNV의 경우 폐사어 (담수 18°C: 100% (1/1마리), 해수 15°C: 100% (5/5마리))를 비롯한 모든 생존어에서 바이러스가 100% 분리되었다 (Table 1). VHSV 침지 그룹에서는 생존어로부터 바이러스가 분리되지 않았으나 폐사어 (해수 15°C)에서 바이러스가 100% (3/3마리) 분리되었다

(Table 1). HIRRV이 경우는 15°C 담수에서 폐사된 개체로부터 바이러스가 80% (4/5마리) 분리되었으며, 생존어에서도 75% (3/4마리)의 분리율을 보였다 (Table 1). 15°C 해수 생존어에서는 5마리 중 1마리에서 (분리율: 20%) 바이러스가 분리되었다. LCDV 침지 그룹에서는 생존한 모든 개체에서 림포시스티스는 관찰되지 않았다. 대조구에서는 모든 개체에서

바이러스가 검출되지 않았다. 이상의 결과, IPNV, VHSV 및 HIRRV 침지실험에서 폐사된 개체로부터 바이러스가 분리됨이 확인되었고, 또한 IPNV와 HIRRV의 생존어로부터도 분리됨이 확인되었다.

본 연구에서는 실험어의 크기로 인해 병어의 증상 및 병리조직을 검사하는데 한계가 있었으나, IPNV, VHSV 및 HIRRV에 의해서 폐사가 발생되며, 또한 폐사체로부터 바이러스가 재분리되므로 바다 송사리는 IPNV, VHSV 및 HIRRV에 감수성이 있음이 확인되었다. 하지만 바이러스의 감수성은 사육환경에 따라 차이를 보이는 것으로 확인되었다. IPNV와 VHSV는 15°C 해수에서 감수성이 있으며, HIRRV는 15°C 담수에서 감수성이 확인되었다. IPNV와 HIRRV는 각각 연어과 어류(담수어)와 넙치(해산어)에서 폐사를 유발하는 바이러스로 알려져 있으나 본 연구에서는 다른 사육환경(IPNV: 해수, HIRRV: 담수)에서 폐사가 발생하였다. 이러한 현상에 대한 이유는 알 수 없으나 이상의 결과는 어류병원바이러스가 기존에 감수성이 있는 어종들이 서식하는 사육환경 외에 서식하는 어종에 있어서도 감수성을 나타낼 수 있음을 시사하였다.

바다 송사리는 담수, 기수 및 해수에서도 사육이 가능하며, 생활사가 짧고 실험실 사육이 용이하다는 장점과 어류병원바이러스인 IPNV, VHSV 및 HIRRV에 감수성이 확인되므로, 어류병원바이러스의 감염 기작, 숙주내 동태, 독력변화 및 진화 등의 연구에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 특히, 사육환경(담수, 기수, 해수)과 바이러스 질병과의 관계를 규명하는데 더욱더 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구에서는 어류병원바이러스(infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), hirame rhabdovirus (HIRRV), infectious

hematopoietic necrosis virus (IHNV), lymphocystis disease virus (LCDV))를 대상으로 바다 송사리 *Oryzias dancena*의 감수성을 조사하였다. 감염실험 결과, IPNV (실험조건: 15°C 해수), VHSV (15°C 해수) 및 HIRRV (15°C 담수)에 침지된 송사리는 각각 30%, 40%, 60%의 누적폐사율이 관찰되었다. 이에 반해 IPNV (15°C 담수, 18°C 해수 및 담수), VHSV (15°C 담수, 18°C 해수 및 담수), HIRRV (15°C 해수), IHNV (15°C 해수 및 담수), LCDV (15°C와 18°C 해수 및 담수) 침지 실험구 및 대조구에서는 10% 이하의 누적 폐사율이 확인되었다. 생존어와 폐사어를 대상으로 한 바이러스 분리 결과에서는 IPNV, VHSV 및 HIRRV에서 폐사된 개체로부터 바이러스가 분리되었으며, 또한 IPNV와 HIRRV에서 생존한 개체로부터도 바이러스가 분리되었다. 이상의 결과로 바다 송사리는 IPNV, VHSV 및 HIRRV에 감수성이 있음이 확인되었다.

## 감사의 글

본 연구는 국토해양부 해양환경복원기술개발사업(과제번호 20088033-1)의 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Chen, C.M. and Cooper, K.R.: Developmental toxicity and EROD induction in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) treated with dioxin congeners. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 63:423-429, 1999.
- Furusawa, R., Okinaka, Y. and Nakai, T.: Betanodavirus infection in the freshwater model fish medaka (*Oryzias latipes*). J. Gen. Virol., 87:2333-2339, 2006.

- Inoue, K. and Takei, Y.: Asian medaka fishes offer new models for studying mechanisms of seawater adaptation. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.*, 136:635-645, 2003.
- Ishikawa, Y.: Medakafish as a model system for vertebrate developmental genetics. *Bioessays*, 22:487-495, 2000.
- Kang, C.K., Tsai, S.C., Lee, T.H. and Hwang, P.P.: Differential expression of branchial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of two medaka species, *Oryzias latipes* and *Oryzias dancena*, with different salinity tolerances acclimated to fresh water, brackish water and seawater. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 151:566-575, 2008.
- Kim, D.H., Oh, H.K., Eou, J.I., Seo, H.J., Kim, S.K., Oh, M.J., Nam, S.W., Choi, T.J.: Complete nucleotide sequence of the hirame rhabdovirus, a pathogen of marine fish. *Virus Res.*, 107:1-9, 2005.
- Kim, W.S., Kim, S.R., Kim, D.W., Kim, J.O., Park, M.A., Kitamura, S.I., Kim, H.Y., Kim, D.H., Han, H.J., Jung, S.J. and Oh, M.J.: An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicaemia virus) infection in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Aquaculture*, 296:165-168, 2009.
- Kim, W.S., Oh, M.J., Nishizawa, T., Park, J.W., Kurath, G. and Yoshimizu, M.: Genotyping of Korean isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Arch. Virol.*, 152:2119-2124, 2007.
- Naruse, K., Shima, A., Matsuda, M., Sakaizumi, M., Iwamatsu, T., Soeroto, B. and Uwa, H.: Description and phylogeny of rice fish and their relatives belonging of the suborder Adrianichthyoidei in Sulawesi, Indonesia. *Fish. Biol. J. MEDAKA*, 5:11-15, 1993.
- Nelson, J.S.: *Fishes of the World*. 4<sup>th</sup> edition. Wiley & Sons Inc, New York, USA, pp 276-277, 2006.
- Parenti, L.R. and Soeroto, B.: *Adrianichthys roseni* and *Oryzias nebulosus*, two new rice fishes (Atherinomorpha: Beloniformes: Adrianichthyidae) from Lake Poso, Sulawesi, Indonesia. *Ichthyol. Res.*, 51:10-19, 2004.
- Robert, T.R.: Systematic observations on tropical Asian medakas or ricefishes of the genus *Oryzias*, with descriptions of four new species. *Ichthyol. Res.*, 45:213-224, 1998.
- Wittbrodt, J., Shima, A. and Scharl, M.: Medaka-a model organism from the Far East. *Nat. Rev. Genet.*, 3:53-64, 2002.

---

Manuscript Received : October 28, 2013

Revised : November 21, 2013

Accepted : November 25, 2013