

연어 세포주에서의 전염성 췌장괴사 바이러스의 감염 증상에 관한 연구

김영길, 이근광*, 정의영**

군산대학교 수산대학 수족병리학과, *동국대학교 응용생물학과, **군산대학교 자연대학 해양개발학과

CHSE-214 무지개송어 세포주는 10% fetal bovine serum과 2mM-glutamine이 첨가된 Eagle's 기본배지에서 성장하였다. CHSE-214 세포주의 최적온도는 20°C였다. IPN바이러스는 CHSE-214 세포주에서 복제되었으며, 세포변성효과를 나타내었다. 또한 IPN 바이러스의 감염시간에 따른 감염증상을 역위상차 현미경으로 관찰하였다. 감염 6-12시간 후 세포는 정상 세포와 비슷하였다. 감염 18-24시간 후 세포는 일부가 정상 세포보다 더 둥근형태로 되었고, 일부세포는 세포배양용 플라스크 바닥에서 떨어져 부유상태로 되었다. 감염 30시간 후 세포는 더 더욱 비정상적인 형태로 되었다. 감염 48-68시간 후 감염된 세포는 파열되었고, 아주 높은 세포 병변 효과를 나타내었다.

Key Words : Infectious pancreatic necrosis virus(IPNV), CHSE-214, TCID₅₀, Cytopathic effect(CPE)

양식 어류인 송어류의 바이러스질병 중 주로 치어기에 대량 폐사를 일으키는 전염성 췌장 괴사증 바이러스(Infectious Pancreatic Necrosis Virus : IPNV)는 Birnavirida과에 속하며, double strand RNA genome을 가지며, 정 20면체의 형태를 하고 있지만 외형상으로는 6각형으로 보이는 55-70nm 정도인 바이러스(Dobos et al., 1977 ; Chang et al., 1978)로 환경변화에 강하여 열이나 건조 상태에서 장기간 생존할 수 있는 특성을 갖고 있다(Fields, 1985 ; Brown, 1986).

IPNV는 처음 송어로부터 분리되었으며(Wolf et al., 1960) 지금은 이 바이러스를 VR-299라고 부른다.

발병은 수온이 10-12°C부근에서 먹이불임 후 8주 때의 치어기에서 잘 발생하지만 수온이 10°C 이하이거나 크기가 1g이상일 때는 발병이 적고, 발병을 한 다해도 갑자기 대량 폐사하는 경우는 드물며, 만성적

인 폐사를 일으킨다.

IPNV는 24°C이하의 온도조건에서 물고기에서 유래된 세포주에서 성장하며(Wolf and Mann, 1980), 물고기 세포주에서 감염 후 3시간 후에 IPN 특이 polypeptide가 생성되었고 감염 후 5시간에는 바이러스 입자가 성숙하였으며, 22°C에서 1회 복제는 16-20시간이었다(Malsberger and Cerini, 1963).

IPNV에 대한 연구는 최근 여러학자들(Duncan et al., 1987, 1991 ; Evanagy et al., 1987 ; Lee et al., 1989., Park et al., 1987)에 의해 이루어지고 있지만 한국에서는 1984년 Hah 등에 의해 처음 분리된 이래 이에 대한 연구가 아주 미비한 실정이다.

본 연구에서는 *in vitro*에서 무지개송어 세포주의 성장조건과 IPNV 연어 세포주에서의 성장곡선을 조사하였고, 또한 IPNV 바이러스의 연어 세포주에서의 감염증상을 역위상차 현미경하에서 관찰하였으며, 이를 토대로 IPN 바이러스병의 치료에 기초자료로 삼

고자 하였다.

재료 및 방법

바이러스와 세포주

무지개송어(rainbow trout)에서 분리한 전염성 쉼장 괴사증 바이러스(IPNV)를 사용하였으며, 어류 세포주는 Chinook salmon embryo : *Oncorhynchus tshawytscha* 세포에서 유래한 CHSE-214 (ATCC CRL 1961 : John L. Fryer, Oregon State Univ.) 을 사용하였다.

사용배지

세포배양은 Eagle's MEM기본배지(minimal essential medium : Flow Lab.)를 3차 증류수로 녹인 후 pH를 7.2로 조절하고 0.2um여과지로 여과한 후 기본배지 95ml, fetal bovine serum(Flow Lab.) 10 ml, 2mM-glutamin과 streptomycin(50IU/ml, 50 ug/ml)을 첨가하여 완전배지로 사용하였다.

세포배양

CHSE-214세대 세포는 세포배양용 플라스크(Falcon, 25cm)에서 배양하였다. 플라스크 바닥에 부착되어 있는 세포의 상태를 역위상차 현미경(inverted contrast microscope : Olimpus, japan)으로 매일 관찰하면서 세포가 단층(monolayer)으로 성장하면 0.25% trypsin을 처리하여 세포를 바닥에서 떨어뜨린 후 계대배양하였으며, 5% CO₂와 95% 공기가 있는 배양기에서 배양하였다.

세포의 최적 성장온도 조사

CHSE-214 세포주의 성장 최적 온도를 조사하기 위하여 4개의 25cm² 세포배양용 플라스크를 한조로 하여 각각 1×10⁶세포를 넣고 Eagle's MEM배지 5 ml을 넣은 다음 각각 15C, 20C, 25C, 30C CO₂ 배양기에서 6일간 배양한 후 0.25% trypsin을 처리하여 세포를 떼어낸 다음 hematocytometer를 이용 세포수를 계산하여 결정하였다.

바이러스의 역가측정

세포배양용 플라스크(100cm², Falcon)에 세포를 부착시킨 후 1 M.O.I.(multiplicity of infection)되게 바이러스를 1시간 감염시키고, 감염 되지않은 바이러스는 인산완충액으로 2회 세척한 후 Eagle's MEM 배지를 5ml 넣은 후 20℃의 CO₂ 배양기에서 배양하면서 역가를 측정하였다. 역가측정은 TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infectious Dose/ml)을 사용하였다.

IPNV의 CHSE-214 세포주에서의 감염증상 관찰

세포배양용 플라스크(25cm²)에서 세포가 70% 정도로 단층 배양되었을 때 배양액을 버리고 IPNV를 3 M.O.I.가 되도록 넣은 후 세포에 부착감염이 용이하도록 15분 간격으로 플라스크를 진후좌우로 기울여 주면서 1시간 감염시킨 후 인산 완충용액(pH 7.2)으로 2회 세척한 후 완전 배양액 5ml을 넣고 20℃의 CO₂배양기에서 배양하면서 관찰한 후 세포변성 효과(cytopathic effect)를 역위상차 현미경하에서 관찰하고 사진을 촬영하였다.

결과 및 고찰

세포의 최적 성장온도

CHSE-214 세포주는 *in vitro* 상태에서 10% fetal bovine serum과 2.5mM-glutamin이 첨가된 Eagle's MEM 배지에서 잘 성장하였으며, 이 세포의 최적 성장온도를 조사한 바 배양 5일 후 20C에서 약 3.3×10⁶ 세포로 다른 온도조건에서 배양한것 보다 가장 많은 세포를 생산하여 20C가 최적온도임을 알 수 있었다. 또한 15C와 25C에서도 세포는 성장하였지만 20C에서 배양한것 보다 약간 부진한 경향을 보였으며, 30C에서는 거의 성장하지 않았고 사멸하는 모습이였다.

이러한 결과는 Yoshimizu 등(1978)이 보고한 결과와도 일치하였으며, 이들 보고에 의하면 대부분 연

어와 무지개송어에서 유래된 세포주의 최적 온도는 20°C였다. 또한 Nicholson(1985)은 물고기 세포는 일반적으로 배양온도 범위가 넓다고 보고하고, 대부분 적정온도는 15-20°C이지만 냉수와 온수 또 그 중간에서 서식하는 어류의 종에 따라서 온도가 달라진다는 보고와도 같았다.

바이러스 역가측정

바이러스의 복제정도를 알아보기 위하여 실험하였다. IPNV는 CHSE-214 세포에서 복제되었고, 감염 1일부터 서서히 TCID₅₀이 증가하면서 감염 6일후에 최고값을 보였으며, 감염 7일 정도부터는 거의 비슷한 양상을 보였다. 이결과로 IPNV는 OMV(*Oncorhynchus masou virus*)와 IHNV(infectious hematopoietic necrosis virus)와는 달리(Yoshimizu, 1987) CHSE-214 세포에 대한 감수성이 높게 나타났다. 그러나 Fendrick 등(1982)과 Kelly 등(1978)은 EPC와 FHM 세포주에서 IHNV와 IPNV는 RTG-2와 CHSE-214 세포주 보다 더욱 높은 역가를 보였다고 보고하기도 하였다.

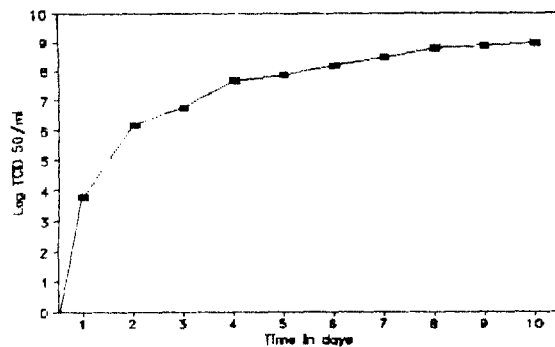


Fig. 1. Representative growth curve of IPNV in CHSE-214 cell line.

감염시간에 따른 세포병리학적 소견

무지개송어 세포주 CHSE-214에 전염성 췌장 괴사 바이러스(IPNV)를 감염시켜 감염시간에 따른 감염 증상을 조사하였다.

IPNV로 감염되지 않은 CHSE-214 세포는 세포

배양용 플라스크 바닥에 부착하여 성장하였고, 형태는 약간 길다란 반추형 모양으로 Chen과 Kou(1987)가 보고한 Hybrid tilapia의 kidney로부터 유래된 TH세포주와 비슷한 형태였다. 또한 세포는 바닥에 완전히 부착된 상태에서 성장하기 때문에 현미경 하에서 그다지 명암이 뚜렷하지는 않았다(Fig. A). 그러나 IPNV를 감염시켜 시간이 경과함에 따라 정상상태였던 세포는 변성을 가져오기 시작하여 감염 6-12시간후의 세포는 정상형의 세포들과 별 차이가 없었으나 단지 바이러스가 감염되므로 인해서 세포의 활성을 점점 잃게 되어 부착력을 상실해가면서 세포의 형태가 더욱 뚜렷해지는 것이 특징적이었다(Fig. B). 감염 18-24시간 후에는 대부분 세포들은 활성을 잃어가고 있었고, 바닥에서 일부 세포들이 떨어지는 상태였으며, 일부세포는 둥근형태로 변하였다. 세포의 형태도 반추형 모양에서 부정형에 가까운 형태로 변해 전형적인 세포변성효과(cytopathic effect)를 나타내기 시작했다(Fig. C, D). 이는 바이러스가 감염되어 세포의 활성을 잃게하는 증상이다.

감염 30시간 후에는 많은 세포가 부착력을 잃고 플라스크 바닥에서 떨어져가고 있었으며, 세포는 거의 완전한 부정형태로 되었다(Fig. E, F). 감염 36시간 후에 세포는 완전히 활성을 잃었고, 대부분 세포가 둥근 형태로 되었으며, 일부 세포는 약간씩 파괴되는 모습도 관찰되었다(Fig. G). 감염 48시간 이후에는 둥글게 되었고, 세포는 거의가 파열되어 세포 내용물이 세포 밖으로 나왔으며, 시간이 경과함에 따라서 더욱 많은 세포들이 파열되었다(Fig. H, I, J).

이러한 결과로 볼 때 IPNV는 CHSE-214 세포주에 감염되어 세포변성효과를 가져오고, 또한 감염시간이 지속됨으로 인해 세포는 파괴되는 결과를 초래하였으며, IPNV 바이러스는 20°C CO₂ 배양기에서 CHSE-214 세포주에 감염되어 24시간 이내에 복제됨을 알 수 있었는데(Fig. 1, 2) 이는 Malsberger와 Cerini(1963)가 보고한 16-20시간과 거의 비슷한 시간이었다. 이 결과를 토대로 앞으로 전자현미경을 통해 바이러스의 감염기작을 밝혀내는 것은 중요하리

Fig. 2. Micrographs of normal CHSE-214 salmon cells and infection symptom of the cells infected with IPNVs and observed with inverted phase contrast microscopy.

A : CHSE-214 normal cell (x 100)

B : 6–12 hours post-infection(P. Ix100)

C : 24h P. I(x 100) D : 24h P. I(x 200)

E : 30h P. I(x 100) F : 30h P. I(x 200)

G : 36h P. I(x 200) H : 48h P. I(x 200)

I : 56h P. I(x 200) J : 68h P. I(x 200)

라고 사료된다.

참 고 문 헌

- Brown, F.** : The classification and nomenclature of virus : Summary of results of meetings of the international committee on taxonomy of viruses in Sendai. September, 1984. *Intervirology*, 1986.
- Chang, N., MacDonald, R. D. and Yamamoto T.** : Purification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and comparison of polypeptide composition of different isolates. *J. Gen. Virol.* 67 : 2193-2205, 1978.
- Chen, S. N. and Kou, G. H.** : Establishment, characterization and application of 14 cell lines from warm-water fish. Invertebrate and fish tissue culture. Japan Scientific Societies press. Tokyo, pp. 218-227, 1987.
- Dobos, P., Hallett, R., Kells, D. T. C., Becht, H. and Rowe, D.** : Biophysical studies of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* 22 : 150-159, 1977.
- Dobos, P., Hill, B. J., Hallett, R., Kells, D. T. C., Becht, H. and Tenings D.** : Biophysical and biochemical characterization of five animal virus with segmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.* 32(2) : 593-605, 1979.
- Dobos, P., Robert, T. E.** : The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus : Review. *Can. J. Microbiol.* 29 : 377-384, 1983.
- Duncan, R., Nagy, E., Krell, P. J. and Dobos, P.** : Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein. Detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J. Virol.* 61 : 3655-3664, 1987.
- Fendrick, J. L., Groberg, W. J. and Leong, J. C.** : Comparative sensitivity of five fish cell lines to wild type infectious haematopoietic necrosis virus from to oregon sources. *J. Fish Dis.* 5 : 87-95, 1982.
- Filds, B. N.** : Virology. Raven press. New York, 1985.
- Hah, Y. C., Hong, S. W., Kim, M. H., Fryer, J. L. and Winton, J. r.** : Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from gold fish (*C. auratus*) and Chum salmon (*O. keta*) in Korea. *Kor. J. Microbiol.* 22 : 85-90, 1984.
- Ke'ly, R. K., Souter, B. W. and Miller, H. R.** : Fish cell lines comparisons of CHSE-214, FHM and RTG-2 in assaying IHN and IPN virus. *J. Fish. Res. Board Can.* 35 : 1009-1011, 1978.
- Lee, J. J., Park, J. W., Har, Y. C. and Jeong, G. J.** : A new serotype confirmed by partial physical mapping of cDNA clones from the infectious pancreatic necrosis virus isolated in Korea. *Kor. J. Microbiol.* 27(3) : 231-236, 1989.
- Malsbergr, R. G and Cerini, C. P.** : Characteristics of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Bacteriol.* 86 : 1283-1287, 1963.
- Park, J. W., Lee, J. J., Jeong, G. J. and Har, Y. C.** : Characterization of the infectious pancreatic necrosis virus(IPNV) isolated from cultured rainbow trout in Korea. *Kor. J. Microbiol.* 27 (3) : 225-230, 1989.
- Wolf, K and Mann, J. A.** : Poikothermic vertebrate cell lines and viruses : A current listing for fishes. *In vitro.* 16 : 168-179, 1980.
- Wolf, K., Snieszko, S. F., Dunbar, C. E. and Pyle, E.** : Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104 : 105-108, 1960.
- Yoshimizu, M., Kamel, M., Dirakbusarakon, S. and**

Kimura, T. : Fish cell lines : Susceptibility to salmonid viruses. Invertebrate and fish tissue

culture. Japan Scientific Societies Press. Tokyo. pp. 207–210, 1987.

A Study on infection symptom of infectious pancreatic necrosis virus(IPNV) in chinook salmon embryo cell line

Young-Gill Kim, Keun-Kwang Lee* and Ee-Yung Chung**

*Department of Fish Pathology, Kunsan National University, Kunsan 573–400, Korea, *Department of Applied Biology, Dongguk University, Seoul 100–715, Korea and **Department of Marine Development, Kunsan National University, Kunsan 573–350, Korea*

CHSE(Chinook Salmon Embryo)-214 fish cell lines was cultured in Eagle's minimal medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 2mM-glutamin. Optimum growth temperature of CHSE-214 cell line was 20°C. Infectious pancreatic necrosis virus(IPNV) was successfully multiplied and showed the cytopathic effect in CHSE-214 cell line. Infection symptom of IPNV was observed with inverted phase contrast microscopy. At 6h–12hrs post-infection, the cells infected with IPNV were similar to normal cells. At 18–24hrs post-infection, the cells were somewhat round form and a little swollen form than normal cells. At 30hs post-infection, the cells were becoming more abnormal cells. At 48-68 post-infection, the infected cells were lysed and showed the severe cytopathic effect.