

핵다면체 바이러스의 감염증상과 전자현미경적 연구

이근광, 김영길

군산대학교 해양산업대학 수족병리학과

핵다면체 바이러스는 *S. frugiferda* 세포주에 감염되었다. 감염 12시간 후에 세포는 운동성을 잃고 세포의 핵은 팽창되었다. 감염 24시간 후에 세포는 비정상적인 형태로 되었으며, 작은 PIB가 나타나기 시작하였다. 감염 48시간 후에는 전체 세포에 PIB가 형성되었고, 감염 76시간 후에는 핵속에 있는 PIB는 일부가 세포밖으로 방출되었다. 전자현미경을 통해 감염후 13시간이 지난후 NPV를 관찰한 결과 세포의 핵속에서는 virogenic stroma가 형성되었으며, 그 부분에서 nucleocapsids가 형성되었다. 감염 48시간 후에는 많은 nucleocapsid들은 bundle을 형성하고, PIB에 봉입되었다. PIB는 대부분 4면체이며, 크기는 3~10 μ m 정도이었다. Virion은 막대형으로 nucleocapsid는 30~40 \times 300~400nm이었다.

Key Words : Nuclear polyhedrosis virus, polyhedral inclusion body, nucleocapsid, virogenic stroma, *S. frugiferda*

Baculovirus중 핵다면체 바이러스(nuclear polyhedrosis virus, NPV)는 무척추동물 세포의 핵내에서 분열 증식하며, 이중나선형의 DNA 게놈을 갖는 막대형 바이러스로서, nucleocapsid의 크기는 35~50 \times 200~320nm이다(Haghes, 1972; Harrap, 1972). Nucleocapsid는 외부막으로 둘러싸여 있고, 외부막으로 둘러싸인 virion의 크기는 약 40~70 \times 300~400nm이고(Vlak and Smith, 1982; Ackerman and Smirnoff, 1983). 이들 바이러스는 핵속에서 핵다면체(polyhedral inclusion body, PIB)를 형성하는 특성을 가지고 있다(Goodwin *et al.*, 1970). 최근 이들 virus는 수중의 무척추 동물에도 감염하여 질병을 일으키는 중요한 인자로 알려져 있으며(Chang *et al.*, 1992; Boonyratpalin *et al.*, 1993). 특히 Lightner and Redman(1981)은 Taiwan으로부터 북미에 수입된 새우(*P. monodon*)의 유생에서 baculovirus성 질병을 처음으로 발견하였다.

Momoyama(1988)는 보리새우(*P. japonicus*)의 종묘 생산시 baculovirus가 중장선 괴사증을 유발했다고 보고

하는 등 baculovirus 질병에 대한 보고는 많으며, 이 바이러스에 감염되면 100% 폐사율에 이른다. 이들 virus는 수중의 양식 무척추 동물중 절지동물에 대단히 큰 피해를 주고 있는 것으로 추정되는데, 이 virus병에 대한 대책을 수립하기 위한 일환으로써 본 연구에서는 baculovirus중 핵다면체 바이러스의 *in vitro*에서의 감염과 일부 특성을 전자현미경을 통하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 세포

본 실험에 사용한 virus는 nuclear polyhedrosis virus이며, 세포는 IPLB-SF-21 계대세포를 사용하였다.

2. 세포배양

세포배양은 TNM-FH 기본배지에 10% fetal bovine serum과 2.6% tryptose broth, penicillin-streptomycin (1,000unit/ml, 1,000 μ g/ml)을 첨가하여 완전 배지로 사용하였다.

3. 감염증상 관찰

세포배양용 플라스크에 세포가 70% 정도 단층 배양 되었을 때 NPV를 3 M.O.I.되게 감염시킨 후 inverted contrast microscopy하에서 세포변성 효과를 관찰하고 사진 촬영하였다.

4. 전자현미경관찰

감염된 세포를 원심분리하여 침전시킨 후, 3% glutaraldehyde 용액에서 1시간, 2% osmium tetroxide에서 1시간 고정시킨 후, 각 시료는 60, 70, 80, 95와 100%의 ethanol로 10분간 탈수하였다. 탈수가 끝난 시료는 epon과 propylen oxide의 비가 1:2, 1:1, 2:1인 용액에 각각 1시간 정착시킨 후, epon에 포매하여 24시간 정착하고 65°C에서 3일간 건조시켰다. 박편제작은 ultra-microtome(sorval MT-2)으로 절단하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 후, 투과전자현미경(Hitach H-500)으로 75KV에서 관찰하고 사진 촬영하였다.

결과 및 고찰

1. 감염시간에 따른 세포병리학적 특성

NPV는 Sf세포주에서 정상적으로 감염 복제되었으며, 세포에 바이러스를 감염시킨 결과 정상세포(Fig. 1, A)는 감염 12시간 후, 플라스크 바닥에서 떨어지면서 운동성을 잃고, 세포변성 효과를 나타내었다. 감염 24시간 후부터 세포의 핵내에서는 작은 polyhedral inclusion body가 약간씩 형성되기 시작하였으며(Fig. 1, B), 시간이 경과할수록 크기는 커지고 숫자는 증가하여 감염 48시간 후에는 현미경 하에서 반짝반짝 빛나는 모습이였다. 또한 세포의 형태는 불규칙하게 되었으며, 거의 모든 세포에 PIB가 형성되었다(Fig. 1, C). 그후 감염시간이 증가되면서 PIB는 완전히 성숙하여 감염 76시간 이후에 PIB가 세포밖으로 방출되었다(Fig. 1, D). 이러한 결과는 Faulkner와 Henderson(1972)이 AcNPV를 *T. ni* 세포주에 감염한 결과 48~72시간에 PIB의 생성과 성숙이 완결된다는 보고와 유사하였으며, Summers와 Volkman(1976), Oh와 Lee(1990)가 보고한 결과와도 유사하였다.

Fig. 1. Photomicrographs representing the sequence of cytopathic effects that were observed when *S. frugiperda* cultures were infected with NPV and examined by inverted contrast microscopy at intervals PI: (A) normal cell, (B) 24PI, (C) 48PI, (D) 76PI.

2. 전자현미경 관찰

NPV는 세포의 핵속에서 분열복제되고 감염 13시간 후에 세포의 핵에서는 바이러스의 유전물질인 virogenic stroma가 형성되었으며, virogenic stroma부분에서는 많

은 nucleocapsid가 생성되고 있음을 관찰하였다(Fig. 2, A). 또한 감염 48시간 후에는 Fig. 2, B에서 보는 바와 같이 nucleocapsid가 bundle을 형성하고, polyhedrin으로 이루어진 PIB가 형성되었으며, 일부 nucleocapsid는 PIB에 봉입되었다(Fig. 3, A, B, C, D). 이러한 결과는 Oh와 Lee(1990)가 보고한 AcNPV와도 유사하였으며, Kundson과 Harrap(1976)가 보고한 NPV복제과정과도 유사하고 그의 많은 연구자들(Goodwin *et al.*, 1970; Faulkner and Henderson, 1972; Summers and Volkman, 1976, Miltenburger, 1979)의 보고와도 유사하여 baculovirus중 대부분 NPV는 위의 결과와 비슷한 양상

임을 알 수 있다. Nucleocapsid는 rod shape으로 약 $30\sim 40 \times 300\sim 400\text{nm}$ 이었고, PIB형태는 대부분 tetrahedron이었으며, 크기는 대략 $3\sim 10\mu\text{m}$ 정도로 다양하였다. 이러한 PIB는 바이러스성 환경 오염원으로 토양이나 수질에 한번 오염되면 PIB를 구성하는 단백질이 nucleocapsid를 외부 환경요인으로부터 보호하여 오랜 세월을 유지해주기 때문에 이 virus의 감염 대상이 되는 수중의 무척추동물의 양식중에 막대한 영향을 줄 수 있어 우리는 이 바이러스에 노출되지 않도록 유의해야하며 앞으로 이 바이러스를 퇴치할 수 있는 연구를 계속해야 할 것으로 사료된다.

Fig. 2. Electron micrographs representing the initial stages of NPV replication in *S. frugiperda* cells 10~13hrs PI. Dispersed virogenic stroma and nucleocapsid morphogenesis were seen in the cell nucleus.

C : cytoplasm. N : nucleus. NC : nucleocapsid
VS : virogenic stroma.

Fig. 3. Electron micrographs representing the late stages of NPV replication in cell cultures. By 48 hrs, nucleocapsids were bundled and occluded in PIB, and the PIBs were mature and surrounded by an almost continuous polyhedron membrane. Bar indicates $0.5\mu\text{m}$.

References

- Ackermann, H. W. and W. A. Smirnof: A morphological investigation of 23 baculoviruses. *J. Invert. Pathol.* 41 : 269~280, 1983.
- Boonyaratpalin, S., K. Supamattaya, J. Kasornchandra, S. Direkbusaracom, U. Aekpanithanpong and C. Chantanachooklin : Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow head disease in the black tiger shrimp (*P. monodon*). *Jap. J. Fish Pathol.* 28(3) : 103~109, 1993.
- Chang, P. S., Y. C. Wang, C. F. Lo, G. H. Kou and S. N. Chen : Purification and biochemical characteristics of occlusion body of *P. monodon*-type baculoviruses. *Jap. J. Fish Pathol.* 27(3) : 127~130, 1992.
- Goodwin, R. H., J. L. Vaughn, J. R. Adams and S. J. Louloides : Replication of nuclear polyhedrosis virus in an established insect cell line. *J. Invert. Pathol.* 16 : 284~288, 1970.
- Faulkner, P. and J. F. Henderson : Serial passage of a nuclear polyhedrosis disease virus of the cabbage looper in a continuous tissue culture cell line. *Viol.* 50 : 920~924, 1972.
- Harrap, K. A. : The structure of nuclear polyhedrosis virus. I. The inclusion body. *Viol.* 50 : 114~123, 1972.
- Hughes, K. M. : Fine structure and development of polyhedrosis virus. *J. Insect Pathol.* 19 : 198~207, 1972.
- Kundson, D. L. and K. A. Harrap : Replication of a NPV in a continuous cell culture of *S. frugiferda* : Microscopy study of the sequence of events of the virus infection. *J. Virol.* 17 : 254~258, 1976.
- Lightner, D. V. and R. M. Redman : A baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *P. monodon*. *J. Invert. Pathol.* 38 : 299~302, 1981.
- Miltenburger, H. G. : Nuclear polyhedrosis viruses in cell cultures. 3rd General Meeting of ESACT. Oxford 1979. *Develop. Biol. Standard.* 46pp. 1979.
- Monoyama, K. : Infection of baculoviral mid-gut gland necrosis in mass production of kuruma shrimp larvae, *P. japonicus*. *Jap. J. Fish Pathol.* 23(2) : 105~110, 1988.
- Oh, C. K. and K. K. Lee : Electron microscope studies of infection and multiplication of AcNPV clone L-1 and ts-B1074. *Kor. J. Genetics* 12(1) : 62~74, 1990.
- Summers, M. D. and L. E. Volkman : Comparison of biophysical and morphological properties of occluded and extracellular nonoccluded baculovirus from *in vivo* and *in vitro* system. *J. Virol.* 17 : 962~972, 1976.

Infection Symptom and Electron Microscopic Visualization of Nuclear Polyhedrosis Virus

Keun-Kwang Lee and Young-Gill Kim

Department Fish Pathology, Kunsan National University Kunsan 573-400, Korea

Nuclear polyhedrosis virus was successfully infected the continuous Sf cell line. At 12hrs post-infection(P. I), the cell lost the motility and the nuclei of the cells were hypertrophied. At 24hrs P. I, the cells were somewhat abnormal form and PIB formation was observed. At 48hrs, the PIBs formed in all cells. PIBs in the nuclei were released in the culture media at 72hrs P. I. By the observation of NPV morphogenesis by electron microscopy at 13hrs P. I, the virogenic stroma formed in the nucleus, and nucleocapsids formed. At 48hrs P. I, many nucleocapsids were bundled and then occluded in PIB, and PIBs were matured. PIB shapes were mostly tetragonal and a polyhedron was about 3~10 μ m in size. Virions were rod shape, nucleocapsids ranging in size 30~40 \times 300~400nm.

Key Words : Nuclear polyhedrosis virus, polyhedral inclusion body, nucleocapsid, virogenic stroma, *S. frugiferda*