

## Vero 세포적응 뉴캐슬병 바이러스의 생물학적 특성

최강석<sup>†</sup> · 박미자 · 계수정 · 김지예 · 권준헌

농림수산검역검사본부 조류질병과

### Biological Properties of Vero Cell-Adapted Newcastle Disease Virus

Kang-Seuk Choi<sup>†</sup>, Mi-Ja Park, Soo-Jeong Kye, Ji-Ye Kim and Jun-Hun Kwon

Avian Disease Division, Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, Anyang 430-757, Korea

**ABSTRACT** Newcastle disease virus (NDV) Kr005/V strain was generated through 55 serial passages of NDV Kr005 strain in Vero cells. The Kr005/V virus yielded high infective titers of  $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub>/mL in Vero cells and the infected cells showed cytopathic effects such as marked cell rounding, though less frequent syncytia. The Kr005/V virus was heat-stable and classified into the lentogenic type with a Mean Death Time (MDT) of 120h or greater while the Kr005 strain was heat-labile and velogenic (MDT of 49.6 h). Only the single amino acid substitution (T to S) was observed at position 433 of the HN protein of the Kr005/V strain, whereas no amino acid change was found in the F protein. The Kr005/V input virus correlated well (correlation coefficient  $r^2=0.97$ ) with the Kr005 virus when ten field sera were tested by virus neutralization test. The biological properties and usefulness of Vero cell-adapted Kr005/V virus were discussed.

(Key words : Newcastle disease virus, Vero cells, biological properties, virus neutralizing antibody)

## 서 론

뉴캐슬병(Newcastle disease, ND)은 닭에서 빠른 전염력과 높은 폐사율을 보이는 악성 가금전염병 중 하나이다. 국내의 경우, 2000년대 이전에는 3년 내지 5년마다 양계 농장에서 주기적으로 ND가 대유행하여 양계산업 피해가 심각하였다(박근식, 1979; 김재홍과 송창선, 1992). 2001년 이후 부화장 및 양계 농장에서 의무적으로 NDV 백신 접종하기 시작하면서 국내 양계 농장에서의 ND 발생 건수는 지속적으로 감소하고 있는 추세이다(최강석, 2010).

ND를 유발하는 병원체는 Paramyxoviridae family, *Avulavirus* genus에 속하는 뉴캐슬병 바이러스(Newcastle disease virus, NDV)이다(Mayo, 2002). NDV는 닭에서의 바이러스 독력을 기준으로 약독형(lentogenic), 중간독형(mesogenic) 및 강독형(velogenic) 등 최소 세 가지 pathotype으로 분류하고 있다(Alexander, 2003).

NDV는 바이러스 독력과 관계없이 종란에서 고농도로 증식하고 접종방법이 용이하기 때문에, 바이러스 증식을 위하여 가장 일반적으로 사용하는 방법이다. 뿐만 아니라 NDV는

계태아 섬유아(chicken embryofibroblast, CEF) 세포, 계태아 간 세포(chicken embryo liver, CEL) 세포, 계태아 신장 세포(chicken embryo kidney, CEK) 세포와 같은 계태아 유래 초대배양 세포(Bankowski, 1964)뿐만 아니라 Vero 세포, baby hamster kidney (BHK-21), HeLa 세포 등 각종 포유류 동물 유래 세포에서도 증식할 수 있다(Fenner et al., 1974; Reddy and Srinivasan, 1992). 특히 CEF 세포 등 계태아 유래 초대배양 세포에 강독형 NDV를 감염시킬 경우, 합포체 형성 등 세포 변성효과(cytopathic effects, CPE)가 뚜렷하고 증식성이 우수하다(Bankowski, 1964). 그러나 Vero 세포, BHK 세포 등 포유류 동물 유래 세포의 경우 대부분 강독형 NDV를 감염시키더라도 증식성이 낮고 CPE 형성이 뚜렷하지 않기 때문에, 감수성 세포에서 연속적인 계대과정을 거쳐 적응(adaptation) 시켜야 한다(Alexander, 2003; Ahamed et al., 2004). 이러한 계대과정에서 바이러스 독력 등 NDV의 생물학적 성상이 wild-type 바이러스와 상이할 수 있다(Ahamed et al., 2004).

따라서 본 연구에서는 강독형 NDV인 Kr005주를 Vero 세포에서 연속 계대하여 증식성과 CPE 형성이 뚜렷하게 나타나는 Vero 세포 적응 NDV 주를 작성하였다. 또한 작성된

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed : kchoi0608@korea.kr

NDV 주에 대하여 Vero 세포에서의 바이러스 증식성, CPE 형성, 내열성, 바이러스 독력 등 생물학적 성상을 조사하여 Kr005주와 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 바이러스 및 닭 혈청

본 연구에 사용된 NDV는 Kr005주으로써(Lee et al., 2004), 국내에서 NDV 백신 검정을 위한 공격집종 바이러스(challenge virus)로 사용하고 있는 강독형 NDV 중 하나이다. Kr005주는 특정병원체부재(specific pathogen free, SPF) 종란(SPAFAS<sup>®</sup>, Charles River Laboratories, Nort Franklin, CT, USA)의 요막강(allantoic cavity) 내로 접종한 다음 3일간 배양하여 바이러스를 증식시킨 요막강 액(allantoic fluid)을 무균적으로 채취하여 사용하였다.

본 연구에 사용된 닭 혈청시료는 농림수산검역검사본부 뉴캐슬병 OIE reference laboratory에 보관되어 있는 혈청으로서 NDV 표준 항혈청 1점(대조양성 혈청), SPF 닭 혈청 1점(대조음성 혈청) 그리고 NDV 백신을 접종한 야외 농장 유래 닭 혈청 10점이었다.

### 2. 세포배양

Vero 세포와 CEF 세포가 실험에 사용되었다. Vero 세포(ATCC CCL81)는 African green monkey kidney 유래 세포 주로서 미국 American Type Culture Collection사(ATCC; Manassas, VA, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. Vero 세포 배양을 위하여 항생제(Gibco<sup>™</sup> antibiotic-antimycotic solution, Invitrogen Corp, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 D-MEM 용액(Dulbecco's Medium, GibcoBRL, Grand Island, NY, USA)을 사용하였으며, 이때 fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL)을 증식 배지에는 10%, 유지 배지에는 2% 되게 첨가하였다.

CEF 세포는 10일령 SPF 종란의 계태아 몸통을 무균적으로 적출하여 세절한 다음 0.25% 트립신 용액으로 소화하여 CEF 세포를 채취하여 10<sup>6</sup>/mL 농도로 조정하여 세포배양에 사용하였다. 세포 배양에 사용한 배지는 Medium 199와 F10 medium(GibcoBRL)을 동량 혼합한 것으로, 송아지 혈청(calf serum, GibcoBRL)을 증식 배지에는 5%, 유지배지에는 1% 되게 첨가하였다.

### 3. Vero 세포에서의 연속계대

Kr005 주를 Vero 세포에서 연속적으로 반복 계대하였다.

즉, Vero 세포 monolayer에 Kr005 주를 1.0 multiplicity of infection(MOI)되게 접종하여 37°C에서 1시간 동안 흡착시켰다. 그 후 접종액을 제거하고 유지 배지를 첨가하여 37°C 배양기에서 5일간 배양하면서 CPE 출현 여부를 관찰하였다. 접종 5일 후 세포배양 상층액만을 회수하여 새로운 Vero 세포에서 동일한 방법으로 계대 배양을 반복 실시하였다. Vero 세포에서의 반복 계대는 cell monolayer에서 CPE가 완전히 형성될 때까지 반복하였다. Vero 세포에서의 계대가 최종 완료된 후 바이러스 배양액은 분병하여 실험에 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

### 4. 바이러스 역가 측정

바이러스 역가는 종란접종법 또는 세포배양법으로 측정하였다. 종란접종법의 경우 바이러스 희석액을 종란당 0.1 mL 씩 희석당 종란 5개씩 요양막강(allantoic cavity)내로 접종한 다음 5일간 37°C에서 배양하였다. 그 후 배양 종란의 요양막강액(allantoic cavity fluid)을 무균적으로 채취하여 닭 적혈구 응집능(HA) 여부를 조사하여 HA양성인 경우 NDV가 증식한 것으로 간주하였다. 바이러스의 증식 역가는 접종 종란의 50%를 감염시킬 수 있는 바이러스 희석 배수의 역수 즉 50% egg infectious dose(EID<sub>50</sub>)로 표시하였으며, Reed and Muench (1938)의 방법에 따라 계산하였다. 세포배양법의 경우, Vero 세포 또는 CEF 세포를 미리 단층 형성시킨 96 well microplate에 바이러스 희석액을 well당 0.1 mL씩 희석 당 8개 well 씩 첨가한 다음 5일간 37°C 배양기에서 배양하였다. 그 후 CPE가 관찰된 well의 경우 바이러스가 증식한 것으로 간주하였다. 바이러스의 증식 역가는 접종 well중 50%를 감염시킬 수 있는 바이러스액 희석 배수의 역수 즉 50% tissue culture infectious dose(TCID<sub>50</sub>)로 표시하였으며, Reed and Muench (1938)의 방법에 따라 계산하였다.

### 5. 혈구응집 (Hemagglutination, HA) 역가 측정

HA 역가 측정은 U자형 96 well microplate를 사용하여 실시하였다. 즉, 96 well microplate의 전체 well에 0.1 M phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)을 well당 25  $\mu$ L씩 첨가한 다음, 첫 번째 well에 혈청을 25  $\mu$ L를 첨가하여 2진 단계 희석을 실시하였다. 그 후 4 hemagglutination unit(HAU)의 NDV 용액을 전체 well에 well 당 25  $\mu$ L씩 첨가한 다음 실온에서 30분간 반응시켰다. 그 후 1% 닭 적혈구 부유액을 전체 well에 well당 25  $\mu$ L씩 첨가한 다음 실온에서 40분간 반응시킨 다음 판독하였다. 항체 역가는 혈구응집이 완전히 억제된 최고 희석 배수의 역수로 결정하였다.

## 6. 내열성 조사

NDV의 내열성을 조사하기 위하여 56°C, 30분간 바이러스를 열처리한 다음 실험에 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다. 열처리한 바이러스는 96 well microplate에서 HA 역가를 측정하였으며, 감염성 여부를 판단하기 위하여 SPF 종란에 접종하여 바이러스 증식 여부를 조사하였다. 그 결과, HA 역가가 4배 이상이거나 종란에서 바이러스가 증식하는 경우 내열성이 있는 것으로 판단하였다.

## 7. 종란 평균치사시간(MDT) 측정

바이러스 독력은 Alexander(1988)가 제시한 방법에 따라 SPF 종란에서의 평균치사시간(mean death time, MDT)을 측정하여 결정하였다. MDT는 100% 종란 폐사가 나타난 바이러스 희석액 중 최고 희석 배수에서 측정한 종란 평균 치사시간으로 결정하였다. 바이러스의 독력은 MDT가 60시간 이하일 경우, 강독(velogenic), 60시간 이상 90시간인 경우 중간독(mesogenic), 90시간 이상일 경우 약독(lentogenic)으로 판정하였다.

## 8. 바이러스 유전자 분석

Vero 세포에 적응시킨 NDV의 유전적 변이 여부를 조사하기 위하여 HN과 F단백질 유전자 전체 open reading frame (ORF) 염기서열을 분석하였다. 이를 위하여 바이러스로부터 직접 RNA를 추출한 다음 one-step RT-PCR kit(Qiagen)를 사용하여 RT-PCR를 실시하였다. HN 유전자 1,779bp를 증폭하기 위하여 forward primer HNf(5'-ACA AGAGTCAA TCATGGACCG-3')와 reverse primer HNr(5'-TCGTCTTCCC AACCATCCTAT-3')를 사용하였으며, F유전자 1,719 bp를 증폭하기 위하여 forward primer Ff(5'-ACATTCAGGACACA ATATGGG-3')와 reverse primer Fr(5'-CACAGGCTGCTGTT GGGTAT-3')를 사용하였다(Lee et al., 2008). RT-PCR에 의해 증폭된 DNA들은 순수 정제하여 direct sequencing을 실시하였으며, sequence data는 Vector NTI(Invitrogen, Carlsbad, CA) and BioEdit software(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)를 사용하여 alignment와 editing 과정을 거친 후 염기서열을 분석하였다.

## 9. 바이러스 중화시험

바이러스 중화시험은 일정량의 NDV (200 TCID<sub>50</sub>)와 단계 희석한 닭 혈청을 사용하여 beta method로 실시하였다. 즉, 96 well microplate에서 검사 혈청을 2진 희석하여 well 당 25 µL씩 첨가한 다음 동량의 바이러스액을 첨가한 다음,

37°C, 1시간 동안 중화시켰다. 그 후 Vero 세포 또는 CEF 세포를 단층 형성시킨 96 well microplate에 바이러스-혈청 반응액을 well당 100 µL씩 첨가하여 37°C 배양기에서 5일간 배양하면서 CPE 출현 여부를 관찰하였다. 바이러스 중화항체 역가는 well 내 CPE 형성이 완전히 억제되는 최대 희석 배수의 역수로 하였다. 각 검사 혈청에 대한 바이러스 중화 시험은 3번씩 반복하여 실시하였다.

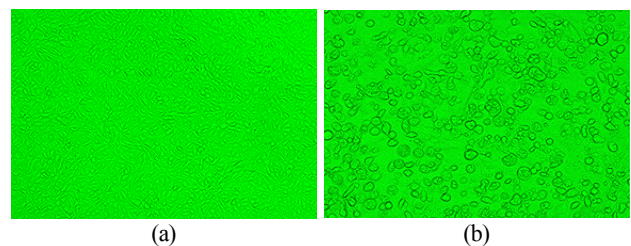
## 결 과

### 1. Vero 세포적응 NDV주 작성

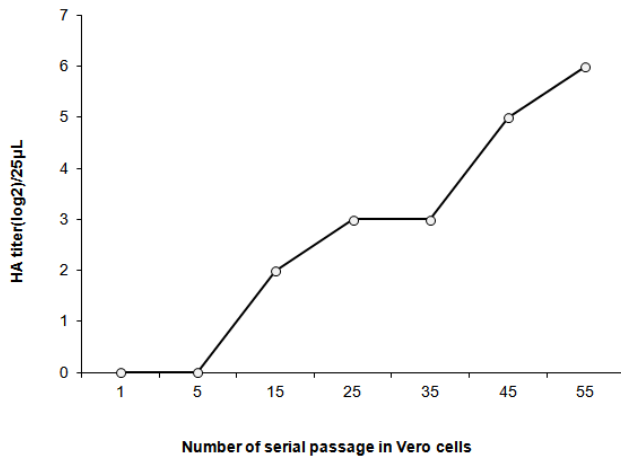
Vero 세포적응 NDV주를 작성하기 위하여, Kr005주를 Vero 세포에 연속 계대하였다. 그 결과, Kr005 주를 5대 연속 계대할 때까지 CPE는 관찰되지 않았으며, 배양 5일째 채취한 배양액에서도 HA가 관찰되지 않았다. 그 이후 계대에서는 Vero 세포에서 cell rounding과 같은 CPE가 관찰되기 시작하였으며, 15대 이상 계대하면서 CPE 출현시점이 점점 단축되면서 채취한 배양액에서도 HA가 관찰되었다. Vero 세포에서 35대 이상 계대하면서 접종 24시간 이내에 cell rounding이 관찰되었고, 시간이 경과하면서 일부 세포에서 작은 크기의 함포체도 관찰되기 시작하였다(Fig. 1). 채취한 바이러스 배양액에서의 HA역가는 35대 연속 계대이후 급격하게 증가하기 시작하여 55대 계대한 바이러스 배양액에서는 HA 역가가 64배까지 상승하였다(Fig. 2). 따라서 Vero 세포에서 Kr005주를 55대 연속 계대한 후 채득한 바이러스를 Vero 세포에 적응된 NDV로 간주하고, Kr005/V 주로 명명하였다.

### 2. NDV Kr005/V 주의 생물학적 특성

Vero 세포에 적응시킨 Kr005/V 주의 내열성 및 바이러스 독력 등 생물학적 특성을 조사하고, Kr005 주와 비교 분석하였다(Table 1). 바이러스 내열성 여부를 조사하기 위하여 56°C,



**Fig. 1.** Cytopathic effects on Vero cell monolayer within 48 hours of post infection with the NDV Kr005 strain. (a) Mock-infected (b) infected by the NDV Kr005 strain at the 55th passage on Vero cells.



**Fig. 2.** HA titers of the NDV Kr005 strain after each serial passage in Vero cells. Culture fluids sampled after each of 55 serial passage in Vero cells were harvested on 5 days post-inoculation and tested for HA activity by microtiter HA test.

30분간 열처리한 결과, Kr005/V 주의 경우 열처리 전과 동일한 64배의 HA 역가를 유지하고 있었으며, 열처리한 NDV를 종란에 접종했을 때에도 바이러스가 증식하였다. 반면에 동일한 조건에서 열처리를 실시한 Kr005 주의 경우 열처리 이후 바이러스의 HA 능을 완전히 상실하였으며, 종란에 접종

했을 때에도 바이러스가 증식되지 않았다.

바이러스의 독력을 평가하기 위하여 SPF 종란에서 MDT를 측정하였다. 그 결과 Kr005 주의 MDT는 49.6시간이었다. 반면에 Kr005/V 주를 종란에 접종했을 경우 측정된 MDT는 120시간 이상이었다.

Vero 세포 배양액에서 채득한 Kr005/V 바이러스에 대하여 Vero 세포 배양법과 SPF 종란접종법으로 바이러스 역가를 측정하였다(Table 1). 그 결과, Kr005/V 바이러스의 역가는 Vero 세포에서 측정했을 때  $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub>/mL, SPF 종란에서 측정했을 때  $10^{5.3}$  EID<sub>50</sub>/mL이었다. 종란에서 증식시킨 Kr005 바이러스의 경우, Vero 세포 대신 CEF 세포에서 측정하였으며, 이때 바이러스의 역가는  $10^{8.3}$  TCID<sub>50</sub>이었으며, SPF 종란에서 측정하였을 때 바이러스 역가는  $10^{9.6}$  EID<sub>50</sub>이었다.

Vero 세포에 적응시키는 과정에서 NDV의 유전적 변화가 일어났는지 여부를 조사하기 위하여 Kr005 주 및 Kr005/V 주의 HN 단백질과 F 단백질의 전체 유전자 ORF 염기서열을 비교 분석하였다. 그 결과, Kr005/V 주의 HN 단백질의 경우, 443번째 아미노산에서만 변이(T에서 S)가 관찰되었으며, 주요 항원 부위를 포함한 나머지 부위에서의 유전적 변화는 관찰되지 않았다(Table 2). Kr005/V 주의 F 단백질의 경우 Kr005 주의 F 단백질 염기서열과 일치하였다. 특히 Kr005/V 주의 F0 분절 부위(aa 112에서 aa 117)는 Kr005 주와 동일한 "RRQKRF"

**Table 1.** Comparison of biological properties of the wild type NDV Kr005 and vero cell-adapted Kr005/V strain

	Heat treatment (37°C, 30 min)				Mean death time (MDT)	Virus titer <sup>c</sup>	
	HA activity <sup>a</sup>		Infectivity <sup>b</sup>			TCID <sub>50</sub>	EID <sub>50</sub>
	Before	After	Before	After			
Kr005	256	<2	5/5	0/5	49.6 h	$10^{8.3}$	$10^{9.5}$
Kr005/V	64	64	5/5	5/5	>120 h	$10^{7.8}$	$10^{5.3}$

<sup>a</sup>HA titer per 25 µL.

<sup>b</sup>Infectivity was measured using SPF chicken embryonated eggs. No. eggs infected/no. eggs inoculated.

<sup>c</sup>TCID<sub>50</sub>, 50% tissue culture infectious dose; EID<sub>50</sub>, 50% egg infectious dose. TCID<sub>50</sub> values of Kr005 and Kr005/V strains were measured in CEF and Vero cells, respectively.

**Table 2.** Comparison of amino acid sequences of major antigenic sites in the HN protein and the F protein cleavage site motif of the NDV Kr005 and Kr005/V strains

NDV strain	HN protein (position)						F protein (position)
	441~448	193~211 (site 23)	345~352 (site 1/14)	494 (site 12)	513~521 (site 2/12)	569 (site 2)	112~117 (F0 cleavage site)
Kr005	PY <del>I</del> FNAFT	LSGCRD <del>H</del> SHSHQYLALGVL	PDEQDYQIRKA	D	RVTRVSSSS	D	RRQKRF
Kr005/V	PY <del>S</del> FNAFT	LSGCRD <del>H</del> SHSHQYLALGVL	PDEQDYQIRKA	D	RVTRVSSSS	D	RRQKRF

아미노산 배열을 가지고 있었다.

### 3. NDV Kr005/V를 이용한 바이러스 중화항체 역가 측정

Kr005/V 주와 Vero 세포를 이용하여 닭 혈청 중 존재하는 NDV 중화항체를 검출할 수 있는 지 96 well microplate에서 beta method 방법으로 조사하였다. 동일한 검사 방법으로 Kr005 주와 CEF 세포를 사용하여 측정된 바이러스 중화항체 역가와 비교하였다. NDV 백신 접종을 실시한 농장 유래 닭 혈청 10점을 대상으로 Kr005/V 주로 NDV 중화항체 역가를 측정하였을 때 바이러스 중화항체 역가(log<sub>2</sub>)는 3.3에서 8로 다양하였다. 동일 시료에 대하여 Kr005 주를 사용하여 측정된 NDV 중화 항체 역가(log<sub>2</sub>)는 3.0에서 7.7로 다양하였다. MicroSoft Excel 프로그램에 내장된 도구를 사용하여 두 그룹간 바이러스 중화항체 역가간 상관성을 조사했을 때 97%(r<sup>2</sup>=0.97)의 높은 상관성을 보였다.

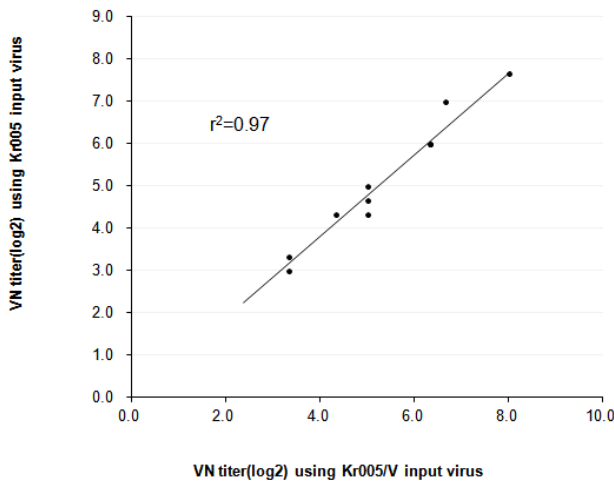
## 고 찰

바이러스의 증식은 바이러스를 취급하는 각종 실험을 위하여 필수적이다. NDV의 경우, SPF 종란이나 조류와 포유류 동물 유래의 다양한 감수성 세포를 사용하여 증식할 수 있다. NDV 증식에 가장 일반적으로 사용하는 종란의 경우, 고도의 기술이 필요없이 고농도의 바이러스를 생산할 수 있

다는 장점을 가지고 있다. 그러나 종란을 사용하는 경우, 고가의 SPF 종란을 사용하기 때문에 소독제 효력 시험이나 바이러스 중화시험 등과 같이 다량의 종란이 필요한 경우, 경제적 비용이 많이 들어가는 문제점이 있다. 또한 9일 내지 11일령의 종란을 사용하므로 장기간의 종란 부화기간이 필요하고, SPF 농장 내 질병 발생이나 종란 수요 폭증(예, 인플루엔자백신 생산) 등과 같은 긴급 상황이 발생할 경우 SPF 종란 공급이 원활하지 않을 수 있다. 그러므로 세포배양법은 종란 사용의 문제점을 극복할 수 있는 대안이 될 수 있다. 현재 세포배양법으로 바이러스를 증식하는 데 일반적으로 사용하는 세포는 계태아 유래 초대배양세포인 CEF 세포이다(Ahamed et al., 2004). 그러나 CEF 세포배양의 경우, 초대배양세포이기 종란(계태아)을 사용하여 매번 세포배양을 실시해야 하는 번거로움이 있고, 적기에 종란이 공급되지 않는 경우 CEF 세포배양을 실시하는 데 장기간이 소요될 수 있다. 또한 종란을 통해 수직 전파될 수 있는 바이러스의 오염 위험성도 존재한다(Ahamed et al., 2004). 그러므로 본 연구를 통하여 Vero에 적응시킨 Kr005/V 주의 경우 Vero 세포를 사용하기 때문에 CEF 세포가 가지고 있는 문제점들을 극복하는 데 도움이 될 수 있다.

본 연구에서 작성한 NDV Kr005/V 주는 Vero 세포에서의 바이러스 증식성이 10<sup>7.8</sup> TCID<sub>50</sub>/mL로 우수하고 CPE 형성이 명확하였다. 비록 야외 농장 닭 혈청 10수만 가지고 실시했지만, Kr005/V 주와 Vero 세포를 사용하여 측정된 바이러스 중화 항체 역가시험 결과가 CEF 세포를 사용하여 측정된 바이러스 중화시험 결과와 높은 상관성(r<sup>2</sup>=0.97)을 보였다. 이것은 CEF 세포 대신 Vero 세포를 이용하여 닭 혈청에 존재하는 NDV 중화항체 역가를 측정할 수 있다는 것을 말해 준다. 그러므로 본 연구에서 작성한 Kr005/V 주는 Vero 세포에서 실시할 수 있는 각종 검사 또는 평가시험(예, 소독제 효력시험이나 혈청검사)에 유용할 것으로 판단된다.

본 연구에서 NDV Kr005 주를 Vero 세포에 연속 계대한 결과 몇 가지 중요한 생물학적 성장 변화가 나타났다. 먼저 CEF세포에 Kr005 주를 접종할 경우 cell rounding이 형성된 직후 거대 syncytia를 형성하는 특징을 가지고 있다. 그러나 본 연구에서 보는 바와 같이 Vero 세포에 적응시킨 Kr005/V 주의 경우, 감염 세포 대부분은 cell rounding을 보였으며, 감염 수일 후 일부 감염세포에서 CEF 세포에 비해 작은 syncytia가 형성되었다. 감염 후 형성되는 syncytia는 Kr005/V 주의 경우 감염된 세포막에 축적된 신생 바이러스의 외피 당단백질(HN 단백질 및 F단백질)에 의한 fusion(fusion from within, FFWI) 활성화에 의해 나타나는 현상이다(Iorio and Glickman,



**Fig. 3.** Correlation between Kr005/V input virus and Kr005 virus when ten field sera were tested by virus neutralization (VN) test. VN tests were performed using Kr005/V input virus in Vero cells and Kr005 virus w chicken embryo-fibroblast cells.

1992). 그러므로 Kr005/V 주의 경우 감염된 Vero 세포에서의 FFWI 활성이 Kr005 주에 감염된 CEF 세포에서보다 낮은 것으로 판단된다. NDV HN 단백질과 F 단백질이 감염세포에서의 FFWI에 관여하는 것으로 알려져 있다(Horvath et al., 1992; Heminway et al., 1994; Takimoto et al., 2002; Gravel and Morrison, 2003; Melanson and Iorio, 2004). 본 연구에서 Kr005/V 주의 HN 단백질과 F 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 HN 단백질의 443번째에서만 아미노산 변이가 나타났을 뿐 F 단백질과 나머지 HN 단백질 부위에서는 Kr005 주와 동일하였다. 그러나 HN 단백질의 443번째 아미노산이 FFWI 활성에 관여하는지는 현재까지 밝혀져 있지 않다. 그러므로 Kr005/V 주에 감염된 Vero 세포에서 syncytia가 제대로 형성되지 않는 것이 바이러스 단백질의 특정 아미노산의 변이에 의한 것인지, 아니면 Vero 세포 자체의 생물학적 특성 때문에 기인한 것인지는 명확하지 않다. 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

또한 이열성(heat-labile)을 가진 Kr005주와 달리, NDV Kr005/V 주는 내열성(thermostable)을 보였다. NDV의 열에 대한 저항성 정도는 바이러스주와 야외 분리주마다 다양하게 나타나며, 바이러스 독력과 관련성이 없는 것으로 알려져 있다(Lomniczi, 1975; Alexander, 2003). 그러나 열에 대한 저항성에 관여하는 바이러스 인자가 무엇인지는 현재까지도 명확하게 밝혀져 있지 않다. 그러므로 Vero 세포에 적응하는 과정에서 어떤 인자가 있는 내열성에 관여하는지를 조사해 볼 필요가 있다.

흥미롭게도 강독형 NDV Kr005주를 Vero 세포에서 55대 연속 계대한 결과, 바이러스 독력이 약독 바이러스 수준으로 순화되었다. 이와 같은 세포 계대에 의한 독력의 순화는 일부 연구자들에 의해 이미 보고된 바가 있다(Kumanan et al., 1993; Kumanan and Venkatesan, 1994; Mohan et al., 2007). 현재까지 NDV의 F 단백질(특히 F0분절부위) (Peeters et al., 1999; Panda et al., 2004)과 HN 단백질(Römer-Oberdörfer et al., 2003; Huang et al., 2004; de Leeuw et al., 2005; Khattar et al., 2009)이 바이러스 독력을 결정하는 데 주된 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. F 단백질의 경우 Kr005/V 주는 Kr005 주와 동일한 강독형 바이러스의 아미노산 배열(RRQKRF)을 그대로 유지하고 있었다. HN 단백질의 경우 Kr005/V HN 단백질의 443번째 아미노산에서 변이가 나타났지만, 이 부위가 바이러스 독력 결정에 관여하는지는 현재까지 밝혀져 있지 않다. 여기서 Kr005/V 주에 대한 바이러스 역가 측정 결과에 유의할 필요가 있다. Kr005/V 바이러스액을 Vero 세포로 측정할 역가( $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub>)가 종란으로 측정할 역가( $10^{5.3}$

EID<sub>50</sub>)보다 100배 이상 높게 나왔다. 반면, Kr005 바이러스액을 CEF 세포(계태아 유래)로 측정할 역가( $10^{8.3}$  TCID<sub>50</sub>)는 종란으로 측정할 역가( $10^{9.6}$  EID<sub>50</sub>)보다 10배 이상 낮게 나왔다. 이 결과로 볼 때, Kr005/V 주는 Vero 세포에서 55대 연속계 대하는 과정에서 Vero 세포에 이미 적응되어 계태아에 대한 바이러스 감수성이 Vero 세포에서 계대하기 이전보다 훨씬 낮아진 것으로 판단된다. 따라서 바이러스 독력을 종란(계태아)에서 MDT로 측정했다는 점을 감안해 볼 때 Kr005/V 주의 독력이 순화된 것은 독력을 결정하는 바이러스 구조단백질의 변이에 의한 것이라기보다 계태아 숙주의 바이러스 감수성이 낮아진 데서 기인하였다고 보는 것이 보다 설득력이 있어 보인다.

## 적 요

본 연구를 통하여 Vero 세포에서 강독형 NDV인 Kr005주를 55대 연속 계대하여 Vero 세포에 적응된 Kr005/V 주를 작성하였다. Kr005/V 주는 Vero 세포에서  $10^{7.8}$ /mL의 높은 바이러스 증식성을 보였으며, 감염세포는 cell rounding과 같은 CPE를 형성하였다. 또한 이열성(heat labile) NDV Kr005주와 달리 NDV Kr005/V 주는 내열성(thermostable)을 보였다. 계태아에서 평균 치사 시간(MDT)를 측정할 결과, 강독형인 Kr005주(49.6시간의 MDT)와 달리 Kr005/V 주는 120시간 이상의 MDT를 보여 약독형 바이러스(lentogenic virus)로 분류되었다. Kr005/V 주의 HN 단백질과 F 단백질의 염기서열을 분석한 결과, HN 단백질의 443번째 아미노산에서만 변이(T에서 S)가 관찰되었다. Kr005/V 주와 Vero 세포를 사용하여 야외 닭 혈청을 대상으로 혈청중화 항체를 측정할 결과, Kr005주와 CEF 세포를 사용하여 측정할 혈청중화 항체와 97%의 상관성을 나타내었다.

(색인어: 뉴캐슬병바이러스, Vero 세포, 생물학적 특성, 바이러스 중화항체)

## 사 사

이 논문은 농림수산검역검사본부 수의과학기술개발 연구 사업의 지원에 의하여 이루어졌습니다.

## 인용문헌

Ahamed T, Hossain KM, Billah MM, Islam KMD, Ahasan MM, Islam ME 2004 Adaptation of Newcastle disease virus

- (NDV) on Vero cell line. *Int J Poult Sci* 3: 153-156.
- Alexander DJ 1988 Newcastle Disease Diagnosis. pp 147-160. In: Newcastle Disease. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Alexander DJ 2003 Newcastle Disease. pp 64-87 In: Diseases of Poultry, 11th edition. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Bankowski RA 1964 Propagation of Newcastle Disease Virus. pp 231-246. In: Newcastle Disease Virus: An Evolving Pathogen. University Wisconsin Press, Madison.
- de Leeuw OS, Koch G, Hartog L, Ravenshorst N, Peeters BP 2005 Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein. *J Gen Virol* 86:1759-1769.
- Fenner F, McAuslan BB, Mims CA, Sambrook J, White DO 1974 The Biology of Animal Viruses. p 40. Academic Press, London.
- Gravel KA, Morrison TG 2003 Interacting domains of the HN and F proteins of Newcastle disease virus. *J Virol* 77: 11040-11049.
- Heminway BR, Yu Y, Galinski MS 1994 Paramyxovirus mediated cell fusion requires co-expression of both the fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins. *Virus Res* 31:1-16.
- Horvath CM, Paterson RG, Shaughnessy MA, Wood R, Lamb RA 1992 Biological activity of paramyxovirus fusion proteins: factors influencing formation of syncytia. *J Virol* 66:4564-4569.
- Huang Z, Panda A, Elankumaran S, Govindarajan D, Rockemann DD, Samal SK 2004 The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. *J Virol* 78:4176-4184.
- Iorio RM, Glickman RL 1992 Fusion mutants of Newcastle disease virus selected with monoclonal antibodies to the hemagglutinin-neuraminidase. *J Virol* 66:6626-6633.
- Khattar SK, Yan Y, Panda A, Collins PL, Samal SK 2009 A Y526Q mutation in the Newcastle disease virus HN protein reduces its functional activities and attenuates virus replication and pathogenicity. *J virol* 83:7779-82.
- Kumanan K, Venkatesan RA 1994 Adaptation of Newcastle disease virus strains to different cell culture. *Indian J Comp Microbiol Immunol Infect Dis* 15:39-41.
- Kumanan K, Vijayarani K, Padmanabhan VD 1993 Adaptation of a velogenic Newcastle disease virus isolate to Vero cells. *Indian Vet J* 70:993-995.
- Lee YJ, Sung HW, Choi JG, Kim JH, Song CS 2004 Molecular epidemiology of Newcastle disease viruses isolated in South Korea using sequencing of the fusion protein cleavage site region and phylogenetic relationships. *Avian Pathol* 33:482-491.
- Lee YJ, Sung HW, Choi JG, Lee EK, Yoon Y, Kim JH, Song CS 2008 Protection of chickens from Newcastle disease with a recombinant baculovirus subunit vaccine expressing the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins. *J Vet Sci* 9:301-308.
- Lomiczi B 1975 Thermostability of Newcastle disease virus strains of different virulence. *Arch Virol* 47:249-255.
- Mayo MA 2002 A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol* 147:1655-1663.
- Melanson VR, Iorio RM 2004 Amino acid substitutions in the F-specific domain in the stalk of the Newcastle disease virus HN protein modulate fusion and interfere with its interaction with the F protein. *J Virol* 78:13053-13061.
- Mohan CM, Dey S, Kumanan K, Manohar BM, Nainar AM 2007 Adaptation of a velogenic Newcastle disease virus to Vero cells: assessing the molecular changes before and after adaptation. *Vet Res Commun* 31:371-383.
- Panda A, Huang Z, Elankumaran S, Rockemann DD, Samal SK 2004 Role of 250 fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microb Pathog* 36:1-10.
- Peeters BP, de Leeuw OS, Koch G, Gielkens AL 1999 Rescue of Newcastle 253 disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a 254 major determinant for virulence. *J Virol* 73:5001-5009.
- Reddy GS, Srinivasan VA 1992 Use of BHK cell culture-adapted Newcastle disease virus for immunization of chicks. *Vaccine* 10:164-166.
- Reed LJ, Muench H 1938 A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 27:493-497.
- Römer-Oberdörfer A, Werner O, Veits J, Mebatsion T, Mettenleiter TC 2003 Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *J Gen Virol* 84:3121-

- 3129.
- Takimoto T, Taylor GL, Connaris HC, Crennell SJ, Portner A 2002 Role of the hemagglutinin-neuraminidase protein in the mechanism of paramyxovirus-cell membrane fusion. *J Virol* 76:13028-13033.
- 김재홍·송창선 1992 최근의 닭 뉴캐슬병 만연에 따른 원인 과 바이러스의 성장, 진단 및 백신 운용에 관한 고찰. *한 국가금학회지* 19:65-76.
- 박근식 1979 한국에 있어서 뉴캐슬병 발생의 역학적 조사. *한국가금학회지* 6:38-46.
- 최강석 2010 최근 국내에서 유행하는 뉴캐슬병 바이러스의 특성 고찰. *한국가금학회지* 37:89-99.
- (접수: 2012. 3. 10, 수정: 2012. 5. 8, 채택: 2012. 5. 16)