

돼지 폐포탐식세포로부터 adenovirus의 국내분리주 작성

권창희 · 조재진 · 권병준 · 송재영 · 채찬희*

수의과학연구소
서울대학교 수의과대학*
(1996년 7월 18일 접수)

Isolation of adenovirus from porcine alveolar macrophages

Chang-hee Kweon, Jae-jin Cho, Byung-joon Kwon, Jae-young Song, Chanhee Chae*

National Veterinary Research Institute,
College of Veterinary Medicine Seoul National University*

(Received Jul 18, 1996)

Abstract : One cytopathogenic virus was isolated in alveolar macrophages from pig without any apparent respiratory clinical signs. Biophysical properties and electron microscopy of the isolate showed the characteristics of adenovirus. Intracytoplasmic inclusion bodies were seen in virus-inoculated cells. The genetic analysis indicated the presence of DNA with the size of > 20Kb. In a serological survey of 40 serum samples collected from two different farms in slaughter house, 9 sera were positive for neutralizing antibody against the isolate. The potential implications of the isolate as the causative agent in respiratory disorder were discussed.

Key words : adenovirus, porcine alveolar macrophage, biophysical characteristics, serological survey in Korea.

서 론

돼지에 있어서 adenovirus의 감염은 일상적으로 눈에 띄는 경제적 손실을 유발시키지는 않는 질병으로서 보고되어 있다. 그러나 실험동물을 이용한 adenovirus의 감염은 소화기 계통이나 호흡기 계통 장기 전반에 걸쳐 감염될 수 있으며 소화기 장애나 폐렴증상을 보이는 유산 돼야로부터 바이러스의 분리가 보고되어 있다¹⁻⁶.

현재까지 돼지 adenovirus는 4종의 혈청형으로 구분되고 있으며 혈청형에 따른 병원성의 차이가 인정되어 있

다. 이와같은 측면에서 돼지 adenovirus는 광범위한 감염 상태를 일으킬 수 있는 것으로 추측할 수 있으나 실제로 유발시키는 경제적 손실은 확실히 규명되어 있지 않다.

Adenovirus는 약 30-35Kb상당의 linear double stranded DNA를 가지고 있으며 사람의 경우 생체내 비병원성 adenovirus를 이용하여 분자생물학적으로 변형시킨 후 발현백터 또는 유용 유전자 전달매체로서 응용이 활발하게 진행되고 있다⁷⁻¹¹.

우리나라의 경우 돼지 adenovirus의 감염실태나 바이러스 감염에 의한 경제적 손실은 현재까지 확인되어 있지 않은 실정이며 이 바이러스에 대한 연구도 미비하다.

Address reprint request to Dr. Chang-Hee Kweon, National Veterinary Research Institute, Rural Development Administration, Anyang 430-016, Republic of Korea.

본 연구는 자돈의 폐포탐식세포로부터 adenovirus의 분리 및 혈청학적 역학조사결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

세포 : 돼지 폐포 유래 탐식세포는 4-5주령의 정상자돈으로부터 채취하였으며 탐식세포를 배양하였다¹². 초대 돼지 신장 및 고환세포는 건강한 3-4주령 자돈의 장기를 채취하여 2.5% trypsin으로 소화시킨 다음 α -MEM(Gibco BRL) 배지에 10% 우태아혈청(FBS), 항생제(Antibiotic, Gibco BRL)를 첨가하여 배양하였다. 분리한 바이러스를 계대 증식시키기 위한 세포로서 돼지 신장세포주(PK-15) 및 돼지 고환 세포주(ST-line)는 5% 우태아혈청이 함유된 α -MEM(Gibco BRL)으로 증식시킨 후 바이러스를 접종한 다음 2% 우태아혈청으로 유지하였다.

바이러스 분리 및 이화학적 성상시험 : 돼지 폐포탐식세포를 배양하여 세포변성효과를 나타내는 상층액을 채취하여 돼지 초대신장 및 고환세포에 접종한 다음 세포변성효과를 관찰하여 계대하였다. 계대한 바이러스는 -70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 바이러스의 물리화학적 성상은 바이러스 배양 상층액을 이용하여 chloroform, pH 3.0, pH 8.0 및 56℃에서 30분간 처리한 다음 96well(Greiner) 세포배양 용기에 배양된 돼지 초대고환세포나 돼지 고환 세포주에 접종한 다음 5% CO₂ 농도의 배양기내에서 37℃를 유지하였다. 혈구응집반응은 Kweon *et al.*의 방법에 준하여 실시하였다¹². 바이러스의 형태학적 동정은 바이러스를 접종한 돼지 초대신장세포 배양 상층액을 Chu *et al.*¹³이 보고한 방법에 준하여 PEG 6000(M.W.)을 첨가하여 농축한 다음 2% uranyl acetate로 염색하여 전자현미경으로 관찰하였다.

바이러스의 유전자 추출 및 확인시험 : 바이러스의 유전자 추출 및 확인시험은 바이러스 농축액을 proteinase K로 처리한 다음 Kweon *et al.*이 보고한 방법을 따라 phenol과 chloroform을 처리하여 추출하였다¹². 추출한 유

전자는 제한효소인 EcoR I 이나 RNase를 첨가하여 37℃에서 1시간동안 반응시킨 후 제한효소와 RNase를 처리하지 않은 대조군과 함께 0.8% agarose gel에 전기영동하였다.

조직 염색에 의한 adenovirus 봉입체(inclusion body) 형성 확인시험 : Cover slip에 돼지 초대신장세포를 배양한 다음 바이러스를 접종하여 24-48시간 배양하여 채취한 다음 cold acetone으로 고정한 후 직접 H & E 염색을 하여 바이러스의 특이적인 세포질내 봉입체를 광학현미경으로 관찰하였다.

분리한 바이러스에 대한 혈청학적 역학조사 : 1991년 경기도 지역의 2개 농장에서 반입되어 도축되는 돼지로부터 수집된 혈청을 각 20두씩 채취하여 분리된 바이러스에 대한 항체가를 조사하였다. 항체가의 측정은 혈청을 α -MEM 배지에 단계별로 희석한 다음 200 TCID₅₀/ml의 바이러스를 동량 혼합하여 37℃에서 1시간동안 감작시킨 후 돼지 고환세포에 접종하여 1시간동안 흡착시키고 10% 우태아혈청이 첨가된 α -MEM 배지를 동량 첨가하여 배양하면서 세포변성효과를 억제하는 최종단계를 현미경으로 검사하여 판정하였다.

결 과

돼지 폐포 유래 탐식세포로부터 돼지 adenovirus의 분리 : 23두의 자돈 폐로부터 돼지 폐포탐식세포를 추출 배양하였던 바 2두에서 세포변성효과를 나타내었다. 돼지 폐포탐식세포 배양시 세포변성효과는 접종후 8시간부터 관찰되었다. 세포변성효과가 일어난 배양 상층액을 돼지 초대신장세포, 돼지 초대고환세포, 신장세포주, 고환세포주에 접종하였던 바 접종세포 모두에서 세포변성효과를 관찰할 수 있었다(Fig 1).

폐포탐식세포 유래 바이러스의 이화학적 성상 : 국내 폐포탐식세포에서 유래된 adenovirus의 이화학적 성상은 Table 1에 요약되어 있다. 폐포탐식세포 유래 바이러스

Table 1. Biophysical characteristics for a Korean isolate of adenovirus from porcine alveolar macrophage

Korean isolate	chloroform	56℃ 30분	pH 3.0	pH 8.0	HA*	Mouse** (I.C.)
10 ^{5.0} TCID ₅₀ /ml	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ^{2.5}	-	-

* : Hemagglutination test with red blood cells of guinea pig and chicken.

** : Intracerebral inoculation into 2 day-old suckling mice.

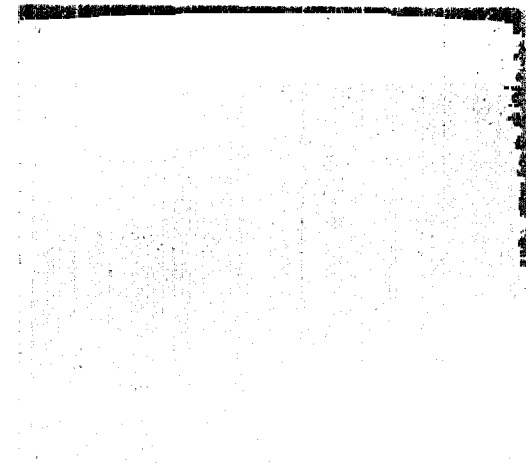
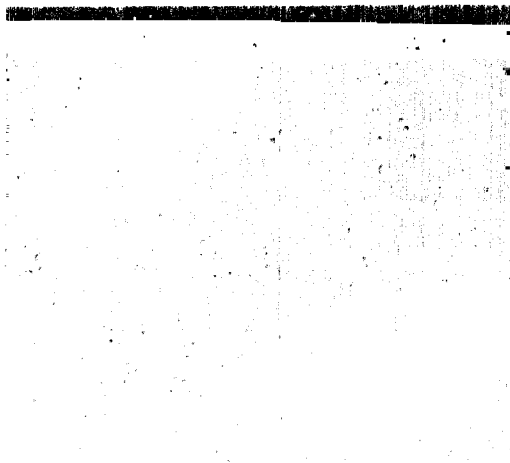
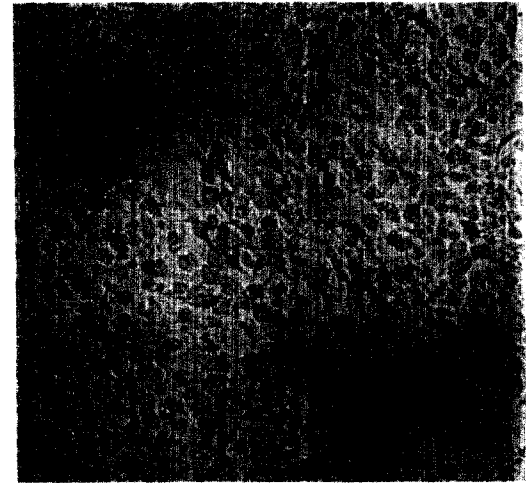
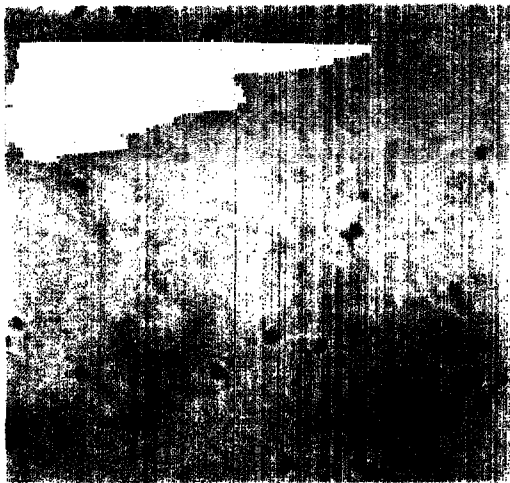
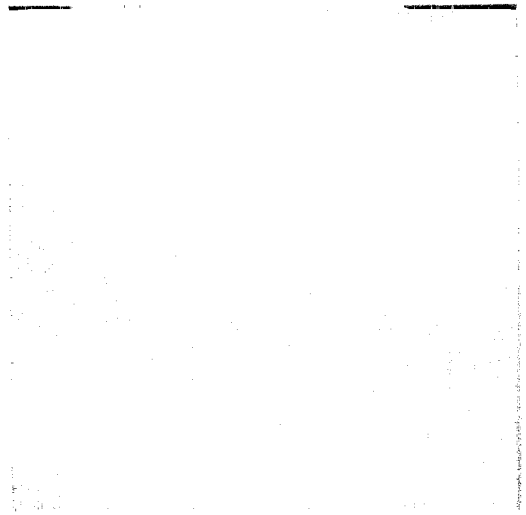
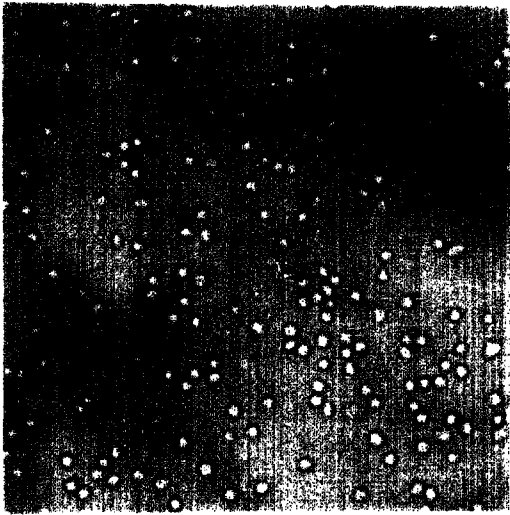


Fig 1. Cytopathic effect(CPE) of the isolate from porcine alveolar macrophage(PAM), porcine primary kidney cells(PPK) and testicle cells(PST).
a) Uninfected PAM b) CPE of PAM(8 hours after culture) c) Uninfected PPK d) PPK after infection with the isolate(96 hours post inoculation) e) Uninfected PST f) PST after infection with the isolate(96 hours post inoculation).

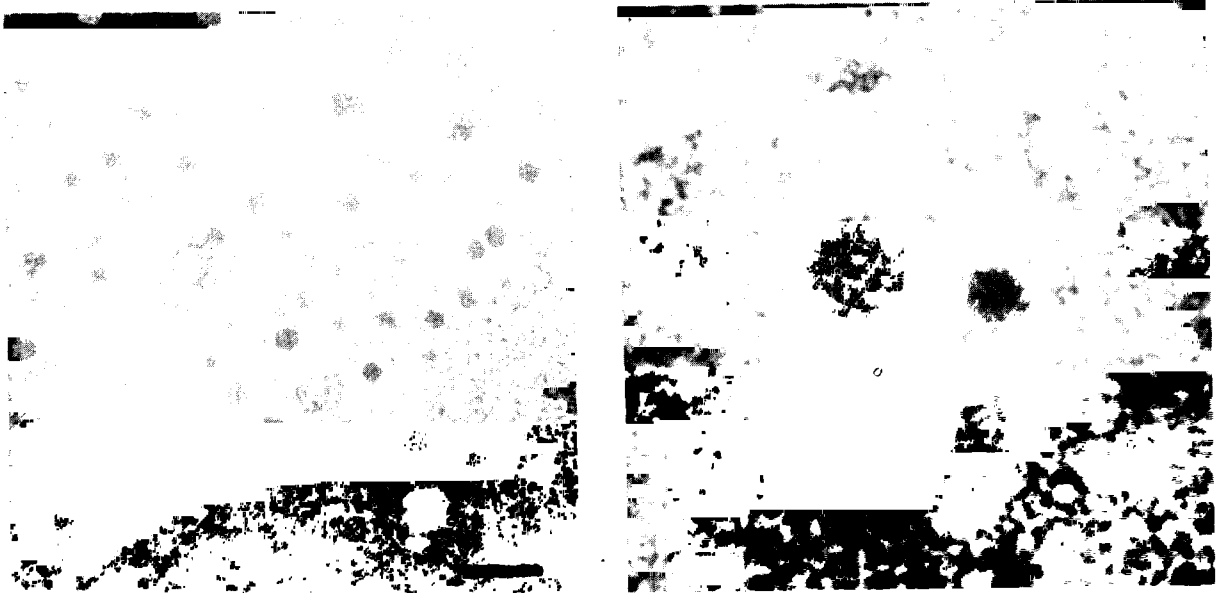


Fig 3. Identification of basophilic intracytoplasmic inclusion body(arrow) from porcine primary kidney cells after inoculation with the adenovirus isolate.

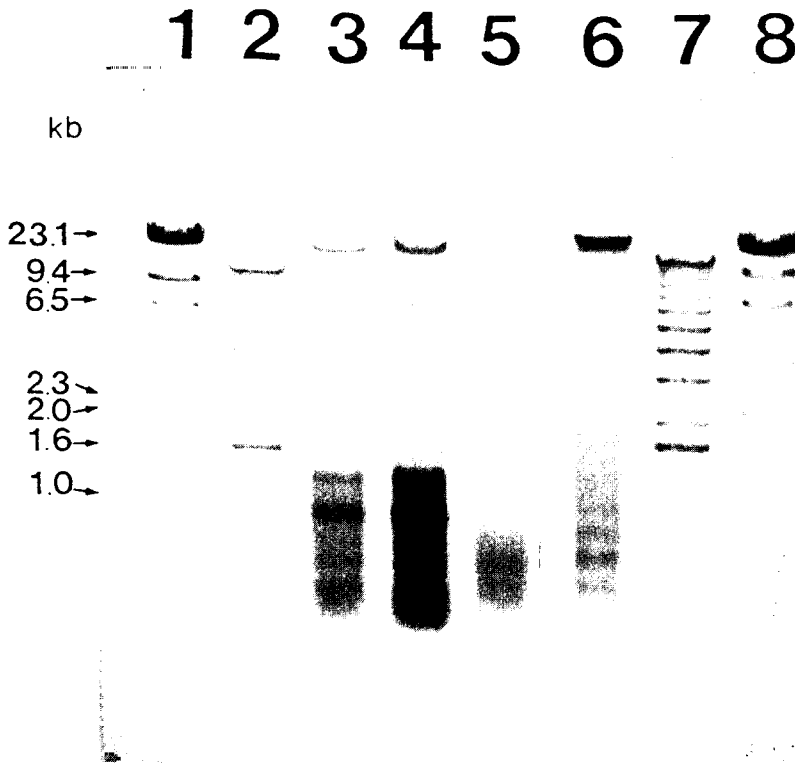


Fig 4. Genetic analysis of the isolate from PAM.

Lane 1 and 8 : Hind III digested DNA Size of each fragment are indicated on left.

Lane 2 and 7 : 1Kb DNA ladders

Lane 3 and 4 : Extracted DNA from isolate before(3) and after concentration(4)

Lane 5 : EcoR I treated sample

Lane 6 : RNase I treated sample

(10_{50} TCID₅₀/ml)는 chloroform 56℃ 30분 처리, pH 3.0의 처리가 바이러스의 감염력에 큰 영향을 미치지 않았으며 마우스 및 닭 적혈구에 대한 혈구응집능력이나 2일령 신생 마우스 뇌내접종시 병원성도 나타나지 않았다. 그러나 pH 8.0의 처리시에는 감염력의 저하를 관찰할 수 있었다.

분리 바이러스의 전자현미경적 관찰 : 분리 바이러스를 농축하여 전자현미경으로 관찰하였던 바 50-80nm의 바이러스 입자를 관찰할 수 있었다(Fig 2). 전자현미경상에서 관찰된 형태학적 소견은 크기가 50-70nm인 adenovirus의 형태학적 특징을 나타내었다(Fig 2).

조직 염색을 이용한 봉입체 및 유전자 분석 : Adenovirus의 특징적인 감염세포의 세포질내 봉입체를 관찰하기 위하여 분리 바이러스를 0.1 multiplicity of infection로

초대 돼지 신장세포에 접종한 후 acetone으로 고정한 다음 H & E 염색하여 관찰한 결과 바이러스 감염에 의한 세포질내 호염성의 봉입체를 관찰할 수 있었다(Fig 3). 또한 바이러스의 유전자를 추출하여 RNase와 제한 효소를 처리한 다음 전기영동을 한 결과 RNase를 처리한 후에도 유전자는 대조군과 동일한 상태로 약 20Kb이상의 크기로 검출되었으며 DNA 제한 효소인 EcoR I 처리하면 유전자의 분해현상을 관찰할 수 있었다(Fig 4).

돼지 adenovirus에 대한 혈청학적 역학조사 : 돼지 adenovirus에 대한 감염실태를 파악하고자 경기도 지역의 2개 농장에서 반입되어 도축되는 돼지로부터 채취한 40두의 혈청으로부터 분리바이러스에 대한 중화항체를 조사한 결과는 40두중 9두의 혈청에서 adenovirus에 대한 세포변성 억제현상을 관찰할 수 있어 22.5%의 항체 양

성울을 나타내었다.

고 찰

돼지 adenovirus는 광범위한 감염실태에도 불구하고 우발적인 병인체로 보고되어 있다. 현재까지 보고된 돼지 adenovirus는 4가지의 혈청형으로 이중 병원성을 갖는 바이러스는 4형으로서 주로 소화기 장애했을 나타내는 설사 변에서 분리되는 바이러스 주로서 규명되어 있다¹⁴.

본 연구는 정상자돈의 폐포담식세포 배양시 분리된 바이러스가 adenovirus로 규명되었지만 4형의 특징인 혈구응집능은 관찰되지 않았다. 그러나 그외 여러 물리화학적 특성 즉, pH 3.0, 56℃ 30분 처리 및 chloroform의 처리시 저항력을 나타내었다는 사실, 전자현미경을 통해 관찰한 형태, 감염세포내 특징적인 봉입체 형성 그리고 유전자 분석 등의 특징은 기존에 보고되었던 adenovirus의 전형적인 물리화학적 및 유전적 특징과 일치하였다¹⁵. 그러므로 본 시험에서 분리된 바이러스는 호흡기 계통에 친화성이 있는 돼지 adenovirus로서 병원성이 있는 것으로 보고된 4형과는 상이한 것으로 추정된다.

실제 Watt *et al.*⁵은 호흡기 상재바이러스로서 adenovirus를 보고하였다는 점과 정상육성돈의 혈청학적 역학검사시 22.5%이상의 높은 항체양성율을 감안할 때 본 연구에서 분리된 adenovirus의 생체내 병원성은 추후 규명되어야 할 흥미로운 과제로 생각된다.

한편 adenovirus와 다른 호흡기에 감염을 일으키는 병원성 세균이나 바이러스와 혼합감염시 생체내 병원성의 증폭이나 억제여부는 현재까지도 해결하지 못한 과제이다. 특히 분자생물학적 기술을 이용한 비병원성 adenovirus의 DNA를 이용하여 외부 유전자 발현매체로서 연구가 활발히 진행되고 있다는 현실을 감안할 때 본 연구에서 분리된 adenovirus의 병원성 여부는 흥미로운 추후 연구과제로 생각된다.

결 론

정상자돈의 폐포담식세포로부터 분리한 바이러스의 이화학적 성상을 조사하였던 바 다음의 결과를 얻었다.

돼지 폐포담식세포 유래 바이러스는 pH 3.0, 56℃에서 30분 처리, chloroform처리시 저항성을 나타내었으며 pH 8.0의 조건하에서는 감염력의 저하를 관찰할 수 있었다.

그러나 기니피그 닭의 RBC에 대한 혈구응집능을 확인할 수 없었으며 1-2일령 마우스의 뇌내접종시 병원성을 나타내지 않았다. 돼지 초대 신장세포에서 H & E 염색시 핵내봉입체를 관찰할 수 있었으며 전자현미경에 의한 검사시 50-70nm의 adenovirus의 특징을 나타내었다. 또한 분리 바이러스의 유전자는 전기영동시 20Kb 이상의 크기를 나타내었으며 RNase의 처리시 영향을 받지 않아 DNA 바이러스로 확인되었다. 실제 분리된 바이러스를 이용 경기도지역의 성돈의 혈청을 대상으로 바이러스에 대한 항체가를 조사한 결과 20%이상의 항체양성을 나타내었다.

이상의 결과로 보아 본 실험에서 돼지 폐포담식세포에서 분리한 바이러스는 돼지 adenovirus로 확인되었으며 추후 병원성에 대한 구체적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글 : 본 연구를 수행하는데 있어서 바이러스의 전자현미경관찰을 위하여 많은 도움을 주신 수의과학연구소 박중원기사님께 진심으로 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Ducatelle R, Coussement W, Hoorens J. Sequential pathological study of porcine adenovirus enteritis. *Vet Pathol*, 19:179-189, 1982 .
2. Kasza L. Isolation of an adenovirus from brain of a pig. *Am J Vet Res*, 27:751-758, 1966.
3. Kasza L, Hodges RT, Betts AO, *et al.* Pneumonia in gnotobiotic pigs produced by simultaneous inoculation of a swine adenovirus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Rec*, 84:262-267, 1969.
4. Kirkbride CA, McAdaragh JP. Infectious agents associated with fetal and early neonatal death and abortion in swine. *J Am Vet Med Assoc*, 172:480-483, 1978.
5. Watt RG. Virological study of two commercial pig herd with respiratory disease. *Res Vet Sci*, 24:147-153, 1978.
6. Narita M, Imada Y, Fukusho A. Pathologic changes caused by transplacental infection with an adenovirus-like agent in pig. *J Vet Res*, 46:1126-1129, 1985.
7. Benko M, Harrach B, D, Halluin JC. Molecular clon-

- ing and physical mapping of the DNA of bovine adenovirus type 4; study of the DNA homology among bovine, human and porcine adenovirus. *J Gen Virol*, 71:465-469, 1990.
8. Berkner KL. Development of adenovirus vector for the expression of heterologous genes. *BioTechniques*, 6: 616-629, 1988.
 9. Berkner KL, Schaffhausen BS, Roberts TM, *et al.* Abundant expression of polyomavirus middle T antigen and dihydrofolate reductase in an adenovirus recombinant. *J Virol*, 61:1213-1220, 1987.
 10. Davison D, Hanssell JA. Overproduction of polyomavirus middle T antigen in mammalian cells through the use of an adenovirus vector. *J Virol*, 61: 1226-1239, 1987.
 11. Eloit M, Gilardi-Hebenstreit P, Toma B, *et al.* Construction of a defective adenovirus vector expressing the pseudorabies virus glycoprotein gp50 and its use as a live vaccine. *J Gen Virol*, 71:2425-2431, 1990.
 12. Kweon CH, Kwon BJ, Lee HJ, *et al.* Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Korea. *Korean J Vet Res*, 34:77-83, 1994.
 13. Chu HJ, Zee YC. Morphology of bovine viral diarrhea. *Am J Vet Res*, 25:103-107, 1984.
 14. Derbyshire JB. In Adenovirus. In Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, Allaire SD, Taylor DI ed. Disease of swine, 7th ed, Iowa State Press, Ames : 11. 225-227, 1992.
 15. Derbyshire JB, Brown EG. The inactivation of viruses in cattle and pig slurry by aeration or treatment with calcium hydroxide. *J Hyg*, 82:293-299, 1979.