최 종
연구보고서

# 돼지 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방 백신 개발

# Development of Vaccine for Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome

연구기관
서울대학교

농 림 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방 백신 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 월 일

주관연구기관명 : 서울대학교
총괄연구책임자 : 채 찬 희
세부연구책임자 : 이 창 우
세부연구책임자 : 윤 여 성
연 구 원 :
연 구 원 :
연 구 원 :
연 구 원 :
연 구 원 :
연 구 원 :
연 구 원 :

# 요 약 문

Ⅰ. 제 목

돼지 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방 백신 개발에 관한 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

국내의 양돈산업은 꾸준히 증가하여 2003년 말 기준 총 사육두수가 약 9백 20만 두가 되었다 (농림부 가축 사육통계). 또한 조류독감 및 광우병 파동으로 인한 돼지고기의 상대적인 가격상승으로 인해 앞으로도 양돈 산업은 지속적인 성장을 계속하리라 예측된다. 하지만 IMF 외환위기 이후 지속된 경제의 불황으로 인하여 국내의 양돈 산업은 질적인 성장보다는 양적인 성장을 지속해왔다. 한정된 사육시설에서 점점 더 많은 수의 돼지를 사육하게 되었다. 이러한 사육환경의 저하로 인한 질병의 발생은 사육두수의 증가와 더불어 폭발적으로 증가하였다. 최근 이러한 상황에서 국내 양돈농가에서 문제가 되고 있는 질병이 바로 이유자돈 전신성 소모성 증후군 (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS)이다.

이유자돈 전신성 소모성 증후군은 1991년 캐나다의 Clark 등에 의해서 최초로 보고된 질병으로 주로 5주령에서 10주령 사이의 이유자돈 및 11주령에서 13주령 사이의 육성돈에서 위축, 설사 및 만성 호흡기 질환 등 만성염증을 특징으로 하는 바이러스성 전염병이다. 현재까지 원인체로는 돼지 써코바이러스 2형 (Porcine circovirus type 2, PCV2)이 보고되었으나 아직까지 정확한 병인론은 밝혀져 있지 않다.

몇몇 감염실험을 통하여 돼지 써코바이러스 2형을 단독으로 감염시켰을 때에는 이유자돈 전신성 소모성 증후군이 발현되지 않았으며, 파보바이러스와 혼합 접종하였을 때 전형적인 질병이 발현되었다. 또 최근 연구결과에 따르면 면역을 촉진시키는 물질과 돼

지 써코바이러스 2형을 함께 접종하였을 때 이유자돈 전신성 소모성 증후군이 발현하는 것으로 보아, 돼지 써코바이러스 2형이 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 발현하는 데에는 다른 병원체의 2차적인 감염, 강력한 면역촉진 유발인자가 들어있는 백신 등을 통한 면역계의 이상이 반드시 필요한 것으로 추정하고 있다.

국내에서는 1997년 서울대학교 수의과대학 본 연구실에서 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 최초 발생을 보고하였으며 1997년 최초 보고한 이래로 국내에서 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 발병양상은 해를 거듭하면서 폭발적인 증가양상을 보이고 있다. 국내 첫 발병을 보고한 1997년과 1998년에는 10건의 발병도 발생되지 않았지만 1999년에는 50건으로 1998년보다 10배 이상 발병되었으며, 2001년에는 225건으로 2년 전 보다는 3배, 국내에서 첫 발병해인 1997년보다는 100배 이상의 폭발적인 발병양상이 관찰되고 있다(본 연구실 자체 통계). 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 원인체인 돼지 써코바이러스 2형은 일반적인 세정제나 소독제에 매우 저항성이 강하여 감염된 건물 전체를 비감염 상태로 만드는 것은 매우 어렵다. 또한 웅돈의 정액이나 모돈의 태반을 통하여 수직 전파되며, 분변, 타액, 공기를 통하여 쉽게 수평전파 된다. 현재 국내의 자돈들 중 약 70%에서 돼지 써코바이러스 2형에 이미 감염되어 있으며, 이들 중 약 10%에서만 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 증상을 보이고 있다. 현재까지는 높은 감염수치에 비하여 증상을 보이는 자돈이 많지 않은 편이지만 나머지 90% 자돈들도 언제든지 이유자돈 전신성 소모성 증후군이 발병될지 모르는 형편이다.

이유자돈 전신성 소모성 증후군의 폭발적인 증가양상은 아직까지 효과적인 백신이나 예방법의 부재에 기인한다. 또한 백신 및 예방법이 개발되지 않는 이유는 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 정확한 병인론이 밝혀지지 않았기 때문이다. 국내뿐만 아니라 국제적으로도 이유자돈 전신성 소모성 증후군에 의한 양돈 산업의 피해는 심각한 수준이며, 현재 국제적인 동물약품 업체들은 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방백신의 개발에 경쟁적으로 뛰어들어 막대한 자본을 투자하고 있다. 그러나 아직까지 효과적인 백신이 개발되지는 않고 있다. 여기에는 여러 가지 이유가 있겠지만, 우선 돼지 써코바이러스 2형이 이미 많은 돈군에 감염이 되어 있으며, 현재 개발·사용되고 있는 백신들의 추세는 보다 강력한 면역력을 획득하기 위해서 다양한 adjuvant를 함께 넣고 있는데

이 adjuvant들이 돼지 써코바이러스 2형의 예방보다는 오히려 증상을 악화시키는 역할을 하기 때문이다. 그러므로 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 예방백신을 개발하는데 이러한 상황을 충분히 고려해야 할 것이다.

국내 많은 양돈 농가들은 이유자돈 전신성 소모성 증후군으로 인하여 큰 경제적 손실을 입고 있으며 이러한 상태를 장기간 방치했을 경우 국내 양돈 산업의 위기 및 국내 축산 질병에 관련된 국가 연구기간이나 수의과대학 등 관계기관에 대한 불신감을 확산 시킬 수 있다.

그러므로 본 연구의 목적은 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 정확한 병인론을 밝히고 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 실험적으로 100% 재현할 수 있는 질환 모델을 개발하는 것이 첫 번째 목표이며, 이 결과를 토대하여 막대한 경제적 부가가치를 창출할 것으로 기대되는 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 예방하기 위한 효과적인 백신을 개발하는 것이 이 연구과제의 최종 목표이다.

## Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 이유자돈 전신성 소모성 증후군 병인론 및 질환 모델 개발

이유자돈 전신성 소모성 증후군의 병인론 연구 및 질환모델을 개발하기 위하여 다음과 같은 연구를 수행하였다.

#### 가. 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 이용한 이유자돈 전신성 소모성 증후군 모델의 분자병리학적 연구

1) 돼지 써코바이러스 2형 배양
2) 돼지 파보바이러스 배양
3) 돼지 써코바이러스 2형과 파보바이러스를 이용한 이유자돈 전신성 소모성 증후군 감염실험

4주령 자돈 40두를 준비하고 10마리씩 4개 군으로 나눈다. 1) 바이러스를 접종하지 않은 음성군, 2) 돼지 써코바이러스 2형만을 접종한 군, 3) 돼지 파보바이러스만을 접종한 군, 4) 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 혼합 접종한 군. 각각의 군의 특성에 맞게 바이러스를 접종하고 접종 후 28일에 부검한다.

4) 조직내 교잡법을 통한 돼지 써코바이러스 2형 DNA 발현정도 실험

접종 실험을 통해서 얻은 조직으로부터 돼지 써코바이러스 2형의 감염 기관, 감염 정도를 알아보기 위하여 조직내 교잡법 (In Situ Hybridization)을 실시하였다.

5) 조직내 교잡법을 통한 돼지 파보바이러스 DNA 발현정도 실험

접종 실험을 통해서 얻은 조직으로부터 돼지 파보바이러스의 감염 기관, 감염 정도를 알아보기 위하여 조직내 교잡법을 실시하였다.

6) 조직내 교잡법을 통한 TNF-α핵산 발현실험

만성염증반응 및 식용억제 물질인 cachectin로 작용하는 주요한 싸이토카인(cytokine)인 Tumor Necrosis Factor-α(TNF-α)의 발현정도 및 발현 분포를 확인하기 위하여 조직내 교잡법을 실시하였다.

7) 조직내 교잡법을 통한 MCP-1 핵산 발현실험

만성염증반응에 관계된 주요한 케모카인(chemokine)인 Monocyte Chemo-attractant Protein-1 (MCP-1)의 발현정도 및 발현 분포를 확인하기 위하여 조직내 교잡법을 실시하였다.

8) 조직내 교잡법을 통한 MIP-1 핵산 발현실험

만성염증반응에 관계된 주요한 케모카인(chemokine)인 Macrophage inflammatory Protein-1 (MCP-1)의 발현정도 및 발현 분포를 확인하기 위하여 조직내 교잡법을 실시하였다.

나. 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 이용 이유자돈 전신성 소모성 증후군 모델의 임상병리학적 연구

1) 임상병리학적 체중과 증체율 변화 관찰

접종실험 시 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 주요한 임상증상인 위축을 판정하

기 위하여 3일간격으로 체중을 측정하고 증체율을 관찰하였다.

2) 임상병리학적 ELISA을 이용한 TNF-α 분비실험

접종실험 시 3일 간격으로 채혈한 혈액으로부터 TNF-α를 ELISA를 이용하여 측정하였다.

3) 임상병리학적 빈혈 검사

접종실험 시 3일 간격으로 채혈한 혈액으로부터 적혈구 수를 측정하여 빈혈을 판정하였으며, 골수를 채취하여 조직검사도 병행 실시하였다.

다. 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 이용한 이유자돈 전신성 소모성 증후군 모델의 병리조직학적 연구

바이러스 접종후 7, 14, 21, 28, 35일에 각 군별로 부검을 실시하여 현미경으로 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 특이적인 육아종성병변과 포도송이 모양의 호염성의 세포질내 봉입체나 거대다핵세포의 유무을 임파장기 내에서 관찰하였다.

2. 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 혼합백신을 이용한 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방 연구

가. 돼지 써코바이러스 2형과 파보 바이러스 사독백신 제작

분리된 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 이용하여 돼지 써코바이러스 2형 단독 백신 및 혼합 백신을 제작한다.

나. 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방효과 평가

1) 백신을 이용한 공격접종 실험

백신을 1주령 1cc, 3주령에 1cc 추가접종 하였으며, 4주령에 바이러스를 공격 접종 하였다.

2) 조직내 교잡법을 통한 돼지 써코바이러스 2형 DNA 발현정도 실험

3) 조직내 교잡법을 통한 돼지 파보바이러스 DNA 발현정도 실험

4) 조직내 교잡법을 통한 TNF-α핵산 발현실험

5) 조직내 교잡법을 통한 MCP-1 핵산 발현실험

6) 조직내 교잡법을 통한 MIP-1 핵산 발현실험

7) 체중과 증체율 변화 관찰

8) ELISA을 이용한 TNF-α 분비실험

9) 빈혈 검사

10) 병리조직학적 변화 관찰

## Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 연구 개발 결과

가. 이유자돈 전신성 소모성 증후군 병인론 및 질환 모델 개발

이유자돈 전신성 소모성 증후군의 주요 원인체인 돼지 써코바이러스 2형을 이유자돈 전신성 소모성 증후군에 감염된 돼지로부터 돼지 써코바이러스에 감염되어 있지 않은 PK-15 cell line을 이용하여 분리(SNUV000463). 증식($1.2 \times 10^5$ $TCID_{50}$/ml)하였으며, 돼지 써코바이러스 2형이 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 유발하는데 중요한 역할을 담당하는 돼지 파보바이러스를 Swine testicle (ST) cell line을 이용하여 분리(SNUV000464), 증식($1.3 \times 10^5$ $TCID_{50}$/ml) 하였다. 이들 국내에서 분리한 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 이용하여 4주령 돼지에 공격접종 실험하였다.

접종 후 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 2형을 혼합 접종한 군에서 심한 위축, 기침, 설사, 황달 등 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 임상증상을 보였으며 5주후 부검 및 조직병리학적 검사결과 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 전형적인 육아종성병변 및 세포질내 포도송이 모양의 세포질내 봉입체를 관찰할 수 있었다. 반면에 돼지 써코바이러스 2형만을 단독으로 접종한 군에서는 임상증상이나 병변의 정도가 모두 혼합접종군에 비하여 경미하였으며, 파보바이러스 단독 접종군과 바이러스를 접종하지 않은 군에서는 병변이 관찰되지 않았다.

접종 실험을 통하여 얻은 조직으로부터 돼지 써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스에 대한 조직내교잡법을 수행한 결과 감염 일령이 증가 할수록 바이러스에 감염된

세포의 수가 급격히 증가 하는 것을 알 수 있었으며 감염부위는 폐, 간, 심장, 비장, 소장, 림프절, 편도선 등 주요 장기에서 거의 모두 감염이 이루어 지고 있었다. 만성염증의 주요 유발 물질이자 병변 형성에 관여하는 싸이토카인인 TNF-α와 케모카인인 MCP-1, MIP-1에 대한 조직내교잡법을 수행한 결과에서도 이들 싸이토카인 및 케모카인이 돼지 써코바이러스가 감염된 육아종성 염증을 보이는 부위에서 발현하는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 돼지 써코바이러스가 TNF-α, MCP-1, MIP-1의 발현을 유도하고, 이들 물질에 의해서 거대다핵세포 등의 육아종성 염증병변이 형성되는 것으로 추정해 볼 수 있다.

접종 실험을 통하여 이유자돈 전신성 소모성 증후군에 실험적으로 감염된 자돈으로부터 채혈한 혈액에서 만성염증에 관여하는 싸이토카인인 TNF-α에 대한 ELISA를 실시한 결과 접종 초기에 TNF-α의 혈액내 발현양이 급격히 증가하였으며 감염일령이 증가 할수록 TNF-α가 서서히 증가하여 접종 기간 내내 높은 발현양을 유지하는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 육아종성염증의 형성과 TNF-α가 상호 밀접한 연관이 있음을 말해주고 있으며, 식용억제 물질인 cachectin으로 작용하는 TNF-α가 혈액내에 높은 농도로 발현되므로 돼지 써코바이러스 2형이 자돈들의 식욕억제에 간접적으로 작용하여 위축을 유발하는 하는 것으로 밝혀졌다.

이유자돈 전신성 소모성 증후군에 실험적으로 감염된 자돈을 가지고 혈액학적인 분석을 실시한 결과 이유자돈 전신성 소모성 증후군에 감염된 자돈에서 심한 빈혈 증상이 관찰되었으며, 골수를 채취하여 분석한 결과 많은 골수 세포에서 돼지 써코바이러스 2형에 감염된 것을 확인 할 수 있었으며, 돼지 써코바이러스 2형의 감염에 의한 빈혈의 유발을 확인 할 수 있었다.

위 결과를 종합해 보면 이유자돈 전신성 소모성 증후군은 돼지 써코바이러스 2형 단독 감염으로는 심한 증상이 유발되지 않으며 돼지 파보바이러스가 혼합감염 될 때 전형적인 이유자돈 전신성 소모송 증후군을 유발하는 것을 알 수 있었다. 또한 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 주요한 임상증상인 심한 위축은 돼지 써코바이러스 2형 감염에 의한 식욕억제 물질인 TNF-α의 발현양 증가로 유발되는 것으로 밝혀졌다. 또한 전형적인 육안 병변인 거대다핵세포 및 육아종성염증 병변은 돼시 써코바이러스 2형 감

염으로 유도되는 TNF-α, MCP-1, MIP-1 등에 의해서 형성되는 것이다.

본 연구를 통하여 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 질환모델을 국내분리 돼지써코바이러스 2형(SNUV000463)과 돼지 파보바이러스(SNUV000464)를 이용하여 확립하였으며, 이 모델을 이용하여 이유자동 전신성 소모성 증후군 예방 연구 및 만성염증반응 연구에 활용할 수 있을 것이다.

나. 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 혼합백신을 이용한 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방 연구

이유자돈 전신성 소모성 증후군으로 진단된 이유자돈으로부터 원인체인 돼지 써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스를 분리하였으며, 순수하게 국내에서 분리한 돼지 써코바이러스 2형 (SNUV000463)을 백신제조를 위하여 PK-15 cell line을 이용하여 대량으로 증식하였으며 돼지 파보바이러스(SNUV000464)는 Swine testicle (ST) 세포를 이용하여 대량으로 증식하였다. 대량으로 증식한 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스에 포르말린을 첨가하여 불활화한 후에 알루미늄겔을 첨가하여 돼지써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스 혼합 사독백신을 제작하였다.

백신의 효능을 알아보기 위하여 1주에 1cc, 3주에 추가로 1cc씩 백신을 근육접종하고 4주에 바이러스를 접종하는 실험을 실시한 결과 백신을 투여하지 않은 양성대조군의 경우 심한 위축, 기침, 설사, 황달 등 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 임상증상을 보였으나 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 혼합백신 접종군의 경우 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 임상증상이 전혀 관찰되지 않았다. 또한 공격접종 5주후 실시한 부검 및 조직병리학적 검사결과에서도 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 전형적인 육아종성병변 및 세포질내 포도송이 모양의 세포질내 봉입체가 관찰되지 않았다. 이후 실시한 분자병리학적 실험에서도 돼지 써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스의 증식이 대조군에 비하여 확연히 억제되는 등 본 연구를 통하여 개발한 돼지 써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스 혼합백신이 이들 바이러스의 감염을 효과적으로 예방하는 것으로 판명되었다.

2. 활용에 대한 건의

가. 이유자돈 전신성 소모성 증후군 병인론 및 질환 모델 확립

본 연구를 통하여 밝혀진 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 병인론 및 질환모델은 돼지 써코바이러스 2형의 연구에 중요한 핵심 자료를 제공할 것이며, 질병을 컨트롤 하는데 많은 도움을 줄 것이다. 또한 앞으로 추가로 개발될 백신 등 예방연구에도 지속적으로 이용될 수 이용될 수 있다. 또한 이유자돈 전신성 소모성 증후군은 전형적인 바이러스성 만성 육아종성 염증 반응을 일으키는데 이번 예방연구를 통하여 얻은 TNF-α 및 싸이토카인·케모카인 연구와 빈혈 연구 결과는 이유자돈 전신성 소모성 증후군에서 관찰되는 만성 육아종성 염증반응에서 관찰되는 거대다핵세포의 생성 기전 및 중요한 임상증상인 체중감소 그리고 빈혈의 병인론 연구에 좋은 정보를 제공하였다. 또한 본 연구과제를 통하여 식욕억제 물질인 cachectin로 작용하는 TNF-α의 작용을 최초로 증명하였는데 이는 앞으로 가축의 생산성 향상에 기여할 것이다. 현재까지 본 연구과제를 통하여 얻은 실험결과는 이미 외국의 저널에 3~4편이 발표되었으며, 앞으로도 2~3편 이상이 투고될 예정이다.

나. 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방 백신 개발

본 연구과제를 통하여 개발되어 효과가 입증된 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방백신은 국내의 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방 및 컨트롤에 많은 효과를 보일 것이다. 또한 본 예방백신은 국제적인 개발 경쟁이 치열한 백신이므로 하루빨리 제품화를 해야 한다. 빠른 시일 이내에 국내의 동물약품업체에 기술이전을 통한 제품화 및 대량생산을 시도해야 한다. 또한 본 백신은 국제적으로 첫 번째로 상업화가 가능한 백신이므로 수출을 통한 많은 부가가치의 창출도 기되 된다.

# SUMMARY

Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) is causally associated with infection by porcine circovirus 2 (PCV2) (Allan and Ellis, 2000; Kim and Chae, 2001a, b). PMWS occurs in swine herds that are usually in good health; it has a low morbidity rate but is associated with a relatively high fatality rate in 5- to 12-week-old pigs. Clinically, the disease is characterized by progressive weight loss, respiratory signs and jaundice. Histopathologically, it is characterized by widespread granulomatous inflammation, multinucleated giant cells, and variable numbers of intracytoplasmic basophilic viral inclusion bodies within infiltrating histiocytes and macrophages.

Since its first description in Western Canada, PMWS has been reported in many swine-raising countries, most notably in North America, Europe and Asia. PMWS has recently become recognized as an important disease of swine in Korea. In the 2-year period 1999-2000, tissues from over 1500 postweaning pigs were examined diagnostically at the Department of Veterinary Pathology, Seoul National University. PMWS was diagnosed in 133 cases (8.1 %), which represented a 5-fold increase in cases diagnosed in the previous two years. Natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), recorded from January 1999 to December 2000, were determine the prevalence, microscopic lesions, and other coexisting pathogens associated with PMWS. One hundred and thirty three (8.1%) of the 1634 pigs submitted from 1243 pig farms were diagnosed for PMWS. The majority of cases (113 cases, 85.0%) was dual infection with other pathogens. The combination of PCV2 and *Hemophilus parasuis* (43 cases, 32.3%) was shown to be the most prevalent followed by PCV2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (39 cases, 29.3%).

This project is consists of two main parts: pathogenesis of postweaning

multisystemic wasting syndrome, development of vaccine for postweaning multisystemic wasting syndrome.

Thirty-two colostrum-deprived conventional pigs aged 28 days were co-infected with Korean isolates of porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV) for a period of 35 days post-inoculation (dpi). Histopathologically, granulomatous inflammation, with or without intracytoplasmic inclusion bodies, was present in lymphoid tissues (e.g., lymph nodes, thymus, spleen and tonsil) from 20 dpi, being most severe at 24 dpi. PCV2 and PPV DNA were detected in the lymph nodes from 3 to 35 dpi by in-situ hybridization, but the labelling for both viruses was particularly intense and widespread at 20 and 24 dpi. A close relationship between the cells labelled for PCV2 and those labelled for PPV was revealed by examination of serial sections from lymph nodes, and PCV2 and PPV were also detected in peripheral blood monocytes from 3 to 35 dpi. Other tissues and cells in which PCV2 and PPV DNA were detected included macrophages in the tonsil, thymus, spleen, lung, liver, kidney and heart. Significantly more PCV2-positive cells than PPV-positive cells were detected in the lymph nodes at 5 to 35 dpi. The pathogenesis of PMWS reproduced in this study may be suggested thus: initial virus entry through tonsillar macrophages, followed within 3 days by viraemia; PCV2 and PPV replicate, at least to some extent, in circulating peripheral monocytes, contributing to the cell-associated viraemia and to virial distribution throughout the lymphoid tissues.

In an experiment, the expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 was determined in granuomatous inflammation of the lymph node by semiquantitative reverse transcrition-polymerase chain (RT-PCR), granulomatous lesion score, and in situ hybridization over a period of 35 days after intranasal inoculation by porcine circovirus 2. Maximum MCP-1 and MIP-1 expression was observed in pigs at 21 dpi followed by most severe

granulomatous lesions at 24 dpi. Detection of MCP-1 and MIP-1 expressing cells precedes granulomatous inflammation formation. A very close cell to cell correlation between PCV2 and chemokines (MCP-1 and MIP-1) in serial sections from lymph nodes suggests that induction of MCP-1 and MIP-1 is a direct response to PCV2. The results described in this study provide evidence for the ability of MCP-1 and MIP-1 to induce granulatous inflammation in vivo.

This study investigated the potentiation of porcine circovirus 2 (PCV2)-induced postweaning multisystemic wasting syndrome by porcine parvovirus (PPV) and found it was associated with excessive production of tumor necrosis factor-α (TNF-α). Colostrum-deprived conventional pigs were inoculated intranasally with PCV2 and PPV alone or in combination (PCV2 and PPV). In vitro assay of TNF-α, obtained from alveolar macrophages coinfected with PCV2 and PPV showed a significant increase in TNF-α compared to single infection of macrophages with either PCV2 or PPV alone ($P < 0.05$). All pigs inoculated with PCV2 and PPV developed severe postweaning wasting syndrome whereas pigs that were inoculated with PCV2 or PPV alone did not. Compared to the pigs inoculated with PCV2 or PPV alone, pigs inoculated dually with PCV2 and PPV showed significantly ($P < 0.05$) increased levels of TNF-α. Levels of TNF-α in the sera were reversely correlated with the body weight in pigs experimentally infected with dual inoculation of PCV2 and PPV ($r_s = -0.92$, $P < 0.001$). These data demonstrate a potentiation of PPV in PCV2-associated PMWS by the excessive production of TNF-α.

The present study demonstrated that hematopoietic cells in the bone marrow is important targets for the PCV2 infection. The role of PCV2 infection in the pathogenesis of anemia remains unclear. Evidence for this comes from immunohistochemical study of bone marrows from pigs at various times following infection with PCV2 at 28 day old. The hematopoietic cells in the bone marrows

are the cells in which PCV2 antigen is detected after infection. Therefore, PCV2 has been implicated in bone marrow failure by a variety mechanisms, including virus infection of hematopoietic cells. Although PPV clearly potentiated PCV2-associated anemia in dually infected pigs, PPV was difficult to demonstrate in bone marrow. There are precedents for the synergistic effects of other viruses in potentiating circovirus disease.

Since no PCV2 vaccine was available so far, we have developed a specific killed vaccine against PMWS. This vaccine is mixture of killed PCV2 and PPV with formalin. The piglets received two times injection; a first injection at 7 days old and a second injection at 21 days old. And PCV2 and PPV was inoculated a seven days later. As evaluated by growth parameters, clinical signs, seroconversion, the pigs were protected against PCV2 and PPV challenge after vaccination. This vaccine induces protective immunity against PCV2 and PPV infection and could potentially serve as an effective vaccine.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction ····· 19

Chapter 2. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting system ····· 24
Part 1. Introduction ····· 24
Part 2. Materials and Methods ····· 26
1. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome using korean strain of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus ····· 26
2. Relationship of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus ····· 30
3. Production of tumor necrosis factor-α ····· 33
4. Cause of anemia ····· 37
5. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammation protein-1 ····· 38
Part 3. Results and Discussion ····· 41
1. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome using korean strain of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus ····· 41
2. Relationship of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus ····· 49
3. Production of tumor necrosis factor-α ····· 56
4. Cause of anemia ····· 64
5. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammation protein-1 ····· 67

Chapter 3. Development of vaccine for Postweaning multisystemic wasting system ····· 72
Part 1. Introduction ····· 72
Part 2. Materials and Methods ····· 74

1. Production of vaccine ····· 74
2. Protection effect of vaccine for postweaning multisystemic wasting syndrome ····· 77
Part 3. Results and Discussion ····· 88
1. Production of vaccine ····· 88
2. Protection effect of vaccine for postweaning multisystemic wasting syndrome ····· 90

Chapter 4. Reference ····· 102

# 목 차

제 1 장 서 론 ····· 19

제 2 장 이유자돈 전신성 소모성 증후군 병인론 및 질환 모델 개발 ····· 24
제 1 절 서 설 ····· 24
제 2 절 재료 및 방법 ····· 26
1. 국내분리 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 이용한 이유자돈 전신성 소모성 증후군 질환모델 개발 ····· 26
2. 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스의 상관관계 분석 ····· 30
3. 성장정체를 유발하는 식욕억제 물질(cachectin) TNF-α의 분석 ····· 33
4. 이유자돈 전신성 소모성 증후군에서 관찰되는 빈혈의 원인 분석 ····· 37
5. 화학주성인자(Chemokine) MCP-1, MIP-1 분석 ····· 38
제 3 절 결과 와 고찰 ····· 41
1. 국내분리 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 이용한 이유자돈 전신성 소모성 증후군 질환모델 개발 결과 ····· 41
2. 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스의 상관관계 분석 결과 ····· 49
3. 성장정체를 유발하는 식욕억제 물질(cachectin) TNF-α의 분석 결과 ····· 56
4. 이유자돈 전신성 소모성 증후군에서 관찰되는 빈혈의 원인 분석 결과 ····· 64
5. 화학주성인자(Chemokine) MCP-1, MIP-1 분석 결과 ····· 67

제 3 장 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방 백신 개발 ····· 72
제 1 절 서 설 ····· 72
제 2 절 재료 및 방법 ····· 74
1. 백신의 제조 ····· 74
2. 백신에 의한 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방효과 평가를 위한 바이러스 공격접종 실험 ····· 77

제 3 절 결과 와 고찰 ····· 88
1. 백신의 제조 결과 ····· 88
2. 백신에 의한 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방효과 평가를 위한 바이러스 공격접종 실험 결과 ····· 90

제 6 장 인용문헌 ····· 102

# 제 1 장 서 론

이유자돈 전신성 소모성 증후군(posteweaning multisystemic wasting syndrome)은 1991년 캐나다에서 처음 발견되었다. 이 후 이유자돈 전신성 소모성은 미국, 아일랜드와 스페인에서도 발견되었으며, 1997년 한국에서도 발견되었다. 이유자돈 전신성 소모성 증후군은 주로 5주령에서 10주령 사이의 이유자돈과 11주령에서 13주령 사이의 육성돈 초기에서 발병하며, 임상적으로는 전체적으로 발육이 억제되어 있으며, 피모가 창백하며, 가끔 황달증상이 관찰된다. 이유자돈 전신성 소모성 증후군에 감염된 조직에서 면역 조직화학법과 조직내 교잡법을 실시해본 결과 돼지 써코바이러스(circovirus) 항원과 핵산이 검출되어 돼지 써코바이러스가 중요한 원인체로 추정하고 있다.

돼지 써코바이러스는 돼지 신장 세포주인 PK-15 cell line에 불현성 감현되어 있는 것이 1974년 밝혀졌다. 신장 세포주에서 분리한 바이러스를 분석한 결과 단선(single-stranded)의 1.76kb의 DNA 바이러스로 밝혀졌다. 전자현미경을 통한 형태학 연구와 DNA 게놈을 분석한 결과, 새로운 동물 바이러스과(family)인 Circoviridae로 확인되었다. 돼지 써코바이러스는 크게 2개의 형태로 분리된다. 돼지 써코바이러스 1형은 돼지 신장 세포주인 PK-15 cell line에 감염된 바이러스이다. 돼지 써코바이러스 2형이 바로 최근 발견된 새로운 질병인 이유자돈 전신성 소모성 증후군과 관련이 있는 바이러스이다. 이들 두 바이러스를 유전학적으로 비교하면 아미노산 동질성은 80%로 나타나고 있다. 최근 돼지 써코바이러스 2형을 이유자돈에게 접종하여 자연 발생과 유사한 병변을 실험적으로 재현하였다. 돼지 써코바이러스 2형만을 단독으로 돼지에게 접종하였을 때에는 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 자연 감염 케이스의 병변이 유발되지 않는다. 반면 돼지 써코바이러스 2형과 파보바이러스를 동시에 접종하였을 경우에만 자연감염과 유사한 병변이 재현되는 것으로 확인되었다.

이유자돈 전신성 소모성 증후군을 연구하는데 가장 중요한 부분은 실험적으로 이유자돈 전신성 소모성 증후군 모델을 확립하는 것이다 이미 질병 이름에서도 알 수 있듯이 증후군이라는 질병은 아직까지 병인론 등이 잘 밝혀져 있지 않는 질병을 의미한다. 따라서 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 예방 프로그램을 연구하는데 가장

중요한 부분은 이유자돈 전신성 소모성 증후군 모델 확립에 있다. 전 세계적인 문헌 조사에서도 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 모델을 정립한 실험실은 아일랜드와 캐나다 미국의 공동 연구단에서만 성공하여 논문을 발표한 실정이다. 따라서 기술적 측면에서 국내 실정에 적합한 이유자돈 전신성 소모성 증후군 모델을 확립하는 것 이 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방 프로그램에서 매우 중요한 사항이다.

이유자돈 전신성 소모성 증후군은 전형적인 만성 염증반응을 유발한다. 만성 염증반응은 급성 염증반응과 달리 주로 대식세포에 의해서 유발되며, 이러한 만성염증 반응에서 중요한 역할을 하는 물질에는 싸이토카인(cytokine)과 케모카인(chemokine)이 있다. 싸이토카인 중에서 만성염증 반응에 관련 있는 물질은 tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin-1(IL-1) 등이 있으며, 케모카인 중에서는 monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)이 있다. TNF-α는 대식구와 림프구가 바이러스 등의 원인체에 자극을 받으면 분비하는 물질로 혈중 단핵세포, 림프구 및 혈관 내피세포에서 유착물질을 발현시켜 만성염증 반응에 관여하는 대식세포가 만성염증 부위로 이동하게 한다. TNF-α는 대표적인 식욕억제 물질인 cachectin으로써, 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 대표적인 임상증상인 소모성 증상을 일으키는데 주요한 역할을 시행하는 것으로 추정된다. MCP-1은 대식구와 림파구가 바이러스등의 원인체나 또는 TNF-α등의 싸이토카인에 자극을 받아 분비하는 물질로써 대식세포가 만성염증 부위로 이동하는 것을 도와준다.

IMF사태이후 국내 양돈장에서는 신규 양돈장 건설이 거의 없는 상태에서 돼지 두수는 최근 20%정도 증가되어 약 9백 20만두가 되었다(농림부 가축 사육통계). 따라서 한정된 시설에서 많은 수의 돼지를 사육해야 되기 때문에 파행적으로 조기 이유가 시행되고 있다. 또한 농장별로는 최근 돼지 고기의 가격이 상승함에 따라 한정된 시설에서 많은 숫자의 돼지를 사육하고 싶어서 사양가들은 조기 이유를 유행적으로 도입하고 있는 실정이다. 하지만 조기이유의 도입은 했지만 국내양돈장의 대부분은 자돈사에서 아직까지 올인/올아웃을 실시하고 있지 않기 때문에 자돈사로 입식한 어린 연령의 이유자돈은 기존의 자돈으로부터 쉽게 질병에 감염되지 쉽다. 따라서 조기 이유는 분만 모돈으로부터 수직감염을 예방하기 위하여 실시하는데 분만 모돈으로부터 수직감염을 예

방하기 위하여 실시한 조기 이유 후 자돈사에서 올인/올아웃 미시행과 사양 관리 부족으로 인하여 오히려 자돈사에서 이유자돈들간 수평 감염이 빈발하게 유발되는 것이다. 전체적인 사양관리와 자돈사의 개선 없이 조기 이유만 시행하다 보니 상대적으로 자돈사에서 질병감염이 폭발적으로 유발되고 있는 실정이다. 이러한 문제로 인하여 최근 국내 양돈장에서 질병적인 측면에서 가장 큰 문제점은 이유자돈 전신성 소모성 증후군에 의한 “이유자돈의 위축”이다.

1997년 처음 보고이래 국내에서 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 발병양상은 해를 거듭하면서 폭발적으로 발생하는 것으로 보고되고 있다. 국내 첫 발병을 보고한 1997년과 1998년에는 10건의 발병도 발생되지 않았지만 1999년에는 50건으로 1998년보다 10배 이상 발병되었으며, 지난해(2001년)에는 225건으로 2년 전 보다는 3배, 국내에서 첫 발병해인 1997년보다는 100배 이상의 폭발적인 발병양상이 관찰되고 있다.

국내에서 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 발병양상을 살펴보기 위하여 1999년 1월부터 2000년 12월까지 2년간 본 서울대학교 수의과대학 병리학교실에 의뢰된 1243농장의 총 1634두의 이유자돈 중 거대 다핵세포 또는 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 진단한 결과 총 133두(8.1%)가 이유자돈 전신성 소모성 증후군으로 확진 되었으며, 국내에서도 높은 발병률을 확인할 수 있었다.

현재 백신이나 예방법이 개발되어 있지 않은 상태에서 국내 양돈 사양가에게 큰 경제적 손실을 야기하고 있기 때문에 이러한 상태를 방치했을 경우 국내 축산 질병에 관련된 국가 연구기간이나 수의과대학 등 질병에 관계된 기관에 대한 불신감을 팽대 할 수 있다. 또한 이유자돈 전신성 소모성 증후군으로 인하여 환축들이 증가하여 사양가들은 환축들에게 치료를 위하여 항생제를 남용하기 때문에 도축되는 돼지고기에서 항생제 잔류 문제를 유발 할 수 있다. 따라서 양질의 청정화된 돼지고기를 공급하지 못할 뿐만 아니라 항생제 내성 문제를 국민건강에도 큰 영향을 미칠 수 있다.

아직까지는 이유자돈 전신성 소모성 증후군과 관련된 논문에서 공인된 자료들은 그리 많지 않다. 현재 개발되어 적용되고 있는 돼지 써코바이러스 2형-specific antibody detecting ELISA는 돼지 써코바이러스 2형이 이미 전 세계적으로 분포한다는 것을 보여주었다. 그리고 최근에 초유를 먹이지 않은 돼지와 초유를 먹인 돼지에 실험적으로

바이러스를 감염시킨 자료가 보고되었다. 실험적으로 감염된 돼지에서 위치상 독립되어 있으나 이웃한 공기에 노출된 혈청무반응 돼지로의 돼지 써코바이러스 2형의 전이가 확인되면서 이 바이러스는 공기전염이 가능하다는 것을 보여주었다. 돼지 써코바이러스 2형의 태반을 통한 수직감염도 이미 알려졌으나 아직까지 일반적이지 않다.

아직까지 이유자돈 전신성 소모성 증후군관 관련된 많은 내용이 조사되지 않았다. 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 보여주는 육안적, 조직학적 병변은 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 실험적으로 감염시킨 gnotobiotic pig에서 1999년에 보고되었다. 초유를 먹이지 않은 돼지에서 유사한 실험이 있었는데, 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 보여주는 임상적 질병과 병변은 돼지 써코바이러스 2형만을 접종한 4마리 자돈 중 단 한 마리에서 보고되었다. 그러나 심각한 질병이나 육안적, 조직학적 병변은 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 모두 접종한 모든 돼지에서 관찰되었다. 같은 gnotobiotic pigs에서의 최근 연구에서는 돼지 써코바이러스 2형만을 감염시키고 비특이적인 면역 유도 물질을 넣었을 때 감염된 자돈의 100%에서 임상적으로 유의한 이유자돈 전신성 소모성 증후군 증상을 보였다. 지금까지 감염성 접종으로서는 100% 확실한 질병모델을 보인 것은 돼지 써코바이러스 2형만을 단독으로 감염시켰을 때는 나타나지 않는다.. 연구자들은 돼지 써코바이러스 2형이 이유자돈 전신성 소모성 증후군에 원인에 되는 유일한 감염성 원인체라고 결론 내리고 있지만, 돼지 써코바이러스 2형 이외에도 면역계와 관계된 다른 요인이 필요한 것으로 추정하고 있다. 즉, 최근의 연구 결과에 따르면 돼지 써코바이러스 2형의 감염에 관한 연구는 dendritic cell에 돼지 써코바이러스 2형 감염과 dendritic cell의 antigen-presenting 기능의 변화가 병인론에 있어서 매우 중요하다는 것을 알아내었다. 어린 자돈의 면역계의 자극이 원인이 될 수 있다는 것이다. 병원체에 노출되는 것은 면역계를 자극할 수 있다. 체중에 따라서 돼지를 무작위로 합사하는 것은 돼지에게 매우 큰 스트레스로 작용할 수 있으며 면역계를 자극할 수 도 있으며, 다른 병원체에 노출될 수 도 있다. 어린 일령의 자돈에 효력이 강한 백신을 사용하는 것도 면역계를 자극할 수 있으며, 좀더 효력이 강한 백신이 계속해서 개발되고 있다. 최근의 연구 결과에 따르면, 초유를 먹이지 않은 14두의 돼지에게 돼지 써코바이러스 2형을 감염시키고 1주일령에 상업적인 백신을 투여한 결과 총

3두에서 소모성 질환이 발병하였다. 그러나 어떤 백신도 투여하지 않은 다른 그룹의 경우는 14두 모두에서 소모성 질환이 발생하지 않았다]. 최근 이태리와 그리스의 연구 결과에 따르면 백신의 사용이 이유자돈 전신성 소모성 증후군과 연관된 질환과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었다.

현재 모돈으로부터 수직감염을 예방하기 위하여 대부분의 농장에서 실시하고 있는 조기 이유로 완전한 면역이 형성되어 있지 않은 자돈들은 돼지 써코바이러스 2형에 쉽게 감염이 되게 되며, 밀사로 인한 스트레스, 잦은 백신접종 및 2차적인 세균이나 바이러스 감염에 의해서 이유자돈 전신성 소모성 증후군이 폭발적으로 증가하고 있다.

돼지 써코바이러스 2형은 일반적인 세정제나 소독제에 매우 저항성이 강하여 감염된 건물 전체를 비감염 상태로 만드는 것은 매우 어렵다. 감염된 웅돈의 정액, 타액, 분변이나 심지어 공기로도 바이러스가 쉽게 전파되기도 한다. 또한 돼지 써코바이러스 2형은 다른 바이러스들과 달리 바이러스의 감염이 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 발병으로 이어지지 않기 때문에 이미 돼지 써코바이러스 2형에 감염된 자돈을 구별해 내기가 쉬지 않다, 이러한 이유로 일선 농가 및 정부기관은 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 예방을 방역대책을 수립하는데 어려움이 많다.

이유자돈 전신성 소모성 증후군과 관련된 예방책 이외에도 치료방법, 또는 백신 등이 알려져 있지 않다. 많은 수의 국제적 동물약품업체 및 연구기관에서 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 예방을 위한 백신을 개발하려  노력하고 있으며, 소수의 백신이 개발되었지만 아직까지 그 효능은 검증된 바가 없다.

본 연구과제의 목적은 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 정확한 병인론을 밝히고 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 실험적으로 100% 재현할 수 있는 질환 모델을 개발하는 것이 첫 번째 목표이며, 이 결과를 토대하여 막대한 경제적 부가가치를 창출할 것으로 기대되는 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 예방하기 위한 효과적인 백신을 개발하는 것이 이 연구과제의 최종 목표이다.

# 제 2 장 이유자돈 전신성 소모성 증후군 병인론 및 질환모델 개발

## 제 1 절 서 설

이유자돈 전신성 소모성 증후군은 돼지 써코바이러스 2형에 의해 유발되는 바이러스성 만성소모성 질환이다. 주요 임상 증상으로는 성장의 정체, 피부의 창백화, 황달, 기침, 호흡곤란, 설사, 드물게 빈혈 등이 관찰되며, 병리조직학적 병변으로는 임파장기 내에서 거대 다핵세포가 관찰되는 육아종성 염증이 관찰되며 임파장기에 침윤한 조직구나 대식구계 세포에서 호염성의 세포질내 봉입체가 관찰된다.

1997년 이유자돈 전신성 소모성 증후군이 최초로 보고된 이래로 많은 연구가 계속되고 있지만 돼지 써코바이러스 2형에 의한 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 병인론은 아직 정확하게 밝혀진 바가 없다. 다만 많은 연구 결과를 토대로 돼지 써코바이러스 2형과 감염된 돼지의 면역증진이라는 면역계의 이상 요인에 의해서 질병이 발병하는 것으로 추정하고 있다. 또한 이유자돈 전신성 소모성 증후군은 실험적으로 질병을 100% 확실하게 재현할 질환 모델이 아직까지 확립되지 않아서, 병인론 연구 및 백신의 효력 검정에 많은 어려움을 겪고 있다.

이번 연구의 첫 번째 목적은 국내에서 분리한 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 이용하여 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 실험적으로 유발할 수 있는 질환 모델을 확립하는 것이다.

둘째, 돼지 써코바이러스 2형은 단독 감염시 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 유발하지 못하며, 돼지 파보바이러스와 혼합 감염시 전형적인 병변이 유발된다. 그러므로 돼지 파보바이러스의 역할이 이 질환의 발현 중요할 것으로 추정된다. 두 번째 연구 목표는 이들 두 바이러스의 상관관계를 조사하는 것이며, 이를 위하여 접종실험을 실시하고 실험적으로 이유자돈 전신성 소모성 증후군이 발현된 자돈의 전신장기 및 혈액을 채취하여 viremia가 일어나는 시점, 돼지 써코바이러스 2형이 감염·증식이 이루어지는 세포를 확인하며 조직내 교잡법(in situ hybridization)을 이용하여 두 바이러스 간의 증

식 역학을 확인하는 것이다.

셋째, 이유자돈 전신성 소모성 증후군은 그 이름에서도 알 수 있듯이 성장 정체를 가장 큰 특징으로 하며 간혹 빈혈이 발생하기도 한다. 현재 돼지 써코바이러스 2형이 어떤 작용으로 성장 정체 및 빈혈을 유도하는지 전혀 밝혀져 있지 않다. 성장정체는 양돈산업에서 경제적으로 중요한 문제이다. 성장정체로 인한 출하일령의 저하는 일선 농가들에게 사료비, 인건비 등의 추가 부담을 가중시키게 된다. 현재 AIDS 등 몇몇 연구를 통해서 만성염증 환자에서 식욕억제 물질(cachectin)으로 작용하는 TNF-α(Tumor Necorosis Factor-α)의 기능이 보고되었다. TNF-α은 염증반응을 조절하는 싸이토카인(cytokine)의 한 종류로서 염증을 조절하는 작용 이외에 대뇌의 식욕 관련 특정 receptor와 반응하여 식욕을 억제하는 것으로 보고되었다. 그러므로 세 번째 목표는 이러한 성장정체 및 빈혈이 나타나게 되는 정확한 원인을 알아보고, 그 예방책을 모색해 보는 것이다.

넷째, 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 병리조직학적 특징은 임파장기 내에서 관찰되는 거대다핵세포의 형성이다. 이 병리조직학적 병변은 만성염증반응의 특징적인 병변으로 현재까지 결핵이나, 기생충감염 등에서 보고가 되었다. 하지만 이번 경우처럼 바이러스에 의해 유도되는 거대다핵세포는 돼지 써코바이러스 2형이 최초이다. 현재까지 거대다핵세포는 대식구계 세포인 macrophage, monocyte 유래의 세포로 알려져 있으며 염증부위로부터 발현되는 화학주성인자(chemoattractant)들인 케모카인(chemokine)들이 거대다핵세포의 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 화학주성인자란 혈액으로부터 염증부위로 염증세포의 이동을 유도하는 물질이다. 본 연구의 목적은 돼지 써코바이러스2형 감염에 의한 만성염증 부위에서 형성되는 거대다핵세포의 형성기전을 밝히는 것이며, 이를 위해 macrophage와 monocyte의 화학주성인자로 알려진 monocyte chemoattractant protein-1과 macrophage inflammatory protein-1을 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 실험적으로 유발한 자돈의 조직으로부터 조직내 교잡법을 이용하여 검출하고, 분석하는 것이다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 국내분리 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 이용한 이유자돈 전신성 소모성 증후군 질환모델 개발

가. 돼지 써코바이러스 2형 분리

이유자돈 전신성 소모성 증후군으로 진단된 자돈의 임파절 장기를 채취한다. 채취한 장기를 세절하여 바이러스 접종용 유제로 준비한다. 75㎠ flask에 써코바이러스 1형 또는 2형에 오염되지 않은 돼지 신장세포주(circo-free PK-15 cell line)을 monolayer가 되게 준비한다. 배지를 버리고, PBS로 2회 세척 후 300mM Glucosamine을 처치하고, 37℃에서 30분간 배양한다. Glucosamine을 버리고 새로운 배지로 갈아준 후 앞서 준비한 조직 유제를 접종하고 48-72시간까지 배양한다. 돼지 써코바이러스 2형은 CPE가 없는 바이러스이므로 72시간 배양 후 일부 세포를 수집하여 PCR로 바이러스의 배양 여부를 확인하고 양성 확인 시, 3회 동결과 해동을 반복하여, 5000rpm 30분 원심분리 후 상층액 만을 분리, -70℃에 동결하고, 일부는 다음 계대용 재료로 이용한다. 분리된 바이러스는 최종 3계대 배양하여 -70℃에 냉동보관 하였으며, 추후에 바이러스의 역가를 측정하여 1.2 x $10^5$ $TCID_{50}$/ml의 농도로 하여 동물실험용 접종 재료로 사용하였다.

나. 돼지 파보바이러스 2형 분리

이유자돈 전신성 소모성 증후군으로 진단된 자돈의 임파절 장기를 채취한다. 채취한 장기를 세절하여 바이러스 접종용 유제로 준비한다. 75㎠ flask에 돼지 고환 세포주(Swine Testicular cell, ST cell)를 monolayer가 되게 준비한다. PBS로 2회 세척 후 앞서 준비한 조직 유제를 접종하고 48-72시간까지 배양한다. 3회 동결과 해동을 반복하여, 5000rpm 30분 원심분리 후 상층액 만을 분리, -70℃에 동결하고, 일부는 다음 계대용 재료로 이용한다. 분리된 바이러스는 최종 3계대 배양하여 -70℃에 냉동보관 하였으며, 추후에 바이러스의 역가를 측정하여 1.3 x $10^5$ $TCID_{50}$/ml의 농도로 하여 동물실험용 접종 재료로 사용하였다.

다. 공시동물 및 실험디자인

다른 질병에 감염되어 있지 않으며 혈청학적으로 돼지 써코바이러스 1형, 2형 및 돼지 파보바이러스에 음성인 4주령 자돈 40두를 준비하고 무작위로 10마리씩 4개 군으로 분리한다. 제1군은 돼지 써코바이러스 2형 접종군, 제2군은 돼지 파보바이러스 접종군, 제3군은 돼지 써코바이러스 2형 과 돼지 파보바이러스 동시 접종군, 제4군은 대조군으로 바이러스가 미접종군으로 설정한다. 각각의 자돈에 비강으로 군의 특성에 맞는 바이러스를 1cc씩 접종하였다. 각 군은 각각 독립된 사육시설에서 사육되었으며, 나머지 환경은 동일하였다. 접종 후 매일 임상증상을 주의 깊게 관찰하였으며, 7, 14, 21, 28, 35 일령에 각 군별로 2두씩 부검하여 육안병변을 관찰하였다.

라. 병리조직학적 관찰

부검시 뇌, 폐, 간, 비장, 췌장, 소장, 대장, 임파절, 편도, 신장 등 전신의 장기를 채취하여 24시간동안 10% 중성화포르말린에 고정한다. 일반적인 조직 처리과정을 통하여 파라핀 포매하였고,. 파라핀 조직 샘플은 5㎛ 두께로 절단하여 Hematoxylin and Eosin (H&E) stain을 실시했다. 조직샘플은 일반적인 광학 현미경하에서 관찰하였다.

마. 조직내 교잡법을 이용한 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 검출

1) DNA 추출

부검시 돼지의 서혜임파절 또는 비장을 채취하고, Qiagen®의 Tissue DNA extraction kit를 이용하여 25 mg 조직으로부터 DNA를 추출하였다.

2) 프라이머(Primer) 합성

다중 중합효소 연쇄반응을 수행하기 위하여 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스에 특이적인 프라이머를 디자인 하였다. 돼지 써코바이러스 프라이머는 Porcine circovirus type 2 (Genbank access code : AF465211)의 open reading frame 2

(ORF2) 부위에서 프라이머를 제작하였다. 돼지 써코바이러스의 전방향 프라이머(AF)는 5‘- CAG TTC GTC ACC CTT TCC C-3′ (939-957 nucleotides), 역방향 프라이머(AR)는 5’-GGG GGA CCA ACA AAA TCT CT-3′ (1466-1485 nucleotides)가 되도록 제작하였다.

돼지 파보바이러스 프라이머는 viral protein 2 (VP2)를 특이적으로 증폭할 수 있도록 디자인 하였다. 돼지 파보바이러스에 대한 전방향 프라이머(BF)는 5‘-CAT ACA CTG GAC AAT CAC AAC AAA-3′ (3451-3474: nucleotides), 역방향 프라이머(BR)는 5’-GCC TAA TG CTG TTG CTT CTG-3′ (3760-3780: nucleotides)가 되도록 제작하였다.

3) 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)

중합효소 연쇄반응을 위해서 5㎕ DNA 상층액, 1㎕ AF, AR, BF, BR 프라이머(25pmol/㎕), 5㎕ 10×reaction buffer (100mM Tris-HCl (pH 8.3), 400mM KCl, 15mM $MgCl_2$, 5㎍/㎖ activated BSA), 0.2mM deoxynucleotides(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5U Taq polymerase를 각각 넣고, 50㎕의 reaction volume이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA) 를 이용하여 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 60초간 35 cycle 수행하고, 마지막으로 72℃ 10분간 반응하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물 10㎕를 ethidium bromide로 염색된 2% agarose gel에 전기영동 하였다.

4) 탐침자(Probe) 제작

전기영동하여 특이적인 band를 확인한 후 PCR product는 Wizard PCR preps (Promega Biotech, Madison, WI, USA) 를 이용하여 증폭된 DNA를 정제하고, DIG DNA labeling & detection kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) 를 사용하여 random labeling 한 후, nylon membrane으로 labeling된 probe의 농도를 결정하였다.

4) 조직내 교잡법(In situ hybridization)

부검시 전신의 장기 조직을 10% 중성 포르말린에 24시간 고정시킨 후 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 파라핀 포매 후 4㎛ 두께로 절편하여 Superfrost/plus slide (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 에 부착시켜 상온에 보관하였다. 동일한 조직 절편 두장을 준비하여, 한 장은 돼지 써코바이러스 2형 검출을 위해서 사용하였으며 다른 한 장은 돼지 파보바이러스 검출을 위하여 사용하였다. 조직 절편을 xylene에 탈파라핀 시키고 함수과정을 거친 후 phosphate-buffered saline (PBS; 0.01M, pH 7.4) 에 5분간 두었다. Target nucleic acids를 노출시키기 위해 0.2N HCl에 20분간 처리하여 단백질을 제거한 후 200㎍/㎖의 proteinase K (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 를 37℃에서 25분간 처리한 후 4% paraformaldehyde로 상온에서 10분간 고정하였다. PBS로 2회 세척한 후 0.1M triethanolamine-HCl buffer (pH 8.0) 에 0.25% acetic anhydride를 넣고 5분간 acetylation 시킨 후 0.25% acetic anhydride를 한 번 더 넣고 5분간 더 acetylation 시켰다. 2×saline sodium citrate (SSC) (1×SSC; 50mM NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0) 로 10분간 세척 후, 한 장에는 digoxigenin으로 표지된 돼지 써코바이러스 2형 탐침자, 다른 한 장의 절편에는 돼지 파보바이러스 2형 탐침자를 각각 1ng/㎕의 농도가 되도록 standard hybridization buffer(2×SSC, 50% deionized formamide, 10mg salmon sperm DNA (Oncor, Gaithersburg, MD, USA), 0.02% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% Denhart's solution, 50% dextran sulfate solution) 에 희석하여 30㎕ 정도를 slide 조직위에 떨어뜨린 후 coverslip을 덮고 가장자리를 rubber cement로 잘 봉한 다음 94℃에서 10분간 가열하여 45℃에서 8시간 교잡반응 하였다. 교잡반응 후 coverslip을 제거하고 상온의 4×SSC에 5분간 2회, 45℃ 2×SSC와 상온의 2×SSC에서 각각 10분씩 2회, 그리고 0.2×SSC에서 5분간 2회 세척 후 maleic acid buffer (Buffer 1; 100mM maleic acid, 150mM NaCl, pH 7.5) 로 5분간 처리한 후 1×blocking buffer (Buffer 2) 에서 40분간 처리하였다. 양성반응을 검출하기 위해 alkaline phosphatase conjugated anti-digoxigenin (Boehringer Mannheim) 을 Buffer 2에 1:500으로 희석하여 조직절편 위에 잘 떨어뜨린 후 37℃에서 1시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Buffer 1과 Buffer 2에서 10분씩 1회 처리 후 detection buffer

(Buffer 3; 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.05M $MgCl_2$, pH 9.5) 로 5분간 처리하였다. 발색을 위하여 alkaline phosphatase의 기질인 nitroblue tetrazolium과 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate를 Buffer 3에 희석하여 조직절편 위에 잘 떨어뜨린 후 상온에서 3-4시간 정도 반응시켰다. 발색이 끝난 후 tris-ethylenediamine tetraacetic acid buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 에 여러번 침적하여 반응을 중지하였다. 0.5% methyl green으로 대조염색한 후 증류수에 세척하여 완전히 말린 후 mounting하여 광학현미경으로 관찰하였다.

## 2. 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스의 상관관계 분석

가. 조직샘플 채취

앞서 실시한 실험의 부검시 전신의 장기 조직을 10% 중성 포르말린에 24시간 고정시킨 후 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 파라핀 포매 후 4㎛ 두께로 절편하여 Superfrost/plus slide (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 에 부착시켜 상온에 보관하였다.

나. Viremia를 확인하기 위한 혈액학적 분석

1) 혈액 도말 슬라이드 제작

목정맥으로부터 정맥혈을 채취하여 0.38% sodium citrate의 항응고제를 처치한다. 혈액을 300***g***에서 20분동안 원심분리하고 buffy coat만을 모은다. 이 세포를 PBS로 재 부유한 후, Superfrost/Plus slides(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에 도말하여 100% 알코올로 5분 동안 고정하고 상온에서 건조하였다.

2) 조직내 교잡법을 통한 혈액세포의 돼지 써코바이러스 2형 감염 확인

분리된 혈액세포로부터 DNA를 추출한다. 전방향 프라이머(5′- CGG ATA TTG

TAG TCC TGG TCG - 3′)와 역방향 프라이머 (5′- ACT GTC AAG GCT ACC ACA GTC A - 3′)를 이용하여, 94℃ 5분간 denaturation 후 94℃ 20초, 61℃ 20초, 72℃ 45초 조건으로 35회 반복하고 72℃ 10분간 elongation하 는 중합효소 연쇄반응을 실시하여 481bp의 DNA product를 얻는다. DNA purification kit를 이용하여 정제한다. DIG-labelling kit를 이용하여 Digoxigenin을 임의 표지하여 probe를 제작, detection 과정 을 통해 농도를 결정하고 probe를 사용한다. 혈액 도말 슬라이드를 단계적인 함수과정을 실시한다. 0.2N HCl에 20분간 처치한다. DW에 30초간 세척 후, 4% paraformaldehyde에 10분간 처리한다. PBS 세척 후, Triethanolamine-HCl buffer에 acetic anhydride를 넣어 10분간 acetylation시킨다. 2× SSC에 10분간 처치한다. 조직상에 돼지 써코바이러스 2형 probe를 1㎍/㎕의 농도로 hybridization buffer에 희석하여 조직 당 20-30㎕씩 적용하고, cover slip을 덮고 sealing한다. 각각의 조직을 hybridization machine상에서 94℃ 10분간 처치후, 45℃ incubator에 15시간 배양한다. cover slip을 제거후 4×SSC, 2×SSC, 0.2×SSC에 각 10분씩 세척단계를 실시한다. maleic acid buffer에 5분간 처리한다. blockig buffer 10분간 처리한다. blocking buffer에 1:250-500으로 희석된 anti-DIG AP conjugate를 적용하여 36℃에서 1-2시간 incubation한다. maleic acid buffer 10분간 처리한다. blocking buffer에 5분간 처리한다. NBT/BCIP를 이용 돼지 써코바이러스 2형의 핵산을 검출한다.

다. 조직내 교잡법을 통한 돼지 써코바이러스 2형 DNA 발현정도 실험

1) 돼지 써코바이러스 2형 probe 제작

분리된 virus로부터 DNA를 추출한다. 전방향 프라이머(5′- CGG ATA TTG TAG TCC TGG TCG - 3′)와 역방향 프라이머 (5′- ACT GTC AAG GCT ACC ACA GTC A - 3′)를 이용하여, 94℃ 5분간 denaturation 후 94℃ 20초, 61℃ 20초, 72℃ 45초 조건으로 35회 반복하고 72℃ 10분간 elongation하 는 중합효소 연쇄반응을 실시하여 481bp의 DNA product를 얻는다. DNA purification kit를 이용하여 정제한다. DIG-labelling kit를 이용하여 Digoxigenin을 임의 표지하여 probe를 제작, detection 과

정 을 통해 농도를 결정하고 probe를 사용한다.

2) 돼지 써코바이러스 2형 핵산 검출 조직내 교잡법

Xylene에 탈파라핀 과정 후, 단계적인 함수과정을 실시한다. 0.2N HCl에 20분간 처치한다. DW에 30초간 세척 후 100㎍/㎖ Proteinase K를 37℃에서 30분간 처치한다. 4% paraformaldehyde에 10분간 처리한다. PBS 세척 후, Triethanolamine-HCl buffer에 acetic anhydride를 넣어 10분간 acetylation시킨다. 2× SSC에 10분간 처치한다. 조직상에 돼지 써코바이러스 2형 probe를 1㎍/㎕의 농도로 hybridization buffer에 희석하여 조직 당 20-30㎕씩 적용하고, cover slip을 덮고 sealing한다. 각각의 조직을 hybridization machine상에서 94℃ 10분간 처치후, 45℃ incubator에 15시간 배양한다. cover slip을 제거후 4×SSC, 2×SSC, 0.2×SSC에 각 10분씩 세척단계를 실시한다. maleic acid buffer에 5분간 처리한다. blockig buffer 10분간 처리한다. blocking buffer에 1:250-500으로 희석된 anti-DIG AP conjugate를 적용하여 36℃에서 1-2시간 incubation한다. maleic acid buffer 10분간 처리한다. blocking buffer에 5분간 처리한다. NBT/BCIP를 이용 돼지 써코바이러스 2형의 핵산을 검출한다.

라. 조직내 교잡법을 통한 돼지 파보바이러스 DNA 발현정도 실험

1) 돼지 파보바이러스 probe 제작

분리된 돼지 파보바이러스로부터 DNA를 추출한다. 전방향 프라이머(5′- CCA GCA GCT AAC ACA AGA AAA GGT TAT CAC - 3′), 역방향 프라이머(5′- GTC CAT GTT GTT GGT GGT AAT CCA TTG TAA ATC T - 3′)를 이용하여 94℃ 5분간 denaturation 과정 후 94℃ 20초, 56℃ 20초, 72℃ 20초 조건으로 35회 반복 후, 72℃ elongation 과정의 중합효소 연쇄반응으로 226bp DNA product를 얻는다. DNA를 정제 후, DIG-labelling kit를 이용, digoxigenin으로 표지하여, detection 과정으로 농도를 결정하여 probe로 사용한다.

2) 돼지 파보바이러스 핵산 검출 조직내 교잡법

돼지 파보바이러스에 대하여 제작된 probe를 이용하여 앞서 실시한 돼지 써코바이러스 2형 핵산 검출 조직내 교잡법과 동일한 방법으로 따라 돼지 파보바이러스의 핵산을 검출한다.

마. 형태학적 분석

조직내 교잡법을 실시한 조직절편 슬라이드를 Kodak DC290 system을 이용하여 광학현미경 하에서 무작위로 3부분 촬영한다. 촬영한 사진은 NIH Image J Program (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA)을 이용하여 돼지 써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스에 감염되어 검게 염색된 세포의 숫자를 계산하고 단위면적($0.25mm^2$)당 양성 세포의 수로 환산하여 평가한다.

바. 통계적 분석

통계학적 분석은 InStat package (GraphPad Softwear, San Diego, CA, USA)를 이용하여 수행하였다.. Wilcoxon matched pairs signed rank test는 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 군내의 유의성을 검증하기 위하여 실시하였으며, Mann-Whitney U-Wilcoxon rank sum W test는 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 군 간의 상관관계를 검정하기 위하여 실시하였다.

## 3. 성장정체를 유발하는 식욕억제 물질(cachectin) TNF-α의 분석

가. In vitro 실험

1) 바이러스 및 세포

돼지 써코바이러스 1형, 2형 및 돼지 파보바이러스에 감염된 적이 없으며 건강한 돼지를 부검하여 폐장과 기관지를 함께 무균적으로 분리한다. 기관지를 통하여 폐장에 멸

균된 PBS buffer를 관류하여 폐포대식구를 분리해낸다. 분리된 폐포대식구를 96well plate에 한 well 당 $1\times10^5$ 개가 되도록 희석하여 준비하고 하루정도 안정화 시킨 후, 실험에 사용한다. 바이러스는 앞서 기술된 방법으로 분리한 돼지 써코바이러스 2형, 돼지 파보바이러스 그리고 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스의 혼합액을 1 x $10^5$ $TCID_{50}$/ml의 농도로 준비한다.

2) 실험디자인 및 샘플 채취

실험은 총 4가지 군으로 나누어 실시한다. 제1군은 돼지 써코바이러스 2형 처치군, 제2군은 돼지 파보바이러스 처치군, 제3군은 돼지 써코바이러스, 돼지 파보바이러스 혼합액 처치군, 제4군은 바이러스 미처치군인 대조군이다. 각 well에 바이러스를 1 x $10^5$ $TCID_{50}$/ml의 농도로 1ml 씩 동시에 접종한다. 접종 후 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48 시간에 세포의 상층액을 채취한다.

나. In vivo 실험

1) 공시동물

돼지 써코바이러스 2형(1.2 x $10^5$ $TCID_{50}$/ml)과 돼지 파보바이러스(1.3 x $10^5$ $TCID_{50}$/ml)를 접종실험을 위한 바이러스로 준비한다. 28일령의 건강한 자돈을 준비하여 8마리씩 4군으로 나눈다. 첫 8마리에는 돼지 써코바이러스 2형을, 다음 8마리에서는 돼지 파보바이러스를, 그리고 다름 8마리에는 돼지 써코바이러 2형과 돼지 파보바이러스를 각각 1cc씩 비강으로 접종하였다. 나머지 8마리는 바이러스가 없는 세포배양액만을 접종하였다.

2) 체중 측정 및 증체량 분석

바이러스 접종 후 0, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35에 각각의 개체별 체중을 측정하였으며 (체중 측정량 - 초기 체중) / 초기 체중 * 100 으로 증체량을 분석하였다.

3) 혈액 및 조직 채취

바이러스 접종 후 0, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35에 각 군별로 1두씩 부검을 실시하였고 목정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액으로부터 혈청을 분리하여 TNF-α 농도 측정에 이용하였다. 부검시 주요 장기 조직을 10% 중성 포르말린에 24시간 고정시킨 후 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 파라핀 포매 후 4㎛ 두께로 절편하여 Superfrost/plus slide (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 에 부착시켜 상온에 보관하였다.

4) TNF-α 정량을 위한 ELISA

porcine TNF-α enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA, Endogen, Woburn, MA)를 이용하여 in vitro에서 얻은 세포 상층액 및 in vivo에서 얻은 혈청 내의 TNF-α의 농도를 측정한다.. 96well plate에 양성대조군인 recombinant TNF-α protein과 실험재료인 세포배양 상층액 및 혈청을 각각 분주한다. 1시간 후 plate를 3회 세척 후 peroxidase conjugate anti-TNF-α 항체를 분주한다. 30분 후 plate를 다시 3회 세척 후 TMB substrate로 발색반응 실시한다. 20분 후 stop solution을 이용하여 발색반응을 정지 후 450nm에서 결과를 읽는다. 양성대조군의 결과를 이용하여 standard curve를 구한 뒤 샘플의 결과와 비교하여 TNF-α의 양을 측정한다.

5) 조직내 교잡법

가) 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 위한 RNA 추출

폐포대식구 세포배양액 500㎕를 Trisol LS (Gibco BRL) 500㎕가 담긴 eppendorf tube에 넣고 vortex하여 상온에 10분간 정체시켰다. 여기에 300㎕의 chlorform을 첨가하여 다시 10분간 정체시킨 다음 4℃ 4,000g에서 15분간 원심하였다. 원심후 얻어진 상층액 500㎕를 새로운 eppendorf tube에 넣고, Isopropanol 500㎕를 추가하고 vortex하여 -20℃에서 overnight 침전시켰다. 다음날 아침에 4℃ 14,000rpm으로 30분간 원심한 후 상층액은 버리고 cold 70% ETOH 500㎕로 세척 후 다시 4℃ 14,000rpm

조건으로 30분간 원심하였다. 상층액을 제거하고 speed vacuum으로 건조시킨 후 30㎕ 멸균증류수로 부유하였다.

나) 역전사 반응(Reverse transcription, RT)

추출된 RNA 1㎕, DEPC D.W. 3.5㎕, 2.5mM dNTP 2㎕, 10X PCR buffer (1.25mM $MgCl_2$) 2㎕, oligo d(T) 0.5㎕, RNase inhibitor(50U) 0.5㎕, MuLV reverse transcriptase(200U) 0.5㎕ (Perkin Elmer)를 혼합하여 총반응량을 10㎕로 맞춘 후에 42℃에서 40분간 반응하여 역전사 반응을 수행하여 cDNA를 합성하였다.

다) 중합효소 연쇄반응

역전사 반응을 마친 10㎕의 cDNA template에 중합효소 연쇄반응을 위해서 TNF-α의 전방향 프라이머(5′- GCT GTA CCT CAT CTA CTC CC - 3′), 역방향 프라이머(5′- TAG ACC TGC CCA GAT TCA GC - 3′) (25pmol/㎕) 각 1㎕, 5㎕ 10×reaction buffer (100mM Tris-HCl (pH 8.3), 400mM KCl, 15mM $MgCl_2$, 5㎍/㎖ activated BSA), 0.2mM deoxynucleotides(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5U Taq polymerase를 각각 넣고, 50㎕의 reaction volume이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA) 를 이용하여 94℃에서 30초, 62℃에서 30초, 72℃에서 30초간 35 cycle 수행하고, 마지막 단계에서 72℃ 10분간 반응하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물 10㎕를 ethidium bromide로 염색된 1% agarose gel에 전기영동 하였다.

라) Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) 탐침자 제작

역전사 중합효소 연쇄반응을 통하여 얻어진 291bp의 특이적인 DNA 분절은 Wizard PCR preps (Promega Biotech)을 이용하여 정제하고, DIG DNA labeling and detection kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 digoxigenin으로 임의표지하여 탐침자로 이용하였다.

마) 조직내 교잡법

TNF-α 대하여 제작된 probe를 이용하여 상기 기술된 조직내 교잡법에 따라 TNF-α의 mRNA를 검출한다.

다. 통계적 분석

통계학적 분석은 InStat package (GraphPad Softwear, San Diego, CA, USA)를 이용하여 수행하였다.. Wilcoxon matched pairs signed rank test는 접종군내의 유의성을 검증하기 위하여 실시하였으며, Mann-Whitney U-Wilcoxon rank sum W test는 접종군 간의 유의성 검정하기 위하여 실시하였다. Pearson correlation analysis는 TNF-α와 체중과의 상관관계를 분석하기 위하여 실시하였다.

**4. 빈혈의 원인 분석**

가. 혈액 샘플 채취 및 적혈구 수 측정

앞선 TNF-α 분석실험을 위한 접종 실험에서 접종 군별로 접종전, 접종 후 1, 3, 8, 11, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35일에 EDTA 처리된 vacutainer에 채혈을 실시한다. 항응고제가 처리된 혈액을 자동 혈구 계산기를 이용하여 적혈구 수를 측정하였다.

나. 골수 조직 채취

부검시 골수를 채취하여 10% 중성화 포르말린에 고정하고 탈회과정을 거친 후 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 파라핀 포매하였다. 파라핀 조직 샘플은 5㎛ 두께로 절단하여 Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색후 광학현미경 하에서 골수의 이상 유무를 관찰하였으며, 일부 파라핀 조직 샘플은 4㎛ 두께로 절편하여 Superfrost/plus slide (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 에 부착시켜 상온에 보관하였다.

다. 면역조직화학법

면역조직 화학법을 위하여 준비된 골수 조직 슬라이드를 xylene에 10분간 2회 침적하여 탈파라핀화 시키고, 알코올을 이용하여 함수과정을 수행하였다. Endogenous

alkaline phosphatase를 제거하기 위하여 glacial acetic acid (20%)를 4℃에서 2분간 처치하였다. 이후 proteinase K (Gibco BRL)을 phosphate-buffered saline (PBS; 0.1M, pH 7.4)에 100㎍/㎖되도록 하여 36℃ 20분간 반응시켰다. 비특이 반응을 차단하기 위하여 10% normal goat serum을 PBS(0,1M, pH 7.4)에 희석하여 조직상에 적용하고, 상온에서 30분간 반응하였다. 돼지 써코바이러스 2형에 특이적인 ORF2 Protein에 반응하는 단클론 항체를 PBTS에 250배 희석하여 1차 항체로 적용하고 4℃에서 overnight incubation하였다. PBTS로 3회 세척하고, PBTS에 100배 희석한 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG (Dako)를 2차 항체로 사용하였다. PBTS로 3회 세척하고, Tris buffer (pH 9.5)로 처리하였다. 발색반응은 alkaline phosphatase red substrate (Vector Laboratories)로 상온에서 20분간 수행하였고, 수세과정을 거쳐 Mayer's hematoxylin으로 대조염색 후 mounting하여 관찰하였다.

## 5. 화학주성인자(Chemokine) MCP-1, MIP-1 분석

가. 공시동물 및 조직샘플 채취

돼지 써코바이러스 2형(1.2 x $10^5$ $TCID_{50}$/ml)과 돼지 파보바이러스(1.3 x $10^5$ $TCID_{50}$/ml)를 준비한다. 1일령의 자돈 60마리를 준비하여 15마리씩 4군으로 나눈다. 첫 15마리에는 돼지 써코바이러스 2형을, 다음 15마리에서는 돼지 파보바이러스를, 그리고 다음 15마리에는 돼지 써코바이러 2형과 돼지 파보바이러스를 각각 1cc씩 비강으로 접종하였다. 나머지 15마리는 바이러스가 없는 세포배양액만을 접종하였다. 바이러스 접종 후 0, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35에 부검시 실시하였고 부검시 superficial lymph node를 10% 중성 포르말린에 24시간 고정시킨 후 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 파라핀 포매하였다. 파라핀 조직 샘플은 5㎛ 두께로 절단하여 Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색후 광학현미경 하에서 병리조직학적 이상 유무를 관찰하였으며, 동일 파라핀 조직 샘플을 4㎛ 두께로 절편하여 Superfrost/plus slide (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 에 부착시켜 상온에 보관하였다.

나. MCP-1, MIP-1 분석을 위한 조직내 교잡법

1) RNA 추출

15㎖ Falcon tube에 PBS를 3㎖과 세절한 superficial lymph node를 3g을 넣고 vortex하여 현탁(50%)하였다. 5,000rpm으로 5분간 원심하여 얻어진 상층액 500㎕를 Trisol LS (Gibco BRL) 500㎕가 담긴 eppendorf tube에 넣고 vortex하여 상온에 10분간 정체시켰다. 여기에 300㎕의 chlorform을 첨가하여 다시 10분간 정체시킨 다음 4℃ 4,000g에서 15분간 원심하였다. 원심후 얻어진 상층액 500㎕를 새로운 eppendorf tube에 넣고, Isopropanol 500㎕를 추가하고 vortex하여 -20℃에서 overnight 침전시켰다. 다음날 아침에 4℃ 14,000rpm으로 30분간 원심한 후 상층액은 버리고 cold 70% ETOH 500㎕로 세척 후 다시 4℃ 14,000rpm 조건으로 30분간 원심하였다. 상층액을 제거하고 speed vacuum으로 건조시킨 후 30㎕ 멸균증류수로 부유하였다.

2) MCP-1, MIP-1 정량을 위한 반정량 역전사 중합효소 연쇄반응 (Semi-Quantitative RT-PCR)

추출된 RNA 1㎕, DEPC D.W. 3.5㎕, 2.5mM dNTP 2㎕, 10X PCR buffer (1.25mM $MgCl_2$) 2㎕, oligo d(T) 0.5㎕, RNase inhibitor(50U) 0.5㎕, MuLV reverse transcriptase(200U) 0.5㎕ (Perkin Elmer)를 혼합하여 총 반응량을 10㎕로 맞춘 후에 42℃에서 40분간 반응하여 역전사 반응을 수행하여 cDNA를 합성하였다. MCP-1의 전방향 프라이머는 5‘- TCA CCA GCA GCA AGT GT-3′, 역방향 프라이머는 5’-CTG AGA TTC ACA GAG GA-3′가 되도록 제작하였다. MIP-1에 대한 전방향 프라이머는 5‘-GCT CAG TTC AGT TCC AAG TC-3′, 역방향 프라이머는 5’-ACC ATG AAG CTC TGC GTG AC-3′가 되도록 제작하였다. 정량을 위한 standard curve를 작성하기 위하여, GAPDH를 internal standard 프라이머로 제작하였다. 역전사 반응을 마친 10㎕의 cDNA template에 각각의 프라이머(25pmol/㎕) 각 1㎕, 5㎕ 10×reaction buffer (100mM Tris-HCl (pH 8.3), 400mM KCl, 15mM $MgCl_2$, 5㎍/㎖ activated

BSA), 0.2mM deoxynucleotides(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5U Taq polymerase를 각각 넣고, 50㎕의 reaction volume이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA) 를 이용하여 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초간 35 cycle 수행하고, 마지막 단계에서 72℃ 10분간 반응하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물 10㎕를 ethidium bromide로 염색된 2% agarose gel에 전기영동 하였으며, Kodak EDS290 System을 이용하여 정량분석 하였다.

3) 탐침자(Probr) 제작

역전사 중합효소 연쇄반응을 통하여 얻어진 DNA 분절은 Wizard PCR preps (Promega Biotech)을 이용하여 정제하고, DIG DNA labeling and detection kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 digoxigenin으로 임의 표지하여 탐침자(Probe)로 이용하였다.

4) 조직내 교잡법

제작된 MCP-1, MIP-1 probe를 이용하여 '실험 3'에서 기술된 조직내 교잡법에 따라 TNF-α의 mRNA를 검출한다.

다. 형태학적 분석

조직내 교잡법을 실시한 조직절편 슬라이드를 Kodak DC290 system을 이용하여 광학현미경 하에서 무작위로 3부분 촬영한다. 촬영한 사진은 NIH Image J Program (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA)을 이용하여 형태학적 분석을 실시한다.

라. 통계적 분석

모든 분석 값은 '평균±표준편차'로 표시하였다. 각 군별의 통계적 유의성을 검증하기 위하여 InStat package (GraphPad Softwear, San Diego, CA, USA)를 이용하여 Wilcoxon matched pairs signed rank test를 실시하였다.

# 제 3 절 결과 와 고찰

## 1. 국내분리 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 이용한 이유자돈 전신성 소모성 증후군 질환모델 개발

가. 돼지 써코바이러스 2형 분리

이유자돈 전신성 소모성 증후군으로 확진된 자돈의 임파절 장기로부터 PK-15 세포를 이용하여 돼지 써코바이러스 2형(SNUV000463)을 분리 하였으며, 바이러스 역가를 측정해 본 결과 1 x $10^8$ $TCID_{50}$/ml 였다.

나. 돼지 파보바이러스 2형 분리

이유자돈 전신성 소모성 증후군으로 확진된 자돈의 임파절 장기를 채취한 뒤 Swine Testicle (ST) 세포를 이용하여 돼지 파보바이러스(SNUV000464)를 분리 하였다. 바이러스 역가를 측정해 본 결과 1.4 x $10^8$ $TCID_{50}$/ml 였다.

다. 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 공격 접종실험

바이러스 접종 후 음성군에서는 아무런 증상이 관찰되지 않았으며, 파보바이러스를 접종한 군에서도 별다른 증상이 관찰되지 않았다. 다만 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스러를 혼합 접종한 군에서 성장의 정체를 시작으로 해서 위축, 기침, 설사, 황달 등의 임상증상을 보였으며 돼지 써코바이러스 2형만을 단독으로 접종한 군에서는 위와 유사한 증상이 관찰되었으나 그 정도가 경미하였다.

5주후 부검을 실시한 결과 음성군과 파보바이러스를 접종한 군에서는 아무런 병변이 관찰되지 않았으며, 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스러를 혼합 접종한 군에서는 .전신 임파절의 종대, 간질성 폐렴 등 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 전형적인 육안 병변을 확인할 수 있었다. (Fig. 1, 2)

라. 전신 장기의 병리조직학적 병변

돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 감염시킨 후 매주 부검을 실시하여 전신장기를 채취하고 이들 장기를 H&E 슬라이드로 제작하여 현미경하에서 병변을 관찰한 결과, 전신의 임파절, 회장의 Peyer's patches, 편도, 비장에서 epithelioid macrophages와 multinucleated giant cells의 침윤이 관찰되었다. 또한 이들 세포의 세포질 내에서는 호염성의 포도송의 모양의 세포질내 봉입체도 관찰되었다. 돼지 써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스를 혼합 감염시킨 자돈의 임파절에서 관찰되는 Granulomatous inflammation은 약 접종 후 24일경부터 관찰되었으며 lymphocytes의 손실 및 germinal centres의 감소 소견이 관찰되었다. 흉선의 granulomatous lesions은 약 24일 경부터 관찰되었으며 경미한 간에서는 경미한 histiocytic interstitial inflammation이 17일경에 관찰되었다. 신장의 histiocytic interstitial inflammation은 매우 경미하거나 정상이었다. 폐의 경우 광범위한 macrophage의 침윤이 관찰되었는데 특히, bronchus-associated lymphoid 조직들과 peribronchial interstitial tissue에서 많이 관찰되었다(Fig. 3, 4)

돼지 써코바이러스 2형 단독 접종군의 경우 전체 자돈의 약 10~30%에서만 위와 같은 소견이 관찰되었으며 병변의 정도는 경미하였다. 음성군에서는 아무런 병변이 관찰되지 않았으며, 파보바이러스를 접종한 군에서도 별다른 특이할 만한 병변이 관찰되지 않았다.

마. 조직내 교잡법을 통한 돼지 써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스의 검출

돼지 써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스의 조직내 감염 및 증식 여부를 알아보기 위하여 조직내 교잡법을 실시하였다. 우선 중합효소 연쇄반응으로 감염조직으로부터 돼지 써코바이러스 2형에 특이적인 547bp의 밴드와 돼지 파보바이러스에 특이적인 330bp의 밴드를 확인하였다(Fig. 5). 이렇게 얻은 DNA fragments를 이용하여 전신 장기에 걸쳐 조직내 교잡법을 수행한 결과 돼지 써코바이러스와 돼지 파보바이러스를 혼합 접종한 자돈들의 임파절 cortex와 paracortex에 걸쳐 많은 수의 돼지 써코바이러스2형과 돼지 파보바이러스의 양성반응이 검출되었으며 접종 후 3일령에서 35일령에 걸쳐 모든 임파절의 germinal centres 부위에서 양성반응을 확인할 수 있었다(Fig. 6, 7). 특

히 임파절의 epithelioid macrophages와 multinucleated giant cells의 세포질에서 강한 양성반응이 있었으며 양성 반응을 보이는 대부분의 세포들이 granulomatous inflammation와 연관이 있는 세포들이었다. 임파절을 제외한 다른 조직에서는 비교적 이들 두 바이러스에 대해 양성 반응을 보이는 세포의 수가 적었으며, 모든 장기에 걸쳐 대부분의 돼지 써코바이러스 2형에 양성반응을 보이는 세포가 돼지 파보바이러스에서도 양성반응을 보였다(Table 1).

위 결과를 종합해 보면 국내분리 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 혼합 접종하여 약 28일 정도에 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 모든 임상적인 증상이 관찰되었으며, 35일경에 실시한 부검 결과 및 병리조직학적 검사 결과에서도 이들 두 바이러스를 혼합 접종하였을 때만 전형적인 이유자돈 전신성 소모성 증후군이 재현되었다. 또한 조직내 교잡법을 수행한 결과 이들 바이러스가 임파절을 중심으로 감염 및 증식하였으며, 돼지 써코바이러스 2형이 증식한 세포에 돼지 파보바이러스 같이 감염되어 있는 것으로 보아, 돼지 파보바이러스가 감염이 돼지 써코바이러스 2형의 증식에 중요한 역할을 한 것으로 사료된다. 즉 국내 분리 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 2형을 혼합 접종하였을 때 이유자돈 전신성 소모성 증후군이 발현되는 것을 실험적으로 확인하였으며 이 방법을 이용하여 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 질환모델을 확립할 수 있었다.

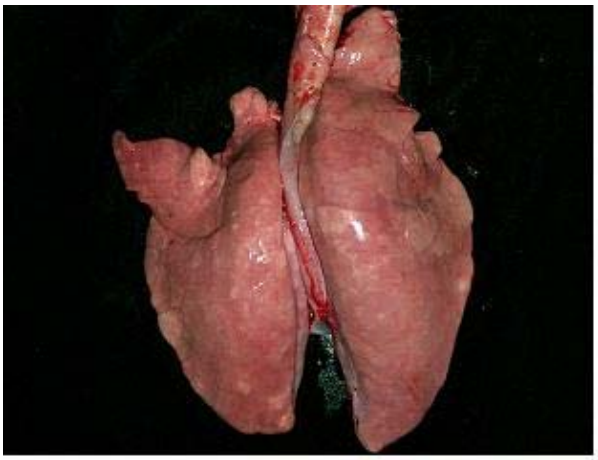


Figure 1. Lung, pig inoculated with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. Lung lesions consisted of interstitial pneumonia characterized by diffusely noncollapsed, heavy and firm or rubbery throughout all lobes.

Figure 2. Lung, pig inoculated with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. Tracheobronchial, mesenteric and mediastinal lymph nodes were moderately enlarged and pale

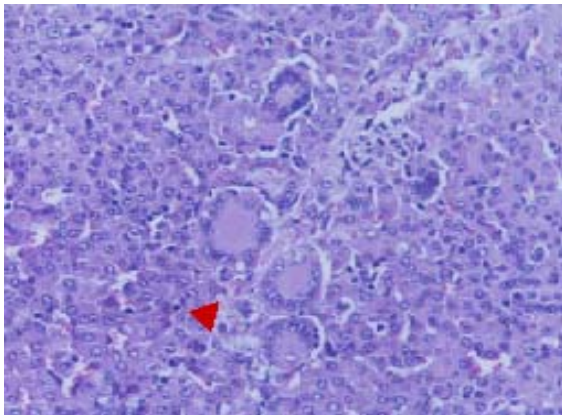


Figure 3. Liver, pigs inoculated with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus.. Several multinucleated giant cells(arrow head) were seen. H&E. x200.

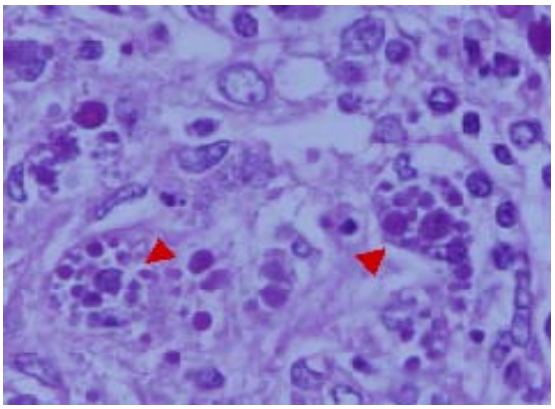


Figure 4. Lymph node, pigs inoculated with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. Multiple, grape-like intracytoplasmic inclusion bodies (arrow head) were often seen in the cytoplasm of histiocytic cells. HE. x400.

Figure 5. Detection of porcine circovirus (PCV) 2 and porcine parvovirus (PPV). Lane M 100 bp DNA ladder, Lane 1 Negative control, Lane 2 PCV2 standard strain, Lane 3 PPV standard strain, Lane 4 PCV2 and PPV standard strain, Lane 5 PCV2-positive sample, Lane 6 PPV-positive sample, Lane 7 PCV2- and PPV-positive sample

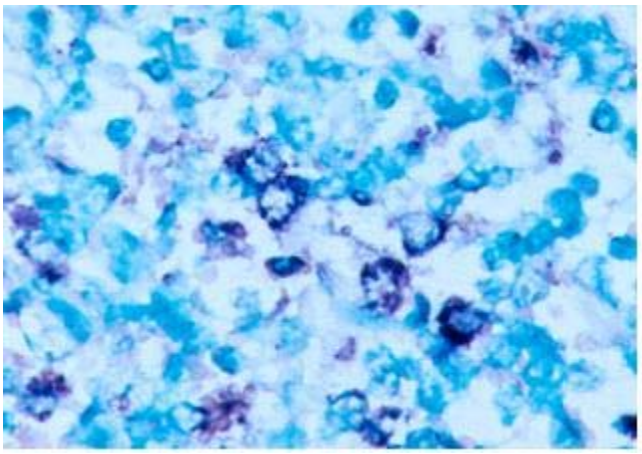


Figure 6. Lymph node, pigs with multisystemic wasting syndrome. Positive hybridization signals for porcine circovirus-2 nucleic acid occurred in the germinal center. In situ hybridization, methyl green counterstain. x400.

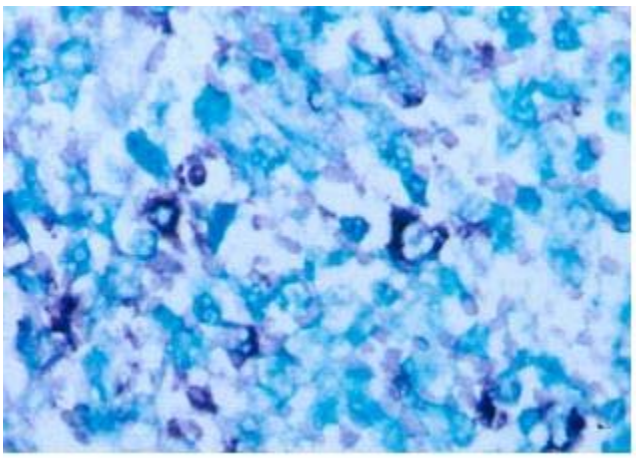


Figure 7. Lymph node, pigs with multisystemic wasting syndrome. Positive hybridization signals for porcine parvovirus nucleic acid occurred in the germinal center. In situ hybridization, methyl green counterstain. x400.

Table 1

Results of in-situ hybridization in pigs experimentally co-infected with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV)

| Tissues | Total Numbers of PCV2 positive / PPV positive in group |
|---|---|
| LN | 24 / 24 |
| Tonsil | 20 / 21 |
| Thymus | 22 / 23 |
| Spleen | 18 / 18 |
| PP | 11 / 0 |
| Lung | 16 / 16 |
| Liver | 11 / 9 |
| Kidney | 13 / 5 |
| Pancreas | 13 / 0 |
| Heart | 5 / 2 |

LN, inguinal lymph node; PP, Peyer's patches.

The eight uninfected control pigs gave consistently negative results.

## 2. 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스의 상관관계 분석

가. Viremia를 확인하기 위한 혈액학적 분석 결과

돼지 써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스에 혼합 감염된 자돈의 혈액을 바이러스 접종 후 3일 간격으로 채혈하여 혈액 내에서 돼지 써코바이러스 2형이 최초로 검출되는 시기를 중합효소 연쇄반응으로 확인해본 결과 바이러스 감염 후 3일에 돼지 써코바이러스 2형이 혈액 내에서 최초로 검출되었으며, 감염 후 35일까지 꾸준하게 검출되었다(Fig. 8).

또한 viremia 시  돼지 써코바이러스 2형이 혈액 내에서 cell-free하게 있는지 아니면 cell-dependent하게 존재하는지 알아보기 위하여 혈액세포를 도말하여 조직내 교잡법을 실시하였다. 실험 결과 혈액 내 monocyte의 세포질 내에서 돼지 써코바이러스 2형에 대한 강한 양성 반응이 검출되었다(Fig. 9). 즉, 돼지 써코바이러스 2형은 감염 후 1~3일 동안 잠복기를 거쳐 3일 경에 viremia가 일어나며, 혈액의 monocyte에 감염되어 전신으로 퍼지는 것을 확인하였다.

나. 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스의 감염 역학 분석 결과

전신 장기에 걸쳐 접종 일령별로 실시한 조직내 교잡법 결과, 폐, 간, 비장, 심장, 신장, 임파절 등 대부분의  전신 장기에 돼지 써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스가 감염 및 증식하는 것을 확인하였다. 감염 세포는 granulomatous inflammation 부위에 침윤한 macrophage였으며 이들 세포의 세포질에 주로 감염되는 것을 확인 하였다. 주로 감염 3일후에 편도 및 임파절 그리고 혈액 내의 monocyte에서 이들 바이러스에 감염된 세포가 최초로 관찰되었으며, 이후 감염 20일까지 전신장기로 바이러스가 퍼져나갔다(Table 2). 양성 반응을 보이는 대부분의 세포에서 돼지 써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스가 동시에 검출되었다(Fig. 10A, B).

특히 임파절에서의 바이러스 증식량을 살펴보면 이들 바이러스가 감염 후 25일 까지 꾸준히 증식하여 최대의 양을 보였으며, 이후 35일까지는 다시 바이러스 양이 줄어드는 양상을 보였다(Fig. 11). 또한 돼지 파보바이러스에 비하여 돼지 써코바이러스 2형의

증식량이 월등히 많았으며, 이는 아마도 돼지 파보바이러스가 돼지 써코바이러스 2형의 증식에 positive effect를 보이는 것으로 추정된다.

즉, 위 결과를 종합해보면 돼지 써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스가 최초 비강을 통하여 편도에 감염이 이루어진다. 이후 약 1~3일간의 잠복기를 거쳐 viremia가 일어나며 혈액 내의 monocyte에 의해 전신으로 바이러스가 퍼지게 된다. 또한 전신 장기에 감염된 바이러스는 파보바이러스의 감염에 의한 염증 및 면역반응에 의하여 대량으로 증식하여 결국 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 유발하는 것이다.

Figure 8. Detection of porcine circovirus (PCV) 2 in blood. Lane M 100 bp DNA ladder, Lane 1 PCV2 standard strain, Lane 2 Negative control, Lane 3 to 7 PCV2 positive blood from 3 to 35dpi

Figure 9. Peripheral blood cell smear from pig experimentally co-infected with PCV2 and PPV at 20 dpi. PCV2 DNA is demonstrated in cytoplasm of peripheral blood monocytes. In-situ hybridization; nitro-blue tetrazolium/5- bromocresyl-3-indolylphosphate, methyl green counterstain. x400.

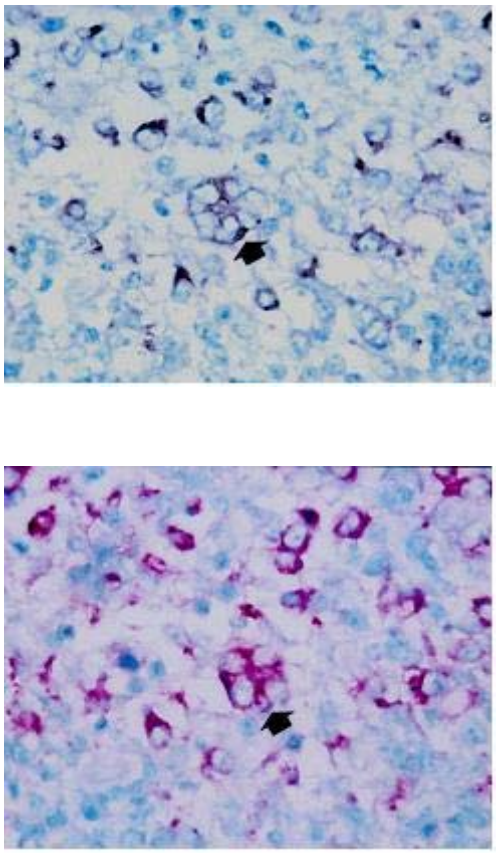


Figure. 10A, B. Consecutive serial sections of lymph node from pigs experimentally co-infected with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV) at 24 days post-inoculation (dpi). (A) PCV2 DNA (arrow) is demonstrated in macrophages in lymph node. In-situ hybridization; nitro-blue tetrazolium/5-bromocresyl-3-indolylphosphate, methyl green counterstain. x400. (B) PPV DNA (arrow) is demonstrated in macrophages in lymph node. In-situ hybridization; red substrate, methyl green counterstain. x400.

Table 2.

Results of in-situ hybridization in pigs experimentally co-infected with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV)

| Tissues | PCV2-positive/PPV-positive pigs in sub-group of three on post-inoculation days | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3 | 5 | 7 | 10 | 17 | 20 | 24 | 35 |
| LN | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| Tonsil | 0/1 | 2/2 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| Thymus | 2/2 | 2/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| Spleen | 0/0 | 1/1 | 2/2 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| PP | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 2/0 | 3/0 | 3/0 | 3/0 |
| Lung | 0/0 | 0/0 | 1/1 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| Liver | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 2/0 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| Kidney | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 2/0 | 2/0 | 3/1 | 3/2 | 3/2 |
| Pancreas | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 1/0 | 3/0 | 3/0 | 3/0 | 3/0 |
| Heart | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 2/0 | 2/1 | 1/1 |
| PBM | 2/2 | 2/2 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/2 |

LN, inguinal lymph node; PP, Peyer's patches; PBM, peripheral blood monocytes.

The eight uninfected control pigs gave consistently negative results.

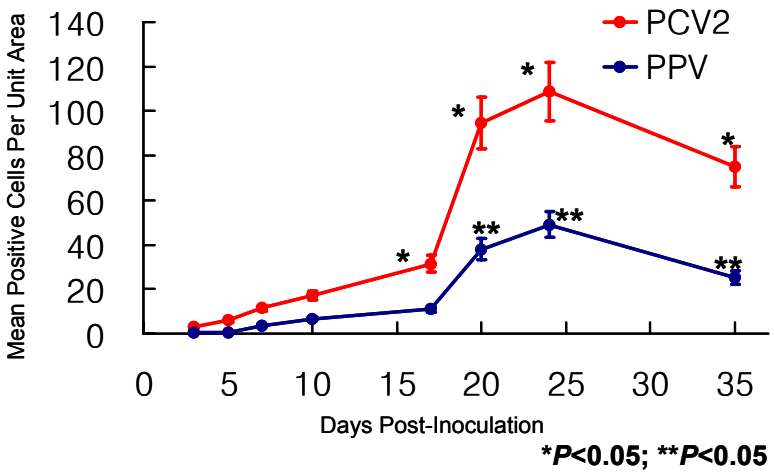



Figure 11. Mean positive cells per unit area for PCV2 and PPV in lymph nodes from pigs experimentally co-infected with PCV2 and PPV. $^{*}P < 0.05$; comparison of 17, 20, 24 and 35 dpi vs. 3, 5, 7 and 10 dpi. $^{**}P < 0.05$; comparison of 20, 24 and 35 dpi vs 3, 5, 7, 10 and 17 dpi.

### 3. 성장정체를 유발하는 식욕억제 물질(cachectin) TNF-α의 분석 결과

가. 체충과 증체율 변화 관찰

돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 2형을 감염시킨 후 3일간격으로 체중을 측정한 결과 바이러스를 접종하지 않은 음성군의 경우 꾸준히 체중이 증가하여 처음 체중에 비하여 약 360%의 체중 증가가 있었다. 하지만 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 혼합 접종한 군에서는 75% 밖에 증가 하지 않았다($P < 0.01$). 파보바이러스 접종군에서는 음성군과 비슷한 체중 증가량을 보였으며 돼지 써코바이러스 2형만을 접종한 군에서도 약 150%의 체중 증가량이 있었으나 혼합 접종군만큼 심한 증체량의 감소는 보이지 않았다(Fig. 12, Table 3).

나. ELISA를 이용한 TNF-α 분비 실험 결과

1) *In vitro* TNF-α 분비 실험

돼지 폐포 대식구를 채취하여 돼지 써코바이러스와 돼지 파보바이러스를 in vitro 상에서 감염 시킨 결과 감염 후 16시간 까지 TNF-α의 분비량이 증가하다가 48시간에 감소하는 양상을 보였다 또한 돼지 써코바이러스나 돼지 파보바이러스를 단독 감염했을 때 보다는 두 바이러스를 혼합감염 시켰을 때 TNF-α의 분비량이 훨씬 더 많은 것을 확인 할 수 있었다($P < 0.01$) (Fig. 13).

2) *In vivo* TNF-α 분비 실험

돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보 바이러스를 공격접종한 돼지를 3일 간격으로 연속 채혈하고 그 혈청으로부터 TNF-α를 측정한 결과 그 분비량이 10일까지 급격하게 증가하였으며 이 후 서서히 감소하는 추세를 보였다. 또한 돼지 써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스를 단독 감염 시켰을 때 보다 두 바이러스를 혼합 감염 시켰을 때 그 분비량이 훨씬 많은 것을 확인 할 수 있었다($P < 0.01$) (Fig. 14).

3) 체중과 TNF-α 분비량과의 상관관계

증체량과 TNF-α 분비량과의 상관관계를 분석하기 위하여 pearson correlation test를 실시하였다. TNF-α 분비량이 많은 개체 일수록 실험 종료 후 체중의 증가량이 적었으며 음성군이나 파보바이러스를 접종한 군처럼 TNF-α 분비량이 많지 않았던 군에서는 체중의 증가량이 많이 나타났다. 즉 체중과 TNF-α 분비량 간에는 negative correlation (pearson $r$= -0.923, $P < 0.001$)의 관계가 있었다(Fig. 15).

다. 조직내 교잡법을 통한 TNF-α 핵산 발현 실험

접종 실험을 통하여 얻은 장기로부터 만성 육아종성 염증 및 식욕억제와 관련된 중요한 싸이토카인인 TNF-α의 mRNA를 검출하기 위하여 조직내 교잡법을 실시한 결과 육아종성 염증 소견을 보이는 macrophage 및 multinucleated giant cell의 세포질 부위에서 TNF-α의 mRNA를 검출 할 수 있었다(Fig. 16A, B). 이들 TNF-α의 mRNA를 발현하는 세포는 돼지 써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스에 감염된 세포로 이들 바이러스의 감염이 직접적으로 TNF-α의 분비를 촉진하는 것으로 추정된다.

위 실험 결과를 종합해보면 이유자돈 전신성 소모성 증후군에서 나타나는 심한 위축 소견은 돼지 써코바이러스 2형 감염에 의한 TNF-α의 분비량 증가로 나타나는 결과이며 파보바이러스의 감염에 의해 그 분비량이 훨씬 증가하는 것을 알 수 있었다. 조직내 교잡법을 시행한 결과에서도 돼지 써코바이러스 및 돼지 파보바이러스가 감염된 세포인 macrophage 및 multinucleated giant cell에서 동시에 TNF-α의 mRNA를 발현하는 것으로 보아 이들 바이러스의 감염이 직접적으로 TNF-α의 분비를 촉진하여 혈중의 TNF-α의 농도를 올리며 이렇게 올라간 TNF-α serum level에 의해 대뇌에서 식욕이 억제되며, 결국 증체량이 감소하는 것이다.

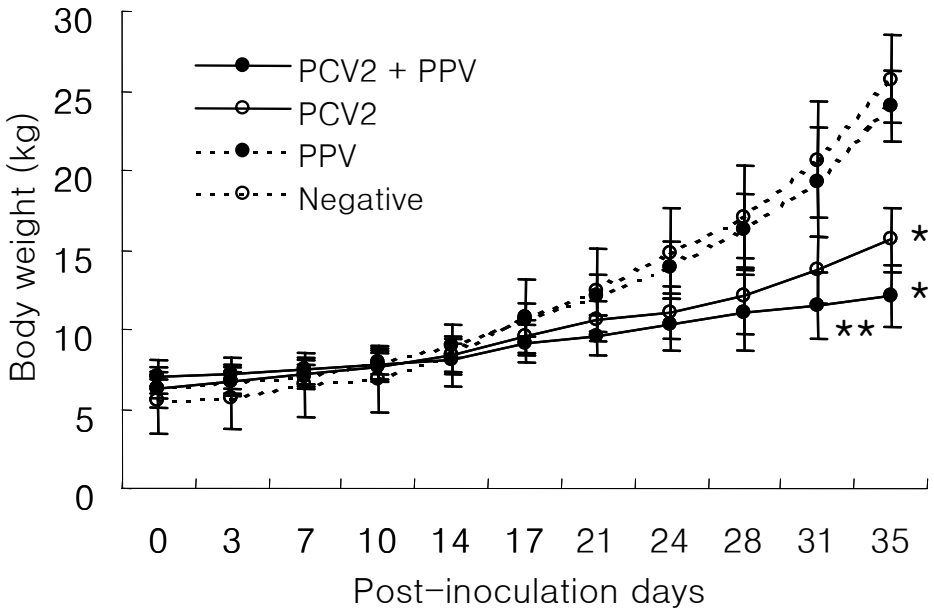



Figure 12. Body weight in pigs experimentally infected with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV) alone or in combination (PCV2 and PPV). Significant differences at the each time point compared to other groups ($P < 0.05^{*}$, $P < 0.01^{**}$)

Table 3. Comparison of gain weight in pigs experimentally infected with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV) alone or in combination (PCV2 and PPV).

| Group | Body weight of 0 dpi | Body weight of 35 dpi | Percentage of gain weight |
|---|---|---|---|
| Negative | 5.53 | 25.7 | + 364.7 % |
| PPV | 6.25 | 24.1 | + 285.6 % |
| PCV2 | 6.20 | 15.60 | + 151.6 % |
| PCV2+PPV | 5.70 | 10.02 | + 75.7 % |

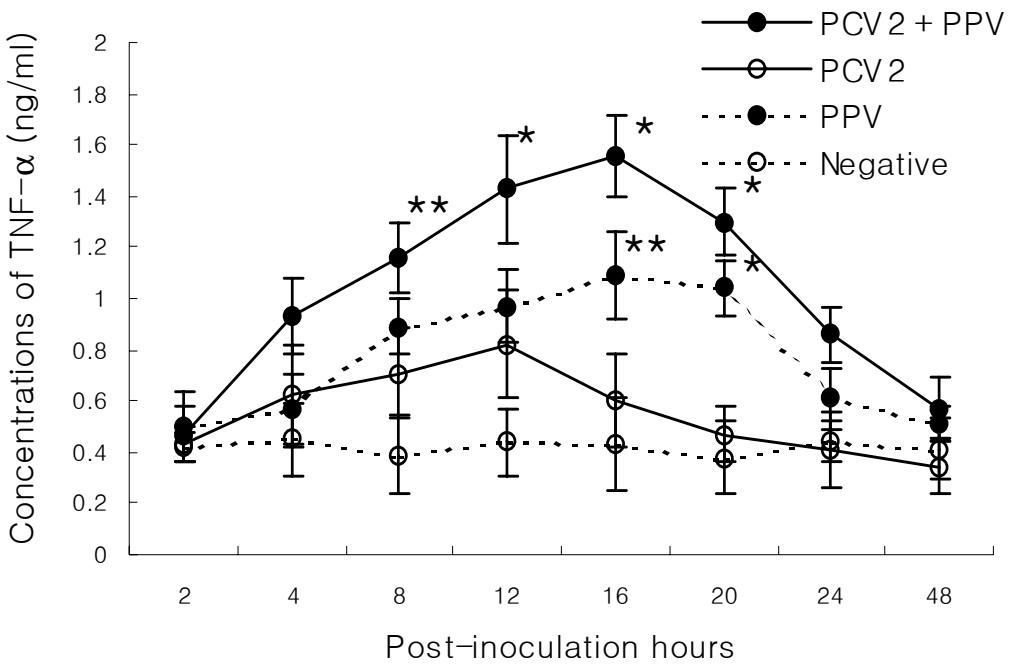



Figure 13. Tumor necrosis factor-α (TNF-α) production of alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV) alone or in combination (PCV2 and PPV). Significant differences at the each time point compared to other groups ($P < 0.05^{*}$, $P < 0.01^{**}$).

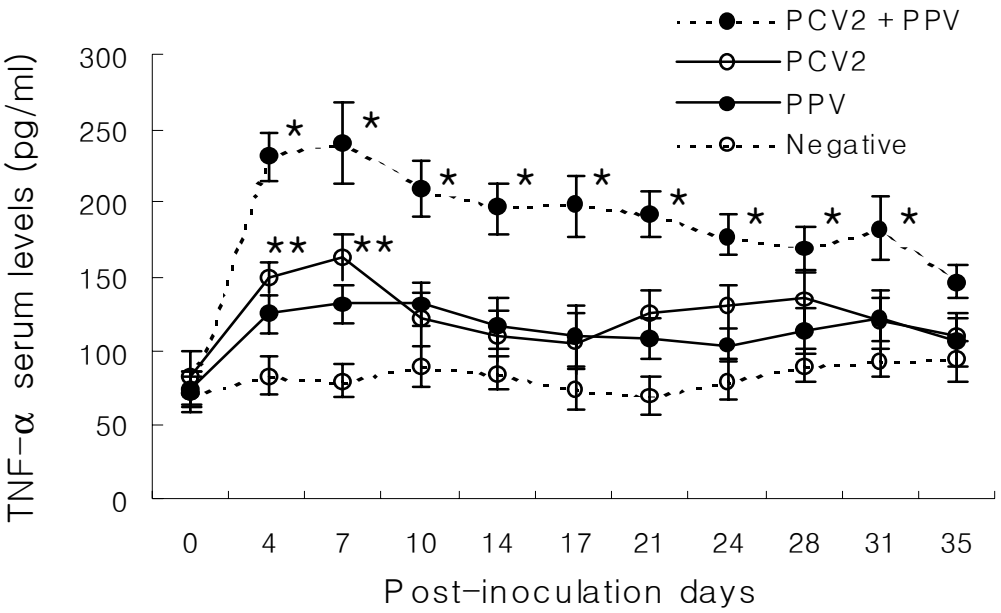



Figure 14. Tumor necrosis factor-α (TNF-α) production of serum in pigs experimentally infected with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV) alone or in combination (PCV2 and PPV). Significant differences at the each time point compared to other groups ($P < 0.05^{*}$, $P < 0.01^{**}$).

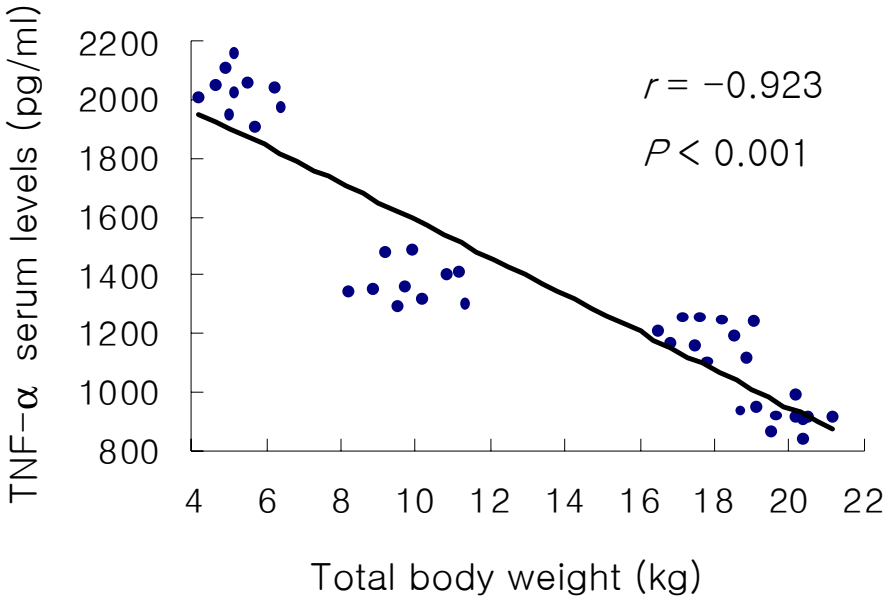
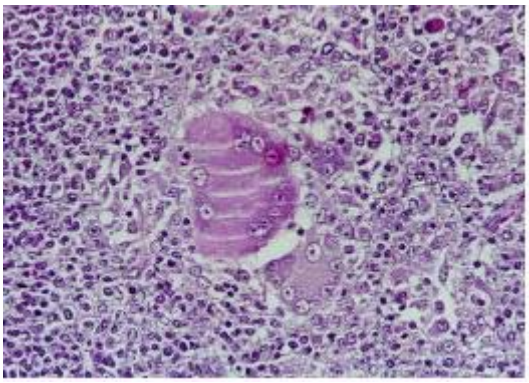



Figure 15. The relationship of tumor necrosis factor-α (TNF-α) production of serum and total body weight in pigs experimentally infected with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV). Significant negative correlation was found between at TNF-α production and body weight ($r$= −0.923, $P$ < 0.001).



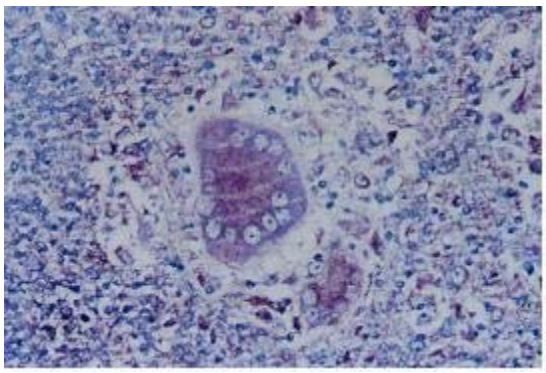


Figure 16A, B. Consecutive serial sections of lymph node from pig experimentally coinfected with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV) at 35 days post-inoculation. (A) Several multinucleated giant cells(arrow head) were seen. H&E. x400. (B) Tumor necrosis factor-α RNA was detected in multinucleated giant cells. In situ hybridization; cDNA probe; nitroblue tetrazolium/5-bromocresyl-3-indolylphosphate, methyl green counterstain. x400.

### 4. 이유자돈 전신성 소모성 증후군에서 관찰되는 빈혈의 원인 분석 결과

돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 공격접종 한 후 3일 간격으로 연속적으로 채혈을 하고 적혈구 수를 측정한 결과 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 보이는 돼지에서 적혈구 수의 지속적임 감소가 나타났다. (Fig. 17). 하지만 돼지 써코바이러스 단독 접종군이나, 파보바이러스 단독 접종군에서는 혼합접종군과 같은 심한 빈혈 현상이 관찰되지 않았다.

빈혈이 나타난 원인을 보다 자세하게 살펴보기 위하여 자돈의 골수 조직을 채취하여 병리조직학적 검사 및 돼지 써코바이러스 2형에 대한 면역조직화학법(immunohistochemistry)을 시행하였다. 병리조직학적으로는 골수조직의 위축 등의 특이할 만한 결과가 나타나지 않았다. 그러나 돼지 써코바이러스 2형에 대한 면역조직화학법을 수행과 결과 골수 조직의 hematopoietic cells의 세포질 내에서 다수의 돼지 써코바이러스 2형의 항원이 검출 되었으며, 반면에 stromal cells에서는 검출되지 않았다 (Fig. 18).

돼지 써코바이러스 2형이 빈혈을 유발하는 정확한 원인은 아직 확실하지 않다. 다만 돼지 써코바이러스 2형과 같은 circoviridae인 chiken anemia virus가 조류에서 심한 빈혈을 유발하는 것으로 보아 돼지 써코바이러스 2형도 이와 유사하게 골수 조직의 hematopoietic cells에 감염되어 조혈기능을 억제하는 것으로 추정된다.

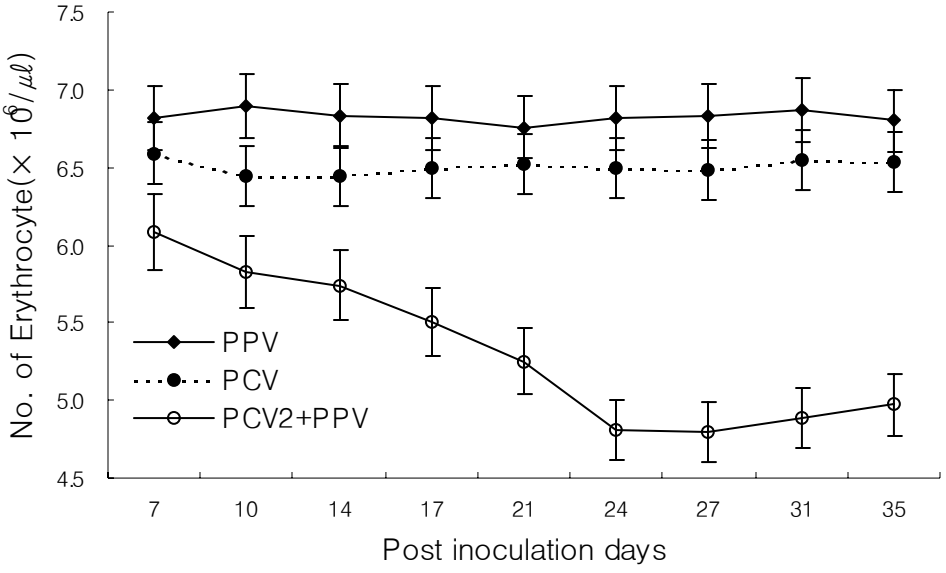



Figure 17. Total red blood cell of pigs experimentally infected with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV) alone or in combination (PCV2 and PPV).

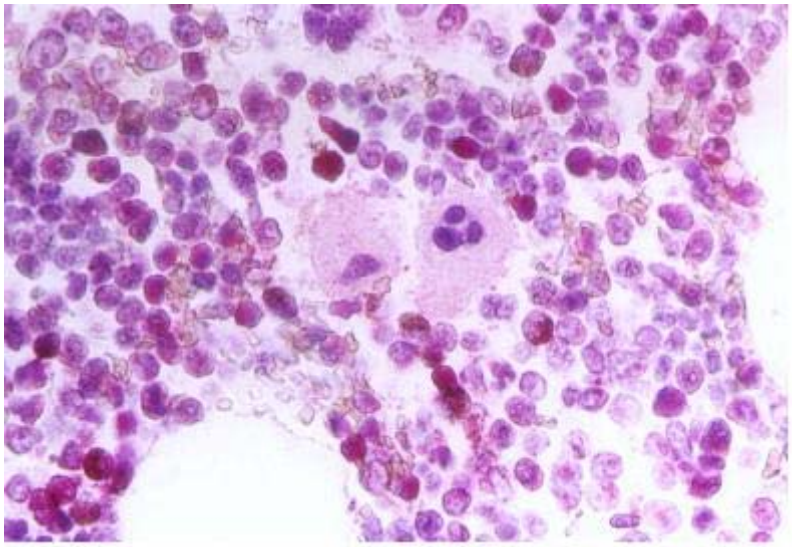


Figure 18. Bone marrow from pigs experimentally infected with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV). Note positive cytoplasmic staining for porcine circovirus in hematopoietic cells. Immunohistochemistry, alkaline phosphatase, fast red, hematoxylin. ×400.

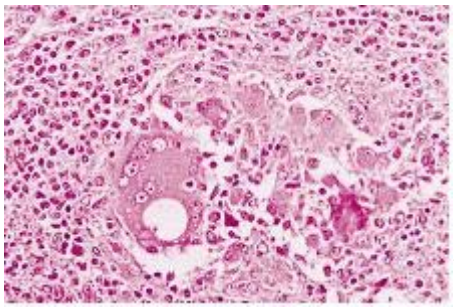
### 5. 화학주성인자(Chemokine) MCP-1, MIP-1 분석 결과

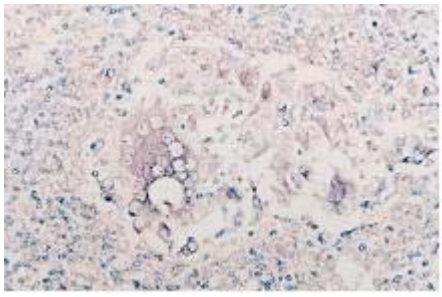
Multinucleated giant cell의 형성에 중요한 작용을 하는 것으로 알려진 강력한 화학주성인자인 MCP-1 그리고 MIP-1의 분석을 위하여 우선 semiquantitative RT-PCR을 실시하였다. 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 혼합 감염시켜 임파절 내에서 거대다핵세포가 형성되는 경우 MCP-1과 MIP-1의 mRNA가 접종후 17일 까지 발발현양 최대로 증가하였다(Fig 19). 이후 임파절에 macrphage의 침윤이 관찰되었으며 28일경에 Multinucleated giant cell이 최초로 관찰되었다.

돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 혼합 감염시킨 이 임파절의 조직을 이용하여 조직내 교잡법을 실시한 결과 육아종성 염증을 보이는 부위에서 MCP-1 및 MIP-1에 양성반응을 보이는 다수의 세포가 관찰되었으며 특히 Multinucleated giant cell의 세포질 내에서 강한 양성 반응이 관찰되었다(Fig 20A, B, C).

병리조직학적 병변에서 만성육아종성 염증의 정도에 따라 1~5까지 점수를 매긴 결과와 조직내에서 MCP-1, MIP-1의 mRNA 발현양의 상관 관계를 분석한 결과, MCP-1, MIP-1 mRNA의 발현양이 증가할 때 심한 만성육아종성 염증반응의 병변이 형성되는 양상을 보였다. 즉 만성 육아종성 염증병변과 MCP-1, MIP-1의 발현에는 positive한 상관관계(pearson $r$= 0.6022, $P < 0.01$)가 있었다(Table 4, Fig. 21).

Figure 19. Semiquantitative PCR for estimating MCP-1 and MIP-1 expression in a pigs experimentally infected with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV).





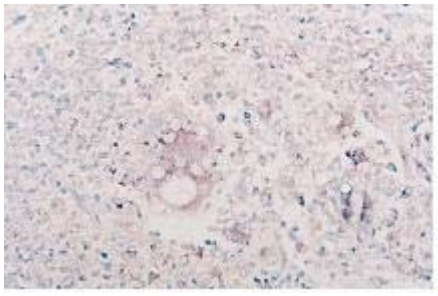


Figure 20A, B, C. Consecutive serial sections of lymph node from pigs experimentally coinfected with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV) at 35 days post-inoculation. (A) Several multinucleated giant cells(arrow head) were seen. H&E. x400. (B) Monocyte chemoattractant protein-1 mRNA was detected in multinucleated giant cells. In situ hybridization; cDNA probe; nitroblue tetrazolium/5-bromocresyl- 3-indolylphosphate, methyl green counterstain. x400. (C) Macrophage inflammatory protein-1 mRNA was detected in multinucleated giant cells. In situ hybridization; cDNA probe; nitroblue tetrazolium/5-bromocresyl-3-indolylphosphate, methyl green counterstain. x400.

Table 4. Correlation of MCP-1, MIP-1 mRNA level and histopathological lesion score in pigs coinfected with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV)

| Days of Post-inoculation | Lesion Scores | MCP-1 | MIP-1 |
|---|---|---|---|
| 0 day | 0±0 | 0.1±0.032 | 0.1±0.022 |
| 4 day | 0.2±0.12 | 0.32±0.028 | 0.13±0.029 |
| 7 day | 0.4±0.18 | 0.4±0.057 | 0.2±0.043 |
| 10 day | 0.8±0.21 | 0.7±0.087 | 0.5±0.032 |
| 14 day | 1.5±0.29 | 0.75±0.053 | 0.66±0.042 |
| 17 day | 2.5±0.34 | 0.8±0.032 | 0.74±0.034 |
| 21 day | 3.8±0.45 | 0.75±0.061 | 0.78±0.056 |
| 24 day | 4.4±0.42 | 0.6±0.053 | 0.65±0.072 |
| 28 day | 4.8±0.54 | 0.5±0.073 | 0.45±0.082 |
| 35 day | 4.7±0.35 | 0.45±0.042 | 0.4±0.063 |

MCP-1, Monocyte chemoattractant protein-1; MIP-1, Macrophage inflammatory protein-1

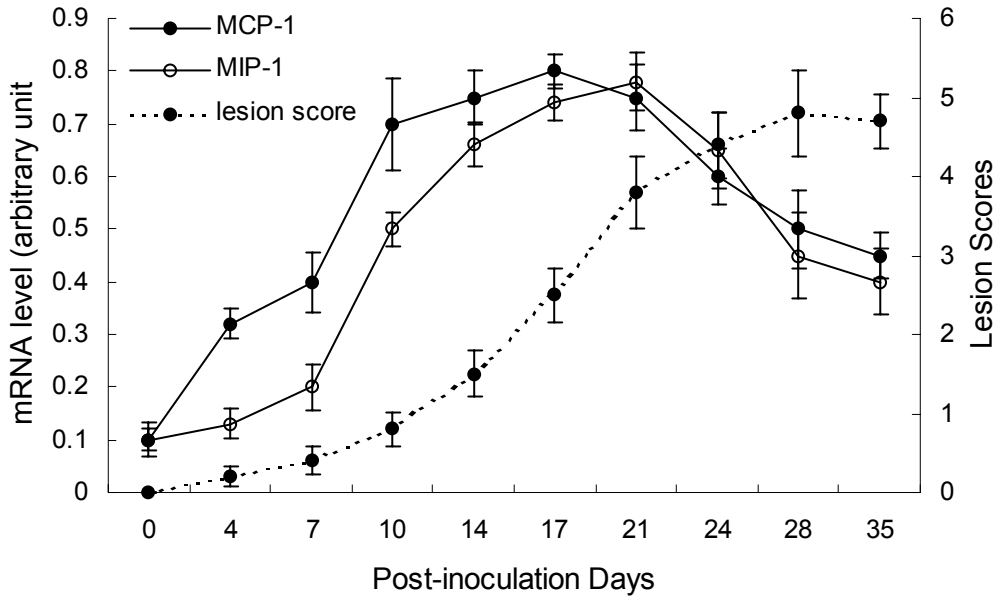



Figure 21. Correlation of MCP-1, MIP-1 mRNA level and histopathological lesion score in pigs coinfected with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV). Significant pasitive correlation was found between at MCP-1, MIP-1 and histopathological lesion score ($r$= 0.6022, $P < 0.01$).

# 제 3 장 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방백신 개발

## 제 1 절 서 설

1997년 캐나다의 만성 소모성 질환을 보이는 돼지로부터 이유자돈 전신성 소모성 증후군이 처음 보고되었으며, 1998년 이 질환의 원인체로 돼지 써코바이러스 2형이 알려졌다. 국내에서는 1998년 서울대학교 본 연구실에서 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 발생을 최초로 보고하였으며, 혈청학적 분석결과 국내의 약 70%의 돼지에서 이미 돼지 써코바이러스 2형에 감염된 것으로 밝혀졌다.

돼지 써코바이러스 2형은 기존에 사용 중인 세정제 및 소독제에 매우 저항성이 강한 특성을 갖고 있으며, 웅돈의 정액 및 모돈의 태반을 통하여 쉽게 수직감염 및, 분변, 타액, 심지어 공기를 통해서도 수평전파가 쉽게 이루어진다. 또한 돼지 써코바이러스 2형의 특성상 바이러스의 감염이 100% 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 발현으로 이어지지 않기 때문에, 이런 불현성 감염을 통하여 바이러스의 전파가 쉽게 이루어지고 있다.

현재까지 국내·외에서 이유자돈 전신성 소모성 증후군에 효과적인 백신이나 예방법이 개발되지 않고 있으며, 이는 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 정확한 병인론이 밝혀지지 않았기 때문이다. 또한 현재 속속 밝혀지고 있는 돼지 써코바이러스 2형의 특성이 백신의 개발을 더욱 어렵게 하고 있다. 즉 현재까지의 연구결과를 종합해보면 돼지 써코바이러스 2형은 이미 70%이상의 자돈에 감염이 되어 있으며 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 발생이 단순한 돼지 써코바이러스 2형의 감염에 의해서 유발되는 것이 아니라 2차적으로 돼지 파보바이러스 및 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 등의 바이러스 또는 흉막폐렴균 등의 세균의 감염이 이 질환의 발생에 중요한 보조적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 또한 돼지 써코바이러스 2형은 면역계의 증진이 바이러스의 증식에 영향을 미치는 것으로 알려 졌는데 현재 많은 농장에서 실시하고 있는 호흡기,

소화기 예방 백신이 오히려 돼지 써코바이러스 2형의 증식을 돕고 있으며 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 발생을 부추기고 있는 것으로 밝혀졌다.

이러한 현 상황 속에서 국내뿐만 아니라 국제적으로도 이유자돈 전신성 소모성 증후군에 의한 양돈 산업의 피해는 심각한 수준이며, 현재 국제적인 동물약품 업체들은 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방백신의 개발에 경쟁적으로 뛰어들어 막대한 자본을 투자하고 있다.

그러므로 본 연구의 목적은 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 정확한 병인론을 밝히고 이 결과를 토대하여 막대한 경제적 부가가치를 창출할 것으로 기대되는 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 예방하기 위한 효과적인 백신을 개발하는 것이 이 연구과제의 최종 목표이다.

# 제 2 절 재료 및 방법

## 1. 백신의 제조

가. 돼지 써코바이러스 2형 분리

이유자돈 전신성 소모성 증후군으로 진단된 자돈의 임파절 장기를 채취한다. 채취한 장기를 세절하여 바이러스 접종용 유제로 준비한다. 75㎠ flask에 써코바이러스 1형 또는 2형에 오염되지 않은 돼지 신장세포주(circo-free PK-15 cell line)을 monolayer가 되게 준비한다. 배지를 버리고, PBS로 2회 세척 후 300mM Glucosamine을 처치하고, 37℃에서 30분간 배양한다. Glucosamine을 버리고 새로운 배지로 갈아준 후 앞서 준비한 조직 유제를 접종하고 48-72시간까지 배양한다. 돼지 써코바이러스 2형은 CPE가 없는 바이러스이므로 72시간 배양 후 일부 세포를 수집하여 PCR로 바이러스의 배양 여부를 확인하고 양성 확인 시, 3회 동결과 해동을 반복하여, 5000rpm 30분 원심분리 후 상층액 만을 분리, -70℃에 동결하고, 일부는 다음 계대용 재료로 이용한다. 분리된 바이러스는 최종 3계대 배양하여 -70℃에 냉동보관 하였다.

나. 돼지 파보바이러스 2형 분리

이유자돈 전신성 소모성 증후군으로 진단된 자돈의 임파절 장기를 채취한다. 채취한 장기를 세절하여 바이러스 접종용 유제로 준비한다. 75㎠ flask에 돼지 고환 세포주(Swine Testicular cell, ST cell)를 monolayer가 되게 준비한다. PBS로 2회 세척 후 앞서 준비한 조직 유제를 접종하고 48-72시간까지 배양한다. 3회 동결과 해동을 반복하여, 5000rpm 30분 원심분리 후 상층액 만을 분리, -70℃에 동결하고, 일부는 다음 계대용 재료로 이용한다. 분리된 바이러스는 최종 3계대 배양하여 -70℃에 냉동보관 하였다

다. 바이러스의 역가($TCID_{50}$) 측정

국내 돼지 써코바이러스 2형을 10진 희석을 하여 $10^0$에서 $10^9$까지 희석하였다.

96-well flat bottom plate(Nunc, USA)에 PK-15 cell을 well당 $1\times10^5$씩 분주하여 monolayer 형성이 60~70% 되었을 때 Maintenance Medium에서 희석해 준비했던 바이러스를 각각의 well에 분주하였다. 37℃, 5% $CO_2$ Incubator에서 배양하였으며 이후 72~96시간 후에 cold ethanol로 10분간 고정하고 PBS로 2회 세척하였다. anti-PCV2 monoclonal antibody를 1:250으로 희석하여 고정된 plate에 well당 100㎕ 첨가한 후 37℃, incubator에서 45분간 방치하였다. 45분간 반응 후 각 well을 PBS로 3회 세척하고 1:50으로 희석한 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated rabbit anti-mouse IgG를 well 당 50㎕씩 분주하였다. 37℃에서 30분간 반응시킨 다음 PBS로 3회 세척하고 형광현미경으로 형광유무를 관찰하였다. 돼지 파보바이러스의 경우 ST cell을 이용하여 동일하게 실시하였다.

라. 바이러스의 불활화 및 Adjuvanting

바이러스를 대량 배양하기 위해 cell factory(Nunc, USA)에 PK-15 cell을 배양시킨 후 80% confluency를 보인 시점에서 돼지 써코바이러스 2형을 1.2 x $10^5$ $TCID_{50}$/ml로 PK-15 cell에 감염시킨 후 37℃, 5% $CO_2$하에서 배양 5~7일째에 수확하였다. 바이러스와 세포를 얼렸다 녹이는 방법을 3회 반복한 후 1,000rpm, 10분, 4℃에서 원심분리하여 상층액만을 수확하였다. 상층액의 일부를 채취하여 상기의 방법으로 바이러스의 역가를 측정하였다. 수확한 바이러스의 농도가 1 x $10^7$ $TCID_{50}$/m가 되도록 희석한 후 배양액을 formalin 최종농도를 1:2000 되게 하여 상온에서 2일간 불활화 시켰다. 불활화 시킨 바이러스 배양액을 멸균된 filter로 여과시킨 후 PBS로 24시간 투석시켜 formalin을 제거하였다. 불활화된 바이러스의 일부를 채취하여 PK-15 cell에 접종하여 불활화 유무를 확인하였다. 불활화된 것을 확인한 후 Aluminum hydroxide gel (Rehydragel)에 24시간 흡착시켜 불활화 백신을 만들었다. 이때 aluminum hydroxide의 양은 총 부피의 10%되게 첨가하였다.

돼지 써코바이러스 2형/돼지 파보바이러스 혼합백신의 두 바이러스의 농도가 1 x $10^7$ $TCID_{50}$/m이 되도록 혼합한 후 다음과정은 위와 동일하게 제조하였다.

마. 백신에 대한 면역원성 및 안전성 측정

1) Rabbit에서의 접종

Rabbit에서 백신의 면역원성을 측정하기 위해 4개월령 토끼에 접종하였다. 돼지 써코바이러스 2형 단독 백신 및 돼지 써코바이러스 2형 / 돼지 파보바이러스 혼합 백신을 각각 접종하였고 1차 접종은 피하로 2㎖을 주사하였고, 그 후 각 2주마다 근육주사를 통해서 2㎖씩 3차까지 접종하였다. 채혈은 접종 2주 후 경정맥에서 실시하였고, 3차 접종후 3주 후에 심장채혈을 통해 전혈을 채취한 후 혈청을 분리하였다. 음성대조혈청은 10%의 aluminum hydroxide gel만을 2ml 접종하였다.

2) Pig에서의 백신의 면역원성 및 안전성 검사

돼지 써코바이러스 및 돼지 파보바이러스에 감염되지 않은 1주령 자돈 60두를 준비하였다. 1주령에 20두씩 임의로 3군으로 나누어 돼지 써코바이러스 2형 단독 백신 및 돼지 써코바이러스 2형 / 돼지 파보바이러스 혼합 백신을 각각 1cc씩 근육주사를 통하여 접종하였고 음성대조군에는 10%의 aluminum hydroxide gel만을 1cc 접종하였다. 2주후 3주령에 다시 각군별로 1cc씩 추가 접종하였다. 백신접종전후 채혈을 실시하였다.

바. 항체의 면역원 및 역가 확인을 위한 간접형광항체법 (Indirect fluorescent assay, IFA)

국내 돼지 써코바이러스 2형을 1 x $10^4$ $TCID_{50}$/ml로 준비한다. 96-well flat bottom plate(Nunc, USA)에 PK-15 cell을 well당 $1\times10^5$씩 분주하여 monolayer 형성이 60~70% 되었을 때 준비했던 바이러스를 각각의 well에 분주하였다. 37℃, 5% $CO_2$ Incubator에서 배양하였으며 이후 72~96시간 후에 cold ethanol로 10분간 고정하고 PBS로 2회 세척하였다. 앞서 준비한 토끼 및 돼지 혈청을 1:8부터 1:2028로 2배씩 희석하여 고정된 plate에 well당 100㎕ 첨가한 후 37℃, incubator에서 45분간 방치하였다. 45분간 반응 후 각 well을 PBS로 3회 세척하고 돼지 혈청에는 1:50으로 희석한 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated rabbit anti-swine IgG, 그리고 토끼 혈청

에는 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-Rabbit IgG를 well 당 50 ㎕씩 분주하였다. 37℃에서 30분간 반응시킨 다음 PBS로 3회 세척하고 형광현미경으로 형광유무를 관찰하여, 항체의 역가를 기록하였다.

사. 항체의 특이성을 검정하기 위한 Western Blotting

백신을 접종한 혈청에서 돼지 써코바이러스 2형에 특이적인 단백질을 검출하기 위하여 돼지 써코바이러스 2형을 감염시킨 PK-15 cell line을 이용하여 Wstern blot을 실시하였다. 돼지 써코바이러스 2형이 감염된 PK-15 cell의 상층액 및 cell lysate를 sample buffer(60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 25% glycerol, 1.44 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 1:5의 비율로 섞어 100℃에서 5분간 끓여 변성시켰다. 이를 12.5% SDS-polyacrylamide gel에서 2시간동안 80 volt로 전기영동을 한 다음 gel을 꺼내어 transfer buffer(15.6 mM Tris base, 120 mM Glycine, pH 8.1~8.4)에 30분간 담구어 두었다. 미리 transfer buffer에 담가 놓은 filter paper(Bio-rad)와 nitrocellulose membrane (NENTM Life Science Products)사이에 gel을 넣어 semi trans-blot(Bio-rad)를 이용하여 13V에서 20분간 전이시켰다. Nitrocellulose membrane을 5% non-fat dry milk/tris buffered saline(10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5: TBS)에서 하룻밤 동안 blocking 시킨 후 TBS로 강하게 흔들며 3회 세척하였다. 1차 항체로 면역원성 실험에 사용한 토끼항체를 사용하여 1시간 동안 실온에서 흔들며 반응시켰다. TBS로 3회 세척한 후 2차 항체로 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Vector, USA)를 1:2,000으로 희석하여 1시간 반응시킨 뒤 이를 TBS로 3회 세척하였다. 발색제로 NBT/BCIP stock solution(Promega)을 alkaline phosphatase buffer(0.1 M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl2) 10 ㎖에 섞어 사용하였다.

## 2. 백신에 의한 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방효과 평가를 위한 바이러스 공격접종 실험

가. 공시동물 및 실험 디자인

돼지 써코바이러스 1,2형 및 돼지 파보바이러스에 혈청학적으로 감염된 적 없는 건강한 1주령 자돈 80두를 준비하였다. 무작위로 20마리씩 4개 군으로 분리한다. 제1군은 돼지 써코바이러스 2형 단독 백신 접종군, 제2군은 돼지 써코바이러스 2형/돼지 파보바이러스 혼합 백신 접종군, 제3군은 백신은 접종하지 않고 돼지 써코바이러스 2형 과 돼지 파보바이러스를 접종하는 양성군, 제4군은 백신 및 바이러스를 모두 접종하지 않는 음성군으로 설정한다. 각 군의 특성에 맞게 1주령에 제1군과 제2군에는 백신을 1cc 근육주사 하였으며, 3주령에 1cc씩 추가접종 하였다. 4주령에 제1,2,3군에 돼지 써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스를 1cc씩 비강으로 접종하였다. 각 군은 각각 독립된 사육시설에서 사육되었으며, 나머지 환경은 동일하였다. 접종 후 매일 임상증상을 주의 깊게 관찰하였으며, 7, 14, 21, 28, 35일령에 각 군별로 4두씩 부검하여 육안병변을 관찰하였다.

나. 병리조직학적 관찰

부검시 뇌, 폐, 간, 비장, 췌장, 소장, 대장, 임파절, 편도, 신장 등 전신의 장기를 채취하여 24시간동안 10% 중성화포르말린에 고정한다. 일반적인 조직 처리과정을 통하여 파라핀 포매하였고,. 파라핀 조직 샘플은 5㎛ 두께로 절단하여 Hematoxylin and Eosin (H&E) stain을 실시했다. 조직샘플은 일반적인 광학 현미경하에서 관찰하였다.

다. 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스의 감염 및 증식에 백신이 미치는 영향 및 효과 분석

1) 바이러스 DNA 추출

부검시 돼지의 서혜임파절 또는 비장을 채취하고, Qiagen®의 Tissue DNA extraction kit를 이용하여 25 mg 조직으로부터 DNA를 추출하였다.

2) 프라이머(Primer) 합성

다중 중합효소 연쇄반응을 수행하기 위하여 돼지 써코바이러스 2형와 돼지 파보바이러스에 특이적인 프라이머를 디자인 하였다. 돼지 써코바이러스 프라이머는 Porcine circovirus type 2 (Genbank access code : AF465211)의 open reading frame 2 (ORF2) 부위에서 프라이머를 제작하였다. 돼지 써코바이러스의 전방향 프라이머(AF)는 5‘- CAG TTC GTC ACC CTT TCC C-3′ (939-957 nucleotides), 역방향 프라이머(AR)는 5’-GGG GGA CCA ACA AAA TCT CT-3′ (1466-1485 nucleotides)가 되도록 제작하였다.

돼지 파보바이러스 프라이머는 viral protein 2 (VP2)를 특이적으로 증폭할 수 있도록 디자인 하였다. 돼지 파보바이러스에 대한 전방향 프라이머(BF)는 5‘-CAT ACA CTG GAC AAT CAC AAC AAA-3′ (3451-3474: nucleotides), 역방향 프라이머(BR)는 5’-GCC TAA TG CTG TTG CTT CTG-3′ (3760-3780: nucleotides)가 되도록 제작하였다.

3) 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)

중합효소 연쇄반응을 위해서 5㎕ DNA 상층액, 1㎕ AF, AR, BF, BR 프라이머 (25pmol/㎕), 5㎕ 10×reaction buffer (100mM Tris-HCl (pH 8.3), 400mM KCl, 15mM $MgCl_2$, 5㎍/㎖ activated BSA), 0.2mM deoxynucleotides(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5U Taq polymerase를 각각 넣고, 50㎕의 reaction volume이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA) 를 이용하여 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 60초간 35 cycle 수행하고, 마지막으로 72℃ 10분간 반응하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물 10㎕를 ethidium bromide로 염색된 2% agarose gel에 전기영동하였다.

4) 탐침자(Probe) 제작

전기영동하여 특이적인 band를 확인한 후 PCR product는 Wizard PCR preps (Promega Biotech, Madison, WI, USA) 를 이용하여 증폭된 DNA를 정제하고, DIG DNA labeling & detection kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) 를

사용하여 random labeling 한 후, nylon membrane으로 labeling된 probe의 농도를 결정하였다.

5) 조직내 교잡법(In situ hybridization)

부검시 전신의 장기 조직을 10% 중성 포르말린에 24시간 고정시킨 후 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 파라핀 포매 후 4㎛ 두께로 절편하여 Superfrost/plus slide (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 에 부착시켜 상온에 보관하였다. 동일한 조직 절편 두장을 준비하여, 한 장은 돼지 써코바이러스 2형 검출을 위해서 사용하였으며 다른 한 장은 돼지 파보바이러스 검출을 위하여 사용하였다. 조직 절편을 xylene에 탈파라핀 시키고 함수과정을 거친 후 phosphate-buffered saline (PBS; 0.01M, pH 7.4) 에 5분간 두었다. Target nucleic acids를 노출시키기 위해 0.2N HCl에 20분간 처리하여 단백질을 제거한 후 200㎍/㎖의 proteinase K (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 를 37℃에서 25분간 처리한 후 4% paraformaldehyde로 상온에서 10분간 고정하였다. PBS로 2회 세척한 후 0.1M triethanolamine-HCl buffer (pH 8.0) 에 0.25% acetic anhydride를 넣고 5분간 acetylation 시킨 후 0.25% acetic anhydride를 한 번 더 넣고 5분간 더 acetylation 시켰다. 2×saline sodium citrate (SSC) (1×SSC; 50mM NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0) 로 10분간 세척 후, 한 장에는 digoxigenin으로 표지된 돼지 써코바이러스 2형 탐침자, 다른 한 장의 절편에는 돼지 파보바이러스 2형 탐침자를 각각 1ng/㎕의 농도가 되도록 standard hybridization buffer(2×SSC, 50% deionized formamide, 10mg salmon sperm DNA (Oncor, Gaithersburg, MD, USA), 0.02% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% Denhart's solution, 50% dextran sulfate solution) 에 희석하여 30㎕ 정도를 slide 조직위에 떨어뜨린 후 coverslip을 덮고 가장자리를 rubber cement로 잘 봉한 다음 94℃에서 10분간 가열하여 45℃에서 8시간 교잡반응 하였다. 교잡반응 후 coverslip을 제거하고 상온의 4×SSC에 5분간 2회, 45℃ 2×SSC와 상온의 2×SSC에서 각각 10분씩 2회, 그리고 0.2×SSC에서 5분간 2회 세척 후 maleic acid buffer (Buffer 1; 100mM maleic acid, 150mM NaCl, pH 7.5) 로 5분간 처리한 후 1×blocking buffer (Buffer 2) 에서 40분간 처리하였다. 양성반응을 검출하기 위해

alkaline phosphatase conjugated anti-digoxigenin (Boehringer Mannheim) 을 Buffer 2에 1:500으로 희석하여 조직절편 위에 잘 떨어뜨린 후 37℃에서 1시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Buffer 1과 Buffer 2에서 10분씩 1회 처리 후 detection buffer (Buffer 3; 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.05M $MgCl_2$, pH 9.5) 로 5분간 처리하였다. 발색을 위하여 alkaline phosphatase의 기질인 nitroblue tetrazolium과 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate를 Buffer 3에 희석하여 조직절편 위에 잘 떨어뜨린 후 상온에서 3-4시간 정도 반응시켰다. 발색이 끝난 후 tris-ethylenediamine tetraacetic acid buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 에 여러번 침적하여 반응을 중지하였다. 0.5% methyl green으로 대조염색한 후 증류수에 세척하여 완전히 말린 후 mounting하여 광학현미경으로 관찰하였다.

6) 형태학적 분석

조직내 교잡법을 실시한 조직절편 슬라이드를 Kodak DC290 system을 이용하여 광학현미경 하에서 무작위로 3부분 촬영한다. 촬영한 사진은 NIH Image J Program (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA)을 이용하여 돼지 써코바이러스 2형 및 돼지 파보바이러스에 감염되어 검게 염색된 세포의 숫자를 계산하고 단위면적 ($0.25mm^2$)당 양성 세포의 수로 환산하여 평가한다.

7) 통계적 분석

통계학적 분석은 InStat package (GraphPad Softwear, San Diego, CA, USA)를 이용하여 수행하였다.. Wilcoxon matched pairs signed rank test는 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 군내의 유의성을 검증하기 위하여 실시하였으며, Mann-Whitney U-Wilcoxon rank sum W test는 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 군 간의 상관관계를 검정하기 위하여 실시하였다.

라. 식욕억제 물질(cachectin) TNF-α에 백신이 미치는 영향 및 효과 분석

1) 체중 측정 및 증체량 분석

바이러스 접종 후 0, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35에 각각의 개체별 체중을 측정하였으며 (체중 측정량 - 초기 체중) / 초기 체중 * 100 으로 증체량을 분석하였다.

2) TNF-α 정량을 위한 ELISA

바이러스 접종 후 0, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35에 각 군별로 1두씩 부검을 실시하였고 목정맥으로부터 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. porcine TNF-α enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA, Endogen, Woburn, MA)를 이용하여 96well plate에 양성대조군인 recombinant TNF-α protein과 실험재료인 세포배양 상층액 및 혈청을 각각 분주한다. 1시간 후 plate를 3회 세척 후 peroxidase conjugate anti-TNF-α 항체를 분주한다. 30분 후 plate를 다시 3회 세척 후 TMB substrate로 발색반응 실시한다. 20분 후 stop solution을 이용하여 발색반응을 정지 후 450nm에서 결과를 읽는다. 양성대조군의 결과를 이용하여 standard curve를 구한 뒤 샘플의 결과와 비교하여 TNF-α의 양을 측정한다.

3) 조직내 교잡법

가) 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 위한 RNA 추출

조직 유제 500㎕를 Trisol LS (Gibco BRL) 500㎕가 담긴 eppendorf tube에 넣고 vortex하여 상온에 10분간 정체시켰다. 여기에 300㎕의 chlorform을 첨가하여 다시 10분간 정체시킨 다음 4℃ 4,000g에서 15분간 원심하였다. 원심후 얻어진 상층액 500㎕를 새로운 eppendorf tube에 넣고, Isopropanol 500㎕를 추가하고 vortex하여 -20℃에서 overnight 침전시켰다. 다음날 아침에 4℃ 14,000rpm으로 30분간 원심한 후 상층액은 버리고 cold 70% ETOH 500㎕로 세척 후 다시 4℃ 14,000rpm 조건으로 30분간 원심하였다. 상층액을 제거하고 speed vacuum으로 건조시킨 후 30㎕ 멸균증류수로 부유하였다.

나) 역전사 반응(Reverse transcription, RT)

추출된 RNA 1㎕, DEPC D.W. 3.5㎕, 2.5mM dNTP 2㎕, 10X PCR buffer (1.25mM $MgCl_2$) 2㎕, oligo d(T) 0.5㎕, RNase inhibitor(50U) 0.5㎕, MuLV reverse transcriptase(200U) 0.5㎕ (Perkin Elmer)를 혼합하여 총반응량을 10㎕로 맞춘 후에 42℃에서 40분간 반응하여 역전사 반응을 수행하여 cDNA를 합성하였다.

다) 중합효소 연쇄반응

역전사 반응을 마친 10㎕의 cDNA template에 중합효소 연쇄반응을 위해서 TNF-α의 전방향 프라이머(5′- GCT GTA CCT CAT CTA CTC CC - 3′), 역방향 프라이머(5′- TAG ACC TGC CCA GAT TCA GC - 3′) (25pmol/㎕) 각 1㎕, 5㎕ 10×reaction buffer (100mM Tris-HCl (pH 8.3), 400mM KCl, 15mM $MgCl_2$, 5㎍/㎖ activated BSA), 0.2mM deoxynucleotides(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5U Taq polymerase를 각각 넣고, 50㎕의 reaction volume이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA) 를 이용하여 94℃에서 30초, 62℃에서 30초, 72℃에서 30초간 35 cycle 수행하고, 마지막 단계에서 72℃ 10분간 반응하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물 10㎕를 ethidium bromide로 염색된 1% agarose gel에 전기영동 하였다.

라) Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) 탐침자 제작

역전사 중합효소 연쇄반응을 통하여 얻어진 291bp의 특이적인 DNA 분절은 Wizard PCR preps (Promega Biotech)을 이용하여 정제하고, DIG DNA labeling and detection kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 digoxigenin으로 임의표지하여 탐침자로 이용하였다.

마) 조직내 교잡법

부검시 전신의 임파절을 10% 중성 포르말린에 24시간 고정시킨 후 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매 후 4㎛ 두께로 절편하여 Superfrost/plus slide (Fisher

Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 에 부착시켰다. Xylene에 탈파라핀 과정 후, 단계적인 함수과정을 실시한다. 0.2N HCl에 20분간 처치한다. DW에 30초간 세척 후 100㎍/㎖ Proteinase K를 37℃에서 30분간 처치한다. 4% paraformaldehyde에 10분간 처리한다. PBS 세척 후, Triethanolamine-HCl buffer에 acetic anhydride를 넣어 10분간 acetylation시킨다. 2× SSC에 10분간 처치한다. 조직상에 TNF-α probe를 1㎍/㎕의 농도로 hybridization buffer에 희석하여 조직 당 20-30㎕씩 적용하고, cover slip을 덮고 sealing한다. 각각의 조직을 hybridization machine상에서 94℃ 10분간 처치후, 45℃ incubator에 15시간 배양한다. cover slip을 제거후 4×SSC, 2×SSC, 0.2×SSC에 각 10분씩 세척단계를 실시한다. maleic acid buffer에 5분간 처리한다. blockig buffer 10분간 처리한다. blocking buffer에 1:250-500으로 희석된 anti-DIG AP conjugate를 적용하여 36℃에서 1-2시간 incubation한다. maleic acid buffer 10분간 처리한다. blocking buffer에 5분간 처리한다. NBT/BCIP를 이용하여 검출한다.

마. 빈혈에 백신이 미치는 영향 및 효과 분석

1) 혈액 샘플 채취 및 적혈구 수 측정

앞선 TNF-α 분석실험을 위한 접종 실험에서 접종 군별로 접종전, 접종 후 1, 3, 8, 11, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35일에 EDTA 처리된 vacutainer에 채혈을 실시한다. 항응고제가 처리된 혈액을 자동 혈구 계산기를 이용하여 적혈구 수를 측정하였다.

2) 골수 조직 채취

부검시 골수를 채취하여 10% 중성화 포르말린에 고정하고 탈회과정을 거친 후 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 파라핀 포매하였다. 파라핀 조직 샘플은 5㎛ 두께로 절단하여 Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색후 광학현미경 하에서 골수의 이상 유무를 관찰하였으며, 일부 파라핀 조직 샘플은 4㎛ 두께로 절편하여 Superfrost/plus slide (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 에 부착시켜 상온에 보관하였다.

3) 면역조직화학법

면역조직 화학법을 위하여 준비된 골수 조직 슬라이드를 xylene에 10분간 2회 침적하여 탈파라핀화 시키고, 알코올을 이용하여 함수과정을 수행하였다. Endogenous alkaline phosphatase를 제거하기 위하여 glacial acetic acid (20%)를 4℃에서 2분간 처치하였다. 이후 proteinase K (Gibco BRL)을 phosphate-buffered saline (PBS; 0.1M, pH 7.4)에 100㎍/㎖되도록 하여 36℃ 20분간 반응시켰다. 비특이 반응을 차단하기 위하여 10% normal goat serum을 PBS(0,1M, pH 7.4)에 희석하여 조직상에 적용하고, 상온에서 30분간 반응하였다. 돼지 써코바이러스 2형에 특이적인 ORF2 Protein에 반응하는 단클론 항체를 PBTS에 250배 희석하여 1차 항체로 적용하고 4℃에서 overnight incubation하였다. PBTS로 3회 세척하고, PBTS에 100배 희석한 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG (Dako)를 2차 항체로 사용하였다. PBTS로 3회 세척하고, Tris buffer (pH 9.5)로 처리하였다. 발색반응은 alkaline phosphatase red substrate (Vector Laboratories)로 상온에서 20분간 수행하였고, 수세과정을 거쳐 Mayer's hematoxylin으로 대조염색 후 mounting하여 관찰하였다.

바. 화학주성인자(Chemokine) MCP-1, MIP-1에 백신이 미치는 영향 및 효과 분석

1) 조직샘플 채취

부검시 superficial lymph node를 10% 중성 포르말린에 24시간 고정시킨 후 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 파라핀 포매하였다. 파라핀 조직 샘플은 5㎛ 두께로 절단하여 Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색후 광학현미경 하에서 병리조직학적 이상 유무를 관찰하였으며, 동일 파라핀 조직 샘플을 4㎛ 두께로 절편하여 Superfrost/plus slide (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 에 부착시켜 상온에 보관하였다.

2) MCP-1, MIP-1 분석을 위한 조직내 교잡법

가) RNA 추출

15㎖ Falcon tube에 PBS를 3㎖과 세절한 superficial lymph node를 3g을 넣고 vortex하여 현탁(50%)하였다. 5,000rpm으로 5분간 원심하여 얻어진 상층액 500㎕를 Trisol LS (Gibco BRL) 500㎕가 담긴 eppendorf tube에 넣고 vortex하여 상온에 10분간 정체시켰다. 여기에 300㎕의 chlorform을 첨가하여 다시 10분간 정체시킨 다음 4℃ 4,000g에서 15분간 원심하였다. 원심후 얻어진 상층액 500㎕를 새로운 eppendorf tube에 넣고, Isopropanol 500㎕를 추가하고 vortex하여 -20℃에서 overnight 침전시켰다. 다음날 아침에 4℃ 14,000rpm으로 30분간 원심한 후 상층액은 버리고 cold 70% ETOH 500㎕로 세척 후 다시 4℃ 14,000rpm 조건으로 30분간 원심하였다. 상층액을 제거하고 speed vacuum으로 건조시킨 후 30㎕ 멸균증류수로 부유하였다.

나) MCP-1, MIP-1 정량을 위한 반정량 역전사 중합효소 연쇄반응 (Semi-Quantitative RT-PCR)

추출된 RNA 1㎕, DEPC D.W. 3.5㎕, 2.5mM dNTP 2㎕, 10X PCR buffer (1.25mM $MgCl_2$) 2㎕, oligo d(T) 0.5㎕, RNase inhibitor(50U) 0.5㎕, MuLV reverse transcriptase(200U) 0.5㎕ (Perkin Elmer)를 혼합하여 총 반응량을 10㎕로 맞춘 후에 42℃에서 40분간 반응하여 역전사 반응을 수행하여 cDNA를 합성하였다. MCP-1의 전방향 프라이머는 5‘- TCA CCA GCA GCA AGT GT-3′, 역방향 프라이머는 5’-CTG AGA TTC ACA GAG GA-3′가 되도록 제작하였다. MIP-1에 대한 전방향 프라이머는 5‘-GCT CAG TTC AGT TCC AAG TC-3′, 역방향 프라이머는 5’-ACC ATG AAG CTC TGC GTG AC-3′가 되도록 제작하였다. 정량을 위한 standard curve를 작성하기 위하여, GAPDH를 internal standard 프라이머로 제작하였다. 역전사 반응을 마친 10㎕의 cDNA template에 각각의 프라이머(25pmol/㎕) 각 1㎕, 5㎕ 10×reaction buffer (100mM Tris-HCl (pH 8.3), 400mM KCl, 15mM $MgCl_2$, 5㎍/㎖ activated BSA), 0.2mM deoxynucleotides(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5U Taq polymerase를 각각 넣고, 50㎕의 reaction volume이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA) 를 이용하여 94℃에서 30초, 60℃에서

30초, 72℃에서 30초간 35 cycle 수행하고, 마지막 단계에서 72℃ 10분간 반응하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물 10㎕를 ethidium bromide로 염색된 2% agarose gel에 전기영동 하였으며, Kodak EDS290 System을 이용하여 정량분석 하였다.

다) 탐침자(Probr) 제작

역전사 중합효소 연쇄반응을 통하여 얻어진 DNA 분절은 Wizard PCR preps (Promega Biotech)을 이용하여 정제하고, DIG DNA labeling and detection kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 digoxigenin으로 임의 표지하여 탐침자(Probe)로 이용하였다.

라) 조직내 교잡법

제작된 MCP-1, MIP-1 probe를 이용하여 '실험 3'에서 기술된 조직내 교잡법에 따라 TNF-α의 mRNA를 검출한다.

3) 형태학적 분석

조직내 교잡법을 실시한 조직절편 슬라이드를 Kodak DC290 system을 이용하여 광학현미경 하에서 무작위로 3부분 촬영한다. 촬영한 사진은 NIH Image J Program (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA)을 이용하여 형태학적 분석을 실시한다.

4) 통계적 분석

모든 분석 값은 '평균±표준편차'로 표시하였다. 각 군별의 통계적 유의성을 검증하기 위하여 InStat package (GraphPad Softwear, San Diego, CA, USA)를 이용하여 Wilcoxon matched pairs signed rank test를 실시하였다.

# 제 3 절 결과 와 고찰

## 1. 백신의 개발

가. 돼지 써코바이러스 2형 단일 사독백신 및 돼지 써코바이러스 2형/돼지 파보바이러스 혼합 사독백신 제조

PK-15 세포를 이용하여 국내 분리주 돼지 써코바이러스 2형을 대량으로 증식하였고 Swine testicle(ST) 세포를 이용하여 국내 분리주 돼지 파보바이러스를 대량으로 증식하였다. 대량으로 증식한 바이러스는 포르말린으로 불활화 시키고 알루미늄겔을 첨가하여 사독백신을 제작하였다.

나. 면역원성 및 안정성 검사 결과

앞선 방법으로 제조된 백신을 토끼와 돼지에게 각각 접종하고 이상 유무를 자세히 관찰하였다. 접종 후 백신에 의한 부작용으로 의심할 만한 별다른 이상 소견은 발견되지 않았다. 백신을 접종한 후 분리한 혈청에서 돼지 써코바이러스 2형에 특이적인 항체가 형성된 것을 확인하기 위하여 western blot을 실시하였다. 돼지 써코바이러스 2형 백신을 접종한 혈청에서 30kDa의 ORF2 및 17kDa의 ORF1 등 돼지 써코바이러스 2형에 특이적인 밴드가 확인되었다.으며, 음성혈청에서는 어떤 밴드도 검출되지 않았다(Fig. 1). 백신의 역가를 측정하기 위해 간접형과항체법을 실시한 결과 돼지 써코바이러스 2형 백신을 접종한 돼지의 혈청을 1:1024배 이상 희석한 혈청에서도 양성 반응이 검출되었다(Fig 2).

즉 새로 개발된 돼지 써코바이러스 2형 사독 백신은 돼지에게 별다른 부작용이 없이 안전하며, 돼지 써코바이러스 2형에 특이적이고 높은 역가의 항체가 형성되었다.

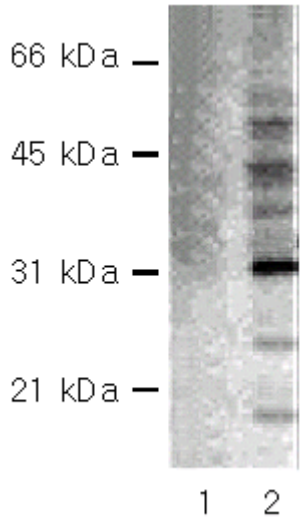



Figure 1. Western blot hybtidization probed with immune serum vaccinated with porcine circovirus 2 vaccine rom rabbit. Lane: 1, negative control; 2, porcine circovirus vaccine

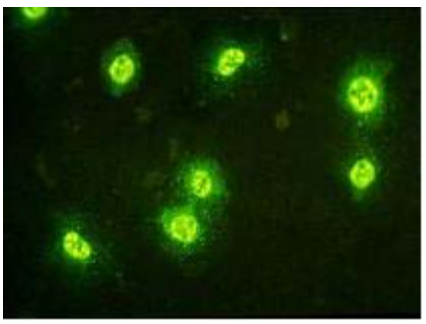


Figure 2. PK-15 cell, infected with porcine circovirus 2. Vaccinated serum with porcine circovirus 2 vaccine from pigs was shown positive signals for reactivity with porcine circovirus 2 antigens by indirect fluorescentantibody assay

## 2. 백신에 의한 이유자돈 전신성 소모성 증후군 예방효과 평가를 위한 바이러스 공격접종 실험

가. 임상 증상 및 병리조직학적 병변

돼지 써코바이러스 2형 단일 백신 및 돼지 써코바이러스 2형/돼지 파보바이러스 혼합 백신을 접종한 후 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 4주령 돼지에게 실험 감염시켰다. 바이러스 접종 후 백신을 접종하지 않았던 양성군에서는 위축, 기침, 설사, 황달 등의 임상증상을 보였으며 5주후 실시한 부검에서 전신 임파절의 종대, 간질성 폐렴, 황달 등 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 전형적인 육안 병변을 확인할 수 있었다. 돼지 써코바이러스 2형 단일 백신을 접종하였던 군에서는 경도의 기침, 설사 등의 임상증상이 관찰되었으며 부검시 경도의 임파절 종대, 간질서 폐렴 등이 관찰되었다. 반면에 돼지 써코바이러스 2형/돼지 파보바이러스 혼합 백신을 접종한 군에서는 전제 20마리 자돈 중 약 25%의 자돈에서 경도의 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 소견을 보였으며 나머지 85%의 자돈에서는 별다른 증상이 관찰되지 않았다.

병리조직학적 병변을 관찰한 결과에서도 백신을 접종하지 않았던 양성군에서는 전신의 임파절, 회장의 Peyer's patches, 편도, 비장에서 epithelioid macrophages와 multinucleated giant cells의 침윤이 관찰되었으며, 이들 세포의 세포질 내에서는 호염성의 포도송의 모양의 세포질내 봉입체도 관찰되었다. 그러나 돼지 써코바이러스 2형 단일 백신을 접종한 군에서는 위와 같은 병리조직학적 소견이 관찰되었으나 병변의 정도는 경미하였다. 반면에 돼지 써코바이러스 2형/돼지 파보바이럿 혼합 백신을 접종한 군에서는 약 30%의 자돈에서 경미한 interstitial pneumonia만 관찰되었을 뿐 별다른 병변이 관찰되지 않았다.

나. 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스의 감염 및 증식에 백신이 미치는 영향 및 효과 분석

백신 접종 후 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스의 감염 및 증식이 어떤 영향을 받았는지 알아보기 위하여 조직내 교잡법을 실시하였다. 각 조직에서 바이러스

에 감염되어 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 측정하여 비교를 해본 결과 돼지 써코바이러스 2형의 증식이 가장 활발하게 일어나는 임파절의 경우 돼지 써코바이러스 2형 단독 백신을 접종한 군에서는 103개 정도 이었으며, 백신을 접종하지 않았던 양성군에서는 164개 이었다. 반면에 돼지 써코바이러스 2/돼지 파보바이러스 혼합백신을 접종한 군에서는 8개로 양성군 및 단독백신을 접종 하였을 때 보다 확연하게 바이러스에 감염된 세포의 숫자가 줄어든 것을 확인 할 수 있었다. 임파절 이외의 전신의 모든 장기에서도 위와 유사하게 혼합백신을 접종한 군에서 바이러스에 감염된 세포의 숫자가 확연하게 줄어들었다.

즉 돼지 써코바이러스 2형 단일 백신의 경우 바이러스의 감염 및 증식을 약 60~70% 정도 예방하는 효과가 있긴 하지만 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 발현을 완전히 예방할 수 없었다. 그러나 돼지 써코바이러스 2형/돼지 파보바이러스 혼합백신을 접종하였을 때는 바이러스의 감염 및 증식을 90% 이상 효과적으로 예방하였으며 바이러스가 증식을 하지 못하므로 이유자돈 전신성 소모성 증후군이 발병하지 않았다.

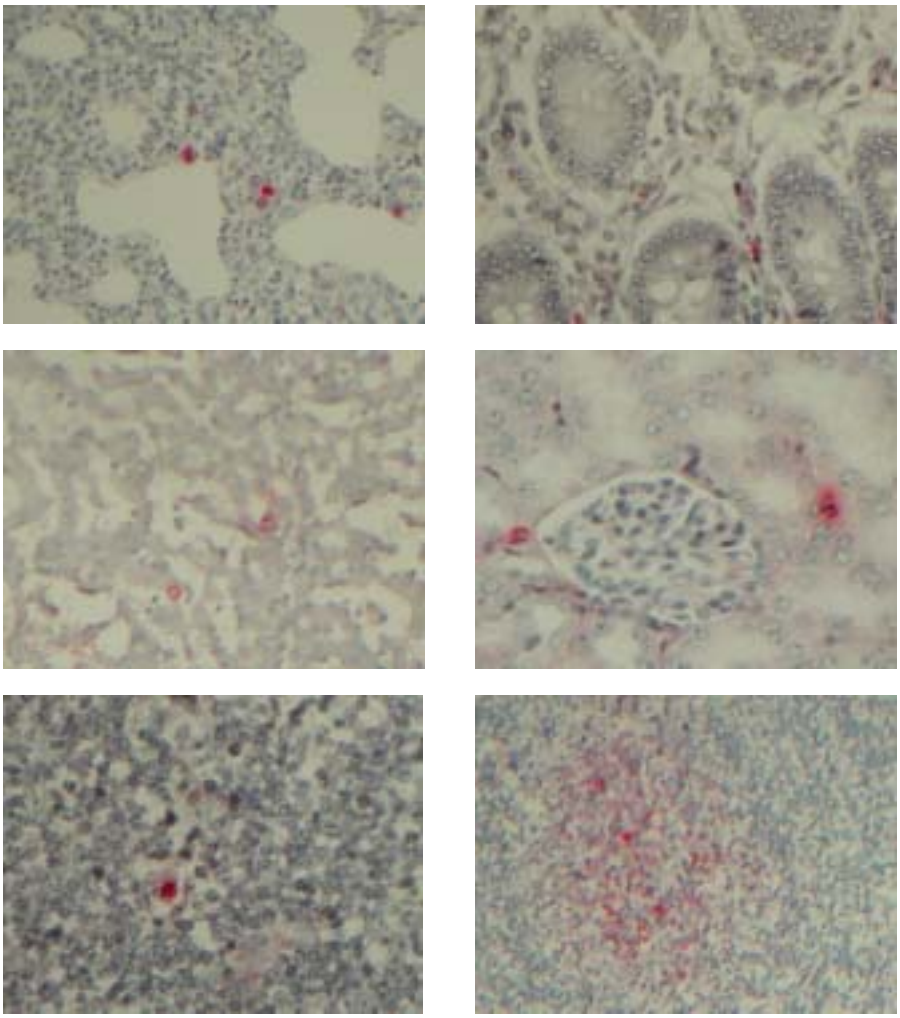


Figure 4A, B, C, D, E, F. In situ hybridization in pigs, vaccinated with porcine cirvorius 2/porcine parvovirus mixed vaccine and then experimentally inoculated with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. (A) Lung. In-situ hybridization; red substrate, Hematoxylin counterstain. x400. (B) Intestine. In-situ hybridization; red substrate, Hematoxylin counterstain. x400. (C) Liver, In-situ hybridization; red substrate, Hematoxylin counterstain. x200. (D) Kidney. In-situ hybridization; red substrate, Hematoxylin counterstain. x400. (E) Thymus. In-situ hybridization; red substrate, Hematoxylin counterstain. x400. (F) Lymph node. In-situ hybridization; red substrate, Hematoxylin counterstain. x200.

Table 1. Results of in-situ hybridization in pigs, injected with porcine cirvirus 2 vaccine alone or porcine circovirus/porcine poarvovirus mixed vaccine.

| Tissue | PCV2-positive/PPV-positive cells in sub-group | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Negative (No virus) | Positive (PCV+PPV) | PCV2 vaccine | PCV2+PPV vaccine |
| Lung | - | 133.7±33.2 / 60.5±19.7 | 93.5±23.7 / 54.2±10.1 | 6.7±2.1 / 2.6±1.3 |
| Heart | - | 24.3±5.7 / 4.6±2.3 | 10.3±4.7 / 6.8±3.7 | 0.7±0.5 / - |
| Lymph node | - | 164.3±42.5 / 88.3±32.5 | 103.3±28.9 / 93.3±12.3 | 8.5±4.9 / 3.5±1.1 |
| Tonsil | - | 117±30.1 / 40.7±24.1 | 50.3±20.4 / 37.7±4.1 | 5.3±1.2 / 2.1±0.9 |
| Thymus | - | 82.8±23.2 / 35.8±15.2 | 40.2±17.2 / 36.8±3.6 | 3.7±1.5 / 1.7±0.4 |
| Spleen | - | 87.6±21.0 / 25.2±18.0 | 37.6±11.5 / 19.3±2.0 | 4.2±1.4 / 2.2±0.6 |
| Liver | - | 43.9±10.3 / 10.9±8.7 | 21.3±10.8 / 12.5±1.3 | 2.3±0.8 / 0.7±0.3 |
| Kidney | - | 37.4±9.7 / 9.3±6.7 | 16.7±9.3 / 3.2±2.8 | 2.7±1.3 / 0.2±0.2 |
| Intestine | - | 32.2±8.3 / 10.2±8.9 | 15.3±7.7 / 15.4±7.9 | 0.3±0.1 / - |

(Mean Number of Positive Cells ± SD / 0.25mm$^2$)

다. 식욕억제 물질(cachectin) TNF-α에 백신이 미치는 영향 및 효과 분석

1) 체중 측정 및 증체량 분석

각 군별로 체중을 측정한 결과 백신과 바이러스를 접종하지 않았던 음성군에서는 약 300%정도의 체중 증가가 있었다. 그리고 이와 유사하게 돼지 써코바이러스 2형/돼지 파보바이러스 혼합백신을 접종하였던 군에서도 꾸준히 체중이 증가하여 처음 체중에 비하여 약 270%의 체중 증가가 있었으며 이는 바이러스만을 접종한 양성군의 체중증가율 89%에 비하며 3배 이상의 놀랄만한 체중 증가량을 보였다. 하지만 돼지 써코바이러스 2형 단일 백신을 접종하였던 군에서는 초기 체중에 비하여 150%가 증가하는데 그쳐 혼합백신에 비하여 확실한 효과가 나타나지는 안았다(Fig. 5, Table 2).

2) TNF-α 분비에 백신이 미치는 영향 분석 결과

백신을 접종하고 바이러스를 감염시킨 후 3일 간격으로 연속 채혈하고 그 혈청으로부터 TNF-α를 측정한 결과 바이러스만을 접종한 양성군에서는 그 분비량이 10일까지 급격하게 증가하였으며 이 후 서서히 감소하는 추세를 보였다. 반면에 돼지 써코바이러스 2형/돼지 파보바이러스 혼합 백신을 접종한 군에서는 바이러스를 접종하였지만 양성군과 달리 확연한TNF-α의 증가가 나타나지 않았으며 음성군과 유사하게 낮은 TNF-α의 농도를 유지하였다. 그러나 돼지 써코바이러스 2형 단일 백신을 접종하였던 군에서는 바이러스 접종 후 21일령까지는 TNF-α의 증가가 나타나지 않았으나 21일 이후에는 급격하게 TNF-α가 증가하였다(Fig. 6). 조직내 교잡법을 수행한 결과에서도 혼합백신을 접종하였던 군에서 TNF-α에 양성반응을 보이는 숫자가 양성군에 비하여 확연하게 줄어들거나 거의 관찰되지 않았다.

즉 위 결과를 종합해 보면 혼합백신을 접종하였던 군에서는 음성군에 비하여 별다른 체중 증가의 감소가 나타나지 않았는데 이것은 혼합백신이 돼지 써코바이러스 2형의 감염 및 증식을 억제하였으며, 돼지 써코바이러스에 감염된 세포의 숫자가 적으므로 바이러스 감염에 의해서 나타나는 TNF-α의 분비량도 적어진 것이다. 또한 결과적으로 TNF-α의 분비가 적기 때문에 식욕이 억제되지 않아, 체중이 꾸준히 증가하였다.

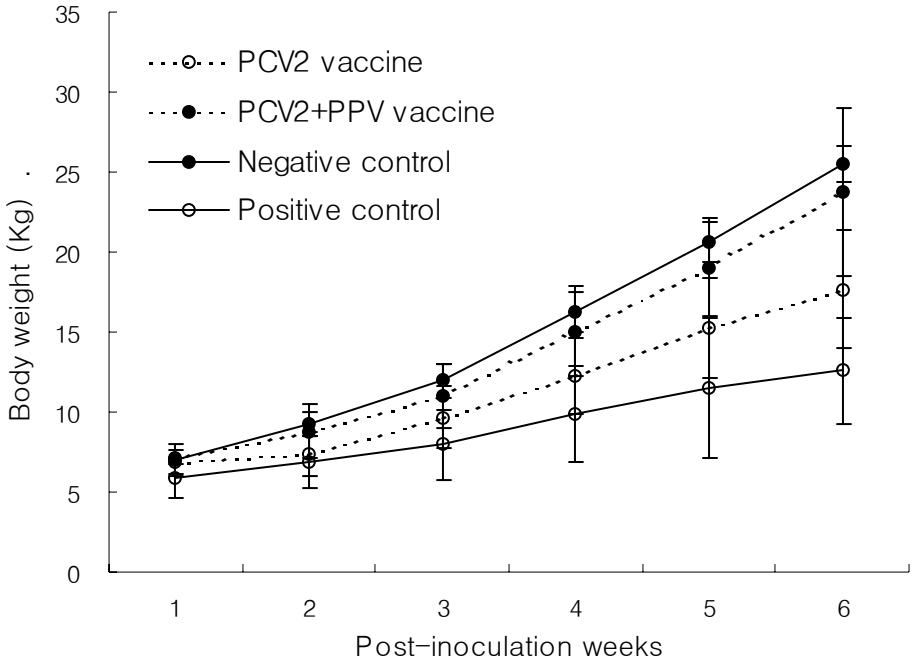



Figure 5. Body weight in pigs vaccineate with porcine circovirus 2 vaccine alone or porcine circovirus 2/porcine parvovirus mixed vaccine.

Table 2. Comparison of gain weight in pigs vaccineate with porcine circovirus 2 vaccine alone or porcine circovirus 2/porcine parvovirus mixed vaccine.

| Group | Body weight of 0 dpi | Body weight of 35 dpi | Percentage of gain weight |
|---|---|---|---|
| Negative | 6.25 | 25.48 | + 307.7 % |
| Positive | 6.12 | 11.62 | + 89.8 % |
| PCV2 vaccine | 6.84 | 17.63 | + 157.7 % |
| PCV2+PPV vaccine | 6.38 | 23.75 | + 272.2 % |

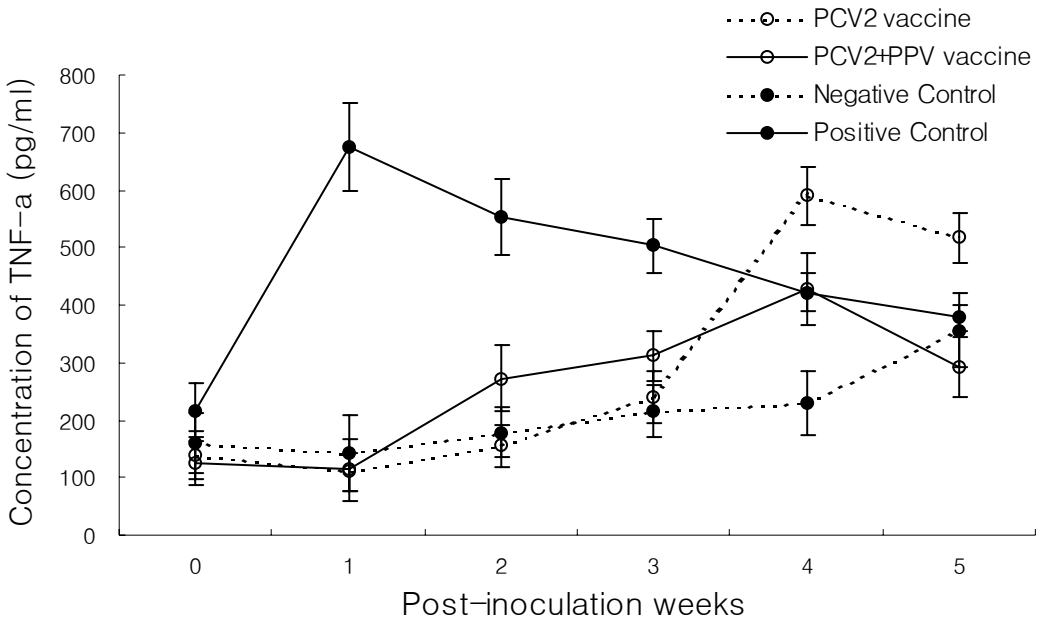



Figure 6. Tumor necrosis factor-α (TNF-α) production of serum in pigs vaccineate with porcine circovirus 2 vaccine alone or porcine circovirus 2/porcine parvovirus mixed vaccine.

라. 빈혈에 백신이 미치는 영향 및 효과 분석

돼지 써코바이러스 2형 단일 백신 및 돼지 써코바이러스 2형/돼지 파보바이러스 혼합 백신을 접종한 후 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 공격접종 한 돼지를 3일 간격으로 연속적으로 채혈을 하고 적혈구 수를 측정하여 빈혈 정도를 판정하였다. 백신을 접종하지 않고 바이러스만을 접종하였던 양성군의 경우 적혈구 수의 지속적임 감소가 나타났으며, 21일경에는 심한 빈혈 및 혈액이 응고하지 않을 정도로 혈소판의 감소가 같이 동반 되었다. 하지만 돼지 써코바이러스 2형/돼지 파보바이러스 혼합백신 접종군에서는 적혈구 수의 감소가 나타나지 않았으며 음성군에 비하여 별 차의가 있지 않았다. 돼지 써코바이러스 2형 단독 백신을 접종한 경우에는 21일 이후부터 경미한 적혈수의 감소가 있었으나 음성군에 비하여 유의성 있는 정도로 감소가 나타나진 않았다(Fig 7).

자돈의 골수 조직을 채취하여 돼지 써코바이러스 2형에 대한 면역조직화학법을 수행과 결과 바이러스만을 접종한 골수 조직에서는 hematopoietic cells의 세포질 내에서 다수의 돼지 써코바이러스 2형의 항원이 검출 되었으나. 단일 백신이나 혼합백신을 접종하였던 군에서는 소수의 항원만이 검출되었다.

즉 빈혈의 경우는 단일 백신과 혼합백신에 모두 효과인 예방효과가 나타났다. 이는 아마도 이유자돈 전신성 소모성 증후군에서 나타나는 빈혈이 어느 정도 이상의 많은 수의 돼지 써코바이러스 2형의 증식이 필수적이며 파보바이러스에 의해 빈혈이 유도되는 것이 아니라 돼지 써코바이러스 2형에 의해서 빈혈이 유도된다고 말할 수 있다.

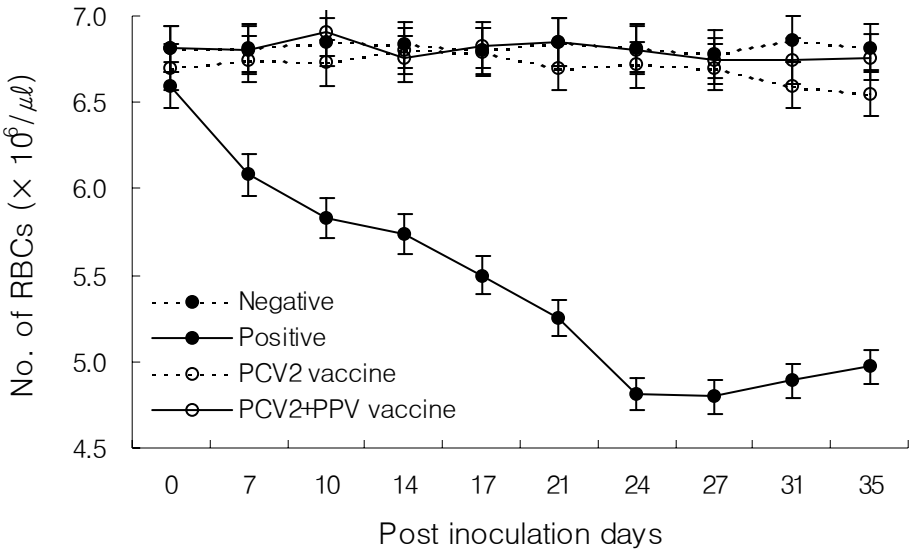



Figure 7. Total red blood cell of in pigs vaccineate with porcine circovirus 2 vaccine alone or porcine circovirus 2/porcine parvovirus mixed vaccine.

마. 화학주성인자(Chemokine) MCP-1, MIP-1에 백신이 미치는 영향 및 효과 분석

Multinucleated giant cell의 형성에 중요한 작용을 하는 것으로 알려진 강력한 화학주성인자인 MCP-1 그리고 MIP-1의 분석을 위하여 semiquantitative RT-PCR을 실시한 결과, 백신의 접종 없이 돼지 써코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 혼합 감염시킨 양성군의 경우 MCP-1과 MIP-1의 mRNA가 접종기간 내내 꾸준히 발현하였다. 그러나 돼지 써코바이러스 2형/돼지 파보바이러스 혼합백신을 접종하였던 군에서는 MCP-1과 MIP-1의 mRNA가 접종을 통틀어 거의 발현하지 않았다(Fig 8). 이들 혼합백신을 접종하였던 조직에서는 병리조직학적으로도 Multinucleated giant cell이 형성되지 않았으며 조직내 교잡법을 실시한 결과에서도 MCP-1 및 MIP-1에 양성반응을 보이는 세포가 관찰되지 않았다.

즉, 혼합백신에 의하여 돼지 써코바이러스 2형의 감염 및 증식이 억제되고 바이러스에 감염된 세포가 많지 않아 만성 염증 반응이 유도되지 않았다. 결과적으로 돼지 써코바이러스 2형에 감염된 macrophage에서 MCP-1 및 MIP-1이 분비되어야 하나 바이러스가 이들 세포에 감염되지 않았으므로 화학주성인자가 분비가 되지 않으며 또한 혈액으로부터 Monocyte 등의 침윤을 유도하지 않았다. 결국 돼지 써코바이러스 2형/돼지 파보바이러스 혼합 백신은 돼지 써코바이러스 2형의 감염 및 증식을 확실히 억제하는 것으로 증명되었다.

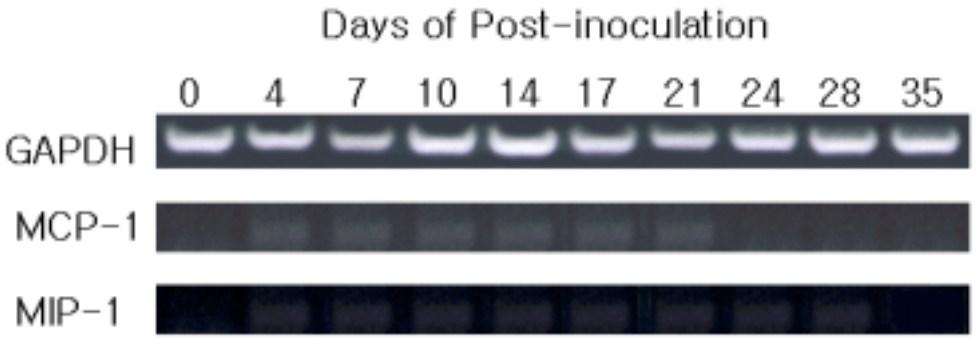



Figure 8. Semiquantitative PCR for estimating MCP-1 and MIP-1 expression in pigs vaccineate with porcine circovirus 2 vaccine alone or porcine circovirus 2/porcine parvovirus mixed vaccine.

# 제 6 장 인용문헌

Allan GM. and Ellis JA. (2000) Porcine circoviruses: a review. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, **12,** 3-14.

Allan GM,, Kennedy S, McNeilly F, Foster JC, Ellis JA, Krakowka SJ, Meehan BM, Adair BM. (1999). Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. Journal of Comparative Pathology, **121,** 1-11.

Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, Daft B, Clarke EG, Ellis JA, Haines DM, Meehan BM, Adair BM. (1998). Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, **10,** 3-10.

Alvarez-Hernandez X, Licega J, McKay I, Brock JH. (1989). Induction of hypoferremia and modulation of macrophage iron metabolism by tumor necrosis factor. Laboratory Investigation **61,** 319-322

Aukrust P, Liabakk N-B, Muller F, Lien E, Espevik T, Froland SS (1994). Serumlevels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and soluble TNF receptors in human immunodeficiency virus type 1 infection-correlations to clinical, immunologic, and virologic parameters. Journal of Infectious Disease **169,** 420-424

Barnes PF, Fong SJ, Brennan PJ, Twomey PE, Mazumder A, Modlin RL (1990) Local production of tumor necrosis factor and IFN-γ in tuberculosis pleuritis. Journal of Immunology **145,** 149-154

Basta S, Carrasco CP, Knoetig SM, Rigden RC, Gerber H, Summerfield A, McCullough KC, (2000). Porcine alveolar macrophages: poor accessory or effective suppressor cells for T-lymphocytes. Veterinary Immunology and Immunopathology **77,** 177-90

Beutler B. Cerami A. (1987) Cachectin: more than a tumor necrosis factor. New England Journal of Medicine **316,** 479-485

Beutler B, Mahoney J, LeTrang N, pekala P, Cerami A. (1985) Purification of cachectin, a lipoprotein-lipase suppression hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. Journal of Experimental Medicine **161,** 984-995

Bolin SR, Stoffregen WC, Nayar GPS. Hamel AL. (2001). Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, **13,** 185-194.

Chae C. (2004) Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. Veterinary Journal **168,** 41-49

Cheon, D.-S. Chae, C. (1999). Distribution of a Korean strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected pigs, as demonstrated immunohistochemically and by in-situ hybridization. Journal of Comparative Pathology, **120,** 79-88.

Choi C, Chae C. (1999). In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus

in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. Journal of Comparative Pathology, **121,** 265-270.

Choi C, Chae C. (2000). Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization. Journal of Comparative Pathology, **123,** 302-305.

Choi C, Chae C, Clark EG. (2000). Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pigs: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, **12,** 151-153.

Choi C, Cho W-S, Kim B, Chae C. (2002) Expression of interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Jounal of Comparative Pathology **127,** 106-113

Clark EG (1997). Post-weaning wasting syndrome. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners, **28**, 499-501.

Cree IA, Nurbhai S, Milne G, Beck JS. (1987) Cell death in granulomata: the role of apoptosis. Journal of Clinical Pathology **40,** 1314-1319

Cushing SD, Fogelman AM. (1992) Monocytes may amplify their recruitment into inflammatory lesions by inducing monocyte chemotactic protein. Arteriosclerosis and Thrombosis **12,** 78-82

Dudley DJ, Spencer S, Edwin S, Mitchell MD. (1995). Regulation of human decidual cell macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1α) production y inflammatory cytokines. American Journal of Reproductive Immunology **34,** 231-235

Ellis JA, Bratanich A, Clark EG, Allan G, Meehan B, Haines DM., Harding J, West KH, Krakowka S, Konoby C, Hassard L, Martin K, McNeilly F. (2000). Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, **12,** 21-27.

Ellis JA, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, Strokappe J, Martin K, McNeilly F, Meehan B, Todd D, Haines D. (1998). Isolation of circovirus from lesions of pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. Canadian Veterinary Journal, **39,** 44-51.

Ellis J, Krakowka S, Laimore M, Haines D, Brantanich A, Clark E, Allan G, Konoby C, Hassard L, Meehan B, Martin K, Harding J, Kennedy S, McNeilly F. (1999). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, **11,** 3-14.

Fahmy M, Young SP. (1993). Modulation of iron metabolism in monocyte cell line U937 by inflammatory cytokines: Changes in transferrin uptake, iron handling and ferritin mRNA. Biochemical Journal **296,** 175-181

Gomez-Villamandos JG, Ruiz-Villamor E, Bautista MJ, Sanchez CP, Sanchez-Cordon PJ, Salguero FJ, Jover A. (2001). Morphological and immunohistochemical changes in splenic macrophages of pigs infected with classical

swine fever. Journal of Comparative Pathology, **125,** 98-109.

Hamel AL. Lin LL. Nayar GPS. (1998). Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. Journal of Virology **72,** 5262-5267

Hosang K, Knoke I, Klaudiny J, Wempe F, Wuttke W, Scheit KH. (1994). Porcine luteal cells express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): analysis by polymerase chain reaction and cDNA cloning. Biochemical and Biophysical Research Communications **199,** 962-968

Kasahara K, Kobayashi K, Shikama Y. (1989). The role of monokines in granuloma formation in mice: the ability of interleukin-1 and tumor necrosis factor-α to induce lung granuloma. Clinical Immunology and Immunopathology **51,** 419-425

Kawakami M, Pekala PH, Lane MD, Orami A. (1982). Lipoprotein lipase suppression in 3T3-L1 cells by an endotoxin-induced factor from exudate cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **79,** 912-916

Kennedy S, Moffett D, McNeilly F, Meehan B, Ellis J, Krakowka S, Allan GM. (2000). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. Journal of Comparative Pathology, **122,** 9-24.

Kim J, Chae C. (2001a). Differentiation of porcine circovirus 1 and 2 in formalin fixed, paraffin-wax-embedded tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by in-situ hybridisation. Research in Veterinary Science, **70,**

265-269.

Kim J, Chae C. (2001b). Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization. Journal of Virological Methods, **92,** 105-111.

Kim J, Choi C, Han DU, Chae C. (2001). Simultaneous detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by multiplex PCR. Veterinary Record, **149,** 304-305.

Kim J, Chung H-K, Jung T, Cho W-S, Choi C, Chae C. (2002). Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. Journal of Veterinary Medical Science, **64,** 57-62.

Kim J, Choi C, Chae C. (2003a). Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. Journal of Comparative Pathology **128,** 52-59

Kim J, Chae C. (2003b). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 but not interleukin-8 in granulomatous lesions in lymph nodes from pigs with naturally occurring postweaning multisystemic wasting syndrome. Veterinary Pathology **40,** 181-186.

Kindler V, Sappino A-P, Grau GE, Piguet P-F, Vassalli P. (1989). The inducing role of tumour necrosis factor □ in the cevelopment of bacterial granulomas during BCG infection. Cell **56,** 731-740

Konjin AM, Carmel N, Levy R, Hershko C. (1981). Ferritin synthesis in inflammation. Mechanism of increased ferritin synthesis. British Journal of Haematology **49,** 361-368

Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, Ringler S, Rings DM. Allan G. (2001). Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting syndrome disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). Veterinary Pathology, **38,** 31-42.

Krakowka S, Ellis JA, Meehan B, Kennedy S, McNeilly F. Allan G. (2000). Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. Veterinary Pathology, **37,** 254-263.

Kreipe H, Radzun HJ, Rudolph P, Barth J, Hansmann ML, Heidorn K, Parwaresch MR. (1988). Multinucleated giant cells generated in vitro. Terminally differentiated macrophage with down regulated c-fms expression. American Journal of Pathology **130,** 232-243

Leonard EJ, Yoshimura T. (1990). Human monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1). Immunology Today **11,** 97-101

Lopez-Fuertes L, Campos E, Domenech N, Ezquerra A, Castro JM, Dominguez J, Alonso F. (2000). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF-α production in infected macrophages. Virus Research **69,** 41-46

Lukacs NW, Kunkel SL, Strieter RM, Warmington K, Chensue SW. (1993). The role of macrophage inflammatory protein 1α in Schistosoma mansoni egg-induced granulomatous inflammation. Journal of Experimental Medicine **177,** 1551-1559

Lukacs NW, Chensue SW Smith RE, Strieter RM, Warmington K, Wilke C, Kunkel SL. (1994). Production of monocyte chemoattractant protein -1 and macrophage inflammatory protein-1α by inflammatory granuloma fibroblasts. American Journal of Pathology **144,** 711-718

Magar R, Larochelle R, Thibault S. Lamontagne L. (2000). Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV 2) in weaned pigs: a sequential study. Journal of Comparative Pathology, **123,** 258-269.

Mankertz A, Persson F, Mankertz J, Blaess G, Buhk H-J. (1997). Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. Journal of Virology **71,** 2562-2566

Mariano M, Spector WG. (1974). The formation and properties of macrophage polykaryons (inflammatory giant cells). Journal of Pathology **113,** 1-19

Martinez FE, Harabor A, Amankwah EK, Hart DA, Belik J. (2000). Urethane suppresses rat lung inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase mRNA levels. Inflammation Research **49,** 727-731

McNeilly F, Smyth JA, Adair BM, McNulty MS. (1995). Synergism between chicken anemia virus (CAV) and avian reovirus following dual infection of 1-day

old chicks by a natural route. Avian Disease **39,** 532-537

Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, Hassard LE, Clark EG, Haines DM, Allan GM. (1998). Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. Journal of General Virology, **79,** 2171-2179.

Myatt N, Coghill G, Morrison K, Jones D, Cree IA. (1994). Detection of tumour necrosis factor α in sarcoidosis and tuberculosis granulomas using in situ hybridization. Journal of Clinical Pathology **47,** 423-426

Oliff A, Defeo-Jones D, Boyer M, Martinez D, Kiefer D, Vuocolo G, Wolfe A, Socher SH. (1987). Tumor secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. Cell **50,** 555-563

Oppenheim JJ, Zacharie COC, Mukaida N, Matsushima K. (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene "Intercrine" cytokine family. Annual Review of Immunology **9,** 617-648

Otaki Y, Nunoya T, Tajima M, Kato A, Nomura Y. (1988). Depression of vaccinal immunity to Marek's disease by infection with chicken anemia agent. Avian Pathology **17,** 333-347

Patton JS, Shepard HM, Wilking H, Lewis G, Aggarwal BB, Eessalu TE, Gavin LA, Grunfeld C. (1986). Interferons and tumor necrosis factoes have similar catabolic effects on 3T3 L1 cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **83,** 8313-8317

Rolfe MW, Kunkel SL, Standiford TJ. (1991). Pulomonary fibroblast expression of interleukin-8: a model for cytokine networking. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **5,** 493-501

Rollins BJ, Morriso ED, Stiles CD. (1988). Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has ytokine-like properties. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85,** 3738-3742

Rollins BJ. (1997). Chemokines. Blood **90,** 909-928

Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-κB transcription factor and HIV-1. The EMBO Journal **10,** 2247-2258

Smyth JA, Moffat DA, McNulty MS, Todd D, Mackie DA. (1993). A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chicken anemia virus infeaction at one day of age. Avian Disease **37,** 324-328

Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA. (1990). Interleukin-8 gene expression by a pulomonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. Journal of Clinical Investigation **86,** 1945-1953

Suttmann U, Selberg O, Gallati H, Ockenga J, Deicher H, Muller MJ. (1994). Tumor necrosis factor receptor level are linked to acute-phase response and malnutrition in human immunodeficiency virus-infected patients. Clinical Science **86,** 461-467

Tischer I, Siegel G. (1984). Biology and pathogenicity of automous parvoviruses. In: The Parvoviruses, ed. Berns KI, pp. 297-362. Plenum, New York, NY

Tischer I, Peters D, Rasch R, Pociuli S. (1987). Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. Archives of Virology, **96,** 39-57.

Todd D, Niagro FD, Ritchies BW, Curran W, Allan GM, Lukert PD, Latimer KS, Steffens WL, McNulty MS. (1991). Comparison of three animals viruses with circular single-stranded DNA genomes. Archives of Virology **117,** 129-135

Torti FM, Dieckmann B, Beutler B, Cerami A, Ringold GM. (1985). A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia. Science **229,** 867-869

Torti SV, Kwak EL, Miller SC, Miller LL, Ringold GM, Myambo KB, Young AP, Torti FM. (1988). The molecular cloning and characterisation of ferritin heavy chain, a tumoe necrosis factor inducible gene. Journal of Biological Chemistry **263,** 12638-12644

Ueda A, Okud K, Ohno S, Shirai A, Igarashi T, Matsunaga K, Fukushima J, Kawamoto S, Ishigatsubo Y, Okubo T. (1994). NF-κB and Sp-1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. Journal of Immunology **153,** 2052-2063

Vezina S-A, Roberge D, Fournier M, Dea S, Oth D, Archambault D. (1995). Cloning

of porcine cytokine-specific cDNAs and detection of porcine tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-1β gene expression by reverse transcription PCR and chemiluminescence hybridization. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology **2,** 665-671

Wolpe SD, Davatelis G, Sherry B, Beutler B, Hesse DG, Nguyen HT, Moldawer LL, Nathan CF, Lowry SF, Cerami A. (1988). Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. Journal of Experimental Medicine **167,** 570-581

Xu B, Aoyama K, Takeuchi M, Matsushita T, Takeuchi T. (2002). Expression of cytokine mRNAs in mice cutaneously exposed to formaldehyde. Immunology Letters **84,** 49-55

Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman MI, Leonard EJ. (1989) Human monocyte chemoattractant-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogenic-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. FEBS Letters **244,** 487-493

Studdert M.J. (1993). Circoviridae: new viruses of pigs, parrots and chickens. Australian Veterinary Journal **4,** 121-122

# 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.