

碩士學位論文

돼지 자성 생식기 내
잠재성 이종전염 바이러스의 검출



濟州大學校 大學院

獸 醫 學 科

康 相 哲

碩士學位論文

돼지 자성 생식기 내
잠재성 이종전염 바이러스의 검출

指導教授 金 哉 勳



濟州大學校 大學院

獸 醫 學 科

康 相 哲

2005年 12月


돼지 자성 생식기 내 잠재성 이종전염 바이러스의 검출

指導教授 金 哉 勳

康 相 哲

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2005年 12月

 제주대학교 중앙도서관
康相哲의 獸醫學 碩士論文을 認准함

審査委員長 _____ □□

委 員 _____ □□

委 員 _____ □□

濟州大學校 大學院

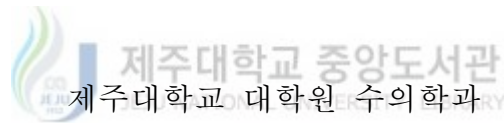
2005年 12月

초 록

돼지 자성 생식기 내 잠재성 이종전염 바이러스의 검출

지도교수 : 김 재 훈

강 상 철



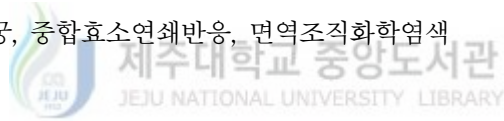
이종장기이식을 위한 무균돼지 생산과 관련하여 이종전염 가능성이 있는 병원체인 돼지 내인성 레트로바이러스(porcine endogenous retrovirus; PERV), 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV), 돼지 E형 간염 바이러스(swine hepatitis E virus; SHEV), 돼지 썬코바이러스 2형(porcine circovirus type 2; PCV-2) 및 돼지 림프구 친화성 허피스바이러스(porcine lymphotropic herpesvirus; PLHV)의 자성 생식기 내 감염 상황을 확인하고자 본 연구를 수행하였다. 제주지역 14개 양돈 농장에서 도축 출하된 70두의 돼지 난소 및 자궁 조직을 대상으로 병리조직학적인 검사와 함께 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 수행하였으며 조직 내 병원체의 분포 상황을 알아보기 위하여 PRRSV, SHEV 및 PCV-2에 대한 면역조직화학 염색을 실시하였다.

병리조직학적 검사 결과, 난소 수질부의 혈관 주위로 단핵염증세포 침윤은 15예, 자궁 내막기질 부위의 국소적인 단핵염증세포 침윤은 13예에서 관찰되었다. 도축돈

70두의 난소 및 자궁에 대한 PCR 검사 결과, PERV는 70예(100%), PLHV는 47예(67.1%), PRRSV는 6예(8.6%), SHEV는 5예(7.1%), PCV-2는 2예(2.9%)에서 양성반응을 나타내었다. 면역조직화학염색을 통한 바이러스의 분포를 확인하여 본 결과, 3예 및 1예의 난소조직에서 각각 PRRSV와 PCV-2 항원이 검출되었으며 항원은 주로 혈관주위엽 부위에 인접한 폐쇄난포 내 큰포식세포의 세포질에서 양성반응을 나타내었다.

본 연구 결과 돼지의 자성생식기 내 잠재적인 이중전염 바이러스는 PERV, PLHV, PRRSV, SHEV 및 PCV-2 순으로 검출되었으며, 이중장기이식용 무균돼지 생산 시 잠재성 이중전염 병원체의 제어를 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

중심어 : 돼지 내인성 레트로바이러스, 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스, 돼지 E형 간염 바이러스, 돼지 썬코바이러스 2형, 돼지 림프구 친화성 허피스바이러스, 난소, 자궁, 중합효소연쇄반응, 면역조직화학염색



목 차

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
III. 결 과	10
IV. 고 찰	14
V. 결 론	19
VI. 참고문헌	24
영문초록	32



I. 서 론

최근 사람의 난치성 질병 치료를 위한 최후수단으로 타인의 조직 일부나 장기를 이식하는 치료 방법이 각광을 받고 있다. 그러나 장기 공여자의 수가 수여자에 비하여 절대적으로 부족한 현실에서 사람과 유사한 특성을 가지는 동물의 장기를 이용한 이종장기이식(xenotransplantation)관련 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있다. 이종장기이식은 이식할 장기의 공급이 지속적이고 필요에 따라 적절한 시기에 장기의 공급이 가능하며 무균 동물의 생산 및 장기의 이식 전 병원체 검색을 통하여 장기이식에 따른 질병의 전파를 미연에 방지할 수 있는 장점이 있다(Boneva 등, 2001; Magre 등, 2003). 그러나 서로 다른 종간의 면역체계 차이에 따른 면역 부작용 및 이종전염(xenozoonosis)의 위험성이 존재하고 있어 일반화되기에는 아직 많은 문제점과 위험성이 남아 있는 실정이다(Boneva 등, 2001).

이종장기이식에 대한 공여동물로서 돼지는 성장에 따른 성성숙 및 임신 기간이 짧고 산자수가 많으며 대량번식의 장점이 있다. 성돈의 경우, 장기의 크기 및 수명은 성인의 수준과 비슷하다. 다른 동물에 비하여 돼지는 면역 체계가 사람과 유사하여 돼지를 활용한 장기이식 연구가 각광을 받고 있다(Magre 등, 2003; Sachs, 1994).

이종장기이식과 관련하여 대두되고 있는 대표적인 바이러스로서 돼지 내인성 레트로바이러스(porcine endogenous retrovirus; PERV)는 다른 종의 내인성 레트로바이러스와 마찬가지로 돼지 유전자 내에 삽입되어 프로바이러스(provirus) 형태로 존재하고 있다(Blusch 등, 2002; Löwer 등, 1996). 근래 돼지 세포주에서 검출된 PERV는 *Retroviridae*, *Gammaretrovirus*속이며, 바이러스 입자의 형태학적 분류상으로는 C형에 속한다(Blusch 등, 2002; 김 등, 2004). C형 PERV중에서 subgroup A, B 및 A와 C의 재조합형인 NIH (the National Institutes of Health)등은 사람유래 세포주에 감염능이 있는 것으로 알려져 있다(Le Tissier 등, 1997; Magre 등, 2003; Takeuchi 등, 1998). Wilson 등 (1998, 2000)은 사람유래 세포주인 293, Hela, Hep2 및 HT1080에서 PERV의 감염을 확인하였다. Martin 등(2000)은 사람의 제정맥(umbilical veins) 및 복재정맥(saphenous veins)으로부터 분리된 내피세포주(human endothelial cells)와

사람의 혈관섬유모세포 (human vascular fibroblast)에서 본 바이러스의 감염을 보고하였다.

돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV)는 *Arteriviridae*, *Arterivirus*속에 속하는 단일가닥의 선상 RNA 바이러스이다. 감염은 전 연령의 돼지에 걸쳐 감수성이 있으며 감염에 따른 주요 증상으로는 호흡기 증상 및 불임, 유사산 또는 허약자돈의 출산 등이 알려져 있다(Benfield 등, 1999). PRRSV는 감염 후 숙주 체내에 장기간 존재하며 정액으로도 전파되어 돼지의 번식 시 주의를 요하는 대표적인 바이러스이다(Rossow, 1998). 사람유래 세포주에 대한 실험 감염 예는 아직 보고된 바 없으나 돼지의 주요 병원성 바이러스 중 하나로 이종장기이식 분야에서도 문제시 될 것으로 추정되고 있다(Fishman과 Patience, 2004).

E형 간염은 주로 중앙아시아, 동남아시아, 아프리카 및 멕시코 지역에서 발생하는 바이러스성 질병이다. 감염된 사람의 분변으로 배출된 바이러스는 음수에 오염되어 경구 감염되며 급성 황달성 간염(acute icteric hepatitis)을 유발한다. 사람사이의 직접 접촉에 의한 감염은 드물다(Aggarwal과 Krawczynski, 2000). 일반적으로 사망률은 0.6% 이하로 낮은 편이나 임신부의 경우에는 25%까지 증가되는 특징이 있으며 모체에서 태아로 수직감염도 가능한 것으로 알려져 있다(Aggarwal과 Krawczynski, 2000; Worm 등, 2002). Meng 등(1997)은 돼지에서 사람 E형 간염 바이러스의 캡시드 항원에 대한 항체에 교차반응하며 사람 바이러스와 ORF2 및 ORF3 유전자가 높은 상동성을 보이는 바이러스를 최초로 보고하였으며 이를 돼지 E형 간염 바이러스(swine hepatitis E virus; SHEV)로 구분하였다.

돼지 썩코바이러스 2형(porcine circovirus type 2; PCV-2)은 *Circoviridae*, *Circovirus*속에 속하는 단일가닥의 환상 DNA 바이러스이다. 1990년대 후반 위축 및 호흡기 증상을 주증으로 하는 이유 자돈에서 분리되었으며 기존의 썩코바이러스와는 유전적, 항원적 특성이 서로 상이하야 PCV-2로 명명하였다(Hamel 등, 1998; Meehan 등, 1998). 본 바이러스는 주로 4~8주령 이유 자돈에서 이유후 전신 소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS)의 주요 원인체로 전 세계적으로 발생하고 있으며 양돈 농가에 심각한 경제적 손실을 야기하고 있다. 최근 Hattermann 등(2004)은 실험적으로 사람유래 세포주에 감염시켜 배양 후 293, HeLa, Hep2, RH 및 Chang liver cells에서 PCV-2의 핵산을

검출하였으며, 이 중 293 및 Hep2 세포주에서는 돼지 신장세포주를 이용한 배양과는 달리 세포변성효과(cytopathogenic effect; CPE)를 확인하였다.

돼지 림프구 친화성 허피스바이러스(porcine lymphotropic herpesvirus; PLHV)는 Ehlers 등(1999)에 의해 처음 검출되어 PLHV type 1 (PLHV-1) 및 PLHV type 2 (PLHV-2)로 분류되었으며, 최근 PLHV type 3 (PLHV-3)가 알려져 있다 (Chmielewicz 등, 2003). 장기이식 후 면역학적 부작용을 줄이려는 목적으로 수여자의 면역력을 저하시키는 동안 발생하는 대표적인 장기이식관련 질환으로 이식후 림프구 증식성 장애(posttransplant lymphoproliferative disorder; PTL)가 있다. 사람에서 본 질병은 Epstein-Barr virus (EBV)가 주요 원인체로 작용하고 증식한 B 림프구에 바이러스가 존재하고 있음이 확인하였다(Setsuda 등, 1999). PLHV는 *Herpesviridae*, *Gammapherpesvirus*속으로 사람의 EBV 및 human herpesvirus 8과 상동성을 가지는 것으로 알려져 있다. 최근 돼지의 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell) 동종이식 시 발생한 이식후 림프구 증식성 질환에서 PLHV-1이 검출되었다(Goltz 등, 2002).

현재 돼지는 이종장기이식 분야에서 가장 적합한 공여동물로 각광받고 있으나 사람에게 전파 위험성이 있는 이종전염이 가장 문제시되고 있다. 따라서 잠재성 이종전염 바이러스를 효과적으로 검출할 수 있는 신속하고 체계적인 검색 방법이 요구되고 있는 실정이다. 본 연구는 돼지의 자성 생식기 내 잠재성 이종전염 바이러스의 검출 여부와 함께 일부 바이러스의 장기 내 분포를 파악하여 이종장기이식용 무균돼지 생산의 기초자료로 활용하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

제주지역 14개 양돈 농장에서 도축용으로 출하된 70두 돼지의 난소 및 자궁을 채취하여 실험에 공여하였다. 난소 및 자궁 조직은 채취 직후 냉장상태로 운송하여 검사 용도에 따라 분리하여 보관하였다.

2. 병리조직학적 검사

채취한 난소 및 자궁 조직은 자궁각을 기준으로 양분하여 한쪽은 10% 중성 완충 포르말린용액에 고정하였다. 일반적인 조직처리 방법에 따라 파라핀 포매 후 3 μ m 두께로 조직 절편을 제작하여 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 실시하였으며, 광학현미경으로 조직 소견을 관찰하였다.

3. 중합효소연쇄반응

1) 검사 시료의 핵산 추출

RNA 바이러스인 PERV, PRRSV 및 SHEV에 대한 역전사중합효소연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR)과 DNA 바이러스인 PCV-2 및 PLHV에 대한 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 실시하였다. 유전자 검사를 위하여 -70 $^{\circ}$ C에 냉동 보관된 난소 및 자궁

조직의 일부를 채취하여 DNase RNase free distilled water (Invitrogen, USA)와 1:10 비율로 혼합하여 균질화시킨 후 상층액을 이용하였다.

DNA추출은 G-spin™ DNA extraction kit (iNtRON biotechnology, Korea)를 이용하였다. 시료의 상층액 200 μ l에 G-buffer 400 μ l을 잘 혼합한 다음 70°C에서 10분간 방치하고 binding buffer 400 μ l를 첨가하여 column에 800 μ l를 넣고 12,000rpm에서 1분간 원심분리하였다. collection tube에 여과된 용액을 제거하고 500 μ l의 washing buffer를 분주하여 12,000rpm에서 1분간 원심분리한 후 상기 과정을 1회 반복하였다. 새로운 1.5ml effendorf tube에 column을 넣고 100 μ l의 elution buffer를 첨가하여 13,000rpm에서 1분간 원심분리를 실시하였다. 최종 추출물은 PCR 검사 전까지 -70°C에 냉동보관 하였다.

RNA의 추출은 RNeasy® Protect Mini Kit (QIAGEN, GmbH, Germany)를 이용하였다. 유제액 200 μ l와 RLT buffer 350 μ l를 혼합한 후, 70% ethanol 350 μ l을 첨가하여 Mini column에 700 μ l의 반응액을 넣고 4°C, 10,000rpm에서 30초간 원심분리 하였다. Collecting tube내 용액을 제거하고 column에 RW1 buffer 700 μ l을 분주 후 4°C, 10,000rpm으로 다시 30초간 원심분리 하였다. Column에 새로운 collecting tube를 장착하고 RPE buffer 500 μ l을 첨가하여 4°C, 10,000rpm에서 1분간 원심분리 한 후, 상기 과정을 1회 반복하였다. Column에 용액이 남지 않도록 4°C, 12,000rpm에서 1분간 원심분리 후 column을 새로운 1.5ml effendorf tube에 넣고 RNase free water를 40 μ l 분주하여 4°C, 12,000rpm으로 1분간 원심분리 하여 최종 추출물을 RT-PCR 검사를 실시하기 전까지 -70°C에서 냉동보관 하였다.

2) Oligonucleotide primer의 염기서열

PERV, PRRSV 및 SHEV의 검출을 위한 primer는 Czauderna 등(2000), Christopher-Hennings 등(1995) 및 Meng 등(1998)의 방법에 준하여 제작하였으며 (Table 1), PCV-2 및 PLHV의 검출을 위한 primer는 Larochelle 등(1999) 및 Ehlers 등(1999)이 제시한 염기서열에 준하여 제작하였다(Bioneer, Korea; Table 2).

3) RT-PCR 반응조건

PERV, PRRSV 및 SHEV의 검출을 위한 반응조건은 추출한 RNA 2 μ l와 검출하고자 하는 바이러스의 primer 각각 0.5 μ l (20pmol) 및 DNase RNase free water 17 μ l를 RT-PCR premix (Maxime RT-PCR premix, iNtRON biotechnology, Korea)에 첨가하여 최종 반응용량이 20 μ l가 되도록 하였다. PERV는 42 $^{\circ}$ C에서 30분, 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응한 다음 95 $^{\circ}$ C, 58 $^{\circ}$ C 및 72 $^{\circ}$ C에서 1분씩 35회 반복하고 최종 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 반응하였다(Specke 등, 2001). PRRSV는 42 $^{\circ}$ C에서 30분, 94 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응한 다음 94 $^{\circ}$ C에서 20초와 47 $^{\circ}$ C 및 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 30회 반복하고 최종 72 $^{\circ}$ C에 15분간 반응시켰다 (Christopher-Hennings 등, 1995). SHEV는 42 $^{\circ}$ C에서 1시간, 95 $^{\circ}$ C에서 9분간 반응한 다음 94 $^{\circ}$ C, 52 $^{\circ}$ C에서 1분 및 72 $^{\circ}$ C에서 90초간 39회 반복하고 최종 72 $^{\circ}$ C에 7분간 반응시켰다(Meng 등, 1998). RT-PCR 과정이 완료된 후 PRRSV와 SHEV의 반응산물 2 μ l에 각각 ORF7nF2, ORF7nR2 및 F2, R2 primer를 이용하여 nested PCR을 실시하였다(Table 1).

4) PCR 반응조건

PCV-2 및 PLHV의 검출을 위한 반응조건은 추출한 DNA 2 μ l와 검출하고자 하는 바이러스의 primer 각각 0.5 μ l (20pmol) 및 DNase RNase free distilled water 17 μ l를 PCR premix (Maxime PCR premix, iNtRON biotechnology, Korea)에 첨가하여 최종 반응용량이 20 μ l가 되도록 하였다. PCV-2는 95 $^{\circ}$ C에 5분간 반응한 다음 95 $^{\circ}$ C, 65 $^{\circ}$ C 및 72 $^{\circ}$ C에 각각 1분씩 35회 반복하고 최종 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하였다(Larochelle 등, 1999). PLHV는 95 $^{\circ}$ C에 12분간 반응한 다음 95 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C 및 72 $^{\circ}$ C에 각각 30초씩 42회 반복하고 최종 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하였다(Ehlers 등, 1999). PCR의 증폭은 PCR Thermal Cycler Dice TP600 (TaKaRa, Japan)을 이용하였다.

5) PCR 및 RT-PCR 증폭산물의 확인

반응 종료 후, 각각의 반응액 7 μ l를 1.5% agarose gel상에서 전기영동을 실시한 다음, ethidium bromide 용액(0.5 μ l/ml in DW)으로 염색하였다. UV transilluminator (Mupid-Scope WD, TaKaRa, Japan)로 각각의 병원체에 대한 특이적인 밴드유무를 확인하였으며, 증폭산물을 확인하기 위하여 100bp DNA Ladder (TaKaRa, Japan)를 molecular size marker로 이용하였다.

Table 1. Oligonucleotide primer pairs for the detection of potentially xenozyoonotic RNA viruses

Agent	Primer	Sequences (5' to 3')	Size of amplified products (bp)
PERV	PK1	TTGACTTGGGAGTGGGACGGGTAAC	817
	PK6	GAGGGTCACCTGAGGGTGTGGAT	
PRRSV	ORF7 F1	TCGTGTTGGGTGGCAGAAAAGC	484
	ORF7 R1	GCCATTCACCACACATTCTTCC	
	ORF7 nF2	CCAGATGCTGGGTAAGATCATC	236
	ORF7 nR2	CAGTGTAACCTATCCTCCCTGA	
SHEV	F1	AGCTCCTGTACCTGATGTTGACTC	404
	R1	CTACAGAGCGCCAGCCTTGATTGC	
	F2	GCTCACGTCATCTGTCGCTGCTGG	266
	R2	GGGCTGAACCAAATCCTGACATC	

Table 2. Oligonucleotide primer pairs for the detection of potentially xenozyoonotic DNA viruses

Agent	Primer	Sequences (5' to 3')	Size of amplified products (bp)
PCV-2	CF8	TAGGTTAGGGCTGTGGCCTT	263
	CR8	CCGCACCTTCGGATATACTG	
PLHV	170S	GCTGACCCAAAGCTCAGGACAATTT	277
	170AS	TATCGCCGTAGATCACCTTGAAGGG	

4. 면역조직화학염색

난소와 자궁 조직 내 PCV-2, PRRSV 및 SHEV 항원의 분포를 확인하고자 면역조직화학염색(immunohistochemistry; IHC)을 실시하였다. 난소 및 자궁 조직을 4~5 μ m 두께로 박절하여 silane 처리된 슬라이드에 부착하였다. 조직 절편이 완전히 부착된 다음, 일반적인 조직처리 방법으로 탈파라핀 및 함수과정을 거쳐 자연적으로 존재하는 peroxidase를 제거하기 위하여 3% H₂O₂가 첨가된 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)에 30분간 반응하였으며, 0.05% proteinase XIV (Sigma, USA)로 37°C에서 7분간 반응하였다. 비특이 반응을 방지하기 위하여 10% normal horse serum으로 37°C에서 20분간 반응시킨 후, 1차 항체인 mouse anti-PRRSV (SDOW17) antibody (South Dakota State University, USA), rabbit anti-PCV2 antibody (Iowa State University, USA) 및 rabbit anti-SHEV antibody (Research Diagnostic Inc., USA)를 antibody diluent solution (DAKO, USA)에 각각 1:5,000, 1:20,000 및 1:200의 농도로 희석하고 적하하여 4°C에서 12시간 반응하였다. 2차 항체로는 bionylated goat anti-mouse and anti-rabbit Ig (DAKO, USA)를 이용하여 37°C에서 60분간 반응하였으며, streptavidin-HRP (DAKO, USA)를 3차 항체로 하여 37°C에서 40분간 반응하였다. 각 단계별로 반응 후에는 PBS로 10분씩 2회에 걸쳐 수세하였다. 모든 면역반응이 끝난 조직은 3, 3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride (DAB; DAKO, USA)로 1~2분간 발색시킨 후, 3차 증류수에서 반응을 종결하였다. 대조염색은 Mayer's hematoxylin (Sigma, USA)으로 핵염색 하였으며, 탈수와 투명과정을 거쳐 봉입하였다. 염색이 끝난 조직 슬라이드는 광학현미경으로 양성 대조군 및 음성 대조군과 비교하여 항원의 존재 여부를 관찰하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 병리조직학적 검사 결과

도축돈 70두의 난소 및 자궁에 대한 병리조직학적인 소견을 검사한 결과, 난소에서는 비화농성 혈관주위염이 15예, 자궁에서는 내막기질 내 국소적인 비화농성 염증이 13예에서 확인되었다(Table 3). 난소의 병변은 수질부에 위치한 나선상 혈관 주변으로 경도에서 중등도의 단핵염증세포 침윤이 관찰되었다. 혈관 중간막에는 호산성을 띠는 균질무구조한 물질의 침착 및 세포질 내 원형의 공포를 함유한 평활근세포가 관찰되었다. 혈관내피세포는 내강쪽으로 현저하게 증창되어 있었다(Fig. 1). 난소의 피질부에는 발육 도중 퇴축 또는 소멸단계에 이르는 폐쇄난포(atretic follicle)가 관찰되었으며, 폐쇄난포의 난포강 내에는 탈락되어 자멸사(apoptosis)한 과립세포 및 폐쇄난포를 처리하기 위해 유입된 탐식세포가 혼재하였다. 자궁은 내막기질에 국소적인 단핵염증세포의 침윤이 관찰되었다(Fig. 2). 보다 심한 병변에서는 국소 다발성의 단핵염증세포 침윤이 관찰되며 병변 주위 혈관의 충혈 및 혈관내피세포의 증창을 확인하였다.

Table 3. Histopathological lesions in the ovaries and uteruses of 70 slaughtered pigs

Type of lesion	Ovary	Uterus
	Perivasculitis	Focal inflammation
No. of pigs	15	13
%	21.4	18.6

2. RT-PCR/PCR 검사 결과

도축돈 70두의 난소 및 자궁으로부터 추출한 RNA를 이용하여 RT-PCR 및 Nested PCR 검사를 실시한 결과, PERV는 전 두수에서 817bp의 특이 band를 확인하였으며, PRRSV는 nested PCR을 통하여 난소와 자궁 각각 5예와 1예에서 236bp의 특이 band를 확인하였다(Fig. 5). 또한 SHEV는 nested PCR 결과, 난소와 자궁 각각 4예와 1예에서 266bp의 양성 band를 나타내었다(Fig. 6). 따라서 총 70두의 도축돈 중에서 PERV는 70예(100%), PRRSV는 6예(8.6%) 및 SHEV는 5예(7.1%)가 양성반응을 나타내었다(Table 4).

Table 4. The results of RT-PCR for PERV, PRRSV and SHEV in the ovaries and uteruses of 70 slaughtered pigs

	Ovary & Uterus	Ovary only	Uterus only	Total	%
PERV	68*	1	1	70	100
PRRSV	0	5	1	6	8.6
SHEV	0	4	1	5	7.1

* No. of positive pigs

도축돈 70두의 난소 및 자궁 조직에서 추출한 DNA를 대상으로 PCR을 실시한 결과, PCV-2는 난소와 자궁 각각 1예에서 263bp의 특이적인 양성 band를 확인 하였으며, PLHV는 난소 35예 및 자궁 33예에서 277bp의 특이적인 양성 band가 검출되었다(Fig. 7). 따라서 총 70두의 도축돈 중에서 PCV-2는 2예(2.9%), PLHV는 47예(67.1%)가 양성반응을 나타내었다(Table 5).

Table 5. The results of PCR for PCV-2 and PLHV in the ovaries and uteruses of 70 slaughtered pigs

	Ovary & Uterus	Ovary only	Uterus only	Total	%
PCV-2	0*	1	1	2	2.9
PLHV	21	14	12	47	67.1

* No. of positive pigs

3. 면역조직화학염색 결과

IHC에 의한 PRRSV, PCV-2 및 SHEV 항원의 난소와 자궁 조직 내 분포를 조사한 결과, PRRSV 및 PCV-2는 난소에서 각각 3예와 1예에서 양성을 나타내었으나, 자궁에서는 양성반응이 관찰되지 않았다. SHEV는 난소와 자궁에서 모두 음성인 것으로 확인되었다(Table 6). 난소 내 PRRSV 항원은 주로 나선상 혈관의 염증세포 침윤이 관찰되는 부위에 근접한 폐쇄난포의 난포강에 혼재된 큰포식세포의 세포질 내에서 갈색의 양성반응을 나타내었다(Fig. 3). 또한 PCV-2는 난소의 폐쇄난포 내 큰포식세포의 세포질에서 갈색 양성반응을 나타내었다(Fig. 4).

Table 6. Detection of PRRSV, PCV-2 and SHEV antigens in the ovaries and uteruses by immunohistochemistry

	Ovary	Uterus	Total
PRRSV	3*	0	3
PCV-2	1	0	1
SHEV	0	0	0

*No. of positive pigs

IV. 고 찰

1905년 급성신부전 증상을 보이는 어린 환자의 신장에 토끼 신장 조직을 이식한 이래, 이종장기이식 연구는 세계 각국에서 돼지, 토끼, 염소, 원숭이 또는 침팬지 등 여러 종의 동물 장기를 이용하여 진행되고 있다(Deschamps 등, 2005). 여러 동물종 중에서 돼지는 생산 및 공급의 효율성과 사람과의 적합성을 고려하여 이종장기이식용 동물로 선호되고 있다. 최근 장기이식용 돼지의 생산은 면역계 차이에 따른 이식 후 부작용을 최소화하려는 사람의 면역유전자 삽입모델 및 사람에게 전파 가능한 병원체를 생산 단계에서부터 차단하는 무균시스템의 개발에 초점이 맞추어져 있다(Boneva 등, 2001; Deschamps 등, 2005; Fishman, 2000; Tucker 등, 2002). 무균돼지 생산을 위해서는 사육시설 뿐만 아니라 공여돼지 및 대리모 생식기계의 무균성이 확보되어야 하며, 이를 검증하기 위하여 확실한 검색 대상 병원체 선정 및 적절한 검사방법이 확립되어야 할 것이다.

대부분의 이종전염은 자연 숙주에는 무증상으로 감염되어 있던 병원체가 장기이식 후 수여자의 면역상태가 현저하게 저하되었을 경우 증식하여 질병을 유발하는 특성이 있다. 이와 같은 이종전염의 문제는 과거 사람에서 발생하지 않던 새로운 병원체가 정상적인 면역계를 거치지 않고 체내에 직접 유입되어 질병이 발생한다는 점이다. 또한 공여동물에서는 병원성이 약한 바이러스라 하더라도 수여자의 체내에 이미 존재하는 바이러스와의 재조합을 통하여 새로운 전염성 질병을 유발할 가능성도 배제할 수 없다. 따라서 이종전염의 문제는 장기이식의 발전과 더불어 더욱 중요시되고 있다(Blusch 등, 2002; 김 등, 2004).

본 연구에서 제주지역 양돈 농장에서 출하된 도축돈 70두의 난소와 자궁의 병리조직학적 병변은 난소 수질부 혈관주위의 비화농성 염증이 15예 및 자궁내막기질의 국소 비화농성 염증이 13예에서 관찰되었다. 병변부위의 염증세포는 림프구, 형질세포 및 소수의 큰포식세포로 구성되어 있었다. 경미한 병변의 경우 소수 단핵염증세포의 침윤이 확인되었으나, 심한 병변의 경우에는 혈관 중간막의 변성 및 내피세포의 현저한 종창이 함께 관찰되었다. 이와 같은 병리조직학적 병변은 주로 바이러스 감염에 의하여 나타날 수 있으며, 본 연구에서 검출한 바이러스 중에서는 PRRSV와 PCV-2가 병변

형성과 관련이 있을 것으로 추정된다. PRRSV 감염 시 주요 혈관의 병변으로는 국소적인 경도의 림프구 및 형질세포 침윤부터 혈관벽 전체에 림프구, 형질세포 및 큰포식세포의 침윤과 중간막의 괴사가 동반되는 것으로 알려져 있다(Rossow, 1998). PCV-2는 감염 정도에 따라 실질장기에 비화농성 혈관염 또는 신장 공상동맥의 괴사성 동맥염을 유발할 수 있는 것으로 보고되어 있다(Allan과 Ellis, 2000; 양 등, 2004). 본 연구에서는 염증병변을 가진 일부 개체에서 PCR 및 IHC를 통해 두 바이러스가 검출되었다. 특히 IHC에서는 매우 한정된 부위에서만 항원이 검출되었다. 따라서 본 연구에서 양성반응을 보인 개체의 경우 극히 소량의 바이러스에 노출되어 있었으며, 전신적인 질병으로까지의 파급되지 않은 상태로 특히 임상증상 없이 도축 과정에 도달할 수 있었을 것으로 추정된다.

70두 도축돈의 난소 및 자궁을 대상으로 PCR 검사를 실시한 결과, 잠재성 이종전염 바이러스의 감염은 PERV 70예(100%), PLHV 47예(67.1%), PRRSV 6예(8.6%), SHEV 5예(7.1%) 및 PCV-2 2예(2.9%) 순으로 확인되었다. PERV는 전형적인 레트로바이러스와 같이 양단의 long terminal repeats (LTR) 및 세 가지 open reading frame인 *gag*, *pol* 및 *env* 유전자를 가지고 있다. 이 중에서 *gag* 및 *pol* 유전자는 바이러스 subgroup간 고도의 상동성이 있으나, *env* 유전자는 서로 차이가 있는 것으로 알려져 있다(Akiyoshi 등, 1998; Le Tissier 등, 1997; Magre 등, 2003). *pol* 유전자를 이용한 PERV의 검출은 바이러스의 subgroup을 분류하기에는 한계가 있지만 PERV의 존재를 확인하기 위한 방법으로 널리 활용되고 있다(김 등, 2004). 국내에서 김 등(2004)은 요크셔, 랜드레이스, 듀록 및 버크셔종 각 5두의 모근을 이용하여 PCR 검사를 실시한 결과, 전 두수에서 PERV 양성을 확인하였다. 본 연구에서는 RT-PCR 기법을 이용하여 70예 모두에서 PERV의 *pol* 유전자를 검출하여 김 등(2004)의 보고와 유사하였다. 따라서 제주지역 내에서 사육되는 돼지에서도 일반적으로 PERV가 감염되어 있는 것으로 확인되었다. 최근 van der Lann 등(2000)은 돼지 채장을 이식한 NOD/SCID 마우스에서 PERV의 감염을 보고하였다. 그러나 돼지에서 사람으로의 이종감염 여부는 확실치 않은 상황이다(Liu 등, 2005; Specke 등, 2001). 따라서 사람유래 세포주에 감염능이 있는 것으로 알려진 A, B 및 NIH subgroup별로 국내 돼지에서의 분포 상황 등 보다 폭넓은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

PLHV는 최근 알려진 돼지의 허피스바이러스로 돼지의 동종장기이식 시 사람의

PTLD와 유사한 림프구 증식성 병변을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 PLHV는 이종장기이식 시 사람에게 전파될 가능성이 있는 병원체로 주목받고 있으나, 아직 국내에서는 연구가 전무한 실정이다. Chmielewicz 등(2003)은 독일에서 사육되고 있는 돼지 92두의 말초 혈액 백혈구를 이용하여 PCR을 실시한 결과 47예(51%)가 양성임을 보고하였다. 또한 다른 국가에서 사육되고 있는 돼지에서도 PLHV 항원을 검출하여 본 바이러스가 지역에 관계없이 널리 감염되어 있을 것으로 추정하였다. 본 연구에서는 PLHV-1 및 PLHV-2를 모두 검출할 수 있는 PCR primer (Ehlers 등, 1999; Ulrich 등, 1999)를 실험에 이용하였으며, 이번 연구를 통하여 본 바이러스가 국내에서 사육되는 건강한 돼지에서도 상당수 존재하고 있음을 확인할 수 있었다.

국내 돼지의 PRRSV 감염에 대하여 Lyoo 등(2001)은 총 86개 양돈 농장으로부터 호흡기 증상이 있는 돼지의 폐장과 림프절 조직을 검사하여 27개 농장(34.1%)의 시료에서 항원을 검출하였다. Kim 등(2002)은 국내 양돈 농장에서 의뢰된 총 3,391두의 혈청을 대상으로 PRRSV 항체 검사를 실시하였다. PRRSV 항체는 1,765두(52.1%)에서 검출되었으며 검사를 의뢰한 총 256농장 중 230개 농장(89.8%)의 돼지가 항체를 보유하고 있는 것으로 확인되었다. 현재 국내 양돈 농가에서 사육되고 있는 돼지 중에서도 이유 자돈의 호흡기 질병 및 모돈의 번식률 저하에 PRRSV가 밀접한 관련을 가지고 있을 것으로 사료된다. 본 연구를 통하여 PRRSV는 자성 생식기 내에도 자연 감염되어 항원이 존재하였으나 폐장 및 림프절 등에 비하여 자성생식기의 검출률은 매우 낮은 것으로 확인되었다. 최근 PLHV와 유사하게 동종의 간 조직을 이식한 돼지에서 형성된 다형태성 림프구 증식성 병변에서 PRRSV의 항원이 검출되어, PRRSV도 이종장기이식 시 문제점을 야기할 가능성이 대두되고 있다(Talpe 등, 2001).

SHEV는 Meng 등(1997)에 의해 돼지에서 처음 확인되어 초기에는 *Caliciviridae*에 속해 있었으나, 최근 *Hepeviridae*, *Hepevirus*속으로 다시 분류되었다. SHEV는 바이러스혈증 기간이 비교적 짧아 주로 분변 또는 혈청을 대상으로 RT-PCR을 수행하여 항원을 검출하는 것이 효율적이다(Aggarwal과 Krawczynski, 2000; Worm 등, 2002). Meng 등(1998)은 붉은털원숭이(rhesus monkey) 및 침팬지에 SHEV를 인공접종 시 감염됨을 확인하였다. 최근 일본에서는 E형 간염 바이러스(HEV)의 사람 감염예가 지속적으로 보고되고 있다. 이는 주로 완전히 가열하지 않은

야생 돼지의 간과 고기 또는 사슴 고기를 섭취하는 중 HEV에 노출되어 감염이 이루어지는 것으로 알려지고 있다(Lei 등, 2003; Yazaki 등, 2003; Li 등, 2005). 국내에서 Choi 등(2003)은 128두의 돼지 혈청을 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과 3예(2.3%)에서 SHEV 항원을 검출하였으며, 본 바이러스에 대한 항체 검사 결과 돼지는 264두 중 39예(14.8%), 사람은 96명 중 17예(17.7%)에서 양성반응을 확인하였다. 본 연구를 통하여 돼지의 자성 생식기내에도 SHEV가 존재함을 확인할 수 있었으나, 양성률은 7.1%로 비교적 낮게 검출되었다.

PCV-2는 감염돈의 직접접촉에 의한 감염 뿐 아니라 정액(Hamel 등, 2000; Larochelle 등, 2000) 및 유사산 태아에서 바이러스 항원이 확인되어(Allan과 Ellis, 2000; Farnham 등, 2003) 수직감염도 가능한 것으로 알려져 있다. 최근 Bielanski 등(2004)은 PCV-2를 실험감염시킨 돼지의 난모세포 및 배아에서 바이러스 항원을 검출하였다. 본 연구에서 PCR 검사를 통한 도축돈의 자성 생식기 내 PCV-2의 항원은 2.9%로 가장 낮게 검출되었다. Bielanski 등(2004)은 캐나다에서 사육되던 5~8개월령 PCV-2 항체 양성돈의 자성 생식기에서 PCV-2의 분포를 조사하였다. PCR을 이용하여 총 55두를 검사한 결과, 혈청 46예(84%), 난포액 12예(22%), 난관세포 31예(56%), 자궁세척액 20예(36%) 및 난모세포 6예(11%)에서 양성반응을 보고하였다. 본 연구에서는 검사 대상이 한정된 면이 있으나, 제주지역에 사육중인 도축돈의 자성 생식기 내에 PCV-2는 극히 소수만이 감염되어 있는 것으로 확인되어, 본 바이러스의 감염률은 지역 또는 국가별로 차이가 큰 것으로 사료된다.

본 연구에서 IHC 결과, PRRSV 및 PCV-2 항원은 각각 3예 및 1예의 난소 조직에서 검출되었다. SHEV의 항원은 난소와 자궁 조직에서 모두 검출되지 않았다. 양성반응은 주로 폐쇄난포의 난포강에 있는 큰포식세포의 세포질에서 확인되었다. PRRSV의 항원은 감염 초기 림프절 등의 장기 내 큰포식세포에 탐식된 항원이 복제를 거듭하여 전파되는 것으로 알려져 있다(Rossow, 1998; Sur 등, 2001). Sur 등(2001)은 실험적으로 PRRSV를 감염시킨 60일령의 돼지에서 IHC 및 in situ hybridization을 실시하여 난소 내 항원의 분포를 조사한 결과, 주로 폐쇄난포에 분포하는 큰포식세포의 세포질에 존재한다고 하였다. PCV-2 또한 폐장, 간, 신장, 비장 및 림프절 등 실질장기에 침윤되어 있는 큰포식세포의 핵 또는 세포질에서 바이러스 봉입체를 관찰할 수 있다(Allan과 Ellis, 2000). 본 연구에서도 두 바이러스의 항원은 주로 폐쇄난포에 침윤된 큰포식세포의 세포질에서 검출되었으며, 이는 항원을 탐식한

큰포식세포가 혈류를 타고 이동하면서 폐쇄난포의 자멸사한 세포를 포함한 변성 물질들의 제거를 위해 난소 내로 유입된 결과로 여겨진다.

IHC 기법을 이용하여 항원을 검사한 결과, 병리조직학적 병변이 확인된 개체 중 극히 일부에서만 항원이 검출되었으며 양성반응은 폐쇄난포의 큰포식세포에 국한되어 나타나는 경향을 보였다. 따라서 IHC 기법이 특정 유전자 영역의 증폭을 통하여 항원 검출이 가능한 PCR 검사법에 비하여 검출률이 매우 낮은 것으로 확인되었다. 이는 바이러스의 항원이 난소 내 극히 소수만 분포하거나, 감염 후 시간이 경과하면서 대부분의 항원은 소실되고 일부 조직학적 병변만이 남아있기 때문으로 추정된다. SHEV의 경우에는 항원이 많이 존재하는 분변 및 혈청에서도 증상 발현 후 평균 2주 이내의 짧은 기간에만 검출되는 것으로 알려져 있다(Aggarwal과 Krawczynski, 2000). 따라서 SHEV의 표적장기가 아닌 난소 및 자궁에서 IHC를 이용한 항원의 검출은 매우 어려운 것으로 판단된다.

본 연구에서 70두의 도축돈을 대상으로 돼지 유전자 내에 삽입되어 있으나 현증이 거의 없는 PERV와 장기이식 후 수여동물의 면역력이 저하된 상태에서 림프구 증식성 질환을 유발하는 PLHV는 PCR 검사 결과, 각각 100% 및 67.1%의 양성률을 보였다. 현재까지 PERV 및 PLHV에 대한 돼지 자성생식기 내 병변은 알려진 바가 없다. 또한 SHEV는 급성 다발성 림프구성 간염을 유발하기도 하지만(Halbur 등, 2001, Meng 등, 1997), 다른 장기의 병변은 모르는 실정이다. 본 연구에서도 자성 생식기 내 PERV, PLHV 및 SHEV의 감염은 확인되었으나 병변과의 상관성은 규명하지 못하였다. 이종장기이식 시 사람에게 감염될 가능성이 있는 잠재성 병원체의 검출을 위하여 PCR 기법은 매우 유용한 것으로 사료된다. 그러나 공여동물에 존재하는 극히 소량의 잠재성 이종전염 병원체라 하더라도 정확히 검출할 수 있는 보다 정밀한 진단 기법의 개발과 적용은 앞으로의 과제라 하겠다.

본 연구는 국내 장기이식용 무균돼지의 생산과 관련하여 문제시 될 수 있는 잠재성 이종전염 바이러스를 제어하기 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

제주지역 14개 양돈 농장에서 출하된 도축돈 70두의 난소 및 자궁에 대한 병리 조직학적 검사, PCR 및 IHC를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 도축돈의 난소 및 자궁에 대한 병리조직학적 병변으로 난소의 비화농성 혈관주위염이 15예(21.4%) 및 자궁의 국소적인 비화농성 염증이 13예(18.6%)에서 관찰되었다.
2. 도축돈의 난소 및 자궁에 대한 RT-PCR 결과, PERV는 70예(100%), PRRSV는 6예(8.6%) 및 SHEV는 5예(7.1%)가 양성을 나타내었다.
3. 도축돈의 난소 및 자궁에 대한 PCR 결과, PLHV는 47예(67.1%) 및 PCV-2는 2예(2.9%)가 양성을 보였다.
4. IHC 결과, 난소조직 내 PRRSV 및 PCV-2의 항원은 각각 3두와 1두에서 양성을 나타내었으나 자궁조직에서는 검출되지 않았다. PRRSV 및 PCV-2 항원은 주로 혈관주위염 부위에 근접한 폐쇄난포 내 큰포식세포의 세포질에서 양성반응을 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 제주지역 도축돈의 자성 생식기 내 잠재성 이중전염 바이러스는 PERV (100%), PLHV (67.1%), PRRSV (8.6%), SHEV (7.1%) 및 PCV-2 (2.9%) 순으로 분포하고 있음이 확인되었다.

Legends for Figures

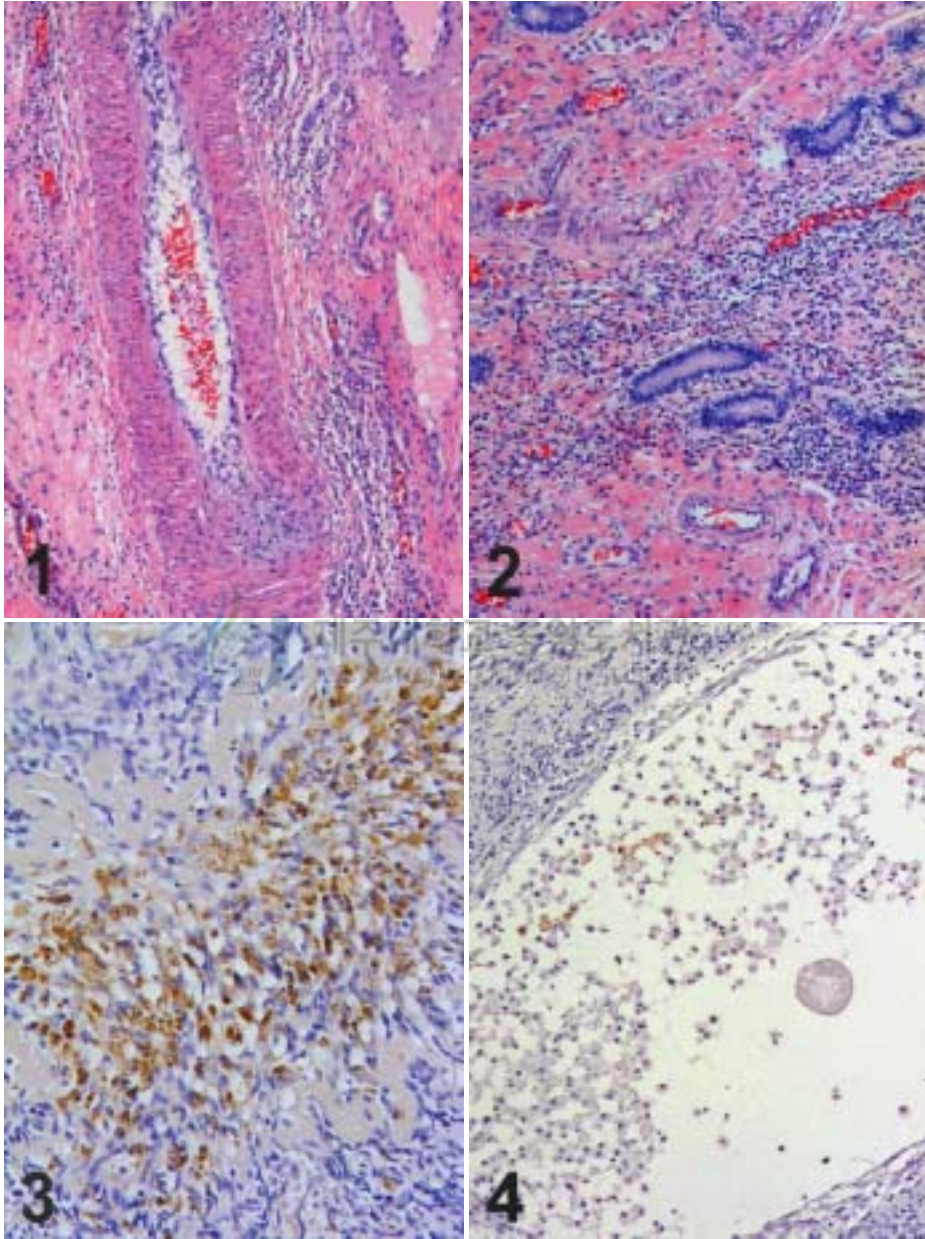
Figure 1. Moderate infiltration of mononuclear inflammatory cells and endothelial swelling of the thick-walled coiled vessel in the ovarian medulla. H&E stain. ×100.

Figure 2. Focal infiltration of many mononuclear inflammatory cells in the endometrial stroma of the uterus. H&E stain. ×100.

Figure 3. Positive reactions for PRRSV antigens within the macrophages in advanced atretic follicle of the ovary. IHC. ×200.

Figure 4. Positive reactions for PCV-2 antigens within the macrophages in the atretic follicle of the ovary. IHC. ×100.





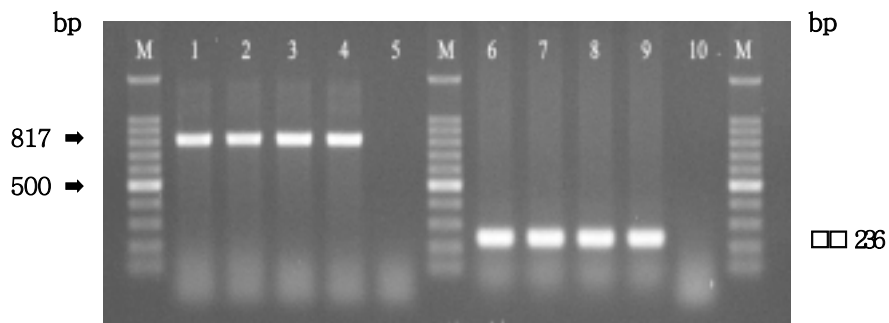


Figure 5. RT-PCR products of PERV and nested PCR products of PRRSV from ovary and uterus homogenate. Lane M: 100bp DNA ladder; lane 1~3: 817bp field samples; lane 4: PERV positive control; lane 5: PERV negative control; lane 6~8: 236bp PRRSV field samples; lane 9: PRRSV positive control; lane 10: PRRSV negative control.

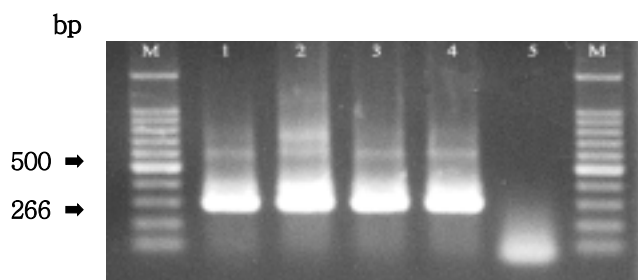


Figure 6. Nested PCR products of SHEV from ovary and uterus homogenate. Lane M: 100bp DNA ladder; lane 1~3: 266bp field samples; lane 4: SHEV positive control; lane 5: SHEV negative control.

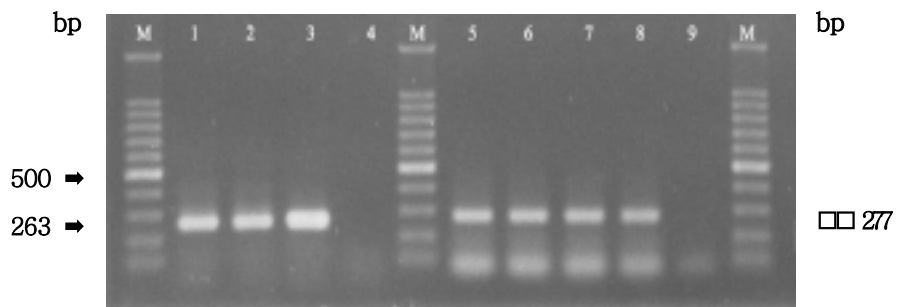


Figure 7. PCR products of PCV-2 and PLHV from ovary and uterus homogenate. Lane M: 100bp DNA ladder; lane 1~2: 263bp field samples; lane 3: PCV-2 positive control; lane 4: PCV-2 negative control; lane 5~7: 277bp field samples; lane 8: PLHV positive control; lane 9: PLHV negative control.



VI. 참고문헌

- Aggarwal, R. and K. Krawczynski. 2000. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol.*, 15: 9~20.
- Akiyoshi, D. E., M. Denaro, H. Zhu, J. L. Greenstein, P. Banerjee and J. A. Fishman. 1998. Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J Virol.*, 72: 4503~4507.
- Allan, G. M. and J. A. Ellis. 2000. Porcine circovirus: a review. *J Vet Diagn Invest.*, 12: 3~14.
- Benfield, D. A., J. E. Collins, S. A. Dee, P. G. Halbur, H. S. Joo, W. L. Mengeling, M. P. Murtaugh, K. D. Rossow, G. W. Stevenson and J. J. Zimmerman. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome, pp. 201 ~232. In "Disease of swine" (ed. Straw B. E., S. D'Allaire, W. L. Mengeling and D. J. Taylor). Iowa state university press, Ames, Iowa.
- Bielanski, A., R. Larochelle, J. Algire and R. Magar. 2004. Distribution of PCV-2 DNA in the reproductive tract, oocytes and embryos of PCV-2 antibody-positive pigs. *Vet Rec.*, 155: 597~598.
- Bielanski, A., R. Larochelle and R. Magar. 2004. An attempt to render oocytes and embryos free from the porcine circovirus type 2 after experimental in vitro exposure. *Can J Vet Res.*, 68: 222~225.

- Blusch, J. H., C. Patience and U. Martin. 2002. Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 9: 242~251.
- Boneva, R. S., T. M. Folks and L. E. Chapman. 2001. Infectious disease issues in xenotransplantation. *Clin Microbiol Rev.*, 14: 1~14.
- Chmielewicz, B., M. Goltz, T. Franz, C. Bauer, S. Brema, H. Ellerbrok, S. Beckmann, H. J. Rziha, K. H. Lahrmann, C. Romero and B. Ehlers. 2003. A novel porcine gammaherpesvirus. *Virology*, 308: 317~329.
- Choi, I. S., H. J. Kwon, N. R. Shin and H. S. Yoo. 2003. Identification of swine hepatitis E virus (HEV) and prevalence of anti-HEV antibodies in swine and human populations in Korea. *J Clin Microbiol.*, 41: 3602~3608.
- Christopher-Hennings, J., E. A. Nelson, J. K. Nelson, R. J. Hines, S. L. Swenson, T. H. Howard, J. J. Zimmerman, J. B. Katz, M. J. Yaeger, C. C. L. Chase and D. A. Benfield. 1995. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J Clin Microbiol.*, 33: 1730~1734.
- Czauderna, F., N. Fischer, K. Boller, R. Kurth and R. R. Tönjes. 2000. Establishment and characterization of molecular clones of porcine endogenous retroviruses replicating on human cells. *J Virol.*, 74: 4028~4038.
- Deschamps, J. Y., F. A. Roux, P. Sai and E. Gouin. 2005. History of xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 12: 91~109.

- Ehlers, B., S. Ulrich and M. Goltz. 1999. Detection of two novel porcine herpesviruses with high similarity to gammaherpesviruses. *J Gen Virol.*, 80: 971~978.
- Farnham, M. W., Y. K. Choi, S. M. Goyal and H. S. Joo. 2003. Isolation and characterization of porcine circovirus type-2 from sera of stillborn fetuses. *Can J Vet Res.*, 67: 108~113.
- Fishman, J. A. 2000. Xenotransplantation from swine: making a list, checking it twice.... *Xenotransplantation*, 7: 93~95.
- Fishman, J. A. and C. Patience. 2004. Xenotransplantation: infectious risk revisited. *Am J Transplant.*, 4: 1383~1390.
- Goltz, M., T. Ericsson, C. Patience, C. A. Huang, S. Noack, D. H. Sachs and B. Ehlers. 2002. Sequence analysis of the genome of porcine lymphotropic herpesvirus 1 and gene expression during posttransplant lymphoproliferative disease of pigs. *Virology*, 294: 383~393.
- Halbur, P. G., C. Kasorndorkbua, C. Gilbert, D. Guenette, M. B. Potters, R. H. Purcell, S. U. Emerson, T. E. Toth and X. J. Meng. 2001. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol.*, 39: 918~923.
- Hamel, A. L., L. L. Lin and G. P. S. Nayar. 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol.*, 72: 5262~5267.
- Hamel, A. L., L. L. Lin, C. Sachivie, E. Grudeski and G. P. S. Nayar. 2000. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can J Vet Res.*, 64: 44~52.

- Hattermann, K., C. Roedner, C. Schmitt, T. Finsterbusch, T. Steinfeldt and A. Mankertz. 2004. Infection studies on human cell lines with porcine circovirus type 1 and porcine circovirus type 2. *Xenotransplantation*, 11: 284~294.
- Kim, S. M., T. U. Han, S. Y. Kang, K. S. Shin, C. J. Kim, J. T. Kim and H. S. Kim. 2002. Seroprevalence of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in diagnostic submission. *J Vet Sci.*, 3: 159~161.
- Larochelle, R., M. Antaya, M. Morin and R. Magar. 1999. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J Virol Methods.*, 80: 69~75.
- Larochelle, R., A. Bielanski, P. Müller and R. Magar. 2000. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J Clin Microbiol.*, 38: 4629~4632.
- Le Tissier, P., J. P. Stoye, Y. Takeuchi, C. Patience and R. A. Weiss. 1997. Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature*, 389: 681~682.
- Li, T. C., K. Chijiwa, N. Sera, T. Ishibashi, Y. Etoh, Y. Shinohara, Y. Kurata, M. Ishida, S. Sakamoto, N. Takeda and T. Miyamura. 2005. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis.*, 11: 1958~1960.
- Liu, Q., Z. Liu and E. Dalakas. 2005. Prevalence of porcine endogenous retrovirus in Chinese pig breeds and in patients treated with a porcine liver cell-based bioreactor. *World J Gastroenterol.*, 11: 4727~4730.

- Löwer, R., J. Löwer and R. Kurth. 1996. The virus in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 5177~5184.
- Lyoo, K. S., Y. H. Park and B. K. Park. 2001. Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus from aborted fetuses and pigs with respiratory problems in Korea. *J Vet Sci*, 2: 201~207.
- Magre, S., Y. Takeuchi and B. Bartosch. 2003. Xenotransplantation and pig endogenous retroviruses. *Rev Med Virol*, 13: 311~329.
- Martin, U., M. E. Winkler, M. Id, H. Radeke, L. Arseniev, Y. Takeuchi, A. R. Simon, C. Patience, A. Haverich and G. Steinhoff. 2000. Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV). *Xenotransplantation*, 7: 138~142.
- Meehan, B. M., F. McNeilly, D. Todd, S. Kennedy, V. A. Jewhurst, J. A. Ellis, L. E. Hassard, E. G. Clark, D. M. Haines and G. M. Allan. 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol*, 79: 2171~2179.
- Meng, X. J., R. H. Purcell, P. G. Halbur, J. R. Lehman, D. M. Webb, T. S. Tsareva, J. S. Haynes, B. J. Thacker and S. U. Emerson. 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 9860~9865.
- Meng, X. J., P. G. Halbur, M. S. Shapiro, S. Govindarajan, J. D. Bruna, I. K. Mushahwar, R. H. Purcell and S. U. Emerson. 1998. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol*, 72: 9714~9721.

- Rossow, K. D. 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Pathol.* 35: 1~20.
- Sachs, D. H. 1994. The pig as a potential xenograft donor. *Vet Immunol Immunopathol.*, 43: 185~191.
- Setsuda, J., J. Teruya-Feldstein, N. L. Harris, J. A. Ferry, L. Sorbara, G. Gupta, E. S. Jaffe and G. Tosato. 1999. Interferon- γ , IP-10, and Mig expression in Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis and posttransplant lymphoproliferative disease. *Am J Pathol.*, 155: 257~265.
- Specke, V., S. Rubant and J. Denner. 2001. Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retrovirus. *Virology*, 285: 177~180.
- Specke, V., S. J. Tacke, K. Boller, J. Schwendemann and J. Denner. 2001. Porcine endogenous retrovirus: in vitro host range and attempts to establish small animal models. *J Gen Virol.*, 82: 837~844.
- Sur, J. H., A. R. Doster, J. A. Galeota and F. A. Osorio. 2001. Evidence for the localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen and RNA in ovarian follicles in gilts. *Vet Pathol.*, 38: 58~66.
- Takeuchi, Y., C. Patience, S. Magre, R. A. Weiss, P. T. Banerjee and J. P. Stoye. 1998. Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J Virol.*, 72: 9986~9991.

- Talpe, S., F. Oike, J. P. Dehoux, C. Sempoux, J. Rahier, J. B. Otte and P. Gianello. 2001. Posttransplant lymphoproliferative disorder after liver transplantation in miniature swine. *Transplantation*, 71: 1684~1688.
- Tei, S., N. Kitajima, K. Takahashi and S. Mishiro. 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, 362: 371~373.
- Tucker, A., C. Belcher, B. Moloo, J. Bell, T. Mazzulli, A. Humar, A. Hughes, P. McArdle and A. Talbot. 2002. The production of transgenic pigs for potential use in clinical xenotransplantation: microbiological evaluation. *Xenotransplantation*, 9: 191~202.
- Ulrich, S., M. Goltz and B. Ehlers. 1999. Characterization of the DNA polymerase loci of the novel porcine lymphotropic herpesviruses 1 and 2 in domestic and feral pigs. *J Gen Virol.*, 80: 3199~3205.
- van der Lann, L. J., C. Lockey, B. C. Griffeth, F. S. Frasier, C. A. Wilson, D. E. Onions, B. J. Hering, Z. Long, E. Otto, B. E. Torbett and D. R. Salomon. 2000. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature*, 407: 90~94.
- Wilson, C. A., S. Wong, J. Muller, C. E. Davidson, T. M. Rose and P. Burd. 1998. Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J Virol.*, 72: 3082~3087.
- Wilson, C. A., S. Wong, M. VanBrocklin and M. J. Federspiel. 2000. Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *J Virol.*, 74: 49~56.

Worm, H. C., H. M. Wilm van der Poel and G. Brandstätter. 2002. Hepatitis E: an overview. *Microbes Infect.*, 4: 657~666.

Yazaki, Y., H. Mizuo, M. Takahashi, T. Nishizawa, N. Sasaki, Y. Gotanda and H. Okamoto. 2003. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol.*, 84: 2351~2357.

김영봉, 유재영, 이종영, 김계웅, 박홍양. 2004. 국내 돼지에 존재하는 내인성 레트로 바이러스의 분포. *동물자원지*, 46: 307~314.

양형석, 양나연, 강완철, 강상철, 강홍원, 김재훈, 배종희. 2004. 제주지역 도축돈의 간질성 신염. *대한수의학회지*, 44: 279~286.



Detection of Potentially Xenozoonotic Viruses in the Female Genital System of the Pig

Sang-Chul Kang

(Supervised by professor Jae-Hoon Kim)

Department of Veterinary Medicine
Graduate School, Cheju National University
Jeju, Korea



Abstract

In order to produce germ free pigs for the xenotransplantation, the study was conducted to detect the rate of infection in the female genital system of the pig for porcine endogenous retrovirus (PERV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), swine hepatitis E virus (SHEV), porcine circovirus type 2 (PCV-2) and porcine lymphotropic herpesvirus (PLHV) as possible causes of xenozoonosis. The ovaries and uteruses of 70 slaughtered pigs from 14 farms in Jeju were examined for histopathological examination and polymerase chain reaction (PCR). Immunohistochemistry were performed to investigate the distribution of viral antigens such as PRRSV, PCV-2 and SHEV in the ovary and uterus.

Histopathologically, infiltrations of mononuclear inflammatory cells around the thick-walled coiled vessels in the ovarian medulla were observed in 15 cases. Focal infiltrations of mononuclear inflammatory cells in the endometrial stroma of the uteruses were observed in 13

cases. Based on the PCR method, PERV, PLHV, PRRSV, SHEV and PCV-2 were detected in 70 cases (100%), 47 cases (67.1%), 6 cases (8.6%), 5 cases (7.1%) and 2 cases (2.9%), respectively. According to immunohistochemistry, PRRSV and PCV-2 antigens were detected in 3 and 1 cases in the ovary, respectively. PRRSV and PCV-2 antigens were mostly presented the cytoplasm of phagocytic macrophages in the atretic follicles.

Results of the present study suggest that PERV and PLHV are believed to be the major xenozoonotic viruses in the female genital system of the pig. This study would be helpful to make the monitoring protocol of the potentially xenozoonotic agents to produce germ free pigs for the xenotransplantation.

Key words : porcine endogenous retrovirus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, swine hepatitis E virus, porcine circovirus type 2, porcine lymphotropic herpesvirus, ovary, uterus, polymerase chain reaction, immunohistochemistry

감사의 글

석사 과정을 마무리하면서 병리학이란 학문의 길을 제대로 찾아갈 수 있도록 지도가 되어주신 배종희 교수님과 제가 선택한 길이 맞는지 판단할 수 있도록 나침반이 되어 주신 김재훈 교수님께 감사드립니다. 부족한 논문을 심사해 주신 이두식 교수님께도 감사의 말씀을 올립니다. 수의학이란 학문에 흠뻑 젖을 수 있도록 많은 가르침을 베풀어 주신 수의학과 교수님들께도 그동안 말씀드리지 못했던 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

실험 계획에서부터 원고를 퇴고하기까지 늘 함께 걱정하며 조언을 아끼지 않으셨던 형석이형 감사합니다. 형이 게시기에 논문을 마칠 수 있었습니다. 또한 시료채취부터 본 실험까지 긴 시간을 함께한 실험실 식구들 - 지열, 송학, 형문, 근영, 기승, 석준, 지환-에게도 감사의 마음을 전합니다. 힘든 학부생활 속에서 각자 자신이 맡은 실험을 위하여 늦은 밤까지 실험실을 환하게 밝혀준 식구들입니다.

제주에서 생활하면서 많은 도움을 주신 외삼촌과 고등학교 졸업 후에도 이 곳 제주에 내려오실 때마다 제자에 대한 끝없는 격려와 사랑을 주신 이중희 선생님과 백정훈 선생님, 말과 일생을 함께 하시며 제게도 많은 가르침을 주신 김병현 회장님, 실험 기법을 가르쳐 주신 노인순 선생님께도 감사드립니다.

대학에 입학하면서 서로 다른 길을 선택하였지만 8년 동안 같은 마음으로 함께한 창환, 요한, 오근, 기윤, 광표, 승호, 성재, 윤석, 인용, 병찬을 비롯한 서울에 있는 친구들에게도 소식을 전합니다.

먼 곳에서 혹시나 아프지는 않는지 생활이 어렵지는 않는지 늘 노심초사하고 있는 세 누님과 매형, 하나밖에 없는 외삼촌이 멀리 떨어져 있어 그리움이 클 정현, 동현, 정권, 정현 및 지우, 어린 시절부터 함께한 순희 이모와도 기쁨을 나누고 싶습니다.

마지막으로 제가 학위를 수여하기까지 오직 공부에만 전념할 수 있도록 모든 생활을 아들을 위해 희생하신 어머님께 이 논문을 바칩니다. 부모님의 고향인 제주에서 그 동안 아들이 한 일들을 보여드릴 수 있게 되어 감회가 새롭고 즐거운 마음 끝이 없습니다. 어머니 감사합니다. 그리고 지금은 멀리 하늘에 계시지만 늘 지켜보고 계실 아버지의 빈소에 이 논문을 올리고 싶습니다.

2005년 12월 제주에서

강 상 철