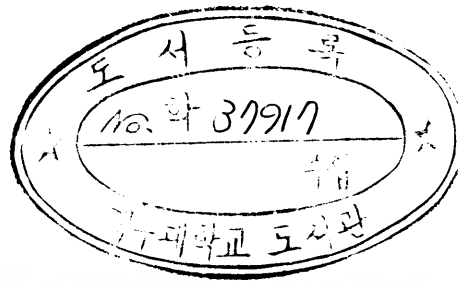


17  
f28.1  
72557

碩士學位論文

# 제주지역의 Akabane virus에 대한 역학조사 및 원인체 분리동정



獸醫學科

姜 完 澈

1998年 12月

제주지역의 Akabane virus에 대한 역학조사  
및 원인체 분리동정

指導教授 李斗植

姜完澈

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함.

1998年 12月



姜完澈의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함.

審査委員長  
委員  
委員

이명준  
김원  
이두식

濟州大學校 大學院

1998年 12月

# 초 록

## 제주지역의 Akabane virus에 대한 역학조사 및 원인체 분리 동정

(지도교수 : 이두식)

강 완 철

제주대학교 대학원  
수의학과

제주도내에서 사육되는 소 542두에 대하여 혈청 중화시험을 이용한 아까바네 바이러스 항체 양성율을 조사하였다.

전체 공시동물에서의 양성율은 47.8%였다. 지역별로는 제주 58.2%, 조천 43.9%, 구좌 22.0%, 표선 43.4%, 안덕 52.6%, 대정 40.0%, 한경 30.0%, 한림 51.0%, 애월 64.8%의 분포를 보였다. 연령이 확인된 325두에 대한 양성율의 연령별 분포는 1세 미만의 소에서 33%, 1세이상 2세 미만에서 43%, 2세이상 3세미만에서 71%, 3세이상에서는 54%를 보였다.

관절만곡과 대뇌수두증을 나타낸 사지기형 송아지의 대뇌가검물을 Vero 세포에 접종하여 CPE를 관찰하였다. CPE를 보이는 Vero 세포를 전자현미경으로 관찰하였을 때 세포질에서 90~130nm 의 바이러스 입자를 확인할 수 있었으며, CPE를 나타낸 Vero 세포를 간접형광항체법을 이용하여 관찰한 결과 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. 또한 Vero 세포에서 배양한 분리바이러스의 배양상층액을 이용하여 PCR을 실시한 결과

365bp의 아까바네 바이러스 S gene을 증폭할 수 있었다.

아까바네 바이러스를 분리한 목장의 기형송아지 분만 축우 및 동거축 10두에 대한 혈청 중화항체를 검사한 결과 모두가 항체 양성을 나타내었고, 역가는 64배 1두, 128배 6두, 256배 3두로 나타났다. 기형송아지를 분만한 축우 3두에 대한 중화항체는 각각 64배, 128배, 256배로 나타났다.



---

중심어 : 제주도아까바네바이러스, 중화항체, 전자현미경, 간접형광항체법,  
PCR

# 목 차

I. 서	론	.....	1
II. 재료 및 방법	.....	4	
III. 결	과	.....	9
IV. 고	찰	.....	15
V. 결	론	.....	17
VI. 참 고 문 헌	.....	18	
영 문 초 록	.....	22	



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

# I. 서 론

아까바네병은 겨모기 등 흡혈곤충의 매개로 소, 염소 등에 감염하는 바이러스성 질병으로(Paronson 등, 1977), 감염된 모체에는 무증상 경과하나 태반을 통해 태아가 감염되면 조산, 유사산, 대뇌수종 및 결손, 사지만곡 등의 번식장애를 유발하기 때문에 일명 Arthrogryposis-Hydranencephaly syndrome(A-H증후군)이라고도 한다(Kurogi 등 1976; Narita 등 1993; 천 등, 1994).

아까바네 바이러스는 Bunyaviridae에 속하며, envelope가 있고 직경이 약 80~100nm인 구형의 single strain RNA바이러스로서 유전자는 large(L), medium(M), small(S)의 3개의 분절로 이루어져 있는데 이들의 크기는 각각  $3 \times 10^6$  dalton,  $2 \times 10^6$  dalton 및  $0.5 \times 10^6$  dalton이다(Doherty, R.L. 등, 1972). L gene은 195 Kd의 L protein을 암호하며 M gene은 120 Kd의 G1 protein과 39 Kd의 G2 protein을 암호하고 S gene은 27Kd의 N protein을 암호한다(井出 등, 1992). Akabane virus의 S gene은 明石 등(1989)이 일본에서 분리한 OBE-1주를 cloning 하여 분석한 바 있다. 아까바네 바이러스 분리를 위한 *in vivo* 실험에서는 젓먹이 마우스(Kurugi 등 1978), 젓먹이 햄스터(Andersen 등 1978)가 이용되며, Vero 세포 및 HmLu-1 세포가 *in vitro* 실험 및 항체검사에 주로 이용된다(Kurugi 등 1976).

아까바네병은 현재 일본, 호주, 이스라엘, 케냐, 터키, 시리아, 아프리카, 인도네시아, 타이완, 한국 등 열대지방을 중심으로 온대지방까지 넓게 분포하고 있으며 특히, 이들 지역에서 서식하는 흡혈곤충의 활동이 왕성한 시기에 감염율이 높은 것이 특징이다(Charles, 1994; Taylor and Mellor, 1994; Liao 등, 1996).

본 질병은 1959년에 일본 동경의 북쪽 군마현(群馬縣) Akabanemachi(赤羽町)에 서식하는 *Aedes vexans*, *Culex tritaeniorhynchus* 모기에서 바이러스(strain JaGAr 39)가 처음 분리되어 아까바네 바이러스라고 불리어지게 되

었다(Oya 등, 1961). 1970년대 초 일본 남부에서 북부 해안까지 소 아까바네병이 대유행하였다(Kurogi 등, 1975). 또한 1974년 모우 혈액에서 아까바네 바이러스(strain OBE-1)를 분리하였고, 임신 134일령에 유산된 태아의 뇌에서도 바이러스(strain NBE-9)가 분리되었다(Kurigi, 1976). 호주에서는 Cybinski 등(1978)에 의해 1975년부터 1976년까지 버팔로, 말, 낙타 등에 대하여 아까바네 바이러스에 대한 항체조사가 수행되어졌으며, 1975년 ICTA(International Committee on Taxonomy of Virus)에서는 본 바이러스를 Bunyavirus 단일 속임이 인정되었다(Indaba, 1980).

국내에서는 1970년도 초에 경기, 강원 일부지역의 임상수의사들이 선천성 기형태아를 아까바네병으로 의사진단 한 바, 주기적인 산발적 발생으로 양축가에게 큰 피해를 주고 있으며(오 등, 1991; 김, 1988), 70년대 말경부터는 경기, 충남, 강원, 전북지역 등에서 아까바네병에 의한 이상분만의 예가 계속적으로 발생하였다(김, 1988). 박 등이 1980년에 중화항체 양성우를 국내 최초로 보고한 것을 시작으로 김(1989)은 1988년 초에 강원지역의 403농가에서 6.3%의 이상분만을 보고한 바 있다. 이 등(1990)은 1988년 12월부터 1989년 2월 사이에 발생한 기형송아지의 포유전 혈액을 채취하여 중화시험을 실시한 결과 32두 중 31두가 아까바네 항체양성을 보고하였다. 오 등(1991)은 1990년 2월에서 4월까지 경상북도 내 1,005두를 조사한 결과 189두(18%)가 아까바네병 백신접종에 의한 항체양성으로 나타났으며, 최와 정(1991)은 충청북도 내의 180두를 조사한 결과 한우에서는 51%, 유우에서는 45%이상의 아까바네바이러스 항체 양성우를 보고하였다. 제주지역에서는 현(1990)이 1988년 10월에서 1989년 2월까지 조사한 아까바네병이 의심되는 소 266두 중 42두(15.8%)가 아까바네 항체 양성으로 판명되었다고 보고하였다. 그러나 1998년 초부터 제주도에서 기형송아지의 분만이 빈번히 보고되어 현장조사를 실시한 결과 66두의 기형송아지 분만이 발생하여 경제적 손실을 초래하였다

본 연구는 제주도에서 사육되는 축우의 아까바네 바이러스에 대한 항

체 양성율을 조사하여 이 병에 감염율을 파악하고자 실시하였다. 또한, 최근 빈발하고 있는 기형송아지 분만의 원인이 아까바네 바이러스에 의함을 밝힘으로써 이에대한 적절한 방역대책을 세우기 위한 기초자료를 제시하기 위하여 수행하였다.





## II. 재료 및 방법

### 1. 바이러스

아까바네바이러스는 국립수의과학검역원에서 분양받은 93FMX주를 실험에 사용하였다.

### 2. 세포배양

국립수의과학검역원에서 분양 받은 Vero 세포를 이용하여 바이러스 분리 및 증식, 혈청중화시험, 간접형광항체법, PCR의 실험에 사용하였다. Vero 세포는 5% 우태아 혈청(FBS, Gibco, USA)이 첨가된  $\alpha$ -Minimal Essential Medium( $\alpha$ -MEM, Gibco, USA)을 사용하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

### 3. 아까바네 바이러스에 대한 혈청 중화 항체가 조사

#### 1) 실험재료

1998년 2월부터 5월 사이 제주지역에서 사육중인 소 542두의 혈청을 대상으로 하였으며 모든 혈청은 56°C에서 30분간 비동화시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 혈청중화시험

혈청중화시험은 St. George 등(1980)에 방법에 준하여 실시하였다. 즉, Microplate에 50 $\mu$ l의 무혈청 배지를 분주하여 동량의 가검혈청을 첫 well에 가하여 계단희석하였다. 여기에 200TCID<sub>50</sub>/0.1ml로 조정된 바이러스를 각 well에 분주한 다음 37°C 배양기에 1시간 반응시켰다. Vero 세포를 subculture 하여 반응시킨 microplate에 2 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml 되도록  $\alpha$ -MEM으로 희석하여 각

well에 100 $\mu$ l씩 분주하고 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 3~5일간 배양하였다. 세포변성효과(cytopathic effect : CPE) 발현 여부를 관찰하면서 CPE가 나타나지 않는 최종 혈청희석배수를 중화항체가로 결정하였다.

#### 4. 바이러스 분리 및 동정

##### 1) 바이러스 분리

제주도축산진흥원에 병성감정 의뢰된 2두의 사지기형의 출산송아지 대뇌를 바이러스 분리 재료로 사용하였다. 무균적으로 채취한 대뇌를 유제하여 항생제가 첨가된  $\alpha$ -MEM으로 10% 조직현탁액을 만들고 2,500rpm에서 20분간 원심분리 후 상층액을 millipore membrane filter(0.2 $\mu$ m)를 사용하여 여과하였다. 100~200 $\mu$ l 여과액을 24-well microplate에 70~80% 단층 배양된 Vero 세포에 접종한 다음 2~3일간 CPE 형성 유무를 관찰하였다.

##### 2) 전자현미경관찰을 이용한 바이러스 입자 확인

단층 배양된 Vero 세포에 분리된 바이러스를 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양한다. 접종한 세포에서 10~20%의 CPE가 관찰될 때 PBS로 3회 세척한 다음 세포를 수거하여 350 xg에서 5분간 원심분리하였다. 수거된 세포 pellet을 2.5% glutaraldehyde에 1시간 전고정하고 0.1M sodium cacodylate 완충액(pH 7.3)으로 30분씩 2회 세척하였다. 그리고 1% osmium tetroxide에 1시간 후고정하고 ethanol로 이행탈수한 후 propylene oxide로 치환하여 Epon 812에 포매하였다. 포매한 재료는 초박절편을 제작하고 uranyl acetate 와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경(H-7100FA, Hitachi, Ltd., Japan)으로 80kv에서 관찰하였다.

##### 3) 간접형광항체법( Indirect Immunoflourescent Antibody test : IFA )

분리한 바이러스를 동정하기 위하여 24-well microplate(Costar, USA)에

cover glass를 넣고 Vero cell을 70~80% 단층 배양시킨 후 PBS(Phosphate Buffer Saline solution)로 2회 세척하고 분리 바이러스 0.1MOI를 접종하고 37℃에서 1시간 감작하였다. 20~30%의 CPE가 형성되었을 때 -20℃에 보관되었던 acetone으로 10분간 고정하였다. 고정한 세포를 PBS로 5회 세척한 후 국립수의과학검역원에서 분양받은 아까바네병 바이러스 단크론항체 50 $\mu$ l을 넣고 30분간 반응시켰다. 이를 다시 PBS로 5회 세척하고  $\alpha$ -MEM에 1:100으로 희석한 FITC (Fluorescence Isothiocyanate) conjugate Antimouse IgG(Sigma, USA) 50 $\mu$ l를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 다시 PBS로 5회 세척하고 90% glycol-saline으로 mounting하여 형광현미경으로 관찰하였다.

#### 4) PCR을 이용한 바이러스의 동정

##### (1) Akabane virus RNA 추출

Akabane virus를 Vero 세포에서 접종하여 증식시킨 후 CPE가 80~90% 일어났을 때 접종액을 수거하여 3,000rpm에서 10분 원심분리한 후 상층액을 500 $\mu$ l 취하여 RNA를 추출하였다. 이때의 virus 역가는 10<sup>5.5</sup>TCID<sub>50</sub>/ml이었다. RNA 추출방법은 Chomczynski & Sacchi 등(1987)에 의한 single-step RNA isolation method (TRIzol<sup>®</sup> Reagent, Gibco)를 이용하였다. 요약하면 바이러스 배양 상층액 500 $\mu$ l에 1ml의 TRIzol<sup>®</sup> Reagent를 넣고 5분 동안 실온에 정치한 200 $\mu$ l chloroform을 첨가하여 잘 섞은 다음 다시 실온에서 10분간 정치하였다. 이것을 1,200rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 다른 tube에 옮기고 0.5ml isopropanol을 첨가하여 실온에 10분간 정치하였다. 다시 12,000rpm에서 10분간 원심한 후 상층액을 버리고 그 pellet을 75% cold ethanol로 2회 세척하여 vacuum dryer에서 건조시켰다. 건조된 pellet을 적당량의 DEPC(Diethylpyrocarbonate) 처리된 증류수에 풀어 RNA template로 사용하였다.

## (2) Oligonucleotide primer 합성

DNA Synthesizer(Applied Biosystem Co. model 392)를 이용하여 primer를 합성하였다. 明石 등(1989)이 보고한 염기서열을 토대로 Akabane virus S gene에 대한 특이 primer를 다음과 같이 합성하였다(Table 1).

Table 1. Oligonucleotide primer for amplication of Akabane virus S gene.

Primer	Nucleotides sequence	Expected PCR product size
AKSF	5'- <sup>169</sup> ACCAGAAGAAGGCCAAGATG <sup>189</sup> -3'	365 bp
AKSR	5'- <sup>313</sup> CACACGGTGCATGTCGATAA <sup>333</sup> -3'	

## (3) Akabane virus first strand cDNA 작성

추출된 RNA template 10 $\mu$ l에 1 $\mu$ l Akabane virus S gene reverse primer(AKSR)를 첨가하고 5분 동안 끓인 후 얼음에 급속히 냉각시켰다. 냉각된 RNA에 20 $\mu$ l DEPC-treated D.W, 10 $\mu$ l 5 $\times$ first strand buffer(250mM Tris-HCL pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub> Gibco, USA)와 5 $\mu$ l 0.1M dithiothreitol(DTT), 2 $\mu$ l 10mM dNTP(Promega), 1 $\mu$ l RNase inhibitor(RNasin 40 U/ $\mu$ l, Promega), 1 $\mu$ l M-MLV Reverse transcriptase(200 U/ $\mu$ l, Gibco, USA)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에 60분 동안 반응시켰다. 반응이 완료되면 합성된 cDNA를 -20 $^{\circ}$ C에 보관하면서 PCR에 사용하였다.

## (4) PCR

### 가. 반응조건

Akabane virus S gene을 증폭하기 위한 PCR 조건은 PCR 반응액의 최종 용량이 50 $\mu$ l 되도록 하였다. 즉, PCR용 tube에 25 $\mu$ l reaction buffer mixture(500mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH 9.0), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, 2.5unit Taq polymerase), 1 $\mu$ l forward primer(AKSF), 1 $\mu$ l reverse primer(AKSR),

5 $\mu$ l cDNA, 18 $\mu$ l PCR grade sterile water를 첨가하여 GeneAmp PCR system 2400(Perkin Elmer, USA)을 이용하여 PCR를 실시하였다. PCR 반응조건은 pre-denaturation을 95 $^{\circ}$ C에 5분간 실시한 다음, 50 $^{\circ}$ C에 30초, 72 $^{\circ}$ C에 45초, 95 $^{\circ}$ C에 30초씩 30 cycle을 반복한 후, post-extension을 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 실시하여 Akabane virus S gene을 증폭시켰다.

#### 나. PCR product의 확인

PCR 증폭산물 10 $\mu$ l를 1 $\mu$ l gel loading buffer(0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol in D.W)와 혼합한 다음 2% agarose gel에서 TAE buffer(40mM Tris-acetate, 1mM EDTA. pH 8.0)를 사용하여 120V에서 30분 전기영동을 실시하고 EtBr(Ethyidium Bromide)로 염색하였다. 증폭산물을 확인하기 위해 100bp DNA Ladder(Gibco)를 molecular size maker로 사용하였고 전기영동 후 UV transilluminator로 Akabane virus S gene에 대한 특이적 band를 확인하였다.

#### 5. 분리 바이러스의 감염역가 측정

분리 바이러스의 감염역가를 측정하기 위하여 75cm<sup>2</sup> flask(Costar. USA)에 Vero cell을 단층으로 배양시키고 배양 부유액을 제거한 후 조직배양 용 PBS을 이용하여 2회 세척하였다. 0.1MOI의 바이러스를 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 20분마다 1분간 흔들어 흡착시킨 후 바이러스 부유액을 버리고 1%의 fetal bovine serum(FBS)이 함유된 배지에 18-50시간 배양하면서 CPE를 관찰하였다.

배양후 CPE가 80~90% 정도 형성되었을 때 -70 $^{\circ}$ C에서 얼린 다음 3회의 냉동, 융해과정을 거쳐 4,500rpm에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 소분, -70 $^{\circ}$ C에서 보관하여 Reed & Muench의 방법(1938)에 준하여 분리 바이러스의 감염역가를 측정하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 아까바네병 항체분포조사

##### (1) 지역별 항체분포조사

제주도에서 사육중인 소에 아까바네병 바이러스에 대한 항체 보유상황을 살펴보기 위해 혈청중화시험을 실시하였다. 중화항체가 2이상을 항체양성으로 판단하였을 때 검사두수 542두 중 259두가 양성을 나타내어 항체 양성율은 47.8%에 달하였다. 9개 지역별로는 각각 제주 58.2%, 조천 43.9%, 구좌 22.0%, 표선 43.4%,안덕 52.6, 대정 40.0%, 한경 30.0%, 한림 51.0%, 애월 64.9%의 항체양성을 보여 애월지역에서 가장 높은 양성율을, 구좌지역에서 가장 낮은 양성율을 보였다(Table 2).

**Table 2.** Sero-epidemiological analysis against Akabane virus by serum neutralization test in Cheju

Region	Sero-positive ratio (%)	No.of cattle tested	Serum neutralizing antibody titer									
			<2	2	4	8	16	32	64	128	256	
Cheju city	58.2	67	28	16	7	2	4	3	2	1	4	
Chocheun	43.9	66	37	6	5	5	2	2	6	2	1	
Gujwa	22.0	59	46	0	2	1	0	5	3	2	0	
P'yosun	43.4	99	56	2	3	3	3	4	6	7	15	
Anduck	52.6	19	9	0	0	1	0	1	0	1	7	
Daejeong	40.0	20	12	0	5	2	0	0	0	1	0	
Hankyung	30.0	20	14	3	0	0	1	0	0	1	1	
Hallim	51.0	98	48	6	6	7	6	2	8	8	7	
Aewol	64.9	94	33	29	13	1	3	2	2	6	5	
<b>Total</b>	<b>47.8</b>	<b>542</b>	<b>283</b>	<b>62</b>	<b>41</b>	<b>22</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>27</b>	<b>29</b>	<b>40</b>	

## (2) 연령별 항체분포 조사

검사 대상의 소에서 연령이 확인된 325두에 대하여 연령별 항체 양성 여부를 검사하였다. 그 결과 1세 미만의 소에서 33%, 1세에서 2세 43%, 2에서 3세 71%, 3이상의 소에서 54%를 보여 검사대상의 개체에서는 2세에서 3세미만의 개체에서 가장 높은 아까바네 항체양성율을 나타내었다 (Table 3).

**Table 3.** The rates & titer of neutralizing antibody to Akabane virus by ages.

Ages	No.of cattle tested/No.of positive cattle(%)	Serum neutralizing antibody titer									
		<2	2	4	8	16	32	64	125	256	
0-1	6/2 (33)	4	-	-	-	-	-	1	1	-	
1-2	55/24 (43)	31	6	3	4	3	-	2	2	4	
2-3	59/42 (71)	17	17	7	1	2	4	1	3	7	
≥3	205/111(54)	94	34	21	10	10	5	14	11	6	
<b>Total</b>	<b>325/179 (55)</b>	146	57	31	15	15	9	18	17	17	

## 2. 바이러스 분리 및 동정

### 1) 바이러스 분리

사지기형 송아지에서 바이러스의 분리를 시도하였다. 육안적으로 송아지의 대뇌혈관은 발적, 종창되어 있었으며 대뇌반구 좌우측이 비대칭을 나타내고 있었다. 2례의 대뇌의 유제액 100~200 $\mu$ l를 70~80% 단층 배양된 Vero cell에 접종한 다음 2~3일간 배양한 결과 다형태성의 CPE형성을 관찰하였다(Fig. 1). 또한 이들 바이러스를 분리하여 각각 CJ1, CJ2라 명명하였다. 그리고 바이러스를 분리한 2개 목장의 소 10두에 대한 항체검사 결과 전두수가 항체 양성을 나타내었고, 역가별로는 64배 1두, 128배 6두,

256배 3두를 나타냈으며 기형송아지 분만 모축에 대한 항체가는 각각 64 배, 128배, 256배로 나타났다(Fig. 2).

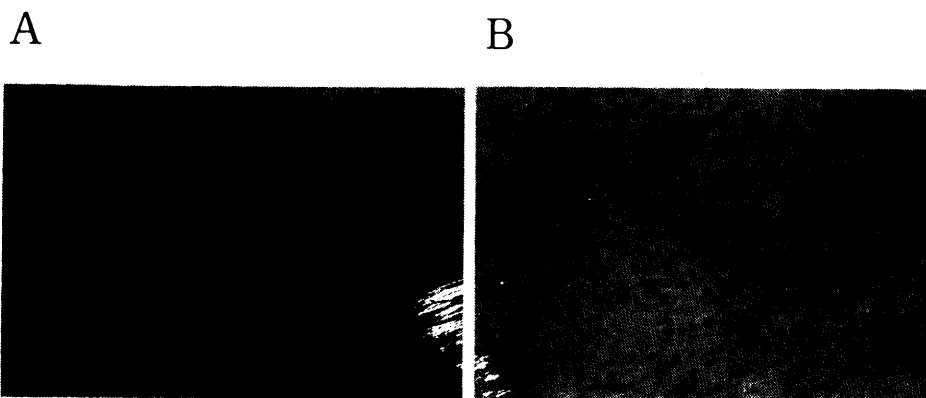


Fig. 1. A : Vero cell control  
 B : Pattern of Cytopathic effect in Vero cell with Akabane virus CJ1

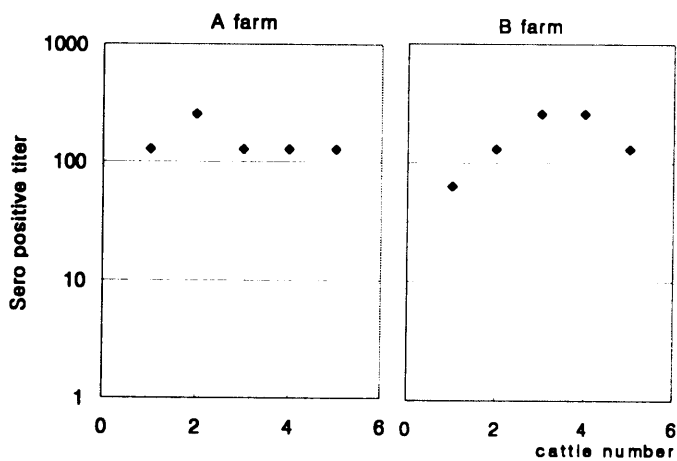


Fig. 2. Level of Antibody titer to Akabane virus by Neutralization test in farms.



## 2) 분리 바이러스의 감염역가측정

분리 바이러스 CJ1, CJ2에 대한 바이러스의 감염역가를 측정한 결과 CJ1은  $10^4$ TCID<sub>50</sub>/0.5ml을, CJ2는  $10^6$ TCID<sub>50</sub>/0.5ml의 감염역가를 보였다.

## 3) 전자현미경관찰을 이용한 바이러스 입자 확인

야외 분리 바이러스를 부분 정제하여 투과전자현미경(H-7100FA, Hitachi, Ltd., Japan)으로 관찰한 결과 90~130nm크기의 바이러스 입자를 세포질에서 확인할 수 있었다(Fig. 3).

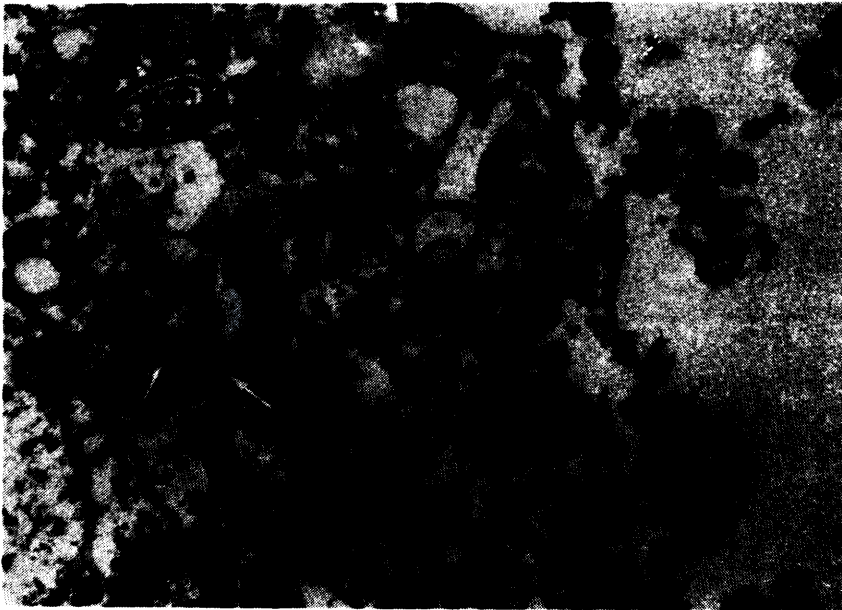
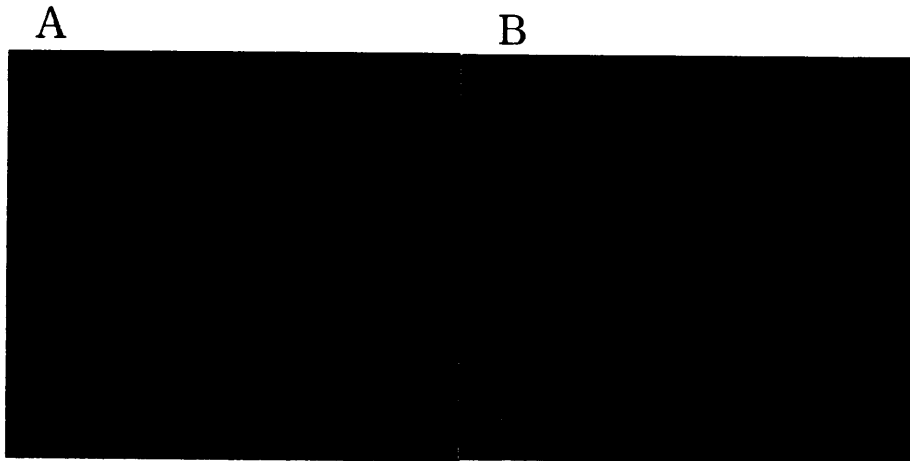


Fig. 3. Electron micrograph of the virus particle propagated in Vero cell showed the size of 90nm to 130nm(x80,000 : Bar = 125nm)

#### 4) 간접형광항체법을 이용한 바이러스 동정

분리 바이러스 CJ1과 CJ2은 아까바네바이러스에 대한 단클론항체를 이용하여 동정하였다.

간접형광항체법에 의한 시험 결과, CJ1과 CJ2를 각각 접종하고 93FMX 주에 대한 항혈청 및 단클론항체와 반응시킨 coverslip위의 Vero cell 세포 질내에서 특이적인 형광이 관찰되었다(Fig. 4).

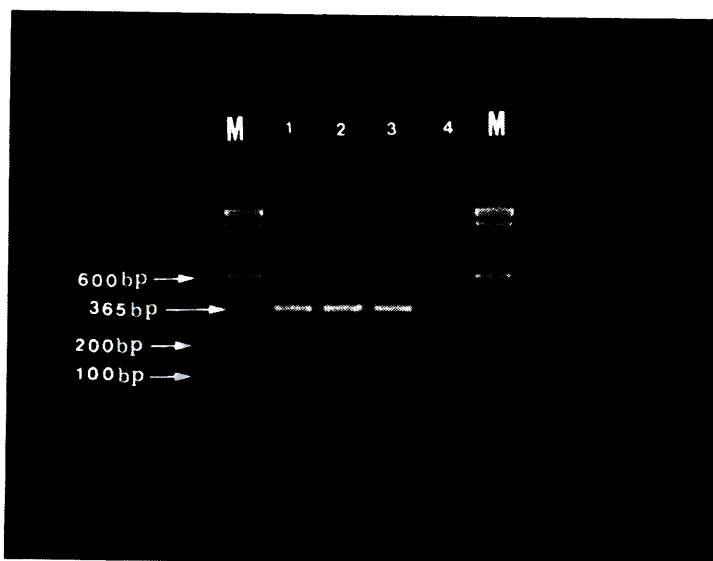


**Fig. 4.** A : Vero cell cotrol

B : Fluorescence in cytoplasm of Vero cells infected with Akabane virus isolates.

### 5) PCR을 이용한 바이러스 동정

Vero 세포에서 배양한 분리바이러스의 배양상층액을 이용하여 RNA를 추출하여 RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)을 실시한 결과 365bp의 아카바네 바이러스 S gene이 증폭되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).



**Fig. 5.** Amplification of Akabane virus S gene by RT-PCR

Lane M : 100bp ladder, Lane 1 : 93FMX, Lane 2 : CJ1, Lane 3 : CJ2,  
Lane 4 : Vero cell

## IV. 고 찰

아까바네병(Akabane Disease)은 전 세계적으로 분포하며 현재 국내에서 가축의 제2종 법정전염병으로 규정하고 있다(대한민국 현행법령집 1991).

제주지역의 축우를 대상으로 조사한 본 연구에서 중화항체가 2배 이상을 항체양성으로 판단하였을 때 지역별 분류는 22.2~64.8%로 나타났으며, 이는 강 등(1994)의 인천지역조사에서 나타난 94~100%보다는 낮은 것으로 나타났다. 지역별로는 애월지역에서 가장 높은 64.8%의 양성율을 나타내었고 구좌지역에서 가장 낮은 22.0%의 양성율을 나타내는 등 지역마다 다양한 항체 양성율을 보였다. 공시동물의 검사두수 소 542두 중 259두인 47.7%가 중화항체 양성을 나타내었다. 이는 일본에서 조사된 Miura 등(1980)이 보고한 81.8%와 1971~1974년 사이에 Matumoto 등(1980)이 보고한 60%이상의 양성율보다는 낮았으나 정 등(1993)이 강원지역의 소에서 보고한 20.6%보다는 높았다.

연령별 소의 중화항체 양성율은 1세 미만에서 33.3%, 1~2세에서 43%, 2~3세에서 71%, 3세 이상에서 54%의 양성율을 나타내어 연령에 따른 상관관계는 없는 것으로 생각된다.

바이러스는 기형송아지 대뇌에서 분리하였으며, 분리한 바이러스들을 동정하기 위하여 전자현미경 검경, 단클론항체를 이용한 간접형광항체법 및 PCR에 의한 분석 결과 아까바네 바이러스임을 확인할 수 있었다. 또한 아까바네바이러스 제주분리주에 대한 특성연구가 심도있는 연구가 계속해서 이루어져야 할 것으로 사료된다.

1998년 2월에서 5월 사이 제주지역에서 아까바네병으로 추정되는 기형송아지 발생에 따른 현장조사 결과 예방백신 접종상황이 미비한 것으로 나타났으며 66두의 기형송아지 분만이 조사되었다. 이 같은 조사 결과로 볼 때 최근 3~4년간 발생보고는 되지 않았으며, 이는 호주에서 1960년부터 1974년까지 3~4년 간격으로 주기적인 유행을 보고한 김(1988)의 결과

와 일치하여 도내에서도 아까바네병이 주기적으로 유행하고 있음을 알 수 있다.

따라서 제주지역의 아까바네병으로 인한 피해가 빈번하여 양축농가의 경제적 손실을 줄이기 위해 앞으로 혈청학적 검사 등 심도있는 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.



## V. 결 론

제주도에서 소의 아까바네병(Akabane disease) 감염 실태를 파악하고 기형송아지로부터 원인체를 분리 동정하기 위하여 본 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1998년 2월부터 5월까지 제주도내 9개 지역에서 사육되고 있는 소 542두에 대하여 혈청중화시험을 이용하여 542두 혈청 중 아까바네병 항체양성율은 47.8%였다. 지역별로는 제주 58.2%, 조천 43.9%, 구좌 22.0%, 표선 43.4%, 안덕 52.6%, 대정 40.0%, 한경 30.0%, 한림 51.0%, 애월 64.9%의 항체양성율을 나타내어 애월지역에서 가장 높은 양성율을, 구좌지역에서 가장 낮은 양성율을 보였다. 또한 검사대상의 소에서 연령이 확인된 325두에 대한 항체양성율은 55%를 나타내었다. 연령별로는 1세 미만의 소에서 33%, 1에서 2세 미만 43%, 2에서 3세미만 71%, 3세이상의 축우에서 54%의 항체양성율을 나타내었다.

기형분만 송아지 2두의 대뇌에서 아까바네바이러스를 분리하고 세포배양을 통하여 분리한 2주의 바이러스를 동정하기 위하여 전자현미경 관찰, 간접형광항체법, PCR을 통하여 아까바네 바이러스임을 확인할 수 있었다. 아까바네 바이러스가 분리된 목장의 축우 10두에 대하여 중화항체를 검사한 결과 모두가 항체 양성을 나타내었고, 역가별로는 64배 1두, 128배 6두, 256배 3두로 나타났으며 기형송아지 분만 모축 3두에 대한 항체는 각각 64배, 128배, 256배로 나타났다.

이러한 결과로 보아 앞으로도 제주도내에 아까바네병이 유행할 가능성이 있을 것으로 사료되며, 이 병의 연구를 보다 활발히 수행하여 방역에 만전을 기하여야 할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Andersen, A. A., C. H. Campbell. 1978. Experimental placental transfer of Akabane virus in the hamster. *Am. J. Vet. Res.* 39: 301~304
- Charles J.A. 1994. Akabane virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 10(3): 525~546
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156~159
- Cybinski, D. H., George, T. D. and Paull, N. I. 1978. Antibody to akabane virus in australia. *Aust. Vet. J.* 54: 1~3
- Doherty R. L. et al. 1972. Virus strains isolated from arthropods during an epizootic of bovine ephemeral fever in Queensland. *Aust. Vet. J.* 48: 81~86
- Indaba Y. 1980. Akabane disease, Epidemic congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome in cattle, sheep and goat caused by Akabane virus. *Tropical Agriculture Research Series*, 13: 140~149
- Kurogi H., Inaba Y., Goto Y., Miura Y., Takahashi H. 1975. Serologic evidence for etiologic role of Akabane virus in epizootic abortion arthrogryposis-hydranencephaly in cattle in Japan. *Arch Virol.*, 47(1): 71~85
- Kurogi H., Inaba Y., Takahashi E., Sato K., Omori T., Miura Y., Goto Y., Fujiwara Y., Hatano Y., Kodama K., Fukuyama S., Sasaki N., Matumoto M.

1976. Epizootic congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome in cattle: isolation of Akabane virus from affected fetuses. *Arch virol.*, 51(1-2): 67~74
- Kurogi H., Y. Inaba, E. Takahashi, K. Sato, H. Akashi, K. Satoda and T. Omori. 1978. Pathogenicity of different strains of Akabane virus for mice. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 18: 1~7
- Liao Y.K., Lu Y.S., Goto Y., Inaba Y. 1996. The isolation of Akabane virus from calves in Taiwan. *J Basic Microbiol.*, 36(1): 33~39
- Matumoto M., and Inaba Y. 1980. Akabane disease and Akabane virus. *Kitasato Arch of Exp Med.* 53: 1~21
- Miura Y., Hayashi S., Ishihara T., Inada Y., Omori T., and Matsumoto M. 1974, Neutralizing antibody against Akabane virus in precolostral sera from calfs with congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome. *Arch. Ges. Virus-forsch.* 46: 377~380.
- Miura Y., et al. 1980. A survey of neutralizing antibody against Aino virus in bovine serum in Kagoshima, Japan. *Nat Inst Anim Health Q.(Jpn)* 20: 34~35
- Narita M., Kawashima K. 1993. Detection of Akabane viral antigen and immunoglobulin-containing cells in ovine fetuses by use of immunoperoxidase staining. *Am J Vet Res.*, 54(3): 420~424
- Oya A., Okuno T., Kobayashi I., and Matsuyama, T., 1961. Akabane, a new



arbovirus isolated in Japan. *Med. Sci. Biol.*, 14: 101~108

Parsonson I. M., Della-Porta A. J., Snowdon W. A. 1977. Congenital abnormalities in newborn lambs after infection of pregnant sheep with Akabane virus. *Infect Immuno.*, 15(1): 254~262

Reed L., and H. Muench. 1838. A Simple method of estimating 50% end points. *Am, J. Hyg.* 27: 493~497

St. George, T. D., H. A. Standfast, D. H. Cybinski, C. Filippich, and J. F. Carley. Peaton virus. 1980. A New Simbu group arbovirus isolated from cattle and *Culicoides brevitarsis* in Australia. *Aust. J. Biol. Sci.* 33: 235~243

Taylor W. P. and Mellor P. S. 1994. The distribution of Akabane virus in the middle east. *Epidemiol Infect.*, 113(1): 175~185

明石博臣, 金子登, 徳井忠史, 等 1989. アカハネ病ウイルス 遺傳子の 構造解析. 農林水産省 家畜衛生試験場 研究成果集. 58~63

井出誠彌, 石崎良太郎. 1992. アカハネウイルスとアイノウイルスの構成蛋白質に關する 免疫學的解所. 日獸畜大研報, 41: 38~46

강태선, 배도권, 강서영, 최진영, 손봉환. 1994. 인천지역의 아까바네병 항체가조사. *Kor J Vet Res.*, 17(1): 9~18

김영민. 1989. 아까바네병의 대유행, 그 대책이 시급하다. *J of Kor Vet Med Assoc.*, 25(2): 79~82

- 김용희. 1988. 소의 아까바네(Akabane)병. *대한수의사회지*. 24(8): 477~486
- 박응복, 임창정, 정창국, 황만장, 조명래. 1980. 한국에서의 소의 아까바네 병의 발생. *Kor J Vet Res.*, 20(1): 65~78
- 法制處. 1991. 大韓民國現行法令集(畜産, 山林). 25: 295
- 오건희, 권 익 등. 1991. 경북지방 소 Akabane병 발생과 중화항체가 분포 조사. *Kor J Vet Serv.*, 14(1): 19~26
- 이오수, 김순재. 1990. 소 아까바네병에 관한 혈청학적 역학연구. *농사시험연구논문집* 32(2): 6~15
- 정기수, 김진옥, 김년수 등. 1993. 소 아까바네병, 유행열 및 이바라키병의 항체보유실태조사, 강원도가축위생시험소년보. 1992: 73~77
- 천정훈, 이재오, 이건택, 박옥배, 박찬신, 박봉균. 1994. 충남 남부지역의 소유행열, 아까바네병 및 이바라기병의 항체 상황 조사. *Kor J Vet Serv.*, 17(1): 1~8
- 최해연, 정운선. 1991. 충청북도 북부 지방의 소 Akabane병 중화항체가 분포조사. *Kor J Vet Serv.*, 14(2): 154~158
- 현관중. 1990. 제주도내 축우 아까바네병 발생 및 항체보유 실태. *Kor J Vet Serv.*, 13(1): 154~158

# **Isolation, Identification and Epidemiological Study of Akabane virus on Cheju island**

**Wancheul Kang**

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

**(supervised by Professor Du-Sik Lee)**

**(Abstract)**



In this experiment, we studied the sero-positive rate of Akabane virus in cattle from Cheju Island and analyzed the seroepidemiological features. In an analysis of 542 samples, the positive rate for neutralizing antibody in sera collected in nine regions on Cheju Island was 47.8%. The rate varied with the region. The positive rate was 64.8% in Aewol, 58.2% in Cheju city, 52.6% in Anduck, 51.0% in Hallim, 43.9% in Chocheon, 43.4% in Pyosun, 40% in Daejeong, 30.0% in Hankyung, and 22.0% in Gujwa. The rate also depended on the age of the cattle. The positive rate was 33% in calves 0 to 12 months old, 48% in cattle 13 to 24 months old, 71% in cattle 25 to 36 months old, and 54% in cattle more than 37 months old.

To isolate the virus from calves with malformations including arthrogryposis and hydranencephaly, cerebral homogenates were inoculated into Vero cells, which were examined for CPE after three days. Vero cells with CPE were examined for Akabane virus using an electron microscope and IFA. Typical virus particles with a width of 90 to 130nm and specific immunofluorescence in the cytoplasm of infected cells were sought for identification. Then a specific 365bp DNA fragment from the S gene of the Akabane virus genome was amplified by PCR.



**감사드립니다.**

자상하게 논문을 지도하여 주신 이두식 교수님, 배종희 교수님, 임윤규 교수님, 그리고 사랑과 격려로 용기를 주신 수의학과 여러 교수님께 깊이 감사드립니다. 또한 학교 실험실의 송호철님, 김성희님께에도 감사드리며 이 기쁨을 함께하고자 합니다.

직장생활을 하면서도 학문에 전념할 수 있도록 격려해 주신 류재선 원장님, 서문현 부장님, 현관종 과장님께 특히 감사를 드리며, 먼 발치에서 격려를 아끼시지 않은 문호규님, 부태삼님, 김우택님, 김익천님과 김옥녀, 강원명 수의사를 비롯한 실험실내 여러 동료들과 김성훈님, 김경건 수의사님께 감사드립니다.



이 논문이 있기까지 깊은 관심과 사랑으로 늘 격려해 주신 수의과학점역원 조재진님, 정정원님, 장정호님, 김재훈님, 박최규님, 그리고 이창희님께 감사드리며 앞으로 더욱 분발할 수 있도록 많은 지도와 격려를 부탁드립니다.

끝으로, 언제나 아낌없는 사랑과 정성으로 후원해주신 부모님, 장모님, 형님가족, 일본에서 공부하는 동생, 그리고 사랑하는 아내 효신, 딸 미선 이와 함께 이 기쁨을 나누고자 합니다.