한국전자현미경학회지 제 35 권 제 1 호 2005
Korean J. Electron Microscopy 35 (1), 23~30 (2005)

젖소 말초혈액 림프구로부터 소백혈병 바이러스 배양 및 전자현미경적 관찰

윤순식*, 박중원, 변재원, 강문일[1], 유한상[2], 한홍율[2]
국립수의과학검역원, [1]전남대학교 수의과대학, [2]서울대학교 수의과대학

Cultivation and Electron Microscopy of Bovine Leukemia Virus from Peripheral Blood Lymphocytes of Holstein-Friesian Dairy Cattle

Soon-Seek Yoon*, Jung-Won Park, Jae-Won Byun, Mun-Il Kang[1],
Han-Sang Yoo[2] and Hong-Ryul Han[2]
National Veterinary Research and Qurantine Service, Anyang 430-824, Korea
[1]College of Veterinary Medicine, Chonnam National University,
Kwangju 500-757, Korea, [2]College of Veterinary Medicine,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
(Received February 28, 2005; Accepted March 21, 2005)

ABSTRACT

Many studies have been performed on the bovine leukemia virus (BLV) since bovine leukosis had been reported in 1968 in Korea. However, there was no report on the ultrastructural examination of BLV. An attempt to detect C type viral particles in the cultured peripheral blood lymphocytes of Holstein Friesian dairy cattle, was made to determine whether in vitro viral expression might be used as a reliable method to identify the cow which is likely to transmit BLV. In transmission electron microscopic (TEM) examination, the virus particles were found predominantly outside of the lymphocytes even though a few particles were also observed within the membrane bound cytoplasmic vacuoles. All of them were C type particles consisting of a central, electron dense core separated by a clear area from a limiting envelope with a unit membrane structure. Virus particles were easily detected in the lymphocyte which was cultured with medium supplemented with either T lymphocyte mitogen (conconavalin A) or B lymphocyte mitogen (lipopolysaccharide). Identical viral particles, although fewer, were also consistently present in the lymphocytes cultured with medium which was containing foetal bovine serum (FBS) only and which was containing neither FBS or mitogen. By contrast, no virus particle was detected in extensive examination of lymphocytes before culture. In conclusion, the BLV cultivation and detection methods established in this study could be used as a tool to identify and eliminate the cattle which can transmit the BLV.

Key words : Bovine, Culture, Electron microscopy, Lymphocyte, Leukemia, Mitogen

* Correspondence should be addressed to Dr. Soon-Seek Yoon, Division of Virology, National Veterinary Research and Quarantine Service, #480, Anyang 6-dong, Kyeonggi-do 430-824, Korea. Ph.: +82-31-467-1783, FAX: +82-31-467-1797, E-mail: yoonss24@hotmail.com

서 론

소백혈병은 1871년 Leisering이 리투아니아의 Klaipeda 지방에서 사육하던 소의 체표 림프절과 비장에 종양이 형성된 것을 보고한 것이 최초이며(Burny, 1987; Schwartz & Levy, 1994) 1878년 독일의 Siedamgrotzky에 의해 자세히 기술되었다(Bendixen, 1965). 소백혈병은 소백혈병 바이러스(bovine leukemia virus, BLV) 감염에 의한 지방병성 소백혈병(enzootoc bovine leukosis, EBL)과 비전염성 원인에 의한 것으로 알려져 있는 산발성 소백혈병(sporadic bovine leukosis, SBL)으로 나누어진다. SBL은 3년 이하의 어린 소에 주로 발생하는 반면 EBL은 4년 이상된 성우에 주로 발생한다(Olson, 1974; Burney et al., 1978; Rebhun, 1995). BLV는 EBL의 원인체로 알려져 있으며 Retrovirinae과의 Oncovirinae아과에 속하며 HTLV-BLV 그룹 또는 Deltaretroviridae속의 바이러스이다(Chevallier et al., 1998; Dequiedt et al., 1999). Retrovirus는 바이러스의 형태에 따라 A, B, C 및 D형 등 4가지로 나눌 수 있으며 BLV는 이 중 C-형에 속하며(Fields et al., 1990; Murphy et al., 1995), 생쥐, 닭, 기니픽 및 고양이의 백혈병바이러스도 C-형에 속한다(Miller et al., 1969; Fields & Knipe, 1990). BLV는 사람 T-림프구 친화성 바이러스(human T-lymphotrophic virus, HTLV)와 구조적, 기능적으로 비슷하나 현재까지 사람에서의 발생은 보고되지 않아 인수공통전염병은 아닌 것으로 생각되고 있다(Maruyama et al., 1989).

Miller et al.(1969)은 BLV에 감염된 소의 말초혈액을 배양하여 투과전자현미경(transmissible electron-microscope, TEM)으로 관찰하여 C-형 바이러스를 검출하는데 성공하였다(Miller et al., 1972). 바이러스 발현에 관한 연구는 그 이후 일본 등 여러나라에서 시도되고 있는데(Ohshima et al., 1977; Baliga & Ferrer, 1977) 등 바이러스는 $CD5^+$은 물론 $CD5^-$ B-림프구에서도 배양되는 것으로 알려져 있다(Schwartz et al., 1994). 특히 T-림프구 분열촉진 물질(mitogen)을 첨가하였을 때 바이러스 배양이 촉진된다고 하였으나(Sordillo et al., 1994; Pyeon et al., 1996) B-림프구 mitogen을 첨가하여 실험한 결과는 현재까지 알려진 바 없다.

BLV에 감염된 소는 평생 동안 바이러스를 가지고 있기 때문에 감염우를 색출하여 도태시키는 것이 이 질병으로 인한 피해를 줄일 수 있는 최선의 방법이나, 감염우가 많을 때는 처리가 곤란한 실정이다(Johnson et al., 1991). 그러나 배양 림프구에 대한 바이러스 검사결과 감염된 소 중 30%는 바이러스를 발현하지 않는다는 사실이 보고된(Weber et al., 1987) 이후 감염우의 혈액에 대한 바이러스 배양검사 결과 음성으로 확인된 소는 BLV를 전파하지 않는다고 판단하여 도태시키지 않고 격리 사육하는 질병 통제 방법이 이용되기도 한다(Weber et al., 1983; Miller et al., 1985). 국내에서는 1982년 Jun et al.(1982)이 최초로 보고하였으며 Yoon et al.(2005)은 국내발생 소림프종에 대한 특성을 조사한 바 있다. Suh(2004)에 의하면 국내 젖소의 54.2%가 BLV에 감염되어 있다고 하는데 현재까지 국내에서는 BLV 입자에 대한 연구보고가 없기 때문에 BLV 항체 양성 소의 림프구를 배양, BLV를 발현시켜 전자현미경으로 바이러스 입자를 검출하고자 하였다. 또한 확립된 검사 방법을 이용하여 국내에 만연하여 있는 EBL 감염 소 중 BLV 전염능이 있는 소를 검출하여 도태시킴으로서 질병 확산을 막기 위해 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 혈액 채취 및 BLV 항체검사

충청남도 지역에서 사육중인 3세 이상의 홀스타인 젖소에서 채취한 말초혈액을 본 연구에 사용하였으며 혈액은 미정맥으로부터 항응고제(K_3 EDTA)가 함유된 vacutainer(BD 6457, California, USA)를 이용하여 채취하였다. BLV 항체검사는 Leukose bovine agar gel immunodiffusion (AGID) 킷트(Synbiotics, Lyon, France)를 이용하여 실시하였다. 본 킷트는 BLV의 gp51 및 p24에 대한 항체를 측정할 수 있는 것으로 제조사의 술식에 따라 수행하였는데, 2.6 mm 두께로 만든 gel에 구멍을 뚫어 항원과 양성혈청 및 채취한 소 혈청을 각각의 well에 넣어 72시간 동안 실온에서 반응시킨

후 결과를 판독하였다.

2. 바이러스 배양

바이러스 배양 검사를 위해 채취한 말초혈액은 500 ×g에서 5분간 원심한 후 백혈구 층을 분리하여 동량의 Histopaque 1077 (Sigma)을 첨가한 후 1,500×g에서 30분간 원심하여 백혈구를 분리하였다 (Stock & Ferrer, 1972; Baliga & Ferrer, 1977). 바이러스 배양을 위해 20% 소태아혈청 (foetal bovine serum, FBS)이 첨가된 α-Minimal essential medium (α-MEM, Gibco)에 Conconavalin A (ConA) (Sigma C-0412) 및 *E. coli* O111 : B4 lipopolysaccharide (LPS) (Difco 3922-25, Michigan, USA)를 각각 5 μg/mL 및 100 μg/mL 농도로 첨가하여 배지를 제조하였다. 분리한 백혈구는 인산완충액으로 3회 씻은 다음 trypan blue dye exclusion test로 살아 있는 세포를 측정하고 2×10^5개/mL가 되도록 세포배양 용기에 넣은 후 5% CO_2 배양기에서 72시간 동안 배양하였다 (Weber et al., 1987). BLV가 감염되어 있는 FLK 세포를 양성대조 바이러스로 이용하기 위하여 시험에 공하였다.

3. 면역염색

배양한 림프구에 대한 면역염색은 전자현미경 검사를 위해 배양한 림프구를 유리 슬라이드에 도말하여 실온에서 건조시킨 후 BLV gp51에 대한 단크론항체 (MCA162, Serotec, NC, USA)와 면역염색키트 (Dako K0679, CA, USA)를 이용하여 실시하였다.

4. 전자현미경 관찰을 위한 림프구 처리

전자현미경 관찰을 위해 Weber et al. (1973) 및 Choi et al. (2004)의 방법에 따라 림프구를 처리하였다. 원심분리한 림프구에 2배 분량의 2.5% Glutaraldehyde (0.1 M PBS, pH 7.2)를 첨가하여 2시간동안 전 고정하였으며, 동일 PBS로 3회 세척 후 1% osmic acid로 2시간 동안 후고정하였다. 에탄올로 3회 10분간씩 단계별로 탈수하였고 무수 에탄올에서 3회 30분간 탈수를 하였다. 탈수 후 치환은 에탄올과 prophylene oxide (PO)로 하였으며, 1 : 1 비율로 10분간 처리한 후 다시 PO 원액으로 30분간 처리하였다. 치환 후 Eponate 12 kit (Pelco 18012)로 침투, 포매 및 중합하여 초박절편 (Leica LG, Germany)을 실시하였다. 시료를 초박절편한 후 그리드에 부착하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색, 공기 중에서 건조하여 전자현미경으로 관찰하였다. 바이러스 검사를 위해서는 림프구 배양액을 직접 원심관에 수집한 후 100개의 림프구에 대해 바이러스 발현 여부를 TEM (Hitachi 7100AF, Japan)으로 관찰하였다.

Table 1. Cultivation and detection of bovine leukemia virus (BLV) by electronmicroscopy of peripheral blood lymphocytes from cattle

Cultivation time	Treatment			
	FBS + ConA[1]	FBS + LPS[2]	FBS	Medium only
3hrs	0[3]	0	0	0
6hrs	0	1	0	0
9hrs	1	9	1	0
12hrs	5	10	2	0
24hrs	10	6	1	2
48hrs	10	6	3	4
72hrs	2	3	2	6

[1] Concentration: ConA (5 μg/mL), FBS (20%). [2] Concentration: LPS (100 μg/mL), FBS (20%). [3] The number of lymphocytes expressing BLV particles per 100 lymphocytes.

결 과

1. 배양 림프구에 대한 면역염색

림프구를 배양하기 전에 채취한 혈액에 대해 BLV 항체검사를 실시하여 (Fig. 1) BLV 항체 양성혈액을 실험에 이용하였다. BLV 항체 양성 소의 림프구를 배양한 후 BLV gp51에 대한 단크론 항체를 이용하여 면역염색을 실시한 결과 대다수 림프구의 세포질에서 갈색의 강한 양성 반응을 확인할 수 있었으며 BLV 항체 음성 소 및 배양전 림프구에서는 양성반응이 관찰되지 않았다 (Figs. 2 & 3).

2. BLV 배양 검사 결과

EBL에 감염된 소의 림프구를 배양하지 않은 상태로 관찰하였을 때는 바이러스 입자가 관찰되지 않았

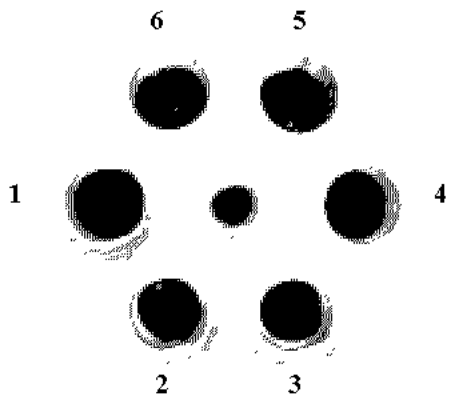

Fig. 1. Precipitation patterns of agar gel immunodiffusion test for the detection of BLV-antibody (1 and 4: positive control sera, 2 and 3: positive sera, 5 and 6: negative sera).

다. 그러나 FBS와 T-림프구 mitogen인 Con A를 첨가하여 배양한 림프구에서는 9시간 후부터 BLV 입자가 관찰되었으며 24시간에 100개의 림프구중 10개에서 바이러스가 관찰되어 가장 많았다. FBS와 B-림프구 mitogen인 LPS 첨가군에서는 6시간부터 관찰되기 시작하여 12시간에 10개로 가장 많이 관찰되었다. FBS만 첨가한 군에서는 9시간부터 바이러스가 관찰되었으나 존재하는 바이러스의 수가 적어 관찰하기가 어려웠다. FBS와 림프구 mitogen을 첨가하지 않은 군에서도 24시간부터 바이러스가 관찰되었다.

배양한 림프구에 대한 전자현미경 검사결과 바이러스는 대부분 세포 밖에서 관찰되었으나 일부는 세포질 안에 존재하는 공포 안에도 존재하였으며(Fig. 4) 세포질 막에 부착되어 있는 상태로도 관찰되었다. 고배율로 관찰하였을 때 이러한 바이러스는 세포질 막 특히 림프구의 미세 융모 부위에서 nuclear core가 형성되고 있는 상태인 초승달 또는 도우넛 모양의 전자밀도가 높은 구조로(A-형 바이러스 또는 미성숙 C-형 바이러스) 관찰(Fig. 6)되기도 하였으며 세포질막을 뚫고 나오는 형태 즉 발아(budding)되고 있는 바이러스도 확인되었다(Fig. 7). 성숙하여 세포질 밖으로 배출된 바이러스는 중심부에 고밀도의 nucleocapsid가 위치하고 있었으며 nucleocapsid 주위를 투명한 층이

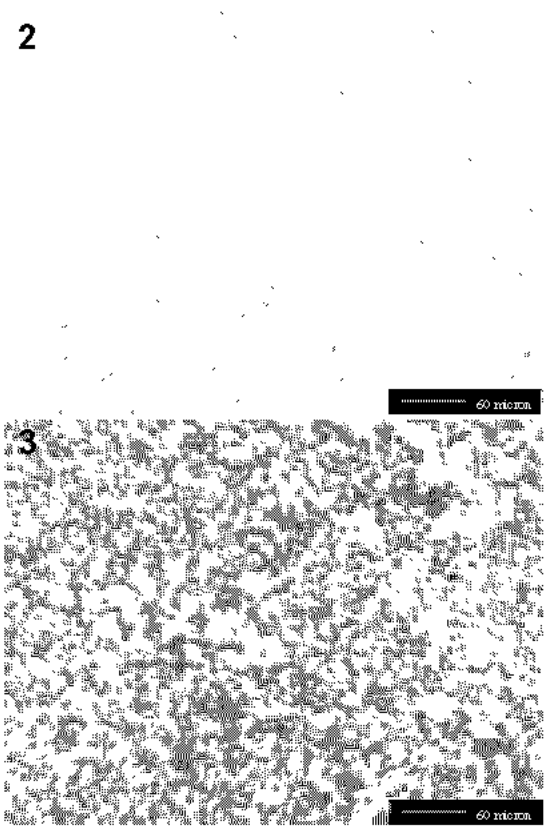

Fig. 2. Cultured lymphocytes of BLV seronegative cow. Immunostaining with BLV MoAb. There are no positive reaction (Negative control).

Fig. 3. Cultured lymphocytes of BLV seropositive cow. Immunostaining with BLV MoAb. Note the numerous brown positive reaction detected in the cytoplasm.

싸고 있는 전형적인 C-형 바이러스 형태를 취하고 있었다. 성숙한 전체 바이러스의 크기는 직경 90~100 nm였고 nucleocapsid는 직경 40~60 nm였다. 림프구에서 배양된 바이러스는 FLK세포에서 관찰되는 BLV (Fig. 5)와 형태학적으로 동일하였다.

고 찰

BLV에 감염된 후 항체가 생산되면 바이러스는 숙주세포의 genomic DNA에 삽입되어 provirus의 형태

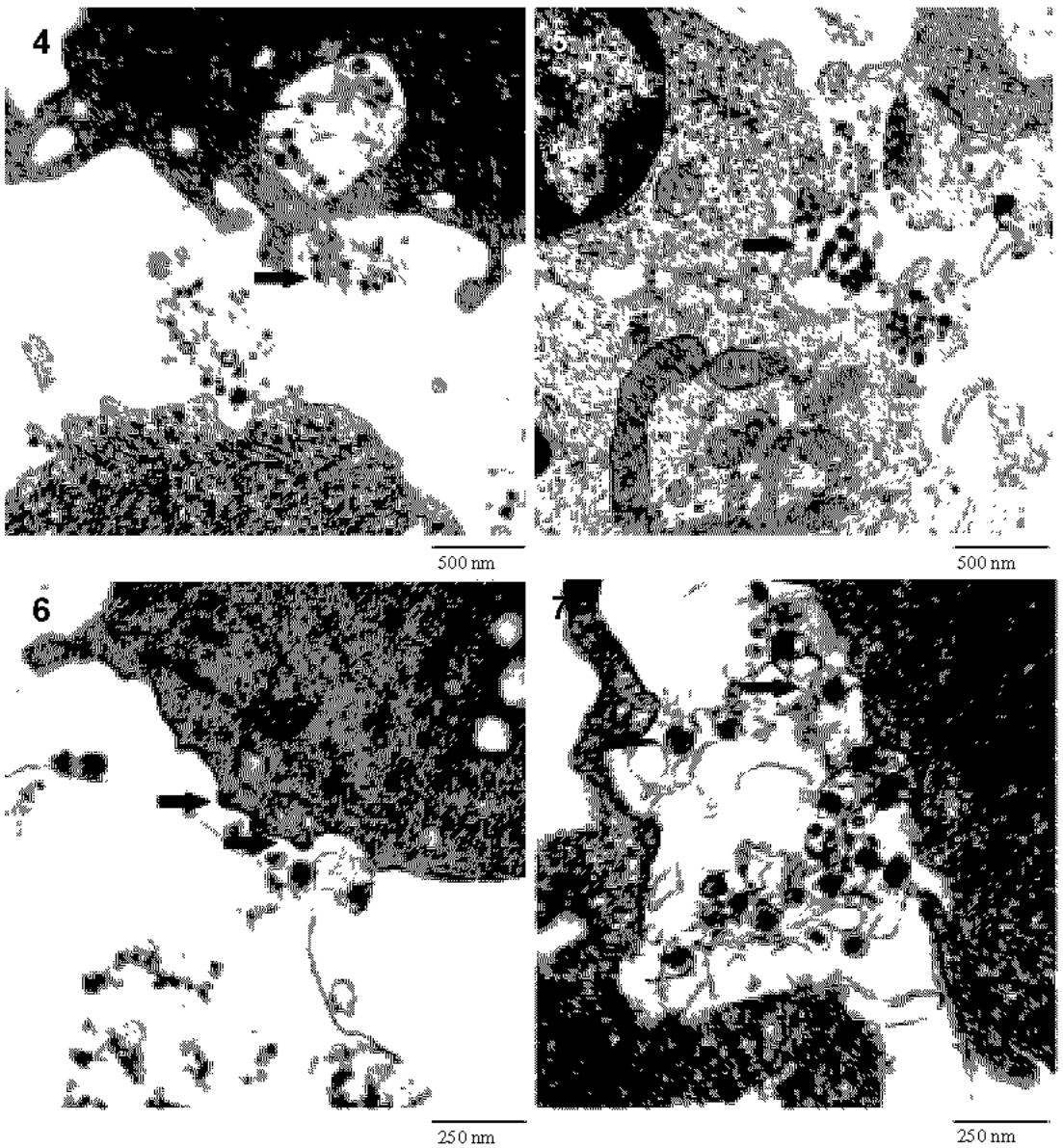

Fig. 4. Lymphocyte. Note the BLV particles in the cytoplasmic vacuole (arrowhead) and outside (arrow) of the lymphocytes.
Fig. 5. FLK cell. Note the BLV particles outside of the cell (arrow).
Fig. 6. Lymphocyte. Developing stage. Note the crescent-shaped structure (arrows) formed on the cytoplasmic membrane.
Fig. 7. Lymphocyte. Note the BLV particles budding from the cytoplasmic membrane (arrow) and typical C-type virus with compact nucleocapsid (arrowhead).

로 림프구내에만 존재하며 (Schwartz, 1994) 종양세포나 순환혈액 중에 있는 림프구에는 바이러스 입자가 존재하지 않는다. 생체 내에서 BLV가 발현되지 못하는 이유는 BLV에 대한 항체뿐만 아니라 미지의 혈청내 물질 (Gupta et al., 1982 & 1984) 때문인 것으로 추정하고 있다. 감염된 BLV를 확인하기 위해서는 유전

자 검사방법 (polymerase chain reaction, PCR)이 가장 일반적으로 이용되고 있으며, 이 검사법으로는 BLV에 감염된 모든 소에서 유전자를 확인할 수 있다 (Ballagi et al. 1996). 또 다른 방법인 감염 림프구 배양법을 이용하면 감염능이 있는 소의 림프구에서만 BLV가 검출되는 것으로 알려져 있다 (Baliga & Ferrer, 1977). BLV 항체 양성 소의 림프구 배양 결과 36%의 소에서 바이러스 입자가 배양되지 않아 감염능이 없는 것으로 보고되어 있기 때문에 (Weber et al., 1987) 본 연구에서는 두 번째 방법을 이용하여 BLV를 검출을 시도하였다.

현재까지 BLV 배양을 위해서는 T-림프구 분열촉진물질 (mitogen)을 배지에 첨가하는 방법이 많이 시도되어 왔다 (Sordillo et al., 1994; Pyeon et al., 1996; Trueblood et al., 1998). T-림프구 mitogen중 concanavalin A (ConA)와 phytohemagglutinin (PHA)을 많이 사용하였으며 (Olson et al., 1970, Weber et al., 1973) 이 물질은 세포의 DNA 합성을 촉진하는 물질로 사람의 림프구에 대한 연구 결과 T-림프구의 분열촉진 뿐만 아니라 부가적으로 B-림프구의 DNA 합성을 도운 다는 사실도 밝혀져 있다 (Paul, 1977). PHA를 첨가하여 감염우의 림프구를 배양한 상청액을 검사하면 Interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-10과 gamma interferon (IFN-γ) 등이 증가한다는 점을 고려하면 T-림프구가 분비하는 cytokine 또는 림프구와의 직접적인 접촉에 의해 B-림프구가 활성, 증식 또는 분화됨으로서 바이러스 생성을 촉진하는 것으로 추정하고 있다 (Keefe et al., 1997; Trueblood et al., 1998).

현재까지 B-림프구 mitogen을 첨가하여 BLV를 배양한 연구 보고는 없었으나 본 실험결과 이 물질도 T-림프구 mitogen과 마찬가지로 BLV 발현을 촉진하는 것으로 확인되었다. T-림프구 mitogen 첨가시 BLV가 배양 6시간만에 검출이 가능하며 48시간에 가장 많이 관찰되었다는 보고 (Baliga & Ferrer, 1977)와 본 연구결과는 일치하였으며 B-림프구 mitogen 첨가시는 12시간에 가장 많이 관찰되어 T-림프구 mitogen 첨가시보다 바이러스 발현이 빨리 되는 것으로 확인되었으나 첨가한 mitogen의 양에 따른 차이도 있을 것으로 사료된다. FBS와 mitogen을 모두 첨가하지 않은 군에서도 배양 24시간 이후부터 72시간까지 바이러스 발현이 증가한 것을 고려하면 mitogen이 바이러스 발현이 빨리되게 하는 작용은 하지만 바이러스 발현에 필수적인 물질은 아닌 것으로 사료된다. 이 결과는 순환 혈액 중에 존재하는 바이러스 배양 억제 물질이 배양액에 의해 물리적으로 희석되기 때문에 바이러스가 발현된다는 해석을 뒷받침하고 있다 (Stock & Ferrer, 1972). 바이러스가 발현된 림프구가 B-림프구인지 T-림프구인지에 대한 추가적인 연구 및 림프구핵주머니 (lymphocyte nuclear pocket) 생성과 바이러스 발현율과의 차이에 대한 연구는 BLV의 발병기전을 구명할 수 있는 중요한 부분이라 생각되며 이에 대한 연구가 추가적으로 수행될 필요가 있을 것으로 사료된다.

C-형 백혈병 바이러스를 세포내에서 관찰되는 다른 유사한 구조물과 구별하기 위해 국제건강기구 (WHO)에서는 몇가지 감별점을 제시하고 있는데, C-형 바이러스로 확정하기 위해서는 발아되는 형태의 바이러스가 관찰되어야 하며 nucleocapsid와 외막 사이에 투명층이 존재하여야 한다. 또한 크기 및 형태가 일정하여야 한다 (Stock & Ferrer, 1972). 보고자에 따라 약간의 차이는 있으나 nucleocapsid는 40~90 nm, 바이러스 전체 직경은 60~120 nm로 알려져 있다 (Miller et al., 1969; Miller et al., 1972; Ohshima et al., 1977). 본 연구에서 관찰된 바이러스도 전형적인 C-형 바이러스였으며 (Miller et al., 1969; Olson et al., 1970; Paul, 1977) 성숙한 바이러스 입자는 직경 90~100 nm로 기존의 보고와 일치하였으며, 다른 동물의 백혈병 바이러스와 마찬가지로 세포막으로부터 발아되는 것도 확인되었다 (Stock & Ferrer, 1972). 또한 TEM으로 확인된 바이러스가 BLV 입자인 지를 면역학적으로 확인하기 위해 BLV 단크론항체를 이용하여 배양 림프구에 대해 면역염색을 실시한 결과 세포질내에서 강한 양성반응이 관찰되어 BLV 항원 양성으로 확인되었다.

본 연구에서는 EBL 감염 소의 말초혈액중 림프구를 배양 및 TEM을 이용한 검사 결과 BLV 입자를 확인하였다. 본 연구에서 확립된 BLV 배양 및 TEM을 이용한 바이러스 관찰 방법은 PCR이나 BLV 항체 검사에서 양성으로 확인된 소 중 바이러스 전파능력이 있는 소를 찾아내어 선택적이고 단계적으로 도태시키고자 할 때 유용하게 활용할 수 있는 감별진단 방법

으로 사료된다. 그러나 국내 BLV 분리주가 없고, 국내 EBL 발생율이 지속적으로 증가하고 있는 추세(Suh, 2004)라는 점을 감안할 때 체계적인 EBL 연구를 위한 국내 분리주 확보가 우선되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

Baliga V, Ferrer JF: Expression of the bovine leukemia virus and its internal antigen in blood lymphocytes. Proc Soc Exp Biol Med 156 : 388 391, 1977.

Ballagi Pordany A, Belak S: The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. Molecular and Cellular Probes 10 : 159 164, 1996.

Bendixen HJ: Bovine Enzootic Leukosis. Advance in Vet Sci and Comp Med 10 : 129 204, 1965.

Burny A, Bex F, Chantrenne H, Cleute Y, Dekegel D, Ghysdael J, Kettmann R, Leclercq M, Leunen J, Mammerickx M, Portetelle D: Bovine leukemia virus involvement in enzootic bovine leukosis. Advance Can Res 28 : 251 311, 1978.

Burny A, Mammerickx M: Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus. Kluwer. Martinus Nijhoff Publishing. Boston, 1987.

Chevallier N, Berthelemy M, Rhun DL, Laine V, Levy D, Cornil IS: Bovine leukemia virus induced lymphocytosis and increased cell survival mainly involve the $CD11b^{+}$ B lymphocyte subset in sheep. J Virol 72(5) : 4413 4420, 1998.

Choi YB, Kim YH, Lee JH, Kim JS: Effects of squalene on the epidermal growth factor (EGF) expression and histological changes by glycerol induced acute renal failure in mice. Kor J Electron Microscopy 34(4) : 241 254, 2004. (Korean)

Dequiedt F, Cantor GH, Hamilton VT, Pritchard SM, Davis WC, Kerkhofs P, Burny A, Kettmann R, Willems L: Bovine leukemia virus induced persistent lymphocytosis in cattle does not correlate with increased Ex Vivo survival of lymphocytes. J Virol 73(2) : 1127 1137, 1999.

Fields BN, Knipe DM: Virology. Second edition. Vol 2: pp 1437 1500. Raven press, New York, 1990.

Gupta P, Ferrer JF: Expression of bovine leukemia virus genome is blocked by a nonimmunoglobulin protein in plasma from infected cattle. Science 215 : 405 406, 1982.

Gupta P, Kashmiri SVS, Ferrer JF: Transcriptional control of the bovine leukemia virus genome: Role and characterization of a non immunoglobulin plasma protein from bovine leukemia virus infected cattle. J Virol 50(1) : 267 270, 1984.

Johnson R, Kaneene JB: Bovine leukemia virus. Part IV. Economic impact and control measures. Compendium 13(11) : 1727 1737, 1991.

Jun MH, Chung UI, Lee CK, Baig SY, Lim CH: Seroepizootiological study on bovine leukosis in Korea. Korean J Vet Res 22(2) : 175 185, 1982.

Keefe RG, Choi Y, Ferrick DA, Stott JL: Bovine cytokine expression during different phases of bovine leukemia virus infection. Vet Immunol Immunopathol 56 : 39 51, 1997.

Maruyama K, Fukushima T, Mochizuki S: Cross reactive antibodies to BLV and HTLV in bovine and human hosts with retrovirus infection. Vet Immunol Immunpathol 22 : 265 274, 1989.

Miller JM, Miller LD, Olson C, Gillette KG: Virus like particle in phytohemagglutinin stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. J Natl Cancer Inst 43 : 1297 1305, 1969.

Miller LD, Miller JM, Maaten MJ, Schmerr MJF: Blood from bovine leukemia virus infected cattle: Antigen production correlated with infectivity. Am J Vet Res 46(4) : 808 810, 1985.

Miller LD, Miller JM, Olson C: Inoculation of calves with particles resembling C type virus from cultures of bovine lymphosarcoma. J Natl Cancer Inst 48 : 423 428, 1972.

Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabriel SA, Janis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD: Virus Taxonomy (Classification and nomenclature of viruses). Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. pp. 193 204. Springer Verlag Wien, New York, 1995.

Ohshima K, Miura S, Numakunai S, Sano H, Suganuma T: C type virus particles associated with Phytohemagglutinin stimulated buffy coat cells of leukemic cows. Jpn J Vet Sci 39 : 77 82, 1977.

Olson C, Miller JM, Miller LD, Gillette KG: C type virus and lymphocytic nuclear projections in bovine lymphosarcoma. JAVMA 156(12) : 1880 1883, 1970.

Olson C: Bovine lymphosarcoma (leukemia). JAVMA 165 :

630 632, 1974.

Paul PS, Pomeroy KA, Johnson DW, Muscoplat CC, Handwerger BS, Soper FF, Sorensen DK: Evidence for the replication of bovine leukemia virus in the B lymphocytes. Am J Vet Res 38(6) : 873 876, 1977.

Pyeon D, O'reilly KL, Splitter GA: Increased interleukin 10 mRNA expression in tumor bearing or persistently lymphocytotic animals infected with bovine leukemia virus. J Virol 70(8) : 5706 5710, 1996.

Rebhun WC, Guard C, Richard CM: Diseases of Dairy Cattle. pp. 484 491. William and Wilkins, Baltimore, 1995.

Schwartz I, Levy D: Pathobiology of bovine leukemia virus. Vet Res 25 : 521 536, 1994.

Sordillo LM, Hicks CR, Pighetti GM: Altered interleukin 2 production by lymphocyte populations from bovine leukemia virus infected cattle. Proc Soc Exp Biol Med 207 : 268 273, 1994.

Stock ND, Ferrer J: Replicating C type virus in phytohemaglutinin treated buffy coat cultures of bovine origin. J Natl Cancer Inst 48 : 985 996, 1972.

Suh GH: Establishment of a bovine leukemia virus free dairy cattle. Ph.D. Thesis, Cheonnam national university, Kwangju, South Korea, 2004. (Korean)

Trueblood ES, Crown WC, Palmer GH, Davis WC, Stone DM, McElwain TF: B lymphocyte proliferation during bovine leukemia virus induced persistent lymphocytosis is enhanced by T lymphocyte derived interleukin 2. J Virol 72(4) : 3169 3177, 1998.

Weber A, M. Fahning, Hammer RH, Jessen C: Relationship between nuclear pockets in bovine peripheral blood lymphocytes and C type virus particles in cultures of these cells. J Natl Cancer Inst 51 : 81 88, 1973.

Weber AF, Meiske JC, Hooker EC, Haggard DL, Domagala AM, Sorensen DK, Buoen LC: In vitro viral expression as a criterion for development of control procedures for enzootic bovine leukosis. Am J Vet Res 48(6) : 899 903, 1987.

Yoon SS, Bae YC, Lee KH, Han B, Han HR: Characteristics of bovine lymphoma caused by bovine leukemia virus infection in Holstein Friesian dairy cattle in Korea. Asian Aust J Anim Sci 18(5) : 728 733, 2005.

<국문초록>

국내 젖소의 54.2%가 BLV에 감염되어 있지만 현재까지 국내에서는 소백혈병 바이러스(BLV) 입자를 확인한 연구 보고가 없기 때문에 BLV 항체 양성 소의 말초혈액 림프구를 배양, BLV를 발현시켜 전자현미경으로 바이러스 입자를 검출하였고 배양조건에 따른 바이러스 발현율 및 발현 시간을 비교하였다. 검사 결과 전형적인 C 형 바이러스를 확인할 수 있었으며 BLV 단크론 항체를 이용한 면역염색결과 BLV 항원 양성으로 확인되었다. BLV는 대부분 세포 외부에 분포하고 있었으며 세포질 막에서 생성, 발아되어 나오는 것도 관찰되었다. 전체 바이러스의 크기는 90~100 nm였으며 nucleocapsid는 40~60 nm였다. 소태아혈청(FBS)과 T 및 B 림프구 분열촉진물질(mitogen)을 각각 첨가하여 배양한 결과 두 군 모두에서 BLV 발현이 확인되었다. Lipopolysaccharide 첨가군은 배양 12시간, Conconavalin A 첨가군은 배양 24시간에 각각 림프구의 10%에서 바이러스가 관찰되었다. 또한 FBS만 첨가한 군과 FBS와 mitogen을 모두 첨가하지 않은 군에서도 관찰되었으나 바이러스의 수는 적었다. 본 연구에서 확립된 BLV 배양 기법을 활용하면 BLV에 감염된 소 중 바이러스를 발현하는 소, 즉 전파능이 있는 개체를 찾아내어 우선적으로 도태할 수 있기 때문에 BLV 감염으로 인한 피해를 막는데 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.