

## 유산망아지에서 말herpesvirus의 면역조직학적 및 immunogold기법에 의한 전자현미경적 진단\*

신태균, 이두식, 진재광, 임윤규, 조길재<sup>1</sup>

제주대학교 농과대학 수의학과  
<sup>1</sup>한국마사회

### Immunohistochemical and immunogold electron microscopic diagnosis of equine herpesvirus(EHV) in aborted foal

Taekyun Shin, Dusik Lee, Jaekwang Jin, Yoon-kyu Lim, Gil-jae Cho<sup>1</sup>

Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Cheju Korea  
<sup>1</sup>Korea Horse Race, Seoul, Korea

**Summary** : To investigate the causative virus in abortion of horse in Cheju, we examined the spleen of affected foal by immunohistochemistry and immunogold electron microscopy using EHV - specific antisera.

Immunohistochemical staining revealed that a large number of EHV immunoreactive cells were detected in the red pulp as well as in the sinusoidal cells in the affected spleen. By the immunogold electron microscopy(EM) of crude preparation of EHV culture, electron dense gold particles were labelled along the envelope of amorphous virus particles with varying sizes of 50 - 200nm.

We suppose that immunohistochemical method is good for the diagnosis of tissues in EHV infections, and immunogold EM is recommended for the study of virus diagnosis of fluid specimen as well as the ultrastructural study.

---

Key words : equine herpesvirus, abortion, diagnosis

\* 이 연구의 일부는 한국과학재단 특성화기기(투과전자현미경) 운영지원금으로 수행되었음.

## 서 론

말의 허피스바이러스(equine herpesvirus; EHV)는 말에 감염시 호흡기 질환, 유산산, 후구마비, 뇌척수염 등을 일으키며 특히 백신에 대한 면역효과가 미진하기 때문에 말을 사육하는 지역에서 경제적인 손실이 크다고 한다(Savine et al, 1983). 현재 제주에서 사육되는 말은 약 80%이상의 혈청 양성을 보임으로 높은 감염율을 기록하고 있고(조 등, 1995) 산과질환의 경우 유산산의 약 30%가 질병에 기인하여 폐사된다고 하며 이 중 EHV에 의한 피해가 가장 클 것으로 추정되고 있다(조 등, 1995; Savine et al, 1983). 말의 유산산을 일으킬 수 있는 여러 원인중 EHV는 가장 중요한 병인체로 알려져 왔으며 최근 ELISA 등의 면역학적 기법을 응용한 신속진단 기술이 개발되고 있다(Sinclair et al, 1992).

면역조직화학적 진단은 병원체에 대한 특이항체가 준비된 경우 조직내에서 바이러스 함유세포를 동정하는 것으로 병원성 연구 및 감염세포의 진단에는 가장 확실한 방법이라고 할 수 있다(Whitewell et al, 1992). 면역전자현미경 기법은 면역조직화학과 같은 원리로 항원 - 항체 복합체를 형성시켜 적은 항원일지라도 응집시켜 검사하면 효과적으로 표적 항원을 동정할 수 있게 된다(Kim et al, 1995). 특히 응집된 항원항체복합체에 다시 전자밀도가 높은 물질을 표시시키면 전자현미경 수준에서 저배율이라도 특이 항원을 동정할 수 있는 이점이 있어 분리배양이 어렵거나 신속진단을 요하는 경우 응용가능성이 높다고 한다(Kim et al, 1995).

이 연구에서는 바이러스성 질병의 신속진

단을 위하여 유산산된 망아지의 조직을 면역조직학적 및 면역전자현미경적 방법을 적용하여 유산산 원인체인 EHV의 면역학적 진단 가능성을 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

공시재료 : 1996년 제주 OO승마장에서 사육중이던 말로써 임신 말기에 유산된 망아지 1두를 이용하였다. 유산망아지를 부검 후 조직을 채취하여 일부는 바이러스 분리를 위하여 동결보존하였으며 일부는 10% buffered formalin에 고정한 후 파라핀 포매 절편을 만들어 조직을 검사하였다.

면역전자현미경 검사 : 말허피스바이러스는 ED 1 세포주에서 3회까지 계대배양하여 EHV의 특징적인 cytopathic effect를 보이는 것을 분리 배양하여 실험에 이용하였다(조 등, 1995).

항체 : EHV의 토끼항혈청은 EHV 1 표준주인 Aust III를 배양한 후 정제하고 이를 토끼에 면역하여 항혈청을 만들었다(조 등, 1995). 면역조직화학적 검사를 위한 Avidin-Biotin complex kit(Vector, Burlingame, CA, USA)를 이용하였고 발색기질로는 3, 3 - diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB) (Sigma)를 이용하였다. 면역전자현미경검사를 위하여는 Gold labelled goat antirabbit IgG(Sigma)는 구입하여 사용하였다.

면역조직화학적 검사 : 바이러스의 감염이 가장 심한 부위로 알려진 비장조직표본을 이용하였다. 먼저 파라핀이 제거된 슬라이드를 0.3% 과산화 수소액으로 처리하여 내재성 peroxidase를 제거하고 5% normal

goat serum을 처리하였다. 그 후 EHV의 토끼항혈청(1 : 1000)을 가하여 실온에서 60분간 반응시키고 biotin이 결합된 goat anti - rabbit IgG, peroxidase가 결합된 avidin - biotin complex(Vector)를 순서대로 반응시켰다. 발색을 위한 기질로는 3, 3 - diaminobenzidine tetrahydrochloride 0.5mg/ml)을 사용하였으며 반응이 끝난후 헤마톡실린으로 대조염색하여 검경하였다. 이 실험에서 이용한 EHV토끼항체는 국내에서 분리된 EHV에 대해 특이성이 증명된 바 있다(조 등, 1995).

면역전자현미경 검사 : 바이러스 함유 pellet을 멸균증류수로 부유시킨후 EHV의 토끼 항혈청(1 : 50)을 적용시킨후 실온에서 1시간 결합시키고 일부는 다시 10nm gold입자가 결합된 goat anti - rabbit IgG(1 : 50)를 첨가한후 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 후 반응물을 1% phosphotungstic acid로 전자염색후 Formvar coated grid (400mesh)에 부착시켜 건조시킨후 JEOL 1200 EX II로 검사하였다.

## 결 과

EHV의 면역조직화학적 동정 : EHV 감염에 의한 유산 망아지의 조직소견은 Whitewell등(1992)의 소견과 일치하였다. 주요 병변으로 알려진 비장에서는 적색수 및 백색수에에서 괴사 부위가 광범위하게 관찰되었다(Fig. 1). 면역조직화학적 염색에서 EHV 양성세포는 비장의 백색수 및 적색수 모두에서 관찰되었으며 세포의 형태로 보아 macrophage로 추정되는 원형의 세포 및 sinusoid를 따라 배열된 혈관내피세포

등이 EHV 항원 양성세포로 확인되었으며 그 외 혈관내 혈구세포에서도 양성반응이 관찰되었다(Fig. 2).

면역전자현미경 검사: 면역전자 현미경 검사를 위해 배양후 정제된 EHV pellet에 항체를 결합시켜 검사하였다. herpes virus 입자는 5 - 10 개의 바이러스 입자가 집단으로 모여 있는 상태로 관찰되었다(Fig. 3). 입자의 크기는 50nm - 200nm로 다양한 형태가 관찰되었으며 이는 envelope이 표본처리과정중 변화된 것으로 생각되었다(Murphy, 1985).

배양된 미정제 herpesvirus를 면역 gold법에 의한 검사한 결과 바이러스입자의 envelope 주위를 따라 10nm크기의 gold입자가 원형으로 둘러싸고 있는 형태를 나타내었으며 작은 크기의 입자에서도 바이러스의 확인이 쉬웠다(Fig. 4).

## 고 찰

EHV는 말에서 유산산의 중요한 원인으로 알려져 왔으며 제주에서 사육되는 말의 유산산 태아에서 바이러스의 분리동정을 통해 제주지역에는 양체 양성 말이 있을 뿐만 아니라 유산산의 원인체가 될 수 있음이 지적되어 왔다(조 등, 1995; 이등, 1986). 이 연구에서는 시간이 소요되는 조직배양을 거치지 않고 가검물 조직중 바이러스의 감염이 가장 심한 부위로 알려진 비장에서 EHV를 동정함으로써 이 바이러스는 말의 유산산을 일으킬 수 있는 병인체가 될 수 있음을 처음으로 확인하였다. 이와같은 면역조직화학적 방법은 유산태아의 진단에 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

면역전자현미경 기법으로 확인된 EHV 입자의 모양은 이미 알려진 구조와 마찬가지로 다양한 크기로 확인되었다(Roizman and Batterson, 1985). 더구나 항원 - 항체 복합체의 형성으로 투과전자현미경하에서 여러 바이러스 입자가 응축된 형태로 확인할 수 있었을 뿐만 아니라 전자밀도가 높은 immunogold의 응용은 투과전자현미경을 통

한 신속진단의 가능성을 보여준 결과라 생각된다(김 등, 1995). 특히 비강점막조직은 EHV의 진단에 효용성이 큰 점을 고려해 볼 때(Sinclair & Mumford, 1992) 수태전 또는 임신 말에서 EHV 감염증의 신속진단에 immunogold를 이용한 전자현미경적 진단법은 유용할 것으로 생각된다.

### Legends for figures

Figure 1. spleen of aborted foal. Necrosis was seen the the red pulp as well as white pulp of spleen. H - E, X132.

Figure 2. Immunoperoxidase staining of equine herpesvirus in the spleen of aborted foal. Arrows indicate herpesvirus - immunoreactive cells, presumably macrophages, counterstained with hematoxylin. X132.

Figure 3. Immune electron microscopy of equine herpesviruses. Aggregates of virus particles are seen. Scale represents 100nm.

Figure 4. Immunogold electron microscopy of equine herpesvirus. Gold particles are attached to the envelope of virus particles. Scale represents 200nm.

## 참 고 문 헌

Kim J, Hwang E, Bae Y, Son H, Park J, Yoon Y. Detection of PED by the immunoelectron microscopy and immunogold conjugate immunoelectron microscopy. Korean J Vet Res 35 : 575-581, 1995.

Murphy FA. Chapter 2. Virus taxonomy. In : Virology, Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Melnick JL, Roizman B, Shope RE(eds), pp. 7-25. 1985. Raven press, New York.

Roizman B and Batterson W, Chapter 25. Herpesviruses and their relication. In : Virology, Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Melnick JL, Roizman B, Shope RE(eds), pp. 497-561. 1985. Raven press, New York.

Savine M, Feilen C, Herbert L, Jones R, Lomas S, Love DN, and Wild J. Equine herpesvirus abortion in

Australia 1977 to 1982. Equine Vet. J. 15 : 366-370, 1983.

Sinclair R, Mumford JA. Rapid detection of equine herpesvirus - 1 antigens in nasal swab specimens using an antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. J Virol Methods. 39 : 299-310, 1992.

Whitewell KE, Gower SM, Smith KC. An immunoperoxidase method applied to the diagnosis of equine herpesvirus abortion, using conventional and rapid microwave technique. Equine Vet J. 24 : 10-12, 1992.

이 영옥, 허영, 박봉균. 1985년도 마필전염병 검진 사업실시결과 보고서. 대한수의사회지 22 : 51-56, 1986.

조길재, 김봉환, 이두식, 신태균, 양기천, 임윤규, 조성수. 국내 말로 부터 비폐염바이러스의 분리 및 면역원성에 관한 연구. 대한수의학회지 35 : 735-741, 1995.



