

## 면역조직화학염색 및 전자현미경검사를 이용한 소 유두로부터 소유두종바이러스 검출

배유찬\* · 윤순식 · 박중원 · 이청산<sup>1</sup> · 진영화 · 강문일<sup>2</sup>

국립수의과학검역원 병리과

<sup>1</sup>충청북도 축산위생연구소

<sup>2</sup>전남대학교 수의과대학

(계재승인: 2005년 5월 24일)

### Bovine papillomavirus detection from bovine teats using immunohistochemistry and electronmicroscopy

You-Chan Bae\*, Soon-Seek Yoon, Jung-Won Park, Cheong-San Lee<sup>1</sup>, Yong-Hwa Jean, Mun-Il Kang<sup>2</sup>

National Veterinary Research and Quarantine Service, Ministry of Agriculture and Forestry, Anyang 430-824, Korea

<sup>1</sup>Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute, Cheongwon 363-931, Korea

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Accepted: May 24, 2005)

**Abstract :** We examined the teats of slaughtered cattles to investigate the prevalence of papilloma and to detect bovine papilloma virus (BPV) from those samples. Among 880 heads, 432 (49.0%) was Holstein and 448 (51.0%) was Korean native cattle. Grossly, out of 432 heads (Holstein), 263 (60.8%) had papilloma lesions on teats. However, out of 448 heads (Korean native cattle), only 33 (7.4%) had papilloma lesions on teats. Immunohistochemically, BPV antigen was detected in 35 heads (22.9%) of 153 (Holstein) which had papilloma lesions. But, in Korean native cattle, BPV antigen was detected in 1 head (3.8%) of 26. Electronmicroscopically, in Holstein papilloma cases, BPV particles was detected in 31 heads (39.2%) of 79. This study revealed that papilloma was very prevalent in holstein teats, Korea and the prevalence of papilloma in Holstein was 8 times higher than that of Korean native cattle. Moreover, it was needed to consider gross and histopathological lesions to confirm BPV infection on teats because the sensitivity of immunohistochemistry and electronmicroscopy was not high.

**Key words :** bovine papilloma virus, immunohistochemistry, electronmicroscopy, bovine teat, holstein

## 서 론

유두종(papilloma)은 평균 55 nm 크기의 작은 DNA 바이러스인 파포바바이러스속의 유두종바이러스(bovine papillomavirus)에 의해 일어나는 질병으로서 소, 말, 개 뿐만 아니라 사람의 피부에 사마귀 모양의 결절을 일으키는 양성 종양이다 [1, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 14]. 이 질병의 잠복기는 3~8주 또는 그 이상이다 [14]. 유두종은 처음에 표피에 작은 결절 모양으로 생기며 이 결절이 자

라나서 건조한 빨 같은 백색의 양배추 모양의 덩어리가 된다 [14]. 그리고 나중에는 이 병변의 기저부가 괴사되어 피부에서 떨어지며 병변의 크기는 직경 0.5 mm 부터 수 cm까지 다양하다 [10, 14]. 유두종의 병리조직학적 병변으로는 과각화증, 표피층 특히 유극세포층의 심한 증식이 특징이다 [2, 5, 12, 13]. 이들 세포들은 수포변성이 되어 종창되며 세포질에 keratohyaline granule을 가지고 있으며 핵 내에서는 때때로 핵내 봉입체가 관찰된다. 그리고 표피층이 증식하여 진피층으로 깊숙히 침투

\*Corresponding author: You-Chan Bae

National Veterinary Research and Quarantine Service, MAF, Anyang 430-824, Korea  
[Tel: +82-31-467-1747, Fax: +82-31-467-1800, E-mail: baeyc@nvrqs.go.kr]

해 있는 것이 특징이다 [13].

소 유두종은 감수성이 높은 어린 소에 감염되었을 때 성장지연이 나타날 수 있으며 착유우의 유두에 감염되면 착유 시 통증 때문에 착유가 곤란하여 유량을 저하시킬 수 있고, 그 외에 유두종에 의한 가죽 손상도 경제적 피해로 꼽을 수 있다 [14]. 외국의 경우, 소 유두종 감염 실태조사와 면역조직화학염색에 의한 유두종바이러스 검출 [12], PCR에 의한 유두종 진단 등이 연구되어 왔으며 [3, 11], 최근에는 유두종 병변내의 세포에서 유두종바이러스의 미세구조를 관찰하기 위해 전자현미경검사가 활발하게 이용되고 있다 [6, 12, 13]. 그러나 국내에서는 이러한 연구들이 거의 수행되어 오지 못했다. 따라서 본 연구에서는 첫째, 국내에서 사육되어 도축장에 출하되는 도축우의 유두종 감염실태를 조사하고, 둘째, 이들 유두종 감염 조직에 대한 병리조직학적 검사를 통해 유두종 감염에 따른 조직의 변화를 관찰하고 면역조직화학염색 및 전자현미경검사를 통해 조직내에서 유두종 바이러스 항원을 검출하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 유두 채취

2001년 1월부터 2002년 11월까지 서울, 경기, 강원, 충북, 충남, 전북, 전남, 경북, 경남 소재 도축장에 출하되는 한우 및 홀스타인종 암소 유두를 채취하여 검사하였다. Table 1과 같이 전체 880두를 검사하였으며 이중 홀스타인은 432두(49.0%)이었고 한우는 448두(51.0%)이었다.

### 유두에 대한 육안 검사

유두 표면을 면밀하게 검사하여 표면의 용기 등 유두종으로 의심되는 병변이 있는지를 관찰하였고 그 밖에 다른 병변이 있는지를 확인하였다. 유두종으로 보이는 병변 조직을 채취하여 일부는 10% 완충중성포르말린에 고정하였고 일부는 -70°C에 보관하여 전자현미경 검사에 활용하였다.

### 유두에 대한 병리조직검사

유두의 병변 부위를 10% 완충중성포르말린에 24시간

고정한 후, 두께 1 mm 정도로 자른 후 캡슐에 넣어 흐르는 물에 수세하였다. 조직처리기(Leica TP 1050, Austria)를 이용하여 조직을 탈수, 청명, 파라핀 침투 단계를 거쳤다. 그 후 파라핀에 포매하여 얼린 후 3~4  $\mu$ m 두께의 파라핀 절편을 만든 다음 헤마톡실린 및 에오신(H&E)염색을 한 후 광학현미경(Olympus BX50, Japan)으로 관찰하였다.

### 유두에 대한 면역조직화학염색

육안검사 및 병리조직검사 결과 유두종으로 확인된 유두조직(179두)에서 BPV를 검출하기 위해 면역조직화학염색을 실시하였다. 유두의 파라핀 포매 절편을 슬라이드(Polysciences, Inc, USA)에 부착하였다. 염색에는 LSAB 2 kit(DAKO K0675, USA)를 사용하였으며, 세척용 완충액은 0.01 M PBS(pH 7.2)이었다. 1차 항체로는 rabbit anti-bovine papillomavirus antibody(BPV-1) [Dako B0580, USA]를 200배 희석하여 사용하였다.

염색과정은 다음과 같다. 파라핀에 포매된 유두 절편을 탈 파라핀과 함수과정을 거쳤다. 조직을 증류수에서 희석된 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 5분간 처리한 후 10분간 세척하였다. 1차 항체를 습상에서 37°C에서 30분간 처리한 후 10분간 세척하였다. 이때, 1차 항체 희석 완충액은 DAKO antibody diluent with background reducing components (Dako S3022, USA)를 사용하였다. Biotinylated Link (Bottle 1)을 37°C에서 10분간 처리한 후 10분간 씻어낸 후, Streptavidin-HRP(Bottle 2)을 37°C에서 10분간 처리한 후 10분간 세척하였다. 그 후에 DAB 용액을 실온에서 1~2분간 처리하고 Meyer's Hematoxylin 으로 30초~1분간 대조염색 하였다. 탈수, 청명 단계를 거친 후 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### 유두에 대한 전자현미경 검사

육안검사 및 병리조직검사에서 확인된 유두종 시료(96두)를 2 g 채취하여 멸균 PBS(pH 7.2) 8 ml와 같이 유발에 넣고 갈았다. 이 유제액을 12,000 rpm에서 5분간 원심분리(Hanil Mega 17R Rotor 24x, 1.5 ml, Korea)한 후에 상층액 20  $\mu$ l를 취하여 미리 준비한 파라핀틀 위에 올리고 그 위에 다시 탄소로 처리한 그리드(300 mesh)를 5분간 띄워 놓았다. 5분 후 여분의 유제액을 제거하기 위하여 여과지로 흡수 제거하였다. 염색약인 1% phosphotungstic acid(PTA) 혹은 uranyl acetate를 1방울 파라핀틀 위에 떨어뜨리고 다시 그리드를 띄워 염색을 실시하였으며 건조시킨 후 투과전자현미경(H-7100FA, Hitachi Co., Japan)으로 75 KV에서 바이러스 입자를 관찰하였다.

Table 1. Teat collection

Breed	No. of animals (%)
Holstein	432(49.0)
Korean native cattle	448(51.0)
Total	880(100.0)

**결 과**

**유두의 질병 조사**

Table 2에서 보는 바와 같이 총 432두의 홀스타인 유두에 대한 육안 검사, 병리조직 검사, 전자현미경 검사 결과를 종합한 결과 유두종(papilloma)이 263두(60.8%)에서 확인되어 가장 많은 것으로 나타났다. 또한 유두창상(teat trauma)이 19두(4.4%)로 확인되었으며, 유두종과 가성우두(pseudocowpox) 복합감염이 2두, 가성우두(pseudocowpox)가 1두에서 확인되었다. 한편 한우 유두 448두에 대한 검사 결과 유두종이 33두(7.4%)이며 유두창상이 11두(2.4%)로 나타났다. 따라서 홀스타인의 유두종 감염율이 한우에 비해 훨씬 높은 것으로 나타났다.

**유두종의 육안 병변**

유두종은 형태학적으로 3가지 즉, 비전형적 편평형 유두종(atypical flat form papilloma), 비전형적 실모양 유두종(atypical filiform papilloma), 전형적 섬유유두종

(typical fibropapilloma)로 구분되는데 이번 연구에서는 이 세 가지 형태의 유두종이 모두 관찰되었다. 이들 병변들은 유두나 유방 표면에 형성되어 있었다.

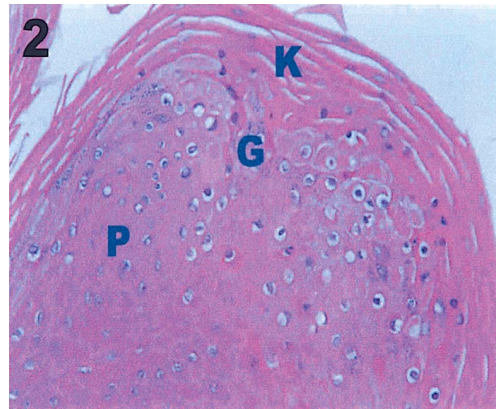
비전형적 편평형 유두종 예의 병변은 보통 직경 2 cm 이하이며 백색 또는 회백색의 융기된 좁쌀 모양의 결절이며 이 병변들은 떼어내려고 해도 잘 떼어지지 않았다(Fig. 1). 비전형적 실모양 유두종 예의 병변은 2 mm 이상의 실 모양의 가는 돌기들이 돌출되어 있으며 이들 병변들은 쉽게 박리되었다(Fig 3). 또한 전형적 섬유유두종 예의 병변은 2 mm 이하의 실 모양의 돌기들이 돌출되어 있는 형태였다.

**유두종의 조직학적 병변**

비전형적 편평형 유두종 예와 비전형적 실모양 유두

**Table 2.** Prevalence of teat diseases

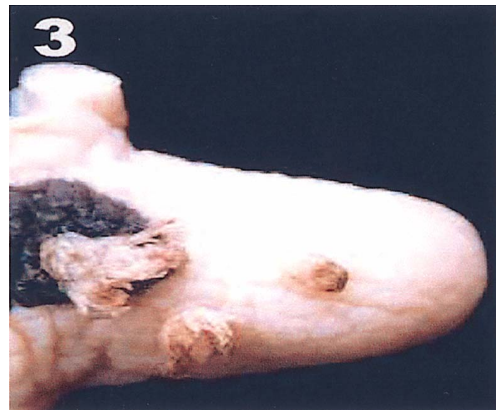
Disease	No. of affected animals (%)	
	Holstein	Korean native cattle
Papilloma	263(60.8)	33(7.4)
Pseudocowpox	1(0.2)	-
Papilloma+Pseudocowpox	2(0.4)	-
Teat trauma	19(4.4)	11(2.4)
Others	8(1.8)	4(0.9)
Normal	140(32.4)	400(89.3)
Total	432(100.0)	448(100.0)



**Fig. 2.** Holstein teat. Atypical flatform papilloma. Parakeratosis(K), severe hyperplasia of granular cells(G) and prickle cells(P). H&E, X200.



**Fig. 1.** Holstein teat. Atypical flat form papilloma, 1~3 mm white round nodules on the surface.



**Fig. 3.** Holstein teat. Atypical filiform papilloma. Fili form lesions on the surface.



**Fig. 4.** Holstein teat. Atypical filiform papilloma. Parakeratosis(K), severe epidermal hyperplasia(E). H&E, X40.

**Table 3.** Morphological classification of teat papilloma

Type	No. of affected animals (%)	
	Holstein	Korean native cattle
Atypical flat form papilloma	224(85.2)	32(97.0)
Atypical filiform papilloma	7(2.7)	-
Typical fibropapilloma	12(4.5)	1(3.0)
Atypical flat form papilloma + Atypical filiform papilloma	11(4.2)	-
Atypical flat form papilloma + Typical fibropapilloma	8(3.0)	-
Atypical filiform papilloma + Typical fibropapilloma	1(0.4)	-
Total	263(100.0)	33(100.0)

중 예의 조직학적 병변으로는 과각화증, 과립세포층 및 유극세포층의 증식이 특징적인 병변이었으며 이들 세포들의 심한 증창이 관찰되었다(Figs. 2, 4). 이들 증식된 세포들의 핵내에서 봉입체는 관찰되지 않았다.

그리고 이들 병변은 비전형적 실모양 유두종 예가 비전형적 편평형 유두종 예 보다 훨씬 심하게 나타났다. 전형적 섬유유두종 예는 과각화증, 과립세포층 및 유극세포층의 증식 이외에 진피층의 심한 증식이 관찰되었다. 유두종 예들을 형태학적으로 분류한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 비전형적 편평형 유두종이 홀스타인과 한우에서 각각 224두(85.2%), 32두(97.0%)로서 다른 형태에 비해 압도적으로 많은 것으로 나타났다. 그 밖에

**Table 4.** BPV detection of papilloma cases using IHC and EM

Breed	BPV positive (%)	
	IHC <sup>#</sup>	EM <sup>##</sup>
Holstein	35/153 (22.9)	31/79 (39.2)
Korean native cattle	1/26 (3.8)	0/17 (0.0)

<sup>#</sup>Immunohistochemistry, <sup>##</sup>Electron microscopy

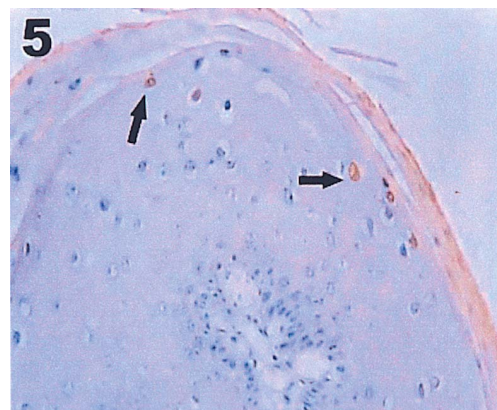
홀스타인에서 전형적 섬유유두종 예가 12두(4.5%), 비전형적 편평형 유두종 및 비전형적 실모양 유두종복합 예가 11두(4.2%)로 나타났다.

#### 유두종의 면역조직화학염색

유두종 병변을 보인 홀스타인 유두 조직에서 유두종 바이러스 항원을 검출하기 위해 면역조직화학염색을 실시한 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 153두중 35두(22.9%)가 양성으로 확인되어 유두종 병변 안에 유두종 바이러스가 많지 않은 것을 확인할 수 있었다. 한편 유두종 병변을 보인 한우 유두 26두 중 1두(3.8%)만이 양성을 나타냈다. 표피층의 과립세포의 핵내에서 갈색으로 양성반응이 관찰되어 유두종바이러스가 과립세포의 핵내에 주로 존재하고 있음을 확인하였다(Fig. 5).

#### 유두종의 전자현미경 검사

Table 4에서 보는 바와 같이 홀스타인 유두종 예에 대한 전자현미경 검사 결과 79두 중 31두(39.2%)에서 유두종바이러스 입자가 관찰되었으며 한우 유두종 예 19두 전체에서 바이러스 입자가 관찰되지 않았다. 유두종 바이러스는 envelope가 없고 정 20면체이며 직경이 55



**Fig. 5.** Holstein Teat. Atypical filiform papilloma. Immunohistochemistry for BPV. The positive reaction is found in the nuclei of granular cells (arrows). H&E, X20.

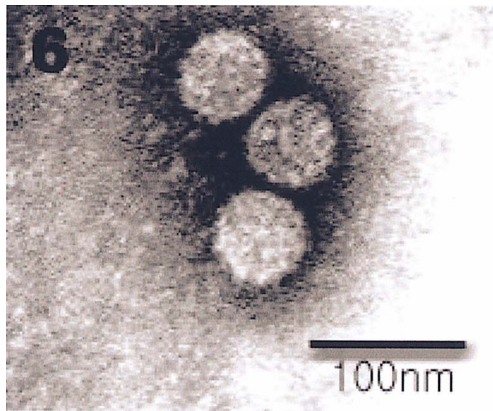


Fig. 6. Electronmicroscopy of teat papilloma. Papillomaviruses are aggregated. Phosphotungstic (PTA) stain.

nm로서 전형적인 유두종 바이러스의 형태를 가지고 있었다(Fig. 6).

## 고 찰

이 연구에서 국내에서 도축되는 홀스타인 유두(432두)에 대한 병변은 유두종이 60.8%(263두)에서 확인되어 가장 흔한 질병으로 밝혀졌는데 특히 홀스타인 유두의 유두종 감염율(60.8%)이 미국 [10]의 25%나 영국 [7, 8]의 36~37.3%에 비해 훨씬 높아 국내 착유 농장은 유두종 감염에 의한 상대적인 경제적 피해는 더 크다고 판단되므로 이에 대한 정확한 영향을 향후 검토해 볼 필요가 있을 것이다. 이와 함께 홀스타인의 유두종 감염율이 한우(7.4%)에 비해 현저히 높게 나타난 것은 전자는 착유 품종이므로 매일 유두에 가해지는 자극이 많은데다가 착유과정 등을 통해 질병의 감염기회가 많은 반면 후자는 비육우로서 유두의 병원체의 노출기회가 상대적으로 매우 적기 때문으로 사료된다.

이번 연구에서도 유두종의 가장 특징적인 병리조직학적 병변은 과각화증과 유극세포층 및 과립세포층의 심한 증식으로 선인들의 보고와 일치하였다 [2, 5, 12, 13]. 이 연구에서는 홀스타인 유두종의 형태학적 구분결과 비전형적 편평형 유두종이 85.2%를 차지하는 것으로 나타났다는데 이 형태는 병변의 형태가 백색 결절로 보이므로 구제역 유두 병변에서 나타나는 수포 또는 가피와 비슷하게 보이기 쉽다는 점에서 주목할 필요가 있다. 2000년 부터 2002년에 걸쳐 국립수의과학검역원에 소 구제역 의심축으로 신고되어 구제역 음성으로 판명된 시료 80건 중, 10건(12.5%)가 유두종으로 확인된 점이 이를 뒷받침하고 있다. 따라서 유두의 유종 병변과 구제역의

유두 병변에 대한 감별 진단은 매우 중요하다고 생각한다.

홀스타인에서 비전형적 편평형 유두종이 대부분이었으며 소수이긴 하나, 비전형적 실모양 유두종(2.7%)과 전형적 섬유유두종(4.5%)이 발생되고 있었다. Meischke [8]의 보고에 의하면 비전형적 편평형 유두종이 52.7%로 역시 가장 많았고 비전형적 실모양 유두종(26.9%)과 전형적 섬유유두종(20.1%)이 그 뒤를 잇고 있어서 이 연구보다 이들 소수 유형들이 다소 높은 발생을 보였으나 그 발생경향은 유사하였다.

면역조직 화학염색법은 조직의 형태를 관찰하면서 조직 내의 항원을 직접 검출할 수 있으므로 동물 질병의 기병성 연구와 확진에 널리 사용되고 있다. 미국의 Olson 등 [10]은 유두의 유두종 병변에서 유두종바이러스 항원을 확인하기 위해 면역조직 화학염색을 실시하여 총 32두 중 34.4%(11두)가 양성으로 확인되었으나, 이번 연구에서는 153두 중 22.9%(35두)가 양성으로 판명되어 이 조직 내 항원 검출법이 확진의 근거는 되지 않았고 그 진단적 민감도가 높지 않았다. 면역조직 화학염색 결과, 유두종 바이러스가 피부 과립세포의 핵 내에서 관찰되어 선인들의 보고와 일치하였다 [12, 13].

더불어 이 연구에서 실시된 홀스타인 유두종 병변을 유제하여 네가티브 염색을 한 후 전자현미경으로 관찰한 결과 79두 중 39.2%(31두)가 양성으로 확인되어 면역조직 화학염색의 양성율(22.9%)보다 다소 높았지만 진단법으로 응용할 정도의 민감도는 안되었다. 유두종의 전자현미경 검사와 면역조직 화학염색 결과 유두종 바이러스의 검출율이 비교적 낮은 이유는 유두종 병변 부위에 유두종 바이러스가 없거나 병변 내에 바이러스가 존재해도 검출할 수 없는 형태로 존재하기 때문인 것으로 추정되고 있다 [12]. 따라서, 유두종 확진을 위한 표준진단법으로서 면역조직 화학염색법과 전자현미경법을 활용키 위해서는 조직 내 항원 검출율을 높이는 방법의 개량과 단크론 항체 사용의 필요성이 인정되었다. 결론적으로 유두종의 확진은 이들 검사법의 단독으로는 확진하는 것은 오류가 있을 수 있으므로 현재로서는 유두종의 확진은 이들 방법들 외에 동시에 육안 및 병리조직학적 병변을 종합적으로 검토하여야 할 것으로 판단되었다.

향후 국내 소 유두의 유두종 감염을 보다 더 쉽게 감별진단하기 위해서는 중합연쇄반응의 확립과 함께 정확한 유두종 바이러스의 기병성을 규명하고 특이성과 민감도가 높은 항체 생산을 위해 국내에서 감염환을 이루고 있는 병원체의 분리가 필요하며 이들 분리 바이러스의 유전자 분석을 통한 분자역학적 조사도 조속히 이루어져야 한다고 판단된다.

## 결 론

소 유두종 감염율을 조사하기 위해 2001년부터 2002년 11월까지 도축우 유두 880두(한우 448두, 홀스타인 432두)를 검사하였다. 홀스타인과 한우의 유두종 감염율은 각각 60.8%, 7.4%로서 홀스타인의 감염율이 약 8배 높았다. 홀스타인의 유두종 감염율은 미국과 영국의 감염율 보다 높은 것으로 나타났다. 유두종을 형태학적으로 구분한 결과, 비전형적 편평형 유두종이 홀스타인(85.2%), 한우(97.0%)로서 가장 많았다. 홀스타인 유두종 예에 대한 면역조직화학염색과 전자현미경검사 결과, 항원검출율이 각각 22.9%와 39.2%로서 비교적 낮았기 때문에 유두종의 확진을 위해서는 이들 방법들 외에 육안검사와 병리조직검사를 병행해야 할 것으로 판단된다.

## 감사의 글

유두의 육안 검사에 도움을 준 이상경 수의사께 깊은 감사를 드립니다. 또한 유두 채취를 도와주신 전국 시도 축산위생연구소 또는 보건환경연구원 직원들께도 감사드립니다.

## 참고문헌

1. **Bagdonas V, Olson C.** Observations on the Epizootiology of Cutaneous Papillomatosis(Warts) of Cattle. *J Am Vet Med Ass* 1953, **122**, 393-397.
2. **Barthold SW, Koller LD, Olson C, Studer E, Holtan A.** Atypical Warts in Cattle. *J Am Vet Med Ass* 1974, **165**, 276-280.
3. **Bloch N, Sutton RH, Breen M, Spradbrow PB.** Identification of papillomaviruses in scrapings from bovine warts by use of the polymerase chain reaction. *Vet Res Commun* 1997, **21**, 63-68.
4. **Campo MS.** Bovine Papillomatosis and Cancer. *Vet J* 1997, **154**, 175-188.
5. **Debey BM, Bagladi-Swanson M, Kapil S, Oehme FW.** Digital papillomatosis in a confined Beagl. *J Vet Diagn Invest* 2001, **13**, 346-348.
6. **Gerdes G, Lugt J.** Electronmicroscopic evidence of a papillomavirus and a parapoxvirus in the same lesion. *Vet Rec* 1991, **128**, 594-595.
7. **Lindholm I, Murphy J, O'Neil BW, Campo MS, Jarrett WF.** Papillomatosis of the teats and udder of cattle and their casual viruses. *Vet Rec* 1984, **115**, 574-577.
8. **Meischke HR.** A Survey of bovine teat papillomatosis. *Vet Rec* 1979, **104**, 28-31.
9. **Nicholls P, Stanley M.** The immunology of animal papillomaviruses. *Vet Immunol Immunopathol* 2000, **73**, 101-127.
10. **Olson RO, Olson C, Easterday BC.** Papillomatosis of the bovine teat(mammary papilla). *Am J Vet Res* 1982, **43**, 2250-2252.
11. **Often N, Tschärner CV, Lazary S, Antczak DF, Gerber H.** DNA of bovine papillomavirus type 1 and 2 in equine sarcoids: PCR detection and direct sequencing. *Arch Virol* 1993, **132**, 121-131.
12. **Sundberg JP, Junge RE, Lancaster WD.** Immunoperoxidase localization of papillomaviruses in hyperplastic and neoplastic epithelial lesions of animals. *Am J Vet Res* 1984, **45**, 1441-1446.
13. **Sundberg JP, Ranst MV, Montali R, Homer BL, Miller WH, Rowland PH, Scott DW, England JJ, Dunstan RW, Mikaelian I, Jensen AB.** Feline Papillomas and Papillomaviruses. *Vet Path* 2000, **37**, 1-10.
14. **Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE.** Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals, 8th ed. pp. 523-526, 584-585. Comstock Publishing Associates, Ithaca and London, 1988.