

## 한우의 림프절내 림프구양 세포에서 *Theileria sergenti* schizonts의 검출

이승옥 · 이주목 · 권오덕 · 박진호 · 박상열

전북대학교 수의과대학  
(1996년 7월 25일 접수)

### Detection of *Theileria sergenti* schizonts in lymphoid cell of lymph node in Korean cattle

Seung-ok Lee, Joo-mook Lee, Oh-deog Kwon, Jin-ho Park, Sang-youl Park

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Received Jul 25, 1996)

**Abstract :** The life cycle of *Theileria sergenti* (*T sergenti*) in cattle, especially Korean native cattle, was not proved clearly. To find schizont stage in the life cycle of *T sergenti* in Korean cattle, *T sergenti* schizonts in the cells of parotid lymph nodes from 10 adult Korean cattle were examined.

Lymphoid cells which were separated from these lymph nodes were cytocentrifuged to observe the parasites in the cells.

*T sergenti* schizonts were detected in the cells of lymph nodes of 6 cattle out of them by IFA (Indirect Fluorescent Antibody) test and Giemsa stain.

By peroxidase stain, the cells which contain schizonts were proved lymphoid cells.

*T sergenti* schizonts identified by IFA test were able to be restained by Giemsa stain.

Also, merozoites were observed in peripheral blood of the same 6 cattle that had schizonts, by giemsa stain, but not observed in the 4 cattle that had not been detected schizonts.

As a part of life cycle of *T sergenti*, schizonts were observed in the lymphoid cells of Korean cattle.

**Key words :** *Theileria sergenti*, schizont, lymph node, Korean native cattle.

### 서 론

현재까지 알려진 *Theileria* 종의 감염경로는 *Theileria* 원

충에 감염되어 있는 진드기가 흡혈할 때 진드기의 타액  
선에 있는 sporozoite가 소의 체내로 들어가서 림프절에서  
분열생식(shizogony)을 통하여 분열체 단계를 거쳐 mi-  
cromerozoite 형태로 유리되어 merozoite가 되며, 이 mero-

이 논문은 1996년도 전북대학교 부속 생체안전성연구소 학술연구비의 일부지원으로 이루어졌음.

Address reprint requests to Dr. Lee Joo Mook, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Republic of Korea.

zoite가 적혈구에 감염되어 질병을 유발시키는 것으로 알려져 있다<sup>1-3</sup>. 그러나 이와같은 생활사(life cycle)는 *Theileria parva*를 주 모델로 한 것이다. 따라서 우리나라에서 theileriosis를 일으키는 *T. sergenti*의 생활사는 아마도 *T. parva*와 같을 것으로 예상은 하고 있지만 이와 일치하는지는 아직 명확히 밝혀져 있지 못한 상태이다. 그러므로 *T. sergenti*의 근절대책 마련 및 theileriosis의 치료와 예방을 위해서는 이의 생활사를 명백히 밝혀서 기본적인 생태 및 특성을 알아야 할 필요가 있다.

현재 *T. sergenti*의 분열체 단계에 관한 연구는 Uilenberg 등이 제주에서 *Theileria*에 감염된 진드기를 채집하여 네덜란드의 Friesian에 흡혈시킨 후 이하림프절과 전 견갑림프절내에서 채취한 생검재료를 Giemsa stain하여 분열체를 관찰한 바 있다<sup>4</sup>. 한편 Kawazu<sup>5</sup>, Minami<sup>6</sup> 등은 일본주 *T. sergenti*를 Holstein에 인공감염시킨 후 립프절에서 면역조직학적 방법으로 세포의 분열체를 검출하였고 Sato 등<sup>7,8</sup>도 일본주 *T. sergenti*를 Holstein에 인공감염 시킨 후 립프절, 간, 비장의 huge cell의 세포질에서 조직학적으로 분열체를 관찰하였다. 그러나 국내에서는 아직 자연감염된 예를 비롯하여 한우의 립프절에서의 *T. sergenti* 분열체에 관한 연구는 보고되어 있지 않다.

따라서 이 실험에서는 야외에서 *T. sergenti*에 자연감염된 한우의 립프절에서 분리한 립프구의 세포질에서 간접형 광항체법(Indirect Fluorescent Antibody test)과 Giemsa stain 및 Peroxidase stain으로 분열체 단계를 확인할 수 있었으므로 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

**실험동물 :** 전북 지역에서 사육된 한우 10두로 부터 적출한 이하림프절과 경정맥에서 채혈한 혈액을 실험에 사용하였다.

**립프절내 립프구양 세포의 분리 및 표본제작 :** 적출된 립프절을 PBS(phosphate-buffered saline)로 세척하여 PBS 내에서 유리세포 부유액을 만든 후 이 부유액을 54%와 45% Percoll(Pharmacia, d=1.12)에 중증하여 500g로 25분간 원심분리 하였다. 이 Percoll의 중간층에 있는 립프구층을 회수하여 PBS로 3회 세정한 후 세포가  $10^6$  cells/ml의 농도가 되도록 부유액을 만들었다. 이 부유액을 slide glass 1장당 100㎕씩 분주하여 Cytospin centrifuge(Shandon)를 이용하여 500rpm으로 5분간 cytocentrifuge를 실시한 후

이를 실험에 사용하였다.

**간접형광항체법 :** 실험은 藤永 徹<sup>9</sup>의 방법에 준하여 실시하였다. 1차 혈청은 *T. sergenti*에 감염되어 있으면서 임상검사상 다른 질병에 이환되지 않은 것으로 판명된 본 실험실에서 사육중인 한우로부터 분리하였다. 이 혈청으로 *T. sergenti* 야외균주를 검사하여 양성혈청임을 결정하였고, 음성대조로는 FBS(Fetal Bovine Serum)를 사용하였다. 2차 혈청은 FITC conjugated anti-bovine IgG (Sigma)를 실험에 사용하였다.

**Giemsa stain :** 간접형광항체법에서 양성반응부위의 형태 확인과 말초혈액에서의 *T. sergenti*의 감염여부를 확인하기 위하여 간접형광항체법에서 양성반응을 나타낸 재료와 말초혈액의 도말표본을 Giemsa stain하여 경검하였다.

**Peroxidase stain :** 간접형광항체법에서 분열체를 포함하고 있는 것으로 확인된 세포의 종류를 구분하기 위해서 peroxidase stain<sup>10</sup>을 실시하였다. Benzidine 0.3g을 alcohol에 녹여 99ml이 되게 하였다. 여기에 sodium nitroprusside 포화수용액 1ml을 더하여 100ml이 되게 하여 solution A를 만들었다. 사용직전에 15ml의 중류수에 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3ml을 혼합하여 solution B를 만들었다.

Solution A를 슬라이드에 떨어뜨려 90초간 염색한 후 그 위에 Solution B를 더하여 3분간 정착시켰다. 흐르는 물로 세정하여 대조염색으로 Wright stain을 하였다.

**간접형광항체법과 Giemsa stain :** 간접형광항체법에서의 양성반응 부위와 Giemsa stain으로 확인된 분열체가 같은 물체인가를 확인하기 위하여, 간접형광항체법을 실시한 후 메탄올로 세정하고 그 위에 Giemsa로 재염색하여 간접형광항체법에서 양성반응이 나타난 부위를 광학현미경으로 관찰하여 분열체의 형태를 확인하였다.

## 결 과

소 체내에서 *T. sergenti*의 분열체를 검출하기 위하여 성숙 한우 10두에서 적출한 이하림프절과 경정맥에서 채혈한 혈액을 사용하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

간접형광항체법을 실시한 결과, 실험에 사용된 10두 중 6두에서 양성반응을 나타내었다(Fig 1). 또한 Giemsa stain을 실시한 결과, 간접형광항체법에서 양성반응을 나타낸 재료에서 소분열체로 생각되는 물체가 관찰되었다

(Fig 2).

간접형광항체법에서 양성반응을 나타낸 부위(Fig 3-1)와 Giemsa stain에서 소분열체로 생각되는 물체(Fig 3-2)가 일치하는 가를 알아보기 위해 간접형광항체법과 Giemsa stain을 이중으로 실시한 결과, 일치함을 알 수 있었다.

Peroxidase stain을 실시하여 소분열체로 생각되는 물체를 포함하고 있는 세포가 림프구양 세포임을 알 수 있었다(Fig 4).

림프절내 림프구양 세포내에서 대분열체로 생각되는 물체가 관찰되었으며(Fig 5), 이는 간접형광항체법으로도 검출할 수 있었다(Fig 6). 한편 또 다른 림프절내 림프구양 세포에서는 다른 형태의 대분열체양 물체가 관찰되었다(Fig 7).

말초혈액내 *T sergenti*의 감염여부를 알아보기 위하여 Giemsa stain을 실시하여 경검하였다. 그 결과 분열체가 검출된 6두의 말초혈액에서는 모두 *T sergenti*가 확인되었으나 분열체가 검출되지 않은 4두의 말초혈액에서는 *T sergenti*가 확인되지 않았다.

## 고 찰

우리나라 Theileriosis의 병원체인 *T sergenti*에 관한 연구는 진단방법, 집단검색, 미세구조 관찰, 치료법 등 다양적으로 이루어지고 있다<sup>11-13</sup>. 그럼에도 불구하고 *T sergenti*는 그 생활사 조차도 아직 명백히 밝혀져 있지 못한 상태이다. *T sergenti*에 관한 연구는 각 방면으로 연구가 진행되어야 할 것이나 무엇보다 우선적으로 그 기본적인 생활사에 관한 연구가 선행되어야 할 필요성이 높다 하겠다.

물론 *T sergenti*의 생활사는 *T parva*를 모델로 하여 이를 확인해 가는 과정이지만 우리나라를 비롯한 극동과 아시아 지역에서 문제가 되는 *T sergenti*의 생활사가 이와 일치하는지는 확인이 필요하다. 이와같은 이유로 현재 일본에서도 *T sergenti*의 생활사에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다<sup>5-8</sup>. 일본에서의 연구는 *T sergenti*를 인공감염시킨 소의 림프절의 조직내 감염을 증명하고 있으며, 우리나라에서는 Uilenberg<sup>4</sup>가 제주에서 *T sergenti*감염 진드기를 채집하여 Friesian에 감염시켜서 림프조직내에서 채취한 생검재료를 Giemsa stain으로 염색하여 분열체를 관찰한 바 있으나 사진소견으로는 다소 의심되는 부분이 있을 뿐만 아니라 면역학적방법에

의한 진단이 되어 있지 못한 상태이다. 따라서 저자는 *T sergenti*에 자연감염되어 있는 한우의 림프절에서 림프구를 추출하여 분열체를 검출하기 위해 실험을 실시하였던 바 간접형광항체법과 Giemsa stain을 통하여 소분열체와 대분열체양 물체를 검출할 수 있었다.

간접형광항체법을 통하여 양성반응을 나타낸 물체를 포함하고 있는 세포를 Giemsa stain으로 재염색하여 이 양성반응을 나타낸 물체가 소분열체임을 관찰할 수 있었다. 또한 Giemsa stain과 간접형광항체법을 실시하여 림프절내 림프구양 세포에서 대분열체양 물체도 관찰할 수 있었다.

분열체를 포함하고 있는 세포는 정상 림프절내의 세포와 달리 핵의 분열이 인정되고 세포의 크기도 커져서 그 세포의 종류를 동정하기가 곤란하였다. 따라서 저자는 Peroxidase stain을 실시하여 이 세포가 림프구양 세포이며 세포내 과립양 물질이 과립구의 과립이 아님을 확인할 수 있었다.

본 실험에서 소분열체에 감염된 림프구양 세포의 핵은 변형이 되어 있는 것을 관찰할 수 있었으며(Fig 1, 2, 3-1, 3-2, 4), Mehlom et al은 분열체에 감염된 숙주세포는 분열을 한다고 보고하고 있는 바 본 실험의 결과와 일치하는 소견을 나타내고 있다<sup>2</sup>. Sato et al은 Theileria 분열체가 숙주세포를 자극하여 숙주세포가 거대해진다고 발표하고 있으며<sup>7</sup>, 본 실험에서도 분열체를 포함하고 있는 세포(숙주세포)의 크기는 다른 림프구양 세포에 비하여 비교적 크기가 증가하였음을 알 수 있었다(Fig 1, 2, 3-1, 3-2, 4, 5, 6, 7).

한편 대분열체양 물체의 핵의 크기를 측정하여 본 결과  $1.9\mu\text{m} \times 2.8\mu\text{m} \sim 4\mu\text{m} \times 7\mu\text{m}$ 로 평균  $2.7\mu\text{m} \times 3.7\mu\text{m}$ 이었으며 *T parva*의 대분열체의 핵의 크기( $0.4\mu\text{m} \sim 2\mu\text{m}$ )에 비해 큰 것을 알 수 있었다. 그러나 *T sergenti* 분열체에 감염된 숙주세포의 변화 및 분열체의 크기에 관하여는 더욱 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

*T sergenti* 분열체의 발육단계를 확인하기 위하여 성숙한 한우 10두의 이하림프절에서 분리한 림프구양 세포를 사용하여 간접형광항체법, Giemsa stain 및 Peroxidase stain을 실시하고, 한편 경정액에서 채혈한 혈액을 Giemsa stain하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 림프절에서 분리한 세포로 간접형광항체법과 Giemsa stain을 실시하여 *T. sergenti*의 소분열체와 대분열체를 검출하였다.

2. Peroxidase stain을 실시하여 분열체를 포함하고 있는 세포가 림프구양 세포임을 알 수 있었다.

3. 실험에 사용된 소의 혈액을 Giemsa stain한 결과 림프절의 림프구양 세포에서 분열체가 검출된 6두에서는

말초혈액에서도 merozoites가 관찰되었으나, 분열체가 검출되지 않은 4두에서는 말초혈액에서 merozoite가 확인되지 않았다. 이상과 같이 *T. sergenti*에 자연감염된 한우의 림프절에서 소분열체와 대분열체를 검출할 수 있었으므로 *T. sergenti*에서도 림프절내에서 소분열체와 대분열체 단계가 존재함을 알 수 있었다.

### Legends of figures

Fig 1. *Theileria sergenti* schizont in the cell which was separated from lymph node of Korean cattle by IFA test.

Fig 2. *Theileria sergenti* microschizont in the cell which was separated from lymph node of Korean cattle by Giemsa stain.

Fig 3-1. *Theileria sergenti* schizont in the cell which was separated from lymph node of Korean cattle by IFA test.

Fig 3-2. *Theileria sergenti* microschizont restained by Giemsa stain after IFA test (It is the same cell as Figure 3-1, arrowed).

Fig 4. The lymphoid cell which contain schizont by peroxidase stain.

Fig 5. *Theileria sergenti* macroschizont like organism in lymphoid cell by Giemsa stain.

Fig 6. *Theileria sergenti* macroschizont like organism in lymphoid cell by IFA test.

Fig 7. The other form of *Theileria sergenti* macroschizont like organism in lymphoid cell by Giemsa stain.



## 참 고 문 현

1. 李宰求. 最新獸醫寄生蟲學. 大韓教科書株式會社, 서울: 525~534, 1993.
2. Mehlhorn H, Schein E. The piroplasm : Life cycle and sexual stage. *Adv Parasitol*, 23: 37~103, 1984.
3. 南哲郎, 藤永徹. 獸醫住血微生物病. 近代出版, 東京: 149~159, 1986.
4. Uilenberg G, Perie NM, Spanjer AAM, et al. *Theileria orientalis*, a cosmopolitan blood parasite of cattle: demonstration of the schizont stage. *Res Vet Sci*, 38: 352~357, 1985.
5. Tetsuro Minami, Sinichiro Kawazu, Kameo Shimura, et al. Detection of the schizont stage in experimentally infected cattle with Japanese *Theileria sergenti*. *Jpn J Vet Sci*, 3: 601~604, 1990.
6. Shin-ichiro Kawazu, Masumi Sato, Shogo Tanaka, et al. Immunohistological staining of *Theileria sergenti* schizonts. *J Vet Med Sci*, 53: 743~745, 1991.
7. Masumi Sato, Tsugihiko Kamio, Shin-ichiro Kawazu, et al. Histological observations on the schizonts in cattle infected with Japanese *Theileria sergenti*. *J Vet Med Sci*, 55: 571~574, 1993.
8. Masumi Sato, Tsugihiko Kamio, Shogo Tanaka, et al. Development of *Theileria sergenti* schizonts in the lymph node of experimentally infected cattle. *J Vet Med Sci*, 56: 715~722, 1994.
9. 南哲郎, 藤永徹. 獸醫住血微生物病. 近代出版, 東京: 269~272, 1986.
10. 李三悅, 鄭允燮. 臨床病理檢查法. 延世大學校出版部, 서울: 103, 1982.
11. 전영. 국내소의 주혈원충과 그 혈액학적에 관한 조사연구. 농시보고, 12: 81~85, 1971.
12. 이주목, 김명철. 젖소의 파이로프라스마증의 효과적인集團檢索과 治療方法에 관한 연구. 대한수의학회지, 27: 321~330, 1987.
13. Irvin Characterization of species and strains of *Theileria*. *Adv Parasitol*, 26: 145~197, 1987.