韓家衛誌 第18卷 第1號
Korean J. Vet. Serv. (1995), 18(1) : 1~21

Bovine Leukemia Virus에 실험감염된 한국재래산양의 혈액상의 변동

이필돈·김종호 · 전무형*
대전광역시 보건환경연구원, 충남대학교 수의과대학*

Hematological Change of Korean Native Goats Experimentally Infected with Bovine Leukemia Virus

Pil-Don Lee, Jong-Ho Kim, Moo-Hyung Jun*
Institute of Health & Environment, Taejon City Government
*College of Veterinary Medicine, Chungnam National University**

Abstract

To elucidate pathogenesis of bovine leukemia virus(BLV) in Korean native goats, the goats experimentally infected with BLV were studied especially for the aspects of infectivity and hematological changes.

The experimental goats were examined for 27 months by agar-gel immunodiffusion(AGID) test and syncytium formation assay. During this period, changes of total leucocyte, absolute lymphocyte and atypical lymphocyte were examined, and the distribution of surface immunoglobulin(sIg)-bearing cells and rosette forming cell(RFC) in the peripheral lymphocyte were also investigated.

By indirect immunofluorescence(IFA) and complement dependent antibody cytotoxicity (CDAC) assay using monoclonal antibody(Mab) against bovine leukosis tumor-associated antigen(BL-TAA), changes of BL-TAA positive lymphocyte in peripheral blood were measured.

The results obtained through the experiment were summarized as follows.

1. Antibody titers were measured by AGID using gP51 and P24 antigens. The animals were serologically converted at 2 months post-inoculation(pi) in gP51 antigen, whereas sero-converted at 4 months pi in P24 antigen. In comparison with antibody titers for gP51, P24 antigen showed lower titers throughout the trial period.
2. The peripheral lymphocytes from all of the infected goats, as co-cultivated with F81 cells

manifested syncytial formation at 4 months pi.

3. On counting total leucocyte, lymphocyte and atypical lymphocyte, two out of four infected goats showed normal distribution, while No 2 of the remaining two revealed temporal and No 3, Persistant increasing number of the cells.
4. The optimal condition of rosette formation of the peripheral lymphocyte of normal Korean native goats was shown in the sheep erythrocyte treated with 0.1M AET for 30 min at 37℃. When the lymphocytes were treated in nylon wool column, the number of sIg-bearing cell were increased in the nylon wool adherent cells, but RFC was increased in the non-adherent cells. Of the infected goats, No 2 and No 3 showed significantly increasing number of sIg-bearing cells at 18 months pi.
5. The lymphocytes of No 2 and No 3 goats reacted positively in IFA using Mab against BL-TAA at 12 months pi and 18 months pi, respectively. In CDAC test, all of four infected goats revealed positive reaction at 24 months pi. The higher positive rates were observed in No 2 and No 3 as compared with the remainders.

Key word : BLV(Bovine leukemia virus), Korean native goat.

서 론

소백혈병(bovine leukosis : BL)은 소의 혈액 종양성 질병으로 임파계세포의 이상증식이 주증이며 임상 병리학적 특성에 따라 성우형, 송아지형, 흉선형 및 피부형으로 분류한다.[1~6] 이 중 발생빈도가 가장 높은 성우형(adult form)은 전염성이 있고 이로 인한 낙농가의 피해가 크며 그 발생이 일정한 지역이나 지리적 조건과 밀접한 관계가 있어 유행성 소백혈병(enzootic bovine leukosis)이라고도 한다.[1~3, 6]

유행성 소백혈병의 병원체는 bovine leukemia virus(BLV)로 Retroviridae에 속하며 85~120 ㎚ 크기로, plus(+) 외가닥 RNA핵산을 가지며 역전사효소를 함유하고 있으며 종양유전자(oncogene)는 가지고 있지 않다.[1, 3, 7, 8] BLV는 B-임파구에 주로 감염하여 세포를 변형시켜 종양을 유발하며, 유전자의 구조와 제반 특성이 human T cell leukemia virus와 매우 유사하다.[3, 9~13] 그러나 산발형 소백혈병인 송아지형, 피부형 및 흉선형의 원인체는 아직 밝혀지지 않았다.[6~7]

유행성 소백혈병은 세계 주요 낙농국가에서 발생되고 있으며 유량 및 체중감소, 악액질 등의 증상을 나타내는 악성 종양성 질병으로서 한번 우군에 감염되면 근절하기가 어렵고, 경제적 손실을 야기하며 우리나라에서는 2종 법정전염병으로 규정하고 있다.[13~14]

본 병의 전염은 주사침, 우유, 타액, 비즙 등으로 인한 경구, 경비 및 피내 경로를 통하여 전파되는 수평전파가 주요 전염방법이나 태반 또는 종모우의 정액을 통한 수직감염도 보고되고 있다.[6, 7, 15]

국내에서는 1968년 이후 본 병에 대한 역학적 조사연구가 여러 학자들에 의해 수행된 바 있고,[13~22] agar-gel immunodiffusion(AGID)법에 의한 전

국 젖소에 대한 표본조사에서 항체 양성율은 20~30%로 보고된 바 있는데 지역적으로는 경기 및 충청지역에 사육중인 젖소에서 감염율이 높으며 이로 인해 낙농산업에 경제적인 손실을 초래하는 것으로 지적된 바 있다.[14~18] 그리고 면역확산법에 이용되는 BLV glycoprotein antigen과 core antigen의 제조와 이에 대한 성상연구 및 야외응용시험이 수행되어 진단용 항원이 개발되었다.[18~19]

최근 김 등[21]은 소백혈병 provirus DNA의 polymerase chain reaction과 enhanced chemiluminescence기법을 이용 BLV감염 세포를 검출하는 실험을 수행한 바 이런 방법들이 기존 진단법 보다 BLV검출에 더 우수하다고 보고하였다.

또한 전 등[22]은 bovine leukosis tumor associated antigen(BL-TAA)에 대한 monoclonal antibody(Mab)를 제조하고 이를 이용하여 소백혈병 종양세포를 특이하게 검출할 수 있음을 보고하였다.

BLV의 인공감염시험은 소[23], 면양[23~25], 산양[26], 원숭이[27] 그리고 토끼[28~29]에서 수행한바 있으며, 특히 면양은 감수성이 높고 발암성이 있어 장기간 감염되었을 때 임파성 종양을 유발한다고 보고된 바 있으며, 소, 산양 및 토끼는 감염이 성립되지만 단기간 관찰시 종양을 유발하지 않는다고 보고도 있다.[23, 26, 28~30]

조 등[31]은 우리나라 재래산양에 BLV를 실험적으로 감염시킨 후 BLV에 대한 항체변동실태를 AGID법, 보체의존성항체세포독성(complement dependent antibody cytotoxicity : CDAC)시험, 보체결합반응, syncytium inhibiton test를 이용한 바이러스 중화시험으로 측정하였고 12개월간의 관찰기간중 BLV의 감염이 성립되어 유의한 항체반응이 있음을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 한국재래산양에 BLV를 인공감염시킨 다음 27개월간 AGID법 및 syncytium assay(SA)로 BLV감염상태를 시험하고, 총백혈구, 임파구 및 비정형임파구수의 변동 및 surface immunoglobulin(sIg)-bearing cell과 면양적혈구를 이용한 rosette forming cell(RFC)의 변동을 조사하였다. 또한 BL tumor-associated antigen(BL-TAA)에 특이하게 반응하는 Mab를 이용한 간접형광항체법 및 CDAC법으로 임파구 중 BL-TAA양성 세포의 변동상태를 구명하여 한국재래산양에 대한 BLV의 병인기전 구명을 위한 기초자료를 얻기 위해 일련의 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

동물접종 : 재래산양 6두(♀)를 대상으로 2주간의 임상관찰 및 적응기간을 거치고 AGID법으로 BLV항체 음성임을 확인한 다음 시험에 공시하였다. 시험개시시 연령은 52~54일령이었고 체중은 6~8kg이었다.

BLV접종은 표 1에서 요약한 바와 같이 No 1 및 No 2 산양은 BLV persistently infected fetal lamb kidney cell line(FLK-BLV)을 Eagle's minimum essential medium(Gibco, USA, MEM)에 $5\times10^{6.5}$cells/㎖ 농도로 조정하여 복강내에 50㎖, 서혜부 피하에 20㎖씩 각각 접종하였고, No 3 및 No 4는 소백혈병 이환우의 말초혈액을 acid-citrate dextrose 용액으로 항응고처리[31]하여 채취한 다음 0.15M NH_4Cl(pH 7.0)과 증류수를 가하여 적혈구를 제거한 다음 MEM에 $1\times10^{7.0}$cells/㎖ 농도로 조정한 백혈구 부유액을 복강내에 80㎖, 서혜부 피하에 20㎖씩을 각각 접종하였다.

No 5 및 No 6은 대조군으로 생리적 식염수를 BLV접종군과 동일한 방법으로 접종하였다.

Table 1. Experimental design

Goat* No	Description	Specimens inoculated	Inoculation dose	Route (dose)
1	54 days old, male, 7kg	FLK-BLV cells**	70㎖	ip(50㎖) sc(20㎖)
2	54 days old, male, 8kg	FLK-BLV cells	70㎖	ip(50㎖) sc(20㎖)
3	53 days old, male, 8kg	PL from BLV-infected cattle***	100㎖	ip(80㎖) sc(20㎖)
4	52 days old, male, 6kg	PL from BLV-infected cattle	100㎖	ip(80㎖) sc(20㎖)
5	52 days old, male, 6kg	control (non-infected)	–	–
6	54 days old, male, 7kg	control (non-infected)	–	–

* All animals were observed for 27 months post inoculation.
** $5\times10^{6.5}$cells / ㎖ in MEM.
*** PL=peripheral leucocyte at $1\times10^{7.0}$cells / ㎖ in MEM.
BLV-infected cattle was obtained by agar-gel immunodiffusion and hematological tests.
ip : intraperitoneal, sc : subcutaneous.

혈액 및 혈청 채취 : 경정맥으로부터 무균적으로 혈액을 채취하여 일부는 임파구 분리를 위해 헤파린(10~20u / ㎖)처리하였고, 일부는 항체검사를 위해 응고시킨후 혈청을 분리하여 56℃에서 30분간 비동화 한 후 −20℃에 냉동보관하였다.

혈액학적 검사 : 혈구계산판(Superior Co, Germany)을 이용하여 통상 방법에 따라 총 백혈구수를 계산하였고, 임파구와 비정형 임파구의 산정은 혈액도말표본을 Giemsa염색하여 McDonald 등[32]을 참고하여 형태적으로 계산하여 백분율로 표시하였다.

Agar-gel immunodiffusion test(AGID) : gP51항원 및 P24항원은 수의과학연구소로 부터 분양받아 사용하였고 AGID시험은 전 등[15~18]의 방법을 응용하여 수행하였다. 약술하면 7% 식염가붕산완충용액에 Noble special agar(Difco. USA)를 0.9%되게 혼합할 겔을 사용하였고 90㎜ 페트리디쉬에 분주한 다음 well의 구경을 5㎜, well간격을 3㎜로 제작하여 사용하였다. 항원과 2배단계 희석한 가검혈청을 각 well에 주입한 후 48시간에 1차 판독하고, 72시간에 최종 판독하였다. 판독 결과 침강대를 나타내는 최종 희석배수의 역수를 항체역가로 표시하였다.

임파구 분리 : Hunt 등[33]의 방법을 응용하였다. 약술하면 헤파린 처리된 말초혈액(1 vol)을 코니컬튜브에든 동량의 Ficoll-Hypaque(64.0g Ficoll, 99.0g sodium diatrizoate, 0.7g NaCl, DW 1ℓ에 혼합 ; specific gravity 1.077g / ㎖)에 혼합되지 않게 중첩시킨 후 700g에서 35분간 원심한 다음 Ficoll-Hypaque과 혈장사이의 임파구층을 채취하여 RPMI 1640(Gibco. USA)배지로 3회 세척하였으며 최종 세포부유액에 대해

0.14% trypan blue로 활성검사를 실시하였다.

합포체세포 형성시험(syncytium assay : SA) : 실험동물의 백혈구로부터 BLV를 검출하기 위해 Onuma 등[34] 및 Honma 등[35]의 방법을 응용하였다. 약술하면 위에서 준비한 임파구를 MEM에 3×10^5cells/㎖ 농도로 조정 부유시켰다. 지시세포인 F81(cat cell containing murine sarcoma virus genome)을 동일 농도로 조정하여 24 multi-well cell culture plate(Falcon, 2.0㎠/well)에 접종하고 CO_2배양기에서 24시간 배양한 다음 상층액을 제거하고 각 well에 DEAE-dextran용액(25㎍/㎖) 0.5㎖을 넣고 37℃에서 1시간 처리한 후 MEM배지로 2회 세척하였다. 그리고 MEM에 0.25% lactalbumin과 polybrene(2㎍/㎖)을 첨가한 배지 1㎖를 가하고 난 후 위에서 준비한 임파구 부유액 1㎖를 각 well에 접종하고 37℃에서 7일간 공동배양한 다음 상층액을 제거하고 methanol로 고정한 후 Giemsa염색을 실시하였다. 합포체세포의 형성은 현미경으로 관찰하였으며, 이때 5개 이상의 핵을 가진 세포가 관찰되면 양성으로 판정하였다. 반응의 특이성은 BLV양성혈청을 임파구 부유액 접종시 10% 농도를 첨가하여 합포체형성저지여부를 관찰하여 확인하였다.

Surface immunoglobulin(sIg)-bearing cell 산정

1) **FITC-conjugated rabbit anti-Korean native goat IgG 제조** : Heide 및 Schwick[36]와 Johnson 및 Holborow[37]의 방법을 응용하여 수행하였다. 즉 정상 흑산양혈청 50㎖에 인산완충식염수(PBS, pH 7.0) 30㎖를 가하고 혼합한 다음 포화유산암모니움[Sat$(NH_4)_2SO_4$] 60㎖를 서서히 가하여 충분히 혼합한 다음 12,000rpm에서 30분간 냉장 원심 침전시킨 후 상층액을 제거하고 PBS 60㎖를 가하여 교반 혼합하였다. 위의 과정을 2회 반복 실시한 후, 최종 침전물에 30㎖의 증류수를 가하여 이 용해 시킨 다음 PBS에서 투석하였으며 최종 단백질 함량은 15.8㎎/㎖이었다. 이 용액에 동량의 Freund's incomplete adjuvant를 혼합한 항원 4㎖를 토끼의 피하에 접종하고 난 다음 5일 간격으로 0.5㎖, 1㎖ 및 2㎖를 이 정맥에 접종한 후 심장채혈하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청으로부터 immunoglobulin을 위와 같은 방법으로 추출하고 총단백량을 측정한[36] 다음 단백량에 비해 fluorescein isothiocyanate(FITC, N.B.CO, USA)를 100:1되게 가하여 6시간 동안 혼합시킨 다음 Sephadex G-25 column을 통과하여 FITC-conjugate를 정제하였다.

2) **직접형광항체 검사** : 준비된 임파구(1×10^7cells/㎖)를 슬라이드글라스에 도말한 후 acetone으로 고정시킨후 FITC-conjugated rabbit anti-Korean native goat IgG를 0.05㎖ 적하하고 습윤상자에 넣고 37℃에서 45분간 반응시켰다. 그 다음 PBS로 3회 세척하고 glycerol 완충용액(pH 8.5)을 놓고 형광현미경(Nikon)을 이용하여 주로 200~400배에서 관찰하였다. 결과는 최소한 100개 세포중 특이 형광을 나타내는 세포의 백분율로 표시하였다.

Rosette forming cell(RFC) 산정 : Hunt[33]와 Paul 등[38]의 방법을 응용하여 다음과 같이 수행하였다. 즉 Alsever's solution에 보관중인 SRBC를 PBS로 3회 원심세척한 다음 침전혈구(1 vol)에 0.05M, 0.1M, 0.15M 및 0.2M로 제조된 α-aminoethylisothio uronium bromide(AET, sigma. pH 9.0)를 4 vol되게 가하고 37℃에서 30분 또는 4℃에서 18시간 반응시킨후 3회 원심세척하고 RPMI 1640 배지를 가하여 4% AET-treated SRBC를 만들었다.

그 다음, 1×10^7cells/㎖ 농도의 백혈구 부유액에 동량의 4% AET-treated SRBC를 가하고 SRBC로 흡착처리된 소태아혈청을 10%되게 가하여 300g에서 10분간 원심하고, 4℃에서 18시간 반응시킨후 조심스럽게 혼합하고 0.14% trypan blue 한방울을 가하고 혈구계산판에 주입한 다음 현미경으로 관찰하였다. 임파구에 부착된 SRBC의 수가 3개 이상일때 RFC양성으로 판정하였다. 결과는 최소한 100개 이상의 임파구에 대한 RFC 양성 세포의 백분율로 표시하였다.

임파구의 nylon wool 처리 : 12㎖ 주사기에 0.6g의 nylon wool(Leucopak, USA)을 5㎖ 눈금까지 채워넣고 MEM(5% FCS가)을 가하고 37℃에서 60분간 균질화시켰다. 그리고 위에서 준비된 임파구(5×10^7cells/㎖) 5㎖를 가한 다음 37℃에서 30분간 반응시킨후 MEM(5% FCS가)을 가하여 서서히(분당 1㎖) 유출한 15㎖로 부터 non-adherent cell을 수확하였다. column을 다시 20㎖ MEM으로 서서히 씻고 난 후, 5㎖의 MEM을 가하고 마개로 압력을 가하면서 나머지 세포를 유출시켰으며 이 과정을 3회 반복하여 얻어진 세포를 합하여 adherent cell로 하였다.

Tumor-associated antigen(TAA) 양성 세포 산정

1) 간접형광항체법 : Aida 등[39] 및 Onuma 등[40]의 방법을 응용하여 수행하였다. 약술하면 준비된 임파구를 슬라이드글라스에 도말하고 acetone으로 고정한 다음 북해도대학 오누마박사로부터 분양받은 BL-TAA에 대한 C-143 Mab를 0.05㎖ 적하하고 37℃에서 45분간 반응시킨 다음 PBS로 3회 세척하고 FITC-conjugated anti-mouse IgG goat serum(Cappel Lab, USA)를 0.05㎖ 적하하고 37℃에서 45분간 반응시킨 다음 PBS로 세척하고 형광현미경에서 관찰하여 특이형광을 나타내는 세포수를 산정하였다. 최소한 100개 이상의 세포중 특이형광을 나타내는 세포의 백분율을 계산하였다.

2) 보체의존성항체 세포독성(complement dependent antibody cytotoxicity : CDAC)시험 : Aida 등[39] 및 Onuma 등[40]의 방법을 응용하였다. 약술하면 준비된 임파구 25㎕와 C143 Mab 25㎕ 그리고 토끼보체 25㎕를 u-bottomed microplate(96 well, Linbro Co, USA)에 혼합시킨 후 37℃에서 45분간 감작시키고 50㎕의 0.14% trypan blue용액을 가한 즉시 혈구계산판을 이용하여 최소한 100개 세포에 대한 viability를 계산하였다. 토끼보체는 표적세포에 대해 5% 이하의 자가용해를 나타내는 것을 공시하였으며 매 시험마다 보체와 C143 Mab에 대한 대조를 두었다. 최종성적은 다음 공식에 의해 산출하여 Cytotoxicity index(CI)치가 33이상일 때 BL-TAA양성으로 판정하였다.

$$\text{Cytotoxicity index(CI)} = \frac{\%\text{ viable cells in control well} - \%\text{ viable cells in TAA-Mab}}{\%\text{ viable cells in control well}} \times 100$$

결과 및 고찰

BLV 항체가 변동 : gP51항원에 대한 AGID 항체가는 BLV접종후 2개월째에 상승하여 No 1, No 3 및 No 4는 2였고 No 2는 의양성이었으며, 4개월에는 4두 공히 2~4의 역가를 나타내었고 그 후 증가추세를 보여 최고 32에 달하였으며 27개월에는 2~32의 역가를 보였다. P24에 대한 항체가는 BLV접종후 4개월에 처음 양전반응이 인정되었고 6개월에 1~2의 항체역가를 보였다. 그 후 No 1과 No 2 산양은 지속적으로 1~2의 낮은 역가를 나타내었다. No 3은 12개월 이후부터 음성반응을 보였고 No 4는 8개월에 다소 감소하다

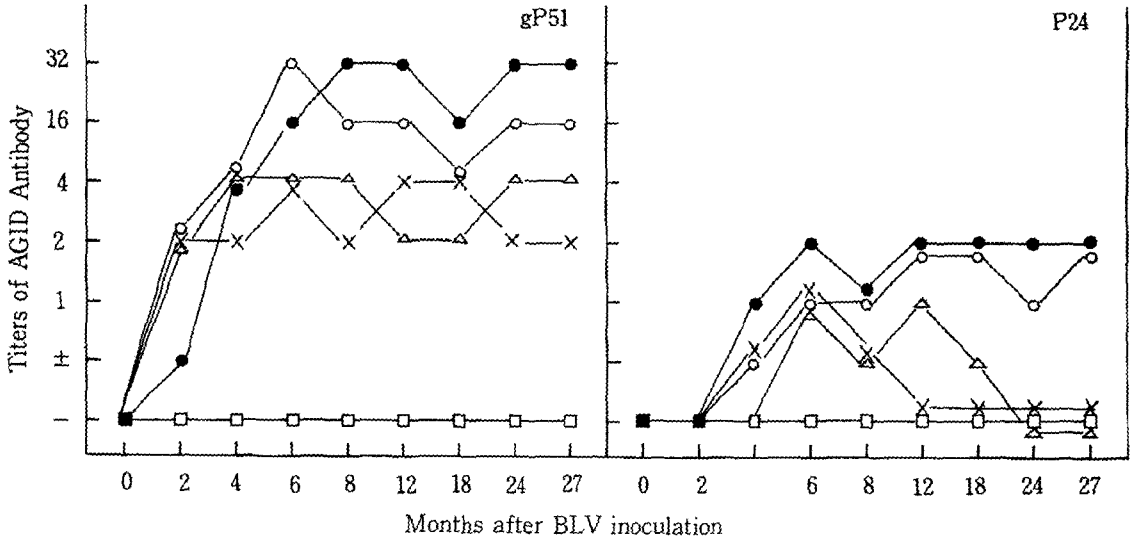

Fig 1. changes in agar-gel immunodiffusion(AGID) antibody titers to glycoprotein(gP51) and core antigen(P24) of BLV in Korean native goats inoculated with BLV

○ : No 1 ● : No 2 : animals inoculated ip and sc with FLK-BLV cells

× : No 3 △ : No 4 : animals inoculated ip and sc with the leucocyte from BLV-infected cattle

□ : No 5 & 6 : non-infected control

가 24개월에는 음성이었다.(그림 1)

조 등[31]은 BLV를 한국재래산양에 접종후 glycoprotein과 core protein이 혼합된 항원으로 AGID를 실시하여 항체가를 조사한 바 8~16배의 역가를 관찰하였으며 동물개체간에 항체역가의 차이가 있음을 보고한 바 있다. 본 시험에서는 BLV의 envelope유래 51,000Da의 gP51항원과 core protein인 24,000Da의 P24항원을 이용하여 AGID를 실시한바[41] gP51항원에서 높은 항체가가 장기간 관찰되었고 P24항원은 낮고 불규칙하였다. 이와같은 결과는 Onuma 등[3]이 소를 모델로하여 제시한 gP51 및 P24 항체소장 패턴과 일치하였고, Suneya 등[42]이 양에서 수행한 성적과 비교한 바, P24항원에 대한 항체가가 늦게 형성되고 조속히 소멸되는 면양의 항체형성 모형과 유사하였다. 본 시험결과 gP51 및 P24항원에 대한 항체 수준은 동물개체간에 차이가 있었고 특히 P24에 대한 항체수준에 개체변동이 심한 것은 다른 동물접종시험에서도 지적된 것으로 감염된 BLV의 생체내 증식환경이 다르기 때문이라 사료된다.[3, 38]

합포체세포 형성능 : BLV에 실험감염된 산양 임파구의 합포체 형성능을 조사한 바 표 2와 같았다. No 1과 No 2 산양은 BLV감염후 4개월 및 2개월에 각각 양성반응을 나타내었고 No 3과 No 4는 공히 4개월부터 양성반응을 보였으며, 그 후 No 1이 8개월째에 일시적 음성반응을 보인 것을 제외하고는 전 기간중 모든 BLV접종 산양은 양성반응을 나타내었다. 대조군(No 5 및 No 6)은 전 기간중 합포체세포 형성 음성이었다.

합포체세포 형성은 BLV의 세포 융합능에 의해 형성되는 것으로서 동물체내에 감염된 BLV를 검

색하기 위한 방법으로 널리 이용되어 왔으며[43~44] 지시세포로는 bovine embryonic spleen cell, bovine embryonic thymic cell, F81 및 SF28 등이 이용된 바 있으나 F81 세포가 보편적으로 응용되고 있다.[15, 42~45] 본 실험에서 BLV 감염된 산양의 말초임파구가 F81에서 지속적으로 합포체 세포 형성을 하고 (그림 1)에서 제시한 바와 같이 BLV에 대한 항체형성이 된다는 사실로 볼 때 BLV에 실험감염된 산양은 말초백혈구중에 BLV를 보유하고 있음이 입증되었다. 또한 합포체세포 형성능은 접종후 4~6개월에 높게 나타났으며 12개월이후에는 감소하여 백혈구중에 감염된 BLV가 소실되고 있는 경향을 나타내어 BLV의 병인기전과 연관하여 더욱 추시해 보아야 할 소견이라 사료된다.

백혈구상의 변동 : 실험동물에 대한 총백혈구

Table 2. Syncytium assay for the peripheral leucocyte from Korean native goats experimentally infected with bovine leukemia virus

Goat No	Treatment	Months after inoculation							
		0	2	4	6	8	12	18	24
1	BLV-inoculated	−	−	+++	++	−	+	++	+
2	BLV-inoculated	−	+	++++	++	+	+	+	+
3	BLV-inoculated	−	−	++	+++	++	NT	++	+
4	BLV-inoculated	−	−	+	++	+	NT	+	+
5	control	−	−	−	−	−	−	−	−
6	control	−	−	−	NT	−	−	−	−

Syncytium formation in each well : − ; 0, + ; 1~25, ++ ; 26~50, +++ ; 51~75, ++++ ; >75
NT : not tested

수와 임파구의 변동상태를 시험한 결과는 (그림 2)와 같았다. No 1 산양은 전 기간동안 정상대조군 수준(총백혈구수 : 10,569~16,938cells/㎕, 임파구수 : 4,863~8,974cells/㎕)의 총백혈구와 임파구상을 보였고, No 2는 BLV접종후 18개월 및 21개월에 총백혈구와 임파구가 일시적으로 증가하였으나 그 후 정상 수준으로 복귀하였다. No 3은 15개월째부터 총백혈구 및 임파구가 지속적으로 증가하여 24개월에 총 백혈구수는 22,680 cells/㎕, 임파구수는 15,653cells/㎕에 달하였으며 No 4는 정상 대조군 수준의 백혈구상을 나타내었다.

시험기간중 비정형임파구의 출현빈도를 조사한 바 (표 3)과 같았다. 비정형임파구 출현빈도(%)는 BLV를 접종한 No 1은 2.7~5.6%, No 2는 3.0~22.5%, No 3은 3.2~28.9%, No 4는 3.9~5.1%이었고 비접종 대조군은 각각 2.7~5.2% 및 2.7~4.2%이였으며 No 2와 No 3은 대조군에 비해 높은 수치를 나타내었고 시기별로는 18개월 및 24개월에서 현저한 증가추세를 보였다.(그림 1)

최[46]는 12개월령된 한국재래산양의 정상 혈액학치에 대해 연구한 결과 총백혈구수는 7,900~15,600/㎕(평균 : 11,470±410/㎕) 그리고 말초혈액중 임파구수는 6,324±462/㎕이었다고 보고

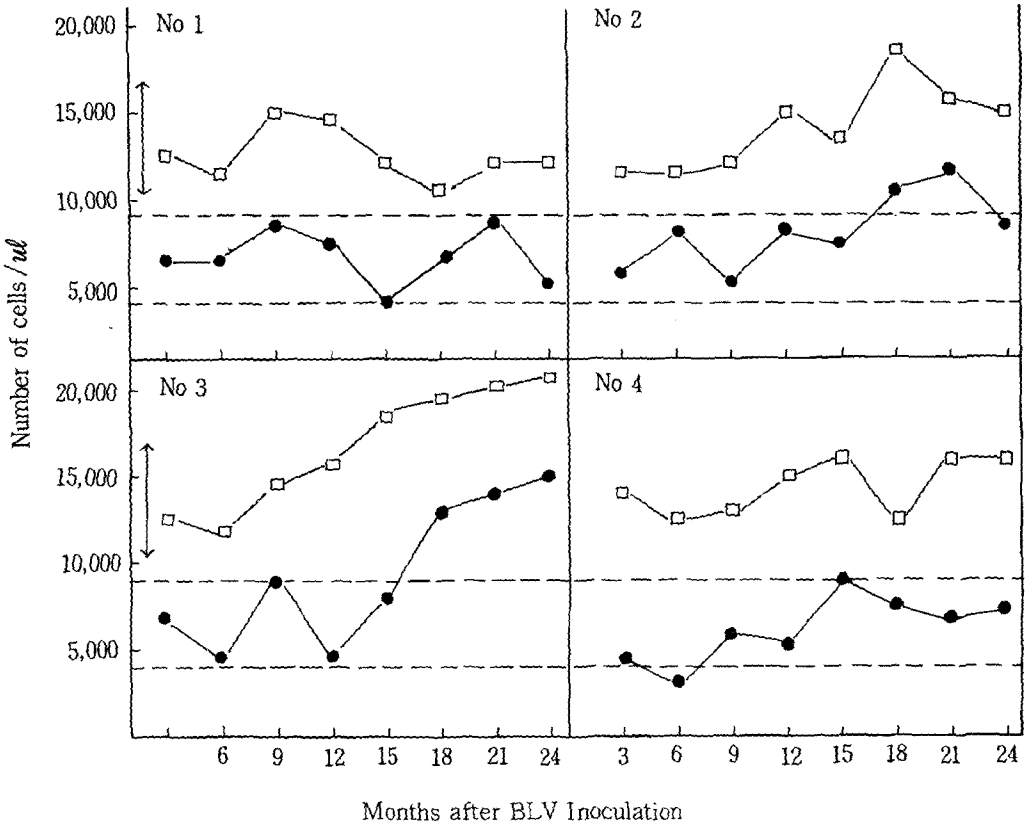

Fig 2. Changes of the number of white blood cells(□) and lymphocyte(●) in peripheral blood of the Korean native goats experimentally infected with BLV.

↕ : Range of No. of WBC in control animals.

✳ : Range of No. of lymphocytes in control animals.

Data represent the mean of triplicate trials.

하였으며, 최근 이 등[47]은 총백혈구는 11,500±2,100/*ul* 그리고 임파구수는 5,743±1,627/*ul*라고 보고하였다.

소나 양이 BLV에 감염되었을 때 70% 정도가 임파구증가증과 비정형임파구 증가소견을 나타내며 이중 5%가 임상소견을 나타낸다고 보고된 바 있으며 이러한 백혈구상의 변화는 면역학적 진단법이 개발되기전 소백혈병의 진단법으로 널리 응용되었다.[1,3,4,7] 혈액학적 진단법에 기준이 되는 Bendixen Key에 의하면 소의 연령에 따라 다르나 4세이상 소에서 절대임파구수가 7,000/*ul*이상이고 비정형임파구수가 증가되면 본 병 양성으로 판정한다.[1,4] 한국재래산양에서는 이와 관련된 연구가 없기 때문에 기준을 설정하기 어렵지만 위 실험결과 No 3 산양은 15개월이후 총백혈구수, 임파구수 및 비정형 임파구가 지속적으로 유의하게 증가하였고, No 2 산양은 18 및 21개월에 일시적인 증가소견을 나타내어 No 2는 확진하기 곤란하나 No 3은 혈액학적으로 백혈병 소인이 있는 것으로 간주되었다.

Table 3. Distribution of atypical lymphocytes in the peripheral blood of Korean native goats experimentally infected with bovine leukemia virus.

Goat No	Treatment	Months after BLV inoculation				% Range
		6	12	18	24	
1	Inoculated	2.7*	5.6	4.1	4.8	2.7 − 5.6
2	Inoculated	3.7	3.0	11.8	22.5	3.0 −22.5
3	Inoculated	5.5	3.2	19.4	28.9	3.2 −28.9
4	Inoculated	4.6	4.3	5.1	3.9	3.9 − 5.1
5	Control	5.2	2.8	2.7	4.7	2.7 − 5.2
6	Control	4.2	3.6	2.7	2.7	2.7 − 4.2

* The numbers represent the mean percentage of atypical lymphocyte in the peripheral blood calculated by triplicate counting.

로제트형성 세포(RFC) 및 sIg-beraring cell의 분포

1) **AET 처리조건** : 면양적혈구의 AET처리에 따른 한국재래 흑산양 임파구의 로제트형성 효과를 AET농도별 처리온도와 시간에 따라 시험한바 (표 4)와 같은 결과를 얻었다. 37℃에 30분 처리시 0.1M AET에서 25.6±8.3%로 가장 높았고, 다음은 0.15M에서 24.7±7.9% 그리고 0.05M에서 18.4±4.7%순이었다. 4℃에서 18시간 작용시켰을 때는 0.05M에서 12.6±4.2%, 0.1M에서 7±6.8%로서 37℃에서 30분간 처리시보다 현저히 낮았다.(그림 2)

Table 4. Effects of treatment of sheep erythrocyte with various concentration of α-aminoethylisothiouronium bromide(AET) on rosette formation of peripheral lymphocyte of normal Korean native goats

Concentration of AET	Incubation	
	37℃	4℃
	30 min	18 hrs
None	1.7±1.2*	1.8±2.0
0.05M	18.4±4.7	12.6±4.2
0.1 M	25.6±8.3	16.7±6.8
0.15M	24.7±7.9	18.1±8.6
0.2 M	14.2±5.1	7.3±5.3

* Mean percentage±SD of rosette formation after counting minimum 100 lymphocyte from 3 animals.

2) **Nylon wool 처리효과** : Nylon wool column처리에 따른 정상 산양 임파구아집단의 분포는 (표 5)와 같다. 말초임파구를 nylon wool처리시 sIg-bearing cell의 수는 nylon wool 부착된 세포에서 현저히 높아 81.4% 및 87.1%로 나타났고, 비부착된 세포에서 1.2% 및 2.7%로 낮았다. 반면에 RFC의 수는 nylon wool부착된 세포에서는 2.4% 및 1.6%로 낮았고 비부착된 세포에서는 74.6% 및 82.7%로 높았다.

3) **RFC 및 sIg-bearing cell의 변동** : BLV

Table 5. Detection of sIg-bearing and rosette forming cells in unfractionated and nylon wool column fractionated peripheral blood lymphocyte from Korean native goats.

Goat* No	Lymphocyte population	Percentage of cells	
		sIg^+	RFC
5	PBL	24.7	22.1
	Nylon-adherent	81.4	2.4
	Non-adherent	1.2	74.6
6	PBL	29.4	26.4
	Nylon-adherent	87.1	1.6
	Non-adherent	2.7	82.7

* Normal healthy goat.

sIg^+=surface immunoglobulin-bearing lymphocytes.

RFC=rosette forming cells with AET-treated sheep erythrocytes.

PBL=peripheral blood lymphocyte.

접종후 6, 12, 18 및 24개월째에 sIg-bearing cell(Photo 3, A)과 RFC의 변동을 조사한 바 Table 6과 같은 결과를 얻었다. 시험기간중 No 1 산양의 sIg-bearing cell 및 RFC는 24.8~27.3% 및 23.8~26.3%, No 4의 sIg-bearing cell 및 RFC는 25.6~29.4% 및 19.9~22.5%로 현저한 변동이 인정되지 않았다. 그러나 No 2는 sIg-bearing cell이 24개월에 55.2%로 접종전에 비해 현저히 증가하였고 RFC는 18개월까지 18.6~20.1%로 유의한 변동이 없었으나 24개월에는 11.2%로 상대적인 감소를 보였다. No 3은 sIg-bearing cell이 18 및 24개월에 각각 49.0% 및 53.7%로 접종전에 비해 증가하였고 RFC는 18 및 24개월에 8.9% 및 9.6%로 감소하였다.

말초임파구에 대한 RFC 및 sIg-bearing cell의 측정은 숙주의 T 및 B임파구 아집단의 분포를 산정하고 면역-혈액학적 상태를 측정하기 위해 널리 응용되고 있다.[32, 38, 48~50]

이러한 기법은 동물종, 실험조건, T 및 B임파구 이외의 단핵구 및 다형핵백혈구등의 비특이반응에 따라 수치에 다소 차이를 일으킬 수 있지만 전체적인 경향을 알아보는데는 통용되고 있다.[48~51]

본 시험에서는 FITC-conjugated rabbit anti-Korean native goat IgG를 이용한 직접 형광항체시험에서 얻어진 sIg-bearing cell과 SRBC를 이용한 rosotte test의 결과를 확인하기 위해 ny-

lon wool column을 이용하여 확인한바, adherent cell에서 sIg-bearing cell의 비율이 증가하고 non-adherent cell에서 RFC의 비율이 증가하여 sIg-bearing cell은 B-임파구 그리고 RFC는 T-임파구를 주로 측정하였음을 알 수 있었다.

Muscoplat 등[49]은 정상우 임파구 중 sIg-bearing cell은 28%, BLV에 감염되어 임파구 증가증을 보이는 소는 63%라 보고했고, Weiland 및 Straub[50]는 정상우에서 18%, BLV에 감염되어 임파구증가증을 보인 소에서는 67%이라 하였고, Kenyon 및 Piper[51]는 정상우군은 15~30%, 임파구증가증을 보인 백혈병우군은 54~76%의 sIg 양성 분포를 관찰했다고 보고하였으며, 일반적으로 정상우에서 25~35%, 백혈병우군에서 43~65%의 sIg-bearing cell분포를 보이고 있다.

또한 Paul 등[38]은 정상소의 RFC는 38.5~88.0%, sIg-bearing cell은 5.0~23.3% 그리고 BLV에 감염되어 임파구증가증 소견이 있는 우군은 RFC가 34.7±12.7% 그리고 sIg-bearing cell은 58.8±10.4%여서 BLV감염우에서 sIg-bearing cell의 분포가 높아졌음을 지적하였다.

본 시험 결과(표 6) No 2와 No 3의 산양에서 sIg-bearing cell의 분포 비율이 현저하게 증가된 것은 말초임파구 중 B-임파구의 증가에 기인된 것을 시사하며 이와같은 변동은 이 동물이 혈액학적으로 백혈병소견을 나타낸 증거라고 사료되었다.[1,3,6,38,51]

한편 본 시험에서 정상 산양임파구의 RFC의 분포는 18.3~26.4%(표 4,5, 및 6)으로 사람, 마우스, 소등에 비해 현저히 낮게 나타나 산양 T-임파구 측정을 위한 로제트시험법의 개선을 위한 추가시험이 요망된다.

BL-TAA 양성 임파구 검출 : BL-TAA에 특이하게 반응하는 C143 Mab를 이용한 간접형광항체 시험결과 No 1과 No 4 그리고 대조군(No 5 및 No 6) 산양은 모두 음성이었다. 그러나 No 2는 접종후 18 및 24개월에 각각 19.1% 및 34.8%의 양성반응을 보였고(Photo 3, B), No 3은 12, 18 및 24개월에 각각 18.7%, 36.2% 및 31.6%의 양성반응을 나타내었다. 또한 C143을 이용한 CDAC에서는 No 1은 18 및 24개월에 각각 39.1% 및 48.5%, No 2는 57.4% 및 60.8%, No 3은 12, 18 및 24개월에 각각 43.2%, 54.7% 및 68.6% 그리고 No 4는 24개월에 46.2%의 양성반응을 나타내었으며 대조군은 모두 음성이었다.

C143 Mab는 Aida 등[39]에 의해 제조된 것으로 IgG2b의 성상을 가지며 74kDa의 BL-TAA에 특이하게 반응하는 항체로서 이를 이용한 간접형광항체법과 CDAC법으로 백혈병성 말초임파구를 검색할 수 있으며 그 특이성과 응용성이 매우 높은 것으로 보고된 바 있다.[22,39,40] 본 실험(표 7)에서 C143 Mab를 이용한 간접형광항체 시험에서 No 2와 No3이 유의한 양성반응을 보여 말초임파구가 종양화 되었음이 입증되었다. 또한 CDAC에서는 No 2와 No 3은 높은 양성율을 보였고 No 1과 No 4는 다소 낮지만 역시 유의한 양성반응을 보였다.[39~40]

CDAC에서는 토끼보체에 기인된 자가세포독성 때문에 가양성 반응이 나올 수 있으므로 양성기준을 CI 33% 이상으로 하고 있다. 그러므로 No 1과 No 4에서 관찰된 48.5% 및 46.2%가 얼마나 유의한 것인지를 확정하기 위해서는 더욱 긴 관찰기간이 요망된다.

C143 Mab를 이용하여 BLV에 감염되고 임파구증가증을 보이는 소에서 CDAC로 측정한 결과는 51.9~75.8%등으로 보고된 바 있으므로[22,40] No 2와 No 3의 양성율은 의의가 있는 것으로 판단된다.

이상 일련의 결과를 종합해 볼 때 BLV에 인공감염된 재래산양 4두중 2두는 접종후 12~24개월

Table 6. Distribution of sIg-bearing and rosette forming cells in the peripheral blood lymphocyte in Korean native goats experimentally infected with bovine leukemia virus

Goat No	Treatment	Months after BLV inoculation									
		0		6		12		18		24	
		sIg^+	RFC	sIg^+	RFC	sIg^+	RFC	sIg^+	RFC	sIg^+	RFC
1	BLV-inoculated	25.8	21.4	27.1	23.8	24.8	26.3	26.9	24.1	27.3	24.7
2	BLV-inoculated	24.2	20.7	29.6	19.8	25.2	18.6	27.7	20.1	55.2	11.2
3	BLV-inoculated	28.8	18.3	NT	NT	28.4	17.4	49.0	8.9	53.7	9.6
4	BLV-inoculated	25.7	22.3	NT	NT	25.6	19.9	28.8	22.5	29.4	21.7
5	control	22.2	21.4	25.6	23.7	24.3	23.1	27.8	24.4	25.9	22.4
6	control	NT	NT	NT	NT	26.6	29.7	25.3	30.2	23.6	26.1

sIg^+=% surface immunoglobulin-bearing cells.
RFC=% rosette forming cells with AET-treated sheep erythrocyte.
NT : not tested

Table 7. Detection of bovine leukosis tumor-associated antigen from peripheral blood lymphocyte of Korean native goats using immunofluorescent and complement dependent antibody tests with monoclonal antibody

Goat No	IFA				CDAC			
	6*	12	18	24	6	12	18	24
1	−	−	−	−	−	−	+ (39.1)	+ (48.5)***
2	−	−	+ (19.1)	+ (34.8)**	−	−	+ (57.4)	+ (60.8)
3	−	+ (18.7)	+ (36.2)	+ (31.6)	−	+ (43.2)	+ (54.7)	+ (68.6)
4	−	−	−	−	−	−	−	+ (46.2)
5	−	−	−	−	−	−	−	−
6	−	−	−	−	−	−	−	−

* Months after BLV inoculation.
** Percentage of positive cells from 100 cell counting(Photo 3, B).
*** Cytotoxicity index expressed viability of the lymphocyte following treatment with the monoclonal antibody.
IFA=indirect immunofluorescent antibody test using monoclonal anti-body against bovine leukosis tumor-associated antigen.
CDAC=complement dependent antibody test using monoclonal antibody against bovine leukosis tumor-associated antigen.

에 백혈병성 혈액소견을 나타낸 것으로 사료된다.

결 론

Bovine leukemia virus(BLV)의 한국재래산양에 대한 병인기전을 구명하기 위해 BLV를 실험감염시킨 한국재래산양에 대해 아가겔면역확산법(agar-gel immunodiffusion test) 및 합포체세포 형성시험으로 감염상태를 시험하고 총백혈구, 임파구 및 비정형임파구수의 변동 및 surface immunoglobulin(sIg)-bearing cell과 rosette forming cell(RFC)의 변동을 조사하였다. 또한 소백혈병 종양항원(BL-TAA)에 특이하게 반응하는 monoclonal antibody(Mab)를 이용하여 말초임파구중 소백혈병 종양항원 양성세포의 변동상태를 시험한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. BLV 실험감염 산양의 혈청 중 BLV항체 수준을 gP51 및 P24항원을 이용한 AGID로 시험한 바 gP51에서는 접종후 2개월부터 양전반응이 일어났으며 항체가는 27개월의 관찰기간중 2~32의 역가를 보였고 반면에 P24항원에서는 접종후 4개월에서 양전반응이 인정되었으며, gP51에 비해 낮은 항체가를 보였다.

2. 말초임파구의 합포체세포 형성능시험에서 BLV에 실험감염된 4두는 접종 4개월이후 모두 양성반응을 나타내었다.

3. 총백혈구수, 임파구수 및 비정형임파구수의 변동상태를 시험한 바 대조군에 비해 BLV에 실험감염된 4두중 2두는 정상이었고, 나머지 2두중 No 2는 접종후 18개월 및 21개월에 각각 일시적인 증가를 보였고 No 3은 지속적인 증가수치를 나타내었다.

4. 말초임파구의 로제트형성능은 면양적혈구를 0.1M α-aminoethylisothio uranium bromide (AET)로 37℃에서 30분간 처리시 높았으며, sIg-bearing cell의 분포는 nylon wool 부착세포군에서 그리고 RFC의 분포는 nylon wool 비부착세포군에서 높았다. 또한 sIg-bearing cell의 수는 임파구증가증을 나타낸 No 2와 No 3에서 높게 나타났다.

5. C143 Mab를 이용하여 BL-TAA 양성 세포를 간접형광항체법으로 시험한 바 No 2와 No 3은 접종후 12개월 및 18개월에 각각 양성반응을 보였으며, CDAC시험에서는 접종후 12개월 부터 양성반응이 인정되어 24개월에는 모두 양성반응을 보였으며 양성율은 No 2와 No 3에서 현저히 높았다.

Legends for photos

Photo 1. Atypical lymphocytes(arrows) in the peripheral blood of the Korean native goats experimentally infected with bovine leukemia virus. Giemsa stain. A : 400×, B : 1,000×.

Photo 2. Various patterns of rosette-formation(arrows) of the peripheral lymphocyte of Korean native goats. the mixtures of the lymphocyte and 0.1M AET-treated sheep erythrocyte were reacted for 18hrs at 4℃. 400×.

Photo 3. Immunofluorescence patterns of sIg-bearing cells and bovine leukosis TAA-positive lymphocytes. A : The acetone-fixed peripheral blood lymphocytes of the goats under experiment were directly applied with FITC-conjugated rabbit anti-goat IgG. The surface immunoglobulins with capping and patching are shown(×400). B : By using BL TAA-specific Mab, the acetone-fixed lymphocytes were tested by indirect immunofluorescence procedures. BL-TAA on the lymphocytes of the goat No 2 and No 3 were evidently detected(×800).

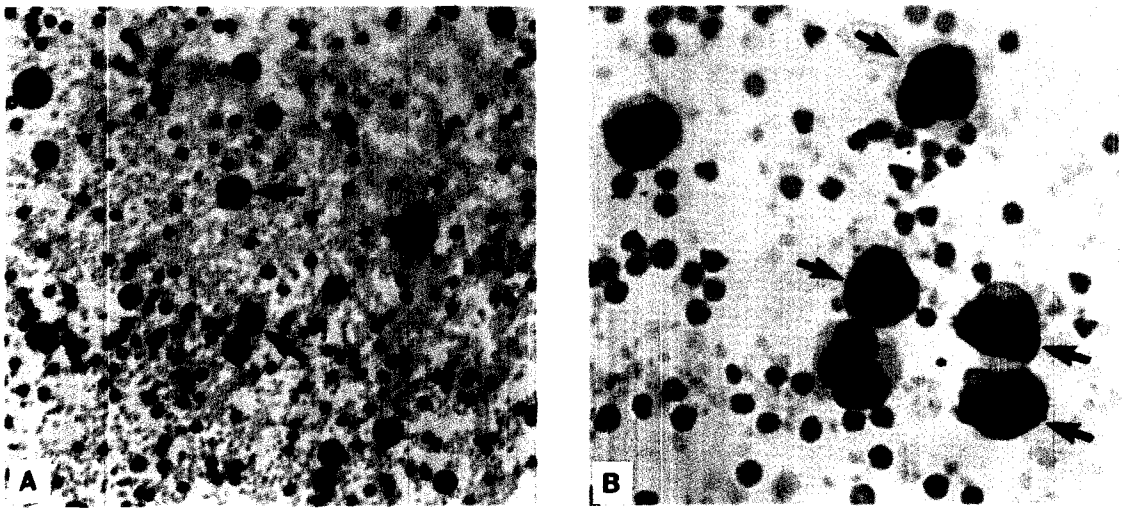

Photo 1.

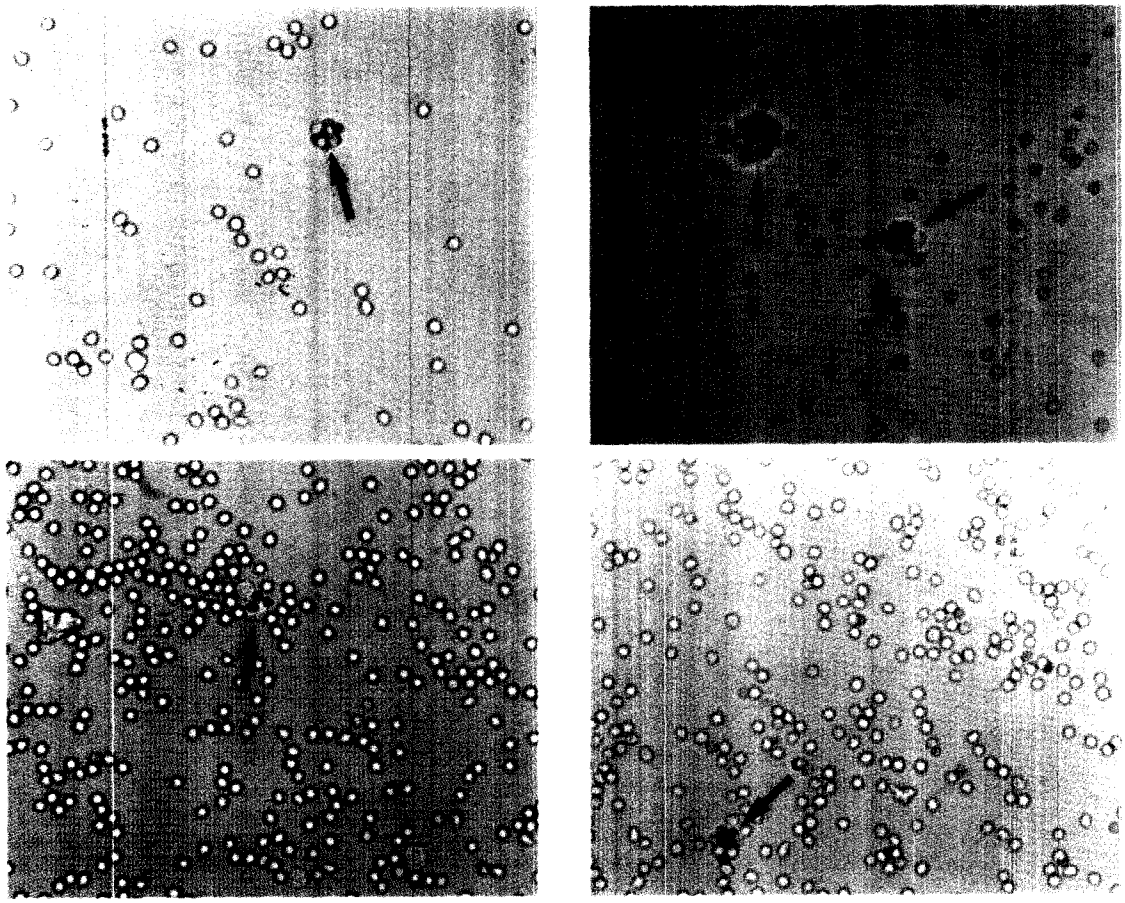

Photo 2.

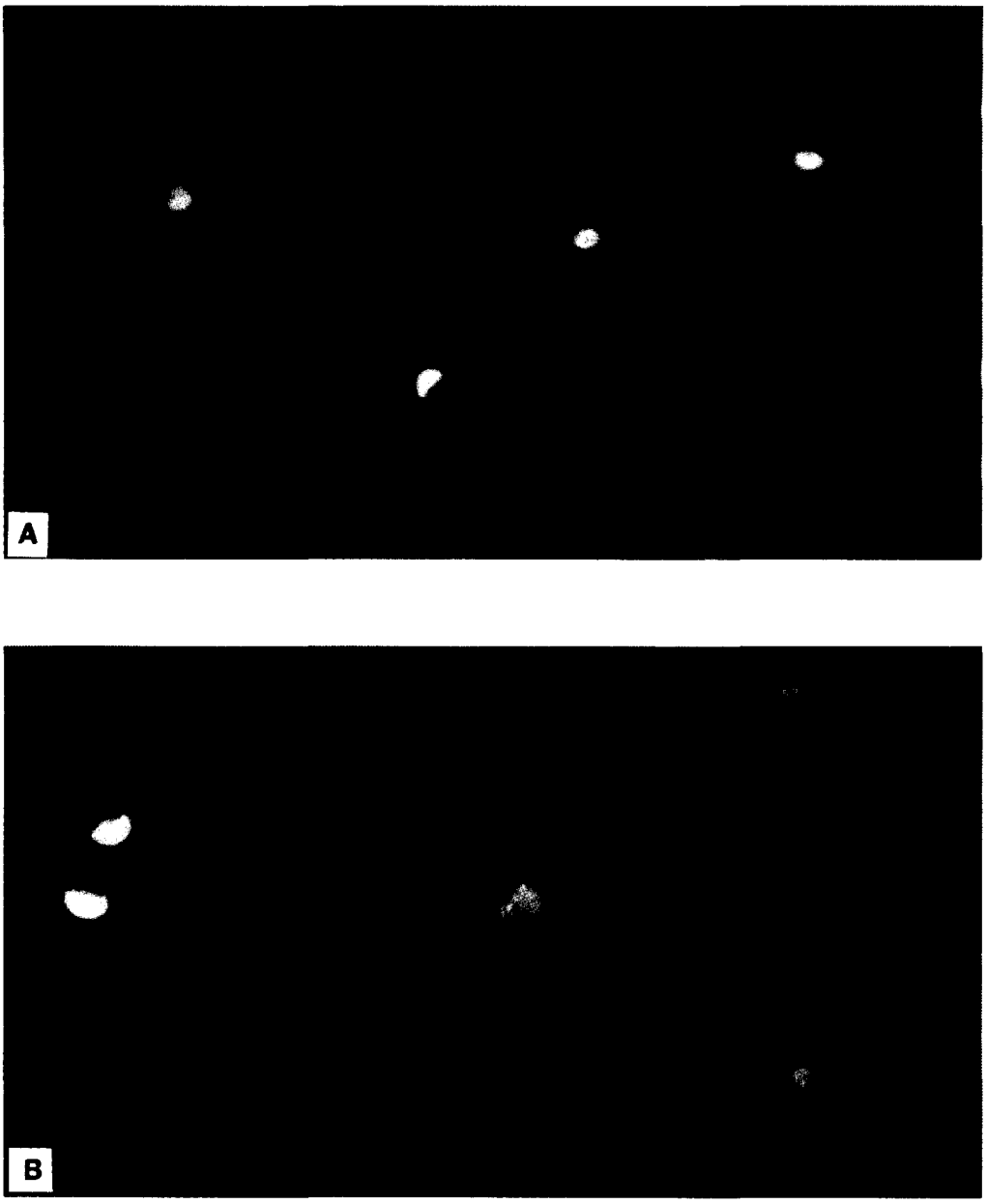

Photo 3.

참 고 문 헌

1. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, et al. 1988. Enzootic bovine leukosis. *In Hagan and Burner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic animals.* comstock Pub Ass London : 867~871.
2. Pritchett RF. 1990. Retroviridae, Bovine leukemia virus. *In Review of Veterinary Microbiology* edited by Biberstein EL and Zee YC, Blackwell Scientific Pub Inc Boston. 573~576.
3. Onuma M. 1985. Bovine leukemia virus. *Progress in Veterinary Science in Japan.* 107~142.
4. Jun MH. 1980. Bovine lymphosarcoma. *A Review Kor J Vet Publ Hlth.* 4(1):31~37.
5. Kim DH. 1985. Clinical and cytomorphological studies on bovine leucosis. *Kor J Clin.* 2(1) :1~26.
6. Theilen GH, Madewell BR. 1979. Leukemia-Sarcoma disease complex, in Veterinary Cancer Medicine, edited by Theilen GH and Madewell, BR Lea & Febiger, Philadelphia. 204~302
7. Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, et al. 1989. Bovine leukemia virus : Fact and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. In : *Retroviruses Biology and Human Diseases,* edited by Gallo R.& Wong-Staal F Marcel Dekker, NY. 9~32.
8. Sagata N, Yasanaga T, Tsuzuku-kawamura J, et al. 1985. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus : Its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc Natl Acad Sci* USA. 82 : 677~681.
9. Paul PS, Pomeroy KA, Johnson DW, et al. 1977. Evidence of the replication of bovine leukemia virus in the B lymphocytes. *Am J Vet Res.* 38(6) : 873~876.
10. Kettman R, Deschamps J, Cleuter Y, et al. 1982. Leukomogenesis by bovine leukemia virus : Proviral DNA integration and lack of DNA expression of viral long terminal repeat and 3'proximate cellular sequences. *Proc Natl Acad Sci* USA. 79 : 2465~2469.
11. Portetelle D, Limbach K, Burny A, et al. 1991. Recombinant Vaccinia virus expression of the bovine leukemia virus envelope gene and protection of immunized sheep against infection. *Vanccine.* 9 : 194~200.
12. Rice NR, Stephens RM, Burny a, et al. 1985. The gag and pol genes of bovine leukemia virus nucleotide sequence and analysis. *Virol.* 142 : 357~77.
13. 손제영, 김교준. 1968. Bovine lymphosarcoma(enzootic bovine Leukosis)에 관한 연구. Bovine lymphosarcoma에 관련한 대구 및 충남지방 유우군에 대한 혈액학적조사. 대한수의학회지. 8 : 31~40.
14. Jun MH. 1982. Epizootiological aspects of bovine leucosis in Korea. Food & Fertilizer Technology center. *Taiwan Tech Bull.* 62 : 1~23.

15. Kono Y, Sent sui H, Arai K, et al. 1983. Serological methods to detect calves infected in utero with bovine leukemic virus. *Jpn J Vet Sci.* 45(4) : 453~461.
16. Jun MH, Chung UI, Lee CK, et al. 1982. Seroepizootiological study on bovine leucosis in Korea, *Kor J Vet Res. 22 : 175~185.*
17. 전무형, 정운익, 이창구 등. *1981.* 소 백혈병*(Bovine Lymphosarcoma)*에 관한 연구
Ⅰ. 혈액학적 진단과 면역확산법에 의한 혈청학적 진단의 상호관계, 농진청·농사시험연구보고. *23 (L/V) : 95~100.*
18. 전무형, 정운익, 이창구 등. *1982.* 소 백혈병*(Bovine Lymphosarcoma)*에 관한 연구
Ⅱ. 유우의 소 백혈병 바이러스 항체분포조사, 농진청, 농사시험연구보고. *24(L/V) : 93~98.*
19. 전무형, 정운익, 안수환 등. *1983.* 소 백혈병에 관한 연구, Ⅲ. 소백혈병 바이러스 항원(진단액)생산 및 성상에 관한 연구. 농진청, 농사시험연구보고. *25(L/V) : 68~74.*
20. 김찬주, 손제영, 고기환. *1990.* 축우의 유행형(지방병성) 백혈병에 관한 연구 Ⅰ. 한유우군의 우백혈병 바이러스 항체와 혈중 임파구의 변동에 관하여. 대한수의학회지. *30(3) : 333~341.*
21. 김우호, 라창식, 안수환 등. *1992.* 소 백혈병 *provirus DNA*의 *PCR*법에 의한 증폭 및 *ECL*법에 의한 검출에 관한 연구. 대한바이러스학회지. *22(1) : 1~12.*
22. 전무형, 김덕한, 최영도 등. *1992. Monoclonal Antibody*를 이용한 *Enzootic Bovine Leucosis Virus* 유래 소백혈병 종양항원에 관한 연구. 대한바이러스학회지. *22(2):129~138.*
23. *Olson C, Miller JM, Hoss HE. 1974. Transmission of lymphosarcoma from cattle to sheep. J Natl Cancer Inst.* 49:1463~1467.
24. Ressang AA, Baars JC, Calafat J, et al. 1976. Studies on bovine leukaemia.
Ⅲ. The hematological responses of sheep and goat to infection with whole blood from leukaemic cattle. *Zent Vet Med(B).* 23:662~668.
25. Van Der Maaten MJ, Miller JM. 1976. Induction of lymphoid tumors in sheep with cell-free preparation of bovine leukemia virus. *Bibl Haemat.* 43:377~379.
26. Hoss HE, Olson C. 1974. Infectivity of bovine C-type(leukemia)virus for sheep and goats. *Am J Vet Res.* 35:633~637.
27. Van Der Maaten MJ. 1976. Serological evidence of transmission of bovine leukemia virus to chimpanzees. *Vet Microbiol.* 1:351~357.
28. Bansal MP, Singh KP. 1980. Infectivity of bovine leukemia virus to rabbits, lambs, rats. *Curr Sci.* 49:567~569.
29. Onuma M, Wada M, Yasutomi Y, et al. 1990. Suppression of immunological responses in rabbits experimentally infected with bovine leukemia virus. *Vet Microbiol.* 25:131~141.
30. Mammericks M, Portetelle D, Burny A. 1981. Experimental cross-transmission of bovine leukemia virus(BLV) between several animal species. *Zentralbl Veterinaermed Reihe B. 28:69~81.*

31. 조용성, 전무형, 장경수 등. 1993. Bovine Leukemia Virus의 한국재래산양에 대한 감염성 I. Bovine Leukemia Virus에 실험감염된 한국재래산양의 항체반응과 Syncytium Assay. 대한바이러스학회지. 23(2):153~163.
32. McDonald GA, Dodds TC, Cruickshak B. 1980. *Atlas of haematology*. 4th Ed. Churchill Livingstion NY.
33. Hunt SV. 1978. Separation of lymphocyte subpopulations. *In Handbook of Experimental Immunology*. 3rd Edition, edited by D M Weir, Blackwell scientific publication. 24.1~24. 26.
34. Onuma H, Watarai S, Sonoda H, et al. 1980. Detection of bovine leukemia virus by syncytium assay. *Can J of Comp Med*. 44(3)289~293.
35. Honma T, Onuma M, Mikami T, et al. 1980. Evoluation of syncytium assay for bovine leukemia virus. *Jpn J Vet. Sci*. 42:1~4.
36. Heide K, Schwick HG. 1978. Salt fractionation of immunoglobulins. *In Handbook of Experimental Immunology*. Third Edition, edited by D M Weir, Blackwell scientific publication. 7. 1~7.11.
37. Johnson GD, Holborow EJ. 1986. Preparation and use of fluorochrome conjugates. *In Handbook of Experimental Immunology,* vol I. Immunohistochemistry. 4th Edition, edited by DM Weir, Blackwell scientific publication. 28.1~28.21
38. Paul PS, Senogles DL, Muscoplat CC, et al. 1979. Enumenration of T cells, B cells and monocytes in the peripheral blood of normal and lymphocytic cattle. *Clin exp Immunol. tyal 35:306~316*.
39. *Aida Y, Onuma M, Ogawa Y, et al. 1985. Tumor-associated antigens on bovine leukemia virus-induced bovine lymphosarcoma identified by monoclonal antibody. Cancer Res*. 45:1174~1180.
40. Onuma M, Aida Y, Okada, et al. 1985. Usefulness of monoclonal antibodies for detection of enzootic bovine leukemia cells. *Jpn J Cancer Res(Gann). 76:959~966*.
41. *Copeland TD, Morgan MA, Oroszlan S. 1983. Complete amino acid sequences of the nucleic acid binding protein of bovine leukemia virus. FEBS Letter*. 156:37~40.
42. Suneya M, Onuma M, Mikami T, et al. 1980. Humoral and cellular immune responses to bovine leukemia virus infection in sheep. Proceedings on 4th Int symposium bovine leukosis. Bologna. Nov5~7.
43. Ferrer JF, Diglio CA. 1976. Development of an in vitro infectivity assay for the C-type bovine leukemic virus. *Cancer Res*. 36:1068~1078.
44. Mamoun RZ, Astier T, Gaillemain B. 1981. Establishment and propagation of a bovine leuckemia virus producing cell line derived from the leucocytes of a leukemic cow. *J gen virol*. 54:357~365.
45. Honma T, Onuma M, Suneya H, et al. 1980. Cytotoxic antibody in cattle and sheep ex-

posed to bovine leukemia virus. *Arch Virol* 66:293~299.
46. 최희인. 1974. 한국재래염소의 성장에 따르는 혈액상의 변동. 대한수의학회지. 14(1):115~133.
47. 이주묵, 권오덕, 채준석 등. 1994. 호남지역의 양축농가에 있어서 UR에 대처한 가축의 생산성향상에 관한 연구. 대한수의학회지.
48. Bloom BR, David JR. In vitro. Methods in cess-mediated in cell-mediated and tumor immunity. Academic Press, New York. 155~229.
49. Muscoplat CC, Johnson DW, Pomeroy KA *et al.* Lymphocyte surface immunoglobulin;frequency in normal and lymphocytotic cattle. *Am J Vet Res* 35:593~595.
50. Weiland F, Straub OC. Differences in the in vitro response of lymphocytes from leukotic and normal cattle to concanavalin. *A Res Vet Sci* 20:340~341.51. Kenyon SJ piper CE. Cellular basis of persistent lymphocytosis in cattle infected with bovine leukemia virus. *Int & Imm* 16:891~897.