

토끼의 바이러스성 肝炎에 관한 研究

II. 實驗的 感染 토끼 脾臟의 電子顯微鏡的 觀察

이차수·권영란·정종식*·신태균**
경북대학교 수의과대학·경북가축위생시험소*
제주대학교 수의학과**
(1992년 12월 22일 접수)

Studies on the rabbit viral hepatitis

II. Electron microscopic observation of the spleen in experimentally infected rabbit

Cha-soo Lee, Young-ran Kwon, Jong-sik Jyeong*, Tae-kyun Shin**
College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Taegu
*Kyungpook Animal Health Experimental Institute, Taegu**
*Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Cheju***
(Received Dec 22, 1992)

Abstract : An acute fatal infectious disease in rabbits has been outbreaked in Korea since 1985. This disease has been characterized as an acute hepatitis caused by viruses. However, viral pathogenesis in rabbit viral hepatitis leading to sudden death remain unclear. This report dealt with the electron microscopic findings on the spleen of experimentally infected rabbits, because spleen is one of the affected organs which have high titer of virus by a haemagglutination test.

A typical crystalline array of virus was not found in the splenic cells of infected rabbits with acute hepatitis. Virus-like particles were seen within the phagosome of macrophages of the spleen. Ultrastructural changes in the spleen were severe with the lapse of time after inoculation.

From these results, virus-like particles in the spleen were supposed to be phagocytosed by macrophage during viremia, while active replication of virus occurred in the liver. It was concluded that sudden death in this viral disease was caused by hepatic coma and/or circulatory disturbance.

Key words : rabbit, haemorrhagic disease, viral hepatitis, spleen, electron microscopy.

緒 論

토끼 바이러스성 간염은 토끼에 강한 전염력을 가지고 급사를 일으키는 疾病으로서 1984년 中國¹에서 처음 發生된 이래 우리나라에서도 1985년 부터 發生하기 시작하여 全國的으로 유행한 바 있으며²⁻⁶ 지금은 세계

적으로 널리 발생하고 있는 실정이다.⁷⁻¹¹

본 疾病의 名稱에 대해서는 報告者에 따라 토끼의 새로운 바이러스성 질병¹, 바이러스성 출혈병¹², 바이러스성 출혈성 폐염¹³ 또는 토끼 picornavirus 출혈열⁴, 토끼의 전염성 괴사성 간염^{7,14}, 토끼의 X병¹¹, 出血病 症候群¹⁵ 등으로 다양하게 불리어 지고 있다. 李와 차^{3,6}은

* 本 研究는 韓國科學財團의 一部 支援으로 遂行되었음(KOSEF 901-1511-003-2).

본 질병의 특징적 소견이 간염에 있다고 보고 본 질병을 토끼의 바이러스성 간염으로命名할 것을提案한 바 있으며張과李⁵,李와朴⁶ 그리고 Lee et al¹⁶은 본 질병을 토끼의 virus성 肝炎이라는命名하에 肝組織과 原因體에 대한 形態學的 所見을 보고한 바 있다.

本 研究에서는 本 疾病의 病理發生機轉을 명확히 규명하고자 본 질병의 標的器官인 肝臟⁶에 이어 바이러스의 力價가 높은 脾臟組織⁴에 대한 電子顯微鏡의 所見을 중심으로 原因體에 대한 動態를 追究하였던 바 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

供試材料: 바이러스성 肝炎에 罹患된 토끼의 肝臟을 절취한 후 생리식염수에서 20% 유제를 만든 후 10분간 원심분리(2,000 RPM)하여 上層液을 취하고 이를 membrane filter(0.45 μm)로 濾過한 후 接種材料로 사용하였다.³

供試動物 및 實驗方法: 울릉도에서 사육된 4~14개월령 在來토끼 9마리를 구입하여 실험동물로 사용하였다. 바이러스의 감염은 조직유제를 0.2ml씩 근육주사하였고 동시에 接種前 혈청을 분리, 혈구응집억제반응을 통하여 抗體有無를 확인하였다. 바이러스 接種후 임상적 소견을 관찰하면서 20時間에서 96時間에 이르는 폐사직전의 토끼를 屠殺解體하여 육안적 소견을 관찰하고 비장은 전자현미경적 검사를 위해 공시하였다. 절취된 비장 조직은 세절편을 만들어 2% paraformaldehyde-2.5% glutaraldehyde(0.1M cacodylate buffer, pH 7.4)로 2時間前固定한 후 2% osmium tetroxide(0.1M cacodylate buffer, pH 7.4)로 2時間後固定하여 alcohol系列에 移行脫水, Epon 812로 포매하였고, ultramicrotome(LKB- II)으로 超薄切片을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 2重染色한 후 電子顯微鏡(Zeiss 109)으로 觀察하였다.

結 果

토끼 바이러스성 肝炎에 罹患된 本 實驗의 感染例은 공시재료를 接種한 후 20시간 내지 96시간에 斃死가 일어났으며, 이들 感染兔의 臨床所見은 體溫上昇과 食慾不振 및 軟便 등이 觀察되었다. 그리고 病理解剖學的으로는 臟器에 따라 充血과 出血이 觀察되었으며 肝臟實質의 壞死性肝炎에 의한 色調의 退色과 脾臟의 充血性腫脹 등이 認定되었다. 病理組織學的으로는 程度에 差異가 있기는 하지만 全例가 壞死性肝炎이 小葉周邊部에서부터 일어났고 공시재료 接種후 시간경과에 따라 肝細胞의 壞死가 甚하였다. 그리고 脾臟에서는 充血 및

出血所見이 認定되었으며 개체에 따라 차이가 있었다.

電子顯微鏡의 所見에 있어서는 脾臟內的 바이러스 增殖與否를 알아보기 위하여 대조로 肝臟組織에 대해서도 觀察하였던 바 肝細胞의 細胞質內에 大小不同한 空胞가 出現하면서 rER 및 mitochondria의 擴張과 mitochondria의 cristae의 消失이 觀察되었고 rER周圍에 바이러스樣 粒子의 出現과 아울러 細胞質內에 바이러스粒子의 結晶體가 觀察되기도 하였다(Figs. 1, 2).

脾臟에서는 血管內에 赤血球과 細胞 破壞物로 이루어진 혈전 形成을 볼 수 있었으며(Fig 3), 적색수내 macrophage 核의 염색질은 다소 消失되었으나 하등의 바이러스 粒子를 觀察할 수 없었고 細胞質에서 myelin figure가 認定되었다. 그리고 一部 macrophage의 細胞質에서는 phagosome의 出現과 그 주위에 擴張된 rough ER의 管腔內에 전자밀도가 낮은 物質이 차 있었다(Fig.4). 또한 어떤 phagosome內에는 바이러스모양의 粒子가 觀察되기도 하였다(Figs 5, 6). 이와같이 細胞의 變性は 接種후 폐사까지의 時間이 많이 經過한 例에서 심하였고 또한 바이러스모양의 粒子가 出現한 例는 주로 接種 후 38時間以後에 폐사한 例에서 觀察되었다.

考 察

토끼의 virus성 肝炎에 이환된 토끼들은 대체로 전구 증상없이 갑자기 폐사하거나 體溫이 急上昇한 후 食慾減退, 沈鬱 또는 發作症勢를 나타낸 후 폐사하고 비강 내 혈액성 포말액이 간혹 나타난다고 하였다.^{3,12} 자연 발생한 토끼 바이러스성 간염은 발견 초기 대체로 全身적인 出血所見이 特徵的으로 나타나 질병의 명칭도 출혈과 관련지워 명명되어 왔으나^{10,11,13,16} 實驗例에서는 出血과 함께 肝臟이 標的臟器가 된다고 하여 급성간염으로 주장되고 있다.^{3,6} 급성간염을 나타낸 간조직에서 肝細胞, 洞樣血管內皮細胞, Kupffer細胞 그리고 肝實質內에 出現한 macrophage의 細胞質內에서 바이러스 입자가 인정되었고 바이러스의 형태는 작은 多角形으로 結晶體 모양으로 配列된 것이 觀察되었으며³ 이와 박⁶은 결정체 모양의 구조는 바이러스의 증식이 왕성한 증거로 추정된 바 있다.

한편 안 등⁴은 바이러스 감염후 바이러스의 분포를 조사한 바 간과 비장에서는 높은 역가가 인정되었으나 신장, 폐 및 뇌에서는 인정되지 않았다고 하였다. 본 實驗에서는 脾臟의 各種 細胞를 관찰한 바 肝臟에서와는 달리 전형적인 바이러스 結晶體가 觀察되지 않았고, macrophage의 phagosome내 바이러스 모양의 粒子들만 認定되었다. 이와 같은 사실은 viremia시 脾臟내 macrophage가 바이러스를 貪食한 것으로 생각되며 비록 脾臟에서

바이러스의 높은 역가가 인정되나 肝臟에서와는 달리 바이러스의 증식은 왕성하지 않은 것으로 추측된다.

한편 본 疾病의 原因體는 研究者에 따라 RNA virus인 picornavirus^{1~4} 또는 calicivirus^{8,9}라고하나 DNA virus인 parvovirus⁷라고도 主張되고 있어 바이러스의 種類에 관해서는 더 追究해야 할 課題라 생각된다.

結 論

國內에서 發生된 토끼 바이러스성 肝炎의 病理發生 기전을 明確히 糾明하고 原因 바이러스의 動態를 알아 보기 위하여 본 疾病에 感染되지 않은 在來토끼에 토끼 肝炎組織의 乳劑를 接種한 후 바이러스의 역가가 높게 나타난 脾臟組織을 電子顯微鏡의으로 觀察하였던 바 다음

과 같은 結果를 얻었다.

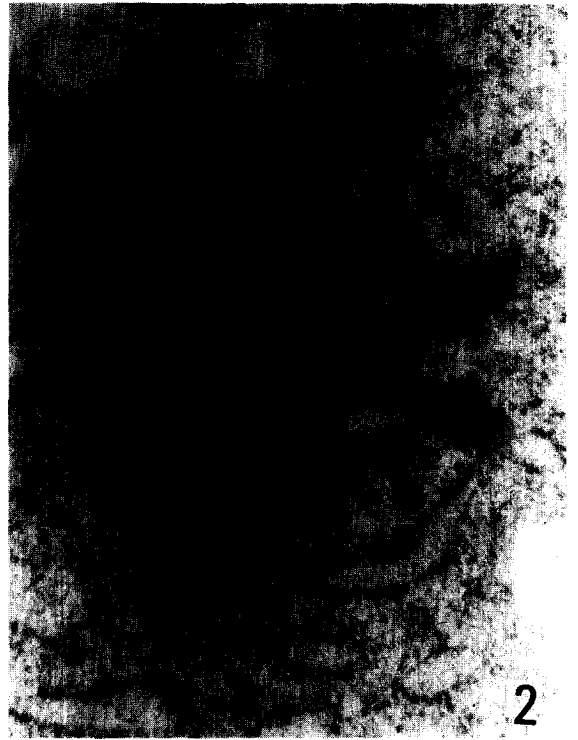
脾臟의 各種 細胞내에서는 전형적인 바이러스 結晶體가 觀察되지 않았으며 macrophage의 phagosome내 바이러스 모양 粒子의 出現을 볼 수 있었다. 또한 脾臟의 微細構造學的 變化는 接種후 폐사까지의 時間이 많이 經過한 예에서 심하였다. 따라서 본 疾病에서 바이러스의 역가가 높게 나타난 肝臟과 脾臟의 微細構造의 變化와 바이러스의 動態를 綜合해 볼 때 脾臟내에서 觀察된 바이러스 모양의 粒子들은 viremia중 貪食된 것으로 추측되며 바이러스의 왕성한 增殖은 肝臟에서 일어나고 增殖된 바이러스는 viremia를 일으키며 동시에 간성혼수와 순환장애로 인해 급성폐사가 야기되는 것으로 생각된다.

Legends for figures

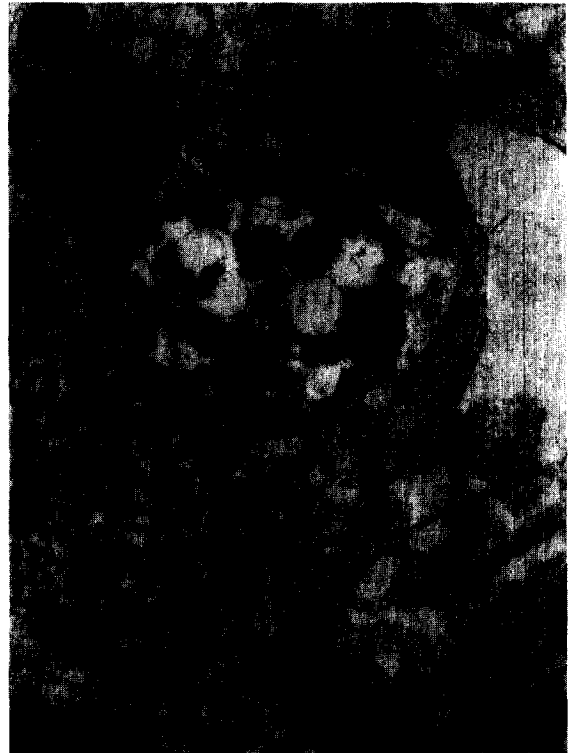
- Fig 1. Electron micrograph of hepatic cell. The crystalline array of virus particles(arrow) is observed in the cytoplasm of hepatic cell. × 20,000.
- Fig 2. Electron micrograph of hepatic cell. The viral crystals(around of black spot) are seen in cytoplasm of hepatocyte. × 20,000.
- Fig 3. Electron micrograph of spleen. Erythrocytes and cell debris are seen in blood vessel. × 7,000.
- Fig 4. Electron micrograph of spleen. Phagosomes appeared in the cytoplasm of macrophages. Dilated rough ER in the vicinity of phagosome is filled with low density-materials. × 12,000.
- Fig 5. Electron micrograph of spleen. A phagosome(arrow) containing many virus-like particles is seen in a degenerative cell. × 12,000.
- Fig 6. Higher magnification of the arrow part in figure 3. the virus-like particles are seen in the phagosome. × 20,000.

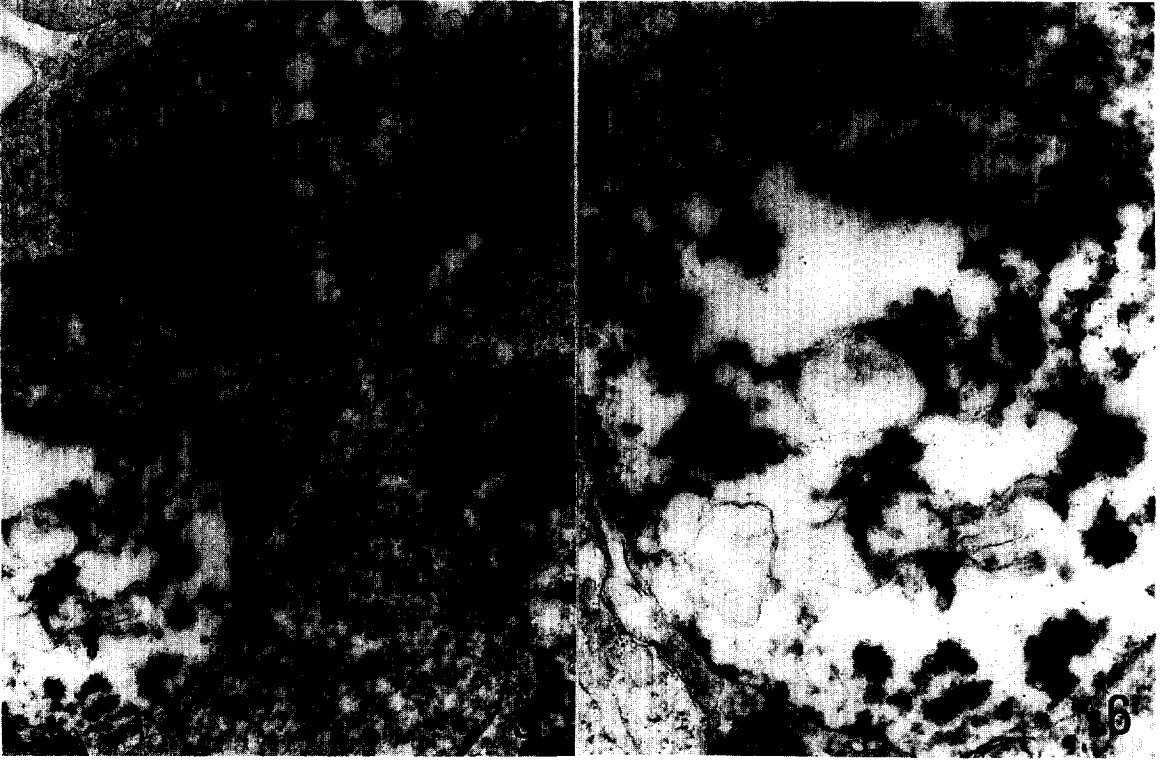
參 考 文 獻

- Liu SJ, Xue HP, Pu BQ, et al. A new viral disease in rabbits. *Ani Hus Vet Med* 1984 ; 16 : 253~255.
- 박남용, 정치영, 김진호 등. 토끼의 바이러스성 출혈성 폐염(잠정명)발생. *대한수의사회지* 1987 ; 23 : 253~258.
- 이차수, 박청규, 양고라 토끼의 급성 폐사성 질병의 병인학적 연구. 소위 토끼의 바이러스성 급사병. *대한수의학회지* 1987 ; 27 : 277~290.
- 안수환, 김병한, 이중복 등. 토끼의 picornavirus 출혈열(잠정명)에 관한 연구. I. 원인 바이러스의 물리학적 특성. *농시논문집(가축위생편)* 1988 ; 30 : 56~61.
- 장성준, 이차수. Dexamethasone투여가 토끼 virus 성 감염 유기에 미치는 영향. *대한수의학회지* 1988 ; 28 : 371~377.
- 이차수, 박청규. 토끼의 바이러스성 간염에 관한 연구. I. 실험적 감염토의 급성 간염조직의 전자현미경적 관찰. *대한수의학회지* 1989 ; 29 : 531~540.
- Gregg DA, House C. Necrotic hepatitis of rabbits in Mexico : a parvovirus. *Vet Rec* 1989 ; 125 : 603~604.
- Ohlinger VF, Hass B, Meyers G, et al. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol* 1990 ; 64 : 3331~3336.
- Parra F, Prieto M. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbit. *J Virol* 1990 ; 64 : 4013~4015.
- Smid B, Valicek L, Stepanek J, et al. Experimental



2





transmission and electron microscopic demonstration of the virus of haemorrhagic disease of rabbits in Czechoslovakia. *J Vet Med B* 1989 ; 36 : 237~240.

11. Cancellotti FM, Villeri C, Renzi M, et al. Occurrence of X disease of rabbits. *Rivista di Coniglicoltura* 1988 ; 255 : 41~46.
12. Xu Z, Chen WX. Viral Hemorrhagic disease in rabbits : a review. *Vet Res Commun* 1989 ; 13 : 205~212.
13. Cao SZ, Liu SG, Gan MH, et al. A preliminary report on viral haemorrhagic pneumonia (tentative name) in rabbits. *Chin J Vet Med* 1986 ; 12 : 9~11.
14. Marcato PS, Benazzi C, Vecchi G, et al. Infectious necrotic hepatitis of rabbits. Pathogenic profile of a new haemorrhagic disease. *Revista di Coniglicoltura* 1988 ; 25 : 59~64.
15. Peshev R, Petkov A, Belemzov P, et al. An acute, contagious disease of domestic rabbits accompanied by a haemorrhagic syndrome. *Veterinaria Sbirka* 1989 ; 87 : 34~36.
16. Lee CS, Park CK, Shin TK, et al. An outbreak of rabbit sudden death in Korea suspected of a new viral hepatitis. *Jpn J Vet Res* 1990 ; 52 : 1135~1137.