

토끼 出血病으로 죽은 토끼의 大腦에서 보인 encephalitozoonosis의 病變

朴在鶴* · 李榮純** · 坂倉智敏*

北海道大學 獸醫學部 比較病理學*

서울大學校 獸醫科大學 公衆保健學**

(1992. 3. 10 접수)

Cerebral lesions of encephalitozoonosis in the rabbits died of rabbit hemorrhagic disease

Jae-hak Park*, Yong-soon Lee**, C. Itakura*

Faculty of Comparative Pathology, Department of Veterinary Medicine, Hokkaido
University, Sapporo, 060, Japan*

Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul
National University, Suwon, Korea**

(Received March 10, 1992)

Abstract : Out of twenty rabbits which died of rabbit hemorrhagic disease spontaneously occurring in Korea, five animals had a concurrent infection with *Encephalitozoon cuniculi* in the cerebrum. The lesions were composed of granulomas, leptomeningitis and perivascular cuffing with mononuclear cells. The granulomas consisted of a central necrotic focus surrounded by an infiltration with plasma cells, lymphocytes and macrophages. Gliosis was associated with the granulomas. Gram-positive organisms were detected in the cerebrum from two rabbits. They were oval to rod-shaped with blunt round ends. The distribution of the pathogens was investigated by the direct avidin-biotin peroxidase complex method. They were present in pseudocysts and macrophages. Pseudocysts were found in the granulomas as well as the neuropil without cellular reactions. Some organisms were present within reticulo-endothelial cells of blood capillaries and macrophages in the subarachnoid spaces. These organisms had ultrastructural characteristics consistent with *Encephalitozoon cuniculi*.

緒 論

Encephalitozoonosis의 原因体인 *Encephalitozoon cuniculi*는 細胞内に 寄生하는 原虫으로 Microsporida에 屬한다.¹ *Encephalitozoon cuniculi*의 宿主領域은 넓어 토끼, 마우스, 랫드, 햄스타, 기니피그와 같은 實驗動物에 뿐만아니라 犬, 猫, 여우, 밍크, 다람쥐원숭이, 사람에게서도 感染이 일어난다.¹⁻⁶ 토끼에 實驗적으로 *Enceph-*

*litozoon cuniculi*를 感染시켰을 때 病原体가 腦, 腎臟, 心臟, 肺 및 肝臟에서 觀察되며 特徵적인 病變은 腦와 腎臟에서 주로 觀察된다.^{7,8} Encephalitozoonosis에 感染된 토끼는 大部分이 臨床症狀을 보이지 않으며 肉眼的으로는 小數의 例에서 腎臟의 表面에 小白色 斑點이 보인다.⁹ 特徵적인 組織病理學的 病變은 血管周圍 細胞浸潤과 增殖性 腦膜炎을 同伴한 慢性 局所性 肉芽腫性 腦炎이다.¹

Encephalitozoonosis 感染兔의 血清은 *Encephalitozoon cuniculi*에 對하여 높은 抗體價를 보이며 *Toxoplasma gondii*와는 交差反應을 보이지 않아 Cox와 Walden¹⁰은 感染兔의 血清을 利用한 螢光抗體法으로 本病의 診斷法을 確立하였다.

著者는 韓國에서 1985년부터 流行하고 있는 토끼의 바이러스性疾病인 토끼 出血病에^{11,12} 感染되어 죽은 토끼를 檢索하던중 encephalitozoonosis 樣의 慢性病變을 보인 5마리의 大腦組織에 對하여 原因究明을 目的으로 組織化學的, 免疫化學的 및 電子顯微鏡의 研究를 實施하였다.

材料 및 方法

1987년부터 1989년에 걸쳐서 國內에 發生했던 토끼 出血病 (Rabbit Haemorrhagic disease; RHD)으로 死亡한 양고라 토끼 20마리의 포르말린 固定 組織材料를 全南大學 및 家畜衛生研究所로부터 分讓받았다. 固定 組織을 通常의 方法에 따라 파라핀 包埋하고 3 μ m 두께로 薄切하여 H-E染色을 하였다. 그중 大腦에 肉芽腫의 形成을 特徵으로 하는 組織病理學的인 病變을 보인 5마리의 大腦組織을 本實驗의 材料로 하여 Goodpasture Gram染色 및 Warthin Starry 銀染色을 實施하였다. 또 glial fibrillary acidic protein (GFAP)에 對한 단클론抗體 (Dakopatts, Denmark)를 1次抗體로 하여 Avidin-biotin peroxidase complex (ABC法; vecterstain ABC kit, Vector Laboratories, CA)을 利用한 免疫染色을 實施하였다. H-E染色切片上에서 보인 病原體의 超微細構造를 觀察하기 위하여 切片上에서 病原體가 보이는 部分을 quato 812로 包埋한뒤 uranium acetate와 lead citrate에 의한 二重染色을 한 超薄切片材料를 Jeol 電子顯微鏡 (model 100CX)로 觀察하였다.

한편 바이오틴 結合家兔 抗*encephalitozoon cuniculi*를 利用하여 ABC 直接法으로 病原體의 分布를 調査하였다. 바이오틴 結合家兔 抗*encephalitozoon cuniculi*는 本教室에서 飼育하던 一般環境下의 New Zealand White 토끼로부터 採血하여 分離하여 놓은 血清中 間接 ABC法에서 凍結組織內的 *Encephalitozoon cuniculi*에 對하여 1:2000以上の 역가를 보인 血清을 Protein A-sepharose 4B chromatography (Zymed Laboratories, CA)으로 IgG를 分離하고 분리한 IgG에 Bayer과 Wilchek¹³의 方法에 의하여 바이오틴을 結合하였다. 抗*Encephalitozoon cuniculi* 血清을 分離했던 토끼의 腦實質에서 肉芽腫 및 *encephalitozoon cuniculi*를 確認하였다.

結果

檢索했던 토끼 5마리가 모두 腦에 肉芽腫의 形成, 單核球의 浸潤을 特徵으로 하는 腦膜炎 및 圍管性 細胞浸潤의 病變을 보였다. 肉芽腫은 基本的으로 中心部의 壞死巢와 그 周邊의 마크로파지, 임파구 및 形質細胞의 浸潤을 特徵으로 하였다(Fig 1). 壞死巢는 好酸性物質과 核破片으로 構成되어 있었으며 核濃縮을 보이는 壞死細胞는 壞死巢의 周邊部에 散在하였다. 壞死巢 周邊의 마크로파지는 類円形 혹은 灣入된 形의 比較的 淡明한 核을 갖고 豊富한 細胞質은 隣接 細胞와 接하고 있어 類上皮細胞의 形態를 取하고 있었다. 密接하게 連接하여 細胞의 境界가 不分明한 類上皮細胞의 集族이 中心部에 觀察된 肉芽腫도 있었다. 한편 上述한 肉芽腫의 特徵은 보이지 않으며 濃艶의 核을 갖는 microglia의 集族을 보이는 病巢도 있었다. 肉芽腫은 主로 皮質에 形成되었으나 수질에도 觀察되었다. 血管에는 임파구와 形質細胞의 浸潤을 特徵으로 하는 圍管性 細胞浸潤의 病變이 보였으며 이와같은 血管病變은 主로 肉芽腫의 周邊部에 位置하고 있었다(Fig 1).

肉芽腫에 對한 星狀膠細胞의 反應을 調査하기 위하여 GFAP에 對한 免疫染色을 實施하였다. 肉芽腫에서 增殖한 星狀膠細胞는 GFAP에 對한 免疫染色에서 가늘고 긴 突起가 陽性的 反應을 보이는 纖維型 星狀膠細胞였으며 肉芽腫에 따라 여러 形態로 增殖되어 있었다. 中心部에 壞死巢를 보이는 肉芽腫에서는 임파구와 形質細胞가 浸潤되어 있는 周邊部에서 主로 增殖하고 있었다. 一部 肉芽腫의 中心部에서는 星狀膠細胞의 突起가 單核球와 함께 增殖하고 있었다(Fig 2). 그러나 microglia의 集族을 보이는 病巢에서는 星狀細胞의 反應은 보이지 않았다.

病原體는 檢索하였던 5마리의 토끼중 2마리의 大腦組織으로 부터 確認되었다. 病原體는 各各 Goodpasture Gram 染色에서는 濃青色으로, Warthin Starry 銀染色에서는 黑褐色으로 染色되었으며, 形態는 類円形 혹은 간상으로 양끝이 둥글었고 크기는 約 2 μ m였다.

病原體의 抗原의 分布를 調査하기 爲하여 實施했던 直接 ABC 免疫染色에서 免疫反應 產物은 病原體의 外質에서 強하게 觀察되었다(Fig 3). 肉芽腫內에서 免疫反應을 보인 抗原은 1~數個씩 마크로파지內에 食食되어 散在하거나 pseudocyst內에 存在하였다. pseudocyst중에는 細胞의 反應이 없이 存在하는 것도 있었으며 pseudocyst 周圍에 數개의 抗原이 microglia에

貪食된 것도 있었다. Pseudocyst를 構成하는 膜은 免疫染色에서 양성으로 염색되었다. 多數의 抗原은 小血管의 細網內皮細胞內 혹은 隨膜에 存在하는 마크로파지 內에서도 觀察되었다.

病原體의 超微細構造에 對하여 透過電子顯微鏡의 觀察를 하였다. 多數의 胞子가 病巢內에서 觀察되었다. 胞子は 얇은 外層과 두꺼운 內層으로된 殼에 싸여 있었으며 最內層은 sporoplasm과 接하고 있었다. 胞子の 內部에서는 polar filament가 觀察되었는데 그 斷面은 中心部에 電子密度가 높은 core와 그 둘레에 電子密度가 比較的 낮은 圓形의 構造로 內層의 殼쪽에 位置하고 있었다(Fig 4).

考 察

各 研究機關으로 부터 分讓받은 토끼의 포르말린 固定 組織材料 20例에 對하여 朴과 板倉¹⁴에 의한 免疫 組織化學法으로 染色한 結果, 本 實驗에서 檢索하였던 5마리를 包含하여 大部分의 肝組織으로 부터 토끼出 血病 virus (rabbit hemorrhagic disease virus; RHDV) 抗原을 檢出하였다(未發表). 이들 20마리의 大腦에 肉芽腫, 圍管性 細胞浸潤, 隨膜炎을 보인 例는 本 實驗에 使用된 5例 였으며 나머지에서는 DIC가 觀察된 例도 있었으나 大部分 特異的인 病變이 觀察되지 않았다. RHD는 感染되어 3~4日만에 90% 以上の 토끼가 死亡하는 甚急性 바이러스性 病患이며^{11,12}, 肝組織에서는 抗原이 檢出되었지만 腦에 特異한 病變을 보이지 않는 토끼가 大多數인 點으로 보아 肉芽腫을 中心으로한 病變은 RHD와 關係가 없음을 알 수 있었다.

本 研究에서 檢索했던 5例의 組織病理學的病變은 토끼에서 發生했던 encephalitozoonosis에 對한 많은 報告와 一致하였다. encephalitozoonosis는 世界 各地에서 發生되며 토끼에서의 發生率은 飼育된 集團에 따라 크게 다르다.^{4,9} 本 研究의 結果 전라도, 경기도 및 강원도에서 收集한 양고라 토끼 20마리중 約 25%가 自然感染되어 있던 것으로 나타났다.

GFAP 對한 免疫染色의 結果, 肉芽腫에 對한 星狀 膠細胞의 反應程度는 多樣하였으나 肉芽腫을 둘러싸며 增殖하는 形과 肉芽腫의 中心部에 增殖한 形으로 區別되었으며 이들의 反應程度는 肉芽腫에 對한 治癒의 進行程度를 나타내고 있는 것으로 생각되었다.

*Encephalitozoon cuniculi*는 H-E染色에서 弱好酸性으로 染色되어 病巢內에 形成된 pseudocyst는 區別이 可能하였으나 pseudocyst의 破裂에 의해 病巢內에 흩

어져 있는 病原體나 細胞의 反應을 보이지 않으며 病巢와 關係없이 存在하는 pseudocyst의 觀察은 어려웠다. 이와같은 病原體는 Goodpasture Gram 染色이나 Warthin Starry 銀染色法에 의하여 確認이 可能하였으며 Goodpasture Gram 染色에 染色되지 않는 *Toxoplasma*와 區別되었다.¹⁵ 한편 pseudocyst를 構成하는 膜은 Gram 染色이나 Warthin Starry 銀染色에서 觀察되지 않았으나 直接 ABC 免疫染色法에서 染色되어 抗原性을 갖고 있는 것으로 나타났다.

Encephalitozoonosis의 診斷法으로 螢光抗體法이 利用되고 있는데 Cox와 Gallichio¹⁶는 encephalitozoonosis에 感染된 토끼의 血清中 間接螢光抗體法에서 最高 1:4000의 抗體価가 있음을 報告하였으며 感染兔로부터 얻은 血清으로 直接螢光抗體法을 開發하여 本病의 診斷에 利用하였다.¹⁷ 本 研究에서 直接 ABC法에 使用된 바이오탄 結合家兔 抗*Encephalitozoon cuniculi*의 作製는 間接 ABC法에서 凍結組織內에 보이는 *Encephalitozoon cuniculi*에 對하여 1:2000의 抗體価를 보이는 感染兔의 血清을 利用하였다. 直接 ABC法에 의한 免疫染色은 間接法에서의 非特異反應을 排除하여 1~數개씩 흩어져 있는 病原體에 對하여도 檢出이 可能하였다. 直接 ABC法에 의하여 病原體의 分布를 調査한 結果, 病原體는 腦血管의 細網內皮細胞內에서도 觀察되었다. *Encephalitozoon cuniculi*의 增殖은 細胞內에서 이루어 지는데¹⁸, 病原體가 腦血管의 細網內皮細胞에서 觀察된 것은 本 病原體가 細網內皮細胞와 親和性을 갖고 있음을 示唆하고 있다. 또한 肉芽腫의 周邊에 보이는 圍管性 細胞浸潤 및 肉芽腫內에 血管의 關與 등을 미루어 볼 때 encephalitozoonosis가 血行性으로 進行되고 있음을 알 수 있다. 犬 및 밍크에서는 動脈 壁에서 *Encephalitozoon cuniculi*가 發見되며 血管炎을 일으킨다는 報告도 있지만^{3,19} 토끼에서는 病原體와 血管과의 關係에 對한 具體的인 報告가 없어 차후 檢討할 必要가 있는 것으로 생각된다.

病原體에 對한 超微細構造를 觀察하기 爲하여 H-E染色上의 切片위에서 包埋하여 超薄切片을 準備하였다. 準備한 材料에서 腦組織의 超微細構造의 保存은 좋지않았으나 *Encephalitozoon cuniculi*의 胞子에 있어서 特徵的 細胞內 小器管인 polar filament는 明確히 觀察되었다. 病原體의 內部構造는 *Encephalitozoon cuniculi*의 超微細構造에 對한 研究結果와 一致하는 것으로 Microsporida의 特徵的 構造를 보여주었다.^{19,20}

結 論

토끼 出血病(RHD)에 自然感染되어 죽은 20마리의 양고라 토끼중 腦에 病變을 보인 5마리에 대하여 病理學的 檢索을 하였다. 檢索했던 토끼 5마리가 모두 腦에 肉芽腫의 形成, 單核球의 浸潤을 特徵으로 하는 腦膜炎 및 圍管性 細胞浸潤의 病變을 보였다. 肉芽腫은 基本的으로 中心部의 壞死所와 그 周邊의 마크로파지, 임과구 및 形質細胞의 浸潤을 特徵으로 하였다. 圍管性 細胞浸潤의 病變은 主로 肉芽腫의 周邊部에서 觀察되었다.

GFAP에 對하여 陽性的 反應을 보인 星狀膠細胞의 突起는 肉芽腫에서 증식되어 있었으며 이와같은 gliosis는 肉芽腫에 따라 差가 있었다.

檢索하였던 5마리의 토끼중 2마리의 大腦組織으로부터 病原體가 確認되었다. 病原體는 各各 Goodpasture Gram 染色에서는 濃靑色, Warthin Starry 銀染色에서는 黑褐色으로 染色되었으며 形態는 類円形 내지 간상으로 양끝이 둥글었고, 크기는 約 2 μ m였다.

病原體의 抗原의 分布를 調査하기 爲하여 實施했던 直接 ABC 免疫染色의 結果 抗原은 1~數개씩 마크로파지内에는 혹은 pseudocyst内에 存在하였다. pseudocyst중에는 細胞의 反應이 없이 neuropil内에 存在하는 것도 있었다. 소수의 抗原은 小血管의 細網 內皮 細胞内 혹은 隨膜에 存在하는 마크로파지内에서도 觀察되었다.

胞子内部에서는 polar filament가 觀察되었다.

以上の 結果에 의하여 토끼 出血病에 自然感染되어 죽은 20마리의 토끼중 本 研究에서 檢索하였던 5마리의 腦에 보인 病變은 *Encephalitozoon cuniculi*의 感染에 의한 것으로 토끼 出血病과 混合感染되어 있었던 것으로 結論지었다.

參 考 文 獻

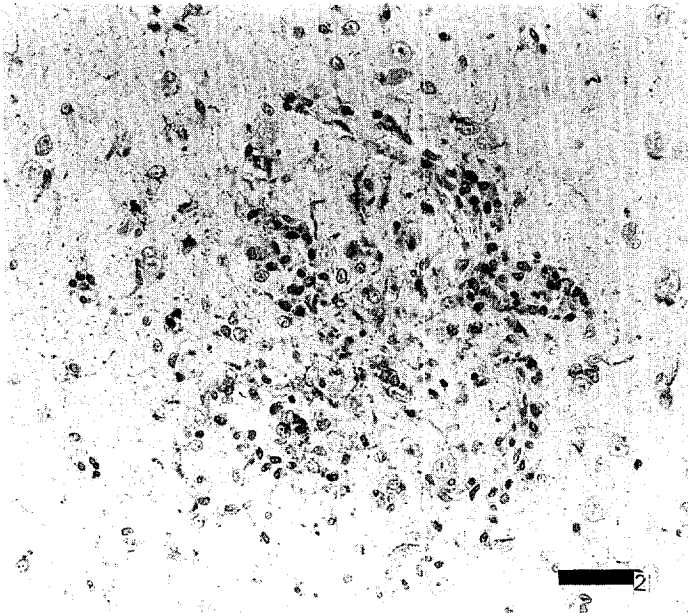
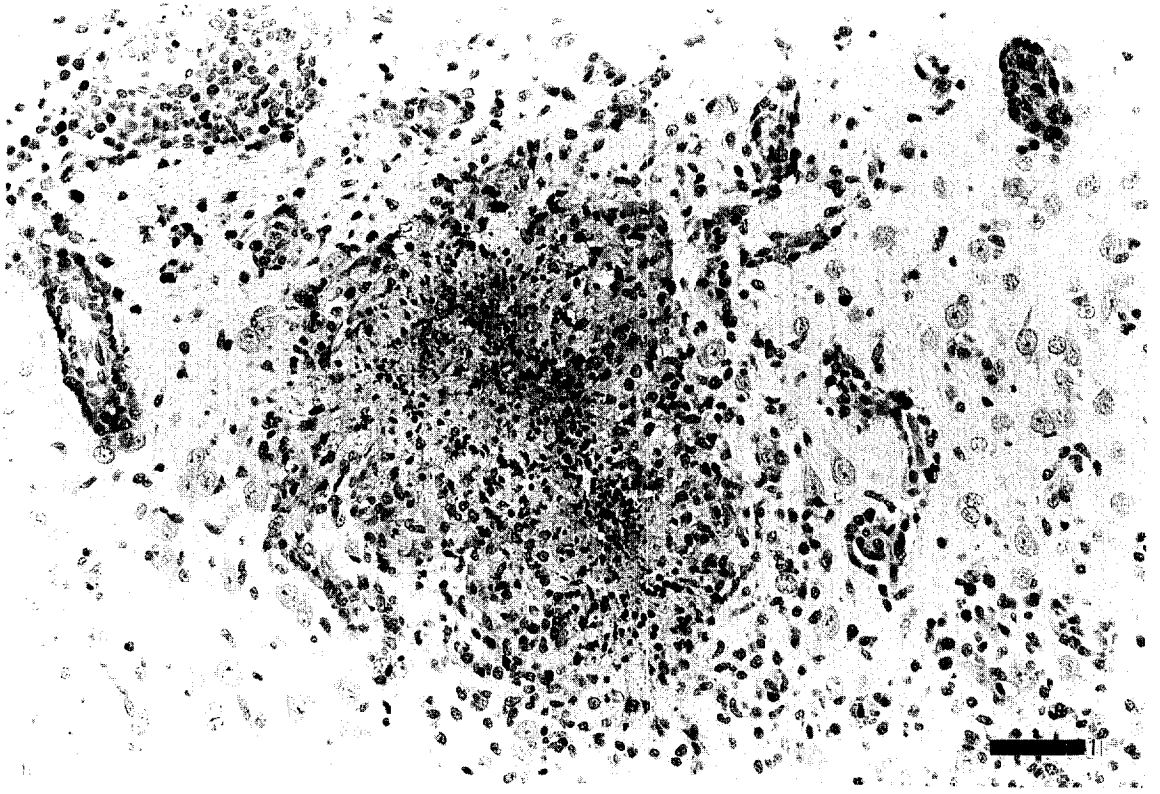
1. Lainson R, Garnham PCC, Killick-Kendrick R, et

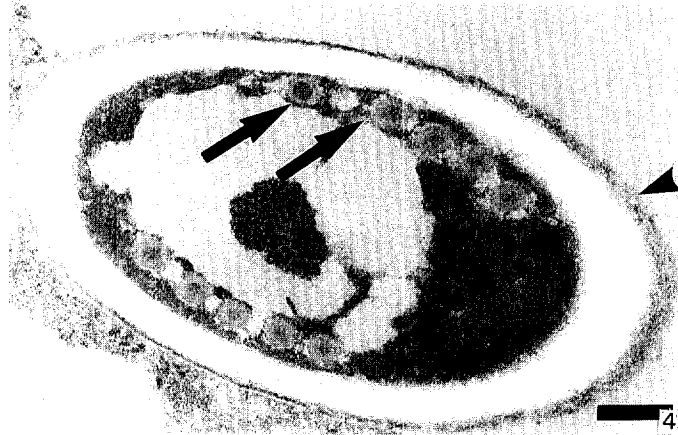
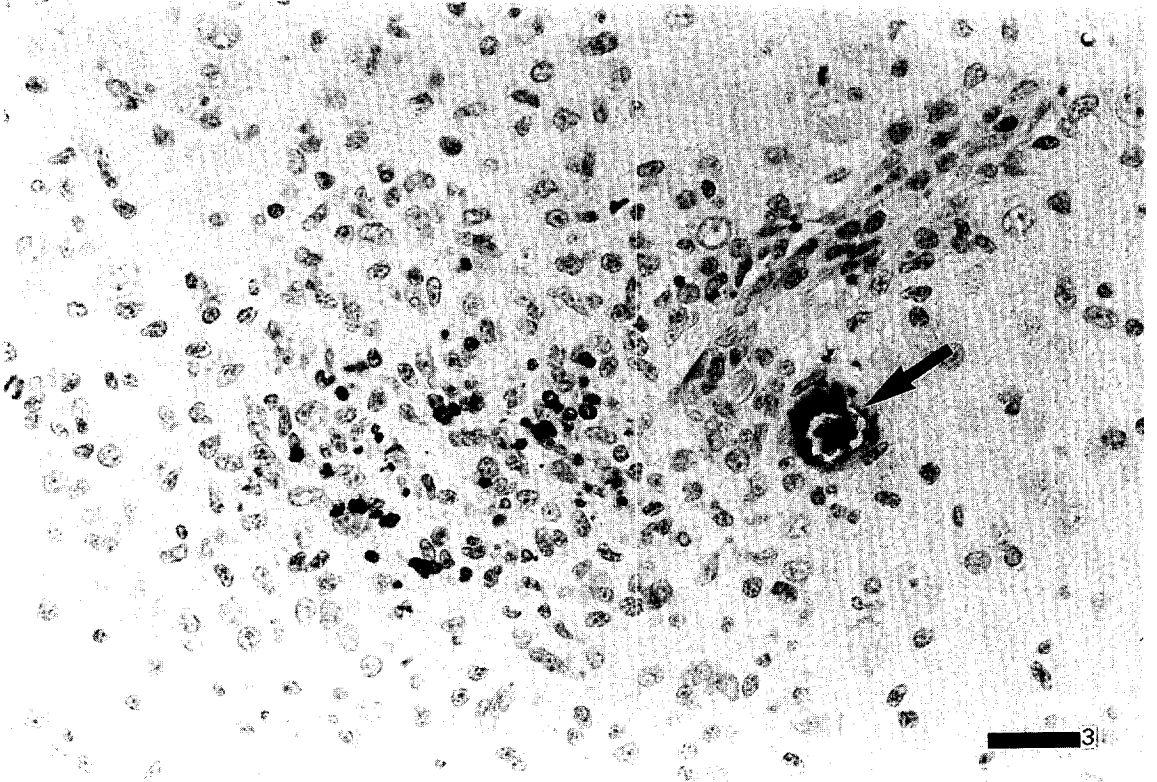
al. Nosematosis, a microsporidial infection of rodents and other animals, including man. *Brit Med J* 1964 ; 2 : 470~472.

2. Anver MR, King NW, Hunt RD. Congenital Encephalitozoonosis in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Vet Pathol* 1972 ; 9 : 475~480.
3. Bjerkas I. Brain and spinal cord lesions in encephalitozoonosis in mink. *Acta Vet Scand* 1990 ; 31 : 423~432.
4. Koller LD. Spontaneous *Nosema cuniculi* infection in laboratory rabbits. *J Am Vet Med Assoc* 1969 ; 155 : 1108~1114.
5. Mohn SFr, Landsverk T, Nordstoga K. Encephalitozoonosis in the blue fox-morphological identification of the parasite. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B* 1981 ; 89 : 117~122.
6. Shaddock JA, Bendele R, Robinson GT. Isolation of the causative organism of canine encephalitozoonosis. *Vet Pathol* 1978 ; 15 : 449~460.
7. Cox JC, Hamilton RC, Attwood HD. An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. *J Protozool* 1979 ; 26 : 260~265.
8. Testoni FJ. Enzootic renal nosematosis in laboratory rabbits. *Aust Vet J* 1974 ; 50 : 159~163.
9. Flatt RE, Jackson SJ. Renal nosematosis in young rabbits. *Patol Vet* 1970 ; 7 : 492~497.
10. Cox JC, Walden NB. Presumptive diagnosis of *Nosema cuniculi* in rabbits by immunofluorescence. *Res Vet Sci* 1972 ; 13 : 595~597.
11. Lee CS, Park CK. Etiological studies on the acute fatal disease of Angora rabbits : the so-called rabbit viral sudden death. *Kor J Vet Res* 1987 ; 27 : 277~290.
12. Park JH, Kida H, Ueda K, et al. Etiology of rabbit haemorrhagic disease spontaneously occurring in

Legends for figures

- Fig 1. A granuloma in the cerebral cortex. The central necrotic focus surrounded by macrophages, lymphocytes and plasma cells. Leptomeningitis was seen with perivascular cuffing around the granuloma. Bar=50 μ m
- Fig 2. Fibres positively stained for GFAP increased in a granulomatous lesion of the cerebral cortex. Avidin-biotin-peroxidase complex method with hematoxylin counterstain. Bar=50 μ m
- Fig 3. The organisms were scattered in the granulomatous lesion of the cerebral cortex. Both clumped organisms and membrane in a pseudocyst (arrow) are stained positively. Direct ABC stain with antiserum to *Encephalitozoon cuniculi*, hematoxylin counterstain. Bar=50 μ m
- Fig 4. A mature spore of *Encephalitozoon cuniculi* in the granulomatous lesion of the cerebral cortex. It has the thick spore shell (arrowheads) and the polar filaments (arrows). Bar=200nm





- Korea. *J Vet Med B* 1991 ; 38 : 749~754.
13. Bayer EA, Wilchek M. The use of avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. *Meth Biochem Anal* 1980 ; 26 : 1~45.
 14. Park JH, Itakura C. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus antigen in tissues by immunohistochemistry. *Res Vet Sci* 1992 (in press)
 15. Perrin TL. Toxoplasma and encephalitozoon in spontaneous and in experimental infections of animals. *Arch Pathol Lab Med* 1943 ; 36 : 568~578.
 16. Cox JC, Gallichio HA. Serological and histological studies on adult rabbits with recent, naturally acquired encephalitozoonosis. *Res Vet Sci* 1978 ; 24 : 260~261.
 17. Cox JC, Gallichio HA. An evaluation of indirect immunofluorescence in the serological diagnosis of *Nosema cuniculi* infection. *Res Vet Sci* 1977 ; 22 : 50~52.
 18. Montrey RD, Shaddock JA, Pakes SP. Invitro study of host range of three isolates of encephalitozoon (*Nosema*). *J Infec Dis* 1973 ; 127 : 450~454.
 19. Van Dellen AF, Botha WS, Boomker J, et al. Light and electron microscopical studies on canine encephalitozoonosis : cerebral vasculitis. *Onderstepoort J Vet Res* 1978 ; 45 : 165~186.
 20. Akao S. Electron microscopical observations on extrusion of polar filament in *Nosema cuniculi*. *Jpn J Parasitol* 1972 ; 21 : 82~89.
-