大韓獸醫學會誌(1995) 第35卷 第2號
Korean J Vet Res(1995) 35(2): 369-374

오제스키병바이러스 인공감염 한국재래산양의 병리학적 소견 및 절편내 *in situ* hybridization 바이러스 동정

김순복 · 송근석 · 문운경* · 정창근**
경상대학교 수의과대학
경남가축위생시험소*
공군교육사령부 항공의무전대**
(1995년 2월 13일 접수)

Pathological findings and virus detection by *in situ* hybridization in the Korean native goats experimentally infected with Aujeszky's disease virus

Soon-bok Kim, Geun-suk Song, Oun-kyong Moon*, Chang-geun Jeong**
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
*Kyongnam Veterinary Service Laboratory**
*Air Medical Group, Air Training Command***
(Received Feb 13, 1995)

Abstract : Aujeszky's disease virus(ADV) was inoculated intranasally into the Korean native goats to investigate pathological findings and pathogenesis of ADV infection by using of histological and immunohistochemical methods and *in situ* hybridization(ISH).

Clinical signs of salvation, pyrexia, pruritus and staggering were followed by death with five days after inoculation. Pathoanatomical findings were edema of the lung and the urinary bladder with hemorrhage and congestion, petechial hemorrhages on the endo-and epicardium, renal congestion, moderate splenomegaly and cystic edema. Main microsocpic lesions observed in all infected goats were confined to the CNS and charcterized by perivascular cuffing with lymphocytes and macrophages, focal gliosis, neuronal degeneration and necrosis, and intranuclear inclusion bodies in the neurons and glial cells.

Positive reactions to ADV were detected more frequently in the nuclei than in the cytoplasms of infected nerve cells in the CNS by immunohistochemistry and ISH. Frequenctly localized sites of ADV in the CNS were olfactory bulb, prietal cortex, callosal sulcus and corpus callosum. Positive reactions were also detected in the tonsillar epithelium, and alveolar macrophage and sloughed epithelium of the lung.

Key words : pathology, immunohistochemistry, *in situ* hybridization, Aujeszky's disease, Korean natvie goats

* 이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.
Address reprint requests to Dr Soon-bok, Kim, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Republic of Korea.

서 론

오제스키병은 거의 모든 포유동물에 감수성을 가지며 특히 소, 양, 토끼, 개, 고양이와 어린돼지에서는 치명적으로 경과하는 무서운 전염병이다[1].

오제스키병의 양에 대한 발생은 1960년대 초에 독일과 발칸지역에서 집단발생한 예가 있으며[2], McFerran과 Dow[3] 및 Schmidt et al[4]은 양에 대한 감염실험결과를 보고한 바 있다. 그러나 이 병에 대한 한국재래산양의 감수성이나 병리학적 성상에 대해서는 알려진 것이 없으며, 각종 외래성 질병에 대한 우리나라 재래가축들의 감수성이 외국품종들에 비해 흔히 상이했던 점을 감안할 때, 재래산양에 대한 오제스키병의 병리학적 성상 규명은 방역대책 수립을 위한 기초자료가 될 수 있을 것이라고 생각된다.

본 연구는 한국재래산양에다 국내에서 분리된 오제스키병 바이러스(Aujeszky's disease vir us: ADV)를 인공접종하여 임상증상 병리해부 및 조직학적 소견을 관찰하고 면역조직화학적 방법과 *in situ* hybridizan 기법을 이용하여 바이러스감염 조직 및 세포를 추적하므로서 병리발생기전을 규명코자 한다.

재료 및 방법

동물접종 및 병리학적 검사 : 4-5개월령의 한국재래산양 4두에다 PK-15 cell에서 증식시킨 ADV(NYJ-1-87/10^7 $TCID_{50}$/0.2ml를 두당 ml씩 비강접종하였으며 폐사측은 해부검사한 뒤 각종장기를 절취하여 10% 중성포르말린에 고정후 파라핀포매하여 일반적인 방법에 따라 hematoxyline-eosin 염색하였다.

면역조직화학적 검사 : 3-5㎛ 두께의 파라핀 또는 냉동조직절편을 0.05M tris buffer, pH 7.6 용액(TBS)에 수세한 뒤 1% hydrogen peroxidase TBS 용액에 30분간, 처리한 다음 Peroxidase-antiperoxidase(PAP) 면역염색을 위하여 1차 항체로서 rabbit/ADV/polyclonal(Dr Ducatelle, University of Ghent, Belgium)과 mouse/ADV/monoclonal(농촌진흥청 수의과학연구소) 50-100배 희석액에다 30-60분간 감작시킨 후 sodium phosphate buffer, pH 7.6(PBS) 3분간씩 6회 수세하였다. 그리고 2차항체로서 goat/rabbit IgG 또는 goat/mous IgG(Sigma)를 PBS로 300-500배 희석하여 60분간 반응시킨 후 3분간씩 6회 수세하였다. 이어서 3차항체로서 rabbit 또는 mouse PBA(Sigma)을 PBS에다 100-200배 희석하여 60분간 반응시킨 후 3분간씩 6회 수세하였다. Avidin-biotin comples(ABC) 면역염색을 위하여는 1차항체 rabbit/ADV/polyclonal과 2차항체 biotinylated antirabbit IgG(Vevtor Lab) 및 3차항체 Vectastain ABC ragent를 각각 30분-60분 반응시킨 다음 양자 모두 동일하게 3,3'-diaminobenzidine, tetrahydrochloride(Sigma)로 발색하였다.

In situ hybridization(ISH) : Probe ADV DNA를 얻기 위해 먼저 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 실시하였다. Template DNA는 Plasmid pBR 325내에 cloning된 6.3Kb 크기의 BamHI 7 fragment(gp50, gp63, gI; Dr Osorio, Nebraska Univ)를 사용하였으며 primer는 gp50의 conserved sequencd를 이용하여 한국생명공학연구소에 의뢰 제작하였다[primer length: 21-mer, arget lengthe: 217-mer]. PCR kit의 protocol에 따라 10×buffer 10㎕, ADV/DNA 4㎕, dNTPs A, T, G, C 각 2㎕씩, primers(fowared primer: 5'CACGGAGGACGAGCTGGGGC T 3', 5㎕; revers primer: 5' GTCCACGCCCGCTTGAAGCT 3', 5㎕) 10㎕, taq polymerase 0.5㎕, 그리고 dH_2O 67.5㎕를 섞어 전체용량이 100㎕가 되도록 혼합한 다음 PCR을 실시하였다. gp50 ADV amplificattion cycle은 94℃에서 1분간 denaturation시켰고 55℃에서 1분간 annealing하였으며 72℃에서 1분간 polymerase하여 한 cycle당 3분씩 모두 30cycle 증폭시켰으며, 1.5% LMP agarose에서 전기영동하여 증폭된 217bp의 band를 확인한 다음 gene clean kit로 분리한 다음 이것을 DNA probe로 사용하였다.

Digoxigein DNA labeling을 위하여 100℃에서 10분간 denature시킨 probe DNA 10㎕를 얼음 위에서 잘 섞은 다음 37℃에서 20시간 방치하였다. 이어 stop solution으로 EDTA, 0.2M, pH 8.0, 2㎕를 첨가하여 반응을 중단시킨 후 LiCl 4M 2.5㎕, -20℃로 미리 냉각시킨 ethanol 75㎕를 넣고 -20℃에서 2시간 방치하여 labeled DNA를 침전시킨 다음 12,000g에서 20분간 원심하여 얻은 pellet를 70% cold ethanol로 수세하고 진공건조 후 TE-buffer 50㎕에다 다시 녹였다.

Hybridization을 위한 효소전처리과정으로서 5㎛ 두께로 제작된 파라핀절편을 먼저 xylene에서 탈파라핀한 다음 100% ethanol에 이행 건조하여 PBS에서 5분간 침적하였으며, deproteinization을 위하여 실온에서 20분간 0.2N HCl에 처리 후 proteinase K(40㎕/ml, Sigma)로 PBS에서 37℃분간 소화시킨 다음 4% paraformaldehyde에 1분간 재고정하여 PBS 3회 수세

후 ethanol에 이행탈수 건조하였다. Hybridization을 위하여 hybridization buffer(5×SSC, 1% blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 50% formamide)를 -20℃ 저장하면서 사용직전에 녹여 labeled ADV-DNA probe와 20-50배가 되도록 희석하여 조직절편위에 한방울씩 떨어뜨린 다음 coverglass로 덮어 메니큐어로 밀봉하였다. 이 슬라이드를 100℃에서 10분간 denature시킨 후 10분간 냉각하는 과정을 2회 반복한 다음 100℃에서 한번 더 denataure 시켜 42℃ moisture chamber 내에서 12-20시간 동안 hybridization 시켰으며, 이어 coverglass를 제거하고 PBS로 수세하였다. 항체결합을 위하여 슬라이드를 buffer 1(maleic acid 0.1M, NaCl 0.16M, pH 7.5, 20℃) 용액에 1분간 수세하고 buffer 2(blocking stock solution, diluted 1:10 in buffer 1) 용액에 30분간 처리한 후 polyclonal sheep anti-digoxigenin Fab feagment conjugated to alkaline phosphatase를 buffer 2에다 1:1000으로 희석하여 실온에서 40분간 감작하였으며, 이어 buffer 1에서 15분간씩 2회, buffer 3(tris-HCl, 100mM, MgC12 50mM, pH 9.5, 20℃)에서 2분간 수세한 뒤 color substrate(NTB solution 45μl, X-phosphate solution 45μl, buffer 310ml)로 암실에서 6-7시간 발색하였다. buffer 4(tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0, 20℃)에 5분간 수세후 methyl green cholorform으로 20-30분간 대조염색한 다음 dH_2O로 1-2분간 세후 wet mounting 하였다.

결 과

병리학적 소견 : 바이러스 접종후 7-8시간부터 침을 해지기 시작하여 시간이 경과함에 따라 식욕부진 또는 절폐, 체온상승, 점액성 비루, 심한 유연, 이빨갈기, 소양증, 선회운동 등의 임상증상이 주로 관찰되었으며, 접종 73시간째부터 107시간 사이에 전두수가 폐사하였다. 폐사축의 부검소견으로는 폐장과 방광점막의 수종성 종창 및 충혈, 심내외막의 정상출혈, 담낭수종, 비장의 경도의 종창, 신장울혈, 심남수 및 흉수의 증가 등이 주로 관찰되었다.

병리조직학적 소견 : 전예에서 관찰되는 가장 일반적인 소견은 중추신경계의 변화였으며, 임파구와 대식구로 구성되는 위관성원형세포침윤, 한국성교세증가증, 신경세포의 종창, chromatolysis 및 핵변화, 신경세포식현상, 세포질의 에오진염색성증가 등이 관찰되었으나 병변의 정도는 그렇게 심하지는 않았고 이들 부위의 신경세포 및 신경교세포에서는 호산성핵내봉입체를 흔히 관찰할 수 있었다(Fig 1). 폐장에서는 간질성 임파구침윤, 세기관지상피세포의 변성, 괴사 및 탈락, 임파소절내 임파구괴사, 충출혈, 수종 등이 관찰되었으며, 비장의 충출혈, 임파구괴사 및 임파여포의 증생, 편도상피세포의 괴사, 임파절의 임파구괴사, 방광점막하 출혈, 임파관염, 신경절염 등이 정도의 차이는 있었으나 종종 관찰되는 병변이었다.

면역조직화학 및 ISH 소견 : 파라핀 및 냉동조직절편에서 바이러스 항원을 검출하기 위하여 PAP 및 ABC 면역염색 그리고 ISH를 실시한 결과, 중추신경계의 신경세포와 교세포의 핵내에서 면역염색의 바이러스항원 양성반응(Fig 2)과 ISH의 바이러스핵산 양성반응은 주로 핵내에서 관찰되었으며(Fig 3) 세포질에서는 상대적으로 빈도가 낮았고, 바이러스의 존재를 나타내는 특이 양성반응세포의 중추신경내 분포(Fig 4)는 olfactory bulb, patrietal cortex, callosal sulcus 및 corpus callosum 주위에 가장 빈번하게 관찰되었고 medulla와 pons에서는 비교적 경미하였으며 척수에서는 변화가 인정되지 않았다. 그리고 양성반응은 편도상피와 폐장의 폐포대식구 및 탈락상피에서도 가끔 볼 수 있었다. 본 실험에 사용한 면역염색 및 ISH 기법은 각각 바이러스항원 및 핵산의 존재에 대해 전자는 갈색, 후자는 청자색색소의 침착으로 양성반응을 나타내었으며, 특히 ISH 기법은 고도의 특이성과 감수성을 보였다.

고 찰

본병의 각종동물에 대한 감수성은 매우 다양하게 나타나고 있으며, 소, 양, 염소는 감수성이 높고 치사적인 것으로 보고되어 있으나[1-5] 한국재래산양에 대한 병원성은 알려진 것이 없다. Dow와 Mcferran[2]이 면양에 대한 인공접종실험에서 7일이내로 모두 폐사하였다고 보고하였으며, 본 실험의 바이러스접종 재래산양은 급성경과를 취하면서 5일 이내에 모두 폐사하여 면양에 비해 더욱 급성경과 하였다. 이러한 결과는 재래산양의 오제스키병에 대한 높은 감수성 때문이라고 해석되나, 다른 한편으로는 공시한 국내분리 바이러스주의 높은 병원성에 기인되었을 가능성을 배제할 수는 없을 것 같다. 여하튼 한국재래산양에 대한 오제스키병은 100% 폐사율을 보이면서 회복하는 개체가 없었기 때문에, 돼지에서 볼 수 있는 것과 같은 잠복감염의 기회는 없다

고 단정해도 좋으리라고 생각된다.

ADV는 비강이나 구강을 통해 주로 자연감염디괴 비강상피 또는 편도상피에서 일차증식한 다음 인근임파절로 이동하여 증식한 후에 임파관을 타고 다른 장기로 평범하게 확한된다. 중추신경계로의 바이러스 이동은 일차감염부위의 말초신경을 타고 직접 파급하기도 하고 바이러스혈증을 일으키는 강독주의 경우에는 혈류를 타고 침입할 수도 있다[1,6-8]. 본 실험의 중추신경계 조직검사에서 주로 olfactory bulb, parietal cortex, callosal sulcus 및 corpus callosum 주위에서 바이러스 핵산과 항원이 검출되었으며 medullar, pons 및 cerebellum에서는 경미한 정도의 양성반응이 관찰되어 재래산양에서의 중추신경계 바이러스 이동은 말초신경로 중에서 주로 olfactory nerve를 통해 침입하는 것으로 보이며 일부 trigeminal nerve를 경유하기도 하나 medullar와 pons에서는 많은 손상을 주지 못하는 것 같고, 더우기 척추에까지는 이르기 전에 이미 폐사하는 것으로 생각된다. 그리고 본 실험에 사용한 바이러스는 강독주로서 혈류를 통한 침입도 예상되나, 산양에서는 신경로를 타고 먼저 중추신경계에 도달한 바이러스의 공격으로 혈류이동 이전에 이미 폐사에 이르는 것으로 보인다.

면역조직화학적 방법은 조직절편에서 직접 병인체 항원을 검출함으로써 각종 질병은 진단은 물론 병리 발생기전을 규명에 널리 활용되고 있으며[8-12], ISH 기법은 감염세포내에서 바이러스 핵산을 동정하는 방법으로서 조직학적 구조를 그대로 유지하면서 잠복감염기에서도 검출이 가능한 장점을 가지며 감염세포가 조직직내에 한개만 존재하여도 검출이 가능할 정도의 높은 감수성과 특이성을 가지는 방법으로 알려져 있다[13-16]. 파라핀 및 냉동조직절편에서 바이러스 항원을 검출하기 위하여 면역조직화학염색과 ISH를 실시한 결과, 감염세포의 핵내에서 양성반응이 주로 관찰되었으며 세포질에서는 상대적으로 빈도가 낮았고, 바이러스의 존재를 나타내는 특이양성반응세포의 분포는 대뇌, 편도상피 및 폐장에서 관찰되었으며, 야외에서 병리학적 진단을 위한 장기의 선택에 있어 지침으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 본 실험에 사용한 면역염색 및 ISH 기법은 각각 바이러스항원 및 핵산의 존재에 대해 전자는 갈색, 후자는 청자색색소의 침착으로 양성반응을 나타냈으며, 특히 ISH 기법은 고도의 특이성과 감수성을 보였다.

결 론

오제스키병바이러스 국내분리주 ADV/NYJ-87-1의 한국재래산양에 대한 병리학적 성상과 발생기전을 규명하기 위하여 조직학적, 면역세포화학적 및 *in situ* hybridization(ISH) 기법을 적용하였다.

접종 재래산양은 소양증과 신경증상을 보이면서 5일 이내에 모두 폐사하였고, 육안적으로 폐의 수종성 종창 및 충혈, 심내외막의 점상출혈, 담낭수종, 비장의 종창, 신장울혈, 심낭수 및 흉수의 증가 등이 주로 관찰되었다. 전예에서 볼 수 있는 주요 현미경적 소견으로는 중추신경계의 임파구와 대식구로 구성되는 위관성원형세포침윤, 한국성교세증가증, 신경세포의 변성 및 괴사 등이었으며 신경세포 및 신경교세포에서는 호산성핵내봉입체를 흔히 관찰할 수 있었다.

면역염색과 ISH 실시 결과에서는 중추신경계의 신경세포와 교세포의 핵내에서 양성반응이 주로 관찰되었으며 세포질에서는 상대적으로 빈도가 낮았고, 바이러스의 존재를 나타내는 특이양성반응세포의 분포는 olfactory bulb, patrietal cortex, callosal sulcus 및 corpus cellosum 주위에서 가장 빈번하게 관찰되었다. 그리고 양성반응과 편도상피, 폐장의 폐포대식구 및 탈락상피에서도 볼 수 있었다.

중추신경계로의 바이러스 이동은 말초신경로 중에서 주로 olfactory nerve를 통해 침입하는 것으로 보이며 일부 trigeminal nerve를 경유하기도 하나 medullar와 pons에서는 많은 손상을 주지 못하는 것 같고, 척추에까지 도달하기 전에 이미 폐사하는 것으로 생각된다.

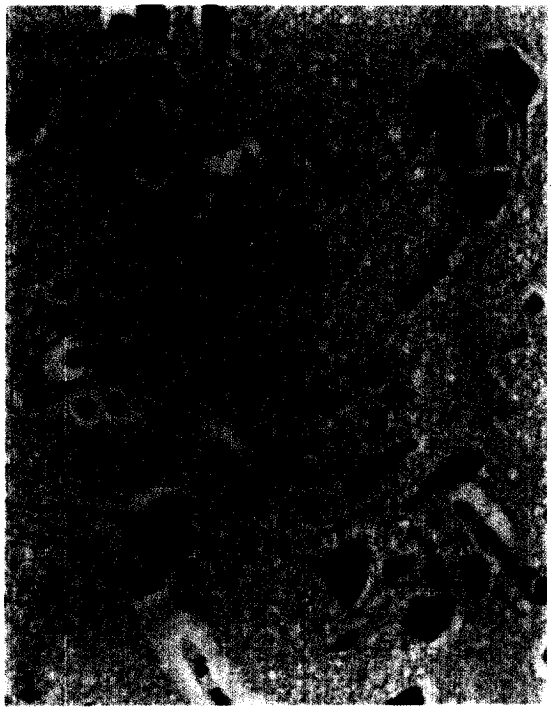
Legends for figures

Fig 1. Neuronal degeneration and intranuclear inclusions in the parietal cortex. H-E stain.

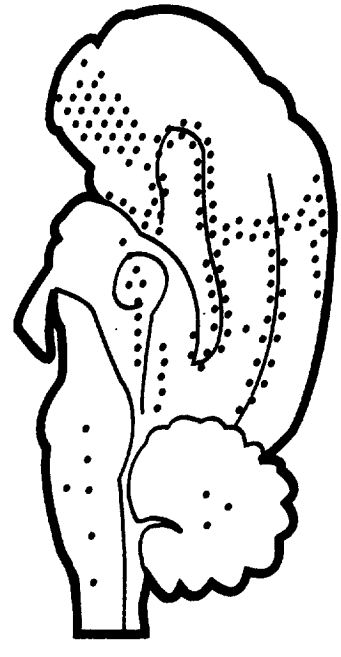
Fig 2. Viral antigens are detected in the infected nerve cells of corpus callosum immunostained with peroxidase-antiperoxidase complex.

Fig 3. Viral nucleic acid is detected in the nuclei of infected nerve cells. Digoxigenin-labeled *in situ* hybridization.

Fig 4. Schematic diagram of viral nucleic acid localization illustrates in the central nervous system of the Korean native goat.



3



4

참 고 문 헌

1. Kluge JP, Beran GW, Hill HT, et al. Pseudorabies. In: Leman AD, ed. *Diseases of swine*. 7th ed. Iowa state Univ Press, 1992; 132-333.
2. Dow C, McFerran JB. Experimental Aujeszky's disease in the sheep. *Am J Vet Res* 1964; 25: 461-468.
3. McFerran JB, Dow C. The distribution of the virus of Aujeszky's disease in experimentally infected sheep. *Res Vet Sci* 1964; 6: 143-149.
4. Schmidt SP, hagermoser WA, Kluge JP, et al. Pathogenesis of ovine pseudorabies(Aujeszky's disease) following intratracheal inoculation. *Can J Vet Res* 1987; 51:326-333.
5. Power EP, O'Connor M, Donnelly WJC, et al. Aujeszk;s disease in a cow. *Vet Rec* 1990; 126: 13-15.
6. Kimman TG, de Wind N, Oei-Lie N, et al. Contribution of single genses within the unique short region on Aujeszky's disease virus(suid herpesvirus type 1) to virulence, pathogenesis and immunogenicity. *J Gen Virol* 1992; 73: 243-251.
7. Wittmann G, Ahl R. multiplication and distribution of Aujeszky's disease(pseudorabies) virus in vaccinated and nonvaccinated pigs after intranasal infection. *Achive of Virol* 1980; 66: 227-240.
8. Narita M, Imada T, Haritani M. Immunohistochemical demonstration of spread of Aujeszky's disease virus via olfactory pathway in HPCD pigs. *J Comp Path* 1991; 105: 141-145.
9. Kim SB. Immunohistochemistry for detection of Aujeszky's diseasa virus antigens: Immunogold silver method in tissue section. *Kor J Vet Res* 1988; 28(2): 365-369.
10. 김순복, 문운경. Immunogold-silver, immunoalkaline phosphatase 및 immunoperoxidase 법을 이용한 돼지 콜레라의 면역조직화학적 진단. 농촌진흥청 연구보고집 1988; 31: 41-44.
11. 문운경, 조희택, 김순복. Peroxidase-antiperoxidase (PAP) 복합체를 이용한 돼지 콜레라의 면역조직화학적 진단. 대한수의학회지 1990; 30(2): 215-21.
12. 노환국, 김순복. Indirect immunoperoxidase 법을 이용한 조직내 뉴캣슬병바이러스 항원동정. 대한수의학회지 1990; 30(3): 309-316.
13. Weiss LM, Movahed LA. In situ demonstraion of Epstein-Barr viral genomes in viral-associated B cell lymphoproliferations. *Am J Pathol* 1989; 134: 651.
14. Weiss LM, Movahed LA, Berry GJ, et al. In situ hybridization studies for viral nucleic acids in heart and lung allograft biopsies. *Am J Clin Pathol* 1990; 93: 673.
15. Wolf BC, Martin AW, Neiman RS, et al. The detecion of Epstein-Barr virus in hairy cell leukemial cells by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1990; 136: 717.
16. 서정향, 문운경, 김순복. In situ hybridization 방법을 이용한 오제스키병바이러스 핵산 검출. 대한수의학회지 1994; 34(2); 327-333.