

실험적 돼지 삼출성 표피염에 관한 병리학적 연구

II. 피부의 면역조직화학적 및 전자현미경적 관찰

오규실 · 이차수

경북대학교 수의과대학
(1995년 3월 2일 접수)

Pathological studies on exudative epidermitis in experimentally infected pigs

II. Immunohistochemistry and electron microscopy on the skin

Kyu-shil Oh, Cha-soo Lee

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University
(Received March 2, 1995)

Abstract : To elucidate pathologic change of skin in porcine exudative epidermitis, immunohistochemical and electron microscopical observations were carried out in the skin of the suckling pigs inoculated with *Staphylococcus hyicus* subsp *hyicus* which were isolated from natural case.

In immunohistochemistry, ATPase-positive dendritic cells were more populated in epidermo-dermal junctional areas and perivascular area in dermis than in epidermal area as the disease was proceeded. These dendritic cells were identified as Langerhans cell by immunoperoxidase staining and these cells were populated granulomatous bodies.

Electron microscopical study showed various retrogressive degeneration and vacuolation of epidermal cell organelles with retention of amorphorous exudates in intercellular space, and cellular separation. Langerhans cells present in intercellular space of epidermis were populated in epidermo-dermal junctional areas, in dermis, and around granulomatous bodies. Langerhans cells contained decreased Birbeck granules in number but increased lysosome and ribosome. These cells were in contact with lymphocytes. This study was discussed relation between the various immunocytes and the formation of granulomatous bodies, and this inflammation was considered as delayed type hypersensitivity.

Key words : pig, exudative epidermitis, skin, immunohistochemistry, electron microscopy

서 론

돼지의 삼출성 표피염은 *Staphylococcus hyicus*

subsp *hyicus*에 의해 발병되고 건강한 돼지의 피부에서도 본 원인균이 고율로 보균되고 있으며 어린 돼지일 수록 보균율이 높다고 한다^{1,2}. 그리고 비면역군은 항상

본 질병에 이환될 가능성이 높으며 동시에 비면역모돈에서 출산된 동복자돈은 본 질병에 감염되어 높은 폐사율을 보인다고 한다. 또한 이 질병의 감염은 외상에 의하여 일어나며 돈사의 온도가 높을때도 본 질병의 발생을 조장시키고 외부 기생충에 의해서도 전파의 기회를 높인다고 한다³. 본 질병의 임상소견은 갑자기 피부병변이 일어나게 되며 안검이나 이익주변에서 두부, 경부 및 허복부로 그리고 전신에 만연하게되고, 초기병소는 적갈색을 띄게 되며 지성 삼출물이 출현하나 차차 시일이 경과함에 따라 피부는 흑갈색의 삼출물로 피복되며 만성화된 병돈은 예후가 불량하거나 발육이 지연되어 위축돈이 된다고 한다^{3,5}.

돼지 삼출성 표피염의 병리조직학적 소견으로는 각화층의 탈락과 부전각화층의 소견에 이어 피부 상피세포의 공포화와 괴사, 모근부의 퇴행성 변화등이 관찰되었다. 그리고 진피내에는 수종과 호중구 및 원형세포의 침윤이 있었으며 병변이 경과함에 따라 다수의 원형세포가 혈관 주위에 출현하였고, 만성화된 병변 소견으로는 혈관 주위에 삼출세포의 증수와 섬유아세포의 증식에 기인된 육아종양 소체의 형성이 인정되었다. 동시에 진피내에서는 다수의 형질세포 및 호중구가 출현하였으며 표피상피층의 기저층 배아세포의 분열증식에 기인된 표피층의 비후와 기저층의 유두상 돌출이 진피내로 일어났었다⁵.

본 연구에서는 이상과 같은 병리조직학적 소견의 병리발생을 추구할 목적으로 피부의 Langerhans 세포의 동태와 병적변화를 면역조직화학적 및 전자현미경적으로 추구하고있던 바 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시동물과 발병시험 : 10일령 내지 22일령의 랜드레이스잡종 포유자돈 8두(대조군 2두 포함)를 공시하였으며, 포유자돈은 모돈과 분리치 않고 그대로 모유를 이용하게끔 하였다.

이들 자돈에 대해 삼출성 표피염의 자연발생자돈 피부병소로 부터 분리동정된 균주 *Staphylococcus hyicus* subsp *hyicus*(type B)^{6,7}를 사용하였으며, 이 공시균을 trypticase soy broth(BBL)에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 균액(87×10⁶CFU/0.1ml)을 일정량씩 공시동물에 피하주사하였다.

포유자돈에 대해서는 공시균을 1.0ml씩 피하주사한 후 임상 및 피부의 발병상태를 관찰하면서 폐사직전 부

검하였고 필요에 따라 피부의 생검을 실시하였다.

상기와 같이 행한 공시동물의 도살해체조직과 생검 조직을 10% 중성 formalin액, Bouin액 및 alcohol 고정제에 각각 동정하여 통상적인 방법에 따라 paraffin포매 절편을 만들어 H-E 염색을 실시하여 광학현미경적으로 관찰을 병행하였다.

조직화학적 및 면역조직화학적 검사 : 피부 antigen presenting cell(APC)에 대한 동태를 알아보기 위하여 paraffin포매절편조직과 동결절편조직에 대해 ATPase 반응능을 Hanau et al⁸과 류 및 이⁹의 방법에 의거 실시하였고, 한편 Ia와 S-100항체를 이용한 avidin-biotin방법^{10,12}과 immunogold-silver염색법^{13,14}을 응용한 간접면역조직화학적 방법으로 추구하고있다. ATPase 양성 dendritic cell의 조사는 H-E 염색표본의 결과를 근거로 절취한 피부조직을 OCT compound(Lab-Tek products)를 이용하여 -25℃ 전후에서 4-8μm로 동결절편을 만들어 acetone 또는 3.7% paraformaldehyde(0.2% calcium chloride를 함유한 0.1M cacodylate buffer, pH 7.3)에 4℃ 이하에서 고정한 후 ATPase(Sigma)를 이용하여 전술한 방법에 의거 반응시켜 검사하였다. 그리고 면역조직화학적 방법에 있어서는 동결절편조직이나 paraffin포매절편조직을 이용하였으며, mouse anti-Ia(Becton Dickinson) 및 rabbit anti-S-100(Sigma)을 이용한 avidin-biotin peroxidase법과 protein A-gold(5nm, Sigma)를 이용한 immunogold-silver염색법을 전술한 방법¹⁰에 따라 실시하였다.

전자현미경적 관찰 : 조직화학적 및 면역조직화학적 검사결과에 따라 본 질병 발병자돈의 피부조직에 대해 전자현미경적 관찰에 공시되었다. 우선 피부조직을 2% paraformaldehyde-2.5% glutaraldehyde(0.1M cacodylate buffer, pH 7.4)로 2시간 전고정한 후 2% osmium tetroxide(0.1M cacodylate buffer, pH 7.4)로 2시간 후고정하였으며, 이들 조직편을 ethanol계열에 이행탈수시킨 후 Epon812에 포매하여 LKB ultramicrotome으로 초박편하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 전자현미경적으로 관찰하였다.

결 과

면역조직화학적 소견 : Antigen presenting cell(APC)의 동태를 알아보기 위하여 ATPase 반응과 Ia항체 및 S-100항체를 이용한 면역조직화학적 반응을 실시하였다. ATPase 양성 dendritic cell은 표피층내에서 보다

epidermo-dermal junction 부위와 진피내 혈관 주위에 다수 출현하였으며 이들 세포는 긴 수지상 돌기를 가지고 질병의 경과에 따라 현저히 증가하였다(Fig 1, 2). 이와 같은 소견은 S-100항체 및 Ia항체를 이용한 avidin-biotin peroxidase 간접법과 protein A-gold에 의거한 immunogold-silver염색법에서도 동일한 소견으로 나타났다(Figs 3-5).

Immunoperoxidase법에 있어서는 ExtrAvidin(Sigma)을 이용한 AEC(3-aminoethylcarbazole) 발색법이 DAB(3'3'-diaminobenzidine tetrachloride)에 의한 발색법보다 적색의 양성세포를 용이하게 동정할 수 있었다(Fig 5). 그러나 AEC에 의한 발색법은 영구표본이 되지 않았고 시간경과에 따라 서서히 염색성이 쇠퇴하는 경향이 있었다.

전자현미경적 소견 : 병리조직학적 소견과 면역조직화학적 소견을 근거로 하여 표피상피층과 antigen presenting cell(APC)에 대해 전자현미경적으로 관찰하였다. 그 결과, 표피층의 다층편평상피세포의 각종 형태의 괴사성 소견과 각질층의 분리가 있었으며 괴사가 일어나는 세포에 있어서 세포간 desmosome장치는 존재하였다. 그리고 이들 세포간 공격에는 무구조한 삼출액이 저류하였으며 상피세포질내에는 대소부동한 공포의 출현과 cell organelle들의 각종 퇴행성 변화가 관찰되었다(Fig 6). 질병이 만성화함에 따라 표피층의 기저 세포들은 광학현미경적 소견에서 관찰된 것과 같은 세포분열상과 세포의 활성을 찾아볼 수 있었다(Fig 7).

표피상피세포간에 출현하는 antigen presenting cell(APC)은 질병초기에 관찰되었으며 이들 세포는 비교적 건재한 상태로 발달된 Birbeck과립을 가지고 있었으며 소위 Langerhans cell로 동정되었다(Fig 6). 이 세포는 괴사성 소견을 나타내는 표피세포간에 존재하였으며 질병이 경과에 따라 이들 표피층에서는 찾아보기가 힘들었다. 그러나 이 Langerhans cell은 epidermo-dermal junction과 진피내혈관 주위에서 질병이 경과됨에 따라 다수 출현하기 시작하였고, 세포질내에는 Birbeck과립은 감소하나 많은 lysosome과 ribosome이 출현하였으며 Birbeck과립은 세포막과 연결되는 양상도 관찰되었다(Fig 8). 또한 이들 Langerhans cell들은 입과구와의 접촉이 인정되었고(Fig 9), 진피내에는 macrophage, 호중구, 비만세포 그리고 섬유아세포 등이 출현하였다(Fig 10).

피부의 임상 및 육안적 소견은 대체로 의견의 일치를 보나 병리조직학적 소견에 있어서는 다소 차이가 있는 것으로 사료된다. 즉 병리조직학적 소견에 있어서 淸水⁴는 발병초기에는 표피에 국한해서 급성 삼출성염이 관찰되나 차차 병변이 피부 심층부로 과급하게 되며 표피층에 원인균의 집락을 함유하는 각화층의 탈락과 부전 각화 현상이 나타나고 표피상피세포들의 공포화와 동시에 괴사가 일어난다고 하였다. 그리고 진피내에는 혈관의 출혈과 조직구와 호중구등의 침윤을 볼 수 있다고 하였다. 그러나 Taylor³는 호중구의 침윤을 동반하는 표피 각화층의 탈락과 표피 배아층이 진피내로 망상으로 돌출한다고 하였다. 오와 이⁵는 표피층의 병적변화에 대해서는 淸水⁴가 기술한 소견과 대체로 일치된 소견이었다고 하였다. 그러나 표피에 기타 세균의 2차 감염이 있을 때는 표피층의 괴사가 매우 심하였고 호중구가 다수 출현하였다. 그러나 진피내의 삼출세포로는 호중구와 원형세포가 출현하였고, 질병이 경과함에 따라 원형세포가 다수 출현하였으며 표피 배아층세포의 분열증식에 의한 진피내에 망상 돌출과 혈관 주위에 많은 원형세포의 침윤 그리고 육아종양 소체의 출현과 비만세포, 호중구 및 형질세포 등이 다수 출현하였다. 한편 이와같은 조직학적 소견은 淸水⁴ 그리고 오와 이⁵가 기술한 바와 같이 피부의 비후를 나타내게 할 수 있는 소견이라고 사료되었다.

본 질병이 만성화함에 따라 피부의 비후가 일어나는 것은 표피 배아층 상피세포의 분열증식과 진피내의 육아종양 소체의 형성 및 많은 세포의 출현에 기인되는 것으로 보며 특히 Langerhans cell의 동태가 주목되는 바이다. 피부 표피층내에는 Langerhans cell이 출현한다는 것은 주지의 사실이나 질병이 경과함에 따라 epidermo-dermal junction 및 진피하층에 다수 출현하였고, 또한 macrophage 및 입과구의 출현을 볼 수 있었다. 이 질병에 있어서 초기부터 호중구에 비해 원형세포 즉 입과구와 macrophage가 피내에 다수 출현한다는 것은 흥미로운 사실이며⁵, 이와같은 소견은 淸水⁴가 기술한 소견과 대체로 일치되나 구체적인 세포침윤에 대한 보고는 찾아볼 수 없었다.

피부 표피세포간에 존재하는 Langerhans cell은 피부의 외적 환경적 요인에 기인된 항원을 전달하는 가장 중요한 면역세포로 알려져 있고^{15,16}, 이 Langerhans cell에 의해 T-lymphocyte의 활성화가 일어나고 동시에 이 T-lymphocyte가 산생한 lymphokine에 의해 육아종

형성과 면역항체 분비를 촉진케 한다고 한다^{17,25}. 그리고 인간의 피부 sarcoidosis시 형성된 육아종에 있어서도 이 Langerhans cell이 다수 출현하며 이 Langerhans cell이 임파구를 활성화시켜 육아종 형성에 관여한다고 암시한 바 있다²⁰. 또한 말의 microfilariasis시 피부의 진피내 혈관 주위에 Langerhans cell과 임파구 및 비만세포가 다수 출현함을 관찰하고 이를 Langerhans cell이 항원정보를 전달하는 활성화된 형태학적 소견이라고 지적한 바 있다²¹. 본 실험에서도 진피내에 많은 임파구와 Langerhans cell 그리고 비만세포⁵가 출현한 것은 지속적인 항원의 작용에 의한 이들 세포의 활성화와 동시에 육아종양 소체를 형성케 하는 것으로 판단되나 계속 추구해 볼 문제라고 사료되는 바이다. 비만세포는 염증과 면역학적 반응에 있어서 중요한 의의를 가지고 있으며 특히 즉시형 과민반응과 지연형 과민반응에 강력한 mediator를 분비한다고 한다^{22,28}. 본 실험에 있어서 진피내 혈관 주위에 출현하는 세포들의 양상으로 보아 지연형 과민반응의 소견이며 이와같은 소견이 나타날 수 있었던 것은 원래 피부에 많은 비만세포가 존재하기 때문에 다른 염증성 반응보다는 더욱 육아종성 반응을 유기할 수 있는 것으로 추측되며 기타 부위의 신장 및 관절에서는 화농성염⁵의 소견인 것으로 보아서도 미루어 짐작할 수 있었다. 그리고 만성화된 병든에 전신요법으로 항 histamine제나 부신피질 hormone제 등을 투여함을 효과적이라고 지적한 것⁴은 이와같은 과민반응 또는

면역세포의 기능을 억제하기 위한 것이라고 사료되는 바이다.

결 론

돼지 삼출성 포피염의 피부의 병적 변화를 면역조직 화학적 및 전자현미경적으로 관찰하였던 바, 면역조직 화학적 검사에 있어서는 ATPase 양성 dendritic cell은 포피상피층내에서보다 epidermo-dermal junction 부위와 진피내 혈관 주위에 다수 출현하였으며 질병이 경과함에 따라 증가하였다. 이와같은 dendritic cell은 immunoperoxidase법에 의해 Langerhans cell로 동정되었으며 육아종양 소체 주위에 다수 관찰되었다.

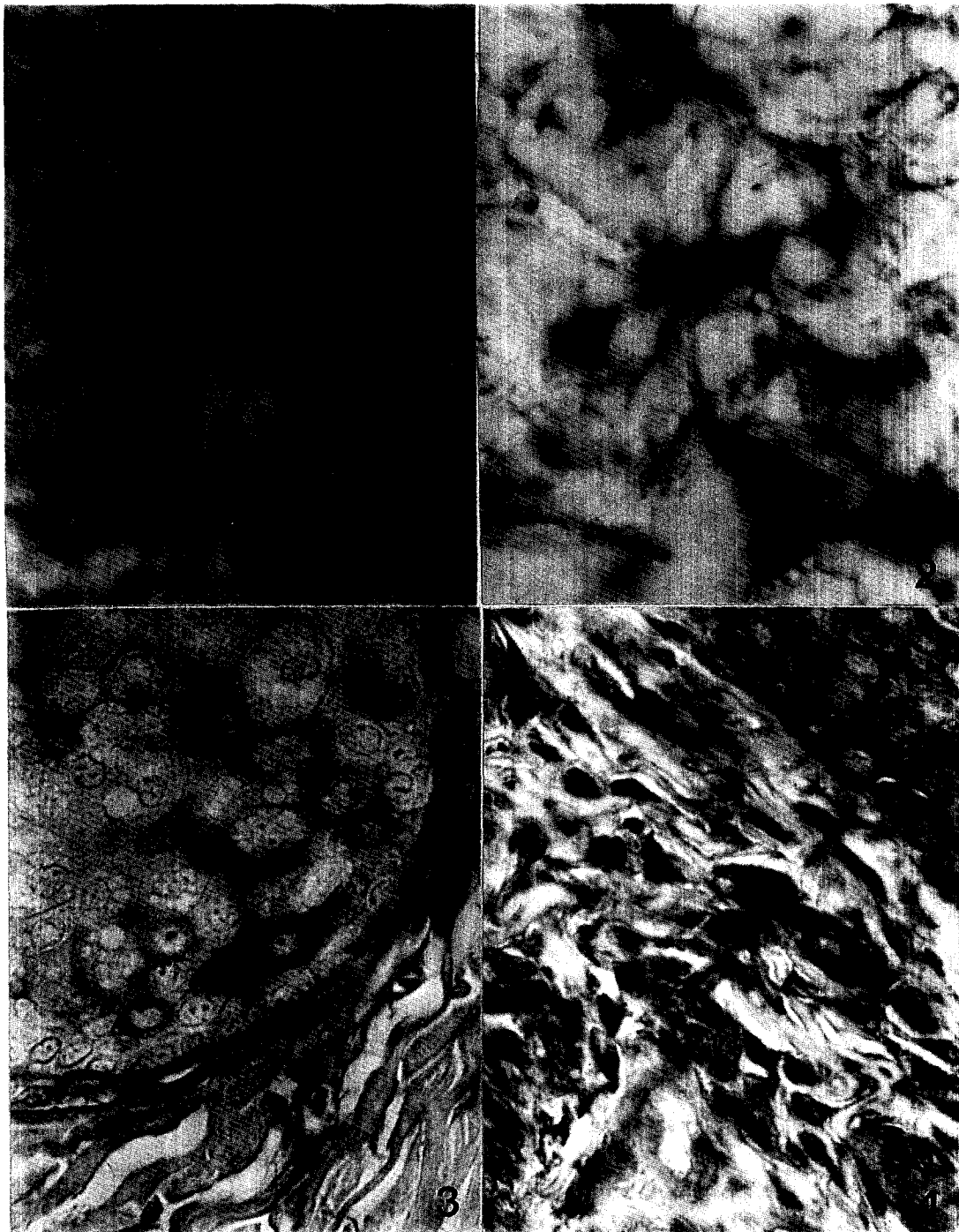
전자현미경적 소견에 있어서는 포피 상피층세포의 cell organelle의 각종 퇴행성 변화와 공포화 그리고 세포간 공격에 무구조한 삼출액의 저류와 세포간 분리가 인정되었다. 그리고 포피 상피세포간에 존재하는 Langerhans cell은 epidermo-dermal junction 및 진피내와 육아종양 소체 주위에 다수 출현하면서 세포질내 Birbeck과립은 감소하나 lysosome과 ribosome이 다수 출현하였고 이들 세포는 임파구와 접촉이 인정되었다. 그리고 진피내에 출현하는 각종 면역세포와 육아종양 소체의 형성등에 관한 고찰과 아울러 이는 지연형 과민반응의 소견으로 간주되었다.

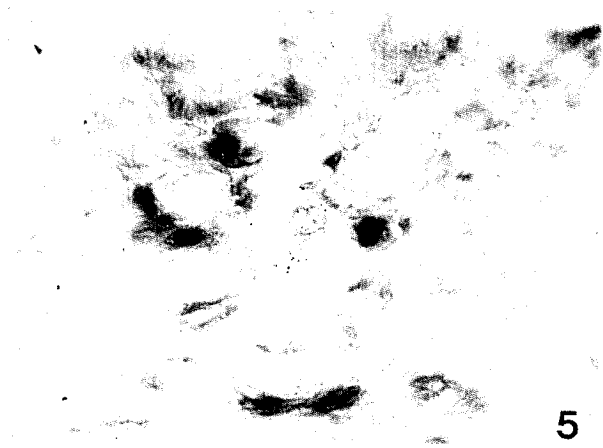
Legends for figures

- Fig 1. ATPase-positive dendritic cell is seen in the epidermo-dermal junctional area of acute case. ×268.
- Fig 2. ATPase-positive dendritic cells in the dermis are increased in chronic case. ×268.
- Fig 3. Ia-positive Langerhans cell is seen in the epidermis of acute case. ×268.
- Fig 4. Immunoperoxidase-positive cells(Langerhans cells) by S-100 protein are seen in the dermis of chronic case. ×268.
- Fig 5. Ia-positive Langerhans cells using chromogen AEC are observed in around blood vessels of the dermis in chronic case. ×268.
- Fig 6. Electron micrograph of epidermis. A Langerhans cell(L) appears among the degenerating keratinocytes. ×4,400.
- Fig 7. Electron micrograph of stratum germinativum. Activated basal cell contains free ribosomes and amorphous materials within cisternae of dilated rER. ×7,000.
- Fig 8. Electron micrograph of perivascular Langerhans cell in dermis. Birbeck granules(arrows) are decreased in number. ×7,000. Insert; Birbeck granules(arrows) of Langerhans cell. ×35,000.
- Fig 9. Electron micrograph of perivascular cell in dermis. Activated Langerhans cell(L) is in contact with

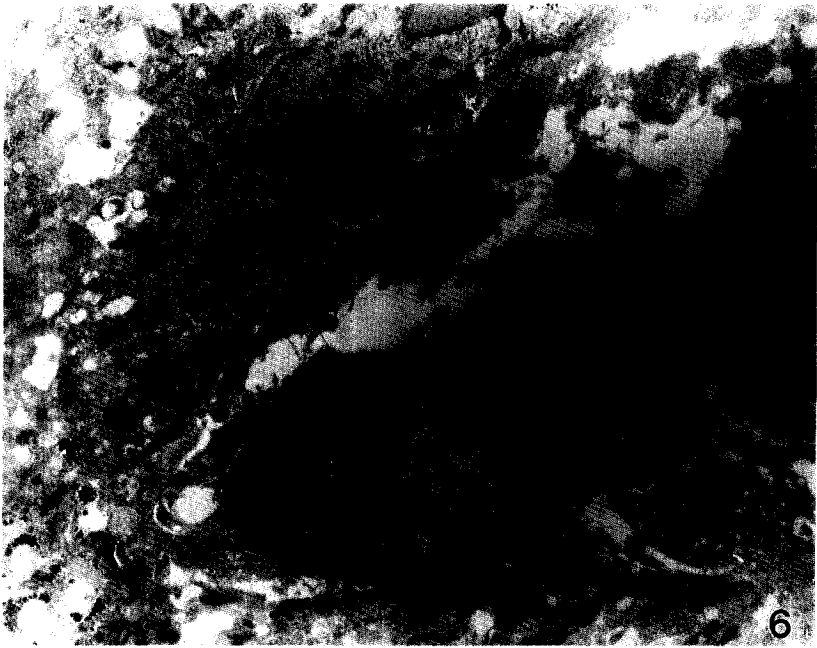
lymphocyte(Ly). M; macrophage, B; blood vessel. $\times 4,400$.

Fig 10. Electron micrograph of perivascular cells in dermis. Various cells are seen around blood vessel(B). F; Fibroblast, M; macrophage, N; neutrophil. $\times 4,400$.

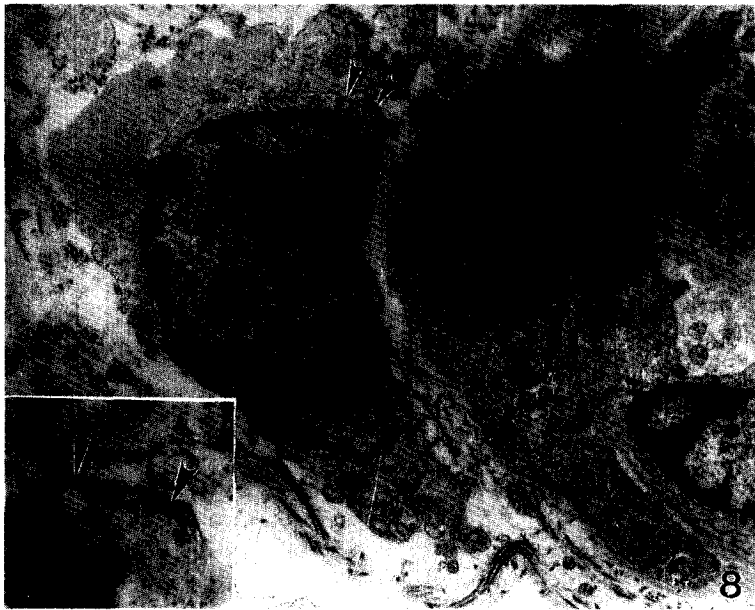
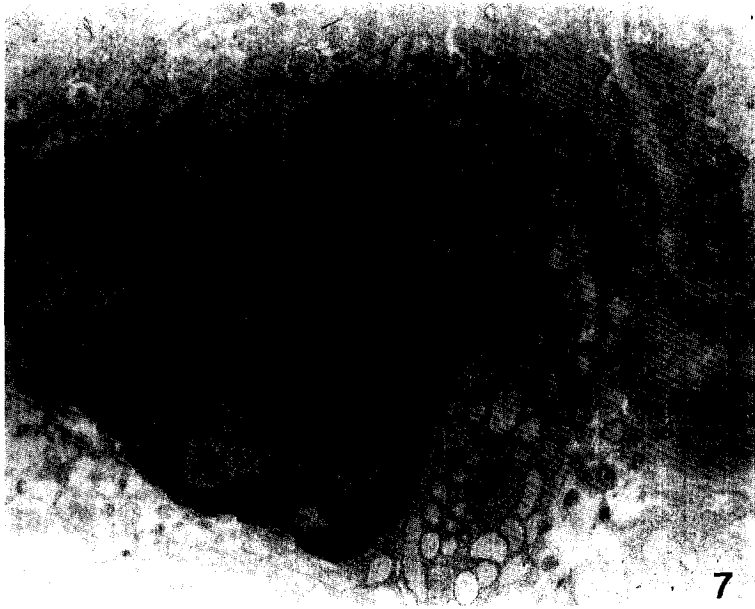


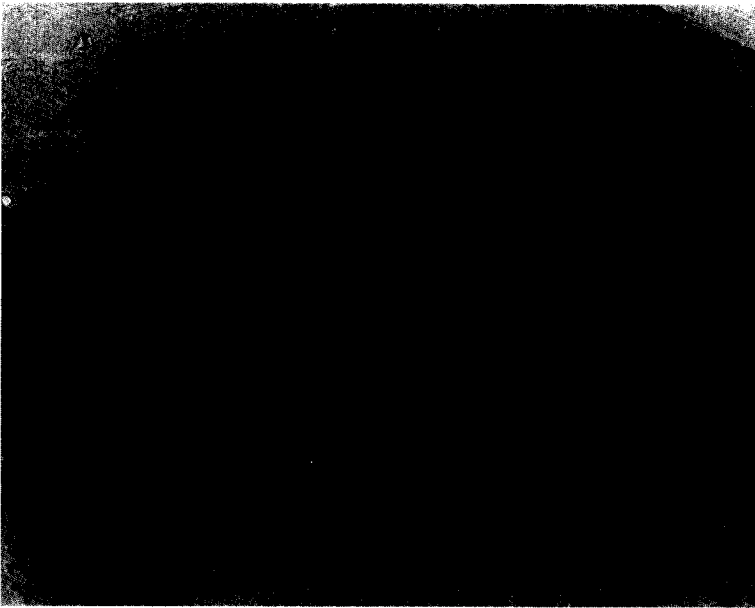
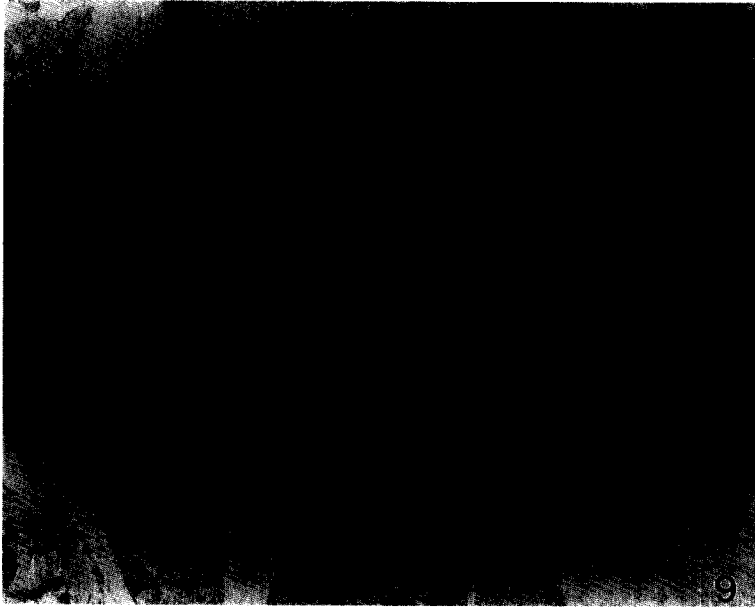


5



6





참 고 문 헌

- Devriese LA. Isolation and identification of *Staphylococcus hyicus*. *Am J Vet Res* 1977; 38: 787-792.
- Takeuchi S, Kobayashi T, Morozumi T, et al. Isolation and some properties of *Staphylococcus hyicus* subsp *hyicus* form pigs, chickens and cows. *Jpn J Vet Sci* 1985; 47: 841-843.
- Taylor DJ. Exudative epidermitis, In: Diseases of swine edited by Leman AD, et al. 7th ed. Ames, Iowa: Iowa State Univ press, 1992; 522-525.
- 清水晃. 渗出性 表皮炎. 豚病学(態容哲夫外). 第3版. 東京: 近代出版, 1987; 438-443.
- 오규실, 이차수. 실험적 돼지 삼출성 포피염에 관한 병리학적 연구 I. 육안적 및 병리조직학적 관찰. 대한수의학회지 1994; 34: 787-799.
- 朴清圭, 康炳奎. 돼지 渗出性表皮炎에 관한 研究. I. 發病豚 및 健康豚으로 부터 *Staphylococcus hyicus* subsp *hyicus*의 分離 및 그 性狀. 大韓獸醫學會誌 1986; 26: 251-257.
- 朴清圭, 康炳奎. 돼지 渗出性表皮炎에 관한 연구. II. 돼지유래 *Staphylococcus hyicus* subsp *hyicus*의 血清刑別. 大韓獸醫學會誌 1987; 27: 47-52.
- Hanau D, Fabre M, Sampf JL, et al. ATPase Langerhans cell staining: A technique allowing progression from light to electron microscope observation. *J Invest Dermatol* 1986; 86: 5-8.
- 류시윤, 이차수. 유선조직내에 출현하는 dendritic cell의 형태학적 연구. I. ATPase-positive dendritic cell의 분포양상. 大韓獸醫學會誌 1988; 28: 227-239.
- Carbone A, Manconi R, Poletti A, et al. S-100 protein immunostaining in cells of dendritic morphology within reactive germinal centers by ABC immunoperoxidase method. *Virchow Arch(Pathol Anat)* 1985; 406: 27-32.
- Lee CS, Shin TK, Choi YJ, et al. Studies on the rabbit viral hepatitis: Immunohistochemical observations. *Korean J Vet Res* 1993; 33: 269-275.
- Dick CP, Johnson RP. Immunohistochemical detection of feline calicivirus in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens. *Can J Vet Res* 1989; 53: 331-335.
- De Waele M, De Mey J, Renman W, et al. Immunogold-silver staining of lymphocyte surface antigens on cells in suspension and in lymph node cryostat sections. *J Microscopy* 1986; 143: 151-160.
- Morris DC, Randall JC, Anderson C. Light microscopic localization of alkaline phosphatase in fetal bovine bone using immunoperoxidase and immunogoldsilver staining procedures. *J Histochem Cytochem* 1988; 36: 323-327.
- Steinman RM, Nussenzweig MC. Dendritic cells: Features and functions. *Immunol Rev* 1980; 53: 127-147.
- Stingl G, Tamaki K, Katz SI. Origin and function of epidermal Langerhans cells. *Immunol Rev* 1980; 53: 149-174.
- Pinkston P, Billerman PB, Crystal RG. Spontaneous release of interleukin-2 by lung lymphocytes in active pulmonary sarcoidosis. *N Engl J Med* 1983; 308: 793-800.
- Hunninghake GW, Bedell GN, Zavala DC, et al. Role of interleukin-2 release by lung T cells in active pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 634-638.
- Garrett KC, Richerson HB, Hunninghake GW. Pathogenesis of the granuloma formation. *Am Rev Respir dis* 1984; 477-483.
- Martin AG, Kleinhenz MA, Elmetts CA. Immunohistologic identification of antigen-presenting cells in cutaneous sarcoidosis. *J Invest Dermatol* 1986; 86: 625-629.
- 黒龍哲郎, 井上哲, 樽山一哲 等. ウマ夏癩における皮膚 Langerhans細胞の病態. 第113回 日本獸醫學會講演要旨集 1992; 122.
- Askenase PW, Van Loveren H. Delayed-type hypersensitivity; Activation of mast cells by antigen-specific T-cells factors initiates the cascade of cellular interactions. *Immunol Today* 1983; 4: 259-264.
- Debeuckelaere S, Schoors DF, Devis G. Systemic mast cell disease: A review of the literature with special focus on the gastrointestinal manifestations. *Acta Clinica Belgica* 1991; 46(4): 226-232.
- Gordon JR, Burd PR, Galli SJ. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol Today* 1990; 11: 458-464.

25. Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. *Nature* 1990; 346: 274-276.
26. Morone G, Casolaro V, Cirillo R, et al. Pathophysiology of human basophils and mast cells in allergic disorders. *Clin Rev Allergy* 1983; 1: 427-448.
27. Mitchell EB, Askenase PW. Basophils in human disease. *Clin Rev Allergy* 1983; 1: 427-448.
28. Huntley JF. Mast cells and basophils: A review of their heterogeneity and function. *J Comp Pathol* 1992; 107: 349-372.