

흰쥐의 일주기조절증추내 바이러스 감염에 대한 매개변수 분석

대구대학교 재활과학대학 물리치료학과
김 진 상

Parametric Analysis on the Viral Infection in the Rat Circadian Control Center

Kim, Jin-Sang, Ph.D., DVM
Dept. of Physical Therapy, College of Rehabilitation Science, Taegu University

〈Abstract〉

The neurotropic pseudorabies virus(PRV) to replicate within neurons is very useful pathogen for neuronal tracing. I carried out this study to investigate the parametric analysis on the viral infection in the rat circadian control center with two genetically engineered strains out of PRV. The two strains are isogenic with the attenuated Bartha strain of PRV : in one strain a lacZ reporter gene was inserted into the gC locus (PRV-BaBlu : 4.75×10^8 pfu/ml) and the other strain contained a PRV envelope glycoprotein gene (PRV-D : 2.5×10^8 pfu/ml) that is absent in PRV-BaBlu. Simultaneous or temporally separated sequential injection of 2 μ l of each strain into the vetrinous body of eye produced a course of transsynaptic infection of retinohypothalamic circuitry.

The results were as follows :

1. PRV-BaBlu and PRV-D infected the suprachiasmatic nucleus in hypothalamus and intergeniculate leaflet in lateral geniculate nucleus of thalamus.
2. The rate of PRV infection was dependent upon PRV strain.
3. Pre-infected neurons by PRV-D were interfered with the replication of PRV-BaBlu.
4. Dual injection of PRV-D and PRV-BaBlu showed more virulent than the parental strain.

이 논문은 1997년도 대구대학교 학술지원비 지원에 의한 논문임.

I. 서 론

시상하부의 시각교차위핵(Suprachiasmatic nucleus, SCN)는 최근 20여년동안 중요한 연구과제 중 하나였다. 최근 망막시상하부로(Retinohypothalamic tract)가 시각교차위핵에 종지한다는 사실이 발견된 이래 일주기조절 중추(Pacemaker of circadian rhythm)로서의 기능에 대한 이해의 폭 또한 매우 넓어졌다(Riley 등 1981). 망막시상하부로는 망막신경절세포(Retinal ganglion cell)에서 기시하여 시각신경과 시각신경교차(Optic chiasm)를 지나 시각교차위핵으로 투사되는 섬유, 앞시상하부영역(Anterior hypothalamic area)으로 투사되는 섬유, 뒤시각교차영역(Retrochiasmatic area)으로 투사되는 섬유 및 외측시상하부영역(Lateral hypothalamic area)으로 투사되는 섬유로 나눌 수 있다(Johnson 등, 1988a). 시각교차위핵으로 투사되는 섬유는 시각교차 바로 위에 놓인 일련의 전종말축돌기와 신경종말로 신경분포는 일정하고 매우 치밀하다(Rinaman 등, 1989). 전자현미경으로 볼 때 시각교차위핵에 종지하는 망막시상하부로의 신경종말은 전형적인 관상의 사립체를 함유한 투명한 세포질내에 가끔 크고 치밀한 소포와 작고 구형의 소포를 지니고 있다. 이 망막시상하부로의 신경종말은 연접후막인 가시돌기와 대칭적 및 비대칭적 연접을 하고 있으며 시각교차위핵의 배쪽외측에 치밀하게 종지하는 이외에 시각교차위핵의 등쪽내측에도 산발적으로 종지하고 있다(Bak 등, 1977).

시각교차위핵에 종지하는 망막시상하부로의 신경종말내에는 흥분성 신경전달물질로서 Glutamate가 함유되어 있는데(Boulos와 Rusak, 1982) 이는 NMDA 수용체 길항제가 빛에 대한 일주기조절기능을 차단한다는 보고(Colwell 등, 1991)와 깨어있는 동물의 시각교차위핵에 Glutamate를 투여하면 통상적으로 빛에 의해 생산되는 것과는 다른 위상반응곡선(phase response curve)을 생산한다는 보고(Meijer와 Rietveld, 1989)에서 확인되었다. 또한 N-acetylaspartylglyutamate도 시각교차위핵에 종지하는 망막시상하부로의 신경종말에서도 확인되었는데 이는 시각신경의 자극과 유사한 효과를 산출하는 것으로 알려졌으며, 그 외에도 Substance P가 시각교차위핵에 종지하는 망막시상하부로의 신경종말에 함유되어 있다(Takakuji 등, 1991). 시각교차위핵은 형태학적으로 뚜렷이 망막시상하부로와 무릎시상하부로(Geniculohypothalamic tract)가 종지하며 신경전달물질로 Vasoactive

intestinal polypeptide(VIP)를 함유한 신경원들이 분포하고 있는 배쪽외측부(Ventrolateral)와 Vasopressin을 함유한 신경원들이 분포하고 있는 등쪽내측부(Dorsomedial)로 나뉘어 진다(Pickard, 1982)(Fig.1).

그리고 외측무릎핵(Lateral geniculate nucleus)은 눈으로부터 뇌의 후두엽에 있는 시각피질까지 가는 정보를 전달하는 시상하부의 중개핵인 외측무릎체등쪽핵(Dorsal lateral geniculate nucleus)과 시각반사, 안구운동의 조절 및 피질하 시각기능과 관련있는 외측무릎체배쪽핵(Ventral lateral geniculate nucleus) 및 등쪽핵과 배쪽핵 사이에 위치하며 등쪽과 반대쪽 눈의 망막으로부터 시각정보를 받는 무릎사이작은핵(Intergeniculate leaflet)으로 구분된다(Moore와 Card, 1993). 무릎시상하부로는 시상에 위치한 외측무릎핵내 무릎사이작은핵의 신경원에서 기시하여 시각교차위핵의 배쪽외측부에 종지하는 이차적 시각전도로이다(Hickey와 Spear, 1976). 무릎사이작은신경핵내에는 Neuropeptide Y(NYP)가 함유되어 있으며, 반대측의 외측무릎사이작은신경핵으로 가는 신경섬유도 내게되는데 여기에는 신경전달물인 Enkephalin이 함유되어 있고 GABA는 반대측 외측무릎사이작은신경핵과 시각교차위핵으로 가는 신경섬유 모두에서 관찰되는 신경전달물질이다(Johnson, 1989). 또한 시각교차위핵은 망막시상하부로와 무릎시상하부로로부터 오는 수입신경섬유 외에 다른 시상하부신경핵, Serotonin을 함유한 솔기핵(Raphe nucleus) 등으로부터 수입신경섬유를 받으며(Nauta와 Haymaker, 1967), 송과체에서 분비되는 호르몬인 Melatonin에 대한 많은 수용체가 존재하는데 Melatonin은 시각교차위핵의 정확한 일주기조절의 되먹이 기전에 관여한다(Cassone 등, 1986b).

한편, *Peudorabies* 바이러스(PRV)는 사람에서 *Herpes simplex* 바이러스에 의해 유도되는 것과 유사하게 돼지에서 감염을 일으키는 *Herpesviridae* 계에 속하는 알파*Herpes* 바이러스이다(Card 등, 1990). 이 DNA바이러스는 적어도 40개 이상의 당단백을 지니고 있는 외막(Envelope)을 지니며 다른 *Herpes* 바이러스의 당단백질과 유사한 구조와 기능을 수행한다(Card 등, 1991). PRV당단백 중 gp50, g II 및 g H는 세포배양시 바이러스 증식에 필요하기 때문에 본질당단백(Essential glycoprotein)에 속하고, g I, g II, g X 및 gp63은 바이러스 증식에 요구되는 것은 아니지만 표적세포 인식, 감염된 세포로부터 바이러스의 유리, 숙주 면역계와 상호작용 및 신경독성유발 등 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려졌다(Card 등, 1993).

PRV은 야생형인 Becker 종(PRV-Be)과 백신형인 약독화된 Bartha 종(PRV-Ba)으로 대별되는데 PRV-Be는 매우 높은 신경친화성을 지니고 있으며, 중추신경계내 세포용해성 감염을 야기시키는 반면에 PRV-Ba는 신경친화성을 지니고 있으나 세포용해성 감염을 야기시키지는 않는다(Goodpasture와 Teague, 1993). 이 차이점의 근본적 기전이 확실히 규명된 것은 아니지만 주된 원인의 하나가 바이러스의 외막의 구성요소인 당단백의 변화이다(Lieberman 등, 1989).

PRV-Ba는 PRV-Be의 계놈 중 Unique Short(Us) Segment에서 gI, gE, USII 및 28K유전자 중 일부와 Unique Long(UL) Segment의 gC유전자의 일부를 제거하여 산출된다. PRV-D는 PRV-Be의 Unique Short(Us) Segment 중 gI와 gE에 해당되는 유전자를 제거하고 Unique Long(UL) Segment의 gC유전자의 일부를 누락 및 변형시켜 산출되며, PRV-BaBlu는 PRV-Ba의 Unique Short(Us) Segment 중 gG 유전자에 lacZ유전자를 삽입시켜 산출된다(Altschuler 등, 1991; Field 등, 1975; Nadelhaft 등, 1992; Robbins 등, 1987, 1989).

그런데 한 개의 신경세포가 두 종 이상의 PRV에 감염될 수 있는가에 대한 연구는 그리 많지 않지만 김 등(1997)은 신경세포내 PRV-D의 침습과 복제는 PRV-BaBlu보다 빠르고, PRV-D가 PRV-BaBlu 보다 병독성이 강하며, PRV-D와 PRV-BaBlu의 동시 주입은 같은 위치의 신경세포를 동시에 감염시켰다고 보고하였으나 중추신경계내 PRV 감염에 대한 매개변수 분석에 대한 연구가 시급한 실정이다. 따라서 연구자는 PRV의 백신형인 PRV-Ba를 유전자 조작을 통해 산출된 PRV-BaBlu와 PRV-D를 흰쥐의 눈의 초자체에 각기 주입, 혼합주입, 좌우주입 및 시간적 간격을 둔 연속 주입 등의 방법으로 주입하여 중추신경계에서의 시각전도로를 재구성하고 신경로 추적자인 PRV-BaBlu와 PRV-D의 복제와 이동의 시공간적 이동 양상을 관찰함으로써 중추신경계내 바이러스 감염의 매개 변수를 분석하고자 본 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

Sprague Dawley계 용성 흰쥐(B.W.: 200~350gn) 50마리를 본 실험에 사용하였다. 사료와 물은 실험 전과

정을 통해 자유로이 공급하였고, 광주기는 14시간은 밤과, 10시간은 어둡게 하여 표준화했다. 실험관리는 American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care와 Animal Welfare(Public Law 99-198)의 관리지침에 준했다. 모든 실험동물은 각 실험의 전과정을 통해 Biosafety level2 laboratory내로 국한시켰다.

2. 돌연변이 바이러스 생산

PRV의 돌연변이종인 PRV-BaBlu와 PRV-D가 본 실험에서 사용되었는데 PRV의 계놈과 PRV-BaBlu와 PRV-D의 모식도는 Fig. 2와 같다. PRV-D는 야생형인 PRV-Be의 계놈 중 Unique Short(Us) Segment 중 gI와 gE에 해당되는 유전자를 제거하고 Unique long(UL) Segment 중 gC유전자의 일부는 누락 및 변형시켜 산출하였고, PRV-BaBlu는 PRV-Be의 계놈 중 Unique Short(Us) Segment에서 gI, gE, USIII 유전자 및 28K 유전자의 제거하여 산출된 PRV-Ba의 Unique Short(Us) Segment 중 gG 유전자에 lacZ(β -galactosidase) 유전자를 삽입시켜 산출하였다. PRV-D와 PRV-BaBlu는 Porcine kidney fibroblast(PK15-cell)에서 배양하되, 사용할 때 plaque forming unit는 각기 4.26×10^8 pfu/ml와 2.5×10^8 pfu/ml 으로 하여 -70°C에서 냉동보관 하였으며, 주사 직전에 녹여 신선한 것을 사용하였다. 아직 사람에게서 PRV에 감염된 보고는 없으나 만일의 경우를 생각하여 실험과정 중 모든 실험기기와 실험동물은 외부와 격리시켜 접촉을 피하고 실험연구자는 반드시 1회용 가운과 모자, 장갑 및 마스크를 사용하고, 사용후에는 모두 소각 처리하였다. 또한 모든 수술도구는 Clorax로 소독하여 보관하는 등 만일의 사고에 대비하여 최대한의 감염방지에 노력하였다.

3. 바이러스 주입

실험동물은 실험직전에 Ketamine(50mg/ml)과 Xylazine hydrochloride(20mg/ml)를 각각 체중 gm당 0.15ml과 0.05ml 씩 혼합시켜 복강내 주사하여 마취시킨 후 바이러스 주입 예정부위인 눈의 초자체내에 Hamilton 주사기로 이용하여 바이러스 2 μ l를 다음과 같은 방법으로 주입하였다.

1) PRV-BaBlu와 PRV-D를 각각 2 μ l 씩 눈의 초자체에 주입하였다.

2) PRV-BaBlu 1 μ l와 PRV-D 1 μ l를 혼합시켜 동시에 눈의 초자체에 주입하였다.

3) PRV-BaBlu 주입 후 24시간 후 PRV-D를 같은 부위에 주입하였다.

4) PRV-D 주입후 24 시간 후 PRV-BaBlu를 같은 부위에 주입하였다.

5) 오른쪽 눈에는 PRV-D를, 왼쪽 눈에는 PRV-BaBlu를 동시에 주입하였다.

바이러스의 유출을 최대한 줄이기 위해 처음 $1\mu\text{l}$ 의 바이러스를 눈의 초자체에 주입하고 5분동안 기다린 뒤 Hamilton 주사기 바늘을 약간 후방으로 당긴 뒤 $1\mu\text{l}$ 의 바이러스를 더 주입하고 10 분간 기다렸다. 바이러스 주입이 끝난 실험동물을 수술부위를 통합한 뒤 실험동물 사육장에서 외부와 격리시켜 사육하였다.

4. 조직처리

PRV-BaBlu를 주입한 뒤 60~120 시간의 생존기간을 준 다음 실험동물을 다시 동일 마취액으로 마취시키고 심장을 통해 관류고정을 실시하였다. 관류고정은 먼저 0.1M sodium phosphate buffer(PB)에 heparin(1000IU/1000ml)을 섞은 용액을 10분간 관류시키고 4% paraformaldehyde-lysine-periodate(PLP)를 30분간 관류시켰다. 관류고정이 끝난 후 대뇌, 소뇌 및 뇌줄기와 척수 등을 적출한 다음 동일 고정액에 넣어 4 °C에서 4시간 후 고정을 실시하였다. 그 후 다시 0.1M PB로 1시간 동안 수세하고 20% phosphate buffered sucrose용액에 담가 4 °C에서 12시간 내지 48 시간동안 보관하였다. 보관된 뇌조직들은 동결절편기(Cryostat, AO)를 이용하여 약 35 μm 두께의 연속횡단절편을 만들어 6 well plate에 순서대로 보관하여 약 500장의 조직절편을 자유부유법(Free floating method)으로 Hsu 등(1981)의 방법에 의해 면역조직화학염색을 실시하였다.

5. 항체

일차항체로 rabbit polyclonal antisera (Rb 134), rabbit monoclonal antisera(Rb1544) 및 mouse anti- β -galactosidase($M\beta$ -Gal)가 사용되었다. 바이러스를 동정하기 위해 Aceton으로 약독화시킨 PRV-Be를 토끼에 접종하여 생성시킨 Rb134는 바이러스에 감염된 중추신경핵 내에서 PRV-BaBlu와 PRV-D를 동정시켰고, Rb1544는 바이러스 외막의 gD당단백에 대한 특이항체로 PRV-D를 동정시켰으며, $M\beta$ -Gal은 lacZ유전자의 산물인 β -galactosidase에 대한 특이항체로 사용되었다.

6. 면역조직화학염색

일차항체인 Rb134(1 : 10,000), Rb1544(1 : 10,000) 및 $M\beta$ -Gal(1 : 2,000)에 조직절편들을 담가 실온에서 12시간내지 24시간동안 반응시켰다. 이때 1차항체의 회석은 0.1M PB에 1% normal donkey serum (Vector Lab.)과 0.3% Triton X-100(Sigma)이 혼합된 것을 사용하였다. 그 후 조직절편들을 실온에서 10분간 3회 0.1M PB로 세척하여 2차항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG(Vector Lab.)와 biotinylated goat anti-mouse IgG(Vector Lab.)를 1 : 200으로 회석하여 실온에서 1시간 가량 반응시켰다. 그 후 다시 0.1M PB로 15분간 2회의 수세과정을 거친후 peroxidase가 표지된 Avidin-Biotin Complex(ABC)용액에 담가 실온에서 1시간 가량 반응시켰다. 그 후 다시 0.1M PB로 15분간 2회 수세하고 나서 30 μl 의 3'-3' diaminobenzidine(DAB)을 150ml의 0.1 M PB에 녹인 용액에서 5분간 반응 시킨후 과산화수소수(H_2O_2)를 0.005% 되게 첨가하여 갈색의 발색반응을 약 10분간 시행하였다. 반응이 끝난 조직들은 다시 0.1 M PB에 여러 차례 수세하고 gelatin이 입혀진 슬라이드 위에 차례대로 얹어 4 °C에서 12시간 이상 건조시켰다. 그 후 통상적인 방법에 따라 ethanol과 xylene의 탈수와 투명화 과정을 거친후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

7. 면역이중형광염색

일차항체인 Rb1544(1 : 50)과 $M\beta$ -Gal(1 : 50)을 조직에 담가 실온에서 12시간 내지 24시간 동안 반응시켰다. 이때 일차항체의 회석은 0.1M PB에 1% normal donkey serum(Vector Lab.)과 0.3% Triton X-100(Sigma)이 혼합된 것을 사용하였다.

그 후 조직절편들을 실온에서 10분간 3회 0.1M PB로 세척하여 2차항체인 Fluorescein이 부착된 biotinylated anti-rabbit IgG(Vector Lab.)와 CY3 fluorophors가 부착된 biotinylated anti-mouse IgG(Vector Lab.)를 1 : 100으로 회석하여 암실에서 24시간 반응시켰다. 반응이 끝난 조직은 슬라이드에 포매후 형광물질을 가시화시킬 수 있는 Filter가 부착된 Zeiss Axioplan photomicroscope를 사용하여 이중면역형광 사진 촬영을 실시하였으며 면역조직 화학반응을 일으킨 조직 슬라이드는 NIH Image Software로 계수하여 통계처리 하였다.

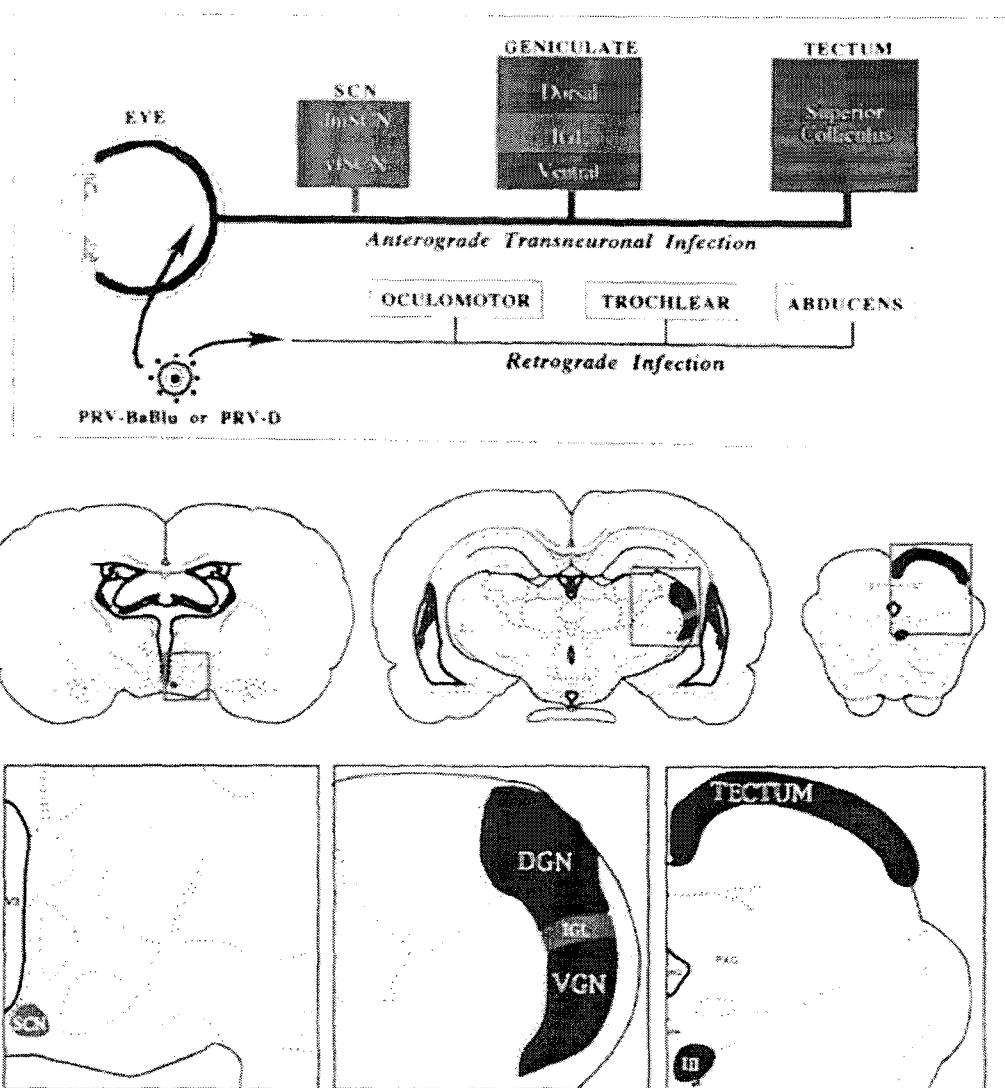
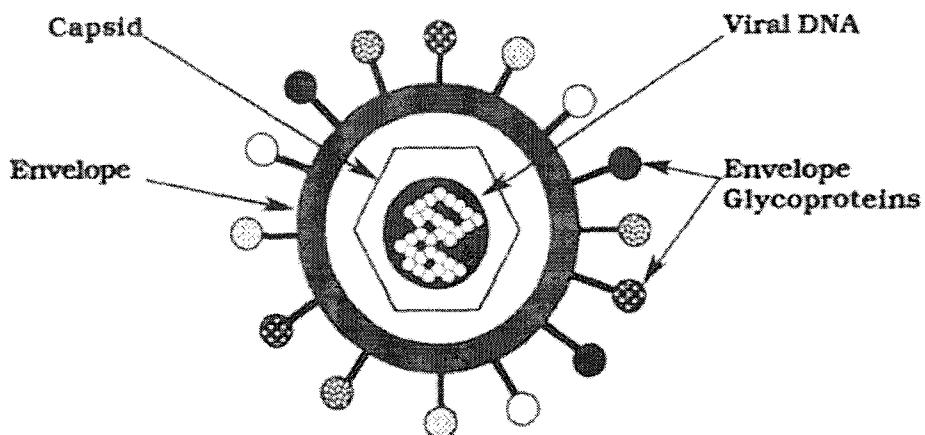


Fig. 1. PRV Neurotropism for Visual Circuits. Wild type (PRV-Beker) and attenuated (PRV-Bartha) virus exhibited differential tropism for visual circuits after intravitreal injection. Wild type virus infected all retinorecipient neurons in two temporally separated waves whereas attenuated PRV only infected a functionally-distinct subset of this circuitry. This differential tropism is illustrated in the above schematic diagrams and photomicrographs. PRV-Bartha was the parental strain used to construct the two mutants used in this study.

SCN : Suprachiasmatic nucleus
 DGN : Dorsal geniculate nucleus
 IGL : Intergeniculate leaflet
 VGN : Ventral geniculate nucleus



VIRAL GENOME

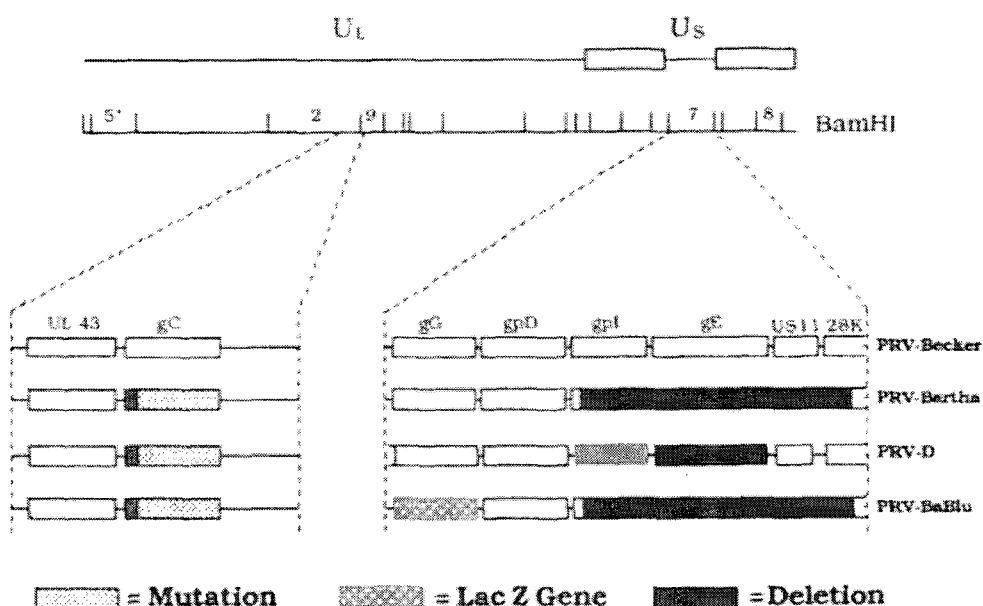


Fig. 2. Viral Strains. The two genetically engineered strains are isogenic with PRV-Bartha.

PRV-D was constructed by repairing by deletion in the short (U_S) region of the genome and then cutting out the gE gene with restriction enzymes. This left a functional gI gene (green in the above gene map) that produced a protein product unique to PRV-D was identified with a monospecific rabbit antiserum. PRV-BaBlu was produced by replacing the gX gene with the lacZ gene (red in above map) which produced the bacterial enzyme β -galactosidase (β -Gal). β -Gal was identified with a mouse monoclonal antiserum purchased from 3'-5' Immunochemicals.

III. 결 과

눈의 초자체에 주입된 PRV-BaBlu와 PRV-D는 망막의 신경절세포에서 기시하는 망막시상하부로를 따라 주행하여 시각교차위핵, 외측무릎체등쪽핵, 외측무릎체배쪽핵, 외측 무릎사이작은핵 및 시각피질내 신경세포들을 감염시켰는데 PRV-D의 침입과 복제는 PRV-BaBlu보다 빠르게 일어났다. 그 이동한 자리는 바이러스가 남아 계속 증식함에 따라 바이러스의 존재위치를 형태학적으로 규명하기 위한 면역조직화학과 이중면역형광염색을 통해 바이러스를 간직한 세포체와 간직하지 않은 신경세포체와는 비교적 명확하게 구분이 되어 같은 신경핵속에서 도 시각정보전달과 관련있는 신경세포인지 무관한 세포인지 쉽게 구별이 되었다.

바이러스 주입후 시간 경과에 따른 생존시간은 PRV-BaBlu를 주입한 경우에는 130시간까지는 기면상태(lethargy)가 나타나지 않았으나 그후 기면상태가 발현되면서 계속 증상이 심해져서 최대 140시간까지 생존하였고, PRV-D를 주입한 경우에는 82시간까지 기면상태가 나타나지 않았으나 그 후 기면상태가 발현되면서 최대

Table 1. The Infected Neurons in Suprachiasmatic nucleus and Intergeniculate Leaflet as PRV-D and PRV-BaBlu were Injected into the Eye Simutaneously.
(Unit : Number)

Nucleus	Green	Red	Yellow
SCN**	127±31	52±17	29±14
IGL**	55±13	16±9	36±15

** : p < 0.01, Mean±S.D.

Green : PRV-D Infected

Red : PRV-BaBlu Infected

Yellow : PRV-BaBlu and PRV-D Co-Infected

SCN : Suprachiasmatic Nucleus

IGL : Intergeniculate Nucleus

Table 2. The Infected Neurons in Suprachiasmatic Nucleus as Injection of PRV-D was Followed by PRV-BaBlu 24 Hours Later.
(Unit : Number)

Nucleus	Green	Red	Yellow
SCN**	168±39	42±19	5±4

** : p < 0.01, Mean±S.D.

Green : PRV-D Infected Red : PRV-BaBlu Infected

Yellow : PRV-BaBlu and PRV-D Co-Infected

SCN : Suprachiasmatic Nucleus

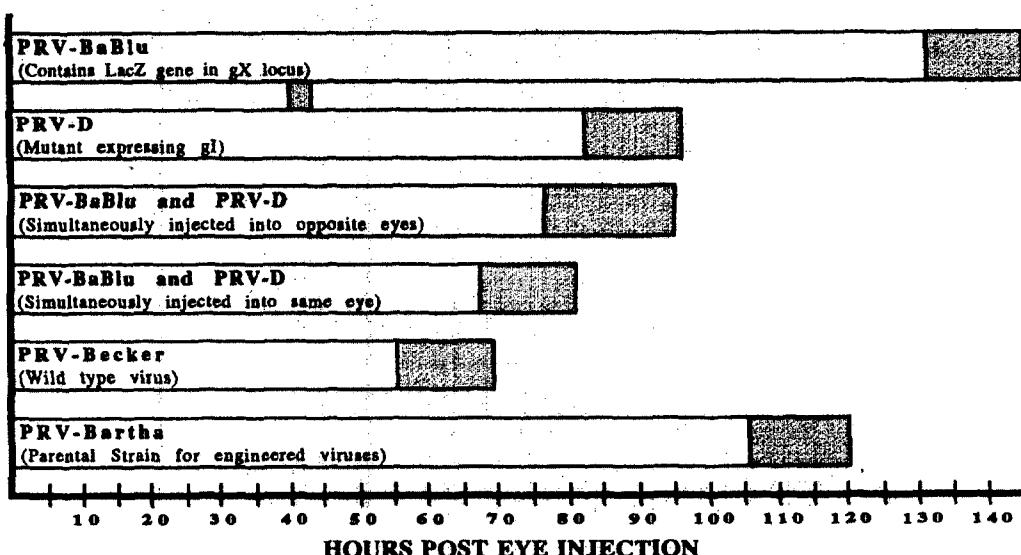


Fig. 3. Examination of virulence by injection of the two mutants either individually or in combination was illustrated. This panel was data derived from eye injection. The length of each bar defines the longest survival in that paradigm and the shaded were indicated the time in which symptoms of infection (Lethargy, weight loss, etc.) were apparent.

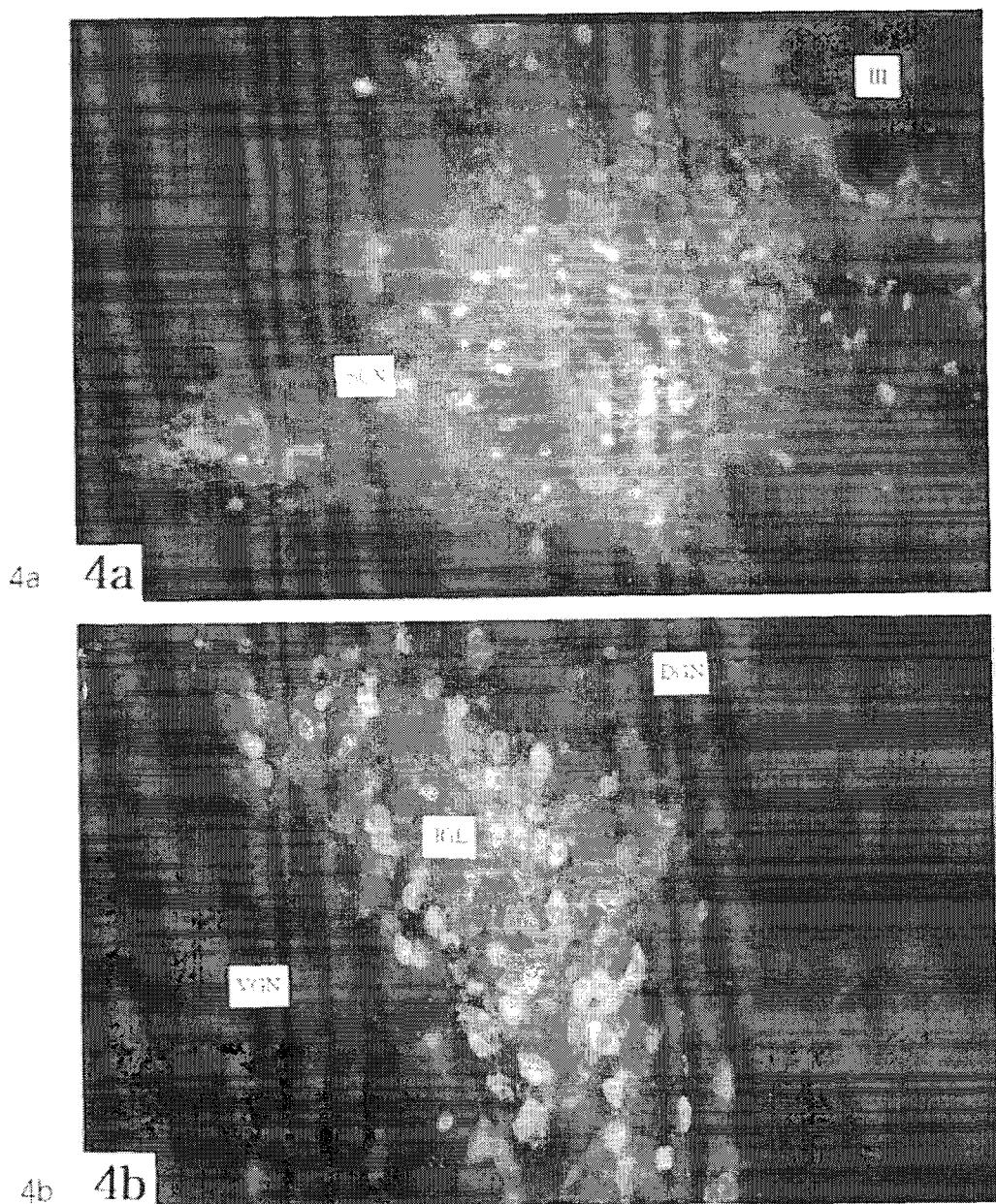


Fig. 4a, 4b. These photomicrographs are from animals subjected to dual injection of the viral mutants into the eye. In both instances three populations of infected neurons were apparent : 1) those infected only with PRV-D (green) ; those infected only with PRV-Bablu (red) and those infected with both strains of virus (yellow). Note that there was extensive co-infection of neurons, but that there are also many examples of single infected neurons.

III : 3rd ventricle	SCN : Suprachiasmatic nucleus	DGN : Dorsal geniculate nucleus
IGL : Intergeniculate leaflet	VGN : Ventral geniculate nucleus	

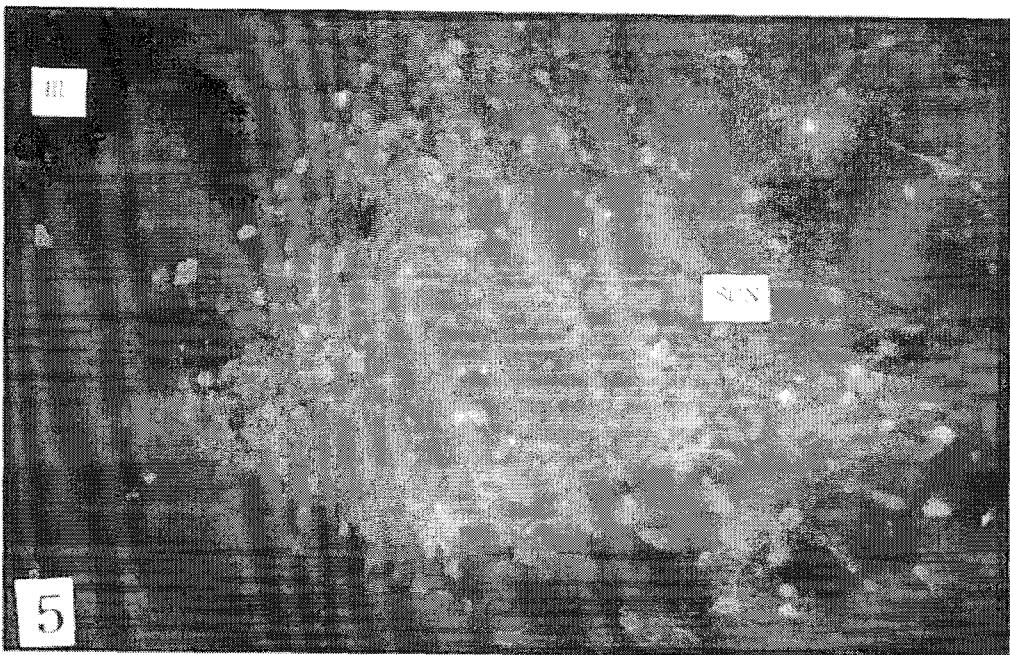


Fig. 5. The tissue shown in this photomicrograph was taken from an animal that received two temporally-separated intravitreal injections of virus. In this case, injection of PRV-D was followed by PRV-BaBlu 24 hours later. Extensive infection of neurons by PRV-D (Green fluorescence) was seen throughout the two subdivisions of the SCN, but only scattered double infected neurons(yellow) were present in spite of the fact that single infection with PRV-BaBlu produces extensive infection of the ventrolateral subfield at this time interval.

III : 3rd ventricle SCN : Suprachiasmatic nucleus

96시간까지 생존하였다. 이는 PRV-D가 PRV-BaBlu보다 감염독성이 강한 것을 나타내며 PRV의 Genome 중 Unique Short(US) segment 중 당단백인 gI와 USII 및 28K가 PRV의 독성발현에 관여함에 관찰되었다(Fig.3).

동시에 왼쪽 눈에는 PRV-BaBlu를 주입하고 오른쪽 눈에는 PRV-D를 주입하였을 경우 76시간까지는 기면상태가 발현되지 아니하였으나 그 후 기면상태가 발현되어 최대생존기간은 95시간이었다. PRV-BaBlu와 PRV-D를 혼합하여 같은 눈에 주입하였을 경우 62시간 까지는 기면상태가 발현되지 아니하였으나 그후 기면상태가 급작스럽게 발현되어 최대 생존시간은 80시간에 불과했다 (Fig.3). 이는 PRV-Ba의 최대 생존기간인 120시간보다 짧은 것으로 두 종이상의 바이러스의 혼합은 감염독성을 현저히 상승시켰고, PRV-D와 PRV-BaBlu를 동시에 주입하였을 경우 두가지 돌연변이종 바이러스에 감염된 신경세포 뿐만아니라 각기 감염된 신경세포도 관찰되었다. 이 때 시각교차위핵에는 3가지 형태의 바이러스에 감염된 신경세포가 관찰되었는데 PRV-D에만 감염된 신경세포(녹색)

가 127 ± 31 개였고, PRV-BaBlu에만 감염된 신경세포(적색)가 52 ± 17 개였으며, PRV-BaBlu와 PRV-D에 동시에 감염된 신경세포(황색)가 29 ± 14 개로로 구분되어 관찰되었다(Fig.4a). 외측무릎사이작은핵에는 PRV-D에만 감염된 신경세포(녹색)가 55 ± 13 개였고, PRV-BaBlu에만 감염된 신경세포(적색)가 16 ± 9 개였으며, PRV-BaBlu와 PRV-D에 동시에 감염된 신경세포(황색)가 36 ± 19 개로 구분되어 관찰되었는데(Table1), 이는 독성이 강한 PRV-D가 PRV-BaBlu의 전감염에도 불구하고 상당수의 신경핵을 감염시켰다는 것을 시사한다(Fig.4b).

또한, PRV-BaBlu를 주입후 24시간이 경과한 뒤 PRV-D를 같은 부위에 재주입한 경우 PRV-D의 전감염은 PRV-BaBlu에 의한 같은 부위의 신경세포의 감염을 감소시켰으며 PRV-D는 PRV-BaBlu에 전감염된 신경세포를 효과적으로 감염이나 PRV-D를 주입한 후 24시간 뒤 PRV-BaBlu를 주입하였을 경우에는 시각교차위핵내에는 PRV-D에만 감염된 신경세포(녹색)가 168 ± 39 개였고, PRV-BaBlu에만 감염된 신경세포(적색)가 42 ± 197 개였

으며, PRV-BaBlu와 PRV-D에 동시에 감염된 신경세포(황색)가 5±4 개로 구분되어 관찰되었다(Table 2). 이는 하나의 바이러스에 전감염된 신경원은 다른 바이러스 감염을 방해하는 것이며 그 방해정도는 독성이 강한 PRV-D를 먼저 주입한 경우가 PRV-BaBlu를 주입한 경우보다 훨씬 강하다는 것을 보여준 결과이다(Fig. 5).

IV. 고 칠

신경계친화성 바이러스인 Pseudorabies 바이러스(PRV)는 신경연접을 건너 상위신경세포로 이동할 수 있고 또 이동시 복제에 의해 점차 그 농도가 증가하여 검출이 용이하다는 획기적인 두 가지 장점을 지닌 탁월한 신경로 추적자(Strack 등 1986; Stadish 등, 1984)로 야생형의 Becker와 백신용인 Bartha로 대별되고 있으며 특히 Bartha는 병원성이 거의 없어 실험실에서 조작이 용이하며 전자현미경 수준에서도 별다른 조작이나 과정이 없이 관찰이 가능하여 획기적인 새 신경로추적자로 여겨지고 있다(Altschuler 등, 1989; Altschuler 등, 1991; Heimer와 Zaborsky, 1989).

Card 등(1990)과 Standish 등(1994)에 의해 PRV가 신경추적자로서 신경연접을 건너가는 특성 뿐 아니라 신경세포체의 핵내에서 복제되어 이동에 따른 양의 감소가 없어(Card 등, 1990, 1993; Standish 등, 1994) 강한 양성반응을 얻을 수 있는 장점과 함께 실험동물에서 외관상 특별한 병변의 징후를 발견할 수 없어 이차감염 등으로 인한 실험결과의 오차를 최소화할 수 있었고, 이 바이러스가 중추신경계내에서 무한정 복제되어 전체신경계를 감염시켜 거짓 양성반응을 보일 가능성은 예비실험결과 배제할 수 있었으며 특히 바이러스에 대한 신경아교세포(Glia cell)의 면역작용(Massa 등, 1987a; Lieberman 등, 1989)등은 더욱 거짓 양성반응을 막을 수 있었던 것으로 보여 신경계추적의 연구에 가장 잘 맞는 실험재료라 할 수 있다. 본 연구에서는 PRV-D와 PRV-BaBlu의 눈의 초자체내 주입이 주사부위에서의 새어나감(Leakage)을 방지하기 위하여 최대한으로 노력하여 새어나감에 의한 거짓양성반응을 최대한 줄였다.

망막시상하부로는 망막신경절세포(Retinal ganglion cell)에서 기시하여 시각신경과 시각신경교차(Optic chiasm)를 거쳐 시각교차위핵으로 투사되는 섬유, 앞시상하부영역(Anterior hypothalamic area)으로 투사되는 섬유, 뒤시각교차영역(Retrochiasmatic area)으로 투사되는

섬유 및 외측시상하부영역(Lateral hypothalamic area)으로 투사되는 섬유로 나눌 수 있다(Johnson 등, 1988a). 시각교차위핵으로 투사되는 섬유는 시각교차 바로 위에 놓인 일련의 전종말 축삭돌기와 신경종말로 신경분포는 일정하고 매우 치밀하다(Swanson과 Sawchenko, 1983). 전자현미경으로 볼 때 시각교차위핵에 종지하는 망막시상하부로의 신경종말은 전형적인 관상의 사립체를 함유한 투명한 세포질내에 가끔 크고 치밀한 소포와 작고 구형의 소포를 지니고 있다. 이 망막시상하부로의 신경종말은 연접후막인 가시돌기와 대칭적 및 비대칭적 연접을 하고 있으며 시각교차위핵의 배쪽외측에 치밀하게 종지하는 이외에 시각교차위핵의 둑쪽내측에도 산발적으로 종지하고 있다.

신경회로의 신경연접횡단분석에서 이전의 연구는 신경회로의 다른 구성요소를 위해 바이러스의 신경친화성의 주의깊은 평가가 바이러스의 신경연접횡단 분석에서 파생된 결과의 적절한 해석을 위해 매우 중요하다는 것을 보고하였다. 본 연구에서는 바이러스의 항원적으로 서로 다른 변이종을 포함한 복잡한 실험의 설계와 해석에 있어서 여러 매개변수가 존재함을 시사한다. 본 연구에서는 PRV의 변이종으로서 PRV-Be의 게놈 중 Unique Short(US) segment의 gI, gE, USII 유전자 및 28K유전자의 일부를 제거하고 Unique Long(UL) segment의 gC유전자의 일부를 제거 변형시켜 산출된 PRV-Ba의 US segment의 gG 유전자에 lacZ 유전자를 삽입시켜 얻은 PRV-BaBlu와 PRV-Be의 게놈 중 US segment의 gI와 gE 유전자를 제거하고 UL segment의 gC 유전자의 일부를 제거 변형시킨 PRV-D를 사용하였다. PRV의 변이종 바이러스인 PRV-D와 PRV-BaBlu를 사용한 본 실험은 변이종 바이러스의 생산과 복잡하게 얹힌 기능적 신경회로상의 동정에 매우 유용한 방법을 제시한 것으로 앞으로 PRV-D와 PRV-BaBlu 뿐만 아니라 많은 변이종 바이러스의 생산과 이를 통한 신경회로상 구축에 일익을 담당할 것으로 사료된다.

또한 김 등(1997)은 PRV-D에 전감염된 신경세포는 PRV-BaBlu에 저항성을 보였다고 보고하였는데 바이러스 주입 후 시간경과에 따른 변화와 생체시간은 바이러스의 종과 혼합여부 등의 실험방법에 따라 다양하였다. PRV-BaBlu와 PRV-D를 각기 주입하였을 경우 기면상태(Lethargy)의 발현과 최대 생존 기간이 PRV-D가 짧은 것으로 나타나 PRV-D가 PRV-BaBlu보다 병독성이 강한 것으로 판명되었고, 이는 PRV의 게놈 중 US segment의

당단백인 gI와 USII 및 28K가 PRV가 병독성에 깊게 관여하는 것을 시사한다.

한편, Card 등(1993)은 PRV 계놈(genome)의 Unique Short 영역은 PRV의 신경친화성과 독성을 매우 중요한 역할을 담당하는데 두 가지 돌연변이종의 서로 다른 독성은 PRV 계놈 중 이 영역의 조작에 의해 산출된다고 보고하였다. 본 연구에서 PRV의 유전자 중 gE 또는 gI의 제거는 시각회로의 기능적으로 뚜렷한 구성을 위한 바이러스의 친화성을 변경시켰으며 독성을 약화시켰다. 이 결과는 gX의 제거가 독성을 드라마틱하게 약화시킨다는 것을 제시한다. gX 외피 당단백은 바이러스의 복제 또는 이동에 중요한 역할을 수행하는데 PRV 복제에 대한 생체내 연구에서 gX의 유전자 표현형(phenotype)은 보고된 바 없지만 본 연구는 lacZ 유전자로 대치한 PRV-BaBlu의 이동 또는 복제에 드라마틱한 감소를 보여주었다.

PRV-D를 먼저 주입했을 때에 기면상태와 발현과 최대 생존 기간이 짧게 나타난 것은 하나의 바이러스에 전 감염된 신경세포는 다른 바이러스의 감염을 방해하나 그 방해정도는 병독성의 발현에 의존적이라고 사료된다. 또한 PRV-D에 전감염된 신경세포는 PRV-BaBlu에 전감염되지 않았으나 PRV-BaBlu에 전감염된 신경세포는 PRV-D에 재감염이 강하게 나타나 바이러스에 의한 신경 세포의 이중감염이 가능하나 이는 전적으로 바이러스의 병독성에 매우 의존적이며 판명되었다.

PRV-BaBlu의 PRV-D를 동량으로 혼합하였을 경우에는 PRV-BaBlu보다 독성이 강한 PRV-D를 주입했을 경우보다 기면상태의 발현과 최대 생존기간이 짧았는데 이는 두 종의 바이러스간 상호작용을 통한 병독성의 상승 효과로 사료되나 확실한 기전을 밝히기 위한 충분한 실험과 연구가 요구된다.

그리고 접종의 시기는 이중 접종의 연구를 설계하는데 제고되어야만 한다. 즉, 같은 신경원의 이중감염의 높은 수준은 두 변이종을 같은 장소에 혼합하여 감염시켰을 경우에 얻어졌다. 그러나 같은 장소에 시간적 차이를 두고 접종하였을 경우 이중감염율을 변화시켰다. 특히 독성이 강한 바이러스를 먼저접종하였을 경우에 이중감염율은 매우 낮았다. 또한 조작된 유전자의 발현(Transgene expression)의 효율성은 감염양상을 평가하는데 고려되어져야만 한다. 즉, β -galactosidase는 단독 또는 이중 감염을 위한 실험에서 PRV-BaBlu에 의해 효과적으로 발현되었다. 그럼에도 불구하고, 복제결핍된 변이종을 사용한 본 연구는 이 효소의발현의 수준은 접종후 생존

시간을 유의성있게 펼어뜨렸다. 그러므로 축삭돌기의 측부지를 통한 다른 연결상황을 확인하기위해서 다른 장소에 변이종들을 접종하는 것은 바이러스 변이종의 복제율과 이동률뿐만아니라 투사회로의 길이 또한 제고되어야 한다.

V. 결 론

신경연접에 의해 연결된 신경원내에서 신경친화성 Pseudorabies 바이러스(PRV)는 신경로추적에 관련된 연구에서 매우 유용한 병원체이다. 최근연구에 따르면 유전자 조작된 바이러스의 변이종의 개발은 복잡한 신경로 추적에 다양한 가능성을 제시하고 있다. 본 연구에서는 PRV로 알려진 돼지 병원체를 유전자조작을 통해 생산된 두가지 돌연변이종의 일주기 조절증추인 시각교차위해 내 신경원의 침습과 바이러스 감염의 매개변수를 분석하기 위해 수행되어졌다. 두 돌연변이종은 약독화된 PRV의 Bartha 종을 변형시킨 것으로 gX locus에 lacZ를 삽입시켜 얻은 종(PRV-BaBlu : 4.75×10^6 pfu/ml)과 PRV-BaBlu에는 존재하지 않은 PRV 외피 당단백을 지닌 종(PRV-D : 2.5×10^6 pfu/ml)이었다. 연구의 초자체내로 각각 변이종 바이러스를 $2 \mu\text{l}$ 씩을 주입한 결과 PRV-Bartha에 의해 얻어진 시각회로 중 제한된 감염양상을 산출하였으며, 두가지 변이종은 서로 상이한 바이러스의 이동과 독성을 나타내었다. 그러나 각 변이종의 감염결과는 감염의 증후를 결정하는데 매우 중요한 변수임이 확증되어되어 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PRV-D와 PRV-BaBlu는 망막시상하부로를 따라 일주기조절증추인 시각신경위해과 무릎사이해 을 감염시켰다.
2. 바이러스의 복제와 이동은 바이러스 종에 의존하였다.
3. PRV-D에 의해 전감염된 신경원은 PRV-BaBlu의 복제를 방해하였다.
3. PRV-D와 PRV-BaBlu를 동시에 주입하였을 경우에는 감염의 병독성을 증가시켰다.

참 고 문 헌

1. 김진상, 이성준, Card.JP : 설치류에서 알파 Herpes 바이러스의 신경친화성과 침습. 대한물리 치료학회지 9(1) : 59-70, 1997.
2. Altschuler SM, Bao X, Bieger D, Hopkins DA &

- Miselis RR : Viscerotopic representation of the alimentary tract in rat : sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts. *J Comp Neurol* 283 : 248-268. 1989.
3. Altschuler SM, Fereni DA, Lynn RB & Miselis RR : Representation of the cecum in the lateral dorsal motor nucleus of the vagus nerve and commissural sub-nucleus tractus solitarii in rat. *J Comp Neurol* 304 : 261-274. 1991.
 4. Bak JI, Markham CH, Cook ML & Stevens JG : Intraxonal transport of herpes simplex virus in the rat central nervous system. *Brain Res* 136 : 415-429. 1977.
 5. Boulus Z & Rusak B : Circadian phase response curves for dark pulses in the hamster. *J Comp Physiol* 146 : 411-417, 1982.
 6. Card JP, Miselis RR, Schwaber JS, Rinaman L & Whealey ME : Neurotropic properties of pseudorabies virus : uptake and transneuronal passage in the rat central nervous system. *J Neurosci* 10(6) : 1976-1994. 1990.
 7. Card JP, Miselis RR, Whealey ME, Robbins AK, Meade RP, Miselis RR & Enquist LW : Two α -herpes virus strains are transported differentially in the rodent visual system. *Neuron* 6 : 957-969. 1991.
 8. Card JP, Rinaman L, Lynn RB, Lee BH, Meade RP, Miselis RR & Enquist LW : Pseudorabies virus infection of the rat central nervous system : Ultrastructural characterization of viral replication, transport and pathogenesis. *J Neurosci* 13(6) : 2515-2539. 1993.
 9. Cassone VM, Chesworth MJ & Armstrong SM : Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends on the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol Behav* 36 : 1111-1121, 1986b. Jouveinal Laboratories, 1984, pp3-13.
 10. Colwell CS, Forster RG & Menaker M : NMDA receptors antagonists block the effects of light on circadian behavior in the mouse. *Brain Res*. 554 : 105-110, 1991.
 11. Field HJ & Hill TT : The pathogenesis of pseudorabies virus replication at the inoculation site and axonal uptake in mice. *J Gen Virol* 26 : 145-148. 1975.
 12. Goodpasture EW & Teague O : Transmission of the virus of herpes fibrils along nerves in experimentally infected rabbits. *J Med Res* 44 : 139-184. 1923.
 13. Heimer GE & Zaborsky L : Neuroanatomical tract-tracing method 2. New York and London, Plenum Press, 1989, pp49-96.
 14. Hickey TL & Spear PD(1976) : Retinogeniculate projections in hooded and albino rats. *Exp Brain Res* 24 : 523-529, 1976.
 15. Hsu SM, Raine L & Fanger H : Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase technique : A comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP) procedure. *J Histochem Cytochem* 29 : 577-580. 1981.
 16. Johnson RF, Morin LP & Moore RY : Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res* 462 : 301-312. 1988a.
 17. Johnson, RF, Moore, RY and Morin LP : Lateral geniculate lesions alter circadian activity rhythms in the hamster. *Brain Res Bull* 22 : 411-422, 1989.
 18. Lieberman AP, Iitha PM, Shin HS & Shin ML : Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Sci USA* 86 : 6348-6352. 1989.
 19. Massa PT, Brinkmann R & ter Meulen V : Inducibility of Ia antigen on astrocytes by murine coronavirus(JHM) is rat strain dependent. *J Exp Med* 166 : 259-264. 1987a.
 20. Meijer JH & Rietveld WJ : The neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev* 69 : 671-702
 21. Nadelhaft I, Vera PL, Card JP & Miselis RR : Central nervous system neurons labelled following the injection of pseudorabies virus into the rat urinary bladder. *Neurosci Letters* 143 : 271-274. 1992.
 22. Nauta WJ & Haymaker W : Hypothalamic nuclei and fiber connections. In : *The hypothalamus*. eds. pp.136-209, Springfield, 1967.
 23. Pickard GE : The afferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the golden hamster with emphasis on the retinohypothalamic projection. *J Comp Neurol* 211 : 65-83, 1987.
 24. Riley JN, Card JP & Moore RY : A retinal projection to the lateral hypothalamus in the rat. *Cell Tiss Res* 214 : 257-269, 1981.

25. Rinaman L & Miselis RR : The organization of vagal innervation of rat pancreas using cholera toxin-horseradish peroxidase conjugate. *J Auton Syst* 21 : 109-125. 1987.
26. Robbins AK, Dorney DJ, Wathen MW, Whealy ME, Gold C, Waston RJ, Holland LE, Weed SD, Levine M, Gioroso JC & Enquist LW : The pseudorabies virus gII gene is closely related to the gb glycoprotein gene of herpes simplex virus. *J Virol* 61(9) : 2691-2701. 1987.
27. Robbins AK, Ryan JP, Whealy ME & Enquist LW : The gene encoding envelop protein of pseudorabies virus vaccine strain Bartha contains a mutation affecting protein localization. *J Virol* 63 : 250-258. 1989.
28. Standish A, Enquist LW & Schwaber JS : Innervation of the heart and its central medullary origin defined by viral tracing. *Science* 263(14) : 232-234. 1994.
29. Strack AM, Sawyer WB, Hughes JH, Platt KB & Loewy AD : A general parren of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infection. *Brain Res* 491 : 156-162. 1986.
30. Swanson LW & Sawchenko PE : Hypothalamic integration : organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann Rev Neurosci* 6 : 269-324. 1983.
31. Takatsuji K, Miguel-Hidalgo JJ & Tohyama M : Substance P-immunoreactive innervation from the retina to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Brain Res* 568 : 223-229.