

<臨床>

네그리 小體의 顯微鏡 檢査

—美 保健文教厚生部 發刊 “狂犬病試驗室診斷法”에서—

林 昌 亨

狂犬病 診斷을 다루는 모든 檢査室에서는 네그리小體(Negri body)의 檢査를 爲해서, 正確하고 迅速한 그리고도 經濟的으로 費用이 節約되는 方法을 願하고 있다.

여기에 提示하고자 하는 檢査方法은 이와 같은 諸要求를 充足케 하는 것이기 때문에 關係機關의 檢査室에 從事하는 人들과 一般開業獸醫師中의 關心을 갖는 人들은, 손쉽게 그 方法을 익혀서 곧 實用할 수 있을 것이다.

狂犬病에 걸린 모든 種類의 動物에 있어서 네그리小體가 存在하고 있을 때는 그 小體가 가장 흔하게 생기고 그렇기 때문에 塗沫標本에 있어서 가장 容易하게 檢出되어 지는 곳은 암몬角이고, 다음이 大腦皮質과 小腦의 순이다. 암몬角組織에는 單位面積에 있어서 가장 많이 神經細胞가 分布되어 있기 때문에, 그만큼 네그리小體의 存在와 檢出率이 많게 되는 것이다. 外에 보다 限制된 範圍內에서 視丘(視神經床), 腦橋, 延髓, 脊椎 그리고 感覺神經節의 神經細胞에서 檢出된다. 그러나 診斷的 對象으로서는 이와같은 制限된 範圍의 組織에서의 네그리小體의 檢出은 非實用的이고 時間의 浪費가 된다. 이러한 部位組織에서 부득이 네그리小體의 檢出을 試圖하여야 될 경우는, 前記 암몬角, 大腦皮質 또는 小腦等의 主要診斷的 對象이 提供되지 않았거나 또는 消滅되었을 때 或은 이와같은 部位에서 네그리小體가 나타나지 않았을 경우이다.

A. 腦의 切開

頭部の 皮膚 및 筋肉을 切除하고, 톱이나 끌로 頭蓋骨을 除去(圖1 參照)하여 露出된 腦를 切開해서 願하는 部位의 組織을 切取. 네그리 小體檢査에 提供하도록 한다.

必要器材

- 1) 小型가위 1個

메스 1個

- 2) 小型핀셋 1個

- 3) 白紙(四方 7~8cm) 數枚

- 4) 깨끗한 slide 數枚

- 5) Sellers' 染色液(使用液— working solution)

- 6) 샤페(petri dish) 1個…必要時에 動物 接種試驗을 하기 爲한 腦組織一部를 받아 놓을 것.

- 7) 50% 그리세린—生理鹽水液 1병…後에 參考試驗을 하기 爲한 腦組織 一部를 保存하여 놓을 것.

切開 및 切取過程

大腦 側腦室(左右 2室)을 向해서 大腦皮質을 切開하면 암몬角이 露出된다. 滅菌된 가위나 또는 메스로 左右 大腦半球의 背部面에 各各 長軸으로 切開를 加한다(圖 2參照). 이와같은 切開는 各大腦半球 後頭端에서 大腦半球의 長軸中間線을 따라 約 中間點쯤 오도록 한다. 그리하여 大腦灰質 및 大腦白質을 깊이 파고들면 좁은 腔이 나타나게 되는데 이것이 '은 側腦室이다. 이때 切開部兩面의 大腦組織을 兩側으로 밀어 저쳐 놓으면, 암몬角이 半圓柱形의 光彩있는 白色體로 側腦室의 底部에서 橫으로 나타나게 된다(圖3 參照). 암몬角은 螺旋狀의 輪廓을 하고 있고, 이것을 橫斷해서 그 斷面을 보면 特徵적인 渦卷型의 表面像을 나타낸다. 이같은 渦卷型의 表面像은 灰色과 白色이 交互된 層을 明瞭하게 區別해서 볼 수 있는데 이 灰色層에 神經細胞가 緻密하게 集結되어 있기 때문에 單位面積으로 볼 때 네그리小體의 存在와 檢出率이 많게 되는 것이다(圖 4參照).

가위나 또는 메스로 이같은 左右의 암몬角에서 橫斷한 小組織片을 斷面을 뒷쪽으로 해서 四方 7~8cm 가량으로 잘라 놓은 白紙(美國에서는 좀 두껍고 길긴 paper towel=종이수건이나, 木製의 tongue depressor =舌壓子를 使用)위에 올려 놓는다. 그리고나서 白紙 위에 놓여진 암몬角의 斷面側이 白紙와 단단히 密着되어 다음 操作時에 떠러지지 않도록, 이 암몬角小片을

傷하지 않을 정도로 눌러 둔다. 같은 식으로 大腦 및 小腦에서 各各 小組織片을 切除해 놓는다. 이들 小組織片은 네그리小體檢査를 爲한 slide塗沫表面을 만드는 데 使用된다.

可檢物材料의 保存

狂犬病의 動物接種試驗이 陽性으로 判明되었거나 또는 그 試驗을 할 수 있는데 까지 24해서(最少 21日間) 陰性으로 結末이 날때까지, 少量의 可檢的 組織材料를 50% 그리세린 生理鹽水液에 保存하여 두도록 한다. 어떠한 境遇에 있어서는 그 原來의 可檢物을 使用해서 動物接種試驗을 다시 反復하여야 될 때가 있기 때문이다.

B. Slide 標本

左右 兩側의 암문角, 大腦 및 小腦에서 各各 最少 2個의 可檢組織(小組織片)을 採取해서 鏡檢한 後, “腦組織의 네그리小體 陰性”이라고 判定을 내려야 한다. 左右 암문角의 各各 다른 部分에서 가위로 한片的 可檢組織을 언제나 더 採取해서 이것을 再鏡檢 하는 일은 그 陰性判定을 내리는데 있어서 매우 조심된 賢明한 方法으로 되고 있다.

Slide에 固定하지 않은 生組織을 묻히는 方法으로, 그 代表的인 것이 印押法(impression method 또는 stamp method)과 塗沫法(smear method)의 2가지인데, 印押法이 보다 좋은 結果를 준다. 印押法으로 하면 神經細胞의 損傷을 最少로 줄일 수가 있고 또한 Slide의 한 小域에 神經細胞가 集結된 狀況의, 單位面積으로 最大數의 神經細胞를 볼 수 있게 된다. 이것은 特別 암문角 斷面의 印押에서 顯著하다.

印 押 法

白紙위에 놓인 小片의 腦組織(암문角, 大腦 및 小腦) 斷面に 平行해서 깨끗히 닦은 Slide를 닿게 한다. 이때 그 Slide面に 少量의 腦組織이 퍼져 묻도록 若干 壓迫하는 程度로 눌렀다가 Slide를 떼낸다. 一般적으로 한개의 小組織片에서 3내지 4의 印押을 한 Slide에 묻쳐 둔다(圖5參照). 各各 한 slide마다 새것의 小組織片을 使用해서 印押을 한다.

塗 沫 法

腦組織의 아주 작은 小片을 깨끗히 닦은 Slide(제 1)의 한 끝에 얹어 놓는다. 그리하여 다른 하나의 제 2 Slide로 그 腦組織의 小片을 壓碎하면서 제 1 Slide面의 3/4이나 1/3 程度가 塗沫되도록 끌어 당긴다(血液塗沫術式과 비슷하다 小片을 壓碎하는 點만 除하고

는-).

이때 腦組織의 小片이 너무 클것 같으며는 塗沫薄膜(film)이 너무 두꺼워 저서 適合한 染色이 되지 못하며, 따라서 顯微鏡檢査가 不可能하게 된다. 그러기 때문에 아주 작은 小片을 取하도록 해서 얇은 塗沫이 되도록 한다.

이 塗沫法은 그 塗沫面積이 印壓法의 것보다 크기 때문에 slide의 많은 面을 鏡檢하지 않으면 안된다.

染色過程

slide에 印押 또는 塗沫한 腦組織이 마르기 前에 Sellers'染色을 하여야 한다. 이 染色은 點滴器(drop-per)를 利用하거나 또는 코프린瓶(Coplin jar)과 같은 한 Slide가 전체로 들어갈 수 있는 染色瓶을 利用한다 Sellers' 染色은 methyl 알콜에 溶解한 것이기 때문에 이 自體가 固定劑로서 作用함으로, 固定 및 染色이 同時에 遂行된다. 이 染色過程은 極히 速한 것이어서 단지 數秒間만 染色시키면 된다. 即 點滴器를 利用할 때는 可檢 Slide위에 染色液이 넘치도록 떨어트린 即時로 水道꼭지에서 나오는 물(tap water)에 染色液을 씻어낸다. 이 물로 씻어내는 일도 餘分의 染色液이 흘러 나가면 못한 것이기 때문에 잠깐만 씻어내면 된다. 코프린 瓶을 利用할 때는 可檢 Slide를 한번 速히 당겼다가 꺼내서 即時 前記한데로 씻어 낸다.

이와 같이 해서 染色洗滌한 可檢 Slide는 濾過紙 같은 것으로 水分을 吸取하지 말고 그대로 세워서 室溫에 마르도록 놓아 둔다.

水道물을 利用할 수 없는 地域에서는, M/150 磷酸鹽緩衝液(phosphate buffer)이 든 pH 7.0의 蒸溜水를 使用하면 좋은 效果를 얻게 된다.

Seller's 染色液의 處方

Sellers' 染色液은 Methylene blue 原液(Stock Solution)과 Basic fuchsin 原液을 混合한 것을 使用液(working solution)으로 한다.

Methylene blue 原液 :

Methylene blue((85%+ dye content).... 1.0gm

Methyl alcohol(無水, acetone-free)100.0ml

Basic fuchsin 原液 :

Basic fuchsin(92%+ dye content).... 1.0gm

Methyl alcohol(無水, acetone-free).... 100.0ml

注意 : 이들 原液은 나사뚜껑(Screw-cap)으로 된 瓶에 넣어서 冷藏庫에 保管하도록 한다.

Sellers' 染色 使用液 :

Methylene blue 原液... 2

Basic fuchsin 原液1

이와같은 比率로 잘 섞는다. 그러나 濾過하여서는 안된다. 이와같은 使用液은 나사 두껍으로 된 瓶에 넣어서 단단히 密閉되도록 해서 蒸發되지 않도록 한다. 上記 두가지의 液을 混合한지 24時間이 지나야 만 이것을 使用液으로서 쓸 수 있다. 이 使用液은 언제나 단단히 막아서 冷藏庫에 保管하고 染色時에만 꺼내 쓰도록 한다. 그리하여 蒸發을 防止한다면, 이 使用液은 끝까지 쓸수가 있다.

萬一에 蒸發이 일어나게 되면 fuchsin(赤色)이 지나치게 強해지기 때문에, 無水 methyl alcohol을 添加해서 適合한 色이 되도록 均衡을 잡아주어야 한다.

染色의 調節

上記 2種의 原染色液 이 正確하게 마련되었을 경우에는 그 2:1의 比率로 섞은 使用液은 大概 滿足한 色調를 나타낸다. 그러나 일단 豫備의 染色을 試圖해서 그 結果가 滿足할만한 것이 못될 때에는, 그 使用液을 滿足한 色調로 容易하게 調整할수가 있다.

Slide에 얇게 塗沫이나 印押面이 淡紅色(rose-pink)을 呈하지 않고 鮮紅色(bright-red)으로 나타나고, 그리고 全體의인 染色調가 붉게 보일 때는 Basic fuchsin原液이 너무 強하게 된 緣由이다. 이런 경우에는 滿足한 色의 調節가언어질 때까지 檢査(check)해가면서 Methylene blue 原液을 適切히 添加한다.

한편 Methylene blue 原液이 너무 強할 때는 네그리 小體가 濁한 靑(栗)色을 呈하고 神經細胞가 지나치게 진하게 染色된다. 이런 경우에는 色의 調節을 Basic fuchsin 原液으로 할 수 있다.

이와같이 해서 各기 이들 2種의 原染色液의 適切한 比率를 안 후에는, 이들 原染色液이 蒸發되지 않게 完全히 保存되고만 있으면, 후후에 이들 二液을 混合해서 다시 使用液을 만들 때에는, 그 調節된 比率로 만들기만 하면 된다.

C. 네그리小體

染色을 施行한 slide를 顯微鏡으로 檢査하는데 있어서, 油浸렌즈(oil immersion lens)로 鏡檢하기 前에, 于先 百倍程度의 低率렌즈로 slide의 어느 部分에 神經細胞가 가장 많이 묻어 있는가를 check하여 놓는다. 그리하여 이 check 된 部分에 鏡檢用油(immersion oil)一滴을 떠르려 놓고 여기를 高率인 油浸렌즈에 맞추어 놓도록 한다. 印押 slide는 勿論이고 塗沫 slide에 있어서도 많은 神經細胞가 한군데에 묻어 있는 部分을 나타내는 것이다.

네그리小體는 神經細胞의 細胞質內에 들어있기 때문

에, 이와같이 神經細胞가 많이 모여 있는 部分을 擇해서 鏡檢을 하도록 한다. 그렇지 않고 처음부터 油浸렌즈로 擴範圍한 slide面을 일일이 훑어가는 時間만 오래 걸리고 非能率의이다. 여기서 또한 알아 두어야 할것은 여러가지 腦組織細胞의 構成과 形態이다. sellers, 染色에서 膠質細胞(glial cells=astrocyte, oligodendroglia 및 microglia의 總稱)는 大小크기의 둥근 核만이 靑色으로 染色되며 細胞質은 染色되지 않는다. 우리가 願하는 神經細胞(neuron 또는 nerve cell)는 둥글고 큰 核이 靑色으로 染色되고, 그 細胞質이 靑靑色으로 染色되서 分明히 나타나며, 細胞質內에 暗靑色의 顆粒(Nissl's granules)이 散在하여 있다. 그리고 길다란 突起를 가지고 있어서 細胞가 다른 것들에 비해서 두드러지게 크게 나타난다. 此外에 赤血球, 白血球 및 毛細血管의 內皮細胞等이 나타난다 또한 죽은지 오래된 動物의 腦에서 만든 Slide에서는 細菌도 나타난다.

네그리小體는 狂犬病에 있어서 疾病特徵的인 것이기 때문에, 네그리小體의 存在는 언제나 狂犬病의 感染을 確定케 한다.

鑑 定

(圖6 參照) 네그리小體는 好酸性 封入物로서 一般적으로 0.24~27.0 μ 의 크기를 하고 있다. 그리고 그 小體속에 0.2~0.5 μ 크기의 好鹽性顆粒(basophilic granules)을 1~20個 含有하고 있다. 이와같이 小體속에 든 顆粒을 內部構造(internal structure)라고하며 이것은 네그리小體에서만 볼 수 있는 特徵的인 構成分이다. 네그리小體는 一般적으로 그 形態가 圓型인 것이 많지만은, 때로는 卵型, 球型, 아메바型, 長圓型, 三角型 또는 其他의 여러 形態를 보이는 수가 있다.

Sellers'染色에서 네그리小體는 一般적으로 뚜렷이 눈에 띄게 나타난다. 네그리小體의 基質(matrix)은 淡紅色(pink)에서 紫色을 띤 淡紅色(purplish-pink)으로 나타나며, 그 속에 든 顆粒(內部構造)은 暗靑色에서 黑色으로 나타난다.

神經細胞의 細胞質은 靑靑色(purplish-blue)으로 染色되고 核 및 核小體는 더 深한靑色으로 染色된다. 神經纖維는 좀 진한 淡紅色을 表示하고 그 神經鞘는 染色되지 않은 채로 남아 있다. 또한 血管壁에서 由來한 平滑筋纖維는 赤煉互色(붉은 벽돌色=brick-red)으로 나타나며, 赤血球는 赤銅色(copper)에서 赤色을 表示한다. 細菌이 介在되었을 때는 그것은 靑色으로 染色되어서 나타난다.

네그리小體는 神經細胞의 細胞質內에 形成되기 때문에, 典型的으로는 神經細胞의 한 모퉁이와 核 사이에서 發見되거나 或은 神經細胞體의 延長된 部分(樹樣 및 軸索突起) 속에서 發見된다. 塗沫이나 印押 slide標本을 만들 時에 神經細胞가 破裂되었을 경우라든지, 또는 神經細胞의 輪廓이 分明히 나타나지 않았을 때에는 네그리小體가 神經細胞밖으로 나타나 보이는 수가 있다. 故로 形態的 諸鑑定要件이 네그리小體로서 갖추어져 있으면, 그 小體가 神經細胞안에서 發見되었거나 或은 神經細胞밖에서 發見되었거나 拘碍됨이 없이 狂犬病 陽性으로 診斷된다.

鑑別診斷

때때로 動物의 腦組織細胞에서 發見되는 封入物의 他型과 네그리小體를 區別하는일은 매우 重要하다.

非特異的 細胞質內 封入物이 때때로 마우스(mouse)와 고양이의 腦組織에서 보여지는데, 이들 封入物은 淡紅色에서 鮮명한 赤色으로 染色되지만, 그 크기가 작고 一律적으로 圓型이며, 또한 內部構造(好鹽性顆粒)가 없고, 이들 封入物은 大端히 屈折性이 높아서 光彩가 強하다(잘 반짝거림).

개와 여우(狐)의 腦組織에 있어서는, 개디스텔퍼(canine distemper)나 或은 犬傳染性肝炎(canine infectious hepatitis=여우 腦炎 fox encephalitis)의 好酸性封入物에 遭遇되는 수가 있다.

類似한 封入物이 스컹크(skunk), 다람쥐 레콘(raccoon)과 같은 野生動物의 腦組織細胞에서도 發見된 적이 있다. 이와같은 封入物은 고양이나 마우스에서 보는 小體처럼 淡紅色으로 染色되고, 內部構造를 가지고 있지 않으며, 그 小體의 輪廓이 大體로 圓型이

네그리小體

1. 好鹽性內部構造 (內部顆粒)가 있다.
2. 小體의 基質이 不等質性이다.
3. 屈折性이 弱하다 (덜 반짝거린다)
4. 赤色에 푸른(靑)기가 있는 色調

非狂犬病性 封入小體

- 內部構造가 없다.
 - 小體의 基質이 均質性이다
 - 屈折性이 強하다 (잘 반짝거린다)
 - 더욱 好酸性인 鮮명한 淡紅色
- 고, 네그리小體보다 屈折性이 높아서 더 반짝거린다.

이들 非狂犬病性 封入小體는 Sellers' 染色으로 그들 서로간은 區別되지 않지만, 이들 封入小體는 다음과 같은 指針에 準한다면 네그리小體와 잘 區別지을수가 있다.

사람의 경우에 있어서는, 다른 疾病으로 形成된 封入小體와 네그리小體와의 鑑別이 別로 어렵지가 않다.

狂犬病의 初期狀態에서 죽인 動物에 있어서는, 때때로 小形의 非典型的의 細胞質內 封入物이 發見된다. 네그리小體의 發見, 크기, 數 그리고 形成段階는 狂犬病의 臨床經過의 日數와 關係되는 수 있음으로, 可能하다면 그 全臨床過程이 經過하도록 하여둔다. 그렇게 하던 臨床的 診斷을 爲한 症勢를 觀察하게 되고, 그리고 檢査室에서 네그리小體를 檢出하는데 있어서 더 많은 機會를 주게 된다.

記憶해 두어야 할것은 狂犬病바이러스의 毒株(strain)에 따라서 네그리小體를 形成하는 能力이 다르다는 점이다. 어떤 例에 있어서는, 動物의 神經細胞에서 네그리小體를 보지 못하였지마는 그後 動物接種試驗에서 狂犬病으로 밝혀진 것들도 있다.

備 考

可檢物腦組織에서의 네그리小體의 檢出으로써 狂犬病의 診斷을 充分한 根據가 된다. 그러나 네그리小體가 檢出되지 않았다고 해서 狂犬病의 可能性이 完全히 排除된것은 아니다.

大量檢索의 結果에 依하면, 檢査室에 送付되어 온 狂犬病可檢物中에서, 마우스 接種試驗으로 陽性으로 判定된 例들 中の 10~15%가, 送付된 可檢物의 直接檢査에서 네그리小體가 檢出되지 않았던 것들이다. 그러기 때문에 可檢物에서의 네그리小體의 直接鏡檢의 結果가 陰性이 었거나 또는 疑心된 경우에는 最終적으로 狂犬病診斷을 可否間에 確定 지우기 爲해서 動物接種試驗을 施行하여야 한다. 따라서 모든 檢査室에서는 動物接種試驗을 爲한 設備를 아울러 갖추어 놓아야 한다.

<筆者=서울大獸醫學科助教授>

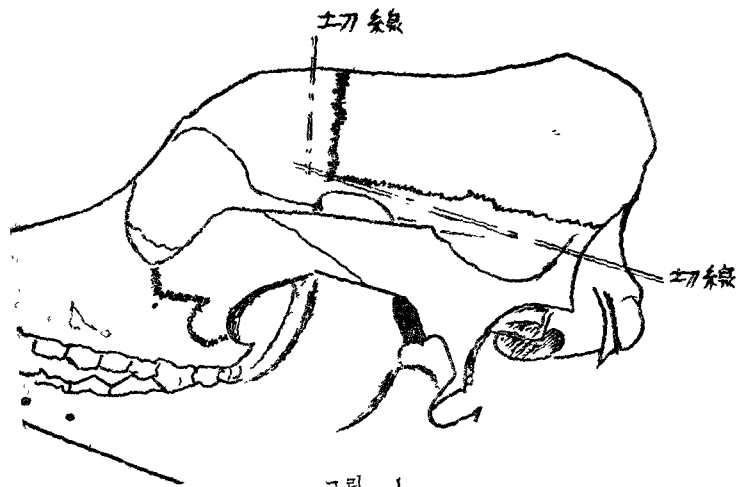


그림 1

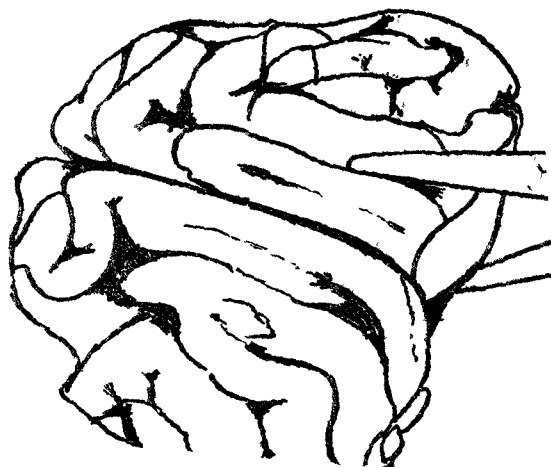


그림 2

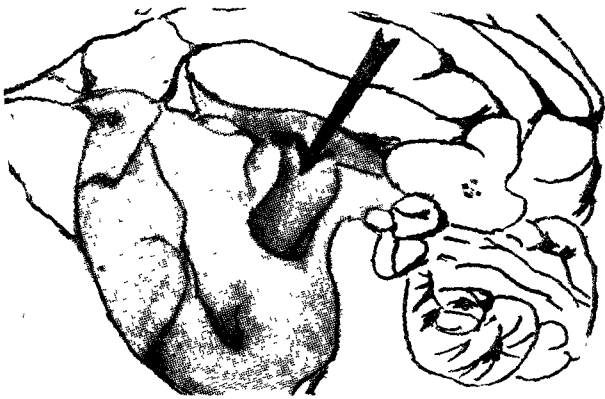


그림 3



그림 4

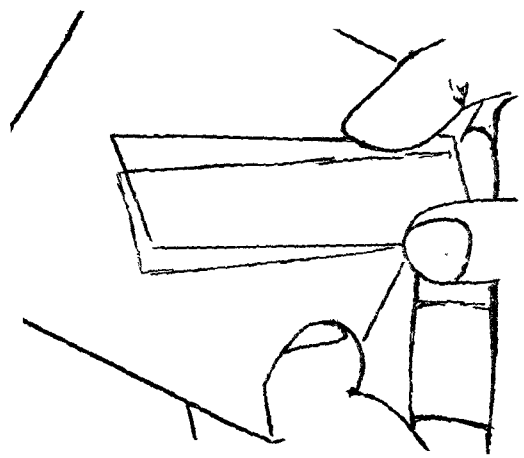


그림 5

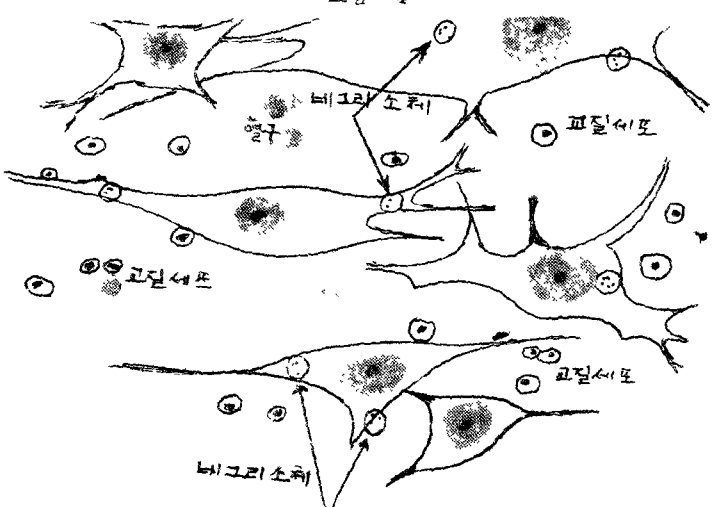


그림 6