

설치류에서 알파 Herpes 바이러스의 신경친화성과 침습

대구대학교 재활과학대학 물리치료학과

김진상

경북대학교 수의과대학 해부학교실

이성준

Pittsburgh대학교 신경과학과

Card, J. Patrick

Neurotropism and Invasiveness of α -Herpes Virus in the Rodent

KIM, Jin-Sang, Ph.D., DVM

Dept. of Physical Therapy, College of Rehabilitation Science, Taegu University

Yi, Seong-Joon, Ph.D., DVM

Dept. of Anatomy, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University

Card, J. Patrick

Dept. of Neuroscience, Pittsburgh University

<Abstract>

The ability of neurotropic alpha herpesviruses to replicate within synaptically linked neurons has made these pathogens valuable tools for transneuronal analysis. Recent studies suggest that unique gene products expressed by genetically engineered strains of virus may permit the use of multiple strains in complex tracing paradigms. In the present study we have examined the invasiveness of two genetically engineered strains of the swine pathogen known as pseudorabies virus (PRV). The two strains were 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) contained a PRV envelope glycoprotein gene that was absent in PRV-BaBlu. Simultaneous or temporally separated sequential injection of $4 \mu\text{l}$ of each strain into the ventral wall of the stomach produced a predictable course of retrograde synaptic infection.

The results were as follows:

1. PRV-BaBlu and PRV-D infected the dorsal motor nucleus of vagus nerve (DMV) and paraventricular nucleus (PVN)
2. Invasion and replication of PRV-D occurred at a faster rate than the parental strain or PRV-BaBlu.
3. PRV-D was much more virulent than PRV-BaBlu or the parental strain.
4. Co-injection of PRV-D and PRV-BaBlu produced an infection that was more virulent than that produced by the parental strain (PRV-Bartha).
5. Neurons in DMV were permissive to co-infection with PRV-D and PRV-BaBlu when they were injected simultaneously into the same site.
6. Replication of PRV-BaBlu was compromised by prior infection of the same circuit with PRV-D.
7. Prior infection of neurons with PRV-D made them resistant to infection with PRV-BaBlu.

I. 서 론

Peudorabies 바이러스(PRV)는 사람에서 Herpes simplex 바이러스에 의해 유도되는 것과 유사하게 돼지에서 감염을 일으키는 Herpesviridae 계에 속하는 알파 Herpes바이러스이다(Card 등, 1990). 이 DNA바이러스는 적어도 40개 이상의 당단백을 지니고 있는 외막(envelope)을 지니며 다른 Herpes바이러스의 당단백질과 유사한 구조와 기능을 수행한다(Card 등, 1991).

PRV 당단백질 중 gp50와 gH는 세포배양시 바이러스 증식에 필요하기 때문에 본질당단백(essential glycoprotein)에 속하고, gI, gII, gX 및 gp63은 바이러스 증식에 요구되는 것은 아니지만 표적세포 인식, 감염된 세포로부터 바이러스의 유리, 숙주면역계와 상호작용 및 신경독성유발 등 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려졌다(Card 등, 1993).

PRV의 야생형인 Becker종(PRV-Be)은 매우 높은 신경친화성을 지니고 있으며, 중추신경계내 세포용해성 감염을 야기시키는 반면에, 백신형인 약독화된 Bartha종(PRV-Ba)은 신경친화성은 지니고 있으나 세포용해성 감염을 야기시키지는 않는다(Goodpasture, 1993). 이 차이점의 근본적 기전이 확실히 규명된 것은 아니지만 주된 원인의 하나로써 바이러스의 외막의 구성요소인 당단백의 변화이다(Lieberman 등, 1989).

PRV-Ba는 PRV-Be의 게놈 중 Unique Short(Us) Segment에서 gI, gE, USII 및 28K 유전자 중 일부와 Unique Long(U_L) Segment의 gC 유전자의 일부를 제거하여 산출된다. PRV-D는 PRV-Be의 Unique Short(Us) Segment 중 gI와 gE에 해당되는 유전자를 제거하고 Unique Long(U_L) Segment의 gC 유전자의 일부를 누락 및 변형시켜 산출되며, PRV-BaBlu는 PRV-Ba의 Unique Short(Us) Segment 중 gG 유전자에 lacZ 유전자를 삽입시켜 산출된다(Fig. 1,2)(Altschuler 등, 1991; Field 등, 1975; Nadelhaft 등, 1992; Robbins 등, 1989).

외막이 있는 PRV는 신경친화성으로 인해 말초장기를 지배하는 신경의 축삭돌기 말단을 통해 중추의 신경원으로 침습(invasiveness)을 시작하는데 바이러스는 축삭돌기 세포막에 있는 지금까지 명확하게 규명되고 있지 않은 수용체와 접하여 바이러스 외피는 축삭돌기막에 붙고, DNA 유전자를 함유하고 있는 capsid만 축삭돌기

내로 유입된다(Altschuler 등, 1989). 이때 축삭돌기막에 붙은 바이러스 외피의 당단백질 성분은 후에 바이러스 감염을 인지하여 숙주를 보호하기 위한 면역체계의 변화에 의해 동원되는 큰 포식세포(macrophage) 등의 탐식작용을 위한 표적이 된다. 축삭돌기내로 유입된 PRV의 capsid는 또한 아직 알려지지 않은 기전에 의해 capsid가 벗겨지게 되고 DNA 성분만 숙주세포의 핵내로 유입되어 신경원핵내의 여러 효소들을 이용하여 다시 수 많은 바이러스 유전자를 복제한다.

복제된 유전자는 세포핵내에서 capsid에 둘러싸이게 되고 capsid는 다시 핵내막에 둘러싸여 과립내형질세망의 관강내로 출아(budding)의 방법을 통해 유출된다(Lycke 등, 1984). 바이러스 capsid를 싸고 있는 이 핵내막은 과립내형질세망을 빠져 나올 때, 다시 과립내형질세망의 막에 붙고 capsid만 Golgi complex의 cis-face로 와서 Golgi complex막에 둘러싸여 이중막을 지닌 PRV의 형태를 취하게 되는데 이중막 중 외막은 PRV가 숙주세포를 빠져 나올 때 가지돌기(dendrite)의 막에 붙게 되고, 단일막을 지닌 PRV가 세포막으로 유리된 후 신경연접을 통하여 계속 기능적으로 연결된 이차신경세포내로 건너가게 된다(Robbins 등, 1989).

바이러스에 감염된 숙주세포는 신경독성으로 인해 신경병리적 증상(neuropathological sign)을 발현하게 되는데, 그 시기는 감염초기, 중기 및 말기의 3단계로 나뉘어져 방어기전인 면역체계의 활성화와 변화를 유발한다. 바이러스에 감염된 숙주세포는 Interleukin-1 β (IL-1 β), Gamma interferon, Tumor necrosis factor (TNF) 등의 cytokine의 활성을 유발시킨다. 또한 최근에는 바이러스 감염에 있어서 Nitric oxide(NO)의 항 바이러스 효과에 대한 연구도 활발히 이루어 지고 있는데 Arginine 으로부터 NADPH 등의 도움으로 NO를 산출하는 효소인 NOS(Nitric oxide synthetase)는 크게 inducible NOS(iNOS), brain NOS(bNOS) 및 endothelial NOS(eNOS)로 구별되어 각기 바이러스에 감염에 대한 다른 생물학적 활성을 나타내고 있다(Rinaman 등, 1989).

신경세포가 바이러스에 감염되면 바이러스의 파급을 국소화시키기 위해 반응성 신경교세포증식(reactive gliosis)이 유발되어 미세아교세포(microglia)가 활성화되어 감염된 신경세포 주위를 둘러싸면서 유리되는 바이러스를 탐식하여 감염의 확산을 방지한다. 이때 미

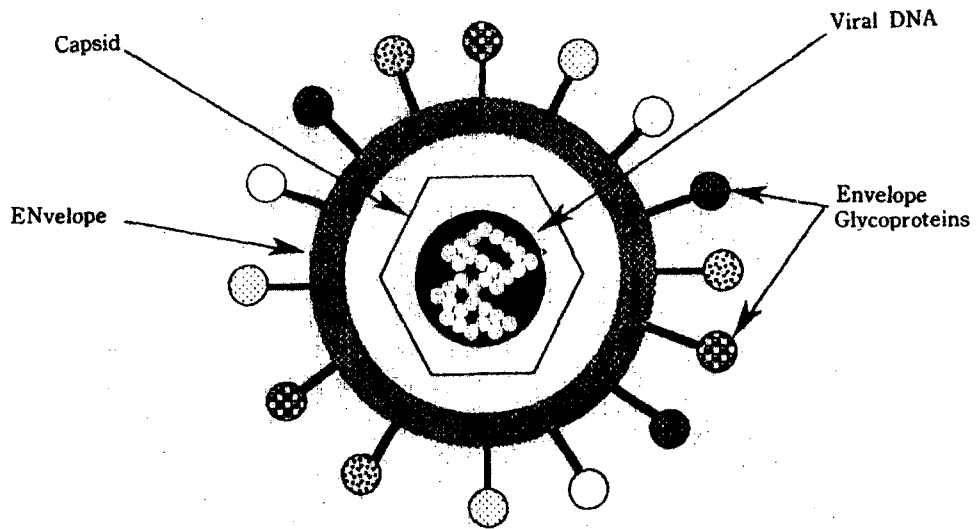


Fig 1. The structure of pseudorabies virus (PRV).

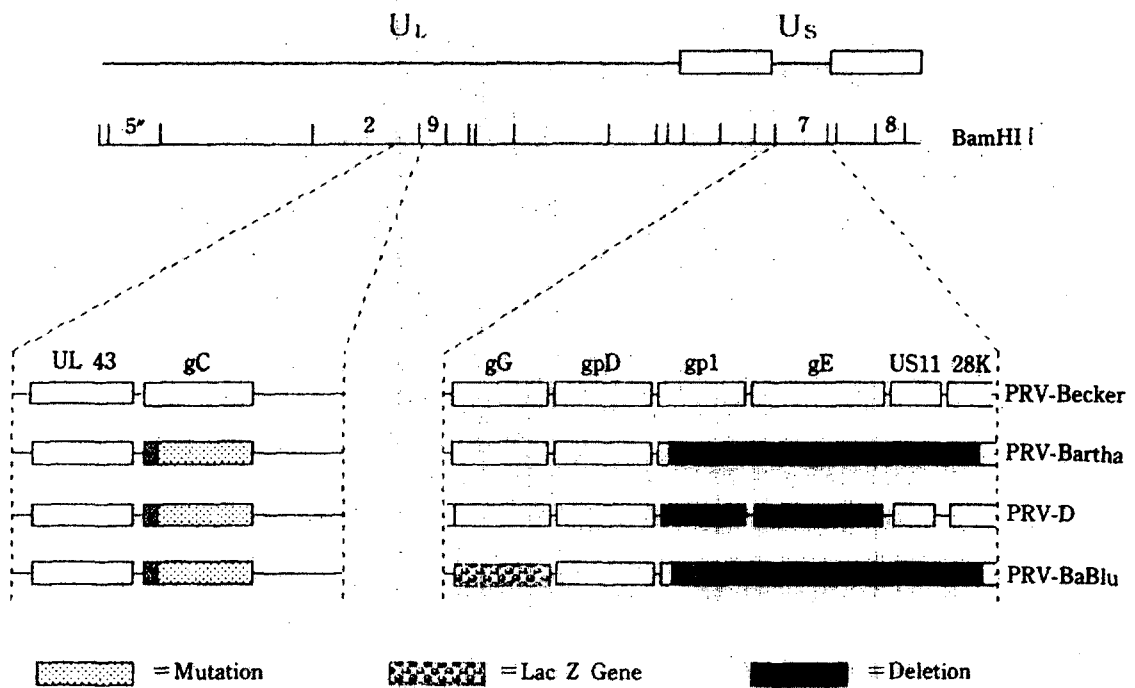


Fig 2. The genetic map of pseudorabies virus (PRV).

세아교세포 내로 탐식된 바이러스는 복제는 일어나지 않고 세포밖으로 유리되지 않고 미세아교세포에서 떨어진 위족(pseudopodia)이 신경연접 사이로 파고 들어가 바이러스가 신경연접을 횡단하지 못하게 하여 바이러스의 파급을 방지하게 된다(Weinstein 등, 1990; Lieberman 등, 1989). 또한 IL-1 β , TNF 등의 여러 가지 cytokine의 작용이 활성화되어 뇌-혈관장벽의 투과성을 증가시켜 혈관내의 단핵세포가 감염부위로 유리되어 탐식능력이 있는 큰포식세포로 활성화되어 감염된 신경원을 탐식하는 등의 면역체계의 변화가 이루어지게 된다.

한편, 위(stomach)는 그 기능을 수행하기 위하여는 미주신경(vagus nerve)을 통하여 운동명령을 받고 감각자극은 척수로 이어져 있는 감각신경을 따라 중추신경으로 전달된다(Atanassova 등, 1980; Code와 Marlett, 1975). 이러한 운동명령을 전하는 신경은 3~4 단계의 신경연접(synapse)을 통해 중추신경과 말단기관 사이를 연결시키고 있는 것으로 알려져 있다(Cunningham, 1990; Diamant, 1984; Bak 등, 1977). 실제로 위에 분포하는 부교감 신경(parasympathetic nerve)은 뇌의 미주신경동쪽핵(dorsal motor nucleus of vagus nerve)에서 시작되어 위벽 안에 위치하는 근육층열기(myentric plexus)에 연결되어 있으며(Leslie 등, 1982; Kalia와 Sullivan, 1982; Willett 등, 1986) 교감신경(sympathetic nerve)은 척수에서 흉수신경(thoracic nerve)을 따라 복강신경절(celiac ganglion)을 거쳐 위의 벽으로 들어가는 것으로 알려져 있다(Netter, 1962; Furness와 Costa, 1974). 또한 위벽의 기계적 수용체와 화학적수용체에서 받아들여진 자극에 관한 정보는 고립로핵(Solitary tract nucleus)을 거쳐 중추신경계통 안에서 다른 곳으로 연결되는 것으로 알려져 있다(Ricardo와 Koh, 1978; Swanson과 Sawchenko, 1983).

위는 각 부위별로 자율신경지배에 의한 주기적운동을 보이며(Veening 등, 1989; Code와 Marlett, 1975) 이 운동은 주로 내인성신경계통(enteric nervous system)과 일부는 미주신경을 포함한 외인성신경계통(extrinsic innervation)의 지배를 받는 것으로 알려져 있어(McCann 등, 1989; Miceli와 Malsbury, 1985; Palkovit 등, 1986) 내장기관 중 특히 위를 지배하는 신경의 중추신경내에서의 형태학적 연결상황을 추적하는 일은 매우 큰 의미를 가질 수 있다고 본다. 따라서 우수한 신경

로추적자로 생각되는 PRV-BaBlu나 PRV-D를 원위 위의 배쪽벽에 주사하여 바이러스의 이동을 조사하여 중추신경계에서의 위치배 신경의 신경경로를 재구성하고 신경로 추적자인 PRV-BaBlu와 PRV-D의 복제와 이동의 시공간적 이동 양상을 관찰함으로써 중추신경계내 바이러스 감염의 매개 변수를 분석하고 PRV의 신경친화성과 침습을 관찰하고자 본 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐(B.W.; 200~350gm) 50마리를 본 실험에 사용하였다. 사료와 물은 실험 전 과정을 통해 자유로이 공급하였고, 팜주기는 14시간은 밝게, 10시간은 어둡게 하여 표준화했다. 실험관리는 American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care와 Animal Welfare(Pubic Law 99-198)의 관리지침에 준했다. 모든 실험동물은 각 실험의 전 과정을 통해 Biosafety Level 2 Laboratory내로 국한시켰다.

2. 돌연변이 바이러스 생산

PRV의 돌연변이종인 PRV-BaBlu와 PRV-D가 본 실험에서 사용되었는데 PRV의 계능과 PRV-BaBlu와 PRV-D의 유전자 모식도는 Fig. 1, 2와 같다. PRV-D는 야생형인 PRV-Be의 계능 중 Unique Short(Us) Segment 중 gI와 gE에 해당되는 유전자를 제거하고, Unique long(U_l) Segment 중 gC유전자의 일부는 누락 및 변형시켜 산출하였고, PRV-BaBlu는 PRV-Be의 계능중 Unique Short(Us) Segment에서 gI, gE, USIII 유전자 및 28K 유전자의 제거하여 산출된 PRV-Ba의 Unique Short(Us) Segment 중 gG유전자에 lacZ(β -galactosidase) 유전자를 삽입시켜 산출하였다. PRV-D와 PRV-BaBlu는 Porcine kidney fibroblast(PK15-cell)에서 배양하되, 사용할 때 plague forming unit는 각기 4.26×10^6 pfu/ml와 2.5×10^6 pfu/ml 으로 하여 -70 $^{\circ}$ 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 마

스크를 사용하고, 사용후에는 모두 소각 처리하였다. 또한 모든 수술도구는 Clorax로 소독하여 보관하는 동안 만일의 사고에 대비하여 최대한의 감염방지에 노력하였다.

3. 바이러스 주입

실험동물은 실험직전에 Ketamine(50 mg/ml)과 Xylazine hydrochloride(20 mg/ml)를 각각 체중 gm당 0.15 ml 과 0.05 ml 씩 혼합시켜 복강내 주사하여 마취시킨 후 바이러스 주입 예정부위인 위를 노출시켜 위의 배쪽벽의 2~3부위에 Hamilton 주사기를 이용하여 바이러스 4 μ l를 다음과 같은 방법으로 주입하였다.

1) PRV-BaBlu와 PRV-D를 각각 4 μ l씩 위의 배쪽벽에 주입하였다.

2) PRV-BaBlu 2 μ l와 PRV-D 2 μ l를 혼합시켜 동시에 위의 배쪽벽에 주입하였다.

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

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

바이러스의 유출을 최대한 줄이기 위해 처음 2 μ l의 바이러스를 위의 배쪽벽에 주입하고 5분동안 기다린 뒤 Hamilton 주사기 바늘을 약간 후방으로 당긴 뒤 2 μ l의 바이러스를 더 주입하고 10분간 기다렸다. 바이러스 주입이 끝난 실험동물은 수술부위를 봉합한 뒤 실험동물 사육장에서 외부와 격리시켜 사육하였다.

4. 조직처리

PRV-BaBlu를 주입한 뒤 60~120 시간의 생존기간을 준 다음 실험동물을 다시 동일 마취액으로 마취시키고 심장을 봉해 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 $^{\circ}$ C에서 4시간 후고정을 실시하였다. 그 후 다시 0.1M PB로 1시간 동안 수세하고 20% phosphate buffered sucrose 용액에 담가 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 내지 48시간 동안 보관하였다. 보관된 뇌조직들은 동결절편기(Cryostat, AO)를 이용하여 약 35 μ m두께의 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 β Gal)가 바이러스를 동정하기 위해 사용되었다. Aceton으로 약독화시킨 PRV-Be를 토끼에 접종하여 생성시킨 Rb134는 바이러스에 감염된 중추 신경핵내에서 PRV-BaBlu와 PRV-D를 동정시켰고, Rb1544는 바이러스 외막의 gD당단백에 대한 특이항체로 PRV-D를 동정시켰으며, M β Gal은 lacZ유전자의 산물인 β -galactosidase에 대한 특이항체로 사용되었다.

6. 면역조직화학염색

일차항체인 Rb134(1 : 10,000), Rb1544(1 : 10,000) 및 M β Gal(1 : 2,000)에 조직절편들을 담가 실온에서 12시간 내지 24시간 동안 반응시켰다. 이때 1차항체의 희석은 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 0.1 M PB로 세척하여 2차항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG(Vector Lab.)와 biotinylated goat anti-mouse IgG(Vector Lab)를 1 : 200으로 희석하여 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 0.1 M PB로 15분간 2회 수세하고 나서 30mg의 3-3' diaminobenzidine (DAB)을 150 ml의 0.1 M PB에 녹인 용액에서 5분간 반응 시킨후 과산화수소수(H₂O₂)를 0.005 %되게 첨가하여 갈색의 발색반응을 약 10분간 시행하였다. 반응이 끝난 조직들은 다시 0.1 M PB에 여러차례 수세하고 gelatin이 입혀진 슬라이드 위에 차례대로 얹어 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 이상 건조시켰다. 그 후 통상적인 방법에 따라 ethanol과 xylene의 탈수와 투명화 과정을 거친후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

7. 면역이중형광염색

1차항체인 Rb1544(1 : 50)과 M β Gal(1 : 50)을 조직

에 담가 실온에서 12시간 내지 24시간 동안 반응시켰다. 이때 1차항체의 희석은 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 희석하여 암실에서 24시간 반응시켰다. 반응이 끝난 조직은 슬라이드에 포매후 형광물질용 가시화시킬 수 있는 Filter가 부착된 Zeiss Axioplan photomicroscope를 사용하여 이중면역형광 사진촬영을 실시하였으며 면역조직화학반응을 일으킨 조직 슬라이드는 NIH Image Software로 계수하여 통계처리 하였다.

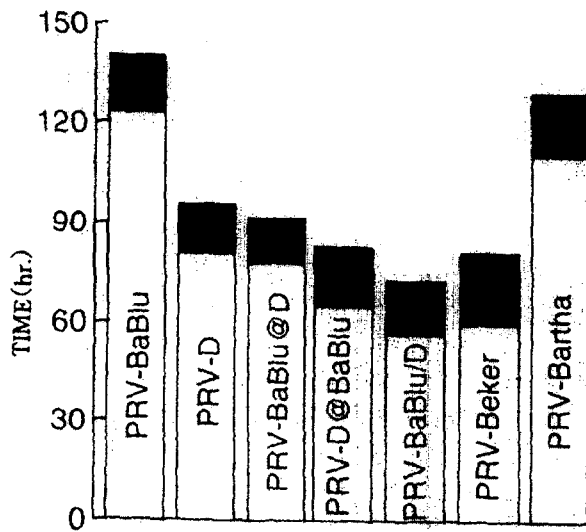


Fig 3. The survival time of animal after stomach injection of PRV.
 PRV-BaBlu@D : PRV-BaBlu followed by PRV-D
 PRV-D@BaBlu : PRV-D followed by PRV-BaBlu
 PRV-BaBlu/D : PRV-BaBlu and PRV-D

III. 결 과

위의 배쪽벽에 주입된 PRV-BaBlu와 PRV-D는 미주신경 섬유를 따라 위지배 일차신경핵인 중추신경계내 부교감성절전신경세포를 감염시켰다(Fig. 4, 6, 7).

바이러스는 위를 지배하는 일차신경핵인 미주신경동쪽핵(dorsal motor nucleus of vagus nerve)으로 이동하여 복제되었고 미주신경동쪽핵을 나온 바이러스는 이차신경핵인 고립로핵(Nucleus of solitary tract), 뇌실옆핵(Paraventricular nucleus), 편도핵중양부(Central part of amygdaloid nucleus) 뿐만아니라 미주신경동쪽핵과 고립로핵으로 투사하는 중추의 많은 신경핵으로 이동하여 감염시켰는데(Fig. 5), PRV-D의 침입과 복제는 PRV-BaBlu보다 빠르게 일어났다. 그이 동안 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, 신경핵 속에서도 위의 기능과 관련있는 신경세포인지 무관한 세포인지 쉽게 구별이 되었다. 위를 지배하는 신경축과 관련있는 신경세포체 모양은 타원형 또는 다각형 모양이 대부분이었다.

바이러스 주입후 시간 경과에 따른 생존시간은 PRV-BaBlu를 주입한 경우에는 122시간까지는 기면상태(lethargy)가 나타나지 않았으나 그 후 기면상태가 발현되면서 계속 증상이 심해져서 최대 140시간까지 생존하였고, PRV-D를 주입한 경우에는 82시간까지 기면상태가 나타나지 않았으나 그 후 기면상태가 발현되면서 최대 96시간까지 생존하였다. 이는 PRV-D가 PRV-BaBlu보다 감염독성이 강한 것을 나타내며 PRV의 Genome 중 Unique Short(U_s) segment 중 당단백인 gI와 USII 및 28K가 PRV의 독성발현에 관여함이 관찰되었다(Fig. 3).

PRV-BaBlu를 주입후 24시간이 경과한 뒤 PRV-D를 같은 부위에 재주입한 경우 80시간까지는 기면상태가 발현되지 아니하였으나 그 후 기면상태가 발현되어 최대 생존기간은 97시간이었으며, PRV-D를 주입후 24시간이 경과한 뒤 PRV-BaBlu를 같은 부위에 재주입한 경우 68시간까지는 기면상태가 발현되지 아니하였으나 그 후 기면상태가 발현되어 최대 생존기간은 83시간이었다(Fig. 3). 이는 하나의 바이러스에 전감

염된 신경원은 다른 바이러스 감염을 방해하는 것이며 그 방해 정도는 독성이 강한 PRV-D를 먼저 주입한 경우가 PRV-BaBlu를 주입한 경우보다 훨씬 강했다. 따라서 PRV-D의 전감염은 PRV-BaBlu에 의한 같은 부위의 신경세포의 감염을 감소시켰으며 PRV-D는 PRV-BaBlu에 전감염된 신경세포를 효과적으로 감염시켰다(Fig. 3,8,9).

PRV-BaBlu 주입후 PRV-D를 재주입하였을 경우 미주신경등쪽핵에는 3가지 형태의 바이러스에 감염된 신경세포가 관찰되었는데 PRV-D에만 감염된 신경세포(녹색), PRV-BaBlu에만 감염된 신경세포(적색) 및 PRV-BaBlu와 PRV-D에 동시에 감염된 신경세포(황색)로 구분되어 관찰되었다. 이는 독성이 강한 PRV-D가 PRV-BaBlu의 전감염에도 불구하고 상당수의 신경핵을 감염시켰다는 것을 시사한다(Fig. 3,8,9).

PRV-BaBlu와 PRV-D를 혼합하여 주입하였을 경우 57시간까지는 기면상태가 발현되지 아니하였으나 그후 기면상태가 급작스럽게 발현되어 최대 생존시간은 73시간에 불과했다(Fig. 3,7). 이는 PRV-Ba의 최대 생존기간보다 짧은 것으로 두 종 이상의 바이러스의 혼합은 감염독성을 현저히 상승시켰고 PRV-D와 PRV-BaBlu를 동시에 주입하는 경우 같은 신경세포를 동시에 감염시켰다(Fig. 3).

한편 PRV-BaBlu에 감염된 미주신경 등쪽핵의 신경세포에서 lacZ 유전자에 대한 면역조직화학반응이 강하게 나타났고 PRV-BaBlu 이동에 따라 신경횡단 방식으로 이동하여 시상하부의 뇌실액행등에서도 β -galactosidase에 대한 면역조직 화학반응이 강하게 관찰되었다.

IV. 고 찰

신경분야의 형태학적 연구는 특정 호르몬을 대상으로 하는 면역조직화학을 이용한 연구(Massa 등, 1987a; Sawchenko와 Swanson, 1982)나 특정장기의 신경 지배에 관한 신경로를 관찰하는 연구가 주를 이루고 있다(Rinaman과 Miselis, 1987; Rogers 등, 1980). 이 중 신경로의 관찰에 관한 연구는 오래전부터 사용되어 오던 방법들인 육안해부법이나 신경조직의 퇴행성 변화를 일으켜 조사하는 법을 사용하거나 최근에는 축삭들기 사이의 물질이동에 근본을 두고 여러종류의 추적자를 사용하는 법이 주를 이루고 있다(Heimer와 Zaborsky,

1989; Schwaber 등, 1982; Shipley, 1982).

현재까지 말초 장기를 지배하는 중추신경계내의 신경로를 밝히기 위한 연구는 주로 통상적인 추적자를 이용하여 왔는데 즉 형광 물질을 이용하거나, 효소의 일종인 horseradish peroxidase(HRP)를 이용하거나(Herman 등, 1990; Shapir와 Miselis, 1986b) 이 HRP를 세균독소인 cholera-toxin에 부착시킨 CT-HRP를 신경로추적자로 이용한 보고(Johnson 등, 1988) 등이 있으나 이들 추적자는 신경연접을 건너 이동하지 못하거나 건너간다 하더라도 극히 제한적이며 중추신경이나 말초신경을 통과하는 도중 그 농도가 점차 희석되어 상위신경으로 이동할수록 양성반응이 약해지는 한계점을 지니고 있다.

최근에 이와같은 단점을 극복한 추적자로 신경계친화성 바이러스인 Pseudorabies 바이러스가 소개된 바 있다(Strack 등 1986; Stadish 등, 1984). 이 바이러스는 신경연접을 건너 상위신경세포로 이동할 수 있고 또 이동시 복제에 의해 점차 그 농도가 증가하여 검출이 용이하다는 획기적인 두가지 장점을 지닌 것으로 야생형의 Becker와 백신용인 Bartha로 대별되고 있으며 특히 Bartha는 병원성이 거의 없어 실험실에서 조작이 용이하며 전자현미경 수준에서도 별다른 조작이나 과정 없이 관찰이 가능하여 획기적인 새 신경로추적자로 여겨지고 있다.

따라서 Card 등(1990)과 Standish 등(1994)에 의해 PRV가 신경추적자로서 신경연접을 건너가는 특성 뿐만 아니라 신경세포체의 핵내에서 복제되어 이동에 따른 양의 감소가 없어(Card 등, 1990, 1993; Standish 등, 1994) 강한 양성반응을 얻을수 있는 장점과 함께 실험동물에서 의견상 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(neuroglia cell)의 면역작용(Massa 등, 1987a; Lieberman 등, 1989) 등은 더욱 거짓 양성반응을 막을 수 있었던 것으로 보여 신경계 추적의 연구에 가장 잘 맞는 실험재료라 할 수 있다.

한편, 중요한 소화기관으로서의 위는 다른 모든 복강내 장기들 처럼 부교간신경과 교감신경을 포함하는 자율신경계통의 운동지배를 받으며 척수로 부터의 감각신경의 연결이 알려져 있으며(Van 등, 1987) 이러한

위를 포함한 내부장기의 대부분은 3~4단계 이상의 신경연결을 건너야 중추신경계로 연결되어 있는 것으로 알려져 있으며 위의 부교감신경은 미주신경동쪽핵을 거쳐 위벽의 말초신경들기로, 교감신경의 경우 복강신경절을 거쳐 흉수신경을 따라 말초신경들기로, 위벽의 기계수용체와 화학수용체에서 시작한 자극에 관한 정보는 고립로핵을 거쳐 중추신경계에 도달하는 것으로 알려져 있다. (Kalia 와 Sullivan, 1982 ; Miceli 와 Malsbully, 1985)

위운동은 내인성신경계통(Atanassova 등, 1980 ; Diamant, 1984)보다 미주신경을 포함하는 외인성신경계(extrinsic innervation)의 지배를 많이 받아 (Marik 와 Code, 1975) 내장기관 중 특히 위를 지배하는 중추신경계의 형태학적 추적은 매우 큰 의미를 가질 수 있다고 생각된다. 위지배 일차중추핵은 중추신경계내 부교감성 절전신경세포인 미주신경동쪽핵이었으며, PRV-D와 PRV-BaBlu는 미주신경동쪽핵에서 복제되어 위장의 운동을 지배하는데 관여하는 이차신경핵인 고립로핵, 뇌실엽핵 뿐만아니라 고립로핵과 미주신경동쪽핵으로 투사하는 중추의 많은 신경핵으로 이동하여 감염시켜 이 부위에서의 면역조직화학적 염색을 통한 바이러스의 검출이 가능하였다.

본 연구에서 PRV-D와 PRV-BaBlu의 배쪽 위벽내 주입은 주사부위에서의 새어나감(leakage)을 방지하기 위하여 최대한의 노력과 함께 불가항력적으로 새어나감 미량의 바이러스는 생리식염수로 복강내에서 세척 및 흡입과정을 거쳐 새어나감에 의한 거짓양성반응을 최대한 줄였다. 또한 Card등(1992)에 의하면 PRV는 신경친화성 바이러스(neurotropic virus)이긴 하나 일부 새어나감 미량의 바이러스는 다른 신경계 부위에서 전혀 발견되지 않음이 입증되었으며, 본 실험의 경우에도 위벽층이 아닌 위내강 또는 복강내로의 바이러스 주사는 중추신경계 어느 부위에서도 양성반응을 보이지 않음을 알 수 있었다.

이렇게 바이러스의 중추신경계로의 이동에 경과되는 시간을 말단장기로부터 중추신경까지의 거리, 신경조직에 대한 바이러스의 병독성(virulence)뿐만 아니라 바이러스의 종과 혼합여부들의 실험방법과 관계있음을 시사한다.

본 연구에서는 PRV의 변이종으로서 PRV-Be의 계통 중 Unique Short(U_s) segment의 gI, gE, USII 유전자 및 28K 유전자의 일부를 제거하고 Unique Long(U_l)

segment의 gC 유전자의 일부를 제거 변형시켜 산출된 PRV-Ba의 U_s segment의 gC 유전자에 lacZ 유전자를 삽입시켜 얻은 PRV-BaBlu와 PRV-Be의 계통 중 U_s segment의 gI와 gE 유전자를 제거하고 U_l segment의 gC 유전자의 일부를 제거 변형시킨 PRV-D를 사용하였다.

PRV의 변이종 바이러스인 PRV-D와 PRV-BaBlu를 사용한 본 실험은 변이종 바이러스의 생산과 복잡하게 얽힌 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.

한편 바이러스 주입후 신경경과에 따른 변화와 생체 시간은 바이러스의 종과 혼합여부 등의 실험방법에 따라 다양하였다. PRV-BaBlu와 PRV-D를 각기 주입하였을 경우 기면상태(lethargy)의 발현과 최대 생존기간이 PRV-D가 짧은 것으로 나타나 PRV-D가 PRV-BaBlu보다 병독성이 강한 것으로 판명되었고, 이는 PRV의 계통 중 U_s segment의 당단백인 gI와 USII 및 28K가 PRV가 병독성에 깊게 관여하는 것을 시사한다.

PRV-D를 먼저 주입했을 때에 기면상태의 발현과 최대 생존 기간이 짧게 나타난 것은 하나의 바이러스에 전감염된 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 신경세포의 이중감염이 가능하나 이는 전적으로 바이러스의 병독성에 매우 의존적임이 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 상승효과로 사료되나 확실한 기전을 밝히기 위한 충분한 실험과 연구가 요구된다.

V. 결 론

기능적으로 연결된 신경세포내에서 복제할 수 있는 신경친화성 Pseudorabies 바이러스(PRV)는 신경연접 평단분석에 대한 연구에서 탁월한 추적자로 각광을 받고 있다.

최근 연구들은 유전자 조작된 바이러스 변이종이 복잡한 신경로 추적 연구에 다양하게 이용되고 있음을 보여주고 있다.

본 연구는 PRV의 유전자 조작된 두가지 변이종의 신경친화성과 신경계 침습을 관찰하기 위해 시도되었다. 본 연구에서 사용된 두가지 변이종 바이러스는 백신행인 PRV-Ba의 Us Segment 내의 gG에 lacZ(β -galactosidase) 유전자를 삽입한 PRV-BaBlu(4.75×10^8 pfu/ml)와 PRV-Ba중 Us Segment 내의 gD 유전자를 회복시킨 PRV-D(2.5×10^8 pfu/ml)였다.

PRV-BaBlu와 PRV-D의 $4\mu\ell$ 를 편취 위의 배쪽벽에 주입한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. PRV-BaBlu와 PRV-D는 위를 지배하는 일차 신경핵인 미주신경등쪽핵과 이차신경핵인 뇌실옆핵등을 감염시켰다.
2. 신경세포내 PRV-D의 침습과 복제는 PRV-BaBlu보다 빨랐다.
3. PRV-D는 PRV-BaBlu보다 병독성이 강했다.
4. PRV-D와 PRV-BaBlu의 동시주입은 동량의 PRV-Ba보다 병독성이 강했다.
5. PRV-D와 PRV-BaBlu의 동시주입은 같은 위치의 신경세포를 동시에 감염시켰다.
6. PRV-BaBlu의 복제는 PRV-D의 전감염에 의해 방해되었다.
7. PRV-D에 의한 전감염된 신경세포는 PRV-BaBlu의 감염에 저항성을 보였다.

참 고 문 헌

1. 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 Com Neurol* 283 : 248-268. 1989.
2. Altschuler SM, Fereni DA, Lynn RB & Miselis RR : Representation of the cecum in the lateral dorsal motor nucleus of the vagus nerve and commissural subnucleus tractus solitarii in rat. *J Com Neurol* 304 : 261-274. 1991.
3. Atanassova E, Kortezyova N, Lolova I & Petrov I : Change of myoelectric complex of the stomach and small intestine under the influence of the intrinsic nervous system. *Acta Physiol Pharmacol. Bulg* 6 : 11-18. 1980.
4. Bak IJ, Markham CH, Cook ML & Stevens JG : Intraaxonal transport of herpes simplex virus in

- the rat central nervous system. *Brain res* 136 : 415-429. 1977.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Code CF & Marlett JA : The interdigestive myoelectric complex of the stomach and the small bowel of dogs. *J Physiol. Lond* 246 : 289-309. 1975.
9. Cunningham ET, Jr Bohn MC & Sawchenko PE : Organization of adrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol* 292 : 651-667. 1990.
10. Diamant NE : Neurological control of interdigestive migrating complex(IDMC). Montreal, Jouveinal Laboratories, 1984, pp3-13.
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 & Teagu O : Transmission of the virus of herpes fibrils along nerves in experimentally infected rabbits. *J Med Res* 44 : 139-184. 1923.
13. Herman GE, McCann MJ & Rogers RC : Activation of the bed nucleus of the stria terminalis increases gastric motility in the rat. *J Autonomic Nerv Sys* 30 : 123-128. 1990.
14. Heimer GE & Zaborsky L : Neuroanatomical tract-tracing method 2. New York and London, Plenum Press, 1989, pp49-96.
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. 1988.
17. Kalia M & Sullivan JM : Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the rat. *J Comp Neurol* 211 : 248-264. 1982.
 18. Leslie RA, Gwyn DG & Hopkins DA : The central distribution of the cervical vagus nerve and gastric afferent and efferent projections in the rat. *Brain Res* 8 : 37-43. 1982.
 19. 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.
 20. Lycke E, Kristensson K, Svennerholm B, Vahlne A & Ziegler RJ : Uptake and transport of herpes simplex virus in neurites of rat dorsal root ganglia cells in culture. *J Gen Virol* 65 : 55-64. 1984.
 21. Marik F & Code CF : Control of the interdigestive myoelectric activity in dogs by the vagus nerves and pentagastrin. *Gastroenterology* 69 : 387-395. 1975.
 22. 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.
 23. McCann MJ, Hermann GE & Rogers RC : Nucleus raphe obsculus (nRO) influences vagal control of gastric motility in rats. *Brain Res* 486 : 181-184. 1989.
 24. Miceli MO & Malsbury CW : Brainstem origins and projection of the cervical and abdominal vagus in the golden hamster : a horseradish peroxidase study. *J Comp Neurol* 237 : 65-76. 1985.
 25. Nadelhaft I, Vera PL, Card JP & Miselis RR : Central nervous system neurons labeled following the injection of pseudorabies virus into the rat urinary bladder. *Neurosci Letters* 143 : 271-274. 1992.
 26. Palkovit M, Mezey E, Eskay RL & Brownstein MJ : Innervation of the nucleus of the solitary tract and the dorsal vagal nucleus by thyrotropin-releasing hormone-containing raphe neurons. *Brain Res* 373 : 246-251. 1986.
 27. Ricardo JA & Koh ET : Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res* 153 : 1-26. 1978.
 28. 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.
 29. Rinaman L, Card JP, Schwaber JS & Miselis RR : Ultrastructural demonstration of a gastric monosynaptic vagal circuit in the nucleus of the solitary tract in rat. *J Neurosci* 9(6) : 1985-1996. 1989.
 30. Robbins AK, Dorney DJ, Wathen MW, Whealy ME, Gold C, Waston RJ, Holland LE, Weed SD, Levine M, Glorioso JC & Enquist LW : The pseudorabies virus gII gene is closely related to the gII glycoprotein gene of herpes simplex virus. *J Virol* 61(9) : 2691-2701. 1987.
 31. 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.
 32. Rogers RC, Kita H, Butcher LL & Novin D : Afferent projections to the dorsal motor nucleus of the vagus. *Brain Res Bull* 5 : 365-373. 1980.
 33. Sawchenko PE & Swanson LW : Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 205 : 260-272. 1982.
 34. Schwaber JS, Kapp BS, Higgins GA & Rapp RR : Amygdaloid and basal forebrain direct connections with the nucleus of the solitary tract and the dorsal motor nucleus. *J Neurosci* 2 : 1424-1438. 1982.
 35. Shapiro RE & Miselis RR : The central organization of the vagus nerve innervating the stomach of the rat. *J Comp Neurol* 238 : 473-488. 1985b.
 36. Shipley MT : Insular cortex projection to the nucleus of the solitary tract and brainstem visceromotor regions in the mouse. *Brain Res Bull* 8 : 139-148. 1982.
 37. 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.
 38. Strack AM, Sawyer WB, Hughes JH, Platt KB & Loewy AD : A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infection. *Brain Res* 491 : 156-162. 1986.
 39. Swanson LW & Sawchenko PE : Hypothalamic integration : organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann Rev Neurosci* 6 : 269-324. 1983.
 40. Van der Kooy, Coda LY, McGinty JF, Gerfen CR & Bloom FE : The organization of the projections from the cortex, amygdala and hypothalamus to

- the nucleus of the solitary tract in rat. *J Comp Neurol* 224 : 1-24. 1984.
41. Veening JG, Swanson LW & Sawchenko PE : The organization of projections from the central nucleus of the amygdala to brainstem sites involved in central autonomic regulation : A combined retrograde transport immunohistochemical study. *Brain Res* 303 : 337-357. 1984.
42. Weinstein DL, Walker DG, Akiyama H & McGeer PL : Herpes simplex virus type I infection of the CNS induces major histocompatibility complex antigen expression on rat microglia. *J Neurosci Res* 26 : 55-65. 1990.
43. Willett CJ, Gwyn DG, Rutherford JG & Leslie RA : Cortical projections to the nucleus of solitary tract : An HRP study in the cat. *Brain Res Bull* 16 : 497-505. 1986.

Legends for Figures

Fig. 4. Parasympathetic neuraxis to innervate stomach.

DMV : Dorsal motor nucleus of vagus nerve
X : Vagus nerve

Fig. 5. The point of slide section for photography.

BNST : Bed nucleus of stria terminalis
PVN : Paraventricular nucleus
NST : Nucleus solitarius tractus
AP : Area postrema
DMV : Dorsal motor nucleus of vagus nerve

Fig. 6. The location of dorsal motor nucleus of vagus nerve at Bregma -13.80mm level.

Fig. 7. Transneuronally labeled immunoreactive neurons in DMV after dual injection of PRV-D and PRV-BaBlu into stomach.

Arrow head(green) : PRV-D infected neuron
Small arrow(red) : PRV-BaBlu infected neuron
Large arrow(yellow) : Co-infected neuron with PRV-D and PRV-BaBlu
DMV : Dorsal motor nucleus of vagus nerve

Fig. 8. Transneuronally labeled immunoreactive neurons in DMV after injection of PRV-D was followed by PRV-BaBlu 24 hours later into stomach.

Arrow head(yellow) : Co-infected neuron with PRV-D and PRV-BaBlu
Small arrow(green) : PRV-D infected neuron
Large arrow(red) : PRV-BaBlu infected neuron
DMV : Dorsal motor nucleus of vagus nerve

Fig. 9. Transneuronally labeled immunoreactive neurons in DMV after injection of PRV-BaBlu was followed by PRV-D 24 hours later into stomach.

Arrow head(yellow) : Co-infected neuron with PRV-BaBlu and PRV-D
Small arrow(red) : PRV-BaBlu infected neuron
Large arrow(green) : PRV-D infected neuron
DMV : Dorsal motor nucleus of vagus nerve

김진상의 논문 사진부도

