

신경로추적자로 바이러스를 이용한 흰쥐 귀밑샘지배 중추신경핵의 면역조직화학적 동정

대구대학교 재활과학대학 물리치료학과

김진상, 채운원

서울대학교 수의과대학 해부학교실

이흥식, 강태천

경북대학교 수의과대학

이성준, 이재현

한려산업대학교 재활학과

최진호

극동전문대학 물리치료과

김동대

Immunohistochemical Localization on the Central Nuclei Innervating Rat Parotid Gland Using Virus as a Neural Tracer

Kim, Jin-Sang, Ph.D., D.V.M., Chae, Yoon-Won, P.T.

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

Lee, Heung-Shik S., Ph.D., D.V.M., Kang, Tae-Chun, M.S., D.V.M.

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

Yi, Seoung-Joon, Ph.D., D.V.M., Lee, Jae-Hyun, Ph.D., D.V.M.

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University

Choi, Jin-Ho, P.T., M.S.

Dept. of Rehabilitation, Hanlyo Sanup University

Kim, Dong-Dae, P.T., M.S.

Dept. of Physical Therapy, Kukdong College

<Abstract>

This Study was carried out to investigate the secondary central nuclei innervating rat parotid gland. PRV-BaBlu as a neuronal tracer was injected into the left parotid gland and brains obtained through cardiac perfusion were treated by immunohistochemical staining. The results were as follows:

1. The secondary central nuclei innervating rat parotid gland were paraventricular nucleus and central part of amygdaloid complex largely in diencephalon.
2. The paraventricular nucleus and central part of amygdaloid complex in diencephalon showed morphologi-

이 논문은 1995학년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의한 논문임.

cal asymmetry between PRV-BaBlu injected site and uninjected one.

3. The Ratio between total neurons and PRV-BaBlu infected neurons in paraventricular nucleus was $27.62 \pm 16.23\%$ in left and $12.78 \pm 8.69\%$ in right.
4. The Ratio between total neurons and PRV-BaBlu infected neurons in central part of amygdaloid nucleus was $14.25 \pm 9.26\%$ in left and $8.35 \pm 6.26\%$ in right.

I. 서 론

침샘은 크게 큰침샘(major salivary gland)과 작은 침샘(minor salivary gland)으로 구분할 수 있는데 귀밑샘, 턱밑샘 및 혀밑샘이 큰침샘에 속하며, 볼샘, 입술샘, 혀샘 및 구개샘 등이 작은 침샘에 포함되나 그 종류와 크기는 동물의 종에 따라 차이가 많다(Nichel 등, 1979; Shiverly, 1987; Habel, 1989). 또한 침샘은 분비되는 침의 화학적 성질에 따라 점액샘, 장액샘 및 혼합샘으로 분류되는데, Munger(1964)는 단백질이 풍부한 수양성 물질을 분비하는 세포를 장액세포(se-rous cell), 점액다당류를 분비하는 세포를 점액세포(mucous cell)로 분류하면서 사람의 경우 귀밑샘은 장액샘이고 턱밑샘은 점액세포외에 장액성 반월(sero-mucous demilune)이 관찰된다고 하였고, 혀밑샘은 점액세포로만 구성된다고 하였다(Leppi, 1966). 소화기관의 부속샘인 침샘은 신체의 변화에 따라 교감신경과 부교감신경을 통해 침을 분비하는데(Banks, 1986), 말초장기의 신경지배를 담당하는 중추신경계통내의 신경로를 밝히는 연구는 신경축삭돌기들의 퇴행성 병변(degeneration)이나 재생(regeneration)을 이용하여 왔으나 최근에는 축삭돌기와 세포질 사이의 물질이동(axoplasmic flow)의 원리를 이용하여 신경이나 신경 섬유에 특정물질을 추적자로 주입하여 신경로를 찾아 내는 방법 등이 널리 응용되어 왔다. 이와같은 물질 중에서 가장 보편적으로 쓰이는 추적자로는 Fluoro-gold, Nuclear yellow 및 True blue 와 같은 형광물질이나 방사성동위원소에 표지된 단백질 또는 Horse-radish peroxidase(HRP) 등의 효소들이 쓰여지고 있다(Sawchenko 와 Swanson, 1982a). 추적자는 신경세포나 신경섬유내에서 이동하는 성질에 따라 세포체에서 축삭쪽으로 이동하는 정방향 이동추적자(anterograde tracer)와 축삭돌기에서 세포체 방향으로 이동하는 역방향 이동추적자(retrograde tracer) 및 양방향 이동추적자(amphigrade tracer)로 구분된다(Rokx 와 Willigen, 1988; Batini 등, 1976; Jacquin과 Roads,

1983; Chiaia 등, 1987; Chen 등, 1988; Shigenaga 등, 1990; Mong 등, 1988). 그러나 이들은 신경로 추적자로서 한계점을 지니고 있는데 중추신경이나 말초신경을 통과할 때 상위신경부분으로 갈수록 그 농도가 희석되며 신경축삭돌기를 통해 상위 신경세포로 이동하는 과정 중 신경연접을 건너가지 못하거나, 건너간다 하더라도 극히 제한적이다. 따라서 이들을 신경로추적자로 이용한 연구는 대부분이 말초기관과 이를 지배하는 최하위 신경세포나 신경핵을 밝히는데 그치거나, 중추신경계통 내에서 관찰된 하위신경핵을 조사하는 정도에 그치고 있는 실정이었다.

이와같은 관점에서 근래에 이용되기 시작한 신경친화성 바이러스인 Pseudorabies 바이러스(PRV)는 종래에 사용된 신경로 추적자들의 한계를 보완할 수 있어 주목을 받고 있다. 즉 이 바이러스는 양방향 이동추적자이지만 축삭을 따라 이동하면서 바이러스가 증식되어 그 수가 증가될 뿐만 아니라 신경연접을 쉽게 통과할 수 있는 특징이 있다(Card 등, 1990; Card 등, 1993; Lowey 등, 1994).

신경연접을 건너 이동할 수 있는 신경친화성이 있어 기능적 신경회로망 동정에 대한 연구에서 탁월한 도구로서 널리 이용되기 시작한 PRV는 알파 Herpes 바이러스에 속한다. PRV는 외피에 여러가지 당단백질(glycoprotein)을 지닌 DNA 바이러스이며 크게 야생형인 Becker strain 과 몇 개의 당단백질에 대한 유전자를 제거하여 약독화시킨 Bartha strain으로 대별된다. 또한 PRV의 신경원 감염기전과 복제, 바이러스와 숙주세포와의 상호관계 및 바이러스 감염에 대한 면역체계의 변화를 규명하기 위해서는 다양한 생물학적 활성을 지닌 바이러스 외피의 당단백질의 성질과 기능에 대한 연구가 절실히 요구되어 PRV에서 유전자조작을 통한 당단백질의 제거 등의 방법으로 몇가지 변이종을 산출하게 되었다. 그 중 PRV-D는 야생형인 Becker strain의 유전자 지도에서 유전자조작을 통해 Us segment의 gE를 제거하여 얻었으며, PRV-Bablu는 Bartha strain의 gG 유전자 중 일부를 제거한 후 β -galactosidase를 삽입하여

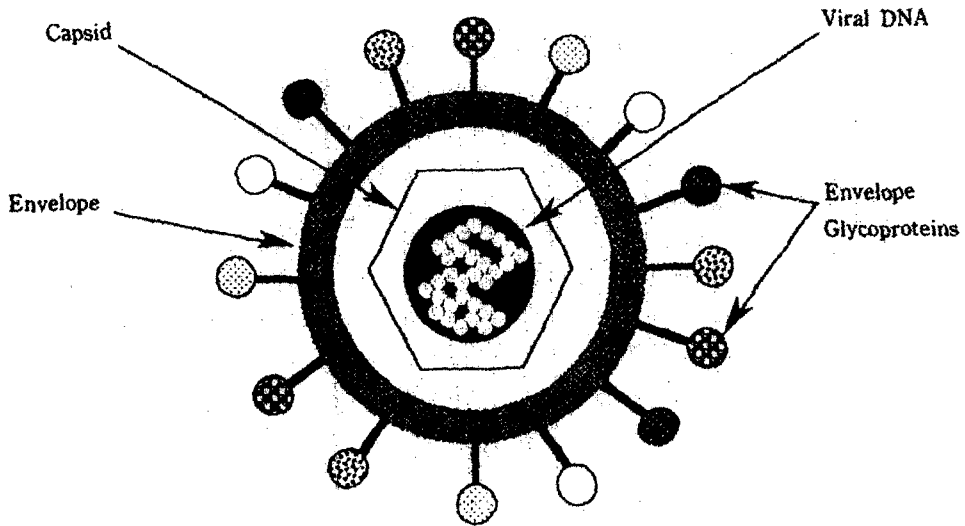


Fig 1. The structure of pseudorabies virus (PRV).

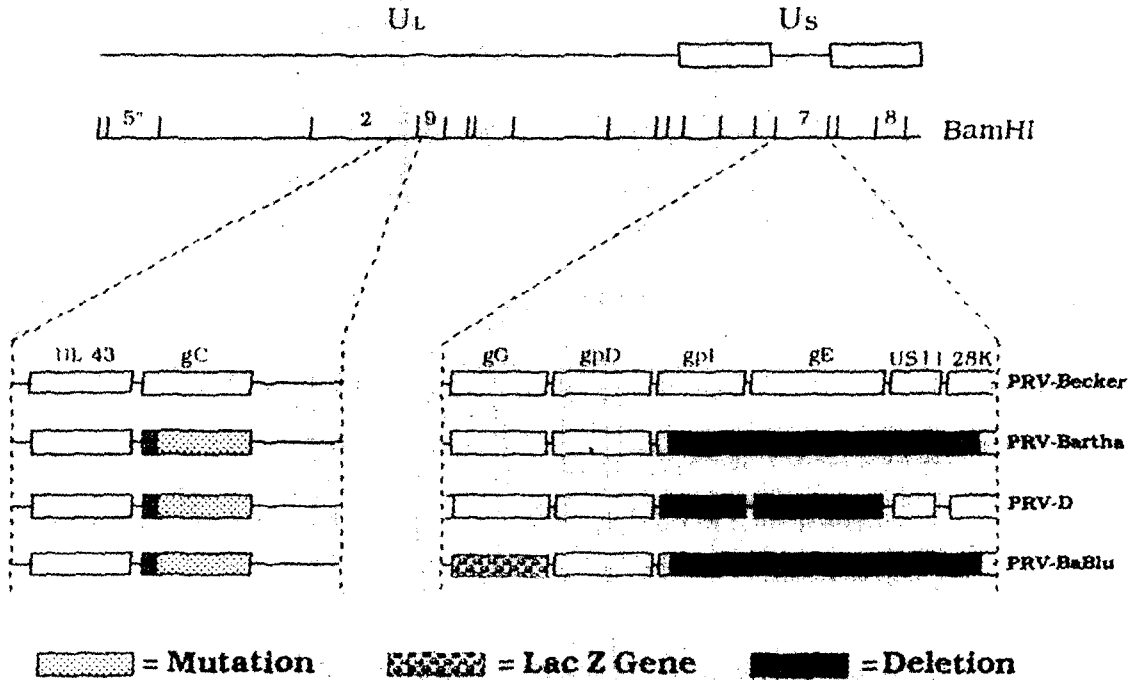


Fig 2. The genome of pseudorabies virus (PRV).

산출하였다(Fig. 1.2)(Card 등, 1991, 1995).

한편 신경로추적자로서 PRV를 이용하여 침샘을 지배하는 연구는 극히 미진한데 Jansen 등(1992)은 PRV를 이용한 연구에서 원위의 턱밑샘을 지배하는 일차중추신경핵은 위침분비핵(superior salivary nucleus)이며 이차중추신경핵은 간뇌의 많은 신경핵이 관여한다고 하였고 이는 침분비 기전에 관여하는 중추신경핵은 매우 복잡한 신경회로망에 의해 연결되어 있음을 보고하였다. 그러나 분비되는 침의 화학적 성질상 턱밑샘과 상이한 침을 분비하는 귀밑샘에서 침분비기전에 관여하는 중추신경핵의 동정은 이루어지지 않고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 신경로추적자로서 PRV-BaBlu를 원위 귀밑샘에 주입하여 침분비에 있어 기능적으로 관련이 있는 중추신경핵들을 동정하여 신경축(neuraxis)을 확립하고, 한쪽 귀밑샘에만 바이러스를 주입하여 귀밑샘지배에 관여하는 이차중추신경핵인 뇌실옆핵(paraventricular nucleus)과 편도핵 중앙부(central part of amygdaloid complex)의 좌,우비대칭성을 관찰하고자 수행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

체중 250gm 내외의 성숙한 Sprague Dawley 계 흰쥐 20 마리를 실험에 사용하였으며 실험동물은 외부와 격리된 20°C 의 온도를 유지한 동물사육장에서 사료와 물을 자유로이 공급하여 사용하되 아침 6시에 물을 꺼고 저녁 6시에 물을 꺼 1일 12시간의 일조시간을 맞추어 실험에 사용하였다.

2. 바이러스

본 연구에 사용된 신경로추적자는 고도의 신경친화성을 지닌 PRV의 변이종인 PRV-BaBlu이었다. PRV-BaBlu는 Becker strain의 유전자 지도 중 Unique Short(Us) segment에 있는 몇 가지 당단백질 유전자와 Unique Long(U_l) segment의 gC 유전자와 일부를 제거시켜 얻은 PRV-Ba의 Us segment의 gG 유전자에 lacZ(β -galactosidase) 유전자를 삽입시켜 산출하였다. PRV-BaBlu는 Porcine kidney fibroblast(PK15-cell)에서 배양하되, 사용시 plaque forming unit는 평균 4.26×10^8 pfu/ml로 하여 냉동보관(-70°C)하였으며

주사직전에 녹여 신선한 것을 사용하였다. 아직 사람에서 이 바이러스에 감염된 보고는 없으나 만일의 경우를 생각하여 실험과정 중 모든 실험기와 실험동물은 외부와 격리시켜 접촉을 피하고 실험연구자는 반드시 1회용 가운과 모자, 장갑 및 마스크를 사용하고, 사용 후는 모두 소각처리하였다. 또한 모든 수술도구는 clorax로 소독하여 보관하는 등 만일의 사고에 대비하여 최대한의 감염방지에 노력하였다.

3. 바이러스 주입

실험동물은 실험직전에 Ketamine(50 mg/ml)와 Xylazine hydrochloride(20 mg/ml)를 각각 체중 gm당 0.15ml 및 0.05ml 씩 혼합시켜 복강내 주사하여 마취시킨 후 바이러스 주입 예정부위인 왼쪽 귀밑샘을 노출시켜 2~3 부위에 Hamilton 주사기를 이용하여 바이러스 2 μ l를 주입하되 바이러스의 유출을 최대한 줄이기 위해 처음 1 μ l의 바이러스를 주입하고 5분 동안 기다린 뒤 Hamilton 주사기 바늘을 약간 후방으로 당긴 뒤 1 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 86 시간의 생존시간을 준 다음 실험동물을 다시 동일 마취액으로 마취시키고 심장을 통해 관류고정을 실시하였다. 관류고정은 먼저 0.1M sodium phosphate buffer(PB)에 heparin(1000 IU/1000 ml)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 후고정을 실시하였다. 그 후 다시 0.1M PB로 1시간 동안 수세하고 20% phosphate buffered sucrose용액에 담가 4°C에서 12시간 내지 48시간 동안 보관하였다. 보관된 뇌조직들은 동결절편기(Cryostat, AO)를 이용하여 약 35 μ m 두께의 연속횡단절편을 만들어 6 well plate에 순서대로 보관하며 약 500장의 조직절편을 자유부유법(free floating method)으로 Hsu 등(1981)의 방법에 의해 면역조직화학염색을 실시하였다.

5. 면역조직화학염색

1차항체인 Rb134(1:10,000) 와 rabbit anti- β -galactosidase(1:2,000) 에 조직절편들을 담가 실온에서 12 시간 내지 24 시간 동안 반응시켰다. 이 때 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 PB 로 세척하여 2차항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG(Vector Lab.) 를 1:200 으로 희석하여 실온에서 1시간 가량 반응시켰다. 그 후 다시 0.1 M PB로 15분간 2회의 수세과정을 거친 후 peroxidase가 표지된 ABC 용액에 담가 실온에서 1시간 가량 반응시켰다. 그 후 다시 0.1 M PB로 15분간 2회 수세하고 나서 30mg의 3-3' diaminobenzidine(DAB)을 150ml 의 0.1 M PB에 녹인 용액에서 5분간 반응시킨 후 과산화수소수 (H_2O_2)를 0.005% 되게 첨가하여 갈색의 발색반응을 약 10 분간 시행하였다. 반응이 끝난 조직들은 다시 0.1 M PB에 여러차례 수세하고 gelatin 이 입혀진 슬라이드 위에 차례대로 얹어 4 °C에서 12시간 이상 건조시켰다. 그 후 통상적인 방법에 따라 ethanol과 xylene 의 탈수와 투명화 과정을 거친 후 permount 로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

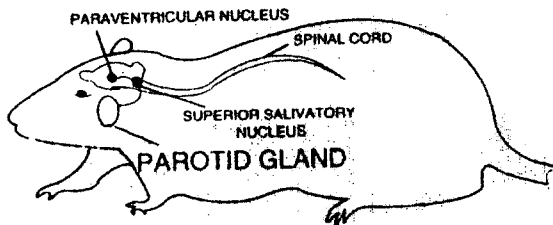


Fig. 3. Neuraxis to innervate parotid salivary gland.

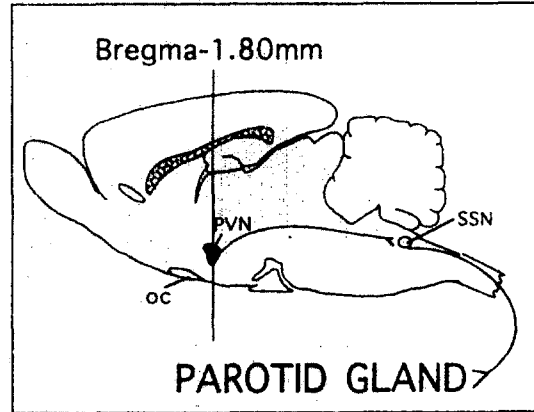


Fig 4. The point of slide section for photography.

PVN : Paraventricular nucleus
SSN : Superior salivatory nucleus.
OC : Optic chiasm

III. 결 과

원위의 왼쪽 귀밑샘에 PRV-BaBlu를 주입한 뒤 86 시간 경과 후 절취한 뇌조직 절편에 면역조직화학적 방법으로 염색반응을 실시한 결과 중추신경계의 여러 부위 즉 뇌줄기(brain stem)에서 대뇌(cerebrum)에 이르는 여러 중추신경핵에서 강한 암갈색의 염색반응이 나타났다(Fig. 5b, 6b, 7b). 양성반응을 보인 것은 신경핵을 구성하고 있는 신경세포체(perikaryon)와 가시돌기(dendrite) 등으로서 양성반응을 보인 신경세포는 위치에 따라 약간의 차이는 있었지만 대부분이 타원형 또는 다각형의 다극신경원(multipolar neuron)으로 관찰되었다(Fig. 5b, 6b, 7b).

귀밑샘에 주입한 PRV-BaBlu가 신경섬유를 따라 이동하면서 머물게 되는 부위에서는 PRV-BaBlu에 대한 면역조직화학적 반응이 양성으로 나타났으며 이러한 양성반응을 보인 세포가 있는 신경핵은 시간경과에 따라 순차적으로 다른 신경원으로 확산되었는데 대체로 처음에는 뇌줄기의 신경핵에서 양성반응을 보이고 차츰 상위의 신경핵으로 양성반응이 진행되었다. PRV-BaBlu 주입 후 86시간내에서 귀밑

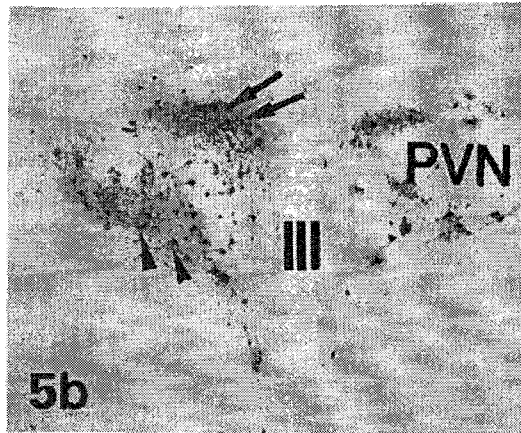
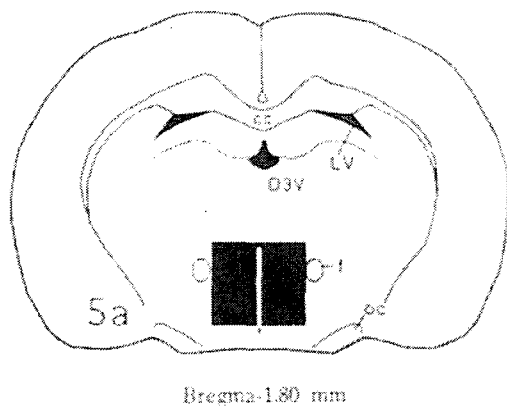


Fig.5a,b. Transneuronally labeled PRV-BaBlu immunoreactive neurons in paraventricular nucleus.
 III : 3rd ventricle PVN : Paraventricular nucleus

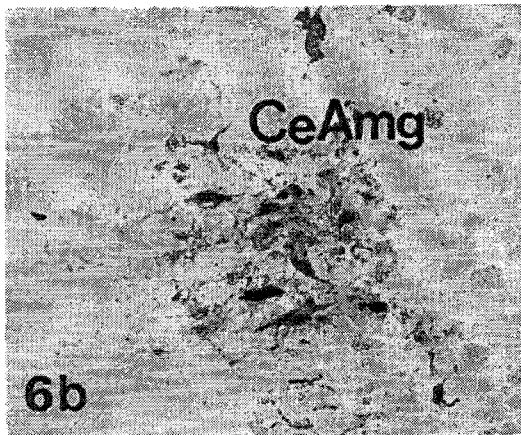
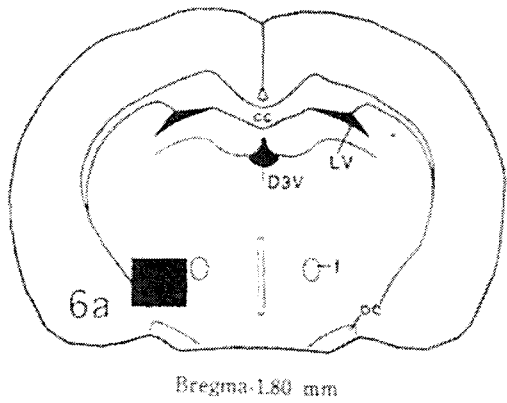


Fig.6a,b. Transneuronally labeled PRV-BaBlu immunoreactive neurons in the left central part of amygdaloid nucleus.
 CeA : Central part of amygdaloid nucleus

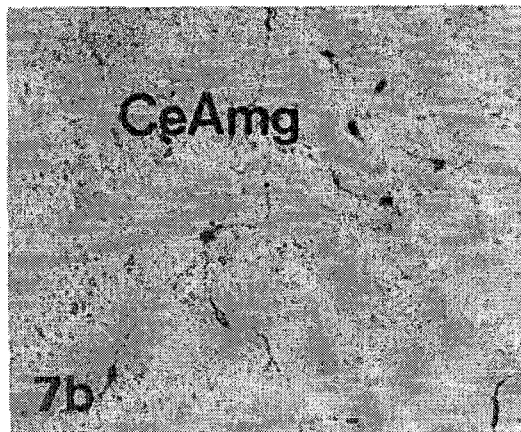
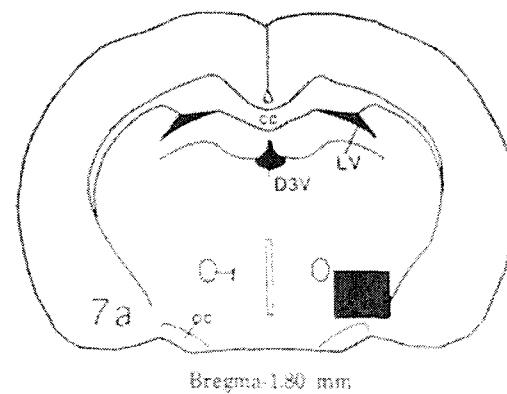


Fig.7a,b. Transneuronally labeled PRV-BaBlu immunoreactive neurons in the right central part of amygdaloid nucleus.
 CeA : Central part of amygdaloid nucleus

샘을 지배하는 이차중추신경핵까지 감염이 확산되었는데 이 신경핵들은 대부분 간뇌(diencephalon)에 분포하고 있었고 그 중 가장 강한 양성반응을 보인 신경핵은 뇌실옆핵 (paraventricular nucleus)과 편도핵 중앙부(central part of amygdaloid nucleus)였다(Fig.5-7).

한편 귀밀샘을 지배하는 이차신경핵의 PRV-BaBlu에 감염되는 정도와 교차되는 정도를 관찰하기 위하여 바이러스를 주입한 왼쪽과 바이러스를 주입하지 않은 오른쪽으로 구분하여 각 신경핵을 이루는 전체 신경세포 중 면역조직화학적 염색에 양성반응을 보인 세포의 비율을 조사하였는 바 뇌실옆핵에서는 PRV-BaBlu 를 주입한 왼쪽에서 평균 $27.26 \pm 10.23\%$ 였고, PRV-BaBlu를 주입하지 않은 오른쪽에서는 평균 $12.78 \pm 8.69\%$ 였다(Fig.5a,b). 또한 편도핵 중앙부에서는 PRV-BaBlu 를 주입한 왼쪽에서 평균 $14.25 \pm 9.26\%$ 였고(Fig. 6a,b), PRV-BaBlu 를 주입하지 않은 오른쪽에서는 평균 $8.35 \pm 6.26\%$ 이었다 (Table 1, Fig.7a,b). 또한 뇌실옆핵과 편도핵 중앙부에서 좌우측에 대한 짝비교에서 양쪽 핵모두 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다(P<0.01).

Table 1. PRV-BaBlu infected neuron distribution and percentage in paraventricular nucleus and central part of amygdaloid nucleus.

Cell No.	Nucleus		PVN		CeAmg	
	Left	Right	Left	Right	Left	Right
PRV-infected cell*	74±32	24±13	17±8	8±5		
%	27.26±10.23	12.78±8.69	14.25±9.26	8.35±6.26		

Mean±S.D.

* : P<0.01

PVN : Paraventricular nucleus

CeAmg : Central part of Amygdaloid nucleus

IV. 고 찰

큰침샘을 구성하는 귀밀샘, 턱밀샘 및 혀밀샘의 생리적 기능 및 형태학적 구조는 샘세포에서 분비되는 분비물질 즉, 침의 화학적 성질에 따라 크게 장액샘, 점액샘 및 혼합샘의 세가지 형태로 구분된다(Banks, 1986). 이 중 귀밀샘은 거의 대부분의 동물에서 장액샘이지만 턱밀샘의 경우 차이가 많아서 동물의 종에 따라 점액선 및 혼합샘으로 구성된다고 보고되어 있다.

혀밀샘의 경우도 동물간 또는 개체간에 차이가 커서 점액샘 또는 장액성반월을 지닌 혼합샘으로 구성되어 있다. 한편 신경분야의 형태학적 연구는 특정 호르몬을 대상으로 하는 면역조직화학을 이용한 연구나 특정 장기의 신경지배에 관한 신경로를 관찰하는 연구가 주를 이루고 있다. 이 중 신경로의 관찰에 관한 연구는 오래전부터 사용되어 오던 방법들인 육안해부법이나 신경조직의 퇴행성 변화를 일으켜 조사하는 법(Laun, 1966a)을 사용하거나 최근에는 축삭돌기 사이의 물질이동에 근본을 두고 여러종류의 추적자를 사용하는 법(Heimer와 Zaborszky, 1989)이 주를 이루고 있다.

현재까지 말초장기를 지배하는 중추신경계 내의 신경로를 밝히기 위한 연구는 주로 통상적인 추적자를 이용하여 왔는데 즉 형광물질을 이용하거나(Rokx와 Willigen, 1988), 효소의 일종인 Horseradish peroxidase(HRP) 를 이용하거나, 이 HRP 를 세균독소인 cholera-toxin 에 부착시킨 CT-HRP를 신경로추적자로 이용한 보고(Mong등, 1988)등이 있으나 이들 추적자는 신경연접을 건너 이동하지 못하거나 건너간다 하더라도 극히 제한적이며, 중추신경어나 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(Roizanan, 1990). 이 바이러스는 신경연접을 건너 상위신경세포로 이동할 수 있고 또 이동시 복체에 의해 점차 그 농도가 증가하여 검출이 용이하다는 획기적인 두가지 장점을 지닌 것으로(Rinaman등, 1993; 개차, 1993; Loewy, 1992; Stack 와 Loewy, 1990, Stack등, 1989a) 야생형인 Becker 와 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(Card와 Enquist,1994; Card와 Enquist, 1995; Enquist, 1994; Enquist 등, 1994). 본 연구에서는 PRV의 변이종으로서 Bartha strain 의 유전자 중 Us segment 의 gG 유전자에 β-galactosidase 유전자를 삽입시켜 얻은 PRV-BaBlu를 흰쥐의 귀밀샘을 지배하는 이차중추신경핵 동정에 신경로추적자로 사용하였다.

Jansen 등(1992)은 흰쥐의 큰침샘의 하나인 턱밀샘에 PRV-Ba를 주입한 후 턱밀샘을 지배하는 중추신경핵을

동정한 연구에서 원위의 턱밑샘을 지배하는 일차중추핵은 위침분비핵(superior salivatory nucleus)이며 이차중추핵은 뇌실옆핵 등이 관여한다고 하였다. 본 연구에서도 유사한 결과를 보여 원위의 귀밑샘을 지배하는 이차중추신경핵은 주로 간뇌에 분포하고 있었고 그 중 뇌실옆핵과 편도핵 중앙부에서 강한 양성반응을 보였다. 또한 귀밑샘을 지배하는 정도와 반대쪽에서 교차되는 정도를 조사하기 위해 바이러스를 주입한 쪽과 주입하지 않은 쪽을 구분하여 양성반응을 보인 신경세포들의 비율을 조사한 바 뇌실옆핵에서는 바이러스를 주입한 왼쪽이 $27.26 \pm 19.23\%$ 였고 바이러스를 주입하지 않은 오른쪽이 $12.78 \pm 8.69\%$ 이었다. 또한 편도핵 중앙부에서는 바이러스를 주입한 왼쪽이 $14.25 \pm 9.25\%$ 이었고, 바이러스를 주입하지 않은 오른쪽이 $8.35 \pm 6.26\%$ 로 관찰되어 바이러스를 주입한 쪽의 신경핵내에 바이러스에 감염된 세포가 바이러스를 주입하지 않은 쪽보다 많은 것을 일차적으로 나타내지만 바이러스를 주입하지 않은 쪽에서도 바이러스에 감염된 신경원이 관찰되어 중추신경계내 신경핵들간 기능적연결에서 서로 교차하고 있음을 나타낸다. 이는 PRV-BaBlu가 귀밑샘을 지배하는 일차중추신경핵내에서 복제한 후 이 신경핵과 기능적으로 연결되어 있는 신경회로를 따라 이동함으로써 얻어진 결과로 귀밑샘을 지배하는 신경축(neuraxis)은 매우 복잡하며 상당부분 교차되고 있음을 시사한다. 그러나 귀밑샘을 지배하는 중추신경계내 신경축의 교차 정도는 각 핵들간 미세신경회로(microcircuitry)의 동정 및 한쪽 신경핵을 파괴한 후의 변화 관찰 등이 선행되어야 가능하다고 판단되므로 앞으로 이에 대한 연구가 기대된다.

한편 최근 신경과학 제분야에 신경로재생이나 신경가소성(neuronal plasticity)에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있는데 그 예로 척수를 절단한 뒤 즉각신경을 떼어 절단된 척수에 이식시켰을 경우 척수의 상,하행 신경로의 형태적 및 기능적 재생과 회복이 이루어져 근육을 비롯한 말초장기의 운동성 회복에 대한 성공적 관찰을 보고한 연구(Cheng 등, 1996)가 있는데 이들 연구분야를 물리치료학분야에 접목시킨다면 신경가소성에 대한 물리치료학적 접근에 있어서 보다 수준 높고 매우 유익한 결과를 얻을 수 있다고 생각된다. 이 때 신경로 재생 및 기능적 회복에 대한 연구에 신경연접을 건널 수 있고 고도의 신경친화성을 지녀 기능적 신경회로망 구축에 탁월한 신경로추적자인 PRV를 이용하면

매우 유용하리라 사료된다.

V. 결 론

원위의 큰침샘 중 하나인 귀밑샘을 지배하는 이차중추신경핵을 동 정하기 위하여 PRV의 변이종인 PRV-BaBlu 를 귀밑샘에 주입한 뒤 일정시간 경과 후 절취한 뇌조직에서 이 바이러스에 대한 면역조직화학 염색을 시행하여 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 귀밑샘을 지배하는 이차중추신경핵은 주로 간뇌에 위치하는 뇌실옆핵과 편도핵 중앙부였다.
2. 간뇌의 뇌실옆핵과 편도핵의 중앙부에서 바이러스에 감염된 신경세포는 PRV-BaBlu를 주입한 쪽과 PRV-BaBlu를 주입하지 않은 쪽은 서로 비대칭성을 이루었다.
3. 뇌실옆핵내 전체 신경세포대 PRV-BaBlu에 감염된 신경세포의 비율은 바이러스를 주입한 왼쪽이 $27.26 \pm 10.23\%$ 이었고, 바이러스를 주입하지 않은 오른쪽이 $12.78 \pm 8.69\%$ 이었다($P < 0.01$).
4. 편도핵 중앙부내 전체 신경세포대 PRV-BaBlu에 감염된 신경세포의 비율은 바이러스를 주입한 왼쪽이 $14.25 \pm 9.26\%$ 이었고, 바이러스를 주입하지 않은 오른쪽이 $8.35 \pm 6.26\%$ 이었다($P < 0.01$).

참 고 문 헌

1. Banks WJ : Applied veterinary histology. 2nd ed, Baltimore, Williams & Wilkins, 1986, pp417-419.
2. Batini C, Buisseret-Delmas C, Corviser J : Horseradish peroxidase localizations of masticatory muscle motoneurons in cat. J Physiol Paris 72 : 301-309. 1976.
3. Card JP, Dubin JR, Whealy ME, Enquist SW : Influence of infectious dose upon productive replication and transynaptic passage of pseudorabies virus in rat central nervous system. J Neurovirology 1 : 349-358. 1995.
4. Card JP, Enquist LW : Use of pseudorabies virus for definition of synaptically linked populations of neurons. Methods Mol Genet 4 : 363-382. 1994.
5. Card JP, Enquist LW : Neurovirulence of pseudorabies virus. Critical Reviews Neurovirology 6 : 134-142. 1995.

6. Card JP, Rinaman LM, Lynn RB et al : Pseudorabies virus infection of the rat central nervous system : Ultrastructural characterization of viral replication, transport, and pathogenesis. *J Neuroscience* 13(6):2515-2539. 1993.
7. Card JP, Rinaman LM, Schwaber JS et al : Neurotropic properties of pseudorabies virus : Uptake and transneuronal passage in the rat central nervous system. *J Neuroscience* 10(6) : 1976-1994. 1990.
8. Card JP, Whealy ME, Robbins AK, Moore RY, Enquist LW : Two alpha herpes virus strains are transported differentially in the rodent visual system. *Neuron* 6 : 967-969. 1991.
9. Chen KN, Wen CY, Shieh JY : The somatotopy of the masticatory neurons in the rat trigeminal motor nucleus as revealed by HRP study. *Proc Natl Sci Counc Taiwan* 12 : 146-155. 1988.
10. Cheng H, Cao Y, Olson L : Spinal cord repair in adult paraplegic rats : Partial restoration of hind limb function. *Science* 273 : 577-580. 1996.
11. Chiaia N, Hess PR, Hosoi M : Morphological characteristics of low-threshold primary afferents in the trigeminal subnuclei interpolaris and caudalis(the medullary dorsal horn) of the golden hamster. *J Comp Neurol* 264 : 527-546. 1987.
12. Enquist LW : Infection of mammalian nervous system by pseudorabies virus(PRV). *Semin Virol* 5 : 221-231. 1994.
13. Enquist LW, Dubin J, Whealy ME, Card JP : Complementation analysis of pseudorabies virus gE and gI mutants in retinal ganglion cell neurotropicism. *J Virol* 68 : 5275-5279. 1994.
14. Habel RA : Guide to the dissection of domestic ruminants. 4th ed, Ithaca, 1989, pp172-185.
15. Heimer L, Zaborszky L : Neuroanatomical tract-tracing methods 2. Plenum Press, New York, 1989, pp49-96.
16. Hsu SM, Raine L, Fanger H : Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques : A comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP) procedures. *J Histochem cytochem* 29 : 577-580. 1981.
17. Jacquin MF, Rhoads RW : Organization and morphology of masticatory neurons in the rat : A retrograde HRP study. *J Comp Neurol* 218-256. 1983.
18. Jansen ASP, Ter Horst GJ, Mettenleiter TC, Loewy AD : CNS cell groups projecting to the submandibular parasympathetic preganglionic neurons in the rat : A retrograde transneuronal viral cell body labeling study. *Brain Res* 572 : 253-260. 1992.
19. Lawn AM : The localization, in the nucleus ambiguus of rabbit, of the cells of origin of motor fibers in the glossopharyngeal nerve and various branches of the vagus nerve by means of retrograde degeneration. *J Comp Neurol* 127 : 293-306. 1966a.
20. Leppi TJ, Spicer SS. The histochemistry of mucins in certain primate salivary glands. *Am J Anat* 118 : 833-860. 1966.
21. Loewy AD : Transneuronal labeling of spinal interneurons and sympathetic preganglionic neurons after pseudorabies virus infections in the rat medial gastrocnemius muscle. *Brain Res* 574 : 291-306. 1992.
22. Loewy AD, Franklin MF, Haxhiu MA : CNS monoamine cell groups projecting to pancreatic vagal motor neurons : A transneuronal labeling study using pseudorabies virus. *Brain Res* 638 : 248-260. 1994.
23. Mong FSF, Chen YC, Lu CH : Dendritic ramification of trigeminal motor neurons innervating jaw-closing muscle of rat. *J Neurological Science* 86 : 251-264. 1988.
24. Munger BL : Histological studies on seromucous and mucous secreting cell of human salivary glands. *Am J Anat* 115 : 411-430. 1964.
25. Nickel R, Schummer A : Seiferle E. The Viscera of the domestic mammals. 2nd ed, Berlin, Verlag Paul Parley, 1979, pp39-44.
26. Rinaman L, Card JP, Enquist LW : Spatiotemporal responses of astrocytes, ramified microglia, and brain macrophage to central neuronal infection with pseudorabies virus. *J Neursci* 13 : 685-702. 1993.
27. Rock DL : The molecular basis of latent infections by alpha herpesviruses. *Semin Virol* 4 : 157-165. 1993.
28. Roizman B : Herpesviridae : A brief introduction. *Virology*. New York, 1990, pp1787-1793.
29. Rokx JTM, van Willigen JD : Organization of neuronal clusters in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat : Fluorescent tracing of temporalis and masseteric primary afferents. *Neuroscience Letters* 86 : 21-26. 1988.
30. 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 205 : 260-272. 1982a.
31. Shigenaga Y, Mitsuhiro Y, Shirana Y et al : Two type of jaw-muscle spindle afferents in the cat

- as demonstrated by intra-axonal staining with HRP. *Brain Res* 514 : 219-237. 1990.
32. Shiverly MS : *Veterinary anatomy. Basic, comparative, and clinical.* 2nd ed, Texas, Texas A & M University Press, 1987, pp439-440.
33. Stack AM, Loewy AD : Pseudorabies virus : A highly specific transneuronal cell body marker in the sympathetic nervous system. *J Neurosci* 10 : 2139-2147. 1990.
34. Stack AM, Sawyer WB, Platt KB, Loewy AD : CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labeling with pseudorabies virus. *Brain Res* 491-274-296. 1989a.