한국수의병리학회지. Korean J Vet Pathol 1 : 66~71(1997)

실험용 토끼에서 *Encephalitozoon cunuculi*의 감염과 병리학적 변화

윤병일[1], 이상구[2]

[1]서울대학교 수의과대학 병리학교실, [2]LG화학 기술연구원 바이오텍연구소

An investigation on the infection of *Encephalitozoon cuniculi* and pathological changes in laboratory rabbits

Byong-Ill Yoon[1], Sang-Koo Lee[2]

[1]Department of Pathology, College of Veterinary medicine, Seoul National University,
[2]Biotech Researh Institute, LG Chemical Research Park,

Abstract. Eighteen NZW rabbits used for local skin irritation study were examined grossly and microscopically for natural infection with *Encephalitozoon cuniculi*. For microscopic tissue evaluation, histochemical techniques such as PAS, Gram, iron hematoxylin and HE stain were used. Although, rabbits in the study had no abnormal clinical signs, 7/18 (38.9 %) animals were microscopically infected with *E. cuniculi*. The affected rabbits had gray-whitish and depressed, approximately 0.1~0.6 cm diameter lesions in the kidneys. All other organs examined were grossly unremarkable. Histopathologically however, in addition to segmental interstitial nephritis, focal lymphocytic myocarditis, and granulomatous inflammatory reaction in portal areas of the liver, multifocal granulomatous foci with vasculitis were present in the brain, kidney and lungs. Aggregates of minute oval organisms were observed in brain and kidney sections frequently within the granulomatous foci and sometimes without any inflammatory reaction particularly in the renal tubules. In histochemical stains, the organisms were gram positive, stained with iron hematoxylin and had PAS positive granule at one pole. They measured approximately 1.5×2.5㎛, consistent with *E. cuniculi*. Histochemical characterization is important to differentiate *E. cuniculi* from other common protozoal infection such as *Toxoplasma gondii*. This study demonstrate the importance of subclinical *E. cunuculi* infection, and the associated histological alterations may interfere with tissue evaluation in toxicologic studies.

Key words; Encephalitis, Encephalitozoon cunuculi, interstitial nephritis, rabbits

Encephalitozoonosis는 microsporida에 속하는 *Encephalitozoon (Nosema) cuniculi*에 의한 원충성 질병으로 랫드[8], 마우스[6], 햄스터[13], 기니픽등의 실험동물과 가축, 개[1]와 고양이[13]를 포함한 육식동물 및 다람쥐원숭이[2]와 사람[10]에서 그 발생례가 보고된 바 있으며, 특히 토끼에서는 종과 환경에 따라 25 %에서 95 %의 높은 발생률이 보고되었다.[5,7,8] 최근 사람에 있어 AIDS와 같은 면역결핍증환자에서 기회감염증으로서도 많은 주목을 받고 있다.

*E. cuniculi*는 Glugeida과에 속하는 세포내 기생충으로 포자가 숙주세포에 감염되기 직전에 하나의 polar filament를 가지는 것이 특징이다. sporoplasm은 이 관을 통하여 숙주세포인 단핵구로 이동한다. 감염된 단핵구는 전신순환을 통하여 여러장기와 조직에 도달하여 국소병변을 일으키게 된다. Encephalitozoonosis의 전파는 주로 포자를 먹음으로써 이루어진다.[16]

국내에서는 박 et al(1992)에 의해 출혈병으로 죽은 토끼에서 *E. cuniculi*에 의한 뇌에서의 병변에 대해서 보고된 바 있다.[11]

본 예는 국내에서 여러 실험에 실험동물로 이용되는 토끼에서 *E. cuniculi*의 감염정도와 그에 따른 병리조직학적 변화를 알아보고자 하였으며, 원인체의 검출과 *Toxoplasma gondii*와의 감별을 위하여 몇 가지 특수염색을 실시하였다. 동물은 국소자극실험에 사용되었던 2~3 kg의 NZW 토끼 18마리를 대상으로 하였으며, 토끼를 부검하여 육안적으로 검사하고 조직검사를 위하여 적출한 장기를 10% 중성 포르말린에 고정하고 조직처리과정과 파라핀 포매를 거쳐 H&E, PAS, Brown & Brenn Gram염색, Weiger's Iron Hematoxylin염색을 실시하였다.

검사한 18마리의 토끼는 임상적으로 아무런 증상이

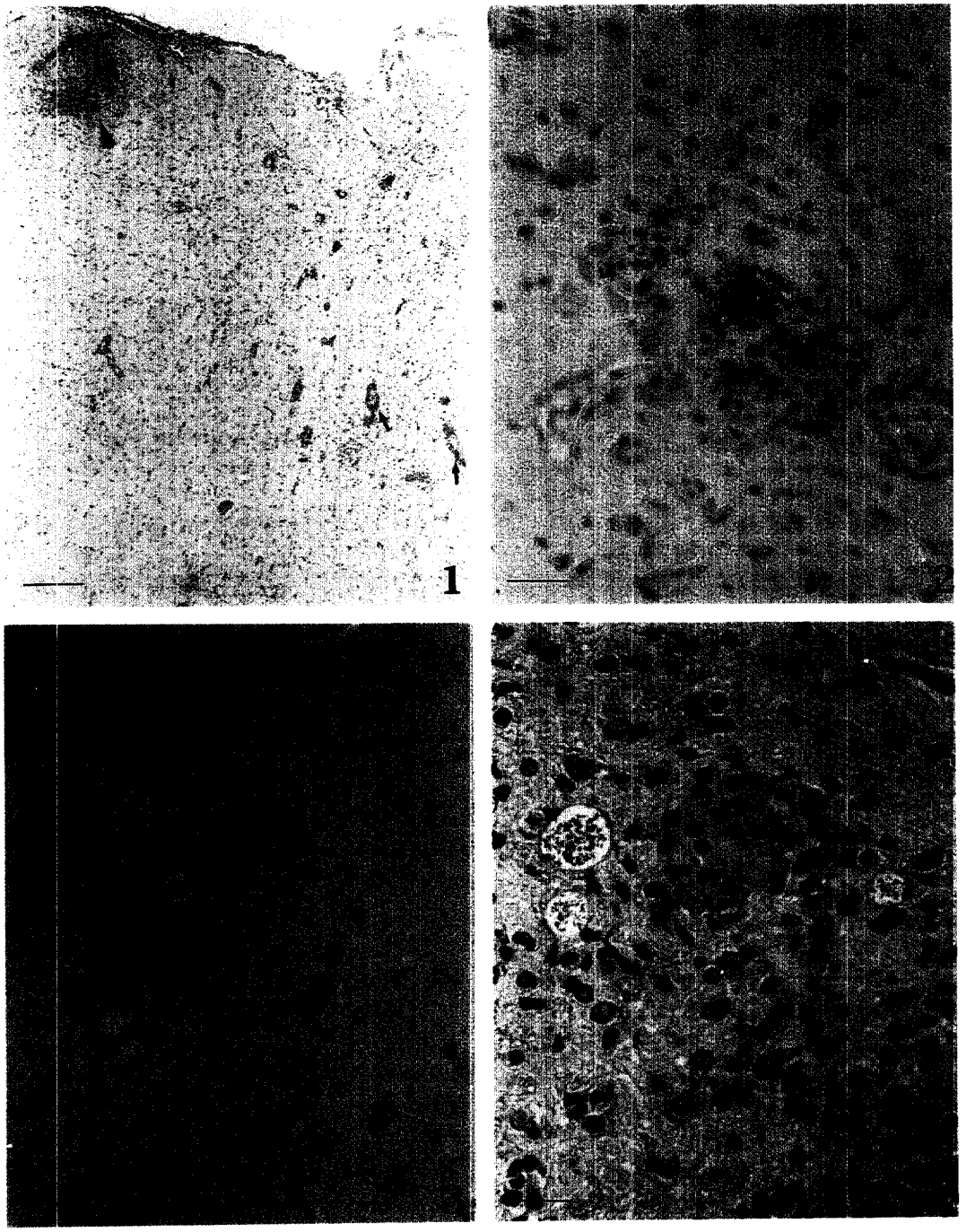

Fig. 1. Nonsuppurative meningitis, granuloma and perivacular cuffings in the cerebrum of the *Encephalitozoon cunicnuli* infected rabbit. H&E Bar=250 μm.

Fig. 2. Gram positive *Encephalitozoon cunicnuli* spores in the pseudocyst or around the lesion in the cerebrum. Gram stain Bar=25 μm.

Fig. 3. *Encephalitozoon cunicnuli* spores in the pseudocysts without the cellular responses in the cerebrum. Gram stain Bar=25 μm.

Fig. 4. *Encephalitozoon cunicnuli* spores in the pseudocysts stained with iron hematoxylin stain. Iron hematoxylin stain Bar=25 μm.

관찰되지 않았으며 부검시 조직학적으로 감염이 확인된 7례(38.9 %)중 5례에서 신장표면에 0.1~0.6 cm 가량의 한계가 불명료한 회백색 함몰부위가 산재하였으며 다른 장기에서는 별다른 이상소견이 관찰되지 않았다. 조직학적으로 이러한 토끼는 모두 대뇌에 심한 뇌막염과 국소성 다발성의 육아종성 염증, 혈관주위 세포침윤(perivascular cuffing), 국소성 또는 광범위한 성교세포의 반응이 관찰되었다(Fig. 1). 소뇌에서는 2/7 례에서, 연수에서는 4/7 례에서 각각 병변이 관찰되었다. 뇌막염을 형성하고 있는 세포들은 주로 림프구와 단핵구였으나 형질세포도 자주 관찰되었다. 뇌막염은 뇌의 깊은 부위의 연막까지 발생하였다. 국소성 다발성 육아종의 중심부는 뇌 실질세포의 괴사와 핵 파괴물들이 자리하고 주위로 대식세포들과 소수의 림프구들이 에워싸고 있었으며, 외곽쪽으로 형질세포들도 소수 관찰되었다. 이러한 병소의 대식구의 세포질내에서는 PAS 양성의 미세한 과립상이 관찰되었다. 혈관들은 내피세포가 증식 또는 종창되어 있었으며 그 주위를 다수의 단핵세포와 소수의 림프구들이 단층부터 15층까지 두텁게 에워싸고 있었다. 혈관주위의 수종성 변화도 자주 관찰되었다. 성교세포의 반응은 전체적으로 관찰되었으나 주로 병변부위와 혈관주변부에서 심하였다. 원인체는 병변과 관련하여 중심부와 그 주변부에 낭상구조내 또는 염증 세포들 사이에 흩어져 관찰되었는데(Fig. 2) 주변의 염증반응 없이 낭상구조내에 무리를 이루어 관찰되기도 하였다(Fig. 3). 이들 원인체는 긴 타원형 또는 유선형이었으며, Gram염색에서 거의 모두가 양성반응을 나타내었으나 드물게 음성으로 관찰되기도 하였다(Fig. 2, 3). Van Dellen et al(1978)[15]은 이러한 음성반응이 미성숙한 단계에서 나타난다고 하였다. Iron-Hematoxylin 염색에서는 병변부위와 관련하여 낭상구조내에 무리져 있는 양성반응의 원인체들이 확인되었다(Fig. 4). 이들 낭상구조내의 원인체들은 PAS염색에서는 한 쪽에 빨간 사인펜으로 점을 찍은 듯한 작은 과립상의 양성반응을 나타내었다.

뇌의 병변을 가지는 이들 7마리 모두에서는 개체간에 정도의 차이는 있으나, 신장의 수질과 피질 및 그 경계부에서 간질 결합조직의 증식을 동반한 다수의 단핵구와 림프구 및 소수의 형질세포의 침윤으로 이루어진 다양한 범위의 간질성 신염이 다발성으로 관찰되었다. 피질에서의 병변은 주로 길게 형성되어 있었으며, 수질에 비하여 간질의 반응이 왕성하였다(Fig. 5). 수질에서 관찰된 병변은 대식세포와 림프구들 그리고 소수의 형질세포들로 이루어진 비교적 원형에 가까운 육아종성 염증반응으로, 간질의 반응은 미약하고 다수의 그람 양성 원인체들이 육아종성 병변 중심부 또는 염증세포들 사이에서 관찰되었으며(Fig. 6), 세뇨관내로 상피세포와 함께 탈락되어 관찰되기도 하였다. Wilson(1979)[16]에 의하면 신장에서 *E. cuniculi*에 의해 가장 영향을 받은 부위는 수질, 특히 집합관 상피세포들로 세뇨관 상피세포내에서 증식하여 pseudocyst가 파열되어 내강으로 탈락되거나 간질조직내로 유입되어 염증반응을 일으키며, 포자는 계속해서 다른 부위를 감염시키고 일부는 뇨로 배출되어 다른 숙주에게로 전파된다.

간장에서는 문맥부위에서 단핵구와 림프구 및 소수의 형질세포로 구성된 만성염증반응과 간질의 증식이 조직학적으로 병변이 확인된 모든 토끼에서 관찰되었다. 간장에서는 원인체가 발견되지 않았으나 문맥부위에 침윤되어 있는 단핵구의 세포질내에서 미세한 과립상의 PAS양성반응이 관찰되었다(Fig. 7).

심장에서는 조직학적으로 병변이 확인된 7례 중 5례에서 심근에 국소성 림프구 침윤이 관찰되어 *E. cuniculi* 감염과 관련이 있을 것으로 생각되었다.

폐장에서의 간질성폐렴은 검사한 대부분의 토끼에서 관찰되었으나 뇌와 신장에 병변이 확인된 7례에서 그 정도가 심하였으며 이들 중 5례에서는 단핵구와 림프구들이 국소적으로 밀집하여 육아종성 병변을 형성하였다(Fig. 8). 따라서 이러한 간질성폐렴과 국소성 다발성 육아종성 병변이 역시 *E. cuniculi* 감염과 관련이 있을 것으로 생각되었다.

비장의 종대가 육안적으로 5례에서 관찰되었는데 이중 4례에서 *E. cuniculi*감염이 확인되었다. 비장의 백수는 내형질세망세포의 증식으로 심하게 확장되어 있었으며, 적수의 sinusoids도 심하게 확장되어 있었다. PAS염색에서 백수와 적수의 대식세포의 세포질내에서 양성반응이 관찰되었다. *E. cuniculi*감염과 관련된 각 장기의 병소 발생상황을 요약하면 Table 1과 같다.

종에 따른 *E. cuniculi*의 형태적, 면역학적 차이는 없으나 숙주에 따라 *E. cnuniculi*에 대한 감수성과 호발하는 장기에 있어서 다소간의 차이가 있다. 토끼에서 분리한 *E. cuniculi*의 감염실험에서 랫드에서는 뇌에 국소성의 glial nodule과 간장에서 다발성 괴사성 간염이 발생하였으나 간질성 신염은 유발되지 않았으며, 마우스는 뇌에 국소성 glial nodules이 형성되었으나 간장과 신장에서는 아무런 병변도 관찰할 수 없었다.[13]

본 례에 있어 *E. cuniculi* 감염과 관련된 병변으로는 뇌의 국소성 다발성 육아종성 뇌염과 비화농성 뇌막염, 혈관주위염, 간질성 신염, 간장 문맥부위에서의 만성염증반응, 심근에서의 국소성 림프구의 침윤 그리고 폐장에서의 국소성 다발성 육아종성 염증반응을 동반한 미만성 간질성 폐렴등이었다. 이러한 결과는 이전의 많은 다른 보고들과 비교적 일치하는 것이었으나[12] 소뇌

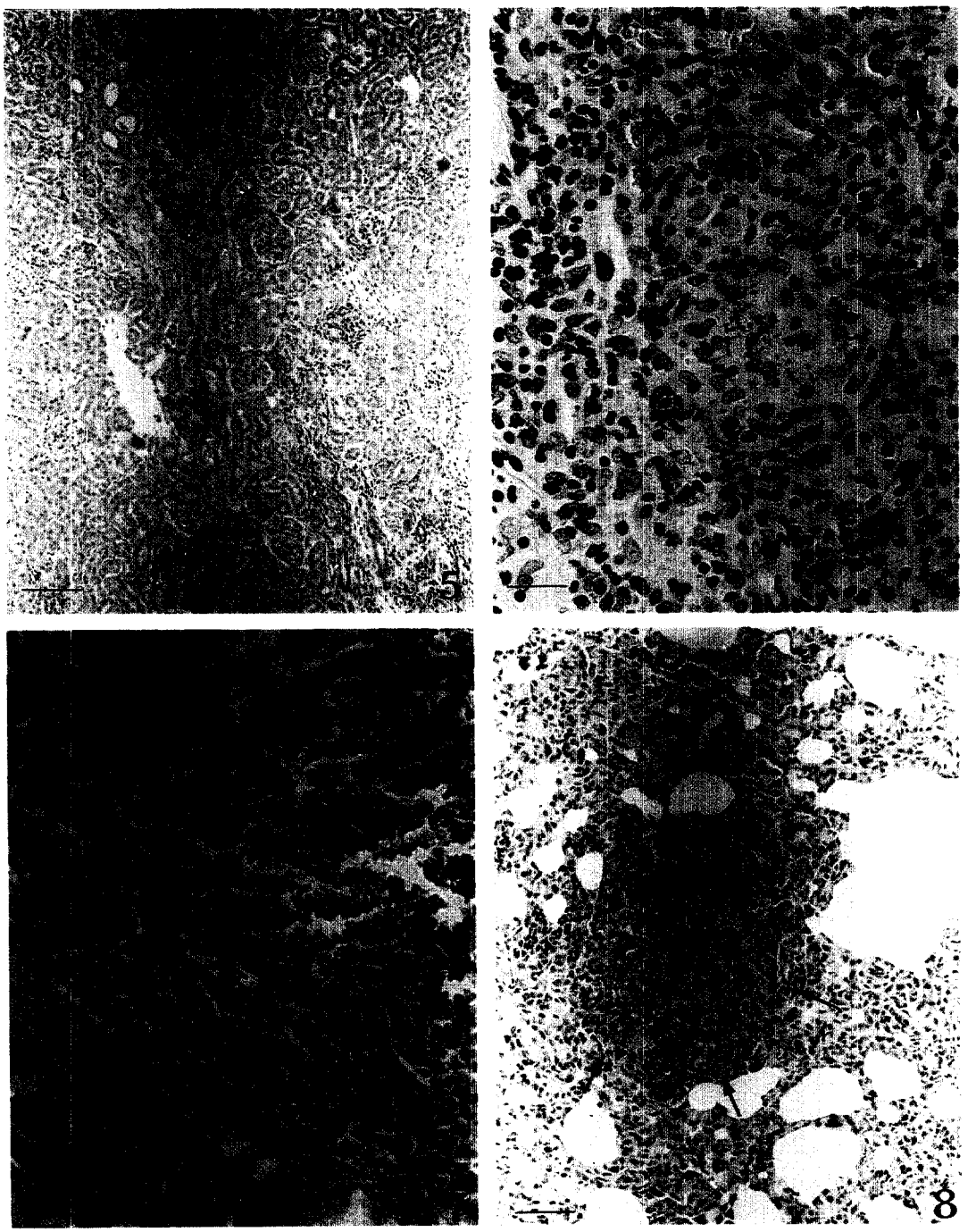

Fig. 5. Segmental interstitial nephritis with the infiltration of mononuclear cells, lymphocytes and a few plasma cells and fibrosis in the cortex of the kidney. H&E Bar=250 μm.

Fig. 6. Granuloma formed in the medulla of the kidney and the gram positive organisms in the center of the lesion. Gram stain Bar=25 μm.

Fig. 7. Moderate chronic inflammation associated with *Encephalitozoon cunicnuli* infection in the portal area of the liver. Mononuclear cells, lymphocytes and a few plasma cells are infiltrated in the area. H&E Bar=25 μm.

Fig. 8. Diffuse interstitial pneumonitis with focal granulomatous inflammation composed of macrophages and lymphocytes. H&E Bar=50 μm.

Table 1. Incidence of the lesions associated with Encephalitozoon cuniculi in each organ

Cerebrum	Cerebellum	M.O.	Kidney	Liver	Heart	Lung	Spleen
7/7(100)	2/7(28.6)	4/7(57.1)	7/7(100)	6/7(65.7)	3/7(42.9)	5/7(71.4)	4/7(57.1)

Incidence in each organ / total No. of infected rabbits
( ) ; %
M.O.; medulla oblongata

와 연수에서의 비교적 높은 병소의 형성, 뇌와 신장을 포함한 간장, 폐장 및 심장에서 병변이 고루 형성되었다는 특징이 있었다(Table 1).

Cox et al(1979)[4]에 의한 토끼 감염 실험 결과 *E. cuniculi*는 감염초기에는 주로 신장, 폐장과 간장, 드물게 심장에서 병변을 형성하나, 감염 98일에는 주로 뇌와 신장에서 병변을 형성하였다. Cox와 Gallichio(1978)[3]는 혈액에서 최초로 *E. cuniculi*에 대한 항체를 검출한 후 적어도 8주까지는 뇌에서 원인체나 병변이 나타나지 않았다고 하였다. 본 례의 경우 뇌의 병변이 뚜렷하고 신장의 간질성 신염이 주된 병변으로 나타났으며 뇌와 신장 모두에서 다수의 원인체가 관찰된 것으로 보아 상당히 만성적으로 진행되었을 것이라 생각된다.

조직에서 Encephalitozoonosis의 진단은 부검에 의한 육안적, 조직병리학적 검사, 특수염색 및 면역조직화학적 검사등이 이용되고 있다. 본 례에서는 육안적으로 신장에서, 조직학적으로는 뇌와 신장에서 특징적인 병소가 관찰되었으며, 이 밖에도 간장, 폐장, 심장에서 *E. cuniculi*와 관련하여 병변이 관찰되었다. 특수염색에서 *E. cnuniculi*는 *T. gondii*에 비교하여 그람양성이며, Iron hematoxylin에 염색되고 PAS염색에서 포자의 한 쪽 끝에 하나의 빨간 과립이 특징으로 이러한 염색법은 *E. cuniculi*에 감염된 장기에서 원인체의 검출과 *T. gondii*와의 감별에 유용하게 이용되었다.

국내에서 실험용으로 사용되고 있는 토끼는 대부분 일반적인 환경하에서 생산되고 사육되고 있다. 본 례의 경우 국내에서는 비교적 좋은 환경에서 사육되었던 토끼들임에도 불구하고 38.9%의 비교적 높은 *E. cuniculi* 감염률이 확인되어 국내에서 생산, 사육되어 실험에 이용되는 다른 토끼에서도 *E. cuniculi*에 의한 감염 가능성이 높은 것으로 판단되며, 이에 대한 각별한 주의가 필요한 것으로 사료된다. 이러한 감염 가능성으로 인하여 토끼를 이용한 여러 실험에서 *E. cuniculi*의 감염으로 인한 병변과 약물에 의한 병변과의 감별이 필요하며, 이를 위해 조직병리학적 검사와 더불어 비교적 용이한 여러 특수염색이 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구를 위하여 많은 조언과 도움을 주신 LG화학 기술연구원 독성팀과 조영자씨에게 감사를 드립니다.

참고문헌

1 Basson PA, McCully RM, et al. Nosematosis: Report of a canine case in the Republic of South Africa. J South Afr Vet Med Assoc **37**:3-9, 1966.
2 Brown RJ, Hinkle DK, et al. Nosematosis in a squirrel monkey. J Med Primatol **2**:114-123, 1973.
3 Cox JC, Gallichio HA. Serological and histological studies on adult rabbits with recent, naturally acquired encephalitozoonosis. Res in Vet Sci **24**:260-261, 1978.
4 Cox JC, Hamilton RC, et al. An investigation of the routev and progression of *Encephalitozoon cunicnuli* infection in adult rabbits. J Protozool **26**(2):260-265, 1979.
5 Chalupsky J, Vavra J, et al. Encephalitozoonosis in laboratory animals a serological survey. Folia Parasitol Praha **26**(1):1-8, 1979.
6 Gannon J. The course of infection of *Encephalitozoon cuniculi* in immunodeficient and immunocompetent mice. Lab Anim **14**:189-192, 1980.
7 Gannon J. A survey of *Encephalitozoon cunicnuli* in laboratory animal colonies in the United Kingdom. Lab Anim **14**(2):91-94, 1980.
8 Lyngset A. A survey of serum antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in breeding rabbits and their young. Lab Anim Sci **30**(3):558-561, 1980.
9 Majeed SK, Zubaidy AJ. Histopathological lesions associated with *Encephalitozoon cuniculi* (nosematosis) infection in a colony of Wistar rats. Lab Anim **16**:244-247, 1982.
10 Matsubayashi H, Koike T, et al. A case ofEncephalitozoon-like body infection in man. Arch Pathol **67**:181-187, 1959.
11 Park JH, Lee YS, et al. Cerebral lesions of encephalitozoonosis in the rabbits died of rabbit hemorrhagic disease. Korean J Vet Res **32**(2):227-233, 1992.

12 Percy DH, Barthold SW. Pathology of laboratory rodents and rabbits, 1st ed., pp. 210-214. Iowa State University Press, Iowa, U.S.A., 1993.
13 Shadduck JA, Watson WT, et al. Animal infectivity of *Encephalitozoon cunicnuli*. J Parasitol **65**(1):123-129, 1979.
14 Van Rensburg IBJ, Du Plessis JL. Nosematosis in a cat: A case report. J South Afr Vet Med Assoc **42**:327-331, 1871.
15 Van Dellen AF, Botha WS, et al. Light and elentron microscopical studies on canine encephaltozoonosis: cerebral vasculitis. Onderstepoort J Vet Res **45**:165-186, 1978.
16 Wilson JM. The biology of *Encephalitozoon cunicnuli.* Medical Biology **57**:84-101, 1979.

Request reprints from Byong-Ill Yoon, Department of Pathology, College of Veterinary medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Republic of Korea