

국내 소에서 *Neospora caninum*의 분리

김재훈 · 손현주 · 황의경 · 황우석* · 허권* · 진영화 · 이병천* · 이재진
강영배 · 山根逸郎** · 김대용*

수의과학연구소 · 서울대학교 수의과대학*
일본 가축위생시험장**
(1998년 1월 13일 접수)

In vitro isolation of a bovine *Neospora* in Korea

Jae-hoon Kim, Hyun-joo Sohn, Eui-kyung Hwang, Woo-suk Hwang*, Kwon Hur*,
Young-hwa Jean, Byung-chun Lee*, Jae-chin Rhee, Yung-bai Kang,
Itsuro Yamane**, Dae-yong Kim*

National Veterinary Research Institute
College of Veterinary Medicine, Seoul National University*
Laboratory of Epidemiology, National Institute of Animal Health, Japan**
(Received Jan 13, 1998)

Abstract : The *Neospora* sp. was isolated from the brain of 1 calf via continuous *in vitro* cultivation in Vero cell. *Neospora* tachyzoites were observed 45 days after inoculation of the homogenized brain suspension into the Vero cell. The isolated parasite (named tentatively as NC-KB-1) was morphologically and ultrastructurally similar to the previously reported *Neospora* sp isolated in cattle (BPA-1, JPA-1). A comparison of the antigenic reactivity of cultivated tachyzoites with polyclonal antisera to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* confirmed that this protozoal isolate was similar to *N. caninum*. This is the first report of successful isolation of *Neospora* sp from cattle in Korea.

Key words : calf, Vero cell, tachyzoite, *Neospora caninum*, isolation.

서 론

Neosporosis는 최근에 밝혀진 질병으로서 *Neospora*

caninum (*N. caninum*) 감염으로 소와 개를 비롯하여 여러 동물에서 유산과 신경증상을 일으키는 것으로 알려져 왔다^{1,2}. *Neospora*에 감염된 유산태아 또는 선천감염된 신생송아지는 병리조직학적으로 비화농성 또는 다병소

성 괴사성 뇌척수염, 심근염 및 근염 등의 병변을 나타내고, 특히 뇌의 병변부위에서 원충의 tachyzoites 또는 cysts를 관찰할 수 있다³⁻⁶. 현재까지 소의 *Neospora* 감염은 미국, 캐나다, 영국, 일본, 한국 등 12개국에서 그 발생이 보고된 바 있다^{1,2,5-8}. Dubey *et al*⁹은 후구마비 증상으로 폐사한 5두의 개 조직에서 다발성 신경근염과 육아종성 다발성 근염병변을 관찰하였으며, 소 단핵구세포(bovine monocytes)와 폐동맥 내피세포(bovine cardiopulmonary arterial endothelial cell : CPAE)를 이용한 세포배양으로 이들 병변부 조직에서 *N caninum*을 최초로 분리하였다. Conrad *et al*¹⁰은 임신 4개월에 유산된 젖소태아에서 본 원충을 분리하였고, 가까운 일본에서는 Yamane *et al*¹¹이 2개월령 송아지에서 원충분리에 성공한 바 있다. 지금까지 분리 보고된 *N caninum*은 개 유래 4주, 소 유래 6주가 알려져 있다. 개 유래 원충 4주는 미국분리주 3주와 영국분리주 1주로 이들간에 증식의 특성, 미세구조 및 항원성에 별다른 차이가 없는 것이 밝혀졌다¹². 소 유래 원충 6주는 미국분리주 4주^{10,13}와 스웨덴¹⁴ 및 일본¹¹분리주 각 1주이며, 미국내에서 분리된 4주의 원충은 small subunit ribosomal RNA sequence 상에 큰 차이점이 없음이 보고된 바 있다¹⁵. 그러나 미국이외의 지역에서 소유래 원충의 분리주가 적기 때문에 이들간의 차이점은 아직까지 알려져 있지 않다.

한국에서는 김 등⁶이 소 유산태아에서 *Neospora* 감염을 최초로 보고한 바 있으며, 본 원충감염으로 인한 동일한 소의 반복유산(repeated abortion)이 증명되기도 하였다¹⁶. 또한 김 등¹⁷은 1996년부터 유산산이 문제시 되고 있는 경기도와 충북지역의 젖소목장에서 60두의 유산태아를 검사하여 5두에서 *Neospora* 감염을 관찰한 바 있으며, 허 등¹⁸은 국내 10개 시·도의 젖소에 대하여 *N caninum* 항체 보유여부를 간접형광항체법으로 조사하여 평균 약 21%의 양성율을 확인하였다.

본 연구는 출생직후 기립불능을 나타낸 젖소 송아지에 대한 원인 규명을 의뢰 받아 세포배양을 통해 *N caninum*을 국내에서 최초로 분리하였기에 이 원충의 실험실적 분리방법 및 동정결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 : 1997년 11월 경기도 여주군 소내 N 젖소목장에서 분만예정일보다 15일 늦게 태어난 송아지가 머

리를 떨어뜨리고 기립불능상태에 빠져서 초유를 섭취하지 못하였다. 본 송아지와 모우의 혈청을 의뢰받아 검사하였으며, 송아지는 수송도중 폐사하였다. 일반적인 소의 부검술식에 준하여 외관검사후 부검을 실시하였다.

혈청검사 : 모우와 초유 섭취전 송아지의 혈청을 분리하여 간접형광항체법 (Indirect immunofluorescent antibody test:IFA)으로 *N caninum* 항체 역가를 검사하였다. 각 혈청을 pH 7.4 PBS로 200배부터 6,400배까지 희석하여 *N caninum* 항원이 coating 된 12 well plate에 각 well당 10 μ l씩 분주하였다. 37 $^{\circ}$ C 습상에서 1시간 반응시키고 0.05% Triton-X-100가 함유된 pH 7.4 PBS로 5분씩 3회 세척하였다. Plate상의 습기를 제거한 후 이차항체는 1 : 500으로 희석된 FITC conjugated sheep anti-bovine anti-serum(Cappel, Durham, USA)을 각 well당 10 μ l씩 분주한 다음 37 $^{\circ}$ C 습상에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 plate는 PBS로 5분씩 3회 세척한 후 25% glycerol이 함유된 PBS로 봉입하여 형광현미경(Nikon Optiphot, Japan)으로 관찰하였다. 양성 및 음성 대조혈청은 일본 가축위생시험장(Dr. Yamane)으로부터 공여받은 것을 사용하였다.

원충분리 : 송아지의 뇌를 무균적으로 적출하여 대뇌종열 방향으로 절개하여 뇌의 1/2을 antibiotic-antimycotic (100unit/ml penicillin G, 100 μ l/ml streptomycin, 0.25 μ g/ml amphotericin B: GIBCO BRL, Grand Island, NY)이 함유된 멸균 PBS에 보관하였다. 나머지 1/2의 뇌는 10% 중성 포르말린에 고정하여 일반적인 조직처리후 hematoxylin & eosin 염색하였다.

원충분리를 위해 원숭이 신장단층세포(Vero cell : CRL6318, ATCC, Rockville, MD)를 10% 말혈청(GIBCO BRL, Grand Island, NY)이 첨가된 Minimum Essential Medium(MEM : GIBCO BRL, Grand Island, NY)에 배양하였다. 또한 배지에는 4mM L-glutamine MEM vitamin solution(GIBCO BRL, Grand Island, NY), MEM essential amino acid solution(GIBCO BRL, Grand Island, NY), MEM non-essential amino acid solution(GIBCO BRL, Grand Island, NY)을 첨가하였다.

멸균 PBS에 보관된 송아지 뇌조직 10~20g(25cm² 플라스크당 5g)을 멸균유발에 넣어 끈적끈적할 때까지 균질화시키고, 멸균 PBS 40ml를 첨가하였다. 트립신 처리 뇌유제액을 만들기 위하여 균질화한 뇌유제액을 2.5% trypsin과 0.25% EDTA가 함유된 멸균 PBS를 4ml 넣은 다음 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 멸균된 가아제에 여

과한 후 20ml의 PBS를 첨가하여 300g에서 10분간 원심분리를 하는 과정을 3회 반복하여 실시하였다. 또한 트립신을 처리하지 않은 뇌유체액을 300g에서 10분간 원심분리하고 PBS로 일회 세척하였다. 각각의 마지막 침전물을 10ml의 MEM 배지에 부유시켜 Vero cell에 2~4시간 배양하였다. 플라스크내 뇌유체액을 제거하고 PBS로 3회 세척한 후 5ml의 신선한 배지를 첨가시켜 배양하였다. 세포배양은 25cm² 플라스크에 유지하였고, 5% CO₂ 조건으로 37℃에서 배양하였다. 배지는 일주일에 약 3회 정도 교체하였으며, 세포의 계대는 7~10일 간격으로 하였다. 기생충의 출현여부를 확인하기 위해 매일 세포를 관찰하였다.

분리된 원충에 대한 면역염색 : 송아지에서 분리된 원충의 항원성을 알아보기 위하여 *N caninum* 고도면역혈청(hyperimmune goat serum : VMRD, INC, Pullman)과 *Toxoplasma gondii* (*T gondii*) 항체(단클론항체 및 다클론항체 : BioGenex Lab, SanRamon)를 이용하여 면역염색을 실시하였다. 분리된 원충을 수확하기 위하여 25cm² 조직배양 플라스크에서 Vero 단층세포를 박리시켰다. 단층세포들을 23G needle로 반복 passage한 후 5µm filter로 통과시켜 세포 봉피물을 제거한 다음, 1500g에서 10분간 원심하였다. 상층액을 제거하고 tachyzoite pellet을 MEM 배지로 부유시켜 6 well plate에 접종하였다. 이 조직배양 6 well plate는 원충을 접종하기 48시간전에 Vero 세포를 배양시켜서 접종시 약 80% 정도의 세포단층이 형성되도록 준비하였다. Tachyzoite 접종 3일후에 면역염색을 실시하였다. 세포의 단층은 슬라이드에 부착된 채로 배양 상층액을 제거하고 4℃에서, 100% 메탄올과 아세톤을 1:1 비율로 만든 고정액으로 10분간 고정하였다. Plate를 공기중에서 완전히 말린 뒤 PBS로 5분씩 3회 수세하였다. 5% normal rabbit serum에 30분간 반응시킨 다음 일차항체로 1:3000으로 희석한 *N caninum* 고도 면역혈청을 37℃ 습상에서 30분간, *T gondii* 항체는 1:40으로 희석하여 30분간 반응시켰으며, 1 well은 음성대조로 normal rabbit serum을 적용시켰다. 이차항체는 biotin이 결합된 각각의 이차항체를 20분간 반응시킨 뒤 avidin-biotin complex 용액에 20분간 적용시키고 DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrachloride)로 발색시켰다.

전자현미경 검사 : 네오스포라가 감염된 Vero 단층세포를 75cm² 플라스크에 증식시켜 약 50%의 세포가 감염되었을 때 플라스크를 멸균 PBS로 3회 수세한 다음 cell

scraper로 잘 긁어 350g에서 5분간 원심분리하였다. 얻어진 pellet을 2.5% glutaraldehyde 용액에 1시간 전고정하고 0.1M sodium cacodylate 완충액(pH 7.3)으로 30분씩 2회 수세한 후 1% osmium tetroxide 용액에 1시간 후고정하였다. 통상적인 방법에 따라 epon 810에 포매하였다. 초박 절편을 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경(H-7100FA, Hitachi, Ltd, Japan)으로 80kv에서 관찰하였다.

결 과

병리검사 : 송아지는 분만후 양쪽 앞다리를 벌리고 머리를 들지 못하는 상태로 있었다. 병리해부소견으로 송아지의 경구개는 결손되어 있었으며, 식도와 기관점막에는 침침대 전후의 담적색 반점이 소수 산재하였다.

조직학적 병변은 뇌와 척수에 경미한 다발 병소성 비화농성 뇌막뇌염소견과 심장에 국소적인 심근섬유의 괴사와 소수 비화농성 염증세포의 침윤이 관찰되었다.

혈청검사 : 가검물이 의뢰된 농장의 젖소를 대상으로 1996년 7월부터 1997년 11월까지 총 41두에 대하여 *N caninum* 항체조사를 실시하였던 바, 약 46.3%의 양성율을 나타내고 있었다. 모우와 초유섭취전 송아지의 혈청에 대하여 간접형광항체법으로 *Neospora* 항체역가를 검사한 결과 모우는 1:6,400, 송아지는 1:3,200배의 매우 높은 역가를 나타내었다. 양성반응은 plate에 coating 된 네오스포라 tachyzoite의 외곽전체에서 강한 형광을 띠고 있었다(Fig 1).

원충분리 : 송아지 뇌조직 균질액으로부터 원충성 기생충을 분리하였다. 원충은 트립신 처리한 뇌 유체액을 접종한 Vero cell에서 접종후 45일째(5계대)부터 관찰되었고 트립신 처리를 하지 않은 뇌 유체액을 접종한 Vero cell에서는 관찰할 수 없었다. 원충이 발견된 초기에는 대개 tachyzoite가 세포질내에서 두개씩 쌍을 이룬 상태로 소수 관찰되었으나 점차 그 수가 증가하여 오디모양의 집락으로 세포질의 대부분을 채우고 있었다(Fig 2). 그후 tachyzoite는 세포벽을 파괴시켜 세포질 외부로 돌출하여 썩기모양으로 관찰되었으며, 배지상에서 좌우로 또는 빙글빙글 선회운동을 하였다. 세포외부로 유리된 원충을 Giemsa 염색하였을 때 그 크기는 길이 5~7µm, 폭 1.5~2µm였다(Fig 3).

분리된 원충에 대한 면역염색 : 조직배양으로 분리된

원충 tachyzoite의 항원성을 밝히기 위해 ABC법을 이용한 면역염색을 실시하였던 바 *T gondii* 단클론항체와 다클론항체에는 전혀 반응하지 않았고, *N caninum* 고도면역 혈청에는 강한 결합능을 나타내어 tachyzoite 표면에서 암갈색의 양성반응을 관찰할 수 있었다(Fig 4). 이를 근거로 이 원충은 국내에서 최초로 분리된 *N caninum* 임이 입증되었고, 잠정적으로 NC-KB-1으로 명명하였다.

전자현미경 검사 : Tachyzoite들은 parasitophorous vacuole에 싸여서 감염된 Vero cell의 세포질내에 존재하였으며, 크기는 길이 5~7 μ m, 폭 1.5~2 μ m에 달하였다. Tachyzoite는 두겹의 내막과 외부의 plasmalemma membrane으로 구성된 피막으로 피복되어 있고, 핵은 중앙 또는 뒤쪽에 위치하고 있으며 긴 관상의 사립체, Golgi 기관, 과립성 또는 무과립성 내형질세망과 많은 유리상태의 라이보솜 등으로 구성되어 있었다. Tachyzoite 침부의 미세구조는 apicomplexa 문의 특징적인 구조를 나타내고 있었다. 두겹의 내막에서 연장된 polar ring, 실린더 또는 콘모양의 conoid, 다수의 micronemes, 전자밀도가 높은 10개 이상의 rhoptries를 함유하고 있었다(Fig 5). 다수의 micronemes은 tachyzoite의 앞쪽에 위치하고 핵의 뒤쪽에는 소수만이 있었으며, 피막과 평행하게 또는 수직방향으로 존재하였다. 때로 하나의 tachyzoite의 내부에서 2개의 후대 zoite를 형성하는 중2분열(endodyogeny) 과정이 관찰되기도 하였다.

고 찰

본 연구를 통하여 기립불능 상태의 1일령 송아지로부터 조직배양을 통해 국내 최초로 *N caninum* 이 분리되었다. 본 송아지의 초유섭취전 혈청의 *Neospora* 항체역가는 1:3,200으로 높았고, 모우 또한 1:6,400으로 상당히 높게 나타난 것으로 보아 태생기에 원충에 노출되었음을 강하게 시사한다 하겠다. 이번에 분리된 국내분리주 NC-KB-1은 미국분리주(BPA-1) 및 일본분리주(JPA-1)와 형태학적으로 거의 유사한 것으로 나타났다^{10,11}. 면역염색을 통한 항원성 검증시험시 국내에서 상당히 문제시되는 *T gondii* 항체와는 반응하지 않았으나 *N caninum* 항체와는 강한 반응을 나타내어 *Neospora* genus임을 증명할 수 있었다. 또한 전자현미경을 이용한 분리원충 tachyzoite의 미세구조도 미국에서 소 유산태아로부터 분리한 BPA-1 및 일본에서 송아지에서 분리한 JPA-1과 일

치하였다^{10,11,19}.

Conrad et al¹⁰은 태아의 사후부패와 비교적 적은 수의 원충감염으로 인해 소 유산태아로부터 *Neospora* 원충의 분리가 매우 어려운 실정이라고 하였다. 가까운 일본에서는 Yamane et al¹¹이 14두의 유산태아와 7두의 송아지에서 *Neospora* 원충의 분리를 시도하여 초유전 혈청내 *N caninum* 역가가 3,200인 송아지로부터 본 원충을 분리한 바 있다. 본 NC-KB-1 분리예의 경우 비록 수송도중 송아지가 폐사하였지만 비교적 사후변화가 적은 시료였기 때문에 원충을 성공적으로 분리할 수 있었다고 판단된다.

미국의 Conrad et al¹⁰은 bovine fetal trophoblast cell과 CPAE 세포를 이용하여 소 유산태아로부터 *Neospora* 를 분리하였다. 일본에서는 Yamane et al¹¹이 본 원충의 분리를 위한 초대배양 세포로 CPAE와 Vero를 이용하였던 바 CPAE에서는 원충이 분리되었으나 Vero 세포에서는 분리되지 않았다고 하였다. 그러나 Stenlund et al¹⁴은 사산된 송아지로부터 Vero 세포를 이용한 세포배양으로 배양 56일째 *N caninum* tachyzoite를 분리할 수 있었다. 금번 국내분리주 NC-KB-1의 경우에도 Vero 세포를 초대배양 세포로 사용하여 비교적 빠른 배양 45일째 원충을 확인할 수 있었다. 따라서 본 원충분리를 위한 CPAE 또는 Vero 세포의 선택여부에 대해서는 좀더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

본 연구를 통하여 국내 젖소의 유사산과 관련된 새로운 질병의 원인체가 분리되었다. 따라서 추후에는 국내 분리주에 대한 병원성 실험, 분자생물학적 특성, 외국분리주와의 비교시험 등이 수행되어야 할 것이다. 또한 궁극적으로는 국내 네오스포라감염증의 발생역학과 생활환을 규명하고 아울러 본 질병의 예방 및 치료를 위한 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

1997년 11월 경기도 여주군 소재 젖소목장에서 예정일보다 15일 늦게 분만된 기형송아지를 검사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 송아지 뇌조직을 Vero 세포에 배양하여 접종후 45일에 네오스포라 tachyzoite를 분리하였다.
2. 송아지와 모우의 혈청에 대한 *N caninum* 항체 역가를 검사하여 각각 3,200과 6,400배의 역가를 나타내었다.

3. 배양된 tachyzoite에 대한 면역염색을 실시하여 *N. caninum* 으로 확증할 수 있었다.

4. 전자현미경 검사를 실시한 결과, 첨단부의 polar ring, conoid, 전자밀도가 높은 rhoptries와 mironemes을 함유하

고 있는 특징적인 네오스포라 미세구조를 확인하였다.

5. 따라서 이상의 결과를 종합하여, 본 원충은 국내에서 최초로 소에서 분리된 *N. caninum* 이며, NC-KB-1으로 잠정 명명하고자 한다.

Legends of figures

Fig 1. *Neospora caninum* IFA test of calf serum.

Note strong positive immunofluorescence (white arrow), X 200.

Fig 2. Vero cells infected with brain homogenate of calf contain numerous tachyzoites (arrow) of isolate NC-KB-1. X 200.

Fig 3. Extracellular tachyzoites were stained strongly with Giemsa method, X 200.

Fig 4. Immunostained vero cells infected with NC-KB-1.

Note the dark brown tachyzoites (arrow) in the cytoplasm of Vero cells. ABC method, X 200.

Fig 5. Electron-micrograph of the tachyzoites of isolate NC-KB-1 within a parasitophorous vacuole (PV) in the cytoplasm of Vero cell.

Note the polar ring (open arrow), conoid (arrow head), rhoptries (r), and micronemes (arrow). Bar = 1 μ m.

1



참 고 문 헌

1. Dubey JP, Lindsay DS. Neosporosis. *Parasitology Today*, 9:452-458, 1993.
2. Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, et al. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *JAVMA*, 198:241-244, 1991.
3. Dubey JP, Leathers CN, Lindsay DS. *Neospora caninum*-like protozoan associated with fetal myelitis in newborn calves. *J Parasitol*, 75:146-148, 1989.
4. Barr BC, Anderson ML, Blanchard BM, et al. Bovine fetal encephalitis and myocarditis with protozoal infection. *Vet Pathol*, 27:354-361, 1990.
5. Ogino H, Watanabe E, Watanabe S, et al. Neosporosis in the aborted fetus and newborn calf. *J of Comp Pathol*, 107:231-237, 1992.
6. 김대용, 황우석, 김재훈 등. *Neospora* 에 의한 소유산 발생. *대한수의학회지*, 37:607~612, 1997.
7. Agerholm JS, Barr BC. Bovine abortions associated with *Neospora* in Denmark. *Acta Vet Scand*, 35:461-464, 1994.
8. Otter A, Jeffrey H, Griffiths IB, et al. A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn fetuses in England and Wales. *Vet Rec*, 136:602-606, 1995.
9. Dubey JP, Hatel AL, Lindsay DS, et al. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs : Isolation of the causative agent and experimental transmission. *JAVMA*, 193:1259-1263, 1988.
10. Conrad PA, Barr BC, Sverlow KW, et al. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora sp* from aborted bovine foetuses. *Parasitology*, 106:239-249, 1993.
11. Yamane I, Kokuho T, Shimura K, et al. *In vitro* isolation and characterization of a bovine *Neospora* species in Japan. *Research in Vet Sci*, 63:77-80, 1997.
12. Barber JS, Holmdahl OJM, Owen MR, et al. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). *Parasitology*, 111:563-568, 1995.
13. Barr BC, Conrad PA, Breitmeyer R, et al. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetus : Four cases (1990-1992). *JAVMA*, 202:113-117, 1993.
14. Stenlund S, Bjorkman C, Holmadahl J, et al. Isolation and characterization of a swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. Proc 13th Int Congress Anial Reproduction, 30th June~ 4 July, 1996, Sydney.
15. Marsh AE, Barr BC, Sverlow KW, et al. Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites. *J of Parasitol*, 81:530-535, 1995.
16. 김재훈, 황의경, 김대용 등. *Neospora* 에 의한 소의 반복 유산증례 및 혈청역학. *한국수의병리학회 추계학술대회*, p. 52, 1997.
17. 김재훈, 김대용, 황의경 등. 국내 *Neospora caninum* 에 의한 소 유산. *대한수의학회 제41차 학술대회*, p. 112, 1997.
18. Kwon hur, Woo-suk Hwang, Eui-kyung Hwang, et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in Korean dairy cows by indirect immunofluorescent assay. *대한수의학회 제41차 학술대회*, p.113, 1997.
19. Barr BC, Conrad PA, Dubey JP, et al. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf : Pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J Vet Diagn Invest*, 3:39-46, 1991.