

IBDV (SH/92)의 인공감염에 의한 닭 면역장기의 병리조직학적 연구

엄성심, 김범석*, 임채웅*, 임병무*, 이호일*, 정동석

전라북도 축산진흥연구소 남원지소, 전북대학교 생체안정성연구소*

Histopathological changes in lymphoid organs of chickens inoculated with IBDV (SH/92)

Sung-shim Eum, Bum-seok Kim*, Chae-Woong Lim*,
Byung-Moo Rim*, Ho-Il Lee*, Dong-Suk Chung

*Namwon branch, Chonbuk Livestock Development and Reserach Institute
Bio-Safety Reserach Institute, Chonbuk National University**

Abstract

Sequential morphologic changes in the lymphoid organs were examined after ocular and cloacal inoculation in 3weekold chicks with a highly virulent strain (SH/92) of infectious bursal disease virus (IBDV). The infected chickens were sacrificed at 6, 12, 24, 48, 72, and 96 hrs post inoculation (PI), and thymus, harderian gland, ceacal tonsil, and spleen were observed.

Histologically, the significant lesions were characterized by lymphocyte depletion and the earliest detectable changes were evident at 12 hrs PI. In thymic cortex, lymphoid depletion with apoptosis and prominent "tingible body macrophages" were observed. As the infection advanced, the lesions showed more severe changes. Dying cells were characterized either by capping of nuclear chromatin (apoptosis) or by cytoplasmic swelling (necrosis). *In situ* staining for apoptosis, some lymphoid cells revealed typical positive reaction, even the stainability was variable depend on every lymphoid organs.

These results suggest that IBDV (SH/92) cause severe damage both primary and secondary lymphoid organs, and both T and B lymphocytes. Also the lymphoid depletion of these organs is caused by necrosis and apoptosis induced by IBDV.

Key words : IBDV (SH/92), Chicken, Lymphocyte depletion, Apoptosis, Necrosis

서 론

전염성 F낭염 (infectious bursal disease; IBD)은 1962년 Cosgrove에 의하여 처음 보고된 이래¹⁾ 어린 병아리 및 육계에서 높은 폐사율과 면역억제로 2차적인 질병을 유발하여 생산성을 저하시키는 대표적인 질병으로 전세계적으로 발병하고 있다. 독주에 따라서는 준임상형으로 지나가지만 1980년도 후반기부터 유럽에서 많은 폐사를 일으키는 강독형도 발견되었다²⁾. 전염성 F낭염 바이러스 (IBDV)는 주로 B 림프구에 친화성을 가지며 F낭의 림프소절내 림프구의 괴사를 일으키는 것으로 알려져 있다³⁾.

닭에서 가장 감수성이 있는 시기는 3~6주령으로 국내에서는 1970년도부터 양계산업에 지속적으로 문제를 야기하고 있다. IBDV는 일단 계사내 발생되면 감염된 계군이 제거된다 하더라도 후에 다른 계군에 감염되고 있어 감염된 계사내의 물, 사료, 깃털 등에 의하여 오랫동안 상존하면서 전염성이 있는 것으로 나타났다⁴⁾. 이 바이러스는 열과 산도에 강하며 일단 감염된 농가는 일반적인 소독제로 바이러스를 완전하게 사멸시키기 어렵다⁵⁾. 따라서 지속적으로 발병되며 퇴치하기가 어려운 것이 현실이다.

IBDV는 Birnaviridae과에 속하며 이중구조의 RNA로 이루어 있으며⁶⁾, 현재까지 I형과 II형의 혈청형이 알려져 있다⁷⁾. II형은 칠면조에서 분리되었으나 닭에서는 폐사나 면역억제를 일으키지는 못하며, I형은 표준형, 변이형, 강독형으로 구분되어 있다⁸⁾. 유럽에서 높은 폐사를 일으켰던 강독형은 1990년에 일본에서⁹⁾, 1992년에 국내에서도 야외에 발생되어 분리되었다¹⁰⁾. 조류에서 면역장기의 특이한 점은 림프절이 없는 반면에 맹장편도, 안구와 비강 사이에 하더선 (Harderian gland), 총배설강에 F낭이 있으며, 흉선은 경정맥을 따라서 12~14개의 분

리된 엽으로 존재한다. 그러나 조류와 포유류의 구조적인 차이에도 불구하고 림프구와 말초 림프 조직의 기능은 동등한 기능을 수행하는 것으로 보고되어 있다¹¹⁾.

일반적으로 닭에서 apoptosis는 닭빈혈성 바이러스^{12,13)}, 인플루엔자 바이러스¹⁴⁾, 뉴캐슬병 바이러스¹⁵⁾ 등에 감염된 닭에서 관찰된다는 보고가 있다. IBDV는 1차 및 2차 림프기관의 세포에 괴사를 유도하는 것으로 알려져 있으나 최근 IBDV가 흉선, 혈관내 림프구에서 apoptosis에 의한 고갈이 다양한 방법으로 알려지게 되었고¹¹⁾, 본 SH/92 virus에 의해서도 F낭의 림프구가 apoptosis를 일으키는 것으로 보고되었다¹⁶⁾.

따라서 국내에서 분리된 강독형 IBDV를 실험적으로 닭에 접종하여 비장, 흉선, 맹장편도, 하더선과 같은 림프조직에서의 투여 후 시간경과에 따른 병리조직학적인 변화를 관찰하고자 한다.

재료 및 방법

SH/92 바이러스

SH/92 바이러스는 전염성 F낭염 바이러스로서 국립수의과학검역원에서 동정 및 분리한 것을 분양 받아 사용하였다.

공시동물 및 바이러스 접종

Specific-pathogen-free (SPF)인 3주령의 닭을 사용하였다. 실험기간 중 닭은 공기가 여과되는 장소에서 1주일간 격리 사육하였다. 국립수의과학검역원에서 분양된 SH/92 바이러스 주입은 EID50/0.1 ml의 바이러스가 들어있는 F낭을 유제로 만들어 500 μ l을 안점막과 총배설강에 나누어 주입하였다. 주입 후 6, 12, 24, 48, 72, 96시간에 희생시켜 부검하였다.

병리조직학적 검사

병리조직학적 검사를 위하여 하더선, 흉선, 비장, 맹장편도를 채취하여 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 파라핀 처리후 4 μ m로 절편하고 hematoxylin-eosin (H&E) 염색하여 광학현미경하에서 검색하였다.

In-situ apoptosis 검색

Apoptosis를 검색하기 위하여 TACS kit (Trevigen, Gaithersburg, MD)를 이용하였는데¹⁷⁾, 그 기법을 간략하면, 절편된 조직을 탈파라핀 후 proteinase K (1.0 mg/ml, Sigma)로 15분간 소화시켰다. Hydrogen peroxide로 소화를 멈추게 하고 dATP, dCTP, dGTP 및 biotin-11-dUTP로 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰고, peroxidase-diaminobenzidine (DAB: 0.1 mg/ml)으로 발색한 후 harris hematoxylin으로 대조염색을 하였다.

결 과

닭에서 IBDV를 감염시킨 후 시간 경과별로 관찰된 특징적인 병리조직학적 소견은 흉선, 하더선, 비장, 맹장편도 모두 림프구 고갈이 관찰되었으며, 접종 후 12시간 이상 경과된 모든 림프장에서 세포괴사가 인정되었다.

흉선에서는 접종 6시간에 수질부의 괴사된 세포괴를 탐식한 대식세포가 많아지기 시작하였으며, 24시간에 괴사세포가 증가하면서 대식세포의 수도 증가하여 “starry-sky appearance”현상이 관찰되었다 (Fig 1). 수질에서 괴사가 좀더 집단적으로 일어났고 출혈과 heterophil이 침윤되기 시작하였다. 48시간에는 괴사된 세포의 수가 증가하면서 핵은 반달모양으로 apoptosis와 같은 형태학적 변화가 관찰되었다 (Fig 2). 72시간에는 수질의 림프구는 현저히 감소되었다 (Fig 3).

하더선 (Harderian gland)은 6시간에 소수의 형질세포가 괴사되기 시작하고 24시간 이후에 세포질이 커지고 핵이 농축되는 괴사 소견이 관찰되며 (Fig 5), 96시간에는 정상군에 비해 (Fig 4) 림프구가 거의 관찰되지 않았으며 소포나 관강을 이루고 있는 세포에도 변화가 관찰되지 않았다 (Fig 6).

맹장편도는 12시간에 germinal center에서부터 괴사세포가 나타나기 시작하였으며 (Fig 7), 24시간에는 heterophil이 침윤되었다 (Fig 8). 72시간에는 심하게 림프구가 소실되어 세포 밀도가 낮게 관찰되었다 (Fig 9). 비장도 12시간에 세포손상이 발견되고 주로 백색수와 림프성 동맥주위집에서 시작되었다. 48시간에는 세포괴사가 더욱 현저하게 나타났으며 heterophil도 침윤되어 있었다 (Fig 10). 96시간에는 적색수와 백색수가 구분이 불분명 할 정도로 림프구가 고갈된 조직상이 관찰되었다 (Fig 11).

Apoptosis를 검색하기 위한 면역염색에서 맹장편도에서는 산발적으로 염색되며 (Fig 12), 흉선에서는 수질에 집단적으로 (Fig 13), 그리고 하더선은 매우 미약한 양성반응을 나타내었다 (Fig 14).

고 찰

실험적으로 국내에서 분리된 야외 강독형 IBDV (SH/92)를 닭에 접종하여 병리조직학적으로 림프장기를 검사한 결과 관찰된 모든 림프조직에서 림프구 고갈이 주요한 특징이었다.

IBDV는 미성숙 B림프구에서 증식하여 세포를 상해한다는 많은 연구보고들이 알려져 있다. IBDV(SH/92)의 인공감염은 F낭의 림프구를 고갈시키는데, 그 기전으로는 괴사와 apoptosis가 동시에 일어나고 있음을 전 실험에서 관찰되었다¹⁶⁾.

Apoptosis는 정상조직에서 세포수의 항상성을 조절하는 생리학적 현상으로 세포분열에

반대되는 개념으로 lymphotoxin, tumor necrosis factor, glucocorticoid 등에 의해서도 야기되며, AIDS, 닭 빈혈바이러스, 소의 herpes 등의 바이러스에 의해서도 유도되는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾.

그러나 아직까지 바이러스에 의한 apoptosis의 유도기전은 알려져 있지 않았다. 전자현미경을 통하여 관찰된 결과에 의하면 IBDV에 기인하는 흉선과 F낭의 apoptosis성 손상을 나타내는 림프구에서 바이러스의 존재는 발견되지 않았다^{11,16)}. 따라서 IBDV자체에 의한 유도보다는 대식세포에 의한 TNF 혹은 다른 내, 외적 요인에 의한 것으로 추정하고 있다¹⁶⁾.

닭의 림프기관은 포유류와는 달리 독특한 형태를 지니고 있다. 흉선은 2차 림프기관으로, 내분비기관으로도 알려져 있으며, 부화 때부터 약 5%의 B림프구가 존재하고 있다. 하더선은 안구, 비강, 상부호흡기 등의 국소 면역을 담당하며 주로 형질세포로 구성되어 있으나 F낭의 B세포와는 관계가 없는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. F낭은 B세포로만 이루어져 있다고 하나 최근에는 T세포 영역이 있음이 밝혀지고 있으며 이것을 “diffusely infiltrated area (DIA)”라 칭하고 있다²⁰⁾.

본 실험의 apoptosis에 대한 염색 결과는 면역장기에 따른 염색의 정도는 차이는 있었으나 전 장기에서 양성반응을 보였다. 흉선에서 최초의 세포괴사는 피질부에서 대식세포를 중심으로 진행되어 “starry-sky appearance”가 관찰되었다. 따라서 B림프구뿐만 아니라 T림프구도 IBDV에 의하여 손상되는 것으로 사료되며 이는 Inoue 등¹¹⁾의 주장과 일치하는 결과이다.

IBDV는 구강 접종시 맹장의 대식세포와 림프구에서 바이러스가 처음 발견되고 간에 이어 혈중으로, 그 다음 F낭을 포함한 다른 림프기관으로 전파되는 것으로 알려져 있다²¹⁾. 안구접종시 하더선에 이어 F낭과 비장에서 검출되는 것으로 알려져 있다²²⁾. 본 실험은 접종 방법상

안구와 총배설강으로 하였기 때문에 조직변화는 거의 동시에 진행되는 양상을 보였다.

국내에서 1980년대 까지만 해도 IBDV에 대해서는 양계농가에게 특별한 문제 제기를 일으키지 않았으나 1990년도에 와서 SH/92와 같은 강독형 IBDV가 출현하여 폐사가 최고 80%에 달하게 되어 이제는 간과할 수 없는 질병으로 대두되고 있다. 일본에서도 1990년에 처음 강독형 IBDV가 서부에 나타나 전국적으로 확산되었고, 이 강독주는 유럽의 강독주에 비하여 폐사는 조금 낮지만 유럽에서부터 전염된 것으로 추정하고 있다. 따라서 국내는 수입되는 닭을 통하여 직접 전파되었거나 가까운 일본에서 전파되었을 것으로 추정된다²³⁾.

본 바이러스의 감염에 대한 예방대책으로는 백신이 가장 좋은 것으로 생각되며, 백신의 종류 선택 외에 모체 이행항체, 적용시기 및 방법 환경적인 요인 등에 관한 사항등을 고려해야 할 것이다. 특히 전염성F낭병 백신은 모체이행항체에 많은 영향을 받기 때문에 모체이행항체 수준에 따른 백신 접종시기를 적절하게 선택되어야 하겠다²⁴⁾.

본 연구는 국내 야외에서 분리된 강독형 IBDV를 접종한 결과 1, 2차 림프기관에 모두 손상을 일으키며, B 림프구 및 T 림프구에 영향을 주어 세포괴사를 일으켰으며 고갈의 기전으로는 세포괴사와 apoptosis가 병행하여 일어남을 관찰할 수 있었다.

결 론

전염성 F낭염의 국내 분리주인 강독형 바이러스 SH/92를 SPF 닭 (3주령)의 총배설강과 안구에 접종한 후 6, 12, 24, 48, 72시간에 각각 림프기관인 흉선, 하더선, 맹장편도, 비장의 병리조직학적 변화를 관찰하였다. 림프기관의 전체적인 특징은 림프구의 고갈이었으며, 접종 후 12시간에 모든 장기에서 세포성 변화가 관

찰되었으며 시간이 경과되면서 림프구의 고갈은 더욱 현저하게 관찰되었다.

흉선의 피질부에는 괴사세포를 탐식하는 대식세포가 증가하였고, 일부 손상된 세포는 핵이 반달모양이나 핵농축을 나타내어 apoptosis와 괴사가 함께 진행됨을 알 수 있었으며 이러한 현상은 TUNEL 염색으로 확인되었다. 하더선, 맹장편도, 비장에서도 림프구의 고갈은 잘 관찰되었다.

따라서 IBDV (SH/92)는 1차 면역기관 뿐만 아니라 2차 면역기관에도 침범하며, 바이러스는 B림프구와 T림프구를 손상시켜 림프구의 고갈을 일으키며, 그 기전으로는 세포괴사와 apoptosis가 동시에 일어나고 있는 것으로 사료된다.

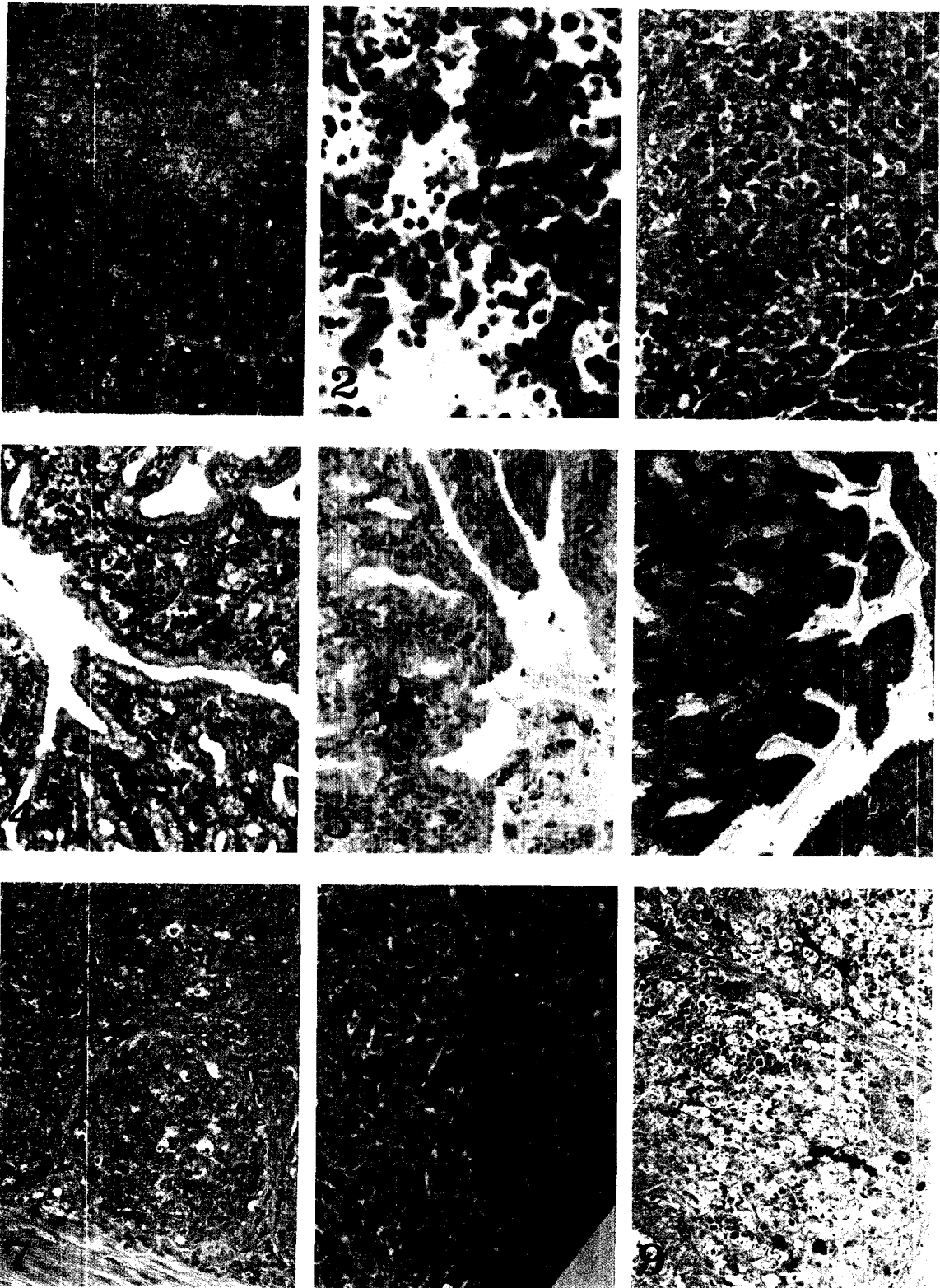
감사의 글

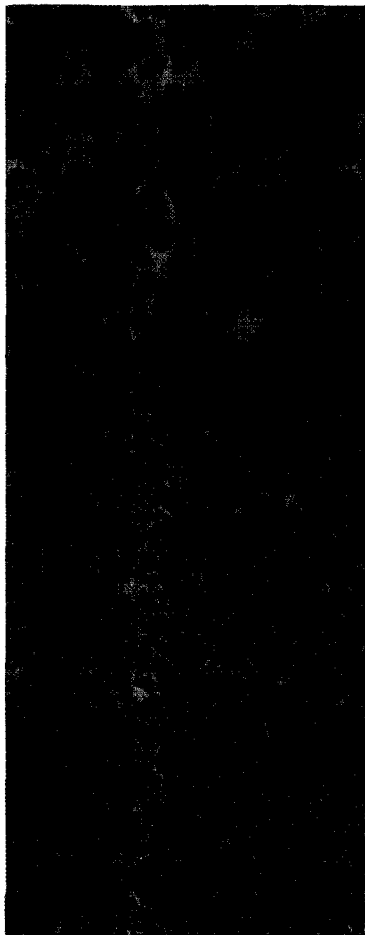
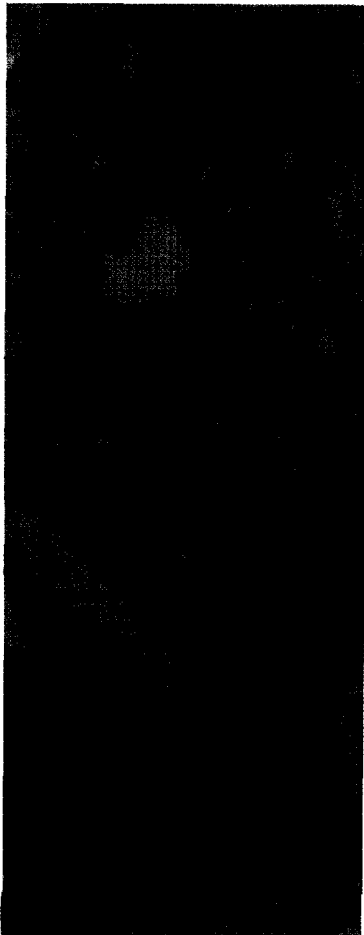
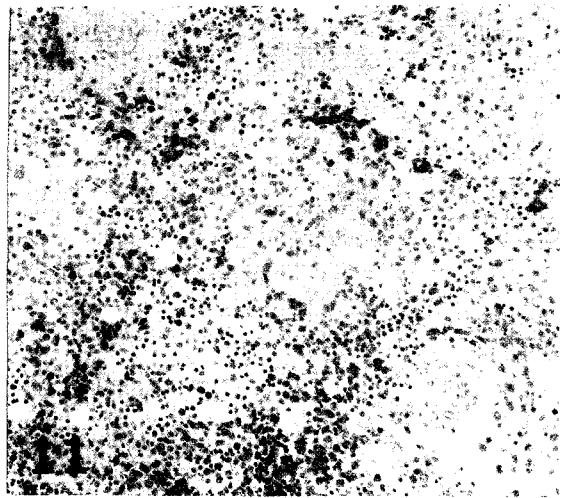
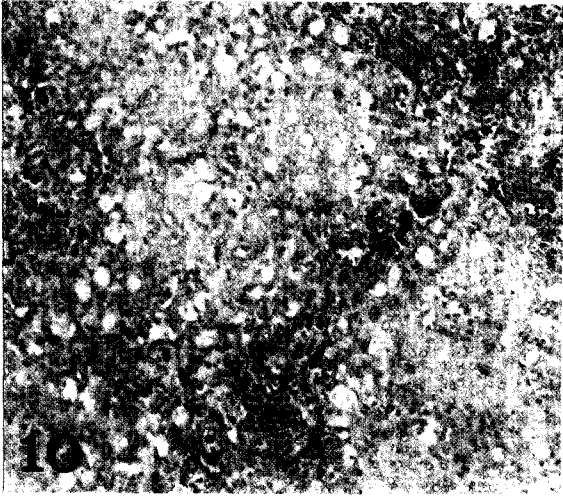
이 논문은 1999년 전북대학교 생체안전성연구소 학술 연구비의 일부지원으로 이루어졌음 (CNU-BSRI, NO 99-11A).

Legends for figures

- Fig 1. Thymus. 24 hrs PI. The number of tingible body macrophages are increased in cortex (starry-sky appearance) and hemorrhage is seen. HE, $\times 100$
- Fig 2. Thymus. 48 hrs PI. Dying cells are characterized either by capping or pyknosis of nuclear chromatin. These are phagocytized by neighboring macrophages in the thymic cortex. HE, $\times 600$
- Fig 3. Thymus. 72 hrs PI. Note the marked depletion of the lymphocytes in the cortex. HE, $\times 400$

- Fig 4. Harderian gland. Plasma cells are infiltrated and densely populated in the uninfected chicken. HE, $\times 200$
- Fig 5. Harderian gland. 24 hrs PI. Plasma cells are necrotized and only a few cells are observed. HE, $\times 200$
- Fig 6. Harderian gland. 96 hrs PI. Note the marked decrease of plasma cell. HE, $\times 100$
- Fig 7. Cecal tonsil. 12 hrs PI. The dying cells are scattered in the follicle and characterized by well defined halo around the cells. HE, $\times 200$
- Fig 8. Cecal tonsil. 24 hrs PI. The heterophils are infiltrated. HE, $\times 400$
- Fig 9. Cecal tonsil. 72 hrs PI. Note the markedly decreased lymphocyte. HE, $\times 200$
- Fig 10. Spleen. 48 hrs PI. There are lymphoid necrosis in the germinal center and periarteriolar lymphoid sheath. HE, $\times 200$
- Fig 11. Spleen. 96 hrs PI. The lymphoid follicles of the white pulp disappear. HE, $\times 200$
- Fig 12. Cecal tonsil. 48 hrs PI. Apoptotic cells are strongly stained with TUNEL, $\times 100$. High magnification of the positive cells is on the top. $\times 600$
- Fig 13. Thymus. 48 hrs PI. Positive cells are scattered in the cortex. TUNEL stain, $\times 200$. High magnification of the positive cells is on the top. $\times 600$
- Fig 14. Harderian gland. 48 hrs PI. Only a few plasma cells are reactive to TUNEL stain. $\times 200$. High magnification of the positive cells is on the top. $\times 600$





참고문헌

1. Cosgrove AS, 1962. An apparently new disease of chickens-avian nephrosis. *Avian Dis* 6 : 385~389.
2. McNulty MS, Saif YM. 1988. Antigenic relationship of non-serotype I turkey infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 32 : 374~375.
3. Hirai K, Calnek BW. 1979. In vitro replication of infectious bursal disease virus in established lymphoid cell lines and chicken B lymphocytes. *Infect Immun* 25 : 964~970.
4. Benton, WJ, Cover MS, Rosenberger JK, et al. 1967. Physicochemical properties of the infectious bursal agent(IBA), *Avian Dis* 11 : 438~445.
5. Snedeker C, Wills FK, Moulthrop IM. 1967. Some studies on the infectious bursal agent. *Avian Dis* 11 : 519~528.
6. Brown F, 1986. The classification and nomenclature of viruses: Summary of results of meetings of the international committee on taxonomy of viruses in Sendai. *Intervirolgy* 25 : 141~14.
7. McFerran JB, McNulty MS, Mckillop ER, et al. 1980. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkey and duck : Demonstration of a second serotype. *Avian Path* 9 : 395~404.
8. Saif Y.M. 1984. Infectious bursal disease virus types. *Proc 19th Natl Meet Poult Health Condemn*. Ocean City, MD, 105~107.
9. Nunoya T, Otaki Y, Tajima M, et al. 1992. Occurrence of acute infectious bursal disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in specific-pathogen-free chickens, *Avian Dis* 36 : 597~609.
10. Kwon YK, Mo IP, Seong HW, et al. 1995. Studies on the pathogenicity of infectious bursal disease virus (SH/92) isolated in Korea. *RDA J Agr. Sci Vet* 37 : 637~647.
11. Inoue M, Fukuda M, Miyano K. 1994. Thymic lesions in chicken infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis*. 38 : 839~846.
12. Jeurissen SHM, Wagennar JMA, Pol AJ, et al. 1992. Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after in vivo infection and of cell lines after in vitro infection. *J Virol* 66 : 7383~7388.
13. Yuasa N, Taniguchi T. 1980. Effect of infectious bursal disease virus infection on incidence of anemia by chicken anemia agent. *Avian Dis* 24 : 202~209.
14. Hinshaw VS, Olsen CW. 1994. Apoptosis : a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J Virol* 68 : 3667~3673.
15. Lam KM, Vasconcelos AC. 1994. Newcastle disease virus induced apoptosis in peripheral blood lymphocyte. *Vet Immuno Immunopath* 44 : 45~56
16. 이희령, 임채웅, 모인필 등. 1998. IBDV (SH/92)에 실험적 감염된 닭에서 림프구의 apoptosis에 관한 연구. *한국수의병리학회* 2 : 1~8.
17. Garrieli Y, Sherman YI, Bensasson BD. 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of

- nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119 : 493~501.
18. Gribel PJ, Ohmann HB, Lawman MJP, et al. 1990. The interaction between bovine herpesvirus type I and activated bovine T lymphocytes. *J Gen Virol* 71 : 369~377.
 19. Eerolar E, Veromaa T, Toivanen P. 1987. Special features in the structural organization of the avian lymphoid system. *Avian immunology: basis and practice*. Crc Press, Inc. Florida, 9~11.
 20. Khan MZ, Hashimoto Y. 1996. An immunohistochemical analysis of T-cell subsets in the chicken bursa of Fabricius during postnatal stages of development. *J Vet Med Sci* 58 : 1231~1234.
 21. Lukert PD, Saif YM. 1991. Infectious bursal disease. *Disease of poultry*. 9th. Wolfe, 721~738.
 22. Kumar A, Rao AT, Amiya K. 1991. Immunofluorescent studies on infectious bursal disease in chickens. *Indian J of Path* 15 : 1, 26~29.
 23. Kenji T, Nobuhiko T, Hiroshi H. et al. 1992. Isolation of virulent infectious bursal disease virus from field outbreaks with high mortality in Japan. *J of Vet Med Sci* 54 : 153~155
 24. 나동균. 1999. 강독 감보로병 중간독 플러스 백신, 아이비디엘의 효능. 양계연구. 99 : 72~75.