

In situ hybridization에 의한 개 디스토펙퍼의 진단

조 현 · 박남용 · 김용환 · 조경오 · 박형선 · 박영석 · 이봉주 · 정치영 · 임형호

전남대학교 수의과대학
(1999년 4월 24일 접수)

Diagnosis of canine distemper by *in situ* hybridization

Hyeon Cho, Nam-yong Park, Yong-hwan Kim, Kyoung-oh Cho, Hyung-seon Park,
Young-seok Park, Bong-joo Lee, Chi-young Chung, Hyung-ho Im

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

(Received April 24, 1999)

Abstract : We have developed the *in situ* hybridization(ISH) technique for rapid diagnosis of canine distemper(CD) which is the major infectious disease in dogs. In our experiment, we rapidly detected distribution of the specific canine distemper viral genome without disrupting morphology of tissues or cells.

Two oligonucleotide probes for ISH were synthesized chemically and labelled 5' end with non-isotopic biotin by DNA synthesizer. The whole procedures of ISH was completed within 1~2 hours using the Microcapillary action system.

On histological study, typical cytoplasmic or intranuclear inclusion bodies were observed in the trachea, bronchiole, brain, and urinary bladder with the presence of prominent red positive signals on ISH, indicating specific CDV genome from the paraffin-embedded tissues of infected 13 cases.

The results showed ISH can be used as a rapid and effective diagnostic method for diagnosis of CD.

Key words : canine distemper, *in situ* hybridization, CD, ISH.

서 론

개 디스토펙퍼(Canine distemper : CD)는 뇌염에 의한 신

경증상과 소화기 및 호흡기 증상이 특징인 질병이고 감수성이 높은 개를 포함하여 야생동물에까지 전세계적으로 발생하고 있는 동물의 가장 중요한 질병이다^{1,2}. 특히 면역형성이 미약한 강아지에서는 급성 뇌염을 유발하여

높은 폐사율을 나타낸다³⁻⁶.

개 디스토펙 바이러스(Canine distemper virus : CDV)는 범조직친화성(pantropism)으로 다양한 병변을 일으키며 감염된 바이러스주에 따라 각종 병원성을 나타낸다^{1,7}. 그리고 CDV는 분변, 타액, 오줌 및 콧물로 배출되며 주로 비말 감염경로로 전파된다^{1,4,7}.

CDV는 불현성 감염이 흔하고 이미 이환되어 임상중상이 발현된 개체에 대해서 효과적인 치료방법이 없기 때문에 예방적인 차원에서 정확한 진단은 매우 중요하다^{1,5,7}.

CD 진단의 혈청학적 기법인 중화항체법⁸은 CDV에 대한 중화항체가를 측정하는 비교적 신속한 진단방법이지만 CDV 접종실험 결과 CDV에 노출된 개의 50% 정도만이 중화항체가를 나타내며⁹ Timoney *et al*⁵은 중화항체의 상승이 수주방어반응으로서 각 개체에 따라 상승정도가 다르며 더욱이 백신을 접종했던 개에서의 상승결과와 혼돈할 수도 있다고 하였다¹⁰.

CDV에 노출된 후 CDV는 림프조직에 전파되어 바이러스 혈증으로 진행된다. 바이러스 혈증이 있는 동안에 체온상승과 백혈구 감소증이 일어나고¹¹ 혈액도말표본에서 적혈구와 백혈구내에 존재하는 봉입체를 확인함으로써 진단에 응용할 수 있다^{12,13}. 그러나 CDV 감염후 10일 이전에 봉입체가 림프조직에서 소실되고 CDV는 다른 장기의 상피세포로 전파되기 때문에 말초혈액도말표본에서 봉입체의 확인은 매우 어렵다¹.

CD의 진단을 위하여 혈액화학치 검사, 방사선 촬영법, 뇌척수액 분석법 그리고 뇌파검사 등이 이용되기도 하나 이는 단순히 보조적인 방법으로서 정확한 진단을 내리기에는 부족하다¹⁴⁻¹⁶.

윤 등¹⁷은 면역형광항체법을 이용하여 CD의 항체가를 측정하였으며 Guy *et al*¹⁸은 이 방법이 뇌척수액, 혈액, 골수 그리고 호흡기 상피세포 등 다양한 시료를 이용할 수 있는 진단방법이라고 하였다. 하지만 Timoney *et al*⁵은 중화항체가 생성된 후에 채취된 시료에서는 위음성반응이 나타날 수 있고 이에 오줌을 이용한 상피세포의 면역형광항체법의 응용에서 Brown *et al*¹⁹은 감염초기에만 진단이 가능하다고 했다. 게다가 비특이적 반응이 많기 때문에 정확한 결과를 판독하기 위해선 전문가의 판독이 요구된다¹⁷. 그러므로 CD를 진단하기 위하여 일반적인 병리조직학적 관찰에 의한 상피세포에서의 세포질 내 혹은 핵내 봉입체를 확인하는 방법이 가장 선호되고

있다^{5,20}. 그러나 정확한 진단을 하기 위해서는 CDV를 감염조직에서 분리·배양하거나²¹ 전자현미경을 이용하여 바이러스 입자를 직접 관찰하여야 한다²². 그러나 CDV는 특히 혈액이나 오줌을 이용한 분리·배양이 어렵고⁵ 이들 모든 과정을 실행하여 결과를 판독하기까지는 최소 일주일 이상의 시간이 소요되기 때문에 신속한 진단 방법으로서의 응용은 전혀 이루어지지 않고 있다.

최근 유전자 수준의 다양한 분자생물학적 기법이 개발되었고 의학분야에서도 진단과 치료를 위하여 이미 응용되고 있다²³. 분자생물학적 기법중의 하나인 *in situ* hybridization 기법은 인위적인 유전자 추출과정없이 조직의 형태학적 구조를 유지한 채로 특이 유전자를 검출하는 방법으로서 특히 감염성 질환의 진단에 유용한 방법으로 인정되었다²⁴.

본 연구의 목적은 CDV에 감염된 조직을 대상으로 하여 *in situ* hybridization 기법을 응용함으로써 조직이나 세포내에 분포하고 있는 CDV의 특이 유전자를 1-2시간 이내에 검출하여 신속하고 정확한 진단기법을 개발할 수 있도록 하기 위함이다.

재료 및 방법

조직의 준비 : 1984년부터 1994년까지 전남대학교 수의과대학 병리학교실에서 병리조직검사에 의해 CD로 진단되었던 자연발생 13례를 이용하였으며 다른 질병으로 확진된 4례를 음성대조군으로 이용하였다.

부검시 채취한 조직은 포르말린 고정후 파라핀 포매하여 마이크로톰을 이용하여 5-6 μ m의 조직절편을 제작하였다. 조직절편은 실험중에 탈락되지 않도록 poly-L-lysine이 처리된 Probe-On plus slide(Fisher BiotechR)에 고정하여 실온에 보관하였다.

Oligonucleotide probe의 제작 : CDV(Onderspoort주)의 full gene(Sidu *et al*)의 viral protein gene을 참고로 하였다²⁵. Nucleocapsid protein gene(NP gene) 부위와 Large gene(L gene)은 CDV의 전사와 복제에 중요한 유전자이다²⁶. Virulent주와 attenuate주의 NP gene 일치부위²⁷에 속하는 CDV 염기서열 161~200 부위와 다른 paramyxovirus와 rhabdovirus의 L gene이 겹치지 않는 부위중 염기서열 620~639 부위²⁶에 상보적으로 작성하여 각각 40mer의 oligonucleotide probe를 제작하였다(Table 1). Probe는 한국바이오니아(주)에 의뢰하여 DNA synthesizer로 합성하

Table 1. Sequence of biotinylated oligonucleotide probes

Probes	Sequences
Probe for NP gene	5'-TTACACAATCAGAGATCCCTGGAACATACATAATAACTGG-3'
Probe for L gene	5'-GGGAGAACGGAGACCGAGGCCCCCTCGTAGTTCTCCTTAT-3'

였으며 Biotin-labelled phosphoamidite를 이용하여 5'-end labelling 하였다.

합성된 probe는 polypeptide agarose 전기영동장치(PAGE)에 의해서 정제하였고 흡광광도계를 이용하여 흡광도(optical density : OD) 260nm에서 probe의 양을 측정 한 후 Tris-EDTA buffer로 100pmole/μl이 되게 희석하였다.

희석한 probe는 -20℃에서 보관하였고 *in situ* hybridization 적용직전에 hybridization cocktail로 1pmole/μl이 되게 희석하여 사용하였다.

In situ hybridization : *In situ* hybridization의 모든 과정은 Park *et al*²⁸의 방법을 변형하여 실행하였다. 두 장의 Probe-On plus slide를 맞대어 생긴 틈 사이로 적은 양의 시약이 흡수되어 반응하도록 하였다. 그 다음 흡수성이 좋은 pad 위에 슬라이드를 놓아 반응하고 남은 시약이 쉽게 제거되도록 하여 ISH의 모든 과정을 1~2시간 내에 끝마쳤다.

두 장의 Probe-On plus 슬라이드를 서로 맞대어 슬라이드 홀더에 고정시키고 Histochoice™ clearing agent 1X (AmrescoR)를 흡수하여 110℃에서 2분동안 반응을 5회 반복하였다. 100% 에탄올에서 3번씩 2회 반복하여 세척하였다.

Pepsin(Research Genetics 750102)을 110℃에서 2분동안 반응시켜 probe의 투과성을 증가시켰으며 Prehybe plus (Research Genetics 750124)를 110℃에서 3분동안 반응시킨 후 흡수 pad를 이용하여 반응하고 남은 시약을 제거하였다. 다음 oligonucleotide probe(40mer)를 적용하여 110℃~85℃ 범위에서 변성과 재결합을 반복시켜서 probe와 특정 유전자가 단계적으로 annealing 되도록 하였다.

Posthybe wash(2X SSC, Research Genetics 750125)로 5초동안 4회 세척하였다. 그리고 Auto blocker(Research Genetics 750110)로 2회 세척하여 내인성 peroxidase의 활성을 억제하여 바이오틴과의 비특이적인 결합을 차단하였다.

바이오틴에 항원-항체 결합처럼 효과를 발현하는 streptavidin-alkaline phosphatase(Research Genetics 750144)를 흡

수하여 50℃에서 10분동안 반응시킴으로써 특정 유전자와 결합하고 있는 바이오틴이 표지된 probe에 결합되도록 하였다.

Probe lock(Chromogen enhancer, Research Genetics 750148)을 반응시킴으로써 alkaline phosphatase의 결합력을 증가시켰다. Red signal을 나타내는 발색제로 stable fast TR salt and naphthol phosphate(Research Genetics 750152)를 반응시키기 바로 전에 각각 75μ씩 혼합하여 50℃에서 10분 동안 2회 반응시켜 적색의 양성반응이 증가되도록 하였다.

다음 Auto wash(Research Genetics 750108)로 2회 세척하여 조직염색과정 중에 잔류된 모든 시약을 제거하였다.

Auto hematoxylin(Research Genetics 750107)를 반응시킨 후 3차 증류수로 4번 세척하였다. 1X Immuno/DNA buffer로 1회 세척한 후 다시 증류수로 2번 세척하였고

Table 2. Detection of specific CHV nucleic acid by *in situ* hybridization and distribution of canine distemper inclusion bodies

Sample	No ^a . of total samples	No. of IB ^b detection	No. of ISH ^c positive
Brain	11	2	10
Urinary bladder	8	6	8
Lung	10	2	8
Trachea	6	4	6
Kidney	5	0	3
Heart	3	0	2
Liver	3	0	2
Stomach	1	1	1
Intestine	3	0	1
Spleen	1	0	1

^aNo : Number.
^bIB : Inclusion body.
^cISH : *In situ* hybridization.

조직이 마르지 않도록 2~3방울의 수용성 Crystal/Mount (Biomedica M-02)를 점적하여 마운팅한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

Control : 음성대조군으로 혈청학적 검사에서 음성이며 임상소견과 병리조직학적 소견상 CDV에 감염되지 않은 것으로 판정된 개 3마리의 정상조직을 10% 중성 포르말린에 고정한 후 파라핀 포매한 조직절편을 target tissue와 함께 동일한 방법으로 *in situ* hybridization을 함께 실시하여 발색반응을 서로 비교하였다.

양성대조군으로는 Alu I/II를 probe로 이용하여 *in situ* hybridization에 적용하여 양성반응과 발색을 비교하였다.

결 과

병리조직학적 관찰 : CD 감염시 뇌, 기관지, 폐의 세기관지와 방광은 봉입체가 관찰되는 주요 장기였다(Table 3). Hematoxylin & eosin 염색한 조직을 광학현미경으로 관찰한 결과 봉입체는 총8례의 방광중 6례에서 봉입체가 관찰되어 가장 높은 봉입체 관찰빈도수를 보였다.

기관지 상피세포(4예), 세기관지 상피세포(2예)에서도 봉입체가 관찰되었으나 뇌에서 봉입체가 관찰된 예는 2예에 불과하였다.

뇌 신경세포에서 봉입체가 관찰된 예는 적었으나 CD의 소견인 혈관주위 단핵세포침윤, 신경교세포증, 탈수초화가 많이 관찰되었다.

폐에서는 CDV에 의한 면역억압으로 2차적 세균감염이나 바이러스 자체에 의한 것으로 인정되는 간질성 폐렴소견이 관찰되었고 폐포벽의 비후와 폐포내에 염증세포의 침윤이 관찰되었다.

신장, 장관 상피세포와 심근에서의 특이한 소견은 관찰할 수 없었다(Table 3).

In situ hybridization : 일상적인 병리조직학적 관찰시, 봉입체가 관찰되는 장기와 일치하여 CDV 핵산의 존재를 나타내는 강한 적색의 양성반응을 확인하였다(Table 3). CD에 감염되지 않은 정상조직의 *in situ* hybridization 결과는 적색의 양성반응을 확인할 수 없었다(Fig 1).

CD의 주된 감염경로인 상부호흡기계의 기관지 상피세포와 삼출물과 함께 혼재되어 있는 탈락된 기관지 상피세포의 세포질과 핵에서도 거친 과립상의 적색 양성반응을 확인하였다(Fig 2).

폐의 세기관지 상피세포에서 양성반응이 확인되었고

세기관지강내에 탈락된 세기관지 상피세포에서 양성적색반응이 있었다(Fig 2). 간질성 폐렴에 의해 비후된 폐포벽의 제II형 폐포상피세포와 폐포대식세포에서도 적색의 양성반응을 확인하였다.

병리조직학적 관찰시 봉입체가 가장 많이 관찰되었던 방광 상피세포에서 광범위한 강한 적색의 양성반응을 확인하였다(Fig 3).

뇌 신경세포의 양성반응은 거친 적색을 보이며 회백질과 백질 부위의 신경세포에서 광범위하게 확인되었으나 주로 백질 부위보다 회백질 부위의 신경세포에서 광범위한 양성반응을 확인하였다(Fig 4). 그러나 뇌연화증 병변에서는 적색의 양성반응은 확인할 수 없었으며 매우 미약하였다.

심장에서는 병리조직학적 소견상 심근의 변성이나 피사소견은 없었으나 심근의 혈관주위에서 양성적색반응이 강하게 관찰되었다(Fig 5).

간에서는 주로 증식된 Kupffer 세포의 세포질과 핵내에서 양성적색반응이 확인되었고(Fig 6) 비장 림프소절의 림프구계 세포들에서 광범위한 양성반응을 확인하였다.

위에서는 위선의 벽세포와 주세포를 포함하여 위저부와 경부의 위선 상피세포에서 고르게 양성반응이 관찰되었다(Fig 7). 그리고 소장 상피세포에서도 강한 적색의 양성반응을 확인하였다.

신장에서는 피질 부위의 신사구체에 근접해있는 근위세뇨관 상피세포(Fig 8)와 신우부위의 원위세뇨관 상피세포에서 양성반응(Fig 8)이 확인되었다.

고 찰

Southern blotting, dot blotting 그리고 polymerase chain reaction(PCR) 같은 기법들은 조직의 형태학적인 구조를 유지한 채 바이러스의 검출이 불가능하지만³³ 전자현미경적 관찰이나 면역조직화학기법 및 *in situ* hybridization (ISH) 기법은 조직의 균질화로 RNA나 DNA를 추출하지 않고서도 진단에 응용할 수 있다^{25,29}.

CD의 진단을 위하여 다양한 시료를 이용할 수 있는 면역조직화학기법은 조직에도 적용할 수 있으나 비특이적 반응이 많기 때문에 숙련자의 판독이 필요하고¹, 전자현미경적 연구는 시료의 제작시간이 많이 걸릴 뿐만 아니라 고가의 장비에 많은 경비가 소요되는 단점이 있다.

혈청학적 진단방법으로 이용되고 있는 중화항체법⁶과 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)의 경우 백신에 의한 위양성반응이 일어날 수도 있고 심급성 경과시에는 위음성으로 진단되는 경우도 있다³⁰.

이러한 점에서 probe를 이용하는 ISH 기법은 급속하게 발전하였으며 감염성 질환의 진단을 위해 최근 이용되고 있다. ISH는 다양한 시료를 이용할 수 있고 초심자도 쉽게 응용할 수 있다는 장점이 있으며²⁴ Oglesbee *et al*³¹도 vero cell 배양 실험을 통하여 CD 진단에 이용되고 있는 면역형광항체법보다 cDNA probe의 이용이 더 우수한 검출방법일 것이라고 하였다.

현재까지 CD의 확정적인 진단은 바이러스를 분리하거나 병리조직학적 관찰에 의한 세포질 또는 핵내 봉입체를 관찰하는 방법이 선호되고 있다^{5,20}.

봉입체는 바이러스 복제과정중에 생성되는 바이러스 단백질형원의 복합체인데 Richter와 Moize³²는 CDV의 nucleocapsid protein이 세포질내 봉입체의 주된 구성성분이라 하였다. 또 CDV에 감염된 뇌병변에서 관찰되는 함포체는 바이러스의 융합단백질에 의한 것으로서 진단에 응용할 수 있었다고 했으나³³ CDV 점종실험에서 함포체의 관찰은 매우 드물었다고 했다³⁴.

CDV는 림프구계 세포에 의해 전신으로 전파되며 그 결과 심근과 신장의 사구체 상피세포에서도 ISH에 의해서 CDV의 양성반응이 관찰되었던 것으로 사료된다. Higgins *et al*³⁵은 CDV가 심근의 괴사를 초래한 예를 보고하였고 Jubb *et al*⁶은 심근의 병변은 미약한 변성소견만이 드물게 관찰될 수 있다고 하여 서로 차이가 있었으나 심근에서도 ISH 결과 적색의 양성반응을 확인할 수 있었던 것으로 보아 CDV가 심근에 병변을 유발할 수 있다는 결론에 일치하였다.

바이러스 혈증시에는 혈액도말표본의 적혈구와 림프구의 세포질내 봉입체가 관찰되기도 하지만 감염초기에만 유용하다^{12,13}. 특히 Axthelm *et al*¹¹은 CDV에 의한 혈소판 감소증시 간의 Kupffer 세포에 의한 혈소판 탐식현상이 일어난다고 하였으며 혈소판 표면에 부착된 바이러스와 항체의 면역복합체가 간의 Kupffer 세포에 탐식된 것을 확인할 수 있는 적색의 양성반응이 관찰되었다.

바이러스 봉입체는 뇌를 포함하여 기관지, 방광 및 폐의 세기관지 상피세포에서 관찰된다. 본 연구에서 각 장기별 봉입체 관찰빈도는 방광에서 가장 높았으며 이러한 봉입체의 분포와 관찰정도는 CD 질병의 경과, CDV

strain의 차이 때문에 다르게 나타날 수 있다^{6,20}. 그리고 주로 뇌 신경세포에서 특이하게 관찰되는 핵내 봉입체를 Oglesbee와 Krakowka³⁶는 cellular stress response로 인해 viral N protein이 핵내로 이동된 결과라고 설명하였다.

본 실험에 이용된 자연감염 CD 13례에서는 방광 이행상피세포에서 봉입체가 많이 관찰되었는데(6례) 급성 CD 감염증례 이외에는 이행상피세포의 탈락으로 봉입체 관찰은 어렵다고 한 바²⁰ 본 연구에 이용된 자연감염 개의 연령이 4개월령 이하가 9예로 대부분을 차지했던 것을 고려해볼 때 이들 모두가 급성 감염이 대부분이었을 것으로 생각된다.

반면 뇌 신경세포에서는 봉입체 관찰은 적었으나 ISH 적용결과, 뇌의 백질과 회백질의 신경세포에서도 광범위한 양성반응에 의해 CDV 핵산을 확인하였다.

Jubb *et al*⁶은 CDV가 직접적으로 간질성 폐렴을 일으키고 2차적인 감염에 의해 기관지 폐렴이 속발한다고 하였으며 세기관지 상피세포, 폐포벽의 제II형 폐포 상피세포, 폐포 대식세포 등에서 양성반응을 관찰하였다. 이러한 기관지 폐렴은 주 감염경로인 상부호흡기계에 CDV가 전파된 후 기타 세균에 의한 혼합감염의 결과이며 이와는 달리 간질성 폐렴은 바이러스 혈증으로 CDV가 전파되었기 때문이라 생각된다. 그러나 본 연구에 이용된 총10례의 폐조직중 8례만이 ISH 적용결과에서 적색의 양성반응을 나타낸 것은 채취된 부위가 2차적 세균감염만이 있었거나 CDV가 바이러스 혈증을 통해 폐포 상피세포에 아직 도달하지 않았던 것으로 생각된다.

최근에는 생물학의 한 분지로서 출발한 분자생물학의 큰 진보에 의해 다양한 기법들이 개발되었으며 핵산, 즉 유전자 수준에서의 진단이 가능하게 되었다²⁵.

그중 ISH 기법과 면역조직화학기법은 시료의 형태를 변화시키지 않으며 감염성 질환의 원인체를 직접적으로 검출할 수 있다. Nuovo *et al*³⁷은 중성 포르말린이 핵산을 변성시키지 않고 잘 노출시킨다고 했으며 중성 포르말린 고정후 파라핀 조직을 이용할 수 있는 ISH 기법에 매우 유용하다고 했다.

Gillespie³⁸는 ISH시 특이 핵산과 probe의 상보적인 결합은 면역조직화학기법의 항원-항체 결합보다 강하고 특이적인 결합을 한다고 했고, 박 등²⁴은 유전자 전사가 되지 않아 단백질이 생산되지 않은 경우에는 면역조직화학기법으로는 검출하기가 어렵다고 하였다.

ISH에 있어서 가장 중요한 것은 특정 유전자의 존재

를 확인시켜 주는 probe이다. 본 실험에서는 비방사성 물질인 바이오틴을 표지한 합성된 2개의 oligonucleotide probe를 사용하여 민감도를 높였다. Probe의 선택부위인 NP gene과 L gene은 CDV의 복제와 증폭에 중요한 부위로서 Kimoto³⁹는 N protein이 감염된 뇌와 폐조직에 풍부하다고 하였으며 이에 일치하여 본 실험에 이용된 급성 감염폐의 뇌 10례와 폐의 세기관지 8례에서 모두 강한 양성반응을 확인하였다.

Zurbriggen *et al*⁴⁰은 회돌기아교세포(oligodendrocyte) 배양에서 CDV 핵산은 분포했지만 CDV 단백질의 생성은 되지 않았다고 했다. 그래서 본 실험결과와 봉입체 관찰횟수와 ISH 양성반응 결과의 차이는 CDV 증폭과정 중에 CDV의 핵산은 분포하고 있었지만 바이러스 봉입체의 주된 구성물질인 바이러스 단백질이 매우 적게 존재하여 병리조직학적 소견상 관찰할 수 없었기 때문으로 생각된다.

Oligonucleotide probe 이외에 cDNA probe와 riboprobe가 있으며 방사성 물질에 비해 경제성, 신속성 및 지속성이 우수한 비방사성인 바이오틴으로 표지하였다. 비방사성 물질의 표지는 세포 한 개당 바이러스 핵산의 800 copy를 검출한다고 추정하였으나 Burns *et al*⁴¹은 바이오틴 표지한 probe를 이용하여 세포 한 개당 10 copy의 바이러스 핵산을 검출할 수 있다고 하여 잠복감염이나 지속감염에 대한 바이오틴 표지 probe를 이용한 ISH의 진단적 유용성을 시사하였다.

그러므로 병리조직학적 관찰에 의해 진단되었던 CD

자연발생 13례를 microcapillary action system 하에서 ISH 기법에 응용한 결과 이 기법이 1~2시간 이내에 끝마칠 수 있는 신속하고 정확한 진단방법으로 응용될 수 있을 것으로 사료된다. 특히 봉입체가 주로 관찰되는 방광, 기관지 상피세포, 폐의 세기관지 상피세포, 뇌 등에서 ISH 결과 적색의 양성반응이 잘 나타난 것으로 보아 이들 장기조직에의 ISH 기법 적용은 CD진단에 유용할 것이다.

결 론

병리조직학적 소견상 세포질내 혹은 핵내 봉입체를 관찰함으로써 CD로 진단되었던 자연발생 총13례의 조직을 대상으로 microcapillary action system 하에서 비방사성 물질인 바이오틴으로 표지된 2개의 oligonucleotide probe를 활용하여 ISH를 실시한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 상부호흡기계인 기관지 상피세포, 방광의 이행상피세포, 뇌의 신경세포, 위의 위선을 구성하는 주세포와 벽세포를 포함한 상피세포, 소장 상피세포, 심근과 신장의 신사구체 상피세포와 신세뇨관 상피세포 그리고 비장에서 광범위한 적색의 양성반응을 확인하였다.

2. 비방사성 물질인 바이오틴을 표지하여 합성한 oligonucleotide probe(40mer)를 이용하여 조직의 세포형태를 그대로 보존하면서 CDV의 감염여부와 그 분포를 확인함으로써 파라핀 블록으로부터 1~2시간 이내에 개 디스토프를 신속, 정확하게 진단할 수 있는 기법을 개발하였다.

Legends for figures

Fig 1. No red pigmentation. Negative control for *in situ* hybridization(ISH). Top: stained normal epithelium of the bronchiole in the lung. Bottom: Intestinal epithelium. × 400.

Fig 2. Rough red color indicated specific canine distemper nucleic acid in the cytoplasm and nucleus of the tracheal epithelium by ISH(Top). × 400. Rough red pigmentations suggesting specific viral genes in the nucleus and rarely cytoplasm of the bronchiolar epithelium in the lung(Bottom). ISH. × 400.

Fig 3. Red positive pigmentation in the epithelial nucleus and cytoplasm of the urinary bladder. ISH. × 400.

Fig 4. Marked rough-red positive signals in the neuron of gray mater in the brain. ISH. × 400.

Fig 5. Rough red positive signals showed nucleic acid of CDV in the cytoplasm and nucleus of myocardial cells around the blood vessel(arrow). ISH. × 400.

Fig 6. Multifocal red positive pigmentations indicating specific CDV nucleic acid in the Kupffer cells. ISH. × 400.

Fig 7. Red signal was in the gastric epithelium of stomach. Longitudinal section. ISH. × 400.

Fig 8. Red positive signals suggesting canine distemper viral genome in the glomerular(Top) and epithelial cells of the renal pelvis (Bottom). ISH. × 400.

참 고 문 헌

1. Shell LG. Canine distemper. *Compend Cont Ed*, 12: 173-179, 1990.
2. Cheville NF. Canine distemper In *Ultrastructural pathology, An introduction to interpretation*, 1st ed, Iowa State University Press:540-541, 1994.
3. Mori T, Shin YS, Okita M, *et al*. The biological characterization of field isolates of canine distemper virus from Japan. *J Gen Virologi*, 75:2403-2408, 1994.
4. 성승규, 서일복. 개 디스탬퍼 바이러스에 감염된 장기병변의 병리조직학적 관찰 및 조직내 항원분포 조사에 관한 연구. *Korean J Vet Res*, 36:405-415, 1996.
5. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, *et al*. The paramyxoviridae In Hagan and Bruner's microbiology and infectious disease of domestic animal. 8th ed, Comstock Publishing Associates:790-804, 1988.
6. Jubb KV, Kennedy PC, Palmer N. Canine distemper In *Pathology of domestic animals*, 4th ed, Academic Press INC:617~624, 1993.
7. 최정옥. 개 디스탬퍼(Canine Distemper : CD). *J Korean Vet Med*, 26:518-523, 1990.
8. Cook SD, Dowling PC, Russell WC. Neutralizing antibodies to canine distemper and measles virus in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 41:61-70, 1979.
9. Appel MJG, Gillespie JH. Canine distemper virus In *Viral Monogr II*. New York, Springer Verlag:1-96, 1972.
10. Black JW. Single serum sample diagnosis of canine distemper disease. *Vet Med and small animal clinician* :1393~1396, 1983.
11. Axthelm MK, Krakowka S. Canine distemper virus-induced thrombocytopenia. *Am J Vet Res*, 48:1269-1275, 1987.
12. Cello RM, Moulton JE, McFarland S. The occurrence of inclusion bodies in the circulating neutrophils of dogs with canine distemper. *Cornell Vet Med*, 49:127-146, 1959.
13. Gossett KA, MacWilliam PS, Fulton RW. Viral inclusions in hematopoietic precursors in a dog with distemper. *J Am Vet Med Assoc*, 181:387-388, 1982.
14. Weisbrode SE, Krakowka S. Canine distemper virus-associated hypocalcemia. *Am J Vet Res*, 40:147-149, 1979.
15. Kealy JK. Canine distemper In *Diagnostic radiology of the dog and cat*, 2ed, Philadelphia WB Saunders Co:201-203, 1990.
16. Cutler RWP, Averill DR. Cerebrospinal fluid gamma-globulins in canine distemper encephalitis. *Neurol*, 19: 1111-1114, 1969.
17. 윤기복, 강문일, 박남용 등. 간접형광항체법에 의한 개 바이러스-canine distemper virus, canine parvovirus, canine adenovirus type-2, canine parainfluenzavirus-항체분포 조사. *Korean J Vet Res*, 35:75-85, 1995.
18. Guy JS. Diagnosis of canine viral infections. *Vet Clin North Am*, 16:1148-1149, 1986.
19. Brown RAL, Morrow A, Heron I, *et al*. Immunocytological confirmation of a diagnosis of canine distemper using cells in urine. *J Small Animal Practice*, 28: 845-851, 1987.
20. Dobos-Kovacs M. Studies on the diagnostic value of cell inclusions in canine distemper. *Acta Vet Acad Sci Hung*, 25:185-200, 1975.
21. Metzler AE, Krakowka S, Axthelm MK, *et al*. *In vitro* propagation of canine distemper virus: establishment of persistent infection in vero cell. *Am J Vet Res*, 45:2211-215, 1984.
22. Confer AW. Comparison of canine distemper viral strains: An electron microscopic study. *Am J Vet Res*, 52:287-231, 1975.
23. 박순희, 권두환. 핵산 탐침을 이용한 감염성 질병의 진단. 제2회 산학연 심포지움 논문집(한국생화학회), 21-34, 1995.
24. 박창수. *In situ* hybridization을 이용한 mRNA의 검출. 대한내분비학회 추계학술대회 심포지움(별책): S23-25, 1992.
25. Sidhu MS, Husar W, Cook S, *et al*. Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequence. *Virology*, 193:66-72, 1993.
26. Sidhu MS, Menonna JP, Cook SD, *et al*. Canine

- distemper virus L gene sequence and comparison with related viruses. *Virology*, 193:50-65, 1993.
27. Stettler M, Zubriggen A. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the nucleocapsid protein of the virulent A75/17-CDV strain of canine distemper virus. *Vet Microbiol*, 44:211-217, 1995.
 28. Park CS, Manahan JM, Brigati DJ. Automated molecular pathology: one hour *in situ* DNA hybridization. *J Histotechnol*, 14:219-29, 1991.
 29. Weiss LM, Chen YY. Effect of different fixatives on detection of nucleic acids from paraffin-embedded tissues by *in situ* hybridization using oligonucleotide probes. *J Histochem Cytochem*, 39:1237-1242, 1991.
 30. Bernard SL, Shen DT, Gorham JR. Antigen requirements and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of canine IgG against canine distemper viral antigen. *Am J Vet Res*, 43:2266-2269, 1982.
 31. Oglesbee M, Jackwood D, Perrine K, *et al.* *In vitro* detection of canine distemper virus nucleic acid with a virus-specific cDNA probe by dot-blot and *in situ* hybridization. *J Virol Methods*, 14:195-211, 1986.
 32. Richter WR, Moize SM. Ultrastructural nature of canine distemper inclusions in the urinary bladder. *Vet Pathol*, 7(4):346-352, 1970.
 33. Summers BA, Appel MJC. Syncytia formation: an aid in the diagnosis of canine distemper encephalitis. *J Comp Pathol*, 95:425-435, 1985.
 34. Palmer DG, Huxtable CRR, Thomas JB. Immunohistochemical demonstration of canine distemper virus antigen as an aid in the diagnosis of canine distemper encephalitis. *Res Vet Sci*, 49:177-181, 1990.
 35. Higgins RJ, Krakowka S, Metzler AE, *et al.* Canine distemper virus-associated cardiac necrosis in the dog. *Vet Pathol*, 18:472-486, 1981.
 36. Oglesbee M, Krakowka S. Cellular stress response induces selective intranuclear trafficking and accumulation of morbillivirus major core protein. *Lab Invest*, 68:109-117, 1993.
 37. Nuovo GJ, Richart RM. Buffered formalin is the superior fixative for the detection of HPV DNA by *in situ* hybridization analysis. *Am J Pathol*, 134:837-842, 1989.
 38. Gillespie D. The magic and challenge of DNA probes as diagnostic reagents. *Vet Microbiol*, 217-233, 1990.
 39. Kimoto T. *In vitro* and *in vivo* properties of the virus causing natural canine distemper encephalitis. *J Gen Virol*, 67:487-503, 1986.
 40. Zubriggen A, Yamawaki M, Vandeveld M. Restricted canine distemper virus infection of oligodendrocytes. *Lab Invest*, 68:277-284, 1993.
 41. Burns J, Graham AK, Frank C, *et al.* Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic *in situ* hybridization. *J Clin Pathol*, 40:858-964, 1987.