

<원 저>

새로운 국내 분리 토끼출혈병바이러스(RHDVa)를 감염시킨 토끼에 서의 경시적인 병리학적 변화와 조직 내 바이러스 항원 분포

박중원¹ · 전지은¹ · 양동균¹ · 박은정² · 김 한¹ · 이명현¹ · 황의경³ · 이종복⁴ · 우계형^{5,*}

¹농림수산검역검사본부, ²연세대학교 치과대학, ³상지대학교 동물자원학과,

⁴건국대학교 수의학과, ⁵세명대학교 임상병리학과

(접수: 2012년 5월 11일, 수정: 2012년 6월 20일, 게재승인: 2012년 6월 21일)

Sequential pathologic changes and viral distribution in rabbits experimentally infected with new Korean strain of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDVa)

Jung-Won Park¹, Ji-Eun Chun¹, Dong-Kun Yang¹, Eun-Jung Bak², Han Kim¹, Myeong-Heon Lee¹,
Eui-Kyung Hwang³, Chung-Bok Lee⁴, Gye-Hyeong Woo^{5,*}

¹Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, Anyang 430-757, Korea

²Oral Cancer Research Institute, College of Dentistry, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

³Department of Animal Science, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

⁴Department College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

⁵Department of Clinical Laboratory Science, Semyung University, Jecheon 390-711, Korea

(Received: May 11, 2012; Revised: June 20, 2012; Accepted: June 21, 2012)

Abstract : Rabbit hemorrhagic disease is a highly acute and fatal viral disease caused by rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV). Since first outbreak in Korea 1987, RHDV has been continually affected in the country, but the pattern of outbreak seem to be changed. In this study, to understand the pathogenesis of the new RHDVa serotype, we therefore carried out to inoculate RHDVa to rabbits, and to examine the sequential histopathologic changes and viral distribution. Macroscopically, various sized dark red or white spots or appearance were observed in the liver, lung, kidney uterus and ureter. In euthanized rabbits, significant pathologic findings such as infiltration of heterophils and mononuclear cells were observed at 24 hours after inoculation (HAI), and these were sequentially extended periportal to centrilobular area. However, in dead rabbits, severe hepatic degeneration and/or necrosis with relatively weak inflammatory responses were observed. RHDV antigens began to detect in liver, spleen, and lung from 12 HAI by PCR. Immunohistochemically, RHDV positive cells were seen in only liver from 24 HAI, and the degree of immunogen reactivity was stronger in dead rabbits than in euthanized ones. In conclusion, RHDVa caused the subacute or chronic infection accompanying low mortality and moderate to severe inflammatory reaction in rabbits, suggesting the possibility that RHD could become endemic.

Keywords : chronic infection, histopathologic changes, new RHDVa serotype, rabbit hemorrhagic disease, viral distribution

서 론

토끼 출혈병 바이러스(Rabbit Hemorrhagic Disease

Virus; RHDV)는 *Caliciviridae*과의 *Lagovirus*속에 속하는 전염성이 매우 강한 바이러스로 RHDV에 감염된 개체는 24시간에서 48시간 이내 급성 괴사성간염과 폐를 포

*Corresponding author

Tel: +82-43-649-1539, Fax: +82-43-649-1537

E-mail: ghwoo@naver.com

합하는 여러 장기와 조직에 출혈성 병변을 나타나는 것으로 보고되었다 [12, 16]. 토끼는 이로 인해 운동실조, 식욕저하, 비강의 출혈 등의 임상증상을 보이다가 갑작스럽게 폐사하는 것이 특징이며 폐사율이 60~90%에 달하는 것으로 알려져 있다 [2].

RHDV는 1984년 중국에서 처음으로 발견되었고 발병된 토끼는 독일에서 수입된 번식군의 개체에서 시작된 것으로 알려졌다 [2]. RHDV는 중국에서 첫 발생 보고 이후에 급속도로 전세계적으로 확산되어 아시아를 포함하여 아프리카, 유럽 및 아메리카 대륙의 많은 국가에서 보고되었다 [2, 5, 12]. 특히 이 바이러스는 특성상 환경에 매우 안정하고 전염성이 높을 뿐만 아니라 직접전파 및 모피, 의복, 케이지 등에 의한 간접전파에 이르기까지 다양한 전파경로를 보였다 [5]. 또한, RHDV는 우리나라를 포함하는 중국, 유럽, 모로코, 쿠바, 호주 및 뉴질랜드 등에서 풍토성 질환으로 점차 정착되어 가고 있는 것으로 추정되고 있다 [10].

국내의 토끼 출혈병(Rabbit Hemorrhagic Disease; RHD)은 1985년 경기도와 강원도 지방에서 처음으로 발생하여 토끼산업에 광범위한 피해를 주었고 발생초기에는 이 병의 원인 바이러스가 picornavirus에 속한 것으로 보고되었었다. 이 병의 유입경로에 대한 역학적 분석 결과, 중국으로부터 수입한 모피를 통해서 전파되었을 것으로 추정하였다 [1, 13]. RHD는 1987년 대유행을 통해 전국적으로 확산 되었고 최근까지 계속적으로 발생하고 있다. 그러나, 국내에 처음 바이러스가 유입되어 발생하였을 때에는 여러 장기의 출혈뿐만 아니라 출혈성 흉수와 복수가 동반하는 질병으로 알려졌으나, 최근 병성감정 의뢰되는 개체에 대한 검사 결과 질병 발생 양상이 다소 변화하고 있는 것으로 생각되었다.

RHDV는 유전학적으로 6개 아종으로 구분할 수 있으나 [9, 17], 혈청학적으로는 과거에 발생한 전형적인 RHDV와 최근에 분리되고 있는 RHDVa로 최소한 2종류 이상으로 분류할 수 있다. 혈청학적으로 차이를 보이는 2종류의 바이러스에 대한 주요항원 단백질인 60 kDa의 VP60의 유전자를 분석한 결과 차이를 보였다 [4, 9, 10]. 최근 국내에서도 새로운 혈청형으로 분류되는 RHDVa가 분리되어 보고된 바 있으며, 바이러스의 VP60에 대한 유전자 및 염기서열 분석결과 이전 혈청형과는 92.1~94.3%의 유사성만을 보이는 새로운 혈청형으로 분류되었다 [18].

이 병의 세계적인 발생 양상의 하나로 RHDV의 확산으로 인하여 풍토성으로 점차 정착되어 가고 있으며, 새로운 혈청형인 RHDVa 분리주가 전형적인 RHDV에 비해 감염 및 바이러스 복제에 우위를 보이는 것으로 밝혀져 있다 [10].

국내에서는 과거에 발생했던 바이러스 분리주에 대한 연구는 여러모로 진행되어 온 바 있으나 새로운 혈청형에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 새로운 혈청형으로 분리된 RHDVa 분리주를 토끼에 감염시킨 후 경시적인 병리조직학적 변화와 바이러스 항원 분포에 대하여 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

바이러스 접종 준비

접종 바이러스는 국내에서 분리된 RHDVa를 사용하였다. 바이러스 증식을 위해 일본에서 구입한 특정병원체부재(specific pathogen free; SPF) 토끼에 근육 접종하여 바이러스를 증식하였다. 접종 후 36시간에 전형적인 빈사상태의 임상증상을 확인한 후 심미취한 다음 방혈하였다. 이어 간을 적출하였고 이를 0.01 M 인산완충염수(0.01 M phosphate-buffered saline; PBS, pH 7.2)에 10% 유제액을 만든 후, 7,000 rpm에서 30분간 4°C에서 원심 분리한 다음 상층액을 0.22 µm 필터로 여과하여 바이러스 접종원액으로 준비하였다. 준비한 바이러스 접종원액을 0.01M PBS(pH 7.2)로 희석하여 혈구응집 역가(hemagglutination; HA)가 10³까지 되게 맞춘 다음 바이러스 접종액으로 사용하였다.

실험동물 접종

바이러스 접종을 위한 실험동물로 15주령의 뉴질랜드 화이트종 토끼(2.5~3.0 kg)를 사용하였고 실험에 사용하기 전에 RHDV에 대한 항체가를 검사하여 음성인 개체만을 이용하였다. 토끼는 접종군과 대조군으로 무작위로 구분하였고, 케이지당 암수를 구분하여 2두씩 합사하였으며 일주일간의 적응기간을 두었다. 접종군은 접종 후 12시간부터 12시간 간격으로 부검을 하는 6개 군(12, 24, 36, 48, 60, 72시간)으로 나누었고 군당 5 마리씩 배치하여 실험을 실시하였다. 대조군은 4마리를 두었으며 접종 후 48시간 부검군 또는 접종 후 72시간 부검군과 같이 각각 2마리씩 부검하였다. 접종군은 토끼의 양쪽 대퇴부 근육에 각각 0.5 mL의 바이러스 접종액을 접종하였고 대조군은 접종군과 동일한 방법으로 PBS 0.5 mL을 각각 접종하였으며 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 그리고 본 실험은 농림수산검역검사본부의 실험동물윤리법을 준수하여 실험을 실시하였다.

병리조직학적 검사

모든 동물은 12시간 간격으로 임상증상을 관찰하였고 병리조직학적 검사를 실시하기 위해 각 시간대별로 부검을 실시하였다. 우선 동물에 졸레틴(Zoletin)을 근육주

사(3 mL/22 kg)하여 심도로 마취시키고 액와동맥을 절제하여 방혈에 의한 안락사를 실시하였다. 부검은 일반적인 실험동물 부검술식에 따라 실시하였고, 개복 후 모든 장기와 조직을 세심하게 관찰하였으며, 병리조직 검사와 바이러스 검사를 실시하기 위해 필요한 시료를 채취하였다. 병리학적인 검사와 면역조직화학적 검사를 위해 뇌, 흉선, 간장, 폐, 심장, 비장, 신장 등의 실질장기들을 채취하여 10% 중성 완충포르말린(10% neutral buffer formalin)에 12시간 고정한 후 3~4 mm 두께로 다시 절절한 다음 새로운 포르말린으로 재고정하였다. 재고정한 조직을 흐르는 물에 3시간동안 수세한 후에 자동조직처리기(Leica TP 1050, Germany)로 탈수, 치환 및 파라핀으로 침투과정을 거친 후 포매하였다. 포매된 조직들을 약 3~4 µm 두께로 절편하여 조직표본을 만들고 건조 후에 hematoxylin(HHS-80; Sigma, USA) 및 eosin(HT-110380; Sigma, USA)염색을 실시한 다음 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

면역조직화학적 검사

각 군의 장기별로 구분하여 항원 분포를 조사하기 위해 각각의 조직은 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀으로 포매한 후 3~4 µm 두께로 조직을 연속 절편하여 면역염색(Immunohistochemistry; IHC)을 실시하였다.

면역염색은 자동면역염색기인 Automated Immunostainer(Discovery XT; Ventana Medical systems, USA)를 사용하여 실시하였다. 간단히 서술하면 파라핀을 제거한 후 내인성인 peroxidase를 차단하기 위하여 3% H₂O₂로 8분간 처리하였으며, 항원의 노출을 위해 protease 1 (Ventana Medical Systems, USA)로 12분간 반응시켰다. 일차항체로 anti-RHDV monoclonal antibody(BIO 315; Bio-X Diagnostic, Belgium)를 사용하였으며 비특이적 반응을 줄이기 위해 시판되는 항체 희석액(Cytomation Antibody Diluent; Dako, USA)으로 50배로 희석하여 60분 동안 반응시켰다. 이차항체는 polyclonal-goat-anti-mouse IgG biotinylated(Dako, USA)를 50배로 희석하여 60분 동안 항원항체반응을 유도하였다. 발색은 DABMap Kit(Ventana Medical Systems, USA)를 이용하여 실시하였으며, 대조염색은 hamatoxylin(Ventana Medical Systems, USA)과 bluing reagent(Ventana Medical Systems, USA)로 각각 4분씩 염색한 다음 탈수 및 봉입하였다. RHDV 항원 양성세포의 수를 확인하기 위해 200배 시야에서 무작위로 5곳을 선정하여 계수하였다(양성세포수/0.06 mm²).

바이러스 항원검사

시간대별로 채취한 간장, 비장, 신장 등 모든 장기로부터 바이러스 RNA를 추출하기 위해 각 장기를 유발을

이용하여 유제하였다. 바이러스 RNA는 RNeasy mini kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 제조사의 사용설명서 방법에 따라 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 spin column에서 30 µL의 elution buffer를 이용하여 추출하였고, RT-PCR법에 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

RHDV의 감염여부를 확인하기 위해서 VP60 유전자의 일부를 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하여 one-step RT-PCR를 실시하였다. 이때 사용한 프라이머의 유전자 배열은 forward primer가 5'-CAACCTCCAGCCCACCA CCAACAC-3'이었고, reverse primer는 5'-TGGTTGGGAGCCTGTGCCGTACTG-3'이었다. one-step RT-PCR을 실시하기 위해 RT/PCR Premix(Intron, Korea)를 사용하였으며, 추출한 RNA 2 µL와 forward primer와 reverse primer 각각 1 µL(20 pM/µL), RNase free water 16 µL를 넣어 총 20 µL를 만들었다. cDNA 합성은 45°C에서 30분간 반응한 후, 94°C에서 5분간 동안 RTase을 불활화시켰다. RCR 반응은 94°C에서 30초간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 40초간 extension 과정을 35회 반복하였다. RT-PCR 증폭산물은 1.2% agarose gel을 사용하여 전기영동한 후 염색하여 특이밴드를 확인하였다.

결 과

임상증상

RHDV를 접종 후 12시간 부검군에서는 특이적인 임상소견이 관찰되지 않았으나, 24시간 후의 부검군부터는 점차 사료섭취량 감소와 식욕결핍, 체온상승, 운동실조, 빠른 호흡, 침울, 비강출혈 등의 증상을 보이다가 폐사하는 경우도 있었다. 폐사가 관찰된 접종군으로 36시간 부검군에서 2마리가 갑작스럽게 폐사하였고, 48시간 부검군에서도 2마리가 코 주위에 선홍색의 물질이 소량 붙어 있는 채로 폐사하였다(Fig. 1A). 48시간 부검군과 60시간 부검군에서는 빈사상태의 토끼가 각각 1마리씩 있었다. 이 외의 다른 접종군에서는 폐사는 관찰되지 않았으며, 접종군 전체에서 폐사한 두수는 6두로 폐사율은 20%로 나타났다. 폐사는 접종 후 31시간에서 60시간 사이에 걸쳐 관찰되었다. 반면, 대조군에서는 어떤 임상증상도 관찰되지 않았고 사료 섭취량이나 음수량의 변화도 관찰되지 않았다.

병리해부 검사

접종 후 12시간 부검군과 24시간 부검군에서는 특이한 부검소견은 관찰되지 않았다. 반면에 36시간 접종군에서는 기관점막이 선홍색 또는 암적색조로 발적되어 있고 폐에서는 모든 엽에서 1~2 mm 미만의 선홍색 내

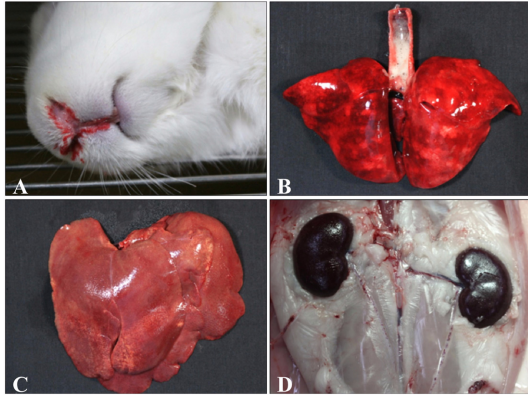


Fig. 1. Gross findings of rabbit inoculated with RHDVa isolate at 48 hours after inoculation. (A) Bloody discharge was present around nose of a rabbit. (B) Lung failed to collapse with dark red appearance and milkish foamy materials existed in the trachea. (C) Multifocal yellow or white foci were scattered in the liver. (D) Petechial or ecchymotic hemorrhages were observed in the kidney and the ureter.

지는 암적색의 반점이 산재하여 있었다(Fig. 1B). 간장은 다소 창백하였고 1~2 mm 내외의 유백색 내지는 유향색의 반점 또는 무늬가 산재해 있었으며 할단시에서도 동일한 반점 또는 무늬가 매몰되어 있었다(Fig. 1C). 신장은 일부 개체에서 암갈색조를 띠기도 하였다(Fig. 1D). 48시간 부검군에서 간장은 36시간 부검군과 유사한 소견들이 관찰되었으나, 그 정도는 다소 완화되어 있었다. 60시간 부검군에서는 1두에서 간장이 황색조를 띠었고 0.5~1 mm 크기의 유백색반점이 수개소가 존재 하였으며, 72시간 부검군에서도 1두의 간장에서 1 mm 미만의 소수의 유백색 반점이 관찰되었으나 그 외의 장기에서는 특이한 병변은 관찰되지 않았다. 72시간 부검군과 모든 대조군의 경우도 특이한 병리해부 소견은 관찰

되지 않았다. 한편 시간대와 상관없이 폐사 또는 빈사상태의 개체는 기관내에 취약한 암적색의 혈액양 물질이 존재하였고 기관 점막은 발적되어 있었다. 폐에는 1~4 mm의 암적색의 반점이 산발하여 있었으며, 간장은 전체적으로 창백하였고 표면과 할단면에 1~2 mm 내외의 유백색, 유향색, 암적색 등의 반점이 다수 관찰되었다. 반면, 48시간 부검군에서 폐사한 1 두의 경우는 대정맥의 벽, 자궁, 요관의 장막 면에 1~3 mm의 다양한 모양의 암적색 반점이 산재해 있었다.

병리조직학적 검사

병리조직학적 병변은 주로 간장에서 관찰되었으며 (Table 1), 임상증상의 진행상황과 유사한 경향을 보였다. 12시간 부검군에서는 특이적인 병변이 관찰되지 않았으나(Fig. 2A), 24 시간째 부검군의 간장에서는 별큰 포식세포(Kupffer's cell)들이 활성화되어 커져 있었고, 이호성 백혈구, 림프구, 큰포식세포 등과 같은 염증세포가 간 문맥주위로 침윤되어 있었다(Fig. 2B). 뿐만 아니라, 동양혈관 주위에도 염증 세포가 침윤되어 있었다. 염증 세포의 침윤 소견은 주로 간 조직에서 국한되어 관찰되었다. 36시간 부검군에서 간세포는 세포질이 농축되어 있고 핵은 농염되게 관찰되었다. 이들 세포는 간 소엽에 무질서하게 산재해 있었으며, 심한 경우는 간세포의 고유배열 구조가 파손되어 관찰되기도 하였다(Figs. 2C and D). 또한, 이호성 백혈구와 단핵세포와 같은 염증세포의 침윤도 관찰되었다. 48시간 부검군과 60시간 부검군에서 시간이 경과함에 따라 침윤된 염증세포들이 중심정맥 쪽으로 점차 확산되어 관찰되었고, 주요 염증세포는 단핵세포였다(Figs. 2E and F). 72시간 부검군의 간장의 병리조직학적 변화의 정도는 다소 감소하였다(Fig. 2F). 48시간 부검군과 60시간 부검군에서의 폐사된 개체의 병리조직학적 변화는 동일한 시간대의 개체들 보다는

Table 1. Histopathologic findings in rabbits inoculated with RHDVa or PBS

Histopathologic change*	Hours after inoculation						Control
	12	24	36	48	60	72	
Liver							
Kuffer's cell activation	-	+	+	+	+	+	-
Heterophil infiltration	-	++	+++	+++	++	+	-
Lymphohistocytic infiltration	-	++	++	+++	+++	++	-
Hepatocyte degeneration	-	++	+++	+++	+	+	-
Hemorrhage**	-	-	+++	+++	++	-	-
Lung							
Multifocal hemorrhage	-	-	+	+++	+	-	-
Interstitial pneumonia	-	-	-	+	-	-	-

*Grade of histopathologic change: -, no lesions; +, mild; ++, moderate; +++, marked. **moribund animal only.

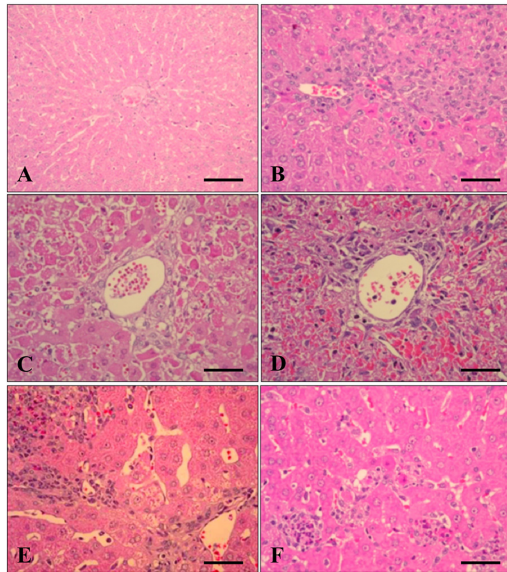


Fig. 2. Histopathologic findings of the liver of rabbits inoculated with RHDVa isolate. (A) There was no lesion in control group and at 12 hours after inoculation (HAI). (B) Inflammatory cells such as heterophils and mononuclear cells were infiltrated in the liver at 24 HAI. (C) Pyknotic hepatocytes were scattered in the liver at 36 HAI. (D) The dissociation of hepatic cell cord and hemorrhage were observed at 48 HAI. (E) The aggregated foci of inflammatory cells existed in the liver at 60 HAI. (F) The smaller foci of inflammatory cells were present in liver at 72 HAI. Scale bars = 100 μ m (A), 50 μ m (B-F). H&E stain.

더욱 심하였다(Fig. 2D). 48시간 부검군의 폐사축의 경우 폐에서 다발병소성의 출혈소견과 더불어 경도의 간 질성 폐렴 소견이 관찰되었으며, 대정맥, 자궁, 요관 등에서도 출혈 소견이 존재하였다.

면역조직화학적 검사

전신장기의 항원분포 변화를 알아보기 위해 RHDV에 대한 면역염색을 실시한 결과, 대부분 간장에서만 강한 양성반응을 확인할 수 있었으며, 양성세포 수는 비록 적은 수였지만(Fig. 3), 24시간 부검군에서도 양성세포가 산발적으로 관찰되기 시작하였다(Fig. 4B). 양성세포는 36시간 부검군에서 급격하게 증가하였고 주로 핵이 농염되었던 세포에서 강한 양성반응을 보였으며(Fig. 4C), 48시간 부검군까지 많은 수의 양성세포가 관찰되다가(Fig. 4D), 60시간과 72시간 부검군에서는 그 수가 급격하게 감소하는 경향을 보였다(Figs. 4E and F). 반면, 12시간 점종군과 대조군에서는 양성세포가 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 4A).

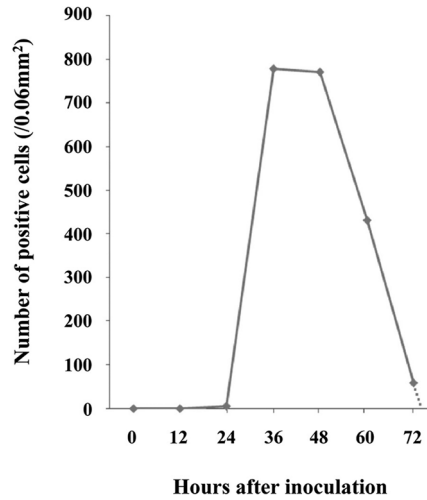


Fig. 3. The number of RHDV antigen-positive cells in the rabbit liver. RHDV-positive cells began to be observed at 24 HAI. The number of RHDV-positive cells was markedly increased at 36 HAI and maintained by 48 HAI. The number was rapidly decreased from 60 HAI.

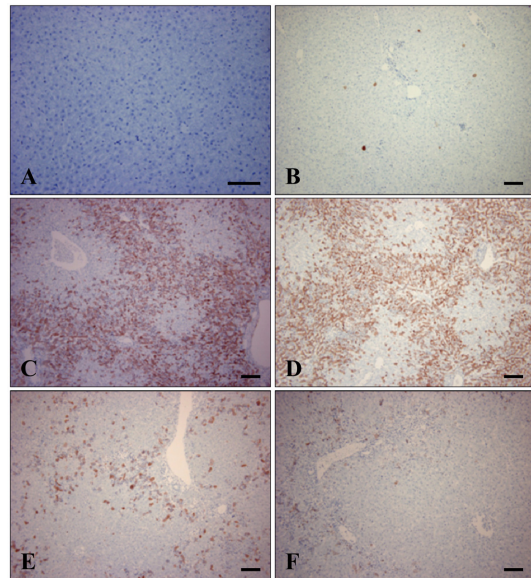


Fig. 4. Immunohistochemistry for RHDV antigen in the rabbit liver. Note the RHDV-positive reaction within the nucleus and cytoplasm of hepatocytes. (A) There was no reactivity on RHDV in control group. (B) RHDV-positive reaction was observed in a few hepatocytes at 24 HAI. (C) Numerous RHDV-positive reactions were shown in the liver at 36 HAI. (D) Numerous RHDV-positive reactions were also observed in liver at 48 HAI. (E) RHDV-positive reactions were observed in several hepatocytes at 60 HAI. (F) RHDV-positive reactions were observed in a few hepatocytes at 72 HAI. Scale bars = 300 μ m.

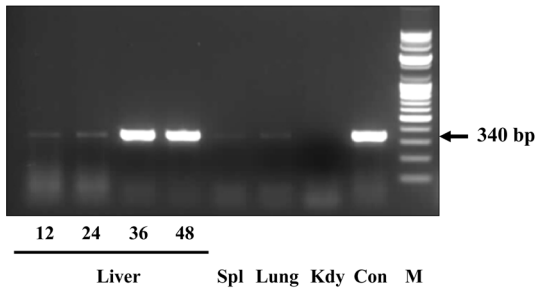


Fig. 5. Electrophoresis photograph. RT-PCR products of 340bp viral RNA were detected in the liver at the indicated hours after infection, and in the spleen (Spl), lung, and kidney (Kdy) at 12 HAI.

RT-PCR법을 이용한 RHDVa 특이 유전자 검출 확인

실질장기에서 RHDVa 항원의 분포와 추이를 알아보기 위해 간장, 폐장, 비장, 신장 등을 이용하여 바이러스의 핵산을 증폭한 결과, 실질장기 모두에서 특이적인 증폭산물인 340 bp의 밴드를 확인하였다. 그러나 간장이외의 장기에서 검출량이 매우 적었다. 간장에서 경시적인 변화에 있어서는 36시간 부검군에서 가장 많은 증폭 산물을 얻었으며, 다소 적었지만 48시간 부검군에서도 많은 증폭산물을 확인 할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

RHD는 토끼에서 급성 간염 및 출혈 등을 일으키고 폐사율이 높은 치명적인 바이러스성 질환으로 우리나라에서도 전국적으로 발생하고 있는 질병이다. 최근까지 농림수산검역검사본부로 의뢰된 토끼의 가검물의 진단 결과를 분석한 결과, 매년 3-4건씩 발생하는 것으로 확인되었고, 이를 미루어 보아 국내에서도 꾸준히 발생하여 토끼산업에 직간접적으로 경제적 피해를 주고 있는 것으로 생각된다. 그러나 최근의 질병 발생 상황은 과거와는 다르게 진행되는 경향을 보이고 있어 현재 유행하고 있는 혈청형에 대한 연구가 필요하다고 판단되었기에 최근 국내에서 분리된 새로운 혈청형인 RHDVa주에 대한 동물 실험접종을 통해 경시적 변화를 관찰하였다.

이 병에 감염된 토끼에서 주로 관찰되는 임상증상으로는 식욕결핍, 체온상승, 운동실조, 빠른 호흡, 침울, 비강출혈 등으로 알려져 있으나, 일부 연구에서는 경련과 회전운동과 같은 신경증상 등도 보고된 바 있었다 [13]. 그러나 본 연구에서는 신경증상은 관찰되지 않았지만, 다른 임상증상은 정도의 차이는 있었으나 유사한 증상들을 나타내었다. 폐사율에 있어서도 일반적으로 60-90%로 알려져 있고 과거의 국내의 연구결과에서도

비슷한 폐사율을 나타냈었다 [13]. 이번 실험에서의 폐사율은 접종 후 48시간 부검군에서 60%였으나, 이를 최고의 정점으로 하여 이 후부터는 감소하는 경향을 보였다. 전체적인 폐사율도 20%로 나타났다. 그리고 RHDV 감염에 의한 폐사는 36-48시간에 주로 발생하였고 60시간 이후에는 폐사가 관찰되지 않았다. 육안적 소견으로는 간장, 폐, 신장 및 심장 등에서 유백색 또는 적색의 반점 또는 무늬가 관찰되었으며, 특히 36-48시간 사이에 폐사한 토끼에서 두드러지게 관찰되었다. 이와 같은 소견들은 다른 연구에서도 비슷하게 나타났다 [3, 13].

병리조직학적으로 이호성 백혈구(heterophil), 림프구 및 단핵세포 침윤과 같은 특이적인 병리소견은 24시간 부검군에서 관찰되기 시작했다. 36-48시간대에서는 염증세포의 침윤 등 간 손상 부위는 간 문맥에서 소엽 중심으로 확산되었다. 그러나 폐사한 토끼와 안락사한 토끼에서 염증반응과 간세포 손상 정도는 확연한 차이를 보였는데, 안락사한 토끼에서는 강한 염증반응과 상대적으로 적은 간 손상이 관찰된 반면 폐사한 토끼는 약한 염증반응과 출혈을 동반한 광범위한 간 손상이 관찰되었다. 이는 RHD가 급성으로 진행되는 경우에 폐사율이 높아지는 것으로 생각되었다. 또한, 주요 염증세포는 초기에 이호성 백혈구에서 점차 단핵세포로 대체되는 경향으로 확인되었으며 이전의 연구에서도 이런 침윤된 염증세포 종류의 변화가 보고되어 있다 [7, 11]. 36시간 이전의 부검군과 폐사한 토끼에서는 신장의 병변이 거의 없었으나, 48-60시간에 폐사한 토끼에서는 울혈 및 출혈 등의 전형적인 병변이 신장 및 폐에서 관찰되었다. 다른 연구자들도 신장의 병변이 관찰된 시간의 차이는 다소 있었으나 본 연구와 같이 시간이 경과함에 따라 같은 병변이 관찰됨을 보고하였다 [6, 14].

본 연구에서는 RHDV 항원 분포를 알아보기 위해 중합연쇄반응법(PCR)과 면역조직화학법(IHC)을 수행하였다. PCR 검사결과 RHDVa 항원은 부검 후 12시간 부검군부터 약하지만 간장, 비장 및 폐에서 검출되기 시작하였고, 48시간 부검군 이후부터는 모든 장기에서 검출되었다. In-situ hybridisation(ISH)기법을 이용하여 바이러스 유전자를 검출한 경우에는 접종 후 8시간 내에도 관찰된다고 하였으며 이들 결과로 보아 바이러스 복제는 접종 후 바로 일어나는 것으로 생각되었다 [8]. PCR법과 달리 IHC법에서는 RHDV 항원에 대한 양성세포는 접종 후 24시간 부검군의 간장에서만 관찰되기 시작하였다. 이것은 검출 민감도의 차이에서 기인한 것으로 여겨졌다 [8].

일반적으로 RHDV는 심급성에서 급성으로 진행되는 질병임으로 아급성이나 만성형으로 나타나는 것은 드문 것으로 알려져 있다 [15]. 그러나 이번 연구에서 새로운

RHDVa 혈청형은 급성과 아급성(만성) 두 가지 형태로 나타났다. 급성형에 감염된 토끼의 경우, 대개 RHDVa 접종 후 36~48시간에 폐사하였고 광범위한 간 손상과 약한 염증반응을 동반하였다. 그러나 아급성 또는 만성형으로 진행된 개체는 간 손상을 동반한 중등도의 염증반응을 보였으며 염증세포도 초기의 이호성 백혈구가 단핵세포로 대체되었다. 이것은 RHDVa에 의한 아급성(만성)형으로 감염된 개체가 오랜 시간 동안 바이러스를 체외로 배출할 수 있게 함으로써 RHD가 국내에서 풍토병이 되는데 중요한 역할을 하였을 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. **An SH, Kim BH, Lee JB, Song JY, Park BK, Kwon YB, Jung JS, Lee YS.** Study on picornavirus haemorrhagic fever (tentative name) in rabbit: 1. Physico-chemical properties of the causative virus. *RDA J Agri Sci* 1988, **30**, 55-61.
2. **Belz K.** Rabbit hemorrhagic disease. *Semin Avian Exot Pet Med* 2004, **13**, 100-104.
3. **Chang HS, Park NY, Kang MI, Han DU, Park YS.** Pathology of disseminated intravascular coagulation in rabbit viral hemorrhagic disease. *Korean J Lab Anim Sci* 1999, **15**, 53-59.
4. **Capucci L, Fallacara F, Grazioli S, Lavazza A, Pacciarini ML, Brocchi E.** A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Res* 1998, **58**, 115-126.
5. **Chasey D.** Rabbit haemorrhagic disease: the new scourge of *Oryctolagus cuniculus*. *Lab Anim* 1997, **31**, 33-44.
6. **Chen SY, Chou CC, Liu CI, Shien JH.** Impairment of renal function and electrolyte balance in rabbit hemorrhagic disease. *J Vet Med Sci* 2008, **70**, 951-958.
7. **Ferreira PG, Costa-e-Silva A, Monteiro E, Oliveira MJR, Águas AP.** Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease. *Res Vet Sci* 2004, **76**, 83-94.
8. **Gelmetti D, Grieco V, Rossi C, Capucci L, Lavazza A.** Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by in situ hybridisation with a digoxigenin labelled RNA probe. *J Virol Methods* 1998, **72**, 219-226.
9. **Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Laurent S, de Boissésion C, Portejoie Y, Rasschaert D.** Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants. *Arch Virol* 2003, **148**, 65-81.
10. **McIntosh MT, Behan SC, Mohamed FM, Lu Z, Moran KE, Burrage TG, Neilan JG, Ward GB, Botti G, Capucci L, Metwally SA.** A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas. *Virol J* 2007, **4**, 96.
11. **Mikami O, Park JH, Kimura T, Ochiai K, Itakura C.** Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Res Vet Sci* 1999, **66**, 237-242.
12. **Moss SR, Turner SL, Trout RC, White PJ, Hudson PJ, Desai A, Armesto M, Forrester NL, Gould EA.** Molecular epidemiology of *Rabbit haemorrhagic disease virus*. *J Gen Virol* 2002, **83**, 2461-2467.
13. **Park NY.** New viral disease of rabbit; hemorrhagic pneumonia. *J Korean Vet Med Assoc* 1987, **23**, 780-788.
14. **Sánchez-Campos S, Alvarez M, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J, Tuñón MJ.** Pathogenic molecular mechanisms in an animal model of fulminant hepatic failure: rabbit hemorrhagic viral disease. *J Lab Clin Med* 2004, **144**, 215-222.
15. **Teifke JP, Reimann I, Schirrmeier H.** Subacute liver necrosis after experimental infection with rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *J Comp Pathol* 2002, **126**, 231-234.
16. **Tham KM, Barnes SM, Hunter SN.** Polymerase chain reaction amplification and gene sequence analysis of a calicivirus from a feral rabbit. *Virus Genes* 1999, **18**, 235-242.
17. **van de Bildt MWG, van Bolhuis GH, van Zijderveld F, van Riel D, Drees JM, Osterhaus ADME, Kuiken T.** Confirmation and phylogenetic analysis of rabbit hemorrhagic disease virus in free-living rabbits from the Netherlands. *J Wildl Dis* 2006, **42**, 808-812.
18. **Yang DK, Kim BH, Lee KW, Kim JY, Kim HJ, Choi SS, Chun JE, Son SW.** Identification and molecular characterization of a rabbit hemorrhagic disease virus (KV0801) isolated in Korea. *Korean J Vet Res* 2009, **49**, 207-213.