

실험적 알러지성 뇌척수염의 면역병리학적 소견에 관한 연구

서울대학교 의과대학 병리학교실

김 우 호 · 지 제 근 · 이 상 국

서 론

실험적 알러지성 뇌척수염(experimental allergic encephalomyelitis)은 수초의 구성성분인 myelin basic protein에 감작된 동물에서 발생하는 뇌 및 척수의 염증으로 병리학적 및 면역학적으로 인체의 다발성 경화증과 유사한 점이 많아 주목을 끌어왔으며¹⁾ 이의 연구 결과들은 자가면역 질환의 이해에 많은 공헌을 하였다²⁾.

역사적으로 실험적 알러지성 뇌척수염은 실험적 자가면역 질환중 가장 먼저 성공하였으며³⁾ 그 이후 여러 종류의 실험동물에서 발병이 가능함이 알려져 있고 그중 기니피크가 가장 흔히 연구 대상으로 되어 왔다⁴⁾. 이 병의 발병기전은 아마도 T세포가 매개하는 지연형 과민반응(IV형)으로 추측되며⁵⁾ 림프구의 주입에 의해 타동물에의 전이가 성공함으로써 이를 뒷바침하고 있다⁶⁾. 그러나 병변에서 많은 형질세포와 면역글로블린이 관찰되고 혈액 및 수액(CSF)에서 수초에 대한 항체가 검출되며 이들 항체가 배양세포의 탈수초화를 초래하는 점⁷⁾ 등으로 미루어 면역 글로블린도 발병에 필수적인 역할을 할 것이라고 주장하는 학자도 많다⁸⁾. 더구나 조직학적으로 세포 침윤이 시작하는 시기에 비해 혈관투과성의 증가가 먼저 증명되는 현상은 혈뇌장벽의 파괴에 체액성분이 관여하리란 증거를 제시하고 있다⁹⁾.

실험적 알러지성 뇌척수염에서 혈뇌장벽(blood-brain barrier)의 파괴에 대한 연구는 병인에 대한 이해뿐 아니라 임상적 측면에서도 매우 중요한 의의가 있다. 다발성 경화증 환자의 수액내 알부민의 농도를 측정된 결과에 의하면 환자중 단지 20~30%에서만 혈뇌장벽의 파괴가 있으며 활동성 병변과 비활동성 병변 간에 뚜렷한 차이가 없었다¹⁰⁾. 그러나 조영제를 투여한 전산화 단층촬영

결과에 의하면 활동성 병변의 대부분이 조영제에 의한 음영의 증강(enhancement)이 있는 반면 비활동성 병변은 그렇지 않으므로 혈뇌장벽의 파괴에 차이가 있을 것임이 확실시된다¹¹⁾.

본 실험은 기니피크에 동종의 척수항원을 투여함으로써 실험적 알러지성 뇌척수염의 동물모델을 만들어 침윤된 세포의 성상을 면역조직학적 방법으로 감별하고 혈뇌장벽의 파괴를 분석하여 자가면역질환의 발병기전을 이해하려는데 그 목적이 있으며 특히 성숙동물과 어린동물간의 발병 양상을 비교함으로써 상기인자들이 발병에 미치는 영향을 밝히고자 하였다. 또한 본 연구에서는 혈뇌장벽의 파괴를 관찰하기 위해 형광 물질을 사용하였는 바, 이 방법은 판독 결과가 주관에 치우칠 우려가 있으나, 국소적인 병변도 쉽게 포착할 수 있으며 변화 양상을 병리학적 소견과 연결시킬 수 있음에 착안하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 동물은 England계 백색 기니피크(Cavia cutleri)이었다. 항원의 제작을 위해 체중 800~900 gm되는 5~6개월생 동물을 사용하였으며 감작시킨 동물은 생후 1개월(평균 320 gm) 짜리와 생후 4개월(평균 670 gm) 짜리이었다.

2. 감 작

감작을 위하여 동종의 동물에서 척수를 얻어 이를 주입하였다. 먼저 동물을 케타민으로 마취한 후 phosphate buffered saline(PBS)을 좌심실을 통하여 관류시킨 다음 척수를 무균적으로 적출하였다. 척수는 경막을 제거

하고 동량의 PBS와 함께 분쇄하였으며 다시 완전 Freund's adjuvant와 1:1로 혼합하였다. 이 혼합액을 동물 1마리당 0.5 ml씩 목덜미 및 등에 5군데 나누어 피내주사하였다.

3. 동물의 구분

동물은 A, B, C, D 군으로 나누었고 A군 및 B군은 대조군으로서 완전 Freund's adjuvant만을 주사하였으며, C군 및 D군은 척수항원과의 혼합액을 주사하였다. 이 중 A군 및 C군은 320 g 내외의 동물로서 생후 1개월 생이었고, B군 및 D군은 670 g 내외의 4개월 생이었다(제1 표 참조). 동물의 수는 각 군당 대조군은 5마리, 실험군은 10마리를 사용하였고 주사후 제 2주부터 도살을 시작하여 1주마다 각 군당 실험군은 2마리, 대조군은 1마리씩 도살하였다.

4. 임상적 관찰

각 동물은 매일 체중을 측정하고 임상증상을 관찰하였으며 임상증상은 Lassman¹²⁾등이 제시한 점수제도를 준용하였다. 즉 아무런 증상이 없는 경우 0점, 갑작스런 체중감소, 무력증, 활동감소등 비신경학적 증상만 있을 때 1점, 경도의 양부전마비(paraparesis) 및 보행의 장애가 있는 경우 2점, 중증의 양부전마비 또는 강직성 마비가 있는 경우 3점, 사기마비(quadriplegia)를 보이는 경우 4점, 그리고 경련이나 호흡장애가 있는 경우를 5점으로 하였다.

5. 도살 및 표본채취

혈뇌장벽 및 혈척수장벽의 파괴를 관찰하기 위해

fluorescent Evans blue를 혈관내에 주입 후 도살하였다. 먼저 정맥에 2% Evans blue 용액을 동물 체중 1 kg 당 2 ml 씩 주사하고 15분 경과 후 개흉하여 좌심실을 통하여 PBS 완충액을 관류하여 혈액을 제거하였으며 곧이어 고정액으로 관류하였다. 고정액은 PBS 용액에 paraformaldehyde 3.5% 및 glutaraldehyde 0.2% 되게 제작하였다.

적출한 조직은 고정액에서 1시간동안 고정한 후 대뇌, 소뇌 뇌교 및 척수 등에서 조직을 채취하였으며 척수에서는 연수를 시점으로 2 cm 간격으로 절단하여 각각 파라핀 포매 및 동결조직을 제작하였다. 파라핀 포매 조직은 Luxol fast blue 염색과 Luxol fast blue hematoxylin-eosin 염색을 시행하였고, 동결조직은 3.42% sucrose를 포함한 PBS 용액으로 처리 후 젤라틴 코팅 슬라이드에 절편을 제작하여, 무염색, hematoxylin-eosin, 기니픽 IgG, 기니픽 IgA, 기니픽 IgM, muramidase (lysozyme)에 대한 면역 염색을 시행하였다.

6. 염색 및 관찰 방법

침윤된 세포의 종류를 구별하기 위하여 기니픽의 IgG, IgM, 및 IgA 와 muramidase(lysozyme)에 대한 항체로 면역형광 또는 peroxidase-antiperoxidase 염색을 시행하였다. IgG 염색의 경우 동결절편을 normal swine serum으로 20분간 처리하여 비특이염색을 방지하였으며 다시 1차 항체(goat anti-guinea pig IgG, Cooper Biomedical)와 상온에서 20분간 반응시켰다. 수세 후 2차 항체(TRITC-conjugated rabbit anti-goat immunoglobulin, Cooper Biomedical)와 실온에서 30분

Table 1. Groups of experimental animals

Groups	Body Weight (mean)	No. of animals	Age	Treatment	Sacrifice time
A	320 g	5	1 m	adjuvant	2 w, 3 w, 4 w, 5 w, 6 w
B	670 g	5	4 m	adjuvant	2 w, 3 w, 4 w, 5 w, 6 w
C	320 g	10	1 m	s.c. + adjuvant	2 w, 3 w, 4 w, 5 w, 6 w
D	670 g	10	4 m	s.c. + adjuvant	2 w, 3 w, 4 w, 5 w, 6 w

m: month (s), w: weeks,
s.c.: spinal cord

간 반응시킨 후 10% glycerin으로 봉입하여 reflect형 형광현미경으로 관찰하였다. IgM 및 IgA의 염색도 이와 같은 방법으로 시행하였으나 다만 1차 항체로 rabbit anti-guinea pig IgM 및 rabbit anti-guinea pig IgA (Miles Scientific)를 사용하였고 2차 항체로 FITC-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulin(DAKO)을 사용하였다. lysozyme의 염색은 peroxidase-antiperoxidase(Immuno Nuclear Cooperation)법을 사용하였는데 먼저 3% H₂O₂ 수용액으로 내인성 peroxidase를 제거하였고 다음 protein blocking agent로 비특이성 반응을 방지하였다. 1차 항체로는 rabbit anti-muramidase를 사용하였고 2차 항체로는 swine anti-rabbit immunoglobulin을 사용하였으며 그 다음 peroxidase-antiperoxidase 용액을 사용하였는 바, 이들은 모두 상온에서 20분간 반응시켰다. 발색을 위하여 3-amino-9-ethylcarbazole을 사용하였으며 hematoxylin으로 대조염색을 3분간 시행한 후 glycergel로 봉입하였다. 염색의 특이성을 확인하기 위해 1차 항체 대신 non-immune rabbit serum(DAKO)을 사용하여 음성 대조표본으로 삼았으며, 경부림프절 및 비(spleen)를 대상으로 같은 염색을 시행하여 양성 대조표본으로 삼았다.

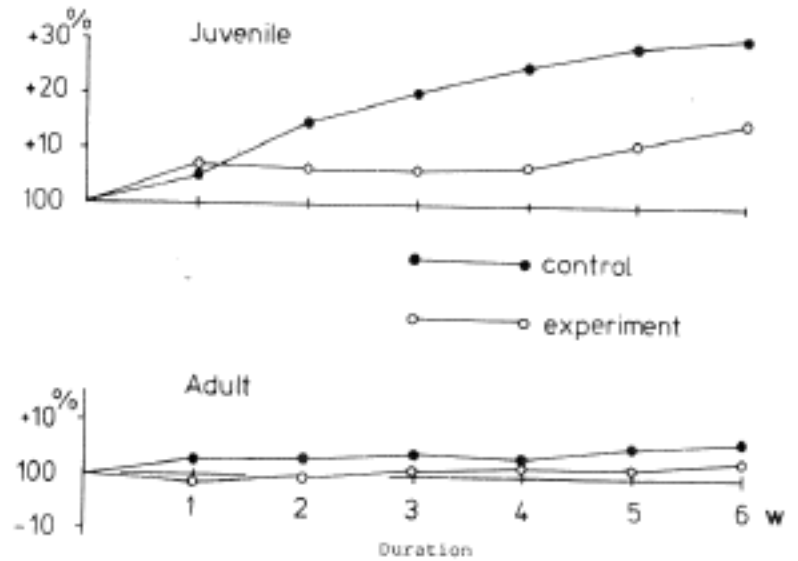


Fig. 1. Changes of mean body weight in the experimental animals.

연구 성적

1. 실험 동물의 체중 변화

실험군 및 대조군에서의 실험기간 중 동물 체중의 변화를 그림으로 나타내면 제 1도와 같다. 실험기간중 대조군은 지속적인 성장을 보였으나 실험군은 대조군에 비해 성장이 더디었고 어린 동물에서는 그 차이가 더욱 현

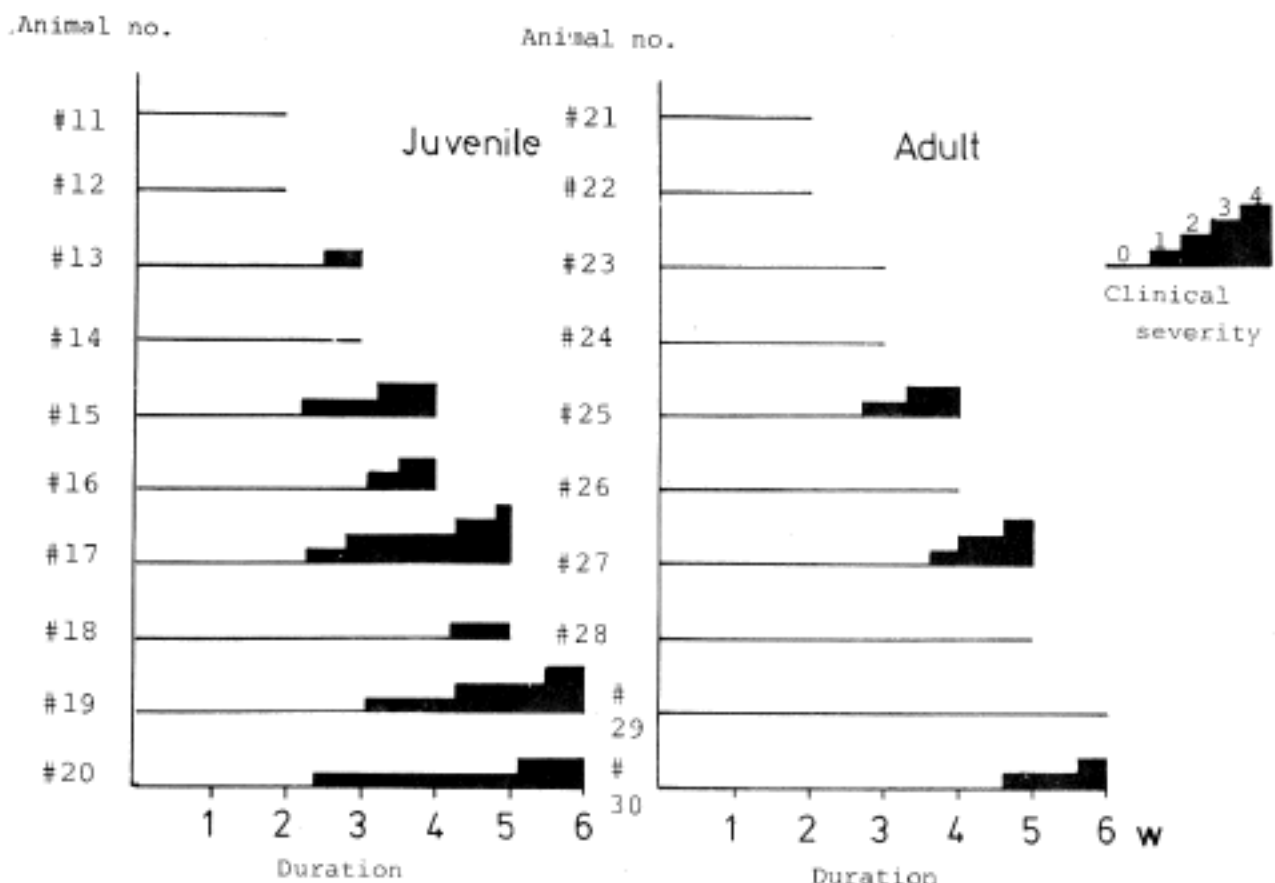


Fig. 2. Clinical features of the experimental animals.

저하였다.

2. 임상증상

대조군은 A군 및 B군 모두 아무런 증상을 나타내지 않았다. 실험군에서의 임상증상의 발현 및 정도를 정리하면 제 2도와 같다. 어린동물에서는 제 3주 부터 임상증상이 나타나기 시작하여 제 4 주에는 대부분의 동물이 증상을 나타내었고 시간이 갈수록 점점 심해지는 경과를 보였으며 제 5주까지 생존한 동물 4마리 모두에서 증상이 나타났다. 반면 성숙동물에서는 임상증상이 나타나는 빈도가 낮아 제 2주, 제 3주 및 제 4주에 각 1마리씩 임상증상을 나타내기 시작하였으며 제 5주에 관찰한 4마리 중 2마리만이 증상을 보였다.

3. 병리학적 소견

어린 기니픽에 발생한 병변의 정도를 임상증상과 함께 나타내면 제 2표와 같다. 어린 기니픽중 제 2주에 도살한 2마리에는 전혀 병변이 없었고, 제 3주에 도살한 2마리 중 1마리에서는 병변이 척수에 국한되어 있을 뿐 대뇌, 소뇌 또는 뇌교에서는 발견되지 않았다. 병변은 척수 중에서도 천수부가 가장 심하였으며 상부(rostral)로 갈수록 점점 경미한 병변을 보였으나 경수에도 작은 병변이 있었다. 이들 병변은 소정맥 주위를 몇개의 단핵세포가 둘러싸고 있었으며 뇌막의 직하부에서 특히 심하였다. 대부분의 병변에서 탈수초는 관찰되지 않았으나 병

변이 심하였던 S₁분절에서 뇌막 직하부위에 조직구의 침윤과 함께 탈수초를 보이는 곳이 한 군데 있었다. 제 3주에 도살한 다른 1마리에는 전혀 병변이 없었다.

제 4주에 도살한 동물은 병변이 좀 더 심하였고 두마리 모두 척수 및 소뇌와 뇌교를 침범하고 있었으나 대뇌에는 병변이 없었다. 그중 한마리는 병변이 매우 심하여 척수의 백질중 뇌막과 연한 부위를 윤상으로 둘러싸고 있었고 광범위한 탈수초화를 보이고 있었으나 축삭은 그 형태를 유지하고 있었다. 침윤된 세포는 핵이 둥글고 농염되며 세포질이 거의 없는 림프구와 핵이 굴곡되고 핵소체가 보이며 세포질이 많은 조직구로 대별되었으며 림프구는 혈관주위에서 많이 관찰되었으나 일부는 실질내로 침윤하고 있었고 조직구는 그 대부분이 혈관 주위보다는 실질내로 침윤되어 있었다. 이들 조직구는 세포질이 포말성이거나 혹은 커다란 공포를 가지고 있었으며 드물게 파괴된 수초를 함유하여 Luxol fast blue 염색으로 청색의 흔적을 보이기도 하였다. 침윤세포중 간혹 호중구 및 형질세포가 섞여 있었으나 호산구는 찾아 볼 수 없었다.

제 5주에 도살한 예중 1예는 제 4주의 예와 흡사하였으며 병변은 척수와 소뇌에 존재하였다. 다른 1예는 병변이 척수에 국한되어 있었는데 천수와 요수는 상당히 심한 병변을 보인 반면 경수에는 매우 미약한 병변만이 있었다(제 3도 참조). 병변은 백질의 대부분과 회백질의 일부분을 침범하였고 조직구의 밀집으로 육아종과 흡사하였으며 국소적으로 괴사도 동반하였다.

Table 2. Summary of pathological and clinical findings in juvenile guinea pigs

Animal No.	Sacrifice time	Clinical onset (wks)	Clinical severity*	Pathologic severity
11	2 w	—	0	—
12	2 w	—	0	—
13	3 w	2+4/7	1	+
14	3 w	—	0	—
15	4 w	2+1/7	2	++
16	4 w	3+1/7	2	++
17	5 w	2+2/7	4	+++
18	5 w	4+1/7	2	+++
19	6 w	3+0/7	3	+++
20	6 w	2+3/7	2	+++

*: score of clinical symptoms at the time of sacrifice

0: no symptom, 1: weight loss, weakness or decreased activity, 2: mild paraparesis or disturbance of gait, 3: moderate paraparesis or spastic paralysis, 4: quadriplegia, 5: convulsion or respiratory distress.

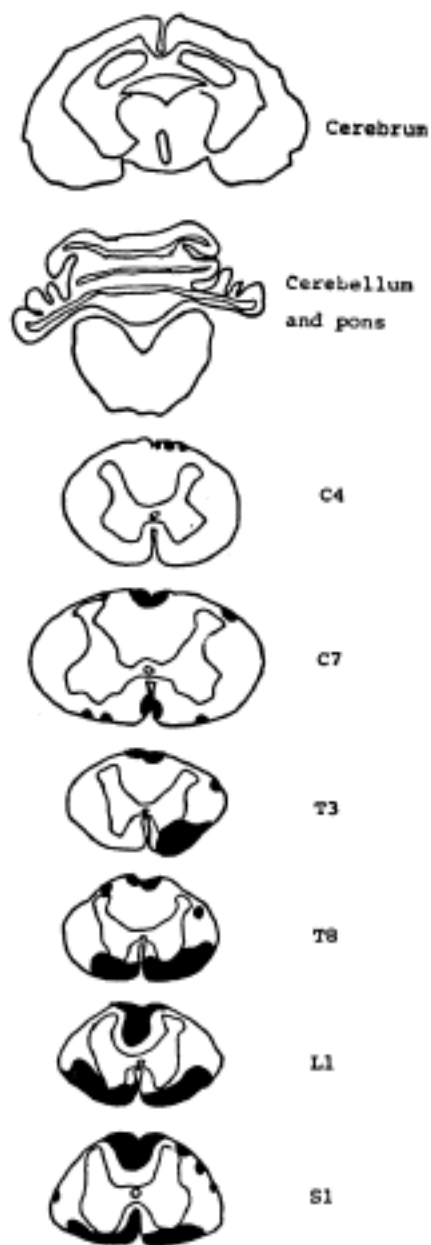


Fig. 3. Histotopographic chart demonstrating the lesions in a juvenile grinea pigs 5 weeks after sensitization.

제6주의 병변은 대뇌 및 소뇌에 많은 병소가 있는 점이 특이하였고 특히 대뇌의 병변은 측뇌실의 주변에 밀집되어 발생하였다. 이들 병변은 림프구는 별로 없고 조직구와 약간의 형질세포로 구성되어 있었으며 탈수초도 현저하였다. 척수에서는 주로 뇌막에 연한 백질부에서 탈수초를 동반한 조직구의 침윤이 미만성으로 있었으나 회백질내의 작은 혈관주위로 림프구의 밀집 현상도 가끔 보였다.

성숙 기니픽의 병변에서는 세포침윤, 탈수초 및 괴사 등의 소견이 관찰되어 어린 동물과 큰 차이가 없으나 시기적으로 변화하는 양상이 다양하여 이를 객관화하기 어려웠으며, 이는 개체 간에 병변의 발생시기 및 분포의 차이가 큰 점에 기인하였다(제 3 표 참조). 다만 대뇌의 침범이 어린 동물에 비해 흔하였고 주로 측뇌실의 주변부에 병변을 보였으며 림프구보다 조직구의 침윤이 현저하였다. 제 4 주에 병변이 발생한 1 예는 대뇌 및 척수에 심한 병변이 산재하였으나 제 6 주에 발병한 1 예는 천수에 국한된 병변만이 관찰되었고 전체적으로는 10 마리 중 단지 4 마리에서만 병변이 발생하였다.

4. 혈관 미세혈관 조영

Evans blue는 혈관 현미경하에서 짙은 붉은 색의 형광을 나타내었다. 정상 대조군(A군 및 B군)의 뇌 및 척수에서는 형광물질이 뇌막에 간혹 염색되어 있을 뿐, 실질내에서는 관찰되지 않았다. 실험군에서는 형광물질이 혈관 주위로 누출되어 있었으며 이의 범위는 병리학적 변

Table 3. Summary of pathological and clinical findings in adult guinea pigs

Animal No.	Sacrifice time	Clinical onset (wks)	Clinical severity*	Pathologic severity
21	2 w	—	0	—
22	2 w	—	0	—
23	3 w	—	0	+
24	3 w	—	0	—
25	4 w	2+5/7	2	+++
26	4 w	—	0	—
27	5 w	3+4/7	3	++
28	5 w	—	0	—
29	6 w	—	0	—
30	6 w	4+4/7	2	+

*: same as the legends in table 2.

화의 정도와 관련성이 있었다. 일반적으로 세포침윤이 Virchow-Robin 공간에 국한되는 경우 형광물질의 확산은 혈관 주위에 머무르나 뇌실질을 침범하는 세포침윤을 보이는 곳에서는 더욱 광범위한 확산을 나타내었다. 간혹 병리학적으로 염증세포의 침윤이 없는 곳에서 혈관 주위로의 형광물질 확산이 관찰되기도 하였으며 이는 요수 또는 천수부에서 주로 나타났을 뿐 대뇌 및 경수에서는 이러한 소견을 볼 수 없었고 또한 어린 동물에서 주로 관찰할 수 있었다. 또한 병리학적 및 임상적으로 아무런 이상을 보이지 않았던 1예(어린 동물, 제 2주 도살)의 천수, 요수 및 흉수에서 뚜렷한 형광물질 확산이 있었다.

병리학적으로 심한 변화를 보임에도 불구하고 형광물질이 별로 관찰되지 않는 경우도 있었으며 특히 괴사를 보이는 부위에서는 주변부에 약간의 염색을 보일 뿐, 병변의 중앙부는 형광물질이 거의 없었다. 어린 동물은 성숙동물에 비해 형광물질의 혈관의 누출이 심하였으며 병변의 정도가 비슷하더라도 더욱 진한 염색상을 나타내었다.

5. 항체염색의 결과

혈관 주위에 밀집된 림프구를 대상으로 관찰하면 면역 글로블린 양성세포중 IgG 양성세포가 가장 많았으며 IgM 및 IgA는 비슷한 수가 관찰되었고 이들 3가지를 합하여도 전체 림프구의 5분의 1을 넘지 아니하였다. 혈관에서 떨어져 있는 뇌 실질에 존재하는 림프구중 면역 글로블린 양성세포는 찾아볼 수 없었다.

조직구는 PAP 법에 의한 muramidase의 염색으로 쉽게 감별할 수 있었으며, 이는 세포질내 진한 갈색의 과립형 염색상을 보여주었다. 세포침윤이 Virchow-Robin 공간에 국한되는 경우 침윤된 세포의 반 수가량이 조직구이었으나, 세포침윤이 진행된 경우에는 조직구의 비율이 더욱 높았으며 육아종 형성부위에서는 모든 세포가 양성으로 나타났다. 병변내 조직구 유사세포중 muramidase 음성세포는 거의 없으므로 교세포의 증식은 인정할 수 없었다.

고 안

실험적 알러지성 뇌척수염의 병변에서 관찰되는 세포중 림프구를 제외하면 그 대부분은 핵이 굴곡되었으며 열게 염색되고 핵소체가 뚜렷하며 세포질이 풍부한 세포이

다. 이 세포의 성상에 대해 골수 유래의 조직구 침윤이라는 설과 교세포의 증식에 의한다는 주장, 그리고 이 두가지 세포가 섞여 있다는 주장이 있었으나, 요즈음은 이들이 조직구라는 설명이 타당하다고 받아들여지고 있으며 그의 증거로서 alpha-naphthylbutyrate esterase (ANBE) 염색에 양성인 점을 들고 있다¹³⁾. 그러나 ANBE는 조직구에 특이한 염색 방법이 아님으로 본 연구에서는 muramidase에 대한 면역 염색을 시행하였다. Muramidase는 조직구 유래의 세포를 증명하는데 가장 주요한 도구로 사용되고 있으므로¹⁴⁾ 본 실험에서 대부분의 세포가 양성으로 염색된 결과는 매우 큰 의의가 있다고 생각된다.

본 실험에서 발생한 병변은 시기적으로 Waksman등¹⁵⁾이 보고한 급성 알러지성 뇌척수염과는 차이가 있는데 그의 보고에 의하면 광학현미경적 변화는 항원의 투여 6일 후부터 관찰되었고 11일이 지나면 모든 동물에서 병리학적 소견을 볼 수 있으며 거의 모든 예에서 2주 이내 임상 증상을 나타낸다고 하였다. 이에 비해 본 실험에서는 2주 이내 임상증상을 보인 예는 한 마리도 없었다. 이러한 차이의 원인으로 두 실험에서 사용한 방법의 차이 또는 실험동물의 차이를 생각할 수 있다. Waksman등¹⁵⁾은 소의 척수를 결핵균이 함유된 adjuvant와 혼합하여 0.1 ml를 1회 투여하였으며 본 실험은 기니픽의 척수를 같은 방법으로 혼합하여 0.5 ml를 1회 투여하였다. 일반적으로 알러지성 뇌척수염을 일으키는데 동종(homologous) 항원이 이종(heterologous) 항원에 비해 효과적이라고 알려져 있으며 특히 기니픽의 척수항원은 동물을 감각시키는 능력이 매우 크다고 인정되고 있으므로 항원의 차이에 의해 이와 같은 차이가 생겼다고 믿기는 어렵다. 또한 본 실험에서 더욱 많은 양의 항원을 투여했기 때문에 더욱 느린 병변이 발생하였으리라고 추측하기는 더욱 어렵다. Raine등¹⁶⁾의 보고에 의하면 기니픽 strain 13은 성숙한 동물에서는 3주 이내 병변이 발생하여 Waksman등¹⁵⁾의 문헌과 유사하나 200 g내외의 어린 동물에서는 투여 후 8~21주가 경과한 후 임상증상 또는 병리학적 소견이 나타난다고 하였고, strain 2의 어린 기니픽은 그 반응이 다양해서 반 수 정도는 7~50주에 발병하나 나머지 절반은 2년까지 전혀 아무런 병변이 생기지 않았다고 하였다. 이와 같이 기니픽 중에서도 그 strain 또는 연령에 따라 반응이 전혀 다르므로 Hartley계 기니픽을 사용한 Waksman등의 실험과 England계 기니픽을 사용

한 본 실험의 성적이 다른 이유는 실험동물의 차이가 결정적인 원인일 것으로 추측된다.

본 실험에서 성숙한 기니픽과 어린 동물간에 병변의 발생에 큰 차이가 있는 결과는 매우 흥미없는 점이다. Koprowski 등¹⁶⁾은 Lewis계 백서에 기니픽의 척수 물 Freund's adjuvant와 함께 주입할 때 성숙동물과는 달리 어린 동물에서는 아무런 병변도 발생치 아니하였으며 이는 뇌 및 척수에 myelin basic protein이 성숙치 못하였기 때문이라고 주장하였으며 이 항원은 생후 6주부터 존재한다고 하였다. 그러나 그 이후 Paterson 등¹⁷⁾에 의해 어린 동물의 척수를 성숙동물에 주입하여 병변을 일으키는 실험이 성공함으로써 항원 자체가 존재하지 아니한다는 주장은 믿기 어렵게 되었으며 오히려 어린 동물에서 면역 기전이 성숙하지 못하였기 때문이라고 이해하게 되었다. 그러나 같은 동물을 이용한 실험에서 Dal Canto 등¹⁸⁾은 어린 동물에서 발생하는 병변은 잠복기가 짧고 섬유소의 침착이 심하며 괴사가 흔히 동반하는 등의 특징이 있어 오히려 초급성 뇌척수염과 유사함을 시사하였고 이것이 혈뇌장벽의 미성숙에 기인한다고 주장하여 성숙동물 및 어린 동물의 차이를 전혀 다른 차원에서 이해하려고 하였다. 또한 기니픽의 척수에서 myelin basic protein을 추출하여 주입하는 경우에는 성숙동물과는 달리 어린 동물에서는 병변이 전혀 발생하지 않았기 때문에 어린 동물은 면역 기능 특히 hapten의 감작에 중요한 역할을 하는 대식구(macrophage)의 기능이 성숙치 못하였기 때문이라고 하였다. 기니픽에서 동물의 나이에 따른 차이는 strain 13 순계동물에서 알려져 있는 바 성숙한 동물은 2주부터 발병하는 급성 알러지성 뇌척수염이 발생하는데 비해 어린 동물에서는 8주 내지 17주에 발생하는 만성 재발성 병변이 발생하고^{4,19)} 성숙동물을 감작시킨 후 면역 세포를 추출하여 어린동물에 주입하는 경우 만성 병변 대신에 급성병변이 발생하는 점으로 미루어 동물의 항원 또는 혈관투과성등에 의한 차이이기 보다는 동물의 면역기전의 차이에 기인할 것이라고 추측되고 있다²⁰⁾.

이상의 연구들을 종합해 볼 때 어린 동물은 성숙동물에 비해 크게 두가지 차이가 있는 바, 첫째는 면역 기능의 미성숙으로 인해 병변이 경미하거나 안 나타날 가능성이 있다. 본 실험에서 어린 동물의 병변이 잠복기가 짧고 병변 및 임상증상이 심하여 부종 및 괴사를 흔히 동반하는 점 등은 혈뇌장벽의 미성숙에 기인하나 성숙동물에 비

해 대뇌부침범이 적고 척수의 회백질 침범이 흔한 점 등은 면역 기능의 능력과 연관이 있을 것으로 추측된다. 다만 본 실험에서는 성숙동물은 그간 여러가지의 면역 경험에 의해 개체간에 매우 다른 반응을 나타내는 점이 또 하나의 특징으로 지적될 수 있다.

본 실험에서 어린 기니픽은 천수부부터 병변이 발생하여 점차 상부로 진행하였으며 임상증상도 뒷다리의 마비가 먼저 시작하고 몸통의 근육이 위약해진 후 앞다리의 마비를 보이는 진행성 경과를 밟고 있다. 이러한 결과는 설치류를 이용한 여러 실험^{21,22)}에서 공통적으로 나타났기 때문에 그의 원인이 무엇인가가 주목을 받게 되었다. 혹자는 서혜부 림프절에 항원을 주입하여 발생한 병변이 천수부부터 발생함을 관찰하고 주입시킨 위치와 연관이 있을 가능성을 언급하였으나 본 실험에서는 오히려 경수부에 가까운 목덜미에 주사하였기 때문에 주입 위치와 무관함을 입증하고 있고 이론적으로도 병변은 혈액내 세포에 의해 일어나므로 설득력이 없는 설명이다. 또한 항원으로 소뇌 또는 대신 척수를 사용하였기 때문에 척수에 더욱 심한 병변이 일어났으리란 가정은 척수 대신 대뇌를 이용한 시험에서도 유사한 결과가 나타남으로 인정받지 못하고 있다¹⁵⁾.

이번 관찰의 결과 천수부가 경수부에 비해 혈관투과성이 더욱 심하게 증가하는 점은 진행성 병변의 이해에 큰 도움이 될 것으로 생각되는 바, 세포침윤에 비해 더욱 현저한 혈관투과성 증가를 보임은 곧 이 부위가 타 부위에 비해 혈뇌장벽의 감수성이 예민하리란 추측을 가능하게 하며 이것이 입증된다면 천수부부터 병변이 시작하는 현상을 설명할 수 있기 때문이다. 이제껏 보고된 대부분의 문헌에서 천수부가 경수부에 비해 또는 대뇌에 비해 현저히 심한 병리학적 소견을 보이며 혈뇌장벽의 파괴가 가장 심하다고 알려져 있으나, 천수부에서 병리학적 소견에 비해 더욱 심한 혈관투과성 증가가 있음은 아직 언급된 바 없다. 이는 병리학적 소견 또는 혈뇌장벽 파괴를 각각 관찰한 문헌은 많으나 이를 연관지어 관찰한 논문이 희귀한 때문일 것으로 추측된다. 그러나 mannitol과 dextran의 혈관투과성과 DNA 함량을 비교한 Oldendorf 등²²⁾의 연구에 의하면 실험적 뇌척수염의 경과중 요수부에서는 혈관투과성이 정상에 비해 9~22배 증가하는데 비해 경수부에서는 2~4배 증가에 불과하였고, 세포침윤을 반영하는 DNA 함량의 증가는 요수부가 경수부의 2배를 넘지 아니하였다. 비록 언급하지 아니하였

으나 이러한 결과는 척수에서 미측(caudal) 일수록 세포침윤에 비해 더욱 심한 혈관투과성 변화가 있다는 증거이며 본 연구에서 세포침윤이 없는 곳에서도 혈관 투과성 항진이 증명되고 조직학적 변화에 비해 형광물질의 확산이 좀 더 근위부에서 관찰되는 소견과 일치하는 결론으로 해석된다.

Juhler 등²³⁾은 방사선 동위원소인 ²⁴Na⁺ 및 ³⁶Cl⁻를 함유하는 이당류를 사용하여 정량적으로 permeability surface area product를 구하여 시기별 및 부위별로 혈뇌장벽의 파괴를 비교하였던 바, 정상 대조군에서 대뇌 또는 소뇌에 비해 척수에서 그 수치가 약간 높았고 발병에 따른 증가는 척수에서 현저하였으며, 특히 경수에 비해 천수에서 그 증가가 더욱 두드러졌다. 이러한 결과를 본 연구의 결과와 비교할 때 혈뇌장벽의 파괴는 실험적 알러지성 뇌척수염의 발생기전과 밀접한 관련이 있으며 이는 연령 또는 부위에 따른 병변의 차이를 유발하는 인자로서의 역할을 시사하고 있다. 그러나 trypan blue를 사용한 Barlow²⁴⁾의 고전적 연구관찰에 의하면 기니픽에서는 혈관 주위의 병변에서도 투과성의 항진이 입증된 반면 원숭이에서는 병변이 실질을 침범할 경우에만 염료의 확산이 관찰되어 두 동물간에 전혀 다른 양상을 보여주고 있으므로 이러한 차이가 동물간의 차이에 기인할 가능성이 배제할 수 없다.

결 론

저자들은 1개월 및 4개월 생 기니픽에 동종의 척수조직을 완전프로인트 아쥘반트(Complete Freund's adjuvant)와 혼합한 후 피내주입하여 실험적 알러지성 뇌척수염을 일으켰으며, 면역 글로블린에 대한 면역형광 염색과 muramidase에 대한 PAP 염색법으로 침윤된 세포를 감별하는 동시에 형광물질을 혈관내 투여하여 혈뇌장벽의 파괴를 관찰하고 이를 광학현미경 소견과 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 발병에 의한 체중감소, 임상증상의 발현 및 광학현미경적 소견은 1개월 생 기니픽에서는 3주부터 관찰되기 시작하여 점차 심해지는 경향을 보였으나 4개월 생 동물에서는 발병이 더디었으며 발병율도 낮았다.
- 2) 병변은 척수의 천수부에 먼저 발생하고 경수부 및 대뇌로 진행되는 경과를 보였으며 혈뇌장벽의 파괴 및 임상증상도 같은 경과를 보였다. 또한 경수부에 비해 천수

부는 일반적으로 병변이 심할 뿐 아니라 염증세포의 침윤이 비슷한 병변에서도 천수부에서 혈뇌장벽의 파괴가 더욱 심하였다.

3) 어린 동물은 성숙동물에 비해 혈뇌장벽 파괴가 더욱 심하였으며 세포침윤이 없는 곳에서도 간혹 혈뇌장벽의 파괴가 관찰되었다.

4) 침윤된 세포 중에는 muramidase를 함유하는 조직구가 가장 많았으며 이들은 뇌 실질내로 침윤하고 있었고 병변이 진행할수록 그비율이 증가하였다. 반면 면역글로블린을 함유하는 B세포 및 형질세포는 혈관 주위에 국한되어 있었다.

이상의 관찰 결과로 병변에 포함된 세포의 대부분이 교세포 증식이 아니라 단핵구 유래의 침윤세포임을 확인하였으며, B세포 및 형질세포도 병변내에 존재하였다. 또한 이상의 소견과 더불어 뇌척수의 미측(caudal)에 병리학적 변화가 심하며 혈뇌장벽 파괴가 먼저 시작하는 점 등으로 미루어 실험적 알러지성 뇌척수염의 발생기전에 혈뇌장벽의 파괴가 관여할 것으로 추측되었다.

REFERENCES

- 1) Mehta PD, Lassmann H, Wisniewski HM: *Immunologic studies of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs: Similarities to multiple sclerosis.* J Immunol 127:334-338, 1981
- 2) Ackermann HP, Ulrich J, Heitz U: *Experimental allergic encephalomyelitis. Exsudate and cellular infiltrates in the spinal cord of Lewis rats.* Acta Neuropathol (Berl) 54:149-152, 1981
- 3) River TM, Sprunt DH, Berry GP: *Observation on attempt to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkey.* J Exp Med 58:39-54, 1933
- 4) Raine CS, Stone SH: *Chronic experimental allergic encephalomyelitis in inbred guinea pigs.* NY State J Med 77:1693-1696, 1977
- 5) Ortiz-ortiz L, Weigle WO: *Cellular event in the induction of experimental allergic encephalomyelitis in rats.* J Exp Med 144:604-616, 1976
- 6) Paterson PY: *Transfer of allergic encephalomyelitis by means of lymph nodes cells.* J Exp Med 111:119-136, 1960
- 7) Appel SH, Bornstein MB: *The application of tissue culture to the study of experimental allergic encephalomyelitis.* J Exp Med 111:119-136, 1960

- lomyelitis. II Serum factors responsible for demyelination. *J Exp Med* 119:303-312, 1964
- 8) Gonatus NK, Gonatus JO, Stieber A, Lisak R, Susuki K, Martenson RE: The significance of circulating and cell-bound antibodies in experimental allergic encephalomyelitis. *Am J Pathol* 76:529-547, 1974
- 9) Oldstone MBA, Dixon FJ: Immunohistochemical study of allergic encephalomyelitis. *Am J Pathol* 52:251-257, 1968
- 10) Eickhoff K, Wikstroem J, Poser S, Bauer H: Protein profile of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis with special reference to the function of the blood-brain barrier. *J Neurol* 214:207-215, 1977
- 11) Aita JF, Bennt DR, Anderson RE, Ziter F: Cranial CT appearance of acute multiple sclerosis. *Neurology* 28:251-255, 1978
- 12) Lassman H, Wisniewski HM: Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. Clinicopathological comparison with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 36:490-497, 1979
- 13) Sobel RA, Blanchette BW, Bhan AK, Colvin RB: The immunopathology of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 135:2393-2401, 1984
- 14) Pinkus GS, Said JW: Profile of intracytoplasmic lysozyme in normal tissue, myeloproliferative disorder, hairy cell leukemia and other pathologic processes. An immunoperoxidase study of paraffin section and smears. *Am J Pathol* 89:351-366, 1977
- 15) Waksman BH, Adams RD: A histologic study of early lesion in experimental allergic encephalomyelitis in the guinea pig and rabbit. *Am J Pathol* 41:135-162, 1962
- 16) Koprowski H, Paraf A, Billingham R, Jervis G: Etudes sur le mecanisme de l'encephalite allergique chez le rat. (Studies on the mechanism of allergic encephalitis in the rat) *CR Acad Sci* 250:2956-2958, 1960 (cited from Dal Canto MC et al, 1977)
- 17) Paterson PY, Brobush DG, Hanson MA, Jacob AF: Induction of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rat. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 37:26-40, 1970
- 18) Dal Canto M, Fujinami RS, Paterson PY: Experimental allergic encephalomyelitis in suckling Lewis rats. Comparison with the disease in adult animals. *Lab Invest* 37:395-406, 1977
- 19) Raine CS, Snuder DH, Valsamis MD, Stone SH: Chronic experimental allergic encephalomyelitis in inbred guinea pigs. An ultrastructural study. *Lab Invest* 31:369-380, 1974
- 20) Stone SH, Lerner EM, Goode JH Jr: Acute and chronic auto-immune encephalomyelitis: age, strain, sex dependency: the importance of source antigen. *Proc Soc Exp Biol Med* 132:341-344, 1969
- 21) Levine S, Hirano A, Zimmerman HM: Hyperacute allergic encephalomyelitis, electron microscopic observation. *Am J pathol* 47:209-221, 1965
- 22) Oldendorf WH, Towner HF: BBB and DNA changes during the evolution of experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuropath Exp Neurol* 33:616-631, 1974
- 23) Juhler M, Barry DI, Offner H, Konat G, Klinken L, Paulson OB: Blood-brain and blood-spinal cord barrier permeability during the course of experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Brain Res* 302:347-355, 1984
- 24) Barlow CF: A study of abnormal blood brain permeability in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuropath Exp Neurol* 15:196-207, 1956

— Abstract —

Immunohistopathologic Changes in Experimental Allergic Encephalomyelitis

Woo Ho Kim, M.D., Je G. Chi, M.D.
and Sang Kook Lee, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine
Seoul National University

Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) has been a well established animal model of postvaccinatal demyelinating disease occurring in humans. Therefore elucidation of its pathogenesis would be very critical for the understanding of various human demyelinating diseases including multiple sclerosis.

This study was performed to characterize the infiltrating cells in inflammatory sites and analyze the nature of the damage of blood brain barrier in experimental allergic encephalomyelitis. Experimental allergic encephalomyelitis was produced by administering homologous spinal cord homogenate together with complete Freund's adjuvant in guinea pigs. Immunostainings on guinea pig IgG, IgM, IgA and muramidase were performed by peroxidase-antiperoxidase or indirect im-

munofluorescent methods. The blood-brain barrier change was assessed by administering fluorescent Evans blue.

Following results were made. In juvenile animals, both clinical findings and histopathologic changes were first noted by 3 weeks after injection and progressed during the whole experimental period. However, these findings were delayed in onset and low in incidence in adult animals.

The clinical and pathologic changes started from the caudal portions and extended rostrally. The blood-brain barrier (BBB) was damaged and progressed starting

also from the caudal portion of the spinal cord. The BBB changes were more severe in young animal than adult animals. Those changes preceded the histologic alterations. It is suggested that the BBB susceptibility is responsible for the caudal onset of histologic changes.

Although the lesion has been thought to be induced by T-cell mediated hypersensitivity, infiltrating cells consisted mainly of muramidase positive histiocytes. A few immunoglobulin positive B cells or plasma cells could also be demonstrated in the lesion. The former usually infiltrated the parenchyme and the latter remained around the small or medium-sized vessels.

Legends for Figures

- Fig. 4.** Microscopic picture of early lesion. There are several lymphocytes around a small vessel. Those cells are confined to the Virchow-Robin space. The surrounding parenchyme is devoid of any alteration. (Luxol fast blue-hematoxylin eosin, $\times 400$)
- Fig. 5.** Microscopic picture of white matter lesion. The nerve cell nuclei show pyknosis and hyperchromasia. Vessels are surrounded by histiocytes, resembling granulomatous lesion. Neutrophilic infiltration is also observed. (Luxol fast blue-hematoxylin eosin, $\times 200$)
- Fig. 6.** Low power magnification of cross section of spinal cord (T3 segment) in juvenile guinea pig 5 weeks after sensitization (animal no. 17). Antero-lateral portion of the gray matter shows extensive demyelination and cellular exudation. (Luxol fast blue-hematoxylin eosin, $\times 40$)
- Fig. 7.** Higher magnification of the lesion shown above. Demyelination is evident at the upper half. Axons as well as myelin fibers are absorbed and replaced by inflammatory cells. White matter (lower portion) is relatively unaffected. (Luxol fast blue-hematoxylin eosin, $\times 100$)
- Fig. 8.** Peroxidase-antiperoxidase staining against IgA. Some of the perivascular infiltrates are IgA positive. IgM and IgG positive cells share the same distribution. ($\times 400$)
- Fig. 9.** Peroxidase-antiperoxidase staining against muramidase. Muramidase positive cells (histiocytes) are scattered at the parenchyme rather than perivascular region. ($\times 400$)

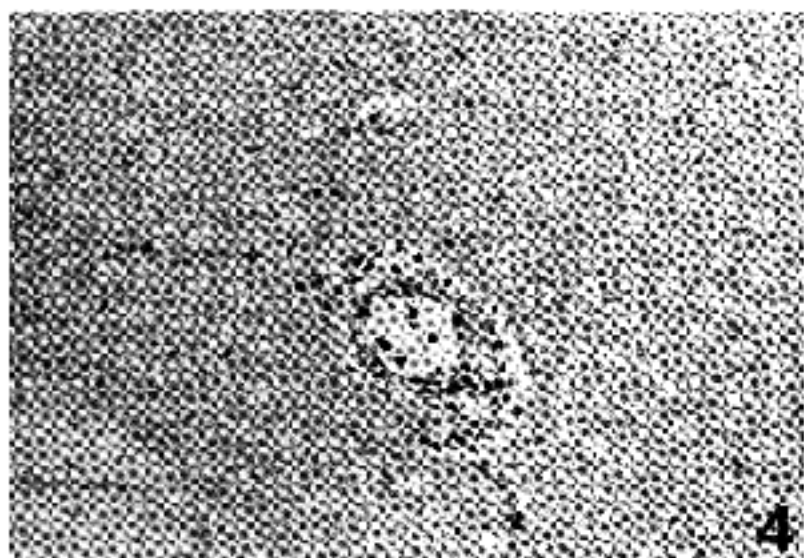


Fig. 4.



Fig. 5.

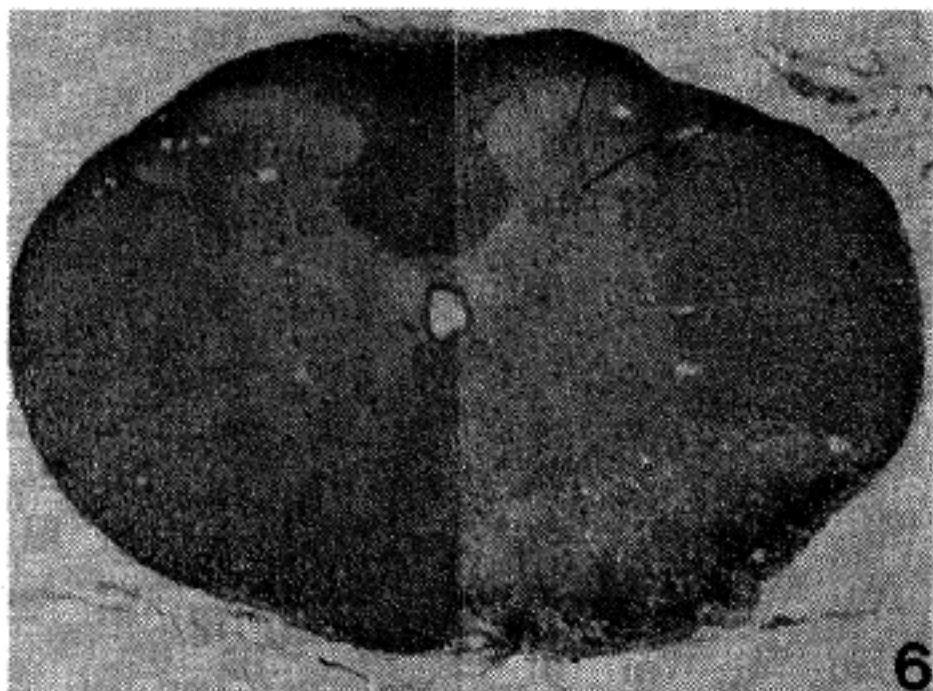


Fig. 6.



Fig. 7.

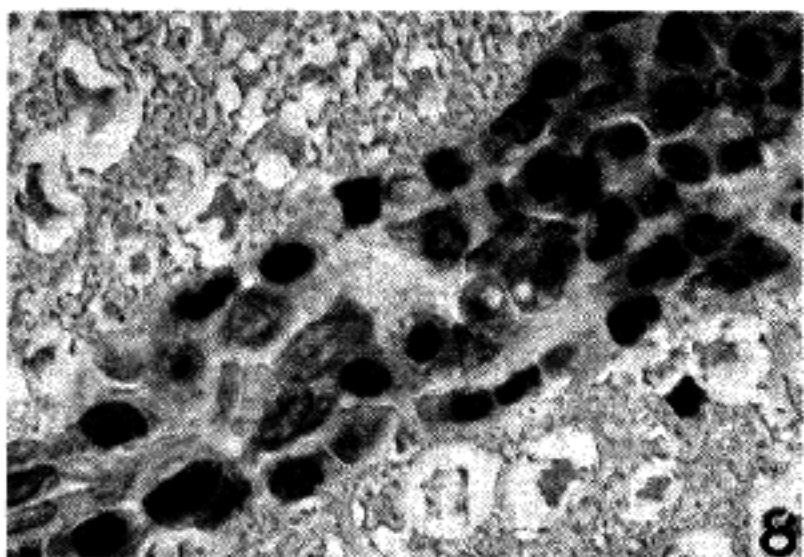


Fig. 8.

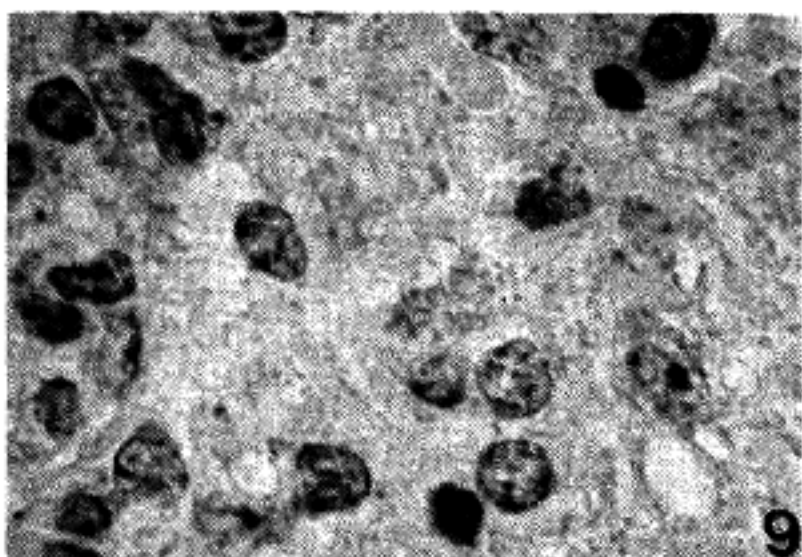


Fig. 9.