

사람에 감염된 Cytomegalovirus의 세포내 성숙과정의 전자현미경적 관찰

서울대학교 의과대학 병리학교실

윤 철 종 · 지 제 근

Ultrastructural Observation on Maturation Process of Cytomegalovirus in Human Cells

Chul Jong Yoon, M.P.H. and Je Geun Chi, M.D.

Department of Pathology, Seoul National University College of Medicine

Cytomegalovirus(CMV) infection can be diagnosed by finding characteristic intranuclear inclusion body and enlargement of the cell size. Congenital CMV infection can be associated with various types of anomalies seen in different gestational age. These anomalies are probable due to direct virus infection of the parenchymal cell in early gestation.

Based on four autopsy cases of congenital CMV infection we have studied maturation process of virus particles in parenchymal cells, with special reference to the mode of replication and transmission.

Virus particles in CMV-infected cells in brain and kidney showed nucleocapsids with characteristic concentric core, that were enclosed around fibrillar network in nucleus. During replication process virions showed various morphogenic mutation that was rather consistent in different tissues and individuals. There were virions without core or with eccentric core. Occasional cores were divided into 2~5 fragments. The virus particles reached the cytoplasm through the nuclear membrane, and here the virions increased twice in size. After virions were fully matured in the cytoplasm, they showed exocytosis phenomenon through the cellular membrane to reach extracellular portion. (**Korean J Pathol 1994; 28: 478~484**)

Key Words: Cytomegalovirus (CMV), Electron Microscopy, Infection, Replication, Fetus

서 론

Cytomegalovirus(CMV)는 건강한 여성에서도 약 10%가 자궁경부에서 검출되며 임신중 태아에게 감염되거나 또는 출생직후에 출산경로를 통하여 감염이 되므로 심한 선천성 기형이나 질환을 유발한다¹⁻⁴⁾. CMV는 침샘, 뇌, 폐, 간, 췌장, 신장등 모든 장기에

침입이 가능하며 감염된 세포는 핵과 세포질에 거대한 봉입체를 만들어 광학현미경으로도 진단이 가능하다. 본 연구는 선천성 CMV감염질환으로 사망한 태아의 뇌조직과 신장조직에서 CMV가 어떻게 증식하고 성숙하여 세포밖으로 나가는가를 밝히기 위하여 감염과정을 투과형 및 주사형 전자 현미경으로 관찰하였다.

재료 및 방법

이 연구에 사용된 증례는 1987년부터 1993년까지 서울대학교 어린이병원 병리과에 의뢰된 부검 및 생검 중 4예의 부검과 1예의 생검으로서 그 중요 임상 및

접 수: 1994년 3월 10일, 게재승인: 1994년 4월 28일
주 소: 서울시 종로구 연건동 28번지, 우편번호 110-744
서울대학교 의과대학 병리학교실, 지제근

병리학적 소견은 Table 1과 같다.

투과형 전자현미경검사를 위한 과정으로 포르말린에 고정된 조직을 인산 완충액으로 24시간동안 충분히 수세하고 1% OsO₄로 2차 고정을 1시간 처리후 60% 에탄올부터 순수한 에탄올로 점차적인 탈수를 거쳐 propylene oxide로 치환한 후 에폭시 수지에 포매하여 60°C oven에서 중합반응을 하였다. 생후 15일된 남아의 조직은 광학현미경용 파라핀에 포매되어 있었으므로 탈 파라핀과정을 거쳐 함수시킨 후 1% OsO₄로 2차 고정을 2시간 처리후 에탄올 탈수과정을 거쳐 일반 전자현미경을 위한 방법으로 처리하였다. 조직은 1 μm두께의 절편을 만들어 톨루이딘 블루 염색을 하여 CMV 감염된 봉입체가 있는 부위를 선택하여 60

~80 nm두께의 초박절편을 만들고 uranyl acetate와 lead citrate로 각각 30분, 2분씩 염색을 시행하였다. 관찰은 투과형 전자현미경(Hitachi H-600, Japan)으로 가속 전압 75 KV에서 3,000~150,000배로 관찰하였다.

주사형 전자현미경(Hitachi S-520, Japan) 관찰을 위한 과정으로 에탄올 탈수과정까지는 투과형 전자현미경과 동일하게 시행한 후 순수한 에탄올을 isoamyl acetate로 치환한 다음 액체 이산화탄소를 이용한 임계점 건조기(Hitachi HCP-2, Japan)로 건조하여 알루미늄 재료대위에 전도성 접착제(silver paste)로 고정시킨 후 이온피막기(Eiko IB-3, Japan)로 피막(Pt-Au)을 입힌 후 가속전압 25 KV에서 관찰하였다.

Table 1. Case summary

Case	Age	Sex	Infected tissues	Associated findings
1.	SB(26 wk)	F	Brain, kidney	Hepatosplenomegaly
2.	SB(38 wk)	M	Brain, Kidney	Hepatosplenomegaly, cephalhematoma
3.	3 day	M	Kidney	Hydrocephalus, corneal opacity, Hepatosplenomegaly
4.	15 day	M	Kidney	Malformed kidney
5.	21 day	M	Kidney	Jaundice, Hepatosplenomegaly,

SB: stillborn

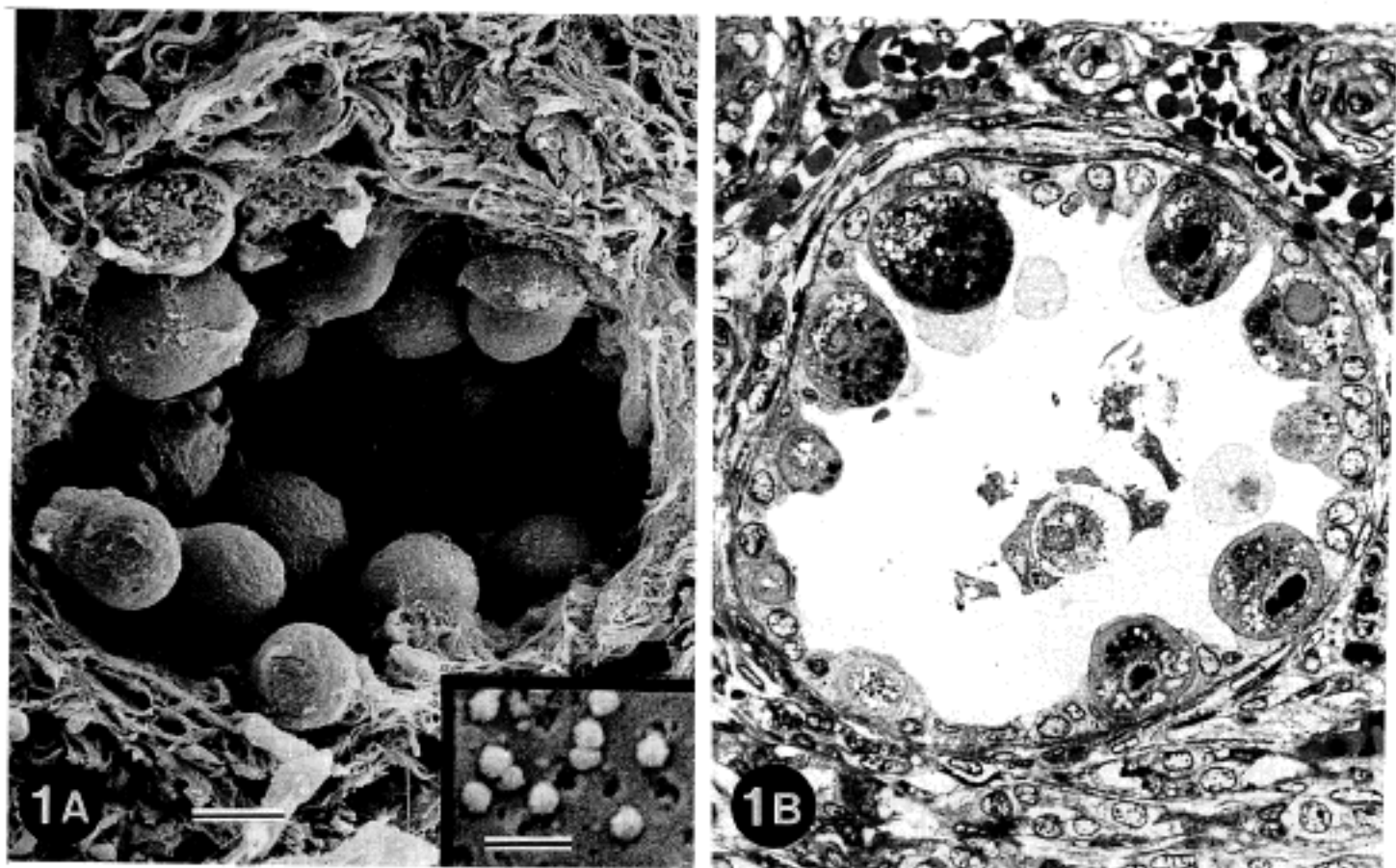


Fig. 1. Distal convoluted tubule of the kidney reveals CMV-infected cells. SEM(A): Cytomegalic cells with CMV. × 1,000. Bar represents 10 μm. Inset: Exocytosis process of CMV. × 25,000. Bar represents 400 nm. LM(B): 1 μm section & toluidine blue staining. × 1,000

결 과

광학현미경상에서 큰 봉입체를 갖는 뇌조직과 신장 조직을 투과형 전자현미경으로 관찰한 결과, 많은 수의 바이러스입자가 세포의 핵과 세포질에서 흔히 관찰되었는데 뇌조직에서 보다는 신 세포관의 상피세포에서 더 많이 관찰되었고(Fig. 1) CMV 입자는 두가지 성숙양태를 보였다. 즉 정상적인 과정을 통해 성숙되는 것과(Fig. 2A) 여러가지로 그 형태가 변형된 것으로서(Fig. 2B) 이들 CMV 입자가 세포질막을 통과하여 세포밖으로 나가는 모습도 관찰되었다.

핵내에 있는 CMV는 비교적 세포의 형태가 잘 보존된 상태에서 약 200~600 nm 두께의 망상구조나 작은 핵소체와 같은 구상구조를 이루는 염색질에 인접하여 관찰되었으며(Fig. 3) 이때 nucleocapsid의 직경이 약 80 nm, core는 50 nm 크기로 투과형 전자현미경에서 6각형, 5각형 혹은 원형으로 관찰되었으며 core는 절편의 방향에 따라 간상체 혹은 원형으로 전자밀도가 높게 나타났다(Fig. 4). CMV는 염색질이 많이 모여 있는 곳(heterochromatin)의 주위에 집중해 있으나 핵내의 CMV 숫자가 점차 증가하면서 전자밀도 높은 염색질이 없어지고 CMV도 고르게 분포하였다.

한편 관찰된 CMV 중에도 core 없이 nucleocapsid만 있어 속이 빈 것처럼 보이는 것과 core와 같은 전자밀도를 갖고 nucleocapsid를 채우고 있는 것

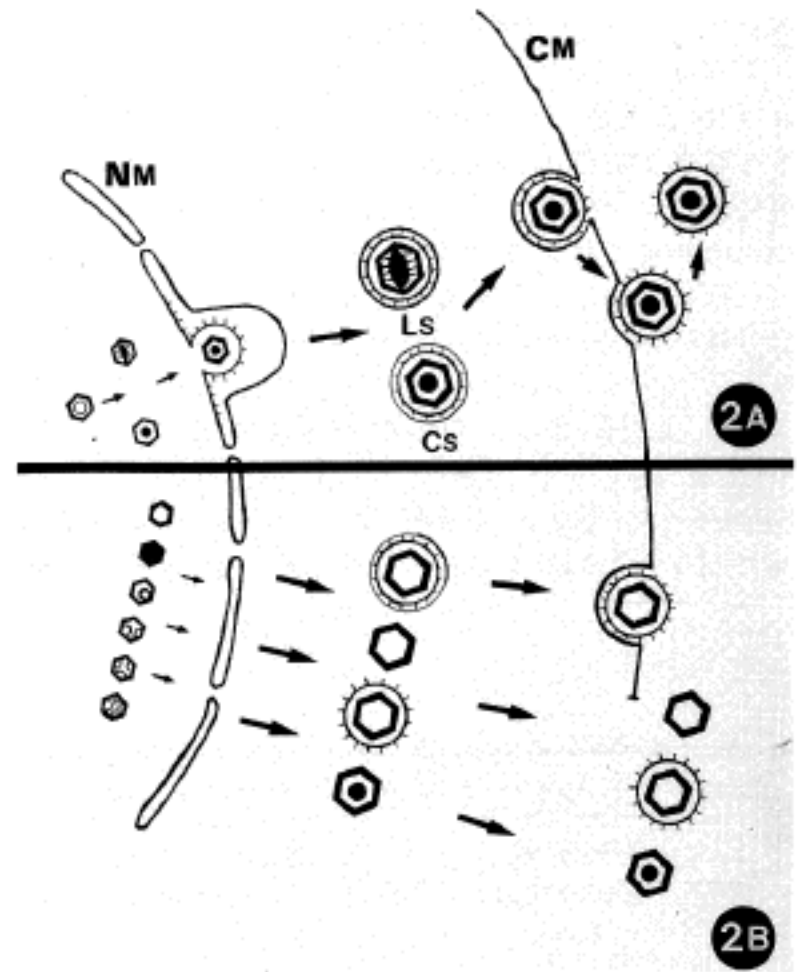


Fig. 2. Schematic diagram of maturation process of cytomegalovirus(CMV). Normal process(A). Mutation process(B). LS: Longitudial section, CS: Cross section. CM: Cytoplasmic membrane, NM: Nuclear emembrane.

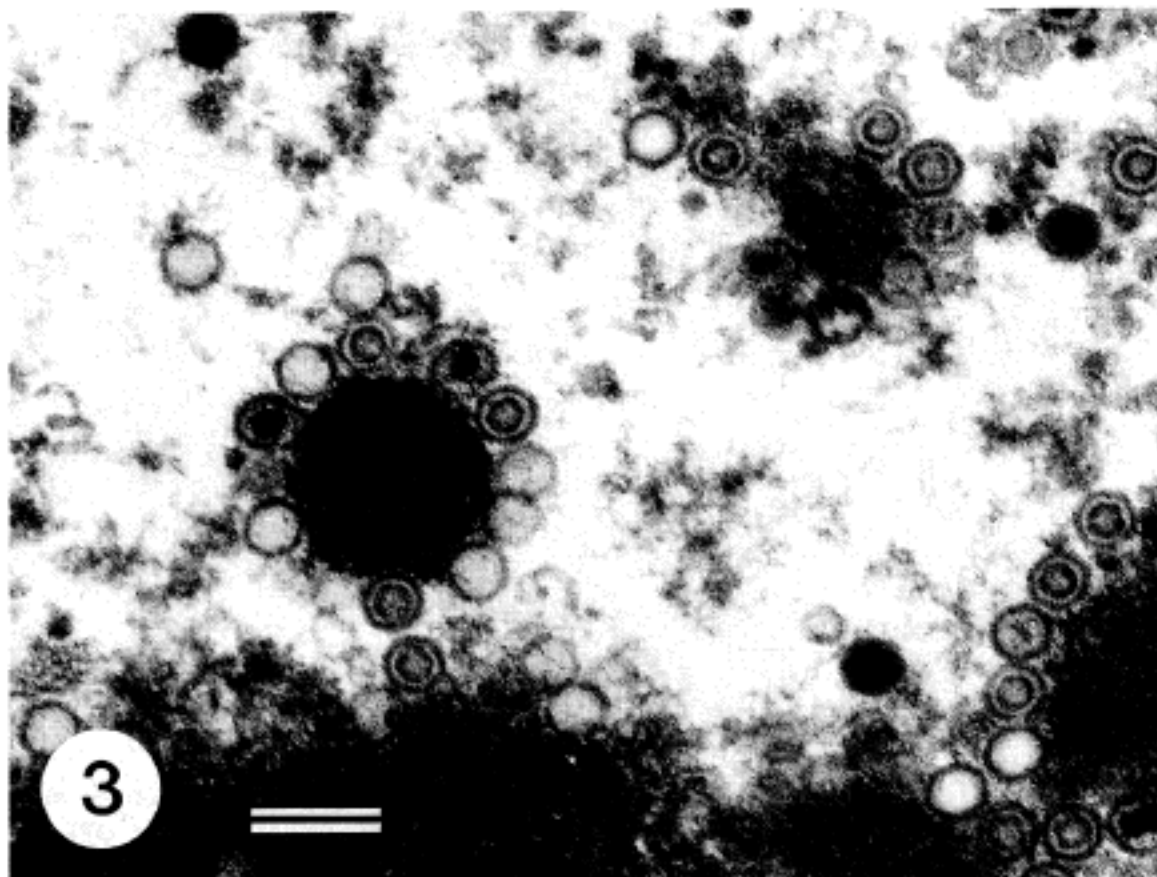


Fig. 3. Rosette formation of CMV around a small nucleolus or network-like chromatin in the infected cell. $\times 45,000$. Bar represents 220 nm.

이 소수 있었다. 그런가하면 core가 있되 중앙에 있지 않고 nucleocapsid의 안쪽에 있거나 2~5조각으로 흩어져서 nucleocapsid 안쪽 벽에 부착되어 있는 것도 있었다(Fig. 5). 이처럼 변형된 CMV는 감염된 세포의 세포질의 손상이 심하거나 초기 복제증식때 보다는 말기의 세포일수록 많은 비율로 발견되었다. 즉 핵내의 CMV의 복제는 염색질이 거의 다 소모될 때까지

진행되며 말기에 세포질이 붕괴된 후에는 비정상적인 것이 대부분으로 core가 없이 nucleocapsid만 있었다(Fig. 6).

CMV가 핵내에서 증식된 이후 비교적 세포의 상태가 유지되었을 때에도 세포질내에서는 외부의 새로운 CMV에 대한 식세포작용이 진행되는 모습도 관찰할 수 있었다. 세포질내의 capsid는 핵내의 nucleo-

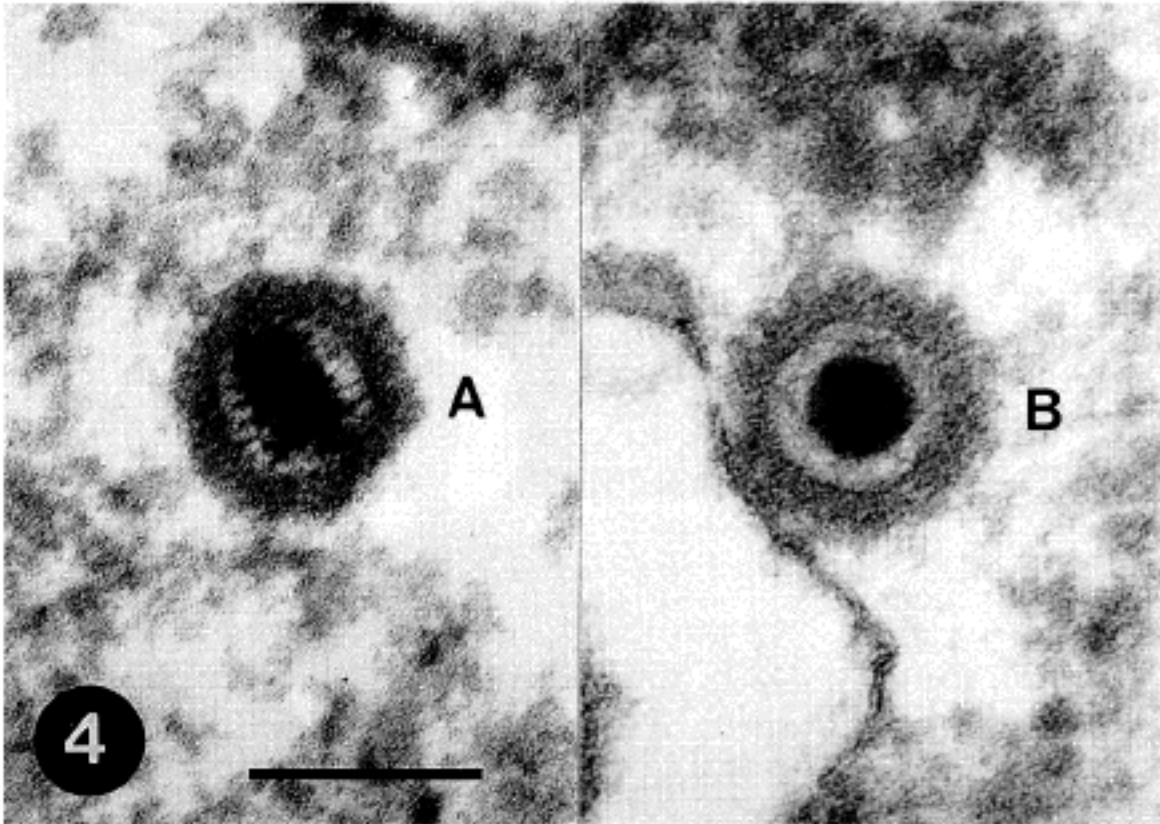


Fig. 4. A: Longitudinal section of CMV. The core is rod-shaped with fibrillar lamella. $\times 140,000$. Bar represents 130 nm. B: Cytomegalovirus cut across. $\times 200,000$. Bar represents 150 nm.

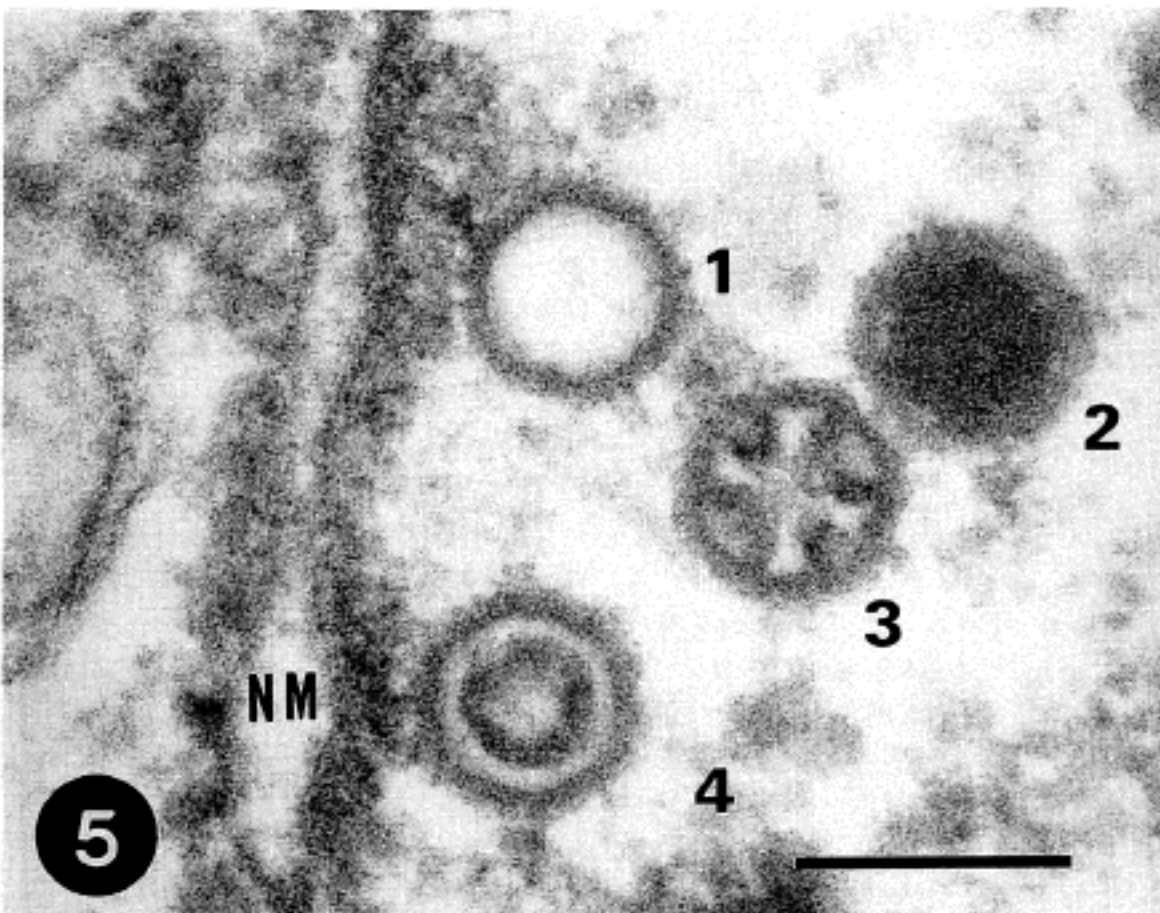


Fig. 5. Empty capsid(1), full core(2), core divided into four pieces(3) among the mutants and normal immature nucleocapsid(4). NM: Nuclear membrane. $\times 170,000$. Bar represents 120 nm.

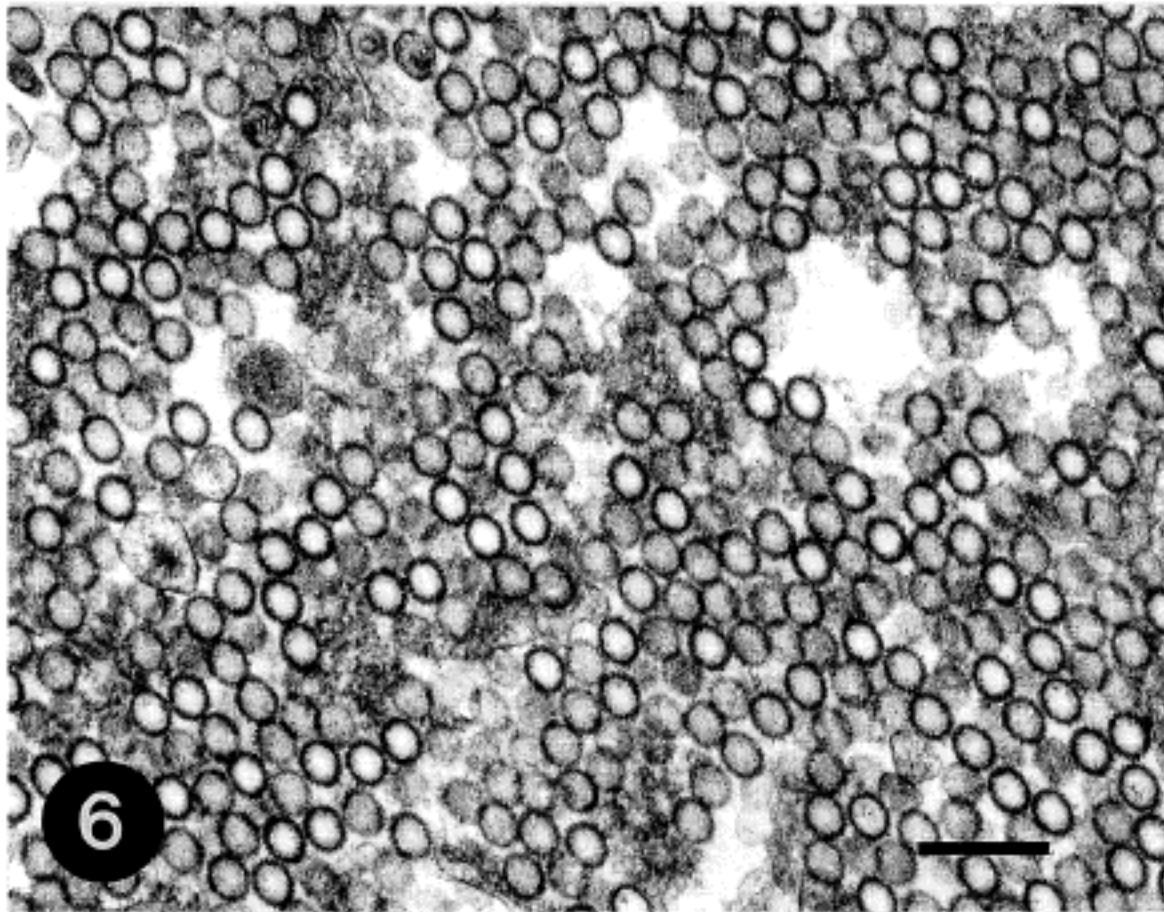


Fig. 6. Predominant empty capsids in exhausted nucleus. $\times 40,000$. Bar represents 250 nm.

capsid보다 직경이 2배로 약 120~180 nm이며 외투막(envelope)을 갖고 있는 것이 대부분이나 없는 것도 동시에 발견되었다. 즉, CMV는 세포에 감염된 후 핵내에서 복제증식한 후 세포질내로 이동할 때 핵막을 통과하면서 외투막을 갖고 세포질로 이동하여 세포밖으로 나가는 것이 발견되었는데 이때 주사형 전자현미경(SEM)에서 세포질막을 나가는 CMV가 관찰되었다(Fig. 1 A, Inset).

그외의 세포내 변화는 감염된 세포의 조면소포체의 얇은 층상구조가 점차 팽창하여 원형으로 되며 층상구조에 붙어 있던 리보솜은 없어지고 나중에는 공포(vacuole)형태로 관찰되며 때로는 그 안에 많은 수의 CMV를 포함하고 있었다. 그러나 복제증식된 많은 양의 CMV들이 세포질내에 존재할 때는 내부를 급속히 팽창시키면서 출아형식을 거치지 않고 세포질과 같이 분출되는 모습이 관찰되었다. 그리고 신장의 세뇨관안에서 많은 CMV입자를 발견할 수 있었다.

고 찰

CMV는 임신초기에 태아에게 감염되면 간비대, 황달, 혈소판감소증, 소뇌증, 정신장애등 심한 기형을 초래하며³⁾ 소아에게 감염시는 경우에 따라 생명에 위협을 줄 만큼 위험하고 출산후 주로 모체의 타액등 모든 분비물로 감염될 수 있으며 모유로도 신생아에게 감염된다⁶⁻⁹⁾. 이와 같은 전파양식은 본 연구에서 관찰된 뇌세포와 신 세뇨관의 상피세포의 소견 특히 핵에서

세포질로, 그리고 세포질에서 세포막을 뚫고 외부로 나오는 양식과 연관할 수 있으며 인체의 모든 체액을 통하여 감염이 될 수 있음을 이해할 수 있었다. 이런 소견은 선천성 감염과 후천성 감염에 차이가 없었다^{1,10)}.

CMV는 Herpes과(family)에 속하는 바이러스중에서 가장 큰 바이러스로 크기는 120~200 nm범위에 포함된다^{11,12)}. 형태학적으로 herpes virus와 같아 보이지만 core형태나¹³⁾ 단백질구조에서 차이가 있다¹⁴⁾. 세포질에서는 capsid를 싸고 있는 구형의 외투막을 볼 수 있는데 이는 세포막의 구성성분인 지질단백질막으로 이루어져있고 바이러스가 숙주세포의 표면의 수용부위에 침입할 때 중요한 역할을 한다^{15,16)}. 그리고 외투막표면의 바늘 못(spike) 모양의 성분은 당단백질로 이루어져 있다¹⁾. Capsid는 원래 20면체이나¹⁷⁾ 투과형 전자현미경으로는 6각형이나 5각형으로 혹은 원형으로 관찰되었다.

Smith등¹⁸⁾은 체외 실험에서 CMV가 새로운 세포에 감염될 때는 3분내에 세포질막을 용해하거나 식세포작용에 의해서 침입하고 capsid는 핵산물질로 미세한 섬유상 구조물로 세포질을 경우하여 핵이 있는 방향으로 이동하여 핵공 주위로 접근함을 보고하였다. 그는 단순포진바이러스(HSV)와 CMV의 감염시간차이에 따른 미세구조를 비교하여 구분한 바 CMV에서는 세포내에서 외투막이 없거나 capsid만 있는 것, 그리고 capsid내에 전자밀도 높은 것으로 가득 찬 것을 보고하였다^{17,19)}. 이러한 소견들은 본 증례들에서도

확인되었다. CMV에 감염된 세포들은 방추모양에서 구형이나 난원형으로 되는데^{20,21)} 이 같은 현상의 주요 원인은 조면소포체가 거대 공포화하는 것으로 사료되며 따라서 CMV에 감염된 세포는 경우에 따라 직경 25~40 μm 로 핵과 세포질을 크게 팽창시킬 수 있다고 보고되어 있다^{1,20,21)}.

Iwasaki 등²²⁾, Ruebner 등²³⁾ 그리고 Albrecht²⁴⁾은 사람의 이배체(diploid)세포에 CMV를 감염시킨 후 48시간내에 핵내에서 적은 수의 CMV를 발견할 수 있으며 72시간에서 96시간이 되면 핵내에 염색질같은 둥근 입자상의 봉입체가 형성되고 이때 core는 둥근 모양이거나 긴 타원이라고 보고하였고 속이 빈 nucleocapsid와 전자밀도높은 core를 갖춘 nucleocapsid, 전자밀도가 낮은 core의 nucleocapsid 등 3종류로 분리하였다^{19,21,25)}. 그러나 본 증례에서는 위의 3종류외에도 core가 중앙에서 한쪽면으로 치우친 capsid, core가 2~5조각으로 나누어져서 nucleocapsid의 안쪽면에 붙은 경우 그리고 core의 구분없이 전체적으로 전자밀도가 높게 보이는 nucleocapsid 등의 구조도 아울러 관찰되었다.

CMV가 핵막밖으로 나오는 과정은 출아하듯이 주머니(sac-like membrane) 모양으로 세포질내로 나오는 것을 볼 수 있었는데 이 경우 초기 출아단계에서는 핵막의 보존상태가 비교적 양호한 것으로 알려졌다^{10,13,17,26,27)}.

조직의 보존상태가 좋지않은 세포의 괴사상태에서도 투과형 전자현미경에서는 관찰이 가능하며²⁸⁾ 이는 바이러스가 외부환경에 저항이 크기 때문인 것으로 사료된다. 본 조직중에는 약 6년동안 포르말린에 고정된 것과 탈 파라핀을 한 조직임에도 불구하고 CMV감염 조직은 전자현미경(TEM)으로 관찰하는 것이 진단에 큰 도움을 줄 것으로 생각되었다.

결 론

인체에 감염된 cytomegalovirus(CMV)의 증식과 전파양식을 알아 보기 위하여 4예의 부검과 1예의 생검조직을 대상으로하여 전자현미경적 연구를 시행하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 감염된 CMV는 세포의 핵에 침입하여 복제증식하며 핵내에서 망상구조의 염색질을 형성하는데 더 진행되면 구상 염색질을 동반하였다. CMV가 숙주의 핵내에서 복제되는 과정에서 정상적인 구조를 갖고 있는 것 이외에도 여러가지 형태를 보였는데 그 중에는 core가 없는 것, core가 nucleocapsid의 한 쪽으로 치우친 것, core가 nucleocapsid 내측에 1~5개의 조각으로 있는 것등이 관찰되었으나 어떤 경우에는 nucleocapsid만은 형태의 변화가 없었다. 이들 비정상적인 구조의 CMV는 복제초기부터 관찰되었다.

2) 세포질내의 CMV는 핵안에 있는 것에 비하여

직경이 약 2배이며 대부분 정상적인 구조를 갖추고 있었으나 capsid만 있는 것, core없이 capsid와 외투막을 갖고 있는 것도 관찰되었다. 투과형 전자현미경에서 CMV의 capsid는 6각형, 5각형 혹은 원형으로 관찰되며 core는 미성숙상태일 때는 원형이지만 성숙된 것은 막대모양으로 5~6개의 섬유상 층상구조로 capsid 내부와 연결되어 있었다.

3) 핵내의 CMV는 핵막을 통과하여 세포질을 경유하여 세포질막을 통하여 세포밖으로 나가는 것이 일반적으로 관찰되었으나 많은 양의 CMV를 갖은 세포질은 급속히 팽창하여 세포질막을 파괴하며 유출되는 것도 관찰되었다. 그리고 세포질이 대부분 파괴되어 없어진 후에도 핵내에서는 CMV가 계속적으로 복제증식되고 있는 모습이 관찰되었다. 그러나 이 경우 core가 없이 capsid만 있는 비정상적인 구조의 CMV가 대부분이었다.

4) CMV가 복제증식할 때 조면소포체는 초기의 층상구조에서 팽창하여 점차 원형으로 변하여 세포질 전체가 부풀었으며 핵은 초기에는 팽창하다가 다량의 CMV유출후 염색질의 전자밀도가 약해지면서 핵막과 함께 위축된 모습으로 관찰되었다.

감사의 글

이 논문을 위하여 자료와 이해를 도와 주신 충북대학교 자연대학 미생물학과의 이찬희선생님, 서울대학교병원 산부인과 오선경선생님께 감사합니다.

참 고 문 헌

- 1) Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. *Cytomegalovirus*. In: *Review of medical microbiology*. 17th ed, California: Appleton & Lange, 1987; 508-10.
- 2) Brasfield DM, Stagno S, Whitley RJ, Cloud G, Cassell G, Tiller RE. *Infant pneumonia associated with cytomegalovirus, chlamydia, pneumocystis and ureaplasma: Follow-up*. *Pediatrics* 1987; 79: 76-83.
- 3) Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Henderson RE, Moore EG, Walton PD, Alford CA. *Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infection*. *N Engl J Med* 1982; 306: 945-9.
- 4) Pass RF, Stagno S, Myers GJ, Alford CA. *Outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of long-term longitudinal follow-up*. *Pediatrics* 1980; 66: 758-62.
- 5) Numazaki Y, Yano N, Morizuka T, Takai S, Ishida n. *Primary infection with human cytomegalovirus: Virus isolation from healthy infants and pregnant*

- women. *Am J Epidemiol* 1970; 91: 410-7.
- 6) Dworsky M, Yow M, Stagno S, Pass RF, Alford C. *Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. Pediatrics* 1983; 72: 295-9.
 - 7) Stagno S, Reynolds DW, Pass RF. *Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. N Engl J Med* 1980; 302: 1073.
 - 8) Pass RF, Stagno S, Dworsky ME, Smith RJ, Alford CA. *Excretion cytomegalovirus in mothers: Observations after delivery of congenitally infected and normal infants. J Infect Dis* 1982; 146: 1-6.
 - 9) Knox GE, Pass RF, Reynolds DW, Stagno S, Alford CA. *Comparative Prevalence of subclinical cytomegalovirus and herpes simplex virus infections in the genital and urinary tracts of low-income, urban women. J Infect Dis* 1979; 140: 419-22.
 - 10) Ho KI, Gotllieb C, Zarbo RJ. *Cytomegalovirus infection of cerebral astrocytoma in an AIDS patient. Clin Neuropathol* 1991; 10: 127-33.
 - 11) Singleton P, Sainsbury D. *Herpesviridae. In: Dictionary of microbiology and molecular biology. 2nd ed, Singapore: John Wiley & Sons Ltd. 1988; 417-8.*
 - 12) De Marchi JM, Blankenship ML, Brown GD, Kaplan AS. *Size and complexity of human cytomegalovirus DNA. Virology* 1978; 89: 643-6.
 - 13) Sarov I, Abady I. *The morphogenesis of human cytomegalovirus: Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirions and dense bodies. Virology* 1975; 66: 464-73.
 - 14) Ebeling A, Keil G, Nowak B, Fieckenstein B, Berthelot N, Sheldrick P. *Genome structure and virion polypeptides of the primate herpesviruses Herpesvirus aotus types 1 and 3: comparison with human cytomegalovirus. J Virol* 1983; 45: 715-26.
 - 15) Singleton P, Sainsbury D. *Envelope. In: Dictionary of microbiology and molecular biology. 2nd ed, Singapore: John Wiley & Sons Ltd. 1988; 310-20.*
 - 16) Geelen JLMC, Waling C, Wertheim P, Van der Noordaa. *Human cytomegalovirus DNA: I. Molecular weight and infectivity. J Virol* 1978; 26: 813-16.
 - 17) McGavran MH, Smith MG. *Ultrastructure, cytochemical, and microchemical observations on cytomegalovirus (salivary gland virus) infection of human cells in tissue culture. Exp Mol Pathol* 1965; 4: 1-10.
 - 18) Smith JD, De Harven E. *Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. II. An ultrastructural study of viral penetration. J Virol* 1974; 14: 945-56.
 - 19) Smith JD, De Harven E. *Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. I. Sequence of viral replication. J Virol* 1973; 12: 919-30
 - 20) Albrecht T, Weller TH. *Heterogeneous morphologic features of plaques induced by five strains of human cytomegalovirus. AM J Clin Pathol* 1980; 73: 648-54.
 - 21) Kanich RE, Craighead JE. *Human cytomegalovirus infection of cultured fibroblasts: I. Cytopathologic effects induced by an adapted and a wild strain. Lab Invest* 1972; 27: 263-72.
 - 22) Iwasaki Y, Furukawa T, Plotkin S, Koprowski. *Ultrastructural study on the sequence of human cytomegalovirus infection in human diploid cells. Arch gesamte Virusforschung* 1973; 40: 314-24.
 - 23) Ruebner BR, Hirano T, Slusser RJ, Medearis Jr DN. *Human cytomegalovirus infection: electron microscopic and histochemical changes in culture of human fibroblasts. Am J Pathol* 1965; 46: 477-97.
 - 24) Albrecht T, Cavallo T, Cole NL, Graves K. *Cytomegalovirus: development and progression of cytopathic effects in human cell culture. Lab Invest* 1980; 46: 477-97.
 - 24) Albrecht T, Cavallo T, Cole NL, Graves K. *Cytomegalovirus: development and progression of cytopathic effects in human cell culture. Lab Invest* 1980; 42: 1-7.
 - 25) Bournerias I, Boisnic S, Patey O, Deny P, Gharakhanian S, Duflo B, Gentilini M. *Unusual cutaneous cytomegalovirus involvement in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Arch Dermatol* 1989; 125: 1243-6.
 - 26) Stern H, Friedmann I. *Intranuclear formation of cytomegalic inclusion disease virus. Nature* 1960; 188: 768-70.
 - 27) Kanich RE, Craighead JE. *Human cytomegalovirus infection of cultured fibroblasts: II. Viral replicative sequence of a wild and an adapted strain. Lab Invest* 1972; 27: 273-81.
 - 28) Schwartz DA, Walker B, Furlong B, Breeding E, Someren A. *Cytomegalovirus in a macerated second trimester fetus: persistent viral inclusions on light and electron microscopy. South Med J* 1990; 83: 1357-8.