

Peroxidase-antiperoxi daes法을 利用한 實驗感染 鷄의 組織內 뉴캐슬病 바이러스 抗原同定

盧煥國·慎宗伯·林基材·金秉志

釜山直轄市 家畜衛生試驗所

Demonstration of Newcastle Disease Virus Antigens in Paraffin Embedded Tissues of Experimentally Infected Chickens Using Peroxidase-antiperoxidase(PAP) Technique

Whan-Goog Nho, Jong-Back Shin, Ki-Jae Lim, Byong-Jee Kim

Pusan City Veterinary Service Laboratory

Abstract

This study was done to identify Newcastle disease virus(NDV) antigens in paraffin sections of various organs from experimentally NDV-infected chicken using peroxidase-antiperoxidase(PAP) technique. Sections were incubated with rabbit anti-NDV polyclonal as first antibody, followed by incubation with goat anti-rabbit IgG conjugate and peroxidase anti-peroxidase(PAP).

Positive reactions were often detected in the epithelium of trachea and in the lymphocyte of spleen at 24 hours after virus inoculation. The viral antigen was localized mainly in the cytoplasm of infected cells.

The method approved to be highly specific for the identification of NDV and allowed a precise localization of the viral antigens in infected cells.

Key words ; Newcatle disease virus, peroxidease-antiperoxidase(PAP).

서 론

뉴캐슬병은 영국의 Newcstle 지방에서 발생하여 Doyle¹⁾에 의해 처음으로 발생보고 되었으며 같은해에 Java와 우리나라에서도 발생되었

다.^{2,3)} FAO-WHO-OIE의 가축보건연보⁴⁾에 의하면 1973년 조사대상 158개국중 136개국에서 발생되고 있어 아직까지 전세계적으로 그 발생이 끊이지 않고 있는 실정이며, 오늘날 양계산업의 가장 큰 피해요인이 되고 있다.^{1, 3, 5~8)}

뉴캐슬병은 바이러스의 병원성에 따라 임상 증상을 거의 나타내지 않은 Lentogenic주에서 부터 폐사율이 100%에 이르는 Velogenic주에 이르기까지 다양한 양상으로 발생되고 있으며^{2, 3, 8, 9)} 야외에서는 흔히 마이코플라즈마병이나 전염성기관지염과 혼합감염을 일으켜¹⁰⁾ 병리학 적으로 진단하기에 어려울 때가 많다. 뉴캐슬병의 실험실진단을 위해서 혈중의 항체를 측정하는 혈구응집억제반응이나 부화계란접종 또는 세포배양을 통한 바이러스 분리동정 등의 방법들이 사용되고 있으나 시간이 많이 소요되며 혈중의 항체가 만으로는 확진이 곤란할 때가 많다.

조직내 바이러스 항원동정을 위한 면역조직 화학적 방법으로서 형광항체 법이 오래전부터 개발되어 바이러스성 질병의 중요한 진단수단으로 사용되어 오고 있다.⁵⁾ 그러나 형광항체법은 비특이반응의 발현이 빈번하여 관독이 애매할 때가 많고 양성반응에 의한 특이형광도 시간의 경과에 따라 신속히 소실되는 결점이 있으며, 반응결과를 반드시 형광현미경으로 관찰해야 하는 등의 결점이 있다. 이러한 형광항체법의 결점을 보완하고 특이성을 더욱 높이고자 하는 노력의 결과로서 새로운 면역조직화학적 방법들이 개발되어, 바이러스 항원¹¹⁻¹⁷⁾은 물론 호르몬^{17, 19)} 단백질^{20, 21)} 등 여러가지 항원을 검출하는데 광범위하게 사용되어 오고 있다.

바이러스 항원의 면역조직화학적 동정은 간편한 방법으로 수시간 이내에 신속하게 진단할 수 있으며^{22, 23)} 혈중에 항체가 생성되기 이전의 혈중항체 음성개체에서도 조직내에서 직접 바이러스 항원을 검출함으로써 조기진단이 가능하고, 혈중항체 양성개체로부터 백신항체 보유

개체와 감염개체를 식별할 수 있는 등의 많은 장점을 가지고 있기에 아주 효과적인 진단법으로 알려져 있어^{24, 25)} 오늘날 이 분야에 많은 연구가 행하여 지고 있다.²⁵⁻³⁰⁾

이 실험에서는 오늘날 많이 사용하고 있는 면역조직화학적 방법들 중 peroxidase-antiperoxidase(PAP)법^{12, 18, 19, 31, 32)}을 이용하여 뉴캐슬병을 신속하게 확진할 수 있는 진단법을 확립하는데 그 목적을 두고, 인공 감염시킨 닭의 각종 장기에 대한 피라핀포매 조직절편에서 뉴캐슬병 바이러스(Newcastle disease virus:NDV) 항원검출을 시도하였다.

재료 및 방법

실험동물

NDV에 대한 혈중항체가 음성으로 확인된 5~12주령의 닭 20수에 NDV '교정원' 주(가축위생연구소, $10^{10.5}$ ELD 50/ml)를 1000배 희석하여 각각 0.5ml 씩 비강접종 하였다. 접종후 24, 48, 72, 96시간에 각각 5수씩을 해부검사 하였다. 이때 기관, 폐장, 뇌, 흉선, 비장, 맹장편도, 간장, 선위 및 소장을 절취하여 formalin고정, paraffin 포매하여 조직절편재료로 이용하였으며, 항체음성의 다른 건강계 2수는 이실험의 대조로서 사용하였다.

고도면역혈청

가토 항 NDV 고도면역혈청을 생산하기 위해서, 건강한 토끼에 뉴캐슬병 생독백신(B₁:바이엘화학)을 0.9% Saline 10ml로 희석한 용액 5ml와 동량의 complete adjuvant를 잘 혼합하여 피하주사하였고, 3주 후에는 incomplete

adjuvant 0.5 ml를 같은 방법으로 혼합하여 2차 접종하였으며 다음은 생독백신만을 3주간격으로 2회 접종하였다. 마지막 접종 3주후에 도살, 자혈하고 혈청을 분리하여 56℃에서 30분간 비동화시킨 다음 1차항체로 사용하였다.

조직절편

Paraffin포매된 조직을 3~5um두께로 박절하여 40℃ water bath위에서 편 후 gelatin coated slide glass상에 조직을 부착시켰다.

Peroxidase-antiperoxidase(PAP) 법

조직절편을 xylene과 alcohol과정을 거치면서 탈파라핀하여 tris-buffer saline(TBS;pH7.6)에 수세후 3% 과산화수소 메타놀용액에 10분간 처리하였으며 수세에 이어 2% 정상 산양혈청으로 20분간 전처리 하였다. 다음 1차항체를 2%정상 산양혈청에 200~300배 희석하여 60분간 감작시킨 후 3분간씩 6회 TBS로 수세하였다. 그리고 2차 항체로서 goat anti-rabbit

IgG(Sigma)를 TBS로 300~500배 희석하여 45분간 반응시킨 후, 3분간씩 6회 수세한 다음 3차항체로서 peroxidase anti-peroxidase(Sigma)를 TBS에 300~500배 희석하여 60분간 감작시킨 후 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(Sigma, DAB)로 25℃부란기 내에서 약 30분간 발색시켰으며, 이때 발색정도를 광학현미경으로 관찰하여 적당한 반응시간을 선택하여 슬라이드를 수세하였고 일부는 헤마톡실린으로 대조염색하여 노출되지 않도록 주의하면서 진행하였고 대조로서 1차항체 또는 2차항체 무처리군을 함께 관찰하였다.

결과

파라핀포매 조직절편에서 NDV항원을 검출하기 위해서 peroxidase-antiperoxidase(PAP) 염색을 실시한 결과, 양성반응 세포들은 주로 기관, 비장 및 맹장편도에서 관찰하였다. (표 1).

Table 1. Detection of Newcastle disease virus antigens in the paraffin sections with PAP method

Organs	24h*	28h*	72h*	96h*
Trachea	5/5**	5/5	5/5	5/5
Spleen	3/5	3/5	2/5	2/5
Cecal tonsil	0/5	0/5	2/5	1/5

* Hours after virus inoculation

** No. of chickens showing positive reaction/No. of chicken tested

기관에서는 전 예에서 양성반응세포가 검출되었으며 양성반응은 관강내측의 미세융모와 상피세포에서 주로 관찰되었고, 정상세포에 비

해 양성반응 세포들은 세포질내에 흔히 암갈색의 색소침착을 일으켰다. (사진 1) 감염 48시간째 부터는 상피세포가 괴사 탈락되는 현상을

나타내었으며, 시간이 경과함에 따라 양성반응 세포수가 증가하였고, 반응 또한 강하게 나타나는 경향을 보였으며 양성반응을 나타낸 기관의 상피세포 주위에는 흔히 입과구가 침윤해 있었다.(사진 3).

비장에서는 양성반응이 적색수내의 입과구서 관찰되었으며 적색수 전반에 걸쳐 고립 또는 소집단으로 출현하였고, 입과구의 세포질내에 암갈색의 색소침착을 일으켰다(사진 4, 5). 그리고 맹장편도에서는 양성반응이 점막상피세포와 고유층내의 림프구들에서 관찰되었으며(사진 6), 소장(사진 7), 폐장(사진 8), 선위에서도 양성반응을 나타내는 세포들이 가끔 관찰되었으나 간장, 뇌, 흉선에서는 볼 수 없었다.

면역염색과정중에서 1차항체, 또는 2차항체를 처리하지 않은 대조군이나 건강계의 조직절편에서는 양성반응 특유의 갈색 침착세포가 관찰되지 않았다.

면역염색에서 적혈구, 호산구, 비만세포, 호중구의 세포과립 등에서 나타나는 내인성 peroxidase활성을 제거하기 위하여 2%과산화수소 메타놀 용액에 전처리 하였으며, 2차항체에 대한 특이반응을 줄이기 위해 2%정상산양혈청으로 사전 감작시킨 결과, 처리하지 않은 대조군에 비해 비특이반응을 현저하게 감소시킬 수 있었다.

고 찰

뉴켓슬병의 자연감염은 호흡기나 소화기점막을 통해 일어나며 NDV는 이들 점막상피에서 일차 증식하여 바이러스혈증을 일으킨 다음, 혈

류를 타고 체내 각 부위의 친화성장기로 파급되고, 침입한 바이러스는 병원성과 개체의 저항력 등에 따라 약 2~15 일간의 잠복기를 거친다음 임상증상을 일으키게 된다.^{9,10)}

Baskaya 등,³³⁾ Hofstad³⁴⁾ 및 Konh³⁵⁾은 각각 병원성이 다른 NDV를 분무 접종하여 1~6일간 장기별로 바이러스 분리실험을 실시한 결과, 폐조직이 바이러스분리에 가장 적합한 장기라 하였고, Hanson³⁶⁾은 velogenic 주 접종계의 폐장, 기관 및 비장혈액에서 접종후 1일째에, 그리고 뇌조직에서는 4일째에 각각 바이러스를 분리할 수 있었다고 보고 하였다.

이 실험에서는 바이러스 증식 및 병변호발부위와 바이러스 분리성적 등을 감안할 때, 면역조직화학적으로 항원검출이 용이할 것으로 예상되는 폐장, 기관, 비장, 맹장편도, 소장, 선위, 뇌 및 간장의 절편조직에 대해 PAP방법을 적용하였던 바 양성반응세포는 주로 기관의 미세용모 및 상피세포와 비장의 림프구에서 관찰되었고, 맹장편도에서는 출현빈도가 높지 않았으며, 검출율이 가장 높을 것으로 예상되었던 폐장에서는 희미하게 관찰되었다. 따라서 NDV의 면역조직화학적 동정을 위해서는 기관과 비장이 가장 적합항 장기로 권장되었으며, 모두 감염 24시간째에 이미 높은 검출율을 보임으로서 야외에서 조기진단을 위해 널리 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

이 실험의 PAP 염색에서 특이양성 반응색소는 주로 상피세포와 림프구의 세포질 내에서 암갈색의 미세한 과립으로 나타났으며, NDV의 복제가 세포질에서 일어난다는 사실^{2,9,10)}을 뒷받침해주고 있었다.

면역염색은 일반적으로 실온에서 진행되는

것으로 알려져 있다.^{15, 24, 37, 38)} 그러나 이 실험의 15°C 이하의 조건하에서는 면역염색반응에 현저한 장애를 일으켰으며, 연중 실험실내의 온도가 일정하게 유지되지 않는 환경에서는 면역반응의 온도조절에 각별히 유의하여야 할 것으로 생각된다. 겨울철에는 35°C 전후의 부란기 내에서 면역염색을 실시하여 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

면역염색을 성공적으로 실시하기 위해서는 특이반응세포와 구별이 곤란한 비특이색소의 발색을 최대한 줄여야 하는데, 내인성 peroxidase 활성^{12, 14, 30, 39, 40)}을 가지는 적혈구, 호산구 및 비만세포들은 양성반응세포와의 감별에 특히 주의를 요한다. 광선에 노출되거나 DAD를 산화시키는 촉매작용을 가지며, 비특이침전물을 만듦으로써 배경의 발색을 일으키기 때문에^{17, 41, 42)} 면역염색을 할 때는 슬라이드를 덮어 광선을 차단해 주어야 한다. 이 실험에서는 내인성 peroxidase 활성을 제거하기 위해서 3% 과산화수소 메타놀용액으로 전처리하였고, 항원항체간의 비특이결합을 방지하기 위해서는 2% 정상 산양혈청을 사용하였으며 면역염색의 전과정을 통해 가능한 광선에 노출되지 않게 주의하면서 실시한 결과, 대조군과 비교할 때 비특이반응을 많이 제거할 수 있었다.

결론적으로, PAP법은 조직내 NDV 항원검출에 있어 높은 특이성을 나타냄으로서 야외에서 뉴캐슬병의 진단을 위한 중요한 수단으로 활용될 수 있을 것이며, 이외에도 다른 여러가지 바이러스성 질병의 진단에 응용 가능성은 매우 높다고 하겠으며, 앞으로 이 분야에 대한 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

뉴캐슬병 바이러스의 면역조직화학적 동정을 위하여 인공감염계의 각종 장기의 파라핀포매 조직절편에 대해 PAP법을 적용하였으며, 모든 절편은 1차 항체로서 가토 항뉴캐슬바이러스 고도면역혈청으로 감작시킨 다음 산양항가토 IgG를 2차항체로 결합시켰다.

양성반응은 감염후 24시간 부터 기관의 미세용모 및 상피세포와 비장의 림프구에서 주로 관찰되었으며, 바이러스 항원은 주로 이들 세포의 세포질내에서 검출되었다.

이상의 결과에서 PAP법은 그 특이성이 높아 뉴캐슬병 바이러스 항원뿐만 아니라 다른 여러 가지 질병의 항원동정을 위한 중요한 수단으로 활용될 수 있을 것으로 생각되었다.

Legends for Photos

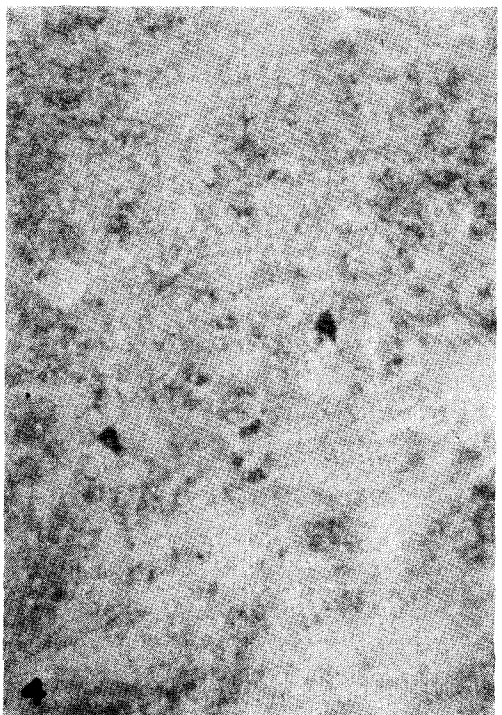
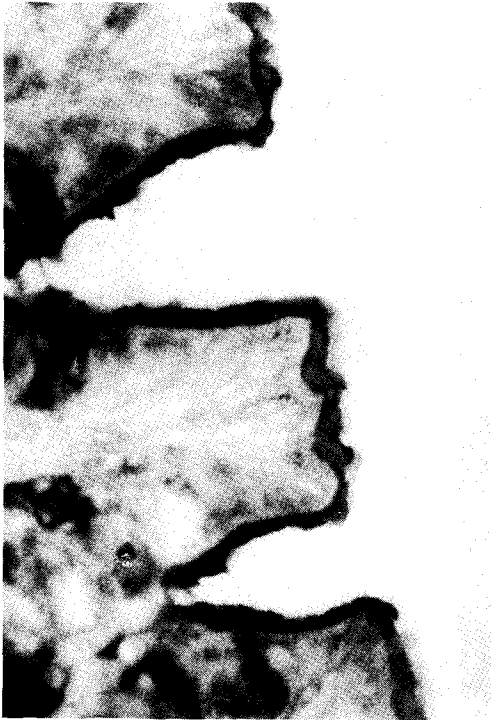
All are paraffin-sectioned and immunostained with Peroxidase-antiperoxidase(PAP) method.

Photo 1. Dark brown deposits indicating the presence of NDV antigen in the tracheal epithelium, 24 hours after : inoculation, X100.

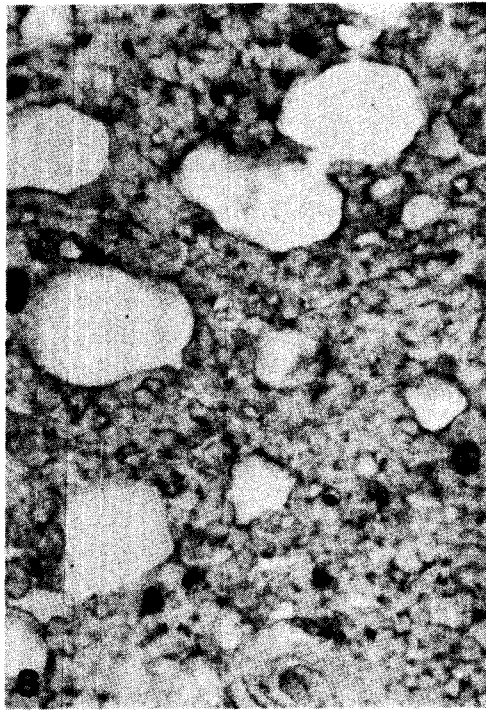
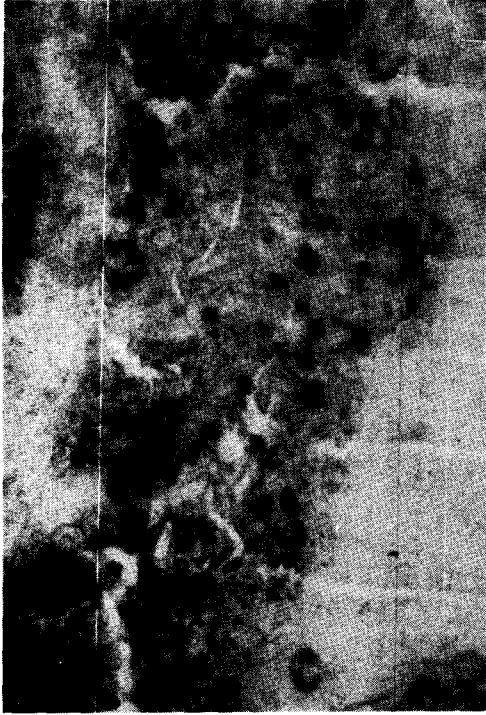
Photo 2. Positive reactions are found in the tracheal epithelium, 48 hours after inoculation, X100.

Photo 3. Higher magnification of photo 2. X400.

Photo 4. Positive reactions are scattered in



3



the spleen. 24 hours after inoculation. X400.

Photo 5. Positive cells are found in the spleen, 48 hours after inoculation. X400.

Photo 6. Positive reactions are found in the cecal tonsil. 72 hours after inoculation. Counterstained with hematoxylin. X400.

Photo 7. Positive cells are found in small intestine. 72 hours after inoculation. Counterstained with hematoxylin. X400.

Photo 8. Positive cells are found in lung. 72 hours after inoculation. X400.

참 고 문 헌

1. Doyle TM. 1927. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filterpassing virus. *J Comp Pathol Therap*, 40:144~169.
2. Mohanty SB, Dutta SK. 1981. *Veterinary virology*. Philadelphia:Lea & Febiger: 267~270.
3. 박근식. 1979. 뉴캐슬병 바이러스 연구사. *가금학회보*, 6(2):57~73.
4. FAO-WHO-OIE. 1973. *Animal health yearbook*. Food and agricultural organization of the United Nations, Rome.
5. Beard CW, Easterday BC. 1967. The influence of the route of administration of Newcastle disease virus on host response. III. *Immunofluorescent and histological studies*. *J Infect Dis*. 117:66~70.
6. 이우용, 윤희정, 김기석 등 1988. 가금질병 검색 및 품종개량에 관한 연구, *가축위생연구소 시험연구보고서* : 271~276.
7. 박근식, 김선중, 1984. 뉴캐슬병 백신 접종 계군에 있어서 면역상태와 ND발생시 닭의 생산성에 미치는 영향. *가금학회보* 11(1):49~64.
8. 여상건, 최원필, 1979. 종계군의 Newcastle disease에 대한 면역상태에 관한 연구. *대한수의학회지*. 19(1):45~51.
9. Beard CW, Hanson RP. 1984. *Disease of Poultry*. 8th ed. Ams, Iowa state university press:452~470.
10. RsellPH, Edington N. 1987. *Veterinary virology*. Cambridge:Burlington Press Ltd. :152~155.
11. Chasey D. 1980. A simple and rapid immunoperoxidase test for the detection of virus antigens in tissue culture. *Vet Res*. 106:506~507.
12. Cherrington JM, Ghalib HW, Swayer MM, et al. 1985. Detection of viral antigen in bluetongue virus infected bovine tissues, using the peroxidase-antiperoxidase techniques. *Am J Vet Res*. 46(11):2356~2359.
13. Ducatelle R, Coussement W, Hoorens J. 1982. Immunoperoxidase study of Aujeszky's disease in pigs. *Res Vet Sci*. 30:294~302.
14. Gilka F, Spencer JL. 1984. Immunohistochemical identification of group spec-

- ific antigen in avian leukosis virus infected chicken. *Can J Com Med.* 48:322~326.
15. Jonsson LGO Engstrom BE. 1986. Immunohistochemical detection of infectious bursal disease and infectious bronchitis viral antigen in fixed paraffin embedded chicken tissue. *Avian Pathology.* 15:385~393.
 16. Mizuno Y, Arai K. 1981. Assay of avian leucosis virus by indirect immunoperoxidase method. *Natl Inst Anim Hcalth Q (Jpn).* 21:63~67.
 17. Yoshikawa T, Yamamura T, Yoshikawa H, et al. 1984. Enzyme histological studies on bovine leukemia cells. *Jpn J Sci.* 46(1):541~547.
 18. Moriarty C, Moriarty CM, Sternberger LA. 1973. Ultrastructural immunocytochemistry with unlabeled antibodies and the peroxidase-antiperoxidase complex; A technique more sensitivity than radioimmunoassay. *J Histochem Cytochem.* 21(9):825~833.
 19. Sandusky GE, Wightman KA. 1985. Application of the peroxidase-antiperoxidase procedure to the localization of pituitary hormones and calcitonin in various domestic animals and human beings. *Am J Vet Res.* 46(3):739~749.
 20. Bondgaard M, Moller M 1981. Horseradish peroxidase and microperoxidase : their purity and binding to serum proteins. *J Histochem Cytochem.* 29(3):331~336.
 21. Gallyas F, Gorcs T, Merchenthaler I 1982. High grade intensification of the end-product of the diaminobenzidine reaction for peroxidase histochemistry. *J Histochem Cytochem.* 30(2):183~184.
 22. Falini B, Solas ID, Halverson C, et al. 1982. Doublelabeled-antigen method for demonstration of intracellular antigens in paraffin-embedded tissue. *J histochem Cytochem.* 30(1):21~26.
 23. Matsuoka T, Kurihara T, Konosu Y, et al. 1987. Demonstration of Aujeszky disease virus antigen in naturally infected cattle by immunoperoxidase method. *Jpn J Vet Sci.* 49(3):725~727.
 24. Bullock GR, Petrusz P. 1982. Techniques in immunocytochemistry. Vol 1. London:Academic Press Inc. :1~183.
 25. Cuello AC. 1984. Immunohistochemistry. New York: John Welly & Sons.;497.
 26. Clark CA, Downs EC, Primus FJ. 1982. An unlabeled antibody method using glucose oxidase-antiglucose oxidase complex(GAG):A sensitivity alternative to immunoperoxidase for the detection of tissue antigen. *J histochem Cytochem.* 30(1):27~34.
 27. Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al. 1984. Immunoenzymatic Labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and antialkaline

- phosphatase(AAAP complex).
J histochem Cytochem. 32(2):219~229.
28. Holgate CS, Jackson P, Cowen PN, et al. 1983. Immunogold-silver staining: New method of immunostaining with enhanced sensitivity. *J histochem Cytochem.* 31(7):938~944.
 29. Hsu SM, Raine L. 1981. Protein A, Avidin and biotin in immunohistochemistry. *J histochem Cytochem.* 29(11):1349~1353.
 30. Swanson PE, Hbgen KA, Wich MR. 1987. Avidin-biotin-peroxidase-antiperoxidase(ABPAP) complex. *Am J Clin Pathol* 88:162~176.
 31. Sternberger LA, et al. 1970. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry : preparation and properties of soluble antigen-antibody complex(horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J histochem Cytochem.* 18(5):315~333.
 32. Vacaca LL, Abrahams SJ, Naftchi NE. 1980. A modified peroxidase-antiperoxidase procedure for improved localization of tissue antigen : Localization of substance P in rat spinal cord. *J histochem Cytochem* 28(4):297~307.
 33. Baskaya H, Burd HE, Hudson CB, et al. 1952. A comparison of Newcastle disease virus recovery from bone marrow and from pools of respiratory tract and spleen. *Am J vet Res* 13:405~406.
 34. Hofstad MS. 1951. A quantitative study of Newcastle disease virus in tissue of infected chicken. *Am J Vet Res.* 13:334~339.
 35. Kohn A, 1955. Quantitative aspects of Newcastle disease virus infection effective of route of infection on the susceptibility of chicks. *Am J Vet Res* 16:450~457.
 36. Hanson RP, Spalatin J, Dickinson EM. 1967. Criteria for determining the validity of a virus isolation. *Avian Dis.* 11:508~514.
 37. Ordronneau P, Lindstrom P B-M, Petrusz P. 1981. For unlabeled antibody bridge techniques: A Comparison. *J Histochem Cytochem.* 29(12):1379~1404.
 38. Weir EE, Pretlow TG, Pitts A, et al. 1974. A more sensitive and specific histochemical peroxidase stain for the localization of cellular antigen by the enzyme antibody conjugate method. *J histochem Cylochem.* 22(12):1135~1140.
 39. Distefano HS, Marucci AA, Dougherty RM. 1973. Immunohistochemical demonstration of avian leukosis virus antigens in paraffin embedded tissue. *Processing of the Socitey for Experimental Biology and Medicine-1422:111~113.*
 40. Eva Loepft BF, Wyler R. 1979. Demonstration of viral antigens in cryostatic section by a new immunoperoxidase procedure elimination endogenous peroxi-

- dase activity. *J Histochem Cytochem.* 27(2):686~688.
41. Swanson PE. 1988. *Foundation: Foundation of immunohistochemistry.*: Am J clin Pathol, 90:333~339.
42. Tayler CR. 1986. *Immunomicroscopy: a diagnostic tool for surgical pathologist* Vol 1. California:WB Saunder.