

## 닭 뉴캐슬병의 발병기전 규명을 위한 RT-PCR 및 면역조직화학적 연구

이민권<sup>1</sup>, 진영배\*, 문운경\*\*, 김순복\*

경상남도축산진흥연구소<sup>1</sup>, 경상대학교 수의과대학\*, 국립수의과학검역원\*\*  
(접수 2004. 2. 7, 게재승인 2004. 3. 23)

### Immunohistochemistry and RT-PCR for pathogenesis of Newcastle disease in chickens

Min-Kwon Lee<sup>1</sup>, Young-Bae Jin\*, Oun-Kyong Moon\*\*, Soon-Bok Kim\*

<sup>1</sup>Gyeongnam Livestock Promotion Research Institute, Jinju, 660-360, Korea

\*College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, 600-701, Korea

\*\*National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang, 430-016, Korea

(Received 7 February 2004, accepted in revised form 23 March 2004)

#### Abstract

The present experiment was carried out to study the pathogenesis of Newcastle disease(ND), ND virus(NDV) antigens and genes in various organs from NDV inoculated chickens were detected by immunohistochemistry and RT-PCR.

Immunohistochemically, NDV antigens were detected in the spleen, thymus, cecal tonsil, proventriculus, trachea and lungs at 12 hour post-inoculation (hpi). Viral antigens were localized mainly in the cytoplasm of lymphocytes and macrophages.

After 48 hpi, clinical findings of the affected chickens were open-mouth breathing, conjunctivitis, watery diarrhea and edema around the eye and neck. After 72 hpi, chickens showed muscular tremor, paralysis of the legs and wings, and coma.

Histopathological results consist of multi-focal necrosis with hemorrhages in lymphoid aggregates of the intestinal tracts, necrosis of the lymphoid tissues, neuronal degeneration and necrosis, and perivascular cuffing.

Using RT-PCR, virus genes were detected in the spleen and proventriculus at 48 hpi, and in the brain at 60 hpi.

Key words : Newcastle disease virus(NDV), Kyojeongwon strain, Pathogenesis

---

<sup>1</sup>Corresponding author

Phone : +82-32-575-7738, Fax : +82-32-576-7785

E-mail : nicebok90@empal.com

## 서론

Newcastle disease(ND)는 Paramyxoviridae Family의 *Rubulavirus* genus에 속하는 Newcastle disease virus(NDV)가 일으키는 질병으로, 1927년 인도네시아 자바섬에서 처음으로 보고되었고<sup>1)</sup>, 우리나라에서는 1924년 이전부터 발생되었다고 알려져 있으며<sup>2)</sup>, 질병의 발생시 막대한 경제적 피해를 입히기 때문에 국제수역사무국 (Office international des epizooties; OIE)과 우리나라는 각각 List A와 제1종 가축 법정전염병으로 분류하고 있다.

NDV는 크기가 약 15 kbp인 피막을 지닌 negative sense, single strand RNA virus로 바이러스 복제에 관여하는 RNA directed RNA polymerase(L), 혈구응집 중화에 관여하는 hemagglutinin-neuraminidase(HN), 침입시 숙주의 세포막침입에 작용하는 fusion(F), matrix (M), phosphoprotein(P), nucleoprotein(N) 등 6종의 단백질을 coding하고 있다<sup>3)</sup>.

이 질병은 오세아니아 대륙을 제외하고는 전 세계적으로 발생하고 있으며, 조류 236종에서 인공 또는 자연형태로 감염이 이루어지는데<sup>4)</sup>, 닭에서 가장 민감하고 오리, 거위, 참새에서는 거의 증상이 나타나지 않는 등 숙주에 따라 병원성이 많이 달라지는 것으로 알려져 있다<sup>5)</sup>. 닭에서 발병 일령, 바이러스 침입량, 침입 경로, 바이러스주 등의 차이에 의해서 각기 다른 질병 경과를 나타내는 것으로 밝혀져 있다. 뉴캐슬병은 원인 바이러스의 병원성에 따라 크게 4종의 발병형(pathotypes)으로 구분되는데, 첫째 불현성 감염으로 오는 asymptomatic enteric형과, 둘째 경미하거나 불현성으로 호흡기에 감염되는 lentogenic형, 셋째 낮은 이병률을 지녔으며 호흡기 및 신경증상을 나타내는 mesogenic형, 마지막으로 높은 병원성을 지닌 velogenic형이 있으며, 이중 velogenic형은 소화기에 출혈성 소견을 특징으로 하는 viscerotropic velogenic(vvNDV)형과 호흡기 및 신경증상을 나타내며 높은 이병률을 지닌 neurotropic velogenic(nvNDV)형으로 나누어진다.

닭 뉴캐슬병의 개체간 전파는 뉴캐슬병에 감

염된 닭의 호흡 비말이나 배설물을 통하여 강한 개체의 호흡기나 소화기로 바이러스가 침입함으로서 이루어지는데, 침입한 바이러스는 이들 상피세포에서 증식하여 1차 viremia를 거쳐 비장과 골수에서 다시 증식한 뒤 2차 viremia를 일으켜 전 장기에 퍼지는 것으로 알려져 있다<sup>3,6)</sup>.

vvND는 2일 정도의 짧은 잠복기를 거친 후에 전신성 질병경과를 취하는 것으로 보고되어 있으며, 감염된 닭은 개구호흡을 하고 침울하게 되며, 다리 및 날개의 마비 및 근육진전 등을 나타내고, 말기에는 혼수상태에 빠지게 된다<sup>3,7)</sup>.

vvND의 병리조직학적으로 소화장기에서는 출혈을 동반한 괴사가, 대뇌와 소뇌 등의 중추신경계에서는 신경의 괴사와 소실을 동반한 신경변성이, 비장 및 흉선, 페브리셔스낭 등의 면역장기에서는 림프구 소실 및 괴사가, 기타 기관, 폐, 심장, 신장, 췌장 등에서는 국소적 괴사가 특징적 소견이다<sup>8-12)</sup>.

분자생물학 분야에서는 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)을 이용하여 Jestin 등<sup>13)</sup>이 인공감염 시킨 부화란의 allantoic fluid에서 처음으로 ND 바이러스를 동정한 이후, 최근 Gohm 등<sup>14)</sup>이 감염된 닭의 분변 및 각 장기에서 RT-PCR로 바이러스 유전자를 검출하는 등 많은 연구들이 수행되었다<sup>15-17)</sup>. 병리학분야에서는 immunohistochemistry와 *In situ* hybridization기법 등으로 발병기전에 관한 연구가 이루어지고 있다<sup>10,11,18)</sup>.

본 연구는 vvNDV인 Kyojeongwon(KJW)주의 발병기전을 알아보고자 2주령의 Specific-Pathogen-Free(SPF) 병아리에 바이러스를 인공 감염시켜 12시간 간격으로 채취된 각 장기에서 immunohistochemistry기법과 RT-PCR로 바이러스 항원과 유전자의 검출을 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 바이러스

vvNDV KJW주는 경상대학교 수의과대학

전염병학교실에서 분양 받았으며, 이를 부화 10일령의 SPF란 요막강에 접종하여 Embryo-Lethal Dose 50%(ELD<sub>50</sub>)을 구하였고, 요막강액을 채취하여 100 ELD<sub>50</sub>/ml 되게 0.1 M phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)에 희석하여 바이러스 접종액으로 사용하였다.

### 실험동물

White leghorn SPF란(Sunrise farms, USA)을 부화시켜 외부와 격리된 곳에서 물과 사료를 자유로이 공급하면서 임상적으로 건강한 2주령의 병아리 33수에 바이러스 희석액을 0.1 ml씩 비강으로 접종하였다.

### 시료채취

바이러스 접종 후 12시간 간격으로 4일간 3주씩 임상증상을 관찰하고 부검을 실시하였다. 병리조직학적 및 면역조직화학적 검사를 위한 시료는 대뇌, 소뇌, 흉선, 비장, 페브리셔스낭, 전위, 십이지장, 맹장편도, 심장, 간, 신장, 췌장, 기관과 폐 등으로 절취하였으며, 절취한 시료는 10% 중성포르말린에 72시간 고정 후 일반적인 방법에 따라 파라핀 포매 시켰고, 3~4 μm 두께로 박절하여 이용하였다.

RT-PCR의 시료는 뇌, 비장, 선위, 백혈구 등을 이용하였고 이중 백혈구는 헤파린이 들어 있는 주사기로 혈액을 채취하여, Percoll-Histopaque(Sigma, USA)를 사용하여 1000rpm에서 10분간 원심분리 후 백혈구 층을 수집하여 -20℃에 보관하였으며, 비장 등 나머지 장기는 부검시 절취하여 -20℃에 보관하며 이용하였다.

대조는 바이러스를 접종하지 않은 3수를 부검하여 접종군의 장기와 비교하며 관찰하였다.

### Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

Primer는 NDV의 발병형과 관련이 있는 fusion protein gene의 cleavage site를 202bp되게 Sense 5' AGG AGA CRR AAA CGC T 3' (R=A/G), Antisense 5' TGC CAC TGC TAG TTG CGA TA 3' 로 Bioneer사에 제작 의

뢰하여 사용하였다.

Template는 -20℃에 저장된 장기를 10배 분량 0.1 M PBS에 유제화하여 RNeasy Mini kit(Qiagen, USA)를 이용해 RNA를 추출 사용하였으며, one step RT-PCR kit(Qiagen)를 이용하여 RNase-free water 23 μl, X5 one step RT-PCR buffer 10 μl, dNTP Mix 2 μl, one step RT-PCR enzyme 2 μl, RNase inhibitor 1 μl, Sense primer 1 μl, Antisense primer 1 μl, template 10 μl를 혼합한 다음, 57℃에 10분간 예열 후 42℃ 60분간 reverse transcription시켜 1차 strand cDNA를 합성하였고, 94℃ 5분간 예열 후 94℃ 1분간 denaturation, 55℃ 1분간 annealing, 72℃ 1분간 polymerization 과정을 30회 반복하여 2차 strand cDNA를 합성하는 one step RT-PCR을 실시하였다.

또한, RT-PCR의 민감도를 알아보기 위하여 바이러스를 접종한 부화란의 요막강액을 채취한 후, 0.1 M PBS에 10<sup>9</sup> ELD<sub>50</sub> 부터 1 ELD<sub>50</sub> 까지 10진 단계 희석하여 각각의 RNA를 추출하여 one step RT-PCR을 실시하였으며, 백신 바이러스와 강독바이러스의 감별 여부를 알아보기 위하여 시판중인 대성미생물의 La Sota 백신과 B1 백신을 구입하여 주사용 증류수에 적정량 희석, RNA를 추출하여 RT-PCR을 실시하였다.

각각의 PCR 산물을 2.0% agarose-gel에 전기영동하여 그 결과를 관찰하였다.

### 병리조직학적 및 면역조직화학적 관찰

병리조직학적 소견을 관찰하고자 3~4 μm 두께로 박절된 파라핀 조직절편을 일반적인 방법에 따라 H-E 염색하였다.

면역염색은 조직절편을 파라핀을 제거 시킨 후 합수과정을 거친 다음, 내인성 peroxidase에 의한 비특이 반응을 줄이기 위해 1% 과산화수소수-메탄올용액에 25분간 전 처리한 다음 1차 항체인 단클론성항체(Anti-NDV monoclonal antibody, Jenobiotec, Korea)를 0.1 M PBS에 500배 희석하여 30분간 반응시키고 2차 항체는 biotinylated anti-mouse IgG(Vector

Laboratories, USA)를 0.1 M PBS에 50배 희석하여 30분간 반응시킨 후 peroxidase가 표지된 avidin-biotin peroxidase com-plex 용액으로 30분간 반응시켰으며, 과산화수소가 들어있는 DAB kit(KPL, USA)로 발색시켰다. 헤마톡시린으로 대조 염색하여 일반적인 방법에 따라 에탄올 탈수와 Xylene 투명을 거친 후 permount (Sigma, USA)로 봉입하여 관찰하였다.

각각의 반응은 37°C 부화기 내 습도유지상자 속에서 진행되었으며, 각 단계별 항체 처리 시 0.1 M PBS로 5분간 3회씩 수세를 실시하였고, 면역염색 대조로서 1차 항체 2차 항체 대신 0.1 M PBS로 반응시킨 감염조직과 정상조직을 함께 관찰하였다.

## 결 과

### 임상증상

바이러스를 접종한 병아리를 임상적으로 관찰한 결과, 접종 후 48시간째에 개구호흡, 눈과 목 주위의 부종, 결막염, 졸음, 수양성 설사 등이, 60시간째에 침울 등 경미한 신경증상이, 그리고 72시간째에 다리와 날개의 마비, 근육진전, 혼수 등의 임상증상을 관찰할 수 있었다. 바이러스 접종 후 49~60시간에 2수, 61~72시간에 1수, 73~84시간에 3수, 85~96시간에 3수가 폐사 하였다.

### 부검소견

바이러스를 접종한 병아리를 부검한 결과, 접종 후 48시간째에 기관지 주위의 출혈을 동반한 부종과 결막염을 관찰할 수 있었다. 60시

간째에는 담낭종대, 비장종대 등의 소견이 관찰되었고, 96시간째에는 선위의 출혈소견이 뚜렷하게 나타났다.

### RT-PCR

바이러스를 접종한 병아리에서 12시간 간격으로 채취된 시료에 대하여 NDV의 발병형과 관련된 fusion protein gene의 cleavage site (202 bp) 특이 유전자 검출을 위한 RT-PCR 결과는 Table 1과 같다. 비장(Fig 1)과 선위에서는 바이러스 접종 후 48시간 이후에, 뇌에서는 60시간 이후에, 백혈구에서는 72시간 이후에 vv-NDV의 특이 유전자를 검출할 수 있었다. 또한 RT-PCR의 민감도를 검사한 결과, 10ELD<sub>50</sub>까지 검출되었으며, vvNDV와 백신바이러스에 대한 cleavage site의 존재유무를 가리는 발병형에 대한 감별검사에서 KJW주는 검출되었으나 국내 백신으로 사용되는 La Sota와 B1바이러스에서는 특이 유전자가 검출되지 않았다(Fig 2).

### 병리조직학적 소견

바이러스 접종 후 12시간 간격으로 채취된 장기의 파라핀 조직 절편에 H-E 염색하여 병리조직학적 소견을 관찰한 결과, 선위, 십이지장과 맹장 등 소화기장기의 lymphoid aggregates인 Peyer's patches, lamina propria, submucosa 등에서 충·출혈을 동반한 광범위한 괴사소견을 관찰할 수 있었으며, 괴사부위에는 대식세포와 림프구 등의 염증세포가 침윤해 있었다(Fig 3). 바이러스 접종 후 시간이 경과할수록 이들 조직의 병변은 심화되었다.

Table 1. Detection of viral genes by RT-PCR in samples of experimentally infected chickens.

Samples	Hours post inoculation							
	12	24	36	48	60	72	84	96
Brain	-	-	-	-	+	+	+	+
Spleen	-	-	-	+	+	+	+	+
Proventriculus	-	-	-	+	+	+	+	+
WBC	-	-	-	-	-	+	+	NT*

\* NT, not tested.

또한, 중추신경계에서는 심한 신경세포의 변성과 괴사, 소실 등이 나타났으며(Fig 4), 혈관 내피세포의 증생과 림프구 침윤에 의한 perivascular cuffing을 관찰할 수 있었고 대뇌보다 소뇌의 병변이 심하였다.

비장, 흉선, 페브리셔스낭 등의 면역장기에서는 충·출혈 소견을 동반한 광범위한 괴사를 관찰할 수 있었으며, 이들 장기의 림프소절내 대식세포와 림프구의 파괴와 소실소견은 바이러스 접종 후 시간이 경과함에 따라 더욱 심화되었다.

호흡기장기인 기관에서는 기관 상피세포의 공포변성과 lamina propria의 부종을, 폐에서는 충출혈소견과 간질의 증가를 관찰할 수 있었다.

심장과 간장, 췌장, 신장 등의 장기에서는 대식세포 및 림프구의 침윤과 이들 염증세포의 괴사를 관찰할 수 있었으며, 시간 경과에 따라 이들 장기의 괴사소견이 조금씩 증가되었다.

### 면역조직화학적 소견

바이러스를 접종한 병아리의 파라핀 조직절편에서 바이러스 항원을 검출하기 위하여 Avidin-biotin peroxidase complex(ABPC) 면역염색을 실시한 결과, 소화기장기, 중추신경계, 면역장기 및 호흡기장기와 심장, 간, 췌장, 신장 등의 장기에서 면역염색 양성반응을 관찰할 수 있었다(Table 2).

바이러스 접종 후 12시간째의 선위와 맹장의 상피세포, 그리고 이들의 lamina propria에서 면역염색 양성반응을 관찰할 수 있었으며(Fig 5), submucosa에서도 나타났다. 이러한 면역염색 양성 반응은 주로 이들 lymphoid aggregates의 림프구 및 대식세포 세포질에서 발견되었다.

바이러스 접종 후 60시간째에는 중추신경계의 신경세포에서도(Fig 6) 나타났으며, 흉선, 비장, 페브리셔스낭 등 면역장기의 림프소절내

Table 2. Immunohistochemical labelling for Newcastle disease viral antigens in organs of experimentally infected chickens

Organs	Hours post inoculation							
	12	24	36	48	60	72	84	96
Proventriculus	++	++	++	++	+++	+++	+++	++
Duodenum	-	-	+	+	+	+	+	+
Cecal tonsil	+	++	++	+++	+++	+++	+++	++
Cerebrum	-	-	-	-	+	+	+	+
Cerebellum	-	-	-	-	++	++	++	++
Spleen	+	++	++	+++	+++	+++	++	++
Thymus	+	+	++	+++	+++	+++	+++	++
F bursa	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
Trachea	+	++	++	++	++	++	++	+
Lungs	+	+	+	++	+++	+++	+++	++
Liver	-	-	-	+	++	++	++	++
Heart	-	-	-	+	++	++	++	++
Kidney	-	-	-	-	++	++	++	++
Pancreas	-	-	-	-	+	+	+	+

\* -, no labelling; +, rare positive cells; ++, frequent positive cells; +++, regular clusters of positive cells.

대식세포와 림프구, 국소성 피사부위에서 면역염색 양성반응이 나타났다. 특히 바이러스 접종 후 12시간째의 흉선과 비장에서 면역염색 양성반응을 관찰할 수 있었으며(Fig 7), 바이러스 접종 후 시간이 경과함에 따라 면역염색 양성반응의 발현 부위 및 빈도의 증가가 관찰되었다.

바이러스 접종 후 12시간째 기관과 폐의 상피세포와 림프구에서, 그리고 접종 후 48시간째 이후의 심장, 간, 췌장 등의 국소성 피사부위 및 이들 장기의 lymphoid aggregates에 침윤한 대식세포와 림프구에서, 신장의 집합관 상피세포에서 면역염색 양성반응을 관찰할 수 있었으며 (Fig 8), 이러한 반응은 주로 세포의 세포질에서 나타났다. 이들 장기에서 접종 후 시간경과에 따라 면역염색 양성반응의 출현 빈도가 증가하였다.

## 고 찰

뉴캐슬병 바이러스의 자연감염은 상부 호흡기 점막이나 소화기 점막을 통하여 이루어지고, 감염된 바이러스는 이들 점막상피세포의 세포막을 침입하여 이들 세포의 세포질 내에서 증식하며, 1차 viremia를 거쳐 비장이나 골수에서 다시 증식한 뒤, 2차 viremia를 일으켜 전 장기에 퍼지는 것으로 알려져 있다<sup>3,6)</sup>. 뉴캐슬병 바이러스의 숙주내 이동경로, 조직 친화도 등 발병기전과 관련된 연구들이 바이러스 분리와 바이러스 항원검출 등의 방법으로 많이 진행되었다. Baskaya 등<sup>19)</sup>과 Hofstad 등<sup>20)</sup>은 각기 병원성이 다른 NDV를 분무 접종하여 1~6일간 장기별로 바이러스를 분리한 결과, 폐 조직이 바이러스 분리에 가장 적합한 장기라고 하였고, Parede 등<sup>21)</sup>은 velogenic NDV를 접종한 닭의 소장과 맹장편도에서, Hanson 등<sup>22)</sup>은 바이러스 접종 후 1일째의 비장, 폐와 기관 및 비장혈액에서 바이러스를 분리할 수 있다고 하였다. 또한 Ojok 등<sup>9)</sup>은 바이러스 접종 후 1일째 안검, 비장, 흉선, 선위와 소장의 파라핀 조직절편에서, Nho 등<sup>8)</sup>은 접종 후 1일째의 기관과 비장의 냉동 조직절편에서 면역조직화학적 기법으로

바이러스 항원 검출을 보고한 바 있다.

본 실험에서는 바이러스 접종 병아리의 파라핀 조직절편에서 NDV 항원을 검출하기 위하여 ABPC 면역염색을 실시한 결과, 바이러스 접종 후 12시간째의 기관, 선위, 맹장편도, 비장, 흉선에서 면역염색 양성반응으로 나타나는 바이러스 항원을 검출할 수 있었다. 이는 Alexander 등<sup>3)</sup>과 Frederick 등<sup>6)</sup>이 주장한 바이러스가 호흡기 및 소화기 점막상피세포에서 증식 후 1차 viremia가 일어나 비장 등의 장기에 빠르게 전파된다는 것을 뒷받침하는 결과로, 바이러스 접종 후 12시간 이전에 1차 viremia가 일어남을 알 수 있었다.

본 실험에서 바이러스에 접종된 병아리는 개구호흡, 수양성 설사, 목과 눈 주위 부종, 다리와 날개의 마비, 근 진전, 혼수 등의 임상증상을 나타냈는데, 이는 vvND의 전형적인 임상증상과 일치하였다<sup>7-12)</sup>.

본 실험의 병리조직학적검사에서 관찰된 소화기장기인 선위, 십이지장, 맹장 등에서 국소성 피사소견, 출혈을 동반한 대식세포와 림프구의 침윤과, 면역장기인 흉선과 비장, 페브리셔스낭 등에서 대식세포 및 림프구의 소실 및 피사소견, 중추신경계에서 신경세포 변성과 피사, perivascular cuffing 소견 등은 Cheville 등<sup>7)</sup>, Ojok 등<sup>9)</sup>, Brown 등<sup>10)</sup>, Brown 등<sup>11)</sup>, Mo 등<sup>12)</sup>과 Hamid 등<sup>24)</sup>의 결과와 일치하였다. 소화기장기에서의 출혈을 동반한 국소성 피사와 비장, 흉선 및 페브리셔스낭에서의 대식세포 및 림프구의 피사와 소실 등은 vvND에서 관찰되는 특징적인 소견이라 판단되며, 바이러스 접종 후 48시간 이후에 이러한 소견의 관찰이 용이하였다.

Cheville 등<sup>7)</sup>에 따르면 velogenic NDV인 Texas 219주와 Largo주를 접종한 닭의 소뇌 Purkinje's cells에서 피사, 소실, 변성 등의 뇌병변 소견이 관찰된다고 하였고, Ojok 등<sup>9)</sup>에 따르면 Fontana 1083주를 접종한 닭의 뇌에서는 어떤 병리학적 소견도 관찰되지 않았다고 하는 등 연구자에 따라 상이한 결과를 발표하였다. vvNDV인 KWJ주를 접종한 본 실험에서는 소뇌 Purkinje's cells에서 피사와 소실, 변성이 심하게 나타났고, 혈관내피세포의 증생이

관찰되었다. 이러한 결과는 바이러스에 따라 각기 다른 조직 친화도를 지닌다는 것으로 해석되며, KJW주는 뇌에 친화도가 강한 바이러스로 생각되었다. 또한 Mo 등<sup>12)</sup>은 면역조직화학적기법으로 뇌에서 바이러스 항원을 검출하였다고 보고한 바 있으며, 본 실험에서는 바이러스 항원과 유전자를 검출하였다. 본 실험의 병리조직학적 소견과 면역염색의 결과, KJW주는 vvNDV 성질과 nvNDV 성질을 함께 지닌 것으로 visceroneurotropic velogenic NDV로 명명하는 것이 오히려 타당하다고 사료된다.

본 실험 결과, 바이러스 접종 후 시간이 경과함에 따라 각 장기에서 병리조직학적 소견의 변화가 있었는데 이러한 변화는 비장, 흉선, 페브리셔스낭 등의 면역장기에서 가장 심하였다. 병리조직학적으로 비장과 흉선의 배중심(germinal center)에서 괴사가 맨 먼저 나타났고, 이후 실질세포들이 모여 있는 림프소절에서 림프성 괴사 및 소실이, 마지막으로 괴사가 일어난 부위 및 림프소절 사이에서 간질조직 증가가 순차적으로 관찰되었으며, 페브리셔스낭의 중심엽(central follicles)에서 림프성 괴사 및 소실 소견이, 이후 여러 엽에서 림프성 괴사와 소실이 나타났고, 마지막으로 엽 사이의 간질조직 증가가 관찰되었다. 이들 면역장기의 면역염색 결과, 비장과 흉선의 배중심에서 접종 후 12시간째에 양성반응이 나타났고, 이후 림프성 괴사 및 소실이 나타난 부위에서 나타났으나, 간질조직이 증가한 부위에서는 양성반응이 거의 관찰되지 않았다. 페브리셔스낭에서는 접종 후 60시간째에 중심엽의 림프성 괴사가 일어난 부분을 중심으로 광범위하게 흩뿌려진 형태로 면역염색 양성반응이 관찰되었으며, 이후 여러 엽에서 양성반응이 관찰되었다. 이러한 결과들은 Cheville 등<sup>7)</sup>, Ojok 등<sup>9)</sup>과 Alexander 등<sup>3)</sup>이 보고한 시간 경과에 따른 병리학적, 면역조직화학적 관찰소견과 일치하였다.

비장과 골수 등에서 증식한 바이러스는 혈류를 타고 친화성이 있는 각 장기로 이동하게 된다. Nho 등<sup>8)</sup>은 면역조직화학기법으로 기관, 폐, 비장, 선위, 소장, 맹장편도 등에서 바이러스 항원을 검출하였고, Ojok 등<sup>9)</sup>은 기관, 폐,

비장, 흉선, 선위, 소장 등에서 검출하였다. Mo 등<sup>12)</sup>은 기관, 폐, 선위, 소장, 맹장편도, 흉선, 비장, 신장 등에서 바이러스 항원을 검출하였다. 본 실험에서는 뇌, 기관, 폐, 선위, 소장, 맹장편도, 흉선, 비장, 심장, 간, 췌장, 신장 등의 거의 모든 장기에서 바이러스항원이 검출되었다. 이 결과는 1차 viremia가 일어나 전 장기에 퍼진다는 Alexander 등<sup>3)</sup>과 Frederick 등<sup>6)</sup>의 사실과 부합되는 것이며, 다른 연구자들과의 차이는 1차 항체의 특이성과 관련된 것으로 사료된다.

본 실험에서 면역염색 결과, 양성반응은 주로 호흡기와 소화기의 상피세포, 대식세포, 림프구 등의 세포질에 위치하였다. 이는 바이러스 복제가 주로 세포질에서 일어난다는 Alexander 등<sup>3)</sup>, Ojok 등<sup>9)</sup>, Cheville 등<sup>7)</sup>, Mo 등<sup>12)</sup>과 Nho 등<sup>8)</sup> 여러 연구자들의 연구결과와 일치하였다.

본 실험에서 RT-PCR을 이용하여 바이러스 접종 닭의 뇌, 비장, 선위, 백혈구 등의 시료에서 vvNDV 특이 유전자를 검출한 결과, 바이러스 접종 후 48시간 이후의 비장과 선위, 60시간 이후의 뇌에서 검출되었다. 본 실험의 면역조직화학 결과와 RT-PCR결과를 비교하면, 면역조직화학기법에 의한 바이러스 항원검출이 RT-PCR에 의한 바이러스 유전자검출보다 더욱 민감하다는 것을 알 수 있었다. 그러나 일시에 많은 재료를 처리하는 데는 RT-PCR이 유리한 측면이 있다. 본 실험에서 RT-PCR로 병원형 감별여부를 확인한 결과, KJW주는 vvNDV의 Cleavage site가 검출되었으나 백신바이러스는 검출되지 않았다. 이는 사용된 primer는 각기 달랐지만, Gohm 등<sup>14)</sup>과 Julie 등<sup>23)</sup>이 발표한 결과와 같이 바이러스의 병원형 감별이 가능하여 야외에서 백신바이러스와의 감별진단에 유용하게 사용될 수 있다고 생각된다.

뉴캐슬병은 원인 바이러스의 병원성에 따라 불현성 감염으로 나타나는 asymptomatic enteric 형에서부터 폐사율이 100%에 도달하는 velogenic형에 이르기까지 다양한 양상으로 발생되고 있으며<sup>3,24)</sup> 야외에서는 흔히 마이코플라즈마병이나 전염성기관지염과 혼합감염을 일으켜 병

리학적으로 진단하기에 어려울 때가 많다<sup>8,25)</sup>. 뉴캐슬병의 실험실 진단에는 부화계란접종법 또는 세포배양을 통한 바이러스 분리 동정 등의 방법과 혈중항체역가를 측정하는 혈구응집 억제반응이 이용되고 있으나, 바이러스 분리 동정은 시간이 많이 소요되며, 혈중항체역가는 양계농장의 일관성 없는 백신접종 등으로 인해 혈구응집억제반응 만으로는 확진이 곤란한 경우가 많다. 본 실험에서 면역조직화학적기법으로 접종 후 12시간째의 비장, 흉선, 맹장편도, 선위, 기관과 폐에서, 이후 여러 장기에서 바이러스 항원의 검출이 가능하였으며, RT-PCR로 중추신경계, 면역장기, 소화기장기와 혈액 등에서 병원형의 감별이 가능한 특이 바이러스 유전자의 검출이 가능하였다. 앞으로 닭 뉴캐슬병의 진단시에는 대식세포와 림프구가 많은 선위, 맹장편도 등 소화기장기와 흉선, 비장, 폐 브리셔스낭 등 면역장기에서 면역조직화학적기법으로 바이러스 항원을 검출하고, 이와 병행하여 이들 장기에서 RT-PCR로 바이러스 유전자를 검사하면, 조기에 신속하게 닭 뉴캐슬병을 진단할 수 있을 것으로 사료된다.

결론적으로, vvNDV인 KJW주는 바이러스 접종 후 12시간 이전에 호흡기 및 소화기 상피 세포에서 증식되어 비장, 흉선 등의 장기에 퍼지는 것으로 사료되며, 또한 KJW주는 뇌신경의 변성과 소실이 심한 neurotropic 성질과 장기친화적인 viscerotropic 성질을 함께 지닌 것으로 사료된다.

## 결 론

닭 뉴캐슬병의 발병기전을 규명하기 위하여 viscerotropic velogenic Newcastle disease virus인 Kyojeongwon주를 인공감염 시킨 병아리에서 면역조직화학적, 병리학적검사와 RT-PCR을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

면역조직화학적기법으로 바이러스 접종 후 12시간째의 비장, 흉선, 선위, 맹장편도, 기관, 폐 등에서, 접종 후 48시간 이후에는 뇌, 심장, 간, 췌장, 신장 등에서 바이러스 항원을 검출할 수 있었다. 바이러스 항원은 주로 림프구와 대

식세포의 세포질에서 면역염색 양성반응으로 나타났다.

임상증상 관찰 결과, 바이러스 접종 후 48시간째에 개구호흡, 수양성 설사, 목과 눈 주위 부종 등이, 72시간째에 다리와 날개의 마비, 근육진전, 혼수 등이 나타났다.

병리조직학적 검사결과, 소화기장기의 출혈을 동반한 괴사, 면역장기의 대식세포 및 림프구의 괴사 및 소실, 신경세포의 변성과 perivascular cuffing 등의 소견을 관찰할 수 있었다.

RT-PCR로는 바이러스 접종 후 48시간 이후의 비장과 선위에서, 60시간 이후의 뇌에서 vvNDV 특이 유전자를 검출할 수 있었다.

## Legends for Figures

Fig 1. Reactivity of RT-PCR for the detection of viral genes in 10 fold serial diluted allantoic fluids. A, allantoic fluids; 1,  $10^8$  ELD<sub>50</sub>; 2,  $10^7$  ELD<sub>50</sub>; 3,  $10^6$  ELD<sub>50</sub>; 4,  $10^5$  ELD<sub>50</sub>; 5,  $10^4$  ELD<sub>50</sub>; 6,  $10^3$  ELD<sub>50</sub>; 7,  $10^2$  ELD<sub>50</sub>; 8, 10 ELD<sub>50</sub>; 9, 1 ELD<sub>50</sub>; L, La Sota strain; B, B1 strain; M, 100bp DNA ladder marker(TOYOBO).

Fig 2. Detection of viral genes in spleen by RT-PCR. N, negative control; 1, 12 hour post-inoculation (hpi); 2, 24 hpi; 3, 36 hpi; 4, 48 hpi; 5, 60 hpi; 6, 72 hpi; 7, 84 hpi; 8, 96 hpi; P, positive control; M, 100bp DNA ladder marker.

Fig 3. Proventriculus at 96 hpi, congestion and haemorrhage, depletion of lymphoid cells in lamina propria. H-E stain. Bar=50 $\mu$ m.

Fig 4. Cerebellum at 96 hpi, note the degeneration and loss of nerve cells. H-E stain. Bar=50 $\mu$ m.

Fig 5. Cecal tonsil at 12hpi, immunolabelling in epithelium and lamina propria, All



the immunostained slides were counterstained with hematoxylin. ABPC method. Bar=50 $\mu$ m.

Fig 6. Cerebellum at 60 hpi, immunolabelling in nervous cells, ABPC method. Bar=50 $\mu$ m.

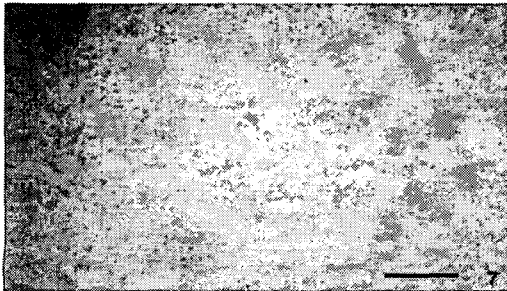
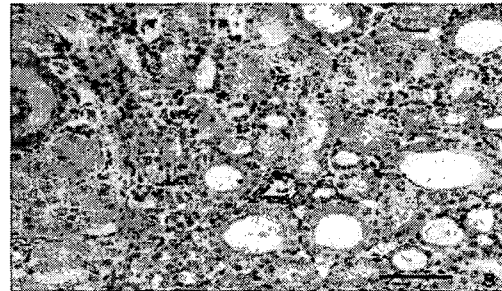
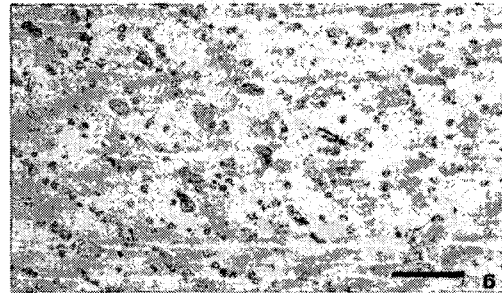
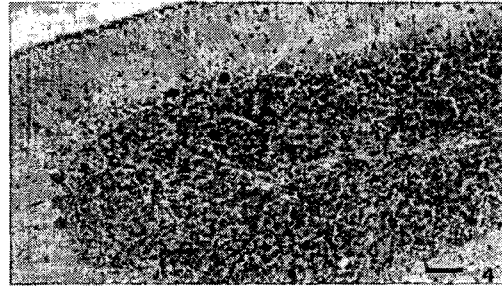
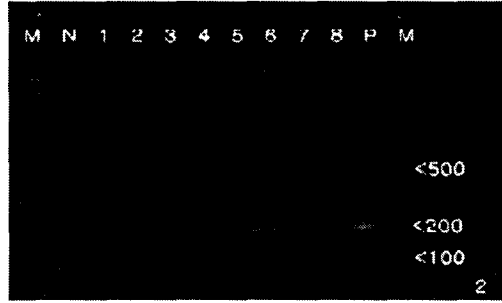


Fig 7. Spleen at 12 hpi, immunolabelling in germinal center's lymphoid cells. ABPC method. Bar=50 $\mu$ m.

Fig 8. Kidney at 96 hpi, immunolabelling in tubular epithelial cells. ABPC method. Bar=50 $\mu$ m.



## 참고문헌

1. Kraneveld FC. 1926. A poultry disease in the Dutch East Indies. *Ned In disch BI Diergeneeskde* 38 : 448-450.
2. Levine PP. 1964. *World dissemination of Newcastle disease*. In: Hanson RP. Newcastle disease, An evolving pathogens. University of Wisconsin Press, Madison, WI : 65-69.
3. Alexander DJ. 1997. *Newcastle disease and other paramyxovirus infection*. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, et al, Disease of poultry, 10th Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa : 541-569.
4. Kaleta EF, Baldauf C. 1988. *Newcastle disease in free-living and pet birds*. In: Alexander DJ. Newcastle disease. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA : 197-246.
5. Higgins DA. 1971. Nine disease outbreaks associated with myxoviruses among ducks in Hong Kong. *Trop Anim Health Prod* 3 : 232-302.
6. Frederick A, Murphy E, Gibbs PJ, et al. *Veterinary Virology*, 3rd Ed. Academic Press : 411-428.
7. Cheville NF, Stone H, Riley J, et al 1972. Pathogenesis of virulent Newcastle disease in chickens. *JAVMA* 161 : 169-179.
8. Nho WG, Sur JH, Kim SB. 1990. Immunohistochemical identification of Newcastle disease virus with indirect immunoperoxidase technique. *Korean J Vet Res* 30(3) : 309-315.
9. Ojok L, Brown C. 1996. An immunohistochemical study of the pathogenesis of virulent viscerotropic Newcastle disease in chickens. *J Comp Pathol* 115 : 221-227.
10. Brown CC, King DJ, Seal BS. 1999. Comparison of pathology-based techniques for detection of viscerotropic velogenic Newcastle disease virus in chickens. *J Comp Pathol* 120 : 383- 389.
11. Brown C, King DJ, Seal BS. 1999. Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. *Vet Pathol* 36(2) : 125-32
12. Mo IP, Kwon YK, Han MG, et al. 2001. Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with virulent viscerotropic Newcastle disease viruses isolated in Korea. *Korean J Poult Sci* 28(2) : 99-106.
13. Jestin V, Jestin A. 1991. Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by in vitro enzymatic amplification(PCR). *Arch Virol* 118 : 151-161
14. Gohm DS, Thur B, Hofmann MA. 2000. Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR. *Avian Pathol* 29 : 143-52
15. Kou YT, Mohd AM, Arshad L, et al. 2000. Performance of an RT-nested PCR and ELISA for detection of Newcastle disease virus. *J Virol Methods* 86 : 71-83.
16. King DJ, Seal BS. 1997. Biological and molecular characterization of Newcastle disease virus isolates from surveillance of live bird markets in the northeastern United States. *Avian Dis* 42 : 507-516
17. Aldous EW, Collins MS, McGoldrick A, et al. 2001. Rapid pathotyping of Newcastle disease virus(NDV) using fluorogenic probes in a PCR assay. *Vet Microbiol* 80 : 201-212
18. Kommers GD, KingDJ, Seal BS, et al. 2001. Virulence of pigeon-origin Newcastle disease virus isolates for domestic

- chickens. *Avian Dis* 45(4) : 906-921
19. Baskya H. 1952. A comparison of Newcastle disease virus recovery from bone marrow and from pools of respiratory track and spleen. *Am J Vet Res* 13 : 405-406
  20. Hofstad MS. 1951. A quantitative study of Newcastle disease virus in tissue of infected chicken. *Am J Vet Res* 12 : 334-339.
  21. Parede L, Young PL. 1990. The pathogenesis of velogenic Newcastle disease virus infection of chickens of different ages and different levels of immunity. *Avian Dis* 34(4) : 803-808.
  22. Hanson R, Spalatin PJ, Dickinson EM. 1967. Criteria for determining the validity of a virus isolation. *Avian Dis* 11 : 508-514.
  23. Creelan JL, Graham DA, McClough SJ. 2002. Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Avian Pathol* 31 : 493-499.
  24. Hamid H, Campbell RS, Parede L. 1991. Studies of the pathology of velogenic Newcastle disease : virus infection in non-immune and immune birds. *Avian Dis* 17 : 354-361.
  25. 여상건, 최원필. 1979. 종계군의 Newcastle disease에 대한 면역상태에 관한 연구. *대한수의학회지* 19(1) : 45-51.
  26. Rssell PH, Edington N. 1987. *Veterinary viruses*. Cambridge: Burlington Press : 452-470.