

Indirect Immunoperoxidase법을 이용한 조직내 뉴캐슬병 바이러스 항원동정

노환국 · 서정향 · 김순복
경상대학교 수의과대학
(1990. 3. 7 접수)

Immunohistochemical identification of newcastle disease virus with indirect immunoperoxidase technique

Whan-goog Nho, Jung-hyang Sur, Soon-bok Kim
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
(Received Mar. 7, 1990)

Abstract: The present experiment was done to identify Newcastle disease virus(NDV) antigens in frozen sections of various organs from experimentally NDV-infected chicken with indirect immunoperoxidase method. Sections were incubated with rabbit anti-NDV polyclonal as first antibody, followed by incubation with goat anti-rabbit or protein A peroxidase conjugate.

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.

Keywords: Newcastle disease virus, indirect immunoperoxidase technique, chicken.

서 론

뉴캐슬병은 영국에서 1926년 Doyle¹에 의해서 처음으로 발생보고 되었으며 같은해에 Java와 우리나라에서도 발생되었다.^{2,3} FAO-WHO-OIE의 가축보건연보⁴에 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 원인 바이러스의 병원성에 따라 임상증상을 거의 나타내지 않는 lentogenic주에서 부터 폐사율이 100%에 달하는 velogenic주에 이르기 까지 다양한 양상으로 발생되고 있으며^{2,3,8,9} 야외에서는 흔히 파이코플라즈마병이나 전염성기관지염과 혼합감염을 일으켜¹⁰ 병리학적으로 진단하기에 어려울 때가 많다. 뉴캐슬병의 실험실진단을 위해서 혈중의 항체를 측정

하는 혈구응집억제반응이나 부화계란접종법 또는 세포 배양을 통한 바이러스 분리동정등의 방법들이 사용되고 있으나 시간이 많이 소요되며 혈중항체가 단으로는 확진이 곤란할 때가 많다.

조직내 바이러스 항원동정을 위한 면역조직화학적 방법으로서 형광항체법이 오래전부터 개발되어 바이러스성 질병의 중요한 진단 수단으로 사용되어 오고 있다.⁵ 그러나 형광항체법은 비특이 반응의 발현이 빈번하여 판독이 애매할때가 많고 양성반응에 의한 특이형광도 시간이 지남에 따라 소실되는 결점이 있으며, 반응결과는 반드시 형광현미경으로 관찰해야 하는 등의 단점이 있다. 이러한 형광항체법의 결점을 보완하고 특이성을 더욱 높이고자 하는 노력의 결과로서 새로운 면역조직화학적 방법들이 개발되어, 바이러스 항원¹¹⁻¹⁷은 물론 호르몬^{18,19} 단백질^{20,21} 등 여러가지 항원을 검출하는데 광범위하게 사용되어 오고 있다.

바이러스 항원의 면역조직화학적 동정은 간편한 방법으로 수 시간 이내에 신속하게 진단할 수 있으며^{22,23} 혈중에 항체가 생성되기 이전의 혈중항체 음성개체에서도 조직내에서 직접 바이러스 항원을 검출함으로써 조기진단이 가능하고, 혈중항체 양성개체로부터 백신 항체보유개체와 감염개체를 식별할 수 있는 등의 많은 장점을 가지고 있기 때문에 아주 효과적인 진단법으로 알려져있어^{24,25} 오늘날 이 분야에 많은 연구가 행하여지고 있다.²⁶⁻³⁰

Indirect immunoperoxidase방법은 1966년 Graham과 Karnovsky가³¹ horseradish peroxidase 표지항체를 사용하여 세포성 항원을 검출함으로써 처음 알려졌으며, 감응도가 높아 오늘날 바이러스 항원동정에 많이 이용되고 있다.³²⁻³⁵ 이 실험은 면역조직화학적으로 뉴캐슬 병을 신속하게 확인할 수 있는 진단법을 확립하는 데 그 목적을 두고, 인공감염체의 각종장기에 대한 냉동절편에서 indirect immunoperoxidase법을 이용하여 뉴캐슬병 바이러스(Newcastle Disease Virus, NDV) 항원검출을 시도하였다.

재료 및 방법

실험동물 : NDV에 대한 혈중항체가 음성으로 확인된 46~100일령의 닭 12수에 NDV '교정원'주(가축위생연구소, $10^{10.5}$ ELD₅₀/ml)를 1,000배 희석하여 각각 0.5ml씩 비강점종 하였다. 점종후 24, 48, 72, 96시간에 각각 3, 3, 2, 4수씩을 해부검사 하였다. 이때 기관, 폐장, 뇌, 흉선, 비장, 맹장편도, 간장, 선위 및 소장을 절취하여 -70°C에 보관하면서 냉동절편재료로 이용하였으며, 항체음성의 다른 건강계 2수는 이 실험의 대조로서 사용하였다.

고도면역혈청 : 가토 항NDV 고도면역혈청을 생산하기 위해서, 건강한 토끼에 뉴캐슬병 생독백신(Hitchner B₁: 마이엘화학)을 0.9% Saline 10ml로 희석한 용액 0.5ml와 complete adjuvant 0.5ml를 잘 혼합하여 1차 정맥주사 하였고, 3주후에는 incomplete adjuvant 0.5ml를 같은 방법으로 혼합하여 2차 점종하였으며 다음은 생독백신만을 3주 간격으로 2회 점종하였다. 마지막 점종 3주후에 도살 채혈하고 혈청을 분리하여 56°C에서 30분간 비동화 시킨다음 1차항체로 사용하였다.

조직절편 : 냉동절편은 동결저장된 조직을 냉동절편기에서 약 3~5 μ m두께로 박절하였으며 아세톤에 10분간 고정된 후 4°C 냉장고에 보관하면서 제작당일 면역염색 하였다.

Indirect immunoperoxidase법 : 조직절편을 먼저 sodium phosphate buffer, pH7.6(PBS)으로 잠시 수세

한 후에 0.3% 과산화수소 메탄올용액에 20분간 처리하였으며 수세에 이어 2% 정산산양혈청으로 10분간 전처리하였다. 다음 1차항체를 2% 정산산양혈청에 100~200배 희석하여 60분간 감작시킨 후 3분간씩 6회 PBS로 수세하였다. 그리고 2차항체로서 protein A-peroxidase 또는 goat anti-rabbit peroxidase를 PBS로 300~500배 희석하여 45분간 반응시킨 후, 3분간씩 3회 수세한 다음 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, DAB)로 25°C 부랑기내에서 약 30분간 발색시켰으며, 이때 발색정도를 광학현미경으로 관찰하면서 적당한 반응시간을 선택하여 슬라이드를 수세하였고 일부는 헤마톡실린으로 대조염색하여 마운팅하였다. 면역염색은 모두 실온에서 가능한 광선에 노출되지 않도록 주의하면서 진행되었고 대조로서 1차 또는 2차항체 무처리군을 함께 관찰하였다.

결 과

냉동조직절편에서 NDV항원을 검출하기 위해서 indirect immunoperoxidase염색을 실시한 결과, 양성반응 세포들은 주로 기관, 비장 및 맹장편도에서 관찰되었다(Table 1).

기관에서는 전 예에서 양성반응세포가 검출되었으며 양성반응은 관광내측의 상피세포에서 주로 관찰되었고 정상세포에 비해 양성반응세포들은 세포질내에 흔히 암갈색의 색소 침착을 일으켰다(Fig 1). 감염 48시간째 부터는 상피세포가 괴사 탈락되는 현상을 나타내었으며(Fig 2), 시간이 경과함에 따라 양성반응 세포수가 증가하였고 반응 또한 강하게 나타나는 경향을 보였다(Fig 3). 2차항체로서 protein A-peroxidase와 goat anti-rabbit peroxidase를 비교하기 위해서 각각을 사용한 결과 perotein A-peroxidase를 사용한 경우에도 뚜렷한 차이점 없이 모두 좋은 반응을 나타내었고, 양성반응을 나타낸 기관의 상피세포 주위에는 흔히 임파구가 침윤해 있었다(Fig 2). 비장에서는 양성반응이

Table 1. Detection of Newcastle disease virus antigens in the frozen sections with indirect immunoperoxidase method

Organ	24h*	48h	72h	96h
Trachea	3/3**	3/3	2/2	4/4
Spleen	2/3	2/3	1/2	2/4
Cecal tonsil	0/3	0/3	1/2	1/4

*Hours after virus inoculation

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

적색수내의 임파구에서 관찰되었으며 적색수 전반에 걸쳐 고립 또는 소집단으로 출현하였고, 임파구의 세포질내에 암갈색의 색소침착을 일으켰다(Fig 4). 그리고 맹장편도에서는 양성반응이 점막상피세포와 고유층내 임파구들에서 관찰되었으며, 소장, 폐장, 선위에서도 양성반응을 나타내는 임파구들이 가끔 관찰되었으나 간장, 뇌, 흉선에서는 볼 수 없었다.

면역염색과정에서 1차 또는 2차항체를 처리하지 않은 대조군이나 전장계의 조직절편에서는 양성반응 특유의 갈색 침착세포가 관찰되지 않았다.

면역염색에서 적혈구, 호산구, 비만세포, 호중구의 세포과립등에서 나타나는 내인성 peroxidase 활성을 제거하기 위해서 0.3% 과산화수소 메타놀용액으로 전처리 하였으며, 2차항체에 대한 비특이반응을 줄이기 위하여 2% 정상산양혈청으로 사전 감작시킨 결과, 처리하지 않은 대조군에 비해 비특이 반응을 현저하게 감소시킬 수 있었다.

고 찰

뉴켓슬병의 자연감염은 호흡기나 소화기점막을 통해 일어나며 NDV는 이들 점막상피에서 일차 증식하여 바이러스혈증을 일으킨 다음, 혈류를 타고 체내 각 부위의 친화성장기로 파급되고, 침입한 바이러스는 병원성과 개체의 저항력등에 따라 약 2~15일간의 잠복기를 거친 다음 임상증상을 일으키게 된다.^{9,10}

Baskaya 등,³⁶ Hofstad³⁷ 및 Kohn³⁸은 각각 병원성이 다른 NDV를 분무 접종하여 1~6일간 장기별로 바이러스 분리실험을 실시한 결과, 폐조직이 바이러스 분리에 가장 적합한 장기라고 하였고, Hanson³⁹은 velogenic 주접종계의 폐장, 기관 및 비강혈액에서 접종후 1일째에, 그리고 뇌조직에서는 4일째에 각각 바이러스를 분리할 수 있었다고 보고하였다.

이 실험에서는 바이러스 증식 및 병변 호발부위와 바이러스 분리성적 등을 감안할 때, 면역조직화학적으로 항원검출이 용이할 것으로 예상되는 폐장, 기관, 비장, 맹장편도, 소장, 선위, 뇌 및 간장의 냉동절편 조직에 대해 indirect immunoperoxidase법을 적용하였던 바 양성반응세포는 주로 기관상피세포와 비장의 임파구에서 관찰되었고, 맹장편도는 출현빈도가 높지 않았으며, 검출율이 가장 높을 것으로 예상되었던 폐장에서는 최우하게 관찰되었다. 따라서 NDV의 면역조직화학적 동정을 위해서는 기관과 비장이 가장 적합한 장기로 권장되었으며, 모두 감염 24시간째에 이미 높은 검출율을 보임으로서 야외에서 조기진단을 위해 널리 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

이 실험의 indirect immunoperoxidase 염색에서 특이양성 반응색소는 주로 상피세포와 임파구의 세포질내에서 암갈색으로 미세한 과립으로 나타났으며, NDV의 복제가 세포질에서 일어난다는 사실^{2,9,10}을 뒷받침해주고 있었다.

면역염색은 일반적으로 실온에서 진행되는 것으로 알려져 있다.^{15,24,40,41} 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 부란기내에서 면역염색을 실시하여 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

면역염색을 성공적으로 실시하기 위해서는 특이반응 세포와 구별이 곤란한 비특이색소의 발색을 최대한 줄여야 하는데, 내인성 peroxidase 활성^{12,14,30,42,43}을 가지는 적혈구, 호산구 및 비만세포들은 양성반응세포와의 감별에 특히 주의를 요한다. 광선에 노출되거나 DAB 발색시간이 길어지면 배경염색이 짙어지며 이때 양성반응색소는 상대적으로 약해져서 관찰하지 못하고 지나칠 수도 있다. 빛은 DAB를 산화시키는 촉매작용을 가지며, 비특이침전물을 만듦으로써 배경의 발색을 일으키기 때문에^{17,44,45} 면역염색을 할때는 슬라이드를 덮어 광선을 차단해 주어야 한다. 이 실험에서는 내인성 peroxidase 활성을 제거하기 위해서 0.3% 과산화수소 메타놀용액으로 전처리하였고, 항원항체간의 비특이결합을 방지하기 위해서는 2%정상산양혈청을 사용하였으며 면역염색의 전 과정을 통해 가능한 광선에 노출되지 않게 주의하면서 실시한 결과, 대조군과 비교할 때 비특이반응을 많이 제거할 수 있었다.

결론적으로, indirect immunoperoxidase법은 조직내 NDV항원검출에 있어 높은 특이성을 나타냄으로서 야외에서 뉴켓슬병의 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

뉴켓슬병 바이러스의 면역조직화학적 동정을 위하여 인공감염계의 각종 장기의 냉동절편에 대해 indirect immunoperoxidase법을 적용하였으며, 모든 절편은 1차항체로서 가토 항뉴켓슬바이러스 고도면역혈청으로 감작시킨 다음 산양항가토 IgG 또는 protein A-peroxidase conjugate를 2차항체로 결합시켰다.

양성반응은 감염후 24시간 부터 기관상피세포와 비장의 임파구에서 주로 관찰되었으며, 바이러스 항원은 주로 이들 세포의 세포질내에서 검출되었다.

이상의 결과에서 indirect immunoperoxidase법은 뉴캐슬병 바이러스 항원동정을 위한 중요한 수단으로 활용될 수 있을 것으로 생각되었다.

Legends for Figures

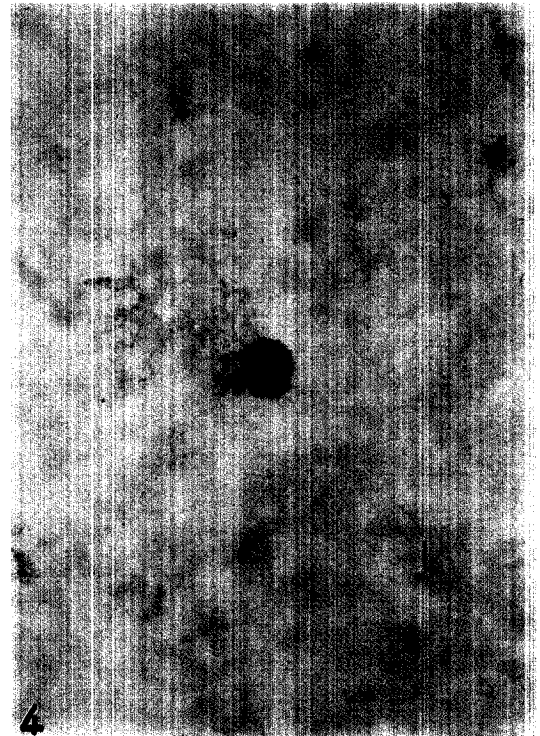
All are incubated with goat anti-rabbit peroxidase conjugate as second antibody except Fig 2 with protein A-peroxidase.

Fig 1. Dark brown deposits indicating the presence of NDV antigen in the tracheal epithelium. 24 hours after inoculation. $\times 200$.

Fig 2. Positive reactions are found in the tracheal ephithelium. Counterstained with hematoxylin. 48 hours after inoculation. $\times 125$.

Fig 3. Positive cells in the trachea. 96 hours after inoculation. $\times 200$.

Fig 4. Positive reaction is localized in the cytoplasm of lymphocyte in the spleen. 72 hours after inoculation. $\times 200$.



참 고 문 헌

1. Doyle TM. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filterpassing virus. *J Comp Pathol Therap* 1927;40:144~169.
2. Mohanty SB, Dutta SK. *Veterinary virology*. Philadelphia: Lea & Febiger 1981;267~270.
3. 박근식. 뉴캐슬병 바이러스 연구사. 가금학회보 1979;6(2):57~73.
4. FAO-WHO-OIE. Animal health yearbook. Food and agricultural organization of the United Nations. Rome 1973.
5. Beard CW, Easterday BC. The influence of the route of administration of Newcastle disease virus on host response. III. Immunofluorescent and histopathological studies. *J Infect Dis* 1967;117:66~70.
6. 이우용, 윤희경, 김기석 등. 가금질병검색 및 품종개량에 관한 연구. 가축위생연구소 시험연구보고서 1988;271~276.
7. 박근식, 김선중. 뉴캐슬병 백신 접종계군에 있어서 면역상태와 ND발생시 닭의 생산성에 미치는 영향. 가금학회보 1984;11(1):49~64.
8. 여상건, 최원필. 종계군의 Newcastle disease에 대한 면역상태에 관한 연구. 대한수의학회지 1979;19(1):45~51.
9. Beard CW, Hanson RP. *Disease of Poultry*. 8th ed. Ams: Iowa state university Press, 1984;452~470.
10. Rssell PH, Edington N. *Veterinary viruses*. Cambridge: Burlington Press Ltd, 1987;152~155.
11. Chasey D. A simple and rapid immunoperoxidase test for the detection of virus antigens in tissue culture. *Vet Res* 1980;106:506~507.
12. Cherrington JM, Ghalib HW, Sawyer MM, et al. Detection of viral antigen in bluetongue virus infected bovine tissues, using the peroxidase-antiperoxidase techniques. *Am J Vet Res* 1985;46(11):2356~2359.
13. Ducatelle R, Coussement W, Hoorens J. Immunoperoxidase study of Aujeszky's disease in pigs. *Res Vet Sci* 1982;30:294~302.
14. Gilka F, Spencer JL. Immunohistochemical identification of group specific antigen in avian leukosis virus infected chicken. *Can J Com Med* 1984;48:322~326.
15. Jonsson LGO, Engstrom BE. Immunohistochemical detection of infectious bursal disease and infectious bronchitis viral antigen in fixed paraffin-embedded chicken tissue. *Avian Pathology* 1986;15:385~393.
16. Mizuno Y, Arai K. Assay of avian leucosis virus by indirect immunoperoxidase method. *Natl Inst Anim Health Q (Jpn)* 1981;21:63~67.
17. Yoshikawa T, Yamamura T, Yoshikawa H, et al. Enzyme histochemical studies on bovine leukemia cells. *Jpn J Sci* 1984;46(4):541~547.
18. Moriarty GC, Moriarty CM, Sternberger LA. Ultrastructural immunocytochemistry with unlabeled antibodies and the peroxidase-antiperoxidase complex; A technique more sensitive than radioimmunoassay. *J Histochem Cytochem* 1973;21(9):825~833.
19. Sandusky GE, Wightman KA. 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* 1985;46(3):739~749.
20. Bundgaard M, Moller M. Horseradish peroxidase and microperoxidase: their purity and binding to serum proteins. *J Histochem Cytochem* 1981;29(3):331~336.
21. Gallyas F, Gorcs T, Merchenthaler I. High grade intensification of the end-product of the diaminobenzidine reaction for peroxidase histochemistry. *J Histochem Cytochem* 1982;30(2):183~184.
22. Falini B, Solas ID, Halverson C, et al. Double-labeled-antigen method for demonstration of intracellular antigens in paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 1982;30(1):21~26.
23. Matsuoka T, Kurihara T, Konosu Y, et al. Demonstration of Aujeszky's disease virus antigen in naturally infected cattle by immunoperoxidase method. *Jpn J Vet Sci* 1987;49(3):725~727.
24. Bullock GR, Petrusz P. *Techniques in immunocytochemistry. Vol 1*. London: Academic Press Inc, 1982;1~183.
25. Cuello AC. *Immunohistochemistry*, New York:

- John Welly & Sons, 1984;497.
26. Clark CA, Downs EC, Primus FJ. An unlabeled antibody method using glucosyl oxidase-antigluco-oxidase complex (GAG): A sensitive alternative to immunoperoxidase for the detection of tissue antigen. *J Histochem Cytochem* 1982; 30(1):27~34.
 27. Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and anti-alkaline phosphatase (APAAP complex). *J Histochem Cytochem* 1984;32(2):219~229.
 28. Holgate CS, Jackson P, Cowen PN, et al. Immunogold-silver staining; New method of immunostaining with enhanced sensitivity. *J Histochem Cytochem* 1983;31(7):938~944.
 29. Hsu SM, Raine L, Perotina A, Avidin and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1981;29(11):1349~1353.
 30. Swanson PE, Hbgen KA, Wick MR. Avidin-biotin-peroxidase-antiperoxidase (ABPAP) complex. *Am J Clin Pathol* 1987;88:162~176.
 31. Graham RC, Karnovsky MJ. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney; ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem* 1966;14:291.
 32. Afroudakis AP, Liew CT, Peters RL. An immunoperoxidase technique for the demonstration of the hepatitis B surface antigen in human livers. *Am J Clin Pathol* 1976;65:533~539.
 33. Ducatelle R, Couesement W, Hoorens J. Demonstration of canine distemper viral antigen in paraffin sections, using an unlabeled antibody enzyme method. *Am J Vet Res* 1980;40(11):1860~1862.
 34. Goodman ZW, Langloss JM, Bratthauer GL, et al. Immunohistochemical localization of hepatitis B surface antigen and hepatitis B core antigen in tissue section; A source of false positive staining. *Am J Clin Pathol* 1988;89:533~537.
 35. Haziroglu R, Haritani M, Narita M. Demonstration of akabane virus antigen in experimentally infected mice using immunoperoxidase method. *Jpn J Vet Sci* 1987;49(1):133~135.
 36. Baskaya H, Burd HE, Hudson CB, et al. A comparison of Newcastle disease virus recovery from bone marrow and from pools of respiratory tract and spleen. *Am J Vet Res* 1952;13:405~406.
 37. Hofstad MS. A quantitative study of newcastle disease virus in tissue of infected chicken. *Am J Vet Res* 1951;12:334~339.
 38. Kohn A. Quantitative aspects of newcastle disease virus infection effective of route of infection on the susceptibility of chicks. *Am J Vet Res* 1955;16:450~457.
 39. Hanson RP, Spalatin J, Dickinson EM. Criteria for determining the validity of a virus isolation. *Avian Dis* 1967;11:508~514.
 40. Ordronneau P, Lindstrom P B-M, Petrusz P. Four unlabeled antibody bridge techniques: A comparison. *J Histochem Cytochem* 1981;29(12):1379~1404.
 41. Weir EE, Pretlow TG, Pitts A, et al. A more sensitive and specific histochemical peroxidase stain for the localization of cellular antigen by the enzyme antibody conjugate method. *J Histochem Cytochem* 1974;22(12):1135~1140.
 42. Distefano HS, Marucci AA, Dougherty RM. Immunohistochemical demonstration of avian leucosis virus antigens in paraffin embedded tissue. *Processing of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1973;142:1111~1113.
 43. Eva Loepft BF, Wyler R. Demonstration of viral antigen in cryostat section by a new immunoperoxidase procedure elimination endogenous peroxidase activity. *J Histochem Cytochem* 1979; 27(2):686~688.
 44. Swanson PE, Foundation: Foundation of immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 1988;90:333~339.
 45. Talyer CR, *Immunomicroscopy: A Diagnostic tool for the surgical pathologist. Vol 1.* 1986; California: WB Saunder,