

단클론항체를 이용한 광견병바이러스의 면역병리조직학적 진단

강문일·박남용·송재영*
전남대학교 수의과대학
농촌진흥청 가축위생연구소 병독과*
(1993년 1월 27일 접수)

Immunohistochemical diagnosis on rabies virus using its monoclonal antibody in mice

Mun-il Kang, Nam-yong Park, Jae-yeong Song*

Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea
Veterinary Research Institute, Anyang, 430-016, Korea*

(Received Jan 27, 1993)

Abstract : For a immunohistochemical diagnosis of the frozen and paraffin-embedded tissues against rabies virus, mice were intracerebrally inoculated with challenge virus standard (CVS) rabies virus and then were used to detect the rabies viral antigen by the immunoperoxidase (IP) and the avidin-biotin complex(ABC) method.

In this study, the results confirmed that ABC and IP methods, although the former showed more specific and sensitive than the latter, were reliable and effective for the demonstration of rabies virus in both frozen and paraffin-embedded brain tissues prepared from rabies-infected mice. Additionally, IP technique using the monoclonal antibody against rabies virus could be recommended as a standard diagnostic tool instead of the present immunofluorescent method for the local veterinary services in Korea.

Key words : rabies, challenge virus standard rabies virus, mice, monoclonal antibody, frozen section, immunoperoxidase, avidin-biotin complex.

서 론

광견병은 모든 온혈동물에 감염을 일으키는 신경친화성의 바이러스성 질병으로서 잠복기가 수일에서 수년으로 다양할 뿐만아니라 뇌염 등 중추신경계통의 병변을 특징적으로 나타내는 치사성 인수공통전염병이다.¹⁻³ 이 질병의 발생은 지역에 따라 다르나 가축의 경우 삼림 내에서 사는 전파매개체인 여우, 늑대 등의 야생동물에게 돌발적으로 물려 발생하는 예가 많고, 사람의 경우 주로 개에 대한 광견병의 국가적 방제대책이 시행되고 있지 않은 나라에서 그 발생이 지속되고 있다.^{2,4} 그럼

에도 광견병은 오늘날까지 항혈청요법에 효과적인 치료법이 없이 단지 예방적 측면에서의 정밀진단법과 예방약들의 개량만이 이루어져 오고 있다.⁵

우리나라의 경우 20세기에 들어와서야 과학적인 광견병 발생조사가 실시되어 1907~1910년 사이에 49두의 가축에서 발생하였고, 이후 이 질병의 발생은 여러번의 증감발생추이를 보였는데 해방전 시기인 1924~1940년 사이에 13,859두가, 그 다음 50~60년대에 이르러서는 연간 40~80두의 발생을 보이다가 80년대 초반까지는 주로 개, 소 등에서 10두내외의 발생빈도를 보였다.^{3,6,7} 이러한 발생두수의 감소는 50년대초 이 등⁸이 국내 최초

*본 연구는 전남대학교 학술진흥연구비의 지원에 의하여 수행된 과제임.

로 광견병예방약을 개발보급한 이래 이들 예방약에 대한 정부차원의 꾸준한 예방약접종정책⁷으로 비교적 선진국 수준의 매우 낮은 발생율을 유지하고 있다.

그러나 이 질병의 전파특성상 가축이나 사람에게 발생빈도가 낮다고 하여 이 질병의 감염경로환이 끊어졌다고 할 수 없다. 이는 여우 등 야생동물과 몇종의 박쥐들에서는 임상증상이 병원체바이러스가 잠복상태로 있다가 감수성 동물과의 접촉시 돌연히 발생할 수 있는데³⁻⁵ 다행히 지난 수년간 국내발생이 없긴하나 최근 한 조사⁹에 의하면 매우 한정된 경기도지역 내에서 1988~1991년의 4년동안 개에 물리거나 할퀴 사람이 200명에 달하였다고 하며, 더구나 공식적으로 북한지방의 광견병발생의 확인여부가 안된 상태아래 비무장지대내 야생태계가 유지되고 있기 때문에 국내의 광견병발생의 위험성은 가축과 사람 모두에게 늘 상존하고 있다고 할 수 있다.^{9,10}

최근 세계보건기구^{5,11}와 함께 여러 나라에서는 광견병에 대한 근본적인 방역수단을 마련키 위해 형광항체법 등 기존의 진단법보다 정확하고도 신속한 진단법¹²⁻¹⁵을 비롯하여 각 지역분리주에 대한 병원성연구¹⁶⁻¹⁷ 및 효과적인 백신개발^{5,11}에 큰 관심을 쏟고 있는 실정이다. 특히 60년대말 Nakane et al¹⁸에 의해 개발된 효소표지면역화합체를 이용한 감염세포내 병원체검출기법의 등장은 면역병리분야의 혁신적 발전을 가져와 많은 질병진단에 이용되고 있으며, 더구나 80년대에 들어와 단크론항체기법이 확립되어 각종 병원체에 대한 특이성이 높은 혈청학적 진단^{19,20}이 가능해짐에 따라 이들 두 가지의 기술적 배경하에 기존 병리조직학적 진단법인 조직의 형태학적 병변의 관찰에 머물러 왔던 한계를 극복하고 세포내외에서 고도의 특이성과 민감도로써 항원의 검출까지 가능케 되었다.

본 연구에서는 기존의 광견병진단법들이 갖고 있는 단점들을 보완하여 보다 정확하고 실용적인 진단법을 마련코자 최근 개발된 광견병바이러스의 단크론항체¹⁹를 이용하여 광견병 바이러스를 뇌내접종하여 인공유발시킨 마우스의 뇌조직에 적용하여 면역조직병리화학적 염색결과의 유의성을 주로 살펴되 실험동물의 임상증상과 병리해부 및 조직학적 소견도 함께 조사한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 : 암수에 관계없이 10일령의 ICR계통의 마우스 30수를 사용하였다. 이들은 시험기간동안 계속 모축과 함께 사육하였다. 물과 사료(실험동물용, 천하제일)는 무제한 공급하였다.

접종바이러스 : 가축위생연구소로부터 분양받은 표준공격바이러스(challenge virus standard ; CVL)인 광견병바이러스를 사용하였다. 이들 접종바이러스는 마우스의 뇌내접종에 의해 계대배양된 마우스의 뇌조직을 무균적으로 갈아 생리식염수로 2배희석한 후 1ml씩 분주하여 동결건조한 다음, 사용전까지 -20도에 냉동보존하였다.

접종유발시험 : 바이러스가 든 동결건조조직액에 1ml의 생리식염수를 부어 잘 혼든다음 1,000rpm에 10분간 원심을 걸어 상층액만을 접종액으로 사용하였다. 수당 0.02ml씩 튜버클린 주사기를 이용하여 안구뒤 뇌경막내로 접종하였다.

임상학적 검사 : 접종 후부터 임상증상이 발현되면 이를 폐사 후까지 각종 소견을 조사하여 기록하였다.

해부 및 병리조직학적 검사 : 전형적인 질병말기의 마비증세로 폐사직전의 마우스를 경추탈구하여 폐사시킨다음 척수를 붙혀 뇌전체를 적출하여 관찰하고, 이를 종축으로 둘로 나눈 후 한쪽은 동결절편용으로 남기고 나머지는 모두 10% 중성포르말린 용액에 적당한 크기로 잘라 고정하였다. 고정조직은 통상적인 수세, 탈수 과정을 거쳐 파라핀포매하여 5 μ m두께로 절편하고, 이를 hematoxylin과 eosin(H & E)염색하여 검경하였다.

면역병리조직학적 검사 : 본 검사는 기본적으로 동결 및 파라핀포매절편을 대상으로 진단특이성을 견주어 보되 immunoperoxidase(IP) 및 avidin-biotin complex(ABC) 염색법을 동시에 실시, 비교하였다. 그 염색과정으로 IP는 Bourgon과 Charlton¹³의 방법을 변형하여 사용하였는데 파라핀포매조직은 탈파라핀시킨 후 무수메탄올내 0.5% 혹은 1% 과산화수소액으로 15분간 내지 30분간 각각 처리하여 중류수와 완충액으로 각 5분씩 씻어낸 다음, 10배 희석한 송아지 태아혈청(Sigma, USA)에 10분간 적용시킨 후 증류수에 0.1% NaCl과 0.1% 결정 트립신(Sigma, USA)혼합용액(pH 7.8)에 37도 60분동안 혹은 0.01N HCl내 0.001% pepsin(Sigma, USA)용액으로 37도 20분간 놓아두었다.

다음으로 흐르는 찬물로 가볍게 씻어낸 뒤 완충액에 다시 씻고, 가축위생연구소로부터 분양받은 광견병바이러스의 단크론항체를 20, 40, 80배로 희석하여 실온의 습상에서 90분간 혹은 12시간이상 처리한 후 완충액으로 수세하였다. 이어 100, 200, 400, 1,000배로 각각 희석한 peroxidase가 붙은 항마우스토끼 면역글로부린 G(Zymed, USA)를 40분간 적용시킨 후 수세한 다음 발색시켰다. 곧바로 Mayer씨 헤마톡실린으로 5분간 대조 염색한 후 glycerin-jelly 혹은 crystal mountant(Biomed-a, USA)로 봉입하여 검경하였다. ABC법은 Fekadu et

al¹⁵의 방법을 기준으로 하되 이를 변형하여 사용하였는데, 2차 항혈청은 biotinylated rabbit anti-mouse IgG(Cappel, USA)을 100, 200, 500 혹은 1,000배 희석하여 10분내지 30분간씩 실온의 습상에서 처리하였으며, 이를 수세후 100, 200, 500 혹은 1,000배 희석한 peroxidase가 붙은 abidin-biotin complex 용액(Cappel, USA)으로 20분간 처리한 다음 발색시켰다. 그외의 과정은 IP와 똑같이 적용하였다. 전과정의 수세는 인산완충액(0.05M, pH 7.5) 혹은 tris완충액(0.05M, pH 7.6)을 사용하였고 통상 각 단계별로 5분씩 세번 적용하였으며, 모든 과정은 실내온도의 습상에서 이루어졌다. 발색제는 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride(Sigma, USA; DAB)에 과산화수소액을 첨가하거나 3-amino-9-ethylcarbazole(AEC)액을 사용하였다. 모든 염색시마다 정상마우스의 뇌절편을 만들어 음성대조로 사용하였고, 접종바이러스를 인공접종하여 유발시켜 형광항체로 이미 확인한 양성 마우스의 뇌조직을 양성대조로 이용하였다.

결 과

임상조건 : 접종마우스들은 접종 후 평균 5일째부터 피모가 거칠어지고 거동이 느슨해지면서 침울 및 간헐적인 근경련을 보이다가 6~7일째에 이르면 선회운동, 운동장애, 마비 등의 신경증상이 두드러졌고, 접종 9~12일(평균 10일)사이에서 폐사하였다.

해부 및 병리조직학적 소견 : 육안적으로 뇌의 병변은 관찰할 수 없었으나 일부 예에서 뇌막의 가벼운 울혈이 인정되었다. 주요한 병리조직학적 병변은 대뇌 피질부를 비롯 뇌량과 해마 등에 형성된 소성 혹은 다병소성 위관성 세포침윤(Fig 1)이었다. 병변이 형성된 맥관주위에 림프구가 소수 침윤한 가벼운 정도에서부터 완전히 Virchow-Robin강을 채워버린 심한 경우까지 다양하게 분포하고 있었고, 이 병변은 바이러스접종부위쪽 뇌에 더욱 심한 병소를 나타내었다. 특히 이들 병변은 정도의 차이는 있었으나 모든 예에서 관찰되었고, 대뇌피질의 뇌량과 해마부위에서 가장 빈번하게 나타났다. 또한 위관성림프구침윤과 더불어 간혹 소상 신경교세포증도 관찰되었다. 뇌의 병변내 신경세포에서 네그리소체는 발견할 수 없었다. 많은 예에서 대뇌의 뇌막내 미만성 울혈과 연막내 다수의 림프구침윤도 쉽게 볼 수 있었다.

면역병리조직화학적 소견 : 신경세포인 뉴런내에서 광견병바이러스항원의 양성반응인 갈색 미립물질들이 다수 확인되었다. 이들 항원들은 핵주변부와 수상돌기내 불규칙한 과립모양으로 분리된 침착물들이 신경세포내에 다수 분포하고 있었다. 이들 바이러스성 과립은

그 크기가 다양하여 크고 작은 과립들이 섞여 부분적으로 덩어리져 보이기도 하였으나 분리된 과립들을 뚜렷이 볼 수 있었다(Fig 2). 이들 바이러스 함유 신경세포들은 병리조직학적 병변의 분포와는 상관이 없었다. 아세톤으로 고정된 동결절편의 경우 10% 중성포르말린으로 고정하고 파라핀으로 포매한 조직절편보다 양성반응의 정도는 다소 뚜렷하였으나 세포의 형태와 조직보존성이 크게 뒤떨어졌다. 본 실험에서 설정한 염색과정중 IP와 ABC염색시 트립신 혹은 펩신으로 달리 처리한 결과 항원노출정도와 그에 대한 특이반응이 후자가 더욱 양호하였다. 수세를 위한 완충액의 차이는 크게 두드러지지 않았으나 tris 완충액이 인산완충액보다 균일한 염색정도를 나타냈다. 단크론항체의 희석농도는 마우스 복강액의 20배 희석액으로 90분간 반응시킬 때와 12시간 이상 주었을 때 별다른 차이없이 좋은 반응을 볼 수 있었다. 이차항혈청은 IP의 경우 200배 희석액으로 40분간 적용시킬 경우에 그리고 ABC법에서는 peroxidase가 붙은 ABC용액은 400배가 적정희석농도로 파악되었다. 발색제로써 DAB와 AEC중 용액제작의 편리성과 반응성 면에서 AEC가 좋았다. 두 염색법의 특이성은 30예 모두에서 양성을 보여 그 일치율은 100%이었으나 전반적으로 양성반응의 정도가 ABC기법이 보다 우수하였는데 특히 소수 예에서는 IP로 검출되지 않았던 부위에서도 양성반응을 찾아볼 수 있었다.

고 찰

현재의 광견병 진단법^{1,3,11-13,15,20-25}으로는 뇌조직내 네그리소체염색법, 원인체분리를 위한 조직배양법, 마우스를 이용한 바이러스 분리동정법, 보체결합법, 혈구 응집 및 응집억제법, 다가면역혈청을 이용한 형광항체법과 효소표지면역항체분석법 등이 있다. 그러나 이들 대부분 방법들의 진단소요시간은 길게는 수일내지 수주일일이 걸리거나 비특이적 반응으로 오진의 가능성이 적지 않아 문제가 되고 있다. 이런 이유로 세계보건기구는 공인된 광견병진단법으로 형광항체법과 마우스접종 시험만을 권장하고 있다.¹¹ 특히 국내에서 가장 광범위하게 사용되고 있는 동결절편을 이용한 형광항체법은 면역형광침착물을 검사할 수 있는 장비가 필요하고, 형광반응이 영구적이지 못하여 일정시간이 지난 후 다시 검사할 수 없으며, 조직검사시 일반적으로 동결조직을 이용함으로써 조직형태의 보존성이 나빠 일반 조직염색의 결과와 일치하는데 어려울 뿐만 아니라 매우 신선한 조직이나 특별히 처리된 조직만이 활용되고 있으며 형광물질의 자가발광효과에 의한 비특이성으로 인해 진단의 장애가 되는 등 여러가지 단점을 안고 있다.²⁶ 보조

진단으로 사용하고 있는 광견병감염 의심동물의 뇌조직에 대한 병리조직검사의 경우 진단소요기간이 길 뿐만 아니라 특징적인 세포질내 핵내 봉입체인 네그리소체여부만으로 감별해야 하는데 실제 광견병의 가상독주에 의한 야외발생예중 30%정도는 네그리소체가 형성되지 않는 등 확진율이 50% 내외로 낮은 편이다.^{2,11,24}

이와 관련하여 본 실험에서 수행된 IP기법은 앞서의 면역형광항체검사법이나 일반병리검사법의 단점들을 크게 보완할 수 있는데 무엇보다도 포르말린으로 고정하여 파라핀포매한 조직을 활용할 수 있고 H & E 염색으로 감별염색을 하여 분명한 주변조직형태와 구조를 일반 명시야 현미경아래서 직접 찾아가 하는 병인체항원의 분포위치와 감염정도를 확인할 수 있다는 장점을 갖고 있어 많은 전염성질환의 병리진단법에 활발히 사용되고 있다.^{13,14,21} 더불어 각종 질병진단의 특이성을 높이기 위해 다크온항체인 고도면역형성을 항체로 사용하는 대신 단크온항체 생산기법이 실용화됨에 따라 광견병바이러스에 대한 단크온항체도 생산가능케 되어¹⁹ 본 연구에서는 위양성이나 위음성 예를 줄이기 위해 단크온항체를 모든 실험에 일차항체형으로 사용하였다.

한편 최근 peroxidase를 붙인 항체를 이용한 광견병의 조직진단기법이 다양하여 IP 외에 peroxidase anti-peroxidase(PAP)¹³, ABC, 혹은 protein A-gold-silver(PAGS) 염색법¹⁴를 비롯 polymerase chain reaction(PCR)²⁷ 및 RNA probe²⁸를 이용한 *in situ* hybridization(ISH) 등 IP법에 비해 특이성과 민감성이 보다 높아진 조직진단법들이 개발 혹은 연구중에 있다. 그러나 이들 개발진단법들은 대부분 염색단계가 복잡하여 시간이 많이 걸리고, 소요시약이 매우 고가일 뿐만 아니라 처리기술도 숙련을 요하는 등 단점도 적지 않다.

그래서 저자 등은 본 실험에서 광견병에 대한 표준진단법으로써 형광항체법을 현재 활용하고 있는 전국 가축위생시험소에서 가장 용이하게 대체활용할 수 있는 기법을 고려하되 Zimmer et al²⁴이 광견병바이러스의 다크온 항체를 이용, 여러동물의 뇌조직을 검사하였던 바 형광항체법과 PAP법은 98%, 마우스접종시험은 95%, 세포배양법은 81%의 검출율을 보였고 포르말린고정 및 파라핀포매절편조직진단은 PAP법이 가장 우수하였던데, 뇌의 네그리소체, 염증 및 변성병변을 확인한 일반조직검사로써는 53%의 진단율에 그쳤다고 한 바 있는데 특히 이 결과중 형광항체법은 PAP법에 비해 위양성이 검출되어 특이성면에서 PAP법에 뒤떨어졌다는 점을 감안하여 진단염색단계가 비교적 간단하여 진단시간의 단축과 진단경비의 경제성면에서 PAP법의 변형인 IP법이 현실적인 국내조건아래 가장 적합하다고 판단

되어 기본적으로 IP법의 활용성 확인에 중점을 두었다. 더불어 현재 효소표지항체이용 조직검사법으로서 특이성이 가장 탁월하다고 알려지고 있는 ABC기법을 동시에 적용비교함으로써 IP의 효용성을 보다 정밀히 검토하였다.

IP와 ABC기법을 동결 및 포르말린고정후 파라핀포매조직에 활용기 위해서는 전자의 경우 고정액이, 후자의 경우 고정액과 항원노출을 극대화하기 위한 효소처리과정이 가장 문제시 되어 왔다. 본 실험에서 동결절편은 아세트산 고정으로 충분하였고, 포르말린 고정후 파라핀포매 조직염색을 위해서는 통상적인 결정 트립신²¹과 Bourgon과 Chalton¹³, Jackson과 Reimer et al¹⁶이 권장한 펩신을 비교하였었는데 반응정도가 펩신처리절편이 항원노출에 대한 특이반응이 우수하여 이 처리방법을 표준염색과정에 포함시킬 수 있었다. 염색과정중 슬라이드부착조직 절편이 효소처리후 자주 탈락하는 경우가 많았는데 이는 probe on plus microscopic slide(Fisher Biotech, USA)를 사용함으로써 해결할 수 있었다. 더구나 IP에 사용하는 peroxidase를 붙인 항체는 -20도에 보관시 1년이상 유효²¹하여 그 경비절감면에서 유리할 뿐만 아니라, 최근 개발된 장비²⁹를 응용할 경우 IP가 형광항체법에 비해 가장 취약하였던 진단소요시간을 1시간이내로 단축시킬 수 있어 그 활용성은 매우 크다고 할 수 있다. 따라서 국내 광견병진단법으로서의 IP와 ABC의 응용은 본 실험의 성적에서와 같이 두 방법의 특이성과 민감도에서 유의할 만한 검색율의 차이를 보이지 않았고, 염색단계와 시약비용을 견주어 볼 때 현행 형광항체법대신에 IP기법을 권장할 수 있으리라 본다.

광견병바이러스는 RNA핵산구조를 갖는 Rhabdoviridae의 Lyssavirus로서 이들 바이러스의 복제는 감염된 신경세포의 뉴런에서만 일어난다³ 따라서 IP와 ABC염색의 반응결과는 감염신경세포의 세포질내에 침착물이 나타나는 것으로 알려져 있다.^{14,23} 본 실험에서 사용한 CVS주를 접종한 뇌조직에서 양성반응은 Reetz et al¹⁴, Movsesiants et al²³이 관찰한 대뇌피질부위의 신경세포에 주로 한정되어 있었고 이들 분포가 Sullivan²이 지적했듯이 병리조직병변과 바이러스항원과의 상관성을 인정할 수 없었으며, Goldwasser와 Kissling¹²이 접종경로에 따라 뇌변형형성부위가 달리 나타나 피하접종의 경우 대뇌간 및 소뇌에서 항원이 주로 검출되는데 반하여 본 실험과 같은 뇌내접종의 경우 대뇌피질하 뉴런과 해마각에서 항원이 검출되었다는 보고와 차이가 없이 본 실험결과에서도 주로 대뇌피질하와 해마부위의 감염신경세포에서 바이러스 항원이 다수 관찰되었고, 이들 세

포내 핵주변부와 수상돌기내에서 뚜렷한 양성과립들이 나타났다. 한편 가상독주보다도 CVS주같은 고정독주는 뇌조직을 압달도말표본아래서 형광항체반응이 보다 작은 과립들로 보인다는 보고¹²도 있으나 본 실험에서는 다소 커다란 과립물질들이 감염세포내에서 주로 관찰되었다. 이는 조직슬라이드 준비방법과 염색법의 차이로 생각되며 이의 차이는 유의할 만한 분류기준은 되지 못한 것으로 사료된다.

한편 CVS주로 접종한 Jackson과 Reimer¹⁶은 임상증상이 접종 후 5~6일에 나타났고 평균 9일째에 폐사하였다고 하였으나 본 연구에서는 하루정도 늦은 성적을 나타내었다. 이는 CVS주의 접종량이나 접종바이러스의 계대 횟수 및 방법이 다른데서 오는 병원성의 차이로 여겨진다. 병리조직학적 병변의 경우 고전적으로 개나 가축에서 알려진 위관성립프구침윤, 신경교세포증으로 이루어진 비화농성 뇌척수염이 나타났으나 네그리소체는 관찰할 수 없었는데 이는 다른 보고^{2,11,17}들과 별다른 차이를 인정할 수 없었다.

향후 국내 실험실진단여건에 보다 적합한 진단법으로서 광견병의 추적 연구 및 병원성 규명에 활용할 수 있도록 감염조직 자체는 물론 포르말린 고정 후 파라핀포매절편을 이용한 PCR이나 ISH의 기법확립에 대한 연구도 조속히 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

30수의 10일령 마우스에 CVS광견병바이러스주를 수당 0.02ml씩 뇌내접종하여 임상증상을 비롯, 병리해부

및 조직검사와 면역병리조직화학적 검사를 수행하였다. 면역병리조직화학적 검사법으로서 단크론항체를 이용한 IP와 ABC기법을 적용하였고, 이들 진단법을 확립하기 위해 주요 염색단계별 시약종류나 희석조건을 달리 처리하여 그 적정기준을 마련하였다.

1. 임상증상은 접종 후 5일째부터 피모가 거칠어지고 침울, 간헐적 근경련 등을 보이다가 선회운동, 운동장애, 마비로 이어져 접종 후 평균 10일째에 폐사하였다.

2. 뇌막의 울혈외에 별다른 육안적 병변은 없었고, 대뇌피질부의 위관성립프구침윤, 신경교세포증, 뇌막내 울혈과 림프구침윤 등이 주요한 병리학적 소견이었다.

3. 면역병리조직화학적 소견은 대뇌피질부쪽 특히 피질하 뉴런과 암몬 각 부위의 감염신경세포의 핵주위와 수상돌기에서 많은 갈색과립들을 뚜렷이 관찰할 수 있었다.

4. 뇌조직내 양성반응 정도와 검출부위에 있어 다소 IP가 ABC법에 비해 떨어졌으나 감염뇌조직내 광견병바이러스항원의 검출율은 모두 100%로 일치하였다. 따라서 두 방법은 동결 및 포르말린 고정후 파라핀으로 고정한 조직을 이용한 광견병 진단법으로 효용성이 인정되었다.

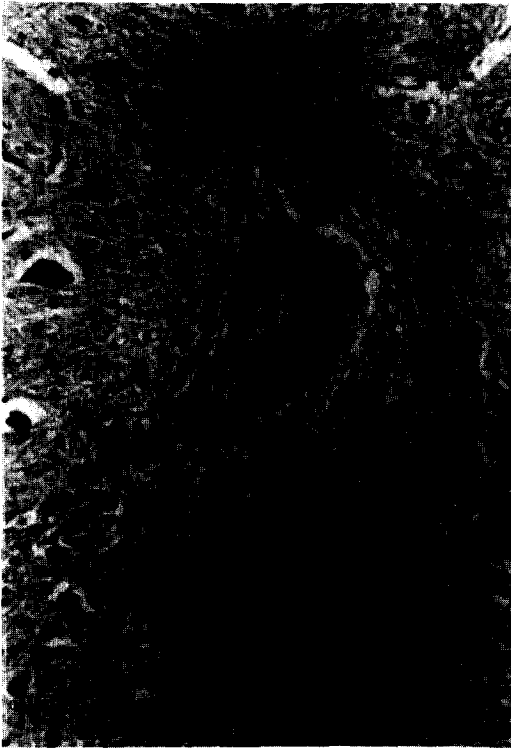
5. 진단시간과 경비, 진단의 특이성과 민감도를 고려할 때 광견병바이러스의 단크론항체를 이용한 IP기법은 현재 국내에서 사용되고 있는 형광항체법을 대체할 수 있을 것으로 본다.

Legends for figures

Fig 1. Mouse cerebrum intracerebrally inoculated with CVS strain. Note marked perivascular lymphocyte infiltration and glial focus around hippocampus. H & E, Bar=3µm.

Fig 2. Mouse cerebrum intracerebrally infected with CVS strain. Note many separated granules in cytoplasm of neurons in hippocampus. IP. Bar=0.3µm.

(Insert) Note clear granules with various size in perikaryon and dendrites in neuron, and more clear background and morphology than those of IP. ABC. Bar=0.3µm.



참 고 문 헌

1. French FL, Geering WA. Exotic disease of animals : a manual for diagnosis. 2nd ed., Canberra : *Australian Government Publishing Service*, 1978 ; 151~159.
2. Sullivan ND. The nervous system. In : Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, ed. *Pathology of domestic animals*. Vol I. 3rd ed. New York : *Academic Press*, 1985 ; 293~296.
3. Russell PH, Edington N. Veterinary viruses. 1st ed. *Cambridge : Burlington Press*, 1985 ; 167~171.
4. Kihm U, Flamand A, Pastoret PP, et al. Round table on epidemiology and control of fox rabies. *Vet Microbiol* 1992 ; 33 : 297~301.
5. WHO expert committee on rabies. *WHO Technical Report Series* 824. 8th ed. Geneva : WHO, 1992 ; 1~49.
6. 李鉉洙. 狂犬病. 家畜防疫史 1輯(李南信 등). 大韓獸醫師會 서울. 1966 ; 55~62.
7. 家畜傳染病發生狀況. 農林水產統計. 農林水產部 1980~1991.
8. 李澤柱, 李鉉洙, 陳榮奎. 犬體用狂犬病豫防劑의 研究. 農林部 中央家畜衛生研究所 研究報告書. 1953 ; 1 : 14~27.
9. Hong CH, Lee YW. Selective administration of human postexposure rabies prophylaxis for animal bite control at the US army in Korea. *Kor J Vet Publ Hlth* 1992 ; 16(1) : 97~102.
10. Annual health yearbook. FAO-OIE-WHO. 1980~1991.
11. Kaplan MM, Koprowski H(eds). Laboratory techniques in rabies. 3rd ed. *Geneva : WHO*. 1973 ; 1~318. 16. Jackson AC, Reimer DL. Pathogenesis of experimental rabies in mice : an immunohistochemical study. *Acta Neuropathologica*, 1989 ; 78(2) : 159~165.
12. Goldwasser RA, Kissling RE. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc Soc Exp Biol Med* 1958 ; 98 : 219~223.
13. Bourgon AR, Charlton KM. The demonstration of rabies antigen in paraffin-embedded tissues using the peroxidase-anti-peroxidase method : a comparative study. *Can J Vet Res* 1987 ; 51(1) : 117~120.
14. Reetz J, Schillow WF, Pahike C, et al Immunohist-

- ochemical detection of rabies antigen. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 1990 ; 45(3) : 85~87.
15. Fekadu M, Greer PW, Chandler FW, et al. Use of avidin-biotin peroxidase system to detect rabies antigen in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J Virol Method* 1988 ; 19(2) : 91~96.
 16. Jackson AC, Reimer DL. Pathogenesis of experimental rabies in mice : an immunohistochemical study. *Acta Neuropathologica* 1989 ; 78(2) : 159~165.
 17. Fekadu M. Pathogenesis of rabies virus infection in dogs. *Rev Inf Dis* 1988 ; 10(Suppl 4) : S679~S683.
 18. Nakane PK, Pierce GB. Enzyme-labeled antibodies : preparation and application for the localized antigens. *J Histochem Cytochem* 1966 ; 14 : 928~931.
 19. Song JY, Lee JB, Kim BH, et al. Studies on production and utilization of monoclonal antibodies against rabies virus. *Res Rep RDA (Veterinary)* 1989 ; 31(4) : 30~34.
 20. Grassi M, Wandeler AL, Peterhans E. Enzyme-linked immunosorbent assay for determination of antibodies to the envelope glycoprotein of rabies virus. *J Clin Microbiol* 1989 ; 27(5) : 899~902.
 21. Kotwal S, Narayan KG. Comparative evaluation of ELISA, FAT and immunoperoxidase tests in the diagnosis of rabies. *Ind J Ani Sci* 1987 ; 57(2) : 65~71.
 22. Bourhy H, Rollin PE, Vincent J, et al. Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture, and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. *J Clin Microbiol* 1989 ; 27(3) : 519~523.
 23. Movsesiants AA, Grigoryeva LV, Krivitskaya EE. Localization and distribution of fixed rabies virus antigen in the central nervous system by the immunofluorescence technique. *Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii Immunobiologii* 1991 ; 10 : 36~40.
 24. Zimmer K, Wiegand D, Manz D, et al. Evaluation of different methods for routine diagnosis of rabies. *J Vet Med Series B* 1990 ; 37(5) : 392~400.
 25. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981 ; 29(4) : 577~580.
 26. Taylor CR. Immunoperoxidase techniques : Practical and theoretical aspects. *Arch Pathol Lab Med* 1978 ; 102 : 113~121.
 27. Ermine A, Larzul D, Ceccaldi PE, et al. Polymerase chain reaction amplification of rabies virus nucleic acid from total mouse brain RNA. *Molecular and Cellular Probes* 1990 ; 4(3) : 189~191.
 28. Jackson AC, Wunner WH. Detection of rabies virus genomic RNA and mRNA in mouse and human brains by using *in situ* hybridization. *J Virol* 1990 ; 65(6) : 2839~2844.
 29. 박남용, 강문일, 조경오. 병리학적 진단법으로서의 one hour, *in situ* hybridization 기법의 응용. 대한수의학회지 1992 ; 32(4, 부록) : 97.