

## 日本腦炎病毒 卵內繁殖에 관한 研究

保健社會部 中央防疫研究所

金慶浩·申長烈

## &lt;目次&gt;

1. 緒言 2. 實驗方法及 材料 3. 考察 및 結論

1. 緒言: 病毒을 有精卵內에서 繁殖企圖한 것은 1911年에 Rous와 Mupphy가 最初로 Chicken Salcoma No. 1을 接種하였으며 其後 1931年에 Goodpasture 또는 Woodruff 등이 Fowl-pox 病毒을 卵內에 接種하는데 成功하였고 其後 1933年, Burnet, Ferry 등이 卵內接種에 對한 技術 또는 病毒의 卵內에서의 毒力測定, 其他 卵內實驗에 關해서 많은 發展을 시켰고 1935年에 Higbie와 Howitt는 最初로 中樞神經系腦炎病毒을 (그들은 Western Equine Encephalomyelitis Virus를 使用하였다) 卵內에서 繁殖시키는데 成功하였고 또한 Vesicular stomatitis virus는 다른 모든 實驗動物보다도 卵內實驗이 더욱 sensitive 하다고 하였다. 1938년부터 1939年 사이에 歐洲에서 Western Equine Encephalomyelitis가 大流行的으로 發生하였을때는 벌써 그 病毒의 卵內培養에 依해서 製造한 豫防藥이 使用되었으며 좋은 效果를 거두었다고한다. 1938年 Cox는 Rickettsia (R. prowazeki, R. mooseri)를 卵內卵黃膜에서 繁殖시키는데 成功하여 이 方面에 一大進展을 가져왔다. 其後 Yellow fever, Influenza Rabies 病毒 등의 卵內實驗이 成功되어 왔으며, 日本腦炎病毒도 1936年에 Taniguchi (谷口)가 最初로 卵內的 chorio-allantoic route로 接種하여 繁殖에 成功하였다는 報告가 있으며 其後 卵黃內接種으로 胎兒에서 病毒繁殖을 하게되었다. 이같이 여러가지 病毒이 着着 卵內繁殖이 可能하게 되어왔으며 이것은 周知하는 바와 같이 經濟的 技術的으로 合理化는 勿論이며 Yellow fever(黃熱) Rabies(恐水病) 등 또는 最近의 Poliomyelitis(小兒痲痺)의 M.E.F. 株는 卵內에서 變異減毒된 病毒 即 egg adapted attenuated living virus가 強力한 抗原性을 發揮하였다는것은 이 方面에 큰 刺戟을 주는 것이다. 日本腦炎病毒의 卵內繁殖에 對해서는 그 性格과 態度에 關한 報告가 매우 적다. 1946年에 美陸軍當局에서는 駐日美陸軍에게 本病毒卵內培養에 依한 材料로 製造한 豫防을 實驗해본 結果 그다지 큰 效果는 보지 못한듯하다. 本研究의 目的은 日本腦炎病毒이 卵內에서 如何한 態度를 取하고 있으며 또 繼續 繼代에 依하여 어떠한 變異狀態가 이어나며 나아가서는 抗原性이 어떠한가를 알고저 몇가지 實驗을 試圖하여 그 結果를 中間報告하는 바이다.

## 2. 實驗方法及 材料

(1) 病毒及 接種: 本實驗에 使用한 日本腦炎病毒은 Nakayama strain (中山株)으로서 美陸軍軍醫學校에서 分讓 받은 것이며 lyophilized 狀態, 마우스 2代 通過한 腦組織을 卵內接種에 使用하였다. 始終 病毒稀釋液으로서는 penicillin과 streptomycin을 各各 500單位씩 每 c.c.에 含有시킨 滅菌食鹽水를 使用하였다. 病毒稀釋은 第一代卵內接種부터  $10^{-3}$  濃度를 0.5c.c. 卵黃內에 接種하였고 使用한 有精卵은 white leghorn 卵을  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 7日間 孵化시킨것이며, 接種後도 亦是  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 培養하였다.

實驗 1. 卵內接種繼代 第10代까지의 病毒의 卵內態度: 第1代에 10個의 有精卵에 接種하였는데 滿4日에 2個, 滿5日에 8個가 死亡하였으며 이 死亡卵의 全胎兒組織을 乳劑하여  $10^{-3}$ 으로 稀釋後 mandler(10 Lb)로서 澁過한後 第2代로 接種하였고 同時에 第1代의 卵內繁殖病毒의 毒力을 마우스 (12~13gm. 體重)와 7日卵孚化卵을 使用하여 測定한 結果, 마우스  $LD_{50}$  價는  $10^{-5.5}$ 와 Egg  $LD_{50}$  價도 亦是  $10^{-5}$ 인 것을 알았다. 第2代 以後 同一한 方法으로 第10代까지 繼代하였으며 接種後의 平均死亡數는 滿4~5日이었다. 第7代 繼代材料로서 病毒의 卵內繁殖狀態를 實驗하기 爲하여 別途로 卵內接種後 每 24時間 間隔으로 48時間, 72時間, 92時間씩, 4個의 接種卵을 破卵하여 卵黃, 卵黃

膜, 胎兒腦組織, 全胎兒組織(腦組織除外)等 4 郡으로 各郡. 體重 12gm. 程度의 마우스 6 首씩에다 腦內接種 ( $0.03\text{ml}/10^{-1}$ , 稀釋,  $1/4\text{c.c.}$  注射器로)하여 14 日間, 腦炎症狀을 觀察하였든바 第 1 表와 같이 接種後 24 時間後 群에서는 卵黃과 卵黃膜에서만 “마우스”에 typical symptom 이 出現하였으며 胎兒腦와 全胎兒組織群에서는 陰性이었다. 接種後 48 時間後群에서는 이와 反對로 卵黃과 卵黃膜群에서는 陰性이었으나 胎兒腦와 全胎兒에서는 陽性이었으므로 接種後 48 時間이라는 病毒이 胎兒에 到達하는 것을 알수있었다. 이 到達時間을 正確히 究明하고자 (이 理由는 以後 두 種類의 neurotropic virus 를 接種하여 modified virus 實驗計劃의 基礎를 세울 目的도 있다) 接種後 24 時間後와 48 時間後 사이에 4 時間 間隔으로 同一한 方法으로 實驗한 結果 第二表와 같이 接種後 滿 32 時間이라는 胎兒에 到達해서 繁殖함을 알수있었다. 그 다음 第 10 代의 病毒의 毒力을 마우스  $\text{LD}_{50}$  價를 測定한 結果  $\text{LD}_{50}$ ,  $10^{-5.74}$ 인 것을 알았다.

**實驗 2.** 第 10 代부터 第 20 代까지 病毒의 卵內狀態: 第 10 代에서 第 11 代로 病毒繼代 材料로서 一部를 接種後 滿 32 時間後에 採取한 胎兒組織을 日本腦炎家兎免疫血清(美陸軍軍醫學校 virus reserch laboratory에서 分讓)으로서 screen 中和試驗을 마우스에 한 結果 第三表와 같이 接種後 32 時間의 胎兒病毒은 正確히 標準免疫血清에 中和되는 것을 알았다.

다음 第 12 代의 卵內病毒材料로서 血球凝集原의 檢索과 Von, Magnus 現象의 有無를 實驗하였다. 血球凝集原檢索에는 Sabin 과 Buescher 의 마우스腦抗原方法을 參酌하여 病毒材料로서 卵黃膜 全胎兒及 胎兒腦組織을 各各 別途로  $0.016\text{M}$  borate kcl PH 9.0 phosphate buffered saline 으로서 20% 乳劑後 13,000 R. P. M. 高速度遠心沈澱으로 60 分間 沈澱시킨後 上清을 採取하여 抗原으로 하고 O型人血球, 병아리 血球(孚化後, 24 時間 병아리 血球) 0.25%로서 凝集反應을 보았으나 陰性이었다. 再次 抗原과 血球反應의 PH range 를 PH 7.0 부터 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 8.0 등으로 反應을 보았으나 모두 結果는 陰性이었다. 今般은 그 以上 實驗을 못하였고 Influenza 에 있어서의 Von Magnus 現象이 本卵內病毒에도 適用與否를 알기依하여 第 13 代의 卵內病毒(全胎兒組織)을 生理食鹽水로  $10^{-1}$ 로 乳劑하여 0.1ml 式 7 日卵에 接種하여 滿 3 日 培養生存卵全胎兒를 再次  $10^{-1}$ 로 乳劑하여 接種後 다시 滿 3 日 培養時死亡卵胎兒를 採取하여  $10^{-1}$ 로 乳劑後 mandler (10 Lb) 遞過後 第 3 代로서 接種하였는데 滿 3 日에 死亡하였다. 이 死亡卵 胎兒를 同操作으로서 15 個의 卵에 接種하여 接種後 24 時間 間隔으로 4 個式을 꺼내어 卵黃膜 全胎兒, 胎兒腦를 各各 血球凝集原檢索을 하였으나 陰性結果였다. 다음 第 20 代의 卵內繁殖病毒의 毒力을 마우스와 卵으로 測定한 結果 Egg  $\text{LD}_{50}$  價는  $10^{-5.0}$ , 마우스  $\text{LD}_{50}$  價는  $10^{-4.0}$ 이었다.

**實驗 3.** 第 20 代부터 第 30 代까지 繼代中의 實驗: 第 30 代의 毒力을 마우스와 卵內에서 測定한 結果 마우스  $\text{LD}_{50}$  價는  $10^{-4.0}$  Egg  $\text{LD}_{50}$  價는  $10^{-5.0}$ 이었다.

**實驗 4.** 第 30 代부터 第 41 代까지 繼代中實驗 第 41 代의 病毒 毒力測定한 結果: 마우스  $\text{LD}_{50}$   $10^{-5.0}$  Egg  $\text{LD}_{50}$   $10^{-5.6}$ 이었다. 第 41 代 繼代病毒을 材料로서 免疫抗原으로 하여 家兎(體重 2kg 程度)와 Guinea pig (體重 450gm 程度)에다 腹腔內에 5ml 와 0.5ml (Guinea pig)式 每週 間隔으로 生病毒을 第 1 回 免疫  $10^{-3}$ 稀釋 第 2 回 免疫  $10^{-2}$  稀釋 第 3 回 免疫에는  $10^{-1}$  稀釋으로 3 回 接種하고 第 3 回 免疫後 一週日後에 採血하여 抗原價를 測定하였다.

對照 免疫으로서 Nakayama 株 마우스腦組織 病毒으로 同一한 方法으로 免疫하였다. 各抗原價는 血球凝集抑制反應과 中和試驗으로 하였다. (中和試驗은 마우스 事情으로 10 LD 50 病毒으로서 Screen Neutralization test 로 하였음)

第四表와 같이 中和試驗結果는 陰性이었고 血球凝集抑制價는 本來의 Nakayama 腦組織으로 免疫한 群은 海獺(Guinea pig)와 家兎의 抗體價가 1:320~1:640이였으나 第 41 代 卵內病毒材料로서 免疫群의 抗體價는 1:20~1:80 程度인 顯著한 差異를 나타내어 免疫原 即 抗原性이 매우 弱하다는 것을 알았다.





-	-	-	-	D															
-	-	-	-	D															

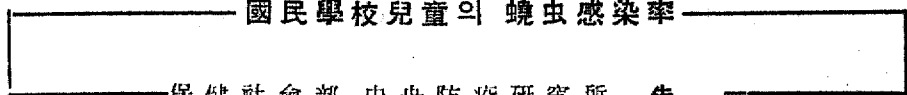
病毒 10<sup>-4</sup>+血清(未稀釋) 病毒 10<sup>-4</sup> (Contra)=10LD50 37°C/60分

第4表 免疫後抗體價測定, 血球凝集抑制價

動物名	接種材料	血清稀釋	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
		No							
海 猴	M	背	4	4	4	4	0	0	0
		頭	4	4	4	4	4	0	0
		尻	4	4	4	4	4	0	0
	E	兩足	3	0	0	0	0	0	0
		黑	4	3	0	0	0	0	0
	CE	頭	4	4	3	0	0	0	0
背		3	0	0	0	0	0	0	
尻		3	0	0	0	0	0	0	
家 兔	M	頭	4	4	4	4	4	4	0
		背	4	4	4	4	4	4	0
		尾	4	4	4	4	4	2	0
		耳	4	4	4	4	4	2	0
	E	白	3	2	0	0	0	0	0
		頭	3	0	0	0	0	0	0
		背	3	3	3	0	0	0	0
		尻	3	0	0	0	0	0	0
CE	耳	4	0	0	0	0	0	0	
	白	4	2	0	0	0	0	0	
	頭	4	4	4	0	0	0	0	
	背	4	4	4	0	0	0	0	
		尻	3	2	0	0	0	0	0

M=마우스腦 E=卵內病毒 CE=卵病毒을 병아리에 通過시킨 것

國民學校兒童의 蟻虫感染率



保健社會部 中央防疫研究所 朱

緒言: 本虫은 世界各地에 널리 分布되어 있고 衛生環境이 좋은 文明國家 特히 美國에서도 學校兒童이 相當한 率로 感染되어 있음을 注意하게 되었다. 이같이 廣範한 分布와 高度의 感染率을 招來하게 되는 原因으로는

(1) 蟻虫의 生活環은 單純하고 所要時間도 4~5週로서 速하다는 것.