

傳染性氣管枝炎 바이러스에 대한 家兔血清抑制物質에 관한 研究

晉州農科大學

柳 泰 錫

目 次

Abstract

I. 緒 論

II. 實驗材料 및 方法

1. 供試 바이러스
2. 磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)
3. 抗生物質
4. 實驗家兔
5. 鷄胎兒
6. 家兔血清
7. 血清中和反應

III. 實驗成績

1. 바이러스抑制物質로써의 正常家兔血清의 證明
 - A. 抗血清과 正常血清의 補體結合力價와 血清中和指數
 - B. 年齡別家兔血清의 中和指數
 - C. 性別別正常家兔血清의 中和指數
2. 正常家兔血清의 中和指數에 미치는 血清學的 要因에 관한 研究
 - A. 바이러스力價가 血清中和指數에 미치는 影響
 - B. 바이러스-血清混合時間의 影響
 - C. 血清稀釋度가 바이러스中和作用에 미치는 影響

3. 正常家兔血清의 中和指數에 미치는 化學的 要因
 - A. 트립신의 影響
 - B. 過沃素酸포타시움의 影響
 - C. 石油이터의 影響
 - D. 三鹽化醋酸의 影響
4. 家兔血清의 中和指數에 미치는 理學的 要因의 影響
 - A. 溫도의 影響
 - B. 血清의 貯藏期間의 影響
5. 血清分層에 의한 中和作用에 관한 研究
 - A. 硫酸소듐염分層의 中和指數와 電氣泳動相
 - B. Ion 交換樹脂에 의한 血清分層의 中和指數
 - C. 其他 各種 吸着劑에 의한 分層의 中和指數
 - (1) Zymosan 分層의 中和指數
 - (2) 第一磷酸포타시움 分層의 中和指數

IV. 考 察

V. 總 括

VI. 文 獻

Studies on Rabbit Serum Inhibitor of Avian Infectious Bronchitis Virus
Chin Ju Agricultural College: Tai Suck Yoo

ABSTRACT

It has been reported that rabbit serum exhibit an inhibitory action on avian infectious bronchitis virus in embryonating chicken embryo. In this thesis, the biological, serological, physical and chemical properties of normal rabbit serum on the effect of the virus propagation were studied.

Throughout the studies, the following experimental results were obtained and summarized here.

1. An inhibitory action of rabbit serum on avian infectious bronchitis virus is due to the normal serum constituents.
2. The nature of the neutralization between normal rabbit serum and the virus is similar to that of the specific antiserum and the virus.
3. Rabbit serum, heat inactivated at 56°C. for 30 minutes, showed its average log₁₀ ELD₅₀ NI of 3.7.
4. The inhibitory compound present in the normal rabbit serum is inactivated by means of 5 per cent trypsin, 0.01 M potassium periodate, and absorbed to zymosan.
5. The inhibitory compound was not affected by 0.05 M trichloroacetic acid and 0.005 M KH₂PO₄.
6. The higher the temperature of heat inactivation of rabbit serum caused the lesser the neutralizing effect on the virus. Heating the serum at 66°C. for 30 minutes brought about a complete loss of the neutralizing index of the serum.
7. No ions, as a cofactor, was incorporated to the inhibitory action of rabbit serum on the virus.
8. The inhibitory compound always be found in a fraction of serum globulin.

I. 緒 論

動物의 組織成分 分泌物 및 血清成分이 바이러스의 感染力을 中和한다는 것이 알려진 바 있다.

즉 痘瘡바이러스(Vaccinia 및 Variola Virus)의 鷄胎兒에서의 發育이 家兔나 기니피그의 易熱性血清因子에 의하여 抑制되었나(Briody 1951, McCarty 1952, Gordon 1955) 그리고 이 바이러스(Wr Strain)의 L cell 培地에서의

plaque 形成能力이 말의 耐熱性血清因子에 의해서 減退 되었다(Galasso 등 1963).

St. Louis 나 日本B型 또는 Russian far east 腦炎바이러스 등의 試驗管内에서의 發育이 家兎 그리고 몇몇 動物血清의 脂肪層成分에 의해서 抑制되었다(Casals 1947). Psittacosis 바이러스의 噬菌作用은 新鮮한 免疫血清이 첨가 됨으로써 그 作用이 가장 크며 加熱된 抗血清 일 지라도 거기에 新鮮한 기니픽의 補體가 첨가 됨으로써 그 作用이 다시 增進되었다(Morgan 1948).

또 이 바이러스는 試驗管内에서의 發育이 몇몇 動物의 血清脂肪層物質에 의하여 抑制되었다(Utz 1948).

西部脊髄腦炎바이러스에 대한 中和力은 70°C에서 保存된 新鮮한 사람의 免疫血清이 든가 加熱된 것이라도 거기에 기니픽이나 원숭이 또는 사람의 新鮮한 血清이 첨가 됨으로써 中和力이 높아졌다(Whitman 1947).

Influenza 바이러스의 鵝胎兒에서의 發育增殖은 기니픽의 易熱性血清因子(Utz 1949) 나 사람, 토끼, 기니픽 그리고 마우스血清의 α -, β -globulin(Tyrrelle 1954)에 의하여 抑制되었다. 그리고 이 바이러스의 원숭이 腎臟細胞培養에서의 細胞病原性은 培地에 첨가된 家兎의 耐熱性血清因子에 의해서 抑制되었다(Henry 등 1957, Cohen 1961).

뉴켓슬病바이러스의 鵝胎兒에서의 發育增殖은 기니픽(Utz 1949)이나 사람(Ginsberg 등 1949, Bang 등 1961)의 易熱性血清因子에 의해서 抑制되었다.

숫소 및 말 그리고 어린소 닭 토끼의 耐熱性血清因子의 Adenovirus I型에 대한 抑制力을 Hela 細胞培養에서 比較하였던 바 숫소의 것이 가장 크고, 다음에 말 어린소의 순서였다. 그러나 닭과 토끼의 血清에는 그와 같은 抑制物質이 들어 있지 않았다. 그러나 숫소의 耐熱性血清因子는 몇몇 Adenovirus의 增殖을 抑制하였지만 脊髄灰白質炎바이러스 I型 및 Adenovirus 2型은 抑制하지 못하였다. 이 숫소의 耐熱性血清因子는 globulin으로 알려 졌다(Gold 등 1962).

New Bovine Adenovirus #19는 56°C에서 30分間 加熱된 成人의 血清이나 이것의 血清 γ -globulin에 의해서 18%의 바이러스活性도가 中和되지만 同一한 條件 밑에서의 幼兒血清은 中和力이 없었다(Klein 1960).

사람 및 말의 耐熱性血清因子는 脊髄灰白質炎바이러스 I型, Coxsackie 바이러스 I型, ECHO 바이러스 I型, 및 Adenovirus III을 抑制하며(Chang 등 1957). 말의 耐熱性血清因子인 γ -globulin은 脊髄灰白質炎바이러스 I型(Mahoney strain)을 抑制하였다(Takemoto 등 1959). 그리고 소의 耐熱性血清因子도 脊髄灰白質炎바이러스를 抑制하였다(Takemori 등 1958).

말의 Ross Sarcoma 바이러스에 대한 닭抗血清 中和

反應에 있어서 新鮮한 기니픽血清의 첨가群에서는 alexin 效果를 볼 수 있었으나 기니픽補體를 59°C에 15分間 加熱함으로써 alexin 效果가 소실 되었다(Mullek 1931).

이상과 같이 여러 動物의 血清成分이 여러 바이러스를 抑制한다는 報告가 있었다. 그러나 기니픽의 新鮮한 血清(Peick 등 1958)과 몇몇 動物의 血清이 Beaudette株인 傳染性氣管支炎바이러스의 鵝胎兒에서의 感染力을 中和한다는 것이 報告되었다(Jeon 등 1961).

바이러스에 대한 動物의 血清이 지니는 中和力 및 血清內 中和物質의 本體를 研究하는 일은 다음과 같은 意義를 지니고 있다. 첫째, 바이러스抑制物質에 관한 研究는 바이러스가 어떤 物質에 의해서 中和되는 非動化機轉을 짐작케 하여, 증으로써 이 바이러스性疾病과 治療를 研究하는데 도움을 줄 수 있다. 둘째, 바이러스 組織培養에 있어서 榮養物質로 供給되는 各種 動物血清의 適否性을 밝혀준다. 셋째, 動物血清의 抑制性을 利用한 바이러스의 特性을 究明함으로써 區別되지 않는 두 가지 이상의 바이러스를 分別할 수 있다.

이상 세가지의 사실은 實際적인 問題에 符合되는 重要な 것의 일부분이 된다.

家兎血清이 傳染性氣管支炎바이러스의 鵝胎兒에서의 發育增殖을 抑制하는 것만은 報告된 바 있으나 이 血清成分의 血清學的 그리고 化學的 및 物理的性狀에 관해서는 아직 研究되지 않고 있다(Jeon 등 1962)

따라서 이 研究는 傳染性氣管支炎바이러스에 대한 家兎血清의 위에 적은 세가지의 性狀을 몇 가지의 實驗으로써 究明하는 것을 目的으로 한다.

II. 實驗材料 및 方法

이 實驗에서 使用된 증류수는 이온交換樹脂에 通過시킨 것이다. 파이펫등의 硝子器具는 비눗물에 잘 씻고 이것을 重크롬硫酸水에 24時間 담겼다가 씻고 다시 증류수으로써 씻은 후에 乾燥하여 使用하였는데 滅菌해야 할 器具는 乾熱滅菌器에서 160~180°C 2時間 滅菌하여 使用하였다.

血清中和反應에 使用한 試驗管의 마개는 縮絨을 쓰지 않고 고무 마개를 使用하였다. 그 밖의 試驗管은 주로 스크류 캡 試驗管을 使用하였다. 이 고무 마개는 비눗물과 증류수로 씻고 乾燥하여 加壓滅菌器에서 15피운드에 約 30分間 滅菌하여 使用하였다.

血清中和反應에는 鵝胎兒를 使用했고 鵝胎兒用孵化器는 過망간酸포타시엄-포르말린으로 49時間 消毒하였다. 一般消毒劑로서는 3% 크레솔液과 5% 石炭酸液을 使用했으며 鵝胎兒의 卵殼은 70% 알콜로 消毒하였다.

1. 供試바이러스

供試바이러스는 Beaudette株의 傳染性氣管支炎바이러스

스(IBV)를 사용하였다. 이 바이러스는 Michigan 大學校 獸醫科大學에서 分讓받았다. 凍結乾燥된 이 病毒은 0.1 M, pH7.2 인 磷酸鹽緩衝食鹽水液(PBS)에 溶解하였다. 이 緩衝液 每 ml에는 Penicillin 2,000 單位와 Streptomycin 2,000 μ g 이 含有되도록 하였다. 바이러스의 力價는 ELD₅₀ 7.5 이상인 것을 사용하였다. 바이러스의 力價를 올리기 위해서 10 日齡의 鷄胎兒에 5 회에 걸쳐 繼續 繼代하였다. 그 다음 부터는 6 日 間隔으로 2 회씩 鷄胎兒에 繼代하여 사용하였다. 繼代된 바이러스의 材料는 每鷄胎兒에 0.1ml 씩을 接種하여 感染된 鷄胎兒의 漿尿膜腔液이다. 바이러스材料는 -60°C 에 保存하면서 사용했고 한번 녹여서 쓰다 남은 것은 凍結使用치 않고 버렸다.

2. 磷酸鹽緩衝食鹽水液(PBS)

바이러스 血清 및 여러 分層物質의 溶劑로 0.1M, pH7.2 의 磷酸鹽緩衝食鹽水液을 사용하였다. PBS 는 15 파운드에 15 分間 加壓滅菌하여 2°C 의 冷藏庫에 貯藏하면서 사용하였다(Kabat 등 1961).

3. 抗生物質

血清中和反應에 使用된 바이러스 血清 및 여러 分層物質의 實驗材料를 無菌化하기 위해서 Penicillin 과 Streptomycin 을 사용하였다. 抗生物質은 磷酸鹽緩衝食鹽水液 每ml에 Penicillin 100,000 單位와 Streptomycin 100,000 을 溶解하여 고무 마개 試驗管에 分注한 다음 -60° 에 凍結하면서 사용하였다. 쓰다 남은 抗生物質溶液은 다시 사용치 않고 버렸다.

4. 實驗家兔

年齡別 및 性別의 血清中和反應用家兔를 除外하고는 體重이 2.0~2.5 kg 인 成兔를 사용하였다. 家兔는 飼養中에 疾病에 罹患되지 않도록 衛生的인 飼養管理를 하였다.

5. 鷄胎兒

바이러스 增殖과 血清中和反應의 目的으로 10 日齡의 鷄胎兒를 사용하였다. 鷄胎兒는 發育이 좋고 卵殼이 平滑清潔하고 氣室部의 位置가 正常的인 것을 사용하였다. 바이러스나 바이러스混合物을 接種하기 위해서 卵殼外面을 70% 알콜로 消毒하였다. 바이러스나 바이러스-血清混合物을 接種한 후 Methylene blue-colloidium 液으로 閉鎖하였다.

6. 家兔血清

家兔血清은 傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 血清中和反應에 사용하였다. 血液은 健康한 家兔의 心臟에서 無菌적으로 얻었다. 血液은 溶血되지 않도록 하면서 室溫에서 約2~3時間, 2°C 의 冷藏庫에 約2~3時間 靜置한 후에 血清을 分離하였다. 血清은 1,000 r.p.m.에서 10 分間 遠心分離하고 細菌汚染의 虞慮가 있을 때는 濾過하

였다. 血清은 養兔場別로 混合하여 56°C 에 30 分間 非働化한 다음 -60°C 의 凍結機에 貯藏하면서 사용하였다.

7. 血清中和反應

傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 家兔의 抗血清과 正常血清 그리고 血清分層物質의 中和程度를 알기 위해서 血清中和反應을 하였다(Cunningham 1961). 바이러스는 進法으로 PBS 에 10⁻¹~10⁻¹⁰ 까지 稀釋하였다. 바이러스를 稀釋할 때는 1ml 의 파이펄으로 10~15 회 混和하였다. 試驗群에는 正常新鮮家兔血清, 56°C 에 30 分間 非働化한 加熱血清, 抗血清 및 血清의 各分層을 各 試驗管에 0.3ml 씩 分注하고 여기에 稀釋된 바이러스를 0.3ml 씩 첨가하여 混和하였다. 그리고 바이러스群에는 血清 대신 同量의 磷酸鹽緩衝食鹽水液을 加하였다. 이것의 0.2 ml 를 5 個의 鷄胎兒에 0.1 ml 씩 接種하였다. 接種된 鷄胎兒는 부화기에서 發育시켰다. 接種後 24 時間 以內에 죽은 것은 非特異死로 간주 하였다. 그 후 接種卵을 每日 約 5 日間 觀察하였고 血清의 ELD₅₀NI 를 決定하였다(Reed 등 1938).

Ⅲ. 實驗成績

1. 바이러스抑制物質으로서의 正常家兔血清의 證明

傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 家兔血清의 抑制機構이 家兔가 바이러스에 自然感染되어 얻어진 抗體에 基因하는 것인지 또는 正常家兔血清成分에 의한 것인지를 밝힐 必要가 있어서 다음과 같은 實驗을 하였다. 첫째, 傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 抗血清을 家兔에서 만들었다. 그리고 이 抗血清과 正常血清이 서로 다르게 보여 줄 補體結合力價와 中和指數를 測定했다. 둘째, 家兔의 年齡別 및 性別 差異를 둔 正常家兔血清을 얻어 이 여러 例의 血清이 띄우는 中和指數를 測定했다.

A. 抗血清과 正常血清의 補體結合力價와 血清中和指數.

補體結合反應은 Kabat & Mayer 法(1961)에 準해서 施行했다. 補體는 적어도 5 首 以上에서 採血하여 모은 거니픽의 血清으로써 本試驗에는 2 充分單位를 使用했다. 溶劑로는 Veronal-NaCl 緩衝液(Mayer 등 1948)을 使用했다. 赤血球는 Alsever 의 改良液(Rukanz 1946)에 同量의 綿羊血液을 無菌적으로 採血하여 冷藏庫에 保管하면서 使用했다. 溶血素는 Rapp 法(1953)에 의해서 家兔에서 만들었고 感作赤血球는 3 회以上 1,000 r.p.m.에서 10 分間 遠心洗滌한 4% 溶液에 同量의 3 單位 溶血素와 混合해서 最終濃度가 1.5 單位, 2%가 되게해서 使用하였다. 抗原은 바이러스에 感作된 鷄胎兒의 漿尿膜腔液으로 2 單位以上을 本試驗에 使用하였다. 抗血清 및 正常血清은 모두 56°C 에서 30 分間 非働化한 것을 使用했으

며, 最高稀釋度 1/8에서 2倍稀釋法으로 1/128까지 稀釋하였다. 反應物質의 量은 各各 0.2ml로 했고 總量이 0.8ml이 되게 하였다. 反應物은 모두 37°C의 恒溫水槽에서 反應케 하였는데 第1次反應은 60分間 그리고 第2次反應은 30分間 施行하였다. 反應의 判定은 100% 溶血度로 삼았다. 이 實驗에 使用된 抗血清은 傳染性氣管枝炎바이러스에 感染된 鷄胎兒의 漿尿膜腔液을 抗原으로 해서 家兔耳靜脈에 接種하여 生成한 것이다. 家兔는 健康한 成兔를 利用하였다. 바이러스에 感染된 鷄胎兒의 漿尿膜腔液을 每4日間隔으로 32ml를 7回에 걸쳐 接種하였다. 接種한 抗原의 量은 처음에 2ml을 接種하고 每回 1ml씩 增量하다가 5回 接種 부티는 6ml로 하였다. 接種이 끝난 후 1週日만에 心臟에서 全採血하고 血清은 56°C에서 30分間 非動化하였다. 이 實驗에 使用한 正常家兔血清은 지역을 달리하는 몇 곳의 養兔場(水原安養 서울 晉州)에서 얻은 것이다. 이 血清은 養兔場別로 混合하고 56°C에 30分間 非動化하였다.

이 實驗의 結果는 第1表와 같다.

第1表 抗血清과 正常血清의 補體結合力價와 中和指數의 比較

血清NO.	抗 血 清		正 常 血 清	
	補體結合力價	中和指數 (ELD ₅₀ NI)	補體結合力價	中和指數 (ELD ₅₀ NI)
1	>64	8.0	< 8	3.9
2	>64	8.2	< 8	3.9
3	>64	8.2	< 8	3.7
4	< 8	4.5	< 8	3.3

이 實驗에서 血清 No.4를 除外한 抗血清의 補體結合力價 및 中和指數는 높았다. 이 反面에 對照血清의 補體結合力價나 中和指數는 없든가 또는 낮았다. 이와 같은 事實은 正常家兔血清의 傳染性氣管枝炎바이러스抑制物質이 特異抗體가 아니고 正常家兔血清成分을 暗示하여 준다.

B. 年齡別家兔血清의 中和指數

年齡別正常家兔血清의 바이러스中和力을 밝히기 위해서 다음과 같은 實驗을 하였다. 各試驗群이 5頭로 構成되는 正常家兔를 生後 1, 2, 4, 8, 12 및 24個月의 兒

第2表 年齡別正常家兔血清의 中和指數

血 清 群	血清中和指數(ELD ₅₀ NI)
1個月 血清	3.7
2個月 血清	3.6
4個月 血清	3.5
8個月 血清	3.9
12個月 血清	3.6
24個月 血清	3.7

兒群이 되게 選定하고 個別로 採血하여 血清을 얻었다. 血清은 同量混合하고 이것을 56°C에 30分間 非動化하여 血清中和反應에 使用하였다. 이 實驗의 結果는 第2表와 같다.

C. 性別正常家兔血清의 中和指數

正常家兔血清의 傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 中和作用에 있어서 家兔의 性別의 差異가 이 中和力에 差異를 가져 오는지의 여부를 實驗했다.

生後 1, 2, 4, 8, 12 및 24個月된 健康한 家兔를 雌雄의 兒群으로 나누어 各群에서 6頭를 選定하고 個別로 採血하여 血清을 얻었다. 血清을 同量으로 混合하고 이것을 56°C에 30分間 非動化한 다음 血清中和反應에 使用하였다.

이 實驗의 結果는 第3表와 같다.

第3表 性別正常家兔血清의 中和指數

性別	血清中和指數 (ELD ₅₀ NI)					
	血清1號	血清2號	血清3號	血清4號	血清5號	血清6號
雌 兔	3.5	3.7	3.3	3.6	3.8	3.8
雄 兔	3.7	3.6	3.8	3.7	3.3	3.7

위의 實驗成績에 의하면 正常家兔血清의 傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 抑制性은 家兔의 年齡別 및 性別差異의 影響을 받지 않았다. 바꿔 말 해서 性을 달리하는 家兔血清이라도 中和指數에는 意義있는 差異가 없다는 것이다. 이것은 血清의 바이러스中和機轉이 傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 家兔의 特異抗體에 基因하는 것이 아니고 正常家兔血清成分에 의한 것임을 暗示하여 준다.

2. 正常家兔血清의 中和指數에 미치는 血清學的要因에 관한 研究

傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 正常家兔血清의 中和反應에 있어서 바이러스의 力價가 血清의 中和指數에 미치는 影響 또는 家兔血清의 反應時間이나 稀釋도가 中和指數에 미치는 影響을 實驗하였다.

A. 바이러스力價가 血清中和指數에 미치는 影響

血清中和反應에 있어서 傳染性氣管枝炎바이러스가 지니는 力價의 高低가 中和指數에 어떠한 影響을 미치게 하는 가를 實驗하였다. 바이러스는 그 力價가 ELD₅₀ 8.0以上, 7.0以上 그리고 6.0以上인 세 가지의 것을 使用

第4表 바이러스力價가 血清中和指數에 미치는 影響

바이러스力價 (ELD ₅₀)	血清中和指數 (ELD ₅₀ NI)		
	血清 1號	血清 2號	血清 3號
6.0	3.6	3.7	3.9
7.0	3.5	3.6	3.7
8.0	3.8	3.9	3.3

하였다. 이 實驗에 쓰인 正常家兎血清은 56°C에서 30分間 非働化하였다. 세 가지의 다른 力價를 지닌 바이러스材料가 세群的 正常家兎血清에 의해서 中和된 實驗結果는 第4表와 같다.

위의 實驗成績에 의하면 바이러스의 力價가 ELD₅₀6.0부터 8.0 사이에 놓여 있을 경우 血清中和指數에는 거의 영향이 미치지 않는 것 같았다.

B. 바이러스-血清混合時間의 影響

抗血清은 바이러스를 中和하기 위하여 一定한 作用時間이 所要된다 이 作用時間의 長短은 바이러스-抗血清系에 따라 다르다. 이 實驗에서는 正常家兎血清이 傳染性氣管枝炎바이러스를 中和하는데 所要하는 作用時間을 밝힘으로써 이 血清이 지니는 血清學的特性을 究明하는데 있다. 血清은 세 곳의 養兎場에서 各各 5頭씩 採血하고 各養兎場別로 血清을 同量 混合하였다. 血清은 56°C에서 30分間 非働化하고 實驗에 使用하였다. 바이러스-血清混合物은 18°C에서 20分, 40分, 80分, 160分 그리고 320分間 作用케 하였고 다른 術式은 一般의 中和反應法에 準하였다. 바이러스群은 血清대신에 PBS를 使用했으며 同量의 바이러스와 混合하여 위에서 實施한 方法에 따랐다.

이 實驗의 成績은 다음 第5表와 같다.

第5表 바이러스-血清混合作用時間의 影響

作用時間 (分)	血清中和指數 (ELD ₅₀ NI)		
	血清 1號	血清 2號	血清 3號
20	3.7	3.6	3.8
40	3.6	3.6	3.5
80	3.8	3.7	3.4
160	3.6	3.5	3.8
320	3.3	3.8	3.7

위의 實驗成績에 의하면 바이러스에 血清이 混合되고 20分~320分 사이에는 中和指數에 아무런 影響을 주는 것 같지 않다.

第6表 血清稀釋도가 바이러스中和作用에 미치는 影響

血清稀釋度	中和指數 (ELD ₅₀ NI)			
	血清 1號	血清 2號	血清 3號	血清 5號
全血清	3.8	3.8	3.6	3.5
1/10	3.7	3.3	3.5	3.8
1/20	3.3	3.5	3.4	3.5
1/40	3.7	3.3	3.3	3.5
1/80	3.3	3.2	3.0	2.8
1/160	1.5	1.3	1.6	1.3
1/320	0.3	0.2	0.2	0.3

C. 血清稀釋도가 바이러스中和作用에 미치는 影響

傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 正常家兎血清의 稀釋도가 中和指數에 어떠한 影響을 미치게 하는 가를 實驗하였다. 正常血清은 前述한 年齡別 및 性別試驗에서 使用하였던 것으로서 -60°C의 冷凍機에 貯藏한 것을 使用하였다. 이 血清을 0.1M, pH7.2의 PBS로 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 및 1/320로 稀釋해서 血清中和反應을 하였다. 이 實驗의 成績은 第6表와 같다.

위의 實驗成績에 의하면 約 80倍로 稀釋된 正常家兎血清은 傳染性氣管枝炎바이러스를 中和하는데 甚다른 影響을 미치지 않으며, 그보다 더 稀釋됨으로써 中和力을 상실 하였다.

3. 正常家兎血清의 中和指數에 미치는 化學的要因

前述한 血清學的이고 生物學的인 實驗에서 傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 正常家兎血清의 抑制物質은 非特異性인 것으로 알려졌다. 이 實驗에서는 家兎血清에 含有되어 있는 非特異性인 抑制物質의 化學的인 性狀을 實驗하였다. 그러기 위해서 첫째, 血清을 트립신으로 處理하고 둘째, 血清을 過沃素酸포타시엄으로 處理하고 셋째, 血清을 石油이터로 그리고 血清을 三鹽化醋酸으로 處理하고 各處理血清을 中和反應에 使用하였다.

A. 트립신의 영향

傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 正常家兎血清의 抑制物質이 트립신의 處理에 의해서 받는 影響을 밝히기 위하여 이 實驗을 하였다. 이 實驗에 使用한 血清은 -60°C에 貯藏하였던 것으로서 非働化한 正常家兎血清이다.

트립신은 미리 그의 活性도가 測定된 것으로서 PBS에 0.05%, 50% 및 5%로 稀釋한 것을 各各 使用하였다. 家兎血清은 트립신溶液과 各各 同量 混合하였다.

이 血清-트립신混合物을 37°C에서 30分間 作用시켰다. 그 후 다시 57°C에서 트립신을 非働化하고 血清中和反應에 使用하였다.

이 實驗의 成績은 다음 第7表와 같다.

第7表 트립신濃도가 血清中和指數에 미치는 影響

트립신濃度	中和指數 (ELD ₅₀ NI)			
	血清 1號	血清 2號	血清 3號	血清 4號
0.05%	3.6	3.7	3.8	3.7
0.5%	3.7	3.5	3.6	3.5
5.0%	0.2	0.2	0	0.3

위의 實驗成績에 의하면 正常家兎血清의 IBV 抑制物質이 0.5트립신溶液에 安全하나 5%트립신溶液에 의해서 破壞되는 것 같다.

B. 過沃素酸포타시엄의 影響

正常家兎血清의 IBV 抑制物質이 過沃素酸포타시엄에

의하여 어떻게變化되는가를 알기 위해서 이 實驗을 하였다. 여기에 使用한 血清은 -60°C 의 冷凍機에 貯藏하였던 것으로서 非働化된 正常家兎血清과 家兎抗血清이다. 供試正常家兎血清과 家兎抗血清을 各各 0.85% 食鹽水로 3倍 稀釋하고 다시 0.01M의 過沃素酸포타시힘溶液과 同量 混合하였다. 이 血清過沃素酸포타시힘混合物를 37°C 에서 1時間 作用시키고, 다시 거기에 同量의 0.5% 葡萄糖溶液을 混合해서 37°C 에 30分間 作用시켰다. 바이러스群 위에 적은 方法을 PBS에 適用하고 血清대신 使用하였다. 이와 같이 處理한 正常家兎血清 및 抗血清을 血清中和反應에 使用하였으며 그 實驗結果는 第8表와 같다.

第8表 過沃素포타시힘이 血清中和指數에 미치는 影響

血清群	中和指數(ELD ₅₀ NI)		
	血清1號	血清2號	血清3號
KIO ₄ 處理正常血清	0.8	0.2	0.2
KIO ₄ 處理抗血清	4.8	4.8	4.0

위의 實驗成績에 의하면 正常家兎血清의 抑制物質은 0.01M의 過沃素酸포타시힘에 의하여 IBV 抑制성이 거의 소멸 되는 듯 하다.

C. 石油이터의 영향

正常家兎血清의 脫脂質血清이 抑制性을 띄우는 거의 여부를 實驗하였다. 이 實驗에 使用한 血清은 -60°C 의 冷凍機에 貯藏하였던 것으로서 非働化한 正常家兎血清이다. 家兎血清은 同量의 石油이터와 混合하였다. 그리고 血清이 石油이터에 잘 混合되도록 흔들고 20分間 室溫에 放置하였다 가 1,000 r.p.m.에 10分間 遠心分離하였다. 下層物質만을 採取하고 上層物質은 버렸다. 下層物質에 다시 同量의 石油이터를 첨가 하고 混合하여 위에서 말한 方法으로 反復處理하여 血清中和 脂質物質을 完全히 除去되게 하였다. 石油이터로 處理된 血清의 下層物質만이 血清中和反應에 利用되었다. 이 實驗結果는 다음 第9表와 같다.

第9表 石油이터가 血清中和指數에 미치는 影響

血清例	中和指數(ELD ₅₀ NI)
이터處理血清1號	3.7
이터處理血清2號	3.5
이터處理血清3號	3.1

위의 實驗成績에 의하면 이터處理正常家兎血清은 아무런 影響을 받지 않는 것 같다.

D. 三鹽化醋酸의 影響

傳染性氣管枝炎바이러스를 抑制하는 正常家兎血清이 三鹽化醋酸에 의해서 어떻게變化되는 가를 알기 위해서 이 實驗을 하였다. 이 實驗에 使用한 血清은 -60°C 의 冷凍機에 貯藏하였던 것으로서 非働化한 正常家兎血清이다. 家兎血清 5ml을 0.15M의 三鹽化醋酸 10ml에 徐徐히 첨가 混合하고 곧 3,000r.p.m.에 15分間 遠心分離하였다. 그리하여 沈澱層物質과 上層物質을 얻었다. 沈澱層物質은 pH7.2의 PBS로 2回 씻고 3.5ml의 PBS를 넣고 나머지는 0.1M, pH12.9의 水酸化소듐溶液으로 原血清量이 되도록 한 다음 pH를 7.0으로 修正하였다. 上層物質의 pH는 0.1M, pH12.9의 水酸化소듐溶液으로 修正하였다. 바이러스群은 血清대신에 PBS를 첨가 하되 血清을 處理한 것과 같은 方法으로 하였다. 이 實驗結果는 第10表와 같다.

第10表 三鹽化醋酸이 血清中和指數에 미치는 影響

分層物質	血清中和指數(ELD ₅₀ NI)		
	血清1號	血清2號	血清3號
沈澱層物質	3.3	3.6	3.7
上層物質	0.3	0.2	0.8

위의 實驗成績에 의하면 三鹽化醋酸으로 處理한 正常家兎血清의 沈澱層物質은 傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 抑制作用을 지니고 있는 것 같다.

4. 家兎血清의 中和指數에 미치는 理學的要因의 影響

이 實驗은 傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 家兎血清의 抑制物質의 理學的의 性狀을 究明한 것이다. 正常家兎血清은 36°C 부터 66°C 까지 여러 段階로 加熱處理하고 또는 -60°C 에서 長期間貯藏하면서 一定한 間隔을 두고 血清中和反應에 使用하였다.

A. 溫度의 影響

正常家兎血清이 지니고 있는 抑制物質에 관해서 여러

第11表 正常家兎血清의 中和指數에 미치는 溫度의 影響

作用溫度	血清의 中和指數(ELD ₅₀ NI)			
	血清1號	血清2號	血清3號	血清4號
($^{\circ}\text{C}$)				
30	4.2	4.2	4.4	4.2
46	4.0	4.1	4.0	4.2
56	3.5	3.6	3.6	3.7
60	2.8	3.0	2.8	3.1
66	0	0.2	0	0.2

段階의 溫度에 의한 影響을 보았다. 그리고 恒溫水槽를 利用해서 各各 36°C , 46°C , 56°C , 60°C 및 66°C 에서 30分間 加熱處理하여 各養兎場別로 5個의 血清群을 만들

었다. 血清群은 血清中和反應에 利用하여 第11表와 같은 實驗成績을 얻었다.

위의 實驗結果에 의하면 正常家兔血清의 IBV 抑制性은 36°C~46°C 사이에서는 中和指數의 變化가 거의 없었으나 46°C부터는 점점 影響을 받아서 60°C에 이르러서는 36°C~46°C 處理血清에 比해서 中和指數 ELD₅₀NI 1 이 적어 지고 66°C에서는 血清의 中和力이 完全히 소실되는 듯 하였다.

B. 血清의 貯藏期間의 影響

傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 正常家兔血清의 抑制物質이 一定한 溫度에 貯藏되어 질에 中和力이 貯藏期間에 따라서 어떠한 影響을 받는 가를 調査하기 위해서 이 實驗을 하였다. 이 實驗에 使用한 血清은 세 곳의 養兔場에서 10 頭씩 採血한 各個養兔場別의 混合血清이며 이것을 56°C에 30 分間 非動化하여 -60°C의 冷凍機에 貯藏하면서 使用하였다. 이 貯藏한 正常家兔血清을 使用해서 1 週, 2 週, 4 週, 2 個月, 4 個月, 8 個月 및 16 個月의 貯藏期間別로 血清中和試驗을 하였다. 이 實驗結果는 第12表와 같다.

第12表 家兔貯藏血清의 中和指數

貯藏期間	血清의 中和指數 (ELD ₅₀ NI)		
	血清 1號	血清 2號	血清 3號
1 週	3.5	3.8	3.6
2 週	3.6	3.6	3.8
4 週	3.8	3.5	3.6
2 個月	3.5	3.8	3.9
4 個月	3.6	3.5	3.5
8 個月	3.8	3.8	3.6
16 個月	3.5	3.5	3.8

위의 實驗成績에 의하면 正常家兔血清의 IBV 抑制物質은 貯藏期間에 따라서 中和力이 減退하지 않았다.

5. 血清分層에 의한 中和作用에 관한 研究

正常家兔血清에 들어 있는 IBV 抑制物質의 化學的本態를 알기 위하여 다음과 같은 實驗을 하였다. 첫째, 正常家兔血清의 여러 硫酸소듐分層의 中和指數, 電氣泳動相 分層別을 比較했고, 그리고 家兔血清中の Ion의 關係 여부를 實驗했다. 그리고 Ion 交換樹脂, Zymosan, Ethyl diamine tetracetic acid (EDTA), 第一磷酸토타시염 등의 分層物質의 中和指數를 比較했다.

A. 硫酸소듐分層의 中和指數와 電氣泳動相

傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 正常家兔血清의 抑制作用에 관한 여러 實驗結果에서 抑制成分이 蛋白質일 것이 다라는 事實을 짐작하게 되었다. 그럼으로 이 實驗에서는 正常家兔血清의 硫酸소듐 分層을 만들어서 (Goldman 1963) 各分層物質에 대한 血清中和反應을 하

는 同時에 이들의 各分層에 대한 電氣泳動을 實驗하였다. 그리하여 血清中和實驗에서 얻어지는 各分層의 바이러스抑制指數와 電氣泳動相을 比較하고 抑制物質이 무슨 成分인가를 證明하였다. 家兔血清의 硫酸소듐分層은 pH8.0, Ion 強度(μ)0.6의 28.6% 硫酸소듐溶液 30 ml 에 正常家兔加熱血清 1ml의 比率로 稀釋하고 이것을 -2°C의 冷凍庫에 12 時間 靜置하였다. 그리고 이것을 4,000 r.p.m.으로 40 分間 遠心分離하여 沈澱層과 上層을 얻었다. 이 分層을 透析囊에 넣어서 이온交換樹脂를 通過한 pH7.0의 중류수內에 浸漬하고 1°C 冷凍庫에 靜置하고 每 6 時間에 中류수를 交換하였다. 그리하여 72 時間後에 凍結乾燥을 하였다. 이것을 pH7.2의 PBS로 稀釋하고 血清中和實驗을 하였다. 이 實驗結果는 第13表와 같다.

第13表 硫酸소듐透折分層의 血清中和指數

分層物質	血清中和指數(ELD ₅₀ NI)		
	血清 1號	血清 2號	血清 3號
沈澱層物質	3.1	2.8	3.3
上層物質	0.7	0.4	0.5

위의 實驗結果에 의하면 正常家兔血清의 硫酸소듐分層에서 沈澱層物質의 中和指數는 높지만 上層物質은 바이러스中和力이 없는 듯 하다.

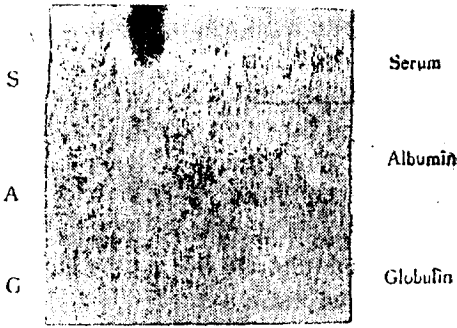
電氣泳動은 正常家兔血清의 硫酸소듐分層에 대해서 正常家兔의 全血清을 對照로 使用하였다. 이들의 分層과 血清은 $\mu=0.1$, 3°C, pH8.6, 0.01M의 Veronal Buffered Solution 에 150 Volts 로서 18 時間 展開하였다. (Josephon 1960, Cohen 1961, Sugahara 1963).

濾紙電氣泳動相은 Brom-phenol-blue(BPB)로서 固定시키고 1%醋酸液으로 發色시켰다. 이것을 室溫에서 乾燥시키고 Optical Densitometer 를 利用하여 各分層의 蛋白質含量을 分析하였다. 電氣泳動相에 의하면 正常家兔血清의 硫酸소듐分層에 있어서 Albumin 層과 Globulin 層이 거의 完全하게 分離되었다. 이 實驗에서 抑制物質은 Globulin 分層에 들어 있음이 밝혀졌다. 이와 같은 事實은 傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 正常家兔血清의 抑制成分이 Globulin 인 것을 立證하여 준다.

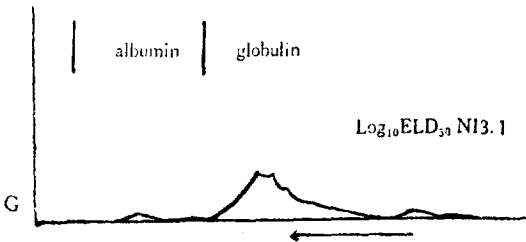
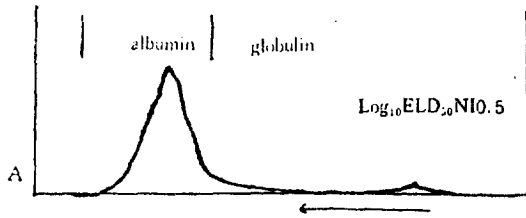
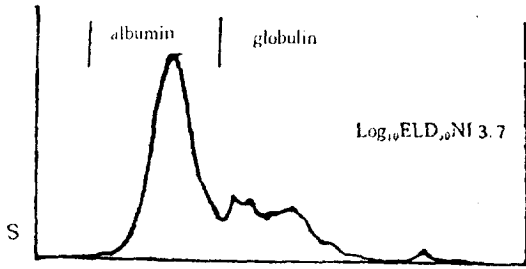
B. Ion 交換樹脂에 의한 血清分層의 中和指數

正常家兔血清成分中の IBV 抑制物質이 어떤 Ion에 의하여 이루어 지는지를 究明하기 위해서 이 實驗을 하였다.

家兔血清中の 이온을 除去하기 위해서 血清을 強 Ion 交換樹脂(Merk)와 EDTA(Merk)로써 處理하였다. 強 이온交換樹脂는 양이온과 陰이온을 使用하였다. 이 強 이온交換樹脂를 細粉하고 이온交換樹脂에 通過시킨 中류수



電氣泳動相



로서 이것을 0.08%, 0.04% 및 0.02% 용액으로 만들었다. EDTA는 0.08M, 0.04M 및 0.02M 용액으로 만들었다.

陰이온交換樹脂 및 EDTA가 鷄胎兒와 바이러스에 영향을 미치지 아니 하는 最大濃度를 決定하였다. 0.08% 이온交換樹脂와 0.08% EDTA는 鷄胎兒에는 影響이 없는 듯 하지만 바이러스力價를 低下시키는 傾向이 있었다. 그러나 0.04%의 陰陽 이온交換樹脂溶液 및 0.04%

의 EDTA 水溶液은 바이러스나 鷄胎兒에 아무 影響이 없었다. 따라서 1ml의 0.04M EDTA 溶液에 血清을 5ml 添加하였다. 이것을 37°C에서 30分間 作用시킨 後 2,000 r.p.m.에 10分間 遠心分離하여 沈澱層物質과 上層物質을 얻었다. 이들의 分層物質에 대해서 中和試驗을 하였던 바 그 實驗成績은 第14表와 같다.

第14表 이온交換樹脂 및 EDTA 處理血清의 血清中和指數

分層物質	血清中和指數(ELD ₅₀ NI)
陰이온交換樹脂沈澱層	0.2
“ 上層	3.2
陽이온交換樹脂沈澱層	0.1
“ 上層	3.6
E D T A 沈澱層	0.4
“ 上層	3.5

위의 實驗成績에 의하면 正常家兎血清을 이온交換樹脂 및 EDTA 로서 處理한 沈澱層物質에는 中和指數가 거의 없는 것으로 보아서 正常家兎血清中の Ion그리고 이들에 吸着되는 物質은 IBV 抑制作用이 없는 듯 하다.

C. 其他 各種吸着劑에 의한 分層의 中和指數

傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 正常家兎血清의 抑制物質이 어떠한 化學劑에 吸着되는 成分인가를 究明하기 위해서 [이 實驗을 하였다. 이 實驗에 使用한 血清은 -60°C의 冷凍機에 貯藏하였던 것이며 이것은 56°C에서 30分間 非鹼化한 正常家兎血清이다. 血清을 Zymosan 과 第一磷酸포타시움에 作用시켜서 沈澱層과 上層物質을 얻었다. 이들의 分層物에 대해서 血清中和反應을 하였다.

(1) Zymosan 分層의 中和指數

正常家兎血清의 抑制物質이 Zymosan 에 의하여 處理된 어느 分層物質에 含有되는 것인가를 밝히기 위해서 이 實驗을 하였다. 이 實驗에서는 먼저 바이러스力價에 影響을 미치지 않고 抑制物質을 吸着할 수 있는 Zymosan 의 정도를 알아 보았다. 그래서 Zymosan 200mg 을 0.9% 食鹽水 20ml 로 溶解하고 90分間 煮沸한 後 2,000r.p.m.에 10分間 遠心分離 하였다. 第一次의 遠心分離에 의하여 沈澱된 Zymosan 을 再次 0.9% 食鹽水 20ml 로써 용해 시켰다. 이 Zymosan 溶液의 1ml, 0.5ml, 및 0.25ml 에 各各 5ml 의 家兎血清을 混合하고 37°C에서 90分間作用시켜 2,000 r.p.m.에 10分間 遠心分離한 그 上層物質만을 利用하여 血清中和實驗을 하였다 正常家兎血清의 IBV 抑制物質에 대한 Zymosan 吸着性은 다음 第15表와 같다.

위의 實驗에 의하면 1.0%의 Zymosan 이 바이러스力價에 影響을 미치지 않는 同時에 正常家兎血清中の 抑制

第15表 家兔血清의 IBV 抑制物質의 Zymosan 吸着性

血清에 混入되는 Zymosan 濃度(%)	血清上層 中和指數 (ELD ₅₀ NI)
1.0	0.5
0.5	1.2
0.25	3.2

物質을 거의 完全히 吸着할 수 있다는 것을 알 수 있게 되었다. 이 實驗에서는 -60°C의 冷凍機에 貯藏하였던 새 곳의 正常家兔血清을 使用하였다. 이 血清은 非働化된 것이며 위에서 말한 바와 같은 方法으로써 1% Zymosan으로 處理하였다. 이와 같이하여 얻어진 沈澱分層物質에 대해서 血清中和反應을 하였으며 이 實驗結果는 다음 第16表와 같다.

第16表 血清-Zymosan 混合이 中和指數에 미치는 影響

血清 種類	血清 No.	中和指數 (ELD ₅₀ NI)
沈澱 分層	1	2.8
	2	3.2
	3	3.3
對照 全血清	1	3.6
	2	3.5
	3	3.5

위의 實驗成績에 의하면 傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 正常家兔血清의 抑制物質이 1% Zymosan에 吸着되었다. 이 沈澱分層物質의 中和指數는 正常家兔血清의 그것과 近似하였다.

(2) 第1磷酸포타시염分層의 中和指數

傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 正常家兔血清의 抑制物質이 어느 磷酸鹽分層에 含有되어있는 것인가를 밝히기 위하여 이 實驗을 하였다. 血清은 -60°C의 冷凍機에 貯

第17表 正常家兔血清의 磷酸鹽分層의 中和指數

血清 種類	血清 No.	中和指數
沈澱 分層	1	2.2
	2	2.8
對照 全血清	1	3.7
	2	3.6

藏하였던 것이며 이것은 56°C에 30分間 非働化시킨 正常家兔血清이다. 이 血清 1容量에 0.005 M 磷酸鹽을 9容量 混合하였다. 이 混合된 血清을 -2°C의 冷藏庫에

60分間 靜置하였다가 2,000r.p.m.으로 20分間 離心分離하였다. 正常家兔血清의 磷酸鹽沈澱分層을 利用하여 血清中和反應을 하였다.

이 實驗成績은 第17表와 같다.

위의 實驗結果에 의하면 正常家兔血清의 IBV 抑制物質은 正常家兔血清을 第一磷酸포타시염으로 處理한 뒤 그의 沈澱分層에 含有되는 듯 하다.

IV. 考 察

動物의 正常血清이 바이러스의 發育增殖을 抑制한다는 事實은 많은 例에서 報告된 바 있다. 이 研究에서는 傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 家兔의 正常血清이 보여 주는 抑制作用을 血清學的 生物學的 그리고 理化學的方法으로 究明하였다.

傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 血清抑制物質의 動物別分布는 報告된 바 있으나(Peiek 등 1958, Jeon 등 1962) 正常家兔血清의 IBV 抑制物質에 관한 血清學的 生物學的 및 理化學的의 性狀은 究明되어 있지 않다.

이 實驗에서는 抑制物質이 家兔血清의 한 正常的인 成分인지 또는 特異的인 抗體인지를 究明하였다. 그러기 위해서 正常家兔加熱血清과 家兔抗血清의 補體結合力價와 中和指數를 比較하였다. 傳染性氣管枝炎바이러스(Beaudette 株)의 家兔抗血清은 一例를 除外하고는 補體結合力價가 64 以上이고 中和指數는 ELD₅₀NI 8.0 이었다. 그러나 正常家兔加熱血清의 補體結合力價는 8 以下이고 中和指數는 ELD₅₀NI 3.7 로써 抗血清의 그것에 比해서 낮았다.

正常家兔血清의 傳染性氣管枝炎바이러스抑制物質이 家兔의 年令別 및 性別血清에 差異가 없다는 것은 正常家兔血清의 抑制作用이 特異抗體에 基因되는 것이 아님을 뒷 據를 하여 준다.

이 IBV 抑制作用이 特異抗體에 基因된다고 하면 적어도 家兔血清의 年令別 差異가 있을 것이다. 즉 年令이 많은 家兔血清에서 보다 높은 抑制作用을 볼 수 있을 것이다.

家兔血清의 IBV 抑制作用은 中和反應으로 測定하였다. 따라서 抗血清이 아닌 正常家兔血清이 리우는 抑制作用 즉 中和反應은 反應의 必須條件이 될수 있는 몇몇 血清學的의 性狀이 먼저 밝혀져야 한다. 이 抑制作用에 관한 血清學的의 實驗으로는 첫째, 家兔血清의 抑制作用의 바이러스의 力價가 어떠한 영향을 미치는가를 實驗한다. 그러나 하면 바이러스의 力價가 높으면 血清一分리하여 ELD₅₀NI가 減尠되게 알기 때문이다. 그러나 傳染性氣管枝炎바이러스는 그의 力價가 ELD₅₀NI 6.0 이상이면 正常家兔血清의 抑制物質과의 血清中和反應을 起할 수 없음을 미치지 않았다. 이 反應의 反應의 力價가 높을수록

바이러스의 家兎抗血清인 경우에는 ELD₅₀ 7.5 以下の 力價를 가지는 傳染性氣管枝炎바이러스로써 血清中和反應을 할 수가 없었다. 왜냐 하면, IBV 家兎抗血清의 [中和指數는 最小限度로 ELD₅₀NI 7.5 以上을 나타 내기 때문이다. 따라서 IBV 家兎抗血清에 대한 血清中和試驗을 할 때는 正常家兎血清을 다룰때와는 달리 ELD₅₀ 8.5 以上の 力價를 지니는 바이러스를 使用해야 한다(第1表)

바이러스와 血清이 混合되어서 血清中和反應이 일어나는 데는 一定한 作用時間이 必要하다. 이 實驗에서는 IBV 과 正常家兎血清을 混合하고 20 分부터 320 分 까지의 作用時間이 經過한 후에 血清中和反應을 하였으나 血清中和指數에는 아무 影響이 없었다. 그러나 IBV 와 IBV 家兎抗血清에서의 中和反應은 混合이 이루어진 직후에 일어나고 또한 鵝痘바이러스와 이 바이러스의 抗血清과의 中和反應은 30 分以上的 作用時間이 必要하다.

正常家兎血清의 傳染性氣管枝炎바이러스 中和力이 몇 배로 稀釋될때 까지 固有의 中和指數를 持續할 수 있는 가를 알기 위해서 血清中和試驗을 하였다. 이 實驗의 結果에 의하면 正常家兎血清은 80 倍로 稀釋될때 비로서 中和力이 약간 低下되는 傾向이 보였다. 그리고 正常家兎血清을 320 倍로 稀釋하면 IBV 抑制性이 거의 消失되었다(第6表). 그러나 닭, 사람, 토끼血清의 뉴캐슬病바이러스(B₁ strain) 中和力은 1:1 보다 더 稀釋됨으로써 中和力이 減退 또는 消失된다고 하였다(Bang 등, 1956). 正常家兎血清은 80 倍의 稀釋度에서도 IBV 抑制性을 維持한다는 事實은 傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 家兎血清抑制物質의 作用이 보다 強力함을 明하여 준다.

正常家兎血清의 抑制物質에 관한 血清學的 및 生物學的 實驗方法에 뒤 이어 디피코(Difco), 過沃素酸포타시움, 石油이터, 三鹽化醋酸 및 第一磷酸포타시움 등의 化學物質에 대한 正常家兎血清의 抑制性을 實驗하였다. 正常家兎血清의 抑制物質은 5% 트립신溶液과 0.1M 過沃素酸포타시움溶液에 의하여 血清의 中和力이 消失되었다(第7表, 第8表). 그러나 0.5% 트립신溶液, 0.15M 三鹽化醋酸 및 第一磷酸포타시움에는 安定하였다. 다시 말해서 處理된 正常家兎血清의 傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 中和力은 正常家兎血清의 그것과 類似하였다. 石油이터로 處理된 脫脂肪血清의 IBV 抑制性도 아무런 影響을 입지 않아서 正常血清의 中和指數와 近似하였다(第9表). 이 實驗結果는 脂肪이 傳染性氣管枝炎바이러스의 抑制作用에 아무런 關係가 없음을 暗示하여 주는 것이다. 그러나 家兎 그리고 몇몇 動物血清을 石油이터로써 處理하여 일어난 脂質層物質은 St. Louis, 日本 B 型 또는 Russian far east 腦炎바이러스를 抑制하였다(Casals, 1948).

Adenovirus 의 경우 寸소의 血清이 하나의 抑制物質이 되는데 이 物質은 1% 트립신溶液에 破壞되지 않을 뿐

더러 이 抑制物質은 電氣泳動法에 의하여 γ -globulin 層에 들어 있음이 밝혀 졌다(Gold 등, 1962).

正常家兎血清의 傳染性氣管枝炎바이러스 抑制物質이 0.01M 過沃素酸포타시움에 不安定하였다. 그런데 Influenza 바이러스 A에 대한 家兎血清의 抑制物質은 0.01M 過沃素酸포타시움溶液에 의해서 破壞되고 따라서 抑制物質을 糖蛋白質이라고 하였다(Davenport, 1960). 이 過沃素酸포타시움 處理實驗結果(第8表)를 보면 家兎血清의 IBV 抑制性은 血清中の 炭水化物系物質 또는 糖蛋白質에 基因된다고 볼 수 있다. 보다 나가서 蛋白質이라도 蛋白質分子의 水酸化炭素原子團이 抑制性을 決定하는 活性原子團이라고 推定할 수 있다. 이 抑制物質의 本體가 蛋白質이며 이 蛋白質分子의 表面構造에 심이 關係된다는 것은 血清의 硫酸水티움沈澱分層이 正常家兎血清과 거의 近似한 中和指數를 보여 주는데 있다. 그리고 이 分層은 電氣泳動法으로 globulin 層이 밝혀 졌다(第13表).

三鹽化醋酸處理實驗結果를 보면 그의 沈澱分層의 傳染性氣管枝炎바이러스 中和力이 正常家兎血清의 中和指數와 近似하다. 三鹽化醋酸이 正常家兎血清의 IBV 抑制物質에 作用하여 蛋白質을 破壞하더라도 蛋白質表面의 活性原子團에는 아무런 影響을 미치지 아니 하는 데 基因될 것으로 생각 할 수 있다.

正常家兎血清의 抑制物質은 貯藏期間 및 溫度등의 理學的 要因에 대해서 比較的 安定度가 크다(第11表, 第12表). 正常家兎血清은 冷凍機內에서 -60°C에 凍結할 때는 傳染性氣管枝炎바이러스抑制性을 安定하게 保存하고 中和指數에 아무 變化를 일으키지 않았다. 正常家兎血清의 IBV 抑制性은 36°C~46°C에서 30 分間 恒溫水槽內에서 加熱하면 中和指數가 非加熱新鮮血清에 대해서 거의 半減되는데(ELD₅₀NI 4.2) 56°C~60°C에서 30 分間 加熱하면 中和指數는 보다 더 減退되고(ELD₅₀NI 3.7~3.0) 66°C에서 30 分間 加熱할 때는 IBV 抑制性이 거의 소멸된다. 따라서 正常家兎血清의 IBV 抑制物質은 易熱性物質과 耐熱性物質로 構成되어 있거나 또는 36°C에 加熱함으로써 破壞되기 始作해서 66°C 30 分에 完全히 破壞되는 單一物質로 構成되어 있는 것 같다.

動物血清이 바이러스의 發育增殖을 抑制한다는 것은 이미 알려져 있는 事實이다. 痘瘡바이러스는 家兎와 기니픽(Briody 1951, Mc Carty 1952, Gordon 1955), Influenza 바이러스는 기니픽(Utz 1949), 뉴캐슬病바이러스는 기니픽(Utz 1949) 사람(Ginsberg 등 1949, Bang 등 1951)의 易熱性血清因子에 의해서 發育增殖이 抑制되었다. 그러나 脊髓灰白質炎바이러스는 소(Takemori 등 1959), 脊髓灰白質炎바이러스 1 型은 말(Takemoto 등 1959), 脊髓灰白質炎바이러스 1 型, Coxackie 바이러스 1 型 ECHO 바이러스 1 型 및 Adenovirus ■ 은 사람, 및 말

(Chang 등 1957), Adenovirus는 숫소(Gold 등 1962)의, 耐熱性血清因子에 의해서 發育增殖이 抑制되었다.

正常家兎血清을 이온交換樹脂 및 EDTA 등으로 處理 하고 이들의 各分層物質의 IBV 抑制性을 比較하였다(第 14表) 正常家兎血清을 이온交換樹脂 및 EDTA로 處理 한 上層物質의 中和指數는 正常家兎血清의 그것과 近似 하지만 比瀝分層物質에는 中和指數가 없었다. 따라서 正常血清內的 IBV는 IBV 抑制作用에 있어서 Co-factor 로써 作用하지 않는 것 같다. 그리고 傳染性氣管枝炎바이러스抑制物質은 Zymosan에 吸着되는 性狀을 가지고 있었다(第15, 16表).

V. 總 括

正常家兎血清의 傳染性氣管枝炎바이러스 (IBV)抑制作用에 관한 血清學的, 生物學的 및 理化學的實驗을 施行 하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 正常家兎血清의 抑制作用은 이 바이러스에 대한 抗體에 基因되는 것이 아니다.
2. 正常家兎血清의 中和作用은 IBV와 이에 特異한 抗體系에서 일어 나는 中和反應과 血清學的으로 差異가 없다.
3. 家兎血清의 IBV 抑制物質은 平均 3.7인 $\text{Log}_{10}\text{ELD}_{50}$ NI를 지니고 있다.
4. 家兎血清의 IBV 抑制物質은 5%트랄산溶液 및 0.01 M 過沃素酸포타시엄溶液에 破壞되고 Zymosan에 吸着되었다.
5. 家兎血清의 抑制物質은 0.05 M 三鹽化醋酸에 그리고 0.005 M 第一磷酸포타시엄에 安定하다.
6. 家兎血清의 IBV 抑制物質은 -60°C 에서 극히 安全하고 56°C 에 30分間 加熱됨으로써 그 抑制力이 減退되기 시작하며 66°C 에 30分間 加熱됨으로써 거의 소실된다.
7. 家兎血清의 IBV 抑制作用에는 Ion이 Co-factor 로서 관련 되지 않는다.
8. 家兎血清의 IBV 抑制物質은 globulin 分層에 含有되어 있는 것 같다.

VI. References

- Bang, F.B., Foard, M. and Karzon, D.T.:
Mode of heat-labile serum inactivating substance on Newcastle disease virus. Bull. Johns Hopkins Hosp., 83-100, 1951.
- Bang, F.B. and Foard, M.:
The serology of Newcastle virus infection.
1 The reaction between various sera and the virus. J. Immunol., 76, 352-356, 1956.
- Briody, B.A., Ledinko, N., and Stannard, C.:
II. Neutralization of vaccinia virus by normal guinea pig serum. J. Immunol., 79, 455-461, 1957.
- Chang, R.S. and Geyer, R.P.:
A serum albumin medium for the cultivation of human epithelial-like cells. J. Immunol., 79, 455-461, 1957.
- Casals, J. and Olitsky, P.K.:
Inactivation of certain neurotropic viruses in vitro by serum lipids. Science, 106, 267-268, 1947.
- Casals, J. and Olitsky, P.K.:
Protection of mice against encephalitis virus by means of organic solvent extracts of brain tumor. Science, 108, 690-691, 1948.
- Cohen, A., and Belyavin, G.:
The influenza virus hemagglutination inhibitors of normal rabbit serum. I. Separation of the inhibitory components. Virology, 13, 58-67, 1961.
- Cunningham C.H.:
A Laboratory Guide in Virology. Burgess Publishing Co., 1956.
- Douglass, S.R. and Smith, W.:
A study of vaccinal immunity in rabbits by means of in vitro methods. Brit. J. Exptl. Pathol., II, 96-111, 1930.
- Galasso, G.J. and Sharp, D.G.:
The effect of horse serum on the quality of vaccinia virus grown in L cell cultures. J. Immunol., 90, 647-653, 1963.
- Ginsberg, H.S. and Horsfall, F.L.:
A labile component of normal serum which combines with various viruses; Neutralization of infectivity and inhibition of hemagglutination by the component. J. Exptl. Med., 90, 475-495, 1949.
- Gold, E. and Ginsberg, H.S.:
An inhibitor of adenoviruses in OX serum. J. Immunol., 88, 513-518, 1962.
- Goodman, J.W. and Gross, D.:
Studies on fragments of rabbit γ -globulin. J. Immunol., 90, 865-871, 1963.
- Henry, C. and Younguen, J.S.:
Influence of normal animal sera on influenza viruses in cultures of trypsin-dispersed monkey kidney cells. J. Immunol., 73, 273-281, 1957.
- Jeon, Y.S.:

- Cited from Ph. D. Thesis of University of Minnesota (1962). Modified complement fixation test of Avian Infectious Bronchitis Virus.
- Jeon, Y.S. and Pomeroy, B.S.:
Personal Communication (1962).
- Josephson, A.S.:
The development of antibodies to penicillin in rabbits. *J. Exptl. Med.*, III, 611—620, 1961.
- Kabat, E.A. and Mayer, M.M.:
Experimental immunochemistry. Thomas pub. Co. 2nd Edition, 1961.
- Klein, M., Zellat, J. and Michaelson, T.C.:
A new bovine adenovirus related to human adenovirus. *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*, 105, 340—342, 1960.
- Mc Carty, K. and Germer, W.D.:
Two heat-labile factors in normal sera which neutralize variola virus. *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 33, 529—536, 1952.
- Mayer, M.M., Osler, A.G., Bire, O.G., and Heidelberger, M.:
Quantitative Studies of Complement Fixation. I. A Method. *J. Immunol.*, 59, 195—206, 1948.
- Morgan, I.M.:
A quantitative study of the neutralization of WEE virus by its antiserum and the effect of component J. *Immunol.*, 50, 359—371, 1945.
- Peick, M. and Corazzola, S.:
Azoine inattivante dell' etere etilico e del siero fresco sul virus della bronchite infettiva. *Vet. Ital.*, 9, 515—520, 1958.
- Rapp, H.J.:
Purification and Immunochemical Characterization of the Heat-stable, Alcohol-soluble Hemolytic Antibody inhibitor of the sheep erythrocyte.
Thesis submitted to the School of Hygiene and Public Health, The John Hopkins University, 1953.
- Reed, L.J. and Muench, H.:
A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.*, 27, 493—497, 1938.
- Sugahara, T., Ishizaka, T.:
Biologic activities of aggregated γ -globulin.
VI. Aggregated products of rabbits serum proteins. *J. Immunol.*, 90, 960—970, 1963.
- Takemori, N., Nomura, S., Nakano, M. Morioka, Y., Henmi, M., and Kitoka, M.:
Mutation of poroviruses to resistance to neutralizing substances in normal bovine sera. *Virology*, 5, 30—55, 1958.
- Takemoto, K.K., and Habel, K.:
Sensitivity and resistance of type I polioviruses to an inhibitor-in certa in horse sera. *Virology*, 9, 228—243, 1959.
- Tyrrell, D.A.:
Separation of inhibitors of hemagglutination and specific antibodies for influenza viruses by starch zone electrophoresis. *J. Immunol.*, 72, 494—502, 1954.
- Utz, J.P.:
Effect in vitro of specific lipid fraction of normal animal sera on psittacosis virus. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 69, 186—189, 1948.
- Utz, J.P.:
Studies on the inactivation of influenza and NDV by a specific lipid factor of normal sera. *J. Immunol.*, 63, 273—279, 1949.
- Whitman, L.:
The neutralization of WEE virus by human convalescent serum. The influence of heat-labile substances in serum on neutralization index. *J. Immunol.*, 56, 97—108, 1947.

附 錄

實驗成績의 數字處理表

第1表 抗血清과 正常血清의 補體結合力價와 中和指數의 比較

血清 No.	抗 血 清		正 常 血 清	
	補 體 結 合力 價	中和指數 (ELD ₅₀ NI)	補 體 結 合力 價	中和指數 (ELD ₅₀ NI)
1	>64	8.00	< 8	3.91
2	>64	8.22	< 8	3.91
3	>64	8.22	< 8	3.73
4	< 8	4.50	< 8	3.33

第2表 年齡別正常家兔血清의 中和指數

血清 群	血清 中和指數 (ELD ₅₀ NI)			
	1 回	2 回	3 回	平均
1個月血清	3.87	3.50	3.68	3.68
2個月血清	3.50	3.73	3.68	3.63
4個月血清	3.54	3.38	3.57	3.49
8個月血清	3.83	4.00	3.83	3.88
12個月血清	3.73	3.54	3.54	3.60
24個月血清	3.73	3.54	3.68	3.65

第3表 性別別正常家兔血清의 中和指數

性 別	血 清 中 和 指 數 (ELD ₅₀ NI)																	
	血清 1號			血清 2號			血清 3號			血清 4號			血清 5號			血清 6號		
	1回	2回	平均	1回	2回	平均	1回	2回	平均	1回	2回	平均	1回	2回	平均	1回	2回	平均
雌 兔	3.54	3.50	3.52	3.68	3.63	3.65	3.33	3.33	3.33	3.63	3.50	3.56	3.68	3.83	3.75	3.80	3.73	3.75
雄 兔	3.73	3.68	3.70	3.73	3.54	3.63	3.81	3.73	3.75	3.50	3.81	3.65	3.33	3.32	3.32	3.57	3.73	3.65

第4表 바이러스力價가 中和指數에 미치는 影響

바이러스力價 (ELD ₅₀)	血 清 中 和 指 數 (ELD ₅₀ NI)												
	血清 1號				血清 2號				血清 3號				
	1 回	2 回	3 回	平均	1 回	2 回	3 回	平均	1 回	2 回	3 回	平均	
6.0	3.68	3.57	3.68	3.64	3.57	3.81	3.68	3.68	3.68	3.87	4.00	3.73	3.85
7.0	3.50	3.57	3.54	3.53	3.57	3.50	3.81	3.62	3.57	3.81	3.57	3.65	
8.0	3.73	3.81	3.73	3.75	3.83	3.83	4.00	3.88	3.22	3.57	3.22	3.33	

第5表 바이러스-血清混合作用時間의 影響

作用時間 (分)	血清 中和指數 (ELD ₅₀ NI)		
	血清 1號	血清 2號	血清 3號
20	3.68	3.57	3.81
40	3.63	3.63	3.54
80	3.81	3.68	3.38
160	3.63	3.54	3.83
320	3.33	3.81	3.73

第6表 血清稀釋度가 바이러스中和作用에 미치는 影響

血清稀釋度	血清 中和指數 (ELD ₅₀ NI)			
	血清 1號	血清 2號	血清 3號	血清 4號
全 血 清	3.81	3.83	3.63	3.54
1/10	3.68	3.33	3.54	3.81
1/20	3.33	3.54	3.33	3.54
1/40	3.68	3.33	3.32	3.54
1/80	3.33	3.22	3.00	3.83
1/160	1.50	1.33	1.63	1.33
1/320	0.33	0.22	0.22	0.33

第7表 트립신濃度가 血清中和指數에 미치는 影響

트립신濃度 (%)	血 清 中 和 指 數 (ELD ₅₀ NI)			
	血清 1號	血清 2號	血清 3號	血清 4號
0.05	3.63	3.73	3.81	3.73
0.5	3.73	3.54	3.63	3.54
5.0	0.22	0.16	0	0.25

第8表 過沃度포타시엄이 血清中和指數에 미치는 影響血

血 清 群	血 清 中 和 指 數 (ELD ₅₀ NI)											
	血清 1號				血清 2號				血清 3號			
	1 回	2 回	3 回	平均	1 回	2 回	3 回	平均	1 回	2 回	3 回	平均
K10 ₄ 處理正常血清	1.16	0.54	0.68	0.79	0.16	0.22	0.16	0.24	0.22	0.22	0.22	0.22
K10 ₄ 處理抗血清	4.81	5.00	4.68	4.83	4.83	4.73	4.73	4.76	4.16	3.83	4.17	4.04

第9表 石油이타가 血清中和指數에 미치는 影響

血 清 例	血 清 中 和 指 數(ELD ₅₀ NI)			
	1 回	2 回	3 回	平均
이타 處理血清 1號	3.73	3.68	3.73	3.71
이타 處理血清 2號	3.50	3.54	3.54	3.52
이타 處理血清 3號	3.33	2.83	3.16	3.11

第10表 三鹽化醋酸이 血清中和指數에 미치는 影響

分層物質	血 清 中 和 指 數 (ELD ₅₀ NI)											
	血清 1號				血清 2號				血清 3號			
	1 回	2 回	3 回	平均	1 回	2 回	3 回	平均	1 回	2 回	3 回	平均
沈澱層物質	3.16	3.38	3.33	3.32	3.54	3.68	3.54	3.58	3.54	3.83	3.83	3.73
上層物質	0.16	0.33	0.33	0.27	0.16	0.22	0.16	0.18	0.68	0.80	0.80	0.76

第11表 正常電兔血清의 中和指數에 미치는 溫度의 影響

作用溫度 (°C)	血 清 의 中 和 指 數 (ELD ₅₀ NI)											
	血清 1號			血清 2號			血清 3號			血清 4號		
	1 回	2 回	平均	1 回	2 回	平均	1 回	2 回	平均	1 回	2 回	平均
36	4.22	4.16	4.19	4.17	4.16	4.16	4.50	4.33	4.41	4.22	4.17	4.19
46	3.83	4.17	4.00	4.16	4.00	4.08	4.00	4.00	4.00	4.16	4.17	4.16
56	3.68	3.38	3.53	3.68	3.57	3.62	3.57	3.57	3.57	3.81	3.54	3.67
60	2.81	2.81	2.81	2.83	3.22	3.02	2.81	2.83	2.82	3.00	3.22	3.11
66	0	0	0	0.16	0.16	0.16	0	0	0	0.16	0.22	0.19

第12表 家兔貯藏血清의 中和指數

貯藏期間	血 清 의 中 和 指 數 (ELD ₅₀ NI)											
	血清 1號			血清 2號			血清 3號					
	1 回	2 回	平均	1 回	2 回	平均	1 回	2 回	平均	1 回	2 回	平均
1 週	3.54	3.50	3.52	3.81	3.73	3.77	3.63	3.54	3.58			
2 週	3.63	3.54	3.58	3.54	3.68	3.61	3.73	3.81	3.77			
4 週	3.73	3.83	3.78	3.54	3.38	3.46	3.63	3.50	3.56			
2箇月	3.54	3.38	3.46	3.73	3.81	3.77	3.73	4.00	3.86			
4箇月	3.54	3.57	3.55	3.54	3.38	3.46	3.54	3.54	3.54			
8箇月	3.73	3.80	3.76	3.80	3.81	3.80	3.50	3.68	3.59			
16箇月	3.33	3.57	3.47	3.54	3.38	3.46	3.73	3.83	3.78			

第13表 硫酸소듐 透析分層의 血清中和指數

分層物質	血清中和指數 (ELD ₅₀ NI)											
	血清 1號				血清 2號				血清 3號			
	1回	2回	3回	平均	1回	2回	3回	平均	1回	2回	3回	平均
沈澱層物質	2.83	3.33	3.16	3.11	2.81	2.81	2.73	2.78	3.50	3.00	3.33	3.27
上層物質	0.80	0.57	0.68	0.68	0.33	0.38	0.38	0.36	0.38	0.57	0.53	0.48

第14表 이온交換樹脂 및 EDT 處理血清의 血清中和指數

分層物質	血清中和指數(ELD ₅₀ NI)		
	1回	2回	平均
陰이온交換樹脂沈澱層	0.22	0.16	0.19
陰이온交換樹脂上層	3.16	3.33	3.24
陽이온交換樹脂沈澱層	-0.22	0	-0.11
陽이온交換樹脂上層	3.57	3.63	3.60
EDTA沈澱層	0.16	0.57	0.36
EDTA上層	3.38	3.57	3.47

第15表 家兔血清의 IBV 抑制物質의 Zymosan 吸着性

血清에 混入되는 Zymosan 濃度(%)	血清上層中和指數(ELD ₅₀ NI)			
	血清 1號	血清 2號	血清 3號	平均
1.0	0.63	0.38	0.50	0.50
0.5	1.25	1.38	0.83	1.15
0.25	3.22	3.16	3.17	3.18

第16表 血清-Zymosan 混合의 中和指數에 미치는 影響

血清種類	血清 No.	中和指數(ELD ₅₀ NI)
沈澱分層	1	3.81
	2	3.22
	3	3.25
對照全血清	1	3.57
	2	3.54
	3	3.54

第17表 正常家兔血清의 磷酸鹽分層의 中和指數

血清種類	血清 No.	中和指數(ELD ₅₀ NI)
沈澱分層	1	2.22
	2	2.80
對照全血清	1	3.68
	2	3.57