

柞蠶膿病 Virus의 免疫學血清學的 反應

林 鍾 聲

農村振興廳 蠶業試驗場

Jong Sung Lim. : Serological Test of Virus disease of Tussah Silkworm.

SUMMARY

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

- 1) What caused tussah silkworms terrible disease broken out all over the Korea in 1965, was examined to be "Inclusion body of virus" through microscop.
- 2) The examined inclusion bodies are easily stained as purple by seller's staining.
- 3) The proper speed of centrifugation for the purification of inclusion bodies is 1,000 r. p. m for 10 minutes.
- 4) It is possible, clearly resulted, to attempt the "Rapid Agglutination Test & Complement Fixation test" with antigen of inclusion bodies.
- 5) The Anti-polyhedra rabbit serum from antigen of the dilution of 2×10^6 /1ml polyhedra made the Rapid Agglutination test possible even with dilution of 1/8 infected pupa blood(antigen).

I. 緒 言

韓國의 柞蠶業은 1959年 柞蠶種의 輸入을 契機로 하여 發展一路에 있었다. 그러던 韓國의 柞蠶은 1965年 秋期에 發生한 膿病의 病原體에 依해서 다시 全國의 蠶 全滅狀態에 逢着하여 이 病原體를 究明하고 그 防止策을 摸索하는 것이 時急한 問題가 되었다. 그런데 病原體가 Virus封入體인 多角體임이 判明되었으므로 家蠶(石川義文 1954)의 膿病에 경우와 같이 柞蠶에 있어서도 Virus가 經卵傳染할 것이라는 抽測에서 Virus가 經卵傳染한 柞蠶種을 索出하여 健康蠶種을 生産하므로써 膿病을 防止하려고 시도하게 될 것이다. 따라서 本試驗은 無膿蠶種을 索出하기 위한 方法으로서 抗多角體家兔血清에 依한 坪板凝集反應을 重點의 으로 하여 始作한 것이다. 勿論多角體에 依한 膿蠶種을 索出하기 위한 것이라면 顯微鏡으로도 可能하겠으나 家蠶의 F型 Virus와 같이 封入體를 形成치 않는 Virus의 病原體를 생각한다면 重要한 檢出法이라 아니할 수 없다. 그런데 家蠶에 있어서 鮎澤啓夫(1952a) 등이 多角體의 免疫學的 血清學的 性狀에 關한 試驗을 시도한 바는 있으나 柞蠶에 있어서는 처음인 것으로 생각하며 또한 Virus가 經卵傳染된 蠶種을 索出하기 위해서 抗多角體血清의 力價를 最適으로 하기 위한 抗原濃度의 測定에 關한 試驗은 처음이라고 생각된다.

II. 試驗材料 및 方法

1. 病柞蠶의 採取

表1에서와 같이 三個道の 各地域別로 病蠶을 採取하였다.

(表 1)

地 域 別 調 査 表

No.	飼 育 地	1965年度秋蠶種구입처	卵量	飼育方法	飼料의 種	葉質의 程 度	成績	其 他
1	충북 제천군 제천읍 후석리	한국작잠공사	1 kg	架蠶(秋蠶) (1령期間)	참나무	良	전멸	※ 3령부터 不脫皮 폐사 8月6日 掃蠶 9월초 전멸
1	" " 익산리	"	4	放 飼	상수리	"	"	※ 1령부터 폐사 전멸
1	" " 도산리	"	17	호 사 육	"	"	"	※ 2령부터 폐사
1	" " "	"	2	방 사	"	"	"	"
3	강원도 원성군소초면이관리	강원작잠	3	"	"	"	"	※ 3령서부터 10月日 거의 전멸
5	강원도 춘성군 서면방동1구	"	2	"	떡갈나무	"	"	※ 1령以後 脫皮전멸
5	" " "	"	3	"	"	"	"	"
7	경기도 광주군침천면오향리	경기작잠	1.5	3령까지 선 반응	상수리	"	收繭 5貫	※ 4령以後부터 폐잠시작 5령中 거의 전멸상태
7	" " "	"	1.5	"	"	"	전멸	※ 3령부터 시작하여 전멸
2	경기도 양주군화진면금남리	"	1	板子上 5月 秋蠶育	참나무	"	收繭 10貫	"

2. 試驗方法

1) 抗原造劑 및 染色

各道の 地域別에서 採取한 柞蠶死體를 蛹體인 경우에는 20cc의 體液을 抽出하여 脫脂綿으로 여과한후 1,500 r.p.m에 10分間 遠心分離하여 上層液을, 幼虫(4~5齡期)인 경우에는 病蠶(또는 死體)를 絶開하여 1頭當 20cc의 生理 食鹽水로서 組織의 細胞內에 多角體를 유리시켜 脫脂綿으로 여과하여 1,000r.p.m에 10分間 遠心分離한 후, 浮游液을 0.5% Formalized-Sailin이 되게 하여 56°C의 water bath에 30分間 非動化한 것을 다음과 같은 方法으로 家兔耳의 靜脈에 注射하였다. 그런데 이때 抗原의 濃度는 Hemocytometer로 測定한 결과 多角體의 數가 約 10×10⁶ml에였다.

回數 單位量	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th
	1st	7th	14th	21th	28th	35th
單位 cc	1	2	3	4	5	bleeding

이렇게 接種完了 1週後 蜂동맥에서 全採血하여 室溫에서 2~3時間 放置한 후 냉장고에서 overnight시켜서 上層液(血清)을 얻어 1,000r.p.m에 10分間 遠心分離하여 抗-多角體 家兔血清으로 使用하였다.

그리고 形態學的인 面에서의 病原性을 檢討하기 위해서 Seller's Stain으로 染色하여 檢鏡한 후 사진으로 촬영하였다.

2) 稀 釋 劑

坪板凝集反應用 稀釋劑로서는 生理的 食鹽水(0.85%), 補體結合反應用 稀釋劑로는 Veronal緩衝食鹽水(VES)를 사용하였다. (Mayer 등 1948)이 緩衝液은 PH가 7.2되도록 Veronal 0.005M 緩衝液에 NaCl 0.145M, Ca⁺⁺과 Mg⁺⁺이 각각 0.00015M과 0.0005M이 되게 만들었다. 그 調劑는 아래와 같이 하였다.

- Sodium chloride.....84.75gm
- 5.5-diethyl barbituric acid(Merck)..... 6.40gm
- Sodium 5, 5-diethyl barbiturate(Merck)10.28gm
- Calcium chloride, dihydrate..... 0.22gm
- Magnesium chloride, hexahydrate 1.02gm

酸은 70°C내외로 加溫한 再蒸溜水 500ml에 먼저 용해시키고 25°C정도로 식힌 다음 다른 성분들을 용해시킨 溶液과 한데 混合하여 總容量이 2000ml가 되게 再蒸溜水を 넣었다. 이 原液은 2°C에 保存되었고 사용할때마다 再蒸溜수로 1:5가 되게 稀釋하였다. 쓰다 남은 溶液은 다음날에 다시 쓰지 않았다.

3) 綿羊赤血球

綿羊血液은 改良 Alsever溶液에(Bukantz 등 1946) 채취하여 2°C에 저장하면서 사용하였다. 改良 Alsever溶液은 다음과 같이 만들었다.

Glucose.....2.05gm
 Sodium citrate0.80gm
 Sodium chloride0.42gm
 Distilled water1,000ml

위의 용액을 Seitz 濾過器로 濾過滅菌한 다음 50ml용적의 병에 15ml씩 分注하여 2°C에 保存하였다. 血液을 채취할 때는 병에 담은 Alsever溶液 15ml중 5ml를 미리 20ml 注射器에 넣고 緬羊頸靜脈에서 無菌的으로 15ml의 血液을 채취하여 20ml되게 한 다음 병에 담아 全量이 30ml가 되게 하였다 이것을 다시 2°C에 保存하였으며 사용시에는 VBS로 1,000 rpm에서 10分間씩 3회이상 遠心沈澱하여 깨끗이 씻어진 赤血球를 4%가 되게 VBS로 稀釋하여 사용하였다.

4) 溶血素와 力價測定

溶血素인 抗緬羊赤血球家兔血清은 품인 緬羊赤血球抗原을 家兔에 高度로 免疫시켜 얻었다. (Rapp 1953) 赤血球抗原과 家兔免疫血清은 다음과 같이 만들었다.

緬羊血液 cl를 3.8% 枸橼酸소다염溶液 250ml에 잘 섞으면서 채취하였다. 이것을 脫脂綿에 濾過하여 不純物을 除去한 다음 遠心沈澱시켜 赤血球沈澱를 얻었으며 이 赤血球를 다시 冷却 生理的食鹽水로 한번 씻어 赤血球를 얻었다.

농축된 이 赤血球를 氷醋酸 4ml로 酸性化한 10l의 冷却蒸溜水에 서서히 가하면서 10分間 잘 휘젓고 2°C 냉장고에 하룻밤 放置하였다가 다음날 上清液은 버리고 침전된 赤血球成分만을 2000 rpm, 15分間 遠心沈澱하여 얻고, 冷却한 0.001M 醋酸鹽緩衝液(pH 5.0)으로 다시 5회에 걸쳐 씻었다. 이것을 마지막으로 0.15M 冷却食鹽水에 浮游시켜 4000rpm, 10分間 2회 씻어서 醋酸鹽을 除去한 다음 스크류型試驗管에 10ml씩 分注하여 70°C에서 60分間 끓였다. 이 품인 血球抗原을 2°C에 保存하면서 家兔免疫에 사용하였다. 赤血球抗原으로 家兔에 免疫接種 할 때는 다음과 같이 하였다.

第一日에는 0.1ml를 第2日부터 5日間은 매일 1ml를, 第7日부터 5日間은 매일 2ml를 家兔耳靜脈에 각각 注射하였다. 그리고 最終 注射日로부터 5일이 지난 第17日에 家兔心臟에서 全採血하여 免疫血清을 얻었다.

溶血素는 56°C에서 30分間 非働化한 다음 -60°C에 保存하였으며 短時日內에 쓸 溶血素는 0.2ml Kahn 피펫으로 10⁻² 되게 스크류型 試驗管에 稀釋하여 2°C에 保存하면서 사용하였다.

溶血素의 力價는 第II表에 준해서 측정하였으며 完全溶血을 띄우게 하는 溶血素의 最低稀釋度를 1單位로 하였다. 緬羊溶血系의 感作赤血球는 1.5單位 2%가 되게 하였다. 感作方法은 4% 赤血球와 3單位의 溶血素 同量을 각각 다른 비커에 담고 빠른 속도로 번갈아 부우면서 感作시켰다.

(表 2) Titration of Hemolysin

TUBE NUMBER	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A., 10 ⁻² , ML.	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
VBS, ML.	2.9	3.9	4.9	5.9	6.9	7.9	8.9	9.9			
A., DILUTION	$\frac{1}{3T}$	$\frac{1}{4T}$	$\frac{1}{5T}$	$\frac{1}{6T}$	$\frac{1}{7T}$	$\frac{1}{8T}$	$\frac{1}{9T}$	$\frac{1}{10T}$			
A., DILUTION	$\frac{1}{3T}$	$\frac{1}{4T}$	$\frac{1}{5T}$	$\frac{1}{6T}$	$\frac{1}{7T}$	$\frac{1}{8T}$	$\frac{1}{9T}$	$\frac{1}{10T}$	CONTROL		
A., ML	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0
SHEEP E., 4%, ML.	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
GPC, 1/25, ML.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0
VBS, ML.	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.6	0.7

37°C., 30 minutes incubation.

5) 기니퓰 補體와 力價測定

補體로 사용한 기니퓰血清은 최소 5마리의 成熟한 기니퓰血液에서 新鮮하게 分離하였다. 血液은 20페이지 1인치의 注射針을 사용한 10ml 注射器로 기니퓰心臟에서 5ml씩 採血하였다. 이 血液을 곧 試驗管에 斜面狀態로 凝固시켰고 室溫과 2°C 冷藏庫에서 각각 2時間씩 放置한 다음 血清을 分離하였다. 分離된 血清을 1,500 rpm, 10分間 遠心分離하여 1.2ml씩 試驗管에 分注하였다. 이 血清을 -60°C에 保存하면서 補體로 사용했으며 일단 녹여서 쓰다남은 補體는 다시 사용하지 않았다. 기니퓰補體의 力價는 第II表와 같이 測定하였으며 1.5單位 2%의 感作綿羊赤血球을 完全히 溶血시킨 補體의 最小量을 1正確單位로 하였다. 本實驗에는 2正確單位의 기니퓰補體를 사용하였다.

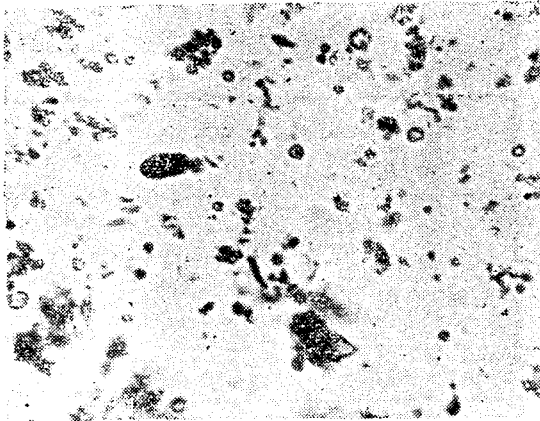
III. 試驗結果

1. 形態學的인 面에서의 病原性檢討

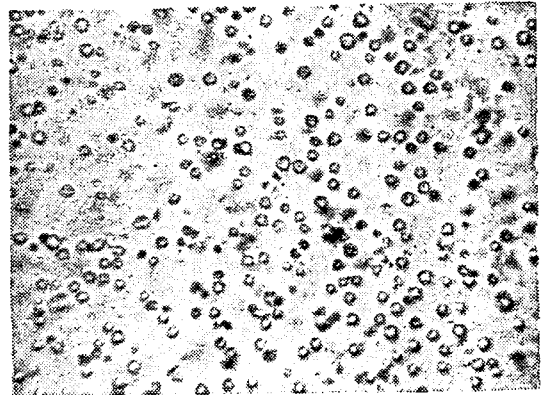
上述한 方法으로 病原體를 유리하여 染色한 후 顯微鏡을 통하여 사진촬영을 한 결과 사진에서 보는 바와 같이 전부가 Virus의 封入體인 多角體임이 判明되었다. (1966年)

2. 坪板凝集反應

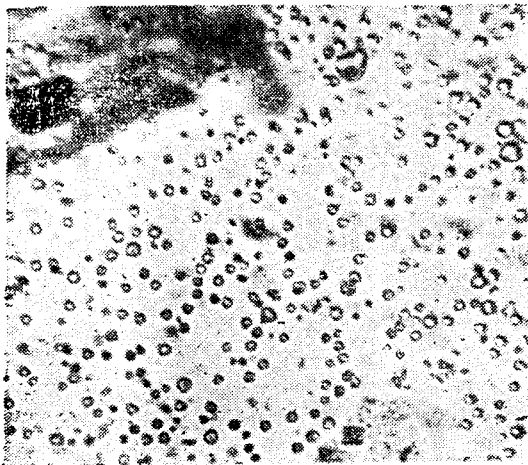
表 3과 4에서 보는바와 같이 抗多角體家兔血清과 抗原과의 坪板凝集反應은 抗原 1/8희석농도에서도 잘 나타나고 있다.



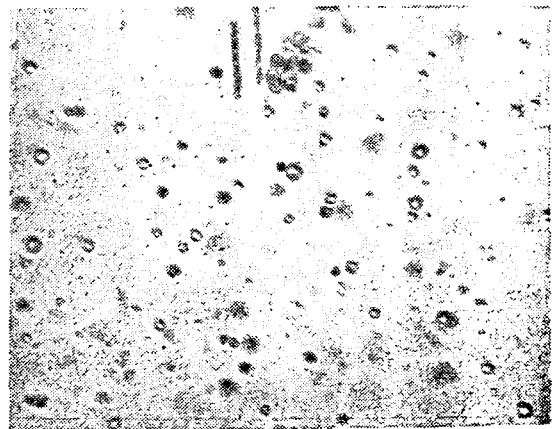
組織과 混合되어 있는 多角體(20×40)
——충북 제천군 제천읍 흑석리——



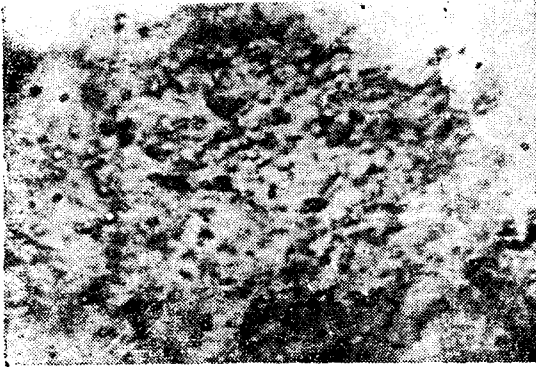
多角體 (20×40) ——충북 제천군 모산리——



多 角 體 (20×40)
——경기도 양주군 화전면 금남리——



多角體의 組織(20×40)
——강원도 원성군 소조면 이관리(第1)——

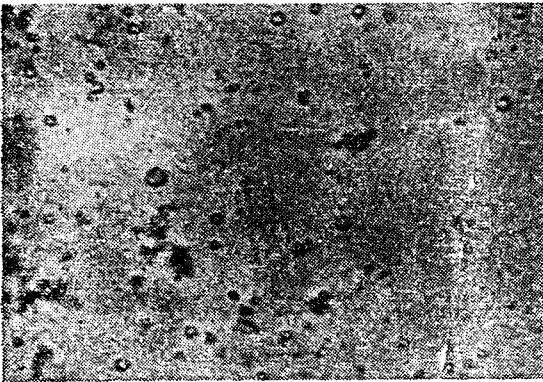


組織과 混合되어 있는 多角體(20×40)
—강원도 순성군 서면 방동1구(第1)—



組織과 混合되어 있는 多角體(20×40)
—강원도 순성군 서면 방동1구(第2)—

〈表 3〉 坪權凝集反應結果(Result of Rapid Agglutination test)



組織과 混合되어 있는 多角體(20×40)
—경기도 광주군 칠천면 오향리(第2)—

家兔 No.	抗一多角體家兔血清 (Anti-polyhedral rabbit serum)		抗一健康柞蠶血液家兔血清 (Anti-healthy blood rabbit serum)		Normal rabbit serum
	#1	#2	#1	#2	
抗原(Antigen)					
膿柞蠶(蛹)의 血液 (Infected pupa blood)	++	++	-	-	-
健康柞蠶(蛹)의 血液 (Healthy pupa blood)	-	-	+	+	-

註: ≡(4plus).....Complete fixation
 ≡(3plus).....25% hemolysis
 ≡(2plus).....50% hemolysis
 +(1plus).....75% hemolysis
 -(1Negative or 0) ...complete hemolysis:

〈表 4〉 坪板凝集反應結果(Reult of Rapid Agglutination test)

抗原濃度(Density of antigen)	家兔血清 (Serum) 家兔 No.	抗一多角體家兔血清 (Anti-polyhedral rabbit serum)		抗健康柞蠶血液家兔血清 (Anti-healthy blood rabbit serum)		Normal Rabbit Serum
		# 1	# 2	# 1	# 2	
1/1	膿柞蠶(幼虫)의 血液 (Infected larval blood)	++++	++++	-	-	-
	健康柞蠶(幼虫)의 血液 (Healthy larval blood)	-	-	++++	++++	-
1/2	膿柞蠶의 血液 (Infected larval blood)	++++	++++	-	-	-
	健康柞蠶의 血液 (Healthy larval blood)	-	-	++++	-	-
1/4	膿柞蠶의 血液 (Infected larval blood)	++++	++++	-	-	-
	健康柞蠶의 血液 (Healthy larval blood)	-	-	-	-	-
1/8	膿柞蠶의 血液 (Infected larval blood)	++++	++++	-	-	-
	健康兔蠶의 血液 (Healthy larval blood)	-	-	-	-	-

그리고 坪板凝集反應을 할 때 抗原 1/에 1% gentian violet 2cc와 1% brilliant green 4cc를 첨가한 후 坪板凝集反應을 行하면 그 反應이 푸른색으로 染色이 되어 明確히 區別을 할 수가 있다.

3. 補體結合反應(Complement fixation test)

補體結合反應은 抗原 0.2ml, 抗一多角體家兔血清(Anti-polyhedra rabbit serum), 기니피그補體(Guineapig Complement)를 0.2ml식 混合해서 37°C의 water bath에 1時間 處理한 후 감작면양혈구(Sensitized sheep erythrocytes)을 더 加하여 다시 37°C에 30分間 處理한 結果는 表 5,6에서 보는 바와 같다.

〈表 5〉 補體結合反應의 結果 (Result of Complement Fixation Test)

抗原 (Antigen)	血清 (Serum)	家兔 No	抗一家兔血清의 희석 정도 (Anti-rabbit serum dilution)					
			1/8	1/10	1/32	1/64	Ag-cont	
膿炸蠶(蛹)의 血清 (Infected pupa blood)	抗一多角體家兔血清 (Anti-polyhedra rabbit serum)	#1	4	4	4	4	0	
		#2	4	4	4	4	0	
		#3	4	4	4	4	0	
	(1/200)	抗一健康炸蠶血清家兔血清 (Anti-healthy blood rabbit serum)	#1	0	0	0	0	0
			#2	0	0	0	0	0
		正常家兔血清 (Normal rabbit serum)		0	0	0	0	0

〈表 6〉 補體結合反應의 結果 (Result of Complement Fixation Test)

抗原 (Antigen)	血清 (Serum)	家兔 No	抗一家兔血清의 희석 정도 (Anti-rabbit serum dilution)					
			1/8	1/16	1/32	1/64	Ag-cont	
健康炸蠶(蛹)의 血清 (Healthy pupa blood)	抗一多角體家兔血清 (Anti-polyhedra rabbit serum)	#1	0	0	0	0	0	
		#2	0	0	0	0	0	
		#3	0	0	0	0	0	
	(1/200)	抗一健康炸蠶血清家兔血清 (Anti-healthy larval rabbit serum)	#1	3	1	0	0	0
			#2	3	1	0	0	0
		正常家兔血清 (Normal rabbit serum)		0	0	0	0	0

IV. 考 察

이 實驗은 一次, 二次로 나누어서 行하였는데, 一次實驗에서는 抗原인 多角體의 濃度を 測定치 아니하였는데 二次實驗에서는 抗原의 濃度を 測定하여 多角體가 2×10^6 /ml개리는 것을 알고서 本實驗을 始作했다. 그런데 本實驗을 行하는데 重要한 것은 膿炸蠶의 死體로부터 多角體를 순수하게 유리시키는 것인데 本實驗에서 볼 때 幼虫인 경우에는 膿炸蠶를 絶開해서 生理的 食鹽水로 세척하여 얻은 부유액을 1,000r.p.m에서 10分間 遠心分類하여 침전물은 제거한 후 上層液을 使用하는 것이 第一 좋았다. 그런데 抗多角體家兔血清學의 力價를 높이기 위해서는 적은 量의 生理的 食鹽水로서 多角體를 유리 시켜야 한다.

그리고 坪板凝集反應에 있어서 第一次實驗成績을 檢討해 보면 모든 抗一多角體家兔血清에 對한 抗原, 膿炸蠶(蛹)의 血液과의 反應에서는 모두 4plus(卍)로 잘 나타났으며, 모든 抗一健康炸蠶血液家兔血清에 對한 膿炸蠶(蛹)의 血液과의 反應은 Negative로 좋은 結果를 보이고 있으나 健康炸蠶(蛹)의 血液과의 反應은 1plus(+)로서 그리 좋은 結果를 얻지 못하였다. 그러나 우리가 利用하려고 하는 것은 抗一多角體家兔血清과 膿炸蠶血液과의 反應이기 때문에 이것은 無關한다고 생각할 수 있다.

第二次實驗에 있어서는 모든(Rabbit No #1, 2) 抗一多角體家兔血清에 對하여 膿炸蠶(幼虫)과 健康炸蠶의 血液(抗原) 1/에서부터 1/8까지 전부 4 plus(卍)와 Negative로 各各 좋은 結果를 보이는데 反해서 抗一健康炸蠶血液家兔血清에 對해서 健康炸蠶血液(抗原)이 濃度 1/까지는 4 plus로 잘 나타나고 있으나 1/2서부터는 전부 4 plus로 나타나지 않고 있다. 그러나 이것은 本實驗의 目的과는 多少無關하며 坪板凝集反應에서 重要한 것은 抗原에 濃度を 높여서 抗原의 濃度가 高度인 경우에도 反應이 쉽게 일어나게 할 수 있는 것이다.

補體結合反應에 있어서는 抗一多角體家兔血清과 抗一健康炸蠶血液家兔血清에 對한 膿炸蠶(蛹)의 血液(抗原)과의 反應이 前者의 경우에는 전부 4 plus, 後者에 경우에는 전부 Negative로 나타났다. 그리고 抗一多角體家兔血清에 對한 健康炸蠶(蛹)의 血液과의 反應은 전부 Negative였으나 抗一健康炸蠶血液家兔血清과의 反應은 抗一血清濃 1/8에서 plus, 1/16濃度에서 1 plus 1/32濃度 및 下에서는 전부 Negative로 나타났다.

따라서 多角體를 形成치 않는 Virus인 경우에도 坪板凝集反應 및 補體結合反應으로 正確한 診斷이 可能하다고 본다.

V. 結 論

이 研究에서 얻은 다음과 같은 새로운 實驗結果를 要約記述한다.

- 1) 1965年 秋期에 전국적으로 發生한 柞蠶病의 病原體는 Virus封體인 多角體이다.
- 2) 柞蠶膿病의 多角體는 Seller's skin으로 보라색으로 染色된다.
- 3) 多角體의 순수유리를 위한 比較遠心分離에서 1,000r.p.m에 10分間이 最適이었다.
- 4) 坪板凝集反應 및 補體結合反應이 可能하다.
- 5) 抗原濃도를 2×10^6 /ml로 한 抗-多角家兔血清의 坪板凝集反應에서는 抗原의 濃도를 1/8까지 희석해도 그 反應이 일어난다.

VI. 文 獻

- Bankowdki R. A., Wichmann, R., and Kummer, M. ;
Fixation Test for Identification and Differentiation of Immunological Types of the Virus of Vesicular Exanthema of Swine. Am. A. Vet Res., (1953); 14, 145
- Buntz, S.C., Rein, C. K., and Keut, J.S. ;
Studies in Omplement fixation. II. Preservation of Sheep's Bllod in Citrate Dextrose Mixtures (Modofood Slsever's Solution) for Use in the Complement Fixation. J. Lab. Clin. Med., (1946); 31, 394
- Jeon, Y.S. ;
Modified Complement Fixation Test of Avian Infectious Brochitis Virus. Thesis Submitted to the Graduate School of the University of Minnesota. (1962)
- Mayer, M.M. ;
Kabat and Mayer's Experimental Immunechemistry. C. C. Thomas Publisher, Springfield, III., (1961)
- Pillemer, L., and Dcker, E.E., Ondley, J. l, and Cohn, E. J. ;
The Preperation and Physicochemical Characterization of the Serum Protein Components of Complement. J. Exp. Med., (1941); 74, 297
- Rapp, J. J. ;
Purification and Immunochemical Characterization of the Heat Stable, Alcohol-soluble Hemolytic Antibody Inhibitor of the Sheep Erythrocytes. Thesis Submitted to the School of Hygiene and Public health, the Johns Hopkin University. (1953)
- Rice, C.E., and Mckercher, P.D. : The Use of the Complement fixation Test in the Study and Diagnosis of Viral Diseases in Man and Animals-A review. Canad. J. Comp. Med., (1960): 24, 126, 154, 204.
- Rice, C.E. The use of the Complement-fixation test in the study and Diagnosis of Viral Disease in Man and Animals-Areview, and. J. comp, Med. (1960) :25, 34, 74, 151.
- 河野幹雄 膿病蠶의 血球에 관한 연구 日蠶雜6(1) : 35
- 鮎澤啓夫 (1952) : 家蠶體液 膿汁遠心上清液 및 多角體의 免疫學的血清學的 性狀에 關하여 2.3의 觀察, 蠶糸 연구 (1):43~53,
- 鮎澤啓夫 (1953e, 1954 b) : 家蠶膿病 Viru의 免疫學 血清學的 反應 (II) 多角體 凝集反應에 對하여. 日蠶雜 22(3):109