

牛氣腫疽에 대한 豫防藥과 抗血清의 檢定을 위한 研究

農村振興廳 家畜衛生研究所

金 東 成

I. 結 論

氣腫疽菌의 感染 및 免疫實驗에 대하여서는 오래전부터 많은 研究가 발표되었으나 氣腫疽菌의 菌力測定에 필요한 感染實驗과 氣腫疽菌에 대한 抗血清이나 豫防藥 効力등의 檢定實驗에는 기니픽을 사용하여 왔다. 왜냐하면 여러 實驗動物은 氣腫疽菌에 대한 感受性이 없거나 심히 약해서 거이 사용하지 않았다. 즉 氣腫疽菌의 感染에 있어 Goss와 Barbarin(1921)은 氣腫疽菌 培養菌液 0.05~0.1ml을 기니픽에 接種함으로써 豚사함을 보았으나 마우스에 있어서는 0.5ml을 接種함으로써 豚사함을 보고하였고 냇트는 感受性이 더욱 약하다고 하였다. 杉村와 近藤(1940)는 氣腫疽菌에 感受性이 높은 기니픽에 있어서도 接種經路에 따라 뚜렷한 感染차이를 볼수 있었다고 하였다. 그리고 氣腫疽菌의 產生毒素 證明實驗에 있어서 McEwen(1926)은 기니픽 家兔 및 綿羊의 靜脈內接種으로서는 毒性을 증명할 수 없었으나 내장의 皮下接種으로서 症狀을 볼수 있었다고 하였다.

Heller(1920)는 氣腫疽菌 分離菌株에 대한 病原性을 조사한바 기니픽에 病原性이 強하며 家兔에 대한 病原性은 없었으나 그중 두개의 分離菌株에 있어서는 家兔에 病原性을 가진 菌株을 확인한바 있다. 이밖에도 氣腫疽菌에 感受性이 없는 蛙에 있어서도 22°C의 수중에 서는 氣腫疽菌에 感染한다는 사실은 알려져 있다.

森田(1926)는 氣腫疽菌 培養濾液과 加熱한 芽胞菌液과 의 混合接種으로서 接種芽胞菌의 體內에 있어 發芽增殖을 용의하게 하여 毒力增加를 촉진한다고 하였다.

그러나 接種菌의 接種經路, 接種物의 조건등에 따라서 기니픽 이외의 동물도 氣腫疽菌에 대하여 높은 感受性을 보여줄수 있을 것이며 이와 같은 사실은 氣腫疽菌 이외의 다른 細菌에서도 잘 알려져 있다.

飯塚와 近藤(1932)는 炭疽菌의 마우스 感染實驗에서 感

染經路가 豚사率에 뚜렷한 차이를 가져왔다고 하였으며 Robertson(1920)은 惡性水腫菌의 毒素 證明에 있어서 家兔의 靜脈內接種이 가장 예민하다고 하였다. Stillman과 Schulz(1940)는 肺炎菌의 菌型에 있어 接種經路에 따라 感受性에 차이가 있으나 接種動物에 알콜을 腹腔內接種하는 前處置로서 接種菌의 毒力증가를 보았고 接種經路에 의한 感受性 차이를 보지 못하였다고 하였다. 이와같은 方法으로서 山田(1942)는 마우스에 알콜을 長期投與함으로써 炭疽菌에 대한 感受性을 높여 주었다.

動物의 細菌感染을 증가하는 方法으로서 Nungester(1932)가 菌液에 Mucin을 가하여 接種하는 方法을 발표한 이래 각종 細菌의 感染實驗에 응용하는등 여러 방면에 이용되었으며 McLeod(1941)는 Mucin이 髓膜炎菌에 미치는 影響을 조사한바 있고 그후 加賀(1956)는 같은 목적으로 卵黃液을 接種菌에 첨가함으로써 Mucin과 같이 感染增強작용이 있음을 알게되었다. 이와같은 實驗으로서 高田(1947)는 惡性水腫菌의 動物感染에 있어 接種菌에 粘土 및 수종의 약품을 첨가하여 洗滌芽胞菌의 毒力を 높였으며 大澤(1942)는 두種의 Hetroxin系 物質을 사용하여 炭疽菌 芽胞의 發芽를 촉진시켰다. 木村(1942)는 Cl. Perfringens A型菌을 洗滌하여 얻은 菌體를 많은 針傷을 입힌 기니픽에 接種함으로써 Cl. Perfringens의 感染力을 增進시켰다.

Russell(1927)은 破傷風菌芽胞를 기니픽接種에 있어 滅菌土壤 및 鹽化칼슘水溶液등을 사용하여 接種部位에 壞瘍을 일으킨 곳에서는 芽胞의 發芽가 촉진된다고 하였으며 Fildes(1927)는 破傷風菌芽胞를 기니픽의 結縛한 藥丸에 接種하여 染感力을 증가시켰다고 하였다.

氣腫疽抗血清의 力價測定에 있어 Goss와 Barbarin 그리고 Haines(1921)는 馬에서 얻은 氣腫疽血清의 力價測定에 기니픽을 사용하였고 Jungherr(1928)도 抗血

本論文은 第1回 大韓獸醫學會에서 發表하였음. (1957)

清價測定에 기니픽을 사용하였는데 抗血清을 接種하고 17時間 후에 培養菌液으로 攻擊하였다. McEwen과 Roberts(1932)는 氣腫疽馬血清을 綿羊, 기니픽 및 마우스를 사용하여 檢定하였으며 이때 菌培養液의 皮下攻擊으로서의 대량의 攻擊量이 필요하였고 對照群의 폐사가 일정하지 못함을 말하여 주었다. 이와같은 사실은 梅津(1937)도 기니픽의 個體差에 의하여 攻擊力에 動搖가 심하여 기니픽의 이용도가 있음을 말하였다.

이와같이 攻擊力의 動搖를 억제하기 위하여 Robertson과 Fellx(1930)는 惡性水腫抗血清價의 測定에 마우스 및 기니픽을 사용하였고 攻擊에는 3%鹽化칼슘芽胞菌液으로 공격하였으며 北田과 八木(1935)는 炭疽抗血清價의 測定에 抗血清接種 24時間후에 공격하였다. 北田과 田淵(1935)는 豚疫免疫血清價의 測定에 마우스를 사용하여 높은 感染防禦力을 얻었고 공격은 免疫血清 接種後 24시간에 攻擊接種하였다.

氣腫疽豫防藥檢定에 있어서도 기니픽을 사용한 豫防藥檢定の 결과가 불안정함을 研究者間에 경험하여 각종의 實驗을 실시하였다. McEwen(1926)은 氣腫疽豫防藥檢定에 있어서 豫防藥接種 3週日후에 培養菌液을 공격할때 對照 기니픽의 폐사율이 일정치 않은 반면에 綿羊의 경우는 그렇지 않았다. 昆野와 橋本(1934)는 氣腫疽培養菌液의 致死量은 動物의 個體에 따라 菌力의 動搖가 심하여 많은 供試數와 大量接種을 필요로 하였다. 奧田(1929)는 氣腫疽菌의 毒素은 이것을 기니픽의 靜脈內에 接種할때 皮下接種에 비교하여 소량으로써 폐사하나 마우스는 거의 感受性이 없다 하였고 抗體產生은 靜脈內接種보다 皮下接種이 免疫原性を 높여 준다고 하였다. Henderson(1932)과 Roberts(1933)는 氣腫疽豫防藥檢定에 있어서 芽胞菌液에 鹽化칼슘水溶液을 加하여 공격적으로 사용함으로써 기니픽의 폐사가 일정하게 되었다고 하였다.

그후 Roberts(1946)도 氣腫疽 Formalin 死菌豫防藥과 Pellet豫防藥과의 力價를 기니픽에서 비교 實驗하였는데 공격군에는 5%鹽化칼슘水溶液을 混合 사용하였다

Breed(1937)는 氣腫疽와 惡性水腫混合豫防藥의 檢定에 仔羊을 사용하여 免疫 3週日후에 培養菌液으로서 공격하였다. Ryff와 Lee(1947)는 氣腫疽豫防藥의 効力檢定에 사용되는 기니픽은 年齒이 어린것이 양호하다고 하였으며 랩스타는 感受性이 약해서 좋지 않음을 시사하였다. 그의 Scott(1923, 1938)의 人工 Aggressin과 培養菌液의 검정을 거쳐 Danielson(1950), Quin(1953), 그리고 Vewter(1942)등의 實驗보고에 뒤이어 Buddle(1954)은 氣腫疽豫防藥의 効力檢定에 기니픽 대신에 綿羊을 使用하여 培養菌液으로 공격接種함으로써

좋은 성적을 얻었다.

이와같이 기니픽을 사용할 경우 공격菌力에 動搖가 있는 것은 공격菌側보다 動物側에 있는 것으로 보는데 거의 모든 사람이 의견을 일치하고 있다. 마우스는 氣腫疽菌에 感受性이 심히 약해서 培養菌의 大量接種으로 폐사하기 때문에 마우스를 이용한 菌分離, 菌力測定, 豫防藥 및 抗血清檢定은 이루어져 있지 않고 있다. 그러나 感染조건을 달리함으로써 氣腫疽菌의 微量接種으로서도 마우스를 感染폐사시킬 가능성이 보이기에 이를 究明하기 위하여 이 實驗을 하였다. 氣腫疽菌이 마우스에서 보다 쉽게 感染폐사를 성립시킬 수 있다면 종래의 氣腫疽豫防藥과 抗血清의 効力檢定에 기니픽을 사용하는 번거로움과 경제적부담을 덜 수 있을 것이다. 즉 기니픽이 지니는 개체에 따라 공격독의 毒力에 動搖가 심하며 菌의 大量接種과 많은 供試數를 필요로 하는 예로 없을 것임을 할 수 있을 것이다.

1. 材料 및 方法

供試菌株 : 供試動物에 感染實驗, 菌力測定, 氣腫疽豫防藥製造등에 사용하였다. 供試菌株는 家畜衛生研究所에 保存中인 氣腫疽 强毒菌 7株(靑川, 報恩, 晋陽, 北海道, 冲繩, 朝鮮, 449)와 弱毒菌株를 사용하였으며 이 밖에도 惡性水腫菌 5株(居昌, 北研, 吳聖福, 長崎, Pig 38) 破傷風菌, Cl. Novyi, Cl. Amylobactor, Cl. Putrificus, Cl. biferments, Cl. Sporogenes. 및 Cl. Hystoriticus등을 사용하였다.

試供菌液 : 培養菌液은 마우스 腦內接種 및 血液을 첨가하여 皮下感染實驗과 공격군으로서 사용하였고 芽胞菌液은 鹽化칼슘水溶液을 첨가하여 皮下感染 및 공격의 목적으로 사용하였다.

모든 供試菌은 肝片加肝臟肉汁培地에 37°C에서 培養한 것을 사용하였으며 일반목적을 위한 菌液은 24~48時間 培養한 것을 그리고 芽胞菌液은 2~3日間 培養한 후 다시 3週日間 室溫에 放置하였다가 다음과같이 集菌하여 實驗에 사용하였다. 즉 全培養菌液을 遠心沈澱하여 上清을 제거한후 沈澱菌塊에 生理的食鹽水를 加하여 충분히 攪拌하고 다시 遠心沈澱하되 이 조각을 3回 반복하였다. 이것을 70°C에서 30分間 加熱하고 40% Glycerin水로 原容量이 되도록 稀釋하여 芽胞菌浮遊液을 만들어 冷장庫에 保存하고 이것을 感染材料로 사용하였다.

實驗動物 : 氣腫疽菌의 感染實驗, 菌力測定, 抗血清 및 豫防藥의 効力測定에 사용하였으며 이밖에도 惡性水腫菌 및 기타 供試菌등의 感染實驗에 사용하였다.

實驗動物로는 體重 10~15gm의 마우스를 비롯하여

體重 250~600gm의 기니픽, 體重 30~60gm의 랫트 그리고 犢牛를 사용하였다. 그런데 犢牛는 市場에서 구입한 것을 그리고 나머지 動物은 家畜衛生研究所에서 사육된 것을 사용하였다.

供試血液: 氣腫疽菌의 마우스 및 랫트의 皮下感染試驗에 있어서 培養菌과 혼합하여 感染力의 增強을 촉진 할려는 목적으로 사용하였다.

供試動物의 혈액은 全血液, 血清 및 赤血球로 구분하여 사용하였다. 여기에 供試된 血液源은 馬, 犢牛, 綿羊, 豚, 犬, 家獺, 기니픽, 오리 및 鷄 등으로 하였다. 혈액은 無菌의으로 脫纖維血液을 採血하여 金網으로 濾過한 후 遠心分離하여 血清을 分離하였고 赤血球는 生理的食鹽水로 3回洗滌한 후 原容量에 復歸하여 사용하였다. 그밖에도 인체용(日本製品) 血漿을 供試하였다

鹽化칼슘水溶液: 氣腫疽菌 그의 供試菌의 芽胞液의 마우스 및 랫트 皮下接種으로서 感染力의 增強을 촉진하여 菌力의 動搖를 막아 殺사율을 일정하게 할려는 목적으로 사용하였다.

供試 鹽化칼슘水溶液은 2%鹽化칼슘水溶液을 증류수로 만들어 이것을 高壓滅菌하여 두었다가 사용할때마다 接種菌의 稀釋劑로 하였다.

氣腫疽抗血清: 氣腫疽의 治療用高度免疫牛血清으로서 이 抗血清의 力價測定에 기니픽 대신에 마우스를 사용한 實驗에 사용하였다. 供試 抗血清은 成牛에 氣腫疽豫防藥으로 免疫接種을 시작하여 점차 少量의 強毒菌의 皮下接種으로 高度로 免疫된 抗血清이다. 採血時마다 少量의 強毒菌을 再接種하여 2~3週日후에 採血하여 만들어진 抗血清이다.

氣腫疽豫防藥: 氣腫疽生菌豫防藥 및 氣腫疽 Formalin 死菌豫防藥으로서 豫防藥의 効力測定에 기니픽 대신에 마우스를 사용하기 위한 實驗에 사용하였다.

氣腫疽生菌豫防藥은 肝片加肉汁培地에 弱毒菌을 接種하여 37°C에서 2~3日間 培養하고 培養菌液을 金網으로 濾過하여 트로루를 1%比率로 加하여 제조한 것이다.

氣腫疽死菌豫防藥은 肝片加肉汁培地에 強毒菌을 接種하여 37°C에서 7~10日間 培養하고 그 培養菌液에 1%比率로 ホル마린을 加하여 다시 37°C에서 24~48時間 방치하여 芽胞를 死滅시킨후 金網으로 濾過하여 제조한 것이다.

感染實驗: 마우스의 感染實驗에 있어서 腦內接種은 培養菌液을 生理的食鹽水에 稀釋하여 0.03ml을 接種하였다. 皮下接種의 경우에는 동물혈액으로 培養菌液을 稀釋하여 0.5ml을 皮下에 接種하였다. 2% 칼슘液으로는 芽胞菌液을 稀釋하여 0.25ml을 皮下接種하였다. 기니픽 및 랫트의 感染實驗에 있어서는 마우스의 경우처럼 血液稀釋菌은 1.0ml을 칼슘液 稀釋菌은 0.5ml~1.0

ml을 皮下接種하였다.

免疫 및 攻撃: 免疫接種후 所定에 致死量의 공격에 耐過生存率을 보아 免疫完成에 필요한 期間, 接種量 및 接種方法등이 免疫形成에 미치는 影響과 공격방법에 의한 耐過率에 미치는 關係를 알고저 한 것이다.

마우스는 皮下에 0.5ml의 抗血清을 接種하고 豫防藥接種은 腦內에 0.03ml을 그리고 皮下에 0.5~1.0ml을 1回 또는 2回로 나누어 接種하였다. 랫트 및 기니픽에서는 豫防藥을 皮下에 1.0ml을 接種하여 免疫하였다. 免疫 마우스에 대한 腦內攻撃과 皮下攻撃은 자료와 방법에 있어서 感染實驗과 같이 하였다. 免疫 기니픽과 랫트에 대한 공격도 感染實驗의 경우와 동일한 재료와 방법을 적용하였다.

II. 實驗成績

1. 氣腫疽菌의 마우스 感染實驗

가. 氣腫疽菌의 마우스 腦內感染實驗

(1) 接種徑路가 感染에 미치는 影響

氣腫疽豫防藥과 抗血清의 檢定에 종래부터 사용되어 오던 기니픽 대신에 마우스를 사용할 경우 高價의 동물 공급에 곤란을 받았고 대량의 공격균이 소요되었으며 기니픽에 대한 공격균의 菌力動搖가 자저 實驗結果의 判정에 곤란을 가져온 난결과 동물관리등에 많은 불편의 해결이 가능하지 않을까 하여 다음과 같은 實驗을 하였다.

Table 1. Infection of C1. chauvoei in Mice by Different Route of Inoculation.

Reciprocal dilution of culture	Route of inoculation*				
	i. c 0.03ml	s. c 0.2	i. m 0.2	i. v 0.2	i. p
10, 240	0/10**				
5, 120	8/10				
2, 560	10/10				
1, 280	10/10				
640	10/10				
320	10/10				
160	10/10	6/10	0/10		
80	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10
40	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10
20	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10
10	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Undiluted	—	8/10	8/10	—	12/20

* i. c-Intracerebral. s. c-Subcutaneous.
i. m-Intramuscular. i. v-Intraveonus.
i. p-Intraperitoneal.

** : No. of death/inoculated.

氣腫疽菌 青川株를 肝片加肝臟肉汁培地에서 37°C 48時間 培養한 培養菌液을 生理的食鹽水로 第1表와 같이

稀釋하여 體重 10~12gm 마우스의 腦內, 皮下, 筋肉內 靜脈內 및 腹腔內에 각각 接種하여 7日間 觀察하였다. 이 實驗成績은 第1表와 같아 즉 마우스 接種群에 있어서는 腦內에 接種할 경우 菌液을 5, 120倍로 稀釋하더라도 80%의 폐사율을 보였고 2, 560倍 이하에서는 100%의 폐사율을 갖어왔다. 이에 反하여 皮下, 腹腔內 및 筋肉內 接種에서는 培養 原液菌을 接種할 경우에 한해서 皮下 接種群에서 80%, 腹腔內 接種群에서 60%, 筋肉內 接種群에서 80%의 폐사율을 갖어왔다.

즉 不感受性으로 인정되어온 마우스에 있어서도 대량의 培養菌을 皮下, 筋肉內 및 腹腔內 接種할 경우 폐사를 볼 수 있었으나 腦內 接種으로서는 微量의 菌 接種으로도 높은 폐사율을 초래하는 결과를 얻었다. 氣腫疽菌의 마우스 感染은 接種經路에 따라 뚜렷한 차이를 보였으며 腦內 接種이 다른 接種經路에 비교하여 感染力이 높다는 사실을 알게 되었다. 즉 氣腫疽菌의 皮下 接種으로 마우스를 感染致死시킬 수 없는 微量의 菌으로도 높은 폐사율을 갖어오며 개체차의 影響도 받지 않는 均功격이 가능한 방법을 알게 되었다. 이와같이 氣腫疽菌의 接種經路에 따라 感染力의 차이가 있는 것은 菌의 組織親和성에 基因한 것으로 보며 腦內 接種의 경우 微量의 菌 接種으로도 菌 增殖이 촉진되어 感染이 명확한 發病까지 진진하는 것으로 본다. 皮下 接種으로서는 培養菌液 10倍 稀釋에 있어서도 폐사를 이루지 못함은 마우스 體內에 氣腫疽菌의 發育阻止因子 등으로 菌의 增殖에 부적당한 환경에 있는 것으로 보며 또한 皮下에 接種한 菌은 腦內에서 菌 증명이 불가능하나 腦內 接種 마우스는 全臟器에서 菌 증명이 가능한 것으로 보아 腦內 接種 菌은 Blood-brain barrier의 人工的 除去狀態에서 腦에 直接作用을

받아 感染力이 증가된 것으로 본다. 그리고 奥田(1929)에 의하면 本菌毒素은 기니픽의 筋肉에 Histolysis를 일으키나 마우스 筋肉에 있어서는 Histolysis를 이르지 않는다고 하였다. 즉 마우스가 氣腫疽菌에 感受성이 弱한 것은 Host-species에 기인한 것으로 보나 接種經路에 따라서는 이와같은 Host-species와는 關聯없이 Histo-toxin 感染力을 가져오게 하는 하나의 원인이 되는 것이 아닌가 생각된다.

(2) 菌株가 感染에 미치는 影響

氣腫疽菌을 마우스의 腦內에 接種하면 높은 폐사율을 초래할 수 있었기에 本實驗에서는 腦內 接種方法에 의하여 菌株間의 毒力을 비교하였다. 氣腫疽菌의 여러 菌株의 毒力을 비교함은 氣腫疽豫防藥이나 治療血清의 檢定에 필요한 基準의 하나를 定하는데 있다. 바꾸어 말해서 菌株間의 毒力差異는 均功격의 標準化를 비롯한 여러 術式이 規定되어야 하기 때문이다.

實驗方法은 진술한 腦內 接種에 準하고 氣腫疽弱毒菌은 肝片加肝臟肉汁培養地에서 37°C 2日間 培養한 培養菌을 血液寒天平板에 分離培養하여 5個의 集落을 無作爲로 선택한 分離菌을 2R-1, 2R-2, 2R-4, 2-1, 2-4로 分離하여 사용하였다. 供試菌株로는 靑川株, 晉陽株, 報恩株, 449號株 및 弱毒菌株를 사용하였다. 實驗結果는 第2表와 같이 靑川株群은 5, 120倍에서 83%, 晉陽株群은 33%, 報恩株群은 67%, 449號株群에서는 2, 560倍에서 83%의 폐사율을 가져왔으며 弱毒菌에 있어서는 接種全例가 生存하였다. 또한 氣腫疽菌 菌株間의 毒力은 靑川株가 가장 強함을 알게 되었고 弱毒菌은 腦內 接種으로도 마우스의 感染폐사는 불가능하였다.

Table 2. Comparison of Different Strain of *Cl. chauvoei* on Mice Virulence.

Reciprocal dilution of culuter	Strains									
	Chungchun	Jinyang	Boeyn	449	2R-1	2R-2	2R-4	2-1	2-4	
10, 240	0/6*	0/6	6/6	0/6						
5, 120	5/6	2/6	4/6	0/6						
2, 560	6/6	6/6	6/6	5/6						
1, 280	6/6	6/6	6/6	6/6						
640	6/6	6/6	6/6	6/6						
320	6/6	6/6	6/6	6/6						
50					6/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
10					0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
5					0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	

*: No. of death/inoculated.

(3) 培養時間이 感染에 미치는 影響

氣腫疽菌의 마우스 腦內接種에 있어 培養時間이 菌力에 미치는 影響을 알고저 實驗하였다. 즉 培養時間에 따라 菌力의 動搖를 알게 됨으로서 腦內接種에 있어서 공격균의 菌力을 標準化하려는 것이다. 實驗方法은 진술한 腦內接種 實驗에 準하고 氣腫疽菌 靑川株를 肝片加肝臟肉汁培地에서 37°C 1~5日間 培養한 培養菌液을 第3表와 같이 稀釋하여 실시하였다.

實驗成績은 第3表와 같이 培養 1~2일의 培養菌에 있어 5,120배에서 100%의 폐사율을 보여주었으나 培養時間의 경과에 따라 菌力이 저하되었다. 즉 氣腫疽菌의 毒素產生은 菌體의 발육 증식과 같이 頂點에 達하여 점차 그 毒力이 감속하여 時間의 경과에 따라 無毒化되는 것으로 보았다. 이와같은 實驗으로서 奧田(1929)는 그의 보고에서 氣腫疽菌의 毒素產生은 菌體의 발육 증식에 따라 2~3日間に 가장 높아 1週日 이상 경과하면 無毒化하였다고 지적한바와 같이 거의 같은 成績을 보여 주고 있다.

Table 3. Effect of Culturing Time of *Cl. chauvoei* Whole Culture and on Mice Virulence.

Reciprocal dilution of culture	Day of culture				
	1	2	3	4	5
10,240	0/6	*0/6	0/6	0/6	0/6
5,120	6/6	6/6	5/6	0/6	0/6
2,560	6/6	6/6	6/6	0/6	0/6
1,280	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
640	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
320	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6

*: No. of death/inoculated.

나. 動物血液이 氣腫疽菌力에 미치는 實驗

本實驗에서는 氣腫疽菌의 마우스皮下感染으로 진술한 바의 목적을 遂行하고자 實驗하였다. 일반적으로 마우스는 氣腫疽菌에 대하여 感受성이 지둔하여 培養菌의 大量接種으로 폐사를 이르킬수 있는 정도로서 마우스는 거의 不感受性인 것으로 되어 있으나 接種經路에 따라서는 感染力에 뚜렷한 차이를 가지며 腦內接種으로 높은 폐사율을 보게 되었다. 이와같이 接種經路에 따른 感受성의 增加現像을 어떤 物質로서 誘發하려고 試圖하였다. 즉 氣腫疽菌의 마우스에 대한 感染力을 增加시키는 방법으로 接種材料에 感染이 유발될 물질을 賦與함으로써 感染力의 증가를 초래할수 있지 않을까하여 感染誘發物質로서 동물혈액을 이용하여 보았다.

(1) 綿羊血液濃도가 마우스 皮下感染에 미치는 影響
氣腫疽菌의 마우스 皮下感染에 있어 菌 공격력에 미치는 有効血液量을 알고저 綿羊의 血液을 선택하여 豫備 實驗으로 다음과 같이 실시하였다. 綿羊血液을 生理的

食鹽水로 2~100배로 稀釋하고 이 稀釋한 血液을 母液으로 하여 氣腫疽培養菌을 稀釋한 10⁻³의 0.5ml씩을 마우스 皮下에 接種하였다. 實驗成績은 第4表에 表示된바와 같이 血液稀釋의 2배에서 100%, 5배에서 67%의 폐사율을 보게 되었다. 氣腫疽菌의 마우스皮下感染에서 동물혈액을 사용할시 혈액을 5배로 稀釋하면 感染增加作用은 약간 감소하여지고 10배 이상으로 하면 거의 효과가 없으며 2배稀釋에 있어서는 原液과 같은 효과를 보였다. 이 결과에 의하면 혈액의 사용량은 2배稀釋 이하의 혈액농도가 효과적인 것으로서 혈액의 原液을 公시하기로 하였다.

Table 4. Enhancng Effect of Sheep Blood on Virulence of *Cl. chauvoei* in Mice.

Reciprocal dilution of blood	No. of death/inoculated
100	0/3
50	0/3
10	1/3
5	2/3
2	3/3
Undiluted	3/3
Controls	
Whole blood alone	0/3
Saline*	0/3

*: Saline contained 10⁻³ diluted bacterial culture.

(2) 마우스 및 랫트의 體重이 菌-綿羊血液에 의한 皮下感染에 미치는 影響

氣腫疽菌의 마우스 皮下感染에 동물혈액을 사용함으로써 感染폐사의 가능성을 보았으므로 마우스의 體重이 感染에 미치는 影響을 알고저 하였다. 즉 氣腫疽菌을 기니피에 接種하면 그의 體重에 따라 毒力에 심한 動搖가 있는 것으로 보아 마우스에 있어서도 毒力에 대한 體重이 미치는 影響이 있을 것으로 믿어 實驗했다. 公시 마우스의 體重은 12~15gm群과 20~30gm群을 사용하였고 랫트의 體重은 30~60gm群, 90~120gm群 및 230~260gm群으로 나누어 사용하였다.

實驗成績은 第5表에 表示된 바와 같이 마우스 體重 12~15gm群, 랫트 體重 30~60gm群에서 높은 폐사율을 가져왔다. 이 實驗의 결과 이후의 氣腫疽菌의 마우스 皮下感染實驗에는 體重 12~13gm, 랫트는 體重 20~30gm를 사용하기로 하였다.

(3) 動物血液의 種類가 마우스 및 랫트의 皮下感染에 미치는 影響

氣腫疽菌의 마우스 皮下感染에 있어 각종 동물혈액이 菌攻擊력에 미치는 影響의 차이를 알고저 實驗했다. 供

Table 5. Effect of Body Weights of Mice and Rats on Virulence Enhancing Action of Sheep Blood of *Cl. chauvoei*.

Reciprocal dilution of culture	Animals and Body Weight														
	Mouse									Rat					
	12-15gm.			20-30gm.			30-60gm.			90-120gm.			230-260gm.		
	1**	3	10	1	3	10	1	3	10	1	3	10	1	3	10
10-6	3/5*			0/5	2/5										
10-5	5/5			0/5	1/5										
10-4	5/5			5/5			0/3	1/3		0/3	1/3		0/3	•	
10-3	5/5			5/5			0/3	3/3		2/3	1/3		1/3	1/3	
10-2							3/3			3/3			1/3	1/3	
10-1							3/3			3/3			3/3		

* No. of death/inoculated.

** Day of observation.

시험동물들은 改良馬 3頭, 犏牛 3頭, 緬羊 3頭, 豚 3頭, 雜種犬 3頭, 家兔 5頭, 기니픽 10수, 鷄 5수 및 오리 5수에서 개체별로 採血한 血液을 각 동물별로 혼합하여 자기 全血液, 赤血球 및 血清의 3群으로 나누어 氣腫疽培養菌液을 稀釋하여 0.5ml씩 마우스 皮下에 接種하였다. 血漿은 人體用을 사용하였으며 實驗方法은 진술 혈액 사용과 같은 방법으로 하였다.

實驗成績은 第6表에 表示된바와 같이 대체적으로 供試動物의 全血液의 稀釋菌에 있어 10⁻⁵~10⁻⁶에서 100% 赤血球에 있어 10⁻⁵~16⁻⁶에서 100%, 血清에 있어 10⁻⁴~10⁻⁵에서 100% 폐사율로서 氣腫疽菌의 마우스皮下感染에 있어 약간의 차이는 있으나 어느群에서나 對照群에 비교하여 높은 폐사율을 가져왔다. 즉 馬血清 및 豚血清을 제외한 모든 동물혈액은 感染力의 增加에 뚜렷한 影響을 주고 있다. 이와같은 사실로 보아 氣腫疽菌의 單味接種으로서 마우스를 感染致死시킬 수 없는 微量의 菌으로도 각종 혈액을 첨가함으로써 높은 폐사율을 가져오며 개체차의 影響도 받지않아 마우스에 菌攻撃이 가능하게 되었으며 이는 氣腫疽菌과 혈액을 混合接種할 경우 혈액이 菌의 발육을 촉진하여 급속한 菌의

增殖으로 菌力增強에 좋은 조건을 주게되어 發病力の 發揮을 증대하는 것으로 菌의 產生毒素에 의하여 筋肉에 特異의 血樣浸潤을 이끄는 것으로 본다. 이와같은 현상은 接種材料에 따른 심한 차이와 동물혈액에 菌을 混合 接種하면 높은 폐사율을 갖어오는 사실로 미루어 생각할 수 있는 것이다.

動物의 細菌感染을 增加하는 방법으로 Nungester(1932)는 菌液에 Mucin을 加하여 接種하였고 이와같은 목적으로 Kapusto와 Kuzin(1939)은 Mucin대신에 卵黃液을 加하여 接種하는 소이 卵黃法을 이용하였다. 山田(1942)은 마우스에 알콜을 連續投與함으로써 炭疽菌의 마우스에 感染增強을 보았다고 하였다. 저자는 氣腫疽菌의 마우스 感染에 동물혈액을 사용하였던바 生理的食鹽水로 稀釋하여 接種할 경우 마우스를 感染致死시킬수 없었던 僅小의 菌量으로도 충분히 폐사시킬 수 있었으며 마우스 개체의 影響도 받지 않았다. 또한 馬血清 및 豚血清의 稀釋菌 10⁻³에서는 폐사를 보지 못하였으나 赤血球에서 높은 폐사율을 나타낸바 이는 血清中 어떤 성분의 작용에 의한 것으로 보며 宿主의 特異性으로 보 이는 一種의 抑制物質의 작용에 의한 것으로 思料된다

Table 6. Effect of Various Animals' Blood on Virulence of *Cl. chauvoei* in Mice.

Animals' Blood	Reciprocal dilution of culture					Control		
	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	Blood	Saline	
						10 ⁻¹	10 ⁻²	
Horse	Whole blood	0/5*	1/5	5/5	5/5	5/5	0/5	
	Red blood cell	0/5	3/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5
	Serum	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
Calf	Whole blood	0/5	3/5	5/5	5/5	5/5	0/5	
	Red blood cell	0/5	2/5	5/5	5/5	5/5	0/5	
	Serum	0/5	3/5	5/5	5/5	5/5	0/5	
	Whole blood	0/5	4/5	5/5	5/5	5/5	0/5	

Sheep	Red blood cell	0/5	3/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	Serum	0/5	2/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	Whole blood	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	0/3
Swine	Red blood cell	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	0/3
	Serum	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Whole blood	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	0/3
Dog	Red blood cell	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	0/3
	Serum	0/3	0/3	1/3	3/3	3/3	0/3
	Whole blood	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
Rabbit	Red blood cell	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
	Serum	0/3	1/3	3/3	3/3	3/3	0/3
	Whole blood	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
Guinea Pig	Red blood cell	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
	Serum	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	0/3
	Whole blood	0/3	2/3	3/3	3/3	3/3	0/3
Chicken	Red blood cell	0/3	2/3	3/3	3/3	3/3	0/3
	Serum	0/3	2/3	3/3	3/3	3/3	0/3
	Whole blood	0/3	2/3	3/3	3/3	3/3	0/3
Duck	Red blood cell	0/3	2/3	3/3	3/3	3/3	0/3
	Serum	0/3	1/3	3/3	3/3	3/3	0/3
Human plasma	Plasma	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6

* : No. of death/inoculated.

다. 鹽化칼슘液이 氣腫痘菌의 마우스 및 랫트 皮下 感染에 미치는 實驗

전술한바와 같이 각종 동물의 혈액을 사용함으로써 氣腫痘菌의 皮下接種으로 마우스 感染을 보게되었다.

이와같은 목적으로 氣腫痘菌의 기니픽 感染에 鹽化칼슘

液을 사용하여 感染增強과 마우스 개체에 의한 菌力動 搖를 防止하기 위하여 마우스 皮下接種에 鹽化칼슘液을 사용함으로써 어떠한 影響을 받게되는가를 알고저 이 實驗을 하였다.

우선 本實驗에 착수하기 전에 鹽化칼슘液의 單味接種

Table 7. Effect of Dose of CaCl₂ on Mice Mortality.

CaCl ₂ solution (%)	12-15		Body weight		17-20	
	3 day**	5	10	3	5	10
0.5			10/10*			10/10
1.0			10/10			10/10
2.0	+	+	10/10	+	-	10/10
3.0	7/10	7/10	7/10	8/10	7/10	7/10
	+ - + + +	+ - + + +		+ - + + +	+ - + + + N	
4.0	5/10	4/10	4/10	6/10	5/10	5/10
	+ - + + +	++		—N	++ - N	
5.0	3/10	2/16	0/10	5/10	3/10	1/10
	+ - + + +	+++N	+++N	— + + + +	+++N	+++N

* : Survivor/inoculated.

** : Day of observation.

N : Necrosis. + - + + + : Degree of swelling.

에 의한 毒性을 알고저 각 濃度の 鹽化칼슘液을 마우스 後肢皮下에 0.5ml씩 接種하여 接種部位 및 全身症狀을 10日間 觀察하였다. 實驗結果는 第7表와 같이 同一接種量일지라도 高濃도에 있어서는 接種部位的 炎性腫脹과 壞死가 심하여 이로 因하여 폐사한 例가 있었다. 즉 2% 鹽化칼슘液의 0.5ml接種에서는 약간의 炎性腫脹이 局部에 보였으나 곧 回復하였으며 後遺症으로 보이는 症狀은 보지 못하였으나 3% 鹽化칼슘液의 接種群에서는 폐사하는 例가 있어 다음 實驗에는 2% 鹽化칼슘液의 0.5 ml이하의 量을 사용하기로 하였다.

(1) 鹽化칼슘液의 濃도가 菌力에 미치는 影響

氣腫疽菌의 마우스 皮下感染에 있어 鹽化칼슘液이 가장 効果의인 사용量을 조사하기 위하여 實驗하였다. 供試한 鹽化칼슘液의 濃도는 2%群, 1%群, 0.5%群의 3群

Table 8. Enhancing Effect of CaCl₂ on Virulence of Cl. chauvoei in Mice.

Reciprocal dilution of culture	CaCl ₂ solution			
	0.5%	1.0%	2.0%	Saline
		0/5		
10-7	0/5*		0/5	
10-6	0/5	1/5	5/5	
10-5	0/5	5/5	5/5	
10-4	1/5	5/5	5/5	
10-3	2/5	5/5	5/5	0/5
CaCl ₂	0/5	0/5	0/5	

*: No of death/inoculated.

Table 9. Effect of Injection Route and Intervals on Mice virulence of Cl. chauvoei in the Administration of 2% CaCl₂ solution.

Inoculation site of two components	Intervals of inoculation		
	Simultaneous	12 hrs	24 hrs
One site of inoculation with two components	5/5*	5/5	4/5
Different site of inoculation with two component separately	0/5	0/5	0/5

*: No. of death/inoculated.

(3) 鹽化칼슘液이 氣腫疽菌菌株別菌力에 미치는 影響
氣腫疽菌의 마우스 皮下感染에 있어 2% 鹽化칼슘液을 사용하여 높은 폐사율을 보게 되었으므로 마우스 皮下 接種方法으로 菌株間에 毒力을 비교하였다. 다시 말하자면 供試 菌株間의 菌力을 알고 攻擊菌의 標準化를 規定하여야 하기 때문이다. 實驗方法은 進술한바와 같이 皮下 接種 實驗에 準하고 接種菌 0.25ml을 마우스에, 1.0ml을 랫트의 皮下에 接種하였다. 實驗成績은 第10表에 表示된 바와 같이 마우스에 있어서는 稀釋菌 10⁻⁵ ~ 10⁻⁶에서 100% 폐사하고 랫트에서는 10⁻⁴ ~ 10⁻⁵에

으로 나누어 각 鹽化칼슘液 濃度別로 芽胞菌液을 稀釋하여 0.25ml씩 마우스 後肢皮下에 接種하였다. 實驗結果는 第8表에 表示된 바와 같이 2% 鹽化칼슘液의 0.25 ml 接種群이 가장 높은 폐사율을 보였고 1% 鹽化칼슘液 接種群에서는 感染力의 增加作用은 약간 감소하였고, 0.5% 鹽化칼슘液에서는 거어 效果가 없음을 알게되어 2% 鹽化칼슘液의 사용이 가장 有效濃度임을 확인하였다

(2) 鹽化칼슘液의 接種方法이 菌力에 미치는 影響

氣腫疽菌의 마우스 感染에 있어 鹽化칼슘液을 사용함으로써 皮下感染이 가능함을 확인하였으므로 鹽化칼슘液의 接種方法에 따른 接種菌의 毒力增加에 미치는 影響을 알고저 本實驗을 했다. 實驗方法으로서 鹽化칼슘液의 0.25ml씩을 마우스 後肢皮下에 接種後 일정한 시간에 生理的食鹽水로 芽胞菌液을 10⁻³으로 稀釋한 0.25ml을 鹽化칼슘液으로 처리한 同一部位에 接種한群과 鹽化칼슘液을 처리하지 않은 部位에 接種한 群으로 나누어 實驗하였다.

實驗結果는 第9表와 같다. 즉 鹽化칼슘液을 처리한 同一部位에 同時接種한 群에서 100%, 12時間後의 接種에서 100%, 24時間後의 接種에서 80%의 높은 폐사율의 成績을 얻었다. 한편 鹽化칼슘液과 接種菌의 接種部位를 달리한 接種群에서는 폐사를 보지 못하였다. 위의 實驗成績에 의하면 鹽化칼슘液의 처리에 의한 接種菌의 毒力 增加는 鹽化칼슘液을 처리한 同一部位에 菌을 接種하는 方法이 필수조건인 것임을 알게 되었다. 同時接種일 경우도 鹽化칼슘液과 菌의 接種部位가 다르면 아무런 影響을 받지 않는다는 사실을 입증하였다.

서 100%의 폐사율을 보여 對照群에 비교하면 뚜렷한 毒力增加를 볼수 있었다. 氣腫疽弱毒菌에서는 鹽化칼슘을 사용하더라도 强毒菌과는 달리 毒力增加를 보지 못하였다. 즉 弱毒菌은 동물혈액 및 鹽化칼슘液을 사용하였으나 마우스를 폐사시킬 정도의 毒力增加는 이르지 못하였다. 鹽化칼슘液은 혈액과 같이 氣腫疽菌의 마우스에 感染力을 增強하였으며 微量의 芽胞로서 충분히 마우스를 폐사시킬 수 있었으며 개체차이에 의한 影響도 받지 않았다.

이와같이 鹽化칼슘을 첨가하여 接種된 芽胞菌은 곧

發芽하여 增殖함으로써 病變을 誘發하는 것이다. 이것은 局所組織에서 Ca의 組織障害에 의한 것으로 보며 즉 Ca接種으로 局所組織에 壞死를 惹起함으로써 因하여 接種

菌은 增殖의 기반을 얻은후에 增殖과 産生毒素에 의하여 感染進行에 좋은 조건을 주는 것으로 생각된다.

2. 氣腫疽免疫牛血清의 마우스를 利用한 檢定實驗

Table 10. Virulence of Cl. chauvoei Suspended in 2% CaCl₂ solution in Mice and Rats.

Reciprocal dilution of organisms	Mouse Strains							Rat			
	Chung chum	Houk kido	Oki nawa	Bo cun	Jin yang	Cho sun	449	Attenuated strain	Chung chun	Bo eun	449
10-7	0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
10-6	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	3/5	0/5	2/5	0/5	0/5
10-5	5/5	5/5	5/5	5/3	3/5	0/5	5/5	0/5	5/5	2/5	2/5
10-4	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	5/5	0/5	5/5	5/5	5/5
10-3	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	5/5	0/5	5/5	5/5	5/5
Control CaCl ₂ alone	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Saline(10-3)**	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

*: No. of death/inoculated.

** : Saline contained 10-3 concentration of bacterial culture.

가. 抗血清의 力價測定實驗

종래부터 氣腫疽抗血清의 力價測定에는 기니픽을 사용하고있으나 여기에는 여러가지 불편이 따르고 있다. 즉 高價의 기니픽이 필요하였고 體重, 年齡 및 個體에 따른 菌力의 甚한 動搖로 實驗成績은 每回 不定함을 드러내고 있었다. 이러한 不安全性을 개선함과 동시에 기니픽 대신에 마우스를 感染防禦力 및 治療効力實驗에 사용할 수 있지 않을까 즉 氣腫疽抗血清의 力價測定の 가능성을 조사하고자 本實驗을 하였다.

供試 抗血清은 Lot. No. 2, 4를 혼합한것과 Lot. No. 6 血清을 사용하였다. 抗血清을 各群으로 나누어 各群의 마우스 後肢皮下에 0.5ml씩 接種하고 24時間後에 2% 鹽化칼슘 芽胞菌液을 反對側 後肢皮下에 0.25ml씩 攻擊接種하였다. 또한 抗血清의 稀釋으로 免疫力價를 저하시켜 耐過生存率에 미치는 抗血清의 濃度를 測定하여 抗體價를 조사하였다. 實驗方法은 抗血清을 生理的食鹽水로 第12表와 같이 稀釋하여 마우스 皮下에

0.5ml씩 接種 24時間後에 攻擊接種하였다.

實驗成績은 第11表와 같이 抗血清의 마우스 接種群 및 0.5ml씩 接種群 各기 攻擊毒 10³ M.L.D에서 100%의 耐過生存率을 보였다. 즉 抗血清實驗 0.5ml로서 攻擊毒 10³ M.L.D를 中和하여 마우스의 耐過生存을 期할수 있으며 마우스를 사용하여서도 効果的인 結果를 보게되었다. 抗血清의 力價를 기니픽 사용시와 같이 100 M.L.D 攻擊에 100%의 耐過生存을 期할수 있는 効력이 있을때 合格으로한 종래의 基準과 비교하여 불매 마우스 및 0.5ml씩 接種하여서도 기니픽과 같은 防禦力을 가짐으로 충분히 利用價値가 있다고 본다. 즉 기니픽 대신에 마우스나 0.5ml씩 接種하여서도 氣腫疽抗血清의 力價檢定이 보다 더 精確하게 이루어질수 있음을 알게되었다. 그리고 第12表와 같이 抗血清 2倍稀釋 한것도 100 M.L.D에서 100%, 1,000 M.L.D에서 60% 耐過生存 하였으며 稀釋에 따라 耐過生存率에 차이가 심한 結果를 얻었다. 이 成績으로 보아 抗體價에 큰 차이가 없는 抗血清間의

Table 11. Protective Potency of Blackleg Anti-serum in Mice and Rats.

Challenge dose	Mouse				Rat		
	Immune serum		Control	Immune serum		Control	
	Lot No. 2-4	Lot No. 6		Lot No. 6	Control		
1 M.L.D.	5/5	5/5	0/5	5/5	0/5		
10 M.L.D.	5/5	5/5	0/5	5/5	0/5		
100 M.L.D.	5/5	5/5	0/5	5/5	0/5		
1,000 M.L.D.	5/5	5/5	0/5	5/5	0/5		
10,000 M.L.D.	4/5	4/5	0/5	2/5	0/5		

*: Survivors/noculated.

Table 12. Protective Effect of Blackleg Immune Serum in Mice.

Challenge dose	Reciparocal dilution of immune serum					Control
	2	5	10	50	100	
1 M. L. D.	5/5*	5/5	3/5	2/5	0/5	0/5
10 M. L. D.	5/5	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5
100 M. L. D.	5/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1,000 M. L. D.	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
10,000 M. L. D.	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

* : Survivors/Inoculated.

力價를 비교할때는 抗體價를 저하시키는 방법을 應用하면 비교적 명확한 차이를 볼수있을 것으로 본다.

나. 抗血清 接種後 時間別로 攻擊한 抗血清의 力價測定實驗

氣腫痘菌 抗血清 接種 24時間후의 攻擊菌에 대한 實驗에서 만족할만한 成績을 얻었으므로 이번에는 어느시기에 防禦作用을 가장 잘 發揮하는 가를 알기위하여 다시말하자면 抗血清을 마우스 皮下에 接種한後 防禦能力이 언제 어느정도 있으며 體內에서 一定時間에 어느정도 消失하는가를 조사하기 위하여 實驗하였다.

實驗方法은 抗血清을 마우스 後肢皮下에 각각 0.5ml씩 接種後 30分, 60分, 3時間, 5時間, 10時間, 24時間7 및 7日등 7群으로 나누어 각 시간별로 2%鹽化칼슘 芽胞菌液 全量 0.25ml로하여 1 M. L. D~10⁴ M. L. D를 反對側 後肢皮下에 攻擊接種하였다. 實驗成績은 第13表와

같다. 抗血清接種 5~10時間에서는 100 M. L. D攻擊에 100% 24時間에서는 1,000 M. L. D에서 100%의 耐過生存率을 보였으며 7日에서는 1 M. L. D攻擊에도 耐過生存하지 못하였다. 氣腫痘抗血清의 力價를 100 M. L. D攻擊에 대하여 100%耐過生存함을 基準으로 한다면 抗血清의 力價測定에 効果적인 攻擊時間은 抗血清接種後 10~24時間임을 알게되었다.

抗血清接種 24時間後에는 時間의 경과에 따라 점차 防禦能力이 저하하여 짐을 볼수있고 7日에 攻擊群에 있어서는 耐過生存함을 보지못하였다. 抗血清을 血管에 接種하면 直時로 全血液에 達하여 最大量이 증명되었다고 Johann과 Franz(1940)등이 말한바 있으나 이實驗에 의하면 皮下에 接種한 抗血清은 비교적 서서히 吸收되어 24時間 前後에 感染防禦作用이 가장 높아지는 사실을 알게되었다.

Table 13. Persistence of Protective Potency of Immune Serum in Mice.

Challenge dose	Intervals of challenge after passive immunization							Control
	30 min.	60 min.	3 hrs.	5 hrs.	10 hrs.	24 hrs.	7 days.	
1 M. L. D.	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5
10 M. L. D.	3/5	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5
100 M. L. D.	2/5	2/5	3/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5
1,000 M. L. D.	0/5	0/5	0/5	3/5	3/5	0/5	0/5	0/5
10,000 M. L. D.	0/5	0/5	0/5	2/5	2/5	4/5	0/5	0/5

* : Survivores/inoculated.

다. 氣腫痘菌 接種後 時間別로 投與한 抗血清의 防禦力測定實驗

氣腫痘菌 接種後 抗血清의 感染防禦能力이 重要한 意義가 있는것으로 氣腫痘菌에 感染된 마우스에 있어서의 抗血清의 治療效果를 얻고저 本實驗을 하였다. 實驗方法은 진술한 實驗 나에 準하고 第14表와 같이 2%鹽化칼슘 芽胞菌液 0.25ml씩을 接種後 一定時間에 抗血清 0.5ml씩을 接種하였다. 實驗成績은 第14表에 表示된 바와같이 氣腫痘菌 接種後 30分과 60분에 抗血清을 接種

하였을때 가장 感染防禦作用이 强하였으며 10 M. L. D. 攻擊에 100% 生存하였다. 菌接種 3時間後에 抗血清을 接種한것은 1M. L. D에서 100%, 10 M. L. D.에서는 60%만이 耐過生存하였다. 또한 菌接種後 6時間에서는 1M. L. D.에서 100%, 10 M. L. D.에서 20%, 10時間에서는 1 M. L. D에서 60%만이 耐過生存하였다. 즉 抗血清의 感染防禦作用은 菌接種後 6~10時間內로 보이며 이 時間內에 있어서는 마우스에서도 기니피에 있어서와 같이 感染防禦 및 治療効力이 있음을 알게되었다.

Table 14. Protective Effect of Blackleg Immune Serum in Mice Previously Inoculated with Virulent *Cl. chauvoei*.

Challenge dose	Intervals of bacterial inoculation and immune serum treatment					Control
	30 min.	60 min.	3 hrs	6 hrs.	10 hrs.	
1 M.L.D.	5/5*	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5
10 M.L.D.	5/5	5/5	3/5	1/5	0/5	0/5
100 M.L.D.	3/5	3/5	1/5	0/5	0/5	0/5
1,000 M.L.D.	2/5	2/5	1/5	0/5	0/5	0/5
10,000 M.L.D.	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

* : Survivors/inoculated.

라. 氣腫疽生菌豫防藥 接種犢牛의 抗體生産實驗
Lindley(1955)는 氣腫疽免疫動物에 있어 抗體生産能力을 試驗管内 絮狀反應으로 試圖한바 있으나 이實驗에서는 野外에서 實施되고 있는 氣腫疽豫防藥 接種에 대한 免疫性獲得을 조사하는 方法으로서 抗體生産의 測定에 마우스를 이용하는 方法하에 實驗했다. 實驗은 氣腫疽豫防藥 Lot. No. 34~36 및 No. 55~58를 혼합하여 實驗群1에 1.0ml, 群2에 5.0ml, 群3에 10ml, 群4에 1.0ml씩 接種한 4群으로 나누어 群1, 2, 3은 豫防藥接種 14日後 群4에서는 28日後에 頸靜脈에서 採血하여 供試하였다. 力價測定은 進술한 實驗1에 準하였다. 實驗成績은 第15表에 表示된 바와 같이 群1에 있어

1 M.L.D.에서 100%, 10 M.L.D.에서 40%, 群2에 있어 1 M.L.D.에서 100%, 10 M.L.D.에서 80%, 100 M.L.D.에서 60%, 群3에서 1~10 M.L.D.에서 100%, 100 M.L.D.에서 80%, 10³ M.L.D.에서 20%의 耐過生存率을 보였다. 群4는 1 M.L.D.에서 100%, 10 M.L.D.에서 100%, 100 M.L.D.에서 20%의 耐過生存率을 보여 주었다. 即 群4가 群1에 比하여 높은 耐過生存率을 나타낸것으로 보아 豫防藥 接種後 충분한 抗體生産은 14日이후 인것으로 생각되었다. 이 實驗成績으로 볼때 野外 豫防藥接種牛에 있어서의 抗體生産을 容易하게 증명할 수 있는바 防疫上 견지에 있어서도 마우스 應用의 價値를 높게 評價할 수 있다.

Table 15. Mice Protective Value of Blackleg Immune Serum Prepared in Calves by Mean of Non Virulent Living Vaccine.

Challenge dose	14 days			28 days	
	1	2	3	4	Control
1 M.L.D.	5/5*	5/5	5/5	5/5	5/5
10 M.L.D.	2/5	4/5	5/5	5/5	5/5
100 M.L.D.	0/5	3/5	4/5	1/5	0/5
1,000 M.L.D.	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5
10,000 M.L.D.	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

* : Survivors/inoculated.

3. 氣腫疽豫防藥의 마우스를 利用한 檢定實驗

진술한바와 같이 氣腫疽豫防藥의 効力檢定에는 기니픽을 이용하였으며 기니픽에 免疫후 培養菌液으로 攻撃하였다. 이 方法에 의하면 기니픽의 個體에 따라 攻撃毒의 菌力動搖가 많으며 攻撃菌量이 많은때에 限하여 對照群 기니픽의 100%폐사를 볼 수 있었다.

MCewen(1926)도 培養菌液의 攻撃으로서는 기니픽 對照群의 폐사율이 일정하지 않다고 보고하였다. 기니픽은 이와같이 實驗成績에 不安全性을 가져옴으로 이檢定法이 지니고있는 결점의 改善이 필요하게 되어 Hen-

derson(1922)은 芽胞菌液에 鹽化칼슘을 加하여 攻撃毒으로 사용하였고 Budlle(1954)은 効力檢定에 緬羊을 사용하였다. 저자는 진술한 實驗 1, 2의 實驗結果 豫防藥効力實驗에 기니픽 대신에 마우스의 사용가능성을 얻었으므로 마우스를 사용함으로써 보다 効率的인 檢定이 가능한가를 檢討하고 그의 基準를 마련 하고자 本實驗을 遂行하였다.

가. 豫防藥接種部位가 耐過率에 미치는 影響
진술한 實驗結果와 같이 氣腫疽菌의 마우스 感染實驗에서 腦內接種과 皮下接種으로 높은 폐사를 보였으며 接

種部位와 接種材料에 따라 人工感染에 많은 차이가 있다는 것이 明確하게 되었다. 이와 같은 사실 즉 氣腫疽豫防藥의 接種部位에 따른 免疫形成의 차이가 있는가를 알고저 皮下接種 및 腹腔內接種을 비교 實驗했다. 免疫方法은 마우스 皮下 및 腹腔內에 氣腫疽生菌豫防藥을 각각 0.5ml씩 1回 接種하고 14日後에 強毒培養菌液을 緬羊血液으로 稀釋하여 0.5ml씩 皮下에 攻擊接種하였다. 實驗成績은 第16表에 表示된 바와 같이 皮下接種群은

Table 16. Comparison Protective Effect of Blackleg in Mice Vaccinated by Different Route of Inoculation Against Black eg.

Challenge dose	s. c	i. p	Control
1 M. L. D.	5/5*	5/5	0/5
2 M. L. D.	5/5	5/5	0/5
5 M. L. D.	5/5	4/5	0/5
10 M. L. D.	3/5	3/5	0/5
50 M. L. D.	0/5	0/5	0/5

*Survivors/total inoculated.

5 M. L. D에서 100%, 10 M. L. D에서 60%의 耐過生存率을 보였다. 腹腔內接種群에서는 1 M. L. D에서 100%, 5 M. L. D에서 80%, 10 M. L. D에서 60%의 耐過生存率을 보여주므로서 兩免疫群間에 뚜렷한 차이가 없었다. 그럼으로 앞으로의 免疫接種 實驗은 皮下接種方法을 이용하기로 하였다.

나. 豫防藥接種과 攻擊法을 달리한 免疫實驗의 比較 氣腫疽菌의 腦內接種 및 皮下接種方法으로 마우스의 높은 感染率을 보았으므로 免疫群에 대하여 攻擊法을 달리하고 耐過率에 미치는 影響을 조사檢討하였다.

Table 17. Pathogenicity of Subcutaneous Challenge on Mice Previously Vaccinated into Subcutaneous.

Challenge does	Vaccinated	Control
1 M. L. D.	10/10*	0/10
2 M. L. D.	10/10	0/10
5 M. L. D.	10/10	0/10
10 M. L. D.	6/10	0/10
50 M. L. D.	0/10	0/10
100 M. L. D.	0/10	0/10

*: Survivors/total inoculated.

(1) 皮下免疫後에 皮下攻擊

氣腫疽生菌豫防藥을 마우스 後肢皮下에 0.5ml씩 接

種하고 14日後에 2%鹽化칼슘 芽胞菌液을 0.25ml씩 反對後肢皮下에 攻擊接種하고 14日間 觀察하였다. 實驗成績은 第17表에 表示된 바와같이 免疫群은 5 M. L. D에서 100%, 10 M. L. D에서 60%가 耐過生存하였으며 對照群은 全例가 폐사하였다.

(2) 皮下免疫後에 腦內攻擊

氣腫疽生菌豫防藥을 마우스 後肢皮下에 0.5ml씩 接種하고 14日後에 強毒培養菌液을 生理的食鹽水로 稀釋하여 0.03ml씩 腦內에 攻擊接種하여 14日間 觀察하였다. 實驗成績은 第18表에 表示된 바와 같이 免疫群은 5 M. L. D에서 100%, 10 M. L. D에서 60%, 50 M. L. D에서 40%의 耐過生存率을 보여주었다. 이와같은 成績으로 보아 腦內攻擊과 皮下攻擊는 別差가 없으며 腦內接種方法으로도 免疫群에 대한 免疫形成檢定이 可能함을 알게되었다.

Table 18. Pathogenicity of Intracerebral Challenge in Mice Previously Vaccinated into Subcutaneous

Challenge dose	Vaccinated	Control
1 M. L. D.	5/5*	0/5
2 M. L. D.	5/5	0/5
5 M. L. D.	5/5	0/5
10 M. L. D.	3/5	0/5
50 M. L. D.	2/5	0/5
100 M. L. D.	0/5	0/5

*: Survivors/total inoculated.

(3) 腦內免疫後에 腦內攻擊

氣腫疽生菌豫防藥을 마우스 腦內에 0.03ml씩 接種하고 14日後에 強毒培養菌液을 生理的食鹽水로 稀釋하여 0.03ml를 腦內에 攻擊接種하였다. 實驗成績은 第19表에 表示된 바와 같이 免疫群은 1 M. L. D에서 100%, 5 M. L. D에서 60%, 10 M. L. D에서 40%가 耐過生存하였다. 이상의 成績으로보아 豫防藥의 皮下免疫後皮下攻擊 및 皮下免疫後 腦內攻擊에 비교하여 免疫價가 약간 저하한 경향이 있으며. 皮下免疫이 腦內免疫보다 優秀한것으로 認定된다.

(4) 腦內免疫後에 皮下攻擊

氣腫疽生菌豫防藥을 마우스 腦內에 0.03ml씩 接種하고 14日後에 2%칼슘 芽胞菌液 0.25ml씩을 皮下에 攻擊接種하였다. 實驗成績은 第20表에 表示된 바와 같이 免疫群은 1 M. L. D에서 100%, 2 M. L. D에서 80%, 5 M. L. D에서 40%가 耐過生存함으로써 腦內免疫後의 皮下攻擊이 진술의 實驗 (1)(2)(3)에 비교하여 効果의이 아

Table 19. Pathogenicity of Intracerebral Challenge on Mice Previously Vaccinated Intracerebrally.

Challenge dose	Vaccinated	Control
1 M. L. D.	5/5*	0/5
2 M. L. D.	5/5	0/5
5 M. L. D.	3/5	0/5
10 M. L. D.	2/5	0/5
50 M. L. D.	0/5	0/5

*: Survivors/total inoculated.

님을 알게 되었다. 이상의 實驗結果로 보아 氣腫疽生菌豫防藥의 皮下免疫에 皮下攻撃 및 皮下免疫에 腦内攻撃方法이 보다 効果的이었다.

Table 20. Pathogenicity of Subcutaneous Challenge on Mice Previously Vaccinated Intracerebrally.

Challenge dose	Vaccinated	Control
1 M. L. D.	5/5*	0/5
2 M. L. D.	4/5	0/5
5 M. L. D.	2/5	0/5
10 M. L. D.	1/5	0/5
50 M. L. D.	0/5	0/5

*: Survivors/total inoculated.

다. 免疫條件이 耐過率에 미치는 影響 氣腫疽生菌豫防藥 接種에 의한 免疫形成을 시간적으로 관찰하기 위하여 豫防藥의 接種量 免疫回數 및 間隔期間 등을 달리하여 接種實驗하였다. 즉 免疫接種後 一定한 致死量의 攻撃에 대한 耐過生存率을 보아 免疫完

成에 要하는 時間과 接種量 및 接種方法이 免疫完成에 미치는 影響을 알고자 다음과 같이 實驗하였다.

마우스에 있어서는 氣腫疽生菌豫防藥의 接種量을 0.5ml 및 1.0ml씩으로 固定하고 이것을 0.1ml 1回接種群, 0.5ml 1回接種群, 7日間隔으로 0.25ml 씩接種한 2回接種群, 2日間隔으로 0.25ml 씩接種한 4回接種群 및 7日間隔으로 0.5ml 씩接種한 2回接種群 등 5群으로 나누어 실시하였다. 攻撃은 免疫接種 14日 및 21日 후에 2% 鹽化 칼슘 芽胞菌液 0.25ml 씩을 皮下接種으로 攻撃하였다. 렐트에서는 0.5ml 씩 1回接種하고 7日間隔으로 0.25ml 씩 接種한 2回接種群으로 나누어 免疫接種 21日 후에 攻撃하였다. 攻撃方法은 마우스와 같은 방법으로 皮下에 1.0ml 씩 接種하였다.

實驗成績은 第21表 第22表에 表示된 바와 같이 각 免疫群間에 약간의 차이가 있는 것으로 보아 攻撃接種은 免疫接種 21日 후가 좋은 경향이 있으며 1回免疫群은 攻撃까지 期間이 14日 이든 21日 이든 간에 同一量을 2回로 나누어 免疫接種한群에 比하여 낮은 耐過生存率을 보여 주었다. 즉 免疫總量에 同一한 조건에서는 1回接種群보다 2回 또는 그이상의 回數로 나누어 接種한群이 耐過生存率이 높았다. 또한 免疫總量 0.1ml 接種群은 1 M. L. D에서 겨우 60%가 耐過生存 하였으나, 0.5ml 接種群에서는 2 M. L. D에서 100% 耐過生存한 차이로 보아 免疫接種總量은 0.5ml 이상이어야 할 것으로 본다. 免疫總量 1.0ml 接種群에서는 10 M. L. D의 攻撃에 70~90%가 耐過生存하였다.

小田(1938)은 Cl. Perfringens 抗毒素 免疫에 總量 2.0ml 을 1回 接種時는 10 M. L. D 攻撃에 50% 生存하였으나 2回로 나누어 接種한 시는 10 M. L. D 攻撃에 100% 耐過生存하였다고 한다 小田의 成績과 같이 심한 差는 보지 못하였다.

이상의 實驗成績으로 보아 이豫防藥에 의한 免疫形成

Table 21. Comparison of Immunity and Repeation of Vaccination in Mice.

Challenge dose	Days between final vaccination to challenge									Control
	0.1	0.5	0.25(2)	0.25(4)	0.5(2)	0.5	0.25(2)	0.25(4)	0.5(2)	
1 M. L. D.	6/10*	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	0/5
2 M. L. D.	2/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	0/5
5 M. L. D.	0/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	0/5
10 M. L. D.	0/10	6/10	6/10	7/10	7/10	7/10	7/10	9/10	8/10	0/5
50 M. L. D.	0/10	0/10	0/10	2/10	3/10	0/10	0/10	4/10	3/10	
100 M. L. D.	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
Immun period	14				21					

*: Survivors/total inoculated.

Table 22. Comparison of Immunity and Repeation of Vaccination in Rat.

Challenge dose	Vaccination dose and repeation		
	0.5	0.5(2)	Control
1 M.L.D.	5/5*	5/5	0/3
5 M.L.D.	2/5	3/5	0/3
10 M.L.D.	0/5	2/5	0/3
100 M.L.D.	0/5	0/5	0/3

* : Survivors/total inoculated.

은 마우스의 個體에 따라 약간의 차이가 있는 것으로 보이며 免疫接種 總量을 0.5ml이상 2회로 나누어 接種 後의 攻擊時期는 最終 免疫接種日로 부터 14日후 즉 初回 接種 21日 이후가 適當한 時期로 思料된다.

라. 効力實驗

(1) 氣腫痘生菌豫防藥의 効力實驗

氣腫痘生菌豫防藥 Lot No. 1, No. 2, No. 3,

No. 4, No. 5의 5群으로 나누어 마우스 皮下에 0.5ml씩 7日間隔으로 2回接種하고 最初接種日로 부터 21日만에 각 免疫群別로 1~10 M.L.D의 強毒培養菌液을 0.03ml씩 腦內에 攻擊接種하고 10日間 관찰하였다. 實驗成績은 第23表와 같이 각 免疫群은 5 M.L.D에서 100%, 10 M.L.D에서 70~80% 耐過生存하였으며 各 Lot別 効力은 大同小異하였다. 종래 기니픽으로만 사용되어오던 氣腫痘豫防藥의 効力檢定은 마우스를 사용하여서도 명확하고 有効한 檢定이 가능함을 알았다. 즉 對擊群의 100% 폐사에 反하여 免疫接種總量 1.0ml로서 攻擊毒 10 M.L.D에서 70~80% 耐過生存하는 것을볼때 기니픽에 攻擊毒 10 M.L.D를 接種하여 80% 耐過生存 함을 함격으로 하는 基準과 比較컨데 마우스를 이용하여 서도 거의같은 成績으로 効力の 優劣을 判定할수 있는 効果의인 結果를 얻었다.

각 免疫群別로 攻擊接種 21日후에 耐過生存한 마우스 및 기니픽을 殺處分하여 各장기別로 培養檢査하였으나 菌證明은 불가능 하였다.

Table 23. Potency Test of Blackleg Living Vaccine Against Mice.

Challenge dose	Vaccine					Control
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	
1 M.L.D.	10/10*	10/10	10/10	10/10	10/10	0/5
2 M.L.D.	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	0/5
5 M.L.D.	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	0/5
10 M.L.D.	8/10	7/10	8/10	8/10	7/10	0/5
50 M.L.D.	3/10	1/10	1/10	2/10	2/10	0/5
100 M.L.D.	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/5

* : Survivors/total inoculated.

(2) 稀釋에 의한 豫防藥의 効力實驗

氣腫痘豫防藥의 原液에 있어서는 어느程度 이상의 力價를 가진 豫防藥은 攻擊量에 따른 耐過生存率에 큰차이가 없었으므로 豫防藥의 濃度가 耐過率에 미치는 影響을 알고저 다음과 같이 實驗하였다. 氣腫痘生菌豫防

藥의 原液과 生理的食鹽水로 5倍 및 10倍로 稀釋하여 사용하였다. 免疫接種은 각 稀釋群別로 0.5ml씩 7日間隔으로 2回 皮下接種하고 免疫시작일 부터 21日後에 強毒培養菌液을 1~50 M.L.D의 0.03ml을 마우스 腦內에 攻擊接種하였다.

Table 24. Evaluation of Dilution Effect on the Potency of Blackleg Living Vaccine in Mice.

Challenge dose	Dilution of vaccine			Control
	Undiluted	5-fold	10-fold	
1 M.L.D.	10/10*	7/10	4/10	0/5
2 M.L.D.	10/10	5/10	3/10	0/5
5 M.L.D.	10/10	1/10	0/10	0/5
10 M.L.D.	8/10	0/10	0/10	0/5
50 M.L.D.	1/10	0/10	0/10	0/5

* Survivors/total inoculated.

實驗成績은 第24表에 表示된 바와 같이 豫防藥의 原液免疫群에 있어서는 攻撃毒의 1~10 M.L.D에 80~100%의 耐過生存率을 보여 큰 차이가 없었다. 그러나 稀釋 豫防藥免疫群에 있어서는 豫防藥의 稀釋에 따른 攻撃量에 대한 耐過生存率의 차이는 컸다. 이와같은 방법을 응용함으로써 豫防藥의 力價를 比較할 경우 비교적 명확한 차이를 찾을수 있을 것이다.

(3) 氣腫疽 Formalin死菌豫防藥의 効力實驗

氣腫疽生菌豫防藥 接種에 의한 마우스에 대한 免疫性은 진술한바와 같거니와 Piercy(1951)가 死菌豫防藥의 比較에 緬羊을 사용한것과는 달리 이 實驗에서는 氣腫疽死菌豫防으로 마우스에 대한 免疫性을 조사함과 동시에 生菌豫防藥에 의한 免疫性을 비교 實驗하였다. 實驗方法은 氣腫疽生菌豫防藥과 死菌豫防藥의 2群으로 나누고 兩豫防藥을 같은 方法으로 7日間隔으로 0.5ml씩 2

回 皮下接種한 21日후에 2%鹽化칼슘 芽胞菌液 1~100 M.L.D의 全量 0.25ml을 皮下接種 攻撃하였다.

實驗成績은 第25表와 같이 死菌豫防藥 1.0ml 接種마우스는 1~5 M.L.D에서 100%, 10 M.L.D에서 70%의 耐過生存率을 보였다. 生菌豫防藥免疫群 마우스는 1~5 M.L.D에서 100%, 10 M.L.D에서 80%의 耐過生存率을 보게되어 死菌豫防藥에 있어도 生菌豫防藥과 同等하게 마우스에 免疫性을 賦與시켜 주므로서 死菌豫防藥에서도 마우스를 이용한 効力檢定에 可能性을 알게되었다. 한편 本實驗에 마우스를 이용한 實驗成績을 뒷받침하고자 기니픽에 같은 방법으로 實驗한 결과 兩豫防藥間에 1~5 M.L.D에서 100%, 10 M.L.D에서 80%의 耐過生存率을 나타낸바 마우스의 實驗成績과 같은 結果를 얻으므로서 氣腫疽生菌豫防藥 및 死菌豫防藥의 効力檢定에 마우스의 이용이 效果的임을 再確認하였다.

Table 25. Comparison of the Protective Immunity of Blackleg Living Vaccine and Formalin Vaccine in Mice.

Challenge dose	Vaccine		
	Living	Formaline	Control
1 M.L.D.	10/10*	10/10	0/5
5 M.L.D.	10/10	10/10	0/5
10 M.L.D.	8/10	7/10	0/5
50 M.L.D.	2/10	2/10	0/5
100 M.L.D.	0/10	0/10	0/5

*: Survivors/total inoculated.

IV. 考 察

從來부터 氣腫疽豫防藥 및 抗血清檢定에 주로 기니픽이 사용되고 있으나 McEwen(1926)과 Henderson(1932) 그리고 Roberts(1933)는 豫防藥効力檢定시의 攻撃毒으로 培養菌液을 기니픽에 接種하는 경우 對照群의 폐사율이 一定하지 않음을 指適하였으며 昆野(1934)도 氣腫疽菌의 기니픽에 대한 致死量은 個體에 따라 심한 動搖가 있어 많은 供試數와 菌의 大量接種이 필요하다고 하였다. 氣腫疽菌 攻撃에 대한 이와같은 動搖는 攻撃菌側보다 動物側에 있으며 이는 기니픽 個體에 따른 動搖로 알려져 있다.

저자도 기니픽을 사용한 氣腫疽豫防藥 및 抗血清의 檢定에서 선인들과 같은 經驗을 얻었다. 즉 對照群은 攻撃量에 따라 폐사율에 變動이 있었고 이러한 變動은 菌의 大量接種시 보다 少量接種시에 動搖는 더욱 심하였다. 따라서 종래의 豫防藥 및 抗血清檢定에 기니픽을 사용하는 대신 마우스의 사용가능성을 조사하고 보다

정확하고 安定性있는 방법을 追究하였다. 우선 感受性이 없다고 알려져 있는 마우스에 대하여 接種方法을 달리하여 感受性을 조사하였던바 마우스는 接種徑路에 따라 氣腫疽菌에 대한 感受性에 심한 차이를 보였으며 氣腫疽菌을 腦內 皮下 腹腔內 및 靜脈內에 接種하여 비교하였던바 強毒菌의 培養菌液을 腦內에 接種할 경우 菌液을 5, 120倍로 稀釋하여도 80~100%의 폐사를 보였고 2,560倍에서는 100%의 폐사율을 갖어왔다. 그리고 기타 接種徑路에 있어서는 培養原液菌을 大量接種할 경우에 한하여 폐사를 보게되었다. (第1表) 이와같이 不感受性인 마우스에 있어서도 大量의 培養菌液을 接種함으로써 폐사를 보게되었으나 大量의 接種으로서도 100%의 폐사를 보지못하여 기타 接種徑路에 의한 菌單味 攻撃法으로서의 豫防藥의 効力檢定은 불가능하였다. 그러나 腦內接種法에 의하면 少量接種으로서도 높은 폐사율을 갖어옴으로 菌單味 攻撃이 可能性으로 氣腫疽菌에 의한 마우스의 免疫程度 腦內攻撃 및 防禦問題등 몇개의 問題가 해결되면 効力檢定이 가능하게 될것이다.

氣腫疽菌에 의한 發病機轉은 菌體와 毒素의 共同作

用에 의한 것으로 알려져 있는바 전술한바와 같은接種徑路에 따른 感染力의 差의 原因은 몇개의 조건으로 이루어지는 것이 아닌가 생각된다. 그 하나는 組織親和性을 생각할 수 있다. 즉 氣腫疽菌의 產生毒素은 Histo-toxin이며 或種의 酵素作用으로 組織溶解를 惹起하여 이에는 宿主特異성이 있는 것으로 보고 있다. 奧田(1929)에 의하면 기니피의 筋肉組織을 溶解할 수 있는 이 毒素가 마우스의 筋肉組織을 溶解시키지 못한다고 보고한 바 있다. 즉 이 Histo-toxin의 作用이 感染과 關聯된 것으로 보고 있는 것이다. 그러나 이러한 宿主特異성이 腦內接種시에 拘礙되지 않음은 毒素의 向神經性 Blood-brain barrier 등 몇가지로 解釋될 수 있는 것으로 본다. Bakey(1951)도 毒素은 일반적으로 向神經性을 지니고 있다고 하였으며 이 사실은 선인에 의하여서 증명된 바 있다. 이와같은 神經毒素은 末梢神經에 局限될 뿐만 아니라 中樞神經에도 作用하며 진전은 上向性으로 이루어지고 있다고 한다. 또한 이러한 上向性神經毒은 末梢部에서 上向部를 차단하면 發病이 되지 않는다는 사실로 선인들에 의하여 立證된 바 있다. 이와 關聯하여 Lewcowsky는 破傷風毒素을 가지고 血流를 통하여 中樞神經系에 侵入시키는데 실패하였다고 하였으며 그는 이 원인을 Blood-brain barrier에 의하여 毒素가 腦에 도달하지 못하는데 있다고 解釋하였으며 이와같은 사실을 Browman(1943)은 色素 電解質을 가지고 證明하였다. 이러한 선인들의 成績으로 미루어보아 저자가 實驗한 氣腫疽菌의 接種徑路에 따른 즉 腦內接種과 皮下接種의 接種徑路의 차이에 오는 感染力의 차이는 Blood-brain barrier의 존재에 의하여 菌體 및 向神經性毒素가 腦에 도달하는 것이 차단됨으로써 惹起된 現象으로 보여진다. 다시 말하자면 皮下接種한 마우스는 Blood-brain barrier 關係로 腦에 毒素作用을 받지 않아 생존할 수 있으나 腦內接種에서는 微量의 菌接種으로서도 菌增殖이 촉진되어 產生毒素가 腦內에 直種作用함은 물론이거니와 菌도 直接作用함으로 높은 폐사율을 가져오는 것으로 思料된다. 이와같은 實驗으로 飯塚와 近藤(1932), Blan와 Caminopetros(1926) 등은 炭疽弱毒菌의 마우스 感染에 있어 感染徑路에 따라 뚜렷한 폐사의 차이를 보게 되었으며 腦內接種의 폐사율이 가장 높았다. 이는 接種菌이 腦組織에 親和性을 가지고 있으며 또한 腦에 直接的인 侵襲을 받음으로 最小量으로 發病을 誘發하였다고 하였다. 이와같이 病原性微生物이 特定臟器에서 增殖한다는 사실로 보아 人工적으로 病原菌을 直接臟器에 接種하면 容易하게 感染시킬 수 있다고 본다. 다시 말하자면 自然感染시 病原菌의 好寄生部位가 아닌 臟器에서도 人工적으로 直接 接種하면 病原

菌은 增殖하여 特有한 病變을 이르게 感染發症시킬 수 있는 것으로 본다.

氣腫疽強毒菌의 마우스 腦內接種에서 菌株間에 菌力の 차이는 있으나 다같이 感染力을 增加하였다. 弱毒菌에서는 菌力增加를 보지 못하였으므로 이의 自然變異 즉 菌力 抗原性 및 기타 性狀을 考慮하여 強毒菌株와 菌力 및 一般性狀을 비교하였으나 기니피에 있어서와 같이 마우스에 있어서도 菌力差異만이 있을뿐 一般性狀에는 대체로 차이가 없었고 弱毒菌株間에도 相互間에 차이를 보지 못하였다.

이와같이 氣腫疽弱毒菌으로 마우스를 폐사시키지 못하였으나 培養菌液을 生理的食鹽水로 5倍 稀釋한 0.03 ml의 腦內接種에서는 菌接種 6時間후 부터 30일까지 腦內, 肝臟, 脾臟 등에서 菌證明이 가능하였으며 60일에서는 불가능하였다. 또한 肺脏, 心血, 腎臟 등에서는 7일까지 菌證明이 가능하였으나 14일에서는 菌證明이 불가능하였다. 즉 接種菌은 마우스를 폐사에 이르지 못하나 각장기에서 增殖함을 알게 되었다. 그리고 菌集中度가 적은 肺脏, 腎臟, 心血에 있어서는 菌消長의 속도가 빠른 경향이 있었으며 菌에 보이는 시기도 거이 一定하였다. 이와같은 현상으로서 病原性을 考慮하여 본다면 病原菌의 宿主體에서의 增殖과 毒力 關係는 接種菌의 宿主體內에 侵襲성과 毒性은 毒力を 決定하는데 重要한 要因으로 보며 이들의 要因이 없으면 病原菌은 無毒으로 非病性인 것으로 볼 수 있다. 同一菌種일지라도 菌株間에 侵襲성과 毒力도 거이 同程度이나 폐사를 즉 毒力차이가 있는 것은 宿主體內에서 菌의 增殖力이 큰 것이 毒력이 強하다고 볼 수 있다. 그러나 氣腫疽弱毒菌의 마우스 腦內接種으로서 短時間에 各장기내에 侵入 增殖하나 強毒菌과는 달리 感染은 하나 發病斃死은 이르지 못함을 알게 되었다. 이것으로 보아 氣腫疽弱毒菌은 強毒菌과는 달리 腦內接種으로서도 感染斃死가 불가능하여 심히 病原성이 弱화된 菌株임을 알 수 있다 弱毒菌의 기니피에 대한 菌力은 培養菌液 3.0ml接種으로서 間或 폐사할 정도로서 大部分은 菌接種部位의 腫脹, 潰瘍, 脫毛 등의 反應이 있을뿐 數日內에 이와같은 症狀은 消失하여 治癒되었다. 그러나 武川(1958)가 보고한바와 같이 炭疽二苗菌株의 毒力은 固定된 것으로 通念되어 왔으나 菌株에 따라 毒力 增強의 動搖가 심하였다는 예는 氣腫疽弱毒菌에서는 보지 못하였다.

마우스 腦內接種으로서 氣腫疽菌의 培養時間別 菌의 曲線은 菌의 發育增殖에 따라 上昇하였으며 培養時間이 경과됨에 따라 菌力은 저하되었다. 이는 氣腫疽菌의 感染發病이 菌體와 毒素의 共同作用에 基因한 것으로 보며 이미 實驗으로서 證明된바와 같이 培養時間에 따라 毒力

이 급격히 증가되는 것은 毒素의 産生이 上昇함은 물론 破壞되지 않아 毒素가 蓄積되기 때문이며 時間이 經過되면 점차 毒素가 破壞 消失되어 菌力이 弱하여지는 것으로 보며 培養 1週日이 經過하면 無毒化되는 사실로서 알수 있는 것으로 본다. 이와같은 현상은 개스壞疽患者에서 볼수 있는바와 같이 發病이 急激하여 早期에 重篤한 症狀을 이루는 것을 볼수 있다. 鈴木(1944)도 惡性水腫菌과 *Cl. Perfringens*의 混合培養시 各菌의 毒力은 培養數時間에서 急激히 增加된다고 한바 있다.

一般的으로 嫌氣性細菌의 動物感染에 있어 接種菌은 增殖의 基礎를 얻은 다음에 增殖과 産生된 毒素가 感染進行의 前驅를 이룬다는 것으로 볼때 이와같은 현상은 接種材料에 따라 感染의 차이가 있는 것으로보아 氣腫菌의 感染力을 增加하는 方法을 追究하고자 接種菌에 동물혈액, 人體用血漿 및 鹽化칼슘液등을 첨가하여 마우스 및 랫트 皮下接種을 하였던바 感染力을 增加하여 높은 폐사율을 보이었다. 이 결과로 腦內接種과 같이 어느정도 熟練된 手技가 필요없이 皮下接種으로도 攻撃이 가능하게 되었다.

供試혈액의 有效濃度는 2倍稀釋液이며 이는 原液과 같은 효과를 가지나 혈액이 稀釋됨에 따라 無効함은 血液中的 菌發育 促進物質이 감소되는 것에 基因하는 것으로 본다.

供試動物의 體重에 의한 影響은 個體의 體重에 따라 약간의 차이가 있으나 대체적으로 全血液의 稀釋菌에 있어 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 에서 100%, 赤血球에 있어 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 에서 100%, 血清에 있어 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 에서 100%의 폐사율을 보였으나 豚과 馬血清에 있어서는 10^{-3} 에서서 폐사를 보지 못하였다(第6表). 이등의 血清中 어느成分의 作用에 의하여 이와같은 현상을 초래하는 것인가는 未知이나 個體特異性으로 보는 抑制物質의 作用에 의한 것이 아닌가 思料된다. 위의 實驗結果로서 進술한바와 같이 氣腫菌의 單味接種으로서 마우스를 폐사시킬 수 없는 微量의 菌으로도 높은 폐사를 가져오며 個體差의 影響은 받지않아 免疫마우스에 菌攻撃이 가능하게 되었다. 이와같은 결과는 感受性이 높은 기니픽에 있어서도 感染力의 增加를 볼수 있었으며 랫트에서도 稀釋菌 10^{-4} 에서 100%의 폐사율을 가져왔다. 또한 惡性水腫菌의 綿羊血液 稀釋菌에서도 10^{-4} 에서 100% 폐사하였으며 對照群은 10^{-2} 에서도 全例生存하였다. 腦內接種시와 같이 氣腫菌弱毒菌은 動物혈액을 사용하여서도 感染力의 增加를 보지 못하였다. 이것은 腦內接種시와 같이 菌은 어느정도 增殖되나 毒力이 極히 弱한 菌에서는 發病을 이르킬 정도의 菌增殖을 이루지 못하여 病變의 進行이 停止하여 治癒되는 것으로 즉 發病체사에는 어느정도의

상의 毒力이 필요한 것으로 본다.

氣腫菌에 혈액을 첨가하여 接種하였을시 感染力이 增加되고 폐사율이 높아지는 것은 혈액을 첨가한 氣腫菌을 마우스 皮下에 接種하였을때 菌의 急速한 增殖으로 毒素産生이 增加하여 發病力의 發揮을 增大하는 것으로 생각된다. 다시 말하자면 菌接種部位에 菌의 增殖에 基礎를 주므로서 菌增殖이 旺盛하여지며 毒素에 의하여 特異의 血樣浸潤을 이르킨후 菌은 淋巴腺과 血流를 따라 全身장기에 移行하여 敗血症을 이르켜 폐사하는 것으로 본다. 바꾸어 말하자면 病原菌의 增殖하는 局所에서는 生體反應으로서 病變이 생기며 炎症, 壞死를 이르키며 炎症은 生體의 防禦機轉이라 볼수 있으나 壞死로 되면 病原菌은 增殖이 容易하게 되어 感染이 增加되는 것으로서 毒力에 重要な 要因으로 볼수있는 侵襲性和 毒性 兩者의 作用을 增加시켜 病原體 侵入局所의 組織을 破壞하는 因子의 增強을 촉진하는 것으로 본다. 이와같은 현상은 菌接種에 添加材料과 방법에 따라 차이가 있으며 培養菌液에 比하여 洗滌芽胞菌의 感染力은 감소된다. 그러나 洗滌芽胞菌液에 培養濾液을 첨가할 경우에는 培養菌液과 같은 感染力을 가지게 된다. 이와같이 洗滌芽胞菌의 感染力이 弱하여지는 것은 菌이 體組織內에서 增殖에 필요한 조건 하나인 隨伴毒素의 消失에 起因한 것이다. 한편 感染力의 增加 方法으로 動物體內에 血行障害 또는 筋肉, 皮下織을 挫滅시켜 菌을 接種하면 感染力의 增加를 볼수 있다. 또한 Smith(1951)와 MacCabe(1951)등은 Mucin을 사용하여 感染力을 增加하였고 Tesarz(1947)는 炭疽菌의 개구리 感染에 있어 溫度調節을 하여주므로서 感受性을 높여 주었다. 그리고 渡邊(1959)는 Cortison을 使用하여 病毒의 毒力을 增加하여 주었다고 하였다.

氣腫菌의 마우스 感染에 2%鹽化칼슘液을 사용하여 感染力의 增加를 檢討한바 氣腫菌의 마우스 皮下接種에 의한 感染力의 增強을 위하여 2%鹽化칼슘液을 사용하는 試驗에서 鹽化칼슘과 菌液을 각각 다른 部位에 接種하였을때는 菌力에 차이가 없었으며 接種菌과 鹽化칼슘液을 同一部位에 接種하였을 때만이 感染力의 增加와 安定性있는 成績을 볼수 있었다. 즉 氣腫菌의 芽胞浮遊液을 2%鹽化칼슘液으로 稀釋한 菌液을 마우스에 0.2 5ml, 랫트에 1.0ml씩 皮下接種하였을 때 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 에서 100% 폐사하고 랫트에 있어서는 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 에서 100%의 폐사율을 보였으며 對照群은 全例가 生存하였다(第10表). 또한 同一한 方法에 의하여 破傷風菌과 惡性水腫菌의 菌力增加는 보았으나 *Cl. amylobacter*, *Cl. putrificus*, *Cl. biferments* 및 *Cl. sporogenes* 등에서는 菌力增加를 보지 못하였다. 이와같은 實驗으로서 Keppe(1951)는 *Cl. botulinum*의 毒力增加에

2.5%鹽化칼슘液을 사용하여 毒力增加를 보였다.

이와같이 鹽化칼슘을 첨가한 菌液이 菌力を 增加하는 原因은 生理的食鹽水로 芽胞菌을 洗滌함으로써 消失된 病原性이 Ca ion의 導入으로 菌력이 再現한 것으로 證明하였으나 이것은 局所組織에서 Ca의 組織障害에 의한 것으로 意見이 一致되고 있다. Fildes(1929)도 이와같은 사실을 증명하였고 高田(1937)는 菌의 發育機轉을 支配하는 것은 ion作用에 의하지 않음을 論하고 局部的 組織障害에 意見을 같이 하였다. 이와같이 本菌에 의한 感染發病은 菌의 發芽增進에 의한 것이고 毒素은 二義的인 것으로 보며 本菌의 實驗動物에 대한 人工感染은 感染의 動搖가 심하고 또 洗滌芽胞의 單味接種으로서는 感染폐사를 보지 못하나 CaCl₂를 첨가 接種함으로써 芽胞發芽를 촉진함으로써 感染폐사 하는 것이다.

이상과 같은 試驗成績에 의하여 氣腫疽抗血清檢定에 마우스를 이용하고자 抗血清의 効力檢定을 기니픽에 있어서와 같은 方法으로 마우스를 사용하였던바 기니픽에 比較하여 遜色이 없으며 安定性있는 實驗成績을 얻었다 즉 抗血清實量 0.5ml의 마우스 免疫接種으로서 攻擊毒 10³ M. L. D.에 100%의 耐過生存率을 보임으로서 종래 기니픽 사용시 攻擊毒 10² M. L. D.에서 100% 耐過生存시에 合格으로 規定한 規準과 比較하여 마우스에 있어서도 기니픽과 같은 防禦力을 發揮함으로써 마우스 사용이 可能함을 確認하였다. 마우스의 被動免疫에 의한 防禦力은 比較的 높으며 기니픽과 같은 實驗結果를 얻었다(第11表).

抗血清의 稀釋으로 抗體價를 低下시켜 抗血清價를 測定할 경우 抗血清價의 차이를 비교적 明白히 증명할 수 있었다. 또한 氣腫疽抗血清 檢定을 위하여 仔細한 成績을 얻고자 마우스에 抗血清을 接種하여 各時間別로 感染防禦力을 測定한 結果 免疫마우스는 攻擊毒 100~1 000 M. L. D.에 100% 耐過生存할 수 있는 有効時間 즉 感染防禦力이 最高의 曲線을 보일때는 抗血清接種後 10時間~24時間 이내임을 확인하였다. 이것으로부터 攻擊이 가장 効果的인 時期도 이때임을 알수 있다. 抗血清을 마우스 皮下에 接種하였을 때 抗血清은 서서히 吸收되는 것으로 보이며 24時間 後에서 最大量이 증명되고 점차 소실하여 7日에서는 攻擊毒 1 M. L. D. 에 대한 防禦能力도 갖지 못하였다. 이와같은 사실로 Basset(1950)는 기니픽을 사용한 實驗에서 抗血清接種 24時間에 菌攻擊을 力說하였으며 Beck(1899), Bruck(1904), 그리고 小田(1935)등은 豚疫抗血清의 効力檢定에 北田(1935)는 炭疽抗血清의 檢定에 있어 다같이 抗血清 接種後 24時間에 攻擊하였다.

氣腫疽生菌豫防藥의 接種犏牛에 있어서의 抗體產生을 조사하고자 마우스를 이용하여 試驗한바 同量의 豫防藥

接種일지라도 14日후에는 攻擊毒 10 M. L. D.에서 40% 28日후에서는 10 M. L. D.에서 100% 耐過生存한 實驗成績을 얻어 野外에서 실시된 豫防藥接種牛의 免疫獲得 정도를 容易하게 증명할 수 있어 氣腫疽抗血清의 効力檢定에 또는 防疫上 전지에 있어서도 마우스 이용의 價値를 높이 評價할 수 있다.

一般的으로 豫防藥의 力價試驗에 供試동물의 선택은 重要한 것이며 가능한 菌對試驗動物의 關係가 自然에서 이러나는 感染病像에 가까운 試驗動物의 사용이 重要한 것으로 보아 마우스를 사용한 氣腫疽豫防藥의 力價試驗에 있어 試驗成績의 新빙성을 높이기 위하여 종래부터 사용하여 오는 기니픽을 對照로 사용하여 比較하였던바 氣腫疽豫防藥의 効力檢定에 있어 기니픽에 有效한 氣腫疽豫防藥이 마우스에 있어서도 有效함으로써 豫防藥의 効力檢定에 마우스 이용이 可能함을 확인하였다.

氣腫疽豫防藥의 마우스 免疫에 있어 接種部位에 따라 攻擊毒에 대한 耐過生存率에 차이를 보였으며 免疫方法으로서는 皮下接種이 良好하였으며 攻擊方法으로서는 腦內攻擊또는 皮下攻擊이 効果的인 방법임을 알게 되었다. 또한 豫防藥의 接種量, 免疫回數, 間隔 및 期間등에 대한 檢討 즉 免疫接種後 所定量의 攻擊毒에 대한 耐過生存에 미치는 影響은 第21表에 表示된바와같이 免疫總量 0.1ml로서는 攻擊毒 1 M. L. D.에서 60%의 耐過生存率에 不過한 結果를 보이므로서 免疫總量은 0.5 ml이상이 필요하였다. 豫防藥의 免疫群에 대한 攻擊時期는 免疫接種後 21日前後가 적합한 時期로 보았다. 이와같이 免疫期間을 충분히 주고 攻擊함으로써 마우스에 충분한 免疫을 賦與하게 되고 높은 耐過生存率을 얻을 수 있다. 그리고 同一免疫量에서도 頻回免疫法이 보다 有效한 結果를 갖어왔다.

豫防藥의 効力檢定에 있어 氣腫疽生菌豫防藥을 各 Lot別로 0.5ml씩 7日 間隔으로 2回皮下接種 21日후에 腦內攻擊한 마우스 各免疫群은 攻擊毒 10 M. L. D.에 70~80%의 耐過生存率을 나타냈으며 各 Lot間的 마우스에 대한 免疫法에는 큰 차이가 없었으며 効力은 大同小異하였고 마우스에 있어서도 氣腫疽豫防藥의 有効性이 높다는 사실을 증명하였다. 한편 이 試驗과 同時에 기니픽을 使用하여 比較試驗한 결과 攻擊毒 10 M. L. D.에 80%의 耐過生存率을 보여 主로서 兩者間에 차이가 없는 것으로 보아 기니픽에 比較하여 遜色없는 成績을 얻어 마우스의 이용가치를 더욱 높게 하였다.

氣腫疽生菌豫防藥의 原液으로서 免疫한 効力試驗에 있어서는 攻擊毒量에 따라 耐過生存率에 차이가 나지 않은 것으로 보아 어느정도 이상의 力價를 가진 豫防藥에서는 攻擊量에 따른 耐過生存率에 큰 影響을 주지 못하였다. 그러나 稀釋 豫防藥의 免疫群에서는 攻擊毒量에

따라 耐過生存率에 差異를 볼수 있었으며 이와같이 豫防藥을 稀釋하여 抗原力을 저하시킨 方法을 應用하면 豫防藥의 効力檢定에 있어 더욱 明確한 結果를 얻을수 있을 것으로 본다.

氣腫疽生菌豫防藥의 免疫接種에 의한 마우스의 免疫法에 대한 實驗成績은 이미 기재한바와 같은 結果를 얻었으므로 氣腫疽死菌豫防藥의 마우스에 있어서의 免疫產生을 調査하였다. 死菌豫防藥은 培養液體 및 菌體成分이 같이 免疫因子로 必要한 것으로서 菌體가 主免疫因子로서 培養液成分은 副因子로 봄이 妥當한 것으로 알려져 왔다. 또한 一般의으로 生菌免疫原은 死菌免疫原에 比較하여 免疫原性이 強하고 免疫產生이 迅速한 것으로 알려져 있는바이나 이 試驗에서는 免疫조건 등 구체적인 點을 考慮하지 않고 生菌豫防藥에서와 같은 조건하에 死菌豫防藥의 接種으로 產生되는 免疫性을 生菌免疫原에 의한 免疫產生을 마우스에서 比較한 결과 死菌豫防藥에서도 生菌豫防藥에 있어서와 같은 정도의 免疫을 賦與함을 입증하였다. 한편 이 試驗을 뒤받침하기 위하여서 이와같은 試驗을 기니픽 및 犢牛을 사용하여 兩豫防藥을 比較하였던바 마우스를 사용한 試驗成績과 차이가 없는 結果를 얻으므로서 死菌豫防藥도 마우스에 있어 生菌豫防藥과 같이 有効性에는 차이가 없음을 알게 되었다.

이상 기재한바와 같이 氣腫疽菌은 마우스 感染에 높은 耐性을 보였으며 氣腫疽抗血清 및 豫防藥의 마우스 接種으로서 기니픽과 동등의 免疫을 賦與함으로써 종래 기니픽을 사용한 氣腫疽豫防藥의 効力檢定으로서 는 기타 豫防藥効力檢定에서 採用되고 있는바와 같은 免疫群과 對照群間的 LD50 또는 M.L.D.의 差를 力價로 定하는 方法의 適用이 곤란하였으나 진술한바와 같은 實驗으로서 氣腫疽菌의 微量 接種으로 마우스에 높은 感染耐성을 가져오며 毒力의 動搖를 阻止하게 되었고 많은 마우스의 사용이 가능하게 됨으로서 M.L.D에 의한 力價測定이 가능하게 되어 ED₅₀을 効力判定의 基準으로 할수 있을 것이며 기니픽에 비하여 精確하고 安定性있는 判定을 期할 수 있어 氣腫疽抗血清 및 豫防藥의 効力選定에 마우스 사용을 제안하는 바이다.

V. 結 論

氣腫疽菌의 마우스에 대한 感染과 豫防藥 및 抗血清의 檢定을 위한 實驗을 施行하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 氣腫疽強毒菌을 生理的食鹽水로 10倍 稀釋한 菌液 0.2ml을 體重 10~12gm의 마우스 皮下, 筋肉內, 腹腔內 및 靜脈內接種에 의한 感染斃死는 불가능하였다.

2. 氣腫疽強毒菌을 生理的食鹽水로 稀釋하여 體重 10~12gm의 마우스 腦內에 0.03ml을 接種하면 5,120倍 까지 感染斃死하였으나 氣腫疽弱毒菌은 5倍 稀釋菌液 接種에 있어서도 感染斃死는 불가능하였다.

3. 氣腫疽強毒菌을 生理的食鹽水 대신에 馬, 犢牛, 緬羊, 豚, 犬, 家菌, 기니픽 鷄, 오리등의 全血, 赤血球 및 血清 그리고 人體用血漿 및 2%鹽化칼슘液등을 稀釋하여 體重 12~15gm의 마우스 皮下에 0.25~0.5ml을 接種하였을때 生理的食鹽水를 稀釋液으로 사용한 것에 比하여 현저한 毒力增強을 이룩했으나 氣腫疽弱毒菌의 毒力增強을 볼수 없었다. 단 氣腫疽強毒菌에 있어서도 馬血清 및 豚血清을 사용한 群에 있어서는 生理的食鹽水를 사용한 對照群과 比하여 차이가 없었다.

4. 랫트에 있어서도 마우스와 같은 方法으로 全血, 赤血球, 血清, 血漿 및 2%鹽化칼슘液으로 氣腫疽強毒菌을 稀釋하여 體重 30~60gm의 랫트皮下에 0.5~1.0 ml을 接種하면 生理的食鹽水 稀釋菌의 對照群과 比較하여 뚜렷한 毒力增強을 일으켰다.

5. 氣腫疽抗血清 0.5ml을 마우스接種 24時間後의 攻擊에 있어서는 攻擊毒 10³ M.L.D.에 100%, 10⁴ M.L.D.에서 80% 耐過生存하였다.

6. 氣腫疽生菌豫防藥이 마우스 免疫에 있어 同一免疫量에서도 1回接種群보다 數回免疫群이 良好하였고 免疫總量은 0.5~1.0ml가 適合하였다.

7. 氣腫疽生菌豫防藥의 마우스 免疫群에 대한 攻擊은 初回 免疫接種日부터 3週日 前後가 가장 適合하였다.

8. 豫防藥의 接種部位로서는 皮下免疫이 좋았으며 攻擊 方法으로서는 腦內 또는 皮下攻擊이 良好한 結果를 얻어왔다.

9. 氣腫疽生菌豫防藥의 마우스 免疫에서 0.5ml씩 7日 間隔으로 2回皮下接種 21日후에 攻擊한 결과 攻擊毒 5 M.L.D.에 100%, 10 M.L.D.에서 70~80% 耐過生存하였다. 이와같은 實驗으로서 氣腫疽死菌豫防藥에 있어서도 같은 成績을 얻었다.

10. 豫防藥을 5倍 및 10倍로 稀釋하여 免疫接種한 마우스群에 있어서는 原液으로 免疫한 마우스群에 比較하여 攻擊毒量에 대한 耐過生存率의 差異가 甚하였다.

11. 氣腫疽豫防藥 및 抗血清力價檢定에 마우스를 供試함으로써 安定性있는 實驗成績을 얻었다.

VI. 參考文獻

- Breed, F. : A study of blackleg and its complication, J. A. V. M. A., 90, 521-528, 1927.
 Bakey, L. : The Blood-Brain Barrier, Charles C. Thomas Pub., Illinois, 1951.

- Browman, T. : The permeability of the cerebral vessels in normal and pathological conditions, Copenhagen, Munksgaard. 1943.
- Basset, J. : Tests for the activity of blackleg vaccines and serum. Bull. Acad. Vet. Fr., 23 427-429, 1950.
- Danielson, I. S. and Bloton, R. : Laboratory studies on the immunizing value of hemorrhagic septicemia bacterin and blackleg bacterin. Proc. U. S. Livestock Sanit. Ass. 54th Ann. Meeting., 259-271, 1950.
- 飯塚和吉 近藤正一 : 炭疽感染及免疫에 관한 研究, 獸疫調査所研究報告, 第14號 277-344. 1932.
- Fildes, P. : IV. The conditions under which tetanus spore germinates in vivo. Brit. J. Exp. Path., 8. 387-393, 1927.
- Fildes, P. : VIII. The positive limit of oxidation reduction potential required for the germination of spore of *B. tetani* in vitro. Brit. J. Exp. Path., 10, 151-175, 1929.
- Fildes, P. : IX. The oxidation reduction potential of the subcutaneous tissue fluid of the guinea pig : its effect of infection. Brit. J. Exp. Path., 10, 197-204, 1929.
- Goss, L. W., Barbarin, R. E. and Haines, A. E. : Some Characteristics of *B. chauvoei*. J. Inf. Dis., 29, 615-629, 1921.
- Heller, H. H. : Etiology of acute gangrenous infection of animals : A discussion of blackleg, braty, malignant edema and whole septicemia. J. Inf. Dis., 27, 385-451, 1920.
- Henderson, D. W. and Roberts, R. S. : Studies on *Clostridium chauvoei*. I. The analysis of the "H" and "O" antigen of *Cl. chauvoei*, II. Active immunization with pure "O" antigen. Brit. J. Exp. Path., 13, 412-421, 1932.
- Jungherr, E. : A comparison of *B. chauvoei* strains from cattle and sheep. J. Inf. Dis., 42 84-92, 1928.
- Johann., J. U. and Franz, H. : Deutsche Tierärztliche Wechenschrift. Nr. 6, 73, 1940.
- Keppe, J. : The pathogenicity of the spores of *Cl. botulinum*. J. Hvg. Comp., 49, 36-45, 1951
- 加賀誠 : 炭疽에 感染과 免疫에 관한 研究 : 1報 菌囊黃液 添加에 依한 炭疽菌의 感染增加에 對하여 日本細菌學雜誌, 第11卷, 第6號, 477-480, 1956,
- 木村將義 : Welch A型菌에 感染機轉及感染防禦의 免疫試驗, 日本細菌學雜誌, No. 553. 118, 1942.
- 北田庄市, 八木紙吉 : 炭疽에 急速免疫法에 關한 實驗的研究, 家畜衛生協會報, 第2卷, 第4號, 1935.
- 北田庄市, 田淵英一 : 豚疫免疫血清의 實驗的研究, 家畜衛生協會報 第2卷, 1935.
- 昆野桓太郎, 橋本今朝壽 : Formalin 處置法 氣腫疽培養의 豫防藥接種에 對한 價値에 對하여, 日本獸醫學會雜誌, 第13卷, 第1號, 19-38, 1934.
- 小田勇男 : GAS 壞疽豫防에 關한 實驗的研究, 衛生學傳染病學雜誌, 第34卷, 第9-12, 264~266, 1938
- Lindley, E. P. : Preliminary observations on a flocculation test in studies on black leg vaccine. Brit. Vet. J., 111, 87-96, 1955.
- McEwen, A. D. : Studies regarding immunity. J. Comp. Path. and Ther., 39, 309-314, 1926.
- McLeod, C. H. : The mode of action of mucin in experimental meningococcus infection. I. The properties of mucin which influence its actovoty. Am. J. Hyg., Sec. B., 34, 41-50, 1 41.
- The mode of action of mucin in experimental meningococcus infection. II. The effect of mucin upon the defense mechanism of the mouse. Am. J. Hyg., Sec. B., 34, 51-63, 1941
- McEwen, A. D. and Roberts, R.S. : Gas gangren infections of sheep : Passive immunization. J. Comp. Path. and Ther., XLV. 212-223, 1932.
- MaCabe, A. F. : The mode of action of mucin in promoting bacteria infection. Edinb. Med. J. 58, 377-391, 1951.
- 森田平治郎 : 氣腫疽 病理의 實驗的研究, 日本獸醫學會雜誌, 第15卷, 第1號, 1-10, 1926.
- 大澤忍婦 : 細菌의 發育促進物質에 關한 研究, 日本微生物學病理學雜誌, 第36卷, 170-174, 1942.
- 奧田金松 : 氣腫疽菌의 產生毒素에 對하여 日本獸醫學會雜誌, 第8卷, 157-199, 1929.
- Piercy, S. E. : A comparison of black quarter vaccines. Brit. Vet. J., 107, 63-75, 1951.
- Qine, A. H. : Factors involved in the protection of cattle against blackleg. J. A. V. M. A., 12, 475-478, 1953.
- Robertson, M. : Serological grouping of vivrion septique and their relation to th productoin of toxin. J. Path. Bact., 23, 153-170, 1920.

- Russell, D. S. : V. The local fate of tetanus spores inoculated in to guinea pig. Brit. J. Exp. Path., 8, 377-386, 1927.
- Robertson, M. and Felix, A. : Serological studies in the group of the spore bearing anaerobes II. In vivo experiments with on "O" immune serum vibriion septique devoid of antitoxin content. Brit. J. Exp. and Path., 11, 14-23, 1930.
- Roberts, R. S. : The practical value of the heat-stable antigen of Cl. chauvoei and immunizing J. Comp. Path. and Ther., 46, 56-61, 1933.
- Ryff, J. F. and Lee, A. M. : Blackleg immunity J. A. V. M., 10, 285-288, 1947.
- Stillamann, E. G. and Schulz, R. Z. : Susceptibility of mice to intranasal instillation of various type of pneumonia. J. Inf. Dis., 66, 174-177, 1940.
- Scott, J. P. : Potency tests for blackleg immunization. J. A. V. M. A., 64, 67-74, 1923.
- Scott, J. P. : Blackleg immunization. J. A. V. M. A., 80, 848-862, 1938.
- Smith, H. : The virulence enhancing action of mucins : A survey of human mucins and muscosal extracts for virulence enhancing activity J. Inf. Dis., 88, 207-211, 1951.
- 彩村克治 近藤正一 : 氣腫疽에 관한 研究, 기내픽에 있어 氣腫疽菌培養菌液 및 Formalin豫防藥의 免疫元性에 對하여 獸疫調査所 研究報告, 第10卷, 111, 1940
- 鈴木一彦 : GAS 壞疽의 發病機轉에[關한 研究, 海軍軍醫學會雜誌, 第33卷, 第4號, 380, 1944.
- Tesarz, Z. : Resistance of the frog to anthrax. Schwiz. Z. Path. Bakt., 10, 50-79, 1947.
- 高田周平 : Novyic 惡性水腫菌에 의한 實驗的 瓦期壞疽의 豫防에 關한 研究, 實驗醫學雜誌, 第21卷, 197-213, 1937.
- 武田義照 : 炭疽菌의 毒力動搖에 對하여 日本獸醫學會雜誌, 第20卷, 第6號, 260-370, 1958,
- 海津元昌, 林文郎 : 免疫血清에 關한 化學的研究. 炭疽高度免疫經過牛에 있어 各種蛋白質의 量的變化, 日本獸醫學會雜誌, 第16卷, 107-134, 1937.
- Vawfer, L. P. : Recovery of Clostridium sordilli from cattle and sheep. A. J. V. R., 3, 1942.
- 度邊守松 : Formon과 感染과의 關連性에 關한 諸問題 Cortisone의 感染增殖作用에 對하여, 日本細菌學雜誌, 第14卷, 第7號, 582-583, 1959.
- 山田倫子 : 마우스의 1.2 細菌에 對한 感染受性에 미치는 酒精의 影響, 日本醫學及 健康保險, 3265-3285, 1942.

Studies on the Biological Assay of Black leg Vaccine and Antiserum

Dong Sung Kim, D. V. M.

Veterinary Research Laboratory, Office of Rural Development
Anyang, Korea

ABSTRACT

Throughout the studies the following experimental results were summarized.

1. It was impossible to infect and kill the mice, weighing 10 to 12 gm, by inoculating 0.2ml of virulent Cl. chauvoei, diluted 1 to 10 with physiological saline, via subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal or intravenous, route.

2. The mice which were inoculated in brain with 0.03ml of Cl. chauvoei diluted 1 : 5120 with physiological saline were resulted in all death after infection, but not in case of attenuated strain even in dilution of one to five.

3. Virulent Cl. chauvoei were diluted with each of those of whole blood, erythrocytes and serum of horse, calf, swine, sheep, rabbit, guinea pig, chicken and duck, human plasma and 2% CaCl solution, and inoculated subcutaneously 0.25 to 0.5ml in mice, weighing 12 to 15gm. It was resulted in significant increase in virulence as comparing with the case of physiological saline solution except when horse and pig sera were used. Such a phenomena were not seen in attenuated strain.

4. Virulence of virulent Cl. Chauvoei could be increased significantly in rat, as the procedures used in mice, by suspending in whole blood, erythrocytes, serum, or plasma of various animals, or 2% CaCl₂ solution and by inoculating subcutaneously 0.5 to 10 ml in rat, weighing 30 to 60 gm, as compared with those of control group which used physiological saline solution as diluent.

5. Mice resisted 100 and 80 percent against challenge of 10³ and 10⁴ M.L.D. respectively, 24 hours after inoculation of 0.5 ml black leg antiserum.

6. Immune response to the black leg living vaccine in mice could be obtained more favorably in the group of repeated vaccination rather than those of single inoculation and the most profitable inoculum size of the vaccine was 0.5 to 1.0ml.

7. Challenge for the immunized mice could be carried out effectively 3 weeks after first vaccination.

8. Satisfactory results could be obtained by inoculating subcutaneously for the immunization and intracerebrally or subcutaneously for the challenge.

9. Mice which were inoculated with 0.5ml of black leg living vaccine via subcutaneously two times at seven days interval and 21 days after first inoculation and challenged with 5 and 10 M.L.D. of virulent strain, resisted 100 and 70 to 80 percent respectively. Same results were obtainable in black leg killed vaccine as the procedures used in living vaccine.

10. There were significantly different resistences against the definite challenge does between the mice groups which were immunized with the living vaccine diluted five or 10 times and the undiluted.

11. For the biological assay of black leg living vaccine and antiserum, satisfactory results could be obtained using mice.