

牛氣腫疽의 改良補體結合反應에 관한 研究

徐 富 甲

서울農業大學

緒 論

牛氣腫疽에 대한 血清學的 診斷法은 이미 오래전부터 研究되어 왔다. 牛氣腫疽의 血清學的 診斷에 있어서 Hecht⁽¹³⁾는 沈降反應을 이용할 수 있음을 처음으로 밝혔고, Declich⁽⁶⁾는 氣腫疽抗血清 및 氣腫疽로 斃死한 畜牛의 臟器抗原으로 沈降反應을 실시한 결과 患部筋肉 및 肝에서만 가벼운 陽性反應을 보였고 기타의 臟器浸出液은 陰性이었기 때문에 沈降反應에 의한 氣腫疽의 診斷的 價値가 거의 없음을 보고 한 바 있다. 한편 Miessner⁽³²⁾ 등은 69例의 牛氣腫疽 可檢物에 대한 실험에서 沈降反應의 診斷價値가 있으며 나아가서 氣腫疽와 惡性水腫의 鑑別도 가능했음을 보고하였다. 그러나 Pfeiler⁽³⁶⁾는 氣腫疽의 自然感染牛에서는 沈降反應이 陽性이었으나 人工感染例에 있어서는 陰性이었다고 보고 하였다.

奥田⁽⁶⁷⁾ 및 川村⁽⁶²⁾ 등은 抗氣腫疽家兔血清으로 沈降反應을 실시하여 陽性反應을 보았으므로 沈降反應이 氣腫疽를 診斷하는데 가치가 있음을 밝혔다. Koegel⁽²¹⁾은 反芻獸의 氣腫疽沈降素를 사용하여 沈降反應이 陽性으로 判定됨을 보고하였으나 Gerlach⁽⁸⁾는 沈降素가 氣腫疽斃死牛의 浸出液이나 氣腫疽分離菌에 대해서 뿐만 아니라 다른 類似嫌氣性菌에 대해서도 陽性反應을 보이기 때문에 沈降反應으로서는 嫌氣性菌症의 鑑別診斷을 하는데 큰 價値가 없음을 보고하였다. 그러나 Rottgardt⁽⁴³⁾는 氣腫疽 沈降素가 類似嫌氣性菌症 중에서 오직 惡性水腫症에서만 交叉反應이 있다고 보고한 바 있다. Lindlay⁽²⁷⁾도 氣腫疽免疫動物에 있어서의 抗體生産能力을 評價하는데 있어 試驗管内沈降反應法을 실시 보고한 바 있다. 또한李 등⁽⁶⁶⁾은 家兔의 高度免疫血清으로 氣腫疽感染筋肉内の 浸出液 沈降原에 대한 沈降反應에서 特異的인 陽性反應을 보였으며 몇몇 다른 嫌氣性菌의 免疫血清에 대해서 交叉反應을 이르

키지 않음으로 沈降反應이 氣腫疽를 診斷하는데 이용될 수 있다고 하였다.

Heller⁽¹⁶⁾, Zeissler^(50,51), Seigneux⁽⁴⁵⁾, Wolter⁽⁴⁹⁾ 등의 보고에 의하면 氣腫疽와 惡性水腫에 대한 凝集反應의 鑑別法으로서는 充分한 鑑別이 될 수 없다고 하였으나 Grosso⁽¹¹⁾와 Rottgardt⁽⁴³⁾는 鑑別이 된다 하였으며 Ginns⁽⁹⁾는 菌株에 따라 凝集되지 않는 것도 있기 때문에 問題點이 남아 있다 하였다. 그리고 Goss 등⁽¹⁰⁾는 馬免疫血清을 사용하여 凝集反應에 의한 鑑別은 되지만 아직도 충분한 성적을 얻을 수 없음을 밝힌 바 있다. 그리고 昆野 등⁽⁵³⁾은 氣腫疽菌 63株에 대한 血清學的 試驗을 하는 동시에 惡性水腫菌과의 鑑別에 대한 實驗結果 氣腫疽菌株의 大部分은 凝集反應上: monotype 이지만 드물게 異型이 있을 수 있다 하였으며, 氣腫疽牛免疫血清은 凝集反應上 各型이 感染을 豫防할 수 있는 동시에 그 培養濾液을 백신으로 한 2型의 交叉免疫試驗에 있어서 相互豫防이 되기 때문에 氣腫疽菌은 免疫學的으로 一元性인을 알게 되었고 氣腫疽菌과 惡性水腫菌은 凝集反應上 特異的이기 때문에 兩者간의 鑑別診斷에 確實性이 있음을 認定하고 있으나 이것은 凝集反應上的 各型을 기초로한 多價免疫血清인 때에 한해서만 가능하다고 發表한 바 있다.

氣腫疽에 대한 防禦試驗에 있어서 Jungher⁽²⁰⁾는 기니픽에 氣腫疽抗血清을 接種하고 17時間 후에 氣腫疽菌液을 後毒接種하여 防禦力價를 測定함으로써 防禦試驗의 가능성을 보고 하였다. McEwen 등⁽³¹⁾도 緬羊과 기니픽 그리고 마우스등을 사용하여 抗氣腫疽馬血清의 防禦力價測定을 함으로써 역시 氣腫疽에 대한 防禦試驗의 成立 가능성을 보고하였다. Ryff 등⁽⁴⁴⁾도 氣腫疽 백신의 効力檢定에서 어린 기니픽을 사용하였고 Perseneus 등⁽³⁵⁾과 Cooper 등⁽⁶⁾도 氣腫疽菌의 免疫力價測定을 하는데 마우스를 사용한 防禦試驗을 하였다.

김⁽⁶⁴⁾은 氣腫疽 백신의 檢定과 抗血清의 力價測定을

위해서 마우스를 사용하여 中和反應의 成立 가능성을 밝혔다.

牛血清이 抗血清인 경우 抗體·抗原結合物은 特異的으로 溶血을 抑制하는 정도가 얇은 것으로 알려져 있다. 즉 Nakamura^(33,34)는 抗牛疫牛血清內에 抗體가 존재 할에도 直接補體結合反應을 하였을 때 종종陰性反應을 보이는 때가 있기 때문에 이 反應이 만족할 만한 診斷法이 될 수 없다고 보고하였다. Rice 등^(38,39)은 牛免疫血清中에 含有된 細菌性抗體는 대체로 特異抗原과 反應하여 補體를 結合시킬 수 있지만 신선한 牛血清을 補強한 改良補體結合反應에서 만큼은 민감도가 약 있음을 보고한 바 있다.

Lambert 등⁽²²⁾은 Brucella 菌症의 凝集反應疑陽性牛를 檢索하기 위해서 補體結合反應을 이용하였던 바 抗血清을 熱處理하는 것이 민감할 뿐 아니라 感染되지 않은 陰性牛血清의 檢査에 있어서도 더욱 정확성을 기할 수 있었음을 보고하였다.

Ristic⁽⁴²⁾와 Welter^(46,47)는 소의 Anaplasma病에 대한 抗血清檢索에 있어서 毛細管凝集反應을 補體結合反應과 比較하였던 바 毛細管凝集反應에서는 疑陽性을 보였으나 補體結合反應에서는 疑陽性 및 抗補體作用이 어느 정도 있을 수 있음을 보고하였다.

조⁽⁵⁸⁾는 韓牛의 炭疽·氣腫疽의 混合백신에 의한 人工免疫牛抗血清에 대하여 기니피補體에다 신선한 家兔正常血清을 補完添加하는 改良補體結合反應을 試圖한 바 있다.

抗原抗體檢索에 가장 편리하게 이용되는 血清學의 方法은 凝集反應과 沈降反應이다. 그러나 牛抗血清은 위의 反應에 적합하지 않아서 力價가 낮거나 有意性인 結果를 갖어 오지 못한다. 더구나 氣腫疽菌과 같이 芽胞形成細菌에 있어서는 그와 같은 경향이 더욱 짙다. 實驗動物을 이용하는 防禦試驗이나 中和反應등은 牛腫疽의 경우 抗原·抗體의 檢索에 적용될 수 있으나 그 結果判定에 있어 長時間이 소요될 뿐더러 非經濟的이고 抗原抗體의 定量試驗에 적합하지 않다. 한편 補體結合反應은 防禦試驗이나 中和反應에서 보는 缺點은 없으나 直接法이 적용될 수 없다. 抗牛血清은 기니피補體와 綿羊赤血球 溶血素로 구성되는 溶血系에 대하여 親補體의인 경향을 보인다. 그러나 기니피補體에 新鮮한 家兔血清成分을 첨가하여 줌으로써 매우 예민하고 특이적인 補體結合反應이 이루어질 수 있다.

이 研究의 目的은 위에 적은 改良補體結合反應의 反應系를 구성하는 抗原과 補強血清製造에 관한 실험을 주로 하여 牛氣腫疽 抗原·抗體의 檢索을 비롯한 改良補體結合反應을 확정하는데 있다.

材料 및 方法

抗原菌株 補體結合反應 抗原과 抗血清을 만들기 위해서 靑川株, 報恩株, 瑞山株 그리고 第2菌株의 네 가지 氣腫疽菌을 사용하였는데 이것은 農村振興廳·家畜衛生研究所로 부터 分讓 받았다.

補體結合反應 抗原 改良補體結合反應에 사용한 靑川株 氣腫疽菌抗原 (No. 14)는 다음과 같이 만들었다.

즉 芽胞가 30mg/ml로 함유되게 만든 浮游液을 37°C에서 48시간 배양하고 나서 70°C의 水槽에서 30분간 加熱하였다. 이 芽胞液을 0.5mM L-(α)-alanine과 0.1mM manganese가 함유된 (Hills^(18,19), Levinson 등⁽²⁸⁾ Harrell 등⁽¹²⁾ Church 등⁽⁴⁾ 徐⁽⁵⁵⁾) cooked meat 배지에 심고 37°C에서 15시간 배양하였다. 이 培養物을 121°C에서 20분간 가열하고 無菌脫脂綿거즈로 濾過하여 異物을 제거하였다. 이 濾過菌液을 Sharple 遠心分離器로 遠沈集菌하여 無菌生理食鹽水로 100배 稀釋하고 다시 이것을 500 rpm에서 2~5분간 가볍게 遠沈시킨 다음 沈查物인 殘餘培地成分을 제거 하였다. 그리고 上濁液은 4,000 rpm으로 30분간 遠心分離하여 採菌하였다. 이렇게 하여 얻은 細菌은 60mg/ml가 되도록 無菌生理食鹽水에 浮游시켜 4°C에 保存 사용하였다. 이것을 補體結合反應에 사용할 때에는 McFarland 混濁計 No. 1~2에 해당되도록 再稀釋하였다.

抗氣腫疽家兔血清製造用抗原 家兔에서 高度免疫血清을 얻기 위하여 사용한 靑川株氣腫疽抗原 (No. 1)을 thioglycollate 액체 배지에서 다음과 같이 만들었다(奧田⁽⁶⁷⁾ Goss 등⁽¹⁰⁾ Henderson 등⁽¹⁷⁾). 즉 供試菌을 배지에 심고 37°C에서 48시간 배양한 다음 石炭酸이 4%로 함유되도록 하여 2시간 放置하였다가 Sharple 遠心分離器로 遠沈集菌하였다. 이 集菌物을 다시 0.5%로 formalin이 첨가된 無菌生理食鹽水에 浮游한 다음 4°C에 보존 사용하였다. 이것은 家兔에 接種할 때에는 60mg/ml가 되도록 無菌生理食鹽水로 다시 稀釋하였다.

抗氣腫疽家兔血清 抗氣腫疽家兔血清을 얻기 위하여 體重 3kg 이상의 家兔 5마리를 供試하였다. 즉 靑川株氣腫疽菌抗原 No. 1을 60mg/ml가 되도록 無菌生理食鹽水로 稀釋 浮游한 다음 여기에다 20% 水酸化알미놀 gel을 1:1 혼합하여 家兔의 양쪽 後肢筋肉에 각 2.0ml씩 接種한 후 20일 만에 心臟에서 全採血하였다. 採血한 血液은 실온에서 10~12시간 방치하였다가 血清을 分離하고 5마리분을 同量混合하여 56°C에서 30분간 非動化한 다음 1.0ml씩 分注하여 -60°C

에서 보존 사용하였다.

抗氣腫疽牛血清 抗氣腫疽 牛血清을 얻기 위하여 1歲 전후의 韓牛 10 두를 供試하였는데 그중 5 두는 숫소였다. 供試牛에게 氣腫疽 2 苗백신을 접종하기 전에 對照用正常血清을 채취하였으며, 그후 12 개월간 月別, 個體別로 免疫血清을 채취하였다. 供試血清은 1.0ml 씩 小分하여 56°C에서 30 분간 非動化한 다음 -60°C 에 보존사용하였다.

Veronal 緩衝液 補體結合反應에 사용한 緩衝液은 pH 7.4의 Veronal buffered saline 으로서 이 原液은 4°C에 보존하고 사용시 蒸溜수로 5 배 희석하였다. 일 단 희석된 것은 24 시간 이내에 消費하였다. 이 용액의 組成은 다음과 같다(Helen⁽¹⁵⁾, Mayer^(29,30)) NaCl 83.00g, Na-5, 5-diethyl barbiturate 10.19g, 1N hydrochloric acid 34.58ml, MgCl₂ · 6H₂O 20.30g, CaCl₂ · 2H₂O 4.40g 蒸溜水 2,000ml (q.s.)

緬羊赤血球浮游液 건강한 緬羊 (3歲 · ♂) 2 마리를 선정하여 1 마리씩 교체하면서 頸靜脈에서 채혈하였는데 血液은 採血時에 동량의 無菌 Asever 용액 (Bukantz 등⁽⁹⁾)과 혼합되게 하였다. 이것을 4°C에 보존하면서 사용할 때 마다 洗滌하였다. 赤血球洗滌는 Veronal 緩

衝液으로 1,000 rpm에서 10 분간, 3 회 遠沈하였다. 그리고 4%浮游液을 만들어 24 시간 이내에 소비하였다. Asever 液의 組成은 다음과 같다. dextrose 2.05g, sodium citrate 0.80g 蒸溜 q.s. 1,000 ml.

溶血素 및 溶血素力價測定 溶血素를 만들기 위하여 體重 3kg 이상의 건강한 家兎 5 首를 사용하였다. 溶血素 제조용 抗原으로는 0.5% formalin 으로 처리한 20% 緬羊脫纖維赤血球浮游液을 사용하였다. (Lee⁽²³⁾) 抗原은 4 일 간격으로 1.0, 2.0, 3.0, 4.0ml 의 순으로 增量하면서 家兎耳靜脈에 接種하였다. 그리고 血清은 최종 接種일로부터 5 일만에 채혈하여 分離하고 混合하여 56°C에서 30 분간 非動化하였다. 非動化된 溶血素는 0.1ml 씩 分注하여 -60°C에서 보존하면서 필요에 따라 100 倍로 稀釋하여 4°C에 보존 사용하였다.

溶血素의 力價測定은 表 1 과 같은 方法으로 실시하였으며, 本試驗에는 2% 赤血球液이 2.5 單位의 溶血素로 감작되게 하여 사용하였다.

補體 및 補體力價測定 補體는 體重 300g 이상의 건강한 기니픽 5 首로부터 각각 10ml 씩을 心臟에서 採血하였다. 분리된 血清은 全部 혼합하여 1.2ml 씩 분

Table 1. Hemolysin Titration

Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Hemolysin (10 ⁻²), ml.	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0	0
Diluent, ml.	0.9	1.9	2.9	3.9	4.9	5.9	6.9	7.9	8.9	9.9	0	0	0
Hemolysin dilution	1/1T	1/2T	1/3T	1/4T	1/5T	1/6T	1/7T	1/8T	1/9T	1/10T	Control		
Hemolysin, ml.	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0
4%, Sheep RBC. ml.	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Complement, 1/30, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0	0.2	0
Diluent, ml.	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.6	0.5	0.7

Incubation at 37°C for 30 minutes.

Table 2. Titration of Guinea Pig Complement

Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Complement, 1/25, ml.	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14	0
Diluent, ml.	0.59	0.58	0.56	0.54	0.52	0.50	0.48	0.46	0.6

Primary incubation at 37°C for 60 minutes.

Sensitized sheep erythrocytes, 2%, 2.5U, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

Secondary incubation at 37°C for 30 minutes.

주하고 즉시로 -60°C 에 보존 사용하였다.

기니픽 補體의 力價測定은 表 2와 같은 술식으로 하였으며 本試驗에는 2 正確單位의 補體를 사용하였다.

抗原의 力價 測定 抗原의 力價測定을 하기에 앞서 抗原의 抗補體力價를 測定하였다. 여기에 사용된 抗原은 靑川株氣腫痘菌抗原 No. 14를 위한 총 14 종류였으며, 각 抗原마다 1/4 부터 2배 階段稀釋한 것 0.2ml에 2 正

確單位의 기니픽補體 0.2ml, 2% 2.5單位의 感作緬羊 赤血球液 0.2ml를 사용하였으며 그 술식은 다음 表 3과 같다.

抗原의 力價測定은 家兔의 抗血清을 사용한 直接法에 의한 것과, 抗牛血清을 사용한 改良法에 의한 두가지로 실시하였다. 直接法에 의한 抗原力價測定은 表 4에 준하여 실시하였다. 이때 抗血清은 1/8로 희석된

Table 3. Titration of Anticomplementary Effect of Blackleg Antigen

Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Antigen dilution	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Control	
Antigen ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0	0.2
Complement, 2EU, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0
Diluent, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4
Primary incubation at 37°C for 60 minutes.											
Sensitized sheep erythrocytes, 2%, 2.5U. ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Secondary incubation at 37°C for 30 minutes.											

것 0.2ml를 사용하였다.

抗牛血清에 대한 抗原力價測定은 家兔의 補強血清을 첨가 해서 실시하였다. (表 5) 本試驗에서는 1/2單位의 抗原 0.2ml를 사용하였다.

抗體力價測定 家兔와 牛抗血清으로 抗原力價가 높은 抗原을 선정했고 No. 14 抗原으로 家兔와 기니픽 抗血清의 抗體力價를 測定하였다. 그 術式은 表 6과 같으며 本試驗에 서는 2單位 0.2ml를 사용하였다.

Table 4. Titration of Blackleg Antigen

Tube No.	1	2	3	4	5	6
Antigen dilution	1/8	1/16	1/32	1/64	Control	
					Agn(1/8)	Aby
Antigen, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0
Rabbit antiserum 1/8, ml	0.2	0.2	0.2	0.2	0	0.2
Complement, 2EU, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Diluent, ml.	0	0	0	0	0.2	0.2
Primary incubation at 37°C for 60 minutes.						
Sensitized Sheep erythrocytes, 2%, 2.5U. ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Secondary incubation at 37°C for 30 minutes.						

補強血清의 製造 改良補體結合反應에 사용된 補強血清인 正常 家兔血清은 다음과 같이 만들었다. 血清은 56°C , 30分間加熱하고 Diethylaminoethyl (DEAE) Cellulose (Weir⁽⁴⁸⁾)로 分割한 다음 zymosan으로 처리하였다. 즉 레진 50g를 0.3M KH_2PO_4 수용액 1,000ml

에 부유세척한 다음 0.5N NaOH 수용액 500ml에 다시 1~4시간 放置하였다가 이것을 다시 0.5N NaOH 수용액 500ml로 再洗滌하였다. 끝으로 ethanol 500ml에 1~2시간 넣어서 脫水시킨 후 증류수로 48시간에 걸쳐 反復洗滌하였다.

Table 5. Antigen Titration with Factor Serum

Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Antigen dilution	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Control Agn(1/8) Aby	
Antigen, 1/2U, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0
Antibovine serum 1/8, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0	0.2
Factor serum, ml	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Complement, 2EU, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Diluent, ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.2

Primary incubation at 37°C for 60 minutes.

Sensitized sheep erythrocytes 2%, 2.5U, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Secondary incubation at 37°C for 30 minutes.

Table 6. Antibody Titration

Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Antiserum dilution	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Control Aby(1/8)	
Rabbit or Guinea pig antiserum, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Antigen 1/8, 1/2U, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0	0
Factor serum, ml.	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Complement, 2EU, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Diluent, ml.	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.2

Primary incubation at 37°C for 60 minutes.

E.A, 2%, 2.5U, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
--------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Secondary incubation at 37°C for 30 minutes.

Table 7. Factor Serum Titration

Tube No.	1	2	3	4	5	Control		
						Agn	Aby	C'
Factor serum, ml	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.03	0.03	0.03
Bovine antiserum 1/8, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0	0.2	0
Antigen (No. 14) 1/8, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0	0
Complement, 2EU, ml.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Diluent, ml.	0	0	0	0	0	0.2	0.2	0.2

Primary incubation at 37°C for 60 minutes.

Sensitized sheep erythrocytes. 2%, 2.5U, ml	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Secondary incubation at 37°C for 30 minutes.

위의 처리가 끝난 DEAE-Cellulose는 硝子 Column (2.5×28.0cm)에 넣고 500ml의 ethanol과 800ml의 0.05N NaOH 용액으로 洗滌하고 800ml의 증류수로 10

번 反復 洗滌하였고 끝으로 0.01M KH₂PO₄ 완충액 (pH 8.0)으로 洗滌하였다.

이 Column에 非動化家兔血清을 15ml 넣고 0.01M

KH₂PO₄ 緩衝液(pH 8.0)으로 分割하였는데 流出速度는 每分當 7ml가 되도록 하였다.

血清分割은 Spectrophotometer로 最高 吸收線長 280m μ 에서 蛋白質의 含有부를 측정하였고 이로써 얻어진 分割은 減壓法과 CABOWAX에 의한 方法으로 原血清量으로 濃縮하였다. 濃縮된 血清分割은 zymosan (100mg/ml) 20容으로 처리하였다 吸着은 37°C에서 90분간에 걸쳐 이루어졌으며, 이렇게 만들어진 補强血清은 -60°C에 보존 하였다.

補强血清의 適正量測定 定抗氣腫疽牛血清에 대한 改良補體結合反應에 첨가된 正常家兔血清인 補强血清의 適正使用量을 알기 위하여 血清 0.01~0.05ml를 첨가하고 1/8로 희석한 抗血清 0.2ml와 1/8로 희석한 抗原 No.14 0.2ml, 正確單位の 기니픽補體 0.2ml, 2% 2.5單位의 感作緬羊赤血球液 0.2ml를 表 7에 준하여 適定量을 測定하였다.

結 果

氣腫疽菌의 抗原製造試驗 芽胞形成細菌의 抗原性은 芽胞가 抗原表面의 活性分子團을 없애기 때문에 抗原은 發育型으로 구성된 것을 사용해야 한다. 이 試驗에서는 芽胞形成을 抑制하는 조건에서 細菌을 培養하고 이로써 얻어진 細菌으로 抗原을 製造하였는데 培養과 不活化方法을 달리한 14종의 抗原을 試作하여 抗原性을 조사하였다. 供試抗原의 力價는 家兔에서 만들어진 抗血清으로는 直接法으로 測定하였고 抗牛血清으로는 改良法에 의해서 測定되었다.

이 試驗에서 사용한 14종의 抗原은 다음과 같이 만들었다.

No. 1 抗原: 靑川株氣腫疽菌을 thioglycollate 液體培地에 심고 37°C에서 48시간 배양하여 芽胞를 얻은 다음 石炭酸이 4% 함유되게 한 것을 Sharple 遠沈器로 遠沈集菌하고 다시 0.5% formalin이 함유한 生理食鹽水에다 60mg/ml로 浮游시켰다. 이 제조법은 材料 및 方法중의 抗氣腫疽家兔血清 제조용 抗原 제조법에 준한 것이다.

No. 2 抗原: 牛肝臟肉汁培地에 靑川株氣腫疽菌을 심고 37°C에서 48시간 배양한 다음 Sharple 遠心分離器로 集菌한 것을 無菌生理食鹽水에 浮游하여 다시 4,000 rpm에서 30분간씩 3회 洗滌한 다음 formalin이 0.5% 함유되도록 하였다. 이것을 滅菌된 脫脂綿거즈로 濾過하여 無菌生理食鹽水로 McFarland 混濁計 No.3이 되도록 浮游 희석하여 4°C에 보존 사용하였다.

No. 3 抗原: 牛肝臟肉汁培地에 靑川株氣腫疽菌을 심어 37°C에서 24시간 배양한 다음 121°C에서 25분간

滅菌하여 Sharple 遠心分離器로 集菌하고 다시 formalin이 0.5% 함유되게 하여 McFarland 混濁計 No.3가 되게 희석사용하였다.

No. 4 抗原: cooked meat 培地에 靑川株氣腫疽菌을 심어 37°C에서 24시간 배양한 것을 121°C, 25분간 高壓滅菌하여 4,000rpm으로 30분간 遠心分離한 다음 無菌生理食鹽水로 McFarland 混濁計 No.3이 되도록 稀釋 사용하였다.

No. 5 抗原: 第 2 菌 氣腫疽 백신을 抗原으로 사용하였다.

No. 6 抗原: 報恩株氣腫疽菌을 No.1 抗原의 제조 방법에 준해서 만들었다.

No. 7 抗原: 瑞山株氣腫疽菌을 No.1 抗原의 제조 방법에 준해서 만들었다.

No. 8 抗原: 靑川株氣腫疽菌을 cooked meat 培地에 심고 37°C에서 20~24시간 배양하여 100°C, 30분간 가열한 다음 Sharple 遠心分離器로 集菌하여 無菌生理食鹽水로 McFarland 混濁計 No.3이 되도록 稀釋浮游시켜서 振盪機로 6시간 동안 진탕하여 만들었다.

No. 9 抗原: 靑川株氣腫疽菌을 cooked meat 培地에 심어 37°C, 20~24시간 동안 배양하여 121°C, 25분간 高壓滅菌한 다음 4,000 rpm으로 30분간 遠沈하여 얻은 沈澱物을 無菌生理食鹽水로 McFarland 混濁計 No.3이 되도록 희석 사용하였다.

No.10 抗原: 抗原 No.8과 No.9를 1:1로 混合하여 만들었다.

No.11 抗原: 抗原 No.8을 無菌生理食鹽水로 McFarland 混濁計 No.2가 되게 다시 희석하여 사용하였다.

No.12 抗原: 抗原 No.6을 無菌生理食鹽水로 McFarland 混濁計 No.2가 되게 다시 희석하여 사용하였다.

No.13 抗原: 抗原 No.7을 無菌生理食鹽水로 McFarland 混濁計 No.2가 되게 다시 희석하여 사용하였다.

No.14 抗原: 氣腫疽菌 濃縮芽胞液을 0.5mM l-(α)-alanine과 0.1mM manganese가 함유된 cooked meat 培地에 심고 37°C에서 15시간 培養한 것을 121°C, 20분간 高壓滅菌하여 濾過 및 遠沈시켜 McFarland 混濁計 No.1~No.2에 해당되게 희석해서 사용하였다. 자세한 方法은 材料와 方法중 補體結合反應用抗原에서 既述하였다.

抗原力價測定에 사용할 抗血清은 다음과 같이 만들었다. 즉 10種의 抗家兔血清과 4種의 抗기니픽血清을 각각 家兔 5首씩과 기니픽 5首씩을 사용하여 만들었

다.

抗家兔血清 # 1 : 青川株氣腫疽菌抗原 No.1, 0.5ml (60mg/ml)를 家兔의 耳靜脈에 주사한 다음 4 일 간격으로 1.0ml, 2.0ml, 4.0ml, 8.0ml의 順으로 接種하고 最終接種日로부터 7 일만에 抗血清을 채취하였다.

抗家兔血清 # 2 : 青川株氣腫疽菌抗原 No.1을 Mc-Farland 混濁計 No.3 이 되게 無菌生理食鹽水로 희석 浮游시킨 다음 여기에다 水酸化 알미늄 gel을 同量 混合하여 1次로 家兔의 양쪽 後肢皮下에 각 0.2ml를 接種한 다음 11日後에 2次로 4.0ml의 强毒 1,000M.L.D.를 耳靜脈에 接種하고 11日만에 抗血清을 채취하였다.

抗家兔血清 # 3 : # 2 抗家兔血清에서 사용한 抗原을 같은 濃度와 方法으로 後肢筋肉에 4.0ml를 接種한 다음 20日만에 抗家兔血清을 채취하였다.

抗家兔血清 # 4 : 青川株氣腫疽菌抗原 No.2를 同量

의 水酸化 알미늄 gel과 混合하여 家兔의 後肢筋肉에 4.0ml를 接種하여 35日만에 抗家兔血清을 채취하였다.

抗家兔血清 # 5 : 青川株氣腫疽菌抗原 No.3으로 抗家兔血清 # 4와 同一한 方法으로 만들었다.

抗家兔血清 # 6 : 青川株氣腫疽菌抗原 No.4를 抗家兔血清 # 4의 方法으로 接種하고 4日 간격으로 3回 同量의 反復接種을 한 다음 20日만에 抗家兔血清을 채취하였다.

抗家兔血清 # 7 : 青川株氣腫疽菌抗原 No.5에 2% CaCl₂를 2%가 되게끔 첨가하여 家兔의 後肢皮下에 1次로 3.0ml를 接種하고 10日만에 다시 2次로 2.0ml의 强毒 10 M.L.D를 皮下에 接種한 다음 7日만에 3次로 2.0ml의 强毒 1,000 M.L.D를 皮下接種하여 4日만에 抗家兔血清을 채취하였다.

抗家兔血清 # 8 : 青川株氣腫疽菌抗原 No.5를 사용

Table 8. Titration of Blackleg Antigen with Rabbit Antiserum # 3

Antigen dilution		1/8	1/16	1/32	1/64	(1/8) Serum control
No. 1	Antigen	4	2	1	0	0
	Control	3	1	0	0	0
No. 2	"	4	2	0	0	0
	"	3	1	0	0	0
No. 3	"	4	3	0	0	0
	"	2	1	0	0	0
No. 4	"	4	3	0	0	0
	"	2	0	0	0	0
No. 5	"	4	3	0	0	0
	"	4	2	0	0	0
No. 6	"	4	2	0	0	0
	"	4	1	0	0	0
No. 7	"	4	3	0	0	0
	"	4	2	0	0	0
No. 8	"	4	2	0	0	0
	"	1	0	0	0	0
No. 9	"	4	3	0	0	0
	"	1	0	0	0	0
No. 10	"	4	3	0	0	0
	"	2	0	0	0	0
No. 11	"	4	1	0	0	0
	"	1	0	0	0	0
No. 12	"	4	1	0	0	0
	"	3	1	0	0	0
No. 13	"	4	1	0	0	0
	"	2	1	0	0	0
No. 14	"	4	2	0	0	0
	"	0	0	0	0	0

하여 抗家兔血清 #1의 제조방법에 준하여 만들었다.

抗家兔血清 #9: 報恩株氣腫疽菌抗原 No.6을 抗家兔血清 #1의 제조방법에 준하여 만들었다.

抗家兔血清 #10: 瑞山氣腫疽菌抗原 No.7을 抗家兔血清 #1의 제조방법에 준하여 만들었다.

抗기니픽血清 #1: 靑川株氣腫疽菌抗原 No.1을 無菌生理食鹽水로 McFarland 混濁計 No.3이 되게 한 것을 水酸化알미늄 gel과 同量混合하여 1次로 기니픽 後肢皮下에 각각 1.0ml를 접종하고 11日만에 2.0ml의 强毒 1,000 M.L.D를 耳靜脈에 接種하여 7日만에 抗기니픽血清을 채취하였다.

抗기니픽血清 #2: 靑川株氣腫疽菌抗原 No.1을 McFarland 混濁計 No.1이 되게 한 것을 同量의 水酸化알미늄 gel과 混合하여 기니픽의 後肢筋肉에 2.0ml를 接種하고 13日만에 2.0ml의 强毒 1,000 M.L.D를 耳

靜脈에 接種한 후 17日만에 抗기니픽血清을 채취하였다.

抗기니픽血清 #3: 靑川株氣腫疽菌抗原 No.5(第2苗 백신)를 1次로 기니픽 後肢皮下에 2.0ml를 接種하고 11日만에 2.0ml의 强毒 1,000 M.L.D를 耳靜脈에 接種한 후 다시 11日만에 抗기니픽血清을 채취하였다.

抗기니픽血清 #4: 抗原 No.5, 2.0ml를 기니픽 後肢皮下에 接種하고 14日만에 다시 2%의 CaCl₂가 함유된 2.0ml의 强毒 1,000 M.L.D를 後肢皮下에 각각 注射한 후 14日만에 抗기니픽血清을 채취하였다.

抗原은 1/4부터 2倍 階段희석하여 0.2ml를 사용하였으며, 기니픽補體는 2 正確單位 0.2ml, 感作緬羊赤血球液은 2.5單位, 2%, 0.2ml가 각각 사용되었다.

이 試驗結果는 表 8 및 9와 같다. 즉 抗原 No.14만은 完全溶血되어 抗補體性이 없었으나 나머지 抗原은

Table 9. Titration of Blackleg Antigen with Bovine Antiserum with Factor Serum

Antigen dilution		1/8	1/16	1/32	1/64	Serum control (1/8)
No.1	Antigen	4	4	1	0	0
	Control	3	0	0	0	0
No.2	"	4	4	0	0	0
	"	3	0	0	0	0
No.3	"	4	4	0	0	0
	"	3	0	0	0	0
No.4	"	4	4	1	0	0
	"	2	1	0	0	0
No.5	"	4	4	0	0	0
	"	4	3	0	0	0
No.6	"	4	4	0	0	0
	"	3	1	0	0	0
No.7	"	4	4	0	0	0
	"	3	1	0	0	0
No.8	"	4	4	2	0	0
	"	2	1	0	0	0
No.9	"	4	4	1	0	0
	"	2	1	0	0	0
No.10	"	4	4	2	0	0
	"	2	1	0	0	0
No.11	"	4	4	2	0	0
	"	1	0	0	0	0
No.12	"	4	4	1	0	0
	"	3	1	0	0	0
No.13	"	4	4	1	0	0
	"	3	2	0	0	0
No.14	"	4	4	4	0	0
	"	0	0	0	0	0

8~16 배에서도 抗補體性を 띠었다. 따라서 抗原 No. 14 의 제조 방법이 본 補體結合反應用抗原을 만드는데 있어서 가장 적합한 方法임을 알게 되었다.

供試抗原의 力價를 抗家兔血清 #3(直接法)과 抗牛血清(改良法)으로 測定結果역시 抗原 No. 14 가 높은 力價

를 보여 주었다.(表 8 및 9) 한편 力價가 높은 抗原 No. 14 를 사용하여 抗家兔血清과 抗기니픽血清의 抗體力價를 測定 함으로써 抗原 No. 14 의 우수성을 확인한 시험에서 거의 모든 供試抗血清이 有意性 있는 抗體力價를 보여 주었다.

Table 10. Antibody Titration of Anti-Blackleg Rabbit and Guinea pig Serum with No. 14 Antigen

Antiserum dilution	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Control		
									Agn (1/8)	Aby (1/8)	
Antirabbit serum											
# 1	4	4	3	3	1	0	0	0	0	0	0
# 2	4	4	4	3	0	0	0	0	0	0	0
# 3	4	4	4	4	3	0	0	0	0	0	0
# 4	4	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0
# 5	4	4	4	3	1	0	0	0	0	0	0
# 6	4	4	4	3	1	0	0	0	0	0	0
# 7	4	4	4	2	0	0	0	0	0	0	0
# 8	4	4	4	2	0	0	0	0	0	0	0
# 9	4	4	4	3	0	0	0	0	0	0	0
# 10	4	4	4	3	0	0	0	0	0	0	0
Antiguineapig serum											
# 1	4	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0
# 2	4	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0
# 3	4	4	3	3	0	0	0	0	0	0	0
# 4	4	4	4	3	0	0	0	0	0	0	0

Table 11. Hemolysis Inhibitory Effect of Various Factor Serum on Anti-Blackleg Bovine Serum and Specific Antigen

Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Factor serum, ml.	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	Control		
						Agn	Aby	C'
Source of sactor ferum								
Swine	0	0	1	2	2	0	0	0
Rabbit	2	4	4	4	4	0	0	0
Bovine	1	4	4	4	4	0	0	0
Horse	1	3	4	4	4	0	0	0
Chicken	2	3	4	4	4	0	0	0

補強血清에 관한 試驗 이 試驗에서는 抗氣腫疽牛血清을 위한 改良補體結合反應에 사용할 補強血清의 종류와 이의 적정량을 결정하였다.

여기에 사용된 補強血清은 소·말·돼지·닭 家兎등에서 얻었다.

抗氣腫牛血清은 豫防接種 후 7개월된 소에서 얻었으며, 抗原은 No. 14 를 사용하였다. 그런데 抗血清과 抗原은 1/8 로 하여 각각 0.2ml 를 사용하였다.

이 밖의 材料와 方法은 抗體力價測定에 사용한 것에

준하였다.

補強血清은 다음과 같이 얻었다. 즉 소 및 말에서는 頸靜脈에서, 닭은 腋下靜脈에서, 돼지는 耳靜脈에서 그리고 家兎는 心臟에서 각각 採血하여 血清을 분리하고 이를 補強血清으로 사용하였다. 이러한 補強血清은 채취후 즉시 -60°C에서 보존 사용하였다.

補強血清은 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 및 0.05ml 를 각각 增量첨가 하였다. 이로써 결정된 補強血清의 적정량으로 抗氣腫疽牛血清의 抗體力價를 測定함으로써

改良補體結合反應의 적합한 補強血清을 선정하였다.

각 동물별 補強血清에 의한 抗氣腫疔牛血清의 改良補體結合力價는 表11과 같다. 즉 豚源補強血清은 親補體性이 強하여 전혀 溶血抑制效果를 보이지 못하였고 馬 및 鷄源補強血清은 中等度の 溶血抑制效果를, 그리고 牛 및 家兔源 補強血清이 가장 높은 溶血抑制效果를 보였다.

表11에서 알 수 있는 바 다섯가지 동물의 補強血清이 程度의 差는 있었으나 모두 溶血抑制反應을 보였기에 補強血清과 抗血清을 2次元으로 力價를 測定하였던 바 豚源補強血清은 表12, 家兔源 補強血清은 表13, 牛源補強血清은 表14, 馬源補強血清은 表15 그리고

鷄源補強血清은 表16과 같은 結果를 얻었다.

表12에서 알 수 있는 바 豚源補強血清은 反應系를 비롯하여 抗原對照 및 抗血清對照群에서 모두 溶血을 보였다.

家兔源補強血清은 (表13) 抗補體性이 가장 낮은 반면에 特異的인 溶血抑制力價가 가장 높았다.

牛馬 및 鷄源補強血清 (表14, 15 및 16) 역시 특이적인 溶血抑制反應을 보였다. 血清對照群에 대한 抗補體性은 뚜렷하였다. 이 試驗에서 家兔源補強血清 0.03 ml가 첨가됨으로써 가장 좋은 改良補體結合反應이 이루어질 수 있음을 알 수 있었다.

Table 12. Hemolysis Inhibitory Effect of Swine Factor Serum on Antiblackleg Bovine Serum and Specific Antigen

Antiserum dilution Factor serum, ml.		Antiserum dilution						Antigen control
		1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
0.01	Test system	0	0	0	0	0	0	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0	0
0.02	Test system	0	0	0	0	0	0	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0	0
0.03	Test system	0	0	0	0	0	0	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0	0
0.04	Test system	0	0	0	0	0	0	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0	0

Table 13. Hemolysis Inhibitory Effect of Rabbit Factor Serum on Antiblackleg Bovine Serum and Specific Antigen

Antiserum dilution Factor serum, ml.		Antiserum dilution						Antigen control
		1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
0.01	Test system	4	4	3	3	0	0	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0	0
0.02	Test system	4	4	4	3	0	0	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0	0
0.03	Test system	4	4	4	4	4	0	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0	0
0.04	Test system	4	4	4	4	4	4	0
	Serum control	4	0	0	0	0	0	0

牛氣腫疔抗體·抗原의 改良補體結合反應機作에 관한 試驗 抗體가 牛血清일 경우 기니픽補體는 抗體·抗原 結合物에 完全結合이 되지 않고 溶血系에 結合하는 경향이 높다. 그러나 앞의 試驗에서 밝힌 바 家兔源補強血清이 기니픽補體가 抗體·抗原系에 보다 많이 結合되어 特異的인 溶血抑制反應을 이룩하였다.

이 시험에서는 家兔源 補強血清의 어느 分割이 기니

픽補體의 不足한 分割을 補完해 주는가를 試驗하였다.

補強血清을 얻기 위하여 3kg 이상의 건강한 家兔 5 首와 250g 이상되는 기니픽 5 首를 각각 선정하여 全採血하고 新鮮한 正常血清을 分離한 다음 補強血清分割을 얻었다.

C'1 및 C'2 分割: 新鮮한 血清 1.0ml 를 0.02M KH_2PO_4 10ml 에 混合하여 20~30 분간 0°C 에 放置한

Table 14. Hemolysis Inhibitory Effect of Bovine Factor Serum on Antblackleg Bovine Serum and Specific Antigen

Antiserum dilution		1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Anttigen cont.
Factor serum, ml.								
0.01	Test system	4	3	3	0	0	0	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0	0
0.02	Test system	4	4	4	3	0	0	0
	Serum control	1	1	0	0	0	0	0
0.03	Test system	4	4	4	4	0	0	0
	Serum control	4	2	0	0	0	0	0
0.04	Test system	4	4	4	4	4	4	0
	Serum control	4	3	0	0	0	0	0

Table 15. Hemolysis Inhibitory Effect of Horse Factor Serum on Antblackleg Bovine Serum and Specific Antigen

Antiserum dilution		1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Antigen cont.
Factor serum, ml.								
0.01	Test system	4	4	3	0	0	0	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0	0
0.02	Test system	4	4	4	4	4	0	0
	Serum control	4	0	0	0	0	0	0
0.03	Test system	4	4	4	4	4	4	0
	Serum control	4	4	3	0	0	0	0
0.04	Test system	4	4	4	4	4	4	0
	Serum control	4	4	4	0	0	0	0

Table 16. Hemolysis Inhibitory Effect of Chickem Factor Serum on Antblackleg Bovine Serum and Specific Antigen

Antiserum dilution		1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Antigen cont.
Factor serum, ml.								
0.01	Test system	4	4	2	0	0	0	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0	0
0.02	Test system	4	4	4	4	0	0	0
	Serum control	4	3	0	0	0	0	0
0.03	Test system	4	4	4	4	0	0	0
	Serum control	4	4	0	0	0	0	0
0.04	Test system	4	4	4	4	4	4	0
	Serum control	4	4	4	0	0	0	0

다음 3,000 rpm 으로 20 분간 냉 장遠心分離하여 上清液 은 따로 0°C 에 보존하였으며, 沈澱物은 pH 5.4 ion 強度인 0.02 의 KH_2PO_4 溶液으로 再遠沈 洗滌하여 얻은 沈澱物을 無菌生理食鹽水로 5 倍稀釋하여 pH 6.5~7.0 이 되도록 0.1M NaHCO_3 溶液으로 수정하여 C'1 分劃 으로 사용하였다.

C'2 分劃은 C'1 分劃을 만들 때 얻은 上清液을 10%

NaCl 용액으로 1/12 이 되게 희석하여 等張液을 만든 다음 0.1M NaHCO_3 로 pH 6.5 이상으로 보정하여 사용하였다. (Ecker 등⁽⁷⁾)

C'3 分劃: 新鮮한 正常血清을 56°C 에서 20 분간 加熱하여 血清 1.0ml 에 0.15M NH_4OH 용액 0.25ml 를 첨가하여 37°C 에서 90 분간 가온하고 여기에 0.15 N, HCl 용액 0.25ml 를 섞어 中和시킨 다음 5 倍로 稀

釋하여 사용하였다.

C'4 分劃: 新鮮血清을 56°C에서 20분간 加熱한 다음 zymosan 으로 처리하여 만들었다. (pillemer 등⁽¹⁷⁾) 즉 zymosan 을 無菌生理食鹽水 10ml에 100mg 용해하여 90분간 끓이고 3,000 rpm, 20분간 遠心沈澱시켜서 上清液을 버리고 沈澱物만을 無菌生理食鹽水로 100倍稀釋하여 0°C에 보존 사용하였다.

이 zymosan 液 20ml에 加熱한 血清 1.0ml를 섞어 37°C에서 90분간 가끔 흔들면서 가열하고 이것을 3,000rpm에서 20분간 遠心分離하여 上清液을 無菌生理食鹽水로 5倍가 되게 희석하여 사용하였다. (Lepow 등^(24,25))

抗血清은 氣腫痘백신을 接種하고 7個月된 牛抗血清을 1/16 (2單位)로 희석하여 사용하였고 抗原은 靑川株氣腫痘抗原 No. 14 (1/8)을 사용하였다.

기니픽 補體는 2 正確單位와 感作緬羊赤血球液은 2%, 2.5 單位를 사용하였다.

補強血清分劃은 0.005, 0.01, 0.02, 0.03ml를 각각 첨가하였는데 總量은 1.0ml가 되도록 하였다. 그밖의 술식은 牛抗血清力價測定法에 준하였다. 이 試驗成績은 表17과 같다. 즉 家兎 C'4 分劃 0.03ml는 溶血을 抑制하였으며 家兎 C'1 과 C'4 分劃의 混合系는 家兎 C'4 分劃만을 添加했을 때와 별로 큰 차이가 없었다. 그리고 家兎 C'1 分劃만을 添加한 경우는 기니픽 補體 單用系와 별 差異가 없었다.

이로서 家兎 C'4 分劃 0.03ml는 抗氣腫痘牛血清에 대한 가장 力價높은 改良補體結合反應을 이룩케 하였다.

한편 家兎 C'4 分劃과 家兎 C'1 分劃에 대한 기니픽 補體分劃이 보여주는 抗體力價는 表 18 및 19와 같다. 즉 이 실험에서도 家兎 C'4 分劃이 家兎 C'1 分劃에 비하여 높은 力價를 보였고 家兎 C'4 分劃 反應系에 있어서도 기니픽 全補體系와의 反應이 가장 높은 力價를 보여 주었다.

Table 17. Modified Complement Fixation Supplemented with Factor Serum Fraction on Antiblackleg Bovine Serum and Specific Antigen

Test system					Control system					
Diluent					Diluent					
0.005	0.01	0.02	0.03 ml.		ml.	0.005	0.01	0.02	0.03	
0	0	0	0	0.005	Rabbit C'1	0.005	0	0	0	
0	0	0	0	0.01		0.01	0	0	0	
0	0	0	0	0.020		0.02	0	0	0	
0	0	0	0	0.03		0.03	0	0	0	
Rabbit C'1					Rabbit C'1					
0.005	0.01	0.02	0.03 ml.		ml.	0.005	0.01	0.02	0.03	
0	0	0	0	0.005	Rabbit C'1	0.005	0	0	0	
0	0	0	0	0.03		0.01	0	0	0	
0	0	0	0	0.01		0.02	0	0	0	
2	2	4	4	0.02		0.03	0	0	1	1
Rabbit C'2					Rabbit C'2					
0.005	0.01	0.02	0.03 ml.		ml.	0.005	0.01	0.02	0.03	
0	0	0	0	0.005	Rabbit C'1	0.005	0	0	0	
0	0	0	0	0.01		0.01	0	0	0	
0	0	0	1	0.02		0.02	0	0	0	1
0	0	2	2	0.03		0.03	0	0	2	2

Rabbit C'3			
0.005	0.01	0.02	0.03 ml.
0	0	0	0 0.005
0	0	0	0 0.01
0	0	3	3 0.02
4	4	4	4 0.03

Rabbit C'1

Rabbit C'3				
ml.	0.005	0.01	0.02	0.03
0.005	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0
0.02	0	0	1	1
0.03	1	1	2	2

Rabbit C'3,4			
0.005	0.01	0.02	0.03 ml.
0	0	1	1 0.005
2	2	3	4 0.01
4	4	4	4 0.02
4	4	4	4 0.03

Rabbit C'1

Rabbit C'3,4				
ml.	0.005	0.01	0.02	0.03
0.005	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0
0.02	0	0	0	0
0.03	0	0	0	4

Rabbit C'4			
0.005	0.01	0.02	0.03 ml.
0	2	2	4 0.005
4	4	4	4 0.01
4	4	4	4 0.02
4	4	4	4 0.03

Rabbit C'1

Rabbit C'4				
ml.	0.005	0.01	0.02	0.03
0.005	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0
0.02	0	0	0	0
0.03	0	0	0	0

GPC'4			
0.005	0.01	0.02	0.03 ml.
0	0	0	0 0.005
0	0	0	0 0.01
0	0	0	0 0.02
0	0	2	2 0.03

Rabbit C'1

GPC'4				
ml.	0.005	0.01	0.02	0.03
0.005	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0
0.02	0	0	0	0
0.03	0	0	0	0

GPC'1			
0.005	0.01	0.02	0.03 ml.
0	0	0	0 0.005
0	0	0	0 0.01
0	0	0	0 0.02
0	0	1	1 0.03

Rabbit C'1

GPC'1				
ml.	0.005	0.01	0.02	0.03
0.005	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0
0.02	0	0	0	0
0.03	0	0	0	0

Rabbit C'4			
0.005	0.01	0.02	0.03 ml.
0	0	2	2
3	3	4	4
4	4	4	4
4	4	4	4

GPC'1

Rabbit C'4				
ml.	0.005	0.01	0.02	0.03
0.005	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0
0.02	0	0	0	0
0.03	0	0	0	0

GPC'4			
0.005	0.01	0.02	0.03 ml.
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

GPC'1

GPC'4				
ml.	0.005	0.01	0.02	0.03
0.005	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0
0.02	0	0	0	0
0.03	0	0	0	0

Rabbit C'4			
0.005	0.01	0.02	0.03 ml.
0	2	2	4
4	4	4	4
4	4	4	4
4	4	4	4

Diluent

Rabbit C'4				
ml.	0.005	0.01	0.02	0.03
0.005	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0
0.02	0	0	0	0
0.03	0	0	0	0

Rabbit C'1			
0.005	0.01	0.02	0.03 ml.
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

GPC'1

Rabbit C'1				
ml.	0.005	0.01	0.02	0.03
0.005	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0
0.02	0	0	0	0
0.03	0	0	0	0

GPC'1			
0.005	0.01	0.02	0.03 ml.
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

Diluent

GPC'1				
ml.	0.005	0.01	0.02	0.03
0.005	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0
0.02	0	0	0	0
0.03	0	0	0	0

Table 18. Effect of Rabbit C'4 and Guinea Pig Complement Fractions on Modified Complement Fixation of Antibrucella Bovine Serum and Specific Antigen

GPC' factor combined with rabbit C'4 (2EU)	Rabbit C'4, ml.		
	0.01	0.02	0.03
Control, only GPC'(2EU).....	0	0	0
Rabbit C'4+GPC' 1, 2, 4.....	2	4	4
Rabbit C'4+GPC' 1, 2, 3.....	1	4	4
Rabbit C'4+GPC' 1, 3, 4.....	2	4	4
Rabbit C'4+GPC' 1, 4.....	3	4	4
Rabbit C'4+GPC' 1, 3.....	1	4	4
Rabbit C'4+GPC' 1, 2.....	0	4	4
Rabbit C'4+GPC' 1.....	3	4	4
Rabbit C'4+GPC' 1, 2, 3, 4.....	4	4	4

Table 19. Effect of Rabbit C'1 and Guinea Pig Complement Fractions on Modified Complement Fixation of Antibrucella Bovine Serum and Specific Antigen

GPC' factor combined with rabbit C'1 (2EU)	Rabbit C'1, ml.		
	0.01	0.02	0.03
Control, only GPC' (2EU)	0	0	0
Rabbit C'1+GPC' 1, 2, 4	0	0	2
Rabbit C'1+GPC' 1, 2, 3	0	0	2
Rabbit C'1+GPC' 1, 3, 4	0	0	2
Rabbit C'1+GPC' 1, 4	0	0	2
Rabbit C'1+GPC' 1, 3	0	0	1
Rabbit C'1+GPC' 1, 2	0	0	1
Rabbit C'1+GPC' 1	0	0	1
Rabbit C'1+GPC' 1, 2, 3, 4	1	2	3

牛氣腫에 대한 改良補體結合反應의 應用試驗 앞의 실험에서 牛氣腫 抗體·抗原에 대한 改良補體結合反應은 家兔補強血清이 첨가됨으로써 가능하였고, 또한 家兔 C'4 分劃 0.03ml가 한 反應系에 대해 積極함을 증명하였다. 이 실험에서는 家兔 C'4 分劃 0.03ml를 한 反應系에 첨가해서 氣腫牛血清의 抗體力價를 측정하였다. 이 應用試驗에서는 60例의 血清에 대한 抗體力價를 測定함과 아울러 豫防接種된 畜牛에서의 抗體生成 및 消長을 조사하였다.

이 生成消長試驗에 사용된 供試血清은 다음과 같이 만들었다. 즉 韓 10頭를 1群으로 선정하여 氣腫第 2 苗 백신 1.0ml씩을 皮下接種하고 그후 1개월부터 1년간에 걸쳐 個體別, 月別로 각각 採血하여 免疫抗血

清을 채취 사용하였다.

60例의 供試血清은 다음과 같이 만들었다. 즉 임의로 선정된 牛群을 3個地域群으로하여 每群當 20例씩 總 60例에 氣腫第 2 苗 백신을 1.0ml씩 接種한 다음 華城郡 地域群은 2개월 후에, 平澤郡 地域群은 7개월 후에, 楊州郡 地域群은 12개월만에 각각 採血하였다. 이때 各試驗群의 飼養條件은 거의 一致된 狀態였다. 對照供試群으로서는 백신 接種前의 것을 사용하였다.

이 試驗 조작에서 抗氣腫牛血清과 正常牛血清은 1/8에서 階段稀釋하여 0.2ml를, 氣腫抗原은 No.14 特異抗原을 1/8로 희석하여 0.2ml를 기니픽 補體는 2 正確單位 0.2ml 중에 補強血清 (家兔 C'4) 0.03ml가 함유되게 하였고 기타 재료 및 방법은 抗體力價測定法에 준하였다.

改良補體結合反應에 의한 抗體生成 및 消長試驗結果는 表 20과 圖 1에서 보는 바와 같이 豫防接種後 35日에는 256의 力價를 보였다가 그 이후부터 262일까지는 力價가 128이었고 그 이후 最終測定日인 380일까지는 力價가 64였다.

그리고 임의로 선정된 60例의 抗氣腫牛血清에 대한 改良補體結合反應의 應用試驗成績은 表 21과 같이 백신 接種後 63日된 華城郡地域群은 大體로 128의 力價를 보였고, 232日된 平澤郡地域群에서도 거의 力價가 128임을 보였으며, 380日된 楊州郡地域群에서는 64의 力價를 보였으므로 牛氣腫免疫血清에 대한 改良補體結合反應이 應用될 수 있음을 알게 되었다. 또한 同一試驗區의 抗體力價分布狀 역시 거의 고르게 변동이 없었다.

補強血清 (家兔 C'4)의 力價增進試驗 抗氣腫牛血清에 대한 補體結合反應에 있어서 反應系에 家兔新鮮血清 0.03ml를 補完添加하면 直接補體結合反應에서 보다 抗體力價가 상승하는데 家兔新鮮血清을 加熱하여 zymosan으로써 C'4 分劃을 만들어 0.03ml를 첨가하면 더욱 抗體力價가 상승하였다.

이 사실은 補強血清에 함유된 親補體性物質을 可及的 많이 除去함으로써 抗體力價의 上昇을 꾀할 수 있다는 것을 짐작케 하여 주었으므로 이 실험에서는 C'4 分劃중에 함유된 親補體性物質을 除去하여 抗體力價를 上昇케 하였다.

補強血清의 純化操作에는 DEAE-Cellulose를 사용하였으며 자세한 것은 材料 및 方法에서 記述한 바 있다.

이 실험에 사용된 抗原은 No.14(1/8), 0.2ml이며 抗體로서는 免疫된 다음 110日이된 抗氣腫牛血清을 1/64부터 階段稀釋하여 각 0.2ml, 기니픽補體 그 正確單位 0.2ml에 처리된 補強血清 C'4의 각 分劃 0.03ml를 첨

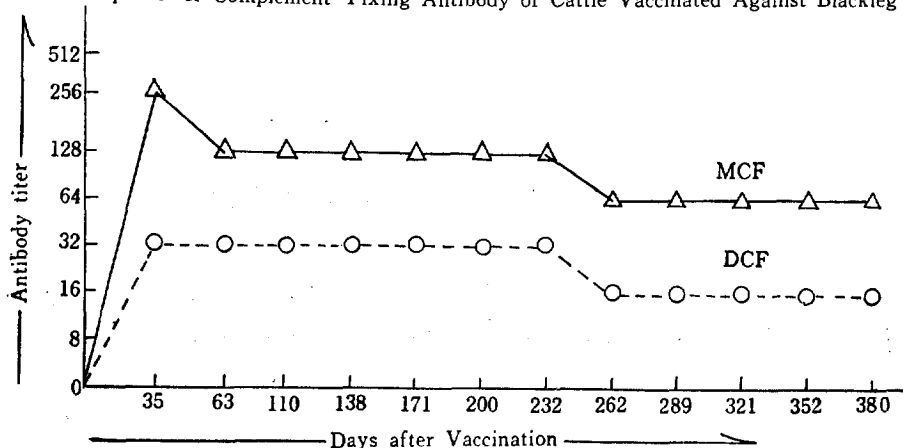
Table 20. Response of Complement Fixing Antibody of Cattle Vaccinated Against Blackleg

Antiserum dilution		1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Serum control (1/8)
35 days	DCF	4	4	4	2	1	0	0	0
	MCF	4	4	4	4	4	4	0	0
63 "	DCF	4	4	4	3	0	0	0	0
	MCF	4	4	4	4	4	3	0	0
110 "	DCF	4	4	4	3	0	0	0	0
	MCF	4	4	4	4	4	3	0	0
138 "	DCF	4	4	4	3	0	0	0	0
	MCF	4	4	4	4	4	3	0	0
171 "	DCF	4	4	4	3	0	0	0	0
	MCF	4	4	4	4	4	0	0	0
200 "	DCF	4	4	4	3	0	0	0	0
	MCF	4	4	4	4	4	0	0	0
232 "	DCF	4	4	4	2	0	0	0	0
	MCF	4	4	4	4	4	0	0	0
262 "	DCF	4	4	3	2	0	0	0	0
	MCF	4	4	4	4	3	1	0	0
289 "	DCF	4	4	3	1	0	0	0	0
	MCF	4	4	4	4	3	1	0	0
321 "	DCF	4	4	3	2	0	0	0	0
	MCF	4	4	4	4	3	1	0	0
352 "	DCF	4	4	2	1	0	0	0	0
	MCF	4	4	4	4	2	1	0	0
380 "	DCF	4	4	2	1	0	0	0	0
	MCF	4	4	4	4	1	1	0	0

MCF : Modified Complement Fixation.

DCF : Direct Complement Fixation.

Fig. 1. Response of Complement Fixing Antibody of Cattle Vaccinated Against Blackleg



가하였고 기타의 材料 및 方法은 前述한 抗體力價測定에 준하였다. DEAE-Cellulose 에 통과된 家兎 C'4 의 7개 分割증에 活性因子가 어디에 含有되어 있는가를 알기 위하여 각 分割을 사용해서 抗體의 力價를 測定

하였던 바 그 결과는 表 22 와 같다. 즉 7개의 分割증의 抗體力價上昇을 확인하기 위하여 10例의 抗氣腫痘牛血清의 抗體力價를 測定하였다. 그成績은 表 23 과 같다. 즉 10例중 3例의 256 力價를 보였으며 나머지

Table 21. Modified Complement Fixing Titer of Cattle Vaccinated Against Blackleg

District	Sample No.	Antiserum dilution							Serum control (1/8)
		1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	
Whaseong-gun	No. 1	4	4	4	4	4	3	0	0
	2	4	4	4	4	4	3	0	0
	3	4	4	4	4	4	3	0	0
	4	4	4	4	4	4	3	0	0
	5	4	4	4	4	4	3	0	0
	6	4	4	4	4	4	2	0	0
	7	4	4	4	4	4	2	0	0
	8	4	4	4	4	4	3	0	0
	9	4	4	4	4	3	2	0	0
	10	4	4	4	4	4	2	0	0
	11	4	4	4	4	4	3	0	0
	12	4	4	4	4	4	3	0	0
	13	4	4	4	4	4	3	1	0
	14	4	4	4	4	4	2	0	0
	15	4	4	4	4	4	3	1	0
	16	4	4	4	4	4	3	0	0
	17	4	4	4	4	4	3	0	0
	18	4	4	4	4	4	3	0	0
	19	4	4	4	4	4	2	0	0
	20	4	4	4	4	4	3	1	0
Pyungtaik-gun	No. 1	4	4	4	4	4	3	0	0
	2	4	4	4	4	3	2	0	0
	3	4	4	4	4	4	2	0	0
	4	4	4	4	4	4	3	0	0
	5	4	4	4	4	4	3	1	0
	6	4	4	4	4	3	1	0	0
	7	4	4	4	4	4	3	0	0
	8	4	4	4	4	4	3	0	0
	9	4	4	4	4	4	3	0	0
	10	4	4	4	4	4	1	0	0
	11	4	4	4	4	4	1	0	0
	12	4	4	4	4	4	1	0	0
	13	4	4	4	4	4	2	0	0
	14	4	4	4	4	4	2	0	0
	15	4	4	4	4	4	3	1	0
	16	4	4	4	4	4	3	0	0
	17	4	4	4	4	4	2	0	0
	18	4	4	4	4	4	1	0	0
	19	4	4	4	4	4	2	0	0
	20	4	4	4	4	4	3	0	0
Yangju-gun	No. 1	4	4	4	4	3	0	0	0
	2	4	4	4	4	1	0	0	0
	3	4	4	4	4	2	0	0	0

	4	4	4	4	4	1	0	0	0
	5	4	4	4	4	1	0	0	0
	6	4	4	4	4	3	0	0	0
	7	4	4	4	4	1	0	0	0
	8	4	4	4	4	3	0	0	0
	9	4	4	4	4	1	0	0	0
	10	4	4	4	4	1	0	0	0
	11	4	4	4	4	3	0	0	0
	12	4	4	4	4	2	0	0	0
	13	4	4	4	4	2	0	0	0
	14	4	4	4	4	1	0	0	0
	15	4	4	4	4	1	0	0	0
	16	4	4	4	4	2	0	0	0
	17	4	4	4	4	1	0	0	0
	18	4	4	4	4	1	0	0	0
	19	4	4	4	4	3	0	0	0
	20	4	4	4	4	2	0	0	0
Negative control	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	1	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 22. Determination of Active Serum Factor Obtained by DEAE-Cellulose Sieving

Antiserum dilution		Antiserum dilution					Antigen control
		1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	
Fraction							
1.	Test system	4	4	4	4	3	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0
2.	Test system	0	0	0	0	0	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0
3.	Test system	0	0	0	0	0	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0
4.	Test system	0	0	0	0	0	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0
5.	Test system	0	0	0	0	0	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0
6.	Test system	0	0	0	0	0	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0
7.	Test system	0	0	0	0	0	0
	Serum control	0	0	0	0	0	0

補强血清의 活性因子가 포함된 分劃은 첫째 分劃이였
 고 그밖의 分劃에서는 아무런 補强能을 찾아 볼 수 없
 었다. 한편 DEAE-Cellulose 로 純化된 家兔 C'4 인 補强血

Table 23. Modified Complement Fixation Test of Antiblackleg Bovine Serum with DEAE-Cellulose Sieved Rabbit C'4 Factor serum

Antiserum dilution		Number of Serum	Antiserum dilution						Antigen control
			1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/104	
No. 1.	Test system		4	4	4	4	3	0	
	Serum control		0	0	0	0	0	0	
No. 2.	Test system		4	4	4	4	2	0	
	Serum control		0	0	0	0	0	0	
No. 3.	Test system		4	4	4	3	2	0	
	Serum control		0	0	0	0	0	0	
No. 4.	Test system		4	4	4	3	1	0	
	Serum control		0	0	0	0	0	0	
No. 5.	Test system		4	4	4	3	2	0	
	Serum control		0	0	0	0	0	0	
No. 6.	Test system		4	4	4	2	1	0	
	Serum control		0	0	0	0	0	0	
No. 7.	Test system		4	4	4	3	2	0	
	Serum control		0	0	0	0	0	0	
No. 8.	Test system		4	4	4	4	3	0	
	Serum control		0	0	0	0	0	0	
No. 9.	Test system		4	4	4	2	0	0	
	Serum control		0	0	0	0	0	0	
No. 10.	Test system		4	4	4	3	1	0	
	Serum control		0	0	0	0	0	0	

는 128의 力價를 보였다.

考 察

牛氣腫疽에 대한 血清學的 診斷은 1913년 이래 沈降反應과 凝集反應法등에 의하여 研究되어 왔다. 즉 氣腫疽菌을 家兔에 接種하여 얻은 抗氣腫疽家兔血清으로 氣腫疽感染牛의 臟器浸出液과 氣腫疽分離菌에 대하여 沈降反應을 가능케 하였다. 臟器浸出液 抗原에 대해서는 그 종류에 따라 反應 정도에 차이가 있고, 抗原이 氣腫疽 分離菌인 경우일찌라도 다른 嫌氣性菌과의 交叉反應이 가능한 까닭에 氣腫疽의 診斷法으로서는 그 價値가 적은것으로 생각된다. 이것은 Rottgardt (43)가 지적한 대로 氣腫疽 沈降素에 의한 沈降反應에서 惡性水腫症과의 交叉反應의 가능성이 높다고 한 것으로 미루어 보아 그러하다. 한편 이등 (56)은 抗氣腫疽 家兔血清과 氣腫疽感染牛의 筋肉浸出液抗原으로 特異的인 沈降反應을 실험하였고 나아가서는 다른 嫌氣性菌症에 대한 交叉反應이 없었기 때문에 沈降反應이 氣腫疽의 抗原檢出에 이용될 수 있음을 밝힌 바 있다. 그러나 이 실험은 診斷液이 抗氣腫疽牛血清이 아닌 抗氣腫疽 家兔血清이어서 細菌同定을 가능케 할 뿐인 것으로서 抗體를 檢出하려는 이 실험과는 그 목적이 다르다고 본다.

Goss 등 (10)은 抗氣腫疽馬血清을 사용하여 不充分하나 氣腫疽와 惡性水腫의 鑑別診斷 가능성을 밝혔는데 昆野 등 (53)은 氣腫疽菌抗原이 凝集反應上 單一抗原性이고 간혹 그렇지 않은 것이 있으나 抗氣腫疽牛血清에 대하여 一元的인 抗原性이 있기 때문에 凝集反應은 氣腫疽診斷에 特異的인 反應이 될 수 있다고 하였다. Grosso (11) 및 Rottgardt (43)는 凝集反應으로 氣腫疽와 惡性水腫이 鑑別된다 하였으며 Ginns 등 (9)은 氣腫疽菌抗原이라도 菌株에 따라서는 凝集되지 않는 것이 있기 때문에 診斷의 確實性이 적다고 하였다. 한편 Heller (16), Seigneux (45), Zeissler (50,51), 그리고 Wolter 등 (46)의 研究가 있기는 하나 이들도 抗家兔血清에 의한 氣腫疽와 惡性水腫과의 鑑別診斷에 充分한 結果를 얻을 수 없다고 하였다. 牛氣腫疽에 대한 凝集反應은 沈降反應보다도 그의 活用性이 어느 정도 좋은 것으로 생각되나 氣腫疽에 대한 凝集反應의 研究는 1920년 後期에서 멈추어졌고 沈降反應만큼 넓리 연구되지 못하였다.

氣腫疽의 抗原이나 抗體檢査를 위하여 실험동물을 사용하는 防禦試驗에 있어서 Goss 등 (10)과 Jungher (20)는 기니픽을, Breed (2)는 緬羊을, McEwen 등 (31)은 緬羊과 기니픽 및 마우스등을, Cooper 등 (5)은 Perseus 등 (35)과 마우스를 사용한 바 있는데 이 실험을

통하여 일치된 사실은 氣腫疽菌의 사용량과 사용된 CaCl₂ 水溶液의 濃度 및 接種部位등에 따라 防禦效果가 달라질 수 있다고 하였다. 김⁽⁶⁴⁾은 2% CaCl₂ 水溶液을 사용하여 氣腫疽백신의 檢定과 抗體力價測定을 위한 中和反應을 하여 좋은 성적을 보고한 바 있다. 그러나 이러한 防禦試驗이나 中和反應은 操作上的 과정이 복잡하고 非經濟的이며 또한 判定時間이 길게 소요되기 때문에 適合하지 못한 것으로 생각한다.

抗氣腫疽牛血清에 대한 성공적인 補體結合反應은 아직 보고된 바 없다. 다른 疾病에 관한 것으로는 Nakanmra^(33,34)의 牛疫에 관한 것이 있으나 直接補體結合反應으로서의 陰性反應을 보일 때도 있다고 하였고, 설혹 陽性反應을 보인다고 해도 낮은 力價를 띠었다고 하였다. 牛抗血清을 사용하는 直接補體結合反應이 불가능하다는 보고는 水泡性口內炎의 경우(Boulanger 등⁽¹⁾)와 Johne病(Rice⁽³⁰⁾)과 Brucella病(Rice^(40,41))을 들 수 있다. 그 이유에 관해서는 報告者의 성적을 참작하여 여러 가지로 추리될 수 있다. 즉 Hegedus 등⁽¹⁴⁾는 소·말 등의 補體에는 C'2 分劃이 있음을 밝혔고 Boulanger⁽¹⁾은 水泡性口內炎에 대한 抗體·抗原系에 다른 소의 新鮮血清을 補完함으로써 補體結合力價의 上昇을 보았다고 한다. Matsumoto⁽²⁸⁾ 등은 日本腦炎에서 회복된 加熱牛抗血清에 신선한 牛血清의 C'1 分劃을 補完할 때에만 補體結合反應이 잘 된다고 하였다. Nakamura^(33,34)도 牛疫高度免疫血清을 55°C에서 30분간 가열하면 그의 特異的인 補體結合능이 소멸되나 여기에 기니픽補體와 다른 동물의 血清을 혼합첨가 함으로써 補體結合力이 회복됨을 확인하였다. 이상의 여러 연구결과를 기니픽補體-抗緬羊赤血球家兔血清의 溶血系에 있어서 牛抗血清이 지니는 부족한 溶血系成分이나 결핍성분을 보충하여 줌으로써 高力價의 特異的인 補體結合反應이 가능함을 알려주었다. 이 사실은 直接補體結合反應系에 다른 동물의 血清을 첨가하여 주는 改良補體結合反應의 필요성이 요망된 동기가 되었다. 改良補體結合反應을 시행하기 위하여 應反系에 첨가될 각종 동물의 全血清을 예비적으로 시험하였으며 대상동물로는 家兔·豚·牛·雞·馬등을 선정하였다. 그 중에서 補體結合力價가 가장 높았던 것은 家兔血清을 사용하였을 때였다. 즉 牛氣腫疽에 대한 改良補體結合反應에 있어서 기니픽補體에 家兔補強血清分劃 중의 C'1과 C'4 分劃을 혼합한 것이나 또는 C'4 分劃만을 單用補強했을 때에는 높은 補體結合力價를 보여 주었다. 특히 家兔補強血清 중의 C'4 分劃의 單用補強과 C'1과 C'4 分劃複合補強을 할 때와의 사이에는 별 다른 차이가 없었으므로 필수 성분은 家兔 C'4 임을 알 수 있었

다. 그리고 補強血清인 家兔 C'4 를 DEAE-Cellulose 로 分劃하여 얻은 I₂G 分劃이 보다 강한 效果를 보여 주었다. 家兔의 加熱血清을 DEAE-Cellulose 로 分劃하고 이것을 다시 zymosan 으로 處理한 補強血清은 家兔의 全血清보다 4 배, 그리고 無處理 家兔 C'4 보다 2 배의 높은 抗體力價를 보여 주었는데 이것은 DEAE-Cellulose 分劃으로 해서 C'4 중의 親補體成分이 제거되는 까닭으로 믿어진다.

改良補體結合反應에 사용된 抗原은 cooked meat 培地에 0.5mM 의 L-(α)-alanine 와 0.1mM 의 manganese 를 첨가하여 發育型氣腫疽菌을 얻어 이것을 抗原으로 사용하였다. 發育型菌을 抗原의 材料로 삼은 것은 芽胞이 지니는 抗原性이 없거나 얇은 탓이다. 芽胞形成을 抑制할 목적으로 L-(α)-alanine 과 manganese 는 Bacillus 속 군에 이용된 바 있으며 (Levinson 등⁽²⁰⁾) 同一한 抑制機能이 Clostridium 속 군에서도 적용되었다. Clostridium chauvoei 의 液體培養物은 抗原性이나 免疫原성을 지니나 發育型만으로 구성된 液體培養物은 더 높은 抗原성을 지닌다는 것은 조⁽⁶⁸⁾의 성적과 비교할 때 쉽게 알 수 있다.

이 研究에서 밝혀진 改良補體結合反應의 原理는 각종 牛疾病의 抗原·抗體系에 적용될 수 있는 가능성을 암시하여 주고 있다.

結 論

抗氣腫疽牛血清에 대한 改良補體結合反應을 실험한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 改良補體結合反應에 사용된 抗原은 0.5mM l(α)-alanine 과 0.1mM manganese 가 含有된 cooked meat medium 에 70°C에서 30분간 加熱濃縮시킨 芽胞液을 移植하여 15시간 배양하여 만든 發育型氣腫疽菌體抗原이 가장 높은 抗原성을 보였다.
2. 家兔新鮮 正常血清 중에 含有된 補強血清成分은 C'4 分劃임이 證明되었으며, DEAE-Cellulose 로 純化한 家兔 C'4 分劃인 補強血清은 더욱 높은 抗體力價를 띄게 하였다. 그리고 每管當 0.03ml 가 添加될 때 抗體의 最高力價를 보여 주었다.
3. 改良補體結合反應에서는 直接補體結合反應에서 보다 4 배 이상의 抗體力價를 보여 주었다.
4. 人工獲得免疫된 소의 氣腫疽免疫血清의 改良補體結合抗體力價는 免疫後 1~7 個月間은 128 배이었으며, 그後 5 個月간은 64 배이었다.

參 考 文 獻

- 1) Boulanger, P, and Bannister, G.L. : A modified

- direct complement fixation test of the detection of antibodies in the serum of cattle previously infected vesicular stomatitis virus. *J. Immunol.*, 1960. 85:368.
- 2) Breed, F.: A study of blackleg and its complication. *J. Ann. Vet. Med. Ass.*, 1927. 90:521.
 - 3) Bukantz, S.C., Pein, C.R. and Kent, J.F.: Studies in complement fixation. II. Preservation of sheep's blood in citrate dextrose mixtures (Modified Alsever's Solution) for use in the complement fixation reaction. *J. Lab. Clin. Med.*, 1946. 31:394.
 - 4) Church, B.D., Halvorson, H. and Halvorson, H.O.: Studies on spore germination; its independence from alanine reemase activity. *J. Bacteriol.*, 1954. 68:393.
 - 5) Cooper, M.S., Martini, F.V. and Perseneus, G.R.: Further studies on *Cl. chauvoei* infection and immunity in laboratory animals., 1960. 1:301
 - 6) Declich, M.: Präzipitation beim Milzbrand und beim Schweinerotlauf., *Zschr. Inf. Krankh. Haut.*, 1912. 12 : 434.
 - 7) Ecker, E.E. and Pilemer, L. and Seifter, S.: The effect of aminocompounds on the fourth component of complement *J. Immunol.* 1943. 47:181.
 - 8) Gerlach, F.: Über die Präzipitationsmethode bei Rauschbrand. *Zschr. Inf. Krankh. Haut.*, 1921. 22 : 299.
 - 9) Ginns and Hussein: Über die serologische-Differenzierung der Rauschbrand-und Pararaschbrandbazillen. *Centb. Bakt. Orig. CVII.*, 1928. 107: 96.
 - 10) Goss, L.W., Barbarun, R.E. and Haines. A.E. : Some characteristics of *bacillus chauvoei.*, *J. Infect. Dis.*, 1921. 29:615.
 - 11) Grosso: Über die Bedeutung der Agglutination in der Rauschbrand Diagnose und über die Gärungsfähigkeit des Rauschbrandbazillus und die bezüglichen Unterschiede Zwischen Rauschbrand und Maligness Oedem. *B.T.W.*, 1911. 27:621.
 - 12) Harrell, W.K. and Halvorson, H.O.: Some studies on the germination of spores following brief exposure to L alanine. *Bacteriol. Prac.*, 1954. p.30.
 - 13) Hecht. V.: Die Präzipitindiagnose des Rauschbrandes, mit einem Beitrag zur Frage der Thermoresistenz der Präzipitinegene., *Zbl. Bakter. I Orig.*, 1913. 67:371.
 - 14) Hegedust, A. and Creiner, H.: Quantitative Bestimmung der Komplementbestandteile. *Z. Immun.*, 1938. 92:1.
 - 15) Helen, L.C.: Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to micro test. *Public Health Monograph No.74*, U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare, 1965.
 - 16) Heller: Etiology of Acute Gangrenous Infections of Animals. *J. Inf. Dis.*, 1920. 27:385.
 - 17) Henderson, D.W. and Roberts, R.S.: Studies on *clostridium chauvoei*. *Brit. J. Exp. Path.*, 1932. 13: 412.
 - 18) Hills, G.M.: Chemical factors in germination of spore bearing aerobes. *Biochem. J. (London)*, 1949. 45:363.
 - 19) Hills, G.M.: Chemical factors in germination on the influence of species, strain and conditions of growth. *J. Gen. Microbiol.*, 1950. 4:38.
 - 20) Jungherr, E.: A comparison of *bacillus chauvoei* strains from cattle and sheep. *J. Inf. Dis.*, 1928. 42:84.
 - 21) Koegel: Untersuchungen über vorkommen von Noralpräzipitinen gegen Rauschbrandim Blutserum verschiedener Tierarten., *Zschr. Inf. Krankh. Haut.*, 1919. 20: 351.
 - 22) Lambert, G. and Amerault, T.E.: Comparative study of virulent *brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, 1962. 23:529.
 - 23) Lee, Y.U.: Studies on a simple method of the preparation of antisheep erythrocytes rabbit serum. M.S. Thesis, The Graduate School, Seoul National University. 1965.
 - 24) Lepow, I.H., Ratnoff, O.D., Rosen, F.S. and Pillemer, L.: Observation on the Proesterase Associated with Partially Purified First Component of Human Complement. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1956. 92:32.
 - 25) Lepow, L.H., Ratnoff, O.D. and Levy, L.R.: Studies on the activation of proesterase associated with partially purified first component of human complement. *J. Exp. Med.*, 1958. 107:451.
 - 26) Levinson, H.S. and Sevag, J.G.: Stimulation of germination and respiration of the spore of *Bacillus*

- megaterium by manganese and monovalent anions. *J. Gen. Physiol.*, 1953. 36:617.
- 27) Lindley, E.P.: Preliminary observations on a flocculation test in studies on black-leg vaccine. *Brit. Vet J.*, 1955. 111:87.
- 28) Matsumoto, M., Ohmori, T. and Akiba, K.: Report Japan Equine Encephalitis., 1951. 2:149.
- 29) Mayer, M.M., Oster, A.G., Bier, O.G. and Heiderberger, M.: The activating effect of magnesium and other cations on the hemolytic function of complement. *J. Exp. Med.*, 1946. 84:535.
- 30) Mayer, M.M., Osler, A.G., Bier, O.G. and Heiderberger, M.: Quantitative studies of complement fixation. *I.A. Method. J. Immunol.*, 1948. 59:195
- 31) McEwen, A.D. and Roberts, R.S.: Gas gangren infections of sheep; Passive immunization. *J. Comp. Path. & Ther.*, 1932. 14:212.
- 32) Miessner, H. and Lange: Vergleichende Untersuchung über den Rinder- und Schafrauschbrand. *D.T.W.*, 1926. 34:571.
- 33) Nakamura, J.: Complement fixation reaction in Rinderpest study. Permanent Asian Commission on Epizootics, Guide for Technique and Application. International Office of Epizootics, Paris, 1958.
- 34) Nakamura, J.: Complement fixation reaction in Rinderpest study. *Onf. Off. Epizootics*, 1958. 20.
- 35) Persenius, G.R., Cooper, M.S. and Martini, F.V.: Studies on Blackleg bacterine: I. Immunity test in laboratory animals. *Cornell Vet.*, 1957. 47:361.
- 36) Pfeiler: *Zschr. Inf. Krankh. Haust.*, 1918. 19: 179. Cited by Lee, H.S. et al, in *Ann. Rep. Vet. Res. Sab.*, 1968. p.17.)
- 37) Pillemer, L. Seiffer, J. and Ecker, E.E.: The effect of aminocompounds on the fourth component of complement. *J. Immunol.*, 1940. 40:89.
- 38) Rice, C.E. and Carriere, J.: The effect of unheated normal bovine serum on the complement fixing activity of heat inactivated bovine antiserum with homologous antigen. I. Dialysis studies. *J. Immunol.*, 1961. 87:665.
- 39) Rice, C.E., Konst, H. and Carriere, J.: Studies of Johnes disease in Canada. 10. A more sensitive complement fixation test. *Can. J. Comp. Med.*, 1961. 25: 121.
- 40) Rice, C.E., Tailyour, I.: Electrophoretic studies of sera from cattle vaccinated or naturally infected with *Br. abortus*. *Can. J. Comp. Med.*, 1966. 30:161.
- 41) Rice, C.E., Tailyour, J. and Cochrane, D.: Ultra-centrifugal studies of sera from cattle vaccinated or naturally infected with *Br. abortus*. *Can. J. Comp. Med.*, 1966. 30:270.
- 42) Ristic, M.: A capillary tube agglutination test for anaplasmosis, A preliminary report., *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1962. 141:588.
- 43) Rottgardt, A.: Diagnostischer Wert der Präzipitations- und Agglutinationsverfahren beim Rauschbrand., *Zbl. Bakter. I Orig.* 1929, 113:245.
- 44) Ryff, J.F. and Lee, A.M.: Blackleg immunity. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1947. 110:285.
- 45) Seigneux: Zur Bakteriologische Diagnose des Rauschbrandes. *Arch. Tierh.*, 1927. 54:420.
- 46) Welter, C.J.: Properties of Anaplasma maginale antigen used a C'4. test. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1962. 141:595.
- 47) Welter, C.J.: Serological stability and specificity of agglutinating anaplasma. *Am J. Vet. Res.*, 1964. 25: 107.
- 48) Weir: *Handbook of Experimental Immunology*, Blakwell Scientific Publication. 1967. p.19.
- 49) Wolter and Dehmel: Zür Zuchtung und Differenzierung der Anaeroben Sporenbildner unter Besonderen Berücksichtigung der Rauschbrand- und Pararouschbrand-bazillen. *Centb. Bakt. Orig.*, 1928 108: 264.
- 50) Zeissler: Der Rauschbrand und verwandte Frkrankungen der Tiere. *Centb. Bakt. Ref.*, 1928. 70: 197.
- 51) Zeissler: Die Diagnostik der Anaeroben Sporenbildner. *Centb. Bakt. Orig.*, 1923. 89:117.
- 52) 川村泰 沈降素血清製造ニ關スル實驗. 1924. 3:113
- 53) 昆野恒太郎・越智勇一: 病原嫌氣性菌ニ關スル研究. II. 氣腫疽菌ノ血清學的研究及ビ惡性水腫菌トノ鑑別ニ對シテ. *日本獸醫學會雜誌*, 1929. 9: 1.
- 54) 김동성: 牛氣腫疽의 豫防藥과 抗血清의 檢定을 위한 研究. *大韓獸醫學會誌*, 1968. 8: 125.
- 55) 서부갑: 牛氣腫疽菌芽胞에 대한 몇가지 化學劑의 發芽促進試驗. *大韓獸醫學會誌*, 1969. 9: 19-25.
- 56) 이현수·차연호·이상단: 기중저 침강소 혈청에 관한 연구. *농촌진흥청, 실험연구보고서*, 1968.

p. 17.
57) 奥田金松 : 氣腫疽診斷用 沈降素血清及ヒ氣腫疽菌
ノ血球溶血素ニ對シテ. 獸疫調査所研究報告, 1919.
2:70.

58) 조현주 한우의 탄저·기종저 혼합백신에 대한 면
항체증명에 관한 연구. 농촌진흥청 실험연구보고서,
1969. p.209.

Studies on Modified Complement Fixation Test of Bovine Blackleg

Boo Kap Seo, D.V.M., Ph.D.

Seoul Municipal Collage of Agriculture

Abstract

Studies on modified complement fixation (MCF) test of antiblackleg bovine serum were made and the results obtained were summarized as followings.

1. The most satisfactory antigen for the MCF test among various materials studied was found to be the vegetative cells of *Cl. chauvoei* grown in cooked meat medium (CMM) containing 0.5mM L-(alpha) alanine and 0.1mM manganese. The antigen was prepared by inoculating the spores of *Cl. chauvoei*, heated at 70°C. for 30 minutes, into the CMM followed by incubation at 37°C. for 15 hours.

2. An active component contained in the factor serum of fresh normal rabbit serum was found to be C'4 fraction. It was also shown that, furthermore, DEAE cellulose sieved C'4 fraction of the factor serum enhanced antibody titer and the highest antibody titer was resulted by the addition of 0.03 ml. of the factor serum to each tube.

3. More than four fold increases of antibody titer, in antiblackleg bovine serum-antigen system, was made with the MCF test than that with the direct complement fixation test.

4. The MCF antibody titer of cattle vaccinated against blackleg was 128 until seven month and 64 for five months thereafter.