

牛血清(分劃)의 豚精巢細胞 發育과 豚콜레라 바이러스 END 효과에 미치는 因子에 관한 研究

全 允 成

서울대학교 獸醫科大學

(1986. 7. 30 接受)

Studies on the Factors Influencing the Growth of Swine Testicle Cells and the END Effect of Hog Cholera Virus

Yun-seong Jeon

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received July 30th, 1986)

Abstract: The bovine serum factor influencing the growth of swine testicle(ST) cell and the END effect of hog cholera SN test was studied. Throughout the experimental studies, following results were obtained and summarized.

1. Bovine whole serum of 16(76.2%) and 4(19.0%) samples out of 21 have shown a positive ST cell growth and the END effect, respectively. However, all of 21(100%) and 8(38.1%) samples out of 21 serum supernatant fractions, prepared from the bovine whole serum, have shown positive ST cell growth and END effect, respectively.

2. In the SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis of the bovine whole serum and the supernatant fractions, ST cell growth inhibiting factor was proved present in globulin fraction and in whole gel plate as a diffusible component.

3. The END ineffective component present in the whole serum and its supernatant fraction was proved to be BVDV neutralizing antibody.

4. The difference of osmolarity, optical density, pH, degree of precipitant formation following heat cold treatment, A/G ratio as well as electrophoretic pattern and NDV SN index of the samples were not correlated to the degree of ST cell growth and to the END effectiveness.

緒 論

豚cholera virus(HCV)의 力價와 HCV의 中和抗體價는 거의 END法으로 측정한다. 이 END法은 豚精巢(ST)細胞, 牛血清(BoS), 細胞培養用 合成培地로 그 기본을 이룬다(Kumagai 등, 1961; 강병직 등, 1967; 권혁진 등, 1968; 강병직 등, 1969; 김선중과 강병직, 1970; 김선중 등, 1982).

END法の의 구성물 가운데 어떤 牛血清은 豚精巢 細胞

의 發育을 저지하거나 또는 發育은 허용하되 END效果를 저해하는 것이 있다. 따라서 END法에 사용할 BoS는 미리 선정 시험을 거쳐 사용하는 것이 통례로 되어 있다.

그러나 BoS의 적부를 결정하는 선정시험은 단순히 ST細胞의 발육상만을 또는 거기에 곁들여 HC陽性 및 陰性 血清을 사용한 END反應의 성패를 基準 삼아 시험할 뿐이다.

따라서 이 研究에서는 BoS가 지니는 ST細胞의 發育

抑制 및 END 中和反應의 저해 요인을 규명하였다.

材料 및 方法

Virus: 供試 virus로는 豚cholera virus(HCV, ALD 株)와 Newcastle病 virus(NDV, Myadera株) 그리고 牛泄瀉病 virus(BVDV, NADL株)를 사용하였다. ALD HCV는 ST細胞를 사용한 END法으로 \log_{10} TCID₅₀/ml 이 5.5인 것을, 그리고 Myadera NDV는 鷄胎兒에서 \log_{10} ELD₅₀/0.1ml이 7.0인 것을, 그리고 NADL, BVDV 는 BK細胞에서 \log_{10} TCID₅₀/ml이 6.0인 것을 사용하였다.

牛血清과 이의 上清血清: 牛血清은 水原地區 屠畜場에서 個體別로 얻은 血液에서 재래의 바방으로 분리하였다. 이것을 濾過, 加熱(56°C 30분)하여 全血清으로 사용하였고, 全血清을 다시 반복 凍結, 融解한 다음 gel 상태로 沈澱하는 부분을 제거한 上清을 上清血液으로, 그리고 沈澱된 것을 沈澱分割으로 삼아 公시하였다.

牛血清과 上清血清의 豚精巢細胞 發育試驗: 可檢 牛血清 또는 上清血清을 Med. 199에 60%가 되도록 稀釋한 것 0.05ml와 同量의 Med. 199 그리고 역시 0.05ml의 ST細胞浮游液(1.0×10^6 /ml)을 micro plate(Costar; 96-well tissue culture clusters with flat bottom wells, 6.4mm diameter)에 넣었다(Fig. 1). 이것을 37°C에서 3~4日間 培養하여 單層培養細胞의 형성 정도를 읽어 供試 牛血清이나 上清血清의 ST細胞 發育能을 관독하였다.

牛血清과 上清血清의 END效能試驗: 可檢 牛血清 또는 上清血清을 Med. 199으로 20%가 되도록 희석한 것 0.05ml을, BVDV抗體 陰性血清이 20%가 들어가도록

만든 Med. 199에 $100 \log_{10}$ TCID₅₀/ml인 HCV液 0.05ml를 microplate에 넣고 37°C에서 1시간 반응케 하였다.

그후 거기에 ST細胞浮游液(1.0×10^6 /ml) 0.05ml를 넣고 37°C에서 3~4日間 배양하면서 單層細胞가 형성됨을 관찰한 다음 배양액을 버리고 1HA單位인 NDV(Myadera株)로 공격하였다. 계속하여 3~4일간 細胞變性의 유무를 읽어 供試 血清과 上清血清의 END效能 여부를 결정하였다.

牛血清 上清血清의 牛泄瀉病 Virus(BVDV) 血清中和價 測定: L-glutamine을 添加한 Earles BSS base, Eagle MEM에 BVDV陰性 BoS를 5%로 가하고 NaHCO₃液으로 pH 7.2로 보정한 것을 增殖培地로 하였다. 거기에 牛腎臟(BK) 2次 培養 細胞를 5×10^5 /ml이 되도록 넣었다. BVD virus液은 增殖培地에 $200 \log_{10}$ TCID₅₀/0.1ml이 되도록 만들었다. 可檢 上清血清은 增殖培地로 단계희석하였고 이것을 동량의 virus液과 섞은 다음 37°C에서 1시간 感作한 후 그중 0.6ml를 한 試驗管에 分注하고 細胞浮游液 0.4ml를 넣어 배양하였다. 培養 4日만에 pH를 수정하고 다시 3日 후에 細胞變性을 일으키지 않은 上清血清의 최고 稀釋 배수의 역수를 그 上清血清의 BVDV 血清中和價로 삼았다.

牛血清 上清血清의 NDV 血清中和價 測定: 牛血清, 上清血清의 NDV에 대한 virus 中和價를 다음과 같이 測定하였다. pH 7.3~7.4의 PBS(8g NaCl, 0.2g KCl, 1.15g Na₂HPO₄, 0.2g KH₂PO₄, 물로 1,000ml 채움)로 virus를 10진 稀釋하였고, virus群에는 동량의 PBS를 그리고 血清群에는 PBS 대신 동량의 上清血清을 混合하였다. 이것을 37°C에서 1시간 感作한 후 각 稀釋群의 virus · PBS나 virus · 上清血清을 5개의 10日齡

Table 1. Swine Testicle Cell Growth Test

	Test	Control
Medium 199	0.05ml	0.1ml
Test bovine serum (60%) in Medium 199	0.05ml	—
ST cell suspension(1.0×10^6 /ml) in Medium 199	0.05ml	0.05ml

Table 2. Hog Cholera Virus END Test

	Test	Control
HCV($100 \log_{10}$ TCID ₅₀ /ml) in 20% BoS* Med. 199	0.05ml	0.05ml
Test bovine serum(20%) in Med. 199	0.05ml	—
BVDV antibody free bovine serum(20%) in Med. 199	—	0.05ml
ST cell suspension (1.0×10^6 /ml) in Med. 199	0.05ml	0.05ml
NDV(1 HA unit) in 10% BoS* Med. 199	0.15ml	0.15ml

*Bovine serum of BVDV antibody free.

鷄胎兒의 漿尿膜腔에 0.1ml씩 接種하였다. 接種卵을 37°C에서 4日間 관찰하면서 鷄胎兒의 感染死를 판독하고 virus·PBS群과 virus·上淸血清群의 log₁₀ ELD₅₀ SN을 산출하였다.

Cellulose acetate 電氣泳動: 牛全血清의 cellulose acetate 電氣泳動은 다음과 같이 하였다(Kaplan과 Savory, 1965). cellulose acetate膜인 濾紙를 소량의 barbital buffer(15.40g Na diethyl barbiturate, 2.76g barbituric acid, 물로 1,000ml로 채움, pH 8.6, ion 強度 0.075)에 적서서 buffer가 스며들면 꺼내서 濾紙로 buffer를 흡수 제거하였다. 거기에 牛全血清 試料 0.25μl를 섞은 다음 이것을 泳動裝置에 올려 놓았다. 泳動은 0.4mA/여지 cm당으로 30분간 하였고, 끝난 濾紙는 Ponceau S로 7분간 染色하였다. 이것을 5% 아세트酸으로 배경이 흰색으로 될 때까지 脫色, 無水 ethanol로 脫水, ethanol-acetic acid로 세척, 濾紙사이에 놓고 탈수한 다음 乾燥(70~80°C에서 20분)하였다. 이것을 550nm에서 scanning하여 泳動像을 分析하였다.

SDS-polyacrylamide gel 電氣泳動(SDS-PAGE): SDS-PAGE는 다음과 같이 하였다(Laemmli, 1970; Ames, 1974). Separation gel은 30g acrylamide, 0.8g N,N'-bis-methyleacrylamide를 물에 녹여 100ml을 만들어 原液을 만들고 이것을 8% 또는 10%로 최종 稀釋하여 사용하였다. stacking gel은 위의 原液을 5%로 稀釋하여 사용하였다. separation gel이나 stacking gel에는 모두 0.1% sodium dodecyl sulfate가 들어가도록 한 다음 사용하였다. Electrode buffer(pH 8.3)는 0.025M Tris, 0.192M glycine 그리고 0.1% SDS가 되도록 만들었다.

泳動用 血清材料는 다음과 같이 만들었다. 즉 血清材料에 최종 농도가 0.0625M Tris-HCl(pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanal, 0.001% bromophenol blue가 되도록 넣고 끓는 물에 2분간 담구어서 血清蛋白을 反應케하였다. 그리고 나서 冷凍保管하다가 全血清은 50μl를 그리고 上淸血清과 沈澱分劃은 각각 15μl씩을 泳動하였다.

泳動은 30mA/14cm×12cm×1.2mm gel에서 실시하였는데 bromophenol blue marker가 gel下部에 도달할 때까지 계속하였다(5~7시간). 泳動이 끝난 gel板은 Coomassie brilliant blue R용액(0.2% Coomassie brilliant blue R, 50% methanol, 10% acetic acid)에 담구어 60°C에서 하룻밤 동안 염색하였다. 染色이 끝난 gel板은 10% acetic acid에 담구었다가 反覆 沈澱하는 과정을 거쳐 脫色하여 蛋白帶가 보이도록 하였다.

牛全血清 또는 上淸血清의 滲透壓, 吸光度, 沈澱分

劃의 生成 정도 및 pH 測定: 牛全血清에 대하여는 滲透壓, 吸光度, 凍結 融解 處理後에 생기는 沈澱分劃의 生成 정도를 測定하였다. 滲透壓과 吸光度는 오랜 保存 기간에 걸쳐 2~3회 測定하고 그 平均值를 성적화하였고, pH는 上淸血清의 것을 성적화하였다.

結 果

牛全血清과 上淸血清의 豚精巢(ST) 細胞 發育과 END效果에 미치는 影響: 牛全血清(bovine whole serum) 21例에 대한 ST細胞 發育能과 END發現能을 조사하여 다음과 같은 성적을 얻었다. 즉, ST細胞의 發育을 가능케 한 全血清은 16例(76.2%)였고, END效果를 보인 것은 4例(19.0%)였다. 그러나 해당 上淸血清은 21例(100%)가 모두 ST細胞의 發育을 가능케 하였고 8例(38.1%)가 END效果를 보여 上淸血清의 우수성을 찾을 수 있었다(Table 3).

Table 3. Comparative Effect of Bovine Whole Serum and Bovine Serum Supernatant Fraction on the Swine Testicle Cell Growth and the END Effect of Hog Cholera-NDV System

No. of Bovine Serum	Bovine whole serum		Bovine serum supernatant				
	ST cell growth	END effect ALD HCV dilution (10 ⁻¹)	ST cell growth	END effect ALD HCV dilution 10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
1	+	-	+	-	-	-	-
2	+	-	+	-	-	-	-
3	+	?	+	+	+	+	-
4	+	?	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	-	-	-
6	-	-	+	+	+	+	-
7	-	-	+	-	-	-	-
8	+	-	+	-	-	-	-
9	+	-	+	-	-	-	-
10	+	-	+	-	-	-	-
11	+	+	+	+	+	-	-
12	+	-	+	-	-	-	-
13	-	-	+	-	-	-	-
14	-	-	+	+	+	+	-
15	+	+	+	+	+	+	+
16	-	-	+	-	-	-	-
17	+	-	+	-	-	-	-
18	+	-	+	-	-	-	-
19	+	-	+	-	-	-	-
20	+	-	+	-	-	-	-
21	+	+	+	+	+	+	-

牛上清血清의 END效果 阻止能과 BVDV 中和抗體價와의 관계: 앞의 실험에서 牛全血清보다 上清血清이 ST細胞 發育效果를 높혔음을 보았다. 그러나 一部 全血清의 END效果 저지능은 제거하지 못하였다. 따라서 이 실험에서는 上清血液의 END效果와 이의 BVDV 中和抗體價와의 관계를 조사하였는데 上清血清의 END效果의 발현과 BVDV 抗體價와는 밀접한 관계가 있음이 밝혀졌다.

END效果를 보인 上清血清은 21例중 8例(38.1%)였는데, 이것은 모두 BVDV中和抗體價가 <1였다. 그리고 BVDV中和抗體價가 100이 넘는 上清血清例에서는 전혀 END效果가 발현되지 않았다. BVDV中和抗體價가 <1인 것에서도 END效果의 정도에는 차이가 있었다. 즉, HCV 10⁻⁴에서 END效果 陽性인 上清血清은 2例였고 10⁻³에서 END效果 陽性인 것은 4例로 가장 많았으며, 10⁻²와 10⁻¹에서 陽性인 것은 각각 1例로 가장 例가 적었다 (Table 4). 血清 No. 6과 14는 上清血清이 되므로서 END效果도 출현하였다(Table 3).

Table 4. Correlation of the END Effect and BVDV Neutralizing Antibody Titer of Bovine Serum Supernatant Fraction Supplemented to ST Cell Growth in the END Method, and BVDV SN Test

No. of Bovine Serum	END effect				BVDV SN Antibody titer
	ALD 10 ⁻¹	HCV 10 ⁻²	dilution 10 ⁻³	10 ⁻⁴	
1	-	-	-	-	3,200
2	-	-	-	-	10,000
3	+	+	+	-	<1
4	+	+	+	+	<1
5	+	-	-	-	<1
6	+	+	+	-	<1
7	-	-	-	-	10,000
8	-	-	-	-	5,000
9	-	-	-	-	100
10	-	-	-	-	1,000
11	+	+	-	-	<1
12	-	-	-	-	1,000
13	-	-	-	-	320
14	+	+	+	-	<1
15	+	+	+	+	<1
16	-	-	-	-	500
17	-	-	-	-	10,000
18	-	-	-	-	1,600
19	-	-	-	-	1,600
20	-	-	-	-	1,600
21	+	+	+	-	<1

牛全血清, 上清血清 및 沈澱分劃의 SDS-polyacrylamide gel電氣泳動(SDS-PAGE)像: 牛血清의 豚精巢細胞 發育 阻止物質을 규명하기 위하여 全血清, 上清血清 그리고 沈澱分劃을 각각 SDS-PAGE로 분석하였다.

이 실험 결과에서 牛血清의 SDS-PAGE像은 個體血清別 차이를 찾는 것 보다는 分劃別 泳動像의 차이를 분석하는 것이 중요함을 알 수 있었다. 즉, 全血清群은 preglobulin帶가 없는 반면에 globulin帶와 albumin帶가 농후하였다. ST細胞의 發育을 가능케한 上清血清分劃은 preglobulin帶가 진한 반면 globulin帶가 줄어들었다. ST細胞의 發育을 저지한 沈澱分劃에서는 變性蛋白質이나 非荷電性物質이 자연 擴散된 것처럼 전면을 흐리게 하였고 globulin分劃이 뚜렷하지 않았다. 따라서 ST細胞의 發育抑制物質은 globulin帶와 全電場에 擴散되는 變性蛋白質이나 非荷電性物質에 기인하는 것으로 밝혀졌다.

牛血清 및 上清血清의 豚精巢(ST) 細胞의 發育과 END效果에 影響을 주지 않는 要因: ST細胞의 發育能

Table 5. Serum Neutralizing Index of Bovine Serum Supernatant Fractions Supplemented to the END Method Against NDV

No. of Bovine Serum	NDV (Miyadera) virus dilution				log ₁₀ LD ₅₀	log ₁₀ LD ₅₀ SN
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹		
Virus group	5/5	5/5	2/5	0/5	7.8	-
Serum 1	5/5	4/5	2/5	0/5	7.8	0
Serum 2	5/5	5/5	0/5	0/5	7.5	0.3
Serum 3	5/5	4/5	2/5	0/5	7.8	0
Serum 4	5/5	4/5	2/5	0/5	7.8	0
Serum 5	5/5	4/5	2/5	0/5	7.8	0
Serum 6	5/5	4/5	1/5	0/5	7.5	0.3
Serum 7	5/5	4/5	2/5	0/5	7.8	0
Serum 8	5/5	5/5	0/5	0/5	7.5	0.3
Serum 9	5/5	4/5	1/5	0/5	7.5	0.3
Serum 10	5/5	5/5	3/5	0/5	8.2	-0.5
Serum 11	5/5	4/5	1/5	0/5	7.5	0.3
Serum 12	5/5	3/5	1/5	1/5	7.3	0.5
Serum 13	5/5	4/5	3/5	0/5	8.2	-0.5
Serum 14	5/5	5/5	0/5	0/5	7.5	0.2
Serum 15	5/5	4/5	1/5	0/5	7.5	0.3
Serum 16	5/5	5/5	2/5	0/5	7.9	0
Serum 17	5/5	5/5	3/5	0/5	8.2	-0.4
Serum 18	5/5	3/5	2/5	1/5	7.5	0.3
Serum 19	5/5	5/5	1/5	0/5	7.4	0.4
Serum 20	5/5	5/5	2/5	0/5	7.8	0
Serum 21	5/5	5/5	3/5	0/5	-	-

을 비롯하여 END法 전반에 걸쳐 影響을 미칠 수 있는 요인을 조사하였음에도 아무런 影響을 미치지 않는 것이 있어 여기에 모았다.

가. 上淸血清의 NDV中和에 미치는 影響을 조사하였다. 즉 上淸血清의 鵝胎兒에서의 NDV에 대한 中和指數($\log_{10} LD_{50} SN$)를 測定하였는데 모두 0.5를 넘지 않았다. 따라서 上淸血清은 NDV에 아무런 影響을 주지 않으며 NDV中和現像에 기인하는 END效果의 저지현상은 없음이 증명되었다(Table 5).

나. 全血清 또는 上淸血清의 滲透壓, 吸光度, pH, 熱凍解處理에 의한 沈澱 정도, 그리고 albumin/globulin比 같은 物理化學的 요인이 ST細胞의 發育이나 END效果에 미치는 影響을 조사하였다(Table 6, 7).

上淸血清과 全血清의 平均 滲透壓(mOSm/Kg H₂O)은 272.5~348.0의 廣範한 범주에 놓여 있었으나 影響을 주는 요인으로는 작용하지 않았다(Table 6).

全血清의 吸光도를 最高吸收波長 650nm에서 測定하

였던 바 0.23~0.52의 廣範한 범주에 있었으나 吸光度의 차이가 ST細胞 發育이나 END效果에 미치는 요인으로는 작용하지 못하였다(Table 6).

다. 全血清을 熱凍解處理하여 얻어지는 沈澱物의 生成 정도는 1+에서 4+에 이르도록 개체별 血清에 따른 많은 차이가 있었으나 그 차이가 ST細胞 發育能이나 END效果에는 아무런 影響을 주지 않았다. 다시 말하여 沈澱物을 제거한 上淸血清은 모두 고루 ST細胞의 發育을 좋게 하였고, END效果에는 直接的인 影響을 주지 않았다 (Table 7).

라. 全血清을 cellulose acetate 電氣泳動하여 albumin/globulin比, $\alpha : \beta : \gamma$ globulin의 比, 全血清蛋白質量 등을 ST細胞 發育能과 END效果와 연관하여 비교하였던바 아무런 影響을 끼치지 않음을 알 수 있었다 (Table 5, Fig. 4).

Table 6. Correlation of the END Effect to Osmorality, Optical Density and pH of Bovine Serum Supplemented to ST Cell Culture in the END Method

No. of Bovine Serum	Osmorality (mOSm/kgH ₂ O)	Optical density at 650nm	pH*	END effect as CPE at the dilution of HCV
1	314.5	0.48	8.4	<10 ⁻¹
2	315.5	0.30	8.5	<10 ⁻¹
3	300.5	0.42	8.4	10 ⁻³
4	308.0	0.46	8.2	10 ⁻⁴
5	303.0	0.41	8.6	10 ⁻¹
6	297.0	0.35	8.6	10 ⁻³
7	289.5	0.26	8.5	<10 ⁻¹
8	305.5	0.28	8.4	<10 ⁻¹
9	306.5	0.26	8.5	<10 ⁻¹
10	282.5	0.40	8.3	<10 ⁻¹
11	312.0	0.39	8.6	10 ⁻²
12	301.5	0.33	8.6	<10 ⁻¹
13	288.5	0.36	8.5	<10 ⁻¹
14	288.0	0.39	8.6	10 ⁻³
15	272.5	0.48	8.3	10 ⁻⁴
16	302.0	0.38	8.5	<10 ⁻¹
17	285.0	0.51	8.4	<10 ⁻¹
18	283.5	0.52	8.1	<10 ⁻¹
19	305.0	0.25	8.3	<10 ⁻¹
20	348.0	0.23	8.5	<10 ⁻¹
21	281.0	0.25	8.7	10 ⁻³

* Bovine serum supernatant fraction.

Table 7. Correlation of the END Effect to Albumin/Globulin Ratio and the Degree of Precipitate Formation of Bovine Serum Supplemented to ST Cell Culture in the END Method

Bovine Serum	Albumin globulin ratio	Degree of precipitate formation	END effect as CPE at the dilution of HCV
1	0.62	1+	<10 ⁻¹
2	0.62	3+	<10 ⁻¹
3	0.38	4+	10 ⁻³
4	0.46	3+	10 ⁻⁴
5	0.49	1+	10 ⁻¹
6	0.44	3+	10 ⁻³
7	0.46	1+	<10 ⁻¹
8	0.59	1+	<10 ⁻¹
9	0.72	4+	<10 ⁻¹
10	0.46	3+	<10 ⁻¹
11	0.44	1+	10 ⁻²
12	0.73	4+	<10 ⁻¹
13	0.51	4+	<10 ⁻¹
14	1.14	3+	10 ⁻³
15	0.46	4+	10 ⁻⁴
16	0.59	2+	<10 ⁻¹
17	0.15	2+	<10 ⁻¹
18	0.93	2+	<10 ⁻¹
19	0.73	1+	<10 ⁻¹
20	0.50	4+	<10 ⁻¹
21	0.62	3+	10 ⁻³

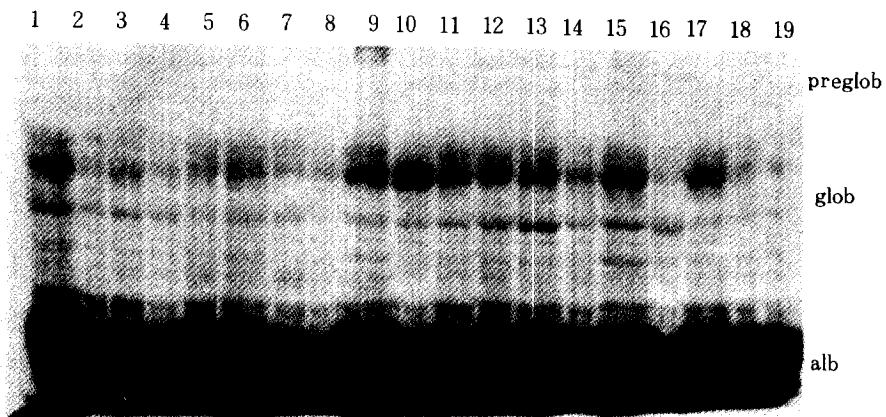


Fig 1. SDS-PAGE pattern of bovine whole serum.

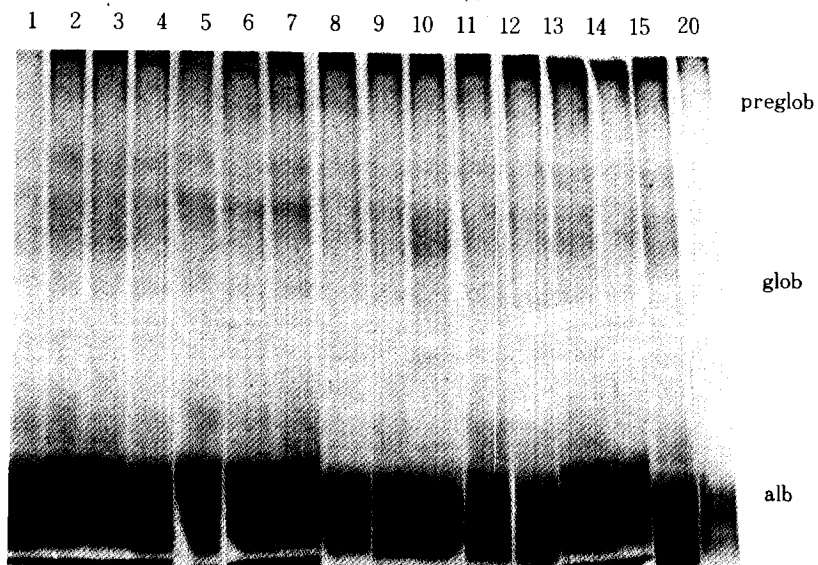


Fig 2. SDS-PAGE pattern of bovine serum supernatant fraction.

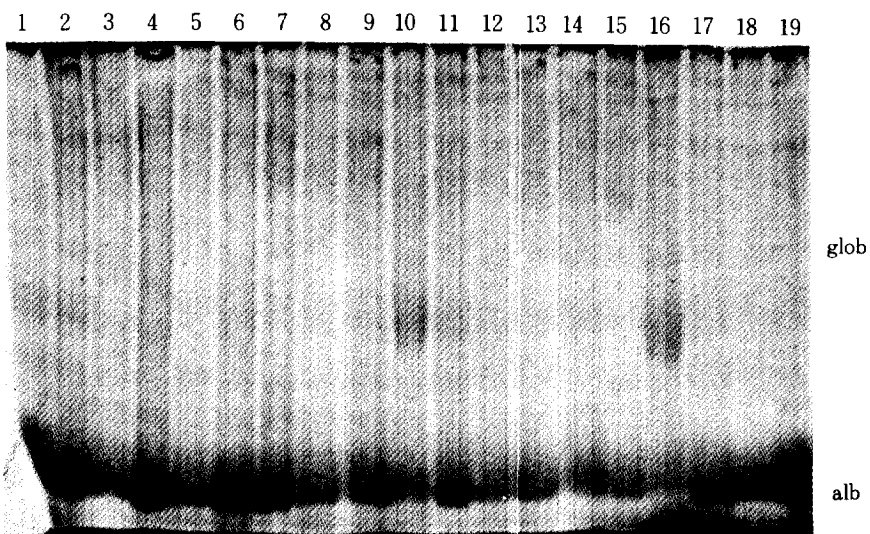


Fig 3. SDS-PAGE pattern of bovine serum sedimented fraction.

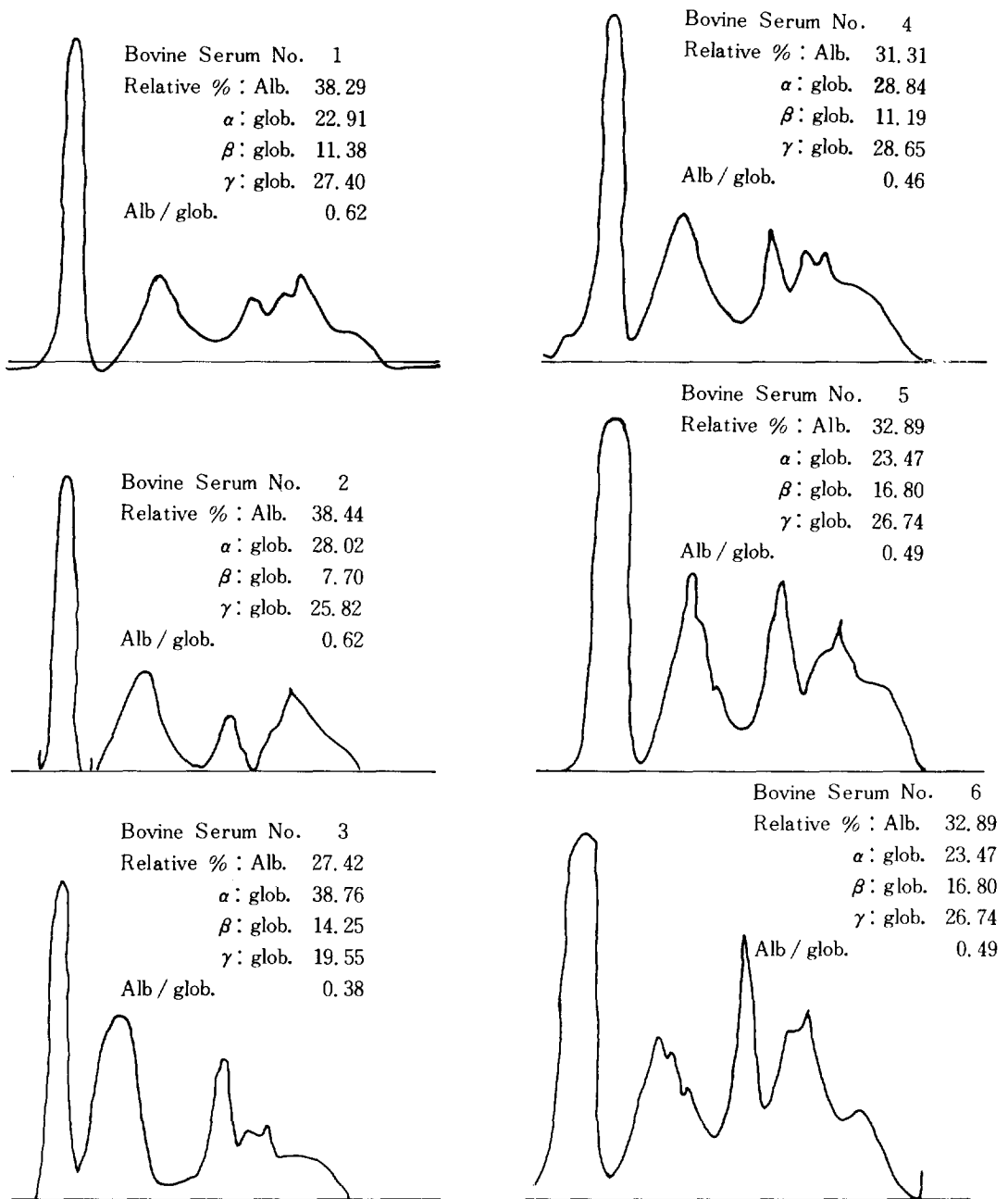
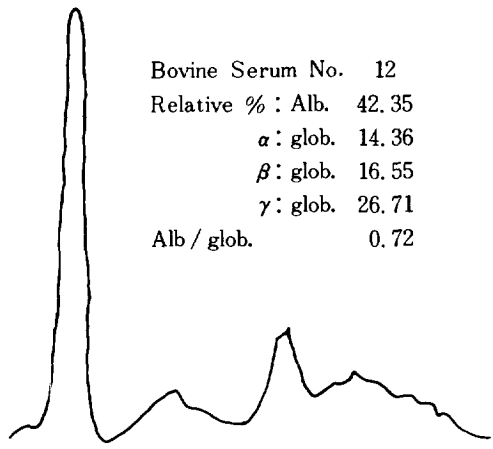
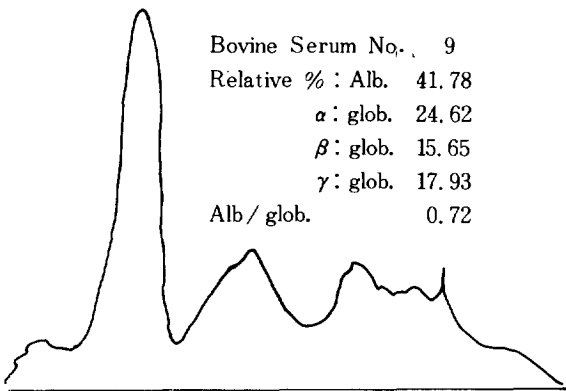
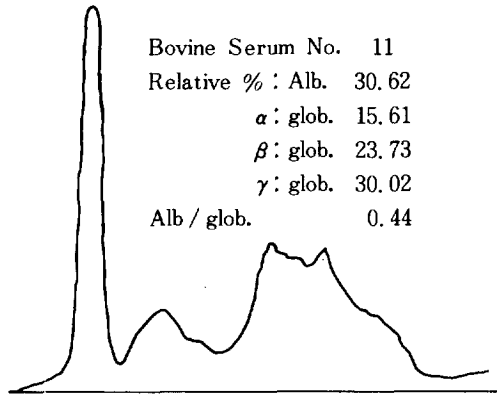
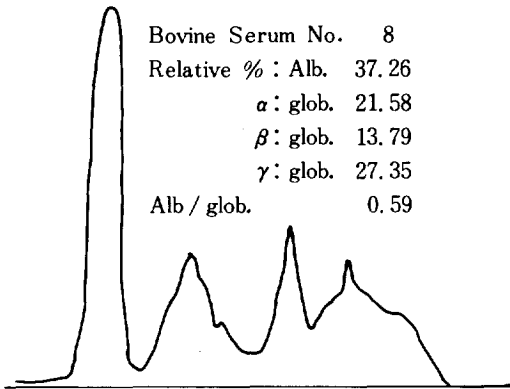
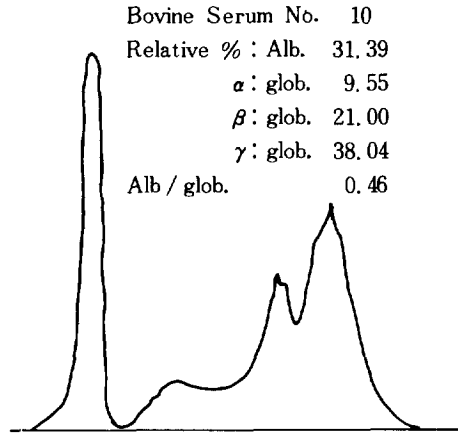
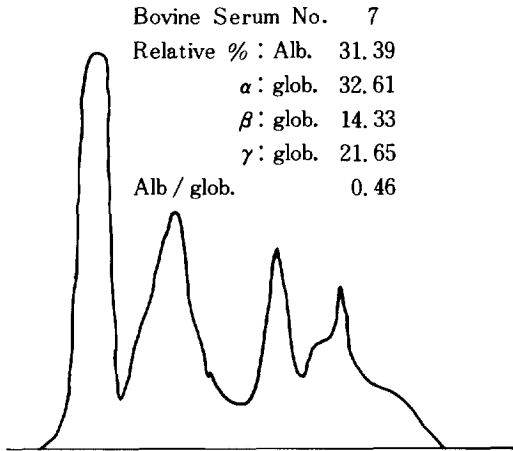
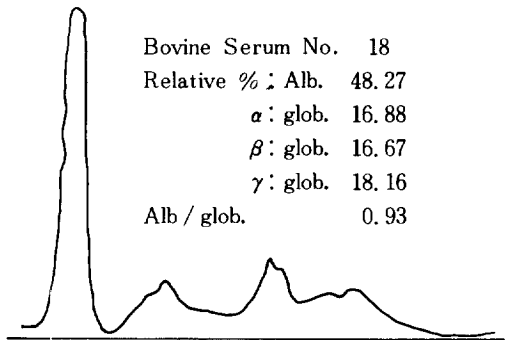
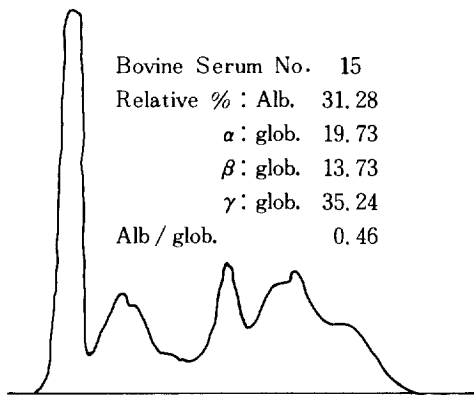
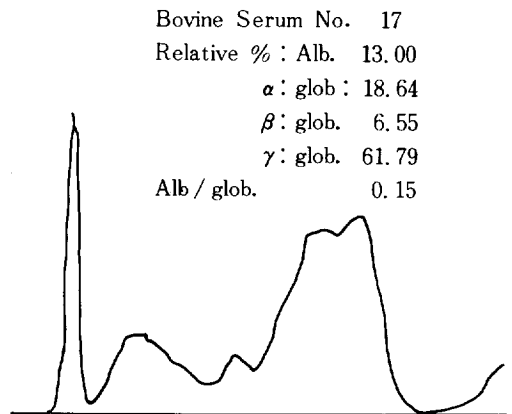
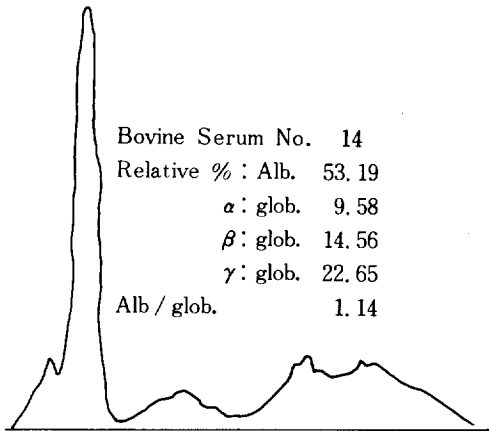
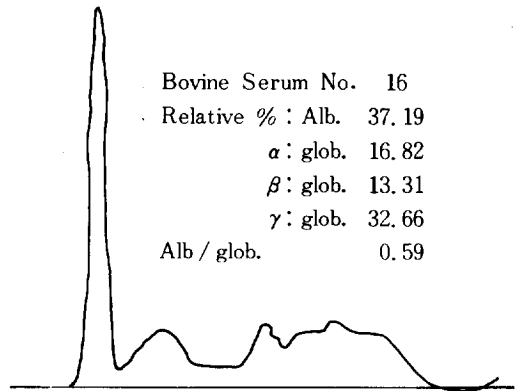
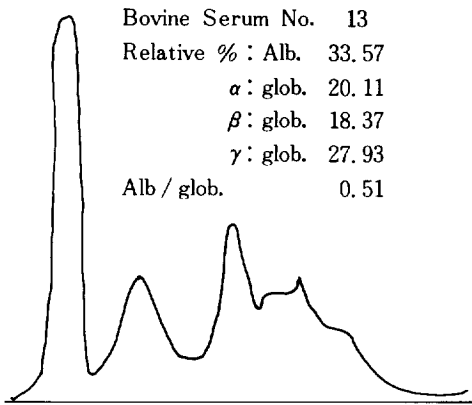


Fig. 4. Cellulose acetate electrophoretic patterns of bovine serum supplemented to ST cell culture of the END method.

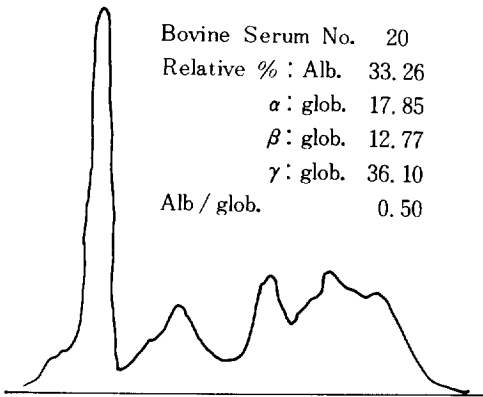
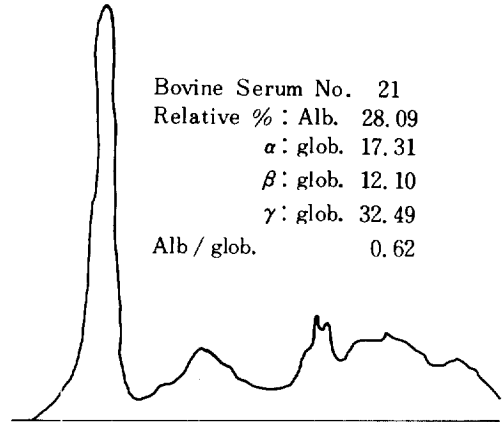
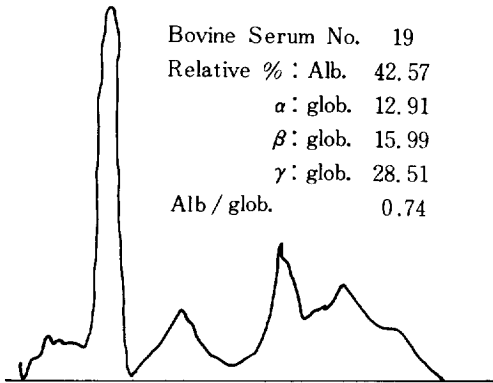
(Continued)



(Continued)



(Continued)



考 察

豚콜레라 비루스(HCV)의 中和抗體價는 거의 유일하게 기존 END法으로 측정할 수 있다. 이 END法은 豚精巢(ST) 細胞, 牛血清(BoS), 뉴캇슬병 비루스(NDV) 그리고 합성 배지가 기본 구성물이 된다. 그리고 END法에 의한 HCV力價나 HCV抗體價의 판정 基準은 HCV와 NDV에 의하여 일어나는 ST細胞의 細胞變性效果에 두고 있다. 왜냐하면 細胞變性效果의 정도는 HCV양에 비례하며, HCV 中和抗體 양에 반비례하기 때문이다.

그러나 END法의 성패는 기본 구성요인의 하나인 牛血清에 좌우된다. 즉, 牛血清은 個體 血清에 따라 ST細胞의 發育을 허용하지 않거나 END效果를 저지하기 때문이다.

따라서 이 연구의 목적은 牛血清에 들어 있는 ST細胞 發育 抑制 物質의 성상을 밝히고, END效果에 影響

을 주는 요인을 밝힘으로써 END法이 보다 체계있게 이루어 질 수 있도록 하였다.

END 反應系에 添加하는 BoS에 문제점이 있을 수 있다는 것은 이 방법의 창안자 팀에 의하여 개발과 동시에 이미 지적된 바 있다(Kumagai 등 1961). END 反應系에 添加하는 BoS, ST細胞의 發育을 저지하거나 HCV를 中和하여 END效果를 없게 한다는 것이다. 하지만 BoS의 ST細胞 發育抑制 기전에 관한 연구 보고는 아직 없다.

일반적으로 細胞培養用 動物血清은 非動物化하지 않고 사용함에도 불구하고, 이 실험에 공시한 것은 56°C 30분간 非動物化하였다. 그 이유로는 첫째, 신선한 牛全血清에 들어 있어서 ST細胞의 發育이나 END效果를 저지할 수 있는 易熱性物質을 破壞하려는 것과 둘째, 牛全血清이 製品 생산용일 경우 血清에 汚染되어 들어 있을 수 있는 미생물을 최소화이나마 제거하려는 것과 셋째, 牛全血清 albumin 分割에 많이 들어 있다는 amine oxidase를 不活化하려는 것 등이다. 특히 amine oxidase는 ST細胞 유래 spermine이나 spermidine을 aminaldehyde로 되게하여 이것이 ST細胞에 有毒하고 따라서 細胞發育을 저해할 수 있기 때문이다(Tabor와 Tabor, 1972).

이 실험에서 上清血清이 ST細胞 發育성을 높혀 준 점은 牛全血清에 들어 있는 ST細胞 發育阻止物質이 沈澱分割에 들어 가게됨을 뜻하며, 이 ST細胞 發育阻止物質인 沈澱分割은 沈澱 정도에 따라 임의로 설정한 1+부터 4+에 이르는 정도의 차이가 있었으나 ST細胞發育 정도에는 차이를 주지 않았다.

沈澱分割成分은 膠質學的으로 불안정 할 뿐더러 점조하여 細胞塊를 만들어 細胞의 發育을 저지할 것으로도

집작된다. 한편 發育阻止物質은 發育促進物質에 부착하여 促進物質의 機能을 發揮하지 못하게 할 수도 있다고 믿어진다.

血清分劃으로 보아 이 ST細胞 發育抑制物質은 牛血清의 globulin分層에 들어 있었는데 그 증거로는 全血清群의 globulin帶보다 上清血清群의 globulin帶가 훨씬 넓어 졌기 때문이다. 따라서 全血清을 熱凍解處理하면 globulin分層이 沈澱되고 거기에 ST細胞 發育 阻止物質이 들어가게 된다고 보아 진다.

沈澱分劃이 보여주는 전면 확산 현상은 globulin分層 蛋白質의 變性에 기인한 것으로 믿어진다. 그리고 albumin帶는 거의 ST細胞 發育을 저지하지는 않는다고 보아지는데 이는 上清血清에도 많은 量의 albumin이 들어 있음을 보여주기 때문이다.

이 실험에서 牛全血清의 END發現 抑制物質은 동일한 것과 그렇지 않은 서로 다른 물질임을 알게 하여 주었다. ST細胞發育抑制物質과 同一한 것은 血清 No. 6과 No. 14의 결과에서 찾을 수 있다. 그리고 END發現 抑制物質은 BVDV抗體에 기인함이 증명되었다. 이 사실은 BoS에는 HCV中和抗體가 들어 있을 수 있다는 報告와 일치한다(Gutekunst와 Malmquist, 1963).

BVDV中和抗體는 비단 成牛의 血清에만 들어 있지 않고 胎畜血清(fetal calf serum, FCS)에도 함유되어 있다는 것이 시사 또는 증명된 바 있다(Kniazff 등, 1967; Gratzer, 1968; McClurkin 등, 1975; Coria와 McClurkin, 1978). 이 사실은 END法에 모든 FCS를 사용할 수 있다는 것을 시사하여 주었는데 실제로 어떤 FCS상품은 END效果를 발휘하지 못함을 경험한 바 있다.

따라서 END法에 添加하는 BoS를 다른 血清成分으로 대체하는 研究가 이루어져서 human plasma protein fraction(HPPF)이 대체될 수 있다는 것이 알려졌다(全允成, 1983). 그리고 이 HPPF를 사용한 END法으로 初乳 給與前 HC vaccine 接種豚의 抗體 調査를 광범하게 수행한 결과 HPPF의 이용 可能性이 있음이 입증되었다(全允成 등, 1985). 그러나 HPPF를 END法에 이용하는 일은 HPPF의 제한된 공급원으로 해서 쉬운 일이 아니기에 牛血清의 결점을 밝혀서 그 결점을 보완하는 연구가 더욱 필요하기에 이르렀다.

이 연구 결과에서 주목할 것은 BVDV中和抗體價가 <1인 BoS일지라도 END效果에는 차이가 있다는 점이고 이 사실은 END試驗用 BVDV BoS 선정에 참고해야 할 점이다. 즉, END發現 可能 BoS일지라도 牛血清 번호 4나 15번이 이상적인 것임을 알 수 있다.

BoS의 理化學的 性狀 調査 成績에서 특히 濾紙電氣

泳動像은 血清 No. 14만을 제외하고는 globulin 分層이 모두 50%를 초과하는 高數值로 기록되어 이것을 FCS의 것과 비교하여 볼 때 細胞培養用 血清으로는 적당치 않음을 짐작할 수 있다. 그러나 이것을 沈澱한 上清血清은 globulin 比較含有量이 떨어져 細胞培養用 血清으로 적합하게 될 수 있었다고 믿어진다. 물론 全血清을 非動化하는 과정과 高齡牛인 탓으로 globulin 値가 높았을 것으로 믿어진다.

BoS의 이상적인 pH는 7.2 ± 0.2 이나 여기에서는 그렇지 못하고 8.1~8.7의 범주였는데 그 원인은 BoS의 非動化 과정에 기인하는 것이며, 이 높은 pH가 ST細胞 發育이나 END效果에 영향을 미치지 못한 까닭은 細胞培養培地の 완충작용에 기인하였다고 믿어진다.

BoS의 이상적인 滲透壓(mOsm/kg H₂O)은 290 ± 10 이어서 몇몇 例를 제외하고는 正常 범주에 들었다고 믿어진다.

BoS의 溶血程度 역시 약간 심하여 最高吸收波長 650 nm에서 0~0.2의 범주에 들어야 이상적이거나 그렇지 못하여 0.23~0.52에 이르렀으나 이로 인한 영향을 받지 않았다.

BoS에 NDV抗體의 含有 可能性은 없었으며 따라서 BoS·NDV抗體 問題는 ST細胞 發育은 물론 END效果에 아무런 영향을 주지 않았다.

BoS를 熱凍融解法으로 처리하여 沈澱物을 [제거하고 그 上清血清을 사용하는 일은 적어도 豚精巢細胞培養과 END試驗에 적합함이 밝혀졌다. 그러나 血清中 BVDV抗體問題와, 보다 간단한 血清處理 내지는 製造法의 開發研究가 앞으로 더욱 이루어져야 할 것으로 생각한다.

結 論

豚精巢라 비루스의 力價와 中和抗體價를 측정하는데 이용하는 END法에 있어서 豚精巢細胞 培養에 必要한 牛血清의 細胞 발육능과 END效果에 미치는 요인을 조사 연구하여 얻은 성적을 요약한 결론은 다음과 같다.

1. 牛全血清 21例中 豚精巢細胞의 발육을 가능케한 것은 16例(76.2%)였고, END效果를 보인것은 4例(19.0%)였다. 그러나 加熱凍結融解로 얻은 上清血清은 21例中 豚精巢細胞의 발육을 가능케한 것은 21例(100%)였고, END效果를 보인것은 8例(38.1%)로 그에 수를 증가시켜 주었다.

2. SDS-PAGE分析에서 豚精巢細胞의 발육 억제 물질은 globulin 分層에 들어 있고, 非荷電性이고 擴散性인 성상을 띠우며 變性蛋白質分劃에 들어 있는 것으로 짐작되었다.

3. 上清血清에 들어 있는 END效果 阻止物質은 주로 BVDV中和抗體에 기인함이 밝혀졌다.

4. 牛血清(上清血清 포함)의 滲透壓(mOsm/kg H₂O)의 차이를 비롯한 吸光度(最高吸收波長 650nm에서), pH, 加熱凍結融解處理에 따른 沈澱分割 생성정도, A/G 比, 濾紙電氣泳動像 및 NDV血清中和指數등은 ST細胞 발육능이나 END效果에 영향을 끼치지 않았다.

參 考 文 獻

- Ames, G.F. (1974) Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis on slabs membrane, soluble, and periplastic fractions. *J. Biol. Chem.*, 249:634.
- Coria, M.F. and McClurkin, A.W. (1978) Duration of active and colostrum derived passive antibodies to bovine viral diarrhea virus in calves. *Can. J. Comp. Med.*, 42:239.
- Gratzer, J.B. (1968) Discussion on comments of bovine viral diarrhea mucosal disease. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 152:768.
- Gutekunst, D.E. and Malmquist, W.A. (1963) Separation of soluble antigen and infectious particles of bovine viral diarrhea viruses and their relationship to hog cholera. *Can. J. Comp. Med.*, 27:121.
- Kaplan, A. and Savory, T. (1965) Evaluation of a cellulose-acetate electrophoresis system for serum protein fraction. *Clin. Chem.*, 11:937.
- Kniazff, A.J., Rimer, V. and Gaeta, L. (1967) Gammaglobulin in fetal bovine sera: significance in virology. *Nature*, 214:805.
- Kumagai, T., Shimizu, T., Ikeda, S. and Matumoto, M. (1961) A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. I. Establishment of standard procedure. *J. Immunol.*, 87:245.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly or the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680.
- McClurkin, A.W., Coria, M.F. and Smith, R.L. (1975) Evaluation of acetyethylamine killed bovine viral diarrhea mucoaal disease virus(BVD) vaccine for prevention of BVD infection of the fetus. *Proc. U. S. Anim. Hlth. Assoc.*, 79:114.
- Tabor, H. and Tabor, C.W. (1972) Biosynthesis and metabolism of 1,4-diaminobutane, spermidine, and related amines. *Adv. Enzyol.*, 36:203.
- 강병직, 권혁진, 문재봉, 김선중(1969) 조직배양순화 돼지콜레라바이러스(LOM-850)의 시험관내 증명 및 배양세포에서의 증식성과 보존성에 대하여. *농사시험연구보고*, 12(5):1.
- 강병직, 권혁진, 이현수, 박동권(1967) 조직배양순화 돈콜레라 생독(LOM주) 예방약의 한국산에 대한 응용시험. *농사시험연구*, 10(5):85.
- 김선중, 강병직(1970) 형광항체법 및 END법에 의한 돼지콜레라 감염돈에서의 바이러스검출. *농사시험연구*, 13(5):53.
- 김선중, 이광득, 박응복, 서익수(1982) 기업양돈장에서 의 END법에 의한 돈콜레라 증화항체조사. *한축과연소보* 2:62.
- 권혁진, 강병직, 문재봉, 김선중(1968) 조직배양순화 돈콜레라병독(LOM-850) 접종돈의 항체소장에 대하여. *농사시험연구보고*, 11(5):53.
- 全允成(1983) 豚cholera virus에 대한 END血清中和反應을 위한 human plasma protein fraction의 應用試驗. *서울大獸醫大論文集*, 8:189.
- 全允成, 芮載吉, 徐鈺洙(1985) '83 豚콜레라 流行時의 免疫母豚과 仔豚의 END血清中和抗體價調査. *大韓獸醫學會誌*, 25:69.