

<原 著>

Coturnix Coturnix Saponica Embryo 組織培養에서 증殖시킨 Newcastle Disease Virus(B₁ strain)의 免疫効力에 關한 研究

서울大學校農科大學獸醫學科

趙 炳 律 · 李 榮 詔

緒 論

世界的으로 널리 蔓延되고있는 닭의 白血病은 그의 病因學的 知識이 아직 不備하며 有效한 豫防法도 考案되고 있지 않으며 그에 依한 養鷄業의 經濟的損失은 莫大한것이다.

本病은 病鷄의 各種排泄物 및 分泌物에 依하여 經口的 및 空氣傳染되며 뿐만아니라 白血病中에서 가장 그의 發生率이 높은 臟器型淋巴腫症은 感染鷄의 種卵을 通하여 다음세대 병아리에 傳染되는 即 介卵性 繼代傳染이 可能하다.

臟器型淋巴腫症의 發生率은 높은 것이며 따라서 多數의 種卵이 本症 病因 바이러스를 含有하고 있는 率이 높다. Rubin(1)등 그리고 Hughes 등(2)의 報告에 依하면 어느 鷄群에 있어서는 全鷄中 1/5은 終身 Viremia로서 繼續感染된 卵을 産卵하며 殘餘 4/5는 抗體를 가지고있으며 그中 1/7이 또한 그의 卵에 Virus를 排泄한다고하며 Levine등(3)이 한 Commercial flock에서 調査한바도 역시 類似한 結果를 보였으며 即 205首의 母鷄中 54%가 RIF virus에 對한 抗體를 가지며 69%가 感染된 卵을 産卵함을 觀察하였다.

오늘날 닭에 使用하는 各種 生毒백신은 孵化卵을 使用하여 製造되고 있으며 우리나라에서도 Newcastle백신으로서 B₁生毒백신 그리고 鷄痘백신이 孵化鷄卵을 使用하여 만들어지고있다.

이미 言及한바와같이 닭의 白血病 특히 가장 흔히 發生하는 臟器型淋巴腫症은 感染鷄卵을 通하여 傳染되며 높은 率의 鷄卵이 本病바이러스를 含有하고 있음에 비추어 孵化鷄卵을 使用하여 製造되는 各種生毒백신이 닭에게 臟器型淋巴

腫症을 비롯한 各種 白血病을 傳染시키는 媒介體가 되는 可能性이 濃厚하다. 이미 1956年 Burmester등(4)은 孵化鷄卵으로 만들어진 生毒 뉴캐슬백신이 臟器型淋巴腫症을 傳播시킬수 있음을 報告한바 있으며 Hemsley(5)는 孵化鷄卵을 使用한 뉴캐슬生毒백신을 使用함에 앞서 이러한 生毒백신이 닭의 白血病을 傳播시키지 않음을 證明해야 할것이라고 主張하고있다. 그리고 美國國務省 國立保健院 生物學的製劑基準局 (Division of Biologics Standards of the National Institutes of Health)은 사람에 使用되는 紅痘生毒백신 製造에 使用되는 孵化鷄卵은 닭의 白血病 바이러스에 感染되지 않은것을 使用하도록 規定하고 있다.

그러므로 孵化鷄卵을 使用하는 生毒백신의 製造는 닭의 白血病豫防上 極히 考慮되어야할 問題이며 이러한 生毒백신에 依한 닭의 白血病傳播을 豫防하기 爲한 措置가 至急히 要請되고있음이 現實이다.

이러한 目的을 이룩하기 爲해서도

1. 白血病바이러스에 感染되지않은 鷄群을 設定 完全隔離下에 飼育하여 그의 種卵만을 生毒백신 製造에 使用하는 方法과,
2. 鷄胎兒組織과 鷄血清을 使用하지않는 組織培養法에 依한 生毒백신의 製造方法을 생각할수있다.

然이나 前者는 우리나라 現實에 비추어 그의 實現性이 極히 稀少함이 分明하다. Rauscher(6)등은 Japanese quail(Coturnix coturnix japonica)는 닭의 白血病바이러스에 感受性이 거의 없으며 人工感染도 容易치 않음을 報告한바있어 本

연구에 있어서는 鷄胎兒以外的 組織과 鷄血清以外的 血清을 應用하는 即 Japanese quail 胎兒 組織과 犢牛血清을 使用하는 組織培養法에 依한 B₁뉴캐슬바이러스의 培養과 그의 生毒백신으로 서의 利用性에 關한 基礎的인 研究을 試圖하였다.

材料 및 方法

I. 材 料

1. Japanese Quails

組織培養에 7日 孵化卵의 胎兒을 使用하였으며 頭部 및 肝은 除去하였음.

2. Solutions 및 Media

1). Hanks' Balanced salt solution(BSS) 洗滌 및 稀釋液으로 使用하였음.

2). La Ye Medium(7)

maintenance medium으로 使用하였으며 pH는 7.4로 調整하였음.

3). Growth medium.

La Ye medium에 犢牛血清 8%을 加한 것을 Growth medium으로 使用하였음.

犢牛血清은 使用에 앞서 不動化했으며, Cytotoxicity와 Viral inhibitory activity 가 없는것을 使用하였고 Growth medium 의 pH는 7.4로 調整했음. pH 調整에는 2.8% NaHCO₃을 使用하였음.

4). Trypsin

Trypsin (Difco, 1:250)으로 10×Stock solution(2.5%)을 Hanks' BSS로써 만들었으며, stock solution은 -20°C에 保存하였음.

Japanese quail embryo tissue의 Trypsinization에는 Stock solution을 Hanks' BSS로 1:10으로 稀釋하여 使用하였음.

5). Newcastle Disease Virus (NDV).

10日 孵化鷄卵에서 增殖시킨 B₁ Newcastle virus(8)을 使用했으며 그의 力價는 10⁸EID₅₀/ml 었음.

II. 方 法

1. 組織培養方法

Screw cap tube(13×100mm)에 Monolayer culture을 만들었으며, 그의 方法은 大體로 Merchant(7)의 方法을 따랐음.

各 tube에는 5×10⁵ cells을 含有하는 Growth medium 1.5 ml. 씩을 集어넣었음.

2. B₁ NDV의 接種 및 培養

組織培養 2~3日後 Monolayer가 完成되었을때 Growth medium을 除去하고 La Ye medium 2ml. 로 1回 洗滌한후 B₁ NDV의 10EID₅₀을 La Ye medium 1.5ml 中에 含有시켜 各 tube에 接種하였음.

3. B₁ NDV의 力價測定

組織培養에 B₁NDV을 接種한후 第1日, 第3日, 第5日, 第7日, 第10日 그리고 第14日에 各各 3個의 tubes을 任意抽出하여 그의 培養液을 混合하고, 2500 rpm에서 20分間 遠沈후 그의 上層液의 바이러스力價를 10日 孵化卵에 接種하여 測定하였음.

바이러스力價測定 方法은Cunningham(a)의 方法에 依하였으며 EID₅₀算出은 Reed & Muench(10)에 依하였음.

4. Hemagglutination-Inhibition(HI) 抗體力價의 測定

組織培養에 B₁NDV을 接種후 第3日에 收集한 培養液을 닭의 人工接種試驗에 使用하였음.

多量의 바이러스 生産을 爲하여 Monolayer culture을 16 oz. Prescription bottle (10⁷ cells seeding)에 만들고 Monolayer가 完成된후 B₁NOV을 10⁵EID₅₀을 接種하였음. 第3日에 培養液을 收集하여 2500 rpm에서 20分間 遠沈하고 그의 上層液을 回收한바 그의 바이러스力價는 10^{8.2} EID₅₀/ml 었음.

本 바이러스材料를 Leghorn 6週日雞 60首에 經鼻接種한후 第7日, 第14日, 第21日, 第42日 그리고 第56日에 各 接種鷄에서 3 ml. 씩을 採血, 血清分離후 56°C에서 30分間 可熱하여 不動化하고 그의 HI抗體力價를 測定하였으며 그의 方法은 Cunningham(a),

의 β 方法에 依하였으나

血清稀釋은 1:2부터 시작하였으며 8 HA units을 사용하였음. 實驗鷄에 바이라즈接種에 앞서 任意抽出한 20首에서 調査한바 모두 HI 力價는 20以下였음.

5. 中和抗體力價의 測定

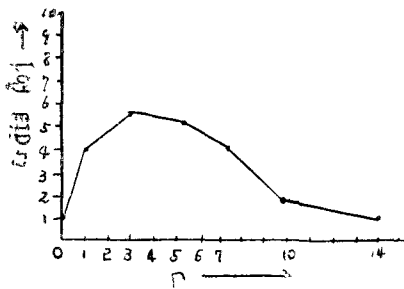
HI 力價測定에 使用한 同一血清의 中和抗體力價를 測定하였으며 그의 方法은 Cunnigham(a)의 α 方法에 依하였음.

結 果

I. *Coturnix Coturnix Japonica* Embryo Tissue Culture에서의 B₁ Newcastle Virus의 增殖.

C. C. japonica embryo monolayer culture 에 B₁ NDV을 接種한후 第1日, 3日, 5日, 7日 10日 그리고 第14日에 總合 30 tubes中 3 tubes을 任意抽出에 依해 擇하여 그의 培養液을 混和하고 Refrigerated contrfuge에서 2500 rpm에서 20分間 遠沈후 그의 上層液을 採取하여 그의 Virus 力價를 孵化卵을 使用하여 測定한바 다음과 같은 結果를 얻었음. (圖1)

圖1—*Coturnix Coturnix Japonica* Embryo Tissue Culture에서의 B₁ Newcastle Disease Virus 의 增殖



即. Virus接種후 第1日에는 10^{4.3} EID50/ml, 第3日에는 10^{5.4} EID 50, 第5日에 10^{5.8} EID 50, 第7日에는 10^{4.5} EID 50 그리고 第14日에는 10^{1.1} EID 50/ml. 을 나타냈으며, Virus 力價는 第3日에 最高에 달하고 次後 漸次的으로 減少되었음.

II. 人工感染試驗

Leghorn 6週日雛 60首에게 組織培養에서 增殖시킨 B₁ NDV(10^{6.2} EID 50/ml)을 約 0.03ml. 씩 兩鼻孔에 經鼻接種하고 各雛의 HI 力價 및 血清中和力價를 測定하였던바 다음과같은 結果를 얻었음.

1. HI 抗體의 形成 및 消長

組織培養에서 增殖시킨 B₁. NDV을 經鼻接種하고 第7日, 第14日, 第21日, 第42日, 그리고 第56日에 各個體別로 採血하여 그의 血清中の HI 力價를 測定하였던바 表1과 같은 結果를 얻었음 即 HI 抗體는 바이라즈接種後 第7日에 이미 形成되었으며 第14日에는 急激히 增加되어 그의 Mean Lag₂ HI titer가 最高點에 達하였고(圖2) 次後 漸次的으로 減少되는 傾向을 보였음.

表1—*Coturnix Coturnix Japonica* Tissue Culture에서 增殖시킨 B₁ Newcastle Disease Virus 人工接種鷄(60首)에 있어서의 HI 力價

日 (接種後)	HI 力 價									Mean Log ₂ HI titer
	0	8	16	32	64	128	256	512	1024	
7	18	27	10	3	2	0	0	0	0	2.46
14	1	3	2	6	9	13	12	10	4	6.95
21	1	2	5	13	16	12	9	2	0	6.01
42	2	3	14	13	17	1	0	0	0	3.98
56	9	6	17	18	7	2	1	0	0	3.16

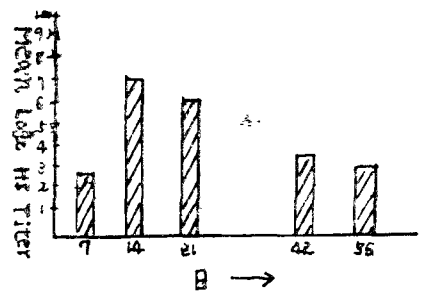


圖2—人工接種鷄(60首)에 있어서의 HI 力價의 消長

2. 中和抗體의 形成 및 消長

Virus人工接種後 第7日, 14日 그리고 第21日에 採血한 血清中の 中和抗體力價를 測定하였던바 그의 結果는 다음 表와 같었음.

表2—*Coturnix Coturnix Japonica* Tissue Culture에서 增殖시킨 B₁ Newcastle Disease Virus 人工接種鷄(60首)의 中和抗體分布

接種後	Log NI						
	<1.0	≥1.0	≥2.0	≥3.0	≥4.0	≥5.0	≥6.0
7日	6 (10%)	42 (70%)	6 (10%)	6 (10%)	0	0	0
14日	0	10 (16.6%)	24 (40%)	18 (30%)	7 (11.6%)	1 (1.6%)	0
21日	0	0	1 (1.6%)	3 (5%)	20 (33.3%)	35 (58.3%)	1 (1.6%)

即 Virus接種後 第7日에는 全體의 80%가 아직 免疫學的으로 意義있는 LogNI=2.0에 達하지 못하였으며 第14日에도 16.6%가 有意性있는 中和抗體力價를 나타내지 않았고 第21日에 이르러서 비로서 全體가 有意性있는 中和抗體力價를 나타냈음. 이것은 中和抗體形成은 HI抗體形成보다도 늦어진다는 從來의 知見과 一致하는것임.

討 議

B₁ Newcastle Disease Virus는 *Coturnix coturnix Japonica* embryo tissue culture에서 增殖하였으며 그의 增殖 및 力價는 Mason & Kaufman(11) Kohn & Goldwasser(12), Pereira & Gompels(13) Gelenczei & Bordt(14) 등이 鷄胎兒組織培養 및 其他 組織培養에서 觀察한바에 거의 一致하였으나 그의 力價는 孵化鷄卵에서 보통 얻을수있는 力價보다는 낮은 傾向을 보였음.

本試驗結果는 또한 Gelenczei & Bordt(14)가 觀察한바 B₁ Newcastle Virus는 다른 Velogenic strain이나 Mesogenic Strain의 Newcastle Virus 보다도 보다 빨리 즉 48~72時間에 Virus 力價가 最高에 達하였다는 結果와도 一致함을 보여주었음.

그러므로 本組織培養法에 依하여 B₁ Newcastle를 培養하였을 경우 Virus의 最高力價를 얻기 爲해서는 바이라스接種後 48~72時間에 Virus를 收穫함이 合理的임을 나타내는 것으로 보임.

Coturnix Coturnix japonica embryo tissue culture에서 增殖시킨 B₁ Newcastle Virus의

人工接種에 依하여 形成되는 HI 및 中和抗體의 形成 및 消長은 孵化鷄卵增殖 B₁ Newcastle Virus를 人工接種하였을 때의 抗體形成 및 消長과 本質的으로 大差가 없었으며 Raggi & Lee (15), Markham 등(16)이 孵化鷄卵增殖 B₁ Newcastle Virus를 닭에 經鼻 接種하였을때의 抗體形成과 거의 一致되는 結果를 보였음.

Newcastle 病에 있어서는 HI抗體나 中和抗體力價가 免疫성과 반드시 一致되는 것은 아니며 Newcastle病에 對한 實地 免疫效果試驗은 Challenge試驗에 依함이 가장 適正한 方法임에 비추워 本研究에 있어서는 Challenge 試驗을 할수 없었음으로 *Coturnix Coturnix japonica* embryo tissue culture에서 增殖시킨 B₁ Newcastle Virus가 HI 및 中和抗體形成을 이룩하는것은 分明하나, 本 Virus 接種에 依한 實地 免疫效果에 關해서는 앞으로 追究를 要하는바이다 本研究에 있어서 長期的인 HI 및 中和抗體力價의 消長을 追究하지 못하였음과 B₁ Newcastle Virus를 *Coturnix Coturnix japonica* embryo tissue Culture에 繼代增殖시킬 境遇의 B₁ Newcastle Virus의 生物學的 및 免疫學的變異를 追究하지 못하였음은 遺憾이었음.

結 論

Coturnix coturnix japonica embryo tissue culture에서의 B₁ Newcastle disease Virus의 增殖과 그의 免疫原性에 關한 試驗을한바 다음과 같은 結果를 觀察하였음.

1. B₁ Newcastle disease Virus는 C. C. japonica embryo monolayer culture에서 增殖하며 Virus力價는 第3日에 最高에 達하였음.
2. C. C-japonica embryo tissue culture에서 增殖시킨 B₁ Newcastle disease Virus는 HI 및 中和抗體를 形成케하였으며, 本抗體形成은 孵化鷄卵增殖 B₁ Newcastle Virus에 依한 抗體形成과 本質的으로 크게 다를바 없었음.
3. C. C. japonica embryo tissue culture에서 增殖시킨 B₁ Newcastle disease Virus가

Live Virus vaccine으로 應用될수 있는 可能性이 示唆되었음.

參 考 文 獻

1. Rubin, H., Fanshier, L., Cornelius, A., and Hughes, W.F.: Tolerance and immunity in chickens after congenital and contact infection with an avian leukosis virus. *Virology*, 17, (1962): 143-156
2. Hughes, W.F., Watanabe, D.H., and Rubin, H.: The development of a chicken flock apparently free of leukosis virus. *Avian Dis.*, 7, (1963): 154-165.
3. Levine, S., and Nelson, D.: RIF infection in a commercial flock of chickens. *Avian Dis.*, 8, (1964): 358-368.
4. Burmester, B.R., Cunningham, C.H., Cottral, C.E., Belding, R.C., and Gentry, R.F.: The transmission of visceral lymphomatosis with (live virus) Newcastle disease vaccines. *Am. J. Vet. Res.*, 17, (1956): 283-289.
5. Hemsley, L. A.: The effect of live Newcastle vaccine on the incidence of leucosis and airsacculitis. *Vet. Rec.*, 76, (1964): 1179-1180.
6. Rauscher, E.J., Reyniers, J.A., and Sacksteder, M.R.: Response or lack of response of apparently leukosis-free Japanese quail to avian tumor viruses. *Natl. Cancer Inst. Monograph*, 17, (1964): 211-229.
7. Merchant, D.J., Kahn, R.H., and Murphy, W.H. Jr.: Handbook of cell and organ culture. Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1960.
8. Hitchner, S.B., Reising, B., and Van Roekel, H.: Characteristics of the B₁ strain of Newcastle disease virus. *Am. J. Vet. Res.*, 12, (1951): 246-249.
9. Cunningham, C.H.: A laboratory guide in virology. 4th ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1960.
10. Reed, L.J., and Muench, H.: Simple method of estimating 50% end points. *Am. J. Hyg.*, 27, (1938): 493-497.
11. Mason, E. J., and Kaufman, N.: Newcastle disease virus in cultures of chicken embryo tissues: Its multiplication, titration, and cytopathogenicity. *Am. J. Path.*, 31, (1955): 883-889.
12. Kohn, A., and Goldwasser, R.: Multiplication of Newcastle disease virus in chick embryo tissue cultures. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, 96, (1957): 198-200.
13. Pereira, H.G., and Gompels, A.E.H.: The growth of fowl-plague and Newcastle disease virus in roller tube cultures. *J. Path. & Bact.*, 67, (1954): 109-115.
14. Gelenczei, E., and Bordt, D.: Studies of Newcastle disease virus strains in various cell cultures. *Am. J. Vet. Res.*, 21., (1960): 987-991.
15. Raggi, L.G., and Lee, G.G.: Response of birds to one intranasal vaccination with B₁ strain of Newcastle disease virus. *Avian Dis.*, 4, (1960): 187-195.
16. Markham, F. S., Cox, H. R., and Bottorff, C.A.: Newcastle disease: A serologic study in vaccination and revaccination. *Cornell Vet.*, 14, (1954): 324-345.