

豚콜레라 바이러스 感染組織의 遊離아미노酸에 關한 比較研究

서울 農業大學

龍 萬 重

I 緒 論

動物 組織의 遊離아미노酸은 動物과 組織의 種類, 生理의 狀態 및 成長度에 따라 그 量과 種類가 다른 것으로 알려져 있다(Low⁽⁸⁾).

Awapara⁽²⁾는 쥐에서 組織 아미노酸을 分析하여 組織의 種類에 따라 各기 다른 分布狀을 報告하였다. 그후 豚의 肝, 脾, 腎, 腦, 筋肉에서의 아미노酸을 調査한 Schurr⁽⁹⁾의 의하면 肝에서 12種을 分析하였고, Buchanan⁽⁷⁾은 18種을 分析하여 그의 濃度를 밝힌바 있다.

Cammarata 및 Cohen⁽⁴⁾은 豚의 腎, 肝, 心臟에서, Tallen 등⁽¹⁰⁾은 豚의 肝, 腦, 筋肉 및 腎臟에서, Hopwood 및 Gassner⁽⁶⁾은 牛의 精巢와 그의 附屬生殖器官에서 遊離아미노酸을 分析 報告한 外에도, 神經組織 및 腦의 아미노酸에 關한 研究가 많으며, (10, 12) Park 등⁽¹¹⁾은 脊椎動物의 腦組織 遊離아미노酸을 動物別로 比較分析하여 그의 分布狀의 差異를 究明한바 있다.

1954年 Squibb^(14, 15)는 Newcastle病 바이러스에 感染된 닭의 肝組織에서 遊離아미노酸을 分析한바 顯著的 減少를 나타냈음을 報告하였다. 本實驗은 이와같은 正常豚과 罹病動物體의 遊離아미노酸에 基礎를 두고 豚에 다음 諸하게 病害를 주는 豚콜레라 바이러스를 돼지에 人工傳染시켜 얻은 感染豚, 免疫豚을 正常豚과 比較하여 罹病豚의 遊離아미노酸을 分析하여 이의 分布狀과 生理學的 意義를 究明코저 하였다. 供試臟器로는 아미노酸 代謝에 重要な 肝과, 本病毒에 感染되면 特異한 剖檢所 見을 보이는 脾, 腎臟組織을 택하여 分析하였다.

II 材料 및 方法

供試病毒 및 動物

供試病毒은 家畜衛生研究所에서 分讓받은 豚콜레라 ROVAC株와 ALD株를 各各 生理的 食鹽水에 100倍 稀釋한 것이며, 供試動物은 健康한 Berkshire雜種 體重約 40kg의 豚 26頭를 使用했다.

感染豚의 材料는 ALD株 材料 2.0ml.를 筋肉內에 接種하여 6~8日만에 病徵을 나타낸 類死豚에서 얻었다. 免疫豚의 材料는 同類의 돼지에 豫防接種하고 10日만에

強毒 2.0ml.을 後毒接種하여 2週間 臨床觀察後 健康하게 生存한 것에서 얻었다. 對照豚의 材料는 同類의 無處置 健康豚에서 얻었다.

遊離아미노酸

各群의 供試豚을 放血致死시켜 肝, 脾, 腎臟組織을 各各 4.0gr.를 秤量하였다. 이것을 切片으로 만들어 蒸溜水로 洗滌한 다음 40~50°C의 乾熱機에서 乾燥하였다. 그리고 80% ethyl alcohol 15ml.를 加하여 攪拌한 다음 24時間 放置하고나서 濾過하였다. 다시 濾液에 chloroform을 加하여 蛋白質을 우선 除去하고 다시 chloroform을 加해서 遠心分離하여 上澄液만을 얻어 이를 Holtfrester, Kaszalka 및 Miller의 方法에 依하여 冰室에서 一晝夜 放置한 다음 白色沈澱物을 除去하였다. 그리고 60°C이 溫水槽에서 加熱濃縮시킨 다음 10% Isopropyl alcohol 0.5ml.과 蒸溜水 4.0ml.을 加하여 paper chromatography의 試料로 使用했다.

아미노酸의 分離

本實驗에 使用한 濾紙는 Watman No. 1 이고 이것을 24×24cm의 크기로 잘라서 使用하였다. 展開는 試料 0.1 ml.을 micropipette로 直徑 0.3~0.5cm가 되도록 濾紙에 spotting 하였다. 展開溶媒는 一次元에서 phenol : H₂O(4 : 1), 二次元에서는 n-butanol : acetic acid : H₂O(4 : 1 : 5)의 混合液을 各各 使用하였다. 展開時間은 一次元에서 12時間, 二次元에서 9時間 消要되었다. 展開가 끝난 다음 濾紙를 25°C±1에서 24時間 乾燥하고나서 0.2% ninhydrin solution을 均一하게 噴霧하여 80~100°C의 乾熱機에서 10分間 加熱 發色시킨다음 Rf 値를 決定하였다.

III 實驗成績

各區別로 肝, 脾, 腎臟組織의 alcohol 抽出物을 paper chromatography法으로 檢出한 아미노酸의 種類와 Spot의 크기 및 色의 濃度로서 決定한 比較表示는 Table 1과 같으며 paper chromatogram의 pattern은 Fig 1~9와 같다.

1) 肝 臟

正常豚에서는 alanine, β-alanine, glutamine, arginine,

cystine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, histidine, leucine, methionine, phenylalanine, proline, lysine, serine, threonine, tyrosine, valine 外 未知物 2 種等 20 種이 檢出되었으며, 免疫豚에서는 arginine, methionine 을 除外한 未知物 1 種等 17 種이 그리고 感染豚에서는 alanine, arginine, β -alanine, methionine, phenylalanine 을 除外한 未知物 2 種等 15 種이 檢出되었다.

2) 腎 臟

未正常豚에는 正常 肝組織에서 檢出된것 중 β -alanine,

arginine, phenylalanine 을 除外한 未知物 1 種等 16 種이 檢出되었고 免疫豚과 感染豚에서는 正常 腎組織에 比하여 alanine, proline, methionine 을 除外한 것과 未知物 各 1 種等을 包含하여 各各 13 種이 檢出되었다.

3) 脾 臟

正常豚에서는 正常 肝組織에서 檢出된것중 alanine, methionine, β -alanine, phenylalanine 을 除外한 未知物 1 種等 15 種이 檢出되었고, 免疫豚에서는 正常 脾臟組織에 比하여 proline, arginine 을 除外한 未知物 1 種等 13 種

Table 1. Comparative contents of free amino acids in swine tissues

	Liver			Kidney			Spleen		
	NC.	IC.	AC.	NC.	IC.	AC.	NC.	IC.	AC.
Aspartic acid	+++	++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Cystine	++	++	++	++	+	+	++	+	-
Glutamic acid	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Serine	++++	++++	+++	++++	+++	+++	++++	++++	+++
Lysine	+++	++	++	++	++	++	++++	++	++
Arginine	++	-	-	-	-	-	++	-	+
Glycine	+++	++	+	+++	+	++	+++	++	++
Glutamine	+++	++	++	++	++	++	+++	++	-
Histidine	++	++	+	++	++	+	++	++	++
Threonine	++++	+++	+++	++++	+++	+++	++++	+++	+++
Tyrosine	+++	+++	++	++	+	+	+++	++	++
Alanine	++++	++	-	++	-	-	+	-	-
δ -Alanine	++	++	-	-	-	-	-	-	-
Proline	+++	+++	+++	++	-	-	++	-	-
Methionine	++	-	-	++	-	-	-	-	-
Valine	++++	+++	+++	+++	++	++	++++	+++	+++
Phenylalanine	++	++	-	-	-	-	-	-	-
Leucine	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++++	+++	+++
Unknown	2	1	2	1	1	1	1	1	1
Total	20	17	15	16	13	13	15	13	12

NC: normal case

IC: Immunized case

AC: Infected case

이, 그리고 感染豚에서는 cystine, proline, glutamine 을 除外한 未知物 1 種等 12 種이 檢出되었다.

4) 感染組織의 全區를 通하여 正常組織에 比해 遊離 아미노酸은 顯著的한 減少를 나타냈다.

5) 感染區는 免疫區 보다 多少 낮은 濃度を 보였으며 glutamic acid, leucine, serine, threonine 은 全區에서 높은 濃도를 나타냈다.

IV 考 察

本實驗에서 Table 1 에서와 같이 豚콜레라 바이러스에

感染된 各組織의 遊離아미노酸은 健康豚 및 免疫豚의 組織에 比較하여 大體적으로 減少함을 보았다. 이 사실은 體内に 攝取된 蛋白質이 消化 分解되고 이로서 生成된 아미노酸은 組織蛋白, 酵素, hormone, 抗體, 그리고 energy 源으로 利用된다는 것으로 보아, 病豚에서의 遊離아미노酸의 減少는 本病毒으로 因한 組織의 物質代謝에 障害가 일어났기 때문이라고 믿어진다.

本實驗에서 aspartic acid, glutamic acid, glycine, histidine, leucine, lysine, serine, tyrosine, threonine, valine 等은 全區에서 檢出되나 正常組織에 比하여 大體적으로

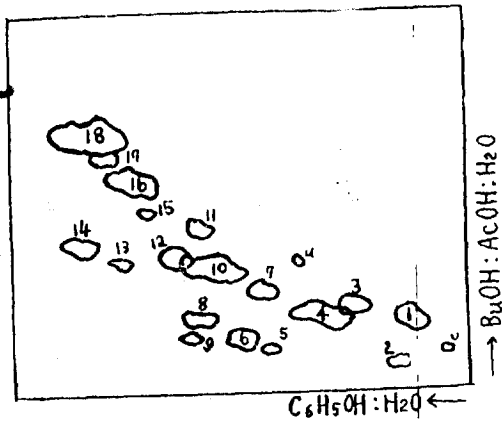


Fig. 1 Normal liver

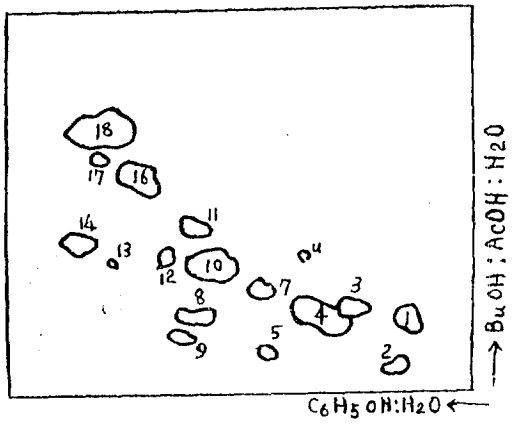


Fig. 2 Immunized Liver

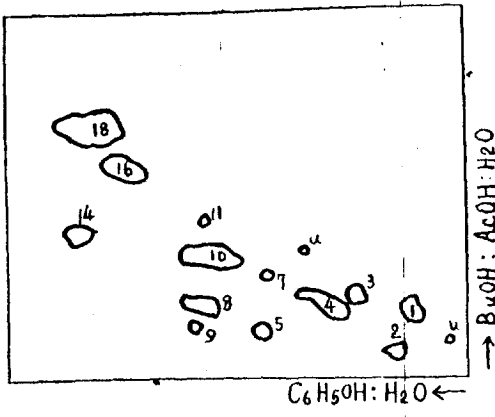


Fig. 3 Infected liver

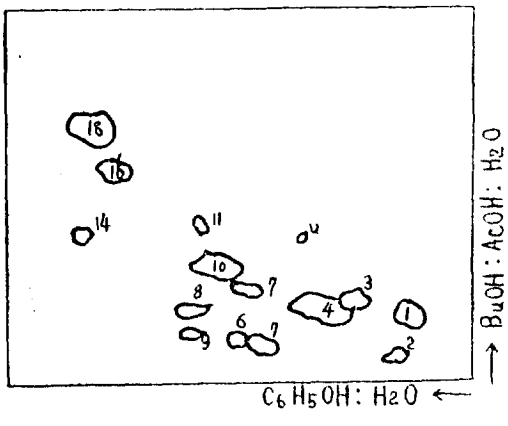


Fig. 4 Normal spleen

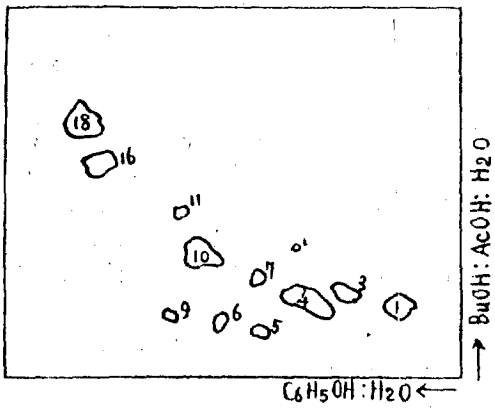


Fig. 5 Immunized spleen

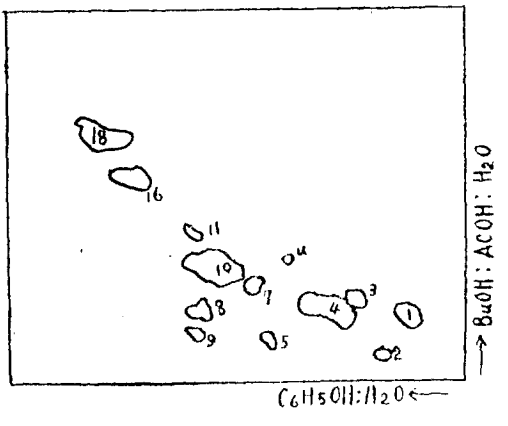


Fig. 6 Infected Spleen

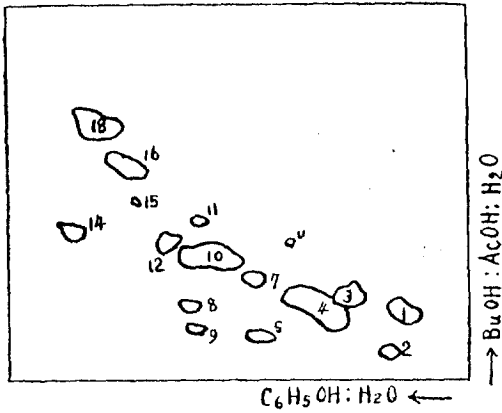


Fig. 7 Normal Kidney

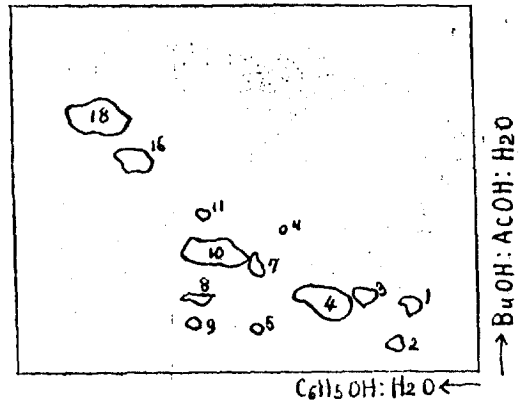


Fig. 8 Immunized Kidney

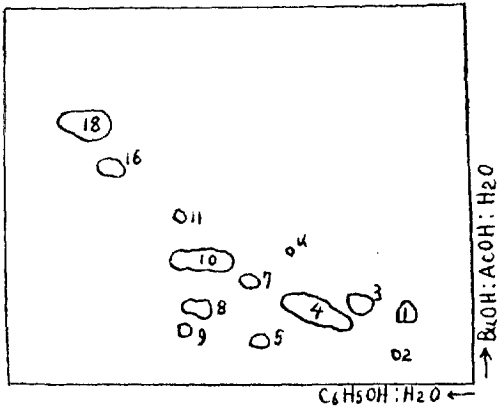


Fig. 9 Infected Kidney

- Remark; 1. aspartic acid 11. tyrosine
 2. cystine 12. alanine
 3. glutamic acid 13. β -alanine
 4. serine 14. proline
 5. lysine 15. methionine
 6. arginine 16. valine
 7. glycine 17. phenylalanine
 8. glutamine 18. leucine and iso-leucine
 9. histidine u. unknown
 10. threonine

減少되는 反面에 glutamic acid, leucine, serine, threonine 은 全區의 組織에서 그 濃度에 差異를 볼 수 없이 많은 分布相을 나타내고 있음은 이들 아미노酸이 感染組織에서의 物質代謝 過程에 아무런 影響도 받지 않은 것으로 생각된다. alanine, arginine, methionine, proline, phenylalanine, β -alanine, cystine 등은 組織에 따라 paper chromatogram 上에 나타나지 않거나 또는 顯著한 減少를 나타내고 있음은 前者와 相反된 理由에 기인하는 것 같다.

Allison 및 Wannemacher⁽¹¹⁾는 굶주린 쥐에 있어서 遊離아미노酸의 量이 減少한다 하였고, Squibb⁽¹⁴⁾는 Newcastle 病 바이러스에 感染된 어린雄鷄의 肝組織 遊離아미노酸中 lysine 70%, histidine 30%, arginine, aspartic acid, alanine, valine, leucine 이 近 50% 減少한다고 하였는데 이것은 飢餓에 기인한다고 하였다. 豚콜레라 感染組織에서의 全區에서도 leucine 을 除外하고는 위와 비슷한 結果가 나타나고 있음은 leucine 이 iso-leucine 과 互換된 까닭이 아닌가 모고 이것은 앞으로 더 研究한 問題라 생각된다.

生長時나 發育時에 不足하여지는 histidine, arginine, 및 tyrosine 그리고 敗血症이나 中毒에서 恢復되는데 그 리고 解毒作用에 利用되는 methionine, cystine⁽¹⁷⁾ 이 豚 콜레라 感染組織에서 減少되었는데 이는 抗體生理的 機能의 維持를 爲한 機轉에 障害가 招來된 까닭으로 믿 어진다. 免疫豚에서는 正常豚에 比하여 大體의 으로 낮은 濃度를 나타내고 있음은 疾病에서 恢復하는 동안에 생기는 成長으로 因한 同化作用의 關係라 생각된다.

Maun 等⁽¹²⁾은 rat 에 있어 phenylalanine 의 缺乏이 plasma protein 과 haemoglobin 의 減少를 招來한다 하였고 Kernkamp⁽¹³⁾는 豚콜레라 感染豚이 終末에 가서 出血로 因하여 血色素가 減少될 수 있음을 밝힌바 本羅病豚體에서 單純한 出血로 因한 것인지 또는 phenylalanine 의 缺乏에 起因되는지의 加否는 좀더 研究할 問題라 믿는다. Gerneroy 等⁽¹⁵⁾은 甚한 蛋白質의 缺乏이 家兔나 닭에서 抗體力價를 減少시킬 수 있다고 하였으며, Squibb⁽¹⁵⁾는 過剩及 缺乏된 蛋白質에 있어서 遊離아미노酸은 赤血球凝集抑制力價에 差異를 招來하며 遊離아미노酸의 要因

에 小量은 抗體生成에 利用될 수 있다고 하였다. 本實驗에서의 結果 大部分의 遊離아미노酸의 減少로 보아 豚自體에서의 어떤 抗體生成에 障害를 갖어 음을, 짐작할 수 있다.

V 結 論

本實驗은 paper chromatography 法에 依하여 豚脾에라 感染豚에 對하여 이의 免疫豚, 그리고 健康豚의 組織遊離아미노酸을 分析하였다.

1. 正常豚全區에서는 aspartic acid, cystine, serine, glutamic acid, lysine, glycine, glutamine, histidine, proline, threonine, tyrosine, valine, leucine 이 檢出되었으며 肝, 脾에서는 arginine 이, 肝, 腎에서 methionine, alanine 이 肝에서 β -alanine, phenylalanine 이 더 檢出되었다.

2. 免疫豚의 肝에서는 arginine, alanine, β -alanine, methionine, phenylalanine. 腎에서는 alanine, proline, methionine. 脾에서는 cystine, glutamine, proline 을 正常豚의 脾에 比하여 檢出せ 못 하였다.

3. 免疫豚의 腎에서는 arginine, methionine, 腎에서는 alanine, proline, methionine. 脾에서는 arginine, proline 을 正常豚全區에 比하여 檢出せ 못 하였으나 感染豚에 比하여 肝에서 alanine, β -alanine, phenylalanine 을 그리고 腎에서 cystine 이 더 檢出되었다.

4. 모든 試驗組織에서 glutamic acid, leucine, serine, threonine 이 높은 濃度로 나타났으며, 感染豚에서는 正常豚에 比하여 顯著한 減少를 보였다.

II. 參 考 文 獻

1. Allison, J.B. and R.W. Wannemacher, Jr. 1964. *Creatinuria-Calcium deficiency*. Brit. J. Nutrition, in Press.
2. Asapara, J. 1949. *Application of paper chromatography to the estimation of some free amino acids in tissues of rat*. J. Biochem., 178 : 113—116
3. Buchanan, D.K.M. 1951. J. Gen. Physiol., 34 : 407
4. Cammarata, P.S. and P.P. Cohn, 1959, *The scope of the transamination reaction in animal tissue*. J. Biol. Chem., 187 : 439—452
5. Gemery, D.G. and A.H. Koffler, 1949. *The production of antibodies in protein depleted and repleted*

- rabbit. J. Nutrition, 39 : 299
6. Hopwood, M.L. and F.X. Gassner, 1957. *Free amino acid concentration in bovine testis and accessory sex organ*. Proc. 38th Ann. Meeting Western Div. Ann. Dairy Sci. Assoc. 8pp.
7. Kernkamp, N.C.H. 1939. *The blood picture in hog cholera*. J. Am. Vet. Med. Assoc., 95 : 525
8. Low, I.P. 1954. *Patterns of free amino acids and related compounds in tissues in tissues of several species*. Dept. of Zoo. Washington Univ.
9. Maun, M.E.W.M. Cahill and R.M. Davis. 1945. Arch. Path. 39 : 294
10. Okumura, N., O. Saburo and A. Tatsuya, 1959. *Studies on the free amino acids and related compounds in the brains of fish, amphibia, reptile, aves and mammal by ion exchange chromatography*. J. Biol. Chem., 46 : 2, 201—212
11. Park, S.Y., S.O. Lee and J.H. Choe. 1964. *Comparative biochemical studies of the free amino acids in brain tissues of vertebrate*. Bull. of the Ann. of Dr. Lee, H. J. 60th Birth., Seoul Mun. Coll. of Agr. 55—59
12. Roberts, E., P.J. Harmon and S. Frankel, 1951. *α -Aminobutyric acid content and glutamic decarboxylase activity in developing mouse brain*. Proc. Exp. Biol. Med., 78 : 779—803
13. Schurr, P. E., H. T. Thompson, B. M. Henderson and C. A. Elevetem. 1950. J. Biol. Chem., 82;
14. Squibb, R. L. 1964. *Nutrition and Biochemistry of survival during Newcastle disease virus infection, (11) Relation of clinical symptoms and starvation to nucleic and free amino acids of avian liver*. J. Nutrition 82(4) : 422—431
15. " (111) *Relation of dietary protein to nucleic and free amino acids of avian liver*. J. Nutrition, 82(4) : 427—431
16. Tallen, H. H., S. Moor and W. H. Stein, 1954. J. Biol. Chem., 211—927
17. 稗田憲太郁, 1958. 組織内成分の代謝障害, 病理化學概論 pp. 75—78, 南川堂, 東京.

Comparative Studies on the Free Amino Acids in Hog
Cholera Infected Swine Tissues

Mahn Joong Yong

Seoul Mun. College of Agriculture.

SUMMARY

The free amino acid contents in several tissues of swine were analyzed qualitatively by means of two dimensional paper chromatography. The tissues used were liver, kidney and spleen that were obtained from normal, immunized and hog cholera infected swines. The results obtained are as follows:

1. Liver: 20 amino acids were detected in normal, 17 in immunized and 15 in infected swines.
2. Kidney: 16 amino acids were detected in in normal, 13 in immunized and infected swines.
3. Spleen: 15 amino acids were detected in normal in immunized and 13 in infected swines.
4. Glutamic acid, leucine, serine and threonine were present in high concentration in all of the cases examined.
5. The free amino acids were appeared to be decreased in the infected tissues with hog cholera virus.