

닭의 전염성 기관지염 바이러스에 관한 연구

1. 전염성 기관지염 바이러스의 항체에 대한 분포 조사

진주농과대학

유 태 석

Studies on the Avian Infectious Bronchitis Virus I. Antibody Survey on Avian Infectious Bronchitis Virus

Tai Suck Yoo, D. V. M., ph D.

Chinju Agricultural College

ABSTRACT

From 1962 to 1968, serum samples were collected from fowls of six provinces in Korea. The investigator tested for serum neutralizing antibody against the Beaudette strain of infectious bronchitis virus.

Twenty(40 percent)serum samples out of fifty revealed a neutralization index of more than 30. Neutralizing antibodies of infectious bronchitis virus are widely spread among chickens in Korea. Intensive poultry farming zones, adult chickens have been neutralizing antibody of infectious bronchitis virus.

I 結 論

美國에서 呼吸器系疾病인 傳染性氣管枝炎의 發生이 처음 報告(Shalk. 1931)된 以來 바이러스의 分離 및 同定試驗이 研究되었고(Beaudette, 1937. Nakamura 등, 1954~1955. Sato 등, 1955)抗體의 分布와 轉移에 관하여 밝혔으며(Jungher 등, 1948. Cunningham, 1951 Sato 등, 1957. Kawakubo 등, 1960~1963. Yoshimura 등, 1965)그의 豫防策에 대하여 研究를 試圖한바 있다. (Van Roekel 등 1951)

그러나 우리 나라에서는 本病의 發生, 바이러스의 分離 및 同定試驗, 抗體에 대한 分布調査, 疫學的 臨床學的 病理學的 調査등에 관한 研究報告가 없었다. 다만 家兎血清이 傳染性氣管枝炎바이러스의 鷄胎兒에서의 發育增殖를 抑制하고(Jeon 등, 1962) 이 血清成分의 血清學的 그리고 化學的 및 物理的 性狀에 관하여 밝힌 바 있다(Yoo, 1965).

따라서 이 研究는 첫째, 우리나라에 傳染性氣管枝炎이 現在 發生되고 있는가 또는 過去에 發生된 事實이 있는가를 밝히기 위하여 抗體證明과 抗體의 分布狀態를 全國的으로 數年間 調査하였고 둘째 本病의 病原性 바이러스를 分離하고 同定試驗을 實施하여 他國에 發生되어 있는 傳染性氣管枝炎바이러스와의 病原性을 比較하고 셋째, 疫學的 豫防策에 대한 研究를 追求하여

養鷄經營에 도움을 주려고 한다.

II 材料 및 方法

이 實驗에서 使用된 증류수는 이온 交換樹脂에 通過 시킨것이다. 파이펫등의 硝子器具는 비눗물에 잘 씻고 이것을 重크롬황산수에 12시간 씻고 다시 물로 씻고 증류수로 씻은 후에 건조하여 사용하였는데 멸균해야 할 기구는 乾熱滅菌器에서 160~180°C에 2시간 멸균하여 사용 하였다.

血清中和反應에 使用한 試驗管의 마개는 綿絨을 쓰지 않고 고무마개를 使用하였다. 그 밖의 試驗管은 주로 스크류캡 試驗管을 使用하였다. 이 고무 마개는 비눗물과 증류수로 씻고 乾燥하여 加壓滅菌器에서 15파운드에 約30分 滅菌하여 使用하였다.

血清中和反應에는 鷄胎兒를 使用했고 鷄胎兒用孵化器는 過망간酸포타시엄-포르말린으로 48時間 消毒하였다. 一般消毒劑로서는 3% 크레솔液과 5% 石炭酸液을 使用했으며 鷄胎兒의 卵殼은 70% 알콜로 消毒하였다.

1. 供試바이러스

供試바이러스는 Beaudette株의 傳染性氣管枝炎바이러스(IBV)를 使用하였다. 이 바이러스는 Michigan 大學校 수의과대학에서 분양받았다. 凍結乾燥된 이 種毒을 0.1M, pH 7.2인 磷酸鹽緩衝食鹽水液(PBS)에 溶解

하였다. 이 PBS每ml. 에는 Penicillin 2,000單位와 Steptomycin 2,000mg이 含有되도록 하였다. 바이러스의 力價는 ELD₅₀ 80이상인 것을 使用하였다. 바이러스의 力價를 올리기 위하여 10日後의 鷄胎兒에 5회에 걸쳐 繼續 繼代하고 다음 부터는 6日 間隔으로 2回씩 鷄胎兒에 繼代하여 使用하였다. 繼代된 바이러스의 每材料는 鷄胎兒에 0.1ml씩을 接種하여 感染된 鷄胎兒의 漿液膜腔液이다. 바이러스材料는 -10°C에 保存하면서 使用 했고 한번 녹여서 쓰다 남은 것은 凍結使用하지 않고 버렸다.

2. 磷酸鹽緩衝食鹽水液(PBS)

바이러스 血清 및 抗生物質등의 溶劑로 0.1M, pH 7.2의 磷酸鹽緩衝食鹽水液을 使用하였다. PBS는 15과 온도에 15分間 加壓滅菌하여 2°C의 冷藏庫에 貯藏하면서 使用하였다. (Kabat등 1961)

3. 抗生物質

血清中和試驗에 使用된 바이러스, 血清 및 여러 物質의 實驗材料를 無菌化하기 위하여 Penicillin과 Streptomycin을 使用하였다. 抗生物質은 PBS每ml 2,000 單位와 Streptomycin 2000μg를 溶解하여 고무 마개 試驗管에 分注한 다음 -10°C에 冷凍하면서 使用하였다. 1개월以上 貯藏한 것은 버리고 또한 쓰다 남은 抗生物質溶液은 다시 使用하지 않고 버렸다.

4. 實驗家兔

IBV의 抗血清生成을 目的으로 體重 2~2.5kg인 健康한 雌雄의 成兔를 使用하였다. 家兔는 衛生的인 飼養管理를 하였다.

5. 鷄胎兒

바이러스 增殖과 血清中和反應의 目的으로 10日後의 鷄胎兒를 使用하였다. 鷄胎兒는 發育이 좋고 卵殼의 平滑清潔하고 氣室部의 位置가 正常的인 것을 使用하였다. 바이러스나 바이러스 混合物를 接種하기 위해서 卵殼外面을 70%알콜로 消毒하였다. 바이러스나 바이러스試驗材料混合物를 接種한 후 Methylene blue-Colloidum液으로 閉鎖하였다.

6. 血 清

닭血清이나 家兔血清은 IBV에 대한 血清中和反應에 使用하였다. 血液은 家兔에서는 心臟에서 그리고 닭은 翼下靜脈에서 無菌的으로 採血하였다. 血液은 溶血되지 않도록 하면서 室溫에 約2~3時間, 2°C의 冷藏庫에 約2~3時間 靜置한 후 血清을 分離하였다. 메로는 野外에서 採血할때 血液을 室溫에 約4~5時間 靜置한 후에 血清을 分離하였다. 血清은 그대로 使用하거나 또는 1,000rpm에 10分間 遠心分離하고 細菌汚染의 憂慮가 있을때는 濾過하였다. 血清은 56°C에 30分間 非動化한

다음 -10°C에 貯藏하면서 使用하였다.

7. 血清中和反應

傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 닭血清과 家兔의 抗血清의 中和程度를 알기 위하여 血清中和反應을 하였다 (Cunningham 1951)

바이러스는 十進法으로 PBS에 10⁻¹~10⁻¹⁰까지 稀釋하였다. 바이러스 稀釋할때는 1ml의 파이펫으로 10~15回 混和하였다. 試驗群에는 56°C에 非動化한 正常的인 家兔血清 닭血清 家兔血清을 各試驗管에 0.3ml씩 分注하고 여기에 稀釋된 바이러스를 0.3ml씩 첨가하여 混和하였다. 그리고 바이러스群에는 血清대신에 PBS를 첨가하였다. 이것의 0.6ml을 5개의 鷄胎兒에 0.1ml씩 接種하였다. 接種된 鷄胎兒는 부화기에서 發育시켰다. 接種후 24時間以內에 죽은 것은 非特異死로 간주 하였다. 그후 接種卵을 每日 約6日間 觀察하였고 血清의 ELD₅₀ NI를 決定하였다. (Reed등, 1938)

8. 家兔抗血清

血清의 生成을 위하여 健康하고 營養이 좋은 體重 2.0~2.5kg의 成兔를 選定하였다. 家兔抗血清은 닭抗血清의 中和指數와 補體結合力價를 比較考察하는데 使用하였다.

II 實驗成績

1. 抗體證明과 分布調査

우리 나라의 全域에 걸친 傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 抗體證明과 慶南地域의 抗體分布狀況을 調査하였다. 特히 慶南一帶(晉州, 馬山, 咸安 및 三千浦 등의 養鷄集團助成地區, 密陽, 忠武, 固城, 河東, 山淸)는 1968年 2月부터 4月까지에 呼吸器系疾病이 많이 發生하였다. 原因未詳인 呼吸器系疾病에 걸린 患鷄의 臨床學的 病理學的의 所見이 傳染性氣管枝炎에 類似하였다. 一般臨床症候로는 幼雛 및 1個月令以內에 多發하고 重症을 呈하고 泡沫音, 喘鳴, 咳嗽音, 奇音등을 發聲하고 滲出性粘液吐出, 食慾減退 羽毛光澤貧相등이고 神經症候와 下痢症은 不定狀態였었다. 病理學的의 所見으로는 口腔內氣管 및 氣管枝內에 漿液性滲出物이 中等程度로 分泌되고 呼吸器粘膜의 輕度의 充血과 肥原 그리고 肺炎症候가 있었다. 이와 같은 症狀을 지닌 呼吸器系疾病에 耐過한 多數의 養鷄場에서 耐過後 40日~100日에 5首씩 無菌的으로 採血하여 血清을 混合하고 56°C에 30分間 加熱하여 非動化하였다. 血清은 -10°C에 貯藏하면서 血清中和試驗에 使用하였다.

Table I. Results of Antibody Survey on Chickens in the Field(1962~1963).

Province	Serum No.	Neutralizing Antibody Titers(ELD ₅₀ NI)			Results
		Exp. No.			
		1	2	3	
Seoul	1	0.75	0	0	—
	2	0	0	0	—
	3	0.67	0	0	—
	4	3.67	3.67	4.17	+
Kyongi	5	4.0	3.72	3.67	+
	6	0.67	0	0	—
Kangwon	7	0	0	0	—
Chung Puk	8	0.75	0	0	—
Cholla Puk	9	4.17	4.0	4.0	+
Kyong Nam	10	3.72	4.0	3.67	+

The resulting neutralization titers were judged as follows: 0 to 1.0, negative(-), 1.1 to 1.9, doubtful(±); and 2.0 or more, positive(+)

Table II. Results of Antibody Survey on Avian Infectious Bronchitis Virus. (1966~1967)

Province	Serum No.	Neutralizing Antibody Titers(ELD ₅₀ NI)			Results
		Exp. No.			
		1	2	3	
Seoul	1	3.67	2.67	3.17	+
	2	0	0	0	—
	3	0.67	0	0	—
	4	0.75	0	0	—
Kyongi	5	0.72	0.67	0	—
	6	2.0	3.72	3.67	+
Kagwon	7	0	0	0	—
Chung Puk	8	0.75	0	0	—
Cholla Puk	9	3.17	3.0	2.67	+
Kyong Nam	10	2.72	2.0	3.17	+

Table III Results of Antibody Survey on Avian Infectious Bronchitis Virus. (1968)

Location	Serum No.	Neutralizing Antibody Titers(ELD ₁₅ NI)			Results
		Exp. No.			
		1	2	3	
Chinju	1	3.50	3.68	3.32	+
	2	0	0.68	0.5	—
	3	0	0	0.83	—
	4	3.68	2.5	2.68	+
	5	3.5	3.54	2.68	+
	6	0	0	0	—
	7	3.68	4.38	3.17	+
	8	2.54	2.38	2.68	+

	9	3.17	3.38	3.2	+
Masan	10	0	0	0	--
	11	0	0	0	--
	12	0.5	0	0	--
	13	3.5	2.54	3.54	+
Haman	14	0	0	0	--
	15	3.17	3.68	4.17	+
	16	0	0	0	--
	17	0	0	0	--
	18	3.54	2.38	3.17	+
Samchunpo	19	0	0	0	--
	20	0	0	0	--
	21	3.83	4.17	4.38	+
Milyang	22	3.50	3.68	3.17	+
	23	2.17	2.5	1.68	+
Chungmu	24	0	0	0	--
	25	0	0	0	--
Kosung	26	0.68	0.5	0.38	--
	27	4.17	4.5	3.68	+
Hadong	28	0	0	0	--
	29	0	0	0	--
Sanchung	30	0.5	0	0.68	--

위의 實驗結果에 의하면(Table I. Ⅱ. Ⅲ)全國적으로 一年以上의 닭血清의 IBV抗體保有率은 中和指數(ELD₅₀NI)2.0以上인 것이 約 40% 證明되는데 慶南地域의 試驗群(Table Ⅲ)即 擬似患鷄를 選擇한 4個月未滿에서는 中和指數(ELD₅₀NI)3.0以上인 抗體陽性率이 約50%로 되었다.

Beaudette등(1937), Van Roekel (1942, 1951), Cunningham(1951), Crauly(1951), Kawakubo등(1998, 1960, 1961)은 傳染性氣管枝炎바이러스에 自然感染및 人工感染되어 恢復된 닭血清에서 抗體證明을 報告하였다. Jungherr등(1948)은 卵黃內의 抗體가 孵化될때 幼雛에 轉移되고 3~5週에 消長되다고 報告하였다. Kawakubo등(1962~1963) 卵黃內의 抗體證明으로 本病의 分布狀態를 推察하였고 Yoshimura등(1965)은 鷄腎細胞單層培養法에 依하여 TCID₅₀NI 2.1 사이의 中和 抗體保有率이 57.1%라고 報告하였다.

우리 나라에는 抗體陽性率이 40~50%의 高率로 分布되어 있으며 이들의 抗體力價는 大體로 ELD₅₀NI 2.0~4.0으로써 人工의 免疫鷄血清의 ELD₅₀NI 8.0以上에 (Jeon 1962)比하여 낮다.

Ⅱ 傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 家兔免疫血清 製劑에 관한 試驗

傳染性氣管枝炎바이러스(IBV)에 대한 家兔血清抑制

物質이 그의 生物學的 및 理化學的 性狀을 通하여 正常成分인 Globulin層인 것이 밝혀졌으며 또한 IBV의 家兔抗血清의 生成에 關하여 報告하였다. (Yoo, 1965) 이 實驗은 家兔抗血清의 抗體力價를 높혀서 本疾病의 豫防劑또는 治療劑로 誘導하여 製劑化하기 위해서 하였다.

家兔는 外觀上으로 健全하고 榮養狀態가 좋은 成兔로써 2.0~2.5kg되는 것을 雌雄別로 區分하여 選擇하였다. 實驗中에는 徹底한 衛生的 飼育管理 特別 營養飼料에 留意하였다.

試驗區는 雌雄別로 세 마리를 一群로 하여 12個의 實驗區를 設定하였다. 그리고 傳染性氣管枝炎바이러스에 感染된 鷄胎兒漿尿管腔液을 抗原으로 해서 이것을 家兔耳靜脈內에 每 4日間隔으로 다음과 같이 各試驗區別로 一定量씩 注射하였다.

最終接種 1週日후에 全採血하여 各個體別로 56°C에 30分間 非動化하여 -10°C에 貯藏하면서 血清中和反應에 使用하였다. 中和指數는 Reed法에 의하여 測定하였으며 實驗成績은 表 V과 같다.

表 IV에 의하면 傳染性氣管枝炎바이러스의 家兔抗血清生成은 抗原의 總接種量이 28ml 以上인 第4試驗區에서 微弱하게 生成되고 35ml 以上인 第5試驗區나 第6試驗區에서는 別로 差異없이 最高度의 抗體力價 即

Table IV. Antigen (IBV) inoculation for rabbits

Group No.	frequenc or dosage Inoculum							Total (ml)
	1	2	3	4	5	6	7	
1 (♀)	1	1	1	1	1	1	1	7
2 (♂)	1	1	1	1	1	1	1	7
3 (♀)	2	2	2	2	2	2	2	14
4 (♂)	2	2	2	2	2	2	2	14
5 (♀)	1	1	2	2	3	3	4	16
6 (♂)	1	1	2	2	3	3	4	16
7 (♀)	1	2	3	4	5	6	7	28
8 (♂)	1	2	3	4	5	6	7	28
9 (♀)	2	3	4	5	6	7	8	35
10 (♂)	2	3	4	5	6	7	8	35
11 (♀)	3	4	5	6	7	8	9	42
12 (♂)	3	4	5	6	7	8	9	42

Table V. Comparison of serum neutralization titers

Exp. No.	Group No												Normal Rabbit Serum
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	3.5	3.3	3.0	3.8	3.6	3.8	3.9	4.5	8.3	8.2	8.3	8.2	3.7
2	3.1	3.5	3.3	3.1	3.7	3.6	4.4	5.8	8.0	8.2	8.2	8.3	3.3
3	3.7	3.6	3.5	3.7	3.0	2.9	5.1	5.0	7.8	8.2	8.2	8.2	3.6

中和指數(ELD₅₀NI) 8.0~8.2를 나타내었다. 그리고 雌雄別로의 抗體生成의 差異는 없었다. 對照區는 Yoo (1965)에 의하여 性別 및 年令別로 中和指數에 差異가 없었다는 것이 證明되었다.

傳染性氣枝炎바이러스에 대한 家兔正常血清抑制物質인 Globulin層과 이 家兔抗血清의 抗體와의 複合體 또는 單純性製劑는 IBV의 豫防劑 또는 治療劑로써 適應될 수 있을 것이라는 推察을 誘導하고 있다.

Ⅱ. 鷄血清의 抗體量 證明하기 위한 補體結合反應 鷄의 正常血清과 抗血清 그리고 家兔의 正常血清과 抗血清의 補體結合力價와 血清中和指數를 比較하였다. 이 實驗의 目的은 첫째, 血清中和指數가 높은 鷄血清의 抗體를 證明할수 있고 둘째, 鷄抗血清과 家兔抗血清의 抗體力價를 比較하여 考察하는데 있다.

補體結合反應은 Kabat & Mayer法(1961)에 따라서 實施하였다. 補體는 5首의 기너픽에서 採血하여 모은

血清으로써 本試驗에는 그 充分單位를 썼다. 溶劑로는 Veronal-NaCl緩衝溶液 (Mayer 등, 1948)을 使用했다. 赤血球는 Alsever의 改良液(Bukantz 등, 19'6)에 同量의 緬羊血液을 無菌의으로 採血하여 冷藏庫에 保管하면서 使用했다. 溶血素는 Rapp法(1953)에 의하여 만들었고 感作赤血球는 3回以上 1,000rpm에서 10分間 遠心洗滌한 4%溶液에 同量의 3單位溶血素와 混合해서 最終濃度가 1.5單位, 2%되게 해서 使用했다. 抗原은 바이러스에 感作된 鷄胎兒의 漿尿膜腔液으로 2單位 以上을 本試驗에 使用했다.

抗血清 및 正常血清은 모두 56°C에서 30分間 非動化한 것을 使用했으며 最低稀釋濃度 1/8에서 倍稀釋法으로 1/128까지 稀釋하였다. 反應物質의 量은 各 0.2ml로 해서 總量이 0.8ml되게 하였다. 反應物은 모두 37°C의 恒溫水槽에서 反應케하였는데 第1次反應은 60分間 그리고 第2次反應은 30分間 하였다. 反應의 判定은

100%溶血度로 삼았다. 이 實驗에 使用된 抗血清은 IBV에 感染된 鷄胎兒의 漿液膜腔液을 抗原으로 해서 家兔 耳靜脈에 接種하여 生産한 것이며 56°C에 30分間 非動

化하였다. 이 實驗에 使用한 鷄血清은 本實驗(Table I, III)에서 血清中和反應에 使用한 것이며 家兔抗血清은 Table V에서 얻은 것이다.

Table VI. Comparison of Complement Fixation Titers and Serum Neutralizing Antibody Titers.

Exp. Serum No.	Antiserum				Chicken CF	Chicken ELD ₅₀ NI	Normal Rabbit CF	Serum EID ₅₀ NI
	Chicken CF	Chicken ELD ₅₀ NI	Rabbit CF	Rabbit ELD ₅₀ NI				
1	>64	3.8	>64	8.0	>8	0.3	<8	3.4
2	>64	3.4	>64	8.2	>8	0	<8	3.5
3	>64	4.0	>64	8.2	<8	0.2	<8	3.3
4	>64	3.8	>64	8.2	<8	0.4	<8	3.6
5	>64	3.5	>64	8.2	<8	0	<8	3.5

위의 實驗成績에 의하면 鷄血清中에서 血清中和反應에서 ELD₅₀NI가 3.0以上인 것은 補體結合力價가 높으며 이 反應에 對照群인 正常血清은 補體結合力價 및 中和指數가 없든가 또는 얕다. 家兔에서의 抗血清 및 正常血清의 補體結合力價와 中和指數는 앞에 報告한바와 同一하다(Yoo, 1965)

이와같은 事實은 Table I, II, III의 抗體證明과 抗體分布의 調査에 관한 實驗成績을 뒷받침하여 주고 있다.

IV 考 察

傳染性氣管枝炎바이러스의 抗體證明 및 分布調査에 관한 研究는 많은 先人들에 의하여 報告되었다. Beaudette등(1937), Jungherr등(1948), Van Roekel등(1951), Cunningham등(1951), Crauly등(1951), Nakamura등(1954~1955), Sato등(1955), Kawakubo등(1958, 1960, 1961, 1963), Yoshimura등(1965)이 IBV에 대한 中和抗體에 관하여 報告하였다. Cunningham(1951)은 IBV에 대한 血清中和反應에 관한 研究에서 中和指數(Log₁₀ ELD₅₀ NI)가 $\geq 10^2$ 일때 陽性이라 하였다. Jungherr등(1948)은 卵黃속에 IBV에 대한 中和抗體가 있다는 事實과 이 抗體가 孵化할 때 병아리에 轉移되어서 3~5週후에 消長된다고 밝혔다. 吉村등(1965)의 報告에 의하면 中和指數 2.0以上인 것이 57.1% 였다고 하는데 比較하여 本調査에서는 中和指數 2.0~4.0인 것이 40~50%였었다. Table I (1962~1963)과 Table II (1966~1967)의 1年生 以上の 成鷄의 抗體保有率이나 抗體力價가 Table III에 比較하여 別로 差度가 없다 그러나 Table II와 Table III사이에는 後者에서 높아 있다. 이 血清中和反應에 使用한 血清은 모두 40日生以上인 故로 卵黃으로 轉移되었든 抗體라고는 말할수 없다 따라서 慶南地域一帶를 비롯하여 全國的으로 採集된 血清에 의하여 얻은 抗體는 後天的 自然感染에 의하여恢

復期에 生成된 것이라고 믿을 수도 있다.

傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 鷄血清의 抗體證明을 보다 明確히 하기 위하여 血清中和反應에서 얻은 陽性血清과 陰性血清에 대하여 補體結合反應을 實施한 結果 陽性血清(抗血清)은 陰性血清에 比較해서 補體結合力價와 中和指數가 높으로 陰性血清은 얕은가 또는 거의 없었다. 이 事實은 IBV에 대한 家兔抗血清과 正常家兔血清에서 얻어진 補體結合力價와 中和指數와 類似하였다 따라서 韓國全域에 抗體가 分布되어 있다는 事實을 證明할수 있다.

이와 같은 實情에 鑑하여 火急히 IBV에 관한 研究 特別히 바이러스의 分離試驗과 疫學的施策의 併行이 重要하다.

V 結 論

傳染性氣管枝炎바이러스에 대한 몇 가지 實驗을 통하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 韓國에 IBV에 대한 鷄抗體保有率이 約 40~50%이다.
2. IBV에 대한 家兔抗血清의 生成은 抗原 32~35ml 이상을 必要로 하며 雌雄의 性別差異는 거의 없었다.

VI 參考文獻

1. Beaudette, F. R., and Stuart, H. O. : Cultivation of the Virus of Infectious Bronchitis: Am. J. Vet. Med. Assoc., 90, 51-60, 1937.
2. Beaudette, F. R. : Twenty years of Progress in Immunization against Virus disease of Birds Am. J. Vet. Med. Assoc., 115, 367-369, 1949.
3. Bukantz, S. C., Rein, C. R., and Kent, J. F.:

- : Studies in Complement Fixation. II Preservation of sheep blood in Citrate Dextrose Mixtures (Modified Alserver's Solution) for use in the Complement Fixation Reaction. *J. Lab Clin. Med.*, 31, 394-399, 1946.
4. Cunningham, C. H. : Newcastle disease and Infectious Bronchitis Neutralizing Antibody Index of Normal Chicken Serum. *Am. J. Vet. Res.* 12, 129-133, 1951.
 5. Cunningham, C. H. : A Laboratory Guide in Virology. Burgess Publishing Co., 1956.
 6. Jungherr, E. L. and Terhell, N. : Naturally Acquired Immunity to Infectious Bronchitis in Chickens. *Am. J. Vet. Res.*, 9, 201-205, 1948,
 7. Jeon, Y. S. : Modified Complement Fixation Test of Avian Infectious Bronchitis Virus. A Thesis Submitted to the Faculty of the Graduate School of the University of Minnesota, 1962.
 8. Kawakubo, A., Kuba, N. and Nakamura, J. : Studies on Infectious Bronchitis of Chickens. I. Isolation of Virus and Characters of Isolated Virus. *NIBS Bull. Biol. Res.*, 3, 3-42, 1958.
 9. Kawakubo, A., Miyamoto, T., Nagashima H. and Nakamura, J. : Studies on Infectious Bronchitis of Chickens. II, Identification of Isolated Virus. *NIBS Bull. Res.*, 5, 17-24, 1960.
 10. Kawakubo, A., Miyamoto, T. and Nakamura J. : Studies on Infectious Bronchitis of Chickens. III. Experiments with Artificially Infected Chickens. *NIBS Bull. Biol. Res.*, 6, 1-12, 1961.
 11. Kawakubo, A. and Takamatsu, Y. : Studies on Infectious Bronchitis of Chickens. IV. Investigation of Neutralizing Antibody and Distribution of this Disease in Japan as Clarified by Neutralizing Antibody Survey. *NIBS Bull. Biol. Res.*, 7, 19-29. 1962-1963
 12. Kawashima, H., Sato, S., Hanaki, T., Yoshida, T. and Harada, K. : On Newcastle Disease and other resembling Disease of Chickens which occurred in 1951 at Iruma County, Saitama Prefecture, Japan. *Jap. J. Vet. Sci.*, 13, 321-322, 1951.
 13. Mayer, M. M. : *Kabat and Mayer's Experimental Immunochemistry*. C. C. Thomas Publisher, Springfield, III, 162-163, 1961.
 14. Nakamura, J., Kuba, N. and Kawakubo, J. : A Virus Isolated from Infectious Bronchitis-like Disease of Chickens. *Jap. J. Vet. Sci.*, 15, 80-81, 1954.
 15. Nakamura, J., Kuba, N. and Kawakubo, J. : Pres. at the 39th Meeting of the Japanese Society of Veterinary Science. April, 1955.
 16. Rapp, J. J. : Purification and Immunochemical Characterization of the Heat-stable, Alcohol-soluble Hemolytic Antibody inhibitor of the sheep Erythrocyte. Thesis submitted to the School of Hygiene and Public Health, The Johns Hopkins University, 1953.
 17. Reed, L. J. and Muench, H. : A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.*, 27, 493-497, 1938.
 18. Sato, T., Sugimori, T., Ishii, S. and Matsumoto, M. : Infectious Bronchitis of Chickens in Japan. I. Epizootiological, Clinical and Pathological Studies and Isolation of the Causative Virus in Embryonated Eggs. *Bulletin of the National Institute of Animal Health*, 31, 151-167, 1957.
 19. Sato, T., Sugimori, T., Ishii, S. and Matsumoto, M. : Infectious Bronchitis of Chickens in Japan. II. Identification of the Causative Virus as the Virus of Infectious Bronchitis of Chickens. *Bulletin of the National Institute of Animal Health*, 32, 169-1957.
 20. Schalk, A. F. and Hawn, M. C. : An apparently New Respiratory Disease of Baby Chickens. *Am. J. Vet. Med. Assn.*, 78, 413-422, 1931.
 21. Van Rekel, H., Clarke, M. K., Bullis, K. L., Olesiuk, O. M. and Sperling, F. G. : Infectious Bronchitis. *Am. J. Vet. Res.*, 12, 140-146, 1951.
 22. Yoshida, T., Oda, Y. and Domo, Y. : Survey of Infectious Bronchitis-Neutralizing Antibody of Chicken in Japan (Osaka). *Jap. J. Vet. Assc.*, 18, 445-447. 1965.
 23. Yoo, T. S. : Studies on Rabbit Serum Inhibitor of Avian Infectious Bronchitis Virus. *Koreana J. Vet. Res.* 5, 43-57, 1965.