

Toxoplasmosis 에 관한 研究

第 2 報 . 補體結合阻止反應에 의한 豚 Toxoplasmosis의 分布調查.

家畜衛生研究所

文 載 鳳

=Author's abstract=

Studies on Toxoplasmosis.

II. Serological Survey of Toxoplasmosis on Swine by Complement Fixation Inhibition Test.

Jae Bong Mun, D.V.M.

Veterinary Research Laboratory

Anyang, Korea

In 1957, a Toxoplasma infection among swine was first discovered in Korea. Thereafter, Complement Fixation Inhibition Test was applied to 2,017 swine serum samples which were obtained from all over the country except Cheju Island. Significant results are those summarized below.

1. 272 out of 2,017 samples(13.4%) were positive, in which the criterion for positive was based on the serum titer of 1.8 or more. (Table 5)

2. Incidences in the normal swine population by localities were that 39 out of 200 samples(19.5%) from Chunnam Province, 34 out of 205(16.5%) from Kangwon and 98 out of 700(13.1%) from Kyungnam showed positive titers, respectively, and not much differences were found in samples from the localities of Chungnam, Chungbuk, Kyunggi and Kyungbuk, where the rates ranged around 12.0% and for the last 14 out of 201(6.0%), the least, were found in case of Chunbuk.

3. Distribution of the incidence of Toxoplasmosis by age and sex in 1,117 swine serum samples from 6 provinces (except Kyungnam and Koyng-buk) revealed no significant difference by sex but showed marked difference by age that 14 out of 156 samples(8.9%) at the age of 7 months or less were positive 84 out of 694 samples(12.1%) at the age from 8 months to 1 year were positive, 29 out of 203 samples obtained from 1 year to 2 years old were positive and 23 out of 64 samples from 2 years or more old were positive.

Correlation of positive incidence between ages and serum titers were paralleled and the highest incidence was observed among serum samples from swines of 2 years or more showing the infection rate being 4 times greater than that of 7 months or less.

本論文의 要旨는 1962年第14回 微生物學會 및 第6回 獸醫學會에서 發表하였음

I. 緒 言

1908年 처음으로 Nicolle, Manceaux²等에 依해서 Ctenodactylus gondii(齧齒類의 一種)로부터 Toxoplasma gondii(以下 Tp)를 分離한 以來

Tp의 感染은 大部分의 哺乳類와 鳥類에서 發見되고 또한 1914年 Castellani에 依해서 사람으로부터 Tp를 檢出한後 人獸共通傳染病으로서 世人的 注目을 받게되어 사람과 動物에 對한 Tp의

많은 연구가發表되었다. 著者③④는 1957年夏節에 原因不明의 患豚으로부터 Tp를 分離하였다. 우리나라에서는 사람은 勿論이고 動物로부터 Tp의 分離는 없는 것으로(1957年以前) 알고 있음으로 著者의 發見이 처음이 아닌가 생각한다. Tp는 사람을 爲始해서 많은 宿主를 갖인 病原原虫中에서도 特異한 存在에 있으며 犬, 猫, 豚, 牛等의 家畜 및 家禽의 Toxoplasmosis(以下 T病)가 明白하게 됨에 따라 乳肉食을 爲主로하는 나라에서는 公衆衛生上의 見地에서 重要視되는 疾病의 하나로서 注意를 喚起시키고 있다. 또한 畜産發展 特히 養豚事業에 있어서도 T病에 因한 妊豚의 流死産과 生産된 仔豚의 發育障害等으로 經濟的인 損失이 적지 않다. 이미 外國에서는 이러한 問題를 檢討하고져 사람④⑤⑥⑦⑧으로부터 分離된 Tp와 家畜⑨⑩⑪⑫⑬으로부터 檢出된 Tp가 報告되어 있으며 그中에는 豚에 關한 發生報告⑩⑪⑬⑭도 있다. 또한 사람과 家畜⑦⑬⑭⑮⑯⑰⑱⑲⑳㉑㉒㉓㉔㉕에 對한 T病의 抗體調査에 對해서도 많은 研究者에 依해서 報告되고 있다. 韓國에 있어서는 Soh⑳에 依해서 skin test를 應用한 T病 抗體調査가 있을뿐 家畜에 對한 抗體調査 實態는 全無하다. 著者는 家畜中에서도 가장 數가 많으며 肉食 供給量에 있어서도 多量이 所要되며 또한 生活環境이 사람과 關係가 깊은 豚에 對한 T病의 樣相을 把握하고져 血清反應을 利用하여 抗體調査를 實施하였다. T病의 血清反應은 여러가지 方法이 考案되어 있다. 이미 알려지고 있는 dye test㉗(色素試驗)는 家畜血清에 應用은 可能하나 非能率的이며 또한 Tp를 常時 保有하고 있어야되며 accessory factor로서 特定한 사람의 血清이 必要하므로 그 應用範圍가 限定되고 있다. 그리고 1942年 Sabin㉘이 發表한 中和試驗은 Tp의 mouse 腦 乳劑와 可檢血清을 混合해서 家兔 皮內에 注入하여 4~7日 後에 皮膚의 發赤 有無에 따라 抗體有無를 判定하는 方法이다. 그러나 反應이 不明確함으로 應用이 적다. Toxoplasmin 皮內反應은 1949年 Frenkel㉙에 依해서 考案된 方法으로서 原理는 tubercullin反應과 같다. Tp를 凍結融解 또는 超音波로서 虫體를 破壞시켜 抗原을 調製하여 0.1ml을 皮內에 接種하여 48時間後

의 發赤 腫脹이 10mm以上일 경우를 陽性으로 한다. 이 方法은 主로 사람에 應用되고 있으며 特異性에 對해서는 研究者에 依해서 區區하며 特히 家畜에 對한 Toxoplasmin은 各種動物에 對한 至適濃度와 反應의 陽性 限界等이 아직 詳細히 檢討되어 있지 않음으로 實用段階에 까지 가지 못하고 있다. 血球凝集反應은 1957年 Jacobs㉚에 依해서 研究된 方法이다. 本方法은 mouse腹水內虫體를 蒸溜水에 抽出한 抗原과 tannic acid處理 羊血球를 使用하여 血球凝集反應을 實施한다. 本法은 血球處理 操作이 複雜하나 다른反應에 代身해서 方法이 容易함으로 널리 應用될 可能性이 있다. 그러나 現在로서는 아직 많은 追試가 必要하며 實用은 거이 되지않고 있다. 1942年 Sabin, ㉛ Warren㉜과 1948年 Warren, Russ㉝等에 依해서 發表된 T病의 補體結合反應(以下 C.F. test)은 사람의 T病診斷에는 널리 利用되고 있으나 豚 牛等의 血清에 對한 應用與否는 最近에 와서 研究가 進展되고 있다.

Rice㉞와 大森㉟椿原㊱守本㊲等에 依해서 日本腦炎, influenza, fowl pox, fowl pest 그리고 newcastle disease virus에 感染된 닭血清과 Karrel㊳과 Hillman㊴ 그리고 大森㉟의 psittacosis-lymphogranuloma의 牛血清에 對한 血清反應에서 닭血清과 牛血清은 56°C 30分加溫 非動化에서는 抗補體作用이 있고 56°C 以上の 加溫에서는 補體結合能이 低下됨으로 C.F. test에서는 特異反應이 잘 일어나지 않으므로 補體結合 阻止反應(Complement Fixation Inhibition Test, 以下 C.F.I. test)의 應用이 可能하다는 報告가 있다. 한편 石井㊵藤田㊶等에 依하면 豚血清에 있어서도 加溫處理하면 C.F.I. test의 可能함을 發表하고 있다. 著者는 豚血清을 45°C~75°C에 加溫處理하여 C.F.I. test의 可能與否를 檢討하여 本바 60°C 20分 加溫處理에서 가장 特異性이 높은 結果를 보았다. 따라서 本法을 應用하여 T病의 實態를 把握하고 本病 豫防에 寄與할 目的으로 全國 各地로부터 採集한 豚血清 2,017例에 對해서 抗體調査를 實施한 그 成績을 報告한다.

II. 實驗材料 및 方法

1) **Tp**: 1958년에 日本家畜衛生試驗場으로부터 分讓받은 RH株(Tp의 標準株)와 1957年著者③④가 豚으로부터 分離한 株를 使用하였다. 分離한 株는 RH株와 同一하게 病原性이 強한 株로서 mouse에 對한 最少致死量(以下 M. L. D)은 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 이었고 抗原性에 있어서도 相互 交叉가 成立되었다(第I報參照)本試驗에는 主로 RH株를 供試하였다.

a) **Tp의 mouse에 對한 繼代**: 感染된 mouse의 腹腔內에 生理的食鹽水를 2ml 注入하여(腸을 傷하지 않게 하기 위하여 注射針의 끝을 둥글게 만든다) 腹腔內에 遊離하고있는 Tp를 注射器로서 뽑아올려 0.2ml를 15~20gm되는 健康한 mouse의 腹腔內에 接種한다. 接種한 mouse는 5~7日 後에는 發病致死하게 됨으로 致死直前에 虫體를 採取하여 야하며 斃死後는 雜菌의 混入으로 因하여 繼代가 不可能하게 되는 경우가 있다. Tp는 動物體 外에서는 長期間 生存이 不安全함으로 當日 或은 4°C에 保存하였다가 7日 以內에 次代에 繼代하였다.

b) **Tp의 發育鷄卵에 對한 繼代**: 37°C에서 10日間 孵化한 白色 레구홍鷄 發育卵의 脈絡漿尿膜上에 生理的食鹽水로 稀釋된 Tp液을 0.1~0.2ml 滴下하여 다시 37°C에서 5~6日間 培養한다 Tp는 脈絡漿尿膜의 血管의 分布에 따라 增殖하게 되며 灰白色結節이 多數 密發한다 繼代는 虫體의 長期 保存이 不可能함으로 當日 或은 4°C에서 保存하였다가 같은 方法으로 7日 以內에 繼代하였다.

2) **Mouse**: 家畜衛生研究所 飼育場에서 飼育된 15~20gm 程度의 健康한 mouse를 使用하였다.

3) **發育鷄卵**: 53gm 以上되는 白色 레구홍種의 有精卵을 使用하였다.

4) **Guinea-pig**: 家畜衛生研究所 飼育場에서 飼育된 350~450gm程度의 健康한 guinea-pig를 使用하였다.

5) **豚血清**: 免疫血清은 感染試驗③에서 供試된 豚으로부터 採取한 血清이며 可檢血清은 各道家畜保健所 職員이 屠獸場에서 屠殺되는 豚으로부터 採取한 血清이다. 이 血清들은 試驗에 使用될 때 까지 -20°C에 保存하였다가 使用直前에 60°C

20分間 非動化한 後 供試하였다.

6) **仔豚**: 生後 50~60日 以內의 仔豚의 腎臟을 組織培養에 使用하였고 使用前에 Tp에 對한 抗體有無를 檢査하여 抗體가 없는것을 供試하였다.

7) **補體**: 補體用 guinea-pig는 300gm 以上 妊娠하지 않은 健康한것을 選別해서 心臟으로부터 1頭當 5.0ml 가량 採血하여 室溫에 30分間 두었다가 다시 冷藏庫에 靜置한後 2,000 r.p.m. 10分間 遠心하여 血清을 分離하였다. 1回採血한 guinea-pig는 3週以上 休息시킨 後에 다시 採血하였고 血清은 當日 或은 -20°C에 凍結하였다가 使用하였다. 補體의 單位測定은 美國 陸軍 軍醫學校法⑩에 準하였으며 本試驗에는 그 2單位 0.2ml를 使用하였다.

8) **溶血素**: 2kg以上되는 健康한 家兔를 2~3頭 選別하여 赤血球浮遊液과 同一한 方法으로 洗滌한 赤血球를 生理的食鹽水에 33%로 稀釋해서 5日間隔으로 1.0ml부터 始作하여 4.0ml까지 5回 耳靜脈에 注射하여 最終注射後 7日째에 一部 採血을 하여 溶血價를 測定해서 3,000倍以上에서 2%緬羊赤血球를 完全히 溶血시키는 家兔만 全採血해서 血清을 分離하여 即時로 56°C 30分間 非動化하고 1.0ml씩 액체에 注入하여 密封해서 -20°C에 保存하였다가 使用했다. 溶血價의 測定은 美國陸軍軍醫學校 方法에 準하였으며 本試驗에는 2單位를 使用했다.

9) **赤血球浮遊液**: 緬羊血液을 無菌의으로 採血하여 Alsever 液에 同量으로 混合해서 使用했으며 殘分은 고무栓을 하고 다시 封臘하여 2°C 冷藏庫에 保存하였다가 1週日 以內에 使用하였다. 血球의 洗滌은 血液을 消毒가—제 또는 60~80 넷슈 金網에 濾過하여 食鹽水로 2,000r.p.m. 10分間 3回以上 遠心洗滌하여 上清이 生理的 食鹽水 原色이 되도록 깨끗이 씻어진 赤血球를 2%가 되게 生理的食鹽水로 稀釋하여 使用하였다.

10) **感作血球浮遊液**: 2單位로 稀釋한 溶血素와 2% 緬羊血球浮遊液을 等量 迅速히 混合해서 室溫에서 30分間 感作시킨것을 0.2ml를 使用하였다.

11) 抗原

a) **Mouse 腹腔液抗原의 製法**: 繼代와 同一한

方法으로 感染시킨 mouse 腹腔內에 生理的食鹽水を 加해서 注射器로 虫體를 採取하여 1,600 r.p.m. 10分間 遠心하여 沈澱된 虫體를 dry ice와 37°C water bath 內에서 凍結과 融解를 5~6回 反覆한 다음 1,600r.p.m. 20分間 遠心後 -20°C에 保存하였다가 使用時에 12,000r.p.m. 60分間 遠心後 그 上清液을 56°C 30分 加溫하여 所定의 方法에 依據해서 指示血清과 抗原의 力價를 測定하여 本試驗에 使用하였다. Tp抗原은 長期保存이 不可能하므로 粗材料(12,000r.p.m.에서 遠心하기 前의 抗原)은 -20°C에서 保存하여 2週以內에 使用하고 12,000r.p.m.에서 遠心分離한 抗原은 當日 使用한다. 1回分의 製造에 必要한 mouse 數는 25~50首가 適當하다(表1參照).

b) 發育鷄卵抗原의 製法: 發育鷄卵漿尿膜上의 Tp의 增殖은 初代에서는 不良하고 4~5代 繼續 接種함으로써 增殖이 良好하게 된다. 繼代에서와 同一한 方法으로 接種하여 漿尿膜上에 가장 Tp가 많이 增殖한 部分만을 選別하여 切取해서 生理的食鹽水로 簡單히 洗滌한後 無菌的으로 採取한 尿腔液을 加해서(萬一 尿腔液이 不足할 경우에는 生理的食鹽水를 補充한다) 10%乳劑를 만들어서 dry ice와 water bath 內에서 凍結과 融解를 5~6回 反覆하고 1,600r.p.m. 20分間 遠心하여 上清液을 -20°C에 凍結保存한後 使用時에는 12,000r.p.m. 60分間 遠心하여 그 上清液을 56°C 30分 加溫한後 指示血清과 抗原의 力價를 測定하여 本試驗에 使用한다. 正常抗原도 同一한 方法으로 同時에 製造하였다(表1參照).

c) 組織培養에 依한 抗原의 製造: 馬, 文^④이 發表한 組織培養에 依한 Tp의 增殖에서와 同一한 方法으로 生後 50~60日된 仔豚의 腎皮質을 trypsin solution에 處理하여 處理된 細胞를 culture medium(Hank's balanced salts solution에 lactoalbumin hydrolysate solution 0.5%, bovine serum 10~20%, penicillin 100 u./ml, streptomycin 0.1mg/ml.)에 200~300倍의 細胞浮遊液을 만들어 test tube에 注加하여 37°C에서 5~6日 斜面靜置培養을 하여 cell sheet가 形成되면 Tp를 接種하고 37°C에서 培養하였다. Tp가 가장 增殖이 많은 5~6日에 medium를 버리고 試

驗管壁에 붙어있는 細胞를 脫落시켜서 3,000r.p.m. 10分間 遠心하여 沈澱된 細胞를 dry ice와 37°C water bath 內에서 凍結과 融解를 2~3回 反覆한 다음 12,000r.p.m. 30分間 遠心하여 그 上清液을 指示血清과 力價를 測定하여 本試驗에 使用하였다(表1參照).

12) 指示血清(guinea-pig 免疫血清): Mouse繼代와 同一한 手技로서 guinea-pig의 腹腔內를 3代 가령 繼代通過시키면 Tp의 增殖이 旺盛하게 된다. 이 무렵에 採取한 Tp를 生理的食鹽水로 1,600r.p.m.에서 遠心洗滌하여 沈澱虫體를 그대로 0.5ml guinea-pig의 腹腔內에 注射한다. 이러한 方法으로 7~10日 間隔을 두고 1回 0.5ml, 2回 0.5ml, 3回 1.0ml, 4回 1.0ml, 5回 2.0ml, 6回 2.0ml씩 腹腔內에 接種하였다. 免疫途中에 動物이 Tp에 感染하여 發病해서 斃死하는 경우가 있음으로 sulfamethazine과 daraprim을 混合 投藥하여 發病을 억제시키면서 免疫을 持續시켰다. 免疫이 끝나면 動物 個體別로 一部를 採血해서 使用量을 測定하여 1:200 以上에서 抗原과 特異的으로 結合하는 動物만을 採血해서 血清을 分離하여 -20°C에 保存하였다가 使用直前에 56°C 30分間 非動化한後 다시 力價를 測定하여 本試驗에 使用하였다(表1參照).

13) 指示血清과 各抗原의 使用量測定: 方法은 Ko-Immer法을 改良한 美陸軍軍醫學校法^④에 準하여 抗原과 血清을 同時에 稀釋하는 box-titration을 實施하여 抗原과 血清의 力價를 同時에 測定하였다. 術式은 普通 C.F. test와 同一한 方法으로 하되 本試驗(C.F.I test, 表3參照)과 같이 反應因子量을 變動시키고 感作方法에 있어서도 第一次感作은 37°C 溫浴中에서 1時間 作用시키고 第二次感作은 4°C 冷藏室에서 一夜感作하고 第3次感作은 37°C에서 30分 感作하여 判讀하였다 對照로서 正常抗原에 對한 非特異反應 指示血清에 對한 特異反應 陽性抗原에 對한 抗補體作用等을 보았다.

表1에서 보는 바와같이 發育卵抗原과 組織培養 抗原은 1:12에서 指示血清 1:200과 結合하였고 mouse抗原은 1:6에서 指示血清 1:200과

Table 1. Box-Titration of Indicating Serum & Antigen.

Antigens	Indicating Serum Dilution								Antigen Controls	
									Complement	
	×50	×100	×150	×200	×300	×400	×600	×800	1 unit	2 units
M. A. A. T. C. A. C. A. M. A. (1 : 2)	4	4	4	4	4	1	0	0	0	0
M. A. A. T. C. A. C. A. M. A. (1 : 3)	4	4	4	4	2	0	0	0	0	0
M. A. A. T. C. A. C. A. M. A. (1 : 4)	4	4	4	4	1	0	0	0	0	0
M. A. A. T. C. A. C. A. M. A. (1 : 6)	4	4	4	4	1	0	0	0	0	0
M. A. A. T. C. A. C. A. M. A. (1 : 8)	4	4	2	1	0	0	0	0	0	0
M. A. A. T. C. A. C. A. M. A. (1 : 12)	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M. A. A. T. C. A. C. A. M. A. (1 : 16)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N. A. T. C. A. C. A. M. A. (1 : 2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Indicating Serum Controls	1 unit	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2 units	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Note : M. A. A., mouse ascites antigen.
 T. C. A., tissue culture antigen.
 C. A. M. A., chorioallantoic membrane antigen.
 N. A., normal antigen.

Fixation is indicated by the following figures:
 0, complete hemolysis.
 1, 75% hemolysis.
 2, 50% Partial hemolysis.
 3, 25% "
 4, no hemolysis.

結合하였다. 本試驗에는 力價가 높으며 製造過程이 簡便한 發育卵抗原 1 : 6(2單位)의 0.1ml와 指示血清 1 : 100(2單位) 0.1ml을 各各 使用하였다.

14) 豚血清의 溫度處理와 時間에對한 C. F. test와 C. F. I. test와의 特異性比較 : Rice³³, 大森³⁴等은 鷄血清과 牛血清은 56°C 30分 加溫處理에서 抗補體作用이 있고 60°C 30分 加溫에서는 補體結合能이 消失 或은 低下됨으로 C. F. test로서는 特異反應이 出現되지 않는다고 하고있다. 豚血清에 있어서도 56°C 以下에서 30分 加溫하면 溶血素

의 存在로서 溶血이 일어나며 60°C 30分 加溫에서는 역시 牛, 鷄血清과 同一하게 補體結合能이 消失 或은 低下되는 傾向이있다. 따라서 이러한 關係를 究明하기 위하여 Tp 感染試驗에서 高度로 感染發病하여 耐過한 人工感染豚의 免疫血清(dye test에 使用한 血清 表4參照)을 45°C 30分, 50°C 30分, 56°C 30分, 60°C 20分, 60°C 30分, 65°C 30分, 70°C 30分, 그리고 75°C 30分으로 各各 加溫處理하여 C. F. test와 C. F. I. test(表3參照)를 實施하여 特異性을 比較檢討하였다.

Table 2. A Comparison of the Complement Fixation Test and the Complement Fixation Inhibition Test on the Immunized Swine Serum Inactivated by Heat.

Temperature & Time	Test method Antigen I.S.S.No.	C.F. test								C.F.I. test								
		P. A.				N.A. S.C. N.C.				P. A.				N.A.	S.C.	N.C.		
		× 2	× 4	× 8	× 16	× 2	× 2	× 2	× 2	× 2	× 4	× 8	× 16	× 32	× 64	× 2	× 2	× 2
45°C 30'	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	2	3	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	±	±	3	4	3	0	0	1
50°C 30'	1	0	0	0	0	0	0	0	±	0	0	4	4	3	4	0	0	±
	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	±	3	4	0	0	3
56°C 30'	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	3	3	3	0	0	4
	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	2	3	2	0	0	4
60°C 20'	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	3	4	0	0	4
	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	1	2	0	0	4
60°C 30'	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	4	0	0	4
	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	1	2	0	0	4
65°C 30'	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	2	3	4	0	0	4
	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	1	2	0	0	4
70°C 30'	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	1	2	4	4	0	0	4
	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	1	4	4	0	0	4
75°C 30'	1	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	0	0	4
	2	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	0	0	4

Note: C.F. test, complement fixation test.
 C.F.I. test, complement fixation inhibition test.
 P.A., toxoplasma antigen cultured on chorioallantoic membrane of chicken embryo.
 N.A., normal antigen (not cultured).
 S.C., serum control.
 N.C., none complement.
 I.S.S.No., immunized swine serum number.

表2에서 보는바와 같이 豚血清은 45°C, 50°C 30分 加温에서 補體의 加擔없이도 溶血이 일어났으며 또한 C.F. test에서는 全體가 特異성이 없는 反應이었다. 그러나 C.F.I. test는 56°C 30分 加温處理한 血清부터 特異反應의 出現을 보여 주었다. 特異性的 安定度는 60°C 20分 또는 30分이 가장 높았으며 高温에 따라 低下되어 75°C

30分에서는 完全히 消失되었다. 또한 正常抗原 (以下 N.A.) 血清對照(以下 S.C.)에 對한 檢討에 있어서도 全히 非特異反應이 없었다. 이러한 事實은 豚血清을 56°C~70°C의 加温處理에서 Tp의 C.F.I. test가 成立된다는 것을 認定할수 있으므로 血清을 가장 特異성이 높은 60°C 20分 加温處理하여 本試驗에 使用하였다.

Table 3. Proper Test of Complement Fixation Inhibition Test of the Toxoplasma.

Tube No.	Swine Serum						Controls								
	1	2	3	4	5	6	N. A.		Serum		Antigen			Indicating Serum	
Dilution	×2	×4	×8	×16	×32	×64	×2	×4	×2	×4	×6	×12	×16	×100	×200
Serum(ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	—	—	—
Antigen(2units)(ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Normal Antigen(ml)	—	—	—	—	—	—	0.1	0.1	—	—	—	—	—	—	—
Saline(ml)	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
1 hour at 37°C. water bath															
Indicating Serum(2units, 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	0.1	0.1
Complement(2units, 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
overnight at 4°C.															
Sensitized Sheep RBC(2%, ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	20.2	0.2	0.2	0.2	0.2
30 minutes at 37°C. water bath															

Note: Fixation inhibition is indicated by the following figures:

- 0, complete hemolysis.
- 1, 75% hemolysis.
- 2, 50% partial hemolysis.
- 3, 25% partial hemolysis.
- 4, no hemolysis.

Interpretation: 1. suspect=1:4
 2. positive=1:8 or more.
 3. limit of positive=75% hemolysis or more.

15) C. F. I. test의 實施方法

實施方法是 術式 表3과 같이 60°C 20分間加溫處理한 可檢豚血清(表 2參照)을 倍數稀釋하여 0.1ml씩 分注하고 指示血清과 抗原의 力價測定(表 1參照)에서 使用量이 決定된 抗原 0.1ml을 加해서 混合하여 37°C water bath에서 1時間 第一次 感作을 한後 역시 使用量이 決定된 指示血清(表 1參照) 0.1ml와 補體 2單位 0.2ml을 加해서 4°C 冷藏室에서 18~20時間 第二次 感作을 行한 다음 室溫에서 約 30分間 두었다가 2% 細羊感作血球液 0.2ml을 注加해서 37°C water bath에서 30分 感作하고 判讀하였다. (夏節에는

冷水에서 冷却狀態下에서 判讀한다). 성적은 dye test (表 4)에서와 같이 各各 特異的인 反應이 出現하였다. 本反應의 反應發現機序는 加溫에 依해서 反應性이 消失하게 되는 血清에 있어서도 一部 抗體로서의 性質을 保有하고 있으며 抗原과 反應하게 된다. 그러나 이 結合物은 補體는 吸着치 않는다. (普通의 C. F. test에 있어서는 抗原, 抗體의 結合物은 다시 補體를 吸着시켜 反應은 陽性이 된다). 이 경우에 抗原은 本來의 性質이 없어지고 耐熱性인 다른 動物의 血清과는 反應이 成立되지 않는다. C. F. I. test는 이 特性을 應用하여 易熱性의 血清의 抗體價를 測定하는

데 있다. 卽 本反應은 第1次 反應에서 免疫血清(可檢血清)의 抗體와 抗原이 反應하면(陽性) 第2次 反應에 있어서 耐熱性抗體와 抗原의 作用이 이러나지 않는다. 따라서 補體의 轉向이 없고 그結果 第3次 溶血反應에서 溶血系는 溶血이 이러 나게 되며 普通의 C.F. test와는 反對로 陽性일 경우에 溶血하게 된다.

16) Dye Test(色素試驗)

Sabin, Feldman⁽²⁷⁾의 方法에 準하였다. 이反應은 Tp에서만이 볼수있는 獨特한 血清反應이다. 反應의 骨子는 Tp는 알카리性 methylene blue에 잘 染色이 된다. 그러나 accessory factor (Tp의 抗體가 없는 正常人血清) 存在下에 抗體의 作用을 받는 Tp는 染色이 잘 않되는 事實을 利用한 것이다.

抗原: 感染 mouse 3~4日째의 腹腔에서 이虫體를 採取하여 生理的食鹽水를 加해서 遠心操作을 2回 反覆해서 洗滌한 後 虫體數를 規正하고 抗原液을 만든다. 虫體數는 浮遊液 1滴을 슬라이드 그라스 上에 滴下하고 카바 그라스를 덮어서 400배에서 鏡檢하여 한 視野의 虫體가 30~40 程度가 되도록 調整하였다.

이 虫體 浮遊液 1에 accessory factor 4를 加한것이 抗原이며 이 accessory factor는 有效成分이 易熱性임으로 隨時 特定한 사람으로 부터 採血하여 使用하였다. 染色에 使用되는 色素와 buffer-solution은 다음과 같이 調製하여 使用

하되 每回마다 새로 調製하여 使用하였다.

Alkaline soda borax buffer solution의 製法:

0.53% Na₂CO₃.....9.73ml } 混合液
1.91% Na₂B₄O₇·10H₂O...0.27ml } (PH 11)

3ml의 methylene blue alcohol 飽和液에 10ml의 alkaline-soda-borax buffer solution을 加한다.

實施: 可檢血清을 56°C 30分間 加溫非動化하여 4倍 稀釋으로 階段稀釋을 하여 0.1ml씩 7個의 試驗管에 分注한다. 그리고 抗原(虫體浮遊液+ accessory factor)을 0.1ml씩 注入하여 37°C에서 1時間 溫浴後 冷水에 冷却하고 바로 染色液~2滴을 試驗管內에 滴下해서 잘混合한 後 5~10分이 지나서 鏡檢하여 任意로 視野의 虫體 100個를 헤아려서 50% 以上 虫體가 不染性狀態로 있는 것을 陽性으로 하며 可檢血清의 抗體價는 血清의 最高 稀釋倍數로 定하였다. 그리고 血清稀釋 倍數 1:64 以上을 陽性으로 한다.

上記한 方法으로 dye test와 C.F.I. test의 特異性을 比較檢討하여 本試驗에 보다 正確을 期하고자 血清의 由來가 確實한 Tp를 接種한 人工感染試驗에서 重症으로 耐過한 豚의 血清과 指示血清用으로 免疫한 guinea-pig의 血清과 Tp의 人工感染試驗에 供試된 山羊의 血清을 使用하고 한편 Tp의 可檢豚血清을 供試해서 豚血清은 dye test와 C.F.I. test를 guinea-pig와 山羊血清은 dye test와 C.F. test를 實施하여 本表 表 4에서 보

Table 4. Titers of the Dye Test and the C. F. I. Test.

Serum No.	Tp Immunized Swine Serum												Tested Swine Serum								TIGS		TIGOS
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	1.	2	1
Dye Test	256	256	256	256	256	256	256	256	256	64	256	16	16	64	64	256	4	16	4	4	1024	256	256
CFI Test	16	32	8	4	16	16	8	16	16	8	16	0	0	2	0	8	0	0	0	0	128	32	8

Note: T. I. G. S., Tp immunized guinea-pig serum.

T. I. G. O. S., Tp immunized goat serum.

Interpretation: Positive, 1:64 or more in dye test, 1:8 or more in C. F. I. test, and suspicious 1:4 in C. F. I. test.

는바와 같이 Tp와 關係가 깊은 血清群은 大部分 同一하게 抗體證明이 되었다. 豚可檢血清에 있

어서도 dye test에서 抗體價가 높은 No. 4 는 C.F.I. test에서도 역시 抗體證明이 되었다. 이

러한 事實을 미루워 보아 C.F.I. test는 特異性 이 높은 反應으로 認定할 수 있다.

Ⅲ. 實驗 成績

1) 豚 Toxoplasmosis의 道別分布

全國(濟州도를 除外)으로 부터 採集한 豚血清 2,017例에 對한 C.F.I. test에 依해서 T病의 抗體 調査를 實施한바 表 5에서 보는 바와 같이 檢査頭數 2,017例中 疑陽性(1:4)이 159例 (7.9%) 陽性(1:8 以上) 272頭 (13.4%)였다. 疑陽性과 陽性을 合하면 431例(21.3%)가 된다. 道別로 陽性率을 보면 忠南은 26例中 1:8이 9例, 1:16이 11例 1:32가 6例였다. 忠北은 12例中 1:8이 10例

1:16이 2例, 1:32는 없었다. 全南은 39例中 1:8이 22例, 1:16이 11例, 1:32가 6例였다. 全北은 14例中 1:8이 9例 1:16이 5例 1:32는 없었다. 京畿는 25例中 1:8이 11例, 1:16이 14例였다. 江原은 31例中 1:8이 24例, 1:16이 9例, 1:32가 1例였다. 慶南은 98例中 1:8이 46例, 1:16이 37例, 1:32가 15例였다. 慶北은 24例中 1:8이 13例, 1:16이 9例, 1:32가 2例였다. 이 成績을 部分面으로 볼때 陽性率이 높은 全南, 慶南, 江原道에서는 血清倍數가 높은 1:32에서 많은 例數가 擧出되었고 全國의으로 볼때 우리나라 豚은 約 13%가 T病 抗體를 保有하고 있는 實態에 있다고 볼 수 있다.

Table 5. Distribution of Swine Toxoplasmosis by Localities.

Distribution Province	Tested No.	Negative	Suspicious		Positive			Suspicious %	Positive %
			×4	×8	×16	×32	Total		
Choong-Nam	210	176	8	9	11	6	26	3.8%	12.3%
Choong-Buk	101	84	5	10	2	0	12	5.0%	11.8%
Chun-Nam	200	135	26	22	11	6	39	12.0%	19.5%
Chun-Buk	201	178	9	9	5	0	14	4.5%	6.9%
Kyung-Ki	200	155	20	11	14	0	25	10.0%	12.5%
Kang-Won	205	150	21	24	9	1	34	10.4%	16.5%
Kyung-Nam	700	553	49	46	37	15	98	7.0%	13.1%
Kyung-Buk	200	155	21	13	9	2	24	10.5%	12.0%
Total	2,017	1,586	159	144	98	50	272	7.9%	13.4%

Note In this CFI test, C.A.M. was used as an antigen and the immunized guinea-pig serum was used as an indicating serum.

Interpretation:

1. negative, < ×4
2. suspect, ×4
3. positive, ≥ ×8
4. limit of positive, 75% hemolysis or more.

2) 豚의 Tp의 性別分布

各道로부터 採集한 豚血清中 性別이 確實한 血清만을 對象으로 性別分布를 調査하였다. 表 6에서 보는바와 같이 雄(♂)은 326頭中 1:8 以上

이 36頭(11.0%)였고 雌(♀)는 791頭中 1:8 以上이 114頭 (14.3%)였다. 雌(♀)는 雄(♂)보다 3.3%가 높았다.

Table 6. Distribution of Toxoplasmosis by the Sex.

Sex	Distribution Tested No.	Negative	Suspect	Suspect %	Positive	Positive %
Male	326	267	23	7.0%	36	11.0%
Female	791	610	67	8.4%	114	14.3%
Total	1,117	877	90	8.0%	150	13.4%

Note: Negative, < 1:4
 Suspect, 1:4
 Positive, ≥ 1:8

3) 豚의 Tp의 年齡別分布

慶南, 慶北을 除外한 忠南北, 全南北, 京畿, 江原道の 血清中 年齡別로 區別하여 Tp의 分布를 調査하였다. 表 7에서 보는 바와같이 7個月以下 156頭中에 14頭 (8.9%)가 陽性이 였고 7個月~1年 以內의 豚 694頭中 84頭(12.1%)가 陽性이

었다. 1年~2年 以內의 豚 203頭中 29頭 (14.2%)가 陽性이 있으며 2年以上 64頭中 23頭 (35.9%)가 陽性이었다. 年齡과 陽性率의 關係는 年齡의 增加에 따라 陽性率도 같이 併行하는 傾向을 보였다.

Table 7. Distribution of Toxoplasmosis Classified by the Age.

Age	Distribution	Tested No.	Negative	Suspect	Suspect %	Positive	Positive %
7 Months or less		156	133	9	5.7%	14	8.9%
8 M. to 12 M.		694	558	52	7.4%	84	12.1%
13 M. to 24 M.		203	155	19	9.3%	29	14.2%
25 M. or more.		64	31	10	15.6%	23	35.9%
Total		1,117	877	90	8.0%	150	13.4%

Note: Negative, < 1:4
 Suspect, 1:4
 Positive, ≥ 1:8

IV. 考 察

Tp의 感染經路에 對하여서는 아직 確實히 究明되어 있지 않으나 Tp가 自然界에서 廣範한 宿主를 가지고 있다는 事實은 여러 研究者에 依해서 사람을 爲始하여 哺乳動物 鳥類로부터 直接 Tp의 檢出 或은 間接的인 方法으로서 抗體 調査에 依한 T病의 分布가 證明되고 있다. 著者は ③④ 1957年 우리나라에서 처음으로 豚으로부터 Tp를 分離하고 계속 國內 Tp의 分布實態를 알고저 豚血清에 對한 血清反應을 試圖하였다.

豚血清에 對한 血清反應은 Rice^③ 大森^④ 椿原^⑤ 등이 이미 牛, 鷄血清의 特異性質에 對하여 發表한바와 같이 正常的인 C.F.test에서는 正確한 特異反應의 期待가 어려움으로 石井^⑥ 藤田^⑦ 등의 報告에 依해서 豚血清을 45°C~75°C에 加溫處理하여 C.F.I. test을 應用하여 抗體 調査를 實施하였다. 本反應에 使用한 抗原은 Sabin^⑧에 依해서 考案된 發育鷄卵抗原과 mouse 抗原에 對해 檢討하였다. 當初 特異성이 높고 調製過程이 簡便한 抗原의 調製에 큰 期待를 가

지고 組織培養抗原을 試圖하였다. 組織培養抗原은 清水^⑨ 등에 依하면 細胞의 選擇없이 接種 虫數 1에 細胞數 10의 比率로서 培養하면 數日~10日 前後에서 虫體數가 1.0ml當 1,000~1,500 萬에 達하고 이 時期의 medium中에는 C.F. 抗原이 出現하게 되며 最高力價는 16~32배에 達하게 됨으로 Sabin의 抗原과 同一하다고 하였다.

著者が 試圖한 組織培養抗原은 清水^⑨의 medium 抗原보다 오히려 細胞抗原이 力價가 높았으며 發育鷄卵抗原과 同一한 力價였다(表 1參照). 豚血清은 溫度處理에 依해서 C.F. test와 C.F.I. test와 의 特異성을 比較檢討하였다. 表 2에서 보는바와 같이 56°C 以下에서 30分間 處理에서는 血清自體에서 補體의 加擔없이도 溶血이 일어났으며 56°C 以上 加溫에서는 C.F.I. test만이 特異反應이 出現하였다. 本試驗에 使用된 豚血清은 豚感染試驗^⑩에서 Tp의 感染을 받고 重症으로 耐過한 豚의 血清이며 dye test (表 4參照)에도 供試된 血清으로서 特異성에 對해서는 조금도 疑心할 餘地가 없다.

C.F.I. test에 使用된 指示血清에 對해서 여러

가지 動物에 免疫시켜 그 優劣을 比較한 大森^④의 試驗成績을 보면 guinea-pig, 犬, mouse, 山羊, 豚, 猫, 그리고 馬의 順序로서 guinea-pig와 犬은 使用이 可能하나 mouse, 山羊, 豚, 猫 또는 馬는 低力價로서 指示血清으로서 銳敏度가 낮다고 하였다. 本試驗에 使用한 指示血清은 免疫動物로서 guinea-pig를 使用하고 Tp를 0.1 ml부터 始作하여 漸次增加하면서 高度로 免疫시켜서 規定된 抗原의 一定量에서 特異적으로 結合하는 力價를 가진 guinea-pig만 採血하여서 使用하였다. 著者の 經驗에 依하면 指示血清은 高力價의 血清은 低力價의 血清에 比해서 作用의 銳敏度가 높았으며 1:100 以上の 力價血清을 使用하는 것이 正確을 期할수가 있었다. (表1參照).

그리고 本試驗에 所要되는 各 因子를 C.F.I. test를 통해서 그 特異性を 確認하고자 表 3과 같은 方法으로 C.F.I. test를 實施하였다. 그 結果 豚 No. 1은 1:16, No. 2는 1:32에서 各各 特異反應이 出現되었다. 한편 C.F.I. test의 特異性を 再確認하고자 同一血清을 使用하여 dye test와 C.F.I. test와의 比較試驗을 實施한 바 表 4와같이 由來가 確實한 豚免疫血清은 dye test와 C.F.I. test와 同一하였다. 그리고 山羊, guinea-pig도 역시 모두 陽性이었고 可檢豚血清에서도 陽性과 陰性이 거의 一致하였으나 豚 No. 2, 3은 dye test에서는 陽性이었으나 C.F.I. test에서는 No. 2는 弱한 反應의 出現을 보였다. 이 成績은 藤田^⑤等에 依하면 C.F.I. test 抗體는 dye test 抗體 보다 早期에 出現하여 빨리 消失된다 함으로 C.F.I. test의 抗體는 消失되었다고 볼수 있으며 C.F.I. test는 早期診斷에 더 큰 意義가 있다고 생각된다. 따라서 陽性領域內에 있어서는 兩者의 相關성은 特異적으로 認定할 수 있다.

以上과 같이 各因子에 對한 檢討를 基礎로하여 C.F.I. test를 應用하여 全國(濟州道는除外)으로부터 採集한 豚血清 2,017例에 對한 T病의 抗體調査를 實施하였다 調査區分은 全例數에 對한 各道別 抗體調査와 慶南, 慶北을 除外한 其他道の 1,117頭에 對한 性別 年齡別 調査를 各各 實施하였다. 表5에서 보는바와같이 道別成績에서

忠南, 全南, 慶南 그리고 江原은 他道에 比해서 陽性率이 높았으며 同時に 抗體價가 높은 1:32에서 많이 證明되었다. 當初에 著者^{③④}가 Tp를 처음으로 分離한 地方으로서 慶南, 忠北이 他地方에 比해서 Tp의 分布가 많은 關係인지는 알수없다. 그러나 한편 Tp가 檢出된 全北은 全國에서 가장 낮은 陽性率을 表示하고 있음으로 이러한 單一的인 調査方法으로서는 抗體의 消長을 把握하기에는 어려운 일이 아닌가 생각된다. 그러나 全體面에서 볼때 우리나라의 豚에 13.4%의 Tp가 分布되어 있다는 事實은 人獸共通傳染病으로서 注目할만한 일이며 나아가서는 公衆衛生分野에 새로운 問題를 提供하게 된 것으로 推想된다. 또한 年令別 性別 調査에서(表6.7參照) 年令이 많은 豚群이 幼若群에 比해서 陽性이 높은 事實은 興味있는 일이며 이 現象은 松林^⑥等이 指摘하는 바와 같이 Tp가 宿主의 體內에서 cyst를 形成하여 長期間 生存함으로써 生産되는 抗體가 年令이 많은 豚群에서 證明되는 것이 않인 지 推測된다. 性別調査에서는 有意差를 認定하지 못하였다.

V. 結 論

1) 全國(濟州道除外)으로 부터 採集한 豚血清에 對한 T病의 抗體調査를 C.F.I. test에 依해서 實施한바 1:8을 陽性限界로하면 檢査例數 2,017例中 272頭(13.4%)가 陽性이었다(表5參照).

2) 各道別 陽性比率을 順位的으로보면 全南의 檢査頭數 200頭中 39頭(19.5%)가 陽性이었고 다음은 江原道の 205頭中 34頭(16.5%)가 陽性이었다. 慶南은 700頭中 陽性이 98頭(13.1%)였고 忠南, 忠北, 京畿 그리고 慶北은 大同小異하게 12% 前後였다 全北은 檢査頭數 201頭中 14頭(6.9%)로서 가장 낮은 陽性率이었다.(表5參照)

3) 慶南 慶北을 除外한 性 및 年令이 確實한 1,117頭에 對한 性別檢査에서는 有意성을 發見할 수는 없었으나 年令別에서는 7月以下豚 156頭中 陽性이 14頭(8.9%)였고 7月以上 1年豚 694頭中 陽性이 84頭(12.1%)였다. 1年以上 2年豚 203頭에서 陽性이 29頭(14.2%)였고 2年以上豚 64頭에서 23頭(35.9%)가 陽性이었다. 年令과 陽性率은

같이 併行하였으며 2年以上 豚은 7月以下豚보다 約 4倍以上의 陽性을 나타내었다.(表6.7參照)

끝으로 指導와 校閱을 하여 주신 朴炳國 教授와 梁學道 博士에게 深謝하오며 勞苦를 아끼지 않고 助力하여 주신 金丁圭, 金龍熙, 金惠源 研究官과 晋州農科大學 馬點述 助教授와 鄭榮錫, 宋基昌, 崔哲淳, 金斗熙 研究士 그리고 趙亨基 獸醫學士에게 感謝드리며 物心兩面으로 協助하여 주신 李南信 博士, 金永漢 畜産局長, 李昌九 研究官에게 謝意를 表하는 바이다.

References

1) 山本修太郎: 日本獸醫師會誌, 8, 1, 1955.
2) Nicolle, C. and Manceaux, L.: *compt. Rend. Acad. Sci.*, 148: 763-766, 19083.
3) 文載鳳. Toxoplasmosis에 關한 研究. 第4回 大韓獸醫學會發表, 1960.
4) 松林久吉: 日本醫事新報, 1674, 23, 1956.
5) 宮川米次: 診斷의 實際, 日本, 5, 63-68, 1954.
6) 宮崎一郎, 平岡輝明: 日本醫事新報, 1722, 38-51, 1958.
7) 大鶴正藤, 他: 綜合臨床, 日本, 7, 1079, 1958.
8) 清水文彥, 他: 日本衛生學雜誌, 13, 173, 1958.
9) 平戶勝七: 1958年 日本文部省 總合研究報告.
10) 藤本胖: 日本獸醫學雜誌, 20, 274, 1958.
11) 佐藤平二, 他: 日本獸醫學雜誌, 20, 213, 1958.
12) 清水龜平次: *Jap. J. Vet. Res*, 6, 157, 1958.
13) 常松文典, 他: 東京醫事新報, 75, 217, 1958.
14) 松林久吉, 阿部道夫, 他: 日本 日新醫學, 44, 368, 1957.
15) 宮崎一郎, 山本嚴重: 日本 寄生蟲學雜誌, 7, 392, 1957.
16) 信藤謙藏, 鈴木藤, 石井進: 日本家畜衛生試驗場 研究報告, 40, 29-52, 1960.
17) 長谷川秀治, 常松之典: 日本細菌學雜誌, 9, 455, 1954.
18) 香川修事, 常松之典: 日本醫事新報, 1590, 43 05, 4309, 1954.
19) 島田幸治, 他: 東京都衛生研究所研究報告, 92, 32, 1956.
20) 清水文彥, 他: 日本衛生學雜誌, 13, 235, 1958.
21) 田中英雄: 1958年 日本文部省總會研究報告.
22) 田中宏: 醫學과 生物學, 日本, 47, 288, 1958.
23) 田中宏, 他: 醫學과 生物學, 日本, 48, 142, 1958.
24) 常松之典, 他: 東京醫事新報, 75, 227, 1958.
25) 辻昭二, 他: 日新醫學, 日本, 45, 447, 1958.
26) Soh, Chin Thack: Yonsei University Medical School, Korea.
27) Sabin and Feldman: *Science*, 108, 660, 1948.
28) Sabin: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 51, 6, 1942.
29) Frenkel: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 68, 634-639, 1948.
30) Jacobs, L.: *J. Prasiat.*, 43, 308, 1957.
31) Warren, J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 51, 11, 1942.
32) Warren, J. and Russ, S.B.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 67, 85, 1948.
33) Rice, C.E.: *J. Immunol.*, 60, 1, 1948.
34) 大森, 他: *Virus*, 3, 269, 1953.
35) 椿原, 佐澤, 片岡: 日本家畜衛生試驗場研究報告, 31, 59, 1956.
36) 守本, 他: 日本獸醫學雜誌, 20, 2, 1950.
37) Karrel, H.: *J. Int. Dis.*, 87, 24, 1950.
38) Hillman, M.R.: *J. Immunol.*, 66, 115, 1951.
39) 石井進, 他: 日本家畜衛生試驗場研究報告, 40, 1962.
40) 馬點述, 文載鳳: 安養家畜衛生研究報告, 7, 1-11, 1961.
41) 細菌學實習提要: 日本傳染病研究所發行 6版, 1961.
42) 藤田壽吉, 他: 日本家畜衛生試驗場 研究報告, 43, 22-26, 1961.
43) 清水龜平次: 第47回 日本獸醫學會發表, 1957.
44) 文載鳳: 大韓獸醫界, 4, 3, 713, 1960.
45) 松林久吉: 日本寄生蟲學雜誌, 10, 3, 512-516, 1961.