

조직배양세포에서의 일본뇌염 virus 증식에 관한 연구

고려대학교 의과대학 미생물학교실
고려대학교 바이러스병 연구소

이 호 왕 · 문 석 배

=Abstract=

Propagation and Attenuation of Japanese Encephalitis Virus in Tissue Culture Cells

Ho Wang Lee and Seok Bae Moon

Department of Microbiology, College of Medicine and Institute for Viral Diseases, Korea University

Japanese encephalitis has been prevalent for long time in the Far East and many patients have been reported in both South East and Mid-West Asia recently.

Recently, vaccine was used in prevention of this viral disease of man which was derived from formalin inactivated virus inoculated into mouse brain, but live attenuated active vaccine for human is not developed yet.

Author inoculated Japanese encephalitis virus into several cell culture strains for development of live attenuated encephalitis virus strain and the results were as follows:

1. Japanese encephalitis virus was inactivated rapidly in cell free medium at 36°C and totally inactivated by 72 hours.
2. In growth curve of Japanese encephalitis virus in HeLa cell cultures, maximal multiplication of the virus was occurred at 4th day and virus multiplication was continued for at least 12 days.
3. After succeeding passage of the virus in HeLa cell cultures and human esophagus epithelial cell cultures, infectivity of virus for mice was disappeared from 2nd passage in HeLa cell cultures and 3rd passage in esophagus epithelial cell cultures.
4. In inoculation to monkey kidney epithelial cells and chick embryo cell cultures, infectivity of the virus for mice was continued after 10th passages.

서 론

일본 뇌염 virus는 Takaki¹⁾ Taniguchi²⁾ 및 Kasahara³⁾에 의하여 처음으로 분리되었고 von Economo의 뇌염과⁴⁾ 구별하기 위하여 Japanese B 뇌염이라 명명되었다. 극동지방에서는 이 뇌염이 100여년간 발생하고 있으며 특히 여름에 발생하기 때문에 하기뇌염이라 불리었다. 뇌염 virus는 계 태아와 흰쥐⁵⁾에서 증식이 되며 Smith는⁶⁾ 일본 뇌염 virus가 St. Louis 뇌염 virus와 같은 변화를 chorioallantoic membrane이나 계 태아의 뇌조직에서 볼 수 있다고 하였다. Howitt⁷⁾는 뇌염 virus를 계 태아에 접종하여 대량의 virus를

얻는데 성공하였다.

일본 뇌염 virus가 각종 조직배양세포에서 증식된다는 보고는 많으며 Kawakita,^{8,9)}는 계 태아세포에서 Scherer 및 Syverton¹⁰⁾은 HeLa 세포에서 증식시켰고 또 Mason은^{11,12)} HeLa 세포에서 배양이되나 세포파괴성은 나타나지 않는다고 하였다. 그 후 McCollum와 Foley¹³⁾은 뇌염 virus를 계 태아섬유세포, 원숭이 신장 상피세포 및 Detroit 6 세포에서 증식하였고李등은¹⁴⁾ 돼지 신 상피세포에서 성공함과 동시에 세포파괴성을 처음 관찰하였다. 그 후 Hammon등은¹⁵⁾ Hantsler 신 상피세포에서 세포 파괴성을 그리고 Kato¹⁶⁾ Porterfield¹⁷⁾ 및 李¹⁸⁾은 돼지 신 상피세포 및 계 태아세포에서 plaque를 만드는데 성공하였다.

본 연구는 일본 뇌염 virus를 [각종 조직배양세포에 장기간 계대배양하면서 virus의 증식을 확인하고 동물에 대한 병원성의 변화를 관찰하므로써 약독화된 뇌염 virus를 얻는데 목적이 있었다. 실험결과 HeLa세포 및 식도상피세포에 계대한 virus가 약독화 되었음이 관찰되었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

Virus : 사용한 일본 뇌염 virus는 세계 표준형으로 Nakayama주¹⁴⁾ 41대 쥐에 계대한 것이다. 이 virus는 3주된 흰쥐에 4번 더 계대한 후 3일된 흰쥐 뇌내에 접종하여 감염여가를 증가시킨 후 stock virus를 만들었다. Stock virus는 BSS에 10% 토끼 혈청이 든 회석액으로 감염된 뇌조직을 10% 부유액으로 만들었으며 tissus grinder에서 간 후 3,000 rpm 20분간 원침 후 상층액을 채취하여 -60°C 냉장고에 사용시까지 보관하였다.

역가 측정은 3주된 흰쥐의 뇌절중으로 하였는데 $10^{6.4}$ LD₅₀/0.03ml이었다. 역가 결정은 10배 희석한 virus 용액을 5마리의 쥐의 뇌내 접종하여 계산하였다.

조직배양세포 : 다음 4종의 조직배양세포를 사용하였다.

1. HeLa 세포 : Scherer 박사에서 얻은 것으로 기원은 Gey가 분리한 것이다.¹⁰⁾
2. 계 태아 세포 : 9일된 계 태아를 Ross의 방법²⁰⁾에 준하여 배양하여 사용하였다.
3. 원숭이 신장 상피세포¹⁸⁾ : establish된 세포를 사용하였다.
4. 사람 식도 상피세포 : Syverton에 의하여 분리된 세포이다.²¹⁾

세포배지 : 송아지 태아 혈청을 각종 세포계대에 사용하였다. 혈청은 GIBCO 회사에서 구입하였으며 사용시까지 -20°C 냉장고에 보관하였고 병아리 혈청 및 송아지 태아 혈청을 virus 계대의 유지배지에 사용하였으며 5~10%의 혈청이 함유되었다. BSS에 yeast extract가 함유된 배지로 성장 및 유지배지를 만들었으며 penicillin 및 streptomycin이 100 μ /ml 함유되었다.

세포 배양 방법 : 모든 세포는 200ml의 병에서 배양하였으며 10ml에 100만세포가 함유되도록 하였으며 성장배지는 10~15%의 송아지 혈청이 함유되었다. 시험병 벽에 완전히 단층으로 세포가 배양되면 0.2% Difco trypsin용액으로 세포를 용해한 후 혈구계산기에서 세포수를 계산하였으며 보통 완전한 세포성장온 3~4일

내에 볼수 있었다. 시험관에 배양된 세포는 유지배지로 바꾸기 전에 BSS로 3회 씻은후 가하였고 세포배양 시험관에 0.1 ml의 virus를 접종하였다. 세포배양 시험관은 매일 관찰하였으며 pH의 변화는 1.4%의 sodium carbonate용액 50 및 송아지혈청 50으로 조절하였다.

Virus 증식 방법 : 0.1ml의 virus용액을 0.9ml가 함유된 조직배양 시험관에 접종한 후 36°C 부란기에 보존하면서 세포파괴성 유무를 매일 관찰하였다. 보통 virus의 상층액은 세포가 80% 이상 파괴될 때에 계대하였고 만일 세포파괴성이 나타나지 않는 경우에는 1주일 전후하여 0.1 ml의 상층액을 계대하였으며 이같은 상층액은 흰쥐 뇌내에 0.3ml 접종하여 병원성을 조사하였다.

Virus의 역가 측정 : 일본뇌염 virus의 역가 측정은 흰쥐에서 하였다. 조직 배양 상층액을 채취한후 1,000 rpm 15분간 원침 후 그 상층액을 BSS에 10배 희석한 후 흰쥐 5수의 뇌내에 0.3ml씩 접종하였다. 쥐에 대한 LD₅₀는 Reed & Muench의 방법²²⁾에 의하여 3주일 이내에 사망된 것으로 계산하였다. 세포계대에 사용한 virus는 면역 토끼 혈청으로 중화하여 확인하였다.

면역혈청 : 뇌염 virus, Nakayama주를 흰토끼 피하에 1주일 간격으로 2회 접종한 후 1개월 후에 전 체혈하여 혈청을 분리 항혈청으로 사용하였다.

Virus 중화법 : 10배 희석법으로 희석한 일정량의 virus에 동량의 면역 토끼 혈청을 가한 후 37°C 에서 1시간 중화한 후 흰쥐에 0.03ml 뇌내에 접종하였으며, 3주일간 매일 관찰하여 사망 유무를 조사하였다.

결 과

1. 액체배지에서의 일본뇌염 virus의 생존기간

각종 세포에서의 virus 증식의 대조로 세포가 없는 액체배지에서 얼마나 virus가 생존하는가를 검사하였다. 뇌염 virus를 액체배지에 혼합한 후 100 ml 병에 넣어 39°C 부란기에 보존하면서 일정한 간격으로 일부 용액을 채취하여 virus의 역가를 측정하였다.

그림 1에 나타난 바와 같이 virus는 급속히 사멸되었으며 특히 12시간 이내에 대부분 사멸되었고 3일후에는 살아있는 virus를 찾아볼 수 없었다.

이 결과는 액체배지에서 virus가 급속히 사멸됨을 증명하는 것으로 만일 4일 후에 조직배양세포 배지에서 증명되면 이는 세포내에서의 virus증식을 의미하는 것이다.

2. HeLa cell에서의 일본뇌염 virus 증식 곡선

뇌염 virus를 HeLa세포 시험관에 가한 후 일정량의

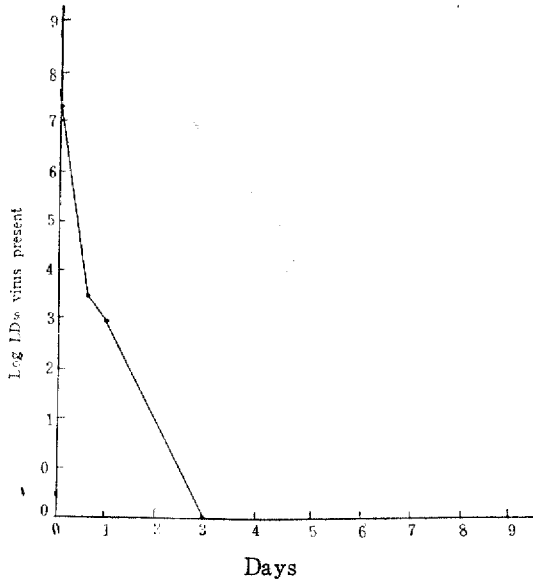


Fig. 1. Survival of Japanese B encephalitis virus in cell-free medium at 36°C

CPE¹ - - - - + # # # + - -

1: CPE=cytopathogenic effect + =20~30% destruction, # = more than 50% destruction, - = no apparent destruction

상층액을 일정한 간격으로 채취 후 virus의 역가를 측정하였다.

그림 2에 나타난 바와 같이 원위에서 1,000~10,000 ID₅₀의 virus를 2일에서 4일까지 증명할 수 있었으며 그 후 서서히 감소하나 12일 후에도 50 ID₅₀의 virus를 증명할 수 있었다. 이 기간중 virus의 세포에 대한 파괴성은 5일에 관찰되었고 6~8일 사이에 약 50%의 세포가 파괴된 후 10일 이후에는 다시 파괴된 세포들이 회복됨을 볼수 있었다.

이 소견은 뇌열 virus가 HeLa세포에서 서서히 오랫동안 계속 증식되고 있음을 보여준 것이다.

3. 일본뇌염 virus의 HeLa세포, 계 태아 세포, 사람 식도 상피세포 및 원숭이 신장 상피세포에서의 증식

일본뇌염 virus가 암세포인 HeLa세포, 계 태아세포에 장기간 계대한 사람의 식도 상피세포 및 원숭이 신장상피세포에서 증식되며 세포에 대한 세포파괴성 유무와 원위에 대한 병원성의 변화를 조사하였다.

표 1은 HeLa 세포에서의 계대 성적이며 보통 세포는 4일 간격으로 계대하였다. 13대 계대시까지 조직배양 세포에서는 세포파괴성을 관찰할 수 없었으나 원위에 대한 병원성은 서서히 감소하여 10대 이후에는 병

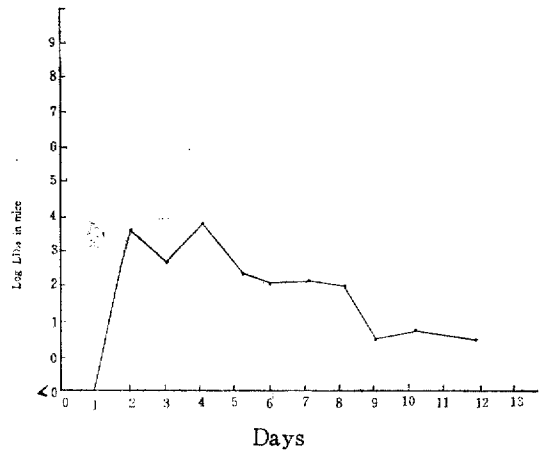


Fig. 2. Growth curve of Japanese B encephalitis virus (Nakayama strain) in HeLa cell cultures

원성을 찾아볼 수 없었다. 표 2는 계 태아세포에서의 증식성적인데 3대까지는 조직배양세포에서 세포파괴성을 관찰하였으나 그 후 소실되어 관찰할 수 없었다. 그리고 원위에서의 병원성은 계속 존재함을 볼 수 있었으나 9대 이후에는 초대의 절반밖에 되지 않았다.

표 3은 식도 상피세포에서의 증식성적인데 이 세포에서는 세포에 대한 세포파괴성은 관찰할 수 없었고 원위에 대한 병원성은 비교적 빨리 소실되어 4대부터는 없었다.

표 4는 원숭이 신장 상피세포에서의 증식성적인데 세포에 대한 파괴성은 관찰되지 않았고 원위에 대한 치사역가는 서서히 감소하나 12대에서도 LD₅₀은 10^{5.0}/0.03ml였다.

고 안

일본뇌염 virus는 각종 조직배양세포 및 동물에서 증식된다. 그러므로 자연계에서의 일본뇌염 virus의 생태는 복잡하며 모든 온혈동물들이 이 virus의 자연계 숙주로 작용하고 있다. 이 중에서도 일본뇌염 virus의 유행과 밀접한 관계가 있는 온혈동물은 돼지로, 항체를 갖고 있지 않은 돼지가 매년 여름 증폭동물로 작용하여 다량의 virus를 일본뇌염모기에 공급하여 주고있다.

극동지방에는 오래전부터 일본뇌염이 유행되어 왔으며 최근 수년간에는 일본 및 한국에서는 환자가 감소되었으나 아직도 중국, 월남, 인도 및 남태평양 여러 섬에서는 많은 환자가 발생하여 큰 문제로 남아있다.

한국이나 일본에서 뇌염환자가 급속히 감소된 원인

Table 3. Propagation and cytopathogenic effect in vitro of Japanese B encephalitis virus (Nakayama strain) in esophagus epithelial cells.

Number of virus passage	Total day in culture	Cumulative log of dilution of original viral inoculum	Results as indicated by		
			Cytopathogenic effect ^{1,2}	Infectivity for mice ¹	Titration in mice log LD ₅₀ /0.03ml.
Inoculum					
1	4	1.0	0/3	4/4	9.4
2	8	2.0	2/4	4/4	
3	12	3.0	0/2	1/4	
4	16	4.0	0/4	0/4	
5	20	5.0	0/2	0/4	
6	24	6.0	0/2	0/4	
7	28	7.0	0/2	0/4	
8	32	8.0	0/2	2/4	
9	38	9.0	0/2	0/4	
10	42	10.0	0/2	0/4	
11	46	11.0	0/2	0/4	

1: The numerator signifies either the number of mice that died from viral infection or the number of cultures that showed 90 or more per cent destruction of cells. The denominator indicates the number of mice or cell culture tubes inoculated with virus.

2: Cell cultures received 0.1ml. of virus and 0.9ml. of CaS-10, YEM-90.

Table 4. Propagation and cytopathogenic effect in vitro of Japanese B encephalitis virus (Nakayama strain) in monkey kidney epithelial cells.

Number of virus passage	Total days in culture	Cumulative log of dilution of original viral inoculum	Results as indicated by		
			Cytopathogenic effect ^{1,2}	Infectivity for mice ¹	Titration in mice log LD ₅₀ /0.03ml.
Inoculum					
1	4	1.0	0/4	4/4	9.4
2	9	2.0	0/4	4/4	
3	16	3.0	0/4	4/4	
4	22	4.0	0/4	4/4	
5	27	5.0	0/4	4/4 ³	6.8
6	31	6.0	0/4	4/4	
7	36	7.0	0/4	4/4	
8	42	8.0	0/4	4/4 ¹	
9	47	9.0	0/4	4/4	4.3
10	51	10.0	0/4	4/4	
11	55	11.0	0/4	4/4	
12	59	12.0	0/4	4/4 ³	4.9

1: The numerator signifies either the number of mice that died from viral infection or the number of cultures that showed 90 or more per cent destruction of cells. The denominator indicates the number of mice or cell culture tubes inoculated with virus.

2: Cell cultures received 0.1 ml. of virus and 0.9ml. of CaS-10, YEM-90.

3: Virus from these passages was neutralized in mice by specific antiserum.

Table 1. Propagation and cytopathogenic effect in vitro of Japanese B encephalitis virus (Nakayama strain) in HeLa cells.

Number of virus passage	Total days in culture	Cumulative log of dilution of original viral inoculum	Results as indicated by		
			Cytopathogenic effect ^{1,2}	Infectivity for mice ¹	Titration in mice log LD ₅₀ /0.03ml
Inoculum					
1	4	1.0	0/3	4/4	9.4
2	8	2.0	0/4	2/4	
3	12	3.0	0/4	1/4	1.9
4	16	4.0	0/4	4/4 ³	
5	21	5.0	0/4	0/4	
6	25	6.0	0/3	2/4	
7	30	7.0	0/2	2/4	
8	36	8.0	0/2	0/4	
9	41	9.0	0/2	0/4	
10	45	10.0	0/2	2/4	
11	46	11.0	0/2	0/4	
12	54	12.0	0/2	0/4	
13	59	13.0	0/2	0/4 ⁴	

1: The numerator signifies either the number of mice that died from viral infection or the number of cultures that showed 90 or more per cent destruction of cells. The denominator indicates the number of mice or cell culture tubes inoculated with virus.

2: Cell cultures received 0.1 ml. of virus and 0.9 ml. of CaS-10, YEM-90.

3: Virus from these passages was neutralized in mice by specific antiserum.

4: Killed 7-day old baby mice but not 3-4 week old mice.

Table 2. Propagation and cytopathogenic effect in vitro of Japanese B encephalitis virus (Nakayama strain) in chick embryo cells.

Number of virus passage	Total days in culture	Cumulative log of dilution of original viral inoculum	Results as indicated by		
			Cytopathogenic effect ^{1,2}	Infectivity for mice ¹	Titration in mice log LD ₅₀ /0.03ml.
Inoculum					
1	2	1.0	2/2	4/4	9.4
2	5	2.0	2/2	6/6	
3	9	3.0	1/4	4/4	6.9
4	13	4.0	0/4	4/4	
5	17	5.0	0/4	4/4 ³	
6	21	6.0	0/4	4/4	
7	25	7.0	0/4	4/4	
8	29	8.0	0/4	4/4	
9	33	9.0	0/4	4/4 ³	
10	37	10.0	0/4	4/4	
11	41	11.0	0/4	4/4	
12	45	12.0	0/4	4/4 ³	

1: The numerator signifies either the number of mice that died from viral infection or the number of cultures that showed 90 or more per cent destruction of cells. The denominator indicates the number of mice or cell culture tubes inoculated with virus.

2: Cell cultures received 0.1ml. of virus and 0.9ml. of CaS-10, YEM-90

3: Virus from these passages was neutralized in mice by specific antiserum

은 여러가지가 있으나 그중에서도 제일 중요한것은 뇌염모기가 발생하는 논에 농부가 매년 수회씩 살충제를 살포하여 뇌염모기의 발생을 억제한 결과 뇌염 예방주사약의 광범위한 보급으로 많은 어린이가 면역되었고 또 돼지에 예방접종을 실시하여 증폭동물울 면역하였기 때문이다.

뇌염 예방주사약은 아직도 흰쥐 뇌에 배양한 virus를 포르마린으로 처리하여 사용하고 있는데 면역효과는 비교적 좋은 것으로 되어 있다. 그러나 좋은 면역효과를 발생하는 것은 소아마비나 홍역등에서 보는 바와 같이 약독화한 생균완전인 것이다. 아직까지 일본 뇌염의 약독화한 생균완전이 사람에게 사용되고 있지않는데 이와같은 약독화한 완전이 완성되면 한번의 예방주사로 일생 지속되는 강력한 면역을 획득할 수 있게 될 것이다.

본 연구는 이런 의도하에 각종 세포에 virus를 제대하여 약독화한 뇌염 virus주를 얻는데 그 목적이 있었다. 본 연구에서 나타난 바와 같이 일본뇌염 virus는 사용한 4종의 세포에서 증식이 잘 됨을 알수 있다. 이 중에서 HeLa세포나 사람 식도 상피세포에 수대 제대한 virus는 쥐에 대한 병원성을 소실하는데 이같은 현상이 사람에게서도 나타나는지는 연구하여야 할 것이다. 완전에서는 병원성만 문제되는 것이 아니고 항원성이 더욱 중요하므로 병원성과 동시에 항원성의 강도에 대하여 많은 연구가 필요하다. 생균완전의 개발은 장시일이 요하며 많은 부작용 문제도 고려하여야 하며 최종적인 결과는 사람에게 가까운 원숭이나 침팬지에서 하여야 할 것이다.

결 론

1. 일본뇌염 virus는 36°C 세포배양배지에서 급속히 사멸되었으며 3일 후 완전히 불활성화됨을 증명하였다.
2. HeLa 세포에서의 일본뇌염 virus의 성장곡선은 최고양의 virus가 배양 제 4일에 나타났으며 그 후 계속하여 12일까지도 증식하고 있음을 알 수 있었다. 증식되는 virus의 양과 세포의 조직학적 변화와는 상관이 없었다.
3. HeLa 세포 및 사람 식도 상피세포에 일본 뇌염 virus를 계속 제대한 결과 HeLa 세포에서는 2대부터 쥐에 대한 병원성이 소실되었고 식도 상피세포에서는 3대후부터 쥐에 대한 병원성이 소실됨을 알수 있었다.
4. 원숭이 신장 상피세포 및 계 태아 세포에 일본뇌염 virus를 제대한 경우 흰쥐에 대한 병원성은 10대 제대 후에도 계속 존재함을 증명할 수 있다.

이상의 성적은 실험에 사용한 4종의 세포에서 일본 뇌염 virus가 잘 증식되며 HeLa 및 식도 상피세포에 수대 제대 배양할 경우 흰쥐에 대한 병원성이 감소 또는 약화되어감을 나타낸 것이다.

REFERENCES

- 1) Takaki, I.: Ueber das virus der encephalitis japonica. Zschr. F. Immunitätsforsch. u. Exper. Ther., I. Mitteilung., 47 : 441, 1926.
- 2) Taniguchi, T. Hosokawa, M., Kuga, S., Wada, T., Horimii, T., and Hashida, S.: A virus isolated in 1935 epidemic of summer encephalitis of Japan. Jap. J. Exper. Med., 14 : 185, 1936.
- 3) Kasahara, S., Ueda, M. Hamano, R., Yamada, R., Okamoto, Y. and Kohno, M.: Experimental studies on epidemic encephalitis. 2. Further transmission test of the Japanese encephalitis. Kitasato Arch., 13 : 248, 1936.
- 4) Rivers, T.M.: Viral and rickettsial infections of man. 2nd Ed. J.B. Lippincott Co., p. 226, 1952.
- 5) Wilson, G.S. and Miles, A.A.: Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity. Fourth Ed. The Williams & Wilkins Co., p. 215, 1955.
- 6) Smith, M.C.: Comparison of activity of viruses of St. Louis and Japanese encephalitis in the chick embryo. Proc. Exper. Biol. & Med., 41 : 323, 1939.
- 7) Howitt, B.F.: Growth of Japanese B encephalitis virus in the yolk of the developing egg. Proc. Soc. Exp. & Med., 62 : 105, 1946.
- 8) Kawakita, Y.: Cultivation in vitro of the virus of Japanese encephalitis. Jap. J. Exp. Med., 17 : 211, 1939.
- 9) Kawakita, Y. and Tazaki, T.: The action of immune serum on the JBE virus cultivated in vitro. Jap. Med. J., 1 : 17, 1938.
- 10) Scherer, W.F. and Syverton, J.T.: The viral range in vitro of a malignant human epithelial cell (Strain HeLa, Gey). II. Studies with encephalitis viruses of the Eastern, Western, West Nile, St. Louis and Japanese B types.

- Amer. J. Patho.*, 30 : 1075, 1954.
- 11) Mason, M.C.: *Growth of Japanese B virus in HeLa cell cultures and inhibition of poliomyelitis virus. Federation Proc.*, 15 : 602, 1956.
 - 12) Mason, M.C.: *Inhibition of poliomyelitis virus by Japanese B encephalitis virus in HeLa tissue culture. Federation Proc.*, 14 : 471, 1955.
 - 13) McCollum, R.W. and Foley, J.F.: *Japanese B encephalitis virus in tissue culture. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 94 : 556, 1957.
 - 14) Lee, H.W., Hinz, R.W. and Scherer, W.F.: *Porcine kidney cell culture for propagation and assay of Japanese encephalitis virus. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 99 : 579, 1958.
 - 15) Diercks, F.H. and Hammon, W.M.: *Hamster kidney cell culture in laboratory aspects of epidemiologic studies on Japanese B encephalitis virus. Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*, 100 : 840, 1959.
 - 16) Inoue, Y.K. and Kato, H.: *Studies on Japanese B encephalitis virus. Virology.*, 16 : 205, 1962.
 - 17) Porterfield, J.S.: *A simple plaque-inhibition test for the study of arthropod-borne virus. Bull. Org. Mond. Sante Bull. Wld. Hlth. Org.*, 22 : 373, 1960.
 - 18) Syverton, J.T. and Scherer, W.F.: *The application of mammalian cells in continuous culture for assays in virology. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 58 : 1056, 1954.
 - 19) Lee, H.W.: *Plaque assay of Japanese encephalitis virus in chick embryo cells and porcine kidney cells. The Korean Central J. Med.*, 11 : 583, 1966.
 - 20) Ross, J.D.: *Laboratory manual of animal cell culture in virology, Department of bacteriology and Immunology. Univ. of Minn.*, p. 13, 1956.
 - 21) Syverton, J.T. and McLaren, L.C.: *Human cells in continuous culture. I. Derivation of cell strain from esophagus, palate, liver and lung. Cancer Research*, 28 : 316, 1957.
 - 22) Read, L.J., and Muench, M.: *A simple method of estimating fifty per cent end points. Am. J. Hyg.*, 27 : 493, 1938.