

# 한국형 낭충봉아 부패병 바이러스(Korean Sacbrood Virus)를 증식 시키고 세포변성효과를 나타내는 Porcine Kidney Cell(PK C4)의 Cloning

권혁진

K. V. 바이오젠

소장

jhmm1123@naver.com

김경태

K. V. 바이오젠

김윤성

K. V. 바이오젠

Abstract : Porcine kidney and Polistinae larval mixed cells were adapted to multiply into Alpha medium at 37°C. Polistinae larval cells were inoculated with Korean sacbrood virus(KSBV) and then porcine kidney cell suspension was added for mixed culture. After 14 days of mixed culture, the early development of the cytopathic effect (CPE) in porcine kidney cells began to appear in the polynuclear cell group. After 41 days, complete CPE was observed and confirmed KSBV proliferated in porcine kidney cells.

Of the porcine kidney cells, 6 clones were selected because they were thought to contain a clone of proliferating KSBV. Among them, by means of the proliferation of KSBV, the clarity of CPE, and the difficulty of reading the results, clone No. 4 was selected and designated as PK C4 cell.

In order to isolate KSBV from the infected larvae, the 10% emulsion of larvae were diluted with 10-fold dilution from 10(-1) to 10(-8) in 96 well microplate and filled with PK C4 cell suspensions(passage 1), transferred 7 days later into new microplate containing PK C4 cells and incubated for another 7 days.(passage 2) After that harvested the virus showing the CPE wells and inoculated into PK C4 cell culture for 3 passage. The virus was isolated from the system and confirmed to be KSBV by PCR.

The confirmed KSBV showed a strong CPE when inoculated in PK C4 cells and propagated well with a maximum titer of 10(8,0) TCID50/0,01ml.

Immune serum of KSBV produced against piglet and serum neutralizing antibody titers were measured using PK C4 cells. This immune serum has been used to identify KSBV-like virus isolated from the infected larvae by serum neutralization test.

Until now, the diagnosis of the larvae suspected of being infected with KSBV-like virus has been limited to PCR methods with low virus detection rates.

PK C4 cells were cloned that KSBV proliferated showing strong CPE and able to investigate the physico-chemical properties of KSBV, detected of KSBV in the infected larvae that could not be detected by PCR method, and highly specific one-way cross serum neutralization test with immune serum against KSBV, can be used to identify isolated KSBV-like viruses. KSBV was certified to be an RNA virus by proliferation in culture medium containing 5-iodo-deoxyuridine.

We also have KSBVs from long-term cultured cells for one year by infected larvae autoculture, and the virus that have been for more than 100 days in PK C4 cell culture. Perhaps these viruses have been attenuated and are planning to investigate whether

can be used to prevent Korean sacbrood disease.

Key words : Alpha mediium, Korean sacbrood virus, cytopathic effect (CPE), one-way serum neutralization test, identification.

## 서론

현재까지 꿀벌의 virus성 질병을 신속하게 진단할 수 있는 세포가 나타나지 않아 연구에 많은 제한을 받아오고 있는 실정이다. 그러나 Kalinin(1972)등<sup>18)</sup>은 세계도처에서 꿀벌유래세포는 물론 이중 숙주세포인 계태아 섬유아(CEF)세포, 돼지신장(PK)세포등 여러 가지 다양한 세포에 Sacbrood virus를 접종하고 세포의 변화를 유도하고 있다고 소개하고 있다.

Virus중에는 조직배양세포에 접종하였을 때 virus 증식의 지표가 되는 세포변성효과 (Cytopathic effect, CPE)를 나타내는 virus가 있고, 나타내지 않은 virus도 있다. CPE를 나타내야 virus가 증식하고 있다는 것이 확인되고, 이 현상을 이용하여 virus의 역가는 물론, 중화항체기도 측정할 수 있어, 질병의 진단을 특이성이 높은 이 중화시험법으로 최후 진단을 할 수 있는 것이다.<sup>15)</sup>

Virus에 관한 연구를 하는 과학자들은 CPE를 나타내지 않은 virus를 조직배양세포에 접종하였을 때 CPE를 나타내게끔 여러가지 방법을 동원하여 찾고 있다.

돼지콜레라 virus(HCV)와 뉴캐슬병 virus(NDV)를 따로 돼지고환세포(ST)에 접종하였을 때 CPE는 나타내지 않으나, ST세포에 HCV를 먼저 접종하여 감염시키고 몇 일후 뉴캐슬병 virus(NDV)로 공격하면 상호 상승작용을 일으켜 CPE를 나타내는 현상으로 이 현상을 이용하여 HCV의 역가와 중화항체기도 측정하는데 이것이 END법(Exaltation of Newcastle Disease Method)인 것이다.<sup>1,2,3,4,5,6,7,8)</sup>

서양종 꿀벌에서 발병하여 피해를 주고 있는 Sacbrood Virus(SBV)는 1913년 미국에서 처음으로 확인되었고,<sup>9)</sup> 동양종 꿀벌에 막대한 피해를 주고 있는 Chinese Sacbrood Virus (CSV)는 1972년 중국에서 발견되었음에도 꿀벌 virus를 배양할 수 있는 세포가 없기 때문에 이들 virus에

대한 연구가 이루어지지 못하고 있었다.<sup>9)</sup>

최근 우리나라와 중국에서는 2일령 토종벌 유충에 CSV를 접종하였을 때 유충을 100% 폐사 시킬 수 있는 그들의 연구 결과를 이용하여 CSV의 병원성 및 물리화학적 성상 등을 조사하여 발표한 바가 있다.<sup>9)</sup>

일찍이 저자 등은 이환자돈의 비장에서 test tube plaque 법으로 형성한 단 한 개의 plaque를 따서 일본뇌염 virus를 분리하고,<sup>20)</sup> 계태아 섬유아세포(CEF)에 300대 연속 계대하여 조직배양순화 약독주를 작성하였으며,<sup>21)</sup> 각종 시험동물에 대한 병원성과,<sup>22)</sup> 돼지에 대한 면역원성을 조사하여 돼지 일본뇌염 생독 백신을 개발한 경험이 있다.<sup>23)</sup>

이러한 경험을 토대로 돼지 신장(PK)세포에서 Cloning한 PK C4세포에 Korean Sacbrood Virus(KSBV)를 접종하면 강력한 CPE를 나타내면서 잘 증식하므로 이를 이용하여 야외 가검 유충에서 KSBV-양 virus의 분리는 물론, PCR 기법으로 확인된 virus를 대량배양하고 자돈에 KSBV에 대한 면역혈청을 생산하며 이를 이용하여 특이성이 높은 중화 시험법으로 분리한 KSBV-양 virus를 동정하는 등 일련의 시험을 실시하였고, KSBV에 감염된 유충세포를 자가배양 (Autoculture)하여 1년간 장기 지속 배양한 virus와 PK C4 세포에 100일 이상 장기 연속계대 배양한 약독화 되었을 거라 생각되는 조직배양순화 virus를 이용하여 꿀벌 유충의 피해를 줄일 수 있는 시험을 진행하고 있어 그 결과를 기대하면서, 그간 실시한 시험 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

- 시험동물 : 자돈
- 벌의 유충 : 토종벌 가검 유충, 쌍살벌 유충
- Virus : 토종벌 유충에서 분리한 Korean Sacbrood Virus (KSBV)와 이 virus를 PK 세포에 장기간 지속 배양하여 순화 시키고 3회 연속 cloning한 RCSV Cl 3 virus.
- 세포배양액 : Sigma사의 Alpha medium에 5% lactalbumin hydrolysate 5%, penicillin 200IU/ml, streptomycin 200ug/ml, fetal bovine serum 5% 가한 것을 사용하였다.
- PK 세포의 cloning : PK 세포의 cloning은 96-well



의 microplate를 사용하여 실시하였다. 세포 부유액을 microplate에 분주하였을 때 가능한 한 한개 well에 한 개의 세포가 들어가게끔 희석하여 배양하고 세포의 증식 상태를 관찰하여 6개의 clone을 따서 증식시켰다.

- Virus 분리 방법 : 가검 유충을 10%로 유제하고 사용할 때 까지 -70℃에 동결보존 하였다. 동결 보존한 유제액을 용해한 후 1,000rpm에 10분간 원심한 후 상청액을 채취하고 0.2um syringe filter로 여과 멸균한다.

Flat bottom의 96-well microplate 각 well에 배양액을 0.1ml/well씩 분주하고 가검 유충 유제액을 10-진법으로 희석한 다음 50만 cell/ml이 함유된 PK C4세포 부유액을 0.1ml씩 분주하고 37℃ CO2-incubator에 배양한다.

- Virus의 역가 측정 방법 : 96-well microplate 각 well에 배양액 0.1ml씩을 분주하고 첫 번째 well에 역가를 측정하고자 할 virus 0.01ml를 가하고 10-진법으로 10(-1)에서 10(-8)까지 희석하고 50만 세포/ml가 함유된 PK C4 세포 부유액 0.1ml/well씩 가한 다음 37℃ CO2-incubator에 배양한다.

매일 CPE출현 여부를 경검 하며 역가측정 7일후 최종 판독하여 Reed and Munch법으로 virus의 역가를 산출한다.<sup>16)</sup>

- 혈청 중화시험법 : 96-well microplate 각 well에 배양액 0.05ml/well씩 분주해 놓고 첫 번째 well에 중화항체를 측정하고자 할 혈청 0.05ml를 가하고 2-진법으로 희석해 놓고 200TCID50/0.05ml가 함유된 KSBV액 0.05ml/well씩 가한 다음 진탕하여 잘 혼합하고 37℃ CO2-incubator에서 2시간 중화시킨다.

중화시키는 동안 약 15분 간격으로 진탕하여 중화가 잘 되도록 한다. 50만 세포/ml가 함유된 PK C4 세포 부유액 0.1ml/well씩 가한 다음 37℃ CO2-incubator에 배양하였다.

매일 경검하여 CPE 출현 여부를 관찰하며 7일후 최종 경검하고 CPE 출현을 억제한 혈청의 최고 희석 배수를 중화항체가로 산출하였다.

- Korean Sacbrood Virus의 핵산결정시험 : KSBV의 핵산결정시험은 Spertzel(1965)등의 방법으로 실시하였다.<sup>17)</sup> 즉 배양액에 5-iodo-deoxyuridine(IUDR) (Sigma,

Chem. Co. USA)가 30ug/ml이 되게 함유시키고, 96-well microplate 각 well에 배양액 0.1ml씩 분주한 다음 여기에 virus를 10-진법으로 희석한 후 PK C4 세포가 50만 cell/ml이 되게 부유시킨 세포 부유액 0.1ml/well씩 분주한 후 37℃ CO2-incubator에 7일간 배양하면서 매일 CPE출현 여부를 관찰하여 분리한 KSBV-양 virus의 핵산결정시험을 실시하였다.

### 시험결과

#### 1. KSBV 배양 및 역가측정용 세포주 선발과정

세포보존용 액체질소에 동결보존중인 쌍살벌 유충세포 1 Ampoule를 Insect medium에 부유시키고 Screw cap glass vial (25x95mm)에 2ml씩 분주한 다음 PCR기법으로 KSBV임이 확인된 감염유충 유제액을 접종하고 3~4일 간격으로 배양액을 교환해 가며 37℃에 회전배양 하였다.

배양액을 3차 교환하고 쌍살벌 유충세포에서 KSBV가 충분히 증식되었을 것이라 생각하고 PK 세포 부유액을 넣고 유충세포와 혼합배양 하였다. 이는 유충세포에서 KSBV가 계속 방출되는 배양액 속에 PK 세포를 배양함으로써 계속하여 KSBV에 접촉하게 되고 중국에는 KSBV가 PK세포에서도 증식되기를 기대하면서 혼합배양을 하고 3~4일 간격으로 배양액을 교환해 가면서 매일 현미경 관찰을 실시하였다.

Table 1. Mutation of Porcine Kidney Cells Mixed Cultivated with Polistinae Larvae Cells Inoculated Korean Sacbrood Virus

Day	Mutation of PK Cell	Remark's
0	-	-
14	Beginning of mutation	CPE emergence showing polynuclear cell group.
41	Complete CPE	Cells are completely destroyed.

PK 세포를 혼합배양한 후 14일이 되는 날 PK 세포에 변화가 나타나기 시작하였다. 세포변성효과(CPE)의 초기에 나타나는 현상인, PK의 단층세포가 융합되어 출현하는 다핵세포군(多核細胞群)이 나타나기 시작했다. CPE는 계속 진행되어 41일 후 거의 완전한 CPE가 출현하였다.

#### 2. PK 세포의 cloning

PK 세포에 KSBV의 역가를 측정하였을 때 CPE가 너무 늦게 나타나고 최종 판독을 하는데 여러 날이 소요되기 때문에 CPE도 빨리 출현하고 최종 판독을 단시일 내에 할 수 있는

세포를 cloning하기로 하였다.

PK 세포에서 cloning한 6개의 clone 세포에 KSBV No. 1 strain과 이 virus를 PK 세포에 장기간 배양하고 3회 연속 cloning한 RCSV Cl 3 strain의 virus의 역가를 측정하고

virus의 증식성, CPE의 선명도 및 결과판독의 난이도 등을 조사한 후 Clone No. 4 세포를 선정하고 PK C4라 명명하였다.

Table 2. Multiplicity of Korean Sacbrood Virus (KSBV No. 1 Strain) in Different Clone Cells of PK Cell Culture

Clone No.	Virus Titer (TCID50/0.01ml)	Growth ability	Clarity of CPE	Reading of Result	Remark's
1	10(5.0)	not good	clear	easy	
2	10(6.0)	not good	not clear	difficult	
3	10(8.0)	good	clear	easy	
4	10(8.0)	good	clear	easy	Selected
5	10(8.0)	good	clear	easy	
6	10(8.0)	good	clear	easy	

Clone No. 1과 2는 virus의 증식성이 안 좋고, Clone No. 3, 4, 5, 6는 virus의 증식성, CPE 선명도, 결과판독 모두

좋으나 그중에서도 Clone No. 4 세포가 더 우수하였다.

Table 3. Multiplicity of Korean Sacbrood Virus (RCSV Cl 3 Strain) in Different Clone Cells of PK C4 Cell Culture

Clone No.	Virus Titer (TCID50/0.01ml)	Growth ability	Clarity of CPE	Reading of Result	Remark's
1	10(5.0)	not good	clear	easy	
2	10(5.0)	not good	not clear	difficult	
3	10(6.0)	not good	clear	easy	
4	10(7.0)	good	clear	easy	Selected
5	10(8.0)	good	clear	difficult	
6	10(8.0)	good	clear	difficult	

KSBV No. 1 strain과 RCSV Cl 3 strain의 virus역가 측정결과와 CPE의 선명도 및 결과판독의 난이도등을 비교분

석한 성적에 의해 Clone No. 4를 KSBV의 대량배양 및 역가측정용 세포로 선정하고 PK C4로 표기하기로 하였다.

### 3. PK C4 세포를 이용한 KSBV 분리

가. 가검유충 세포를 직접 배양하는 자가배양법 (Autoculture)에 의한 분리하는 방법과 감염 유충 유제액을 쌍살벌 유충세포에 접종하여 분리하는 방법을 사용하였다.

Korean Sacbrood virus에 감염된 것으로 의심되는 가검 유충을 2016. 9. 30일자 입수하게 되었다.

가검 유충의 일부는 10% 유제액(No. 1)을 만들고 쌍살벌 유충세포 부유액을 Screw cap glass vial에 2ml씩 분주와 동시에 접종하고, 나머지 유충은 통상적인 배양법으로 세포를 배양 하였다.

가검 유충을 가위로 세절하고 배양액에 부유시킨 다음

Screw cap glass vial (25x96mm)에 2ml씩 분주하고 37°C-incubator에 각각 회전배양하고 3~4일 간격으로 배양액을 교환해 가며 배양을 지속해 왔다.

PK C4 세포를 이용하여, 2017.9.15.~22일자 채득한 배양액에서 KSBV의 분리를 시도하였다.

96-well microplate 각 well에 배양액 0.1ml씩 분주하고 채득한 감염배양액을 10-진법으로 희석한 후 PK C4 세포 부유액 0.1ml씩 분주하고 CO2-incubator에 배양하였다.

표 4.에 나타난 바와 같이 자가배양(Autoculture)세포에



Table 4. Isolation of Korean Sacbrood-like Virus from Autoculture of Infected Larvae Using PK C4 Cell Culture, 2017. 9. 15~22, Harvest (1 G.)

Virus	10(-1)	10(-2)	10(-3)	10(-4)	10(-5)	10(-6)	10(-7)	10(-8)
Autoculture	-	-	-	-	-	-	-	-
Emulsion No. 1	-	-	-	-	-	-	-	-

서 채독한 배양액과 유충유제액(No. 1)을 접종한 쌍살벌 세포에서 채독한 배양액을 회석하여 접종한 배양액 모두에서

virus 증식의 흔적을 찾아볼 수 없었다.

PK C4세포 부유액을 96-well microplate 각 well에 0.1ml 씩 분주하고 [KSBV 분리 1대]의 배양액 0.01ml씩을 그대로

옮겨 접종하여 배양하였다.

Table 5. Isolation of Korean Sacbrood-like Virus from Autoculture of Infected Larvae Using PK C4 Cell Culture, 2017. 9. 15.~22, Harvest (2 G.)

Virus	10(-1)	10(-2)	10(-3)	10(-4)	10(-5)	10(-6)	10(-7)	10(-8)
Autoculture	1+*	4+	4+	-	-	-	1+	-
Emulsion No. 1	-	-	-	-	4+	-	-	-

\*Days since CPE appeared PL

표 5.에 나타난 바와 같이 Autoculture한 배양액의 10(-1), 10(-2), 10(-3) 및 10(-7)에서 CPE가 출현하여 virus가 증식되고 있음이 확인 되었고, 가검유충 유제액(No. 1)을 접종

한 10(-5)에서도 virus가 검출되었다.

CPE가 출현한 well의 감염 배양액을 각각 채독하여 혼합하고 PK C4 세포에 3대 계대한 virus의 역가를 측정하였다.

Table 6. Isolation of Korean Sacbrood-like Virus from Autoculture of Infected Larvae Using PK C4 Cell Culture, 2017. 9. 15.~22, Harvest (3 G.)

Virus	10(-1)	10(-2)	10(-3)	10(-4)	10(-5)	10(-6)	10(-7)	10(-8)
Auto-, 3 G.	3+*	3+	3+	4+	-	-	-	-
Emul, 3 G.	3+	3+	3+	4+	-	-	-	-

\*Days since CPE appeared PL

분리한 virus가 KSBV임을 확인하기 위하여 KSBV에 대한

면역혈청으로 중화시험을 실시하였다.

Table 7. One-Way Serum Neutralization Test of Isolated Korean Sacbrood-like Virus

Virus	Description	SN Antibody Titer	Remark's
KSBV	Known KSBV	256	
Autoculture	PK C4, 3 G.	128	
Emulsion No. 1	PK C4, 3 G.	256	

2016. 9. 30일자 가검 유충을 자가 배양하고, 감염유충의 유제액(No. 1)을 쌍살벌 유충세포에 접종한 후 3~4일 간격으로 배양액을 교환해 가며 장기배양을 해 오다 2017. 9. 15~22일자 채독한 감염배양액에서 KSBV-양 virus를 분리

하고 KSBV에 대한 항혈청으로 기지의 KSBV와 교차중화시험을 실시하여 분리한 virus가 KSBV임을 동정하였다.

같은 방법으로 2017. 9. 22~28일자 채독한 배양액에서도 동일한 성적을 얻었다.

2017. 9. 8일자 6예(A, B, C, D, E, F)의 가검유충을 입수 하고 직접 PK C4 세포를 이용하여 KSBV-양 virus의 분리 를 시도하였다.

Table 8. Isolation of Korean Sacbrood-like Virus from Infected Larvae Using PK C4 Cell Culture (1 G.)

Emulsion(10%)	10(-1)	10(-2)	10(-3)	10(-4)	10(-5)	10(-6)	10(-7)	10(-8)
A	3+*	6+	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	3+	4+	-	-
C	6+	7+	6+	-	-	-	-	-
D	6+	-	-	-	-	-	-	-
E	6+	-	-	-	-	-	-	9+
F	6+	6+	6+	-	7+	6+	-	6+

\* Days since CPE appeared PI.

시험동물과 달리 조직배양세포에 virus의 역가를 측정하였을 때는 virus의 농도가 높은 희석배수부터 순차적으로, 한 계가 분명하게(clear cut) CPE를 나타내는 것이 상예이나, 숙주세포가 달라서인지 CPE가 불규칙하게 나타났다.

새로운 microplate 각 well에 PK C4 세포 부유액 0.1ml씩 분주하고 [KSBV 분리 1대]를 그대로 0.01ml씩을 옮겨 접종 하였다.

Table 9. Isolation of Korean Sacbrood-like Virus from Infected Larvae Using PK C4 Cell Culture (2 G.)

Emulsion(10%)	10(-1)	10(-2)	10(-3)	10(-4)	10(-5)	10(-6)	10(-7)	10(-8)
A	1+*	1+	3+	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	3+	6+	-	-
C	1+	3+	1+	-	-	-	-	-
D	1+	-	-	4+	-	-	-	-
E	1+	3+	-	3+	-	-	-	3+
F	1+	3+	3+	-	3+	3+	3+	3+

\*Days since CPE appeared PI.

대체로 [virus분리 1대] 때와 비슷하게 CPE가 출현하였으나 접종 후 CPE 출현경과 일수가 줄어들고 새롭게 CPE를 나타내는 well도 늘었다. 가검 유충 B의 경우 실제 10(6.0) TCID50/0.01ml의 높은 역가의 virus를 함유하고 있으나 통상적인 방법으로 virus분리를 시도하면 분리를 놓칠 수 있는 예이다.

가검 유충 별로 CPE가 출현한 well의 배양액을 채독하여 혼합하고 이것을 종독 으로 사용하였다. PK 세포 부유액 20ml씩을 6개의 배양병에 분주와 동시에 종독 0.2ml씩을 접종하고 CPE가 약 80% 출현하였을 때 채독하고 역가를 측정 한 결과는 표 10과 같다.

Table 10. Multiplicity of Korean Sacbrood-like Virus isolated from Infected Honey Bee Larvae Using PK C4 Cell Culture

Virus	10(-1)	10(-2)	10(-3)	10(-4)	10(-5)	10(-6)	10(-7)	10(-8)
A. PK C4, 3 G.	3+*	3+	3+	3+	7+	7+	-	-
B. PK C4, 3 G.	3+	3+	3+	3+	3+	7+	-	-
C. PK C4, 3 G.	3+	3+	3+	3+	3+	7+	-	-
D. PK C4, 3 G.	3+	3+	3+	3+	7+	7+	-	-
E. PK C4, 3 G.	3+	3+	3+	3+	7+	7+	-	-
F. PK C4, 3 G.	3+	3+	3+	3+	7+	7+	7+	-

\*Days since CPE appeared PI.



PK C4세포에 3대 계대되는 동안 적응되었음인지 들쭉날쭉 입이 없이 CPE가 virus함량이 높은 10(-1)희석에서부터

순차적으로 깨끗하게 나타내고 있다. 이러한 과정을 거쳐서 가검 유충에서 KSBV-양 virus를 분리하게 되었다.

4. 가검유충에서 분리한 Korean Sacbrood-양 Virus의 동정시험

가) PCR 기법에 의한 동정

가검 유충 A, C, E의 10% 유제액과 B, D, F의 가검유충 유제액을 PK C4 세포에 3대 계대한 조직배양세포 감염배양액

을 PCR기법으로 조사한 성적은 다음 표 11과 같다.

Table 11. Comparison of Sensitivity between PCR Technique and Tissue Culture Cell Inoculation Method in Isolation of Korean Sacbrood Virus from Infected Honey Bee Larvae.

Materials	PCR Technique	Copies/1 ul	TCID50/0.01ml	Remarks
A.10% Emulsion	Negative	-	10(3.0)	
B. Inf. TC Fluid	Positive	7.10 x 10(2)	10(6.0)	
C.10% Emulsion	Negative	-	10(6.0)	
D. Inf. TC Fluid	Positive	4.44 x 10(3)	10(6.0)	
E.10% Emulsion	Negative	-	10(4.0)	
F. Inf. TC Fluid	Positive	9.70 x 10(1)	10(7.0)	
Id.KSBV TC Flu.	Negative	-	10(7.0)	Inf. TC Flu.

가검 유충 유제액을 PK C4 세포에 직접 접종하여 증식시킨 B, D, F의 감염 배양액에서 PCR검사결과 양성으로 나타나서 분리된 virus가 KSBV라는 것은 판정되었으나, 가검 유충 유제액 A, C, E,와 기지 KSBV의 조직배양세포 감염 배양액은 10(3.0)TCID50/0.01ml, 10(6.0) TCID50/0.01ml,

10(4.0)TCID50/0.01ml 및 10(7.0)TCID50/0.01ml의 높은 virus를 함유하고 있음에도 불구하고 음성의 결과가 나온 것은 가검 유충에서 KSBV-양 virus를 분리함에 있어, PCR 기법은 PK C4 세포접종법에 비해 감도가 훨씬 낮은 것으로 생각된다.

나) 중화시험법에 의한 동정

1) KSBV의 자돈에 대한 면역혈청 생산

중화시험을 하기 위해서는 면역혈청이 있어야 하므로 기지의 KSBV로 자돈에 대한 면역혈청을 생산하기로 하였다. 구입한 자돈 2두의 체온을 측정하고 일 일간 임상관찰을 실시

하였으며, 이상이 없음을 확인한 후 virus를 접종하여 면역시키기 시작했다.

Table 12. Immune Serum Production of Korean Sacbrood Virus against Piglet

Days of Post-inoculation of KSBV and Serum Neutralizing Antibody Titers					
Piglet No.	0 day*	7 day	14 day**	21 day	35 day
1	8	2	2	256	256
2	8	2	2	256	256

\* KSBV inoculation. \*\* Booster inoculation.

Virus 접종전 KSBV에 대한 중화항체는 자돈 1, 2호 공히 8배를 나타냈으나 이는 비 특이항체로 생각하였다. 이들 자돈에 10(8.0)TCID50/두의 KSBV를 접종하였다. 7일 간격

으로 채혈하고 측정한 중화항체는 자돈 1, 2호 모두 7일후에 2배를 나타냈고, 14일까지 2배의 항체를 유지하였다. 이들 자돈에 5x10(8.3)TCID50/두의 KSBV를 보강접종하

고 1주일 후에 측정된 중화항체가는 급속히 256배로 상승하였고 보강접종 2주후에도 256배의 중화항체가를 유지하

고 있어서 전(全) 채혈하고 혈청을 분리하여 KSBV의 자돈에 대한 면역혈청을 생산하였다.

Table 13. One-Way Cross Serum Neutralization Test of Known Korean Sacbrood Virus, Isolates and Tissue Culture Attenuated RCSV Cl 3 Virus against KSBV Immune Serum

Virus	Description	SN Antibody Titer	Remark's
KSBV	Known KSBV	256	Antiserum diluted by 2-fold
A	Isolate	128	dilution method.
B	Isolate	128	
C	Isolate	128	
D	Isolate	128	
E	Isolate	128	
F	Isolate	128	
RCSV Cl 3	TC Attenuated	64	

중화시험결과 기지(既知) KSBV의 중화항체가 256배, 분리한 virus A~F의 중화항체가 128배 및 조직배양세포 순화 virus인 RCSV Cl 3 virus에 대한 중화항체가 64배로, 중화

항체가의 희석배수 한 계단씩의 차이는 있으나 완전 교차중화가 성립되어 분리한 virus 모두 KSBV로 동정되었다.

5. KSBV(유충 제 1 주)의 PK C4 세포에서의 증식곡선  
KSBV의 PK C4 세포에서의 증식곡선을 조사하기 위하여 PK C4 세포 부유액 분주와 동시에 기지의 KSBV(유충 제 1

주) 10(3.0)TCID<sub>50</sub>/ml의 중독을 접종하고 매일 그 일부를 채독하고 역가를 측정하여 KSBV의 PK C4 세포에서의 증식곡선을 조사하였다.

Table 14. Growth Curve of Known Korean Sacbrood Virus in PK C4 Cell Culture

Virus	Cell	Inoculum	Harv.(Day)	TCID <sub>50</sub> /0.01ml
			1	10(2.0)
			2	10(3.0)
			3	10(5.0)
KSBV(Strain 1)	PK C4	10(3.0)TCID <sub>50</sub> /ml	4	10(6.0)
			5	10(8.0)
			6	10(8.0)
			7	10(7.0)

표 14.에 나타난 바와 같이 virus접종 후 제 1 일에는 10(2.0)TCID<sub>50</sub>/0.01ml의 역가를 보이던 것이 날이 지날수록 virus의 역가가 상승하다가 제 5일 후에는 10(8.0)TCID<sub>50</sub>/ 0.01ml로 최고의 역가를 보였고, 제 6일 후 까지

지속되었다. 제 7일 후에는 10(7.0) TCID<sub>50</sub>/0.01ml로 virus의 역가는 약간 하강하였으나 이는 CPE가 진행되어 세포가 많이 사멸되었기 때문인 것으로 생각된다.

6. KSBV (유충 제 1 주)의 물리화학적 성상  
PK C4 세포를 이용하여 많은 양의 KSBV를 배양하고 채독한 virus의 역가의 측정은 물론 KSBV의 물리화학적 성상

을 사상 처음으로 조직배양세포를 이용하여 조사하게 되었다.



Table 15. Physico-Chemical Properties of Korean Sacbrood Virus

Virus	Treatment	Virus Titer(TCID50/0.01ml)	Remark's
	None	10(6.0)	-
	Chloroform, 10 min.	10(5.0)	Not influenced
KSBV(No. 1)	50°C, for 1 hr.	10(6.0)	Not influenced
	60°C, for 1 hr.	10(2.0)	Influenced
	70°C, for 1 hr.	< 10(1.0)	Inactivated

표 15.에 나타난 바와 같이 Chloroform 처리와 50°C 1시간 처리에는 영향을 받지 않았고, 60°C 1시간 처리부터는 영향

을 받았고 70°C 1시간 처리에 virus는 완전히 불활화 되었다.

7. KSBV (유충 제 1주)의 pH에 대한 영향

KSBV의 pH에 대한 영향을 조사하기 위하여 pH를 3.0~8.0까지 달리하고 실온에서 1시간 처리 후 virus의 역

가를 측정하여 KSBV의 pH에 대한 영향을 조사하였다.

Table 16. Influence of Korean Sacbrood Virus on Different pH

Virus	Treatment on pH	Virus Titer(TCID50/0.01ml)	Remark's
	None	10(6.0)	Not influenced
	3.0	10(6.0)	Not influenced
KSBV(No. 1)	5.7	10(6.0)	Not influenced
	6.5	10(6.0)	Not influenced
	7.2	10(6.0)	Not influenced
	8.0	10(6.0)	Not influenced

표 16.에 나타난 바와 같이 KSBV는 pH 3.0~8.0으로 달리

하여 처리해도 전혀 영향을 받지 않았다.

8. KSBV(유충 제 1 주 및 RCSV CI 3 주)의 핵산결정시험

KSBV(유충 제 1 주 및 RCSV CI 3 주)를 IUDR가 30ug/ml 함유된 배양액에 10-진법으로 희석하고 PK C4 세포 부유액을 가한 다음 37°C CO2-incubator에 배양하고 7일후

최종 판독하여 KSBV의 IUDR에 미치는 영향을 조사하여 핵산결정시험을 실시하였다.

Table 17. Nucleic Acid Determination Test of Korean Sacbrood Virus

Virus	Treatment	Virus Titer(TCID50/0.01ml)	Remark's
KSBV(No. 1)	None	10(6.0)	
	IUDR	10(6.0)	Not influenced
RCSV CI 3	None	10(7.0)	
	IUDR	10(7.0)	Not influenced

KSBV(유충 제 1 주 및 RCSV CI 3 주) 모두 IUDR가 함유된 배양액으로 역가를 측정하여 배양해도 virus증식에 하등

의 영향을 받지 않아 이들 KSBV는 모두 RNA임이 입증되었다.