

## END법을 이용한 돼지콜레라바이러스 및 이에 대한 중화항체가 측정법 개량에 대한 시험

권혁진·윤석민·하용공·조성수·김교종·윤지병\*

END(Exaltation of Newcastle Disease Virus) 법이란 돼지고환(swing testicle ST)세포에 돼지 콜레라(hog cholera: HC)바이러스를 접종하여 일정기간 배양한후 뉴캐슬병(Newcastle disease: ND)바이러스로 공격하였을 때 HC바이러스에 의하여 ND바이러스의 병원성이 증가함으로써 세포변성효과(CPE)가 나타나는 현상을 이용하여 HC바이러스의 역가 및 이에 대한 중화항체가를 측정하는 방법을 말한다.

지금까지 실시해온 END방법은 약 30일령의 자돈으로 부터 준비한 ST세포를 배양액  $\text{mL}$ 당  $2.5 \times 10^6$  cells이 되도록 사용하였으며 세포증식용 배양액은 0.5% Lactalbumin hydrolysate, 20% 소혈청(bovine serum: BS), 0.028%  $\text{NaHCO}_3$  및 항생제(penicillin 200IU/mL, streptomycin 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )가 함유되어 있는 Eagle배양액을 사용하였다. 그러나 이와같은 종전의 방법으로 HC바이러스 역가를 측정하거나 중화항체가를 측정하기 위하여 세포를 배양하였을 때 세포의 증식이 잘되지 않거나 혹은 세포가 증식하다가도 죽는 경우가 있어 END법을 실시하는데 많은 어려움이 있었다. 저자 등은 이러한 문제점을 해결하기 위하여 END법 및 이를 이용한 HC바이러스에 대한 중화항체가 측정법을 개량하였던 바 그 성적을 보고한다.

Table 1은 지금까지 사용되어온 END방법과 새로 개량한 END방법의 차이를 보여주고 있다.

즉, 새로 개량된 END방법에서 ST세포는 9~20일령 전후의 자돈에서 채취한 것을 사용하였으며 세포는 Trypsin-Versine(TV)용액으로 15분 간격으로 소화시켰다. 세포증식용 배양액은 비필수아미노산이 함유된 Eagle배양액에 재래혹산양혈청(Goat serum: GS)과 우태아혈청(FBS: Commonwealth Serum Laboratories)이 각각 10%되도록 첨가하였으며 Lactalbumin hydrolysate(0.5%), 항생제(penicillin 200IU/mL, streptomycin 200IU/mL) 및  $\text{NaHCO}_3$ (0.03%)를 첨가하였다. S-T세포를 세포증식용 배양액  $\text{mL}$ 당  $1 \times 10^6$  cells 되게 부유시켰다.

END양성( $E^+$ ) HC바이러스(ALD 및 LOM  $E^+$ 주)의 역가를 측정하기 위하여 조직배양용 시험관(10mm  $\times$  100mm)에 ST세포부유액 0.05mL분주하고 10진법으로 희석한 바이러스를 각각 4개의 시험관에 접종하여 73°C에 2일간 정치배양하였다. 2일간의 정치배양후 FBS 20%, Sodium pyruvate 10mg/mL,  $\text{NaHCO}_3$  0.075% 및 항생제가 함유되어 있는 새로운 Eagle 배양액을 시험관당 0.25mL씩 보충한뒤 37°C에서 2일간 정치배양하였다. 2일후 배양액을 제거하고 보충용 배양액을 사용하여 1:50으로 희석한 ND바이러스를 시험관당 0.5mL씩 첨가하여 공격한후 37°C에서 2~3일간 회전배양하면서 CPE출현 유무를 관찰하고 그 결과를 Reed와 Muench법으로 계산하여 HC  $E^+$  바이러스의 역가를 측정하였으며 이러한 현상을 이용하여 중화항체가도 측정하였다.

\* 중앙가축전염병연구소

**Table 1.** Comparison of Conventional and improved END Method

Description	Conventional END		Improved END	
Culture vessel	Test tube (10mm × 100mm)		Test tube (10mm × 100mm)	96-well microplate
Source of swine testicle	30-day-old piglet		9-20-day-old piglet	
Trypsinizaion	0.25% trypsin		1xTV solution	
HC virus used titration and serum neutralization test	E <sup>+</sup> virus		E <sup>+</sup> virus	E <sup>-</sup> virus
Growth medium :				
Eagle medium	80%		80%	
Bovine serum	20%		-	
Goat serum	-		10%	
Fetal bovine serum	-		10%	
Lactalbumin hydrolysate	0.5%		0.5%	
NaHCO <sub>3</sub>	0.028%		0.03%	
Supplemental medium :				
Eagle medium	80%		80%	80%
Bovine serum	20%		-	-
Fetal bovine serum	-		20%	20%
Sodium pyruvate	-		10mg/ml	20mg/ml
L-arginine	-		20mg/ml	40mg/ml
Lactalbumin hydrolysate	0.5%		0.5%	0.5%
NaHCO <sub>3</sub>	0.056%		0.075%	0.15%
Challenge virus	NDV		NDV	WEE
Culture method	Rollr		Rollr	Stationary

**Table 2.** Comparative Titration of Serum Neutralizing Antibody Against Different Strains of HC Virus

Porcine serum No.	Serum neutralizing antibody titers against		
	A L D	LOM E <sup>+</sup>	LOM E <sup>-</sup>
A	<1	<1	<1
B	16	16	16
C	32	40	80
D	200	200	320
E	250	250	800
F	130	200	250
G	1,280	1,600	2,560

ND바이러스는 10일령 발육란에 10<sup>5</sup> EID<sub>50</sub>/0.1ml 되도록 접종하고 37°C에서 40시간 배양한후 채득한 Miyadera주를 사용하였다. END음성(E<sup>-</sup>) HC바이러스의 역가를 측정하기 위하여 세포증식용 배양액을 이용하여 10진법으로 희석한 바

이러스용액을 HC세포부유액이 well당 0.1ml씩 분주되어 있는 96-well-microplate의 4개 well에 0.1ml씩 접종한 다음 desiccator로 옮기고 candle 방법으로 산소를 제거한후 37°C에서 2일간 배양하였다. 2일후 Eagle배양액에 lactalbumin hydrolysate 0.5%, FBS,40%, sodium pyruvate 20mg/ml, L-arginine 40mg/ml 및 NaHCO<sub>3</sub> 0.15%가 첨가되어 있는 배양액을 well당 0.05ml씩 보충하고 같은 방법으로 37°C에서 2일간 배양하였다. 통산 4일후 배양액을 제거하고 ND바이러스 희석에 사용한 배양액과 동일한 배양액에 Western equine encephalitis(WEE)바이러스를 100TCID<sub>50</sub>/ml되게 희석한 것을 well당 0.1ml씩 공격하고 동일한 방법으로 37°C에서 2일간 배양한 다음 WEE바이러스의 CPE출현을 억제하는 현상(WEE바이러스의 증식을 간섭)을 관찰하여 HC E<sup>-</sup> 바이러스의 역가를 측정하였으며 이러한 현

상을 이용하여 중화항체가도 측정하였다.

HC바이러스 ALD주, LOM E<sup>+</sup> 및 LOM E<sup>-</sup>주 등 3개의 다른 바이러스주를 사용하여 7개의 돼지 가검혈청에 함유되어 있는 NH바이러스 중화항체를 비교 측정하였다. Table 2에 나타낸 바와같이 중화항체가에는 큰 차이는 나타나지 않았으나 ALD주 바이러스 및 LOM E<sup>+</sup>주 보다는 LOM E<sup>-</sup>주 바이러스로 중화항체를 측정하였을 때 약간 높은 중화항체를 나타냈다.

소 바이러스성 하리증(BVD)바이러스는 HC바이러스와 공통항원을 가지고 있으므로 BVD바이러스에 감염된 뒤 회복된 소의 혈청을 이용하여 HC바이러스를 증식시킬 수 없음은 잘 알려져 있는 사실이다.<sup>6)</sup> 또한 산양은 BVD바이러스에 감염되는 예가 드물기 때문에 END법을 실시하는데 GS를 사용하는 것이 좋다는 것도 잘 알려져 있다.<sup>7)</sup> 전술한 바도 있거니와 ST세포를 BS나 GS만을 사용하여 증식시킬 때 세포증식이 잘되지 않은 경우도 있고 또한 세포증식은 잘되거나 유지는 잘되지 않는다. 따라서 본 시험에서는 GS와 FBS를 동량 혼합한 것을 20% 되도록 첨가한 세포증식용 배양액을 사용하여 ST세포를 증식시키고 보충하고 ND바이러스 혹은 WE-E바이러스로 공격할 때의 혈청은 FBS만 20% 첨가하고 sodium pyruvate와 L-arginine를 첨가함으로써 ST세포를 시험이 종료될 때까지 유지시킬 수 있었다.

HC바이러스에 대한 중화항체를 측정함에 있어서는 통상 ALD주를 사용하나<sup>4)</sup> HC E<sup>+</sup> 바이러스를 이용하여 중화항체를 측정할 경우에는 ND바이러스로 공격한 후 회전배양을 해야만 CPE가 명확하게 출현하기 때문에 배양용기는 4부시험관을 사용해야만 된다. 저자 등은 시간, 노력 및 시약을 절약하는 의미에서 중화시험용 바이러스는 LOM E<sup>-</sup>바이러스를 이용하고 배양용기는 96-well-microplate를 사용하여 HC바이러스에 대한 중화항체를 용이하게 측정할 수 있었다. LOM E<sup>-</sup>바이러스를 사용하여 바이러스에 대한 중화항체를 측정하였을 때 ALD주나 LOM E<sup>+</sup>주바이러스를 사용하여 중화항체를 측정하였을 때보다 중화항체가 약간 높은 경

향이 있는데 이것은 세포부유액과 접종량이 0.1ml로 동일하고, 배양용기로 96-well-microplate를 사용하므로 4부시험관을 사용하는 것보다 감수성이 높는데 기인하는 것으로 생각된다.

숫돼지를 거세하지 않고 사육하는 양돈장은 거의 없어 END법에 적당한 30일령 숫돼지를 구하기가 어려운 실정이다. 그리하여 저자 등은 9~20일령 전후의 자돈고환을 이용하였으며 세포는 일령이 어린것일수록 잘 증식하기 때문에 세포의 수도 배양액 ml당  $1 \times 10^6$  cells로 부유시켰다. GS와 FBS는 동량혼합한 것을 20%와 Sodium pyruvate 및 L-arginine첨가된 배양액으로 ST세포를 증식시키고 FBS 20%와 Sodium pyruvate 및 L-arginine이 첨가된 배양액으로 보충하여 ST세포를 양호한 상태로 유지시킬 수 있었다. ND바이러스와 WEE바이러스로 공격할 때 사용하였던 동일한 배양액을 사용함으로써 HC E<sup>+</sup> 및 E<sup>-</sup>바이러스의 역가를 용이하게 측정할 수 있었으며 LOM E<sup>-</sup>바이러스를 이용하여 HC바이러스에 대한 중화항체가도 간편하고 손쉽게 측정할 수 있었다.

## References

1. Kumagai, T., Shimizu, T. and Matumoto, M. : Detection of hog cholera virus by its effect on Newcastle disease virus in swine tissue culture, Science., (1958) 128 : 366.
2. Kumagai, T., Shimizu, T., Ikeda, S. and Matumoto, M. : A new *in vitro* method(END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. I. Establishment of standard procedure, J. Immuno., (1961) 87 : 245~256.
3. Matumoto, M., Kumagai, T., Shimizu, T. and Ikeda, S. : A new *in vitro* method(END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. II. Some characteristics of END method, J. Immuno., (1961) 87 : 257~268.
4. Shimizu, T., Kumagai, T., Ikeda, S. and Matumoto, M. : A new *in vitro* method(END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. III. END neutralization test, Arch. ges virus forsch., (1964) 14 : 215~226.

5. Kumagai, T., Shimizu, T., Ikeda, S. and Matumoto, M. : A new *in vitro* method(END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. IV. Reappraisal of effect of serum in culture medium and time of challenge with ND virus, National Institute of Animal Health, (1964) 135~144.
6. Kumagai, T., Shimizu, T., Ikeda, S. and Matumoto, M. : Technical improvement of the END method, Arch ges virusforsch, (1964) 14 : 697~699.
7. Loan, R. W. : Increased sensitivity of END(Exaltation of Newcastle Disease virus) test for hog cholera virus, Am. J. Vet. Res., (1965) 26 : 1110~1113.

## Improvement of Titration Method for Hog Cholera Virus and its Serum Neutralizing Anitbody by Means of END Method

Hyock-Jin Kwon, Seok-Min Yoon, Rung-Kong Ha, Sung-Soo Cho,  
Kgo-Jong Kim and Ji-Byung Yoon

Choong-Ang Animal Disease Laboratory

### Abstract

The END method for titration of hog cholera virus and its serum neutralizing antibody was improved using ST cells grown and kept in modified media.

ST cells were grown in Eagles media containing 0.5% lactalbumin hydrolysate, 10% fetal bovine serum, 10% goat serum, 0.03% NaHCO<sub>3</sub> and antibiotics(penicillin 200IU/mg, streptomycin 200 μg/ml).

Supplemental medium was as same as growth medium except for 20% FBS, sodium pyruvate 10mg/ml, L-arginine 20mg/ml, 0.075% NaHCO<sub>3</sub>(for test tube) or 40% FBS, sodium pyruvate 20mg/ml, L-arginine 40mg/ml, 0.15% NaHCO<sub>3</sub>(for microplate).

Serum neutralizing antibody titers of porcine sera were compared using 3 different strains of hog cholera virus(ALD, HC E<sup>+</sup> and E<sup>-</sup> strain).

There was only minor difference in serum neutralizing antibody titer.

The serum neutralizing antibody was titrated easily and quickly by improved method utilizing hog cholera E<sup>-</sup> virus and microplate.