

韓國産 軟化病 바이러스의 分離 및 性狀

金槿榮 · 姜錫宇 · 姜錫權* · 金洛相**

農村振興廳 蠶業試驗場, *서울대학교 農科大學, **慶北蠶種場

Characterization of Flacherie Virus of the Silkworm, *Bombyx mori*, isolated in Korea

Keun Young Kim, Suk Woo Kang, Seok Kwon Kang* and Rack Sang Kim**

Sericultural Experiment Station, RDA, Suwon, Korea. *College of Agriculture, Seoul National Univ., Suwon, Korea.

**Kyungpook Provincial Sericultural Experiment Station, Sangju, Korea

Summary

The flacherie virus(FV) was isolated from the diseased larvae with flaccidity symptoms of the silkworm, *Bombyx mori*, which were collected in Hyangnam, Kyunggi Province and in Youcheon, Kyungpook Province. The properties of the virus were investigated and compared with the Japanese FV in morphology, size, nucleic acid and structural proteins. The Hyangnam isolate had a diameter of 27 ± 1.7 nm with spherical shape and contained RNA of which the electrophoretic pattern was same as that of the Japanese FV. The virus had four structural proteins and their molecular weight were estimated as 35,000, 33,000, 31,000, and 11,400 daltons, respectively. The Youcheon isolate had two different sizes in diameter of 27 ± 1.7 nm and 21 ± 0.8 nm. The antigenicity of the Hyangnam isolate was proved to be identical to that of Japanese FV, whereas the antisera against the Youcheon isolate (mixed with two different sizes) reacted with Japanese FV and densovirus type 1, respectively. From these characteristics of the isolated viruses, it was concluded that the Hyangnam isolate was identical to the Japanese FV and the Youcheon isolate contained the same viruses as the Japanese FV and DNV-1.

I. 序 論

누에 바이러스性 軟化病은 中腸 皮膜細胞에 增殖하는 直徑 27 nm 크기의 軟化病 바이러스(Flacherie virus, 이하 FV)에 의해 發生하며, 이 病은 違作의 가장 큰 要因으로 작용함으로써 양잠농가에 극심한 피해를 주는 누에疾病의 하나이다.

從來 軟化病은 細菌 및 生理的 障礙에 의해 發生하는 것으로 여겨져 왔으나, Paillot(1929)에 의해 바이러스에 의한 病임이 최초로 지적되었고, 山崎 등(1960) 및 點澤(啓) 등(1964)은 대규모 위작농가에서

採取한 罹病蠶를 조사한 결과 이 病은 전염성이 있는 30-32 nm의 球形 바이러스에 의한 것임을 확인하여, 이러한 바이러스에 의한 연화병을 細菌 및 生理 障礙에 의한 연화병과 구별하기 위하여 “바이러스性 軟化病” 혹은 “傳染性 軟化病”으로 名命하였다.

1960년대부터 1970년대에 걸쳐 일본 잠업에서 위작의 가장 큰 요인으로 작용한 바이러스성 연화병에 관한 연구는 그 당시 바이러스 分離, 精製法이 완전히 확립되지 않아 주로 發生生態(田中·清水 1965, 山崎 등 1965, 細田 등 1966, 荒武·柏村 1973, 荒武 등 1973, 荒武·柏村 1974 a.b, 渡部 1976), 防除法(點澤

(啓) 등 1964, 渡邊 등 1968, 渡部 1976), 蠶品種의 抵抗力(宇治川 · 有賀 1966, 大井 등 1967, 船田 1968, 荒武 1974, 渡部 1976), 診斷法(點澤(啓) 등 1964, 岩下 1965, 井上 · 點澤 1971, 1972) 등 실용적인 측면에서 연구가 이루어 졌다. 그 후 바이러스 분리 정제법의 개선과 함께 바이러스의 形態 및 性狀에 대해 명확히 밝혀지게 되어 川瀨 등(1980)은 바이러스의 形態 및 크기가 27 ± 2 nm의 균일한 球形粒子임을 확인하였다.

바이러스 性狀에 關한 研究로 構成 蛋白質에 있어서는 川瀨 등(198)은 4종류의 polypeptide로 구성되어 있으며 각각의 分子量은 31,000-32,000(VP₁), 41,000-42,000(VP₂), 49,000(VP₃) 및 68,000-69,000 dalton(VP₄)라고 한 반면 Hashimoto & Kawase(1983) 및 崔 (1989)는 35,200(VP₁), 33,000(VP₂), 31,200(VP₃), 11,600(VP₄) dalton의 4종류의 polypeptide로 구성되어 있다고 하였다.

바이러스 核酸에 關하여 Kawase *et al.* (1974)은 분자량이 2×10^6 dalton의 單鎖 RNA라고 하였으나 그 후 川瀨 등(1980)은 그 분자량이 2.4×10^6 dalton 이라고 보고하였으며, Hu *et al.* (1988)은 바이러스 핵산을 전자현미경으로 관찰한 결과 2.4×10^6 dalton의 單鎖 線形 RNA임을 확인하였다.

한편 免疫血清을 이용한 바이러스 抗原 檢出方法으로 螢光抗體法(井上 · 點澤 1971), 沈降反應(古田 등 1976, 古田 · 清水 1976), Single Radial Immunodiffusion Assay(關 · 關渡 1976), Slice법(秋葉 1978) 등이 확립되어 있으며 최근에는 檢出感도가 높은 ELISA法(清水 1982)과 簡便한 Latex 凝集反應(Shimizu *et al.*, 1983) 등이 報告되고 있다.

지금까지 한국의 바이러스성 軟化病에 關한 研究는 日本産 FV를 利用하여 主로 實用的인 研究를 制限的으로 遂行하고 있는 實情에서 養蠶農家の 本病에 對한 被害 상황을 파악하고 그에 對한 防制策을 강구하기 위해서는 우선적으로 우리나라에 존재하는 FV의 分離 및 그 性狀이 把握되어야 한다. 이와같은 견지에서 1989년 京畿 및 慶北지역의 양잠농가를 대상으로 本病이라고 추정되는 病蠶을 수집하여 바이러스를 分離하고, 바이러스 粒子의 電子顯微鏡的 觀察, 核酸의 呈色反應, 構成蛋白質의 電氣泳動 및 Gel diffusion test 등을 통한 바이러스 性狀을 日本에서 分離되어 繼代되고 있는 FV와 比較하여 分析,檢討하였다.

II. 材料 및 方法

1. 바이러스의 分離 및 形態

가. 病蠶蒐集

국내 양잠농가에 분포되어 있는 FV를 분리하기 위하여 京畿 華城지역 3농가 및 慶北 醴泉, 尙州 및 聞慶의 4개 양잠농가를 대상으로 1989년 춘잠기에 바이러스성 연화병으로 추정되는 병잠을 수집하였다.

나. 바이러스 增殖 및 分離

각 농가별로 수집한 병잠의 중장을 채취하여 중장 중량의 10배 증류수를 가하여 마쇄한 후 8,000 rpm에 30분간 원심하여 그 上澄液을 원액으로 하여 10^1 농도로 희석한 후 빙일에 도말 음건하여 1989년 추잠기, 4령 기잠에 경구 접종하였다.

접종후 7-8일에 전형적인 병징을 나타내는 병잠의 中腸을 채취하여 바이러스를 분리했다. 바이러스 분리는 金 · 姜(1984)의 방법에 따라 10-40% 蔗糖密度 勾配 遠心法으로 하여 원심관 바닥으로부터 25방울씩 LKB 분획수집기를 이용하여 31개의 시험관에 분획한 후 각각의 시험관에 3 ml의 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 7.2)를 가한 후 分光光度計를 사용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. 電子 顯微鏡 觀察

위와 같은 방법으로 분획한 바이러스 입자를 전자현미경으로 관찰하기 위하여 260 nm에서 최대 흡광도를 나타낸 16번 분획을 중심한 15-17번 분획을 모아 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 7.2)에 대하여 투석하고 이것을 40,000 rpm에 4℃, 2시간 초원심분리하여 침전물을 얻었다.

정제 바이러스로 생각되는 이 침전물을 2% phosphotungstic acid(PTA)로 negative 염색하여 바이러스 입자의 純度, 形態 및 크기를 전자현미경(日立 HU-12 A)으로 관찰하였다.

2. 바이러스의 化學的 性狀

가. 바이러스 核酸抽出

정제한 바이러스를 TK 완충액(0.025M KCl)를 함유한 0.03M Tris-HCl 완충액, pH 7.5)에 부유해서 최종 농도가 0.5% 되도록 SDS를 가하여 2-3분간 0℃에서 진탕시킨 후 동량의 TK 완충액에 포화시킨 phenol을 가해서 20분간, 0℃에서 진탕하고 3,000 rpm에 10분간 원심하여 上澄液을 얻었다. 위와같은 과정을 3회 반복하여 얻은 핵산 부유액에 2배량의 냉 ethanol을 가해서 -20℃에 하룻밤 靜置시킨 후 생성된 核酸의 沈澱物을 70% ethanol에 3회 세척하여 공시 시료로 사용하였다.

나. 핵산의 呈色 反應

바이러스의 핵산 性狀을 알기 위해서 정제한 바이러스를 orcinol 반응(Mejbaum, 1939) 및 Cysteine Hydrochloride 반응(森精, 1970)을 행하였다. 표준으로서 DNA는 누에 NPV와 흰불나방 GV를, RNA는 누에 CPV를 사용하였다.

다. 바이러스 핵산의 電氣泳動

바이러스 입자로부터 추출한 핵산을 1xSSC에 용해시켜 최종농도가 10%가 되게 蔗糖을 가해서 泳動用 시료를 만들었다. 전기영동은 5% polyacrylamide gel에 30 mA로 20시간 행하였다. 영동후 15% acetic acid에 용해한 0.2% acrydine orange 용액에서 12시간 염색시킨 후 1M acetic acid 용액에서 탈색했다.

라. 바이러스 構成 蛋白質의 電氣泳動

바이러스 구성 단백질을 분석하기 위하여 정제한 바이러스 부유액에 2% SDS 및 2% β-Mercaptoethanol을 함유한 0.02M인산 완충액을 같은 량 혼합하여 100°C, 2분간 가열해서 바이러스 단백질을 분해시켰다. 이것을 Weber *et al.*(1972)의 방법에 준하여 12.5% SDS-PAGE에 30 mA로 4시간 전기영동하였으며, 염색은 0.25% Coomassie brilliant blue R250에 염색하고 7% acetic acid에서 탈색시켰다.

분자량은 marker 단백질을 사용하여 Weber & Osborn(1969)의 방법에 따라 상대이동도로 부터 구하였다.

마. 免疫 血清 生産 및 Gel Diffusion Test

免疫 血清 生産은 정제된 Virus 부유액 1ml(0.4 mg/ml)과 Freund complete adjuvant 1ml을 3 way valve를 이용하여 철저히 혼합한 후 2-3개월 된 숫 토끼에 근육주사하였으며 1주일후 Freund incomplete adjuvant로 혼합한 Virus액을 1주일 간격으로 3회 주사한 다음 최종 주사후 10일째 전 채혈을 실시하여 免疫血清을 分離 蒐集하였다.

Gel diffusion test는 Kurihara *et al.*(1984)의 방법에 따라 조제한 1% agarose gel을 1회용 샐레에 두께 2mm되게 만든 후 직경 4mm well을 13mm 간격으로 뚫어 각각의 well에 25 μl의 정제 바이러스와 면역 혈청을 넣은 후 상온에서 48시간 반응시켰다.

III. 結果 및 考察

1. 바이러스 分離 및 形態

京畿 및 慶北地域의 양잠 농가에서 수집한 병잠을 점증원으로 하여 바이러스性 軟化病蠶 발생 여부를 조사한 결과, 京畿 2, 慶北 2농가에서 전형적인 연화병 증상을 나타내는 병잠이 발생하였다(표 1).

Table 1. Isolation of virus at the sericultural farms

Place	Isolation of virus
Jeongnam(Whasung)	+
Hyangnam(Whasung)	+
Palthan(Whasung)	-
Youcheon(Yecheon)	+
Yongmun(Yecheon)	+
Dongro(Munhyung)	-
Nackdong(Sangju)	-

* "+" and "-" indicate isolation and no isolation of the virus, respectively

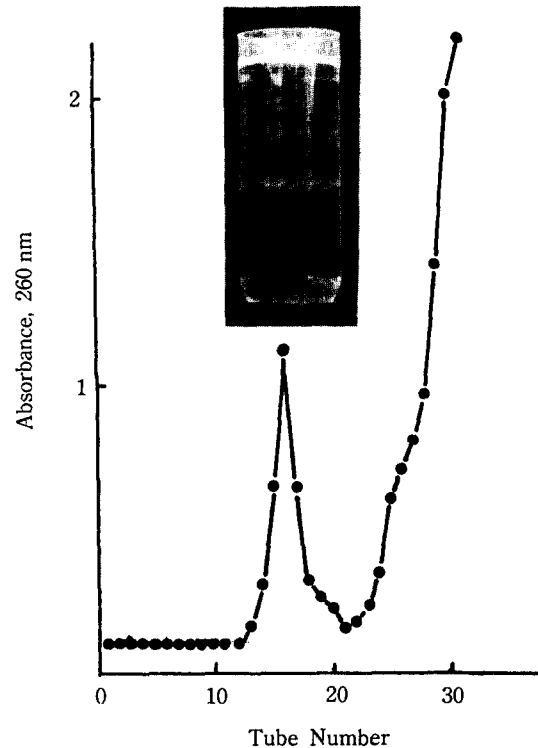


Fig. 1. Sedimentation profile of the virus isolated from Hyangnam.

그 중 경기 鄉南에서 수집한 병잠으로부터 증식된 이병잠의 증장을 채취하여 金·姜(1984)의 방법에 의해 10-40% 蔗糖密度勾配 遠心法으로 바이러스를 분리한 결과 원심관의 중앙부위에 육안으로 관찰 가능한 선명한 1개의 band가 형성되었으며, 이 원심관을 바닥으로부터 25방울씩 분획하여 260 nm에서 흡광도를 측정된 결과 16번 분획을 중심으로 좌우 대칭의 단일 peak를 얻었다(그림 1). peak를 중심으로 한 15-

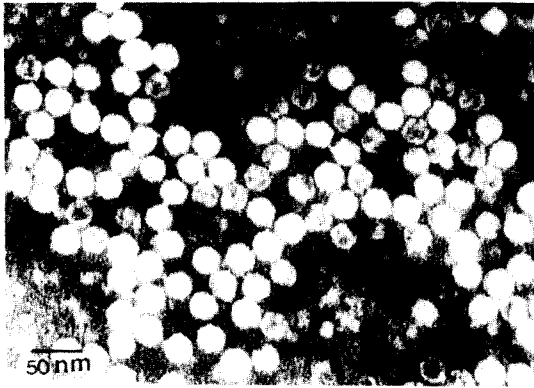


Fig. 2. Electron micrograph of the virus isolated from Hyangnam negatively stained with 2% phosphotungstic acid.

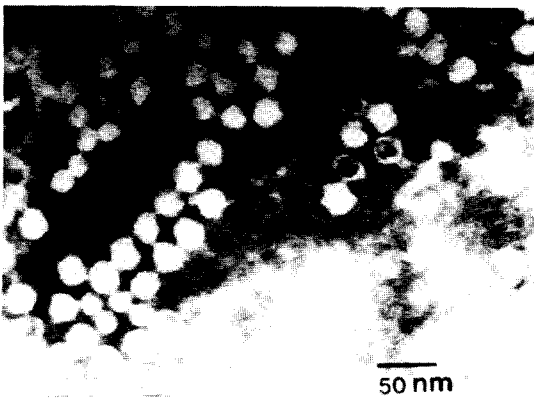


Fig. 3. Electron micrograph of virus isolated from Youcheon negatively stained with 2% phosphotungstic acid.

17번 분획을 4°C, 40,000 rpm에서 2시간 원심하여 그 침전물을 2% PTA로 negative 염색하여 전자현미경으로 관찰한 결과 직경 약 27±1.7 nm의 구형입자임이 확인되었다(그림 2). 한편 경북 柳川의 病蠶서 증식한 것을 분리한 경우는 그림 3과 같이 직경 27±1.7 nm와 21±1.8 nm의 크기를 갖는 입자들이 혼재해 있었다.

이상과 같이 크기로 보아 鄉南의 병잠에서 분리한 것과 柳川의 병잠에서 분리한 직경 27±1.7 nm의 구형 입자들은 點澤(1972) 및 川瀨 등(1980)이 보고한 FV의 형태 및 크기와 일치하는 것으로 보아 FV로 추정되며 柳川의 병잠에서 분리한 직경 21±0.8 nm의

Table 2. Color reaction of the viral nucleic acid

virus	orcinol	cysteine-HCl
virus isolated from Hyangnam	+++	-
FV isolated from Japan	+++	-
BmCPV	+++	-
BmNPV	-	+++
Hc GV	-	+++

* +++ : positive color reaction
 - : negative color reaction

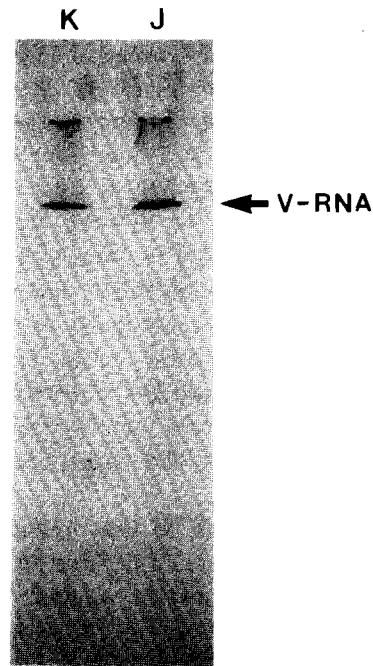


Fig. 4. Electrophoretic patterns of nucleic acids extracted from the virus isolated from Hynagnam with SDS-phenol extraction method.

K : virus isolated from Hynagnam
 J : FV isolated from Japan

입자들은 清水(1975) 및 姜 · 川瀨(1976, 1978)의 보고와 일치하는 것으로 보아 DNV-1으로 추정된다.

2. 바이러스 핵산의性状

바이러스 핵산의 성상을 알기 위하여 鄉南의 병잠에서 분리한 직경 27±1.7 nm의 정제된 바이러스를 orcinol로 반응시킨 결과 표 2에서 보는 바와 같이 DNA 바이러스인 누에 NPV와 흰불나방 GV는 음성으로 나타났으며 鄉南産 바이러스는 RNA 바이러스인

CPV와 日本産 FV와 같이 양성으로 나타났다. 반면에 cysteine hydrochloride 반응에서는 DNA바이러스들은 양성반응을, 鄉南産 바이러스 및 RNA 바이러스들은 음성으로 나타났다.

이는 川瀬 등(1980)이 보고한 바와 일치하였으며 따라서 본 바이러스의 핵산은 RNA임이 확인되었다.

그림 4는 鄉南에서 분리, 정제한 바이러스에서 SDS-phenol법으로 핵산을 추출하여 전기영동을 통해 일 본산 FV와 비교 분석한 결과로 2개 바이러스 핵산이 모두 이동도가 같은 단일 band로 나타났다.

한편 핵산의 抽出시 粉狀을 나타내는 것으로 보아 본 핵산은 單鎖 RNA임을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 鄉南에서 분리한 직경 27±1.7 nm의 바이러스는 日本産 FV와 핵산의 性狀이 同一함을 알 수 있었다.

3. 바이러스 構成 蛋白質의 性狀

핵산 성상에서와 같이 京畿 鄉南의 병잡에서 분리 정제한 바이러스를 12.5% SDS-PAGE로 구성 단백질을 분석한 결과 5개의 major band와 2개의 minor

band를 관찰할 수 있었으며, 이는 日本産 FV 경우와 같은 전기영동상을 보임으로써 日本産 FV와 동일한 구성 단백질을 가진 바이러스임이 판명되었다(그림 5).

분리된 5개의 주요 band는 이동도가 낮은 순서로부터 VP₀, VP₁, VP₂, VP₃ 및 VP₄로 하여 분자량을 산출한 결과 각각 49,000, 35,000, 33,000, 31,000, 11,300 dalton이었다. 이와같은 결과는 Hashimoto & Kawase(1983)가 11, 12, 13% SDS-PAGE로 산출한 분자량 35,200(vp₁), 33,000(vp₂), 31,000(vp₃), 11,600 dalton(vp₄) 및 崔(1989)의 15% SDS-PAGE에 의한 분자량 42,000(vp₀), 36,000(vp₁), 33,000(vp₂), 32,000(vp₃), 11,600 dalton(vp₄)과 거의 일치하였다.

또한 FV의 구성단백질로 확인된 VP₁-VP₄외에 본 실험에서 major band로 나타난 49,000dalton(vp₀)의 polypeptide는 Hashimoto & Kawase(1983)가 VP₂와 VP₄의 전구체를 보고한 것과 崔(1989)가 보고한 VP₁과 VP₄의 전구체로 확인된 42,000dalton의 VP₀에 해당하는 것으로 본 실험에서는 고농도 단백질의 전기영동 결과로 VP₀가 major band로 나타난 것으로 추정되며 따라서 본 바이러스의 구성 단백질은 4개의 polypeptide(VP₁-VP₄)로 구성되어 있는 것으로 사료된다.

2개의 minor band는 고농도의 SDS-PAGE할 때 바이러스 구성 단백질과 분자량이 비슷한 polypeptide가 분리된다는 Hashimoto & Kawase(1983)의 보고와 일치하는 것으로 보아 精製 바이러스中 異物質의 混入에 의한 결과로는 생각되지 않는다.

4. 바이러스의 抗原性

분리,정제한 바이러스의 항원성을 면역침강 반응으로 비교 검토한 결과 鄉南産 바이러스에 대한 항혈청과 鄉南産 바이러스, 日本産 FV 및 柳川産 바이러스는 서로 융합하면서 강한 침강대를 형성하였고, 日本産 FV에 대한 항혈청도 日本産 FV, 鄉南産 바이러스 및 柳川産 바이러스와 강한 반응을 나타낸 반면 2개 항혈청 모두 NPV virion, 흰불나방 GV 및 완충액과는 반응이 일어나지 않았다(그림 6_{LR}).

이와같은 결과로부터 鄉南産 바이러스, 日本産 FV 및 柳川産 바이러스는 상호 공통 항원을 가진 바이러스임이 확인되어 같은 바이러스일 것이라 추정되며 생산된 鄉南産 바이러스 및 日本産 FV에 대한 항혈청은 각각의 바이러스에 높은 反應 特異성을 가진 것으로 판명되었다.

特異성이 확인된 2종류의 항혈청과 DNV-1에 대한 항혈청을 鄉南産 바이러스 및 日本産 FV와 반응시킨 결과, 2종의 항혈청은 서로 융합하면서 강한 침강대를

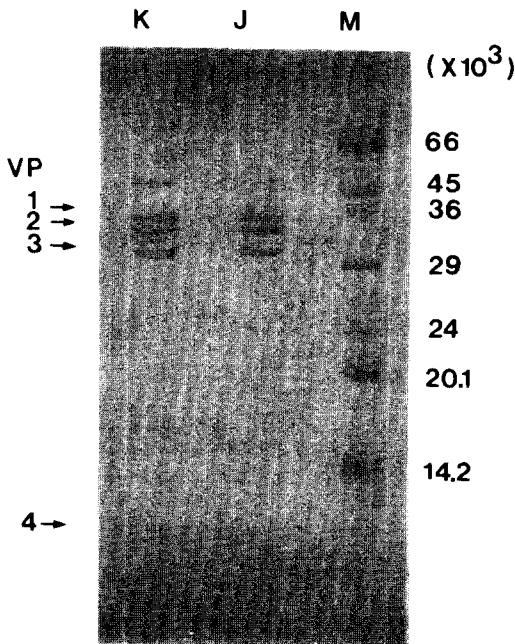


Fig. 5 Electrophoretic patterns of structural proteins of the virus isolated from Hyangnam on 12.5% SDS-PAGE.

K : virus isolated from Hynagmam
 J : FV isolated from Japan
 M : marker protein

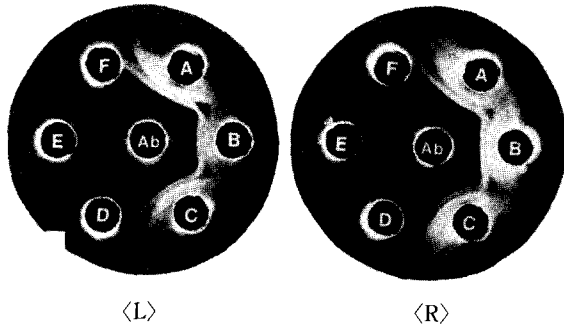


Fig. 6. Serological relation and specificity of anti-serum against the viruses isolated from Hyangnam and Japan.

- L : Ab-antiserum against the virus isolated from Hyangnam
 R : Ab-antiserum against FV isolated from Japan
 A-virus isolated from Hyangnam
 B-FV isolated from Japan
 C-virus isolated from Youcheon
 D-NPV virion
 E-Hc GV
 F-buffer

형성하였으나, DNV-1 항혈청은 鄉南産 바이러스 및 日本産 FV와 반응하지 않았다(그림 7_{L,R}).

이러한 결과로부터 鄉南産 바이러스 및 日本産 FV에 대한 항혈청은 상호 동질성이 인정되었으며 누에 연화병을 일으키는 FV와 DNV간에는 혈청학적 연관성이 없는 것으로 확인되었다.

그림 8은 DNV-1 항혈청을 사용하여 鄉南産 바이러스, 日本産 FV, 柳川産 바이러스, NPV virion, 흰 불나방 GV 및 완충액을 반응시킨 것으로 柳川産 바이러스와 선명한 1개의 침강대를 형성하였다.

이와같은 결과는 柳川産 정제 바이러스중에 DNV-1과 혈청학적 연관성을 가지는 바이러스가 존재하는 것을 의미하며 또한 전자현미경으로 관찰시 柳川産 바이러스중에 21±0.8 nm 크기의 구형입자가 혼재되어 있는 것으로 보아 이것은 DNV-1일 가능성이 매우 높았다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 鄉南産 바이러스는 日本産 FV와 동일한 것이고 柳川産 바이러스는 日本産 FV와 동일한 FV 및 DNV-1이 혼재된 것으로 추정되며 이 바이러스는 韓國에서 最初로 分離된 것이다.

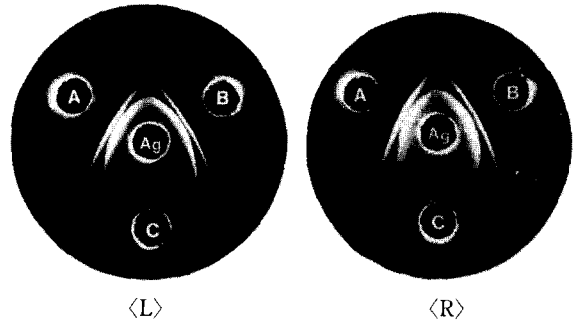


Fig. 7. Serological properties of the viruses isolated from Hyangnam and Japan

- L : Ag-virus isolated from Hyangnam
 R : Ag-FV isolated from Japan
 A-antiserum against virus isolated from Hyangnam
 B-antiserum against FV isolated from Japan
 C-antiserum against DNV-1

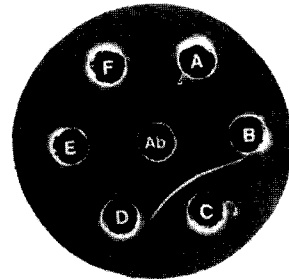


Fig. 8. Serological relation of isolated viruses against antiserum of DNV-1.

- Ab : Antiserum of DNV-1
 A-virus isolated from Hyangnam
 B-FV isolated from Japan
 C-virus isolated from Youcheon
 D-NPV virion
 E-Hc GV
 F-buffer

IV. 摘 要

국내 양잠농가에 분포되어 있는 FV를 分離하여 그 性狀을 把握하기 위하여 京畿 3, 慶北 4개 농가에서 軟化病 症狀을 나타내는 病蠶을 蒐集, 바이러스를 分離하여 그 形態 및 크기, 核酸 및 蛋白質 性狀과 抗原性を 日本産 FV와 비교 검토한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 京畿 2, 慶北 2개 농가의 연화병 증상을 나타내는 병잠으로 부터 바이러스를 분리하였다.
2. 郷南産 바이러스는 직경이 27 ± 1.7 nm의 구형 입자였으며, 柳川産 바이러스는 27 ± 1.7 nm 및 21 ± 0.8 nm의 구형 입자가 혼재되어 있었다.
3. 郷南産 바이러스의 핵산은 RNA로 日本産 FV와 동일한 電氣泳動像을 보였다.
4. 구성단백질은 4개의 polypeptide로 되어 있으며 그 분자량은 각각 35,000, 33,000, 31,000, 11,400 dalton으로 日本産 FV와 동일하였다.
5. 郷南産 바이러스는 日本産 FV와 같은 抗原性을 가진 바이러스이며, 柳川産 바이러스는 日本産 FV 및 DNV-1과 같은 抗原性을 가진 2종류의 바이러스였다.
6. 이상의 결과로부터 郷南 및 柳川에서 분리한 직경 27 ± 1.7 nm의 球形 바이러스는 日本産 FV와 동일한 FV로 판명되었고, 柳川에서 분리한 직경 21 ± 0.8 nm의 球形 바이러스는 DNV-1으로 추정되었다.

引用 文 獻

- 點澤啓夫·古田要二·倉田啓而·佐藤文字(1964) 蠶의 傳染性軟化病ウイルス에 關する 研究. 日蠶試報 19(2): 223-240.
- 荒武義信(1974) 家蠶에 對하여는 바이러스性軟化病抵抗性系統의 選拔. 蠶絲研究 92: 144-151.
- 荒武義信·柏村鶴雄(1973) 催青卵·蠶의 抑制および 蠶의 絶食時間의 長·短と 바이러스感受性. 蠶絲研究 88: 104-113.
- 荒武義信·柏村鶴雄(1974a) 熊本縣下의 養蠶家에 對하여는 蠶病發生의 實態와 作柄との 關係. 日蠶試報 99: 53-66.
- 荒武義信·柏村鶴雄(1974b) 四國, 九州의 養蠶地帶에 對하여는 蠶病病原의 分布와 軟化病發生의 實態調査. 日蠶試報 99: 67-81.
- 荒武義信·柏村鶴雄·上野 博(1973) 家蠶ウイルス病의 發病에 影響을 及ぼす 要因에 關する 研究. 日蠶試報 25(5): 307-370.
- 點澤千壽(1972) 蠶의 바이러스性軟化病에 關する 研究 1. 바이러스의 精製와 2,3의 性狀. 日蠶雜 41(5): 338-344.
- 崔 洪圭(1989) 家蠶傳染性軟化病ウイルス의 增殖機構および 奎尼진による 增殖抑制機構에 關する 研究. 名古屋大 博士學位論文: 56-81.
- 古田要二·滝口義夫·石井正市(1976) 바이러스性軟化病의 血清學的診斷法에 對하여는 沈降反應의 反應條件와 바이러스抗原의 檢出. 蠶絲研究 98: 50-57.
- 古田要二·清水孝夫(1978) 家蠶軟化病ウイルス의 定量接種에 對하여는 바이러스抗原의 檢出時期. 蠶絲研究 106: 100-105.
- Hashimoto, Y. and S.Kawase(1983) Characteristics of structural proteins of infectious flacherie virus from the silkworm, *Bombyx mori*. J. Invertebr. pathol. 41: 68-76.
- 細田茂和·東 哲夫·山崎 壽(1966) 蠶의 傳染性軟化病(F) 病原體의 接種時機および 接種濃度와 發病との 關係. 日蠶雜 35(2): 71-77.
- Hu Y. Y., Y. Hashimoto and S. Kawase(1989) An electron microscopic observation of RNA from infectious flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori*. (Lepidoptera: Bombycidae). Appl. Ent. Zool. 23(1): 103-104.
- 井上 元·點澤千壽(1971) 螢光抗體法による 家蠶ウイルス性軟化病의 診斷에 關する 研究. 日蠶試報 25(1): 21-41.
- 井上 元·點澤千壽(1972) 蠶ウイルス性軟化病에 關する 研究 2. 螢光抗體法による 家蠶中腸皮膜組織 觀察. 日蠶雜 41(5): 345-348.
- 岩下嘉光(1965) 바이러스性軟化病蠶의 中腸皮膜組織에 對하여는 組織, 細胞病理學的 觀察. 日蠶雜 34(4): 263-273.
- 姜 錫權·中桓雅雄·清水孝夫·川瀨茂實(1978) 軟化病ウイルス(伊那株)의 純化와 바이러스核酸의 性狀에 對하여는. 日蠶雜 47(1): 39-46.
- 川瀨茂實·橋本義文·中桓雅雄(1980) 家蠶의 軟化病ウイルス(坂城株)의 化學的性狀에 對하여는. 日蠶雜 49(6): 477-484.
- Kawase S., C. Suto, C. Ayuzawa and H. Inoue(1974) Chemical properties of infectious flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori*. (Lepidoptera: Bombycidae) Appl. Ent. zool. 9: 100-101.
- 金 植榮·姜 錫權(1984) 家蠶의 傳染性軟化病 및 濃核病 바이러스 增殖에 關한 研究. 韓蠶誌 25(2): 1-31.
- Kurihara Y., H. Watanabe, S. Maeda and T. Shimizu (1984) Chemical characteristics of previously undescribed densonucleosis virus isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. J.Sericult. Sci. Japan, 44(1): 45-48.
- Mejbaum(1939) Über die bestimmung kleiner pentosemengen, insbesondere in derivanten der adenylsäure. Hoppe-seyler's Z. physiol. chem. 258: 117-120.
- 森 精(1970) 카이코による 新生物實驗-生物科學의 展開-. 三省堂 pp. 266-278.
- 大井秀夫·宮原達南·山下昭弘(1967) 바이러스에 對하여는 高溫多濕抵抗性ならび에 바이러스性軟化病抵抗性와 實用諸形質との 關係. 蠶絲研究 65: 137-148.
- Paillet A.(1929) La gattine et la flacherie vraie ou flacherie de Pasteur, maladies infectieuses mixtes à ultra-microbe et bactéries. Compt. rend. acad. sci., 189: 308-310.
- 關 宏夫·關島安隆(1976) Single radial immunodiffusionによる 蠶ウイルス性軟化病特異抗原의 檢出. 日蠶雜 45(1): 13-18.
- 秋葉芳男(1978) Es法の改良-蠶體スライス法による IFV 抗原의 檢出. 奇玉蠶試報 50: 39-42.
- 清水 進(1982) 카이코軟化病ウイルス의 Enzyme linked immunosorbent assayによる 檢出. 日蠶雜 51(5): 370-373.
- Shimizu S., M. Ohba, K. Kanda and K. Aizawa(1983) Latex agglutination test for the detection of the fla-

- cherie virus of the silkworm, *Bombyx mori* J. Invertebr. pathol., **42**: 151-155.
- 清水孝夫(1975) 伊那市の農家の病蠶から分離した軟化病ウイルスの病原性. 日蠶雑 **44**(1): 45-48.
- 田中芳男・清水孝夫(1965) カイコの軟化病ウイルスの増殖に及ぼす温度の影響. 日蠶雑 **34**(2): 125-127.
- 宇治川喜平・有賀久雄(1966) カイコにおけるウイルス性軟化病抵抗性系統の選抜. 日蠶雑 **35**(1): 23-26.
- 渡部 仁(1976) 家蠶のウイルス性軟化病. 日蠶雑 **45**(2): 95-106.
- 渡邊正男・船田敏夫・窪田 厚・川上武治・相澤那二・北征三・松尾直(1968) 各種消毒剤の家蠶伝染性軟化病ウイルスに対する不活化効果. 日蠶雑 **37**(3): 213-218.
- Weber K., J. R. Fringle and M. Osborn(1972) Method in enzymology(C. H. Whirs & S. N. Timasheff eds) Academic press, New York vol. **26**, 3-27.
- Weber K and M. Osborn(1969) The reliability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis J. Biol. Chem. **244**(16): 4406-4412.
- 山崎 壽・酒正榮一・下平陸夫・山田たけお(1960) 伝染性のある蠶の軟化病(F)に関する研究(續報 1). 長野蠶試報 **61**: 1-28.
- 山崎 壽・山田たけお・小林あつ子(1965) 伝染性のある蠶の軟化病(F)の沈黙感染. 日蠶雑 **34**(5): 355-358.