



κ-Casein, GMP, Sialic Acid가 한우송아지 Rotavirus와 제주도 Bovine Rotavirus(JBR)의 MA-104 세포감염에 미치는 영향

유제현 · 김종현 · 박범석 · 유대환 · 신원선 · 김세민* · 지병주** · 송진욱
건국대학교 낙농학과, *제동목장, **서화목장

Effect of κ-Casein, GMP and Sialic Acid on the Infection of MA-104 Cells by Korean Native Cattle Rotavirus and JBR

Jae-Hyeun Yu, Jong-Heon Kim, Bum-Suk Park, Dae-Hwan Yu, Won-Sun Shin,
Se-Min Kim*, Byung-Ju Ji** and Jin-Ook Song

Department of Dairy Science, Konkuk University, *Je-dong Dairy Farm, **Seo-Hwa Dairy Farm

Abstract

This study was conducted to investigate inhibitory effects of κ-casein, GMP and sialic acid addition on the infection of MA-104 cells by S97(Korean native cattle rotavirus) and JBR(Jeju island bovine rotavirus). MA-104 cells on incomplete M199 were infected with domestically separated S97 and JBR, activated by incubating at 37°C for 6 days, and analyzed for the titer of rotavirus. κ-casein, GMP and sialic acid added MA-104 culture infected by activated S97 and JBR were incubated for 15 hours and stained by the AEC staining method. The number of infected cells were counted on microscope. The titer of S97 and JBR was 2.5×10^7 and 2.0×10^6 PFU/ml, respectively. The inhibition level against cell infection by S97 was 97.4% for 2000μM of κ-casein and 97.44% for 2000μM of GMP. The inhibition level against cell infection by JBR was 99.52% for 2000μM of κ-casein and 99.78% for 2000μM of GMP. The inhibition level against cell infection by S97 and JBR was 3.85 and 3.63% for 2000μM of sialic acid, respectively. The high inhibitory effects (over 97%) of κ-casein and GMP against infection of MA-104 cells with S97 and JBR indicated great potentials for the use of κ-casein and GMP in the treatment of calf or infant caused by rotavirus.

Key words : κ-Casein, GMP, sialic acid, BRV S97, JBR, AEC staining, diarrhea.

서론

로타바이러스는 유아뿐만 아니라 대부분의 어린 포유동물과 조류 등에 있어서 세계적으로 가장 심한 증세를 나타내는 위장염 설사의 원인체이다(Kapikian and Chanock, 1990). 개발도상국에서는 매년 유아 100만명 이상이 로타바이러스에 의한 위장염으로 사망하고 전세계에 걸쳐 1억 5천명의 어린이가 설사병과 구토를 일으키고 있다(Noel et al., 1994). 송아지 로타바이러스의 경우 전 세계적으로 산재된 설사병의 원

인체로 설사에 의한 급성 폐사 외에도 임신우의 유산 또는 사산, 호흡장애, 백혈병과 유사한 증상을 일으키는 경우도 있다(Ebina and Tsukada, 1991; Estes and Cohen, 1989).

로타바이러스는 11개의 dsRNA 절편을 둘러싸고 있는 3개의 각(shell) 즉 외피각, 내피각 및 core로 구성되어 있으며, 외피각은 구조단백질인 VP7과 VP4로 이루어져 있고 바이러스의 혈청형을 결정한다. VP7 단백질은 중화시험에 의해 14개의 G혈청형이 확인되었고 소에서는 G6와 G10 혈청형이 흔히 분리되고 있다. VP4 단백질은 면역측정법, 중화시험에 연계한 P형 유전자형의 서열비교에 의해 18개의 혈청형이 확인되었고 소에서는 P1, P5와 P11 혈청형이 흔히 분리되고 있다(Gentsch et al., 1992; Kobayashi et al., 1993).

로타바이러스는 다양한 혈청형에 의해 발병이 되고 있기

Corresponding author : Jae-Hyeun Yu, Department of Dairy Science, Konkuk University, 1, Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea. Tel: 82-2-450-3688, Fax: 82-2-455-5362, E-mail: joehyeunyu@hanmail.net

때문에 한 혈청형에 감염되었다가 치료되더라도 다른 혈청형의 로타바이러스의 감염에 대한 방어능력이 형성되지 않기 때문에 효과적인 백신개발이 되지 않고 있다(Conner et al., 1994; De Mol et al., 1986). Bass 등(1992)은 식품성분에 의해 로타바이러스를 저해하는 것이 백신개발의 문제를 해결하는 좋은 선택이 될 수 있다고 했으며, 지금까지 초유, 난황, 녹차추출물, 락토페린 및 감초산 등 식품성분으로 로타바이러스의 감염을 방어하는 많은 연구가 보고되고 있다(Ebina et al., 1985; Ebina et al., 1990; Ebina and Tsukada, 1991; Superti et al., 1997; Cha et al., 1999; Song et al., 2000).

κ -casein은 우유단백질 중 유일하게 당을 함유하고 있으며, C-말단 부분에는 당이 결합할 수 있는 부위가 5개 정도가 있는 것으로 알려져 있다(McKenzie, 1971). κ -casein은 rennet 중의 응유효소인 chymosin의 작용에 의하여 105번의 phenylalanine과 106번의 methionine사이가 특이적으로 절단이 되며, 절단후의 1~105번은 para- κ -casein이라고 하고, 106~169번의 fragment는 당을 함유하고 있어서 glycomacropeptide (GMP)라 한다. GMP는 galactose, N-acetylgalactosamine, N-acetylneuraminic acid를 함유하는 glycopeptide로서 whey에 많이 함유되어 있다(Alais and Jolles, 1961).

GMP의 생리학적 기능은 *Bifidus*균 성장촉진(Azuma et al., 1984), 혈소판 응집 억제작용(Jolles and Henschen, 1982) 및 독소중화작용 등이 있는 것으로 밝혀지고 있다(Kawasaki et al., 1992). 또한 치아에 프라그 형성을 방지하고 충치 역시 예방하는 것으로 알려져 있고(Neerser, 1987), 콜레라독소의 수용체 억제(Kawasaki et al., 1992) 및 인플루엔자 바이러스 hemagglutinin의 억제(Kawasaki et al., 1993)에 대해서 보고되었다.

Sialic acid(N-acetylneuraminic acid)는 생체 pH에서는 카복실기가 음전하를 띠기 때문에 산성 점질당 이라고 한다. 본래 하악선 mucine에서 추출된 산성 점질당의 한 성분으로 인플루엔자 바이러스에 의한 적혈구 응집 반응을 저해하는 것으로 알려져 있다(Jolles and Henschen, 1982).

국내 한우 사육 농가에서도 매년 상당수의 송아지가 로타바이러스성 설사로 도태되고 있으며, 바이러스성 설사에 감염되었던 송아지는 성우가 되었을 때, 외관상으로 구별이 어렵고 소화 흡수 능력이 현저히 떨어진다(Baker, 1987). 이런 관점에서 볼 때, 바이러스성 설사의 발생은 한우육성기반의 저해와 한우 사육농가의 사기 저하를 초래하고 있다. 이러한 점을 감안하여 본 연구는 국내 송아지 설사변에서 분리한 로타바이러스 S-97과 표준 로타바이러스 JBR(Jeju island bovine rotavirus)에 우유의 생리기능성분인 κ -casein과 GMP 및 sialic acid의 농도를 다르게 첨가하여 각각 MA-104 세포에

Table 1. List of rotavirus strains used in this study

Strain	Host species	Serotype	Source
S97	Bovine	G10, P1	Seo-Hwa Dairy Farm, Korea
JBR	Bovine	G6, P11	Je-Dong Dairy Farm, Korea

감염시켰을 때 그 억제효과를 규명하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료

본 실험에서 사용된 κ -casein과 glycomacropeptide (GMP) 및 sialic acid (N-acetylneuraminic acid)는 표준품으로 순도 99% 이상의 정제된 특급 시약을 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)로부터 구입하여 사용하였으며, 이를 각각 2mM 이 되도록 TNC[10mM Trizma base, 100mM NaCl, 15mM CaCl₂ (pH 7.4)]에 용해하여 0.45 μ m pore-size fliter로 여과한 후 -20 $^{\circ}$ C에서 냉동 보관하면서 사용하였다.

세포배양

로타바이러스의 감염 또는 증식을 위한 배양세포로는 *Macacrus Rhesus monkey kidney cell*(MA-104세포)로 미국 Stanford University 의과대학의 Dr. Greenberg Lab으로부터 분양받아 Medium 199(No. 9466 : Irvine scientific. Santa Anna. CA.)에서 증식시킨 후 동결 해동하여 사용하였다. 세포의 증식과 유지는 M199에 7%의 Fetal bovine serum(FBS: GIBCO, USA)과 1% L-glutamin penicillin streptomycin (L-GPS: Irvine scientific. Santa Anna. CA.)을 혼합하여 75cm² 크기의 T-flask에서 매일 배지를 교환하면서 3~4일 후에 완전한 monolayer가 형성된 세포를 계대배양하여 사용하였다.

로타바이러스와 회전배양

국내 분리주인 BRV S97(충남 서화목장 송아지 설사변에서 분리; Yu et al., 2000)과 표준 BRV JBR(제주도 송아지 설사변에서 분리; Yu et al., 1996)을 사용하였으며, Chiarini 등(1983)의 방법에 따라 냉동보관중인 stock solution을 상온에서 해동한 후, ml당 0.2% trypsin 10 μ l의 농도로 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 활성화시킨 다음, MA-104 세포를 사면배양하여 monolayer가 형성된 시험관에, 활성화시킨 로타바이러스를 넣어 회전배양기에서 1시간 동안 흡착시켰다. 그 다음 무혈청 M199를 ml당 0.2% trypsin 1 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 6일간 회전배양하면서 세포변성효과(Cytopathic effect, CPE)를 관찰한 후 동결과 해동을 3회 반복하여 바이러스를 회수하고 -80 $^{\circ}$ C에 보관하면서 실험에 이용하였다.

로타바이러스의 역가분석

로타바이러스의 역가분석은 Ruggeri와 Greenberg(1991)의 방법에 의하여 6 well culture plate를 이용한 plaque assay로 수행하였다. 로타바이러스는 ml당 0.2% trypsin 5 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 활성화시킨 후 무혈청 M199 배지로 10⁻¹에서 10⁻⁸까지 희석하고, MA-104 세포의 monolayer가 형성된 6 well plate는 무혈청 M199로 3회 세척 후 각 well에 희석한 바이러스액을 0.5ml씩 넣어 CO₂ 배양기에서 1시간 동안 흡착시켰다. Microwave Oven에서 완전히 용해된 액상의 1.1% agarose(Seakem ME agarose, FMC Co., USA)를 M199(\times 2)와 1:1로 섞고 0.2% 트립신 0.5 μ l를 첨가하여 혼합하였다. 37 $^{\circ}$ C로 방냉 후 각 well에 남아있는 바이러스를 피펫으로 제거한 다음 agarose가 첨가된 배지 4ml씩을 중층하여 37 $^{\circ}$ C에서 6일간 배양하였다. 배양 후 neutral red(GIBCO, USA)를 무혈청 M199와 1:20으로 희석한 다음 1ml씩 각 well에 넣어 CO₂ 배양기에서 7시간 동안 염색하여 fluorescent light box 위에서 plaque수를 계수하였다.

로타바이러스의 MA-104 세포감염에 대한 κ -casein, GMP, sialic acid의 영향분석

Kaljut 등(1988)의 방법을 응용하여 96 well plate에 MA-104 세포를 배양하였고, 바이러스는 0.25 μ l/ml의 trypsin을 넣은 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 활성화시켰으며, trypsin이 첨가된 M199에 활성화된 바이러스를 10,000배 희석하여 다시 30분 동안 활성화시켜 사용하였다. MA-104 세포의 monolayer가 형성된 96 well plate를 무혈청 M199로 2번 세척하였다. 2mM의 sample을 계속적으로 계단 희석하고 여기에 virus 100 μ l를 혼합한 것을 5% CO₂가 유지되는 37 $^{\circ}$ C배양기에서 13~15시간 동안 감염시켰다.

억제물질에 혼합된 바이러스를 제거한 다음 TNC로 2번 세척하였고 10% formalin을 각 well에 60 μ l씩 넣어 상온에서 30분 동안 세포를 고정하였다. 다시 TNC로 2번 세척하여 1% triton X-100을 각 well에 60 μ l씩 넣었고 상온에서 4분간 정치 후 TNC로 다시 2번 세척한 다음 1차 로타바이러스에 특이적 단클론 항체인 IB2를 FBS가 1% 첨가된 TNC로 15,000배가 되도록 희석하여 각 well에 125 μ l씩 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양시켰다. 다시 TNC로 2번 세척하여 2차 항체 HRP goat anti-mouse(IgG)(Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD.)를 FBS가 1% 첨가된 TNC로 4,000배가 되도록 희석하여 75 μ l씩 각 well에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양시켰다. AEC staining solution은 N, N-dimethylformamide(Sigma, No.D-4254) ml당 4mg의 3-amino-9-ethylcarbazole(Sigma, No.A-5754)이 첨가된 것과 0.05M sodium acetate buffer(pH 5.2), hydrogen peroxide (300 : 700 : 1)를 혼

합하여 각 well에 60 μ l씩 첨가하였고 상온에서 3~8분간 반응하여 염색시킨 후 TNC로 2번 세척하여 현미경(Olympus TE-3000, Japan) 상에서 사진 촬영하였다.

결 과

로타바이러스 역가

한우 송아지 설사변에서 분리한 로타바이러스 S97과 표준 바이러스 JBR의 감염가를 측정하기 위해 6차 계대배양한 로타바이러스를 10⁻¹에서 10⁻⁸까지 희석하여 0.7% agarose 배지로 중층한 다음, neutral red staining에 의해 원형 탈색된 부분의 plaque forming unit(PFU) 수를 관찰하였다. 그 결과 S97은 2.5 \times 10⁷ PFU/ml이었고, JBR은 2.0 \times 10⁶ PFU/ml이었다.

κ -casein, GMP, sialic acid가 한우송아지 로타바이러스 S97의 세포감염에 미치는 영향

우유의 생리기능성분이 로타바이러스의 MA-104 세포감염에 미치는 영향을 조사하기 위해서 한우 송아지 설사변에서 분리 배양한 바이러스 중 S97과 표준바이러스 JBR에 κ -casein, GMP 및 sialic acid 각각을 농도에 따라(2 \times 10⁰~2 \times 10⁹ μ M) 첨가하여 15시간 배양한 다음 AEC stain법으로 염색시켜 현미경 상에서 붉게 염색된 세포를 계수하여, 억제물질이 첨가되지 않은 대조구와 비교하여 감염 저해율을 계산하였다. Fig. 1은 바이러스 control과 각각의 억제물질을 1000 μ M의 농도로 첨가했을 때, MA-104 세포의 감염상태를 현미경상에서 촬영하여 나타낸 것이다. Fig. 2는 바이러스 S97에 감염된 세포수를 계산하여 그 억제율을 나타낸 것으로 κ -casein과 GMP의 로타바이러스 억제율은 농도 15, 1000과 2000 μ M에서 각각 49.6 \pm 11.88, 89.4 \pm 1.98, 97.4 \pm 0.03%와 34.2 \pm 5.94, 98.6 \pm 1.98, 99.78 \pm 0.28%로 κ -casein과 GMP는 농도증가와 비례하여 높게 나타났다. 반면 sialic acid에서는 농도 15, 1000과 2000 μ M에서 각각 1.56 \pm 13.74, 10.71 \pm 8.77와 3.85 \pm 5.29를 나타내 거의 억제효과가 없는 것으로 나타났다.

κ -casein, GMP, sialic acid가 JBR의 세포감염에 미치는 영향

JBR의 MA-104 세포 감염상태는 Fig. 3과 같으며 감염된 세포수를 계산하여 그 억제율을 나타낸 결과는 Table 2와 Fig. 4에서 보는 바와 같이 κ -casein과 GMP는 농도 15, 1000과 2000 μ M에서 각각 43.72 \pm 7.23, 93.60 \pm 5.43, 97.44 \pm 3.62%와 25.81 \pm 3.62, 98.32 \pm 2.30, 99.52 \pm 0.68%의 억제율을 나타냈으며, GMP의 경우 농도에 비하여 억제율이 높게 나타났다. 반면 sialic acid에서는 농도 15, 1000과 2000 μ M에서 각각

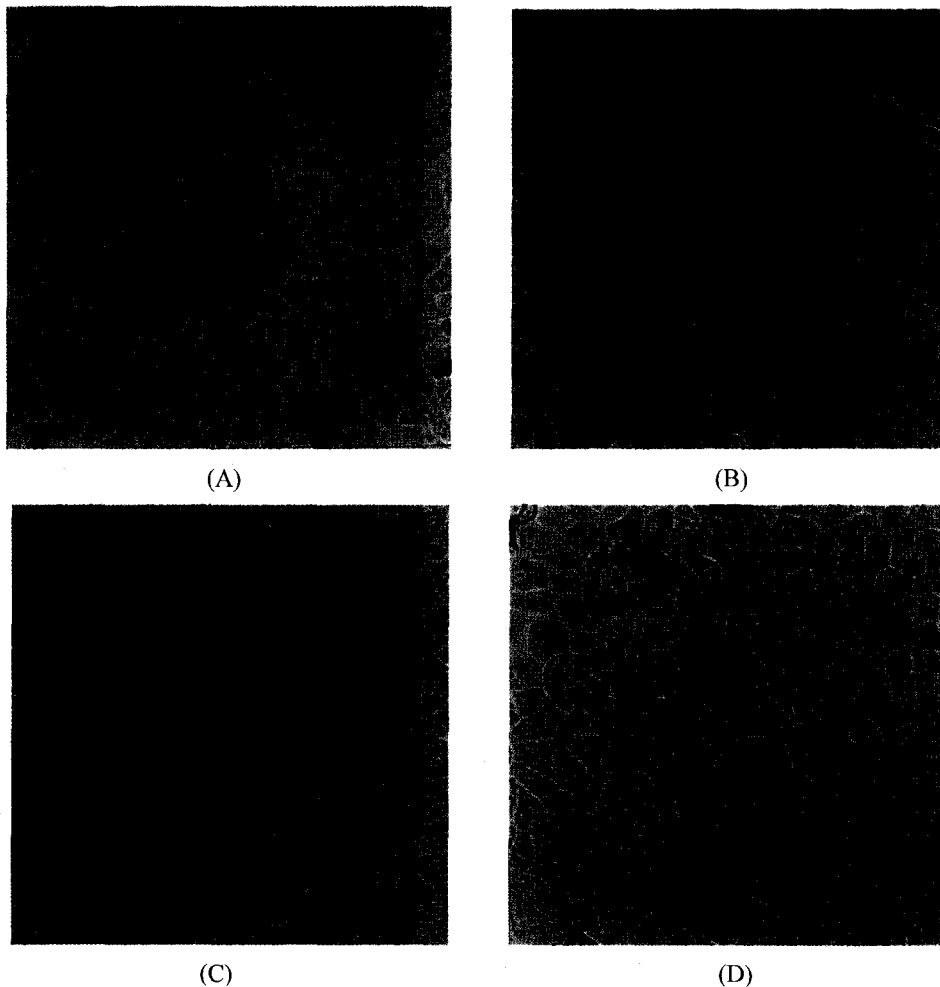


Fig. 1. Microscopes of AEC stained of MA-104 cells infected by Korean native cattle rotavirus S97($\times 200$; Olympus TE-3000). Red colors show rotavirus infected cells. A: Virus control, B: κ -casein concentration $500 \mu\text{M}$, C: GMP concentration $500 \mu\text{M}$, D: sialic acid concentration $500 \mu\text{M}$.

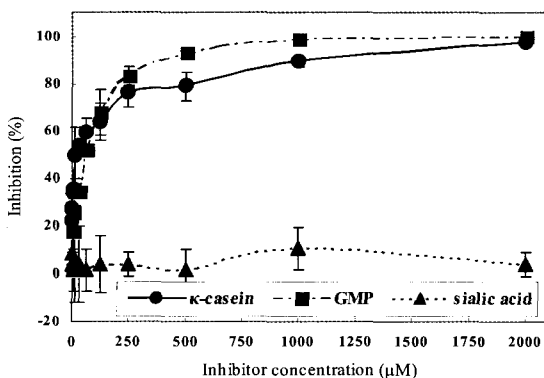


Fig. 2. Patterns of inhibitory effect of κ -casein, GMP and sialic acid on the Korean native cattle rotavirus S97 infected cells by AEC staining.

5.16 ± 4.10 , 10.64 ± 2.26 와 3.63 ± 2.26 으로 거의 억제효과가 없

것으로 나타났다. 표준 로타바이러스 JBR과 국내에서 분리한 한우송아지 설사 바이러스 S97에서 κ -casein와 GMP는 농도가 증가함에 따라 억제율이 높게 나타났지만, sialic acid에서는 JBR과 S97 모두에서 농도가 증가함에 따라 뚜렷한 저해율이 보이지 않았다.

고찰

로타바이러스를 예방하기 위해 백신개발이 꾸준히 진행되어 오고 있지만, VP7과 VP4 혈청형 양쪽에 대해 면역을 획득해야 로타바이러스 감염으로 인한 설사에 대해 저항성을 갖게 되고 또한 자연계에서 계속 변이하기 때문에 백신 개발의 어려움이 있다(Kapikian and Chanock, 1990; Conner et al., 1994). 실제 실험에서 백신개발의 일차적 실패는 로타바이러스들의 부위에 나타난 제한된 면역반응 때문이다. 로타바이러스 설사의 진행에 따른 가장 중요한 방어인자는 소장 내강

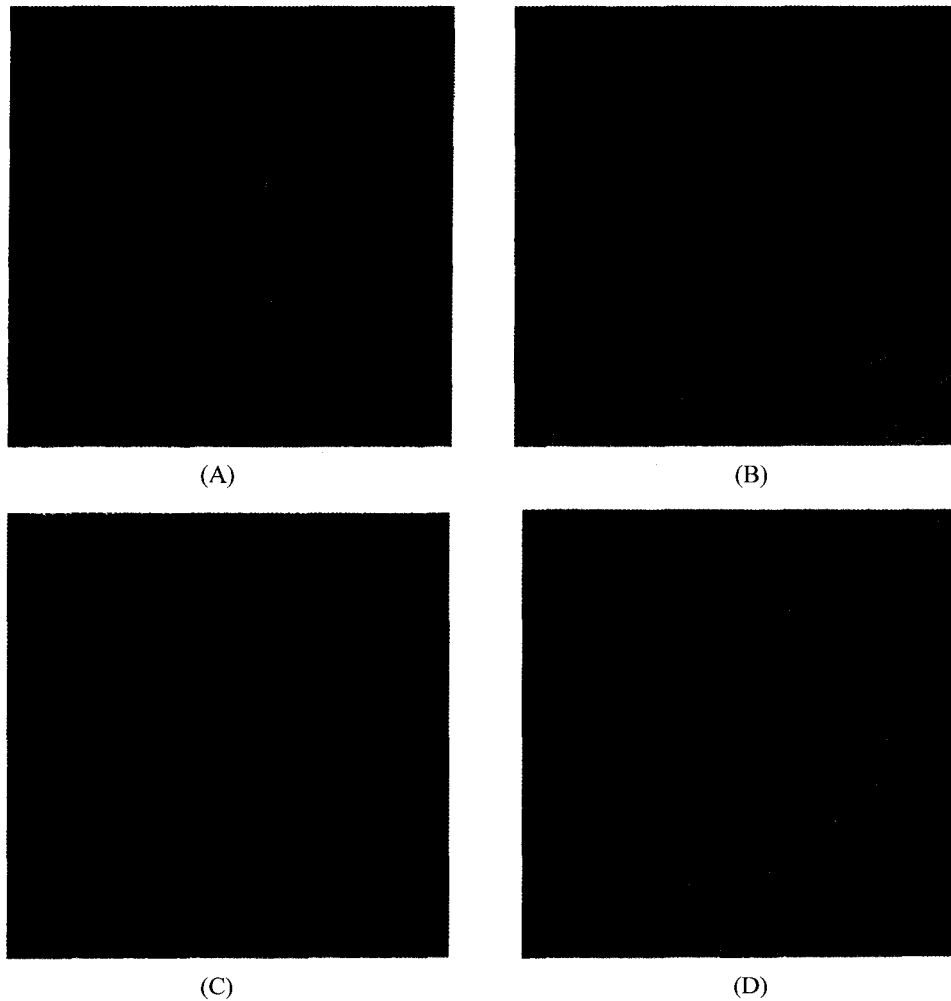


Fig. 3. Microscopes of AEC stained MA-104 cells infected by Jeju island bovine rotavirus($\times 200$; Olympus TE-3000). Red colors show rotavirus infected cells. A: Virus control, B: κ -casein concentration $500 \mu\text{M}$, C: GMP concentration $500 \mu\text{M}$, D: sialic acid concentration $500 \mu\text{M}$.

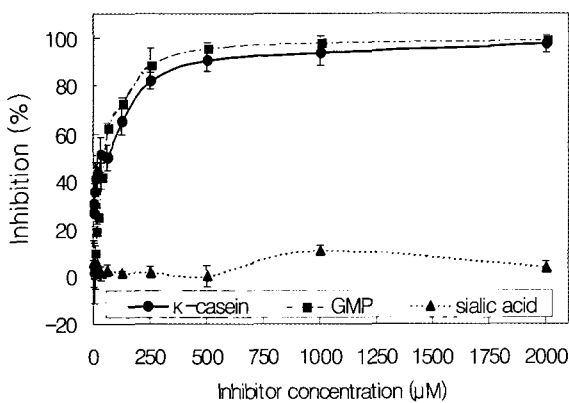


Fig. 4. Patterns of inhibitory effect of κ -casein, GMP and sialic acid on the JBR(Jeju island bovine rotavirus) infected cells by AEC staining.

에 존재하는 IgA의 존재이다(Shaw et al., 1991).

이들 전체적인 문제를 해결하기 위해 식품성분으로 로타 바이러스 감염을 방어하는 많은 연구가 보고되고 있다. Holstein젖소에 HRV Wa, Ku, Mo strain을 면역시킨 후 초유를 탈지하고 동결건조하여 유아에게 음용시켰을 때 항로타 바이러스 초유가 로타바이러스 위장염을 예방하고(Ebina et al., 1992), 모유의 mucin이 *in vitro*와 *in vivo*에서 HRV Wa, DS-1, P와 ST-3 strain을 억제한다(Yolken et al., 1992). 난백의 ovomucoids와 ovalbumin이 로타바이러스 감염을 억제하고(Yolken et al., 1987), 난황에서 분리한 sialyloligosaccharides가 *in vitro*와 *in vivo*에서 로타바이러스를 상당히 억제한다고 보고되고 있다(Koketsu et al., 1995). 그리고 녹차 추출물 중의 458D의 epigallo catechin gallate가 $1\mu\text{g/ml}$ 농도로 HRV 감염가를 96.2% 억제한다(Ebina and Tsukada, 1991).

한우송아지의 바이러스성 설사의 감염율은 지금까지 조사 결과 30% 전후였다. 이러한 바이러스성 설사는 세균성 및 대사성 설사와 달리 치료가 불가능하여 폐사되는 경우가 많

다. 2차 감염을 예방하기 위해 항생제로 치료하거나, 감염된 송아지 자체 면역에 의한 항체생산으로 스스로 이겨낼 수 있는 격리된 위생적 환경 및 환기와 온도, 습도 조절 등 대증요법으로 치료해야 한다. 그러나 완치되더라도 소장 용모돌기가 파손되어 성장과 발육이 잘 되지 않거나, 우유 생산량도 감소하게 되는 등의 경제적 손실도 크다고 할 수 있다.

본 연구에서는 우유의 생리기능성분인 κ -casein, GMP, sialic acid가 한우 송아지 설사 원인인 로타바이러스 S97과 JBR의 MA-104 세포감염에 미치는 영향에 대한 실험을 실시하여 이들 물질이 국내에서 분리해낸 로타바이러스의 세포 감염능력을 저해하는지 확인하였다.

κ -casein, GMP에서의 BRV S97 세포감염 억제율은 97% 이상 나타났고, κ -casein, GMP의 JBR의 세포감염 억제율은 99%로 BRV S97 보다 다소 높은 억제율을 나타냈다. 이상의 결과와 같이 κ -casein, GMP가 BRV S97와 JBR의 감염을 억제함으로써 송아지 사료에 κ -casein, GMP를 첨가하여 송아지 바이러스 설사로 인한 육우나 젖소 사육농가의 손실을 줄일 수 있고 또한 κ -casein, GMP가 유아 로타바이러스 감염을 억제시킬 수 있을 것으로 예상되며, 이를 기초로 어린이의 로타바이러스성 설사를 예방하기 위한 저해제 검색과 그 저해제를 분유나 이유식 등에 이용 가능성이 기대되고 vaccine 개발의 기틀을 마련할 수 있을 것으로 전망된다.

요 약

로타바이러스는 유아와 어린 포유동물에 있어서 위장염을 일으키는 원인체로서 다양한 혈청형에 의해 발병되기 때문에 효과적인 백신 개발이 되지 않고 있다. 본 연구는 국내 분리 한우송아지 로타바이러스 S97과 JBR(Jeu island bovine rotavirus)에 κ -casein, GMP, sialic acid를 첨가하여 MA-104세포에 감염시켰을 때 그 억제 효과를 규명하기 위해 시행하였다. 한우송아지 로타바이러스 S97과 JBR을 무혈청 M199배지의 MA-104세포에 감염시켜 37°C에서 6일간 회전 배양하여 활성화시킨 다음, 로타바이러스 역가를 분석하였고, MA-104 세포에 활성화된 BRV를 감염시키고, κ -casein, GMP, sialic acid를 각각 농도에 따라 첨가하여 15시간 배양한 다음 AEC 염색법으로 염색시켜 현미경 상에서 감염된 세포수를 계산하였다. 한우송아지 로타바이러스 S97과 JBR의 역가는 각각 2.5×10^7 과 2.0×10^6 PFU/ml이었다. κ -casein, GMP의 농도 2000 μ M에서 S97의 세포감염율은 97.4%와 97.44%로 나타났고, κ -casein, GMP의 농도 2000 μ M에서 JBR의 세포감염 억제율은 99.52%와 99.78%로 나타났다. Sialic acid의 농도 2000 μ M에서의 S97과 JBR의 세포감염 억제율은 3.85%와 3.63%로 나타났다. κ -casein, GMP는 로타바이러스 S97과

JBR에 대해 농도 2000 μ M에서 97% 이상의 억제효과를 나타냈으며, sialic acid는 억제효과가 거의 없었다. κ -casein, GMP는 송아지뿐만 아니라 유아의 로타바이러스에 의한 설사를 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

위 논문은 2000학년도 건국대학교 학술진흥연구비에 의해 이루어진 것이므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Alais, C. and Jolles, P. (1961) Etude comparee des caseinoglycopeptide formes par action de la pressure sur les caseines de vache et de chever. Etude de la partie non-peptidique. *Biochim. Biophys. Acta.*, **51**, 315.
- Azuma, N., Yamaguchi, K. and Mitsuoka, T. (1984) Bifidus growth-promoting activity of a glycomacropeptide derived from human κ -casein. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2159.
- Baker, J. C. (1987) Bovine viral diarrhoea virus: A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **190**, 1449-1458.
- Bass, D. M., Baylar, M. R., Chen, C., Meng, L. and Greenberg, H. B. (1992) Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *J. Clin. Invest.*, **90**, 2313-2320.
- Cha, K. J., Yu, D. Y., Lee, J. K. and Yu, J. H. (1999) Effect of bovine lactoferrin on MA-104 cell infected with human rotavirus. *J. Kor. Soc. Virol.*, **29**, 87-97.
- Chiarini, A., Arista, S., Giammanco, A. and Sinatra, A. (1983) Rotavirus persistence in cell culture: select of resistant cells in the presence of fetal calf serum. *J. Gen. Virol.*, **64**, 1101-1110.
- Conner, M. E., Madson, D. O. and Estes, M. E. (1994) Rotavirus vaccines and vaccination potential. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, **105**, 253.
- De Mol, P., Zissis, G., Butzler, J. P., Mutwewingabo, A. and Andre, F. E. (1986) Failure of live, attenuated oral rotavirus vaccine. *Lancet*, **2**, 108-113.
- Ebina, T., Sato, A., Umezu, K., Ishida, N., Ohshima, S., Oizumi, A., Ailawa, K., Katagiri, S., Katsushima, M., Imai, A., Kitaoka, S., Suzuki, H. and Konno, T. (1985) Prevention of rotavirus infection by oral administration of cow colostrum containing antihuman rotavirus antibody. *Medical Microbiology and Immunology*, **174**, 177-185.
- Ebina, T., Tsukada, K., Umezu, K., Nose, M., Tsuda, K., Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T. (1990) Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin (IgY) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation. *Microbiology and Immunology*, **34**, 617-629.
- Ebina, T. and Tsukada, K. (1991) Protease inhibitors prevent the development of human rotavirus induced diarrhoea in suckling mice. *Microbiology and Immunology*, **35**, 583-588.
- Ebina, T., Ohta, M., Kanamaru, Y., Yamamoto-Osumi, Y. and

- Baba, K. (1992) Passive immunization of suckling mice and infants with bovine colostrum containing antibodies to human rotavirus. *J. Med. Virol.*, **38**, 117-123.
13. Estes, M. K. and Cohen, J. (1989) Rotavirus gene structure and function. *American Soci. Microbiol.*, **53**, 410-449.
14. Gentsch, J. R., Glass, R. I. and Woods, P. (1992) Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1365-1373.
15. Jolles, P. and Henschen, A. (1982) Comparison between the clotting of blood and milk. *TIBS*, pp. 29-32.
16. Kaljot, K. T., Shaw, R. D., Rubin, D. H. and Greenberg, H. B. (1988) Infectious rotavirus enters cells direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.*, **62**, 1136-1144.
17. Kapikian, A. Z. and Chanock, R. M. (1990) Rotaviruses. *Virology* 2, 2nd: In B. N. Fields and D. M. Knipe(ed), Raven press, New York. pp. 1353-1404.
18. Kawasaki, Y., Isoda, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Idota, T. and Achiko, K. (1992) Inhibition by lactoferrin and κ -casein glycomacropptide of binding of cholera toxin to its receptor. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 195-198.
19. Kawasaki, Y., Isoda, H., Shinomoto, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Idota, T. and Nakajima, I. (1993) Inhibition by κ -casein glycomacropptide and lactoferrin of influenza virus hemagglutination. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1214-1215.
20. Kobayashi, N., Taniguchi, K. and Urasawa, T. (1993) Reactivity of antihuman rotavirus VP4 neutralizing monoclonal antibodies with animal rotaviruses and with unusual human rotaviruses having different P and G serotypes. *Res. Virol.*, **144**, 201-207.
21. Koketsu, M., Nitoda, T., Juneja, L. R., Kim, M., Kashimura, M. and Yamamoto, T. (1995) Sialyloligosaccharides from egg-yolk as an inhibitor of rotaviral infection. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 858-861.
22. McKenzie, H. A. (1971) Milk proteins II: Chemistry and molecular biology. Academic Press, New York & London.
23. Neerser, J. R. (1987) Caseinoglycopeptides as dental plaque and dental caries inhibiting agents. *Eur. Pat. Appl.*, EP. 283, 675.
24. Noel, J., Mansoor, A., Thaker, U., Hermann, J., Perronhenry, D. and Cubitt, W. D. (1994) Identification of adenoviruses in faeces from patients with diarrhea at the hospitals for sick children, London, 1989-1992. *J. Med. Virol.*, **43**, 84-90.
25. Ruggeri, F. M. and Greenberg, H. B. (1991) Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J. Virol.*, **65**, 2211-2219.
26. Shaw, R. D., Groene, W. S., Macknow, E. R., Merchant, A. A. and Cheng, E. H. (1991) VP4-specific intestinal antibody response to rotavirus in a murine model of heterotypic infection. *J. Virol.*, **65**, 3052-3059.
27. Song, J. O., Cho, H. C., Lee, Y. K., Lee, J. I., Park, B. S., Kim, Y. H., Cha, K. J. and Yu, J. H. (2000) Effect of glycyrrhetic acid on MA-104 cell infected with bovine rotavirus. *Korean J. BRM*, **10**, 115-126.
28. Superti, F., Ammendolia, M. G., Valenti, P. and Seganti, L. (1997) Antitrotavial activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Medical Microbiology and Immunology*, **186**, 83-91.
29. Yolken, R. H., Peterson, J. A., Vonderfecht, S. R., Fouts, E. T. Midthun, K. and Newburg, D. S. (1992) Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *J. Clin. Invest.*, **90**, 1984-1991.
30. Yolken, R. H., Willoughby, R., Wee, S. B., Miskuff, R. and Vonderfecht, S. R. (1987) Sialic acid glycoproteins inhibit *in vitro* and *in vivo* replication of rotaviruses. *J. Clin. Invest.*, **79**, 148-154.
31. Yu, J. H., Cha, K. J., Kim, E. R., Kim, Y. S., Lee, Y. K., Song, J. O., Cho, H. C., Ju, J. S., Park, B. S., Yu, D. H., Kim, S. M., Ji, B. J., Lee, J. B., Urasawa, S., Taniguchi, K. and Greenberg, H. B. (2000) Isolation, serotyping and nucleotide sequence analysis of bovine rotavirus isolated from Korean native cattle. *J. Kor. Soc. Virol.*, **30**, 189-202.
32. Yu, J. H., Lee, Y. K., Ju, J. S., Kim, Y. S., Kim, S. J., Ebina, T., Nakagomi, O., Urasawa, S., Taniguchi, K. and Greenberg, H. B. (1996) Isolation and characterization of Jeju island bovine rotavirus (JBR). *J. Kor. Soc. Virol.*, **26**, 181-189.

(Accepted July 18, 2002)