

인체 폐섬유아세포 배양에 의한 수두바이러스의 생산

김원배 · †박정극 · *최원상 · **김수옥 · **정용주 · **김현수 · ***김익환
동국대학교 화학공학과 · *동국대학교 생화학과 · **제일제당(주) · ***KIST 생명공학연구소

Production of Varicella-zoster Virus Using Human Lung Fibroblast Cells As Host Cells

Won-Bae Kim, Jung-Keug Park[†], Weon Sang Choi*, Soo-Ok Kim**, Yong-Ju Chung**
Hyun-Su Kim**, and Ik-Hwan Kim***

Department of Chemical Engineering, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

*Department of Biochemistry, Dongguk University, Kyongju, Kyungbuk 780-714, Korea

**Cheil Foods and Chemicals Inc., Ichon, Kyonggi 467-810, Korea

***Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-333, Korea

ABSTRACT

Attenuated varicella-zoster virus (VZV) was propagated in human lung fibroblast (HLF) cells. Among media tested in this work, DMEM was the best medium for the growth of HLF cells. Because HLF was a normal finite cell line, cell growth rate was dependent on the age of HLF cells. When the population doubling level (PDL) was higher than 46, apoptosis of HLF cells started and cell growth rate decreased. The optimum temperature for the cell growth and virus propagation in the T-flask culture was 37°C. In a microcarrier culture system in which Cytodex-3 was used for the VZV propagation in spinner vessels, the yield of plaque forming cells was lower than that in the T-flask culture. The relatively high shear environment near microcarriers was thought to cause the low yield of VZV in the microcarrier culture system.

서 론

Varicella-zoster virus(VZV)는 수두(varicella, chickenpox)나 대상포진(herpes zoster, shingles)을 일으키는 바이러스로서 헤르페스바이러스군(Herpes virus group)에 속하며 DNA 바이러스이다. 수두바이러스는 162개의 캡소머(capsomer)를 가지고 있는 20면체 형태를 보이며 크기는 160~200nm 정도이고 외피(envelope)를 가지고 있다. 수두는 주

로 어린이들에게 유행하는 수포성 전염병이며 대상포진은 40세 이상의 연령층에서 어렸을 때 성립되었던 수두-대상포진 바이러스에 의한 잠재 감염이 재활성화되어 나타나게 되는 질병이다. 수두의 증상으로는 몸에 발진과 수포가 일어난 후 며칠간 앓고 나면 치유되고 사망율은 1% 이하이나 신생아의 경우에는 20% 정도의 사망율을 보인다. 면역성이 약한 어린이나 면역력이 떨어진 상태의 사람 또는 악성 종양으로 면역 억제 요법으로 치료를 받고 있는 사람의 경우 수두에 걸리면 치명적일 수 있다. 따라서 수두바이러스에 대한 백신의 중요성이 증대되고 있다.

† Corresponding Author

수두 바이러스는 사람 이외에 전염된다고 알려진 동물은 아직 없으며, 병원성을 나타내는 동물도 없는 것으로 알려져 있다. 따라서 다른 바이러스처럼 실험동물에 의한 바이러스 실험과 그 특성 파악이 어렵다고 알려져 있다. 수두 바이러스의 증식에 대한 실험으로는 1953년에 Weller가 조직배양을 이용하여 처음으로 수두 바이러스를 분리하였으며, Caunt와 Taylor-Robinson, 그리고 Brunell 등이 초대 배양된 사람의 갑상선 세포나 폐세포 또는 흑색종 세포 등으로부터 소량의 바이러스(cell-free virus)를 얻을 수 있었다(1-3). 1979년 Schmidt와 Lennette는 인체 폐세포 조직배양에서 바이러스(cell-free virus)를 획득하였고(4), 1979년 Grose 등은 인체 melanoma 세포를 이용하여 바이러스를 증식, 분리하였다(5).

수두백신에 대한 연구에서는 VZV의 wild type 바이러스를 사람 및 guinea pig의 2배 체세포에 계대배양을 거듭하여 약독화(attenuation)한 Oka 주를 이용한 생수두백신이 1974년 일본에서 개발되었고(6), 미국에서는 KMcC 균주를 사용한 백신이 1968년 이후부터 연구되었다(7, 8). Hayakawa 등은 수두바이러스 DNA를 제한효소로 처리한 후 전기영동을 실시함으로써 약독화된 바이러스주 간의 차이를 알아내려고 시도하였다. 국내에서도 최초로 분리, 확인된 수두 바이러스와 현재 수두 생바이러스 백신주로 사용하고 있는 Oka 주, 국외에서 분양 받은 Ellen 주, Webster 주와의 차이점을 비교 연구한 바 있으며(9), 또한 국내 환자로부터 분리한 수두 바이러스를 guinea pig 세포와 사람세포에 계대 배양함으로써 약독화(attenuation) 실험을 실시(10)하였다.

수두 바이러스는 세포친화성(Cell-associated) 바이러스로서 바이러스의 증식을 위해서는 세포간 계대(Cell-to-cell transfer)가 필요하며 바이러스의 안정성이 매우 낮아 대량생산이 어려운 바이러스이다. 지금까지는 수두바이러스의 대량생산을 위하여 셀팩토리(Cell Factory)나 또는 회전병(roller bottle)을 사용하고 있는데 이러한 기존의 생산 방법은 인건비가 많이 들고 작업시간이 많이 소요되어 대량생산에 적합하지 못하다. 따라서 본 연구에서는 약독화(attenuation)된 VZV를 사용하여 수두바이러스 백신 생산을 위한 바이러스 배양조건 및 spinner flask를 이용한 바이러스 대량배양 가능성에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

세포주 및 바이러스 주

수두 바이러스 생산을 위해 사용한 숙주세포로는 사람의 폐에서 유래한 섬유아세포(MRC-5, ATCC CCL 171, human lung fibroblast, diploid)로서 American Type Culture Collection(ATCC, Maryland, U.S.A.)에서 분양받았다. 수두 바이러스는 Oka 바이러스주로서 ATCC에서 분양받아 사용하였다. Oka 바이러스를 완전하게 자란 숙주세포에 감염시킨 후 변성효과(cytopathic effect, CPE)가 50% 정도 일어났을 때 세포를 회수하여 감염세포를 바이러스 접종용으로 사용하였다.

배양액 및 혈청

배지는 powder 상태인 Minimum essential medium(MEM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.), Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, 4.5g/l glucose, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.), RPMI-1640(Sigma), DMEM/F-12(1:1 mixture)(Sigma)를 사용하였고, 각각의 배지에 sodium bicarbonate 2.0g/l, 4-2-hydroxyethyl-1-piperazineethane sulphonic acid(HEPES) 2.38g/l, pyruvic acid 0.11g/l 을 넣고 3차중류수를 첨가하여 배지 1 Liter를 만든 후 멸균(121°C, 25min.)된 여과장치(0.22 μ m pore size membrane)를 사용하여 제공하였다. 혈청은 fetal bovine serum(FBS, Gibco)을 56°C에서 30분 처리하여 성장억제 물질을 불활성화시킨 후 10%(v/v) 농도로 배양액에 첨가하여 사용하였다.

숙주세포의 최적 성장배지 선정

숙주세포의 증식정도와 숙주세포가 성장할 수 있는 최적 성장배지를 알기 위해 25cm² T-flask에 MEM, DMEM, DMEM/F12(1:1), RPMI 1640 배지를 5ml(10% FBS)씩 각각 넣고 숙주세포를 7.5 × 10⁴ cells/ml이 되게 접종하여 CO₂ incubator(37°C, 5% CO₂, 95% air) 내에서 7일간 배양하였다. Trypsin-EDTA 용액(trypsin 0.25%, ethylenediaminetetraacetic acid 0.02%)을 사용하여 매일마다 세포를 회수한 후 혈구계로 세포수를 측정하여 세포성장 정도를 관찰하였다.

세포 및 바이러스 배양

세포 배양용 배지로는 DMEM에 10% FBS를 첨

가한 배지를 사용하였다. 배양 시작 5일 후 완전하게 자란 세포에 Trypsin-EDTA 용액을 사용하여 계대 배양하였다. 바이러스 감염세포 배양은 숙주세포가 완전하게 자란 T-flask에 바이러스 감염 세포와 숙주세포의 비가 1:5가 되게 바이러스 감염세포를 넣어 1시간 정도 부착시킨 후 배양액(2% FBS)을 넣어 배양하였으며, 바이러스 감염후 48시간 이내에 세포를 회수하여 바이러스 접종용 세포로 사용하였다.

미립담체(Microcarriers)

본 실험에 사용한 미립담체는 비다공성 미립담체인 Cytodex-3(Pharmacia LKB)를 사용하였다. 먼저 미립담체를 측량(3g/l)하여 표면이 siliconized 된 용기에 넣고 Phosphate Buffered Saline(PBS) 용액(50ml/g bead)을 넣어 3~5시간 정도 충분히 swelling하였다. 상등액을 제거한 후 다시 PBS 용액을 넣고 swelling을 2번 반복한 후 멸균(121°C, 25분)하여 사용하였다.

바이러스(cell free virus) 회수

수두 바이러스에 감염된 세포를 바이러스 회수용 용액(sucrose 74.62g/l, KH₂PO₄ 0.52g/l, K₂HPO₄ 1.26g/l, sodium glutamate 0.84g/l, bovine serum albumin 10g/l)에 넣은 후 sonicator(Vibra cell, Sonics & materials Inc., U.S.A.)를 사용하여 ice bath 내에서 40초간 sonication하여 세포를 터뜨렸다. 세포를 터뜨린 후 원심분리(3,000rpm, 15분)하여 바이러스를 회수하였다.

세포수 측정

혈구계(hemocytometer, Hausser Scientific Co., U.S.A.)를 사용하여 세포농도를 측정하였다. Viable cell density를 측정할 때는 염색액으로 trypan blue (0.4%)을 사용하여 염색되지 않은 세포를 세었고, 미립담체를 이용한 spinner flask 배양시 세포농도가 매우 높으므로 세포보다 크기가 작은 핵을 염색하여 세포농도를 측정하였는데 핵의 염색액으로는 crystal violet 0.1%, 0.1M citric acid 용액을 사용하였으며 이때 세포용액과 염색액을 1:1로 섞은 후 pipetting하여 세포 덩어리들을 깨뜨린 후 핵이 염색된 세포의 수를 혈구계로 세어 전체 세포수를 계산하였다. 모든 실험에서의 세포수 측정은 3번 반복실험한 후 평균치로 나타내었다.

Cell age 계산

숙주세포의 age에 따른 세포성장과 바이러스 감염 정도를 알기 위하여 정상세포의 노화(aging) 정도를 PDL(Population doubling level)로 나타내었다. 세포를 T-flask에 접종하여 5일간 배양한 후 회수하여 세포의 doubling 정도를 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$X_1 = X_0 \times 2^{PDL} \quad (1)$$

$$PDL = \frac{\log(X_1/X_0)}{\log 2} \quad (2)$$

여기서 X₀는 초기 세포접종 농도, X₁은 배양 5일 후 세포농도를 나타낸다. 그리고 정상세포 계대배양 횟수를 passage number로 정하였으며, passage number와 PDL의 상관 관계로부터 세포의 노화 정도를 간접적으로 판단하였다.

바이러스 정량

감염성 바이러스(infectious virus particle)를 정량할 수 있는 방법으로 plaque assay 방법을 이용하여 바이러스 감염 세포(plaque forming cells, PFC)와 cell-free virus(plaque forming units, PFU)를 정량하였다. Plaque assay 3일 전에 12-well plate에 세포를 포함한 배양액(2×10⁵cells/ml)을 각 well에 1ml씩 넣어 배양하였으며 3일 후 바이러스(cell-free)를 적당한 농도로 희석하여 0.1ml씩 well에 분배하였다. 매 10분마다 well-plate를 흔들어 1시간 동안 균일하게 감염되도록 한 다음 2% FBS가 함유된 DMEM 배지를 well 당 1ml씩 넣어 37°C에서 3일간 배양한 후 CMC 용액(0.8% carboxymethyl cellulose, medium viscosity)을 각 well에 1ml씩 넣어 overlay하였으며 4~6일 배양한 후 현미경(40X)을 이용해 plaque를 세어 바이러스 숫자를 결정하였다. 모든 바이러스 정량 결과는 네 번 반복된 실험으로부터 평균치를 나타내었다.

결과 및 고찰

숙주세포의 최적 성장배지 선정

수두바이러스의 숙주세포인 MRC-5 세포의 배양을 위해서는 MEM, DMEM, HAM-F10 또는 DMEM/F-12(1:1 혼합물) 등의 여러 가지 기본배지들이 사용되어 왔다(11-18). 그러나 여러 가지 서로 다른 기본배지에 대한 세포성장의 비교연구는 이루어지지 않았다. 수두바이러스의 증식을 위해서는

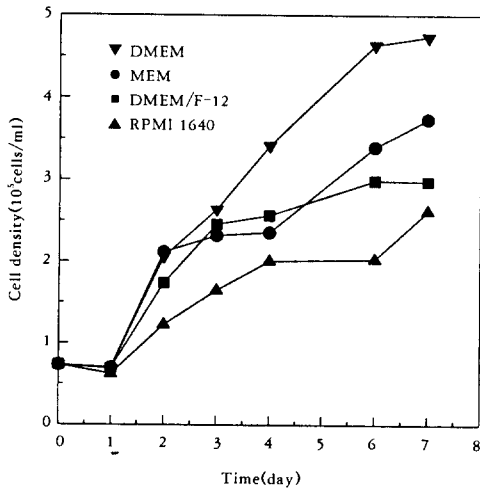


Fig. 1. Effect of basic media on the growth of MRC-5 cells.

숙주세포의 원활한 증식조건이 확립되어야 하므로 여러 가지의 배지를 사용하여 MRC-5 세포의 증식을 조사해 본 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 DMEM 배지에서 가장 좋은 세포성장을 보였다. 이는 DMEM 배지가 RPMI 1640, MEM, F-12 등 본 실험에서 사용된 다른 배지들과 비교하여 glutamine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tyrosine, valine 등의 아미노산과 folic acid, nicotinamide, pyridoxal HCl, riboflavin, thiamin HCl 등의 비타민 함량이 상대적으로 높아서 섬유아세포의 지속적인 성장에 유리한 때문인 것으로 사료된다.

숙주세포 증식에 대한 PDL의 영향

정상세포는 세포에 따라 조금씩 다르지만 세포의 age 증가 즉, doubling 횟수의 증가에 따라 세포의 성장이 둔화되어 결국은 성장을 멈추는 것으로 알려져 있다(19-20). 본 연구에서는 세포의 age를 나타내는 기준으로서 PDL을 사용하였으며, 세포의 PDL에 따른 숙주세포의 성장속도를 측정하였다. MRC-5 세포는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 PDL 46 (passage 32)까지는 정상적인 세포성장을 보였고 그 이후는 세포성장이 둔화되었다. 따라서 PDL이 47 이상일 경우 MRC-5 세포의 노화가 진행됨을 알 수 있었는데 세포의 성장이 둔화되어 노쇠한(Senescent) 세포로 되는 기작은 아직 완전히 밝혀지지

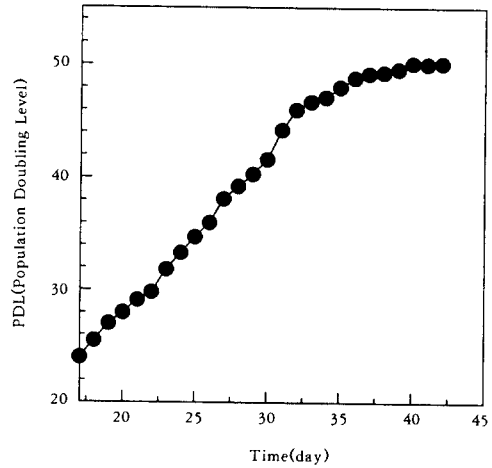


Fig. 2. Relationship between passage number and population doubling level (PDL) of MRC-5 cells.

않았으며 error accumulation hypothesis(21)와 genetic programmed cell death(22-25)의 두 가지 이론이 제시되어 있다. 숙주세포가 노쇠하면 숙주세포 생산기간의 증가, 바이러스의 감염능 저하, 바이러스의 증식속도 감소 등 수두바이러스의 생산성에 영향을 미칠 뿐만 아니라 숙주세포 자체의 error accumulation이나 또는 genetic defects로 인한 바이러스 백신의 안전성에도 영향을 미칠 수 있다. 그러므로 바이러스 백신의 대량생산용 숙주세포는 세포의 성장속도가 둔화되지 않은 상태의 정상적인 세포를 사용하는 것이 바람직하며 따라서 본 연구에서는 PDL 40 이하의 세포만을 바이러스 생산용 세포로 사용하였다.

바이러스 최적 배양 조건

수두바이러스 증식에 영향을 주는 인자로서 온도, 바이러스 감염비, 혈청 사용량 등의 최적 배양조건을 검토하였다. 배양온도의 변화에 따라 바이러스 고유의 성질, 증식관련 효소활성 등이 영향을 받게 되는데 Grose와 Brunell(5)은 VZV를 인체 melanoma 세포에서 증식시킬 때 36℃와 32℃에서 비교해 본 결과 온도가 낮아지면 세포증식은 느려지지만 바이러스 증식은 활발하다고 보고한 바 있다. 본 실험에서는 바이러스 감염세포의 배양온도를 37, 34, 32℃로 유지하여 배양온도의 효과를 조사하였다. 25cm² T-flask에 숙주세포와 바이러스 감염세포의

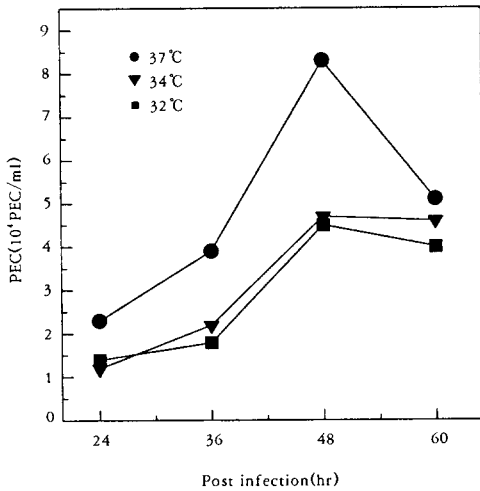


Fig. 3. Effect of temperature on VZV propagation.

비를 1:5로 하여 바이러스를 감염시킨 다음 각각의 온도에서 배양한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 배양온도가 다름에도 바이러스 증식경향은 동일함을 알 수 있었고 37°C에서 바이러스를 배양하여 48시간이 경과했을 때 가장 높은 PFC를 나타내었다. 이 결과는 Grose와 Brunell의 결과와는 상충되는 것으로서 이는 서로 다른 숙주세포를 사용한 것과 본 실험에서는 37°C에서 적용된 세포를 사용한 때문인 것으로 사료된다.

바이러스의 감염비 즉, 바이러스에 감염된 세포와 숙주세포의 비율(multiplicity of infection, MOI)에 따라 바이러스 증식 경향이 크게 달라지는데 VZV는 세포친화성 바이러스로서 세포간 접촉(cell-to-cell transfer)을 필요로 하기 때문에 바이러스 감염비가 높은 경우 많은 초기접종용 바이러스 감염세포가 필요하게 되어 scale-up이 어렵다. 본 실험에서는 세포가 완전하게 자란 25cm² T-flask에 바이러스 감염세포와 숙주세포의 비(MOI)가 각각 1:3, 1:5, 1:10, 1:20이 되게 바이러스를 감염하여 MOI의 영향을 관찰하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 MOI가 낮을수록 최고 PFC를 보이는 시간은 길어졌으며, 최대 PFC는 1:5로 감염시킨 후 48시간 경과하였을 때 얻을 수 있었다. Scale-up에서는 MOI가 낮을수록 유리한데 그에 따라 최대 PFC 값도 낮아질 뿐만 아니라 최대 PFC를 나타내는 시간도 길어지므로 최적 MOI는 1:5가 적당한 것으로 판단된다.

혈청의 영향을 살펴 보면 유리 바이러스를 숙주세

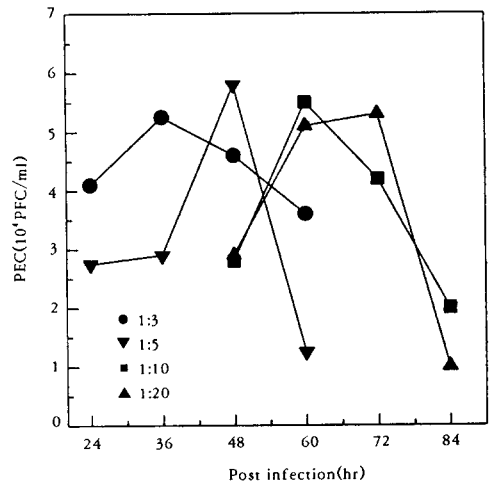


Fig. 4. Effect of MOI on VZV propagation.

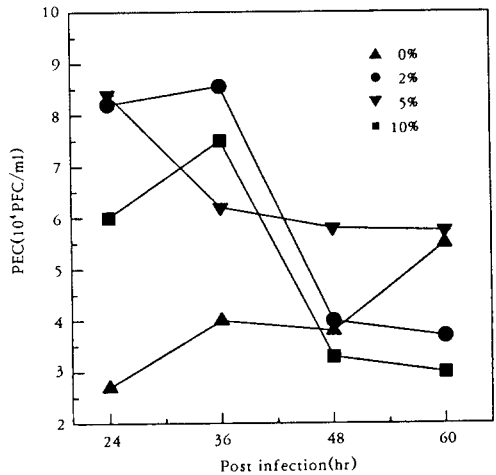


Fig. 5. Effect of FBS concentration on VZV propagation.

포에 감염시킬 때 혈청의 단백질 성분이 바이러스를 중화시키거나 숙주세포에 바이러스가 부착되는 것을 방해하는 작용을 하므로 혈청농도를 적절한 농도로 낮추어 사용하는 것이 일반적이다. 25cm² T-flask에 세포를 배양한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 대부분 감염후 36시간에서 가장 높은 PFC를 나타내었고 2% FBS를 사용하였을 경우가 8.4 × 10⁴/ml로 가장 높은 PFC를 나타내었다. 혈청을 사용하지 않은 경우 세포 및 바이러스의 증식이 억제됨을 알 수

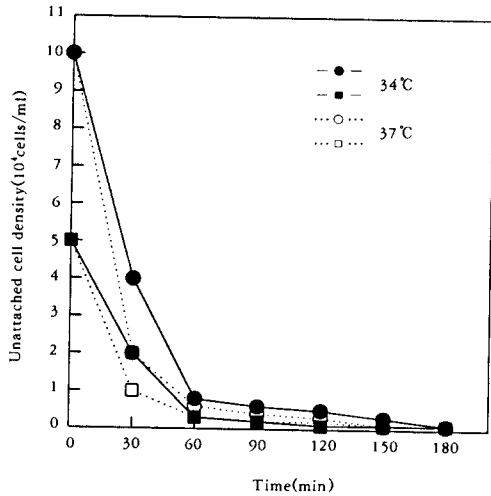


Fig. 6. Attachment of MRC-5 cells onto Cytodex 3 microcarriers.
● and ○: 34°C, ■ and □: 37°C

있었으므로 바이러스 증식시 혈청의 사용은 필수적이고, 최적 혈청농도는 2% FBS를 사용하는 것이 가장 좋은 결과를 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

미립담체를 이용한 숙주세포배양

숙주세포의 담체부착성을 확인하기 위하여 250ml spinner flask를 사용하여 배지 50ml, 미립담체의 농도 6g/l 일 때 배양온도와 접종농도에 따라 미립담체에 부착되는 정도를 측정하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 1시간 이내에 90% 이상의 세포가 미립담체 표면에 부착되었고 34°C에서 보다는 37°C에서 세포부착이 더 우수하였다. 이때 어느 경우든 3시간 이내에 세포가 모두 부착하는 것을 확인할 수 있었다. 세포가 완전히 부착된 후 50ml의 배지를 추가하여 최종 담체농도를 3g/l로 되도록 한 후 30rpm으로 연속 교반배양하면서 초기 세포접종농도를 1×10^5 과 5×10^4 cells/ml로 하여 세포성장을 살펴 본 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 초기 접종농도를 1×10^5 cells/ml로 하였을 경우 8일간 배양시 최종 세포농도는 5.4×10^5 cells/ml이었고, 초기 세포접종농도가 5×10^4 cells/ml인 경우 약 4×10^5 cells/ml의 세포를 얻을 수 있었다. 이는 T-flask와 비교하여 거의 대등한 세포농도를 나타내는 것으로서 (Fig. 1 참조) 미립담체배양은 바이오리액터를 이용한 대량배양이 가능하기 때문에 현재 VZV의 대량

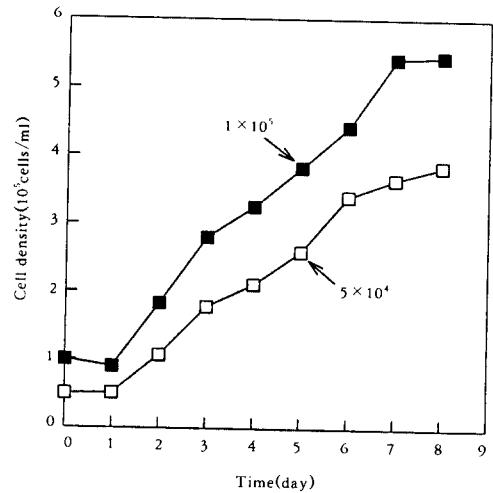


Fig. 7. Effect of initial cell density (■ 1×10^5 cells/ml, □ 5×10^4 cells/ml) on the growth of MRC-5 cells on Cytodex 3 microcarriers at 37°C.

생산에 사용되고 있는 T-flask, Cell factory 또는 roller bottle보다 scale-up이 훨씬 용이할 것으로 사료된다.

미립담체를 이용한 바이러스 대량배양

정상세포가 미립담체에서 confluent하게 자란 후 배지를 모두 회수하고 FBS를 2% 함유한 새로운 배지 50ml을 넣고 MOI가 1:5되게 바이러스 감염 세포를 접종하였다. 30분마다 2분씩 간헐적으로 교반하면서 세포의 부착여부를 점검한 결과 2시간 이내에 바이러스 감염세포가 모두 숙주세포에 부착됨을 확인하였다 (data not shown). Fig. 8에서 보는 바와 같이 숙주 세포가 가득차게 자란 미립담체에 바이러스 감염 세포를 접종하였을 때 바이러스 감염 세포가 미립담체 표면 위의 숙주세포에 잘 부착되는 것을 확인할 수 있었다.

바이러스 감염 세포를 미립담체에 부착시킨 후 배지 50ml을 추가하여 넣고 30rpm으로 연속교반하면서 PFC의 증식을 검토하였는데 spinner flask를 이용한 microcarrier culture와 T-flask 배양결과를 비교해 보면 Fig. 9에서 보는 바와 같이 microcarrier culture의 PFC 결과가 T-flask 결과인 8.5×10^4 cells/ml에 비하여 약 15%에 불과한 1.3×10^4 PFC/ml를 보였다. 이렇게 microcarrier의 PFC 증

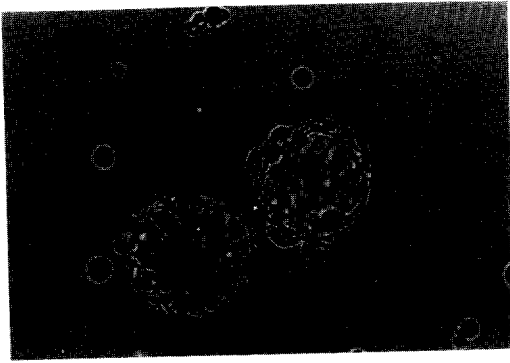


Fig. 8. Photomicrograph of confluent MRC-5 cells on Cytodex-3 and virus infected cells attached onto the MRC-5 cells (1hr after virus infection, 100X magnification).

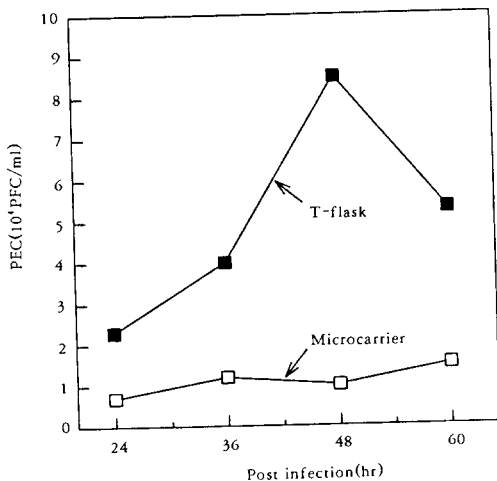


Fig. 9. Comparison of VZV propagation in T-flask culture (■) and microcarrier culture (□).

식이 낮은 이유로는 T-flask 배양에서는 정체상태의 세포간 감염전달로 단시간 내에 높은 PFC를 보이는 반면 미립담체를 이용한 바이러스 증식의 경우에는 상대적으로 T-flask보다는 훨씬 높은 바이오리액터 내의 전단응력(shear stress) 때문에 PFC의 증식이 제한되는 것으로 생각된다. 더욱이 바이러스 감염세포를 접촉하고 36~48시간이 경과한 후에는 세포가 붙어 있는 미립담체들이 서로 엉기어 aggregates를 형성함으로써 미립담체의 원활한 교반을 저해하는 것이 관찰되었다. 이러한 복합적인 요인들이 미립담

체에서의 PFC 증식을 방해하는 것으로 사료되는 바 미립담체를 이용한 VZV의 대량생산을 위해서는 추후 전단응력이 작은 바이오리액터의 개발과 세포가 부착된 미립담체들의 엉김 방지법 개발 등의 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

수두 바이러스(Varicella-zoster virus, VZV) 백신을 생산하기 위하여 약독화된 수두 바이러스 주인 Oka 주를 사용하여 정상세포인 인체 폐세포(human lung fibroblast cells)로부터 수두 바이러스 생산조건을 검토하였다. 숙주세포의 배양을 위한 최적 성장배지로는 DMEM이 조사된 배지 중에서는 가장 좋음을 알 수 있었으며 숙주세포의 성장율은 세포 age의 지표인 population doubling level (PDL)이 46 이상인 경우 낮아지는 것으로 확인되었으며 따라서 수두바이러스 생산을 위해서는 PDL 46 이하의 young cell을 사용해야 할 것으로 사료된다. 한편 수두바이러스 생산을 위한 최적 증식조건으로는 배양온도 37°C, 혈청농도 2%, MOI 1:5였다. 숙주세포를 대량배양하기 위한 기본조건을 검토하기 위하여 미립담체(Cytodex-3)를 이용한 spinner flask culture를 시행하였다. 미립담체에서의 숙주세포 성장은 T-flask와 비교하여 별다른 차이가 없었으나 VZV의 증식은 T-flask 배양에서보다 훨씬 낮았다. 이는 미립담체배양에서의 높은 전단응력과 미립담체 끼리의 엉김현상 때문으로 생각된다.

참고 문헌

1. T. H. Weller(1953), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **83**, 340.
2. A. E. Caunt(1963), *Lancet*, **2**, 982.
3. D. Taylor-Robinson(1959), *Br. J. Exp. Pathol.*, **40**, 521.
4. N. J. Schmidt and E. H. Lennette(1976), *Infect. Immun.*, **14**, 709.
5. C. Grose and P. A. Brunell(1978), *Infect. Immun.*, **19**, 199.
6. M. Takahashi, Y. Hayakawa, and K. Shiraki (1985), *Postgraduate Medical J.*, **61**, 37.
7. A. M. Arbeter and S. E. Starr(1983), *Pediatrics*, **71**, 307.
8. B. J. Neff and R. E. Weibel(1981), *Proc. Soc.*

- Exp. Biol. Med.*, **166**, 339.
9. K. K. Hwang, S. Y. Park, S. J. Kim, Y. W. Ryu, and K. H. Kim(1991), *J. Korean Soc. of Virol.*, **21**, 201.
 10. K. K. Hwang, B. H. Chun, H. S. Park, S. Y. Park, K. H. Kim, and H. M. Moon(1992), *J. Korean Soc. Virol.*, **22**, 105.
 11. F. Rapp and D. Vanderslice(1964), *Virology*, **22**, 321.
 12. X. Trias, H. M. Strebel, G. Paumgartner, and U. N. Wiesmann(1977), *Europ. J. Clin. Invest.*, **7**, 189.
 13. F. J. Candal, V. G. George, and E. W. Ades (1991), *Biologicals*, **19**, 213.
 14. C. L. Crespi, T. Imamura, P. M. Leong, R. J. Fleischaker, H. Brunengraber, and W. G. Thilly(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2673.
 15. J. M. Clark, C. Gebb, and M. D. Hirtenstein (1982), *Develop. Biol. Standard*, **50**, 81.
 16. D. Fairweather, M. Fox, and G. P. Margison (1987), *Exp. Cell. Res.*, **168**, 153.
 17. C. Wistrom and B. Villeponteau(1990), *Exp. Gerontology*, **25**, 97.
 18. S. P. Forestell, N. Kalogerakis, and L. A. Behie(1992), *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 1039.
 19. L. Hayflick and P. S. Moorehead(1961), *Exp. Cell. Res.*, **25**, 585.
 20. L. Hayflick(1976), *N. Engl. J. Med.*, **295**, 1302.
 21. L. E. Orgel(1973), *Nature*, **243**, 441.
 22. R. Holliday, L. I. Huschtscha, G. M. Tarrant, and T. B. L. Kirkwood(1977), *Science*, **198**, 366.
 23. R. Holliday, L. I. Huschtscha, and T. B. L. Kirkwood(1981), *Science*, **213**, 1505.
 24. O. M. Pereira-Smith and J. M. Smith(1988), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 5635.
 25. O. Sugawara, M. Oshimura, M. Koi, L. Annab, and J. C. Barret(1990), *Science*, **247**, 707.