

베로 세포에 적응된 약독화 일본뇌염바이러스의 성장 특성

홍 선 표 · 정 용 주 · 문 상 범 · 신 영 철 · 이 성 희 · †김 수 옥

제일제당 종합연구소

(접수 : 1997. 12. 1., 게재승인 : 1998. 3. 15.)

Growth Characteristics of an Attenuated Japanese Encephalitis Virus in a Monkey Kidney Cell (Vero)

Sun Pyo Hong, Yong-Ju Chung, Sang Bum Moon, Young-Cheol Shin, Sung-Hee Lee, and Soo-Ok Kim†

R & D Center, Cheiljedang Corp., 522-1 Ichon-Si, Kyonggi-Do 467-810, Korea

(Received : 1997. 12. 1., Accepted : 1998. 3. 15.)

An attenuated Japanese encephalitis virus (JEV) clone SA-14-14-2(Vero) was obtained through successive adaptation of a primary cell adapted strain, SA14-14-2(PDK) to Vero cell, a continuous line of monkey kidney cells. The virus titer reached above the 10^7 plaque forming unit (pfu) per mL of culture supernatant with 3 passages in Vero cells and was maintained close to this level in the further passages. The optimum temperature for the virus growth was 35°C. Growth pattern of the virus indicated that optimum time for the virus harvest is 4 days post infection and the virus accomplished rapid initial propagation even in medium containing no serum supplement. The roller bottle (RB) system and the spinner flask (SF) system using micro-carrier (Cytodex-1) for the JEV cultivation were explored. When RB, SF, and T-flask culture system were compared, there was no significant difference in virus yield. Furthermore, the results indicated that virus could be harvested multiple times from 3 days to 9 days post infection; neither severe cytopathic effect (CPE) in the infected cells nor the decrease in the titer was observed on duration of 9 days.

Key Words : Japanese encephalitis virus, Vero cell, roller bottle culture

서 론

일본뇌염은 돼지를 중간숙주로 하여 전파되는 바이러스 질환으로 잠복기는 약 7-14일이며, 두통, 오한, 발열, 구토, 경련 그리고 혼수 등의 증세를 일으키고 치사율은 5-25%이다(1, 2). 일본뇌염바이러스는 일본, 중국, 대만, 한국 필리핀, 극동러시아, 인도와 동남아 지역에 폭넓게 분포하고 있으며, 중국의 경우 매년 10,000 명 이상이 감염되고 있으며 국내에서도 300만명의 소아가 매년 백신 접종을 받고 있다(3). 현재 사용되고 있는 일본뇌염백신은 일본 오사카대학의 The Research Foundation for Microbial Disease (BIKEN)이 쥐의 뇌를 이용하여 바이러스를 배양하여 처음으로 개발한 백신으로 1960대 이후 계속 사용되고 있으나 쥐뇌세포 유래 단백질로 인한 부작용을 배제할 수가 없다. 1990년 이후에는 국내에서 접종후 부작용으로 인한 수 건의 소아 사망사례가 있었으며, 일본, 미국, 덴마크, 호주 등에서도 유사한 사례가 보고되고 있다(4, 5). 기존의 일본뇌염백

신은 세계적으로 접종되고 있는 백신중 유일하게 백신 항원인 바이러스를 쥐뇌를 이용하여 제조되는 백신으로 접종으로 인한 부작용 외에도 제조 공정이 쥐뇌를 파쇄해야 하는 등의 많은 노동력을 요구하는 문제점이 있다. 그 외에, Ashok 등의 대장균 발현 벡터를 이용한 유전자 재조합 백신, 미국 Micro Gene Sys.의 Baculovirus 발현벡터를 이용한 유전자 재조합 백신, 일본 Nippon Zeon과 미국 NIH 공동 연구의 일본뇌염/B형 간염 복합 백신 등이 개발 중이나 진도와 실용성 면에서는 미국 Oravax (Sumiyoshi 등)가 가장 앞서 있다(6-9). Oravax는 유전자 조작을 이용하여 약독화 바이러스주를 선별하였고, 세포배양을 통해 제조한 생바이러스 백신을 임상실험 중인 것으로 알려져 있다. 한편 중국에서는 약독화 바이러스를 primary hamster kidney (PHK) 세포에 배양하여 제조한 생백신을 그간 1 억도스 이상 접종하였으나, 약독화 면에서 균주 안정성과 높은 면역원성을 갖는 장점에도 불구하고, PHK세포주가 세계보건기구(WHO)의 Human Vaccine Standard에 적합한 세포주로 평가되지 않는 상황으로 중국 내에서 국한되어 사용되고 있는 실정이다(10).

이에 본 연구에서는 안전성과 효능 면에서 개선된 백신 개발을 위해 WHO가 백신 생산에 권장하고 있는 표준세포주인 Vero 세포에 일본뇌염바이러스를 연속 계대배양을 통해 적응(adaptation)시키고, 바이러스 배양 조건 및 roller bottle과

† Corresponding author : R & D Center, Cheiljedang Corp., 522-1 Ichon-Si, Kyonggi-Do 467-810, Korea
Tel : 0336-39-4373, Fax : 0336-32-2784
e-mail : suekim@cheiljedang.com

spinner flask를 이용한 바이러스 대량배양 가능성에 대하여 고찰하였다.

재료 및 방법

세포주 및 바이러스주

일본뇌염바이러스 생산을 위해 사용한 숙주세포는 계대수가 139인 Vero cell로서 미국방성 소속인 Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR, Washington D.C., USA)에서 분양받았다. Parent 바이러스로 사용한 일본뇌염바이러스는 약독화 균주인 SA14-14-2(PDK)로서 WRAIR에서 분양받았다.

배지 및 혈청

배지는 Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM, GibcoBRL 11700-077, autoclavable) 을 3차 증류수에 녹인 후 121°C에서 15분 동안 멸균하여 식히고, sodium bicarbonate 2.2 g/L, L-Glutamine 0.292 g/L, Neomycin 을 50 mg/mL가 되도록 첨가하였다. 혈청은 fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL 16000-044)을 55°C에서 30분 처리하여 성장억제물질을 불활성시킨 후 10% (v/v) 농도로 배양액에 첨가하여 사용하였다. Vero cell 배양에는 EMEM 배지에 10% FBS를 첨가한 성장배지를 사용하였고, 바이러스 배양은 EMEM 배지에 2% FBS를 첨가하거나 FBS를 첨가하지 않는 유지배지를 사용하였다.

세포 및 바이러스 배양

Vero 세포주는 액체질소 안에 보관한 계대수가 139인 master cell bank로부터 꺼내어 37°C 중탕기에서 천천히 흔들며 녹인 후 원심분리 (1500 rpm, 5분)하여 상등액을 버리고 Vero cell만을 배지로 현탁시켜 175 cm²T-flask에 넣어 성장배지로 배양하였다. 배양 4-5일 후에 완전하게 자란 세포를 phosphate-buffered saline (PBS)로 씻어내고 trypsin-EDTA 용액을 사용하여 cell monolayer를 1:3 또는 1:4로 35°C, 새로운 175 cm²T-flask로 계대배양하였다. 세포 및 바이러스의 대량배양에 사용한 roller bottle culture는 다음과 같이 수행하였다. 2개의 175 cm²T-flask에 완전히 자란 Vero cell을 상기의 방법으로 떼어내어 850 cm²-roller bottle에 접종하고 FBS가 10% 들어간 EMEM 배지를 200 mL 넣어 35°C 항온실에서 4일간 0.5 rpm으로 배양하였다.

미립담체 (Microcarriers)

본 실험에 사용한 미립담체는 비다공성 미립담체인 Cytodex-1 (Pharmacia LKB)를 사용하였다. 미립담체를 20 g/L 가 되도록 정량하여 표면이 silicon으로 coating된 용기에 넣고 PBS 용액을 10 mL/g of bead가 되도록 넣어 3-5시간 정도 충분히 swelling시켰다. 상등액을 제거한 후 다시 PBS 용액을 넣고 swelling을 2번 반복한 후 멸균 (121°C, 15분)하여 사용하였다.

Plaque assay

감염성 바이러스의 titer를 측정하기 위해 plaque assay 방법을 사용하여 배양액 내의 바이러스양을 plaque forming unit (pfu)로 측정하였다. Plaque assay 2일전에 24 well plate에 세

포를 포함한 배양액을 2x10⁵ cells/mL이 되도록 각 well에 1 mL씩 넣어 배양하였다. 바이러스는 적당한 농도로 희석하고 각각의 well에서 배양액을 제거한 후 바이러스 희석액을 0.1 mL씩 well에 분배하였다. 2시간동안 감염시킨 후 바이러스 희석액을 제거하고 methyl cellulose 0.8%, FBS 2% 함유된 EMEM 배지를 well 당 1 mL씩 넣어 35°C, CO₂ incubator에서 7일 동안 배양하였다. Methyl cellulose 배양액을 제거하고 세포 고정액 (ethanol 200 mL, PBS 750 mL, crystal violet 10 g, formalin 50 mL)을 well당 1 mL씩 넣고 30분 동안 상온에서 방치하고 수돗물로 씻어낸 후 plaque 수를 세어 바이러스 titer를 계산하였다.

Suckling mice에서의 neurovirulence 연구

3주령의 BALB/c mice 20마리를 한 그룹으로 mouse당 10⁴-10⁷ pfu의 바이러스를 뇌내 (intracerebrally, ic) 경로로 주사하였다. Mice의 치사율을 3주간 매일 관찰하여 LD₅₀을 결정하였다.

결과 및 고찰

바이러스의 Vero Cell Adaptation (적응)

일본뇌염바이러스 (JEV)의 Vero cell 적응을 위해 사용한 parent 바이러스는 SA14-14-2(PDK)로 PDK 계대수는 8이다. 5X10⁶개의 Vero cells을 80 cm²T-flask에 접종한 후, 35°C CO₂ 배양기에 4일간 배양하여 Vero cell monolayer를 준비하였다. 바이러스 감염을 위해 flask로부터 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척한 다음 상기의 parent 바이러스를 0.1 moi (multiplicity of infection)로 감염시켰다. 감염을 위한 바이러스 adsorption (흡착)은 35°C CO₂ 배양기에서 2시간 동안 시행하였고, 종료 후 유지배지 (EMEM + 2% FBS) 50 mL를 첨가하고 CPE를 관찰하면서 35°C CO₂ 배양기에 7일간 배양하였다. 바이러스 배양 기간 동안 매일 배양상등액을 취하여 잔류세포를 원심분리로 제거한 다음, 동일 부피의 FBS와 섞어 -70°C에 보관하였다. Plaque assay를 시행하여 바이러스의 성장 곡선을 plotting한 결과 바이러스 감염 후 4일째 배양상등액의 바이러스 titer가 2×10⁶ pfu/mL로 최고조에 달했다 (Figure 1). 상기의 바이러스액을 바이러스 Vero cell 1계대로 명명하고 다음 계대의 seed로 사용하였다. 바이러스 Vero cell 2계대는 1계대를 Vero cell monolayer에 0.1 moi로 감염시켜 4일 간 배양하여 얻었고, plaque assay를 시행하여 바이러스 titer를 결정하였다. 상기의 방법으로 바이러스 배양을 16계대까지 수행한 결과 Figure 1에서 보는 바와 같이 Vero cell 3계대부터 바이러스 titer가 10⁷ pfu/mL에 도달하여 16계대까지 유지됨이 확인되었다. SA14-14-2(PDK) 균주를 이용한 중국의 생백신은 백신 1 dose당 10^{6.7} TCID₅₀의 바이러스를 함유하고(11), 본 연구팀에서 제조한 SA14-14-2(Vero) 바이러스주는 실험결과에 의하면 Biken에서 제조한 기존 일본뇌염 백신의 효능에 상응하는 바이러스양이 대략 10⁶-10⁷ pfu로 판명되었다 (data not shown). 따라서 Vero cell 3계대 후부터 분리한 바이러스는 백신 상업화를 위한 생산 수율을 충분히 갖는다고 판단하여 바이러스 대량 생산을 위한 master seed virus 생산의 seed로 사용하였다. Production seed (바이러스 Vero Cell 5계대)와 백신 바이러스 (바이러스

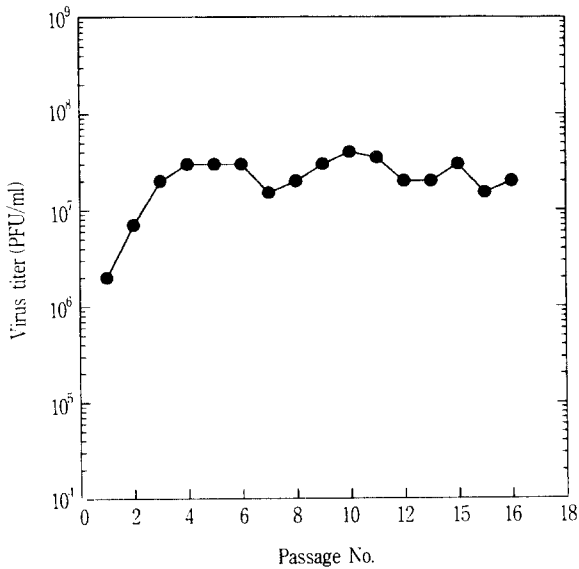


Figure 1. Passage and adaptation of JEV in Vero cell.

Table 1. Intracerebral virulence of suckling mice inoculated with Vero-passaged JE viruses (PS represents passage in PDK or Vero cell).

Virus Inoculum	PFU Inoculum	logLD ₅₀	LD ₅₀ /PFU ratio
JE Vero - 0 PS (PDK - 8 PS)	2.0 x 10 ⁷	7.3	1.0
JE Vero - 5 PS	1.1 x 10 ⁷	7.0	0.9
JE Vero - 6 PS	1.7x 10 ⁷	7.2	0.9
JE Vero -10 PS	1.5 x 10 ⁷	7.2	1.1

Vero cell 6계대)를 생산하여 mice에서 neurovirulence를 시험한 결과 parent 바이러스인 SA14-14-2(PDK)보다 낮은 실험치를 나타냈고, 이 값은 바이러스 Vero cell 10계대까지 유지되었다 (Table 1). 또한 백신 바이러스 (바이러스 Vero cell 6계대)의 표면항원 유전자 서열을 분석한 결과 parent 바이러스로부터 5개의 nucleotides 변화에도 불구하고 약독화 균주의 특성인 138, 176번째 lysine, valine은 변화가 없었다(12). 상기의 결과로써 SA14-14-2(Vero) 바이러스는 생산성 뿐만 아니라 약독화 균주로서의 안정성이 높아 백신 개발에 적합한 균주로 판단되었다. 이후 production seed virus (바이러스 Vero cell 5계대)를 바이러스 성장 조건 확립 실험에 사용하였다.

바이러스의 최적 배양 조건

일본뇌염바이러스의 증식에 영향을 주는 인자로서 온도, 바이러스 감염비, 혈청 사용량 등의 최적 배양 조건을 검토하였다. 배양 온도의 변화에 따라 바이러스 고유의 성질, 증식 관련 효소의 활성 등이 영향을 받게 되는데 Igarash, Morimoto 등 (13, 14) 이 JEV를 각각 mosquito cell, bovine kidney cell에서 증식시킬 때 37°C에서 28°C 사이에서 비교한 결과 온도가 낮아지면 세포 증식은 느려지지만 바이러스 증식은 활발하다고 보고

한 바 있다. 본 실험에서는 바이러스 감염 세포의 배양 온도를 각각 37, 35, 30, 28°C로 유지하여 바이러스 titer에 미치는 배양 온도의 효과를 조사하였다. 80 cm²T-flask에 배양된 Vero cell monolayer에 JEV production seed virus를 0.1 moi로 감염시켜서 각각의 온도에서 배양한 결과, Figure 2에서 보는 바와 같이 배양온도가 다름에도 불구하고 바이러스 증식 경향은 동일함을 알 수 있었고 35°C에서 바이러스를 배양하여 4일이 경과하였을 때, 4.0×10⁷ pfu/mL로 가장 높은 titer (pfu/mL)를 보였다. 이 결과는 상기의 연구자들과는 상충되는 것으로서 서로 다른 숙주세포를 사용한 것과, 본 실험에서는 35°C에 적응된 세포와 seed 바이러스를 사용한 때문인 것으로 사료된다. 35°C의 바이러스 배양에서 배양 기간별 CPE의 양상을 보면 감염 후 2일부터 CPE가 시작되어 4일째 전체 세포의 30% 정도가 CPE를 보였으며 전체 세포의 50%가 CPE를 보여 monolayer가 거의 파괴되기 시작하는 5일부터 바이러스 titer가 급격히 떨어지기 시작했다. 이는 CPE의 증가로 바이러스 생산에 참여하는 세포의 개수가 줄어서 나타나는 현상이라 추측된다. 생산된 바이러스를 정제하여 37, 35, 30, 28°C에서 약 7일간 infectivity의 변화를 조사한 결과 온도 간 별 차이가 없는 thermal inactivation kinetics를 보이는 것으로 보아 (data not shown) 온도에 따른 바이러스 생산의 차이는 thermal stability의 차이보다는 온도 차이에 따른 viral replication 효율의 차이에 의한 것이라 사료된다. 또한 Figure 7의 결과에 제시된 바와 같이 배양 배지를 신선한 배지로 교환했을 경우 바이러스의 생산 감소 시기가 지연되는 것으로 보아 nutrient depletion이 바이러스 생산에 중요함을 알 수 있다.

바이러스의 감염비 즉, 바이러스의 titer와 숙주세포의 비율 (multiplicity of infection, moi)에 따라 바이러스의 증식 경향이 크게 달라질 수 있는 데, 본 실험에서는 0.2, 0.1, 0.05, 0.01 moi로 바이러스가 감염된 세포를 가지고 바이러스의 증식을 조사하였다. 0.2 moi로 감염된 세포가 최고 titer를 보이는 배양 기간

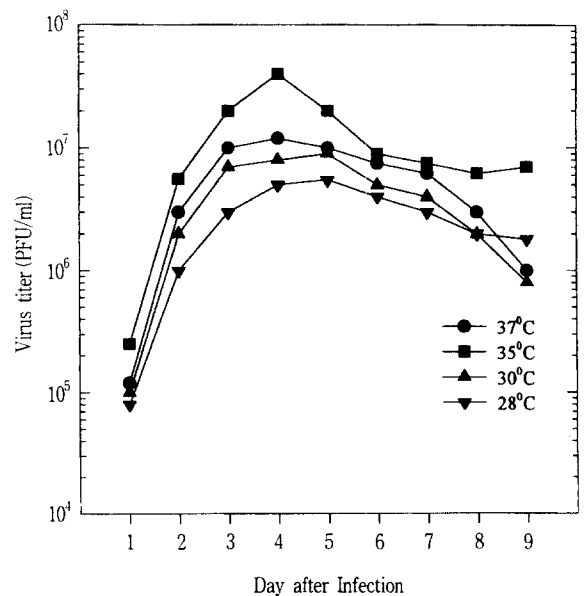


Figure 2. Effect of culture temperature on JEV propagation in Vero cell.

이 3일으로써 다른 moi로 감염된 세포들보다 하루 빠른 증식 속도를 보이는 점을 제외하고는 0.1, 0.05, 0.01 moi로 감염된 세포들의 경우에는 증식 경향과 최고 titer를 보이는 배양 기간 (4일)이 동일하였다 (data not shown). 이는 Figure 2에서 보는 바와 같이 JEV의 초기 증식 속도가 매우 빨라 바이러스의 접종 titer가 바이러스의 전체 증식 곡선에 미치는 영향이 미미한 때문인 것으로 사료된다. 위 사실은 공업화의 시각에서 볼 때, master seed virus bank의 수명과 직결되는 것으로 moi가 낮을수록 master seed virus bank의 수명은 늘어나므로 바이러스 생산 비용의 절감 효과를 기대할 수 있다.

바이러스 증식에 미치는 혈청의 영향을 살펴보기 위해 바이러스를 세포에 감염시킨 후 서로 다른 혈청 농도를 갖는 EMEM에서 배양한 후, 바이러스 증식 속도를 비교 조사하였다. Figure 3에서 보는 바와 같이 5% FBS를 사용한 경우나 2% FBS를 사용한 경우, 혈청을 사용하지 않은 경우 모두 비슷한 성장 곡선을 보였다. 이는 일반적으로 알려진 사실인 혈청 단백질 성분의 바이러스 세포 흡착 방해 효과나 바이러스 증식의 혈청 요구 성과는 배치되는 결과로 5% 정도의 열변성된 FBS는 JEV의 감염능에 영향을 미치지 않는 점과 본 실험에 숙주세포로 사용된 confluent하게 자란 Vero cell monolayer는 바이러스 생산에 혈청이 필요치 않은 점을 시사한다. 무혈청 배지를 이용한 바이러스 생산은 배양 이후 바이러스 정제 단계에서 노력을 줄일 수 있는 점과 생산 단계에 혈청이 차지하는 비중이 큰 점으로 미루어 볼 때, 공업화에 매우 유리한 결과로 사료된다.

미립담체를 이용한 Vero cell 배양

바이러스의 대량 배양을 시도하기 위해 우선 Vero cell의 미립담체를 이용한 spinner flask culture를 시도하였다. 효율적인 바이러스의 증식을 위해서 T-flask를 이용한 배양과 마찬가지로 Vero cell이 confluent하게 미립담체에 monolayer를 형성하는 것이 중요하다. 미립담체에서의 효과적인 Vero cell monolayer 형성에 미치는 접종 세포 초기 농도의 영향을 고찰

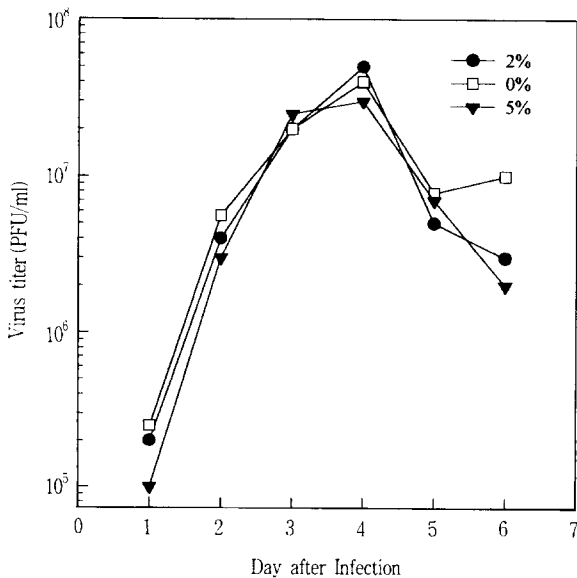


Figure 3. Effect of FBS concentration on JEV propagation in Vero cell.

하기 위해 450 mL의 성장배지 (EMEM + 10% FBS)가 채워진 500 mL spinner flask에 각각 2×10^5 , 4×10^5 및 8×10^5 cells/mL로 Vero cell을 접종하고 미립담체 없이 2시간 동안 30 rpm으로 교반 배양한 후, 2%의 Cytodex-1 미립담체 50 mL를 첨가하여 미립담체의 최종 농도를 0.2%로 조정하였다. 이후 8일간 50 rpm에서 연속 교반 배양하면서 세포의 최종 농도를 매일 조사하였다. 세포의 최종 농도는 다음과 같은 방법으로 결정하였다. 각 flask로부터 1 mL를 취해 PBS로 미립담체를 2번 세척하고 부착되어 있는 세포를 trypsinization한 다음, 유리된 세포를 trypan blue로 염색한 후, haemocytometer로 단세포의 갯수를 counting함으로써 결정하였다. Figure 4에서 보는 바와 같이, 4×10^5 cells/mL의 초기 세포 농도로 접종된 spinner flask가 7일째에서 약 3×10^6 cells/mL의 최고 최종 농도를 보였고, cell monolayer도 잘 형성된 것으로 관찰되었다 (Figure 5). 8×10^5 cells/mL의 초기 세포로 접종된 spinner flask는 오히려 2×10^6 cells/mL의 최종 농도를 보였고, 세포 접종 초기에 세포가 뭉쳐진 것으로 여겨지는 clumps가 현미경 상태에서 많이 관찰되는 것으로 보아 (data not shown) 세포의 과다 농도 접종은 세포의 뭉침을 유발하여 오히려 세포의 미립담체 부착에 악영향을 미친 것으로 사료된다. 또한 2×10^5 cells/mL의 초기 세포로 접종된 spinner flask는 현미경 관찰 결과 접종된 세포가 거의 모두 미립담체에 부착하였으나 (data not shown), 세포의 성장 속도는 나머지 flasks에 비해 매우 느렸고, 최종농도도 1×10^6 cells/mL 미만으로 확인되어, 적정선 이상의 초기 세포 부착이 미립담체에서의 세포 배양에 매우 중요함을 시사하였다.

Roller bottle과 미립담체를 이용한 바이러스 대량 배양

미립담체를 이용한 spinner bottle culture와 roller bottle culture를 통해 바이러스의 대량 배양을 수행하고 두 경우의 바이러스 증식 곡선을 비교하였다 (Figure 6). 미립담체를 이용한

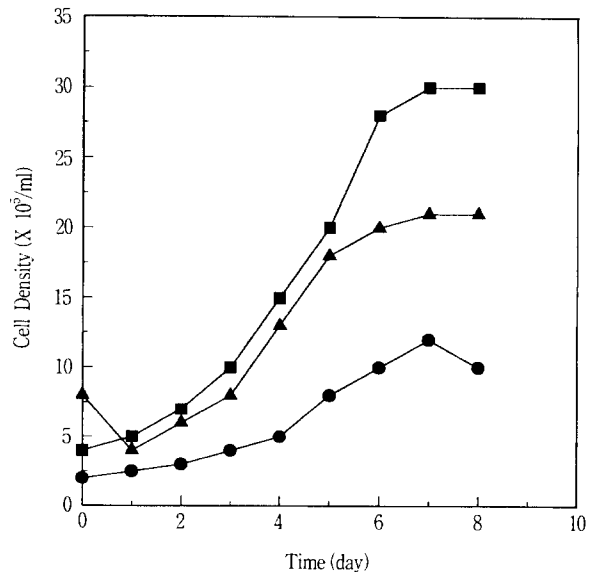


Figure 4. Effect of initial cell density on the growth of Vero cell on Cytodex-1 (● : 2×10^5 , ■ : 4×10^5 , ▲ : 8×10^5 cells/mL of initial cell density).

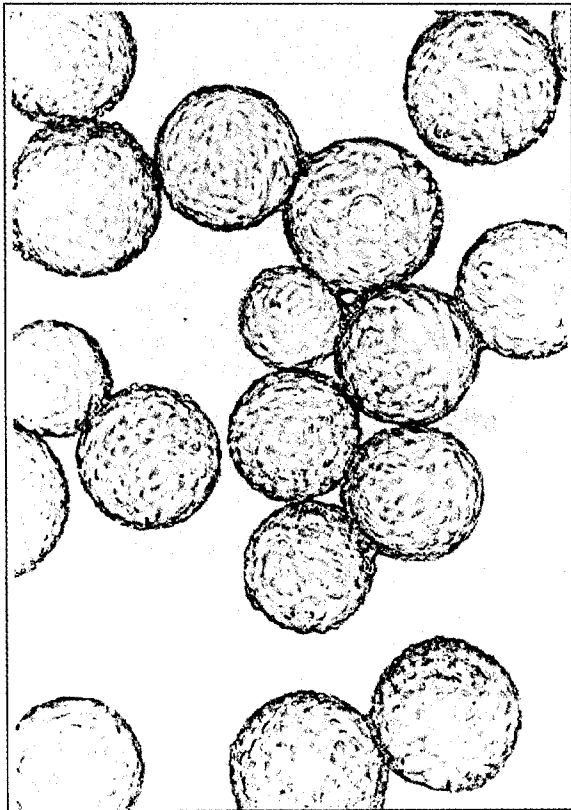


Figure 5. Photomicrograph of confluent Vero cells on Cytodex-1 before virus infection (100X magnification). Vero cells started to detach from Cytodex-1 after virus infection and eventually cell monolayers were peeled off from microcarrier.

spinner bottle culture에서의 바이러스 증식 곡선은 다음과 같은 방법으로 조사하였다. 4×10^5 cells/mL의 초기 세포 농도로 접종된 0.2% 미립담체 함유 spinner flask를 배양 7일째 배지를 제거하고 200 mL의 PBS로 미립담체 상의 Vero cell을 2번 세척하였다. 1.5×10^8 pfu (0.1 moi)의 바이러스를 함유한 50 mL을 flask에 첨가하고 2시간 동안 15분마다 flask를 swirling하여 바이러스 감염액이 미립담체를 충분히 적시도록 하였다. 이후 450 mL의 유지배지를 첨가하고 7일간 50 rpm에서 연속 교반 배양하였다. 배양 기간 7일 동안 매일 배양상등액의 일부를 취하여 plaque assay를 수행하여 바이러스의 titer를 결정하였다. Figure 6의 SF1와 SF2는 바이러스 감염 후 유지배지로 각각 혈청 무함유 EMEM 또는 2% FBS 함유 EMEM이 사용된 경우이다. SF2의 2, 3일째 최고 titer인 1.1×10^7 pfu/mL를 보였으며 SF1이 SF2보다 전체적으로 약간 낮은 바이러스 titer를 보였으나, SF1 및 SF2 모두 감염 후 2일째부터 4일까지 10^7 pfu/mL를 넘는 titer가 유지되었다.

Roller bottle culture에서의 바이러스 증식 곡선은 다음과 같은 방법으로 조사되었다. 850 cm²-roller bottle에 8×10^7 개의 Vero cell을 접종하여 4일간 0.5 rpm으로 회전 배양한 후, 배지를 제거하고 2.4×10^7 pfu (0.1 moi)의 바이러스가 함유된 EMEM 10 mL을 첨가하였다. Roller bottle을 2시간 동안 35°C

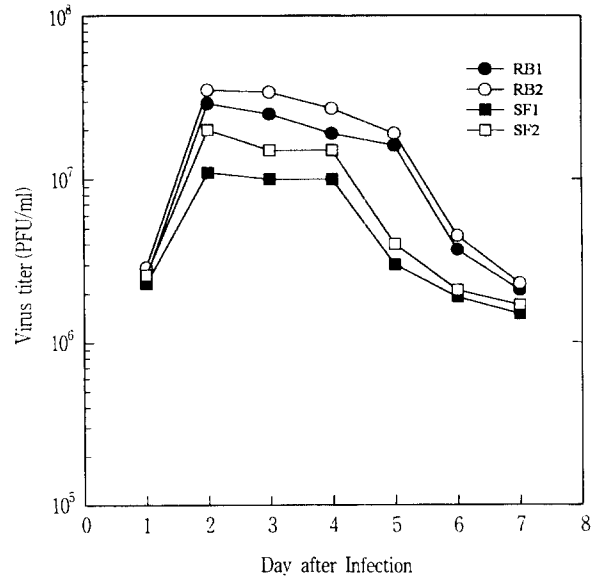


Figure 6. Comparison of JEV propagation in roller bottle (RB) and spinner flask (SF) culture using microcarrier (In the cases of RB1 and SF1, culture media were replaced with EMEM right after infection, while RB2 and SF2 cultures were refed with EMEM containing 2% FBS).

항온실에서 0.5 rpm으로 회전시킨 후, 바이러스액을 제거하고 PBS로 2번 감염세포를 세척한 다음 유지배지인 2% FBS 함유 EMEM을 첨가하거나 (Figure 6의 RB2), 혈청 무함유 EMEM을 첨가하였다 (Figure 6의 RB1). 이후 7일간 35°C 항온실에서 0.5 rpm에서 회전 배양하면서 매일 배양상등액의 일부를 취하여 plaque assay를 수행하여 바이러스의 titer를 결정하였다. Figure 6에서 보는 바와 같이 RB2의 2일째 최고 titer인 3×10^7 pfu/mL를 보였으며, RB1이 RB2보다 전체적으로 약간 낮은 바이러스 titer를 보였으나, RB1 및 RB2 모두 감염 후 2일째부터 5일까지 10^7 pfu/mL을 넘는 titer가 유지되었다. 결론적으로, 바이러스의 roller bottle 배양이 spinner flask 배양보다 바이러스 titer면에서 2배 내지 3배 우수한 성적을 나타냈고, 10^7 pfu/mL을 넘는 배양 기간도 하루 길었다. 그러나 두 배양 방법 모두 T-flask 배양에서와 같이 무혈청 배지를 사용하여도 바이러스 증식이 활발했고, 최고조의 titer를 보이는 배양기간은 감염 후 2일째로써 T-flask 배양에서 보다 2일 빨랐다. 이는 roller bottle 배양이나 spinner flask 배양에서는 Vero cell의 physiology가 T-flask 배양에서와 차이가 있거나, 교반이나 회전으로 인한 progeny 바이러스의 재감염속도가 증가한데 기인한 것으로 추측된다.

바이러스 감염 직전, spinner flask와 roller bottle에서의 Vero cell 증식을 살펴보면, spinner flask에서의 세포 농도는 3×10^6 cells/mL이고 roller bottle에서의 세포 농도는 1.2×10^6 cells/mL이다. SF2와 RB2의 최고 바이러스 titer가 각각 1.1×10^7 pfu/mL, 3×10^7 pfu/mL이므로 단위 세포당 생산된 바이러스의 양을 계산해보면 spinner flask 배양에서는 3.3 pfu/cell, roller bottle 배양에서는 25 pfu/cell이다. 감염 moi가 0.1 pfu/cell이었으므로 각각 33배, 250배로 바이러스가 증식된 것이다. 물론 위의 계산에서 바이러스 감염 후 나타나는 CPE로 인

해 죽은 세포의 개수를 고려하지 않았지만 결과적으로 나타나는 titer로 판단할 때 roller bottle에서의 단위세포당 바이러스 생산량이 spinner flask에서의 그것보다 대략 7배 정도 높은 것으로 보인다. 상기의 이유로는 여러 가지 이유를 추측할 수 있겠지만, 낮은 바이러스 감염 효율, shear stress에 의한 바이러스 불활화, 용존 산소의 부족, micro-carrier간의 접촉으로 인한 세포내로의 물질 수송 방해 등을 상정할 수 있다.

바이러스 multi-harvest

잘 알려진대로 일본뇌염바이러스의 약독화 (attenuated) 균주와 야생 (wild type) 균주를 구분 짓는 4가지 기준은 생쥐 신경독성, 플라크 형태, 표피단백질의 아미노산 서열, cytopathic effect (CPE, 세포괴사효과)이다(15, 16). 본 연구에 사용한 일본뇌염바이러스는 parent 바이러스의 약독화 바이러스 성질을 그대로 유지하고 있고 특히 바이러스 감염세포의 CPE는 바이러스 배양 기간중 매우 약하고 더디게 관찰되었다 (Figure 7). 바이러스의 roller bottle 배양시에 10^7 pfu/mL을 넘는 배양 기간이 4일이나 된 점, 그리고 배양기간 중에 감염세포의 CPE가 매우 미약하여 Vero cell monolayer가 배양기간 중에 계속 유지되는 점으로부터 저자들은 감염세포로부터 높은 바이러스 titer를 갖는 바이러스 배양액을 한번 이상 회수할 수 있는지의 가능성을 고찰하였다. 850 cm²-roller bottle에 confluent하게 자란

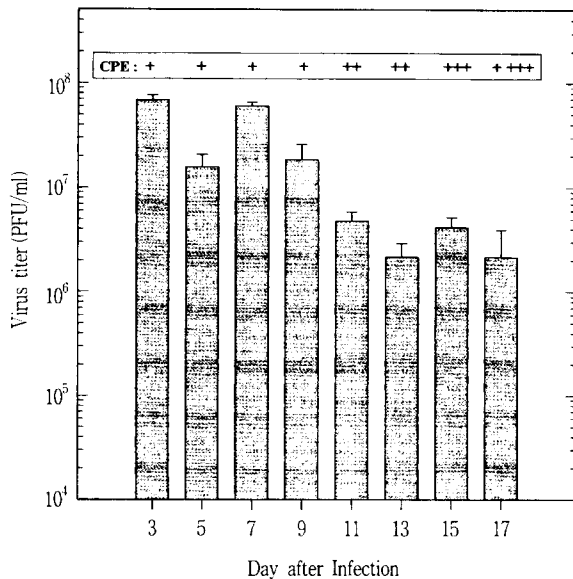


Figure 7. Multiple time harvest of JEV cultured in roller bottle every other day from day 3 to day 17 post infection. (CPE : +, less than 30% of the cells exhibit CPE; ++, about 50% of the cells exhibit CPE; +++, about 75% of the cells exhibit CPE; +++++, the monolayer is totally destroyed).

Vero cell monolayer에 바이러스를 0.1 moi로 감염시키고 무혈청 EMEM에서 배양하였다. 감염 후 3일부터 17일까지 2일 간격으로 배양액을 무혈청 EMEM으로 100% 교체하면서 배양을 지속하였다. 위와 같이 해서 얻은 바이러스 배양액 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17일 회수액의 plaque assay를 수행하여 바이러스

titer를 결정하였다. Figure 7에서 보는 바와 같이 감염 후 3일부터 9일까지 10^7 pfu/mL을 넘는 titer가 유지되는 것이 확인되었고, 17일까지도 titer가 10^6 pfu/mL을 초과하였다. 상기의 결과는 공업화의 관점에서 매우 유리한 결과로 roller bottle 한 개로부터 바이러스 배양액을 다수 회수함으로써 제품의 생산 단가를 낮추고 작업 노력을 절감하는 기대효과가 예측된다.

요 약

세계보건기구 (WHO)가 백신 생산에 권장하고 있는 표준세포주인 Vero 세포에 약독화 일본뇌염바이러스인 SA14-14-2 (PDK)를 연속 계대배양을 통해 적응(adaptation)시켜, titer가 10^7 pfu/mL을 넘는 SA-14-14-2(Vero)을 분리하였다. 바이러스 배양 최적온도는 35°C이며, T-flask에서 배양된 바이러스의 최고 titer는 감염 후 4일째에 4×10^7 pfu/mL로 관찰되었다. 또한 무혈청배지에서 바이러스 증식이 활발하여 2% 혈청이 보충된 경우와 거의 비슷한 바이러스 titer를 보였다.

바이러스 대량 배양을 위해 roller bottle culture와 미립담체를 이용한 spinner flask culture 가능성에 대하여 고찰하였다. 바이러스 감염을 위한 미립담체에서의 Vero cell monolayer는 초기 세포 농도 4×10^5 cells/mL로 접종하여 50 rpm에서 7일간 배양하여 얻을 수 있었다. 바이러스의 roller bottle 배양이 spinner flask 배양보다 바이러스 titer면에서 2배 내지 3배 높았고, 10^7 pfu/mL을 넘는 배양 기간도 하루 길었다. 하지만 두 배양 방법 모두 T-flask 배양에서와 같이 무혈청 배지를 사용하여도 바이러스 증식이 활발했고, 최고조의 titer를 보이는 배양기간은 감염 후 2일째로써 T-flask 배양에서 보다 2일 빨랐다. Roller bottle culture의 경우, 감염 후 3일부터 17일까지 2일 간격으로 배양액을 무혈청 EMEM으로 100% 교체하면서 배양을 지속한 결과 3일부터 9일까지 10^7 pfu/mL을 넘는 titer가 유지되는 것이 확인되어 바이러스의 multi-harvest가 가능한 것으로 고찰되었다. 상기의 결과는 생산성 면에서 매우 유리한 결과로 제품의 생산 단가를 낮추고 작업 노력을 절감하는 기대효과가 클 것으로 예측된다.

참 고 문 헌

1. Umenai (1985), Current Japanese Encephalitis: Current Worldwide Status, *Bull. WHO*, **63**, 625.
2. Chamber, T. J., C.S. Hahn, R. Galler, and C.M. Rice (1990), Flavivirus Genome Organization, Expression and Replication, *Annual Review of Microbiology*, **44**, 649-648.
3. Ni, H. and A. D. T. Barrett (1995), Nucleotide and Amino acid Sequences of the Structural Protein Genes of Japanese Encephalitis Virus from Different Geographical Locations, *J. Gen. Virol.*, **76**, 401-407.
4. Plesner, A.-M., A.-S. Peter, and H. Margrethe (1996), Neurological Complications and Japanese Encephalitis Vaccination, *The Lancet*, **348**, 202-203.
5. Northdurft, H. D., T. Jelinek, A. Marschang, H. Maiwald, A. Kapaun, and T. Loscher (1996), Adverse Reactions to Japanese Encephalitis Vaccine in Travellers, *Journal*

- of Infection*, **32**, 119-122.
6. Srivastava, A.K., J.R. Putnak, R.L. Warren, and C.H. Hoke Jr. (1995), Mice Immunized with a Dengue Type 2 Virus E and NS1 Fusion Protein Made in *Escherichia coli* Are Protected Against Lethal Dengue Virus Infection, *Vaccine*, **13**, 1251-1258.
 7. Sumiyoshi, H., G.H. Tignor, and R.E. Shope (1995), Characterization of A Highly Attenuated Japanese Encephalitis Virus Generated from Molecularly Cloned cDNA, *The Journal of Infectious Diseases*, **171**, 1144-1151.
 8. Lee, G. C.-Y., J. T. Grayston, and G. E. Kenny (1965), Growth of Japanese Encephalitis Virus in Cell Culture, *Journal of Infectious Diseases*, **115**, 321-329.
 9. Peiwei, G., D. Zhifen, and W. Zhongquan (1989), Experience with Production of Interferon and Japanese Encephalitis Vaccine in Continuous Cell Lines, *Develop. Biol. Standard*, **70**, 223-226.
 10. Steinhoff, M. C. (1996), Japanese Encephalitis: a Chinese Solution?, *The Lancet*, **347**, 1570-1571.
 11. Wang, S.G., H.J. Yang, Y. Y. Den, F. B. Wang, Q. W. Jheng, Y. X. Yu (1990), Studies on the production of SA14-14-2 Japanese Encephalitis live vaccine. *Chin. J. Virol.*, **6**, 38-43.
 12. Chung, Y., S. P. Hong, S. B. Moon, Y. Shin, and Soo-Ok Kim (1997), Characterization of an Attenuated Japanese encephalitis Virus Adapted to African Green Monkey Kidney Vero Cell, *The Journal of Microbiology*, In Press.
 13. Morimoto, T., T. Sugimori, Y. Miura, H. Sazawa, and M. Watanabe (1969), Growth Characteristics and Persistent Infection of Japanese Encephalitis Virus in Bovine Kidney Cell Culture at Different Temperatures, *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.*, **9**, 65-73.
 14. Igarashi, A., F. Sasao, S.Wungkobkiat, and K. Fukai (1973), Growth of Japanese Encephalitis Virus in Established Lines of Mosquito Cells, *Biken Journal*, **16**, 17-23.
 15. Ni, H., G.-J. J. Chang, H. Xie, D.W. Trent, and A.D.T. Barrett (1995), Molecular Basis of Attenuation of Neurovirulence of Wild-Type Japanese Encephalitis Virus Strain SA14, *Journal of General Virology*, **76**, 409-413.
 16. Lee, T., T. Komiya, K. Watanabe, C. Aizawa, and H. Hashimoto (1995), Immune Response in Mice Infected With The Attenuated Japanese Encephalitis Vaccine Strain SA14-14-2, *Acta Virologica*, **39**, 161-164.