

수두 바이러스 증식에 미치는 혈청의 영향

전복환·우규진·황규계·박호선·박송용·문홍모

목암생명공학연구소

Effect of Serum on Varicella-Zoster Virus Propagation

Bok-Hwan Chun, Gyu-Jin Woo, Kyu-Kye Hwang, Ho-Sun Park,
Song-Yong Park and Hong-Mo Moon

MOGAM Biotechnology Research Institute,
341 Pojung-Ri, Koosung-Myon, Yongin-Kun, Kyonggi-Do 449-910, Korea

ABSTRACT

Attenuated varicella-zoster virus(VZV) was cultured in human embryonic lung cells. The effects of serum type and its concentration on the production of VZV were studied. Regardless of cell culture conditions, VZV yield was increased with multiplicity of infection, and the total cell concentration was decreased after virus infection. The newborn calf serum, calf serum, or horse serum was not as good as the fetal bovine serum or calf serum supplemented with iron for the propagation of VZV in the human embryonic lung cells. The yields of total VZV(cell-associated virus and cell-free virus) in the medium with calf serum containing iron were comparable to those in the medium supplemented with fetal bovine serum. Furthermore, some components of serum appear to be important for the maintenance of VZV infectivity.

서론

수두 바이러스(Varicella-Zoster Virus : VZV)는 사람에서만 질병을 유발하는 바이러스이며, 수두는 전염성이 매우 높은 질병으로 2~8세의 소아에게 많이 걸리고 온대지방에서는 주로 겨울과 봄철에 많이 발생한다. 수두 바이러스가 시험관 내에서 처음으로 성공적으로 계대배양 되어진 이래로(1), 수두 바이러스는 사람과 원숭이의 여러 형태의 세포주에서 배양 되어졌고, 초대 배양된 사람 감상선 세포나 폐세포 또는 흑색종 세포 등에서 세포 유리 수두 바이러스를 얻을 수 있었다(2-4). 이 세포 유리 바이러스를 수두 바이러스의 증식, 복제, 항원, 유전자 등의 연구에 이용하여 수두 바이러스의 생물학적 특성과

병원성에 대한 연구에 큰 도움이 되었다. 수두 바이러스는 세포 친화성이 매우 높기 때문에 세포배양 배지 내에서 감염력이 있는 바이러스가 거의 존재하지 않으며, 이런 이유로 수두 바이러스의 증식은 수두 바이러스에 감염된 세포를 감염되지 않은 세포에 직접 계대배양해야만 일어난다. 수두 바이러스의 이런 세포 친화 특성에도 불구하고, 여러 종류의 세포 배양으로부터 감염력 있는 세포 유리 수두 바이러스를 높은 수율로 얻기 위한 연구들이 보고 되어졌다(5-7). 이들 연구의 도움으로 세포 유리 바이러스를 이용하여 약독화 수두 생백신(live attenuated varicella vaccine)이 세포배양 방법을 통하여 일본에서 개발되어졌다(8). 그러나, 수두 백신 생산을 위하여 세포 배양으로부터 감염력 있는 세포 유리 수두 바

이러스를 높은 수율로 얻기에는 어려움이 있었다.

동물세포 배양에서 혈청의 사용은 일반적인 것으로 알려져 있으며, 실질적으로 의학적 산물의 대량 생산을 위한 세포 배양에서는 혈청이 거의 필수적으로 사용되고 있다. 백신, 항체, 호르몬, 성장 인자 등의 의학적 산물들의 경제적 생산을 위하여, 저혈청 또는 무혈청 배지의 개발이 특정 세포주를 이용하여 수행되어졌으며, 생산물의 수율상에 미치는 혈청의 효과가 여러 세포 배양 기술을 이용하여 연구되어졌다(9, 10). 앞선 연구에서 저자 등은 국내에서 분리된 사람 폐세포와 국내 수두 환자에서 분리된 수두 바이러스 주(MAV/06)를 사용하여 세포 배양방법을 이용한 약독화 수두 생 바이러스 백신의 개발을 보고하였다(11-13).

본 연구에서는 혈청을 사용하는 세포 배양에 의한 수두 바이러스의 생산에서 생산비용을 줄일 수 있는지를 조사하기 위하여, 일반적으로 세포배양에서 사용되는 혈청을 선택하고 이 혈청의 종류와 혈청 농도에 따른 수두 바이러스의 생산성과 세포 친화 수두 바이러스와 세포 유리 수두 바이러스의 생산 수율을 비교하였다.

재료 및 방법

세포와 세포 배양

사람 폐세포(human embryonic lung cells: LuMA cells)를 태아의 폐 조직에서 분리하였고, 조직 배양용 T-flasks를 이용하여 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle(DME, Gibco)배지에서 계대배양하였고, 2% FBS가 함유된 동일 배지를 이용하여 유지하였다. LuMA 세포는 23~29계대의 세포를 이용하여 실험을 실시하였다.

이 실험에 사용된 LuMA 세포는 마이코플라즈마와 다른 외래성 오염원에 감염되지 않았다. LuMA 세포의 염색체 분석은 American Type Culture Collection(ATCC)에서 분양받은 사람 폐세포인 WI-38과 MRC-5 세포에 비하여 더 정상 세포에 가까운 것으로 판명되어졌다(11).

바이러스 배양

임상 소견상 수두로 판단된 환자의 수포로부터 채취한 수액에서 분리된 수두 바이러스 중 MAV/06 주의 바이러스를 본 실험에 사용하였다. LuMA 세포에 이 바이러스를 계대배양한 후 세포변성 효과

(cytopathic effect, CPE)를 나타내었으며, 면역형광항체 분석(immunofluorescence assay), western blot 분석, 전자현미경 사진을 통하여 수두 바이러스임을 확인하였다. 이 바이러스를 LuMA 세포와 guinea pig embryonic lung 세포에 여러번 계대배양하고, 이 바이러스를 수두 바이러스의 야외주와 함께 약독화의 생물학적, 생물리학적 특징 등을 비교 시험하였다(12).

이 수두 바이러스를 T-flasks(Nunc, 175cm²)에서 단층이 형성된 LuMA 세포에 감염시키고, 2% FBS 함유된 DME 배지에서 배양하였다. T-flasks를 36°C의 humidified CO₂ 배양기에서 4~6일 배양한 후, 낮은 배율의 현미경으로 세포변성 효과를 보이는 세포(round refractile cell)를 관찰하였다. 2% FBS가 함유된 DME 배지에서 배양된 수두 바이러스가 40~60% CPE를 보일 때, 0.25% trypsin을 처리하여 바이러스가 감염된 LuMA 세포를 수확하고, LuMA 세포 단층이 형성된 다른 조직배양 용기로 수두 바이러스 감염된 세포와 감염되지 않은 세포의 비율이 1:10의 비율로 계대하여 배양하였다. 바이러스 감염시킨 세포를 humidified CO₂ 배양기에서 배양하고, 이 배양된 수두 바이러스를 여러 세포 배양의 접종용 바이러스로 사용하였다.

바이러스 역가 분석

수두 바이러스의 plaque assay를 수행하기 위한 세포의 준비는 계대배양된 지 4일된 LuMA 세포를 6 well plate 배양에 사용하였다. 단층이 형성된 세포를 plaque assay 하루전에 trypsin을 처리하여 수확한 후, 6 well 배양용기(6 well culture cluster, Costar)에 접종하여 배양하였다. 10% FBS 함유된 DME 배지에 5×10⁵cells/well의 농도로 접종하고, 거의 단층이 형성되는 기간인 24시간 동안 37°C humidified CO₂ 배양기에서 배양하였다.

혈청 종류와 혈청 농도의 효과를 조사하기 위하여, LuMA 세포를 10% FBS 함유한 배지로 175cm² 표면적의 T-flasks에서 배양하였다. 단층을 형성한 정상 LuMA 세포에 감염 세포 대 비감염 세포의 비율을 1:10으로 하여 수두 바이러스를 감염시키고 36°C에서 배양하였다. 감염시킨 배양 세포가 CPE를 보일 때, LuMA 세포를 Ca²⁺, Mg²⁺-free phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하고 세척액을 제거하였다. 안정제를 첨가한 완충액을 1×10⁶cells/ml의 농도로 T-flask에 첨가하고, 긁게(Cell Scraper, Costar)로 세포를 긁어 떨어뜨린 후

pipet를 이용하여 단일 세포로 잘 현탁시켰다. 이 현탁액의 일부를 취하여 10% FBS를 함유한 DME 배지로 적절히 희석하여 세포 친화 바이러스(Cell-Associated Virus : CAV)의 분석에 사용하였다. 바이러스 감염된 세포의 수확과 수확된 세포의 초음파 처리 동안 수두 바이러스의 감염력을 유지하기 위하여 완충액을 5% sucrose, 2% gelatin, 0.1% sodium glutamate를 함유한 PBS로 조성하여 사용하였다. 세포 유리 바이러스(Cell-Free Virus : CFV)는 수두 감염된 세포로부터 초음파 처리 방법으로 준비하였다. 수확된 수두 바이러스 감염된 세포현탁액을 초음파분쇄기(Branson Sonifier 450)를 사용하여 0°C 얼음 안에서 5분 동안 초음파 처리하였다. 초음파 처리된 세포-바이러스 부유액은 3500rpm에서 10분간 원심하여 세포 부스러기를 제거하고, 상층은 세포 유리 바이러스의 정량분석에 사용하였다.

10% FBS가 함유된 DME 배지를 바이러스 희석용으로 사용하여 시료의 연속희석 방법으로 바이러스 희석액을 준비하였다. 바이러스 희석액에서 20~200 plaque forming unit(PFU)를 포함하도록 바이러스를 희석하여 각 well에 0.2ml씩 접종하고, 가끔 흔들어 주면서 36°C CO₂ 배양기에서 배양하였다. 90분 후 2% FBS 함유한 DME배지 3ml을 각 well에 첨가하였고, 대조군으로 10% FBS를 함유한 PBS용액 0.2ml를 각 6 well plate에 한 well씩 접종하였다. 36°C에서 4~7일간 배양 후, 각 well에서 나타난 plaque 수를 현미경에서 측정하였다. 이 기간 동안은 2차적인 CPE가 관찰되지 않았다. 0.1% methylene blue로 염색된 plaques를 현미경으로 다시 측정하고, 두 방법에서 얻어진 바이러스 역가를 비교하여 정확한 세포 유리 바이러스의 양을 계산하였다.

결과 및 고찰

LuMA 세포 성장에 미치는 혈청 농도의 영향

동물세포 배양의 대량배양에서 혈청의 농도는 비용 절감의 면에서 가장 중요한 요소이며, 이런 중요성은 대량배양을 실시 하기 전인 소규모 세포 배양에 미리 적응되어야 한다. LuMA 세포 성장에 최적의 농도를 결정하기 위하여, 세포를 6%, 7%, 8%, 9%, 10%(v/v)의 FBS 농도를 함유한 DME 배지에서 배양하였다. LuMA 세포를 2.5×10^4 cells/cm²의 초기 세포 농도로 175cm²의 T-flasks에서 배양하고, 매일 각 혈청 농도마다 3개의 T-flask에

서 세포를 수확하여 세포 성장을 비교하였다. Fig. 1은 세포 성장이 FBS 농도가 감소함에 따라서 감소되어짐을 보여주고 있으며, FBS 농도가 6, 7, 8%에서는 초기에 세포 성장이 둔화되는 형태(lag phase)를 보이는 전형적인 세포 성장 곡선을 보여주었다. 9% FBS를 함유한 배지에서의 세포 성장은 10% FBS를 첨가한 배지에서의 성장과 유사한 성장 곡선을 보였으며, 같은 혈청 농도에서 세포의 계대수에 따른 차이는 본 실험에 사용된 계대수(23-29)에서는 차이를 보이지 않았다. 그러므로, 앞으로의 실험에서 LuMA 세포의 생육에 필요한 FBS의

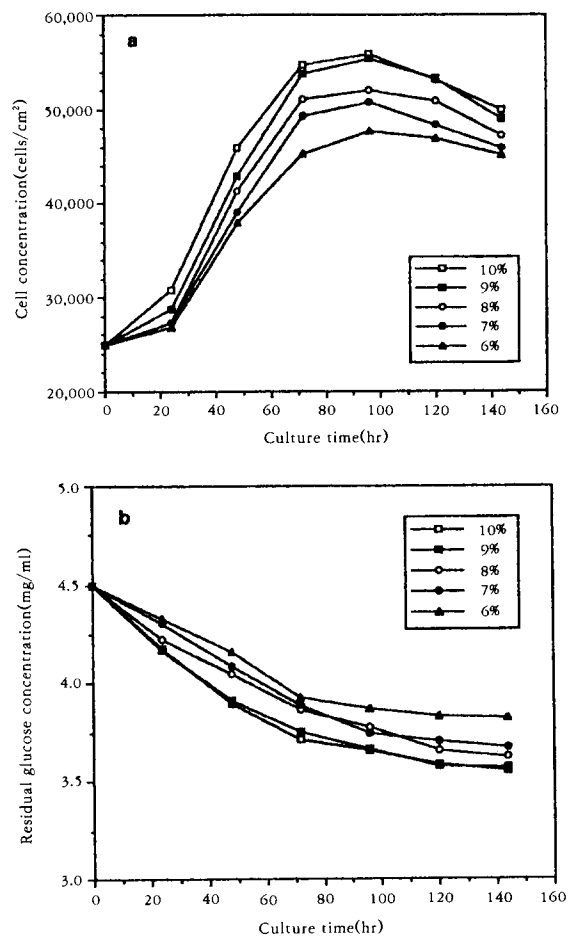


Fig. 1. Growth profiles of human embryonic lung (LuMA) cells in DME media supplemented with different concentrations of FBS: a) profiles of LuMA cell growth; b) profiles of glucose consumption.

농도는 9% (v/v)를 사용하였다. 이들 배양에서의 주요 에너지원의 하나인 glucose의 소비도 혈청 농도의 감소에 따른 세포 성장과 관련있음을 나타내고 있으며, 원래의 glucose 농도의 약 10~20%만을 소모하는 경향을 보였다. 이것은 LuMA 세포 증식이 glucose 농도에 의해서 보다는 해로운 대사 산물의 축적이나 특정 영양분의 고갈에 의해서 저해된다고 할 수 있다. 또한 9%와 10%의 경우에는 세포가 최대에 도달되어진 후 세포가 자랄 수 있는 표면적의 제한으로 세포의 증식이 멈추어졌을 가능성도 있다.

바이러스 감염 비율에 따른 바이러스 역가 비교

수두 바이러스의 감염비율(multiplicity of infection : MOI)에 따른 LuMA 세포에서의 수두 바이러스의 증식을 비교하고 바이러스 증식이 최대가 되는 최적 MOI를 결정하기 위하여, 단층이 형성된 LuMA 세포에 감염 비율을 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 MOI로 변화하여 접종하였다. 접종용 수두 바이러스는 CPE가 50%를 보이는 배양에서 수확된 바이러스 감염된 세포를 사용하였다. Fig. 2b에서와 같이 MOI값의 증가에 따라 세포 친화 수두 바이러스(CAV)의 증식이 증가하는 현상을 보였다. 0.2 MOI일 때, 48시간에 바이러스 역가가 최대(5.84×10^4 PFU/ml)에 도달되었고, 이 이후로는 바이러스 역가가 계속 감소하였다. 바이러스 증식에 따른 CPE현상에서는 배양시간이 증가함에 따라 MOI에 관계없이 CPE가 계속 증가하는 경향을 보였으며, CPE가 80% 이상에서는 바이러스 감염된 세포의 T-flask 표면에서의 이탈 현상이 현저하게 나타났다 (Fig. 2a). 이것은 바이러스 감염으로 세포의 대사가 저해되며, 결국 세포 생존도를 잃고 T-flask에서 떨어지게 되는 것이라 할 수 있다. 0.2MOI에서 얻은 최대의 수두 바이러스 역가는 CPE가 80%일 때 얻어졌고, 0.1MOI에서의 최대의 바이러스 역가는 90%의 CPE를 보일 때 얻어졌다. 이 결과는 MOI 값이 높은 경우에는 수두 바이러스의 역가가 CPE가 100%에 도달되기 전에 최대가 됨을 의미하는 것이다. 바이러스 감염된 세포가 배양 시간이 경과함에 따라 파괴되어 수두 바이러스의 감염력을 상실하는 특성 때문에 최대에 도달된 세포 친화 바이러스의 역가가 배양시간이 증가함에 따라 감소하는 것이다.

혈청 종류에 따른 수두 바이러스의 역가 비교

혈청의 종류는 fetal bovine serum(FBS, Gibco), newborn calf serum(NCS, Sigma), calf serum

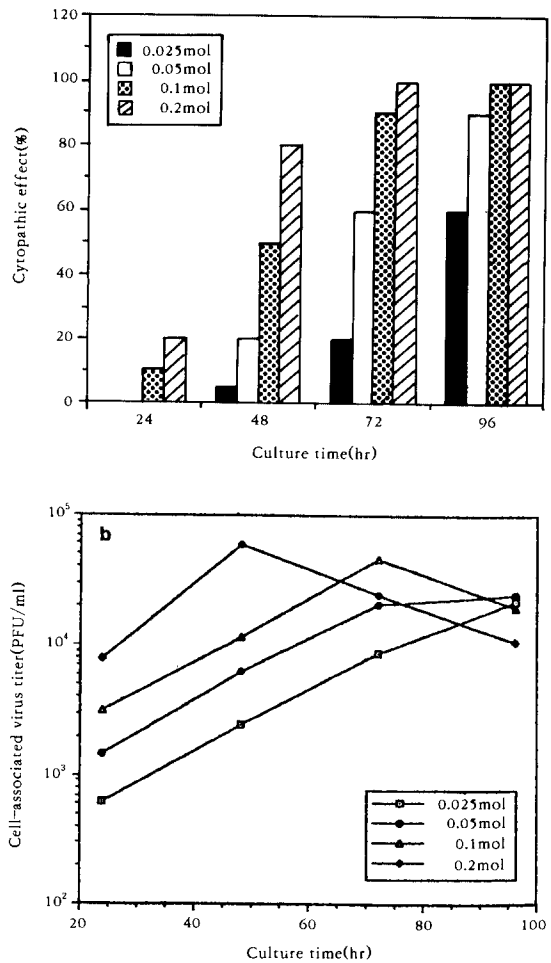


Fig. 2. Effect of virus infection ration(multiplicity of infection:MOI) on cytopathic effect and cell-associated varicella-zoster virus titer in T-flask culture:a) cytopathic effect : b) cell-associated virus titer.

iron supplemented(CSis, Gibco), calf serum(CS, Gibco), horse serum doner herd(HS, Sigma) 등으로 이들 혈청을 2% (v/v)로 DME 배지에 각각 현탁시켜 사용하였다. 초기 LuMA 세포 농도를 2×10^4 cells/cm²로 T-flasks에 접종하여 4일간 배양하여 단층을 형성한 후 세포 배양액을 제거하였다. 세포를 PBS로 2회 세척하고, 각 T-flasks에 혈청이 들어 있지 않은 DME 배지를 10ml씩 넣어 37°C에서 60분간 항온한 후, 배지를 제거하여 남아 있는

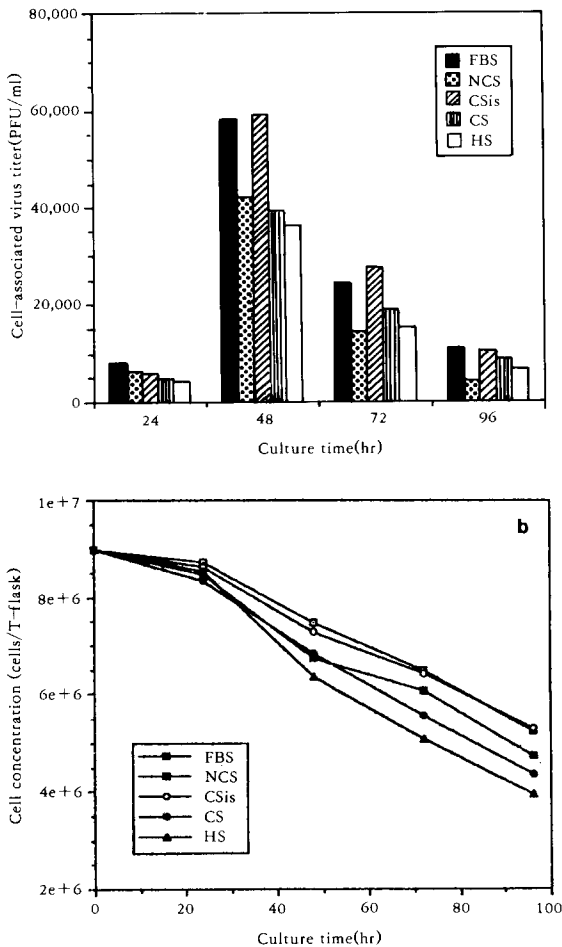


Fig. 3. Comparison of cell-associated varicella-zoster virus titer and maximum cell concentration in different types of serum in T-flask culture: a) cell-associated virus titer; b) maximum cell concentration, Abbreviations: FBS, fetal bovine serum; NCS, newborn calf serum; CSis, calf serum iron supplemented; CS, calf serum; HS, horse serum.

혈청 성분을 가능한 제거하였다. 수두 바이러스 감염된 LuMA 세포를 각각의 혈청이 2% (v/v) 첨가된 배지로 현탁하여 감염되지 않은 세포에 1:10의 비율로 접종하였다. 90분 후 배지를 35ml로 맞추고 36°C humidified CO₂ 배양기에서 배양하면서 수두

바이러스 역가를 비교하였다. Fig. 3에서와 같이 FBS와 CSis에서의 세포 친화 바이러스의 역가는 다른 혈청들에 비하여 높았으며, 배양시간에 따른 바이러스 역가와 세포수는 상관관계를 보였다. 이것은 수두 바이러스의 증식이 혈청의 종류에 의하여 영향을 받음을 의미하는 것이며, 바이러스 감염된 세포의 세포 생존도 상실로 인하여 혈청 종류에 관계없이 T-flask 당 전체의 세포농도가 배양시간에 따라서 감소하는 현상을 보였다.

기질 표면에서 떨어진 수두 바이러스에 감염된 세포의 부스러기를 포함한 세포 배양 배지에서는 감염력을 가진 바이러스가 검출되었으나, 세포 유리 바이러스를 얻는 조건인 3500rpm에서 10분간 원심하여 세포 부스러기를 제거한 후에는 감염력을 가진 바이러스를 검출할 수 없었다(Fig. 4a). 세포 배양액에서의 바이러스 역가는 48시간에 가장 높은 역가를 보이나 배양시간이 경과함에 따라 낮아졌다. CS와 HS의 혈청을 사용한 경우에는 다른 혈청을 사용한 배양에 비하여 낮은 역가를 나타내었다. 배양액에서 얻어진 수두 바이러스 역가는 세포에서 얻어진 바이러스의 약 3% 이하이었다(Fig. 4b). 이 결과는 세포 배양액에는 감염력을 가진 세포 유리 바이러스가 존재하지 않으며, 수두 바이러스는 세포 밖으로 나온 후에는 세포 배양액에서 감염력을 빨리 상실하는 극히 낮은 안정성을 가진 세포 친화 특성을 갖고 있음을 의미하는 것이다. 이 결과는 높은 역가의 수두 바이러스를 얻기 위해서는 세포 배양액이 아닌 세포로부터 얻어야 함을 나타내는 것이다.

혈청의 농도 변화에 따른 수두 바이러스 역가 비교

175cm² 표면적을 가진 T-flasks에서 배양하여 단층을 형성한 LuMA 세포를 trypsin 처리하고 DME 배지로 재현탁하여 접종용 세포로 사용하였다. 이것은 바이러스 접종시의 세포수를 같게 하여 세포수의 차이에 의한 바이러스 역가 차이를 없애기 위한 목적으로 실시하였다. 초기 세포수를 2 × 10⁴ cells/cm²의 농도로 배양하여 9% FBS가 함유된 35ml DME 배지에 세포를 현탁시키고 37°C humidified CO₂ 배양기에서 배양하였다. 4일 배양하여 단층을 형성시킨 후 배지를 제거하였다. 남아 있는 혈청 성분을 제거하여 정확한 혈청 농도의 효과를 조사하기 위하여, PBS로 2회, 무혈청 DME배지로 다시 1회 세척하였다. 앞의 혈청 종류에 의한 실험에서 다른 혈청에 비하여 높은 바이러스 역가를 보인 혈청인 FBS와 CSis의 농도를 0.5%, 1%, 2%, 4%, 8% (v/v)

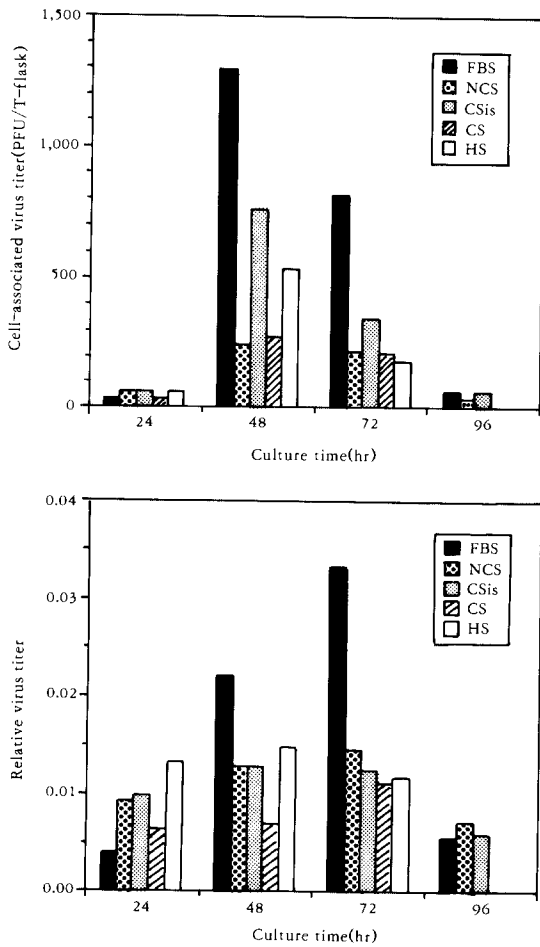


Fig. 4. a) Comparison of cell-associated virus titer in culture medium with various serum types, b) Relative cell-associated virus titer in culture medium to virus-infected cells with various serum types.

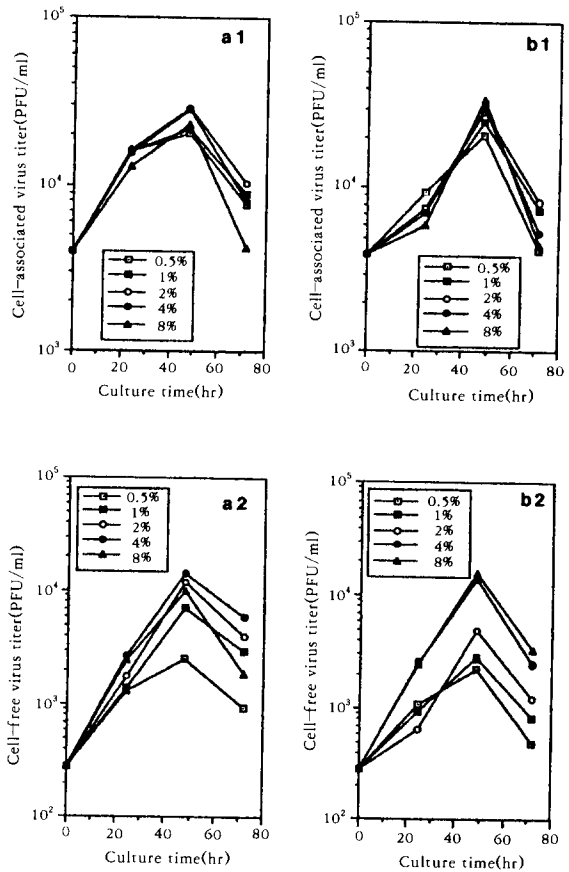


Fig. 5. Comparison of cell-associated and cell-free varicella-zoster virus production with respect to serum type and its concentration: a) profiles of virus titer at various concentrations of FBS; b) profiles of virus titer at various concentrations of CSis.

로 하여 DME 배지에 각각 현탁하고, 이들 각각의 혈청이 첨가된 배지를 단층이 형성된 T-flasks에 넣어 37°C에서 3시간 동안 배양하여 LuMA 세포가 각 농도의 혈청에 적응되도록 하였다. 배지를 제거한 후 같은 농도의 혈청이 첨가된 배지 30ml을 각 T-flasks에 첨가하였다.

접종용 수두 바이러스의 준비는 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 40~50%의 CPE를 보인 수두 감염된 LuMA 세포를 수확한 후 원심하여 상층을 버리고 세포 침전을 각각의 혈청 농도가 포함된 배지

로 재현탁하여 다시 원심하고, 세포 침전을 동일 혈청이 첨가된 배지로 재현탁하였다. 이런 세척 방법으로 남아 있는 혈청 성분에 의한 영향을 최소화하였다. 이 재현탁된 수두 바이러스 감염된 세포 현탁액을 각 혈청 농도를 함유한 T-flasks에 접종하고 36°C CO₂ 배양기에서 배양하였다. 초기 바이러스 접종 역가는 4 × 10³ PFU/ml로 하였다. 각 배양을 매일 수확하여 각 혈청 농도에서의 세포 친화 바이러스(CAV)와 세포 유리 바이러스(CFV) 역가를 비교하였다(Fig. 5). 실험적 오차를 줄이기 위하여 같은 농도의 혈청에 3개의 T-flasks를 사용하였고 2회

반복 실험하였다.

FBS 함유 배지에서 세포 친화 바이러스와 세포 유리 바이러스의 생산량은 CSis에 비하여 다소 낮았다. CSis가 첨가된 배양에서 수두 바이러스(CAV와 CFV)의 역가는 혈청 농도의 증가로 높아지는 경향을 보였으나, FBS가 첨가된 배양에서는 세포 친화 바이러스는 2% 사용한 배양에서, 세포 유리 바이러스는 4%를 사용한 배양에서 최대값을 보였다. 이것은 혈청 성분이 수두 바이러스의 감염력 유지와 관련되어 있음을 의미하는 것으로 보인다. 세포 유리 수두 바이러스는 CPE가 최대에 도달되기 전인 70~80% 부근에서 얻어졌다. 이것은 CPE가 최대로 되면 세포의 파괴로 인하여 감염력 있는 수두 바이러스가 감소하는 것을 의미한다. 최대의 세포 친화 바이러스는 FBS를 함유한 배지에서는 2% (2.86×10^4 PFU/ml)를 사용했을 때, CSis를 함유한 배지에서는 8% (3.44×10^4 PFU/ml)를 사용하였을 때 얻어졌다. 최대의 세포 유리 바이러스의 역가는 FBS 함유 배양에서는 4% (1.45×10^4 PFU/ml)를 사용하였을 때, CSis를 사용한 배양에서는 8% (1.57×10^4 PFU/ml)에서 얻어졌다. FBS는 CSis에 비하여 훨씬 가격이 비싸므로, 수두 바이러스 대량생산을 위하여 CSis에 의한 FBS의 대체 가능성이 고려되었다. 이상의 결과는 혈청의 어떤 성분뿐만 아니라 농도에 의해서도 수두 바이러스가 세포에서 증식하는데 영향을 받으며, 이런 이유로 수두 바이러스의 대량 생산을 위하여 혈청 종류와 농도의 선택이 중요하다 할 수 있다.

요 약

약독화된 수두 바이러스(Varicella-zoster virus : VZV)를 사람 폐세포(human embryonic lung cells)에서 배양하였으며, 수두 바이러스의 생산에 미치는 혈청의 종류와 농도의 효과를 조사하였다. 수두 바이러스는 바이러스 감염 비율이 높을수록 높은 역가를 보였으며, 배양시간이 경과함에 따라 바이러스 감염된 세포의 파괴로 인하여 세포수가 감소되었다. Newborn calf serum(NCS), calf serum(CS), horse serum(HS) 등의 혈청을 사용한 배양

에서의 수두 바이러스의 역가는 CSis와 FBS를 사용한 배양에서보다 낮아서 수두 바이러스 생산을 증가하기 위해 이들 혈청의 사용은 적합하지 못하였다. 그러나, calf serum iron supplemented(CSis) 혈청을 첨가한 배지에서의 세포 친화 바이러스(cell-associated virus)와 세포 유리 바이러스(cell-free virus)수율은 fetal bovine serum(FBS)을 첨가한 배지에서의 수율과 비슷하였으며, 고농도의 혈청 사용은 고려되어야 할 요소이었다. 또한, 수두 바이러스의 증식 및 감염력 유지가 혈청성분과 농도에 의해서 영향을 받고 있음을 보였다.

참고문헌

1. T. H. Weller and M. B. Stoddard(1952), *J. Immunol.*, **68**, 311.
2. P. A. Brunell(1977), *Pediatrics.*, **59**, 1.
3. A. E. Caunt(1963), *Lancet.*, **2**, 982.
4. C. Grose, D. M. Perrota, P. A. Brunell and G. C. Smith(1979), *J. Gen. Virol.*, **43**, 15.
5. A. E. Caunt and D. Taylor-Robinson(1964), *J. Hygiene, Cambridge*, **62**, 413.
6. C. Grose and P. A. Brunell(1978), *Infect. & Immun.*, **19**, 199.
7. N. J. Schmidt and E. H. Lennette(1976), *Infect. & Immun.*, **14**, 709.
8. M. Takahashi, T. Otsuka, Y. Okuno, Y. Asano, T. Yazaki and S. Isomura(1974), *Lancet*, ii, 1288.
9. D. Barnes(1987), *Bio/Techniques*, **5**, 534.
10. M. Ratafia(1989), *Bio/Technology*, **7**, 574.
11. S. Y. Park, K. K. Hwang, M. K. Choi, Y. W. Ryu, S. B. Paik and K. H. Kim(1991), *J. Korean Soc. of Virol.*, **21**, 1.
12. K. K. Hwang, B. H. Chun, H. S. Park, S. Y. Park, K. H. Kim and H. M. Moon(1992), *J. Korean Soc. of Virol.*, **22**, 105.
13. K. K. Hwang, S. Y. Park, S. J. Kim, Y. W. Ryu and K. H. Kim(1991), *J. Korean Soc. of Virol.*, **21**, 201.