

Production of Newcastle Disease Virus by Vero Cell Culture

전주미¹, 전계택¹, 김익환², 이상중⁴, 장용근³, 정연호
강원대학교 생명공학부, 생명과학부¹, 고려대학교 생명공학원²
한국과학기술원 생명화학공학과³, (주)에스티알바이오텍⁴
전화 (033)250-6484, FAX (033)254-3835

Abstract

Newcastle disease virus (NDV) vaccines were produced from Vero cells by using lively attenuated virus strain. The MOI of 0.1, serum concentration of 2%, initial pH of 8.0, and infection time of 3 days were found to be optimum conditions for vaccine production. The treatment of polycation enhanced the virus production. When ascorbic acid was added as an antioxidant, NDV production was also enhanced. Utilization of CaCl_2 showed an inhibitory effect on the propagation of NDV. It was also found the ammonium ion concentration higher than 4mM inhibited virus production. Thus ammonium ion removal system was tried for the efficient production of NDV vaccine.

서론

뉴캐슬병은 모든 닭에서 발생하는 질병으로, 대량 사육되는 지역에서 특히 심각한 발병을 보이며 병의 전파속도가 크고 산란을 저하 및 폐사로 인해 양계산업에 큰 피해를 주고 있다. 이러한 뉴캐슬병으로 인한 손실을 줄이기 위해서는 백신이 대량으로 필요하며, 백신의 대량생산을 위해 동물세포배양을 이용하면 동물이나 수정란을 이용할 때보다 적은 공간, 적은 비용, 그리고 적은 인력으로 쉽게 바이러스를 생산할 수 있다는 장점이 있다. 생물반응기에서 동물세포를 이용하여 뉴캐슬병 바이러스를 효과적으로 생산하기 위해서는 우선 고밀도 세포배양시스템의 개발과 함께 고 생산성 뉴캐슬병 백신생산시스템 구축 및 운전 전략의 확립이 필수 불가결하다. 이를 위한 기초 연구로 본 연구에서는 최적 pH, 혈청농도, MOI, 감염시기 등 기초적인 생산조건을 확립하고, 생산성 향상을 위한 첨가제 조사, 암모늄 이온의 백신 생산에 대한 영향 조사, 암모늄 이온 제거 시스템의 적용 가능성 조사 등을 통해 bioreactor를 기반으로 하는 고 생산성 뉴캐슬병 바이러스 백신 생산 시스템 구축을 위한 기본 전략을 모색하였다.

재료 및 방법

본 실험에서 뉴캐슬병 바이러스 생산을 위한 숙주세포는 African green monkey kidney (Vero) 세포주를 이용하였다. 세포 성장을 위한 기본배지로는 RPMI 1640을 이용하였으며 5% FBS, streptomycin sulfate (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), penicillin G (100units/ml), 10mM sodium

bicarbonate 및 10mM HEPES를 첨가하였다.

세포는 5% CO₂, 37°C 조건의 humidified CO₂ incubator에서 유지하였다. 세포농도 및 세포 생존율은 trypan blue exclusion 방법을 이용하여 haemocytometer로 측정하였다. 바이러스주로는 NDV중 비강독인 BI 주를 사용하였으며 백신생산을 위해 세포 농도가 지수기 말기에 도달한 후 배지를 제거하고 0.1 MOI로 감염시켰다. CO₂ 배양기에서 3일간 배양한 후 수확하여 plaque assay 방법으로 역가를 측정하였다.

결과 및 고찰

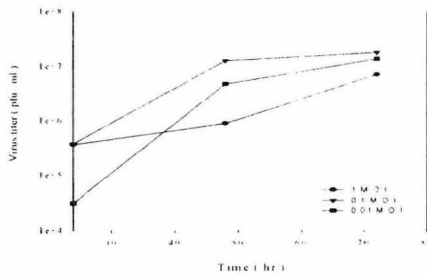


Fig.1 Effect of MOI on NDV production

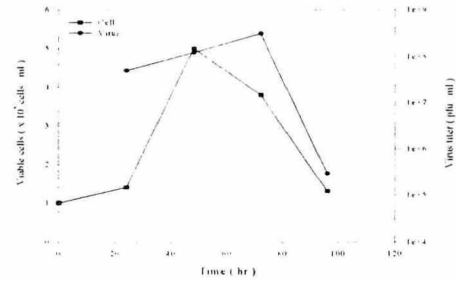


Fig.2 Optimization of infection time

Fig.1에서 MOI가 0.1일 경우 바이러스 역가가 최대임을 보여주고 있어서 최적 MOI는 0.1임을 확인할 수 있었다. Fig.2에 의하면 세포 접종 72시간 후에 바이러스를 감염시켰을 때 바이러스 역가가 최대였고 96시간 후 감염시켰을 경우 급속한 감소를 보였다. 즉 최적의 감염 시기는 세포의 성장 단계 중 지수기에서 정지기 사이인 72시간 후임을 확인하였다. 그밖의 최적생산조건을 조사한 결과 pH 8.0, 2% 혈청 농도에서 가장 높은 바이러스 역가를 보였다. 또한 0.1mM ascorbic acid, 20µg/l DEAE-dextran, 3µg/l Poly-L-lysine을 첨가함으로써 바이러스 감염능을 향상시킬 수 있었다. 세포성장 및 바이러스 생성을 저해하는 암모늄 이온은 회분식 배양결과 4mM 이상이 생성되었다. 4mM 이상의 암모늄 이온은 Vero 세포 성장을 저해하며 바이러스 증식도 저해하였다. 한편 암모늄 이온을 제거하기 위해 고정화 흡착제를 부여하여 바이러스를 증식시키는 시스템의 이용 가능성이 조사되었다.

참고문헌

1. J. Shevitz, T.L. LaPorte, T.E. Stinnett, "Production of viral vaccine in stirred bioreactors" In: Mizrahi A, editor, Advances in biotechnological processes, Viral vaccines, New York, Wiley-Liss Publishers, 14, 1-35
2. J.M. Berry, N. Barnabe, K.M. Coombs, M. Butler, " Production of retrovirus type-1 and type-3 from Vero cells grown on solid and microporous microcarriers" (1999), Biotech. & Bioeng., 62, 12-19