

## Vero 세포배양을 이용한 뉴캐슬병 바이러스 생산

이 광 원 · \*김 익 환 · †김 동 일  
인하대학교 생물공학과, \*생명공학연구소

## Production of Newcastle Disease Virus Using Vero Cell Culture

Kwang-Won Lee, Ik-Hwan Kim\* and Dong-Il Kim†

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
\*KRIBB, Daejeon 305-606, Korea

### ABSTRACT

Studies on the production of Newcastle disease virus(NDV) were carried out to optimize culture conditions such as initial pH, temperature, serum concentration, multiplicity of infection(M.O.I.) as well as the addition of polycation, antioxidant, and DMSO. Initial pH from 7.2 to 8.1 showed little difference on NDV production but the initial pH below 6.8 resulted in the negative effect. The highest NDV titer was obtained at 0.1 M.O.I. In addition, the maximum production of virus was achieved at 2% FBS and optimum temperature was found to be 34°C. Treatment of polycation increased the virus production. When ascorbic acid was added as an antioxidant, NDV production was also enhanced. Utilization of DMSO, a well-known permeabilizing agent, showed an inhibitory effect on the propagation of NDV.

### 서 론

뉴캐슬병(Newcastle disease)은 남극을 제외한 전세계 모든 대륙에서 발생하는 질병으로, 대량 사육되는 지역에서 특히 심각한 발병을 보이며 병의 전파는 고밀도 양계, 양계장내 강제통풍, 새의 이동, 배설물의 농경지 투기 등이 복합적으로 작용하여 촉진된다. 이의 통제를 위해서는 배설물과 감염된 개체를 매장 또는 소각하는 효과적인 처리가 필요하며 감염된 지역 밖으로 이동을 통제하는 것 또한 중요하다. 뉴캐슬병으로 인한 치사율 및 병으로부터의 손실을 줄이기 위해서 백신예방접종이 필요하다(1).

뉴캐슬병 바이러스(Newcastle disease virus, NDV)는 paramyxoviridae과에 속하는 RNA 바이

러스로 독특한 nucleocapsid 구조를 지니고 있다. Ribonuclease의 공격으로부터 RNA를 보호해 주는 nucleocapsid는 지름이 18nm인 helix로 유연하고 길다(1000nm). Paramyxovirus는 그 모양이 매우 불규칙해서 거의 구형에서 필라멘트형까지 다형태적(pleomorphic)이고 지름은 150~300nm 정도이며 표면은 짧은 spike로 덮여 있다. RNA 게놈의 분자량은  $5\sim 7 \times 10^6$  dalton으로 알려져 있다(2).

뉴캐슬병 바이러스는 합성배지에서의 복제가 불가능하며 살아있는 세포를 숙주로 요구한다. 세포배양을 이용하면 동물이나 수정란을 이용할 때보다 적은 공간, 적은 비용, 그리고 적은 인력으로 쉽게 바이러스를 생산할 수 있다는 장점이 있음에도 불구하고 아직까지는 대규모 유행성 바이러스 백신제조에 수정란을 이용하여 바이러스 백신이 생산되고 있다(3). 인유래 세포와 동물세포를 기내배양을 통해 대

† Corresponding Author

량 증식시키는 방법의 개발은 바이러스학, 유전학, 그리고 세포 생리학 발전에 필수적이라고 여겨지며 최근의 생물공학기술의 발달과 여러 가지 단백질의 약품의 상업화는 동물세포배양의 필요성을 더욱 부각시키고 있다. 또한 세포배양을 이용한 바이러스의 일차 분리, 감염능 분석, 생화학 연구 및 백신생산 등도 가능하다. 따라서 바이러스와 세포간의 특이성, 바이러스복제 검사방법, 그리고 바이러스 복제에 영향을 미치는 물리화학적, 생물학적 조건 등을 연구함으로써 동물세포배양에 의한 바이러스의 대량증식 및 백신생산이 가능하게 될 것이다.

본 연구에서는 *Vero* 세포배양을 이용한 뉴캐슬병 바이러스 생산시 pH, 온도, 혈청농도의 영향을 조사하고 항산화제, polycation, DMSO 처리 및 M.O.I. 최적화를 통하여 생산성 증대를 시도하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포주 및 세포배양

본 실험에서는 African green monkey kidney (*Vero*) 세포주를 이용하였다. 세포생장을 위한 기본 배지로는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, U.S.A.)을 이용하였으며 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco), streptomycin sulphate(100 $\mu$ g/ml), penicillin G(100units/ml), 10mM sodium bicarbonate 및 10mM HEPES를 첨가하였다. 세포는 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 배양기에서 25cm<sup>2</sup> T-flask(Nunc, Denmark)를 사용하여 배양하였으며 배양온도는 37 $^{\circ}$ C로 조절하였다.

세포 농도는 Neubauer counting chamber를 이용하여 trypan blue exclusion 방법에 의하여 측정하였다.

#### 바이러스주 및 바이러스 배양

바이러스주로는 NDV 중 비강독인 B1 주를 국내에서 강독화시킨 교정원주를 대성미생물연구소(경기도 의왕시)로부터 제공받아 사용하였으며 -70 $^{\circ}$ C deep freezer에 보관하였다.

바이러스 접종을 위해서는 T-flask의 세포 농도가 지수기 말기에 도달하면 배지를 제거하고 phosphate-buffered saline(PBS)으로 2회 세척한 후 0.1 M.O.I.로 NDV를 감염시키고 1시간 동안 흡착하면서 간헐적으로 흔들어서 주었다. CO<sub>2</sub> 배양기에서 2일간 배양한 후 수확하여 원심분리(3000rpm, 15min)한 다음 역가를 측정하였다.

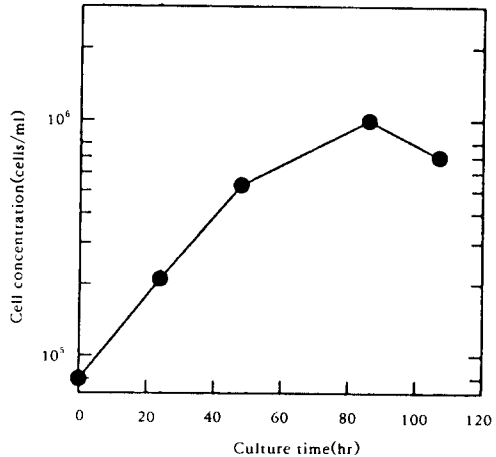


Fig. 1. Growth kinetics of *Vero* cells in T-flasks.

#### 바이러스 역가측정

뉴캐슬병 바이러스의 plaque assay를 수행하기 위해서는 12 well plate에 10% FBS가 함유된 DMEM을 이용하여 well당  $2 \times 10^5$  *Vero* 세포를 접종하고 confluent하게 자랄 때까지 37 $^{\circ}$ C humidified CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 한편 FBS가 함유되지 않은 DMEM으로 시료를 10배 단계희석하여 적당량 바이러스를 함유한 희석시료를 준비하였다. 각 well의 배지를 제거하고 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free PBS로 세척한 후 0.1ml씩 바이러스 희석액을 각 well에 접종하고 가끔 흔들어 주면서 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 배양기에 정지배양하였다. 60분 후 2% agarose와 2배 농축된 DMEM을 1:1 혼합한 agarose 배지를 각 well에 2ml씩 첨가하고 2~3일 후 각 well에 나타난 plaque 수를 1% crystal violet 용액으로 염색시켜 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### *Vero* 세포의 성장 특성

일반적으로 세포유리 바이러스는 숙주세포 농도가 최대가 되는 지수기 말기에 감염시킬 때 바이러스 생산이 최대인 것으로 알려져 있으므로(4), *Vero* 세포의 성장특성을 조사한 후 뉴캐슬병 바이러스 감염 시기를 결정하고자 하였다. Fig. 1은 *Vero* 세포의 성장곡선을 보여주는 것으로 세포 농도는 접종 후 4일째까지 증가하다가 이 이후 감소하는 경향을 보였다. 비성장속도는  $0.039\text{hr}^{-1}$ 이었고 배가시간(dou-

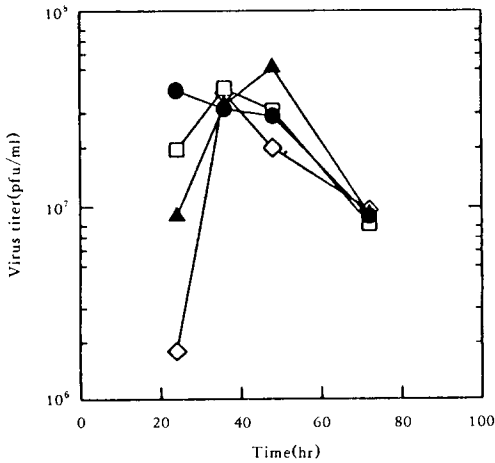


Fig. 2. Optimization of M.O.I. (●, 10 M.O.I.; □, 1 M.O.I.; ▲, 0.1 M.O.I.; ◇, 0.01 M.O.I.)

bling time,  $T_{50}$ )은 17.8hr였다. 따라서 이 결과에 근거하여 이후 모든 실험에서는 세포접종 후 3.5일에 바이러스를 감염시키고 2일 후 수확하여 역가를 조사하였다.

#### M.O.I.의 최적화

바이러스 생산에서는 M.O.I.(세포에 대한 바이러스의 감염비)가 바이러스 증식에 영향을 주는 중요한 변수이다. 높은 M.O.I.로 감염시킬 경우 Nguyen 등(5)의 보고와 같이 단시간 내에 많은 바이러스가 급속하게 증식되므로 생산성면에서 좋지 않은 영향을 줄 수 있다. 따라서 Vero 세포에서 M.O.I.에 따른 뉴캐슬병 바이러스 증식을 비교하고 바이러스 복제가 최대가 되는 최적 M.O.I.를 결정하기 위하여 0.01, 0.1, 1, 10 M.O.I.로 접종하고 그 최대역가를 확인하였다. 그 결과 10 M.O.I.일 때, 24시간에 바이러스 역가가 최대( $3.9 \times 10^7$  pfu/ml)였고, 이후로는 계속 감소하였다. 1 및 0.01 M.O.I.인 경우는 36시간에서 바이러스 역가가 최대( $4.0 \times 10^7$  pfu/ml과  $3.8 \times 10^7$  pfu/ml)였으며, 이후로는 10 M.O.I.경우와 유사하게 계속 감소하였다. 0.1 M.O.I.인 경우는 48시간에서 바이러스 역가가  $5.1 \times 10^7$  pfu/ml로 최대치를 보였으며, 이 이후에는 역시 감소하는 경향을 나타냈다. 따라서 Vero 세포를 이용한 뉴캐슬병 바이러스 생산시 0.1 M.O.I.가 최적으로 사료된다 (Fig. 2).

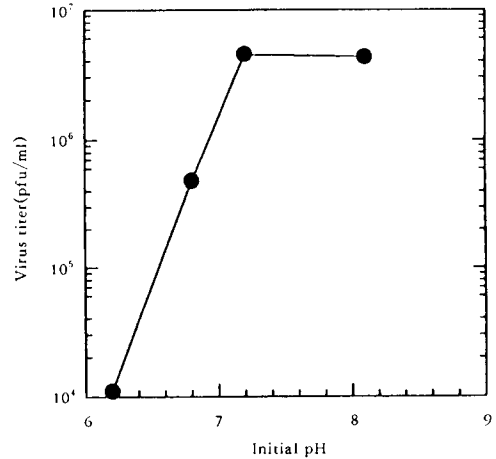


Fig. 3. Effect of initial pH on NDV production.

#### 배양조건이 NDV 생산에 미치는 영향

세포의 대사과정을 최대화하는 조건이 반드시 바이러스나 바이러스 산물 생산을 최대화하지는 않는다. 따라서 초기 pH, 온도, 혈청농도 등이 뉴캐슬병 바이러스 생산에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 먼저 초기 pH를 6.2에서 8.1까지 변화시키면서 바이러스 복제에 미치는 영향을 실험하여 본 결과 초기 pH 7.2~8.1에서는 바이러스 역가가  $4 \sim 4.5 \times 10^6$  pfu/ml로 큰 차이가 없었으나, 6.8 이하의 초기 pH는 바이러스 생산을 크게 감소시켰다 (Fig. 3).

바이러스 생산의 중요한 영향인자 중 하나인 온도가 뉴캐슬병 바이러스 생산에 미치는 영향을 확인하기 위해 본 실험에서는 37°C에서 세포를 배양한 후 바이러스를 접종시킨 다음 배양온도를 34, 37, 38.5°C로 유지하였다. 그 결과 바이러스 증식은 온도가 34°C에서 가장 좋았다. 이러한 세포배양의 최적온도와 바이러스배양 최적온도가 다른 Grose와 Brunell(6)의 결과에서도 볼 수 있다.

동물세포 배양에서 혈청은 필수적으로 사용되고 있으나 백신, 단일클론항체, 호르몬, 성장인자 등과 같은 산물들의 경제적인 생산 및 정제 과정의 단순화를 위해 저혈청 배지 또는 무혈청 배지 이용이 시도되고 있으며, 혈청이 산물의 수율에 미치는 영향에 대해서도 많은 연구가 이루어져 왔다(7, 8). 혈청에는 백신생산을 위한 바이러스 증식을 억제하는 성분이 함유되어 있어 바이러스 감염능을 저하시킨다고 알려져 있으므로(9). 본 실험에서는 0, 2, 4, 6, 8, 10% FBS 혈청농도가 뉴캐슬병 바이러스 생산에

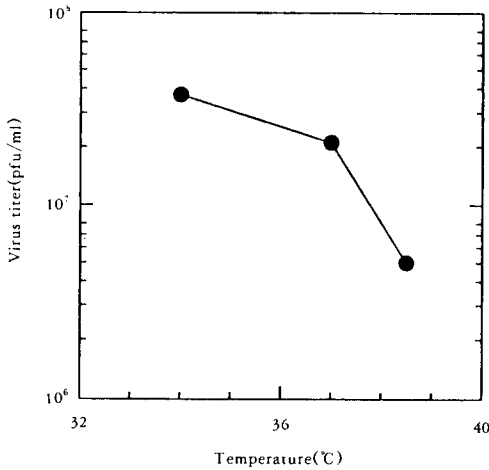


Fig. 4. Effect of temperature on NDV production.

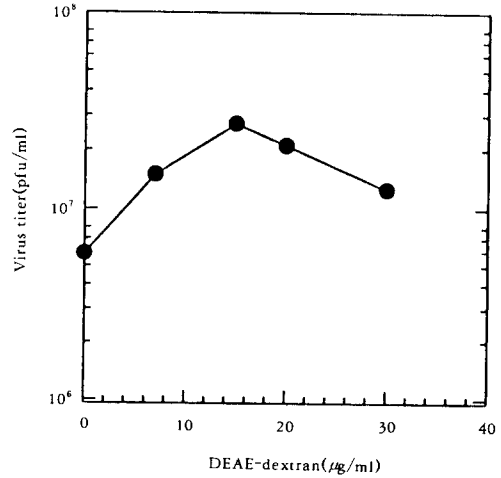


Fig. 6. Effect of DEAE-dextran on NDV production.

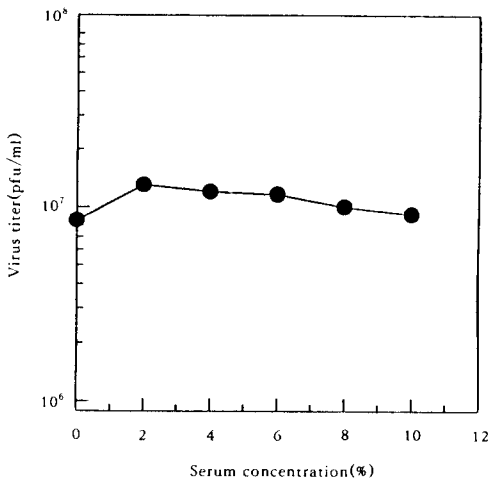


Fig. 5. Effect of serum concentration on NDV production.

미치는 영향을 조사하였다. Fig. 5에 나타난 결과와 같이 혈청의 존재는 NDV 증식에 효과적이었으며 2% FBS를 함유한 배지를 사용했을 때  $1.3 \times 10^7$  pfu/ml로 최대 바이러스 생산을 보였고 혈청농도가 증가함에 따라 바이러스 복제가 저해되는 현상이 나타났다. 따라서 높은 역가의 뉴캐슬병 바이러스 생산을 위해서 2% FBS를 함유한 DMEM의 사용이 최적임을 확인하였다.

#### NDV 생산 증진물질의 첨가

뉴캐슬병 바이러스의 세포결합부위는 세포막의 phospholipase 또는 neuraminidase 작용에 의해 파괴되며 음전하를 띤 head group을 가진 인지질과 당지질은 바이러스가 숙주세포에 부착하는 것을 저해한다(10). 이러한 문제를 해결하기 위해서는 효소 처리하거나(11), 전기적 상호작용을 이용하여 바이러스와 세포간의 부착을 증진시킬 수 있다(12-15). 따라서 NDV 생산을 증진시킬 목적으로 polycation인 DEAE-dextran과 poly-L-lysine을 처리한 결과 DEAE-dextran은 15 µg/ml에서 바이러스 역가가 최대( $2.7 \times 10^7$  pfu/ml)를 보였으며(Fig. 6) 이는 대조군에 비해 약 5배가 증가한 것이다. Poly-L-lysine 처리의 경우는 3 µg/ml에서 최대 바이러스 역가( $1.27 \times 10^7$  pfu/ml)를 보였다(Fig. 7). 위 결과는 polycation이 바이러스와 세포간의 상호작용을 도와 바이러스 감염능 증대에 효과적이었다는 여러 보고와 일치함을 보여준다(12-15).

세포에서 산소가 물(H<sub>2</sub>O)로 완전 환원되는 과정 중 불완전 환원이 일어나면 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)가 되거나 superoxide radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)이 된다. 반응성이 강한 이들 부산물들은 막지질의 불포화 지방산 성분과 반응하여 막구조에 손상을 주기 때문에 세포에 강한 독성을 보인다(16). 이에 근거하여 비효소적 항산화 작용에 관여하는 물질로 산소의 유독성 유도체들을 중화시키는 ascorbic acid를 0.1~1.0mM 범위로 첨가하여 바이러스 복제에 비효소적 항산화제가 미치

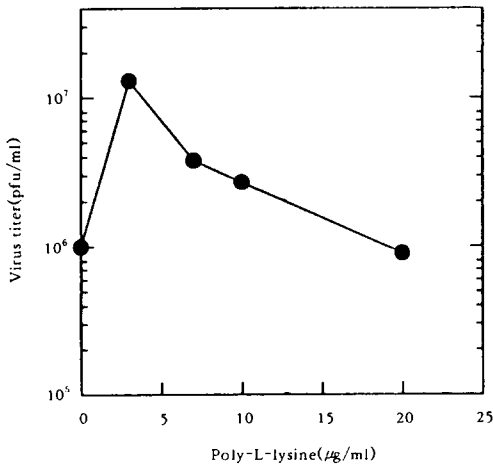


Fig. 7. Effect of poly-L-lysine on NDV production.

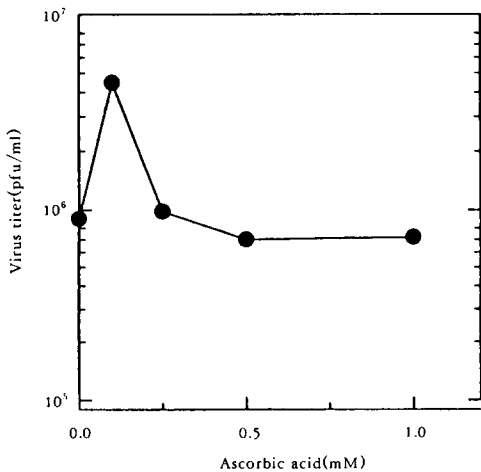


Fig. 8. Effect of ascorbic acid on NDV production.

는 영향에 대하여 조사해 보았다. 그 결과 0.1mM ascorbic acid를 첨가하는 것이 가장 효과가 좋았으며(Fig. 8) 그 이상의 농도에서는 큰 효과가 없는 것으로 보아 최적농도로 첨가할 필요가 있다고 판단된다.

용매로 널리 사용되고 있는 DMSO(dimethyl sulfoxide)는 바이러스 핵산의 침투를 용이하게 하여 감염능을 증대시키는 것으로 알려져 있다(17, 18). 이에 본 실험에서는 Vero 세포를 이용하여 뉴캐슬병 바이러스를 생산함에 있어서 DMSO 농도가

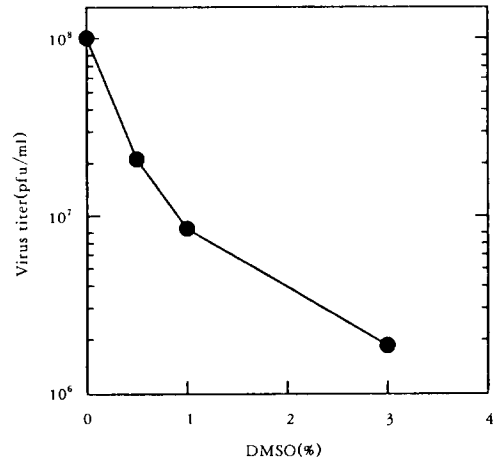


Fig. 9. Effect of DMSO on NDV production.

미치는 영향에 대해 살펴 본 결과 DMSO 농도가 높을수록 바이러스 생산에 해로운 영향을 주는 것으로 나타났다(Fig. 9). 이러한 예상과 다른 현상은 DMSO가 감염능을 증대시키는 긍정적인 영향을 미치기 보다는 바이러스 증식에 부정적인 영향을 주기 때문인 것으로 생각된다.

## 요 약

Vero 세포를 이용한 뉴캐슬병 바이러스 생산에서 pH, 온도, 혈청농도, M.O.I. 등의 최적조건을 구하고 polycation, 항산화제, 그리고 DMSO 등의 첨가제가 바이러스 생산에 미치는 영향에 대한 연구를 수행하였다. 뉴캐슬병 바이러스의 최적 배양조건은 초기 pH 7.2, 혈청농도 2% FBS, 바이러스 접종량 0.1 M.O.I. 및 바이러스 증식온도 34°C로 확인하였다. Polycation인 DEAE-dextran, poly-L-lysine과 항산화제인 ascorbic acid는 각 15 μg/ml, 3 μg/ml 그리고 0.1mM의 최적농도로 첨가했을 때 대조군에 비해 상당히 증대된 최대 바이러스 수율을 얻을 수 있었다.

## 참고문헌

1. W. H. Allan, J. E. Lancaster and B. Toth (1978), *Newcastle Disease Vaccines*, p. 1, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

2. H. Fraenkel-Conrat, P. C. Kimball and J. A. Levy(1988), *Virology*, p. 135, Prentice Hall, New Jersey.
3. R. E. Spier and J. B. Griffiths(1985), *Animal Cell Biotechnology*, **2**, 9, Academic Press, Orlando.
4. R. C. Telling, P. J. Radlett and G. N. Mowat (1967), *Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 257.
5. B. Nguyen, K. Jarnagin, S. Williams, H. Chan and J. Barnett(1993), *J. Biotechnol.*, **31**, 205.
6. C. Grose and P. A. Brunell(1978), *Infection and Immunity*, **19**, 199.
7. M. Ratafia(1989), *Bio/Technology*, **7**, 574.
8. D. Barnes(1987), *Biotechniques*, **5**, 534.
9. J. E. Bailey and D. F. Ollis(1986), *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed, p. 631, McGraw-Hill, New York.
10. C. Conti, P. Mastromarino, M. G. Ciuffarella and N. Orsi(1988), *Arch. Virol.*, **99**, 261.
11. C. Conti, P. Mastromarino, A. Riccioli and N. Orsi(1991), *Arch. Virol.*, **142**, 17.
12. K. Sasaki, T. Furukawa and S. A. Plotkin (1981), *Proc. Sci. Exp. Bio. Med.*, **106**, 282.
13. J. E. Craighead(1967), *J. Virol.*, **1**, 988.
14. K. Toyoshima and P. K. Vogt(1969), *Virology*, **38**, 414.
15. M. M. Kaplan, T. J. Wiktor, R. F. Maes, J. B. Campbel and H. Koprowski(1967), *J. Virol.*, **1**, 145.
16. A. L. Lehninger(1982), *Principles of Biochemistry*, p. 467, Worth Publishers, New York.
17. G. W. Patricia and B. Aldrich(1989), *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 770.
18. D. R. Tovell and J. S. Solter(1967), *Virology*, **32**, 84.