

사람 로타바이러스 Wa의 감염 조건 및 formaldehyde에 의한 inactivation에 대한 연구

장경화·박종화·¹박장호·[†]정인식
경희대학교 유전공학과·¹화학공학과
(접수 : 1998. 7. 27., 게재승인 : 1999. 2. 20.)

Studies on the Infection Condition and Formaldehyde Inactivation of Human Rotavirus Wa

K. H. Chang, J. H. Park, C. H. Park¹, and I. S. Chung[†]
Departments of Genetic Engineering and

¹Chemical Engineering Kyung Hee University, Suwon, Korea, 449-701
(Received : 1998. 7. 27., Accepted : 1999. 2. 20.)

Effects of protease, CaCl₂, EGTA, polybrene, medium pH, and formaldehyde on the infection and inactivation of human rotavirus Wa were investigated using T-flask culture of monkey kidney MA-104 cells. Rotavirus titer was improved by the addition of trypsin or clostripain. Rotavirus titer was increased 8 and 10 times in the infection medium supplemented with 300 µg/mL of CaCl₂ and in the medium adjusted its pH to 8, respectively. However, addition of EGTA or polybrene to the medium decreased rotavirus titer. Rotavirus titer was reduced to 53-95% of the initial value at 1 hr after formaldehyde treatment. Furthermore, rotavirus was inactivated more than 98% at 12 hrs after formaldehyde treatment.

Key Words : CaCl₂, protease, formaldehyde, inactivation, human rotavirus Wa

서론

Family Reoviridae에 속하는 로타바이러스는 소아 및 소, 말, 돼지, 원숭이 등의 어린 동물에서 급성설사나 장염을 일으키는 주 원인체로 알려져 있다 (1-2). 선진국의 경우 급성 소아설사 입원 환자의 약 50%가 로타바이러스 감염에 의한 질병이며 개발도상국에서는 문제가 더욱 심각해서 World Health Organization의 추산에 의하면 매년 백만명의 소아가 로타바이러스에 의한 설사로 사망한다고 한다. 대부분의 환자는 적절한 처치 (수분공급)를 받으면 회복하지만 개발 도상국에서는 이러한 처치 조차 보편화되어 있지 않으며 깨끗한 식수공급, 위생처리 등에 의해 세균성 설사 환자의 발생 빈도는 감소하고 있으나 로타바이러스에 의한 감염은 이 방법이 큰 효과를 보지 못하고 있다. 이처럼 로타바이러스 백신 개발은 매우 시급한 문제이며 지난 10여년 간 백신 개발을 위한 많은 노력이 경주되어 왔지만 이러한 백신 개발의 노력은 아직 해결되고 있지 않다. 현재 사람 로타바이러스 백신과 사람/동물의 재조합 로타바이러스를 이용한 백신 개발이 진행중이며 조직 배양세포에서 획득된 로타바이러스가 사람에서 seroconversion을 일으키고 로타바이

러스성 설사로부터 보호한다는 보고가 있다 (3). 따라서 로타바이러스 백신 개발의 중요성으로 미루어 로타바이러스 백신 개발용 바이러스의 증식 및 inactivation에 대한 연구가 필요하다.

로타바이러스는 T-flask 또는 roller bottle에서 monkey kidney 세포의 배양을 통해 증식이 가능함이 보고되면서 (4-7) 바이러스의 세포내 감염경로나 바이러스의 infectivity에 중요하게 관여하는 것으로 알려진 trypsin의 mechanism (8), 세포형태에 따른 바이러스의 증식 (9), 바이러스의 증식에 미치는 온도, trypsin 등의 영향 등에 대해 연구되었다 (4). 하지만 배지 첨가물이 바이러스의 감염이나 증식에 미치는 영향에 대한 연구는 동물 로타바이러스의 경우 일부 수행된 바 (10-12) 있으나 사람 로타바이러스 Wa의 경우는 체계적으로 검토된 바 없다. 본 연구에서는 로타바이러스의 감염을 증진시키기 위하여 감염 배지의 protease, CaCl₂, EGTA, pH 등의 영향을 살펴보고 formaldehyde에 의한 로타바이러스의 inactivation에 대해 검토하였다.

재료 및 방법

Cell line, 배지 및 바이러스

로타바이러스의 감염 또는 증식을 위한 동물세포로는 Rhesus monkey kidney 세포인 MA-104를 이용하였다. MA-104 세포 배양용 배지는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco)이며 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 10

[†] Corresponding Author · Department of Genetic Engineering, Kyung Hee University, Suwon, 449-701, Korea
Tel · 0331-201-2436, Fax : 0331-203-4969
e-mail : ischung@nms.kyunghee.ac.kr

mL/L antibiotics-antimycotics (Gibco), 35 g/L sodium bicarbonate를 보장하여 이용하였다. 바이러스의 감염 실험에 이용한 감염배지는 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지에 10 mL/L antibiotics-antimycotics, 3.5 g/L sodium bicarbonate 와 2 µg/mL trypsin을 보장하여 사용하였다 바이러스를 MA-104 세포에 감염시키기 전에 로타바이러스를 활성화 시키기 위해 사용한 trypsin solution은 100 µg/mL의 trypsin을 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지에 녹여 만들었다. 모든 배지의 pH는 7.0으로 맞추었고 0.2 µm cellulose nitrate filter (Gelman)로 여과하여 사용하였다. 본 실험에서 사용한 바이러스는 사람 로타바이러스의 wild type인 Wa 바이러스 (ATCC VR-2018) 이다. Wa 바이러스는 항원적으로 서로 다른 6 군의 로타바이러스 중 group A의 serotype 1에 속한다.

세포 배양

MA-104 세포는 CO₂ 배양기에서 뚜껑에 여과기가 달린 25 cm² T-flask (Nunc)에 1-2 × 10⁶ cells/flask가 되도록 분주한 뒤 3~4일 마다 계대 배양하였다. 바닥에 부착된 세포를 떼어내기 위해 trypsin-EDTA (10x) (Gibco)를 사용하였고 trypsin-EDTA의 처리 전에 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지를 이용해 세척하여 주었다.

바이러스 감염 조건 연구

T-flask에 1 × 10⁶의 MA-104 세포를 분주하고 2 시간 동안 배양하여 세포를 T-flask 바닥에 부착시킨 후 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 2 번 washing하고 MOI (multiplicity of infection) 0.5로 Wa 바이러스를 감염시켰다. 로타바이러스는 감염시 trypsin 100 µg/mL이 첨가된 DMEM을 바이러스 1 mL 당 50 µL (trypsin concentration : 5 µg/mL) 첨가하여 37°C에서 30 분간 배양하여 바이러스를 활성화 시킨 후 MA-104 세포에 2시간 동안 감염시키고 overlay를 제거하고 protease, CaCl₂, EGTA (ethylene glycol-bis-(β-aminoethylether) N,N',N',-tetraacetic acid), polybrene 등 서로 다른 종류 및 농도의 배지 첨가물이 보강된 감염배지 5 ml을 첨가하여 배양하였다. 배양 3 일 후 3 회 freezing-thawing으로 세포를 파쇄하고 3000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 바이러스 용액을 회수하고 바이러스 수를 측정하였다.

Formaldehyde가 바이러스 inactivation에 미치는 영향 연구

바이러스 (1 mL)에 formaldehyde의 농도를 0.01, 0.1, 0.5, 1% 등으로 변화시켜 첨가하고 37°C에서 1, 6, 12, 24 시간 간격으로 바이러스를 inactivation 시켜 formaldehyde에 의한 로타바이러스의 inactivation 정도를 측정하였다. Inactivation된 바이러스는 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 10⁻¹에서 10⁻³으로 희석하고 2-3 × 10⁴ cells/well로 96 well plate에 분주되어 하루 동안 배양된 MA-104 세포에 100 µL씩 분주한 후 2 시간 동안 배양시켜 MA-104 세포에 감염시켰다. 2시간 후 96 well plate에서 overlay를 제거하고 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 세척하여 남아있는 formaldehyde 용액을 제거하였고 2 µg/mL trypsin이 첨가된 감염배지 200 µL를 첨가하여 5~7일 간 배양 후 cytopathic effect (CPE)를 관찰하여 바이러스 수를 측정하였다.

바이러스의 수 측정

Wa 바이러스의 수는 TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infectious Dose) 방법을 이용하였다 바이러스를 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지로 10⁻¹에서 10⁻⁸으로 희석하여 100 µL씩 96 well plate에 분주하고 2 µg/mL trypsin이 함유된 FBS가 존재하지 않는 DMEM 배지에 MA-104 세포를 희석하여 2-3 × 10⁵ cells/mL이 되도록 준비한 후 바이러스가 분주된 96 well plate에 100 µL씩 분주하였다. 5~7 일간 배양 후 CPE를 관찰하고 그 결과를 Reed와 Muench 법 (13)으로 계산하여 바이러스 수를 측정하였다

결과 및 고찰

로타바이러스 감염 조건 연구

로타바이러스의 조직배양에 감염은 protease에 의해 촉진되어진다고 여겨지고 있다 (8) 따라서 본 실험에서는 감염배지내 첨가되어지는 protease 종류에 따른 영향을 살펴보았다. 10 µg/ml의 trypsin, chymotrypsin, pancreatin, elastase, clostripain, papain 등의 protease를 감염배지에 첨가하여 로타바이러스의 titer를 살펴본 결과 trypsin과 clostripain을 첨가한 경우 높은 바이러스 농도를 보임을 알 수 있었다 (Figure 1). 또한 로타바이러스의 감염에 미치는 trypsin, clostripain, pancreatin의 농도별 영향을 살펴본 결과 Figure 2에서와 같이 trypsin과 clostripain의 농도가 높을수록 바이러스 농도는 증가하였고 clostripain이 가장 우수하였으며 두 번째로 trypsin이 좋은 것으로 나타났다. Protease에 의한 로타바이러스의 infectivity의 증가는 VP4의 247 번째 amino acid인 arginine의 cleavage에 의한 VP5와 VP8의 형성에 의한 것으로 알려져 있다 (14). Clostripain은 arginine의 carboxyl side를 cleavage 시키는 protease로써 lysine이나 arginine의 carboxyl side를 cleavage 시키는 trypsin과 비교하여 로타바이러스 감염을 더욱 증가시킨 것으로 생각된다. 하지만 trypsin의 가격이 clostripain의

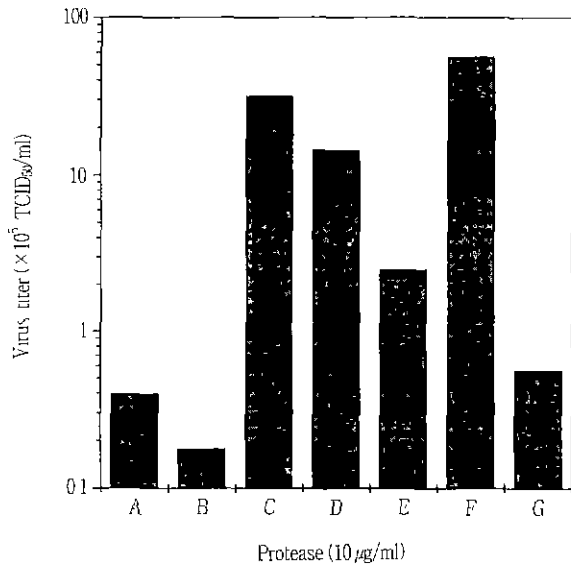


Figure 1. Effect of proteases on the titer of human rotavirus Wa (A : control, B : chymotrypsin; C : trypsin; D : pancreatin; E : elastase; F : clostripain; G : papain)

1/1000밖에 되지 않으므로 로타바이러스 감염을 위한 protease로는 trypsin이 적절하다고 생각된다.

CaCl₂, EGTA, polybrene 등의 배지 첨가물과 감염배지의 pH에 따른 로타바이러스의 titer를 살펴보았다. 감염배지내 CaCl₂의 농도에 따른 사람 로타바이러스 Wa의 titer를 살펴본 결과 Figure 3과 같이 바이러스 농도는 CaCl₂ 농도가 300 µg/mL 일 때 가장 높게 나타났다. 로타바이러스의 titer는 CaCl₂를 300 µg/mL 수준으로 첨가하였을 때 가장 좋은 것을 알 수 있었다. 이러한 현상은 배지내 Ca²⁺ 이온이 로타바이러스의 maturation에 관여하여 infectivity를 지니는 double layer protein coat의 형성을 돕기 때문인 것으로 생각되며 로타바이러스와 함께 reoviridae에 속하는 reovirus에서는 발견되지 않는 특성이다. 이 결과는 소 (bovine) 로타바이러스의 경우 배지내 Ca²⁺ 이온이 존재하지 않으면 infectivity를 잃어버린다는 보고와 유사한 결과이다 (10).

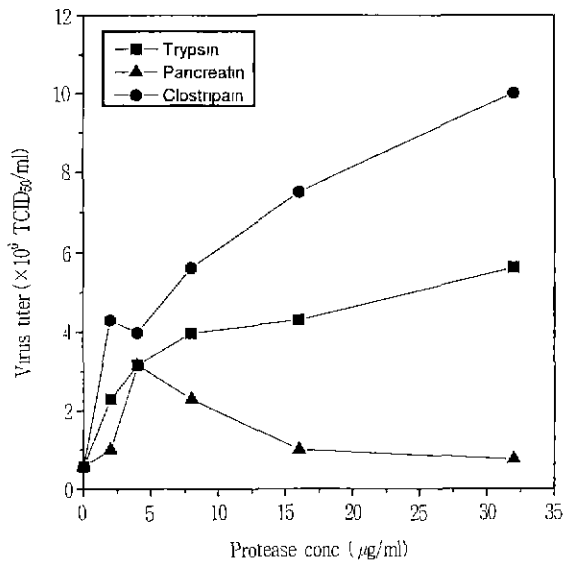


Figure 2. Effect of protease concentration on the titer of human rotavirus Wa.

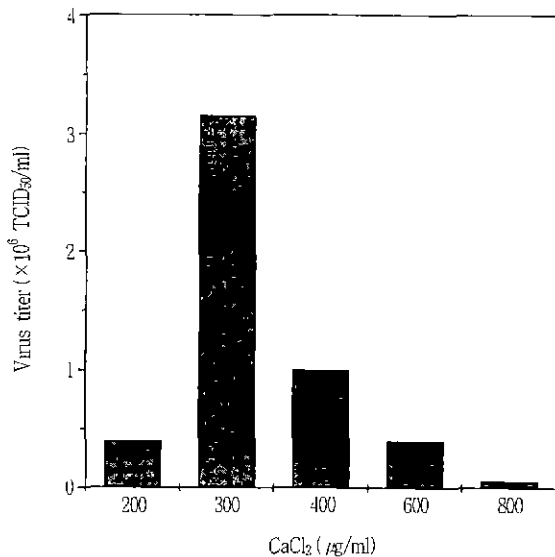


Figure 3. Effect of CaCl₂ on the titer of human rotavirus Wa.

로타바이러스는 자신의 RNA-dependent RNA polymerase에 의해 복제되며 이러한 polymerase activity에 영향을 미칠 수 있는 것으로 사료되는 chelating agent와 pH가 바이러스 감염에 미치는 영향을 연구하였다. 사람 로타바이러스 Wa의 증식은 chelating agent인 EGTA의 첨가에 의해 감소하는 것으로 나타났다 (Figure 4). 감염배지의 pH를 7, 7.5, 8, 8.5로 조절하여 Wa 바이러스를 감염시킨 결과 pH 8에서 사람 로타바이러스의 titer가 가장 높았다 (Figure 5). 이러한 결과는 소 로타바이러스의 경우 높은 pH에서 chelating agent EDTA를 처리한 결과 (15)와 유사하다. 이처럼 사람 로타바이러스의 경우에 나타난 chelating agent에 의한 바이러스 감염에 미치는 영향에 대한 결과는 chelating agent에 의해 infectivity에 차이를 보이지 않는 reovirus와는 다른 결과이다 (11).

Polybrene을 감염배지에 첨가하였을 때 사람 Wa 바이러스의 titer는 현저하게 감소하였다 (Table 1). 이는 polycation인

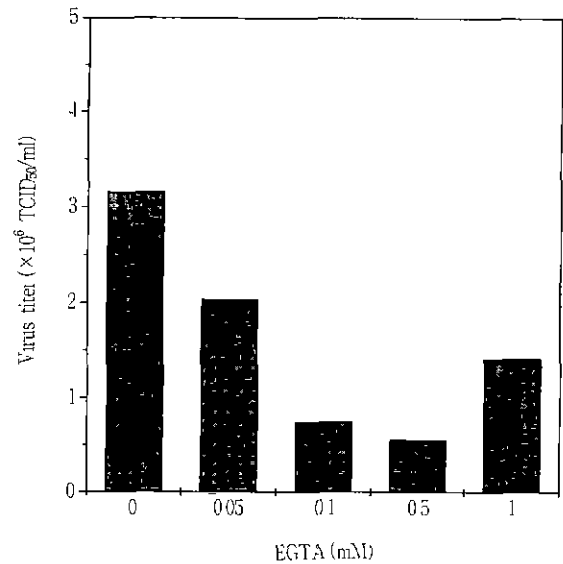


Figure 4. Effect of EGTA on the titer of human rotavirus Wa. (배지내 초기 CaCl₂의 농도는 200 µg/mL이었음)

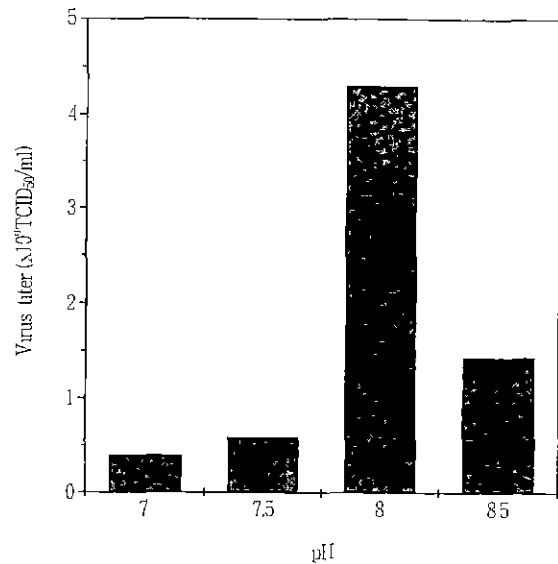


Figure 5. Effect of pH on the titer of human rotavirus Wa.

Table 1. Effect of polybrene on the titer of human rotavirus Wa.

| Polybrene (µg/ml) | Virus titer (x10 ⁶ TCID ₅₀ /ml) |
|-------------------|---|
| 0.0 | 2.41 |
| 0.1 | 1.98 |
| 0.5 | 1.09 |
| 1.0 | 0.66 |
| 5.0 | 0.36 |
| 10.0 | 0.02 |
| 20.0 | 0.01 |

polybrene은 바이러스에 의해 유도되는 gene transfer를 촉진시키는 물질이므로 (16) 세포와 바이러스의 interaction에 도움을 줄 수 있을 것이라는 예상과 다른 결과이며 Rous sarcoma virus (RSV)의 경우 polybrene이 바이러스의 세포에의 adsorption을 8 배 증진시킨다는 보고 (17)와 다른 것이다. 그 이유는 정확히 알 수 없지만 Wa 바이러스의 경우 polybrene에 의해 바이러스의 infectivity가 상실되어 titer가 낮게 나타난 것으로 생각된다.

Formaldehyde가 로타바이러스 inactivation에 미치는 영향 연구

사람 로타바이러스 Wa를 37°C에서 formaldehyde 농도를 0.01, 0.1, 0.5, 1% 등으로 변화시키면서 1, 6, 12, 24 시간 동안 처리한 후 바이러스의 infectivity를 측정하였다. Figure 6에서 알 수 있듯이 1 시간 처리한 경우 바이러스의 infectivity는 처리 전과 비교하여 formaldehyde 0.01%와 0.1% 농도에서 53-85% 정도를 소실하였으며 formaldehyde 0.5% 와 1% 농도에서는 91-95% 이상을 소실하였다. 그리고 처리 12 시간 후에는 바이러스 infectivity의 대부분 (98% 이상)을 소실하였

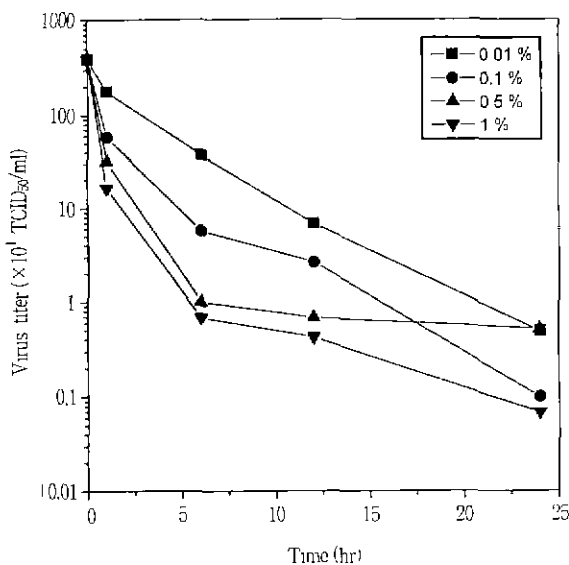


Figure 6. Effect of incubation time and concentration of formaldehyde on rotavirus Wa inactivation.

다. 원숭이 로타바이러스 SA11의 경우 37°C에서 4 일 후 infectivity의 95%를 소실 (12)하였다는 문헌상의 보고와 비교할 때 사람 로타바이러스 Wa는 formaldehyde에 매우 민감함을 알 수 있었다. 송아지 (calf)와 원숭이 로타바이러스의 경우 sonication, freezing-thawing, ether, chloroform 등에 높은 저항성을 보여 준 것으로 나타나 있다 (18-19). 따라서 사람 로타바이러스를 증식시켜 inactivated vaccine을 제조할 때 formaldehyde가 유효한 inactivation 제제로 사용이 가능한 것을 확인할 수 있었다.

요 약

원숭이 콩달세포를 T-flask에서 배양할 때 로타바이러스 감염에 미치는 protease, CaCl₂, EGTA, polybrene, 감염배지내 pH의 영향과 formaldehyde에 의한 로타바이러스의 inactivation 정도를 조사하였다. 로타바이러스의 증식은 trypsin이나 clostripain과 같은 protease의 첨가에 의해 크게 향상되었다. CaCl₂ 농도가 300 µg/mL이거나 pH가 8인 감염배지에서 로타바이러스의 증식은 각각 8 및 10 배 증가하였다. 그러나 EGTA와 polybrene을 감염배지에 첨가하였을 때 바이러스 증식은 감소하였다. Formaldehyde는 로타바이러스 inactivation에 유효하였으며 로타바이러스의 농도는 formaldehyde를 처리하였을 때 1 시간 후 약 53-95% 수준으로 감소하였으며 12 시간 후에는 로타바이러스가 98% 이상 inactivation 되었다.

감 사

본 연구는 교육부의 생물회화공학 학술연구조성비(과제번호 : 97-C-13)와 농업생물신소재 연구센터 연구비의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다

참 고 문 헌

- Wyatt, R. G., A. R. Kalica, C. A. Mebus, H. W. Kim, W. T. London, R. M. Chanock and A. Z. Kapikian (1978), Reovirus-like agents (rotaviruses) associated with diarrheal illness in animals and mans, In: *Perspectives in Virology*, M. Pollard, ed. vol 10. New York: Raven Press.
- Wyatt, R. G., W. D. James, E. H. Bohl, K. W. Theil, L. H. Saif, A. F. Kalica, H. R. Greenburg, A. Z. Kapikian and R. M. Chanock (1980), Human rotavirus type 2: cultivation in vitro, *Science*, **207**, 189-191.
- Mackow, E. R., R. D. Shaw, S. M. Matsui, P. Vo, L. Madsen and H. B. Greenberg (1988), Characterization of homotypic and heterotypic VP7 neutralization sites of rhesus rotavirus, *Virology*, **165**, 511-517.
- Birch, C. J., S. M. Rodger, J. A. Marshall and I. D. Gust (1983), Replication of human rotavirus in cell culture, *J. Med. Virol.*, **11**, 241-250.
- Hasagawa, A. S., S. Matsuno, S. Inouye, R. Kono, Y. Tsurukubo, A. Mukoyama and Y. Saito (1982), Isolation

- of human rotaviruses in primary cultures of monkey kidney cells, *J. Clin. Microbiol.*, **16**, 387-390
6. Sato, K., Y. Inaba, T. Shinozaki, R. Fujii and M. Matamoto (1981), Isolation of human rotavirus in cell cultures, *Arch. Virol.*, **69**, 155-160.
 7. Urasawa, T., S. Urasawa and K. Taniguichi (1981), Sequential passage of human rotavirus in MA-104 cells, *Microbiol. Immunol.*, **25**, 1025-1035.
 8. Konno, T., H. Suzuki, S. Kitaoka, T. Sato, N. Fukuhara, O. Yoshie, K. Fukudome and Y. Numazaki (1993), Proteolytic enhancement of human rotavirus infectivity, *Clin. Infectious Diseases*, **16**, S92-97.
 9. Ward, R. L., D. R. Knowlton and M. J. Pierce (1984), Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture, *J. Clin. Microbiol.*, **19**, 748-753
 10. Shahrabadi, M. S. and P. W. K. Lee (1986), Bovine rotavirus maturation is calcium-dependent process, *Virology*, **152**, 298-307.
 11. Estes, M. K., D. Y. Graham, E. M. Smith and C. P. Gerba (1979), Rotavirus stability and inactivation, *J. Gen. Virol.*, **43**, 403-409.
 12. Meng, Z., C. Birch, R. Heath and I. Gust (1987), Physicochemical stability and inactivation of human and simian rotavirus, *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(4), 727-730.
 13. Reed, L. F. and H. Muench (1938), A simple method for estimating fifty percent endpoint. *Am. J. Hyg.*, **2**, 492-497.
 14. Arias, C. F., P. Romero, V. Alvarez and S. Lopez (1996), Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. Virol.*, **70**(9), 5832-5839.
 15. Cohen, J., J. Laporte, A. Charpilienne and R. Scherrer (1979), Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation, *Arch. Virol.*, **60**, 177-186.
 16. Mastromarino P., C. Conti, C. Petruzzello, R. Lapadula and N. Orsi (1992), Effect of electric charged molecules on sindbis virus hemagglutination and hemolysis. *Microbiology*, **15**(1), 23-28
 17. Sorokin, L. M., E. H. Morgan, G. C. Yeoh and R. Cohen (1986), A method for incubation of cultured myogenic cells with Rous sarcoma virus using polybrene. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **25**(1), 63-68
 18. Malherbe, H. H. and M. Stickland-Cholmley (1967), Simian virus SA11 and the related O agent, *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **22**, 235-245.
 19. Welch, A. B. and T. L. Tompson (1973), Physicochemical characterization of a neonatal calf diarrhoea virus. *Can. J. Comp. Med.*, **37**, 295-301.