

Bovine Herpesvirus Type 1 정량 검출을 위한 Real-Time PCR

이동혁¹ · 정효선² · 이정희¹ · 김태은¹ · 이정숙² · 김인섭^{1*}

¹한남대학교 생명·나노과학대학 생명과학과, ²한스바이오메드(주) 한스대덕연구소

소의 혈액, 세포, 조직, 기관 등은 생물의약품과 조직공학제제, 세포치료제의 원료로 널리 사용되고 있다. 소유래 물질을 원료로 사용한 제제의 경우 소유래 원료 물질에 다양한 바이러스가 오염된 사례가 있기 때문에 바이러스 안전성 검증이 필수적이다. Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1)은 소에게 가장 흔하게 감염되는 바이러스 중의 하나이다. 소유래 물질을 원료로 하는 생물의약품, 조직공학제제, 세포치료제 등에서 BHV-1 안전성을 확보하기 위해, 원료물질, 제조공정, 완제품에서 BHV-1을 정량적으로 검출하고, 제조공정에서 BHV-1 제거 검증을 위한 시험법으로 활용이 가능한 BHV-1 real-time PCR 시험법을 확립하였다. BHV-1에 특이적인 primer를 선별하였으며, 형광염료 SYBR Green I을 사용하여 BHV-1 DNA 정량 검출 시험법을 최적화하였다. 세포배양법에 의한 감염역가와 비교한 결과 real-time PCR 민감도는 2 TCID₅₀/ml이었다. 확립된 시험법의 신뢰성(reliability)을 보증하기 위해 시험법 검증을 실시한 결과 특이성(specificity)과 재현성(reproducibility)이 우수함을 확인하였다. 확립된 real-time PCR을 생물의약품 제조공정 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 BHV-1을 오염시킨 Chinese hamster ovary (CHO) 세포주와 소유래 콜라겐에서 BHV-1 검출 시험을 실시하였다. BHV-1을 감염시킨 CHO 세포에서 세포변형효과를 관찰할 수 없었지만, 세포와 세포배양 상청액에서 BHV-1을 정량적으로 검출할 수 있었다. 소유래 콜라겐에서도 10 TCID₅₀/ml 까지 정량적으로 검출할 수 있었다. 위와 같은 결과에서 확립된 BHV-1 real-time PCR 시험법은 생물의약품 안전성 보증을 위한 세포주 검증, 생물의약품 생산 공정 검증, 바이러스 제거 공정 검증 등에서 감염역가 시험법과 같은 생물학적 시험법을 대신할 수 있는 신속하고, 특이성과 민감성이 우수한 시험법임을 확인하였다.

Key words □ bovine herpesvirus type 1, Chinese hamster ovary (CHO) cell, collagen, real-time PCR, virus validation

소유래 혈액, 세포, 조직, 기관 등은 생물의약품과 조직공학제제, 세포치료제의 원료로 널리 사용되고 있다(24, 28). 소유래 혈청은 치료용 단백질과 항체 등을 생산하기 위해 사용하는 CHO 세포, baby hamster kidney (BHK) 세포, hybridoma 세포와 백신을 생산하기 위한 세포주를 배양하기 위한 원료물질로 사용된다. 또한 소유래 혈청은 자가세포치료제, 동종유래세포치료제 또는 이종세포치료제의 배양을 위한 원료물질로도 사용된다(10). 소 조직으로부터 추출하는 콜라겐은 낮은 항원성, 지혈효과, 세포부착 능력이 우수하기 때문에 의료용 생체재료로 널리 이용되고 있다(11, 20, 21, 23). 소 양막은 세포성장인자가 풍부하며, 염증 유발 유전자발현 억제, 단백질분해 억제, 흉터생성 억제 등의 효능이 있는 조직적합성 의료용 소재로 창상피복제, 각막이식제 등의 원료로 사용된다(5, 12). 이러한 세포배양 유래 생물의약품과 조직공학제제, 세포치료제는 생체에서 유래한 복잡한 분자구조를 가진 물질로 최종제품에 대한 물리화학적 분석만으로는 제품의 효능을 평가하기 어렵다. 또한 원료 자체에 감염성 병원 인자가 오염될 가능성이 크기 때문에 안전성에 관한 논란이 오래 전부터 있어왔다(4, 15, 19). 따라서 최근 World Health Organization

(WHO), 미국, 유럽 등을 중심으로 이러한 제제의 최종제품에 대한 안전성과 유효성 분석과 함께 원료부터 완제품에 이르는 전체 제조공정에 대한 철저한 품질관리의 중요성이 대두되고 있는 실정이다(2, 6, 16).

소유래 물질에 오염될 수 있는 감염성 병원 인자 중 바이러스는 종류의 다양성과 검출 방법의 제한성으로 인해 그 중요성이 더 강조되고 있다(17). 세계 각국의 규제기관에서는 생물의약품과 조직공학제제, 세포치료제에서 내인성 또는 외래성 위해 바이러스의 오염을 방지하기 위하여 감도와 특이도가 우수한 검출시험법 개발, 바이러스 제거 및 불활화 공정 확립과 검증, 바이러스 관련 기준 규격 제정 등에 관한 연구를 활발히 진행하고 있다(18).

생물의약품, 조직공학의약품, 세포치료제 제조시 사용되는 원료물질의 기원과 특성에 따라 오염 바이러스의 검색대상이 매우 다양하나, 소유래 원료물질을 함유한 제제에 있어서 공통적인 검색대상이 되는 대표적인 오염 바이러스는 Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1)이다(9). BHV-1은 소에게 전염성 비기관염(infectious bovine rhinotracheitis), 전염성 농포성 외음염(infectious pustular vulvovaginitis), 전염성 농포성 포피염(infectious pustular balanoposthitis), 유산, 결막염, 뇌염 등을 유발하는 가장 전형적인 병원성 바이러스이다. 이 바이러스는 Herpesviridae 과에 속하

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-42-629-8754 Fax: 82-42-629-8751
E-mail: inskim@hnu.kr

며, 선형의 double-stranded DNA로 구성된 137 kb 유전체를 갖고 있는 외피보유 바이러스(enveloped virus)이다(27). BHV-1은 동물세포 배양 배지로 사용되는 우혈청(Fetal bovine serum)에 가장 빈번하게 오염되는 바이러스 중의 하나이기 때문에 생물의약품 생산용 세포주와 제조공정에 오염될 가능성이 있다(3, 10, 13).

BHV-1 검출 시험법에 대한 연구는 주로 인공 수정을 위해 사용할 소의 정자에서 BHV-1 감염여부를 빠른 시간에 진단하고자 하는 PCR과 nested-PCR 시험법에 집중되어 왔다(8, 14, 22, 25). 본 연구에서는 소유래 물질을 원료로 하는 생물의약품, 조직공학 제제, 세포치료제 등에서 BHV-1 안전성을 확보하기 위해, 원료 물질, 제조공정, 완제품에서 BHV-1을 정량적으로 검출하고, 제조공정에서 BHV-1 제거 검증을 위한 시험법으로 활용이 가능한 민감도와 특이도가 우수한 real-time PCR 시험법을 확립하고자 하였다. 또한 확립된 real-time PCR 시험법을 활용하여 인위적으로 BHV-1을 감염시킨 CHO 세포와 소유래 콜라겐에서 BHV-1을 정량적으로 검출하여 바이러스 안전성 검증 시험법으로의 활용 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

BHV-1의 배양 및 정량

BHV-1 (ATCC VR-188)의 배양과 정량을 위해 Madian-Derby bovine kidney (MDBK; ATCC CCL-22) 세포를 사용하였다. MDBK 세포를 10% 우혈청(Gibco BRL, USA)을 첨가한 Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM; Gibco BRL, USA) 배지에 배양하였다. T-150 flask에 배양된 단층 세포에 바이러스를 감염시킨 후 주기적으로 세포병변효과(cytopathic effect: CPE)를 관찰하였다. CPE가 명백하게 관찰 될 때 배양액과 세포를 수거한 다음, 400×g에서 5분간 원심 분리하여 상층액은 따로 모으고 pellet은 재현탁하였다. Pellet을 동결과정을 2회 반복하여 파쇄한 후 400×g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 원심 상층액을 혼합한 후 0.45 μm filter로 여과한 다음 소분하여 -70°C에 보관하였다.

BHV-1의 정량을 위해 감염성 있는 바이러스의 titer를 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)로 나타내었다. BHV-1을 2% 우혈청을 첨가한 DMEM 배지로 7배수로 희석하여 24 well plate에 배양된 세포에 0.25 ml씩 접종하였다. 음성대조군으로 세포 배양배지를 0.25 ml씩 접종하였다. 그 후 CO₂ 배양기에서 5% CO₂, 35°C로 배양하면서 계속적으로 현미경으로 CPE를 관찰하였다.

Primer의 선별

BHV-1 유전자를 증폭하기 위해 사용한 올리고핵산 primer 염기서열은 NCBI data base에 보고된 BHV-1 complete genome (NC 001847)을 기초로 Primer3 Software를 이용하여 디자인하였다(Table 1). Corbett Research사(Australia)의 PALM-CYCLER를 이용한 일반 PCR 반응을 통해 디자인 한 primer 5쌍들의 특이

성을 확인하고, annealing temperature와 MgCl₂ 농도를 변화시켜 PCR 조건을 최적화하였다. 또한 증폭된 DNA가 목적하는 산물 인지를 확인하기 위하여 PCR product의 DNA sequencing을 실시하였다.

BHV-1 DNA는 GENE ALL™ Blood SV Mini Kit (General Biosystem, Korea)을 사용하여 분리하였다. PCR 반응을 위해 바이러스 genomic DNA 2 μl, 10 pmol forward primer 1 μl, 10 pmol reverse primer 1 μl, 2× GoTaq®Green Master Mix (Promega, USA) 12.5 μl 혼합액에 Nuclease-free water 8.5 μl를 첨가하여 최종부피를 25 μl로 맞추었다. 핵산증폭은 pre-incubation은 95°C에서 2분, denaturation은 95°C에서 30초, annealing은 30초(annealing 온도 최적화를 위해 52, 54, 56, 58 °C에서 PCR 수행), extension은 72°C에서 1분으로 하여 45 cycle을 수행하였다. 45 cycle PCR 후 72°C에서 5분 반응시킨 후 1.5% agarose gel (Sigma Co., USA)을 사용하여 100 V 전압으로 30분 정도 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 PCR 반응산물을 확인하였다.

Real-time PCR을 이용한 BHV-1 DNA 정량

BHV-1의 정량을 위해 일반 PCR을 통해 확립된 PCR 조건을 기초로 AccuPower Greenstar PCR Premix Ex Taq (Bioneer, Korea)을 사용하여 real-time PCR 조건을 확립하였다. BHV-1 정량을 위해 Corbett Research사의 Rotor-Gene 3000 real-time PCR 기계를 사용하였다. PCR 반응액은 AccuPower Greenstar PCR Premix Ex Taq 5 μl, 10 pmol forward primer 0.5 μl, 10 pmol reverse primer 0.5 μl, template 2 μl에 멸균된 3차 증류수를 넣어 총 20 μl가 되게 하였다. 핵산증폭은 pre-incubation은 95°C에서 15분, denaturation은 95°C에서 10초, annealing은 30초(annealing 온도 최적화를 위해 52, 54, 56, 58, 60°C에서 real-time PCR 수행), extension은 72°C에서 30초로 하여 50 cycle을 수행하였다. 마지막 cycle 후에는 모든 반응물에 대하여 72부터 95°C까지 영역에서 melting curve 분석을 실시하였다. 최적 MgCl₂ 농도를 설정하기 위해 최적화된 annealing 온도 52°C에서 MgCl₂를 2 mM에서 5 mM까지 변화시켜 첨가해준 BHV-1 DNA 농도에 따른 crossing point 값을 비교하였다.

Titer를 측정하고자 하는 시료들과 함께 Titer가 2×10⁷ TCID₅₀/ml인 BHV-1을 순차적으로 2×10⁰ TCID₅₀/ml까지 10단계 희석한 후 real-time PCR을 수행하여 정량을 위한 표준곡선을 작성하였다. 시료 속에 들어있는 BHV-1 DNA의 양을 표준곡선에 대입하여 정량하였다. 표준곡선은 BHV-1의 농도에 따라 real-time PCR에 의해 검출되는 crossing point 값을 TCID₅₀ equivalent/ml로 전환하여 작성하였다. Crossing point는 PCR cycle이 exponential phase로 들어가는 cycle 수를 나타낸다. 시료 속에 들어 있는 BHV-1 양을 환산하기 위해 아래와 같은 식을 사용하였다.

$$\text{Virus titer (TCID}_{50}\text{ equivalent/ml)} =$$

$$\text{Result (TCID}_{50}\text{ equivalent/}\mu\text{l)} \times \text{Elution volume (}\mu\text{l)} / \text{Sample volume (ml)}$$

Real-time PCR의 신뢰성 검증

확립된 BHV-1 DNA 정량법의 신뢰성(reliability)을 보증하기 위해 확립된 실험법의 민감도(sensitivity), 재현성(reproducibility) 등을 검증하였다. 민감도를 측정하기 위해 titer가 2×10^7 TCID₅₀/ml인 BHV-1을 순차적으로 2×10^0 TCID₅₀/ml까지 10단계 희석한 후 real-time PCR을 수행하였다. 재현성 검증을 위해 titer가 2×10^7 TCID₅₀/ml인 BHV-1을 순차적으로 2×10^0 TCID₅₀/ml까지 10 단계 희석한 표준시료를 서로 다른 날에 3회 정량 분석하여 crossing point 값을 비교하였다. 특이성 검증을 위해 human parvovirus B19 (BBI Diagnostics, USA), minute virus of mice (ATCC VR 1346), bovine parvovirus (ATCC VR 767), porcine parvovirus (ATCC VR 742)에 대한 cross-reactivity를 측정하였다. 시험에 사용한 바이러스의 titer는 각각 9.4×10^5 IU/ml, 10^6 TCID₅₀/ml, 10^6 TCID₅₀/ml, 10^6 TCID₅₀/ml이었다.

인위적으로 BHV-1을 감염시킨 CHO 세포에서 real-time PCR을 이용한 BHV-1 검출

확립된 real-time PCR을 생물약품 제조공정 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 BHV-1을 오염시킨 CHO 세포주에서 BHV-1 검출 시험을 실시하였다. CHO DG44 세포를 5% 우혈청을 첨가한 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM: Gibco BRL, USA) 배지에 $100 \times$ Hypoxanthine-Thymidine supplement (HT supplement; Gibco BRL, USA) 1%를 첨가하여 배양하였다. T-25 flask에 배양된 CHO DG44에 BHV-1을 감염시킨 후 4일 동안 배양하였다. 세포 배양액을 제거한 후 세포 배양액에 남아있을 수 있는 BHV-1을 완벽히 제거하기 위해 phosphate buffered saline (PBS)으로 3번 세척한 다음 CHO DG44를 계대 배양하였다. 4일 동안 배양한 후 다시 계대 배양한 다음 4일 후에 현미경으로 CHO DG44의 모양을 관찰한 후 세포 배양액과 세포를 따로 수거하였다. 확립된 real-time PCR 방법을 이용하여 세포 배양액과 세포에 BHV-1이 존재하는지 여부를 확인하였다. Real-time PCR 양성 대조군으로는 Titer가 10^7 TCID₅₀/ml인 BHV-1을 사용하였으며, 음성 대조군으로는 CHO 세포주 배양배지 또는 비감염된 CHO 세포주를 사용하였다.

소유래 콜라겐에서 real-time PCR을 이용한 BHV-1 검출

확립된 real-time PCR을 소유래 콜라겐 제조공정 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 BHV-1을 오염시킨

콜라겐에서 BHV-1 검출 시험을 실시하였다. Titer가 10^8 TCID₅₀/ml인 BHV-1을 순차적으로 10배씩 희석한 후 각 희석액 0.2 ml을 소유래 콜라겐 1.8 ml에 spiking한 다음 확립된 real-time PCR 방법을 사용하여 BHV-1을 검출하였다. Real-time PCR 음성 대조군으로는 바이러스를 첨가하지 않은 콜라겐을 사용하였다.

결 과

Primer의 선별

PCR 방법을 사용하여 특정 바이러스 존재를 확인하고, 정량분석하기 위해서는 바이러스 내에서 유전적인 변이가 심하지 않은 conserved sequence를 가진 부위를 선택하여야 한다. 선택된 sequence는 특정 바이러스에만 존재하여 특이성이 높아야 한다. 생물약품과 조직공학제제, 세포치료제의 원료물질, 공정 중간물질, 최종제품 등에 미량으로 오염될 수 있는 바이러스 검출을 위한 정량 PCR의 경우 높은 민감도가 요구된다(1, 2). 위와 같은 조건을 만족하는 PCR을 확립하기 위해 Primer3 Software를 이용하여 BHV-1 특이적인 primer 5쌍을 디자인하였다(Table 1). 일반 PCR을 실시하여 각각의 primer 쌍들의 민감도를 확인하였다. Titer가 2×10^3 TCID₅₀/ml과 2×10^1 TCID₅₀/ml인 BHV-1을 시료로 PCR을 수행한 결과 primer 쌍 BHV-F2, BHV-R2가 가장 민감도가 우수하였다(자료 미제시). PCR 조건을 최적화한 결과 annealing temperature와 MgCl₂ 농도는 각각 52°C와 3 mM이었다. 최적 조건에서 PCR의 민감도를 측정하였다. Titer가 2×10^7 TCID₅₀/ml인 BHV-1을 순차적으로 희석하여 PCR한 결과 2×10^0 TCID₅₀/ml까지 PCR 산물을 확인할 수 있었다(Fig. 1). PCR 산물을 sequencing한 후 blast searching (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 한 결과 PCR 산물이 BHV-1 유전자임을 확인할 수 있었다(자료 미제시).

BHV-1 DNA 정량을 위한 real-time PCR 최적화

일반 PCR을 통해 확립된 PCR 조건을 기초로 AccuPower Greenstar PCR Premix Ex Taq (Bioneer, Korea)을 사용하여 real-time PCR 조건을 확립하였다. Forward primer로 BHV-F2를 reverse primer로 BHV-R2를 사용하여 PCR 반응의 annealing temperature를 최적화하였다(Fig. 2). Titer가 2×10^7 TCID₅₀/ml, 2×10^5 TCID₅₀/ml, 2×10^3 TCID₅₀/ml, 2×10^1 TCID₅₀/ml인 BHV를 시료로 annealing temperature를 52, 54, 56, 58°C로 변화시키며

Table 1. Sequences of oligonucleotide primer sets used in the detection of BHV-1

Forward primer	Reverse primer	Nucleotide position ^a	Amplicon size
BHV-F1 GACCCTCGCCGATATTTATT	BHV-R1 GAGGGACCACAGAGAAGGAT	127549-127651	103
BHV-F2 GAGGGACCACAGAGAAGGAT	BHV-R2 GACCCTCGCCGATATTTATT	110567-110669	103
BHV-F3 GCGTCTTTCTAAAGAGCAG	BHV-R3 GAGCTGTTCAACCAAAAAGA	23143-23255	113
BHV-F4 GCCGCAAGTTTATGCTGTAT	BHV-R4 CATCGAGGCAGTGTAGGTCT	706-849	144
BHV-F5 GGTGCAATTGAGCTTGACTTT	BHV-R5 GACTTGTGGGGACACAGG	1458-1600	143

^a NC 001847

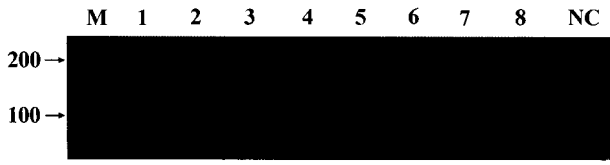


Fig. 1. Sensitivity of PCR assay for detection of BHV-1. M, 100 bp DNA ladder; 1; 2×10^7 TCID₅₀/ml, 2; 2×10^6 TCID₅₀/ml, 3; 2×10^5 TCID₅₀/ml, 4; 2×10^4 TCID₅₀/ml, 5; 2×10^3 TCID₅₀/ml, 6; 2×10^2 TCID₅₀/ml, 7; 2×10^1 TCID₅₀/ml, 8; 2×10^0 TCID₅₀/ml, NC; Negative control.

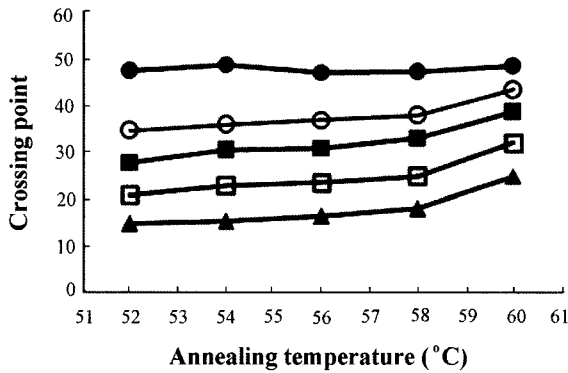


Fig. 2. Optimization of annealing temperature. The crossing point value refers to the cycle number at which the fluorescence of the PCR reaction rises above a set threshold and is inversely proportional to the amount of starting target. (▲) 2×10^7 TCID₅₀/ml, (□) 2×10^5 TCID₅₀/ml, (■) 2×10^3 TCID₅₀/ml, (○) 2×10^1 TCID₅₀/ml, (●) Negative control.

real-time PCR을 수행하였을 때 52°C에서 crossing point가 가장 낮게 나타나 52°C가 최적 온도임을 알 수 있었다.

최적 온도에서 MgCl₂ 농도를 변화시켜 PCR 조건을 최적화하였다(Table 2). Titer가 2×10^5 TCID₅₀/ml, 2×10^3 TCID₅₀/ml, 2×10^1 TCID₅₀/ml인 BHV-1을 시료로 MgCl₂ 농도를 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM로 변화시켜가며 real-time PCR을 수행하였을 때 2 mM에서 crossing point가 가장 낮게 나타나 최적 MgCl₂ 농도는 2 mM임을 알 수 있었다.

Real-time PCR의 신뢰성 검증

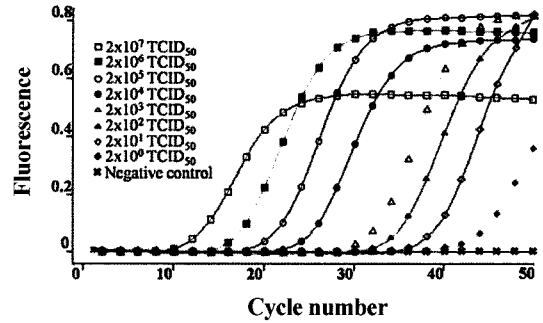
BHV-1 DNA 정량을 위한 real-time PCR 방법의 신뢰성

Table 2. Optimization of MgCl₂ concentration in real-time PCR assay

TCID ₅₀ /ml	MgCl ₂ concentration			
	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM
2×10^5	21.02 ^a	25.42	33.38	41.84
2×10^3	27.91	32.29	38.18	43.24
2×10^1	34.74	36.91	41.00	44.74
Buffer control	47.50	46.90	47.20	47.54

^a Values indicate crossing point value

(A)



(B)

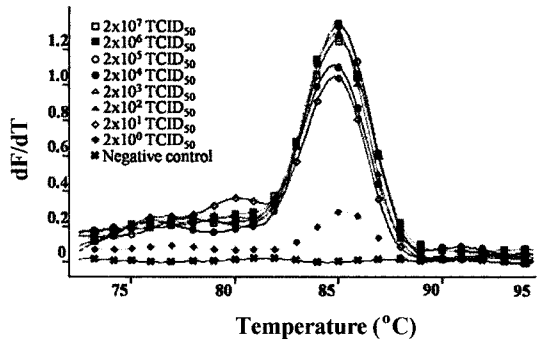


Fig. 3. Sensitivity of real-time PCR assay for quantification of BHV-1. (A) Amplification plots obtained with 10-fold serial dilutions of BHV-1 stock solution. (B) Melting curve analysis of the amplification plot. BHV-1 stock solution of 2×10^7 TCID₅₀/ml was serially diluted and cycle-by-cycle detection of BHV-1 DNA was performed with SYBR Green I.

(reliability)을 보증하기 위해 확립된 실험법의 민감도(sensitivity), 재현성(reproducibility), 특이성(specificity) 등을 검증하였다. 민감도를 측정하기 위해 titer가 2×10^7 TCID₅₀/ml인 BHV-1을 순차적으로 10배씩 희석한 후 real-time PCR을 수행하였다. 각 시료에 대해 real-time PCR cycle 수에 따른 fluorescence값의 증가를 관찰한 결과 민감도는 2 TCID₅₀/ml임을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). Melting curve 분석 결과 BHV-1 DNA에 특이적인 부분과 primer dimer 등 비특이적인 부분으로 나뉘었으며, 완충용액 대조군에서는 BHV-1 DNA에 특이적인 peak를 확인할 수 없었다(Fig. 3B). 증폭된 PCR 산물을 2% (w/v) agarose gel을 사용하여 전기 영동한 결과 각 BHV-1 양성시료에서 예상 크기의 밴드를 확인할 수 있었지만, 완충용액 대조군에서는 PCR 산물을 확인할 수 없었다(자료 미제시).

확립된 BHV-1 DNA 정량법의 재현성 검증을 위해 서로 다른 날에 BHV-1 표준시료에서 DNA를 추출하고 real-time PCR을 수행한 후 crossing point 값을 비교하였다(Fig. 4). BHV-1 log titer (log₁₀ TCID₅₀/ml; x)에 대한 crossing point 값(y) 간의 표준 회귀식은 첫째 날의 경우 $y = -4.3831x + 50.671$ (결정계수 $r^2 = 0.995$), 둘째 날의 경우 $y = -4.3262x + 50.255$ ($r^2 = 0.994$), 셋째 날의

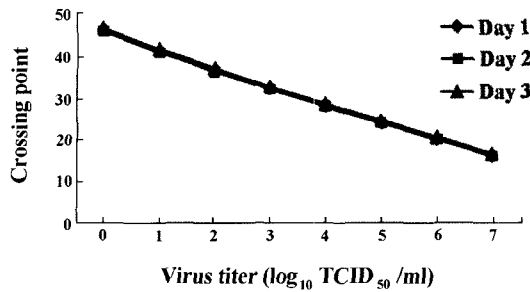


Fig. 4. Reproducibility of real-time PCR assay for quantitative detection of BHV-1. The standard curves were obtained by the regression analysis of crossing point values versus initial virus titer. These results were obtained from three independent assays performed at different days.

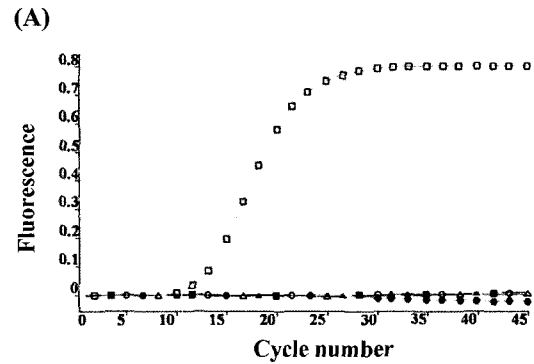
경우 $y = -4.1439x + 49.666$ ($r^2 = 0.996$)로 BHV-1 log titer와 crossing point 값 간의 회귀성이 매우 높았다.

다른 DNA virus들(human parvovirus B19, minute virus of mice, bovine parvovirus, porcine parvovirus)을 대상으로 특이성을 실험할 결과 BHV-1의 경우에만 fluorescence값의 증가를 관찰할 수 있었고, 다른 바이러스에서는 완충용액 음성 대조군과 같이 fluorescence값의 증가를 관찰할 수 없었다(Fig. 5A). Real-time PCR 산물을 1.5% agarose gel 상에서 분석한 결과 BHV-1 양성 대조군에서만 PCR 반응 산물이 생성되었고, 다른 바이러스와 완충용액 음성 대조군에서는 PCR 반응 산물이 생성되지 않았다(Fig. 5B). 이와 같은 결과에서 확립된 real-time PCR 방법은 BHV-1에 특이적인 실험법임을 확인하였다.

BHV-1이 오염된 CHO 세포주에서 real-time PCR을 이용한 BHV-1 검출

확립된 real-time PCR을 생물약품 제조공정에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 BHV-1을 오염시킨 CHO 세포주에서 BHV-1 검출 시험을 실시하였다. T-25 flask에 배양된 CHO DG44 세포에 BHV-1을 인위적으로 오염시킨 후 T-25 flask에 3번 이상 계대 배양하면서 병변효과를 관찰하였다. BHV-1은 CHO DG44 세포주에서 병변효과를 나타내지 않았다(Fig. 6A and B). 세포배양 상청액 4 ml을 회수하고, CHO DG44 세포를 trypsin을 처리하여 4 ml 부피로 회수하였다. 세포배양 상청액과 CHO 세포에서 각각 DNA를 추출하고, 확립된 real-time PCR을 활용하여 BHV-1을 정량 검출하였다(Fig. 6C). 세포배양 액에서는 1.4×10^6 TCID₅₀ equivalent/ml BHV-1이 검출되었고, 세포에서는 5.8×10^5 TCID₅₀ equivalent/ml BHV-1이 검출되었다. 증폭된 PCR 산물을 1.5% (w/v) agarose gel을 사용하여 전기 영동한 결과 각 BHV-1 양성시료, 세포배양액, 세포에서 예상 크기의 밴드를 확인할 수 있었지만, 음성 대조군에서는 PCR 산물을 확인할 수 없었다(Fig. 6D). BHV-1이 비감염된 CHO DG44에서도 BHV-1을 검출할 수 없었다(자료 미제시).

소유래 콜라겐에서 Real-Time PCR을 이용한 BHV-1 검출



(B)

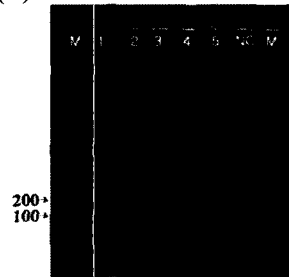


Fig. 5. Specificity of real-time PCR assay to potential cross-reactive viruses. (A) Amplification plots. (□) Bovine herpesvirus type 1, (■) human parvovirus B19, (○) minute virus of mice, (●) bovine parvovirus, (△) porcine parvovirus, (▲) Negative control. (B) Agarose gel electrophoresis of the PCR products. Specificity of the real-time PCR assay was evaluated using the optimized protocol and then the PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. M; 100 bp DNA ladder, 1; Bovine herpesvirus type 1, 2; human parvovirus B19, 3; minute virus of mice, 4; bovine parvovirus, 5; porcine parvovirus, NC; Negative control.

확립된 real-time PCR을 소유래 콜라겐 제조공정에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 BHV-1을 오염시킨 콜라겐에서 BHV-1 검출시험을 실시하였다. Titer가 10^8 TCID₅₀/ml인 BHV-1을 순차적으로 10배씩 희석한 후 real-time PCR을 수행하고, 각 시료에 대해 real-time PCR cycle 수에 따른 fluorescence 값의 증가를 관찰한 결과 10^2 TCID₅₀/ml 까지 정량적으로 검출할 수 있었다(Fig. 7).

고 찰

소유래 혈액, 세포, 조직, 기관 등을 이용하여 생산되는 생물약품, 조직공학제제, 세포치료제는 원료 자체에 감염성 병원 인자가 오염될 가능성이 있기 때문에 안전성 확보가 가장 큰 문제 중의 하나로 대두되고 있다. 인체에 유해한 바이러스가 오염되는 것을 방지하여 안전한 생물학적 제제가 제조되도록 하기 위해서는 오염 바이러스의 검출 및 불활화 또는 제거 검증 관련 기술을 확립해야만 한다(1, 4, 7). 또한 완제품은 물론 원료부터 완제품의 생산에 이르기까지 전체 제조공정에 대한 철저한 품질관리가 필수적이다. BHV-1은 소에게 가장 흔하게 감염되는 바이러스

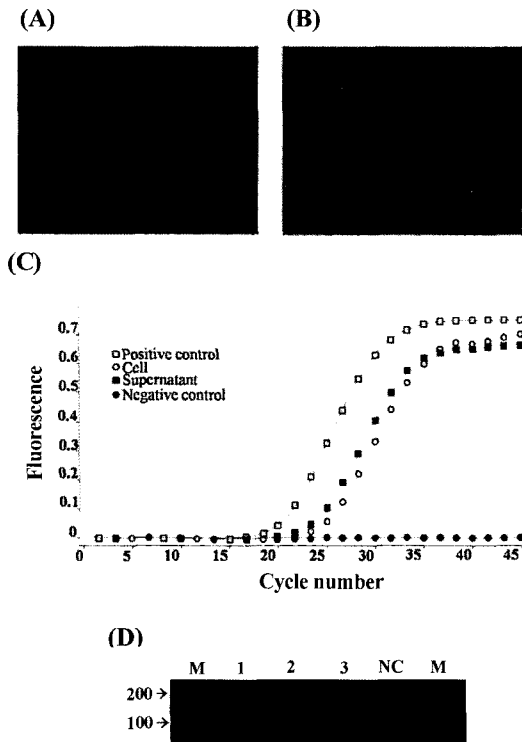


Fig. 6. Quantitative detection of BHV-1 in artificially infected CHO DG44 cell line. (A) Morphology of CHO DG44 cell line not infected with BHV-1. (B) Morphology of CHO DG44 cell line infected with BHV-1. (C) Amplification plots of BHV-1 positive control, CHO DG44 cell line infected with BHV-1, cell culture supernatant, and negative control. (D) Agarose gel electrophoresis of the PCR products. M; 100 bp DNA ladder, 1; BHV-1 positive control, 2; CHO DG44 cell line infected with BHV-1, 3; cell culture supernatant, NC; negative control.

중의 하나이기 때문에 소유래 원료물질을 사용하는 생물 의약품과 조직공학체제, 세포치료제의 경우 BHV-1에 오염될 가능성이 있다. BHV-1은 생물 의약품 제조용 세포주의 배양을 위해 첨가하는 우혈청에 오염된 사례가 있기 때문에, 인체에 직접적인 위해 여부는 알려져 있지 않지만, 잠재적인 위해요소의 하나이다. 따라서 우혈청을 세포배양 원료로 사용한 세포주의 경우 반드시 BHV-1의 오염 여부를 민감도와 특이도가 우수한 검증된 시험법으로 확인하여야만 한다(3, 10, 13). 세포치료제의 배양 원료로 우혈청을 사용할 경우에도, BHV-1의 오염 여부를 확인하여야만 한다. 또한 소의 조직을 이용하여 생산되는 콜라겐과 조직공학체제의 경우에도 BHV-1의 오염 여부를 확인하여야만 한다. 내인성 또는 외래성 위해 바이러스 오염을 방지하기 위한 ICH 가이드라인(Q5A)은 원료의 오염 여부를 검사하고, 제조공정에서 바이러스 제거 능력을 평가하기 위하여 민감도와 특이도가 우수한 검증된 시험방법을 사용하도록 권장하고 있다(16).

BHV-1 검출시험법은 주로 소 질병의 진단을 위해 개발되어 왔다. BHV-1 검출시험법으로는 소의 정액, 비즙, 질점액, 유산태아 등으로부터 세포배양법에 의해 직접 바이러스를 분리하거나,

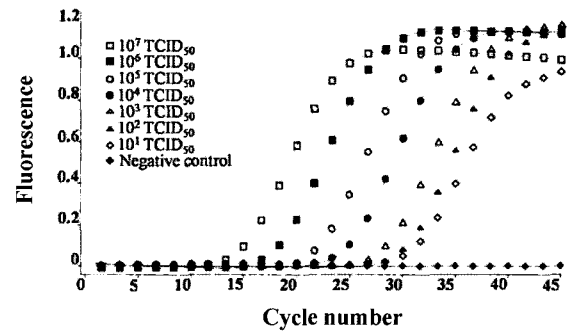


Fig. 7. Quantitative detection of BHV-1 in artificially contaminated bovine collagen. BHV-1 stock solution of 10^8 TCID₅₀/ml were serially diluted with 10-fold and then 0.2 ml of each diluted solution was spiked in a 1.8 ml aliquot of 0.5% bovine collagen. Cycle-by-cycle detection of BHV-1 DNA in the artificially contaminated bovine collagen was performed with SYBR Green I.

형광항체법과 ELISA 방법으로 항원을 검출하거나, 혈액내의 BHV-1 항체를 검출하는 방법 등이 있다. 이러한 시험법은 시간과 비용이 많이 들고, 민감도와 특이도가 떨어지는 단점이 있다. 따라서 PCR을 이용하여 BHV-1을 검출하려는 연구가 활발히 진행되어 왔는데, 주로 conventional PCR 또는 nested PCR 방법을 이용하여 소의 정자에서 BHV-1 감염여부를 빠른 시간에 진단하고자 하는 연구였다(8, 14, 22, 25). 최근에 와서 real-time PCR을 이용하여 소의 정자에서 BHV-1 감염여부를 판별하려는 연구가 시도되었다(26). 최적화된 조건에서 real-time PCR의 민감도는 3.8 TCID₅₀/ml이었다.

본 연구에서는 소유래 원료를 사용하는 생물 의약품과 조직공학체제, 세포치료제의 안전성을 보증하기 위해서 BHV-1을 정량적으로 신속하게 검출할 수 있는 민감도와 특이도가 우수한 real-time PCR 시험법을 개발하고자 하였다. BHV-1 전체 유전자를 대상으로 BHV-1에만 특이적인 primer 5쌍을 디자인하였다. 5쌍의 primer 중 BICP4 (early-intermediate transcription control protein) 유전자를 대상으로 디자인 한 primer쌍 BHV-F2, BHV-R2의 민감도가 가장 우수하였다. 선별된 primer를 활용하여 annealing temperature와 MgCl₂ 농도 등 PCR 조건을 최적화한 결과 확립된 실험법의 민감도는 2 TCID₅₀/ml이었다. 본 연구결과는 Wang 등(26)이 발표한 real-time PCR의 민감도 3.8 TCID₅₀/ml 보다 더 우수하였다. 확립된 BHV-1 DNA 정량법의 재현성 검증을 위해 서로 다른 날에 BHV-1 표준시료에서 DNA를 추출하고 real-time PCR을 수행한 후 crossing point 값을 비교한 결과, BHV-1 log titer (\log_{10} TCID₅₀/ml; x)에 대한 crossing point 값(y) 간의 표준 회귀식의 결정계수(r^2)는 모두 0.99 이상으로 재현성뿐만 아니라 회귀성이 매우 높음을 알 수 있었다. 생물 의약품의 품질관리 평가에 있어 시험법의 민감도와 재현성은 분석의 정확성, 특이성, 검출한계 등과 함께 매우 중요한 요인으로 고려되는데, 본 연구에서 확립한 시험법은 BHV-1을 정량하는데 있어 민감도와 재현성이 우수함을 확인할 수 있었다.

WHO, EMEA (European Medicines Agency), FDA (Food and

Drug Administration)와 같은 규제기관은 유전자 재조합 단백질 의약품 생산하기 위해 사용하는 동물세포주의 마스터세포 (Master cell)와 제조용세포(Working cell)에서 외인성 바이러스 검출에 대한 관리 규정을 정하고, 세포주에 의한 바이러스 오염 사고를 최소화하고 있지만, 비용과 시간이 많이 드는 생물학적 시험법(*In vitro* 시험법, *In vivo* 시험법, 항체생산 시험법)을 대체할 수 있는 민감한 분자시험법이 상용화되지 않은 실정이다. 9CFR section 113.53은 원료물질 유래 생물의 세포주(primary cells 또는 cell line)를 사용하여 생산용 원료물질, 생산용 세포주, 공정 시료 등에 오염될 수 있는 바이러스를 검출하도록 요구하고 있다(6). BT (bovine turbinate) 세포주는 소유래 바이러스에 쉽게 감염되기 때문에 우혈청을 사용하는 공정에서 바이러스 검출에 사용되는 세포주이다. 일반적으로 BT 세포주 단층세포에 원료물질, 세포주 파쇄액, 공정 시료, 반제품, 완제품 등을 첨가한 후 7일 이상 배양을 하면서 병변효과를 관찰하여 오염여부를 판단하거나 haemadsorption test를 통해 바이러스 오염여부를 판단한다. 또한 BT 세포주 단층세포에 원료물질, 세포주 파쇄액, 공정 시료, 반제품, 완제품 등을 첨가한 후 7일 이상 배양한 다음 소유래 바이러스에 대한 항혈청을 이용해 면역형광 방법으로 바이러스 오염 여부를 판단한다. 이러한 생물학적 실험법의 경우 시간이 많이 걸리고, 비용이 많이 드는 단점이 있다. 본 연구를 통해 확립된 BHV-1 검출 시험법을 CHO 세포주에서 BHV-1 검출 시험에 활용하였을 때, BHV-1에 오염된 CHO 세포주가 병변현상을 일으키지는 않았지만, CHO 세포주와 세포주 배양 상등액에서 BHV-1을 효과적으로 검출할 수 있었다. 따라서 BHV-1 real-time PCR 시험법은 동물세포주 검증과 생산공정 검증에서 BHV-1 오염 여부를 정성적 또는 정량적 검출할 수 있는 우수한 시험법임을 확인할 수 있었다. 동물세포주 검증에서 real-time PCR을 활용한 BHV-1 검출 시험은 지금까지 보고된 바 없다.

소유래 콜라겐은 의약품 생체재료로 널리 이용되고 있지만, 콜라겐의 바이러스 안전성 검증에 관한 구체적인 가이드라인이 현재까지 제시되지 않아 제조사에서 자체적으로 안전성 검증시스템을 구축하고 안전성 보증 시험을 실시하고 있다. 하지만 BHV-1을 효과적으로 검출할 수 있는 시험법이 확립되지 않아 real-time PCR 시험법 같은 민감한 시험법이 요구되고 있다. 본 연구를 통해 확립된 BHV-1 검출 시험법을 0.5% 콜라겐에 적용하였을 때 10 TCID₅₀/ml 까지 정량적으로 검출할 수 있어 콜라겐의 품질보증에 활용할 수 있는 우수한 시험법임을 확인하였다. 민감도를 높이기 위해서는 콜라겐으로부터 BHV-1 DNA 추출 조건의 최적화가 필요하다고 판단된다.

Real-time PCR을 활용한 바이러스 정량 검출 방법은 크로마토그래피 공정과 같은 단백질 분리 정제 공정에서 미량의 바이러스를 실시간에 정량화 할 수 있기 때문에, 생물의약품 제조공정에서 바이러스 제거 검증 실험 시 감염역가시험과 함께 적용할 수 있는 유용한 평가기술임 뿐만 아니라, 감염역가시험으로는 분석할 수 없는 크로마토그래피 세척공정에서의 바이러스 안전성 검증에 활용할 수 있는 적절한 방법이다(1). 본 연구를 통해 확립된 BHV-1 real-time 시험법도 세포배양 유래 생물의약품 제조

공정에서 바이러스 제거 검증과 크로마토그래피 세척 검증에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말

본 논문은 산업자원부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업과 식품의약품안전청 용역연구개발사업(2006년도, 2007년도)으로 수행된 연구결과임.

참고문헌

1. 길태건, 김원중, 이동혁, 강용, 성학모, 유시형, 박순희, 김인섭. 2005. 혈장분획제제 제조공정에서 크로마토그래피 세척 검증을 위한 모델바이러스로서의 Porcine Parvovirus 정량. 미생물학회지 41, 216-224.
2. 류승렬, 신진호, 백선영, 김재욱, 민경일, 민복순, 김병국, 김도근, 박미경, 안미진, 채경숙, 정혜성, 이석호, 박순희. 2003. 세포배양 유래 생물의약품 중 Bovine Viral Diarrhoea Virus 검출을 위한 RT-PCR, Real-time RT-PCR 및 RT-PCR-ELISA 기법의 검출한계와 정량범위 평가. *J. Bacteriol. Virol.* 33, 161-168.
3. Adamson, S.R. 1999. Experiences of virus, retrovirus and retrovirus-like particles in chinese hamster ovary (CHO) and hybridoma cells used for production of protein therapeutics. *Dev. Biol. Stand.* 93, 89-96.
4. Celis, P. and G. Silvester. 2004. European regulatory guidance on virus safety of recombinant proteins, monoclonal antibodies and plasma derived medicinal products. *Dev. Biol. Stand.* 118, 3-10.
5. Choi, Y.-M., J.-K. Kim, J.-I. Park, and S.-W. Jeong. 2006. Evaluation of bovine amniotic membrane for the treatment of superficial canine corneal ulcer. *J. Vet. Clinics* 23, 334-336.
6. Code of federal regulation 9 (9CFR), animal and animal products. 1996. Part 113.53. Requirement for ingredients of animal origin used for production of biologics.
7. Darling, A. 2002. Validation of biopharmaceutical purification process for virus clearance evaluation. *Mol. Biotechnol.* 21, 57-83.
8. Deka, D., Ramneek, N.K. Maiti, and M.S. Oberoi. 2005. Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. *Rev. Sci. Tech.* 24, 1085-1094.
9. Eloit, M. 1999. Risks of virus transmission associated with animal sera or substitutes and methods of control. *Dev. Biol. Stand.* 99, 9-16.
10. Erickson, G.A., S.R. Bolin, and J.G. Landgraf. 1991. Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. *Dev. Biol. Stand.* 75, 173-175.
11. Faraj, K.A., T.H. Van Kuppevelt, and W.F. Daamen. 2007. Construction of collagen scaffolds that mimic the three-dimensional architecture of specific tissues. *Tissue Eng.* 13, 2387-2394.
12. Gajiwala, K. and A.L. Gajiwala. 2004. Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing. *Cell Tissue Bank* 5, 73-80.
13. Garnick, R.L. 1998. Raw materials as a source of contamination in large-scale cell culture. *Dev. Biol. Stand.* 93, 21-29.
14. Grom, J., P. Hostnik, I. Toplak, and D. Barlic-Maganja. 2006. Molecular detection of BHV-1 in artificially inoculated semen and in the semen of a latently infected bull treated with dexametha-

- son. *Vet. J.* 171, 539-544.
15. Horaud, F. 1991. Introductory remark: viral safety of biologicals. *Dev. Biol. Stand.* 75, 3-7.
 16. International Conference on Harmonisation. 1998. Guidance on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin; availability. *Federal Resister* 63, 51074-51084.
 17. Jennings, A. 1999. Detecting viruses in sera: methods used and their merits. *Dev. Biol. Stand.* 99, 51-59.
 18. Jeong, H.-S., J.-H. Shin, Y.-N. Park, J.-Y. Choi, Y.-L. Kim, B.-G. Kim, S.-R. Ryu, S.-Y. Baek, S.-H. Lee, and S.-N. Park. 2003. Development of real-time RT-PCR for evaluation of JEV clearance during purification of HPV type 16 L1 virus-like particles. *Biologicals* 31, 223-229.
 19. Parkman, P.D. 1996. Safety of biopharmaceuticals: a current perspective. *Dev. Biol. Stand.* 88, 5-7.
 20. Powel, H.M., D.M. Supp, and S.T. Boyce. 2008. Influence of electrospun collagen on wound contraction of engineered skin substitutes. *Biomaterials* 29, 834-843.
 21. Prabu, P., N. Dharmaraj, S. Aryal, B.M. Lee, V. Ramesh, and H.Y. Kim. 2006. Preparation and drug release activity of scaffolds containing collagen and poly(caprolactone). *J. Biomed. Mater. Res. A* 2006, 153-158.
 22. Rocha, M.A., E.F. Barbosa, S.E.F. Guimarães, E. Dias Neto, and A.M.G. Gouveia. 1998. A high sensitive-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Vet. Microbiol.* 63, 1-11.
 23. Rudnick, A. 2006. Advances in tissue engineering and use of type 1 bovine collagen particles in wound bed preparation. *J. Wound Care* 15, 402-404.
 24. Schneider, G. 2003. Bioimplants-characteristics and use. *Laryngorhinootologie* 82, 839-852.
 25. Takiuchi, E., K.C. Médici, A.F. Alfieri, and A.A. Alfieri. 2005. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. *Res. Vet. Sci.* 79, 85-88.
 26. Wang, J., J. O'Keefe, D. Orr, L. Loth, M. Banks, P. Wakeley, D. West, R. Card, G. Ibata, K. Van Maanen, P. Thoren, M. Isaksson, and P. Kerkhofs. 2007. Validation of a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in bovine semen. *J. Virol. Methods* 144, 103-108.
 27. Whitebeck, J.C., L.J. Bello, and W.C. Lawrence. 1988. Comparison of the bovine herpesvirus 1 gI gene and the herpes simplex virus type 1 gB gene. *J. Virol.* 62, 3319-3327.
 28. Yarlagadda, P.K., M. Chandrasekharan, and J.Y. Shyan. 2005. Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Biomed. Mater. Eng.* 15, 159-177.

(Received January 14, 2008/Accepted March 3, 2008)

ABSTRACT: Real-Time PCR for Quantitative Detection of Bovine Herpesvirus Type 1

Dong Hyuck Lee¹, Hyo Sun Jeong², Jung Hee Lee¹, Tae Eun Kim¹, Jungsuk Lee², and In Seop Kim^{1*} (¹Department of Biological Sciences, Hannam University, Daejeon 305-811, Republic of Korea, ²Tissue Engineering Division, Research and Development Dept., Hans Daedeok R&D Center, Hans Biomed Corp., Daejeon 305-811, Republic of Korea)

Bovine blood, cell, tissue, and organ are used as raw materials for manufacturing biopharmaceuticals, tissue engineered products, and cell therapy. Manufacturing processes for the biologicals using bovine materials have the risk of viral contamination. Therefore viral validation is essential in ensuring the safety of the products. Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) is the most common bovine pathogen found in bovine blood, cell, tissue, and organ. In order to establish the validation system for the BHV-1 safety of the products, a real-time PCR method was developed for quantitative detection of BHV-1 in raw materials, manufacturing processes, and final products as well as BHV-1 clearance validation. Specific primers for amplification of BHV-1 DNA was selected, and BHV-1 DNA was quantified by use of SYBR Green I. The sensitivity of the assay was calculated to be 2 TCID₅₀/ml. The real-time PCR method was validated to be reproducible and very specific to BHV-1. The established real-time PCR assay was successfully applied to the validation of Chinese hamster ovary (CHO) cell artificially infected with BHV-1. BHV-1 DNA could be quantified in CHO cell as well as culture supernatant. Also the real-time PCR assay could detect 10 TCID₅₀/ml of BHV-1 artificially contaminated in bovine collagen. The overall results indicated that this rapid, specific, sensitive, and robust assay can be reliably used for quantitative detection of BHV-1 contamination during the manufacture of biologics.