

Sodium butyrate에 의한 돼지 전염성 위장염 바이러스 백신의 생산성 향상

이창진¹, 김철민², 정연호^{1*}

Improvement of Virus Productivity by Sodium Butyrate in the Production of Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus Vaccine

Chang-Jin Lee¹, Cheol-Min Kim², and Yeon-Ho Jeong^{1*}

접수: 2011년 2월 9일 / 게재승인: 2011년 3월 22일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The essential operating parameters in virus vaccine production are multiplicity of infection (MOI), harvest time, and infection time. Stimulating agents also can be applied in order to improve vaccine productivity further. We investigated the optimum operating conditions in porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV) vaccine production and the applicability of sodium butyrate (NaBu) as a stimulating agents for the improvement of vaccine productivity. The optimum MOI, infection time, and harvest time for high production of TGEV by swine testicle (ST) cells were found to be 0.0001 pfu/cell, 3 day after cell inoculation, and 24 hpi, respectively. NaBu is known as a histone deacetylase inhibitor that has been widely used for the high expression of recombinant protein using mammalian cells and for the enhancement of virus propagation. So we tried to examine the potential of NaBu as a stimulating agent and to determine the optimum concentration by comparing TGEV titers with different range of NaBu concentration. TGEV titer with 5 mM NaBu was 1.5 times higher than control. Therefore, we concluded that NaBu can be a promising agent for stimulating various vaccine production including TGEV and the optimum NaBu

concentration for TGEV production was determined to be 5 mM.

Keywords: Porcine transmissible gastroenteritis virus, Vaccine, ST cell, Sodium butyrate, Multiplicity of infection

1. 서론

최근 인간 및 가축의 바이러스 질병에 의한 사회·경제적 문제들이 심각하게 발생하고 있으며, 대표적인 인간 바이러스 질병으로 2003년의 중증 급성 호흡기 증후군 (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS)과 2009년의 신종 플루가 전 세계적으로 유행하였고, 가축의 경우 매년 조류 독감, 돼지 콜레라, 구제역 등이 빈번히 발생하고 있다. 특히 우리나라의 경우 앞에서 언급한 가축 바이러스 질병으로 인한 가축의 살처분으로 축산업 농가의 피해뿐만 아니라 육류 및 관련 제품들의 공급부족에 따른 가격 상승으로 소비자들까지 피해를 입고 있어서 국가적으로 막대한 손실을 보고 있다. 이러한 바이러스 질병에 대해 지금까지 개발된 항바이러스제와 같은 치료제가 소수이고, 그 치료 적용 범위도 매우 국한되어 있다. 따라서 현재까지 바이러스 질병에 대한 치료보다는 예방에 주력하고 있고, 그 예방을 위한 수단으로 백신이 널리 사용되고 있다.

백신은 생독이나 사독백신과 같은 whole 백신뿐만 아니라 재조합단백질과 같은 subunit 백신에 이르기까지 모두 SPF 수정란, 뇌와 같은 기관, 숙주세포와 같은 살아있는 조직 또는 세포를 필요로 한다. 수정란이나 기관을 사용하는 전통적인 방식의 백신 생산의 경우 백신 생산 조건에 변화를 주는

¹강원대학교 의생명공학과

¹Department of Medical Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea
Tel: +82-33-250-6484, Fax: +82-33-241-6480
e-mail: jeongyhb@kangwon.ac.kr

²바디텍메드(주)

²Boditechmed Inc., Chuncheon 200-883, Korea

데 한계가 있다. 반면 세포를 사용하여 생산하는 경우 생산 조건을 변화시키는데 수정란이나 기관보다 자유롭다. 또한 동물세포배양을 통한 백신 생산은 수정란 등의 전통적인 방식에 비해 경제적인 대량 생산이 가능할 뿐만 아니라 추가적인 확장 용이성 때문에 차후 신종플루와 같은 판데믹 바이러스성 전염병에 대비하는 중요한 수단이 될 수 있다 [1].

동물세포를 이용한 생물공학 제품 생산에서 세포는 배지 성분을 기질로 하여 제품을 생산한다. 반면에 백신 생산을 위한 바이러스는 생세포의 대사를 활용하여 증식한다. 따라서 바이러스 생산은 재조합단백질이나 항체와 같이 세포배양과 동시에 생산물을 발현하는 한 단계가 아닌 숙주세포 배양 단계와 바이러스 감염에 의한 바이러스 감염/생산 단계의 두 개의 과정으로 나눌 수 있다.

유전자 재조합 세포를 이용한 재조합단백질이나 항체의 생산에서 생산성을 향상시키기 위해 다양한 배양방법이 연구되었고, 또한 배양방법 외에 small molecule enhancer 또는 stimulating agent라고 불리는 첨가제를 투여하여 생산물의 수율을 향상시키는 방법이 많이 보고되고 있다 [2]. 재조합 단백질 생산에서 가장 많이 연구되어진 첨가제는 histone deacetylase inhibitor로 알려진 sodium butyrate (NaBu) 이다 [3]. NaBu는 erythropoietin [4], tissue plasminogen activator [5], antibody [6,7], nitric oxide synthase [8] 등의 재조합 단백질의 발현을 향상시키는데 주로 이용되어져 왔다.

바이러스 백신의 경우도 생산성을 향상시키기 위한 방법으로 바이러스 감염 전 단계에서는 고농도 세포 배양 방법을 이용하고, 바이러스 감염/생산 단계에서는 바이러스 백신 생산 조건의 최적화 (Multiplicity of infection (MOI), 감염시간, 수확시간)와 더불어 재조합단백질 생산에서와 같이 바이러스 생산을 증폭시키기 위해 NaBu, DMSO, Mg^{2+} , Ca^{2+} 등과 같은 다양한 첨가제를 투여하는 방법들이 보고되었다 [9-13].

돼지 전염성 위장염 (Transmissible gastroenteritis, TGE) 은 구토, 설사 등을 주된 증상으로 하는 급성 바이러스성 전염병이다. TGE는 모든 일령의 돼지가 감수성이 있으나 어린 일령일수록 발병률과 폐사율이 높다. 특히 2주령 이하의 포유자돈이 감염되면 매우 심한 설사와 구토를 일으켜서 탈수를 유발하여 폐사율이 거의 100%에 달한다. 이러한 TGE를 일으키는 원인체는 돼지 전염성 위장염 바이러스 (Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)인데, TGEV는 *Coronaviridae* 과에 속하는 Coronavirus이다 [14,15].

본 연구에서는 바이러스 감염/생산 단계에서 TGEV의 백신 생산성 향상을 위해 MOI, 감염시간, 수확시간의 최적 생산 조건을 먼저 확인하였고, 바이러스 역가 향상을 위한 stimulating agent로 재조합단백질 생산뿐만 아니라 바이러스 생산에서도 생산성 향상에 효과가 있는 것으로 보고된 NaBu를 투여하여 바이러스 역가의 증대 효과를 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포주 및 세포배양

본 실험에 사용한 세포주는 TGEV의 생산을 위해 돼지 고환

(swine testicle, ST) 세포를 사용하였다. ST 세포의 배양은 10% Fetal Bovine Serum (FBS, JRS), 23.8 mM $NaHCO_3$ (Sigma), 10 mM HEPES (Sigma), Streptomycin sulfate (100 μ g/mL, Sigma), Penicillin G (100 units/mL, Sigma)가 첨가된 RPMI1640 (Gibco)를 사용하였다. ST 세포는 37°C, 5% CO_2 incubator (Sanyo)에서 배양하였으며, 계대배양은 ϕ 100 mm tissue culture dish에 1×10^5 cells/mL의 농도로 10 mL씩 배양하며, 3일 간격으로 계대하였다.

세포농도와 viability는 hemocytometer를 이용한 trypan blue exclusion method를 이용하여 측정하였다.

2.2. 바이러스주 및 바이러스 생산

본 실험에 사용한 바이러스주는 돼지전염성위장염을 일으키는 돼지전염성위장염 바이러스인 TGEV-175L주으로써, 국립수의과학검역원으로부터 분양받았으며, -80°C deep-freezer에 보관하였다.

TGEV의 생산은 tissue culture dish, 6 well culture plate 등의 culture vessel에 1×10^5 cells/mL의 농도로 ST 세포를 접종하여 3일간 배양한 후, 배지를 제거하고, 바이러스를 감염시켜 37°C, 5% CO_2 incubator에서 1시간 동안 간헐적으로 흔들어주며 흡착시켰다. 흡착 1시간 후 바이러스가 포함된 배지를 제거하고, 새로운 배지로 교환하였다. 24시간 동안 바이러스를 생산 후 바이러스 생산 culture vessel을 deep-freezer에 넣어 보관하였고, 보관중인 culture vessel을 3회 동결해동법으로 세포파괴를 한 후 1,600 g로 10분 간 원심분리하여 얻은 상등액을 역가 측정 및 바이러스 stock에 사용하였다.

2.3. 실험재료

본 실험에서 sodium butyrate (B-5887, Sigma)는 증류수에 녹여 1 M의 농축 stock solution을 제조하여 사용하였다. ST 세포의 세포성장에 NaBu가 미치는 영향을 알아보기 위해 ST 세포의 접종 2일과 3일 후 배양액에 다양한 농도의 NaBu를 투여하였다. TGEV 생산에 미치는 NaBu의 효과를 알아보기 위해 바이러스 감염 후 배양액에 다양한 농도의 NaBu를 투여하여 농도에 따른 역가 변화를 비교하였다.

2.4. 바이러스역가 측정

TGEV의 역가를 확인하기 위한 방법으로 plaque assay를 사용하였다. 먼저 6 well culture plate에 ST 세포를 1×10^5 cells/mL의 농도로 각 well에 2 mL씩 접종하고, 37°C, 5% CO_2 incubator에서 3일간 배양하여 세포가 culture vessel 표면을 80~90% 이상 차지하면 배지를 제거하고, 10배씩 serial dilution한 바이러스 희석액을 접종하고, 1시간 동안 간헐적으로 흔들어서 바이러스가 세포에 흡착되도록 하였다. 1시간 후 바이러스액을 제거하고, 4% low melting agarose와 RPMI1640 (2X)배지를 1:2로 혼합한 overlay medium을 각 well에 2 mL씩 도포하고, 실온에서 굳혔다. Agarose overlay 배지가 굳은 후 parafilm으로 plate를 봉하고, 37°C, 5% CO_2 incubator에서 2일간 배양하였다. 2일간 배양 후 육안으로 plaque가 형성된 것이 보이면, 4% agarose solution : RPMI1640 (2X) : neutral red solution = 1 : 2 : 0.1의 agarose 염색배지를 만

들어 각 well에 1 mL씩 도포하여 실온에서 굳혔다. Agarose 염색배지가 굳은 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 overnight 하여 neutral red dye가 세포에 염색되도록 하였다. 다음날 계수하기에 적합한 희석배수에서의 plaque를 계산하여 역가를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. ST 세포 성장에서의 NaBu 효과

NaBu가 TGEV의 생산에 미치는 영향을 알아보기 전에 TGEV를 생산하는 숙주세포인 ST 세포의 세포 성장에 NaBu가 어떠한 영향을 미치는지 먼저 조사하였다. 백신 생산을 위해서는 대부분 바이러스 감염 후 배지를 교환하므로 ST 세포의 접종 48시간과 72시간 후에 배지를 교환해 줌과 동시에 NaBu를 최종농도가 0, 2.5, 5, 7.5, 10 mM이 되도록 배양액에 투여하고, 세포 성장을 조사하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 NaBu 농도가 증가함에 따라 세포 성장의 저해 및 급격한 세포 사멸을 보이고 있다. 따라서 NaBu가 농도 의존적으로 세포 성장을 저해함을 알 수 있었다. 이러한 양상은 대부분의 세포에서도 유사한 결과를 보이고 있다. 따라서 ST 세포를 이용한 TGEV 생산에서는 세포 성장 단계에서 NaBu를 투여하지 않는 것이 바람직함을 알 수 있었다.

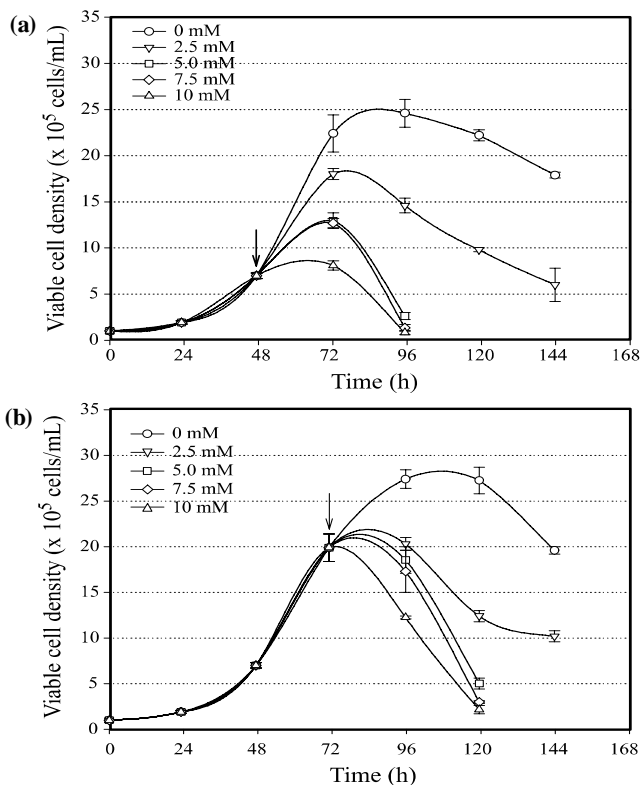


Fig. 1. The effect of NaBu on ST cells growth. (a) Addition at 48 h after ST cell inoculation, and (b) Addition at 72 h after ST cell inoculation. The arrow means both medium exchange and NaBu treatment. The data represent the mean and standard deviations calculated from the results of two independent experiments.

3.2. TGEV 생산의 최적 MOI 및 수확시간

MOI는 바이러스 생산에서 바이러스 증식에 영향을 미치는 변수 중 매우 중요한 변수이다. 또한 바이러스 수확시간도 MOI에 따라 달라지므로 중요한 변수이다. 아주 높은 MOI로 감염시킬 경우 Nguyen 등 [16]의 보고와 같이 단시간 내에 많은 바이러스가 급속하게 증식되므로 생산성면에서 좋지 않은 영향을 줄 수 있다. 반면 아주 낮은 MOI로 감염시켰을 경우 생산시간이 길어져 생산성이 떨어질 수도 있어서 최적 MOI가 존재하게 된다. 이러한 MOI와 수확시간 사이의 관계는 바이러스에 따라 다르다. 따라서 ST 세포에서 MOI와 수확시간에 따른 TGEV의 생산성을 비교함으로써 최적 MOI와 수확시간을 확립하였다. 바이러스 역가가 최대가 되는 최적 MOI와 그에 따른 최적 수확시간을 결정하기 위하여 ST 세포 접종 3일 후에 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 MOI로 바이러스를 감염시키고, 24, 48 hpi (hours post-infection)에 수확하여 각각의 역가를 비교하였다. 그 결과 0.0001 MOI, 24 hpi에서 최대 바이러스 역가를 얻었기 때문에 (Fig. 2), 세포 접종 3일 후 감염 시 TGEV의 최적 생산 조건으로 0.0001 MOI, 24 hpi를 선정하였다.

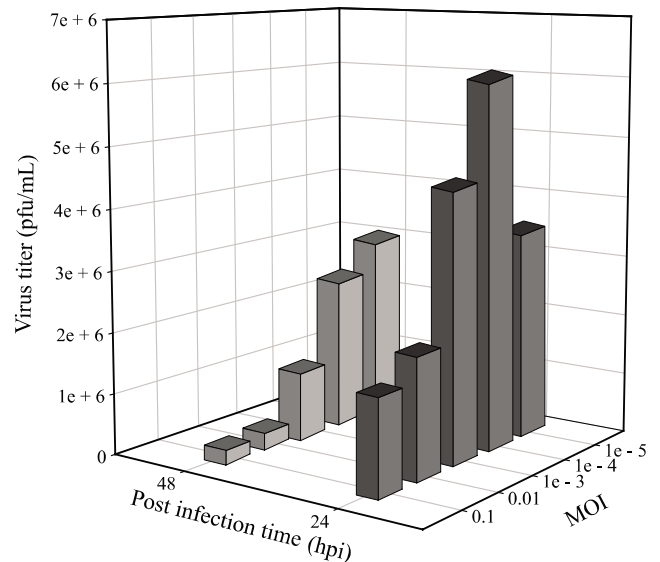


Fig. 2. The TGEV titer profile according to MOI and harvest time in ST cells. The data represent the mean calculated from the results of two independent experiments.

3.3. TGEV 생산의 최적 감염시간

바이러스는 세포내의 대사를 활용하여 증식하므로 세포 농도가 높을수록 유리할 것으로 생각할 수 있으나 세포의 농도가 증가해도 세포의 활성이 떨어진다면 바이러스 생산에 있어서도 좋지 않다. 따라서 세포의 성장에 있어 지연기 (lag)와 사멸기 (decline)의 사이인 세포 접종 후 2, 3, 4일에 앞서 확인한 최적 MOI인 0.0001 MOI로 세포를 감염시킨 후 최적 수확 시간인 24 hpi에 수확하여 각각의 감염시간에 따른 바이러스 역가를 확인하였다 (Fig. 3). 그 결과 세포 접종 후 3일에 바이러스를 감염시켰을 때 1.4×10^7 pfu/mL의 가장 높은 바이러스 역가를 보였다. 세포 접종 2일 후 바이러스 감염에서 세포 활

성은 좋으나 세포 농도가 낮아 바이러스 역가가 낮다. 그러나 세포 접종 후 4일의 세포 농도는 3일 보다 높지만 세포가 지수성장기 (exponential)를 벗어나 사멸기에 들어가기 전단계인 감속기 (deceleration)나 정지기 (stationary)의 상태이기 때문에 세포 활성이 세포 접종 후 3일 보다 떨어져 최종역가가 낮아지는 것으로 추측된다. 따라서 세포 활성 및 농도의 측면에서 세포 접종 후 3일의 감염시간이 바이러스 생산에 최적 감염시간이라고 할 수 있다.

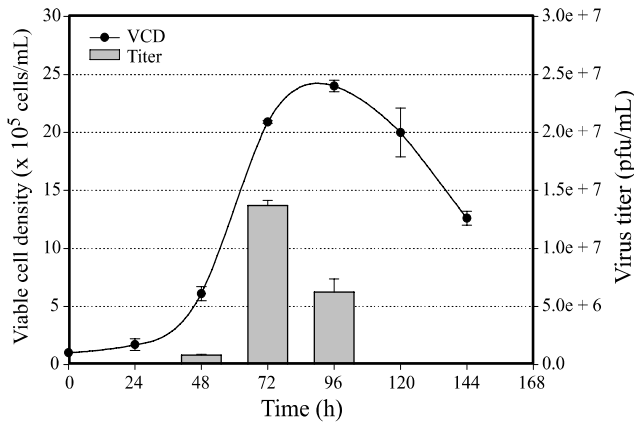


Fig. 3. The TGEV titer profile according to infection time in ST cells. The curve represents non-infected ST cell growth profile. The ST cells were infected with MOI of 0.0001 pfu/cell and harvested at 24 hpi. The bars represent TGEV titers for each infection time (at 48, 72, and 96 h after cell inoculation). The data represent the mean and standard deviations calculated from the results of two independent experiments.

3.4. NaBu에 의한 TGEV 생산성 증대

Radsak 등 [17]에 의하면 human cytomegalovirus 감염 후 NaBu를 처리하였을 때 바이러스의 역가가 증가한다고 보고

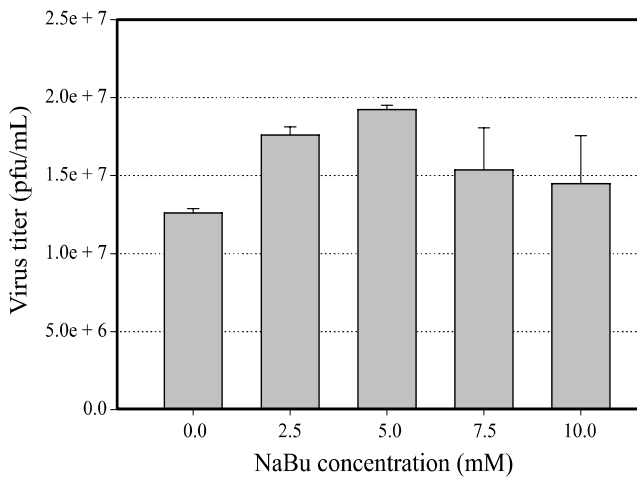


Fig. 4. The effect of NaBu on TGEV production in ST cells. At 72 h after cell inoculation, the ST cells were infected with MOI of 0.0001 pfu/cell and treated with different concentrations of NaBu. TGEV was harvested at 24 hpi. The data represent the mean and standard deviations calculated from the results of two independent experiments.

되었다. NaBu가 TGEV 생산에도 증대효과가 있는지 알아보기 위해 ST 세포에서 최적 TGEV 감염시간인 접종 3일 후 최적 MOI인 0.0001 MOI로 감염시킨 뒤 배양액에 NaBu 최종 농도가 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10 mM이 되도록 투여하고, 최적 수확 시간인 24 hpi에 수확하여 각 NaBu 농도들에 따른 역가를 비교하였다. 그 결과 모든 NaBu 농도에서의 바이러스 역가가 대조군보다 높았으며, 그 중 5.0 mM NaBu 처리군에서 대조군 대비 1.5배의 가장 높은 바이러스 역가를 보였다 (Fig. 4). 5.0 mM 이상의 NaBu 농도에서는 바이러스 생산성도 증가시키지만 Fig. 1(b)의 결과에서와 같이 NaBu 농도가 증가할수록 세포 성장의 저해 및 사멸속도가 증가하듯이 세포에 대한 독성으로 인해 더 이상의 바이러스 역가 향상을 기대할 수 없는 것으로 판단된다. 따라서 ST 세포에 의한 TGEV 생산에서도 NaBu에 의해 TGEV의 생산성 증대가 확인됨으로써 NaBu는 다양한 백신 생산에서도 생산성 향상을 위한 첨가제로 사용될 수 있음을 확인하였고 TGEV의 경우 그 최적농도는 5 mM 임을 알 수 있었다.

4. 결론

바이러스 백신의 생산은 바이러스 감염을 기준으로 전 단계인 세포 증식 단계와 그 후 단계인 바이러스 감염/생산 단계로 크게 나눌 수 있다. 이 두 단계 중 실질적으로 중요한 단계는 바이러스 감염/생산 단계이다. 바이러스 감염/생산 단계에서의 기본적인 최적 조건으로 MOI와 수확시간을 들 수 있다. 또한 바이러스는 증식을 위해 살아있는 세포를 필요로 하는데, 이는 감염 전 단계인 세포 증식 단계에서의 최적 조건을 요구하고, 그 기본적인 최적 조건으로 감염시간을 들 수 있다. TGEV 백신의 고생산을 위한 바이러스 감염/생산 단계에서의 최적화를 위해 0.0001 MOI, 24 hpi의 조건을 구하였고, 세포 증식 단계에서의 최적화로 세포 접종 3일 후에 TGEV를 감염시키는 조건을 선정하였다. 이렇게 기본적인 TGEV 백신 최적 생산 조건을 확립한 후, 바이러스 백신의 추가적 생산성 증대를 위해 histone deacetylase inhibitor인 NaBu를 stimulating agent로서 사용 가능성을 조사하였다. NaBu를 바이러스 감염 후 여러 농도로 투여하여 바이러스 역가를 비교한 결과 5 mM NaBu 처리군에서 대조군 대비 1.5배 향상된 가장 높은 바이러스 역가를 보였다. 따라서 NaBu는 다양한 백신 생산에서도 생산성 향상을 위한 첨가제로 사용될 수 있음을 확인하였고, TGEV의 경우 그 최적농도는 5 mM 임을 알 수 있었다. 향후 세포 증식 단계에서 활성이 높은 세포의 고농도 배양 공정연구와 바이러스 감염/생산 단계에서 생산성을 높일 수 있는 다양한 stimulating agent의 개발 등이 바이러스 역가의 향상을 위해 요구된다.

감사

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의 지역혁신인력양성사업 및 2010년도 강원대학교 학술연구조성비로

수행된 연구결과입니다.

References

- Jang, J. and I. H. Kim (2010) Current status and perspectives of cell culture-based vaccine production. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 38: 124-128.
- Allen, M. J., J. P. Boyce, M. T. Trentalange, D. L. Treiber, B. Rasmussen, B. Tillotson, R. Davis, and P. Reddy (2008) Identification of novel small molecule enhancers of protein production by cultured mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* 100: 1193-1204.
- Kruh, J. (1982) Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol. Cell. Biochem.* 42: 65-82.
- Chang, K. H., K. S. Kim, and J. H. Kim (1999) N-acetylcysteine increases the biosynthesis of recombinant EPO in apoptotic Chinese hamster ovary cells. *Free Rad. Res.* 30: 85-91.
- Palermo, D. P., M. E. DeGraaf, K. R. Marotti, E. Rehberg, and L. E. Post (1991) Production of analytical quantities of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using sodium butyrate to elevate gene expression. *J. Biotechnol.* 19: 35-47.
- Kim, N. S. and G. M. Lee (2001) Overexpression of bcl-2 inhibits sodium butyrate-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells resulting in enhanced humanized antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* 71: 184-193.
- Kim, N. S. and G. M. Lee (2002) Inhibition of sodium butyrate-induced apoptosis in recombinant Chinese hamster ovary cells by constitutively expressing antisense RNA of Caspase-3. *Biotechnol. Bioeng.* 78: 217-228.
- Laubach, V. E., E. P. Garvey, and P. A. Sherman (1996) High-level expression of human inducible nitric oxide synthase in Chinese hamster ovary cells and characterization of the purified enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 802-807.
- Tsao, Y. S., R. Condon, E. Schaefer, P. Lio, and Z. Liu (2001) Development and improvement of a serum-free suspension process for the production of recombinant adenoviral vectors using HEK293 cells. *Cytotechnology* 37: 189-198.
- Brorson, K., C. de Wit, E. Hamilton, M. Mustafa, P. G. Swann, R. Kiss, R. Taticek, G. Polastri, K. E. Stein, and X. Yuan (2002) Impact of cell culture process changes on endogenous retrovirus expression. *Biotechnol. Bioeng.* 80: 257-267.
- Scholtissek, E. and K. Müller (1988) Effect of dimethylsulfoxide (DMSO) on virus replication and maturation. *Arch. Virol.* 100: 27-35.
- Boriskin, Y. S., L. L. Steinberg, L. V. Dorofeeva, I. N. Zazorina, and E. P. Barkova (1988) Salt-induced enhancement of measles virus yields in cultured cells. *Arch. Virol.* 101: 131-136.
- Pando, V., P. Iša, C. F. Arias, and S. López (2002) Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virolog.* 295: 190-200.
- Fenner, F. J., E. P. J. Gibbs, F. A. Murphy, R. Rott, M. J. Syddert, and D. O. White (1993) *Veterinary Virology*. 2nd ed., pp. 457-469. Academic Press, Inc., San Diego, CA, USA.
- Saif, L. J. and K. Sestak (2006) Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus. pp. 489-516. In: B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, and D. J. Taylor (eds.). *Diseases of Swine*. 9th ed., Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Nguyen, B., K. Jarnagin, S. Williams, H. Chan, and J. Barnett (1993) Fed-batch culture of insect cells: a method to increase the yield of recombinant human nerve growth factor (rhNGF) in the baculovirus expression system. *J. Biotechnol.* 31: 205-217.
- Radsak, K., R. Fuhrmann, R. P. Frank, D. Schneider, A. Kollert, K. H. Brucher, and D. Drenckhahn (1989) Induction by sodium butyrate of cytomegalovirus replication in human endothelial cells. *Arch. Virol.* 107: 151-158.