

HEp- 2 : VSV system 을 이용한 인터페론 역가측정 연구

정인환 · 장 옥 · 김현수 · 배종찬 · 이원영*

제일제당(주) 종합연구소, *연세대학교 의과대학미생물학교실
(1985년 1월 29일 수리)

Study of Interferon Assay by HEp- 2 : VSV system.

In Whoan Jung, Uk Chang, Hyun Su Kim,
Jong Chan Bai and Won Yung Lee *

R & D center, Cheil Sugar Co., Kyunggi-Do.

*Department of Microbiology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul.

(Received January 29, 1985)

A rapid assay for interferon based on reduction of cytopathic effect was developed with HEp-2 and Vesicular Stomatitis Virus. The number of manipulations and the lengths of the various incubation steps were reduced to minimum. The assay is simple to perform and can be completed with 22-24 hr. Moreover, it was precise method than CPE-reading method.

인터페론의 역가검정법은 Wagner⁽¹⁾에 의하여 최초로 개발된 이래 많은 연구가 진행되어 Plaque-Reduction assay^(2~4), Yield-Reduction assay^(5, 6), Cytopathic Effect-Inhibition assay^(7~9), Radiochemical assay⁽¹⁰⁾ 등 여러 종류의 인터페론에 사용할 수 있는 검정법이 개발되어 왔다. 또한 매우 정밀한 방법이기는 하지만 사용범위가 제한되어 있는 Reverse Transcriptase Inhibition assay⁽¹¹⁾, Immunofluorescence assay⁽¹²⁾, EB virus-Expression assay⁽¹³⁾, Cytochemical assay⁽¹⁴⁾, Agar Diffusion assay⁽¹⁵⁾, pH Indicator assay⁽¹⁶⁾ 등의 방법들도 개발되어 왔다.

그러나, 이 방법들은 역가검정에 많은 시간이 요구되거나 결과가 명확하지 않을 때가 많이 있어 인터페론의 대량 생산 및 정제과정에서 요구되는 분석의 신속성 및 정확성을 충족시키기 위하여 본 실험에서는 분석용 세포주를 선정할 후 선정된 세포주의 성장 특성, 분석계내에서 Challenge virus 와 분석용 세포주와의 최적 반응 조건을 조사하여 22

~24시간내에 역가검정을 끝마칠 수 있는 방법을 개발한 후, 이 방법을 CPE-reading method와 비교하여 신뢰성 정도를 조사하여 다음의 결과를 얻었다.

재료 및 방법

세포주 및 Virus

인터페론 역가검정용 세포주는 Human amnion cell인 FL, WISH와 후두암에서 유도된 HEp-2 세포주를 사용하였으며, Challenge Virus는 Vesicular Stomatitis Virus(이하 VSV라 칭함)를 사용하였고 이들의 Origin은 Table 1 과 같다.

VSV의 TCID₅₀ 측정

10% fetal bovine serum가 함유된 EMEM 배지에 세포농도가 ml당 5×10^5 cells이 되도록 넣은 후 이 세포 혼탁액을 96wells plate에 각 well당 0.1ml씩 첨가한 후, 37°C 5% CO₂ 농도에서 3 시간 배

Table 1. Established cell lines and virus.

Cell & virus	Source	ATCC No.	Deviation
FL	human	CCL 62	normal amnion
WISH	human	CCL 25	normal amnion
HEp-2	human	CCL 23	Epidermal carcinoma, larynx
Vero	Monkey	CCL 82	African green monkey kidney
VSV	Indian strain	VR 158	Chick embryo cell cultured.

양하였다.

Plate를 뒤집어서 배지를 제거한 후 김 등⁽¹⁷⁾의 방법에 따라 배양한 VSV를 Eagle's minimum essential media 배지로 2 단계씩 희석시킨 용액을 0.1 ml씩 각 well에 첨가하였다. 이 plate를 18~21 시간 배양한 후 배지를 제거한 다음 0.02% neutral red 용액으로 세포를 30분간 염색하였다. 引地一昌 등⁽¹⁸⁾의 방법으로 염색된 neutral red를 추출하였으며 Microelisa auto-reader MR 580을 사용하여 570nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다.

VSV를 첨가시키지 않은 세포에서 추출해 낸 색소량의 50%의 역수를 VSV의 TCID₅₀로 하였다.

인터페론 역가 측정

CPE-reading method에 의한 인터페론의 역가 측

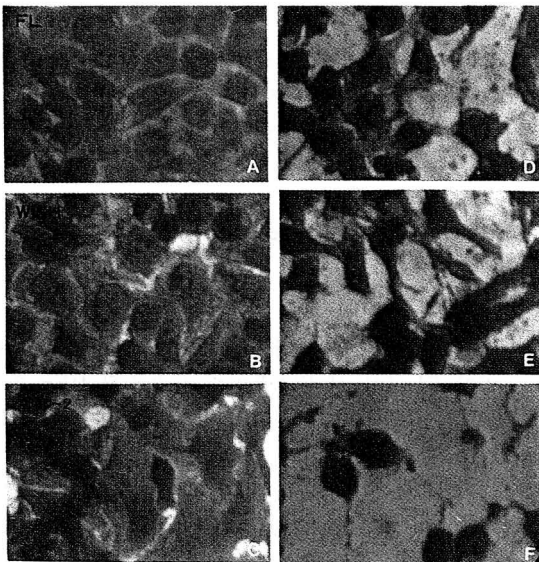


Fig. 1. Morphologies of FL, WISH, and HEp-2 cells A, B, C; Uninfected cells. D, E, F; Cells infected by VSV.

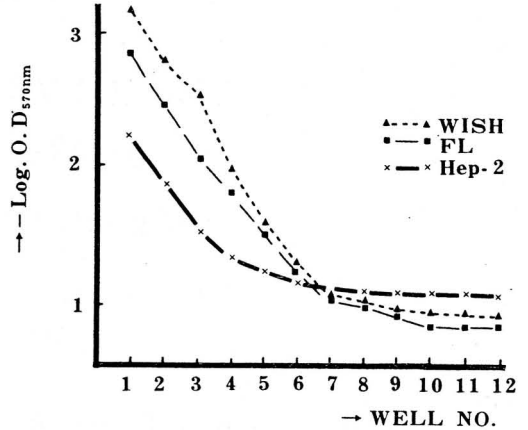


Fig. 2. Sensitivity test of target cells by VSV.

정법 및 인터페론 표준액의 조제는 김 등⁽¹⁷⁾의 방법에 따라 행하였다.

결 과

인터페론 역가검정용 세포주의 선별

FL, WISH, HEp-2 세포주를 각각 배양한 후 VSV를 첨가 배양한 결과 HEp-2 세포주가 가장 뚜렷한 세포병변 현상을 보였으며 (Fig. 1), VSV를 첨가하지 않았을 경우도 가장 큰 cell size를 갖고 있음을 알 수 있었다.

또한 VSV에 대한 sensitivity를 조사한 결과 Fig. 2에서 볼 수 있듯이 VSV의 농도 변화에 대해 급격한 변화를 보이지 않았다. 이것은 역가검정 과정에서 일어나기 쉬운 VSV 현탁액의 부정확한 첨가

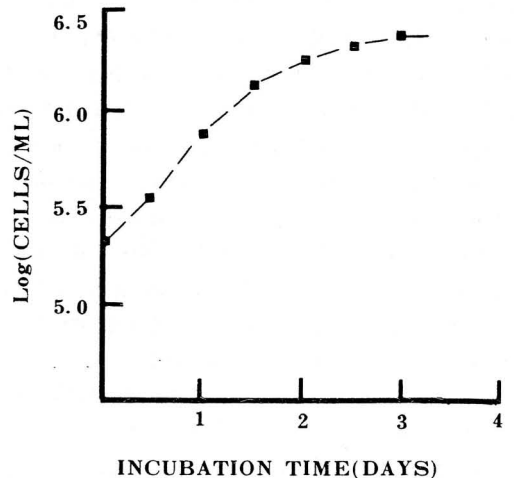


Fig. 3. Time course of HEp-2 cell growth.

Table 2. Effect of time of virus challenge.

VSV activity	Time required for 100% CPE (hr)
63 TCID ₅₀	17
125 TCID ₅₀	17
250 TCID ₅₀	15
500 TCID ₅₀	14
1000 TCID ₅₀	14

The number of cells per well was 5×10^5 .

Table 3. Effect of cell concentration.

Cell type	Number of cell (cells/ml)	Time required for 100% CPE.
HEp-2	1×10^5	12
	2×10^5	12
	5×10^5	16
	1×10^6	20

Cells were challenged with 200 TCID₅₀ of VSV per well after 5hr of incubation.

에 의한 실험 오차를 최소화시킬 수 있음을 의미하며 따라서 이후의 실험은 HEp-2 세포주를 사용하였다.

분석계의 최적조건 조사

HEp-2 세포주의 EMEM 배지 내에서의 성장 특성을 조사한 결과 72hr 후에는 stationary phase 에 도달됨을 알 수 있었으며 (Fig. 3), 역가검정시 첨가되어야 할 세포수와 VSV의 역가를 조사한 결과 Table 2 및 Table 3.에서와 같이 ml당 5×10^5 세포수와 200 TCID₅₀의 VSV 농도를 사용하는 것이 24 시간 내에 역가검정을 끝마치기 위한 필수 조건임을 알 수 있었다.

인터페론의 역가검정

이상의 조건을 사용하여 Fig. 4의 방법으로 인터페론 역가검정을 행하였다. Fig. 5는 CPE-reading method에 의한 역가검정 결과이며 Fig. 6은 HEp-2 : VSV system을 이용한 역가검정 결과이다. 본 연구소에서 생산된 표품을 사용하여 이들 2 가지 방법에 대한 역가검정을 행하였다. 1×10^5 I. U/ml의 역가를 갖는 인터페론 상용 표준 용액에 대한 표품의 역가를 비교해 본 결과 Table 4에서 볼 수 있듯이 HEp-2 : VSV system을 사용한 분석계가 더 유효한 분석치를 제공해주며 CPE-reading method에 비해 더 낮은 범위의 역가까지 검정할 수 있음을 알 수 있었다.

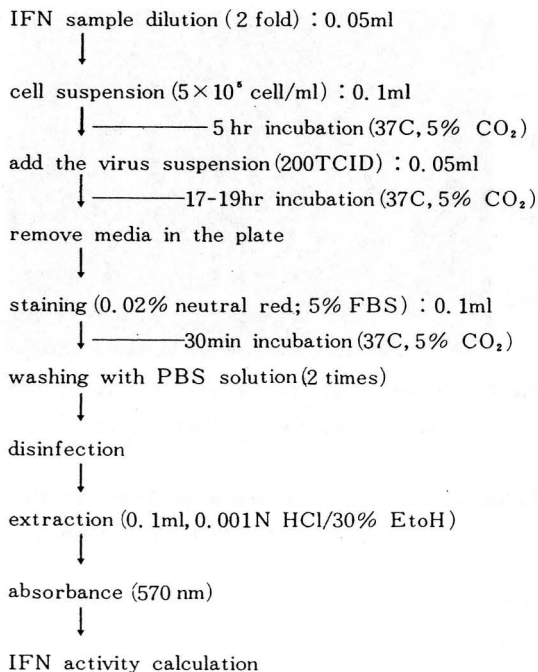


Fig. 4. Flow chart IFN activity measurement using HEp-2: VSV system.

신뢰성 비교

CPE-reading method를 임의로 기준하여 HEp-2 : VSV system에 의해 구해진 표품의 역가 검정치에 대한 신뢰성을 조사하였다.

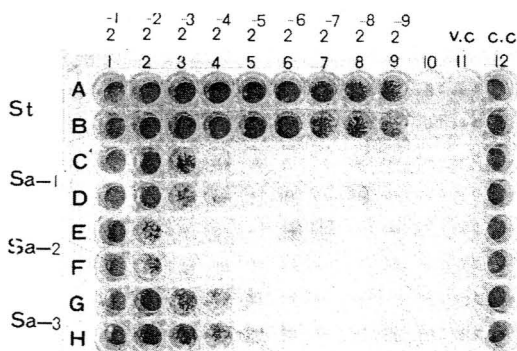


Fig. 5. Photograph of 96 well microplate for dye-binding interferon assay by CPE-FL/VSV system.

Rows 1 to 9 (horizontal line) contained various dilution of standard IFN and other samples. Vertical lines were standard IFN and samples. C. C; cell control, V. C; virus control.

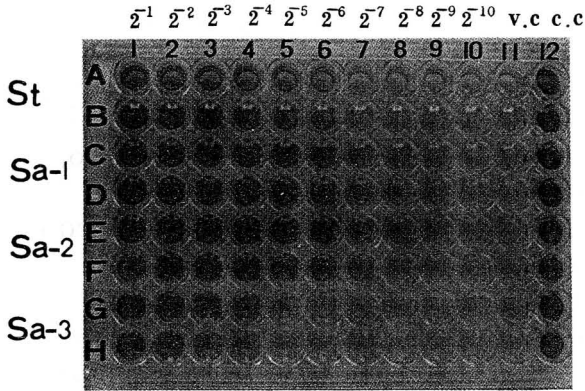


Fig. 6. Effect of the dye uptake IFN assay IFN assay using HEp-2: VSV system.

Table 4. Comparison of the sensitivity of CPE-reading method with that of HEp-2: VSV system.

Samples	IFN units (I. U. /ml)	
	HEp-2 : VSV assay method	CPE-reading method
St*	1000	1000
Sa-1	256	250
Sa-2	1946	2000
Sa-3	4520	4500
Sa-4	1540	1500
Sa-5	1100	1000
Sa-6	1403	1500
Sa-7	467	500
Sa-8	337	250
Sa-9	14	0

St* : Lymphoblastoid IFN (1×10^3)

Fig. 7 은 1,500 I.U./ml 의 역가를 갖는 인터페론 상용 표준 용액을 사용하여 2 가지 역가 검정법을 통해 검정한 값을 Histogram 한 것이다. CPE-reading method에 의한 역가 검정치는 0.17의 표준편차를 가지며 95%의 신뢰구간에서 1.42 ± 0.069 의 신뢰도를 보였다. 이에 비해 HEp-2 : VSV system을 이용해 얻어진 역가 검정치는 0.158의 표준편차를 가지며 95%의 신뢰구간에서 1.40 ± 0.069 의 신뢰도를 갖는 것으로 판명되었다.

고 찰

인터페론 역가 검정의 기본 원리는 세포에 인터

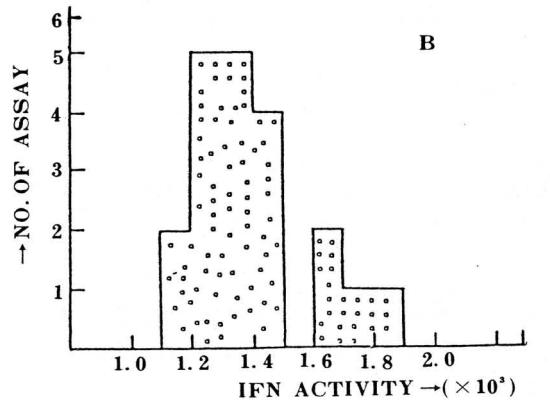
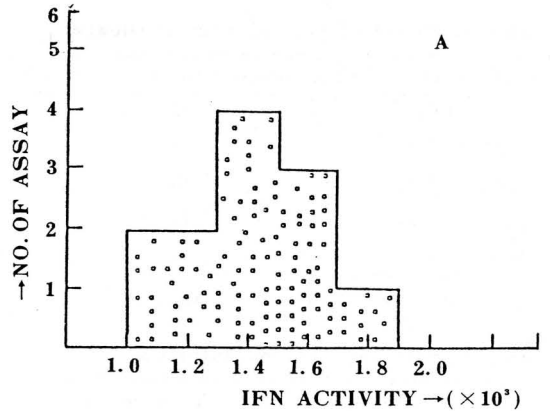


Fig. 7. Incidence of particular values for the activity of a standard Human IFN(Leucoferon) preparation obtained by the IFN assay.

A: CPE-reading method

B: assay method using HEp-2: VSV system.

페론 희석액을 첨가시켜 항바이러스 상태를 유발시킨 후 challenge virus의 첨가에 의해 세포 병변을 일으킨 다음 인터페론의 역가를 계산하는 것이다. 따라서 검정시 가장 중요한 요인으로 세포, 바이러스, 분석계의 안정성을 들 수 있다.

HEp-2 세포주를 분석용 세포로 선정하여 역가 분석을 위한 최적조건을 조사한 결과 5×10^6 cells/ml의 세포 농도를 plate에 첨가한 후 200TCID₅₀의 virus 농도를 첨가하는 것이 가장 안정된 분석계를 구성하는 것으로 판명되었다.

요 약

WISH, FL 및 HEp-2 세포주중 분석용 세포주를 선정하기 위하여 VSV에 대한 sensitivity와 세

포성장능을 조사하였다. 그 결과 HEp-2 세포주가 가장 유리한 것으로 판별되었으며, 이 세포주를 이용하여 초기 세포농도 5×10^5 cells/ml과 200TCI-D₅₀의 VSV 활성을 사용하여 22~24hr 내에 인터페론 역가 분석을 할 수 있는 방법을 개발하였으며, 이 방법에 대한 신뢰성을 조사한 결과 CPE-reading method와 유사한 신뢰도를 보여주었다.

참고문헌

1. Wagner, R.R.: *Virology*, **13**, 323-337 (1961)
2. Sellers, R.F.: *Brit. J. Exp. Path.*, **43**, 674-683 (1962)
3. Stewart, R.B., S.S. Gandhi : *Can. J. Microbiol.*, **13**, 1421-1425 (1967)
4. Finter, N.B.: *J. Gen. Virol.*, **5**, 419-427 (1967)
5. Baron, S., C.E. Buckler : *Science*, **141**, 1061-1063 (1963)
6. Finter, N.B.: *J. Gen. Virol.*, **1**, 395-397 (1967)
7. Ho, M., J.F. Enders : *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **45**, 385-389 (1959)
8. Billiau, A., C.E. Buckler : *Symp. Ser. Immunobiol. Stand* (Karger, Basel) **14**, 37-40 (1970)
9. Allen, P.T., D.J. Giron : *Appl. Microbiol.*, **20**, 317-322 (1970)
10. McWilliams, M., M.S., Finkelstein, P.T., Allen, D.J. Giron : *Applied Microbiol.*, **21**, 959-961 (1971)
11. Aboud, M., O., Weiss, S. Salzberg : *Infect. Immun.*, **13**, 1626-1630 (1976)
12. Boxaca, M., K. Paucker : *J. Immunol.*, **98**, 1130-1135 (1967)
13. Adams, A., H., Strander, K. Cantell : *J. Gen. Virol.*, **28**, 207-214 (1975)
14. Sueltenfuss, E.A., M. Pollard : *Science*, **139**, 595-596 (1963)
15. Porterfield, J.S.: *The Lancet*, **7098**, 326-327 (1959)
16. Paucker, K.: *J. Immunol.*, **94**, 371-378 (1965)
17. 김현수, 정현도, 공운영, 배종찬, 유주현, 이원영 : 대한바이러스학회지, **14**, 35-41 (1984)
18. 引地-昌等 : *SRL Report*, **6**, 28-32 (1982)