

## *in situ* ELISA를 이용한 사람세포거대바이러스의 측정법 개발

서울대학교 의과대학 미생물학교실 및 서울대학교 의학연구원 감염병연구소  
황응수\* · 김진희 · 박정규 · 차창룡

=Abstract=

### Establishment of Measurement of Human Cytomegalovirus with *in situ* ELISA

Eung-Soo Hwang\*, Jinhee Kim, Chung-Gyu Park and Chang-Yong Cha

Department of Microbiology, Seoul National University College of Medicine,  
and Institute of Endemic Diseases, Seoul National University Medical Research Center,  
Seoul 110-799, Republic of Korea

Infection with human cytomegalovirus (HCMV) is of considerable clinical relevance after placental transmission and in immunosuppressed patients such as transplant recipients or patients with AIDS. The rapid detection method of HCMV has been required to overcome the time-consuming methods such as classical plaque assay or other immunological methods. This study was performed to establish the *in situ* ELISA, in which human lung fibroblasts infected with HCMV were fixed and used directly as antigen in 96 well culture plate. Expressed HCMV antigens were detected with HCMV-specific monoclonal antibodies. This method could detect HCMV dose-dependently upto  $3 \times 10^2$  pfu/ml. Antiviral activity of ganciclovir could be assayed within the known range of effective dose. This result showed that HCMV could be quantitated by *in situ* ELISA. The chemical, which was selected on the basis of component analysis in natural product, was tested to have the anti-HCMV activity by *in situ* ELISA, and three among five samples were found to have anti-HCMV activity with the dose-dependent manner. Conclusively *in situ* ELISA could be useful method for quantitation of HCMV and screening antiviral activity of samples to HCMV.

**Key Words:** Human cytomegalovirus, *in situ* ELISA, Antiviral agent

## 서 론

사람세포거대바이러스 감염증은 면역기능이 저하된 후천성면역결핍증 환자나 장기이식 후 환자에게 치명적 질병을 유발시키며, 정상 건강인에서도 바이러스 재활성 등으로 세포내 침투

후 세포주기의 혼란을 일으켜서 질병을 유발하고 있는 것이 밝혀짐에 따라 그 임상적인 중요성이 증대되고 있다 (6,9,14,15). 그러나 이에 대처할 연구가 미흡한 실정이다. 이것은 바이러스의 특성상 바이러스를 배양할 수 있는 세포의 범위가 한정되어 있고, 바이러스 증식도 매우 느리며 바이러스 유전자의 구성도 상당히 복잡하여 그 특성

접수: 2000년 3월 30일, 논문게재확정: 2000년 6월 27일

\*책임저자: 황응수, 110-799, 서울시 종로구 연건동 28, 서울대학교 의과대학 미생물학교실  
TEL: (02) 740-8307, FAX: (02) 743-0881, e-mail: hesss@plaza.snu.ac.kr

을 밝히기 어려운 것이 일부 이유가 될 것이다.

사람세포거대바이러스의 역가를 측정하는 방법으로 플라크 측정법이 가장 대표적인 것이나 측정하는데 걸리는 시간이 길며 관찰하는데 어려움이 크다. 이와같은 단점을 극복하기 위하여 특이항체를 이용하여 형광항체법 (1), immunoperoxidase법 (2) 등이 개발되어 사용되었다. 또 특이한 서열의 유전자를 이용하여 바이러스의 존재와 양을 측정하는 법이 개발되기도 하였다 (5,7, 17,20). 그러나 이러한 방법들도 많은 양의 샘플을 동시에 처리하기 힘들고, 정량하기 어려운 단점이 있다.

본 연구에서는 대량으로 신속하게 항바이러스 활성을 검색하기 위한 방법의 하나로써 사람세포거대바이러스에 대한 단세포균향체를 사용하여 바이러스가 감염된 세포를 신속히 검색할 수 있는 *in situ* ELISA법을 확립하여 항바이러스 활성을 검색법으로 사용할 수 있는지를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 및 바이러스

바이러스 배양을 위한 숙주세포로는 초대배양한 사람 태아 폐섬유아세포 (human fetal lung fibroblast: FLF)를 사용하였다. 바이러스주는 사람세포거대바이러스 Towne주 (ATCC VR-977)를 사용하였다.

### 2. Chemicals, 효소, 항체, 배지, 혈청 및 배양 용기

세포배양을 위한 배지와 우태아혈청은 Gibco/BRL사 (Gaithersburg, MD)의 제품을 사용하였고 배양용기 및 기구는 Falcon사 (Lincoln Park, NJ)의 제품을 사용하였다. 기타 다른 시약들과 면역염색 시 사용되는 peroxidase-conjugated goat-antimouse IgG는 Sigma사 (St. Louis, MD)의 제품을 사용하였다. Ganciclovir는 Roche Pharmaceutical Co.의 주사 제품 (Cymevene<sup>®</sup>)을 사용하였다. 항사람세포거대바이러스 활성을 검색하기 위하여 천연물 추출액 중에 활성인자로 밝혀진 것을 선택하여 순수한 chemical (C1, C2, C3, C4, C5)을 구입하여 사용하였으며 각 chemical은 dimethylsulfoxide에 녹여 배지에 반응 최종농도가 25 µg/ml 되게 조정하여 2배 계단희석하여 사용하였다.

### 3. 단세포균향체

사람세포거대바이러스의 ppUL44에 특이하게 반응하는 SCMVM34 (10)와 MCMVA (4) 계열 중 gB 당단백에 특이하게 반응하는 잠중세포주, 즉 MCMVA 98과 MCMVA 135를 선택하여 사용하였다. MCMVA 135는 D2b domain에 반응하는 단세포균향체로 중화능을 갖고 있고, MCMVA 98은 D3 domain에 반응하는 단세포균향체이다 (8).

### 4. *in situ* ELISA

96-well 배양판에 숙주세포인 FLF를  $10^5$  cells/well씩 분주하여 단층배양시킨 후 2배 계단희석한 사람세포거대바이러스를 접종하였다. 37°C 배양기에서 1시간 반응시켜 바이러스를 숙주세포에 부착시키고 배지로 세척한 후 일주일간 배양하였다. 대조군으로는 바이러스액 대신 배지를 첨가하였다. 항바이러스물질로서 ganciclovir는 배지에 희석하여 최종농도가 1.25 mg/ml 되게 조정하여 2배 계단희석하여 각 well에 농도별로 바이러스를 흡착시킨 후에 50 µl씩 첨가하였다. 화학물질 중에서 사람세포거대바이러스의 증식을 억제하는 것이 있는가를 검색하기 위하여 최종농도가  $2.5 \times 10^3$  pfu/ml이 되게 50 µl씩 감염시키고 chemical을 25.0 µg/ml부터 2배 계단희석하여 50 µl씩 첨가하고 일주일간 배양하였다. 배양이 끝난 96-well 배양판을 인산완충식염수로 세척한 후 2% paraformaldehyde 액을 well당 100 µl씩 넣어 실온에서 10분간 반응시켰다. 인산완충식염수로 세척하고 0.5% NP40 용액을 100 µl씩 넣어 5분간 반응시키고 세척하였다. 2% skim milk가 함유된 인산완충식염수로 1시간 반응시켜 blocking한 후 단세포균향체 SCMVM34, MCMVA 98과 MCMVA 135를 동량씩 섞은 cocktail을 50 µl씩 넣어 1시간 반응시켰다. 인산완충식염수로 3회 세척 후 2% skim milk가 함유된 인산완충식염수에 1:1,000으로 희석한 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG 50 µl를 1시간 반응시켰다. 다시 인산완충식염수로 3회 세척한 후에 peroxidase의 기질용액 (ortho-phenylenediamine과 hydrogen peroxidase) 50 µl를 넣어주고 실온에서 10분간 반응시켜 발색시켰다. 2 M 황산용액 50 µl를 첨가하여 효소반응을 정지시킨 후 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 희석액에 대한 반응은 2 well씩 시행하였고, 적어도 3번 시행하였다.

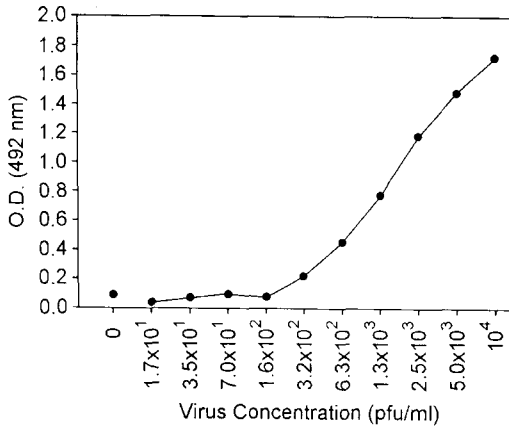


Figure 1. Titration curve of HCMV by *in situ* ELISA.

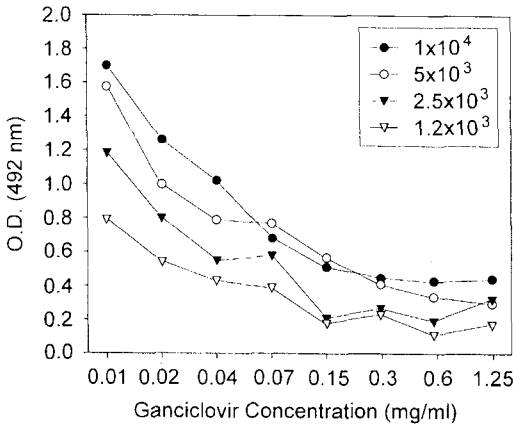


Figure 2. Titration curve of antiviral activity of ganciclovir depending on HCMV concentration.

### 5. 바이러스 역가 측정

바이러스의 역가 측정은 플라크 측정법을 사용하였다 (2). 즉, 24-well 배양판에 섬유아세포를 배양하여 각 well의 90% 정도를 덮었을 때 배지를 제거한 후 냉동보관중이던 바이러스를 꺼내 해동시켜 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM: Gibco/BRL, Gaithersburg, MD)으로 10배 계단희석하여 200  $\mu$ l씩 접종하였다. 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 1시간 반응시켜 바이러스를 숙주세포에 부착시키고 인산완충식염수로 세척한 후 2% 우태아혈청 및 0.8% gum tragacanth가 함유된 반고형의 중첩배지를 well당 1 ml씩 넣어 14일간 배양하였다. 배양 14일째 배지를 제거한 후 0.002%의 neutral red

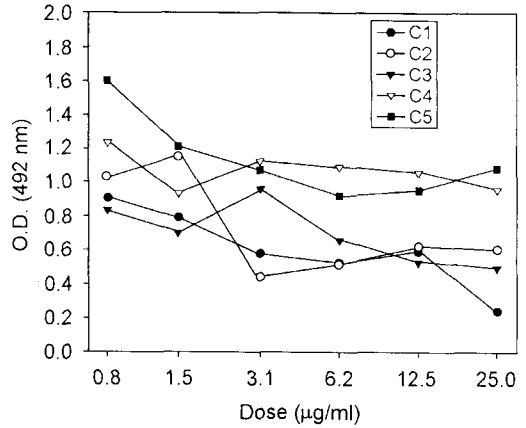


Figure 3. Screening of anti-HCMV activity with active component deduced from natural products with *in situ* ELISA.

가 함유된 중첩배지를 well당 1 ml씩 넣어 18시간 배양하여 생존세포를 염색하였다. 배지를 제거하고 인산완충식염수로 세척한 후 0.1%의 formalin이 함유된 인산완충식염수로 5분간 고정하였다. 건조시킨 후  $\times 40$ 의 현미경 시야에서 염색되지 않은 플라크의 수를 세어 바이러스 역가를 산정하였다.

## 결 과

### 1. *in situ* ELISA 확립

사람세포거대바이러스 감염량에 따라 발현되는 항원에 의해 나타나는 반응을 결정하기 위하여 감염량을 2배 계단희석하여 96-well 배양판에 배양된 섬유아세포에 감염시키고 일주일 후에 ELISA를 시행하였다. Figure 1에 나타난 바와 같이 배지만 넣은 대조군에서는 0.1을 나타냈다. 바이러스를 접종시킨 경우에는 감염량에 따라 나타나는 반응이  $3 \times 10^2$  pfu/ml 이상에서는 직선적으로 증가하였으나  $1.5 \times 10^2$  pfu/ml 이하에서는 감염시키지 않은 음성대조와 비슷한 정도의 반응을 보였다.

### 2. *in situ* ELISA를 이용한 바이러스 증식억제제 검색

사람세포거대바이러스의 증식을 억제하는 것으로 알려진 ganciclovir에 의해 사람세포거대바이러스의 증식 및 항원 발현이 억제되는 것을 *in situ* ELISA로 검색할 수 있는가를 보았다. Figure

2에 나타난 바와 같이 전체적으로 ganciclovir의 농도가 증가함에 따라 반비례하여 발현되는 바이러스 항원의 양이 감소함을 나타내고 있다. 그러나 사람세포거대바이러스의 양이  $5 \times 10^3$  pfu/ml 이상의 경우에는 ganciclovir의 양이 1.25 mg/ml이 되어도 흡광도가 background까지 감소되지 않았다.  $2.5 \times 10^3$  pfu/ml 이하에서는 ganciclovir의 양이 증가함에 따라 반비례하여 흡광도가 감소되었고, 0.15 mg/ml 이상에서는 background까지 감소되었다. 바이러스 양이  $2.5 \times 10^3$  pfu/ml 이하인 경우  $ED_{50}$ 은 40  $\mu$ g/ml이었다.

다섯 종류의 chemical을 25.0  $\mu$ g/ml부터 2배 계단희석하여 첨가하고 5일 후에 *in situ* ELISA를 시행한 결과를 Figure 3에 나타내었다. C4와 C5는 25  $\mu$ g/ml까지 흡광도가 전혀 감소하지 않았다. C2와 C3의 경우에는 chemical의 농도가 증가함에 따라 흡광도가 다소 감소하였으나 background까지는 감소하지 않았다. C1의 경우에는 최고농도에서 background에 근접하는 흡광도를 보였다.

## 고 찰

바이러스의 증식이 느리거나 바이러스의 증식 유무를 플라크 형성으로 판정하기 어려운 varicella-zoster virus나 influenza virus의 경우에 증식 유무의 판정을 위하여나 항바이러스제의 효능검정을 위해 *in situ* ELISA법이 개발되어 사용되어 왔다 (3,16). 바이러스의 증식이 빠르고 플라크도 잘 형성하는 herpes simplex virus의 경우에도 항바이러스제의 검색 또는 활성을 측정하기 위하여 개발되어 사용되었다 (12,13,18,19). 바이러스의 증식이 느려 플라크 형성이 느린 사람세포거대바이러스의 경우 플라크 측정법으로 바이러스를 정량하는 것은 시간이 많이 걸려서 항바이러스제 등을 검색할 때 사용하는 데는 어려운 점이 많았다. 이 연구에서 Figure 1에 나타난 바와 같이  $3 \times 10^2$  pfu/ml까지 측정할 수 있는 방법을 확립하였다. 플라크 측정법으로 정량하려면 적어도 2주일이 걸리므로 시간적으로 많은 이득이 있다. 다만 플라크 갯수로 나타낼 수 없기 때문에 절대적인 바이러스 양의 계산은 어려운 단점이 있다. 항바이러스 활성의 양성대조로는 사람세포거대바이러스에 대한 항바이러스 활성이 잘 알려진 ganciclovir를 사용하였다. *In situ* ELISA법에서도 ganciclovir는 dose-dependent한 항바이러스 활성을

보였으며 흡광도를 50% 감소시키는 농도 ( $ED_{50}$ )는 약 40  $\mu$ g/ml 정도로 기존에 보고된 것과 유사한 결과를 보여 *in situ* ELISA법의 신뢰도를 확인할 수 있었다 (Figure 2) (11). 또한 기존의 플라크 감소측정법은 *in situ* ELISA법에 비해 시간과 노력이 더 드는 것 외에도 측정하는 플라크의 수를 2배 또는 10배 단위로 판독하는데 비해 *in situ* ELISA법에서는 매우 적은 바이러스 역가의 감소도 측정할 수 있기 때문에 항바이러스 활성의 검색에 매우 유용하다고 사료되었다. Figure 3에 나타난 것과 같이 특정 성분이 항바이러스 활성을 갖고 있는가를 검색할 때 정확한 효능을 나타내는 농도 등을 결정할 수는 없었지만 항바이러스 활성을 갖고 있는 경향을 확인할 수 있었다. 특히 숙주세포와 무관하게 항바이러스 활성만을 나타내는 선택적 독성을 가지는 물질을 검색해야 한다는 점에 있어서는 플라크 측정법이나 다른 면역검색법으로 측정할 수 없는 세포의 생존 유무를 MTT 측정법 등 간단한 방법을 병행함으로써 짧은 시간에 효능을 판별할 수 있는 장점도 갖고 있다. 이번 실험에 사용된 chemical들은 MTT 측정법에서 세포독성이 거의 없는 것으로 나타났다 (Data not shown). 그러나 처음 넣어준 세포수와 세포배양 상태가 다를 수 있고 세포고정 후 반응 과정에서 세포의 탈락이 있을 수 있어 최종 반응 후에 나타나는 흡광도는 하나의 고정된 값을 나타내지 못하는 단점이 있었다.

결론적으로 본 연구에서 확립한 *in situ* ELISA법은 사람세포거대바이러스의 절대량의 측정에는 오차가 존재할 수 있으나 바이러스의 존재 유무나 표준량과 비교한 경우에는 바이러스 정량에도 사용 가능할 것이며, 더 나아가 많은 수의 시료에서 항바이러스제의 활성을 단시간에 검색할 수 있는 방법으로 사용할 수 있을 것이다.

### 감사의 글

이 연구는 일부 1998년도 서울대학교 간연구소의 보조와 일부 차세대정밀화학사업 (한국과학기술연구원) 위탁연구로 수행되었음. 기술적인 도움을 많이 준 이혜승, 고민경씨에게 감사한다.

## 참 고 문 헌

- 1) 국윤호, 황응수, 박정규, 최성배, 차창룡: 단세포균항체를 사용한 간접면역 형광항체 염색법에 의한 세포배양에서의 신속한 인형거

- 대세포바이러스 탐지법 개발. *J Kor Soc Microbiol* **25**: 433-443, 1990.
- 2) 황응수, 황도영, 박정규, 국운호, 최성배, 차창룡: 과산화수소 결합 단세포균향체를 이용한 세포배양에서의 인형거대세포바이러스 (HCMV, AD-169) 항원의 신속한 탐지. *J Kor Soc Microbiol* **25**: 423-432, 1990.
  - 3) Berkowitz FE, Levin MJ: Use of an enzyme-linked immunosorbent assay performed directly on fixed infected cell monolayers for evaluating drugs against varicella-zoster virus. *Antimicrob Agents Chemother* **28**: 207-210, 1985.
  - 4) Cha CY, Hwang ES: Production and characterization of monoclonal antibodies reactive with human cytomegalovirus. *J Kor Soc Microbiol* **23**: 495-504, 1988.
  - 5) Donovan RM, Cohen SH, Peterson WR, Bolton V, Jordan GW, Carlson JR, Vanden Brink KM, Goldstein E, Bush C: *In situ* detection of human immunodeficiency virus (HIV) nucleic acid in H9 cells using nonradioactive DNA probes and an image cytophotometry system. *J Histochem Cytochem* **36**: 1573-1577, 1988.
  - 6) Fiala M, Payne JE, Berne TV, Moore TC, Henle W, Montgomerie JZ, Chatterjee SN: Epidemiology of cytomegalovirus infection after transplantation and immunosuppression. *J Infect Dis* **132**: 421-433, 1975.
  - 7) Furuta Y, Shinohara T, Sano K, Meguro M, Nagashima K: *In situ* hybridisation with digoxigenin-labelled DNA probes for detection of viral genomes. *J Clin Pathol* **43**: 806-809, 1990.
  - 8) Hwang ES, Lim DG, Park JW, Park CG, Kook YH, Cha CY: Eukaryotic expression of the major antigenic determinants evoking neutralizing antibodies in human cytomegalovirus (HCMV) isolated in Korea. *J Kor Soc Microbiol* **32**: 315-323, 1997.
  - 9) Jacobson MA, Mills J: Serious cytomegalovirus disease in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Ann Intern Med* **108**: 585-594, 1988.
  - 10) Jong HS, Park JG, Hwang ES, Seoh JY, Lim DG, Park JW, Kook YH, Cha CY: Characterization of intranuclear protein in human cytomegalovirus infected cells by HCMV specific monoclonal antibodies. *J Kor Soc Microbiol* **31**: 581-589, 1996.
  - 11) Kesson AM, Zeng F, Cunningham AL, Rawlinson WD: The use of flow cytometry to detect antiviral resistance in human cytomegalovirus. *J Virol Methods* **71**: 177-186, 1998.
  - 12) Leahy BJ, Christiansen KJ, Shellam G: Standardisation of a microplate *in situ* ELISA (MISE-test) for the susceptibility testing of herpes simplex virus to acyclovir. *J Virol Methods* **48**: 93-108, 1994.
  - 13) Leahy BJ, Christiansen KJ, Collins P: A blinded comparison of two methods of viral susceptibility testing: plaque reduction assay versus microplate *in situ* ELISA. *J Virol Methods* **56**: 85-90, 1996.
  - 14) Light JA, Burke DS: Association of cytomegalovirus (CMV) infections with increased recipient mortality following transplantation. *Transplant Proceed* **11**: 79-82, 1979.
  - 15) Meyers JD, Spencer HC, Watts JC, Gregg MB, Stewart JA, Troupin RH, Thomas ED: Cytomegalovirus pneumonia after human marrow transplantation. *Ann Intern Med* **82**: 181-188, 1975.
  - 16) Myc A, Anderson MJ, Baker JR Jr: Optimization of *in situ* cellular ELISA performed on influenza A virus-infected monolayers for screening of antiviral agents. *J Virol Methods* **77**: 165-177, 1999.
  - 17) Nielsen OL, Handberg KJ, Jorgensen PH: *In situ* hybridization for the detection of infectious laryngotracheitis virus in sections of trachea from experimentally infected chickens. *Acta Vet Scand* **39**: 415-421, 1998.
  - 18) Rabalais GP, Levin MJ, Berkowitz FE: Rapid herpes simplex virus susceptibility testing using an enzyme-linked immunosorbent assay performed *in situ* on fixed virus-infected monolayers. *Antimicrob Agents Chemother* **31**: 946-948, 1987.
  - 19) Safrin S, Palacios E, Leahy BJ: Comparative evaluation of microplate enzyme-linked immunosorbent assay versus plaque reduction assay for antiviral susceptibility testing of herpes simplex

황응수 등: *in situ* ELISA에 의한 HCMV 측정

virus isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 1017-1019, 1996.

- 20) Stockl E, Popow-Kraupp T, Heinz FX, Muhlbacher F, Balcke P, Kunz C: Potential of *in*

*situ* hybridization for early diagnosis of productive cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* **26**: 2536-2540, 1988.

---