

수두바이러스의 정량에 있어서 Solid-overlay Standard Plaque Assay와 Immunofocus Assay의 효용성 비교 연구

경희대학교 문리과대학 생물학과 분자바이러스학 연구실

이 화 경 · 정 용 석*

=Abstract=

Comparative Study of the Standard Plaque Assay with Solid-overlay and Immunofocus Assay for Varicella-zoster Virus Titration

Hwa Kyung Lee and Yong Seok Jeong*

Molecular Virology Laboratory, Department of Biology, College of Liberal Arts and Sciences, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Standard plaque assay using agarose-overlay has long been used for titration of many infectious virus particle. Plaque assay for the titration of varicella-zoster virus and its live vaccine requires three intermittent agarose overlay to visualize plaques. Overall procedure of the assay takes at least nine days from virus inoculation and microbe contamination including fungi is frequently accompanied during incubation period. We studied whether an immunofocus assay in conjunction with peroxidase-mediated immunohistochemical reaction may replace the standard plaque assay for the virus titration by comparing the two methods. A linear relationship was observed between number of foci and virus dilution. The number of foci in a given dilution of virus appeared a little higher than counted plaques formed in standard plaque assay. Independent titration results obtained from two assay methods for a given dilution of virus demonstrated a strong correlation ($r^2=0.99$). Foci of virus infected cells as revealed by the enzyme reaction could be counted either 4 days post-infection (p.i.) under low magnification (40X) microscopy, or 6 days p.i. by naked eye observation. Larger size of cell culture plate, virus adsorption at 35°C, and 10% FBS in diluent appeared to be better conditions for the assay. Immunofocus assay will be an effective and dependable titration method for varicella-zoster virus and its live vaccine in place of the standard plaque assay in respect to accuracy, costs, and experimental convenience.

Key Words: Varicella-zoster virus, Immunofocus assay, Plaque assay, Titration

서 론

수두 감염의 예방 접종에 사용되는 약독화 수두바이러스 (Varicella-Zoster virus: VZV) 백신 제

의 역가 검정법에는 반고형의 한천을 2~3회 덧씌우고 적어도 8~10일의 장기배양 후 형성된 plaque의 수를 세어 plaque-forming unit (pfu)로서 바이러스 titer를 나타내는 solid-overlay plaque assay가 오랫동안 표준형으로 사용되어 왔다 [4,7~9,11].

접수 : 2000년 3월 27일, 논문게재확정 : 2000년 5월 8일

* 책임저자: 정용석, 130-701, 서울시 동대문구 회기동 1번지, 경희대학교 문리과대학 생물학과
전화: (02) 961-0829, Fax: (02) 961-0244, E-mail: ysjeong@nms.kyunghee.ac.kr

Plaque assay는 수두바이러스를 포함한 대부분 바이러스의 감염성 입자 수를 밝히는데 사용되어 왔으며 바이러스 연구에 필요한 일반적인 실험 조건 이외의 특별한 기자재 등이 요구되지 않는다는 점과 육안만으로도 관측이 불가능한 바이러스 입자를 현미경의 도움 없이 셀 수 있다는 등의 장점들이 효용성의 기반을 이루고 있다. 그러나 수두바이러스를 배양세포에서 감염시킬 경우 세포 내에서 복제된 대부분의 바이러스 입자들은 세포로부터 유리되지 않은 상태로 남아 있음이 보고되어 왔으며 [1~3,5,10] 그나마 세포로부터 방출된 일부 바이러스 입자들도 대부분이 감염력을 상실한 비감염성 입자임이 밝혀진 바 있다 [7~9,11]. 이러한 연구 결과는 기존의 수두바이러스 plaque assay가 갖는 시험과정상의 단점을 보완할 수 있는 새로운 방법론을 요구하고 있으며 특히 백신역가 검정과 같이 다량의 검체가 대상이 될 때에는 새 검정법의 신뢰도 및 효용성 검증이 중요하다.

Takayama 등 [11]은 한천을 덧씌우지 않고 액체 배지상의 배양 후, 감염 3일째부터 숙주세포의 형태변화를 현미경 관찰을 통해 확인, 감염성 바이러스 입자 수를 focus-forming unit (ffu)로 환산하였다. 이 방법론에서는 plaque assay에서 필요한 한천 증층을 덧씌우는 제 과정이 생략되고 시험기간도 5~7일 정도 단축되어 상당한 경비와 시험기간이 절감될 수 있다. 더욱이 감염세포의 배양기간 단축은 장기간의 배양에 높은 빈도로 수반되는 진균류의 오염 가능성도 최소화한다. 그러나 infection focus를 현미경 관찰로 확인해야 하는 경우 작업 수행이 원활하지 못하고 검사자의 주관적 판단에 따른 titer의 변이 폭이 상대적으로 커질 수밖에 없어 다량의 검체 검정을 위한 객관적 신뢰도가 문제로 남는다. 한편, infection focus 확인의 수월성을 높이기 위해 Hayakawa 등 [6]은 methylene-blue 염색을 이용하여 현미경으로 관찰, 비교적 수월하게 infection focus를 확인할 수 있었으나 현미경 관찰 작업에 따르는 문제점은 그대로 남았다. Schmidtmayerova 등 [8]은 수두바이러스 특이항체 또는 항혈청을 반응시키고 과산화효소가 접합된 2차 항체를 추가 반응시켜 효소발색 반응을 육안으로 관찰하였다. 이 경우, 수두바이러스에 감염된 세포를 감염원으로 하여 새로운 배양세포를 감염시킬 때에는 감염 후 48시간만에, 그리고 세포유리 바이러스를 흡착 감염할 때

에는 감염 후 72시간만에 infection focus를 확인할 수 있었다. 1992년 Seoh 등 [9]은 Vero 세포를 이용, Gum tragacanth 증층을 이용한 plaque assay와 효소발색을 이용한 immunoenzyme plaque (IEP) assay를 비교하고 IEP assay 및 plaque assay에 의해 도출된 각 결과 사이에 선형의 상관관계가 나타나고 있음을 제시하였다. 한편, 우 [4] 등은 Hayakawa 등의 방법을 기본으로 바이러스 감염 후 methylene-blue 염색을 이용하여 감염성 바이러스 입자 수를 확인하는 plaque assay에 의한 검정 효율성을 분석하고 사용 세포의 수, 세포의 배양시간, 바이러스 흡착시간 등의 실험조건을 설정하여 검정조건 최적화를 시도하였다 [4].

현재 국내 수두바이러스 약독화 백신역가의 국가검정에는 한천 증층을 3차에 걸쳐 덧씌우는 표준형 plaque assay (이하 Standard Plaque Assay: SPA)를 기준시험법으로 설정하여 사용하고 있다. 기타 연구실에서는 앞서 기술한 몇 가지의 새로운 방법론들이 복합적으로 사용되고 있어 역가 검정 기준에 대한 혼란이 있으므로 대량 검정의 경제성과 수월성을 제고한 기준 검정법의 개선 및 이에 따른 표준화가 시급하다. 따라서 본 연구에서는 SPA와 과산화효소 발색을 이용한 immunofocus assay (IFA)를 비교하여 시험과정의 수월성과 비용의 효율성을 제고하였다. IFA의 검정 방법론 표준화에는 현재 SPA에서 사용하는 제 조건을 기준으로 MRC-5 세포주를 사용하고 세포 수, 바이러스 희석액의 조성, 바이러스 흡착온도 및 immunofocus 형성과 관찰시점 등을 매개변수로 설정하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 세포주

검체 바이러스는 식품의약품안전청에서 제공된 수두바이러스 약독화 백신을 사용하였다. 분말 상태의 검체는 0.7 ml 희석액 (10% FBS, 5% sucrose with D-sorbitol, 0.1% sodium glutamate in PBS, pH 7.2)을 가해 완전히 용해시킨 다음 1/10, 1/30, 1/60 및 1/100 등의 비율로 희석하여 접종에 사용하였다. 희석비율과 방법은 SPA에서의 희석과정을 따랐다. 숙주 세포주로는 현재 SPA에서 사용하는 MRC-5를 식품의약품안전청으로부터 분양받아 사용하였으며 바이러스 접종시에는 30계대 이내의 세포를 사용하였다. 세포배양에는 0.22% NaHCO₃,

5~10% FBS, 1 mM sodium pyruvate, 1% penicillin/streptomycin 등으로 보정된 EMEM을 배양액체배지로 사용하였으며 각 시약은 Gibco (USA)와 Sigma (USA)에서 구입하였다.

2. SPA (Standard Plaque Assay)

SPA에 의한 역가산출은 현재 사용중인 국가검정 표준법을 기준으로 하였으며 그 실험과정은 다음과 같다. T25 플라스크에 키운 MRC-5 세포를 trypsin으로 처리하고 최종 2×10^5 cells/ml이 되도록 배양용 액체배지로 희석하였다. 세포배양용 35 mm 또는 60 mm plate에 세포부유물을 각 plate 당 3 ml을 가하고 5% CO₂가 공급되는 37°C 세포배양기에서 3~4일간 배양하였다. 바이러스 접종시에는 세포배양 상층액을 흡입하여 제거한 후 plate 당 2 ml PBS (37°C)로 세척하고 단계적으로 희석된 바이러스 용액을 각 plate 당 200 µl 씩 접종하여 5% CO₂가 공급된 37°C 세포배양기에서 배양하였다. 흡착시간은 90분으로 하고 매 15분 간격으로 plate rocking을 수행하였다. 바이러스 흡착 후, 1.6% (w/v) agarose (Polyscience Inc. #17213-100, USA), NaHCO₃ (7.5%, Gibco, Sigma, USA), 20% FBS (Gibco, USA) 및 penicillin/streptomycin (Gibco, Sigma, USA)이 첨가된 M-199 배지(GibcoBRL #11157-021, USA) 3 ml을 세포단층에 덧씌우고 흡착 후 5일 및 7일째에 각각 1.5 ml의 동일한 agarose M-199 배지를 모두 3차에 걸쳐 덧씌웠다. 단 3차에 덧씌우는 agarose M-199 배지에는 0.0012%의 neutral red를 포함하였다. 바이러스 접종 후 9일째 형성된 plaque의 수를 세어 각 plate에서 계산된 수의 평균치를 얻은 다음 바이러스 용액 1.0 ml 당 pfu (pfu/ml)를 계산하였다. 따라서 바이러스 용액의 pfu/ml은 평균 plaque 수/plate × 검체희석배수 × 5로 계산되었다.

3. IFA (Immunofocus Assay)

Schmidtmayerova 등 [8]의 과산화효소 발색을 이용한 IFA를 기준으로 하고 작업의 수월성을 높이기 위해 부분적인 수정을 가하였다. 세포배양용 24-well 또는 12-well plate에 well 당 $1 - 1.5 \times 10^5$ 정도의 MRC-5 세포를 가하여 3~4일간 정치배양하고 배양용 및 접종용 배지는 SPA와 동일한 배지들을 사용하였다. 바이러스 접종시에는 세포단층에 well 당 1 ml의 PBS를 가하여 가볍게 세척한 뒤 흡입제거한 다음, 단계적으로 희석된 검체 바

이러스 용액 100 µl/well을 가하여 세포에 접종하였다. 흡착시간은 90분으로 하고 매 15분 간격으로 plate rocking을 수행하였다. 바이러스 흡착이 끝난 후에는 5% FBS로 보정된 유지용 배지 (FBS 농도를 제외한 모든 조성은 배양용 배지와 동일) 1 ml을 각 well에 가하고 5% CO₂가 공급된 37°C 세포배양기에서 정치배양하였다. 바이러스 접종 후 4~8일째에 well 당 37°C의 PBS 1 ml을 가하여 간단히 세척하고 흡입제거하였다. 세척된 세포단층에 well 당 100% methanol 500 µl를 가하여 30분 동안 상온에서 고정한 다음 흡입제거하고 다시 PBS 1 ml을 가하여 가볍게 세척하였다. 1차 항체로는 PBS 용액 (0.05% Tween 20, 1% Bovine albumin serum, 0.02% sodium azide)에 일정 비율 (1:100, 1:250, 1:300)의 비율로 희석된 mouse anti-VZV IgG (Chemicon International, CA, USA)를 사용하였고 항체 적정량을 고정된 세포단층에 가하여 37°C에서 60분간 배양하였다. 1차 항원-항체 반응 후, 0.05% Tween 20이 포함된 1 ml PBS로 세척하여 잉여의 항체를 제거한 다음, peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (동일 희석액으로 1:500 희석)를 가하여 37°C에서 60분간 배양하였다. 2차 항원-항체 반응 후, 0.05% Tween 20이 포함된 PBS와 0.05 M Tris-HCl (pH 7.6) 용액으로 충분히 세척하여 잉여의 2차 항체를 제거하고 과산화효소의 기질용액 (0.6 mg/ml 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride in 0.05 M Tris-HCl containing 0.05% H₂O₂, pH 7.6)을 가하여 5~30분간 상온에서 발색하였다. 충분한 발색으로 immunofocus가 확인되면 세포단층을 1 ml 멸균 증류수로 1회 세척한 다음 상온에서 공기건조하여 접종 후 경과 일자에 따라서 40X 배율의 광학현미경으로 또는 육안으로 직접 관찰하였다. 바이러스 역가는 접종 후 4~8일째 형성된 immunofocus의 수를 세어 각 well에서 계산된 수의 평균치를 얻은 다음 바이러스 용액 1.0 ml 당 focus-forming unit (pfu/ml)로 계산하였다. 따라서 바이러스 용액의 ffu/ml은 평균 immunofocus 수/well × 검체희석배수 × 10으로 계산되었다.

4. IFA 실험조건 표준화 실험

IFA 수행과정의 각 조건에 따라 수두바이러스 백신역가에 미치는 영향 여부를 확인하기 위한 매개변수 표준화 실험에서는 위의 실험과정에서 조건에 따른 역가의 변화가 유의하지 않은 것으로 확인된 세포 수 (12-well 및 24-well plate)와 바

Table 1. Titers of live-attenuated VZV by the Standard Plaque Assay

Trial No. ¹⁾	VZV titer (pfu ²⁾ /ml)				Mean	S.D. ³⁾
	Dilutions					
	1/10	1/30	1/60	1/100		
1st	3537	2925	3300	2875	3159	315
2nd	3283	2799	2899	2333	2954	224
3rd	5075	4500	5100	5500	5044	411

¹⁾ For the first and second trials, MRC-5 cells grown on 35 mm cell culture plates and for the third trial, the cells grown in 60 mm cell culture plates were used for VZV titration.

²⁾ pfu: plaque forming unit ³⁾ S.D.: Standard Deviation

Table 2. Titers of live-attenuated VZV by immunofocus assay

Trial No. ¹⁾	VZV titer (ffu ²⁾ /ml)				Mean	S.D. ³⁾
	Dilutions					
	1/10	1/30	1/60	1/100		
1st	3660	3500	3800	5300	4065	832
2nd	3500	3750	3300	3388	3388	317
3rd	5950	5700	6600	5813	5813	661

¹⁾ For the first and second trials, MRC-5 cells grown in 24-well cell culture plates and for the third trial, the cells grown in 12-well cell culture plates were used for VZV titration.

²⁾ ffu: focus forming unit ³⁾ S.D.: Standard Deviation

이러스 흡착시간 (90분, rocking/every 15 min) 및 immunofocus 형성, 발색 및 관찰을 위한 제 조건을 적용하고 숙주세포 (MRC-5)와 바이러스 희석 배수 (1/10, 1/30, 1/60 및 1/100)는 SPA의 조건을 따랐다.

(1) 바이러스 희석용액의 FBS 농도에 의한 영향

바이러스 희석용액의 FBS 농도가 실험과정 중 바이러스 안정성에 미치는 영향을 검사하기 위해 희석용액의 FBS 농도를 10%와 30%로 조성하여 각 희석용액으로 바이러스를 단계별로 희석한 후 24-well plate에 흡착접종하고 (37℃, 90분), 5% CO₂, 37℃에서 6일 동안 정치배양하였다.

(2) 바이러스 흡착온도에 따른 영향

숙주세포에 바이러스를 흡착, 감염시키는데 필요한 적정 흡착시간을 확인하기 위해 각 단계별로 희석된 (FBS 10% 희석용액) 바이러스 용액을 24-well plate에 접종하고 35℃와 37℃에서 각 90분간 흡착한 다음 5% CO₂, 37℃에서 6일 동안 정치배양하였다.

(3) 바이러스 접종 후 배양기간에 따른 영향

바이러스 접종 후 배양기간에 따라 immunofocus의 형성과 관찰 및 산출역가에 미치는 영향을 조사하기 위해 각 단계별로 희석된 (FBS 10% 희석용액) 바이러스 용액을 24-well plate에 흡착접종하고 (37℃, 90분), 5% CO₂, 37℃에서 정치배양하고 접종 후 4, 6, 8일째에 각각 immunofocus를 형성하고 관찰하였다.

결 과

1. SPA에 의한 바이러스시료의 산출역가

본 연구에서는 현재 국가검정의 방법론으로 적용되고 있는 SPA가 IFA로 대체될 수 있는지를 포함한 두 검정법의 효용성을 비교하기 위하여 우선 주어진 시험조건하에서 SPA에 의한 산출역가의 일관성을 확인하였다. SPA의 제 과정은 MRC-5 세포주를 포함, 현재 식품의약품안전청에서 설정하여 공식 검정에 적용하고 있는 기준 방법론

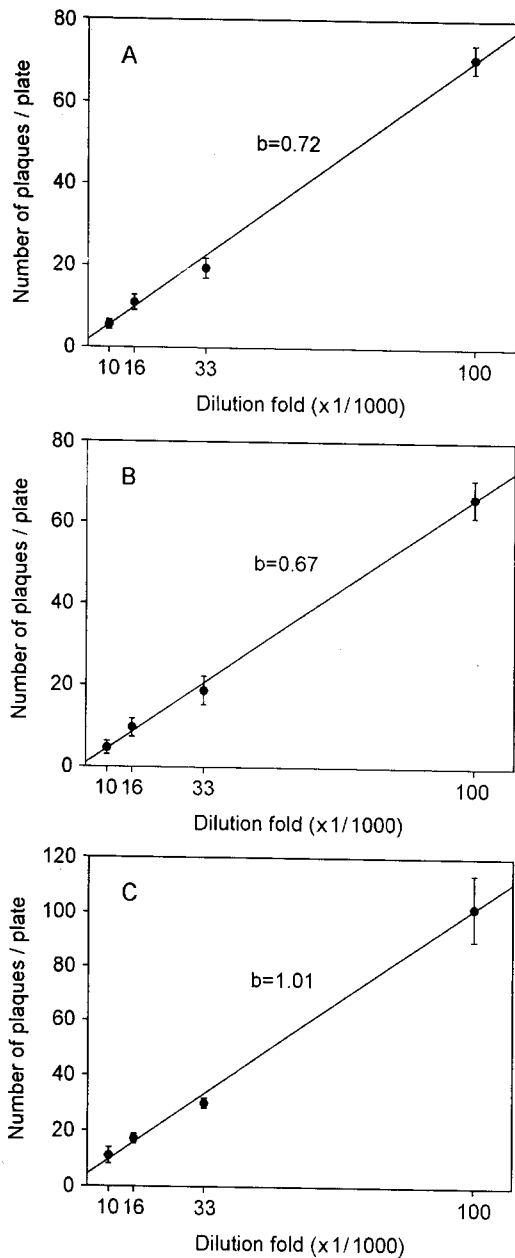


Figure 1. Relationship between VZV dilutions and number of plaques in SPA. Number of plaques was calculated from three independent experiments with triplicated plates for each dilution (mean \pm standard deviation). Two experiments (A-B) were performed in 35 mm tissue culture plate and one experiment was performed in 60 mm tissue culture plate (C). Abscissae: virus dilution fold; ordinates: number of plaques per plate.

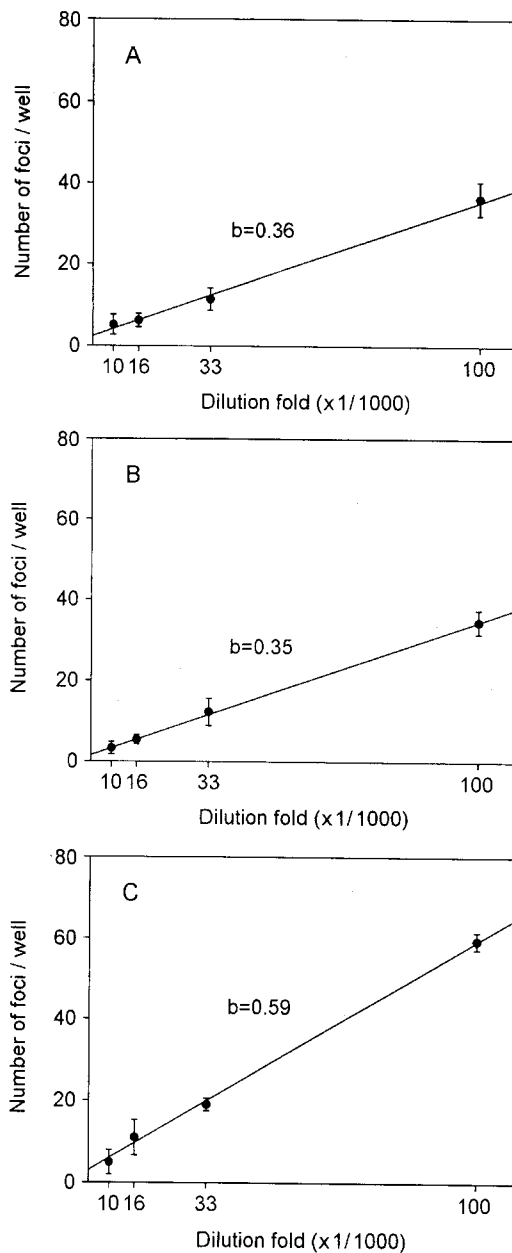


Figure 2. Relationship between VZV dilutions and numbers of foci in IFA. Number of foci was calculated from three independent experiments with triplicated wells for each dilution (mean \pm standard deviation). Two experiments (A-B) were performed in 24-well (8 mm in diameter) tissue culture plate and one experiment was performed in 12-well (16 mm in diameter) tissue culture plate (C). Abscissae: virus dilution fold; ordinates: number of foci per well.

에 따랐다. Plaque의 육안관찰은 3차 중층을 덧씌운 후 2일째 (접종 후 9일째)에 수행하였으며 산출된 역가는 Table 1에 정리하였다. 각 실험은 지정 배수의 희석 단계마다 3~4개씩 중복 접종하여 plaque의 평균치를 산출하였다. 세포배양용 35 mm plate를 사용한 경우, 3159 및 2954 pfu/ml의 역가와 60 mm plate를 사용한 경우, 5044 pfu/ml의

역가가 각각 산출되었다. 이 결과는 주어진 실험 조건에서 Standard Plaque Assay에 의한 바이러스 시료가 모두 백신역가 기준치 (1000 pfu/0.5 ml)를 상회하고 각 산출역가는 좁은 편차범위 내에서 일관성을 나타내고 있었다. 그러나 35 mm plate의 세포단층을 접종에 사용하는 것보다 60 mm plate를 사용하는 경우에 동일한 바이러스시료의 산출역가가 다소 증가된 것으로 나타났다.

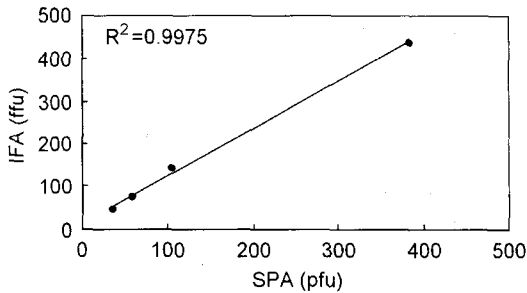


Figure 3. Correlation between the number of plaques resulted from SPA and that of foci resulted from IFA at each dilution fold.

Ordinate: the number of foci at 1/100, 1/60, 1/30, and 1/10. The numbers of foci represent the averaged focus counts of three independent experiment at each dilution. Abscissa: the number of plaques at 1/100, 1/60, 1/30, and 1/10. The numbers of plaques represent the averaged plaque counts of three independent experiment at each dilution.

2. SPA에서의 바이러스 희석배율과 형성 plaque 수의 상관관계

주어진 실험조건하에서 SPA를 수행할 경우 바이러스시료의 희석배율과 형성된 plaque 수와의 상관관계를 확인하기 위해 3회의 독립적 실험 결과를 그래프로 나타내었다 (Figure 1, A-C). 각 독립 실험 결과들은 plaque의 개수가 바이러스의 각 희석배율과 충실한 선형관계를 나타내고 있는 것으로 관찰되었다.

3. IFA에 의한 바이러스시료의 산출역가

IFA에 의한 바이러스시료의 역가 검정 효용성을 확인하기 위해 SPA에서 사용한 동일 바이러스시료의 희석용액 희분을 양분하여 IFA에 사용하였다. IFA의 제 과정은 Schmidtmayerova 등 [8]의 방법을 기준으로 하되 보다 효율적인 실험 수

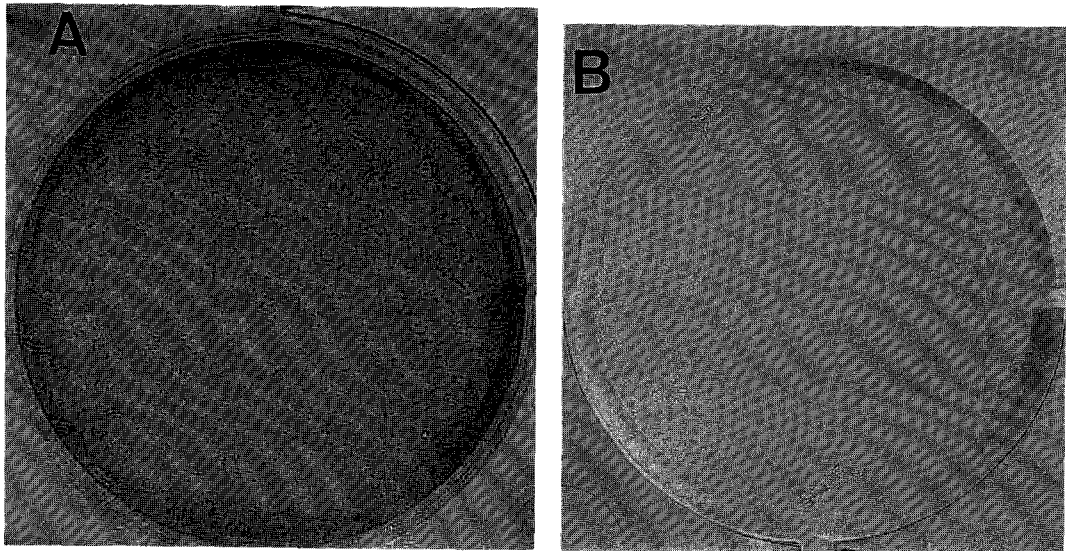


Figure 4. Plaques (A) and immunofoci (B) formed by SPA and IFA, respectively. Plaques were visualized by 0.0012% neutral red staining in agarose-containing M199 media for 4 days during 7~10 days p.i. Immunofoci were visualized by mouse anti-VZV IgG and peroxidase-conjugated anti-mouse IgG for 60 min at 6 days p.i.

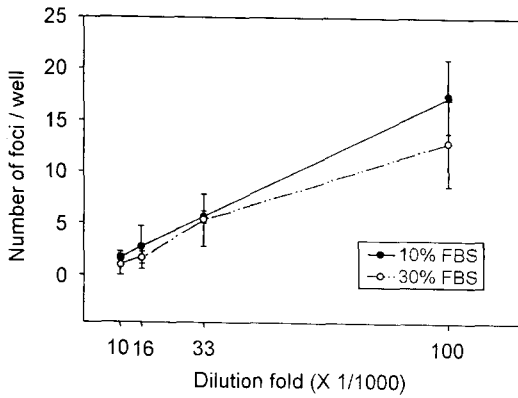


Figure 5. Effect of FBS concentration in diluent on immunofocus formation. Number of foci were calculated from three independent experiments with triplicated wells for each dilution (mean \pm standard deviation). Abscissae: virus dilution fold; ordinates: number of foci per well.

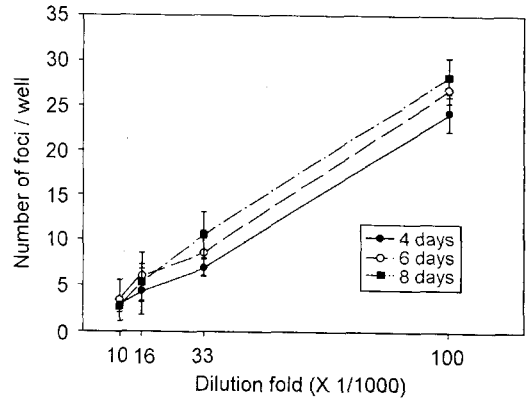


Figure 7. Effect of cell culture period after virus inoculation on foci observation. Number of foci were calculated from three independent experiments with triplicated wells for each dilution (mean \pm standard deviation). Abscissae: virus dilution fold; ordinates: number of foci per well.

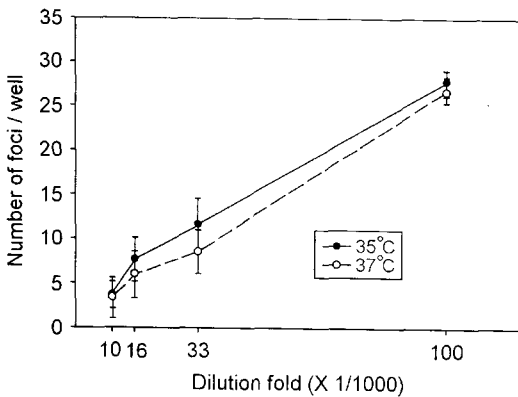


Figure 6. Effect of virus adsorption temperature on immunofocus formation. Number of foci were calculated from three independent experiments with triplicated wells for each dilution (mean \pm standard deviation). Abscissae: virus dilution fold; ordinates: number of foci per well.

행을 위해 부분적인 수정을 도입하였다 (재료 및 방법 참조). 세포주, 바이러스시료의 희석배율 및 바이러스 흡착시간 등은 SPA의 제조조건을 적용하였으며 각 독립 실험에 사용된 바이러스시료는 모두 서로 다른 vial에서 유래된 것이다. 각 실험은 지정 배수의 희석 단계마다 3~4개씩 중복 접종하여 immunofocus의 평균치를 산출하였고 3회의 독립 실험 결과를 Table 2에 정리하였다. Immunofocus의 관찰 및 개수 확인은 접종 후 4일째

와 5일째의 경우 40X 배율의 현미경 관찰로 가능하였으며 6일째 이후에는 7~8일째와 큰 차이 없이 조명상자 위에서 육안으로 판독하였다. 세포의 배양과 접종에 24-well plate를 사용한 경우, 4065 및 3388 ffu/ml의 역가와 12-well plate를 사용한 경우, 5813 ffu/ml의 역가가 각각 산출되었다. Immunofocus의 개수와 SPA의 plaque 개수가 모두 감염성 바이러스 입자 수를 나타낸다고 생각할 경우, 시험된 시료 모두 역가 기준치를 상회하고 각 산출역가는 좁은 편차범위 내에서 일관성을 나타내어 SPA에 의한 역가산출과 병립할 수 있음을 확인하였다. 그러나 동일 시료에서 IFA에 의한 산출역가는 SPA에 의한 것보다 15~28% 정도 높게 나타났으며 한편, SPA에서와 마찬가지로 IFA에서도 24-well plate에서 세포를 배양, 접종에 사용하는 것보다 12-well plate를 사용하는 경우에 동일한 바이러스시료의 산출역가가 다소 증가된 것으로 나타났다.

4. IFA에서의 바이러스 희석배율과 immunofocus 형성의 상관관계

장기간 높은 신뢰도를 바탕으로 한 SPA에 대한 IFA의 대체 여부는 역가산출의 일관성 외에 바이러스의 희석배율에 따른 immunofocus의 개수 사이에 선형의 상관관계가 성립되어야 한다. 따라서 3회의 독립 실험 결과를 바탕으로 바이러스 희석배율에 따른 immunofocus 개수를 비교하여

그래프로 나타내었다 (Figure 2, A-C). 바이러스 접종 후 6일째에 판독된 실험 결과들은 immunofocus의 개수가 바이러스의 회석배율에 따른 선형 관계를 나타내고 있음이 관찰되었다.

5. SPA와 IFA에 의한 산출역가 대비

SPA와 IFA에 의한 산출역가 사이에서 절대치의 편차에 관계없이 일관된 선형관계가 성립되는지 여부를 확인하기 위하여 각 3회의 대표 실험 결과를 적용하여 두 방법론의 상관관계를 그래프로 나타내었고 (Figure 3) 각 방법에 의해 형성된 plaque와 immunofoci의 형태를 대비하였다 (Figure 4). 동일한 바이러스시료의 농도별 접종 실험에서 IFA에 의한 산출역가는 바이러스 회석배율의 높고 낮음에 관계없이 SPA에 의한 산출역가에 비해 상대적으로 높은 일관성을 보였으며 (data not shown) 동일 회석배율마다 대비된 각 실험 결과 사이의 상관관계는 매우 높은 것으로 ($r^2=0.99$) 나타났다.

6. IFA의 실험조건이 역가산출에 미치는 영향

(1) 바이러스 회석용액의 FBS 농도에 의한 영향

IFA에서 바이러스시료의 회석에 사용되는 회석용액의 FBS 농도는 접종 전후 수두바이러스 입자의 안정성에 관여하는 것으로 보고되어 있다 [4]. 여기서는 IFA의 기타 조건 (재료 및 방법 참조)은 변화 없이 현재 가장 널리 사용되고 있는 FBS 농도 10%와 30% 회석용액을 immunofocus 형성 효율과 비교하여 그래프로 나타내었다 (Figure 5). FBS 10% 용액을 사용하여 단계별로 회석된 시료에 따른 IFA 역가는 FBS 30% 용액을 사용한 경우보다 다소 높게 나타났으며 회석비율별로는 1/10 회석시료에서 가장 뚜렷하였다. 그러나 이러한 차이는 유의한 것으로 판단되지 않았다.

(2) 바이러스 흡착온도에 따른 영향

바이러스 흡착시의 온도가 IFA 역가산출에 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 10% 용액으로 단계별 회석된 바이러스시료를 양분하여 35℃와 37℃에서 각각 90분간 흡착시킨 다음 37℃에서 정지배양하였다. 접종 6일 후 immunofocus의 형성 결과를 관찰하고 그래프로 나타내었다 (Figure 6). 바이러스의 흡착을 35℃에서 수행한 경우 산출역가는 37℃에서 흡착한 경우보다 전반적으로 약 15~20% 가량 높은 것으로 나타났다.

(3) 바이러스 접종 후 배양시간에 따른 영향

Immunofocus를 형성, 적정 관찰시기를 설정하기 위하여 단계별로 회석된 동일 시료를 3등분하여 접종하고 접종 후 4일, 6일 또는 8일째에 관찰하였다. 동일한 발색 반응 조건을 적용하였으며 관찰시기에 따른 각 산출역가를 그래프로 나타내었다 (Figure 7). IFA 역가는 4, 6, 8일째에 각 평균 2454, 3058, 3513 ffu/ml로 나타나 8일째의 산출역가가 가장 높게 나타났으나 8일째 관찰할 경우 plate상의 각 immunofocus 끼리 융합되는 현상이 뚜렷하고 4일째에 관찰할 경우에는 immunofocus의 크기가 매우 작아 육안관찰이 용이하지 않았다. 따라서 대량 검정에 용이한 육안관찰을 수행할 경우 바이러스 접종 후 6일째에 immunofocus를 형성하여 관찰하는 것이 산출역가의 신뢰도와 작업 수월성을 확보한다고 판단된다.

고 찰

현재 약독화 수두바이러스 백신을 포함하여 감염성 수두바이러스 입자의 정량을 위해 적용하는 국가검정 기준 방법론은 3차에 걸쳐 한천 증층을 덧씌우고 접종 후 9~10일째에 형성된 plaque을 계산하여 역가를 산출하는 SPA이다. 우리는 SPA의 고비용 및 장기간의 실험시간에 따른 단점을 보완하여 제시된 새로운 방법론 중, 항체 반응과 효소발색을 이용한 IFA를 SPA와 비교, 분석하여 대체 가능성을 확인하고 이에 따른 실험조건외의 표준화를 수행하였다. 이를 위해 국내에서 생산된 약독화 수두바이러스 백신을 분양받아 SPA에 따른 역가를 산출하고 한편으로는 동일 시료에 IFA를 적용, 역가를 산출하여 각 방법에 의한 검정 신뢰도를 비교, 확인하였다. SPA에 의한 백신 바이러스의 산출역가는 모든 시료가 기준역가 (1000 pfu/0.5 ml)를 만족하였으며 반복된 독립 실험에서 허용편차범위 이내로 일관성을 나타냈다.

한편, IFA에 의한 동일 시료의 동일 회석배율에 대한 산출역가는 SPA의 역가보다 많게는 28% 정도 높게 나타났다. 이러한 차이는 각 방법론에서 독립적으로 수행된 실험 결과들 사이의 편차 폭을 넘지 않는 것으로 판단되며 과산화효소 발색으로 형성된 immunofocus가 neutral red-negative plaque에 비해 상대적으로 선명하여 보다 정확한 관찰이 용이하기 때문으로 생각된다. IFA에서는 바이러스 접종 후 4일째와 5일째에 저배율 현미경

(40X)으로 immunofocus의 판독이 가능하여 SPA의 실험기간에 비해 4~5일을 단축할 수 있었으며 접종 후 6일째에 발색하여 조명상자 위에서 육안으로 관찰하면 현미경이나 확대경 [8] 등의 도움 없이도 3일을 단축할 수 있어 시료의 대량 검정에 매우 유용할 것으로 판단된다. 바이러스 접종 후 관찰까지의 적정 배양기간 설정 실험에서 4일부터 8일까지 배양시간이 길수록 산출역가도 따라서 다소간 증가하는 것으로 나타난 결과는 접종 후 3~7일 사이에 산출역가의 변화 없이 infection focus의 관찰이 가능하다고 보고된 Seoh 등 [9]의 결과와는 일치하지 않았으며 이는 실험에 사용된 세포주 (Vero)나 immunofocus의 관찰 방법 및 기타 실험조건의 차이 등에 기인할 것으로 추정된다. 본 연구에서 적용한 IFA는 1986년 Schmidtmayerova 등 [8]이 보고한 방법론을 기준으로 하였다. 그러나 접종 후 유지용 배지 (maintenance medium)의 FBS 함량을 1%에서 5%로 증가하고 SPA에서 사용된 세포배양배지를 그대로 적용하는 한편, glutaraldehyde 대신 100% methanol을 사용하여 세포를 고정하거나 효소 기질 농도를 다소 증가시키는 등의 부분적 수정을 도입함으로써 시약 선정 및 판독의 수월성을 도모하였다.

IFA에 의한 역가산출에 영향을 미치는 조건들 중 다른 하나는 배양과 접종에 사용되는 세포배양용 well의 크기로 나타났다. 24-well plate에 비해 12-well plate에 세포를 키워 사용하는 경우에서 보다 높은 역가가 산출되는 이유는 아마도 좁은 well 안에 소량의 희석시료가 접종될 경우 well의 가장 자리에 접종시료 용액의 대부분이 몰려 바이러스 입자들이 충분히 분산되지 못한 때문으로 생각된다. 따라서 상대적으로 넓은 well-size나 plate를 사용하는 것이 바람직하나 시료 수가 많은 대량 검정의 경우 사용되는 1, 2차 항체의 비용을 고려해야 할 것이다. 기존에 보고된 바와 같이 [1,4,8,11] 바이러스의 흡착온도 및 바이러스 희석용액의 FBS 농도 등이 IFA의 역가산출에 다소의 영향을 미치는 것이 본 연구에서도 확인되었으나 이 조건들은 검정의 수월성을 고려하여 허용범위 이내에서 적절히 조정될 수 있을 것으로 생각된다. 그의 바이러스의 단계 희석비율과 흡착시간 등은 역가산출에 대한 유의한 영향인자로 판단되지 않았다. 한편, 접종에 사용되는 세포주로 여기서는 현재 SPA에서 사용하는 MRC-5를 모든 실험에 공통적으로 적용하였으나 HEL (human embryonic

lung cell), Vero 및 MRC-5 등 수두바이러스 감수성 세포는 모두 사용이 가능하며 앞으로 IFA의 적정 세포주를 선정하는 연구도 IFA의 표준화를 위해 필요할 것이다.

지금까지 비교된 위 두 검정 방법의 경제성을 비교하면, 검정 시료 당 최소 24 plates가 소요되는 것을 기준으로 12-well culture plate를 사용하여 IFA를 수행한 실험재료 원가가 약 56,000원 정도로 60 mm plate를 사용하여 SPA를 수행한 실험재료의 원가 약 20,000원에 비해 2.8배 비싸게 나타났다. 그러나 IFA 실험재료 중 VZV 항원과 반응하는 1차 항체의 가격이 약 49,000원으로 총 원가의 약 85%를 차지하고 있어 1차 항체의 가격 비중을 제외하면 IFA의 재료원가는 SPA의 50% 이하로 나타난다. 본 실험에서 사용한 1차 항체 anti-VZV mouse IgG는 Chemicon International Co. (CA, USA)에서 상품화한 항체를 수입한 것이며 단가가 매우 높아 이를 대규모 검정에 적용하는 것은 바람직하지 않을 것이다. 오히려 적절한 정도 관리를 동반한 검정기관의 자체생산이나 국내의 항체생산 전문기관 및 연구소에 의뢰하여 공급받는 것이 공급효율성 측면에서 보다 바람직하며 이 경우 IFA의 재료원가는 SPA와 대비하여 상당한 경쟁력을 갖게 된다. 이에 더하여 3~4일간의 검정기간 단축이 가져오는 인건비 절감효과와 IFA 검정공정의 높은 수월성에 의한 부대효과까지를 고려하면 IFA 검정법이 SPA에 비해 보다 높은 경제적 가치가 인정된다.

감사의 글

수두바이러스 백신주와 MRC-5 세포주를 제공해 주신 식품의약품안전청의 협조에 감사드립니다. 이 연구는 1999년 식품의약품안전청의 위해도 평가사업 연구비로 수행되었습니다.

참고 문헌

- 1) 박승용, 황규계, 최문기, 유연우, 백승복, 김경호: 국내에서 분리한 수두바이러스의 동정 및 배양. *J Kor Soc Virol* 21: 1-9, 1991.
- 2) 손영모, 박종영, 황규계, 우규진, 박승용: 수두 약독화 생백신 (MAV/06주)의 면역원성 및 안정성에 대한 연구. *소아과* 37: 1405-1413, 1994.
- 3) 손영모, 유철주, 김병길, 김길영, 박종영, 김미란, 정우갑, 황규계, 우규진, 박승용: 건강

- 한 소아와 면역기능저하자에서 약독화 수두 백신 (MAV/06주)의 면역원성 및 안전성에 대한 연구. 소아과 **38**: 771-777, 1995.
- 4) 우규진, 황규계, 전복환, 박송용, 문홍모: Plaque assay 방법을 이용한 수두바이러스의 역가 측정. *J Kor Soc Virol* **24**: 123-128, 1994.
- 5) Asano Y, Takahashi M: Studies on neutralization of varicella-zoster virus and serological follow-up of cases of varicella and zoster. *Biken J* **21**: 15-23, 1978.
- 6) Hayakawa Y, Torigoe S, Shiraki K, Yamashita K, Takahashi M: Biologic and biophysical markers of a live varicella vaccine strain (Oka): identification of clinical isolates from vaccine recipients. *J Infec Dis* **149**: 956-963, 1984.
- 7) Heider H, Schroeder C: Focus luminescence assay: macroscopically visualized foci of human cytomegalovirus and varicella zoster virus infection. *J Virol Met* **66**: 311-316, 1997.
- 8) Schmidtmayyerova H, Mayer V, Zachar V: Focus assay for varicella-zoster virus in human embryo cells stained with immunoperoxidase method. *Acta Virol* **30**: 408-474, 1986.
- 9) Seoh J-Y, Kim B-S, Park C-G, Hwang E-S, Oh M-D, Kook Y-H, Choi S-B: Focus assay for varicella-zoster virus by immunoperoxidase staining. *J Kor Soc Microbiol* **27**: 365-369, 1992.
- 10) Takahashi M, Okuno Y, Otsuka T, Osame J, Takamizawa A, Sasada T, Kubo T: Development of a live attenuated varicella vaccine. *Biken J* **18**: 25-33, 1975.
- 11) Takayama M, Oya A: A single serum dilution method for the quantitation of neutralizing antibodies to varicella-zoster virus. *Biken J* **24**: 109-118, 1981.
-