Journal of Bacteriology and Virology 2007. Vol. 37, No. 1 p.23－30

일본뇌염바이러스의 엔벨로프를 지닌 MuLV Pseudotype 바이러스를 이용한 중화 항체 시험법 개발

건국대학교 동물생명과학대학 동물생명공학과[1], 식품의약품안전청 생물의약품평가부 백신과[2], 가톨릭대학교 생명공학부 분자바이러스연구실[3]

이희정[1] · 민경일[2] · 박누리[1] · 배고은[1] · 남재환[3] · 허숙진[2*] · 김영봉[1*]

Development of Neutralization Assay using Murine Leukemia Virus (MuLV) Pseudotyped with *Japanese encephalitis* Virus (JEV) *env* Gene

Hee Jung Lee[1], Kyung-Il Min[2], Nuri Park[1], Go-eun Bae[1], Jae Hwan Nam[3], Sook-Jin Hur[2*] and Young Bong Kim[1*]

[1]Department of Animal Biotechnology, College of Animal Bioscience & Technology, Konkuk University, Seoul, 143-701, Korea, [2]Biological Diagnostic Products Team Biologics Headquarters #231 Jinheungno Eunpyung-Gu, Seoul,122-704, Korea, [3]Department of Biotechnology, The Catholic University of Korea, 43-1 Yeokgok Dong, Wonmi-Ku, Bucheon, 420-743, Korea

Received : July 13, 2006
Accepted : October 13, 2006

The envelope (E) glycoprotein of JEV is the major antigen to elicit neutralizing antibody (NAb) against JEV infection. In order to develop a rapid and safe neutralization assay system for evaluation of the JEV vaccine strains, we constructed JEV-pseudotyped viruses with JEV *env* genes (Nakayama-NIH, Beijing-1). The titers of JEV-pseudotyped viruses with NK and BJ strains were 4.0×10^4 IFU/ml and 1.3×10^5 IFU/ml in Vero cell cultures, respectively. We have analyzed the neutralization activity of immunized mouse sera with JEV-NK and JEV-BJ pseudotyped viruses. The neutralizing antibody titers of NK and BJ (50% reduction of virus) were about 1:10,000 at each immunized sera. Compared with conventional plaque reduction neutralization test (PRNT), the method using JEV-pseudotyped virus has desirable advantages such as more rapid, easier, and non-biohazardous. This neutralization assay system might be useful to evaluate NAb activity against JEV vaccine strains or vaccine candidates.

Key Words: JEV, Envelope (E), Pseudotyped virus, Neutralization

서 론

일본뇌염은 바이러스성 뇌염 중의 하나로, 작은 빨간집모기 (*Culex tritaeniorhynchus*)에 의해 전파되며, 아시아 전역에서 발생되고 있다. JEV는 *Flaviviridae* 과 (family), *Flaviviridae* 속 (genus)에 속하며, *Flaviviridae* 속에는 황열바이러스, 뎅기열바이러스, 웨스트나일바이러스, 그리고 세인트루이스뇌염바이러스 등이 포함되어 있다 (11,20).

JEV는 약 11 kb 길이의 단일 가닥의 RNA 게놈을 갖고 있으며, 게놈은 하나의 긴 open reading frame (ORF)를 암호화하고, ORF 외에도 게놈 양쪽에 5' nontranslated region (NTR)과 3' NTR의 두 cis-acting element가 위치한다 (7,24,28). ORF는 3개의 구조단백질 (capsid; C; 12~14 kDa, membrane; M; 8~9 kDa, 그리고 envelope; E; 53~55 kDa)과 7개의 비구조단

*교신저자: 김영봉. 143-701, 서울특별시 광진구 화양동 1번지, 건국대학교 동물생명과학대학 동물생명공학과 면역유전학연구실
Phone: 02-450-4208, Fax: 02-450-3667,
e-mail: kimera@konkuk.ac.kr

**본 연구는 학술진흥재단 젊은 과학자 연구 (KRF-2005-F00008-100015)지원과 식품의약품안전청 2006년도 용역 연구사업지원으로 수행된 것임.
***이희정은 서울과학장학생 (Seoul Science Fellowship) 지원을 받았음.

백질 (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5)을 암호화하고 있다 (9).

이 중, 엔벨로프는 바이러스 표면의 당단백질로서 숙주 세포의 수용체와 바이러스의 결합, 특이적 막 융합, 적혈구 응고 억제, anti-fusion 항체의 유도 및 바이러스에 대한 중화 항체의 생성 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (9,25). 특히, 중화 항체는 바이러스의 엔벨로프 complex에 직접 결합하여 바이러스에 대한 감염 예방 및 치료에 결정적인 역할을 하기 때문에 백신 효능 평가에 중요한 기준으로 알려져 있다 (6,20,23,27).

국내에서 현재 사용하고 있는 백신 주는 Nakayama-NIH 주와 SA14-14-2 주이며, 일본에서는 Nakayama-NIH 주를 수출용으로, Beijing-1 주를 내수용으로 사용하고 있으며, 중국에서는 P-3 주와 SA14-14-2 주를 사용하고 있다 (1,2). 일본뇌염백신이 접종된 1970년대 이후 국내의 일본뇌염 환자의 수는 급감하였으나, 백신의 면역력 유지, 추가 접종 등의 문제점이 아직 남아 있으며, 더욱이 현재 사용되고 있는 백신 주를 회피하는 돌연변이 주가 발생할 경우에 대한 대책이 미약한 실정이다 (1). 효과적인 백신은 백신 주와 동일한 바이러스 외에 다른 야외 바이러스 주에 대해서도 높은 중화 항체능을 지녀야 한다. 따라서 백신 주인 Nakayama-NIH 주와 Beijing-1 주에 대한 재평가뿐 만 아니라, 현재 분리되고 있는 일본뇌염 야외 주의 중화 항체능 분석 및 연구가 요구된다.

중화 항체능을 측정하기 위해서는 전염성 있는 위험한 야외 주들을 분리, 동정해야만 가능하기 때문에 기술적으로 여러 어려움을 지니고 있다. 전염이 가능한 바이러스의 분리 또는 배양은 생물학적으로 위험한 작업이기 때문에 이에 대한 실험실 안전 교육이 중요하지만, 근본적으로 안전한 검체를 다루는 방법이 최선이라 할 수 있다. 기존의 백신 효능을 평가하거나 바이러스의 중화 항체능을 측정하는 방법 중 하나로써, 플라크 감소 중화 항체 검사법 (PRNT)이 주로 사용되고 있다 (14). 이 검사법은 감염 위험성이 존재하는 바이러스를 직접 사용하여 계태아 세포에 감염시켜 일정 기간의 배양 동안 세포 병변 효과를 통해 관찰하기 때문에 BL3 조건의 실험실에서 작업을 요하며, 효과를 관찰하는데 많은 시간이 소요되고 숙주 세포를 준비하는데 어려움이 있다 (17, 18). 바이러스의 정량 측정은 RNA polymerase activity 또는 ELISA를 이용하여 왔으나 실험자에 따라 많은 오차를 나타낸다는 단점이 있다 (15,19,21). 이를 개선하고자 PCR 또는 green fluorescent protein (GFP)가 표지된 바이러스를 이용한 보고들이 있으나 (4,10,19), 정량화에 문제점을 지니며, 그 측정 방법이나 평가 분석에 대한 기준이 아직까지 명확하게 존재하지 않는 문제점이 있다.

Pseudotype 바이러스를 이용한 중화 항체 측정 방법의 개발에 관한 연구는 엔벨로프를 지닌 고 위험 바이러스를 대상으로 보고된 바 있다 (12,13). 이 새로운 방법은 human immunodeficiency virus (HIV-1)의 gp140이나, severe acute respiratory syndrome (SARS) 바이러스의 S 당단백질을 지닌 Moloney murine leukemia virus (MuLV) pseudotype 바이러스를 제조함으로써 생물학적으로 안전하고 빠른 중화 항체능 분석 방법이 보고되었다 (5,6,8,16).

본 연구는 현재 사용되고 있는 JEV 백신 주 (Nakayama-NIH와 Beijing-1)의 E 유전자를 지닌 MuLV-JEV pseudotype 바이러스를 제조하였으며, 이를 이용하여 JEV 백신 주로 면역시킨 마우스 혈청 내의 중화 항체능을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 세포 배양

Pseudotype 바이러스의 생성을 위해 TELCeB6 세포 주를 사용하였으며, JEV-pseudotype 바이러스의 감염성 측정 및 중화 항체능 분석을 위해 Baby hamster kidney (BHK-21)와 African green monkey kidney (Vero) 세포 주를 사용하였다. 각각의 세포 주는 penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)을 사용하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양되었다.

PRNT를 위한 일본뇌염바이러스 주 (Nakayama-NIH; NK와 Beijing-1; BJ)는 국립보건연구원 바이러스부 신경계바이러스과에서 분양받았으며, 각 바이러스 배양 숙주 세포로는 BHK-21 세포 주를 이용하였다.

2. JEV-E 발현 유전자 클로닝

JEV-NK 주와 JEV-BJ 주의 DNA는 국립식품의약품안전청에서 분양받았다. 이를 주형으로 PCR을 이용하여 JEV *env* 지역을 증폭하였으며, 증폭된 DNA를 CMV 프로모터를 지닌 발현 벡터 (pHCMV)에 연결시켜 클로닝하였다 (4,29). 얻어진 클론을 pHCMVJEV-NKenv와 pHCMVJEV-BJenv로 명명하였다. DNA 증폭을 위해 사용된 primer는 forward primer 5'-GGTCGC<u>GAATTC</u>TGCAGGTTCCAACTGTCTGG-GAGTG-3'와 reverse primer 5'-ACCAATGTGCATGCTTAGCT-CGA<u>GAATTC</u>CATTG-3'를 사용하였으며, *EcoR* I 제한효소 부위 (밑줄)를 지닌다.

3. 마우스 면역

SPF 상태로 사육된 6주령의 BALB/c 마우스 10마리씩을 이용하여, UV로 불활성화시킨 JEV-NK 주와 JEV-BJ 바이러

스 주 10^5 PFU/mouse를 근육 주사를 통해 1주일 간격으로 3회 면역시켰다. 1차 면역 후 22일째에, 각 마우스에서 채혈하여 혈청을 확보하였다.

4. JEV-pseudotype 바이러스 생성과 E 단백질의 Western Blotting

E 단백질을 발현할 수 있는 pHCMV/JEV-NKenv와 pHCMV/JEV-BJenv를 TELCeB6 세포에 calcium phosphate 방법을 이용하여 각각 transfection 시켰다 (12). 2일간 배양 후, pseudotype 바이러스를 포함하는 배양액을 취하여 저속으로 원심 분리 (1,500×*g*, 5분)하고 상층액을 취하여 -80℃에 보관하였다.

E 단백질의 발현을 확인하고자 cell lysate와 JEV-pseudotype 바이러스를 지닌 상층액으로 Western Blotting을 수행하였다. Western Blotting 분석에 사용한 항체는 JEV 백신 주 (BJ)로 면역시킨 마우스의 혈청을 사용하였다.

5. JEV-pseudotype 바이러스의 titer (IFU/ml) 측정

BHK-21과 Vero 세포를 96 wells plate에 배양하여, JEV-pseudotype 바이러스 (NK 또는 BJ)를 각각 감염시킨 후, X-Gal을 이용하여 염색하였다. 감염된 세포 내 존재하는 β-galactosidase를 통하여 X-Gal에 의해 염색된 세포의 수를 세어 바이러스의 감염성과 titer를 측정하였다 (3). 동일한 조건으로 실험을 3회 반복하여 NK 주와 BJ 주에서 기원한 pseudotype 바이러스의 감염력을 비교하였다.

6. JEV-pseudotype 바이러스를 이용한 중화 항체능 분석

JEV 백신 주 (NK와 BJ)로 면역된 마우스 혈청을 이용하여 중화 항체능 분석을 실시하였다. 음성대조 혈청으로는 면역시키지 않은 정상 마우스의 혈청을 사용하였고, 사용된 모든 혈청은 56℃, 30분 동안 열처리하여 사용되었다. 5배수로 희석된 혈청은 100 IFU의 JEV-pseudotype 바이러스와 혼합한 후, 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 각각의 pseudotype 바이러스와 마우스 혈청의 혼합액은 96 well plate에 미리 준비된 Vero 세포에 접종 후, 36시간 배양하였다 (31). 중화 항체능 분석 방법은 X-Gal 염색법을 통하여 정량화되었다. 중화 항체가는 pseudotype 바이러스의 감염을 50% 감소시킬 수 있는 마우스 혈청의 희석 배수로 결정하였으며 모든 실험은 세 번의 반복 실험을 통하여 평균값을 얻었다.

7. JEV를 이용한 PRNT

면역하여 얻은 혈청을 2배수 희석하고 각각의 JEV 주를 혼합하여 중화 반응을 시킨 다음, 미리 제조된 계태아 세포에 접종하여 90분간 흡착시켰다. 1, 2차 한천 배지를 중층하여 2일간 배양 후, 플라크의 수를 세었다. 시험군의 플라크 수와 대조군의 플라크 수를 비교하여 감소율을 구하고 각 혈청의 중화 항체가를 산출하였다.

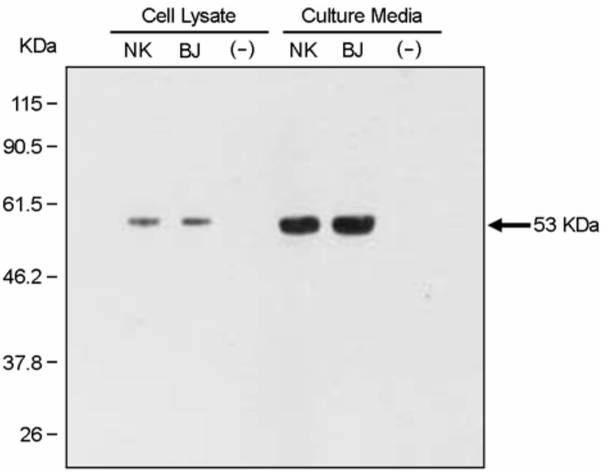


Figure 1. Expression of JEV-envelope (E) protein. Cell lysate and culture media of JEV-pseudotyped viruses were subjected to SDS-PAGE. JEV-E proteins were detected by Western blotting using sera from mouse immunized with JEV (Nakayama-NIH strain). The bands show the JEV-E protein in cell lysates and culture media. Nontransfected TELCeB6 cells were used as a negative control.

결 과

1. JEV *env* 유전자의 클로닝과 E 단백질의 발현

JEV-E 단백질을 발현시키기 위해, 발현 벡터인 pHCMV에 JEV-NK 또는 JEV-BJ의 *env* 유전자를 PCR로 증폭하여 발현 벡터에 클로닝하였다. 각각의 클론된 유전자는 염기서열 분석을 통해 확인하였으며, TELCeB6 세포에 각각 transfection 하여 pseudotype 바이러스를 제조하였다.

JEV-pseudotype 바이러스의 E 단백질의 발현은 Western Blotting으로 확인하였다. JEV-E 단백질은 JEV-NK 주와 JEV-BJ 주로부터 기원한 각각의 pseudotype 바이러스에서 53 kDa 크기의 band로 관찰되었으며 (Fig. 1), cell lysate와 배양액에서도 JEV-E 단백질의 발현을 확인하였다. 또한 Cell lysate에서 보다 배양액에서 band가 더 강하게 나타난 것을 볼 수 있었다. 이것으로 세포 내에 존재하는 JEV-E 단백질보다 세포 밖으로 분비된 E 단백질이 더 많음을 알 수 있었다.

2. JEV-pseudotype 바이러스의 titer

BHK-21와 Vero 세포를 숙주 세포로 사용하여 JEV-pseudotype 바이러스의 감염성 시험을 하였다. JEV-pseudotype

Table 1. Titers of JEV-pseudotyped viruses (IFU/ml)

Strain	Infectious units/ml (IFU/ml) Host cell	
	BHK-1	Vero
Nakayama-NIH	1.5×10^4	4.0×10^4
Beijing-1	1.2×10^5	1.3×10^5

바이러스는 β-galactosidase (*lacZ*) 유전자를 지니기 때문에, 감염된 세포는 X-Gal 염색에 의해 파란색을 띄게 된다 (Fig. 2). JEV-pseudotype 바이러스를 감염시키지 않은 세포는 파란색으로 염색되지 않음을 관찰할 수 있었다. 이 때 염색된 세포의 수를 통해서 숙주 세포에 따른 JEV-pseudotype 바이러스의 감염성을 비교하였으며, JEV-pseudotype 바이러스의 titer는 바이러스 배양액 1 ml당 감염된 세포의 수 (IFU/ml)로 titer를 결정하였다.

Table 1에서 보는 것과 같이, BHK-21와 Vero 세포는 JEV-pseudotype 바이러스에 의해 모두 감염됨을 보여 주었다. JEV-NK 주의 *env* 유전자를 지닌 pseudotype 바이러스의 titer는 Vero 세포에서 4.0×10^4 IFU/ml, BHK-21 세포에서 1.5×10^4 IFU/ml이었으며, JEV-BJ 주의 *env* 유전자를 지닌 pseudotype 바이러스는 Vero 세포에서 1.3×10^5 IFU/ml, BHK-21 세포에서 1.2×10^5 IFU/ml이었다. 각각 JEV-pseudotype 바이러스의 titer를 비교한 결과, JEV-BJ 주가 JEV-NK 주보다 동일한 조건에서 바이러스를 약 2배 가량 높게 생산한 것으로 나타났다 (Table 1). 두 종류의 JEV-pseudotype 바이러스는 숙주 세포에 따라 titer가 약 5에서 10배 차이를 보였다. 각각의 JEV-pseudotype 바이러스의 titer는 차이가 있었으나, JEV-pseudotype 바이러스의 엔벨로프는 JEV의 엔벨로프와 마찬가지로 숙주 세포의 수용체와 결합하여 숙주 세포를 감염시키는 역할을 수행함을 알 수 있었다.

3. JEV-pseudotype 바이러스를 이용한 중화 항체능 분석

중화 항체능 분석은 JEV-pseudotype 바이러스와 JEV-NK 주 또는 JEV-BJ 주에 면역된 마우스 혈청을 이용하여 수행되었다. 각각의 JEV-pseudotype 바이러스와 마우스 혈청을 혼합하여 Vero 세포에 감염시킨 후, X-gal 염색을 하여 결과를 분석하였다.

중화 항체능을 지닌 혈청은 JEV-pseudotype 바이러스를 중화시켜 감염된 세포가 관찰되지 않는 반면, 중화 항체능을 지니지 않은 혈청은 JEV-pseudotype 바이러스의 감염을 막지 못하여 세포가 X-gal에 의해 염색됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). Fig. 2-A는 JEV-pseudotype 바이러스가 JEV-NK 주 항체에 의해 100% 중화되어 감염된 세포가 관찰되지 않음을 보였으며, Fig. 2-B는 음성 대조군으로 JEV-pseudotype 바이러스를 중화시키지 못하여 세포가 감염되었음을 관찰할 수 있었다.

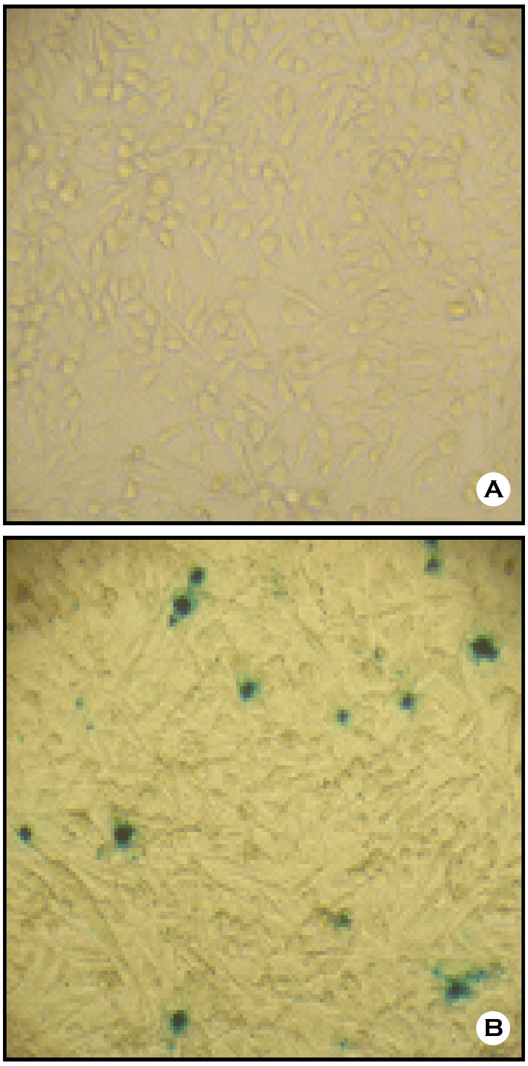
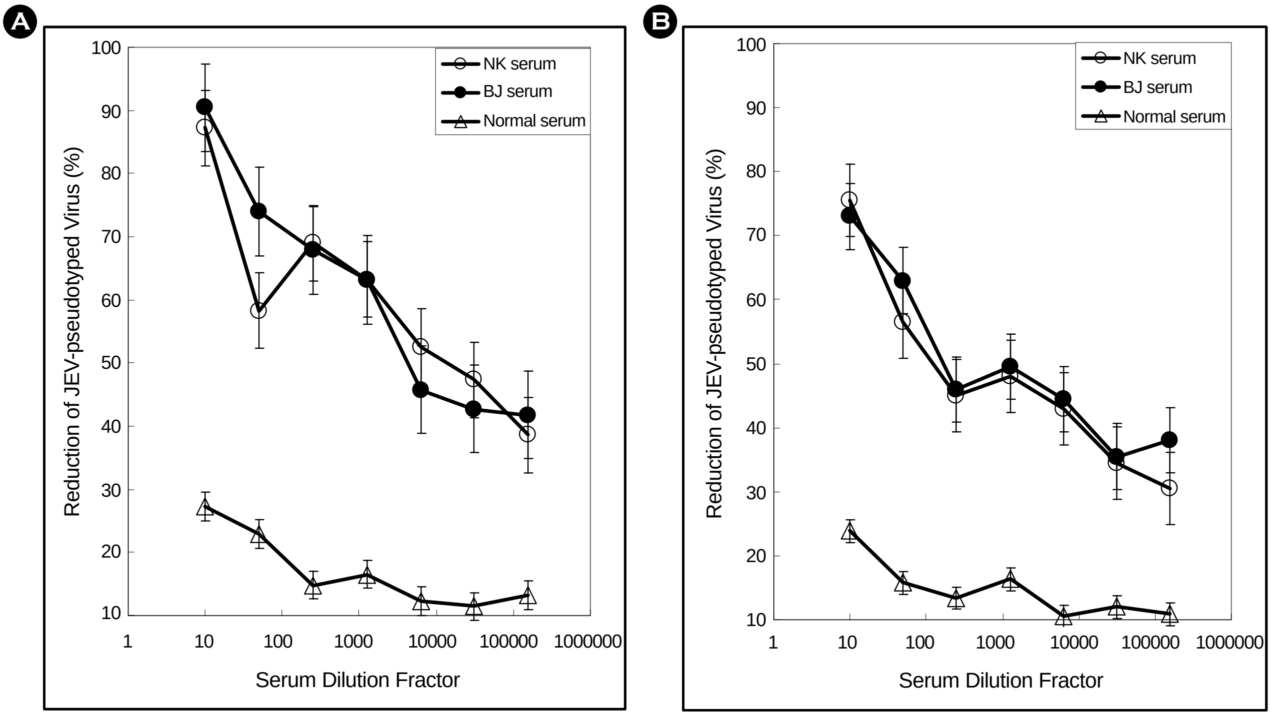


Figure 2. Cells in the JEV reduction by neutralization using sera from mouse immunized with JEV in Vero cells. **(A)** 100% of neutralizing activity; **(B)** No neutralizing activity.

100 IFU/ml의 JEV-pseudotype 바이러스가 마우스 혈청에 의해 중화되어 세포에 감염되지 않는 비율 (reduction rate)이 100% 될 때를 중화 항체능 100%로 간주하였다. 중화 항체가는 중화 항체능이 50% 일 때를 기준으로 마우스 혈청 희석 배수로 결정하였다.

Fig. 3는 JEV-pseudotype 바이러스를 이용, JEV에 면역된 마우스의 혈청에 대한 중화 항체가를 나타낸 것으로써, Fig. 3-A는 JEV-NK 주 pseudotype 바이러스를 이용하여 JEV-NK 주 또는 BJ 주를 면역시킨 마우스 혈청, 또는 정상 마우스



JEV-NK pseudotyped virus JEV-BJ pseudotyped virus

Figure 3. Neutralization assay with JEV-pseudotyped viruses. Two different JEV-pseudotyped viruses (NK and BJ strain) were incubated with either normal serum (△), or two sera from mouse immunized with JEV-NK strain (●) and JEV-BJ strain (○). **(A)** Neutralization assay of used JEV-NK pseudotyped virus. **(B)** JEV-BJ pseudotyped virus.

혈청에서의 중화 항체능을 보여주고 있다. 1:10으로 희석된 혈청에서는 평균 88.5%의 높은 중화 항체능을 보인 반면 (NK는 90%, BJ는 87%), 정상 마우스 혈청에서는 30% 이하의 낮은 중화 항체능를 보였다. Fig. 3-B는 JEV-BJ 주 pseudotype 바이러스를 이용하여 각각의 JEV 백신 주를 면역시킨 마우스 혈청, 또는 정상 마우스 혈청에서의 중화 항체능을 보여주고 있다. 1:10으로 희석된 혈청에서는 평균 74%의 중화 항체능을 보였으며 (NK는 75.5%, BJ는 73%), JEV-NK 주 pseudotype 바이러스를 이용한 경우와 마찬가지로 정상 마우스 혈청에서의 중화 항체능은 30% 이하로 나타났다. 혈청을 1:10으로 희석하여 각각의 중화 항체가를 측정한 결과, JEV-NK 주 pseudotype 바이러스를 이용하였을 때의 중화 항체가가 조금 높게 나타났으나, JEV-NK 주와 JEV-BJ 주 pseudotype 바이러스를 이용한 경우 모두에서 1,000에서 10,000 사이의 중화 항체가를 확인하였다.

JEV-NK 주 또는 JEV-BJ 주를 면역시킨 마우스 혈청에 대해 JEV-NK 주와 JEV-BJ 주 pseudotype 바이러스 모두에서 중화 항체능이 나타났으며, 이러한 JEV-NK 주와 JEV-BJ 주 pseudotype 바이러스 간의 cross reactivity는 두 백신 주의 항원 유사성을 짐작하게 한다.

기존의 PRNT 방법을 이용하여 얻은 중화 항체가는 각각의 JEV에 대한 JEV 백신 주를 면역시킨 마우스 혈청이 대조군에 비해 50% 플라크 감소율을 보일 때의 혈청 희석배수로 결정하였다. PRNT 결과, JEV-NK에 대한 JEV-NK를 면역시킨 마우스 혈청의 중화 항체가는 320이었고, JEV-BJ 주를 면역시킨 마우스 혈청의 중화 항체가는 160이었다. JEV-BJ에 대한 JEV-NK 혈청의 중화 항체가는 80이었으며, JEV-BJ 혈청의 중화 항체가는 640이었다 (자료 생략). 따라서, 위에서 확인한 두 가지의 중화 항체능 분석 방법을 비교할 때, JEV-pseudotype 바이러스를 이용한 새로운 중화 항체능 분석 방법이 기존의 PRNT 방법 보다 더 민감함을 보여 주었다.

고 찰

기존의 일반적으로 사용되는 중화 항체 분석 방법은 PRNT가 주로 이용되고 있으며, JEV 뿐만 아니라 다른 바이러스 감염에 대한 면역능 측정에 가장 많이 사용되고 있다 (14,31). PRNT는 분석하고자 하는 항체와 감염성 바이러스를 혼합한 후, 바이러스가 복제될 수 있는 세포에 감염시킨 다음 측정 가능한 양의 바이러스가 복제될 때까지 일정 기간 동안

배양한다. 배양된 바이러스의 정량 측정을 위해 RNA 바이러스가 특이적으로 지닌 RNA polymerase activity 또는 바이러스 항원을 ELISA를 이용하여 측정하거나 세포 병변 효과를 통하여 관찰한다. 이 방법은 시간이 오래 걸리고 숙주 세포를 준비하는 불편함이 있으며, 정량적인 바이러스의 역가 결정이 어렵기 때문에, 초기에 혈청과 혼합되는 바이러스의 양에 따라 중화 항체가의 차이를 보이는 문제가 있다. 또한 중화 항체가를 대조군에 대한 퍼센트 비율로 나타내기 때문에 정량적 분석에도 문제가 있다. 이를 개선하고자 많은 방법들이 보고되어 감염 후 빠른 시일 내에 측정하기 위해 PCR을 이용하거나 green fluorescent protein (GFP) 표지된 바이러스를 이용하거나, hemagglutination inhibition test, complement-fixation test, 그리고 enzyme immunoassay 등의 방법이 이용되고 있다 (3,14,26). 그러나 이 방법 역시 높은 background 때문에 정량화하는데 문제점을 지니며 더욱이 각 측정 백신 주에 대한 야외 주에 대한 바이러스 준비에는 아무런 대안이 없었다.

Cosset 등이 개발한 packaging cell line (TELCeB6)은 *lacZ* gene을 지니고 MuLV *gag*와 *pol*을 갖고 있어 겉껍질인 각종 바이러스의 E 단백질만 발현시키면 one cycle 감염능을 지닌 바이러스를 만들 수 있다 (5). 직접 바이러스를 사용하지 않고 생물학적으로 안전한 바이러스를 이용하기에 실험실 안전 차원에서 장점을 지니며, 각 RNA 바이러스의 엔벨로프를 지닌 MuLV 바이러스를 생성함으로 여러 종류의 바이러스 주에 대한 분석이 용이한 장점이 있다. 이를 이용하여 HIV-1 또는 SARS-CoV을 대상으로 한 연구에서 pseudotype 바이러스를 이용하여 중화 항체능의 대량 분석의 가능성이 보고된 바 있다 (6,8). 그 외 recombinant baculovirus system을 이용하여 JEV의 E 단백질을 발현하고, 중화 항체 반응 시험을 통하여 면역 반응을 확인한 보고가 있었다 (30).

위에서 언급된 기존의 중화 항체 분석법에 비해, JEV-pseudotype 바이러스를 이용한 새로운 중화 항체 분석법은 다음과 같은 장점을 지닌다. JEV-pseudotype 바이러스는 JEV의 특징을 가지면서도 감염의 위험이 없는 바이러스이므로, 감염 위험이 있는 바이러스를 직접 사용하지 않아 실험자와 실험실 내의 안전성이 확보되는 장점을 지닌다. PRNT는 바이러스를 숙주 세포에 감염시킨 후 플라크가 관찰될 때까지 오랜 시간 세포를 배양해야 하지만, JEV-pseudotype 바이러스는 *lacZ* 유전자를 지니기 때문에 감염된 세포를 X-gal 염색을 통해 2일 이내에 측정이 가능하며, PRNT는 숙주 세포에 접종되는 바이러스 양을 정확하게 측정할 수 없고, 중화 항체능 분석도 상대적인 비율로 평가할 수 밖에 없지만, 새로운 중화 항체 분석 방법은 염색된 세포의 수로써 neutralizing reduction을 정량적으로 측정할 수 있다. 또한 기존의 PRNT는 숙주 세포로 계태아 세포를 준비하는 번거로움이 있으나, 새로운 중화 항체 분석 방법은 Vero 세포 주를 이용하기 때문에 간편하고, 세포 주를 이용함에 따라 실험실간, 실험자간의 오차를 줄일 수 있다.

본 연구에서는, 현재 사용되는 JEV 백신 주 또는 백신에 대한 재평가를 위한 중화 항체능 분석법은 표준화된 방법 및 평가 기준이 아직까지 없어, 신속하고 정확하며 실험 방법이 간편한 새로운 중화 항체능 분석 방법을 개발하고자 JEV-pseudotyped 바이러스를 생성하였다. JEV-pseudotype 바이러스의 titer는 10^4 IFU/ml 이상으로, 바이러스를 대량 생산함으로써 중화 항체능 분석을 대량으로 할 수 있는 가능성을 확인하였다. JEV-NK 주 또는 JEV-BJ 주 pseudotype 바이러스는 JEV 백신 주 (NK 또는 BJ)에 면역된 마우스의 혈청을 이용하여 중화 항체가 (1:10,000)를 측정하였으며, 기존의 PRNT에 비해 민감도가 높음을 확인하였다. 또한 기존의 중화 항체능 분석법을 대치하는 새로운 항원으로 사용할 수 있음을 확인하였다. 따라서 JEV 백신 주와 동일 또는 다른 (혈청형, 유전형) 야외 주에 대한 JEV-pseudotype 바이러스 주를 확보함으로 백신 효능 측정 시, 중화 항체능을 여러 각도에서 평가할 수 있을 것이라 기대된다. 또한 JEV 뿐만 아니라 다른 enveloped RNA 바이러스에 대하여도 적용이 가능하며, 일본뇌염 감염 환자의 예후 추적 및 백신 투여자의 효능 측정으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1) **민경일, 김영민, 추미성, 백선영, 김재옥, 류승렬, 민복순, 김연희, 박미경, 변우현, 허숙진:** 낮은 복제수 플라스미드를 활용한 일본뇌염바이러스 SA14-14-2주의 Full-Length cDNA 클론의 제작 및 안정적 유지. *J Bacteriol Virol* **34:** 339-353, 2004.

2) **박민수, 노혜옥, 손영모, Chandler L, Shope R, Tsai TF:** SA14-14-2주 일본뇌염 약독화 생백신의 면역 반응에 대한 연구. *Korean J Pediatr* **43:** 351-359, 2000.

3) **Abe M, Kuzuhara S, Kino Y:** Establishment of an analyzing method for a Japanese encephalitis virus neutralization test in Vero cells. *Vaccine* **21:** 1989-1994, 2003.

4) **Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK:** Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90:** 8033-8037, 1993.

5) **Cosset FL, Takeuchi Y, Battini JL, Weiss RA, Collins MK:** High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses

resistant to human serum. *J Virol* **69:** 7430-7436, 1995.

6) **Han DP, Kim HG, Kim YB, Poon LL, Cho MW:** Development of a safe neutralization assay for SARS-CoV and characterization of S-glycoprotein. *Virology* **326:** 140-149, 2004.

7) **Kaur R, Vrati S:** Development of a recombinant vaccine against Japanese encephalitis. *J Neurovirol* **9:** 421-431, 2003.

8) **Kim YB, Lee MK, Han DP, Cho MW:** Development of a safe and rapid neutralization assay using murine leukemia virus pseudotyped with HIV type 1 envelope glycoprotein lacking the cytoplasmic domain. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17:** 1715-1724, 2001.

9) **Konishi E, Mason PW:** Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol* **67:** 1672-1675, 1993.

10) **Konishi E, Pincus S, Paoletti E, Shope RE, Wason PW:** Avipox virus-vectored Japanese encephalitis virus vaccines: use as vaccine candidates in combination with purified subunit immunogens. *Vaccine* **12:** 633-638, 1994.

11) **Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB:** Phylogeny of the genus Flavivirus. *J Virol* **72:** 73-83, 1998.

12) **Lee MK, Martin MA, Cho MW:** Higher western blot immunoreactivity of glycoprotein 120 from R5 HIV type 1 isolates compared with X4 and X4R5 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16:** 765-775, 2000.

13) **Lee MK, Seo JK, Kim HK, Cho JH, Poo H, Kim KL:** A vector system for introducing foreign HIV-1 env genes and pseudotyping of MuLV particles with the recombinant HIV-1 envelope proteins for anti-HIV-1 assay. *Antiviral Res* **53:** 99-111, 2002.

14) **Mauldin J, Carbone K, Hsu H, Yolken R, Rubin S:** Mumps virus-specific antibody titers from pre-vaccine era sera: comparison of the plaque reduction neutralization assay and enzyme immunoassays. *J Clin Microbiol* **43:** 4847-4851, 2005.

15) **Mutoh E, Ishikawa T, Takamizawa A, Kurata T, Sata T, Kojima A:** Japanese encephalitis subunit vaccine composed of virus-like envelope antigen particles purified from serum-free medium of a high-producer J12#26 cell clone. *Vaccine* **22:** 2599-2608, 2004.

16) **Schnierle BS, Stitz J, Bosch V, Nocken F, Merget-Millitzer H, Engelstadter M, Kurth R, Groner B, Cichutek B:** Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94:** 8640-8645, 1997.

17) **Shibata R, Igarashi T, Haigwood N, Buckler-White A, Ogert R, Ross W, Willey R, Cho MW, Martin MA:** Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Nat Med* **5:** 204-210, 1999.

18) **Ting SH, See E, Tan HC, Lee MA, Ooi EE:** Development of a simplified assay for the detection of neutralizing antibodies to Japanese encephalitis virus. *J Virol Methods* **93:** 43-47, 2001.

19) **Vazquez S, Valdes O, Pupo M, Delgado I, Alvarez M, Pelegrino JL, Guzman MG:** MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. *J Virol Methods* **110:** 179-184, 2003.

20) **Venugopal K, Gould EA:** Towards a new generation of flavivirus vaccines. *Vaccine* **12:** 966-975, 1994.

21) **Vorndam V, Beltran M:** Enzyme-linked immunosorbent assay-format microneutralization test for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* **66:** 208-212, 2002.

22) **Wengler G:** Cell-associated West Nile flavivirus is covered with E+pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. *J Virol* **63:** 2521-2526, 1989.

23) **Wu HH, Chen CT, Lin YL, Lee ST:** Sub-fragments of the envelope gene are highly protective against the Japanese encephalitis virus lethal infection in DNA priming-protein boosting immunization strategies. *Vaccine* **22:** 793-800, 2004.

24) **Wu SC, Lian WC, Hsu LC, Liau MY:** Japanese encephalitis virus antigenic variants with characteristic differences in neutralization resistance and mouse virulence. *Virus Res* **51:** 173-181, 1997.

25) **Wu SC, Lin CW:** Neutralizing peptide ligands selected from phage-displayed libraries mimic the conformational epitope on domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *Virus Res* **76:** 59-69, 2001.

26) **Yang DK, Kweon CH, Kim BH, Lim SI, Kwon JH, Kim SH, Song JY, Han HR:** Immunogenicity of baculovirus expressed recombinant proteins of Japanese encephalitis virus in mice. *J Vet Sci* **6:** 125-133, 2005.

27) **Yang KD, Yeh WT, Chen RF, Chuon HL, Tsai HP, Yao CW, Shaio MF:** A model to study neurotropism and persistency of Japanese encephalitis virus infection in human neuroblastoma cells and leukocytes. *J Gen Virol* **85:** 635-642, 2004.

28) **Yasuda A, Kimura-Kuroda J, Ogimoto M, Miyamoto M,**

Sata T, Sato T, Takamura C, Kurata T, Kojima A, Yasui K: Induction of protective immunity in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express PreM and E glycoproteins of Japanese encephalitis virus. *J Virol* **64:** 2788-2795, 1990.

29) **Yee JK, Miyanohara A, LaPorte P, Bouic K, Burns JC, Friedmann T:** A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91:** 9564-9568, 1994.

30) **Yun SI, Kim SY, Rice CM, Lee YM:** Development and application of a reverse genetics system for Japanese encephalitis virus. *J Virol* **77:** 6450-6465, 2003.

31) **Zielinska E, Liu D, Wu HY, Quiroz J, Rappaport R, Yang DP:** Development of an improved microneutralization assay for respiratory syncytial virus by automated plaque counting using imaging analysis. *Virol J* **2:** 84, 2005.