

## 장바이러스(Enterovirus) 배양에서의 293 세포의 유용성

김한성, 송원근\*, 이규만\*

국군대전병원 병리시험과, 한림대학교 의과대학 임상병리학교실\*

### Utility of 293 Cells in Culture of Enteroviruses

Han-Sung Kim, Wonkeun Song\*, and Kyu-Man Lee\*

Department of Pathology, The Armed Forces Daejeon Hospital, Daejeon, Korea,

Department of Clinical Pathology, Hallym University College of Medicine\*, Seoul, Korea

**Background** : Viral isolation in cell culture remains as a reference method for diagnosis of enteroviral infection. Enteric adenoviruses are cultivated in 293 cells. Enteroviral and enteroadenoviral tropisms for the gastrointestinal tract lead to the assumption that 293 cells would be useful in enteroviral isolation. We evaluated usefulness of 293 cells in the diagnosis of enteroviral infection.

**Methods** : Human embryonic lung fibroblasts (HEL), HeLa, RD and 293 cells were used to evaluate viral isolation from clinical specimens, susceptibilities of the cell lines to reference enteroviral strains and influence to stool extracts on the viral isolation. Forty-four stool specimens collected from patients during the epidemic period of type 9 echoviral aseptic meningitis and type 30 echoviral culture-positive 33 stool and 58 cerebrospinal fluid (CSF) specimens were inoculated onto cell lines.

**Results** : Echovirus type 9 was isolated from 31 of 44 stool specimens. Of 31 echovirus 9 isolates, 22 (71.0%), 21 (67.7%), 6 (19.4%) and 3 (9.7%) were detected in HEL, 293, RD and HeLa, respectively. Of 33 echovirus 30 isolates from stool specimens, 32 (97.0%) were detected in 293; 17 (51.5%) were detected in RD. Of 58 echovirus 30 isolates from CSF specimens, 39 (67.2%) were detected in 293; 30 (51.7%) were detected in RD. 293 cells were sensitive for coxsackievirus A9 reference strain and echovirus 7 reference strain. Stool extracts induced enhanced cytopathic effect by echovirus 9 infection in 293 and HEL.

**Conclusions** : 293 cells are useful in the diagnosis of echoviral and some enteroviral infection.

(Korean J Clin Microbiol 2001;4(2):129-133)

**Key words** : Enterovirus, Cell culture, 293 cells, Echovirus, Stool

## 서론

장바이러스는 중추신경계를 침범하는 급성 바이러스 성 감염의 가장 흔한 병원체로[1, 2], 감염의 확인 및 혈청형 규명에는 세포배양을 이용하여 바이러스를 검

출하는 것이 표준방법이다[1, 3].

장바이러스 속(genus)에는 5가지 바이러스 군(group), 총 65 혈청형이 규명되어 있고[4], 이에 따라 장기에 대한 편향성(tropism)이 다르며[5], 세포배양시도 세포에 따라 분리율에 차이가 있다[6, 8]. 따라서 다양한 혈청형의 장바이러스를 임상검체에서 분리하기 위하여는 여러 가지 세포를 조합하여 사용한다[7, 9].

장바이러스 배양에 사용하는 세포 중 primary monkey kidney (PMK) 세포는 국내에서 구하기가 쉽지 않고, human diploid fibroblast는 수명이 제한되어 계대

접수번호 : CM 4-2-07

교신저자 : 김한성

(305-153)대전광역시 유성구 추목동 사서함 78-504

국군대전병원 병리시험과

Tel : 042) 870-4715 Fax :

E-mail : khslsh@hitel.net

배양시 노화되므로 계속적으로 사용할 수 없으며, 수립세포주(established cell line)인 human rhabdomyosarcoma (RD) 세포는 세포배양시 관찰되는 과성장파 세포변성을 장바이러스 감염으로 인한 세포병변효과와 쉽게 구별하기 힘든 단점이 있다[4].

아데노바이러스 40형 및 41형은 장바이러스와 마찬가지로 하부장관을 침범한다[5, 10]. 아데노바이러스 40형 및 41형의 분리에는 293세포가 이용되는데[11, 12], 이세포는 아데노바이러스 5형으로 human embrionic kidney 세포를 변형시킨 수립세포주이다[13].

장바이러스와 아데노바이러스 40형 및 41형이 하부장관에 편향성을 갖는 점을 감안하면, 293 세포가 장바이러스에도 감수성을 보일 것이라 예측할 수 있다. 본 연구에서는 장바이러스 감염환자로부터 채취한 임상검체를 대상으로 293 세포 및 기존의 장바이러스 검출에 이용되고 있는 세포 사이의 장바이러스 분리율을 비교함으로써, 293 세포가 장바이러스 배양에 있어서 유용한지를 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 대상

#### 1) 검체

에코바이러스 9형에 의한 무균성수막염이 유행하였던[14] 1996년 하절기에 한림대학교 의료원 한강성심병원에 장바이러스 배양이 의뢰된 대변 검체 44예와 1997년 하절기에 에코바이러스 30형이 분리되었던 대변 검체 33예와 뇌척수액 검체 58예를 대상으로 하였다.

#### 2) 표준 바이러스

표준 바이러스로는 폴리오바이러스 1형(ATCC VR-58), 콕사키바이러스 A9형(ATCC VR-186), 콕사키바이러스 B3형(ATCC VR-688), 에코바이러스 7형(ATCC VR-37), 장바이러스 71형(ATCC VR-784)을 사용하였다.

#### 3) 세포

검체 접종을 위한 세포로는 293 (ATCC CCL 1575), 인태아폐섬유아세포(human embryonic lung fibroblast, HEL; The University of Calgary, Provincial Laboratory의 Dr. Kevin으로부터 제공받음), RD (ATCC CCL 136), human cervix epitheloid carcinoma (HeLa, ATCC CCL 2) 세포를 사용하였다. 표준 바이러스의 역가를 결정하기 위하여는 MRC-5 (ATCC CCL 171)와 BS-C-1 (ATCC CCL 26) 세포를 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 접종세포의 준비

24 well 조직배양판에 293, HEL, RD, HeLa 세포를 배양하였다. 293, HEL, HeLa 세포에는 minimum essential medium (MEM)을 RD 세포에는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 배지로 사용하였고, 증식배지에는 우태아혈청을 10% 농도로 유지배지에는 2% 농도로 첨가하였다.

### 2) 검체 접종 및 바이러스 동정

대변 검체는 Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 1:10으로 희석하여 혼합한 후 3000×g에서 30분간 냉장 원심하였다. 상층액을 취하여 0.2 μM 필터로 여과한 여과액과 이를 다시 HBSS로 4배 희석한 희석여과액을 접종에 사용하였다.

대변 검체 여과액과 희석여과액을 각각 0.2 mL씩 293, HEL, RD, HeLa 세포에 접종한 후 배양하며 12일까지 세포병변효과를 관찰하였고, 에코바이러스에 대한 단클론 항체(mouse anti-echovirus monoclonal antibody, Chemicon International Inc., U.S.A.)를 이용하여 간접면역형광법으로 바이러스를 확인하였다[15].

### 3) 표준 바이러스에 대한 세포의 감수성 시험

폴리오바이러스 1형, 콕사키바이러스 A9형, 콕사키바이러스 B3형, 에코바이러스 7형, 장바이러스 71형을 세포에 배양 증식한 후 원심하여 상층액을 분주하여 보관된 것을 사용하였다. 조직배양감염농도(tissue culture infective dose, TCID)를 결정하기 위하여 표준 바이러스 배양액을 10배수로 계단희석한 후 96 well 조직배양판에 단층배양된 세포에 매 희석배수 당 6 well, 각 well 당 50 μL씩 접종하였고, 폴리오바이러스 1형, 콕사키바이러스 A9형, 에코바이러스 7형, 장바이러스 71형의 시험에는 MRC-5 세포를 콕사키바이러스 B3형의 시험에는 BS-C-1 세포를 이용하였다. 5일간 배양하여 세포병변효과를 관찰하였고, TCID<sub>50</sub>을 계산하였다[16]. 다음 단계로 5가지 표준바이러스를 100 TCID<sub>50</sub>, 10 TCID<sub>50</sub>, 1 TCID<sub>50</sub>, 0.1 TCID<sub>50</sub>, 0.01 TCID<sub>50</sub>, 0.001 TCID<sub>50</sub> 농도로 조정 한 후 293, HEL, RD, HeLa 세포에 접종하여 5일 후 세포병변효과를 관찰하였다.

### 4) 대변추출액이 에코바이러스 9형의 세포감염에 미치는 영향

임상검체에서 분리된 에코바이러스 9형 2주(strain)를 배양한 후, 100 TCID<sub>50</sub>, 10 TCID<sub>50</sub>, 1 TCID<sub>50</sub>, 0.1 TCID<sub>50</sub>, 0.01 TCID<sub>50</sub>, 0.001 TCID<sub>50</sub> 농도로 조정하여 293, HEL, RD, HeLa 세포에 중복 접종하였다. 중복 접종한 2 well 중 1 well은 장바이러스 음성인 대변을 1:10 희석한 후 원심하여 얻은 상층액 0.2 mL를 첨가하였고, 5일간 배

양한 후 세포병변효과를 관찰하였다.

3. 통계

세포간의 바이러스 분리율에 대한 비교에는 카이제곱검정(chi-square analysis)을 이용하였고, *P* 값이 0.05 미만인 경우 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 대변 검체의 바이러스 분리율

1) 에코바이러스 9형

44 대상 검체 중 31 검체에서 에코바이러스 9형이 분리되었다. 293 (21예), HEL (22예)의 분리율이 RD (6예), HeLa (3예)의 분리율보다 유의하게(*P* < 0.001) 높았다. 293 세포에서만 분리된 경우는 7예로 총 배양 양성 예의 23%이었다(Table 1).

2) 에코바이러스 30형

에코바이러스 30형이 분리된 33예 중 32예(97%)가 293 세포에서 분리되어, 293 세포의 분리율이 RD 세포의 분리율(17예, 52%)보다 유의하게(*P* < 0.005) 높았다 (Table 2).

Table 1. Number of viral isolates from echovirus type 9-positive 31 stool specimens in 4 cell lines

| Cell line | Total positive (%) | Only cell line positive |
|-----------|--------------------|-------------------------|
| 293       | 21 (68)*           | 7                       |
| HEL       | 22 (71)*           | 8                       |
| RD        | 6 (19)             | 2                       |
| HeLa      | 3 (10)             | 0                       |

\**P* value < 0.001, vs RD and HeLa.

Abbreviations : HEL, human embryonic lung fibroblasts; RD, human rhabdomyosarcoma cells; HeLa, human cervix epitheloid carcinoma cells.

2. 뇌척수액 검체의 바이러스 분리율

에코바이러스 30형이 분리된 58예 중 39예(67%)가 293 세포에서 분리되었고, 30예(52%)가 RD 세포에서 분리되었으며, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 2).

3. 표준 바이러스에 대한 세포의 감수성

폴리오바이러스 1형은 RD, HeLa 세포에서 콕삭키바이러스 A9형은 RD, 293 세포에서 감염력이 높았고, 콕삭키바이러스 B3형은 HeLa 세포에서 에코바이러스 7형은 RD, HEL, 293 세포에서 장바이러스 71형은 HEL 세포에서 높은 감염력을 보였다(Table 3).

4. 대변추출액의 영향

대변추출액을 첨가하였을 때 에코바이러스 9형에 대한 293세포의 감수성이 증가하였다(Table 4).

고 찰

장바이러스 감염의 진단에는 세포배양을 통하여 바이러스를 분리하는 전통적인 방법과 최근 소개된 중합효소연쇄반응법을 이용하고 있다. 중합효소연쇄반응법은 표준화가 어렵고 바이러스 혈청형을 알 수 없는 등 제한점이 있어서, 세포배양을 이용하여 바이러스를 검출하는 방법이 아직까지 “gold standard”로 인식되어 있다[4].

장바이러스의 분리에는 여러 가지 세포를 이용하고 있는데[7, 9], 이는 장바이러스가 혈청형에 따라 세포에 대한 감수성이 다르기 때문이다. 에코바이러스에 감수성이 높은 세포로는 HEL, PMK, RD 세포가 있다[17]. RD 세포는 증식속도가 빨라 과성장과 세포변성이 자주 일어나서 세포병변효과를 식별하기 어렵고, 추가적인 맹계대배양을 필요로 하는 등 일반검사실에서 사용하기에 제한점이 있으며[4, 6], 에코바이러스에 대한 RD 세포의 감수성이 높지 않다는 일부 보고도 있다 [18]. HEL 세포는 에코바이러스 등 장바이러스에 높은

Table 2. Frequency of echovirus 30 recovery by specimen type in 293 cells and RD

| Specimen | No. of isolates in |          |         | Frequency of isolation (%) in |    |
|----------|--------------------|----------|---------|-------------------------------|----|
|          | 293 and RD         | 293 only | RD only | 293                           | RD |
| Stool    | 16                 | 16       | 1       | 97*                           | 52 |
| CSF      | 11                 | 28       | 19      | 67                            | 52 |
| Total    | 27                 | 44       | 20      | 78*                           | 52 |

\**P* value < 0.05, vs RD.

Abbreviations : CSF, cerebrospinal fluid; See Table 1.

Table 3. Host cell susceptibilities to enteroviruses

| Cell line | Minimum TCID <sub>50</sub> producing CPE by day 5 |       |       |       |      |
|-----------|---------------------------------------------------|-------|-------|-------|------|
|           | PV1                                               | CA9   | CB3   | E7    | EV71 |
| 293       | 100                                               | 0.01  | 1     | 0.01  | ~*   |
| HEL       | 1                                                 | 0.1   | 100   | 0.01  | 0.01 |
| RD        | 0.001                                             | 0.001 | -     | 0.001 | 1    |
| HeLa      | 0.001                                             | -     | 0.001 | -     | 0.1  |
| Total     | 27                                                | 44    | 20    | 78*   | 52   |

\*No cytopathic effect at 100 TCID<sub>50</sub>.

Abbreviations : TCID, tissue culture infective dose; CPE, cytopathic effect; PV1, poliovirus 1; CA9, coxsackievirus A9; CB3, coxsackievirus B3; E7, echovirus 7; E71, enterovirus 71; See Table 1.

Table 4. Effect of stool extracts on host cell susceptibilities to echovirus 9

| Cell line | Minimum TCID <sub>50</sub> producing CPE by day 5 |        |                          |        |
|-----------|---------------------------------------------------|--------|--------------------------|--------|
|           | Without 1:10 Stool extracts                       |        | With 1:10 Stool extracts |        |
|           | Case 1                                            | Case 2 | Case 1                   | Case 2 |
| 293       | 1                                                 | 0.1    | 0.1                      | 0.01   |
| HEL       | ~*                                                | 100    | -                        | 100    |
| RD        | 100                                               | -      | 100                      | -      |
| HeLa      | -                                                 | -      | -                        | 100    |

\*No cytopathic effect at 100 TCID<sub>50</sub>.

Abbreviations : See Table 1 and 3.

감수성을 보이지만, 연속적인 계대배양시 노화되어 계속적으로 사용할 수 없다는 단점이 있는 반면, 293 세포는 수립세포주로서 계속유지할 수 있는 장점이 있다. 이 연구에서 293 세포는 대변 검체에서 높은 에코바이러스 분리율을 보였고, 이는 장바이러스 양성인 대변에서 293 세포의 장바이러스 분리율이 84%이었다는 Brown 등의 보고와 유사하였다[12].

표준 바이러스에 대한 293, HEL, RD, HeLa 세포의 감수성은 기존의 연구 결과와 유사하였다[6-8]. 표준 에코바이러스 7형에 대해서 RD 세포는 293 세포보다 감수성이 높았는데 이는 임상 검체의 에코바이러스 9형 및 30형의 분리율과 차이를 보였다. 이러한 차이는 혈청형의 차이 또는 에코바이러스 9형 및 30형은 야생주(wild type strain)인데 비하여 에코바이러스 7형은 검사실 적응주(laboratory adapted strain)이기 때문에 오는 차이로 생각할 수 있겠다.

대변 검체에서는 293 세포에서 RD 세포에서보다 에코바이러스의 분리율이 높았으나, 뇌척수액 검체에서는 유의한 차이가 없었다. 대변 검체에서의 이러한 차이는 대변이 293 세포의 감수성에 영향이 있음을 시사하며, 대변추출액을 가한 경우 293세포의 감수성이 증가된 결과로 입증할 수 있었다. 실제로 바이러스 배양시 분리율을 높이기 위하여 pH, 여러 가지 효소, 텍사

메타손, dimethyl sulfoxide 등을 사용하는데[19-21], 대변내의 특정 성분이 293 세포의 감수성에 영향을 준 것으로 추정된다.

에코바이러스 감염은 장바이러스 감염 중 가장 빈도가 높으며[22], 최근 국내에서 유행한 수막염도 에코바이러스가 원인 바이러스였다[14, 15, 23]. 결론적으로 임상검체로부터 장바이러스 분리시 통상적으로 사용하는 세포에 추가하여 또는 일부 세포를 대치하여 293 세포를 사용하는 것이 유용하며, 특히 대변 검체에서 에코바이러스 분리시 매우 효과적이라 생각한다.

## 요 약

**배 경 :** 장바이러스 감염의 진단은 세포배양을 이용하여 바이러스를 분리하는 것이 표준방법이다. 장아데노바이러스는 293 세포에서 배양한다. 장바이러스와 장아데노바이러스가 갖는 위장관에 대한 편향성으로 미루어 293 세포가 장바이러스 분리에 이용될 수 있으리라 생각하였다. 이에 저자들은 293 세포의 장바이러스 감염에서의 진단적 유용성을 조사하였다.

**방 법 :** Human embryonic lung fibroblasts (HEL), HeLa, RD, 293 세포를 이용하였고, 임상검체에서의 바이러스 분리율, 표준 장바이러스 혈청형에 대한 세포의 감수

성 및 대변추출액의 바이러스 분리에 대한 영향을 평가하였다. 에코바이러스 9형에 의한 수막염이 유행하던 시기에 의뢰된 대변 검체 44예와 에코바이러스 30형이 분리되었던 대변 검체 33예 및 뇌척수액 검체 58예를 대상으로 하였다.

**결 과 :** 에코바이러스 9형은 44 대변 검체 중 31 검체에서 분리되었으며, 바이러스가 분리된 31예 중 HEL에서 22예(71.0%), 293에서 21예(67.7%), RD에서 6예(19.4%), HeLa에서 3예(9.7%)가 양성이었다. 에코바이러스 30형이 분리되었던 33 대변 검체 중 293에서 32예(97.0%), RD에서 17예(51.5%)가 양성이었으며, 58 뇌척수액 검체 중 293에서 39예(67.2%), RD에서 30예(51.7%)가 양성이었다. 표준 장바이러스에는 293 세포가 콕사키바이러스 A9형과 에코바이러스 7형에 감수성이 높았다. 대변추출액은 293 세포에서 에코바이러스 9형의 감염력을 증가시켰다.

**결 론 :** 293 세포가 에코바이러스를 포함한 장바이러스 감염의 진단에 유용하게 이용될 수 있으리라 생각한다.

## 참 고 문 헌

1. Rotbart HA. Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis* 1995;20:971-81.
2. Wildin S and Chonmaitree T. The importance of the virology laboratory in the diagnosis and management of viral meningitis. *Am J Dis Child* 1987;141:454-7.
3. Overall JC Jr. Diagnostic virology. In : McClatchey KD. ed. *Clinical laboratory medicine*, Baltimore: Williams & Wilkins, 1994:1359-85.
4. Rotbart HA. Enteroviruses. In : Marray PR, Baron EJ, et al. eds. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1999:990-8.
5. Minor PD, Morgan-Capner P, Schild GC. Enteroviruses. In : Zuckerman AJ, Banatvala JE, et al. eds. *Principles and practice of clinical virology*, Chichester: John Wiley & Sons, 1994:417-39.
6. Dagan R and Menegus MA. A combination of four cell types for rapid detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Med Virol* 1986;19:219-28.
7. Chonmaitree T, Ford C, Sanders C, Lucia HL. Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *J Clin Microbiol* 1988;26:2576-80.
8. Johnston SLG, Siegel CS. Presumptive identification of enteroviruses with RD, Hep-2 and RMK cell lines. *J Clin Microbiol* 1990;28:1049-50.
9. Costello M and Yungbluth M. Viral infection. In : Henry JB ed. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*, 19th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996:1083-114.
10. Minor PD, Morgan-Capner P, Schild GC. Adenoviruses. In : Zuckerman AJ, Banatvala JE, et al. eds. *Principles and practice of clinical virology*, Chichester: John Wiley & Sons, 1994:417-39.
11. Takiff HE, Staratus WS, Garon CF. Propagation and in vitro studies of previously non-cultivable enteral adenoviruses in 293 cells. *Lancet* 1981;8251:832-4.
12. Brown M and Petic M. Evaluation of cell line 293 for virus isolation in routine viral diagnosis. *J Clin Microbiol* 1986;23:704-8.
13. Graham FL and Smiley J. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36:59-74.
14. 권오수, 이경림, 김원엽, 정원조, 마상혁, 이규만. 96년 상반기에 경상남도 중부지방에 유행한 무균성 뇌막염에 대한 고찰. *소아감염* 1997;4:97-104.
15. 김혜경, 강희정, 이규만. 1993년 유행한 무균성 수막염 환자에서 확인된 제9형 에코바이러스 감염. 대한임상병리학회지 1994;14:185-92.
16. Koneman EW, Allen SD, et al. eds. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 4th ed., Philadelphia: J.B. Lippincott, 1992:965-1074.
17. Grandien M, Forsgren M, Ehrnst A. Enteroviruses. In : Lennette EH ed. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections*. 7th ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1995:279-97.
18. Schnur D. Enteroviruses. In : Lennette EH ed. *Laboratory diagnosis of viral infections*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1992:351-64.
19. Zerbini M, Musiani M, Xarpi C, Faccieri E. Productive and abortive replication of human cytomegalovirus at different environmental pH values. *Arch Virol* 1982;72:127-31.
20. Spendlove RS, McClain ME, Lennette EH. Enhancement of reovirus infectivity by extracellular removal or alternation of the viral capsid proteolytic enzymes. *J Gen Virol* 1970;9:83-94.
21. West PG, Hartwig RA, Baker WW. Comparison of sensitivities of three commercial MRC-5 cell lines grown in shell vials to cytomegalovirus and response to enhancing agents. *J Clin Microbiol* 1992;30:557-60.
22. Moore M. Enteroviral disease in the United States, 1970-1979. *J Infect Dis* 1982;146:103-8.
23. 정현주, 김선주, 김윤정, 맹국영. 무균성 수막염 진단을 위한 바이러스 배양시 인후도말의 유용성. 대한임상병리학회지 1997;17(부록2):S384.