노로바이러스 *in vitro* 증식 모델 개발

Progress on the Development of in vitro Human Norovirus Cell Culture Model

김동환[1], 이정수[2], 주인선[2], 이희정[2], 명진종[1*]

Dong Hwan Kim[1], Jeong-Su Lee[2], In-Sun Joo[2], Hee Jung Lee[2], Jinjong Myoung[1*]

[1]전북대학교 인수공통전염병연구소, [2]식품의약품안전처

[1]Korea Zoonosis Research Institute, Chonbuk National University,

[2]Ministry of Food and Drug Safety, Korea

1. Norovirus 서론 (발견과 질병)

노로바이러스는 1968년 미국 오하이오주의 Norwalk라는 마을 초등학교에서 급성위장염이 집단 발병한 것을 계기로 그 존재가 알려지고, 1972년에 면역전자현미경법으로 바이러스 감염에 의한 질환임을 확증하였다 (1, 2). 위장염은 다양한 세균과 바이러스의 감염에 의하여 발병하나, 바이러스성 위장염이 특별히 문제가 되는 것은 효과적인 항바이러스제제가 아직 개발되어 있지 못하기 때문이다. 노로바이러스에 의한 급성 위장염은 전세계 바이러스성 위장염 발병 원인의 90% 이상을 차지할 것으로 추정된다. 미국의 경우 영아와 노약자등 매년 800명 정도의 사망자가 발생되고, 개발도상국을 포함한 전세계적으로는 5세 이하의 유아에서 매년 200,000 명의 사망자를 내는 것으로 보고되었다. 건강한 성인에서의 노로바이러스 감염은 구토와 설사를 포함한 병변을 보이고 대부분 2~3일 후에는 자연 치유가 가능하지만, 면역능이 약한 환자에서는 장기적이고 심각한 질환을 나타낼 수도 있는 것으로 알려져있다 (3).

노로바이러스가 발견되고 게놈이 cloning이 된 이후 (4) 바이러스를 in vitro에서 배양하고자 하는 많은 시도가 이어져 왔다. 그러나 human norovirus가 감염할 수 있는 세포주의 부재로 인하여, 노로바이러스 배양은 현재로서는 in vitro에서는 불가능하다. 따라서 바이러스를 얻는 것은 환자들이나 인간 지원자들에게 바이러스를 접종하고 분변 샘플을 얻음으로써만 가능하다. 따라서 human norovirus의 병리학적 특성을 연구하는 것이나, 바이러스의 증식 및 바이러스 유전자 발현의 기작을 연구하는 것은 다른 양성가닥 바이러스 (picornavirus, Hepatitis C virus, 등)에 비해서 연구의 진척이 매우 느린 편이다. 이 글에서는 현재까지 노로바이러스의 in vitro 배양 기술 개발의 현황과 문제점을 살펴보고, 노로바이러스를 연구할 수 있는 대체 시스템에 대하여 살펴보고자 한다.

* Correspondence to: Jinjong Myoung
Korea Zoonosis Research Institute, Chonbuk National University,
820-120 Hanaro, Iksan-Si, Chollabuk-Do, South Korea 570-390
Tel: +82-63-900-4055 E-mail: jinjong.myoung@jbnu.ac.kr

표1. 인간 유래 세포주에서의노로바이러스 감염 시험

사용된 세포주	세포 배양 및 형질 전환 처치법	Novirus strain	Reference
인간 위장관 상피 세포주			
AGS	▷ 세포배양기 회전 ▷ 저온 배양 (34 ℃)	GGI.1, GGI.2, GGI.4, GGII.4	(5, 8)
Caco-2	▷ 세포 분화 유도 (I & II) ▷ CCD-18 세포와의 공배양 ▷ 다양한 세포 배양법 (III) ▷ 원심분리를 이용한 감염 (IV) ▷ Lipofectamine Plus 첨가 ▷ 저온 배양 (34 ℃)	GGI.1, GGI.2, GGI.4, GGII.3, GGII.4, GGII.5	(7, 12, 15)
HT-29	▷ 세포 분화 유도 (I) • 장기간 배양 • transwell 배양	GGI.1, GGI.2, GGI.4, GGII.3, GGII.4, GGII.5	
HCT-8 Detroit 562 HuTu-80	5. 세포 분화 유도 (II) • DMSO (0.3-1%) • Butyric acid (1-5mM) • Insulin (0.5 U/ml) • Dexamethasone (0.1-10 uM) 6. 다양한 세포 배양법 (III) • 세포배양기 진동 (rocking) • 저장성 용액 (hypotonic shock) 7. 원심분리를 이용한 감염 (IV)	GGI.2, GGI.4, GGII.3, GGII.4, GGII.5	(6, 9, 13)
I-407 Kato-3	8. Lipofectamine Plus 첨가 9. 저온 배양 (34 ℃)	GGI.1, GGII.4	(5, 10)
기타 인간 조직 세포주			
A549			
CCD-18	▷Caco-2 세포와의 공배양	GGI.1	(7)
Detroit 551	▷ 세포배양기 회전	GGI.1-4, GGII.1-4	(8)
HEp-2			
HEC	▷ 원심분리를 이용한 감염 (IV)	GGI.1	(11, 14)
HeLa	▷ 저온 배양	GGI.1	(5)
RD	▷ 세포배양기 회전	GGI.1-4, GGII.1-4	(8)
293	▷ 원심분리를 이용한 감염 (IV)	GGI.1	(11, 14)

2. In vitro 노로바이러스감염 및 배양 기술법

2.1 세포주 직접 감염법 (de novo infection)

Human norovirus를 in vitro에서 배양하기 위하여 많은 시도들이 이어져 왔다 (표 1 & 2). 인간 위장관 상피 세포주 뿐만 아니라 다양한 동물 세포주들에 감염을 시도하였으나, 현재까지 뚜렷한 진전은 없는 형편이다. 일반적인 바이러스 감염법이성공적이지 않았기 때문에 다양한 세포 배양

표2. 동물 유래 세포주에서의노로바이러스 감염 시험

원숭이 신장 상피세포	Origin
FRhJ-4	Rhesus
MA104	Rhesus
TMK	Cynomolgus
Vero	African green monkey

기타 동물 세포	Origin
CR-PEC	Cotton rat
CRFK	Feline
IEC-18	Rat
IEC-6	Rat
L208	Mouse
MDCK	Canine
MDBK	Bovine

표 1 & 2 (Adapted and modified from Duizer, E. et al (16))

법 및 세포주의 형질 전환이 시도 되었다 (5-15). 그러나 그 어떤 방법으로도 노로바이러스의 감염 (de novo infection)이 이루어진다는 징후는 관찰되지 않았다(16). 한 가지 가능성은 분변으로 배출되는 노로바이러스는 급속하게 불활성화 됨으로써, de novo 바이러스 감염에 적합한 바이러스 샘플이 아닐 수 있다는 것이다. 따라서 인간 분변에서 추출하는 것 이외의 방식으로 감염용 바이러스 샘플 (virus stock)을 얻을 필요가 있다. 그러나 Schwab et al (2000)의 보고에 따르면(17), 노로바이러스는 매우 안정된 바이러스이고, 인체 밖에서는 매우 오랫동안 생존 할 수 있는 것으로 알려져 있다. 또한 인간 분변에 존재하는 다른 장내 바이러스를 조사해보면, 분변에서 바이러스는 얻는 실험적 방법에 의해서 바이러스의 불활성화가 일어나지는 않았다. 따라서, 노로바이러스의 불활성화가 in vitro에서 바이러스 감염을 제한할 가능성은 낮아 보인다(16).

다른 Calicivirus의 감염과 증식에 내장의 내용물이 필요하다는 것이 알려져 있으므로 (18-20), 바이러스와 세포가 인체내에서와 비슷한 환경으로 일종의 변형이 필요하지 않을까 하는 가설이 제기되고 시험되었다. 예를 들어, trypsin 혹은 gnotobiotic pig에서 얻은 내장 내용물 (intestinal contents)이 각각 고양이 노로바이러스와 돼지 노로바이러스의 증식에 도움을 준다는 것이 보고 되어 있다. 하지만 이러한 첨가제를 세포배양에 넣어주는 것으로는 인간노로바이러스의 감염과 증식에도움이 되지 않았다. 또 한가지 확인해야 할 사항은 바이러스 특이성 항체의 존재가 바이러스의 감염에 필요하거나 방해할 수 있다는 가능성이 있다. 만약, 인간 분변에서 얻은 바이러스가 장내 내용물에 포함된 바이러스 특이성 항체에 의해서 중화 된 채로 존재한다면 바이러스의 감염을 방해할 가능성이 있다. 역으로 최근HCMV 감염 연구에 따르면, 중화 항체가 바이러스와 결합함으로써 비면역세포 (non-immune cell)에의 감염을 오히려 촉진한다고 보고되었다 (21). 따라서 노로바이러스를 중화항체와 결합시켜줌으로써 바이러스 감염을 오히려 증가시킬 흥미로운 가능성도 확인해야 할 것으로 보인다.

세포주 뿐만 아니라, 사람 유래 macrophage 및 dendritic cell에의 노로 감염이 시도되었다 (22). Murine norovirus (MNV)는 원래 면역기능이 약화된 생쥐에서 처음 발견되었다 (23). MNV는 STAT-$1^{-/-}$ 생쥐의 macrophage와 dendritic cell에 감염하고 증식하는 것이 확인되었고, 이후 in vitro에서도 유사한 세포에 감염이 가능하다는 것이 보고 되었다(24, 25). 또한 소아 환자의 혈청에 노로바이러스 RNA가 검출되었다(26). 따라서 인간 노로바이러스도 비슷한 세포에 감염할 가능성을 시험 하였으나, 인간 노로바이러스는 macrophage나 dendritic cell에 감염하지 못하는 것으로 확인되었다(22). 돼지 노로바이러스 (PEC)의 증식에 담즙산 (bile acids)이 반드시 필요하고, 담즙산이 STAT1의 기능을 억제한다는 흥미로운 보고가 있다 (27). 또한 Type I 및 II 인터페론이 MNV의 단백질 발현과 증식을 억제한다는 알려져있고(24, 28), STAT1이 결핍된 생쥐에서 MNV가 증식한다는 점에 착안하여, siRNA knockdown으로 이 분자들의 발현을 억제한세포주에서 human norovirus의 감염과 증식을 조사하였지만, 바이러스의 감염은 확인 되지 않았다 (Mary K. Estes, personal communications).

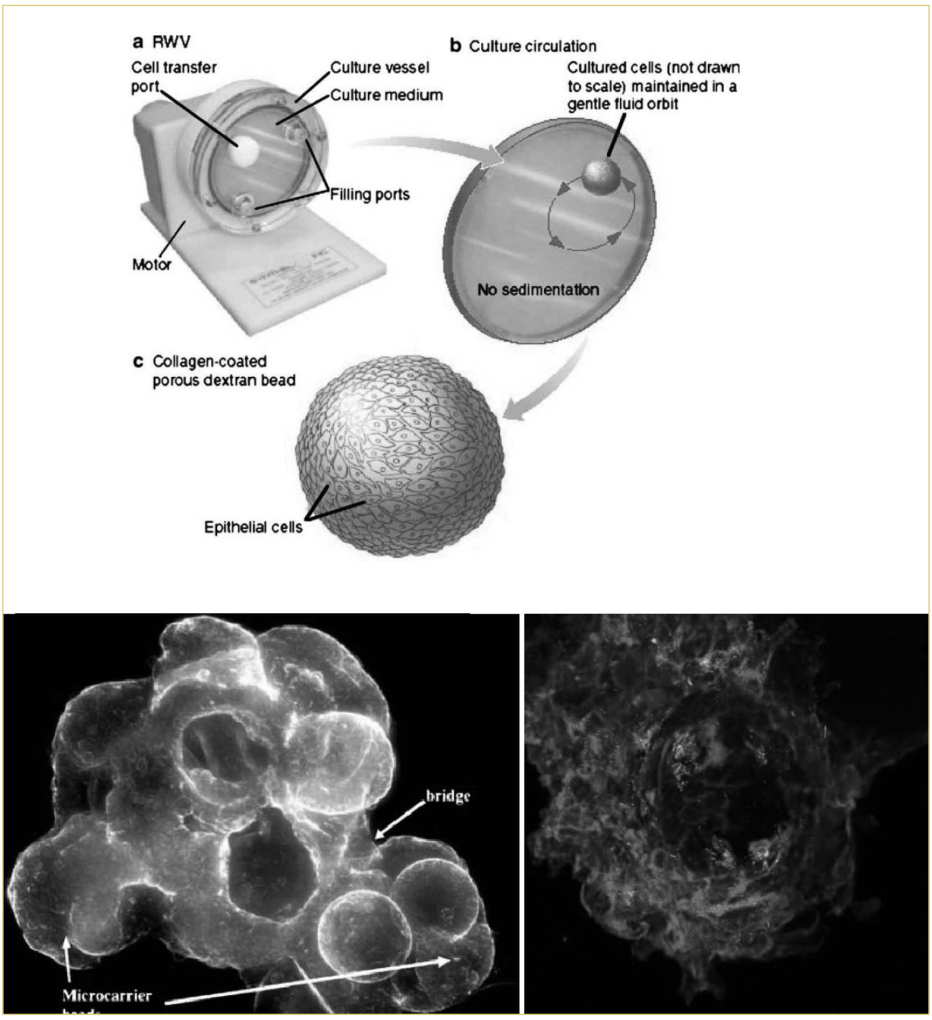

그림 1. 3-D 세포 배양 기술의 개발과 Salmonella 감염에의 적용.NASA에서 처음 개발한 rotating-wall vessel (RWV)는 세포를 부유 상태에서 3-D 배양하기에 최적화 된 기술이다. RWV 상태에서 키운 세포는 생체에서 가지는 특성을 잘 보존하는 것으로 알려져 있다. RWV bioreactor는 배양액으로 가득 채워진 cylinder로서, 세포가 cylinder의 벽에 붙지 못하도록 cylinder를 회전 시킨다. 이렇게 부유하는 세포들은 콜라겐 코팅이 된 bead 위에서 서로 붙어 세포의 집단체를 이루게 되고, 이것은 결국 생체에서와 비슷한 3-D 구조를 이루게 된다. RWV를 이용한 세포 배양법 (위), 3-D로 키운 HT-29 세포 (왼쪽 아래), 3-D Int-407 세포에 감염하는 *S. typhimurium* (오른쪽 아래). Reprinted with permission from the American Society for Microbiology (ASM News, April 2004, pp. 169-175)

의 상황과는 매우 다를 수 있음을 고려해야 한다. 세포가 제대로 분화하기 위해서는 생체 내에서처럼 세포의 apical 및 basolateralpolarisation이 일어나야 하는데, 2-D 배양에서는 생체에서와 비슷한 분화는 일어날 수 없다는 것이다. *Salmonella enteritica*의 감염과 병원성을 조사하기 위해서 인간 소장 상피 세포의 일종인 INT-407을 이용하여 3D organoid culture를 처음 개발하였고 (29-31) (그림 1), 이를 응용하여 Escherichia coli (29, 30)및 Pseudomonas (32)등 다양한 세균과 cytomegalovirus (33), Epstein-Barr virus(34), 및 노로바이러스(35)의 감염을 위한 3D 세포 배양법이 개발 되었다. 이 3-D 세포 배양 기술은 NASA에서 처음 개발 되었는데 (31), 기본적으로는 회전하는 cyliner를 가진 bioreactor이다. 우선 세포 배양액을 cylinder에 가득 채우고, 콜라겐으로 코팅된 bead (collagen-I-coated porous micro-carrier beads)를 넣어 준다. 여기에 세포를 넣어주고 회전을 시키게 되는데, 이 회전 하는 액체의 힘 때문에 세포는 cylinder 벽에 붙지 못하고, bead 위에서 서로 엉겨 붙어 3차원적 구조로 자라나게 된다. 이것은 마치 생체 내에서 조직이나 기관의 모양과 구조를 띄

2.2 3-Dimenstional (3D) 세포 배양법

최근에 3D 세포 배양 기술이 개발되고, 이것이 다양한 병원성 세균 및 바이러스의 감염과 배양을 돕는다는 것은 것은 고무적이다. 사실 배양용기 상에서 monolayer로 세포를 배양하고 여기에 바이러스를 감염시킨다는 것은, 생체 내에서

게 되고, 연구한 기능을 갖추게 된다 (그림 1). 이렇게 3-D 구조로 자라난 INT-407 세포는 다양한 세포로 분화 되어, 마치 bioreactor에서 '공배양 (co-culture)' 을 하는 것과 비슷한 효과가 있다(29, 35). 이렇게 생성된 다양한 세포의 공배양이노로바이러스의 감염성에 중요한 영향을 미칠 수도 있다고 알려져 있다(16). 또한 이러한 3-D 배양의 끝 (apical tip)에서 자라는 세포는노로바이러스의 감염에 필요한 항원(예: Lewis antigen A)을 발현 하는 것으로 보고 되었다.3-D 배양으로 자라는 INT-407 세포에 노로바이러스를 감염시켰을 때, 세포의 괴사 (cytopathic effect, CPE)가 관찰 되었고, 5번의 passage를 거치는 동안 바이러스의 증식이 RT-PCR과 FISH에 의해 검출되었다. 이를 근거로 Straub et al은 3-D 구조로 자라는 INT-407 세포에 노로바이러스의 감염이 가능하다고 보고 하였다. Straub et al (35) 등이 2007년에 처음 3-D 배양 기술로 Caco-2와 HT-29 세포에노로바이러스를 감염시키고자 시도 하였을 때는 실패하였다고 보고 하였으나, 이후 2011년에 같은 연구진의 연구에 의하면, Caco-2 세포에서 유도된 클론 (subclone, $C2_{bbe1}$)의 3-D 배양에서는 감염이 확인 된다고 보고 하였다 (36).Caco-2를 사용한 첫 시도에서는 실패하고, 두번째 시도에서 성공한 이유는$C2_{bbe1}$이 모세포인 Caco-2와는 다르게 3D 배양시에온전히 분화할 수 있었기 때문이라고 기술하고 있다.

그러나 다른 그룹의 연구에 따르면 (2013년), 같은 방법으로 확인 하였을 때 노로바이러스의 감염이 관찰되지 않았다고 보고 하였다 (37). 3-D 배양기술을 병원체 연구에 처음 도입한 Nickerson 그룹과 norovirus 연구를 중점적으로 하는 Estes 그룹의 공동 연구에 의하면, real-time PCR이나 형광염색법에 의해서 바이러스의 감염이 측정되지 않았을 뿐 아니라, 3-D 상태로 자라는 세포에서 Lewis antigen과 같은 histo-blood group antigen의 발현이 거의 이루어지지 않았다고 보고 하였다. 뿐만 아니라, Straub et al 이 보고한 CPE는 인간 분변에서 얻은 노로바이러스 샘플에 흔히 오염된 lipopolysaccharide의 독성 때문인 것으로 결론을 내렸다.

2.3 Norovirus in vitro 배양 기술 개발의 전망과 과제

노로바이러스는 인간의 소장에서 발현되는 HBGA에 결합함으로써 숙주에 감염하는 것으로 알려져 있다(38-44). 인간을 대상으로 한 실험에서 정상적인 $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase (FUT2) 유전자가 발현되지 않는 경우 노로바이러스의 감염이 일어나지 않는다는 것이 보고되었다. FUT2는 상피세포의 표면에 HBGA를 발현함에 있어서 필수적인 효소인 것으로 알려져 있고, 이렇게 생성된 HBGA는 체액으로 분비되기도 한다(45, 46). 위장과 십이지장이 만나는 접점에 있는 상피세포에서는 HBGA type 1 (예, Lewis b[Leb])가 주로 발현이 되고, 분비샘 근처에서는 (glandular level) HBGA type 2가 주로 발현된다(42, 47-49). 노로바이러스 virus-like particles (VLPs)을 이용한 실험에서, VLP가 HBGA에 결합하고, 이 결합이 VLP의 세포내 진입 (internalization)을 유도하는 것으로 알려져 있다(42). 또한 VLP는 A, H1 형, 및 Lewis b 항원에 특이적으로 결합하는 것으로 보인다 (42, 50-52). 따라서 norovirus in vitro 배양 기술이 성공적이기 위해서는 반드시 확인 된 노로바이러스의 수용체가 발현 되어야 할 것으로 사료된다. 그러나, FUT2를 인간 hepatoma 세포주인 Huh-7에서 과량 발현 하였을 때, 바이러스가 세포에 결합하는 정도는 증가하였으나, 바이러스가 세포내로 감염하고 증식하는 것에는 영향을 미치지 못하였다. 다른 많은 보고에서도 FUT2의 과량발현이 바이러스의 세포 결합은 증가 시키지만 그것을 넘어 선 바이러스 감염과정, 즉 virus internalization, uncoating 및 viral genome replication등에는 영향을 미치지 못하는 것으로 확인 되었다(42, 53-56).이것은 HBGA의 발현만으로는 노로바이러스의 감염을 가능하게 하지 못한다는 것을 의미한다. 뿐만 아니라, 또 다른 단백질의 존재가 필요할 수도 있다는 것을 의미할 수도 있다(37, 57).이와 관련하여 노로바이러스의 in vitro 배양 기술 개발이 어려운 이유 중 흥미로운 가설 하나는, 노로바이러스가 숙주 세포와 상호 작용을 함에 있어 HBGA뿐 아니라 또 다른 co-receptor가 필요 할지 모른다는 것이다 (57). 이것은 다양한 그룹에 의해서 제기된 가설

이기도 하다(37, 58). 향후 연구에서 co-receptor의 존재가 실재로 알려진다면, in vitro 바이러스 배양 모델의 개발에 획기적인 전기가 마련 될 것으로 보인다.

더불어 성공적인 노로바이러스 in vitro 배양 기술의 확보를 위해서는 인간 일차 소장 세포 (primary human intestinal cells)이나 소장 조직 (tissue explants), 혹은 몇 가지 세포를 공배양하는 3-D 배양 등 다양한 방법들을 시도해 보는 것이 바람직하다고 판단된다. 또한 최근 연구에서 보여진 바와 같이 pluripotent stem cell을 이용하여 인간 장 기관 (intestinal organoids)를 개발, 사용하는 것도 고려해 볼만 하다(59).

노로바이러스 연구를 어렵게 하는 또 하나의 이유는, 정제되고 순수한 바이러스 스톡 (virus stock)을 얻기가 힘들다는 것이다. 인간 분변에서 얻은 바이러스 샘플은 많은 경우, LPS나 다른 enteric virus (예, rotavirus)등에 의해 오염되어 있어, 감염 시도에서 관찰되는 CPE를 신뢰할 수 없게 만들기도 한다 (37). 따라서 정제된 다량의 노로바이러스를 생산할 수 있는 세포주 (norovirus producer cell line)의 생성은 노로바이러스 분야 발전의 획기적인 전기를 마련해 줄 것으로 사료된다.

3. Norovirus 연구 방법론

3.1 Norovirus replicon이나 cDNA clone 을 활용하는 방법

아직 human norovirus가 감염할 수 있는 세포주가 없기 때문에, 바이러스의 감염을 막는 백신이나 처치법을 개발이 매우 느리게 진행되고 있다. 그러나 바이러스 게놈의 일부를 발현하는 replicon을 활용한다면, 항바이러스 제제를 찾고 효능을 시험할 수는 있다. 처음 개발된 human norovirus replicon은 VP1 캡시드 단백질 대신에 Neomycin을 발현함으로써 세포내에서 안정적으로 유지할 수 있는 Huh-7 세포와 BHK-21 세포였다 (그림 2)(56). 몇 번의 계대배양 동안 바이러스 게놈이 유지 될 뿐 아니라, 노로바이러스 단백질이 발현되는 것을 확인 하였다. 이 replicon을 이용하여, Chang et al 등은 노로바이러스의 증식을 막는 항바이러스 제제로 interferon alpha(56), interferon gamma, ribavirin (60) 및 peptide-conjugated phosphorodiamidatemorpholino oligomers (PPMOs)를 찾아 낼 수 있었다(61). 이 replicon system은 virus capsid 단백질이 발현 되지 않는 상태에서 비구조단백질을 저해하는 항바이러스억제제를찾는데는 도움이 되지만, 바이러스 증식의 전체적인 cycle 을 연구하는데 적합한 것은 아니다. 이런 제약을 극복하고자노로바이러스 게놈 전체를 발현하는 시스템이 두 연구 그룹에 의해서 독자적으로 개발 되었다 (62, 63). 이들 두 그룹이 디자인 한 노로바이러스 생성 전략은 매우 유사하다. 우선 T7 promoter를 노로바이러스 cDNA 앞에 붙이고, 그 뒤에 poly(A)를 26에서 30개 정도를 넣었다. T7 polymerase의 전사를 조절 하기 위해 T7 terminator sequence를 붙었으며, poly(A)와 T7 terminator 사이에 ribozyme sequence를 넣어, 정확한 바이러스 게놈이 생성되도록 하였다 (그림 2). T7 polymerase를 재조합 vaccinia virus에 의해서 발현되도록 하였을 때, 전자 현미경상에 virus particle이 생성되었고, 그 부유밀도는 1.318 g/cm^{3}로 측정되었다. 이것은 바이러스 게놈과 캡시드가 결합된 온전한 virus particle이 형성되었음을 의미한다. 그러나 여기서 생성된 바이러스의 감염성 (infectivity) 여부는 확인할 수 없었다.

3.2 Norovirus virus-like particle (VLP)를 이용하는 방법

노로바이러스의 면역학적 연구를 위해서 VLP 만큼 좋은 연구의 재료는 없을 것이다. VLP는 RNA 게놈이 없이 self-assembly된 캡시드 단백질만으로 된 particle을 의미한다. 노로바이러스는 VP1과 VP2의 두 개의 서로 다른 캡시드 단백질이 있고, VP1 만으로도 virus particle을 형성할 수 있는데, VP2의 기능과 역할에 대해서는 아직 알려진 바가 없다. VP1만으로 만들어진 VLP는 RNA 게놈을 가진 정상적인 virus particle과 형태상 완벽히 동일한 것으로 알려져 있다. 지금까지 다양한 단백질 발현 시스템을 이용하

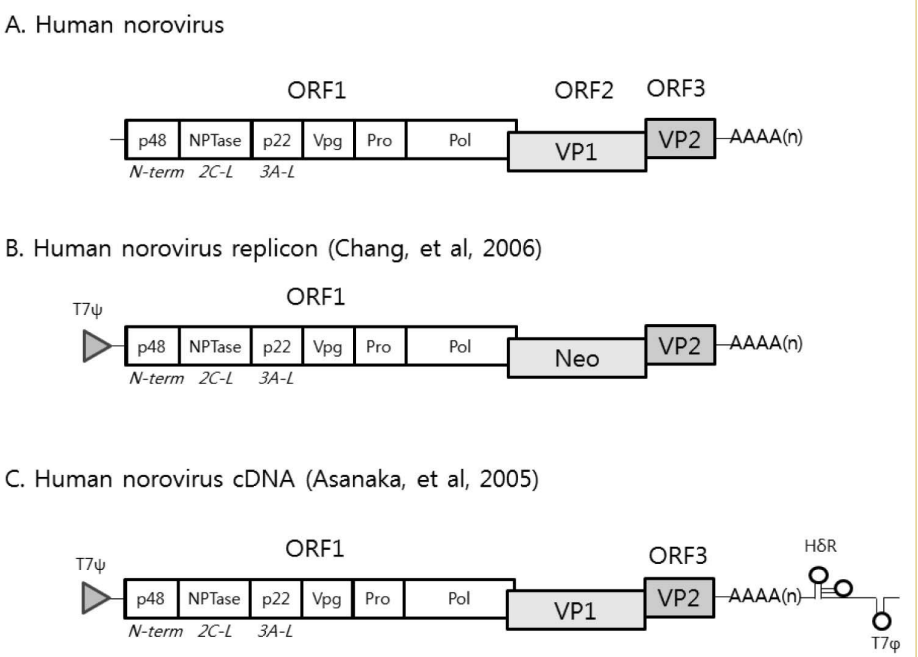

그림 2. Human norovirus replicons. T7ψ: T7 promoter sequence, T7φ: T7 transcription terminator, HδR: hepatitis delta (δ) virus ribozyme sequence.

여 VLP를 생성하였는데, 예를 들면, 곤충세포(64, 65), 인간 세포 (293T(66),Caco-2(67)), 및 식물 세포 (토마토(68), 감자(69))가 효과적으로 사용되었다. 노로바이러스를 생성하는 세포주가 아직 존재하지 않은 상태에서, VLP를 이용한 연구는 바이러스가 숙주 세포와 어떻게 상호 작용을 하는지에 대한 이해를 넓히는데 획기적인 역할을 하였다. In vitro에서 VLP는 숙주 세포의 HBGA에 직접 결합하는 것을 확인 하는 것을 시작으로(42), VLP가 A, H type 1, Le^b 다당류에 선택적으로 잘 결합한다는 것 또한 확인할 수 있었다 (42, 50-52). 이러한 연구를 통하여 노로바이러스의 세포수용체가 HBGA임을 밝혀 낼 수 있었다는 점에서 VLP가 노로바이러스 연구분야에 미친 영향은 대단히 크다고 할 수 있다. 향후에도 백신 개발이나, 바이러스-숙주 상호 작용을 연구하는데 있어 VLP의 활용 가치는 무척 클 것이라고 사료된다.

3.3 동물 노로바이러스를 대용하는 방법

아직 노로바이러스의 세포 배양 기술이나 동물 모델 개발이 미진하기 때문에, 다른 동물의 Calicivirus를 이용하는 것은 큰 의미가 있다. 사실 현재까지 알려진 human norovirus의 유자자 발현 기작이나 유전자의 기능 및 게놈의 구조는 animal norovirus 연구에서 추론된 것이 많다. Animal calicivirus 중 세포 배양이 가능한 것을 Table 3에 표시하였다. Animal norovirus 중에 그 특성이 가장 잘 연구 된 것은 소동물 연구모델이 있는 MNV일 것이다(23, 70, 71). MNV는 human norovirus와 유사하게 오염된 음식을 섭취함으로써 감염이 일어난다(72). murine macrophage나 DC에 감염하고, macrophage cell line인 RAW264.7 세포에 잘 감염하고 증식하기 때문에(25) 연구가 매우 용이하다는 장점이 있다. MNV는 genogroup V에 속하고 (비교: human norovirus는 genogroup I, II, 및 IV에 속함), MNV가 노로바이러스에 대한 면역 반응을 연구하기에 적합한 것은 기존에 존재하는 knock-out mouse를 이용하여 쉽게 연구 할 수 있기 때문인데 (73), mouse model 연구를 통하여 노로바이러스의 감염과 면역 반응 및 면역 메모리 연구 등이 활발히 연구 되었다 (74-76). 뿐만 아니라, 노로바이러스 백신 개발에 많이 활용되고 있다(77, 78).

하지만 많은 MNV system이 가지는 많은 장점에도 불구하고, MNV 연구는 분명한 한계가 존재한다. 우선 MNV 감염 후 mouse는 설사나 구토를 하지 않으며, 급성 감염 후 제

표 3. Human norovirus 연구를 위한 동물 질환 모델 (animal pathogenicity model)

Virus	Genus	질병	숙주	세포배양
GII NV (Hu) AY772730	Norovirus	Gastroenteritis	Human	불가능
GII.4 NV (Hu) DQ658413	Norovirus	Gastroenteritis	Human	불가능
GI NV (Hu) AB187514	Norovirus	Gastroenteritis	Human	불가능
Swine NV (Hu-like) AB126320	Norovirus	Asymptomatic	Porcine	불가능
BNV AY126474	Norovirus	Asymptomatic	Bovine	불가능
MNV AY228235	Norovirus	Asymptomatic*	Murine	macrophage/DC
Tulane EU391643	Recovirus	Not known	Rhesus macaques	kidney cells
RHDV EF558575	Lagovirus	Hemorrhagic	Rabbits	BHK21
PEC AF182760	Sapovirus	Gastroenteritis	Porcine	kindney cell line
Saporovirus Nc_006269	Sapovirus	Gastroenteritis	Human	불가능
FCV U13992	Vesivirus	Respiratory / systemic disease	Cat	kidney cortex cells

*MNV는 면역능이 약화된 mouse에 감염할 경우 전신 감염을 일으킬 수 있음

Adapted and modified from Vashist, S. et al (58)

거 되는 human norovirus와는 달리, 만성 감염을 하는 것으로 보고 되었다 (79, 80). 또한 MNV의 유전형이 다양하지 않기 때문에 백신 개발에 응용하기에는 한계가 있으며 (81), human norovirus가 감염하지 않는 macrophage/DC에 감염하는 분명한 차이가 존재한다 (77).

4. 결론

Human norovirus는 최초의 발견 이후 40여년이 흘렀지만, 아직 바이러스의 감염, 증식, 면역 반응에 대해서 알려진 것이 거의 없다. 이것은 바이러스 세포 배양 기술의 부재와 소동물 연구 모델이 없기 때문이다. 노로바이러스에 대한 항바이러스제제나 백신을 개발 하고 시험하기 위해서는 human norovirus가 감염할 수 있는 세포 배양 시스템을 개발하는 것이 무엇보다 중요하다. 향후 폭발적인 노로바이러스 연구의 성장은 세포배양 기술 개발에 의지하는 바가 크다고 할 수 있겠다.

Acknowledgement

본 연구는 식품의약품안전처의 2014년 용역연구사업의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다 (14162-973)

참고 문헌

1. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. Journal of virology 10:1075-1081.

2. Kapikian AZ. 2000. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. The Journal of infectious diseases 181 Suppl 2:S295-302.

3. Bok K, Green KY. 2012. Norovirus gastroenteritis in immunocompromised patients. The New England journal of medicine 367:2126-2132.

4. Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. 1990. Norwalk virus genome cloning and characterization. Science 250:1580-1583.

5. Cubitt WD, Barrett AD. 1984. Propagation of human candidate calicivirus in cell culture. The Journal of general virology 65 (Pt 6):1123-1126.

6. Gauthier R, Harnois C, Drolet JF, Reed JC, Vezina A, Vachon PH. 2001. Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. American journal of physiology. Cell physiology 280:C1540-1554.

7. Goke M, Kanai M, Podolsky DK. 1998. Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. The American journal of physiology 274:G809-818.

8. Hughes JH. 1993. Physical and chemical methods for enhancing rapid detection of viruses and other agents. Clinical microbiology reviews 6:150-175.

9. Joshi SS, Jackson JD, Sharp JG. 1985. Differentiation inducing effects of butyrate and DMSO on human intestinal tumor cell lines in culture. Cancer detection and prevention 8:237-245.

10. Lamartina S, Roscilli G, Rinaudo D, Delmastro P, Toniatti C. 1998. Lipofection of purified adeno-associated virus Rep68 protein: toward a chromosome-targeting nonviral particle. Journal of virology 72:7653-7658.

11. Maitreyi RS, Broor S, Kabra SK, Ghosh M, Seth P, Dar L, Prasad AK. 2000. Rapid detection of respiratory viruses by centrifugation enhanced cultures from children with acute lower respiratory tract infections. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology 16:41-47.

12. Pinto RM, Diez JM, Bosch A. 1994. Use of the colonic carcinoma cell line CaCo-2 for in vivo amplification and detection of enteric viruses. Journal of medical virology 44:310-315.

13. Quaroni A, Tian JQ, Goke M, Podolsky DK. 1999. Glucocorticoids have pleiotropic effects on small intestinal crypt cells. The American journal of physiology 277:G1027-1040.

14. Seno M, Takao S, Fukuda S, Kanamoto Y. 1991. Enhanced isolation of influenza virus in conventional plate cell cultures by using low-speed centrifugation from clinical specimens. American journal of clinical pathology 95:765-768.

15. Svensson L, Finlay BB, Bass D, von Bonsdorff CH, Greenberg HB. 1991. Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. Journal of virology 65:4190-4197.

16. Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK. 2004. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. The Journal of general virology 85:79-87.

17. Schwab KJ, Estes MK, Neill FH, Atmar RL. 1997. Use of heat release and an internal RNA standard control in reverse transcription-PCR detection of Norwalk virus from stool samples. Journal of clinical microbiology 35:511-514.

18. Schaffer FL, Soergel ME, Black JW, Skilling DE, Smith AW, Cubitt WD. 1985. Characterization of a new calicivirus isolated from feces of a dog. Archives of virology 84:181-195.

19. Flynn WT, Saif LJ. 1988. Serial propagation of porcine enteric calicivirus-like virus in primary porcine kidney cell cultures. Journal of clinical microbiology 26:206-212.

20. Parwani AV, Flynn WT, Gadfield KL, Saif LJ. 1991. Serial propagation of porcine enteric calicivirus in a continuous cell line. Effect of medium supplementation with intestinal contents or enzymes. Archives of virology 120:115-122.

21. Manley K, Anderson J, Yang F, Szustakowski J, Oakeley EJ, Compton T, Feire AL. 2011. Human cytomegalovirus escapes a naturally occurring neutralizing antibody by incorporating it into assembling virions. Cell host & microbe 10:197-209.

22. Lay MK, Atmar RL, Guix S, Bharadwaj U, He H, Neill FH, Sastry KJ, Yao Q, Estes MK. 2010. Norwalk virus does not replicate in human macrophages or dendritic cells derived from the peripheral blood of susceptible humans. Virology 406:1-11.

23. Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HWt. 2003. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. Science 299:1575-1578.

24. Changotra H, Jia Y, Moore TN, Liu G, Kahan SM, Sosnovtsev SV, Karst SM. 2009. Type I and type II interferons inhibit the translation of murine norovirus proteins. Journal of virology 83:5683-5692.

25. Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, Krug A, Mackenzie JM, Green KY, Virgin HW. 2004. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. PLoS biology 2:e432.

26. Takanashi S, Hashira S, Matsunaga T, Yoshida A, Shiota T, Tung PG, Khamrin P, Okitsu S, Mizuguchi M, Igarashi T, Ushijima H. 2009. Detection, genetic characterization, and quantification of norovirus RNA from sera of children with gastroenteritis. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology 44:161-163.

27. Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, Kim Y, Saif LJ, Green KY. 2004. Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101:8733-8738.

28. Maloney NS, Thackray LB, Goel G, Hwang S, Duan E, Vachharajani P, Xavier R, Virgin HW. 2012. Essential cell-autonomous role for interferon (IFN) regulatory factor 1 in IFN-gamma-mediated inhibition of norovirus replication in macrophages. Journal of virology 86:12655-12664.

29. Nickerson CA, Goodwin TJ, Terlonge J, Ott CM, Buchanan KL, Uicker WC, Emami K, LeBlanc CL, Ramamurthy R, Clarke MS, Vanderburg CR, Hammond T, Pierson DL. 2001. Three-dimensional tissue assemblies: novel models for the study of Salmonella enterica serovar Typhimurium pathogenesis. Infection and immunity 69:7106-7120.

30. Honer zu Bentrup K, Ramamurthy R, Ott CM, Emami K, Nelman-Gonzalez M, Wilson JW, Richter EG, Goodwin TJ, Alexander JS, Pierson DL, Pellis N, Buchanan KL, Nickerson CA. 2006. Three-dimensional organotypic models of human colonic epithelium to study the early stages of enteric salmonellosis. Microbes and infection / Institut Pasteur 8:1813-1825.

31. Nickerson CA, Richter EG, Ott CM. 2007. Studying host-pathogen interactions in 3-D: organotypic models for infectious disease and drug development. Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology 2:26-31.

32. Carterson AJ, Honer zu Bentrup K, Ott CM, Clarke MS, Pierson DL, Vanderburg CR, Buchanan KL, Nickerson CA, Schurr MJ. 2005. A549 lung epithelial cells grown as three-dimensional aggregates: alternative tissue culture model for Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. Infection and immunity 73:1129-1140.

33. LaMarca HL, Ott CM, Honer Zu Bentrup K, Leblanc CL, Pierson DL, Nelson AB, Scandurro AB, Whitley GS, Nickerson CA, Morris CA. 2005. Three-dimensional growth of extravillous cytotrophoblasts promotes differentiation and invasion. Placenta 26:709-720.

34. Long JP, Hughes JH. 2001. Epstein-Barr virus latently infected cells are selectively deleted in simulated-microgravity cultures. In vitro cellular & developmental biology. Animal 37:223-230.

35. Straub TM, Honer zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA, Valdez CO, Bruckner-Lea CJ, Gerba CP, Abbaszadegan M, Nickerson CA. 2007. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. Emerging infectious diseases 13:396-403.

36. Straub TM, Bartholomew RA, Valdez CO, Valentine NB, Dohnalkova A, Ozanich RM, Bruckner-Lea CJ, Call DR. 2011. Human norovirus infection of caco-2 cells grown as a three-dimensional tissue structure. Journal of water and health 9:225-240.

37. Herbst-Kralovetz MM, Radtke AL, Lay MK, Hjelm BE, Bolick AN, Sarker SS, Atmar RL, Kingsley DH, Arntzen CJ, Estes MK, Nickerson CA. 2013. Lack of norovirus replication and histo-blood group antigen expression in 3-dimensional intestinal epithelial cells. Emerging infectious diseases 19:431-438.

38. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, Stewart P, LePendu J, Baric R. 2003. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. Nature medicine 9:548-553.

39. Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. 2002. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. The Journal of infectious diseases 185:1335-1337.

40. Hutson AM, Airaud F, LePendu J, Estes MK, Atmar RL. 2005. Norwalk virus infection associates with secretor status genotyped from sera. Journal of medical virology 77:116-120.

41. Marionneau S, Airaud F, Bovin NV, Le Pendu J, Ruvoen-Clouet N. 2005. Influence of the combined ABO, FUT2, and FUT3 polymorphism on susceptibility to Norwalk virus attachment. The Journal of infectious diseases 192:1071-1077.

42. Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, Huang P, Jiang X, Le Pendu J. 2002. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. Gastroenterology 122:1967-1977.

43. Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. 1977. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. The New England journal of medicine 297:86-89.

44. Karst SM. 2010. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. Viruses 2:748-781.

45. Kelly RJ, Rouquier S, Giorgi D, Lennon GG, Lowe JB. 1995. Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. The Journal of biological chemistry 270:4640-4649.

46. Oriol R. 1990. Genetic control of the fucosylation of ABH precursor chains. Evidence for new epistatic interactions in different cells and tissues. Journal of immunogenetics 17:235-245.

47. Shirato H, Ogawa S, Ito H, Sato T, Kameyama A, Narimatsu H, Xiaofan Z, Miyamura T, Wakita T, Ishii K, Takeda N. 2008. Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. Journal of virology 82:10756-10767.

48. Ruvoen-Clouet N, Mas E, Marionneau S, Guillon P, Lombardo D, Le Pendu J. 2006. Bile-salt-stimulated lipase and mucins from milk of 'secretor' mothers inhibit the binding of Norwalk virus capsids to their carbohydrate ligands. The Biochemical journal 393:627-634.

49. Mollicone R, Bara J, Le Pendu J, Oriol R. 1985. Immunohistologic pattern of type 1 (Lea, Leb) and type 2 (X, Y, H) blood group-related antigens in the human pyloric and duodenal mucosae. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 53:219-227.

50. Harrington PR, Lindesmith L, Yount B, Moe CL, Baric RS. 2002. Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. Journal of virology 76:12335-12343.

51. Huang P, Farkas T, Zhong W, Tan M, Thornton S, Morrow AL, Jiang X. 2005. Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. Journal of virology 79:6714-6722.

52. Choi JM, Hutson AM, Estes MK, Prasad BV. 2008. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:9175-9180.

53. Guix S, Asanaka M, Katayama K, Crawford SE, Neill FH, Atmar RL, Estes MK. 2007. Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. Journal of virology 81:12238-12248.

54. White LJ, Ball JM, Hardy ME, Tanaka TN, Kitamoto N, Estes MK. 1996. Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. Journal of virology 70:6589-6597.

55. Amano J, Oshima M. 1999. Expression of the H type 1 blood group antigen during enterocytic differentiation of Caco-2 cells. The Journal of biological chemistry 274:21209-21216.

56. Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, King AD, Green KY. 2006. Stable expression of a Norwalk virus RNA replicon in a human hepatoma cell line. Virology 353:463-473.

57. Tan M, Jiang X. 2010. Norovirus gastroenteritis, carbohydrate receptors, and animal models. PLoS pathogens 6:e1000983.

58. Vashist S, Bailey D, Putics A, Goodfellow I. 2009. Model systems for the study of human norovirus Biology. Future virology 4:353-367.

59. Finkbeiner SR, Zeng XL, Utama B, Atmar RL, Shroyer NF, Estes MK. 2012. Stem cell-derived human intestinal organoids as an infection model for rotaviruses. mBio 3:e00159-00112.

60. Chang KO, George DW. 2007. Interferons and ribavirin effectively inhibit Norwalk virus replication in replicon-bearing cells. Journal of virology 81:12111-12118.

61. Bok K, Cavanaugh VJ, Matson DO, Gonzalez-Molleda L, Chang KO, Zintz C, Smith AW, Iversen P, Green KY, Campbell AE. 2008. Inhibition of norovirus replication by morpholino oligomers targeting the 5'-end of the genome. Virology 380:328-337.

62. Kamata K, Shinozaki K, Okada M, Seto Y, Kobayashi S, Sakae K, Oseto M, Natori K, Shirato-Horikoshi H, Katayama K, Tanaka T, Takeda N, Taniguchi K. 2005. Expression and antigenicity of virus-like particles of norovirus and their

application for detection of noroviruses in stool samples. Journal of medical virology 76:129-136.

63. Asanaka M, Atmar RL, Ruvolo V, Crawford SE, Neill FH, Estes MK. 2005. Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102:10327-10332.

64. Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. Journal of virology 66:6527-6532.

65. Green KY, Kapikian AZ, Valdesuso J, Sosnovtsev S, Treanor JJ, Lew JF. 1997. Expression and self-assembly of recombinant capsid protein from the antigenically distinct Hawaii human calicivirus. Journal of clinical microbiology 35:1909-1914.

66. Taube S, Kurth A, Schreier E. 2005. Generation of recombinant norovirus-like particles (VLP) in the human endothelial kidney cell line 293T. Archives of virology 150:1425-1431.

67. Baric RS, Yount B, Lindesmith L, Harrington PR, Greene SR, Tseng FC, Davis N, Johnston RE, Klapper DG, Moe CL. 2002. Expression and self-assembly of norwalk virus capsid protein from venezuelan equine encephalitis virus replicons. Journal of virology 76:3023-3030.

68. Huang Z, Elkin G, Maloney BJ, Beuhner N, Arntzen CJ, Thanavala Y, Mason HS. 2005. Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. Vaccine 23:1851-1858.

69. Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ. 2000. Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. The Journal of infectious diseases 182:302-305.

70. Ward JM, Wobus CE, Thackray LB, Erexson CR, Faucette LJ, Belliot G, Barron EL, Sosnovtsev SV, Green KY. 2006. Pathology of immunodeficient mice with naturally occurring murine norovirus infection. Toxicologic pathology 34:708-715.

71. Wobus CE, Thackray LB, Virgin HWt. 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. Journal of virology 80:5104-5112.

72. Khan RR, Lawson AD, Minnich LL, Martin K, Nasir A, Emmett MK, Welch CA, Udall JN, Jr. 2009. Gastrointestinal norovirus infection associated with exacerbation of inflammatory bowel disease. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition 48:328-333.

73. Scipioni A, Mauroy A, Vinje J, Thiry E. 2008. Animal noroviruses. Veterinary journal 178:32-45.

74. Mumphrey SM, Changotra H, Moore TN, Heimann-Nichols ER, Wobus CE, Reilly MJ, Moghadamfalahi M, Shukla D, Karst SM. 2007. Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses. Journal of virology 81:3251-3263.

75. Bailey D, Thackray LB, Goodfellow IG. 2008. A single amino acid substitution in the murine norovirus capsid protein is sufficient for attenuation in vivo. Journal of virology 82:7725-7728.

76. McCartney SA, Thackray LB, Gitlin L, Gilfillan S, Virgin HW, Colonna M. 2008. MDA-5 recognition of a murine norovirus. PLoS pathogens 4:e1000108.

77. Chachu KA, LoBue AD, Strong DW, Baric RS, Virgin HW. 2008. Immune mechanisms responsible for vaccination against and clearance of mucosal and lymphatic norovirus infection. PLoS pathogens 4:e1000236.

78. LoBue AD, Thompson JM, Lindesmith L, Johnston RE, Baric RS. 2009. Alphavirus-adjuvanted norovirus-like particle vaccines: heterologous, humoral, and mucosal immune responses protect against murine norovirus challenge. Journal of virology 83:3212-3227.

79. Hsu CC, Riley LK, Wills HM, Livingston RS. 2006. Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses. Comparative medicine 56:247-251.

80. Hsu CC, Riley LK, Livingston RS. 2007. Molecular characterization of three novel murine noroviruses. Virus genes 34:147-155.

81. Thackray LB, Wobus CE, Chachu KA, Liu B, Alegre ER, Henderson KS, Kelley ST, Virgin HWt. 2007. Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence. Journal of virology 81:10460-10473.