

수두 바이러스의 인체 폐세포내 증식모델

류재남 · 박정극[†] · 김현수* · 김수옥* · 정용주* · 김익환**

동국대학교 화학공학과

*제일제당(주)

**고려대학교 생명공학원

(1998년 2월 4일 접수, 1998년 6월 9일 채택)

Varicella-Zoster Virus Propagation Model in Human Lung Fibroblast Cells

Jae-Nam Ryu, Jung-Keug Park[†], Hyun-Su Kim*, Soo-Ok Kim*, Yong-Ju Chung*,
and Ik-Hwan Kim**

Dept. of Chem. Eng., Dongguk University

*Cheil Food & Chemicals Inc.

**Graduate School of Biotechnology, Korea University

(Received 4 February 1998; accepted 9 June 1998)

요 약

수두 바이러스는 불안정한 바이러스로 알려져 있다. 수두 바이러스에 감염된 세포는 직접적으로 인접한 세포를 감염시키고, 세포와 밀접하게 결합(cell-associated)되어 있다. 수두 바이러스는 환경민감도가 높아서 실험할 때마다 실험결과가 달라질 수도 있다. 따라서 수두 바이러스의 정확한 수율을 예측하는 것이 어려우며 이러한 문제를 해결하기 위해 수두 바이러스 증식에 대한 이론적 모델이 필요하다. 수두 바이러스의 증식에 영향을 미치는 두 가지 중요한 변수는 정상 세포에 감염 세포를 접종하는 감염비(multiplicity of infection, MOI)와 감염 후 배양 시간이다. 본 연구에서는 수두 바이러스의 cell-to-cell 감염 특징을 사용하여 finite element method를 이용한 증식모델을 개발하였다. 감염세포가 이웃세포를 감염시키는데 걸리는 시간은 실험에 의해 8시간으로 결정하였고, 감염세포는 감염된 후 48시간 후에 감염능을 잃는 것으로 추정하였다. 본 연구에서 설정된 모델의 simulation 결과 감염비(MOI)가 증가할수록 감염속도는 빨라지며, monolayer culture 경우 수두 바이러스의 최대 수율은 감염비 1:10에서 얻을 수 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구의 2차원적인 증식모델은 추후 실제 시스템에 더 가까운 3차원적 바이러스 증식모델 설정에도 응용될 수 있을 것이다.

Abstract—Varicella-zoster virus(VZV) is known to be an unstable virus. Infectious cells infect directly adjacent cells and VZV has the strongly cell-associated nature. Kinetics analysis of VZV proliferation shows different experimental values due to the environmental sensitivity of VZV. So the prediction of exact yield of VZV is difficult. In order to solve this problem, a theoretical model is required to estimate more precise yield of VZV. The yield of VZV is related to multiplicity of infection(MOI) and time of culture in the proliferation of VZV. A model was developed by using the finite element method considering the cell-to-cell infection characteristic of VZV. The spreading time of plaque forming cells to the neighboring cells was determined as 8 hours by several experiments. It was assumed that plaque forming cells lost infectivity within 48 hours after it was infected. From the simulation of two-dimensional model used in this work, it was confirmed that the maximum yield of VZV could be obtained at the MOI of 1:10, which corresponded with experimental results. The VZV propagation model can be extended to the future 3-dimensional model which is closer to real VZV propagation.

Key words: Varicella-Zoster Virus, Propagation Model

1. 서 론

수두는 주로 어린이들에게 유해한 수포성 전염병이며 전염성이 매우 높은 질병으로 2-8세의 소아에게 많이 걸리는데 상피세포의 팽윤

변성, 조직액의 축적을 일으켜 수포를 형성하고 감염 초기에는 세포의 핵내에 포괄체를 형성한다. 수두의 증상으로는 몸에 발진과 수포가 일어난 후 며칠간 앓고 나면 치유되고 사망률은 1% 이하이나 신생아의 경우에는 20% 정도의 사망률을 보이며 면역성이 약한 어린이나 면역력이 떨어진 상태의 사람, 악성종양으로 면역억제 요법으로 치료를 받고 있는 사람의 경우 수두에 걸리면 치명적일 수 있다고

[†]E-mail: jkpark@cakra.dongguk.ac.kr

알려져 있다[1]. 수두의 치료방법으로는 발진 후 3일 이내에 acyclovir를 정주하면 대상포진의 진행을 막을 수 있고 인터페론도 효과가 있는 것으로 알려져 있다[2]. 수두 바이러스는 사람 이외에 감수성이 있다고 알려진 동물은 아직 없으며, 병원성을 나타내는 동물도 없는 것으로 알려져 있다. 따라서 다른 바이러스처럼 실험동물에 의한 바이러스 실험과 그 특성을 알기가 어렵고 병원성 관찰이 매우 어렵다고 알려져 있다[3].

수두 바이러스의 증식에 대한 실험으로는 1953년에 Weller가 조직 배양을 이용하여 처음으로 수두 바이러스를 분리한 후 많은 종류의 사람과 원숭이 세포주에서 바이러스가 증식됨이 확인되었다. 그러나 조직배양에서 증식된 수두 바이러스 입자는 배양세포와 세포내 소기관에 밀접하게 결합되어 있어서[4] 이들 바이러스에 대한 물리화학적 성질과 생화학적 특성조사에 어려움이 있었다. 그 후 계속된 실험에서 초대 배양된 사람 감상선 세포[5]나 폐세포 또는 흑색종 세포[6] 등으로부터 소량의 세포유리 바이러스를 얻을 수 있었다. 1979년 Schmidt와 Lennette는 인체 폐세포 조직배양에서 cell-free virus를 획득[7]하였고, 1979년 Grose와 Brunell은 melanoma 세포를 이용하여 바이러스를 증식, 분리하였다[8].

수두 바이러스는 매우 불안정한 바이러스로 알려져 있으며, 수두 바이러스에 감염된 세포는 직접적으로 인접한 세포에 감염하며 세포내에서 세포밖으로 나오지 않는 특징을 가지고 있다. 그리고 정상 세포가 근본적으로 감염된 세포에 접촉되어 있지 않거나 또는 조건이 세포성장과 이동성에 부분최적화된다면 감염속도가 느려지거나 멈추어진다. 섬유아세포 배양에서 초기 감염 세포는 변형되지 않은 성장세포와는 분명하게 대조가 되는 변형된 모습으로 나타난다. 전형적으로 바이러스 감염은 정상세포의 죽을 따라 선형적으로 진행되며[9, 10], 세포에서 세포로 수두 바이러스의 감염속도를 수두 바이러스 항원의 면역형광법으로 조사한 결과가 여러 문헌에 나타나고 있다[11-13].

충분한 수두 바이러스 수율을 얻기 위한 두 가지 중요한 변수는 정상 세포에 감염 세포를 접종하는 감염비(MOI)와 감염 후 배양 시간이다. 수두 바이러스의 수율은 수두 바이러스에 감염된 세포 배양에서 감염비와 배양 시간에 영향을 받는다는 사실이 이미 밝혀졌고[14], 이와 아울러 수두 바이러스는 환경 민감도가 높기 때문에 실험할 때마다 결과가 크게 달라질 수도 있으며 따라서 정확한 바이러스 수율을 예측하는 것이 어렵다. 이 때문에 바이러스 수율에 관한 이론적 모델의 필요성이 요청된다. 이론적 모델은 바이러스 수율에 영향을 미치는 감염비와 배양시간에 따른 수율의 변화에 대하여 그리고 다양한 실험적 변수에 따른 수율의 변화를 쉽게 예측할 수 있는 잇점이 있다. 접촉방해를 받는 부착성 세포의 성장모델에 관한 연구는 여러 문헌[15-20]에서 찾아 볼 수 있지만, 최근까지도 이론적인 수두 바이러스 증식모델의 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 논문에서는 이러한 이론적 모델을 개발하여 감염비와 배양시간에 따른 수두 바이러스의 수율 변화를 산출해 내었다.

2. 실험재료 및 방법

2-1. 세포주 및 바이러스주

수두 바이러스 증식에 사용한 숙주세포로는 바이러스 백신개발 및 생산에 널리 쓰이고 있는 Human Lung Fibroblast(HLF) 세포로써 ATCC(American Type culture collection, 12301 parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, U.S.A)로부터 분양 받아 사용하였다.

수두 바이러스주는 약독화된 Oka 바이러스주를 사용하였는데 일본 阪大微生物病研究會(3-1 Yamada-Oka, Suita, Osaka, Japan)에서 판매하는 생수두 백신 Varicella Biken(1,400 PFU/0.7 ml)을 완전하게

자란 숙주세포에 감염시킨 후 세포변성효과(cytopathic effect, CPE)가 50-60% 정도 일어났을 때 세포를 회수하여 얻은 감염세포를 바이러스 주로 사용하였다.

2-2. 배지 및 혈청

배지는 powder 상태인 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4.5 g/l glucose; Gibco Co., 8451 Helgeman court, Gaithersburg, MD 20877, U.S.A)를 사용하였고, 배지에 Sodium bicarbonate(Sigma Co.) 2.0 g/l, HEPES(Sigma Co.) 2.38 g/l, Pyruvic acid(Sigma Co.) 0.11 g/l, Antibiotics(neomycin sulfate, Gibco Co.) 0.05 g/l를 첨가하여 배지 1 L를 만든 후 Autoclave로 완전하게 멸균(121 °C, 25 min)된 여과장치(0.22 µm pore size membrane)를 사용하여 clean bench내에서 진공 여과하여 사용하였다. 혈청은 fetal bovine serum(FBS, Gibco Co.)을 사용하였는데 56 °C에서 30 min 처리하여 성장억제물질을 inactivation시킨 후 사용하였다.

2-3. 바이러스 정량(Plaque Assay)

재 감염능이 있는 바이러스를 정량할 수 있는 방법으로 plaque assay 방법을 이용하여 감염된 세포(PFC, plaque forming cells)를 정량하였다. 이때 plaque assay용 숙주세포로 HLF 세포를 사용하였으며 다음과 같은 assay 방법을 사용하였다.

Plaque assay 2-3일 전에 12-well plate에 세포용액(1×10^5 cells/ml)을 well에 2 ml씩 넣어 배양하였다(10% FBS 사용). 세포배양 2-3일 후 well-plate에 있는 배지를 피펫으로 제거하고 well에 바이러스 감염 세포를 적당한 농도로 희석하여 50 µl씩 분배하고 매 10분마다 well-plate를 흔들어 1시간 동안 균일하게 감염되도록 한 다음 2% FBS가 함유된 유지용 DMEM 배지 2 ml를 넣었다. 그리고 37에서 2-3일간 배양한 후 배지 1 ml를 버리고 FBS 2%가 함유된 새배지 1 ml를 넣어 주었다. Incubator(37 °C)에서 4-6일간 incubation하여 plaque 형성여부를 관찰하고 현미경($\times 40$)을 이용해 plaque를 counting하여 titer를 결정하였다.

2-4. 세포크기 및 Plaque 크기 측정

T-flask(25 cm^2)에 5×10^5 cells/ml의 농도로 세포를 접종하고 37 °C incubator에서 4일 동안 배양한 후 cell counting을 하여 세포크기를 다음과 같은 방법으로 측정하였다. T-flask에서 4일 동안 배양된 세포의 수(n)로 T-flask의 표면적($2.5 \times 10^9 \mu\text{m}^2$)을 나누면 세포 한 개당의 면적(A)이 구하여 지고, 세포의 형태가 단축(W)과 장축(L)의 비가 1:7인 실제 세포의 형태에 가까운 직사각형(현미경으로 관찰한 실제 형태의 비율)이라 가정하고 세포의 크기(W)를 다음과 같이 구하였다.

$$A = \frac{2.5 \times 10^9}{n} (\mu\text{m}^2/\text{cell}) \quad (1)$$

$$W = \sqrt{A/7} (\mu\text{m}/\text{cell}) \quad (2)$$

Plaque 크기의 측정은 six-well plate에 3×10^5 cells/well의 농도로 세포를 접종하고 3일간 배양한 후 바이러스에 감염된 세포와 정상 세포를 1:5로 감염시켰다. 그리고 plaque이 형성되기 시작하는 날부터 매일 사진 촬영하여 plaque 크기를 측정하였다. 배양에 사용된 배지는 정상 세포에서는 10% FBS 함유 DMEM을, 바이러스에 감염된 세포에는 2% FBS 함유 DMEM을 well에 각각 5 ml씩 넣어주었고, 3일에 한번씩 배지를 갈아주었다.

3. 바이러스 증식 변수 측정

3-1. 수두 바이러스의 감염속도(step-time) 측정

Plaque의 단축의 크기(P)는 six-well plate에 3×10^5 cells/well의 농도로 세포를 접종하고 세포가 완전하게(confluent) 자라면 바이러스에 감염된 세포로 감염시켰다. 그리고 plaque이 형성되기 시작하는 날부터 매일 plaque의 단축의 크기를 측정하여 plaque의 단축의 크기(P) 변화를 구하였다. 그리고 세포의 단축의 크기(W)로 plaque의 단축의 크기(P)를 나누어 주어 하루에 몇 개(M)의 세포가 감염되는지 계산하였다. 바이러스에 감염된 하나의 세포가 이웃한 정상세포를 감염시키는데 걸리는 시간(step-time)은 식 (4)와 같이 구하였다.

$$M = \frac{P}{W} \text{ (cell/day)} \quad (3)$$

$$\text{Step-time} = \frac{24}{M} \text{ (hr/cell)} \quad (4)$$

3-2. 이론적 모델에 사용되어진 변수 및 가정

모델에 사용되어진 변수로써는 감염된 세포의 배양시간(end-time)을 12, 24, 36, 48, 64, 89시간으로 하였고, 감염된 세포 한 개당 정상 세포의 수(multiplicity of infection, MOI)를 1:5, 1:10, 1:20으로 하였다. 그리고 수두 바이러스 증식에 대한 이론적 모델에 사용한 세포 숫자는 75×75 로 제한하여 정상 세포의 수를 5,625개로 하였고, 이론적 모델의 시뮬레이션에 사용한 가정은 다음과 같다.

- (1) 세포의 형태는 단축(W)과 장축(L)의 비가 1:7인 직사각형이다.
- (2) 수두 바이러스의 증식은 감염된 세포에 인접한 정상세포 즉, 감염의 진행은 감염된 세포의 E, W, S, N의 4 방향으로 진행된다.
- (3) 감염된 세포는 감염된 지 48시간에 감염능을 잃어버린다(death-time).
- (4) 초기 감염세포의 50%만이 감염능을 가진다.

3-3. 시뮬레이션의 실행

감염비(MOI)와 배양시간(end-time)을 변수로 하여 다음과 같이 실행하였다.

- (1) 정상 세포에 바이러스 감염 세포가 random하게 감염되면 computational cell의 색을 lightgray에서 black으로 전환시켰다.
- (2) 시간이 step-time에 도달하면 step-time에 따라 black으로 전환된 세포의 E, W, S, N 방향으로 바이러스 감염이 시작되고, lightgray를 black으로 전환시킨다.
- (3) Death_time(감염세포가 감염능을 잃는 시간)이 되면 감염 진행 속도와 같은 속도로 감염된 세포가 죽어가고, black을 white로 전환시켰다.
- (4) End_time이 되면 시뮬레이션의 실행을 정지시키고, 감염능을 가진 감염세포(색이 black인 세포) 숫자를 계산하였다.

4. 결과 및 고찰

4-1. 세포 및 Plaque의 크기 측정

DMEM 배지(혈청 10%함유)에서 세포를 4일간 배양하고 세포의 크기를 측정한 결과세포 수는 $1.28 \times 10^6 \pm 2.01 \times 10^5$ 개/25 cm²였고, 각각의 세포의 크기는 $16.70 \pm 2.66 \mu\text{m}$ 로 측정되었다. 그리고 혈청을 2% 함유한 배지에서 바이러스에 감염된 세포를 배양하고 plaque의 단축의 크기의 변화를 현미경 상에서 측정한 결과를 Fig. 2, 3에 나타내었다. Fig. 2는 six-well plate에서 감염세포의 증식을 보여주는 것으로 배양시간이 증가함에 따라 plaque의 크기도 점점 증가함을 볼 수 있으며, Fig. 3은 배양시간에 따른 plaque의 평균 단축 길이 변화를 보이고 있다. Plaque의 단축 길이는 $101.2 \pm 31.4 \mu\text{m/day}$ 로 증가

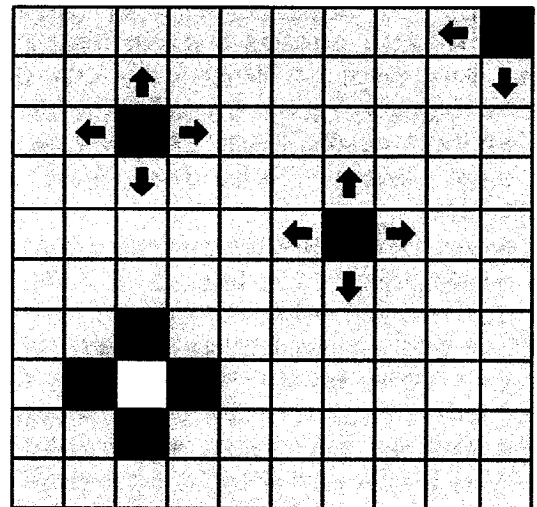


Fig. 1. Small computational grid showing the three-states(black, white, lightgray) computational cells. (lightgray : uninfected cells, black : infected cells, white : infectivity-lost cell, $\leftarrow, \uparrow, \rightarrow, \downarrow$: progressive direction of infection)

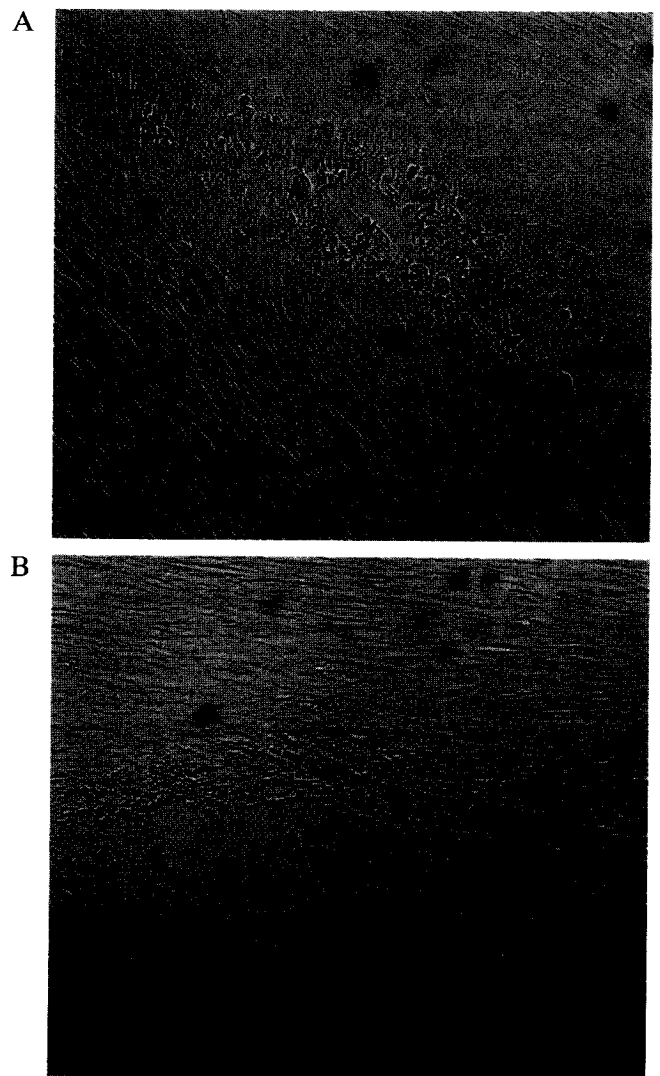


Fig. 2. Propagation of plaque forming cells at 5 days (A) and 7 days (B) after infection.

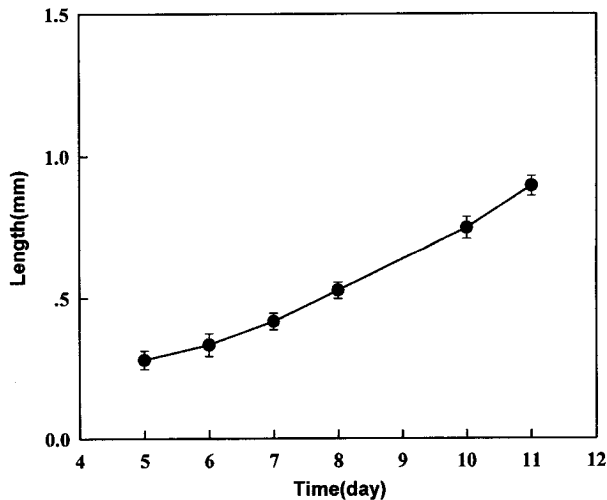


Fig. 3. Change of average short axis length of a plaque.

함을 확인하였다.

4-2. 바이러스 감염속도 측정

바이러스 증식에 대한 이론적 모델에서 나타난 방법으로 바이러스에 감염된 세포가 이웃한 정상세포를 감염시키는데 걸리는 시간(step-time)을 구하였다. Plaque의 평균 단축 길이 변화는 $101.2 \pm 31.4 \mu\text{m/day}$ 인데 plaque의 크기 변화 결과는 bidirection에 대한 결과치이다. 따라서 unidirection에 대한 plaque의 평균 단축 길이 변화는 $50.6 \mu\text{m/day}$ 가 된다. 세포의 크기 $16.70 \mu\text{m/cell}$ 로 plaque의 크기 변화 $50.6 \mu\text{m/day}$ 를 나누어 주면 3.03 cells/day 의 값이 구하여 진다. 그러므로 감염된 하나의 세포가 이웃한 하나의 정상세포를 감염시키는데 걸리는 시간은 약 8시간으로 계산되었다.

4-3. Monolayer Culture에서 감염비(MOI)에 따른 바이러스의 생산

일반적으로 바이러스의 대량생산에서는 숙주세포와 바이러스의 접촉비에 따라 바이러스 증식 경향이 크게 달라지기 때문에 바이러스 감염비(multiplicity of infection, MOI)가 중요한 변수로 알려져 있다. 바이러스 감염비가 높은 경우 단시간내에 많은 바이러스가 숙주세포에 침입하므로 바이러스 증식으로 인한 숙주세포의 독성으로 세포농도가 급격히 감소하여 숙주세포내의 바이러스 증식보다는 숙주세포 자체의 유지가 어려워지므로 적당한 바이러스 감염비가 요구된다.

수두 바이러스 경우는 바이러스의 감염이 cell-to-cell로 이루어지기 때문에 바이러스 감염세포의 접촉비가 scale-up시 큰 변수로 작용한다. 수두 바이러스를 대량으로 배양할 때 숙주세포가 완전하게 자란 다음 바이러스 감염세포를 감염시키므로 감염비가 낮을수록 바이러스 감염세포 요구량이 매우 적어지므로 대량생산에서의 scale-up이 용이하게 된다. 본 실험에서는 세포가 완전하게 자란 25 cm^2 T-flask에 바이러스 감염세포와 숙주세포의 수가 1:5, 1:10, 1:20이 되게 바이러스를 감염시킨 후 12, 24, 36, 48, 64, 89시간의 샘플을 plaque assay하여 감염비 영향을 관찰하였다.

그 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 감염비가 적을수록 최고 PFC를 보이는 시간이 길어짐을 알 수 있었고, MOI를 1:5로 감염시켰을 때 다른 감염비를 사용한 것보다 높은 PFC를 배양후 48시간에 얻을 수 있었다.

4-4. 바이러스 생산에 대한 실험결과와 이론적 모델 결과의 비교

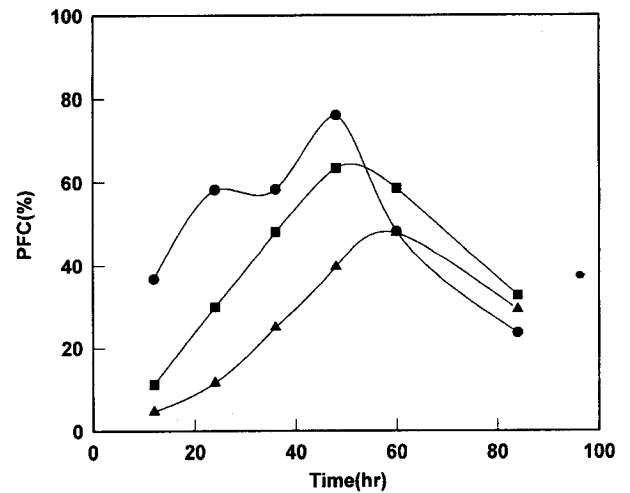


Fig. 4. Experimental result of varicella-zoster virus infected cell density.

MOI=1:5(●), MOI=1:10(■), MOI=1:20(▲).

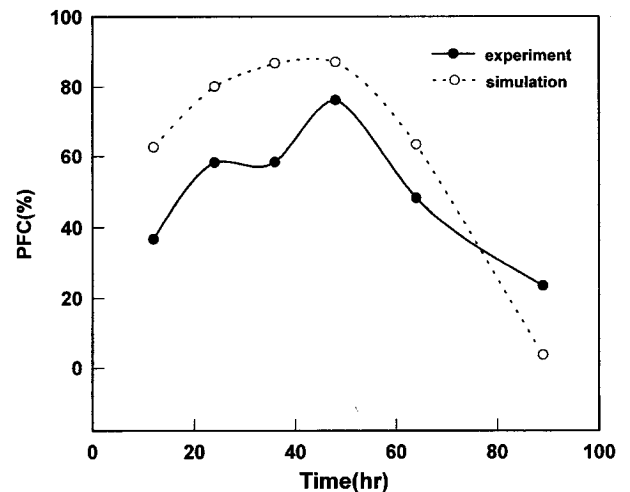


Fig. 5. Comparison of experimental results with computer simulation in MOI=1:5.

Experimental results (●), computer simulation (○)

시뮬레이션은 위에서 서술한 방법으로 실행하였고, 변수 중에서 step-time은 바이러스 감염 속도 측정에서 8시간으로 구해져 이 값을 사용하였다. 그리고 end-time은 감염세포를 배양하는 기간으로 12, 24, 36, 48, 64, 89시간을 사용하였으며, death-time은 48시간을 시뮬레이션에 적용하였다. 또한 시뮬레이션은 바이러스 감염세포와 숙주세포의 수를 1:5, 1:10, 1:20으로 하여 각각의 감염비에 따른 이론적인 바이러스 생산 수율을 구하였다. 시간과 감염비에 따른 바이러스 생산은 감염비가 증가할수록 감염속도는 빨라지고, 최대 수두 바이러스의 수율은 감염비 1:10일 때 감염 48시간 후 얻을 수 있음을 알 수 있었는데 Fig. 5-7은 바이러스 생산에 대한 시뮬레이션과 실험결과를 비교한 것을 나타낸다. 시뮬레이션에서 감염비와 시간에 따른 바이러스 증식의 경향과 최대 PFC에 도달하는 시간은 실험결과와 유사했지만, 바이러스 생산 수율은 크게 차이를 보이고 있는데 이러한 결과는 실험조건이 같을지라도 실험적으로 얻어진 바이러스 생산 수율은 변화가 생길 수 있으며, 또한 실험에서 사용한 조건과 같거나 유사한 조건을 시뮬레이션에 적용해야 하는 어려움때문일 수도 있다. 그리고 감염비 1:10과 1:20의 실험결과와 시뮬레

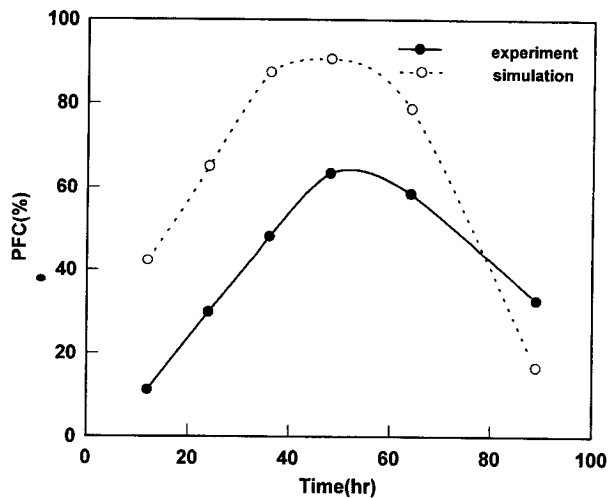


Fig. 6. Comparison of experimental results with computer simulation in MOI=1:10.

Experimental results (●), computer simulation (○)

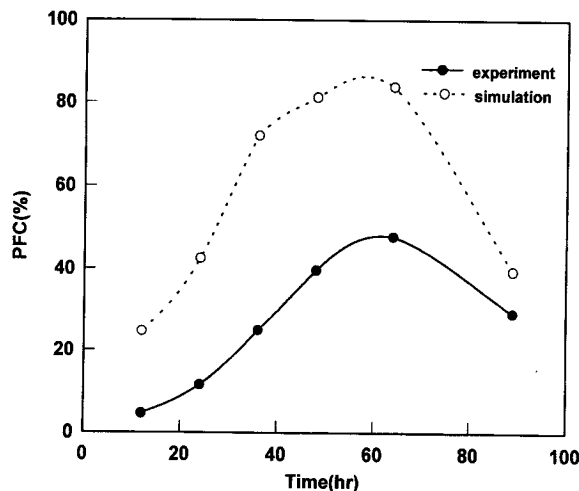


Fig. 7. Comparison of experimental results with computer simulation in MOI=1:20.

Experimental results (●), computer simulation (○)

이선이 현저하게 차이가 나고 있는데, 이러한 차이는 시뮬레이션에서는 바이러스의 증식과 사멸만을 고려하고 숙주세포의 사멸을 고려하지 않아 발생하는 것으로, 또한 시뮬레이션에서 사용되어진 세포 수의 제한에 의해 발생하는 것으로 사료된다.

실험결과와 시뮬레이션에서 최대 바이러스 수율은 감염비 1:5와 1:10사이의 감염비에서 감염시킨 48시간 증식할 때 얻어졌으며, 감염비가 작아질수록 최대 바이러스 수율에 도달하는 시간은 증가하였다. 이것은 시뮬레이션과 실험결과가 일치하는 것으로서 본 이론적 모델의 유용성을 보여주는 것이다. 한편 본 연구에서 기본적인 모델정립과 시뮬레이션을 위하여 설정한 세포의 직사각형 형태와 감염된 세포가 감염능을 잃어버리는 시간이 48시간이라는 가정은 추후 실제에 더 가깝도록 설정할 필요가 있다고 생각되며 또한 실제적인 바이러스의 증식이 평면적으로만 진행되는 것은 아니며 숙주세포의 숫자가 많을 때 인체내에서의 바이러스 감염과 증식의 경우에는 3차원으로 진행되기 때문에 본 모델에서 설정한 평면적 바이러스 감염을 3차원적 세포배양에 적용하기 위한 시도와 아울러 바이러스 감염세포의 time-distribution에 따른 감염능력 변화를 고려한 이론적

모델정립도 추후 연구되어야 할 것으로 사료된다.

5. 결 론

Oka virus 주를 사용한 인체 폐세포(HLF)로부터의 수두 바이러스 (Varicella-zoster virus, VZV) 증식 모델 개발연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다. T-flask 실험을 통하여 수두 바이러스에 감염된 세포가 인접한 정상세포를 감염시키는데 걸리는 시간은 평균 8시간이었으며, 수두 바이러스에 감염된 세포는 약 48시간 후에는 수두 바이러스의 감염능을 상실하는 것을 가정한 이론적 모델을 이용하여 감염비(MOI)와 배양 시간에 따른 수두 바이러스의 증식을 형상화할 수 있었다. 실제 실험결과와 마찬가지로 이론적 모델에서도 감염비(MOI)가 증가할수록 감염 속도는 빨라지며, monolayer culture 경우 최대 수두 바이러스의 수율은 감염비가 1:10일 때 얻을 수 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 이론적 모델은 바이러스 증식의 최적화에 유용하게 적용될 수 있을 것이다. 이러한 이론적 시뮬레이션은 앞으로 3차원적 세포배양에도 적용될 수 있을 것으로 생각되며, 실제 세포의 기하학적인 형태를 고려하고, 또한 바이러스에 감염된 세포에 time-distribution을 적용한 모델의 개발이 필요하다.

사용기호

n	: cell number in 25 cm ² -flask
L	: length of a cell [μm]
W	: width of a cell [μm]
A	: area of a cell [μm ² /cell]
P	: change of plaque size [μm/day]
M	: infected cell number in a day [cell/day]
Step-time	: spreading time of plaque forming cell to neighboring cell [hr/cell]

참고문헌

1. Sim, T. S.: *kgcc news*, **13**(2), 79(1985).
2. J. Kor. Soc. Virology: "Essential Virology", Suhheoung Pulish, 122 (1992).
3. Michiaki, T.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **83**, 340(1953).
4. Weller, T. H., Witton, H. M. and Bell, E. J.: *J. Exp. Med.*, **108**, 843 (1958).
5. Caunt, A. E.: *Lancet*, **2**, 982(1963).
6. Taylor-Robinson, D.: *J. Exp. Pathol.*, **40**, 521(1959).
7. Schmidt, N. J. and Lennette, E. H.: *Infection and Immunity*, **14**, 709(1976).
8. Grose, C. and Brunell, P. A.: *Infection and Immunity*, **19**, 199 (1978).
9. Gold, E.: *J. Immunology*, **95**, 683(1965).
10. Takahashi, M.: *Advances in Virus Research*, **28**, 286(1983).
11. Rapp, F. and Vanderslice, D.: *Virology*, **22**, 321(1964).
12. Cook, M. L. and Stevens, J. G.: *J. Ultrastructure Research*, **32**, 334(1970).
13. Yamanishi, K., Matsunaga, Y., Ogino, T., Takahashi, M. and Takamizawa, A.: *Infection and Immunity*, **28**, 536(1980).
14. Kim, W. B., Park, J. K., Choi, W. S., Kim, S. O., Chung, Y. J., Kim, H. S. and Kim, I. H.: *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **11**(2), 254(1996).

15. Kelly, K. F. and Hu, W. S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 1061(1988).
16. Lim, J. H. F. and Davies, G. A.: *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 547(1990).
17. Zygorakis, K., Markenscoff, P. and Bizios, R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 459(1991).
18. Zygorakis, K., Markenscoff, P. and Bizios, R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 471(1991).
19. Forestell, S. P., Milne, B. J., Kalogerakis, N. and Behie, L. A.: *Chemical Engineering Science*, **47**, 2381(1992).
20. Ruaan, R. C., Tsai, G. H. and Tsao, G. T.: *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 380(1993).