

어린이 설사원인 Rotavirus의 새로운 Vaccine개발에 관한 접근

유제현, Harry B. Greenberg¹, 海老名三卓郎², Premt S. Paul³, Young S. Lyoo³

건국대학교 축산대학

I. 서 론

1940년대까지는 어린이 설사증이라고 하면 이질을 대표하는 세균성설사증(bacterial diarrhea)이 중심이었으나 그 후 항생물질의 사용과 위생조건의 개선에 의해 세균성감염증은 점점 감소하고 그 대신에 흰설사(白痢, white diarrhea)라고 불리워지는 항생물질로 치료가 되지 않는 virus성 설사증(viral gastroenteritis)을 중심으로 한 rotavirus(RV)에 의한 설사증이 증가하고 있다.

Ebina 등(1991)에 의하면 초기의 유아기의 장관 감염증은 소화불량성 중독증이라 하여 치사율(78%)이 높은 매우 무서운 병이었지만, 1975년대에는 급성위장염(acute gastroenteritis)의 치사율이 0.2% 이하로 되고 전체적으로 가볍게 된 실정이다. 또한 전세계적으로 과거에는 여름철에 발생하는 설사증의 병원체가 세균성이 80% 정도로 매우 높았으나, 오늘날에는 병원체가 세균성 20~30%와 virus성 70~80%로 오히려 virus성에 의한 비율이 훨씬 높아지고 있는 실정이다. 세계적으로 설사증의 원인은 세균성과 virus성을 각각 반반으로 생각하고 두가지 설사증을 제압하기 위한 연구가 진행되고 있으며 특히 virus설사증은 세균성 설사증과는 달리 항생물질에 대한 감수성이 없고 오히려 증상을 악화시키기 때문에 주의할 필요가 있다.

RV의 전파는 수평감염에 의하며 vector는 없다. 또한 human RV 외에 mouse, calf, sheep, swine, simian, murine 및 avian 등에도 존재하고 RV는 세

포질내에서 증식한다. 혈청형에 따라 증상의 경중이 있고 임상증상으로는 구토와 설사를 주로 하는 위장염 증상 이외에 발열과 호흡기도염의 증상은 상당히 다르며 때로는 탈수증상을 일으키기 때문에 수혈이 필요하기도 하다.

RV의 감염경로는 호흡기감염과 경구감염 두가지를 생각할 수 있다. 유아의 RV감염은 모유영양아에서는 인공영양아군에 비해서 발생이 적기 때문에 모유 중의 특이항체(specific antibody)가 감염방어에 큰 역할을 한다고 생각한다.

실험실내 진단법으로서 가검물에서 전자현미경법에 의한 RV입자의 확인과 혈청 중의 항체 측정이 있다. 항체 측정은 가검물중으로 부터 정제한(배양가능한 bovine RV)를 항원으로서 면역전자현미경법(IEM), PAGE법, ELISA법, LA법, RPHA법(Reverse Passive Hemagglutination)법, AEC stain법 등이 이용되고 있다.

RV가 선진국은 물론 개발도상국 특히 저개발국 등 세계적으로 어린이 장염의 주된 바이러스성(Fig. 1, Table 1-1, Table 1-2) 원인체로 규명되면서 세계보건기구(WHO)는 RV 감염의 보다 효율적인 억제와 예방을 최우선 과제로 삼고 있다(Kapikian과 Chanock, 1990, Estes 등, 1983).

최근 몇 년 동안 많은 연구로 면역학적인 감염뿐만 아니라 RV의 항원적 특성 등이 많이 알려졌고 이는 효과적인 백신개발의 기틀을 마련하도록 되고 있다.

RV는 core내부가 이중나선체의 RNA 11개 분절

¹ Stanford대학교 의대

² 일본 미야기현 암센터

³ Iowa 주립대 수의대

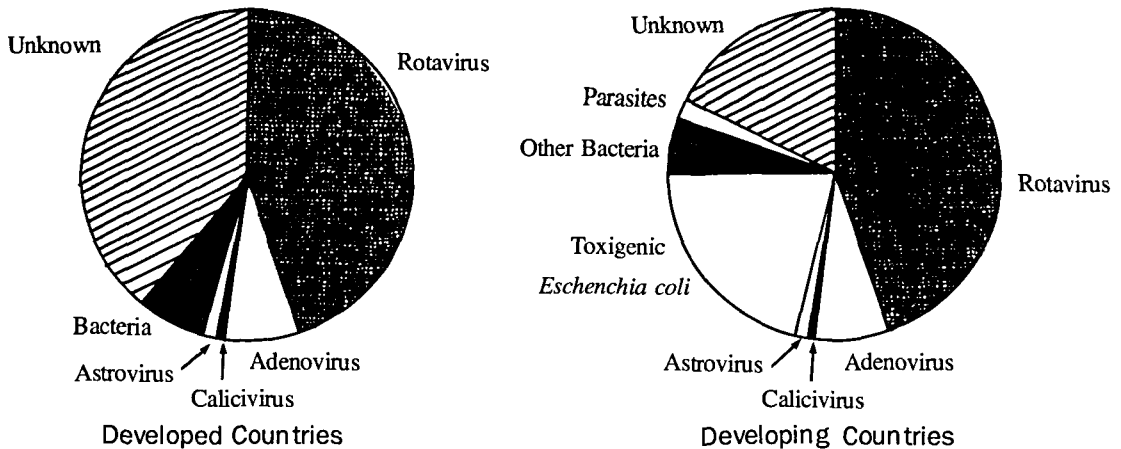


Fig. 1. An estimate of the role of etiological agents in severe diarrheal illnesses requiring hospitalization of infants and young children in developed countries(left) and in developing countries(right)

Kapikian (1993)

Table 1-1. Global deaths from diseases

Illness	Annual deaths
Cardiovascular disease	12 million
Diarrheal diseases	5 million
Cancer	4.8 million
Pneumonia	4.8 million
Tuberculosis	3 million
Chronic obstructive lung disease	2.7 million
Measles	1.5 million
Malaria	1-2 million
Hepatitis B	1-2 million
Tetanus (neonatal)	775 thousand
Pertussis (whooping cough)	500 thousand
Maternal mortality	500 thousand
AIDS	200 thousand
Schistosomiasis	200 thousand
Amoebiasis	40-110 thousand
Hookworm	50- 60 thousand
Rabies	35 thousand
Typhoid	25 thousand
Yellow fever (epidemic)	25 thousand
African trypanosomiasis (sleeping sickness)	20 thousand
Ascariasis	20 thousand

Source : World Health Organization, 1990.

(Paul 등, 1988)이 RV 외곽 구성물인 두 개의 다른 단백질 층에 의해 둘러 싸여 있는 복잡한 icosahedral 구조를 하고 있다.

대부분 RV의 outer capsid는 첫째 VP₇인 37-KDa의 당단백질로 되어 있으며 RV strain에 따라 7, 8 또는 9번 분절의 gene에 의해 encode되었다. 둘째 표면구성물은 VP₄는 nonglycosylated 단백질이다. 이 단백질은 gene 4에 의해 생산되어지며 viral hemmagglutinin이다. 또 조직배양의 성장과 실험동물의 병원성을 제한하는 역할을 한다.

전자현미경(EM)의 관찰에 따르면 VP₄는 virion 표면 층에서 12nm정도 spike형태로 뿔어 존재한다. VP₄는 약한 trypsin에 의해 cleavage되며, 86.5 KDa의 VP₄는 두 개의 polypeptide로 나누어져 각각 65KDa의 VP₅와 28KD의 VP₈로 개열되며 이 두 개의 fragments은 분해후 viron과 결합된 상태로 남아 있다(Estes, 1990).

VP₄의 proteolytic cleavage는 infection되는 동안 위장내의 lumen(管腔)에서 빠르게 일어나며 tissue culture에서는 RV의 세포의 RV penetration의 증가로 인해 바이러스의 infection이 더욱 증가되리라고 믿는다(Estes 등, 1981, Flore 등, 1991, Fukuhara 등, 1988).

Table 1-2. Estimated annual disease burden of rotavirus gastroenteritis

Parameter	United States		World	
	Total	Risk per child	Total	Risk per child
Births	4.1 million		140 million	
Episodes of rotavirus gastroenteritis	3.5 million	1:1.2	130 million	1: 1.1
Doctor visits	500,000	1:8	?	
Hospitalizations (U.S.)				
or cases of moderate-to-severe disease	70,000 to	1:40	18 million	1: 30
(World)	100,000			
Deaths	75 to 125	1:40,000	873,000	1:160
Cost				
- Hospitalizations	- \$ 500 million		?	
- Indirect	- \$ 1,200 million		?	

U.S. data from Glass et al.(1990) and world data are from Zoysa and Feachman(1985).

RV의 두 개의 표면단백질은 자연적인 감염과 같이 *in vitro* 조건에서도 면역항원이 된다는 것이 입증되었다(Shaw 등, 1987, Svensson, 1987).

RV에는 VP₄와 VP₇ 중화항원(혈청형)에 관여하는 항원의 존재하고 각각 독립의 유전자분절에 의해 code되어 있다(Estes와 Cohen, 1989). P type을 결정하는 VP₄ 유전자와 G type을 결정하는 VP₇ 유전자에 있어서 유전자 조합(genetic reassortant, 유전자 재조합이라고도 함)에는 그대로 혈청형의 조합 변화를 의미하므로 어떤 RV의 처음감염에서는 주로 VP₇(G type)에 대한 중화항체가 생산되고 감염을 반복하는 중에 VP₄(P type)에 대한 중화항체가 생산되는 것으로 생각하고 있다(Green 등, 1990). VP₄와 VP₇ 양쪽에 대한 면역을 얻은 어린이나 어른이 RV성 설사증에 대해 저항성을 갖게 된다. 현실적으로 유아에게 유행되는 RV 집단발생에 있어서 G type과 P type이 어떠한 빈도로 존재하는가 정확한 지식을 갖게 되면 Vaccine 개발면에서 중요한 의의를 갖게 된다(Ishida, 1994). 현재 RV의 vaccine 개발은 동물 RV를 이용한 Jennerian approach, 약독성 vaccine, 조합체를 이용한 modified Jennerian approach, 유전자 조합 기술등에 의해 진행되고 있지만, 그 성적은 불안정하고 만

족하지 않다(Flores와 Kapikian, 1992). 그리고 그 원인으로서 VP₇ 항원만 중요시해 왔고 또하나 외곽 VP₄(P type)의 중요성을 무시해 온 것이다. 그런 의미로 *in vitro*, *in vivo*에서 G type과 P type의 조합의 정보와 그 mechanism의 해명은 Vaccine 개발에 중요한 의미를 갖는 것으로 본다(Ishida, 1994). RV의 vaccine을 Jennerian approach 또는 modified Jennerian approach의 입장에서 simian RRV와 murine EHP₁의 reassortant를 gradient PAGE에 의해 select하여 *in vitro*(MA104 cell)와 *in vivo*(suckling mice)에서 local immunity의 stimulation을 검토하였다(Ludert 등, 1995).

RV에는 VP₄와 VP₇에 대한 Monoclonal Antibodies (MAbs)는 세포배양시 RV의 replication을 효과적으로 막으며 실험동물의 바이러스의 수동감염으로부터 막는데 효과적으로 사용되어 졌다(Hoshino 등, 1985; Matsui 등, 1989; Offit 등, 1986). 중화 MAbs에 의한 경쟁적 결합 분석에 의해 VP₇에 적어도 하나의 중화 domain이 동정되었고 VP₄에서는 두 개의 domain이 동정되었다. 이들 domain은 여러 개의 관련된 epitopes로 되어 있다(Dyall-Smith 등, 1986; Shaw 등, 1986; Taniguchi 등, 1984).

RV의 구조와 복합체 항원의 관점에서 RV표면의 각기 다른 부분에 대한 항체가 여러 가지 다른 mechanism에 의해 감염을 중화 또는 무력화시키는데 작용할 것으로 본다. 그러나 아직 이러한 논점에 관한 정보는 매우 적다. 본 연구에서는 VP₄가 VP₃와 VP₆으로 절단되지 않는 full length를 Baculovirus에 clone하여 insect cell(sf-9)에서 recombinant RRV VP₄ protein을 생산하여 BALB/c mouse에 immunize하여 boost하고 titer가 상승한 mouse spleen cell과 Fox cell를 fusion 후 Hybridoma cell을 AEC stain에 의해 screen하였고 subcloning, recloning 반복하고 MAbs의 ELISA, HI test, AEC stain을 3회 반복 recloning하였다(Yu 등, 1994). 설사증의 배경과 RV의 실상 및 RV에 대한 MAbs와 Vaccine(Ressortants) 개발의 접근에 대해 살펴 보기로 하겠다.

II. 세균성 설사증

유아에게 설사를 일으키는 세균은 Table 2에서 보는 바와 같은 것이 알려졌고 새로운 설사증병원균인 대장균도 발견되어 주목되고 있다. 대장균등 장내세균은 그 항원으로서 균체항원인 O 항원(내열성 다당체로 합계 164형이 알려져 있다), 헤파항원인 x 항원(이열성 다당체로 100형이 알려져 있음), 편모항원인 H 항원(이열성 단백질로서 154형이 알려져 있음)의 3종류가 밝혀져 그 차이에 의해 혈청형이 분류되고 있다.

병원성 대장균은 장관원성 대장균(enteropathogenic *E. coli*; EPEC), 독성원성대장균(enterotoxigenic *E. coli*; ETEC), 세포침입성대장균(enteroinvasive *E. coli*; EIEC), 용혈성 대장균(enterohemorrhagic *E. coli*; EHEC)의 4종류로 분류되지만 각각 대표적인 혈청형 strain이 알려져 있다.

EHEC의 특징은 이질균과 같이 원숭이 신장계 대세포인 Vero cell를 죽이기 때문에 Verotoxin이라

고 부른다. ETEC이 생성하는 enterotoxin과는 달리 단백질합성저해작용을 갖고 세포를 파괴하며 이질 같은 혈변을 보는 특징을 갖고 있다.

Table 2. Microorganisms responsible for neonatal diarrhea

-
- *Esherichia coli*
enteropathogenic *E. coli* (EPEC)
enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)
enteroinvasive *E. coli* (EIEC)
enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)
 - *Salmonella enteritidis typhimurium*
 - *Shigella dysenteriae flexneri*
 - *Vibrio cholerae parahaemolyticus*
 - *Yersinia enterocolitica*
 - *Campylobacter jejuni*
-

III. Rotavirus성 설사증과 예방 및 치료제

1. Rotavirus는 (Table 3-1, 3-2, Fig. 2)

① 최소의 감염성입자로서 20~300nm로 전자현미경으로만 입자를 관찰할 수 있다.

② 기본구조는 DNA 또 RNA의 핵산 한 종류의 주위를 단백질의 각(capsid)이 둘러싸인 형태를 하고 있다.

③ Ribosome를 갖고 있지 않기 때문에 virus는 산세포의 도움을 빌리지 않으면 자기의 증식이 되지 않고 편성세포 기생성의 성질을 갖고 분열형식도 세포와 달리 그 분열식은 아니고 세포와의 틀린 것을 중심으로 RV의 성질을 비교하면(Table 4-1, 4-2)와 같다. 특히 항생물질의 표적이 되는 세포벽과 ribosome를 갖지 않기 때문에 RV는 항생물질과 전혀 반응하지 않는다. Virus성 이전의 설사병의 병원체 검출의 변천을 살펴보면 1950년 전에는 콜레라, 이질, 살모넬라 등의 병원세균이 검출되지 않는 설사병의 발생이 보고 기재되어 일본에서

는 그 증상으로서 흰설사병(白痢)을 특징으로 하는 것이 알려졌다.

1950년 이후에는 virology가 진보되고 가검물에서 tissue culture method에 의해 virus의 분리가 이루어져 시험관내 배양이 가능한 enterovirus, adenovirus가 분리되었다. 1970년대에 시험관내 배양이 불가능한 Norwalk인자와 RV가 전자현미경

및 면역 전자현미경에 의해 직접 RV입자가 확인되게 되었다.

RV성 설사병은 세계적으로 겨울철에 발생율이 많고 유아의 구토와 설사 증세를 일으키고 대부분은 RV가 분리되어 그의 감염성 설사병에는 2/3가 RV이고 기타 Norwalk virus 등 small round virus (SRV)와 adenovirus가 분리되었다.

Table 3-1. General characteristics of rotaviruses

Structure	65 to 75nm icosahedral particles Double-layered protein capsid Nonenveloped (resistant to lipid solvents)
Genome	11 segments of dsRNA Purified RNA segments are not infectious Each RNA segment codes for at least one protein RNA segments from different viruses reassort at high frequency during dual infections of cells
Replication	Cultivation facilitated by proteases Cytoplasmic replication Inclusion body formation Unique morphogenesis involves transient enveloped particles Virus normally released by cell lysis

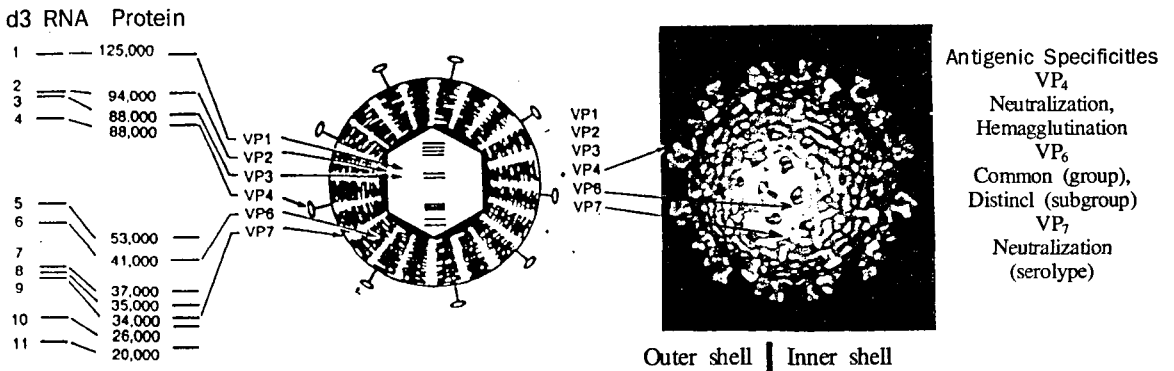


Fig. 2. The figure on the left is a schematic representation of the rotavirus double-shelled particle. The figure on the right(Prasad, 1990) shows surface representations of the three-dimensional structures of a double-shelled particle(on the left half) and a particle(on the right half) in which most, if not all, of the outer shell and a small portion of the inner shell mass have been removed(Kapikian and Chanock, 1994).

Table 3-2. Rotavirus Proteins

Genome segment	Protein product	Nagscent polypeptide (mol wt)	Mature protein modified	Location in virus particles	Approximate percentage of capsid protein	Function
1	VP ₁	125,005	—	Inner core	2	• Slightly basic
2	VP ₂	94,000	—	Inner core	15	• RNA binding?
3	VP ₃	88,000	—	Inner core	0.5	• ?
4	VP ₄ * (VP ₅ + VP ₈)	86,751	Cleaved VP ₅ (529) VP ₈ (247)	Outer capsid	1.5	• Hemagglutinin, neutralization antigen, protease-enganced infectivity, virulence, putative fusion region cell attachment
5	NSP1(NS53)	58,654	—	Nonstructural		• Slightly basic, zinc finger
6	VP ₆	44,816	—	Inner capsid	51	• Hydrogobic, trimer, subgroup antigen
7	NSP3(NS34)	34,600	—	Nonstructural		• Slightly acidic, RNA binding?
8	NSP2(NS35)	36,700	—	Nonstructural		• Basic, role in RNA replication?
9	VP ₇	33,919	Cleaved signal sequence, high-mannose glycosylation and trimming	Outer capsid	30	• Rough endoplasmic reticulum (RER) integral membrane protein, neutralization antigen, bicistronic gene? two hydrophobic NH ₂ -terminal regions
10	NSP4(NS20)	20,290	NS29 → NS28 uncleaved signal sequence, high-mannose glycosylation and trimming	Nonstructural		• RER transmembrane glycoprotein, role in morphogenesis, two hydrophobic NH ₂ -terminal regions
11	NSP5(NS26)	21,700	28 kd phosphorylated, second type unknown	Nonstructural		• Slightly basic, rice in serine and threonine

* There are two trypsin cleavage sites in SA11 VP4241 and 247. The indicated mature products are those on use of only the preferred second cleavage site.

2. Small Round Virus (SRV)

겨울철에 젖먹이 어린이에게 발병하는 virus성 설사증은 “어린이 구토성 설사병”으로 알려져 대부분이 RV에 의해 일어난다. 한편 같은 겨울철에 어린이뿐만이 아니고 학생이나 어른에게도 감염되어 “감염성 위장염”을 일으키는 virus성 설사병은 최근 “소형구형 바이러스(SRV)”가 중요한 병

원체라는 것이 밝혀졌다. 그 크기는 약 30nm이며 표면이 둥근 것을 SRFV라 하고 표면에 구조물이 있는 것을 SRSV라 하며, 1968년 미국 오하이오주 Norwalk의 국민학교에 위장염이 집단발생했을 때 환자의 가검물에서 최초로 발견한 직경 27nm의 구형입자이다. 미국의 volunteer의 실험에서 어른도 설사를 일으킨다는 것이 밝혀졌다.

이 group의 SRV는 오염된 음식물, 음료수, 풀장

의 물 등을 매개로 감염하고 어른에서는 특히 생 조개류를 먹은 사람에 있어서 식중독사례를 일으 키기 때문에 세균성 식중독과의 감별이 필요하지만 여기서는 RV성 설사증의 감염을 위하는 것 같다.

Calicivirus(calix=cup)의 특징은 입자표면과 중심이 한 개의 cup처럼 꼭 들어가고 6개의 cup 같이 둘러싸여 있어 일면 David's star, 축구공이라고도 표현한다. 어린이 설사증의 1~2%가 이 virus에 의한 것이라 한다. Astrovirus는 5~6개의 끝을 갖는 별모양을 하고 설사증의 5%를 차지하고 있다.

RV는 Bishop등(1973)에 의해 처음으로 발견된 이래 연구가 진행되어 왔다. RV의 명명은 전자현미경에서 보는 바와 같이 두 겹의 차바퀴 같이 보이기 때문에 차바퀴를 의미하는 "rota"의 이름을 붙인 것이다. 크기는 직경이 70nm로 유전자가 2개 사슬 RNA(dsRNA)이라고 하는 특징을 갖고 있다. 그리고 Fig. 3와 같이 처음부터 11개의 분절(11 segments)로 나누어져 있다. 각각의 유전자는

Table 3-2와 같이 대응하는 단백질이 동정되었다. 그 중에서 외막단백인 VP₄와 VP₇은 감염에 관계가 있는 중화항원으로 밝혀졌고 당단백인 VP₆(G type)은 11개의 serotype이 알려졌다. 이 중에 사람의 설사병의 중심은 serotype 1-4이다. 또 VP₆는 내충단백으로서 ELISA나 보체결합반응으로 알려진 항원으로 아군을 결정하고 있다. RV의 연구가 늦어진 이유의 하나는 RV의 시험관내 배양이 어렵고 회진배양과 trypsin처리가 필요했기 때문이다. 지금에 와서는 설사병 등의 RV의 검출은 EM에 의한 것이 확실하지만, 최근에는 RPHA법, LA법, ELISA법, Stain법(Greenberg, 1995)이 개발되어 각각 검출 kit가 시판되고 간편화되고 있다. 그러나 일장일단이 있어 앞으로 다시금 새로운 개발법, 예로 sf-9 insect cell AEC stain법이 기대된다.

또 하나 RV의 연구가 늦어진 이유는 human RV의 실험감염동물 model이 없었기 때문에 설사증 발병의 상세한 mechanism을 알 수 없었다. 그래서 MO strain(Serotype 3, Kutzusawa등, 1982)을 5일

Table 4-1. Differences between bacteria and virus

Items	Animal cell	Bacteria	Virus	Viroid
Size	>10um	0.5~10um	20~300nm	50nm(RNA)
	(um= 1/10 ⁶ m)		(nm= 1/10 ⁹ m)	
Molecular weight of nucleic acids	10	10	10	10
Nucleoic	DNA RNA	DNA RNA	DNA or RNA	RNA
Chromosom number	>2	1	1	1
Ribosome	+	+	-	-
Cell wall	-	+	-	-

Table 4-2. Diagnosis of Infections Diarrhea Symptoms

Items	Viral	Bacterial
Age of frequent incidence	Infant	Infant-childhood
Incidence season	Winter	summer(thr. year)
Incidence site in the G.I. tract	stomach-S.I. (gastroenteritis)	I.i.(large intestinitis)
Fecel status	Watery	Mucous bloody
Theurapeutic effect	Symptomatics	Antibiotics

G.I. : gastroenteritis

Table 4-3. Gene Map of RRV × EHP_T reassortants(Gene substitution)

Gene of RRV	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	R(RRV) Gene segment
Gene of EHP _T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	E(EHP _T) Gene segment
Protein products												
No. of RRV × EHP _T reassortants	VP ₁	VP ₂	VP ₃	VP ₄	NS34 (NSP1)	VP ₆	NS35 (NSP3)	NS35 (NSP2)	VP ₇	NS20 (NSP4)	NS26 (NSP5)	
1-1			E			E	E					R/E3,6,7
1-2						E	E					R/E6,7
1-3				E								R/E4
3-1			E				E		E			R/E3,6,9
35-1								E				R/E8
48-1							R	R				E/R7,8
72-1					E		E					R/E5,7
151-1			E									R/E3
174-1						E						R/E6
191-1			E		E			E				R/E3,5,8
212-2								E				R/E8
212-5				E				E				R-E4,8
224-1							R				R	E/R7,11
233-1			E				E					R/E3,7
241-1		R					R		R		R	E/R2,7,9,11
250-1							R					E/R7
252-1								E			E	R/E8,11
256-1				R								E/R4
311-1					R					R		E/R5,10
317-1		E						E	E		E	R/E2,8,9,11
320-1											R	E/R11
326-1	R			R	R			R	R		R	E/R1,4,5,8,9,11
358-1							R					E/R7
362-1								E				R/E8
441-2								E				R/E8
441-4							E	E				R/E7,8

(Yu et al., 1994)

령의 BALB/c mouse에 경구 감염시키므로 인해 90%의 mice에 3일간 설사를 일으키는데 성공했다.

RV는 장관상피세포에만 감염하고 설사를 일으키는 것은 형광항체법에 의해 확인했다. 그래서 설사증의 예방 및 치료법의 연구에 들어갔다.

일반적으로 RV감염을 예방하는 데에는 능동백신이 유효하다고 생각되어 세계적으로 시도되고 있지만, RV는 그 개발이 어렵다. 그 이유는 ① Influenza virus처럼 처음부터 유전자가 분절되어 있어 변이를 일으키기 쉽다. ② 소, 돼지, 조류 등의 동물에도 사람과 같이 RV가 있고 동물 virus와

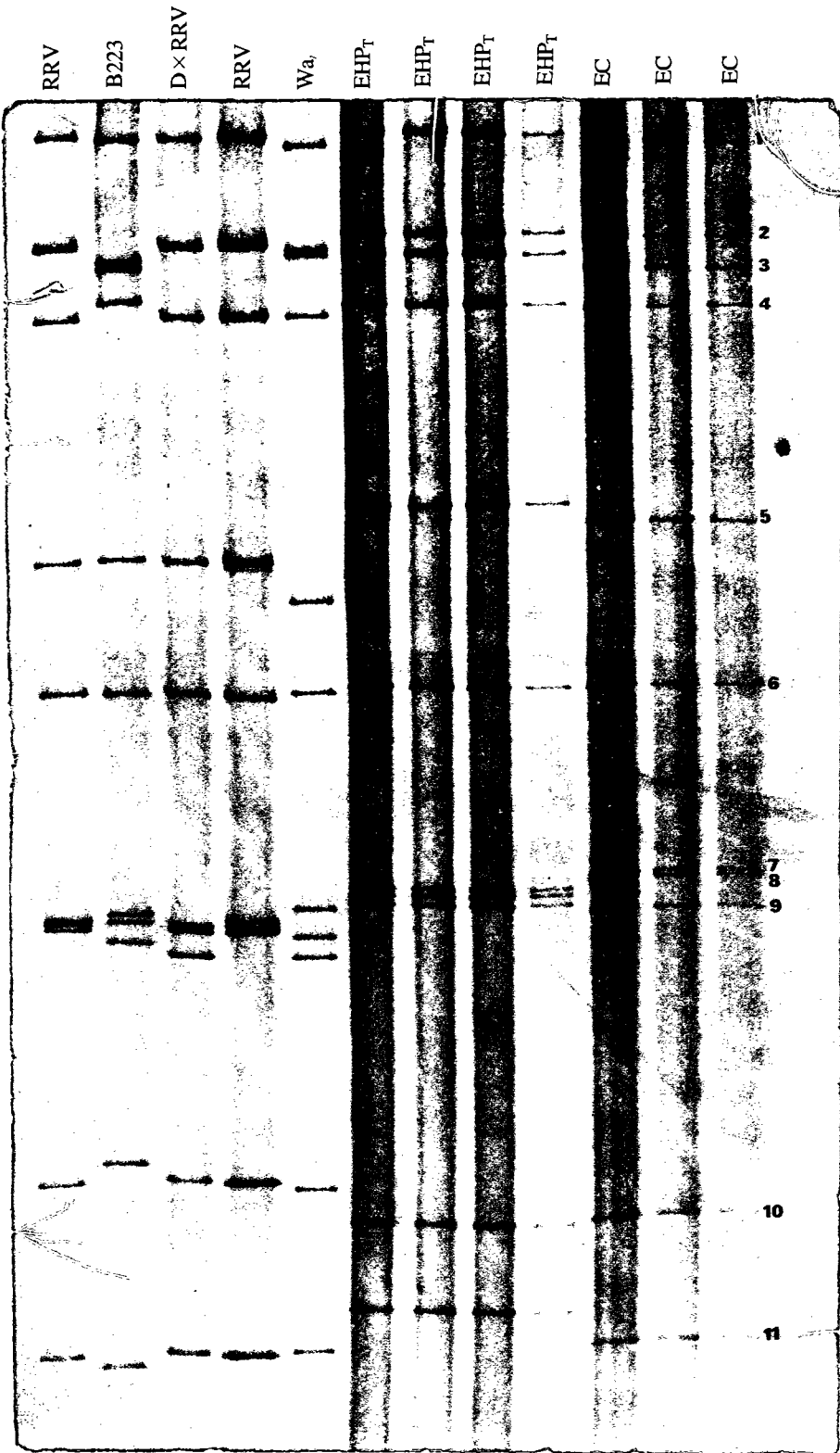


Fig. 3. RNA Fragment of various Rotavirus(RRV, B223, D x RRV, Wa, EHP_T, EC) (Yu et al. 1994)

혼합감염에 의해 새로운 strain(reassorted strain)이 출현할 가능성이 높다. ③ human RV는 6개의 serotype이 알려졌고 그 발생과 유행하는 형태는 매년 다르며 모든 형에 공통하는 중화항체를 생산하는 것은 어렵다. ④ RV성 설사증의 대부분이 1세 미만의 면역학적으로 미숙한 유아에 발생하기 때문에 능동백신에 의해 높은 역가의 중화항체를 체내에서 만들어 낸다는 것은 어렵게 된다. 그래서 능동 백신대신으로 수동면역에 의한 예방도 지향하게 되었다.

3. RV 설사병의 예방(Prophylaxis)

(1) Anti-RV-Colostrum에 의한 예방

지금까지 젖소의 초유는 정상유와는 성분이 다르기 때문에 일반송아지에 포육하고 나머지는 사용치 않고 폐기되어 왔다. 그런데 젖소의 초유 중에는 IgG, IgA, IgM이 정상유에 비해 100배 이상 많이 함유되어 특히 IgA은 단백질효소에 저항성이 있고 RV에 대한 중화항체와 활성도 높은 것을 알았다. 그래서 폐기되는 초유를 이용하기 위해 임신 8개월 Holstein 젖소에 human RV Wa strain(serotype 1) Kun strain(Serotype 2) MO strain(Serotype 3)를 각각 4회 피하면역하고 분만후 3일 분까지 초유를 채취하였다. 이 초유를 원심분리하여 탈지하여 탈지유를 vial에 20ml씩 분주하고 동결건조하여 사용하였다. 이것을 human RV의 혈청형 4 종류에 대해 중화항체가를 측정한 결과 모두 높은 항체가를 나타냈다. 한편 비면역젖소의 초유에서는 중화항체가가 100단위 이하였다.

그래서 mice를 이용한 감염실험때에 각각 50 μ l의 초유를 RV 감염 2시간 전에 투여한 결과 Anti-RV-Colostrum은 어떤 것이나 설사증을 예방하였다. 다시 감염 8시간전의 투여에서는 설사증은 부드러운 변으로 되었다.

다음으로 유아원에서 Wa strain로 면역한 초유를 매일 20ml씩 음용시킨 군과 보통시유를 먹인

군과 30일간 관찰한 결과 Anti-RV-Colostrum을 먹인 군에서 6아이 중 1아이만 발병하고 대조구에서 7아이 중 6아이만 발병하여 RV면역초유의 설사예방에 있어서 유효성이 시사되었다(Ebina 등, 1985).

(2) Anti-RV-Yolk(Ig Y)에 의한 설사예방

150일령의 백색레구혼 닭에 Wa MO strain를 피하면역하고 채란, 난황(yolk)을 분리 난황 IgG(IgY)을 동결건조하여 사용하였다. IgY는 포유동물의 IgG와 비교하면 보체결합능력이 없는 것과 분자량이 약간 큰 것을 제외하면 같은 성상으로 보면 좋다.

정제 IgY의 수량은 1ml의 난황에서 6.5mg을 얻었다. 한 개의 닭을 면역하면 1년간에 150개의 채란을 할 수 있기 때문에 한 마리 닭에서 15g의 IgY를 얻을 수 있다. IgY의 중화항체가는 Wa로 면역했기 때문에 Wa에 대한 항체가는 8mg/ml용액으로 90,000 unit, MO로 면역한 IgY는 MO에 대해서 110,000 unit로 상승하였다. 대조구는 100 unit 이하였다. 그래서 실험감염 model를 50 μ l 용액으로 경구투여한 결과 용량의존적으로 설사증을 예방하였다. 감염 9시간 전에는 예방되었으나 감염 24시간 전에는 예방효과가 적은 것이 확인되었다.

Wa로 면역해 얻은 anti-Wa-IgY를 이용하여 MO 감염 mice의 설사증의 예방효과는 8mg/ml의 50ml 투여로 있었지만 10배 희석액은 예방효과를 얻을 수 없었다. 그래서 in vitro에 있어서 MO, Wa에 대한 중화항체가와 in vivo에 있어서 50% mice의 설사예방하는 IgY의 희석배수(감염예방치)를 비교 결과는 거의 비슷했었다(Ebina 등, 1990).

4. Rotavirus 설사증의 치료제

(1) Polysaccharide-Kureha(PSK)

RV 위장염의 치료를 목표로 하고 먼저 RV에 직

접 결합해서 불활성화하는 약제를 탐색한 결과 단백질 결합 다당체(protein-bound polysaccharide)인 담자균제제(*mycelia of Coriolus versicolor* of Basidiomycetes)인 PSK에 anti-RV 활성이 있음을 알았다(Ebina 등, 1990). PSK는 20g/kg의 경구대량투여에도 전혀 독성을 나타내지 않고 더욱이 아무 변화 없이 그 형태로 장관에 흡수되어 혈관 이행하는 약제라는 것이 이미 판명되었다. 또 RV증식에 필요한 MA104 cell에 대해서 0.1% 농도에서도 독성이 없었다. 그래서 human RV Wa strain과 PSK를 0.1%이하 농도로 37℃에서 1hr 반응시킨 후 감염가를 측정한 결과 용량의존적으로 감염을 저지하였다. 또 혈청형이 다른 Kun, MO, ST-3 strain도 각각 같은 감염가를 저하시켰다. 다음에 PSK를 ion exchanger chromatography에 의한 용출부분(α -D-glucan)과 흡착부분(β -D-glucan)으로 나누어 각각 RV 불활성화 작용을 비교한 결과 β -D-glucan에 단백질이 결합한 분자량 약 100KDa의 부분에 그 활성이 보였다. 5일령 BALB/c mice에 MO 10⁶ FCFU를 감염시킨 24시간 후에 PSK를 mouse당 5mg, 0.25mg, 25 μ g씩 각각 경구투여한 결과 감염 2, 3일 후 용량의존적으로 억제하였다. 즉 설사증 기간이 단축이 보여 PSK에 의한 RV설사증의 치료효과가 확인되었다.

(2) 녹차 ethanol extract

녹차 추출물 중의 분자량 458D의 Epigallocatechin gallate가 1 μ g/ml의 농도로 감염가를 96.2% 감소시키는 것이 발견되었다. In vivo에서 그 예방효과를 검토한 결과 RV 감염 12시간 후와 24시간 후에 200 μ g을 2회 경구투여 했으나 대조구와 같이 3일간 계속 치료효과가 보이지 않았다. 앞으로 장내용제 캡슐형태로서 장관까지 확실하게 도달하는 것을 확인하는 실험이 필요하다고 생각한다(Ebina 등, 1990).

(3) Cysteine protease inhibitor(E-64-C, E-64-D)

RV는 trypsin 5 μ g/ml의 첨가에 의해 감염력을 갖게 된다. 이는 VP₄가 trypsin에 의해 VP₈과 VP₅로 cleavage(개열)되어 활성화 된다. 역시 VP₇도 protease에 의해 cleavage되어 signal peptide가 된다는 것을 알았다(Estes와 Cohen, 1989). Protease는 그 활성기의 차이에 의해 ① serine protease ② cysteine protease ③ aspartic acid protease ④ metallo protease의 4종류로 나뉜다. ①은 arginine (R), X의 부위를 주로 절단하고 trypsin이 그 대표적인 효소이며 VP₄의 241, 247번째의 아미노산이 R, X로 된다. ②는 tyrosin(Y)·Glycine(G)의 부위를 절단하지만 VP₇의 53번째의 부위에 Y-G가 존재하고 protease가 RV의 감염력 증강에 중요한 역할을 하고 있음을 나타낸다. in vitro에서 trypsin이나 cathepsin B를 RV에 1시간 37℃에서 반응시켜 감염력이 증가하는 것을 확인하였다. 그래서 cysteine protease 저해제인 합성 E-64-C 보다 100배 낮은 E-64-D에 대해서 in vivo에서 anti-RV 활성을 본 결과 RV감염 12시간과 24시간 후에 2회 투여하고 감염 2일 3일 후의 설사증세를 용량의존적으로 저해하였다.

(4) Ovocystatin과 Aprotinin과 핵산유도체단백에서 얻은 Cysteine protease 저해제인 ovocystatin과 소의 췌장 추출물인 serine protease 저해제인 Aprotinin을 RV감염 12시간, 24시간 후에 투여한 결과 2일째 설사증세를 저해했다. 특히 ovocystatin 150 μ g의 2회 투여로 완전히 설사증을 저해하고 치료효과가 인정되었다(Ebina와 Tsukata, 1991).

핵산유도체인 3'-fluro-deoxyadonosine를 5일령 BALB/c suckling mice에 300 μ g(100 μ g/kg)을 2회 경구 투여한 결과 설사증을 저해하지 않았다. 이상과 같이 human RV감염 mouse model에 있어서 PSK와 protease inhibitor의 투여가 설사증의 진행을 저해하는 것이 밝혀지고 앞으로 임상시험이 기대된다.

IV. 새로운 Reassortant Vaccine의 개발과 전망

1) Reassortants(RRV × EHP_T, EWT, Wa)의 선발과 model test

RV는 인간과 동물신생아, 조류 등의 급성 위장염을 일으키는 주요한 바이러스성 병원체이다 (Estes와 Cohen, 1989). RV의 genome은 이중나선쇄 구조 RNA의 11개 분절로 되어 있기 때문에 새로운 strain인 reassortant(組合, 組換)는 배양된 조직내의 세포에서 쉽게 coinfection에 의해 일어난다. 다른 포유동물끼리 혹은 사람과 동물, 조류 사이에서 자연적 또는 in vitro에서 만들어지는 reassortant는 그 수가 많다(Broome 등, 1993). Reassortant는 유전자의 gene-coding 및 그 기능을 연구하는데 매우 중요하다(Ruggeri와 Greenberg, 1991). 예를 들면 VP₆는 공통적 특이성의 domain subgroup 항원을 갖고 있다(Greenberg 등, 1983). Outer capsid protein인 VP₄는 적혈구 응집 및 독성

과 중화항원으로 관여한다(Kalica 등, 1983; Offit 등, 1986). 또한 감염성을 활성화시키는 trypsin cleavage의 위치를 갖고 있다(Kalica 등, 1983; Lopez 등, 1985). VP7은 strain에 따라 7, 8 및 9번째 유전자 분획에 의해 code되고 주요한 중화항원이다(Dyall Smith 등, 1986; Matsuno 등, 1985; Offit 등, 1986). 특이적 reassortant의 분석은 VP₇의 단순 분리와 VP₄의 중화특이성을 밝히게 되었다(Greenberg 등, 1983; Hoshino 등, 1985). 그리고 VP₇과 VP₄ 모두 immunoantigen으로서 작용하는 것을 알게 되었다(Hoshino 등, 1988; Offit 등, 1986).

Simian 유래의 rhesus rotavirus(RRV)와 murine 유래의 attenuated rotavirus(EHP_T)를 mobility of infection(MOI) 1 이하로 MA104 cell에 coinfection하여 plaquing한 후 gradient PAGE에 의해 11 gene이 substitute된 reassortants를 1, 2차 및 3차 plaquing으로 selection(purification)하였고 (Yu와 Greenberg 등, 1994), suckling mice에 있어서 local immunity가 증명되었다(Feng 등, 1995).

Table 5. Select of Reassortants by PAGE and gradient PAGE and immunogenicity in Mice.

Virus Reassortants	Function Diarrhea	Serum immunity	Local immunity	Protection of diarrhea	Note
EW _T	+++	+++	+++	+	Murine rotavirus wild type
EHP _T	+	+	+++	+	Rotavirus attenuate type
RRV	+	+	+	+	10 ⁷ PFU/mouse high dose
Wa	-	+	-	-	10 ⁶ ~10 ⁵ PFU/mouse low dose human rotavirus
EW _T × RRV (Feng)	(-)	(+)	(+)	(+)	
EHP _T × RRV (Yu)	(-)	(+)	(+)	(+)	(1993. 12 ~ 1994. 5) 1st, 2nd and last pluquing
Wa × EHP _T (Ludert)	(-)	(+)	(+)	(+)	

(Yu et al., 1994)

2) Recombinant RRV VP₄에 Monoclonal Antibodies(MAbs)생산과 그 의의

Viral Gastroenteritis에 논쟁되는 문제는 host cell에 결합하는 RV의 억제자 중화항체의 활동이 추

가적 mechanism으로서 간주되는지 아닌지 아는데 있는데 이를 뒷받침하는 결과를 볼 수 있다(Ebina 등, 1983; Fukuhara 등, 1988; Ho 등, 1988; Lee 등, 1981; Sabara 등, 1985). 그러나 RV의 cell

attachment의 억제와 중화 사이에서 분량적인 관계에 대한 것은 확실히 밝혀지지 않았다. 반면에 많은 경우에 항체에 의해 중화된 RV(antibody neutralized rotavirus)가 세포에 효과적으로 결합하는 것을 보여 주었다. 더욱이 몇 가지 경우에는 세포에 RV의 결합과 감염이 MAbs에 의해 특이하게 일어날 수 있다는 것이다. 이 경우에서 RV와 MAbs의 복합체는 viral receptor보다 FC receptor에 결합한다(Homsey 등, 1989; Schlegel과 Wade, 1983). 두 개의 RV 표면 단백질 즉 VP₄와 VP₃(neutralize virus)에 대한 특정 MAbs가 RV를 중화하는 mechanism을 연구하였다(Ruggeri와 Greenberg, 1991). 이전의 연구에서 RV감염 model mouse를 이용하여 VP₄과 VP₃의 trypsin에 의한 fragments(VP₃와 VP₃)에 대한 MAbs는 수동적 면역 보호를 야기할 수 있는 것은 명백히 하였다(Matsui 등, 1989; Offit 등, 1986). 더욱 유전적 연구에서 VP₄ 또는 VP₃에 대한 MAbs가 murine 모델에서 수동면역 보호를 야기할 수 있다는 것을 보여 주었다(Offit 등, 1986).

In vivo에서 능동적 면역 보호를 유발하는 세포성 면역 뿐만 아니라 VP₄과 VP₃에 대한 MAbs의 확실한 역할은 아직 알려지지 않았다. 그러나 MAbs의 중화능력을 바탕으로 해서 RRV에 대한 두 group의 MAbs를 파악할 수 있었다(Ruggeri와 Greenberg, 1991).

표면 당단백인 VP₂에 대한 MAbs는 RV와의 배양을 통해 RV감염율이 2~3배 급격히 감소하는 중화능을 갖는 특성을 보였다. 한편 VP₄에 대한 5개의 MAbs는 약한 중화력을 나타냈다.

이러한 차이점에도 불구하고 상당한 중화가 두 group의 MAbs에서 농도에 따라 비교되어진다. In vivo에서 VP₄와 VP₃에 대한 항체의 방어적 효과는 구별되어 지지 않는다. VP₃에 비해 VP₄ MAbs에서 얻은 중화곡선의 점진적 경사는 MAbs에 의한 RRV의 중화에서 동적인 단순자극의 상호작용에 의한 것 같지 않다. 왜냐하면 virion당 VP₄분자보

다 VP₃분자가 거의 10배이기 때문이다. 이러한 경사내에서 차이는 훨씬 크다. 사실 virion당 VP₄분자의 수가 120이고(Prasad 등, 1990; Yeager 등, 1990) 단지 1/100에서 1/1,000 virion이 세포 배양에서 감염된다고 하면 분석조건에 이용될 수 있는 VP₄ epitope의 수는 10¹²~10¹³/ml이고 VP₃ epitope수는 10^{13.4}/ml이다. 90% 중화를 할 수 있는 항체 농도에서 약 4 × 10¹³의 VP₄에 대한 특이항체분자가 반응하는 혼합물에 존재한다. 이 말은 항체 대 epitope 비율(antibody to epitope ratio)이 최소한 4:1을 의미한다. 즉 RV의 감염을 없애기 위해 거의 대부분의 VP₄ 항체가 virion의 VP₄분자와 상호작용을 해야 한다는 것이다.

다른 한편 10¹² 만큼의 VP₃, 특이항체가 비슷한 효과를 나타내는 것이 요구된다. 그래서 다른 한편 10¹²만큼의 VP₃, 특이항체가 비슷한 효과를 나타내는 것이 요구된다. 그래서 virion에서 항원분자 1~10%에 대한 VP₃, 특이성 항체의 결합으로 중화가 일어나기에 충분하다고 본다. Viral attachment block에 의한 항체의 중화는 viral attachment protein의 전부 또는 거의 다 결합해야 한다는 추측이 옳다고 본다. 반면에 virion포화 보다 낮은 농도에서 중화하는 항체는 아마도 inhibition binding과 다른 mechanism에 의해서 중화한다고 본다. 세포결합 방해 실험결과로 그 가설을 보충할 수 있다. 이 가설은 VP₃ MAbs가 RRV결합의 blocking에 의해 중화하는데 VP₄ MAbs 5개중 4개가 MA104 cell에 RRV attachment를 상당히 줄여주는 것으로 보인다. 역시 VP₄의 subfragment인 VP₃에 대한 특이성 MAbs 모두가 이러한 효과를 보였다. 반면에 VP₃를 인식하는 MAbs(2G4)는 그렇지 않았다. 더욱이 VP₃에 대한 항체는 MA104 cell monolayer에 viral binding을 방해하지 않았다. VP₃항체가 중화를 야기시키고 virus 흡착을 저지할 뿐만 아니라 이 MAbs가 virion과 cell 표면에 결합하는 것은 방해하므로써 RV의 복제를 못하게 하는 것으로 추측된다. 이 가설이 합당하다는 것이 VP₄가 RV의

cell attachment protein인 것은 많은 증거가 있기 때문이다. 그리고 유전적 생화학적 연구에서 VP₄가 RV hemagglutinin이라는 것이 증명되었다(Estes, 1990; Mackow 등, 1989).

최근 RRV의 연구에서 hemagglutinin activity가 VP₈에 위치한다고 지적하였다(Flore 등, 1991). 그러나 만약 VP₄가 cell attachment protein이라고 하면 VP₄에 대한 MAb가 cell viral binding을 효과적으로 억제하는 것은 당연할 것이다.

In vitro와 in vivo의 연구(Ludert 등, 1995)에서 VP₄가 RV cell attachment protein이라는 것을

reassortant의 genetic mapping에서 밝혔고, Recombinant RRV VP₄ protein에 대한 MAb(Table 6)는 infant 뿐만아니라 calf, porcine, avian 등의 rotaviral gastroenteritis의 연구에 커다란 의의를 갖게 되었고 새로운 Reassortants Vaccines 개발(Glass 등, 1994)의 전망이 밝아졌으며, Table 7와 같이 reassortants(RRV×EHPT)가 in vivo에서 fecal IgA와 serum IgG 역가가 증가될 뿐만아니라 virus shedding이 되지 않음이 증명(Feng 등, 1995)되어 rotavirus의 vaccine개발이 더욱 활발하게 전개되리라 믿는다.

Table 6. ELISA to measure hybridoma Abs (sups, T75) to bv. exp. RRV VP₄, VP₈, VP₅ protein Sf-9 insect cell(mean of triplicate)

unit : OD 405nm				
Monoclonal Antibodies	Antigens			
	VP ₄ (1/40)	VP ₈ (1/4)	VP ₅ (1/4)	Sf-9
1B ₂	2,600	963	591	314
3D ₇	2,054	205	70	40
4C ₂	2,080	101	2	5
6B ₁₁	2,464	231	25	27
6D ₄	2,564	311	157	87
7F ₈	2,353	251	104	57
8B ₈	8	—	19	8
13F ₄	2,600	288	4	3
14D ₆	140	65	132	104
15B ₅	2,336	150	10	8
15B ₁₀	2,388	214	34	14
17F ₇	2,563	202	73	66
Standard Abs (sup)				
2G ₄ ∝ VP ₅	1,825	375	820	181
7A ₁₂ ∝ VP ₈	2,600	1,318	337	270
255/60 ∝ VP ₆	173	115	163	108
Hy-15 control	10	—	—	—

* 2G₄(unknown, V₀), 7A₁₂(11/9/93, V₀), 255/60(3/23/94, V₀) (Yu et al., 1995)

※ Abs : Monoclonal Antibody against baculovirus expressed rhesus rotavirus(bv. exp. RRV) VP₄ protein(full length)

Ags : (Antigens) : VP₄, VP₈, VP₅ and Sf-9 insect cell were diluted in PBS-Azide and sonicated 3 times in ice.

Table 7. Immunogenicity of RRV × EHP_r Reassortant Rotaviruses in Mice

Responder	Reassortant	Genotype	Fecal IgA Mean OD	Prop (+)	Serum IgG Mean Titer	Prop (+)	Prop Virus Shedding
Parent 1	EHP _r	E	1.223	4/4	779	4/4	0/4
Parent 2	RRV	R	0.009	0.6	779	6/6	6/6
High	256-1	E/R4	1.027	5/5	361	5/5	0/5
	258-1	E/R9	1.152	5/5	361	5/5	0/5
	320-1	E/R11	1.090	5/5	1,084	5/5	0/5
	224-1	E/R9,11	1.038	5.5	150	5/5	0/5
	241-1	E/R3,8,9,11	1.181	6.6	180	6/6	0/6
Medium	72-1	R/E5,9	0.393	5/11	870	7/10	8/11
	191-1	R/E2,5,7	0.760	8/12	408	8/12	9/12
Low	311-1	E/R5,10	0.023	0/5	< 50	0/5	5/5
	233-1	R/E2	0.008	0/6	104	6/6	6/6
	1-3	R/E4	0.008	0/6	< 50	1/6	6/6
	174-1	R/E6	0.012	0/5	150	5/5	5/5
	35-1	R/E7	0.0419	0/5	699	3/7	5/5
	252-1	R/E11	0.015	0/6	< 50	0/6	6/6
	3-1	R/E2,7	0.012	0/5	< 50	1/5	5/5
	1-1	R/E2,6,9	0.02	0/11	50	2/5	11/11
	326-1	R/E2,3,6,10	0.046	0/5	66	4/5	5/5
	317-1	R/E3,7,8,11	0.044	0/5	97	2/5	5/5

Note : fecal IgA positive is OD>0.3. Serum IgG positive is titer ≥ or = 1:50

* Only parental origin of gene 5 correlates completely with immune phenotype.

(Feng et al., 1995)

V. 인용문헌

- Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes I. H., and Ruck, B. J. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2:1281-1283.
- Broome, R. L., P. T. Vo, R. L. Ward, H. F. Clark, and H. B. Greenberg. 1993. Murine Rotavirus Genes Encoding Outer Capsid Proteins VP₄ and VP₃ are not Major Determinants of Host Range Restriction and Virulence. *J. Virol.* 67:2448-2455.
- Dyall-Smith, M. L., I. Lazdins, G. W. Tregear, and I. H. Holmes. 1986. Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3465-3468.
- Ebina, T., Ohta, M., Kanamara, Y., Yamamoto-Osumi, Y., and Baba, K. 1992. Passive immunizations of suckling mice and infants with bovine colostrum containing antibodies to human rotavirus. *J. Med. Virol.* 38:117-123.
- Ebina, T., Sato, A., Umezumi, K., Ishida, N.,

- Ohyama, S., Oizumi, A., Aikawa, K., Katagiri, S., Katsushima, M., Imai, A., Kitaoka, S., Suzuki, H., Konno, T. 1983. Prevention of rotavirus infection by oral administration by cow colostrum containing antibody against human rotavirus. *Lancet*. 2:1029-1030.
6. Ebina, T., Sato, A., Umezu, K., Ishida, N., Ohyama, S., Oizumi, A., Aikawa, K., Katagiri, S., Katsushima, M., Imai, A., Kitaoka, S., Suzuki, H., Konno, T. 1985. Prevention of rotavirus infection by oral administration of cow colostrum containing antihuman rotavirus antibody. *Medical Microbiology and Immunology*. 174:177-185.
 7. Ebina, T., Tsukada, K. 1991. Protease inhibitors prevent the development of human rotavirus-induced diarrhea in suckling mice. *Microbiology and Immunology*. 35:583-588.
 8. Ebina, T., Tsukada K, Umezu, K., Nose, M., Tsuda, K., Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T. 1990. Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin(Ig Y) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation(PSK). *Microbiology and Immunology*. 34:617-629.
 9. Estes, M. K., D. Y. Graham, and B. B. Mason. 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol*. 39:879-888.
 10. Estes, M. K., E. L. Palmer, and J. F. Objeski. 1983. Rotaviruses: a review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 105:123-184.
 11. Estes, M. K., and J. Cohen. 1989. Rotavirus Gene Structure and Function. *Microl. Rev*. 53:410-449.
 12. Estes, M. K. 1990. Rotaviruses and their replication. In B. N. Fields and D. M. Knipe (ed.), *Virology*. Raveness, New York. 1329-1351.
 13. Feng, N., P. T. Vo, J. H. Yu, and H. B. Greenberg, 1995, unpublished data
 14. Flores, J., and A. Z. Kapikian, 1992. Rotavirus vaccines. In Ellis RW(ed) *Vaccines*, Butterworth-Heinemann, stoneham. P. 255-288.
 15. Fiore, L., H. B. Greenberg, and E. R. Mackow. 1991. The VP₈ fragment of VP₄ is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology*, 181:553-563.
 16. Fukuhara, N., O. Yoshie, S. Kitakoa, and T. Konno. 1988. Role of VP₃ in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP₇. *J. Virol*. 62:2209-2218.
 17. Glass, R. I., J. Gentsch, and J. C. Smith. 1994. Rotavirus vaccines: Success by reassortant? *Science*. 265:1389-1391.
 18. Greenberg, H. B., J. Flores, A. R. Kalica, R. G. Wyatt, and R. Jones. 1983. Gene coding assignments for growth restriction, neutralization, and subgroup specificities of the Wa and Ds-1 strains of rotavirus. *J. Gen. Virol*. 64:313-320.
 19. Greenberg, H., V. McAuliffe, J. Valdesuso, R. Wyatt, J. Flores, A. Kalica, Y. Hoshino, and N. Singh. 1983. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus using monoclonal antibodies. *Infect. Immun*. 39:91-99.
 20. Green, K. Y., K. Taniguchi, E M. Machow, and A. Z. Kapikian. 1990. Homotypic and heterotypic epitope-specific antibody responses in adult and infant rotavirus vaccines. *J. Infect Dis*. 161:667-679.
 21. Ho, D. D., J. C. Kaplan, I. E. Rackauskas, and M. E. Gumej. 1988. Second conserved domain of gp 120 is important for IIIV infectivity and antibody neutralization. *Science*. 239:1021-1023.
 22. Homsy, J., M. Meyer, M. Tateno, S. Clarkson,

- and J. A. Levy. 1989. The Fc and not CD4 receptor mediates antibody enhancement of HIV infection in human cells. *Science*. 244:1357-1360.
23. Hoshino, Y., M. M. Sereno, K. Midthun, J. Flores, R. M. Chanock, and A. Z. Kapikian. 1987. Independent segregation of two antigenic specificities(VP₃ and VP₇) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8701-8704.
 24. Hoshino, y., M. M. Sereno, K. Midthun, J. Flores, A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock. 1985. Independent segregatin of two antigenic specificities(VP₃ and VP₇) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8701-8704.
 25. Ishida, S. I. 1994. Epidemiological study on the mechanism which restricts the diversity of the combination of serotypes(G and P types) of rotaviruses. *Akita J. Med.* 21:27-32.
 26. Kalica, A. R., J. Flores, and H. B. Greenberg. 1983. Identification of the rotaviral gene that codes for the hemagglutinin and protease-enhanced plaque formation. *Virology*. 125:194-205.
 27. Kapikian, A. Z. 1993. Viral gastroenteris. *J. Am. med. Assoc.* 269:627-630
 28. Kapikian, A. Z., and R. M. Chanock. 1990, 1994 Rotaviruses, p. 1353-14047. In B. N. Fields and D. M. Knipe(ed.), *Virology*. Raven Press, New York.
 29. Kutsuzawa, T., Konno, T., Suzuki, H., Kapikian, A. Z., Ebina, T., Ishida, N. 1982. Isolation of human rotavirus subgroups 1 and 2 in cell culture. *Journal of Clinical Microbiology*. 16:727-730.
 30. Lee, P. W. K., E. C. Hayes, and W. K. Joklik. 1981. Protein Signal is the reovirus cell attachment protein. *Virology*. 108:156-163.
 31. Lopez, S., C. F. Arias, J. R. Bell, J. H. Strauss, and R. T. Espejo. 1985. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA 11 infectivity. *Virology*. 144:11-19.
 32. Ludert, J. E., N. Feng, J. H. Yu, R. L. Broome, Y. Hoshino, and H. B. Greenberg. 1995. Genetic Mapping Indicates that VP₄ is the Rotavirus cell Attachment Protein in vitro and in vivo. *J. Virol.* inpress.
 33. Mackow, E. R., J. W. Barnett, H. Chan, and H. B. Greenberg. 1989. The rhesus rotavirus outer capsid protein VP₄ functions as a hemagglutinin and is antigenically conserved when expressed by a baculovirus recombinant. *J. Virol.* 63:1661-1668.
 34. Matsui, S. M., P. A. Offit, P. T. Vo, E. R. Mackow, D. A. Benfield, R. D. Shaw, L. Padilla-Noriega, and H. B. Greenberg. 1989. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to the heterotypic neutralization domain of VP₇ and the VP₈ fragment of VP₄. *J. Clin. Microbiol.* 27:780-782.
 35. Matsuno, S., and S. Inouye. 1983. Purification of an outer capsid glycoprotein of neonatal calf diarrhea rotavirus and preparation of its antisera. *Infect. Immun.* 39:155-158.
 36. Oflit, P. A., G. Blava, H. B. greenberg, and H. F. Clark. 1986. Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4. *J. Virol.* 57:46-49.
 37. Oflit, P. A., H. F. Clark, G. Blavat, and H. B. Greenberg. 1986. Reassortant rotaviruses containing structural proteins VP₃ and VP₇ from

- different parents induce antibodies protective against each parental serotype. *J. Virol.* 60:491-496.
38. Ofrit, P., R. D. Shaw, and H. B. Greenberg. 1986. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins VP₃ and VP₇. *J. Virol.* 58:700-703.
39. Paul, P. S., Y. S. Lyoo, and G. N. Woode, S. Zheng, H. B. Greenberg, S. Matsui, K.J. Schwartz, and H. T. Hill. 1988. Isolation of a bovine rotavirus with a "Super-Short" RNA electrophoretic pattern from a calf with diarrhea. *J. Clinical Microbiology.*
40. Prasad, B. V., J. W. Burns, E. Marletta, M. K. Estes, and W. Chiu. 1990. Localization of VP₄ neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature (London)* 343:476-479.
41. Ruggeri, F. M., and H. B. Greenberg. 1991. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP₃ neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to get cells in culture. *J. Virol.* 65:2211-2219.
42. Sabara, M., J. Gilchrist, G. R. Hudson, and L. A. Babiuk. 1985. Preliminary characterization of an epitope involved in neutralization and cell attachment of an epitope that is located on the major bovine rotavirus glycoprotein. *J. Virol.* 53:58-66.
43. Schlegel, R., and M. Wade. 1983. Neutralized vesicular stomatitis virus binds to host cells by a different "receptor". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:774-778.
44. Shaw, R. D., K. J. Fong, G. A. Losonsky, M. M. Levine, Y. Maldonado, R. Yolken, J. Flores, A. Z. Kapikian, P. T. Vo, and H. B. Greenberg. 1987. Epitope-specific immune responses to rotavirus vaccination. *Gastroenterology.* 93:941-950.
45. Shaw, R. D., R. T. Vo, P. A. Ofrit, B. S. Coulson, and H. B. Greenberg. 1986. Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus rotavirus. *Virology.* 155:434-451.
46. Svensson, L., H. Sheshberadaran, T. Vesikari, E. Norrby, and G. Wadell. 1987. Immune response to rotavirus polypeptides after vaccination with heterologous rotavirus vaccines (RIT4237, RRV-1). *J. Gen. Virol.* 68:643-651.
47. Taniguchi, K., S. Urasawa, and T. Urasawa. 1984. Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 66:1045-1053.
48. Yeager, M., K. A. Dryden, N. H. Olson, H. B. Greenberg, and T. S. Baker. 1990. Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J. Cell Biol.* 110:2133-2144.
49. Yu, J. H., N. Feng, and H. B. Greenberg. 1994. Selection of Reassortants (Rheus rotavirus × attenuated murine rotavirus) by long gradient PAGE. unpublished data.
50. Yu, J. H., P. T. Vo., B. Z. Tang, S. Ishida, J. M. Gilbert, and H. B. Greenberg. 1995. To make monoclonal Antibodies to Baculovirus expressed Rheueus rotavirus VP₄ unpublished data.