

당첨가가 한탄바이러스백신의 안정성에 미치는 영향

고려대학교 의과대학 미생물학교실, 고려대학교부설 바이러스병연구소

성 인 화

=Abstract=

Effect of Addition of Sugar on the Stability of Hantaan Virus Vaccine

Inwha Seong

Department of Microbiology, Medical College, the Institute for Viral Diseases,
Korea University, Seoul, Korea

Hantaan virus vaccine was developed in 1988 and proved effective. This vaccine is a kind of inactivated vaccine, stable for two years when stored at 2-8°C. Almost virus vaccines including Hantaan virus vaccine are produced and kept in fluid state, and the immunogenicity can be easily destroyed at room temperature or at higher temperature. Therefore the vaccines should be kept in the refrigerator to maintain the immunogenicity. In this study, glucose and/or lactose was added as a stabilizer into Hantaan virus vaccine to increase the stability and dried in vacuum with ethanol treatment. 5% glucose and or lactose in Hantaan virus vaccine most effectively increased the stability of vaccine and maintained the immunogenicity at least for three months at room temperature. But drying with ethanol treatment did not help increasing the stability. These results suggest that glucose and lactose could be good stabilizer of virus vaccines.

Key Word : Hantaan virus vaccine, Glucose, Lactose, Stability.

서 론

Edward Jenner에 의하여 천연두의 예방법이 개발된 이후 [1], 세계보건기구는 여러 가지 감염질환에 대한 백신을 개발, 보급하였고 특히 천연두 박멸 운동을 통하여 천연두 발생은 계속 감소하여 천연두는 1977년의 발생을 끝으로 지구상에서 사라졌다고 선언하였다 [2].

제너 이후 많은 사람들의 연구결과 여러 종류의 바이러스 및 세균에 대한 백신들이 개발되었으나 바이러스질환을 예방하기 위한 백신의 대량생산이 가능해진 것은 1949년 Enders등이 신경세포에서만 자라나는 소아마비 바이러스를 배양된 비신경세포내에서 증식시키는 방법을 고안해 낸 후 부터이다 [3]. 이 방법을 통하여 개발된 소

아마비 백신은 매우 높은 예방효과를 나타내었고 이러한 백신제조방법은 여러종류의 바이러스 백신 제조에 적용되어 많은 바이러스백신들이 제조되고 사용되어 왔다 [4-8]. 최근에는 유전자 재조합기술을 이용한 백신들이 제조되고 있다 [9-14].

신증후출혈열은 1951년 한국에서 처음 환자발생이 보고된 후 백신이 개발되지 않은 상태에서 매년 1,000 명이상의 환자가 발생하였으며 1988년 한탄바이러스 백신이 개발되었고 [15] 이 백신의 임상적 효과, 항체지속성 및 면역성에 대한 연구를 통해 이 백신이 신증후출혈열 예방에 효과적임이 보고되었다 [16].

그러나 현재까지 개발되어 사용되고 있는 백신들은 냉장보관을 하지 않으면 대개 항원성이 쉽게 저하되기 때문에 냉장시설이 없는 지역이

나 기온이 높은 미개발국에서는 감염성 질환발 생률이 아직까지 높은 편이다. 백신의 항원성을 장기간 유지하기 위해 동결건조법을 사용하기도 하였으나 모든백신이 쉽게 효과적으로 동결건조 되는 것은 아니고 동결건조로 말미암아 백신의 효능을 잃게 되는 경우도 있기 때문에 안정성이 높은 백신을 개발하는 일은 매우 중요한 일로 생각된다.

저자는 이미 Sucrose-Acetone처리법이 한탄바이러스 백신 및 간염 B바이러스 백신의 안정성에 미치는 영향에 대해 보고 한바 있다 [17-18]. 본 연구는 포도당과 유당의 첨가가 한탄바이러스 백신의 안정성에 미치는 영향을 규명하고자 시행되었다.

재료 및 방법

1. 한탄바이러스 백신

주식회사 녹십자에서 제조한 한타박스 (제조번호 4001)를 사용하였는데 0.5 ml에는 불활성화한 한탄바이러스 부유액 0.25ml이 들어 있었고 수산화알루미늄겔 0.25ml과 안정제로 젤라틴(0.02 w/v%)등이 들어있었다.

2. 포도당 및 유당용액 첨가

백신 0.25ml에 10% 및 20% 포도당, 유당 및 포도당과 유당은 동량씩 혼합한 것 0.25ml을 각각 첨가하여 최종 당농도를 5%와 10%가 되게 하였다.

3. 백신의 분말화

당을 첨가한 백신 1 volume을 10 volumes의 에탄올에 한방울씩 떨어뜨리며 진탕하고 원심침전하여 상층액을 제거한 후 다시 10 volumes의 에탄올을 가하여 4℃에 1시간 방치한후 원심분리

하고 상층액을 제거한 다음 vacuum jar에 넣어 남은 에탄올을 제거하여 분말화 하였다.

4. 당을 첨가한 백신과 분말화한 백신의 실온방치

당을 첨가한 백신과 당을 첨가하고 분말화한 백신과 당을 첨가하지 않은 백신이 들어있는 vials을 밀봉하여 실온에 1개월, 2개월, 3개월간 각각 방치하였고 정상대조용 백신은 4℃에 3개월간 보관하였다 (Table 1).

5. 백신접종

실온에 방치하였던 분말화백신은 0.5ml의 증류수에 용해하였고 당을 첨가한 백신과 함께 각각 2-3 마리의 5주령 된 ICR mouse의 대퇴부 근육에 0.05ml씩 접종하였다.

6. 혈액채취

접종 2주후에 심장을 천자하여 전혈을 채취하고 혈청을 분리하여 항체검사시까지 -70℃에 냉동보관하였다.

7. 항체검사

한탄바이러스에 대한 항체검사는 통상적인 간접형광항체법을 사용하여 실시하였다.

결 과

항체검사 결과는 다음의 같았다 (Table 2)

1. 4℃에 3개월간 보관하였던 정상 대조 백신을 접종한 쥐들은 두 마리 모두 1: 128의 항체가를 나타내었다.

2. 당을 첨가하지 않고 실온에 방치하였던 백신은, 1개월 방치한 백신을 접종한 흰쥐 두 마리 중 하나는 1: 128의 항체가를 나타내었으나 다른

Table 1. Treatment and storage of Hantaan virus vaccines

| Final concentration of Sugar | Ethanol treatment and drying | Storage | |
|--|------------------------------|-------------|----------------|
| | | temperature | duration |
| 5% glucose 10% glucose | + / - + / - | Room temp. | 1, 2, 3 months |
| 5% lactose 10% lactose | + / - + / - | Room temp. | 1, 2, 3 months |
| 5% glucose + 5% lactose 10% glucose + 10% lactose | + / - + / - | Room temp. | 1, 2, 3 months |
| No sugar | - | Room temp. | 1, 2, 3 months |
| Normal control | - | 4℃ | 3 months |

Table 2. Titers of antibody against Hantaan virus in sera from ICR mice inoculated with sugar-added Hantaan virus vaccines

| Concentration of sugar | Ethanol treatment and drying | Duration of storage at room temperature | Antibody titers against Hantaan virus | | | | | |
|------------------------|------------------------------|---|---------------------------------------|--------------------|--------------|--------------|-------------------|--|
| | | | Glucose | | Lactose | | Glucose + lactose | |
| 5% | + | 1 month | 16, 128, 128 | <2, <2, 2 | <2, <2, <2 | <2, <2, <2 | 4, 8 | |
| | | 2 months | <2, <2, 2 | <2, <2, <2 | <2, <2, <2 | <2, <2, <2 | | |
| | | 3 months | <2, <2, <2 | <2, <2, <2 | <2, <2, <2 | <2, <2, 4 | | |
| 10% | + | 1 month | <2, 8, 32 | <2, 4, 32 | 8, 64, 128 | 8, 64, 128 | | |
| | | 2 months | <2, <2, 2 | <2, <2, 2 | <2, 8, 128 | <2, 8, 128 | | |
| | | 3 months | <2, <2, 2 | <2, <2, 16 | <2, 2, 8 | <2, 2, 8 | | |
| 5 | - | 1 month | <2, 64, 256 | <2, 64, 128 | 12, 256, 256 | 12, 256, 256 | | |
| | | 2 months | 16, 64, 128 | <2, 128, 128 | <2, 16, 256 | <2, 16, 256 | | |
| | | 3 months | 16, 128, 128 | <2, 128, 128 | 4, 256, 256 | 4, 256, 256 | | |
| 10% | - | 1 month | 8, 32 | <2, 2 | <2, 128 | <2, 128 | | |
| | | 2 months | <2, <2 | 128, 128 | <2, 8 | <2, 8 | | |
| | | 3 months | <2, 128 | <2, 128 | <2 | <2 | | |
| No sugar | - | 1 month | | <2, 128 | | | | |
| | | 2 months | | <2, <2 | | | | |
| | | 3 months | | <2, <2 | | | | |
| Normal control | - | 3 months 4°C | | <2, <21 28, 128 | | | | |

한 마리는 1: 2이하였고 2 개월부터는 1: 2이하로 백신의 면역완성이 소실되었음을 알 수 있었다.

3. 당을 첨가하고 분말화한 백신군에서 5%당을 첨가한 것 중 포도당을 첨가한 백신의 항원성이 1개월간 거의 잘 보존되었으나 2개월만에 항원성이 거의 소실되었고, 포도당과 유당을 같이 첨가한 것은 유당만을 첨가한 것 보다는 약간 나으나 1달만에 항원성이 많이 소실되었다. 10%당을 첨가한 것들중 포도당을 첨가한 것과 유당을 넣은 것은 1개월만에 항원성이 반이상 파괴되었으나 포도당과 유당을 같이 첨가한 쪽은 2개월 방치시에도 상당부분 항원성이 유지되었으며 3개월 방치시는 항원성이 거의 소실되었다.

4. 당을 첨가하고 분말화하지 않은 백신군에서 5%당을 포함한 경우 5% 쪽은 포도당, 유당, 혼합한 것 모두 실온방치 3개월에도 항원성이 거의 잘 보존되어 있음을 알 수 있었고 5% 당을 첨가한 쪽이 10% 당을 첨가한 것 보다 백신의 안정성 유지에 더 나은 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

고 안

제너이후 많은 감염성 질환을 예방하기 위하여 여러 가지 백신들이 개발되고 생산되었지만

특히 바이러스질환을 예방하기 위한 백신이 대량 생산될 수 있게 된 것은 1949년 Enders를 비롯한 연구자들이 신경세포에서만 자라는 소아마비 바이러스를 신경세포가 아닌 세포주에서 증식시키는 방법을 고안해 낸 이후이다. 이 방법을 통하여 개발된 소아마비 백신 특히 Sabin과 Salk에 의해 개발된 소아마비 백신들은 매우 효과적으로 소아마비를 예방할 수 있었고 여러 종류의 바이러스 백신 개발에 적용되었다. 최근에는 유전자 재조합기술을 이용하여 안전한 백신을 다량으로 효모나 대장균으로 부터 생산해내고 있다 [9-14]. 현재 국내에서도 각종의 백신이 생산되고 있고 어떤 백신은 국내수요를 충족시킬뿐더러 외국에 수출까지 하고 있는 상태에 와 있다. 한탄바이러스 백신은 1988년 개발되어 현재 널리 사용되고 있다 [15].

국내에서 생산되는 백신이나 생산이 안되어 외국에서 수입하여 사용되는 거의 모든 백신들이 냉장보관을 하지 않으면 항원성이 쉽게 저하되는 문제점을 가지고 있어 냉장시설이 없는 지역이나 국가에서는 백신접종에 큰 장애요인이 되고 있다. 그러나 이 문제를 해결하기 위한 연구는 극히 드물어서 국외에서도 백신의 안정성 증대를 위한 연구논문은 매우 적은 편이다. 이에

대한 연구를 위해 저자는 한탄바이러스 백신과 간염B바이러스 백신의 안정성을 높이기 위한 시도를 Sucrose-Acetone 처리법을 적용하여 보았으나 어느 정도의 안정성만 보장해 줄 뿐이어서 본 연구에서는 Sucrose대신 포도당과 유당을 사용하였고, acetone처리로 분말화 하는 대신 에탄올 처리로 대체하여 실험을 하였는데 그 이유는 Sucrose-acetone처리하여 분말화 한후 증류수를 넣어 녹일 때 상당한 시간이 소요되며 sucrose가 소화기관이 아닌 다른 부위에 들어가서 제대로 분해될지가 염려스러웠기 때문이었다. 따라서 그보다 간단한 당인 유당과 체내에서 직접 사용될 수 있는 포도당을 안정제로 사용하여 분말화 한 것과 하지 않은 것을 비교하였다.

정상대조 백신을 1회 접종하여 얻은 항체가는 1:128이었고 당을 첨가하지 않고 실온에 방치하였던 백신들은 2 개월에 항원성이 소실되었다. 당을 첨가하여 분말화 한 경우 5% 포도당을 첨가한 백신은 실온에서 1 개월간 항원성을 거의 완벽하게 유지하였으나 10% 농도에서는 더 쉽게 항원성이 저하되었다. 유당은 5%나 10% 모두 안정성 증대에 효과가 없었고 동량 혼합하여 첨가하여 분말화한 백신의 경우 10% 농도에서 상당한 안정성증대 효과를 나타내었다.

분말화 하지 않고 당만 첨가한 백신들은 분말화한 백신보다 높은 안정성을 보였으며 특히 5% 농도로 당을 첨가한 경우 포도당이나 유당 또는 포도당과 유당을 혼합한 것 모두 실온에서 3개월간 항원성이 잘 보존되었음을 알 수 있었다. 10% 농도에서는 유당의 효과가 조금 나은 것 같았다. 따라서 전의 Sucrose-acetone처리법 [17-18] 보다는 포도당과 유당을 사용하는 것이 여러 가지 면에서 나을 것이며 에탄올 처리로 분말화 하는 것 보다 단지 당만을 첨가해 주는 것이 효과적인 방법으로 판단된다. Sood등 [19]은 여러 종류의 당과 아미노산을 첨가한 황열백신의 안정성에 대한 연구를 하였는데 한탄바이러스 백신에도 당이외에 아미노산 첨가에 대한 연구를 앞으로 진행하고자 한다.

결 론

백신의 안정성을 높여 실온에서도 장기간 보관이 가능한 백신을 개발하기 위한 연구의 일환으로 한탄바이러스 백신에 포도당과 유당을 각

각 또 포도당과 유당을 섞은 것을 최종 농도가 5% 및 10%가 되게 첨가한 후 에탄올 처리하여 분말화 한 것과 에탄올처리 하지 않은 백신들을 각각 실온에 1 개월, 2 개월, 3 개월 방치한 후 ICR mice에 접종하여 항체가를 조사 비교한 결과 5% 포도당, 5% 유당, 5% 포도당·유당 혼합물이 모두 효과적으로 한탄바이러스 백신의 면역원성을 적어도 3개월간 보호 유지 시킬 수 있음을 알 수 있었고 에탄올 처리로 분말화하는 방법은 백신의 안정성을 유지시키는데 도움이 되지 못하였다. 따라서 포도당과 유당이 한탄바이러스 백신의 안정성을 유지 및 증가시키는 안정제가 될 수 있으며 다른 바이러스 백신의 제조에도 적용될 수 있을 것으로 생각되며 앞으로 더 효과적인 안정제를 찾아낼 수 있는 연구가 필요하다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Jenner E: An inquiry into the causes and effect of the variable vaccine, a disease discovered in some of the western counties of England, particulaly Gloucestershire, and known by the name of complex. Reprinted in: Camac, ed. classics of medicine and surgery. New York: Dover 213-240, 1959.
2. Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladny ID: Smallpox and its eradication, Geneva: World Health Organization, 1988.
3. Enders JF, Weller TH, Robbin FC: Cultivation of Lansing strain of poliomyelitis virus in culture of various human embryonic tissues. Science 109: 85, 1945.
4. Salk JE: A concept of the mechanism of immunity for preventing poliomyelitis. Ann NY Acad Sci 61: 1023, 1955.
5. Salk JE: Basic principles underlying immunization against poliomyelitis with a non-infectious vaccine. In "Poliomyelitis: Papers and discussions presented at the Fourth International Poliomyelitis Conference" p66, Lippincott, Philadelphia, pennsylvania, 1958.
6. Sabin AB: Oral Poliovirus vaccine: Recent results and recommendations for optimum use. R Soc Health J 2:51, 1962.

7. Sabin AB: Properties of attenuated polioviruses and their behavior in human beings In "Cellular Biology, Nucleic Acids and Viruses" (T.M. Rivers ed) Spec Publ., Vol 5, p113 NY Acad.Sci. New York Poliomyelitis: accomplishments of live virus vaccine. In "First International conference on vaccines against viral and Rickettsial diseases of man" Amer. Health Org. Washington DC, 1967.
8. Tortora GJ, Funke BR, Case CL: Microbial Diseases of the Nervous System. Microbiology An Introduction (4th ed) p539-559, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, 1992.
9. Emini EA, Ellis RW, Miller WJ, McAleer WJ, Scolnick EM, Gerety RJ: Production and immunological analysis of recombinant hepatitis B virus vaccine. J Infect 13 (suppl A):3-9, 1986.
10. Hauser P, Thomas HC, Waters J, et al: Induction of neutralizing antibodies in chimpanzees and humans by a recombinant yeast-derived hepatitis surface antigen particle: Zuckerman AJ, Viral hepatitis and liver disease. New York: Alan R Liss, 1031-1037, 1988.
11. McAleer WJ, Bunyak EB, Maigetler RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR: Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. Nature 307:178-180, 1984.
12. Peetermans JH: Specifications and quality control of a yeast-derived hepatitis B vaccine. Postgrad Med J 63(suppl 2): 97-100, 1987.
13. 박병훈, 이상옥, 소재목, 정현도, 민병길: Heat-inactivated and aggregated HBs Ag as a New Type of vaccine against Hepatitis B. 대한바이러스학회지 16:69-76, 1986.
14. 박만훈, 김성진, 구만복, 정경환, 송희복, 박경남, 김경호: 효모유래 B형 간염 백신에 관한 연구. 대한바이러스학회지 18:11-19, 1988.
15. 이호왕, 안창남: Development of vaccine against Hemorrhagic fever with renal syndrome. 대한바이러스학회지 18:143-148, 1988.
16. Lee HW, An CN, Song JW, Baek LJ, Seo TJ, Park SC: Field trial on inactivated vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome in humans. Arch Viral [Suppl.1]: 35-47, 1990.
17. 성인화: Sucrose-Acetone 처리한 한탄바이러스 백신의 안정성. 대한바이러스학회지 24:167-170, 1994.
18. 성인화: 서당을 첨가한 간염 B 바이러스 백신의 안정성. 대한바이러스학회지 25:147-153, 1995.
19. Sood DK, Aggarwal RK, Sharma SB, Sokhey J, Singh H: Study on the stability of 170-204 yellow fever vaccine before and after stabilization. Vaccine 11:1124-1128, 1993.