

신증후출혈열의 혼합백신을 접종한 햄스터에서의 면역성 조사

아산생명과학연구소 바이러스 연구과, ¹주) 녹십자 종합연구소

이호왕 · 주용규 · 최용수 · 우영대 · 안창남¹ · 김 훈¹ · 장양석¹

=Abstract=

Immune Reaction of the Vaccinated Hamsters with Combined Hantaan-Puumala Vaccine

Ho-Wang Lee, Yong-Kyu Chu, Long-Zhu Cui, Young-Dae Woo, Chang-Nam Ahn¹,
Hoon Kim¹ and Yang-Seok Jang¹

Asan Institute for Life Sciences, Seoul 138-040 Korea, ¹Central research institute, Korea
Green Cross Co., Yongin 449-900, Korea

A large number of viruses belonging to Genus Hantavirus in Family Bunyaviridae are etiologic agents for hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), or hantavirus pulmonary syndrome (HPS). Hantaan (HTN), Seoul (SEO), Belgrade (BEL), Puumala (PUU) serotype viruses are well known causative agents for HFRS in Eurasian continent. Among those viruses Hantaan and Seoul serotypes are well known to cause HFRS in Korea, but there are some sporadic incidence by other than Hantaan or Seoul viruses. Recently we have developed the combined Hantaan-Puumala virus vaccine to prevent world-wide occurring HFRS. This combined vaccine is formalin inactivated, suckling mouse and suckling hamster brain extracts for Hantaan and Puumala viruses, respectively. Protein contents of this purified candidate vaccine is 27 µg/ml, which contains 1,024 ELISA antigen units to each virus, but content of myelin basic protein which is causing experimental allergic encephalomyelitis is less than 0.1 ng/ml. Thirty hamsters were given twice at one month interval intra-muscularly and bled on 30 days after each vaccination from retro-orbital sinus vein. Antibody titers were tested against 5 major serotype viruses, Hantaan, Seoul, Belgrade, Puumala and Sin Nombre viruses by IFA and PRNT. The mean IF antibody titers on 30 days after primary shot were 78.4, 68.8, 68.8, 37.9, and 15.6; mean neutralizing antibody titers were 65.4, 12, 6.1, 65.6 and 0.5 against Hantaan, Seoul, Belgrade, Puumala and Sin Nombre viruses, respectively. The mean IF antibody titers on 30 days after booster shot were 686.9, 567.5, 550.4, 516.3, and 430.9; and neutralizing antibody titers were 710.8, 41.9, 24.3, 409.9, and 1.6 against Hantaan, Seoul, Belgrade, Puumala and Sin Nombre viruses, respectively.

Key Words: Hantavirus, Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), Combined Hantaan-Puumala vaccine

서 론

신증후출혈열은 분야비리대과의 한타바이러스속에 속하는 바이러스들에 의하여 발생하는 급성전염성 질환으로 전세계적으로 발병하고 있다. 신증후출혈열은 80여년전부터 러시아의 극동지역과 중국 만주지역에 주둔하였던 군인들 사이에서 많은 환자가 발병되어 주목을 받기 시작하였으며, 우리나라의 경우 한국전쟁시 중부전선에 주둔하였던 유엔군에서 수천명의 환자가 발생하여 전세계적인 관심을 끌게 되었다 [1]. 이 질병은 유라시아대륙에 걸쳐 광범위하게 존재하며, 러시아에서는 유행성신우장염, 중국과 일본에서는 유행성출혈열, 한국에서는 한국형출혈열 또는 유행성출혈열, 유럽에서는 유행성신염이라는 이름으로 지역마다 각기 달리 불리워왔으나 1982년 세계보건기구는 세계여러지역에서 발생하는 한국형출혈열과 유사한 상기 질병들이 한타바이러스 및 이와 유사한 바이러스에 의하여 발생된다는 사실을 입증하여 신증후출혈열이라는 이름으로 통일하였다 [2].

1976년 세계최초로 신증후출혈열의 병원체인 한타바이러스가 이 등에 의하여 한탄강유역에서 채집한 등줄쥐의 폐장에서 분리되었고, 신증후출혈열의 최초유행지역 주변을 흐르는 한탄강의 이름을 따서 한타바이러스로 명명하였다 [3]. 한타바이러스가 분리된 이후 한타바이러스 및 이와 유사한 바이러스에 의하여 발생하는 신증후출혈열의 역학조사가 가능하게 되었고, 이와 더불어 이 질병을 예방할 수 있는 예방백신의 개발이 가능하게 되었다 [4]. 현재까지 신증후출혈열의 병원체로 알려진 바이러스들은 크게 3개의 genetic lineage로 나누고 있다 [5, 6]. 제 1그룹에는 동아시아지역의 등줄쥐 (*Apodemus agrarius*) [3] 및 환자혈액에서 분리된 한탄혈청형 바이러스와 전세계적으로 분포하는 집쥐 (*Rattus norvegicus*, *R. rattus*)에서 분리된 서울혈청형 바이러스 [7], 그리고 중부유럽의 유고슬라비아의 들쥐 (*Apodemus flavicolis*)에서 분리된 벨그레이드 혈청형 바이러스 [8]들이 이에 속한다. 제 2그룹에는 유럽의 들쥐 (*Clethrionomys glareolus*)에서 분리된 푸말라혈청형 바이러스 [9]와 미국의 들쥐 (*Microtus pennsylvanicus*)에서 분리된 프로스펙트 힐혈청형 바이러스 [10]들이 이에 속한다. 또한

최근 미국에서 발생한 새로운 질병인 한타바이러스 폐 증후군의 병원체인 신놈브레바이러스 [11]가 또 다른 종류의 들쥐 (*Peromyscus maniculatus*)에서 분리된 바 있다. 신놈브레혈청형 바이러스의 유전자 분석결과 제 2그룹에 속하는 것으로 밝혀졌다. 제 3그룹에는 인도의 따쥐 (*Suncus murinus*)에서 분리된 쏘타팔리암 바이러스 [12]로 사람에게 대한 병원성은 아직 보고된 바 없다. 각각의 혈청형 바이러스들에 대한 중화항체는 특이하며, 다른 혈청형에 속하는 바이러스에 대한 교차중화항체역가는 거의 없거나, 같은 genetic lineage에 속하는 혈청형 바이러스들 사이 일지라도 낮은 중화항체역가를 나타낸다 [6].

전세계적으로 매년 20만명 이상의 신증후출혈열환자가 발생하는 것으로 알려져 있으며 [13], 우리나라의 경우 매년 약 1,000명 가량의 신증후출혈열환자 발생이 보고되고 있고, 주로 제 1그룹의 genetic lineage에 속하는 한탄혈청형 바이러스와 서울혈청형 바이러스에 의한 것으로 알려져 있다 [14]. 현재 국내에서 사용되고 있는 신증후출혈열의 예방백신은, 한국형출혈열 환자의 혈액에서 분리한 한타바이러스 84/105균주를 생후 48시간 이내의 젓빨이 마우스의 뇌내에 접종하고, 바이러스가 다량으로 증식하여 접종된 마우스에서 뇌염증세가 나타나기 시작할 때 바이러스가 증식된 마우스의 뇌를 채취하여, 일본뇌염 백신제조방법을 개량하여 제조된 한타바이러스 정제 불활화 백신이다 [4]. 그러나 이 백신은 한탄혈청형 바이러스에서 유래된 것으로 타혈청형 바이러스인 서울혈청형 바이러스와 다른 genetic lineage에 속하는 푸말라혈청형 바이러스에 대한 교차 방어여부에 관한 보고는 없다. 그러나 최근 우리나라에서도 유럽의 경증의 신증후출혈열과 유사한 임상증상을 보이며, 혈청학적으로 제 2그룹의 genetic lineage에 속하는 푸말라혈청형 바이러스에 높은 항체를 가지는 환자가 산발적으로 존재하며, 우리나라에서 채집한 들쥐 중에서도 산발적으로 제 2그룹의 genetic lineage에 속하는 바이러스에 감염된 것으로 의심되는 검체가 존재한다는 보고가 있다 [15]. 따라서 전세계적으로 다양한 종류의 한타바이러스에 의하여 발생하는 신증후출혈열을 예방하기 위하여는 적어도 두가지 genetic lineage에 속하는 각각의 대표적인 혈청형바이러스가 혼합된 혼합백신이어야 할 것이다.

본 연구에서는 젓빨이 마우스의 뇌내 배양한 한탄혈청형 바이러스 호왕균주와 젓빨이 햄스터의 뇌내 배양한 푸말라혈청형 바이러스 K27 균주를 각각 정제 불활화하여 혼합하여 제조된 혼합백신을 실험동물 햄스터에 접종한 후 생성되는 면역항체를 5종류의 혈청형바이러스인 한탄바이러스, 서울바이러스, 벨그레이드바이러스, 푸말라바이러스 그리고 신넴브레바이러스들에 대한 항체반응을 형광항체법 및 플라크 감소 중화시험법으로 조사하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스

중증의 임상경과를 나타내어 사망한 한국형출혈열 환자의 혈액을 Vero E6조직배양세포 (Vero C 1008, ATCC CRL 1586)에 접종하여 분리배양한 한탄바이러스 호왕균주 [16]를 생후 1일된 SPF ICR 젓빨이 마우스에 7대 계대배양하였다. 바이러스 접종 후 10일 이내에 마비증상을 나타내는 병독성이 강한 바이러스를 7대 계대배양한 마우스의 뇌조직으로 부터 얻어, 이 바이러스를 종균으로 하여 다량의 한탄혈청형 바이러스를 젓빨이 ICR마우스뇌내에서 다량 증식시켰다.

러시아의 신증후출혈열 환자의 혈액을 Vero E6조직배양세포에 접종하여 분리배양한 푸말라바이러스 K27균주 [17]를 생후 1일된 SPF 시리안 젓빨이 햄스터에 10대 계대배양하였다. 바이러스 접종 후 10일 이내에 마비증상을 나타내는 병독성이 강한 바이러스를 10대 계대배양한 햄스터의 뇌조직으로 부터 얻었으며, 이 바이러스를 종균으로 하여 다량의 푸말라혈청형 바이러스를 증식시켰다.

백신을 접종한 햄스터에서의 항체반응을 조사하기 위하여 Vero E6조직배양세포에 배양한 한탄바이러스 호왕균주 [16], 서울바이러스 80/39균주 [7], 벨그레이드바이러스 1균주 [8], 푸말라바이러스 K27균주 [17] 그리고 신넴브레바이러스 뉴욕균주 [18]를 사용하였다.

2. 백신의 정제와 불활화

한탄바이러스 호왕균주와 푸말라바이러스 K27균주가 다량으로 증식된 젓빨이 동물의 뇌조직을 인산완충용액으로 10% 부유액을 만든 후 초음파분쇄기를 사용하여 섭씨 4도에서 15초간

3번의 sonication한 다음 냉장원침기에서 6,000g로 30분간 원침을 시켰다. 원침후 얻은 상층액을 프로타민 설페이트 및 알콜로 처리하여 이중단백질을 제거한 다음 초원심침전과정과 특수여과기를 사용한 정제작업을 실시한 후 섭씨 4도에서 0.1% 포르말린으로 약 30일간 처리하여 불활화시켰다. 불활화시킨 백신은 500 µg/ml의 Aluminum hydroxide 면역보조제와 혼합하였다.

3. 백신중의 단백질 조사

백신중의 총 단백질 함량을 Bicinchoninic (BCA) 방법 [19]으로 조사하였으며, spectrophotometer를 사용하여 562 nm의 파장에서 검출하였다. 백신중의 myelin basic protein은 double-antibody sandwich ELISA방법 [20]을 사용하여 측정하였다. Rat α -myelin basic protein monoclonal antibody를 8 µg/ml로 희석하여 96 well microplate에 100 µl씩 분주하여 흡착시켰다. 그후 Tween 20-PBS 완충용액으로 3회 세척한 후 10배 농축시킨 백신원액을 100 µl씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 동일한 방법으로 세척한 후 2차 항체로 1,000배 희석한 rabbit α -myelin basic protein serum을 100 µl씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 동일한 방법으로 세척하고, goat α -Rabbit HRP conjugate를 100 µl씩 분주하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 Tween 20-PBS 완충용액으로 5회 세척하였다. ABTS 기질용액을 100 µl씩 분주하여 실온에서 30분간 반응시킨 다음 1 N H₂SO₄ 가하여 효소반응을 정지시킨 후 405 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다.

4. Immunoblot

정제된 백신원액을 SDS가 함유된 12% Polyacrylamide gel에서 전기영동 [21]을 시킨 다음 젤상의 분획된 단백질 밴드들을 Towbin 등 [22]의 방법을 이용하여 nitrocellulose membrane (0.2 µm, Bio-Rad, Richmond, CA)으로 전사시켰다. 전사된 필터를 5% skim milk가 함유된 인산완충용액 희석액으로 실온에서 한시간 동안 blocking시킨 후, 신증후출혈열 회복기 환자혈청이 들어있는 희석액으로 섭씨 37도에서 한시간동안 반응시킨 후 0.1% Tween 20이 함유된 인산완충용액 세척액으로 세척하였다. 1:500으로 희석된 HRP conjugated anti Human IgG 혈청으로 섭씨 37도에서 한시간동안 반응시킨 후 0.1% Tween 20이 함

유된 인산완충용액 세척액으로 세척하였다. 세척 후 DAB 발색제로 실온에서 30분간 반응시킨 후 증류수로 세척하여 반응을 중지시키고 공기중에 건조시켰다.

5. 백신중의 항원함량 측정

제조된 백신중의 한탄바이러스와 푸말라바이러스의 항원함량을 IgM capture ELISA방법 [23]을 사용하여 측정하였다. 일정량 인산완충용액에 희석한 Goat α -Human IgM을 96 well microplate에 well당 100 μ l씩 분주하여 흡착시킨 후 초기 신증후출혈열 환자의 혈청을 5% skim milk가 함유된 Tween 20-PBS 완충용액의 희석액으로 8 unit되게 희석하여 well당 100 μ l씩 분주한 다음 37°C에서 1시간 반응시켰다. Tween 20-PBS 완충용액으로 3번 세척한 후 제조된 백신후보물질을 상기의 희석액으로 두배 계단희석하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 동일한 방법으로 세척한 후 상기 희석액에 8 unit로 희석한 Rabbit α -Hantaan 또는 Rabbit α -Puumala serum을 100 μ l씩 분주한 다음 37°C에서 1시간 반응시켰다. 동일한 방법으로 세척하고 상기 희석액에 1 μ g/ml되게 희석한 goat α -Rabbit HRP conjugate를 100 μ l씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 Tween 20-PBS 완충용액으로 5회 세척하고, ABTS 기질용액을 100 μ l씩 분주하여 실온에서 30분간 반응시킨 다음 1 N H₂SO₄ 가하고 405 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다.

6. 혼합백신 면역 및 면역항체가 측정

6-8주령의 SPF 시리안 햄스터의 근육내로 2차에 걸쳐 백신을 접종하였다. 일차 접종한 한달 후 햄스터의 안와정맥총으로부터 1 ml의 혈액을 채취하고, 이차 부스터 접종을 하였다. 이차 접

종 한달 후 동일한 방법으로 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 다음 실험에 사용할 때 까지 영하 80도 냉동고에 보관하였다. 형광항체법 [23] 및 플라크 감소 중화항체법 [23]으로 생성된 항체역가를 검사하였다.

결과 및 성적

1. 정제된 백신의 불활화 검증

한탄바이러스 호왕균주를 배양한 젓빨이 마우스와 푸말라바이러스 K27균주를 배양한 젓빨이 햄스터의 뇌조직에서 다량 배양된 바이러스를 인산완충용액에 20%되게 부유액을 만들어 프로타민 설페이트와 에탄올 등으로 처리한 다음 초고속원심 및 특수여과를 한 후 포르말린으로 불활화처리하여 제조된 백신후보물질의 불활화 여부를 확인하기 위하여 각각의 정제불활화 시킨 백신후보물질을 Vero E6 조직배양세포에 접종 14일 간격으로 3대 계대배양하였다. 한탄백신의 불활화를 확인하기 위하여 생후 1일 된 젓빨이 ICR마우스를 사용하였으며, 푸말라백신의 불활화를 확인하기 위하여 생후 1일된 젓빨이 시리안 햄스터를 사용하였다. 뇌내로 각각의 백신원액을 접종하여 14일 간격으로 3대 계대배양하였다. 조직배양세포와 실험동물에서의 바이러스 증식 여부를 형광항체법으로 조사하였으며, 접종된 실험동물의 바이러스 증식에 의한 마비형상을 검정하여 불활화 여부를 판정하였다. 조직배양세포와 접종된 실험동물의 뇌조직과 폐장조직중의 바이러스 항원존재여부를 확인한 결과 표1과 2에서와 같이 바이러스의 증식을 확인할 수 없었다.

2. 백신중의 단백질량 조사

백신중의 총단백 함량을 Bicinochonic (BCA)

Table 1. Determination of inactivation of the formalin inactivated vaccine in Vero E6 cells

Inoculum	Days after infection	Antigen
Formalin inactivated HTNV vaccine	D-14	-
Formalin inactivated HTNV vaccine E6-p1	D-14	-
Formalin inactivated HTNV vaccine E6-p2	D-14	-
Formalin inactivated PUUV vaccine	D-14	-
Formalin inactivated PUUV vaccine E6-p1	D-14	-
Formalin inactivated PUUV vaccine E6-p2	D-14	-

Table 2. Determination of inactivation of the formalin inactivated vaccine in suckling animals

Inoculum	Animal	Killed on days after inoculation	No. antigen positive/ No. total tested	
			Brain	Lung
HTNV vaccine	ICR mouse	d-14	0/4	0/4
HTNV vaccine mouse-p1	ICR mouse	d-14	0/4	0/4
HTNV vaccine mouse-p2	ICR mouse	d-14	0/4	0/4
PUUV vaccine	hamster	d-14	0/4	0/4
PUUV vaccine hamster-p1	hamster	d-14	0/4	0/4
PUUV vaccine hamster-p2	hamster	d-14	0/4	0/4

Table 3. Total protein, myelin basic protein and antigen content in formalin inactivated vaccine

vaccine	Total protein content	Myelin basic protein content	Antigen content
Hantaan vaccine	6.9 µg/ml	0.01ng/ml	1024 unit/ml
Puumala vaccine	16.7 µg/ml	0.01ng/ml	1024 unit/ml
Combine Hantaan-Puumala vaccine	13.8 µg/ml	0.01ng/ml	HTNV: 1024 unit/ml PUUV: 1024 unit/ml

방법을 사용하여 검출한 결과 한탄백신에서 6.9 µg/ml, 푸말라백신에서 16.7 µg/ml, 두 백신을 혼합한 혼합백신에서 13.8 µg/ml 이었다. 제조된 백신 후보물질중의 한탄바이러스와 푸말라바이러스의 함유함량을 IgM capture ELISA방법을 사용하여 측정 한 결과 표 3에서와 같이 1024 units/ml의 함유함량을 나타내었다.

젓빨이 동물을 이용하여 제조한 불활화백신 중의 Myelin basic protein은 실험동물인 기니피과 원숭이에서 알레르기성 뇌척수염을 유발하고, 인체에서 백신에 의한 부작용을 유발하는 물질로 알려져 있다. 백신후보 물질중의 myelin basic protein 함량을 ELISA방법으로 측정한 결과 표 3에서와 같이 모든 백신후보 물질중의 myelin basic protein 함량은 0.01 ng/ml이하로, 세계보건기구와 American Hospital Formulary Service Drug Information과 Physicians' Desk Reference에서 권장하는 불활화백신 제조시 myelin basic protein 함량 1 ng/ml 이하의 100분의 1에 훨씬 미달하는 더욱 정제된 백신을 개발하였다.

3. 백신중의 한타바이러스 구조단백질 검출

정제된 백신후보 물질중의 한타바이러스 구조단백질을 확인하기 위하여, 한타바이러스 백신 후보물질과 푸말라바이러스 백신후보물질을 각 정제단계별로 12% SDS-PAGE상에서 전기영동을 한 후 분리된 단백질을 Coomassie brilliant blue염

색액으로 염색하여 본 결과 한탄백신의 경우 41 KDa크기의 핵단백질 (nucleocapsid protein), 53 KDa크기의 G2 당단백질과 68 KDa크기의 G1 당단백질을 확인할 수 있었다 (그림 1). SDS-PAGE상에서 전기영동을 하여 분리된 단백질을 NC filter에 옮긴 다음 한국형출혈열 회복기 환자의 혈청으로 immunoblot test를 실시하여 본 결과 백신 후보물질중의 한타바이러스 구조단백질의 함량은 핵단백질, G2 당단백질, G1 당단백질의 순으로 검출할 수 있었다 (그림 1). 푸말라바이러스 백신의 경우 약 43 KDa크기의 핵단백질, 50 KDa크기의 G2 당단백질 그리고 68 KDa크기의 G1 당단백질을 확인할 수 있었다 (그림 2). 푸말라바이러스 백신을 SDS-PAGE상에서 전기영동을 하여 분리된 단백질을 NC filter에 옮긴 다음 유럽러시아의 신증후출혈열 회복기 환자의 혈청으로 immunoblot test를 실시하여 본 결과 백신 후보물질중의 한타바이러스 구조단백질의 함량은 G2 당단백질, 핵단백질, G1 당단백질의 순으로 검출할 수 있었다 (그림 2). 그러나 한국형출혈열 환자의 혈청을 사용하여 immunoblot test를 실시하였을 때에는 43 KDa크기의 핵단백질만을 볼 수 있었다. 역으로 한타바이러스 백신의 분리된 단백질을 유럽러시아의 신증후출혈열 회복기 환자의 혈청으로 immunoblot test를 실시하였을 때에도 43 KDa크기의 핵단백질만을 볼 수 있었다.

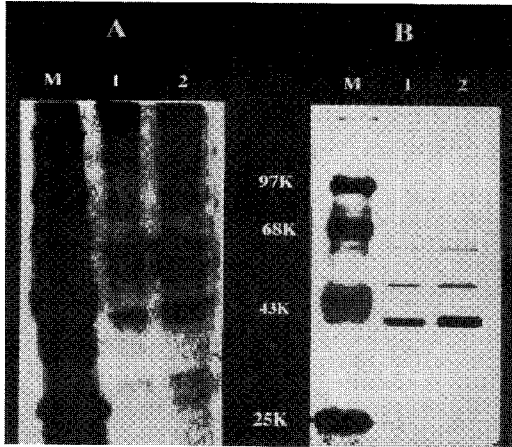


Fig. 1. SDS-PAGE (A) and immunoblotted (B) protein bands of HTNV HW infected suckling ICR mice brain. 1) concentrated after treatment with protamine sulfate twice and ethanol, 2) concentrated after protamine sulfate treatment of 20% brain pool. Transferred protein bands were reacted with Korean HFRS convalescent patient's serum.

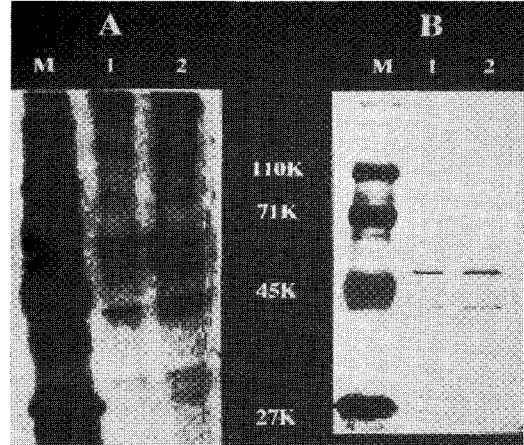


Fig. 2. SDS-PAGE (A) and immunoblotted (B) protein bands of PUUV K27 infected suckling Syrian hamsters' brain. 1) concentrated after treatment with protamine sulfate twice and ethanol, 2) concentrated after protamine sulfate treatment of 20% brain pool. Transferred protein bands were reacted with Nephropathia Epidemica patient's convalescent serum.

Table 4. Immune response of combined hantaan-puumala vaccine in hamsters against 5 serotype hantaviruses

Virus	Primary vaccination		Booster vaccination	
	Mean antibody titers by		Mean antibody titers by	
	IFA	PRNT	IFA	PRNT
Hantaan virus Howang	78.4	65.4	686.9	710.8
Seoul virus 80/39	68.8	12	567.5	41.9
Belgrade virus 1	68.8	6.1	550.4	24.3
Puumala virus K27	37.9	65.6	516.3	409.9
Sin Nombre virus New York	15.6	0.5	430.9	1.6

4. 혼합백신을 접종한 햄스터에서의 항체형성 조사

백신의 면역원성을 확인하기 위하여 혼합백신 0.5 ml을 한타바이러스 항체 음성인 정상햄스터 30수에 한달 간격으로 2차에 걸쳐 근육내로 접종하였다. 1차 접종 한달 후 백신을 접종한 햄스터의 안와정맥총으로부터 혈액을 채취한 후 2차 부스터 접종을 하였다. 2차 부스터 접종 후 한달이 경과하여 동일한 방법으로 채취한 혈청을 5가지 주요 병원성 바이러스들인 한타혈청형 바이러스, 서울혈청형 바이러스, 벨그레이드혈청형 바이러스, 푸말라혈청형 바이러스 및 신놈브레혈청형 바이러스에 대한 항체역가를 형광항체법 및 플라크 감소 중화실험법으로 조사하였다. 표4에서와 같이 1차 접종 한달 후 채취한 햄스터

혈액중의 한타바이러스 호왕균주, 서울바이러스 80/39 균주, 벨그레이드바이러스 1균주, 푸말라바이러스 K27균주 및 신놈브레바이러스 CC107균주에 대한 형광항체가는 각각 78.4, 68.8, 68.8, 37.9, 15.6 이었으며, 중화항체가는 각각 65.4, 12, 6.1, 65.6, 0.5이었다. 2차 부스터 접종한 후 한달 후의 형광항체가는 위의 5가지 바이러스에 대하여 각각 686.9, 567.5, 550.4, 516.3, 430.9이었으며, 중화항체가는 710.8, 41.9, 24.3, 409.9, 1.6의 항체역가를 나타내었다.

고 찰

신증후출혈열의 병원체인 한타바이러스는 현재까지 8가지의 혈청형이 알려져 있으며 [6, 24],

이들은 바이러스 유전자의 염기서열 변이에 따라 크게 3그룹으로 나눌 수 있다 [5, 25]. 지역에 따라 2가지 이상의 혈청형 바이러스가 공존하고 있으며, 우리나라의 경우 한탄바이러스와 서울바이러스가 주요 병원체로 잘 알려져 있다. 그러나 신증후출혈열로 의심되어 혈청검사가 의뢰된 환자혈청중 제2그룹에 속하는 푸말라바이러스와 신놈브레바이러스에 높은 항체를 가지는 환자가 산발적으로 발생하고 있다. 따라서 전세계적으로 발생하는 여러종류의 혈청형 바이러스들에 의한 신증후출혈열을 동시에 예방하기 위하여는 적어도 두가지 그룹에 속하는 각각의 혈청형 바이러스들이 혼합된 혼합백신을 사용하여야 할 필요가 있다.

현재 한탄바이러스에 의한 신증후출혈열을 예방하기 위하여 개발되어 시판중인 백신은 한국형출혈열 환자의 혈액에서 분리한 한탄바이러스 84-105균주를 생후 48시간 이내의 마우스 뇌내로 접종하여 증식시킨 후, 이 바이러스를 포르말린으로 불활화처리하고 제조된 백신이다. 그러나 한탄혈청형 바이러스에서 유래된 백신이 타 혈청형 바이러스인 서울바이러스 및 푸말라바이러스에 대한 교차방어 여부는 불분명하다. 또한 생성되는 중화항체의 한탄, 서울혈청형 바이러스 이외의 타 혈청형 바이러스에 대한 교차 항체를 조사한 보고도 없다. 유전자 재조합기술을 이용하여 제조된 한탄-Vaccinia 바이러스 유전자 재조합백신을 접종하여 면역된 햄스터에 살아있는 한탄혈청형 바이러스, 서울혈청형 바이러스 그리고 푸말라혈청형 바이러스로 challenge 실험을 실시한 결과 동일 그룹에 속하는 한탄 및 서울혈청형 바이러스에 대하여는 감염저지력을 나타내었으나 다른 그룹에 속하는 푸말라혈청형 바이러스에 대하여는 방어효과가 없어 혈액 및 조직중에서 바이러스 항원을 검출한 것을 볼 수 있었다 [26]. 따라서 타 혈청형 바이러스들에 대한 교차방어는 한가지 혈청형 바이러스로 제조된 백신보다 두가지 혈청형 바이러스를 혼합하여 만든 혼합백신에서 더 높은 감염저지력을 나타낼 것으로 생각된다.

본 연구에서 개발된 혼합백신을 한달 간격으로 2차에 걸쳐 접종한 햄스터의 혈청중의 면역항체를 조사한 결과 백신이 유래된 한탄혈청형 바이러스와 푸말라혈청형 바이러스들에 대하여 뿐만 아니라 타 혈청형 바이러스들인 서울혈

청형 바이러스와 벨그레이드혈청형 바이러스들에 대하여도 비교적 높은 역가의 교차항체를 가지는 것을 볼 수 있었다. 그러나 최근 미주대학의 한타바이러스 폐증후군의 병원체로 미국의 들쥐에서 분리된 새로운 혈청형 바이러스인 신놈브레혈청형 바이러스에 대하여는 극히 낮은 교차항체를 나타내었다. 따라서 백신의 유효성을 검정하기 위하여 백신을 접종한 실험동물에 살아있는 각각의 잘 알려져 있는 5종류 혈청형의 병원성 바이러스를 일정량 challenge 감염시켜, 백신에 의하여 형성된 항체가 살아있는 타 혈청형 바이러스들에 대한 감염저지 역지력을 조사할 필요가 있다.

현재 개발된 불활화 혼합백신은 기존에 개발된 일본뇌염백신이나 한타박스와 마찬가지로 제조된 백신으로, mouse brain에 한탄바이러스를 다량으로 증식시킨 후 정제 불활화시킨 한탄백신과 hamster brain에 푸말라바이러스를 다량으로 증식시킨 후 정제 불활화시킨 푸말라백신을 혼합한 백신이다. 푸말라바이러스의 경우 한탄바이러스와는 달리 마우스의 뇌내에서 증식을 하지 않고 햄스터의 뇌내에서 증식하는 동물숙주에 대한 특이성을 나타내었다. 또한 햄스터의 뇌내조직에서 순응시킨 푸말라바이러스를 SDS-PAGE상에서 분리된 핵산단백질 및 G2당단백질의 크기는 Vero E6조직배양세포에서 증식시킨 바이러스의 크기보다 적은 것을 볼 수 있었다. 이것은 바이러스의 병원성을 높이기 위하여 젓쌀이 햄스터의 뇌조직에서 여러번 계대배양하는 동안 바이러스의 변이가 축적된 결과일 것으로 추정된다.

불활화백신의 인체접종시 나타나는 문제점은 백신 유래세포중에 포함된 이종단백에 의한 부작용일 것이다. 그 중에서도 이종동물의 뇌조직에서 유래된 이들 백신중의 myelin basic protein은 중추신경계 myelin protein중 30%를 차지하는 단백질로서 [20] 실험동물 기니픽에 접종하였을 때 실험적 알레르기성 뇌척수염을 일으키는 물질로 잘 알려져 있다 [27]. 따라서 유사한 방법으로 제조되는 일본뇌염백신의 경우 myelin basic protein과 같은 brain유래 이종항원의 유입에 대한 기준을 두고 있다 [28]. 본 연구를 위하여 개발된 혼합백신중의 myelin basic protein의 함량은 AHFS drug information이나 PDR 등에서 기준으로 설정하고 있는 2 ng/ml에 훨씬 못미치는

0.01 ng/ml이하의 정제도가 높은 것을 알 수 있었다.

결 론

젓쌀이 마우스의 뇌내 배양한 한탄혈청형 바이러스 호왕균주와 젓쌀이 햄스터의 뇌내 배양한 푸말라혈청형 바이러스 K27 균주를 각각 정제 불활화하여 혼합하여 제조된 혼합백신을 실험동물 햄스터에 접종한 후 생성되는 면역항체를 5종류의 혈청형바이러스인 한탄바이러스, 서울바이러스, 벨그레이드 바이러스, 푸말라바이러스 그리고 신놈브레바이러스들에 대한 항체반응을 형광항체법 및 플라크 감소 중화시험법으로 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 혼합백신중의 총단백함량은 13.8 µg/ml 이었으며, 한탄바이러스와 푸말라바이러스 항원함량은 각각 1024 units/ml이었다.

2) 1차 접종 한달 후 채혈한 햄스터 혈액중의 한탄바이러스 호왕균주, 서울바이러스 80/39 균주, 벨그레이드바이러스 1균주, 푸말라바이러스 K27균주 및 신놈브레바이러스 CC107균주에 대한 형광항체가는 각각 78.4, 68.8, 68.8, 37.9, 15.6 이었으며, 중화항체가는 각각 65.4, 12, 6.1, 65.6, 0.5이었다. 2차 부스터 접종한 후 한달 후의 형광항체가는 위의 5가지 바이러스에 대하여 각각 686.9, 567.5, 550.4, 516.3, 430.9이었으며, 중화항체가는 710.8, 41.9, 24.3, 409.9, 1.6의 항체역가를 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Smadel JE: Epidemic hemorrhagic fever. *Am J Pub Hlth* 43: 1327-1330, 1953.
2. World Health Organization: Hemorrhagic fever with renal syndrome. Memorandum from a WHO meeting. *Bull WHO* 61: 269-275, 1983.
3. Lee HW, Lee PW: Korean hemorrhagic fever. I. Demonstration of causative antigen and antibodies. *Kor J Int Med* 19: 371-383, 1976.
4. Lee HW, Ahn CN: Development of vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Kor Soc Virol* 18: 143, 1988.
5. Puthavathana P, Lee HW, Kang CY: Typing of Hantaviruses from five continents by polymerase

- chain reaction. *Vir Res* 26: 1-14, 1992.
6. Chu YK, Rossi C, LeDuc JW, Lee HW, Schmaljohn CS, Dalrymple JM: Serological relationships among viruses in the Hantavirus genus, family Bunyaviridae. *Virology* 198: 196-204, 1994.
7. Lee HW, Baek LJ, Johnson KM: Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever from wild urban rats. *J Infect Dis* 146: 638-644, 1983.
8. Avsic-Zupanc T, Xiao SY, Stojanovic R, Gligic A, Van der Groen G, JW LeDuc: Characterization of Dobrava virus: a hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *J Med Virol* 38: 132-137, 1992.
9. Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Hovi T et al: Nephropathia epidemica detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infections. *J Infect Dis* 141: 131-134, 1980.
10. Lee PW, Amyx HL, Yanagihara R et al: Partial characterization of Prospect Hill virus isolated from meadow voles in the United States. *J Infect Dis* 152: 826-829, 1985.
11. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs J, Zaki SR, Peters CJ: Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262: 914-917, 1993.
12. Carey DE, Reuben R, Panicker KN, Shope RE, Myers RM: Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. *Indian J Med Res* 59: 1758-1760, 1971.
13. Lee HW, van der Groen G: Hemorrhagic fever with renal syndrome. *Prog Med Virol* 36: 62-102, 1989.
14. Lee HW: Hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. *Rev Infect Dis Suppl* 2: 864, 1989.
15. Baek Luck J, Kang Ju I, Song Ki J, Yang Byung K, Lee Yong J: Serologic survey of Hantavirus infection in field in mice captured at Inje-Kun, Kangwon-do. Abstracts 28th annual meeting of the Korean Society of Virology, p18, 1996.

16. Lee HW, Chu YK: Comparason of antigenicity of Hantaviruses by polymerase chain reaction for new vaccine candidate strain against hemorrhagic fever with renal syndrome and isolation of a new Howang virus. *J Kor Acad Sci* 32: 121-133, 1993.
17. Tkachenko EA, Bashkirtsev VN, van der Groen G, Dzagurova TK, Ivanov AP, Ryltsseva EV: Isolation in Vero-E6 cells of Hantavirus from *Clethrionomys glareolus* captured in the Bashkiria area of the U.S.S.R. *Annales de la Societe belge de medicine tropicale* 64: 425-426, 1984.
18. Song JW, Baek LJ, Gajdusek DC, Yanagihara R, Gavrilovskaya I, Luft BJ, Mackow ER, Hjelle B: Isolation of pathogenic hantavirus from white footed mouse (*Peromyscus leucopus*). *Lancet* 344: 1637, 1994.
19. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85, 1985.
20. Gendelman HE, Pezeshkpour GH, Pressman NJ, Quarles RH, Dobersen MJ, Trapp BD, Kitt CA, Aksamit A, Johnson RT: A quantitation of myelin-associated glycoprotein and myelin basic protein loss in different demyelinating diseases. *Ann Neurol* 18: 324-328, 1985.
21. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
22. Towbin H, Staehlin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4353, 1979.
23. Lee HW, Dalrymple JM: Manual of hemorrhagic fever with renal syndrome. *여문각* pp75-106, 1989.
24. Chu YK, Jennings G, Schmaljohn A, Elgh F, Hjelle B, Lee HW, Jenison S, Ksiazek T, Peters CJ, Rollin P, Schmaljohn C: Cross-neutralization of Hantaviruses with immune sera from experimentally infected animals and from hemorrhagic fever with renal syndrome and Hantavirus pulmonary syndrome patients. *J Infect Dis* 172: 1581-1584, 1995.
25. Xiao SY, Chu YK, Knauert FK, Lofts R, Dalrymple JM, JW LeDuc: Comparison of hantavirus isolates using a genus-reactive primer pair polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 73: 567-573, 1992.
26. Chu YK, Jennings GB, Schmaljohn CS: A vaccinia virus-vectored Hantaan virus vaccine protects hamsters from challenge with Hantaan and Seoul viruses but not Puumala virus. *J Virol* 69: 6417-6423, 1995.
27. Kitaka M: Follow-up on use of vaccine in children in Japan. *Immunization for Japanese encephalitis. Excerpta Medica*, pp275-277. Amsterdam 1972.
28. AHFS Drug Information: 2: 2325-2327, 1995.