

트리할로스, 포도당 및 유당이 한탄바이러스 백신의 안정성에 미치는 영향

고려대학교 의과대학 미생물학교실, 고려대학교부설 바이러스병 연구소

고 은 주 · 성 인 화*

=Abstract=

Effects of Trehalose, Glucose and Lactose on the Stability of Hantaan Virus Vaccine

Eun Joo Ko and Inwha Seong*

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

Most of the currently licensed viral and bacterial vaccines produced in the world are in state of antigen suspension and the immunogenicity of vaccines could be maintained for one or two years only by keeping in the refrigerator, but without refrigeration vaccines would easily lose their immunogenicities.

In this study, as a step to develop the method of increasing the stability of vaccines and maintaining the immunogenicity of vaccines for a long time at room temperature or higher temperature, trehalose, glucose and lactose at different concentration were added into the Hantaan virus vaccines and then kept at 37°C for 12, 24, 48 hours and at room temperature for seven days respectively. Treated vaccines were then inoculated respectively into ICR mice and the titers of antibody against the antigen of Hantaan virus from the mice sera were evaluated. Vaccine without sugar lost immunogenicity completely in 24 hour at 37°C, but the vaccines containing trehalose could maintain some of the immunogenicity even after exposure at 37°C for 48 hours and the best concentration of trehalose for maintaining the immunogenicities of vaccines was 7.5~10 percent.

The results suggest that addition of trehalose could increase the stability of Hantaan virus vaccine.

Key Words: Hantaan virus vaccine, Trehalose, Stability

서 론

두창의 예방법이 1959년 에드워드 제너 [15]에 의하여 개발된 이후 여러 종류의 세균 및 바이러스

백신들이 개발되었는데 현재까지 질병예방에 가장 공헌한 백신은 세계보건기구가 두창 박멸을 위하여 전세계에 보급한 백신니아 바이러스 백신으로 세계적인 두창 박멸운동을 통하여 두창의 발생은 서서히 감소하다가 1977년의 발생을 끝으

접수 : 1999년 9월 27일, 논문게재확정 : 1999년 12월 29일

*책임저자: 성인화, 서울시 성북구 안암동 5가, 고려대학교 의과대학 미생물학교실 Tel: (02) 920-6167,
E-mail: inwha@kucenx.korea.ac.kr

로 지구에서 사라졌다고 세계보건기구는 발표하였다 [12].

제너 이후 많은 사람들의 연구 결과로 여러 종류의 바이러스 및 세균백신들이 개발되었지만 바이러스 백신의 대량 생산이 가능하게 된 것은 1949년 엔더스 등 [11]이 신경세포에서만 자라나는 소아마비 바이러스를 신경세포가 아닌 배양된 사람의 태아조직세포 내에서 증식시키는 방법을 고안해낸 후부터이다. 이 방법을 통하여 개발된 소아마비 바이러스 백신은 예방효과가 매우 높았으며 이러한 백신 제조방법은 여러 종류의 바이러스 백신의 제조에 적용되어 지금까지 사용되고 있으며 최근에는 유전자 재조합 방법을 이용하여 대장균이나 효모세포들을 통하여 간염백신 등 여러 종류의 백신들이 생산되고 있다 [1,2,10,14,19,20,23~26,29]. 우리나라는 그 동안 많은 종류의 백신들을 수입하여 사용하였으며 지금까지도 수입에 의존하고 있는 백신들도 상당수가 있지만 국내 제약회사들이 여러 종류의 백신들을 생산하여 현재는 국내 수요를 충족시킬 뿐만 아니라 아프리카와 동남아시아 지역의 여러 나라로 수출하는 나라로 바뀌었다.

신증후 출혈열은 1951년 6월 한국전쟁 중 중부전선에 주둔하고 있었던 유엔군 병사들에서 발생하였고 10~15%의 사망률을 나타내어 주목을 받게 되었고 [27] 한국형 출혈열이란 이름으로 세계에 소개되었으나 그 병원체가 무엇인지 규명되지 않다가 1976년 출혈열 다발생 지역에서 채집된 등줄쥐의 폐조직에서 한국형 출혈열 환자의 회복기 혈청과 특이하게 반응하는 항원이 발견되었고 [17] 이 항원이 바이러스임이 증명되어 한탄바이러스라고 명명되었으며 [18] 계속된 연구를 통하여 한탄바이러스가 Bunyaviridae에 속한 바이러스임이 알려졌다 [20,31]. 그 이후 세계 각처에서 한국형 출혈열과 그 증상이 비슷한 출혈열들이 있고 그 원인 바이러스들의 항원 구조들도 유사함이 밝혀져 세계보건기구는 이 유사한 질병들을 하나의 통일된 이름인 신증후 출혈열 (hemorrhagic fever with renal syndrome)로 부르기로 결정하였다 [32]. 매년 한국에서 천명 이상의 신증후 출혈열 환자들이 발생하여 백신의 개발이 절실했으나 신증후 출혈열의 예방백신인 한탄바이러스 백신은 1988년에야 개발되었으며 [7], 임상적 효과, 항체지속성 및 면역성에 대한 연구를 통하여 이 백신이 신증후 출혈열의 예방에 상당한 효과

가 있음이 증명되었고 신증후 출혈열이 많이 발생하는 군부대와 농촌 지역에서 예방접종에 사용되고 있다 [16].

한탄바이러스 백신을 비롯하여 현재까지 우리나라를 비롯하여 전세계에서 개발되어 사용되고 있는 백신들은 대개 항원 부유액 상태로 되어 있으며 냉장보관 하지 않으면 백신의 면역원성이 쉽게 저하되거나 완전히 소실될 수 있기 때문에 냉장시설이 없거나 기온이 높은 아프리카 동남아시아 지역의 미개발국에서는 감염성 질환의 발생률이 아직까지 높은 편이다. 또한 백신을 이런 지역으로 수출할 때이나 지방으로 수송할 경우 냉장보관이 제대로 되지 않아 백신의 역가가 저하되거나 면역원성이 소실되어 문제가 발생하는 경우가 적지 않았다. 이런 백신의 단점을 해결하는 방법은 백신이 실온이나 더 높은 온도에서도 면역원성을 유지할 수 있도록 백신의 안정성 (stability)을 높이는 방법밖에는 없지만 백신에 대한 연구는 거의 대부분 새로운 백신의 개발과 백신의 안전성 (safety)에 관한 것이며 백신의 안정성에 대한 연구는 극히 적었으며 그것도 대개 동결건조에 관한 것이었다 [8,22].

본 연구는 바이러스 및 세균백신의 안정성을 증대시켜 냉장시설 없이도 백신의 저장이나 수송시 면역원성을 제대로 유지시킬 수 있는 방법을 개발하기 위한 과정의 한 단계로 한탄바이러스 백신에 당의 한 종류인 트리할로스 및 트리할로스에 포도당 또는 유당의 혼합물을 첨가하여 백신의 안정성을 증가시킬 수 있는지 여부를 알아보기 위하여 시행되었다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 한탄바이러스 백신

주식회사 녹십자에서 제조한 한탄박스를 사용하였으며 백신 0.5 ml에는 불활성화된 한탄바이러스 부유액 0.25 ml이 들어 있었고 수산화 알루미늄 0.25 ml과 안정제로 젤라틴 (0.02 w/v%)이 들어 있었다.

2) 실험 동물

간접 항체법으로 한탄바이러스에 감염되지 않은 것으로 확인된 4주령의 ICR mouse 159마리를 사용하였다.

Table 1. Antibody-positivity against Hantaanvirus antigen in ICR mice inoculated with Hantaanvirus vaccines containing trehalose, trehalose-glucose and trehalose-lactose mixture

conc. of sugar	T			TG			TL			No sugar			T	TG	TL	No sugar	
													RT / hours			RT	4℃
	12	24	48	12	24	48	12	24	48	12	24	48	12	24	48	7 days	
2.5%	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
5.0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+	-		
	+	+	-	+	-	-	-	-	-				+	-	-		
	+	-	-	-	-	-	-	-	-				-	-	-		
7.5%	+	+	+	+	+	-	+	+	+				+	+	+		
	+	+	+	+	+	-	-	-	-				+	-	-		
	+	-	-	-	-	-	-	-	-				+	-	-		
10.0%	+	+	+	+	+	+	+	+	-				+	+	-		
	+	+	+	+	+	+	-	-	-				+	+	-		
	-	-	-	-	-	-	-	-	-				+	-	-		

T: trehalose, TG: trehalose + glucose, TL: trehalose + lactose, RT: room temperature

2. 방법

1) 당의 첨가

트리할로스를 증류수에 녹여 5%, 10%, 15% 및 20% 용액을 만들고, 트리할로스에 포도당과 유당을 각각 동량을 넣어 증류수에 녹여 역시 5%, 10%, 15% 및 20%의 용액을 만든 후 백신 0.25 ml에 동량의 당용액을 각각 첨가하여 최종 당농도가 각각 2.5%, 5%, 7.5% 및 10%가 되게 하였다. 대조백신에는 당용액 대신 0.25 ml의 인산완충용액을 첨가하였다.

2) 당을 첨가한 백신의 방치

세계보건기구가 생바이러스 백신의 안정성 검사에 권장하는 방법 중의 하나인 accelerated degradation test에서 사용하는 방법 [33]을 약간 변형시켜 37℃에 12, 24, 48시간 및 실온에 7일간 각각 방치하였고 당을 첨가하지 않은 대조백신도 위와 동일한 온도에 동일 기간 방치하였고, 정상 대조백신은 4℃에 7일간 보관하였다.

3) 백신의 접종

ICR mouse의 대퇴부 근육내에 백신 0.1 ml씩 접종하였다.

4) 혈액 채취

접종 2주 후에 심장을 천자하여 전혈을 채취하였고 혈청을 분리하여 항체 검사시까지 -70℃에 보관하였다.

5) 항체 검사

한탄바이러스에 대한 항체 검사는 한탄바이러스를 접종한 Vero 세포들을 슬라이드상에 배양한 spot slide를 사용하여 통상적인 간접 형광항체 검사법으로 검사하였는데 혈청들을 1:32로 희석하여 screen 하였고, 양성으로 나온 혈청들은 2배 계단희석하여 항체가를 결정하였다.

6) 통계처리

항체가에 영향을 미치는 요인인 당의 종류와 농도, 37℃에서의 노출 시간 등을 종합적으로 평가하기 위하여 SAS 시스템의 로지스틱 다변량 회귀분석법을 사용하였다.

결 과

1. 혈청 검사

당을 첨가하고 37℃와 실온에서 각각 12, 24, 48 시간 동안 노출시킨 한탄바이러스 백신을 접종받

Table 2. Antibody titers against Hantaanvirus in sera from ICR mice inoculated with Hantaanvirus vaccines containing trehalose, trehalose-glucose and trehalose-lactose mixture

final conc. of sugar	T			TG			TL			No sugar			T	TG	TL	No sugar	
													RT / hours			RT	4°C
	12	24	48	12	24	48	12	24	48	12	24	48	12	24	48	7 days	
2.5%	128	32	32	32	32	-	128	32	-	32	-	-	256	64	32	-	170 (mean)
	64	32	-	32	32	-	32	-	-	32	-	-	32	32	-	-	
	32	-	-	32	-	-	-	-	-	32	-	-	-	32	-	-	
5.0%	256	128	32	64	32	32	64	32	32				128	32	-		
	64	32	-	32	-	-	-	-	-				32	-	-		
	32	-	-	-	-	-	-	-	-				-	-	-		
7.5%	128	64	32	32	32	-	64	32	32				64	64	32		
	32	64	32	32	32	-	-	-	-				32	-	32		
	32	-	-	-	-	-	-	-	-				32	-	-		
10.0%	128	64	32	128	64	64	32	32	32				128	32	-		
	64	32	32	128	64	64	-	-	-				64	32	-		
	-	-	-	-	-	-	-	-	-				32	-	-		

T: Trehalose, TG: Trehalose + Glucose, TL: Trehalose + Lactose, RT: room temperature

Table 3. Means of titers of antibody against Hantaanvirus in sera from ICR mice inoculated with Hantaanvirus vaccines containing trehalose, trehalose-glucose and trehalose-lactose mixture

final conc. of sugar	T			TG			TL			No Sugar			T	TG	TL	No Sugar	
													RT / hours			RT	4°C
	12	24	48	12	24	48	12	24	48	12	24	48	7 days				
2.5%	74.7	32	10.7	32	21.3	10.7	53.3	10.7	-	32	-	-	96.0	53.3	10.7	-	170.7
5.0%	84	53.3	10.7	32	10.7	10.7	21.3	10.7	10.7				53.3	10.7	-		
7.5%	64	42.3	21.3	21.3	21.3	-	21.3	10.7	10.7				53.3	21.3	21.3		
10.0%	64	46.7	21.3	85.3	46.7	46.7	10.7	10.7	-				34.7	21.3	-		

T: trehalose, TG: trehalose + glucose, TL: trehalose + lactose, RT: room temperature

Table 4. Statistic Analysis for Antibody Formation by Multiple Logic Regression (Analysis of Maximum Likelihood Estimates)

	Parameter Estimate	Standard Error	P-value	Odds raio
Intercept	2.1584	0.6075	0.0004	
Media 1	-0.6376	0.5105	0.2117	0.529
Media 2	-1.0069	0.5147	0.0504	0.365
Concentration	0.3752	0.1507	0.0128	1.455
Duration	-0.0805	0.0153	0.0001	0.923

Media 1: trehalose to trehalose-glucose, Media 2: trehalose to lactose

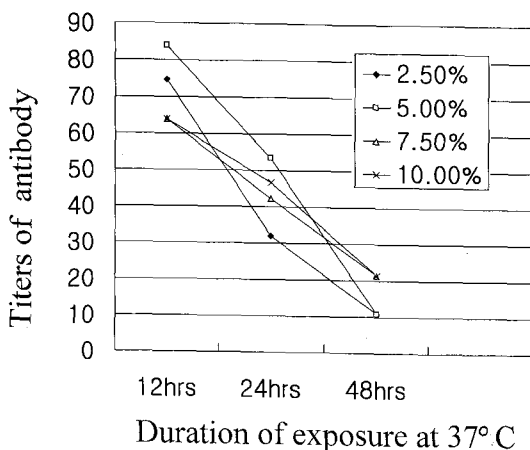


Figure 1. Means of titers of antibody against HTNV in sera of ICR mice inoculated with vaccines containing trehalose

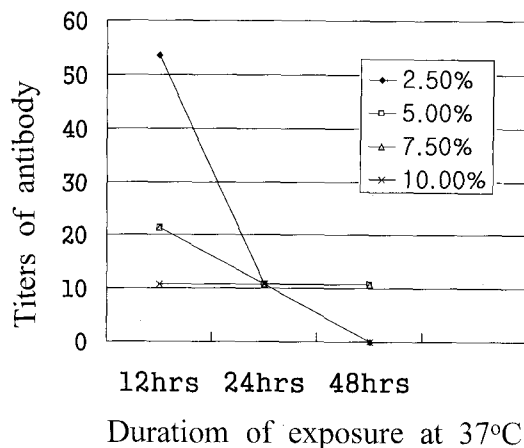


Figure 3. Means of titers of antibody against HTNV in sera of ICR mice inoculated with HTNV vaccines containing trehalose and lactose

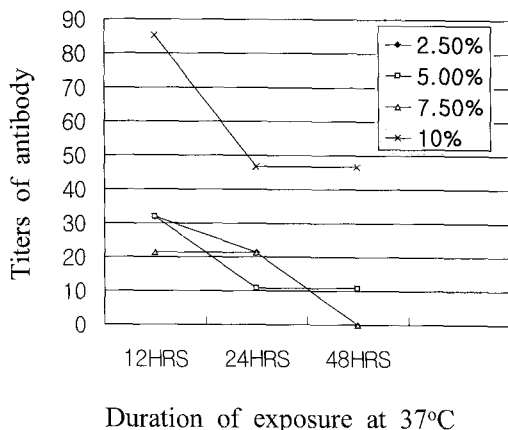


Figure 2. Means of titers of antibody against HTNV in sera of ICR mice inoculated with HTNV vaccines containing trehalose and glucose

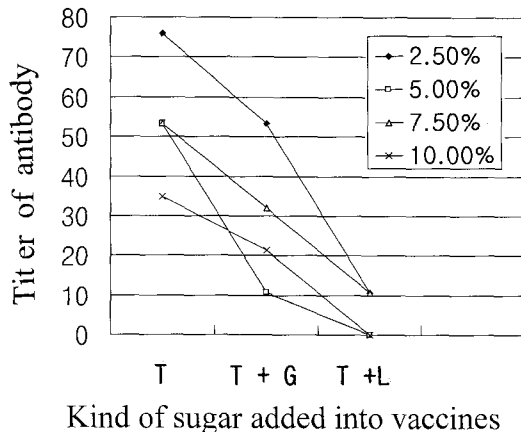


Figure 4. Means of titers of antibody against HTNV in sera of ICR mice inoculated with sugar-containing vaccines exposed at room temperature for 7 days

은 ICR mice 혈청 내 한탄바이러스 항원에 대한 항체 보유 여부를 알기 위하여 1:32로 희석한 혈청을 간접 형광항체법을 이용하여 screen한 결과 당을 첨가하지 않고 37°C에 12시간 보관한 백신을 접종받은 3마리의 혈청들은 항체 양성을 보였으나 24시간에는 백신의 면역원성이 완전히 소실되었고, 실온에 7일간 방치하였던 백신도 면역원성이 유지되지 않았다 (Table 1).

양성으로 나온 혈청을 2배 계단희석하여 검사한 결과 당을 첨가하지 않고 4°C에 보관한 백신을 접종받은 세 마리 쥐들의 혈청들은 각각 1:256, 1:128, 1:128의 항체가 나타내었다. 그러나 트리

할로스를 첨가한 백신들은 37°C에 12시간 노출시 거의 4°C에 보관한 대조백신의 면역원성과 거의 비슷하거나 한 단계 낮은 수준을 유지하였고, 24시간에는 절반 수준으로, 48시간에는 사분의 일 전 수준의 면역성이 남아 있었으며, 실온에 7일간 보관한 백신들은 대조백신의 면역원성 보다 약간 떨어진 수준을 보였다. 트리할로스의 농도에 따른 차이는 크지 않았으나 2.5%와 5.0% 보다 7.5%와 10%가 백신의 면역원성 보전능력이 약간 나았다. 트리할로스에 포도당이나 유당을 첨가한 것들은 트리할로스만을 첨가한 것보다 면역원성 유지능이 사분의 일 정도로 낮은 수준이었으며 유당은

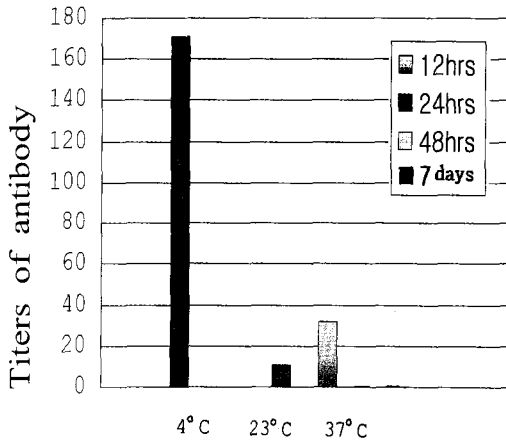


Figure 5. Means of titers of antibody against HTNV in sera of ICR mice inoculated with control vaccines

포도당 보다 못하였다 (Table 2).

또한 각각 세 마리씩의 항체가 평균치를 비교하여 보았는데, 트리할로스만을 첨가한 경우에는 37°C에서 48시간 경과 후 면역원성 보존성은 7.5%와 10%의 농도에서 가장 높았으며 (Table 2, Figure 1), 트리할로스와 포도당을 첨가하는 10%의 농도에서 (Table 2, Figure 2), 트리할로스와 유당을 첨가한 경우는 5%와 7.5%가 좋은 것처럼 보였다 (Table 2, Figure 3). 실온에 7일간 방치한 경우에는 트리할로스와 유당을 7.5%로 첨가한 것이 나아보였고 (Table 2, Figure 4) 당을 첨가하지 않은 정상 대조백신의 면역원성이 온도에 따라 상당히 민감하게 변화될 수 있음을 알 수 있었다 (Table 2, Figure 5). 각 그룹의 마리수가 적었지만 당의 첨가와 노출 시간에 따른 항체의 추세는 쉽게 알아볼 수 있었다.

2. 통계처리 결과

전체 결과에서 항체 양성을 보인 경우는 모두 74개였고 항체 음성을 나타낸 경우는 85개였다. 항체 형성에 영향을 미치는 요인인 당의 종류, 당의 농도, 보존기간 등을 종합적으로 평가하기 위하여 통계분석으로 로지스틱 다변량 회귀분석법으로 분석한 결과 보존기간은 항체 형성과 역의 관련성을 통계적으로 유의하게 보였고 농도는 양의 관련성을 통계적으로 유의하게 보였다. Trehalose의 경우는 통계적으로 유의한 관련성을 보였으나 Trehalose-lactose의 경우는 관련성이 떨어졌다. 로지스틱 분석 결과는 당의 농도가 높을수록

항체 양성이 나타날 가능성이 높아지고, 보존기간이 길어질수록 항체 양성으로 나타날 가능성이 떨어지며, Trehalose의 경우 항체 양성이 나타날 가능성이 높다는 결과를 보였다 (Table 4).

고 찰

한국에서 매년 1,000명 이상의 신증후 출혈열 환자들이 발생하고 있어서 이에 대한 백신의 개발이 절실하였으나 사람에게 투여할 수 있는 한탄바이러스 백신은 1988년에야 개발되었고 [7] 이 백신도 다른 바이러스 백신과 마찬가지로 포르말린으로 사멸화한 백신으로 한탄바이러스 부유액 상태로 제조된 백신으로 냉장보관하는 경우 약 2년간 면역원성을 보존할 수 있는 백신이지만 실온에서는 면역원성이 쉽게 소실된다. 한탄바이러스 백신의 안정성을 높이기 위한 연구는 Seong [4,5]이 한탄바이러스 백신에 sucrose를 첨가하는 방법을 개발한 이래 sucrose의 첨가가 간염 B 바이러스 백신의 안정성을 증대시킬 수 있었고, glucose, lactose 및 glucose과 lactose의 혼합물이 한탄바이러스 백신과 간염 B 백신의 안정성을 증가시킬 수 있음을 보고하였으며 Seong [6]은 1998년 당의 첨가가 바이러스 백신들 뿐만 아니라 세균백신인 랩토스피라 백신의 안정성도 증대시킬 수 있음을 보고하였지만 trehalose를 안정제로 사용한 연구보고는 없었다.

본 실험에서 사용된 한탄바이러스 백신에는 0.02 w/v%의 젤라틴이 들어 있었지만 당을 첨가하지 않은 상태에서는 실온 및 37°C에서 면역원성을 유지시키는데는 별 효과가 없음을 알 수 있었으며 당의 한 종류인 trehalose, trehalose와 포도당 또는 유당과의 혼합물을 한탄바이러스 백신에 각각 첨가하여 한탄바이러스 백신의 안정성을 증대시키고자 하였는데 trehalose는 sucrose나 lactose와 구조가 비슷하고 분자량은 trehalose가 342.31이며 sucrose와 lactose는 똑같은 342.30이다. trehalose만을 첨가한 것이 전체적으로 보아 trehalose에 lactose나 glucose를 혼합한 것보다 백신의 면역원성 유지능이 나았으며 glucose는 분자량이 180.16으로 작아도 불구하고 trehalose와 혼합 첨가시 lactose와 첨가한 것보다 면역원성 유지능이 약간 높은 것으로 나타났고 sucrose와 동시 비교는 본 연구에서 시행되지 않았으나 trehalose가 sucrose에 필적할 만한 항원성 유지능력이 있는 것으로 생

각된다. 가장 높은 유지능을 보인 trehalose는 7.5%와 10%의 농도가 2.5%나 5.0% 보다 백신의 안정성을 높이는 데 보다 효과적이었는데 이런 경향은 37°C와 실온에 노출시 비슷하였다. 백신의 안정성을 검사하는 방법은 실온에 노출시키는 방법보다 세계보건기구 [33]가 생바이러스 백신의 안정성 검사에 사용하도록 권장하는 방법인 accelerated degradation 검사방법이 시간을 크게 절약할 수 있었으며, 실온에서 7일간 방치하는 것만으로도 당의 종류와 농도에 따른 안정성의 차이를 충분히 볼 수 있어 Seong [4]의 실온에 3개월까지 방치하는 방법보다 간단하였다. Sood 등 [28]은 안정제를 첨가한 황열백신을 37°C에서 1, 2, 3 및 4주간 방치하였고, 세계보건기구는 poliovirus 백신 같은 생바이러스 백신의 안정성 검사시 37°C에서 48시간 동안의 노출을 규정하고 있으나 제약회사에 따라 또 제품에 따라 4주까지 노출시켜 생존하는 바이러스 역가를 검사하기도 한다. Trehalose가 들어있는 백신을 접종받은 ICR mouse들에서 접종 2주 후까지 접종으로 인한 특별한 부작용을 발견할 수 없었고 접종 부위에도 종창이나 발적을 찾아볼 수 없었다. 통계분석 결과도 trehalose의 첨가가 통계학적으로 유의함을 나타내었다. Sood 등은 네가지의 안정제를 가지고 황열백신의 안정성에 대하여 실험을 하였는데 첫째는 lactose, sodium glutamate와 gelatin의 혼합물이며, 둘째는 Medium 199에 sodium glutamate와 gelatin을 혼합한 것이었고, 셋째는 lactose, D-sorbitol, L-histidine HCl, L alanine HCl의 혼합물 이었으며, 넷째는 sucrose에 gelatin을 혼합한 것이었으며 이들을 yellow fever 백신에 첨가한 결과 lactose에 아미노산들을 첨가한 안정제가 yellow fever 백신의 면역원성을 가장 잘 유지시킬 수 있었다고 보고하였는데 이 안정제가 한탄바이러스 백신의 안정성을 증대시킬 수 있을지는 미지수이며 앞으로의 연구가 필요하다.

결 론

한탄바이러스 백신의 안정성을 증대시키기 위하여 한탄바이러스 백신에 trehalose, trehalose-lactose, trehalose-glucose 혼합물을 각각 최종 농도가 2.5%, 5.0%, 7.5% 및 10.0%가 되도록 첨가한 후 37°C에 12, 24, 48시간, 실온에 7일간 방치한 다음 대조백신과 함께 ICR mice에 접종하여 항체가를

비교한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 당을 첨가하지 않은 한탄바이러스 백신은 37°C에서 24시간만에 면역원성이 완전히 소실되었다.
- 2) trehalose를 첨가한 백신들은 당의 농도에 따른 약간의 차이는 있었지만 대체로 37°C에서 12시간 방치한 후에도 대조백신의 이분의 일 정도의 면역원성을, 24시간에는 사분의 일 정도의 면역원성을 유지하였고, 48시간에는 팔분의 일 이하로 저하되었으며 실온에서 7일간 방치하였던 백신들도 이분의 일 내지 사분의 일 정도의 면역원성이 유지되었다.
- 3) 가장 높게 면역원성을 유지시킨 trehalose의 농도는 7.5%와 10.0%였으며 trehalose에 동량의 lactose나 glucose를 혼합하여 첨가한 경우는 trehalose 단독으로 첨가한 것보다 백신의 면역원성 유지능력이 떨어짐을 알 수 있었다.
- 4) 통계처리 결과도 trehalose가 한탄바이러스 백신의 안정성을 높일 수 있는 안정제로 사용될 수 있을 가능성을 보여주며 앞으로의 계속된 연구를 통하여 다른 종류의 바이러스 백신 및 세균백신의 제조에도 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) 박만훈, 김성진, 구만복, 정경환, 송희복, 박경남, 김경호: 효모유래 B형 간염백신에 관한 연구. 대한바이러스학회지 **18**: 143-148, 1988.
- 2) 박병훈, 이상욱, 소재목, 정현도, 민병길: Heat-inactivated and aggregated HBsAg as a New Type of vaccine against Hepatitis B. 대한바이러스학회지 **16**: 69-76, 1986.
- 3) 성인화: 서당을 첨가한 간염 B 바이러스 백신의 안정성. 대한바이러스학회지 **25(2)**: 147-153, 1995.
- 4) 성인화: 당 첨가가 한탄바이러스 백신의 안정성에 미치는 영향. 대한바이러스학회지 **26(2)**: 245-249, 1996.
- 5) 성인화: 당 첨가가 B형 간염바이러스 백신의 안정성에 미치는 영향. 대한바이러스학회지 **27(2)**: 143-149, 1977.
- 6) 성인화: 당 첨가가 랩토스피라 백신의 안정성에 미치는 영향. 감염 **30(6)**: 551-557, 1998.
- 7) 이호왕, 안창남: Development of vaccine against Hemorrhagic fever with renal syndrome. 대한바

- 이러스학회지 18: 143-148, 1988.
- 8) **Bennett PS, Maigetter RZ, Oslon MG, Provost PJ, Scattergood EM, Schofield TL:** The effects of freezing-drying on the potency and stability of live varicella virus vaccine. *Developments in Biological Standardization* 74: 215-221, 1952.
 - 9) **Brostoff J, Scadding GK, Male D, Roitt IM:** Vaccines, Clinical Immunology. 1st ed, *Gower Medical Publishing*, pp 56.1-36.18, 1991.
 - 10) **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.
 - 11) **Enders JF, Weller TH, Robbin FC:** Cultivation of Lansing strain of Poliomyelitis virus in culture of various human embryonic tissues. *Science* 109: 85, 1945.
 - 12) **Fenner F, Handerson DA, Arita I, Jezek Z, Ladny ID:** Smallpox and Its eradication, Geneva: *World Health Organization*, 1988.
 - 13) **Grose C, Friedrichs WE, Smith KO:** Cryopreservation of varicella-zoster virus without loss of structural Integrity or infectivity. *Interviol* 15(3): 154-160, 1981.
 - 14) **Hause 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, in *Viral hepatitis and liver disease*. New York: Allan R Liss, 1031-1037, 1988.
 - 15) **Jenner E:** An inquiry into the causes and effect of the variable vaccine, a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of complect. Camac, ed. in *Classics of Medicine and Surgery*. New York: Dover 213-240, 1959.
 - 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 Virol (supple 1)*: 35-47, 1990.
 - 17) **Lee HW, Lee PW:** Korean hemorrhagic fever I. Demonstration of causative antigen and antibodies. *Korean J Intern Med* 19: 371-384, 1976.
 - 18) **Lee HW, Lee PW, Johnson KM:** Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 137: 298-308, 1978.
 - 19) **McAleer WJ, Bunyak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR:** Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307: 178-180, 1984.
 - 20) **McCormick JB, Palmer EL, Sasso DR, Kiley MP:** Morphologic identification of the agent of Korean hemorrhagic fever (Hantaan virus) as a member of Bunyaviridae. *Lancet* 1: 756-760, 1982.
 - 21) **Petermans JH:** Specifications and quality control of a yeast-derived hepatitis B vaccine. *Postgrad Med J* 63(suppl 2): 97-100, 1987.
 - 22) **Plotkin SA, Beale AJ:** Production of RA 27/3 rubella vaccine and clinical results with the vaccine. *Developments in Biological Standardization* 37: 2911-296, 1976.
 - 23) **Sabin AB:** Oral poliomyelitis Vaccine: Recent results and recommendations for optimum use. *R Soc Health J* 2: 51, 1962.
 - 24) **Sabin AB:** Properties of attenuated poliovirus and their behavior in human beings. *Spec Publ NY Acad Sci* 5: 113-127, 1957.
 - 25) **Salk JE:** A concept of the mechanism of Immunity for preventing poliomyelitis. *Am NY Acad Sci* 61: 1023, 1955.
 - 26) **Salk JE:** Basic Principles underlying immunization against poliomyelitis with non-Infectious vaccine. In "Poliomyelitis: Papers and discussions presented at the fourth International Poliomyelitis Conference" p 66, Lippincott, Philadelphia, Pennsylvania, 1958.
 - 27) **Smadel JE:** Epidemic hemorrhagic fever. *Am J Public Health* 43: 1327-1330, 1953.
 - 28) **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(11): 1124-1128, 1993.
 - 29) **Tortora GI, Funke BR, Gase CL:** Microbial Diseases of the Nervous System, *Microbiology An Introduction* (4th ed) p 539, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, 1992.
 - 30) **van der Walt NT:** A haemagglutination and haemagglutination-inhibition test for blue tongue vi-

- rus. *Onderstepoort J Veterinary Research* **42(2)**: 113-117, 1980.
- 31) **White JD, Shilly FG, French GR, Huggins JW, Brand OM**: Hantaan virus, aetiologic agent of Korean hemorrhagic fever, has Bunyaviridae-like morphology. *Lancet* **1**: 768-771, 1982.
- 32) **World Health Organization**: Hemorrhagic fever with renal syndrome. Memorandum from a WHO meeting. *Bull WHO* **61**: 269-275, 1983.
- 33) **World Health Organization**: WHO Expert Committee on Biological Standardization "Requirements for varicella vaccine (live)". *WHO Technical Report Series No. 848*: 23-52, 1994.
-