

Herpes Simplex Virus Type 1 마우스 뇌염모델에서의 조직내 바이러스 증식 및 재활성에 미치는 Acyclovir의 약효

한국화학연구소 의약활성연구실

이종교* · 김지현 · 배판기 · 피미경 · 김해수

=Abstract=

Efficacy of Acyclovir on Virus Replication in Infected Tissues and Virus Reactivation from Explanted Tissues in Mouse Encephalitis Model of Herpes Simplex Virus Type 1

Chong-Kyo Lee*, Jee Hyun Kim, Pan Kee Bae, Mi Kyung Pi
and Hae Soo Kim

*Pharmaceutical Screening Center, Korea Research Institute of
Chemical Technology, Taejon 305-600, Korea*

To investigate viral pathogenesis and in vivo efficacy of acyclovir (ACV) in mouse HSV-1 encephalitis models, female BALB/c mice aged 5 weeks were inoculated with strain F either intranasally (IN) or intracerebrally (IC). ACV-treatment by intraperitoneal injection with 0, 5, 10 and 25 mg/kg b.i.d. for 6 days was commenced 1 h after infection. Body weight and signs of clinical disease were noted daily up to 2 weeks. ED₅₀ of ACV in IN infection was <5 mg/kg and 14.1 mg/kg in IC infection. Tissues of central nervous system were collected from 2 mice per group everyday up to 5 day p.i. and the virus titers were measured. In IN infection model, high titers in eyes and trigeminal nerves were observed. ACV-treatment showed significant reduction of the titers in all the isolated. In IC infection model, cerebrum, cerebellum and brain stem showed high virus titers. ACV-treatment showed less significant reduction of virus titers than that in IN infection model. Reactivation of explanted trigeminal nerves from mice 30 day p.i. was monitored. In all of ACV treated mice reactivation was observed, i.e. even the highest dose of ACV did not inhibit the establishment of viral latency.

Key Words: Herpes simplex virus type 1, Mouse encephalitis, Intranasal infection, Intracerebral infection, Acyclovir

서 론

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)은 외피를

접수 : 1999년 9월 6일

*; Corresponding author: Chong-Kyo Lee, Pharmaceutical Screening Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-600, Korea. Tel: (042) 860-7412, Fax: (042) 861-4246, E-mail: ckyolee@pado.kriict.re.kr

가진 DNA 바이러스로서 현재까지 발견된 8가지의 human herpesvirus 중 한 종류이다 [21]. HSV-1은 입술주위에 흔히 나타나는 단순포진, 각막염, 치명적인 뇌염 등의 다양한 질병을 유발하며, 항바

이러스치료제 개발의 주요 목표 바이러스 중의 하나이다 [2,3]. HSV-1의 생물학적 특징 중 특히 중요한 점은 neurovirulence와 잠복감염 그리고 재활성이라 할 수 있다 [19,21,23,24,26,28]. 바이러스가 신경계에 침투하여 증식할 수 있고 잠복감염하기 때문에 많은 연구가 이루어지고 있으며, 바이러스의 잠복감염이나 재활성을 막는 약물이 아직 개발되어 있지 않기 때문에 항바이러스제 개발목표에 있어 가장 중요한 것 중의 하나로 간주되고 있다. HSV-1은 세포배양체계에서 증식 및 식별이 용이하여 많은 실험방법들이 개발되어 있을 뿐 아니라 마우스, 기니피그와 토끼 등의 여러 종류의 동물을 이용한 다양한 감염모델들이 확립되어 있어 타 바이러스 감염동물모델의 표본이 되고 있다 [12,13,27].

Herpes 구안, 성기, 안구, 뇌염 및 전조직 감염모델 등이 있는데, 이 중 herpes 뇌염모델은 감염된 동물이 뇌염에 의해 사망하기 때문에 사망률로서 약효를 간단히 평가할 수 있다는 장점이 있다. 비강, 대뇌, 복강, 정맥내 투여, 질내 감염 등의 접종법이 이용된다. 비강감염은 호흡기관의 상피세포에서 증식된 바이러스가 중추신경계로 침입한 후 증식하여 급성뇌염을 일으키며 [4,11,15], 대뇌감염법은 HSV-1이 사람에게 감염하는 자연적인 침입경로는 아니지만, 바이러스를 대뇌에 직접 주입하기 때문에 blood-brain barrier의 통과과정이 필요없이 중추신경계에서의 바이러스 증식이 일찍 일어나며 소량의 바이러스로도 감염을 유도할 수 있다는 장점이 있다 [1,18]. 일반적으로 감염동물 모델을 이용하여 항바이러스 효과를 평가할 경우 임상적, 바이러스학적, 조직병리학적 분석법을 이용하는데, 임상적인 경우 사망률과 체중변화 및 제반 증세를 조사한다. 바이러스학적 분석은 감염된 동물 체내 조직에서의 바이러스 역가를 측정하여 바이러스 증식을 약물이 실제로 어느 정도 저해했는가를 확인하며, 조직병리학적 분석을 통해서 약물이 감염조직의 손상을 어느 정도 막았는가를 조사할 수 있다. 일반적으로 감염에 이용되는 바이러스 균주 종류, 접종량, 접종부위, 감염모델, 동물의 주령 및 성별과 약물투여 시작 시간 및 투여기간 및 용량과 용법 등에 따라서 다양한 결과가 발생한다 [14]. 대표적인 herpes 치료제 중 하나인 acyclovir (ACV)는 전구물질로서 ACV triphosphate가 항바이러스 활성을 나타내는 약물이다 [6,7]. 세포내에서 3개의 인산기가 차

레로 결합하여 활성화 물질이 되는데, HSV-1 thymidine kinase (TK)에 의하여 첫 번째 인산기가 결합되고 그 이후에는 세포내 효소들에 의해 인산기가 차례로 추가되어 활성물질이 된다. 따라서 비감염세포에는 활성화된 물질이 적기 때문에 부작용도 줄어든다는 장점이 있지만, TK활성에 이상이 생길 경우는 약효를 나타낼 수 없다는 단점이 있으며, 실제로 가장 중요한 ACV 내성기전으로 알려져 있다 [8,9,22]. ACV가 잠복감염을 막지는 못하지만 감염된 조직의 바이러스 재활성에 의한 재발병을 감소시킨다는 점에서는 아직 많은 논의가 이루어지고 있다.

본 연구에서는 마우스 뇌염모델에서의 바이러스 감염의 병리학적 연구와 ACV in vivo 약효 평가를 목적으로, 5 주령의 BALB/c 암컷 마우스들을 비강감염법과 대뇌감염법으로 바이러스를 감염시킨 다음 임상적 측면과 바이러스 증식 측면에서 약효를 조사하였고, ACV 투여가 잠복감염을 저해하였는지를 잠복감염장소인 삼차신경을 적출하여 재활성이 유도되는지를 Vero세포를 이용하여 조사하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 세포

HSV-1 strain F (ATCC VR-733)을 구매하여 마우스 감염에 이용했으며, 바이러스 증식이나 역가 측정에는 Vero (African Green monkey kidney)세포를 American type culture collection으로부터 구매하여 이용했다 [17]. 세포의 계대배양에는 Dulbecco's Modified Eagle (DME)배지 (Gibco)에 5%의 fetal bovine serum (FBS) (Gibco)를, 바이러스 증식에는 2% FBS를 첨가해서 사용했다. 항균제로는 40 µg/ml gentamycin (Gibco)을 첨가했다. 바이러스 중균액은 액체질소에 보존했다가 실험직전에 37°C에 녹여 사용했다.

2. 시험동물

한국화학연구소 실험동물실이나 일본 Charles River사로부터 4 주령의 specific pathogen free (SPF) BALB/c 암컷 마우스를 구입하여 군당 5~6 마리씩 분류한 다음, 일주일간 항온·습습 사육실에서 적응시킨 다음 실험에 이용했다.

3. Acyclovir

삼천리 제약으로부터 기증받은 acyclovir 주사제 (바크로비[®])를 칼슘과 마그네슘 불포함 phosphated buffered saline (PBS)에 50 mg/ml로 녹인 후 시험농도에 따라 PBS로 희석하여 실험에 이용했다

4. 바이러스 역가측정

바이러스 중균액의 역가는 plaque 검색법을 이용하여 조사했는데, DME/2% FBS에 연속 희석된 바이러스를 48 well plate에 배양된 Vero세포에 접종시킨 후 3 일간 배양한 다음 crystal violet로 염색하여 plaque 수를 세고, 바이러스 역가를 plaque forming unit (PFU)로서 표시했다. HSV-1에 감염된 동물의 조직에서 바이러스 증식정도를 조사하기 위하여, 감염된 마우스들로부터 조직들을 적출하여 -70℃에 보존하였다가, 역가측정 실험 직전에 대뇌에는 DME/2% FBS 배양액 0.5 ml을, 나머지 조직들에는 0.3 ml을 첨가하여 분쇄하였다. 원심분리한 다음, 상등액을 바이러스 중균액으로 취하고 배양액으로 10 배 연속 희석하였다. 48-well plate에 배양된 Vero세포에 감염시키고 3 일간 배양한 다음 crystal violet로 염색하고 plaque 수를 세어 바이러스 역가 (PFU/조직)을 결정하였다.

5. 마우스의 감염

일주일간 사육실에서 적응된 5 주령의 SPF 암컷 BALB/c 마우스들을 감염시켰다. 에테르로 마취된 마우스의 코에 50 µl 바이러스 중균액을 흡입시켜 비강감염시켰다 (접종량 10⁶ PFU/mouse). 대뇌감염은 바이러스액 50 µl를 직접 대뇌 주사하였다 (접종량 10³ PFU/mouse). 각 실험군은 5~6 마리로 이루어졌는데, 바이러스 대신에 DME/2% FBS로 접종한 mock 감염군도 포함되었다. 접종 직전부터 약 한 달 동안 매일 마우스의 체중을 측정하고 감염증세를 관찰했다. 감염증세는 사망, 눈 질환, 뇌염증세 등이었다.

6. 약물투여 효과

약물의 전신투여 효과를 평가하기 위하여 군당 5~6 마리의 마우스를 비강 또는 대뇌감염 시킨 직후부터 ACV를 체중 1 g 당 10 µl의 양으로 시작하여 하루 두 번씩 5 일간 복강투여했는데, 용량은 0, 5, 10, 25 mg/kg b.i.d (bis in die, twice a day) (이후 b.i.d. 생략)였다. 용량 0의 경우에도 PBS를

투여했다. ACV의 부작용 조사를 위해 mock 감염군에도 약물을 투여했다. 매일 증세관찰과 함께 체중을 측정했다. 바이러스 감염으로 인한 사망률을 50% 감소시키는 약물의 농도인 50% effective dose (ED₅₀)를 Reed and Muench 계산법으로 산출했다 [20]. 조직역가측정을 위해서는 감염 직후 부터 6 일 동안 각 실험군의 마우스를 매일 2 마리로부터 중추신경계 관련 조직들을 적출하여 세포배양체계에서 분석할 때까지 -70℃에 보존했다.

7. 바이러스의 재활성화 시험 [29]

바이러스 감염 30 일 후에 생존한 마우스를 해부하여 좌우 삼차신경을 적출하여 DME/2% FBS에 담고 37℃ CO₂ 배양기에서 5 일간 배양하였다. 조직에 DME/2% FBS 배양액 300 µl를 넣은 후 분쇄하였다. 분쇄된 액을 48 well plate에 배양된 Vero세포에 duplicate로 감염시키고, 2 주 동안 매일 현미경으로 바이러스에 의한 세포병리현상을 관찰하므로써 바이러스 증식을 확인하였다.

결 과

1. Acyclovir의 임상적 효과

ACV의 임상적 조사항목은 사망여부, 체중감소, 털모양의 변화나 눈의 염증 여부 등의 증세였다. 비강감염에서는 접종량 10⁶ PFU이 되도록 바이러스 균주 F 원액 50 µl를 가볍게 마취된 5 주령의 암컷 BALB/c의 비강에 떨어뜨려 흡입시켰다. 대뇌감염의 경우 DME/2% FBS에 희석하여 접종량이 10³ PFU가 되도록 50 µl를 대뇌에 직접 주사했다. 감염 즉시 ACV 복강투여를 시작하여 하루 2 번씩 12 시간 간격으로 6 일간 투여했다. DME/2% FBS로만 감염시킨 mock군도 실험에 포함시켰다. 관찰용으로 비강감염의 경우 군당 5 마리씩 평균체중 18.7±1.4 g, 대뇌감염의 경우 군당 6 마리, 평균체중 19.4±1.5 g의 마우스로 관찰용과 조직적출을 위한 마우스 군으로 구성했다. 매일 생존여부와 함께 증세 및 체중변화를 2 주 동안 관찰했다. 일반적으로 바이러스에 감염된 마우스는 감염모델에 상관없이 아무런 증세가 없는 mock군과 달리 체중감소와 함께 털모양이 변하며 눈에 염증이 생긴 다음 행동이상을 나타난 후 죽었다. 체중감소의 멈춤이 감염으로부터 회복되는 징후로서 이후 지속적인 체중증가와 함께 회

Table 1. Antiviral efficacy of acyclovir on the mortality of the mice infected with HSV-1 intranasally or intracerebrally

Virus	Route of administration	Acyclovir (mg/kg, b.i.d.)	Mice survived	Mortality (%)	Mean survival days of dead mice	ED ₅₀ or LD ₅₀ (mg/kg, b.i.d.)
HSV-1 (F)	Intranasal	0	0/5	100	7.6	<5
		5	5/5	0	-	
		10	5/5	0	-	
		25	5/5	0	-	
	Intracerebral	0	0/6	100	6.3	14.1
		5	1/6	83	8.2	
		10	2/6	67	7.8	
		25	4/6	33	7.0	
Mock	Intranasal	0	5/5	0	-	>25
		5	nt	nt	nt	
		10	nt	nt	nt	
		25	5/5	0	-	
	Intracerebral	0	5/5	0	-	>25
		5	nt	nt	nt	
		10	nt	nt	nt	
		25	5/5	0	-	

nt: not tested

ED₅₀ and LD₅₀ were calculated by using Reed and Muench method [17]

복되었다. 비강감염의 경우 약물 비투여군의 경우 감염 후 3~4 일부터 체중감소가 관찰되기 시작하여 죽을 때까지 감소하였으며, 털모양의 변화 및 눈에 염증이 관찰된 다음 뇌염에 의한 행동이상을 나타내다가 모두 죽었는데, 가장 빠리는 감염 6 일 후, 가장 늦게는 감염 후 11 일에 죽었으며, 죽은 마우스들의 평균 생존일은 7.6 일이었다. ACV 투여군은 재활성조사를 위한 조직적출일인 감염 후 30 일까지 모두 100% 생존율을 나타냈으며, 생존율로 본 ED₅₀는 <5 mg/kg였다 (Table 1). 증세 및 체중감소 측면에서는 용량이 증가할수록 뚜렷하여, 5 mg/kg의 경우 5 마리중 4 마리가, 10 mg/kg의 경우 1 마리가 체중감소 및 증세를 나타냈으며, 25 mg/kg의 경우에는 5 마리 모두 전혀 나타나지 않았다 (성적제시 안함). 대뇌감염의 경우 약물 비투여군에서는 감염 하루나 이틀 뒤부터 모두에서 지속적인 체중감소가 관찰되었고, 털모양의 변화가 관찰된 다음 뇌염에 의한 행동이상을 나타내다가 모두 죽었다 (Table 1). 조직적출용군에서 가장 빠리는 감염 이틀 후였으며, 관찰군에서는 6 일에 4 마리가 7 일에 2 마리가 죽어 평균 생존일 6.3 일을 나타냈다. 감염 후 30 일까지 조사된 ACV 투여군 각 6 마리에서

생존 마우스의 수는 5 mg/kg에서 5 마리, 10 mg/kg에서 4 마리, 25 mg/kg에서 2 마리로 용량이 증가함에 따라 증가하였다. 그러나 죽은 마우스들의 평균 생존일은 투여 용량이 높아짐에 따라 오히려 짧아지는 것이 관찰되었다 (ACV 0, 5, 10, 25 mg/kg 순으로 각각 6.3, 8.2, 7.8, 7.0 일). 생존율로 결정한 ACV의 ED₅₀는 14.1 mg/kg였다. 체중변화는 최고 용량에서조차 비투여군과 같이 하루나 이틀 뒤부터 체중감소가 관찰되었으며, 생존 마우스의 경우 체중이 회복되었으나 죽은 마우스의 경우 지속적인 감소가 관찰되었다 (성적제시 안함). 털모양의 변화 등이 최고 용량까지 관찰되었으나, 25 mg/kg의 경우에만 빠른 회복이 관찰되었고 5 나 10 mg/kg의 경우 회복이 더딜을 알 수 있었다 (성적제시 안함). 비강이나 대뇌감염된 mock감염군의 경우 ACV 비투여군이나 25 mg/kg 용량에서 체중감소 등의 어떠한 부작용도 관찰되지 않았다.

2. Acyclovir가 감염조직내 바이러스 증식에 미치는 효과

마우스의 감염조직내 바이러스 증식에 미치는 ACV의 약효를 평가하기 위하여 비강감염 또는

Table 2. Virus titers of the various tissues isolated from the mice infected with HSV-1 intranasally

Tissues isolated	Day post infection					
	0	1	2	3	4	5
Cerebrum	0	30	0	0	150	45
Cerebellum	0	5	0	0	50	1,400
Brain stem	0	0	15	210	43,500	50,000
Spinal cords	0	0	0	10	7,000	10,000
Trigeminal nerves	0	5	6,000	100,000	60,000	39,000
Eyes	0	0	0	31,000	180,000	600,000
Olfactory bulbs	0	0	600	30	3,400	22,000

(PFU/tissue)

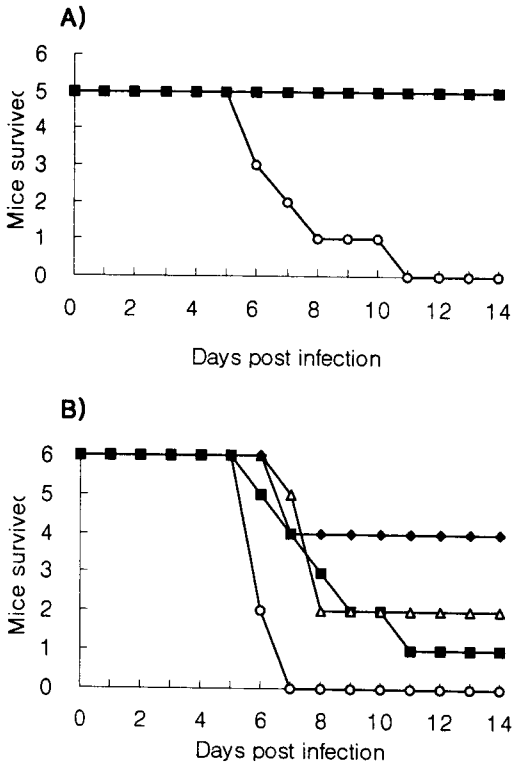


Figure 1. Effect of acyclovir (ACV) doses on the survival of HSV-1-infected mice.

a) Intranasal infection, b) intracerebral infection ○, ACV 0; ■, 5; △, 10; ◆, 25 mg/kg, b.i.d.

대뇌감염된 마우스를 감염직후부터 용량 0, 5, 10, 25 mg/kg로 복강투여를 시작하여 하루 두 번 6 일

간 투여하고, 감염직후부터 6 일간 각 용량당 두 마리씩에서 대뇌, 소뇌, 뇌간, 척수, 삼차신경, 눈 (눈동자와 눈물샘), 후구, 경추 부분의 척수 등을 적출하여 -70℃에 보관했다. 매일 한 마리씩 6 일 동안 적출된 조직들을 한 조로 구성하여 2 조로 나눈 다음, 각 조에 속한 조직들의 바이러스 역가를 같은 날에 조사하였다. 재료 및 방법에 설명한 것 처럼 역가 조사 실험 직전에 조직을 분쇄하여 바이러스 중균액을 만들고 연속 희석한 다음 Vero세포에서 plaque형성법으로 조직의 바이러스 역가를 조사했다. 각 마우스의 질병진행 정도가 동일하지 않았지만, 비강감염 ACV 비투여군의 경우 이틀째부터 삼차신경과 뇌간 및 후구에서 바이러스 증식이 관찰되어 4 일 또는 5 일째 최고가 되었으며, 눈과 척수에서 3 일 후부터 증식이 시작되어 4~5 일째 최고에 달함을 확인할 수 있었다 (Table 2). 대뇌와 소뇌에서는 4 일부터 감지되었다. 바이러스 증식이 활발히 일어나는 조직은 삼차신경과 눈과 뇌간 등임을 알 수 있었는데, 5 일 후 눈에서 최고 6×10^5 PFU가 관찰되었다. 척수와 후구에서는 중간정도, 대뇌와 소뇌에서는 낮은 역가를 나타냈다. ACV 투여군의 경우 3 일 후부터 바이러스가 증식하기 시작하였고, 각 용량에서의 약물투여 효과가 뚜렷하지 않았던 대뇌나 소뇌를 제외하고는 대부분의 조직에서, 또한 5 mg/kg에서도 뚜렷한 역가 감소가 관찰되었다. 매일 해부한 두 마리 중 한 마리의 마우스의 조직내 바이러스역가 변화를 Figure 2에 표시했다. 삼차신경, 눈 및 척수에서의 약효는 25 mg/kg

이종교 등: HSV-1 Mouse Encephalitis Model

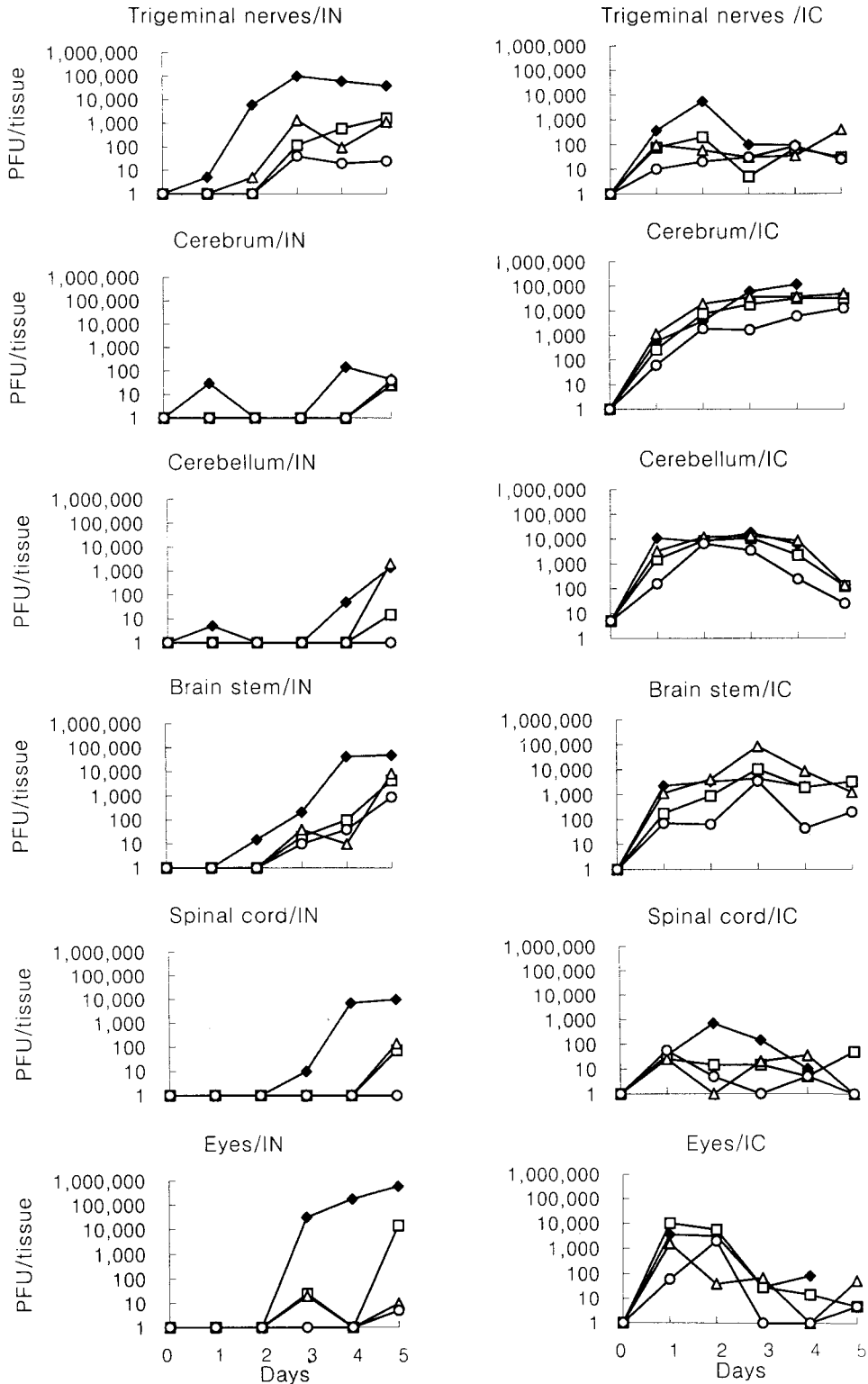


Figure 2. Effect of acyclovir (ACV) doses on virus titers of various tissues isolated from the mice infected with HSV-1 intranasally (IN) or intracerebrally (IC). ◆, ACV 0; □, 5; △, 10; ○, 25 mg/kg, b.i.d.

Table 3. Virus titers of the various tissues isolated from the mice infected with HSV-1 intracerebrally

Tissues isolated	Day post infection				
	0	1	2	3	4
Cerebrum	0	550	3,850	60,000	120,000
Cerebellum	5	11,000	7,500	18,000	6,000
Brain stem	0	2,250	3,300	4,350	21,000
Spinal cords	0	35	700	145	10
Trigeminal nerves	0	360	5,500	100	95
Eyes	0	3,550	3,200	30	85
Olfactory bulbs	0	85	1,250	2,700	3,450

Table 4. Reactivation of virus from explanted trigeminal nerves isolated from the mice infected with HSV-1 intranasally or intracerebrally

Acyclovir (mg/kg, b.i.d.)	Reactivation			
	Intranasal		Intracerebral	
	Numbers	%	Numbers	%
0	16/16*	100*	7/10*	100*
5	5/5	100	1/1	100
10	5/5	100	2/2	100
25	5/5	100	4/4	100

*Accumulated data from several separate experiments

의 경우에서 특히 뚜렷했다. 대뇌감염 ACV 비투여군의 경우 감염 5 일 째는 모두 죽었기 때문에 4 일까지만 조직을 적출할 수 있었다. 매일 해부한 두 마리 중 한 마리의 마우스들의 조직내 바이러스 역가 변화를 Table 3에 표시했는데, 감염 직후 적출한 조직에서는 바이러스의 증식이 전혀 확인되지 않다가 하루 뒤에는 모든 조직에서 바이러스가 확인되었다. 대뇌, 소뇌, 뇌간에서 증식이 활발하여 4 일까지 역가가 계속 증가하였으며 대뇌에서 최고 1.2×10^5 PFU가 관찰되었으며, 눈과 삼차신경 등의 역가는 높지도 않았고 2~3 일까지 증가하다가 감소되는 것을 알 수 있었다. 간, 심장, 지라 및 허파 등에서는 바이러스가 검출되지 않았다 (성적제시 안함). 비투여군을 포함하여 ACV 투여군 중 매일 해부한 두 마리 중 한 마리의 조직내 바이러스 역가 변화를 Figure 2에 표시했다. 약물이 투여된 군에서의 바이러스

역가는 대뇌나 소뇌처럼 바이러스 증식이 활발한 조직에서는 비투여군과 뚜렷한 차이가 없었으며, 삼차신경이나 척수 등 바이러스 역가가 비교적 낮은 조직에서 최고 용량인 ACV 25 mg/kg에서만 비교적 뚜렷한 약효를 나타냄을 알 수 있었다.

3. Acyclovir가 재활성에 미치는 효과

바이러스 감염으로부터 살아남은 마우스들을 감염 30 일 후에 좌우의 삼차신경을 적출하였다. 적출된 조직을 DME/2% FBS액에 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 배양하여, 잠복감염된 바이러스가 재활성화 되도록 유도하였다. 배양 5 일 후 조직을 분쇄하여 Vero세포에 감염시키고, 매일 현미경 관찰을 통하여 바이러스 감염에 의한 CPE 여부를 조사했다. ACV가 투여된 마우스들 중 살아 남은 마우스 모두를 조사했는데 분쇄된 적출조직물이 Vero세포로 옮겨진지 9 일부터 CPE를 나타낸 비강감염 10 mg/kg ACV 투여군에서의 한 마리를 제외하고는, 모든 경우에 이틀 후에 CPE가 관찰되었고 3 일째는 100% CPE가 관찰되었다 (Table 4). 비강감염 또는 대뇌감염된 마우스들 중 ACV 비투여군은 모두 죽었기에, 재활성화를 함께 조사하지 못했지만, 별도로 수행된 여러 실험결과를 종합하면, 비강감염된 ACV 비투여군의 재활성은 16 마리 중 16 마리 (100%), 대뇌감염된 비투여군의 재활성은 10 마리 중 7 마리 (70%)였으며, ACV 투여군의 결과와 같이 Vero세포에 감염 2 일 후부터 CPE가 관찰되었고 3 일째에는 100% CPE가 관찰되었다. 이로써 비강 또는 대뇌감염된 마우스에 ACV 하루 2 번 복용투여로는 최고 투여용량인 25 mg/kg까지 바이러스의 잠복감염

예방이나 감소에는 전혀 효과가 없음을 알 수 있었다.

고 찰

HSV-1을 마우스에 감염시킨 다음 임상적 변화와 함께 실제로 감염된 동물체내에서의 바이러스 증식을 관찰하여 발병기전을 연구하고, ACV의 치료효과를 조사하는 것이 연구목적이었다. 일반적으로 감염에 이용되는 바이러스 균주의 종류, 접종량, 접종부위, 감염모델, 동물의 주령과 체중 및 성별 등의 요인에 따라 바이러스의 발병기전에 큰 차이가 있을 수 있으며, 약물투여 시작 시간과 투여기간과 용량 및 용법 등에 따라서 약효에도 큰 차이가 날 수가 있다. 여러 종류의 HSV-1 동물 감염모델 중 뇌염모델을 선정하였는데, 이는 적정 접종량으로 감염된 동물군을 100% 사망율로 이끌 수 있어 약효평가가 용이하고, 중추신경계에 침입하여 뇌염을 일으키기 때문에 바이러스 증식을 조사하기가 비교적 용이하기 때문이다. 마우스 뇌염모델을 위한 다양한 접종방법들 중에서 본 연구에서는 비강감염법과 대뇌감염법을 이용하였는데, 균주 F가 이용될 수 있음이 확인되었다. 비강감염은 비교적 높은 접종량으로만 100% 발병을 유발할 수 있고 마취를 시켜야 한다는 단점이 있으나, 본 연구결과에서 본 바와 같이 질병진행이 비교적 더디고, 약물의 약효가 증세 완화나 바이러스 증식 측면에서 좀 더 뚜렷이 관찰할 수 있다는 장점이 있다. 마취가 필요없이 낮은 접종량으로 100% 발병을 유발할 수 있는 대뇌감염법은 약물의 약효를 뚜렷이 관찰하기가 어렵고, 바이러스 접종량이 조금만 더 높을 경우에 평가할 수 없다는 단점이 있는데 [18], 이는 본 연구결과와도 일치한다. 복강감염법도 뇌염모델 중 하나인데 [15,16], 본 연구에 이용된 F 균주로 감염시킬 경우 마우스 체중에 따라 감염증세가 크게 차이가 나기에 사용에서 배제하였다. 즉, 10 g 미만의 저체중 마우스에서만 100% 사망이 관찰되고 고체중일 경우 증세가 나타나지 않을 경우가 많았다 (성적제시 안함). 마우스 각 개체마다 감염 진행사항이 다르겠지만, 감염된 마우스들의 체중 및 증세 변화와 조직내 역가 변화를 보면, 비강감염의 경우 대뇌감염보다 질병의 진행이 하루나 이틀정도 늦게 진행됨이 관찰되었는데, 비강감염의 경우 감염부위인 호흡기관 상피

세포에서의 증식한 다음 중추신경계로 진입하는데 시간이 걸리며, 대뇌감염의 경우 바이러스 증식이 확인되는 기간이 하루 밖에 걸리지 않는 것으로 보아 바이러스가 접종된 직후부터 증식을 시작했음을 알 수 있었다. 실제로 접종부위에 따라 바이러스 증식이 보다 활발히 일어나는 조직이 다름을 확인했는데, 접종위치에서 가까운 조직들이 바이러스에 의해 먼저 감염되어 증세와 연결되기 때문일 것이다. 예로서 비강감염의 경우 대뇌감염과 달리 보통 감염 4 일 후부터 눈에 염증이 외형적으로 관찰되기 시작하고, 이 때 눈 조직의 바이러스의 역가도 높아짐을 확인할 수 있었다. 대뇌감염의 경우 눈의 염증은 보통 관찰되지 않았고 실제로 눈 조직에서의 바이러스 역가도 높지 않았으며, 그나마 3 일 이후 부터는 줄어드는 것이 관찰되었다.

ACV는 경구 흡수율이 매우 낮고 혈중농도를 오래 유지하지 못하기 때문에 약물의 용량 및 용법이 약효에 큰 영향을 준다 [5,10,25]. 복강투여된 BALB/c 마우스에서의 ACV의 혈중 최고 농도는 1 시간 안에 도달한 다음 급격히 감소하기 시작하여 4 시간 후면 거의 검출되지 않았다 (성적제시 안함). 본 연구에서 가능한 정확히 12 시간 간격으로 약물을 투여했지만, 바이러스를 저해할 수 있는 혈중농도를 지속적으로 유지할 수 없고, 활발한 바이러스 증식이 시작된 경우 충분한 약효를 나타내기에는 더욱 부적합한 투여횟수일 수도 있었을 것이다. 이런 문제를 보완하기 위하여 ACV의 prodrug인 valaciclovir와 같이 경구흡수율이 높은 약물을 물에 녹여 물병 속에 넣어 24 시간 복용이 가능하도록 하여 약효를 평가하기도 한다 [11]. 바이러스 감염 후 약물투여 시작 시간에 따라 약효가 달라지는데 감염 하루 후에 시작하면 약효가 거의 관찰되지 않는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 감염 10 분 후부터 투여를 시작하여 약효는 관찰되었지만 잠복감염 자체를 저해하지도 못하고 바이러스 재활성을 늦추거나 약화시키지도 못한 것이 확인되었다. 앞으로 조직역가 검사일을 좀 더 연장하고, 약물의 체내 농도 및 유지시간 및 활성화 정도와 함께 면역학적 측면에서도 조사되어야만 보다 정확한 약효 및 바이러스 증식 저해기작이 이해될 것으로 사료된다.

결 론

HSV-1에 대한 ACV의 항바이러스효과를 조사하기 위하여 마우스 뇌염모델중 비강감염과 대뇌감염 모델을 이용하였다. 군당 5~6 마리씩 5 주령의 BALB/c 암컷을 바이러스로 감염시킨 다음 ACV를 0, 5, 10, 25 mg/kg으로 감염직후부터 하루 2 회씩 6 일간 복강투여하고 2 주간 증세를, 처음 6 일간의 감염조직내 바이러스 역가를 관찰했다. 비강감염의 경우 ACV 비투여군은 100% 사망을 및 사망한 마우스의 평균 생존일은 7.6 일을 나타냈는데, 투여군은 모두 살아남아 생존율로 본 ACV의 ED₅₀는 <5 mg/kg이었다. 대뇌감염모델의 경우 비투여군의 경우 100% 사망 및 평균 생존일 6.3 일이었으며, 투여군은 5, 10, 25 mg/kg 순으로 각각 83%와 8.2 일, 67%와 7.8 일, 33%와 7.0 일을 나타내었다. 생존율로 본 ACV의 ED₅₀는 14.1 mg/kg이었다. 비강감염의 경우 투여량이 높을수록 증세도 크게 완화되었지만, 대뇌감염의 각 투여군 모두에서 체중감소, 눈 질환, 털 및 체형변화 등의 외형상의 증세가 관찰되어 약효가 거의 관찰되지 않았다. 두 모델의 각 mock감염군의 경우 어떠한 약물의 부작용도 관찰되지 않았다. 비강감염된 동물조직내 바이러스 역가는 감염 3 일부터 높아지기 시작하여 5 일에 최고의 역가를 나타냈다. 삼차신경, 눈, 뇌간, 후구에서 높은 바이러스 역가를 나타냈고 대뇌, 소뇌, 척수는 상대적으로 낮았다. 약물의 투여 효과는 최저 투여량에서도 뚜렷하게 관찰되었다. 대뇌감염된 동물조직내 바이러스 역가는 감염 하루 후부터 높아지기 시작하여 죽기전인 3~4 일까지 증가하였다. 대뇌, 소뇌, 뇌간에서 높은 바이러스 역가를 나타냈고 삼차신경, 척수, 눈, 후구는 상대적으로 낮았다. 약물의 투여 효과는 25 mg/kg 용량을 제외하고는 뚜렷하지 않았다. ACV 투여가 잠복감염을 저해하였는지를 확인하기 위하여 적출된 삼차신경에서의 바이러스 재활성을 Vero세포에서 조사했는데, 비강 또는 대뇌감염된 모든 약물투여군에서 100% 재활성이 관찰되었다. 결론적으로 ACV의 치료효과는 비강감염 모델이 대뇌감염 경우보다 사망률과 증세완화 및 조직내 바이러스 증식저해 측면에서 훨씬 더 뚜렷했지만, 두 경우 모두 잠복감염은 막지 못하는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술연구개발사업의 일환으로 1997년도 용역사업인 HMP-97-D-5-0031 연구과제의 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다. Acyclovir 주사제를 제공해 주신 삼천리제약에도 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Collins P, Oliver NM: Comparison of the in vitro and in vivo antiherpesvirus activities of the acyclic nucleosides, acyclovir and BWB759U. *Antiviral Res* 5: 145-156, 1985.
- 2) De Clercq E: Trends in the development of new antiviral agents for the chemotherapy of infections caused by herpesviruses and retroviruses. *Rev Medical Virol* 5: 149-164, 1995.
- 3) De Clercq E: In search of a selective antiviral chemotherapy. *Clin Microbiol Rev* 10: 674-693, 1997.
- 4) De Clercq E, Luczac M: Intranasal challenge of mice with herpes simplex virus: an experimental model for the evaluation of efficacy of antiviral drugs. *J Infect Dis* 133: A226-A236, 1976.
- 5) De Miranda P, Good SS: Species differences in the metabolism and disposition of antiviral nucleoside analogues: Acyclovir. *Antiviral Chem and Chemother* 3(1): 1-8, 1992.
- 6) Elion GB: The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *J Antimicrob Chemother* 12(suuppl B): 9-17, 1983.
- 7) Elion GB, Furman PA, Fyfe JA, De Miranda P, Beauchamp L, Schaeffer HJ: Selectivity of action of an antiherpetic agents, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5716-5720, 1977.
- 8) Field AK, KK Biron: "The end of innocence" revisited: resistance of herpesviruses to antiviral drugs. *Clinical Microb Rev* 7: 1-13, 1994.
- 9) Field HJ, Darby G, Wildy P: Isolation and characterization of acyclovir-resistant mutants of herpes simplex virus. *J Gen Virol* 49: 115-124, 1980.
- 10) Furman PA, De Miranda P, St. Clair MH,

- Elion GB:** Metabolism of acyclovir in virus-infected and uninfected cells. *Antimicrob Chem Chemother* **20**: 518-524, 1981.
- 11) **Gold SE, Boyd MR, Field HJ:** Effects of penciclovir and famciclovir in a murine model of encephalitis induced by intranasal inoculation of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Chem Chemother* **3**: 37-47, 1992.
 - 12) **Hsiung GD, Chan VF:** Evaluation of new antiviral agents: II. the use of animal models. *Antiviral Res* **12**: 239-258, 1989.
 - 13) **Kern ER:** Animal models as assay systems for the development of antivirals. p. 149-172. In De Clercq E, Walker RT (Ed.), *Antiviral drug development*. Plenum Press, New York 1988.
 - 14) **Kern ER:** Preclinical evaluation of antiviral agents. p. 79-111. In Galasso GJ, Whitley RJ, Merigan TC (Ed.), *Antiviral agents and human viral diseases*. Lippincott-Raven Inc, New York, 1997.
 - 15) **Kern Er, Richards JT, Overall Jr JC, Glasgow LA:** Alteration of mortality and pathogenesis of three experimental herpesvirus hominis infections in mice with adenine arabinoside 5'-monophosphate, adenine arabinoside and phosphonoacetic acid. *Antimicrob Agents Chemother* **13**: 53-60, 1978.
 - 16) **Kuemel G, Kirchner H, Zawatsky R, Engler H, Schroder CH, Kaemer HC:** Experimental infection of inbred mice with herpes simplex virus. V. Investigations with a virus strain non-lethal after peritoneal infection. *J Gen Virol* **63**: 315-323, 1982.
 - 17) **Lee Chong-K, Kim Hae S:** The replicative cycle of HSV-1 and in vitro evaluation of antiviral agents. *J Kor Soc Virol* **22(2)**: 227-233, 1992.
 - 18) **Lee Chong-K, Kim Hae S:** Evaluation of anti-herpes simplex virus type 1 activity of acyclovir by using mouse intracerebral infection model. *J Kor Soc Virol* **28(1)**: 63-69, 1998.
 - 19) **Maggioncalda J, Mehta A, Su YH, Fraser NW, Block TM:** Correlation between herpes simplex virus type 1 rate of reactivation from latent infection and the number of infected neurons in trigeminal ganglia. *Virol* **225**: 72-81, 1996.
 - 20) **Reed LJ, Muench HA:** A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* **27**: 493-497, 1938.
 - 21) **Roizman B, Whitley RJ, Lopez C:** The human herpesviruses. Raven Press, 1993.
 - 22) **Sasadeusz JJ, Tufaro F, Safrin S, Schubert K, Hubinette MM, Cheung PK, Sacks SL:** Homopolymer mutational hot spots mediate herpes simplex virus resistance to acyclovir. *J Virol* **71**: 3872-3878, 1997.
 - 23) **Sawtell NM:** The probability of in vivo reactivation of herpes simplex virus type 1 increases with the number of latently infected neurons in the ganglia. *J Virol* **72**: 6888-6892, 1998.
 - 24) **Sawtell NM, Poon DK, Tansky CS, Thompson RL:** The latent herpes simplex virus type 1 genome copy number in individual neurons is virus strain specific and correlates with reactivation. *J Virol* **72**: 5343-5350, 1998.
 - 25) **Stahle L, Öerg B:** Pharmacokinetics and distribution over the blood brain barrier of two acyclic guanosine analogs in rats, studies by microdialysis. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 339-342, 1992.
 - 26) **Steiner I:** Human herpes viruses latent infection in the nervous system. *Immunol Rev* **152**: 157-173, 1996.
 - 27) **Sutton D, Kern ER:** Activity of famciclovir and penciclovir in HSV-infected animals: a review. *Antiviral Chem Chemother* **4(Suppl 1)**: 37-46, 1993.
 - 28) **Thompson RL, Sawtell NM:** The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene regulates the establishment of latency. *J Virol* **71**: 5432-5440, 1997.
 - 29) **Thompson RL, Stevens JG:** Biological characterization of a herpes simplex virus intertypic recombinant which is completely and specifically non-neurovirulent. *Virol* **131**: 171-179, 1983.