

1996~1998년 유고슬라비아에서 실시한 한탄바이러스 불활화 백신 (Hantavax™)의 면역효과에 대한 야외시험

세계보건기구 Hantavirus 연구협력센터; 아산생명과학연구소¹, Institute of Immunology and Virology "Torlak" Yugoslavia², 주) 녹십자 종합연구소³, 고려대학교 의과대학 내과⁴ 및 예방의학교실⁵

주용규¹ · Anna Gligic² · Snezana Tomanovic² · Boyana Bozovic²
Mirceta Obradovic² · 우영대¹ · 안창남³ · 김 훈³ · 장양석³
박승철⁴ · 김민자⁴ · 이은일⁵ · 이호왕^{1*}

=Abstract=

A Field Efficacy Trial of Inactivated Hantaan Virus Vaccine (Hantavax™) Against Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS) in the Endemic Areas of Yugoslavia from 1996 to 1998

Yong-Kyu Chu¹, Anna Gligic², Snezana Tomanovic², Boyana Bozovic²,
Mirceta Obradovic², Young-Dae Woo¹, Chang-Nam An³, Hun Kim³,
Yang-Seok Jiang³, Seung-Chul Park⁴, Min-Ja Kim⁴, Eunil Lee⁵
and Ho Wang Lee^{1*}

*WHO Collaborating Centre for Virus Reference and Research (Hantaviruses);
Asan Institute for Life Sciences¹, Institute of Immunology and Virology "Torlak"
Yugoslavia², Central Research Institute, Korea Green Cross Co.³,
Department of Internal Medicine⁴, Department of Preventive Medicine⁵,
College of Medicine, Korea University*

In Yugoslavia, hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) is one of the important national health problem, but no vaccine has been used to prevent HFRS. Since first HFRS case in 1952, sporadic cases of HFRS occurred every year and over 4,000 registered cases with 1~16% mortality so far. We performed a prospective, randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the effectiveness of Hantavax™ against HFRS in 3,900 healthy adults living in the endemic areas of Yugoslavia. 1,900 people were given 0.5 ml of Hantavax subcutaneously twice at one month interval and a booster shot at one year after. For controls other 2,000 healthy people were given 0.5 ml of physiological saline as a placebo. We investigated HFRS cases in both the vaccinated and nonvaccinated groups by monitoring the program for patient registration in the areas from 1996 to 1998, and the effect of vaccine was analyzed epidemiologically. No confirmed case of HFRS was observed among 1,900 Hantavax vaccinees, while 20 confirmed cases were observed among 2,000 nonvaccinated control group. There were no remarkable side effects among the vaccinees either locally or in general after inoculation of the vaccine. The

접수 : 1999년 6월 15일

*책임저자: 이호왕, 아산생명과학연구소, 서울시 송파구 풍납동 388-1 전화) 02-2224-4102, 팩스) 02-2224-4182
e-mail)hwlee@www.amc.seoul.kr

Hantavax vaccine showed statistically significant protective efficacy against HFRS among Yugoslavian people.

Key Words: HFRS, Hantaan virus vaccine, Field efficacy, Hantavirus

서 론

1982년 2월 일본 도쿄에서 개최된 세계보건기구 (WHO)회의에서 한국의 한국형출혈열 구 소련의 출혈성신우신염 (Hemorrhagic nephroso-nephritis), 스칸디나비아제국의 유행성신염 (Nephropathia epidemica), 중국 및 일본의 유행성출혈열 (Epidemic hemorrhagic fever), 등 비슷한 임상증상을 나타내는 이들 질병의 원인이 한탄바이러스 또는 항원적으로 이와 유사한 바이러스에 의하여 발생한다는 사실이 증명되어 이들 질병의 명칭을 신증후출혈열 (Hemorrhagic fever with renal syndrome: HFRS)로 통일하기로 하였다 [17]. 유럽과 아시아 대륙에서는 매년 약 20만명 이상의 신증후출혈열 환자가 발생하여 이중 3~10%가 사망하고 있다 [13]. 국내에서도 1994년까지 매년 1,200여명이 신증후출혈열로 입원 치료를 받아 왔지만 실제 환자 발생수는 더 많은 것으로 추측되어 왔다. 그러나 1995년 부터는 환자수가 700명 이하로 감소되고 있다. 국내에서 제2종 법정전염병으로 분류되어 있는 이 질환은 등줄쥐 및 집쥐 등이 배설하는 한탄바이러스와 서울바이러스가 원인이며, 감염된 보균동물의 배설물중에 있는 바이러스가 공기 중에 먼지와 함께 부유되면서 사람의 호흡기를 통하여 감염된다. 현재까지 이 질환에 대한 효과적인 특이 항바이러스 약제나 치료방법은 개발되지 못하였으므로, 주로 대증요법으로 치료하고 있다. 그러므로 우리 나라와 같은 신증후출혈열의 유행지역에서는 백신을 통한 예방법이 매우 절실하다.

1984년 세계보건기구는 일본 센다이에서 열린 신증후출혈열대책회의에서 본 질환의 예방차원에서 효과적인 백신개발을 최우선 과제로 권장한 바 있다. 국내에서 Lee 등은 1984년 신증후출혈열 환자혈청을 직접 Vero E6 세포에 접종하여 Hantaan virus ROK84/105주를 분리하였으며 이 바이러스를 생후 24시간 이내의 마우스의 뇌내에서 계대 배양하여, 면역원성이 탁월한 백신 생산용 균주를 얻었다 [10]. 1989년에는 젓먹이마우스의 뇌에서 대량 배양한 한탄바이러스를 유제화하여

에탄올-프로타민 설페이트법으로 처리하고 한외여과법과 초고속 원심법으로 바이러스항원을 순수 정제한 후 포르말린으로 불활화한 신증후출혈열 예방 백신 (한타박스)을 개발하였다 [8,10]. 현재까지 여러 연구자들에 의하여 동물실험과 사람을 대상으로 한 임상시험 결과 이 백신의 면역성 및 안전성이 인정되었고 [9,11,15,16], 부작용의 원인으로 항상 문제가 되어 온 myelin basic protein 함량은 기준치 이하임이 보고되었다 [7].

국내에서는 연간 발생하는 신증후출혈열 환자수가 많지 않고 지역도 광범위하여 적절한 야외 임상시험을 실시하기에 많은 어려운 점이 있었다. 더욱이 1991년부터는 예방접종이 실시되어 그동안 효율적인 야외임상시험이 한국에서는 시행하기 어렵게 되었다. 그로 인하여 포르말린 불활화 한타박스의 효능에 대한 의문이 제기되어, 1995년 예방접종 심의위원회에서는 한타박스의 백신효능을 검증하기 위한 시험 안을 제시하였고, 그에 따라 한타박스 백신의 효능을 검증하는 후향적 역학조사가 진행 중에 있다. 본 연구는 신증후출혈열 만연지역의 하나인 유고슬라비아에서 한탄바이러스 및 이와 유사한 바이러스에 의하여 신증후출혈열이 매년 발생하는 지방에 거주하는 3,900명의 건강한 성인을 대상으로 한타박스의 면역효과에 대한 야외실험을 1996~1998년의 3년에 걸쳐 실시하였다. 1,900명에게는 한타박스 백신을 2회의 기본접종과 1년 후 부스터 접종하고, 이에 대한 대조군 2,000명에게는 생리식염수를 백신대신 투여한 전향적 이중맹검 야외시험 연구를 통하여 한타박스의 예방효과를 확인하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 대상

피접종자는 건강한 유고슬라비아 성인으로서 신증후출혈열 다발지역인 유고슬라비아의 Cacak, Ivanjica, Pec 지역 그리고 Montenegro 공화국의 Plav 지역 (Figure 1)에 거주하는 주민 3,900명을 대상으로 하였고, 백신투여에 따른 신증후출혈열 발생을 접종군과 비접종군으로 나누어 비교하였



Figure 1. Hantavax vaccination sites for field efficacy trial against HFRS and HFRS endemic foci in Yugoslavia.

다. 이들은 농촌지역에 거주하는 성인이며 대부분의 직업은 농업이고, 성별은 Pec 지역의 경우 남녀 각각 반 정도 되었고; Cacak, Ivanjica 지역의 경우 남성이 거의 대부분이었으며; Plav 지역에서는 남녀의 비율이 4:1로서 전체 시험군에서 남성이 71%에 달하였다. 시험군의 연령별 분포를 보면 20세 이상의 성인 주민이 전체 시험군의 90%를 차지하였다 (Table 1). 한타박스를 투여한 1,900명의 백신 접종군과 백신대신 생리식염수를 접종한 대조군 주민 2,000명에 대한 선정은 유고슬라비아 보건성 산하의 보건소가 담당하는 지역을 무작위로 나누어 지역을 우선 선정하였고 각각의 동일 지역내에 거주하는 동일한 직업군을 대상으로 백신 접종군 또는 생리식염수를 투여받은 대조군으로 나누어 연구대상이 이루어 졌다. 이때

접종자들과 피접종자들은 백신을 투여받는 것인지 아닌지를 알 수 없도록 하는 이중맹검법을 사용하였다. 유고슬라비아에서의 백신투여는 국가 백신프로그램에 의해 수행되는 것이었기 때문에 임상시험 연구에서 요구되는 사전동의 (informed consent)는 받지 않았다.

백신 접종 후 항체양전율에 대한 조사는 125명의 자원자를 대상으로 이루어 졌고, 안전성 및 부작용에 대한 조사는 백신 투여자 1,900명 중 758명에 대한 직접면접조사를 통하여 실시하였다.

2. 방법

1) 백신 제조 및 역가시험

본 연구에 사용한 신증후출혈열 예방 백신은 주식회사 녹십자에서 1995년 생산한 한타박스

Table 1. Locations of Hantavax™ field efficacy trial in the Yugoslavia from 1996 to 1998 and age distribution of Hantavax vaccinee and placebo

Location	Group	Age							Total	Sex	
		7~14	15~19	20~29	30~39	40~49	50~59	>60		Male	Female
Pec	Hantavax	9	77	106	122	103	16	44	477	218	259
	Placebo	8	78	105	130	105	18	43	487	223	264
Cacak	Hantavax	0	0	28	78	63	8	0	177	171	6
	Placebo	0	0	30	79	64	8	0	181	173	8
Ivanjica	Hantavax	0	1	16	30	43	6	8	104	97	7
	Placebo	0	2	18	33	46	6	7	112	102	10
Plav	Hantavax	23	79	134	386	352	128	40	1142	862	280
	Placebo	26	87	151	403	366	142	45	1220	918	302
Total	Hantavax	32	157	284	616	561	158	92	1900	1348	552
Number	Placebo	34	167	304	645	581	174	95	2000	1416	584

(Lot no. 4007)로서 백신에 대한 자가시험 및 국립보건원에서 국가검정시험으로 생물학적 제제 기준 및 시험방법을 통과한 제품이었다. 백신은 생후 48시간 이내의 젖먹이 ICR 마우스의 뇌내에 한탄바이러스 ROK84-105주를 접종하고 뇌염 증세가 나타나기 시작한 마우스 뇌를 채취하여 0.01 M PBS로 20% 유제를 만들어 일본뇌염백신 제조방법을 개량한 방법으로 프로타민설페이트와 에탄올 등을 처리한 후 포르말린으로 불활화하여 제조되었다. 세계보건기구 신증후출혈열백신의 생산기준을 일본뇌염백신의 최소요구기준에 준한다는 지침에 따라 생산된 한타박스의 바이러스항원 함량은 백신 0.1 ml당 1,024 ELISA 항원단위이며, 보존제로 500 µg/ml의 aluminium hydroxide gel이 첨가되어 있다. 이 백신에 포함된 단백질 함량은 3 µg/ml (기준 125), 치메로살함량은 0.008 w/v% (기준 0.012)이었고 myelin basic protein의 함량은 0.05 ng/dose로서 AHFS Drug Information이나 PDR 등에서 기준으로 설정하고 있는 2 ng/dose 이하보다 훨씬 낮았으며 무균시험, 이상독성시험, 동정시험, 불활화시험 등에서 이상이 없는 것으로 확인되었다.

백신의 역가시험은 체중 약 350 g의 guinea pig 5마리를 1군으로 하여 제조한 한타박스 및 참조백신을 각각의 군에 접종하였다. 마리당 0.5 ml씩 10일 간격으로 3회 근육내에 주사하였다. 최종주사 10일 후에 모든 동물을 채혈하고, 각 군별로

혈청을 동량 취하여 4배 단계희석하고 200 PFU로 희석한 한탄바이러스와 동량 혼합하여 36±1℃에서 90분간 중화시킨 후 조직 배양용 페트리 디쉬 (60 mm)에 단층배양된 Vero-E6세포에 바이러스-혈청 혼합액을 0.4 ml/dish씩 접종하여 36±1℃ 5% CO₂ incubator에서 90분간 흡착 후 접종을 제거한 다음 1차 중층 한천배지를 가하여 36±1℃ 5% CO₂ incubator에서 7일간 배양 후 5% neutral red solution이 포함된 2차 중층 한천배지를 가한 다음 2일 내지 3일간 배양하였다. 형성된 바이러스 플라크 수는 바이러스 대조군 플라크 수와 비교하여 플라크 감소율을 계산한 후 플라크 수를 50% 감소시키는 혈청 배수의 역수로 각 혈청의 중화항체를 계산하였다. 본 시험에 사용된 한타박스의 guinea pig에서의 중화항체는 87이었다.

유고슬라비아에 보낸 동일한 백신 (Lot no. 4007)을 한타바이러스에 대한 항체음성인 아산생명과학연구소 직원 17명을 대상으로 한타박스를 한달 간격으로 2회에 걸쳐 접종한 한달후 채혈하여 항체양전율과 생성된 형광항체가 및 중화항체를 조사하였다. 16명 (94.1%)이 형광항체 양성 반응을 나타내었고 평균 형광항체가 297.4이었으며, 13명 (76.5%)이 중화항체 양성으로 평균 중화항체가 147.1이었다 (Table 2).

2) 접종방법

접종방법은 모든 성인 대상자의 외측상박부에

Table 2. Immune response of 17 vaccinees with Hantavax™ (lot no. 4007) on a month after basic vaccination in Korea

	IFA ^a	PRNT ^b
Total no. of positive/ total no. of tested	16/17 (94.1%)	13/17 (76.5%)
Geometric mean antibody titers	297.4	147.1

^a Immunofluorescent antibody assay, ^b Plaque reduction neutralization test

백신 0.5 ml를 피하주사한 후 접종 1개월 후에 같은 양을 2차 접종하였다. 그리고 백신 기본접종 13개월 후에 같은 양을 3차로 추가접종 하였다.

3) 채혈 및 면역학적 혈청검사

면역반응과 항체양전율을 관찰하기 위한 피접종자의 채혈은 백신 기본접종 직전, 1차접종 1개월 후, 2차접종 1개월 후와 1년 후 그리고 부스터 백신 접종 1개월 후 등 모두 5회에 걸쳐 실시하여 한탄바이러스에 대한 IgG항체를 형광항체법으로 측정하였다. 채혈된 가검물은 24시간 이내에 혈청을 분리하여 항체검사를 수행하기 전까지 -70℃에 보관하였다.

IgG항체의 측정은 표준화된 간접면역형광항체법을 사용하였으며 [12], 그 방법을 간략히 설명하면, 한탄바이러스 감염세포가 단층배양된 spot slide를 4℃로 냉각된 아세톤으로 10분간 고정하고 건조 후 각 well에 혈청희석액을 25 µl씩 넣어 37℃에서 30분간 반응시킨 다음 인산완충식염수로 3회 세척 후 건조하였다. 다음으로 FITC-conjugated anti-human IgG를 각 well에 25 µl씩 넣어 37℃에서 30분간 반응시킨 후 다시 인산완충식염수로 3회 세척하고 건조한 후 mounting media를 가하고 cover glass로 덮어 형광현미경으로 관찰하였다. 4회에 걸쳐 채혈하여 분리한 혈청을 1:32로 희석하여 사용하였으며, 한탄바이러스에 대한 항체 유무를 유고슬라비아 국립면역학 및 바이러스학 연구소에서 실시하였다.

4) 임상관찰

백신 피접종자에 대한 부작용은 접종 24시간 후부터 국소 또는 전신반응을 피접종자로부터 청취하여 기록한 후 임상관찰을 겸하였다. 관찰소견은 본 야외시험의 공동연구자인 유고슬라비아 학자들이 현지에서 이미 작성된 예방접종 임상기록표에 기록하여 부작용의 종류 및 발현빈도를 조사하였으며 부작용 발현자는 증상 소실 때까지 특별 관리를 하였다.

5) 환자확인

백신 접종 지역 내에서 백신 접종자 및 비접종자 중에서 발생한 신증후출혈열 환자 확인은 각 지역에서 보고되는 등록자료를 이용하였다. 신증후출혈열 환자의 확인 과정은 유고슬라비아 내 각 지역 보건소에서 신증후출혈열로 의심되는 임상증상을 나타낸 환자의 혈청을 유고슬라비아 국립면역학 및 바이러스학 연구소에 혈청검사를 의뢰하여 한탄바이러스에 대한 항체 유무를 간접형광항체법으로 진단하였다. 백신 투여군과 대조군 간의 환자 발생률의 차이는 비윤검정을 이용하여 통계적 차이를 검증하였다.

결 과

1. 백신 접종 후 항체양전율

건강한 유고슬라비아 성인 지원자를 대상으로 혈청검사를 우선 실시하여, 항체양성으로 판명되어진 사람은 백신 접종을 하지 않았다. 항체음성인 주민들을 대상으로 한타박스 0.5 ml를 0, 1, 13개월의 일정표에 따라 피하주사로 접종한 후 한탄바이러스에 대한 IgG항체양전율을 추적조사가 가능한 일부를 대상으로 하여 조사하였다. 1차접종 1개월 후에 52.9% (36/68), 2차접종 1개월 후에 86.3% (38/44)와 1년 후에 84.6% (33/39) 그리고 3차접종 1개월 후에 96.0% (24/25)을 나타내었다 (Table 3). 백신 접종을 받기 전과 백신 접종을 받을 때 마다 모두 채혈이 가능하였던 13명의 경우, 1차접종 1개월 후에 69.2% (9/13), 2차접종 1개월 후에 92.3% (12/13)와 1년 후에 84.6% (11/13) 그리고 3차접종 1개월 후에 92.3% (12/13)의 항체양전율을 나타내었다 (Table 4).

2. 안전성 및 부작용

백신 투여자 1,900명중, 758명을 대상으로 실시한 부작용 조사에서 국소적 부작용으로는 주사부위의 발적과 통증이 7명 (0.92%)에서, 소양증이

Table 3. Seroconversion rate of vaccinees by demonstration of IF antibodies to Hantaan virus after subcutaneous vaccination with Hantavax™ (lot no. 4007) in Yugoslavia

Group	Number of sera tested	Positive immune sera	Seroconversion rate (%)
0	125	0	0
I	68	36	52.9
II	44	38	86.3
III	39	33	84.6
IV	25	24	96.0

0: Sera before vaccination, I: First sera, one month after first vaccination, II: Second sera, one month after second vaccination, III: Third sera, one year after second vaccination, IV: Forth sera, one month after third vaccination

Table 4. Seroconversion rates of 13 vaccinees who have all five sera, by demonstration of IF antibodies to Hantaan virus after subcutaneous vaccination with Hantavax™ (lot no. 4007) in Yugoslavia

Group	Number of sera tested	Positive immune sera	Seroconversion rate (%)
0	13	0	0
I	13	9	69.2
II	13	12	92.3
III	13	11	84.6
IV	13	12	92.3

0: Sera before vaccination, I: First sera, one month after first vaccination, II: Second sera, one month after second vaccination, III: Third sera, one year after second vaccination, IV: Forth sera, one month after third vaccination

Table 5. Incidence of adverse reactions of 758 vaccinees after vaccination of 2 doses of Hantavax™ (lot no. 4007) in Yugoslavia, 1996

Symptoms and reactions	No. of reactions
Itching	5 (0.65%)
Pain and redness	7 (0.92%)
Exhausted	3 (0.39%)

5명 (0.65%)에서 관찰되었으나 일과성 증상이었다. 전신적인 부작용으로 피로감이 3명 (0.39%)에서 있었으며, 모두 1~3일 이내에 자동적으로 소실되었고 그외 우려할 만한 부작용은 관찰되지 않았다 (Table 5).

3. 야외임상시험에서 한타박스의 방어효과

신증후출혈열 다발지역인 유고슬라비아의 Ca-cak, Ivanjica, Pec 지역 그리고 Montenegro 공화국의 Plav 지역에 거주하는 건강한 성인 총 3,900명 (1,900명의 백신 접종군과 2,000명의 대조군)에 대

Table 6. Comparison of HFRS incidence among vaccinated and control group in Yugoslavia, 1996~1998

	Vaccinated group (n=1,900)	Control group (n=2,000)
No. of HFRS cases (Percentage)	0 (0%)	20 (1.0%)

p<0.0001 (by Z-test for proportion)

하여 신증후출혈열 환자의 발생유무를 환자 등록 자료에 의해 조사하였다. 백신 접종군 1,900명 중에서는 환자발생이 전혀 없었고, 백신대신 생리 식염수를 접종한 대조군 2,000명에서는 시험이 진행된 3년간 총 20명의 신증후출혈열 환자가 발생하였다 (Table 6). 이러한 비율은 통계적으로 유의한 차이를 보였다 (p<0.0001).

고 찰

이 연구를 할 수 있게 된 동기는 1995년 유고

내전 때 약 3,000여명의 신증후출혈열 환자가 내전에 관련된 당사국들과 유엔군에서 발생하여 세계의 이목을 집중시킨 바 있고, 내전당사국인 세르비아측은 유엔 결의에 의한 경제제재를 받아 몹시 어려운 입장에 처해 있었다. 그리하여 세계보건기구 신증후출혈열 연구협력센터인 본 아산 생명과학연구소는 유고슬라비아측의 요청에 따라 신증후출혈열 환자발생을 예방하기 위한 인도적인 차원으로 주) 녹십자로부터 우리 나라에서 사용중인 4000명 분의 한타박스를 1995년 11월 무료로 제공받아 본 논문의 저자인 이호왕 소장 과 주용규 박사가 직접 유고슬라비아측에 운반 공급하였으며, 유고슬라비아 학자들이 유고슬라비아 정부의 허가를 받아 직접 이 백신을 예방 목적으로 사용하였다.

구 유고슬라비아에서는 1952년 처음으로 신증후출혈열 환자가 보고된 이래, 임상적으로 경증 혹은 중증의 산발적인 유행성 질병의 형태로 매년 구 유고슬라비아 전역에서 발생해 왔다. 현재까지 4,000명 이상의 신증후출혈열 환자가 발생했고 치사율은 1~16%이었다 [5,6].

유고슬라비아 지역에서 한타바이러스 항체나 항원 또는 이들을 둘 다 지닌 설치류는 노란턱쥐 (*Apodemus flavicollis*, 46.5%), 들쥐 (*Apodemus sylvaticus*, 19.3%), 등줄쥐 (*Apodemus agrarius*, 15.6%), 유럽대륙밭쥐 (*Clethrionomys glareolus*, 57%), 생쥐 (*Mus musculus*, 48.2%), 집쥐 일명 시궁쥐 (*Rattus norvegicus*, 66.6%), *Pitimys subteraneous* (38.77%), 유라시아밭쥐 (*Microtus arvalis*, 50%)이며, 채집된 23종의 설치류 중 13종이 한타바이러스 항체나 항원을 보유하고 있음이 확인되었다 [4,6]. 발칸반도국가에서 발생하는 HFRS는 중증과 경증의 임상증세를 나타내는 두가지 형이 있으며 한탄, 푸말라, 서울 및 Belgrade바이러스들이 함께 공존하고 있는 것으로 조사되었다 [4,6].

1984년이래 2년간 수행된 연구에서 노란턱쥐 (*Apodemus flavicollis*)와 유럽대륙밭쥐 (*Clethrionomys glareolus*)에서 항원학적, 생물학적으로 구별되는 두 한타바이러스 즉 Fojnica와 Vranica 주가 각각의 들쥐로부터 분리되었다 [4]. 한탄 및 푸말라 바이러스와 유사한 바이러스들의 발견으로 구 유고슬라비아에서 이전에 혈청학적으로 보고된 결과 및 임상적으로 관찰된 중증과 경증의 HFRS가 공존한다는 사실이 증명되었다 [5,6]. Kraljevo 바이러스는 중증의 임상경과를 나타내는

HFRS 환자의 검체로부터 분리된 바이러스로 Fojnica나 한타바이러스와 유사한 바이러스로서 세르비아에서 치명적이고 심한 임상경과를 보이는 신증후출혈열의 원인임이 확인되었다 [3].

그러나 보스니아, 시베리아의 중남 지역, 마케도니아, 몬테네그로, 알바니아 등의 몇 HFRS 환자에서 분리된 바이러스들은 prototype 한타바이러스 strain들에 의한 전형적인 혈청반응에서 벗어난 새로운 양상을 보여 주었고 이러한 점은 과거와 현재에 유고슬라비아에서 병원성을 나타내는 새로운 한타바이러스의 존재 가능성을 뒷받침하였다 [6]. 중증의 HFRS 환자 3명 (1명 사망)의 혈액과 뇨로부터 분리한 Belgrade virus와 슬로베니아에서 채집한 설치류 (*Apodemus flavicollis*)로부터 분리된 Dobrava바이러스는 위의 추측을 입증하였다 [1,3]. Belgrade 바이러스에 감염된 환자의 발병양상은 폐수종, 쇼크, 위장의 hemorrhage와 신부전이다. Belgrade 바이러스에 감염된 환자는 Kraljevo (한탄) 바이러스에 의한 환자가 감염 후 2주내에 사망하는 것과 달리 발병후 3~4주경에 사망한다. Belgrade 바이러스에 감염된 환자는 신 기능이 서서히 개선되며, 폐수종의 시작은 폐가 급속히 악화되는 상태이다. 사망하는 환자는 보통 광범위한 폐수종과 출혈로 발병 후 3~4주경에 사망한다 [3].

1988년 유고슬라비아의 작은 도시의 외곽지역에서 4형제 (3~12세)가 신증후출혈열에 걸렸다. 감염된 모든 아이들은 발열, 위장출혈, makulopapular exantema, 림프선증, 간-비장증대를 보였고 고혈압 (170/130 mmHg)과 혈뇨가 있었으며, 둘은 혈뇨와 혈변을 나타냈다. 한명은 사망하였고 나머지 환자들은 형광항체법으로 서울바이러스에 대하여 높은 항체가 나타내 혈청학적으로 한타바이러스 감염임이 확인되었다. 혈청학적 확인에 이은 즉각적인 역학 연구에서 환자 발생지역에서 포획된 집쥐 (*Rattus norvegicus*) 모두에서 그리고 집생쥐 (*Mus musculus*)의 50%가 한타바이러스에 감염되어 있었다 [14]. 이 결과 최초로 유고슬라비아에서 서울바이러스의 감염을 확인하였다. 1994년 다른 저자들이 위의 결과를 검증하였고, 서울바이러스가 유고슬라비아에 유행하고 있으며 사람에서 한타바이러스 감염을 일으킴을 밝혔다 [2]. 지금까지의 자료에 근거하여 유고슬라비아에 존재하는 한타바이러스는 항원학적으로 비동질성을 지닌 4가지 바이러스들이 명백하다.

국내에서는 1990년을 전후하여 신증후출혈열에 대한 한타박스의 예방효과 및 안전성에 대한 임상연구 결과들이 보고된 바 있으며 그간의 보고에 의하면 백신을 0, 1개월의 일정에 따라 2회 접종하였을 때 각각 62%~81.5%, 96.1%~97%의 항체양성률을 나타내어 매우 효과적인 백신으로 보고되었다 [9,15,16]. 그러나 백신접종 후 인체 이증맹검에 의한 백신의 야외효과시험은 국내외적으로 시도하기에 그동안 많은 난관이 있었다. 따라서 저자들은 이점에 유의하여 1996년 한번도 백신을 사용한 적이 없는 유고슬라비아에서 야외효과시험을 할 수 있는 좋은 기회를 얻어 3년에 걸쳐 이 백신의 효과시험을 실험하게 되었다.

백신 투여군과 대조군에서의 환자발생을 비교하기 위해 환자 등록자료를 이용하였고 신증후출혈열 환자 여부를 혈청학적 검사를 통하여 확인하였다. 생리식염수를 접종한 2,000명의 대조군과의 비교에서 백신 투여군에는 단 한명의 환자도 발생하지 않았지만 대조군에서는 3년동안의 관찰기간 내 총 20명의 환자가 발생하여 두군간의 환자 발생률은 통계적으로 매우 유의한 결과를 보임으로써 한타박스 백신의 방어효과가 증명된 것으로 판단되었다. 그러나 모든 환자가 제대로 보고 되었는지, 혹은 백신 접종군과 대조군이 다른지역으로 이동하여 대상에서 빠질 가능성이 없는지에 대한 고려가 있어야 할 것이나 신증후출혈열 환자의 전형적인 임상증세와 유고슬라비아의 국가적인 환자 등록사업을 고려할 때 그 지역에 거주한다면 사실상 환자가 보고되지 않았을 가능성은 거의 없을 것으로 판단되었다. 단지 가벼운 증상으로 앓았을 경우 환자등록에서 누락되지만 환자등록에서 누락될 수 있지만 실제 환자 발생을 예방하는 백신의 효과를 검증하는 것에는 큰 문제가 없을 것으로 판단된다. 반면에 발생된 환자가 다른 지역으로 이주하여 환자로 등록되지 않은 경우 문제가 될 수 있다. 이러한 경우 분모와 분자가 함께 감소하고 분모에 비해 분자의 감소가 크므로 발생률은 크게 감소하게 된다. 따라서 조사 결과 나타난 백신 투여군과 대조군의 발생률은 실제보다 과소 평가되었을 가능성이 있다. 그러나 두군 사이의 발생률의 차이가 매우 크기 때문에 백신의 효과를 평가하는데 중대한 영향을 주지는 않았을 것으로 판단된다. 발생률의 분모에 해당되는 1,900명의 백신 투여군과 2,000명의 대조군은 일일이 추적되지 않았

으므로 실제 지역에 있는 숫자는 이보다 감소할 수 있으나 그 감소 정도를 알 수 없으므로 처음 조사 시점의 숫자를 그대로 사용하였다. 이것은 발생률을 과소평가하지 않음으로써 조사 결과에 심각한 영향을 미치지 않는다.

항체양전율은 1차접종후 1개월 째에 52.9%, 2차접종후 1개월 째에 86.3%의 항체양전율을 보여 한국에서 실시한 임상연구 결과보다 다소 낮은 항체양전율을 나타내었는데 이는 한국에서 시행한 검사에서는 cut off value를 1:16으로 하였으나 유고슬라비아의 경우 1:32로 했기 때문일 것으로 생각된다. 한탄바이러스 백신 접종시의 부작용으로는 미열, 근육통 등의 전신반응과 접종부위의 동통, 발적, 색소 침착 등의 국소 반응이 관찰되었고 이러한 부작용들은 접종 후 1~3일 이내에 소실되는 일과성 증상 뿐이었으며 우려할 만한 부작용이 없다는 기존의 임상보고 [9,11,15, 16]와 일치한다.

결론적으로 국내에서 자체 개발되어 널리 보급되고 있는 포르말린 불활화 신증후출혈열 백신인 한타박스의 방어면역효과를 평가하는 야외시험이 그동안 제한된 여건상의 문제로 수행되지 못하였으나, 본 연구에서 실시된 신증후출혈열 만연지역의 하나인 유고슬라비아에서의 이중맹검 야외 임상시험을 통하여 그 방어면역효과를 명백히 입증할 수 있었다.

결 론

본 연구는 신증후출혈열 만연지역이며, 이전에 신증후출혈열 백신이 투여된 적이 없는 유고슬라비아에서 특히 한탄바이러스 및 이와 유사한 바이러스가 유행하는 지방을 중심으로 건강한 성인에서 한타박스의 방어면역효과를 평가하기 위해 야외임상시험을 실시하였다. 유고슬라비아의 신증후출혈열 유행지역에 거주하는 건강한 성인을 무작위로 선정하여 한타바이러스 항체가 음성이고 면역장애 질환이 없는 1,900명에게 한타박스 ([주] 녹십자)를 0.5 ml씩 1개월 간격으로 2회 그리고 13개월 후에 1회 상부부 외측 피하에 주사하였고, 대조군으로 건강한 성인 2,000명에게 생리식염수를 0.5 ml씩 동일한 방법으로 주사한 후 백신이 접종된 후 1996년부터 1998년까지 3년간 신증후출혈열에 대한 방어효과를 관찰하였으며, 동시에 백신의 면역원성과 안전성을 평가하였다.

1. 한타박스 피접종자들에서 한탄바이러스 IgG 항체양전률은 1차 백신 접종 1개월 후에 52.9% (36/68), 2차 백신 접종 1개월 후에 86.3% (38/44), 2차 백신 접종 1년 후에 84.6% (33/39), 기본접종 일년 후의 추가접종 1개월 후에 96.0% (24/25)였다.

2. 한타박스 피접종자들에서 일과성 국소적 부작용 이외의 우려할 만한 부작용은 관찰되지 않았다.

3. 이중맹검 시험에 의한 백신의 방어효과는 1,900명의 백신 접종 군에서는 환자발생이 없었고, 백신대신 생리식염수를 접종 한 2,000명의 대조군에서는 3년간 총 20명의 환자가 발생함으로써 백신 접종군에서 유의한 방어효과를 보였다.

국내에서 개발된 포르말린 불활화 한탄바이러스 백신 (한타박스)의 신증후출혈열 다발생지역에서 시행된 전향적 이중맹검 야외시험을 통하여 백신의 방어효과를 명백하게 입증하였다.

참 고 문 헌

- 1) Avsic-Zupanc T, Xiao SY, Stojanovic R, Gligic A, van der Groen, LeDuc JW: Characterization of Dobrava virus; A hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *J Med Virol* **38**: 132-137, 1992.
- 2) Clement J, Mc Kenna P, Avsic-Zupanc T, Skinner CR: Rat-transmitted hantavirus disease in Sarajevo. *Lancet* **344**: 131, 1994.
- 3) Gligic A, Dimkovic N, Xiao SY: Belgrade virus; A new hantavirus causing severe hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia. *J Infect Dis* **166**: 113-120, 1992.
- 4) Gligic A, Frusic M, Obradovic M: Hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia; Antigenic characterization of hantaviruses isolated from *Apodemus flavicollis* and *Clethrionomys glareolus*. *Am J Trop Med Hyg* **41**: 109-115, 1989.
- 5) Gligic A, Obradovic M, Stojanovic R: Epidemic hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia, 1986. *Am J Trop Med Hyg* **41**: 102-108, 1989.
- 6) Gligic A, Stojanovic R, Obradovic M, Hlaca D, Dimkovic N, Diglisic G, Lukac V, Ler Z, Bogdanovic R, Antonijevic B, Ropac D, Avsic-Zupanc T, LeDuc JW, Ksiazek T, Yanagihara R, Gajdusek DC: Hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia; Epidemiological and epizootiological features of a nationwide outbreak in 1989. *European J Epidemiol* **8(6)**: 816-825, 1992.
- 7) Kim H, Jang YS, An CN, Kim HC, Lee HW: The quantitation of myelin basic protein using ELISA in the mouse brain derived vaccine; Hantavax™ and Japanese encephalitis vaccine. *J Kor Soc Microbiol* **30(5)**: 563-571, 1995.
- 8) Kim JH, Park SJ, Lee LJ, Shim HS, An CN, Shin KS, Lee HW: The influence of gelatin in the stability of an inactivated HFRS vaccine. *J Kor Soc Microbiol* **28(1)**: 37-41, 1993.
- 9) Lee CH, Byun KS, Kim WJ, Woo YD, Lee HW: Persistence of antibodies after immunization with inactivated vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome in humans. *J Kor Soc Virol* **22(2)**: 239-243, 1992.
- 10) Lee HW, An CN: Development of a vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Kor Soc Virol* **18**: 143-148, 1988.
- 11) Lee HW, An CN, Song JW, Baek LJ, Seo TJ, Park SC: Field trial of an inactivated vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome in humans. *Arch Virol [Suppl 1]*: 35-47, 1990.
- 12) Lee HW, Dalrymple JM: Manual of hemorrhagic fever with renal syndrome. pp75-106. Yeo-Mun Kak, Seoul, Korea, 1989.
- 13) Lee, HW, van der Groen, G: Hemorrhagic fever with renal syndrome. *Prog Med Virol* **36**: 62-102, 1989.
- 14) Peco-Antic A, Popovic-Rolovic M, Gligic A: Clinical characteristics of hemorrhagic fever with renal syndrome in children. *Ped Nephrol* **6**: 335-338, 1992.
- 15) Sohn YM, Oh KH, Kim CH, Shin SM, Lee SJ, Moon YB, Yang IS, Kim MR, Kim DH, Lee HR, Park CY: Safety and immunogenicity of a inactivated Hemorrhagic fever with renal syndrome vaccine (hantaan virus vaccine) in children with two different dose regimen;

- Changes of antibody response after 3 doses (0, 1, 13 months) vaccination. *J Kor Soc Chemo* **12(2)**: 138-144, 1994.
- 16) **Suh DJ, Lee MS, Woo YD, Lee HW**: A study of immunogenicity of an inactivated vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Kor Soc Virol* **22(2)**: 245-248, 1992.
- 17) **World Health Organization**: Regional Office for the Western Pacific. Report of the working group on haemorrhagic fever with renal syndrome. Tokyo Japan February 22, 1982.
-