大韓바이러스學會誌 : 第 30 卷 第 2 號 2000
J. Korean Soc. Virology, Vol. 30, No. 2, 2000

한국에서 분리된 유행성이하선염 바이러스 변이에 관한 연구

식품의약품안전청 생물학평가부 바이러스제제과, [2]세균제제과, [3]혈액제제과,
[1]국립독성연구소 독성부 특수독성과

민경일 · 김도근 · 조수열 · 안광수[1] · 민복순 · 김병국 · 반상자[2]
허숙진[3] · 박순희 · 이길웅*

=Abstract=

Study on Variation of Endemic Mumps Viruses in Korea

Kyung Il Min, Do Keun Kim, Soo Yeul Cho, Kwang Soo Ahn[1], Bok Soon Min, Byoung Guk Kim, Sang Ja Ban[2], Sook Jin Hur[3], Sue Nie Park and Kil Ung Lee*

Division of Viral Products, [2]Division of Bacterial Products, [3]Division of Blood Products, Biologics Evaluation Department, Korea Food and Drug Administration, [1]Division of Specific Toxicology, Toxicology Department, National Institute of Toxicological Research

We had isolated 8 viruses from 91 specimen collected at southwest Cheju Province during early spring 1998 and 2 viruses from 9 specimen collected at Chung Nam Province during early spring 1999. To perform cross-reactivity among 4 mumps vaccine strains and 10 wild-type mumps viruse isolates, we immunized mice and took antisera against each virus. There were no antibody titer differences by indirect immunofluorescence assay (IFA), but most isolated mumps viruses showed a little cross-reactivities with Jeryl Lynn and Rubini strains. It has shown similar result by haemagglutination-inhibition (HAI) test. These results show that 4 mumps strains used as vaccine have the protection ability against endemic wild-type mumps viruses.

Also the SH gene analysis was performed to identify genotypes. Most isolated mumps viruses belonged to genotype D. These results indicate that endemic mumps viruses in Korea are different to ones isolated in Japan and China.

Key Words: Mumps virus, SH gene, Genotype, Haemagglutination-inhibition (HAI)

서 론

유행성이하선염 바이러스 (mumps virus)는 *Paramyxoviridae* 과 (family), *Paramyxovirinae* 아속 (subfamily)의 *Rubulavirus* 속으로 분류되며 (23, 33), virion은 모양이 다양하고, particle의 크기는 100~600 nm 정도이며, 나선형의 구조에 외막을 가지고 있다. 게놈은 음극의 단일 가닥 RNA (negative ssRNA)로서 크기는 약 15.3 kb이다. 유행성이하선염 바이러스의 유전자 배열순서는 3' 말단으로부터 뉴클레오단백질 (NP), phospho (P) protein, membrane 또는 matrix (M) protein, fusion (F) protein, 두개의 glycoprotein인 hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein, Large (L) protein 유전자 순으로 배열하고 있으며, small hydrophobic (SH)

접수 : 2000년 3월 27일, 논문게재확정 : 2000년 7월 13일

*; Corresponding author: Kil Ung Lee, Division of Viral Products, Biologics Evaluation Department, Korea Food and Drug Administration (KFDA), 5 Nokbun-dong, Eunpyung-ku, Seoul 122-704, Korea Phone: 82-2-380-1748, Fax: 82-2-380-1750, E-mail: ung6255@kfda.go.kr

protein은 HN과 F 유전자 사이에 위치하고 있다.

유행성이하선염 (mumps)는 BC 5세기 전후 히포크라테스에 의해 처음 기록되었으며, 1개의 antigenic type으로 사람이 유행성이하선염 바이러스의 유일한 숙주이면서 병원소이다 (33).

유행성이하선염 바이러스는 호흡기 전염에 의한 감염으로 인후부와 국소 림프절 (regional lymph nodes)에서 증식하여 혈류로 침입하고 최종적으로 침샘과 다른 기관들에 영향을 미치며 최초 임상적인 진단이 가능한 침샘의 확장시기는 바이러스 감염 후 약 18일이 경과된 후가 된다. 잠복기는 14~24일 정도이며 전염성이 있는 기간은 그 후 9일까지 가능하고 바이러스는 질병이 시작한 후 14일까지 뇨로 배설된다 (33).

유행성이하선염 바이러스의 감염에 의한 증상은 근육통 (myalgia), 식욕부진 (anorexia), 불쾌감 (malaise), 두통 그리고 미열이다. 그리고 감염자들 중 30~40%가 한쪽 또는 양쪽 이하선염을 나타내나 20% 정도는 불현성 감염을 나타낸다. 남녀 감염 비율은 대략 3:1을 보인다. 보통 6~10세의 어린이들 질환으로서 계절적으로 봄에 주로 유행한다. 유행은 지역적으로 일어나지만 세계의 모든 지역에서 발생하고 있는 것으로 보고되고 있다. 이하선의 팽창은 48시간 후에 최대가 되고 대부분 7~10일간 팽창한 상태로 남게 되지만 체온의 변화는 거의 없다. 유행성이하선염 바이러스의 감염으로 인한 합병증으로는 감염 환자들 중 50~60%가 무증상 수막염이 발생되고, 환자 중 15% 정도는 수막염 증상을 보이고 3~10일 이내에 후유증 없이 회복된다. 뇌염 발생은 드물지만 (2/100,000명) 이들 중 생존자의 25%가 영구후유증이 발생된다. 또한, 유행성이하선염 바이러스의 감염으로 사춘기가 지난 성인 남성의 경우 20~50% 정도가 고환염 및 부고환염이 발생되고, 성인 여성의 경우 5% 정도에서 난소염이 유발된다. 기타 합병증으로는 췌장염 (2~5%), 귀머거리 (1/20,000명), 관절염 및 심근염 (현성 환자들 중 3~15%) 등이 있으며, 유행성이하선염 감염에 의한 사망률은 1~3.4/10,000명으로 보고되어져 있다 (33). 그리고 유행성이하선염 감염으로 인한 진성당뇨병에 대한 보고는 있으나 현재까지 확실한 결론은 없다 (27).

1934년 Johnson과 Goodpasture에 (15) 의해 유행성이하선염의 원인 바이러스가 동정되었으며 1945년 환아의 타액으로부터 계란의 양막강에서 처음 분리 보고된 후 포르말린으로 처리된 불활화 백신이 1948년 미국에서 허가를 취해 사용해 왔으나, 변성된 F 단백에 대한 항체만 생성하고 HN 단백에 대한 IgG 항체의 지속 기간 짧아 면역 지속 기간이 채 1년도 못 되어 1979년부터는 사용하고 있지 않으나, 현재 몇 나라의 군대에서는 사용하고 있다 (26). 1946년 Enders와 그의 동료가 계란에서 연속적인 유행성이하선염 바이러스의 계대로 원숭이에 약독을 보임을 알아냈고, 이를 바탕으로 1966년 Buynak과 Hilleman은 닭의 태아세포 배양에서 바이러스를 계대배양하여 처음 성공적인 약독화 생바이러스 백신을 개발하였다 (7). 또한, 구소련, 일본, 스위스에서도 약독화된 유행성이하선염 백신을 개발하여 사용해 오고 있다. 홍역, 유행성이하선염 및 풍진 혼합 생바이러스 (MMR) 백신이 1967년 허가를 취한 (7) 이후로 세계적으로 유행성이하선염 발생이 현저하게 감소하였으나, 일정한 주기성을 가지고 발병하고 있는 것으로 보고되고 있다 (2,20,30). 1974년 국내에 유행성이하선염 생바이러스 백신 예방접종이 실시된 이래로 국내 유행성이하선염 환자들의 현저히 감소하였으나, 1990년에 2천 1백 여건, 1994년에 2천 여건, 1998년에는 4천 4백 여건, 그리고 1999년 8월 현재 2천 3백여건의 환자가 보고되었다 (Figure 1).

이와 같이 유행성이하선염이 국내에서 대략 4년 주기로 크게 유행하고 있는 것이 현재 외국에서 분리되어 약독화된 백신주의 면역원성이 국내 유행성이하선염 바이러스를 충분히 방어하지 못하고 있을 가능성이 있다. 혹은 1997년까지는 면역계획이 12개월 이후 아동들에게 한번 면역하는 것으로 되어 있었기에 (6,10,16,29,32) 항체가가 낮아져 방어력의 약화로 유행성이하선염 질환에 걸릴 수도 있다. 따라서 이 가능성과 관련하여 본 연구에서는 국내에서 유행하는 유행성이하선염 바이러스를 분리하여 백신주와의 혈청학적 비교 및 유전자형 분석을 통해 변이도를 알아보고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 유행성이하선염 환자 가검물 채취 및 전처리

대상 환자는 1998년 4월 28일부터 31일 사이 제주도, 대정읍을 중심으로 임상적으로 유행성이하선염 환자로 진단된 91명의 환자와 1999년 4월 29

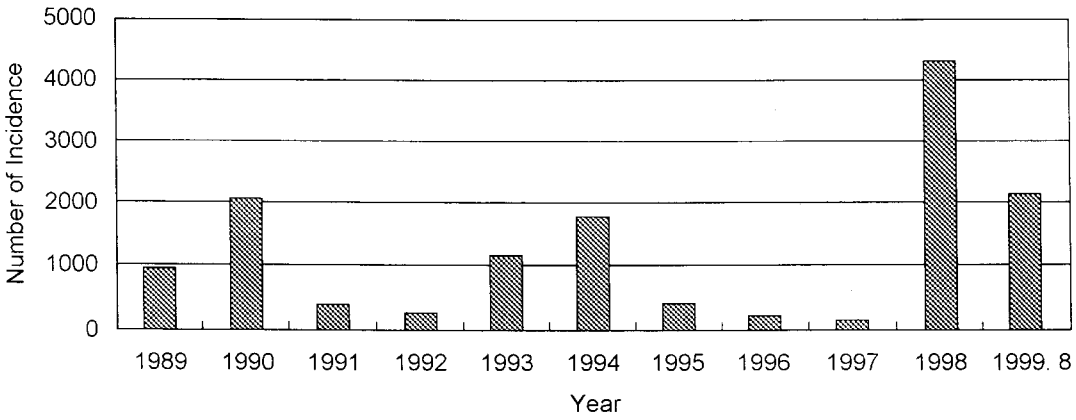

Figure 1. Annual incidence of mumps in Korea, 1994-99.

일과 30일에 충청북도 옥천과 충청남도 서천에서 유행성이하선염 환자로 추정되는 9명이었다. 총 100명의 환자로부터 인후분비물을 멸균된 면봉으로 도말채취한 후 소혈청알부민이 강화된 VTM 배지 (Earle's Minimum Essential Medium [EMEM, Gibco BRL, USA, 41500-034] supplemented with final 1% BSA, 2 ml/tube)에 넣어 냉장상태로 수송하여 세포접종전까지 -70℃에 보관하였다. 인후분비물의 대부분은 증상이 나타난지 1~3일 사이에 채취하였다. -70℃에 보관되어진 가검물을 흐르는 물에서 빠르게 녹이고 가검물 채취배지에 gentamycin을 최종적으로 250 μg/ml의 농도로 처리하고 냉장조건에서 3,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후 상청액만을 따로 옮겨 세포접종에 사용하였다 (1,11,28).

2. 유행성이하선염 바이러스 분리 및 동정

전처리되어진 가검물을 각각 100 μl씩 취하고 접종용 배지 (EMEM suppemented with 2% glucose, 0.2 μg/ml of crystalline trypsin [1:250])에 2×10^5 cells/ml의 농도로 현탁되어진 Vero (African green monkey kidney, ATCC CCL-81) 및 HEp-2 세포 (Human hepatocarcinoma, ATCC CCL-23) 100 μl와 함께 섞어 96 well cell culture plate (flat bottom)에 접종하였다.

34℃, 5% CO_2 배양기에서 7일간 배양하면서 세포병변 (cytopathic effect; cpe)이 나타나는지를 관찰한 후 3회 맹검계대배양 (blind passage)을 실시하여 최종적으로 세포병변이 관찰된 가검물만을 수확하였다.

세포배양을 통해 세포병변이 나타난 바이러스를 분리 동정하기 위해 anti-mumps serum (Denka Seiken, 410 706, Japan, 1:320/ml)을 항체역가가 1:32가 되도록 맞추어 처리하였다. 세포병변이 나타난 바이러스 배양액과 anti-mumps serum을 동량으로 혼합하여 암실조건 4℃에서 2시간 동안 충분히 중화반응을 시킨 후 Vero 세포 (2×10^5 cells/ml)와 동량으로 혼합하여 접종하였다. 그 중 세포병변이 나타나지 않은 바이러스 배양액을 유행성이하선염 바이러스로 확인하였다.

동정된 검체를 3회에 거친 플라크 형성시험을 수행하여 야생 유행성이하선염 바이러스를 순수분리하였다 또한 국내에서 사용중인 유행성이하선염 백신주를 순수분리하기 위해 시판중인 Trikovax (Korea Vaccine Co., Korea, TR9807-1), MMR-II (MSD, USA, W4380), MuMeRu Vax (KGCC, Korea, 1280047) 및 Triviraten Berna (Swiss Serum and Vaccine Institute, Switzerland, 147 680.124)로부터 각각 4종류의 Urabe Am9, Hoshino, Jeryl Lynn, Rubini strain을 야생 유행성이하선염 바이러스 분리와 동일한 방법으로 순수분리하였다 (11).

3. 유행성이하선염 바이러스의 정제

순수분리된 백신주 (Jeryl Lynn, Hoshino, Rubini 및 Urabe Am9)와 환자로부터 분리된 바이러스 (분리주 1, 4, 6, 13, 15, 72, 77, 243, 4A 및 8번)들을 Vero 세포에서 2회 증식시켜 discontinuous sucrose density gradient (20~60%)에서 정제 및 농축시켜 사용하기 전까지는 -70℃ 이하에 보관하였다.

Table 1. Origin of 10 wild-type mumps virus (MuV) isolates characterized in the study

MuV strain	Location	Date of onset	Age (years)	Sex	MMR vaccination	Specimen	Type of case	Genotype (SH)
Isolate #1/Kr98	Cheju-do	4/23/98	12	M	NK	Throat swab	Outbreak	A
Isolate #4/Kr98	Cheju-do	4/26/98	10	F	NK	Throat swab	Outbreak	D
Isolate #6/Kr98	Cheju-do	4/28/98	16	F	NK	Throat swab	Outbreak	D
Isolate #13/Kr98	Cheju-do	4/23/98	10	F	NK	Throat swab	Outbreak	D
Isolate #15/Kr98	Cheju-do	4/26/98	10	F	NK	Throat swab	Outbreak	D
Isolate #72/Kr98	Cheju-do	4/27/98	10	F	NK	Throat swab	Outbreak	D
Isolate #77/Kr98	Cheju-do	4/26/98	8	F	NK	Throat swab	Outbreak	D
Isolate #243/Kr98	Cheju-do	4/26/98	10	F	NK	Throat swab	Outbreak	D
Isolate #4A/Kr99	ChungNam-do	4/20/99	14	M	Yes	Throat swab	Outbreak	D
Isolate #8/Kr99	ChungNam-do	4/25/99	15	F	Yes	Throat swab	Outbreak	D

NOTE: SH, small hydrophobic; Kr, Korea; NK, not known; A and D, proposed genotypes

4. 유행성이하선염 바이러스 genomic RNA 분리 및 RT-PCR

각각의 분리 증식되어진 유행성이하선염 바이러스의 150 μl를 취하여 QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, USA, 29504)를 이용하여 각 바이러스당 최종적으로 50 μl의 genomic RNA를 분리하였다. 분리된 2 μl의 genomic RNA를 random hexamer (Gibco BRL, USA, 18418-012)와 cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Japan, 6120)를 이용하여 20 μl의 cDNA를 합성하였다. 유행성이하선염 바이러스의 SH 유전자를 얻기 위하여 Künkel 등 (20)이 고안한 primer (Forward: 5'-TCAACACAATATCAAGTA-3' (position 2964-2981), Reverse: 5'-TTCTGTGTT-GTATTGTGA-3' (position 3401-3418))로 94℃에서 5분간 반응시키고 94℃, 30초, 42℃, 30초, 72℃, 30초로 총 35 회 반응시킨 후 72℃에서 10분간 마지막으로 반응시킨 후 455 bp의 PCR 산물을 얻었다 (3,13,19,20).

5. 유행성이하선염 바이러스 염기서열 분석과 deduced 아미노산 서열 분석

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, USA)를 사용하여 제조사의 지침대로 반응액 20 μl당 Terminator Ready Reaction Mix 80 μl, 1 μM primer 3 μl와 30 ~100 ng template을 첨가하고 termal cycler로 25회 주기로 증폭하였다. 또한 결정된 염기서열 결과를 DNASTAR (Madison, WI, USA) 프로그램을 이용하여 결정된 염기서열을 비교 분석하였으며, deduced 아미노산 염기도 결정하고 이를 비교 분석하였다 (4,9,18).

6. 분리 증식된 유행성이하선염 바이러스 및 4종류의 백신주에 대한 항혈청 생산

분리 증식된 4종류의 백신주와 분리된 야생형 유행성이하선염 바이러스를 각각 바이러스의 역가가 2.5×10^3/ml이 되도록 하고, 바이러스 종류별 10마리 마우스 (ICR, outbred, 6주령)에 각각의 바이러스를 0.5 ml씩 복강내에 1주 간격으로 3회 면역하고, 최초 면역으로부터 총 4주가 경과한 후 채혈하여 혈청을 분리 수확하였다 (17).

7. 혈구응집억제 (Haemagglutination-inhibition, HAI) 시험용 혈청준비

각각의 바이러스에 대한 마우스 항혈청은 RDE (Receptor Destroying Enzyme, Denka Seiken, Japan, 420 302)을 1:3의 비율로 혼합하고 37℃ 항온수조에서 18시간 반응시킨 후, 56℃에서 1시간 열처리하여 RDE를 불활성화시키고 사용하였다.

8. 혈구응집억제시험용 항원준비

분리 정제되어져 -70℃ 이하에 보관되어진 바이러스를 흐르는 물에서 빨리 녹이고, 4℃ 냉장고

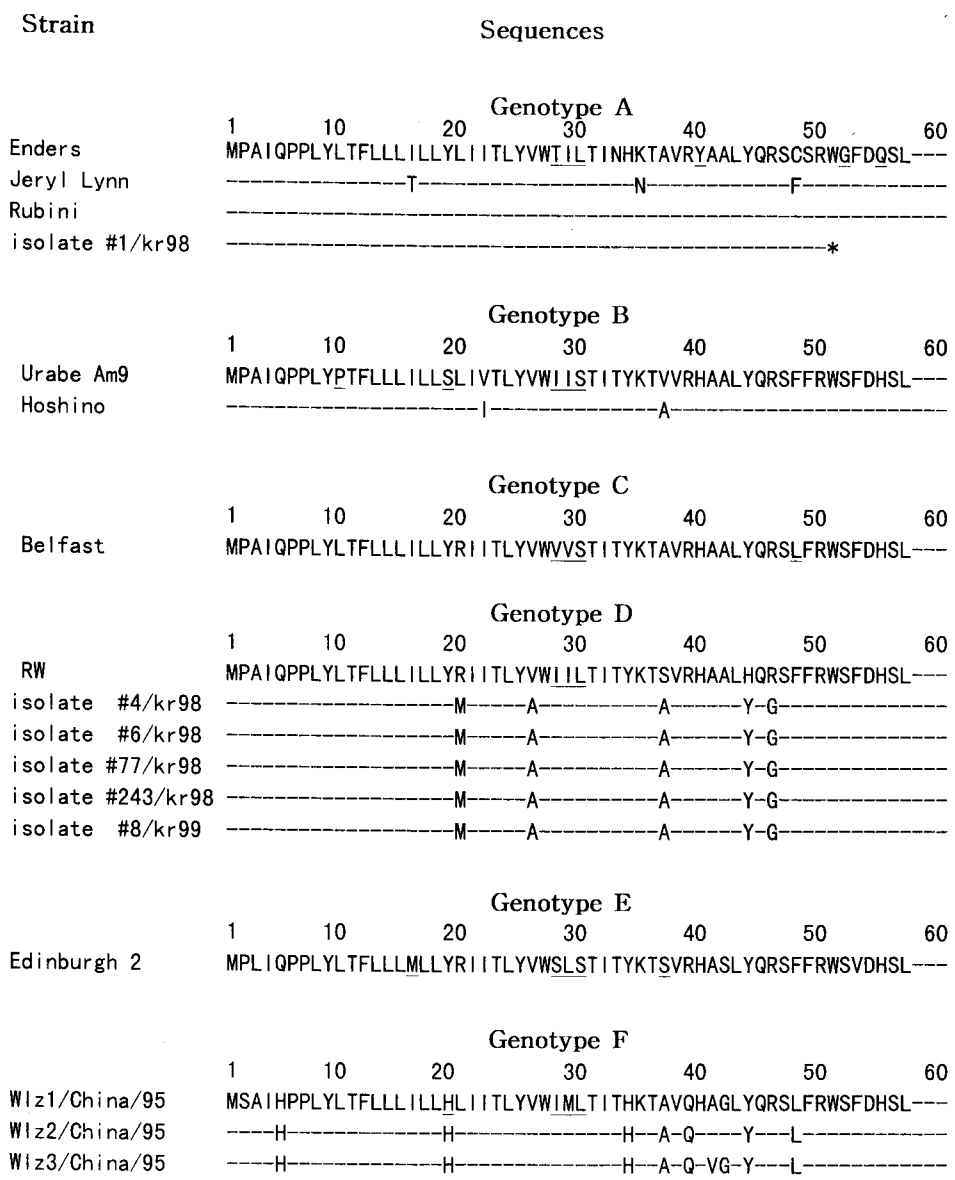

Figure 2. Alignment and comparision of deduced amino acid sequences of SH gene among vaccine strains and isolated mumps viruses. Identified signature amino acids are underlined. Isolates were sequenced during this study, the source of other sequences is reported eleswhere.

에 최소한 4시간 이상 방치한 후 HAI 시험에 사용하였다. 각각의 바이러스에 대한 HA (Haemagglutination) unit를 결정하기 위해 바이러스를 일회용 96 well plate (V-bottom, nontreated)에서 PBS (0.01 M sodium and potassium phosphate buffer, 2.7 mM potassium chloride, 0.137 M sodium chloride, pH 7.4) buffer로 2배씩 계단희석하고 여기에 다시 25 μl의 PBS buffer를 첨가한 후 1.0%의 guinea pig erythrocyte 용액 50 μl를 넣고 상온에서 30분간 반응시킨 후 바이러스의 HA unit를 결정하고 최종적으로 바이러스를 4 HA unit로 만들어 사용하였다 (22).

9. 혈구응집억제시험

일회용 96 well plate (V-bottom, nontreated)에서 25 μl씩 항혈청을 2배 계단희석하고, 4 HA unit로

Table 2. Sequence pair distances between mumps viruses based on the SH gene sequences

		Percent Similarity																
		END	RUB	JL	#1	URA	HO	RW	#4	#6	#77	#243	#8	ISLI	KEN	LON	BF	WLZ
Percent Divergence	END	***	100.0	97.7	99.4	86.4	86.9	88.7	86.4	86.4	86.4	86.4	86.4	85.9	86.4	85.9	86.4	88.1
	RUB	0.0	***	97.7	99.4	86.4	86.9	88.7	86.4	86.4	86.4	86.4	86.4	85.9	86.4	85.9	86.4	88.1
	JL	2.3	2.3	***	97.2	85.3	85.8	88.7	85.3	85.3	85.3	85.3	85.3	84.7	85.3	84.7	85.2	85.8
	#1	0.6	0.6	2.8	***	85.9	86.4	88.1	85.9	85.9	85.9	85.9	85.9	85.3	85.9	85.3	85.8	87.5
	URA	13.6	13.6	14.7	14.1	***	98.3	91.0	92.1	92.1	92.1	92.1	92.1	90.4	91.0	90.4	90.9	86.9
	HO	13.1	13.1	14.2	13.6	1.7	***	92.6	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	92.6	92.6	92.0	92.6	88.6
	RW	11.3	11.3	11.3	11.9	9.0	7.4	***	91.0	91.0	91.0	91.0	91.0	91.5	92.1	91.5	93.2	86.9
	#4	13.6	13.6	14.7	14.1	7.9	6.2	9.0	***	100.0	100.0	100.0	100.0	91.5	92.1	91.5	89.8	85.8
	#6	13.6	13.6	14.7	14.1	7.9	6.2	9.0	0.0	***	100.0	100.0	100.0	91.5	92.1	91.5	89.8	85.8
	#77	13.6	13.6	14.7	14.1	7.9	6.2	9.0	0.0	0.0	***	100.0	100.0	91.5	92.1	91.5	89.8	85.8
	#243	13.6	13.6	14.7	14.1	7.9	6.2	9.0	0.0	0.0	0.0	***	100.0	91.5	92.1	91.5	89.8	85.8
	#8	13.6	13.6	14.7	14.1	7.9	6.2	9.0	0.0	0.0	0.0	0.0	***	91.5	92.1	91.5	89.8	85.8
	ISLI	14.1	14.1	15.3	14.7	9.6	7.4	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	***	97.2	96.6	89.8	87.5
	KEN	13.6	13.6	14.7	14.1	9.0	7.4	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	2.8	***	98.3	89.8	87.5
	LON	14.1	14.1	15.3	14.7	9.6	8.0	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	3.4	1.7	***	89.2	86.9
	BF	13.6	13.6	14.8	14.2	9.1	7.4	6.8	10.2	10.2	10.2	10.2	10.2	10.2	10.2	10.8	***	84.7
	WLZ	11.9	11.9	14.2	12.5	13.1	14.2	14.2	14.2	14.2	14.2	14.2	14.2	12.5	12.5	13.1	15.3	***

NOTE: END, Enders; RUB, Rubini; JL, Jeryl Lynn B; URA, Urabe Am9; HO, Hoshino; #1, MuV isolate #1/Kr98; #4, MuV isolate #4/Kr98; #6, MuV isolate #6/Kr98; #77, MuV isolate #77/Kr98; #243, MuV isolate #243/Kr98; #8, MuV isolate #8/Kr99; ISLI, Islip1/UK97; KEN, Kent1-3/UK97; LON, Lon1/UK96; BF, Belfast; WLZ, Wlz1/China/95 (34)

맞추어진 바이러스를 동량 첨가 후 37℃에서 30분간 반응시킨 후 1.0%의 guinea pig erythrocyte 용액 50 μl를 넣고 상온에서 30분간 반응시킨 후 바이러스의 HAI 역가를 결정하였다 (5,22). PBS를 음성대조액으로 사용하여 최초 응집이 일어나는 희석 배수에서 음성대조액과 비교하여 반응집이 일어나는 경우는 희석 단계의 중간값을 HAI 역가로 결정하였다.

결 과

1. 유행성이하선염 바이러스 분리

1998년 총 91개의 가검물로부터 Vero 세포를 이용하여 가검물 번호 1, 4, 6, 13, 15, 66, 72, 77, 80, 84, 243이 세포병변을 나타냈으며, 3, 21, 242, 282, 283, 285, 286, 288, 289은 추가로 약한 세포병변을 나타내었다. 중화시험을 실시한 결과, 양성으로 나타난 분리번호로는 1, 4, 6, 13, 15, 72, 77, 243번이었으며, 분리번호 66, 84은 동정시험 결과 음성으로 판정하였다. 또한 1999년 총 9개의 가검물에서는 가검물 번호 4A와 8에서 2종류의 바이러스를 분리, 동정하였다 (Table 1). 한편 HEp-2 세포를 이용하여 바이러스 분리를 Vero 세포와 동시에 수행하였으나, HEp-2 세포에서는 세포병변이 나타난 가검물은 없었기에 숙주세포의 유래가 다른 경우 유행성이하선염 바이러스에 대한 감수성에서 많은 차이가 있음을 볼 수 있었다 (8).

2. 국내에서 분리된 유행성이하선염 바이러스의 염기서열 분석 및 특성

1998년 국내에서 분리된 유행성이하선염 바이러스의 SH (small hydrophobic) 유전자의 염기서열을 비교해 본 결과 Figure 2에서 볼 수 있듯이 분

Table 3. Sequence pair distances between mumps viruses based on the SH amino acid sequences

		Percent Similarity																
		END	RUB	JL	#1	URA	HO	RW	#4	#6	#77	#243	#8	ISLI	KEN	LON	BF	WLZ
Percent Divergence	END	***	100.0	94.6	98.2	76.8	80.4	80.4	80.4	80.4	80.4	80.4	80.4	78.6	80.4	85.9	80.4	78.6
	RUB	0.0	***	94.6	98.2	76.8	80.4	80.4	80.4	80.4	80.4	80.4	80.4	78.6	80.4	85.9	80.4	78.6
	JL	5.4	5.4	***	92.9	75.0	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	80.4	76.8	75.0
	#1	0.0	0.0	5.5	***	75.0	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	80.4	78.6	76.8
	URA	23.2	23.2	25.0	23.6	***	96.4	87.5	85.7	85.7	85.7	85.7	85.7	80.4	82.1	83.9	85.7	73.2
	HO	19.6	19.6	21.4	20.0	3.6	***	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	83.9	85.7	87.5	89.3	75.0
	RW	19.6	19.6	21.4	20.0	12.5	10.7	***	91.1	91.1	91.1	91.1	91.1	83.9	85.7	87.5	89.3	75.0
	#4	19.6	19.6	21.4	20.0	12.5	10.7	8.9	***	100.0	100.0	100.0	100.0	83.9	87.5	87.5	87.5	75.0
	#6	19.6	19.6	21.4	20.0	12.5	10.7	8.9	0.0	***	100.0	100.0	100.0	83.9	87.5	87.5	87.5	75.0
	#77	19.6	19.6	21.4	20.0	12.5	10.7	8.9	0.0	0.0	***	100.0	100.0	83.9	87.5	87.5	87.5	75.0
	#243	19.6	19.6	21.4	20.0	12.5	10.7	8.9	0.0	0.0	0.0	***	100.0	83.9	87.5	87.5	87.5	75.0
	#8	19.6	19.6	21.4	20.0	12.5	10.7	8.9	0.0	0.0	0.0	0.0	***	83.9	87.5	87.5	87.5	75.0
	ISLI	21.4	21.4	21.4	21.8	19.6	16.1	16.1	16.1	16.1	16.1	16.1	16.1	***	94.6	96.4	80.4	75.0
	KEN	19.6	19.6	21.4	20.0	17.9	14.3	14.3	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	5.4	***	98.2	82.1	76.8
	LON	17.9	17.9	19.6	18.2	16.1	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	3.6	1.8	***	83.9	78.6
	BF	19.6	19.6	23.2	20.0	14.3	10.7	10.7	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	19.6	17.9	16.1	***	75.0
	WLZ	21.4	21.4	25.0	21.8	26.8	23.2	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	23.2	21.4	25.0	***

NOTE: END, Enders; RUB, Rubini; JL, Jeryl Lynn B; URA, Urabe Am9; HO, Hoshino; #1, MuV isolate #1/Kr98; #4, MuV isolate #4/Kr98; #6, MuV isolate #6/Kr98; #77, MuV isolate #77/Kr98; #243, MuV isolate #243/Kr98; #8, MuV isolate #8/Kr99; ISLI, Islip1/UK97; KEN, Kent1-3/UK97; LON, Lon1/UK96; BF, Belfast; WLZ, Wlz1/China/95 (34)

리주 1번을 제외하고 나머지 4, 6, 13, 15, 72, 77 및 243번 모두는 동일한 아미노산 서열을 볼 수 있었다. 이는 동일 기간 중에 동일 지역을 중심으로 가검물을 채취하였기에 한 종류의 야생형 바이러스가 전파되었으리라 추정된다. 또한 1999년 충청남도 서천에서 분리된 분리주 4A와 8번도 1998년에 분리된 바이러스와 동일 아미노산 염기서열을 보였다. 분리주 1번은 C-말단 부위에 7개의 아미노산이 결손된 상태로 나타났으며 genotype A로 분류되었고 그 밖의 분리주들은 genotype D로 분류되었다.

분리주와 현재 우리나라에서 사용하고 있는 백신주 및 외국의 분리주의 SH 구조유전자를 비교·분석해 본 결과를 Table 2에 나타내었다. 분리주 1번은 genotype A에 속하는 백신주인 Jeryl Lynn 주, Rubini 주 및 Enders 주에 각각 97.2%, 99.4% 및 99.4%의 염기서열 유사성을 보인 반면에 genotype B에 속하는 백신주인 Urabe Am9 주 및 Hoshino 주에 대해서는 각각 85.9% 및 86.4%의 염기서열 유사성을 보였다 (12,24,25). 또한 분리주 1번의 SH 단백의 유도 아미노산 서열 비교에서도 genotype A에 속하는 백신주들과 높은 유사성을 보였다. 그러나 나머지 모든 분리주들은 백신주인 Jeryl Lynn 주, Rubini 주, Enders 주, Urabe Am9 주 및 Hoshino 주에 대하여 각각 78.6%, 80.4%, 80.4%, 85.7% 및 89.3%의 아미노산 서열 유사성을 보였고, genotype D의 prototype인 RW 주에 대해서는 91.1%의 아주 높은 아미노산 서열 유사성을 보였다. 반면에 1번을 제외한 나머지 분리주들은 RW 주에 대해서 91.0%의 염기서열 유사성을 보였고 오히려 다른 genotype인 Urabe Am9 주 및 Hoshino 주에 대해서 각각 92.1%, 93.8%의 염기서열 유사성을 보였다 (31,36) (Table 2, 3).

Table 4. Comparison of vaccine strains and wild type mumps isolates by HAI assay

Serum \ Virus	JL	HO	RUB	URA	#1	#4	#6	#13	#15	#72	#77	#243	#4A	#8
JL	**24**	16	12	24	12	12	12	12	16	16	12	6	16	24
HO	6	**16**	3	16	16	12	12	8	12	8	12	< 4	12	16
RUB	16	12	**24**	16-24	4	4	4-6	3	12	12	4-6	16	8-12	8-16
URA	24	16	8	**32**	24	32	32	16	24	16	24	8	24	32
#1	6	16	< 8	12	**8**	12	12	8	12	8	12	< 8	12	16
#4	12	16	8	32	16	**24**	24	32	32	24	24	8	24	32
#6	8	16	6	24	24	24	**24**	12	24	24	24	< 8	24	24
#13	8	8	6	24	24	24	16-24	**12**	16	16	16-24	< 8	24	24
#15	8	8	< 8	< 8	8	< 8	< 8	< 8	**< 8**	< 8	< 8	< 8	< 8	< 8
#72	8	8	< 8	16	12	12	12	8	8	**12**	12	< 8	12	12
#77	< 4	< 4	< 4	6	4	6	4-6	4	4	4-6	**4-6**	< 4	6	6
#243	< 4	< 4	4	3	4	3	6	3	< 4	3	< 4	**< 4**	3	4-6
#4A	12	16	8	32	12	16	32	16	16	24	24	6	**24**	24
#8	16	24	8	48	24	16	32	24	24	32	32	8	24	**32**
Ref	12	16	16	24	6	16	16	12	12	12	16	8	16	16
HA uint (/0.025 mL)	4	4	4	3	4	4	3	4	3	4	4	4	3	4

NOTE: JL, Jeryl Lynn strain; HO, Hoshino strain; RUB, Rubini strain; URA, Urabe Am9 strain; #1, MuV isolate #1/Kr98; #4, MuV isolate #4/Kr98; #6, MuV isolate #6/Kr98; #13, MuV isolate #13/Kr98; #15, MuV isolate #15/Kr98; #72, MuV isolate #72/Kr98; #77, MuV isolate #77/Kr98; #243, MuV isolate #243/Kr98; #4A, MuV isolate #4A/Kr99; #8, MuV isolate #8/Kr99; Ref, Commercial rabbit anti-Enders serum (Denka Seiken, Japan, 410 706)

3. 유행성이하선염 바이러스의 HAI 시험 결과

항원 바이러스의 HA unit를 4 HA unit로 맞추고 상호 HAI 역가를 시험한 결과는 Table 4와 같다. 분리주 15, 77 그리고 243에 대한 항혈청의 역가가 매우 낮아 시험 결과를 판독하기 어려웠으나, genotype A에 속하는 것으로 결정된 분리주 1번을 제외하고는 나머지 분리주들에 대한 항혈청은 공히 Hoshino와 Urabe Am9 주 항혈청에 대해 비슷한 HAI 역가를 보였으나, genotype A에 속하는 Jeryl Lynn 주에 대해서는 약간 낮은 HAI 역가를 보였으나 2배 희석범위내에 있었다. Rubini 주에 대한 HAI 역가는 다소 낮은 것으로 나타났다. 또한 Rubini 주에 대한 항혈청은 분리주 243번을 제외한 모든 분리주에 낮은 HAI 역가를 보였다 (Table 4).

고 찰

유행성이하선염은 젊은 성인층에서 발병하는 급성 질병으로서, 전세계적으로 지난 2세기 동안 유행이 있었다는 보고가 있다. 국내에서도, 1998년 4월을 전후하여 제주도 지역에서 유행성이하선염 환자들이 예년에 비해 급증하였고, 이 당시 유행성이하선염 유아 환자들로부터 검체를 채취하여 바이러스를 분리하였다. 총 91개의 유사 환자 검체로부터 10개의 바이러스가 분리되었고, 8개의 검체에서 유행성이하선염 바이러스로 동정되었다. 또한 1999년 충청남북도에서 9명의 환자의 인후가검물을 채취하여 이를 Vero 세포배양을 통해 2개의 유행성이하선염 바이러스를 분리 증식하였다. 최종적으로 플라크 형성실험을 통해 최종적으로 10개의 바이러스를 순수분리하였다. 분

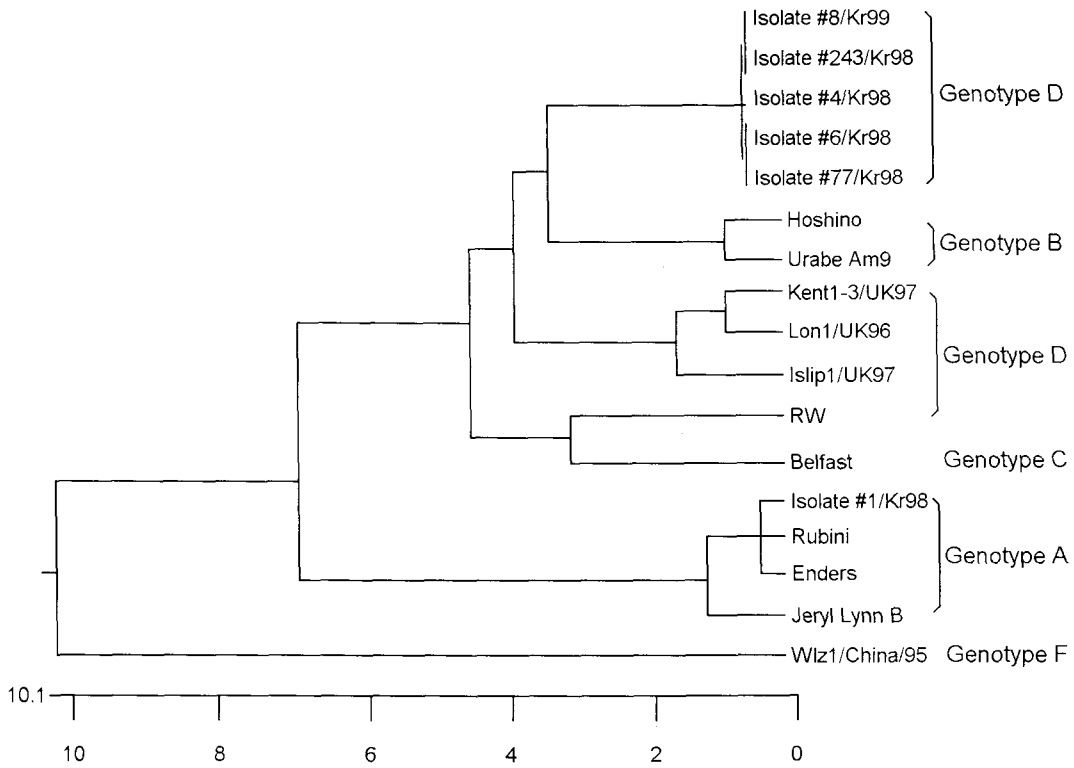

Figure 3. Phylogenetic relationships between mumps viruses based on the SH (small hydrophobic) gene sequences.

리 방법상 유행성이하선염 바이러스에 대하여 감수성이 있다고 알려진 세포인 Vero 세포와 HEp-2 세포를 사용하여 분리 시도를 하였는데, 분리된 바이러스 모두 Vero 세포에서만 분리되었으며, 이는 유행성이하선염 바이러스 분리에는 Vero 세포가 더욱 감수성이 있는 것으로 볼 수 있다. 한편, 분리된 바이러스의 기원인 환자들의 연령 분포나, 지역 분포상에 일관성은 찾아보기 힘들었다. 이는 분리된 바이러스가 적고, 유행 지역이 제주 지역에서도 국한적으로 일어났기 때문에 어떠한 연관성을 유추하기는 힘들지만 이후에 새로운 유행이 있어 조사된다면 본 연구가 기초 자료로 쓰일 수 있을 것이다.

분리 바이러스에 대한 혈청학적 연구로 간접형광항체시험 (indirect immunofluorescence assay, IFA)을 실시한 결과로서는 국내 분리주와 백신주의 유연 관계는 찾아보기 힘들었지만, 6번 분리주만 제외하고 대체적으로 미국과 유럽에서 유래한 백신주인 Jeryl Lynn 주나 Rubini 주보다는 일본에서 유래한 백신주인 Hoshino 주나 Urabe Am9 주쪽에 가까웠다 (1). 또한 HAI 시험을 실시한 결과 1998년에 보고된 IFA 결과와 유사한 시험 결과를 얻을 수 있었다. 10개 분리 유행성이하선염 바이러스 모두 genotype A에 속하는 백신주인 Jeryl Lynn 주와 Rubini 주에 대해서는 약한 HAI unit를 보였으며, 특히 Rubini 주에 대해서는 다소 낮은 HAI unit를 보였다. 따라서 병원소, 즉 환자로부터가 아닌 마우스로부터 얻어진 항혈청으로 수행한 IFA 및 HAI 시험만으로 완전한 평가를 가늠하기는 어려우나, 일본주와 국내 유행바이러스의 항원성이 유사한 것으로 나타났다. 국내 분리주에 대한 본 연구에서, 혈청학적으로 국내 유행주와 백신주와의 항원성 차이를 나타내고 있지만 높은 교차 반응이 일어나고 있는 점으로 보아 국내에 사용되는 백신주 4가지 모두가 국내 유행바이러스에 대한 방어력이 있음을 인정할 수 있다.

Örvell 등 (24)은 57개의 아미노산으로 구성된 SH 단백질 중 아미노산 서열의 차이를 보이는 28-30번의 아미노산 motif에 따라 genotype을 분류하는 체계를 설정하였다. 이에 따라서 국내 분

리주의 아미노산 서열 분석 결과 분리주 1번은 genotype A로 나머지 분리주들은 genotype D로 나타났다. genotype A와 D는 1970~80년대 유럽에서 분리된 바이러스 type으로 1990년대 중반 genotype B인 일본 분리주들과는 다르게 나타났다 (24,36). 또한 중국에서 1995년에 분리된 바이러스도 다른 genotype에 속하는 것으로 보고되어 있다 (34). 1998년과 1999년에 국내 유행 유행성이하선염 바이러스 대부분이 Table 2 및 3에서 볼 수 있듯이 아미노산 서열상으로는 영국에서 1997년에 유행하였던 genotype D와 높은 유사성을 보였으나 (14), 염기서열은 오히려 genotype B에 속하는 바이러스들과 높은 유사성을 보였다. Figure 3의 계통도상에 분리주들이 genotype B와 근접해 있는 이유가 염기서열의 유사성에 의해서 작성되었기 때문이다. 그러므로 2년이란 짧은 기간 동안의 연구 결과로써 결론을 내리기는 어렵지만 우리나라에서는 가까운 중국과 일본과는 다른 endemic mumps virus가 유행하는 것으로 추정할 수 있다.

마우스에서 백신주 및 분리주들에 대한 항혈청을 생산하는데 있어 동일한 바이러스역가로 면역을 시켰으나 분리주 15, 77 및 243번에 대한 항혈청 역가가 낮게 생성되었다. 한편 플라크 생성 크기에서도 차이가 있었다. 백신주들은 분리주보다 크기가 작고, 분리주들내에서도 6, 13, 15번은 나머지 분리주보다 크기가 현저히 크게 나타났다. 따라서 SH 단백질 염기서열 분석상으로는 동일한 genotype으로 구분되더라도 바이러스의 증식 및 항원성에 약간의 차이가 있음을 짐작케 한다.

감사의 글

이 논문은 1998-9년 식품의약품안전청 조사연구사업의 지원에 의하여 수행되었음.

이 연구를 위해 도움을 주신 제주시 보건소, 서귀포시 보건소, 남제주군 보건소 강원규 계장님, 홍경자 선생님, 옥천군 보건소 권오석 선생님, 서천군 보건소 구남윤 선생님께 감사드리며, 아울러 환자가검물을 채취해 주신 대정보건지소장님, 대정의원 원장님, 중앙의원 원장님 그 밖의 도움을 주신 모든 분들, 특히 본 연구실의 최승은 씨, 신계명 씨에게 감사드립니다.

참 고 문 헌

1) 이길웅, 허숙진, 반상자, 민경일, 김도근, 조수열, 안광수, 민복순, 김병국, 최승은: 바이러스백신 표준화를 위한 연구 (I)-국내 바이러스주와 백신주의 항원에 따른 면역효과와 변이유전자 탐색에 관한 연구. *The Ann Report of KFDA* **2:** 274-283, 1998.

2) **Afzal MA, Buchanan J, Heath AB, Minor PD:** Clustering of mumps virus isolates by SH gene sequence only partially reflects geographical origin. *Arch Virol* **142:** 227-238, 1997.

3) **Afzal MA, Pickford AR, Forsey T, Heath AB, Minor PD:** The Jeryl Lynn vaccine strain of mumps virus is a mixture of two distinct ioslates. *J Gen Virol* **74:** 917-920, 1993.

4) **Afzal MA, Buchanan J, Dias JA, Cordeiro M, Bentley ML, Shorrock CA, Minor PD:** RT-PCR based diagnosis and molecular characterization of mumps viruses derived form clinical specimens collected during the 1996 mumps outbreak in Portugal. *J Med Virol* **52:** 349-353, 1997.

5) **Albrecht P, Klutch M:** Sensitive hemagglutination inhibition test for mumps antibody. *J Clin Microbiol* **13(5):** 870-876, 1981.

6) **Benevento, Compobasso:** Field evaluation of the clinical effectiveness of vaccines against pertussis, measles, rubella and mumps. *Vaccine* **16(8):** 818-822, 1998.

7) **Buynak EV, Hilleman MR:** Live attenuated mumps virus vaccine. *Proc Soc Exp Biol Med* **123:** 768-775, 1966.

8) **Clucerescu V, Babes L, Gălesanu M:** Study of the behaviour of the mumps virus in different cell culture systems. *Roum Arch Microbiol Immunol* **51(3):** 131-135, 1992.

9) **Cusi MG, Bianchi S, Valassina M, Santini L, Arnetoli M, Valensin PE:** Rapid detection and typing of circulating mumps virus by reverse transcription/polymerase chain reaction. *Res Virol* **147:** 227-232, 1996.

10) **Davidkin I, Valle M:** Vaccine-induced measles virus antibodies after two doses of combined measles, mumps and rubella vaccine: a 12-year follow-up in two cohorts. *Vaccine* **16(20):** 2052-2057, 1998.

11) **Flanagan TD, Barron AL:** Plaque formation by

mumps viruse and inhibition by antiserum. *Appl Microbiol* **19(2):** 360-366, 1970.

12) **Heider A, Ignatyev G, Gerike E, Schreier E:** Genotypic characterization of mumps virus isolated in Russia (Siberia). *Res Virol* **148:** 433-435, 1997.

13) **Hiroyuki S, Takahashi Y, Harata S, Tanaka K, Sato H, Suto T, Yamada A, Yamazaki S, Morita M:** Cloning and characterization of the genomic RNA sequence of the mumps virus strain associated with a high incidence of aseptic meningitis. *Microbiol Immunol* **42(2):** 133-137, 1998.

14) **Jin L, Beard S, Brown DW:** Genetic heterogeneity of mumps virus in the United Kingdom: Identification of two new genotypes. *J Infect Dis* **180:** 829-833, 1999.

15) **Johnson CD, Goodpasture EW:** The etiology of mumps. *Am J Hyg* **21:** 46-57, 1935.

16) **Johnson CD, Kumar ML, Whitwell, J K, Staehle BO, Rome LP, Dinakar C, Hurni W, Nalin DR:** Antibody persistence after primary measles-mumps-rubella vaccine and response to a second dose given at four to six vs. eleven to thirteen years. *Pediatr Infect Dis J* **15(8):** 687-692, 1996.

17) **Kantoch M, Falecka W, Litwinska B, Imbs D, Litynska J, Sadowski W:** Cell- and antibody-mediated responses to measles and mumps viruses in experimental animals. *Acta Virol* **22:** 209-217, 1978.

18) **Kazuko O, Tanabayashi K, Takeuchi K, Hishiyama M, Okazaki K, Yamada A:** Molecular cloning and sequence analysis of the mumps virus gene encoding the L protein and the trailer sequence. *Viology* **188:** 926-930, 1992.

19) **Kashiwagi Y, Kawashima H, Takekuma K, Hoshika A, Mori T, Nakayama T:** Detection of mumps virus genome directly from clinical samples and a simple method for genetic differentiation of the Hoshino vaccine strain from wild strains of mumps virus. *J Med Virol* **52(2):** 195-199, 1997.

20) **Künkel U, Dresel G, Henning U, Gerike E, Willers H, Schreier E:** Differentiation of vaccine and wild mumps viruses by polymerase chain reaction and nucleotide sequencing of the SH gene: Brief Report. *J Med Virol* **45:** 121-126, 1995.

21) **Künkel U, Schreier E, Siegl G, Schultze D:** Molecular characterization of mumps virus strains circulating during an epidemic in Eastern Switzerland 1992/93. *Arch Virol* **136:** 433-438, 1994.

22) **Lennete EH:** Diagnostic procedures for viral, richettsial and chlamydial infections. pp 455-463, 7th ed. American Public Health Association, 1995.

23) **Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL:** Virus Taxonomy: Sixth report of the International Committee on Taxonomy of viruses. *Arch Virol Suppl* **10:** 268-274, 1995.

24) **Örvell C, Kalantari M, Johansson B:** Characterization of five conserved genotypes of the mumps virus small hydrophobic (SH) protein gene. *J Gen Virol* **78:** 91-95, 1997.

25) **Outlaw MC, Pringle CR:** Sequence variation within an outbreak of measles virus in the Coventry area during spring/summer 1993. *Virus Res* **39:** 3-11, 1995.

26) **Peltola H:** Mumps vaccination and meningitis. *Lancet* **341:** 994-995, 1993.

27) **Ratzmann KP, Strese J, Witt S, Berling H, Keilacker H, Miclaelis D:** Mumps infection and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Diabetes Care* **7:** 170-173, 1984.

28) **Saito H, Takahashi Y, Harata S, Tanaka K, Sano T, Suto T, Yamada A, Yamazaki S, Morita M:** Isolation and characterization of mumps virus strains in a mumps outbreak with a high incidence of aseptic meningitis. *Microbiol Immunol* **40(4):** 271-275, 1996.

29) **Schwarzer S, Reibel S, Lang AB, Struck MM, Finke B, Gerike E, Tischer A, Gassner M, Gluck R, Stuck B, Cryz Jr SJ:** Safety and characterization of the immume response engendered by two combined measles, mumps and rubella vaccines. *Vaccine* **16(2/3):** 298-304, 1998.

30) **Ströhle A, Bernasconi C, Germann D:** A new mumps virus lineage found in the 1995 mumps outbreak in Western Switzeriand identified by

nucleotide sequence analysis of the SH gene. *Arch Virol* **141:** 733-741, 1996.

31) **Turner PC, Forsey T, Minor PD:** Comparison of the nucleotide sequence of the SH gene and flanking regions of mumps vaccine virus (Urabe strain) grown on different substrates and isolated from vaccinees. *J Gen Virol* **72:** 435-437, 1991.

32) **Volti SL, Giammanco-Bilancia G, Grassi M, Garozzo R, Gluck R, Giammanco G:** Duration of the immume response to MMR vaccine in children of two age-different groups. *Eur J Epidemiol* **9(3):** 311-314, 1993.

33) **Wolinsky JS:** Mumps Virus. 1243-1265. *In* Fields Virology, 3rd ed, Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Ed), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996.

34) **Wu L, Bai Z, Li Y, Rima BK, Afzal MA:** Wild type mumps viruses circulating in China establish a new genotype. *Vaccine* **16(No.2/3):** 281-285, 1998.

35) **Yates PJ, Afzal MA, Minor PD:** Antigenic and genetic variation of the HN proteins of mumps virus strains. *J Gen Virol* **77:** 2491-2497, 1996.

36) **Yeo RP, Afzal MA, Forsey T, Rima BK:** Identification of new mumps virus lineage by nucleotide sequence analysis of the SH gene of ten different strains. *Arch Virol* **128:** 371-377, 1993.