

신증후출혈열의 혼합백신 개발

Development of combination Hantaan-Puumala  
vaccine against HFRS in the world

아산생명과학연구소

과 학 기 술 부

## 최종연구보고서

1998년도 특정연구개발사업에 의하여 완료한 “신증  
후출혈열의 혼합백신 개발”에 관한 연구의 최종보  
고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 최종보고서 11부

1998. 8.

주관 연구기관 : 아산생명과학연구소

총괄연구책임자 : 이 호 왕 (인)

주관연구기관장 : 이 호 왕 [직 인]

과학기술부 장관 귀하

# 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “신증후출혈열의 혼합백신 개발에 관한 연구”의 최종 보고서로 제출합니다.

1998. 9.

주관연구기관명 : 아산생명과학연구소

총괄연구책임자 : 이 호 왕

공동연구기관명 : 주)녹십자 종합연구소

공동연구책임자 : 김 종 수

위탁연구기관명 : 러시아의학아카데미

소아마비·뇌염바이러스 연구소

위탁연구책임자 : Dr. S.G. Drozdov

# 요 약 문

## I. 제 목 : 신증후출혈열의 혼합백신 개발

Development of combination Hantaan-Puumala vaccine  
against HFRS in the world

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

신증후 출혈열의 병원체의 원인균은 현재까지 모두 9가지 이상의 혈청형 한타바이러스에 의한 것으로 알려져 있으며 이들 바이러스들은 크게 3가지의 Genetic line으로 나눌 수 있다. 전세계적으로 매년 10 ~ 15만명의 환자가 발병하여 입원하고 있으며, 그 치사율은 4 ~ 10%에 이르고 있고, 우리나라에서는 매년 약 1200여명의 환자가 입원하고 있는 것으로 알려져 있다. 전세계적으로 한지역에 2-3종류의 혈청형 바이러스가 혼재하며 질병을 발생시키고 있으며, 우리나라의 경우에서도 종전에는 유럽에만 존재하는 것으로 알려져 있던 푸말라혈청형바이러스에 의한 신증후출혈열 환자가 발생하고 있는 실정이다. 따라서 전세계적으로 발생하는 한타바이러스에 의한 신증후출혈열을 예방할 수 있는 백신은 적어도 두가지의 Genetic line에 속하는 서로다른 혈청형 바이러스들이 혼합된 혼합백신이어야 함을 알 수 있다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

혼합백신에 사용하는 두 가지 서로다른 Genetic line에 속하는 각각의 혈청형 한타바이러스들을 다량으로 증식시키고, 백신정제법을 확립하여 정제된 백신중의 총단백함량 및 이중 단백질함량 특히 Myelin basic proteing함량을

세계보건기구에서 규정한 함량이하로 정제하며 바이러스 특이단백 검정을 실시하고, 제조된 백신의 안전성 및 면역성과 유효성을 실험동물에서 확인하여 차후 개발된 백신의 상용화를 위한 임상시험을 위한 기초자료를 얻는데 본 연구개발의 내용으로 한다.

#### IV. 연구개발결과

젖빨이동물의 뇌조직에서 대량증식시킨 바이러스를 정제불활화한 백신을 조직배양세포와 젖빨이실험동물을 이용한 증식여부를 조사한 결과 바이러스의 증식을 확인할 수 없었다. 백신중의 총단백함량 및 이종단백함량을 최소화할 수 있는 바이러스정제기술 및 백신중의 바이러스 항원량은 극대화시킨 정제 불활화기술을 확립하였다. 개발된 혼합백신의 실험동물을 이용한 안전성시험을 실시하여 백신의 독성이 없음을 확인하였으며 실험동물에서의 면역효과를 확인한 결과 우수한 면역원성을 나타내는 것을 볼 수 있었다. 백신을 접종한 실험동물에 살아있는 병독성 바이러스로 공격감염을 시키는 유효성시험을 실시한 결과 다양한 혈청형의 신증후출혈열 병원체에 대한 방어효과를 확인할 수 있었다.

#### V. 연구개발의 활용계획

본 연구개발의 결과로 얻어진 푸말라바이러스백신과 혼합백신을 대규모 야외임상시험을 실시하여 상용화할 수 있도록 한다. 또한 부수적으로 얻어진 푸말라바이러스에 의한 신증후출혈열을 신속히 진단할 수 있는 진단키트도 상용화시킬 수 있도록 한다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

Development of combination Hantaan-Puumala vaccine against HFRS in the world

We have developed the Hantaan-Puumala virus combination vaccine to prevent world-widely occurring HFRS. This combination vaccine is formalin inactivated brain extracts of suckling mice and suckling hamsters for Hantaan and Puumala viruses, respectively. Hamsters were given combination vaccine twice at one month interval intra-muscularly and challenged to 5 different serotype viruses; HTNV, SEOV, BELV, PUUV and SNV. IF and neutralizing antibody titers were measured on 30 days after each vaccination, and 30 days after challenge infection. 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; and on 30 days after booster vaccination, the mean IF antibody titers 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 HTNV, SEOV, BELV, PUUV and SNV viruses, respectively. There was no significant antibody increase against HTNV, SEOV, BELV, PUUV challenged hamsters except SNV challenged hamsters. By nested RT-PCR using serotype specific primers, we found that vaccinated hamsters, challenged with HTNV, SEOV, BELV, PUUV, were neither viremic nor had virus in their lung tissues. In contrast, SNV challenged hamsters were viremic and had virus in their lung tissues.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

I. Introduction .....	6
II. Current status of the are development .....	13
III. Details of the research project and the result .....	16
IV. Achievment of the research project and contribution to the art development .....	70
V. Application plans of the result from research project ...	79
VI. References .....	81

## 목 차

제 1 장 서론 .....	6
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	16
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 .....	70
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	79
제 6 장 참고문헌 .....	81

# 제 1 장 서 론

## 1) 연구개발의 목적

신증후 출혈열은 분야비리대과에 속하는 한타바이러스에 의하여 발생하는 급성전염성 질병으로 전세계에 걸쳐 발병하고 있다 (1). 신증후출혈열은 80여년전 부터 러시아의 극동지역과 중국의 만주지역에 주둔하였던 군인들사이에서 많은 환자가 발병되어 주목을 받기 시작하였으며 (2), 우리나라의 경우 한국동란시 중부전선에 주둔하였던 미군에서 수천명의 환자가 발생하여 전세계적인 관심을 끌게 되었다 (3). 이 질병은 유라시아대륙에 걸쳐 광범위하게 존재하며, 러시아에서는 유행성신우신장염, 중국과 일본에서는 유행성출혈열, 한국에서는 한국형출혈열 또는 유행성출혈열, 유럽에서는 유행성신염이라는 이름으로 지역마다 각기 달리 불리워왔으나 1982년 세계보건기구는 세계 여러지역에서 발생하는 한국형출혈열과 유사한 상기 질병들이 한타바이러스 및 이와 유사한 바이러스에 의하여 발생된다는 사실을 입증하여 신증후출혈열이라는 이름으로 통일하였다 (4). 최근에는 한타바이러스에 의한 질병이 없는 곳으로 생각되었던 미국에서 백수십여명의 환자가 새로운 한타바이러스에 의한 급성 폐질환이 발생하고, 그 치사율이 70% 이상의 높은 사망율을 기록함으로써 새로이 떠오르는 질병으로 더욱 더 높은 관심을 끌게 되었다 (5). 현재 매년 전세계적으로 10 ~ 15만명의 환자가 발병하여 입원하고 있으며, 그 치사율은 4 ~ 10%에 이르고 있고 (1), 우리나라에서는 매년 약 1200여명의 환자가 입원하고 있는 것으로 알려져 있다 (6).

1976년 세계 최초로 우리나라 연구팀에 의하여 신증후출혈열의 병원체인 한타바이러스가 한탄강 유역에서 채집한 등줄쥐의 폐장에서 분리되었고, 신증후출혈열의 최초유행지역 주변을 흐르는 한탄강의 이름을 따서 한타바이러스

스로 명명되었다 (7). 한탄바이러스가 분리된 이후 한탄바이러스에 의한 질병의 역학조사가 가능하게 되었고, 이와 아울러 이 바이러스에 의하여 발생하는 질병을 예방할 수 있는 예방백신의 개발이 가능하게 되었다. 현재까지 신증후 출혈열의 병원체의 원인균은 크게 3개의 Genetic lineage으로 나눌 수 있다 (8, 9). 제1그룹에는 동아시아 지역의 등줄쥐에서 분리된 한탄혈청형 바이러스와 전 세계적으로 분포하는 집쥐에서 분리된 서울혈청형 바이러스, 그리고 유럽의 유고슬라비아의 들쥐에서 분리된 벨그레이드 혈청형 바이러스들이 있으며 모두 중증의 질병을 일으키는 병원균이다. 제 2그룹에는 유럽의 들쥐인 Vole에서 분리된 푸말라혈청형 바이러스가 있으며 비교적 경증의 질병을 일으키고, 최근 미국에서 발생한 새로운 급성폐질환을 일으키는 Four Corners virus가 여기에 속한다. 제 3그룹에 속하는 쏘타팔리암 혈청형 바이러스는 인도의 따쥐에서 분리된 바이러스로 사람에게 대한 병원성은 확인된 바 없다. 각각의 Genetic lineage사이에서의 염기서열 보존율은 약 40%이고, 각 Genetic lineage에 속하는 혈청형 바이러스들 사이에서는 75%의 보존율을 보인다.

각각의 혈청형 바이러스들에 대한 중화항체는 특이하며, 다른 혈청형 바이러스에 대한 교차중화역가는 없거나, 같은 Genetic lineage에 속하는 바이러스들 사이일지라도 극히 낮은 중화역가를 나타낸다 (10).

종전까지 Genetic lineage 1그룹에 속하는 한탄, 서울, 벨그레이드 혈청형바이러스들은 아시아 및 중부유럽의 한정된 지역에서만 발생하는 것으로 알려져 왔으나, 집쥐에서 분리되는 서울혈청형 바이러스들은 세계각지의 집쥐에서 분리되고 있으며, 서유럽의 일부국가에서는 이들 바이러스에 의한 환자발생의 보고도 있었다 (11). Genetic lineage 2그룹에 속하는 푸말라, 프로스펙트힐, 신놈브레 혈청형바이러스들은 유럽과 미국대륙에서만 발생하는 것으로 알려져 왔으나, 최근 러시아의 시베리아 및 일본에서채집한 야생들쥐

에서 Genetic lineage 2그룹에 속하는 푸말라 혈청형바이러스가 증명되었으며 (12, 13), 우리나라에서도 푸말라 혈청형 바이러스에 감염된 환자가 보고된 바 있다. 따라서 전세계적으로 발생하는 한타바이러스에 의한 질병을 예방할 수 있는 백신은 적어도 두가지의 Genetic lineage에 속하는 혈청형 바이러스들이 혼합된 혼합백신이어야 함을 알 수 있다.

현재 사용되고 있는 신증후 출혈열 예방백신은 한타바이러스를 사용하여 만든 한타박스로서 세계보건기구에서 추천된 일본뇌염 백신제조법과 유사한 방법, 즉 생후 1일된 마우스의 뇌조직에서 증식시킨 바이러스를 불활화하여 정제한 것이다 (14). 그러나 다른 Genetic lineage에 속하는 푸말라 혈청형 바이러스는 마우스뇌 내에서 증식이 되지 않아 이 혈청형 바이러스에 대한 백신개발에 어려움이 있었다. 그러나 최근 본 연구소에서는 푸말라 혈청형 바이러스를 생후 1일된 햄스터의 뇌조직에서 다량으로 증식시킬 수 있다는 것을 발견함으로써 유럽형신증후출혈열을 예방할 수 있는 백신을 개발할 수 있는 기초를 마련하였다.

본 연구개발사업에서는 전 세계적으로 서로 다른 여러 혈청형 바이러스에 의해 발생하는 신증후 출혈열을 하나의 백신으로 동시에 예방할 수 있는 혼합백신을 개발하고자 서로 다른 Genetic lineage에 속하는 각각의 대표적인 혈청형 바이러스를 이용한 혼합백신을 개발하고, 불활화시킨 정제된 백신중의 바이러스 단백질 및 이중단백질의 함량이 세계보건기구에서 권장하는 기준치 이하인가를 검정한 다음 실험동물을 이용하여 개발된 백신의 안전성 및 면역성을 검정하고 실험동물에서의 중화항체 발현능력 및 다른 혈청형 바이러스에 대한 교차 중화항체여가를 검정하고 백신을 접종하여 면역이 된 실험동물에 신증후출혈열을 일으키는 대표적인 혈청형에 속하는 살아있는 바이러스들로 공격감염시험을 실시한 다음 백신에 의한 방어효능을 검정하여 개발된 백신의 유효성을 증명하고자 하였다. 실험동물에서의 이들 결과를 바

탕으로 실제 신증후출혈열이 다발생하는 지역에 거주하는 주민들에게 사용될 수 있는 상용화된 백신을 제조할 수 있는 기초를 마련하고자 하였다.

## 2) 연구개발의 필요성

### 가. 기술적 측면

최근 한국에도 푸말라혈청형 바이러스에 감염된 것으로 의심되는 환자가 14명 발생한 바 있음이 증명된 바 있으며, 한국 및 일본의 경우 다수의 실험 동물 흰쥐가 푸말라혈청형 바이러스에 감염되었다는 사실이 증명된 바 있다. 또한 러시아의 극동지역에 서식하는 *Microtus*에서 푸말라혈청형 바이러스에 속하는 바이러스가 분리된 바 있으며 (12), 일본의 경우에도 홋카이도에 서식하는 야생들쥐로부터 푸마라혈청형바이러스에 속하는 바이러스에 대한 보고가 있었다 (13). 발칸반도유역 국가들인 그리스 및 유고슬라비아에서는 한탄혈청형바이러스와 유사한 바이러스 및 벨그레이드혈청형바이러스 그리고 푸말라혈청형바이러스에 감염된 환자가 다수 보고되고 있다 (15). 따라서 아시아 및 동유럽의 일부지역에서는 한탄혈청형 바이러스, 서울혈청형 바이러스, 푸말라혈청형 바이러스가 함께 공존하고 있으므로 이들 혈청형 바이러스를 모두 예방할 수 있는 혼합백신의 필요성이 대두되게 되었다.

### 나. 경제·산업적 측면

신증후출혈열은 이 질병의 원인균을 보균하고 있는 설치류 숙주동물과 접촉이 많은 사람들에서 높은 발병율을 나타내고 있다 (1). 우리나라의 경우

농촌에서 농업에 종사하는 사람들과 국방에 힘쓰는 군인들 및 지하공사, 특히 통신배관등의 시설에서 일하는 산업역군들에게서 많은 수의 환자가 발생하고 있다.

따라서 이 질병에 대한 유용한 예방백신을 개발함으로써 유효노동력을 보호할 수 있고 그로 인하여 생산성을 높힐 수 있을 것으로 기대하며, 개발된 혼합백신을 세계 각지의 신증후출혈열 만연지역에 수출함으로써 외화가득효과를 기대할 수 있다.

특히 최근 전세계적으로 지구온난화에 따른 생태계의 변화로 인하여 신증후출혈열의 원인바이러스인 한타바이러스를 보균하고 있는 숙주동물들인 야생들쥐들이 평년에 비해 다량번식되어 있음이 보고된 바 있으며 (16) 이에 따라 많은 수의 환자가 발생하는 것으로 보고되고 있다. 매년 수천명의 신증후출혈열 환자가 발생하는 러시아의 경우 지구 온난화에 따른 생태계의 변화로 인하여 1997년도에는 이례적으로 수만명의 환자가 발생하였으며, 신증후출혈열에 의한 사망률 또한 예년에 비하여 5배 이상 급증한 것으로 보고하고 있다 (17).

작년 러시아내 신증후출혈열 다발생지역인 바쉬코르코스탄 자치공화국에서는 한타바이러스에 의한 신증후출혈열이 인구 일천명당 5명의 환자발생율을 나타내었고 환자가 생겼고, 도시와 농촌의 구분없이 모든지역에서 많은 수의 환자가 발생하였으며 그 사망율도 3.5%에 달하였다.

종래 러시아내 신증후출혈열 다발생지역인 바쉬코르코스탄 자치공화국에서 실시한 역학조사에서는 푸말라혈청형 바이러스에 의한 신증후출혈열이 대부분인 것으로 알려졌으며, Genetic lineage 1그룹에 속하는 한탄, 서울, 벨그레이드 혈청형 한타바이러스에 의한 신증후출혈열환자의 발생은 없는 것으로 알려져 왔다. 그러나 본 연구개발사업의 최종년도 연구사업으로 대규모 야외임상시험을 실시할 수 있는 신증후출혈열 다발생지역에서 채취한 환자혈

청중에서 Genetic lineage 1그룹에 속하는 벨그레이드 바이러스에 감염된 신증후출혈열환자를 확인할 수 있었으며 그 중 한 환자는 수년전에 푸말라바이러스에 의한 신증후출혈열 감염경력이 있었으나 최근 벨그레이드 바이러스에 의하여 재차 감염되어 심한 신증후출혈열을 경험한 환자를 발견할 수 있었다.

따라서 신증후출혈열을 효과적으로 예방할 수 있는 유용한 예방백신을 개발함으로써 인류보건복지에 기여할 수 있고 유효노동력을 질병으로부터 보호함으로써 생산성을 높힐 수 있는 경제적인 효과와 더불어 세계 각지의 신증후출혈열 만연지역에 개발된 백신을 수출함으로써 외화를 벌어들일 수 있는 경제성도 있다.

한타바이러스에 의한 신증후출혈열환자의 증가로 인하여 심각한 사회문제가 야기된 바 있는 러시아의 경우 신증후출혈열 유행지역에 거주하는 주민들에게 적어도 매년 수천만명 이상의 주민에게 백신을 접종하여야 하므로 일회 접종분에 단 1불의 이익을 낸다고 하여도 수천만불의 외화가득효과를 얻을 수 있을 것이다.

현재까지 유럽에서 발생하는 신증후출혈열의 주요 원인균인 푸말라바이러스를 예방할 수 있는 백신을 개발한 것은 우리나라가 세계 최초이며, 개발된 백신의 상용화를 이룩함으로써 전세계에 우리나라 백신생산기술의 우수성을 알리는 기회가 되며 우리나라 생물제제 제조산업의 발전을 기할 수 있을 것이다.

### 3) 사회·문화적 측면

신증후출혈열 다발생지역의 하나인 러시아의 러시아의학아카데미 소아마비·뇌염바이러스병 연구소는 신증후출혈열 예방백신 개발에 많은 관심을 가

지고 있었으며, 세계보건기구 신증후출혈열 연구협력센터로 지정되어 활동중인 아산생명과학연구소와 푸말라바이러스에 의한 신증후출혈열을 예방할 수 있는 백신개발에 관한 연구협약을 맺은 바 있다. 이 연구협약에 의하여 러시아내 중증의 환자로부터 분리된 바이러스를 러시아의 공동연구기관으로부터 분양받아 사용하는 등 신증후출혈열 연구에 있어 양국간의 정보교류 및 인적·물적 교류를 할 수 있는 바탕을 마련하였다.

또한 하나의 예방백신으로 다양한 혈청형의 한타바이러스에 의하여 발생하는 신증후출혈열을 예방할 수 있는 백신을 개발함으로써 신증후출혈열로 인한 보건상의 위협을 받고 있는 많은 주민들을 위한 인류보건복지향상에 기여할 수 있을 것이다.

## 다) 연구의 범위

따라서 본 연구과제에서는 서로 다른 Genetic lineage에 속하는 각각의 혈청형 바이러스를 다량으로 배양하고 배양된 바이러스를 순수하게 분리정제할 수 있는 기술을 확립하며, 정제불화화시킨 각각의 백신을 혼합한 혼합백신으로 세계 여러나라에서 다양한 혈청형 바이러스에 의하여 발생하는 신증후출혈열을 예방할 수 있는 백신을 개발하는데 목적을 둔다. 예방백신은 한타바이러스속에 속하는 다양한 혈청형바이러스들에 의한 신증후출혈열을 동시에 예방할 수 있는 Universal Vaccine으로써, 우리나라에서 뿐만 아니라 세계여러지역에서 공통으로 사용할 수 있음으로 전세계적으로 발생하는 신증후출혈열 예방에 크게 기여할 것으로 기대한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 가. 신증후출혈열 예방백신 국내 기술개발 현황

신증후출혈열 예방백신개발에 대한 국내 연구기관의 현황을 살펴보면, 1988년 고려대학교 부설 바이러스병 연구소 이호왕 교수팀과 주식회사 녹십자 종합연구소가 공동으로 한탄바이러스에 의한 신증후출혈열 예방백신을 개발하였다 (14). 이 백신은 중증의 한국형출혈열 환자혈액으로부터 분리한 한탄바이러스 84-105균주를 생후 1일된 젖뱀이 마우스의 뇌내로 접종하여 다량으로 바이러스를 증식시키고 일본뇌염백신 제조방법을 응용한 개선된 방법을 사용하여 바이러스를 순수분리정제한 다음 포르말린 처리하여 불활화시킨 백신이다. 그 후 동물에서의 전임상시험과 인체에서의 임상시험을 거쳐 상용화되어 (18, 19, 20) 현재 신증후출혈열 예방백신으로 상품화되어 한국내에서 널리 사용되고 있으며, 최근 한국에서 발생하는 신증후출혈열 발생건수를 급격히 감소시키는데 큰 기여를 하고 있다. 한탄바이러스로 부터 유래된 백신으로 한탄바이러스와 서울바이러스에 의한 신증후출혈열은 예방할 수 있으나 푸말라바이러스에 의한 신증후출혈열은 예방할 수 없다는 연구결과가 발표된 바 있다 (21). 이들 결과를 바탕으로 푸말라바이러스에 의하여 발병하는 유럽형 신증후출혈열을 예방할 수 있는 백신개발에 착수하였다. 그러나 유럽에서 신증후출혈열 다발생지역의 대부분 지역에서는 Genetic lineage 2그룹에 속하는 푸말라바이러스에 의한 신증후출혈열환자가 대부분을 차지하고 있으나 그리스, 유고슬라비아를 비롯한 발칸반도 유역국가들에서는 Genetic lineage 1그룹에 속하는 한탄바이러스와 유사성이 많은 벨그레이드바이러스 뿐만 아니라 서울바이러스에 의한 환자발생의 경우도 보고된 바 있어 (22)

하나의 예방백신으로 모든 한타바이러스에 의한 신증후출혈열을 예방할 수 있는 백신개발을 모색할 필요가 있음을 확인하였다. 아산생명과학연구소와 주)녹십자 종합연구소는 공동으로 혼합백신개발에 착수하여 세계 최초로 푸말라바이러스를 예방할 수 있는 푸말라바이러스백신 뿐만 아니라 모든 혈청형 한타바이러스에 의한 신증후출혈열을 예방할 수 있는 혼합백신 개발에 성공하였다.

## 나. 신증후출혈열 예방백신 국외 기술개발 현황

신증후출혈열 예방백신개발에 대한 외국 연구기관의 현황을 살펴보면, 한국에서 이호왕교수팀과 주)녹십자가 신증후출혈열백신개발에 성공하여 상용화시킨 다음 중국에서도 자체적으로 서울바이러스에 의하여 발병하는 신증후출혈열을 예방할 수 있는 백신을 개발하여 상용화하고 있다 (23). 이 백신은 중국의 장시성에서 채집한 집쥐 조직에서 분리한 바이러스를 젓밭이 마우스의 뇌조직에서 18번 계대한 다음 golden hamster kidney 세포에 계대배양한 바이러스를 불활화하여 제조한 백신이다. 미국에서는 10여년 전 백신니아 바이러스 (Vaccinia virus) 벡터를 사용한 한타바이러스 M과 S유전자 절편을 함유하는 유전자재조합백신을 개발하였으며 (24), 개발된 백신의 실험동물을 이용한 전임상시험을 성공적으로 완료하여 최근 2-3년전부터 소수의 자원자를 대상으로 하는 제1상 및 제2상의 임상시험을 시행하여 왔으나 개발된 백신의 인체에서의 면역원성을 조사하는 연구에서 만족스러운 결과를 얻지 못하여 백신개발을 중단한 바 있다. 푸말라바이러스에 의한 신증후출혈열 만연지역인 유럽에서도 백신개발에 지대한 관심을 가지고 연구를 진행하고 있는 상태로 독일의 연구그룹에서는 최근 B형 간염바이러스를 이용하여 푸말라바이러스의 핵산단백질의 일부유전자를 발현시킬 수 있는 유전자재조합 백신

개발을 추진중에 있다 (25). 이 백신은 세포성면역을 유발시키는 것이 주된 목적이며, 한타바이러스 당단백질들에 의한 체액성면역을 유발시킬 수는 없다. 따라서 개발된 백신의 면역원성과 유효성을 확인하는 전임상시험 및 임상시험을 완료하여 상용화할 수 있는 백신을 개발하기 까지에는 앞으로도 10여년 이상의 시간이 소요될 것으로 예상된다.

## 다. 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

본 연구개발에 의하여 세계최초로 푸말라바이러스에 의한 유럽형신증후출혈열을 예방할 수 있는 푸말라바이러스 백신 뿐 만 아니라 모든 혈청형 한타바이러스에 의하여 발생하는 신증후출혈열을 예방할 수 있는 혼합백신을 개발함으로써 유라시아 대륙에 걸쳐 연간 수십만명의 환자와 4~10%에 달하는 사망률을 보이는 신증후출혈열을 예방할 수 있게 되어 세계인류의 건강·복지증진에 크게 기여할 것이며, 대한민국이 신증후출혈열 예방백신제조 및 한타바이러스 연구에 있어 앞으로도 계속 중심적인 역할을 할 수 있을 것이다. 또한 개발된 푸말라바이러스백신과 혼합백신이 상용화된다면 우리나라의 생물학제제산업의 기술발전에도 크게 기여할 수 있을 것이다. 또한 개발된 혼합백신의 상용화연구에 이은 기업화에 성공하면 수익분에 달할 것으로 예상되는 러시아시장을 선점할 수 있어 얻어지는 경제적효과도 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

## 제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

### 가. 연구개발수행 내용

#### 1) 종균바이러스 대량증식 및 바이러스 순수분리정제

본 연구개발사업에 사용되는 백신용 종균바이러스는 Genetic lineage 1그룹에 속하는 한탄혈청형바이러스 호왕균주와 Genetic lineage 2그룹에 속하는 푸말라혈청형바이러스 K27균주를 사용하였다. 한탄바이러스 호왕균주 (26)는 중증의 한국형출혈열환자의 혈액을 Vero E6 조직배양세포에 배양하여 분리한 바이러스로서 생후 1일된 마우스의 뇌조직에 7대 계대한 바이러스를 종균으로 하여 생후 1일된 마우스의 뇌내로 접종한 후 7일경 마비증세를 나타낼 때 무균적으로 뇌조직을 적출하여 한탄혈청형바이러스 백신의 원료로 사용하였다. 푸말라바이러스 K27균주 (27)는 러시아의 신증후출혈열 다발생 지역인 바쉬키리아 지역에서 발생한 중증의 신증후출혈열 환자혈액을 Vero E6 조직배양세포에 계대배양하여 분리한 바이러스로서 생후 1일된 햄스터의 뇌조직에 14대 계대한 바이러스를 종균으로 하여 생후 1일된 햄스터의 뇌내로 접종한 후 10일 경 마비증세를 나타낼 때 무균적으로 뇌조직을 적출하여 푸말라혈청형바이러스 백신의 원료로 사용하였다.

대량으로 증식된 바이러스의 순수분리정제는 이등이 한탄바이러스백신 개발에 사용한 방법 (14)에 의하여 정제하였다.

#### 2) 정제된 백신중의 단백질함량 및 바이러스항원 함량 조사

동물의 뇌조직에서 대량증식된 바이러스를 순수분리 정제한 백신의 정제도를 조사하기 위하여 a. 백신중의 총단백함량을 Bicinochonic(BCA) 방법

(28)에 의하여 spectrophotometer를 사용하여 562nm의 파장에서 검출하였다.  
b. 신경조직유래 백신접종시 부작용의 주원인으로 작용하는 것으로 추정되는 백신중의 이종단백질인 Myelin basic protein은 실험동물인 기니픽에서 experimental allergic encephalomyelitis를 일으킨다고 보고되고 있다 (29). 백신중의 Myelin basic protein의 함량은 ELISA방법을 사용하여 측정하였다. (30) c. 백신중에 함유되어 있는 바이러스항원의 함량을 ELISA방법을 사용하여 검출하였다 (14).

### 3) 정제된 백신중의 한타바이러스 구조단백질 분석

다량증식된 뇌조직으로부터 순수분리정제된 한타바이러스 백신과 푸말라 바이러스백신중의 바이러스 구조단백질을 확인하기 위하여 정제된 백신을 SDS-PAGE에서 전기영동을 실시하고 분리된 단백질을 NC filter상으로 옮긴 후 Western blot방법을 사용하여 검출하였다 (31).

### 4) 포르말린 불활화처리된 백신의 불활화 확인

뇌조직에서 대량증식되어 정제된 바이러스들을 포르말린을 가하여 4℃에서 한달간 불활화처리한 다음 백신중의 바이러스 불활화 여부를 확인하기 위하여 Vero E6 조직배양세포와 생후 1일 된 젓빨이 ICR마우스 및 젓빨이 시리안햄스터의 뇌내로 각각의 정제불활화시킨 한타바이러스백신후보물질과 푸말라바이러스백신후보물질을 접종하여 14일 간격으로 3대 계대배양을 하였다. 계대배양 된 조직배양세포와 실험동물의 조직내에서의 바이러스 증식여부를 형광항체법과 중합효소연쇄증합반응방법을 사용하여 검사하였다.

### 5) 면역보조제 alum gel의 적정농도 산출

면역보조제로 사용되는 alum gel의 적정농도를 산출하기 위하여 일정농도

별로 희석된 alum gel에 흡착시킨 백신을 실험동물에 접종한 후 생성된 항체의 역가를 형광항체법 (7)으로 비교하여 최소의 면역보조제로 최대의 면역반응을 나타내는 적정 alum gel 농도를 산출하였다.

#### 6) 백신을 접종한 실험동물에서 백신에 의한 면역반응 조사

적정농도의 Alum gel 면역보조제를 함유하는 혼합백신을 한달간격으로 2차에 걸쳐 실험동물 햄스터의 대퇴부 근육내로 접종한 다음 생성된 면역반응을 형광항체법과 플라크감소 중화항체시험법 (32)으로 조사하였다. 햄스터에서의 면역반응조사에 사용된 바이러스들은 신증후출혈열의 원인균인 4가지 혈청형 한타바이러스들인 한탄바이러스, 서울바이러스, 벨그레이드 바이러스, 푸말라바이러스들뿐만 아니라 한타바이러스 폐증후군의 원인균인 신늄브레바이러스에 대한 항체역가를 측정하였다.

#### 7) 한타바이러스혈청형 특이 primer를 사용한 nested RT-PCR진단법

한타바이러스의 자연계 숙주동물인 다양한 종류의 설치류는 바이러스 혈청형에 따라 그 숙주를 달리하며 (1), 바이러스에 감염되어도 아무 영향을 받지 않으며 사람과 유사한 질병을 앓거나 또는 한타바이러스 감염에 의한 사망은 없는 것으로 알려져 있다. 또한 바이러스의 혈청형에 따라 숙주동물을 달리하는 특성으로 인하여 자연계 숙주동물이외에 다른 설치류에 혈청형을 달리하는 바이러스를 접종하였을 경우 접종된 동물에서 항체 양성으로 전환될지라도 조직중의 바이러스항원을 기존에 확립되어 있는 형광항체법으로 검출할 수 있는 범위는 제한되어 있다. 따라서 백신을 접종하여 면역을 시킨 다음 살아있는 병독성 바이러스로 공격감염을 실시하여 실험동물의 장기조직에 바이러스가 증식되었는지 또는 바이러스의 증식이 억제되었는지를 검사하

는 백신의 유효성 검정에 있어 형광항체법을 사용하여 장기조직중의 바이러스항원 증명에 어려움이 있다. 따라서 기존에 확립되어 있는 형광항체법을 대체할 수 있는 민감하고 특이적인 방법이 개발되어야 할 필요가 있다. 최근 여러질환의 진단에 널리 사용되고 있는 민감하고 특이적으로 반응하는 연쇄 효소중합반응법을 이용하여 신증후출혈열의 주요 병원체들인 한탄바이러스, 서울바이러스, 푸말라바이러스를 신속하게 진단할 수 있는 방법이 개발되어 사용된 바 있으나 (33) 벨그레이드 바이러스와 한타바이러스 폐증후군 병원체인 신놈브레 바이러스까지 특이적으로 진단할 수 있는 방법이 개발된 것은 없다. 따라서 신증후출혈열의 주요병원체들인 4종류의 서로 다른 혈청형 바이러스들: 한탄바이러스, 서울바이러스, 벨그레이드 바이러스, 푸말라바이러스 뿐 아니라 한타바이러스 폐증후군 병원체인 신놈브레 바이러스까지 민감하고 특이적으로 진단할 수 있는 진단방법을 개발할 필요가 있다.

#### 8) 햄스터에서 생균 병독성 한타바이러스의 적정감염농도 측정

백신을 접종하여 면역을 시킨 실험동물에 살아있는 병독성 바이러스로 공격감염을 실시하여 백신의 유효성을 검정하기 위한 예비실험으로, 일정농도로 희석한 신증후출혈열의 주요병원체인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라바이러스뿐만 아니라 한타바이러스폐증후군의 병원체인 신놈브레바이러스를 햄스터의 대퇴부 근육내로 접종하였다. 신증후출혈열의 주요병원체인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라바이러스뿐만 아니라 한타바이러스폐증후군의 병원체인 신놈브레바이러스로 감염시킨 햄스터의 혈액 및 장기조직에서 각각의 혈청형 한타바이러스항원을 기존에 확립되어 널리 사용되고 있는 형광항체법과 새로이 개발된 nested RT-PCR방법을 이용하여 검출할 뿐만 아니라 바이러스에 감염된 모든 햄스터가 항체 양성으로 양전되는 적정감염농도를 결정하고자 하였다.

### 9) 백신의 유효성 검증

신증후출혈열 혼합백신을 햄스터의 대퇴부 근육내로 한달간격으로 2회에 걸쳐 접종을 하여 면역을 시킨 한달후 적정감염농도로 희석된 살아있는 병원성 한타바이러스 즉 4종류의 신증후출혈열 병원체 바이러스인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라혈청형바이러스들로 공격감염을 실시하는 challenge 감염을 시켰다. 혈청형 특이 primer를 사용한 nested RT-PCR 방법으로 혈액중의 바이러스 증식을 관찰하였고, 조직중의 바이러스증식은 기존에 확립되어 있는 형광항체법과 혈청형 특이 primer를 사용한 nested RT-PCR 방법으로 관찰하였다. 이와 더불어 면역된 햄스터에서의 공격감염 후 항체역가 변화를 형광항체법과 플라크감소 중화항체법으로 관찰하여 백신에 의한 공격감염 저지효과를 검증하고자 하였다. 이와 더불어 한타바이러스페증후군의 병원체인 신놈브레혈청형바이러스로 공격감염을 실시하여 햄스터에서 신증후출혈열 혼합백신의 한타바이러스페증후군의 병원체인 신놈브레혈청형바이러스에 대한 감염저지효과를 아울러 검증하고자 하였다.

### 10) 혼합백신을 접종한 실험동물에서의 급성 및 아급성 독성시험

일정량의 혼합백신을 마우스와 랫트의 피하와 복강내로 주사하여 실험동물에서 백신독성에 의한 체중변화를 관찰하고 접종된 동물의 조직검사를 하여 혼합백신에 의한 급성 및 아급성 독성시험을 실시하였다.

### 11) 러시아내 신증후출혈열 만연지역내 환자에서의 원인 바이러스 혈청형 조사

본 연구개발과제에서 개발한 혼합백신은 서로 다른 Genetic lineage에 속하는 각각의 서로 다른 혈청형에 속하는 두가지 이상의 한타바이러스에 의한 신증후출혈열 다발생지역을 대상으로 하여 개발된 것이며, 개발에 있어 러시

아의학아카데미 소아마비·뇌염바이러스 연구소와 연구협정을 체결하게 됨으로서 가능하게 된 연구개발과제이다. 또한 개발된 백신의 기업화를 이루기 위하여는 신증후출혈열 다발생지역에서의 대규모 야외임상시험이 필수적이다. 본 연구개발과제에 의하여 개발된 신증후출혈열 예방 혼합백신의 기업화 가능성이 확인되었고, 차후 계속사업으로 개발된 혼합백신의 상용화연구를 위한 대규모 야외임상시험을 준비하여야 할 필요가 있다. 국제공동연구의 일환으로 러시아의학아카데미 소아마비·뇌염바이러스 연구소와 공동으로 본 연구개발과제에서 개발된 푸말라백신과 혼합백신의 대규모 야외임상시험을 실시할 후보지인 러시아내 신증후출혈열 만연지역에서 발생한 환자들의 혈청을 채취하여 만연지역내에 존재하는 주요 한타바이러스혈청형을 형광항체법과 플라크감소중화항체법으로 확인하고자 하였다.

## 12) 푸말라바이러스에 의한 신증후출혈열 환자 진단방법 개발

현재까지 푸말라혈청형바이러스에 의한 유럽형신증후출혈열 진단은 기존에 확립되어 있는 형광항체법 또는 면역효소항체법을 사용하여 진단하여 왔다 (1). 그러나 기존의 형광항체법에 의한 진단방법에서는 형광현미경과 같은 특수한 장비를 갖춘 실험실에서 숙련된 실험자에 의하여 실시되어야 하는 관계로 제한된 실험실에서만 진단이 가능하여 왔다. 면역효소항체법에 의한 경우 진단에 있어 많은 시간이 소요되어야 하며 비특이적인 반응이 많이 나타나는 단점이 있다.

본 연구개발과제인 신증후출혈열 예방 혼합백신개발을 하는 과정에서 부수적으로 얻은 정제된 푸말라바이러스항원을 이용하여 푸말라바이러스에 의한 신증후출혈열환자를 간편하고 신속하게 진단할 수 있는 새로운 진단방법을 개발할 수 있게 되었다.

혼합백신 제조시 사용한 종균바이러스인 푸말라바이러스 K27균주를 백신

제조방법에서 사용한 방법과 동일하게 정제하여 포르말린으로 불활화처리한 푸말라바이러스 항원을 고밀도입자(High Density Particle)에 감작시켰으며, 대조항원으로는 바이러스에 감염되지 않은 정상 햄스터의 뇌조직으로부터 추출한 단백질을 감작시킨 고밀도 입자를 준비하였다. 유라시아 대륙 즉 한국, 중국, 일본, 핀란드, 유럽러시아에서 발생한 신증후출혈열 환자혈청 및 정상인의 혈청들을 사용하여 기존의 확립된 진단방법인 형광항체법과 비교하여 푸말라바이러스항원 고밀도입자응집진단법의 민감도 및 특이도를 조사하였다.

### 13) 한탄혈청형 호왕바이러스의 유전자구조 분석

호왕바이러스는 1990년 중증의 신증후출혈열로 사망한 국내환자의 혈액으로부터 Vero E6 조직배양세포를 사용하여 분리된 바이러스로 기존의 한탄혈청형 바이러스보다 그 병원성이 강하다. 호왕바이러스의 면역혈청과 기존의 알려진 한탄혈청형 바이러스들에 대한 교차항체역가를 형광항체법과 중화항체법으로 비교하여 보면 기존의 한탄혈청형 바이러스에 비하여 높은 교차중화항체가를 나타낸다. 또한 역전사-중합효소연쇄반응법에 의하여 일부 유전자를 증폭한 후 제한효소로 절단하였을 때 기존의 알려진 한탄바이러스와 다른 양상을 나타내었다 (26).

기존의 한탄혈청형바이러스들과 다른 양상을 나타내는 호왕균주의 대, 중, 소 3 유전자 절편중 중간크기와 작은 크기의 M, S 유전자 절편의 염기배열을 분석하여, 이미 알려져 있는 한탄혈청형 바이러스들의 염기배열과의 차이를 분석하여 비교하였다.

## 나. 연구수행의 결과

### 1) 종균바이러스 다량증식 및 바이러스의 순수분리 정제

한탄 혈청형바이러스로 한국형출혈열 환자의 혈액을 Vero E6조직배양세포에 접종하여 분리배양된 호왕바이러스를 SPF 실험동물인 생후 1일된 젓뱀이 ICR마우스에서 7대 계대배양하였다. 접종 후 10일이내에 마비증상을 나타내는 마우스의 뇌조직에서 얻은 병독성이 강한 바이러스를 종균으로 하여 다량의 한탄혈청형 바이러스를 생후 1일된 젓뱀이 ICR마우스에서 증식시켰다.

푸말라 혈청형바이러스로 러시아의 신증후출혈열 환자의 혈액을 Vero E6 조직배양세포에 접종하여 분리배양한 K27바이러스를 SPF 실험동물인 시리안 햄스터의 생후 1일된 젓뱀이 햄스터에 10대 계대배양하였다. 10대 계대배양하여 10일이내에 접종된 햄스터에서 마비증상을 나타내는 병독성이 강한 바이러스를 종균으로 하여 다량의 푸말라혈청형 바이러스를 생후 1일된 젓뱀이 햄스터에서 증식시켰다.

한탄 혈청형바이러스와 푸말라 혈청형바이러스를 각각 생후 1일 된 젓뱀이 마우스와 젓뱀이 햄스터의 뇌내로 접종하여 마비증상을 일으킨 동물의 뇌조직으로 부터 다량으로 증식된 바이러스들을 순수분리정제한 개략적인 모식도는 그림 1과 같다. 한탄 혈청형 바이러스를 증식시킨 마우스와 푸말라 혈청형 바이러스를 증식시킨 햄스터의 뇌조직을 무균적으로 적출한 다음 완충용액으로 10% 부유액을 만들었다. 원심침전시킨 후 얻은 상청액을 프로타민 설페이트 및 알콜 처리를 한 다음 원심침전을 하여 얻은 상청액을 특수여과기를 사용한 정제작업을 실시하였다. 정제된 바이러스는 초원심침전과정을 거쳐 바이러스 pellet을 얻은 다음 완충용액에 재부유시킨 후 0.1% 포르말린으로 약 30일간 섭씨 4도에서 처리하여 불활화시켰다.

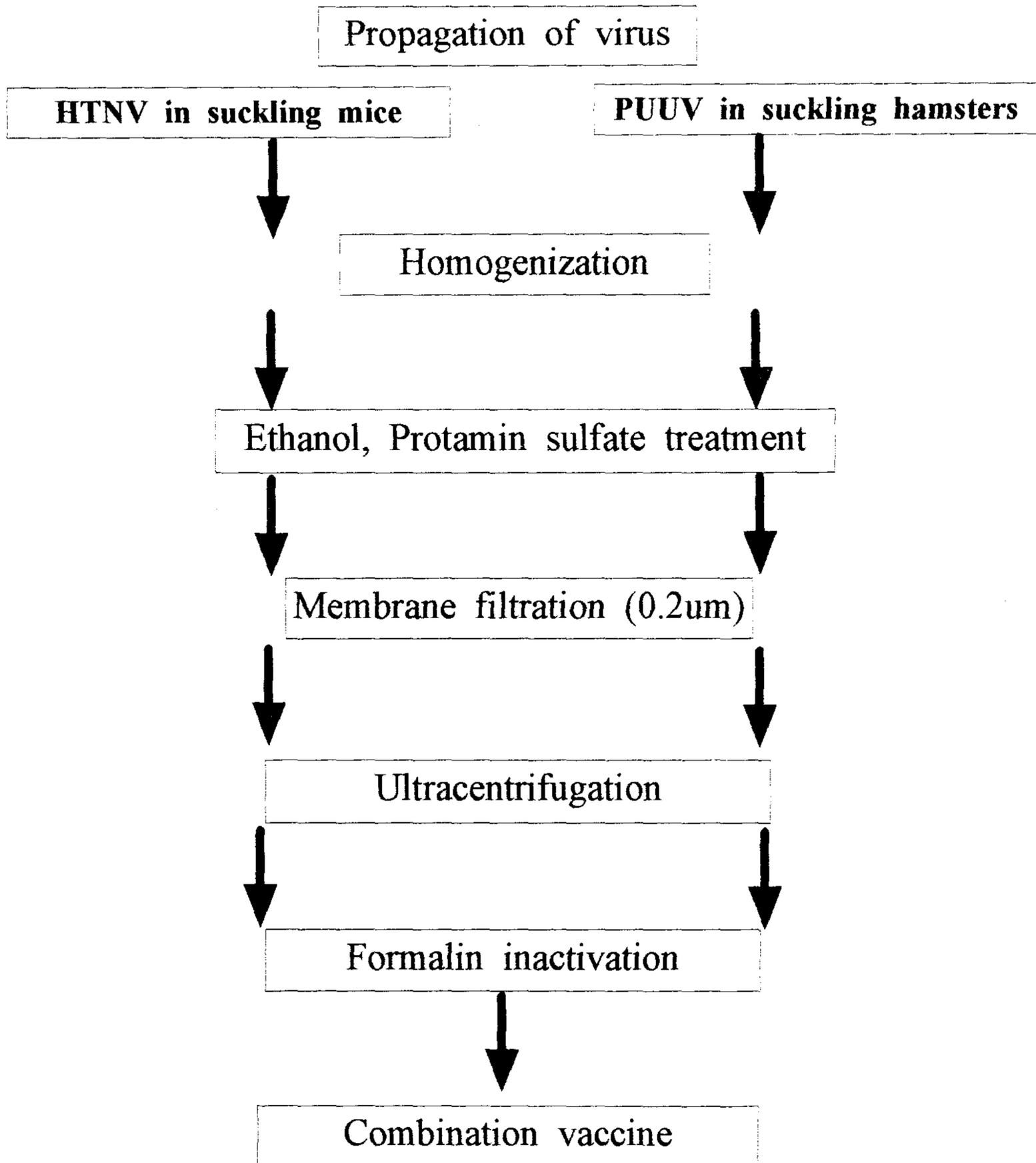


그림 1. Preparation steps of inactivated Hantaan-Puumala combination vaccine

## 2) 정제된 백신중의 단백질함량 및 바이러스항원 함량

### 1 백신후보물질중의 총 단백질 함량 측정

Bicinchoninic(BCA) 방법을 사용하여 백신후보물질중의 총단백질을 562nm 파장의 spectrophotometer에서 검출하였다 (28). 표 1에서 보는바와 같이 백신후보물질 중의 총 단백질함량은 한탄백신, 푸말라백신 그리고 혼합백신에서 각각 6.9, 16.7, 13.8ug/ml이었다.

### 2. Myelin basic protein 함량측정

Suckling mouse 와 Suckling hamster의 뇌조직에서 각각 증식시킨 한탄혈청형바이러스와 푸말라혈청형바이러스 백신후보물질중의 신경조직세포 유래 Myelin basic protein은 실험동물인 기니픽과 원숭이에서 알레르기성 뇌척수염을 유발하고, 인체에서 백신에 의한 부작용을 유발하는 물질로 알려져 있다 (29).

본 연구에서는 ELISA방법을 사용하여 Myelin basic protein 함량을 측정하였다 (30). 모든 백신에서 Myelin basic protein 함량은 0.01ng/ml이하로 (표1), 세계보건기구와 American Hospital Formulary Service Drug Information과 Physicians' Desk Reference (34, 35)에서 권장하는 불활화 백신 제조시 Myelin basic protein 함량 1ng/ml 이하의 100분의 1에도 훨씬 미달하는 더욱 정제된 백신을 개발하였다.

### 3. 항원함량 측정

제조된 백신후보물질중의 한탄바이러스와 푸말라바이러스의 항원함량을 ELISA방법을 사용하여 측정한 결과 (14), 표1에서 보는바와 같이 한탄바이러스와 푸말라바이러스 모두 1024 unit/ml로 좋은 결과를 나타내었다.

표 1. Concentration of total protein, myelin basic protein and virus antigen in vaccine

Vaccine	Total protein	Myelin basic protein	Virus antigen
Hantaan virus	6.9ug/ml	0.01ng/ml	1024 unit/ml
Puumala virus	16.7ug/ml	0.01ng/ml	1024 unit/ml
Hantaan-Puumala combination	13.8ug/ml	0.01ng/ml	HTNV:1024 unit/ml PUUV:1024 unit/ml

### 3) 정제된 백신중의 한타바이러스 구조단백질 분석

뇌조직에서 다량증식된 바이러스를 순수분리정제한 한탄바이러스 백신과 푸말라바이러스백신중의 한타바이러스 구조단백질을 확인하기 위하여 정제된 백신을 12% SDS-PAGE에서 전기영동을 실시하고 분리된 단백질을 Coomassie brilliant blue 염색액으로 염색하여 본 결과 한탄백신의 경우 41KDa 크기의 핵산단백질, 50KDa 크기의 G2당단백질 그리고 66KDa 크기의 G1 당단백질을 확인할 수 있었다. SDS-PAGE에서 전기영동을 실시하고 분리된 단백질을 NC filter상으로 옮긴 후 한국형출혈열환자 회복기혈청으로 검출된 바이러스의 3개의 구조단백질을 확인할 수 있었으며, 백신후보물질중의 한탄바이러스 구조단백질의 함량은 핵산단백질, G2 당단백질, G1 당단백질의 순으로 검출할 수 있었다 (그림 2).

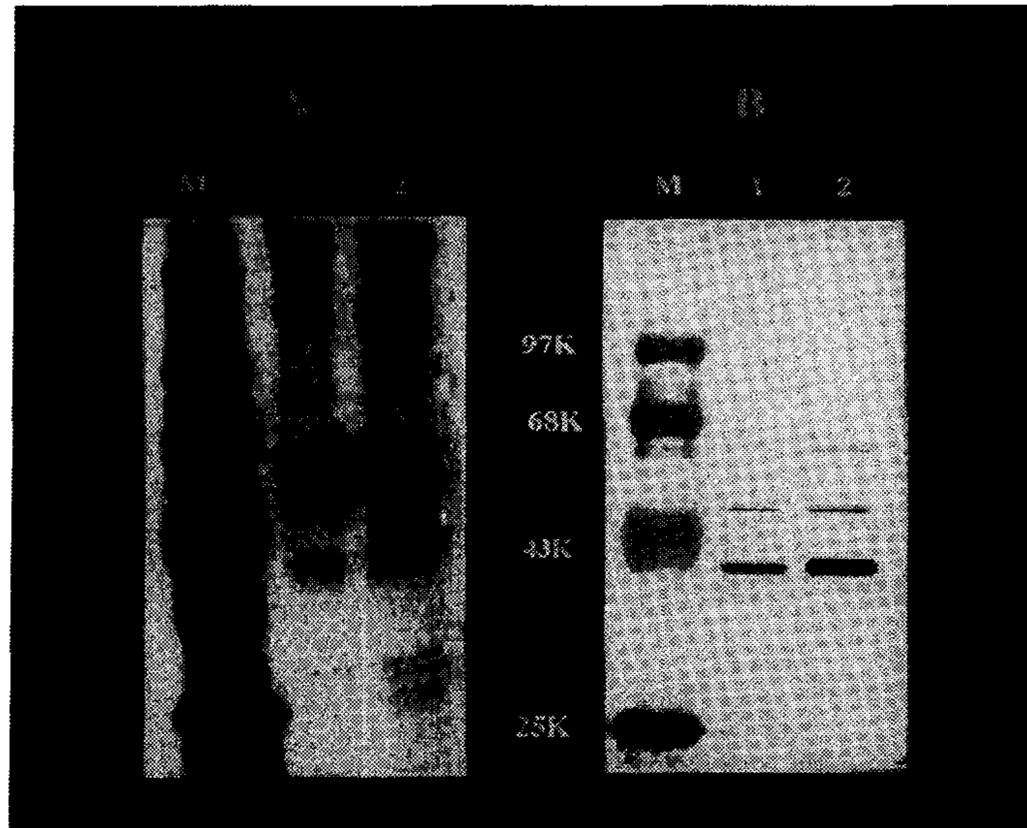


그림 2. (A) SDS-PAGE and (B) immuno-blotted protein bands of HTNV HW virus infected suckling ICR mice brains. 1) concentrated after treatment with protamine sulfate, ethanol and membrane filtration. 2) concentrated after treatment with protamine sulfate twice and ethanol of 20% brain pool. Transferred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

푸말라바이러스 백신의 경우 SDS-PAGE에서 전기영동을 실시하고 분리된 단백질을 NC filter 상으로 옮긴 후 러시아에서 발생한 푸말라바이러스에 의한 신증후출혈열환자 회복기혈청으로 반응시킨 결과 48KDa 크기의 핵산단백질, 50KDa 크기의 G2당단백질 그리고 68KDa 크기의 G1 당단백질을 확인할 수 있었으며 백신후보물질중의 한탄바이러스 구조단백질의 함량은 G2 당단백질, G1 당단백질, 핵산단백질의 순으로 검출할 수 있었다 (그림 3).

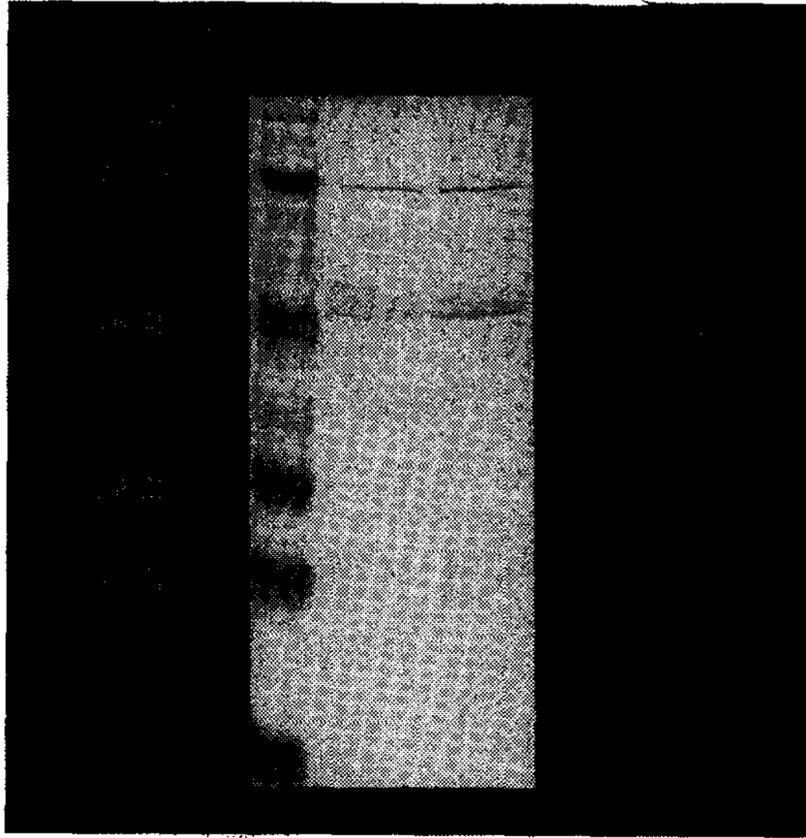


그림 3. Immuno-blotted protein bands of PUUV K27 virus infected suckling hamster brains. 1) concentrated after treatment with protamine sulfate, ethanol and membrane filtration. 2) concentrated after treatment with protamine sulfate twice and ethanol of 20% brain pool. Transferred protein bands were reacted with Russian HFRS patient's convalescent serum.

위의 결과에서 본 바와 같이 동물뇌조직중에서 대량증식되고 순수정제된 한탄바이러스백신과 푸말라바이러스백신중의 한타바이러스 특이 구조단백질을 확인할 수 있었으며, 함유되어 있는 바이러스 항원의 농도도 1,024unit/ml로서 만족스러운 결과를 얻을 수 있었다.

#### 4) 포르말린 불활화처리된 백신의 바이러스 증식여부 검사

한탄 혈청형 바이러스와 푸말라혈청형 바이러스가 다량으로 증식된 뇌조직을 완충용액으로 10% 부유액을 만든 후 원심침전시켜 얻은 상청액을 프로타민 설페이트 및 알콜 처리를 한 다음 원심침전시켰다. 원침후 얻은 상청액을 특수여과기를 사용한 정제작업을 실시한 다음 초원심침전을 시켜 얻은 바

이러스 펠렛을 완충용액으로 부유시킨 후 0.1% 포르말린으로 약 30일간 섭씨 4도에서 처리하여 불활화시켰다. 포르말린으로 불활화처리한 정제된 바이러스의 불활화 여부를 확인하기 위하여 각각의 한탄바이러스와 푸말라바이러스 백신후보물질을 Vero E6 조직배양세포와 생후 1일 된 젓밭이 ICR마우스와 젓밭이 시리안햄스터의 뇌내로 접종하여 14일 간격으로 3대 계대배양하였다. 3대에 걸쳐 조직배양세포와 실험동물에서 바이러스의 증식여부를 형광항체법과 중합효소 연쇄증합반응 방법으로 검사하였다. 표1에서 보는바와 같이 정제불활화된 백신을 조직배양세포에서 바이러스증식을 검사하여 본 결과 바이러스의 증식을 확인할 수 없었다. 또한표2에서 보는바와 같이 정제불활화된 백신을 생후 1일 된 젓밭이 ICR마우스와 젓밭이 시리안햄스터의 뇌내로 접종하여 동물의 뇌조직 및 폐장조직에서 한탄혈청형바이러스와 푸말라혈청형바이러스의 증식으로 인한 바이러스 항원 존재 유무를 확인하여 본 결과 바이러스의 증식을 확인할 수 없었다.

표 2. Detection of virus in vero E6 cell inoculated with formalin inactivated HTNV, PUUV vaccine

Inoculum	Days after infection	Antigen detection by	
		IFA	nested RT-PCR
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	-	-

표 3. Detection of virus in vero E6 cell inoculated with formalin inactivated HTNV, PUUV vaccine

Inoculum	Animal	Killed on days after infection	No. antigen positive/ No. total tested			
			Brain		Lung	
			IFA	PCR	IFA	PCR
Formalin inactivated HTNV vaccine	1 day old ICR mouse	d-14	-	-	-	-
Formalin inactivated HTNV vaccine mouse-p1	1 day old ICR mouse	d-14	-	-	-	-
Formalin inactivated HTNV vaccine mouse-p2	1 day old ICR mouse	d-14	-	-	-	-
Formalin inactivated PUUV vaccine	1 day old hamster	d-14	-	-	-	-
Formalin inactivated PUUV vaccine hamster-p1	1 day old hamster	d-14	-	-	-	-
Formalin inactivated PUUV vaccine hamster-p2	1 day old hamster	d-14	-	-	-	-

4) 면역보조제 Alum gel의 적정농도 산출 및 백신의 면역유발효과 검정

면역효과를 상승시키며, 지속시키는 Adjuvant로 사용하는 Alum gel의 적

정 농도를 산출하기 위하여 일정농도로 2배 계단희석한 Alum gel과 백신후보 물질의 혼합액 0.3ml을 그룹당 3수씩의 실험동물 햄스터에 한달간격으로 2차에 걸쳐 대퇴부 근육내로 접종한 다음 햄스터에서의 항체생성효과를 형광항체법으로 조사하였다. 표4에서 보는 바와 같이 정제불활화된 바이러스에 500ng/ml의 Alum gel을 함유하는 백신을 접종한 햄스터에서 가장 좋은 면역효과를 나타내었으며 그항체역가는 1024이었다.

표 4. Effect of alum gel concentration in HTNV-PUUV combination vaccine

Alum gel concentration	Mean IF antibody titers on		
	Before vaccination	After primary vaccination	After secondary vaccination
125ug/ml	<16	43	96
250ug/ml	<16	128	725
500ug/ml	<16	192	1024

#### 5) 백신접종한 실험동물에서의 중화항체 생성 측정

4)에서의 결과를 바탕으로 하여 면역보조제 Alum gel이 500ug/ml 첨가된 한탄혈청형바이러스백신과 푸말라혈청형백신 및 두가지 혈청형 바이러스백신이 일정비율로 혼합된 혼합백신을 실험동물 시리안햄스터에 한달간격으로 두 번에 걸쳐 대퇴부 근육내로 접종한 다음 실험동물 햄스터에서 생성되는 면역반응을 플라크감소중화항체법 (32)으로 조사하였다. 일차 및 이차에 걸쳐 백신을 접종한 후 한달 간격으로 면역된 햄스터의 안와정맥총으로부터 혈액을 채취한 다음 플라크감소중화시험법으로 한탄혈청형바이러스와 푸말라혈청형 바이러스뿐만 아니라 다른 혈청형에 속하는 병원성 한타바이러스인 서울혈청형바이러스와 벨그레이드혈청형바이러스에 대한 교차중화항체도 측정하였다. 표 5에서와 같이 두 번의 백신을 접종한 동물에서 백신유래 바이러스인

한탄바이러스와 푸말라바이러스에 대하여 높은 중화항체를 나타내었으며, 다른 두 혈청형 바이러스인 서울바이러스와 벨그레이드 바이러스에 대하여도 비교적 높은 교차중화항체를 나타내는 것을 볼 수 있었다.

표 5. Neutralizing antibody titers in vaccinated hamsters

Vaccine	Primary vaccination				Secondary vaccination			
	HTNV	SEOV	BELV	PUUV	HTNV	SEOV	BELV	PUUV
HTNV	9	3	3	0	597	117	107	3
PUUV	0	2	0	8	4	8	2	177
combined HTN-PUU	6	2	2	4	427	176	197	263

표 6. Immune response of Hantaan-Puumala virus combination vaccine in hamsters against 5 serotype Hantaviruses

Virus	Primary vaccination <sup>a</sup>		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

<sup>a</sup>Hamsters were vaccinated twice intramuscularly at one month interval, and antibody titers were measured from the sera of 30 days after each vaccination.

36수의 햄스터에 한달간격으로 2회에 걸쳐 대퇴부 근육내로 한탄-푸말라 바이러스 혼합백신을 접종한 한달후 채혈한 혈청중의 면역반응을 형광항체법과 중화항체법으로 신증후출혈열의 주요원인균인 4가지 서로다른 혈청형바이

러스인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라혈청형 바이러스와 한타바이러스페증 후군의 주요 원인균의 하나인 신늄브레바이러스에 대한 교차항체가를 검사하였다. 표 6에서 보는 바와 같이 1회 접종 한달 후 채혈한 혈청을 형광항체법으로 조사한 항체역가를 살펴보면 한탄바이러스, 서울바이러스, 벨그레이드 바이러스, 푸말라바이러스에 대한 형광항체가는 각각 78.4, 68.8, 68.8, 37.9이었고, 한타바이러스페증후군의 원인균인 신늄브레바이러스에 대한 항체가는 15.6으로서 형광항체법에 의한 각각의 혈청형 바이러스에 대한 항체역가에 큰 차이를 나타내지 않았다. 1회 접종 한달 후 채혈한 혈청을 플라크 감소중화항체법으로 조사한 항체역가를 살펴보면 한탄바이러스, 서울바이러스, 벨그레이드바이러스, 푸말라바이러스에 대한 중화항체가는 각각 65.4, 12, 6.1, 65.6 이었으며, 한타바이러스페증후군의 원인균인 신늄브레바이러스에 대한 항체가는 0.5의 극히 낮은 교차중화항체역가를 나타내었다. 2회 접종 한달 후 채혈한 혈청을 형광항체법으로 조사한 항체역가를 살펴보면 한탄바이러스, 서울바이러스, 벨그레이드바이러스, 푸말라바이러스에 대한 항체가는 각각 686.9, 567.5, 550.4, 516.3이었으며, 한타바이러스페증후군의 원인균인 신늄브레바이러스에 대한 항체가는 430.9이었다. 2회 접종 한달 후 채혈한 혈청을 플라크감소중화항체법으로 조사한 항체역가를 살펴보면 한탄 바이러스, 서울바이러스, 벨그레이드바이러스, 푸말라바이러스에 대한 항체가는 710.8, 41.9, 24.3, 409.9이었으며, 한타바이러스페증후군의 원인균인 신늄브레바이러스에 대한 항체가는 1.6의 극히 낮은 교차중화항체역가를 나타내는 것을 볼 수 있었다.

#### **6) 혈청형 감별특이primer를 사용한 nested RT-PCR 진단법과 동물모델 확립**

## 1. nested RT-PCR진단법 확립

현재까지 한타바이러스에 감염된 사람에서 발생하는 신증후출혈열과 임상적으로 유사한 증상을 나타내며 사망하는 실험동물 모델은 알려진 바 없다. 또한 한타바이러스는 바이러스의 혈청형에 따라 각각 자연계 숙주동물을 달리하며, 바이러스에 감염이 되어도 자연계 숙주동물에서 감염된 바이러스에 의하여 질병을 일으키거나 사망하지 않는다 (1). 현재까지 전세계적으로 신증후출혈열을 일으키는 원인바이러스로 알려진 4가지 혈청형 한타바이러스들은 동아시아에서 등줄쥐 (*Apodemus agrarius*)를 숙주동물로 하는 한탄바이러스, 전세계적으로 분포한 집쥐 (*Rattus norvegicus*, *R. rattus*)를 숙주동물로 하는 서울바이러스, 중부유럽의 노란목들쥐 (*Apodemus flavicolis*)를 숙주동물로 하는 벨그레이드바이러스, 그리고 유럽의 독쥐 (*Clethrionomys glareolus*)를 숙주동물로 하는 푸말라바이러스들이다. 이들 4가지 바이러스들은 자연계 숙주가 다른 것 처럼 실험실에서 사용되는 실험동물의 종류에 따라 면역항체 생성능력도 다르며, 숙주동물을 달리하는 바이러스로 감염시켰을 때 실험동물의 장기조직에서 바이러스 증식을 기존에 개발되어 있는 형광항체법으로 검정할 수 없으므로, 실험에 사용하는 바이러스의 혈청형에 따라 실험동물을 달리하여야 하는 어려운 점이 있다. 따라서 본 연구개발과제에서 개발된 혼합백신을 실험동물에 접종하여 면역을 시킨 후 각각의 살아있는 병독성 한타바이러스들로 공격감염을 실시하여 개발된 혼합백신의 서로다른 신증후출혈열 병원체에 대한 유효성을 검정하기 위한 실험동물모델 확립과 기존의 검사방법보다 더욱 민감하고 각각의 혈청형 바이러스들에 대하여 특이적으로 반응하는 검사법을 개발할 필요가 있다. 따라서 4가지 신증후출혈열 병원체인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라바이러스들 뿐만 아니라, 한타바이러스 폐증후군의 병원체인 신놉브레바이러스까지를 특이적으로 검사할 수 있는 nested RT-PCR 진단법을 개발하였다. nested RT-PCR방법으로 각각의

혈청형 바이러스를 민감하고 특이하게 검출하기 위하여 표7에서 보는 바와 같이 모두 6쌍의 혈청형특이 primer를 확립하였다. 이들 primer들은 현재까지 발표된 한타바이러스의 M segment 유전자 염기서열을 분석하여 G1당단백질 유전자부위의 상보성이 높은 부위로부터 모든 한타바이러스에 반응할 수 있는 한쌍의 외부 genus-reactive primer와 이들 primer쌍으로 증폭된 유전자 내에서 각각의 혈청형바이러스별로 특이하게 반응하는 5쌍의 한타바이러스혈청형 특이 primer를 확립하였다.

표 7. Nucleotide sequence of Hantavirus genus-reactive and serotype specific primers.

Serotype	Name	Nucleotide position	Primer sequence	Sense	Function	Products (bps)
Genus-specific	MOF103	1190-1212	5'>GGACCAGGTGCAGCTTGTGAAGC<3'	+	cDNA synthesis and downstream primer	490bp
	MOR204	1661-1680	5'>ACCTCACAAACCATTGAACC<3'	-	1' PCR upstream primer	
HTNV	HTN G1F	1343-1362	5'>TGCAACGGGCAGAGGAAAGT<3'	+	nested PCR downstream primer	285bp
	HTN G1R	1604-1625	5'>GTACTGATTTTAGCCTATTCTC<3'	-	nested PCR upstream primer	
SEOV	SEO G1F	1343-1362	5'>TGTAATGGTCAGAAAAAGAC<3'	+	nested PCR downstream primer	289bp
	SEO G1R	1607-1629	5'>CGTAGAATGGCTTTGAATCGGTT<3'	-	nested PCR upstream primer	
BELV	BEL G1F	1308-1327	5'>ATGCCAGCGAGTCGACCAA<3'	+	nested PCR downstream primer	293bp
	BEL G1R	1580-1599	5'>GAGCTATTATGTAAGATTGC<3'	-	nested PCR upstream primer	
PUUV	PUU G1F	1296-1315	5'>GTGTCCAGAGATTCCGTGGT<3'	+	nested PCR downstream primer	327bp
	PUU G1R	1599-1620	5'>GAACATAAGTATGCGAATGCAA<3'	-	nested PCR upstream primer	
SNV	SN G1F	1291-1312	5'>GTCCAAAAATTTAGAGGTTTCAG<3'	+	nested PCR downstream primer	333bp
	SN G1R	1600-1621	5'>AATAGTGCGAGCATGAGAAGGT<3'	-	nested PCR upstream primer	

이들 primer를 사용한 nested RT-PCR 진단법의 민감도와 특이도를 조사한 결과 그림 4에서 보는 바와 같이 혈청형특이 primer를 사용하여 각각의 혈청형 바이러스에 대하여 1PFU의 바이러스까지도 검출할 수 있는 민감도를 나타

내었으며, 그림 5에서 보는바와 같이 각각의 혈청형바이러스별로 특이하게 반응하는 것을 볼 수 있었다.

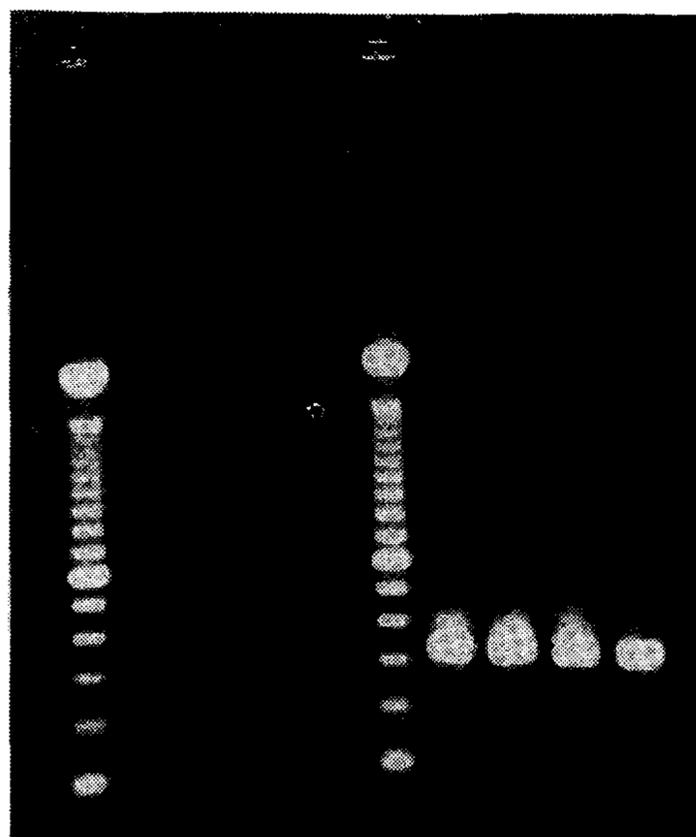


그림 4. Sensitivity of the nested RT-PCR. Agarose gel electrophoresis of nested RT-PCR products was performed in 1.2% agarose and TAE buffer. Lanes 1, 6 and 11 contain 100bp DNA ladder size marker. Lane 2 to 5 show RT-PCR product produced by outer generic primers MOF103 and MOR204. Lane 7 to 10 display nested PCR products generated with HTNV serotype-specific primers, from the first round products.

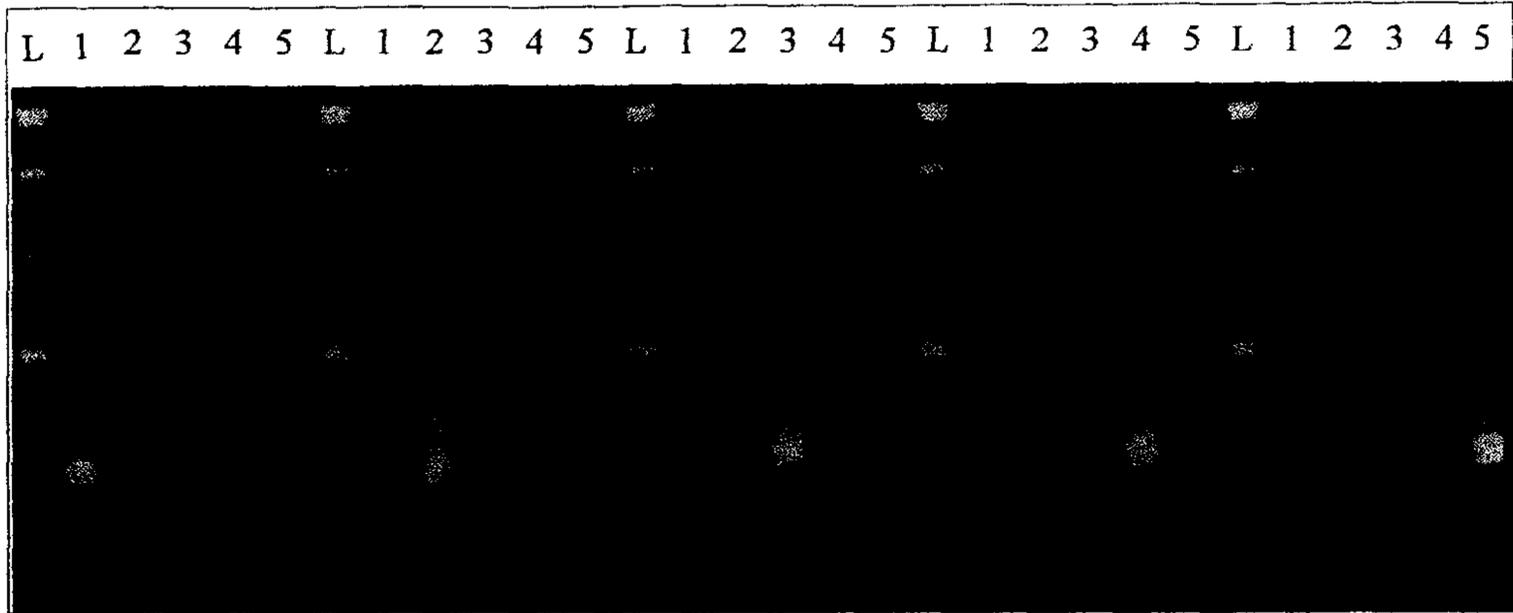


그림 5. **Specificity of nested RT-PCR.** Agarose gel electrophoresis of PCR products was performed in 1.2% agarose. Shown are nested RT-PCR products obtained from 5 different serotype viruses RNA amplified by HTN (lane 1), SEO (lane 2), BEL (lane 3), PUU (lane 4), SN (lane 5) virus serotype-specific primers. PCR products are shown in comparison to 100bp DNA ladder (BRL, Gaithersberg, MD, USA)

## 2. 한타바이러스 감염동물모델 확립

현재까지 한타바이러스에 감염되어 사람과 동일한 임상증세를 나타내거나 죽는 실험동물은 젓밭이 설치류를 제외하고는 없다. 또한 자연계에서 한타바이러스 보균동물로 알려진 설치류는 바이러스의 혈청형에 따라 그 숙주를 달리하며, 바이러스에 감염되어 있어도 보균동물에는 아무 영향을 미치지 않는다 (1). 따라서 백신의 유효성을 검정하기 위하여 백신을 접종하여 면역을 시킨 다음 살아있는 병독성 바이러스로 공격감염을 실시하여도 바이러스에 감염된 실험동물이 사망을 하거나 죽지 않는 것으로서 백신의 유효성을 입증할 수 없는 문제점이 있다. 따라서 백신의 살아있는 병독성 바이러스에 대한 방어능력 즉 백신의 유효성을 검정할 수 있는 방법은 백신을 접종하여 면역을 시킨 동물에 일정량의 살아있는 병독성 바이러스로 공격감염을 시킨 다음

실험동물의 장기조직에서 바이러스가 증식되었는지 또는 바이러스의 증식이 억제되었는지를 검사함으로써 백신의 유효성을 검정하여야 한다.

한탄혈청형바이러스의 자연계 숙주동물인 등줄쥐에 푸말라혈청형바이러스를 접종하였을 때 바이러스가 전혀 증식되지 않으며 바이러스에 의한 항체양전률도 극히 빈약하다. 햄스터와 몽골리안저빌등은 한타바이러스의 자연계 보균숙주동물은 아니지만 실험실에서 한타바이러스의 병원성연구에 많이 사용되었던 동물이며, 특히 햄스터는 한타바이러스백신의 유효성을 검정하는 동물로 사용된 바 있다 (33).

백신의 유효성을 검정하기 위한 Challenge실험의 예비실험으로서 한타바이러스에 감염된 경험이 없어 한타바이러스에 대한 항체를 보유하지 않은 정상 실험동물 햄스터에 10배 계단희석한 살아있는 병독성 바이러스인 한탄, 서울, 벨그레이드 푸말라, 신놈브레 혈청형바이러스를 일정량 대퇴부 근육내로 접종한 후 한달이 경과한 다음 실험동물의 장기조직내 바이러스 증식여부와 항체양전률을 조사하여 병독성바이러스의 최적감염농도 희석배수를 알고자 하였다. 살아있는 바이러스를 감염시킨 실험동물의 폐장 및 신장조직에서의 바이러스 증식은 간접형광항체법과 nested RT-PCR법을 사용하여 조사하였다. 표 8에서 보는바와 같이 1000pfu와 10000pfu의 바이러스를 햄스터에 접종하였을 때 모든 햄스터가 감염이 되어 바이러스에 대하여 100%의 항체양전률을 나타냈을 뿐만 아니라 폐장과 신장조직에서 바이러스항원을 검출할 수 있었다. 그러나 100000pfu의 바이러스를 감염시킨 햄스터에서는 모든 동물이 항체 양성으로 전환되었음에도 불구하고 일부 동물에서 조직중에 바이러스항원을 검출할 수 없었다. 10pfu와 100pfu의 바이러스로 감염시킨 동물에서는 일부동물에서만 항체양성으로 전환되었고 일부동물의 조직중에서만 바이러스항원을 검출할 수 있었다. 따라서 이 결과를 바탕으로 백신의 살아있는 병독성 바이러스에 대한 방어능력 즉 백신의 유효성을 검정하는 실험에서

1000pfu의 바이러스로 Challenge실험을 실시하기로 결정하였다.

표 8. Optimal virus concentration for challenge experiment in hamster model

Virus concentration	No. of antibody positive / Total no. of tested	No. of antigen positive / Total no. of tested	
		IFA	PCR
10 pfu	3/5	3/5	3/5
100 pfu	4/5	4/5	4/5
1000 pfu	5/5	5/5	5/5
10000 pfu	5/5	5/5	5/5
100000 pfu	5/5	3/5	4/5

햄스터 장기조직에서의 바이러스증식 뿐 아니라 혈액에서의 바이러스 증식을 검출하기 위하여 한타바이러스에 대한 항체가 음성인 정상 햄스터에 신증후 출혈열의 주요 병원성 바이러스들인 4가지 혈청형 바이러스 즉 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라혈청형 바이러스들과 한타바이러스페증후군의 원인균인 신놈브레혈청형바이러스를 각각 적정감염농도인 1000pfu의 바이러스를 대퇴 부 근육내로 접종하였다. 살아있는 병독성바이러스로 감염시킨 햄스터의 혈액에서 바이러스 증식을 조사하기 위하여 바이러스 접종 4일 후 부터 4일 간격으로 안와정맥총에서 혈액을 채취한 후 혈액중의 전체 리보핵산을 추출한 다음 한타바이러스 특이 프라이머쌍들을 사용하는 nested RT-PCR법으로 혈액 중의 바이러스를 조사하였다. 표 9에서와 같이 각각 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라 및 신놈브레혈청형 바이러스로 감염시킨 그룹들에서 감염된 바이러스의 혈청형에 따라 초기 바이레미아가 출현하는 시기에 차이가 있었으나 접종 4-16일 후의 혈액검체로 부터 바이러스를 검출할 수 있었다. 조직중에서 바이러스증식 검사는 접종 후 한달이 경과한 다음 감염된 동물을 안락사 시켜 희생시킨 다음 표적 조직을 채취하여 형광항체법 및 nested RT-PCR법을

사용하여 검사하여야 하나 혈액을 사용할 경우 감염시킨 동물을 희생시키지 않고도 바이러스 감염유무를 일주일 이내에 신속하게 판정할 수 있는 장점이 있다.

한타바이러스에 대한 항체가 음성인 정상 햄스터에 신증후출혈열의 주요 병원성 바이러스들인 4가지 혈청형 바이러스 즉 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라혈청형 바이러스들과 한타바이러스페증후군의 원인균인 신놈브레혈청형 바이러스를 각각 적정감염농도인 1000pfu의 바이러스를 대퇴부 근육내로 접종하여 한달이 경과한 다음 감염된 동물을 마취시켜 안락사시킨 다음 폐장과 신장 장기조직을 적출하여 간접형광항체법과 한타바이러스 특이 프라이머쌍들을 사용하는 nested RT-PCR법으로 장기조직중의 바이러스 증식을 조사하였다. 표10에서 보는바와 같이 간접형광항체법으로는 한탄바이러스 접종감염시킨 햄스터의 폐장과 신장 장기조직에서만 바이러스항원을 검출할 수 있었고 한탄이외의 서울, 벨그레이드, 푸말라바이러스 및 한타바이러스 페증후군의 원인균인 신놈브레바이러스를 감염시킨 햄스터의 장기조직으로 부터는 바이러스항원을 검출할 수 없었다. 그러나 한타바이러스 특이 프라이머쌍들을 사용하는 nested RT-PCR법으로 조직중의 바이러스핵산을 검출하였을 때 접종감염시킨 햄스터의 장기조직으로부터 모든 바이러스를 검출할 수 있어 한타바이러스 특이 프라이머쌍들을 사용하는 nested RT-PCR법의 민감도 및 특이도를 다시한번 증명할 수 있었다. 접종실험동물 모델로 사용할 햄스터에 살아있는 바이러스를 감염시킨 후 모든 감염된 동물에서 100%의 항체양전률을 나타내고 감염된 모든 동물의 장기조직중에서 바이러스를 검출할 수 있는 최적 감염농도는 1000pfu이었으며, 감염된 동물의 혈액중에서도 바이러스 증식을 검출할 수 있었다.

표 9. Detection of virus in the blood of hantavirus infected hamsters by nested RT-PCR

Virus	Viremia positive on days after infection				
	D-4	D-8	D-12	D-16	D-23
HTNV 1000pfu	4/5	1/5	0/5	0/5	0/5
SEOV 1000pfu	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5
BELV 1000pfu	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5
PUUV 1000pfu	3/5	2/5	0/5	1/5	0/5
SNV 1000pfu	0/5	3/5	2/5	1/5	0/5
Uninfected	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

표 10. Detection of virus in the lung and kidney tissues of hantavirus infected hamsters by IFA and nested RT-PCR

Virus	Antigen detection in			
	Lung		Kidney	
	IFA	nested RT-PCR	IFA	nested RT-PCR
HTNV, HW	5/5	5/5	5/5	5/5
SEOV, 80/39	0/5	5/5	0/5	5/5
BELV, Belgrade 1	0/5	5/5	0/5	5/5
PUUV, K27	0/5	5/5	0/5	5/5
SNV, New York	0/5	5/5	0/5	5/5
Uninfected	0/5	0/5	0/5	0/5

### 8) 백신의 유효성 검증

혼합백신을 접종하여 면역시킨 햄스터에 병독성이 있는 살아있는 신증후 출혈열 병원체 바이러스로 공격감염을 실시하는 Challenge 실험을 실시하여 개발된 혼합백신의 한타바이러스에 대한 감염저지력 즉 백신의 유효성을 검증

하였다. 한달 간격으로 2차에 걸쳐 혼합백신을 햄스터의 대퇴부 근육내로 접종하여 면역시킨 한달 후 햄스터를 그룹별로 나누어 각각 서로 다른 혈청형의 살아있는 1000pfu의 한타바이러스로 공격감염을 시켜 challenge 실험을 실시하였다. challenge 실험에 사용한 바이러스는 신증후출혈열의 병원체들인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라혈청형 바이러스들과 한타바이러스 폐증후군 질병을 일으키는 신놈브레바이러스를 사용하였다.

### 1. 혼합백신으로 면역된 햄스터에 Challenge 감염 후 viremia 검출

한달간격으로 2차에 걸쳐 혼합백신을 햄스터의 대퇴부 근육내로 접종하여 면역된 햄스터에 1000pfu의 살아있는 신증후출혈열 병원체 바이러스들인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라혈청형 바이러스들과 한타바이러스 폐증후군의 원인균인 신놈브레바이러스로 공격감염시킨 다음 일정간격으로 햄스터의 안와정맥총으로부터 혈액을 채취하여 혈청형 특이primer를 사용한 nested RT-PCR 진단법으로 감염시킨 햄스터 혈액내의 바이러스 즉 바이레미아를 검사하였다. 표 11에서 보는바와 같이 혼합백신으로 면역된 햄스터에 신증후출혈열 병원체 바이러스들인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라혈청형 바이러스로 공격감염시킨 각각의 햄스터의 혈액에서 바이러스의 증식을 검출할 수 없었다. 그러나 한타바이러스 폐증후군의 병원체 바이러스인 신놈브레바이러스로 감염시킨 햄스터의 혈액에서는 이 바이러스의 증식을 검출할 수 있었다.

표 11. Detection of virus RNA from the blood of vaccinated with HTNV-PUUV combination vaccine and challenged with each serotype hantaviruses by nested RT-PCR.

Virus <sup>a</sup>	Virus detection days after infection on					
	D-4	D-8	D-12	D-16	D-23	D-30
HTNV	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
SEOV	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
BELV	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
PUUV	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
SNV	0/6	4/6 <sup>b</sup>	3/6	2/6	3/6	5/6
Mock	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

<sup>a</sup>Viruses used for challenge infection were 1,000PFU of HTNV Howang, SEOV 80/39, BELV belgrade 1, PUUV K27, and SNV New York.

<sup>b</sup>Data are number of hamsters with detectable viral antigen or RNA/total number of hamsters.

## 2. 혼합백신으로 면역된 햄스터에 Challenge 감염 후 폐장조직중의 바이러스 검출

혼합백신으로 면역된 햄스터에 1000pfu의 살아있는 신증후출혈열 병원체 바이러스들인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라혈청형 바이러스와 한타바이러스페증후군의 원인균인 신놈브레바이러스로 공격감염시킨 한달 후 채취한 폐장조직에서 증식된 바이러스를 형광항체법 및 한타바이러스혈청형 특이 primer를 사용한 nested RT-PCR 항원진단법으로 검사하였다. 표 12에서 보는 바와 같이 혼합백신으로 면역된 햄스터에 신증후출혈열 병원체 바이러스들인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라혈청형 바이러스로 공격감염시킨 각각의 햄스터 폐장조직으로 부터 바이러스 증식을 검출할 수 없었다. 그러나 한타바이러스페증후군의 병원체 바이러스인 신놈브레바이러스로 감염시킨 햄스터의 폐장조직에서는 이 바이러스의 증식을 검출할 수 있었다.

표 12. Detection of virus RNA from the lung tissues of vaccinated with HTNV-PUUV combination vaccine and challenged with each serotype hantaviruses by nested RT-PCR.

Virus	Antigen detection in lung tissues <sup>a</sup>	
	IFA	nested RT-PCR
HTNV Howang	0/6	0/6
SEOV 80/39	0/6	0/6
BELV Belgrade 1	0/6	0/6
PUUV K27	0/6	0/6
SNV New York	0/6	6/6 <sup>b</sup>
Mock	0/6	0/6

<sup>a</sup>All vaccinated, challenged hamsters were killed on 4 weeks after challenge infection.

<sup>b</sup>Data are number of hamsters with detectable viral antigen or RNA/total number of hamsters.

### 3. 혼합백신으로 면역된 햄스터에서 Challenge 감염 후 항체가변이 조사

#### a. 형광항체법에 의한 항체가 변이 조사

한달 간격으로 2차에 걸쳐 혼합백신을 접종하여 면역시키고, 2차부스터접종이 끝난 한달 후 햄스터를 그룹별로 나누어 4가지 혈청형의 살아있는 신증후출혈열 병원체 바이러스인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라바이러스와 한타바이러스페증후군의 원인균인 신놈브레바이러스 각각 1000pfu로 challenge 감염시킨 한달 후 안락사시켜 채혈한 다음 면역된 햄스터에서 공격감염 실시 전 과 후의 항체가 변이를 형광항체법과 플라크감소증화항체법으로 조사하였다.

표 13에서 보는바와 같이 혼합백신으로 면역된 햄스터에 신증후출혈열 병원체 바이러스들인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라바이러스들을 challenge 감염시킨 햄스터 그룹에서의 항체역가를 형광항체법으로 조사한 항체역가의 급격한 증가를 볼 수 없어 신증후출혈열 병원체인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라바이러스들은 모두 방어할 수 있음을 볼 수 있었다. 그러나 한타바이

리스페증후군 질병을 일으키는 신놈브레바이러스로 challenge감염시킨 햄스터 그룹에서는 형광항체 역가가 challenge 감염시키기 전 45.3에서 challenge 감염시킨 후 1706.7로 약 38배의 급격한 증가를 나타내어 한타바이러스증후군 원인균인 신놈브레바이러스는 방어할 수 없음을 알 수 있었다.

표 13. IFA antibody titers of vaccinated, challenged hamsters against 5 different serotype Hantaviruses

Group <sup>a</sup>	Before challenge					After challenge				
	IFA antibody titers against					IFA antibody titers against				
	HTNV	SEOV	BELV	PUUV	SNV	HTNV	SEOV	BELV	PUUV	SNV
HTN	576	197.3	197.3	522.7	96	448	112	162.7	330.7	72
SEO	938.7	213.3	336	309.3	34.7	1045.3	288	501	522.7	61.3
BEL	512	176	170.7	554.7	32	704	266.7	394.7	810.7	37.3
PUU	640	234.7	266.7	416	40	800	661.3	650.7	440	80
SN	768	277.3	277.3	778.7	45.3	1045.3	565.3	906.7	1280	1706.7

<sup>a</sup>Vaccinated hamsters were divided into 5 challenged groups of each 6 hamsters of HTNV Howang, SEOV 80/39, BELV belgrade 1, PUUV K27, SNV New York.

<sup>b</sup>Hamsters were vaccinated twice intramuscularly at one month interval, and antibody titers were tested against HTNV Howang, SEOV 80/39, BELV belgrade 1, PUUV K27, SNV New York.

<sup>c</sup>Antibody titers were expressed as mean antibody titer.

## b. 플라크감소중화항체법에 의한 항체가 변이 조사

표 14에서 보는 바와 같이 혼합백신으로 면역된 햄스터에 신증후출혈열 병원체 바이러스들인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라바이러스들을 challenge감염시킨 햄스터 그룹에서 공격감염 실시 전·후의 중화항체역가를 플라크감소중화항체법으로 조사한 결과 중화항체역가의 급격한 증가를 볼 수 없어 신증후출혈열 병원체인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라바이러스들은 모두 방어할 수 있음을 볼 수 있었다. 그러나 한타바이러스 폐증후군 질병을 일으키는 신놈브레바이러스를 challenge감염시킨 햄스터 그룹에서는 중화항

체역가가 challenge 감염시키기 전 1.3에서 challenge 감염시킨 후 1045의 중화항체역가를 나타내어 약 804배로 급격히 증가된 것을 볼 수 있어 신놈브레바이러스에 감염된 것을 알 수 있었다.

표 14. Neutralizing antibody titers of vaccinated, challenged hamsters against 5 different serotype Hantaviruses

Group <sup>a</sup>	Before challenge					After challenge				
	Neut antibody titers against					Neut antibody titers against				
	HTNV	SEOV	BELV	PUUV	SNV	HTNV	SEOV	BELV	PUUV	SNV
HTNV	2762.7	102.7	32	90.7	0	3456	33.3	37.3	154.1	1.3
SEOV	221.3	28	24	477.3	0	330.7	53.3	34.7	477.3	5.0
BELV	320	60	50.7	492	6.7	496	92	76	149.3	6.7
PUUV	77.8	6.7	8	720	0	172	10.7	17.3	520	2.7
SNV	172	12	6.7	269.3	1.3	120	49.3	36	725.3	1045

<sup>a</sup>Vaccinated hamsters were divided into 5 challenged groups of each 6 hamsters of HTNV Howang, SEOV 80/39, BELV belgrade 1, PUUV K27, SNV New York.

<sup>b</sup>Hamsters were vaccinated twice intramuscularly at one month interval, and antibody titers were tested against HTNV Howang, SEOV 80/39, BELV belgrade 1, PUUV K27, SNV New York.

<sup>c</sup>Antibody titers were expressed as mean antibody titer.

혼합백신을 접종하여 면역시킨 햄스터에 살아있는 병독성이 있는 신증후출혈열 병원체 바이러스로 공격감염을 실시하는 Challenge 실험을 실시하여 개발된 혼합백신의 한타바이러스에 대한 감염저지력 즉 백신의 유효성을 검정하는 실험결과 신증후출혈열의 원인균인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라바이러스로 공격감염을 시킨 햄스터의 혈액 및 폐장조직으로부터 바이러스를 검출할 수 없었으며, Challenge 감염 전과 후에 채취한 혈청에서의 형광항체 및 중화항체 역가의 변이를 볼 수 없어 이들 신증후출혈열의 병원체에 대한 감염저지력을 확인할 수 있었다. 그러나 한타바이러스페증후군의 원인균인 신놈브레바이러스로 공격감염을 시킨 햄스터의 혈액 및 폐장조직으로부터 바이러스의 증식을 검출할 수 있었으며, Challenge 감염 전과 후에 채취한

혈청에서 형광항체 및 중화항체 역가의 급격한 증가변이를 볼 수 있어 한타 바이러스폐증후군의 병원체에 대하여는 신증후출혈열 예방 혼합백신의 유효성이 없음을 알 수 있었다.

#### 10) 혼합백신의 급성 및 아급성 독성시험결과

약 6주령의 SPF S.D. Rat와 ICR 마우스의 피하 및 복강내로 각각 사람 기준용량의 100 ~ 1000배로 농축시킨 혼합백신 0.5ml, 0.2ml을 각각 랫트와 마우스에 투여하였으며, 대조군으로 동량의 생리식염수를 접종한 다음 2주에 걸쳐 접종한 동물의 운동성, 외관 및 자율신경증상등의 임상증상을 관찰하였다. 접종 2주후 접종한 동물을 부검하여 주요장기의 이상유무를 관찰하였다. 실험계 각군에 대한 측정치는 생물학적 통계프로그램을 이용한 one way ANOVA를 실시하고 F ratio값을  $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다. 각군의 유의성있는 차이가 검출된 검사항목은 다시 Tukey's HSD-test를 실시하여 어느구간에 유의성있는 차이가 도출되는지  $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다. 추정임상용량의 100 ~ 1000배에 해당하는 용량의 혼합백신을 각각 암·수 랫트에 피하투여했을 때도 사망하는 동물이 없었으며, 체중, 일반증상, 부검소견등에 있어서도 시험군과 대조군사이에 유의할만한 차이가 인정되지 않았다(표 15, 표 16).

표 15. Body weight changes of male S.D. rats subcutaneously injected with HTNV-PUUV combination vaccine.

Group <sup>a</sup> Days	Control	100x	200x	500x	750x	1000x
d-0	168.8 ± 7.1 <sup>b</sup>	179.0 ± 5.1	180.0 ± 7.8	182.2 ± 8.9	183.3 ± 4.4	185.8 ± 5.8
d-2	178.7 ± 6.5	180.5 ± 6.1	188.8 ± 6.5	188.5 ± 7.4	190.3 ± 3.8	200.2 ± 6.9
d-4	186.3 ± 4.7	203.5 ± 14.9	186.0 ± 35.5	220.2 ± 36.6	207.5 ± 7.1	210.0 ± 6.2
d-6	202.2 ± 9.0	213.5 ± 13.1	216.0 ± 10.2	215.5 ± 9.6	214.0 ± 3.2	217.2 ± 7.4
weight increase	33.3 ± 5.3	34.5 ± 10.6	36.0 ± 4.7	32.8 ± 2.9	30.7 ± 5.9	31.3 ± 9.2

<sup>a</sup> Each group consisted of 6 rats

<sup>b</sup> Body weight changes are expressed in g unit

표 16. Body weight changes of female S.D. rats subcutaneously injected with HTNV-PUUV combination vaccine.

Group <sup>a</sup> Days	Control	100x	200x	500x	750x	1000x
d-0	141.0 ± 3.0 <sup>b</sup>	140.2 ± 5.5	145.8 ± 8.4	148.8 ± 5.3	143.7 ± 5.2	145.8 ± 6.7
d-2	150.7 ± 2.3	148.2 ± 5.3	156.3 ± 10.1	154.0 ± 6.2	152.0 ± 6.3	155.8 ± 5.1
d-4	156.0 ± 5.1	156.8 ± 4.5	162.8 ± 10.9	157.0 ± 6.2	156.7 ± 6.7	162.5 ± 3.9
d-6	156.5 ± 5.0	164.2 ± 3.1	165.2 ± 8.8	166.3 ± 4.6	163.0 ± 6.7	165.8 ± 3.6
weight increase	24.5 ± 3.2	24.9 ± 3.9	19.3 ± 5.2	18.0 ± 3.9	19.3 ± 2.7	20.0 ± 4.5

<sup>a</sup> Each group consisted of 6 rats

<sup>b</sup> Body weight changes are expressed in g unit

임상용량의 100 ~ 1000배에 해당하는 용량의 혼합백신을 랫트의 복강내로 접종하였을 때에도 피하투여의 경우와 마찬가지로 사망하는 동물이 없었으며, 체중, 일반증상, 부검소견등에 있어서도 시험군과 대조군사이에 유의할 만한 차이가 없었다 (표 17, 표 18).

표 17. Body weight changes of male S.D. rats intraperitoneally injected with HTNV-PUUV combination vaccine.

Group <sup>a</sup> Days	Control	100x	200x	500x	750x	1000x
d-0	183.2 ± 10.5 <sup>b</sup>	183.3 ± 7.5	180.5 ± 7.5	184.8 ± 8.7	186.3 ± 5.3	186.2 ± 5.3
d-2	204.8 ± 15.7	183.7 ± 0.7	187.2 ± 5.9	185.8 ± 9.7	192.2 ± 4.9	196.8 ± 8.3
d-4	214.0 ± 13.9	206.3 ± 13.6	203.3 ± 9.0	202.5 ± 13.4	208.7 ± 5.6	210.1 ± 9.5
d-6	219.0 ± 14.7	217.5 ± 13.0	218.3 ± 10.3	218.7 ± 10.0	216.7 ± 5.3	218.3 ± 8.1
weight increase	35.8 ± 5.1	34.2 ± 10.5	37.8 ± 7.4	33.8 ± 2.3	30.3 ± 6.6	32.2 ± 6.6

<sup>a</sup> Each group consisted of 6 rats

<sup>b</sup> Body weight changes are expressed in g unit

표 18. Body weight changes of female S.D. rats intraperitoneally injected with HTNV-PUUV combination vaccine.

Group <sup>a</sup> Days	Control	100x	200x	500x	750x	1000x
d-0	140.0 ± 4.3 <sup>b</sup>	140.5 ± 4.8	144.7 ± 6.9	142.5 ± 8.8	140.5 ± 3.6	142.2 ± 4.9
d-2	151.3 ± 66.3	149.7 ± 64.9	152.5 ± 67.4	153.0 ± 7.9	149.2 ± 64.2	156.7 ± 6.0
d-4	152.7 ± 5.9	150.5 ± 3.9	153.7 ± 7.1	155.0 ± 7.4	151.2 ± 3.8	158.3 ± 6.2
d-6	160.5 ± 5.7	157.5 ± 4.5	161.0 ± 6.3	159.5 ± 8.9	185.7 ± 4.8	160.8 ± 5.8
weight increase	20.5 ± 2.0	17.0 ± 0.6	16.3 ± 2.1	17.0 ± 3.3	18.2 ± 3.3	18.6 ± 2.1

<sup>a</sup> Each group consisted of 6 rats

<sup>b</sup> Body weight changes are expressed in g unit

임상용량의 100 ~ 1000배에 해당하는 혼합백신을 마우스의 피하로 주사하였을 때에도 사망하는 동물이 없었으며, 체중, 일반증상, 부검소견등에 있어서도 시험군과 대조군사이에 유의할 만한 차이를 볼 수 없었다 (표 19, 20).

표 19. Body weight changes of male ICR mice subcutaneously injected with HTNV-PUUV combination vaccine.

Group <sup>a</sup> Days	Control	100x	200x	500x	750x	1000x
d-0	23.8 ± 1.6 <sup>b</sup>	27.3 ± 0.9	24.3 ± 1.7	27.0 ± 0.2	23.8 ± 1.5	24.0 ± 1.7
d-2	25.3 ± 1.5	28.5 ± 1.1	26.0 ± 1.7	27.3 ± 3.5	26.2 ± 1.9	25.5 ± 1.4
d-4	26.2 ± 1.9	30.3 ± 1.5	26.5 ± 1.5	30.3 ± 2.1	26.7 ± 0.2	26.3 ± 1.5
d-6	27.3 ± 1.3	30.8 ± 0.7	30.8 ± 0.7	30.8 ± 2.4	27.2 ± 2.3	27.2 ± 1.5
weight increase	3.5 ± 0.8	3.5 ± 0.5	6.5 ± 1.5	3.8 ± 0.9	3.3 ± 0.2	3.2 ± 1.3

<sup>a</sup> Each group consisted of 6 mice

<sup>b</sup> Body weight changes are expressed in g unit

표 20. Body weight changes of female ICR mice subcutaneously injected with HTNV-PUUV combination vaccine.

Group <sup>a</sup> Days	Control	100x	200x	500x	750x	1000x
d-0	20.8 ± 1.1 <sup>b</sup>	20.0 ± 0.8	19.8 ± 1.6	21.2 ± 1.8	22.3 ± 2.8	20.8 ± 1.7
d-2	22.2 ± 1.1	21.5 ± 1.3	21.7 ± 1.7	22.8 ± 1.7	22.0 ± 1.7	22.5 ± 1.4
d-4	23.2 ± 1.7	22.2 ± 1.1	22.7 ± 1.1	23.8 ± 0.9	23.7 ± 1.5	24.2 ± 1.8
d-6	24.0 ± 1.3	23.2 ± 0.7	23.0 ± 1.2	24.7 ± 0.7	25.0 ± 1.9	24.0 ± 1.2
weight increase	3.5 ± 1.2	3.2 ± 0.9	3.2 ± 1.3	3.5 ± 1.3	2.7 ± 3.8	3.2 ± 1.1

<sup>a</sup> Each group consisted of 6 mice

<sup>b</sup> Body weight changes are expressed in g unit

임상용량의 100 ~ 1000배에 해당하는 혼합백신 농축액을 마우스의 복강내로 투여하였을 때에도 사망하는 동물이 없었으며, 체중, 일반증상, 부검소견 등에 있어서도 시험군과 대조군 사이에 유의할 만한 차이가 인정되지 않았다.

(표 21, 22).

표 21. Body weight changes of male ICR mice intraperitoneally injected with HTNV-PUUV combination vaccine.

Group <sup>a</sup> Days	Control	100x	200x	500x	750x	1000x
d-0	25.0±1.3 <sup>b</sup>	28.0±1.9	24.2±2.1	26.8±2.8	26.0±2.2	26.2±1.6
d-2	27.7±1.8	30.5±2.0	27.2±2.5	29.3±2.6	28.2±2.4	28.7±1.5
d-4	28.3±1.5	31.0±1.6	28.3±2.3	30.5±2.1	29.2±2.2	29.8±1.1
d-6	28.8±1.3	31.0±1.3	28.3±2.4	30.5±1.7	29.7±2.1	29.7±0.7
weight increase	3.8±1.3	3.0±1.0	4.2±0.7	3.7±1.8	3.7±0.9	3.5±1.3

<sup>a</sup> Each group consisted of 6 mice

<sup>b</sup> Body weight changes are expressed in g unit

표 22. Body weight changes of female ICR mice intraperitoneally injected with HTNV-PUUV combination vaccine.

Group <sup>a</sup> Days	Control	100x	200x	500x	750x	1000x
d-0	18.7±4.3	20.5±2.0	19.2±2.0	20.8±1.9	18.2±2.3	20.0±1.9
d-2	19.3±4.5	21.8±2.7	20.5±2.1	22.5±2.1	21.5±2.6	22.2±1.8
d-4	21.2±4.1	22.5±3.0	21.2±2.0	23.3±2.2	22.5±2.6	23.0±1.5
d-6	22.3±4.1	23.0±2.4	21.5±1.7	23.8±2.0	23.0±2.2	23.3±1.6
weight increase	3.7±2.4	2.5±1.7	2.3±1.5	3.0±1.8	4.8±1.2	3.3±0.7

<sup>a</sup> Each group consisted of 6 mice

<sup>b</sup> Body weight changes are expressed in g unit

## 11) 러시아 신증후출혈열 만연지역내 환자들에서의 원인바이러스 혈청형 조사

본 연구개발과제에서 개발한 푸말라바이러스백신과 혼합백신은 푸말라바이러스 및 서로 다른 Genetic lineage에 속하는 각각의 서로 다른 혈청형에 속하는 두가지 이상의 한타바이러스에 의한 신증후출혈열 다발생지역인 러시아를 비롯한 중부유럽지역을 대상으로 하여 개발된 것이며, 개발에 있어 러시아의학아카데미 소아마비·뇌염바이러스 연구소와 연구협정을 체결함으로써 가능하게 된 연구개발과제이다. 또한 개발된 백신의 기업화를 이루기 위하여는 신증후출혈열 다발생지역에서의 대규모 야외임상시험이 필수적이다. 대규모 야외임상시험을 위하여는 러시아나 중국과 같이 인구가 많고 신증후출혈열의 발생빈도가 높아서 인구 일천명당 수명의 환자가 발생하는 지역이 가장 이상적인 지역일 것이다. 본 연구개발과제에 의하여 개발된 혼합백신의 우수한 면역성, 유효성이 확인되었고 차후 계속사업으로 진행시킬 개발된 혼합백신의 상용화연구에서 반드시 실시하여야 할 대규모 야외임상시험을 준비하기 위한 기초자료로 먼저 신증후다발생지역에 어떠한 혈청형의 한타바이러스에 의하여 환자가 많이 발생하는가를 알아야 할 필요가 있다.

본 연구개발과제에서 개발된 푸말라백신과 혼합백신의 대규모 야외임상시험을 추진하는데 있어 러시아의학아카데미 소아마비·뇌염바이러스 연구소와 체결한 국제공동연구 협정에 의한 연구사업의 일환으로 러시아내 신증후출혈열 만연지역에서 발생한 환자들의 혈청을 채취하여 어떠한 혈청형의 한타바이러스에 의한 신증후출혈열환자인지를 형광항체법 (7)과 플라크감소중화항체법 (32)으로 조사하였다.

1996년도와 1997년도에 러시아내 신증후출혈열 만연지역인 바쉬코르토스탄 자치공화국에서 신증후출혈열 유행기인 6 ~ 10월 사이에 발생하여 임상적, 혈청학적으로 신증후출혈열환자임이 확인된 환자들 중의 일부인 121개의 혈청 중 1996년도 환자혈청 91개와 1997년도 환자혈청 30개를 러시아의학아

카데미 소아마비·뇌염바이러스 연구소와 공동으로 조사하였다. 총 121명의 환자혈청을 신증후출혈열 병원체인 한탄바이러스, 서울바이러스, 벨그레이드 바이러스, 푸말라바이러스 그리고 한타바이러스페중후군의 원인균인 신놈브레바이러스에 대하여 형광항체법과 플라크감소중화시험법으로 검사한 결과 표 23에서 보는 바와 같이 1996년도 환자 91명중 89명 (97.8%)은 푸말라바이러스에 감염된 환자이고 2명 (2.2%)은 벨그레이드바이러스에 감염된 환자임이 확인되었다. 1997년도 환자 30명중 25명 (83.3%)은 푸말라바이러스에 감염된 환자이고 4명 (13.3%)은 벨그레이드바이러스에 감염된 환자임을 확인할 수 있었으며 1명 (3.3%)의 환자는 표 24에서 보는 바와 같이 푸말라바이러스와 벨그레이드바이러스 두가지 혈청형의 바이러스에 모두 높은 중화항체를 나타내어 바이러스혈청형을 감별할 수 없었다. 이 혈청형을 감별할 수 없었던 한명의 환자는 임상적으로 신증후출혈열을 두 번 앓았음이 확인되었다. 최초 입원시의 혈청을 얻을 수 없어 처음에 감염되었던 바이러스혈청형을 확인할 수 없었으나 임상적인 자료에 의하면 최초 푸말라바이러스에 의한 신증후출혈열을 앓은 후 수년이 경과한 후 다른 Genetic lineage에 속하는 벨그레이드바이러스에 감염된 것으로 추정된다.

Æ 23. Serotype identification of HFRS patients in Bashikiria, Russia during 1996, 1997

Year \ Virus	HTNV <sup>a</sup>	SEOV <sup>b</sup>	BELV <sup>c</sup>	PUUV <sup>d</sup>	SNV <sup>e</sup>
1996	0/91	0/91	2/91 (2.2%)	89/91 (97.8%)	0/91
1997	0/30	0/30	5/30 (16.7%)	26/30 (86.7%)	0/30
Total	0/121	0/121	7/121 (5.8%)	115/121 (95.0%)	0/121

<sup>a</sup>HTNV : Hantaan virus strain 76/118

<sup>b</sup>SEOV : Seoul virus strain 80/39

<sup>c</sup>BELV : Belgrade virus strain 1

<sup>d</sup>PUUV : Puumala virus strain K27

<sup>e</sup>SNV : Sin Nombre virus strain New York

표 24. PRN antibody titers of HFRS patients against 5 serotype hantaviruses.

Country	Code no.	PRN titer against				
		HTNV <sup>a</sup>	SEOV <sup>b</sup>	BELV <sup>c</sup>	PUUV <sup>d</sup>	SNV <sup>e</sup>
Korea	31	160	20	20	<10	20
	402	160	20	40	40	10
	570	160	10	40	10	<10
	573	160	20	40	20	10
Sweden	647	10	10	20	160	10
	1342	20	10	20	160	10
	1543	10	10	40	160	10
	1754	20	20	20	160	20
Yugoslavia	205	20	<10	20	2560	20
	1911	20	<10	10	1280	10
	4985	10	<10	2560	<10	10
	5404	10	<10	2560	10	10
	5455	320	<10	2560	2560	10
Russia	9	40	<10	<10	640	10
	15	40	<10	<10	80	10
	Uf 3	40	10	80	320	<10
	Bl 13	20	<10	80	320	10
	Ig 28	160	40	1280	1280	20
	49	1280	10	2560	320	10
	58	160	40	2560	320	10
	Uf 10	80	10	320	20	10
	Bl 15	80	10	640	40	10

<sup>a</sup>HTNV : Hantaan virus strain 76/118

<sup>b</sup>SEOV : Seoul virus strain 80/39

<sup>c</sup>BELV : Belgrade virus strain 1

<sup>d</sup>PUUV : Puumala virus strain K27

<sup>e</sup>SNV : Sin Nombre virus strain New York

## 12) 푸말라바이러스 신증후출혈열 환자 진단방법 개발

현재까지 푸말라혈청형바이러스에 의한 유럽형신증후출혈열 진단은 기존에 확립되어 있는 형광항체법 또는 면역효소항체법을 사용하여 진단하여 왔다 (1). 그러나 기존의 형광항체법에 의한 진단방법에서는 형광현미경과 같은 특수한 장비를 갖춘 실험실에서 숙련된 실험자에 의하여 실시되어야 하는 관계로 제한된 실험실에서만 진단이 가능하여 왔다. 면역효소항체법에 의한 경우 진단에 있어 많은 시간이 소요되어야 하며 비특이적인 반응이 많이 나타나는 단점이 있다.

본 연구개발과제인 신증후출혈열 예방 혼합백신개발을 하는 과정에서 부수적으로 얻은 정제된 푸말라바이러스항원을 이용하여 푸말라바이러스에 의한 신증후출혈열환자를 간편하고 신속하게 진단할 수 있는 새로운 진단방법을 개발할 수 있게 되었다.

### **1. Preparation of antigen-coated high density particle**

혼합백신 제조시 사용한 종균바이러스인 푸말라바이러스 K27균주를 백신제조방법에서 사용한 방법과 동일하게 정제하여 포르말린으로 불활화처리한 푸말라바이러스 항원을 고밀도입자(High Density Particle)에 감작시켰으며, 대조항원으로는 바이러스에 감염되지 않은 정상 햄스터의 뇌조직으로부터 추출한 단백질을 감작시킨 고밀도 입자를 준비하였다. 푸말라바이러스항원을 5% 고밀도입자 (High Density Particle)와 혼합한 후 실온에서 3시간 반응시킨다. 그후 인산완충용액으로 세척한 후 고밀도입자 완충용액에 부유시킨다음 냉동건조시킨다. 그후 유럽신증후출혈열 환자의 혈청을 2계단 희석하여 Chessboard titration방법으로 적정항원 농도를 산출한 결과 푸말라바이러스 항원 감작 HDP는 8000ELISA units/ml 으로 coating하여 사용하였 때

가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다 (표 25).

표 25. Box titration of the Puumala virus antigen coated HDP and antibody positive serum

Antigen (ELISA units/ml)	Dilution of IFA positive serum							
	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800
10,000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
8,000	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
6,000	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
4,000	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
2,000	+++	+++	++	-	-	-	-	-
1,000	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-

## 2. 고밀도입자 응집반응과 형광항체법의 비교

푸말라바이러스항원 고밀도입자 응집진단법의 민감도 및 특이도를 조사하기 위하여 유라시아 대륙의 즉 한국, 중국, 일본, 핀란드, 유럽러시아에서 발생한 신증후출혈열 환자혈청 및 정상인의 혈청들을 사용하여 기존의 확립된 진단방법인 형광항체법과 비교하여 본 결과 표 26에서 보는바와 같이 고밀도입자 응집반응의 민감도 및 특이도는 형광항체법에 의한 결과와 유사한 것을 알 수 있었다. 따라서 형광현미경과 형광물질이 부착된 항혈청을 필요로 하는 등의 시설이 갖추어진 실험실에서만 형광항체법에 의한 진단이 가능하나 이번에 개발된 고밀도입자 응집반응에 의한 항체검사는 특수시설을 필

요로 하지 않는다. 또한 형광항체법에 의한 혈청진단검사는 숙련된 실험자를 필요로 하나 고밀도입자 응집반응에 의한 항체검사는 누구나 손쉽게 조작을 할 수 있는 우수한 진단방법이다.

表 26. Comparison of antibody titers by HDPA to IFA

No.	Nation	Code no.	HDPA		IFA	
			HTNV	PUUV	HTNV	PUUV
1	KOREA	KHF81-498-6	5,120	80	10,240	80
2		KHF81-499-6	5,120	<20	20,480	80
3		KHF81-566-7	5,120	80	20,480	320
4		KHF81-745-4	2,560	<20	5,120	40
5		Negative	<20	<20	<20	<20
6		Negative	<20	<20	<20	<20
7		Negative	<20	<20	<20	<20
8	CHINA	C-X-15	1,280	80	10,240	2,560
9		C-X-27-1	10,240	40	20,480	2,560
10		C-X-46	10,240	80	20,480	80
11		C-X-28	10,240	<20	20,480	<20
12		C-X-24	10,240	80	20,480	80
13	FINLAND	FIN85-869	40	1,280	80	5,120
14		FIN85-860	80	5,120	80	5,120
15		FIN85-736	160	5,120	320	5,120
16		FIN85-805	80	2,560	160	5,120
17		FIN85-808	40	5,120	80	5,120
18		Negative	<20	<20	<20	<20
19		Negative	<20	<20	<20	<20
20	RUSSIA	USSR75-1308	640	2,560	320	5,120
21		USSR90-1333a	20	80	<20	160
22		USSR96-1061	160	1,280	80	2,560
23		USSR91-1333	20	2,560	20	2,560
24		USSR96-587	40	<20	80	2,560
25	JAPAN	HM-9	160	<20	320	20
26		Yoshimi Ueda	80	<20	160	<20
27		NCU-8	160	<20	640	<20
28		NCU-28	<20	<20	<20	<20
29		H-05	<20	<20	<20	<20

### 13) 한탄혈청형 호왕바이러스의 유전자구조 분석

#### 가. 호왕바이러스의 M, S 유전자 염기서열 분석

한타바이러스는 분야비리대과에 속하는 바이러스로 3분절로 이루어진 음극성의 단선 리보핵산을 유전자로 가지는 바이러스이다 (36). 본 연구과제인 신증후출혈열 예방 혼합백신 제조의 종균바이러스로 사용하는 한탄혈청형바이러스 호왕바이러스와 푸말라혈청형 바이러스 K27 바이러스중 푸말라혈청형 바이러스 K27 바이러스의 M, S 유전자 염기서열이 발표되어 보고된 바 있으나 한탄혈청형바이러스 호왕바이러스의 M, S 유전자 염기서열의 자료는 아직 밝혀진바 없다. 기존의 한탄혈청형 바이러스 76/118균주, 현재 한탄바이러스 백신의 종균으로 사용되는 84/105균주와 호왕균주의 차이를 보기 위하여 유전자염기서열을 분석하였다. 그림 6에서 보는 바와 같이 호왕바이러스의 M유전자는 모두 3615개의 염기로 구성되어 있어 76/118 균주 (38) 와 비교하여 하나의 염기가 결손되어 있는 것을 알 수 있었으며, 한탄 76/118균주와는 그 염기서열에서 약 93.5%의 상동율을 나타내는 것을 볼 수 있었다.

그림 6. Nucleotide sequence of the M genome segment of Hantaan virus Howang strain.

10	20	30	40	50
TAGTAGTAGA	CACCGCAAAA	GAAAGCAGTC	AATCAGCAAC	ATGGGGATAT
60	70	80	90	100
GGAAGTGGCT	AGTGATGGCC	AGTTTAGTAT	GGCCTGTTTT	GACACTAAGA
110	120	130	140	150
AATGTCTATG	ACATGAAAAT	TGAGTGTGCC	CACACAGTAA	GTTTCGGGGA
160	170	180	190	200
AAACAGTGTG	ATAGGGTATG	TGGAATTACC	CCCAATGCCA	TTGGCTGACA
210	220	230	240	250
CAGCACAGAT	GGTGCCTGAG	AGTTCTTGCA	GCATGGATAA	TCACCAATCA
260	270	280	290	300
TTAAATACAA	TCACGAAATT	TACCCAAATA	AGTTGGAGAG	GAAAGGCTGA
310	320	330	340	350
TCAGTCACAG	TCTAGTCAAA	ATTCATTTGA	GGCAGTGTCT	ACTGAAGTTG
360	370	380	390	400

ACTTGAAAGG AACATGTGTT TTGAAACACA AGATGGTGGG GGAATCATA  
 410 420 430 440 450  
 CGCAGTAGAA AATCAATAAC CTGTTATGAC TTATCTTGTA ATAGCACTTA  
 460 470 480 490 500  
 CTGCAAGCCA AACTATAACA TGATTGTACC AATTCATGCA TGTAATATGA  
 510 520 530 540 550  
 TGAAAAGTTG TTTGATTGCA TTGGGACCAT ACAGAGTGCA GGTAGTTTAT  
 560 570 580 590 600  
 GAGAGAAGTT ACTGCATGAC AGGAGTCCTG GTTGAAGGAA AATGCTTTGT  
 610 620 630 640 650  
 CCCAGATCAA AGTGTGGTCA GTATTATTAA GCACGGGATC TTTGATATTG  
 660 670 680 690 700  
 CAAGTGTTCA CATTGTATGT TTCTTTGTGG CAGTTAAAGG GAATACTTAT  
 710 720 730 740 750  
 AAACTTTTTG AACAGGTAA GAAATCCTTT GAATCAACAT GCAATGATAC  
 760 770 780 790 800  
 AGAGAATAAA ATACAAGGAT ATTATATCTG TATTGTAGGG GGAAACTCTG  
 810 820 830 840 850  
 CACCAATATA TGTTCCAACA CTTGATGATT TCAGGTCCAT GGAGGCATTT  
 860 870 880 890 900  
 ACAGGAATTT TTAGATCACC ACACGGAGAA GACCACGATC TGCCCGGAGA  
 910 920 930 940 950  
 GGAAATTGCA TCTTATTCTA TAGTCGGACC TGCCAATGCA AAAGTTCCTC  
 960 970 980 990 1000  
 ATAGTGCTAG CTCAGATAACA TTGAGCCTGA TTGCTTATTC AGGTATACCA  
 1010 1020 1030 1040 1050  
 TCTTATTCTT CCCTTAGCAT CCTAACAAGT TCAACAGAAG CTAAACATGT  
 1060 1070 1080 1090 1100  
 ATTCAGCCCT GGGTTGTTCC CAAAGCTTAA CCACACAAAT TGTGATAAGA  
 1110 1120 1130 1140 1150  
 GTGCTATACC ACTCATGTGG ACCGGGATGA TTGATTTACC TGGATACTAT  
 1160 1170 1180 1190 1200  
 GAAGCTATCC ACCCTTGCAC AGTTTTTTGC GTATTGTCAG GTCCTGGGGA  
 1210 1220 1230 1240 1250  
 CATCTGTGAG GCCTTTTCTG AAGGCGGGAT TTTTAACATA ACCTCCCCTA  
 1260 1270 1280 1290 1300  
 TGTGCTTAGT GTCAAAGCAA AATCGATTCC GGTTAACAAA ACAGCAAGTG  
 1310 1320 1330 1340 1350  
 AATTCGTGT GTCAGCGGGT GGACATGGAC ATTGTTGTGT ACTGCAACGG  
 1360 1370 1380 1390 1400  
 GCAAAGGAAA GTTATATTAA CAAAACTTT AGTTATTGGA CAATGTATAT  
 1410 1420 1430 1440 1450  
 ATACTATAAC AAGCTTATTT TCATTACTAC CTGGAGTAGC ACATTCTATT  
 1460 1470 1480 1490 1500  
 GCTGTTGAAT TGTGTGTACCT GGATTCCAC GGATGGGCCA CAGCTGCTCT  
 1510 1520 1530 1540 1550  
 ACTTGTTACA TTCTGTTTTG GATGGGTTCT TATACCAGCA ATCACATTA

1560	1570	1580	1590	1600
TCATACTAAC	AATTCTAAAG	TTCATCGCCA	ATATTTTCCA	CACAAGTAAC
1610	1620	1630	1640	1650
CAAGAAAATA	GGCTAAAATC	AGTACTTAGA	AAAATAAAGG	AAGAGTTTGA
1660	1670	1680	1690	1700
AAAAAAAAAAA	GGTTCAATGG	TGTGTGATAT	CTGGAAGTAT	GAGTGTGAAA
1710	1720	1730	1740	1750
CCTATAAAGA	ATTAAAGGCA	CATGGGGTTT	CATGTCCTCA	ATCTCAATGT
1760	1770	1780	1790	1800
CCTTACTGTT	TTACACATTG	TGAACCCACA	GAAGCAGCAT	TCCAAGCTCA
1810	1820	1830	1840	1850
TTACAAGGTA	TGCCAAGTCA	CTCACAGATT	CAGGGATGAC	CTAAAGAAAA
1860	1870	1880	1890	1900
CTGTCACTCC	TCAGAACTTC	ACACCAGGAT	GTTACCGTAC	ACTGAATTTA
1910	1920	1930	1940	1950
TTTAGATACA	AAAGTAGGTG	TTACATCTTT	ACAATGTGGA	TATTTCTCCT
1960	1970	1980	1990	2000
TGTCCTAGAA	TCTATACTGT	GGGCTGCAAG	TGCATCAGAG	ACACCATTGA
2010	2020	2030	2040	2050
CTCCTGTATG	GAATGATAAT	GCCCATGGGG	TAGGTTCTGT	TCCTATGCAT
2060	2070	2080	2090	2100
ACAGATTTAG	AACTTGATTT	CTCCTTAACA	TCCAGTTCCA	AGTACACATA
2110	2120	2130	2140	2150
TCGTAGGAAG	TTAACAAACC	CACTTGAGGA	AGCACAATCC	ATTGATCTAC
2160	2170	2180	2190	2200
ATATTGAGAT	AGAAGAACAA	ACAATTGGTG	TTGACGTACA	TGCTCTAGGG
2210	2220	2230	2240	2250
CACTGGTTTG	ATGGTCGTCT	CAACCTCAA	ACATCCTTTC	ACTGTTATGG
2260	2270	2280	2290	2300
TGCTTGTACA	AAGTATGAAT	ACCCCTGGCA	TACTGCAAAG	TGCCACTATG
2310	2320	2330	2340	2350
AAAGAGATTA	TCAGTATGAG	ACAAGTTGGG	GTTGTAACCC	ATCAGATTGT
2360	2370	2380	2390	2400
CCTGGGGCGG	GCACAGGCTG	TACAGCATGT	GGTTTATACC	TAGACCAACT
2410	2420	2430	2440	2450
AAAACCAGTT	GGTAGTGCTT	ATAAAATCAT	CACAATAAGG	TATAGCAGGA
2460	2470	2480	2490	2500
GAGTCTGTGT	TCAATTTGGA	GAGGAAAACC	TTTGTAAGAT	AATAGACATG
2510	2520	2530	2540	2550
AATGATTGTT	TTGTATCTAG	GCATGTTAAG	GTCTGTATAA	TTGGTACAGT
2560	2570	2580	2590	2600
ATCTAAATTC	TCTCAGGGTG	ATACATTGTT	GTTTTTTGGG	CCACTTGAAG
2610	2620	2630	2640	2650
GTGGTGGTCT	AATATTTAAA	CACTGGTGTA	CATCCACATG	TCAATTTGGT
2660	2670	2680	2690	2700
GACCCAGGAG	ACATCATGAG	TCCAAGAGAC	AAAGGTTTTT	TGTGCCCTGA
2710	2720	2730	2740	2750

ATTCCCAGGC AGTTTCAGGA AAAAATGCAA CTTTGCTACT ACCCCTATTT  
 2760 2770 2780 2790 2800  
 GTGAGTATGA TGGAAATATG GTTTCAGGTT ATAAGAAGGT GATGGCAACA  
 2810 2820 2830 2840 2850  
 ATTGATTCAT TTCAATCTTT CAATACAAGC ACTATGCACT TTAAGTATGA  
 2860 2870 2880 2890 2900  
 AAGGATAGAG TGGAAAGACC CTGATGGAAT GCTAAGGGAC CATATAAACA  
 2910 2920 2930 2940 2950  
 TTTTAGTAAC AAAGGACATT GACTTTGATA ACCTTGGTGA AAATCCTTGT  
 2960 2970 2980 2990 3000  
 AAGATTGGCC TACAAACGTC TTCTATTGAG GGAGCCTGGG GTTCTGGGGT  
 3010 3020 3030 3040 3050  
 GGGGTTTACA TTAACATGTC TGGTGTCACT AACAGAATGT CCCACCTTTT  
 3060 3070 3080 3090 3100  
 TAACCTCAAT AAAGGCTTGT GATAAAGCCA TCTGTTATGG TGCAGAGAGT  
 3110 3120 3130 3140 3150  
 GTAACATTAA CAAGAGGACA AAATACAGTC AAGGTATCAG GGAAAGGTGG  
 3160 3170 3180 3190 3200  
 CCATAGTGGT TCAACATTTA AGTGTTGTCA TGGGGAGGAC TGTTTCGCAGG  
 3210 3220 3230 3240 3250  
 TCGGGCTCCA TGCTGCTGCA CCTCACCTCG ACAAGGTCAA TGGGATTTCT  
 3260 3270 3280 3290 3300  
 GAGATAGAAA ATAGTAAAGT ATATGATGAT GGAGCACCGC AATGTGGAAT  
 3310 3320 3330 3340 3350  
 AAAATGTTGG TTTGTAAAT CAGGGGAATG GATTTTCAGGG ATTTTCAGTG  
 3360 3370 3380 3390 3400  
 GTAATTGGAT TGTAATCATT GTCCTCTGTG TATTTCTATT GTTTTCATTG  
 3410 3420 3430 3440 3450  
 GTGTTGCTAA GCATTCTCTG TCCTGTTAGG AAACATAAAA AATCATAGCT  
 3460 3470 3480 3490 3500  
 ACACGGTGTC ACTATCCCAT TATTGTGTAT AGCTTTAACA TATATACTAA  
 3510 3520 3530 3540 3550  
 TTTTTGTATT CCAATATACT CTATCTAACA CACTAAAAAA AATAGTAGCT  
 3560 3570 3580 3590 3600  
 TTCTAACCAC AAAACTTAGA TTTTCTTCT GTATGATGTC TTAACATCTG  
 3610  
 CGGAGTCTAC TACTA

호왕균주는 한탄 76/118균주와 동일하게 하나의 긴 open reading frame(ORF)을 가지는 것을 볼 수 있었으며 (그림 7), 생성되는 아미노산은 한탄 76/118균주와 와 97.1%의 상동률을 나타내는 것을 볼 수 있었다.

File : HW M

Range : 1 ~ 3615

Initiation Codon : ATG

Termination Codon : TAA, TAG, TGA

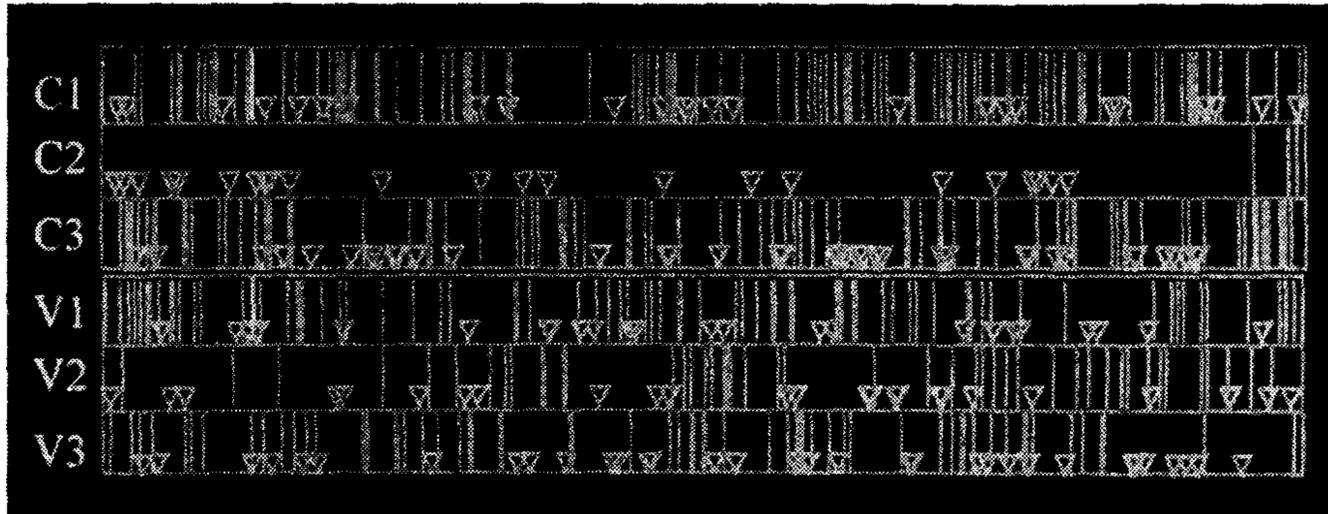


Fig. 7. Open reading frame of the M genome segment of Hantaan Howang strain.

생성되는 단백질은 다른 한타바이러스들과 동일하게 cysteine 아미노산의 함량이 높은 편으로 약 5.2%(60개)의 cysteine 아미노산을 함유하는 것을 볼 수 있었다. 염기서열 분석으로 추정되는 아미노산의 N-glycosylation 부위는 모두 7개로 한타바이러스 76/118균주와 동일한 위치에 가지고 있었으며, G1 부위에 5개 그리고 G2부위에 2개의 부위를 가지는 것을 볼 수 있었다. 다른 한타바이러스와 동일하게 G1과 G2당단백질의 아미노기 말단은 일련의 험수성 아미노산들로 이루어져 있는 것을 볼 수 있었으며, G2부위의 카르복실기 말단의 아미노산들은 일련의 긴 험수성 아미노산들로 이루어져 있어 막에 단단히 달라붙는 것으로 추정할 수 있다. 호왕균주의 M segment에서 추정되는 G1 당단백질의 예상되는 분자량은 64KDa이었으며, G2 당단백질의 예상되는 분자량은 53.7KDa이었다. 호왕균주의 M segment에서 추정되는 아미노산들의 험수도를 한타바이러스 76-118균주와 비교하였을 때 거의 동일한 양상을 나타내었으나, 생성되는 단백질의 2차원적 구조를 비교하였을 때, 두 균주간에 약간의 차이가 있음을 볼 수 있었다 (그림 8).

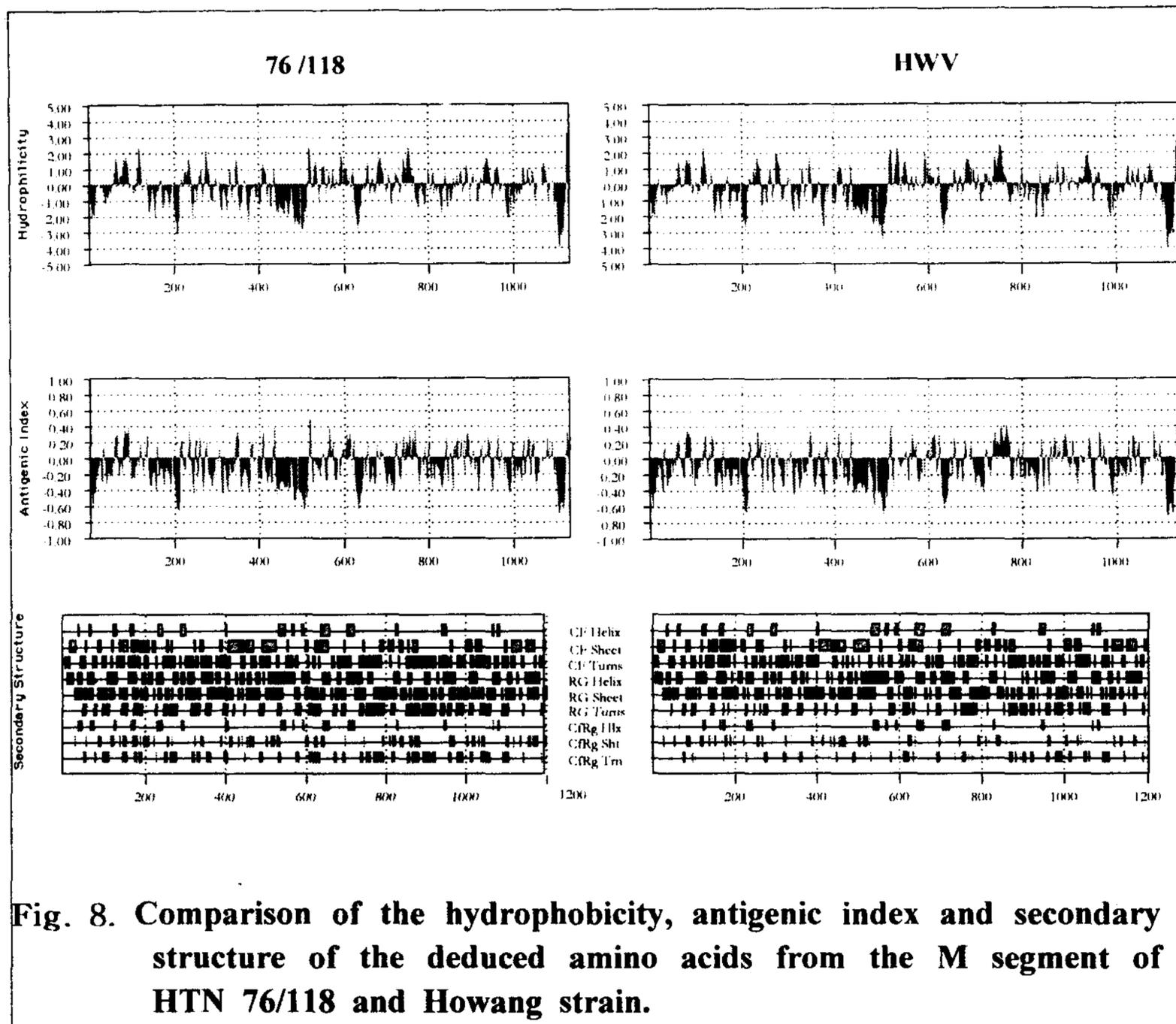


Fig. 8. Comparison of the hydrophobicity, antigenic index and secondary structure of the deduced amino acids from the M segment of HTN 76/118 and Howang strain.

호왕균주 S segment는 한탄바이러스 76/118균주 (39)와 동일하게 모두 1696개의 염기로 이루어져 있으며(그림 9), 두 균주 사이의 상동률은 약 94%인 것을 알 수 있었으며, 호왕균주 S segment의 ORF (그림 10)도 M segment와 동일하게 하나의 긴 ORF를 바이러스 상보핵산에 가지는 것을 확인하였으며, 429개의 아미노산 또는 48.1kDa의 단백질을 encode하는 것을 볼 수 있었다. 호왕균주 S segment로부터 추정되는 아미노산은 한탄바이러스 76/118균주와 비교하여 약 97.2%의 상동률을 나타내었으며, 생성되는 아미노산의 함

수도를 비교하여 본 결과 두 바이러스가 거의 동일한 양상을 나타내는 것을 볼 수 있었으나, 생성되는 단백질의 2차원적 구조 및 항원도에서 약간의 차이가 있음을 볼 수 있었다 (그림 11).

그림 9. Nucleotide sequence of the S genome segment of Hantaan virus Howang strain.

10	20	30	40	50
TAGTAGTAGA	CTCCCTAAAG	AGCTACTAGA	ACAACGATGG	CAACTATGGA
60	70	80	90	100
GGAATTACAG	AGGGAAATCA	ATGCCACGA	GGGTCAATTA	GTGATAGCCA
110	120	130	140	150
GGCAGAAGGT	GAGGGATGCA	GAAAAACAGT	ATGAAAAGGA	TCCAGATGAG
160	170	180	190	200
TTGAACAAGA	GAACATTAAC	GGACCGAGAG	GGTGTTGCAG	TATCTATTCA
210	220	230	240	250
GGCAAAGATT	GATGAGTTAA	AAAGACAGCT	GGCAGACAGG	ATTGCAACTG
260	270	280	290	300
GGAAGAACCT	TGGGAAGGAA	CAGGATCCAA	CAGGGGTAGA	GCCTGGAGAC
310	320	330	340	350
CACCTGAAAG	AGAGATCAAT	GCTTAGTTAT	GGCAATGTAC	TGGATTTAAA
360	370	380	390	400
CCACTTGGAT	ATTGATGAAC	CTACAGGACA	GACAGCAGAC	TGGCTGAGCA
410	420	430	440	450
TTGTTGTCTA	TCTTACATCC	TTTGTGTCC	CAATACTTCT	GAAAGCCCTG
460	470	480	490	500
TATATGTTAA	CAACAAGAGG	GAGGCAGACC	ACCAAGGACA	ACAAAGGAAC
510	520	530	540	550
CCGGATTCGA	TTTAAGGATG	ATAGCTCATT	TGAGGATGTT	AACGGTATTC
560	570	580	590	600
GAAAACCAA	ACATCTTTAC	GTGTCCTTGC	CAAATGCACA	GTCAAGTATG
610	620	630	640	650
AAGGCAGAAG	AGATTACACC	TGGCAGATAT	AGGACAGCAG	TCTGTGGACT
660	670	680	690	700
CTACCCTGCA	CAGATCAAGG	CAAGGCAAAT	GGTCAGTCCA	GTCATGAGTG
710	720	730	740	750
TAATTGGTTT	TCTGGCATTG	GCGAAAGATT	GGAGTGATCG	TATTGAGCAA
760	770	780	790	800
TGGTTGAGTG	AACCCTGCAA	GCTTCTTCCA	GATACAGCGG	CAGTCAGCCT
810	820	830	840	850
CCTCGGTGGT	CCTGCAACAA	ACAGGGACTA	TTTACGGCAG	CGGCAAGTTG
860	870	880	890	900
CATTAGGCAA	TATGGAGACA	AAGGAGTCAA	AGGCTATACG	CCAGCATGCA
910	920	930	940	950

GAAGCAGCTG GCTGTGGCAT GATTGAAGAT ATTGAGTCAC CATCATCAAT  
960 970 980 990 1000  
ATGGGTATTT GCTGGAGCAC CAGACCGTTG TCCACCAACA TGCTTGTTTA  
1010 1020 1030 1040 1050  
TAGCAGGCAT TGCCGAGCTT GGGGCATTTT TTTCCATCTT ACAGGATATG  
1060 1070 1080 1090 1100  
CGAAATACAA TCATGGCATC TAAGACAGTT GGGACATCCG AGGAGAAGCT  
1110 1120 1130 1140 1150  
GAGGAAAAAA TCATCATTCT ACCAGTCTTA TCTCAGGAGG ACACAATCAA  
1160 1170 1180 1190 1200  
TGGGAATACA ACTGGACCAA AGAATCATTG TGCTCTTCAT GGTTGCCTGG  
1210 1220 1230 1240 1250  
GGAAAGGAGG CTGTAGACAA CTTCCACTTA GGGGATGATA TGGATCCTGA  
1260 1270 1280 1290 1300  
ACTGAGGACA CTGGCACAGA GCTTGATTGA TGTCAAGGTG AAGGAAATCT  
1310 1320 1330 1340 1350  
CCAACCAAGA GCCTTTAAAA CTCTAATTA TGAATGTATT AACCCTTTTA  
1360 1370 1380 1390 1400  
TGTGATTAGC ATATACTACT GAATCATTAT CAATCATATT TACACTATCA  
1410 1420 1430 1440 1450  
TTATCAGGGG AATCATTATA TCAGGGTAAG GGAACATTTA TGGGTGGGAA  
1460 1470 1480 1490 1500  
TCATTACTCA AGGGTGGGCC AGTTAATCCG TTGTGGGTGG GTTTAGTTCC  
1510 1520 1530 1540 1550  
AGGCTGCCTT AAGTAGCCTT TTTCTGTATA TATGGATGTA GATTCATTT  
1560 1570 1580 1590 1600  
GATCCTTAAC TAATCTTGCT TTCTTTCCCT TTCTTTCTGC TTTCTCTGCT  
1610 1620 1630 1640 1650  
TACTAACAAC AACATTCTAC CTCAACACAC AACTACCCCA ACTTAACTAC  
1660 1670 1680 1690  
CTCATTTGAT TGCTCCTTGA TTGTCTTTTT AGGGAGCATA CTAATA

File : HW S

Mode : Normal

Range : 1 ~ 1693

Initiation Codon : ATG

Termination Codon : TAA, TAG, TGA

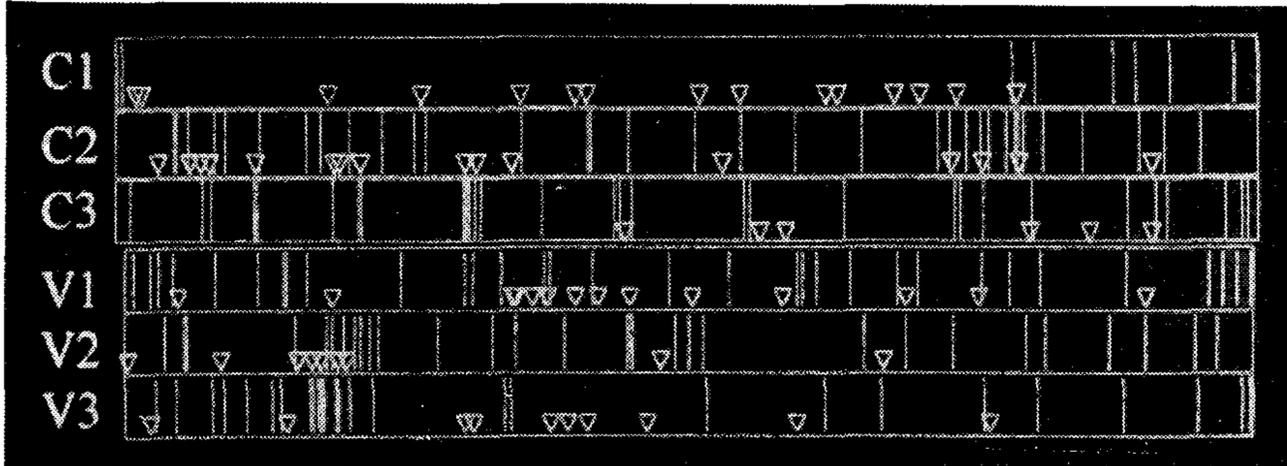


Fig. 10. Open reading frame of the S genome segment of Hantaan virus Howang strain

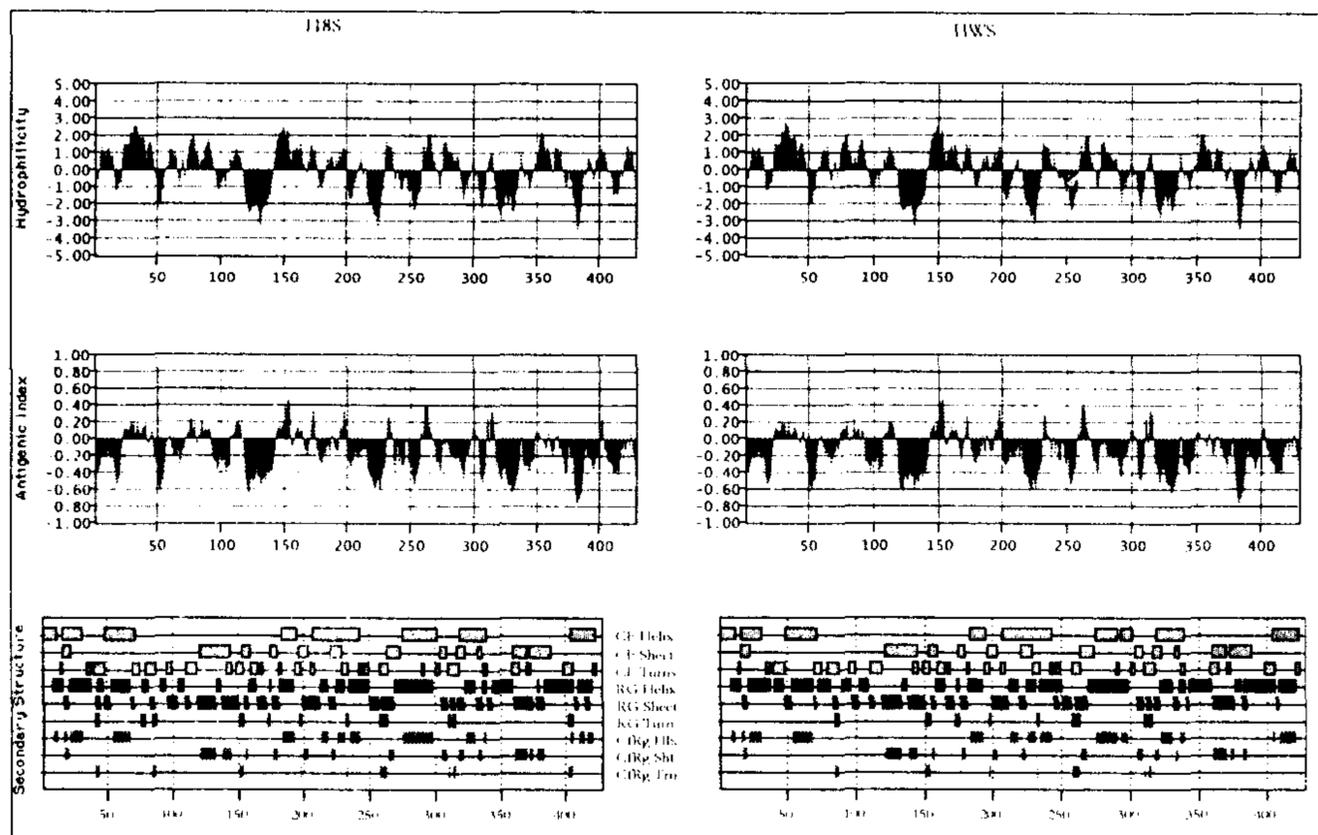


Fig. 11. Comparison of the hydrophobicity, antigenic index and secondary structure of the deduced amino acids from the S segment of HTN 76/118 and Howang strain.

## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 1. 연도별 연구목표 및 연구개발목표 달성도

#### 1) 1차년도

##### 가. 1차년도 연구목표

- 두가지 혈청형 바이러스의 다량증식
- 바이러스의 정제법 확립
- 실험동물에서 정제 불활화된 백신의 면역성 안전성 확인

##### 나. 평가착안점

- 정제된 백신후보물질의 총 단백질함량 과 이종단백질함량 특히 Myeline basic 단백질의 함량 및 백신중에 포함된 바이러스항원의 양이 세계보건기구에서 권장하는 기준치에 일치하는지를 평가의 척도로 한다.
- 백신후보물질을 실험동물에접종하여 백신의 면역원성을 조사한다. 백신을 접종한 실험동물에서의 항체역가를 형광항체법과 플라크감소중화시험법으로 측정한다. 특히 바이러스의 감염을 중화시키는 중화항체의 역가를 정량적으로 측정한 결과의 유의성을 평가의 척도로 한다.
- 두가지 서로 다른 Genetic lineage에 속하는 각각의 혈청형 바이러스를 사용하여 만들어진 혼합백신을 동물에 접종하여 백신의 면역원성을 형광항체법과 플라크감소중화시험법으로 생성된 항체를 조사하며, 교차 중화실험을 통하여 타 혈청형 바이러스들에 대한 교차중화항체의 역가를 정량적

으로 측정된 결과를 평가의 척도로 한다.

#### 다. 1차년도 연구개발목표 달성도

##### · 백신후보물질의 총단백함량 평가

백신후보물질중의 총 단백질함량은 13.8ug/ml이하였으며 바이러스항원 함유량은 1024 ELISA unit/0.1ml이고, 신경조직세포 유래 불활화백신에서 부작용을 일으키는 원인으로 알려진 Myelin basic 단백질의 함량을 ELISA법으로 측정된 결과 0.01 ng/ml이하의 결과를 얻어, 세계보건기구에서 규정한 백신중의 총 단백질함량 75ug/ml과 Myelin basic 단백질함량 1ng/ml 이하보다 훨씬 적은 수치를 나타내는 백신을 정제할 수 있는 기술을 확보하였다.

##### · 백신후보물질의 불활화 검사

정제 불활화된 백신후보물질을 Vero E6 조직배양세포와 생후 1일 된 젓뱀이 마우스와 젓뱀이 햄스터의 뇌내에 접종하여 정제불활화된 백신중의 살아있는 바이러스 증식을 확인하여 본 결과 완전히 불활화된 것을 확인할 수 있었다.

##### · 백신후보물질의 항원성 검사

백신중에 함유되는 Alum gel 면역보조제의 적정농도를 산출한 결과 500 ng/ml를 함유하였을 때 가장 좋은 항체역가를 나타내었다. 500 ng/ml의 Alum gel 면역보조제를 함유하는 백신후보물질을 실험동물 햄스터에 접종한 다음 얻은 면역혈청을 형광항체법과 플라크감소중화시험법으로 신증후출혈열 병원체인 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라바이러스에 대한 형광항체와 중화항체를 검사하였다. 한탄바이러스와 푸말라바이러스에 대한 형광항체는 각각

1024 - 4096의 항체역가를 나타내었고 중화항체가는 64-1024의 항체역가를 나타내었다. 또한 신증후출혈열의 또다른 병원성 바이러스인 서울바이러스와 벨그레이드바이러스에 대하여도 만족할만한 중화항체가를 나타내었다.

## 2) 2차년도

### 가. 2차년도 연구목표

- 혼합백신을 접종한 실험동물에서 얻은 면역혈청중 신증후출혈열 원인균인 4종류 혈청형 바이러스와 한타바이러스폐증후군의 원인균에 대한 교차중화 항체 역가 측정
- 백신으로 면역된 실험동물에서 여러 혈청형의 한타바이러스에 대한 교차 방어능력 측정
- 백신을 접종한 실험동물에서 급성 및 아급성독성시험 실시

### 나. 평가착안점

- 신증후출혈열의 동물모델로 사용한 햄스터에서의 신증후출혈열 병원체 바이러스들뿐 아니라 한타바이러스 폐증후군의 병원체 바이러스의 증식을 검정할 수 있는 실험방법으로 확립한 한타바이러스혈청형 특이 primer쌍을 사용한 nested RT-PCR 방법의 유의성

- 혼합백신을 실험동물에 접종한 후 얻은 면역혈청중의 생성된 중화항체의 역가를 백신유래 바이러스 뿐 아니라 신증후출혈열의 병원체임이 증명된 타 혈청형 바이러스들에 대한 조사하여 얻은 교차중화항체 역가의 유의성
- 혼합백신으로 면역시킨 실험동물에 살아있는 병원성 바이러스들로 공격감염을 시켰을 때, 이 감염으로부터 실험동물이 보호되었는지를 검정한 감염저지력시험결과의 유의성
- 혼합백신백신을 접종한 실험동물에서 급성 및 아급성 독성시험의 결과의 유의성

#### 다. 2차년도 연구개발목표 달성도

- **혈청형 특이 primer를 사용한 nested RT-PCR**

한타바이러스의 M segment 유전자로부터 유래된 Genus-reactive primer와 각각의 혈청형 특이 primer를 사용한 nested RT-PCR검사법으로 1pfu의 바이러스까지도 확인할 수 있는 민감도를 나타내었다. 이와 더불어 감염시킨 바이러스의 혈청형을 감별진단할 수 있는 특이도를 확인할 수 있었다. 이 nested RT-PCR검사법을 사용하여, 햄스터 실험동물 모델에 적용하여 햄스터 혈액 및 조직에서의 바이러스 증식여부를 조사하여 본 결과 신증후출혈열 병원체들인 4종류의 서로 다른 혈청형 바이러스들인 한탄바이러스, 서울바이러스, 벨그레이드 바이러스, 푸말라바이러스 뿐 아니라 한타바이러스페증후군의 병원체인 신놉브레바이러스까지 민감하고 특이적으로 진단할 수 있었다.

- **신증후출혈열 병원체 바이러스들과 한타바이러스페증후군 병원체 바이러스에 대한 교차중화항체역가 조사**

한달간격으로 2차에 걸쳐 혼합백신을 접종한 햄스터로 부터 혈청을 채취하여 신증후출혈열을 발병시키는 4가지 대표적 혈청형 바이러스들인 한탄바이러스, 서울바이러스, 벨그레이드 바이러스, 푸말라바이러스들에 대한 교차 중화항체 역가를 조사한 결과 1차로 백신을 접종한 한달 후 채혈한 검체에서 한탄바이러스, 서울바이러스, 벨그레이드바이러스, 푸말라바이러스에 대한 중화항체역가는 각각 65.4, 12, 6.1, 65.6이었으며, 2차 부스터 접종 한달 후 채혈한 검체에서 한탄바이러스, 서울바이러스, 벨그레이드바이러스, 푸말라바이러스에 대한 중화항체역가는 각각 710.8, 41.9, 24.3, 409.9의 우수한 결과를 나타내었다. 그러나 한타바이러스페증후군의 병원체인 신놈브레바이러스에 대한 중화항체의 역가는 극히 미약하여 1차 접종 한달 후 채혈한 혈청의 중화항체 역가는 0.5이었으며, 2차 접종 한달 후 채혈한 혈청의 중화항체 역가는 1.6으로 미약한 중화항체가를 나타내었다.

**· 신증후출혈열 혼합백신으로 면역시킨 햄스터에서 공격감염에 대한 감염저지력 검사**

한달간격으로 2차에 걸쳐 혼합백신을 햄스터에 접종한 한달 후 살아있는 4종류의 신증후출혈열 병원체 바이러스로 challenge 감염시킨 다음 혈청형 특이 primer를 사용한 nested RT-PCR 방법으로 혈액 및 조직중의 바이러스 증식을 관찰하였다. 신증후출혈열 병원체 바이러스들로 공격감염을 실시한 모든 햄스터의 혈액 및 폐장조직에서 바이러스 증식을 관찰할 수 없었으며, 바이러스 감염에 의한 항체가의 증가도 볼 수 없어, 백신의 신증후출혈열 병원체 바이러스들에 대한 우수한 감염저지력을 관찰할 수 있었다. 그러나 한타바이러스 페증후군 병원체인 신놈브레바이러스로 challenge감염시킨 햄스터의 경우 혈액 및 폐장조직으로부터 신놈브레바이러스를 검출할 수 있었으며, 신놈브레바이러스에 대한 항체가도 급격히 증가하여 한타바이러스페증후

군 병원체 신늄브레바이러스에 감염된 것을 알 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 신증후출혈열 혼합백신이 한타바이러스페증후군 병원체 감염을 저지할 수 없음을 알 수 있었다.

#### · 혼합백신을 접종한 실험동물에서의 급성 및 아급성 독성시험

약 6주령의 SPF S.D. Rat와 ICR 마우스의 피하 및 복강내로 각각 사람 기준용량의 100 ~ 1000배로 농축시킨 혼합백신 0.5ml, 0.2ml와 대조군으로 동량의 생리식염수를 접종한 다음 2주에 걸쳐 접종한 동물의 운동성, 외관 및 자율신경증상등의 임상증상을 관찰하였다. 그리고 접종 2주후 접종한 동물을 부검하여 주요장기의 이상유무를 관찰하였다. 추정임상용량의 100 ~ 1000배에 해당하는 용량의 혼합백신을 각각 암·수 랫트에 피하투여했을 때 사망하는 동물은 없었으며, 체중, 일반증상, 부검소견등에 있어서도 시험군과 대조군사이에 유의할만한 차이가 인정되지 않았다

### 3) 3차년도

#### 가. 3차년도 연구목표

- 러시아 신증후출혈열 다발생 지역에서의 바이러스 혈청형 조사
- 야외 임상시험에 필요한 기초자료 수집

#### 나. 평가착안점

- 인체를 대상으로 하는 혼합백신의 야외임상시험을 실시할 지역에 존재하는 한타바이러스 혈청형의 종류

#### 다. 3차년도 연구개발목표 달성도

##### · 푸말라바이러스항원을 사용한 고밀도입자 응집 진단법 확립

혼합백신을 개발하는 과정중에 얻은 부산물로서 푸말라바이러스 항원을 이용하여 사용하기 간편하고, 신속하게 진단할 수 있으며, 진단의 민감도가 기존의 형광항체법에 근접하는 새로운 진단법인 푸말라바이러스 고밀도입자 응집반응법을 개발하여 아시아 및 유럽에서 발생한 신증후출혈열 환자의 혈청을 사용하여 항체역가를 조사한 결과 그 민감도 및 특이도가 형광항체법에 의한 항체측정과 유사한 좋은 결과를 얻어 유럽형 신증후출혈열을 감별진단할 수 있는 상용화된 진단키트를 개발할 수 있는 기초를 만들었다.

##### · 러시아 신증후출혈열 다발생 지역에서의 바이러스 혈청형 조사

1996년도와 1997년도에 러시아내 신증후출혈열 만연지역인 바쉬코르토스탄 자치공화국에서 신증후출혈열 유행기인 6 ~ 10월 사이에 발생하여 임상적, 혈청학적으로 신증후출혈열환자임이 확인된 환자들 중의 검체 중 1996년도 환자혈청 91개와 1997년도 환자혈청 30개를 러시아의학아카데미 소아마비·뇌염바이러스 연구소와 공동으로 조사하였다. 총 121명의 환자혈청을 신증후출혈열 병원체인 한탄바이러스, 서울바이러스, 벨그레이드바이러스, 푸말라바이러스 그리고 한타바이러스페증후군의 원인균인 신놈브레바이러스에 대하여 형광항체법과 플라크감소중화시험법으로 검사한 결과 1996년도 환자 91명중 89명 (97.8%)은 푸말라바이러스에 감염된 환자이고 2명 (2.2%)은 벨그레이드바이러스에 감염된 환자임이 확인되었으며, 1997년도 환자 30명중 25명 (83.3%)은 푸말라바이러스에 감염된 환자이고 4명 (13.3%)은 벨그레이드바이러스에 감염된 환자임을 확인할 수 있었으며 1명 (3.3%)의 환자는 푸말라바이러스와 벨그레이드바이러스 두가지 혈청형의 바이러스에 모두 높은 중

화항체가를 나타내어 바이러스혈청형을 감별할 수 없었다. 이 혈청형을 감별할 수 없었던 한명의 환자는 임상적으로 신증후출혈열을 두 번 앓았음이 확인되었다. 최초 입원시의 혈청을 얻을 수 없어 처음에 감염되었던 바이러스혈청형을 확인할 수 없었지만 임상적인 자료에 의하면 최초 푸말라바이러스에 의한 신증후출혈열을 앓은 후 수년이 지나 다시 다른 Genetic lineage에 속하는 벨그레이드바이러스에 감염된 것으로 추정된다.

따라서 러시아내 신증후출혈열 다발생지역에서 발생하는 환자는 주로 푸말라바이러스에 의하여 감염된 환자가 대부분을 차지하나 푸말라바이러스와 유전적성상이 다른 벨그레이드바이러스에 의한 신증후출혈열 환자도 확인이 되어 개발된 혼합백신의 유효성을 검증하기 위한 대규모 야외임상시험을 실시할 수 있는 이상적인 장소임을 확인할 수 있었다.

## 2. 대외기여도

신증후출혈열은 이 질병의 원인균을 보유하고 있는 숙주동물인 설치류와 접촉이 높은 사람들과 농촌에서 농업에 종사하는 사람들과 군인들 그리고 지하공사, 특히 통신배관등의 시설에서 일하는 산업역군들에서 높은 발병율을 나타내어 많은 수의 환자가 발생하는 질병이다. 전세계적으로 매년 10 ~ 15 만명의 환자가 발병하여 입원하고 있으며, 그 치사율은 4 ~ 10%에 이르고 있는 질병으로서 지구온난화에 따른 생태계의 변화로 인하여 보균동물인 설치류의 증가로 말미암아 전세계적으로 환자 발생 수는 증가하고 있는 실정이다. 본 연구개발과제에 의하여 개발된 혼합백신에 의하여 이 질병을 예방할 수 있음으로써 인류보건복지에 기여할 수 있고 유효노동력을 질병으로부터 보호함으로써 생산성을 높힐 수 있으며, 세계 각지의 신증후출혈열 만연지역에 개발된 백신을 수출할 수 있는 경제성도 있다. 또한 신증후출혈열 예방

혼합백신을 개발하는 과정에서 부수적으로 푸말라바이러스에 의한 신증후출혈열환자를 신속하게 진단할 수 있는 새로운 진단방법을 개발함으로써 한타바이러스에 의한 질병의 신속한 진단 및 예방에 획기적인 발전을 이룰 수 있게 되었다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

유럽의 경우 매년 수만명의 신증후출혈열 환자가 발생하며 그중 70%가량의 환자가 러시아에서 발생하고 있다. 지구 온난화에 따른 기후변화와 생태계의 변화로 인하여 러시아의 경우 최근 수년간 환자발생이 점차 증가하는 추세에 있었으며 특히 1997년의 경우 평년보다 5배 이상의 환자가 발생하여 큰 사회적 문제가 된바 있다.

현재까지 전세계적으로 푸말라바이러스에 의하여 발생하는 유럽형 신증후출혈열을 예방할 수 있는 상용화백신이 개발된 것은 없다. 그러나 아산생명과학연구소와 주)녹십자 종합연구소는 공동으로 푸말라바이러스에 의한 유럽형 신증후출혈열뿐만 아니라 전세계적으로 다양한 혈청형 한타바이러스에 의하여 발생하는 신증후출혈열을 예방할 수 있는 푸말라백신과 혼합백신을 개발한 바 있다. 신증후출혈열 만연지역에서 개발된 백신의 이중맹검법에 의한 대규모 야외임상시험인 제3임상시험을 거쳐 상용화를 이룸으로써 수익불에 달할 것으로 예상되는 유럽에서의 백신시장을 선점하여 우리나라의 기술력을 과시하고 아울러 경제적으로 수익불의 외화가득효과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

신증후출혈열에 의하여 심각한 사회문제가 된 바 있는 러시아의 경우 적어도 매년 수천만명 이상의 주민들에게 예방백신을 접종하여야 하므로 일회 접종분에 단 1불의 이익을 낸다고 하여도 수천만불의 외화가득효과를 얻을 수 있을 것이다.

1998년 8월 러시아내 신증후출혈열 다발생지역인 바쉬코르토스탄 자치공화국의 생물학제제 제조회사인 Immunopreparat사의 책임자가 아산생명과학연구소와 주)녹십자를 방문하여 개발된 백신의 상용화가 완료되면 년 2500만 도즈 이상의 백신을 수입할 의사가 있음을 표명하여 더욱 밝은 전망을 기대할

수 있다.

전세계적으로 집쥐를 숙주로 하는 Genetic lineage 1그룹에 속하는 서울혈청형 바이러스가 존재하며, 이와 더불어 지역별로 Genetic lineage 1그룹과 2그룹에 속하는 서로 다른 혈청형 바이러스들이 함께 존재하므로, 하나의 예방백신으로 여러가지 한타바이러스 혈청형바이러스들에 의하여 발생하는 신증후출혈열을 동시에 예방할 수 있는 혼합백신의 제3임상시험인 Field efficacy trial을 통하여 백신의 유효성을 입증함으로써 조속한 시일내에 이들 백신의 상품화를 이룩할 계획이다. 이를 통하여 세계인류 보건복지향상에 큰 기여를 할 수 있을 것으로 전망하며, 이와 더불어 개발된 예방백신을 외국에 수출함으로써 우리나라 백신제약기술의 선진화를 이룰수 있을 것이다.

특히 푸말라바이러스에 의한 유럽형신증후출혈열 뿐 아니라 벨그레이드바이러스에 의한 신증후출혈열 만연지역의 하나인 러시아에서는 본 연구개발사업에서 개발된 푸말라바이러스 백신 및 혼합백신에 지대한 관심을 가지고 있으며, 러시아 의학아카데미 소아마비·뇌염바이러스병 연구소와 바쉬코르토스탄 자치공화국에서는 개발된 백신을 러시아에서 조속한 시일내에 제3임상시험을 통해 상용화하는 연구를 제안하는 연구협약서를 보내온 바 있어 개발된 백신의 제품화에 밝은 전망을 던지고 있다. 이들 지역에서 개발된 백신을 수출하기 위하여는 우리나라에서 국제규격에 의한 전임상시험을 완료할 필요가 있으며, 이와 더불어 주요 수출대상국인 러시아 국내 자체적으로 전임상시험 및 대규모 야외임상시험인 제3임상시험을 하여야 할 필요가 있다.

## 제 6장 참고문헌

1. Lee HW, Guido van der Groen : Hemorrhagic fever with renal syndrome. *Prog. Med. Virol.* 1989, 36:62-102.
2. Smorodintsev AA, Chudakov VG, Churilov AV : Hemorrhagic nephroso-nephritis. London, Pergamon Press, 1959, pp. 125.
3. Smadel JE : Epidemic hemorrhagic fever. *Am. J. Publ. Hlth.* 1953, 43:1327-1330.
4. World Health Organization : Haemorrhagic fever with renal syndrome. Memorandum from a WHO meeting. *Bull WHO* 1983, 61:269-275.
5. Centers for Disease Control : Update: Outbreak of hantavirus infection-Southwestern United States. *MMWR* 1993, 42-421 .
6. Lee, H.W.: Hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. *Rev. Infect. Dis.*, 1989, 11(Suppl. 4): S864.
7. Lee, H.W., Lee, P.W. and Johnson, K.M.: Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.*, 1978, 137: 298.
8. Puthavathana, P., Lee, H.W. and Kang, C.Y.: Typing of Hantaviruses from five continents by polymerase chain reaction. *Virus Research*,

1992, 26: 1

9. Xiao, S.Y., Chu, Y.K., Knauert, F.K., Lofts, R., Dalrymple, J.M. and LeDuc, J.W. (1992). Comparison of hantavirus isolates using a genus-reactive primer pair polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 73, 567-5739.
10. Chu YK, Rossi C, Lee HW, Schmaljohn CS and Dalrymple JM : Serological relationships among viruses in the Hantavirus Genus, Family Bunyaviridae. *Virology* 1994, 198:196-204.
11. Desmyter J, LeDuc JW, Johnson KM, Bresseur F, Deckers C and van Ypersele de Strihou C : Laboratory rat associated outbreak of hemorrhagic fever with renal syndrome due to Hantaan-like virus in Belgium. 1983, *Lancet* 2:1445.
12. Horling J, Chizhikov V, Lundkvist A, Jonsson M, Ivanov L, Dekonenko A, Niklasson B, Dzagurova T, Peters CJ, Tkachenko E, Nichol S : Khabarovsk virus: a phylogenetically and serologically distinct hantavirus isolated from *Microtus fortis* trapped in far-east Russia. *J Gen Virol*, 1996, 77:687-94.
13. Kariwa H, Yoshizumi S, Arikawa J, Yoshimatsu K, Takahashi K, Takashima I, Hashimoto N : Evidence for the existence of Puumala-related virus among *Clethrionomys rufocanus* in Hokkaido,

- Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1995, 53:222-227.
14. 이호왕, 주용규 : 신증후출혈열 약편용 한타바이러스항원의 비교 및 새로운 호왕바이러스 분리. *학술원 논문집 (자연과학편)*, 1993, 32: 121.
  15. Gligic A, Dimkovic N, Xiao SY : A new hantavirus causing severe hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia. *J. Infect Dis.*, 1992, 169:204-207.
  16. Yates T, Ksiazek T, Parmenter R, Rollin P, Nichol S, Dunnum J, Baker R, Parmenter C, and Peters CJ : Hantavirus outbreaks and rodent ecology: The role of El Nino. 1998. 4th Int'l Conference on HFRS and Hantaviruses, pp. 61.
  17. Tkachenko EA, Dzagurova TK, Dekonenko AE, Ivanov AP and Ivanov LI : Current status of HFRS and Hantaviruses in Russia. 1998. 4th Int'l Conference on HFRS and Hantaviruses, pp. 152.
  18. Lee HW, Ahn 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.*, 1990, (Suppl 1):35-47.
  19. 서동진, 이명식, 우영대, 이호왕. 신증후출혈열백신의 면역성에 관한 연구. *대한바이러스학회지* 1992, 22:239-243.

20. 손영모, 오경환, 김창휘, 신상만, 이상주, 문영배, 양인석, 김미란, 김덕하, 이혜란, 박종영. 소아에서 접종량에 따른 불활화 신증후출혈열백신 (한타바이러스 백신)의 면역원성과 안정성에 관한 연구 : 3회 접종 후 (0, 1, 13개월) 항체가 변화. 대한화학요법학회지 1994, 12:138-144.
21. Chu YK, Jennings GB, Schmaljohn CS. A Vaccinia-vectored Hantaan virus vaccine protects hamsters from challenge with Hantaan and Seoul viruses but not Puumala virus. J. Virology 1995, 69:6417-6423
22. Clement J, Heyman P, McKenna P, Colson P and Avisic Zupanc T. The hantaviruses of Europe: from the bedside to the bench. Emerg Infect Dis., 1997, 3:205-211.
23. Song G, Huang YC, Hang CS. Hao FY, Li DX, Zheng XL, Liu WM, Li SL, Huo ZW, Hwei LJ and Zhang QF. Preliminary human trial of inactivated golden hamster kidney cell (GHKC) vaccine against haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). Vaccine 1992, 10:214-216.
24. Schmaljohn CS, Hasty SE and Dalrymple JM. Preparation of candidate vaccinia-vectored vaccine for haemorrhagic fever with renal syndrome. Vaccine 1992, 10:10-13.

25. Ulrich R, Lundkvist A, Meisel H, Koletzki D, Sjolander KB, Gelderblom HR, Borisova G, Schnitzler P, Darai G and Kruger D. Chimaeric HBV core particles carrying a defined segment of Puumala hantavirus nucleocapsid protein evoke protective immunity in an animal model. *Vaccine* 1998, 16:272-280.
26. 이호왕, 주용규 : 신증후출혈열 확진용 한타바이러스항원의 비교 및 새로운 호왕바이러스 분리. *학술원 논문집 (자연과학편)*, 1993, 32: 121.
27. Tkachenko EA, Bashkirtsev VN, Van der Groen G, Dzagurova TK, Ivanov AP and Ryltseva EV : Isolation in Vero E6 cells of Hantavirus from *Clethrionomys glareolus* captured in the Bashkiria area of the USSR. *Ann Soc Belg Med Trop* 1984, 64:425-426.
28. Brown RE, Jarvis KL and Hyland KJ : Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem.*, 1989, 180:136-139.
29. Egashira Y, Okaw T, Oya A. : Allergic encephalitis in guinea pigs and monkeys with special reference to the relationship between the properties of the antigen and the reaction of the host. *Proc Comm Jpn Enceph Vaccine* 1966, 1:70-71.
30. Shinomiya Y, Kato N, Imazawa M and Miyamoto K : Enzyme immunoassay of the myelin basic protein. *J Neurochem.*, 1982, 39:1291-1296.

31. 이호왕, 주용규, 최용수, 우영대, 안창남, 김훈, 장양석. (1997) 신증후 출혈열의 혼합백신을 접종한 햄스터에서의 면역성 조사. 대한바이러스 학회지 27:39-47
32. Chu YK, Rossi C, Lee HW, Schmaljohn CS and Dalrymple JM : Serological relationships among viruses in the Hantavirus Genus, Family Bunyaviridae. Virology 1994, 198:196-204.
33. Chu YK, Jennings GB, Schmaljohn CS : A Vaccinia-vectored Hantaan virus vaccine protects hamsters from challenge with Hantaan and Seoul viruses but not Puumala virus. J. Virology 1995, 69:6417-6423.
34. AHFS Drug Information : AHFS Drug Information 95. 1995, Volume 2:2325-2327.
35. WHO : Requirements for haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) vaccine (inactivated). WHO Technical report serieses, 1994, No.848, pp 53-70.
36. Fields BN, Knipe DM, Howley PM : Fields Virology, 1996, pp1447-1504. Lippincot - Raven Publisher, Philadelphia.
37. Xiao SY, Spik KW, Li D, Schmaljohn CS : Nucleotide and deduced

amino acid sequences of the M and S genome segments of two Puumala virus isolates from Russia. *Virus Res*, 1993, 30:97-103.

38. Schmaljohn CS, Schmaljohn AL, Dalrymple JM : Hantaan virus M RNA: coding strategy, nucleotide sequence, and gene order. *Virology*, 1987, 157:31-39
39. Schmaljohn CS, Jennings GB, Hay J, Dalrymple JM : Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus. *Virology*, 1986, 155:633-643