

매우 치사율이 높은 H5N1 독감바이러스에 대한 킬러 T임파구 반응에 대한 연구

서 상 희 / 충남대학교 수의과대학 면역학 실험실

1997년 홍콩 가금시장에서의 H5N1 조류독감바이러스의 발병은 18명의 감염된 사람 중에서 6명의 사람의 생명을 앗아갔다. 이 사건은 조류독감바이러스가 매개체를 통하지 않고 닭에서 바로 사람에게 감염한 처음 있는 사건이다. 홍콩가금시장에서의 역학조사는 H5N1과 H9N2 조류독감바이러스가 함께 공존한다는 것을 밝혔다. 가금에서는 H5N1과 H9N2 조류독감바이러스가 검출되었다. 우리는 H5N1 조류독감바이러스로부터 닭을 방어하는데 H9N2 조류독감바이러스의 역할에 대해 연구했다. H5N1과 H9N2 바이러스의 혼합바이러스를 동시에 닭에 접종하면 닭은 생존하지 못했다. 그러나, H5N1 조류독감바이러스감염 이전에 H9N2 조류독감바이러스를 감염한 닭들은 생존할 수 있었다. H9N2 조류독감바이러스로 감염된 닭으로부터 얻어진 혈청은 H5N1 조류독감바이러스와 교차반응을 일으키지 않는다. H9N2 조류독감바이러스로 감염시킨 닭으로부터 얻어진 T임파구 또는 CD8 T임파구를 감염하지 않은 닭에 주입할 때 닭은 H5N1 조류독감바이러스로부터 생존할 수 있었다. 실험실의 킬러임파구실험은 H9N2 조류독감바이러스로 감염된 닭으로부터 얻어진 T임파구는 H5N1과 H9N2 조류독감바이러스로 감염된 목표세포를 동시에 감지했다. 게다가, 생체내 T임파구의 제거실험은 교차보호면역은 a/b TCR를 가진 CD8 T임파구가 중요한 역할을 하며, a/b TCR (Vb1)형의 T임파구가 목표세포를 감지한다는 것을 증명했다. H9N2 조류독감바이러스에 의한 방어면역은 시간이 지남에 따라 감소를 했고, 감염 100일까지 방어력을 나타냈다.

1997년 조류독감바이러스인 H5N1의 홍콩에서의 발병에 대한 풀리지 않은 것 중의 하나는 약 20%의 조류들이 매우 치사율이 높은 H5N1 독감바이러스를 가지고 있음에도 홍콩가금시장에서의 대부분의 닭들은 건강했다. 얻을 수 있는 정보에 따르면 대부분의 닭들은 H5N1 조류독감바이러스를 변으로 방출했고, 단지 두 곳의 가금시장에 있는 닭들이 질병증상을 보였다. 홍콩가금시장에서 분리된 모든 H5N1 조류독감바이러스를 닭에 감염하면 100%의 치사율을 나타낸다.

바이러스 측면에서의 연구에 따르면, H9N2 조류독감바이러스는 홍콩가금시장에서 두 번째로 많이 분리되었다. H9N2 조류독감바이러스에 대한 연구에 따르면 세 가지 형이 홍콩가금시장에서 검출되었다. 1997년에 가장 많이 분리된 H9N2 조류독감바이러스는 PB1과 PB2가 A/Chicken/HongKong/156/97 (H5N1)과 유전적으로 유사한 A/HongKong/G9/97 (H9N2)형이다. A/Chicken/HongKong/156/97(H5N1)의 나머지 유전자는 A/Chicken/HongKong/739/94 (H9N2)와 A/Chicken/HongKong/G23/97의 유전자와 비슷하다. 하나의 A/Quail/HongKong/G1/97은 Quail에서 분리되었고, 두 개의 A/Duck/HongKong/Y280/97 (H9N2)은 오리에서 분리되었다. A/Quail/HongKong/G1/97 (H9N2)의 6개의 내부유전자는 A/HongKong/156/97 (H5N1)에 유사하나, A/Duck/HongKong/Y280/97 (H9N2)의 유전자는 A/HongKong/156/97 (H5N1)과 유사하지 않다. 킬러임파구는 바이러스로 감염된 목표세포를 MHC에 의존하여 파괴한다. 독감바이러스 특이 킬러임파구는 독감바이러스로 감염된 mice의 폐로부터 독감바이러스를 제거하는데 중요하다고 알려져 있다.

독감바이러스의 HA단백질은 특이 킬러임파구의 주요 목표항원 단백질이 아니다. 내부단백질인 nucleoprotein, polymerase (PB1, PB2, PA), Matrix protein, 그리고 비 구조단백질인 NS1에 대한 특이 킬러임파구의 반응이 사람과 mice에서 보고되었다. 독감바이러스에 대한 mice의 킬러임파구의 인식영역은 제한되어 있다고 알려져 있다. 많은 mice MHC 1은 독감바이러스 단백질의 킬러임파구의 epitope를 표현하지 못한다. 사람 기억킬러임파구는 다양한 종류의 독감바이러스의 단백질을 인식한다고 알려져 있다. 지금까지, 닭에서의 독감바이러스의 킬러임파구에 대한 연구는 되지 않았다.

H9N2와 H5N1 독감바이러스 사이의 혈청학적 교차반응 없음

H9N2 독감바이러스로 감염된 닭에서 얻은 혈청이 H5N1 독감바이러스와 교차반응을 보이는지를 알아보기 위해서 우리는 H5N1 독감바이러스로 감염 이전에 A/Chicken/HK/G9/97 (H9N2)로 감염된 닭에서 혈청을 얻었다. H9N2와 H5N1의 혈청교차반응은 혈구응집억제반응에 의해 실행되었다. H9N2 바이러스 감염 3일 후 또는 감염하지 않은 닭에서 얻은 혈청은 H9N2나 H5N1 바이러스의 혈구응집반응을 억압하지 않았다. 감염 6일 후 얻은 혈청은 H9N2 바이러스(A/Chicken/HK/G23/97, A/Duck/HK/Y280/97, A/Chicken/HK/G9/97)에 의한 혈구응집을 억압했으나 A/Quail/HK/G9/97과 A/Chicken/HK/G9/97에 의한 혈구응집반응은 억압하지 못했다. 감염 15일, 30일, 70일 이후에 얻은 혈청은 H9N2 바이러스에 의한 혈구응집반응을 억압했으나, H5N1에 의한 혈구응집반응을 억압하지 않았다.

닭의 교차방어

A/Chicken/HK/G9/97 (H9N2) 바이러스 감염된 닭을 H5N1 독감바이러스로부터 방어할 수 있는지를 알기 위해서, 우리는 H9N2 바이러스로 닭을 H5N1 감염 3일에서 70일 이전에 감염하였다. H9N2 바이러스 감염된 대부분의 닭들은 H5N1 바이러스로부터 생존할 수 있었다. 그러나 생존한 닭들은 상당한 양의 H5N1 바이러스를 항원으로 배출하였다. H5N1 바이러스는 많은 생존한 닭의 기관지에도 감지할 수 있었다. H9N2 독감바이러스로 감염하지 않은 닭들은 H5N1 바이러스 감염 3일 후 죽었다.

H5N1 바이러스의 감염 양에 대한 반응

30일 이전에 H9N2 바이러스로 감염된 닭들을 다양한 양의 H5N1 바이러스로 감염하였다. 닭의 치사율은 H5N1 바이러스의 양이 증가함에 따라 증가하였다. 10CLD50의 H5N1 바이러스 감염된 10마리의 닭 중에서 8마리의 닭들이 생존하였다. 그러나 50CLD50의 H5N1 바이러스로 감염된 10마리의 닭들은 모두 생존할 수 없었다.

임파구의 대리 전달

생체내 면역세포의 닭 방어기전을 규명하기 위해서 우리는 1000CLD50의 A/Chicken/HK/G9/97 (H9N2) 바이러스로 유전적으로 같은 닭에 감염하고 감염 10일 후에 비장세포를 획득한 후 정제하였다. 이 정제된 비장세포를 정상 닭에 전달하고 전달 하루 후 10CLD50의 H5N1 바이러스로 감염하였다. 비장임파구를 받은 닭들은 모두 생존할 수 있었다. 그러나 비장임파구를 받지 않은 닭은 생존할 수 없었다. 어떠한 T임파구가 닭을 H5N1 바이러스 감염에서 방어하는데 공헌하는 것을 알기 위해서 H5N1 바이러스 감염 7일 이전에 H9N2 바이러스 감염된 닭에서 얻은 T임파구를 항체가 붙어있는

Dynabead를 이용해 정제한 후 정상 닭에 전달 하루 후 10CLD50 H5N1 바이러스로 감염하였다. CD4 T세포를 제거한 T임파구를 받은 닭들은 H5N1 바이러스 감염으로부터 생존할 수 있었다. 그러나 CD8 T임파구를 제거한 T임파구를 전달받은 닭들은 H5N1 바이러스 감염으로부터 생존할 수 없었다.

생체의 킬러임파구 파괴실험

교차 T임파구에 의한 닭의 방어기전을 알기 위해서 우리는 생체의 킬러임파구 파괴실험을 하였다. H9N2 바이러스로 감염된 닭에서 얻은 T임파구는 H9N2와 H5N1 바이러스로 감염된 목표세포를 동시에 감지하여 파괴하였다. 파괴율은 74% 정도였다. CD4 T세포를 제거한 임파구는 목표세포를 감지하여 파괴하나 CD8 T임파구를 제거한 T임파구는 목표세포를 파괴하지 못했다.

A/Quail/HK/G1/97 (H9N2) 바이러스에 의한 닭의 방어연구

A/Chicken/HK/G9/97 (H9N2) 바이러스가 닭에서 분리되었고, A/Quail/HK/G1/97 (H9N2) 도 하나의 Quail에서도 분리되었다. A/Quail/HK/G1/97 (H9N2) 바이러스는 6개의 내부유전자가 H5N1 바이러스와 유사하다. 우리는 A/Quail/HK/G1/97 (H9N2) 바이러스가 닭을 H5N1 바이러스 감염에서 보호될 수 있는지를 알아보기로 했다. A/Quail/HK/G1/97 바이러스로 감염된 닭들은 모두 H5N1 바이러스 감염으로부터 방어되었다.

닭을 H5N1 바이러스 감염에서 방어하는 생체내 T임파구의 역할

H9N2와 H5N1 바이러스 사이에 혈청학적으로 교차반응이 없다는 것은 세포면역이 닭을 H5N1 바이러스 감염에서 방어하는데 중요하다. 어떠한 T임파구가 생체 내에서 닭을 방어하는데 중요한 역할을 하는지를 알기 위해서 항체를 이용해 T임파구를 생체내 제거한 후 H5N1 바이러스로 닭을 감염하였다. CD8 또는 CD3 T임파구를 제거한 모든 닭들은 폐사했으며, CD4 T임파구를 제거한 닭들은 모두 생존했다. T임파구는 TCR a/b 또는 TCR g/d를 가지고 있다. 그래서 우리는 이 두 가지의 T세포의 닭 방어기전을 연구했다. 생체내 TCR g/d T임파구를 제거한 닭들은 모두 생존했으나 TCRa/b (Vb1)를 제거한 닭들은 모두 생존할 수가 없었다.

면역 하강기전

교차방어 세포면역은 시간이 지남에 따라 감소했다. 이 면역 하강기전을 연구하기 위해, 우리는 A/Chicken/HK/SF3/99 (H9N2)로 감염된 닭에서 얻은 폐와 비장에서 얻은 T임파구 중에서 인터페론을 표현하는 CD8 T세포를 측정했다. 비장에 있는 기억 CD8 T세포는 감염 20일 후에 감소하기 시작했고 감염 100일까지 유사한 숫자가 유지되었다. 폐에 있는 인터페론을 표현하는 CD8 T세포는 감염 30일 후 감소하기 시작했고 감염 100일까지 계속 감소했다.

< 참고 문헌 >

- ▶ Bennink, J.R., and J.W.Yewdell, 1988. Murine cytotoxic T lymphocyte recognition of individual influenza virus proteins. *J. Exp. Med.* 168:1935-1939.
- ▶ Braciale, T.J., V.L. Braciale, T. J. Henkel, J. Sambrook, and M.J. Gething. 1984. Cytotoxic T cell recognition of the influenza hemagglutinin gene product expressed by DNA-mediated gene transfer.

- J. Exp. Med. 159:341-354.
- ▶ Cauthen, A.N., D.E. Swayne, S. Schultz-Cherry, M.L. Perdue, and D.L. Suarez. 2000. Continued circulation in China of highly pathogenic avian influenza viruses encoding the hemagglutinin gene associated with the 1997 H5N1 outbreak in poultry and humans. *J. Virol.* 74:6592-6599.
 - ▶ Doherty, P.C., D.J. Topham & R.A. Tripp. 1996. Establishment and persistence of virus-specific CD4+ and CD8+ T-cell memory. *Immunol Rev* 150:23-44.
 - ▶ Flynn, K.J., G.T. Belz, J.D. Altman, R. Ahmed, D.L. Woodland, and P.C. Doherty. 1998. Virus-specific CD8+ T cells in primary and secondary influenza pneumonia. *Immunity* 8:683-691.
 - ▶ Gianfrani, C., C. Oseroff, J. Sidney, R.W. Chesnut, and S. Alessandro. 2000. Human memory CTL response specific for influenza A virus is broad and multispecific. *Human Immunology.* 61:438-452.
 - ▶ Gotch, F., J. McMichael, G. Smith, and B. Moss, 1987. Identification of viral molecules recognized by influenza specific human cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 165:408-416.
 - ▶ Guan, Y., K.F. Shortridge, S. Krauss, and R. G. Webster. 1999. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the internal genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:9363-9367.
 - ▶ Hill, D. A., S. Baron, J. C. Perkins, M. Worthington, J. E. Van Kirk, J. Mills, A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock. 1972. Evaluation of an interferon inducer in viral respiratory disease. *JAMA.* 219:1179-1184.
 - ▶ Kodihalli, S., D.L. Kobasa, and R.G. Webster. 2000. Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines. *Vaccine* 18:2592-2599.
 - ▶ Kuwano, K., M. Scott, J. F. Young, and F. A. Ennis. 1988. HA2 subunit of influenza A H1 and H2 subtype viruses induces a protective cross-reactive cytotoxic T lymphocyte response. *J. Immunol.* 140:1264-1268.
 - ▶ Lin, Y.L., and B.A. Askonas, 1981. Biological properties of an influenza A virus-specific killer T cells clone: Inhibition of virus replication in vivo and induction of delayed-type hypersensitivity reactions. *J. Exp. Med.* 154:225-234.
 - ▶ Murphy, B.R., S. Baron, E.G. C.P. ChalhubUhlendorf, and R.M. Chanock., 1973. Temperature-sensitive mutants of influenza virus. IV. Induction of interferon in the nasopharynx by wild-type and a temperature-sensitive recombinant virus. *J Infect Dis.* 128:488-493.
 - ▶ Reay, P.A., I.M. Jones, F.M. Gotch, A. J. McMichael, and G. G. Brownlee. 1989. Recognition of the PB1, neuraminidase, and matrix proteins of influenza virus A/NT/60/68 by viral T lymphocytes. *Virology* 170:477-485.
 - ▶ Richman, D.D., B.R. Murphy, S. Baron, and C. Uhlendorf. 1976. Three strains of influenza A virus (H3N2): interferon sensitivity in vitro and interferon production in volunteers. *J Clin Microbiol.* 3:223-226.
 - ▶ Shortridge, K.F., N.N. Zhou, Y. Guan, P. Gao, T. Ito, Y. Kawaoka, S. Kodihalli, S. Krauss, D. Markwell, K. G. Murti M. Norwood, D. Senne, L. Sims, A. Takada, and R. G. Webster, 1998. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virology* 252:331-342.
 - ▶ Seo, S.H., & E.W. Collisson, 1997. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in-vivo

- clearance of infectious bronchitis virus, *J. Virol.* 71: 5173-5177.
- ▶ Seo, S.H., & R.G. Webster, 2001. Cross-reactive, cell-mediated immunity and protection of chickens from lethal H5N1 influenza virus infection in Hong Kong poultry markets. *J. Virol.* 75:2516-2525.
 - ▶ Seo, S.H., M. Peiris, & R.G. Webster, 2002. Protective cross-reactive cellular immunity to lethal A/Goose/Guangdong/1/96-like H5N1 influenza virus is correlated with the proportion of pulmonary CD8(+) T cells expressing gamma interferon. *J. Virol.* 76:4886-4890.
 - ▶ Seo, S.H., E. Hoffmann, & R.G. Webster, 2002. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses, *Nature Medicine* 8(9):950-954.
 - ▶ Suaraz, D. L., M. L. Perdue, N. Cox, R. Rowe, C. Bender, J. Huang, and D.E. Swayne, 1998. Comparison of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *J. Virol.* 72:6678-6688.
 - ▶ Subbarao, K., A. Klimov, J. Katz, H. Regnery, W. Lim, H. Hall, M. Perdue, D. Swayne, C. Bender, J. Huang, M. Hemphill, T. Rowe, M. Shaw, X. Xu, K. Fukuda, and N. Cox, 1998. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279:393-396.