

기니픽과 마우스에서 HRccine (HFRS 바이러스 백신)의 항원성 시험

백영옥 · 손정진 · 안세현 · 김태성 · 이상옥 · 이영수 · 조정식

제일제당 제약사업부

Antigenicity of HRccine (HFRS-vaccine) in Guinea Pigs and Mice

Yeong Ok Baik, Jung Jin Son, Sei Hun Ahn, Tae Sung Kim,
Sang Ok Lee, Young Soo Lee and Jung Sik Cho

Pharmaceutical division, Cheil Foods and Chemicals Inc, 511 Dokpyong-Ri,
Majang-Myon, Pharmaceutical division, Kyonggi-Do 467-810, Korea

(Received June 1, 1995)

(Accepted June 8, 1995)

ABSTRACT : A study on antigenicity of HRccine (formalin inactivated HFRS virus vaccine) was investigated in guinea pigs and mice. As a part of the safety evaluation of the HRccine, antigenicity tests were carried out according to the Establish Regulations of National Institute of Safety Research. In active systemic anaphylaxis (ASA) test no sign was detected when sensitized with up to 120 clinical dose and challenged with up to 1200 clinical dose in guinea pigs. In passive systemic anaphylaxis test guinea pigs showed no sign. In passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test, HRccine specific IgE antibody was not detected when sensitized and challenged with up to 1200 clinical dose. Conclusively, there was no adverse antigenic potential at the clinical dose of 120 clinical dose alone and 120 clinical dose with Al(OH)₃.

Key Words : HFRS, HRccine, ASA, PSA, PCA, Guinea pigs, Mice, Antigenicity test, Clinical dose.

I. 서 론

HRccine은 신증후성출혈열 바이러스의 감염예방을 위하여 제조한 백신(제일제당 Inc.)으로서 불활화한 HFRS virus에 수산화알루미늄겔을 흡착하여 제조되었다. 본 실험은 HRccine에 대한 안전성 시험 평가 중 특수 독성시험의 하나로 불활화한 바이러스 자체 또는 제조과정중에 생길 수 있는 면역독성을 알아보고자 국립보건안전 연구원 면역독성시험기준(국립보건안전연구원, 1994)에 준하여 아나필락시스 쇼크등 항원성 시험(Ivan, R 등, 1993)을 실시하였다.

II. 재료 및 시험방법

1. 시험물질

시험물질로는 HRccine(CFC-HS 9405, 백신원액)을 사용하였으며, 양성 대조물질로는 항원성이 잘 알려져 있는 Ovalbumin (Sigma Lot No. 19F-8105), 음성 대조물

질로는 생리 식염수를 사용하였다.

2. 실험동물 및 사육조건

백색 기니픽(Hartley계)은 삼육실험동물센터에서 구입하여 체중 340 - 360 g의 건강한 수컷을 선별하여 사용하였고, 마우스는 제일제당(주) 실험동물실에서 사육하는 근교계 ICR 마우스로서 체중 20 - 30 g의 수컷을 사용하였다.

실험기간중 사육실 환경조건은 온도 24±3°C, 상대습도 55±5%, 자동공조시스템, 조명 하루 10시간씩 300 lux로 유지하였다.

기니픽은 기니픽 사육용 케이지에 5마리씩 수용하였고, 마우스는 마우스용 케이지에 10마리씩 수용하였으며, 사료는 토끼용 펠렛사료(퓨리나 코리아), 양배추등을 급여하였으며, 음수는 수도물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

3. 시험방법

1) Active Systemic Anaphylaxis(ASA)

ASA를 위하여 기니픽 25마리를 5마리씩 5개군으로 나누고 제 1군은 음성대조군으로 0.9% 주사용 생리 식염수를, 제 2군은 양성대조군으로 Ovalbumin을, 제 3군은 HRccine(비흡착항원)의 저용량을 투여하였다. 또 제 4,5군은 HRccine의 고용량군으로 면역보조제를 사용한 군과 면역 보조제를 사용하지 않은 군으로 구별하여 투여하였다. 면역보조제 사용군은 2주간 3회 감작시 키고 면역보조제를 사용하지 않은 군은 2주간 7회 피하에 감작시켰다(Table 1). 면역보조제로는 백신에 사용된 수산화알루미늄을 사용하였다(알루미늄으로서 0.25 mg/Dose/0.5 ml).

최종감작 2주후 정맥주사로 유발투여하여 아나필락시스 유무를 관찰하고 종합적으로 쇼크 정도에 따라 무증상, 보통, 경증, 중증 및 사망 등 5단계(국립보건안전연구원, 1994)로 평가 하였다.

2) Passive Systemic Anaphylaxis(PSA)

ASA와 같은 방법으로 항원을 감작시켜 얻은 기니픽과 마우스의 항혈청을 기니픽에 정맥 주사한 후 18시간

Table 1. 기니픽의 아나필락시스 반응 집중 스케줄.

Gr-oup	투여 물질	DOSE량	접종 횟수	동물수	주사 경로
1	Saline	-	8	5	피하
2	Ovalbumin+Al(OH) ₃	6.6 mg/kg	4	5	피하
3	HRccine(비흡착)	0.1 DOSE/kg	8	5	피하
4	HRccine(비흡착)	1 DOSE/kg	8	5	피하
5	HRccine(비흡착)+Al(OH) ₃	1 DOSE/kg	4	5	피하

Table 2. 기니픽에서 아나필락시스 쇼크반응 결과.

Gr-oup	Sensitizing Antigen	Challenging Antigen	No. of Animal	Severing of Anaphylaxis			
				±	+	++	+++
1	Saline	Saline	5	5	-	-	-
2	Ovalbumin+Al(OH) ₃ (6.6 mg/kg)	Ovalbumin (6.6 mg/kg)	5	-	-	-	5
3	HRccine (0.1 DOSE/kg)	HRccine (1 DOSE/kg)	5	5	-	-	-
4	HRccine (1 DOSE/kg)	HRccine (10 DOSE/kg)	5	5	-	-	-
5	HRccine+Al(OH) ₃ (1 DOSE/kg)	HRccine (10 DOSE/kg)	5	5	-	-	-

Table 3. 기니픽에서 PSA 반응 결과.

Gr-oup	항혈청	항원	동물수	접종 경로	결과
1	Anti-GP serum to HRccine	HRccine	5	정맥	무증상
2	Anti-Mouse serum to HRccine	HRccine	5	정맥	무증상

이 경과하였을때, HRccine(비흡착항원)을 정맥주사하여 2일간 아나필락시스 쇼크를 관찰하였다. 증상에 따라 ASA와 마찬가지로 무증상, 보통, 경증, 중증 및 사망등 5단계로 평가하였다.

3) Passive Cutaneous Anaphylaxis(PCA)

ASA와 같은 방법으로 항원을 감작시켜 얻은 항혈청을 생리 식염수로 단계 희석하여 기니픽의 등배부 피내에 2 cm 간격으로 9개소 주사하였다. 6시간후 10배 농도의 각 항원과 Evan's Blue 혼합액을 이개정맥으로 주입하고, 30분후 경추탈골 및 방혈한 다음, 피부를 박리하여 주사부위에 생성되는 청색반점을 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

1) Active Systemic Anaphylaxis(ASA)

아나필락시스 반응의 결과, 양성대조군인 Ovalbumin 투여군에서는 매우 심한 아나필락시스 쇼크를 보이다가 5마리가 모두 폐사하였으나, 음성대조군인 0.9% 생리식염수 투여군 및 각 조합의 HRccine 투여군에서는 아나필락시스 쇼크라고 할 수있는 어떠한 임상예도 관찰할 수 없었다(Table 2).

Table 4. 기니픽에서 기니픽 혈청에 대한 수동피부 아나필락시스 쇼크반응 결과.

Gr-oup	Sensitizing Antibody(GP anti-)	Challenging Antigen	No. of Animal	PCA titer	Positive Ratio
1	Saline	Saline	5	-	0/5
2	Ovalbumin+Al(OH) ₃ (6.6 mg/kg)	Ovalbumin (6.6 mg/kg)	5	1/512	5/5
3	HRccine (0.1 DOSE/kg)	HRccine (1 DOSE/kg)	5	-	0/5
4	HRccine (1 DOSE/kg)	HRccine (10 DOSE/kg)	5	-	0/5
5	HRccine+Al(OH) ₃ (1 DOSE/kg)	HRccine (10 DOSE/kg)	5	-	0/5

Table 5. 기니픽에서 마우스 혈청에 대한 수동피부 아나필락시스 쇼크반응 결과.

Gr-oup	Sensitizing Antibody(GP anti-)	Challenging Antigen	No. of Animal	PCA titer	Positive Ratio
1	Saline	Saline	5	-	0/5
2	Ovalbumin+Al(OH) ₃ (6.6 mg/kg)	Ovalbumin (6.6 mg/kg)	5	1/512	5/5
3	HRccine (0.1 DOSE/kg)	HRccine (1 DOSE/kg)	5	-	0/5
4	HRccine (1 DOSE/kg)	HRccine (10 DOSE/kg)	5	-	0/5
5	HRccine+Al(OH) ₃ (1 DOSE/kg)	HRccine (10 DOSE/kg)	5	-	0/5

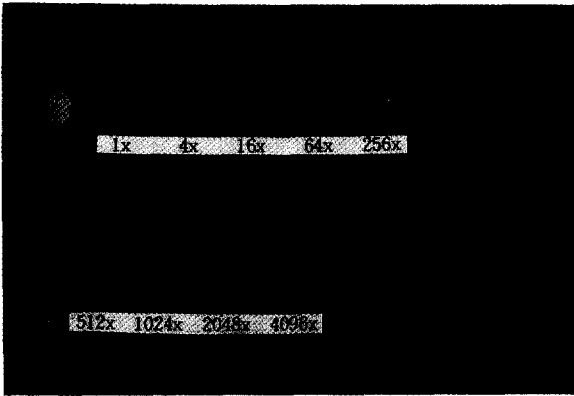


Photo. 1. Passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs treated with antisera of ovalbumin+Al(OH)₃ (positive control) sensitized guinea pigs.

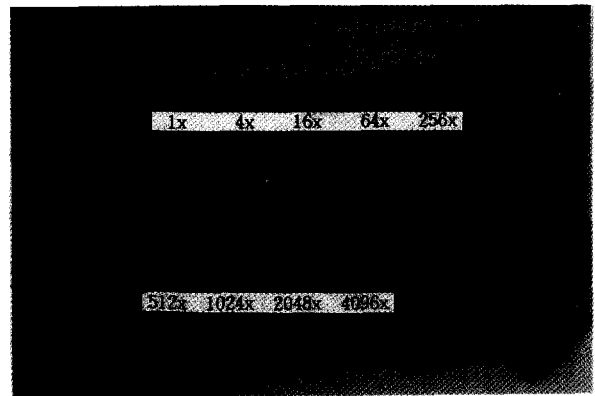


Photo. 3. Passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs treated with antisera of HRccine (high dose)+Al(OH)₃ sensitized guinea pigs.

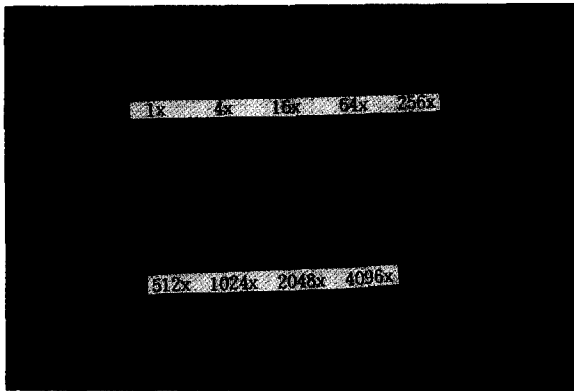


Photo. 2. Passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs treated with antisera of HRccine (high dose) sensitized guinea pigs.

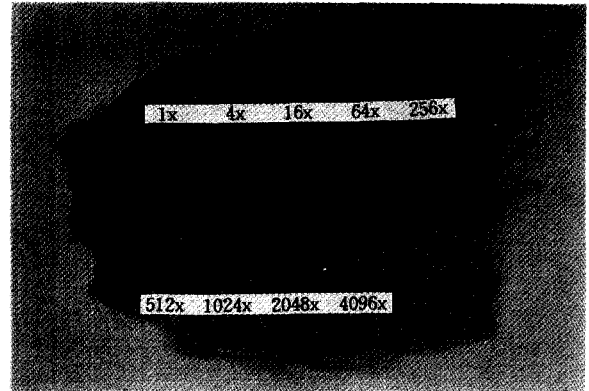


Photo. 4. Passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs treated with antisera of HRccine (high dose)+Al(OH)₃ sensitized mice.

2) Passive Systemic Anaphylaxis(PSA)

ASA 시험으로부터 얻은 고용량군의 마우스 및 기니 피크 항혈청을 정맥주사하고 고용량의 항원으로 야기하여 2일간 관찰하였으나 아나필락시스라고 할 수 있는 아무런 증상도 관찰할 수 없었다 (Table 3).

3) Passive Cutaneous Anaphylaxis(PCA)

ASA 시험중 실제 형성된 IgE량을 간접적으로 측정하기 위해 PCA 시험을 하였다. 각 항혈청을 단계 희석하여 피내 주사하고 항원과 Evan's Blue 혼합 용액을 정맥 주사한 결과, Ovalbumin 투여군에서는 512 희석배율까지 청색반점을 관찰할 수 있었으나, 음성대조군, 저용량, 고용량 투여군 및 면역보조제를 사용한 고용량 투여군의 모든 희석배율에서는 청색 반점을 관찰할 수 없었다 (Table 4, 5).

본 실험 결과로 볼때 고용량의 HRccine을 면역보조제로서 수산화알루미늄겔을 흡착시켜 투여하고, 실제 임상투여 예상용량의 1200배 이상의 유발량에서도 어떠한 유형의 아나필락시스 쇼크도 유발하지 않았으므로 본 실험에 사용한 HRccine(CFC-HS) 9405, 백신원액)은 비특이적인 면역반응으로서 아나필락시스쇼크 및 IgE 항체를 거의 유발하지 않는 것으로 생각된다.

참고문헌

- 국립 보건 안전연구원 (1994) : 의약품등의 독성 시험 기준, 국립보건 안전연구원 고시 제 94-3호.
- Ivan, R., Jonathan, B. and David, M. (1993). Immunology (3rd Ed) Chapter 19 Mosby-Year Book Europe Ltd., London.