

베로 세포에서 생산된 2세대 일본뇌염 백신의 마우스에서의 면역원성

문상범 · 홍선표 · 강재구 · 김달현 · 유왕돈 · Kenneth H. Eckels¹ · 김수옥*

제일제당(주) 종합기술원, ¹Walter Reed Army Institute of Research

베로 세포에 적응시켜 개발된 약독화(attenuated) 일본뇌염 바이러스인 CJ5003 주를 이용해 제조된 새로운 2세대 일본뇌염 백신의 효과를 마우스에서 조사하였다. Adjuvant로 aluminium hydroxide gel을 사용한 경우, 그렇지 않은 경우에 비해 높은 일본뇌염 바이러스 특이 항체 유도능과 10배 향상된 중화항체 유도능을 보였으며, 항원의 양을 변화시켜 면역시킨 결과 0.5 ng의 작은 항원량으로도 항체가 유발되었고 방어 가능한 수준인 1:10 이상의 중화항체가 유지되었다. 500 ng의 항원량으로 면역된 마우스를 면역 초기부터 24주간 관찰한 결과 중화항체가 14주까지 1:200 이상으로 계속 유지되었으며 24주에도 1:160을 유지하여 일본뇌염에 대한 방어효력이 장기간 유지되고 있음을 나타냈다. 또한 면역된 마우스 혈청은 Nakayama-NIH, SA14, P3 등 3종의 신경독성 일본뇌염 바이러스 주에 대해서 각각 유사한 수준의 일본뇌염 바이러스 특이 항체가를 보여주어 다양한 일본뇌염 바이러스 주에 대한 방어 가능성을 보여주었다. 마우스를 이용한 뇌내 직접 공격(challenge) 시험 결과, CJ5003 후보 백신은 90% 이상의 높은 생존률을 나타냈다. 이상의 *in vitro*, *in vivo* 시험 결과는 베로 세포에서 생산된 CJ5003 후보 백신의 차세대 백신으로서 개발 가능성을 시사한다.

KEY WORDS □ immunity, Japanese encephalitis, vaccine

일본뇌염은 모기(*Culex tritaeniorhynchus* 등)에 의해 전염되는 바이러스 질환으로 우리나라를 비롯한 동아시아에서부터 인도를 포함하는 동남아시아에 이르는 지역에 분포하여 발생한다(19). 이 지역에서 매년 약 35,000여 명의 환자가 발생하여, 10,000여 명이 사망한다고 보고되고 있으나, 실제 발생 건수는 이보다 많을 것으로 추정된다(9). 일본뇌염 바이러스에 감염된 환자는 5~15일의 잠복기를 거쳐 두통, 오한, 발열, 구토, 경련 및 혼수 등의 증세를 보이며 환자 중 5~25%는 사망하고 50%는 심각한 신경학적, 정신적 후유증을 나타낸다(4, 21). 일본뇌염 바이러스는 flaviviridae에 속하며 11 Kb의 단쇄 positive sense RNA를 가지는 enveloped virus이고 그 지름은 약 40 nm이다. 외피에는 외피 단백질(E)과 막단백질(M)의 2가지 바이러스 단백질이 존재하는데 이중 당단백질인 외피단백질이 바이러스의 감염에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(3, 7-8).

일본뇌염은 백신에 의해 효과적으로 예방될 수 있으며, 현재 3종류의 백신이 개발되어 사용되고 있다. 국제적으로 사용되고 있는 백신은 일본 오사카대학 Research Foundation for Microbial Diseases(Biken)의 Nakayama-NIH strain을 이용한 불활화 백신이 유일하고(18) 우리나라에서만도 해마다 약 300만명의 소아가 동종의 백신을 접종받고 있다. 그러나, 이 백신은 마우스의 뇌에서 바이러스를 증식하는 방법으로 생산되기 때문에 생산과정에 근본적인 문제점이 존재한다. 비록 정제공정의 개선으로 마우스 뇌 유래물질을 최대한 제거하려 했음에도 불구하고, 마우스 유래물질에 의한

부작용의 가능성을 완전히 배제하지 못하는 한계를 지니고 있다. 국소적 민감증, 붉어짐, 또는 주사부위의 부어오름 등이 백신접종자 중 약 20%에서 나타나며, 두통, 미열, 근육통, 불쾌감, 위장증상 등의 가벼운 전신성 증상 등이 백신접종자의 10~30%에게서 보고되었다. 또, 1989년 이래 호주, 유럽, 북아메리카 등지에서 행해진 여행자를 대상으로 한 백신 접종에서 두드러기, 혈관부종, 호흡곤란, 다형홍반, 결절성 홍반 등과 심각한 신경학적 장애가 보고된 바 있으며(3), 최근에는 백신 접종으로 사망한 사례까지 보고되고 있다(11, 14). 그밖의 일본뇌염 백신으로는 중국에서 자체 개발하여 사용하고 있는 불활화 백신과 약독화 생백신이 있지만, 생산 세포와 공정이 국제 기준에 미치지 못하고 안전성이 입증되지 않은 등의 문제로 국제적으로 인정받지 못해 중국내에서만 국한되어 사용되고 있다(17).

따라서 위와 같은 기존 일본뇌염 백신의 문제점들을 극복한 새로운 일본뇌염백신의 개발이 요구되고 있다. 현재 세계적으로 대장균 발현 벡터를 이용한 유전자 재조합 백신, baculovirus 발현벡터를 이용한 유전자 재조합 백신, 일본뇌염/B형 간염 복합 백신, 유전자 조작을 이용한 약독화 생바이러스 백신 등, 개선된 백신을 개발하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다(10, 13, 15, 20).

본 연구자들은 세계적으로 통용될 수 있는 안전하고 효과적인 새로운 일본뇌염 백신을 개발하기 위해 약독화된 일본뇌염 바이러스 주를 세계보건기구(WHO)에 의해 백신 생산에 사용이 권장되고 있는 베로 세포에 적응시켜 생산성 및 안전성이 높은 새로운 백신용 일본뇌염 바이러스 주를 개발하였다. 또한, 이 바이러스를 베로 세포에서 증식하고 정제 한 후 불활화하는 방법으로 일본뇌염 백신을 제조하였다(2,

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 0336-639-4373, Fax : 0336-632-2784
E-mail : suekim@chcilljedang.com

5). 본보는 개발된 2세대 일본뇌염 백신(CJ50003)의 면역원성에 대한 것으로, 마우스를 이용하여 일본뇌염의 방어에 중요하다고 알려진 humoral immunity를 중심으로 고찰하였다.

재료 및 방법

세포 및 바이러스

바이러스의 증식 및 plaque assay를 위해 사용한 숙주세포 또는 배로 세포로 Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR, Washington D.C., U.S.A)에서 분양받았다. 백신 제조를 위한 바이러스는 CJ50003 주로 약독화된 일본뇌염 바이러스 주인 SA14-14-2(PDK) 주를 WRAIR에서 분양받아 배로 세포에서 계대하며 plaque 선택을 통해 배로 세포에 적응시키는 방법으로 개발하여 사용하였다. 분석을 위해 사용한 바이러스는 Nakayama-NIH, SA14 및 P3 바이러스 주로 Nakayama-NIH는 국립보건원에서 분양받았으며, SA14와 P3는 중국의 유명신 박사로부터 분양받아 사용하였다.

세포 및 바이러스의 배양

백신의 제조를 위한 바이러스는 roller bottle system을 이용하여 흥 등(2)의 방법으로 배양하였다. 배로 세포를 Eagle's minimal essential medium(EMEM, GibcoBRL)에 fetal bovine serum(FBS, GibcoBRL) 10%를 첨가한 성장배지를 200 ml 넣은 850 cm² roller bottle(Corning)에 접종하여 35°C에서 0.5 rpm으로 4~5일 배양하여 confluent하게 키운 다음, CJ50003 바이러스 seed(0.1~0.01 moi)를 1~2시간 동안 배로 세포에 감염시킨 후 유지용 배지인 EMEM 배지를 200 ml 넣고 35°C, 0.5 rpm의 조건하에 배양하였다. 배양된 바이러스의 회수는 바이러스 접종 후 3일부터 9일까지 2일간격으로 roller bottle로부터 배지를 회수하고 새로운 유지용 배지 200 ml을 넣어주는 방법으로 4차례 multi-harvest하였다. 회수한 바이러스액은 원심분리(Sorval GS-3, 5,000 rpm, 10분)하여 세포를 제거하고 0.45 µm 필터(Vacucap, Gelman Science)로 여과한 후 정제에 들어갈 때까지 4°C에 보관하였다.

바이러스의 정제 및 백신의 제조

회수된 바이러스액을 NMWL 100 kDa의 ultrafiltration kit(ULTRASETTE™, Pall Filtron)를 이용하여 50~200배 농축하였다. 농축 바이러스액에 protamine sulfate(Sigma)를 2 mg/ml이 되도록 첨가하고 얼음에서 2시간 방치하여 세포 유래 DNA 등의 불순물을 침전시킨 후 원심분리(10,000×g, 10분)하여 침전물을 제거하였다. Protamine sulfate로 처리된 농축 바이러스액은 5% 등간격의 30-60% sucrose step gradient ultracentrifugation(Beckman 45Ti rotor, 22,000 rpm, 18시간)을 통해 바이러스 분획을 분리하였다. 원심분리관의 바닥으로부터 2 ml씩 받아 분획하고, 각 분획의 바이러스 양 및 순도를 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis 등의 방법으로 확인하여 바이러스의 순도가 높은 분획들만을 모았다. 이상의 과정을 거쳐 정제된 바이러스를 phosphate buffered saline(PBS, Biowhittaker)을 사용해 적당한 부피로 희석하였다. 0.45 µm filter system(Corning)으로 여과한 후 formalin(37% formaldehyde, Sigma)을 0.05%

가 되도록 첨가하고 22°C에 7~10일간 정치하여 바이러스를 불활화시켰다. 불활화 종료 후, sodium metabisulfite(Sigma)를 formalin과 동일 mole로 첨가하여 formalin을 중화시켰다. 불활화가 완료된 바이러스액을 PBS로 투석한 후 백신 원액으로 정하여 4°C에 보관하였다. Bovine serum albumin(Bio-Rad)을 표준단백질로 사용하여 Bradford 방법으로 백신 원액의 단백질 양을 측정하였다.

항원의 면역 및 혈청

10마리의 4주령 BALB/c 수컷 마우스를 하나의 그룹으로 일본뇌염 백신 0.5 ml을 3주 간격으로 2회 피하 주사하여 면역시켰다. 백신은 원액을 PBS로 희석하여 0.5 ml에 정해진 양의 항원이 들어가도록 제조하였으며, 실험에 따라 정해진 대로 adjuvant로 aluminium hydroxide gel(Rehydralgel[®]HPA, Reheis)을 1/200(v/v)로 첨가하여 사용하였고 음성대조군에는 PBS 만을 사용하였다. 백신의 2차 주사후 실험에 정해진 시간이 지난후 모세관을 사용하여 안정맥을 통해 혈액을 채취하였다. 혈액을 응고시킨 후 상온에서 2시간이상 방치한 다음 1,000×g로 15분 원심분리하여 혈청을 모아 -20°C에 보관하였다.

효소흡착면역분석법(Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA)

혈청내의 일본뇌염 바이러스에 대한 항체가를 측정하기 위해 ELISA를 실시하였다. Coating 항원으로는 Nakayama-NIH, SA14 및 P3 주를 각각 배양하여 polyethylene glycol 8000(PEG8000, Sigma) 침전, sucrose gradient ultracentrifugation을 통해 정제하여 사용하였으며, coating 항원을 coating buffer(sodium carbonate buffer, pH 9.6)에 5 µg/ml이 되도록 희석하여 96-well ELISA plate(Corning)의 각 well에 100 µl씩 분주하고 4°C에서 18시간 정치시켜 coating하였다. 3% bovine serum albumin(Sigma) 용액을 사용하여 37°C에서 1시간 blocking한 후, 시험 혈청을 실험에 따라 정해진 배수로 PBS에 희석하여 각 well에 100 µl씩 넣고 37°C에서 2시간 반응시켰다. 2차 항체로는 peroxidase-goat antimouse IgG(GibcoBRL)를 PBS에 1/500 희석하여 각 well에 100 µl씩 첨가하고 37°C에서 2시간 반응시켰다. 발색은 phosphate/citrate buffer(pH 5.0)에 o-phenylenediamine(Sigma)을 0.5 mg/ml이 되도록 녹이고 hydrogen peroxide(35% H₂O₂, Junsei)를 1/1000(v/v) 첨가하여 각 well에 100 µl씩 넣고 3분간 수행하였다. 4 N H₂SO₄(Sigma)를 50 µl첨가하여 발색반응을 중지시킨 후 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

중화항체가(Plaque reduction neutralization antibody titer: PRNT) 측정

55°C에서 20~30분 처리된 혈청을 희석용 배지인 2% fetal bovine serum이 함유된 EMEM을 사용하여 1/10 희석한 후 2배씩 단계 희석하였다. 중화 대상 일본뇌염 바이러스는 희석용 배지에 100~200 pfu/100 µl가 되도록 희석한 후, 상기 혈청 희석액과 1:1의 비율로 섞어주었다. 이후 35°C에서 90분간 정치하여 중화항체와 바이러스간에 충분한 중화반응이 일어나도록 하였다. 이를 흥 등(2)의 plaque assay 방법

으로 배로 세포상에서 잔류 바이러스 titer를 측정하였다. 측정된 잔류 바이러스 titer와 혈청의 회석배수를 이용하여 바이러스 titer가 50%이하로 감소하는 최대 회석배수를 구하여 이를 실험 혈청의 PRNT₅₀으로 정하였다.

면역된 마우스에서의 *in vivo* 방어효력 시험

CJ50003 백신의 *in vivo* 효력을 알아보기 위하여 마우스 신경독성을 지니는 challenge용 일본뇌염 바이러스를 사용하여 마우스 직접 공격 실험을 수행하였다. 국립보건원으로부터 분양받은 Nakayama-NIH 바이러스 주를 갖는 BALB/c 마우스의 뇌내에 주사한 후, 마우스의 상태를 매일 관찰하면서 사망 직전에 뇌를 회수하여 신경독성을 지니는 마우스 challenge용 바이러스의 제조에 사용하였다. 회수된 뇌를 homogenization한 후, 원심분리에 의해 침전물을 제거하여 상등액을 -70 °C에 보관하였다. 뇌유액 바이러스의 titration 결과에 따라 적절한 배수의 회석 단계를 정하여 마우스에 대한 공격시점과 동일한 10주령 마우스 10마리를 한 그룹으로 하여 마우스의 뇌에 회석된 뇌유액 바이러스를 30 µl씩 주사하였다. 2주간 사망 여부를 관찰하고 각 군당의 최종 사망 마리수와 생존 마리수를 비교하여 리드위험법에 의해 LD₅₀를 결정하였다. 공격 실험을 위해서는 그룹당 10마리의 4주령 BALB/c 수컷 마우스에 500 ng의 백신 항원을 3주간격으로 2회 피하 면역주사하였다. 음성 대조군은 PBS를 주사하였고, 비교 백신으로는 일본 Biken사의 불활화 일본뇌염 백신 1/10도스를 면역주사하였다. 2차 접종 3주후 마우스의 뇌내에 상기 방법으로 제조한 challenge용 바이러스를 10 LD₅₀씩 주사하고 2주간 매일 생존 및 사망 개체수를 관찰하므로써 *in vivo* 백신 방어효력을 조사하였다.

결 과

Adjuvant의 첨가가 백신의 면역반응 유도에 미치는 영향

일반적으로 adjuvant는 백신과 함께 주사하면 백신의 면역성을 높여주는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이 실험에서는 개발된 일본뇌염 백신에 aluminium hydroxide gel을 adjuvant로 첨가하였을 때 백신에 대한 면역반응이 어떻게 변화하는지 조사하였다(Table 1). 마우스 면역시 항원의 양은 500 ng, 50 ng의 두가지를 사용하였으며, 각각 adjuvant를 첨가한 군과 첨가하지 않은 군으로 나누어 마우스를 면역시켰다. 음성 대조군은 PBS를 0.5 ml씩 주사하였다. 1차

면역 3주후 같은 방법으로 boosting하고 다시 7주가 경과한 후 채혈하였다. 얻어진 혈청들은 각군별로 동량씩 모아서 Nakayama-NIH 주를 각각 coating 항원과 중화대상 바이러스로 한 ELISA와 PRNT를 통해 항체를 분석하였다. 500 ng의 항원을 사용하여 마우스를 면역시켰을 때, adjuvant 첨가시 ELISA값은 2.09로 나타났고 중화항체는 1:220으로 나타나 adjuvant를 첨가하지 않은 경우의 각각 0.31과 1:20에 비해 크게 증가하였다. 특히 백신에 의한 일본뇌염의 방어에 중요하다고 알려진 중화항체가 10배 이상 증가하였다. 50 ng의 항원으로 면역시켰을 경우에도 adjuvant를 첨가했을 때와 adjuvant를 첨가하지 않았을 때 ELISA값은 각각 1.28과 0.81, 중화항체는 1:110과 1:11로 500 ng의 경우와 동일한 경향을 보였으며, 음성대조군의 경우는 측정범위 이하로 나타났다. 따라서, adjuvant의 사용이 일본뇌염 바이러스에 대한 면역반응을 효과적으로 증가시켰으며, 특히 백신의 방어효력에 중요한 중화항체를 현저히 증가시키는 것을 알 수 있었다.

Dose response

항원의 양에 따른 면역반응의 변화를 알아보기 위해 여러 가지 항원량을 마우스에 주사하여 면역반응을 비교 측정하였다(Table 2). 백신 항원은 500 ng, 50 ng, 5 ng, 0.5 ng으로 10배 단계 희석하여 aluminium hydroxide gel adjuvant를 첨가하여 면역주사하였으며 음성대조군은 PBS 0.5 ml을 주사하였다. 2차 면역주사는 1차 면역으로부터 3주 경과 후 수행하였으며, boosting 시점부터 7주후 채혈하여 각 개체의 혈청을 각각의 군별로 동량씩 모아서 Nakayama-NIH 주를 각각 coating 항원과 중화대상 바이러스로 한 ELISA와 PRNT 방법으로 분석하였다. 일본뇌염 바이러스 특이 항체인 ELISA값은 항원량이 감소함에 따라 감소하는 경향을 보였으나, 실험의 최소 항원량인 0.5 ng에서도 0.62로 나타나 음성대조군의 0.18에 비해 여전히 3배 이상의 값을 나타냈다. 즉 CJ50003 후보 백신이 0.5 ng의 항원량으로도 유의성있게 마우스 면역반응을 일으킨다고 하겠다. 일본뇌염 바이러스에 대한 중화항체는 항원량을 50 ng에서 5 ng으로 낮추었을 경우 1:110에서 1:18로 크게 감소하였으나, 항원량을 0.5 ng까지 줄여도 1:10 이상의 값을 유지하여 방어효력을 나타내기에 충분한 면역반응이 유도되는 것으로 나타났다. 이러한 마우스 동물실험 결과는 개발된 CJ50003 후보 백신이 면역원의 양과 면역반응의 강도 간에 500~0.5 ng의 항원량에서 상관관계가 있다는 것을 나타내며, 0.5 ng의 적은

Table 1. The effect of aluminium hydroxide adjuvant on immune response induced by CJ50003 Japanese encephalitis(JE) vaccine in mice

Dose	Adjuvant	ELISA(A ₉₂) ^a	PRNT ₅₀
500 ng	+	2.09	220
	-	0.31	20
50 ng	+	1.28	110
	-	0.81	11
Negative control	-	0.08	<10

^aSerum samples were tested at 1:4500 dilution by ELISA on Nakayama-NIH-coated plates.

Table 2. The effect of immunized dose of CJ50003 JE vaccine on immune response in mice

Dose	Adjuvant	ELISA(A ₉₂) ^a	PRNT ₅₀
500 ng	+	2.17	220
50 ng	+	1.95	110
5 ng	+	1.09	18
0.5 ng	+	0.62	14
Negative control	-	0.18	<10

^aSerum samples were tested at 1:1500 dilution by ELISA on Nakayama-NIH-coated plates.

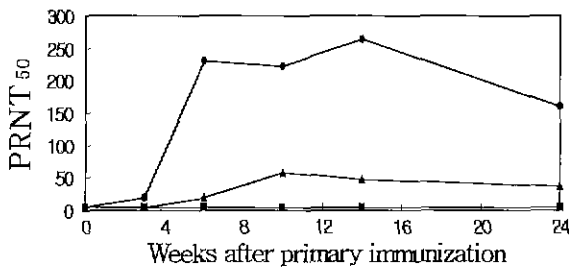


Fig. 1. Persistence of neutralizing antibody titer against JE virus in mice immunized with CJ50003 vaccine 500 ng(●), Biken JE vaccine 1/10 dose(▲), and PBS(■). Groups of 10 BALB/c mice were immunized twice subcutaneously at an interval of 3 weeks. PRNT assay was done with serum samples taken at the designated time points. PRNT₅₀ titers are expressed as reciprocals of the highest dilutions of serum to reduce the number of JE Nakayama-NIH plaques by 50%.

항원양으로도 충분한 체액성 면역반응(humoral immune response)을 일으킬 수 있다는 것을 나타낸다.

항체가의 변화 및 지속성

백신이 방어 효과를 나타내기 위해서는 면역 반응을 유발시키는 것도 중요하지만 방어 가능한 면역 반응이 충분한 기간 동안 유지되는 것도 중요하다. 면역후 면역 상태의 변화 및 지속성을 알아보기 위하여 마우스를 면역시켜 그 혈청의 Nakayama-NIH 주에 대한 중화항체가를 24주까지 3~4주 간격으로 혈액을 채취하여 관찰하였다(Fig. 1). 마우스의 면역을 위하여 500 ng의 항원양을 3주간격으로 2회 면역 주사하였다. 이때 비교 백신으로서 국제적으로 통용되고 있는 Biken사의 백신을 동일한 방법으로 주사하여 비교 측정하였다. CJ50003 후보 백신은 1차 접종 3주 경과시 방어에 충분한 1:20의 중화항체가에 도달하였고, boosting에 의해 중화항체가가 크게 증가하여 초기 접종 6주후 약 1:230에 도달하였다. 이후 중화항체가는 초기 접종 후 14주까지 1:200 이상으로 유지되다가 그후 감소되는 경향을 보였지만 24주까지도 여전히 1:160의 높은 중화항체가를 나타내었다. 반면 Biken 백신으로 면역시킨 경우에는 1차 접종만으로는 중화항체가가 거의 증가하지 못하다가 boosting 후 증가하여 초기 접종 10주 후 1:50으로 최고에 도달한 후 서서히 감소하는 경향을 보였다. 따라서 초기 중화항체 유도능과 최고 중화항체가 면에서 개발된 백신이 기존 백신에 비해 우수함을 알 수 있었다. 또한 CJ50003 후보 백신이 면역 지속성 측면에서도 기존 백신에 비해 상대적으로 우수한 것을 알 수 있었다.

교차 면역반응

일본뇌염 바이러스는 다양한 바이러스 주가 존재하며, RNA 바이러스로서 유전자 변이성도 높다고 알려져 있다. 다양한 바이러스 주에 대한 교차 면역반응을 조사하기 위하여, 신경독성을 나타내는 대표적인 일본뇌염 바이러스인 Nakayama-NIH, P3, SA14 등을 사용하여 마우스 혈청의 이들 각각에 대한 항 바이러스 항체가를 ELISA를 통해 비교

Table 3. Comparison of anti-JE antibody response elicited by CJ50003 and Biken vaccines against 3 wild type neurovirulent JE viruses

Immunogen		ELISA(A _{49c}) ^a		
Vaccine	Dose	Anti-Nakayama-NIH	Anti-P3	Anti-SA14
CJ50003	500 ng	2.17	2.35	1.99
	50 ng	1.95	1.92	1.78
Biken ^b	1/10	0.70	0.65	0.49
	1/100	0.38	0.34	0.29
Negative control		0.18	0.20	0.13

^aSerum samples were tested at 1:1500 dilution by ELISA

^bBiken vaccine 1 dose contains 5 µg of TCA-precipitable viral protein according to our experiments.

측정하였다(Table 3). 면역 항원은 50, 500 ng 등 두가지 항원양을 마우스를 대상으로 각각 3주간격으로 2차례 주사하여 면역시켰으며 대조군으로서 Biken 백신을 주사하여 비교하였다. CJ50003 후보백신 500 ng으로 면역주사시, 각각의 바이러스 주에 따라 2.35~1.99의 높은 일본뇌염 바이러스 특이 항체가를 나타내었으며 Biken 백신 1/10도스를 면역주사한 경우의 0.70~0.49 보다 높은 항체가를 보였다. 또한 접종 항원양을 1/100로 하였을 때에도 개발된 백신은 여전히 1.78~1.95의 높은 항체가를 유지하여 큰 감소를 보이지 않았으며, 바이러스 주에 따른 차이도 거의 없었다. 반면 Biken 백신의 경우 1/100도스 접종시 항 바이러스 ELISA 항체가가 0.38~0.29로 측정되어 항체 유발능이 크게 감소하였다. 따라서 개발된 2세대 일본뇌염 백신은 우수한 교차 면역 반응을 일으키며 기존의 백신에 비해 항 바이러스 항체가가 높다는 것을 알 수 있었다.

마우스 in vivo 방어효력 실험

이상에서 humoral immunity를 중심으로 면역된 마우스의 혈청을 in vitro에서 분석해 보았다. 이러한 분석 결과에 따른 일본뇌염에 대한 방어효력이 실제 생체내에서도 나타나는지 알아보기 위하여 마우스를 면역시키고 신경독성을 가지는 일본뇌염 바이러스 주로 감염시킨 후 마우스의 생존율을 조사하였다(Table 4). 500 ng CJ50003 후보백신을 마우스 대상으로 3주간격으로 2회 면역주사하였으며, 2차 접종

Table 4. The survival rates of each mouse group after lethal challenge of JE Nakayama-NIH virus

Immunogen		Number of mice	Number of Survivors 2 weeks after challenge	Survival rate
CJ50003	500 ng	10	9	90%
Biken ^a	1/10	10	6	60%
Negative control		10	1	10%

Immunized mice were intracerebrally challenged with 10 LD₅₀ of JE Nakayama-NIH virus 3 weeks after immunization. The vitality of individual mice was monitored for 14 days after challenge. ^aBiken vaccine 1 dose contains 5 µg of viral protein (TCA-precipitable) according to our experiments.

3주 경과 후 LD₅₀의 10배 양인 1000 pfu의 Nakayama-NIH 주를 뇌내 주사하고 그후 2주일간 마우스의 생존율을 관찰하였다. 음성대조군의 경우 10%의 생존율을 보이는데 비해, 후보백신으로 면역된 마우스는 90%의 생존율을 보여 *in vivo*에서도 방어효력이 있음을 알 수 있었다. 또한 Biken의 백신은 60%의 생존율을 기록해 CJ50003 후보 백신이 방어 효력면에서도 상대적으로 우수한 것으로 나타났다.

고 찰

본 연구자들은 기존 일본뇌염 백신의 문제점을 극복한 일본뇌염 백신을 개발함에 있어, 개선된 백신으로서 높은 면역원성과 안전성, 경제성을 갖는 백신 바이러스 주(CJ50003)를 개발하였고, 개발된 CJ50003 바이러스를 이용하여 제조된 백신의 면역원성을 마우스를 대상으로 고찰하였다.

CJ50003 바이러스 주를 이용한 백신은 WHO에 의해 백신 생산세포주로서 권장되고 있는 certified cell인 배로 세포에서 바이러스를 증식시키고 그 배양액으로부터 바이러스를 정제한 후 불활화하는 방법으로 제조되었다. 배양시 fetal bovine serum이 포함되지 않은 배지를 사용하였고 또한 세포괴사효과(CPE)가 매우 적게 나타나기 때문에 바이러스를 정제하는 과정을 크게 단순화 할 수 있었으며, 또한 세포 유래 이물질도 크게 감소시킬 수 있었다(2). 이렇게 배양과정에서부터 외래성 이물질의 혼입 가능성을 배제함으로써 기존의 백신에 비해 불가피하게 혼입되는 불순물에 의한 부작용이 크게 감소될 것으로 기대된다. 또한 바이러스 배양시 사용된 배로 세포는 이미 사람을 위한 백신의 생산에 허가된 바 있어 백신의 안전성 측면이 마우스 뇌 배양을 통해 생산되는 기존의 백신에 비해 크게 향상되었다.

개발된 CJ50003 후보 일본뇌염 백신으로 마우스를 면역시켰을 때 중화항체가(PRNT₅₀)가 항원양을 50 ng까지 줄여도 1:10 이상으로 나타났다. 특히 adjuvant로써 aluminium hydroxide gel을 사용한 경우에는 0.5 ng의 백신 항원으로도 1:10 이상의 중화항체를 보여 뛰어난 중화항체 유도능을 가지고 있음을 보여주었다. 따라서 효과적인 백신의 제조를 위해 aluminium hydroxide gel을 adjuvant로 사용하기로 하였다. 일반적으로 일본뇌염백신의 효능은 시험백신 또는 일본의 국가표준참조백신에 의해 마우스를 면역시킴으로써 측정되며, 중화항체가 1:10이면 마우스에서의 혈청 변환 및 방어의 최소한의 증거로서 인정되고 있는데 이는 수동적으로 면역된 마우스가 감염성 모기에 의해 투여되는 것으로 추산되는 일본뇌염 바이러스 양인 10⁵ LD₅₀의 바이러스 공격으로부터 방어되는 항체의 수준으로 여겨지고 있다(12). 이러한 항 바이러스 항체는 혈액속의 virion을 제거함으로써 중추신경계의 바이러스 침입을 막거나 제한하여 일본뇌염 바이러스 감염을 억제하는 중요한 방어기작으로 생각되고 있다.

마우스 면역후 면역반응의 변화 및 유지상태를 관찰하기 위해 면역 후 24주까지 주기적으로 채혈하여 실험한 결과에서는 CJ50003 후보 백신으로 면역시킨 경우 중화항체가 boosting에 의해 크게 증가하여 초기 면역 14주 후까지 1:200 이상으로 계속 유지되고 24주 후까지도 1:160 이상의

높은 값을 유지하는 것을 보여주었다. 반면 Biken 백신을 접종하였을 때에는 중화항체가가 최고 1:50으로 상대적으로 낮았고 시간이 경과하면서 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과에 의하여, 개발된 CJ50003 후보 백신은 기존 백신의 사용시 문제점의 하나인 1~2년의 재접종 간격을 늘일 수 있게 해주어 백신 접종시의 비용 및 노력을 줄여줄 수 있을 것으로 기대된다.

일본뇌염 바이러스에는 특정한 염기서열에 의해 정의되며 지리적으로 구별되는 다양한 유전형이 있고, 바이러스 자체의 변이성도 큰 것으로 알려져 있다(16). 이들 다양한 바이러스주에 대한 방어 가능성을 알아보기 위한 3종의 신경독성 일본뇌염 바이러스 주들에 대한 혈청학적 시험에서 CJ50003 후보 백신이 Biken 백신에 비해 Nakayama-NIH, SA14, P3 주 모두에 대해 높은 일본뇌염 바이러스 특이 항체가를 나타냈다. 보고된 바에 의하면, 본 연구자들에 의해 개발된 백신용 바이러스 주의 모 바이러스 주인 SA14-14-2 (PDK) 주는 기존에 분리된 일본뇌염 바이러스 주들에 대한 실험 결과에서 중국, 일본, 베트남, 태국, 인도네시아 등지의 20여개종의 바이러스 주를 중화하는 광범위한 교차 면역성(cross reactivity)을 가지는 것으로 나타났다(22). 그러므로 일본뇌염 바이러스 주간의 항원적 차이는 그 지리적 위치, 분리된 숙주, 분리연도 및 virulence에 무관한 것으로 보인다. 국내에서는 국내 분리 일본뇌염 바이러스 주와 Nakayama-NIH, Beijing-1 주 간의 항원성 및 연관관계가 적혈구 응집반응(hemagglutination)과 유전자 염기서열 분석을 통해 비교, 분석되어 보고된 바 있다(1). 그에 따르면 유전적으로는 국내 분리주가 Nakayama-NIH와 다른 군에 속하며 국내에 최소 2종류의 유전적 차이가 있는 분리주가 존재하지만, 혈청학적으로는 항원성에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 개발된 백신에 대한 실험의 결과와 이들 보고를 종합해 볼 때, CJ50003 후보 백신은 넓은 지역에서 다양한 바이러스 주에 의해 발생하는 일본뇌염의 방어에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

이러한 혈청학적 방법에 의한 효과의 확인은 효율적이지만 간접적인 방법이다. 이들 혈청학적 결과에 따른 효과가 생체내에서도 기대한 바대로 나타나는지 확인하기 위해 면역된 마우스를 신경독성을 가지는 바이러스로 직접 뇌내 공격하는 방법으로 실험하여 보았다. 그 결과에서 음성대조군은 10%의 생존율을 보이는 반면, 면역된 마우스는 90%의 생존율을 보여 *in vivo*에서도 백신의 효과를 확인할 수 있었다. 뇌에는 뇌관문이 존재하여 물질의 이동을 제한하는 것으로 알려져 있으므로 뇌내에 바이러스를 직접 주사하는 것은 강력한 감염 조건이라고 할 수 있다. 중화항체는 세포의 바이러스를 중화하거나 주변의 감염되지 않은 세포로 재감염되는 것을 막거나, 또는 항체의존성 cytotoxicity에 의해 감염된 세포를 facilitating lysis시켜 뇌염 발병시 회복에도 기여하는 것으로 생각되고 있다(12).

본 연구는 개발된 일본뇌염 백신이 마우스에 면역시켰을 때 특이적 항체(specific antibody)와 일본뇌염 바이러스에 대한 중화항체 유도능이 기존 백신에 비해 뛰어나다는 것을 보여주고 있다. 또한 면역반응을 통해 일본뇌염 바이러스의 감염을 생체내에서 실제로 방어해 준다는 것도 보여 주었

다. 이러한 결과들에 의해 CJ50003 후보 백신은 체액 면역을 효과적으로 유발시킴으로써 기존의 일본뇌염 백신 대비 동등 이상의 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

감사의 말

본 연구에서 시험한 CJ50003 일본뇌염 후보백신은 미국 Walter Reed Army Institute of Research와의 공동 연구에 의해 개발되었습니다. 실험에 필요한 바이러스 주와 조언을 주신 국립보건원과 중국의 유명신 박사께 감사드립니다. 동물 실험에 도움을 준 제일제당 종합기술원 약리분석연구팀 여러분께 감사의 말씀을 전합니다.

참고문헌

1. 조해월, 남재환, 이유진, 김은정, 이호동, 윤경식, 고희철. 1996. 일본뇌염 바이러스 Nakayama-NIH주와 국내에서 분리된 일본뇌염 바이러스주의 유전적 차이 및 항원성 차이의 조사. 대한바이러스학회지 26, 191-204.
2. 홍선표, 정용주, 문상범, 신영철, 이성희, 김수옥. 1998. 베로 세포에 적응된 약독화 일본 뇌염 바이러스의 성장 특성. 한국생물공학회지 13, 231-237.
3. Anderson, M.M. and T. Ronne. 1991. Side effects with Japanese encephalitis vaccine. *Lancet* 337, 1044.
4. Chamber, T.J., C.S. Hahn, R. Galler, and C.M. Rice. 1990. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Ann. Rev. Microbiol.* 44, 649-688.
5. Chung, Y.J., S.P. Hong, S.B. Moon, Y.C. Shin, and S.O. Kim. 1998. Characterization of an attenuated Japanese encephalitis virus adapted to African green monkey kidney cells, Vero. *J. Microbiol.* 36, 189-195.
6. Eckels, K.H., Y.X. Yu, D.R. Dubois, N.J. Marchette, D. W. Trent, and A.J. Johnson. 1988. Japanese encephalitis virus live attenuated vaccine, chinese strain SA14-14-2: adaptation to primary canine kidney cell cultures and preparation of a vaccine for human use. *Vaccine* 6, 513-518.
7. Gollins, S.W. and J.S. Porterfield. 1984. Flavivirus infection enhancement in macrophage: radioactive and biological studies on the effect of antibody on viral fate. *J. Gen. Virol.* 65, 1261-1272.
8. Heinz, F.X. 1986. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Advances in virus Research* 31, 103-168.
9. Igarashi, A. 1992. Epidemiology and control of Japanese encephalitis. *World Health Stat Q* 45, 299-305.
10. Lee, T., T. Komiya, K. Watanabe, C. Aizawa, and H. Hashimoto. 1995. Immune response in mice infected with the attenuated Japanese encephalitis vaccine strain SA14-14-2. *Acta Virologica* 39, 161-164.
11. Northdurft, H.D., T. Jelinek, A. Marschang, H. Maiwald, A. Kapaun, and T. Loscher. 1996. Adverse reactions to Japanese encephalitis vaccine in travellers. *J. Infection* 32, 119-122.
12. Oya, A. 1998. Japanese encephalitis vaccine. *Acta. Pediatr. Jpn.* 30, 175-184.
13. Peiwei, G., D. Zhifen, and W. Zhongquan. 1989. Experience with production of interferon and Japanese encephalitis vaccine in continuous cell lines. *Develop. Biol. Standard* 70, 223-226.
14. Plesner, A.-M., A.-S. Peter, and H. Margrethe. 1996. Neurological complications and Japanese encephalitis vaccination. *Lancet* 348, 202-203.
15. Srivastava, A.K., J.R. Putnak, R.L. Warren, and C.H. Hoke Jr. 1995. Mice immunized with a Dengue type 2 virus E and NS1 fusion protein made in *Escherichia coli* are protected against lethal Dengue virus infection. *Vaccine* 13, 1251-1258.
16. Seinbauer, D.A. and J.J. Holland. 1987. Rapid evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 409-433.
17. Steinhoff, M.C. 1996. Japanese encephalitis: a Chinese solution?. *Lancet* 347, 1570-1571.
18. Takaku, K., T. Yamanishita, and T. Osani. 1973. Japanese encephalitis purified vaccine. *Biken J.* 11, 25-39.
19. Tsai, T.F. and Y.X. Yu. 1994. Japanese encephalitis vaccines. p. 671-714 In S.A. Plotkin and E.A. Mortimer (ed.), *Vaccines*. W.A. Saunders.
20. Sumiyoshi, H., G.H. Tignor, and R.E. Shope. 1995. Characterization of a highly attenuated Japanese encephalitis virus generated from molecularly cloned cDNA. *J. Infectious Diseases* 171, 1144-1151.
21. Umenai, T. 1985. Current Japanese encephalitis: current worldwide status. *Bull. WHO.* 63, 625-631.
22. Wills, M.R., B.K. Sil, J.X. Cao, Y.X. Yu, and A.D.T. Barrett. 1992. Antigenic characterization of the live attenuated Japanese encephalitis vaccine virus SA14-14-2: a comparison with isolates of the virus covering a wide geographic area. *Vaccine* 10, 861-872.

(Received November 20 1998/Accepted February 22, 1999)

ABSTRACT: The Immune Response of Mice Vaccinated with Japanese Encephalitis Vaccine, CJ50003 Produced in Vero Cells

Sang Beom Moon, Sun Pyo Hong, Jae Ku Kang, Dal Hyun Kim, Wangdon Yoo, Kenneth H. Eckels¹, and Soo-Ok Kim* (Institute of Science & Technology, CHEIL-JEDANG Corporation, 522-1 Ichon, Kyonggi 467-810 Korea; ¹Walter Reed Army Institute of Research, Washington D.C. 20307 USA)

In this study, to evaluate newly developed Japanese encephalitis (JE) vaccine candidate CJ50003, we assessed its immunogenicity along with a previously commercialized inactivated JE Biken vaccine. The CJ50003 viral antigens produced in Vero cells were administered subcutaneously to mice either with alum-adsorbed or free form. The ELISA titers and neutralizing (NEUT) antibody titers accounting for major protective immunity in JE were determined. Mice given alum-adsorbed vaccine had a 10 times higher antigen-specific NEUT antibody response than did those which had received free antigens. This NEUT antibody response was maintained until day 168 with NEUT titer more than 1:160. Even with the 0.5 ng of alum-adsorbed antigen dose, NEUT titer was induced more than 1:10 which is considered as an evidence for seroconversion and protection. The mice immune sera had a similar rate of cross-reactivity against three different viral antigens, Nakayama-NIH, P3 and SA14, as determined by ELISA assay. In a mice challenge model, vaccination with the CJ50003 conferred more protection than with commercialized Biken vaccine against Nakayama virus. These data demonstrated that CJ50003 vaccine candidate has an excellent prophylactic efficacy and implicated it has a strong potential for further development and commercialization.