

장티푸스 협막 다당체와 일본 뇌염 바이러스의 혼합 백신 제조 및 면역성

지 희 윤 · † 김 을 제
건양대학교 의학과 생물학 교실, ¹(주) 백텍
(접수 : 2003. 3. 15., 게재승인 : 2004. 2. 22.)

Preparation and Immunogenicity of the Combined Vaccine composed of the Polysaccharide Capsule of *Salmonella typhi* and Japanese Encephalitis Virus

Hee Youn Chee and Eul Che Kim† ¹

Division of Biological Sciences, Medical School, Konyang University, Non-san 320-711, Korea

¹VaccTech Corp. Yoo-Sung Gu, TaeJeon 305-806, Korea

(Received : 2003. 3. 15., Accepted : 2004. 2. 22.)

The immunogenicity of investigational combined vaccine, composed of the Japanese encephalitis virus(JEV) and the polysaccharide capsule(Vi) of *Salmonella typhi* covalently bound to tetanus toxoid(TT) was evaluated in mice. The mice immunized with combined vaccine elicited higher anti-Vi Immunoglobulin G(IgG) as well as anti-JEV IgG levels than the mice immunized with Vi-TT or JEV alone. The combined vaccine produced four-fold increase in anti-Vi IgG level than Vi-TT alone. In JEV the combined vaccine was significantly more immunogenic than JEV alone and induced six-fold increase in IgG level. Adsorption of combined vaccine onto aluminium hydroxide gel also enhanced IgG level for both Vi and JEV.

Key Words : Combined vaccine, immunogenicity, japanese encephalitis virus, *Salmonella typhi*

서 론

일본 뇌염은 Japanese encephalitis virus (JEV)가 전염시키는 바이러스 성 전염병으로서 동남 아시아의 뇌염 모기 서식지에서 매년 35,000명 이상 발생하며 약 만명 정도가 사망하는 것으로 알려져 있다(1, 2). 우리나라에서도 매년 일본 뇌염이 발생하고 있어서 예방을 위한 백신 주사를 접종하고 있다. 뇌염 백신은 쥐의 뇌 조직에서 바이러스를 배양하여 불활화시킨 백신이 국제적으로 가장 널리 사용되고 있다. 일본 뇌염 백신의 접종 스케줄과 횟수는 국가마다 차이가 있는데 우리나라는 기초 3회 접종하고 12세까지 5년마다 추가 접종하고 있다.

장티푸스는 식수공급 관리나 하수 처리 시설이 미비한 동남 아시아 등지의 개발 도상국들에서 발병율이 높은 전염병으로 원인균인 *Salmonella typhi*가 장내 점막조직을 통하여 단기간에 체내로 감염하여 전신 발병을 일으킨다. 전 세계적

으로 매년 1,200만명이 넘는 발병 환자가 보고되고 있으며 그중 약 1% 가량이 사망하는 것으로 보고되어 있다(3, 4). 이러한 장티푸스의 백신은 19세기말 영국에서 열처리로 불활화시킨 *S. typhi*를 이용한 것이 시초가 되어서 현재는 세균의 협막 다당체를 분리하여 제조한 성분백신을 사용하고 있다. 이러한 백신은 성인의 경우에는 IgG 항체 형성이 80-90% 정도 되나 5세 미만 소아들에 대하여는 항체 형성 능력이 매우 낮은 것으로 보고되고 있으며 재 접종시에도 아동이나 성인 모두의 경우 항체 형성의 boosting 효과가 매우 미비한 것으로 알려져 있다(5).

근래 세균성 병원체에 대한 성분백신 개발에 많이 사용되고 있는 항원의 한 종류는 세균 협막을 구성하고 있는 다당체이다. 세균의 항원성 다당체 백신 사용의 문제점은 다당류 항원의 낮은 면역성으로서 다당체는 T-independent 항원으로서 memory B cell을 자극시키지 않아 면역 기억능력이 없어 재접종시에도 항체의 boosting 효과가 미비하여 백신으로서의 효과에 한계점을 가지고 있다. 특히 이러한 백신들은 예방 면역성이 가장 요구되는 생후 18개월 이하에는 효과가 거의 없는 것으로 알려져 있다(6). 이러한 문제점들은 장티푸스 이외에도 *Haemophilus influenza*, *Shigella dysenteriae* 등의 여러

† Corresponding Author : Division of Biological Sciences, Medical School, Konyang University, Non-san 320-711, Korea

Tel : +82-42-862-5342 Fax : +82-41-730-5138

E-mail : eckim@vacctech.com

다당체 백신들에 대하여 공통적으로 나타나고 있어 다당체의 면역성을 증가시키기 위하여 면역성이 높은 단백질과 결합시키는 백신의 개발이 진행되어 왔다(7-9). 단백질은 T-cell에 의하여 항원이 인지되고 T-cell dependent 면역성을 자극시킨다는 점에서 단백질을 다당류에 공유 결합시키면 면역성과 면역 기억성을 모두 생성시킬 수 있다. 따라서 다당류 항원의 면역성을 증가시키기 위하여 면역성이 높은 단백질과 conjugation시키는 혼합 백신 개발이 요구되고 있다.

장티푸스와 일본 뇌염은 둘 다 아동들에게 노출되기 쉬운 전염병이며 접종 스케줄에 있어서도 3-5년으로 비슷하다는 공통점이 있다. 본 연구는 예방 접종 백신으로서 장티푸스와 일본뇌염 각각의 백신으로 혼합 백신을 제조하여 각 백신의 접종회수를 줄이고 혼합 백신으로서 장티푸스 다당체 항원으로서 갖는 소아 면역의 제한성을 일본뇌염 단백질체가 개선할 수 있는 가능성이 있으므로 두 백신의 conjugation이나 혼합형 제조방법을 개발하여 혼합 백신의 가능성을 시도하는 것이 본 연구의 목적이다.

재료 및 방법

Salmonella 협막 항원의 제조

Salmonella 협막 (Vi) 항원은 (주)VaccTech (Taejeon, Korea)에서 *S. typhi* Ty2 균주를 반합성 배지(10)에서 발효 배양하여 균체를 불활화시킨 배양액을 공급 받아 제조하였다. 배양액은 원심 분리하여 균체를 회수하고, 멸균 생리식염수로 균질하게 부유시킨 후 2.5 M 칼슘 용액을 첨가하고 30분간 교반하여 Vi를 추출하였다. 추출된 항원액은 총액량의 30% 정도 되게 순수에탄올을 첨가하고 30분간 교반하여 혼합하고 원심 분리하여 상층액을 회수한 후 최종 알콜농도 80% 되게 에탄올 첨가 분획하여 침전물을 회수하였다. Vi 항원의 양은 O-acetyl 함량 시험(11)을 통하여 측정하였다.

일본뇌염 항원 단백질의 활성화

기존의 일본뇌염 백신 제품 (J사)을 100,000 Xg에서 1시간 동안 초원심 분리하여 바이러스입자를 침전시키고 생리식염수에 적당농도로 부유시켰다. 일본뇌염 바이러스 용액에 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC, Sigma, USA) 용액을 첨가하고 20분간 4°C에서 교반 혼합하였다. Adipic acid dihydrazide (ADH, Sigma) 용액을 pH 5.2 되게 조정하고 EDAC가 첨가된 일본뇌염 용액에 20분 동안 pH 5.2를 유지하면서 첨가시켰다. 3시간 교반 후에 pH를 7.0으로 조정하여 반응을 중지시키고 pH 조정시 형성된 응집 침전물을 50,000 g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 상층액을 수집하여 0.15 M NaCl에 투석시키고 여과 농축기로 투석액을 농축시키고 농축액을 sodium phosphate로 평형시킨 BioGel P-10 column (BioRad, USA)에 첨가하고 배제용적을 수집하여 0.15 M NaCl으로 한외여과 시키고 농축시켰다.

Tetanus toxoid의 활성화

Tetanus toxoid 항원은 (주)VaccTech에서 제공받아 사용하

였다. 0.15 M NaCl에 용해시킨 EDAC 용액을 tetanus toxoid 용액에 pH 6.0을 유지시키면서 혼합시켰다. 20분 혼합 후 tetanus toxoid 용액을 ADH 용액에 pH 5.2를 유지시키면서 천천히 첨가하고 3시간 혼합 후 pH를 6.0으로 조정하고 침전물은 원심분리하여 제거하였다. 상층액을 분획 분자량 5,000의 투석막을 이용하여 pH 7.0의 10 mM sodium phosphate 용액에 18시간 투석한 후 막여과 장치로 농축하고 농축액을 sephadex-G-25 column chromatography (Pharmacia, USA)로 탈염 하였다. 수집된 배제용적을 막여과장치로 농축시키고 농축액을 0.15 M NaCl에 투석여과한 후 0.45 μ m 주사기 필터로 무균여과하였다.

Vi-tetanus conjugation

정제된 Vi 항원 100 mg을 0.15 M NaCl 용액에 용해시키고 EDAC 용액을 첨가하여 20분 동안 혼합시킨 후 반응액의 pH를 5.3으로 유지시켰다. 활성화된 tetanus toxoid를 EDAC 첨가한 Vi 항원 용액에 pH 5.3으로 유지하면서 서서히 첨가한 후 혼합 반응을 pH 5.3 유지하면서 3시간 가량 더 반응시켰다. 3시간 반응 후에 NaOH로 pH를 7.0으로 조정하고 이때 생긴 침전물은 원심분리하여 제거하였다. 상층액을 분획 분자량 50,000의 투석막을 이용하여 0.1 M NaCl을 포함한 pH 7.0의 10 mM sodium-phosphate용액에 18시간 투석하였다. 투석액은 sephacryl S-1000 column (Pharmacia)으로 chromatography하였고, 배제용적을 수집하여 농축시키고, 0.15 M NaCl 용액에 투석 여과시켰다. O-acetyl 함량 측정으로 conjugate의 Vi 함량을 측정하였고 Lowry 방법(12)으로 단백질 함량을 측정하였다.

항원 formulation 및 항체형성 동물실험

마우스를 이용한 동물 실험에서는 4주령 암컷 ICR 마우스를 구입하여 (Daehan Biolinc, Korea) 실험동물로 사용하였으며 실험 대상 시료군은 1그룹) 멸균 생리식염수 대조군, 2그룹) 50 μ g/mL의 Vi 용액 1 mL에 생리식염수 9 mL 혼합한 Vi 정제 항원액, 3그룹) 50 μ g/mL의 Vi-tetanus toxoid conjugate 항원액 mL에 생리식염수 9 mL에 혼합한 액, 4그룹) 25 μ g/mL의 일본 뇌염 기존 시제품 시료를 생리식염수 9 mL와 혼합한 액, 5그룹) Vi-tetanus toxoid conjugate (50 μ g/mL)와 25 μ g/mL의 JEV 항원을 1 mL씩 혼합하고 생리식염수를 8 mL 혼합한 제조액, 6그룹) 5)번 혼합 제조시료에 aluminium hydroxide gel을 120 μ l를 첨가하고, 6시간 동안 흡착한 후 생리식염수 8 mL에 혼합한 제조액들을 사용하였다.

위의 항원 formulation 시료를 시료군 당 10마리의 마우스에 500 μ l씩 복강내 주사를 하였으며, 접종 횟수는 2주 간격으로 2회 접종하였으며 채혈은 최종 접종 후 7일 후에 수행하였다.

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 항체가 시험

항체 형성을 검사하기 위해 96-microplate well에 100 μ l의 Vi 정제 항원과 뇌염 백신 항원액을 첨가하고 4°C에서 18시간 방치하여 항원을 고정화하였다. 고정화 항원액을 제거하고 blocking 용액으로 bovine serum albumin (5 μ g/mL,

sigma)을 포함한 pH 7.3의 phosphate-buffered saline으로 수세 후 blocking 용액을 well 당 200 μ l씩 첨가하고 37°C에서 1시간 방치시켰다. Blocking 용액을 제거하고 채혈된 혈청 시료를 blocking 용액으로 1,000배 희석시키고 각 well에 첨가한 뒤 37°C에서 1시간 방치시킨다. 1시간 경과 후 혈청 시료를 제거한 뒤 blocking 용액으로 수세하고 alkaline phosphatase-제2항체 중합체 (Sigma)를 100 μ l씩 첨가하고 37°C에서 30분간 방치시켰다. 수세 뒤에 *p*-nitrophenylphosphate (Sigma) 기질용액을 첨가하여 20분 반응시킨 후 405 nm에서 ELISA reader로 색의 강도를 측정한다.

중화항체에 의한 plaque감소 시험법 (중화항체시험법)

일본뇌염의 중화항체 시험을 하기 위해서 바이러스 숙주세포로 Vero cell (ATCC CCL-81)을 사용하였다. Vero cell은 5% Fetal Bovine serum (FBS, Gibco)가 함유된 Minimum essential medium (MEM) 배지에서 배양하였다. 채취한 마우스 혈청 시료들은 각 그룹별로 혼합하여 0.22 μ m 주사필터로 멸균하고 56°C에서 30분간 열처리하여 불활성시켰다. 각 혈청 시료들은 5% FBS를 함유한 MEM 배지로 1 : 320 (V/V)과 1 : 640 (V/V)으로 희석시키고 동일 부피의 뇌염 바이러스 용액 (200 PFU/0.4 ml)을 첨가하고 37°C 항온수조에서 90분간 중화시켰다. 각 혼합액을 각각 400 μ l씩 4개의 배양접시에 배양한 Vero cell에 접종하고 37°C에서 90분간 배양하였다. 대조군으로는 바이러스 부유액과 5% FBS 함유 MEM 배지를 동일 부피 혼합하고 37°C에서 90분 방치 후 10개의 배양접시에 대조 접종하고 37°C에서 90분간 배양하였다. 배양 후 모든 배양 접시에 10% FBS 함유 MEM 배지와 agarose의 1 : 1 혼합한 1차 중층배지를 배양접시당 5 ml씩 중층하고 37°C에서 72시간 배양하였다.

3% neutral red를 함유한 MEM-agarose 혼합 2차 중층배지를 4 ml 첨가하여 37°C에서 24시간 배양하고 plaque수를 세었다. 시험군의 plaque수와 대조군의 plaque수를 비교하여 감소율을 구하고 각 혈청 시료들의 중화항체가를 산출하였다.

결과 및 고찰

본 실험에서는 일본 뇌염 바이러스와 장티푸스 Vi 항원을 conjugation하여 conjugate vaccine을 제조하려고 시도하였다. 일본 뇌염 바이러스 항원 용액을 활성화 시키는 과정에서 반응용액의 pH를 5.2로 조정하였을 때 침전 응집물이 형성되었으며 pH를 7.0으로 재조정 후에도 침전 응집물은 용해되지 않았다. 원심 분리하여 침전물을 제거하고 상층액에 대하여 투석과 농축을 하여 얻은 농축액의 단백질 함량과 잔여 ADH 량을 측정한 결과 protein은 0.0001 mg/mL 이하로 거의 없었고 잔여 ADH 함량도 무시할 만큼의 양으로 측정되었다. 이러한 결과는 pH를 5.2로 조정하는 과정에서 일본뇌염 바이러스 항원에 변성이 발생하여 응집 침전물이 형성된 것으로 판단되었다. 따라서 뇌염 바이러스 자체를 conjugation을 위한 carrier 단백질로 사용하는 것은 적합치 않음을 알 수 있었으며 따라서 뇌염 단백질과 장티푸스 항원과의 conjugate형성은 수행할 수 없었다. 반면 Tetanus toxoid 단백질과 Vi 항원과

의 conjugation은 성공적으로 수행되어 Vi-Tetanus toxoid 항원 (Vi-TT)을 제조하였다. 따라서 뇌염 바이러스 항원과 Vi-TT 항원을 formulation시키는 방법으로 혼합백신 시료를 제조하였다.

마우스를 이용한 Immunoglobulin (IgG) 항체 형성 실험에서는 장티푸스 경우는 Vi 단독 항원과 Vi-TT conjugate 항원을 비교하였을 때 마우스 10마리 중 6마리에서 Vi-TT 항원이 Vi 단독 투여 때보다 더 많은 Vi에 대한 IgG 항체를 형성시켰다(Table 1). 이와 같은 결과는 이전에 Szu(13) 등이 발표된 연구결과와 동일한 경향을 나타내었으며 Vi-TT+JEV의 혼합 항원도 Vi-TT conjugate 항원보다도 더욱 많은 IgG 항체를 형성시키는 결과를 나타내었다. Aluminium hydroxide를 adjuvant로 첨가한 시료도 adjuvant를 첨가하지 않은 항원에 비하여 상대적으로 더 많은 IgG 항체 형성 증가를 나타냈다. 따라서 Vi에 tetanus toxoid을 carrier로서 부착시킬 때 IgG 생성 능력이 증가하고 일본 뇌염 항원과 혼합시킨 결과에서는 항체 형성능력이 더욱 증가함을 나타내었다(Table 1).

Table 1. Immunoglobulin G level elicited in mice by Vi antigen

No.	Control	Vi	ViTT	JEV+ViTT	AI (JEV+ViTT)
1	0.081	0.133	0.140	0.442	0.777
2	0.075	0.126	0.274	0.503	0.862
3	0.081	0.089	0.154	0.896	0.778
4	0.077	0.082	0.191	0.513	1.091
5	0.093	0.150	0.337	0.288	0.768
6	0.092	0.143	0.178	0.183	0.833
7	0.084	0.230	0.581	0.391	0.640
8	0.088	0.160	0.172	0.401	0.459
9	0.097	0.242	0.196	0.463	0.372
10	0.080	0.134	0.259	0.927	0.576
P	0.077	0.118	0.129	0.482	0.735

Control : Saline solution

Vi : *Salmonella typhi* capsular antigen

ViTT : Vi plus tetanus toxoid

JEV+ViTT : Japanese Encephalitis virus plus ViTT

AI (JEV+ViTT) : JEV+ ViTT plus Aluminium hydroxide gel as adjuvant

P : pooled sample

일본 뇌염의 경우는 실험대상 마우스 10마리 모두에서 일본 뇌염과 Vi-TT conjugate 항원을 혼합한 시료가 일본 뇌염 항원 단독 투여 시에 비교하여 더 많은 양의 뇌염 항원에 대한 IgG 항체를 형성하였다(Table 2). Aluminium hydroxide를 adjuvant로 첨가한 Vi-TT+JEV 혼합 항원도 adjuvant를 첨가하지 않은 항원보다 상대적으로 더 많은 IgG를 형성하였다(Table 2). 일본뇌염의 경우 중화항체 시험에서도 ELISA 시험의 경우와 유사하게 JEV 단독에 비하여 JEV와 Vi-TT의 혼합 백신 제조 시료가 더 높은 중화항체 값을 나타내었으며 혼합 시료에 aluminium hydroxide를 첨가한 시료가 첨가하지 않은 시료에 비하여 더 높은 중화항체 값을 나타내는 경향을 보였다(Table 3). 비록 동물 실험 마우스의 숫자를 더 많이 하여 통계적으로 보다 정확한 자료를 얻을 수 있는 실험이 요구되지만 이러한 결과는 장티푸스 항원과 일본 뇌염 항원

을 동시에 함께 혼합 접종 투여할 때에도 서로 다른 항원 간에 나타날 수 있는 항원 masking effect가 없다는 것을 보여줌으로써 두 항원을 formulation하여 혼합 백신으로 개발할 수 있는 가능성을 보여 주었다. 더구나 IgG의 항체 형성량 측정치를 분석하면 두 항원은 서로 상대 항원의 항체 형성 능력을 향상시키는 synergic effect를 보여주어 혼합 백신 제조로 인하여 항원력이 증대되는 결과를 나타내었다. 또한 tetanus toxoid와 장티푸스 Vi항원의 conjugate 항원도 동물 실험에서 단독 투여시 보다 높은 항체 형성 능력을 나타내어 장티푸스의 소아용 백신 개발의 가능성을 보여 주는 기초 자료를 제공하였다.

Table 2. Immunoglobulin G level elicited in mice by JEV antigen

No.	Control	JEV	JEV+ViTT	AI (JEV+ViTT)
1	0.280	0.397	0.877	1.742
2	0.132	0.226	1.689	1.983
3	0.194	0.218	1.155	1.173
4	0.164	0.165	1.321	1.373
5	0.153	0.189	1.594	2.145
6	0.143	0.134	0.824	2.265
7	0.239	0.192	1.479	1.959
8	0.160	0.194	0.729	1.660
9	0.159	0.262	0.470	1.801
10	0.152	0.149	1.788	0.754
P	0.137	0.238	1.414	2.111

Control : Saline solution

Vi : *Salmonella typhi* capsular antigen

ViTT : Vi plus tetanus toxoid

JEV+ViTT : Japanese Encephalitis virus plus ViTT

AI (JEV+ViTT) : JEV+ ViTT plus Aluminium hydroxide gel as adjuvant

P : pooled sample

Table 3. Antibody titer of plaque reduction neutralization test for JEV (titers in log)

Test No.	JEV	JEV+ViTT	AI (JEV+ViTT)
1	1.772	2.32	3.168
2	1.668	2.14	2.84
Ave	1.72	2.23	3.004

JEV : Japanese Encephalitis virus

JEV+ViTT : Japanese Encephalitis virus plus ViTT

AI (JEV+ViTT) : JEV+ ViTT plus Aluminium hydroxide gel as adjuvant

Aluminium hydroxide와 같은 adjuvant를 사용하면 항체 형성 능력이 더욱 증대되는 결과를 보여주어 혼합 백신 개발시 adjuvant 사용이 본 혼합 백신 역가 증대를 위하여 사용될 수 있음을 보여주었다. 더욱 상세한 앞으로의 연구가 필요하지만 본 동물 실험의 결과로만 본다면 adjuvant를 사용하지 않고 formulation만 해도 높은 농도의 항체 형성을 할 수 있는 항원의 능력을 보여 주었으므로 adjuvant를 첨가하지 않는 혼합 백신을 사용하여 adjuvant 사용시 나타날 수 있는 부작용도 최소화시킬 수 있으리라 사료된다.

본 연구의 결과는 성분이 서로 다른 장티푸스 항원과 일본 뇌염 항원으로 구성된 혼합 백신 시료가 항체 형성능력을 증

대시키며 서로 작용을 방해하지 않는다는 결과와 formulation을 통한 혼합 백신만으로도 높은 항체 형성 능력을 나타냈다는 결과는 백신제조에 있어서 conjugation 과정에 따르는 공정 과정의 단순화 및 경비절감에 대한 가능성도 보여 주었다.

본 연구에서 제조된 장티푸스 항원과 일본 뇌염 항원의 formulation 혼합 백신의 항체 형성력 증진은 접종 스케줄이 유사한 두 백신의 혼합 백신을 산업적으로 생산할 수 있는 가능성에 대한 자료를 제시하여 백신 산업의 최근 경향인 다가혼합 백신 (multi-valent combined vaccine) 개발로 인한 백신 생산 비용 절감 및 경쟁력 상품화에 대한 기초 자료를 제공하였다.

요 약

장티푸스 헤파막 다당체와 일본 뇌염 바이러스로 구성되어있는 혼합백신을 제조하여 마우스에서 면역성을 측정하였다. 혼합 항원 백신은 단일 항원을 투여한 경우보다 장티푸스와 일본 뇌염에 대해서 더 높은 IgG 항체 형성을 나타내었다. Aluminium hydroxide를 adjuvant로 첨가한 경우에도 첨가하지 않은 대조군에 비하여 모두 IgG 항체 형성이 증가하는 것으로 나타났다. 일본뇌염의 경우 중화항체 값 측정 시험에서도 혼합 항원백신은 일본뇌염 단독 항원 시에 비교해서 더 많은 중화항체 값을 형성하는 결과를 나타내었다. 본 실험에서 장티푸스 헤파막 다당체와 일본뇌염 바이러스의 혼합백신은 서로 다른 성분의 항원 간에 나타날 수 있는 항체 형성에 대한 masking effect가 발생하지 않으며 오히려 synergic effect를 나타낸다는 사실을 보여주었다. 본 연구에서는 접종시기가 유사한 두 항원의 혼합 백신으로의 사용가능성을 높여주고 최근에 백신 산업에서 종류가 다른 여러 백신들을 혼합하여 다가백신을 제조 생산하는 추세에 산업화에 큰 기대효과를 제공할 수 있으리라 사료된다.

감 사

본 연구는 한국과학재단에서 2000년도에 지원한 산학협력 연구과제 연구비로 수행되었기에 깊은 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. Umenai, I. (1985), Current Japanese Encephalitis: Current Worldwide Status, *Bull. WHO* **63**, 625.
2. Ni, H. and A. D. T. Barrett (1995), Nucleotide and amino acid sequences of the structural protein genes of Japanese encephalitis virus from different geographical locations, *J. Gen. Virol.* **76**, 401-407.
3. Edelman, R. and Levine, M. M. (1986), Summary of an international workshop on typhoid fever, *Rev. Infect. Dis.* **8**, 329-349.
4. Calva, E., J. L. Puente, and J. J. Calva (1988), Research opportunities in typhoid fever, *Epidemiology and molecular biology, Bioassay* **9**, 173-177.
5. Plotkin, S. A. and N. Bouverest-Le Cam (1995), A new typhoid vaccine composed of the Vi capsular polysaccharide, *Arch. Intern. Med.* **155**, 2293-2299.

6. Keitel, W. A., N. L. Bond, J. M. Zahrdanik, T. A. Cramoton, and J. B. Robbins (1994), Clinical and serological responses following primary and booster immunization with *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine, *Vaccine* **12**, 195-199.
7. Black, S. B., H. R. Shinefield, B. Fireman, R. Hiatt, M. Polen, and E. Vittinghoff. (1991), Efficacy in infancy of oligosaccharide conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine in a United states population of 61,080 children, *Pediatr Infect. Dis. J.* **10**, 97-104.
8. Booy, R., S. Hodgson, L. Carpenter, R. T. M. White, M. P. Slack, J. A. MacFarlane, E. A. Haworth, M. Kiddle, S. Shribman, and J. S. Roberts (1994), Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine PRP-T, *Lancet* **344**, 362-366.
9. Chu, C. Y., B. Liu, D. Watson, S. C. Szu, D. Bryla, J. Shiloach, R. Schneerson, and J. Robbins (1992), Preparation, characterization and immunogenicity of conjugates composed of the O-specific polysaccharide of *Shigella dysenteriae* type I bound to tetanus toxoid, *Infect. Immun.* **59**, 445-4458.
10. Frantz, I. D. (1973), Growth requirement of the meningococcus, *J. Bacteriol.* **43**, 757-761.
11. Hestrin, S. (1949), The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application, *J. Biol. Chem.* **180**, 249-261.
12. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951), Protein measurement with the Follin-Phenol reagents, *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
13. Szu, S. C., A. L. Stone, J. D. Robbins, R. Schneerson, and J. Robbins (1987), Vi capsular polysaccharide-protein conjugates for prevention of typhoid fever, *J. Exp. Med.* **166**, 1510-1524.