

로타바이러스 감염성 설사에 대한 항-로타바이러스 난황항체의 치료 효과

중앙대학교 의과대학 소아과학교실, 미생물학교실*, (주)바이오인디스트†, (주)매일유업‡

임인석 · 이호석 · 김원용* · 최응상 · 정동혁† · 정후길‡ · 윤승섭‡ · 전호남‡

Therapeutic Effect of Anti-Rotavirus Chicken Egg Yolk Immunoglobulin(IgY) on Diarrhea by Infection of Rotavirus

In Seok Lim, M.D., Ho Seok Lee, M.D., Wonyong Kim, Ph.D.*

Eung Sang Choi, M.D., Dong Hyuk Jung, Ph.D.†

Hoo Kil Jung, Ph.D.‡, Sung Seob Yun, Ph.D.† and Ho Nam Chun, Ph.D.‡

Department of Pediatrics and Microbiology*, College of Medicine, Chung Ang University, Bioindist Co., Ltd., R&D Center†, Mael Dairy Industry Co., Ltd.‡, Seoul, Korea

Purpose : Rotavirus is an enteric pathogen that affects millions of children globally each year. But no specific therapy is available for the management of rotavirus diarrhea. Due to the clear need to define improved modality for treatment of rotavirus diarrhea, we evaluated the efficacy of anti-rotavirus IgY in the treatment of infants and children with gastroenteritis.

Methods : First, the amount of viral particle in the stools of thirteen patients(seven were given IgY, 6 placebo) infected by rotavirus were evaluated for 3 days with the quantitative RT-PCR method. Second, 36 children with known rotavirus infection identified by ELISA or semi-quantitative RT-PCR were evaluated. We gave 5 g anti-rotavirus egg yolk daily in two equally divided doses for 3 days to two groups(an 18 IgY group and an 18 placebo group), respectively after parenteral consent. Daily vomiting frequency, stool frequency, oral intake and urine output were monitored for 3 days, and electrolyte and blood chemistry were checked at the first and third days.

Results : First, in the placebo group, the amount of virus particles increased daily, but in the IgY group it decreased daily. Second, when IgY and placebos were given to children infected with rotavirus, diarrhea on the third day decreased significantly in the IgY group, compared with the placebo group.

Conclusion : Treatment with antirotavirus immunoglobulin from immunized chicken's egg resulted in a decrease in the amount of viral particles in stools and diarrhea frequency in children. These results suggest that anti-rotavirus IgY is effective in the treatment of rotavirus gastroenteritis. (Korean J Pediatr 2005;48:1354-1361)

Key Words : Immunoglobulin Y, Rotavirus, Diarrhea

서 론

로타바이러스(rotavirus)는 1973년에 Bishop 등에 의해서 장염을 앓고 있는 소아의 소장 용모 상피세포에서 처음 발견되었

다. 로타바이러스는 세계적으로 5세 이하 영유아 설사증의 1/3 이상을 차지하는 주요 원인체로서 연간 전 세계적으로 영유아 약 80만 명이 로타바이러스로 인하여 사망하는데, 이는 모든 설사로 인한 사망률의 25%, 5세 미만의 영유아 사망률의 6%에 해당하는 높은 수치이다^{1,2)}. 국내의 경우 로타바이러스 감염에 의한 사망률은 낮지만 급성 장염으로 종합병원에 입원하는 소아군의 70%에서 확인되는 가장 흔한 소아 설사의 원인체이다³⁾.

이 로타바이러스에 의한 급성위장관염의 치료는 탈수교정을 위한 경구 및 비경구 수액요법 외에는 특이한 치료법이 없는 상태로서 이를 예방하기 위한 방법으로서 로타바이러스 백신 개발

본 연구과제는 2001년도 (주)매일유업 연구비 지원에 의해 수행되었음.

접수 : 2005년 8월 4일, 승인 : 2005년 9월 15일

책임저자 : 임인석, 중앙대학교 의과대학 용산병원 소아과

Correspondence : In Seok Lim, M.D.

Tel : 02)748-9967 Fax : 02)795-4698

E-mail : inseok@cau.ac.kr

에 대한 연구가 전 세계적으로 활발히 수행되어 왔다. 그러나 각 혈청형에 따라서 서로 교차방어가 되지 않는 바이러스의 특성으로 인하여 백신을 만드는데 커다란 어려움이 있는 실정이다. 현재까지 개발된 경구용 약독화 생백신과 동물-사람 재조합 백신은 아직까지 다른 혈청형의 감염에 대하여 충분한 방어능을 보여주지 못하고 있다. 또 최근에 개발되어 사용된 예방백신도 장중첩증 등의 부작용으로 인하여 사용 허가가 취소되어 로타바이러스성 설사증은 전 세계적으로 커다란 문제점으로 대두되고 있다⁴⁻⁷⁾. 결국 로타바이러스 감염에 대한 새로운 치료법이 필요한 상태이다.

한편 최근에는 각종 호흡기 및 소화기와 관련하여 질병을 일으키는 세균 및 바이러스에 대응하기 위한 수동면역 방법이 임상적으로 응용되고 있으며, 사람이나 동물 유래의 항체를 경구 투여하여 감염을 예방하고 치료하는 방법이 점진적으로 시도되고 있다⁸⁾. 이러한 방법 중 난황을 이용한 방법이 있는데 조류의 면역항체가 난황으로 이행, 축적되어 새끼로 전달되는 것을 이용한 방법으로 세균, 바이러스, 단백질 등의 여러 가지 항원을 조류에 면역시켜 이에 대응하는 특이적인 항체를 난황으로 이행시켜 이것을 치료에 이용하는 것이다⁹⁾. 즉, 로타바이러스, 대장균, 살모넬라 등의 항원에 대해서 특이적으로 반응하는 난황 항체(IgY)를 실험동물에 투여했을 때 그에 상응하는 병원체를 중화시켜 이들 동물을 감염으로부터 예방하는데 효율적이라는 연구 결과가 여러 연구자에 의하여 보고되고 있는 것이다^{10, 11)}.

이에 본 연구에서는 현재까지 특이한 치료방법이 없는 로타바이러스에 감염된 소아에서 항-로타바이러스 난황항체를 투여하여 로타바이러스의 증식 억제 및 임상 증상에 대한 효과를 연구하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2001년 12월부터 2002년 9월까지 중앙대학교 용산병원 소아과에 급성 장관염으로 입원한 환자 중 ELISA 및 Semi-quantitative RT-PCR의 방법으로 로타바이러스 감염으로 진단된 36명을 대상으로 하였다.

2. 방법

1) 분변으로부터 로타바이러스 RNA 추출

환아들의 분변을 대상으로 SERODIRECT ROTA kit(Eiken, Tokyo, Japan)를 이용한 역 수동 적혈구 응집반응(reverse-passive hemagglutination test)으로 로타바이러스 항원의 존재

를 확인하였다. 분변은 DPC 처리 PBS(pH 7.4)로 10배 희석하여 상층액 200 μ L을 취한 다음, 500 μ L의 TRIZOL 용액(Gibco BRL, USA)을 가하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 50 μ L의 DPC water에 녹인 후 polyacrylamide gel electrophoresis로 확인하고 -70 $^{\circ}$ C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) VP6 cDNA 합성

로타바이러스의 공통항원인 VP6 단백을 조절하는 VP6 유전자를 대상으로 하는 반정량 PCR의 최적 조건을 확립하기 위하여 로타바이러스 RNA로부터 경시적으로 cDNA를 합성하고 cDNA 합성시간에 따른 PCR 증폭 산물의 차이를 조사하였다. 실험 방법으로는 3일 동안 채취한 한 환자의 시료로부터 추출한 바이러스 RNA 3 μ L에 7%의 dimethyl sulfoxide 1.4 μ L를 가하고 100 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 가열하여 변성시킨 다음, 얼음에 5분 동안 정치하고 20 pM의 sense 및 antisense primer 1 μ L, reverse transcriptase 0.5 μ L, RNase 0.5 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, 2.5 mM dNTP 1.6 μ L, DEPC H₂O 10 μ L를 가한 다음 42 $^{\circ}$ C에서 각각 5분, 10분, 20분 및 30분 동안 반응하여 cDNA를 합성하였다. 여기에 사용된 primer는 미국 NCBI Genbank에 수록된 Wa(G1)의 염기서열을 기초로 하여 Lazergene software (DNASTar, Madison, USA)를 이용하여 제작하였고 MWG-BIOTECH GmbH(Ebersberg, Germany)에 주문하여 합성하였다. 염기서열은 Table 1과 같다.

3) 정량 PCR 조건 확립

42 $^{\circ}$ C에서 각 5분, 10분, 20분 및 30분 동안 반응하여 합성한 위 시료의 VP6 cDNA 3 μ L에 20 pM의 VP6 sense 및 antisense primer, 2.5 mM dNTP 1 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, Taq polymerase(5 U/ μ L) 0.5 μ L 및 ddH₂O 11.5 μ L를 가하고 각 cDNA당 95 $^{\circ}$ C에서 2분 동안 1회, 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 48 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 동안의 반응을 각각 15, 20, 25 및 30 cycle 실시하였다. 증폭 산물은 1.5% SeaKem LE agarose gel(FMC, Rockland, MD, USA)에서 0.5 \times TAE buffer(40 mM tris-acetate, 2 mM EDTA, pH 8.0)에서 100 V로 1시간 전기영동하였다. 분자량 측정을 위한 size marker로는 Φ X174-Hae III (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였으며, gel은 ethidium bromide(1 mg/mL)로 염색한 다음 Gel Doc 2000 system(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 증폭된 cDNA의 면적을 측정하였다. 측정 결과 cDNA 합성시간에 따른 증폭량은 차이가 없었다. PCR 회수에 따른 증폭량을 조사한 결과 25회까지는 대수적으로 유전자가 증폭되었으나 30회에서는 25회와 동일하거나 오히려 감소하였다. 본 실험은 조건을 cDNA 합성 10분, PCR은 20 cycles로 결정하였다.

Table 1. Sequence of Primers Used to Full Length VP6 Gene Amplification

Primer	Sequence(5'-3')	Position
Sense	GGCTTTTAAACGAAGTCTTCGACATGG	1-27
Antisense	GGTCACATCCTCTCACTACATCATTC	1356-1331

4) 정량 PCR

로타바이러스 항원 양성인 13명의 환자의 각각 3일간의 분변 즉 39례의 분변을 PBS로 10배 희석하고 그 중 200 μ L로부터 추출한 RNA 용액 50 μ L 중 3 μ L를 취하여 정량 PCR을 실시하였다. 전반적인 과정은 Fig. 1과 같다.

5) 항로타바이러스 난황항체의 제작

우선 급성 장염 증세를 갖는 환자에서 분리한 로타바이러스 (G1, G2, G3, G4의 혈청형)를 배양한 후 불활성화시켜 만든 항원액에 보강제(adjuvant)를 사용하여 접종액을 만들었다. 양계용 백색 레그혼에 0.5 mL를 피하접종하고 2주 간격으로 2회, 4주 간격 1회 추가 접종하여 면역반응을 유도한 후 계란을 수거하여 난황액을 분리하고, 분리된 난황액을 Inlet 185도, Outlet 80도로 스프레이 드라이하여 항로타바이러스 난황항체 분말을 제조하였다.

6) 임상증상에 대한 효과 관찰

보호자에게 동의서를 받은 후, 18명의 항로타바이러스 난황항체 투여군에는 수액요법 외에 입원 3일간의 연식을 먹게 하면서 항로타바이러스 난황항체가 함유된 난황 2.5 g을 5 mL의 물에 부유하여 하루 2회(아침, 저녁) 3일 동안 투여하였고(총 6회, 총 투여량 15 g), 위약군 18명에게는 수액요법 외에 입원 3일간 그 외에는 같은 조건으로 하면서 항로타바이러스 난황항체가 함유되지 않은 난황을 같은 기간 동안 같은 양을 투여한 이후 양군에서 치료 전후의 발열기간, 설사 횟수, 구토 횟수, 전해질 및 혈청 생화학치, 입원기간, 경구 섭취량, 소변 횟수를 비교 관찰하였다.

3. 통계처리

통계분석은 SPSS 10.0 for Windows 프로그램을 이용하여 독립표본 T검정을 시행하였고 P값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의성을 두었다.

결 과

1. 대상 환자의 특징

항로타바이러스 투여군은 18명(남아 10명, 여아 8명)으로 평균연령은 23.1개월(6.5-39.7개월), 평균체중은 12.4 kg, 입원 전 발열기간은 평균 1.3일이었다. 위약군은 18명(남아 13명, 여아 5명)이었으며 평균연령은 29.1개월(10.1-48.1개월), 평균체중은 15.7 kg, 입원 전 발열기간은 평균 1.4일로 양군이 통계학적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다(Table 4). 입원 시 시행한 혈청학적 검사 상 blood urea nitrogen(BUN), creatinine(Cr), sodium(Na), potassium(K), chloride(Cl), total carbon dioxide (CO₂), aspartate transferase(AST), 그리고 alanine transferase(ALT)도 양 군간에 통계학적으로 의미 있는 차이는 보이지 않아(Table 5) 연구에 이용된 두 군은 임상적 혈청학적으로 서로 차이를 보이지 않았다.

2. 정량 PCR 결과

실험에 사용한 시료는 3일간의 분변을 모두 모은 13명의 환

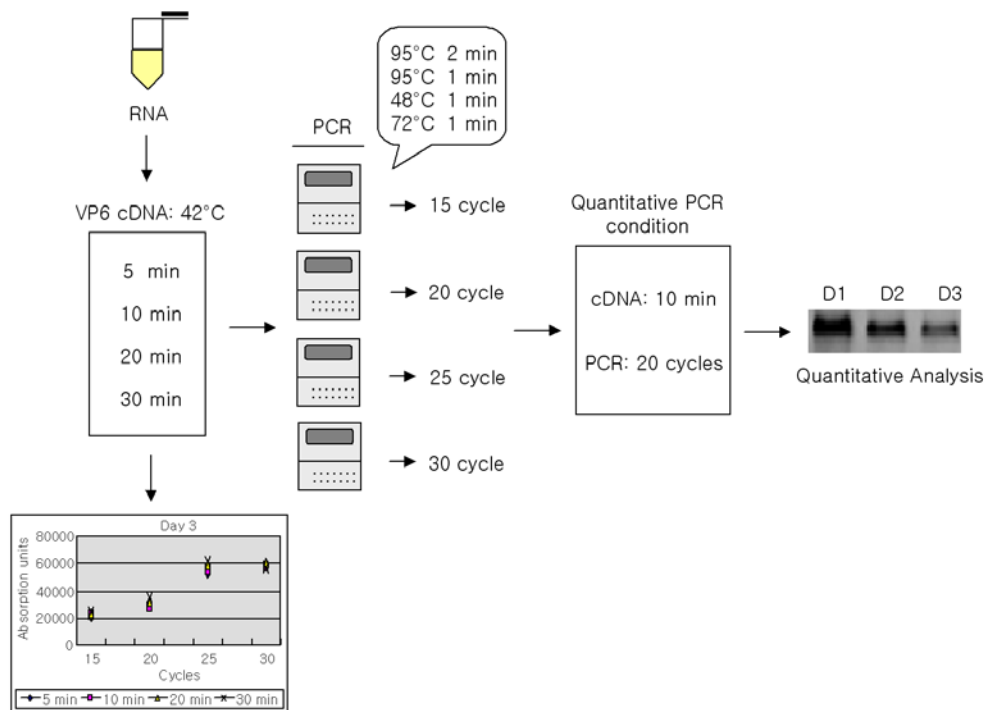


Fig. 1. General scheme of semi-quantitative PCR.

Table 2. The Amount of Rotavirus Obtained from Quantitative PCR

	Sample No.	Day 1(%)	Day 2(%)	Day 3(%)
IgY	1	100	97.1	65.3
	2	100	100.0	100.0
	3	100	68.1	57.5
	4	100	108.0	45.0
	5	100	87.0	108.9
	6	100	55.6	53.7
	7	100	100.0	100.0
Control	8	100	125.21	139.0
	9	100	107.18	110.82
	10	100	117.61	129.11
	11	100	119.87	128.27
	12	100	121.88	121.42
	13	100	101.55	113.58

Table 3. The Amount of Rotavirus Particles in IgY Group and Placebo Group

Group	Day 1(%)	Day 2(%)	Day 3(%)
IgY	100	88.0±19.2	75.8±26.3
Placebo	100	115.6±9.2	123.7±10.06
P-value		0.008	0.002

Table 4. Clinical Characteristics in IgY Group and Placebo Group

	IgY	Placebo	P-value
Sex(M:F)	18(10:8)	18(13:5)	0.298
Age(month)	23.1±16.6	29.1±19.0	0.159
Weight(kg)	12.4±7.0	15.7±8.7	0.211
Febrile term before admission (days)	1.3±1.5	1.4±1.5	0.823

Table 5. Blood Chemistry in IgY Group and Placebo Group

	IgY	Placebo	P-value
BUN(mg/dL)	10.4±4.3	9.3±4.9	0.478
Cr(mg/dL)	0.41±0.09	0.42±0.09	0.850
Na(mEq/L)	138.1±2.0	136.4±3.0	0.051
K(mEq/L)	4.2±0.4	4.2±0.6	0.821
Cl(mEq/L)	108.9±4.3	108.5±3.6	0.792
CO ₂ (μmol/L)	18.7±1.7	20.2±1.2	0.069
AST(I.U./L)	44.8±14.4	48.9±18.1	0.606
ALT(I.U./L)	27.8±11.0	31.6±25.1	0.560

아의 시료를 대상으로 결과를 분석하였다. 이중 7명은 항로타바이러스 난황항체를 투여한 군이었고 6명은 위약군이였다.

정량 PCR 결과 day 1을 100%로 하였을 때 day 2와 day 3의 변화 값은 Table 2와 같다. 즉 위약군은 2, 3일째에 걸쳐 바이러스 RNA의 양이 증가한데 비하여 IgY 투여군에서는 현격한 감소를 보였다(P=0.008, 0.002)(Table 2, 3, Fig. 2).

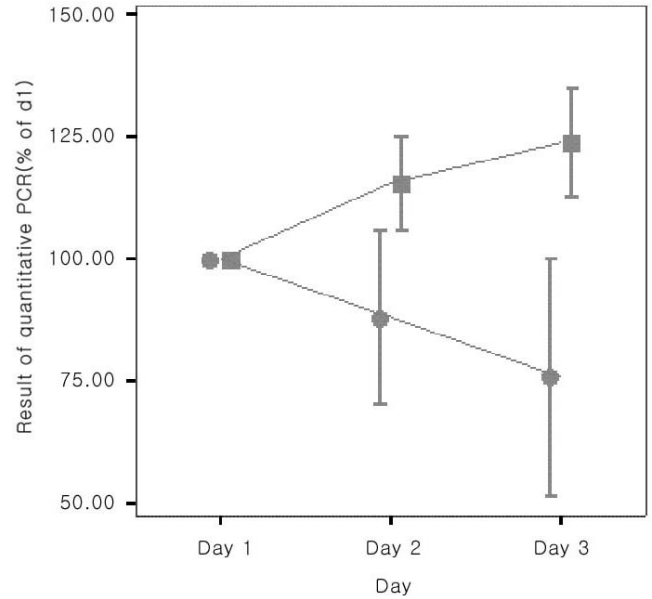


Fig. 2. The amount of rotavirus decreased significantly(●: IgY group, ■: placebo group).

Table 6. Change in Frequency of Vomiting(/day) in IgY Group and Placebo Group

	Day 1	Day 2	Day 3
IgY	3.1±3.4	0.1±0.5	0.1±0.3
Placebo	2.4±3.3	0.2±0.7	0.2±0.7

3. 항로타바이러스 난황항체 투여 후의 임상증상의 변화

1) 구토증상의 변화

2일째와 3일째의 구토증상의 감소 정도를 첫째 날과의 차이로 보았을 때 투여군에서 2일째에는 3.1±3.4회/일에서 0.1±0.5회/일로 2.9±3.5회/일의 감소를 보였고 3일째에는 3.1±3.4회/일에서 0.1±0.3회/일로 3.1±3.4회/일의 감소를 보였고 위약군에서는 각각 2.4±3.3회/일에서 0.2±0.7회/일로 2.2±3.5회/일 및 2.4±3.3회/일에서 0.2±0.7회/일로 2.4±3.6회/일의 감소를 보여 투여군과 위약군 사이의 통계학적 차이를 보이지는 않았다(Table 6).

2) 설사증상의 변화

2일째와 3일째의 설사증상의 감소 정도를 첫째 날과의 차이로 보았을 때 투여군에서 2일째에는 7.5±4.7회/일에서 3.8±5.0회/일로 3.7±4.0회/일의 감소를 보였고 3일째에는 7.5±4.7회/일에서 1.9±2.5회/일로 5.6±3.7회/일의 감소를 보였다. 이에 비해 위약군에서는 각각 5.5±2.9회/일에서 4.7±4.4회/일로 0.8±4.8회/일 및 5.5±2.9회/일에서 3.2±4.4회/일로 2.3±5.0회/일의 감소를 보여 3일째에 위약군에 비해 통계학적으로 의미 있는 감소를 보였다(P=0.030)(Table 7, Fig. 3).

Table 7. Change in Frequency of Diarrhea(/day) in IgY Group and Placebo Group

	Day 1	Day 2	Day 3
IgY	7.5±4.7	3.8±5.0	1.9±2.5
Placebo	5.5±2.9	4.7±4.4	3.2±4.4

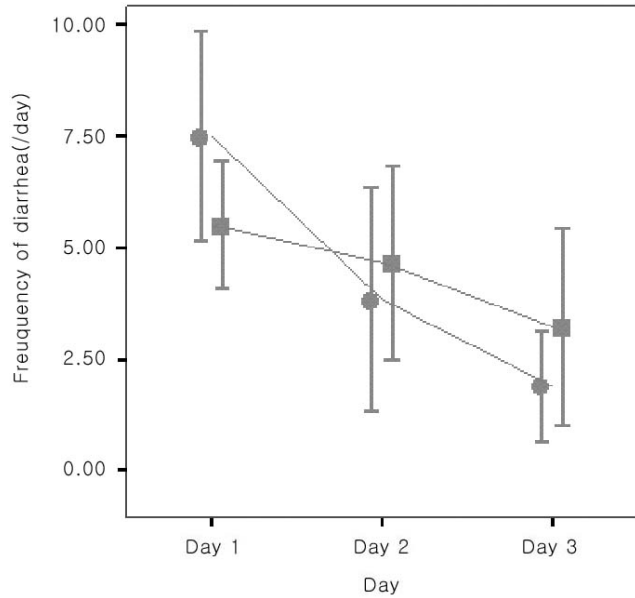


Fig. 3. Change in frequency of diarrhea(●:IgY group, ■: placebo group): The difference of decrease was statistically significant at day 3($P=0.030$).

3) 경구 섭취량의 변화

2일째와 3일째의 경구 섭취량의 증가 정도를 첫째 날과의 비율로 보았을 때 투여군에서 2일째에는 48.4±31.2 mL/kg/day의 증가를 보였고 3일째에는 56.5±32.8 mL/kg/day의 증가를 보였고 위약군에서는 각각 50.6±31.0 mL/kg/day 및 55.9±37.8 mL/kg/day의 증가를 보여 3일째에 경구 섭취량의 증가가 있었으나 통계학적 의미는 없었다(Table 8).

4) 소변 횟수의 변화(횟수/일)

2일째와 3일째의 소변 횟수의 증가 정도를 첫째 날과의 비율로 보았을 때 투여군에서 2일째에는 9.7±4.0/day에서 9.8±4.9/day로 1.1±0.6배의 증가를 보였고 3일째에는 9.7±4.0/day에서 9.0±2.3으로 1.0±0.4배의 증가를 보였으나 위약군에서도 각각 8.0±2.9/day에서 8.0±3.7/day로 1.0±0.6배 및 8.0±2.9/day에서 9.4±3.6/day로 1.2±0.4배의 증가를 보여 양 군간 통계학적 차이를 보이지 않았다(Table 9).

5) 입원기간 및 투여 후 발열기간의 차이

입원기간은 투여군과 위약군이 각각 5.3±1.9일과 4.8±2.2일로 양 군간 통계학적 차이는 없었으며 투여 후 발열기간도 각각 1.0±1.1일과 1.4±1.3일로 투여군에서 발열기간이 짧았으나 양 군간 통계학적 차이가 없었다.

Table 8. Change in Oral Intake(mL/kg/day) in IgY Group and Placebo Group

	Day 1	Day 2	Day 3
IgY	44.7±35.9	48.4±31.2	56.5±32.8
Placebo	41.2±30.1	50.6±31.0	55.9±37.8

Table 9. Change in Frequency of Urination(/day) in IgY Group and Placebo Group

	Day 1	Day 2	Day 3
IgY	9.7±4.0	9.8±4.9	9.0±2.3
Placebo	8.0±2.9	8.0±3.7	9.4±3.6

Table 10. Change in Blood Chemistry in IgY Group and Placebo Group

	IgY (increased rate%)	Placebo (increased rate%)	P-value
BUN(mg/dL)	3.7±1.9(29.9)	3.4±1.3(45.5)	0.686(0.237)
Cr(mg/dL)	0.40±0.12(103.8)	0.43±0.08(98.8)	0.540(0.799)
Na(mEq/L)	139.0±2.4(102.1)	138.2±3.4(102.2)	0.619(0.964)
K(mEq/L)	3.9±0.4(85.8)	4.0±0.3(101.6)	0.653(0.017)
Cl(mEq/L)	109.0±1.8(102.2)	107.8±1.9(100.4)	0.306(0.243)
CO ₂ (μmol/L)	24.0±1.3(128.7)	24.4±2.2(118.6)	0.744(0.297)
AST(I.U./L)	45.0±19.5(83.1)	58.5±59.1(97.9)	0.642(0.678)
ALT(I.U./L)	38.6±29.1(110.5)	39.5±59.1(78.2)	0.977(0.415)

6) 혈청학적 결과의 변화

투여군과 위약군 간의 첫째 날과 투여 3일째 사이의 혈청학적 검사의 차이는 potassium치만 투여군에서 의미 있게 감소하였으나(85.8% vs 101.6%, $P=0.017$) 정상 범위 내에서의 변화였으며 다른 검사치는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 10).

고 찰

로타바이러스는 생후 6개월-2세의 영유아에 주로 감염되어 설사와 구토를 동반하는 급성 장염을 일으킨다. 감염경로는 분변-구강경로로서 잠복기는 1-3일 정도이며 주요 증상으로는 열과 구토를 동반한 수양성 설사이다. 설사 증상은 로타바이러스가 소장 용모 끝의 세포를 파괴하여 이로 인한 소장 내 수분 흡수의 장애에 기인한다. 구토와 발열은 증상 2일 후에 호전되지만 설사는 흔히 5-7일 동안 지속되며, 로타바이러스는 보통 증상이 나타난 후 7-8일 동안 대변으로 배출된다. 감염기의 환자는 분변 1 mL 당 1×10¹²개의 바이러스 입자를 배출한다. 이러한 로타바이러스는 소아 환자의 약 50%에서는 증상을 전혀 보이지 않는 불현성 감염을 일으키며, 또한 비파막 이중나선 RNA 바이러스의 특성상 소독제, 열, 건조 등의 물리화학적 처리에 매우 강하기 때문에 소아병동이나 유아원 등에서 많이 발생한다. 계절

적으로는 우리나라와 같은 온대지역에서는 주로 11월에서 2월까지의 겨울철에 주로 발생한다고 보고되어 왔지만 현재는 기후 온난화의 영향으로 연중 발생하는 추세로 바뀌고 있다¹¹⁻¹³.

로타바이러스는 레오비리디(Reoviridae)과에 속하는 크기가 70 nm인 non-enveloped RNA 바이러스로서 두 가닥의 RNA 11개 절편과 피막 단백 3층으로 구성되어 있다. 바깥피막은 중화항원인 VP4와 VP7, 중간피막은 군 특이항원인 VP6로 이루어져 있다. 로타바이러스는 혈청학적인 방법에 의해서 중간피막인 VP6에 따라서 A-G의 7개 혈청 그룹으로 나누어진다¹⁴. A 및 B, C 그룹은 사람과 동물 모두에서 질병을 유발하지만 D 및 E, F, G 그룹은 단지 동물에서만 보고되었다. 세계적으로 가장 높은 분포를 보이는 그룹 A 로타바이러스는 다시 외피단백인 VP4와 VP7의 구성에 따라서 세분된다¹⁵. 이 두 가지 단백질은 서로 다른 유전자로부터 독립적으로 형성되는 VP7에 의한 G형(glycoprotein)과 VP4에 의해서 결정되는 P형(protease-cleaved protein)으로 중화 항체를 형성하여 바이러스의 중요한 면역원성에 관계한다^{16, 17}.

현재 로타바이러스의 검출 및 형 결정은 electropherotype, hybridization, monoclonal antibody(MoAb)를 이용한 ELISA, type-specific primer를 사용한 multiplex PCR 및 염기서열 분석 등이 이용된다¹⁸⁻²⁰. 현재까지 밝혀진 G혈청형은 14개로서 이 중 10개는 사람에서 분리되었고 G1-G4가 전 세계적으로 사람에서 설사증을 유발하는 것으로 알려져 있다. P혈청형은 1989년까지 아미노산 서열에 근거하여 최소 9개가 보고되어 있으며 Gorziglia 등²¹은 사람 로타바이러스에는 6개의 형이 존재한다고 보고하였다.

이러한 급성 로타바이러스성 설사증의 예방 및 치료에 대한 노력이 계속되고 있지만 현재까지 로타바이러스의 감염을 효과적으로 예방, 치료할 수 있는 확실한 방법이 명확히 제시된 바 없다. 최근에 초유, 난황, 녹차추출물, lactoferrin 등의 식품성분으로 로타바이러스의 감염을 방어하는 많은 연구 결과가 보고되어 있으며^{22, 23}, 프로바이오틱 유산균도 로타바이러스성 설사를 치료하는데 효과적인 것으로 밝혀졌고²⁴⁻²⁷, 면역결핍 환아나 영아에게 로타바이러스 항체가 포함된 면역글로불린을 경구 투여하면 감염을 방어하는데 효과가 있는 것으로 보고되었으며, Guarino 등²⁸은 사람의 장 상피세포인 Caco-2 세포에 로타바이러스를 감염시켜 면역글로불린의 억제 효과를 연구한 결과 면역글로불린이 Caco-2 세포에서 로타바이러스 감염에 대하여 억제 효과를 나타내는 것으로 보고하였으나 아직까지는 실제적으로 탈수방지를 위한 경구 또는 비경구 수액요법 외에는 특이한 치료법이 없는 상태이다.

이에 세계보건기구(WHO)는 로타바이러스 감염에 대한 보다 효율적인 백신 개발을 최우선 연구과제로 삼고 있다²⁹. 현재까지 전 세계적으로 로타바이러스 백신의 개발에 대한 연구가 활발히 수행되어 왔지만 한 혈청형의 바이러스에 감염되었다가 회복되더라도 다른 혈청형의 감염에 대한 완전한 방어능이 형성되지

않기 때문에 효과적인 백신 개발에 커다란 어려움이 있는 실정이다. 또 최근에 개발된 로타바이러스에 대한 예방백신도 장중첩증 등의 부작용으로 인하여 사용 허가가 취소되어 로타바이러스성 설사증은 전 세계적으로 커다란 문제점으로 대두되고 있다.

한편 최근에 각종 호흡기 및 소화기와 관련하여 질병을 일으키는 세균 및 바이러스에 대응하기 위한 수동면역 방법이 임상적으로 응용되고 있으며, 사람이나 동물 유래의 항체를 경구 투여하여 감염을 예방하고 치료하는 방법이 점진적으로 시도되고 있다¹². 이러한 감염에 대한 면역학적 예방 전략의 본질은 대부분이 세균이나 바이러스를 특이적인 항체로 중화시키는 것이다. 실제로 사람 유래의 IgG는 소아의 로타바이러스 감염을 효율적으로 예방하고 치료할 수 있는 것으로 알려져 있어³⁰ 소화기 감염에 대하여 수동면역을 사용하는 것이 유리하다는 주장이 강력하게 제기되고 있다.

포유동물과 달리 조류의 면역항체는 난황으로 이행, 축적되어 새끼로 전달된다. 이렇듯 산란계는 획득면역을 자손에 전달하기 위해서 혈중 항체를 난황에 농축하여 축적하게 되는데 이러한 현상은 난생동물인 조류가 가지고 있는 특이적인 모자 면역기능이다. 따라서 세균, 바이러스, 단백질 등의 여러 가지 항원을 조류에 면역을 시켜 이에 대응하는 특이적인 항체를 난황으로 이행시키는 연구가 다수 보고되었다^{11, 12}. 즉, 로타바이러스, 대장균, 살모넬라 등의 항원에 대해서 특이적으로 반응하는 난황 항체를 실험동물에 투여했을 때 그에 상응하는 병원체를 중화시켜 이들 동물을 감염으로부터 예방하는데 효율적이라는 연구 결과가 여러 연구자에 의하여 보고되었다^{13, 22}. 따라서 로타바이러스성 설사증을 예방하고 치료하는데 있어서 특이항체가 함유되어 있는 IgY를 응용하는 연구개발이 기대되고 있다.

본 연구에서도 유아 로타바이러스성 설사 증상에 대한 IgY 난황 항체의 치료 효과를 조사할 목적으로 영유아 환아를 대상으로 IgY 난황 항체를 투여하였다. 이후 분변으로 배출되는 바이러스 양의 변화를 조사하기 위하여 유전자에 대한 정량 PCR을 실시한 결과, 위약군은 로타바이러스 입자가 지속적으로 증가하는데 비하여 IgY 투여군은 감소를 나타냈다. 또 임상적으로도 투여 3일째에 설사증상이 위약군에 비하여 의미있게 감소하였다. 이는 본 연구에서 사용한 항-로타바이러스 IgY 난황 항체가 설사와 바이러스의 배출 억제에 효과가 있음을 시사하였다.

이러한 연구 결과는 로타바이러스성 설사증을 예방 및 치료하기 위하여 실험동물과 사람에서 수행한 다른 연구자들의 연구결과와 일치하는 것으로 나타났다. 즉 Ebina 등³¹은 백색 레그 혼 닭을 사람 로타바이러스인 Wa와 MO strain으로 피하 면역시켜 채란한 후 난황 IgY를 동결건조하여 사람 유래의 로타바이러스로 인공 감염시킨 쥐에 경구투여 했을 때, 항-로타바이러스 IgY가 로타바이러스 감염을 예방하였다고 보고하였으며 Yolken 등³²은 난백의 ovomucoid와 ovalbumin이 로타바이러스 감염을 저해한다고 보고하였다. 이렇게 계란으로부터 추출한 로타바이러스 특이 IgY가 경구 수동면역으로 로타바이러스 감염증

예방에 효과가 있는 것으로 확인되었다. Sarker 등³³⁾은 사람 유래의 로타바이러스로 면역시킨 닭의 계란에서 추출한 IgY를 사용하여 로타바이러스에 감염되어 설사증상을 보이는 어린 아이를 치료하였다. 즉, 로타바이러스 설사 어린이에게 매일 10 g의 IgY를 4일 동안 투여했을 때, 분변량의 현저한 감소, 경구용 수액제제의 섭취량 감소, 그리고 투여 후 4일에는 분변으로부터 로타바이러스가 완전히 제거되는 효과를 나타냈다. 난황 황체인 IgY 이외에 Ebina 등²⁶⁾은 탈지된 초유의 항-로타바이러스 항체를 경구 투여하여 유아의 로타바이러스성 장염을 예방할 수 있다고 보고하였다. 이러한 사실은 로타바이러스에 특이적인 항체인 IgY가 위 내의 효소에 의해서 활성이 소실되지 않고 소장에도 도달할 수 있으며 유아의 로타바이러스 감염이 항-로타바이러스 IgY의 경구투여에 의해서 예방된다는 것을 강력히 시사하고 있다.

전반적으로 효과적인 로타바이러스 예방약이 개발되어 있지 않은 현 시점에서 로타바이러스의 감염을 억제시킬 수 있는 방법 중의 하나로 식품 성분을 이용한 경구 투여방법은 효과적인 방법으로 사료된다. 경구 수동면역에는 감염증의 발병 시기에 미리 항체를 섭취하는 것이 필요하다. 이러한 점에서 식품 원료인 계란으로부터 다량 생산이 가능한 IgY를 경구 수동면역 소재로 이용하면 로타바이러스 설사증을 예방 치료하는데 매우 효과적인 것으로 생각된다. 이러한 이유로 향후 여러 가지 감염증의 수동면역에 IgY가 크게 이용될 것으로 전망되며 계란에서 추출 가공된 특수 면역단백질(specific IgY)은 식품 첨가물로서 조제 분유나 아이스크림 및 요구르트 등에 첨가하여 기능성이 획기적으로 강화된 신제품을 제조할 수 있을 것으로 생각된다.

이와 같이 닭의 난황을 이용한 항-로타바이러스 항체는 조제가 쉽고 상대적으로 싸고 안전하고 청결하여 한 마리의 닭이 한 해에 약 40 g의 면역글로불린을 만들 수 있기 때문에 대량생산과 비용 효율적인 장점이 있다는 장점이 있으므로 적절한 역가, 용량, 투여시기, 투여방법, 장관 내에서의 안전성의 확보 그리고 투여로 인한 부작용 등에 대한 연구가 이루어질 때 항-로타바이러스 난황항체가 로타바이러스 감염된 환아들에게 효과적인 치료제가 될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

목적: 로타바이러스는 세계적으로 5세 이하 영유아 설사증의 1/3 이상을 차지하는 주요 원인체이다. 이 로타바이러스에 의한 급성위장관염의 치료는 탈수교정을 위한 경구 및 비경구 수액요법 외엔 특이한 치료법이 없는 상태로서 로타바이러스 감염에 대한 새로운 치료법이 필요한 상태이다. 이에 본 연구에서는 로타바이러스에 대한 난황 황체를 투여하여 환아에서의 로타바이러스 억제 효과 및 임상증상의 치료효과를 조사하였다.

방법: 본 연구는 두 부분으로 나누어 첫째 로타바이러스 위장관염 환아의 분변에서 바이러스 입자 감소 정도를 보았으며

둘째 환아에게 난황황체를 환아에게 직접 투여하여 임상증상이 개선되는 지를 보았다. 첫째로, 2001년 12월부터 2002년 9월까지 중앙대학교 용산병원 소아과에 급성 장관염을 주요 증상으로 내원한 환아의 분변을 대상으로 역수동 적혈구 응집반응으로 로타바이러스 항원의 존재 유무를 조사하였고 이중 양성인 13명의 환아의 3일간에 각각 걸친 분변시료를 재료로 정량 PCR을 시행하여 바이러스 양의 감소를 측정하였다. 13명 중 7명에게는 난황항체가 투여되었고 6명에게는 위약이 투여되었다. 둘째로는 같은 기간 로타바이러스 감염으로 진단된 36명을 대상으로 하여 18명에는 항-로타바이러스 난황항체가 함유된 난황 2.5 g을 5 mL의 물에 부유하여 하루 2회(아침, 저녁) 3일 동안 투여하였고 위약군 18명에게는 난황항체가 함유되지 않은 난황을 같은 기간 동안 같은 양을 투여한 이후 양군에서 치료 전후의 발열기간, 설사 횟수, 구토 횟수, 전해질 및 혈청 생화학치, 입원기간, 경구 섭취량, 소변 횟수를 비교 관찰하였다.

결과: 첫 번째 실험에서, 정량 PCR을 이용하여 환아 분변에서 바이러스 입자의 감소를 측정된 결과 위약군에서는 지속적으로 증가를 보였으나 투여군에서는 지속적인 바이러스 입자의 감소를 보였다. 두 번째 실험에서는 환아의 임상증상 치료효과 면에서 투여군에서 위약군에 비해 3일째에 설사 증상의 개선을 보였다.

결론: 항로타바이러스 난황항체의 로타바이러스 감염에 대한 치료효과를 본 결과 환아의 분변에서 바이러스 입자량의 감소와 함께 설사 증상의 개선의 치료 효과를 보이기 때문에 항로타바이러스 난황항체는 로타바이러스 감염증의 치료제가 될 수 있을 것으로 생각된다.

References

- 1) Cook SM, Glass RI, Lebaron CW, Ho MS. Global seasonality of rotavirus infections. *Bulletin World Health Organ* 1990;68:171-7.
- 2) Glass RI, Kilgore PE, Holman RC, Jin S, Smith JC, Woods PA, et al. The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States: Surveillance and estimates of disease burden. *J Infect Dis* 1996;174:5-11.
- 3) Kim DS, Park BS, Jung DH, Ahn JM, Kim CJ, Kang SY. Prevalence and identification of rotaviruses in stool specimens of patients with acute diarrhea from several regions of Korea. *J Korean Pediatr Soc* 1999;42:501-9.
- 4) Anderson EL, Belshe KB, Bartram J, Crookshanks-Newman F, Chanock RM, Kapikian AZ. Evaluation of rhesus rotavirus vaccine(MMU18006) in infants and young children. *J Infect Dis* 1986;153:823-31.
- 5) Bernstein DI, Glass RI, Rodgers G, Davidson BL, Sack DA. Evaluation of rhesus rotavirus monovalent and tetravalent reassortant vaccines in US children. *AMA* 1995;273:191-6.
- 6) Rennels MB, Glass RI, Dennehy PH. Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines: report of the national multicenter trial. *Pediatrics* 1996;97:7-

- 13.
- 7) Vesikari T. Clinical trials of live oral rotavirus vaccine: the Finnish experience. *Vaccine* 1993;11:255-61.
 - 8) Blacklow NR, Greenberg HB. Viral gastroenteritis. *N Engl J Med* 1991;325:252-64.
 - 9) Kapikian AZ, Chanock RM. Rotaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. PA 1996:1657-708.
 - 10) Isolauri E, Kaila M. Lactic acid bacteria to cure or prevent infant diarrhea. In: *Lactic Acid Bacteria, Actes du colloque LACTIC* 1997;97:31-37.
 - 11) Patterson R, Younger JS, Weigle WO, Dixon FJ. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J Immunol* 1962;89:272-8
 - 12) Guarino A, Guandalini S, Albano F, Mascia A, de Ritis G, Rubino A. Enteral immunoglobulins for treatment of protracted rotaviral diarrhoea. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:612-4.
 - 13) Kapikian AZ, Flores J, Hoshino Y. Rotavirus: The major etio logic agent of severe infantile diarrhea may be controllable by a "Jennerian" approach to vaccination. *J Infect Dis* 1986;153:815-22.
 - 14) Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 1989;53:410-49.
 - 15) Desselberger U, McCrae MA. The rotavirus genome. *Curr Microbiol Immunol* 1994;185:31-66.
 - 16) Prasad BV, Wang GJ, Clerx JPM, Chiu W. Three dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol* 1988;199:269-75.
 - 17) Yeager M, Dryden KA, Olson NH, Greenberg HB, Baker TS. Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J Cell Biol* 1990;110:2133-44.
 - 18) Coulson B, Unicomb LE, Pitson GA, Bishop RF. Simple and specific enzyme immunoassay using monoclonal antibodies for serotyping human rotavirus. *J Clin Microbiol* 1987;25:509-15.
 - 19) Coulson BS. Typing of human rotavirus VP4 by an enzyme immunoassay using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1993;31:1-8.
 - 20) Leite JP, Alfieri AA, Woods P, Glass RI, Gentsch JR. Rotavirus G and P types circulation in Brazil: Characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch Virol* 1996;141:2365-74.
 - 21) Gorziglia M, Larralde G, Kapikian AZ, Chanock RM. Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4. *Proc Natl Sci USA* 1990;87:7155-9.
 - 22) Rabalais GP. Recent advances in the prevention and treatment of diarrhoeal diseases. *Curr Opin Infect Dis* 1996; 9:210-3.
 - 23) Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994;344:1046-9.
 - 24) Guarino A, Casola A, Bruzzese E, Saini M, Nitsch L, Rubino A. Human serum immunoglobulin counteracts rotaviral infection on Caco-2 cells. *Pediatr Res* 1996;40:881-7.
 - 25) Glass RI, Gentsch J, Smith J. Rotavirus vaccines: success by reassortment? *Science* 1994;265:1389-91.
 - 26) Ebina T, Sato A, Umezu K, Ishida N, Ohyama O, Oizumi O, et al. Prevention of rotavirus infection by oral administration of cow colostrum containing antihuman rotavirus antibody. *Med Microbiol Immunol* 1985;174:177-85.
 - 27) Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M, Yamamoto T, Ebina T. Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. *Biosci Biotech Biochem* 1993;57:1077-81.
 - 28) Isolauri E, Kaila M, Mykkanen H, Ling WH, Salminen S. Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. *Dig Dis Sci* 1994;39:2595-600.
 - 29) Bartz CR, Conklin RH, Tunstall CB, Steele JH. Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulin. *J Infect Dis* 1980;142:439-41.
 - 30) Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck RJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet* 1973;2:1281-3.
 - 31) Ebina T, Tsukada K, Umezu K, Nose M, Tsuda K, Hatta H, Kim M, Yamamoto T. Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin(IgY) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation(PSK). *Microbiol Immunol* 1990; 34:617-29.
 - 32) Yolken RH, Leister F, Wee SB, Miskuff R, Vonderfecht S. Antibodies to rotavirus in chickens' eggs: A potential source of antiviral immunoglobulins suitable for human consumption. *Pediatrics* 1988;81:291-5.
 - 33) Sarker SA, Casswall TH, Juneja LR, Hoq E, Hossain I, Fuchs GJ, et al. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;32:19-25.