

Urabe AM-9 볼거리 백신주의 Hemagglutinin-Neuraminidase 유전자 염기서열 분석

이주연 · 김지희* · 이진수 · 박지호 · 손영모[†]

국립보건원 호흡기바이러스과*, 연세대학교 의과대학 영동세브란스병원 소아과[†]

= Abstract =

Nucleotide Sequence Analysis of the Hemagglutinin-Neuraminidase Gene of Urabe AM-9 Strain

Joo Yeon Lee, Jee Hee Kim, M.D.*, Jin Soo Lee, M.D.
Ji Ho Park, M.D. and Young Mo Sohn, M.D.[†]

Division of Respiratory Viruses, Department of Viral Diseases, National Institute of Health,
Department of Pediatrics[†], Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea*

Purpose : Urabe AM-9 strain was known to be associated with increased aseptic meningitis. The reason for high incidence of vaccine-associated meningitis was known that nucleotide(nt) substituted from G to A at position 1081 of the hemagglutinin-neuraminidase(HN) gene and therefore, glutamic acid changed to lysine at amino acid 335. We assessed by comparing nt sequence of the HN gene from Urabe AM-9 strain with wild strain and documented the correlation between nt substitution and vaccine-associated meningitis.

Methods : Two lots of Urabe AM-9 vaccine distributed in Korea and mumps wild strains isolated from 1998 through 1999 were analysed. Analysis was made by nt sequencing following amplification of HN gene by RT-PCR.

Results : Nucleotide substitution at position 343, 1476, 1570 was not found in both Urabe AM-9 vaccines and wild strains. But analysis of vaccine strains and wild strains isolated from patients revealed substitution from G to A at nt 1081 of the HN gene. Therefore, it encodes lysine instead of glutamic acid at amino acid 335. There was no mixture form of G and A at nt 1081. Nt at 1470 of one lot of Urabe AM-9 vaccines changed from C to A after Vero cell passage. Nt at 1727 of vaccines and wild strains was substituted A to G, so it encodes glycine instead of aspartic acid.

Conclusion : Nucleotide analysis of HN gene revealed that nt 1081 of Urabe AM-9 vaccines and wild strains had wild type AAA(Lys³³⁵) instead of variant type GAA(Glu³³⁵). The results of this study suggest that there was a probability of vaccine-associated meningitis due to Urabe AM-9 in Korea before. But incidence of actual side effect was not evaluated

* 본 연구는 1998년 보건복지부 국민건강증진사업 연구비로 이루어졌음.

책임저자 : 손영모, 연세대학교 의과대학 소아과학교실

Tel : (02)3497-3354 Fax : (02)3461-9473 E-mail : youngmo@yumc.yonsei.ac.kr

because there was no reporting system in Korea.

Key Words : Mumps, Urabe AM-9, aseptic meningitis, RT-PCR, nucleotide sequence

서 론

유행성 이하선염은 제 2종 법정 전염병이며 소아 정기 예방접종이 필요한 질환으로 치명률은 높지 않으나 무균성 뇌막염이나 고환염 등의 후유증이 문제가 될 수 있다. MMR 백신을 보편적으로 사용하기 이전 볼거리의 유행은 주기적으로 큰 유행을 일으켜 인구 100,000명당 수 백명이 발생하였을 것으로 추측된다. 1980년대 후반 MMR 백신이 널리 상용화되면서부터 발생이 5/100,000 이하로 감소하였지만 최근 5년간 매년 지역적으로 간헐적인 유행이 계속되는 상황이며¹⁾ 특히 학동기 연령층에서 10/100,000명 이상의 환자가 발생하는 것으로 추측하고 있다.

국내에서는 1983년 일본에서 개발한 Kitasato MMR 백신(녹십자 MuMeRu Vax: 홍역 AIK-C주, 볼거리 Hoshino주, 풍진 Takahashi주)과 Biken MMR 백신(한국백신 Tricovax: 홍역 Tanabe주, CAM-70주, 볼거리 Urabe AM-9주, 풍진 Matsuura주)이 수입되면서 본격적인 MMR 혼합 백신의 접종이 시작되었다. 지난 10여년 이상 국내에서 대부분 일본산 MMR 백신을 접종하여 왔으나 이 백신의 면역원성이나 안전성에 대한 국내 임상자료는 매우 부족한 실정이다.

일본의 경우 1989년 일본산 MMR백신(統一株: 홍역 AIK-C주, 볼거리 Urabe AM-9주, 풍진 TO-336주)이 일본 전역에서 사용된 후 백신 접종자 중 발열과 구토를 동반한 무균성 뇌막염 환자가 발생하면서, Urabe AM-9주를 포함하여 일본에서 개발된 MMR 백신에 의한 무균성 뇌막염 발생 실태가 알려지기 시작하였고 1991년 6월 일본 후생성은 자국산 MMR 백신을 접종하는 경우 부작용(무균성 뇌막염)이 발생할 수 있다는 경고와 함께 보호자가 원하는 경우에만 MMR 백신을 접종할 것을 지시하였다. 이후 1991년 10월 일본 후생성은 Urabe AM-9주가 혼합된 統一株 MMR 백신의 접종을 금지하

고 Urabe AM-9주가 배제된 自社株 MMR 백신으로 대체 접종을 시작하였으나 自社株 역시 무균성 뇌막염의 빈도가 100,000당 49~100명으로 매우 높아 1993년 4월 결국 自國産 MMR 백신의 사용을 4년만에 중지하기로 공중보건심의위원회를 통하여 결정하였다.

외국에서도 Urabe AM-9주가 포함된 MMR 백신을 접종한 후 무균성 뇌막염 발생 빈도가 높아지자 과거 Urabe AM-9주를 사용하던 영국, 캐나다²⁾, 오스트레일리아, 아일랜드, 룩셈부르크, 프랑스 등에서도 자체 조사를 통해 Urabe AM-9주를 더 이상 사용하지 않고 있다.

국내에서의 일본산 MMR 백신 접종 후 무균성 뇌막염 발생에 대한 조사 자료는 없으며 1984년 이 등은 머미루 백신 접종 후 임상 양상에 대한 수십례의 임상 반응 및 부작용에 대한 보고를 최신 의학 27권, 1984에 발표한 바 있으나 그 내용이 학술적 자료로는 매우 빈약하였다. 이러한 상황에서 1994년 4월 일본 후생성이 自國産 MMR 혼합 백신의 사용을 중지시킨 바, 국내에서도 일본산 MMR 백신의 계속 사용 여부에 대하여 논의가 있었으나 당시 보건 당국은 기존 일본산 MMR 백신을 확보하고 있는 백신 생산 회사들이 일본산 MMR 백신 사용을 중지할 경우 대체 백신의 공급이 당장 어렵다는 주장과 국내에서의 MMR 백신 접종 후 무균성 뇌막염에 대한 정확한 발생 빈도와 실태가 파악되지 못하고 있다는 이유로 당분간 계속 사용하기로 결정한 바 있다.

1996년 Brown 등³⁾은 Urabe AM-9주 접종자에서 무균성 뇌막염의 발생 빈도가 높은 이유는 백신주 Urabe AM-9주 바이러스의 hemagglutinin-neuraminidase(HN) 유전자의 열려진 해독틀(Open Reading Frame)의 1081번 위치의 염기인 G가 A로 치환되어 결국 335번째 아미노산 Glutamic acid/GAA가 Lysine/AAA으로 바뀌는 경우 신경친화 독력이 회복되어 무균성 뇌막염을 일으킬 수 있다고 주장하였다. 즉, 볼거리 뇌막염 환자에서 분리된 야생

주와 약독화 이전의 야생주 Urabe AM-9주가 모두 Lysine/AAA form인 것이 확인되어 안전성을 확보하기 위해서는 Glutamic acid/GAA form의 백신주로 균일하게 생산되어야 한다고 발표한 바 있다.

이러한 연구 결과를 토대로 볼 때 Urabe AM-9 주를 포함하여 일본산 MMR 백신주를 사용하고 있는 국내 상황하에서 MMR 백신의 안전성 여부(무균성 뇌막염 발생 여부)를 조사하기 위하여 1998년도에 발생한 무균성 뇌막염 후향적 역학 조사 결과와 1999년도 MMR 백신 접종 후 부작용 발생 여부에 대한 전향적 조사를 함에 있어서 국내에서 공급되는 Urabe AM-9주의 HN 유전자의 염기서열 분석으로 무균성 뇌막염을 일으킬 수 있는 AAA form 여부를 확인하여 무균성 뇌막염이 일어날 생물학적 가능성을 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포주와 바이러스주

세포주로는 Vero 세포를 5% fetal bovine serum이 첨가된 EMEM(Eagle's Minimum Essential Medium, Gibco BRL, NY, USA)에서 증식시켜 사용하였으며 백신주로는 Urabe AM-9주가 포함되어 있는 2종류의 혼합 MMR 백신(한국백신 Tri-Kovax, 제조번호 TR9811-3, TR9811-4와 보령제약 MMR 백신)을 이용하였다. 그리고, 1998년 12월 울산과 대구지역, 1999년 7월 서울지역의 불거리 환자로 부터 분리한 바이러스(wild strain; 981098, 981134, 991171)를 이용하였다.

2. RNA 추출

백신주는 세포배양에 따라 나타날 수 있는 염기변화를 배제하기 위해 백신 vial을 증류수에 재구성시킨 상층액으로부터 직접 Viral RNA Kit(Qiagen, Chatsworth, CA, USA)를 사용하여 RNA를 분리하였다.

분리주의 경우 Vero 세포에 접종한 후 세포병변 효과가 확인된 배양액을 원심분리하여(10,000rpm, 5분, 4℃) 얻은 침전물에서 RNeasy total RNA Kit(Qiagen, Chatsworth, CA, USA)를 이용하여 사용방

법에 따라 RNA를 분리하였다.

3. 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)

cDNA 합성을 위해 10 μ L viral RNA extract에 4 μ L enzyme reaction buffer, 2 μ L dNTP(10mM), 1 μ L specific primer(10pmole), 0.5 μ L RNase inhibitor (40U/ μ L, Promega, Madison, USA), 0.5 μ L M-MLV reverse transcriptase(200U/ μ L, Promega, Madison, USA)를 넣어 최종 부피가 20 μ L가 되도록 조정한 후 37℃ 10분, 42℃ 50분, 94℃ 5분으로 반응시켜 -20℃에 보관하면서 사용하였다^{10, 11)}.

SH 유전자와 L 유전자간의 1차 중합효소연쇄반응을 수행하기 위해 5 μ L cDNA를 이용하여 0.5 μ L Taq DNA polymerase(5U/ μ L, Omega biotech, USA), 5 μ L 10x enzyme reaction buffer, 2 μ L dNTP(10 mM), 양방향의 specific primer(10pmole) 각각 2.5 μ L를 사용하여 최종 50 μ L가 되도록 반응 용액을 만든 후 94℃ 5분간 pre-denaturation 시키고 94℃ 1분, 37℃ 1분, 72℃ 3분을 10회, 94℃ 1분, 42℃ 1분, 72℃ 3분을 25회 반응시키고 72℃ 10분간 1회 실시하였다.

이를 주형으로 하여 nested PCR을 수행하기 위해 HN 유전자에 상보적으로 제조된 primer를 이용하여 94℃ 5분간 pre-denaturation 시키고 94℃ 50초, 50℃ 50초, 72℃ 1분 30초를 25회 반응시키고 72℃ 10분간 1회 실시한 후 전기 영동을 통해 증폭 산물을 확인하였다.

본 연구에서 사용한 primer 및 위치는 다음과 같다(Fig. 1).

1) 1차 중합효소 연쇄 반응

forward nt 6427-6450(SH160-184)

5' GATCAATCACTCTAGAAAGATCGC 3'

reverse nt 8552-8572(L 124-144)

5' TGCTAGTGGGCCCAAGTCATC 3'

2) nested PCR

forward

HN nt 273-295

5' CAATCAGTTGTCTTCAATTGCAG 3'

HN nt 165-186

5' CCGAACCTGCTTCCGAATATTG 3'

HN nt 650-676
 5' GGTGCTACACATAATGTAATTAATG 3'
 HN nt 888-908
 5' GTCCAGCCACCTACCCAGAA 3'
 HN nt 1039-1058
 5' CCTGCATATGGGGGTGTCTT 3'
 HN nt 1393-1413
 5' TTTACAAACTCTGGTCAATCA 3'
 reverse
 HN nt 359-378
 5' TAAGGATACCGTTACTCCGT 3'
 HN nt 722-742
 5' ACGCGTCTGAACGAGTATCC 3'
 HN nt 1128-1144
 5' TCTTGTGTGGTCTCTGA 3'
 HN nt 1503-1522
 5' CAAGATAAACCCCTGACACA 3'
 L nt 5-24
 5' CATTTAGGCCCGCCATTCTG 3'

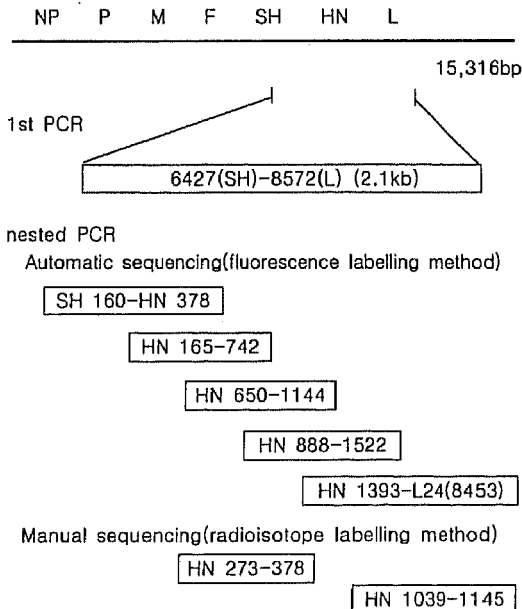


Fig. 1. Location of RT-PCR products of mumps virus genome.

4. Sequencing

RT-PCR로 얻어진 산물을 QIAquick PCR purification kit(Qiagen, Chatsworth, CA, USA)를 이용하여 정제한 후 이를 주형으로 하여 형광표지법(fluorescence labelling)과 일부 염기에 대해서는 방사성 동위원소표지법(radioisotope labelling)을 병행하여 염기서열 분석을 실시하였다.

형광표지법은 3.5 μ L PRISM TM Ready Dye Termination Cycle Sequencing kit with Ampli-Taq DNA polymerase, FS(Perkin Elmer, Foster city, CA, USA), 3.5pmole primer, 60~300 μ g template를 사용하여 증류수로 최종 부피 10 μ L를 맞춘 후 96 $^{\circ}$ C 10초, 50 $^{\circ}$ C 10초, 60 $^{\circ}$ C 4분간 25회 반응시켰다. 반응된 산물은 ethanol precipitation 방법을 이용하여 정제한 후 ABI Prism 310 Genetic Analyzer(Perkin-Elmer, USA)로 염기서열 결과를 판독하였다.

방사성동위원소표지법은 PCR-directed sequencing kit(USB 70170, Amersham Pharmacia, USA)와 α -³²S-dATP를 사용 방법에 따라 실시하였다. 방사성 동위원소로 표지된 DNA를 8% urea-polyacrylamide gel상에서 전기영동한 후 vacuum gel dryer (Hoefer Scientific Instrument, San Francisco, USA)로 건조시켰다. 이후 -70 $^{\circ}$ C에서 3일간 X선 필름에 노출시켜 염기서열을 분석하였다.

5. 염기 및 deduced 아미노산 서열 분석

증폭된 PCR 산물의 염기서열 및 추정되는 아미노산 서열 비교를 위해 Lasergene program(DNASTar, Madison, WI)을 이용하여 유전자 은행에 등록된 Urabe AM-9 백신주의 HN 유전자 서열과 비교 분석하였다.

결 과

1. 볼거리 바이러스 HN 유전자의 염기 서열과 추정되는 아미노산의 서열 분석

Urabe AM-9 볼거리 백신주에 의한 유행성 이하선염이나 무균성 뇌막염 발생 가능성 여부를 조사하기 위하여 국내에서 사용되고 있는 Urabe AM-9

백신주와 국내 볼거리 바이러스 분리주의 주요 표면항원인 hemagglutinin-neuraminidase(HN) 유전자에 대한 염기 및 아미노산 서열을 분석하였다. 백신주는 Urabe AM-9주를 사용한 Hankuk MMR 백신주(TR9811-3, TR9811-4)와 Boryong MMR 백신주(BR/MMR)를 이용하였으며 분리주는 1998~1999년 국내 볼거리 감염 환자로부터 분리된 것을 이용하였다.

HN 유전자중 169~1887번 위치에 해당하는 1,718개의 염기를 형광표지법으로 sequencing하였고 특히 Afzal 등⁹⁾에 의해 변이가 보고된 부위 중 343, 1081번 위치 염기에 대해서는 방사성동위원소 표지법으로도 확인하였다(Fig. 2, 3).

백신주 HK/TR9811-3, HK/TR9811-4, BR/MMR과 야생분리주 981098, 981134, 991171은 모두 HN 유전자 343, 1476, 1570번 위치의 염기가 A, T, A로

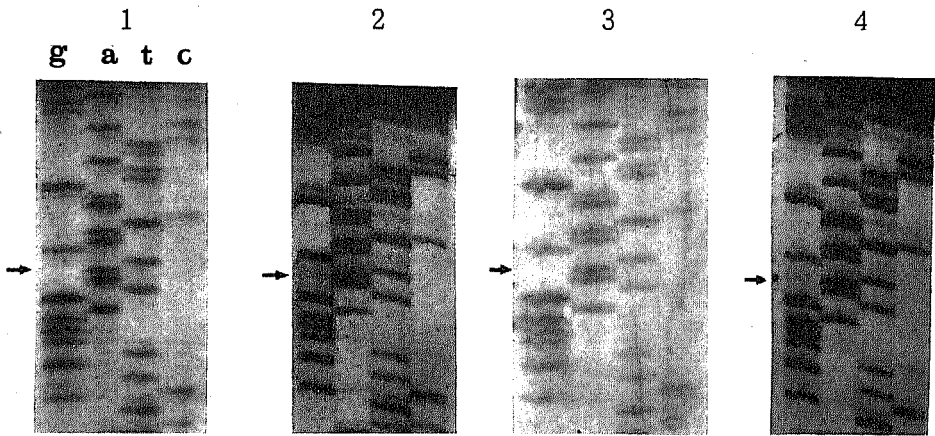


Fig. 2. Direct sequence analyses of HN gene including nt 343 of Urabe AM-9 vaccine strains and isolates. 1: Vaccine(Hankuk TR9811-4), 2: Vaccine(Hankuk TR9811-4, vero passage No. 3), 3: Vaccine(Boryong), 4: Isolate(991171).

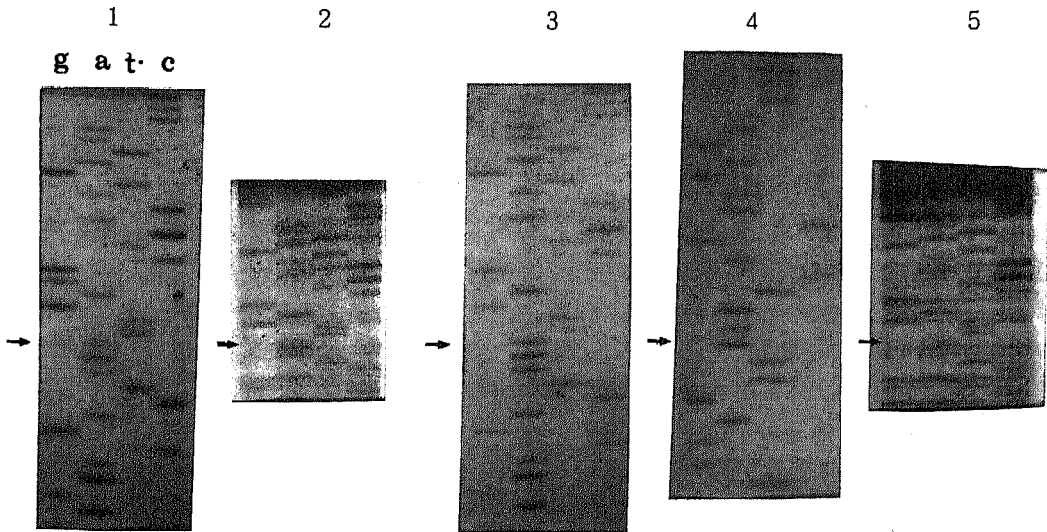


Fig. 3. Direct sequence analyses of HN gene including nt 1081 of Urabe AM-9 vaccine strains and iso 1: Vaccine(Hankuk TR9811-4), 2: Vaccine(Hankuk TR9811-4, vero passage No. 3), 3: Vac (Boryong), 4, 5: Isolate(981098, 991171).

서 변이가 관찰되지 않았고 아미노산도 각각 Met, Ser, Asn으로 변이가 없었다(Table 1, Fig. 4, 6, 7).

그러나 1081번 위치의 염기는 본 실험에 사용된 백신주 HK/TR9811-3, HK/TR9811-4, HK/TR9811-4-P3(vero세포에서 3회 계대배양), Boryong주와 야생 분리주인 981098, 981134, 991171에서 모두 wild type인 Lysine/AAA form으로 나타났다(Fig. 3, 5).

한편 백신주의 1081번 위치 염기에서의 A form과 G form 바이러스 혼합 여부를 확인하기 위하여

백신주(HK/TR9811-4)를 Vero 세포에서 3회 계대 배양시킨 HK/TR9811-4(P3)의 염기서열 분석 결과 형광표지법에서는 A form과 G form이 동일하게 최고치를 보였으나 방사성동위원소를 사용했을 때에는 A form만이 나타나 HK/TR 9811-4(P3)주에서의 A-G 혼합 양상은 관찰하지 못했다.

또한, HN 유전자 1470번 위치 염기의 경우 Afzal 등⁹⁾의 보고에 의하면 백신주에서 C와 A form이 혼합되어 있는 것으로 나타났는데 백신주

Table 1. Nucleotide and Amino Acid Sequences in the HN Genes of Urabe AM-9 Strain Vaccines and Wild Strains in Korea

Source	Passage No.	Nucleotide/Amino acid					
		343/89	1081/335	1470/464	1476/466	1570/498	1727/550
Urabe AM-9							
Wild type*	—	A/Met	A/Lys	C/Asn	T/Ser	A/Asn	G/Gly
Vaccine type*	—	A/Met	G/Glu	C/Asn	T/Ser	A/Asn	A/Asp
Korean Vaccine							
TR9811-3	0	A/Met	A/Lys	C/Asn	T/Ser	A/Asn	G/Gly
TR9811-4	0	A/Met	A/Lys	C/Asn	T/Ser	A/Asn	G/Gly
TR9811-4(P-3)	3	A/Met	A/Lys	A/Lys	T/Ser	A/Asn	G/Gly
Korean Isolates							
981098	2	A/Met	A/Lys	C/Asn	T/Ser	A/Asn	G/Gly
981134	2	A/Met	A/Lys	C/Asn	T/Ser	A/Asn	G/Gly
991171	2	A/Met	A/Lys	C/Asn	T/Ser	A/Asn	G/Gly

* Sequences of wild type and Vaccine type were extracted from gene bank accession, No. AB000388 and X9318, respectively.

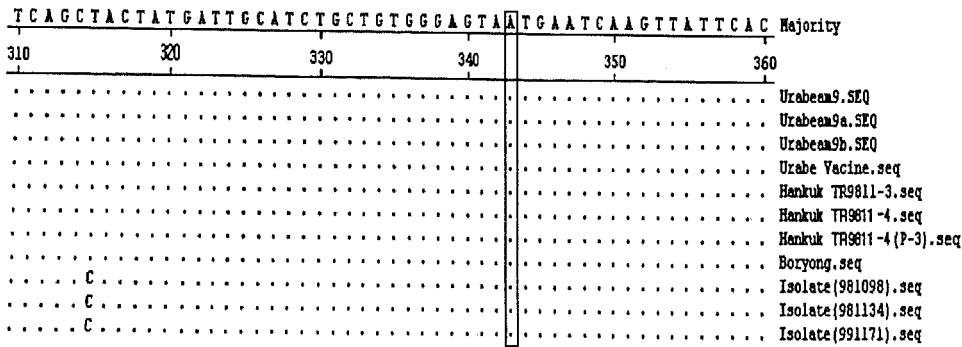


Fig. 4. Sequence analyses of Urabe AM-9 vaccine strains and isolates of HN gene nucleotide 343 region. Sequences of wild type(Urabe AM-9, Urabe AM-9a, Urabe AM-9b) and Vaccine (Urabe AM-9 vaccine) were extracted from gene bank accession No. AB000388, AB000386, AB000387 and X9318, respectively. Hankuk TR9811-4, Hankuk TR9811-4(vero passage 3), Hankuk TR9811-3, Boryong were used vaccine in this experiment.

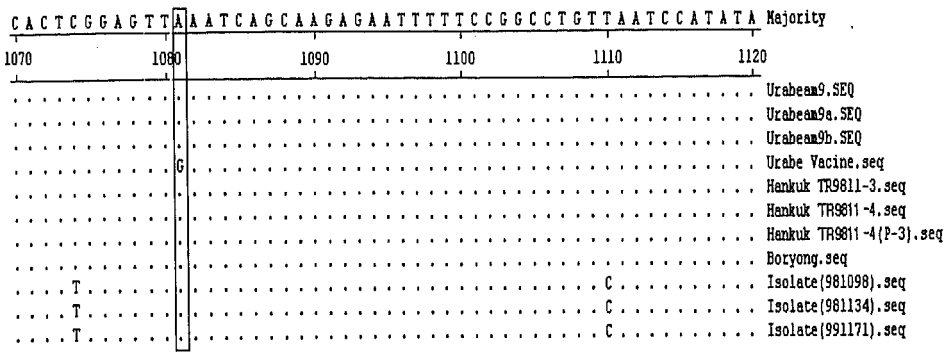


Fig. 5. Sequence analyses of Urabe AM-9 vaccine strains and isolates of HN gene nucleotide 1081 region. Sequences of wild type(Urabe AM-9, Urabe AM-9a, Urabe AM-9b) and Vaccine (Urabe AM-9 vaccine) were extracted from gene bank accession No. AB000388, AB000386, AB000387 and X9318, respectively. Hankuk TR9811-4, Hankuk TR9811-4(vero passage 3), Hankuk TR9811-3, Boryong were used vaccine in this experiment.

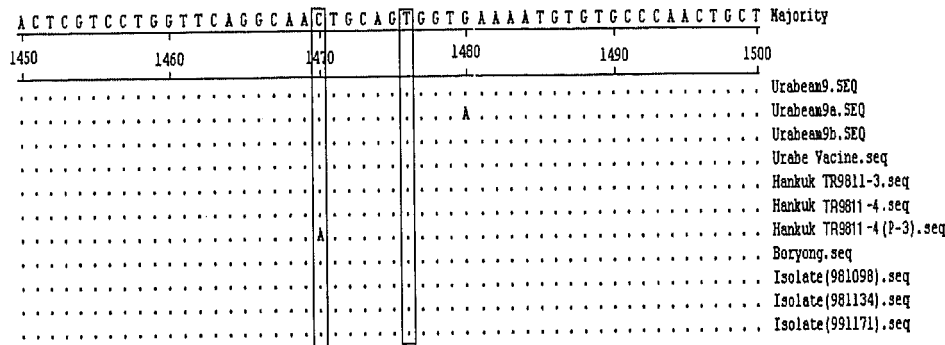


Fig. 6. Sequence analyses of Urabe AM-9 vaccine strains and isolates of HN gene nucleotide 1470, 1476 region. Sequences of wild type(Urabe AM-9, Urabe AM-9a, Urabe AM-9b) and Vaccine(Urabe AM-9 vaccine) were extracted from gene bank accession No. AB000388, AB000386, AB000387 and X9318, respectively. Hankuk TR9811-4, Hankuk TR9811-4(vero passage 3), Hankuk TR9811-3, Boryong were used vaccine in this experiment.

(HK/TR9811-3, HK/TR9811-4)와 분리주의 경우 C로 나타났으나 HK/TR9811-4주를 Vero세포에서 3회 계대 배양시킨 HK/TR9811-4(P3)주는 A로 나타났다(Fig. 6).

HN 유전자 1727번 위치 염기는 Urabe AM-9 백신주의 경우 A로 보고되어 있으나 본 실험에서의 백신주와 분리주는 모두 G로 나타나 아미노산이 GAT인 aspartic acid가 아닌 GGT인 glycine으로 나타났다(Fig. 8).

전체적으로 HN 유전자중 169~1887번 위치에 해당하는 1,718개의 염기서열 분석 결과, 국내에서

Urabe AM-9 백신주를 사용하고 있는 일부 백신(Hankuk TR9811-3, Hankuk TR9811-4, Boryong)의 경우 1081, 1470, 1727번 위치 염기에서 기존에 알려진 백신주 Urabe AM-9주와는 다른 염기를 포함하고 있는 것으로 확인되었다. 한편, 국내 환자로부터 분리된 야생주의 경우 위에서 언급한 위치 이외에 다른 위치에서의 많은 염기 변이로 인해 Urabe AM-9 백신주와 비교시 2.0~2.2%의 차이가 나타났다.

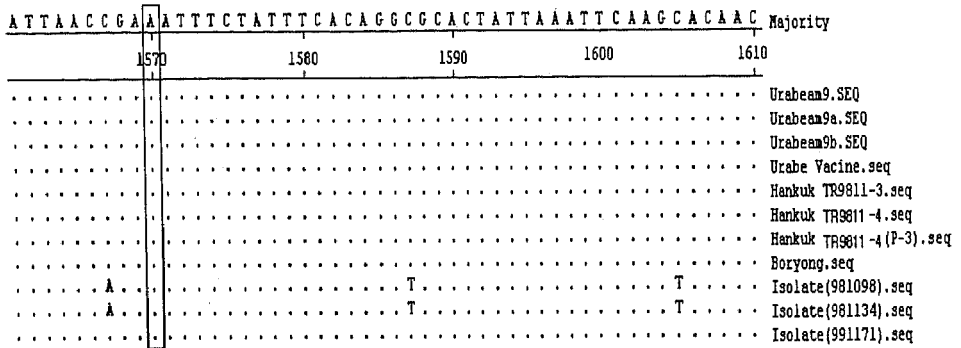


Fig. 7. Sequence analysis of Urabe AM-9 vaccine strains and isolates of HN gene nucleotide 1570 region. Sequences of wild type(Urabe AM-9, Urabe AM-9a, Urabe AM-9b) and Vaccine (Urabe AM-9 vaccine) were extracted from gene bank accession No. AB000388, AB000386, AB000387 and X9318, respectively. Hankuk TR9811-4, Hankuk TR9811-4(vero passage 3), Hankuk TR9811-3, Boryong were used vaccine in this experiment.

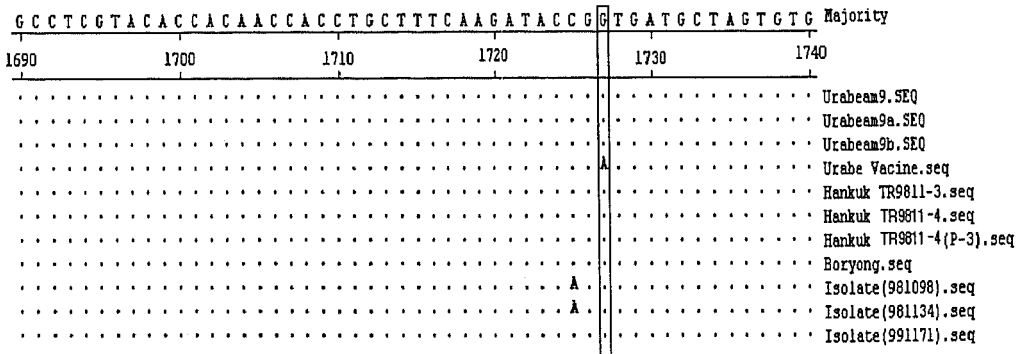


Fig. 8. Sequence analysis of Urabe AM-9 vaccine strains and isolates of HN gene nucleotide 1727 region. Sequences of wild type(Urabe AM-9, Urabe AM-9a, Urabe AM-9b) and Vaccine (Urabe AM-9 vaccine) were extracted from gene bank accession No. AB000388, AB000386, AB000387 and X9318, respectively. Hankuk TR9811-4, Hankuk TR9811-4(vero passage 3), Hankuk TR9811-3, Boryong were used vaccine in this experiment.

고 찰

유행성 이하선염은 소아 정기 예방접종으로 예방할 수 있는 질환으로 치명률은 높지 않으나 무균성 뇌막염이나 고환염 등의 후유증이 문제가 될 수 있다. 국내의 경우 1955년 이래 유행성 이하선염의 발생률에 대한 자료를 보면 20~30/100,000명이 발생하였으나 실제 발생률은 이보다 훨씬 많았을 것으로 추측된다. 1980년 이후 MMR 백신이 보편적으로 사용된 이래 발생률은 지속적인 감소 추세를

보여 5/100,000 이하로 감소하였지만 최근 5년간 매년 지역적으로 간헐적인 유행이 계속되는 상황이며¹⁾ 특히 학동기 연령층에서 10/100,000명 이상의 환자가 발생하는 것으로 추측하고 있다. 또한 1994년도 경기 지역 소재 초등학교에서의 유행성 임상적인 진단에 의한 발병률이 전염 기간 동안 약 30%에 이르는 것으로 보고되고 있다.

국내에 볼거리 백신이 보편적으로 사용된 것은 1983년 이후 일본으로부터 MMR 백신 원료를 수입 혼합 분주하기 시작하면서부터였으며 볼거리 백신주로는 Hoshino주와 Urabe AM-9주가 사용되었

다. 그러나 1989년 일본 전역에 MMR 백신(統一株: 홍역 AIK-C 주, 볼거리 Urabe AM-9주, 풍진 TO-336주)이 사용된 이래 접종 후 발열과 구토를 동반한 무균성 뇌막염 환자가 발생한 것을 시작으로 하여 일본에서 개발된 Urabe AM-9주가 포함된 MMR 백신으로 인한 무균성 뇌막염 발생 실태가 알려지기 시작하였으며 이후 1993년 결국 공중보건심의위원회를 통하여 自國産 MMR 백신의 사용이 4년만에 중지되는 것이 결정되었으며 이밖에 Urabe AM-9주를 사용하고 있던 영국, 캐나다²⁾, 오스트레일리아, 아일랜드, 룩셈부르크 등에서도 자체 조사를 통해 Urabe AM-9주 사용을 금지하였다.

유정란이나 닭의 배아 세포에서 배양된 Urabe AM-9 볼거리 백신주는 1979년 일본에서 최초로 허가된 후 벨지움, 프랑스, 이태리 등에서도 허가되었다. 그러나 Urabe AM-9주가 포함된 MMR 백신을 접종한 후 무균성 뇌막염 발생 빈도가 증가하자 캐나다 오타와 의대의 Dr. Brown 등^{2, 3)}, 영국 National Institute for Biological Standards and Controls의 Dr. Afzal 등⁷⁻⁹⁾과 일본 오사카 의대 Dr. Mori 등¹³⁾은 그 원인에 대한 연구 결과를 발표한 바 있는데 이들의 연구에 의하면 MMR 백신 접종 후 뇌막염을 일으킨 Urabe AM-9주 바이러스의 hemagglutinin-neuraminidase(HN) 유전자의 염기서열을 조사한 결과 뇌막염을 일으킨 바이러스는 HN 유전자 열린 해독들의 1081번 위치 염기가 guanosine에서 adenosine으로 치환되어 결국 335번째 아미노산 Glutamic acid/GAA가 Lysine/AAA으로 바뀐 것 때문이라고 주장하였다. 또한 사용되고 있는 Urabe AM-9 백신주는 HN 유전자의 염기가 균일한 바이러스로 이루어져 있지 않고 서로 다른 두 종류, 즉 1081번 위치 염기가 Glutamic acid/GAA form인 것과 Lysine/AAA form인 두 종류의 바이러스로 구성되어 있는데 만일 Lysine/AAA form이 주축인 경우 백신 접종 후 무균성 뇌막염을 일으킬 빈도가 높을 것이라고 주장하였다. 그 증거로 백신 접종 후 뇌막염을 일으킨 백신은 바이러스 성분의 98~100%가 Lysine/AAA form이었으며 또한 접종 후 뇌막염을 앓고 있는 환자에서 분리된 야생주 볼거리 바이러스도 Lysine/AAA form인 것으로 보아

Urabe AM-9주 백신이 안전성을 확보하기 위해서는 1081번 위치 염기가 A가 아닌 G인 Glutamic acid/GAA form의 Urabe AM-9 백신주로 균일하게 조성되어야 한다고 하였다. 즉, MMR 백신에 포함되어 있는 Urabe AM-9주는 HN 유전자 1081번 위치의 염기가 야생주인 Lys/AAA와 변이주인 Glu/GAA 두 종류의 바이러스가 혼재되어 있는데 1081번 위치 염기가 G가 A로 치환된 lysine이 우세한 경우 Urabe AM-9주 백신 접종자에게서 부작용을 유발할 가능성이 많다는 것이었다.

이와 같이 HN 유전자는 주요 표면항원으로서 백신 failure와 관련된 중요한 유전자일 수 있다는 가능성이 보고된 바 있어⁴⁾ 이에 대한 유전자 염기서열 분석이 많이 시도되고 있다. 이러한 사실을 근거로 국내에서 생산되고 있는 Urabe AM-9 백신주의 안전성 여부를 조사하기 위하여 HN 유전자 염기서열 분석을 실시한 결과 본 실험에서는 HN 유전자 중 169~1887번 위치에 해당하는 1,718개의 염기서열을 확인하였으며 Afzal 등⁹⁾에 의해 변이가 보고된 부위중 343, 1476, 1570번 위치에서는 염기 및 아미노산의 변이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 1081번 위치 염기는 본 실험에 사용된 백신주 Hankuk TR9811-3, Hankuk TR9811-4, Hankuk TR9811-4(P3), Boryong주와 야생 분리주인 981098, 981134, 991171 모두 야생주인 Lysine/AAA form으로 나타났다. 특히, 백신주 HK/ TR9811-4의 경우 기존에 알려진 Urabe AM-9 백신주와 비교시 1081번 위치 염기와 1727번 위치의 염기 이외에 계대 배양후에는 1470번 위치에서 C염기가 A염기로 치환된 것이 추가로 관찰되었다.

또한, HN 1727번 위치 염기는 Urabe AM-9 백신주에서 GAT인 aspartic acid로 보고되어 있으나 본 실험의 백신주와 분리주는 모두 GGT인 glycine으로 나타났다.

본 실험의 결과에서 나타났듯이 국내에서 사용되는 Urabe AM-9주 MMR 백신은 1081번 위치 염기가 모두 야생주인 Lysine/AAA form이었으며 역시 볼거리 환자에서 분리된 야생 분리주도 동일한 Lysine/AAA form으로 판명되었다. 그러나 변이주인 Glutamic acid/GAA form과의 혼재 여부는 관찰

하지 못했는데 계대 배양 후의 백신주를 이용하여 형광표지법 사용시 A와 G의 최고치가 동일하게 나타난 것으로 보아 계대 배양을 더 실시한 후의 염기서열 분석을 실시해 볼 필요가 있을 것으로 사료된다. 이 위치에서의 백신주 염기서열 변이와 무균성 뇌막염 발생 병인론과의 직접적인 연관성은 단클론항체(monoclonal antibody)를 이용한 중화 실험만이 보고되고 있는데^{5,6)} 이에 대한 보완 연구는 더 실시될 필요가 있다고 본다. 한편 볼거리 증상이 있는 환자에서 분리된 국내 분리주의 경우 Urabe AM-9 백신주와 염기서열 비교시 약 2.0%의 차이가 나타나 백신주에 의해 감염된 것으로는 단정지을 수는 없었다.

결론적으로 현재 사용되고 있는 일본산 MMR 백신에 함유되어 있는 Urabe AM-9주는 외국에서의 연구 결과와 동일한 무균성 뇌막염을 일으킬 수 있는 생물학적 가능성을 지니고 있으므로 국내에서 MMR 백신 접종 후 상당수에서 무균성 뇌막염 환자가 발생하였을 가능성이 있을 것으로 사료되나, 부작용 발생보고 체계를 갖추고 있지 않은 관계로 실제 부작용 발생 실태를 파악하지 못하고 있는 것으로 사료된다.

요 약

목 적 : Urabe AM-9 볼거리 백신주는 무균성 뇌막염의 발생 빈도가 높은 것으로 알려져 있다. 백신 접종 후 무균성 뇌막염을 일으키는 경우 Urabe AM-9 백신주의 hemagglutinin-neuraminidase(HN) 유전자의 염기서열 1081번의 G가 A로 치환되어 335 번째 아미노산이 glutamic acid에서 lysine으로 바뀌게 됨에 따라 야생형의 mumps 바이러스와 동일한 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이에 국내에서 사용중인 Urabe AM-9 백신주의 안전성 여부를 조사하기 위해 일부 백신주와 야생 분리주의 HN 유전자의 염기서열 분석을 실시하였다.

방 법 : 국내에서 사용되고있는 Urabe AM-9주 백신 2종류와 1998~1999년에 볼거리 환자로부터 분리된 야생 분리주를 이용하여 RT-PCR 방법에 의해 HN 유전자를 증폭시킨 후 염기 및 아미노산

서열 분석을 실시하였다.

결 과 : 백신주와 야생 분리주 모두 HN 343, 1476, 1570번 위치에서의 염기 변이는 없었으나 1081번 위치 염기는 모두 야생주와 같은 Lysine/AAA form으로 나타났으며 변이주인 Glutamic acid/GAA와의 혼합 양상은 관찰되지 않았다. HN 1470번 위치의 염기는 백신주 중 계대 배양시 C에서 A로 치환되었으며, HN 1727번 위치 염기는 모두 A에서 G로 치환된 것으로 나타났다.

결 론 : 국내에서 사용중인 2종류의 Urabe AM-9 백신주와 야생 분리주 모두 1081번 위치의 염기가 야생주와 같아 무균성 뇌막염을 일으킬 생물학적 가능성이 있는 것으로 나타났으며, 국내에서도 상기 백신주를 사용한 후 무균성 뇌막염이 발생하고 있을 개연성이 매우 크다고 사료되며 직접적인 연관성에 대한 보완 연구를 위하여 정확하고 믿을만한 자료에 의한 실제 부작용 실태를 파악하여야 한다.

참 고 문 헌

- 1) 보건복지부. 보건복지통계연보 1999.
- 2) Brown EG, Furesz J, Dimock K, Yarosh W, Contreras G. Nucleotide sequence analysis of Urabe mumps vaccine strain that caused meningitis in vaccine recipients. *Vaccine* 1991;9: 840-2.
- 3) Brown EG, Dimock K, Wright KE. The Urabe AM9 mumps vaccine is a mixture of viruses differing at amino acid 335 of the hemagglutinin-neuraminidase gene with one form associated with disease. *J Infect Dis* 1996;174: 619-22.
- 4) Choppin PW, Scheid A. The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration and pathogenicity of viruses. *Rev Infect Dis* 1980;2: 4-60.
- 5) Kovamees J, Rydbeck R, Orvell C, Norrby E. Hemagglutinin-neuraminidase(HN) amino acid alterations in neutralization escape mutants of Kilham mumps virus. *Virus Res* 1990;17: 119-30.

- 6) Ovrvell C. The reactions of monoclonal antibodies with structural proteins of mumps virus. *J Immunol* 1984;132:2622-9.
 - 7) Afzal MA, Buchanan J, Dias JA, Cordeiro M, Bentley ML, Shorock CA, Minor PD. RT-PCR based diagnosis and molecular characterization of mumps virus derived from clinical specimens collected during the 1996 mumps outbreak in Portugal. *J Med Virol* 1997;52:349-53.
 - 8) Afzal MA, Pickfore AR, Forsey T, Heath AB, Minor PD. The Jeryl Lynn vaccine strains of mumps virus is a mixture of two distinct isolates. *J Gen Virol* 1993;74:917-20.
 - 9) Afzal MA, Yates PJ, Minor PD. Nucleotide sequence at position 1081 of the hemagglutinin-neuraminidase gene in the mumps Urabe vaccine strain. *J Infect Dis* 1998;177:265-6.
 - 10) Forsey T, Mawn JA, Yates PJ, Bentley ML, Minor PD. Differentiation of vaccine and wild mumps viruses using the polymerase chain reaction and dideoxynucleotide sequencing. *J Gen Virol* 1990;71:987-90.
 - 11) Winship PR. An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulfoxide. *Nucleic Acids Res* 1989;17:1266-76.
 - 12) Wu L, Bai Z, Li Y, Rima BK, Afzal MA. Wild type mumps viruses circulating in China establish a new genotype. *Vaccine* 1997;16:281-5.
 - 13) Mori C, Tooriyama T, Imagawa T, Yamanishi K. Nucleotide sequence at position 1081 of the hemagglutinin-neuraminidase gene in the mumps virus urabe vaccine strain. *J Infect Dis* 1997;175:1548-49.
-