Journal of Bacteriology and Virology 2007. Vol. 37, No. 3 p.161 – 167

일본뇌염바이러스 백신제조주인 Nakayama-NIH주와 Beijing-1주에 대한 중화항체 생산 및 Cytotoxic T Lymphocyte 반응 분석

가톨릭대학교 생명공학부[1], 건국대학교 동물생명과학대학 동물생명공학과[2],
질병관리본부 국립보건연구원 면역병리센터 신경계바이러스팀[3],
식품의약품안전청 생물의약품평가부 백신과[4]

조영주[1] · 정수영[1] · 김연정[1] · 김대선[1] · 김영봉[2] · 주영란[3] · 정영의[3] · 허숙진[4] · 남재환[1*]

Neutralizing Antibody Induction and Cytotoxic T Lymphocyte Response to Nakayama-NIH and Beijing-1 as Japanese Encephalitis Virus Vaccine Strains

Young-Joo Cho[1], Soo-Young Jung[1], Yeun-Jung Kim[1], Dae-Sun Kim[1], Young-Bong Kim[2], Young-Ran Joo[3], Young-Weo Jung[3], Sook-Jin Hur[4] and Jae-Hwan Nam[1*]

[1]Department of Biotechnology, The Catholic University of Korea, Bucheon, 420-743, Republic of Korea; [2]Department of Animal Biotechnology, College of Animal Bioscience & Technology, Konkuk University, Seoul, 143-701, Republic of Korea, [3]Korea Center for Disease Control & Prevention, National Institute of Health, Seoul, 122-701, Republic of Korea; [4]Biological Diagnostic Products Team Biologics Headquarters, Korea Food and Drug Administration, Seoul, 122-704, Republic of Korea

Received : May 29, 2007
Accepted : June 30, 2007

The Japanese encephalitis virus (JEV), a member of the *Flaviviridae* family and *Flavivirus* genus, is transmitted by mosquitoes. JEV, of which some 35,000 cases are recorded every year, is a positive RNA virus. Two types of JEV vaccines have been developed to prevent the onset of encephalitis in humans, namely formalin-inactivated and live-attenuated vaccines. JEV inactivated vaccines are usually made using the Nakayama-NIH or Beijing-1 strains of the JEV virus. In this study, the immunological response to the Nakayama-NIH and Beijing-1 strains was analyzed as part of the effort to compile basic data which could lead to the selection of a suitable vaccine strain. To this end, the virus titer of Beijing-1 was found to be two-fold higher than that of Nakayama-NIH by plaque assay. Moreover, Beijing-1-induced neutralizing antibodies showed a higher level of titers when confronted by Korean JEV isolates than Nakayama-NIH-induced neutralizing antibodies (1:320 vs. 1:160, respectively). However, as a minimum ratio of 1:10 neutralizing antibody titers are required to protect against JEV infection, both strains in effect exhibited a sufficient level of neutralizing antibody titers. What's more, Beijing-1 was found to induce a somewhat higher cytotoxic T lymphocyte (CTL) response than Nakayama-NIH. Taken together, this can be taken to mean that Beijing-1 may in fact be a more effective vaccine candidate strain when it comes to inducing a high level of protective immunity against JEV infection.

Key Words: Japanese encephalitis virus vaccine, Nakayama-NIH, Beijing-1

*교신저자: 남재환. 420-743, 경기도 부천시 원미구 역곡2동 산 43-1, 가톨릭대학교 생명공학부
Phone: +82-2-2164-4852, Fax: +82-2-2164-4917, e-mail: jhnam@catholic.ac.kr

**본 연구는 2007년도 가톨릭대학교 교비연구비 지원과 식품의약품안전청 2005년도 용역 연구사업지원으로 수행되었음.

서 론

일본뇌염바이러스 (Japanese encephalitis virus, JEV)는 양성극성을 가진 RNA 바이러스로서 *Flaviviridae*에 속하는 바이러스이다. JEV는 11 kb 길이의 single open reading frame을 가지고 있고 구조 단백질로서 capsid (C) protein과 membrane (prM/M) protein 및 envelope (E) protein이 있으며 비구조 단백질로서 NS1부터 NS5까지 존재하고 있다 (20). 1935년 Kasahara에 의해 최초로 분리되었으며 (6, 18) 국내에서는 1932년에 문헌상으로 보고된 이래 1949년 5616명이 발생하였으며, 1950년대에는 연평균 1556명, 1960년대에는 1459명이 발생하였으나 1970년대에 와서는 연평균 86명으로 감소하였다 (1). 그러나 1982년 1197명의 환자가 발생하여 이 후 전국적인 대규모 백신 접종을 통해 1990년대 이 후 매년 3~4명의 환자만이 발병하는 등 백신 접종에 의해 환자 발병이 급감한 대표적인 전염성 질환이 되었다 (3,4).

일본뇌염바이러스 백신 생산에 사용되고 있는 strain은 크게 3종류가 있다. 마우스 뇌에서 유래한 불활화 백신으로는 Nakayama-NIH주와 Beijing-1주가 사용되고 있으며, primary hamster kidney (PHK) 세포에서 유래한 약독화 백신주는 SA14-14-2주를 사용하고 있다. 아시아 대부분의 국가에서 불활화 백신제조주로 Nakayama-NIH주를 사용하고 있으나, 중국 및 일본에서는 Beijing-1주를 사용하고 있다. 일본에서는 자국 내에서 소비하는 백신주는 Beijing-1주를 사용하여 제조하고 수출용은 Nakayama-NIH주를 사용하고 있다. 또한 Nakayama-NIH주 및 Beijing-1주 모두 다른 지역에서 분리된 일본뇌염바이러스 분리주들에 대해 교차중화반응을 보이고 있으나, 일반적으로 Beijing-1주가 Nakayama-NIH주보다 더 넓은 중화반응을 보인다고 알려져 있다 (9,15,21). 현재 국내에서는 1970년대부터 Nakayama-NIH주를 이용하여 불활화 백신을 제조하여 일본뇌염바이러스 유행 시기 전에 백신 접종을 권장하고 있다. 최근에는 SA14-14-2주를 사용한 생백신 역시 임상적으로 사용되고 있다. 그러나 생백신은 높은 면역효과 등 다양한 장점에도 불구하고 재돌연변이 등 안전성에 있어서 아직까지 문제점을 가지고 있다. 또한 매년 국내에서 분리되는 일본뇌염바이러스주의 유전학적 분석을 통해 국내 분리주들은 SA14-14-2주뿐 아니라 Nakayama-NIH주와 유전 진화적으로 차이가 있음이 확인되었다 (5,10,11,12,23).

따라서 본 논문에서는 현재 대표적으로 사용되고 있는 불활화 백신주인 Nakayama-NIH주 및 Beijing-1주에 초점을 맞추어 두 바이러스주를 Balb/c 마우스에 접종하여 각 바이러스주에 대한 항체 생성율, 국내 분리주와의 교차반응, cytotoxic T lymphocyte 반응 등 다양한 면역학적 반응을 상호 비교하여 현재 국내에서 불활화 백신제조주로 사용되고 있는 Nakayama-NIH주의 교체에 대비한 기반 자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 세포

일본뇌염바이러스의 혈청학적 type은 크게 Nakayama-NIH, Beijing-1, 그리고 JaGAr주로 나눠진다 (11,14,15). 본 연구에서는 현재 국내에서 백신제조주로 사용되고 있는 Nakayama-NIH와 Beijing-1를 주로 비교하였으며, 또한 JaGAr주 역시 일부 실험에서 함께 비교하였다. 이외에 1987년에 분리된 K87P39, 2001년도에 분리된 K2001주는 국내에서 분리된 일본뇌염바이러스 분리주이다. 이러한 바이러스주는 모두 질병관리본부 신경계바이러스팀에서 분양받아 사용하였다. 분양받은 바이러스는 VERO 세포주에 접종하여 48시간 후 상층액을 수거하여 plaque assay를 통해 역가를 확인한 후 -80℃에 보관하여 사용하였다.

2. Plaque assay 및 중화항체 분석

Nakayama-NIH, Beijing-1 및 JaGAr주의 바이러스 역가를 확인하기 위해 plaque assay를 실시하였다. VERO 세포에 상기 바이러스들을 접종하고 48시간 후 얻은 상층액을 10배 계단 희석하여 6-well plate의 한 well 당 90~95%로 자란 VERO 세포에 100 μl씩 접종, 90분간 37℃ CO_2 배양기에서 배양하였다. 이 후 각 세포로부터 바이러스가 포함되어 있던 배지 상층액을 제거한 뒤, 각 well당 0.5% agar가 함유되어 있는 complete DMEM을 2 ml씩 첨가하여 약 10분간 clean bench 내에서 정치시킴으로써 agar를 굳힌 뒤 37℃ CO_2 배양기에서 약 48시간 동안 배양하였다. 바이러스가 CPE (cyto pathic effect)를 유발하는 것이 관찰되었을 때, Carnoy's fixative solution (75% methanol-25% acetic acid)을 각 세포에 약 10분간 처리하여 고정시킨 후, 1% crystal violet으로 염색하였다. 생성된 플라크를 계수하여 바이러스 역가를 plaque-forming unit

(pfu) per milliliter로 결정하였다.

중화항체 역가를 확인하기 위하여 검사할 혈청을 56℃에서 30분간 비동화시킨 후 1:10으로부터 2단계 희석하고 200 pfu로 조절한 Nakayama-NIH, Beijing-1 혹은 JaGAr 주와 동량 혼합한 다음 37℃에서 90분간 중화시켰다. 그리고 6-well culture plate에서 1차 배양된 VERO 세포에 바이러스 혈청 혼합액을 well당 0.3 ml씩 접종하여 37℃ CO_2 배양기에서 약 90분간 흡착시킨 후 0.5% agar가 포함된 DMEM배지로 37℃ CO_2 배양기에서 2일간 배양하였다. 바이러스가 CPE를 유발하는 것이 관찰되었을 때, Carnoy's fixative solution을 각 세포에 약 10분간 처리하여 고정시킨 후, 1% crystal violet으로 염색하여 생성된 플라크를 계수하였다. 중화항체가는 바이러스 플라크 수를 50% 이상 감소시키는 최대 혈청 희석배수의 역수로 결정하였다.

3. Indirect Immunofluorescent Assay (IFA)

24 well plate에 멸균된 cover slip을 얻고 그 위에서 24시간 동안 VERO 세포를 배양한다. 배양된 VERO 세포에 Nakayama-NIH와 Beijing-1주를 각각 1 multiplicity of infection (moi)로 접종하고 24시간 후 cover slip을 조심스럽게 수거하여 -20℃에 차갑게 보관된 methanol과 acetone이 1:1로 섞인 고정액에 5분간 넣어 세포를 고정하였다. 이 후 Nakayama-NIH와 Beijing-1주로 면역된 마우스 혈청을 이용하여 1:100으로 5% FBS가 포함된 PBS와 섞은 후 세포가 고정된 cover slip 위에서 30분간 반응시켰다. 이 후 PBS로 5분씩 3회 세척 후 다시 마우스 혈청에 대해 반응하는 Alexa-594 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA)를 1:100으로 희석하여 30분간 반응한 후 형광현미경 (Leica, Davie, FI, USA)으로 관찰하였다.

4. 동물면역

실험동물은 4주령의 Balb/c를 코아텍 (평택, 대한민국)에서 구입하여 1주간의 순화기를 거쳐 사용하였으며 온도 23±2℃, 습도 55±10% 12시간 명암 주기하에서 계속적으로 사육하였고, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 동물 실험은 가톨릭대학교 동물 실험 및 처리 위원회의 승낙을 받고 수행하였다. 면역은 마우스 한마리 당 1×10^6 pfu의 바이러스를 복강으로 1차 면역을 실시하였으며 10일 간격으로 3차 면역을 하였다. 3차 면역이 끝난 후 2일째 마우스를 희생시키고 채혈하여 혈액을 굳힌 후 3,000 rpm, 15분 동안 원심분리하여 혈청을 분리하여 중화항체실험에 사용하였다.

5. Cytotoxic T lymphocyte (CTL) 반응 분석

일본뇌염바이러스에 대한 CTL 반응 분석은 Pan 등의 논문을 변형하여 사용하였다 (16). 방법을 간단히 언급하면, target cell로서 RAW264.7 세포주를 96 well plate에 well당 1×10^6으로 접종하여 하루 동안 배양시켰다. CTL 반응을 측정하기 하루 전에 100 moi로 각 바이러스를 target cell로 미리 96 well plate에 배양한 RAW 264.7 세포에 감염시켰다. Effector cell은 1×10^6 pfu로 복강으로 각 바이러스를 마우스에 면역시킨 후 10일이 지나서 동일 양으로 다시 면역을 시킨 후 3일째 비장을 무균적으로 적출하여 비장세포를 만들어 사용하였다. 비장세포는 5일 동안 37℃, CO_2 배양기에서 배양하여 사용하였다. 비장세포에 의한 CTL 반응은 lactate dehydrogenase (LDH) release 반응을 측정하였으며 Promega (Madison, WI, USA)에서 나온 Cytotox96 nonradio- active cytotoxicity assay kit를 이용하여 측정하였다. Effector cell과 target cell이 일정 비율이 되게 effector cell을 준비하여 일본뇌염바이러스를 사전에 감염시킨 RAW264.7 세포주에 혼합시킨 후 4시간 동안 배양한 후 250 g에서 4분 동안 원심분리하였다. 상층액 50 μl를 immunoplate에 넣은 후 substrate 혼합액 50 μl를 넣고 암실에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 종료를 하기 위해 stop 용액 50 μl를 넣은 후 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. CTL 반응 측정 결과는 다음과 같은 공식에 의해서 구하였다.

Cytotoxicity (%) = [(experimental - effector spontaneous - target spontaneous) ÷ (target maximum - target spontaneous)] × 100

결 과

1. 바이러스 역가 측정

일본뇌염바이러스를 혈구응집저지반응 및 보체결합반응을 활용하여 Nakayama 및 JaGAr01 immunotype으로 나눌 수 있으며 (14), Oya 등은 교차중화반응을 이용하여 Nakayama 및 Beijing-1 group으로 구분하였다 (15). 이 중 Nakayama-NIH 및 Beijing-1주는 백신제조주로 활용되고 있다 (15,21). 이들 바이러스주들이 VERO 세포주에서 생산하는 바이러스 역가를 조사하기 위해 1×10^4 pfu 바이러스를 6 well에 동일하게 접종한 후 24시간 후에 상층

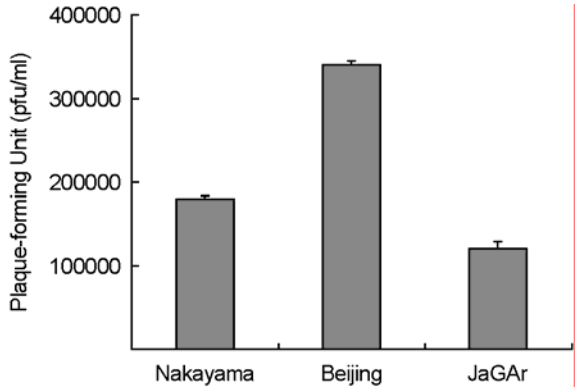

Figure 1. The viral titer of Nakayama-NIH, Beijing-1 and JaGAr in VERO cells at 24 hours after infection. The results shown are the averages of three independent assays, with error bars representing the standard deviations.

액을 수거하여 바이러스 역가를 조사하였다. Beijing-1주가 Nakayama-NIH주와 JaGAr주보다 약 2~3배 정도 높은 역가를 보여주었다 (Fig. 1). 이는 일본뇌염 백신을 세포배양을 통해 생산할 때 Beijing-1주 바이러스 역가가 다른 바이러스에 비해 2배 정도 높기 때문에 더 경제적으로 백신을 생산할 수 있음을 의미한다.

2. 중화항체 생산

Nakayama-NIH, Beijing-1, JaGAr 세 종류의 일본뇌염바이러스를 바이러스 당 10마리의 Balb/c 마우스에 10일 간격으로 3회 면역하였다. 마지막 면역 후 2일 후에 마우스 심장에서 혈청을 확보하여 각 바이러스에 대한 중화항체가를 측정하였다. 마우스 각각의 중화항체가를 측정한 결과 Beijing-1주를 면역한 마우스의 평균 중화항체가는 1:640이며, Nakayama-NIH주를 면역한 마우스들은 1:320, JaGAr주를 면역한 마우스들은 1:80의 중화항체가를 보여주었다 (Fig. 2A). 또한 이렇게 생성된 항체가 일본뇌염바이러스에 대한 항체임을 확인하기 위해 간접형광항체법을 실시하여 Nakayama-NIH 및 Beijing-1에 대한 특이 항체가 생성되었음을 확인하였다 (Fig. 2B).

3. 국내일본뇌염바이러스 분리주와의 교차반응

국내에서 1987년과 2001년에 분리된 두 종류의 국내분리 일본뇌염바이러스 (K87P39와 K2001)를 사용하여 Nakayama-NIH와 Beijing-1에 의해 생성된 중화항체와의 교차반응을 수행하였다. 상호 교차반응의 중화항체 역가를 확인한 결과, Beijing-1주에 의해 생산된 중화항체는

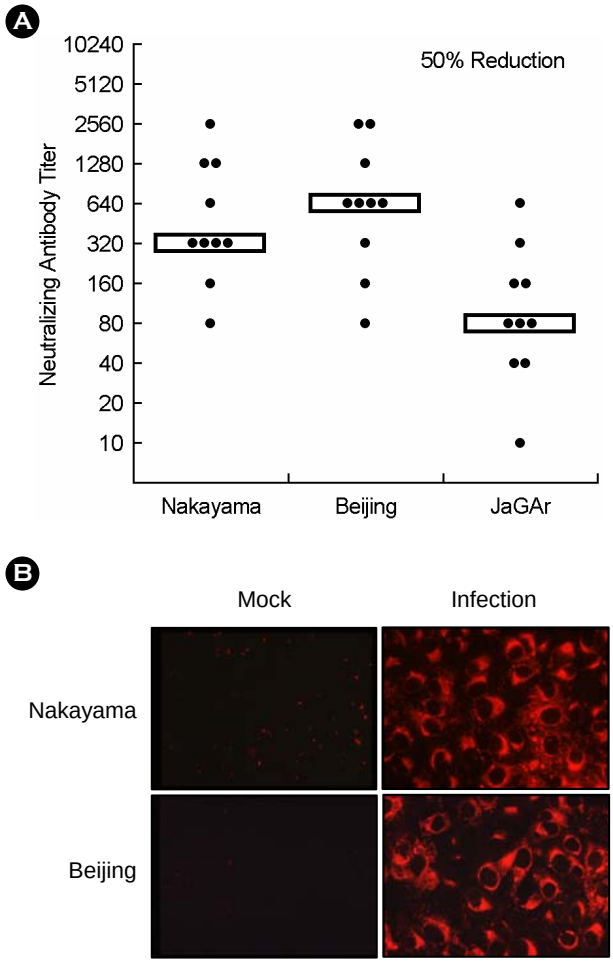

Figure 2. The antibodies induced by Nakayama-NIH, Beijing-1 and JaGAr. **(A)** The neutralizing antibody titer to each JEV. **(B)** The indirect immunofluorecent analysis to detect JEV antibodies.

국내 분리주 K87P39 및 K2001 대해 중화항체 역가가 1:320을 보여주었다. 그러나 Nakayama-NIH주에 의해 생산된 중화항체는 국내분리 일본뇌염바이러스에 대해 각각 1:160의 중화항체가를 나타내었다 (Fig. 3). 따라서 Beijing-1주에 의해 생산된 중화항체가 Nakayama-NIH주에 의해 생산된 중화항체보다 국내에서 분리된 일본뇌염바이러스를 더 잘 중화한다고 할 수 있다. 그러나 Nakayama-NIH주 역시 국내에서 분리된 일본뇌염바이러스주에 대하여 중화항체가가 1:160이 나타났으며, 일반적으로 일본뇌염바이러스에 대해 1:10 이상의 중화항체가 나타나면 바이러스 감염을 막을 충분한 중화능이 있다고 보고되었기 때문에 (9) Nakayama-NIH에 의해 유도된 중화항체가 국내분리 일본뇌염바이러스를 방어하는데 충분한 중화능을 보여주고 있다고 할 수 있다 (Fig. 3). 물론 이러한 중

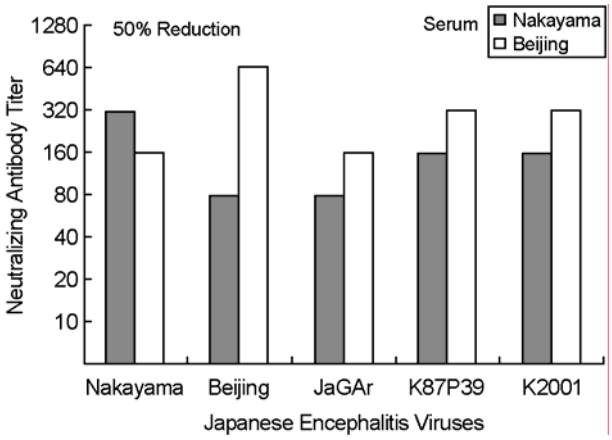

Figure 3. The cross-reacting neutralizing activities of anti -Nakayama-NIH and anti-Beijing-1 polyclonal antibodies from immunized mouse to each JEV and Korean isolates, K87P39 and K2001.

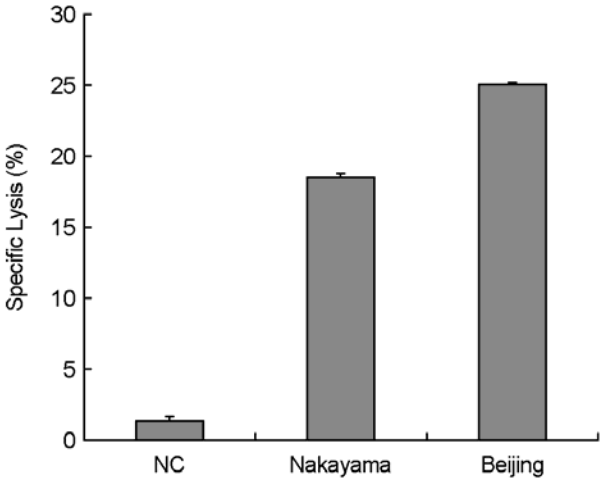

Figure 4. The cytotoxic T lymphocyte response of splenocytes from immunized with Nakayama-NIH and Beijing-1 strains. The results shown are the averages of three independent assays, with error bars representing the standard deviations.

화능 확인 결과는 두 바이러스를 이용한 불활화 백신을 직접 사용하여 면역력을 확인하는 것이 가장 정확한 결과를 보여주는 것이나, 살아 있는 바이러스를 사용하는 것 역시 기본적인 면역반응의 정도를 이해하는데 도움이 될 것으로 판단된다. 이러한 교차반응을 위해 사용한 혈청은 Fig. 2에서 보여준 각 바이러스가 면역된 10마리의 마우스 혈청을 동일양으로 섞어 각 바이러스에 대하여 적용하였다.

4. CTL 반응

Nakayama-NIH주와 Beijing-1주는 중화항체를 생산하는 체액성 면역반응을 효율적으로 유발하였다 (Fig. 2 및 3). 이와 함께 두 바이러스에 의한 CTL 반응을 유발하는 세포성 면역반응의 정도를 확인하여 보았다. 3마리의 Balb/c 마우스에 1×10^6 pfu의 바이러스를 각각 복강으로 면역한 후 10일 후에 2차 면역을 한 후 3일째에 면역된 마우스의 비장을 적출하여 비장 세포를 확보하였다. 비장 세포를 effector cell로 하여 일본뇌염바이러스를 감염시킨 RAW264.7 cell을 target cell로 하여 CTL 반응을 수행하였다. Bejing-1주는 CTL 반응을 통해 용해된 세포가 25% 정도인데 비하여 Nakayama-NIH주는 18% 정도의 용해된 세포를 보여주었다 (Fig. 4). 따라서 Beijing-1주가 Nakayama-NIH주보다 약간 높은 CTL 반응을 보여주었으나 Nakayama-NIH주도 적절한 CTL 반응을 보여주고 있다고 할 수 있다. 기존의 결과에 따르면 (16) 살아 있는 일본뇌염바이러스에 의해 유도된 CTL 반응이 30~40% 정도의 세포용해능을 보여주고 있어 본 연구 결과보다 높은 세포용해능을 보여주었으나, 사용한 마우스의 종류 및 target cell의 종류가 달라 직접적인 비교는 어렵다고 판단된다.

고 찰

국내에서 분리된 일본뇌염바이러스의 envelope sequence를 기준으로 할 때 국내 일본뇌염바이러스 분리주는 일본 및 중국 분리주들과는 확연히 다른 분리주로 확인되어지고 있다 (2,12,23). 또한 1994년도에 분리된 국내 분리 일본뇌염바이러스주인 K94P05주의 전체 염기서열을 분석한 결과 기존의 일본뇌염 백신제조주인 Nakayama-NIH주와는 다른 그룹으로 분류되며, 혈청학적 데이터가 없음에도 불구하고 바이러스의 3' non-coding region (NCR) 유전자 염기서열에 기초한 데이터에 의하면 특이하게도 오스트레일리아에서 분리된 주와 유사한 양상을 보여주고 있었다 (10,11). 그럼에도 불구하고 일본뇌염바이러스는 혈청학적으로 단일 그룹으로 분류되고 있다. 즉, 한 종류의 바이러스에 대한 중화항체가 각 분리주들에 대한 역가의 차이에도 불구하고 다른 지역에서 분리된 일본뇌염바이러스 분리주들을 중화할 수 있음을 의미한다. 그럼에도 불구하고 일부 논문들에 의하면 자국에서 분리된 일본뇌염바이러스 분리주가 기존의 일본뇌염바이러스 백신주인 Nakayama-NIH주 및 Beijing-1주에 의해 유도된

중화항체를 피할 수 있는 epitope-escaping mutant virus가 출현할 가능성이 높다고 확인하였다 (7,8,15,19,22).

현재 사용되고 있는 일본뇌염백신은 크게 두 종류로 나눌 수 있다. 하나는 포르말린을 이용한 불활화 백신이고 다른 하나는 약독화 백신이다. 불활화 백신은 기본적으로 영아마우스 뇌 혹은 primary hamster kidney cell을 이용하여 배양된 바이러스를 포르말린을 이용하여 불활화하여 제작하고 있다. 반면에 약독화 백신은 SA14-14-2주를 사용하여 primary hamster kidney cell에서 생산하고 있으며 대부분 중국에서 유통되고 일부 국가에서 이를 사용하고 있다. 이 중 한국, 일본, 중국, 미국 등 국제적으로 가장 널리 사용되고 있는 백신은 불활화 백신으로 마우스 뇌에서 오염된 neural antigen과 알러지 반응의 가능성이 있고, 제조 단가가 상대적으로 비싸며, 추가 접종의 필요성이 있음에도 불구하고 가장 오랜 기간 사람에게 사용되어 왔으며, 다양한 역학 및 안전성 데이터가 확보되어 있어 현재까지 가장 광범위하게 사용되어지고 있다 (3,17). 이러한 불활화 백신을 제조하는 바이러스주에는 Nakayama-NIH주와 Beijing-1주 두 가지가 사용되고 있다 (21). 두 백신제조주에 대한 다양한 특성에도 불구하고 백신제조국에 따라 두 종류의 백신제조주를 모두 사용하고 있다. 국내에서는 현재까지 Nakayama-NIH주를 불활화 백신제조주로 사용하고 있다. 그러나 몇몇 연구를 통해 Beijing-1주가 Nakayama-NIH주보다 좀 더 넓은 중화항체능을 보여주고 있다는 보고가 있는 등 백신제조주의 교체에 대한 다양한 의견이 제시되고 있다 (15,21). 또한 Nimmannitys 등은 대만에서 Nakayama-NIH주와 Beijing-1주의 필드 테스트를 통해 두 백신제조주의 seroconversion rate을 비교한 결과, 두 바이러스 주가 유사한 결과를 나타내었으나 Beijing-1주에 의해 제조된 백신의 GMT level이 약간 높았다고 보고하였다 (13). 따라서 본 연구에서는 두 백신제조주의 생물학적 특성을 비교하여 국내에서 백신제조주 선정의 기반 자료를 제시하고자 하였다.

본 연구를 통해 바이러스를 감염시킨 VERO cell에서 24시간 후의 바이러스 역가는 Beijing-1주가 Nakayama-NIH주보다 2배 정도 높았다 (Fig. 1). 이러한 사실은 백신생산 시 Beijing-1주가 경제적으로 좀 더 유리함을 의미하고 있다. 또한 마우스에서의 중화항체 생성능을 비교한 결과 Beijing-1주가 Nakayama-NIH주보다 한 fold 높은 중화항체 생성능을 보여주었으나 크게 차이가 나지는 않았다 (Fig. 2, 1:640 vs. 1:320). 또한 CTL 반응 역시 Beijing-1주는 25%, Nakayama-NIH주는 18%로서 Beijing-1주가 약간 높은 결과를 보여주었으나 큰 차이를 보여주지는 못했다 (Fig. 4). 이러한 결과들은 두 종류의 백신제조주 모두가 항체 생성능 및 CTL 반응 등 기본적인 면역학적 반응이 유사하여 백신제조주로 사용되는데 큰 문제가 없음을 보여주고 있다. 본 연구진은 이미 Nakayama-NIH주의 다가 항체와 국내에서 분리된 일본뇌염바이러스주인 K94P05 및 K87P39의 다가 항체를 사용하여 국내에서 분리된 일본뇌염바이러스들에 대한 교차 중화반응 역가를 조사한 결과, 국내 분리주인 K94P05 및 K87P39의 다가 항체가 국내 분리주들에 대해서 더 높은 중화항체가를 보여줌을 확인하였다 (11). 그러나 국내 분리주를 일본뇌염바이러스 불활화백신제조주로 사용하는 것에 많은 장점이 있음에도 불구하고 안전성 등에서 아직 완전한 검증이 되지 않아 임상에서 바로 사용하는 것에는 문제가 있다. 따라서 기존의 백신제조주인 Nakayama-NIH와 Beijing-1주를 급격히 대체하는 완전히 새로운 일본뇌염바이러스 분리주를 사용하는 것 보다는, 이미 널리 사용되고 있는 두 개의 백신제조주 중 어느 것이 국내에서 일본뇌염바이러스 감염을 억제하는데 더 효율적인지 등 기본적인 면역학적 정보를 확보하는 것에 본 연구의 초점을 맞고자 하였다. 이러한 관점에서 보면 이미 언급한 데로 국내에서 분리된 일본뇌염바이러스주에 대한 교차 중화반응에서는 Beijing-1주가 Nakayama-NIH주에 비해 조금 더 효율적인 중화능을 보여주고 있었으며 (Fig. 3, 1:320 vs. 1:160), Beijing-1주의 생산 효율이 높다는 점을 고려할 때 (Fig. 1), Nakayama-NIH주가 아직까지는 국내에서 분리되는 일본뇌염바이러스 분리주들을 잘 방어하고 있음에도 불구하고, 장기적인 관점에서 볼 때 Beijing-1주가 좀 더 효율적으로 국내 일본뇌염분리주에 대해 중화능을 보여 줄 수 있음을 시사하고 있다. 그러나 이러한 결과들을 뒷받침하기 위해서는 좀 더 상세한 분석이 앞으로 수행 되어져야 할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1) 보건사회부 86 급성전염병 통계연보 **1:** 40 1, 1986.

2) **조해월, 김정림, 반상자, 정연준, 남재환, 이유진, 김은정, 원은하, 최승은:** 일본뇌염 백신 접종후 항 일본뇌염 항체의 생성율과 지속기간 확인 및 신경계 부반응의 원인규명. 국립보건원보 **32:** 151-158, 1995.

3) **조해월, 남재환, 이유진, 김은정, 이동호, 윤경식, 고현철:** 일본뇌염바이러스 Nakayama-NIH주와 국내에서 분리된 일본뇌염바이러스주의 유전적 차이 및 항원성 차이의 조사. *J Korean Soc Virology* **26:** 191-204, 1996.

4) **조해월, 남재환, 이호동, 고현철, 김은정, 채수림, 이연승:** 한국에서 매개모기 (*Culex tritaeniorhynchus*)로부터 분리된 일본뇌염바이러스 Envelope protein의 발현과 특성분석. 국립보건원보 **33:** 151-169, 1996.

5) **Chung TJ, Nam JH, BanSJ, Cho HW:** Antigenic and Genetic analysis of Japanese encephalitis viruses isolated from Korea. *Am J Trop Med Hyg* **55:** 91-97, 1996.

6) **Igarashi A:** Epidemiology and control of Japaneses encephalitis. *World Health Stat Q* **45:** 299-305, 1992.

7) **Kitano T, Yabe S, Kobayashi M, Oya A, Ogata T:** Immunogenicity of JE Nakayama and Beijing-1 vaccines. *JE & HFRS Bull* **1:** 37-41, 1986.

8) **Ku CC, King CC, Lin CY, Hsu HC, Chen LY, Yueh YY:** Homologous and heterologous neutralization antibody responses after immunization with Japanese encephalitis vaccine among Taiwan children. *J Med Virol* **44:** 122-131, 1994.

9) **Kurane I, Takasaki T:** Immunogenicity and protective efficacy of the current inactivated Japanese encephalitis vaccine against different Japanese encephalitis virus strains. *Vaccine* **18:** 33-35, 2000.

10) **Nam JH, Chae SL, Park SH, Jeong YS, Joo MS, Kang CY, Cho HW:** High level of sequence variation in the 3' noncoding region of Japanese encephalitis viruses isolated in Korea. *Virus Genes* **24:** 21-27, 2002.

11) **Nam JH, Chae SL, Won SY, Kim EJ, Yoon KS, Kim BI, Jeong YS, Cho HW:** Short report: genetic heterogeneity of Japanese encephalitis virus assessed via analysis of the full-length genome sequence of a Korean isolate. *Am J Trop Med Hyg* **65:** 388-392, 2001.

12) **Nam JH, Chung YJ, Ban SJ, Kim EJ, Park YK, Cho HW:** Envelope gene sequence variation among Japanese encephalitis viruses isolated in Korea. *Acta Virol* **40:** 303-309, 1996.

13) **Nimmannitya S, Hutamai S, Kalayanarooj S, Rojanasuphot S:** A field study on Nakayama and Beijing strains of Japanese encephalitis vaccines. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **26:** 689-693, 1995.

14) **Okuno T, Okada T, Kondo A, Suzuki M, Kobayashi M, Oya A:** Immunotyping of different strains of Japanese encephalitis virus by antibody-absorption, haemagglutination-inhibition and complement-fixation tests. *Bull World Health Organ* **38:** 547-563, 1968.

15) **Oya A:** new development of criteria on Japanese encephalitis vaccine requirements in Japan. *JE HFRS Bull* **2:** 11-13, 1987.

16) **Pan CH, Chen HW, Huang HW, Tao MH:** Protective mechanisms induced by a Japanese encephalitis virus DNA vaccine: requirement for antibody but not CD8(+) cytotoxic T-cell responses. *J Virol* **75:** 11457-11463, 2001.

17) **Plesner AM:** Allergic reactions to Japanese encephalitis vaccine. *Immunol Allergy Clin North Am* **23:** 665-697, 2003.

18) **Sabin AB, Schledinger RW, Ginder PR, Matsumoto M**: Japanese encephalitis American soldiers in Korea. *Am J Hyg* **46:** 356-375, 1947.

19) **Shyu WRH, Wang YC, Chin C, Chen WJ:** Assessment of neutralizing antibodies elicited by a vaccine (Nakayama) strain of Japanese encephalitis virus in Taiwan. *Epidemiol Infect* **119:** 78-83, 1997.

20) **Sumiyoshi H, Mori C, Fuke I, Morita K, Kuhara S, Kondou J, Kilkuchi Y, Nagamutu H, Igarashi A:** Complete nucleotide sequence of the Japaneses encephalitis virus genome RNA. *Virology* **161:** 497-510, 1987.

21) **Tsai TF, Yu YX:** Japanese encephalitis vaccines, In plotkin SA, Mortimer EA, eds. *Vaccines WA Saunders* 671-714, 1994.

22) **Wu CJ, Huang HW, Tao MH:** Induction of cross-protection against two wild-type Taiwanese isolates of Japanese encephalitis virus using Beijing-1 strain DNA vaccine. *Vaccine* **21:** 3938-3945, 2003.

23) **Yun SI, Kim SY, Choi WY, Nam JH, Ju YR, Park KY, Cho HW, Lee YM:** Molecular characterization of the full-length genome of the Japanese encephalitis viral strain K87P39. *Virus Res* **96:** 129-140, 2003.