

소아에서 접종량에 따른 불활성 신증후출혈열 백신 (한탄바이러스 백신)의 면역성 및 안전성에 대한 연구

연세대학교 의과대학 소아과학교실

손 영 모

고려대학교 의과대학 미생물학교실

이 호 왕

= Abstract =

Safety and Immunogenicity of a Inactivated Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Vaccine (Hantaan Virus Vaccine) in Children: Clinical Study of Dose Regimen

Young Mo Sohn, M.D.

Department of Pediatrics, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Ho Wang Lee, M.D.

Department of Microbiology, Korea University, College of Medicine, Seoul, Korea

Formalin inactivated Hantaan virus vaccine (Hantavax[®]) purified from suckling rat brains is currently licensed in Korea. This vaccine was demonstrated 97% of seroconversion rate and no significant side reaction in adult volunteers with standard dose of 0.5 ml (10,249 ELISA unit/ml). There is no data in children. We have recently compared results of the safety and immunogenicity of Hantaan virus vaccine in healthy children to investigate the seroconversion rate with half of recommended adult dose in standard vaccination schedule. Sixty five children with age between eight to eighteen were randomly assigned to two groups. Full dose group (FDG) (n=29, mean age 14 yrs) received 0.5 ml (4,096 ELISA unit) of Hantavax and half dose group (HDG) (n=36, mean age 10 yrs) received 0.25 ml (2,049 ELISA unit). Both group was treated with two consecutive subcutaneous injections, according to 0 and 4 weeks vaccination schedule. Immunogenicity was assessed by determination of IgG antibody titers for vaccine antigens using immunofluorescent antibody technique in four different time period, prior to vaccination (T_0), 4 weeks after first dose (T_1) and 4 weeks after second dose (T_2), 16 weeks after second dose (T_3). Reactogenicity was assessed by nurse recording of local and general reactions for one week after administration of each dose. The seroconversion rate and geometric mean titers (GMTs) between two groups were as follows; seroconversion rate of HDG was 97.1% and that of FDG was 96.3% at T_2 . The GMTs of HDG was 206 and that of FDG was 217 at T_2 . There was no significant general reaction during follow up, except mild fever (1), induration and redness (2) at the injection site. We concluded that low dose administration of Hantaan virus vaccine, 0.25 ml, subcutaneously may be optimum in immunogenicity for the immunization of children, and we are waiting the results of other studies in progress of this vaccine in children.

본 연구는 독집자 임상연구비로 이루어 졌음.

서 론

한탄바이러스(Hantavirus) 감염으로 발생하는 신증후출혈열(Hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)은 유럽 및 아시아대륙에서 매년 약 20만명 이상의 환자가 발생하는 것으로 보고되고 있으며 이중 3-10%가 사망하고 있다¹⁾. 유행성출혈열(HFRS)은 법정전염병으로 한탄바이러스에 감염된 쥐가 바이러스를 증식시킨 후 배설물을 통해 배출하면 공기에 노출된 바이러스가 호흡기를 통해 인체에 감염된다²⁾. 국내의 발생빈도는 남한지역에서만 매년 300-900명이 입원하는 것으로 보고 되고 있으나 실제로는 이보다 많은 환자가 발생되고 있는 실정이며 더욱이 최근 한탄바이러스에 감염된 쥐들에 의하여 감염지역에서 비감염지역으로의 전파가 일어나는 것으로 밝혀져, 이질화에 대한 예방이 시급한 것으로 사료된다. 국내에서 발생하고 있는 유행성출혈열의 원인 바이러스는 1977년 이 등³⁾에 의하여 최초로 규명되었다. 한탄바이러스 감염에 대한 근본적인 치료제가 없는 실정에서는 HFRS 유행지역내에서 백신의 필요성은 강조되고 있다. 최근 국내에서 최초로 개발된 불활성 HFRS 백신(inactivated HFRS vaccine)에 대한 면역성이나 안전성은 성인을 대상으로 한 임상연구 결과 높은 면역성과 안정성이 증명되었으나 소아를 대상으로 한 연구는 시행되지 않았다.

본 저자들은 최근 소아를 대상으로 suckling rat brain에서 순수 분리한 한탄바이러스를 포르말린으로 불활성화시킨 신증후출혈열백신(Hantavax)을 접종량에 따라 두 군으로 분류하여 접종한 후, 5개월까지 추적 검사를 시행하여 백신의 면역성 및 안전성을 비교한 결과를 얻었기에 일차 보고하는 바이다.

대상 및 방법

1. 접종 대상

수원 소재 고아원에서 8세에서 18세 이하 원생 65명을 대상으로 고아원 당국의 동의서(informed consent)를 얻은 후 임의로 0.5 ml(10,240 ELISA unit/ml) 접종군과 그 반량인 0.25 ml 접종군으로 나누어 문진과 이학적 진찰을 시행하였으며 말초혈액 검사와 한탄바이러스 항광항체(IgG) 검사를 면역형광항체법(IFA)으로 시행한

후 백신을 접종하였다.

2. 투여백신 및 접종방법

Suckling rat brain 세포배양에서 증식 정제 분리된 한탄바이러스 항원 백신(Hantavax[®] Lot No. 2003, 2004, 제조일 1992년 7월 13일, 8월 30일, Korea Green Cross, Seoul)을 상완 상박부위에 피하접종 하였다. 접종량은 임의로 선정한 두 군에서 각각 0.25 ml(Half Dose Group, HDG)와 0.5 ml(Full Dose Group, FDG)를 접종하였으며 1차 접종(Lot No. 2003) 4주 후에 2차 접종(Lot No. 2004)을 하였다.

3. 혈청채취 및 형광항체 IgG검사 방법

백신 접종전(T_0)에 말초혈액 검사와 한탄바이러스 항체 조사를 위한 채혈을 하였고, 1차접종 4주 후(T_1), 2차접종 4주 후(T_2), 2차접종 16주 후(T_3)에 각각 2 ml씩 채혈하였다. 피검자로부터 채취한 혈액은 원심분리하여 혈청을 분리한 후 보관하였다가 IFA법으로 측정하여 그 결과를 혈청의 희석배수의 역수로 표시하였으며 혈청학적 양전(seroconversion)군은 접종 후, 접종 전의 항체가보다 4배이상 증가한 경우를 혈청학적 양전군으로 구분하였으며 1:16 희석배수를 cut off titer (양성반응 기준)으로 하였다.

4. 접종 후 부작용 관찰

접종 후에 나타나는 경미한 발열, 근육통, 관철통, 두통, 전신권태감, 현기증 등의 전신적 부작용 유무와 국소부위의 발적, 동통, 가려움증, 부어오름등이 고아원 소속 간호사에 의하여 매일 관찰되었다.

결 과

1. 접종군의 항체 양성률

총 65명의 환자의 평균 연령은 12세였으며 0.25 ml 접종군(HDG) 36명의 평균연령은 10세였고, 0.5 ml 접종군(FDG) 29명의 평균연령은 14세였다. 이들에게 시행한 말초 혈액 검사상 혈색소 평균치는 12.9 g/dl였으며, 백혈구 평균치는 8,450/mm³였다. 이중 중성다핵구 평균치는 49%, 임파구 평균치는 43%를 나타내었고 두 군간에 차이는 없었다. 접종전(T_0) 한탄바이러스 항체 검사는 65명 전체에서 음성을 나타내었으며 일차접종 4

주 후(T_1)에 시행한 항체검사서 HDG군의 항체양전율은 77.1%(34/35)였으며 FDG에서는 66.7%(14/21)로 나타났다. 이들의 geometric mean titers(GMTs)는 HDG가 158, FDG가 207로 나타났다. 이차접종 4주 후(T_2)에 검사한 항체양전율은 HDG에서 97.1%(34/35), FDG에서 96.3%(26/27)로 크게 향상되었으며 GMTs도 HDG에서 206, FDG에서 217로 증가하였다. 이차접종 16주 후(T_3)에 검사한 항체양전율은 HDG에서 97.1%(34/35), FDG에서 96%(24/25)였으며 GMTs는 HDG에서 200, FDG에서 132로 다소 감소하였다(Table 1, Fig. 1).

2. 접종 후 부작용

접종 후 나타난 부작용으로는 1예에서 미열반응이 있었으며, 2예에서 국소종창과 발적이 관찰되었다. 미열반응은 접종 후 24시간에 나타났으나 곧 해열되었으며 두군에서 각각 1예씩 2예에서 국소종창과 발적이 있었다. 국소종창 1예는 접종후 24시간 이내에 발적을 동반한 종창이 나타났으며, 1예는 24시간 이후에 발적이 나타난 후 부어올랐다. 이러한 국소반응은 48시간 이후에 별다른 조치없이 해소되었다.

Table 1. 접종량에 따른 한탄바이러스 백신 접종 후 항체 양성을

Group	Antigen Dose (ELISA unit)	Mean Age (Yr)	Seroconversion Rate (%)				Geometric Mean Titers			
			(No. Seropositive/No. Vaccinees)							
			T_0	T_1	T_2	T_3	T_0	T_1	T_2	T_3
HDG* (n=36)	2560	10	0	77.1 (27/35)	97.1 (34/35)	97.1 (34/35)	0	158	206	200
FDG** (n=29)	5120	14	0	66.7 (14/21)	96.3 (26/27)	96.0 (24/25)	0	207	217	132

* HDG : half dose group, ** FDG : full dose group.

T_0 : 백신접종전, T_1 : 일차백신 접종 후 4주, T_2 : 이차백신 접종 후 4주, T_3 : 일차백신 접종 후 5개월 후

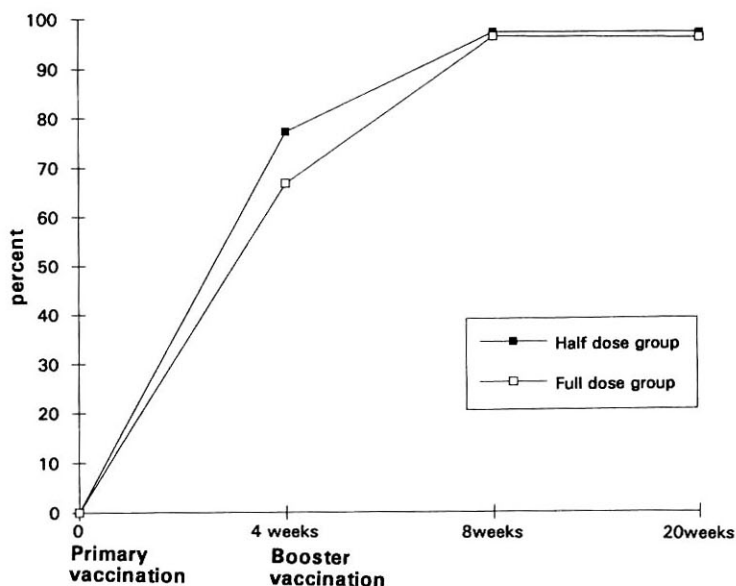


Fig. 1. IF antibody seroconversion rate after primary and booster vaccination.

고 찰

국내에서 발생하는 HFRS는 한탄바이러스에 의하여 주로 발생하지만 서울바이러스에 의해서도 발병한다^{2,3)}. 국내에서의 HFRS 발생 빈도는 매년 약 500-900명의 환자가 입원하는 것으로 나타나 있으나 실제 환자 발생은 약 10배 정도 많은 것으로 추측되고 있다. 호발연령은 환자의 약 1/3이 군인이며 민간인의 경우 40대에서 가장 발생 빈도가 높다. 소아에서의 발병빈도는 드물어 연간 인구 10만 명당 0.03-0.59명으로 알려졌으나 최근에는 11-14세의 소아환자들도 늘어나는 추세이다⁴⁾. 잠복기는 다양하여 짧게는 4일 길게는 40일 이상 되기도 하지만 대개 2-3주가 된다. 임상양상 역시 다양하여 불현성감염(30%)에서부터 경증(50%), 중증감염(20%)으로 사망에 이르기도 한다. 5-10%에서 신부전증에 의한 합병증, 패혈증, 비가역적 췌크, 출혈성 뇌병증에 의하여 사망한다²⁾. 서울바이러스에 의한 도시형은 임상증상이 한탄바이러스에 의한 경우보다 신부전 증세는 가벼우나 위장관 증상이 심하며 간비대, 간장기능 장애등이 심하다. 최근 이 등²⁾은 28세 임신부에서 수직감염에 의한 선천성 HFRS예를 보고하였다. 산모는 임신 8개월에 전형적인 HFRS를 앓았으며 회복기에 3.3 kg의 태아를 분만하여 생후 11시간만에 사망하였다. 부검소견상 신장, 심장, 폐, 부신 등에 성인과 유사한 병리소견을 관찰하였고 한탄바이러스에 대한 간접면역 항체를 측정한 결과 IgG가 산모에서 1:4,096(IgG 1:256) 태아 혈청에서 IgG 1:8,192(IgG 1:256)임을 증명하였다.

1988년 이 등⁵⁾은 환자에게 분리한 한탄바이러스(ROK 84-105 strain)를 suckling ICR mouse brain과 SD rat brain에 접종하여 얻은 seed virus를 가지고 불활성과 백신을 처음으로 개발하였다. 이들은 한탄바이러스의 감염성을 제거하기 위하여 섭씨 56도에서 30분간 열처리하고 0.05% 포르말린 용액으로 불활성화시킨 후 일본뇌염백신 제조과정과 동일한 방법으로 만들었다. 다음 단계로 Vero E6 세포배양 및 쥐를 이용한 생체실험을 거친 후 잔존 바이러스가 없음을 확인하였다. 최종 백신에 포함된 바이러스 항원의 함량은 10,240 ELISA unit/ml이며 보존제로 500 µg/ml의 aluminum hydroxide gel이 첨가되어 있다^{5,6)}. 백신에 포함된 단백질 함량은 27-50 µg/ml로 현재 국내에서 사용되고 있는

일본뇌염백신의 허용 단백질 기준함량(80 µg/ml)보다 낮은 것으로 나타나 안전성 면에서 더욱 우수한 백신으로 볼 수 있으며 쥐 뇌조직 성분인 myelin protein의 잔존성 여부에 대한 검사도 거친 것으로 되어 있다⁶⁻⁸⁾. 또한 독성검사를 위하여 쥐의 피하 및 복강내로 추정 임상 사용량의 1000배까지 과량 접종하여도 특기할 만한 독성 및 병리조직학적 변화가 없었음을 증명하였다^{7,8)}. 이 등⁵⁾은 백신으로 유도되어 IFA법으로 측정된 IgG 항체가 동물실험에서 감염방지 능력이 있음을 증명하였고 1991년 안 등⁹⁾은 한탄바이러스의 G1, G2 및 N 단백질이 백신에 함유되어 있음을 증명하여 백신으로 유도된 항체가 중화항체임을 증명하였다. 최근 vaccinia virus 또는 baculovirus vector를 이용하여 한탄 바이러스 RNA M genome이 삽입된 recombinant 백신에 대한 연구가 진행중이나 면역성이 약하며, Yamanish 등도 쥐 암세포 유래 한탄바이러스를 이용한 사백신을 개발하였으나 안전성이 환자에게 검출된 한탄바이러스를 이용한 경우에 비하여 취약할 것으로 생각된다^{6,10,11)}.

정상 성인을 대상으로 시행한 소규모 임상실험 결과를 보면 항원농도 5,120 ELISA unit로 피하접종한 경우에서 일차접종 4주 후 IFA법으로 조사한 IgG 항체전환율이 96%였으며 일차접종 4주 후 이차접종을 시행하고 다시 4주 후에 검사한 항체전환율은 100%로 나타나 높은 항체생성율을 나타내었다^{6,8)}. 반면 근육주사한 경우 피하접종시보다 69%, 87%로 다소 낮은 전환율을 나타내어 피하접종이 근육접종시 보다 높은 항체생성율을 나타냄을 확인하였다⁶⁾. 또한 접종량에 따른 항체 생성율에 대한 조사에서는 10,240 ELISA unit와 반량인 5,120 ELISA unit에서 항체전환율에 차이가 없는 결과가 나타나, 0.5 ml(10,240 ELISA unit/ml)를 성인의 접종량으로 하였다. 이들이 시행한 임상실험에서 나타난 백신의 부작용으로는 가장 흔하게 나타난 증상은 주사부위의 가려움증(6.8%), 종창 및 발적(8.6%)으로 나타났으며 대부분의 접종후 48시간 이내에 출현하였다가 소실되었다^{6,12)}. 그외의 전신증상으로는 전체 162명의 접종자중 전신쇠약감(1예), 근육통(4예), 구역질(2예) 등이 나타나 대조군과 유의있는 차이를 발견할 수 없었다고 하였다.

본 연구에서 IFA법으로 조사한 소아에서의 접종량에 따른 IgG 항체전환율은 성인 접종량 5,120 ELISA unit와 그 반량인 2,560 ELISA unit에서 이차접종 종료 후

4주 후(T_2)에 검사한 결과는 각각 97.1%, 96.3%를 나타내었으며 다시 4개월 후(T_3)에 검사한 항체전환율 역시 97.1%, 96.0%로 차이가 없었다. 다만 이들의 GMTs는 5,120 ELISA unit 접종군(HDG)에서는 T_1 에서 158, T_2 에서 206으로 FDG군 보다 다소 낮았다. 그러나 T_3 에 검사한 결과는 오히려 FDG에서 132, HDG에서 200으로 나타나 접종량과 관계없이 다소 감소함을 알 수 있었다. 평균 연령이 10세인 HDG과 평균연령이 14세인 FDG의 항체 양전율을 비교해 보면 두군간에 접종량에 따른 항체생성율의 차이는 없을 것으로 사료되었다. 이들에서 나타난 부작용은 미열반응의 전신 증상이 있었던 예가 1예 있었으나 곧 소실 되었으며 두군에서 각각 1예씩, 2예에서 국소종창과 발적이 나타났다. 이러한 결과로 보아 소아에서 포르말린 처리 한탄 바이러스 사백신의 면역성과 안전성은 우수한 것으로 평가 되며 10세이하에서 성인 접종량의 반, 0.25 ml를 접종하여도 백신의 면역성에 문제가 없을 것으로 사료된다. 그러나 이들에서 나타난 형광항체가의 GMTs가 각각 205, 217로 in vitro 실험에서 나타난 방어기준치인 1:256에 다소 낮은 수치를 나타내고 있었으며 4개월 후에는 더욱 감소하고 있음을 알 수 있었다. 그러므로 현재 진행중인 다른 연구자들의 임상 실험결과와 추후 이들의 형광항체가 감소에 대한 추적이 이루어진 후 소아에서의 접종량에 대한 최종 결론이 있어야 하겠다.

결 론

포르말린 처리 불활성화 신증후출혈열 백신의 소아에서의 접종량을 결정하기 위해서 시행한 성인 접종량인 0.5 ml(5120 ELISA unit) 접종군(평균연령 14세)과 성인량의 반량인 0.25 ml(2,560 ELISA unit) 접종군(평균연령 10세)에서 측정된 항체생성율은 각각 96.0%와 97.1%로 두군간에 차이가 없었으므로 10세 이하에서는 0.25 ml를 접종하여도 면역성과 부작용의 빈도에 차이가 없을 것으로 사료되나 더 많은 예의 임상실험과 이들의 항체가 변동에 대한 추적검사가 반드시 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) LeDuc JW, Smith GA, Childs JE, Pinheiro FP, Maiztegui JI, Niklasson B, antoniadis A, Robinson DM, Khin M, Shortridge KF, Wooster MT, Elwell MR, Ilbery PLT, Koech D, Rosa EST, Rosen L: *Global survey of antibody to Hantaan-related viruses among peridomestic rodents. Bull WHO* 64:139-144, 1986
- 2) Lee HW: *Hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. J Infect Dis* 11 (Sup):S864-S876, 1989
- 3) Lee HW, Lee PW, Johnson KM: *Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. J Infect Dis* 137:298-308, 1978
- 4) 고대경, 조근행, 정지태, 최평화: 소아의 한국형 출혈열 12예에 대한 임상적 고찰. 소아과 8:837-845, 1987
- 5) Lee HW, An CN: *Development of vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. J Kor Soc Virol* 18:143-148, 1988
- 6) Lee HW, Ahn CN, Song JW, Back LJ, Seo TJ, Park SC: *Field trial of an inactivated vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome in humans. Arch Virol (Suppl. 1)* 35-47, 1990
- 7) Moon CK, Park KS, Hwang GS, Mock MS, Kim SG, Jung MK, Won HS, Kim JY: *Acute toxicity of Hantabax (HFRS-Vaccine) in rats and mice. Kor J Toxicol* 5:105-109, 1989
- 8) Moon CK, Park KS, Hwang GS, Mock MS, Kim SG, Jung MK, Won HS, Kim JY, Lee YS, Jeong JY, Hur GH, Kang KS: *Subacute toxicity of Hantabax (HFRS-Vaccine) in mice. Kor J Toxicol* 5:111-121, 1989
- 9) An HN, Kim TY, Paik SB, Lee HW: *Identification of G1, G2 and N protein of Hantaan virus in an inactivated HFRS vaccine. J Kor Soc Virol* 21:19-23, 1991
- 10) Pensiero MN, Jennings GB, Schmaljohn CS, Hay J: *Expression of the Hantaan virus M genome segment by using a Vaccinia virus recombinant. J Virol* 62: 696-702, 1988
- 11) Schmaljohn CS, Hasty SE, Dalrymple JM: *Preparation of candidate vaccinia-vectored vaccines for haemorrhagic fever with renal syndrome. Vaccine* 10:10-13, 1992
- 12) Kim BS, Kim GR, Lee HW: *Clinical efficacy of a killed vaccine of hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. J Kor Soc Virol* 20:205-208, 1990