

1)

## Respiratory Syncytial Virus 단클론 항체의 개발과 이를 이용한 8년간 국내 분리주의 항원성 변이 관찰

성균관대학교 의과대학 강북삼성병원 소아과, 서울대학교 의과대학 소아과학교실\*

박진영 · 이환종\*

### Development of Monoclonal Antibodies to Respiratory Syncytial Virus (RSV) and Application for Study of Antigenic Variation of RSV

Jin-Young Park, M.D. and Hoan-Jong Lee, M.D.

*Department of Pediatrics, Sungkyunkwan University, College of Medicine,  
Department of Pediatrics, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background :** Strains of respiratory syncytial virus (RSV) can be classified by reactivity with monoclonal antibodies into two major subgroups A and B, then further into several antigenic variants in each subgroup. Antigenic characterization of strains prevailing in a particular community may be essential in the future development of vaccine.

**Methods :** We developed monoclonal antibodies (MAbs) to RSV subgroups A and B. Antigenic specificities were characterized by immunoblot assay and radioimmunoprecipitation. By the pattern of reactions with these MAbs, RSV isolated over 1990~1998 were categorized into subgroups A and B, then further into antigenic variants.

**Results :** Thirty-four monoclonal antibodies to RSV were produced; twelve were directed against nucleoprotein; seven against matrix protein; ten against fusion protein; and five against major envelope glycoprotein. During the study period, yearly epidemics of

RSV infection existed. Both subgroups circulated concurrently in 6 epidemics with predominance of subgroup A, and only one of each subgroup was identified in 2. Antigenic variations were observed in matrix, fusion and major glycoprotein. Six antigenic variants were identified in subgroup A and 2 in subgroup B among 242 strains of RSV. One major variant of subgroup A dominated in all of the 7 subgroup A epidemics, while the dominant variant of subgroup B was different in each of the 7 subgroup B epidemics.

**Conclusion :** During the study period, yearly epidemics of RSV infection existed. The proportion of each subgroup varied in each of the 8 epidemics. The antigenic variability of RSV should be considered in the future development of RSV vaccine (Korean J Infect Dis 31:111~121, 1999).

**Key Words :** Respiratory syncytial virus, Monoclonal antibody, Antigenic variation

## 서론

호흡기 감염증은 소아에서 가장 흔한 감염증으로, 이 중 하기도 감염증은 주로 respiratory syncytial virus(RSV), parainfluenza virus, influenza virus 및 adenovirus 등에 의해 발생한다<sup>1, 2)</sup>. 하기도 감염증에서 각 호흡기 바이러스가

차지하는 상대적 감염빈도는 대상 집단, 검사 시기, 검사 방법 등에 따라 다소 차이가 있으나 RSV가 가장 흔히 원인이 된다. 거의 모든 소아가 2세까지는 RSV에 감염되며, 이 중 1%는 입원을 요한다.

외국의 보고에서는, RSV의 유행은 매년 일어나지만 RSV 감염증의 심한 정도는 해마다 다소 차이가 있다<sup>3, 4)</sup>. 이러한 임상상의 차이가 유행하는 주의 차이에 기인하는지 여부가 최근에 RSV에 대한 연구에 있어서 큰 관심의 대상이다. 최근에 와서야 바이러스학 및 단클론 항체의 개발로 인해 RSV를 A 아형과 B 아형으로 분류가 가능하게 되었으며, 또 같

접수 : 1999년 1월 13일, 승인 : 1999년 3월 28일  
교신저자 : 이환종, 서울대학교 소아병원 소아과  
Tel : 02)760-3633, Fax : 02)745-4703  
E-mail : hoanlee@plaza.snu.ac.kr

은 아형 내에서 항원성의 변이가 있음이 밝혀졌다<sup>5-7)</sup>.

RSV의 아형 및 아형 내에서의 항원성의 변이 여부는 임상적 및 역학적 관심 외에, 향후 백신 개발에 더욱 중요한 의미를 갖는다. 지역에 따라 유행하는 아형의 분포에 차이가 있기 때문에 향후 개발되는 백신의 성분에 중점을 두어야 할 아형에 차이가 있을 수 있다. RSV에 대한 수종의 단클론 항체를 Long(A 아형), A2(A 아형), CH18537(B 아형) 주 등 여러 가지 RSV의 표준주들과 반응시켜 개발된 단클론 항체들이 A, B 아형과 반응하는 양상을 결정한 후, 임상 검체에서 분리된 주들과 반응시켜으로써 유행하는 주의 아형 및 항원성의 변이를 알 수 있다.

본 연구에서는 RSV A, B 아형에 대한 단클론 항체를 개발하여, 8년간 국내에서 분리된 RSV의 항원성의 변이 양상을 관찰하고 RSV 분리 시기별 각 항원형의 상대적 빈도를 밝혀 국내 RSV 역학을 분석하고자 하였으며, 개발된 항체는 향후 RSV에 대한 다른 연구에 이용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 단클론 항체의 생산

RSV의 표준주인 A2 주와 국내에서 분리된 RSV B 아형(주번호 93-418)을 HEp-2 세포에서 plaque-purify한 후 HEp-2 세포에 접종 후 2~4일에 세포 병변 효과가 형성되면 cell scraper로 긁어내어 균질화하여 -70 °C에 보관하였다(stock virus).

Stock virus 용액을 플라크 형성 단위(Plaque forming unit, PFU)가  $2 \times 10^7$  PFU/mL이 되도록 인산 완충 용액으로 희석하여 30  $\mu$ L을 6~8주된 specific-pathogen free BALB/c 마우스 비강내 주입하였다. 4주 후 희석된 stock virus 용액 100  $\mu$ L 와 Freund's incomplete adjuvant를 복강 내로 주사하였다. 2주 후에 혈청 내의 충분한 항체가 생성되었으면, 다시 복강 내로 바이러스를 접종한 후 3일째에 세포 융합을 실시하였다. 항체가가 낮으면 복강 내 면역반복하였다.

세포 융합은 Köhler & Milstein<sup>8)</sup>의 방법으로, 항체 역가가 높은 두 마리의 마우스의 비장 림프구 세포와 형질세포(P3- $\times$  63-Ag8. v653 세포주)(ATCC CRL 1580)를 사용하였다. 융합된 세포만을 선택하기 위하여 Littlefield<sup>9)</sup>가 고안한 HAT 선별 배지(50  $\mu$ M hypoxanthine, 0.4  $\mu$ M aminopterin, 16  $\mu$ M thymidine)를 이용하였다.

간접 면역형광 염색법으로 항체 생산이 확인된 융합 세포는 HT 배지(hypoxanthine-guanine 1%, NCTC 0.2% [v/v],

gentamicin 50  $\mu$ L가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium)로 배양하였으며, McKearn<sup>10)</sup>의 무한대 희석법으로 단클론 세포를 얻었다. 단클론 세포의 배양 상청액 또는 마우스에서 만든 복수를 실험에 사용하였다. 생산된 항체는 RSV와 반응하고 동시에 influenza A, B, adenovirus, parainfluenza 1, 2, 3 등의 호흡기 바이러스 각 종류 5주 이상과 반응시켜 이들 바이러스와는 교차 반응하지 않는 것을 확인하였다.

### 2. 단클론 항체의 특성 분석

단클론 항체의 isotype은 mouse monoclonal antibody sub-isotyping kit(Hyclone Lab., Logan, Utah, USA)로 확인하였다. Immunoblotting과 방사 면역 침전법으로 결합 단백을 확인하였다.

#### 1) Immunoblotting

HEp-2 세포 단층에 plaque-purified RSV A2주 또는 RSV B 아형(주번호 93-418)을 접종하여 세포 병변 효과가 진행되면, cell scraper로 긁어내어, 원심 분리하여 TNE 세포 용해 완충 용액(TNE lysis buffer; 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)과 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)를 넣은 후, 원심 분리하여 상청액을 12.5%의 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. 전기영동한 gel은 nitrocellulose에 전이시킨 후 생산된 단클론 항체와 반응시키고 세척 후, alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse polyvalent Ig(IgG, A, M) (Sigma Immunochemical Co., St. Louis, MO, USA)와 반응시켰다. 세척 후 10 mL의 alkaline phosphatase 완충 용액(100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris, pH 9.5)에 66  $\mu$ L의 nitroblue tetrazolium(NBT) 용액과 33  $\mu$ L의 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate(BCIP) 용액을 혼합한 것으로 발색시켜 단클론 항체와 반응하는 바이러스 단백질의 분자량을 계산하였다.

#### 2) 방사 면역 침전법(radioimmunoprecipitation)

HEp-2 세포에 RSV를 접종하고 세포 병변 효과가 진행되었을 때 [<sup>35</sup>S]-methionine(Amersham, Arlington Heights, England) 또는 [<sup>3</sup>H]-glucosamine(Amersham, Arlington Heights, England)을 50  $\mu$ Ci/mL 농도로 넣고 2~6시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 cell scraper로 세포를 모아 원심 분리하였다. 상청액을 버리고 TNE 세포 용해 완충 용액에 1 mM PMSF를 첨가한 용액을 넣고 원심 침전 후 상청액을 냉동 보관하였다.

상청액과 단클론 항체의 배양 상청액 또는 복수를 넣고 Protein A sepharose CL-4B(Pharmacia, Uppsala, Sweden) 또는 protein G sepharose(Pharmacia, Uppsala, Sweden)로 침전 시킨 후<sup>11)</sup> 12.5%의 SDS-polyacrylamide gel 에서 전기영동하였다. 전기영동한 gel은 건조시켜 X-ray film에 노출 시킨 후 현상하였다.

### 3. 국내에서 분리된 RSV의 아형의 결정 및 아형 내에서 항원성의 변이 관찰

#### 1) 호흡기 검체에서 RSV의 분리 및 보관

하기도 감염 환자의 비 흡인물(nasal aspirate)을 HEp-2 세포에 접종하고 RSV의 세포 병변 효과가 관찰되면 cell scraper로 긁어내어, RSV의 모든 주와 반응하는 단클론 항

**Table 1. Characterization of Monoclonal Antibodies (MAbs) to Respiratory Syncytial Virus (RSV)**

MAb*	Immunoglobulin subclass	Immunizing RSV subgroup	Immunoblotting <sup>†, ‡</sup>	RIP <sup>§</sup>
A 1A4 2	G2b	A	—	VP41, VP47
A 1B4 3	G2b	A	—	VP41, VP47
A 1B12 1	M	A	VP41	VP41, VP47
A 1E1 1	G1	A	—	VP41, VP47
A 1F12 1	G3	A	VP41	VP41, VP47
A 2E7 2	M	A	VP41	VP41, VP47
B 1H12 1	G1	B	VP41	VP41, VP47
B 2G1 1	G2a	B	—	VP41, VP47
B 3A1 1	G1	B	VP41	VP41, VP47
B 4E11 1	G1	B	VP41	VP41, VP47
B 4G11 2	G1	B	—	VP41, VP47
B 4H2 3	G2a	B	—	VP41, VP47
A 1A11 1	M	A	VP27	VP24
A 4C9 1	G2b	A	VP27	VP24
B 1A5 1	G2b	B	—	VP24
B 1F4 5	G2a	B	VP27	VP24
B 3H12 3	G2a	B	VP27	VP24
B 4B8 1	G2a	B	—	VP24
B 4D1 1	G1	B	—	VP24
A 2E4 4	G2a	A	—	VP70, (VP50, VP22) <sup>  </sup>
A 1A8 9	G3	A	—	VP70, (VP50, VP22)
A 2C7 2	G2b	A	—	VP70, (VP50, VP22)
A 2D5 5	G2a	A	—	VP70, (VP50, VP22)
B 1F11 1	G1	B	—	VP70, (VP50, VP22)
B 2C10 2	G1	B	—	VP70, (VP50, VP22)
B 3B10 6	G1	B	—	VP70, (VP50, VP22)
B 4C5 1	G2a	B	—	VP70, (VP50, VP22)
B 4D4 1	G1	B	—	VP70, (VP50, VP22)
B 4H5 3	G2a	B	—	VP70, (VP50, VP22)
A 3A10 1	G2b	A	VGP89	VGP89
A 4C7 1	G2a	A	VGP89	—
A 4D7 1	G2a	A	VGP89	—
B 3F8 1	Not done	B	VGP89	VGP89
B 3E9 2	G1	B	VGP89	VGP89

\*Six monoclonal antibodies which could not be evaluated for protein specificity were not included.

<sup>†</sup>VP41, nucleoprotein; VP27, matrix protein; VP70, fusion protein; VGP 89, large glycoprotein

<sup>‡</sup>— : negative, <sup>†</sup>RIP; radioimmunoprecipitation

<sup>||</sup> Additional bands at 50 and 22 kD were precipitated, which were supposed to be cleavage products of VP70.

체(MAB 858-4, Chemicon, Temecula, CA, USA)로 염색하여 RSV 확인 후 -70℃에 보관하였다.

## 2) 국내 RSV 분리 주의 아형 결정 및 항원성의 변이 관찰

개발된 단클론 항체를 RSV 표준주와 반응시켜 A아형과 B아형 모두와 반응하는 항체, A 아형과만 반응하는 항체, B 아형과만 반응하는 항체로 나누었다. 이들 항체와의 반응 양상에 따라 RSV A, B 아형으로 분류하였다. 보관된 바이러스를 재배양하여 도말을 만들어 단클론 항체 배양 상청액 또는 복수로 간접 면역 형광 염색하였다. 단클론 항체와의 반응 양상에 따라 각 아형 내에서 항원성 변이를 관찰하고, RSV A아형, B아형 중에서도 여러 가지 항원형으로 분류하였다.

## 결 과

### 1. 단클론 항체의 생산과 특성 분석

RSV A2주에 대한 단클론 항체 18종, RSV B 93-418주에 대한 단클론 항체 22종의 총 40종의 단클론을 얻고, 단클론 항체가 함유된 배양 상청액 및 복수를 만들었다. 단클론 항체의 isotype을 검사한 결과, 40종 중 IgG<sub>1</sub>이 13종, IgG<sub>2a</sub> 12종, IgG<sub>2b</sub> 6종, IgG<sub>3</sub> 4종, IgM이 4종이었고(Table 1), 1종은 isotype 검사를 시행하지 못하였다.

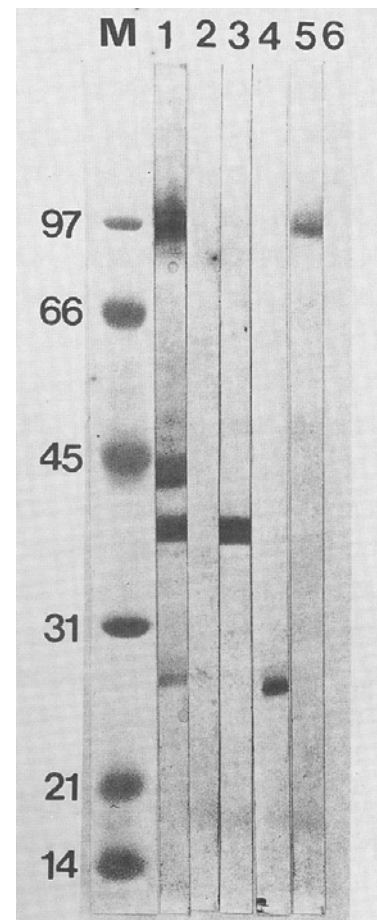
### 2. Immunoblotting을 이용한 단클론 항체의 결합 단백질의 확인

Immunoblotting으로 15종의 단클론 항체에서 반응하는 단백을 확인할 수 있었다(Figure 1). 그 중 6종은 분자량 41 kDa의 nucleoprotein(VP41), 4종은 27 kDa의 matrix 단백(VP27), 5종은 89 kDa의 당단백(VGP89)과 결합함을 확인할 수 있었다(Figure 1). 25종은 immunoblotting으로 결합 단백을 확인할 수 없었다(Table 1).

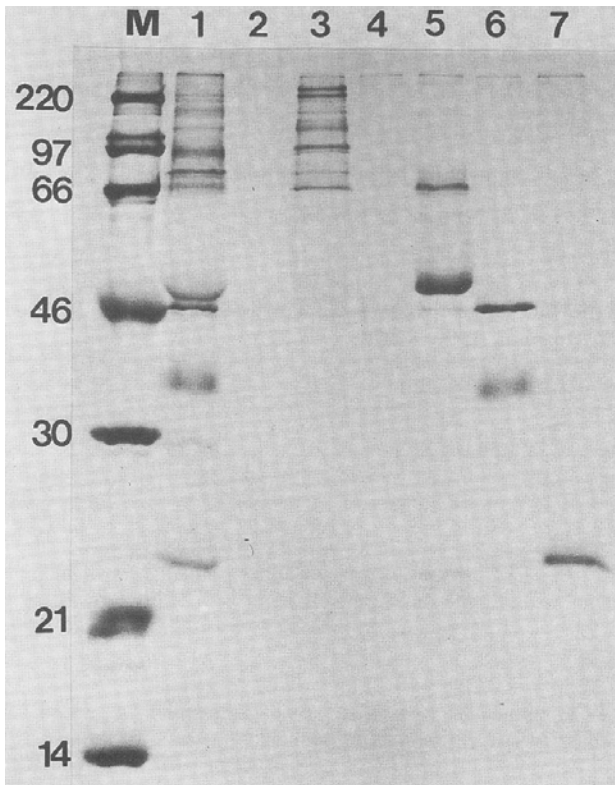
### 3. 방사 면역 침전법을 이용한 단클론 항체의 결합 단백질의 확인

[<sup>35</sup>S]-methionine으로 방사능 표식한 RSV 단백으로 방사 면역 침전법을 시행한 결과 단클론 항체 12종은 분자량 41 kDa와 47 kDa의 두 가지 단백을(immunoblotting에서 41 kDa의 단백질과 반응한 6종 포함), 7종은 24 kDa 단백질(immunoblotting에서 27 kDa와 반응한 4종 포함) 침전되었다. 이 단클론 항체중 일부는 immunoblotting에서 27 kDa의 단백질과 반응하였다. 단클론 항체 10종은 70 kDa, 50 kDa, 22 kDa의 3가지 단백질 침전되어 F 단백질과 반응함을 확인

하였고 이들은 immunoblotting상 모두 결합 단백을 확인할 수 없었다(Figure 2). [<sup>3</sup>H]-glucosamine으로 방사능 표식 세포 용해액으로 침전시 단클론 항체 3종이 89 kDa의 당단백과 결합하는 것이 확인되었다(Figure 3). 전체 40종의 단클론 항체 중 immunoblotting으로 반응 단백을 확인할 수 없었던 25종 중 19종은 방사 면역 침전법으로 반응 단백을 확인할 수 있었으며, 나머지 6종은 반응 단백을 확인할 수 없었다. 결합 단백질 확인되지 않은 6종의 단클론 항체는 이후의 분석에서 제외하였다. Immunoblotting으로 결합 단백을 확인할 수 없었던 15종 중 89 kDa의 단백질과 반응한 단클론 항체 5종 중 2종은 방사 면역 검사상 음성이었다. 방사 면역 침전법으로 41 kDa와 47 kDa의 두 가지 단백을 침전시켰던 12종 중 6종은 immunoblotting 결과 41 kDa의 단백질과만 반응하였다.



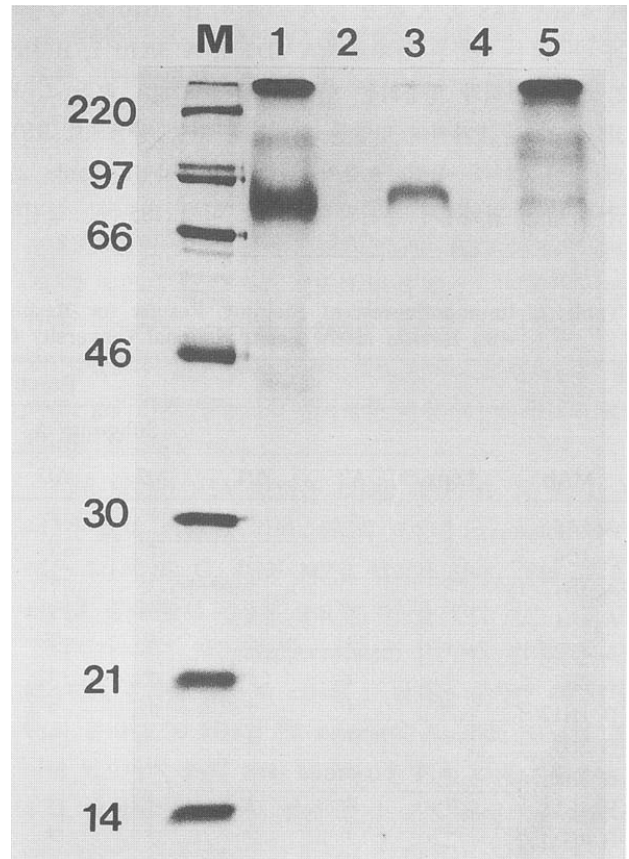
**Figure 1.** Immunoblotting patterns of respiratory syncytial virus (RSV) proteins reacted with monoclonal antibodies (MAbs): M, marker protein; lane 1, RSV by polyclonal serum; lane 2, RSV by control antibody (antithymocyte antibody); lane 3, RSV by MAb A 1B12 1; lane 4, RSV by MAb A 1A11 1; lane 5, RSV by MAb A 3A10 1; lane 6, HEp-2 cell by MAb A 1B12 1.



**Figure 2.** Radioimmunoprecipitation (RIP) of [ $^{35}$ S]methionine-labeled respiratory syncytial virus(RSV) proteins with monoclonal antibodies (MAbs): RSV-infected HEP-2 cells were pulse-labeled for 2 hours. M, marker protein; lane 1, RSV infected cell lysate by polyclonal serum; lane 2, RSV by control antibody (antithymocyte antibody); lane 3, uninfected HEP-2 cell lysate by polyclonal serum; lane 4, RSV uninfected cell lysate by MAb A 1B12 1; lane 5, RSV by MAb A 2E4 4; lane 6, RSV by MAb A 1B12 1; lane 7, RSV by MAb A 1A11 1.

#### 4. 국내에서 분리된 RSV의 아형의 분포 및 아형 내에서 항원성의 변이 관찰

34종의 단클론 항체로써 임상 검체 분리주와 RSV 면역주(A2, 93-418)를 간접 면역형광 염색하였다. 이들을 A 아형, B 아형 모두와 반응하는 항체, A 아형과만 반응하는 항체, B 아형과만 반응하는 항체로 분류하였다(Table 2). VP27, VP70, VGP89 등에서 바이러스에 따라 항원성의 변이가 있음이 확인되었다. VP41 단백질과 반응하는 단클론 항체 12종은 모든 RSV 분리주와 반응하였다. VP24 단백질과 반응하는 7종 중 3종은 모든 RSV와 반응하고 4종은 바이러스에 따라 반응 양상이 달랐다. VP70 단백질과 반응하는 10종 중 5종은 모든 RSV와 반응하였고 5종은 바이러스에 따라 반응 양상이 다양하였다. VGP89와 반응하는 5종 중 3종은 A 아형과 반응하고 B 아형과는 반응하지 않았고, 1종은 모든 B 아형과만 반응하였고, 1종은 B 아형의 일부와 반응하였다. 따라



**Figure 3.** Radioimmunoprecipitation (RIP) of [ $^3$ H]glucosamine-labeled respiratory syncytial virus(RSV) proteins with monoclonal antibodies (MAbs): M, marker protein; lane 1, RSV infected cell lysate; lane 2, RSV by control antibody (antithymocyte antibody); lane 3, RSV by MAb A 3A10 1; lane 4, uninfected HEP-2 cell lysate by MAb A 3A10 1; lane 5, uninfected HEP-2 cell lysate.

서 A 아형, B 아형 모두 반응하는 단클론 항체는 20종, 모든 A 아형과만 반응하는 단클론 항체는 1종, 모든 B 아형과만 반응하는 단클론 항체는 5종이었으며, A 아형의 일부만 반응하는 단클론 항체는 6종, B 아형의 일부와 반응하는 단클론 항체는 1종, A아형과 B 아형의 일부와 반응하는 단클론 항체는 1종이었다.

1990년부터 1998년까지 서울대학교 어린이병원에 내원한 하기도 감염 환자의 비흡인물 검체에서 배양 검사 또는 간접 면역형광 검사로 RSV로 확인된 것은 400례 있었고(Table 3), 이들 중 바이러스가 배양되어 냉동 보관 중 다시 녹여 배양이 가능했던 242주를 단클론 항체 34종과의 반응양상에 따라 RSV A 아형주를 항원형 A/1, A/2, A/3, A/4, A/5 및 A/6으로, B 아형주를 항원형 B/1 그리고 B/2로의 분류가 가능하였다(Table 2). 34종의 단클론 항체 중 같은 반응 양상을 보이는 단클론을 제외하면, F단백과 반응하는 단클론 항

체 4개(A 1A8 9, A 4C9 1, A 2E4 4, B 3B10 6), G단백과 반응하는 단클론 항체 3개(A 4D7 1, A 3A10 1, B 3E9 2) 및 M단백과 반응하는 단클론 항체 2개(A 4C9 1, B 3H12 3) 등 9가지의 단클론 항체와의 반응 양상으로 RSV의 확인 및 각 항원형으로의 분류가 가능하였다(Table 2). 국내 임상 검체에서 분리된 RSV A 아형 185주중 항원형

A/1 169주, A/2 3주, A/3 9주, A/4 2주, A/5 1주, A/6 1주  
로 항원형 A/1이 대부분을 차지하였으며, RSV B야형 57주  
중 항원형 B/1이 22주, B/2가 35주이었다(Table 4).

국내 임상 검체에서 분리된 RSV A 아형주 중 A 아형의 표준주인 Long주의 가접 면역형광 검사와 같은 양상을 보이는 항원형 A/3이었으며, RSV B 아형주 중 B 아형의 표준

**Table 2. Immunofluorescent Staining Results for Respiratory Syncytial Virus Monoclonal Antibodies (MAbs) Reacted with Isolates at the Seoul National University Children's Hospital, 1990~1998**

[illegible]

**Table 3. Respiratory Syncytial Virus Subgroup A and B Isolates at the Seoul National University Children's Hospital, 1990~1998**

Epidemic year	Total No. of RSV-positive samples*	No.(%) of isolates		
		Total No. examined	Subgroup A	Subgroup B
1990~91	58	44	23 ( 52)	21 ( 48)
1991~92	53	37	37 (100)	0
1992~93	74	45	42 ( 93)	3 ( 7)
1993~94	37	11	0	11 (100)
1994~95	63	43	32 ( 74)	11 ( 26)
1995~96	30	26	24 ( 92)	2 ( 8)
1996~97	24	20	13 ( 65)	7 ( 35)
1997~98	61	41	29 ( 71)	12 ( 29)
Total	400	267	200 ( 75)	67 ( 25)

\*Includes all the samples positive for RSV in nasal aspirates either by immunofluorescent staining or culture using HEp-2 cell monolayer.

**Table 4. Subgroups and Antigenic Variants of RSV Isolates at the Seoul National University Children's Hospital, 1990~1998**

Epidemic year	No. of isolates								
	Total	Subgroup A						Subgroup B	
		A/1	A/2	A/3	A/4	A/5	A/6	B/1	B/2
1990~91	36	21	1	0	0	0	0	4	10
1991~92	34	28	0	6	0	0	0	0	0
1992~93	31	27	1	2	0	0	0	1	0
1993~94	11	0	0	0	0	0	0	11	0
1994~95	42	30	0	0	2	0	0	4	6
1995~96	26	23	0	0	0	1	0	0	2
1996~97	21	12	1	0	0	0	1	0	7
1997~98	41	28	0	1	0	0	0	2	10
Total	242	169	3	9	2	1	1	22	35

주인 CH18537주의 간접 면역형광 검사와 같은 양상을 보이는 항원형 B/2이었다.

1990~1998년 동안 매년 RSV의 유행이 관찰되어 총 8회의 RSV 유행이 있었던 바, 1990/91, 1992/93, 1994/95, 1995/96, 1996/97, 1997/98년에는 A 아형이 주를 이루었고, 1991/92년에는 A 아형만 분리되었으며 1993/94년에는 B 아형만 분리되었다(Table 3). 같은 유행 시기에 A, B 아형이 동시에 분리될 수 있고, 최대 4가지 항원형의 바이러스가 분리되었다(Table 4, Figure 4). 8번의 유행 시기 중 7번의 유행 시기에서 A 아형이 분리되었고, 특히 항원형 A/1이 주로 분리되었다. B 아형은 8번의 유행 시기에서 7번 유행 시기

에 분리되었고, B/1과 B/2 항원형의 상대적인 분리 빈도는 유행 시기에 따라 다양하였다.

## 고찰

RSV의 바이러스 단백질에 대한 연구는 RSV가 조직 배양에서 잘 자라지 않고 숙주 세포의 단백질 합성의 억제가 어렵고, RSV virion의 다양성과 불안정성 등으로 그 연구에 어려움이 있었으나 방사 면역 침전법으로 바이러스 단백질을 증명하고, gel 전기 영동으로 분자량을 측정하여 6~9개의 RSV 단백질이 보고되어 있다.

이미 알려진 RSV 단백질은 7가지, 즉 F, G, N, P, L, M, M2가 있고, 이들 중 감염 세포의 표면에 expression되는 단백질은 4가지, F, G, SH와 M2로 알려져 있다. F와 G 표면 단백질은 중화 항체 생성에 중요한 역할을 한다.

당화가 되지 않은(unglycosylated) F 단백질 분자량은 63.5 kDa이며 분자량 60~70 kDa의 F 단백질은 분자량 48 kDa인 F1과 분자량 20 kDa인 F2 subunit이 disulfide bond로 결합되어 있으며<sup>12)</sup>, F<sub>2</sub>의 NH<sub>2</sub> terminal은 F<sub>1</sub>에 비해 친수성이 강하다. Virion assembly 전에 감염 세포 내에서 proteolytic cleavage에 의해 disulfide-linked F1과 F2로 나뉜다. F 단백질은 세포 매개성 면역과 체액 면역 모두에 관여하는 가장 중요한 protective antigen이다. F 단백질에 대한 단클론 항체는 RSV에 의한 세포 융합을 억제하는 것으로 보고되었다<sup>13)</sup>. 또 F 단백질에 대한 단클론 항체는 in vitro에서 RSV의 중화 작용이 관찰되었다<sup>14)</sup>. 여러 연구에서 밝혀진 바 중화와 융합 억제 작용이 가장 강한 neutralizing epitope는 F 단백질의 48 kDa F1 subunit에 있다<sup>15)</sup>. 오스트레일리아, 유럽과 미국의 여러 지역에서 30년에 걸쳐 분리된 RSV 23주의 neutralization epitope가 16개 중 8개가 보존되어 있음이 관찰되어 F 단백질은 비교적 안정된 단백질임이 확인되었다<sup>16)</sup>.

가장 큰 당단백(G 단백질)의 protein moiety 분자량은 32.6 kDa로 적은데 비해 완전한 당단백으로 당화되었을(glycosylation) 때는 분자량이 84~90 kDa로 carbohydrate content가 풍부하다<sup>17)</sup>. 두 아형 모두 RSV를 HEp-2 세포에 감염시켰을 때 G 단백질의 잘려진 일부 즉 soluble G단백이라고 하는 Gs의 많은 양이 배양 배지에서 관찰되었다<sup>18)</sup>. F 단백질과 다르게 G 단백질에 대한 단클론 항체의 일부만이 중화 항체로 작용한다<sup>19, 20)</sup>.

Wunner 등<sup>21)</sup>은 RSV envelope의 dissociation 연구 결과 정제된 바이러스에서 분자량 48 kDa와 42 kDa의 당단백과 분자량 28 kDa의 paramyxovirus의 M단백에 해당하는 단백질

**Figure 4.** Temporal distribution of total, subgroup A, subgroup B and antigenic variants of RSV at the Seoul National University Children's Hospital 1990~98. A total of 400 RSV infections was identified and 185 subgroup A and 57 subgroup B RSV isolates were further classified into antigenic variants by reactivity with monoclonal antibodies raised against RSV subgroups A and B.

을 보고하였다. Peeples 등<sup>22)</sup>은 정제된 바이러스에서 SDS-10% polyacrylamide gel로 분석한 결과 분자량 79 kDa와 42 kDa의 주요 당단백과 분자량 22 kDa의 당단백을 보고하였다.

본 연구에서 개발된 단클론 항체는 41 kDa, 27 kDa, 70 kDa와 89 kDa 단백질과 결합함을 확인하였다. [<sup>35</sup>S]-methionine으로 방사능 표식한 RSV 단백질으로는 G 단백질(VGP89)에 대한 단클론 항체를 확인 할 수 없었다. 이것은 이미 알려진 바로 G 단백질에는 methionine residue가 2개밖에 없기 때문이다<sup>23)</sup>. G 단백질은 glycosylation이 많이 되어 있으며 배양시 사용된 세포의 종류에 따라 glycosylation이 다르게 되어 G 단백질의 크기가 다를 수 있다. 분자량 70 kDa의 융합 단백질은 2-mercaptoethanol의 처리로 F<sub>1</sub>과 F<sub>2</sub>의 두개의 subunit으로 분리되는 것이 관찰되었다. Nucleoprotein으로 생각되는 41 kDa 단백질과 반응하는 단클론 항체는 방사 면역 침전법을 시행한 결과 41 kDa와 47 kDa의 두 가지 단백을 침전시켰다. 이는 방사 면역 침전법시 두 가지 단백질이 complex를 이루어 동시에 침전된 것으로 생각된다. 다른 연구에서도 M 단백질, P 단백질 또는 F 단백질에 대한 단클론 항체가 nucleoprotein을 동시에 침전시킨 것을 관찰하였다<sup>19)</sup>.

RSV F 단백질의 protective epitope은 비교적 안정되어 있는 것에 비해 분리된 RSV의 교차 중화 검사에서 RSV 항원

성의 다양성이 처음 관찰되었다<sup>24)</sup>. 최근에는 단클론 항체의 개발로 인해 RSV의 항원성이 연구되었다. Anderson 등<sup>5)</sup>이 2개의 아형이 있음을 관찰하였으며, Mufson 등<sup>25)</sup>은 A 아형과 B 아형으로 분류하였고 이 두 아형의 항원성의 차이는 G 단백질과 관련되어 있음을 관찰하였다. 그러나 이 후 두 아형의 F<sub>1</sub> subunit과 P 단백질의 차이가 관찰되었다<sup>26)</sup>. A 아형과 B 아형의 F 단백질은 항원성이 50%가 연관되어 있고 아미노산은 89%가 일치하나, G 단백질은 항원성이 1~5%만 연관되어 있고 아미노산은 53%만 일치한다<sup>3, 27)</sup>. 본 연구에서도 간접 면역형광 검사 결과 F 단백질에 대한 단클론 항체 10종 중 5종은 A, B 아형 모두와 반응하고 5종은 A 아형 또는 B 아형과만 반응하였다. 그러나 G 단백질에 대한 단클론 항체 5종 중 A, B 아형 모두 반응하는 단클론 항체는 없어 G 단백질은 두 아형간에 항원의 유사성이 적다는 것을 알 수 있었다.

RSV A 아형과 B 아형은 두 가지 모두 유행할 수 있으나 시기와 장소에 따라 상대적 빈도가 다르다<sup>5, 28-32)</sup>. 미국 Rochester에서 과거 15년간(1975~1990) 냉동 보관중이던 RSV를 검사한 결과<sup>3)</sup>, A 아형이 71%, B 아형이 29%이었으며, 3가지 유행 양상이 관찰되었는데, 첫째는 A 아형이 절대적으로 우세한 양상(A 아형이 83~100%)으로 9년간 이런 양상을 보였다. 둘째는 A 아형과 B 아형이 동등한 비율로



분포하는 양상으로 4년간 이런 양상을 보였다. 셋째는 B 아형이 절대적으로 우세한 양상(B 아형이 75~85%)으로 10년간격으로 2번 이러한 경우가 있었다. 본 연구에서는 1990~1998년 동안 8회의 RSV 유행이 있었으며, 1회는 A 아형만이 관찰되었고, 6회는 A 아형이 우세하였고, 나머지 1회는 B 아형만 관찰되었다. 미국 Huntington에서 보고된<sup>6)</sup> 바에 의하면 1981년부터 1986년까지 5년 동안 A 아형과 B 아형이 매년 분리되었으나, 전체적으로 A 아형이 75.8%를 차지하였고, 5년 중 4년간은 A 아형이 우세하였으며 1984~1985년 기간에만 B 아형이 우세하였다고 한다. 미국 Boston에서 보고된 바에 의하면<sup>7)</sup>, 1981년부터 1987년까지 A 아형이 60%, B 아형이 39%이었고, 6년 중 3년은 A 아형이 우세하였고, 2년은 두 아형이 고루 분포하였으며, 1년은 B 아형이 우세하였다고 한다. Tsutsumi 등<sup>32)</sup>이 일본에서 1980년부터 1987년까지의 검체를 대상으로 한 연구에서는 A 아형이 53.5%, B 아형이 45.1%이었고, 검체가 소실된 두 해를 제외한 5년 중 3년간은 B 아형이 우세하였고, 2년간은 A 아형이 우세하였다. 이와 같이 같은 유행 시기일지라도 서로 다른 지역에서는 서로 다른 유행 양상을 보임을 알 수 있고, 이것은 Hall 등<sup>3)</sup> 및 Hendry 등<sup>7)</sup>의 보고와도 일치한다. 이와 같이 지역에 따라 유행하는 아형의 분포에 차이가 있기 때문에 각 지방에서의 유행하는 아형의 양상에 따라 향후 개발되는 백신의 성분에 중점을 두어야 할 아형에 차이가 있을 수 있다. 따라서 백신 개발 등을 위해서는 우리 나라에서도 장기간에 걸쳐 유행 양상이 파악되어야 할 것이다.

각 아형 내에서도 항원성의 변이를 보여 단클론 항체와의 반응 양상에 따라 A 아형은 6가지, B 아형은 2가지 항원형으로 분류되었으며, 본 연구에서 확인된 항원성의 변이를 보이는 바이러스 단백질은 VP27, F 그리고 G 단백질이었다. 각 아형 중에서도 항원형에 따른 유행 양상을 살펴보면 같은 유행 시기에 2~4가지의 항원형이 동시에 분리되었으며, 항원형 A/1, B/1 그리고 B/2는 3년 이상 지속적으로 분리되었다. 이것은 이러한 다양한 항원형이 일시적인 항원성의 변이에 의한 것이 아니고 A아형, B아형 뿐 아니라 각각 다른 항원형이 독립적으로 존재한다는 것을 시사하고 있다. 본 연구 기간 중 8회 중 7회의 유행 시기에서 항원형 A/1이 우세하였다. Tsutsumi 등<sup>32)</sup>이 일본에서 1980년부터 1987년까지의 검체를 대상으로 한 연구에서는 한가지 아형이 유행되면 이에 대한 집단 면역(herd immunity)이 생겨 다음 유행에는 다른 아형의 유행이 보고되었다. 그러나 본 연구에서는 한가지 항원형이 지속적으로 우세하였다. 이는 이 항원형에 대한 면역 즉 중화 항체가 잘 생기지 않는 것에 기인하거나 이 항

원형의 유전적 안정성(genetic stability)에 기인할 수 있으나, 본 연구에서 개발된 단클론 항체가 한정적이기 때문에 변화하는 epitope를 충분히 인지하지 못하는 데에 기인할 수도 있다.

아직 RSV 단백질의 epitope이 몇 개인지, in vitro 중화에 어떤 epitope이 관여하는지 알려진 바가 없으며 본 연구에서 사용한 방법으로 정확한 epitope의 위치를 밝힐 수가 없었다. 또한 각 아형간의 항원성이 얼마나 차이가 나는지 정확히 알 수가 없었다. 최근 분자 생물 기법의 발달로 viral mRNA로부터 RSV cDNA cloning, cloned RSV cDNA의 염기 서열 분석을 통해 유전적 변이성(genetic variation)이 연구 중인 바, 이를 통해 각 아형간의 항원성의 차이와 생물 유전학적 측면에서의 관련성에 대해 앞으로 더 활발한 연구가 진행되어야 할 것이다. 또한 이러한 항원성의 차이가 임상적, 역학적으로 어떠한 의미가 있는지 앞으로 더 연구되어야 할 것이다.

## 요 약

**목 적 :** RSV A, B 아형에 대한 단클론 항체를 개발하여 우리나라에서 분리되는 RSV주의 항원성 변이를 관찰하였다.

**방 법 :** BALB/c 마우스에서 생산된 A 아형 표준주인 A2주에 대한 단클론 항체 15종과 국내 분리주인 B 아형 93-418에 대한 단클론 항체 19종 등 총 34종 단클론 항체의 결합 단백을 immunoblotting과 방사 면역 침전법으로 확인하였다. 1990년부터 1998년까지 분리된 바이러스 242주를 개발한 단클론 항체로써 간접 면역형광 염색하여 반응 양상을 관찰하여 A, B 아형으로 분류하고 각 아형 내에서의 항원성 변이를 관찰하였다.

**결 과 :** 12종은 분자량 41 kDa의 nucleoprotein(VP41)과, 7종은 분자량 27 kDa(VP27)의 M 단백질과, 10종은 분자량 70 kDa의 F 단백질(VP70)과, 그리고 5종은 분자량 89 kDa의 당단백(VGP89)과 반응하였다. 1990년부터 1998년까지 분리된 RSV 242주를 개발한 단클론 항체로써 간접 면역형광 염색하여 A, B 아형으로 분류하고, 각 아형 내에서의 항원성 변이를 관찰하였다. 바이러스주 간의 항원성의 변이는 VP27, VP70과 VGP89 단백질에서 관찰되었다. 90/91년에는 A 아형에 이어 B 아형이 유행하였고, 92/93년, 94/95년, 95/96년, 96/97년과 97/98년에는 A 아형이 대부분이었으며, 91/92년에는 A 아형만이, 93/94년에는 B 아형만이 유행하였다. A, B 각 아형은 9종의 단클론 항체와의 반응 양상에 따라 각각 A/1, A/2, A/3 A/4, A/5 및 A/6의 6종의 항원형과 B/1,

B/2의 2종의 항원형으로 분류할 수 있었으며, 항원형 결정이 시행된 242주 중 A/1 169주, A/2 3주, A/3 9주, A/4 2주, A/5 1주, A/6 1주, B/1 22주 그리고 B/2 35주이었다. 같은 유행 시기에도 A, B 아형이 동시에 분리되고 최대 4가지 항원형의 바이러스가 분리되었다. A 아형 유행 시기에는 항원형 A/1이 대부분이었으며, B 아형 유행 시기에 B/1, B/2 항원형의 상대적 분리 빈도는 유행 시기에 따라 다양하였다.

**결론** : 이상의 결과에서 우리나라에서 분리되는 RSV의 단클론 항체와의 반응 양상에 따른 아형의 분포는 A 아형은 6종의 항원형 중 A/1형이 주를 이루고, B아형은 B/1과 B/2의 항원형은 유행시기에 따라 다르게 분리되는 것을 알 수 있었다. 이러한 항원성의 변이는 향후 RSV 감염증의 진단 시약 및 백신 개발에 고려되어야 하리라 생각된다.

#### 감사의 글

본 연구는 보건복지부 1996년도 보건의료기술개발사업(번호 HMP-96-M-1-1061)의 일부 지원으로 이루어 졌음.

#### 참 고 문 헌

- Glezen WP, Denny FW : *Epidemiology of acute lower respiratory tract disease in children*. N Engl J Med 288: 498-505, 1973
- Yun BY, Kim MR, Park JY, Choi EH, Lee HJ, Yun CK : *Viral etiology and epidemiology of acute lower respiratory tract infection in Korean children*. Pediatr Infect Dis J 14:1054-1059, 1995
- Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW : *The occurrence of group A and B respiratory syncytial virus over 15 years: the associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children*. J Infect Dis 162:1283-1290, 1990
- McConnochie KM, Hall CB, Walsh EE, Roghmann KJ : *Variation in severity of respiratory syncytial virus with subtype*. J Pediatr 117:52-62, 1990
- Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Fernie BF : *Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies*. J Infect Dis 151:626-632, 1985
- Mufson MA, Belshe RB, Orvell C, Norrby E : *Respiratory syncytial virus epidemic: variable dominance of subgroup A and B strains among children, 1981-1986*. J Infect Dis 157:143-148, 1988
- Hendry RM, Pierik LT, McIntosh K : *Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups over six consecutive outbreaks : 1981-1987*. J Infect Dis 160:185-190, 1989
- Köhler G, Milstein C : *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature 256:495-497, 1975
- Littlefield JW : *Selection of hybrids from mating of fibroblast in vitro and their presumed recombinants*. Science 145:709-710, 1964
- Mckearn TJ : *Cloning of hybridoma cells by limiting dilution in fluid phase*. In monoclonal antibodies-hybridoma : A new dimension in biological analysis 1st ed, P374, New York, Plenum Press, 1980
- Orvell C, Norrby E : *Immunological relationships between homologous structural polypeptides of measles and canine distemper virus*. J Gen Virol 50:231-245, 1980
- Fernie BF, Gerin JL : *Immunochemical identification of viral and nonviral proteins of the respiratory syncytial virus virion*. Infect Immunol 37:243-249, 1982
- Walsh EE, Schlesinger JJ, Brandriss MW : *Protection from respiratory syncytial virus infection in cotton rats by passive transfer of monoclonal antibodies*. Infect Immunol 43:756-758, 1984
- Fernie BF, Cote PJ, Gerin JL : *Classification of hybridoma to respiratory syncytial virus glycoproteins*. Proc Soc Exp Biol Med 171:266-271, 1982
- Trudel M, Nadon F, Seguin C, Dionne G, Lacroix M : *Identification of a synthetic peptide as part of a major neutralization epitope of respiratory syncytial virus*. J Gen Virol 68:2273-2280, 1987
- Beeler JA, Coelingh K : *Neutralization epitopes of respiratory syncytial virus: effect of mutation upon fusion function*. J Virol 63:2941-2950, 1989
- Wertz GW, Collins PL, Huang Y, Gruber C, Levine S, Ball LA : *Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein*. Proc Natl Acad Sci USA 82:4075-4079, 1985
- Hendricks DA, Baradaran K, McIntosh K, Patterson JL : *Appearance of soluble form of the G protein of respiratory syncytial virus in fluids of infected cells*. J Gen Virol 68:1705-1714, 1987
- Orvell C, Norrby E, Mufson MA : *Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against five structural components of human respiratory syncytial virus subgroup B*. J Gen Virol 68:3215-3235, 1987
- Walsh EE, Hall CB, Breselli MW, Brandriss MW, Schlesinger JJ : *Immunization with glycoprotein subunits of respiratory syncytial virus to protect cotton rats against viral infection*. J Infect Dis 155:1198-1204, 1987

- 21) Wunner WH, Pringle CR: *Respiratory syncytial virus proteins*. *Virology* 73:228-243, 1976
- 22) Peeples M, Levine S: *Respiratory syncytial virus polypeptide: their location in the virion*. *Virology* 95:137-145, 1979
- 23) Satake M, Coligan JE, Elango N, Norrby E, Venkatesan S: *Respiratory syncytial virus envelope glycoprotein(G) has a novel structure*. *Nucleic Acids Research* 13:7795-7812, 1985
- 24) Coates HV, Alling DW, Chanock RM: *Antigenic difference between two strains of respiratory syncytial virus*. *Proc Soc Exp Biol Med* 112:958-964, 1963
- 25) Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E: *Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus*. *J Gen Virol* 66:2111-2124, 1985
- 26) Norrby E, Mufson MA, Sheshberadaran H: *Structural differences between subtype A and B strains of respiratory syncytial virus*. *J Gen Virol* 67:2721-2729, 1986
- 27) Johnson PR, Olmsted RA, Prince GA, Murphy BR, Alling DW, Walsh EE *et al.*: *Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroup A and B: evaluation of the contribution of F and G glycoproteins to immunity*. *J Virol* 61:3163-3166, 1987
- 28) Akerlind B, Norrby B: *Occurrence of respiratory syncytial virus subtypes A and B strains in Sweden*. *J Med Virol* 19:241-247, 1986
- 29) Gimenez HB, Hardman N, Keir HM, Cash P: *Antigenic variation between human respiratory syncytial virus isolates*. *J Gen Virol* 67:863-870, 1986
- 30) Hendry RM, Talis AL, Godfrey E, Anderson LJ, Fernie BF, McIntosh K: *Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks*. *J Infect Dis* 153:291-297, 1986
- 31) Storch GA, Park CS: *Monoclonal antibodies demonstrate heterogeneity in the G glycoprotein of prototype strains and clinical isolates of respiratory syncytial virus*. *J Med Virol* 22:345-356, 1987
- 32) Tsutsumi H, Onuma M, Suga K, Honjo T, Chiba Y, Chiba S: *Occurrence of respiratory syncytial virus subgroup A and B strains in Japan, 1980 to 1987*. *J Clin Microbiol* 26:1171-1174, 1988