

인플루엔자 바이러스 백신의
면역 상관성 평가를 위한
효소면역측정법 개발

연세대학교 대학원

의 과 학 과

박 은 선

인플루엔자 바이러스 백신의
면역 상관성 평가를 위한
효소면역측정법 개발

지도교수 이 재 면

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2013년 12월

연세대학교 대학원

의 과 학 과

박 은 선

박은선의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 이 재 면 인

심사위원 김 정 기 인

심사위원 용 동 은 인

연세대학교 대학원

2013년 12월

감사의 글

저의 졸업 논문이 나오기까지 많은 분들의 도움을 받았습니다. 그분들의 도움이 없었다면 힘든 시간들을 잘 견뎌내지 못했을 것 같다는 생각이 듭니다.

무엇보다도 항상 열린 마음으로 저의 의견을 들어주시고 격려해 주신 이재면 교수님께 감사의 마음을 전합니다. 그리고 면역학에 재미를 느끼고 과학 하는 자세를 일깨워주신 박전한 교수님, 연구실 생활을 처음 시작할 때 아낌없는 조언과 도움을 주신 최인홍 교수님께 감사 드립니다. 저의 부족한 부분을 세심하게 지적해주시고 조언해주신 김정기 교수님, 그리고 제가 미처 생각해보지 못했던 새로운 관점을 제시해주시고 관심 가져주신 용동은 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

이 외에도 오랜 시간 연구실 생활을 함께 하며 도움을 주셨던 이현규 선생님, 권승현 선생님, 박광환 선생님,

심두희 선생님, 김승엽 선생님께도 감사 드리고,
동료로서 많은 추억들을 함께 만들었던 혜미와
경주에게도 고마운 마음을 전합니다.

마지막으로, 저를 아낌없이 사랑해주시고 도와주신
할아버님, 할머니님, 아버님, 어머님께도 감사 드리고, 은영
언니, 남편 건우, 아들 도욱이, 그리고 곧 세상에 나올
딸에게 이 논문을 바칩니다.

박은선 드림

차 례

국문요약.....	1
I. 서론.....	4
II. 재료 및 방법	9
1. 유전자 클로닝	9
2. 바이러스 배양, 발현 및 정제	9
3. 단백질 발현의 확인	10
4. 효소면역측정법	11
5. 혈구응집억제 측정법	12
6. 미세중화 분석법	13
7. 동물실험	14
III. 결과	16

1. 인플루엔자 바이러스 H1N1의 재조합 HA1 단백을 이용한 효소면역측정법 시험관의 개발	16
2. 동물모델을 이용한 면역 상관성 평가 및 검증	24
IV. 고찰.....	30
V. 결론	38
참고문헌.....	40
영문요약.....	47

그림 차례

- 그림 1. 인플루엔자 바이러스 A/New York/3561/2009 (H1N1)의 헤마글루티닌 유전자 정보17
- 그림 2. 바쿨로바이러스 시스템에서 생산한 HA1 단백질의 발현 확인.....18
- 그림 3. *E. coli* 및 바쿨로바이러스 시스템에서 발현시킨 재조합 HA1 단백을 이용한 항체 역가 측정....19
- 그림 4. 혈청의 희석 배수에 따른 항체의 검출 정도 측정..... 20
- 그림 5. 표본시료를 이용한 효소면역측정법의 민감도 및 특이도 측정21
- 그림 6. 대유행 인플루엔자 H1N1 환자 시료를 이용한 효소면역측정법 검사.....22
- 그림 7. 마우스 및 사람의 표준 항혈청세트를 이용한 인플루엔자 H1N1의 항체 역가 측정23

그림 8. 마우스 공격 실험을 통한 항체 역가 측정 및 이의 기능 평가.....	26
그림 9. 정량적인 면역학적 상관관계 확인	29

국문요약

인플루엔자 바이러스 백신의 면역 상관성 평가를 위한

효소면역측정법 개발

인플루엔자는 인플루엔자 바이러스에 의해서 발병되는 급성 감염성 질병으로 높은 전염성을 가지며 매년 세계적 규모의 유행을 일으킨다. 인플루엔자는 현존하는 주요한 공중 보건 문제 중의 하나로 이로 인한 사회 경제적 손실이 매우 크다.

인플루엔자 바이러스는 항원 변이를 통해 크고 작은 유행을 초래하는데 항원 변이의 정도에 따라 계절형 유행과 대유행이 있으며, 2009년 4월 멕시코에서 시작하여 전 세계적으로 유행한 바 있는 신종 인플루엔자 바이러스는 유전자 재편성으로 항원 대변이가 일어나 새로운 바이러스가 만들어진 것이다.

자연감염이나 백신접종을 통하여 얻어진 특정 인플루엔자 바이러스에 대한 항체는 다른 형이나 아형의 바이러스에 대한 교차 항체를 형성하지 못할 수 있으며, 한 가지 항원 내의 새로운

변이에 대해서도 충분한 면역원성을 갖지 못할 수 있다. 따라서 안전하고 효과적인 백신의 개발 및 사용은 신종 인플루엔자 바이러스로 인한 피해를 최소화 하는 데 가장 효과적인 방법이 될 수 있다.

인플루엔자 백신의 경우 백신의 효능을 예측할 수 있는 면역학적 지표가 잘 알려져 있는데 일반적으로 인플루엔자 백신 접종 후 형성되는 혈청 내 혈구응집억제(hemagglutination inhibition) 항체 역가로 평가한다.

그러나 혈구응집억제 측정법은 시간과 노동력이 많이 들고 자동화가 어려워 큰 규모의 실험을 진행하는 데 있어 어려움이 있기 때문에, 최근에는 한 번에 대량의 샘플을 처리할 수 있어 실험실에서의 노동력이 적게 들고 측정에 대한 민감도가 높은 장점을 가진 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

본 연구에서는 인플루엔자 바이러스 재조합 단백을 이용한 효소면역측정법 기술을 개발하였고, 인플루엔자 바이러스 백신에 대한 면역 상관성을 보이는 적절한 항체 역가를 설정하여 동물모델을 통해 이를 검증하였다. 이를 통해 인플루엔자 백신 접종 후 일어나는 면역반응과 인플루엔자 감염에 대한 백신의

보호효과의 관계 설정에 이를 지표로 사용하고자 하였다.

핵심 되는 말: 인플루엔자 바이러스, 면역학적 지표,
효소면역측정법, 항체 역가

인플루엔자 바이러스 백신의 면역 상관성 평가를 위한 효소면역측정법 개발

<지도교수 이재면>

연세대학교 의과학과

박은선

I. 서론

인플루엔자 바이러스(influenza virus)는 *Orthomyxoviridae* 과(family)에 속하며, 핵산단백질(nucleocapsid protein, NP)과 기질단백질(matrix protein, MP)의 항원 특이성에 따라 A, B, C 형으로 분류되고, 이 중에서 A, B 형이 주로 사람에게 질병을 유발한다.

인플루엔자 바이러스는 표면항원인 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA)과 뉴라미니다제(neuraminidase, NA) 단백질의 항원성 차이에 따라 다양한 아형(subtype)으로 분류되고 헤마글루티닌은 17개, 뉴라미니다제는 10개의 아형이 존재한다고 보고되고 있다^{1,2}.

인플루엔자(Influenza, 독감)는 인플루엔자 바이러스에 의해서 발병되는 급성 감염성 질병으로, 인플루엔자 바이러스에 감염되면 발열, 인두통, 마른 기침 등의 호흡기 증상과 함께 근육통, 두통, 쇠약감, 식욕부진 등의 전신 증상이 나타날 수 있다. 또한 인플루엔자는 높은 전염성을 가지며 매년 세계적 규모의 유행을 일으켜 단시간에 많은 환자를 발생시킬 수 있다. 인플루엔자 바이러스에 감염된 후 대부분의 경우는 수 일간 앓고 회복되나 노약자나 만성 질환자들에게서는 중이염, 부비동염, 천식지속증, 모세기관지염 및 폐렴과 같은 합병증을 초래하며 일부는 사망에 이를 수도 있다. 이와 같이 인플루엔자는 현존하는 주요한 공중보건 문제 중의 하나로, 전 세계적으로 매년 약 10억의 인구가 인플루엔자 바이러스에 감염되며 미국에서는 매년 20만 명 이상이 입원하고, 3만 5천명 이상이 인플루엔자로 인해 사망하는 것으로 보고되고 있으며 이로 인한 사회 경제적 손실이 매우 큰 실정이다^{3,4}.

인플루엔자 바이러스는 항원변이를 통해 크고 작은 유행을 초래하는데, 인플루엔자 바이러스의 항원변이의 정도에 따라 계절형 유행(seasonal epidemic)과 대유행(pandemic)으로 나눌 수 있다. 계절형 유행은 항원 소변이(antigenic drift)에 의한 것이며 주로 겨울철에

발생한다⁵. 반면에 대유행을 일으키는 항원 대변이(antigenic shift)는 유전자 재편성(gene reassortment) 과정을 통해 일어난다⁶. 2009년 4월 중순 이후 멕시코에서 시작하여 전 세계적으로 유행한 바 있는 신종 인플루엔자 바이러스 (pandemic influenza H1N1 2009)는 유전자 재편성으로 항원 대변이가 일어나 새로운 인플루엔자 바이러스가 만들어진 것이다⁷⁻¹⁰.

자연감염(natural infection)이나 백신접종(vaccination)을 통하여 얻어진 특정 인플루엔자 바이러스에 대한 항체는 다른 형이나 아형의 인플루엔자 바이러스에 대한 교차 항체(cross protective antibody)를 형성하지 못할 수 있으며, 한 가지 항원 내의 새로운 변이에 대해서도 충분한 면역원성을 나타내지 못할 수 있다. 그렇기 때문에 인플루엔자 바이러스의 잦은 유전자 변이에 따라 항원성이 바뀌므로 근본적인 근절이 어려우며 크고 작은 유행이 반복 된다.

안전하고 효과적인 백신의 개발 및 사용은 신종 인플루엔자 바이러스로 인한 피해를 최소화 하는 데 가장 효과적인 방법으로¹¹, 인플루엔자 백신은 인플루엔자 바이러스의 외피에 발현되는 헤마글루티닌에 대한 항체를 생성하여 바이러스의 세포 내 침입 및 증식을 억제하는 중화항체(neutralizing antibody)를 생성하게 하는 효과를 기대한다¹². 현재 많은 나라에서 유정란에서 키운 인플루엔자 바이러스를 이용한 불활성화 백신 (inactivated vaccine)을 사용하고 있다^{13,14}. 인플루엔자 백신으로 마우스를 면역시킨 후 인플루엔자

바이러스로 공격(virus challenge)하여 생존율로써 백신의 효능 여부 및 항체 역가를 평가한다. 인플루엔자 예방 백신의 효과는 성인의 경우 80-90%을 보이는데¹⁵ 이는 인플루엔자 바이러스의 항원성의 변이에 따른 차이에서 비롯된다.

인플루엔자 백신의 경우 백신의 효능을 예측할 수 있는 면역학적 지표가 잘 알려져 있으므로 면역원성 자료를 통해 백신의 효능을 평가할 수 있다. 백신의 면역원성을 확인하기 위해서는 백신을 접종한 실험동물에서 유발된 체액성 면역(humoral immunity) 및 세포매개 면역(cell-mediated immunity) 등의 적절한 면역반응을 통해 평가하는데, 주로 면역반응의 기능과 관련이 있는 중화항체 역가를 평가한다. 이에 대한 면역원성의 평가 지표로는 항체 방어율(seroprotection rate), 항체 양전율(seroconversion rate) 및 기하 항체증가비(geometric mean titer) 등이 포함된다^{16,17}.

세계보건기구(World Health Organization, WHO)의 Expert Committee on Biological Standardization 에 따르면, 적절한 면역확산법(immunodiffusion)으로 측정된 1ml 또는 1 도스에 포함된 헤마글루티닌의 양으로 인플루엔자 백신의 항체 역가를 표시하도록 권하고 있다. 살아있는 바이러스를 사용하는 경우에는 백신의 항체 역가 지표를 세포 배양 또는 계란에서의 최소 유효 용량(minimum effective dose) 적정 방식으로 측정한다¹⁸.

인플루엔자 바이러스에 대한 보호 항체의 생성여부는 혈구응집억제

측정법 (hemagglutination inhibition assay, HI assay), 미세중화 분석법(microneutralization test) 및 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 통해 측정하며, 현재 표준방법으로 혈구응집억제 측정법을 사용하고 있다. 측정에 사용된 특정한 아형에 대한 혈구응집억제 항체 역가는 감염에 대한 보호 효과를 반영하는데, 인플루엔자 백신접종 후 혈청 내에서 생성되는 혈구응집억제 항체의 역가가 1:32 에서 1:40 인 경우 인플루엔자 감염에 대해 50%의 보호 효과를 가진다고 알려져 있다¹⁹⁻²¹.

그러나 시간과 노동력이 많이 드는 혈구응집억제 측정법은 큰 규모의 실험을 진행하는 데 있어 어려움이 있고, 표준화가 어렵다는 단점이 있다^{22,23}. 따라서 최근에는 한 번에 대량의 샘플을 처리할 수 있으며 실험실에서의 노동력이 적게 들고, 측정에 대한 민감도가 높은 장점을 가진 효소면역측정법에 대한 연구가 많이 진행되고 있다²⁴.

본 연구에서는 인플루엔자 바이러스의 재조합 헤마글루티닌 단백을 이용한 효소면역측정법 기술을 개발하였고, 인플루엔자 바이러스 백신에 대한 면역 상관성을 보이는 적절한 항체 역가를 설정하여 동물모델을 통해 이를 검증하였다. 이를 통해 인플루엔자 백신 접종 후 일어나는 면역반응과 인플루엔자 감염에 대한 백신의 보호효과의 관계 설정에 이를 지표로 사용하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 유전자 클로닝

합성한 인플루엔자 바이러스 A/New York/3561/2009 (H1N1)의 헤마글루티닌 유전자는 5' 말단에 제한효소 BglII, 3' 말단에 제한효소 XbaI 인지서열이 있는 프라이머로 연쇄중합반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통해 증폭하였다. 증폭된 DNA 단편을 해당하는 제한효소로 절단하여 C-말단에 6X His-tag이 있는 *E. coli* 단백질 발현벡터인 pET와 바큘로바이러스(baculovirus) 단백질 발현벡터 pACgp67 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA)에 삽입하였다.

2. 바이러스 배양, 발현 및 정제

완성된 곤충세포 발현벡터를 인산 칼슘법으로 SF9 세포에 형질전환을 시킨 후 (BD BaculoGold™), 생산된 바이러스를 2회 연속 계대 배양하여 바이러스를 얻었다. 그리고 바이러스의 상층액으로 발현 세포에 형질 도입을 실시하고, 3일 동안 진탕배양기에서 (27°C, 115 rpm)

배양한 배양액을 황산암모늄 침전법으로 농축한 후 침전물을 완충액에 녹여 니켈 컬럼을 이용하여 단백질을 정제하였다. 정제된 단백질을 10% 글라이세롤이 포함된 20 mM Tris-HCl pH 8.0으로 투석시킨 후 최소 1 mg/ml 농도로 농축시켰다.

3. 단백질 발현의 확인

단백질의 농도를 BCA protein assay kit (Thermo scientific, USA)으로 정량하여 30 µg의 총 단백질을 SDS-PAGE를 통하여 분리하였다. 그런 다음 쿠마씨블루 염색법 및 은염색법으로 단백질의 발현을 확인하였다. 0.25 g의 Coomassie brilliant blue R250을 염색시약인 10% 아세트산, 45% 메탄올 혼합용액에 녹인 후 덜 녹은 시약을 제거하기 위해 여과지로 거른 다음 단백질을 분리한 SDS-PAGE 젤을 5배 부피에 해당하는 염색시약에 담근 후 염색이 될 때까지 서서히 흔들어 염색을 시켰다. 염색시약을 제거하고 염색시약이 포함되지 않은 10% 아세트산, 45% 메탄올 혼합용액에 젤을 담가 두어 탈색시키고 탈색용액을 여러 차례 갈아주며 단백질의 발현을 확인하였다. 그리고 젤 부피의 5배 되는 양의 10% 아세트산, 30% 메탄올 혼합용액에 젤을 담고 실온에서 12시간 서서히 흔들어주며 젤을 고정 한 다음, 용액을 버리고 5배 부피의 30% 에탄올을

첨가한 후 실온에서 30분 동안 서서히 흔들어 주고 이를 1회 반복하였다. 그런 다음 에탄올을 제거하고 10배 부피의 증류수를 가하여 실온에서 10분 동안 서서히 흔들어주고 이를 1회 반복하였다. 증류수를 제거하고 젤의 5배 부피의 0.1% 질산은 용액을 부은 후 실온에서 30분 동안 서서히 흔들어 준 뒤 질산은 용액을 버리고 증류수로 젤의 양쪽 끝을 씻어주었다. 그런 다음 5배 부피의 2.5% 탄산나트륨, 0.02% 포르말데히드 혼합 용액을 가한 후 실온에서 서서히 흔들어 주면서 젤을 관찰하였다.

4. 효소면역측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay)

제조합 HA1 항원을 75 ng/well 농도로 coating buffer에 희석하여 96-well microplate에 처리 한 후 4°C에서 16시간 동안 반응하여 항원을 부착시켰다. 다음날 0.05% Tween-20가 포함된 PBS (PBST)로 3회 세척한 후 blocking buffer (0.2% Skim milk가 포함된 PBST)를 well당 100 μ l씩 처리한 뒤 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 microplate를 PBST로 3회 세척하고, 10 μ g/ml High 5 배양액이 포함된 serum dilution buffer에 1:100으로 희석한 혈청시료 100 μ l를 항원을 부착시킨 96-well microplate에 넣고 37°C에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 항원과 희석한 혈청을 반응시킨 후에 microplate를 PBST로 3회

세척하고, 2차 항체인 HRP가 결합된 rabbit anti-human IgG를 1:50,000으로 희석하여 100 μ l씩 처리하고 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 그런 다음 microplate를 PBST로 3회 세척하고 TMB solution (KPL, Gaithersburg, MD, USA)으로 상온에서 10분 동안 반응시킨 후 2.5 N (1.75 M) 황산용액으로 반응을 종료시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 혈구응집억제 측정법 (hemagglutination inhibition assay)

비특이 억제제를 불활성화 시키기 위한 혈청 전처리 과정으로, 혈청과 receptor destroying enzyme (RDE)을 1:3 부피가 되도록 혼합하고 37°C에서 12시간 배양한 후 56°C에서 30분 동안 반응시켜 RDE를 불활성화시킨 다음 탄산나트륨(sodium carbonate, Na_2CO_3)으로 중화시켰다. 그런 다음 혈청을 실온으로 옮긴 후 PBS를 6배 부피만큼 첨가하여 혈청의 최종 희석 농도가 1:10이 되게 하였다. 혈청 내 비특이 응집원을 제거하기 위해, 위의 방법으로 RDE를 처리한 혈청을 적혈구에 1:20 비율이 되도록 첨가한 후 잘 섞어 주었고, 4°C에서 1시간 반응 시킨 후 원심분리 (1,200 rpm, 10분, 4°C)한 후 흡착된 혈청을 제거하였다. 그런 다음 96-well microplate의 각 well에 PBS 25 μ l씩을 넣고 1:10으로 희석된

혈청을 각 well에 50 μ l씩 넣었으며 대조군으로는 PBS 50 μ l를 사용하였다. 1번 well부터 혈청을 25 μ l씩 2배 단계 희석하였고 마지막 25 μ l는 버렸다. 인플루엔자 바이러스 항원(8 HAU/25 μ l)을 각 well에 처리하고 혈청 대조군에는 항원 대신 PBS 25 μ l를 첨가하였다. 0.5% 칠면조 적혈구를 각 well에 50 μ l씩 넣고 25 $^{\circ}$ C 에서 30분 반응시킨 후 응집패턴 및 항체 역가를 측정하였다.

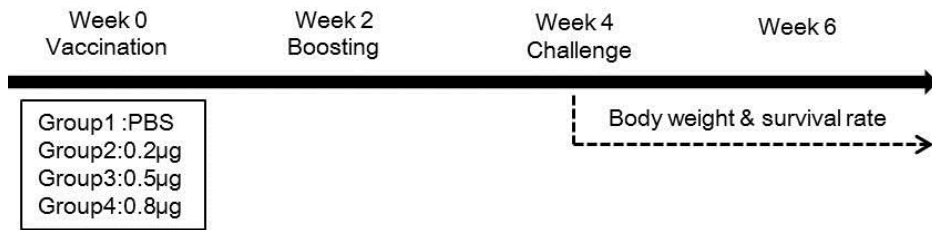
6. 미세중화 분석법 (microneutralization test)

혈청 내 중화 항체 역가를 측정하기 위해 MDCK 세포를 96-well culture plate에 1.5×10^4 cells/well이 되게 하고 37 $^{\circ}$ C에서 배양하여 monolayer가 형성되도록 하였다. 혈청을 56 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 처리한 후 희석액을 각 well에 50 μ l씩 넣은 후 위에서 처리한 혈청을 10 μ l씩 처리하였고, 대조군에는 희석액을 40 μ l 더 첨가하였다. 그런 다음 50 μ l씩 2배 배수로 희석하였고 마지막 50 μ l는 버렸다. 표준화된 바이러스(100 TCID) 50 μ l를 각 well에 넣고 50 μ l씩 2배 배수로 희석하여 전체 부피가 100 μ l가 되도록 하였다. 혈청과 바이러스 혼합액을 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후, 이 반응물을 MDCK 세포에 첨가하였다. 그런 다음, 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 배양하고 세포를 PBS로

세척하고 80% 아세톤으로 고정시켰다. 바이러스 단백질의 존재는 인플루엔자 바이러스의 핵산단백질에 대한 단일클론항체로 확인하였고, 바이러스 항원이 검출되지 않는 지점까지의 역회색 배율을 항체 역가로 측정하였다.

7. 동물실험

6주 된 female C57BL/6 mice 를 각 10개체 별로 4그룹으로 나누어 인플루엔자 바이러스 A/California/04/2009 (H1N1, CA/04)의 항원(녹십자 목암연구소)을 각 0.2, 0.5, 0.8 μg 도스별로 근육주사 하였다. 2주 후에 동일한 방법으로 2차 백신접종을 하였으며, 바이러스 공격실험(virus challenge)을 위해 대조군과 실험군을 설정하여 2차 백신접종 2주 후에 C57BL/6 mice에 바이러스를 주입한 후 체중변화(body weight change)와 생존율(survival rate)을 분석하였다. 또한 백신접종 2주 및 4주째의 혈청을 분리하여 혈구응집억제 측정법 및 효소면역측정법을 수행하였다. 백신접종 스케줄은 다음 그림과 같다.



III. 결과

1. 인플루엔자 바이러스 H1N1의 재조합 HA1 단백을 이용한 효소면역측정법 시험관의 개발

효소면역측정법 시험관에 항원으로 사용할 재조합 HA1을 얻기 위해 합성한 인플루엔자 바이러스 A/New York/3561/2009 (H1N1)의 헤마글루티닌 유전자는 5' 말단에 제한효소 BglII, 3' 말단에 제한효소 XbaI 인지서열이 있는 프라이머로 연쇄중합반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통해 증폭하였다. 증폭된 DNA 단편을 해당하는 제한효소로 절단하여 C-말단에 6X His-tag이 있는 *E. coli* 단백질 발현벡터인 pET와 바큘로바이러스(baculovirus) 단백질 발현벡터인 pACgp67 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA)에 삽입하였다 (그림 1).

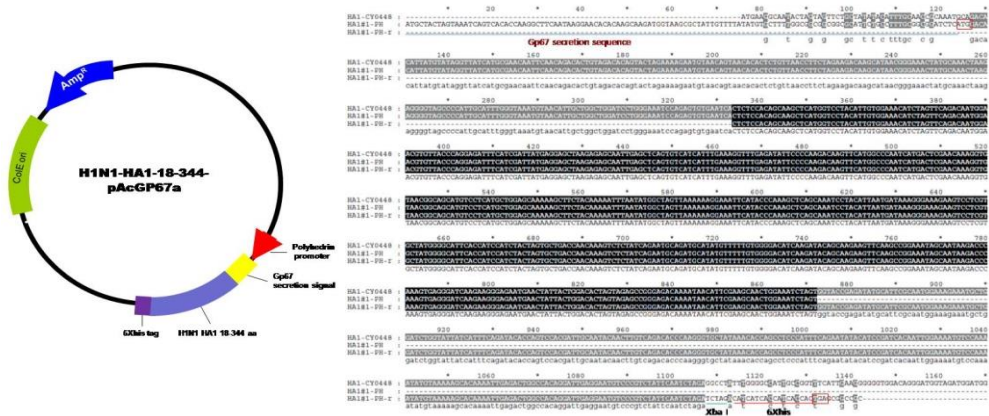


그림 1. 인플루엔자 바이러스 A /New York/3561/2009 (H1N1)의 헤마글루티닌 유전자 정보. 헤마글루티닌 유전자는 5-말단에 제한효소 BglII, 3-말단에 제한효소 Xba I 인지서열이 있는 프라이머로 연쇄중합반응을 통해 증폭하였다. 증폭된 DNA 단편을 각각의 제한효소로 절단하여 C-말단에 6X his-tag이 있는 *E. coli* 및 바클로바이러스 단백질 발현벡터에 삽입하였다.

완성된 곤충세포 발현벡터를 인산 칼슘법으로 SF9 세포에 형질전환을 시킨 후 생산된 바이러스를 배양하여 바이러스를 얻었다. 바이러스의 상층액으로 발현 세포에 형질 도입을 실시하고, 배양액을 농축하여 단백질을 정제하였다. 단백질의 농도를 정량한 후 SDS-PAGE를 수행하여 46 kDa 크기의 재조합 HA1 단백질 발현을 쿠마씨블루 염색법 및 은염색법으로 확인하였다 (그림 2).

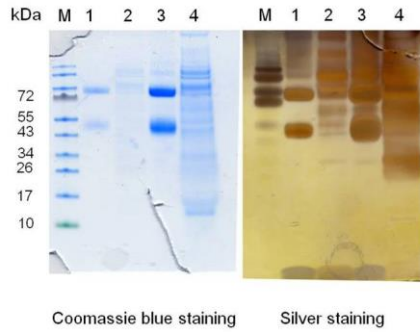


그림 2. 바쿨로바이러스 시스템에서 생산한 HA1 단백질의 발현 확인. SDS-PAGE를 수행하여 HA1 단백을 분리하고 쿠마씨블루 및 은염색법을 통해 HA1 단백질의 발현을 확인하였다. M은 미리 염색된 marker 이며, 순서대로 HA1 1 μ g, High 5 세포배양액 1 μ g, HA1 8.6 μ g, High 5 세포배양액 8.6 μ g을 처리하였다.

인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌의 수용체 결합 부위를 포함한 재조합 HA1 단백을 클로닝하여 *E. coli* 및 바쿨로바이러스 시스템에서 생산하였다. His-HA1 0.2 mg/ml, 항원 도포 농도 500 ng/well, 혈청 희석 배수 1:100, anti-human-IgG 1:10,000 조건에서 실험을 수행하였고, *E. coli* 에서 생산된 HA1 단백을 이용하여 antibody capture ELISA 시험관을 제작하여 환자인 양성 혈청과 건강인의 음성 혈청을 비교해 본 결과 도포한 항원에 반응을 하지 않은 것을 알 수 있었다 (그림 3A). 반면에, 위와 같은 실험 조건으로 바쿨로바이러스에서 생산한 HA1 단백을 이용하여 양성 혈청과 음성 혈청으로 효소면역측정법을 수행한 결과 높은 상관관계를 보였다 (그림 3B).

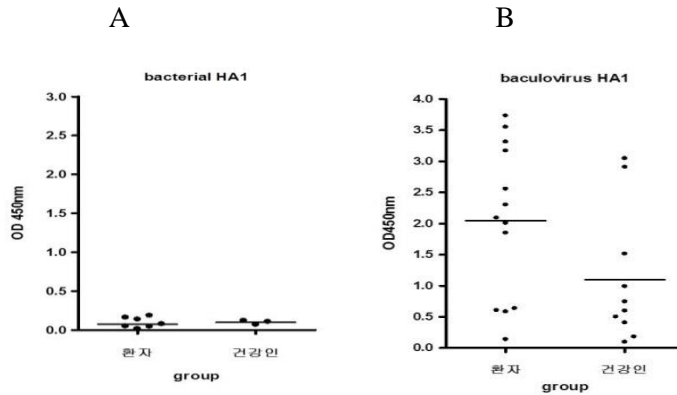


그림 3. *E. coli* 및 바큘로바이러스 시스템에서 발현시킨 재조합 HA1 단백을 이용한 항체 역가 측정. H1N1 HA의 수용체 결합 영역을 포함한 HA1 단백을 클로닝하여 (A) *E. coli*와 (B) 바큘로바이러스 시스템에서 재조합 HA1 단백을 생산하였다. 효소면역측정법 시험관에 각 항원을 도포하고 환자와 건강인의 샘플로 효소면역측정법을 수행하였다.

그 다음으로, 진핵세포 시스템에서 발현시킨 재조합 HA1 단백을 이용한 효소면역측정법의 최적화를 위해 시험관에 도포하는 항원의 양을 조절하여 항원과 결합하는 최적의 항체의 양을 확인하였다. 항원의 양을 200 ng/well로 했을 때 증가되는 흡광도의 값이 크지 않고 배경 값 역시 증가할 수 있기 때문에 100 ng/well의 항원 농도로 결정하였으며, 그래프 상에서 흡광도 값이 1에 가까운 75 ng/well로 항원의 농도를 결정하였다 (그림 4).

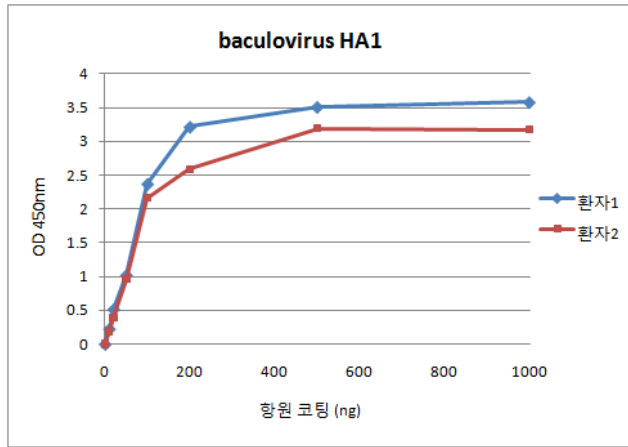


그림 4. 혈청의 희석배수에 따른 항체의 검출 정도 측정. 인플루엔자 환자 2명의 샘플을 이용하여 항원의 농도에 따른 항체의 검출 정도를 측정하였다. 가로축은 항원의 농도이며 세로축은 450 nm에서 흡광도를 나타낸다.

표본시료를 이용하여 효소면역측정법의 민감도와 특이도를 조사하였는데, 표준시료의 기준검사를 미세중화 분석법으로 하였을 때 효소면역측정법의 민감도는 95.6%, 특이도는 87.4% 를 보였다 (그림 5).

Reference standard	Microneutralization test (above 1:160 is positive)		
Test	ELISA		
		Reference standard is positive	Reference standard is negative
	Test is positive	65	20
	Test is negative	3	143
confidence interval	95		
Sensitivity	0.9559	CI: 0.8781 to 0.9849	
Specificity	0.8773	CI: 0.8181 to 0.9191	

그림 5. 표본 시료를 이용한 효소면역측정법의 민감도 및 특이도 측정. 표준 방법을 미세중화 분석법으로 하여 효소면역측정법의 민감도와 특이도를 측정하였다.

다음으로, 인플루엔자 바이러스 H1N1의 재조합 HA1 단백을 이용한 효소면역측정법 시험관에 2009년 대유행 인플루엔자 H1N1 환자의 혈청 샘플을 이용하여 항체 역가를 측정해 보았다. 대조군으로는 인플루엔자 백신을 접종 하기 위해 내원한 H1N1에 노출된 적이 없는 건강한 성인 30명의 혈청을 확보하였고, 환자 샘플은 2009년 10월부터 12월 사이에 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)로 인플루엔자 H1N1 감염 확진을 받은 47명으로부터 얻었다. 재조합 H1N1-HA1 단백을 이용해 만든 효소면역측정법 시험관을 사용하여 위 두 그룹에 대해 검사를 시행한 결과 유의한 차이를 관찰할 수 있었다 (그림 6).

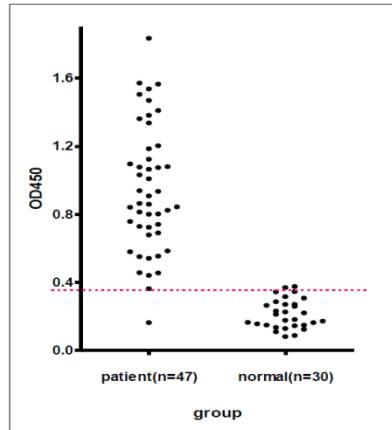


그림 6. 대유행 인플루엔자 H1N1 환자 시료를 이용한 효소면역측정법 검사. H1N1 감염환자와 정상인의 항체가 차이를 측정하였다. H1N1 감염 확진을 받은 환자의 샘플과 H1N1에 노출된 적이 없는 성인의 샘플을 대조군으로 효소면역측정법을 수행하였다.

마지막으로, 2009년 대유행 H1N1 인플루엔자 바이러스의 마우스 및 인간의 표준 항혈청 세트를 구축하였다. 마우스에 2009 H1N1 인플루엔자 바이러스를 3회 주입한 후 혈액을 채취하고, 혈구응집억제 측정법을 수행하여 1:2,560의 혈구응집억제 항체 역가를 가지고 있음을 확인하였다. 시험관과 항원 도포량, 희석액의 조성 및 실험 조건은 위에서 실험한 조건과 동일하며 2차 항체인 anti-mouse-IgG를 1:10,000의 희석비율로 하여 효소면역측정법 수행하였다 (그림 7A). 또한 2009년 H1N1 인플루엔자 바이러스 감염에 확진을 받은 환자의 혈청 및 백신접종을 한 사람의 혈청 중에 미세중화 분석법 결과 1:1,280

이상이며 동시에 혈구응집억제 항체 역가가 1:160 이상인 혈청을 선정하여, 1:40으로 희석한 혈청 샘플을 2배씩 희석하여 효소면역측정법을 수행하였다 (그림 7B). 위 실험 결과, 혈청의 희석 배수가 높아질수록 흡광도 값이 감소하는 것을 확인하고, 1:100의 희석농도를 표준 항혈청 세트로 사용하도록 정했다.

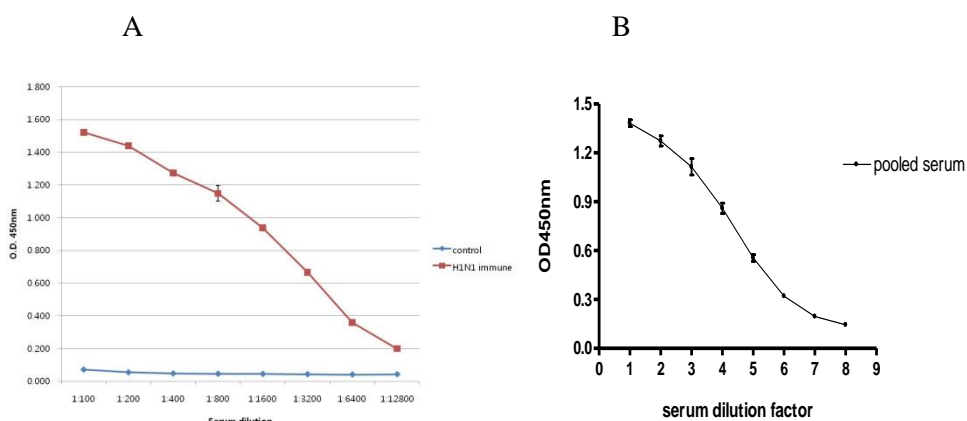


그림 7. 마우스 및 사람의 표준 항혈청세트를 이용한 인플루엔자 H1N1의 항체 역가 측정. (A) 마우스에 2009 H1N1 인플루엔자 바이러스를 주입하고 혈액을 채취하여 효소면역측정법을 수행하였다. (B) 인플루엔자 바이러스 감염 확진 환자의 혈청 및 백신을 접종한 사람의 혈청을 이용하여 효소면역측정법을 수행하였다. 가로축은 혈청 희석 배수, 세로축은 흡광도를 나타낸다.

2. 동물모델을 이용한 면역상관성 평가 및 검증

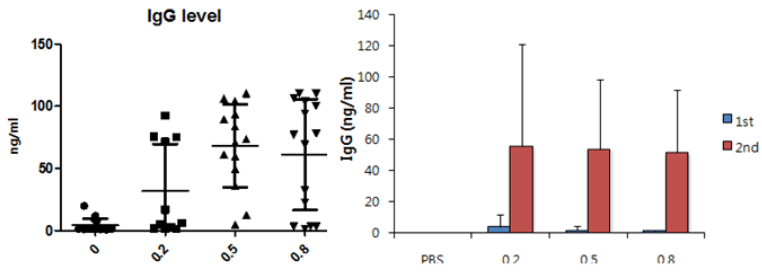
6주 된 female C57BL/6 마우스를 4개의 그룹으로 나누어 인플루엔자 바이러스의 항원을 도스별(0.2, 0.5, 0.8 μg 의 HA 농도)로 피하주입 하고, 대조군 마우스에는 PBS를 주입하였다. 1차 백신접종 후 2주째에 2차 백신접종을 실시 하였으며, 백신접종 2주, 4주째의 혈액에서 혈청을 분리하여 IgG 항체 역가를 조사하였다. 그 결과, 백신을 1회 접종 했을 때보다 2회 접종하였을 때 IgG 항체 역가의 정도가 크게 증가하는 것을 볼 수 있으며, 백신의 농도에 따른 차이점은 크게 나타나지 않는 것으로 보였다 (그림 8A).

또한 2차 백신접종 후 2주째 마우스에 바이러스를 공격 접종한 후의 체중변화와 생존율을 조사하였는데, PBS를 주입한 마우스 그룹에서는 바이러스를 공격 접종 하였을 때 큰 체중변화를 보였으며 생존율이 크게 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 반면에 백신을 접종한 그룹에서는 백신의 용량이 0.5 μg 및 0.8 μg 도스로 늘어났을 때 체중변화가 나머지 두 그룹에 비해 크지 않은 것으로 보였으며, 바이러스를 공격 접종 하였을 때 백신을 접종한 모든 그룹에서 100% 생존율을 보였다 (그림 8B).

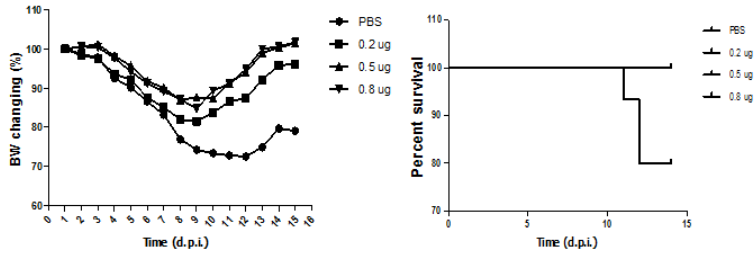
바이러스 공격 접종 후 혈청을 분리한 뒤 혈구응집억제 측정법 및 효소면역측정법을 수행하여 PBS를 주입한 대조군과 백신을 접종한 실험군 마우스의 혈구응집억제 항체 역가 및 IgG 항체 역가를 측정하였다. 인플루엔자 바이러스에 대한 중화 항체의 역가가 1:40 이상

또는 백신접종 전과 후에 항체 역가가 4배 이상 증가한 경우 중화 항체 양성으로 정의 하는데, 백신을 0.8 μg 도스로 접종하였을 때 혈구응집억제 항체 역가가 약 1:40 이상, 백신을 0.2 μg 및 0.5 μg 도스로 접종하였을 때는 약 1:80의 항체 역가를 보여, 백신이 바이러스에 대한 중화 항체를 생성하게 한다는 것을 알 수 있었다. 그리고 PBS를 주입한 마우스의 경우 IgG 항체 생성이 되지 않으며 혈구응집억제 항체 생성도 거의 없다는 것을 알 수 있다. 그러나 백신을 접종한 마우스에서는 백신의 용량에 상관없이 약 50 ng/ml 정도의 IgG 항체가 생성 되는 것으로 보아 백신이 바이러스에 대한 보호 효과를 가지고 있음을 확인하였다 (그림 8C).

A



B



C

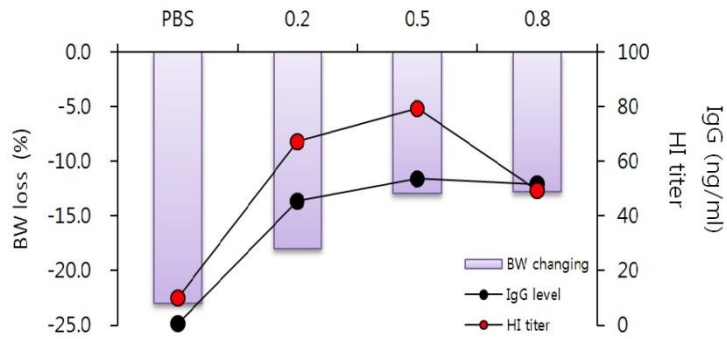


그림 8. 마우스 공격 실험을 통한 항체 역가 측정 및 이의 기능 평가. (A) 도스별로 백신을 접종한 마우스 그룹과 접종하지 않은 그룹에 각각 바이러스를 공격 접종하고 혈청을 분리하여 항체 역가를 측정하였다. (B) 도스별 백신 접종 그룹과 대조군에 바이러스를 공격 접종 하였을 때의 체중변화와 생존율을 측정하였다. (C) 백신접종 후 혈청을 분리하여 혈구응집억제 측정법 및 효소면역측정법을 수행하여 PBS를 주입한 대조군과 백신을 접종한 실험군 마우스의 체중 변화와 혈구응집항체 및 IgG 항체 역가를 측정하였다.

그 다음으로 인플루엔자 바이러스 감염과 백신의 보호 효과의 정량적인 면역학적 상관관계를 알아보기 위해, 도스별로 백신을 접종한 그룹과 대조군 마우스에 바이러스 공격 접종을 한 후 혈액을 채취하여 혈구응집억제 측정법과 효소면역측정법을 각각 실시하였다. 이 실험에서 20% 이상의 체중 변화를 보인 마우스는 생존하지 못한 것으로 판단하였다.

혈구응집억제 측정법을 실시하여 항체 역가를 측정해 본 결과, 바이러스 감염에 대한 보호 효과를 보이는 1:40 의 혈구응집억제 항체 역가를 가지는 마우스가 생존하지 못하는 경우도 있었으며, 1:10 정도의 항체 역가를 가지는 마우스의 생존 여부 또한 일정하게 나타나지 않음을 확인할 수 있었다 (그림 9A).

그리고 효소면역측정법을 실시한 결과를 통해 마우스 혈청의 IgG 항체 역가의 농도가 46.8 ng/ml 이상일 때 백신이 인플루엔자 바이러스

감염에 대한 85% 보호 효과를 보이는 것을 확인하였고 (그림 9B), 인플루엔자 바이러스에 대한 백신의 보호효과를 검증하기 위해 효소면역측정법을 이용하여 면역학적 지표를 설정할 수 있었다.

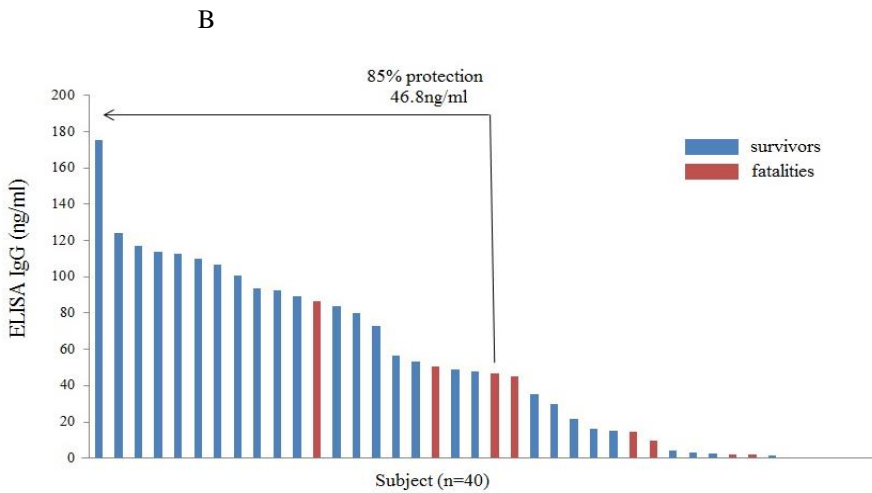
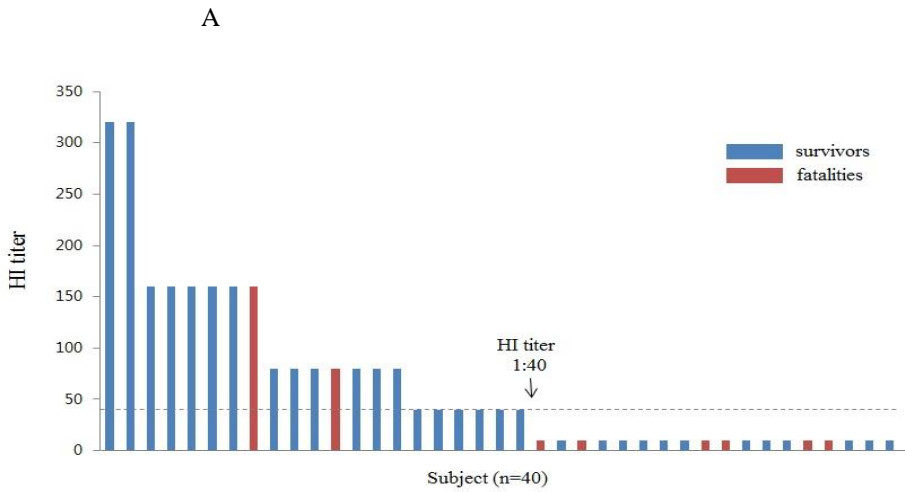


그림 9. 정량적인 면역학적 상관관계 확인. 백신을 접종한 그룹과 대조군 마우스에 바이러스 공격 접종한 후 (A) 혈구응집억제 측정법과 (B) 효소면역측정법을 실시하여 항체 역가를 측정하였다. 체중변화가 20% 이상인 마우스는 생존하지 못한 것으로 판단하였다.

IV. 고찰

인플루엔자는 전 세계적으로 많은 인구가 감염되는 질병으로 사망의 중요한 원인이 되기 때문에 사회적, 경제적으로 큰 영향을 미친다. 최근 가금류에서 발생한 고병원성 조류인플루엔자(highly pathogenic avian influenza, HPAI)의 전 세계적 유행에 따른 위험상황을 고려할 때 정확하고 신속한 혈청학적 진단 및 인플루엔자 백신 개발에 대한 중요성이 커지고 있다.

기존에 사용하고 있는 혈청학적 진단의 대표적인 방법으로는 혈구응집억제 측정법, 미세중화 분석법 및 효소면역측정법 등이 있다. 혈구응집억제 측정법은 바이러스 헤마글루티닌의 적혈구 응집 저해를 이용하는 방법으로 혈구응집억제 항체 역가는 바이러스 감염에 대한 보호 효과의 정도를 나타내는 지표로 사용되고 있으며 현재 항체 역가를 측정하는 표준방법으로 많이 사용되고 있지만, 자동화가 어려워 대량의 샘플을 한 번에 검사할 수 없다는 한계가 있다. 또한 이 측정법은 민감도가 낮으며 교차 반응의 가능성이 있고 측정 내 변수가 많은 단점이 있기 때문에^{25,26}, 최근에는 바이러스에 대한 항체를 측정하는 데 미세중화 분석법이 사용되기도 한다. 이 방법은 바이러스의 세포 감염을 억제하는 능력을 측정하는 방법으로, 혈구응집억제 측정법에 비해 민감도가 높지만 노동력이 많이 들어 빠르고 신속한 진단에 어려움이

있으며, 살아있는 바이러스를 다루기 때문에 시설을 갖춘 일부 실험실에서만 측정이 가능하다는 단점이 있다²⁷⁻²⁹.

따라서 바이러스를 사용하지 않고 대단위 스크리닝이 가능하며, 민감도와 특이도가 높고 일반 실험실에서 수행할 수 있는 검사법의 개발이 절실하게 요구되고 있으며, 최근에는 이러한 장점을 갖춘 효소면역측정법에 대한 연구가 많이 진행되고 있다²⁴.

기존 연구에서는 H5N1 항체를 검출하는 방법으로 미세중화 분석법이 가장 효과적이라고 알려졌으나³⁰, 또 다른 연구에서는 다른 아형의 감염으로부터 생긴 교차반응 항체가 이 검사법의 특이도를 떨어뜨린다는 결과를 제시하였다³¹⁻³³. 이에 따라 항원결정부위-차단 효소면역측정법(epitope-blocking ELISA)을 개발한 연구 사례가 있는데³⁴, 이 검사법에서는 인플루엔자 바이러스 H5 헤마글루티닌의 HA1 항원결정부위에 존재하는 특정한 아미노산 서열에 대한 단일클론항체를 이용하였으며, 기존의 혈구응집억제 측정법 및 미세중화 분석법과 비교했을 때 높은 민감도와 특이도를 보였다³⁵. 뿐만 아니라, 이 검사법을 이용하여 바이러스의 다른 많은 병원균에 대한 항체들도 민감하고 특이적으로 검출할 수 있다는 보고가 있었다³⁶⁻⁴⁰.

인플루엔자의 중화 항체 측정을 시도한 최근의 연구에서는 *E. coli* 와 같은 박테리아 시스템에서 재조합 HA1 단백을 발현시켰는데, 발현한 HA1 단백질이 다시 가공 전의 형태로 재접힘(refolding) 되어 효과적으로 항체 역가를 측정 할 수 없었으며⁴¹, 글리코실화 (glycosylation)와 같은

진핵세포 단백질의 특징이 항원-항체 결합에 중요한 역할을 하기 때문에 박테리아에서 재조합 HA1 단백을 대량생산 하는 방법은 대부분 실패하였다. 또 다른 최근의 한 연구에서는 유럽 돼지 인플루엔자 바이러스의 재조합 HA1 단백을 박테리아 시스템에서 발현하여 생체 외에서(*in vitro*) 다시 가공하여, 돼지 혈청에서 아형 특이적인 항체를 검출하기 위한 간접 효소면역측정법(indirect ELISA)을 개발하였다⁴².

또한 Rowe 등은 1999년 바쿨로바이러스 시스템을 이용하여 H5N1 바이러스의 HA를 생산하여 효소면역측정법을 개발하였는데, 이 때 사용한 단백질은 HA 전체 부분이였다. 이를 통해 개발한 시험관으로 효소면역측정법을 수행하여 미세중화 분석법과 비교해 본 결과, 소아의 경우에는 민감도와 특이도가 모두 높게 나왔으나 성인의 경우에는 특이도가 매우 낮은 결과를 보였다³⁰. 그 이유는 HA 전체를 사용함으로써 다른 아형과 염기서열이 유사한 HA2 부위가 노출되었기 때문일 것이라고 추정된다.

인플루엔자의 항원인 헤마글루티닌은 바이러스가 세포에 부착하는데 관여하며, 바이러스의 대표적인 표면 단백질로 이에 대한 중화 항체가 생성된다. 헤마글루티닌은 HA0로 발현되어서 HA1과 HA2로 갈라지는데 이 과정에서 나온 HA1이 헤마글루티닌 전체(HA0) 보다 항원 특이성이 높다⁴³. 따라서 HA1 부분을 항원으로 선택할 경우 특이도를 향상시킬 수 있다.

본 연구에서는 인플루엔자 바이러스 H1N1의 재조합 HA1 단백을

이용한 효소면역측정법 시험관을 개발하였다. 박테리아 및 바쿨로바이러스 시스템을 이용하여 진핵세포에서 발현시킨 HA1 단백을 시험관에 항원으로 사용하여 각각 음성 혈청과 양성 혈청으로 효소면역측정법을 수행한 결과 바쿨로바이러스 시스템에서 발현시킨 재조합 HA1 단백을 이용한 경우에만 유의한 결과를 보였다 (그림 3).

또한 H1N1 인플루엔자 바이러스의 HA1 단백을 적용한 효소면역측정법의 민감도와 특이도를 조사하였는데, 표본시료의 기준검사를 미세중화분석법으로 하였을 때 효소면역측정법의 민감도는 95.6%, 그리고 특이도는 87.4%를 보였다 (그림 5).

위의 연구 결과들을 종합해 볼 때, 바쿨로바이러스와 같은 진핵세포 시스템을 이용하여 단백을 생산하면 진핵세포에서 일어나는 단백질 발현 과정들이 모두 일어나게 되므로 재조합 HA1 단백질의 3차원 구조가 인플루엔자 바이러스의 HA 단백질 구조와 가장 근접할 것으로 추정할 수 있다.

효소면역측정법을 이용한 항체가 측정 표준화 기술을 이용하면, 신종 인플루엔자에 대한 항체의 유무 또는 백신 접종 후 항체 생성의 유무를 파악할 수 있어 백신의 재접종이나 대단위 역학조사에 활용할 수 있다. 또한 항체가를 정확하게 알고 있는 표준 항혈청 세트를 확보하면 재조합 단백질의 개선 및 효소면역측정법을 이용한 검사법의 성능을 개선하는 데 유용하게 사용할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 인플루엔자 바이러스 H1N1의 재조합 HA1 단백을 이용한 효소면역측정법 시험관을

개발하여 2009년 대유행 인플루엔자 H1N1 바이러스의 마우스 및 인간의 표준 항혈청 세트를 구축하였고 1:100의 희석농도를 표준 항혈청 세트로 사용하도록 정했다 (그림 7).

인플루엔자 감염으로 인한 사회적, 경제적 피해를 최소화 하기 위해 안전하고 효과적인 백신을 개발하는 것이 중요한데, 백신 개발에 있어 예방의 효능을 평가하려면 평가지표가 필요하다. 가장 좋은 방법은 실험동물에 백신을 접종한 후 대상 병원균으로 감염시키고 생존율로써 백신의 예방 효능을 판단하는 것이지만, 개발하고 있는 백신의 감염동물 모델이 없는 경우에는 면역학적 지표(immune correlates of protection)의 개념을 사용한다.

면역학적 지표란 감염이나 질병 또는 면역학적 종말점(immunological end point)과 밀접하게 연관된 백신에 대한 특정한 면역반응을 뜻하는데, 이러한 면역학적 지표는 동물 실험을 통해 인간에게서 심각한 질병의 경감이나 생존과 같은 효과를 얻기 위한 백신의 용량에 따른 면역반응의 양적인 상관성을 보여준다.

예를 들면, 에볼라 바이러스(Ebola virus) 감염은 예측 불가능하고 산발적으로 발생하기 때문에 백신의 효능을 임상실험을 통해 검증하기가 어렵다. 따라서 에볼라 바이러스 감염에 대한 백신의 보호효과와 면역학적 상관성은 동물모델에서 규명되어 있는데, 에볼라 바이러스의 당단백(glycoprotein) 또는 뉴클레오단백의 조합으로 만들어진 백신을 원숭이에 접종한 후 혈청을 분리하여 효소면역측정법으로 항체가를

조사한 결과, IgG 항체 역가가 1:3,700인 경우 100% 생존율을 보임으로써 백신의 효능을 양적으로 예측하였다⁴⁴. 이를 통해, IgG 항체는 면역성분들의 활동을 양적으로 반영하므로 백신의 효능을 확인할 수 있는 좋은 지표가 될 수 있다는 것을 확인할 수 있다.

이와 같은 방식으로, 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 백신의 보호 효과와 면역학적 상관성을 보이는 IgG 항체 역가를 효소면역측정법을 이용하여 설정할 수 있다. 인플루엔자 바이러스에 대한 혈구응집억제 항체 역가가 1:40 이상인 경우 바이러스 감염에 대한 보호 효과를 가지는데, 백신을 접종한 마우스 그룹에서는 모두 1:40 이상의 혈구응집억제 항체 역가를 가지고 있었고, 백신의 농도에 상관 없이 IgG 항체가 약 50 ng/ml 이상으로 생성 되었으며, 바이러스를 감염시켰을 때 100% 생존율을 보임으로써 백신이 바이러스 감염에 대한 보호 효과를 가진다는 것을 확인하였다 (그림 8). 이를 통해 마우스 혈청의 IgG 항체 역가의 농도가 46.8 ng/ml 이상일 때, 백신이 바이러스 감염에 대해 85%의 보호 효과를 가진다는 것을 확인할 수 있었다 (그림 9B).

위의 실험에서 같은 마우스의 혈청 샘플에서도 혈구응집억제 항체가 검출되었지만 IgG 항체는 검출되지 않은 경우가 있었는데, 이를 통해 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 항체 역가를 측정하는 경우에는 효소면역측정법이 혈구응집억제 측정법보다 특이도가 높은 방법이라는 것을 알 수 있었다.

그러나 양적으로 비슷한 항체 역가를 가지는 개체들이 생존 여부가

다른 경우를 보였는데, 이것은 항체의 질적인 차이 때문이라고 생각되며 효소면역측정법으로는 이를 검증할 수 없기 때문에 바이러스 중화 시험(virus neutralization test) 등과 같은 다른 검사법을 통해 항체의 기능을 정확하게 확인해야 할 것이다.

그리고 돼지 인플루엔자 바이러스에 대한 항체를 측정하기 위해 효소면역측정법과 혈구응집억제 측정법을 비교한 한 연구에서는 혈구응집억제 측정법을 통해서도 IgG 항체뿐만 아니라 바이러스 감염 초기에 생성되어 빠르게 사라지는 IgM 항체를 검출할 수 있어 최근에 인플루엔자 바이러스에 감염된 경우도 파악할 수 있지만, 효소면역측정법을 통해서도 오직 IgG 항체만을 검출할 수 있다고 지적하였다²⁴. 이와 같은 검사법에 따른 차이가 민감도와 특이도에 반영될 것이고, 이러한 측면에서 효소면역측정법이 혈구응집억제 측정법을 비롯한 다른 검사법들이 가진 장점을 보완할 수 있어야 할 것이다.

본 연구에서는 진핵세포 시스템에서 생산한 인플루엔자 바이러스 H1N1의 재조합 HA1 단백을 이용한 효소면역측정법으로 백신에 대한 보호 효과와 면역학적 상관성을 보이는 IgG 항체 역가를 찾아 이를 동물모델에서 검증하였으며, 이를 통해 효과적으로 백신의 효능을 평가할 수 있는 면역학적 지표를 설정할 수 있었다.

그러나 효소면역측정법을 이용하여 IgG 항체 역가를 측정하고 이를 바이러스에 대한 보호 효과를 예측하는데 유용하게 사용할 수 있다

하더라도, 추가적으로 이를 뒷받침 해줄 수 있는 요소들이 규명되어야 할 것이다. 예를 들면, T 세포의 면역반응과 같은 세포매개 면역 반응에서도 면역학적 상관성을 추가적으로 뒷받침 할 수 있는 지표를 설정한다면, 백신 개발에 있어 바이러스 감염에 대한 백신의 보호 효과를 보다 정확하게 예측하고 평가할 수 있을 것이다.

V. 결론

본 연구에서는 인플루엔자 바이러스의 재조합 헤마글루티닌 단백을 이용한 효소면역측정법 기술을 개발하였고, 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 면역 상관성을 보이는 적절한 항체 역가를 설정하여 동물모델을 통해 이를 검증하였고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 박테리아 시스템 및 바쿨로바이러스 시스템을 통해 인플루엔자 바이러스 H1N1의 재조합 HA1 단백을 생산하여 75 ng/well의 항원 도포 농도로 효소면역측정법 시험관을 제작하였다. 또한 박테리아 시스템 및 바쿨로바이러스 시스템에서 생산한 재조합 HA1 단백을 항원으로 도포한 시험관을 이용하여 음성 및 양성 혈청 샘플로 효소면역측정법을 시행한 결과 바쿨로바이러스 시스템을 사용한 시험관에서만 유의한 결과를 얻을 수 있었다. 다음으로 항원 도포량, 혈청 희석 배수, blocking buffer, conjugating buffer 및 혈청 희석액의 조성 등의 요소들에서 시험관의 최적화를 시도하였고, 2009 H1N1 인플루엔자 바이러스의 마우스 및 인간의 표준 항혈청 세트를 구축하였다.
2. 면역학적 상관성을 보이는 항체 역가를 확인하기 위해 인플루엔자 백신접종 전 후의 혈청 샘플로 혈구응집억제

측정법을 실시하여, 인플루엔자 바이러스에 대한 중화 항체의 역가가 1:40 이상 또는 백신접종 전과 후에 항체 역가가 4배 이상 증가한 경우 중화 항체 양성으로 정의 하였다. 이와 같은 면역학적 상관성을 보이는 항체 역가를 이용하여 백신의 효능을 C57BL/6 마우스 동물모델에서 검증하였다. 마우스를 4개의 그룹으로 나누어 인플루엔자 바이러스 A/California/04/2009 (H1N1, CA/04)의 항원을 도스별로 주입하고, 대조군 마우스에는 PBS를 주입하였다. 백신접종 스케줄에 따라 1차, 2차 백신접종 및 바이러스 공격접종을 실시하여 마우스의 체중변화와 생존율을 분석한 결과, 백신을 접종한 경우 바이러스에 대한 보호 효과를 확인할 수 있었다. 또한 각 단계의 마우스 혈청을 분리하여 혈구응집억제 측정법 및 효소면역측정법을 수행한 결과, CA/04 항원을 접종한 마우스에서는 혈구응집억제 항체 역가가 1:40 이상, 그리고 약 50 ng/ml 농도의 IgG 항체가 형성 되었음을 알 수 있었으며, IgG 항체의 농도가 46.8 ng/ml 이상일 때 백신이 바이러스에 대한 85% 보호 효과를 보이는 것을 확인하였다.

이상으로부터 진핵세포 시스템에서 생산한 인플루엔자 바이러스 H1N1의 재조합 HA1 단백을 적용한 효소면역측정법이 백신의 효능을 정량적으로 평가하는 데 충분히 효과적임을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Schnitzler SU, Schnitzler P., An update on swine-origin influenza virus a/h1n1 : A review. *Virus Genes*, 2009 Oct 7. [Epub ahead of print]
2. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. *Fields' Virology*. 5th ed. New York: Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams & Wikins, 2007;1691-740.
3. Thomson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Bridges CB, et al., Influenza-associated hospitalizations in the United States. *JAMA*, 2004;**292**: 1333-40.
4. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA* 2003;289: 179–86.
5. Webster, R. G., Laver, W. G., Air, G. M. & Schild, G. C. Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature*, 1982;**296** : 115–21.
6. Lindstrom, S. E., Cox, N. J. & Klimov, A. Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957–1972: evidence for genetic divergence and multiple reassortment events. *Virology*, 2004; **328**:101–19.
7. Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten FJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki TM., Emergence of a novel

- swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*, 2009; **360**: 2605-15.
8. Zimmer SM, Burke DS., Historical perspective-emergence of influenza A (H1N1) virus. *N Engl J Med*, 2009;**361**: 279-85.
 9. Shinde V, Bridges CB, Uyeki TM, Shu B, Balish A, Xu X, et al. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the united states, 2005~2009, *N Engl J Med* 2009;**360**: 2616-25.
 10. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. The persistent legacy of the 1918 influenza virus. *N Engl J Med* 2009;**361**: 225-9.
 11. Fiore AE, Shay DK, Broder K, Iskander JK, Uyeki TM, et al. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2009. *MMWR Recomm Rep* **58**: 1–52.
 12. Wrammert J, Smith K, Miller J, Langley WA, Kokko K, et al. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature*. 2008;**453**: 667–71.
 13. World Health Organization (WHO). Influenza (Seasonal). Fact sheet N°211. April 2009. [updated 2011]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>. Accessed November 30, 2011.
 14. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention and Control of Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR*

- Morb Mortal Wkly Rep., 2011; **60**(33) :1128–32.
15. Palache, AM. Influenza vaccines: a reappraisal of their use. *Drugs*. 1997;**54**:841-56.
 16. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for guidance on harmonisation of requirements for influenza vaccines. CPMP/BWP/214/96. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), March 1997.
 17. Treanor J, Keitel W, Belshe R, Campbell J, Schiff G, Zangwill K, Wolff M, Klimov A, Levandowski R, Lambert L. Evaluation of a single dose of half strength inactivated influenza vaccine in healthy adults. *Vaccine*. 2002;**20**:1099-105.
 18. Requirements for inactivated influenza vaccine (Addendum 1977). In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Twenty-ninth report. Geneva, World Health Organization, 1978, Annex 3 (WHO Technical Report (1) Series, No. 626):99-100.
 19. Couch, R. B. & Kasel, J. A. Immunity to influenza in man. *Annu. Rev. Microbiol.* 1983; **37**:529–49.
 20. Potter, C. W. & Oxford, J. S. Determinants of immunity to influenza infection in man. *Br. Med. Bull.* 1979; **35**:69–75.
 21. Hobson, D., Curry, R. L., Beare, A. S. & Ward-Gardner, A. The role of serum haemagglutinationinhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. *J. Hyg. (London)* 1972;**70**:767–77.

22. Katz JM, Hancock K, Xu X. Serologic assays for influenza surveillance, diagnosis and vaccine evaluation. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;**9**:669–83.
23. Wood JM, Montomoli E, Newman RW, Daas A, Buchheit KH, Terao E: Collaborative study on influenza vaccine clinical trial serology - part 2: reproducibility study. *Pharmeur Bio Sci Notes* 2011;**1**:36–54.
24. KJ Yoon, Bruce HJ, Rick WS, Gene E. Comparison of a commercial H1N1 enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition test in detecting serum antibody against swine influenza viruses. *J Vet Diagn Invest* 2004;**16**:197-20.
25. Julkunen I, Phylala R, Hovi T. Enzyme immunoassay, complement fixation and hemagglutination inhibition tests in the diagnosis of influenza A and B virus infections: purified hemagglutinin in subtype specific diagnosis. *J Virol Methods*. 1985;**10**: 75–84.
26. Massicot J, Murphy BR. Comparison of the hemagglutination-inhibiting and neutralizing antibody responses of volunteers given 400 chick cell–agglutinating units of influenza A/New Jersey/76 split-virus vaccine. *J Infect Dis*. 1977;**136**: S472–4.
27. WHO. Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A (H5N1) virus in specimens from suspected human cases; 2007. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/RecAllabtestsAug07.pdf. Accessed May 1st, 2008.
28. Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the laboratory in diagnosis of

- influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J Infect Dis.* 2006;**194**:S98–110.
29. Stlzer-Braid S, Wong B, Robertson P, Lynch GW, Laurie K, et al. A commercial ELISA detects high levels of human H5 antibody but cross-reacts with influenza A antibodies. *J Clin Virol.* 2008;**43**: 241–3.
 30. Rowe T, Abernathy RA, Hu-Primmer J, Thomson WW, Lu X, et al. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J Clin Microbiol.* 1999;**37**:937-41.
 31. Profeta ML, Palladino G. Serological evidence of human infections with avian influenza viruses. *Arch Virol.* 1996;**90**:355-60.
 32. Okuno Y, Isegawa Y, Sasao F, Ueda S. A common neutralizing epitope conserved between the hemagglutinins of influenza A virus H1 and H2 strains. *J Virol.* 1993; **67**:2552-8.
 33. Govorkova EA, Smirnov YA. Cross-protection of mice immunized with different influenza A (H2) strains and challenged with viruses of the same HA subtype. *Acta Virol.* 1997;**41**:251-7.
 34. Mookkan P, Hui-Ting H, Nayana P, Sumathy V, Milene S, Fang H, et al. Development of Epitope-Blocking ELISA for Universal Detection of Antibodies to Human H5N1 Influenza Viruses. February 2009, vol4, Issue2, e4566.
 35. de Boer F, Back W, Osterhaus ADME. An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various

- animal species. Arch Virol. 1990;**115**: 47–61.
36. Gut-Winiarska M, Jacobs L, Kerstens H, Bienkowaska-Szewczyk K. A highly specific and sensitive sandwich blocking ELISA based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein B. J Virol Methods. 2000;**88**: 63–71.
 37. Kuck D, Kern A, Kleinschmidt JA. Developmental of AAV serotypespecific ELISAs using novel monoclonal antibodies. J Virol Methods. 2007;**140**: 17–24.
 38. Ameri-Mahabadi M, Zhou E, Hsu WH. Comparison of two swine Mycoplasma hyopneumoniae enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies from vaccinated pigs and field serum samples. J Vet Diagn Invest. 2005;**17**: 61–4.
 39. Fevereiro M, Barros S, Fagulha T (1999) Development of a monoclonal antibody blocking-ELISA for detection of antibodies against Maedi-Visna virus. J Virol Methods. 1999;**81**: 101–8.
 40. Couch, R. B. & Kasel, J. A. Immunity to influenza in man. Annu. Rev. Microbiol. 1983; **37**:529–49.
 41. Khurana S, Larkin C, Verma S, Joshi MB, Fontana J, Steven AC, et al. Recombinant HA1 produced in E. coli forms functional oligomers and generates strain-specific SRID potency antibodies for pandemic influenza vaccines. Vaccine 2011;**29**:5657–65.
 42. Na Z, Elke L, Sybille K, Christian G, Martin B, Timm C. Distinction of subtype-specific antibodies against European porcine influenza

viruses by indirect based on recombinant hemagglutinin protein fragment-1. *Virology Journal* 2013; **10**:246.

43. Jue C, Lee KH, David A, Steinhauer, David J, Stevens et al. Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell* 1998;**95**:409-17.
44. Nancy JS, Julie EM, Barney SG, Gary JN. Correlates of protective immunity for Ebola vaccines: implications for regulatory approval by the animal rule. *Nature Reviews, Microbiology* 2009. Volume7:393-400.

Abstract

Development of the enzyme-linked immunosorbent assay for assessing immunological correlates of protection against influenza virus infection

Eunsun Park

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Jae Myun Lee)

Influenza is a highly contagious, acute illness in humans. Influenza viruses cause annual epidemics and occasional pandemic that have claimed the millions of lives. And the burdens from influenza are the severe disease and deaths and also great economic impact.

The two surface glycoprotein of the influenza virus hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) are the most important antigens for inducing protective immunity in the host and therefore show greatest variation.

The RNA of influenza A viruses is segmented into 8 distinct genes and as a result of genetic reassortment can occur in mixed infections with

different viruses. The pandemic viruses may arise by genetic reassortment of viruses of human and avian origin.

Up to this date, the pandemic influenza H1N1 2009 has spread throughout the world with unexpected speed. Accurate and rapid diagnosis of this influenza virus is critical for minimizing further spread combined with timely implementation of antiviral treatment and public health based measures.

Vaccination is the primary means to prevent seasonal and pandemic influenza infections, however, antibody responses to influenza virus are generally not cross-reactive neutralizing but rather strain-specific. Therefore, development of effective vaccines is crucially important as a strategy for minimizing the public health risk.

Most of the acquired protection against influenza virus comes from antibodies in the blood. After the primary infection or vaccination, virus neutralizing antibodies to the hemagglutinin and neuraminidase appear in the blood. Hemagglutinin inhibition assay (HI assay) has been used most commonly to detect anti-influenza virus antibody. Antibodies inhibit hemagglutination and this correlates fairly well with the level of protection. Hence often the level of these specific antibodies is used as a proxy for the presumed level of protection to indicate immunity.

However, the labor intensiveness of HI assay is a major hindrance to its

use on a large scale. Recently, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), such as its ability to deal with a large number of samples at a time, less labor intensiveness, and higher analytic sensitivity has been developed for detecting antibody against influenza viruses.

We developed ELISA with recombinant HA1 protein of influenza virus H1N1 and investigated the ELISA IgG titer that correlates with immune protection against influenza virus infection and validated immune correlation of protection in animal model.

Key Words: Influenza virus, immune correlates of protection, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), ELISA IgG titer