

Influenza A virus 감염에 대한 저 농도 이산화염소 가스의 보호효과

Norio Ogata and Takashi Shibata

일본, 오사카, Taiko 제약회사 연구소

Influenza virus 감염은 인류의 질병과 사망의 주요 원인중의 하나이다. 사람들 사이에서 이 virus는 대부분이 호흡기 계통에서 분출되는 噴霧를 통하여 옮는다. 현재 influenza virus 감염을 예방하는 방법들은, 그것들의 제한적 효능때문에 전적으로 만족하지 못하고 있다. 전 세계적으로 만연하는 influenza를 막아내기 위해서는 안전하고도 효율적인 수단이 절실히 요구된다.

Influenza A 분무로 유발시킨 감염된 쥐가, 현저히 낮은 농도 (인간에 대한 장기 허용 노출수준, 즉 0.1 p.p.m.)의 이산화염소 (ClO_2)가스로 예방될 수 있었음을 증명해 보이려고 한다. 반 밀폐 우리(semi-closed cages)에 갇힌 쥐들을 influenza A virus (1 LD₅₀)의 분무와 ClO_2 가스 (0.03 p.p.m.)에 동시에 15분간 노출시켰다. 노출 3일 후에, 폐질환을 일으킨 virus 滴定量 (pulmonary virus titre [TCID₅₀])은 ClO_2 로 처리한 5마리의 쥐들에서는 $10^{2.6 \pm 1.5}$ 인 반면, 처리하지 않은 5마리의 쥐들에서는 $10^{6.7 \pm 0.2}$ 이었다 ($P=0.003$).

16일 후에 ClO_2 로 처리한 경우의 죽은 쥐의 누적수량은 0/10이었고, 처리하지 않은 경우는 7/10이었다 ($P=0.002$). 시험관 실험에서, ClO_2 는 virus의 감염에 없어서는 안 되는 virus의 외피 단백질 (haemagglutinin과 neuraminidase)을 變性시켜 감염성을 파괴시켰다.

상기 두 사실을 고려해 볼 때, ClO_2 가스는 인간에게 허용되는 노출 수준보다 훨씬 낮은 농도에서 virus의 외피 단백질을 변성시켜 쥐들에게 분무로 전염되는 influenza virus 감염을 예방할 수 있는 효능이 있다고 결론지을 수 있다.

그러므로 ClO_2 가스는 활동영역으로부터 인간을 疏開할 필요 없이 influenza를 예방할 수 있는 유용한 수단이 될 수 있다.

INTRODUCTION

인간의 호흡기 계통 상.하부에 가장 흔하게 감염되는 것들 중에는 enveloped, negative-sense, single-stranded RNA virus인 influenza A virus에 의한 것이 가장 많다(Skehel & Hay, 1978; Ghendon et al., 1981; McCauley & Mahy, 1983). 전형적으로 매년, 그 virus는 인구의 15-20%을 감염시키고, 전 세계적으로 500,000명이 넘는 사람들을 사망케 한다(Thompson et al., 2003; WHO, 2003), 그러나 가장 놀라운 결과는 새로운 virus 변종이 나타날 때이며, 전 세계적으로 참화를 가져오게 한다(Reid & Taubenberger, 2003). 현재 보고되고 있는, 조류로부터 인간에게 전염되는 influenza A virus, 특히 H5N1 아류 형은 전 세계적으로 널리 퍼질 가능성이 있어 각별한 경계를 요한다고 한다 (Webby & Webster, 2003; Webster et al., 2007). 지금까지 없던 influenza virus의 새로운 변종들이 가까운 장래에 전 세계적으로 번져 참화를 불러오게 될 것임은 아무리 강조해도 지나치지 않다(Palese, 2004). 지난 세기 동안 influenza virus 감염이 3번 발생하여 엄청난 수의 사망자를 냈었다. 그것들 중에 1918년에 나온 변종은, 감염성이 강하여 쓰러린 병고를 준 것으로 유명하다 (Kong et al., 2006).

호흡기 계통의 여러 virus들과 마찬가지로, influenza virus는 감염자로부터 쏟아진 분무(飛沫)의 형태로 공기 속에 퍼진다. 감염을 일으키기 위해서는 이것들이 표적세포에 붙은 다음 속으로 침투하여야 한다(Wagner et al., 2002). Virus가 표적세포 속에 침투할 수 있는 주 경로는 호흡기관의 상피세포 표면에 있는 수용체(receptor)에 달라붙은 다음 감염세포 속으로 virus의 유전물질을 전달하는 것이다. (Wagner et al., 2002). Influenza virus의 외피는 두 개의 주요한 표면 糖蛋白質(glycoproteins)인 haemagglutinin (HA)와 neuraminidase (NA)을 가지고 있다(EC3.2.1.18). HA는 숙주세포의 상피(sialic) acid-containing receptor에 달라붙은 다음 세포 속으로 침투하여 세포막과의 융합을 꾀함으로써 virus 감염의 시작단계에서 주도적 역할을 한다(Tsuchiya et al., 2001; Wagner et al., 2002; Bentz & Mittal, 2003). 감염의 후반 단계에서는, NA 또한 주요역할을 하는데, progeny virus 입자 표면과 감염된 세포로부터 sialic acid residues를 내놓아 virus 방출을 용이하게 한다(Solorzano et al., 2000; Wagner et al., 2002; Gong et al., 2007).

NA가 활동 중에 influenza virus가 부족하면 progeny virus 입자들이 감염세포 표면에 모여 들어 다른 세포에 더 이상 virus가 퍼지는 것을 강력하게 저해한다. HA와 NA는 모두 이 virus의 감염과 확산에 없어서는 안 되는 물질들이다. zanamvir, oseltamivir와 resveratrol 같은 몇 개의 항바이러스 화합물들이 개발되었지만, 독성과 약에 내성을 가지는 바이러스 돌연변이가 계속 나타남으로 인하여 그것들의 장기적 효능은 아직 제한적이다(Nicholson et al., 2003). Influenza virus를 막기 위한 예방접종은 아직 제한적 효능을 가지고, Influenza virus에 의한 질병을 완전히 예방하는 것은 아직도 가능하지 않다 (Ge et al., 2004).

이산화염소(ClO_2)는 水溶性이고 鹽素와 같은 독특한 냄새와 강한 산화력을 가지는 노랑색 기체이다(Moran et al., 1953; Fukayama et al., 1986; Ogata, 2007). ClO_2 는 통상적으로 sodium chlorite (NaClO_2)용액에 酸을 첨가하여 만든다. ClO_2 는 분자궤도에 짝 지워지지 않은 한 개의 電子때문에 free radical로 존재한다(ClO_2^\cdot) (Lynch et al., 1997). ClO_2 는 물에 녹았을 때 강한 산화력 때문에

(Moran et al., 1953; Fukayama et al., 1986), 박테리아, 균류, 원생동물 및 바이러스에 대하여 강력한 항균성을 가진다 (Taylor & Butler, 1982; Harakeh et al., 1988; Chen & Vaughn, 1990; Foschino et al., 1998; Eleraky et al., 2002; Schwartz et al., 2003; Sivaganesan et al., 2003; Li et al., 2004; Loret et al., 2005; Sy et al., 2005; Wilson et al., 2005; Okull et al., 2006; Simonet & Gantzer, 2006). 그러나 기체상태의 ClO₂가스의 항균성에 대한 연구는 잘 이루어지지 않았다. 특별히, 농도가 매우 낮은 (subtoxic levels) ClO₂가스의 항균성은 인간에게 해를 끼치지 않고 충분히 안전하게 사용할 수 있다는 사실은 진실이다. 미국의 Occupational Safety and Health Administration에 따르면, 大氣 환경에서 인간에게 허용되는 ClO₂의 長期 (8시간) 허용노출 수준은 0.1 p.p.m.이다. (v/v) (US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 2006).

만약에 기체상태의 ClO₂가 독성수준 이하에서 강력한 항균능력을 가진다면, 사무실, 학교, 극장, 병원 및 공항등과 같은 공공장소에서 호흡기 감염의 전염을 방지하기 위하여, 독성수준 이하에서, 내부에 있는 사람들을 疏開함 없이 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 이번 연구의 목적은 쥐-influenza model을 사용하여 influenza A virus 감염을 독성수준 이하의 ClO₂가스로 예방할 수 있는지 여부를 알아보기 위함이다. 이 virus에 대한 ClO₂효과의 mechanism이 시험관 내 생화학적 실험을 통하여 다시 입증되었다.

METHODS

반응물(시약), 동물 및 바이러스

Sodium chlorite (NaClO₂)는 JT Baker로부터 구입하였다. 모든 다른 시약들은 시약수준의 것이었다. CD-1 수컷 쥐들은 생후 6-8주 된 것으로 Charles River Laboratories에서 구입하였다. 그것들은 실험 전 적어도 1주일간 실험실 환경에 익숙해지도록 하였다. 각 실험 세트마다 15마리의 쥐들로 구성하였다. 5 마리는 virus 분무에 노출시킨 후 3일 후 (72시간)에 희생시켜 그것들의 폐의 virus 滴定량을 측정하고 폐 조직의 병리학적인 검사를 하였다. 10마리는 21일이 될 때까지 죽는 숫자를 관찰하였다. 이 동물실험(결과)는 Taiko Pharmaceutical Experiment Committee가 공인하였다. Influenza 바이러스 변종인 A/PR/8/34 (H1N1) 은 여러 동물실험에 사용되었으며 A/New Caledonia/20/99 변종은 모든 시험관 실험에 사용되었다. 이들 virus는 Madin-Darby 개(犬)의 콩팥(MDCK) 세포와 소(牛) 태아(fetal)의 10% 혈청을 추가한 Eagle社의 MEM(minimum essential medium)을 사용하여 배양. 전파되었다. 그것들은 20-50% linear sucrose gradient로 velocity density-gradient 원심분리기를 사용하여 깨끗하게 정화되었다. virion (바이러스의 최소단위)을 함유하는 단편을 수집하여 滴定한 다음 -80 ° C에서 사용 시까지 보관하였다. 사용 직전에, virus가 들어 있는 유리병을 재빨리 녹여서 Dulbecco's PBS로 희석하여, aerosol 형태로 되었을 때 대략 1 LD₅₀ (one 50% lethal dose)가 되도록 하였다. 이렇게 준비하여 쥐들을 이것에 15분간 노출시켰다. 희석시킨 virus 현탁액을 Aero-Mist 분무기 (CIS-US, Inc.)의 저장통 안에 넣어두었다. Virus가 없는 대조실험을 위하여 PBS만을 넣은 교환 가능한 저장통이 있는 또 다른 분무기를 병행하여 사용하였다. virus가 있는 것과 없는 것을 전환 장치를 이용하여 재빨리 교환하였다 (Fig. 1). aerosol을 투여한 날을 'day 0'라 하였다.

ClO₂ generator.

ClO₂ 생성기는 실험실에서 자체 제작하였다(Fig. 1a). ClO₂는 250mM HCl과 28 mM. NaClO₂를 섞어 만들었다; 이 용액들은 정밀 액체펌프 A와 B를 사용하여 반응조에 넣었다. ClO₂는 다음과 같은 반응으로 생성되었다.

$5\text{NaClO}_2 + 4\text{HCl} \rightarrow 4\text{ClO}_2 + 5\text{NaCl} + 2\text{H}_2\text{O}$. 반응조에서 생성된 ClO₂를 기체 상태로 뽑아내기 위하여 공기로 거품을 일게 하였다. 약 50 p.p.m.의 ClO₂ 가스가 반응조로부터 0.41 l min⁻¹씩 흘러 나왔다. 다음에 ClO₂ 가스를 공기 펌프 B와 C를 사용하여 공기를 섞어 희석하였다. 마지막으로 약 0.8 p.p.m.의 ClO₂ 가스를 1.8 l min⁻¹씩 쥐 cage로 흘러 넣었다 (Fig. 1). ClO₂ 가스의 농도와 유입 속도는 각각 농도 조절기와 유입 조절기로 미세하게 조절하여 실험에 필요한 가스 농도와 유입 속도를 맞추도록 하였다. ClO₂ 가스는 최종적으로 Fig. 1(b)에서와 같이 쥐 cage로 유입시켰다.

Set-up of the animal experimental system.

ClO₂ 가스와 virus aerosol에 쥐들을 노출시키기 위하여, class II biosafety cabinet에서 실험이 진행되었다. Biosafety cabinet 안 26X37X18 cm (inner dimensions) 크기의 반 밀폐 cage에 15마리의 쥐들을 넣었다 (Fig. 1b). cage안의 공기를 순환시키기 위하여 건전지로 작동되는 선풍기(2x6x6 cm)를 쥐들과 건전지 박스와 함께 cage안에 넣었다. Plexiglass cage는 밀폐되어 있으나 위쪽 뚜껑은 공기가 스며 나올 수 있을 만큼 느슨하게 되어 있어 cage안의 압력이 상승하는 것을 막을 수 있었다. 교환할 수 있는 2개의 분무기 즉 PBS만을 담은 것과 PBS 속에 virus를 넣은 현탁액 중 하나는 공기펌프 하나에 연결하였다. (Fig. 1b). PBS만을 담은 것이거나 PBS 속에 virus를 넣은 현탁액이거나 분무기로 만든 aerosol을 쥐 cage로 유입시켰다. 위에 언급한 2 종류의 aerosol은 전환기에 의하여 재빨리 교환할 수 있었다. ClO₂ 가스나 공기 (대조군으로서의 0 p.p.m. '가스')를 다른 구멍을 통하여 cage안으로 넣었다 (Fig. 1b, right). ClO₂ 분석 장치(model 4330-SP; Interscan Corporation)의 sampling tube는 또 다른 구멍을 통하여 삽입되었다. ClO₂ 가스 농도를 간헐적으로 측정하였다.

Pathological examination.

Pentobarbital sodium을 근육 내에 주사하여 쥐들을 희생시킨 다음, 그것들의 폐를 주의 깊게 떼어내어 중량을 달았다. 폐의 일부는 PBS로 균질화 하고 일부는 MDCK 세포를 이용하여 virus 滴定量을 측정하였다. Virus 滴定量은 TCID₅₀로 표시하였다. 폐의 또 다른 일부는 buffered formalin으로 고착시켜 조직 병리학적 검사를 위하여 haematoxylin과 eosin으로 착색하였다.

Assay of in vitro infectivity, HA titre and NA activity of virus.

Influenza virus (1 mg protein ml⁻¹)를 0 °C에서 2 분간 PBS안에 있는 여러 가지 농도의 ClO₂로 처리하였다. 그 반응은 Na₂S₂O₃의 질량을 2배로 초과 첨가하여 끝냈다. 시험관 내에서 그 virus의 감염성을 MDCK 세포를 지표세포로 사용하여 측정하였다. 간단히 말하면, 1x10⁶ 개의 세포를 10% 소(牛) 태아(fetal)의 혈청을 가지는 10 ml Eagle's MEM 을 사용하여, 직경 6cm의 Petri 접시에서 접종하였다.

세포들은 유착될 때까지 (약 2일간) 자라도록 한 다음, ClO₂로 처리한 것이나 처리하지 않은 것이나, 10배로 연속 희석하여 PBS에 현탁시킨 virus로 오염시켰다. 다음에 세포들을 0.9 % 寒天, 2.5 μg trypsin ml⁻¹ (취액중의 소화효소), 100 units penicillin G ml⁻¹과 100 μg streptomycin ml⁻¹을 보강하였으나 혈청이 없는 새로운 매질로 도포하였다. 배양 접시(culture dish)는 95 %의 공기와 5 %의 ClO₂ 환경에서 37°C로 3-4일간 배양하였다. 그 다음 세포들을 고착시켜 plaque (斑) 수량을 세기 위하여 crystal violet으로 착색하였다. 상기 실험에서 사용된 ClO₂ 및/또는 Na₂S₂O₃의 농도는 MDCK 세포들의 성장에는 아무 영향을 끼치지 않았다. HA 滴定량 측정을 위해서, 2배로 연속 희석 처리한 (0 °C, 2min, in PBS) virus를 PBS에 넣은 다음 바닥이 둥근 96-well을 가진 미세 적정 (microtitre) 접시에 첨가하였다 (50 μl per well). 닭의 적혈구 세포 (2X10⁶ cells in 50 μl)를 첨가하고 4 °C에서 1시간 배양하였다. HA 적정의 종말점은 완전한 haemagglutination을 보이는 마지막 희석의 역수로 나타내었다. NA 분석에 대해서는, virus는 8 μg protein ml⁻¹로 희석하고 나서, calcium-MES buffer [32.5 mM MES buffer (pH6.5), 4 mM CaCl₂]속에 있는 2mM 2'-(4-methylumbelliferyl)-α -D-N-acetylneuraminic acid (sodium salt)를 1 mM의 최종농도에 첨가하였다. 이 혼합물을 37 °C에서 1시간 배양하였다. 그 반응은 25 % ethanol을 가지는 800 μl glycine buffer (0.1 M, pH 10.7)을 첨가하여 종료시켰다. 강도는 spectrofluorophotometer (model RF-5300PC; Shimadzu)로 측정하였다 (λ_{ex}=365nm, λ_{em}=450nm).

Sequencing and mass spectrometry (MS) of peptides.

합성 펩티드인 HA1 (NPENGTCTYPG)와 HA2 (RNLLWLTGKN)은 각각 HA 단백질의 aa 101-110과 162-171에 해당한다. 펩티드 NA1 (FESVAWSASA)와 NA2 (SGYSGSFVQH)는 각각 NA 단백질의 aa 174-183과 400-409에 해당한다. 이것들은 Global Peptide Services로부터 구입하였다. 이들 펩티드 (2 mM each)는 체적 500 μl의 PBS 안에 있는 4mM ClO₂로 25 °C에서 2분간 처리하였다. 반응 후에 2.5M Na₂S₂O₃의 2배 초과 분자량(1.6μl)을 첨가하여 반응을 종료시켰다. 그런 다음 reverse-phase column (Cosmosil 5C18-AR-300, 4.6 mm inner diameter, 250 mm long; Nacalai Tesque)을 이용하는 high-performance liquid chromatography (HPLC)를 하기 위하여 반응 혼합물의 일부 (100 μl)를 첨가하였다. column은 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid 의 solvent로 6분간 반응시킨 다음 solvent 내 linear gradient 10-50%의 acetonitrile로 다음 54분에 걸쳐 1 ml min⁻¹로 흘러내려 溶離하였다. 펩티드는 270 nm에서 흡수에 의하여 monitor 되었다. Peak materials (peptides)를 수집하여 냉동 건조하였다. 냉동 건조시킨 펩티드는 protein sequencer (Procise; Applied Biosystems)를 사용하여 Edman degradation에 의하여 분석하여 amino acid sequences를 측정하였다. 펩티드와 amino acid residues의 분자량은 matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF)와 MALDI - TOF/ TOF (tandem MS) modes에서, mass spectrometer (model Ultraflex; Bruker Daltonik)를 사용하여 측정하였다. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid는 matrix로 사용하였다.

Statistical analysis.

Data는 Student's *t*-test 또는 Fisher's exact test를 사용하여 분석되었다. *P* 값이 <0.05라는 것은 통계적으로 의미가 있다고 생각된다.

RESULTS

Simultaneous exposure of mice to virus aerosols and ClO₂ gas

ClO₂ 생성기(fig. 1a)에서 만들어진 ClO₂ 가스는 PBS만의 분무 또는 PBS에 현탁된 influenza A (Fig. 1b)로 동시에 15 분간 쥐 cage로 집어넣었다. 이 시간 동안 ClO₂로 처리한 그룹의 쥐 cage안의 ClO₂ 가스 농도는 0.032±0.026 p.p.m. 이었다 (time-weighted mean±SD). ClO₂로 처리하지 않은 대조 그룹으로서 오로지 공기(0 p.p.m. ClO₂)와 PBS에 현탁된 influenza A의 분무를 또 다른 15마리의 쥐들을 넣어둔 cage에 집어넣었다. ClO₂로 처리하지 않은 대조 그룹에서 3일 되는 날 (day 3; 72h), virus의 pulmonary titre (TCID₅₀)은 10^{6.7±0.2} (n=5)이었으나, ClO₂로 처리한 그룹에 있어서는 10^{2.6±1.5}이었으며 (P=0.003, Student's *t*-test) (Table 1). 이것은 ClO₂ 가스가 쥐의 폐에 전염성 virus 숫자를 줄이는 데에 효과가 있다는 사실을 명백히 증명하는 것이다 (또 독립적으로 행해진 다른 실험에서도 비슷한 결과가 나왔다.). 16일째 되는 날 누적된 죽은 쥐는 ClO₂로 처리하지 않은 대조 그룹에서는 70% (7/10)이었고, ClO₂로 처리한 그룹에서는 0% (0/10)이었다 (P=0.002, Fisher's exact test) (Table 2). 이러한 결과로 보면, ClO₂ 가스는 influenza virus A 분무로 공격을 받은 쥐의 죽음을 예방할 수 있다는 사실을 말하는 것이다. 다른 실험을 통하여 상기의 결과를 또 다시 확인할 수 있었는데, 그 실험에서는 ClO₂ 가스로 처리하지 않은 대조 그룹에서는 5/10이었고, 0.03 p.p.m.의 ClO₂ 가스로 처리한 그룹에서는 0/10이었다 (P=0.03).

상대적 체질 량 (body mass at day 7 compared with that at day 0)은 ClO₂로 처리한 그룹에서는 1.09±0.04 (n=5)이었고 ClO₂로 처리하지 않은 대조 그룹에서는 0.91±0.04 (n=5)이었다 (P=0.002, Student's *t* test) (Table 3). 이 결과는 influenza A virus 로 야기되는 쥐의 죽음을 막을 수 있음을 더욱 뒷받침하는 것이다. 또 다른 대조 실험으로서, 농도 0.03 p.p.m.의 ClO₂ 가스가 15 마리의 쥐에게 어떤 독성효과를 가지는 지 알아보기 위하여, ClO₂가스 (0.03 p.p.m., without virus)와 PBS 분무 (without virus)를 또 다른 15마리의 쥐가 있는 쥐 cage로 넣었다. 쥐들은 관찰 21일 동안 외관상으로 완벽한 건강상태를 유지하였다. 0.03 p.p.m.의 ClO₂ 가스와 PBS분무로 처리한 5마리의 쥐의 폐 조직 표본을 현미경으로 검사한 결과, 그 쥐들의 폐는 완벽하게 정상이었다 (data not shown).

Delayed gas-delivery experiment

다음으로, influenza virus 분무를 쥐 cage로 넣고부터 여러 시간대별로 나누어 ClO₂가스를 쥐 cage로 넣어가면서 그 효과를 검사하였다. 이 실험의 목적은 virus 분무를 넣은 후에 투입된 ClO₂가스가 virus 오염을 막을 수 있는 지 알아보는 것이었다. Virus 분무와 동시에 ClO₂를 투입한 경우에 쥐의 사망률은 0 % (0/10)가 되어 (0 min delay, P=0.022 versus no-ClO₂ group) (Table4), Table

2에서 보인 결과를 확인할 수 있었다. virus 분무를 넣은 후 5분 후에 ClO₂ 가스를 투입했을 때는, 사망률은 10 % (1/10)가 되었다 (P=0.081 versus no-ClO₂ group). 15분 경과 시에 투입한 경우의 사망률은 50 % (5/10)가 되었는데, 이것은 ClO₂가스를 투입하지 않은 동물의 경우와 같았다 (Table 4). 이러한 결과는, virus 분무와 동시에 투입된 환경일 경우에 influenza virus 감염에 대하여 예방효과가 있음을 보여준다. 5분 뒤에 투입될 경우에는 효과가 조금 떨어지나 (P=0.081), virus 분무를 넣은 후 15분에 투입된 경우에는 효과가 全無하였다. 이 같은 두 사실을 함께 감안해 볼 때, ClO₂가스는 폐 속으로 들어가기 전에 virus를 무력화 시킬 수 있으나, 이미 폐 속으로 들어가 감염을 시켜버린 다음에는 virus를 무력화 시킬 수 있는 능력이 없음을 알 수 있다. 요컨대, ClO₂가스는 지극히 낮은 농도에서 (below the long-term permissible exposure level to humans), 해로운 영향을 끼치지 않고 influenza virus에 의한 쥐의 감염을 효과적으로 예방할 수 있음을 말해주는 것이다.

Effects of ClO₂ on the infectivity of influenza A virus *in vitro*

시험관 내에서 Influenza A virus를 ClO₂로 처리하고 배양한 세포들을 이용하여 그 감염성을 평가하였다. 40-320 μ M의 ClO₂로 처리한 후에는 virus의 감염성이 현저하게 줄었으며, 이것은 ClO₂가 virus의 감염성을 확실하게 무력화 함을 증명하는 것이다 (Table 5). virus 표면 (envelope)의 HA 및 NA 단백질이 virus의 감염에 필요 불가결하므로 그 단백질들의 생물학적 활동을 시험하였다. Table 5에서 보인 바와 같이, 시험관내 ClO₂ 처리 후에 HA와 NA의 활동은 현저하게 감소하였다. 이는 influenza virus의 감염성이 감소한 것은 virus 표면에 있는 HA 및 NA 단백질의 생물학적 활동이 감소한 것에 기인되었음을 암시하는 것이다.

Denaturation of HA and NA proteins

ClO₂가 HA 및 NA단백질을 변성시켜 그것들의 생물학적 활동성을 무력화시켰으리라고 생각하였다. 이 가설을 뒷받침하기 위하여, HA로부터 두 개의 model decapeptides (HA1and HA2)와 NA로부터 두 개 (NA1 and NA2)를 선택하였다 (for sequences, see Methods). 이들 펩티드를 ClO₂로 처리한 후에 이것들을 reverse-phase HPLC로 분석하였다. 이들 4가지의 펩티드를 ClO₂로 개별적으로 처리하여 chromatography로 분석하였을 때, 원래의 펩티드 peaks와 완전히 다른 새로운 몇 개의 peaks가 나타났다 (data not shown). 이는 ClO₂와 반응하여 공유원자가가 변경되었음을 나타낸다. 이 가설은, HPLC로부터 찾아낸 펩티드 peaks 의 배열의 결과로 (by Edman degradation) 펩티드에 있는 어떤 amino acid residues 는 확인할 수 없었다는 사실을 더욱 뒷받침하였다(Table 6). 예를 들면, ClO₂로 처리한 펩티드 HA2 (RNLLWLTGKN, aa 162-171)에 관하여, HLPC에서 나타나는 펩티드 peaks의 배열은 RNLLXLTGKN 이었다; 다섯 번째 amino acid residue (Trp¹⁶⁶ in the original protein)는 통상적인 protein-sequencing method로 확인할 수 없었다. 이것은 residue (tryptophan)가 ClO₂에 의하여 공유원자가가 변경되었음을 의미한다. 마찬가지로 tryptophan과 tyrosine residues에서 다른 펩티드가 변경되었음을 알 수 있다 (Table 6). HA1의 cysteine residue가 ClO₂에 의하여 변경되었는지는 불명확한데 이는 cysteine residues를 통상적인 sequencing method로는 확실하게 확인할 수 없기 때문이다.

ClO₂ 처리로 인한 tryptophan 및 tyrosine residues의 공유원자가 변경 여부는 MS에 의하여 확인할 수 있었다. Table 7에서 보인 바와 같이, HA2와 NA1 펩티드가 변경되었을 때, tryptophan residues에 약 32 또는 48 원자량이 증가하였는데 이것은 2 또는 3개의 산소원자들이 tryptophan residues에 공유원자가적으로 결합되었음을 의미한다. 마찬가지로 변경된 HA1 및 NA2 펩티드의 tyrosine residues에 약 32 또는 48 원자량이 증가하였는데 (Table 7), 이것은 tyrosine residues에 2 또는 3개의 산소원자들이 공유원자가적으로 결합되었음을 의미한다. 이 사실을 종합해 볼 때 HA 및 NA proteins의 amino acid residues, 주로 tryptophan 및 tyrosine residues들이 ClO₂에 의하여 공유원자가적으로 변경되었다고 결론내릴 수 있다. Amino acid residues의 그러한 변경은 감염에 반드시 필요한 influenza virus의 HA 및 NA 단백질을 변형시켰으며, 이는 결과적으로 virus의 전염성을 없앤 것으로 보인다.

DISCUSSION

극히 낮은 농도의 ClO₂ gas가 분무에 의해 야기되는 influenza A virus에 의한 쥐의 감염을 막을 수 있음을 증명하였다. US Occupational Safety and Health Administration에 의하면, 인간 작업장에서 ClO₂의 8시간 허용노출 수준은 0.1 p.p.m.이다. 본 연구에서 사용한 ClO₂ 수준 (0.03 p.p.m.)은 허용 수준보다 훨씬 낮은 수준이며, 이번 연구결과로 보건데, 이 수준의 ClO₂는 인간에게 influenza A virus 및 아마도 호흡기 계통의 다른 비슷한 virus에 의한 감염을 막는데 사용될 수 있음을 나타낸다. 특별히 ClO₂ gas는 사람들을 疏開함 없이, 따라서 인간의 정상적인 활동을 방해함이 없이, 사무실, 극장, 학교 및 공항에서 사용할 수 있다.

높은 발병성의 조류독감 virus인 H5N1으로 야기되는 위협에 대하여 사람들의 관심이 점점 증가하고 있으며, 그 virus를 막아낼 방법을 찾아내는데 관심을 갖게 하였다. 수돗물의 살균제로써 ClO₂와 chlorine이 오랜 동안 사용되어 오고 있다. 지금까지 chlorine 처리 (chlorination)는 수돗물 처리 시 살균제로써 가장 흔히 사용되었다. Rice et al. (2007)은 최근 시험관 실험에서 influenza A virus의 변종인 H5N1이 chlorine에 의하여 비활성화 되었다고 보고하였다. 그들의 실험에서 음용수 처리 시 전형적으로 사용되는 free chlorine 농도는 1000배 이상 virus를 비활성화 하는 데에 충분하였다. 우리의 현재 실험 (H1N1)에서 사용된 influenza virus 변종은 Rice et al. (2007)이 사용한 것과는 다르지만, 우리의 현재 방법, 즉 ClO₂로 virus를 처리하는 것은 virus에 오염된 수돗물의 처리에 또 다른 효과적인 방법을 제공하는 것이며, 전 세계적으로 유행하는 influenza를 막아내는 새로운 길을 열어 놓는 것이다.

ClO₂ gas는 물에 잘 녹고, gas와 물 상태 사이에서 평형상태를 이룬다. 우리의 예비 실험에서, ClO₂는 30 s 내에서 gas상태와 액체상태 사이에서 평형에 도달하였다. (half-maximal in 20 s) (N. Ogata, unpublished data). 일반적으로 말하면, 물에 녹는 기체상의 물질은 Henry's law $C=kP$ 에 따라 기체와 물은 평형상태에 이르며 여기에서 C는 물속에 있는 물질의 농도이고 k는 평형 상수임. 현재의 실험에서와 같이 분무의 직경이 1-10 μ m 범위에 있으면 평형상태는 1분 내에 도달한다. ClO₂-water 평형과 관련하여 Henry의 평형기체상수를 알아 냈는데, k, 즉 위 방정식에서 k는 $3.9 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ 이었다 (N. Ogata, unpublished data). 그러므로 virus 분무가 0.03 p.p.m.의 ClO₂와 평형상태에 있을 때, virus 분무에 있어 ClO₂

농도는 이론적으로 0.12 μ m이다. 이것은 influenza A virus가 물속에서 0.12 μ m ClO₂로 비활성화 됨을 의미한다(PBS in our present experiment).

우리는 지금까지 ClO₂가 influenza virus 의 envelope에 있는 HA 및 NA 단백질을 변성시켰음을 보였다 (Table 5). 이들 단백질이 virus의 감염에 필수 불가결하므로 그것들이 ClO₂에 의하여 변성되었다는 사실이 ClO₂로 처리 후 virus의 감소된 감염성을 설명할 수 있었다. 그러나 plaque assay로 증명된 바와 같이 감염성이 감소되었다고 해도 반드시 HA 및 NA 활동성이 동시에 감소되지 않음에 주목해야 한다 (Table 5). 한 가지 가능성은 감염성에 중요하고 없어서는 안 되는 virus에 다른 단백질이 출현하여 ClO₂에 의하여 변성된 경우이다. 예를 들면, virus envelope의 proton channel인 M2 단백질이 ClO₂의 target 이 되는 것이다. 이 단백질이 virus가 감염을 일으키는 데에 없어서는 안 되는 것이다 (Tang et al., 2002). 이 단백질의 tryptophan residue (Trp⁴¹)가 proton channel로 비어져 나와서 proton이 들어가 channel을 통과하도록 ' gate'로서 작용하게 하는 것이다(Tang et al., 2002). Tryptophan residues가 ClO₂에 의하여 변성되었으므로 (Tables 6 and 7) 이 단백질에 있는 tryptophan residue (Trp⁴¹)가 변성되어 그래서 그 기능을 못하게 하는 것 같다.

HA의 Tyrosine (Tyr¹⁰⁸)과 Tryptophan (Trp¹⁶⁶) residues가 influenza virus의 많은 변종 가운데 보존되어 receptor (sialic acid)를 위한 단백질의 binding site를 구성 한다 [Tyr⁹⁸ and Trp¹⁵³, respectively, in Stevens et al.,(2002)]. 그러므로 이들 amino acid residues (Table 5-7)의 공유원자가 변형은 ClO₂에 의한 HA 활성 감소 이유를 설명한다. 마찬가지로 tyrosine (Tyr⁴⁰²)와 tryptophan (Trp¹⁷⁹) residues는 NA에 보존된다. 이것들은 단백질의 활발한 site pocket을 형성하며 촉매활동에 필요하기도 하다 [Tyr⁴⁰⁶ and Trp¹⁷⁸, respectively, in Lentz et al. (1987)]; 이러한 관점은, 효소 활성성을 완전히 잃는 것은 다른 amino acids로 대체되었을 때 발생한다는 사실로 뒷받침 된다 (Lentz et al., 1987). 그러므로 ClO₂에 의한 비활성화는 ClO₂에 의한 NA의 amino acid residues의 공유원자의 변형 때문이라고 설명할 수 있다.

ACKNOWLEDGEMENTS

우리는 이 작업에 공헌하신 Dr Philip R. Wyde, Koji Abe, Cholsong Lee와 Hirofumi Morino 씨에게 감사한다. 또한, influenza A virus의 New Caledonia 변종을 제공해 주신 Dr Yoshinobu Okuno 씨에게도 감사한다.

REFERENCES

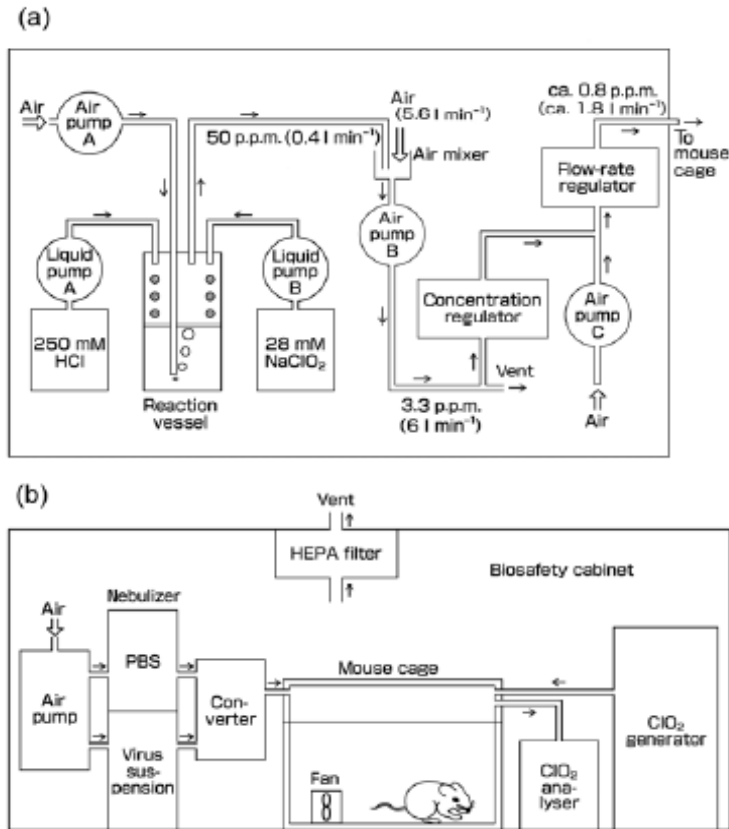


Fig. 1. (a) Schematic structure of a ClO₂ generator. (b) Experimental setup for exposure of mice to influenza A virus aerosols and ClO₂ gas.

Table 1. Pulmonary virus titres of each mouse challenged with influenza A virus aerosols in the absence or presence of 0.03 p.p.m. ClO₂ gas

[ClO ₂ gas] (p.p.m.)	Virus titre in each mouse (log ₁₀)*					Mean±SD
0	6.3	6.8	6.8	6.8	6.8	6.7±0.2†
0.03	1.3	2.1	3.6	4.8	1.3	2.6±1.5†

*Virus titre, expressed as TCID₅₀, was measured 72 h after challenge by virus aerosols (n=5 mice per group).

†P=0.003 when the means of two groups were compared (Student's *t*-test).