

개 코로나바이러스 불활화 백신에 대한 개와 기니픽 간의 면역반응 비교

안동준 · 김병한* · 정병열 · 이철현 · 전우진 · 이필수 · 정갑수

농림부 국립수의과학검역원

(계재승인: 2005년 5월 30일)

Comparison of immune responses of dogs and guinea pigs inoculated with inactivated canine coronavirus vaccines

Dong-jun An, Byoung-han Kim*, Byeong-yeal Jung, Chul-hyun Yi, Woo-jin Jeon,
Pil-soo Lee, Gab-soo Chung

National Veterinary Research and Quarantine Service, Ministry of Agriculture and Forestry, Anyang 430-824, Korea

(Accepted: May 30, 2005)

Abstract : Canine coronavirus (CCV) causes a mild gastroenteritis in dogs. The virus is highly contagious. Although the virus was isolated more than thirty years ago, canine coronavirus infection continues to be a widespread problem. Mixed infections with both CCV and canine parvovirus (CPV) are common. Four kinds of commercial killed CCV vaccines are available in Korea. All the commercial vaccines should pass the National Assay for Veterinary Biologicals prior to release. For the potency test of CCV vaccine, it is necessary to use CCV antibody free dogs. The test requires not only kennels but high cost. To develop easy, efficient and economic potency test method for killed CCV vaccine using laboratory animals, a series of experiments with rabbits and guinea pigs were carried out in this study. In the preliminary test, the guinea pigs showed better immune responses than rabbits. The guinea pig was also easy to manage. So guinea pig was selected for the potency test animals. When the guinea pigs were inoculated twice with one dose of vaccine intramuscularly each, slower and a little lower SN antibody titers were induced in guinea pigs than in dogs (about 2 kg body weight Beagle strain) given the same posology as guinea pigs'. It was concluded that guinea pigs could be substituted for dogs in the potency test of killed CCV vaccine.

Key words : canine coronavirus, inactivated vaccine

서 론

개 코로나바이러스(canine coronavirus; CCV)는 코로나바이러스과(Coronaviridae)에 속하는 single-stranded RNA 바이러스로서 개에서 중등도 내지 심한 위장염을 일으키는 것으로 알려져 있다 [7, 13, 17, 20, 25]. CCV는 1971년 독일에서 설사증에 감염된 미군의 군견에서 최초로 분리되었으며 1978년 봄과 여름 미국에서 CCV에 의한 개의 설사증이 대규모로 유행한 이후 감염된 개에서 흔하게 분리되었다 [6, 9, 10]. 그 후 CCV 감염증

과 임상적으로 감별진단하기 어렵지만 CCV 감염증보다 증상이 더 심하게 나타나는 개 파보바이러스(canine parvovirus; CPV)에 의한 장염이 크게 주목을 받기 시작하였다 [9, 10, 11, 16, 21, 22]. 그리고 CCV와 CPV의 중복감염도 흔히 관찰되고 있다 [7, 9]. 즉 CCV 단독감염의 경우 개에서 중등도의 설사증을 유발한 후 회복될 수 있지만 CCV 감염 회복기에 crypt cell이 급속하게 분열하게 되어 CPV가 증식되기 위한 이상적인 조건을 제공하여 그 후에 감염되는 CPV의 증상을 악화시켜 감염된 개는 치명적일 수도 있다는 보고가 있다 [8, 19, 28].

*Corresponding author: Byoung-han Kim

National Veterinary Research and Quarantine Service, MAF, Anyang 430-824, Korea
[Tel: +82-31-467-1782, Fax: +82-31-467-1797, E-mail: kimbh@nvrqs.go.kr]

Coronavirus는 항원적, 유전적 관련성에 따라 group1과 group2로 구분되며 CCV는 돼지전염성위장염바이러스(transmissible gastroenteritis virus; TGEV), 돼지유행성설사바이러스(porcine epidemic diarrhea virus; PEDV), 고양이전염성복막염바이러스(feline infectious peritonitis virus; FIPV), 사람 코로나바이러스(human coronavirus 229E; HCV-229E) 등과 같이 group1에 속하며, 이들 바이러스의 숙주특이성과 관련하여 TGEV는 개, 고양이, 여우 등에서 증식할 수 있으며 FIPV와 CCV 또한 돼지에 감염할 수 있는 것으로 알려져 있다 [24, 27].

CCV는 전세계적으로 분포하고 있으며 유럽, 미국, 태국, 호주, 일본 등의 지역에서 분리보고가 되고 있으며 [7, 12, 29], 국내의 CCV관련 연구를 살펴보면 1993년 이 등 [5]은 서울, 경기, 대전, 충북 등의 지역에서 사육 중인 개에 대하여 CCV에 대한 항체분포 조사를 실시하였다. 그리고 1994년 이 등 [4]은 설사증 이환견에서 CCV를 국내 최초로 분리 보고한 바 있다. 한편 윤 등 [3]은 서울 및 광주광역시 지역 사육견에 대하여 CCV에 대한 항체조사 결과를 보고하였으며 1993년 전후의 국내에서 사육되는 개에 대한 항체분포는 약 50-60% 수준인 것으로 밝혀져 당시에는 이 병에 대한 백신이 허가되지 않은 상황을 고려해 보면 국내에 CCV 감염증이 광범위하게 분포한 것으로 알려졌다.

국내의 CCV 감염증에 대한 백신의 허가 사항을 간략하게 살펴보면, 1995년 CCV 불활화 단미 백신이 최초로 수입허가가 되었으며 그 후 1996년 국내 제조사에서 CCV와 CPV의 불활화 혼합백신 제조허가를 획득한 이래 다양한 종류의 불활화, 단미 또는 혼합(복합) 백신 뿐만 아니라 생백신도 사용되고 있는 실정이다 [1, 2]. 국립수의과학검역원 고시인 「국가검정동물용의약품검정기준」 중 「개 코로나바이러스 불활화 백신 검정 기준」에 의하면, 개 코로나바이러스 불활화 백신의 역가 시험(potency test, 중화항체역가)은 3개월령의 CCV에 대한 항체 음성인 개에 백신을 2회 접종하였을 때 중화항체가 4배 이상 유도되어야 합격될 수 있도록 규정하고 있다. 따라서 이 백신에 대한 역가시험을 하기 위해서는 개 사육시설이 요구될 뿐만 아니라 CCV에 대한 항체 음성인 개의 확보 등 여러 가지 문제점이 발생하고 있는 실정이다. 한편 동물용 백신의 국가검정을 실시하지 않는 외국의 경우에는 백신 제조회사에서 자가검정을 하고 있으며 이들 자가검정법으로 대부분 경우 효소면역측정법(ELISA)을 이용하여 기존의 CCV 표준항원에 대한 신규 생산된 항원의 상대적 흡광도를 측정하여 백신내에 첨가되는 항원량을 조정하는 방법을 사용하고 있다. 이러한 relative potency를 측정하기 위해서는 제조회사마다 각기 다른 표준항원을 확보하고 있어야

하며 타 회사의 항원역가를 측정하기 어렵다. 또한 백신 완제품의 경우 adjuvant와 항원이 혼합되어 있어서 순수 항원만을 특이적으로 분리할 수가 없어 백신내의 항원역가를 정확하게 측정할 수 없는 실정이다.

이상에서 언급한 CCV 백신의 국가검정 및 백신 제조사의 자가검정에서 발생하는 시험상의 문제점을 해결하고 국내 백신 제조회사의 품질관리에 도움을 주기 위하여 목적동물인 개를 대체하여 실험용 소 동물을 사용한 역가시험법을 개발하기 위하여 CCV 백신을 접종 받은 개와 실험소동물간의 항체 형성능을 비교 분석하는 일련의 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

바이러스 및 세포배양

혈청중화시험(serum neutralization test; SN test)에 사용한 CCV는 Binn 등 [13]이 분리한 VR-809주를 ATCC(American type culture collection)로부터 구입하여 사용하였다. CCV의 배양 및 혈청중화시험을 위하여 Binn 등 [14]이 개의 대퇴부종양에서 작성한 A-72 cell line(ATCC ARL-1542)을 사용하였다. A-72 cell은 10% 소 태아혈청(fetal calf serum, Gemini Bio-Products, USA)과 항생제가 첨가된 alpha minimum essential medium (α -MEM; Jeil Biotechservices, Korea)을 사용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

백신

국내에 시판되고 있는 4종의 CCV 불활화 백신을 사용하였다. A와 B사 제품은 국내제조 백신이며 C와 D사 제품은 수입백신으로서 A사 제품은 CPV·CCV 혼합백신으로 합성 mineral oil을 adjuvant로 첨가한 백신이었다. B, C 및 D사 제품은 모두 수산화 알루미늄 젤을 adjuvant로 첨가한 백신으로 C사 제품은 단미 백신인 반면, B와 D사 제품은 각각 개 디스토포·전염성간염·파라인플루엔자·파보바이러스(DHPP) 생백신 및 CPV 생백신의 희석액으로 사용되는 액상의 CCV 불활화 백신 부분만을 사용하였다.

실험동물 및 백신접종

백신접종 시험용 목적동물은 체중 약 2kg의 11주령의 소형 비글견(Beagle dog)으로서 시험을 시작하기 전에 CCV에 대한 항체검사를 실시하여 항체음성으로 확인한 후 대조군을 포함하여 총 15두의 개를 사용하였다. 백신을 1 dose(1 ml)를 근육접종한 후 2주 후에 동량을 2차 접종하였으며 5주 후까지 매주 채혈하여 CCV에 대한 혈청중화 항체가를 조사하였다. 실험 소동물로

는 충분한 양의 채혈을 할 수 있으며 다루기 편리한 토끼(뉴질랜드화이트, 약 2.5 kg)와 기니픽(Hartley계, 300-350 g)을 사용하였다. 백신접종은 개에서와 마찬가지로 1 dose 씩 2회 접종하였으며 접종 후 6주까지 매주 채혈을 하여 혈청중화항체가 조사에 사용하였다. 각각의 동물접종에 사용한 백신은 가능하면 제조사별로 동일한 로트의 백신을 사용하고자 하였다.

혈청중화 시험

이 등 [5]과 Bandai 등 [12]의 방법을 응용하여 실시하였다. 약술하면, 채혈한 혈액에서 혈청을 분리한 후 56°C에서 30분간 비동화하였다. 이 혈청 50 µl를 동량의 α-MEM 배지를 이용하여 96 well microplate에서 2진 희석한 다음 각각의 희석된 well에 200TCID₅₀/0.1 ml의 CCV를 50 µl 씩 첨가하여 잘 혼합한 후 37°C CO₂ 배양기에서 1시간 동안 중화시켰다. 단층배양 된 A-72 세포를 trypsin 처리하여 5% 혈청이 함유된 α-MEM 배지에 ml 당 약 15만개의 수가 되도록 세포를 부유시킨 후 microplate의 각 well에 100 µl 씩 첨가한 후 CO₂ 배양기에서 5일간 배양하였다. 세포변성효과(cytopathic effect; CPE)를 완전하게 억제하는 최종 혈청희석배수의 역수를 중화항체가로 산정하였다.

결 과

실험 소동물간의 개 코로나바이러스 불활화 백신에 대한 항체 형성능 비교

면역항체 생산 또는 백신검정용 실험 소동물로 가장 흔하게 사용되는 토끼와 기니픽을 이용하여 시판되는 4개사의 제품들에 대한 항체형성능을 비교 조사하였다. 이 시험에서 CCV 불활화 백신에 대하여 더 우수한 면역반응을 나타내는 실험 소동물을 선발하기 위하여 예비 시험을 실시하였던 바 공시한 4개 제품 모두 백신접종 2주 후부터 중화항체가 검출되기 시작하여 4-5주 후에 가장 높은 항체가를 나타낸 후 항체 역가는 떨어지기 시작하였다. 그리고 백신 접종 후 경과한 시기와는 상관없이 토끼보다 기니픽에서 더 높은 항체가를 유도하였다(Table 1). 따라서 CCV 백신에 대한 항체역가 시험을 하기위한 실험 소동물로 기니픽을 선발하였다.

개 코로나바이러스 불활화 백신의 제조회사 및 제조 로트에 따른 기니픽에서의 항체 형성능 비교 조사

시판중인 개 코로나바이러스 불활화 백신 4종에 대하여 제조회사 별로 2-3로트 씩 총 11개 로트에 대하여 백신을 각각 1 dose 씩 기니픽에 근육접종한 다음 2주 후에 동량을 각각 2차 접종하였으며, 2차 접종 3, 4, 5주

Table 1. Comparison of antibody responses to commercial canine coronavirus vaccines between rabbits and guinea pigs

Animal	Company	No. of animals	Antibody titers (log ₂)					
			1 ^c	2	3	4	5	6
Rabbit ^a	A	3	<1.0 ^d	1.3	3.3	3.8	3.0	3.0
	B	3	<1.0	0.6	2.0	2.6	2.0	1.5
	C	3	<1.0	0.6	3.0	3.0	2.6	3.0
	D	3	<1.0	<1.0	1.3	2.5	2.0	1.5
Guinea pig ^b	A	15	<1.0	0.8	3.9	4.6	4.6	4.6
	B	15	<1.0	0.6	3.8	4.3	4.1	3.8
	C	15	<1.0	0.9	3.4	4.6	5.1	4.5
	D	15	<1.0	0.9	2.9	3.6	3.8	3.1

^aVaccinated with 1 dose, 2nd vaccination at 2 weeks after 1st vaccination.

^bVaccinated with 1 dose, 2nd vaccination at 2 weeks after 1st vaccination.

^cWeeks post 1st vaccination.

^dGeometric mean titers. Titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution of serum to give complete CCV neutralization.

Table 2. Serum neutralization antibody responses in guinea pigs vaccinated with inactivated canine coronavirus vaccines

Company	Lot No.	Antibody titers (log ₂)			Adjuvant
		3 ^a	4	5	
A	23paco05	1.6 ^b	3.6	4.6	Oil
	23paco09	3.8	4.3	5.0	
	23paco10	3.2	4.6	5.2	
B	33KC01	4.8	4.5	5.0	Gel
	33KC02	4.8	4.5	5.3	
C	A242153A	4.2	6.4	6.0	Gel
	A350822A	3.6	4.4	5.3	
	A350823C	3.4	4.4	5.0	
D	356103A	4.4	4.2	4.4	Gel
	356104B	3.0	3.6	4.4	
	336106B	3.0	4.3	3.5	
Mock	None	<1.0	<1.0	<1.0	None

^aWeeks post 1st vaccination.

^bGeometric mean titers. Guinea pigs were vaccinated with 1 dose of vaccines 2 times at 2 weeks intervals. Five heads were vaccinated per lot and 5 guinea pigs were used as control group.

후에 각각 채혈하여 중화항체 형성능을 조사하여 제조사별, 제조 로트별 항체역가의 편차를 비교하였다. Table 1의 예비시험에서와 마찬가지로 1차 접종 3주 후부터 대부분의 경우 약 3(log₂) 이상의 중화항체가 생성되기 시작하여 4-5주 후에 가장 높은 역가에 도달하였으며 이 시기의 항체가는 제조회사 및 제조 로트에 따라 다소 차이가 있었지만 평균적으로 4-5(log₂)의 중화항체를 나타냈다. 동일 제조회사 제품 중에서 서로 로트가 다른 경우 로트간의 항체 역가의 차이는 대부분의 경우 2배 이하로 비교적 균일한 항체가를 나타냈다(Table 2).

개 코로나바이러스 불활화 백신 접종 후 개에서의 항체가 변화

시판중인 CCV 불활화 백신 4개 제품에 대하여 제조회사별로 1로트씩 총 4로트에 대하여 백신을 각각 1 dose 씩 체중 약 2 kg의 소형 비글견에 각각 3두씩 근육 접종 한 후 2주 후에 동량으로 2차 접종을 하였다. 한편 대조군 3두는 백신접종을 하지 않았다. 그 결과 4개 회사 제품 모두 백신접종된 개에서 1주 후에 중화항체가 1(log₂) 이상으로 유도되었으며 2주 후에는 대부분의 백신 접종견이 3(log₂) 이상의 항체가를 나타내었으며 4주 후까지는 항체가가 지속적으로 상승하였다. 그리고 대부분의 백신접종군에서 평균항체가 5(log₂) 이상의 높은 항체가를 나타냈다. 그러나 접종 5주 후부터는 항체가가 다소 저하하는 것을 확인하였다(Table 3).

개 코로나바이러스 불활화 백신 접종 후 기니픽과 개에서의 항체역가 변화 비교

개 코로나바이러스 백신 접종 후 매주 경시별로 개와 기니픽에서 유도되는 항체역가의 변화를 비교 조사하기 위하여 Table 1에 나타난 4개 제조사별 기니픽에서의 항

Table 3. Serum neutralization antibody responses in dogs vaccinated with inactivated canine coronavirus vaccines

Company	Lot No.	Antibody titers (log ₂) at weeks after 1st vaccination					
		0	1	2 ^a	3	4	5
A	23paco10	<1.0 ^b	1.7	4.0	5.0	6.0	5.7
B	33KC02	<1.0	1.7	3.7	4.3	5.7	5.3
C	A350823C	<1.0	1.3	3.3	4.3	5.3	5.3
D	336105A	<1.0	1	2.7	4.0	5.7	5.0
Mock	-	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0

^a2nd vaccination, 3 dogs were vaccinated with 1 dose of vaccines per lot and 3 dogs were used as control group.

^bGeometric mean titers.

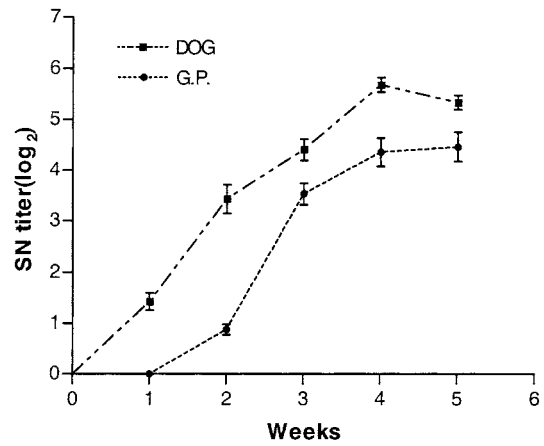


Fig. 1. Comparison of serum neutralization antibody titers of dogs and guinea pigs after vaccination of inactivated canine coronavirus vaccines respectively. Fifteen and 3 heads of guinea pigs and dogs were inoculated with 1 dose of CCV vaccines of 4 companies, respectively. Two weeks after 1st vaccination, 2nd vaccination was done with 1 dose. SN titers show geometric means of mean titers of each 4 group. The results represent the SN mean titer \pm SEM (standard error of the mean).

체역가의 기하평균과 Table 3에 나타난 백신 제조사별 개에서의 항체역가의 기하평균값을 각각 구하여 이들 두 동물간의 평균 항체역가의 변화양상을 비교하였다(Fig. 1). 각 제조사별로 기니픽은 15두씩, 개는 3두씩 사용하였다. 1차 접종 1주 후에는 개에서는 평균 1(log₂) 이상의 중화항체가 유도되는 반면 기니픽에서는 항체가 검출되지 않았다. 1차 접종 2주 후(2차 접종 시점)부터 기니픽에서 항체가 검출되기 시작하여 3주 후에는 항체가가 평균 3.5(log₂)로 급격히 상승하여 4-5주 후까지 4.5-4.4(log₂)의 수준을 유지하였다. 한편, 개의 경우에는 1차 접종 2주 후에 3.4(log₂), 3주 후에 4.4(log₂)의 항체가 유도된 후 4-5주 후에는 5(log₂) 이상의 항체가를 나타냈다. 따라서 CCV 불활화 백신 접종 후 개와 기니픽 간의 평균 항체역가를 비교해 볼 때 접종 후 2주까지는 두 그룹간의 항체역가의 차이는 현저하게 나타났지만 3주 후부터 5주 사이에 개에서 유도되는 항체가는 기니픽에서의 항체가 보다 2배 정도 높게 유도되는 것을 알 수 있었다. 즉, 체중 약 2 kg의 소형견을 사용할 때 CCV 불활화 백신에 대한 면역반응은 기니픽보다 목적동물인 개가 더 우수함을 확인하였다.

고 찰

개 코로나바이러스 감염증은 전 세계적으로 분포되어

있으나 개의 소화기 질병(설사병)에서 CCV가 직접적인 원인으로 관여하는지에 대해서는 명쾌한 결론이 내려져 있지 않으며, 이 병을 예방하기 위한 백신의 필요성에 대한 공감대가 형성되지 않아 다른 종류의 개 백신에 비하여 생산 및 판매량이 크게 적은 실정이지만 국가나 지역에 따라서 다양한 백신들이 사용되고 있다 [1, 2, 15]. 국내외적으로 사용되는 CCV 백신은 크게 약독(modified live virus; MLV) 및 불활화(inactivated) 백신 등으로 구분할 수 있으며 CCV감염증이 문제시 되는 지역에서 선택적으로 사용되고 있다. 최근 국내의 경우 CCV 생백신과 불활화 백신을 합하여 연간 약 190만두분 정도의 백신이 공급되고 있으며 이 중 생백신은 국내의 1개 제조회사에서만 연간 약 70만 두분 정도 생산하고 있어 전체 CCV 백신 공급량의 약 40% 정도를 차지하고 있다.

국내의 동물용의약품 국가검정 기준에 따라 국가검정을 실시하기 위해서는 역가시험(항체가)에서 반드시 목적동물인 개를 사용하여야 하기 때문에 개 사육시설을 갖추고 있어야 한다. 또한 국내 사육견의 경우 CCV의 자연감염 뿐만 아니라 모견에 CCV백신을 접종하기 때문에 시험용 자견에서 항체 양성율이 매우 높아 목적동물을 확보하는 데 상당한 어려움을 겪고 있다. 그리고 국내외적으로 중·대동물용 백신의 역가시험을 목적동물을 대체하여 실험동물을 사용할 수 있는 경우에는 실험동물을 이용하여 역가시험을 수행하고 있다. 유럽약전(European pharmacopoeia; EP)에는 개 및 돼지파보바이러스 불활화 백신의 역가시험에 기니픽을 사용하고 있으며 광견병 불활화 백신의 역가 시험에 마우스를 이용하고 있다 [18]. 한편 국내의 동물용 백신 국가검정 기준에도 소 전염성비기관염, 돼지 및 개 파보바이러스, 오제스키병 불활화 백신 등의 역가시험에 기니픽을 사용할 수 있도록 규정하고 있다.

목적동물을 이용한 개 코로나바이러스 불활화 백신의 역가시험 수행상의 문제점을 개선하여 국가검정 뿐만 아니라 민간 백신제조회사의 자가검정의 편의성 및 효율성을 제공하고자 CCV 불활화 백신의 역가시험에 사용할 수 있는 실험 소동물 선별하기 위하여 일련의 시험을 수행하였다. 우선 백신의 역가 시험용으로 가장 흔하게 사용되는 토끼와 기니픽에서 CCV 백신에 대한 항체 형성능 비교시험에서 백신의 제조회사와 백신접종 후 경과한 시간에 상관없이 토끼보다는 기니픽에서 더 높은 항체가 유도되었다. 이러한 이유 중의 하나로 동일한 설치동물로서 CCV 항원에 대한 이들 동물의 면역반응이 유사하다고 가정할 때 투여된 항원량이 동일할 경우 항원투여 대상 동물의 체중과 면역항체 유도 간에는 상관성이 있으며, 체중이 작을수록 항체역가가 높게 유도되는 것이 일반적인 현상이다. 따라서 다루기 쉽고

CCV 백신에 대한 면역반응이 더 우수한 기니픽을 실험소 동물로 결정하였다. 백신접종 및 채혈은 기존의 개를 이용한 역가시험에 준하여 실시하였다.

그러나 전술한 바와 같이 CCV 역가시험을 위한 실험소 동물로 선택된 기니픽에 대하여 4개의 제조회사별로 각각 2-3룻트의 백신을 접종한 후 항체가 유도 정도의 차이를 조사하여 보았을 때 C사의 1개 룻트의 백신을 제외하고는 2차 접종 2-3주 후에 동일 제조사 및 서로 다른 제조사와 룻트 별 항체역가는 2배 이상의 편차가 인정되지 않았다. 따라서 다양한 제조회사의 백신에 대해서 역가시험을 할 때 공통적으로 사용하여도 항체가 측정시험에는 문제가 되지 않을 것으로 판단되었다. 그리고 A사의 제품은 나머지 3개 회사의 제품과는 달리 adjuvant로 수산화알루미늄 젤[Al(OH)₃ gel]을 사용하지 않고 mineral oil을 사용하는 것으로 확인되었다. 일반적으로 oil adjuvant는 gel adjuvant 보다 접종반응 등의 부작용이 다소 큰 반면 항체 유도능은 더 우수하게 나타나는 것으로 알려져 있다. 그러나 A사의 백신은 다른 3개사의 백신과 거의 유사한 항체 형성능을 나타내어 기니픽을 이용하여 역가시험을 수행하더라도 결과 판정에는 문제가 없는 것으로 판단되었다.

일반적으로 알려진 바와 같이 생 백신을 접종할 때와는 달리 불활화 백신을 접종할 때에는 효과적인 면역반응을 유도하기 위해서는 반드시 추가접종(booster inoculation)이 필요하며 이렇게 하여 유도된 항체기는 시간이 경과하면 서서히 떨어지기 때문에 대부분의 불활화 백신은 6개월 내지 1년마다 추가접종을 실시하도록 권장하고 있다 [26]. 이 연구의 결과에서도 CCV 불활화 백신 접종시 실험동물인 토끼와 기니픽 뿐만 아니라 목적동물인 개에서도 1차 접종 후 2주까지는 낮은 역가의 항체가 유도되기 시작한 후 memory cell의 면역기억에 의하여 2차 접종(booster inoculation) 후에는 항체가가 급격하게 상승하는 것을 관찰할 수 있었다. 생성된 항체가의 지속능에서는 개와 토끼의 경우 1차 접종 4주 후까지는 항체가가 지속적으로 상승하다가 5-6주 후에는 항체역가가 저하하는 것을 확인하였다. 한편 기니픽의 경우 1차 접종 5주 후까지 지속적으로 항체가가 상승한 후 6주후부터 항체가가 저하하기 시작하였다. 그리고 유도되는 항체역가에서도 전체적으로 백신접종 후 동일한 시기에 항체가를 측정하였을 때 목적동물인 개에서의 항체가가 기니픽에서의 항체가 보다 약 2배 정도 높게 나타남을 알 수 있었다. 이러한 사실은 시험에 사용한 동물의 체중만을 단순히 비교하여 볼 때 이 백신의 항원성은 기니픽보다는 개에서 월등하게 우수함을 확인하였다. 한편 추가적인 고려 사항으로 이 시험에서는 체중 약 2 kg의 소형견을 사용하였으나 대형견을 사용할 경

우에는 면역반응이 소형견에 비하여 낮은 수준으로 나타날 수 있음을 고려하여야 할 것으로 생각되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 시판되는 4종류의 CCV 불활화 백신의 역가시험을 수행할 때 목적동물인 개를 대신하여 기니픽을 사용할 수 있음을 확인하였으며, CCV 불활화 백신에 대한 개와 기니픽간의 항체형성능 및 개의 체중에 따른 안전범위 등을 고려하여 1차 접종 4주후에 항체가를 측정하여 평균항체가 3(log₂) 이상인 경우 합격처리 할 수 있을 것으로 판단되었다. 실험 소동물인 기니픽을 이용한 역가 시험에서 불합격되는 CCV 불활화 백신에 대해서는 최종 확인 시험으로 개를 사용하는 기존의 역가시험을 실시하여 적합여부를 결정하는 것이 타당할 것으로 사료된다. 기니픽을 사용하여 CCV 불활화 백신의 역가시험을 실시함으로써 국가검정 뿐만 아니라 백신제조회사의 자가검정 시에 편리하고 경제적으로 역가시험을 수행할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

목적동물인 개를 이용한 CCV 불활화 백신의 역가시험을 대체하기 위하여 실험 소동물을 이용한 역가시험법을 개발하고자 일련의 시험을 수행하였던 바 실험 소동물로는 토끼보다는 기니픽이 CCV 불활화 백신에 대하여 더 높고 균일한 면역반응을 나타내어 기니픽을 실험 소동물로 선정하였다.

CCV 불활화 백신을 개(체중 약 2kg, 비글)와 기니픽(300-350g, Hartley계)에 각각 1 dose 씩 2회 투여한 후 이들 동물에서의 면역반응(중화항체역가)을 조사하였을 때 개에서의 항체역가가 기니픽에서의 항체역가 보다 더 우수하게 나타났다. 그러나 백신접종 후 경과한 시간에 따른 이들 두 동물에서의 항체역가의 변화 추이는 높은 상관성을 나타냈다. 따라서 현재의 국가검정기준에 CCV 백신에 대한 역가시험(potency test)에서 개에 대한 중화항체가가 1:4 이상으로 규정되어 있으므로, 목적동물인 개의 품종에 따른 체중의 차이가 큰 점 등을 고려하여 기니픽에서 중화항체가를 1:8 이상으로 설정한다면 중·대형견의 경우에도 비교적 항체형성능이 우수한 백신을 합격처리 할 수 있을 것으로 판단되었다.

이상의 결론을 근거로 CCV 불활화 백신의 역가시험을 개를 대신하여 기니픽을 사용하여 실시한다면 실험동물의 안정적인 확보, 간편한 사육 시설, 동물의 관리 및 실험의 편의성을 도모할 수 있을 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. 김병한. 최근 3년간 동물용 생물학적제제 수급 동향.

수의과학검역정보 2004, **24**, 67-76.

2. 사단법인 한국동물약품협회. 동물용의약품등편람. pp. 1888-1898, 경성문화사, 2001.
3. 윤기복, 강문일, 박남용, 한동운. 간접형광항체법에 의한 개의 바이러스 - canine distemper virus, canine parvovirus, canine coronavirus, canine adenovirus type-2, canine parainfluenza virus - 항체분포 조사. 대한수의학회지 1995, **35**, 75-85.
4. 이병형, 전무형, 박종현, 황의경, 허원. 설사증 이환견으로부터 분리한 canine coronavirus의 성상에 관한 연구. 대한수의학회지 1994, **34**, 517-527.
5. 이병형, 전무형, 허원. 국내 사육견에 대한 canine coronavirus 항체 분포 조사. 한국수의공중보건학회지 1993, **17**, 295-300.
6. Appel M, Meunier P, Pollock R, Greisen H, Carmichael L, Glickman L. Canine viral enteritis. A report to practitioners. Canine Pract 1980, **7**, 22-36.
7. Appel MJ. Virus infections of carnivores. 1st ed. pp. 115-122, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1987.
8. Appel MJG. Does canine coronavirus augment the effects of subsequent parvovirus infection? Vet Med 1988, **83**, 360-366.
9. Appel MJG, Cooper BJ, Greisen H, Carmichael LE. Status report: canine viral enteritis. Am J Vet Res 1978, **173**, 1516-1518.
10. Appel MJG, Cooper BJ, Greisen H, Scott F, Carmichael LE. Canine viral enteritis. I. Status report on corona- and parvo-like enteritis. Cornell Vet 1979, **69**, 123-133.
11. Appel MJG, Scott FW, Carmichael LE. Isolation and immunization of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. Vet Rec 1979, **105**, 156-159.
12. Bandai C, Ishiguro S, Masuya N, Hohdatsu T, Mochizuki M. Canine coronavirus infections in Japan: Virological and epidemiological aspects. J Vet Med Sci 1999, **61**, 731-736.
13. Binn LN, Lazar EC, Keenan KP, Huxsoll DL, Marchwichi RH, Strano AJ. Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. In: Proceedings of the 78th Meeting of the U.S. Animal Health Association. PP. 359-366. Ranoke, 1974.
14. Binn LN, Marchwicki RH, Stephenson EH. Establishment of a canine cell line: Derivation, characterization, and viral spectrum. Am J Vet Res 1980, **41**, 855-860.
15. Carmichael LE. Vaccines for dogs. In: Pastorel PP,

- Blancou J, Vannier P, Verschuere C (eds.). *Veterinary Vaccinology*. 1st ed. pp. 326-335, Elsevier, New York, 1997.
16. **Carmichael LE, Joubert JC, Pollack RVH.** Hemagglutination by canine parvovirus: Serological studies and diagnostic applications. *Am J Vet Res* 1980, **41**, 784-791.
 17. **Cartwright S, Lucas M.** Vomiting and diarrhea in dogs. *Vet Rec* 1972, **91**, 571-572.
 18. **Council of Europe.** *European Pharmacopoeia*. 4th ed. pp. 2245-2284, Council of Europe, Strasbourg, 2001.
 19. **Evermann JF, Foreyt W, Maag-Miller L, Leathers CW, McKeirnan AJ, LeaMaster B.** Acute hemorrhagic enteritis associated with canine coronavirus and parvovirus infections in a captive coyote population. *J Am Vet Med Assoc* 1980, **177**, 784-786.
 20. **Keenan KP, Jarvis HR, Marchwicki RH, Binn LN.** Intestinal infection of neonatal dogs with canine coronavirus 1-71: studies by virologic, histologic, histochemical, and immunofluorescent techniques. *Am J Vet Res* 1976, **37**, 247-256.
 21. **Macartney L, McCandlish IAP, Thompson H, Cornwell HJC.** Canine parvovirus enteritis 1: clinical, haematological and pathological features of experimental infection. *Vet Rec* 1984, **115**, 201-210.
 22. **Macartney L, McCandlish IAP, Thompson H, Cornwell HJC.** Canine parvovirus enteritis 2: pathogenesis. *Vet Rec* 1984, **115**, 453-460.
 23. **Mills RM.** Letters. *Aus Vet J* 2003, **81**, 531.
 24. **Siddell S, Wege H, Meulen V.** The biology of coronaviruses. *J Gen Virol* 1983, **64**, 761-776.
 25. **Tennant BJ, Gaskell RM, Kelly DF, Carter SD.** Canine parvovirus infection in the dog following oronasal inoculation. *Res Vet Sci* 1991, **51**, 11-18.
 26. **Tizard IR.** *Veterinary immunology an introduction*. 6th ed. pp. 235-252, Saunders, Philadelphia, 2000.
 27. **Wesseling JG, Vennema H, Godeke G, Horzinek MC, Rottier PJM.** Nucleotide sequence and expression of the spike (S) gene of canine coronavirus and comparison with the S proteins of feline and porcine coronaviruses. *J Gen Virol* 1994, **75**, 1789-1794.
 28. **Yasoshima A, Fujinami F, Doi K, Kojima A, Takada H, Okaniwa A.** Case report on mixed infection of canine parvovirus and canine coronavirus - Electron microscopy and recovery of canine coronavirus. *Jpn J Vet Sci* 1983, **45**, 217-225.
 29. **Yesilbag K, Yilmaz Z, Torun S, Pratelli A.** Canine coronavirus infection in Turkish dog population. *J Vet Med* 2004, **B51**, 353-355.