大韓獸醫學會誌(2009) 第49卷 第3號
Korean J Vet Res(2009) 49(3) : 201~205

가토화 · 계태화 우역 생백신의 유효기간 설정을 위한 안정성 및 효능 평가

예정용 · 김현주 · 나진주 · 박지용 · 이지혜 · 서현지 · 권창희 · 조인수 · 문진산*

국립수의과학검역원

(게재승인: 2009년 09월 16일)

Evaluation of stability and potency of live attenuated rinderpest vaccine of lapinized-avianized tissue culture strain origin for the establishment of expiration period

Jung-Yong Yeh, Hyun-Ju Kim, Jin-Ju Nah, Jee-Yong Park, Ji-Hye Lee, Hyun-Ji Seo, Chang-Hee Kweon, In-Soo Cho, Jin-San Moon*

National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea

(Accecpted: September 16, 2009)

Abstract : In this study, we evaluated the stability and potency of live attenuated rinderpest vaccines of lapinized-avianized tissue culture strain origin, which had been produced annually from 2005 to 2008. When immune responses to the vaccines were evaluated using two Holstein calves weighing 100~150 kg, neutralizing antibody titer of 1 : 16 was induced at 21 days post vaccination. When calves were also inoculated with vaccines lots that had been stored for 39 months at 4°C, same level of antibody titer was observed. Using the virus titer test, we found that all batches of the vaccine that had been kept for 3, 10, 15, 22, 27, 34, 39, and 45 months showed no significant loss of titers, and fulfilled the requirement necessary ($\geq$3 log$TCID_{50}$) to be used as the national rinderpest vaccine reserve in Korea. In this study, we demonstrated that stability and potency of the rinderpest vaccines were maintained over three years when kept at 4°C storage. This indicates that it maybe feasible to extend the expiration period of this vaccine from one year to three years.

Keywords : potency test, rinderpest, stability test, vaccine

서 론

우역은 paramyxoviridae과의 morbillivirus속의 우역바이러스(rinderpest virus)가 병인체로서 우제류에 감염시 치사율이 매우 높고 전염성이 매우 강한 바이러스성 전염병이다. 이 질병에 감염되면 발열, 누루와 안루, 입과 소화기 점막의 괴사를 일으키고 심한 혈변과 탈수 등의 임상증상을 보인 후 6-12일에 대부분의 동물이 폐사하게 된다 [10].

우리나라에서의 우역 발생에 대한 정확한 기록은 없으나 시베리아와 몽고를 경유해서 북한에서 1870년경에 발생되었으며, 1906년부터 1931년에 이르는 동안 20여 년간 주로 북한 지방과 1921년 경상북도와 1922년 및 1924년에 경상남도에서도 19두에서 161두의 발생하였다. 이후 1945년 조선총독부 통치가 종결 될 때 국내 전반적인 방역은 물론 만주국과의 국경에 우역 방역지대를 설치하여 년간 5만두 이상의 방역지대 내 사육우에 예방을 위하여 백신접종과 발생에 대응하기 위한 우역 고도 면역혈청을 생산하여 상시 비축하는 등 강력한 방역 조치가 강구되어서 1931년 이후에는 발생이 종식되

*Corresponding author: Jin-San Moon
National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea
[Tel: +82-31-467-4398, Fax: +82-31-449-5882, E-mail: moonjs@nvrqs.go.kr]

었다 [4].

그러나 1945년 종전후 해방과 더불어 북위 38도선을 경계로 통치영역이 남북으로 분단되어서 북한 내의 우역발생은 물론 기타 질병의 발생 및 방역 정보가 아주 불명인 상태에서 북한을 경유한 중국으로부터의 침입이 우려되어 1950년 초부터 38선경계 인접 경기도, 강원도 지역 일대에 우역 방역지대를 설치하여 1985에 이르기까지 매년 연간 2-3만 여두의 소에 백신을 접종하였다 [4]. 1986년부터는 국제수역사무국(Office International des Epizooties) 연보에 의해 처음으로 북한에서의 우역 비 발생 정보를 접하게 되어 방역지대의 백신 접종을 중지하고 비축용으로 2-3만두 분의 백신을 매년 생산하여 보관하고 있으며 [8], 현재에도 지속적으로 진행되고 있다.

한편, 1982-1984년에 아프리카와 중동지역에서 대규모 우역 발생으로 인하여 최소 500억 달러의 경제적 손실 초래하였으며, 2000년 이후에는 아프리카와 중동지역에서 간헐적으로 우역이 발생되었으며, 2003년 케냐를 마지막으로 현재까지 발생이 없는 상태이다 [9]. 이와 같이 우역 발생이 감소한 것은 1993년부터 2010년까지 국제농업식량기구(Food and Agriculture Organization)를 중심으로 집중적인 백신과 예찰활동을 수행함으로써 우역 근절을 목표로 하는 프로그램이 추진되었기 때문이다.

우역은 불현성 보균동물이 없기 때문에 질병의 발생 및 감시에 용이하다. 또한, 원인체가 단일 혈청형으로만 존재하고, 바이러스 구조도 안정적으로 존재하여 방어효과도 우수하다 [10]. 현재 아프리카지역 등에서 우역 박멸을 위해 Plowright 등 [12]이 조직 배양하여 순화시킨 우역약독화생백신이 사용되고 있다.

국내에서도 1920년부터 우역 백신 연구가 시작되어 이 질병의 예방을 위하여 1920-1930년대에는 감염우 장기 불활화 백신이, 1940-1950년대에는 가토화우역바이러스 백신이 각각 사용되었다 [4]. 1954년에는 가축위생연구소의 이와 김이 [7] 발육란(chicken embryo)에 대한 우역병독의 감염시험을 수행하였으며, 1960년 초반에 문 등 [5, 6]이 면역효과가 우수한 변이생독백신을 생산할 목적으로 가토화 · 계태화 우역바이러스를 도입하여 시험백신을 생산하여 한우에 대한 병원성과 면역원성을 조사한 이후 백신 생산 기초시험으로 동결건조 바이러스의 보존성 및 소에 대한 면역효과와 면역지속성 등을 조사하였다. 그 후 권 등 [3]이 Vero, BGK, CEF 세포에서의 조직배양법을 이용한 백신 생산으로 개량 응용되었다. 그 이후에도 Choi 등 [8]이 우역 생백신에 사용되고 있는 바이러스의 생물학 특성을 조사하는 등 우역 백신의 개발 및 개량이 지속적으로 진행되어 비축용 백신 주로서 현재까지 사용되고 있다.

현재 생산 비축에 사용되고 있는 우역 생백신의 유효기간은 12개월로 설정되어 있다 [1]. 하지만 최근 백신의 제조 및 보관 기술의 발달 등에 의하여 백신의 안정성을 높임으로써 유효기간 연장할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 2005년부터 2008년까지 매년 생산되어 비축용으로 보관되고 있는 우역 생백신의 소에 대한 역가시험과 백신 내 바이러스 함량시험을 통하여 백신의 유효기간을 재평가하고자 하였다.

재료 및 방법

시험 백신주 및 세포 배양

우역 생백신 제조에는 가토화 · 계태화 우역바이러스를 원숭이 신장세포에(Vero cell)에 계대 배양한 lapinized-avianized tissue culture 주를 사용하였다. 시험 백신주의 계대 및 보존을 위하여 African green monkey kidney 유래의 Vero 세포(ATCC CCL81)를 사용하였다. 세포 증식용 배지로는 5% calf serum과 항생제가 첨가된 alpha-MEM(Gibco, USA) 를 사용하였다.

백신 제조

우역 생백신은 국립수의과학검역원의 동물용의약품 생물학적제제 기준에 의하여 의 제조하였다 [1]. 즉, Vero 세포를 세포증식용 배지에 부유시켜 37°C에서 2~3일간 배양하고 배양세포의 단층이 형성되었을 때 우역 백신 제조용 바이러스(seed virus)로부터 5대 이내 계대한 우역 바이러스 역가가 0.1~1.0 multiplicity of infection이 되게 접종한 후 1시간 동안 37°C에서 회전 배양하였다. 바이러스 배양 후 세포변성효과(cytopathic effect, CPE)가 80% 이상 진행되었을 때 배양 병을 동결 및 융해 과정을 3회 반복시킨 후 3,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 세포파편을 제거하고 무균적으로 상층액을 수확하였다.

수확된 바이러스를 10배 단계 희석하여 각 희석단위별로 Vero 세포배양 시험관 5개에 0.1 mL씩 각각 접종하고 37°C에서 7일간 회전배양하면서 CPE 출현여부를 관찰하였을 때 바이러스 함량이 $10^{5.0}$ $TCID_{50}$/mL 이상인 경우에 백신 생산에 사용하였다. 바이러스 함량을 조정한 원액의 80%와 보호제 20%(lactose 800 g, KH_2PO_4 4.53 g, K_2HPO_4 10.03 g, KH_4PO_4-L-glutamate 80 g, gelatin 80 g, 증류수 4,000 mL, antibiotics 30 mL)를 잘 혼합하고 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조하였다. 동결 건조 후 바이러스 함량이 $10^{3.0}$ $TCID_{50}$/mL (50% Tissue culture infective dose)이상일 때 적합한 백신으로 판정하였다.

제조된 백신의 품질관리차원에서 동물용의약품 생물

학적 제제 일반시험법 [2]에 준하여 특성시험, 진공도 시험, 함습도시험, 무균시험, 미입바이러스 부정시험을 실시하여 합격된 것을 최종제품으로서 정하고, 4°C ± 2°C 냉장시설에서 비축용 백신으로 장기간 보존하면서 무작위로 선발하여 백신의 안정성 및 유효성 시험을 실시하였다.

백신의 안전성 및 역가시험

생산된 백신의 안전성을 확인하기 위하여 멸균 증류수에 백신을 부유시킨 후 체중 13~15 g의 건강한 마우스 10마리, 체중 300~350 g의 건강한 기니픽 4마리, 그리고 체중 100~150 kg의 우역바이러스 항체 음성인 송아지 2마리를 실험에 사용하였다. 마우스에는 검사품(10두분)의 현탁액 0.5 mL를 복강에, 기니픽에는 2.0 mL을 복강 내 접종하고 14일간 관찰하였다. 송아지에는 10두분 1 mL를 목의 피하에 접종하고 14일간 관찰하여 접종부위에 이상반응, 몸무게 변화, 체온 상승 등의 임상증상을 관찰하였다.

백신의 효능시험은 안전시험이 끝난 송아지 2마리를 7일 후에 채혈한 혈청에 대하여 우역 생백신 국가검정기준의 혈청 역가시험법에 준하여 중화항체가를 조사하였다 [2]. 가검혈청을 56°C 30분간 비동화한 후 증식용 배양액으로 2진법으로 희석하여 각 희석혈청 0.1 mL와 중화용 소우역바이러스 (200 $TCID_{50}$/0.1 mL)액을 동량 혼합하여 37°C에서 60분간 감작시킨 후 증식용 조직배양세포 2개 이상에 각각 접종하고 37°C에서 7일간 배양하여 관찰하였다.

또한, 유효기간이 초과된 우역 백신의 효능 재평가를 위하여 4년 동안 생산된 제품중에서 가장 오래된 2005년 제품을 선발하여 송아지 2두에 접종하여 접종전, 접종 후 21일, 75일과 90일째에 혈액을 채혈하여 중화항체가를 조사하였다.

백신의 바이러스 함량시험

백신의 유효기간 설정을 위하여 2005년부터 2008년까지 매년 생산된 4개 롯트의 냉장상태에서 보관되고 있는 제품 3병을 무작위로 선발하여 경시별로 바이러스 함량을 국가검정 동물용의약품 검정기준 방법에 준하여 조사하였다 [2]. 이를 위해 Vero cell을 2배 volume의 배지를 넣어 부유시킨 후 cell culture 15 mL tube 당 1 mL씩 넣은 cell이 부착할 때까지 정치 배양하고 우역백신 vial 1개를 10 mL 멸균 증류수에 부유시킨 후 1 mL(1두분)을 배지에 10배수 계단 희석(10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} per 1 mL)하여 tube 당 해당 희석배수 100 μL을 넣고 37°C에서 7일간 회전배양하면서 CPE 형성 유무를 관찰하여 바이러스 함량을 $TCID_{50}$ 값으로 결정하였다.

결 과

백신의 안전성 및 효능 평가

2005년부터 2008년까지 매년 생산된 4개 롯트의 우역 생백신의 안전성을 조사하기 위하여 마우스, 기니픽, 소에 접종한 후 14일 동안 접종부위에 이상반응, 몸무게 변화, 체온 상승 등 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다 (Table 1). 생산된 우역 백신의 송아지에 대한 면역원성 시험에서 모두 16배 이상의 혈중 중화항체가를 나타내어 역가시험의 권장 기준인 10배에 도달되었음을 확인하였다(Table 2).

Table 1. Result of safety tests for laboratory animals and calves inoculated with live attenuated rinderpest vaccine lots produced annually from 2005 to 2008

No. of animals	No. of test animals per year	Inoculation route & dose	Observation period	Clinical signs and thermal reaction after vaccination
Mouse	10	IP, 0.5 mL	14 days	None
Guinea pigs	4	IP, 2.0 mL	14 days	None
Calves	2	SC, 10 mL	14 days	None

Table 2. Serum neutralizing antibody titer of calves vaccinated with four different live attenuated rinderpest vaccine lots by production year

No. of animals	Neutralizing antibody titer of calves before and after vaccination							
	2005		2006		2007		2008	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
Calf 1	≤ 2	16	≤ 2	16	≤ 2	16	≤ 2	16
Calf 2	≤ 2	32	≤ 2	64	≤ 2	16	≤ 2	16

Table 3. Change of serum neutralizing antibody titer of calves before and after inoculation with live attenuated rinderpest vaccine lot produced in 2005 and stored at 4°C for 39 months

No. of animal	Time course of neutralizing antibody titer			
	Before	21 day after vaccination	75 day after vaccination	90 day after vaccination
Calf 1	< 2	16	16	16
Calf 2	< 2	16	16	32

Table 4. Comparison of virus activity of four different live attenuated rinderpest vaccine lots kept at 4°C storage for various durations

Item		Virus activity of vaccine lots produced annually (log $TCID_{50}$/mL)			
		2005	2006	2007	2008
Vaccine right after production		3.50 ± 0.34*	3.70 ± 0.28	3.50 ± 0.33	3.46 ± 0.28
Vaccine stored at 4°C for various durations (months)	First test	3.37 ± 0.45 (38 months)	3.50 ± 0.38 (27 months)	3.13 ± 0.36 (15 months)	3.43 ± 0.48 (3 months)
	Second test	3.45 ± 0.52 (45 months)	3.38 ± 0.38 (34 months)	3.20 ± 0.42 (22 months)	3.40 ± 0.55 (10 months)

*Geometric mean (±SD) of virus titers tested three times per vaccine lot.

2005년도에 제조하여 3년 3개월 동안 보관되고 있는 시험 백신에 대한 송아지의 면역원성을 재평가한 바, Table 3에서와 같이 접종 후 21일째에 기존 백신과 유사한 16배의 중화항체가를 나타내었다. 접종한 백신의 항체 지속성을 조사하기 위하여 접종 후 75일과 90일째에 항체가를 조사한 바, 16배-32배를 나타내어 최소한 백신 접종 후 3개월까지는 면역항체가 안정적으로 유지되고 있었다.

백신의 안정성 평가

백신의 유효기간 재설정을 위하여 2005년부터 생산된 제품에 대하여 동물용 생물학적 제제 특성시험법 준하여 일반적인 성상을 조사한 바, 백신의 색깔 변화 또는 특이한 침전물의 생성이 육안적으로 관찰되지 않아 보존 기간 동안 백신의 물리화학적 성상은 균일하게 유지되고 있음이 확인되었다. 각 롯트별 보관 백신에 포함되어 있는 백신바이러스 역가를 측정한 결과, 2005년부터 2008년까지 생산된 4개 우역 생백신의 최초 생산품에서부터 냉장 보관 후 3, 10, 15, 22, 27, 34, 39, 45개월이 되는 현재까지 모두에서 $10^{3.0}TCID_{50}$/mL 이상으로 상당기간 유효기간이 지났음에도 합격 검정기준에 적합하였으며, 유효기간 내에 있는 2008년 생산한 제품과도 통계학적으로 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 4).

고 찰

우역은 바이러스 질병으로서 전파 속도가 매우 빠르기 때문에 이 질병의 확산 방지를 위해서는 무엇보다도 예방접종이 중요하다 [10]. 그리하여 국내에서는 오래전부터 우역 발생을 대비하기 위하여 백신 접종을 실시하였다 [4]. 우역 생백신에 사용되고 있는 바이러스는 1930년에 송아지 혈액에서 분리한 바이러스를 가토화·계태화 우역바이러스를 Vero cell에 계대 배양한 것으로서 $10^{3.0}TCID_{50}$/mL 이상의 역가로 건강한 송아지 근육 내에 접종하였을 때 경미한 발열 이외에 특별한 부작용이 없이 높은 면역원성을 나타내는 것으로 알려져 있다 [3, 8].

본 연구에서는 2005년부터 2008년까지 생산되어 보관되고 있는 4개 롯트의 우역 생백신의 보관품에 대한 경시별 바이러스 함량을 조사하여 백신의 안정성을 재평가한 바, 백신 제조 후 3, 10, 15, 22, 27, 34, 39, 45개월이 되는 보관품 모두에서 우역 생백신 국가검정기준 [2]에서 제시한 합격기준인 $10^{3.0}$ $TCID_{50}$/mL 이상으로 조사되었다. 즉, 백신의 권장 유효기간인 12개월보다도 훨씬 초과된 45개월째에도 백신 내 바이러스 함량이 안정적으로 유지되고 있음을 알 수 있었다.

또한, 본 연구에서 백신제조 단계별 바이러스 함량 변화를 조사해 보았을 때 보호제 혼합 비율과 동결건조과정에서 평균적으로 $10^{2.0}TCID_{50}$/mL의 바이러스 함량이 감소되었지만 동결 건조 후에서 냉장 보관단계에서는 바이러스 함량에 있어서 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 따라서 우역 백신 내 적정 바이러스 함량에 도달하고 유효기간을 연장하기 위해서는 무엇보다도 백신 제조 시 동결건조 전에 바이러스 함량이 $10^{5.0}TCID_{50}$/mL 이상 되도록 높게 생산하는 것이 가장 중요할 것으로 사

료된다 [1]. 아울러 매번 백신생산시마다 여러 가지 영향을 미치는 요인을 분석하여 백신 생산 및 검정에 관한 표준 매뉴얼을 작성하여 가급적 동일조건하에서 백신이 생산되어야 할 것으로 사료된다.

한편, 본 연구에서 유효기간 만료 후에도 바이러스 함량이 유지되고 있는 것으로 확인된 보관품 중에서 보관기간이 가장 오래된 2005년도에 제조하여 3년 3개월 동안 보관되고 있는 백신을 송아지 2두에 백신 접종 후 21일, 75일, 90일째에 바이러스 중화항체가를 재평가하였다. 그 결과 모든 송아지에서 2005년부터 2008년까지 4회에 걸쳐서 조사한 면역원성 결과와 유사한 16배의 중화항체가를 나타내었다. 이러한 결과는 이 백신의 역가시험의 국가검정 권장 기준인 10배에 도달되어 [2] 백신 유효기간이 2년 3개월이 경과한 시험백신에 있어서도 면역 항체를 형성하는데 있어서도 문제가 없음이 확인되었다. 향후에도 계속해서 우역 생백신의 안정성이 어느 정도까지 지속될 수 있을 것인지에 대한 정기적인 평가가 있어야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서의 냉장 보관중인 시험백신의 바이러스 함량과 송아지에서의 면역원성 시험에 의한 안정성 성적을 종합해 볼 때 우역 생백신의 유효기간을 현재의 12개월에서 36개월로 연장할 수 있을 것으로 사료된다. 이와 같이 우역 백신의 유효기간 연장을 통하여 매년 우역 백신의 생산 및 검정을 위하여 사용되는 예산과 노동력을 절감할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

2005년부터 2008년까지 매년 생산되어 비축용으로 보관되고 있는 4개 롯트의 우역 생백신에 대하여 최초 생산품에서부터 냉장 보관 후 3, 10, 15, 22, 27, 34, 39, 45개월이 되는 현 시점까지 백신 내 바이러스 함량을 조사한 바, 모든 제품에서 합격 검정기준인 $10^{3.0}TCID_{50}$/mL 이상을 나타내었다. 또한, 2005년도에 제조하여 3년 3개월 동안 보관되고 있는 백신을 송아지 2두에 접종하여 바이러스 중화항체가를 조사한 바, 유효기간 내의 백신 효능과 유사한 성적을 나타내었다. 이러한 사실에 비추어 볼 때 우역 생백신의 유효기간을 현재의 12개월에서 36개월로 연장할 수 있을 것으로 생각한다.

참고문헌

1. **국립수의과학검역원.** 동물용 생물학적제제 기준(안). 우역 생백신. pp. 48-52, 국립수의과학검역원, 안양, 2004.
2. **국립수의과학검역원.** 국가검정 동물용의약품 검정기준. 우역(조직배양) 생건조백신 검정기준. pp. 78-79, 국립수의과학검역원, 안양, 2009.
3. **권혁진, 김두희, 임영문, 이창구, 강병직.** 조직배양우역 생독백신개발에 관한 시험. 농사시험연구보고 21. pp. 1-9, 농촌진흥청, 수원, 1979.
4. **농촌진흥청.** 한국의 가축위생 연구(가축위생연구소 80년사). 우역. pp. 125-130, 농촌진흥청, 수원, 1991.
5. **문재봉, 이남신, 김정규.** 연속계대에 있어서의 조화우역독(LA)과 가토화 우역독(L)의 여러 숙주에 대한 태도. 가축위생연구소보 5. pp. 7-14, 농촌진흥청, 수원, 1961.
6. **문재봉, 마점술.** 우역 예방약에 관한 연구. 가축위생연구소보 8. pp. 88-95, 농촌진흥청, 수원, 1962.
7. **이남신, 김정규.** 발육란에 우역 병독의 감염시험. 농림부 중앙가축위생연구소 연구보고 2. pp. 1-10, 농림부, 서울, 1954.
8. **Choi KS, Kwon CH, Choi CU, Lee JG, Kang YB.** Biological properties of attenuated rinderpest virus (LATC strain) adapted in Vero cell. RDA J Vet Sci 1998, **40**, 61-70.
9. **Diop BA, Bastiaensen P.** Achieving full eradication of rinderpest in Africa. Vet Rec 2005, **157**, 239-240.
10. **Huygelen C.** The immunization of cattle against Rinderpest in Eighteenth-century Europe. Med Hist 1997, **41**, 182-196.
11. **Kärber G.** Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. Arch Exp Pathol Pharmacol 1931, **162**, 480-483.
12. **Plowright W, Ferris RD.** Studies with rinderpest virus in tissue culture. The use of attenuated culture virus as a vaccine for cattle. Res Vet Sci 1962, **3**, 172-182.
13. **Rossiter PB, Jessett DM, Taylor WP.** Microneutralisation systems for use with different strains of peste des petits ruminants virus and rinderpest virus. Trop Anim Health Prod 1985, **17**, 75-81.
14. **Wamwayi HM, Rossiter PB, Wafula JS.** Confirmation of rinderpest in experimentally and naturally infected cattle using microtitre techniques. Trop Anim Health Prod 1991, **23**, 17-21.