

# 구제역 백신의 제조와 관리를 위한 국제적 권고기준의 이해 - 1



**박종현**  
농림축산검역본부 동식물위생연구부  
구제역진단과 수의연구관  
parkjhvet@korea.kr

구제역 방역정책은 국가적으로 운영되어야하고 백신의 사용도 정부 통제하에 사용되어야 한다. 만약 백신생산시 강한 병원성을 지닌 구제역바이러스가 항원으로 사용된다면 적절한 생물안전절차를 수행할 수 있는 생산시설에서 실시되어야 한다.

일반적으로 백신접종은 구제역이 유행되는 지역이나 나라에서 사용된다. 구제역 청정국은 백신접종은 하지 않으나 엄격한 이동제한과 살처분 조치를 취한다. 그럼에도 많은 청정국가가 불활화 항원을 비축하여 필요시 사용하는 전략으로 긴급백신 접종을 선택할 수 있다.

우리나라의 경우도 전국을 대상으로 백신접종을 실시하는 정책을 2011년 1월 이후 시행되고 있고, 이에 따라 구제역 백신의 국내에서 생산을 준비하고 있다.

구제역 백신의 생산과 관리는 주변지역에서 유행하거나 유행되었던 바이러스형에 대한 항원 개발과 원할한 백신의 공급을 통해 우리나라에서 구제역을 근절하고 재유입을 예방하는 데 매우 중요한 요소가 될 것이다. 본 글에서는 백신에 사용되는 종독주, 항원의 생산 및 관리에 대한 세계적인 기준으로 사용되고 있는 세계동물보건기구 (OIE)에서 권고되는 백신에 대한 관리 사항을 알아보려고 하였다.

## 1. 구제역 항원의 역가와 백신 항원의 적용범위

구제역 백신은 표준역가 백신과 고역가 백신으로 구분되고 표준역가 백신은 3 PD50(50% protective dose, 50% 방어량)의 면역반응이 나타나기 충분한 최소량이 포함된 항원을 포함한다. 이 백신은 일반적인 백신접종 전략에 사용한다. 백신 접종하지 않은 동물에서 구제역을 통제하기 위해 빠른 면역 반응과 넓은 항원 스펙트럼을 위해 사용되는 백신은 고역가 (6PD50이상) 백신이다.

현재까지 구제역에서 살아 있는 바이러스를 이용한 생백신의 사용은 동물에 적용시 병원성이 회복되는 위험 때문에 사

용하기 어렵고, 백신접종 동물에서 구제역 감염을 진단하는데 방해되기 때문에 사용이 곤란하다.

구제역 백신을 적용하고자 하는 지역 또는 국가에서 여러 가지 혈청형의 발생이 있을 경우 2개 또는 다른 바이러스의 혈청형은 준비되어야 하고 어떤 지역에서는 많이 발생하는 바이러스에 대해 방어가 가능한 넓은 항원영역을 확보하기 위해서 혈청형 당 1개 이상의 여러 바이러스 주를 포함하여 사용하는 것이 추천된다.

표 1은 구제역 백신의 제조시 권고되는 필요한 검사 및 관리사항을 요약한 것이다.

표 1. 구제역 백신 제조시 관리와 검사

관리항목	백신 생산 과정중의 관리요점					
	1. 종독주의 관리	2. 항원의 생산	3. 제조과정 중 관리 (In-process)	4. 최종산물의 배치 검사 (final product batch)	5. 백신의 등록시 요구조건	6. 농축항원의 관리
바이러스(항원) 상태	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 증식성, 생산성, 안정성, 넓은 항원스펙트럼에 의한 바이러스 선정</li> <li>◆ 외인성 원인체 제거(지질 막바이러스)</li> <li>◆ 불활화 변화주조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 불활화제(BE/E)처리과정 중에 10,000 리터당 1 감염성 바이러스 이하 존재</li> <li>◆ 불활화제의 중화(2%로 sodium thiosulfate)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 불활화 변화 주이 (효율 및 직선성조사)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 항원이력확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 배치(batch volume)의 적어도 1/3로 3개의 백신연속배치에 대한 정보제시</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 저장용기 (평균기능, 온도변화 내구성)</li> <li>◆ 표식 (철사 이용, 지워지지 않는 마킹펜)</li> <li>◆ 5년마다 정기적인 모니터링(146S의 정량)</li> </ul>
배양법	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 단층배양 또는 부유배양</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 단층배양 또는 부유배양</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 146S 항원의 1ug에 맞는 바이러스의 사용량이 <math>10^8</math> TCID<sub>50</sub> 이상의 역가생산 세포 적용하여 불활화 주조사</li> <li>◆ 바이러스를 2-3회의 계대 배양을 실시하여 바이러스잔존 검사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 멸균검사</li> </ul>	-	-
백신의제조	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 초원심, PEG침전, PEO 흡착처리</li> <li>◆ 크로마토그래피 정제</li> <li>◆ 보좌제 (오일+tween80 또는 겔) 추가</li> <li>◆ 보존제 추가</li> <li>◆ 기타 혼합제 추가 (antifoam, phenol red dye, lactalbumin hydrolysate, tryptose phosphate broth, amino acid, vitamin, buffer salt)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 바이러스(항원) 농도 측정 - 당밀도 구배 (sucrose density) 및 감염력 시험법 또는 혈청학적 기법으로 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ NSP제거확인 - 정제동물에서 2회이상 백신 접종하여 혈청학적 검사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 순수도 검사 (8마리 이상의 소 3번 21-30일 간격으로 접종마지막 백신 접종 후 30-60일에 NSP 항체검사)</li> </ul>	-
백신주의유효성	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 순수분리하고 동물실험으로 효력인정</li> </ul>	-	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ EPP법 (16, 30두검사, 각각 75, 70%방어 효력) 또는,</li> <li>◆ ELISA, VNT로 대체 시험법 분석가능</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 유효성시험 (PD50, PGP)-소를 기준으로 검사 (주요 축종이 다를 경우 해당 축종으로 교체 고려)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 5년마다 정기적인 모니터링 (백신의 혈청학적 분석, 백신 공격접종)</li> </ul>
안전성	-	-	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 2두의 건강한 항체 음성 목적동물에 접종하고 동물은 14일 이상 국소 및 전신성 반응관찰</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 8마리의 목적동물에 3회 접종하고 14일 이상 국소 및 전신반응을 관찰</li> </ul>	-
면역지속과 안정성	-	-	-	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 지속력을 공격접종 또는 혈청학적검사로 대체로 증명</li> <li>◆ 유효기간은 2-8°C에서 1-2년 이 가능함을 증명</li> </ul>	-

## 2. 종독주(seed virus)의 관리

### 1) 종독주의 특징

최종 종독주(master seed virus)의 선발은 바이러스의 세포배양에서의 증식성, 바이러스 생산량, 안정성, 넓은 항원 스펙트럼 등에 기초한다. 바이러스 분리 동정에 대한 정확한 정보(지역, 축종, 분리된 가검체의 종류)가 기록되어야 하고 이 바이러스에 대한 명칭이 일치되도록 동일하게 사용하여야 한다. 실험실에서 바이러스의 계대기록과 재료에 대해 상세한 사항들이 기록되어 있어야 한다.

### 2) 종독주의 배양방법

새로운 백신은 어떤 지역에서의 바이러스 분리된 것으로부터 여러 번의 계대를 통한 단층배양 또는 부유배양에서의 증식하기 위해 적응시킴으로 종독주의 확립을 통해 수행된다. 배양 전 또는 배양과정 중 종독주는 지질막을 가지는 바이러스들의 오염될 수 있는 위험으로부터 유기용매 처리를 통해 제거시키는 것이 좋다.

### 3) 백신주로서 유효성 평가

종독주는 다른 병원체로부터 완전히 순수 분리되어야 한다. 원래의 백신 생산을 위한 후보 바이러스주와 유전적인 동질성과 유행하는 바이러스에 대한 효과가 증명되어야 한다. 이것은 동물의 공격방어 실험 등 믿을 만한 방법을 통해 수행되어야 하고, 대체법으로는 백신 접종후 혈청에서 요구되는 중화시험과 같은 실험실에서 결과를 도출할 수 있다. 종독 바이러스는 -70°C에서 보관하거나 동결 건조하여 보관하여 사용한다. 이러한 중간과정의 종독 바이러스들은 1번 또는 그 이상 계대를 통하여 마지막 세포 배양시 사용할 수 있다. 이 때 전염성해면상뇌증(TSE)의 위험을 최소화하기 위한 실험 재료를 이용하여야 한다.

### 4) 새로운 종독주의 임시적 적용과 백신의 생산

항원적으로 새로운 바이러스주를 개발할 필요가 있는 경우 야외주종 대표적인 바이러스를 새로운 백신주로 선정한다. 새로운 종독주로 인정되기 전에 모든 외인성 원인체로부터 오염되지 않았음이 증명되어야 하고 원래 후보 바이러스주와 유사성이 인정되어야 한다. 특별히 고안된 항혈청이 외인성 원인체를 중화하기 위해 사용될 수 있다. 긴급 상황에서 종독

바이러스의 완전한 평가는 어렵기 때문에 임시 승인된 새로운 바이러스에 대해서 다른 원인체의 오염의 위험성을 제거하도록 하여야 한다. 이러한 위험 평가는 첫째, 지질막 소유 바이러스를 불활화하기 위해 유효한 과정이 고려되어야 하고, 두 번째로 바이러스가 불활화 변화추이(kinetics)이 분석되어 완전히 불활화 되도록 분석한다. 각 생산 배치(batch)을 기록하고 모니터링하여 불활화의 변화추이에 대한 요구조건을 제시 등이 추후 보증되어야 한다.

## 3. 구제역 항원 생산방법

### 1) 항원의 생산, 불활화 및 정제처리

항원의 생산은 대규모의 부유세포 또는 단층 배양방법이 추천된다. 배양세포는 다른 미생물에 오염되지 않아야 한다. 많은 항원을 일시에 생산할 때 바이러스는 종종 chloroform으로 처리하고 원심과 여과하여 정제 처리한다.

그 이후에 보통 불활화제로 binary ethyleneimine (BEI)를 처리하고 바이러스는 불활화된다. BEI 또는 ethyleneimine (EI) 처리시 안전하도록 주의를 요한다. BEI는 미리 결정된 최종 농도로 바이러스 상층액에 첨가한다. 불활화 변화추이(kinetics)을 분석하여 서류로 정리한다. BEI처리의 시간과 온도는 실효성있게 실제 상황에서 기계를 사용하여 평가되어야 한다. 불활화 처리과정중 바이러스 역가는 모니터링되어야 하고 이 과정중 바이러스 역가가 감소되어야 한다. 불활화 과정 중에 10,000 리터당 1 감염성 바이러스 (infectious virus)보다 덜 존재해야 한다. 불활화에서 잔존되어 있는 BEI/EI가 제거되어야 하며, 최종 농도 2%로 sodium thiosulfate 용액을 첨가하므로써 중화된다.

불활화 항원은 초원심, PEG(polyethylene glycol)침전, PEO(polyethylene oxide) 흡착에 의한 절차로 농축되고 정제된다. 농축된 바이러스는 크로마토그래피로 추가적으로 정제할 수 있다. 농축 및 정제된 항원은 낮은 온도에서 장기간 저장될 수 있고, 적절한 완충용액 및 보좌제를 첨가하고 적정농도로 희석하여 백신이 만들어질 수 있다.

### 2) 보좌제(adjuvants)의 첨가

백신은 오일 또는 수용성 백신으로 보통 만들어지며 오일 백신은 Marcol과 Drakeol과 같은 미네랄오일을 보통 water-

in-oil 현탁액으로 만들어진다. 미네랄오일이 백신의 수용성 층의 적절한 비율로 첨가하기 전에 현탁된 항원과 미리 섞고 초음파 또는 연속적으로 사용이 가능한 현탁 장비를 사용하여 섞는다.

더욱 복잡한 이중오일 에멀전(double-oil emulsion)은 tween 80과 같은 세정제(detergent)의 적은 양이 포함된 수용성 용액과 한번 더 처리된다. 수용성 백신은 aluminium hydroxide gel에 바이러스를 흡착하여 준비되고 보좌제의 일 부분이 최종 백신 제작시 추가로 혼합된다.

최종백신을 위한 혼합액은 antifoam, phenol red dye, lactalbumin hydrolysate, tryptose phosphate broth, amino acid, vitamin, buffer salt와 기타 물질들을 포함한다. 사포닌과 같은 보좌제(adjuvants)와 보존제(preservatives)와 같은 것 들이 포함될 수 있다. 보존제는 구제역 항원이 적절하게 간섭이 없으면서 보존할 수 있도록 한다. 새로운 보좌제 또는 보존제를 이용할 경우 축산물 소비자의 안전이 중요하기 때문에 결정권자로 부터 허가될 수 있도록 잔류 등에 관한 상황에 대해 관심을 갖는 것은 중요하며, 적절한 평가가 이루어져야 한다.

#### 4. 제조과정 (In-process) 중의 관리

바이러스의 세포배양시 그 역가가 24 시간내 적절한 수준으로 형성되어야 하고, 배양시 선정된 시간은 세포사멸에 기초한다. 바이러스 농도는 당밀도(sucrose density)구배 및 감염력 시험법 또는 혈청학적 기법으로 평가되어 질 수 있다. 당밀도 구배와 같은 항원물질의 농도 측정법과 감염력 측정법이 사용되어 질 수 있으며 이 실험 방법은 동시에 수행하는 것은 필수적이지 않고, 다른 방법들이 이중 한 가지 방법으로 대체될 수 있다.

##### 1) 불활화 변화추이 (Inactivation kinetics)

불활화에 대한 부분은 과정중의 불활화 효율 또는 직선성(linearity)을 모니터링하기 위해서 정기적으로 샘플을 채취한다. 바이러스 역가는 구제역바이러스의 높은 감수성이 있는 세포 즉 BHK와 같은 세포에 접종하여 결정한다. 배양은 재현이 가능하도록 통계학적 유의성이 있도록 시험하여야 한다. 샘플의 log10 값으로 계산된 감염성 수치로 시간에 따라 표현된다. 이러한 바이러스 역가의 경사도가 직선으로 줄어드는 현상이 나오지 않는다면 그 결과는 만족스럽지 못한 것

이다. 이 추정치는 불활화의 마지막 과정이 10,000 리터당 결코 1 감염력보다 많은 바이러스가 존재함을 말해준다.

##### 2) 불활화 관리

바이러스 잔존 (innocuity)검사는 항원의 매 배치(batch)마다 수행되어야 하는 제조과정의 검사이다. 잔존 바이러스의 부재를 위하여 사용하는 세포가 146S 항원의 1 ug에 맞는 바이러스의 사용량이 106 TCID50보다 적은 역가로 나온다면 잔존검사에서 사용할 수 있는 적절한 세포는 아니다.

불활화에 따라서 적어도 200 doses로 불활화 항원의 매 배치 샘플마다 민감한 단층세포배양에서 감염된 바이러스가 없다는 것이 확인되어야 한다. 농축 항원에 적용될 때 이 시료가 결과 판정 또는 민감도가 저해되지 않는다는 것을 미리 증명해야하고, 세포를 2 - 3일 이상 매일 조사한다. 사용했던 배지는 새로운 단층배양 세포에 첨가한다. 그리고 원래 단층 세포에 새로운 배지를 갈아준다. 이 방법을 이용하여 살아있는 바이러스 추적이 계대 과정중 증폭되어서 CPE 형성이 확인된다. 일반적으로 바이러스를 2 - 3회의 계대 배양을 실시하고, 단층배양했던 세포를 얼리고 녹이는 과정을 통하여 세포내의 바이러스는 밖으로 방출될 수 있는 가능성은 더욱 높아진다.

- 다음호에 계속 -