

## 광견병 진단시약 및 예방백신의 국제표준 Standard Diagnostic Tests and Vaccines for Rabies

강영배\* · 이재진\*\*

이 자료는, 국제수역사무국(Office de International Epizooties ; O.I.E.)에서 발행한 Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for List A and List B Diseases of Mammals, Birds and Bees(1992) (포유류, 조류, 꿀벌에 있어서의 A급 및 B급 질병에 대한 진단시약 및 예방백신에 대한 표준지침) 중에서 광견병(B8, Rabies)에 관한 내용(Chapter 22, 205-215)을 우리나라의 광견병 방역대책 수립과 생물학적 제제개발을 위한 참고자료로 활용하기 위하여 번역 소개한 것이다.

본래의 원저자는 프랑스의 Dr J. Blancou로서 프랑스 국립수의식품연구원(CNEVA) 산하의 광견병 및 야생동물 병리연구소(Laboratoire d'Etudes sur la Rage et de la Pathologie des Animaux Sauvages)에 책임자로 재직하 바 있으며, 1991년 이후 현재에는 국제수역사무국(O.I.E.)의 사무총장(Director-general)직을 맡고 있다.

\* 원저자 연락처 : Director-general, Office de International Epizooties 12 rue de Prony, 75017 Paris, France  
Tel(33-1) 4227 4574 Fax(33-1) 4267 0987

### 광견병(Rabies; B8)

#### 요약(Summary)

광견병(Rabies)은 그 진단기법이 국제적으로 표준화가 되어있는 주요 인수공통전염병(zoonosis)이다.

현저한 병리학적 병변(pathognomonic lesion)이 없으므로 진단은 실험실 내에서만 내려질 수 있다. 실험실 진단기법은 두개골로부터 미리 떼어낸 중추신경조직(central nervous tissue)에 대하여 주로 적용된

다. 해마상 용기(또는 암몬각으로 불리운다) (hippocampus 또는 Ammon's horn)와 연수(medulla oblongata)가 가장 적합한 조직으로 선택된다.

#### 병인체 동정

주로 형광항체 진단(fluorescent antibody test; FAT)으로 이루어진다. 바이러스 뉴클레오캡시드(viral nucleocapsid)와 형광색소(fluorescein isothiocyanate; FITC)로 미리 결합시킨 면역혈청(immune serum)의 한 방울을 해마상 용기로부터 미리 준비된 뇌조직 도말표본(brain tissue smear)에 떨어뜨린다. 역학조사에서와 같이 표본의 수가 많은 경

\* 가축위생연구소 해외전염병과 과장(대한수의사회 학술홍보위원)

\*\* 가축위생연구소 검정화학과 과장(대한수의학회 부회장)

우에는, 효소면역기법(immunoenzyme technique)을 적용하면 보다 신속한 결과를 얻을 수 있다(신속 광견병 효소면역 진단기법; rapid rabies enzyme immuno-diagnosis; RREID). FAT와 RREID는 모두 98~100%의 신빙성 있는 진단을 내릴 수 있다.

감염된 신경세포(infected neuronol cells)를 찾아내기 위하여는 신선한 해마상 용기조직을 현미경용 슬라이드에 도말하여 Seller's 방법으로 염색하거나 조직절편을 Mann's 방법으로 염색하면 된다. 두 방법 모두 빨간색으로 염색되는 바이러스 물체의 응집체인 네그리 소체(Negri's bodies)를 찾아낼 수 있다. 그러나 이 방법들은 약 15% 정도의 위음성(false negative) 결과를 나타낼 수 있는 단점이 있다.

신선한 재료에 대한 음성시험(negative test)이 감염 가능성을 배제시키는 것은 아니므로 마우스 접종시험(mouse inoculation tests)이 동시에 수행되어야 한다. 해마상 용기조직의 부유액을 갖 태어난 마우스 또는 마우스의 뇌 내에 접종하고 28일간 관찰한다. 5일부터 28일 사이에 죽은 마우스에 대하여 FAT로 사인을 확인하여야 한다.

또 다른 방법으로는 신경세포인 뉴로블라스토마 세포(neuroblastoma cells)의 단층배양물(monolayer culture)에 마우스에 사용한 것과 같은 재료를 접종한다. 18~24시간 이후 FAT를 시행하여 바이러스 항원(viral antigen)의 존재여부를 확인한다. 어떤 상황 하에서는 48시간 이상이 소요되기도 한다.

전문화된 연구실에서는 병인체의 동정과 더불어 변이 바이러스 스트레인(variant virus strains)에 대한 동정이 보완적으로 수행될 수도 있는데, 이때에는 단클론성 항혈청(monoclonal antisera) 특히 핵산 프로브(specific nucleic acid probes) 또는 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR)과 제노믹 부위(genomic areas)에 대한 DNA 시퀀싱(DNA Sequencing) 등을 이용한다. 이러한 기법으로 야외 스트레인과 백신스트레인을 감별해 낼 수 있으며, 야외 스트레인에 대한 지리적 기원의 확인도 가능하다.

## 혈청학적 검사

바이러스 중화(virus neutralisation : VN) 검정은 마우스에서 시행될 수 있는데, 신속 형광 초점 저지 시험(rapid fluorescent focus inhibition test; RFFIT) 등이 VN과 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다. 결과는 표준 항혈청(standard antiserum)에 상관되는 국제 표준단위(International Units; IU) 또는 대등한 단위로 나타내진다.

## 생물학적 제제의 필수요건

동물용으로 사용되는 광견병 예방백신은 목적동물에 순화된 생독(live virus) (예를 들어 Flury, SAD 또는 Keler) 또는 화학적 물리화적으로 불활화시킨 바이러스 또는 재결합된 리컴비넌트(recombinant) 백신들이다. 바이러스는 신생동물의 중추신경조직, 발육계란 내 또는 세포배양에서 배양된다.

광견병 예방백신은 흔히 동결처리된 것이지만 불활화 바이러스 백신은 액상으로 더 좋게는 어췌반트(adjuvants)와 함께 사용되기도 한다. 새로 개발된 예방백신이 품목승인을 받기 이전에 그것의 사용결과로 얻어지는 면역지속기간에 대한 검토가 예방접종하고자 하는 목적동물에서 결정되어야 한다. 모든 백신은 최소 1년간 안정성을 유지하여야 한다.

생독백신에 대하여는 숙주체 내에서 바이러스의 증식을 보장할 수 있는 그리고 이후에 면역반응을 끌어낼 수 있는 최소한의 바이러스 내용이 설정되어 있지 않으면 안된다.

불활화 바이러스 백신의 역가는 마우스 접종과 뇌 내 공격접종으로 설정된다. 미국 국립보건연구원(National Institute of Health; N.I.H., USA)과 유럽약전(European Pharmacopoeia)에 공식화된 시험방법들은 예방접종되지 않은 마우스를 치사시킬 수 있는 바이러스의 정량으로 공격했을 때의 마우스의 여러 가지 방어효율을 나타낼 수 있는 백신의 등급별 용량에 따라 적용시켜야 한다. 표준 예방백신에 대한

결과를 국제단위로 표시하여야 한다. 위의 시험방법과 상관성을 나타내는 시험관내 방법이 예방백신 생산과정 진행중의 대조로 사용될 수도 있다. 최소 필수요건(minimum requirement)으로 두 가지 예방백신 모두 최종제품에 대한 순수(innocuity)시험과 독성(toxicity)부재시험에 공시되어야 한다.

야생(또는 집에서 사육하는) 동물에 대한 경구적 예방접종용으로 제조된 생독백신에 대하여는 순수시험과 목적동물(target animals)에 있어서의 효능시험 그리고 비 목적동물(non-target species)에 있어서의 안전시험이 반드시 시행되지 않으면 아니된다.

## 1. 진단기법(Diagnostic Techniques)

광견병은 랍도바이러스과(Family Rhabdoviridae)의 Lyssavirus에 속하는 신경 친화성 바이러스(neurotropic virus)에 의하여 기인되는데, 모든 종류의 온혈동물(warm-blooded animals)에 전염될 수 있다. 감염성 바이러스의 접종(inoculation)이나 흡입(inhalation)에 의하여 사람에게도 전염되기 때문에, 모든 의심되는 감염재료는 세계보건기구(WHO)에서 특정화한 적절한 안전 조건(safety conditions)하에서 취급되지 않으면 안된다(8).

Lyssavirus에는 교차-방어시험(cross-protection tests) (3.13)에 의하여 구별되는 4종의 혈청형(serotypes)이 있는데, 이름하여 진성 광견병 바이러스(Serotype 1), Lagos bat 바이러스(Serotype 2), Mokolah rhabdovirus(Serotype 3) 그리고 Duvenhage rhabdovirus(Serotype 4) 등이다. 2종의 바이오타입(biotypes)으로 구분되는 유럽형 박쥐 Lyssavirus(EBL), EBL<sub>1</sub>과 EBL<sub>2</sub>는 Lyssavirus에 속하기는 하지만 아직까지는 혈청형으로 분류되지는 않고 있다. 혈청형 2-4에 속하는 바이러스와 EBL은 광견병 유사 바이러스(rabies-like viruses)로 알려져 있다. 바이러스 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 또는 글라이코프로틴(glycoprotein) 항원에 대한 단클론성 항체의

사용과 제한된 제놈부위(genomic areas)의 시퀀싱은 각 혈청형 내의 여러 가지 서브타입(subtypes)에 대한 정의를 내리는 것을 가능하게 한 바 있다.

병리학적 변화로 간주되는 임상증상이나 현저한 사후병변이 없으므로, 광견병에 대한 진단은 실험실적인 것에 의존되어야만 한다. 감염에 대한 혈청학적 증명은, 숙주에 있어서의 높은 폐사율 때문에 매우 드물게 얻어지곤 하지만, 그러한 증명이 몇가지 역학적 조사에는 이용되기도 한다.

### 1) 병원체 동정(Identification of the agent)

세계보건기구(WHO)에 의하여 표준화된 광견병 바이러스에 대한 동정기법은, 진단효율(efficiency), 특이성(specificity) 그리고 신빙성(reliability)에 있어서 다양하다(8). 이러한 동정기법은 모두 뇌조직(brain tissue)에 적용되는데, 바이러스가 특히 해마상 용기(암문각)와 연수에 많이 있으므로, 뇌 전체를 도려내는 것을 의미한다. 어떤 경우(예, 대규모 역학조사)에는 안와(orbital cavity)의 후두공(occipital foramen)을 통하여(5) 표본을 채취하는 간편법이 적용되기도 한다(10).

기본적으로 3가지 방법이 있다.

#### I 신경세포에 있어서의 감염의 확인

##### (Identification of infection in neurons)

슬라이드상에 직접 도말표본된 해마상 용기조직재료에 대하여는 Seller법으로 염색한다. 감염의 증명은 세포원형질 내(intracytoplasmic)에서 Negri 소체의 형태로 있는 바이러스 물체(viral material)의 존재를 확인하면 된다. 해마상 용기는, 신경섬유가 크기 때문에 Negri 소체가 쉽게 잘 보이므로 흔히 사용된다. 또 다른 방법으로는, 조직재료를 고정시켜 조직학적 절편을 Mann 방법으로 염색하는 것이다. 이러한 방법들, 특히 Seller 방법은 근래에는 잘 이용되지 않는 경향에 있는데, 15% 이상의 위음성 결과(false negative results)가 나타날 수 있기 때문이다. 이들의 장점

이라면 진단결과를 24~48시간 이내에 얻을 수 있다는 신속성과 실험실 장비의 낮은 비용, 그리고 조직학적 검사를 위하여 검사재료를 냉장해야 할 필요가 없기 때문인데 특히 열대지역의 조건하에서의 장점인 것이다. 이러한 진단기법들은 일반적으로 기타 다른 방법에 대한 보완진단으로 이용되고 있다.

## ② 동물 또는 세포배양에 대한 감염력 (Infectivity for animals or cell cultures)

가장 적합한 동물은 신생의 SPF 마우스이다. 48시간 된 신생 마우스에 예를들어 Hank's 와 같은 등장배지(isotonic medium)에 항생물질을 첨가하고 해마상 용기 조직재료 20%(W/V) 부유액을 만들어 0.015ml씩을 뇌 내에 접종한다.

만일 가능하다면, 뇌의 다른 부위 즉 연수(medulla oblongata), 소뇌(cerebellum), 피질(cortex)의 조직재료 부유액도 검사하는 것이 좋은데, Ammon 각에서 발견되지 않는 경우에서도, 그러한 재료에 바이러스가 함유되어 있을 수 있기 때문이다. 0.45 × 12mm 짜리 주사침을 이용하도록 한다. 마우스는 21일까지 관찰하에서 사육한다. 만일, 제 5일차에 폐사가 없는 경우라면 5, 7, 9 및 11일차에 새끼 마우스 한 마리씩을 죽여 뇌조직을 면역형광법으로 검사한다. 21일차에는 나머지 생간 마우스들을 모두 죽여서 면역형광 시험에 공시한다. 이 시험법은 3~4주령의 SPF 스위스 마우스 5마리에 대하여도 적용 될 수 있다. 이들에는 가병운 마취상태에서 같은 부유액 0.03ml을 뇌 내에 접종한다. 마우스들은 최소 21일간 관찰하에서 사육하며 광견병 진단은 5일차부터 마비(paralysis) 또는 기타 신경이상을 보이면서 폐사되는 경우에 확인된다. 모든 예는 특이 면역형광으로 확인되어야 한다(아래 내용 참조).

바이러스 분리를 위한 최적세포는 송아지 혈청(bovine calf serum)을 함유하는 Dulbecco 변형 최소 필수배지(minimum essential medium; MEM)와 같은 적절한 배지 내에서 2산화탄소(carbon dioxide) 존재하에 배양된 neuroblastoma 세포(ATCC내에 CCL

B1로 동정되어 있는 N2a 세포)이다. 배양재료는 마우스에서와 같은 재료로 접종된다. 18~24시간 후에 특이 면역형광으로 광견병 바이러스 뉴클레오캡시드 항원(nucleocapsid antigen)의 존재를 밝혀 낼 수 있다(아래 내용 참조)

## ③ 특이면역형광

### (Specific immunofluorescence)

재래식 형광현미경에 의하여 수행되는 형광항체진단(FAT)이 아직까지는 가장 좋은 방법인데, 관련된 동물과 존재하는 바이러스유형(virus types)에 따라 차이는 있지만 수 시간 이내에 98~100%의 믿을만한 결과를 나타내 준다(7).

이 진단은 신선한 재료에 대하여 시행되어야만 한다. 특이 광견병 항혈청 한 방울을 공시조직 대개는 해마상 용기(hippocampus)조직 도말표본에 적용시킨다. 이 혈청은 광견병 뉴클레오캡시드 항원(rabies nucleocapsid)에 대하여 직접 관련된다. 시중구입이 가능한 것인데, 이미 형광색소(fluorescein isothiocyanate)로 결합시켜져 있는 것이다. 뉴클레오캡시드의 집합체(agggregates)는 그들 형광에 의하여 동정 될 수 있다.

만일 항혈청이 예를들어 peroxidase와 같은 효소와 결합한다면 특이 반응이 광학현미경에서 관찰 될 수 있다. 이 기법의 변화응용(11)은, 특이항체로 미리 코팅처리해 놓은 반응판(plate)의 구멍(well)내에 완충액으로 균질화된 의심 조직재료의 투명처리한 상청액을 넣어주므로써 조성된다. 결과적으로, 결합된 바이러스는 면역흡수 검정기법(신속 광견병 효소면역진단법 또는 RREID 시험)으로 찾아진다.

결과는 눈으로 판정하거나 대규모 역학조사에서 적용될 수 있는 분광광도 계측법(spectrophotometry)으로 판정 할 수 있다. 어떤 경우에는 포르말린 처리 조직재료를 펩신 또는 트립신으로 조절효소 소화처리 시킨 후에 검사할 수도 있다(4).

위의 시험법(가, 나, 다)에 대한 보완적인 방법으로 는 보다 전문화 된 연구소(예를들면 OIE 또는 WHO

표준 연구기관)에 있어서는 단클론성 항혈청(monoclonal antisera), 뉴클레익 프로브(nucleic probes), 또는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR) 처리 후 제놈 부위(genomic areas)의 DNA 시퀀싱(sequencing)을 하여 바이러스를 형별하기도 한다(7).

이것은 백신 바이러스(vaccine virus)와 바이러스의 야외스트레인(field strain of virus)을 감별 할 수도 있으며 야외 스트레인의 지리적 기원을 밝힐 수도 있다.

## 2) 혈청학적 진단기법(Serological tests)

혈청학적 진단법은 역학적 조사에서는 거의 이용되지 않는데, 그 질병으로 살아남은 동물의 비율이 낮기 때문이며 따라서 감염 후 항체를 보유하고 있는 동물 숫자가 적기 때문이다. 예방백신의 효력을 검증하기 위하여 이용되는 혈청학적 시험법은 아래 4) ① 항에 기술되어 있다.

VN 시험법은 권장될만하며 마우스와 세포배양에 대하여 적용될 수 있다.

### ① 마우스에 있어서의 바이러스 중화

#### (Virus neutralisation in mice)

이 시험방법의 원리는 37에서 90분간의 배양시간 동안에 역가를 측정하고자 하는 혈청의 다양한 양에 대하여 광견병바이러스의 불변의 질량(constant amount) (50 LD<sub>50</sub>/0.03ml, “공격용 바이러스 스탠다드”(challenge virus standard; CVS스트레인)과의 시험관내 중화(neutralisation)이다. 바이러스-혈청 혼합물(0.03ml)을 3주령 마우스의 뇌 내에 접종한다. 혈청 역가는 마우스 50%를 방어할 수 있는 바이러스-혈청 혼합물 내에 있는 혈청의 최종 희석배수이다.(중화항체가 없으면 폐사율은 100%이다). 이러한 역가는 동일한 실험조건하에서의 표준혈청의 중화 희석배율과 비교할 수 있는 국제단위(IU)로 나타내 줄 수 있다.

시험을 수행하기 위하여는, CVS 바이러스 앰플을 용해하여 100 LD<sub>50</sub>/0.03ml를 함유하는 부유액을 조

제한다(왜냐하면, 주사되기 이전에 공시용 혈청의 동량을 넣어 주므로서 2배수로 희석되기 때문이다). 시험중에 실제로 사용되는 바이러스의 양(허용한계: 30~300 LD<sub>50</sub>/0.03ml)은 바이러스 조제액의 4배 희석을 적정하므로써 적정되는데, 그것은 각각 5마리의 마우스에 접종된다. 공시혈청은 보체를 불활화시키기 위하여 56°C에서 30분간 가열된다.

역가측정조건을 체크하기 위하여 표준혈청에 대한 시험이 반드시 시행되어야 한다. 기대되는 중화능력과 역가측정에서 계측된 것과의 최대 허용 차이는 100.5이다. 최대 희석에 있어서는 바이러스를 중화하여서는 아니된다. 희석액은 바이러스 조제에 사용된 것과 동일한 것을 사용한다.

각각의 혈청 희석액을 100 LD<sub>50</sub>/0.03ml를 함유하는 바이러스 조제액 동량에 넣는다. 그 혼합액을 37°C 수조에서 90분간 배양한다. 녹고 있는 얼음에 침지시켜 반응을 중지시킨다. 접종하는 동안에는 즉시 사용되지 않는 시험관은 +4°C에 보관한다.

각 희석액에 대하여, 5마리의 마우스에 혈청-바이러스 혼합액 0.03ml를 뇌 내에 접종한다. 폐사율을 접종 후 21일간 기록하며 초기 4일 동안에 폐사가 일어난 것은 비특이적(non-specific)인 것으로 간주한다(쇼크나 감염 등에 의한 것으로 본다). 혈청역가는 국제 표준 혈청과 비교한 IU 단위로 계산 될 수 있다.

### ② 세포에 있어서의 바이러스 중화시험

#### (Virus neutralisation test in cells)

#### (Rapid fluorescent focus inhibition test, RFFIT)

이 시험방법의 원리는, 광견병 바이러스에 감수성이 있는 세포(예, baby hamster kidney; BHKcells)로부터 유래된 손상되지 않은 세포 단층재료에 접종하기 이전에 광견병바이러스(세포배양에 미리 적용시킨 CVC 스트레인)의 불변의 양에 대한 시험관(in vitro) 내 중화이다.

혈청역가는 공시 바이러스의 중화되지 아니한 부유액에 의하여 시행된 형광 필드의 반수를 저지하는 희석 배수이다. 이러한 역가는 동일한 실험조건하에

서의 표준혈청에 대한 중화 희석액과 비교될 수 있는 IU 단위로 나타낼 수 있다.

이 시험방법을 수행하기 위하여는 역가측정 바로 전날 세포액 75ml 플라스크를 조제하는 것이 꼭 필요하다. 이것으로부터 ml당  $10^5$ 의 세포 부유액을 조제하여, 세포배양을 위하여 플라스틱 챔버에 넣고, 현미경용 슬라이드 'Labetk'에 부착시킨다.

역가측정 당일에 공격용 바이러스(CVS Virus) 한 앰플을 용해한다. 공시 희석액은 20 현미경 시야에서 쉽게 볼 수 있는 20개의 형광초점(fluorescent foci)을 나타내어야 한다. 실제로 사용된 바이러스의 양을 적정하기 위하여는 바이러스 조제액을 각각 2 챔버에 접종하여 4배 희석으로 역가를 측정한다. 바이러스 부유액은 접종 24시간 후에 세포의 80%를 감염 시켜야만 한다.

보체를 비동화시키고 공시혈청과 대조혈청을 희석한 다음 바이러스 중화를 시키려면 마우스 접종(상기 2) [I 항)에서와 같이 하면 된다. 각각의 혈청-바이러스 혼합액 0.2ml를 미리 비워둔 'Labetk' 챔버의 바닥에 넣은 손상되지 않은 세포 단층재료와 접촉시킨다. 실온에서 30분간 배양한 다음 배지 0.3ml를 각 챔버에 넣고 그 슬라이드를 37에서 48시간 동안 보관한다.

'Labetk' 챔버의 벽을 제거하고 슬라이드를 공기 중에서 조심스럽게 건조시키며 다음에  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 아세톤에 넣어 고정시킨다. 항 뉴클레오캡시드 형광관주계이트(형광항체 시험에서 사용된 것과 같은것)를 30분간 슬라이드에 적용시킨다. 그 슬라이드를 수돗물을 서서히 적서서 행구며(세포가 떨어져 나가지 아니하도록) 그런 다음 글리세롤도 포매시킨다.

결과는 30분 후에 각 챔버마다 100배 확대에서 현미경 시야 20개를 관찰하며 판정한다. 각 희석단계마다의 초점의 수를 주목한다. 바이러스만 있는 대조군에서 관찰된 형광초점의 수가 50% 이하인 희석배율을 선형방정식 또는 전산화 neoprobit절차에 따라 계산한다(1). 혈청 역가는 국제표준혈청(또는 준표준 혈

청)에 대한 비교로 계산된다.

96공 반응판에서 수행되는 RFFIT의 변형응용기법도 있다(micro titration). 반응판을 염색하고 도립현미경(inverted microscope)을 이용하여 직접 판독한다

## 2. 생물학적 제제에 대한 필수요건 (Requirements for Biological Products)

광견병바이러스의 아형들은 병원성(pathogenicity)에 있어서 상당히 다를 수 있다. 그것들은 기원에 따라 여우형(vulpine), 개형(canine) 등으로 분류될 수 있다. 그러나 혈청형 3을 제외하고는 그들의 면역원성(immunogenicity)은 거의 완벽한 교차방어(cross-protection)을 나타낸다. 그리하여 Pasteur의 오리지널 1885 스트레인과 Virus Standard, Pitman-Moore 스트레인 등)와 최근에 분리된 것(Flury, Street Alabama Dufferin SAD, Vnukovo 및 Kelev) 으로 제조된 백신들은 혈청형 1에 속하는 현재까지 분리된 모든 스트레인에 대하여 방어한다.

불활화 광견병 백신의 제조원리는 동물용 백신에 어췌반트를 넣는 것 이외에는 인체용이건 동물용이건 동일하다.

동물용으로는 생독백신이 또한 효과적이며 경구적으로 접종하는데, 야생(또는 집에서 사육하는)동물을 면역시키기 위하여 미끼(baits)에 넣어 살포될 수 있다(9). 생독재결합 백신(live revombinant vaccine) (예를들어, vaccinia virus 내에 익스프레스시킨 광견병 바이러스 글라코프로틴) 또한 효과가 있는 것으로 입증된 바 있다.

목적동물에 대한 병원성을 감소시키기 위하여 동물체 내, 계란 내 또는 세포배양으로 배양 순화된 생독을 함유하고 있는 예방백신에 적용하는 표준과, 화학약품으로 불활화시킨 바이러스로 제조된 예방백신에 적용하는 표준이 서로 상이하다. 이들 두 종류

의 예방백신은 각각 장점과 단점을 가지고 있지만 (3), 그것들은 모두 1년과 3년이라는 기간동안 동물을 면역시키는 데 사용될 수 있다. 그것들은 감염에 노출된 비접종동물을 방어하지는 못한다(6). 예방백신만 가지고도 노출 후 치료의 효과가 입증된 동물은 인체뿐이다.

예방백신을 제조하거나 시험하는 동안 바이러스의 모든 취급은 WHO에서 규정한 철저한 안전주의사항을 반드시 준수하여야 하다(8.13).

### 1) 종독관리(Seed management)

예방백신의 형태가 무엇이든간에 재결합 백신을 제외하고는 백신 생산의 최초절차는 바이러스를 계란이나 세포배양 또는 동물에 접종하는 것이다.

#### ① 성상(Characteristics)

혈청형 1에 속하는 스트레인이면 야의 광견병바이러스에 대하여 방어하는 것으로 입증된 것(그 백신이 권장되고 있는 그 국가 내에서 현재 사용중인 것)이면 적합하다. 사용되는 바이러스의 스트레인은 생물학적(예, 병원성) 그리고 혈청학적 성상(단클론성 항체에 의한 형별)이 잘 알려져 있는 것이어야 한다.

#### ② 배양(Culture)

종독(seed virus)의 마스터 셀 스톡(master cell stock)을 반드시 준비해 두어야 하며 동결상태(deep frozen)로 보존해야 한다. 이러한 배양보존주(stock)로부터 계대배양하여 백신생산에 사용한다. 바이러스의 증식은 종독의 발육기간 중 역가추정으로 확인된다.

#### ③ 백신으로서의 유효(Validation as a vaccine)

예방백신으로 승인받기 전에 목적동물 중 예방접종된 동물과 대조동물에 대한 공격접종에 의하여 면역 지속기간이 반드시 설정되어야 한다. 항체 카이네틱스(antibody kinetics) 또한, 항체역가와 공격에 대

한 저항과의 상관성을 확인하기 위하여 밝혀져 있어야 된다.

면역의 지속기간은 매 배치마다 시험되지는 않지만 불화화 백신에 대한 항원역가 또는 생독백신에 대한 바이러스 역가로부터 흔히 추론된다(4) ③항 참조).

예방백신의 승인을 목적으로 면역지속기간이 반드시 밝혀져야 하는데, 그 백신이 사용될 동물종류별로 시험되어야 하며 마우스 또는 세포배양에 있어서의 중화시험으로 항체 카이네틱스를 시험하여야 된다 (1. 2) 참조).

목적동물에 있어서의 효능과 마우스에서 추정된 항원역가 사이의 상관성이 반드시 설정되어야 한다 (2. 4) ③항 참조).

예방백신의 안정성(vaccine stability)은 흔히 1~2년의 장기간 저장 후에 배치(batch)를 시험하는 것으로 확인된다. 37에 1주간 보존하는 가속화 숙성과정(accelerated aging)도 때로는 이용된다. 제조업체에서 주장하는 보존기간은, 국가검정기관(national licensing authority)에 의하여 체크되어야 한다. 일반적으로 액상 예방백신(fluid vaccine)에 대하여는 12~18개월이며, 동결백신(lyophilised vaccines)에 대하여는 24개월 정도이다.

### 2) 제조(Manufacture)

어떤 방법을 적용하던간에 기질(substrate)의 품질(quality)에 대하여 세심한 주의를 기울여야 하는데, 동물과 계란은 모두 SPF 오리진이어야 하며 baby hamster kidney cell line과 같은 세포배양계는 무균성과 순수성에 있어서 국제 표준에 적합하지 않으면 안된다.

#### ① 동물에서(In animals)

바이러스를 뇌 내로 접종하여 광견병 말기에 그 동물을 죽여서 신경조직을 채취한다. 바이러스를 자외선등(ultra-violet light) 조사(irradiation)와 같은 물

리적 방법(physical methods)으로 또는 석탄산(phenol)이나 베타 프로피올락톤( $\beta$ -propiolactone) 또는 아이민(imine)과 같은 화학적 방법(chemical methods)으로 불활화 시킨다. 예방백신은 바이러스를 많이 얻기 위하여 어린동물(마우스, 새끼양 등)에서 제조되어야 한다.

어떤 경우에는 바이러스가 완전히 불활화되지 않기도 하는데, 예를들면 Fermi형과 같은 석탄산 처리백신이 있는데 그러한 예방백신은 요즘에는 사용이 권장되지 않고 있다.

### ② 계란에서(In eggs)

바이러스 순화 스트레인을 SPF 발육계란 내에 접종하여 38°C에서 5~6일간 배양한다. 감염성 계태아 조직형태로 바이러스를 채취하여 흔히 동결처리한 것을 생독예방백신으로 사용한다. 그러한 예방백신의 예를들면 Flury low-egg-passage(LEP) 또는 보다 나은 high-egg-passage(HEP) 변형 스트레인이 있는데, 이것은 어떤 동물에 있어서는 보다 안전한 것으로 인정된다(예, 고양이).

### ③ 세포배양에서(In cell cultures)

바이러스를 세포배양계에 감염시켜 35~36°C에서 배양한다. 이것을 생독예방백신으로 쓸수도 있으며(Flury 그리고 SAD 백신과 같이) 또는 석탄산을 첨가하여(Semple 백신) 또는 베타 프로피올락톤( $\beta$ -propiolactone)과 같은 화학약품으로 처리하여 사독 예방백신으로 사용할 수도 있다.

제조과정 중 앞에서 언급한 기질 중 어느 것에서든 바이러스의 증식을 확인하여야 하며 가장 적절한 시기 흔히 동물이나 계란, 세포배양계에 접종 후 4~6일에 바이러스를 채취한다. 바이러스의 채취는, 최종제품의 적정항원성을 나타내주는 희석농도에서 완충용액에 부유시켜 수집한다. 필요하다면 그 부유액을 불활화시키거나 동결시킨다. 불활화 바이러스로 제조된 예방백신에 대하여는 어췌벤트를 넣는 것이 권장되는데, 왜냐하면 다른 예방백신의 항원과 마찬가지로

가지로 다가백신(pothvalent vaccines)에서 부조화가 있을 수 있기 때문이다.

세포배양계는 광견병 바이러스 글라이코프로틴(glycoprotein)의 엑스프레션(expression)을 위하여 gene coding을 가지고 있는 vector virus(예, Vaccinia virus)를 발육시키고자 하는 데에도 사용될 수도 있다.

## 3) 공정중 관리(In-process control)

이것은 적절한 역가를 나타내는 바이러스의 발육을 확인하고 원하지 않는 미생물의 오염부재를 확인하기 위한 절차이다.

생독백신에 있어서는, 바이러스 발육 카이네틱스(virus growth kinetics)를 확인하여야만 되는데, 바이러스의 최종역가가 목적동물에서의 기대하는 방어수준과 상관이 있음을 확인코자 하는 것이다.

불활화 바이러스 백신에 있어서는, 최종제품에 대한 면역학적 성상을 시험관내 기법(예, ELISA, 한천겔 면역침강법(agar gel immunodiffusion), 항체결합 시험(antibody binding tests) 또는 감염세포 염색법(infected cell staining)으로 평가 할 수도 있다. 이러한 평가는 세포 배양계내에서 바이러스를 채취하기 위한 가장 적합한 시기를 나타내주기도 한다.

## 4) 생산품 관리(Batch control)

### ① 무균시험(Sterility tests)

무균도 및 생물학적 재료의 오염부재시험은 “일반정보(Chapter on General Information)”편에 기술되어 있다.

### ② 안전시험(Safety tests)

예방백신을 허가하기 위한 목적으로는 안전시험이 목적동물에서 수행되어야 한다. 생독 예방백신(재결합 예방백신(recombinant vaccine)을 포함하여)의 경우에 있어서는 안전시험은 예방접종지역 내에 있는



그러한 목적동물 모든 종류에 대하여 수행되어야 한다(3).

불활화 바이러스 예방백신의 최종제품에 대한 안전시험은 세포배양계 또는 마우스의 뇌내접종으로 살아있는 바이러스를 확인하는 것으로 수행된다. 현재 사용중인 생독 예방백신들에 대하여는 안전시험을 하지 않고 있다.

### ③ 효능시험(Potency tests)

생독 예방백신에 대하여는 효능시험은 예방백신에 존재하고 있는 바이러스의 양을 측정하므로써 수행된다. 일단 목적동물과 바이러스 역가에 있어서 예방백신의 효능사이에 상관성이 있는 것으로 확인되면 바이러스의 역가는 예방백신의 효력을 나타내 주는 것을 신빙할 수 있는 것이다. 이것은 세포 배양계를 사용하거나 또는 포유중 마우스의 뇌내접종으로 수행된다.

불활화 바이러스 예방약에 대하여는 목적동물에 있어서의 효능과 마우스에서 추정된 항원역가와와의 상관성은 예방백신 효력의 신빙성 있는 지표로 될 수 있다(2. 1) ③ 참조).

예방백신의 효능은 국립보건연구원(NIH) 시험법과 유럽약전(European Pharmacopoeia) 시험법으로 수행된다.

344주령의 최소 10마리의 마우스군에 유럽약전에 따라 1회씩 점차 감소되는 용량으로 접종하거나(12), 또는 NIH 시험법에 따라 1주간격으로 2회 접종한다(8). 예방백신 희석농도의 충분한 숫자를 14일 후의 뇌내 공격접종에 대한 50%의 마우스를 방어하는 희석농도에 비교한다(8.12).

WHO 국제표준 예방백신을 사용할 수 있으며 항원성 시험의 결과는 국제단위(IU)로 표시 될 수 있다 다음 사항에 한해서 시험결과가 유효한 것으로 본다.

- 검사용 예방백신과 표준품(reference preparation) 모두, 방어율 PD<sub>50</sub>(protective dose)의 최대량과 최소량 사이의 용량을 마우스에 투여할 것

- 공격용 부유액(challenge suspension)의 역가는 최소 10 ID<sub>50</sub>을 함유하는 부유액으로 0.03ml 일 것
- 신뢰간격(confidence interval) (P = 0.95)은 추정역가(estimated titration)의 25% 이상과 400% 이내일 것
- 통계분석(statistical analysis) 결과는 용량-반응 관계선(dose-response lines)상에서 선형(linearity) 또는 평행선형(parallelism)에서 유의성 있는(significant) 비례(slop) 를 보여야 하며 유의성 있는 편차가 없어야 할 것

예방백신은 추정효능(estimated potency)이 최소 기술용량(smallest described dose)에 있어서 1 IU 보다 큰 경우에 한해서 합격 처리된다.

단순화된 시험기법(simplified test)이 예비시험으로 사용될 수도 있는데, 이 예비시험에서 공사용 예방백신은 1 IU 이상의 항원역가를 보이는 것이어야 한다(2).

## 참고문헌

- AUBERT M.F.A.(1982). Une methode simple de calcul des titres des suspensions virales, vaccinales ou seroneutralisantes : la methode graphique.(A simple method for calculating titres of virus, vaccine or serum-neutralising suspensions : the graphic method.) *Rev.Sci.Tech. Off.Int.Epiz.*, 1, 828-833.
- AUBERT M.F.A. & BLANCOU J.(1982). Test simplifie de controle d activite des vaccins antirabiques a virusinactives. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 1 811-822.
- BAER G.M.(1991). The natural history of rabies. CRC Press, Boston.
- BARNARD B.J.H. & VOGES S.F.(1982). A simple technique for the diagnosis of rabies in formalin-preserved brain. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 49, 193-194.

5. BARRAT J. & HALEK H.(1986). Simplified and adequate sampling and preservation techniques for rabies diagnosis in Mediterranean countries. *Comp.Immunol.Microbiol.Inf.Dis.*, 9, 10.
6. BLANCOU J., SORIA BALTAZAR R., MOLLII. & STOLTZ J.F.(1991). Effective postexposure treatment of rabies-infected sheep with rabies immune globulin and vaccine. *Vaccine*, 9, 432-437.
7. BOURHY H. & SUREAU P.(1991). Methodes de laboratoire pour le diagnostic de la rage. Metodos de laboratorio para el diagnostico de la rabia. Laboratory methods for rabies diagnosis. Commission des Laboratoires de reference et d'Expertise de l'Institut Pasteur, Paris, 197 pp.
8. KAPLAN M.M. & KOPROWSKI H.(1973). Laboratory techniques in Rabies, 3rd Edition-. World Health Organisation Monograph Series, No. 23, 367 pp.(New edition due in 1992.)
9. KIENY M.P., LATHE R., DRILLINEN R., SPEHNER D., SKORY S., SCHMITT D., WIKTOR T., KOPROWSKI H. & LECOCQ J.P.(1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature*, 312, 163-166.
10. MONTANO HIROSE J.A., BOURHY H. & SUREAU P.(1991). Retro-orbital route for brain specimen collection for rabies diagnosis. *Vet. Rec.*, 129, 291-292.
11. PERRIN P., ROLLIN P.E. & SUREAU P.(1986). A rapid rabies enzyme immuno-diagnosis(RREID) ; useful and simple technique for the routine diagnosis of rabies. *J.Biol. Stand.*, 14, 217-222.
12. *Vaccinum rabiei inactivatum ad usum veterinarium*. Inactivated rabies vaccine for veterinary use. *European Pharmacopoeia*, Second Edition(1985), Part(9), 451.
13. WHO Expert Committee on Rabies. Seventh report(1984). *World Health Organisation Technical Report Series No. 709*, 104 pp.(Eighth report is due in 1992.)