大韓獸醫學會誌(2009) 第49卷 第3號
Korean J Vet Res(2009) 49(3) : 221~229

동아시아 유래 구제역바이러스 Asia1혈청형과 백신항원의 면역학적 상관성

박종현* · 고영준 · 김수미 · 이향심 · 이광녕 · 조인수
국립수의과학검역원 해외전염병과
(게재승인: 2009년 9월 16일)

Immunological relationships of FMD vaccine strain and Asia1 field isolate from East Asia

Jong-Hyeon Park*, Young-Joon Ko, Su-Mi Kim, Hyang-Sim Lee, Kwang-Nyeong Lee, In-Soo Cho
Foreign Animal Disease Division, National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-727, Korea
(Accepted: September 16, 2009)

Abstract : Foot-and-mouth disease (FMD) is the most contagious disease of mammals. The use of inactivated vaccine can be chosen to prevent or control FMD. However, vaccination against one serotype of FMDV doses not cross-protect against other serotypes and may not protect fully against some strains of the same serotype. Appropriate selection of vaccine strain is an important element in the control of FMD. The immunity of vaccine antigens should be matched against newly circulating viruses. The phylogenetic analysis of serotype Asia1 reported from China, Mongolia, North Korea and Russia since 2005 shows that they are all classified into genetic group V, but the strain, Asia1/Shamir (ISR/89) which have been used as a vaccine strain in Korea, is clustered into different genetic group. So, in this study the serological relationship between the isolate (Asia1/MOG/05; MOG) and the Shamir strain was determined by ELISA and virus neutralization test. Even though the matching value of the virus (MOG) against the vaccinated sera in target animals was not so high, the vaccinated animals elicited antibodies enough for protection after vaccinated once or twice. Conclusively, we suggest that the vaccine containing Asia1/Shamir antigen could protect the genetic group V strains circulating in East Asia currently if vaccinated twice or the more.

Keywords : ELISA, FMD vaccine, neutralization, vaccine matching

서 론

구제역은 공기전파가 가능하며 전염력이 강한 바이러스성 동물 전염병중 하나로 자연 감염될 수 있는 숙주가 다양하고, 동물의 생산성을 저하시켜 발생시 막대한 경제적 피해를 일으킬 수 있다 [1].

구제역 청정국은 이 질병을 사전 차단하기 위해서는 주변국가로부터 유입가능성에 대한 국경 검역을 통한 철저한 대비가 필요하다. 또한 평소에도 유입되었을 상황을 대비하여 구제역에 대한 소, 돼지, 염소 등 감수성 동물을 사육하는 농가에서는 정기적인 소독을 실시하는 것은 구제역을 예방하는 필수적인 사항이 되었다. 이와 더불어 백신접종은 동물의 질병 예방을 위해 가장 확실한 방법이다. 그러나 발생 후 지속 감염되는 반추수의 인 후두에 존재할 수 있는 바이러스로 인한 재발생 가능성은 [16], 나라 간에 축산물 교역을 어렵게 하고 그로 인해 많은 국가에서 발생시에도 예방 접종을 기피하고 있고 백신접종을 중지하기 위한 노력을 기울이고 있다 [6]. 구제역 청정국이지만 발생이 우려되는 국가에서는 다른 나라와의 접경지역에 백신접종을 실시하기도

*Corresponding author: Jong-Hyeon Park
Foreign Animal Disease Division, National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-727, Korea
[Tel: +82-31-467-1719, Fax: +82-31-449-5882, E-mail: parkjh@nvrqs.go.kr]

한다. 예를 들어 몽골, 중국, 러시아 등 동아시아 일부 국가에서는 야생동물 등 구제역 감염이 우려되는 동물이 국경을 오가는 것을 막기 위해 그 지역에 한하여 백신접종도 실시하고 있다 [15]. 일반적으로 청정국 또는 발생국 모두에서 구제역 발생시에 급속히 전파되는 바이러스 특성을 고려하여 감염된 동물로부터 배출되는 바이러스 양을 줄이기 위하여 발생지역 주변에 긴급 백신접종을 할 수 있다 [5]. 1980년 이후 유럽의 백신접종 중단 정책 이후 세계적으로 백신접종을 기피하는 상황으로 바뀌었다. 특히 2001년 영국의 구제역 발생은 백신접종을 시도하지 않고 방역에 성공하여 청정국이 되었지만 많은 수의 동물을 살처분하여 세계적으로 백신접종에 대한 찬반 논란이 이어져 왔다 [6]. 따라서 백신접종 후 그 동물을 살처분하지 않고 유지하는 것도 제시하고 있는 대안 중의 하나이다 [14].

예방접종을 위해서 백신주의 선택 및 그 효력(potency)를 고려하는 것은 중요하다 [19]. 구제역 한 종류의 혈청형에 대한 백신 접종은 다른 혈청형에 대해 교차방어가 되지 않고, 같은 혈청형이라 할지라도 다른 지역 또는 시간 차이를 두고 분리된 바이러스에 대해서 완전한 방어를 나타내지 못한다 [13]. 교차면역을 측정하기 위해서 가장 직접적이고 믿을 만한 방법은 목적동물에 백신을 접종한 뒤 바이러스로 공격접종하여 방어가 되는지를 확인하는 것이다. 공격접종 방법은 그 백신항원에 대한 효력과 혈청학적 분석으로 충분하게 해석이 가능한 결과를 직접적으로 보여줄 수 있는 장점이 있으나, 목적동물을 사용함으로 실험비용이 많이 들고 실험기간이 오래 걸리는 단점이 있으며 세계적으로도 동물보호에 따른 여러 제약이 존재하는 현실을 고려할 때 추천할 만한 방법은 아니다. 또한 중요한 사항은 이 실험은 고도로 밀폐 처리된 차폐실험실을 요구한다는 사실이다 [13]. 따라서 일반적으로 구제역 백신의 동물 공격접종 실험은 그리 흔하게 진행되는 실험은 아닐 수 밖에 없다. 이러한 단점들을 보완하기 위하여 공격 접종실험이 아닌 동물에 접종된 혈청을 채취하여 실험 가능한 혈청학적 실험법으로 구제역 바이러스 백신주와 야외주간의 항원적 차이를 입증할 수 있다 [13].

구제역의 7가지 혈청형(O, A, Asia1, C, SAT1, SAT2, SAT3) 중 아시아 지역에서는 과거 2000년에 PanAsia O type의 혈청형이 유행되었고, 한국도 2000년 및 2002년에 이 혈청형에 의해 발생하였다. 2000년에는 구제역 완제품 백신(O, A, Asia1 3가 백신접종)이 접종되었으며, 이 당시는 O형 백신주로 O1manisa 주가 사용되었고 야외주와 백신항원의 동질성은 인정되었다 [20]. 당시에는 영국에 필요시 백신으로 제작할 수 있는 항원뱅크를 미리 준비된 것을 발생당시 도입하여 빠른 시간 내에 발생을 중단시킬 수 있었다 [18]. 그리고 2002년에는 구제역 발생 또는 방역 상황 등을 고려하여 백신접종은 실시되지 않았다 [15, 18].

최근 동아시아 지역에서는 2005년 중국의 Asia1형의 구제역 발생이후 지속적으로 Asia1형이 그 주변국가에 발생되고 있으며, 심지어 2007년에는 북한에 Asia1 혈청형에 의한 구제역이 발생되었고, 이 바이러스를 분석한 결과 유행하는 바이러스 형은 유전형 group V에 속하는 것으로 [8, 17], O형 이외에도 이 Asia1형 바이러스가 국내에 유입되어 벌어질 발생 상황에 대한 사전 대비가 필요할 것으로 생각된다. 세계동물보건기구(OIE)에서 추천한 백신 후보주로서 인정되고 있는 Asia1 Shamir주 [7, 15]는, 우리나라를 비롯한 세계 여러 국가에서 발생에 대비하여 준비되고 있는 Asia1형으로는 유일한 백신 바이러스주이다. 최근 우리나라 주변지역인 중국 등 동아시아에서 발생되고 있는 이 바이러스에 대하여 적절히 방어할 수 있는 가를 알아보는 것은 국내 방역상 매우 중요하다. 비록 분자역학적인 분석방법을 통하여 동아시아 발생 바이러스 유전형 group V가 Asia1 Shamir 백신주의 방어가 가능할 것이라는 예측과 [8], 이와는 상반되게 백신주와 야외주간에 면역학적 상관성(r1)이 비교적 낮다는 단편적인 결과는 알려져 있으나 [7], 여러 동물에서의 면역학적인 상관성을 각종 실험을 통하여 종합적으로 분석한 결과는 현재까지 없다.

따라서 본 논문에서는 구제역 Asia1 백신 항원을 실험 및 목적동물에 접종 후 혈청에서 면역학적인 교차실험을 통하여 최근 유행하는 Asia1혈청형 야외주와의 상관관계를 알아보고 실제 발생시 야외 방역상황에 대한 능동적인 대처를 위해 Shamir주의 면역에 의한 실제 방어가능성을 예측하고자 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

구제역 면역항원 및 실험동물

구제역 O, A 및 Asia1 혈청형에 대한 3가 불활화 백신 항원(> 10 PD_{50}, 50% protective dose; Merial, UK)을 사용하였다. O형 바이러스 주는 O1 Manisa, A형은 A22 Iraq 및 Asia1형은 Shamir 항원으로 사용하였고, 불활화 처리되어 이중 오일로 혼합되어 있는 제형으로 동물에 접종하였다.

마우스에 접종은 그룹 당 5두로 소 접종량의 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 doses로 구제역 백신 항원을 2주 간격으로 2회 접종하였고 1차 접종 시점으로부터 4주후에 채혈하여 각 실험법에 따라 항체의 역가를 분석하였다. 기니픽은 동물에 따라 다르게 복강 또는 피하로 1 dose를 1회 접종하였고, 접종 후 2주후에 혈청을 채취하여

Table 1. Comparison of immune resopnses between FMDV Asia1 serotypes in guinea pigs and goats vaccinated with trivalent vaccine antigen

Animals	No. animal	Routes	Dose (volume)	Antibody titers (log)				coefficient (r)	r1 by ELISA
				VNT* (MOG)¶	LPBE† (MOG)	LPBE (Shamir)	SPCE‡ (MOG)		
Guinea pig (Shamir)	No.1	S.C	1 (2 mL)	2.04	N/A§	N/A	1.00	0.92 between VN and SPCE	N/A
	No.2	S.C	1 (2 mL)	2.65	N/A	N/A	2.20		
	No.3	I.P	1 (2 mL)	2.36	N/A	N/A	1.90		
	No.4	I.P	1 (2 mL)	2.65	N/A	N/A	2.81		
	No.5	I.P	1 (2 mL)	2.65	N/A	N/A	3.11		
	No.6	–	–	< 1.20	N/A	N/A	< 1.20		
	No.7	–	–	< 1.20	N/A	N/A	< 1.20		
Goats (Shamir)	No.1	I.M	1 (2 mL)	2.71	2.26	1.65	N.D‖	0.89 between LPBEs	>1.0
	No.2	I.M	1 (2 mL)	2.41	1.95	1.65	N.D		
	No.3	I.M	1 (2 mL)	2.11	2.56	1.95	N.D		
	No.4	I.M	1 (2 mL)	2.71	2.86	1.95	N.D		
	No.5	–	–	< 1.20	< 1.20	< 1.20	N.D		
	No.6	–	–	< 1.20	< 1.20	< 1.20	N.D		

*VNT: virus neutralization test. †LPBE: liquid-phase blocking ELISA. ‡SPCE: solid-phase competitive ELISA. §N/A: not available. ‖N.D: not done. ¶MOG: Asia1/MOG/05.

Table 2. Comparison of immune responses against FMDV Asia1 (Asia1/MOG/05 or Asia1/Shamir) strains in the sera from vaccinated pigs and cattle

Species	Vaccinated Antigen	No. Sera	Injected round ($TCID_{50}$)	Antibody titers (log)			r1 by ELISA
				VNT (MOG)	LPBE (MOG)	LPBE (Shamir)	
Pigs	Shamir	No.1	2	2.41	3.06	3.01	>1.0
		No.2	2	2.56	4.06	4.06	
	MOG	No.1	1 (2×10^7)	2.11	2.56	1.51	N/A†
		No.2	1 (2×10^7)	2.56	3.16	1.95	
		No.3	1 (2×10^7)	2.26	3.16	1.51	
		No.4	1 (2×10^7)	2.56	3.16	1.65	
Cattle*	Shamir	No.1	4	2.11	3.76	3.46	>1.0
		No.2	4	1.51	3.76	3.76	
		No.3	2	3.01	3.76	3.46	
		No.4	5	1.51	3.46	3.16	

*The corelation coefficient (r) between LPBE (MOG and Shamir) methods in the cattle is 0.82. †N/A: not available.

분석에 사용하였다(Table 1). 동물의 사용은 국립수의과학검역원의 실험동물 윤리규정에 따라 관리하였다.

구제역에 대한 대표적인 감수성 숙주 즉, 염소, 돼지, 소를 면역 접종하여 채취된 혈청을 각종 항원에 대한 교차면역 및 중화 반응 분석을 위하여 사용하였다. 소는 1 dose로 2-5회 접종하여 최종 접종 후 2주 후 채취된 혈청을 사용하였다(Table 2). 소의 경우 양성 혈청은 국립수의과학검역원에서 진단용 양성 항체제작을 위해 항원을 접종하여 얻어진 혈청을 이용하였다(Table 2). 염소는 백신 1 dose를 근육 1회 접종 후 2주후에 채취된 혈청을 공시하였고(Table 1), 돼지는 Shamir 항원이 포함된 1 dose로 2회 근육 접종된 혈청을 공시하였다(Table 2). 또한 야외주인 Asia1/MOG/05(MOG)주(2×10^7 $TCID_{50}$)를 불활화하여 염소 및 돼지에서 1회 접종된 혈청을 시기별로 35일째까지 채취하여 교차비교 실험에 공시하였다(Table 2, Fig. 2).

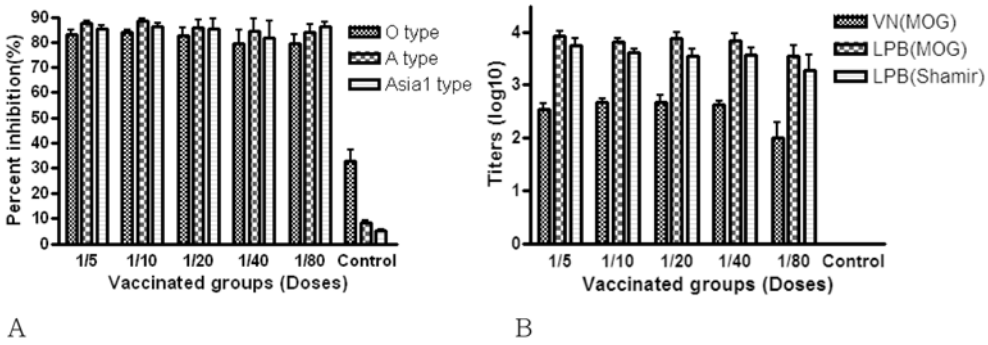

Fig. 1. Immune responses in vaccinated mice according to variant dosage of trivalent (O, A and Asia1) vaccine antigen. The five mice per groups were bled at 2 weeks after 2nd booster vaccination by intramuscular route (0.4, 0.2, 0.1, 0.05 and 0.025 ml of vaccine volume). (A) The serotype-specific liquid-phase blocking (LPB) ELISAs (LPBE) for antibodies of O serotype using O1 manisa, A serotype using A22Iraq and Asia1 serotype using Asia1 Shamir as a compared antigen were used. (B) The comparison of antibody titers by virus neutralization test (VNT) using Asia1/MOG/05 (MOG) and LPBE using MOG or Asia1 Shamir according to variant dosage of trivalent (O, A and Asia1) vaccine. The corelation coefficient (r) between LPBE (MOG and Shamir) methods is 0.79.

항체검출을 위한 liquid-phase blocking (LPB)-ELISA

항체검출을 위한 ELISA로는 OIE에서 표준 방법 [13]으로 이용되는 스크린용으로 항체 유무 판단을 위해서 LPB-ELISA(LPBE, 영국 구제역 세계표준연구소)를 사용하였다. 항원으로는 킷트에서 제공되는 O1 manisa, Asia1 Shamir(Shamir) 및 A22 Iraq를 이용하였고(Fig. 1), 동아시아 지역의 Asia1형의 항원에 대한 면역원성 비교검사를 위해서는 몽골에서 2005년 발생되어 분리된 Asia1 유전형 V로 분류된 구제역바이러스(MOG)를 불활화바이러스 항원을 사용하였다. LPBE 방법은 제공되는 매뉴얼을 참고하였다. 요약하면, 검사혈청과 위에 언급된 항원을 overnight로 반응시킨 혼합물을 trapping 항체(rabbit anti-FMDV antibody)가 플레이트에 overnight로 미리 코팅된 플레이트에 1시간 반응한 후, detector 항체(guinea pig-anti-FMDV antibody)를 반응시켰다. Conjugate (rabbit anti-guinea pig-HRP)를 1시간 반응시키고, ortho-phenylenediamine로 10-15분간 발색하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 well 억제 백분율 PI(percent inhibition)는 100-(대조 또는 검사혈청의 OD 값/Control buffer well의 OD 중간 평균값 × 100)으로 구하였고, PI가 50 미만일 경우는 음성, PI가 50 이상일 경우는 양성으로 판정하였다. 역가검사는 위에 언급된 방법을 적용하여 혈청 희석배율을 조정하여 Asia1혈청형에 대해서만 실시하였다. 백신주와 야외주와의 상관성(r1)은 '야외바이러스에 대한 항체의 역가/백신바이러스에 대한 항체의 역가'로 산출하였다. ELISA에서는 0.2 이하는 부적절한 백신 주, 0.2-0.39는 2회 접종으로 방어가 가능하며, 0.4 이상이면 백신이 야외주에 대하여 충분히 방어한다는 세계표준의 기준을 적용하였다 [13, 19].

항체검출을 위한 solid-phase competitive(SPC)-ELISA(SPCE)

SPCE는 Ko 등 [9]이 개발한 방법을 이용하였다. 이 방법은 trapping 및 detector 항체로 마우스 유래 단클론항체를 사용하는 방법으로 MOG를 비교항원으로 사용하였다 [9, 12]. 실험방법은 다음과 같다. 이미 코팅된 구제역 단클론항체에 항원을 반응시킨 후에 가검 혈청, HRP가 결합된 구제역 단클론항체의 순서로 1 시간씩 반응시키고 TMB(3,3'5,5'-tetramethyl benzidine) substrate로 15분간 발색시켜 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과판정은 대조 well 억제 백분율 PI로 표시하였으며 PI값이 50% 이상이면 양성, 이하이면 음성으로 판정하였다.

항체검출을 위한 중화시험(virus neutralization test, VNT)

혈청의 중화역가 확인을 위한 VNT는 최근 동아시아 유행 구제역바이러스 MOG를 사용하였다. MOG 100 $TCID_{50}$와 가검 혈청, 양성혈청, 음성혈청 등을 적정한 희석배율로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. BHK-21 세포를 분주한 후 48시간에서 72시간 반응 한 후 세포변성효과(cytopathic effect)를 관찰하였다. Asia1/Shamir 백신주(Shamir)에 대하여 불활화 항원만(LPBE 항원)을 확보하였고 생 바이러스를 확보하지 못해 두 바이러스 간 중화실험에 대한 비교는 실시할 수 없었다. 세계 표준방법 [19]에 따라 VNT r1은 0.3 미만일 경우 백신과 야외주는 차이가 있어 방어가 안될 것으로 예측되며, 0.3 이상은 충분히 방어될 수 있는 백신주로 해석되었다.

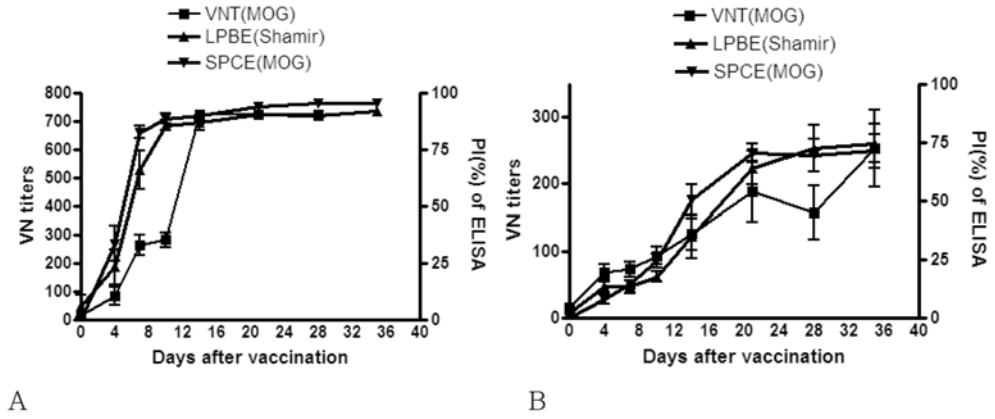

Fig. 2. Comparison of immune responses against FMDV Asia1 (Asia1/MOG and Asia1/Shamir) strains in (A) goats and (B) pigs vaccinated with inactivated Asia1/MOG. Goats (n = 4) and pigs (n = 4) were bled from 3 to 7 days intervals until 35 days after vaccination. The samples over 50% percent inhibition (PI) in LPBE or SPCE were decided as a positive. Test results in negative control (n = 2) in VNT were < 16.

통계분석

통계분석은 GraphPad Prism(Ver 4.0; GraphPad Software, USA)과 GraphPad Instat(Ver 3.05; GraphPad Software, USA)를 이용하여 접종개체 및 그룹간의 상관성 및 *t*-test를 실시하였다.

결 과

마우스에서의 반응성 분석

구제역 3종 항원(O, A, Asia1형)에 대한 LPBE 항체의 스크리닝 결과 낮은 접종량에서도 O, A, Asia1 3종 모두 ELISA 항체의 양성 반응을 확인할 수 있었다(Fig. 1A).

Asia1에 대한 백신의 반응성을 분석하기 위하여 백신 dose 별로 마우스에 접종하여 채취된 혈청을 동아시아 지역에서 유행 유전형인 MOG 바이러스로 중화시험을 실시한 경우 낮은 접종 dose(1/80)에서도 최소 100배 정도의 중화항체를 보여 높은 방어 항체역가를 유지하고 있었다. Shamir항원을 이용한 LPB에서도 높은 항체 역가를 확인할 수 있으며, Shamir 및 MOG 항원으로 서로 항원이 다르게 사용된 LPBE 방법에 있어서도 상관성(r = 0.79)이 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1B).

기니픽 및 염소에서의 반응성 분석

기니픽에 피하 또는 복강으로 1회 접종한 후 2주후 혈청을 채취하여 그 역가를 분석을 위해 혈청 중화시험을 실시하였다. LPBE는 기니픽 혈청이 detecting antibody로 사용되므로 기니픽 혈청에서는 실험이 불가능하여 SPCE를 실시하였다. 그 결과 같은 MOG 항원을 사용한 중화시험 및 SPCE와의 비교에서 높은 상관성(r = 0.92)을 확인할 수 있었으며, 1회 접종인데도 대부분 높은 항체 역가를 확인할 수 있었다(Table 1).

염소에의 반응성(Table 1)은 근육에 1회 접종하여 그 반응을 측정한 결과로서 같은 바이러스를 사용한 VNT(MOG)과 LPBE(MOG)에서 실험방법에서 차이가 확인되지 않았고($p > 0.05$), 상관성도 보이지 않았으나(r = 0.14), 항원이 다르게 사용된 VNT(MOG) 및 LPBE (Shamir)와 LPBE(MOG) 및 LPBE(Shamir)의 비교대상간에 차이가 인정되었다($p < 0.05$). 그 항체의 역가는 LPBE 실험에서 Shamir보다 오히려 MOG와의 반응성이 더 높은 항체 양성을 보였다. 그러나 LPBE(MOG)와 LPBE(Shamir)의 LPBE 실험간에 실험법의 상관성(r = 0.89)을 확인할 수 있었고 백신과 야외주와의 상관성도 높았다(r1 > 1.0, Table 1).

MOG 항원을 접종한 염소에서 중화항체 수준은 접종 후 4일부터 방어항체가 형성되기 시작하여 35일까지도 방어항체를 유지하였으며, LPBE(Shamir)실험에서는 Shamir 항원에 대한 방어항체가 7일부터 모든 개체에서 형성되었다(Fig. 2). SPCE(MOG)의 실험결과에서도 LPBE보다 빠른 4일째부터 항체가 형성되었고, 7일에는 모든 개체에서 방어항체가 형성되었다(Table 2, Fig. 2).

돼지 및 소에서의 반응성 분석

돼지에서의 항원을 접종한 그룹간 3개 실험법간의 차이가 확인되지 않았으며(p = 0.27), 각 실험법 간의 비교는 VNT(MOG)와 LPBE(MOG), VNT(MOG)와 LPBE (Shamir) 및, LPBE(MOG) 및 LPBE(Shamir)와는 서로의 실험방법이 유사성이 있었다($p > 0.05$). 또한 LPBE(MOG)

및 LPBE(Shamir)의 실험이 유사한 관련성은 LPBE 항체 형성도 역가가 유사하게 나타나는 것으로 알 수 있었으며 2회 접종결과로 그 역가는 1,000배 이상으로 매우 높은 항체 수준을 확인할 수 있었다. 백신 및 야외주 항원을 이용하여 돼지의 혈청에 대한 분석결과 ELISA 실험 간의 충분한 방어수준(r1 > 1.0)의 값임을 확인할 수 있었다.

MOG 항원을 접종한 개체에서 중화항체 수준은 접종 후 4일부터 방어항체가 형성되기 시작하여 35일까지 방어항체를 유지하였으며, Shamir항원을 사용한 LPBE실험에서는 14일부터 항체가 형성되기 시작하여 21-35일째에 모두 방어항체가 형성되었다(Fig. 2). SPCE(MOG)의 실험결과에서도 LPBE와 유사하게 14일째 항체가 형성되어 21일에는 모든 개체에서 방어항체가 형성되었다(Fig. 2).

소에서의 3개의 실험법 간의 분석에서 실험법은 실험 간 차이가 인정되었다($p = 0.001$). VNT(MOG)와 LPBE(MOG), VNT(MOG)와 LPBE(Shamir)은 실험법에 차이가 있었으나($p < 0.01$), LPBE(MOG) 및 LPBE(Shamir)와는 실험법간의 차이가 크지 않았고 상관성도 확인되었다($p > 0.05$, $r = 0.82$). 또한 항체 역가도 매우 유사하게 항체생산이 높음을 확인하였다. 결과적으로 소의 경우도 LPBE 실험간의 충분한 방어 수준임(r1 > 1.0)을 확인할 수 있었다(Table 2).

고 찰

구제역바이러스의 다양한 변이 가능성 때문에 사용할 수 있는 백신을 확보하고도 그 효과가 저하될 수 있는 가능성이 있다. 즉, 백신주와 야외주와의 항원 유사성의 차이에 따라 백신접종 후의 면역 효과와 야외 상황에서의 방어능은 달라질 수 있다. 보유하고 있는 백신 항원의 야외주에 대한 방어능을 실제적으로 알아보는 평가는 매우 중요한 과정이며 이미 여러 방법이 개발되어 있다.

OIE에서 추천하는 백신바이러스 주에 대한 평가실험은 ELISA, VNT, 보체결합반응(complement fixation test, CFT)와 방어기대율 측정법(expected percentage of protection, EPP)등의 방법이 있다 [13]. ELISA와 CFT는 스크리닝 방법으로 추천되고 있는 반면 VNT나 EPP법에 의해 더욱 정밀한 검사결과를 낼 수 있다. 흔히 사용되는 ELISA는 검사 혈액이 적은 양으로도 가능하고 빠르게 실험이 가능하다. 특히, VNT 결과는 여러 다른 실험 결과보다 동물을 이용한 공격실험처럼 적절한 방어에 대한 예측 결과를 보여 줄 수 있는 장점이 있다. EPP법은 여러 항체검출법을 이용한 역가측정으로 방어의 가능성을 비교 예측할 수 있다. 그러나, 공격실험을 수행하여 미리 상관성 비교표를 작성하는 등 사전에 상당한 노력이 필요하며 간단한 실험법은 아니다 [13]. 그 이외에도 항원의 항체 결합능을 확인하기 위한 프로파일링 검사법 또는 VP1의 염기서열분석은 백신 적합성을 확인을 위해 부가적으로 사용할 수 있는 적절한 방법이 될 수 있을 것이다 [10, 13]. 특히 유전적인 특징과 항원에 대한 연구는 새로운 바이러스의 출현을 입증할 수 있으며, 야외에 유행하는 바이러스에 일치하는 혈청형의 백신 바이러스를 신속히 찾아낼 수 있는 장점도 있다.

그러나 이 방법들도 실험실 여건에 맞는 적절한 실험법이 선택되어야 한다. 왜냐하면 백신에 대한 적합성검사를 위해 사용되는 양성대조, 바이러스 등의 확보가 어려워 적절한 실험이 되지 못할 가능성이 있기 때문이다. 따라서 백신의 교차면역성분석을 위해 가능한 실험법을 선택하는 것도 매우 중요하다.

본 연구에서는 Asia1형 Shamir 백신의 생 바이러스를 확보하지 못하였으나, 불활화 항원은 LPBE법을 위하여 확보되었기 때문에 그것을 감안하여 가능한 방법을 고려하여 실험을 실시하였고, 백신면역 혈청에 대해 동아시아 바이러스를 이용한 VNT를 실시하여 방어항체 형성 유무를 확인하였다. 가장 공통적으로 추천되고 있는 구제역 백신 항원이 최근 동아시아 지역에서 발생되는 Asia1 바이러스 주에 대한 교차 방어능을 갖는지 여부를 VNT과 ELISA(백신주 및 Asia 1형 group V)로 실시하여 확인하는 실험에서 그 결과 면역교차 반응은 인정되었다. 각 항원 간의 항체 역가 등의 차이를 보아 야외주와 백신 주가 완전히 동일한 항원 성상은 아니라고 판단되나, 분석결과 대부분 동물에서의 항원을 다르게 시험한 LPBE에 대한 항체의 반응성은 그 상관성에 있어서 유사한 결과를 보였다. 이 백신을 사용하여도 최근 유행하는 Asia1 바이러스에 대하여 마우스, 기니픽 및 염소에서는 1-2회 접종시, 돼지 및 소의 경우도 2회 이상 접종시에 방어 역가 이상의 결과를 확인하였으며, ELISA에 의한 백신과 야외주의 상관성 값(r1)은 본 실험 결과 백신주로서 부적절한 기준 수치인 0.2 보다 높은 [13, 19], 거의 항원 특성이 대등할 정도 수준인 1이상의 결과를 보임으로써, Asia1형 유전형 V 바이러스의 유입 시에도 Shamir 백신이 충분히 방어할 것으로 추정되었다. 기니픽 및 염소 실험에서와 같이 1회 접종만의 경우도 모든 개체에서 중화항체 100배 이상의 방어 항체를 유지하고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 면역반응은 돼지 및 소에서도 비슷하게 적용될 것으로 추정되었다. 그러나 돼지에서는 야외주의 방어에 충분한 바이러스중화(VN) 항체를 보이는 면역형성을 확인할 수 있었으나, 소에서는 백신 접종 후에도 ELISA 결과와는 다르게 2두

에서 MOG에 대한 중화항체(VN) 역가가 낮게 형성되는 것으로 보아 각 동물에 따라서도 면역반응은 다르게 나타났고 ELISA에 의하여 그 유사성이 확인되었음에도 불구하고 백신주와 야외주의 항원 성상이 중화항체 분석결과와 완벽히 일치한 결과를 보이지 않았다. 이것은 Knowles [7]이 분석한 결과에서도 유사한 결과를 보이고 있는 데, 유전형이 group V인 2005년 러시아 분리주인 Asia1/Amursky/RUS/2005에서는 r1 값은 ELISA에서 0.25, VNT에서는 0.18-0.25이였고, 본 실험과 동일한 바이러스 MOG를 이용하여 VNT에서 이미 0.25로 확인된 바 있다. 이 결과에 대한 해석은 ELSIA에서는 r1 값이 < 0.2, VNT에서는 < 0.3 일 때 백신주로서 사용하는 것이 부적절할 수도 있는 결과로 판정하는 결과에 비춰 보면 [13, 19], VNT와 ELISA의 실험방법은 서로 다르지만 r1 결과는 유사하게도 비교적 낮게 나타났다. ELISA의 r1이 0.2-0.39의 수치이면 백신과의 유사성이 인정되나 2회 이상의 접종을 추천하고 있는 바 [13, 19], Asia1/Amursky/ RUS/2005에서 0.25의 수치는 백신을 2번 이상 접종해야 하는 경우로 해석될 수 있다. 0.3이하로 비교적 낮은 상관성을 지니는 것이기는 하지만 VNT와 ELISA 실험간 판정 기준에서 VNT 결과 백신 부적절과 ELISA에서 2번 접종 추천의 상이한 차이를 보여 최종 판단하기는 어려우므로 Shamir 백신 접종시 신중을 기할 필요가 있다.

백신의 효력은 포함되어 있는 항원의 면역학적 수용범위에 의해 결정되며, 약한 면역을 유발하는 백신보다 강력한 면역반응을 자극하는 높은 효력의 백신은 이종의 바이러스(heterologous virus)에 더욱 높은 방어 효과를 보일 수 있다. 또한 비록 완전한 방어를 나타내기까지 면역반응의 시작이 늦어질 수 있다할 지라도, 백신의 2차 접종은 주어진 백신에 의해서 효력이 증강되고, 항원의 수용범위가 넓어질 수 있다고 알려져 있다 [3, 13]. 따라서, 본 동물 실험의 결과를 판단할 때 마우스 및 기니픽과 같은 실험동물의 경우 소에 접종하는 투여량의 일부를 접종한 것이지만 과량의 항원이 투여되었고, 돼지 및 소의 경우 이종 바이러스라 할지라도 r1값은 2회 이상의 접종으로 r1 수치가 상승되었을 것으로 추정된다. 또한, 일반적으로 백신적합성을 평가할 경우는 OIE에서도 소에서 1차 면역 후 21-30일 후에 혈청을 채취하여 사용하는 것을 추천하고 있으므로 [13], 다른 동물 실험 결과보다도 소의 실험 결과를 우선하여 생각하여야 할 것이다. 우리가 확보하고 있는 접종 가능한 백신으로는 긴급 접종항원용으로 50% 방어량(50% protective dose, PD_{50})은 10 이상의 역가의 항원량을 갖는 것이다. 따라서 그 면역반응은 3 PD_{50}의 일반 백신 접종 보다 더욱 강력할 수 있으며, 야외 발생상황에서도 더욱 효과적으로 효력을 발휘할 가능성이 크다.

백신바이러스의 선발은 백신 항원의 설치와 유지에 중요하며, 구제역 발생지역의 방역 및 백신프로그램의 적용에 필수적인 사항이다. 주변지역의 발생에 따라 우리나라에 위험한 혈청형은 O형와 Asia1형으로 판단된다. O형 백신에 대해서는 우리나라가 2000년 접종 경험 [18]이 있는 O1 manisa주를 이용하는 것으로 이 백신주는 세계적으로 가장 많이 사용되고 있고, 일부 2005년 이스라엘 및 베트남에서 유행되었던 바이러스를 제외하면 광범위 항원특성을 지니고 있기 때문에 대부분 바이러스와 상동성이 인정되므로 [7, 20], 우리나라 주변지역 발생 주에 대한 면역은 차질은 없을 것으로 생각된다. A형은 최근까지 중국에서 발생보고가 없다가 2009년 최근 발생 보고되었으며, '97년 태국, '02년 말레이시아, '03, '06년 라오스에서 분리된 바이러스와 분자 역학적으로 유사하다고 확인되었으나 [4], 백신과의 상호관계는 알려져 있지 않다. 우리가 확보하고 있는 백신 A22 Iraq는 2005 말레이시아, 2004-2005년 베트남, 2006년 파키스탄 및 터키에서 분리된 바이러스와 상동성(r1)은 0.1-0.2로 낮은 것으로 알려져 있다 [7]. 따라서 중국이 2009년 새로 발생되기 시작된 바이러스 유전형이 지속적으로 발생된다면 유행하는 야외주와 백신에 대한 상동성이 확인되지 않는 한 우리나라에도 위협이 될 가능성도 있다.

우리는 가장 위험하다고 생각되는 우리나라 주변에서 최근 유행하는 Asia1형 group V에 대한 분석을 실시하였으며, 본 실험의 결과에서 마우스, 기니픽, 염소, 돼지 등에서 그 면역형성 결과는 좋은 결과를 얻었고 상관성도 높다고 판단된다. 그러나 소의 경우 LPBE 결과 상관성도 인정되었고 높은 항체 형성을 보였으나, 확보된 4두 혈청 중 2두에서 야외주에 대한 중화항체가 낮은 것이 확인되었는데, 일반적으로 ELISA보다는 생바이러스를 이용한 직접적 실험방법인 VNT에 좀 더 신뢰를 두고 있으므로 이 결과를 간과해버릴 수는 없다.

야외주인 MOG를 불활화 하여 염소 및 돼지에서의 접종실험 결과 염소에서 1회 접종만으로도 접종 후 4일 정도에 야외주인 동일 바이러스(MOG)에 대한 중화항체가 형성되는 것으로 확인되었고 돼지접종 실험의 경우보다 3일 빠른 면역 반응이 형성된 것이다. 이종 바이러스를 이용한 LPBE(Shamir) 실험에서도 염소는 7일, 돼지는 14일에 항체가 형성되어 반응됨을 확인하였다. 돼지에서는 항체 양전은 14일부터 모든 동물에서 나타났으나 그 항체역가는 비교적 높지 않은 것으로 나타났다. 위의 돼지 및 염소의 야외주 접종시험 결과에서 확인 되었듯이, 백신항원으로서 동일바이러스인 야외주를 확보하여 접종하면 가장 좋은 면역 효과를 나타낼 것으

로 예상된다. 그러나 Asia1 백신바이러스 주는 Shamir주로 광범위 항원성을 지닌 유일하게 세계적으로 널리 사용된 표준 바이러스이며, 상재지가 아닌 구제역 청정국가가 그 지역형의 발생 우려에 따라 해당국가에서 백신바이러스를 지역 유행형 바이러스로 교체하여 대비하는 것은 많은 검토가 필요하다. 왜냐하면, 야외주 group V로 백신바이러스 주의 교체는 group V 이외의 베트남, 중국남부 등에서 분리되고 있는 group IV(Shamir와의 VNT r1은 0.36) [7] 및 2005년 홍콩에서 분리된 group II 등의 바이러스 유입에 대한 대비는 또 다른 분석이 필요하며 더 나은 상관관계를 보장할 수 없다. 그러므로 유행형에 따라 자주 백신주를 교체하는 것은 역학 및 항원의 상호관련성을 감안하여 충분히 고려하여 결정하여야 한다. 또한 백신주를 야외주로 교체한다 하더라도 백신주의 배양시 사용되는 BHK-21 부유 세포에 배양에서 잘 자라기 어렵고 바이러스 성상이 매우 불안정할 수 있으며, 세포에 적응하더라도 항원성이 변하거나 손상될 가능성도 있기 때문에 [2, 11, 15], 해결해야 할 문제가 많다. 따라서 전반적인 상황을 종합하여 볼 때 유전형 group V의 유입시 백신접종 정책을 도입한다면 현재 유지하고 있는 Shamir 백신으로 야외 상황 하에서 동물 방어를 위하여 2회 이상의 접종 등의 보강적인 방법을 고려할 수 있다고 생각된다.

결 론

우리나라를 비롯한 세계적으로 많이 사용되고 있고, 발생에 대비하여 준비되고 있는 백신주인 Asia1 Shamir 주가 최근 우리나라 주변지역인 동아시아에서 발생되고 있는 이 바이러스에 대하여 적절히 방어할 수 있는 가를 알아보기 위하여 구제역 백신항원을 동물에 접종 후 혈청에서의 면역학적인 실험을 통하여 그 간접적으로 방어능을 확인해보고자 하였다. 그 결과 마우스, 기니픽, 염소, 돼지에서 그 면역형성 결과는 동아시아 유행되는 바이러스과 백신항원과의 상관성이 매우 높다고 판단된다. 그러나 소의 경우 LPBE 결과 비교에서는 상관성도 인정되었고 높은 항체 형성을 보였으나, 일부 개체에서 중화항체가 낮은 것이 확인되었으므로 완벽한 면역형성을 위하여 Asial group V 유전형의 바이러스가 유입이 되어 발생되었을 경우 소에서는 접종 시 2회 이상의 접종 등 보강적인 접종방법도 고려될 수 있다.

감사의 글

본 실험은 국립수의과학검역원의 연구비로 수행되었으며, 본 연구 수행을 위하여 도움을 주신 해외전염병과 연구원들께 감사드립니다. 특히 세포를 준비하여 주신 정기식 님과 ELISA 실험에 도움을 주신 방민우, 고효림 님께 감사드립니다.

참고문헌

1. **Bachrach HL.** Foot-and-mouth disease. Annu Rev Microbiol 1968, **22**, 201-244.
2. **Bolwell C, Brown AL, Barnett PV, Campbell RO, Clarke BE, Parry NR, Ouldridge EJ, Brown F, Rowlands DJ.** Host cell selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus. J Gen Virol 1989, **70**, 45-57.
3. **Brehm KE, Kumar N, Thulke HH, Haas B.** High potency vaccines induce protection against heterologous challenge with foot-and-mouth disease virus. Vaccine 2008, **26**, 1681-1687.
4. **Hammond JM, King DP, Knowles NJ, Wadsworth J, Swabey KG, Statham B, Li Y, Keel P, Hamblin P, Hutchings GH, Reid SM, Ebert K, Stirling JM, Ferris NP, Chisholm C, Byrom E, Paton DJ**. Update on the world situation in relation to FMD. In: OIE regional coordinational unit (ed.). Report of 15th Meeting of the OIE Sub-commission for Southeast Asia. Appendix 1. OIE, Bankkok, 2009.
5. **Hedger RS.** Observations on the carrier state and related antibody titres during an outbreak of foot-and-mouth disease. J Hyg (Lond) 1970, **68**, 53-60.
6. **Kitching P, Hammond J, Jeggo M, Charleston B, Paton D, Rodriguez L, Heckert R.** Global FMD control-Is it an option? Vaccine 2007, **25**, 5660-5664.
7. **Knowles NJ.** Update on the world situation in relation to FMD. In: OIE regional coordinational unit (ed.). Report of 13th Meeting of the OIE Sub-commission for Southeast Asia. Appendix 1. p. 11, OIE, Bankkok, 2007.
8. **Knowles NJ, Valarcher JF, Zakharov VM, Scherbakov AV, Zhang Z, Shang YJ, Liu ZX, Liu XT, Sanyal A, Hemadri D, Tosh C, Rasool TJ, Rodriguez LL, Backham TR, Linchongsubongkoch W, Ferris NP, Roeder PL, Paton DJ.** Recent molecular epidemiology of foot and mouth disease virus Asia 1. In: Food and agriculture organization of the united nations (FAO), European commission for the control of foot-and-mouth disease (EUFMD) (eds.). Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of EUFMD. pp 97-104,

OIE, Rome, 2006.

9. **Ko YJ, Jeoung HY, Lee HS, Chang BS, Hong SM, Heo EJ, Lee KN, Joo HD, Kim SM, Park JH, Kweon CH.** A recombinant protein-based ELISA for detecting antibodies to foot-and-mouth disease virus serotype Asia 1. J Virol Methods 2009, **159**, 112-118.
10. **Mahapatra M, Aggarwal N, Cox S, Statham RJ, Knowles NJ, Barnett PV, Paton DJ.** Evaluation of a monoclonal antibody-based approach for the selection of foot-and-mouth disease (FMD) vaccine strains. Vet Microbiol 2008, **126**, 40-50.
11. **Meloen RH.** Localisation on foot-and-mouth disease virus (FMDV) of an antigenic deficiency induced by passage in BHK cells. Arch Virol 1976, **51**, 299-306.
12. **Oem JK, Park JH, Lee KN, Kim YJ, Kye SJ, Park JY, Song HJ.** Characterization of recombinant foot-and-mouth disease virus pentamer-like structures expressed by baculovirus and their use as diagnostic antigens in a blocking ELISA. Vaccine 2007, **25**, 4112-4121.
13. **Office International de Epizooties (OIE).** Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008: Mammals, Birds and Bees. 6th ed. pp 190-216, OIE, Paris, 2008.
14. **Oh YI.** Current knowledge of foot-and-mouth disease. Kor J Vet Publ Hlth 2008, **32**, 237-243.
15. **Park JH, Lee KN, Kim SM, Ko YJ, Lee HS, Heo EJ, Joo YS, Kweon CH, Yang CB.** The present and future of foot-and-mouth disease emergency vaccine. Kor J Vet Publ Hlth 2008, **32**, 173-181.
16. **Park JH, Lee KN. Kim SM, Ko YJ, Lee HS, Heo EJ, Kweon CH, Yang CB.** Role of persistent infection in the transmission of foot-and-mouth disease. Kor J Vet Publ Hlth 2008, **32**, 189-197.
17. **Park JH, Lee KN, Kim SM, Ko YJ, Lee HS, Kweon CH, Yang CB.** Molecular epidemiological analysis and recent distribution of foot-and-mouth disease in the world. Kor J Vet Publ Hlth 2008, **32**, 61-68.
18. **Park JH, Park JY, Kim YJ, Oem JK, Lee KN, Kye SJ, Joo YS**. Vaccination as a control measure during the outbreak of foot-and-mouth disease in 2000 in Korea. Dev Biol (Basel) 2004, **119**, 63-70.
19. **Paton DJ, Valarcher JF, Bergmann I, Matlho OG, Zakharov VM, Palma EL, Thomson GR.** Selection of foot and mouth disease vaccine strains-a reviews. Rev Sci Tech 2005, **24**, 981-993.
20. **Sur JH, Shin JH, Loubroth J, Yeh M, Ku BK, Choi KS, Kweon BJ, Sohn HJ, Ko YJ, Choi CU, Kwon CH, Kim JY, An SH, Kim KS, Moon OK, Kim JH, Choi SH, Lee HG, Hwang EK, Kim SB, Kang SS, Kim OK.** *In Vivo* characterization and transmission of Korean foot-and-mouth disease virus (FMDV). Korea J Vet Res 2000, **40**, 719-727.