

# 수두생바이러스백신 국가표준품 (2차) 제조 및 확립에 관한 연구

김연희<sup>1</sup> · 김도근<sup>1</sup> · 손여원<sup>2</sup> · 한의리<sup>1</sup> · 김석환<sup>1</sup> · 임종미<sup>1</sup> · 원윤정<sup>1</sup> · 윤희성<sup>1</sup> · 조문희<sup>1</sup> · 김관수<sup>3</sup> · 김재옥<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>식품의약품안전평가원 국가검정센터, <sup>2</sup>식품의약품안전청 바이오생약심사부, <sup>3</sup>식품의약품안전평가원 생물약품연구과

## Manufacturing and Establishment of the 2nd National Standard for Varicella Vaccine

Yeon Hee Kim<sup>1</sup>, Dokeun Kim<sup>1</sup>, Yeo Won Sohn<sup>2</sup>, Euiri Han<sup>1</sup>, Jong-Mi Lim<sup>1</sup>, Seok Hwan Kim<sup>1</sup>,  
Yun Jung Won<sup>1</sup>, Heui Seong Yoon<sup>1</sup>, Moon Hee Jo<sup>1</sup>, Kwan Soo Kim<sup>3</sup>, and Jaeok Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>National Center for Lot Release, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation

<sup>2</sup>Biopharmaceuticals and Herbal Medicine Evaluation Department, Korea Food & Drug Administration

<sup>3</sup>Biologics Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation

**Abstract** Biological products, such as live varicella vaccine, are composed of biological substances derived from biological organisms. It is very difficult to identify these biologics' characteristics by analysis of simple physical and chemical methods alone. So the reference material is essential in order to evaluate the quality of biologics. The 1st national standard for varicella live vaccine was manufactured, established in 2002 and 2003, and have been used for the manufacturer's quality control and national lot release since then. As the lack of its availability and the decrease of its stability, this study was initiated by National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (NiFDS) in 2008 to manufacture and establish the 2nd national standard for varicella live vaccine. The candidate material was manufactured from one of domestic manufacturers and the joint research of the NiFDS and manufacturers of varicella live vaccine was conducted to estimate of the reliable virus content. In the collaborative study, 3 laboratories including NiFDS performed the virus content test more than 7 times and all assay results were statistically analyzed. The mean coefficient of variation (CV) was 1.24%, and the geometric mean titre (GMT) variation range of each laboratory was low. On the basis of the results of this study, the candidate material of 2nd national standard for varicella live vaccine was assigned a potency of 4.26 log<sub>10</sub> pfu/0.5 mL, when reconstituted in 0.7 mL.

**Keywords:** Standard, Potency, Varicella, Virus, Vaccine

### 서 론

수두는 선진국에서 성인의 약 90%가 항체 양성율을 보일 만큼 전 세계적으로 만연되어 있는 급성 바이러스성 질병으로 수두를 발병시키는 수두 바이러스 (varicella-zoster virus; VZV)는 Herpesviridae family, Alphaherpesvirinae subfamily의 Varicellovirus 속으로 분류되며 이중 나선의 DNA 게놈을 가지고 있다. 현재까지 1개의 혈청형이 알려져 있는 VZV

는 감염력에 있어서 높은 종 (species) 특이성을 보이고 자연상태에서는 사람이 유일한 숙주로 알려져 있다 [1,2]. 또한 감염 후 바이러스가 중추 ganglia에 잠복해 있다가 노약자나 면역력이 저하된 사람에게 대상포진을 유발시키기도 한다. VZV는 세포간 접촉에 의해 전신으로 퍼지기 때문에 바이러스의 숙주방어에 세포성 면역반응이 중요하며, 감염시 면역억제 치료를 받거나 세포성 면역이상인 사람에게는 치명적일 수 있다.

현재까지 수두예방은 예방접종만이 최선의 수단으로 알려져 있으며, 1974년 일본 Biken Institute의 Michiaki Takahashi 등에 의해 약독화된 Oka 주의 live attenuated varicella vaccine 이 최초로 개발된 [3] 후 현재까지 Oka 및 MAV/06 주에서

### \*Corresponding author

Tel: +82-2-380-1346, Fax: +82-2-386-6584

e-mail: kimjo70@korea.kr

유래된 수두백신 (제제명: 수두 생바이러스 백신)이 일본, 우리나라, 미국 및 유럽 여러 국가에서 허가를 얻어 사용되고 있다 [4].

수두 생바이러스 백신과 같은 생물약품은 그 특성에 따라 단순한 물리·화학적 방법만으로는 그 특성을 규명할 수 없으므로 품질을 평가하기 위해서는 표준품이 필수적이다.

표준품이란 의약품 등의 제조에 있어서 제제의 효능이나 활성 측정을 위한 각종 시험에 필요한 기준물질을 말하며, 표준품은 일관성 있는 완제품 제조를 위하여 제조공정 중 중간산물 및 완제품에 대한 시험 등 생물약품 품질관리에 사용된다. 이 중 국가관에 의하여 확립되어 생물약품 제조 및 품질관리 등에 사용되는 표준품을 생물약품 국가 표준품이라 한다.

식품의약품안전청에서는 2002년에 수두 생바이러스 백신 국가표준품 (1차)을 제조 및 확립하여 수두 생바이러스 백신 제조사에 표준품을 공급하고 제조사의 품질관리와 국가검정에 사용하여 국가적 차원의 품질관리를 하고 있다. 수두 생바이러스 백신 국가표준품 (1차)의 재고량 및 역가가 감소함에 따라 본 연구를 통하여 수두 생바이러스 백신 국가표준품 (2차)을 제조 및 확립하고 이를 통해 수두 생바이러스 백신의 신뢰성 있는 품질관리가 지속적으로 이루어지도록 하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 수두 생바이러스 백신 국가표준품

2002~2003년 연구사업을 통해 제조 및 확립한 수두 생바이러스 백신 국가표준품 (Code 02/006,  $4.389 \pm 0.035 \log_{10}$  PFU/0.5 mL)으로, 2009년까지 국가검정 및 국내 수두 생바이러스 백신 제조사의 품질관리에 사용하였다.

### 수두 생바이러스 백신 2차 국가표준품 후보물질

2008년 국내의 수두 생바이러스 백신 제조회사에서 MAV/06 주의 바이러스를 이용하여 2차 국가표준품 후보물질 4,000 바이알을 제조하였으며, 이는 1차 수두 생바이러스 백신 국가표준품과 동일한 제조소 및 제조공정으로 이루어졌다.

### 세포주

유럽세포주은행인 European Collection of Cell Cultures (ECACC)로부터 사람이배체 세포인 MRC-5 (PD 19)를 분양받아 국가검정센터에서 계대배양 후, 공동연구 시험소에 무상으로 분양하였다.

### 기타 재료

MEM, FBS, penicillin-streptomycin, Sucrose (D-sorbitol),

Sodium mono Glutamate, low melting agarose, 2X MEM, NaHCO<sub>3</sub>, Neutral Red 등

### 세포배양

MRC-5는 MEM 배지 (10% FBS + 1% penicillin-streptomycin)를 사용하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 175T Flask에서 80% 정도 confluent하게 세포가 자라면 PBS로 헹구어 준 후 trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후 1:3 ~ 1:6의 비율로 계대배양 하였다.

### 바이러스함량시험 (표준한천중층법)

MRC-5 세포 농도가  $1 \times 10^5$  cell/mL이 되도록 희석하고 6 well plate에  $3 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 세포들이 충분히 단층을 형성할 때까지 배양하였다. 시험을 위해 국가표준품 후보물질 3 바이알을 각각 0.7 mL 주사용수로 용해한 후 하나의 바이알에 모은 뒤 시험전에 제조한 희석액 (10% FBS, 5% Sucrose (D-sorbitol), 0.001% Sodium mono Glutamate)을 이용하여 0.5 log<sub>10</sub>씩 계단희석하였다 ( $10^{-2}$ ,  $10^{-2.5}$ ,  $10^{-3}$ ). 6 well plate의 세포배양 상층액을 조심스럽게 제거하고, PBS로 세척한 후 계단희석한 국가표준품 후보물질을 100  $\mu$ L/well씩 접종하여 37°C CO<sub>2</sub> (5%) 배양기에서 90분간 흡착시켰다. 흡착시키는 동안 15~20분 간격으로 plate를 흔들어서 소량의 흡착배지가 well에 고루 퍼지도록 하였다. 바이러스 흡착 후 0.8% agarose 한천 중층액을 3 mL/well씩 가해 조심스럽게 중층 (1차 중층)하여 균하고 37°C CO<sub>2</sub> (5%) 배양기에서 배양한다. 1차 중층 후 5일째에 동일한 조성의 한천 중층액으로 2차 중층을 하고, 2차 중층 후 3일째에 neutral red (0.0012%)가 포함된 3차 중층시약을 1.5 mL/well이 되도록 가하여 중층한 후 세포병변이 일어난 plaque 수를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 수두 생바이러스 백신 국가표준품 (1차, 02/006) 실시간 안정성 결과

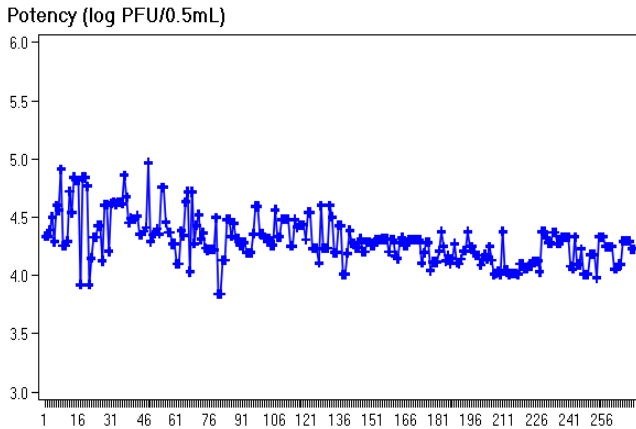
수두 생바이러스 백신 국가표준품 (1차, 02/006)은 2002년 국내 수두 생바이러스 백신 제조회사에서 MAV/06 바이러스주를 사용하여 제조 [5] 후, 표준품의 역가를 산정하기 위하여 국내제조 회사를 포함한 8개의 시험소에서 공동연구를 수행하였다. 세포주 및 시험방법에 따른 영향을 알아보고자 MRC-5를 비롯한 LBHEL, LuMA, 2BS의 세포주로 표준한 천중층법과 면역포커스염색법을 사용하여 시험하였다. 시험결과 세포주 및 시험방법이 달라도 역가는 통계학적 유의성 있는 차이가 없음을 확인하였으며 [6], 공동연구를 통하여 수두 생바이러스 백신 국가표준품 (1차, 02/006)의 역가

를  $4.389 \pm 0.035 \log_{10}$  PFU/0.5 mL로 산정하고 [5], 이 후 국가표준품으로 등록하여 제조사의 품질관리 및 국가검정에 사용하였다.

국가표준품의 신뢰성 및 안정성을 확보하기 위한 실시간 안정성에 대한 자료로서 국가검정시의 바이러스함량시험 결과를 활용하고 이를 통계학적으로 분석하였다. One way ANOVA 분석결과 연도별로 유의한 차이를 보였으며 ( $p < 0.0001$ ), Bonferroni method를 이용하여 다중비교한 결과 2003년에 비해 2004~2009년도의 값이 유의하게 낮음을 확인할 수 있었다 (Table 1, Fig. 1).

**Table 1.** Stability results of national standard for varicella vaccine (02/006)

Year	Mean $\pm$ SD ( $\log_{10}$ PFU/0.5 mL)	CV (%)	Relative Potency (%)	p-value
2003	4.49 $\pm$ 0.23	5.12	100	< 0.0001
2004	4.35 $\pm$ 0.23	5.29	96.88	
2005	4.34 $\pm$ 0.14	3.23	96.66	
2006	4.28 $\pm$ 0.05	1.14	95.32	
2007	4.18 $\pm$ 0.08	1.92	93.09	
2008	4.12 $\pm$ 0.13	3.04	91.76	
2009	4.18 $\pm$ 0.11	2.74	93.10	



**Fig 1.** Potency of national standard for varicella vaccine (02/006).

또한 국가표준품 제조회사에서 수행한 국가표준품의 2003년과 2009년 바이러스함량시험 결과를 비교한 결과 2009년의 역가가 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다 (p-value: < 0.0001) (Table 2).

**Table 2.** Virus content of national standard for varicella vaccine (02/006) performed by manufacture

Year	Mean $\pm$ SD ( $\log_{10}$ PFU/0.5 mL)	CV (%)	Relative Potency (%)	p-value
2003	4.49 $\pm$ 0.24	5.25	100	< 0.0001
2009	3.77 $\pm$ 0.04	1.12	83.96	

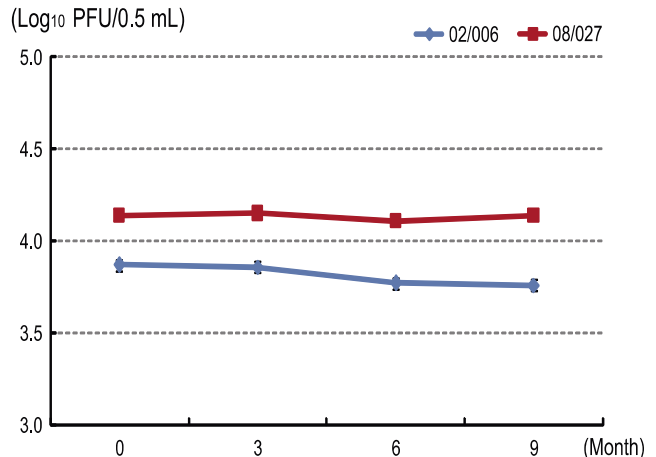
국가표준품에 대한 실시간 안정성 결과의 모니터링 결과, 지속적인 역가감소 경향을 미리 파악할 수 있었고, 제조 후 5년

이 경과한 점을 고려하여 2008년 신뢰성 있는 수두생바이러스 백신의 품질관리를 위한 2차 국가표준품을 제조하였다.

**수두 생바이러스 백신 2차 국가표준품 후보물질 제조 및 품질평가**

국내의 수두 생바이러스 백신 제조회사에 의뢰하여 MAV/06 주의 바이러스를 이용해 2차 국가표준품 후보물질을 제조하였다. 위 회사는 2002년의 1차 수두 생바이러스 백신 국가표준품을 제조한 회사로서, 1차와 동일한 제조공정으로 수두 생바이러스 백신 2차 국가표준품 후보물질 (code 08/027) 4,000 바이알을 제조하였다.

제조한 표준품 후보물질의 품질평가를 위해 바이러스함량, 정상, 함습도, 불용성이물, 질량편차, 불용성미립자, 이상독성 부정시험, 확인시험 등의 시험을 수행하였으며, 이는 수두 생 바이러스 백신의 완제의약품과 동등한 기준에 모두 부합함을 확인하였다. 표준품 후보물질 (08/027) 제조 후 0, 3, 6, 9개월 주기로 국가표준품 (02/006)과 표준품 후보물질 (08/027)을 이용하여 수행한 바이러스함량시험을 결과, 표준품 및 후보물질의 역가가 시험주기에 따라 감소되지는 않았으나, 후보물질에 비하여 국가표준품 (02/006)의 함량이 모든 시험주기에서 낮게 나왔음을 다시 한번 확인할 수 있었다 (Fig. 2).



**Fig 2.** Potency of candidate for varicella vaccine 2'nd national standard (08/027).

**표준품 후보물질의 역가 (바이러스함량) 산정을 위한 공동연구**

표준품 후보물질 인수한 후, 국내 수두 생바이러스 백신 제조회사 및 제조 및 공동연구 경험이 있는 국내회사와 식품의약품안전평가원 국가검정센터 등 총 3개의 시험소에서 표준품 후보물질의 역가 (바이러스함량시험)산정을 위해 공동연구를 수행하였다.

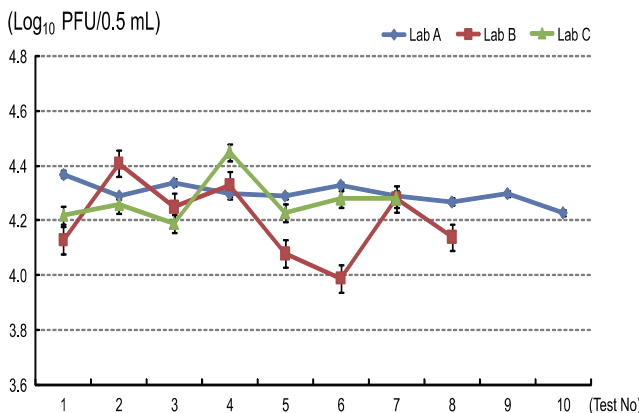
동일한 조건에서의 결과를 값을 얻기 위해 국가검정센터에서는 유럽세포주은행 (ECACC)으로부터 사람임배체세포

인 MRC-5를 구매하여 계대배양 후 공동연구시험소에 무상으로 분양하였으며, 시험방법 또한 표준한천중층법으로 통일하고 표준화된 시험방법 (SOP)를 제공하였다. 공동연구에 사용된 세포주 및 시험방법은 2003년에 수행된 1차 국가표준품 확립연구의 세포주 및 시험방법에 따라 역가 차이가 없다는 자료를 근거로 하여 선정하였다.

2차 국가표준품 후보물질에 대한 공동연구 시험소는 1차 국가표준품 (02/006)을 이용하여 3회 이상의 바이러스함량 시험을 반복함으로써 공동연구 수행에 적합하다는 것을 확인하였으며, 이후 역가산정을 위해 후보물질 (08/027)을 가지고 시험소간 7회 이상의 반복시험을 하였다. 공동연구 시험소별 바이러스함량시험에 대한 결과는 Table 3 및 Fig 3과 같으며, 각 시험소별 역가는 ANOVA 분석 결과 유의한 차이가 없음을 확인할 수 있었다 ( $p = 0.098 > 0.05$ ).

**Table 3.** Descriptive statistics for potency of candidate for varicella vaccine 2'nd national standard (08/027) of MRC-5 ( $\log_{10}$  PFU/0.5 mL) in each lab

Lab	No of assay	Mean	SD	Min	Median	Max
Lab A	10	4.30	0.04	4.23	4.30	4.37
Lab B	8	4.20	0.14	3.99	4.20	4.41
Lab C	7	4.27	0.08	4.19	4.26	4.45



**Fig 3.** Mean Potency for varicella vaccine 2'nd national standard (08/027) in each lab.

**역가 (바이러스함량) 산정을 위한 공동연구 통계분석**

표준품 후보물질의 역가산정을 위해 3곳의 공동연구 시험소에서 수행한 바이러스함량 시험결과를 생물학적 제제의 통계 분석 경험이 많은 회사에 의뢰하여 역가를 산정하였다.

각 공동연구 시험소별 반복 측정된 역가의 통합 역가는 기하평균 (GMT; Geometric Mean Titer)으로, 시험소별 역가 변동을 확인하기 위하여 기하변동계수 (GCV; Geometric Coefficient of Variation)를 제시하고, 시험소별 역가차이가 있는지를 검정하기 위하여 유의수준 0.05 이하에서 one-way ANOVA를 실시하였다. 공동연구 시험소의 역가를 모두 이용한 수두 생바이러스 백신 국가표준품 후보물질의 최종 역가

는 각 실험실별 계산된 기하평균 (GMT)을 이용하여 이것의 기하평균 (GMT)를 다시 구하였으며, 이에 대한 기하변동계수 (GCV)를 제시하였다.

공동연구 시험소별 기하평균 (GMT)은 Lab A 4.30, Lab B 4.20, Lab C 4.27으로 나타났으며, 각 기관별 기하변동계수 (GCV)는 0.90%, 3.39%, 1.98%로 나타났다 (Table 4). 기하변동계수 (GCV)의 경우 모든 시험소에서 5% 미만의 값을 보였고, 기하평균과 산술평균간의 차이는 없었으며, 변동계수도 두 방법 모두에서 유사하게 나타났다.

**Table 4.** Geometric mean potency estimates of candidate for varicella vaccine 2'nd national standard (08/027) of MRC-5 ( $\log_{10}$  PFU/0.5 mL) in each lab

Lab	GMT	GCV (%)	AMT	ASD	ACV (%)
Lab A	4.30	0.90	4.30	0.04	0.90
Lab B	4.20	3.39	4.20	0.14	3.33
Lab C	4.27	1.98	4.27	0.08	1.98

\* AMT (Arithmetic Mean Titer), ASD (Arithmetic SD), ACV (Arithmetic CV).

**수두생바이러스백신 2차 국가표준품 역가산정**

공동연구 시험소별 결과는 통계학적으로 유의한 차이가 없었으며 변동계수 또한 큰 차이를 보이지 않았기 때문에 3개의 시험소에서 수행된 역가를 통합하여 수두 생바이러스 백신에 대한 최종역가를 Table 5와 같이 산출하였다. 전체 역가는 각 연구기관별 기하평균 (GMT)를 이용하여 추정하였으며, 최종 기하평균 (GMT) 역가는 4.26  $\log_{10}$  PFU/0.5 mL, 기하변동계수 (GCV)는 1.24%로 나타났다.

**Table 5.** Overall geometric mean potency estimates of candidate for varicella vaccine 2'nd national standard (08/027) of MRC-5 ( $\log_{10}$  PFU/0.5 mL) in each lab

GMT	GCV (%)	AMT	ASD	ACV (%)
4.26	1.24	4.26	0.05	1.21

\* AMT (Arithmetic Mean Titer), ASD (Arithmetic SD), ACV (Arithmetic CV).

**요 약**

수두 생바이러스 백신과 같은 생물약품은 다양한 물질이 복합적으로 구성되어 있어 단순한 물리·화학적 분석방법만으로는 그 특성을 규명할 수 없다. 따라서 이러한 생물약품의 품질을 평가하기 위해서는 표준품이 필수적이다. 2002년과 2003년에 제조 및 확립한 1차 국가표준품의 재고량 소진 및 역가 감소에 따라 식품의약품안전평가원에서는 수두 생바이러스 백신의 2차 국가표준품을 확립하기 위하여 2008년 용역연구사업을 통해 국내의 수두 생바이러스 백신 제조회사에서 표준품 후보물질을 제조하였으며, 국가표준품

후보물질의 역가산정을 위하여 국내 제조사 및 식품의약품 안전평가원에서 공동연구를 수행하였다. 국내제조사를 포함한 3개의 공동연구 시험소에서 7회 이상의 반복시험을 수행하여 얻은 공동연구 결과를 통계학적으로 분석한 결과 3곳의 공동연구 시험소의 통합역가에 대한 변이계수 (coefficient variation, CV)는 1.24%로 각 시험소간의 기하평균 (GMT) 변동 수준이 매우 낮음을 확인할 수 있었다. 또한, 수두 생 바이러스 백신의 2차 국가표준품의 표시역가는 4.26 log<sub>10</sub> PFU/0.5 mL로 산정하였다.

## 감 사

수두 생바이러스 백신 국가표준품을 제조하고 공동연구를 수행한 (주)녹십자 및 (주)한국백신 관계자 분들과 통계분석에 도움을 주신 (주)엘에스케이글로벌파마서비스에 감사드립니다. 또한 국가표준품의 실시간 안정성 연구를 주관해 주신 식품의약품안전평가원 생물약품연구과 및 본 연구를 위해 많은 도움을 주신 식품의약품안전평가원 국가검정센터 외 많은 분들께 감사의 인사를 드립니다.

접수 : 2010년 6월 30일, 게재승인 : 2010년 12월 3일

## REFERENCES

1. Bernard, N. F., M. K. David, M. H. Peter, M. C. Robert, P. M. Thomas, L. M. Joseph, R. Bernard, and E. S. Stephen (2001) *Fields Virology*. 4th ed., pp. 2707-2730. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
2. Liesegang, T. J. (1999) Varicella zoster viral disease. *Mayo Clin Proc.* 74: 983-998.
3. Takahashi, M. (2001) 25 year's experience with the Biken Oka strain varicella vaccine: a clinical overview. *Paediatr Drugs.* 3: 285-292.
4. World Health Organization, WHO Position Paper on Varicella Vaccines, [http://www.who.int/immunization/wer7332varicella\\_Aug98\\_position\\_paper.pdf](http://www.who.int/immunization/wer7332varicella_Aug98_position_paper.pdf).(1998).
5. Min, K. I., S. Y. Baek, J. H. Shin, J. O. Kim, S. R. Ryu, B. S. Min, B. G. Kim, D. K. Kim, M. K. Park, M. J. Ahn, Y. Kim, H. Kim, S. H. Lee, and S. N. Park (2002) A collaborative study to establish a national standard for live varicella vaccine. *The annual report of KFDA.* 2, 16-25. Seoul, Korea.
6. Min, K. I., S. Y. Baek, J. H. Shin, J. O. Kim, S. R. Ryu, B. S. Min, B. G. Kim, D. K. Kim, M. K. Park, M. J. Ahn, Y. M. Kim, and S. N. Park (2003) Collaborative study on evaluation for the 1st national varicella vaccine standard. *The annual report of KFDA.* 3: 109-117. Seoul, Korea.