Journal of Bacteriology and Virology 2013. Vol. 43, No. 4 p.253 – 261
http://dx.doi.org/10.4167/jbv.2013.43.4.253

Review Article

Evaluation Methods for the Immunogenicity of Varicella and Zoster Vaccines

Hosun Park*

Department of Microbiology, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea

Varicella vaccine has been included in the national immunization program for children since 2005 and zoster vaccine has been released since 2012 in Korea. Even though both varicella and zoster are caused by varicella-zoster virus (VZV), pathogeneses are different. In varicella, neutralizing antibody is very important to protect disease because VZV spreads via blood or lymph. In contrast, cell-mediated immunity is more important in zoster because of the neuronal spread of VZV. Therefore, the measurement methods of the immunogenicity against varicella and zoster vaccines are different. Fluorescent antibody to membrane antigen (FAMA) assay is the gold standard method to detect the protective antibody against VZV. It is still used as a reference test for the other methods. However, the fastidious nature required to perform the FAMA assay limits its use as a routine assay for the evaluation of vaccine immunogenicity. Nowadays, glycoprotein ELISA (gpEIA) is used as an alternative method for FAMA assay. However, there is no agreement over the protective level of gpEIA antibody titer with WHO standard international unit. The immunogenicity of zoster vaccine has been evaluated by responder cell frequency assay and IFN-γ ELISpot assay. Nevertheless, skin test is considered to be a more accurate biomarker for cell-mediated immunity against zoster. For the evaluation of varicella vaccine, it is necessary to standardize the FAMA assay and to set the cut-off value for the gpEIA antibody titer through long-term follow-up study. For zoster vaccine, the evaluation of cell-mediated immunity in Korean adults is urgently needed.

Key Words: Varicella, Zoster, Vaccine, Immunogenicity

서 론

수두-대상포진 바이러스(varicella-zoster virus: VZV)는 초감염 시에는 수두로, 재활성 감염 시에는 대상포진으로 서로 다른 두 가지 유형의 질환으로 나타난다. 수두백신은 1974년에 약독화 바이러스를 사용하여 일본에서 처음 개발되었으며, 수두백신에 사용되는 동일한 바이러스를 이용하여 2006년에 대상포진백신이 미국에서 출시되었다 (1, 2). 수두백신과 대상포진백신은 거의 유사하나 바이러스 함량과 접종 대상 연령에 차이가 있다. 수두백신은 약독화된 바이러스를 사용하므로 백신에 의해 유도되는 면역력은 수두 자연감염에 의해 유도된 면역력에 비해 1/10 정도 낮은 것으로 알려져 있다 (3, 4). 따라서 백신의 면역원성을 평가하기 위해서는 일반적으로 진단 목적으로 사용되는 방법에 비하여 더 민감한 방법을 사용해야 한다. 또한 수두와 대상포진은 그 병리기전이 달라서 수두 예방에는 중화항체가 방어에 중요한 역할을 하나, 대상포

Received: November 9, 2013/ Revised: November 20, 2013/ Accepted: November 27, 2013
*Corresponding author: Hosun Park. Rm#407, Department of Microbiology, College of Medicine, Yeungnam University, 170, Hyeonchung-ro, Namgu, Daegu, 705-703, Korea.
Phone: +82-53-620-4364, Fax: +82-53-653-6628, e-mail: hspark@ynu.ac.kr
**This research was supported by grant 13172MFDS315 from the Ministry of Food & Drug Safety in 2013 and Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (2012R1A1A3015050).
ⓒThis is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/license/by-nc/3.0/).

진의 방어에는 세포매개면역력이 중요하게 작용한다. 그러므로 방어력이 있는 항체가의 측정은 수두백신에 대한 면역력 평가로 사용할 수 있으나 대상포진백신의 방어력 지표는 되지 못하는 것으로 알려져 있다.

수두백신이 국내에서 사용된 지 20여년이 지났지만 아직까지 우리나라 소아 및 성인에서 수두-대상포진 바이러스에 대한 면역력이 어느 수준인지에 대한 자료가 부족한 실정이다. 수두백신의 면역원성 평가법이 전세계적으로 표준화되어 있지 못하고, 더구나 2012년 대상포진백신이 국내에서 출시되었으나 우리나라 성인에서 대상포진에 대한 세포매개면역력의 자료도 거의 존재하지 않는다. 따라서 이 종설에서는 수두백신과 대상포진백신의 면역원성 측정법에 대하여 논하고자 한다.

본 론

1. 수두-대상포진 바이러스 및 질환

수두-대상포진 바이러스(varicella-zoster virus: VZV)는 헤르페스바이러스과(Herpesviridae)의 알파 헤르페스아과(α-herpesvirinae)에 속하는 120 nm 크기의 외피보유 바이러스로 double-strand DNA 유전자를 가지고 있다. VZV는 전염력이 강한 바이러스로 호흡기 점막이나 결막 등을 통해 감염이 되며, VZV에 처음 감염이 되면 혈액을 통해 온몸으로 퍼져 피부에 발진과 수포를 주 증상으로 하는 수두를 유발한다. 소아에서 수두가 발병할 경우 발열과 발진이 주 증상으로 그리 심한 질병을 유발하지는 않지만 성인에서 수두가 발생하면 폐렴 등 매우 심한 증상을 나타내며 임신 시 감염은 유산이나 신생아 사망, 선천수두증후군 등의 원인이 되기도 한다 (5). 피부에서 증식한 VZV는 신경세포를 타고 이동하여 감각신경절에 잠복해 있다가 바이러스가 재활성되면 신경을 따라 다시 피부로 이동하여 대상포진을 유발한다 (6~8). 대상포진은 신경괴사와 염증을 동반하여 심한 통증을 유발하며 경우에 따라서는 수년간 통증(postherpetic neuralgia: PHN)이 지속되기도 한다. 일생 동안 외부에서 침입하는 VZV와 신경절에서 재활성되는 VZV는 지속적으로 면역계를 자극하여 VZV에 대한 면역력을 유지시키나 VZV에 대한 특이적인 세포매개면역력이 어떠한 한계 이하로 감소되면 대상포진이 발생하는 것으로 알려져 있다 (6~8).

Table 1. Comparison of currently used varicella and zoster vaccines in Korea

Vaccine name	Production company	Virus strain	Virus amount (PFU)
Suduvax	Green Cross	MAV/06	≥1,400
Varilrix	GlaxoSmithKline	Oka	≥2,000
Varivax	Merck	Oka	≥1,350
Vari-L	Changchun Biological Institute	Oka	≥1,400
Zostavax	Merck	Oka	≥19,400

2. 수두백신과 대상포진백신

수두백신은 일본에서 수두 환자에서 분리한 Oka주 바이러스를 사람의 이배체세포와 기니픽세포 등에서 약독화하여 1974년 Takahashi 등에 의해 개발되었다 (1). VZV를 세포에서 배양하는 경우 VZV는 거의 세포 내에 존재하며 감염력이 있는 바이러스 입자는 세포배양액으로 많이 방출되지 않는다. 따라서 백신제조 시 바이러스가 배양된 세포를 초음파 분쇄 후 원심분리를 하여 일부 정제된 바이러스를 사용하므로 사람 이배체세포 성분이 백신에 포함되어 있다. 수두백신은 일본에서 1988년부터 Biken사에서 상품화되어 사용었으며, 우리나라에서는 1989년부터 Biken사의 수두백신이 사용되기 시작하였다. 미국에서는 Oka주를 사용한 바리박스(Merck)와 바릴릭스(GSK)가 개발되어 1995년도부터 1회 접종 스케줄로 소아기본접종에 포함시켰으며, 2006년부터는 2회 접종 스케줄로 바뀌었다 (2, 9~13). 우리나라에서도 1990년대 중반부터 국내 여러 제약회사들이 수두백신을 개발하여 사용되었으나 현재는 대부분 생산이 중단되었고, 국내 수두환자에서 분리한 약독화 바이러스인 MAV/06주를 사용한 백신만이 생산되고 있다. 현재 국내에서는 수두박스® (녹십자), 바리박스®(Merck)와 바릴릭스™(GSK), 중국 Changchun Institute of Biological Products에서 생산되는 바리-엘™(SK chemical), 네 종류의 수두백신이 사용되고 있다(Table 1). 우리나라에서는 2005년부터 소아 기본예방접종에 포함되어 12~15개월 사이의 소아에서 1회 접종을 실시하고 있다.

대상포진백신은 수두백신에 사용한 바이러스와 동일한 Oka주의 바이러스 함량을 높여 Merck사에서 개발되었다 (Table 1). Merck사의 조스타박스®는 2008년부터 미국에

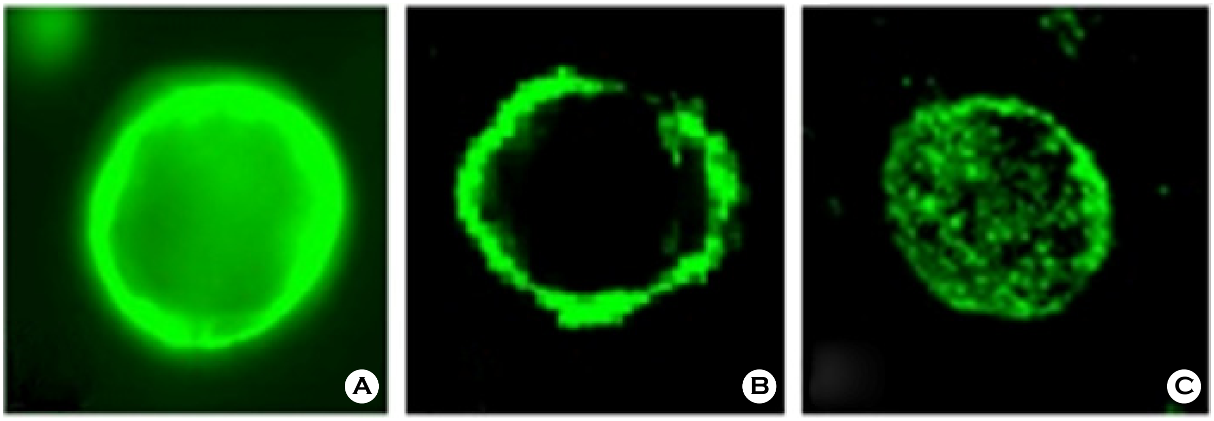

Figure 1. Images of fluorescent antibody to membrane antigen test. (A) Conventional fluorescent microscope image (×400), (B) single plan image of confocal microscope, (C) stacking image of confocal microscope of FAMA test using VZV- infected MRC-5 cell with WHO international VZV standard IgG.

서 60세 이상을 대상으로 접종하기 시작하였으며 2011년에는 50세 이상으로 적용범위가 확대되었다 (14). 우리나라에서는 2012년도부터 50세 이상을 대상으로 사용되고 있다.

3. 수두-대상포진 바이러스에 대한 면역원성 측정법

1) 체액성면역력 측정법

VZV에 대한 체액성면역력을 나타내 주는 VZV에 대한 항체를 측정하는 방법으로는 Complement-fixation test (CFT), Neutralization test (NT), Fluorescent antibody to membrane antigen (FAMA), Immune adherence hemagglutination (IAHA), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Indirect immunofluorescence assay (IFA), Radioimmunoassay (RIA), glycoprotein ELISA (gpEIA), Latex agglutination (LA), Time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) 등 다양한 방법이 개발되어 왔다 (15~24). 현재 진단용으로는 주로 ELISA와 IFA, 수두백신 평가용으로는 FAMA와 gpEIA, IFA가 사용된다.

(1) Fluorescent antibody to membrane antigen (FAMA)

FAMA assay (Fig. 1)는 1974년 Williams 등이 개발한 방법으로 현재까지 VZV에 대해 방어력이 있는 항체가를 측정하는 'gold standard' 방법으로 다른 항체가 측정법의 reference로 사용되고 있다 (17). FAMA assay는 VZV가 감염된 세포막에 표출되는 VZV 당단백과 반응하는 항체를 측정하는 방법으로 수두에 대한 방어력을 잘 대변하는 것으로 알려져 있다. VZV 외피에 존재하는 당단백들 중 5가지의 단백, 즉 gE, gB, gH, gI, gC가 수두를 방어할 수 있는 항체인 중화항체를 유발한다고 알려졌고 이 당단백들은 VZV가 감염된 세포표면에 발현을 한다 (25). FAMA assay는 아주 높은 민감도와 특이도를 가지고 있어 수두백신의 면역원성 평가에 reference method로 중요하게 사용되지만 FAMA assay를 실시하기 위해서는 많은 노동력이 필요하고 바이러스에 감염된 세포의 정도에 따라 또는 판독자의 주관에 따라 다른 결과가 나올 수 있다는 단점이 있어 routine test로 사용하기는 어렵다. 또한 William 등이 사용한 방법은 VZV가 감염된 세포를 고정하지 않은 상태에서 그대로 항원-항체 반응을 실시하는 것으로 고정하지 않은 상태에서 세포를 오래 보관할 수 없다는 단점 때문에 glutaraldehyde로 고정한 세포를 사용한 modified FAMA assay가 사용되기도 한다 (26~28). 그러나 glutaraldehyde에 의한 비특이적인 반응 때문에 음성인 혈청이 위양성으로 판단되는 문제점 등이 있어 modified FAMA assay는 백신 면역원성 평가에 적절하지 않다 (17).

수두에 대해 방어력이 있는 수준의 항체가 기준은 현재 일반적으로 FAMA 항체가 1:4 이상을 사용하고 있으나 백신 접종 후 20년 추적 결과에서는 1:8 (29), 또는 1:16 이상인 경우 방어력이 있는 것으로 보고되기도 하였다 (30). 그러나 연구자들마다 사용한 바이러스주와 양성대조 혈청들이 다르므로 판독에 차이가 있을 수 있다. 따라서 FAMA assay의 경우 사용하는 세포, 바이러스주, 감

Table 2. Interpretation guidelines of three VZV gpEIA test kits

Guidelines	Merck (EU/ml)	Serion ELISA classic VZV IgG (mIU/ml)	VaccZyme^{TM} VZV IgG (mIU/ml)
Negative or Susceptible to infection	<1.25	<50	<100
Equivocal range	1.25~5	50~100	100~150
Immune or Protective level	≥5.0	≥100	≥150

염 정도, 양성대조 혈청, 판독기준 등에 대한 표준화가 필요하다.

(2) 중화항체법(Neutralization test: NT)

VZV는 세포에서 배양을 하면 바이러스는 주로 세포내에 존재하고 배양액으로 잘 방출되지 않는다. 따라서 cell-free virus를 얻기 위해서는 바이러스가 감염된 세포를 초음파 처리 등으로 분쇄한 후 세포 내에 존재하던 cell-associated virus를 세포에서 유리시켜 원심분리 후 상층액에 존재하는 cell-free virus를 수확한다. 이러한 VZV의 특성 때문에 중화항체가 측정 시 일반적인 plaque reduction neutralization test (PRNT)가 잘 되지 않아 보체로 중화반응의 민감도를 증가시키는 enhanced neutralization test (Enhanced NT)를 사용하기도 하였으나 (31), 이러한 문제점 외에도 많은 시간과 노동력을 필요로 하므로 중화항체법은 수두백신의 면역원성 검사에는 잘 사용하지 않는다.

(3) Immunofluorescence assay (IFA)

GSK의 바릴릭스 면역원성 평가에는 IFA를 사용하여 백신 접종 후 혈청 희석배수 1:4 이상에서 양성으로 나오는 경우 항체양전(seroconversion)으로 판정하였다 (32). 그러나 IFA에서는 acetone이나 methanol 등으로 세포를 고정하므로 세포막이 파괴되어 세포막에 존재하는 당단백에 대한 항체를 정확히 검출할 수 없어 방어력이 있는 항체가를 대변하지 못한다. 따라서 수두백신의 면역원성 판단에 사용되기는 어렵지만 진단에는 편리하게 사용할 수 있으므로 현재 수두 IFA kit가 상품화 되어 판매되고 있다 (32).

(4) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

VZV에 대한 항체를 측정하는데 있어서 가장 쉽고, 단시간 내에 대량의 검체를 검사할 수 있으며, 상품화가 되어 있다. 따라서 수두 감염 여부를 진단하거나, 임산부나 장기 이식 공여자와 수혜자 등에서 항체 보유 유무 등을 측정하기 위하여 많이 사용되는 방법이다. 백신 개발 초기에는 백신회사들에서 자체 개발한 "in-house" ELISA를 많이 사용하였으나 각 백신 회사들 마다 항체를 측정하는 단위 및 cut-off value가 다르다 (33). 이 방법은 주로 VZV 항원 전체를 사용하므로 중화항체를 대변하지 못해 방어력 있는 항체의 지표로 사용하기는 어렵다.

(5) Glycoprotein ELISA (gpEIA)

VZV 외피에 존재하는 당단백질들을 항원으로 사용하여 만들어진 ELISA kit로 중화항체가를 대변할 수 있으며, 사용하기 쉽고, 단 시간에 많은 검체를 검사할 수 있어 현재 수두백신의 면역원성을 검사하는데 가장 적절하다고 여겨지는 방법이다. 현재 바리박스는 Merck gpEIA의 항체가 5 EU/ml 이상인 경우를 protective level로 정하고 있다. 그러나 Merck에서 이 제품을 상품화하여 판매하지 않고, 항체가 단위도 국제표준 단위인 WHO standard International Unit (IU)가 아니어서 다른 연구들의 결과와 비교하기가 어렵다. 최근에 Serion ELISA Classic VZV IgG (Serion\Virion, Germany)와 VaccZyme^{TM} VZV IgG (Binding Site, UK) 두 종류의 gpEIA kit가 WHO IU를 사용하여 상품화되어 사용이 가능하다 (27, 34). Kim 등에 의하면 소아혈청의 FAMA 항체가와 gpEIA가 사이의 상관관계가 높은 것으로 보고되었다 (34). 그러나 세 종류의 gpEIA kit들의 수두에 대한 방어력 cut-off value는 일치하지 않는다(Table 2).

(6) Time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA)

최근 영국의 Health Protection Agency Center for Infections 에서는 VZV에 대한 항체를 측정하기 위하여 TRFIA 방법을 개발하여 상품화된 VZV IgG ELISA kit들과의 민감도 및 특이도를 비교하였다 (24, 35~37). TRFIA는 매우 민감한 방법이고 많은 검체를 한꺼번에 검사할 수 있는 장점이 있으나, euphorium을 측정할 수 있는 fluorescence reader 장비가 있어야만 사용할 수 있는 방법이다.

2) 세포매개면역력 측정법

VZV에 대한 세포매개면역력을 측정하는 방법으로는 Skin test, Lymphocyte proliferation assay (LPA), Cytotoxicity assay, Responder cell frequency (RCF) assay, Intracelluar cytokine (ICC) assay, ELISpot assay 방법 등이 있다 (7, 38~42). 수두백신 개발 초기에 skin test나 LPA 등으로 세포매개면역력 검사를 실시하였으나, 현재는 수두백신의 면역원성 측정에 세포매개면역력은 사용하지 않는다. 그러나 성인에서는 VZV에 대한 항체가 있음에도 불구하고 대상포진이 발생하며 이는 수두에 대한 세포매개면역 반응이 감소한 결과로 알려졌다 (6, 7). 따라서 대상포진백신의 면역원성 검사에서는 세포매개면역 반응의 측정이 매우 중요하게 되었다.

(1) Skin test

수두백신에 대한 skin test는 일본에서 백신 개발 초기 Kamiya 등에 의해 개발되었다 (38). Skin test는 VZV 항원을 피내 주사하여 24~48시간 후 발적 정도를 측정하는 방법으로 지연과민반응의 세포매개면역력을 나타내며, skin test 결과와 중화항체가 사이에는 상관관계가 있는 것으로 나타났다 (38, 43). 최근에 성인을 대상으로 대상포진백신이 개발되면서 항체보다 세포매개면역력의 중요성이 대두되고 있어 skin test 결과들이 보고되고 있다. gpELISA로 모두 양성인 20~60대의 성인 151명에서 세포매개면역력을 나타내는 skin test와 IFN-γ ELISpot 사이에서는 상관관계가 아주 높았고, 연령이 증가함에 따라 skin test와 IFN-γ ELISpot 반응이 감소하는 것으로 나타나 연령이 증가할수록 VZV에 대한 세포매개면역력이 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 gpELISA와 skin test 사이에는 상관관계가 없었다 (44).

현재 Skin test용 VZV 항원은 일본의 Biken사에서 VZV 당단백을 정제한 것이 유일하나 일본 내수용으로 제한되어 있어 거의 대부분의 skin test 결과는 일본에서 발표되고 있다. 최근에 연구 결과에 의하면 말초혈액 림프구를 VZV 항원으로 자극할 경우 VZV에 대한 IFN-γ나 IL-2 양성인 CD4 T 세포($CD4^+IFN\text{-}\gamma^+$, $CD4^+IL\text{-}2^+$)의 수가 VZV 항원으로 자극하지 않은 림프구에 비하여 거의 증가하지 않으나 skin test에서 생긴 수포에서 분리된 림프구에서는 CD^4+IFN-γ^+와 $CD4^+IL\text{-}2^+$ 수가 현저하게 증가함을 보고하고 있다 (45). 즉, skin test가 말초혈액 림프구로 VZV에 대한 세포매개면역력을 측정하는 것보다 VZV에 대한 메모리 능력을 더 잘 평가할 수 있음을 의미한다. 국내에서는 수두백신을 실온에 방치하여 불활화한 후 항원으로 사용한 skin test를 실시한 보고가 있으나 이 연구에서는 대조 항원으로 생리식염수 등을 사용하였다 (46). 수두백신 자체에 사람의 이배체세포 항원과 기타 안정제 등의 항원이 존재하므로 정확한 검사를 위해서는 순수하게 정제된 VZV 항원을 사용하거나, 백신을 항원으로 사용할 경우 대조 항원을 VZV를 배양하지 않은 사람의 이배체세포를 백신 제조 시와 동일한 방법으로 제조하여 사용하여야 한다.

(2) Lymphocyte proliferation assay (LPA)

LPA는 특정 항원에 반응하여 증식된 T 세포를 측정하는 고전적인 방법으로, 백신을 맞은 사람의 말초혈액에서 림프구를 분리하여 그 림프구를 바이러스 항원으로 자극시킨 후 4~6일간 배양하여 림프구가 항원 자극에 의해 얼마나 증식되는가를 측정하는 검사이다. 수두백신 개발 초기에는 lymphocyte proliferation assay를 사용하여 백신의 면역원성을 확인한 보고들이 있다 (47~51). 그러나 최근에는 LPA가 그다지 정량적이지 못하며, 자동화가 불가능하여 노동력이 많이 요구되고, 많은 양의 검체를 한꺼번에 처리할 수 없고, 동위원소를 사용하여야 하며, 장기간에 걸친 배양이 세포의 증식과 사멸 등을 유도하여 실제 체내에서 T 세포의 기능과 수에 대한 정확성이 떨어진다는 이유로 잘 사용하지 않는다.

(3) Responder cell frequency (RCF) assay

RCA는 lymphocyte proliferation assay의 변형된 방법으로 limiting dilution을 통하여 정량적인 개념을 도입한 방법이다 (40). 이 방법 역시 노동력이 많이 요구되므로 다수의 인원을 대상으로 하는 백신의 면역원성 측정에는 사용하기 어려운 방법이다. 그러나 대상포진백신 개발 초기에 대상포진에 대한 세포매개면역원성 연구에서 ELISpot과 함께 사용한 보고들이 있다 (50, 51).

(4) ELISpot assay

ELISpot assay는 말초혈액을 항원으로 자극한 후 IFN-γ 등과 같은 cytokine을 세포 수준에서 enzyme-linked immunoassay를 통하여 정량적으로 측정하는 매우 민감하고 특이적인 방법으로 최근 여러 종류의 질환에 대한 T cell의 monitoring이나 백신의 세포매개면역력 검사 등에 많이 사용하고 있다 (51~55). helper T cell과 cytotoxic T cell의 반응을 모두 측정할 수 있는 방법으로 백신의 세포매개면역원성을 측정하는 차세대 biomarker로 각광을 받고 있다 (54). 최근 대상포진백신 면역원성 측정에 주

로 IFN-γ ELISpot을 사용하고 있다 (42, 50, 51, 56). Smith 등에 의하면 당일 날 채혈한 림프구과 채혈 후 오랜 기간 liquid nitrogen에 보관하였던 림프구로 ELISpot을 실시한 결과가 크게 차이가 나지 않아 여러 지역에서 수집한 혈액을 다른 곳으로 가지고 가서 검사를 할 수 있을 것으로 판단하여 백신의 유용성 평가이나 대상포진 유행에 사용할 수 있을 것으로 보고하였다 (42). 그러나 Vukmanovic-Stejic의 보고에 의하면 건강한 성인의 말초혈액 림프구는 VZV 항원으로 자극한 실험군과 자극하지 않은 대조군과 차이가 거의 없어 평가에 어려움이 있을 수 있음을 시사하였다 (45).

(5) Intracelluar cytokine (ICC) assay

혈액세포 내 존재하는 메모리 T 세포를 특정한 바이러스로 자극하여 그 세포에서 생성되는 IFN-γ와 같은 사이토카인을 측정하는 방법으로, 말초혈액을 바이러스 항원으로 자극시킨 후 세포 안으로 항체가 통과하도록 세포막을 투과시키고 세포 내에 생성된 사이토카인을 항체로 염색하여 fluorescence activated cell sorter (FACS)로 분석한다. ICC는 단일 세포 수준으로 측정이 가능하며, 어떠한 항체를 사용하느냐에 따라 CD4와 CD8 세포, memory/effector 세포 등을 구분해서 측정하거나 사이토카인 외에도 perforin, granzyme, granulysin과 같은 세포독성에 대한 기능적인 표지자들도 측정할 수 있다. ICC는 방법이 간단하고, 적은 양의 혈액으로 하루 만에 검사를 끝낼 수 있으며, 정략적 측정이 가능하고, 세포표면 마커들과 사이토카인 같은 여러 parameter를 동시에 측정할 수 있다는 장점이 있어 T 세포의 면역 기능을 측정하는데 점차 많이 사용되고 있다 (57). ICC는 ELISpot과 더불어 백신의 면역원성을 측정하는데 차세대 biomarker로 각광을 받고 있는 방법으로 (54), 정상 성인과 수두 환자에서 ICC로 IFN-γ를 분비하는 T 세포를 측정한 보고들이 있다 (41, 58). 그러나 채혈 당일에 실험을 해야 하는 점은 다기관 임상시험의 제한점이 되고 있다.

결 론

백신의 면역원성을 측정을 위해서는 다음과 같은 조건을 갖추어야 한다. 실험 결과는 실험자에 따른 편차가 적은 객관성(objectivity)이 있어야 하고, 항체 양에 따라 측정값이 비례하는 linearity가 있어야 하며, 적은 양의 항체도 잡아 낼 수 있는 민감도(sensitivity)와 특정 항원에 대한 항체만을 잡아 낼 수 있는 특이도(specificity)가 좋아야 하고, 동일한 조건하에서 반복하였을 때 정확도(precision)가 높아야 한다. 또한 동일한 시험법을 가지고 실험실이나 실험자가 바뀌어도 동일하게 나오는 재현성(reproducibility)이나 견고함(ruggedness)이 있어야 하며, 많은 검체를 한꺼번에 처리할 수 있는 능력(throughput)이 있어야 한다. 또한 자동화(automation)가 가능하고, 결과가 빨리 나오며 상품화되어 있는 kit나 시약들이 존재해야 한다 (59).

수두백신에 대한 면역반응은 수두 자연감염에 비하여 10배 정도 항체가가 낮게 유도되므로 매우 민감한 방법이 필요하며, 특히 방어력을 측정할 수 있는 검사법이어야 한다. 그러나 아직까지 VZV 항체를 측정하는데 상기의 조건들을 다 갖춘 제품이나 방법이 없다는 것과 방어력에 대하여 전세계적으로 동의하는 혈청학적 기준이 없다는 것이 수두백신의 면역원성을 판단하는데 가장 큰 걸림돌이 되고 있다. 따라서 gold standard인 FAMA assay를 표준화하는 것과, 장기간에 걸친 추적검사를 통하여 방어력이 있는 FAMA 항체가와 gpEIA 항체가 기준을 설정하는 것이 필요하다.

대상포진백신의 면역원성 측정방법으로는 skin test가 가장 적절하다고 여겨지나 아직까지 사람에게 사용할 수 있는 VZV skin test 항원 공급이 제한적이라 대부분 IFN-γ ELISpot 방법을 사용하고 있다. 우리나라에서 대상포진의 발생률이 급격하게 증가하는 추세이고 이미 대상포진백신이 사용되고 있으므로 skin test용 항원의 개발과 우리나라 성인의 대상포진에 대한 세포매개면역도를 조사하는 것이 대상포진백신의 면역원성 평가를 위해 시급한 실정이다.

REFERENCES

1) Takahashi M, Otsuka T, Okuno Y, Asano Y, Yazaki T. Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in Hospital. Lancet 1974;2:1288-90.
2) Kroger AT, Atkinson WL, Marcuse EK, Pickering LK. General recommendations on immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep 2006;55:1-48.
3) Ndumbe PM, Cradock-Watson J, Levinsky RJ. Natural and artificial immunity to varicella zoster virus. J Med Virol 1988;

25:171-8.
4) LaRussa PS, Gershon AA, Steinberg SP, Chartrand SA. Antibodies to varicella-zoster virus glycoproteins I, II, and III in leukemic and healthy children. J Infect Dis 1990;162:627-33.
5) Sauerbrei A, Wutzler P. Herpes simplex and varicella-zoster virus infections during pregnancy: current concepts of prevention, diagnosis and therapy. Part 2: varicella-zoster virus infections. Med Microbiol Immunol 2007;196:95-102.
6) Miller AE. Selective decline in cellular immune response to varicella-zoster in the elderly. Neurology 1980;30:582-7.
7) Berger R, Florent G, Just M. Decrease of the lymphoproliferative response to varicella-zoster virus antigen in the aged. Infect Immun 1981;32:24-7.
8) Arvin AM. Cell-mediated immunity to varicella-zoster virus. J Infect Dis 1992;166:S35-41.
9) Kuter B, Matthews H, Shinefield H, Black S, Dennehy P, Watson B, *et al*. Ten year follow-up of healthy children who received one or two injections of varicella vaccine. Pediatr Infect Dis J 2004;23:132-7.
10) Lopez AS, Guris D, Zimmerman L, Gladden L, Moore T, Haselow DT, *et al*. One dose of varicella vaccine does not prevent school outbreaks: is it time for a second dose? Pediatrics 2006;117:e1070-7.
11) Chaves SS, Gargiullo P, Zhang JX, Civen R, Guris D, Mascola L, *et al*. Loss of vaccine-induced immunity to varicella over time. N Engl J Med 2007;356:1121-9.
12) Marin M, Güris D, Chaves SS, Schmid S, Seward JF. Prevention of varicella: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep 2007;56:1-40.
13) Michalik DE, Steinberg SP, Larussa PS, Edwards KM, Wright PF, Arvin AM, *et al*. Primary vaccine failure after 1 dose of varicella vaccine in healthy children. J Infect Dis 2008;197:944-9.
14) Harpaz R, Ortega-Sanchez IR, Seward JF. Prevention of herpes zoster: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep 2008;57:1-30.
15) Schmidt NJ, Lennette EH, Shon CW, Shinomoto TT. A Complement-Fixing Antigen for Varicella-Zoster Derived from Infected Cultures of Human Fetal Diploid Cells. Proc Soc Exp Biol Med 1964;116:144-9.
16) Caunt AE, Shaw DG. Neutralization tests with varicella-zoster virus. J Hyg 1969;67:343-52.
17) Williams V, Gershon A, Brunell PA. Serologic response to varicella-zoster membrane antigens measured by direct immunofluorescence. J Infect Dis 1974;130:669-72.
18) Gershon AA, Kalter ZG, Steinberg S, Kuhns WJ. Detection of antibody to varicella-zoster virus by immune adherence hemagglutination. Proc Soc Exp Biol Med 1976;151:762-5.
19) Forghani B, Schmidt NJ, Dennis J. Antibody assays for varicella-zoster virus: comparison of enzyme immunoassay with neutralization, immune adherence hemagglutination, and complement fixation. J Clin Microbiol 1978;8:545-52.
20) Arvin AM, Pollard RB, Rasmussen LE, Merigan TC. Selective impairment of lymphocyte reactivity to varicella-zoster virus antigen among untreated patients with lymphoma. J Infect Dis 1978;137:531-40.
21) Arvin AM, Koropchak CM. Immunoglobulins M and G to varicella-zoster virus measured by solid-phase radioimmunoassay: antibody responses to varicella and herpes zoster infections. J Clin Microbiol 1980;12:367-74.
22) Keller PM, Lonergan K, Neff BJ, Morton DA, Ellis RW. Purification of individual varicella-zoster virus (VZV) glycoproteins gpI, gpII, and gpIII and their use in ELISA for detection of VZV glycoprotein-specific antibodies. J Virol Methods 1986;14:177-88.
23) Steinberg SP, Gershon AA. Measurement of antibodies to varicella-zoster virus by using a latex agglutination test. J Clin Microbiol 1991;29:1527-9.
24) Maple PA, Gray J, Breuer J, Kafatos G, Parker S, Brown D. Performance of a time-resolved fluorescence immunoassay for measuring Varicella-Zoster virus immunoglobulin G levels in adults and comparison with commercial enzyme immunoassays and Merck glycoprotein enzyme immunoassay. Clin Vaccine Immunol 2006;13:214-8.
25) Keller PM, Neff BJ, Ellis RW. Three major glycoprotein genes of varicella-zoster virus whose products have neutralization epitopes. J Virol 1984;52:293-7.
26) Zaia JA, Oxman MN. Antibody to varicella-zoster virus-induced membrane antigen: immunofluorescence assay using monodisperse glutaraldehyde-fixed target cells. J Infect Dis 1977;136:519-30.
27) Sauerbrei A, Wutzler P. Serological detection of varicella-zoster virus-specific immunoglobulin G by an enzyme-linked immunosorbent assay using glycoprotein antigen. J Clin Microbiol 2006;44:3094-7.

28) Sauerbrei A, Wutzler P. Serological detection of specific IgG to varicella-zoster virus by novel ELISA based on viral glycoprotein antigen. Clin Lab 2009;55:1-7.
29) Asano Y, Suga S, Yoshikawa T, Kobayashi I, Yazaki T, Shibata M, *et al*. Experience and reason: twenty-year follow-up of protective immunity of the Oka strain live varicella vaccine. Pediatrics 1994;94:524-6.
30) Johnson CE, Stancin T, Fattlar D, Rome LP, Kumar ML. A long-term prospective study of varicella vaccine in healthy children. Pediatrics 1997;100:761-6.
31) Asano Y, Albrecht P, Vujcic LK, Quinnan GV Jr, Kawakami K, Takahashi M. Five-year follow-up study of recipients of live varicella vaccine using enhanced neutralization and fluorescent antibody membrane antigen assays. Pediatrics 1983;72:291-4.
32) Kreth HW, Lee BW, Kosuwon P, Salazar J, Gloriani-Barzaga N, Bock HL, *et al*. Sixteen years of global experience with the first refrigerator-stable varicella vaccine (Varilrix). Biodrugs 2008;22:387-402.
33) Robertson PW, Bell SM, Ferson MJ. A method for determining the cut-off value of a varicella-zoster virus IgG enzyme immunoassay for immune status. J Virol Methods 1989;26: 115-8.
34) Kim YH, Hwang JY, Shim HM, Lee E, Park S, Park H. Evaluation of a Commercial Glycoprotein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measuring Vaccine Immunity to Varicella. Yonsei Med J 2014 (in press).
35) Chris Maple PA, Gray J, Brown K, Brown D. Performance characteristics of a quantitative, standardised varicella zoster IgG time resolved fluorescence immunoassay (VZV TRFIA) for measuring antibody following natural infection. J Virol Methods 2009;157:90-2.
36) Chris Maple PA, Gunn A, Sellwood J, Brown DW, Gray JJ. Comparison of fifteen commercial assays for detecting Varicella Zoster virus IgG with reference to a time resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) and the performance of two commercial assays for screening sera from immuno-compromised individuals. J Virol Methods 2009;155:143-9.
37) Pinquier D, Gagneur A, Balu L, Brissaud O, Gras Le Guen C, Hau-Rainsard I, *et al*. Prevalence of Anti-Varicella-Zoster virus antibodies in French infants under 15 months of age. Clin Vaccine Immunol 2009;16:484-7.
38) Kamiya H, Ihara T, Hattori A, Iwasa T, Sakurai M, Izawa T, *et al*. Diagnostic skin test reactions with varicella virus antigen and clinical application of the test. J Infect Dis 1977;136:784-8.
39) Bowden RA, McGavren L, Hayward AR, Levin MJ. Use of bone marrow fibroblasts to prepare targets for an HLA restricted-cytotoxicity assay system. J Clin Microbiol 1984;20: 696-700.
40) Hayward AR, Zerbe GO, Levin MJ. Clinical application of responder cell frequency estimates with four years of follow up. J Immunol Methods 1994;170:27-36.
41) Asanuma H, Sharp M, Maecker HT, Maino VC, Arvin AM. Frequencies of memory T cells specific for varicella-zoster virus, herpes simplex virus, and cytomegalovirus by intra-cellular detection of cytokine expression. J Infect Dis 2000; 181:859-66.
42) Smith JG, Liu X, Kaufhold RM, Clair J, Caulfield MJ. Development and validation of a gamma interferon ELISPOT assay for quantitation of cellular immune responses to varicella-zoster virus. Clin Diagn Lab Immunol 2001;8:871-9.
43) Baba K, Yabuuchi H, Okuni H, Takahashi M. Studies with live varicella vaccine and inactivated skin test antigen: protective effect of the vaccine and clinical application of the skin test. Pediatrics 1978;61:550-5.
44) Sadaoka K, Okamoto S, Gomi Y, Tanimoto T, Ishikawa T, Yoshikawa T, *et al*. Measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity: comparison between VZV skin test and interferon-gamma enzyme-linked immuno-spot assay. J Infect Dis 2008;198:1327-33.
45) Vukmanovic-Stejic M, Sandhu D, Sobande TO, Agius E, Lacy KE, Riddell N, *et al*. Varicella zoster-specific CD4+Foxp3+ T cells accumulate after cutaneous antigen challenge in humans. J Immunol 2013;190:977-86.
46) Kim JY, Lee HJ, Kim MJ, Kim YH, Jung JA, Yang S, *et al*. The usefulness of skin test in evaluation of immunity to varicella. Korean J Pediatr 2008;51:377-82.
47) Bergen RE, Diaz PS, Arvin AM. The immunogenicity of the Oka/Merck varicella vaccine in relation to infectious varicella-zoster virus and relative viral antigen content. J Infect Dis 1990;162:1049-54.
48) Watson B, Keller PM, Ellis RW, Starr SE. Cell-mediated immune responses after immunization of healthy seronegative children with varicella vaccine: kinetics and specificity. J Infect Dis 1990;162:794-9.
49) Sohn YM, Roh HO, Goo ML, Park BR, Park JH, Lim GJ. Humoral and Cell Mediated Immune Response After Immunization with Varicella Vaccine (Oka/LG). Korean J

Pediatr 1998;41:170-8.

50) Levin MJ, Oxman MN, Zhang JH, Johnson GR, Stanley H, Hayward AR, *et al*. Varicella-zoster virus-specific immune responses in elderly recipients of a herpes zoster vaccine. J Infect Dis 2008;197:825-35.

51) Weinberg A, Zhang JH, Oxman MN, Johnson GR, Hayward AR, Caulfield MJ, *et al.* Varicella-zoster virus-specific Immune responses to herpes zoster in elderly participants in a trial of a clinically effective zoster vaccine. J Infect Dis 2009;200:1068-77.

52) Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI. Immunologic monitoring. Immunol Rev 2003;196:247-64.

53) Whiteside TL, Gooding W. Immune monitoring of human gene therapy trials: potential application to leukemia and lymphoma. Blood Cells Mol Dis 2003;31:63-71.

54) Hogrefe WR. Biomarkers and assessment of vaccine responses. Biomarkers 2005;10:S50-7.

55) Zhang W, Caspell R, Karulin AY, Ahmad M, Haicheur N, Abdelsalam A, *et al*. ELISPOT assays provide reproducible results among different laboratories for T-cell immune monitoring--even in hands of ELISPOT-inexperienced investigators. J Immunotoxicol 2009;6:227-34.

56) Smith JG, Levin M, Vessey R, Chan IS, Hayward AR, Liu X, *et al*. Measurement of cell-mediated immunity with a Varicella-Zoster Virus-specific interferon-gamma ELISPOT assay: responses in an elderly population receiving a booster immunization. J Med Virol 2003;70:S38-41.

57) Ghanekar SA, Maecker HT. Cytokine flow cytometry: multiparametric approach to immune function analysis. Cytotherapy 2003;5:1-6.

58) Malavige GN, Jones L, Black AP, Ogg GS. Rapid effector function of varicella-zoster virus glycoprotein I-specific CD4+ T cells many decades after primary infection. J Infect Dis 2007;195:660-4.

59) Krah DL. Assays for antibodies to varicella-zoster virus. Infect Dis Clin North Am 1996;10:507-27.