

119081-
5

아프리카
돼지
열병
(ASF)
백신
개발을
위한
국제
공동
연구

최
종
보
고
서

2024

농
림
축
산
식
품
부

농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
가축질병대응기술고도화지원사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004660-01

아프리카돼지열병(ASF) 백신 개발을 위한 국제공동 연구

2024.06.18.

주관연구기관 / (주)중앙백신연구소
공동연구기관/서울대학교 산학협력단
공동연구기관/경상국립대학교 산학협력단
공동연구기관/농림축산검역본부

농 립 축 산 식 품 부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “아프리카돼지열병(ASF) 백신 개발을 위한 국제공동 연구”(개발기간 : 2019. 08. ~ 2023. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자 2024.06.18.

주관연구기관명 : 윤 인 중 (대표자)
공동연구기관명 : 김 재 영 (대표자)
공동연구기관명 : 정 재 우 (대표자)
공동연구기관명 : 김 정 희 (대표자)

주관연구책임자 : 이 주 용
공동연구책임자 : 채 찬 희
공동연구책임자 : 이 창 희
공동연구책임자 : 최 준 구

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 별람에 동의 합니다.

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	가축질병대응기술고도화지원	총괄연구개발 식별 번호 (해당 시 작성)				
내역사업명 (해당 시 작성)	동물의약품	연구개발과제번호		119081-5		
기술 분 류	국가과학기술 표준분류	LC0316	60%	LA0908	40%	
	농림식품 과학기술분류	RB0201	100%			
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	아프리카돼지열병(ASF) 백신 개발을 위한 국제공동 연구					
연구개발과제명	아프리카돼지열병(ASF) 백신 개발을 위한 국제공동 연구					
전체 연구개발기간	2019. 08. 30 - 2023. 12. 31(4년 5개월)					
	해당단계	-				
	해당연도	5차년도_2023. 01. 01 - 2023. 12. 31(12개월)				
총 연구개발비	총 1,219,000 천원 (정부지원연구개발비: 839,000 천원, 기관부담연구개발비 : 380,000 천원)					
	해당단계 해당연도	총 301,275 천원 (정부지원연구개발비: 217,000 천원, 기관부담연구개발비 : 84,275 천원)				
연구개발단계	기초[<input checked="" type="checkbox"/>] 응용[<input type="checkbox"/>] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[<input type="checkbox"/>]	기술성숙도 (해당 시 작성)		착수시점 기준 (1단계) 종료시점 목표 (4단계)		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)	-					
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)	-					
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> ◎ 전 세계적인 양돈 산업에 경제적 영향을 미치고 있는 아프리카돼지열병(ASF)에 대한 효율적인 방어 시스템 구축을 위하여 ASFV 발생 국인 국가와 협력하여 ASFV 백신 항원주 개발 및 백신 시스템 구축을 도모함 				
	전체 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 아프리카돼지열병(ASF) 연구 가능한 국제협력 네트워크 구축 ○ 아프리카돼지열병(ASF) 백신 항원주 개발 및 기초 메커니즘 연구/유전체 분석 ○ 아프리카돼지열병(ASF) 바이러스에 감수성을 보이는 cell line 선별 ○ 아프리카돼지열병(ASF) 백신으로 활용 가능한 항원 개발 ○ CRISPR 기술을 활용한 아프리카돼지열병(ASF) 바이러스 대체 항원 개발/ 생산 시스템 구축 <p>1) 아프리카돼지열병(ASF) 연구 정책 조정 및 백신 개발 지원</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 농림축산검역본부와 연구방향 조정과 진도·성과를 공유하여 협동적 과제 진행. ○ ASF 발병 국가의 선행 연구를 기초로 국내 발생 ASF 기초연구 ○ ASF 예방을 위한 백신 개발 지원 : (ABSL3+ 활용) <p>2) ASF 바이러스 국제 네트워크 구축과 백신 항원주 개발/메커니즘 연구 및 백신 세포주 선별</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 베트남과의 MOU 협약 체결/ ASFV 발병 검체 확보/ ASFV 병 				

		<p>원성 인자 발굴을 위한 분석 및 유전자 합성</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 최신 바이러스주 분리/ 동물 바이러스 감염성 세포의 ASFV 감수성 확인 및 선별/ ASFV 특이 병원성 인자 발굴/ 합성된 ASFV 유전자 발현 ○ 적응/약독화된 ASFV 항원 개발/ 동물세포에서의 항원 발현 시스템 구축/ ASFV 특이 병원성 인자 특성 규명 ○ ASFV 특이 병원성 인자 기전 규명/ CRISPR 활용: 분석된 유전들에 대하여 적응 및 발현/ 동물 모델에서의 재조합/약독화 항원들의 효력 평가를 통한 선별 ○ ASFV 특이 병원성 인자 기전 규명/ 면역 선별한 항원과 항체 생산 및 활용 <p>3) 국제 협력 구축 및 ASFV에 감수성을 보이는 Porcine 유래의 cell line 개발 및 항원 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 돼지 대식세포/조직세포의 수득 방법 및 배양 조건을 설정함 ○ 돼지 대식세포/조직세포를 이용한 아프리카돼지열병(ASF) 바이러스 분리 ○ 면역세포화학법(immunohistochemistry)을 이용한 바이러스 증식 분석/ 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)을 이용한 바이러스 증식 분석 ○ ASFV 백신 유효성 평가 가이드라인 개발 : 백신 유효성 평가를 위하여 임상학적, 면역학적, 바이러스학적, 병리학적 평가 <p>4) ASF 바이러스 재조합 subunit 백신 개발 시스템 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ ASF 바이러스 구조 단백질 클로닝 ○ ASF 바이러스 재조합 단백질 항원 정제 및 농축 ○ 재조합 백신 항원 후보 물질 선별
--	--	--

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ ASFV 메커니즘 연구로 병원성 인자 발굴 ○ ASF 감수성 cell line을(CA-CAS-01-A) 확보 및 기탁(KCTC14568BP) ○ 활용한 Live attenuated candidate 확보 ○ (연구기반지표) SCI 논문 12건, 학술발표 9건 ○ (사업화 지표) 특허 출원 3건, 특허 등록 1건, 고용창출 1, 인력양성 13 																											
	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">구분</th> <th rowspan="2">논문</th> <th rowspan="2">특허</th> <th rowspan="2">학술 발표</th> <th rowspan="2">품종 등록</th> <th rowspan="2">기술 이전</th> <th rowspan="2">고용 창출</th> <th rowspan="2">인력양성</th> <th colspan="2">생명자원</th> <th colspan="2">신품종</th> </tr> <tr> <th>생명 정보</th> <th>생물 자원</th> <th>정보</th> <th>실물</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>성과 (NY)</td> <td>12</td> <td>4</td> <td>9</td> <td>1</td> <td></td> <td>1</td> <td>13</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	구분	논문	특허	학술 발표	품종 등록	기술 이전	고용 창출	인력양성	생명자원		신품종		생명 정보	생물 자원	정보	실물	성과 (NY)	12	4	9	1		1	13			
구분	논문									특허	학술 발표	품종 등록	기술 이전	고용 창출	인력양성	생명자원		신품종										
		생명 정보	생물 자원	정보	실물																							
성과 (NY)	12	4	9	1		1	13																					

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p>1) 활용 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 국내에 발생하지 않는 아프리카 돼지열병(ASF) 바이러스의 성장특성, 병원성, 감수성 cell line 개발의 특성 규명을 통해 국내 발병에 대한 사전 대응·대비를 강화하여 국가 방역
---------------------	--

	<p>체계를 공고히 하는데 활용</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 아프리카 돼지열병(ASFV)의 플랫폼 구축을 통해 ASFV 발생국과 발생 미지역에 아프리카 돼지열병(ASFV)대한 위해도 평가 및 대응수단의 효능을 예측 ○ 시스템 생물학 기술로 향후 신·변종 아프리카 돼지열병(ASFV)이 국가 보건안보를 위협할 경우 조기에 병원체 특성을 규명하는 데에 활용 ○ 신·변종 아프리카 돼지열병(ASFV) 위기 발생 시 병원체 특성을 조기 규명하고 과학에 근거한 투명한 정보공개와 소통으로 국민 불안 해소 및 사회 안정에 기여 <p>2) 기술적 기대 효과</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 조기에 병원체 특성규명이 가능한 플랫폼 구축함으로써 미래에 신·변종 아프리카 돼지열병(ASFV)의 위협이 있을 때 빠르게 병원체를 규명하고 특성을 제시하여 조기에 대응 가능 <p>3) 경제적 기대 효과</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 감수성 cell line/면역 항원 개발의 확립이 아프리카 돼지열병(ASFV)의 백신체계를 구축하는데 기여한다면 전 아프리카 돼지열병(ASFV) 발생국의 양돈 산업계에 크게 이바지 가능 ○ 아프리카 돼지열병(ASFV) 바이러스 위기 시 효과적인 방역에 기여하여 국가 이미지 제고가 가능 				
국문핵심어 (5개 이내)	아프리카 돼지열병	국제 협력	동물세포	재조합	백신
영문핵심어 (5개 이내)	ASFV	International cooperation	Cell of mammalian	Recombinant	Vaccine

※ 각 항목에서 요구하는 정보를 포함하여 연구개발과제의 특성에 따라 항목을 추가하거나 항목의 순서와 구성을 변경하는 등 서식을 수정하여 사용하거나 별도의 첨부자료 활용이 가능합니다.
 다만, '1.3) 세부 정량적 연구개발성과' 항목은 2021.1.4.부터 2021.12.31.까지 수정 사용 가능합니다.

<연구개발성과 목표 대비 실적>

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연구 활용 등)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	S M A R T	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		논 문 평 균 I F			학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
													S C I	비 S C I							
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건				
가중치	40	20								10				30							
최종 목표	5	1								1		4		6							
연구 년도	목표	5	1							1		4		6							
	실적	3	1	1						1		12		9	13						
달성률 (%)	60	100								100		300		150							

목 차

1. 연구개발과제의 개요	9
1.1. 연구개발 목표 및 결과	9
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용	16
2.1. ASFV 바이러스 국제 네트워크 구축과 백신 항원주 개발 및 백신 세포주 선별	16
2.2. ASF 바이러스에 대한 메타니즘 연구 결과	44
2.3. 국제 협력 구축 및 ASFV에 감수성을 보이는 Pocine 유래의 cell line 개발 및 항원 연구63	
2.4. ASF 바이러스 재조합 subunit 백신 개발 시스템 구축(감수성 cell 포함)	81
2.5. 아프리카돼지열병(ASF) 연구 정책 조정 및 백신 개발 지원	88
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	92
4. 연구개발과제 수행 결과물	96
4.1. 연구노트 점검 결과 보고서	96
4.2. 특허 출원/등록 및 생물자원 관련 실적	100
4.3. ASF 연구 관련 논문 실적	105
4.4. 인력 양성 및 고용 창출 실적	117
별첨 2. 자체평가의견서	120
별첨 3. 연구성과활용계획서	124

최종보고서						보안등급		
중앙행정기관명	농림축산식품기획평가원			사업명	사업명	가축질병대응기술고도화지원		
전문기관명 (해당 시 작성)					내역사업명 (해당 시 작성)	동물의약품		
공고번호	제 농축2019-293호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)				
기술분류	국가과학기술 프로젝트분류	LC0316	60%	LA0508	40%			
	농림축산식품과학기술분류	RB0201	100%			119081-5		
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문	아프리카돼지열병(ASF) 백신 개발을 위한 국제공동 연구						
	영문	International cooperation bases africa swine fever (ASF) research and their vaccine development						
연구개발과제명	국문	아프리카돼지열병(ASF) 백신 개발을 위한 국제공동 연구						
	영문	International cooperation bases africa swine fever (ASF) research and their vaccine development						
주관연구개발기관	기관명	농중앙립식물연구소		사업자등록번호		305-81-19849		
	주소	(우) 대전광역시 유성구 유성대로 1476-37		법인등록번호		160111-0042533		
연구책임자	성명	이주용		직위		사장		
	연락처	직상전화			휴대전화			
		참사우편			국가연구자번호			
연구개발기간	전체	2019. 08. 30 - 2023. 12. 31(4년 5개월)						
	해당 연도	5연차 2023. 01. 01 - 2023. 12. 31(12개월)						
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금		합계		연구개발 비외 지원금
	현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	
총계	839,000	200,000	180,000			1,039,000	180,000	1,219,000
1년차	79,000	24,900	18,000			103,900	18,000	121,900
2년차	190,000	43,775	40,500			233,775	40,500	274,275
3년차	190,000	-	84,275			190,000	84,275	274,275
4년차	163,000	43,775	40,500			206,775	40,500	247,275
5년차	217,000	43,775	40,500			260,775	40,500	301,275
해당 연도	217,000	43,775	40,500			260,775	40,500	301,275
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	참사우편	비고		
						역할	기관유형	
공동연구개발기관	서울대학교 산학협력단	재 찬 희	교수			공동	대학	
	경상국립대학교 산학협력단	이 창 희	교수			공동	대학	
	농림축산 검역본부	최 근 구	연구관			공동	국립연	
	충남대학교 산학협력단	이 종 수	교수			위탁	대학	
연구개발과제 실무담당자	성명	권 익 일		직위		차 장		
	연락처	직상전화			휴대전화			
		참사우편			국가연구자번호			

이 면서보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 연구개발과제 중단, 협약 해약, 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2023년 12월 31일

연구책임자:

주관연구개발기관의

위탁연구개발기관의

공동연구개발기관의

공동연구개발기관의

공동연구개발기관의

농림축산식품부장관·농림축산식품기획평가원장 귀하

210mm×297mm [백상지(80g/㎡), 또는 풀질지(80g/㎡)]

1. 연구개발과제의 개요

1.1. 연구개발 목표 및 결과

가. 최종목표

○ 전 세계적인 양돈 산업에 큰 경제적 손실을 초래하고 있는 아프리카 돼지열병(ASF)에 대한 효율적인 방어 시스템 구축을 위하여 ASFV 발생국인 국가와 협력하여 ASFV 백신 항원주 개발 및 백신 시스템 구축을 도모함.

나. 세부과제 별 연구 목표

○ 1세부 : ASFV 바이러스 국제 네트워크 구축과 백신 항원주 개발/메커니즘 연구 및 백신 세포주 선별.

- ▶ 신·변종 아프리카 돼지열병(ASFV) 바이러스 발생 국가와의 국제 협력 네트워크 구축 및 바이러스 메커니즘 연구
- ▶ ASF 항원 선정 및 세포주 선별과 백신관련 재조합 기반 연구
- ▶ 새로운 적응성/재조합 항원 개발 및 항원 단백질 고발현 시스템 구축
- ▶ 아프리카 돼지열병(ASFV) 재조합/약독화 항원들의 발현 및 평가와 활용

○ 1 협동 : 국제 협력 구축 및 ASFV에 감수성을 보이는 Porcine 유래의 cell line 개발 및 항원 연구

- ▶ ASF 바이러스의 배양이 가능한 돼지 유래의 세포주 준비/epithelial 세포주 선별
- ▶ 선별한 세포주에서 ASF 바이러스 증식/유전자발현 분석
- ▶ 계대배양 세포주에서 ASF 바이러스 배양 최적화
- ▶ 아프리카돼지열병 발병 농장에서 역학 분석 연구
- ▶ 아프리카돼지열병 발병 농장에서 병리학 분석 연구

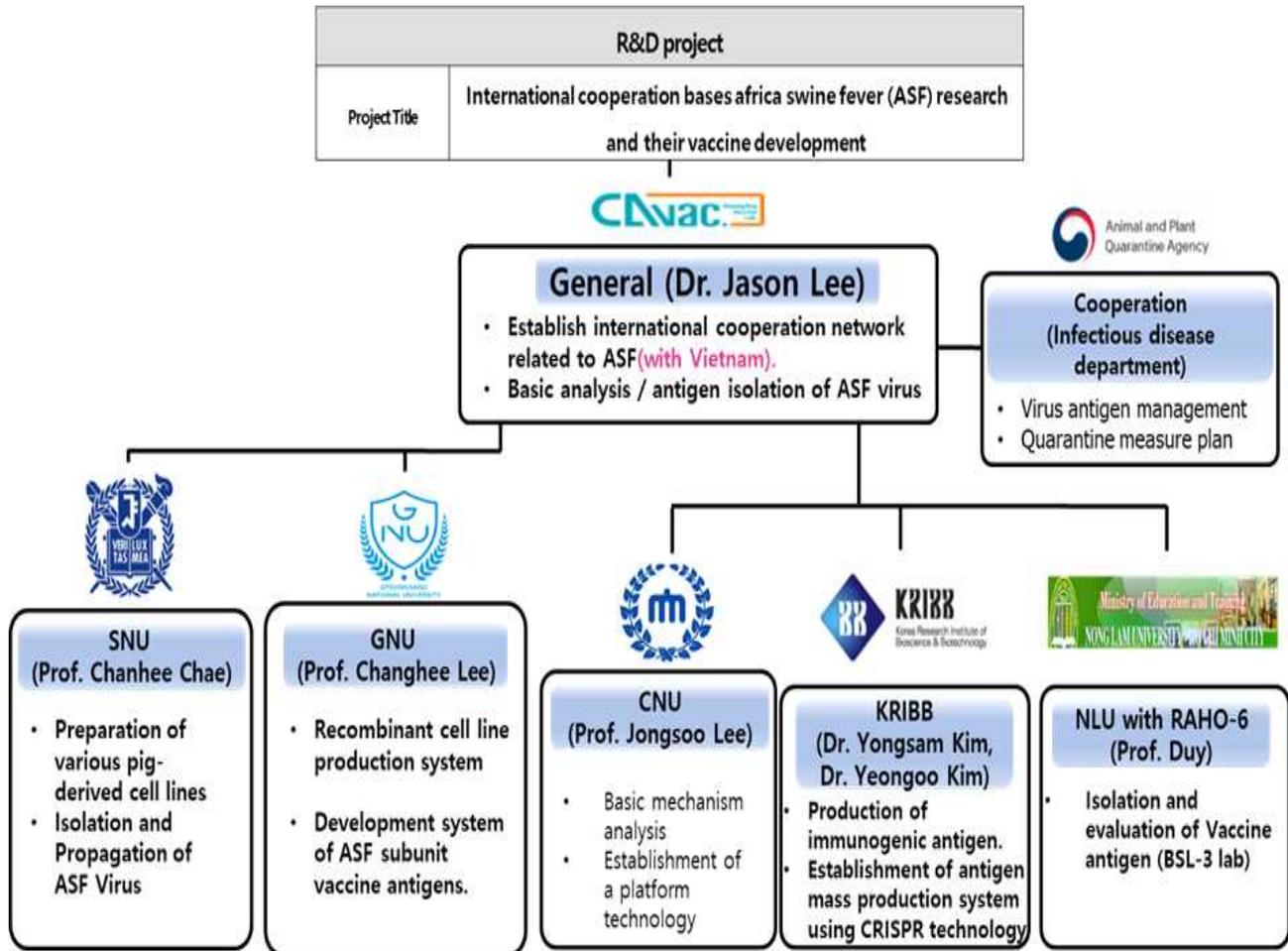
○ 2 협동 : ASFV에 감수성을 보이는 transgenic cell line 개발

- ▶ ASF 바이러스 감수성 관련 수용체 검색 및 특이 수용체 CD163 단백질 유전자 확보
- ▶ ASF 바이러스 감수성 재조합 세포주 제작/불멸화
- ▶ ASF 바이러스 재조합 서브유닛 백신 항원 개발

○ 3 협동 : 아프리카돼지열병(ASF) 백신 개발 위한 세포주 및 항원 평가 연구

- ▶ ASF 바이러스 국내 분리주 특성 및 세포내 증식성 연구
- ▶ 국내 분리 바이러스 및 해외 표준주 이용, 개발된 세포주의 감수성 등 평가
- ▶ 보유 바이러스 이용, 개발된 항원의 면역원성 및 중화능 평가
- ▶ ASF 예방을 위한 백신 개발 지원(ABSL3+)

○ 기관별 업무 분장



다. 세부과제 별 목표 및 결과

<1차년도>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2019)	제 1 세부 (중앙백신연구 소, 충남대학교, 베트남)	<ul style="list-style-type: none"> 신·변종 아프리카 돼지열병 (ASFV) 바이러스 발생 국가와의 국제 협력 네트워크 구축 	<ul style="list-style-type: none"> 베트남과의 MOU 협약 체결. 베트남 발생 ASF 바이러스 관련 샘플 확보. ASFV 발병 검체 확보 	<ul style="list-style-type: none"> 베트남과(정부 기관 Raho-6와 수의 대학 기관 Nong lam uni.)의 MOU 협약 체결 완료. 총 900개의 samples 중 ASFV positive 95개 sample을 확보함. P72 감작 Real-time을 이용하여 평균 CT value samples을 확보함. ASFV 감수성 확인을 위한 총 7개의 cell line을 확보.
		<ul style="list-style-type: none"> ASFV 바이러스 메커니즘 연구. 	<ul style="list-style-type: none"> ASFV 병원성 인자 발굴을 위한 분석 및 유전자 합성 (충남대학교) 	<ul style="list-style-type: none"> 숙주의 인터페론 분비 신호 전달을 억제하는 ASFV 병원성 인자들의 탐색
	제 1 협동 (서울대학교)	<ul style="list-style-type: none"> 아프리카돼지열병 바이러스 (ASF)의 배양이 가능한 세포주 준비함. 	<ul style="list-style-type: none"> 돼지 대식세포의 수득 방법 및 배양 조건을 설정함. 	<ul style="list-style-type: none"> 돼지 폐장 유래 대식세포 배양 방법 확립 - 돼지 혈액 유래 대식세포 배양 방법 확립
			<ul style="list-style-type: none"> 돼지 조직세포의 수득 방법 및 배양 조건을 설정함. 	<ul style="list-style-type: none"> 돼지 신장 유래 조직세포 배양 방법 확립 - 돼지 간 유래 조직세포 배양 방법 확립
	제 2 협동 (경북대학교)	<ul style="list-style-type: none"> 아프리카 돼지열병(ASF) 바이러스 감수성 세포주 개발을 위한 기반 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 재조합 세포주 제작을 위한 체계 구축 	<ul style="list-style-type: none"> 레트로바이러스 유전자 전달 시스템 구축 완료 불멸화 세포주 제작을 위한 인체 유래 텔로머라제 (telomerase) 유전자 확보 완료
			<ul style="list-style-type: none"> ASF 바이러스 특이 수용체 단백질 유전자 및 재조합 단백질 확보 	<ul style="list-style-type: none"> 돼지 유래 CD163 단백질 유전자 확보 완료 돼지 CD163 기반 재조합 단백질 유전자 확보 완료
	제 3 협동 (검역본부)	<ul style="list-style-type: none"> ASF 바이러스 국내 분리주 특성 조사 및 발생 역학 분석 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 각 나라의 ASF 발생 역학을 조사하고 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 유럽, 중국, 아시아 국가 발생 ASF 바이러스와 국내 발생 ASF 바이러스 간의 계통학적 비교 완료
			<ul style="list-style-type: none"> ASF 바이러스 국내 분리주의 특성을 조사 	<ul style="list-style-type: none"> Vero adaptation ASF 바이러스 분양 완료. ASF 바이러스 국내 분리주 분리중

<2차년도>

구분 년도	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
2차 년도 (2020)	ASFV 바이러스 국제 네트워크 구축과 백신 항원주 개발/메커니즘 연구 및 백신 세포주 선별 (제 1 세부)	<ul style="list-style-type: none"> ASF 항원 선정 및 세포주 선별과 백신관련 재조합 기반 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 베트남 발생 ASF 바이러스 관련 샘플 확보 및 ASF 감수성 세포 발굴 기초 연구 수행함. (베트남에서의 국제 공동 연구). ASF 감수성 세포주를 활용한 베트남 최신 바이러스 분리주를 발굴함(KVL strain). ASF 감염 방법 구축 	<ul style="list-style-type: none"> 베트남(Raho-6, Nong lam University) ASF 의심 샘플 (swab, 조직 샘플 확보). ASFV 감수성 cell line에서의 베트남 2019 ASF 바이러스 분리. Adaptation된 베트남 유래 ASF 항원 확보(17 passaged).
	아프리카돼지열병 바이러스에 감수성을 보이는 세포주 선별 (제 1 협동)	<ul style="list-style-type: none"> 아프리카돼지열병 바이러스 (ASF)에 감수성을 보이는 초대 세포주 선별 	<ul style="list-style-type: none"> 돼지 대식세포를 이용한 아프리카돼지열병(ASF) 바이러스 분리 	<ul style="list-style-type: none"> 신장 유래 조직세포에서 ASFV 감수성 확인 완료
	아프리카 돼지열병(ASF) 바이러스에 감수성을 보이는 재조합 cell line 개발 (제 2 협동)	<ul style="list-style-type: none"> 아프리카 돼지열병(ASF) 바이러스 감수성 재조합 세포주 제작 	<ul style="list-style-type: none"> 외인성 돼지 CD163 과발현 재조합 세포주 제작 	<ul style="list-style-type: none"> 재조합 세포주 제작 완료. 멧돼지 대식세포/조직세포 유래 iPAM 세포주 불멸화 시도함.
	아프리카돼지열병(ASF) 백신 개발 위한 세포주 및 항원 평가 연구 (제 3 협동)	<ul style="list-style-type: none"> ASF 바이러스 국내 분리주 유전자 특성 분석 및 세포내 증식성 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 폐포대식세포에서 국내 분리주 증식 최적 조건 확립 국내 분리주의 유전자 분석하여 특징적으로 감별할 수 있는 부위를 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> 돼지 폐포대식세포에서 ASF 바이러스 분리 및 증식 최적 조건 확립 2019년 국내 분리 ASF 바이러스 14건 유전자 특성 분석 완료 VP72, MGF 505 9R/10R 등 5개 특정 부위 유전자 비교 분석

<3차년도>

구분 년도	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차 년도 (2021)	ASFV 바이러스 국제 네트워크 구축과 백신 항원주 개발/메커니즘 연구 및 백신 세포주 선별 (제 1 세부)	<ul style="list-style-type: none"> • 새로운 적응성/재조합 항원 개발 및 무혈청 부유형 동물세포 배양 공정 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • 베트남 발생 ASF 바이러스 관련 샘플 확보. • 적응/약독화된 ASFV 항원 개발(베트남과의 국제 공동연구) • 적응/약독화된 국내 ASFV 항원 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • ASFV 감수성 세포 CA-CAS-A-01 확보 • CA-CAS-A-01 세포를 활용한 국내외 ASF 항원 평가 • Adaptation된 국내 유래 ASF 항원 확보 및 유전자 변이 확인(검역본부 공동 연구) • 연천 ASF 분리주 활용한 inactivated vaccine 제작 완료 • 연천 ASF 바이러스 불활화 조건 확립 • 연천 ASF 바이러스 돼지 내 효능 평가 완료
			<ul style="list-style-type: none"> • 무혈청 부유형 동물세포배양 공정 확립 • 목적 항원 조작용 위한 CRISPR/Cas9 시스템 구축 (한국생명공학연구원) 	<ul style="list-style-type: none"> • CRISPR 기술을 활용한 약독화 후보군 확보(5개) • 선별된 재조합 바이러스의 유전자 삽입 확인 • 선별된 재조합 바이러스 유전형 분석
			<ul style="list-style-type: none"> • ASFV 특이 병원성 인자 특성 규명(충남대학교) 	<ul style="list-style-type: none"> • ASFV 병원성 인자(3종)의 발현에 따른 세포내 Interferon 및 NF-kB 관련 신호전달 체계 영향 분석 • ASFV 병원성 인자(3종)와 상호작용하는 숙주 단백질의 탐색 및 상호작용 확인
	아프리카돼지열병 바이러스에 감수성을 보이는 세포주 선별 (제 1 협동)	<ul style="list-style-type: none"> • 선별한 세포주에서 ASF 바이러스의 증식 연구 	<ul style="list-style-type: none"> • 돼지 신장유래 대식세포주를 이용한 ASF 바이러스 증식배양 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • 면역세포화합법과 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용한 바이러스 증식 분석
		<ul style="list-style-type: none"> • 아프리카돼지열병 발병 농장에서 병리학적 조사 및 역학 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 아프리카돼지열병바이러스에 감염된 돼지들에 대한 병리학 분석 수행 • 아프리카돼지열병 발병 농장에서 역학 분석 수행 	<ul style="list-style-type: none"> • 자돈, 육성돈, 모돈 세그먼트의 연령들에 대한 비교 병리 분석 • 아프리카돼지열병으로부터 회복한 동물에 대한 장기적인 추적 연구
아프리카 돼지열병(ASF) 바이러스에 감수성을 보이는 재조합 cell line 개발 (제 2 협동)	<ul style="list-style-type: none"> • ASF 바이러스 재조합 서브유닛 백신 항원 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 서브유닛 백신 항원 개발 체계 구축 	<ul style="list-style-type: none"> • ASF 바이러스 구조 단백질 클로닝 완료 • ASF 바이러스 재조합 단백질 항원 정제 및 농축 계속 • 재조합 백신 항원 후보 물질 선별 계속 	
아프리카돼지열병(ASF) 백신 개발 위한 세포주 및 항원 평가 연구 (제 3 협동)	<ul style="list-style-type: none"> • 국내 분리 ASF 바이러스를 이용하여 개발된 세포주 감수성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 개발된 세포주에 국내 분리주 접종하여 감수성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • CA-CAS-01-A 세포주에서 연천(Yc1)과 파주(Pj1) 분리 및 계대배양으로 감수성 확인 • 계대 배양에 따른 국내 분리 연천 ASF 바이러스 NGS 분석 완료 	
		<ul style="list-style-type: none"> • 계대 배양에 따른 국내 분리주의 유전자 변화 조사 		

<4차년도>

연구 기관	연구개발목표	개발내용	연구결과
<ul style="list-style-type: none"> 제 1 세부 (중앙백신연구소) 	<ul style="list-style-type: none"> 재조합/약독화 항원들의 발현 및 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ASFV 특이 병원성 인자 기전 규명(충남대학교) 	<ul style="list-style-type: none"> ASFV 특이 단백질들의 분자적 기전 규명 연구
		<ul style="list-style-type: none"> CRISPR 활용: 분석된 유전들에 대하여 적용 및 발현 (한국생명공학연구원) 	<ul style="list-style-type: none"> 충남대학교에서 선별된 목적 항원들에 대하여 CRISPR 기술 적용 ASF plasmid 제작 완료 CRISPR 재조합 ASF 항원 제작 완료
		<ul style="list-style-type: none"> 베트남 발생 ASF 바이러스 관련 샘플 확보. 	<ul style="list-style-type: none"> 베트남 분리주에 대한 CA_CAS-01_A 적응 항원 발굴 (KVL)
		<ul style="list-style-type: none"> 동물 모델에서의 재조합/약독화 항원들의 효력 평가를 통한 선별 	<ul style="list-style-type: none"> 약독화 항원에(ASFV_CAP-01) 대한 목적 동물에서의 안전성 및 방어능 평가 완료.
<ul style="list-style-type: none"> 제 1 협동 (서울대학교) 	<ul style="list-style-type: none"> ASF 실험 감염 모델 병인론 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ASFV 균주를 돼지에 실험적으로 감염시켜 경시적 병리 모델 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ASFV 실험 감염모델 병인론 연구
<ul style="list-style-type: none"> 제 2 협동 (경상국립대학교) 	<ul style="list-style-type: none"> ASF 바이러스 재조합 서브유닛 백신 항원 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 서브유닛 백신 항원 개발 체계 구축 	<ul style="list-style-type: none"> ASF 바이러스 재조합 단백질 항원 정제 및 농축 재조합 백신 항원 후보 물질 선별
<ul style="list-style-type: none"> 제3 협동 (검역본부) 	<ul style="list-style-type: none"> ASF 항원의 면역원성, 중화능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ASF 항원을 목적동물에 접종하여 면역혈청 생산 국내 분리주 등 ASF 바이러스에 대한 중화능 시험 	<ul style="list-style-type: none"> ASF 면역 혈청 확보(총 4회) 확보된 면역 혈청에 대한 평가 시스템 구축

<5차년도>

○ 연구개발 목표 및 결과

연구 기관	연구개발목표	개발내용	연구결과
<ul style="list-style-type: none"> 제 1 세부 (중앙백신 연구소) 	<ul style="list-style-type: none"> 아프리카 돼지 열병 (ASFV)에 대한 면역선별항원의 활용 	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 약독화 single 항원 확보 및 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 약독화 항원을 확보하고, 동물 모델에서의 안전성 및 방어능을 확인함.
		<ul style="list-style-type: none"> 면역선별항원/항체 생산 및 활용(한국생명공학연구원) 	<ul style="list-style-type: none"> 면역 선별 항원 제조 리액터 수준의 생산 가능 조건을 확립
		<ul style="list-style-type: none"> ASFV 특이 병원성 인자 기전 규명(충남대학교) 	<ul style="list-style-type: none"> ASFV 특이 단백질들의 분자적 기전규명 연구
<ul style="list-style-type: none"> 제 1 협동 (서울대학교) 	<ul style="list-style-type: none"> ASFV 백신 유효성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ASFV 백신 유효성 평가 가이드라인 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 임상학적, 면역학적, 바이러스학적, 병리학적 평가 등 4가지 항목에 관하여 세부 검사항목을 설정함.
<ul style="list-style-type: none"> 제 2 협동 (경상국립대학교) 	<ul style="list-style-type: none"> ASF 바이러스 재조합 서브유닛 백신 항원 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 서브유닛 백신 항원 개발 체계 구축 	<ul style="list-style-type: none"> ASF 바이러스 재조합 단백질 항원 정제 및 농축 재조합 백신 항원 후보 물질 선별
<ul style="list-style-type: none"> 제 3 협동 (검역본부) 	<ul style="list-style-type: none"> ASF 예방을 위한 국제적 백신 개발 지원 	<ul style="list-style-type: none"> 국내/외 ASF 바이러스에 대한 교차 면역 확인 	<ul style="list-style-type: none"> ASF 바이러스 국내 분리주 및 해외 표준주(조지아) ASF 바이러스 국내 분리주를 이용한 평가 시스템 구축

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2.1. ASFV 바이러스 국제 네트워크 구축과 백신 항원주 개발 및 백신 세포주 선별

- ▶ 신·변종 아프리카 돼지열병(ASFV) 바이러스 발생 국가와의 국제 협력 네트워크 구축 및 바이러스 메커니즘 연구
- 베트남과의 MOU 협약 체결.
 - Raho-6, NLU와의 세부적인 목표를 설정함.
 - 베트남 Raho-6와의 공동 연구 진행으로 국내 연구원들의 파견이 가능하게 됨으로써 ASF 백신 개발에 교두보를 마련함.



그림 4. 베트남(Raho-6와 Nong lam 대학교)와의 계약

- 베트남 발생 ASF 바이러스 관련 샘플 확보.
 - 현재 호치민 내 70%가 ASFV에 감염된 상태임.
 - Raho-6는 국내 검역원과 같은 기능을 담당하는 기관으로서 각 농가로 부터 ASFV 의심 검체들에 대하여 진단 의뢰를 받음.
 - Raho-6 기관에서 확보되는 ASF 의심 검체들은 혈액, 림프절, 각 조직(폐, 비장 등)들로 다양함 (매주 300건 이상의 의심 검체 확보됨).

- ASFV 발병 검체 확보 시스템 구축.

- Real-time (P72 유전자 검출)과 면역 염색(ASFV P30 antibody 사용)

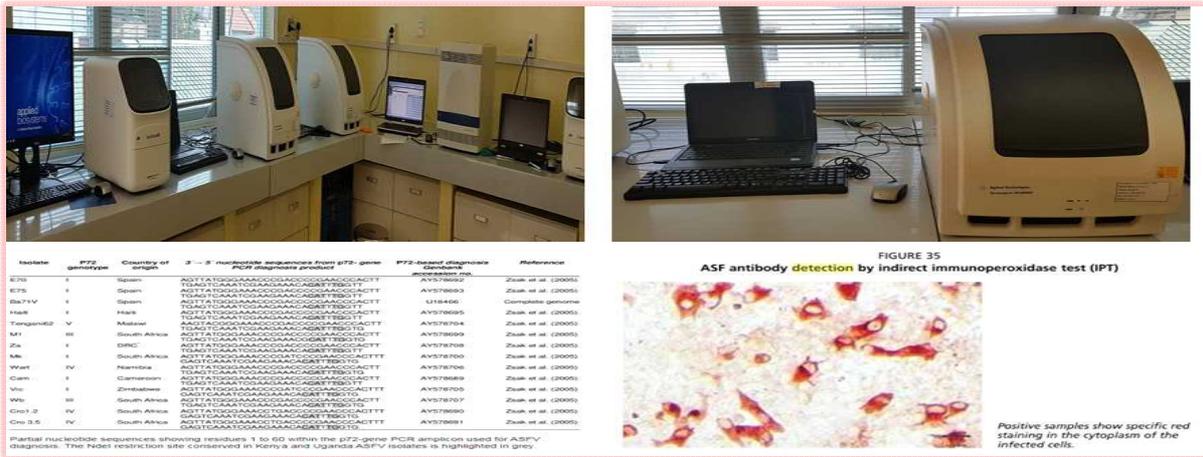
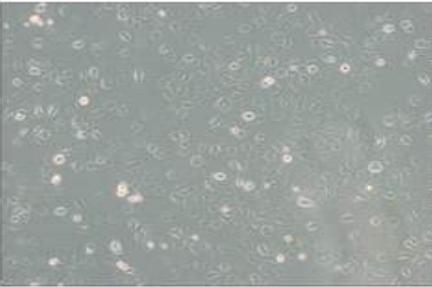


그림 5. ASFV 감작을 위한 시스템 확보 (real-time & 면역 염색 in Raho-6)

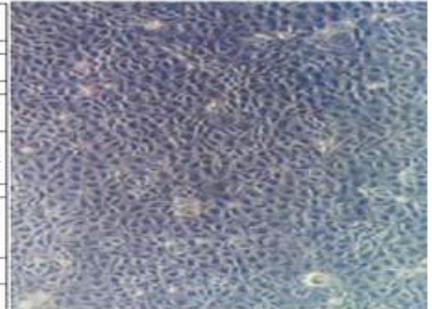
- ASFV 감수성 확인을 위한 각 cell line 확보

- 각 cell line에 대한 정보 (cell table 활용)

1. MARC-145	
Organism	Monkey
Tissue	Kidney
Product Format	frozen
Morphology	epithelial
Culture Properties	adherent
Biosafety Level	2 <i>Biosafety classification is based on U.S. Public Health Service Guidelines, it is the responsibility of the customer to ensure that their facilities comply with biosafety regulations for their own country.</i>
Age	embryo
Applications	This cell line is a suitable transfection host.
Storage Conditions	Liquid nitrogen vapor phase
Virus Susceptibility	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Simian rotavirus



2. MA-104	
Organism	Cercopithecus aethiops
Tissue	Kidney
Product Format	frozen
Morphology	epithelial
Culture Properties	adherent
Biosafety Level	1 <i>Biosafety classification is based on U.S. Public Health Service Guidelines, it is the responsibility of the customer to ensure that their facilities comply with biosafety regulations for their own country.</i>
Age	embryo
Applications	This cell line is a suitable transfection host.
Storage Conditions	Liquid nitrogen vapor phase
Virus Susceptibility	Simian rotavirus



3. Vero	
Organism	Cercopithecus aethiops
Tissue	Kidney
Product Format	Frozen
Morphology	epithelial
Culture Properties	Adherent
Biosafety Level	1 <i>Biosafety classification is based on U.S. Public Health Service Guidelines, it is the responsibility of the customer to ensure that their facilities comply with biosafety regulations for their own country.</i>
Age	Adult
Applications	This cell line can be used for the detection of verotoxin. This cell line can be used for efficacy testing. This cell line can be used to study malaria biology. This cell line can be used for media testing. This cell line can be used for mycoplasma testing. This cell line is a suitable transfection host. This cell line can be used for the detection of virus in ground beef.
Storage Conditions	Liquid nitrogen vapor phase
Virus Susceptibility	Human poliovirus, Getah virus, Poxuna virus, Ross River virus, Semliki Forest virus, Kokobera virus, Modoc virus, Guarao virus, Tacaribe virus, Tacaribe virus, SV-5 (parainfluenza type 2), SV40 virus, Measles virus, Rubella virus, Rubella virus, Reovirus type 2, Reovirus 3, Simian adenovirus 3

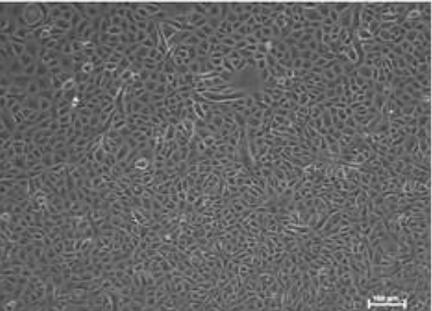
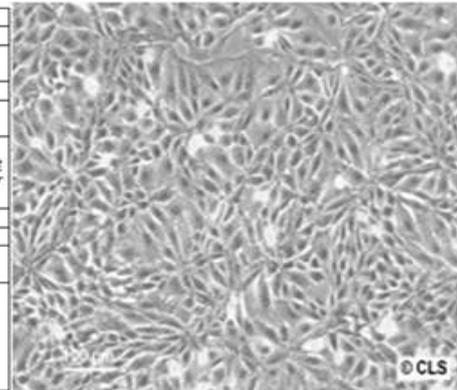


그림 6. Monkey kidney 유래 cell line

1. PK-15²

Organism ²	Sus Scrofa, pig ²
Tissue ²	Kidney ²
Product Format ²	Frozen ²
Morphology ²	Epithelial ²
Culture Properties ²	Adherent ²
Biosafety Level ²	1 ² Biosafety classification is based on <u>U.S. Public Health Service Guidelines</u> , it is the responsibility of the customer to ensure that their facilities comply with biosafety regulations for their own country ²
Age ²	Adult ²
Applications ²	This cell line is a suitable transfection host. ²
Storage Conditions ²	Liquid nitrogen vapor phase ²
Virus Susceptibility ²	Classical swine fever virus , Classical swine fever virus ² African swine fever virus ² Vesicular stomatitis, Glasgow (Indiana) ² Vesicular stomatitis, Orsay (Indiana) ² Vaccinia virus ² Human adenovirus 4, 5; Human Coxsackievirus B2, B3, B4, B5, B6. ²



2. Porcine alveolar macrophages (PAMs) cell line²

Organism ²	Sus Scrofa, pig ²
Tissue ²	lung ²
Product Format ²	Frozen ²
Morphology ²	macrophage ²
Culture Properties ²	Adherent ²
Biosafety Level ²	1 ² Biosafety classification is based on <u>U.S. Public Health Service Guidelines</u> , it is the responsibility of the customer to ensure that their facilities comply with biosafety regulations for their own country ²
Age ²	8-week-old ²
Applications ²	This cell line is a suitable transfection host. ²
Storage Conditions ²	Liquid nitrogen vapor phase ²
Virus Susceptibility ²	Classical swine fever virus , Classical swine fever virus ² African swine fever virus ²

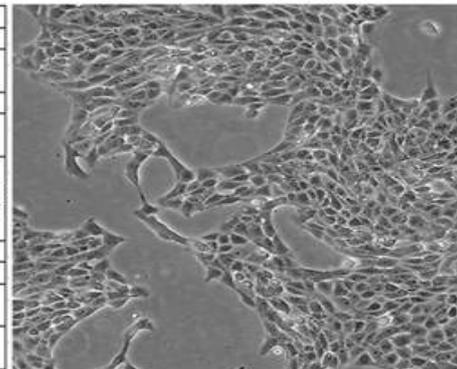
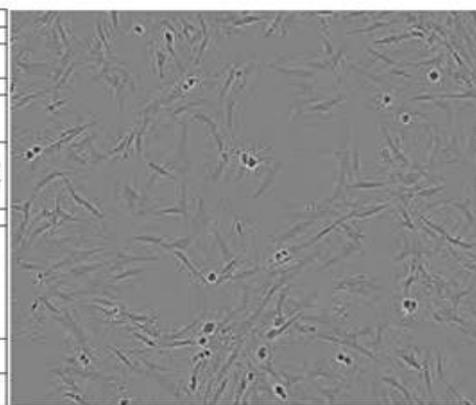


그림 7. Porcine 유래 cell line

1. BHK²

Organism ²	<i>Mesocricetus auratus</i> , hamster, Syrian golden ²
Tissue ²	Kidney ²
Product Format ²	frozen ²
Morphology ²	Fibroblast ²
Culture Properties ²	adherent ²
Biosafety Level ²	1 ² Biosafety classification is based on <u>U.S. Public Health Service Guidelines</u> , it is the responsibility of the customer to ensure that their facilities comply with biosafety regulations for their own country ²
Age ²	1 day old newborn ²
Applications ²	The World Organization for Animal Health (OIE) uses these ² cells for routine diagnosis of rabies. ² This cell line has been used as a host for transformation ² with expression vectors containing selectable and amplifiable ² marker DNAs. ²
Storage Conditions ²	Liquid nitrogen vapor phase ²
Virus Susceptibility ²	Human adenovirus 25, Reovirus 3, Vesicular stomatitis virus, Human poliovirus 2 ²



2. NG108²

Organism ²	<i>Mus musculus (neuroblastoma)</i> , mouse (<i>neuroblastoma</i>), rat (<i>glioma</i>) ²
Tissue ²	Brain ²
Product Format ²	frozen ²
Morphology ²	flat, round, 10 to 100 micrometers diameter ²
Culture Properties ²	Adherent, but please note: as the culture media becomes acidic ² these cells begin to detach and grow as a suspension, ² but they will typically reattach again when fresh medium is added. ²
Biosafety Level ²	1 ² Biosafety classification is based on <u>U.S. Public Health Service Guidelines</u> , it is the responsibility of the customer to ensure that their facilities comply with biosafety regulations for their own country ²
Applications ²	This cell line is a suitable transfection host. ²
Storage Conditions ²	Liquid nitrogen vapor phase ²
Virus Susceptibility ²	Rabies ²

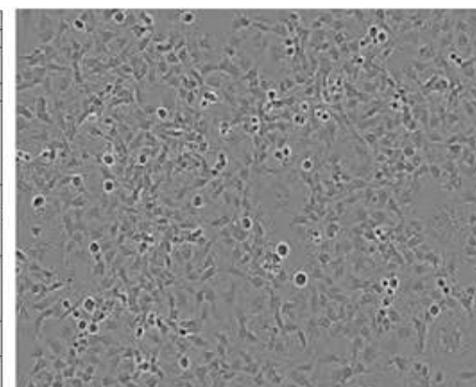


그림 8. Other 유기체 유래 cell line

- 베트남 발생 ASF 바이러스 관련 지속적인 샘플 확보(Raho-6 & Nong lam University 협동).
- 현재 호치민 내 70%가 ASFV에 감염된 상태임.
- Raho-6는 국내 검역원과 같은 기능을 담당하는 기관으로서 각 농가로 부터 ASFV 의심 검체들에 대하여 진단 의뢰를 받음.
- Raho-6 기관에서 확보되는 ASF 의심 검체들은 혈액, 림프절, 각 조직(폐, 비장 등)들로 다양함 (매주 300건 이상의 의심 검체 확보됨).
- 2020년 코로나 19로 장기간 shut down 되었고, 현재 2020년 sample로 확보된 것은 1, 2, 9, 10월으로 약 4개월간의 ASF 의심 sample을 확보 및 진단 함.
- Longnam 대학교 또한 코로나 19로 장기간 shut down 되었고, ASF 발생 농장들에 방문하여 돼지의 임상학적 상태를 모니터링 하고 있으며, 병리학적 실험을 병행하여 향후 백신에 대한 효능 평가 수행 대비.

▶ ASF 항원 선정 및 세포주 선별과 백신관련 재조합 기반 연구

- 동물 바이러스 감염성 세포의 ASFV 감수성 확인 및 선별
- ✓ 여러 세포 내 ASF 감수성 비교 (Real-time PCR, ALA test)
- PAM-KNU cell 결과 : 각각의 조직 sample을 PAM cell에 감염시켜 CT value를 확인한 결과, Lung/Blood mix에서 Lymph node mix 보다 많은 특이적인 유전자양이 확인되었다. 조직 sample을 감염시키지 않은 1-7(Negative control)유전자 발현양은 CT value 35.4로 다른 세포의 negative control(<45)과 비교하여 비 특이적인 반응을 보였음.

Table 1. PAM-KNU cell에서의 ASFV 감수성 비교결과

Cell	Sample No.	Challenge Sample	CT-value
PAM-KNU	1-1	Lung/Blood mix	24.41
	1-2		22.79
	1-3		23.79
	1-4	Lymph node mix	29.72
	1-5		25.53
	1-6		30.9
	1-7	Negative control	35.4
Lung/Blood mix original			17.19
Lymph node mix original			18.75

- PAM-KNU cell에서 ASFV 의심 sample을 감염 시킨 결과, Negative control에 비하여 세포 질에서 ASFV P30 단백질이 검출되었음.

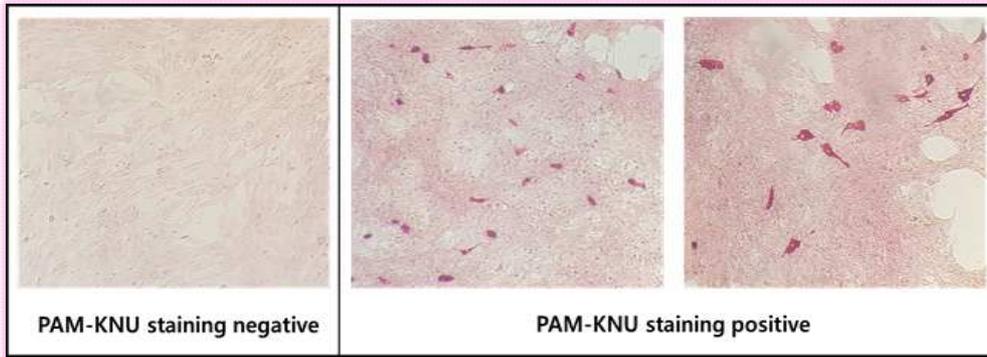


그림 9. PAM_KNU cell line 내 ASFV P30 감작 결과

- PK-15 cell 결과 : PK-15 cell에서 ASFV 의심 sample을 감염 시킨 결과, Lung/Blood mix 에서 Lymph node mix 보다 많은 유전자 발현양이 검출 되었으며, Negative control의 >45 CT-value에 비하여 감염시킨 그룹들은 22.81~30.89로 낮은 CT-value를 나타냈음.

Table 2. PK-15 cell에서의 ASFV 감수성 비교

Cell	Sample No.	Challenge Sample	CT-value
PK-15	2-1	Lung/Blood mix	23.68
	2-2		22.81
	2-3		24.25
	2-4	Lymph node mix	26.53
	2-5		25.86
	2-6		30.89
	2-7	Negative control	>45
Lung/Blood mix original			17.19
Lymph node mix original			18.75

- PK-15 cell에서 ASFV 의심 sample을 감염 시킨 결과, P30 항체의 비특이적 결합이 많고 cell 의 condition이 좋지 못하여 염색이 확실히 보이지는 않지만 Negative control에 비하여 세포 질에서 ASFV P30 단백질이 소량 검출되었음.

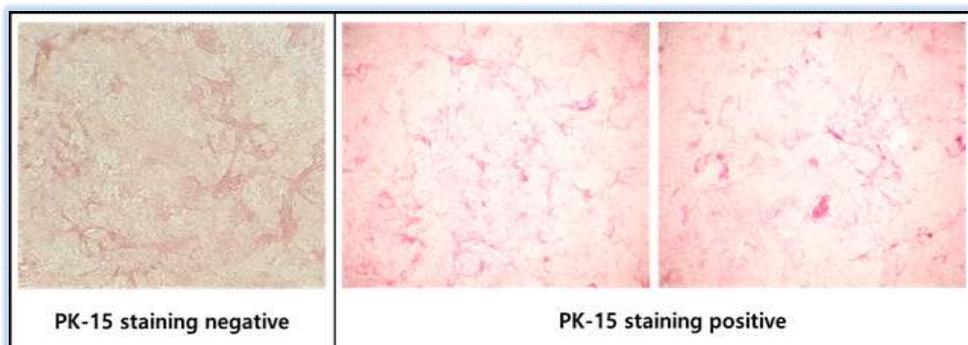


그림 10. PK-15 cell line 내 ASFV P30 감작 결과

- Vero cell 결과 : Vero cell에서 ASFV 의심 sample을 감염 시킨 결과, Lung/Blood mix에서 Lymph node mix 보다 많은 유전자 발현양이 검출 되었고, Negative control의 >45 CT-value에 비하여 감염시킨 그룹들은 24.44~31.68로 낮은 CT-value를 나타냈음.

Table 3. Vero cell에서의 ASFV 감수성 비교

Cell	Sample No.	Challenge Sample	CT-value
Vero	3-1	Lung/Blood mix	25.53
	3-2		25.31
	3-3		24.44
	3-4	Lymph node mix	30.83
	3-5		28.33
	3-6		31.68
		3-7	Negative control
Lung/Blood mix original			17.19
Lymph node mix original			18.75

- Vero cell에서 ASFV 의심 sample을 감염 시킨 결과, P30 항체의 비특이적 결합이 많고 cell의 condition이 좋지 못하여 염색이 확실히 보이지는 않지만 Negative control에 비하여 세포질에서 ASFV P30 단백질이 소량 검출되었음.

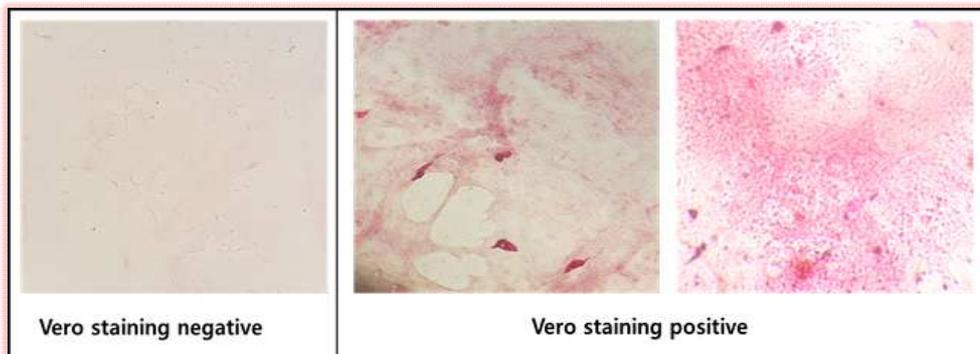


그림 11. Vero cell line 내 ASFV P30 감작 결과

- Marc145 cell 결과 : Marc145 cell에서 ASFV 의심 sample을 감염 시킨 결과, Lung/Blood mix에서 Lymph node mix 보다 많은 유전자 발현양이 검출 되었고, Negative control의 >45 CT-value에 비하여 감염시킨 그룹들은 22.15~30.49로 낮은 CT-value를 나타냈음.

Table 4. Marc145에서의 ASFV 감수성 비교

Cell	Sample No.	Challenge Sample	CT-value
Marc145	4-1	Lung/Blood mix	22.15
	4-2		23.13
	4-3		24.52
	4-4	Lymph node mix	28.07
	4-5		23.72
	4-6		30.49
		4-7	Negative control
Lung/Blood mix original			17.19
Lymph node mix original			18.75

- Marc145 cell에서 ASFV 의심 sample을 감염 시킨 결과, Negative control에 비하여 세포질

에서 ASFV P30 단백질이 검출되었음.

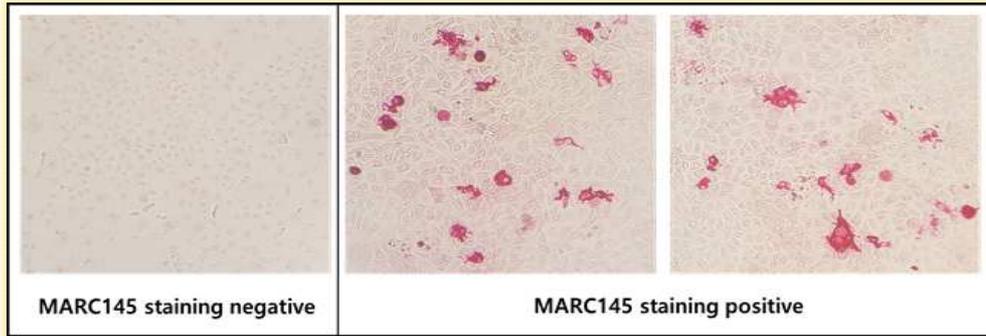


그림 12. Marc145 cell line 내 ASFV P30 감작 결과

- MA104 cell 결과 : MA-104 cell에서 ASFV 의심 sample을 감염 시킨 결과, Lung/Blood mix에서 Lymph node mix 보다 많은 유전자 발현양이 검출 되었으며, Negative control의 >45 CT-value에 비하여 감염시킨 그룹들은 20.87~31.13로 낮은 CT-value를 나타냈음.

Table 5. MA104에서의 ASFV 감수성 비교

Cell	Sample No.	Challenge Sample	CT-value
MA104	5-1	Lung/Blood mix	21.55
	5-2		20.87
	5-3		23.23
	5-4	Lymph node mix	27.99
	5-5		23.23
	5-6		31.13
	5-7	Negative control	>45
Lung/Blood mix original			17.19
Lymph node mix original			18.75

- MA104 cell에서 ASFV 의심 sample을 감염 시킨 결과, Negative control에 비하여 세포질에서 ASFV P30 단백질이 다량 검출되었음.

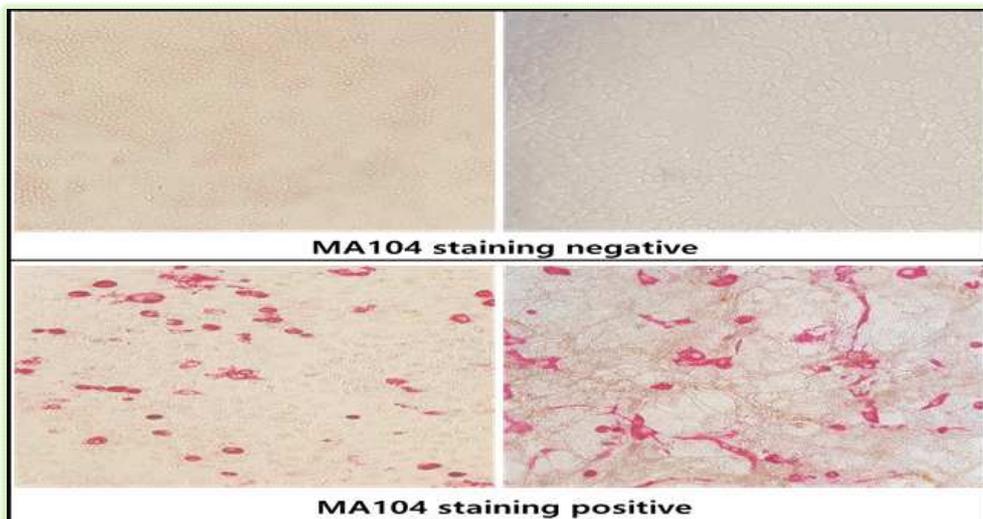


그림 13. MA104 cell line 내 ASFV P30 감작 결과

- BHK-tail (CD163) cell 결과 : Marc145 cell에서 ASFV 의심 sample을 감염 시킨 결과, Lung/Blood mix에서 Lymph node mix 보다 많은 유전자 발현양이 검출 되었고, Negative control의 >45 CT-value에 비하여 감염시킨 그룹들은 25.16~31로 낮은 CT-value를 나타냈음.

Table 6. BHK-tail.CD163에서의 ASFV 감수성 비교

Cell	Sample No.	Challenge Sample	CT-value
BHK-tail	6-1	Lung/Blood mix	27.3
	6-2		26.49
	6-3		25.16
	6-4	Lymph node mix	27.68
	6-5		29.63
	6-6		31
		6-7	Negative control
Lung/Blood mix original			17.19
Lymph node mix original			18.75

- BHK-tail(CD163) cell에서 ASFV 의심 sample을 감염 시킨 결과, Negative control에 비하여 cell 모두 떨어져 염색으로 인한 세포 감수성을 확인 할 수 없었음.

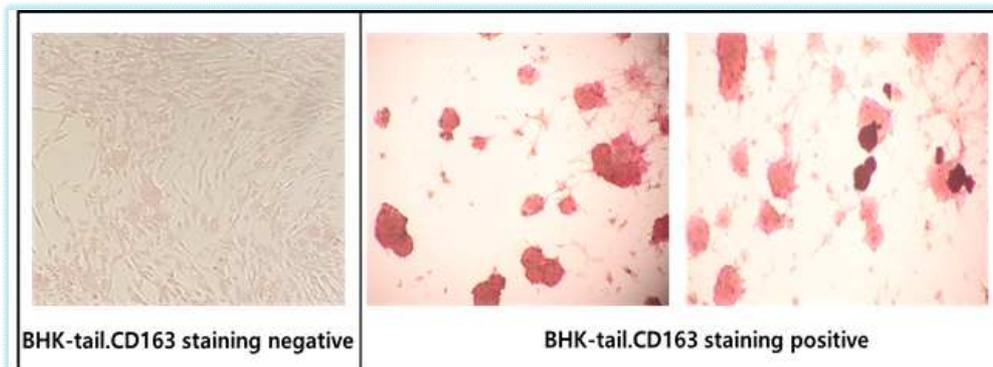


그림 14. BHK-tail(CD163) cell line 내 ASFV P30 감염 결과

- 베트남 최신 발생 ASF 감수성 세포주 Single clon화_CAS_01
- ASF 바이러스에 높은 감수성을 보이는 cell(MA104, MARC145, Vero, Cos)을 선별하기 위하여 여러 cell들에 대하여 single cloning하여 감염 실험한 결과 original cell 보다 높은 감수성을 보이는 Single cell(CAS_01)을 확보(Fig.7) 하였음.

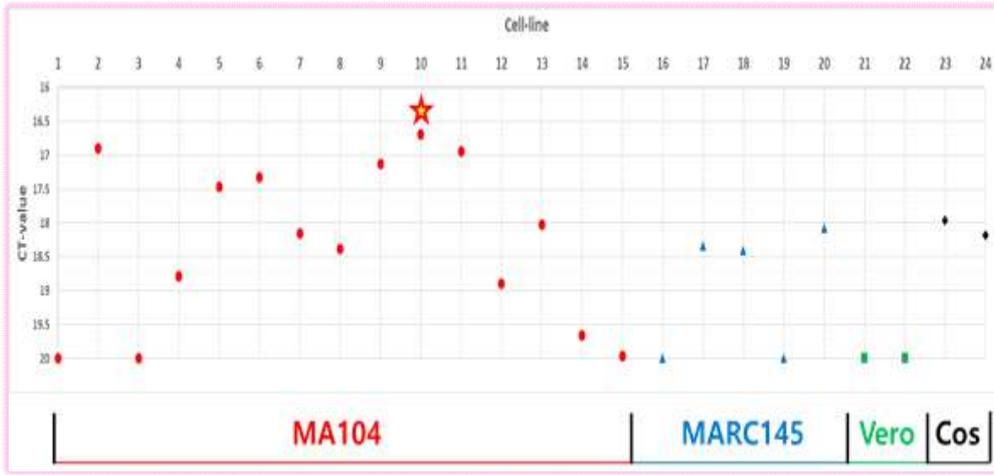


그림 15. ASF 바이러스에 대한 감수성이 높은 Cell clone 선별

● 베트남 최신 발생 ASF 바이러스주 분리

- Blood에서 ASFV 분리 실험을 진행하였다. ASF 바이러스에 대한 세포별 첫 번째 감염에 대한 Real-time PCR 결과는 각 세포 및 배지별 평균CT value 기준으로 20.87이었고, MA104에서 11번 계대(Fig.8) 한 결과 바이러스의 증식성이 올라간 것을 확인하였음(CT value : 13.95, about 1 x 10⁷TCID₅₀/mL).

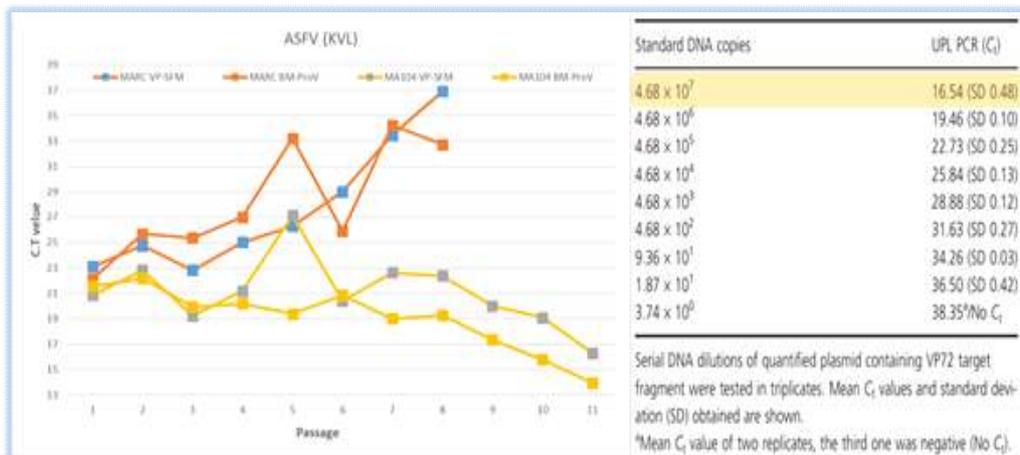


그림 16. MA104-original cell line에서의 ASF-KVL 바이러스 계대

▶ 새로운 적응성/재조합 항원 개발 및 항원 단백질 고발현 시스템 구축(무혈청 부유형 동물세포 배양 공정 확립)

● 베트남 발생 ASF 바이러스 관련 지속적인 샘플 확보(Raho-6 & Nong lam University 협동).

- 현재 호치민 내 70%가 ASFV에 감염된 상태임.
- Raho-6는 국내 검역원과 같은 기능을 담당하는 기관으로서 각 농가로 부터 ASFV 의심 검체들에 대하여 진단 의뢰를 받음.
- Raho-6 기관에서 확보되는 ASF 의심 검체들은 혈액, 림프절, 각 조직(폐, 비장 등)들로 다양함 (매주 300건 이상의 의심 검체 확보됨).
- Longnam 대학교 ASF 발생 농장들에 방문하여 돼지의 임상학적 상태를 모니터링 하고 있으며, 병리학적 실험을 병행하여 향후 백신에 대한 효능 평가 수행함.

● ASFV 감수성 cell line(CAS-01) 발굴 및 평가

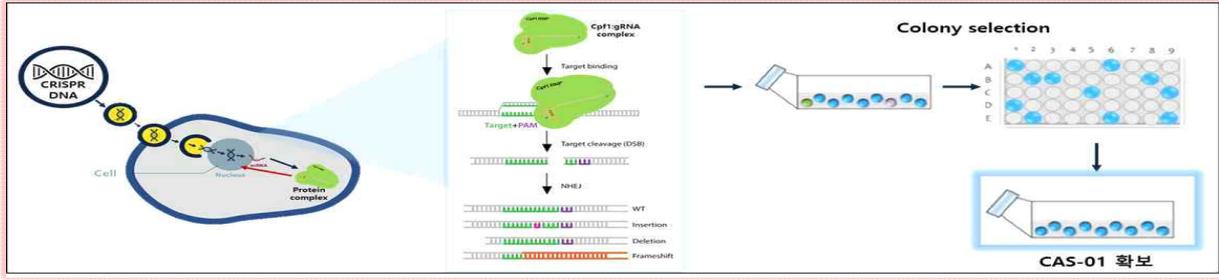


그림 17. CA-CAS-01-A 세포주 확보



그림 18. CA-CAS-01-A 유전자형 분석

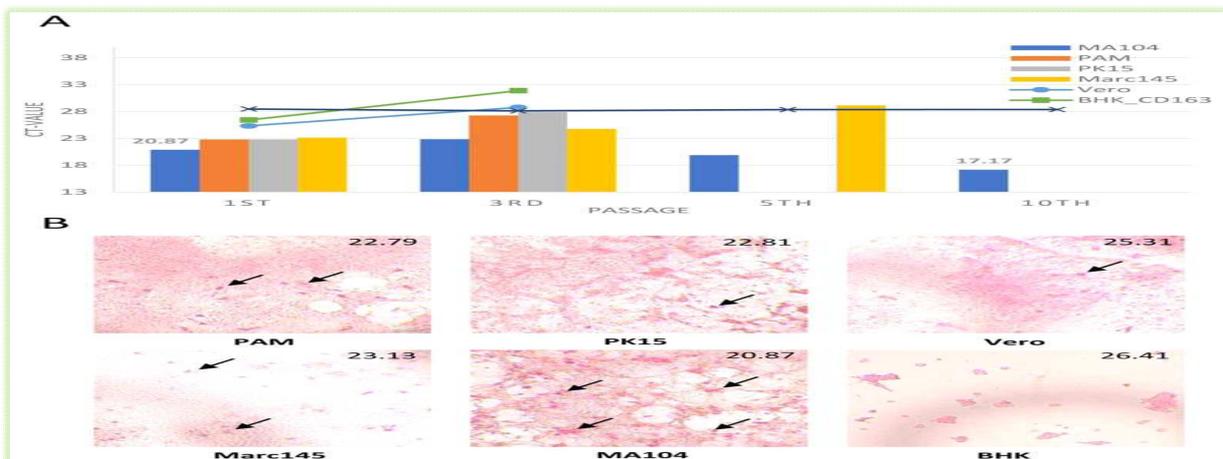


그림 19. 다양한 세포주 내 ASF 바이러스 감수성 확인 및 계대 배양

- 다양한 세포주의 아프리카돼지열병 바이러스(ASFV)에 대한 감수성 결과로 계대(passage)에 따른 각 세포주별 ASFV 유전자 발현 수준을 확인함.
- 각 세포별 감수성을 ASF 바이러스 P72 유전자를 real-time으로 측정하여 Ct값으로 나타내었으며, ASF 바이러스 P30 유전자로 염색하여, 바이러스가 세포질에서 관찰 되는 것을 확인함.

- 세포주별 동일 항원을 지속 계대한 결과 MA104에서 적응되는 것을 확인함.

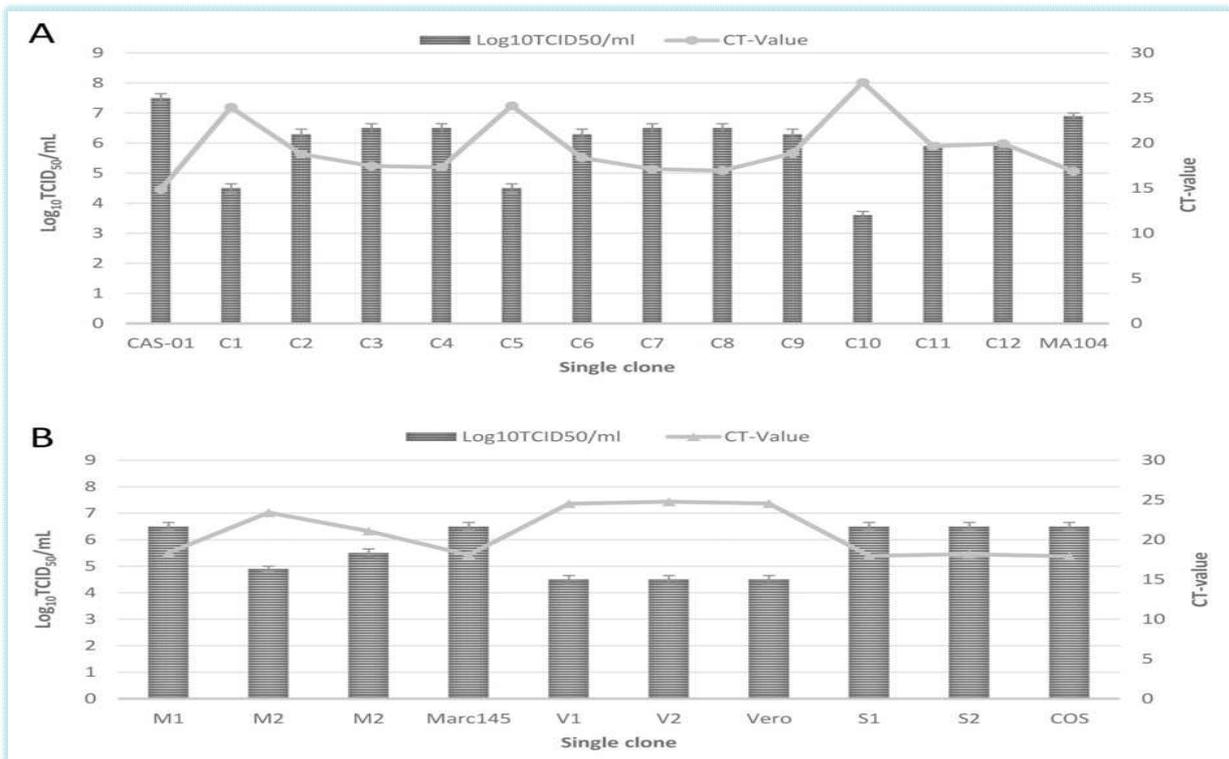


그림 20. ASF 바이러스 감수성 세포 내 single clone 분리

- MA104 모세포 및 MA104 유래 단일 세포 클론들의 ASFV에 대한 감수성을 Ct값과 TCID50로 확인한(7계대) 결과임.
- Marc145, Vero 및 COS 세포와 이들의 단일 세포 클론들의 ASFV에 대한 감수성을 확인함.
- 그 결과를 통하여 ASFV 감수성 세포를 최종 선별하였으며, CAS-01에서 증식성이 높은 것을 확인하였음.

● ASFV 감수성 cell line(CA-CAS-01-A) 활용한 국내외 항원 발굴

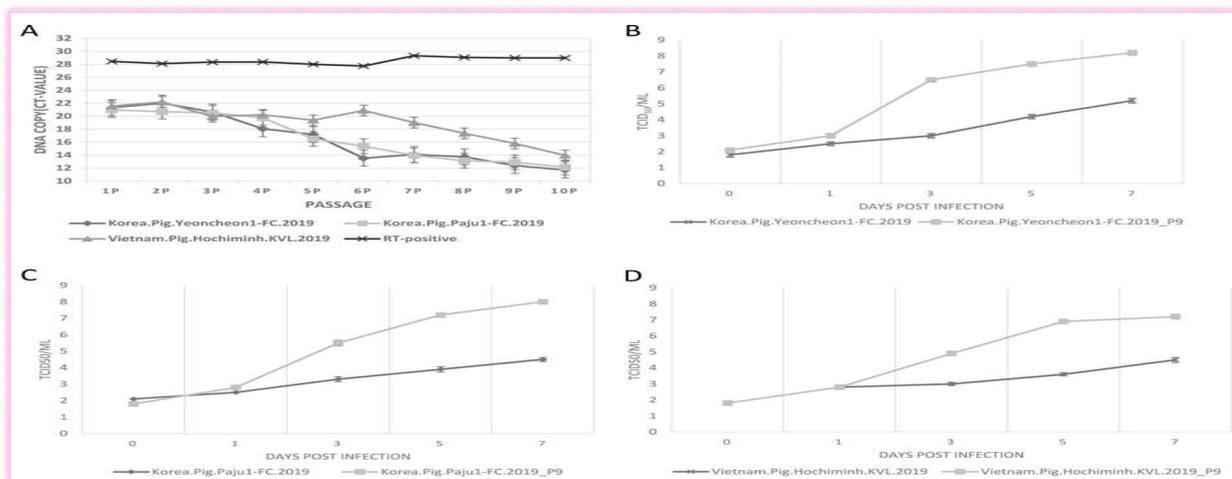


그림 21. CA-CAS-01-A를 활용한 바이러스 분리

- ASFV 감수성 세포주 (CA-CAS-01-A)를 통하여 국내 분리주 2종

(Korea.Pig.Yeoncheon1-FC.2019와 Korea.Pig.Paju1-FC.2019)과 베트남 분리주 1종 (Vietam.Pig.Hochiminh-KVL.2019)을 분리함.

- 계대배양 후 1, 2, 4, 6, 10 계대에 따른 세포 적응 과정을 ASF 바이러스 P30 유전자를 이용하여 확인하였고, 국내 분리 적응주 2종(Korea.Pig.Yeoncheon1-FC.2019_P10과 Korea.Pig.Paju1-FC.2019_P10)과 베트남 분리주 1종(Vietam.Pig.Hochiminh-KVL.2019_P10)을 확보함.

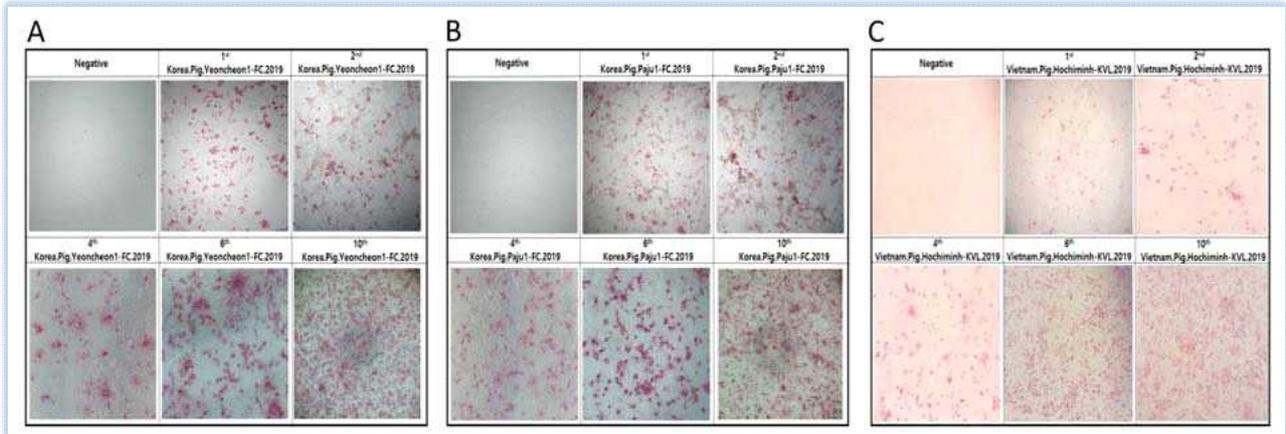


그림 22. CA-CAS-01-A를 활용한 adapted ASFV 항원 확보 (3주)

- 연천 ASF 분리주 활용한 inactivated vaccine 제작 및 항원 불활화

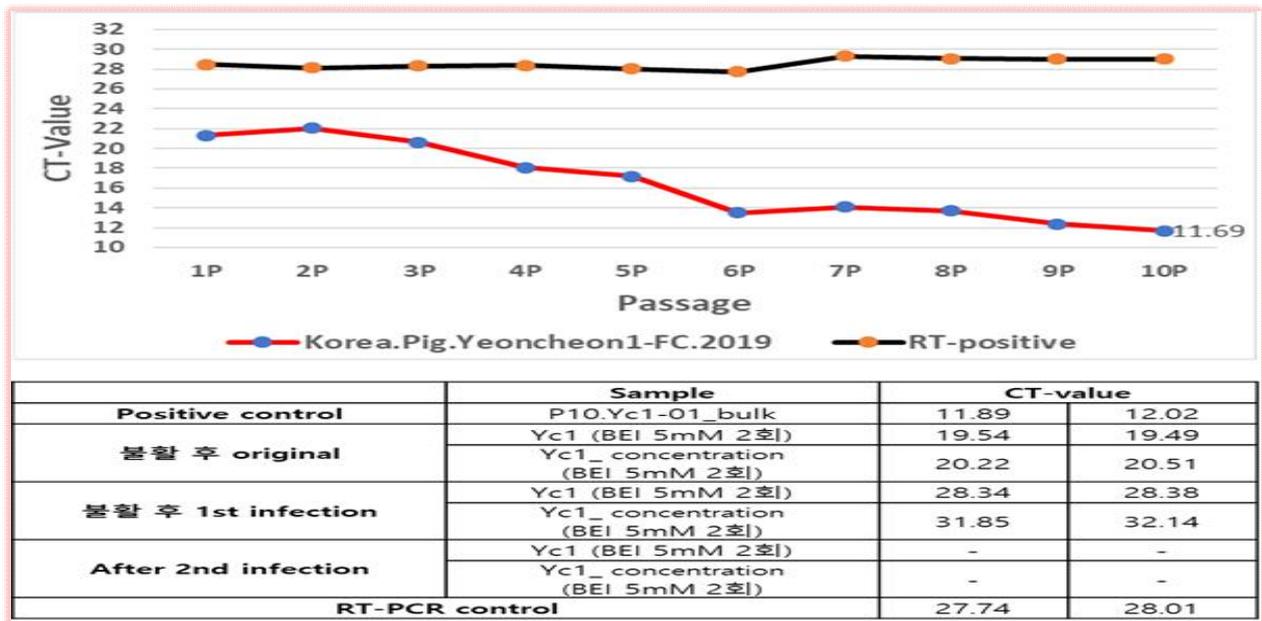


그림 23. Inactivated vaccine 항원 propagation 및 불활화 확인 시험

- ASFV 감수성 세포주 (CA-CAS-01-A)를 통하여 국내 분리주 Korea.Pig.Yeoncheon1-FC.2019 passage 10 sample을 활용하여, inactivated vaccine antigen을 제조하였으며, BEI를 이용하여 불활화 처리함.

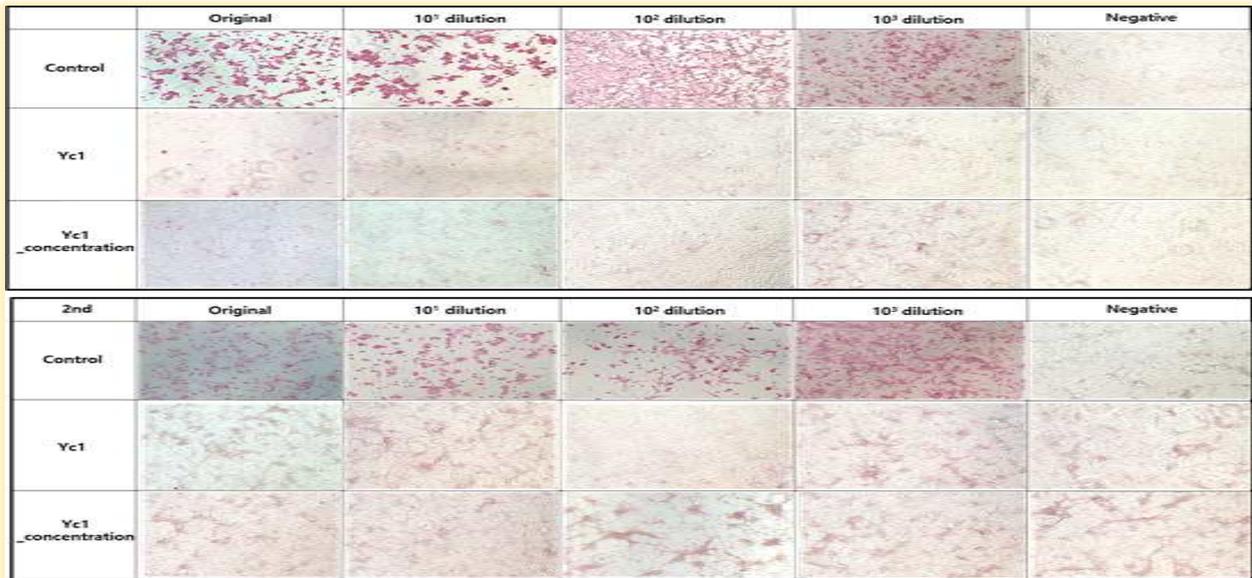


그림 24. 불활화 항원에 대한 1, 2차 세포 계대 감염 확인

- 연천 ASF 바이러스 돼지 내 효능 평가 완료
- ASFV 감수성 세포주 (CA-CAS-01-A)를 통하여 국내 분리주 Korea.Pig.Yeoncheon1-FC.20 19 passage 10 sample을 활용하여, inactivated vaccine antigen을 제조함.
- 중앙백신연구소에서 개발한 adjuvant를 활용하여 최종 불활화 백신 제조함.
- ASFV 불활화 백신을 1회 접종하고, 약 4주후에 공격접종을 실시함.
- ASFV 불활화 백신 접종 후에는 체온 증가, 식욕 부진과 활동성 감소 등 어떠한 임상증상도 보이지 않았음.
- 일반적으로 ASFV 백신 평가 시 2HAD/unit의 양으로 공격 접종을 실시하나, 국내에서 분리된 연천 바이러스의 병원성을 확인해보기 위하여 1, 3 HAD/unit으로 공격 접종함.
- 3 HAD로 공격 접종한 group에서는 백신 그룹에서 공격 접종 후 5일째부터 폐사가 일어났으며, 1HAD로 공격 접종한 group에서는 백신 그룹에서 공격 접종 후 7일째부터 폐사가 일어남.
- 백신 모든 그룹의 모든 개체가 폐사가 일어났으며, 백신 접종된 그룹에서 더 빨리 폐사가 일어나는 것을 확인함 (antibody dependent).
- 백신 모든 개체의 부검 결과 전형적인 ASF 바이러스 감염 소견을 보임.

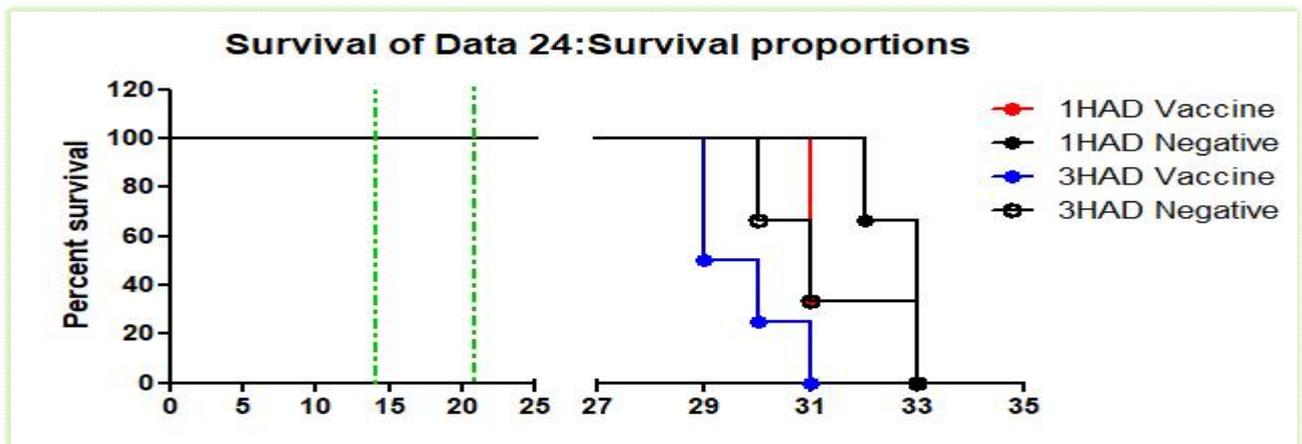


그림 25. ASFV inactivated vaccine 돼지 동물 평가 (생존율)

▶ 아프리카 돼지열병(ASFV) 재조합/약독화 항원들의 발현 및 평가와 활용



그림 26. ASFV_CAP-01 발굴 및 NGS 분석

- Deleted ASFV 항원 발굴(CA_CAS-01_A cell line 활용)
 - CA_CAS-01_A cell line 활용하여 연속계대 배양한 국내 연천 유래 ASF 분리주의 계대별 항원을 NGS로 비교 분석함.
 - 계대 별 ASFV 항원들을 비교한 결과, CA_CAS-01_A cell line에 적응이 됨에 따라 유전자의 deletion이 발생함을 확인함.
 - ASFV 선행 연구들과 비교 할 때 특정 cell line에 적응이 되면서 deletion이 유발되는 MGF 지역과 병원성 요인 유전자로 알려진 일부 유전자들이 소실됨을 확인함.
- Deleted ASFV_CAP-01 항원에 대한 동물 평가_검역 본부 공동 수행

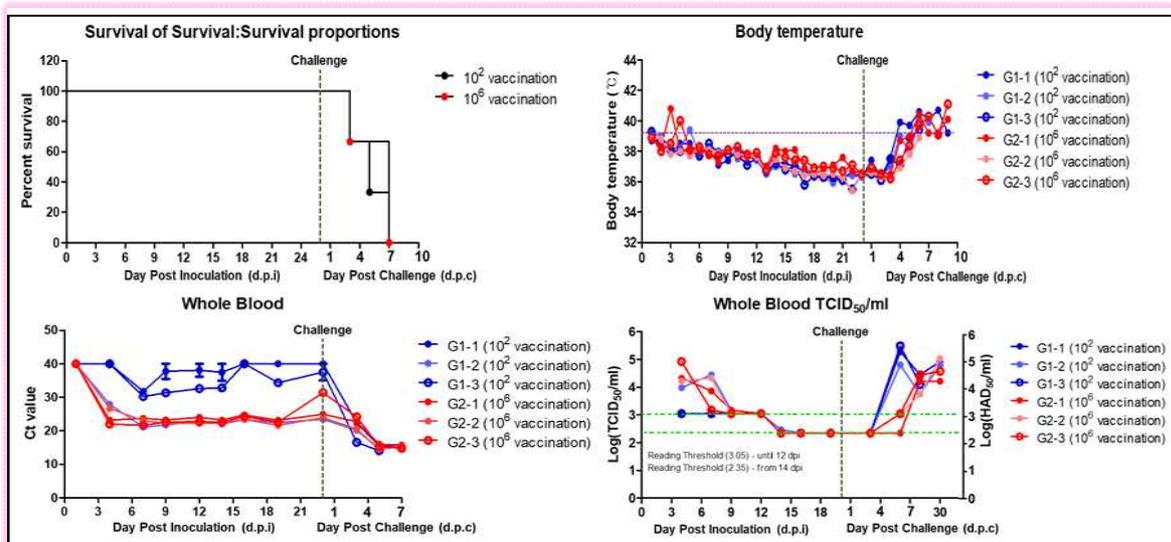


그림 27. ASFV_CAP-01 항원에 대한 안전성 및 방어능 평가(1차)

- ASFV_CAP-01 항원을 4주령 돼지에 단회 접종하여, 안전성 및 효능을 확인함.

- ASFV_CAP-01 항원을 10^2 TCID₅₀/ml과 10^6 TCID₅₀/ml로 접종한 결과, 두 농도 모두에서 3주간 폐사체가 발생하지 않았으며, 임상 증상 및 체온 증가 양상을 보이지 않음.
- Whole blood 내 ASFV 바이러스 역가를 CT-value와 TCID₅₀로 확인한 결과, 모든 그룹에서 양성 역가를 보여, 접종이 정상적으로 이뤄짐을 확인함.
- 하지만, 공격 접종 후 4~7일에 모든 개체에서 폐사가 발생함.
- ASFV_CAP-01 항원을 7주령 돼지에 단회 접종하여, 안전성 및 효능을 확인함.
- ASFV_CAP-01 항원을 10^6 TCID₅₀/ml로 접종한 결과, 모든 개체에서 4주간 폐사체가 발생하지 않았으며, 임상 증상 및 체온 증가 양상을 보이지 않음.
- Whole blood 내 ASFV 바이러스 역가를 CT-value로 확인한 결과, 모든 그룹에서 양성 역가를 보여, 접종이 정상적으로 이뤄짐을 확인함.
- 하지만, 공격 접종 결과 백신 접종군과 비접종군 모두에서 7~14일 이내에 모든 개체의 폐사가 발생함.
- ELISA를 통하여 ASF에 대한 항체를 측정된 결과, 공격 접종 전 ELISA 수치가 40 ~ 60% 이상인 개체는 G104, G105로 두 개체였고, 다른 개체들은 음성 판정 기준인 40% 이하로 측정됨.
- 위 결과 ASFV_CAP-01 항원은 유전자 소실에 의한 약독화가 진행되었으나, 공격 접종을 방어하기에는 역부족이라고 판단됨.

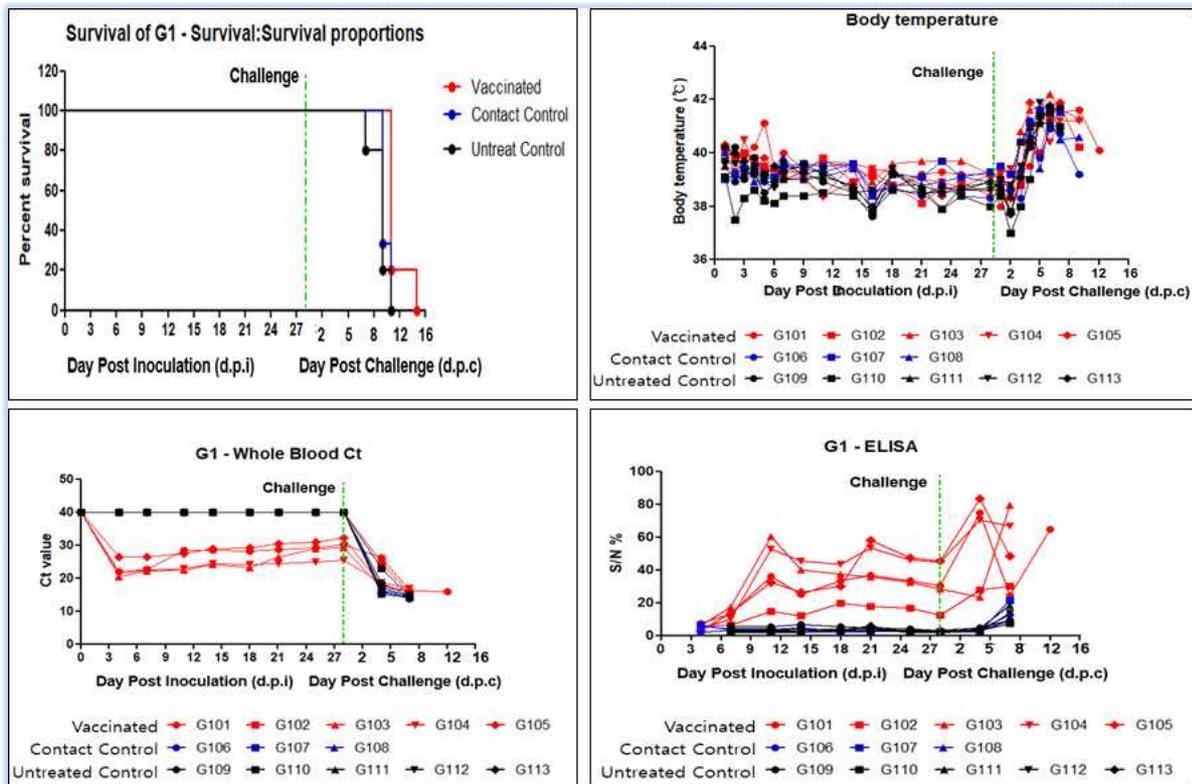


그림 28. ASFV_CAP-01 항원에 대한 안전성 및 방어능 평가(2차)

- ASFV_CAP-01 항원을 7주령 돼지에 2회 접종하여(Live + Live, Live + Killed), 안전성 및 효능을 확인함.
- ASFV_CAP-01 항원을 1, 2차 접종한 결과, 모든 개체에서 7주간 폐사체가 발생하지 않았으며, 임상 증상 및 체온 증가 양상을 보이지 않음.

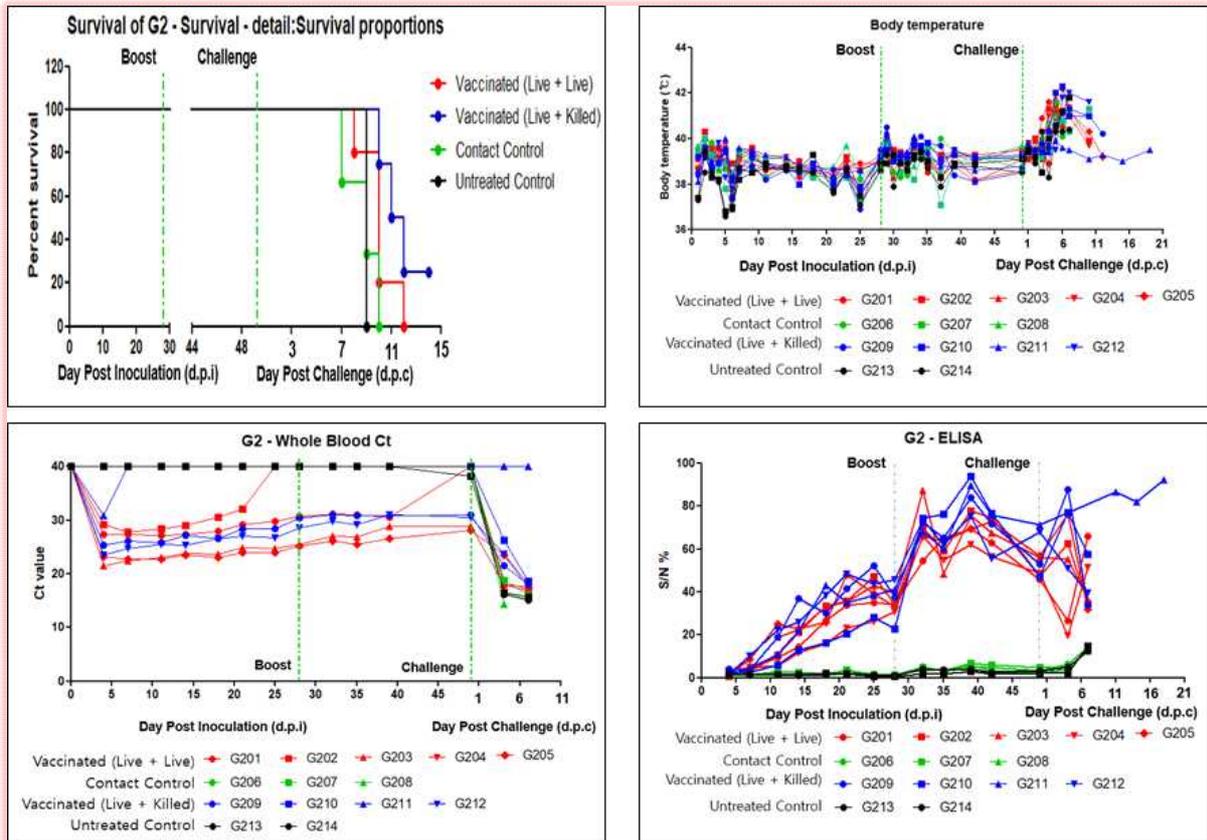


그림 29. ASFV_CAP-01 항원에 대한 안전성 및 방어능 평가(3차)

- Whole blood 내 ASFV 바이러스 역가를 CT-value로 확인한 결과, 모든 그룹에서 양성 역가를 보여, 접종이 정상적으로 이뤄짐을 확인함.
- 하지만 Live attenuated vaccine 2회 접종군은 ASFV.Korea.Paju1.2019 공격 접종에 모든 개체에서 폐사가 발생함.
- Mixed vaccine treated group (live attenuated + killed)은 3마리의 폐사가 발생하였으며, 1마리의 생존개체가 발생함.
- 또한, 상대적으로 mixed vaccine 접종군이 double shot live attenuated vaccine 접종군 보다 상대적으로 1~2일 생존 기간이 증가함.
- ELISA를 통하여 ASF에 대한 항체를 측정된 결과, 1차 접종 후에는 ELISA 수치가 20 ~ 60%로 일부 개체만 양성 판정 기준인 40% 이상으로 측정 되었으나, 2차 접종 후에는 모든 개체가 40% 이상으로 측정 되었으며, 일부 개체에서는 80% 이상의 값이 측정됨.
- 위 결과 ASFV_CAP-01 항원은 유전자 소실에 의한 완벽한 약독화가 진행되었으나, 공격 접종을 방어하기에는 역부족이며, 2회 접종에서만 부분적 방어를 보이는 것을 확인함.

- 베트남 국제공동 연구

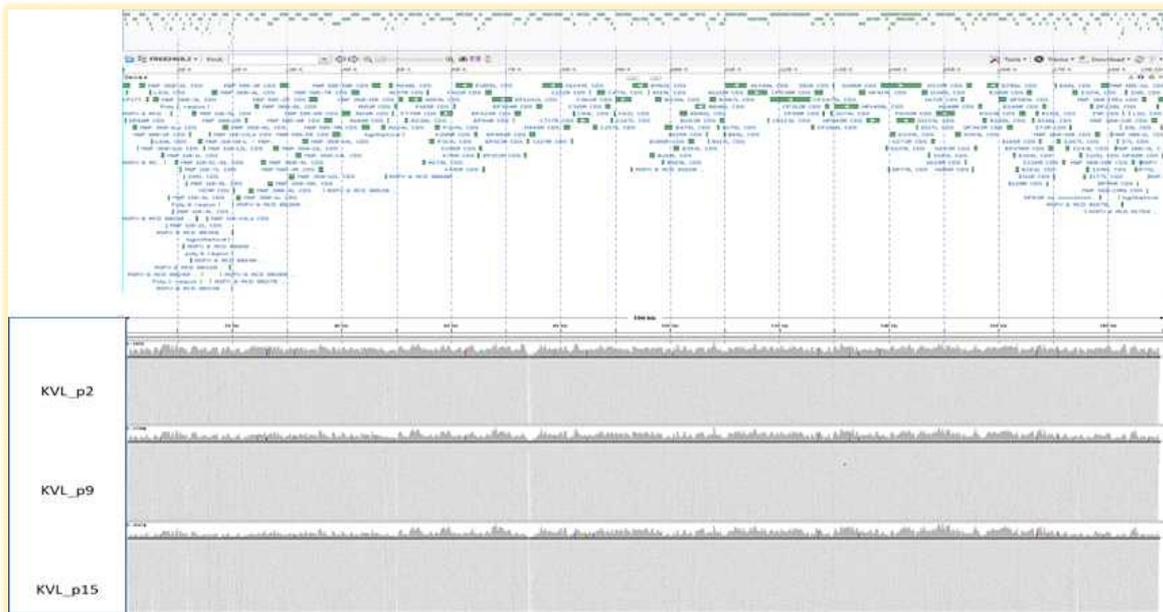


그림 30. CA_CAS-01_A 적응 베트남 호치민 유래 ASF 분리주 NGS 분석

CA_CAS-01_A cell line에서 호치민에서 분리된 ASFV 항원을 연속 계대 하였고, NGS 분석을 통하여 계대 별 유전자 서열을 분석함.

- 호치민에서 분리된 ASFV 항원은 지속 계대 내에서 유전자 결손이 발생하지 않음.

- 다양한 약독화 single 항원 확보 및 평가

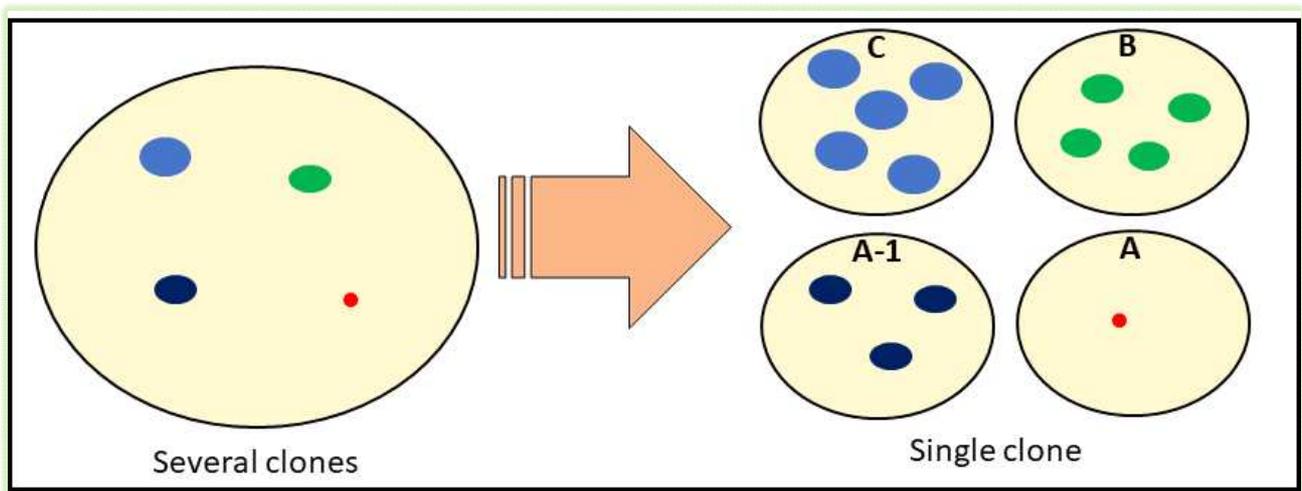


그림 31. 다양한 유전자 특성 갖은 항원들의 single clone화

- 선행 연구를 통하여 CA-CAS-01 cell line 적응 계대 시 다양한 유전자 특성을 갖은 다양한 항원들이 존재하며, 단일 유전자 서열의 single clone들을 발굴함.
- 향후 연계연구를 통하여 다양한 후보주들의 동물평가를 통하여, 안전하고 유효력을 갖고 있는 다양한 ASF 백신 후보주 발굴 가능함.
- 또한, 다양한 유전자 특성을 갖고 있는 후보주들의 특성을 분석하여 ASF 백신 개발의 기초 자료로 활용한 계획임.

▶ 재조합 ASFV 항원 제작 및 발현(CRISPR 활용)-한국생명공학연구원 공동 참여

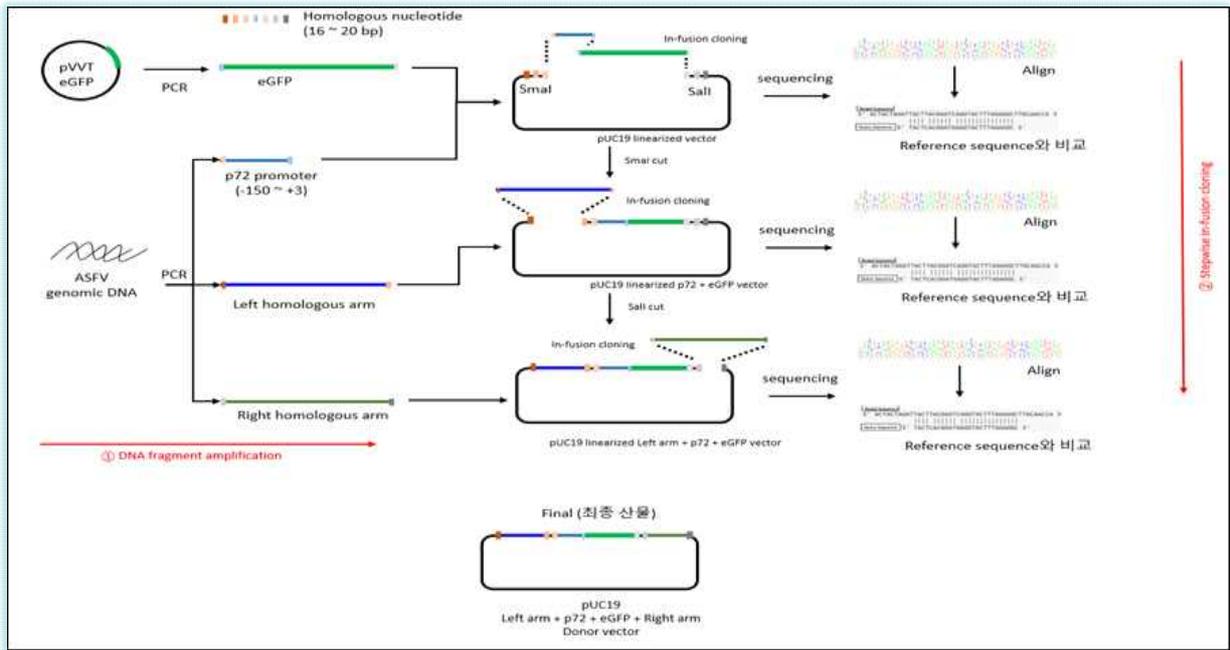


그림 32. Donor vector 제작 전략 모식도

- (주)진코어에서 제공된 pUC19 vector에 pVVT eGFP + p72 promoter를 In-fusion cloning 방법을 통하여 제작 후 ASFV target 유전자 삽입을 위한 특정 left와 right arm을 추가로 cloning함.
- 각 단계별 reference sequence와 비교하여 확인하였고, 최종적으로 pUC19 Left arm + p72

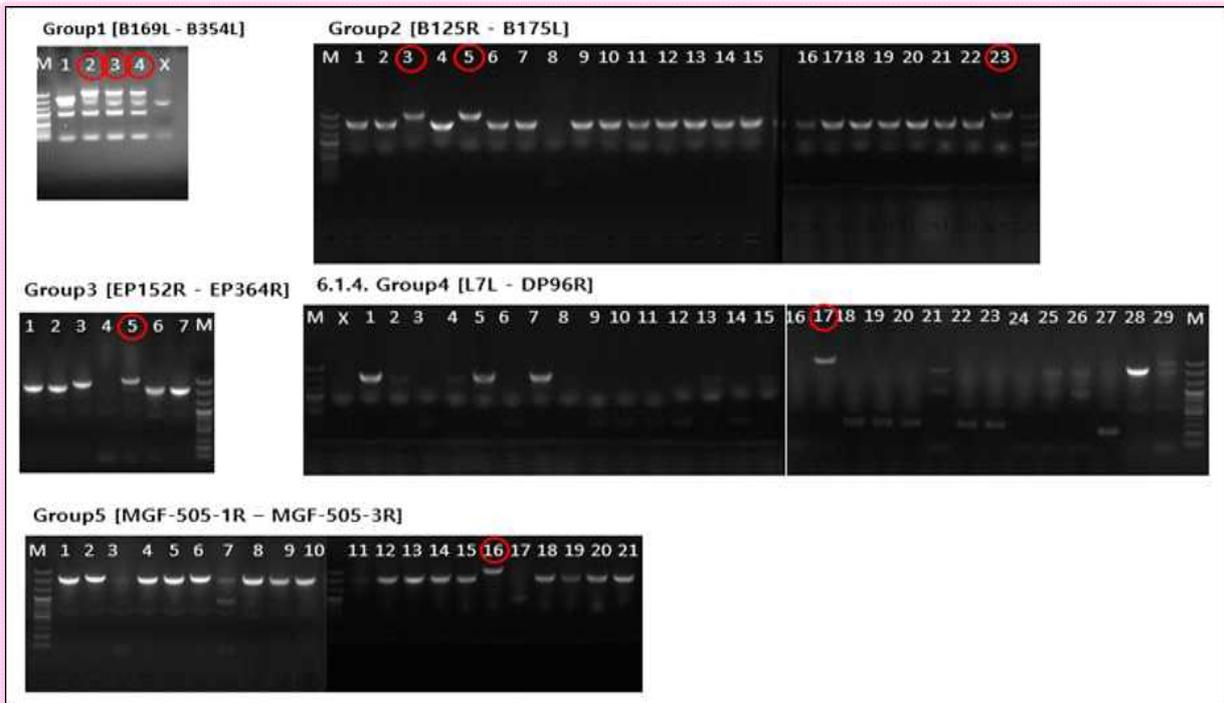


그림 33. ASF target 유전자 별 Colony PCR 확인

+ eGFP + Right arm Donor vector를 제작함.

- ASF 바이러스 deletion에 사용될 5개 groups의 Plasmid 모두 제작 완료됨.
- 검역본부 BSL3 내 ASF 바이러스 infection과 ASF deletion 관련 plasmid의 transfection을 통한 발현을 확인함(GFP 발현).
- 초기 GFP 발현양 대비 ASFV 감염에 의해 죽는 세포가 많아 바이러스 감염량과 plasmid tran

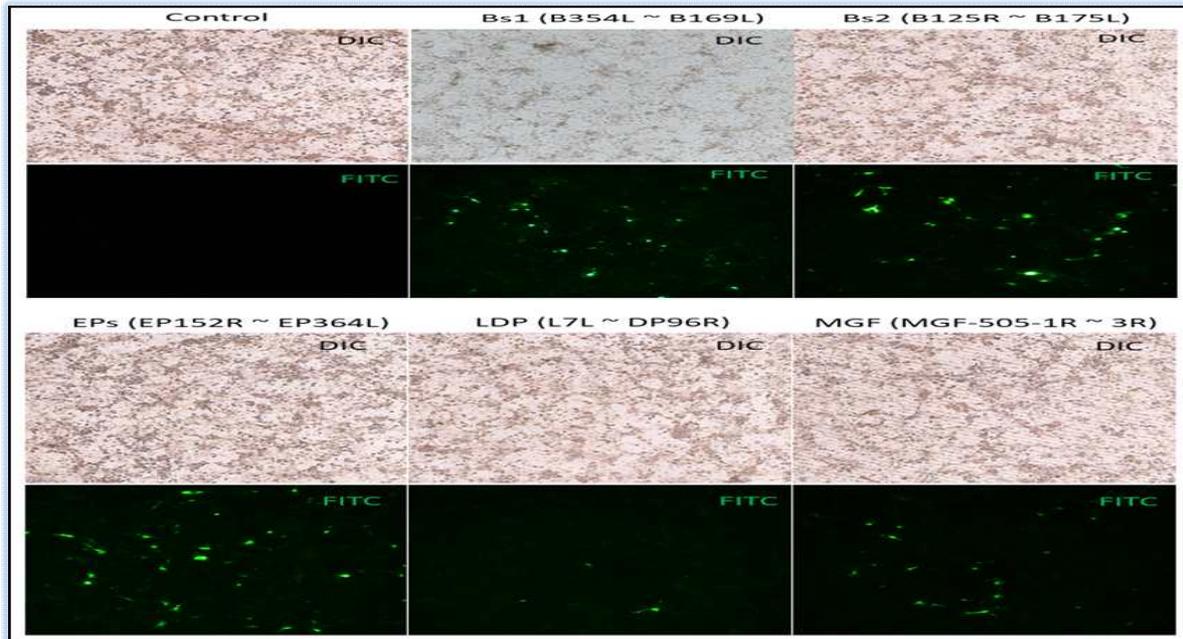


그림 34. GFP expressed Donor transfection & ASFV infection condition

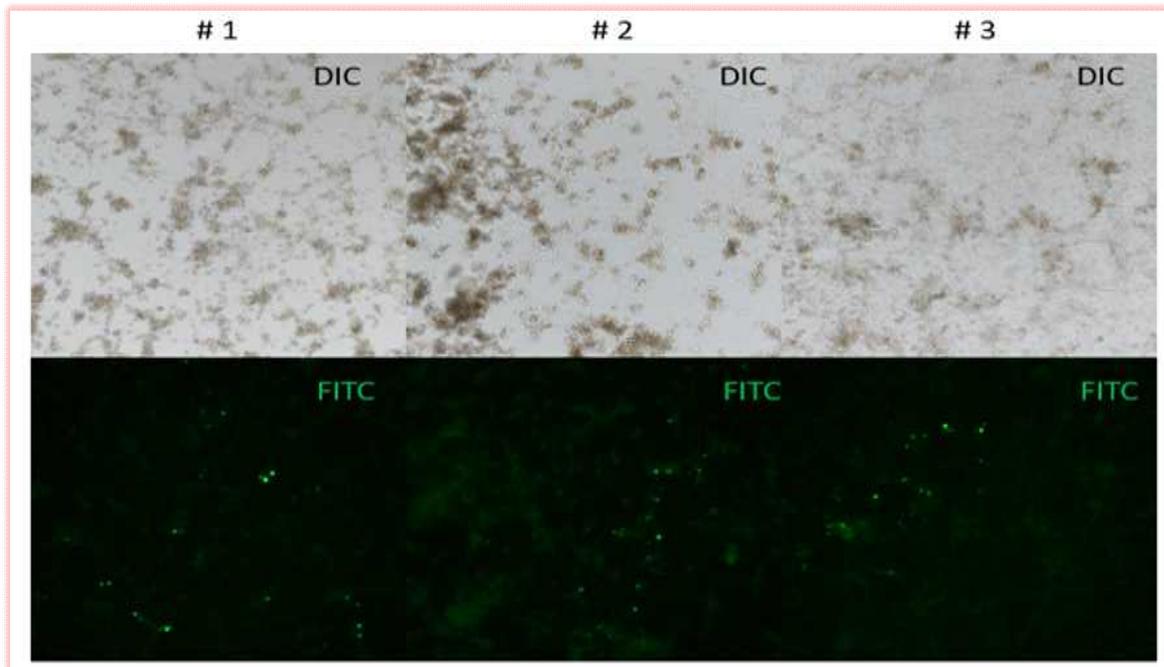


그림 35. GFP expression by infection of recombinant ASFV contained harvested media
sfection 농도를 조절함.

- Transfection을 통하여 GFP를 확인하고, 획득한 재조합 ASFV가 포함된 배지를 계대 배양하여 지속적으로 GFP를 보이는 세포가 존재하는지 확인한 결과 GFP를 보이는 세포를 확인함.
- 상대적으로 많은 세포가 사멸이 되고, GFP를 나타내는 세포는 3% 내외로 관찰이 되어 CRISPR/Cas9 적용을 하여도 재조합 ASFV보다 WT ASFV가 많이 포함됨을 확인함.
- Plaque assay를 통해 단일 재조합 바이러스만을 선별하는 과정이 필요함.

- 목적 항원 조작을 위한 CRISPR/Cas9 시스템 구축



그림 36. CRISPR 기술을 활용한 약독화 후보군 확보

- ASF 약독화 관련 후보 유전자를 선별하였고, 제작할 ASFV 재조합 항원의 그룹을 우선 순위로 선정함(1~5순위).
- 약독화 바이러스 제작을 위한 donor 제작을 완료하였고, 동물 시험결과 바탕으로 1순위 LDL 바이러스에 필요한 donor 제작 완료.

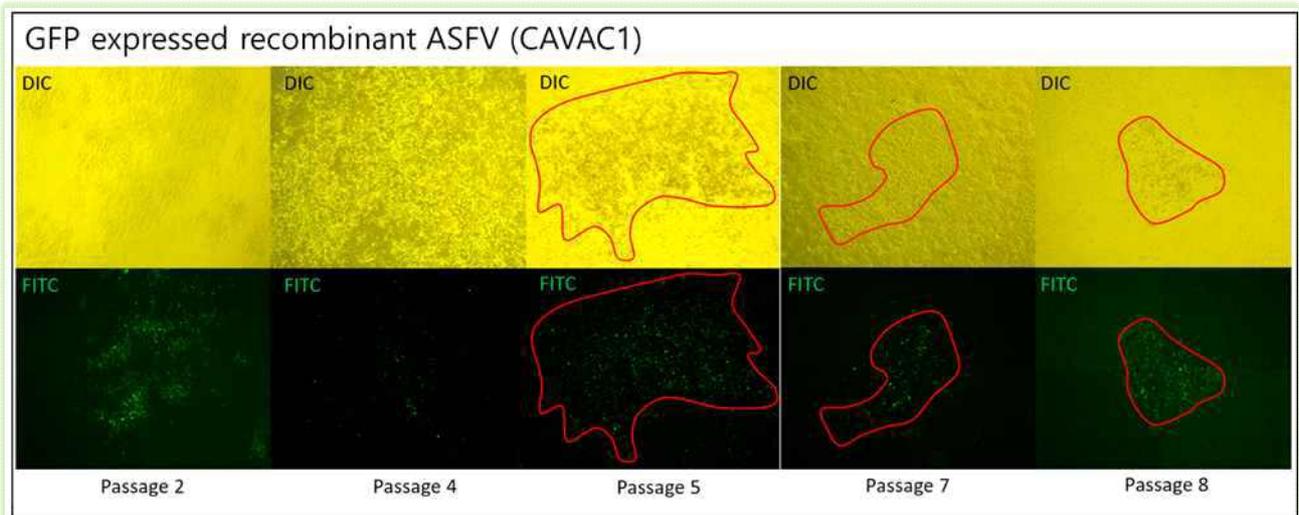


그림 37. 약독화 후보 ASFV 선별

- 농림축산검역본부 BSL3 시설에서 CAS-01 세포주에 ASF 바이러스를 감염하였고, 유전자가위 기술을 이용한 CAVAC1 제거를 시도함.

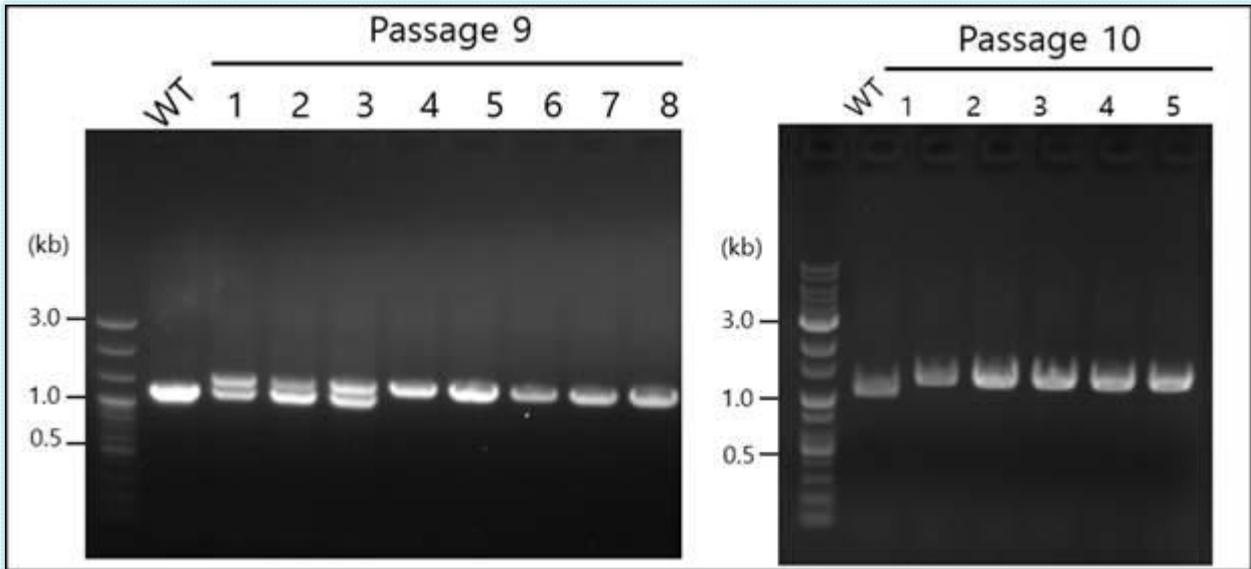


그림 38. 선별된 재조합 바이러스의 유전자 삽입 확인

- 재조합 ASF 바이러스 유전자내에 GFP 삽입을 하였고, 재조합 ASF 바이러스 선별을 진행함.
- 선별된 재조합 바이러스의 유전형 분석을 진행하였고, 재조합 바이러스의 DNA 추출 및 삽입 여부를 확인함.



그림 39. 선별된 재조합 바이러스 유전형 분석

● 무혈청 부유형 동물세포배양 공정 확립

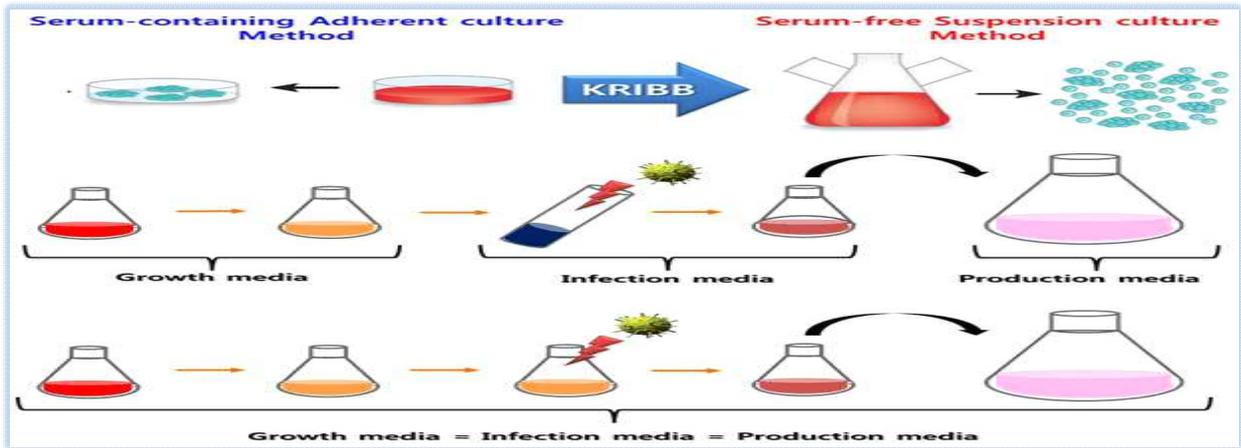


그림 40. 일반적인 백신 생산법 개요

- (주)중앙백신연구소 4종 동물용 백신 생산 세포주의 상업용 무혈청 배지 부유화 적응.
- PAM cell line의 무혈청 배지 부유화 적응.

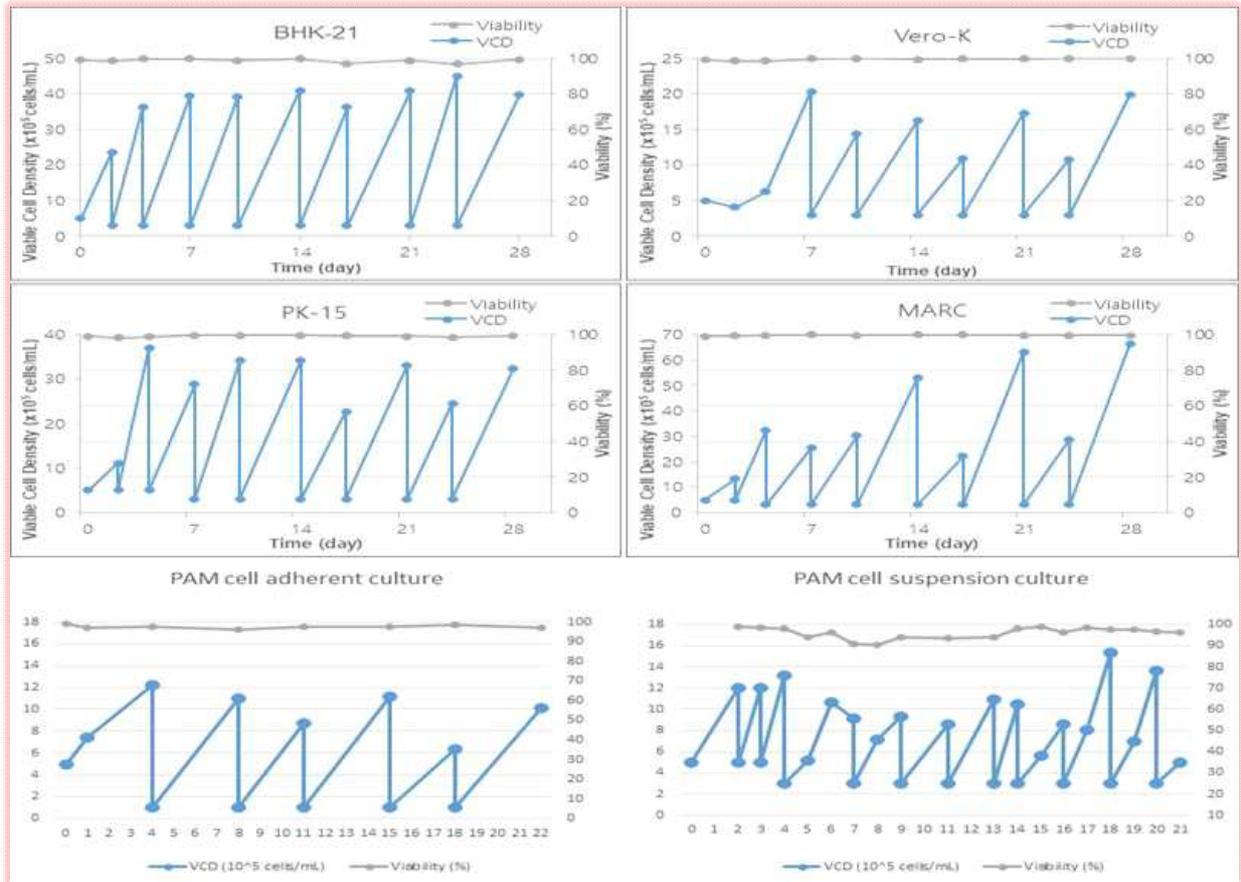


그림 41. 4종 동물세포주의 배양 결과 : 세포 성장성 및 생존율

- 세포주 부유화를 위한 상업용 무혈청 배지 리스트화.

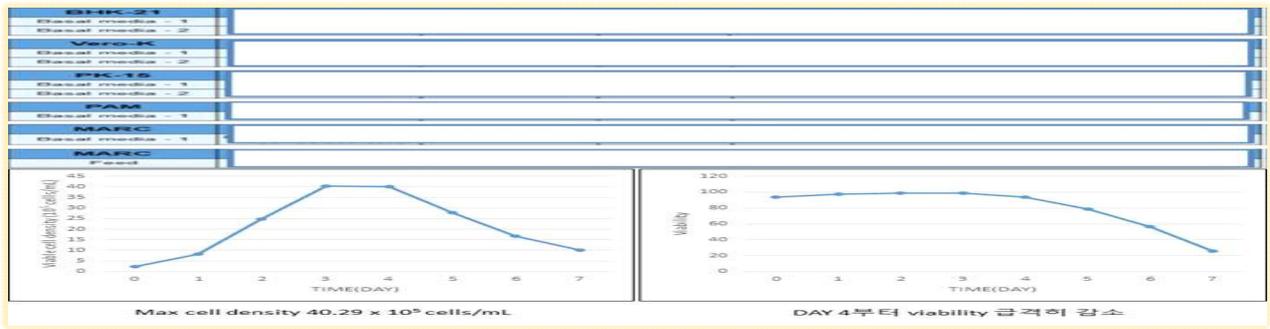


그림 42. 배양 배지 선정 및 배양 결과

- 일반적으로 ASF 바이러스에 감수성을 보인다고 알려진 COS cell line을 부유배양 진행함.

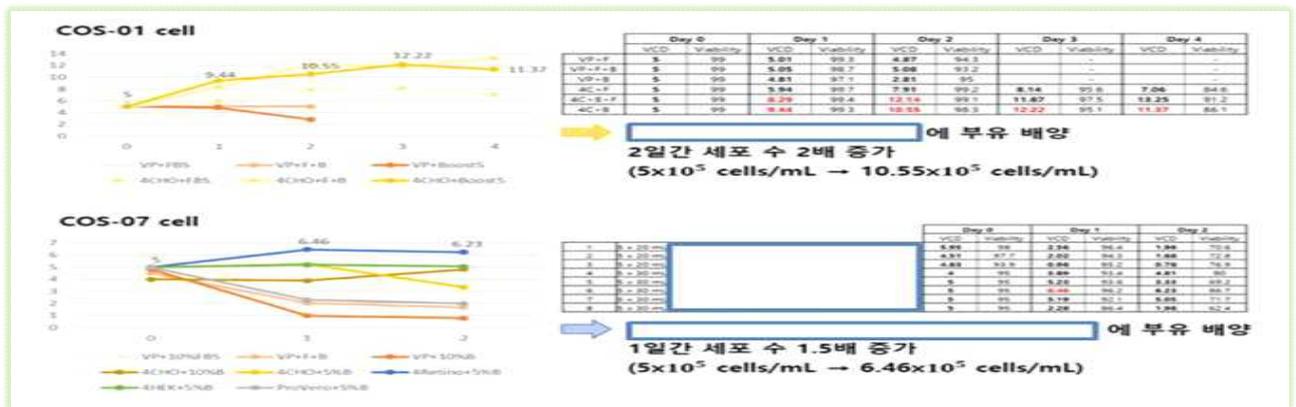


그림 43. COS cell line 배양 결과 : 세포 성장성 및 생존률

- 중앙백신연구소에서 개발한 CAS cell line을 부유배양 진행함.

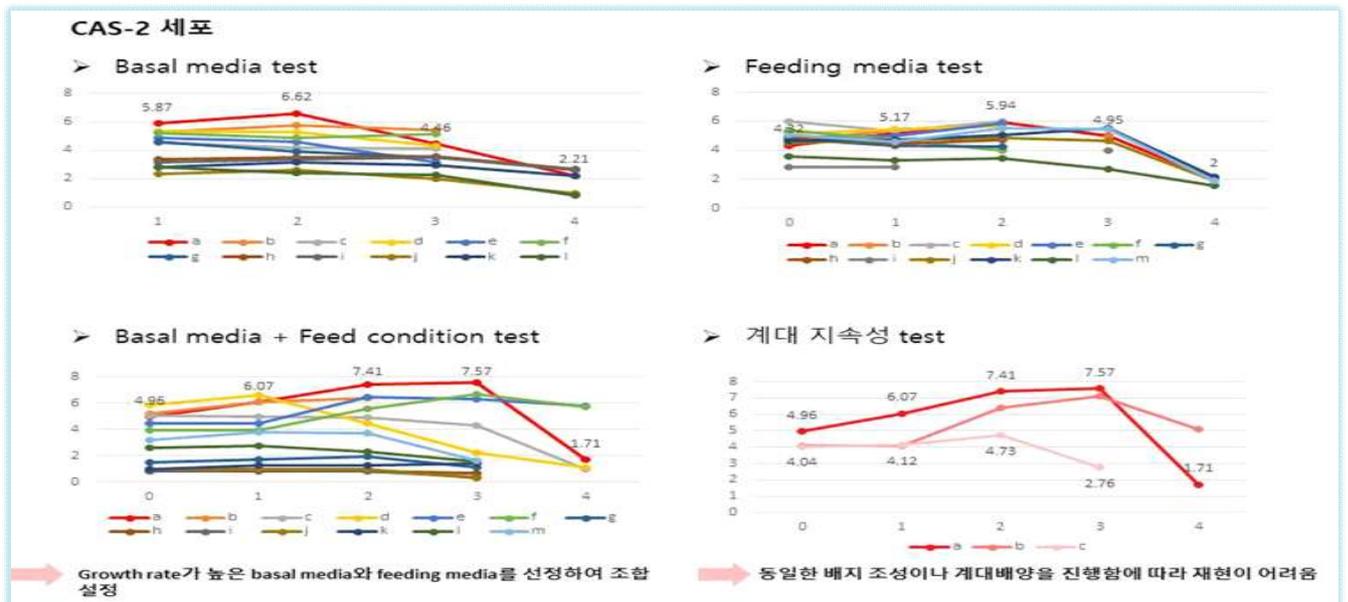


그림 44. CAS cell line 배양 결과 : 세포 성장성 및 생존률

● 면역선별항원/항체 생산 및 활용_한국생명공학연구원 공동 참여

- 최근 동물세포에서 목적 단백질의 단기간 내 생산 최적화를 위해 일시발현 시스템(transient expression system)을 널리 활용되고 있음.

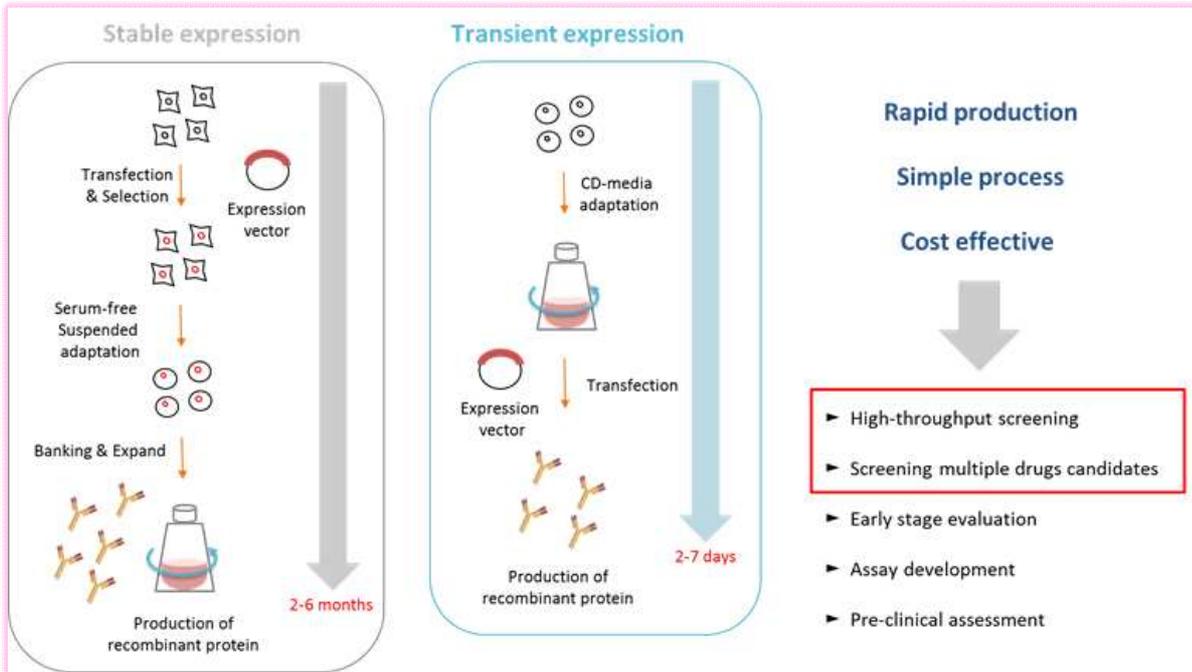


그림 45. 동물세포배양 기반 일시발현 시스템의 장점

- (주)중앙백신연구소로부터 아프리카돼지열병 바이러스 진단을 위해 후보군을 제시받음. 항체 Fc 부분을 활용하여 발현률과 정제 용이성을 확보함.



그림 46. 항체 Fc 영역을 활용한 KRISS의 단백질 생산 플랫폼 개요

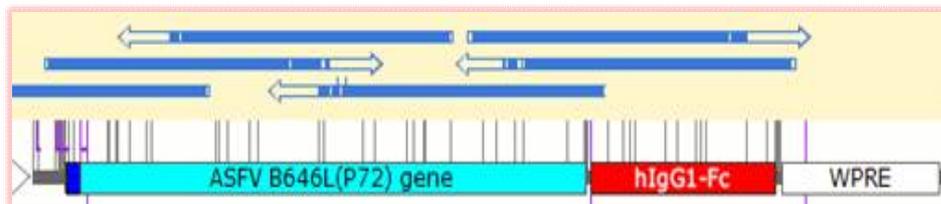


그림 47. 아프리카돼지열병 바이러스 진단 단백질 생산 발현벡터 제작 결과

- Thermo사의 Expi293™ system와 ExpiCHO™ system을 활용하여 ASFV 진단 단백질을 발현함. 세포성장성은 Roche社의 Cedex HiRes Analyzer를 활용하였으며, 단백질 생산성은 Roche社의 Cedex Bio Analyzer를 활용하여 측정함.
- 낮은 생산성으로 인해, Western blot analysis을 통한 detection이 추가 필요함.

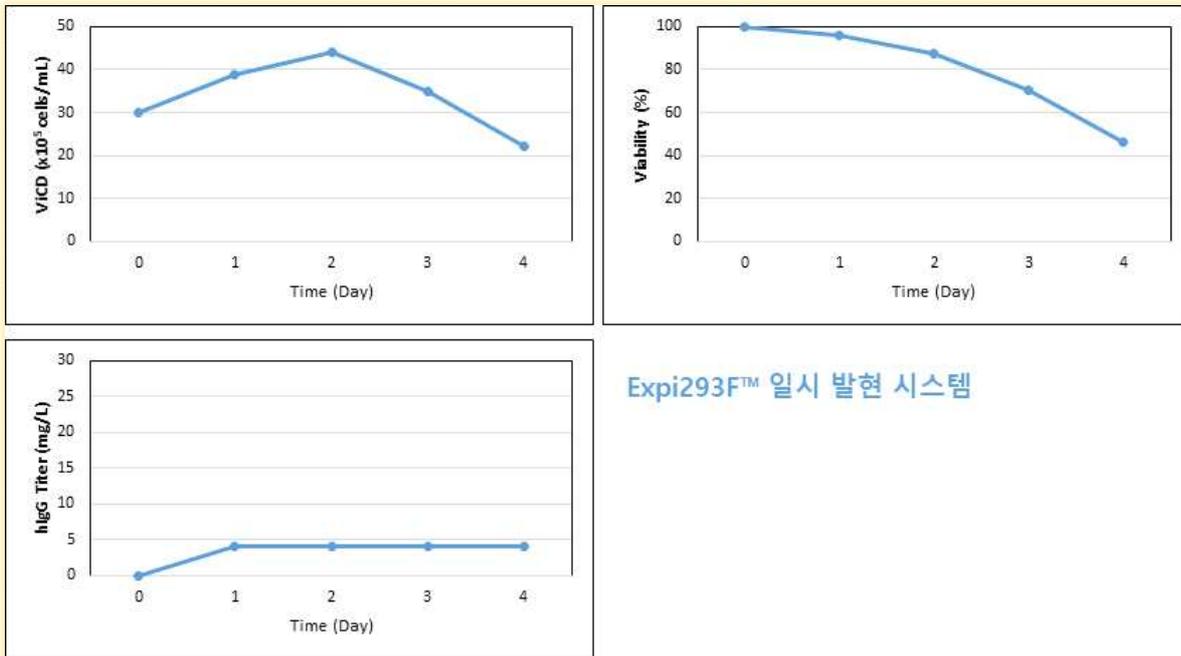


그림 48. Expi293™ system 기반 ASFV 진단 단백질 생산 결과

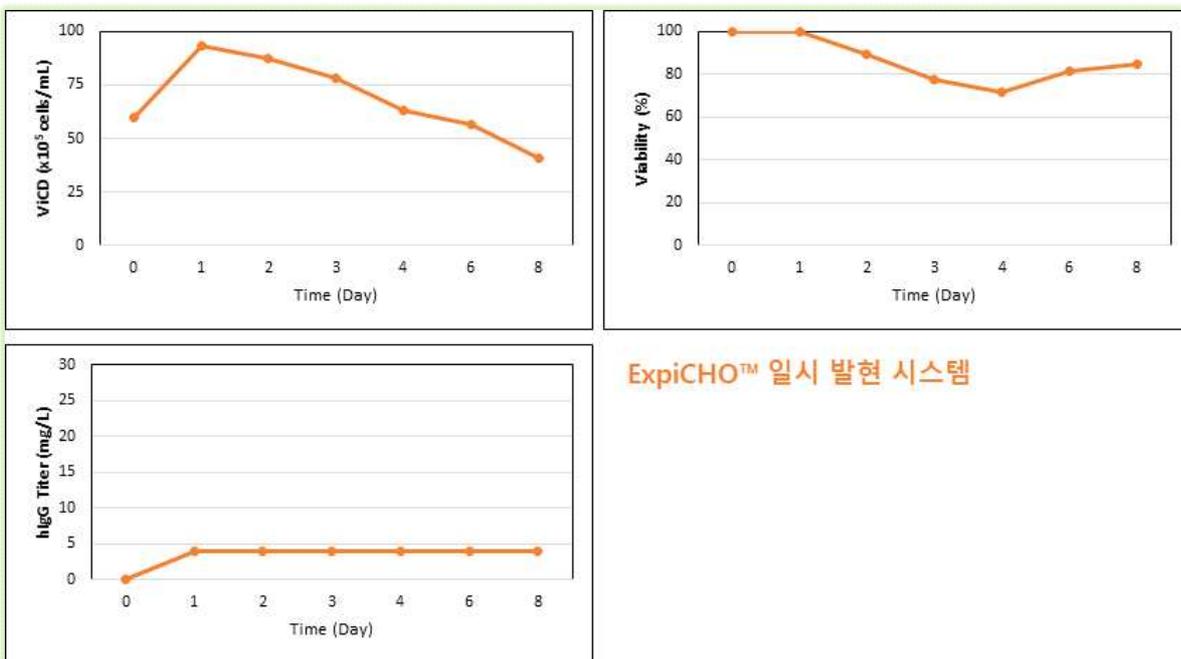


그림 49. ExpiCHO™ system 기반 ASFV 진단 단백질 생산 결과

- Expi293™ system에서 발현된 ASFV 진단 단백질은 낮은 생산성으로 인하여 Human IgG standard를 활용한 Western blot analysis를 통해 단백질 생산성 및 단백질의 발현 양상을 확인함.
- Control로 Fc 부분만 발현 후 정제한 샘플과 이를 희석한 샘플을 활용하여 positive control로 활용함. 진단 단백질의 발현과 분비능을 분석하기 위해 배양 과정 중에 상층액과 세포를 확

보함.

- 예상과 달리, ASFV 진단 단백질은 Expi293™ system에서 발현이 되지 않는 것으로 파악됨.

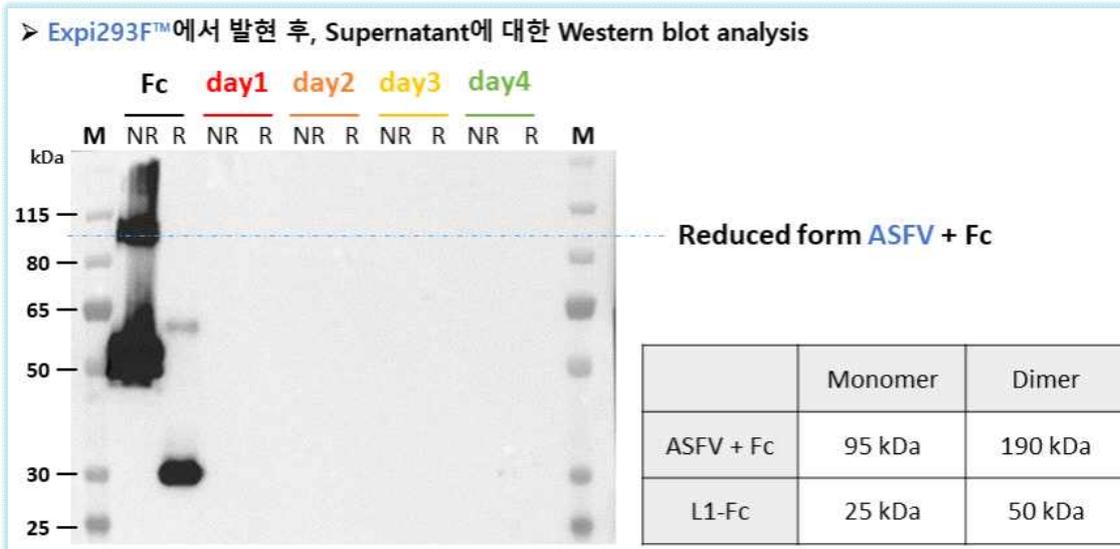


그림 50. Expi293™ system에서 생산된 ASFV 진단 단백질 분석 결과 I

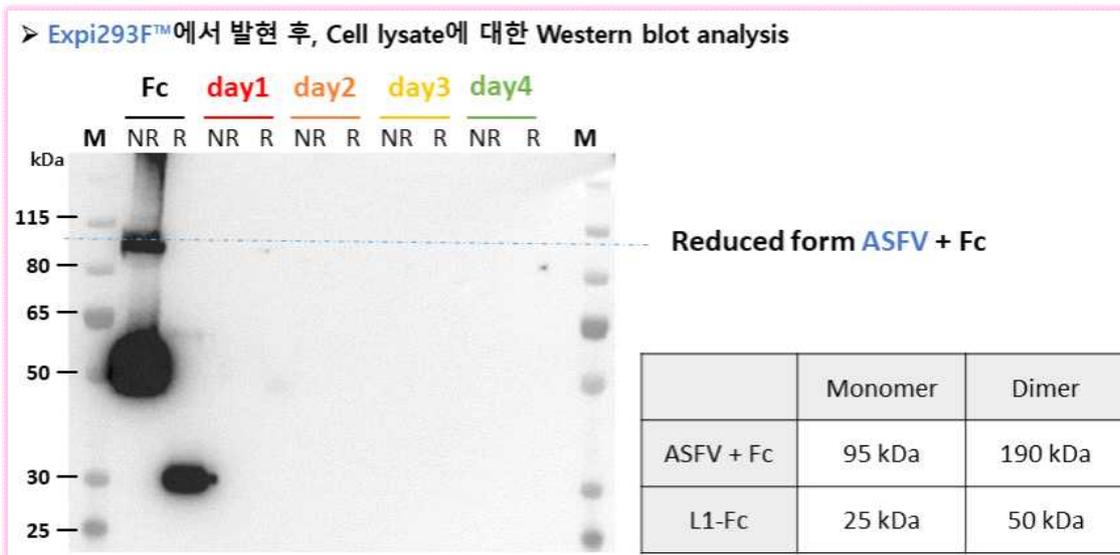


그림 51. Expi293™ system에서 생산된 ASFV 진단 단백질 분석 결과 II

- Expi293™ system과 유사하게, ExpiCHO™ system에서도 ASFV 진단 단백질을 생산한 후 Western blot analysis를 통해 단백질의 발현 양상을 확인함.
- Expi293™ system에서 생산된 ASFV 진단 단백질과는 다르게, ExpiCHO™ system에서는 일부 진단 단백질이 발현되는 것으로는 확인됨. 하지만, 분비가 이루어지지 않는 것으로 파악됨. 세포 간의 단백질 발현 양상이 다른 것으로 보아 추가적으로 다른 세포주에서 발현 여부를 확인할 필요가 있음.

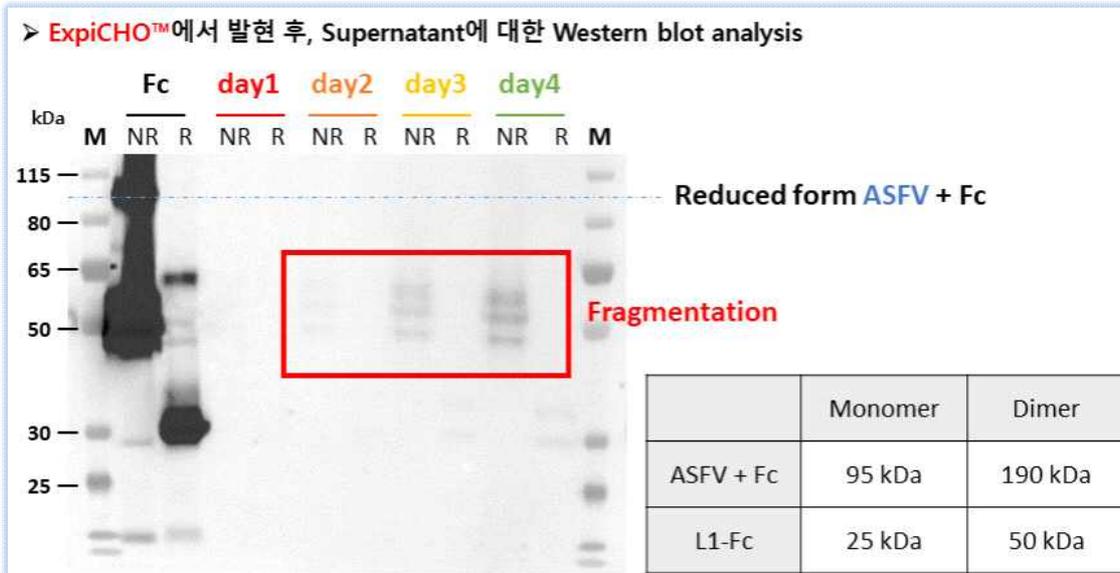


그림 52. ExpiCHO™ system에서 생산된 ASFV 진단 단백질 분석 결과 I

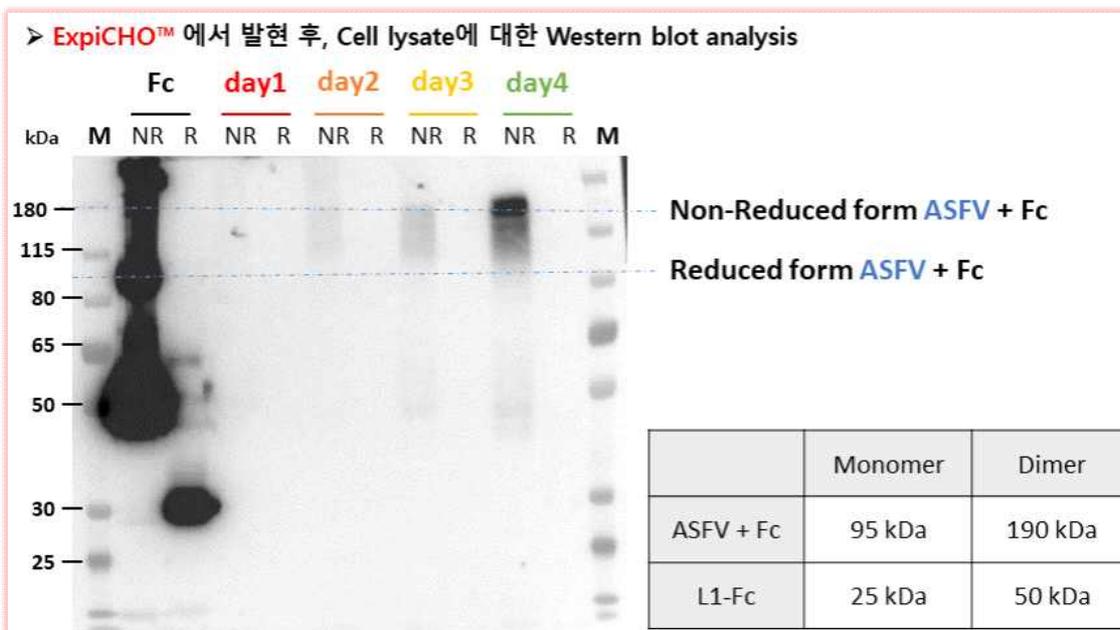


그림 53. ExpiCHO™ system에서 생산된 ASFV 진단 단백질 분석 결과 II

- 앞서 언급한 바와 같이, CHO 세포와 HEK293 세포 이외에 ASFV가 감염 및 생산 가능한 다른 동물세포주에서 발현을 시도할 필요성이 있음.



그림 54. 단백질 생산세포주 변경을 통한 발현 유도 전략

- 동물세포에서 단백질의 낮은 생산성은 일반적으로 signal sequence 변경을 통해 극복이 가능

하며, 이에 대한 시도는 생산성 향상을 목표로 적용 가능함.



그림 55. 단백질 발현벡터 개량을 통한 생산성 향상 전략

- 상기 연구 결과는 배양액에서 주로 단백질을 분석하였으므로, 정제 수행 후 단백질의 성질 및 물성을 파악하는 것도 추가 연구개발을 통해 필요할 것으로 보임.

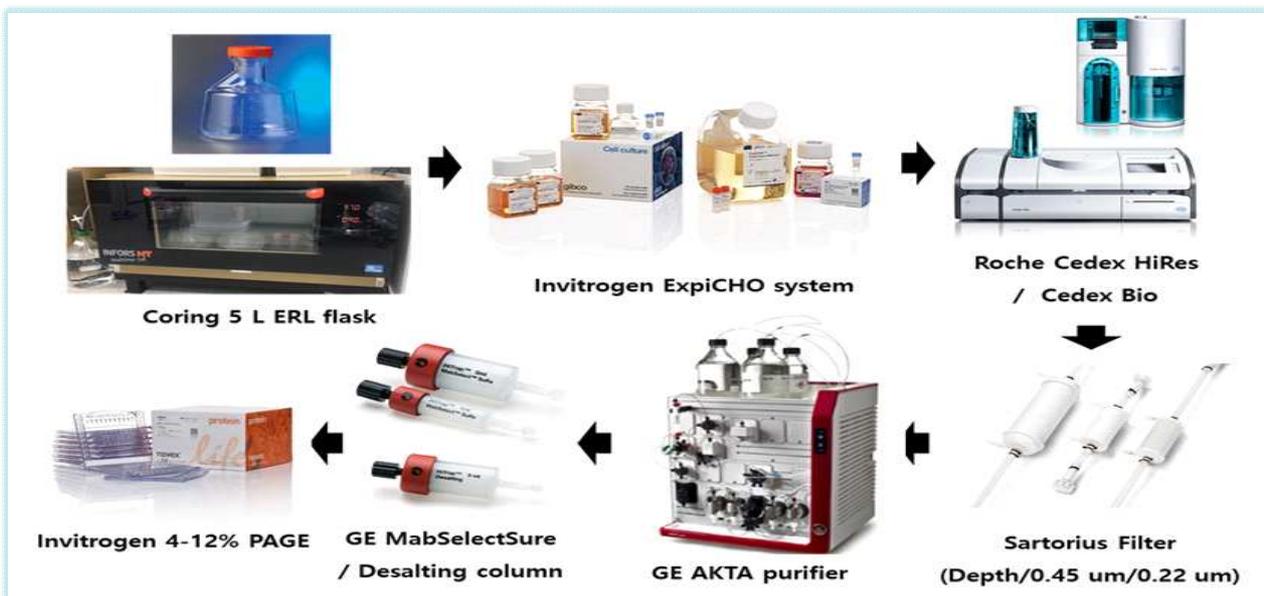


그림 56. 단백질 생산 개념도(생명공학연구소)

2.2. ASF 바이러스에 대한 메타니즘 연구 결과

▶ ASFV 병원성 인자 발굴 및 세포내 역할 규명연구 (충남대학교)

- ASFV 병원성 인자 발굴을 위한 분석 및 유전자 합성 : 숙주의 인터페론 분비 신호 전달을 억제하는 ASFV 병원성 인자들의 탐색
- ASFV시 이에 대응하는 숙주의 선천면역 체계 특히, 바이러스 감염시 유도되어 바이러스 감염에 대해 방어기작을 나타내는 인터페론 신호전달 체계를 회피하는 ASFV의 특이 병원성 인자들에 대한 연구를 수행하고 있음.
- 문헌조사와 다양한 ASFV 유전자에 대한 분석을 통하여 DP71L, DP96R 그리고 CP123L등을 선별하였으며, 이들 단백질들에 대한 세포내 역할 연구를 수행하였음.
- ASFV DP71L의 세포내 역할연구 및 기작 연구
 - 본 실험실에서는 우선적으로 ASFV DP71L 유전자를 합성하여 단백질 발현벡터에 삽입 후, 이 벡터를 이용하여 단백질발현 세포주를 확인하였음.
 - DP71L 단백질을 안정적으로 과발현시키는 대식세포주인 돼지 PAM (Porcine Alveolar Macrophage) stable 세포주에 Adenovirus-GFP, Herpesvirus-GFP 그리고 Vaccinia virus-GFP를 감염시킨 후 바이러스의 증식정도를 측정하였음. 그 결과 그림에서 보는바와 같이, DP71L 단백질이 과발현된 PAM 세포에서는 바이러스의 증식이 현저히 증가하였고, 염증성 사이토카인인 IL-6와 IFN-β의 분비량이 현저히 감소되었음을 확인하였음.
 - 이를 통해 DP71L 단백질이 과발현되면 염증성 사이토카인과 인터페론의 분비를 억제함으로써 바이러스 증식을 증가시키는데 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였음.

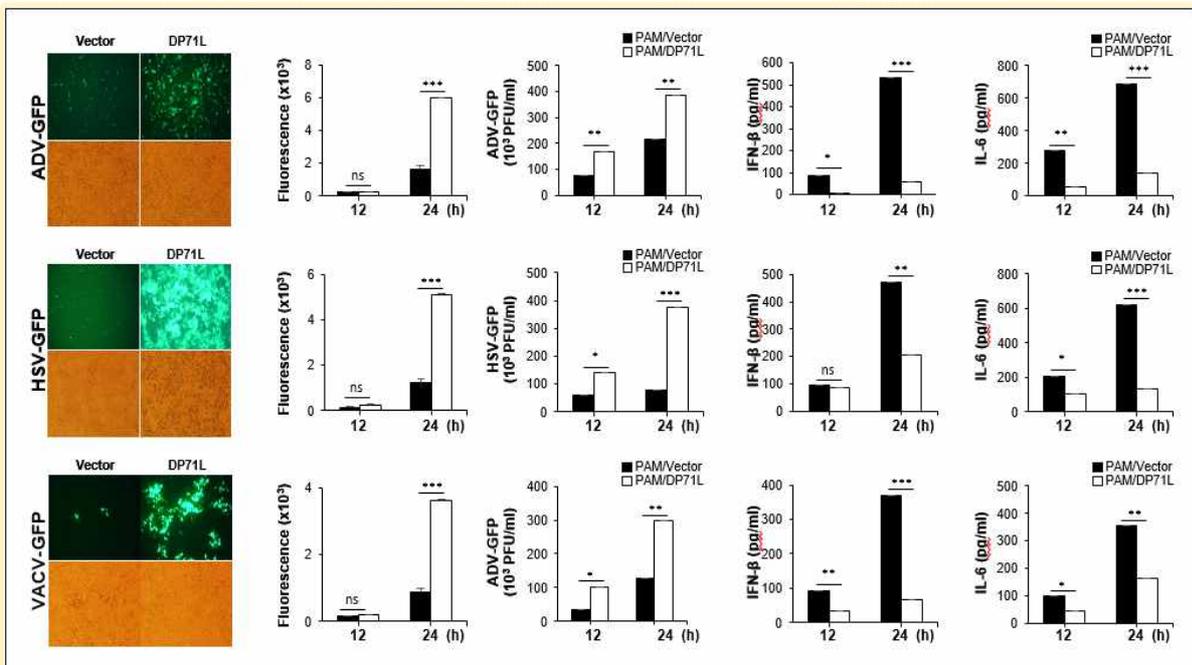


그림 57. 면역세포인 PAM에서 ASFV DP71L 과발현에 의한 바이러스 증식 및 사이토카인 분비 검증

- PAM세포와 더불어 DP71L 단백질을 안정적으로 과발현시키는 porcine immortalized BMDM (Bone marrow derived Macrophage) stable 세포주를 구축하였고, 이 세포주에 Adenovirus-GFP, Herpesvirus-GFP 그리고 Vaccinia virus-GFP를 감염시킨 후 바이러스

의 증식정도를 측정하였음. 그 결과 그림에서 보는바와 같이, 마찬가지로 DP71L 단백질이 과발현된 PIB 세포에서는 바이러스의 증식이 현저히 증가하였고, 염증성 사이토카인인 IL-6와 IFN-β의 분비량이 현저히 감소되었음을 확인하였음.

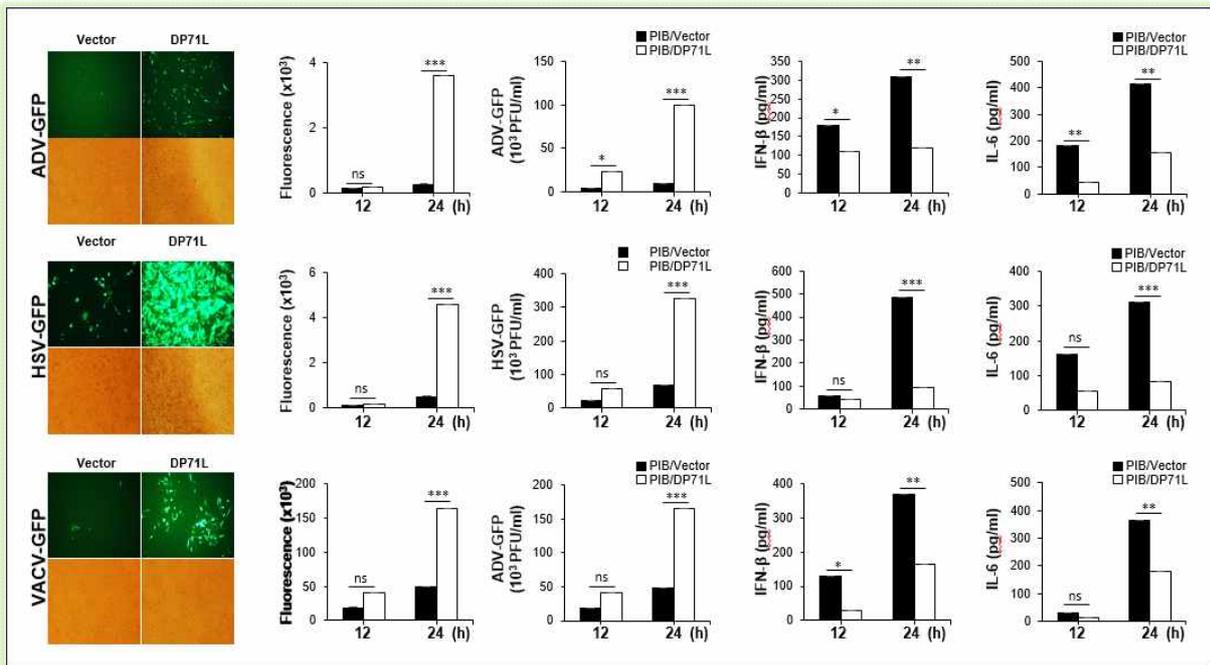


그림 58. 면역세포인 PIB에서 ASFV DP71L 과발현에 의한 바이러스 증식 및 사이토카인 분비 검증

- 결과적으로, 면역세포에 ASFV DP71L 단백질이 과발현되면 바이러스에 대한 방어와 관련한 인터페론이나 사이토카인의 분비가 억제됨으로서 바이러스의 증식이 증가되는 phenotype을 확인함으로써 ASFV DP71L 단백질이 숙주세포의 인터페론 신호전달 경로에 negative regulation 역할을 한다고 결론내릴 수 있음.
- 덧붙여 ASFV DP71L 단백질이 돼지의 신장상피세포인 PK15 세포와 PAM 세포에 과발현되었을 때 항바이러스, 인터페론, 염증성 사이토카인 및 항원제시 관련 분자들의 mRNA 수준을 Real-time PCR로 확인해 본 결과, 아래의 그림에서 보는 바와 같이, 상피세포와 면역세포 모두에서 관련 유전자들의 발현이 억제되고 있음을 확인하여 상기의 phenotype을 보충하고 있음.

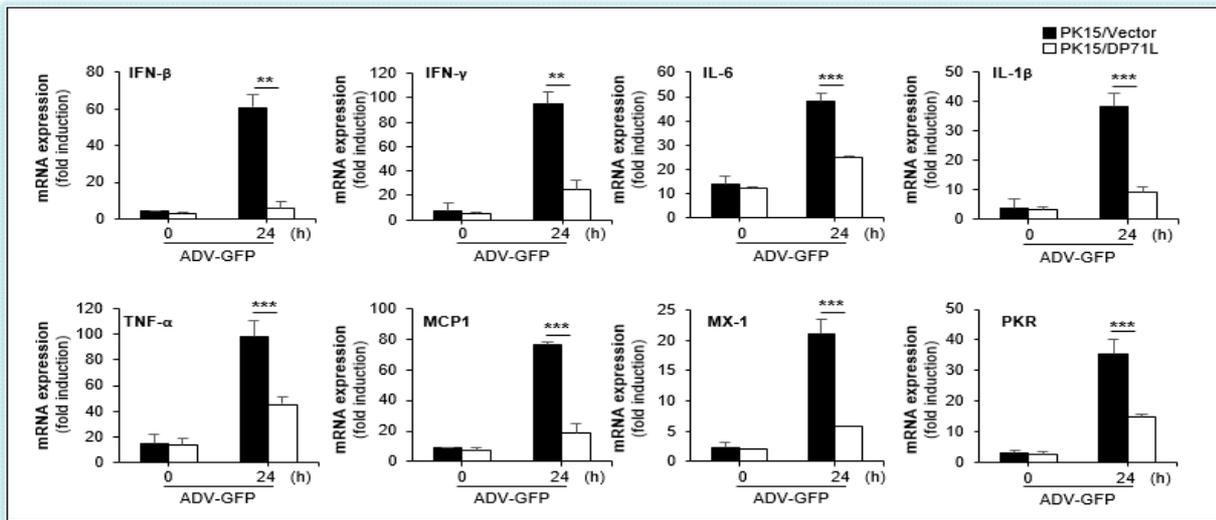


그림 59. ASFV DP71L 과발현 PK15 세포에서의 바이러스 감염 후 항바이러스 관련 유전자 발현 검증

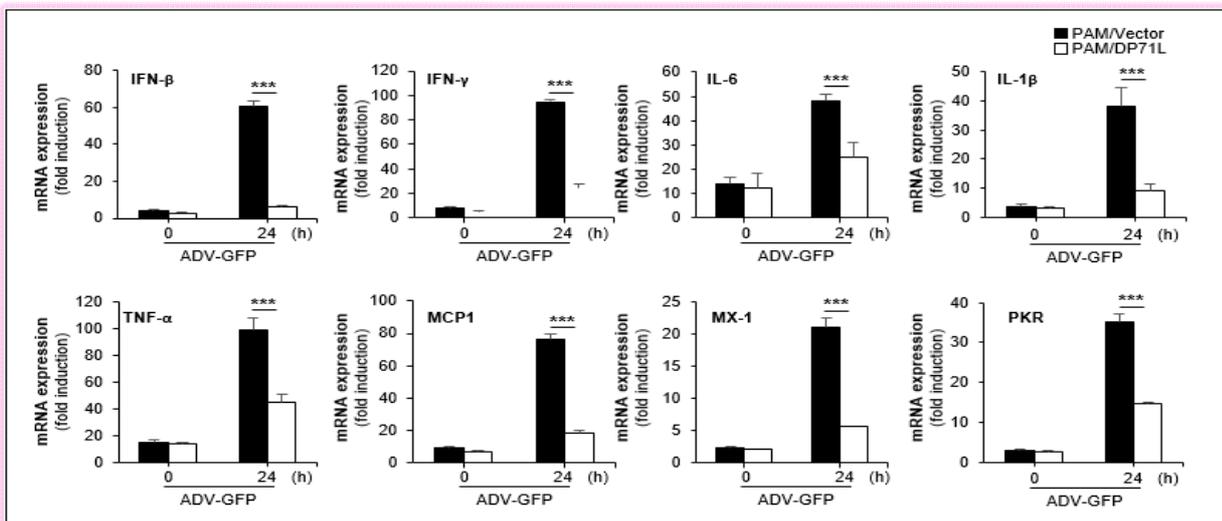


그림 60. ASFV DP71L 과발현 PAM 세포에서의 바이러스 감염 후 항바이러스 관련 유전자 발현 검증

- 다음으로 역시 PK15 세포와 PAM 세포에서 DP71L 단백질의 과발현에 의한 인터페론과 NF-κB 신호전달 체계에 대한 영향을 분석하기 위해 인터페론과 NF-κB 신호전달 체계 내 주요 단백질들의 활성화 정도를 확인하였음.
- 측정 결과, 아래의 그림에서 보는 바와 같이 DP71L을 과발현하는 세포에서 TBK1, IRF3, P65, STAT1 등의 활성화 수준이 컨트롤 세포보다 선명하게 감소하는 것이 확인되었음.
- 결론적으로, DP71L 단백질에 의해 인터페론과 NF-κB 신호전달 체계가 억제가 되어, 이로 인해서 사이토카인의 분비가 감소하고, 바이러스 증식에 차이를 만들었음이 확인되었음.

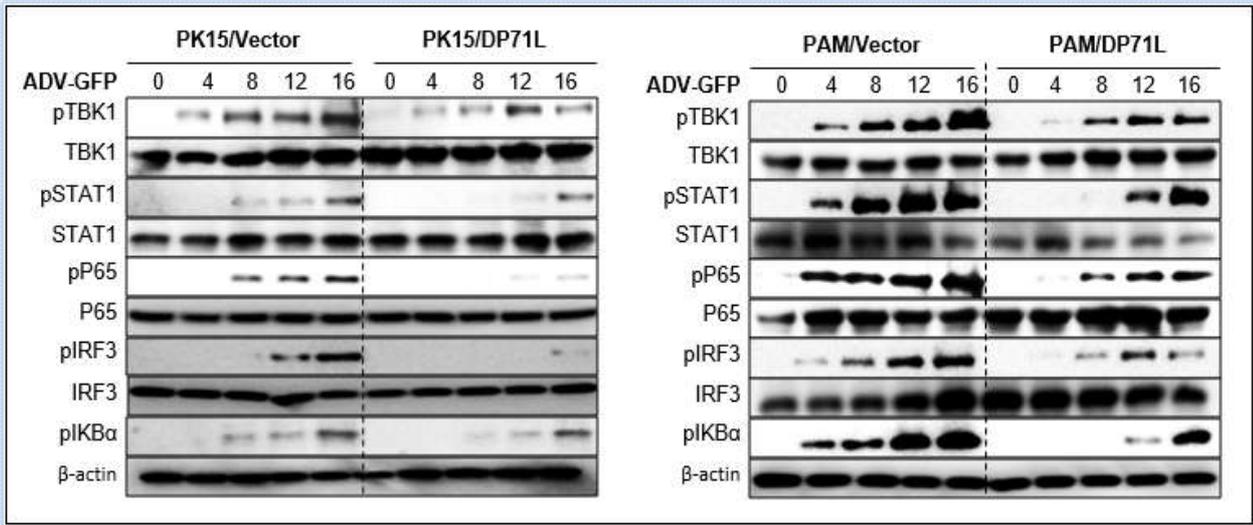


그림 61. ASFV DP71L 단백질 발현에 따른 신호전달 활성화 검증

- 이러한 DP71L 단백질의 세포내 효능이 어떠한 분자생물학적 기전에 의해 나타나는지를 확인하기 위해 다음의 연구를 수행하였음.
- ASFV DP71L 단백질이 숙주세포의 인터페론 신호전달 경로 중 어떠한 위치에서, 어떠한 주요 단백질과 상호작용함으로써 negative regulation 역할을 하는지를 확인하기 위한 luciferase assay를 수행하였음. 인터페론 신호전달 경로에서 중요 역할을 담당하는 단백질들과 함께 DP71L 단백질을 발현시킨 후 IFN-β promoter의 활성화를 확인하였음.

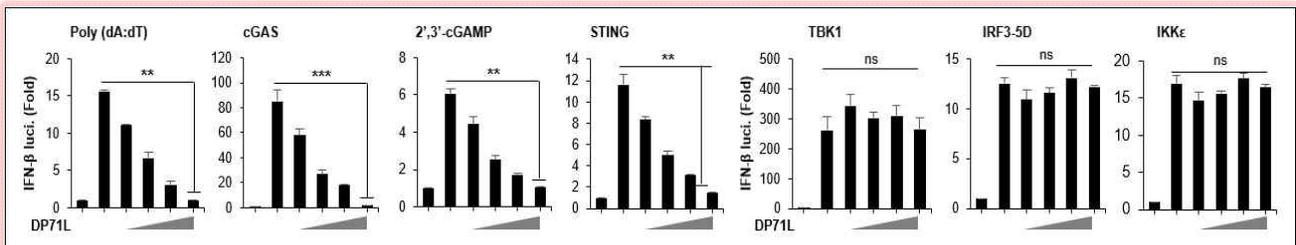


그림 62. ASFV DP71L 단백질에 의한 IFN-β promoter 활성 검증

- 실험 결과, Poly(dA:dT), cGAS, cGAMP, STING에 의해 증가한 IFN-β promoter의 활성이 DP71L 단백질의 dose-dependent 발현에 따라 감소하는 것이 확인되었음. 그리고 보다 정확한 target 후보단백질을 도출하기 위해 DP71L 발현 plasmid를 이용하여 large scale pull down을 수행하였음. 단백질의 발현을 silver staining을 통해 아래와 같이 확인하였으며, 그 결과로서 세포내 다양한 숙주 단백질들이 DP71L과 상호작용하고 있음을 확인하였고, 최종적으로 STING 단백질 정보를 확보하였음.

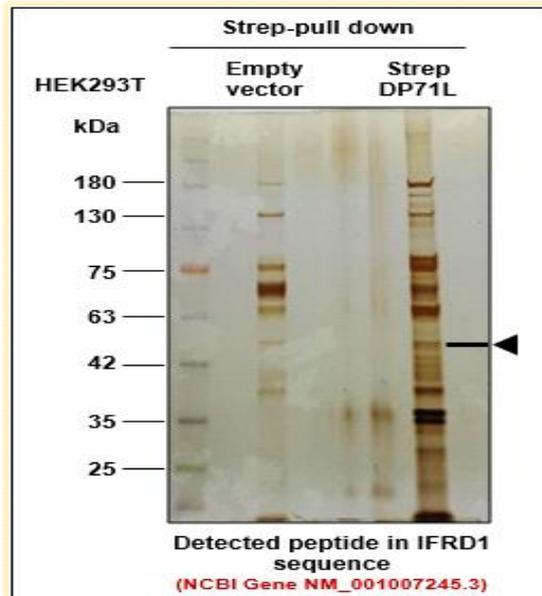


그림 63. STREP tagged ASFV DP71L 단백질을 이용한 Pull Down Assay

- IFN- β promoter의 활성화 억제실험과 Mass spectrometry 시험결과를 분석하여 확보한 target molecule인 STING이 DP71L의 target 단백질로 숙주세포의 인터페론 신호전달 경로를 억제할 가능성이 있음. 따라서, 본 연구에서는 DP71L 단백질과 STING과의 interaction을 확인한 결과 DP71L 단백질이 STING과 서로 binding 함을 아래와 같이 확인하였음.
- 결론적으로, 세포내 ASFV DP71L 단백질은 숙주세포의 인터페론 신호전달 경로에 있어 중요한 인자인 STING과 상호작용함으로써 숙주세포의 인터페론 분비 및 항바이러스 인자들의 기능을 억제할 가능성이 있고 보다 구체적인 기전연구를 수행하였음.

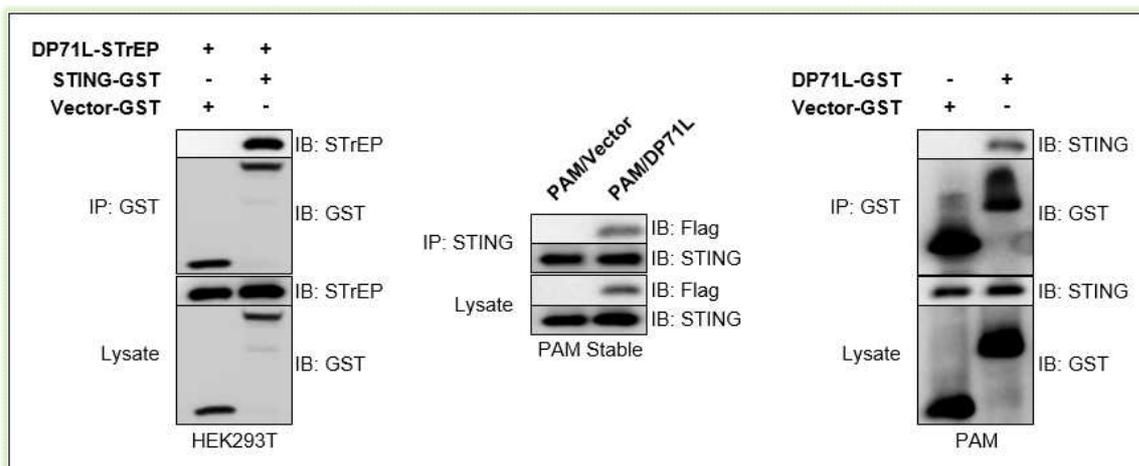


그림 64. ASFV DP71L 단백질과 STING의 interaction

- 세포내 ASFV DP71L 단백질은 숙주세포의 인터페론 신호전달 경로에 있어 중요한 인자인 STING과 상호작용함으로써 숙주세포의 인터페론 분비 및 항바이러스 인자들의 기능을 억제할 가능성이 있고 보다 구체적인 기전연구를 수행하였음.
- 본 연구에서는 아래의 그림에서 보는 바와 같이, ASFV DP71L 단백질과 STING과의 interaction을 confocal microscopy로 확인을 하였음.

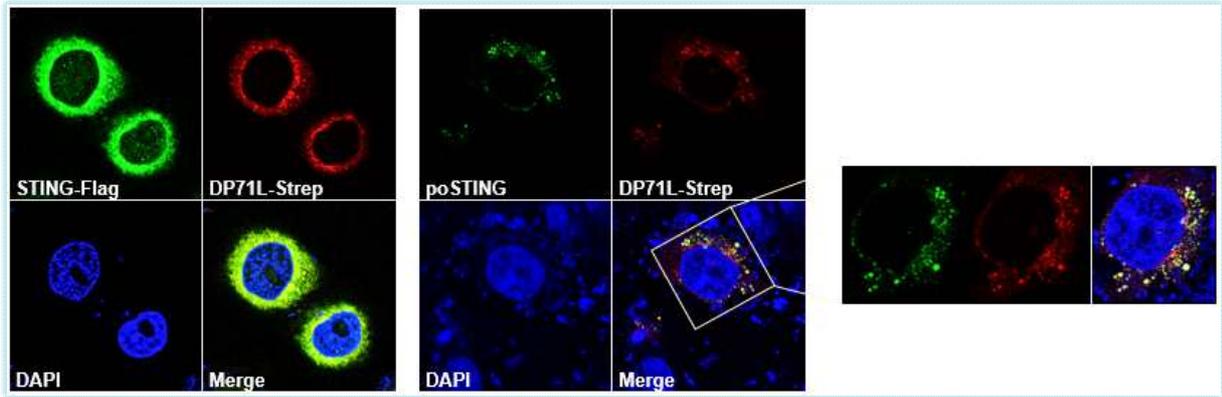


그림 65. ASFV DP71L 단백질과 STING의 interaction 검증

- 다음으로 본 연구에서는 ASFV DP71L 단백질이 STING과의 어떤 domain과 interaction하는지를 확인하였고, 그 결과 ASFV DP71L은 STING의 C-terminal domain과 interaction 하였음 (그림11. A). 알려진 바에 의하면 STING의 C-terminal domain은 신호전달체계에 있어 TBK1과 interaction하는 주요 domain으로 ASFV DP71L의 존재하에는 STING과 TBK1의 interaction이 억제됨을 아래의 그림에서 보는 바와 같이 다양한 방법에 의해 확인하였음 (그림11. B, C, D, E).
- 결론적으로, 세포내 ASFV DP71L 단백질은 숙주세포의 인터페론 신호전달 경로에 있어 중요한 인자인 STING과 상호작용함으로써 숙주세포의 인터페론 분비 및 항바이러스 인자들의 기능을 억제하는 기전적 역할을 함.
- 본 연구의 내용은 해외 저명 바이러스 학회지에 투고할 예정임.

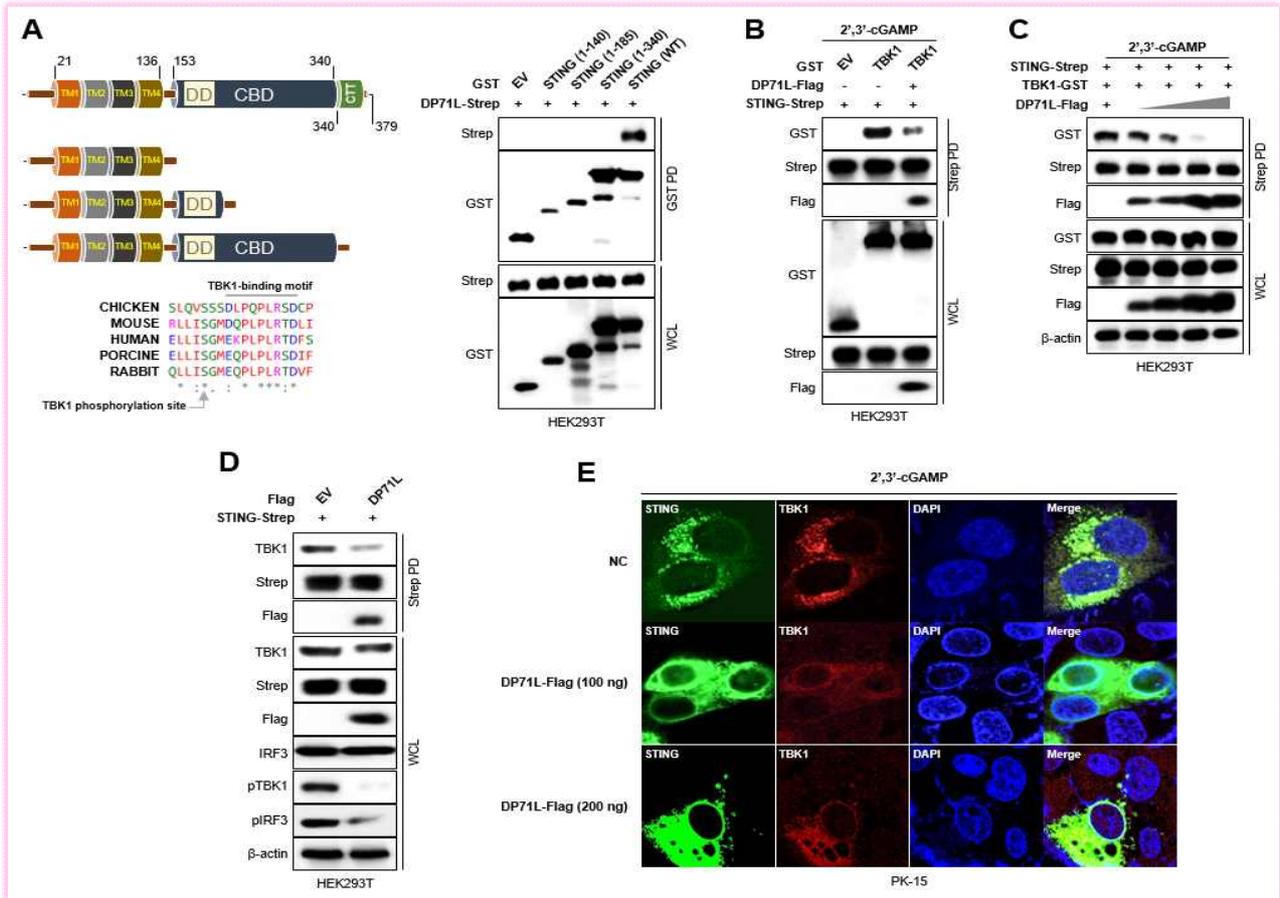


그림 66. ASFV DP71L 단백질의 STING-TBK1 interaction 억제 검증

● ASFV DP96R의 세포내 역할 및 기작 연구

- 본 실험실에서는 ASFV DP96R 유전자를 합성하여 단백질 발현벡터에 삽입 후, 사람의 신장상 피세포인 293T 세포와 PK15 세포에 DP96R 단백질을 과발현시키고, DNA 바이러스인 Adenovirus-GFP 혹은 Herpesvirus-GFP를 감염시킨 후 바이러스의 증식정도를 측정하였음. 그 결과 그림에서 보는바와 같이, DP96R 단백질이 과발현된 세포에서 바이러스 증식이 현저히 증가하였고, 염증성 사이토카인인 IL-6와 IFN-β의 분비량이 현저히 감소되었음을 확인하였음.

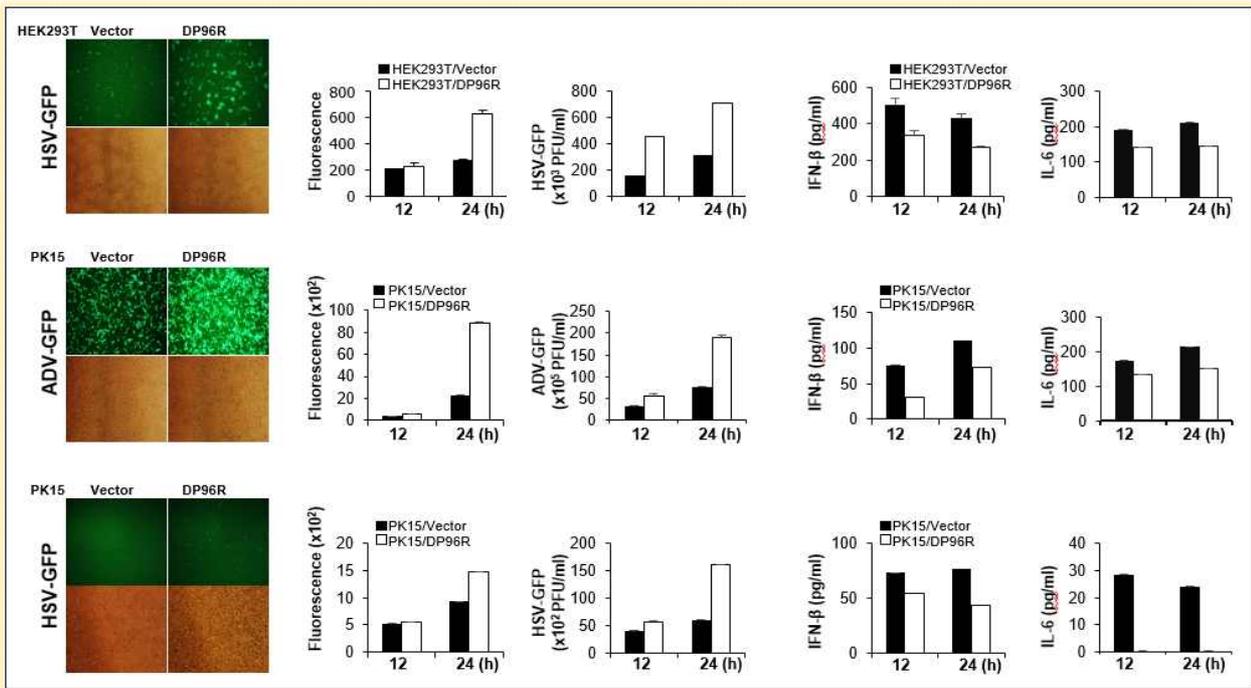


그림 67. 상피세포 293T, PK15에서 ASFV DP96R 과발현에 의한 바이러스 증식 및 사이토카인 분비 검증

- 상피세포와 더불어 ASFV DP96R 단백질을 안정적으로 과발현시키는 대식세포주인 돼지 PAM stable 세포주를 구축하였고, Adenovirus-GFP 혹은 Herpesvirus-GFP를 감염시킨 후 바이러스의 증식정도와 염증성 사이토카인인 IL-6와 IFN-β의 분비량을 측정하였음. 그 결과 그림에서 보는바와 같이, DP96R 단백질이 과발현된 PAM 세포에서도 역시 바이러스의 증식이 현저히 증가하였고, 상피세포주에서와 마찬가지로 염증성 사이토카인인 IL-6와 IFN-β의 분비량이 현저히 감소되었음을 확인하였음.

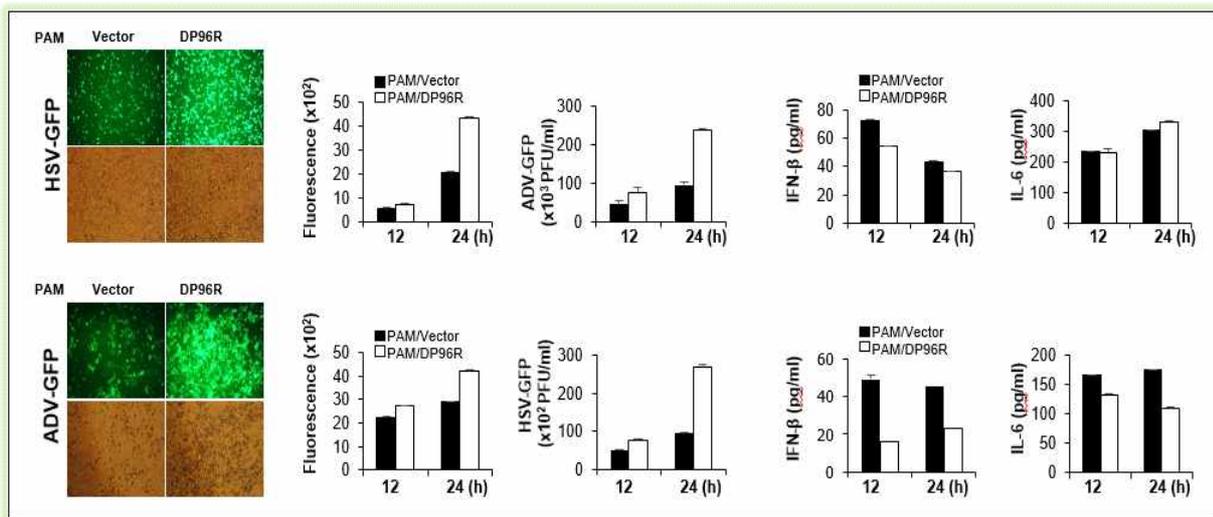


그림 68. 면역세포인 PAM에서 ASFV DP96R 과발현에 의한 바이러스 증식 및 사이토카인 분비 검증

- 돼지의 primary BMDM세포를 immortalization시킨 후 세포주(PIB)를 만들고, 이 PIB에 DP96R 단백질을 역시 과발현시키고, Adenovirus-GFP 혹은 Herpesvirus-GFP를 감염시킨 후 바이러스의 증식정도와 염증성 사이토카인인 IL-6와 IFN-β의 분비량을 측정하였음. 그 결과 그림에서 보는바와 같이, DP96R 단백질이 과발현된 PIB 세포에서도 역시 바이러스의 증식

이 현저히 증가하였고, 마찬가지로 염증성 사이토카인인 IL-6와 IFN-β의 분비량이 현저히 감소되었음을 확인하였음.

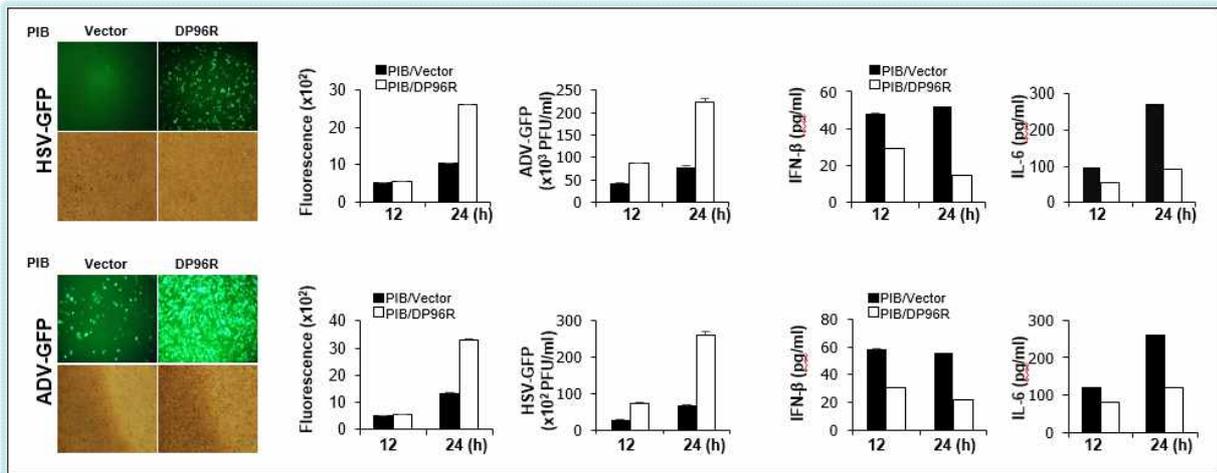


그림 69. 면역세포인 PIB에서 ASFV DP96R 과발현에 의한 바이러스 증식 및 사이토카인 분비 검증

- 또한, 주관연구기관에서 선별한 CAS 세포주에 DP96R 단백질을 역시 과발현시키는 CAS stable 세포주를 구축하였고, Adenovirus-GFP 혹은 Herpesvirus-GFP를 감염시킨 후 바이러스의 증식정도와 염증성 사이토카인인 IL-6와 IFN-β의 분비량을 측정하였음. 그 결과 그림에서 보는바와 같이, DP96R 단백질이 과발현된 CAS 세포에서도 역시 바이러스의 증식이 현저히 증가하였고, 마찬가지로 염증성 사이토카인인 IL-6와 IFN-β의 분비량이 현저히 감소되었음을 확인하였음.

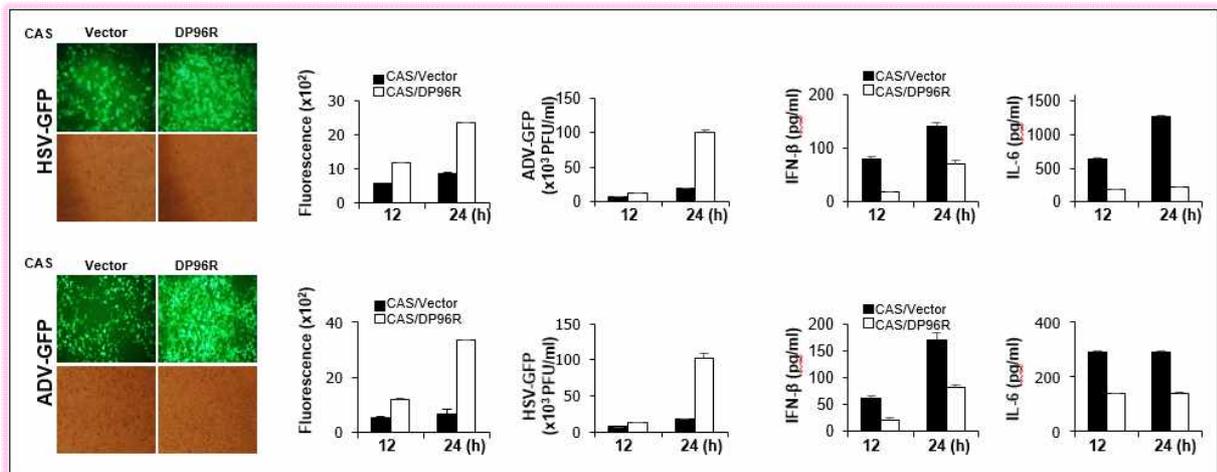


그림 70. CAS세포에서 ASFV DP96R 과발현에 의한 바이러스 증식 및 사이토카인 분비 검증

- 결과로서, 다양한 세포에 ASFV DP96R 단백질이 과발현되면 바이러스의 증식이 증가되는 phenotype을 확인함으로써 ASFV DP96R 단백질이 숙주세포내에서 바이러스 증식을 위한 중요한 역할을 하고 있음을 확인하였음.

- 다음으로 상피세포와 면역세포에서 ASFV DP96R 단백질의 과발현에 의한 Interferon, inflammation, 항바이러스 관련 유전자들의 발현양 변화를 측정하였음. 즉, PK15와 PAM 세포주에 ASFV DP96R 단백질을 과발현시키고 바이러스를 감염시킨 후 Interferon,

inflammation, 항바이러스 관련 유전자들의 mRNA 발현양을 측정된 결과, 아래의 그림에서 보는바와 같이, ASFV DP96R가 과발현된 면역세포에서 Interferon, inflammation, 항바이러스 관련 유전자들의 발현이 현저히 억제되었음을 확인하였음.

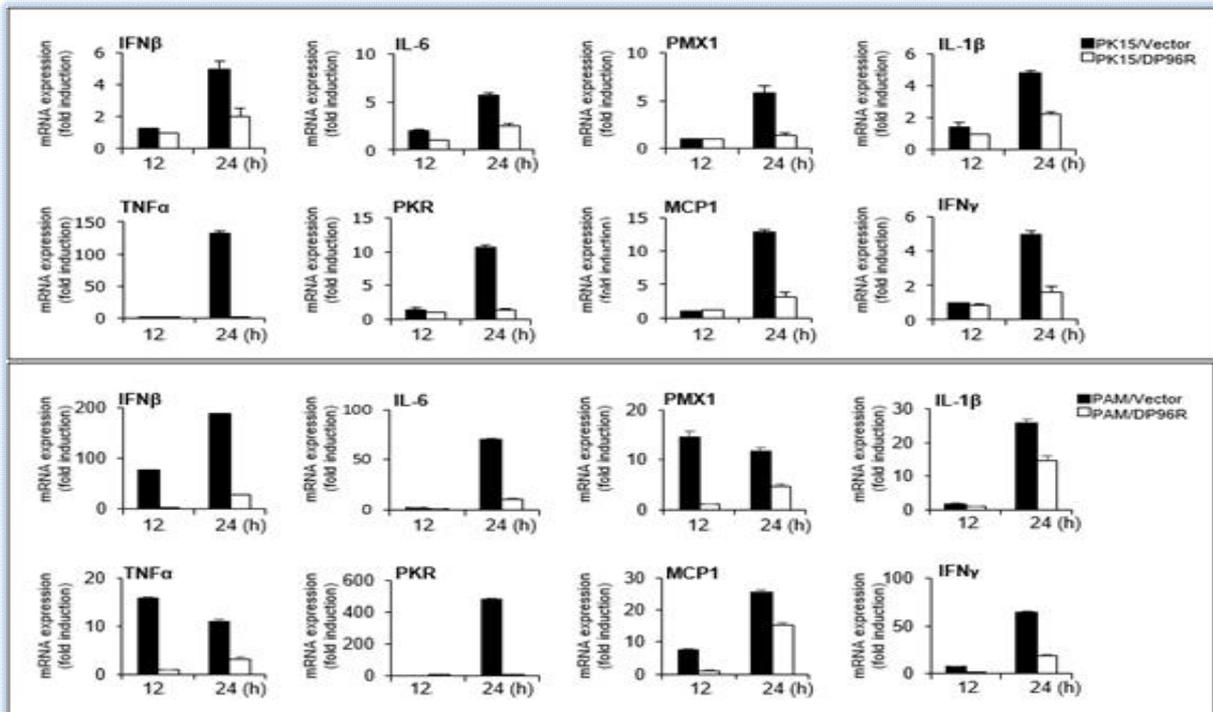


그림 71. ASFV DP96R 과발현 면역세포에서의 바이러스 감염 후 항바이러스 관련 유전자 발현 검증

- 결론적으로, ASFV의 DP96R 단백질이 세포의 선천면역 활성을 저해하고 그로 인한 사이토카인 분비의 감소 및 Interferon, inflammation, 항바이러스 관련 유전자들의 발현양이 감소하여 바이러스의 증식이 증가하는 것을 다양한 세포를 통해서 검증하였음.
- 흥미롭게도 ASFV의 DP96R 단백질을 과발현하는 세포주의 경우 control 세포와 비교하여 세포의 증식성이 상당히 높게 나타남을 MTT, CCK8, BrDU assay를 통하여 아래와 같이 확인하였음. 이러한 세포증식의 특성은 ASF 바이러스의 증식 및 분리를 위한 세포주 개발에 도움을 줄 수 있으리라 사료됨.

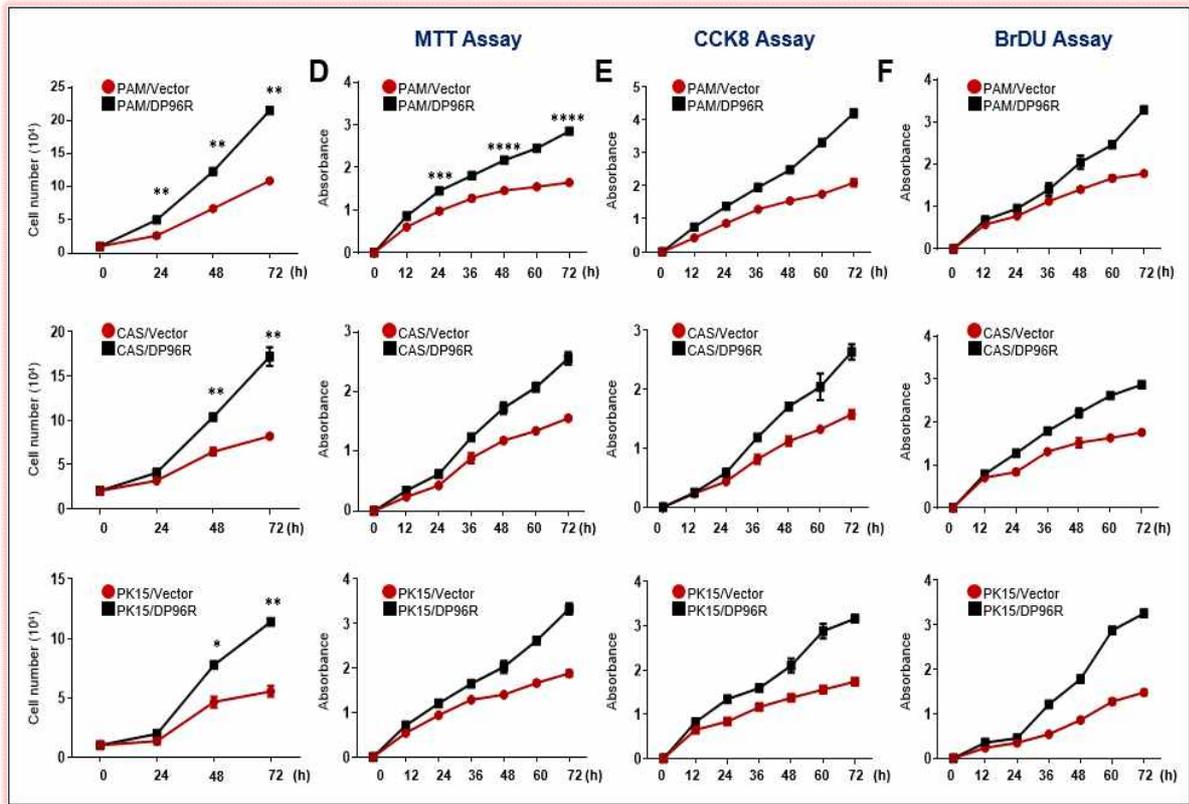


그림 72. ASFV DP96R 과발현 세포들에서의 세포증식성 검증

- ASFV의 DP96R 단백질이 세포의 선천면역 활성을 저해하고, 그로 인한 사이토카인 분비의 감소 및 Interferon, inflammation, 항바이러스 관련 유전자들의 발현을 감소시켜, DP96R 단백질이 발현되면 바이러스의 증식이 증가하는 것을 다양한 세포를 통해서 검증하였음.
- 이러한 DP96R 단백질의 세포내 효능이 어떠한 분자생물학적 기전에 의해 나타나는지를 확인하기 위해 다음의 연구를 수행하였음.
- 우선적으로 ASFV DP96R 단백질이 숙주세포의 인터페론 신호전달 경로 중 어떠한 위치에서, 어떠한 주요 단백질과 상호작용함으로써 negative regulation 역할을 하는지를 확인하기 위한 luciferase assay를 수행하였음. 인터페론 신호전달 경로에서 중요 역할을 담당하는 단백질들과 함께 DP96R 단백질을 발현시킨 후 IFN- β promoter의 활성화를 확인하였음.

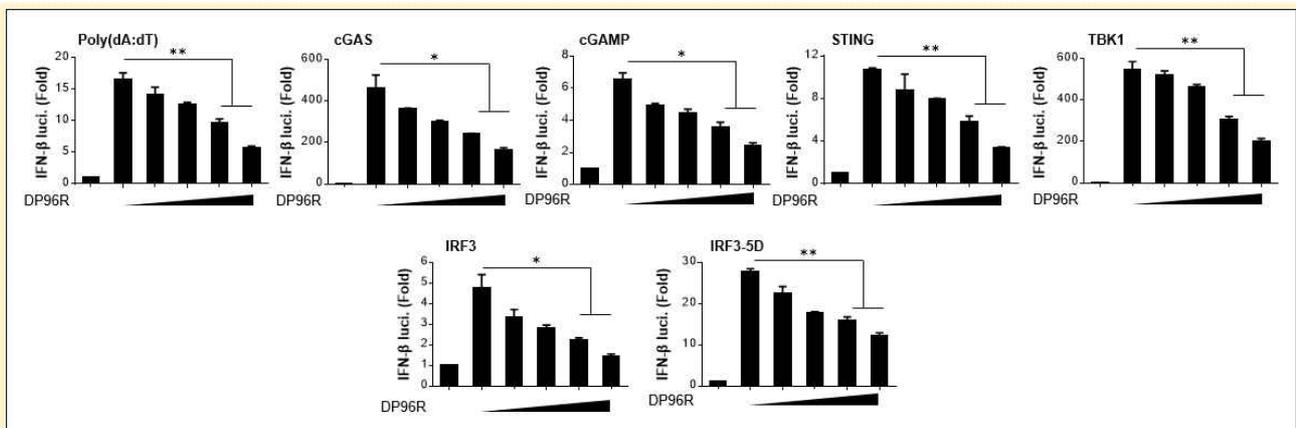


그림 73. ASFV DP96R 단백질에 의한 IFN- β promoter 활성 검증

- 실험 결과, Poly(dA:dT), cGAS, cGAMP, STING, TBK1, IRF3에 의해 증가한 IFN- β

promoter의 활성이 DP796R 단백질의 dose-dependent 발현에 따라 감소하는 것이 확인되었음. 즉, DP796R 단백질은 IRF3를 target 단백질로 하여 숙주세포의 인터페론 신호전달 경로를 억제할 가능성이 있음. 따라서, 본 연구에서는 DP96R 단백질과 IRF3와의 interaction을 확인한 결과 DP96R 단백질이 IRF3와 서로 specific binding 함을 아래와 같이 확인하였음.

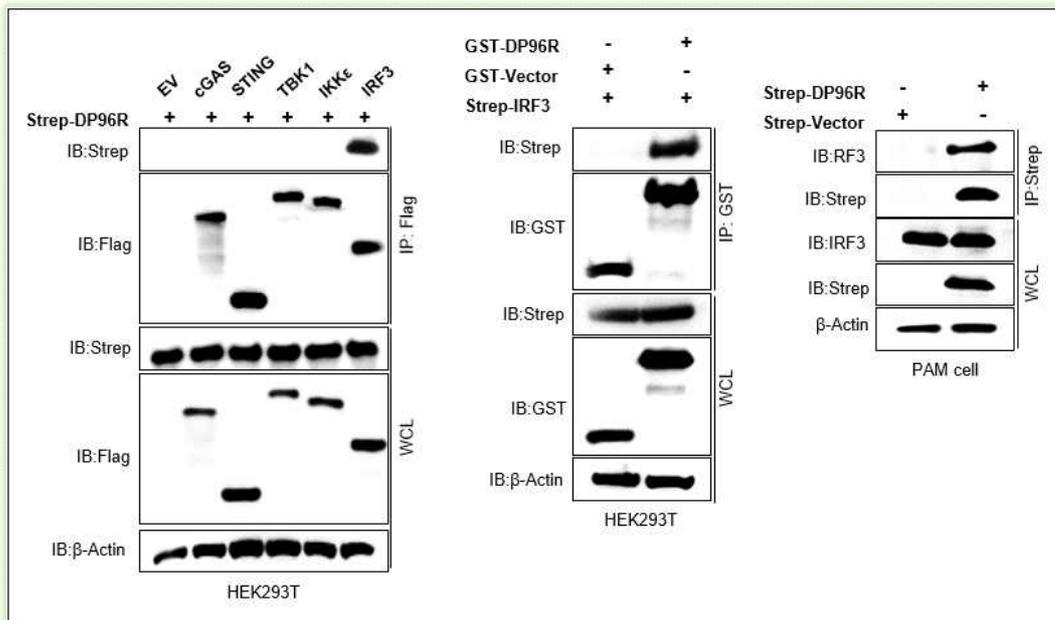


그림 74. ASFV DP96R 단백질과 IRF3의 interaction

- 다음으로는 DP96R 단백질이 IRF3의 어떠한 부분과 상호작용하는지 아래와 같이 평가하였음.

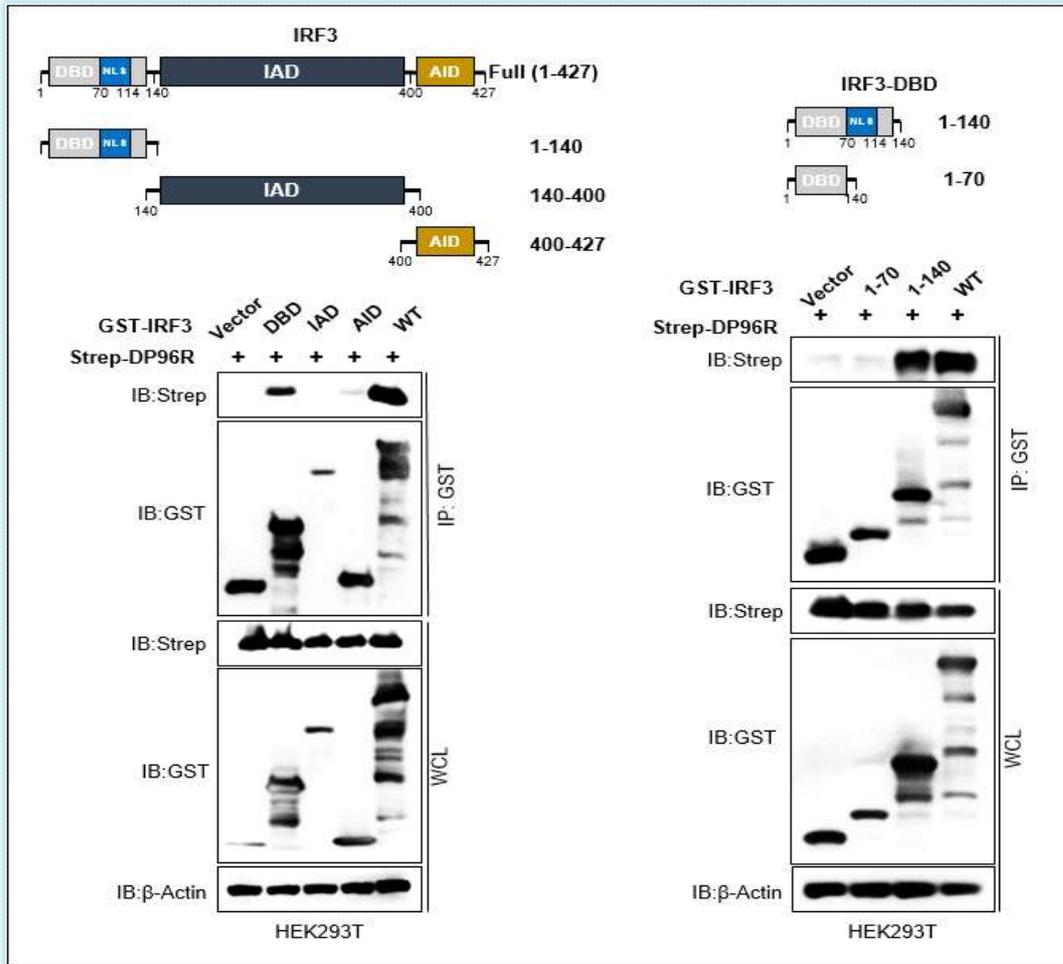


그림 75. ASFV DP96R 단백질과 IRF3 fragment의 interaction 검증

- 실험 결과, DP96R 단백질이 IRF3의 70-140 a.a region 부분과 상호작용함을 확인하였음.
- 결론적으로, 세포내 ASFV DP96R 단백질은 숙주세포의 인터페론 신호전달 경로에 있어 중요한 인자인 IRF3와 상호작용함으로써 숙주세포의 인터페론 분비 및 항바이러스 인자들의 기능을 억제할 가능성이 있다 보다 다음과 같은 구체적인 기전연구를 수행하였음.
- ASFV DP96R이 있는 상황에서는 인터페론 신호전달 경로에 있어 중요한 IRF3의 phosphorylation (A), dimerization (B), nuclear translocation (D, F) 작용들이 모두 억제가 됨을 아래의 그림에서 보는 바와 같이 다양한 방법에 의해 확인하였음.
- 결론적으로, 세포내 ASFV DP96R 단백질은 숙주세포의 인터페론 신호전달 경로에 있어 중요한 인자인 IRF3와 상호작용하여 억제함으로써 숙주세포의 인터페론 분비 및 항바이러스 인자들의 기능을 억제하는 기전을 보임.
- 이와 같은 연구내용은 “The African Swine Fever Virus Virulence Determinant DP96R Suppresses Type I IFN Production Targeting IRF3”라는 제목으로 2024년 International Journal of Molecular Science에 발표하였음.

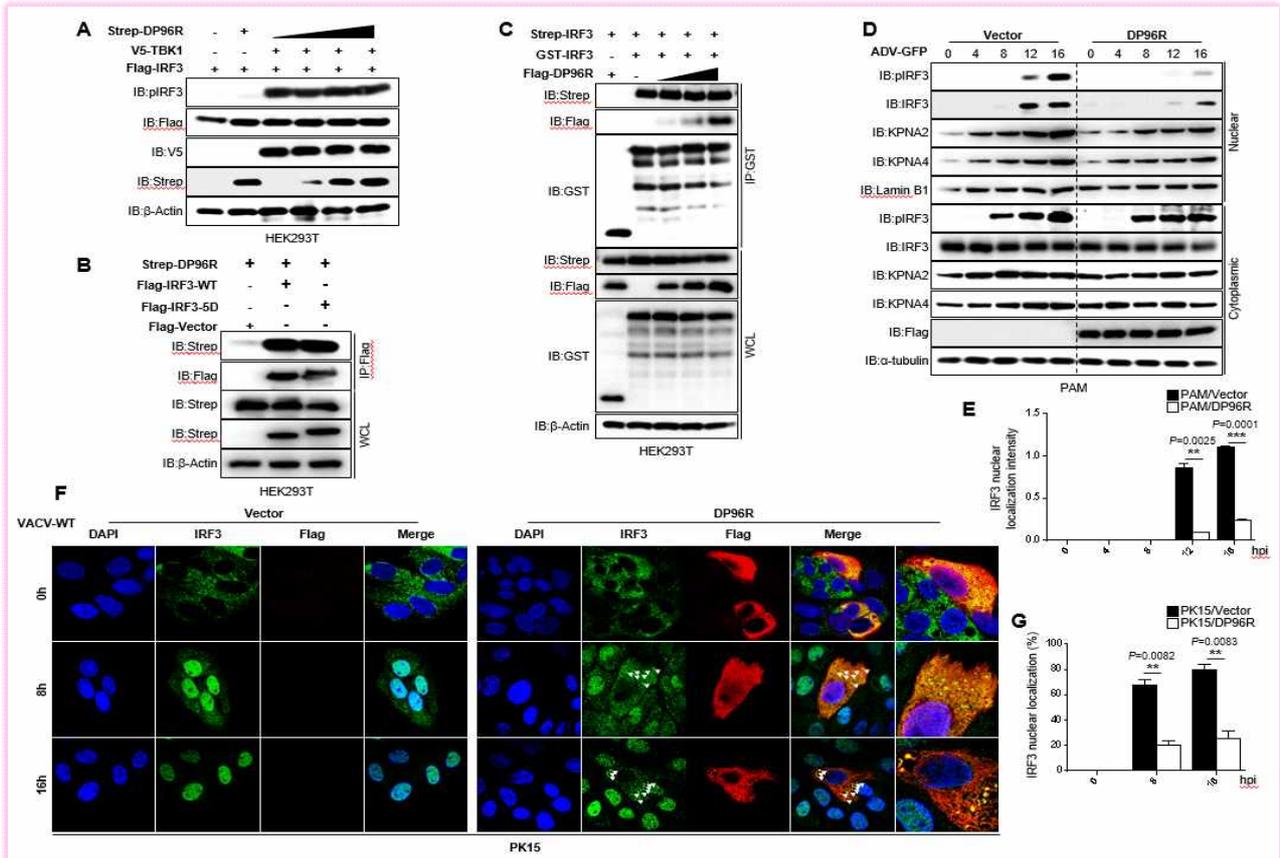


그림 76. ASFV DP96R 단백질의 IRF3 억제 검증

● ASFV CP123L의 세포내 역할 및 기작 연구

- 본 실험실에서는 CP123L 단백질을 안정적으로 과발현시키는 대식세포주인 돼지 PAM (Porcine Alveolar Macrophage) stable 세포주에 Adenovirus-GFP, Herpesvirus-GFP 그리고 Vaccinia virus-GFP를 감염시킨 후 바이러스의 증식정도를 측정하였음. 그 결과 그림에서 보는바와 같이, CP123L 단백질이 과발현된 PAM 세포에서는 바이러스의 증식이 현저히 증가하였고, 염증성 사이토카인인 IL-6와 IFN- β 의 분비량이 현저히 감소되었음을 확인하였음.
- 이를 통해 CP123L 단백질이 과발현되면 염증성 사이토카인과 인터페론의 분비를 억제함으로써 바이러스 증식을 증가시키는데 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였음.

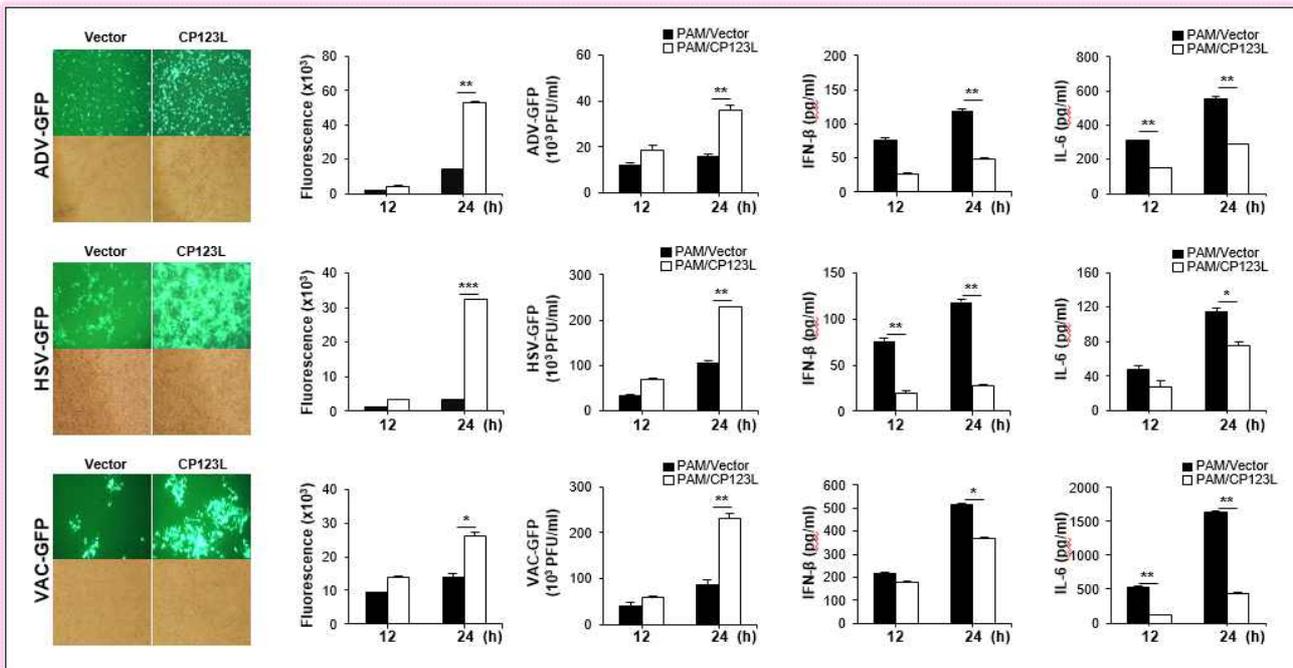


그림 77. 면역세포인 PAM에서 ASFV CP123L 과발현에 의한 바이러스 증식 및 사이토카인 분비 검증

- PAM세포와 더불어 CP123L 단백질을 PK15 세포에 과발현시키고, 이 세포주에 Adenovirus-GFP, Herpesvirus-GFP 그리고 Vaccinia virus-GFP를 감염시킨 후 바이러스의 증식정도를 측정하였음. 그 결과 그림에서 보는바와 같이, 마찬가지로 CP123L 단백질이 과발현된 PK15 세포에서는 바이러스의 증식이 현저히 증가하였고, 염증성 사이토카인인 IL-6와 IFN-β의 분비량이 현저히 감소되었음을 확인하였음.

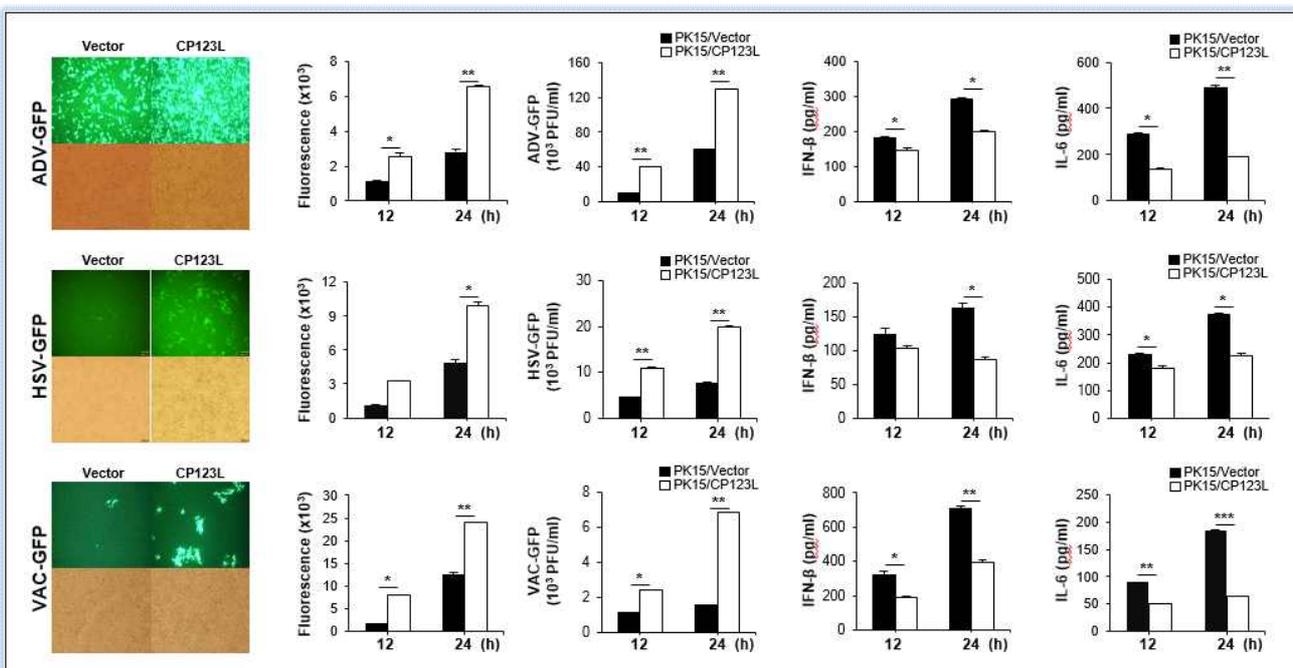


그림 78. 면역세포인 PK15에서 ASFV CP123L 과발현에 의한 바이러스 증식 및 사이토카인 분비 검증

- 덧붙여 ASFV CP123L 단백질이 돼지의 신장상피세포인 PK15 세포와 PAM 세포에 과발현되었을 때 항바이러스, 인터페론, 염증성 사이토카인 및 항원제시 관련 분자들의 mRNA 수준을 Real-time PCR로 확인해 본 결과, 아래의 그림에서 보는 바와 같이, 상피세포와 면역세포 모

두에서 관련 유전자들의 발현이 억제되고 있음을 확인하여 상기의 phenotype을 보충하고 있다.

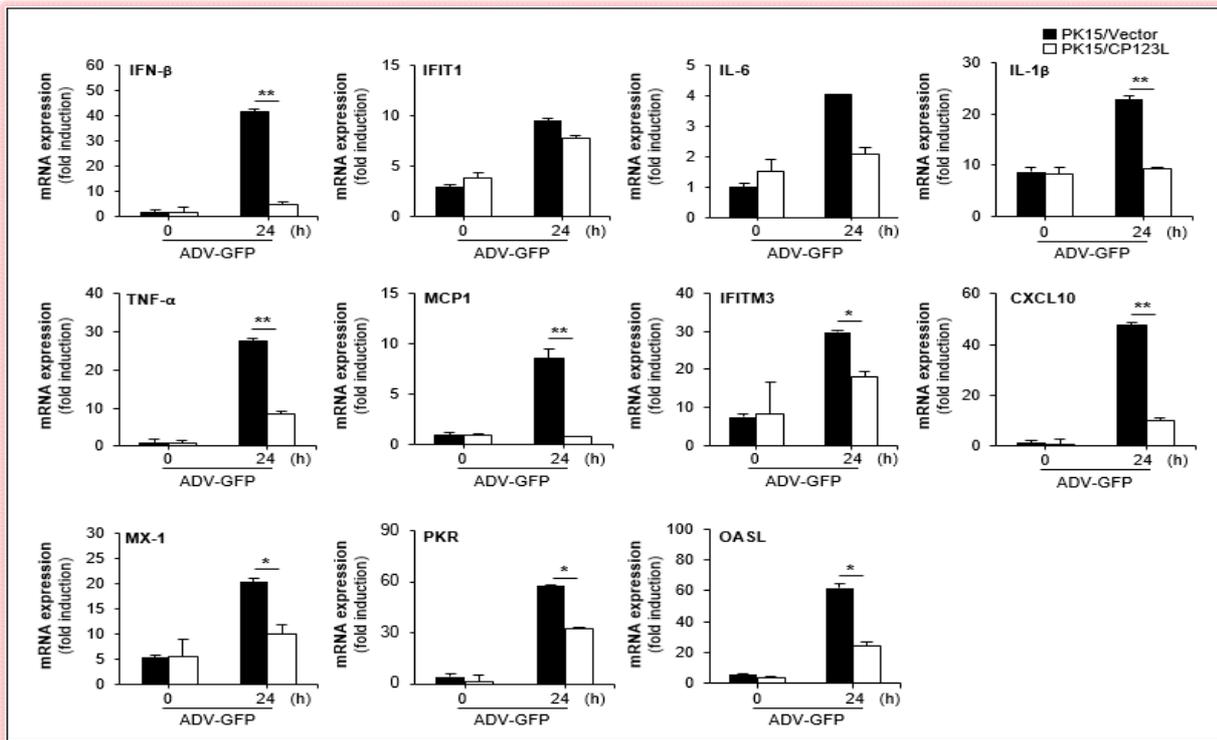


그림 79. ASFV CP123L 과발현 PK15 세포에서의 바이러스 감염 후 항바이러스 관련 유전자 발현 검증

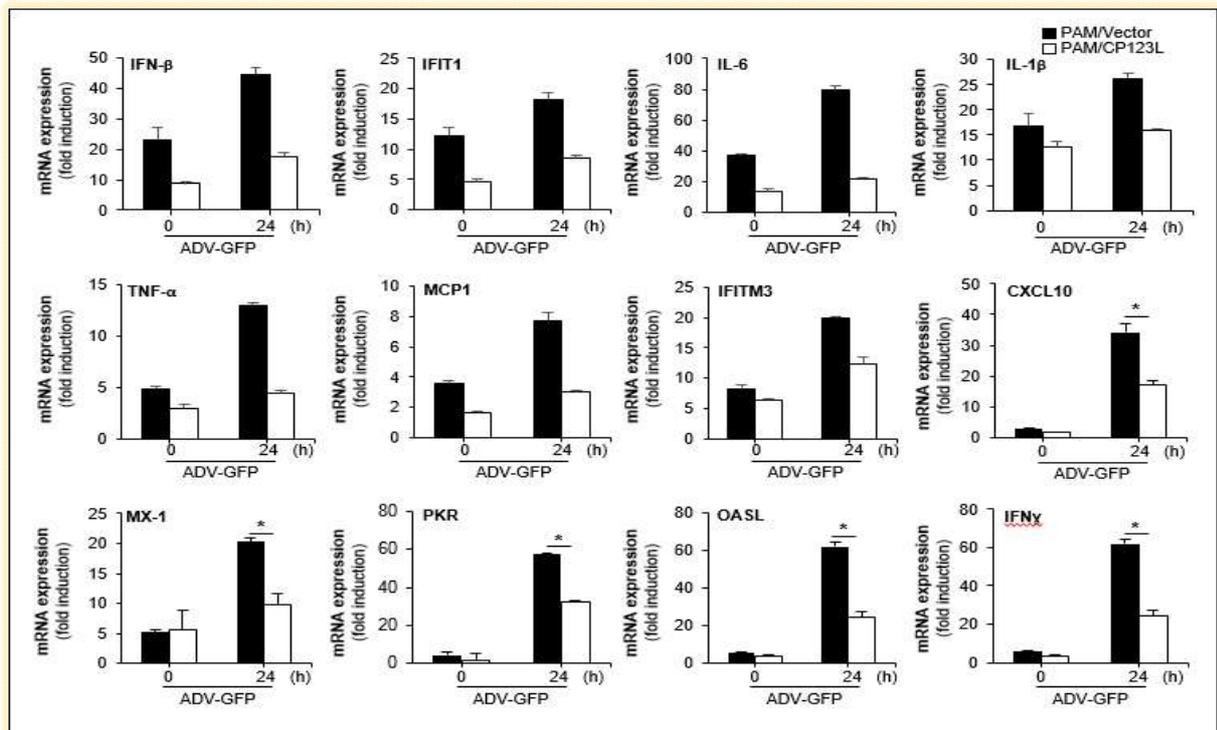


그림 80. ASFV CP123L 과발현 PAM 세포에서의 바이러스 감염 후 항바이러스 관련 유전자 발현 검증

- 다음으로 역시 PAM 세포와 PK15 세포에서 CP123L 단백질의 과발현에 의한 인터페론과 NF-κB 신호전달 체계에 대한 영향을 분석하기 위해 인터페론과 NF-κB 신호전달 체계내 주요 단백질들의 활성화 정도를 확인하였음.
- 측정 결과, 아래의 그림에서 보는 바와 같이 CP123L을 과발현하는 세포에서 TBK1, IRF3,

P65, STAT1 등의 활성화 수준이 컨트롤 세포보다 선명하게 감소하는 것이 확인되었음.

- 결론적으로, CP123L 단백질에 의해 인터페론과 NF- κ B 신호전달 체계가 억제되어, 이로 인해서 사이토카인의 분비가 감소하고, 바이러스 증식에 차이를 만들었음이 확인되었음.

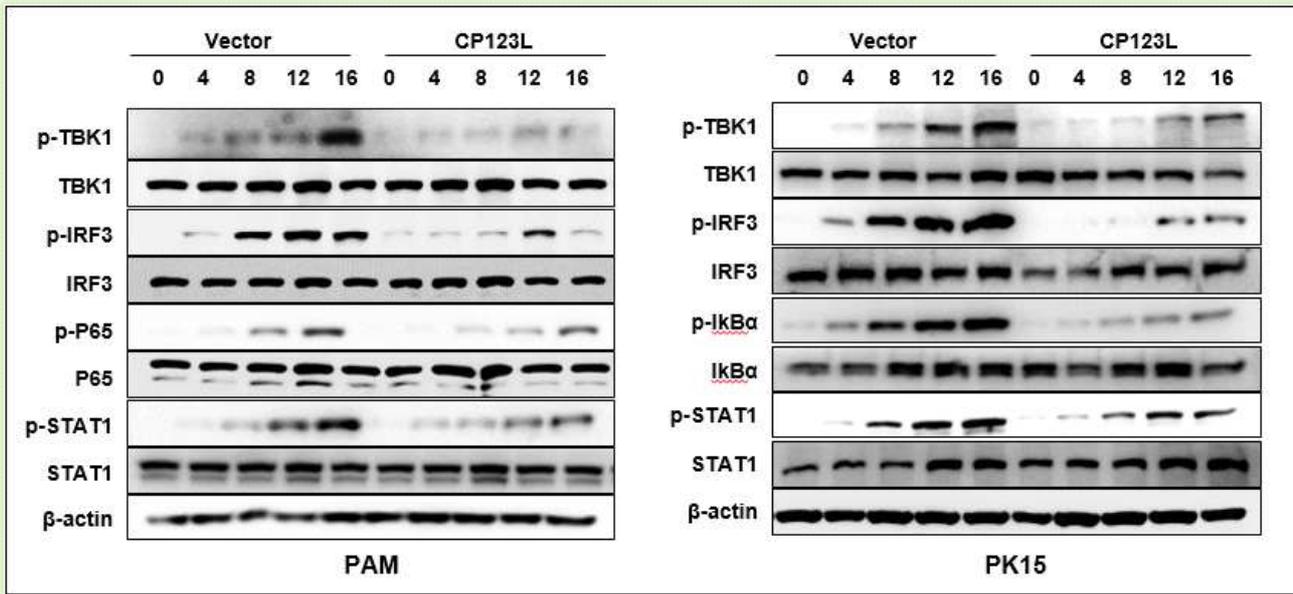


그림 81. ASFV CP123L 단백질 발현에 따른 신호전달 활성화 검증

- 이러한 CP123L 단백질의 세포내 효능이 어떠한 분자생물학적 기전에 의해 나타나는지를 확인하기 위해 다음의 연구를 수행하였음.
- ASFV CP123L 단백질이 숙주세포의 인터페론 신호전달 경로중 어떠한 위치에서, 어떠한 주요 단백질과 상호작용함으로써 negative regulation 역할을 하는지를 확인하기 위한 luciferase assay를 수행하였음. 인터페론 신호전달 경로에서 중요 역할을 담당하는 단백질들과 함께 CP123L 단백질을 발현시킨 후 IFN- β promoter의 활성화를 확인하였음.

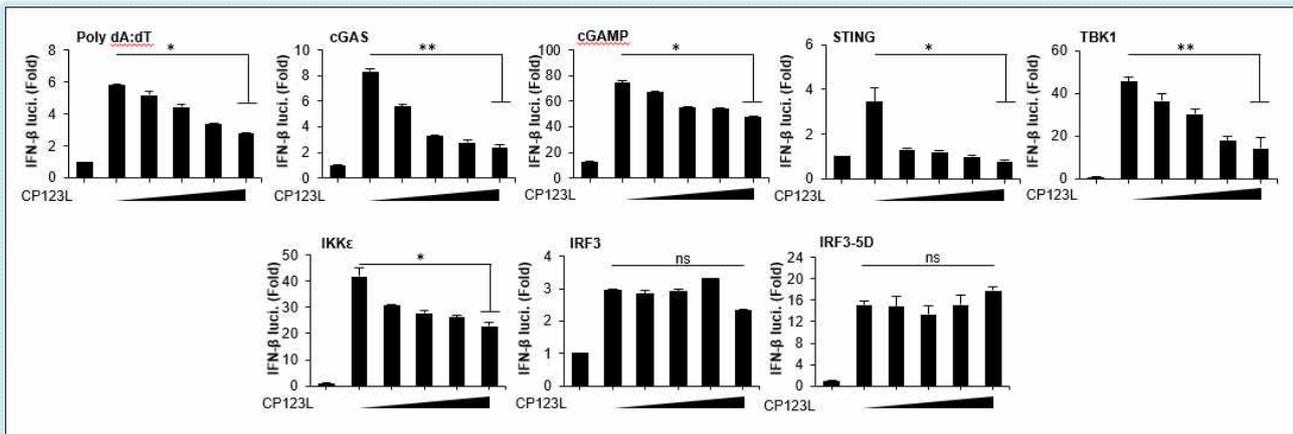


그림 82. ASFV CP123L 단백질에 의한 IFN- β promoter 활성 검증

- 실험 결과, Poly(dA:dT), cGAS, cGAMP, STING, TBK1, IKK ϵ 에 의해 증가한 IFN- β promoter의 활성이 CP123L 단백질의 dose-dependent 발현에 따라 감소하는 것이 확인되었음. 즉, CP123L 단백질은 TBK1 혹은 IKK ϵ 를 target 단백질로 하여 숙주세포의 인터페론 신호전달 경로를 억제할 가능성이 있음. 따라서, 본 연구에서는 CP123L 단백질과 TBK1 혹은 IKK ϵ 과의 interaction을 확인한 결과 CP123L 단백질이 IKK ϵ 와 서로 specific binding 함을 아래

와 같이 확인하였음.

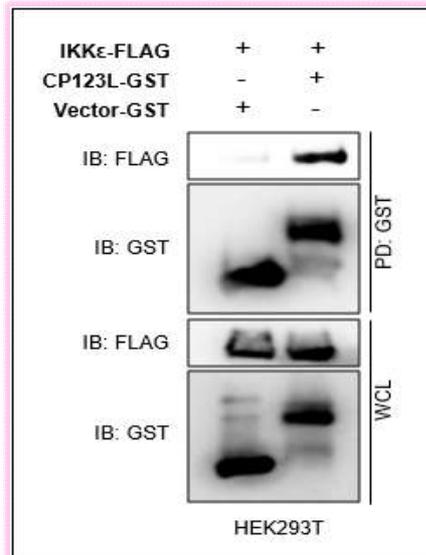


그림 83. ASFV CP123L 단백질과 IKKe의 interaction

- 결론적으로, 세포내 ASFV CP123L 단백질은 숙주세포의 인터페론 신호전달 경로에 있어 중요한 인자인 IKKe과 상호작용함으로써 숙주세포의 인터페론 분비 및 항바이러스 인자들의 기능을 억제할 가능성이 있고 보다 구체적인 기전연구를 향후 지속적으로 수행할 예정임.
- 세포내 ASFV CP123L 단백질은 숙주세포의 인터페론 신호전달 경로에 있어 중요한 인자인 IKKe과 상호작용함으로써 숙주세포의 인터페론 분비 및 항바이러스 인자들의 기능을 억제할 수 있으며, 보다 구체적인 기전연구를 수행하였음.
- 본 연구에서는 ASFV CP123L 단백질과 IKKe과의 interaction을 우선적으로 확인하였으며, IKKe의 어떤 domain과 interaction하는지를 확인하였음. 그 결과 ASFV CP123L 단백질은 IKKe의 kinase domain과 interaction 하였음 (그림13. C).
- 또한, 아래의 그림에서 보는 바와 같이, ASFV CP123L 단백질과 IKKe과의 interaction을 confocal microscopy로 확인을 하였음.
- 결론적으로, 세포내 ASFV CP123L 단백질은 숙주세포의 인터페론 신호전달 경로에 있어 중요한 인자인 IKKe과 상호작용함으로써 숙주세포의 인터페론 분비 및 항바이러스 인자들의 기능을 억제할 수 있으며, 보다 구체적인 IKKe와의 분자생물학적 병인기전 규명연구를 향후 지속적으로 수행할 예정임.

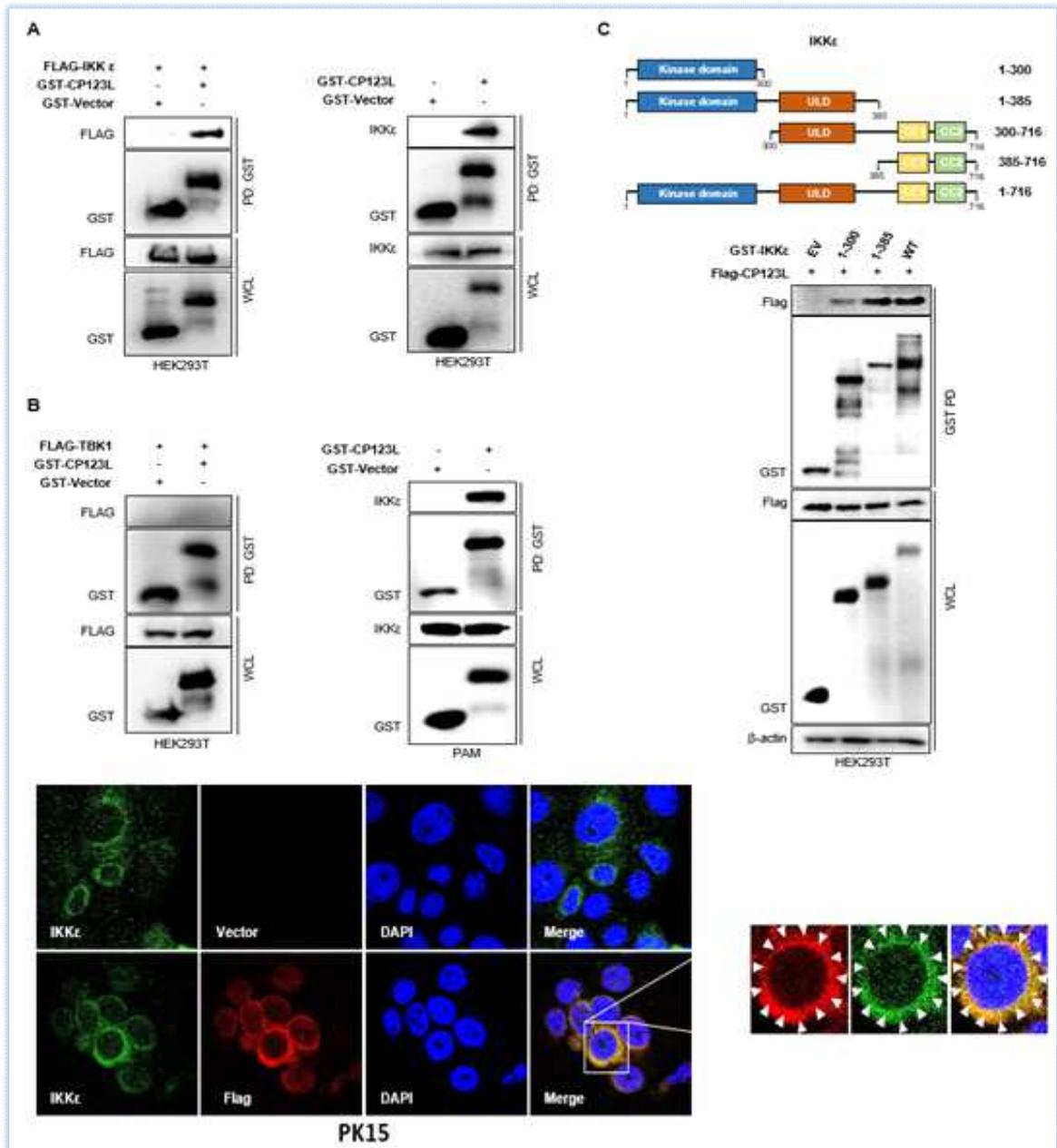


그림 84. ASFV CP123L 단백질과 IKK ϵ 의 interaction

2.3. 국제 협력 구축 및 ASFV에 감수성을 보이는 Pocine 유래의 cell line 개발 및 항원 연구

- ▶ ASF 바이러스의 배양이 가능한 돼지 유래의 세보주 준비/epithelial 세포주 선별
- 돼지 대식세포 초대 배양법 개발

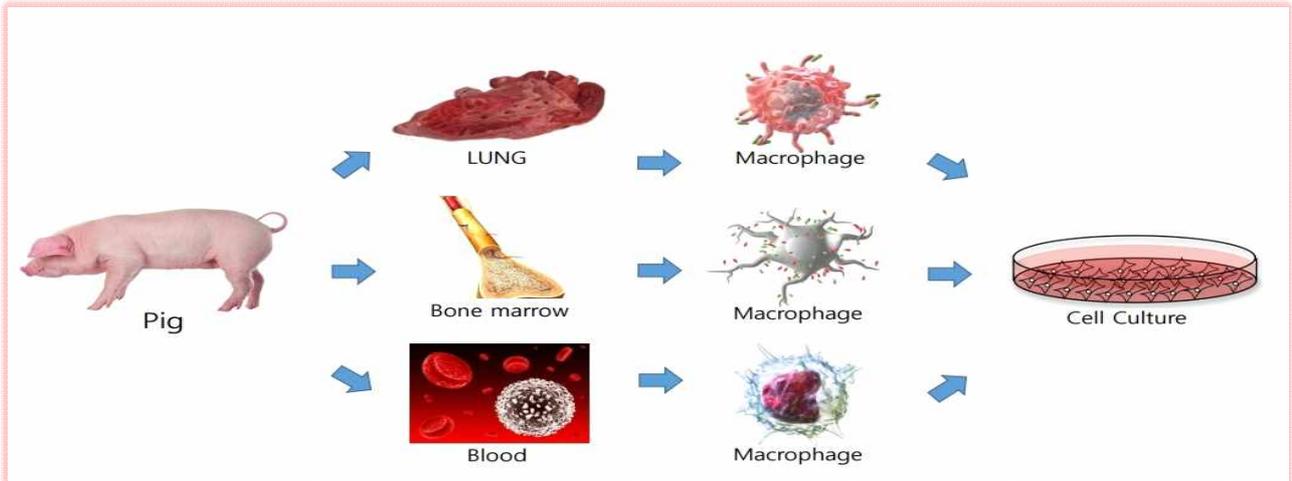


그림 82. 돼지로부터 대식세포의 수득

- 돼지 유래 초대배양 대식세포에서 분리, 증식되는 ASF 바이러스의 특징에 기인하여 기존의 방법보다 간소화된 배양법을 마련함.
- 본 배양법은 세포적응과 병원성 변이가 없는 높은 역가의 바이러스 배양을 위하여 현지에서 쉽고 빠른 대식세포의 즉시 공급이 목적임.
- 초대배양법을 적용하는 모든 돼지는 돼지 생식기호흡기증후군 바이러스와 돼지 2형 썬코바이러스의 음성 조건을 전제로 함.

- 폐장 유래 대식세포 배양법 확립

- 먼저, 돼지의 흉강을 노출 시킨 후 기관을 포셉으로 잡아 흉강으로부터 분리하고, 이때, 폐가 손상되지 않도록 하며 기관입구를 알코올로 소독한 후 50cc 주사기를 기관에 연결함.
- PBS 200ml을 주입하여 폐를 세척한 후, 추가로 100ml씩 3~4번 주입해 500ml의 기관지 폐포 세척액을 얻음.
- 기관지폐포세척액을 100nm의 스테인리스 필터를 통과시킨 후 1300rpm으로 4분 동안 원심 분리하여 세포를 수득하고, 수득한 세포를 10%FBS, Streptomycin(0.1mg/ml), penicilin(100 i.u./ml), gentamycin (0.1mg/ml) RPMI배지에 현탁 시켜 5% Co2 incubator 에서 2일 동안 배양하면 바이러스감염에 가능한 상태가 됨.
- 추후에 CD163과 CD172a와 같은 단핵구/ 대식세포 계통의 세포 표면 마커로 면역세포화학염색을 통해 세포의 특성을 확인할 수 있음.
- Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection(2003) 논문에 따르면 단핵구가 성숙하면서 CD163을 발현하는 정도가 ASFV의 감염과 연관이 있다고 발표함.
- 이번에 확립한 대식세포 배양법에서 90% 이상의 세포가 CD163을 충분히 발현하는 것을 면역 화학염색법으로 확인하였기 때문에 추후 바이러스 분리에 적합할 것으로 예측됨.

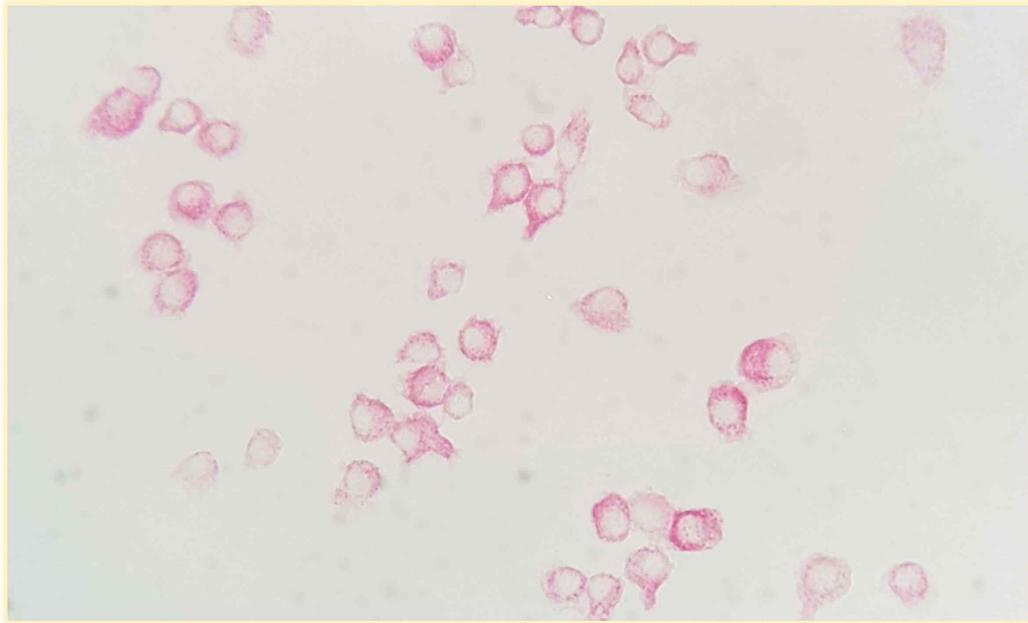


그림 83. 폐장 유래 대식세포의 CD163 세포표면마커 면역세포화학염색

- 혈액 유래 대식세포 배양법 확립
 - 이 방법은 별도로 돼지의 희생이 필요하지 않으므로 지속적인 병원체 모니터링이 수반될 경우에 반복적으로 시도될 수 있음.
 - 돼지의 바깥목정맥으로부터 채혈한 혈액을 혈액3.5ml와 PBS 3.5ml으로 1:1 희석하여 2ml의 Ficoll위에 분주하고, 3500rpm의 속도로 30분 동안 원심분리하면 monocyte로 이루어진 세포층이 만들어지는데 이 층의 세포를 수득하여 PBS에 2000rpm, 15분 동안 원심분리하여 세척한 후, 다시 10%FBS, 100U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 0.25ug/ml Amphotericin B를 포함하는 RPMI배지에 현탁하여 5% CO2 incubator에서 배양함.
 - 2일후 상층액과 함께 부유세포를 제거하고 새로운 배지로 1일간 추가로 배양하면 대식세포와 유사한(macrophage-like) 세포를 얻을 수 있음.

- 돼지 조직세포 초대 배양법 개발
 - 연속적으로 계대가 불가능한 돼지 유래 초대배양 대식세포의 단점을 극복하기 위하여 초대배양의 장점은 살리되, 계대가 가능한 돼지 유래 조직세포 배양법을 마련함.
 - 본 배양법은 일차적으로 대식세포에서 빠르게 증식한 바이러스를 연속적으로 병원성 변이 없이 초대배양세포에서 증식시키기 위함이 목적임.
 - 조직세포의 초대배양법 또한 돼지 생식기호흡기증후군 바이러스와 돼지 2형 썬코바이러스 음성 돼지의 사용을 전제로 함.

- 신장 유래 조직세포 배양법 확립
 - 먼저, 돼지의 후복강을 노출시킨 후 신장을 적출하고, 신장의 섬유막을 제거하고 피질부위를 여러 조각(3-5g)으로 잘게 자른 후, 수술용가위로 곱게 갈아낸 후 갈아진 신장조직을 Collagenase(0.5ml/ml), Dispase(250 U/ml), DNase I (13 U/ml) 효소를 포함하는 완충액에

서 37도로 약 1시간 소화시킴.

- 소화된 조직액을 100mm 스테인리스망으로 걸러 세포를 수득하고, 수득한 세포를 순수한 RPMI-1640배지를 사용하여 현탁 시킨 후, 600rpm 2분의 조건으로 원심분리하여 세포를 세척함.
- 같은 방법으로 약 3번의 세척이 완료되면 10%FBS, 0.005mM 2-mercaptoehanol, 10ug/ml insulin, 100U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 0.25ug/ml Amphotericin B를 포함하는 RPMI배지에 신장 조직세포를 재현탁 시켜 곧바로 5% CO₂ 조건에서 배양함.
- 2주 정도의 배양으로 세포주가 안정화되면 비로소 바이러스에 감염에 가능한 상태가 되며, 이 배양법은 신장의 상피세포(epithelial)뿐 아니라 내피세포와 섬유아세포를 포함하는 간엽세포(mesenchymal)의 혼합배양임.

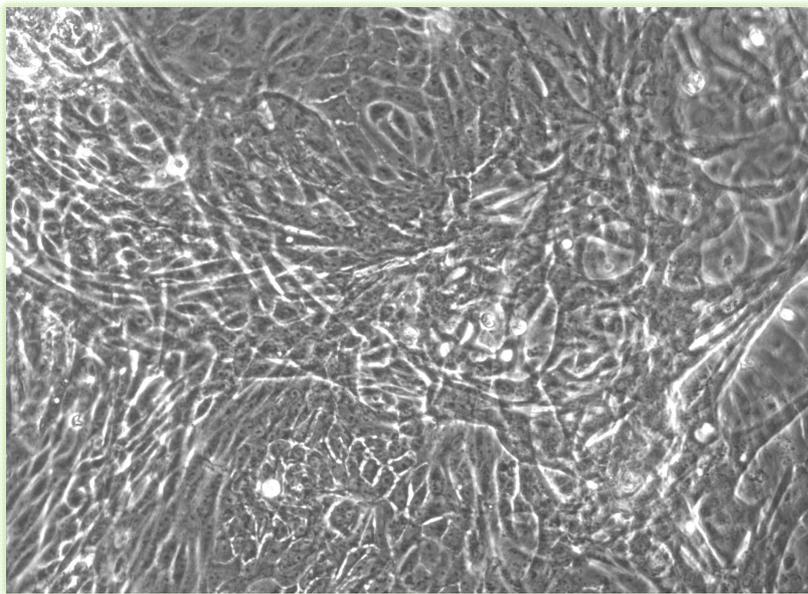


그림 84. 신장조직세포혼합배양 현미경사진 200x

- 간 유래 조직세포 배양법 확립
 - 전반적인 방법은 신장 유래 조직세포 배양법과 크게 다르지 않음.
 - 충분히 방혈을 시행한 상태의 돼지에서 복강을 노출시킨 후, 후대정맥과 간동맥을 포셉으로 잡아 간을 적출해내고, 간 실질을 Collagenase(0.5ml/ml), Dispase(250 U/ml), DNase I (13 U/ml) 효소를 포함하는 완충액에서 여러조각(3-5g)으로 잘게 자른 후, 수술용가위로 곱게 갈아냄.
 - 소화된 조직액을 100mm 스테인리스망에 걸러 결합조직과 같은 소화되지 않은 조직파편을 걸러내어 세포를 수득하고, 수득한 세포를 순수한 MEM배지를 사용하여 현탁 시킨 후, 600rpm 2분의 조건으로 원심분리하여 세포를 세척함.
 - 같은 방법으로 약 3번의 세척이 완료되면 10%FBS, 100uM 2-mercaptoehanol, 10ug/ml insulin, 100U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 0.25ug/ml Amphotericin B를 포함하는 DMEM배지에 간 조직세포를 재현탁 시켜 곧바로 5% CO₂ 조건에서 배양함.
 - 2주 정도 배양이 안정화되면 대부분의 간세포는 상피세포의 형태를 잃고 섬유아세포와 같은 모

양을 띄게 된 후 바이러스 감염을 시도할 수 있음.

▶ 선별한 세포주에서 ASF 바이러스 증식/유전자발현 분석

● 돼지 신장유래 조직세포를 이용한 ASFV 분리

- 1차년도에서 개발한 돼지 신장 조직세포 초대 배양법을 이용하여 상피세포(epithelial)뿐 아니라 내피세포와 섬유아세포를 포함하는 간엽세포(mesenchymal)의 혼합배양을 실시하였다. 이러한 배양한 세포들을 이용하여 아래와 같은 방법으로 ASFV 분리를 시도하였음.

① ASFV 양성 돼지조직샘플을 준비한다.

② 37°C 5% CO₂ 조건에서 RPMI(10% FBS, 1% antibiotics)배지를 사용하여 25 cm² flask 와 96 well cell plate 에서 세포를 incubation 한다.

③ 배양중인 세포를 1% trypsin 을 이용하여 flask 로부터 띄운 후, 바이러스 양성 조직 현탁액과 혼합하는 co-infection 방법을 사용한다. 감염 후 배양은 37°C 5% CO₂ 조건에서 incubation 한다.

④ 감염후 7 일째까지 바이러스가 세포에 일으키는 cytopathic effect 를 관찰하고 감염 7 일차에 면역세포화학염색(immunocytochemistry)을 실시한다. 세포염색에는 ASFV 구조단백질 p30 과 p72 에 특이적인 항체를 이용한다.

- 결과적으로 본 연구팀이 배양한 돼지 신장유래 조직세포는 아프리카돼지열병바이러스에 감수성이 있다는 사실을 면역세포화학염색을 통해 확인 할 수 있었다.



그림 88. 신장유래 조직세포에서 면역세포화학염색사진. 왼쪽에서부터 각각 negative, p30염색, p72염색

● 돼지 신장유래 대식세포 초대배양법 확립

- 대식세포는 아프리카돼지열병바이러스의 1차 주요 타겟 세포로 전통적으로 바이러스 분리를 통한 진단법이나 최근에는 백신후보주 바이러스의 생산을 위해 사용되는 등 그 활용도가 매우 높다. 그러나 1차년도에서 확립한 혈액유래 대식세포나 폐유래 대식세포 배양법은 공여동물로부터 충분한 세포수를 얻을 수 없으므로 여러 마리의 동물을 희생시켜야하는 윤리적 제약이 뒤따른다. 또한, 수득시마다 다양하게 달라지는 세포 표현형은 균일한 바이러스 증식 세포실험에 문제를 야기하였음.

- 이에 2차년도에서 서울대학교는 신장으로부터 유래하는 대식세포 초대 배양법을 새로이 확립하였다. 간략하게 보면 일차년도에서 확립한 신장유래 조직세포배양으로부터 대식세포 배양을 시작하여야 함.

- 먼저, 적출한 신장을 곱게 갈아 Collagenase (0.5ml/ml), Dispase(250 U/ml), DNase I (13

U/ml) 효소를 포함하는 완충액에서 소화시킨 후 소화된 조직액을 스테인리스망으로 걸러 세포를 수득한 다음, RPMI-1640배지를 이용하여 세포를 세척해줌.

- 약 3번의 세척이 완료되면 10%FBS, 0.005mM 2-mercaptoethanol, 10ug/ml insulin, 100U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 0.25ug/ml Amphotericin B를 포함하는 RPMI배지에서 신장 조직세포를 5% CO₂ 조건에 배양함.
- 2~3주정도 배양하면 신장의 상피세포(epithelial), 내피세포(endothelial cell), 섬유아세포(fibroblast)가 혼합되어 다각형의 섬과 방추형의 끈처럼 보이는 세포층을 형성하는데, 이 세포층으로부터 마크로파지와 같은 원형의 세포들이 형성되기 시작함.
- 이 세포들은 신장조직세포층에 약하게 붙어있어 세포배양 플라스크를 흔들어 상층액에 띄운 후 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 원심분리(2000rpm/5min)하는 방법으로 세포를 수득함.
- 위와 같은 방법으로 한 개의 T-75 flask로부터 1 x10⁶cells에 달하는 세포를 수득할 수 있고, 이 방법으로 2달 동안 3~4일에 한번씩 지속적으로 충분한 양의 세포를 수득할 수 있으므로 기존의 다른 대식세포가 가진 윤리적 문제나 불균일한 세포 표현형의 단점을 극복할 수 있음. 이렇게 수득한 세포들은 대식세포 계통의 수용체인 CD163과 CD172a을 발현하였다는 것을 면역세포화학염색을 통해 확인하였음.

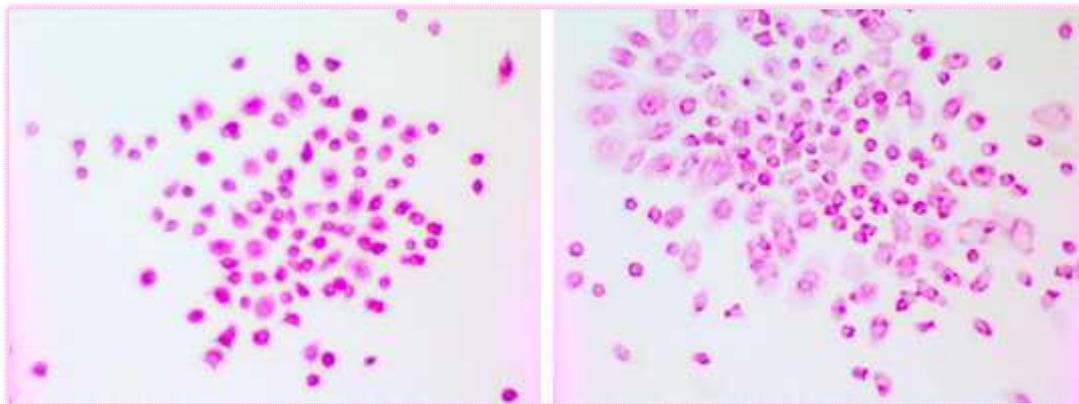


그림 89. 면역세포화학염색. 왼쪽 (CD163), 오른쪽 (CD172a)

● 돼지 신장유래 대식세포를 이용한 ASFV 분리

- 본 연구팀이 2차년도에서 새로이 확립한 신장유래 대식세포를 이용하여 ASFV 분리를 시도함.
- 바이러스의 세포감염방법은 신장유래 조직세포를 이용한 바이러스 분리법과 같은 co-infection 방법을 이용하였음.
- 감염된 돼지 신장유래 대식세포는 바이러스 구조단백질 p30과 p72에 특이적인 항체를 이용한 면역세포화학염색에서 양성반응을 보였음.
- 이러한 결과를 통해 신장유래 대식세포는 ASFV에 감수성이 있고 추후 바이러스 계대배양을 통해 백신생산 후보 셀라인으로서의 가능성을 보임.

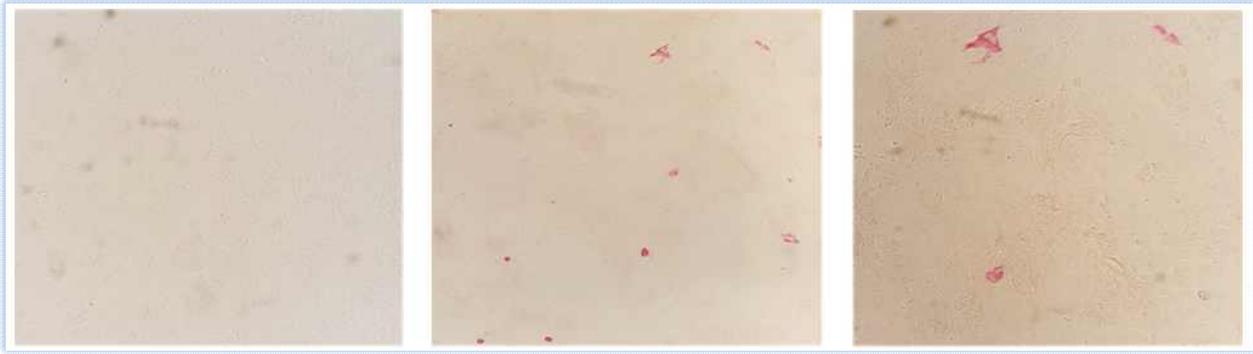


그림 90. 신장유래 대식세포에서 면역세포화학염색사진. 왼쪽에서부터 각각 negative, p30염색, p72염색

▶ 계대배양 세포주에서 ASF 바이러스 배양 최적화

● 돼지 신장유래 대식세포주를 이용한 ASF 바이러스 증식 배양 확립

- 서울대학교는 지난 1,2년도 연구개발을 통해 지속적으로 초대 배양 세포 (primary cell)를 이용한 연구를 지속해왔고, 돼지 신장세포를 이용한 연구 중에서도 특히 돼지 신장세포 유래 대식세포를 개발하여 아프리카 돼지열병바이러스 베트남 균주를 분리하고 증식하는 데 성공함.
- 이번 3차년도에서는 확립된 돼지 신장유래 대식세포 배양법을 이용하여 ASFV 베트남 균주를 분리하고 그 증식능을 다른 세포주와 비교 분석하여 *Frontiers in Veterinary Science*, 2021에 게재함.

● 돼지 신장유래 대식세포의 분자적 특성 규명

- 돼지 신장유래 대식세포는 돼지로부터 직접적으로 유래한 일차 세포로서, 기존에 ASFV의 분리 배양을 위해 널리 사용되는 폐 대식세포가 가지는 분자적인 특성을 모두 갖고 있음.
- 이를 증명하기 위해 서울대학교에서는 대식세포 표면 마커 CD163, CD172a, Iba1에 대한 단클론항체를 통한 세포면역염색을 실시하였고, 그 결과 돼지 신장 배양으로부터 얻은 대식세포들이 CD163, CD172a, Iba1를 모두 발현한다는 것을 증명함.

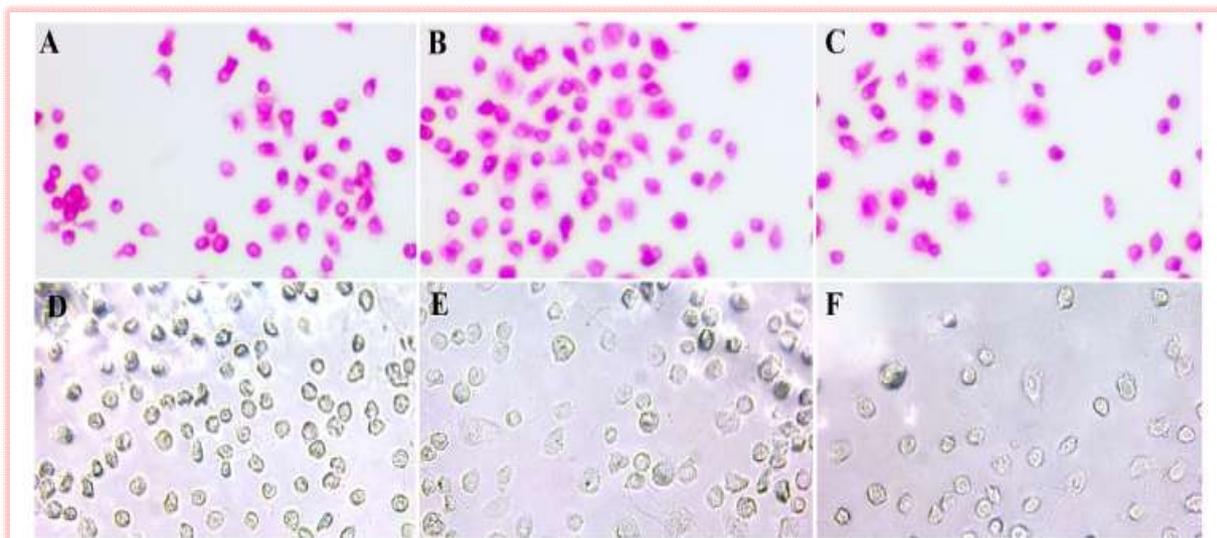


FIGURE 1 | Immunocytochemical characterization of renal-derived swine macrophages using monoclonal antibodies against macrophage markers CD163 (A), 172a (B), and Iba1 (C), epithelial cell markers CK18 (D) and CK19 (E), and mesenchymal cell marker SMA (F) ×400.

그림 91. 신장유래 대식 세포 내 대식 세포 표면 마커 확인 시험

- 돼지 신장유래 대식세포에서 ASFV 분리 배양 확인

- ASFV가 대식세포 감염되었다는 것을 증명하기 위해 ASFV 단백질 p30, p72에 특이적인 단클론 항체를 이용하여 세포면역화학염색을 시행하였고, 그 결과 세포질내에서 p30, p72가 모두 검출됨.

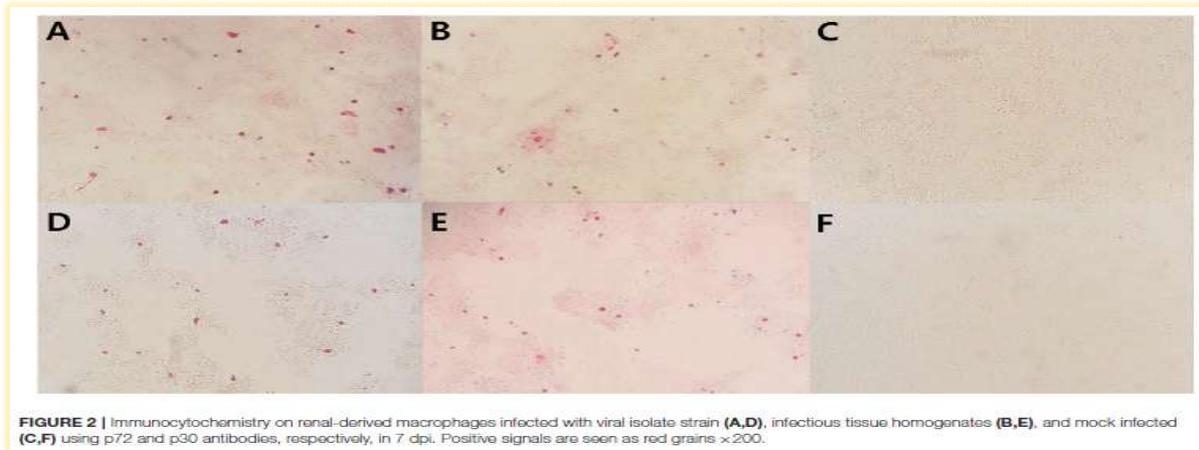


그림 92. 신장유래 대식 세포 내 ASF 바이러스 증식성 확인 (P30, P72)

- 돼지 신장유래 대식세포에서 분리한 ASFV 베트남 균주의 증식 분석

- 기존에 확보한 분리균주(MW287337)과 야외주(MW039157)를 각각 돼지 신장유래 대식세포에 접종하여 7일 동안 증식을 확인함.
- 증식능을 확인하기 위해 감염력있는 바이러스를 측정할 수 있는 TCID method와 바이러스 유전자 증폭 정도를 확인할 수 있는 Real time PCR을 시행하였고, 또한, 기존의 확립된 상용화 세포주 MA-104와 비교하여 돼지 신장유래 대식세포의 바이러스 증식능을 분석함.
- 그 결과 대식세포 배양 상층액에서 바이러스 유전자가 시간이 지남에 따라 증가하고, 감염력있는 바이러스 역가 또한 증가하는 것을 확인함.
- MA-104와 비교해보았을 때, 신장유래 대식세포는 야외주 바이러스에 대하여 더 높은 증식성을 보였고, 분리주 바이러스에 대하여 더 낮은 증식성을 보임.
- 따라서 신장유래대식세포는 야외주 분리에 좀 더 적합하고 유용하게 쓰일 수 있다는 것을 시사함.

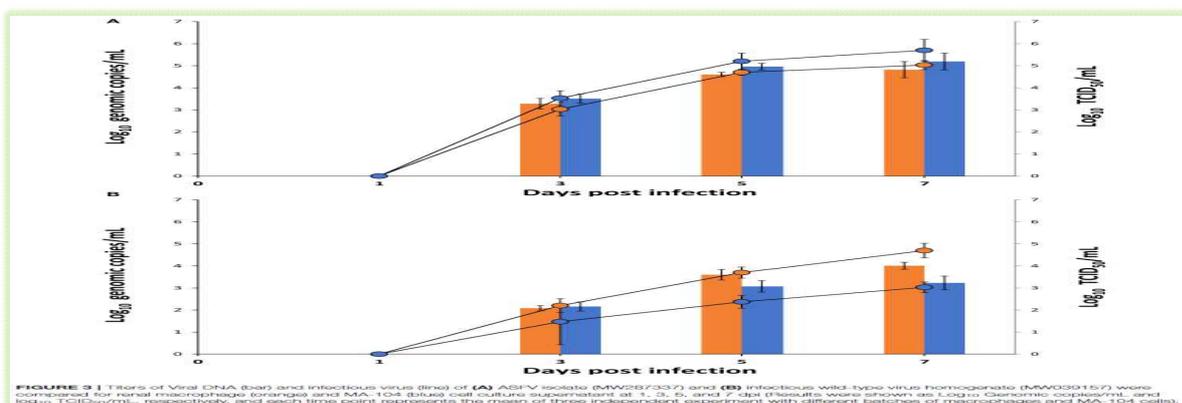


그림 93. 신장유래 대식 세포와 MA-104 세포 내 ASF 바이러스 증식성 비교

- ▶ 아프리카돼지열병 발병 농장에서 병리학 분석 연구

- 아프리카돼지열병바이러스에 감염된 돼지들에 대한 병리학 분석 수행

- 서울대학교에서는 ASFV에 감염된 돼지들로부터 다양한 장기를 샘플링하여 만든 파라핀 조직을 이용하여 육안 병변, 조직 병변, 바이러스 항원분포를 분석하고, 다양한 연령에서 비교 분석하여 Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2021에 게재함.
- 이러한 병리학적 분석 연구를 통하여 아시아에서 발생하는 ASF 병인론을 밝혀내고, 추후에 신규 ASFV 백신이 개발될 경우에 대비하여 야외 임상시험을 실시하기 위한 기준을 마련함.

● 폐

- 육성돈에서 이유자돈과 모돈에 비하여 더 심한 육안병변(부종, 울혈)을 보였고, 세 연령의 그룹 모두 비슷한 조직병변(부종, 출혈, 염증세포 침윤)을 보였음.
- 또한, 이유자돈에서 육성돈과 모돈에 비하여 ASFV 항원 양성세포가 더 많은 것을 확인함.

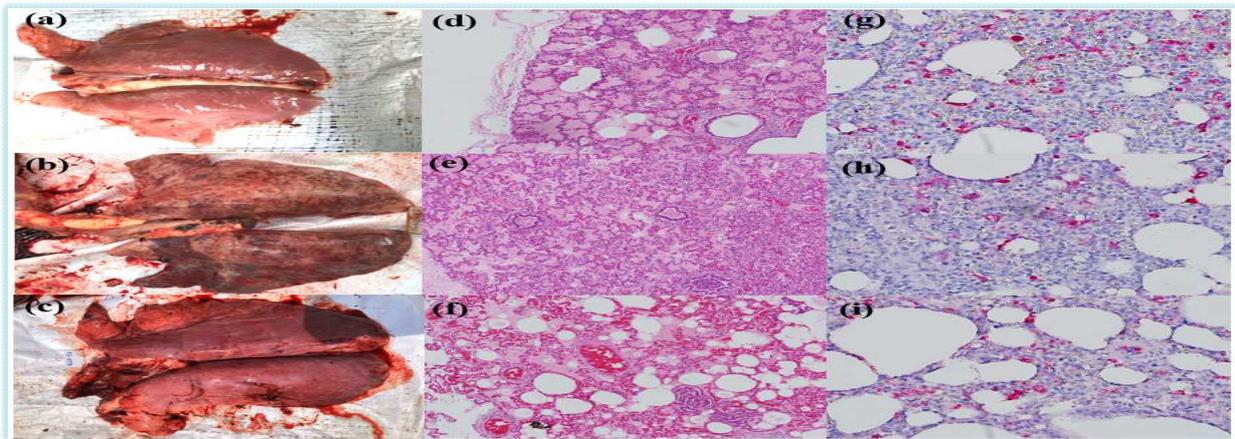


그림 94. (a,d,g) 이유자돈, (b,e,h) 육성돈, (c,f,i)모돈 의 폐 병리 사진

● 간

- 세 연령의 그룹모두 비슷한 육안병변(발적, 담관출혈, 담낭부종)을 보였고, 육성돈에서 이유자돈과 모돈에 비하여 더 심한 조직병변(혈관 확장, 간세포 변성)을 보였으며, 이유자돈에서 육성돈과 모돈에 비하여 ASFV 항원 양성세포가 더 많은 것을 확인함.

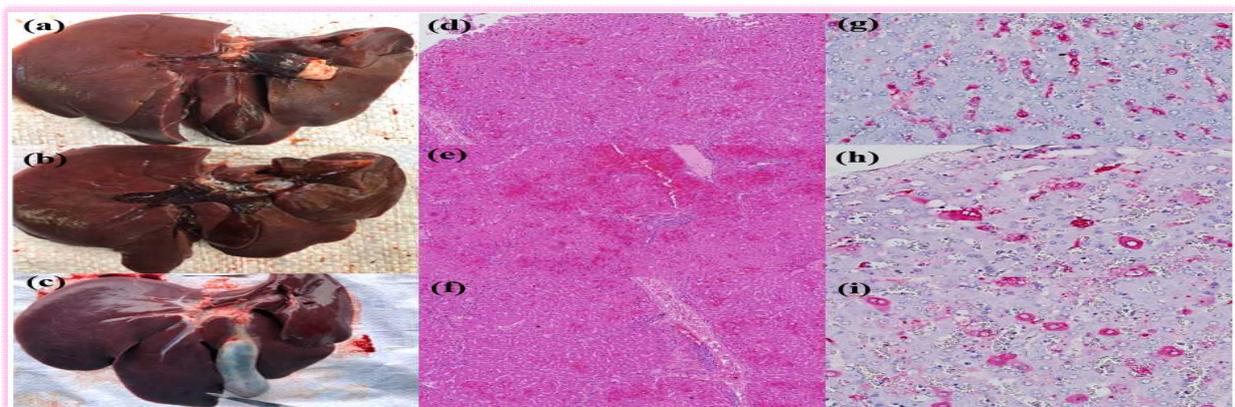


그림 95. a,d,g) 이유자돈, (b,e,h) 육성돈, (c,f,i)모돈 의 간 병리 사진

● 비장

- 이유자돈과 육성돈에서 모돈에 비하여 더 심한 육안병변(비장종대, 울혈)을 보였고, 이유자돈에

서 모돈에 비하여 더 심한 조직병변(림프구사멸, 괴사, 울혈)을 보였으며, 세 연령의 그룹 모두 비장에서 비슷한 ASFV 양성 세포수를 보였음.

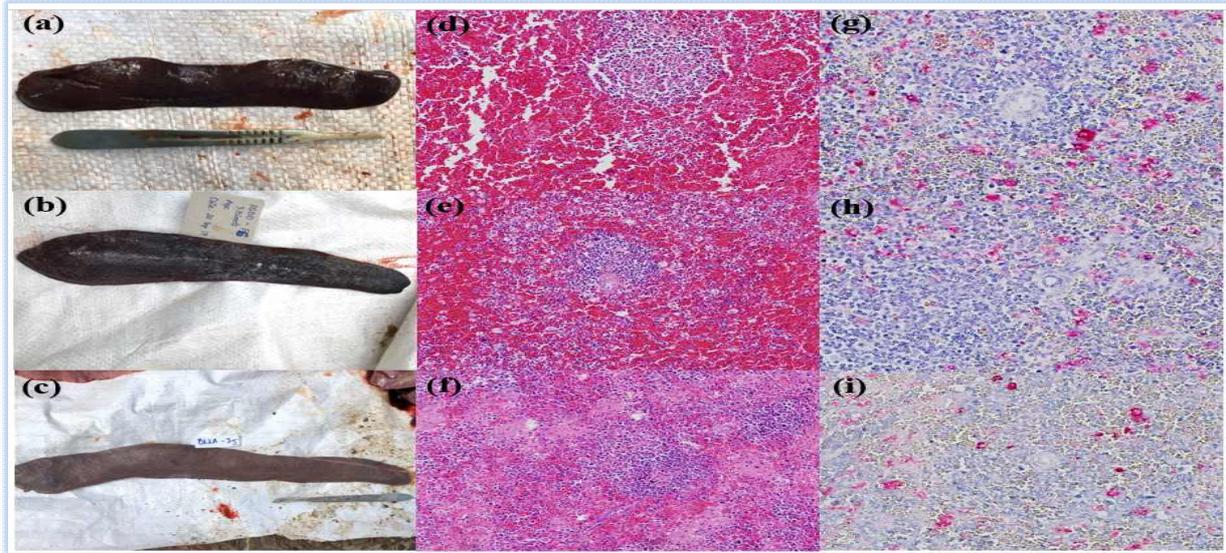


그림 96. (a,d,g) 이유자돈, (b,e,h) 육성돈, (c,f,i)모돈 의 비장 병리 사진

● 신장

- 이유자돈과 육성돈에서 모돈보다 더 심한 육안병변(피질, 수질 출혈)을 보였고, 이유자돈과 육성돈에서 모돈보다 더 심한 조직병변(출혈, 세뇨관 괴사)을 보였으며, 세 연령의 그룹 모두 신장에서 비슷한 ASFV 양성 세포수를 보였음.

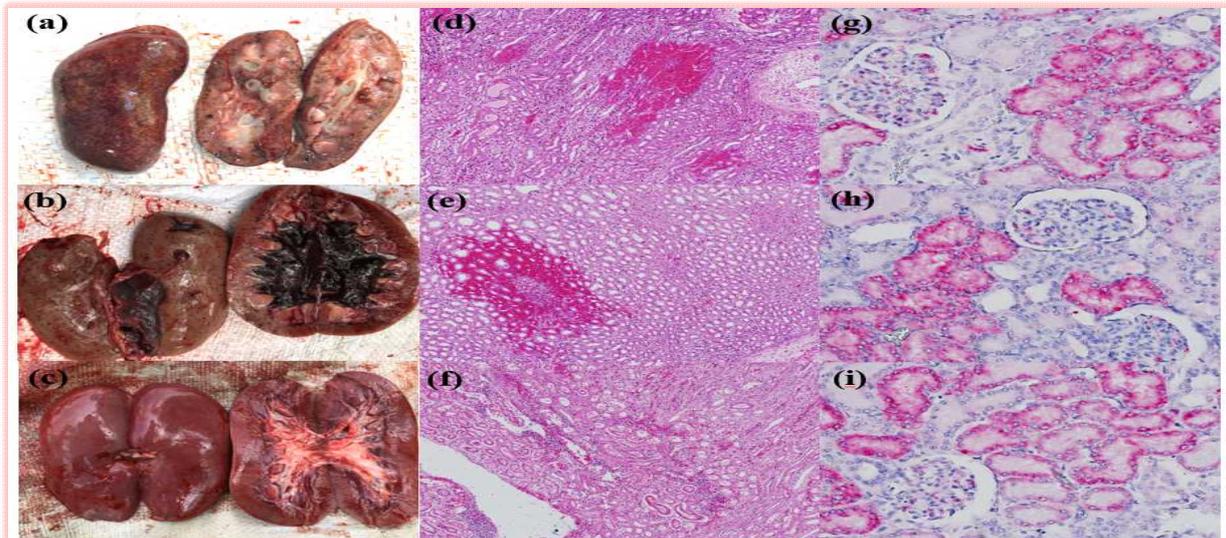


그림 97. (a,d,g) 이유자돈, (b,e,h) 육성돈, (c,f,i)모돈 의 신장 병리 사진

● 림프절

- 육성돈에서 이유자돈과 모돈에 비하여 더 심한 육안병변(울혈, 비대)를 보였고, 육성돈에서 이유자돈에 비하여 더 심한 조직병변(림프조직 소실, 출혈)을 보였으며, 이유자돈에서 육성돈과 모돈에 비하여 ASFV 항원 양성세포가 더 많았다.

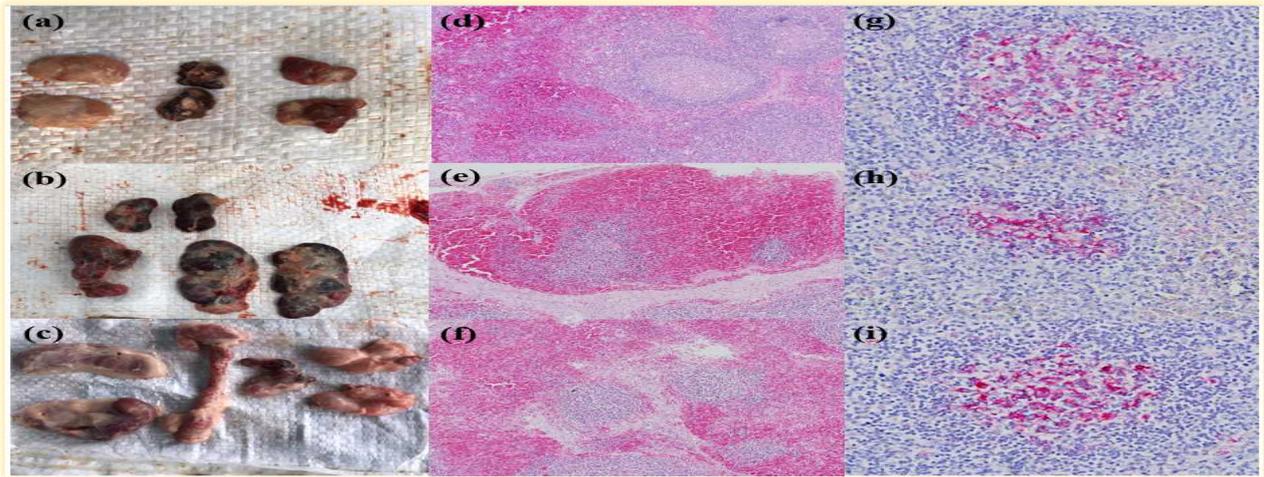


그림 98. (a,d,g) 이유자돈, (b,e,h) 육성돈, (c,f,i)모돈 의 신장 병리 사진

▶ 아프리카돼지열병 발병 농장에서 역학 분석 연구

● 아프리카돼지열병에 대한 역학 분석 연구의 필요성

- 앞으로 신규 개발하게 될 백신을 평가하기 위해서는 야외임상시험이 필수적이고, 현재 우리나라에서 아프리카돼지열병은 산발적으로 발생하고 있는 반면에 베트남에서는 아프리카돼지열병이 지속적으로 유행하고 있음.
- 베트남에서 발생하는 아프리카돼지열병은 급성으로 증상을 일으키고, 그 바이러스는 유전자형 2형으로 우리나라와 매우 비슷한 것으로 알려져 있음.
- 따라서 서울대학교는 추후에 개발될 백신을 평가하기 위한 기준을 마련하고, 더 나아가 우리나라에서 아프리카돼지열병이 유행하게 될 상황에 대비하기 위해 베트남에서 역학조사를 실시하여 Transboundary Emerging Diseases. 2021년에 게재하였다.

● 아프리카돼지열병이 발생한 농장에서 역학 조사 수행

- 먼저 아프리카돼지열병이 터진 농장 1개를 특정지어 역학 조사를 실시하였고, 이 농장은 처음 15마리의 모돈에서 ASF관련 임상증상을 보인 후, PCR 검사로 양성인 확인되었고, 이 후로 이유자돈사, 육성자돈사에 연이어 급성 ASF가 확산됨.
- 이에 서울대학교에서는 폐사가 가장 심하게 나타난 이유자돈사에 대하여 장기간 추적조사를 실시하였고, 479마리의 7주령으로 구성된 이유자돈사에서는 출입구쪽에 위치한 돈방들부터 ASF관련 임상증상과 폐사가 나타나기 시작하였음.
- 이는 다른 돈사를 통한 직원들의 빈번한 출입과 관련한 것으로 보이며, 49일령에 처음 1개의 돈방에서 증상이 나타난 이후로 27일만에 모든 돈방에 있는 돼지에서 임상증상과 폐사 (85.39%)가 발생하여 91일령에는 단지 70마리(14.61%)의 이유자돈들이 생존함. (그림 20).

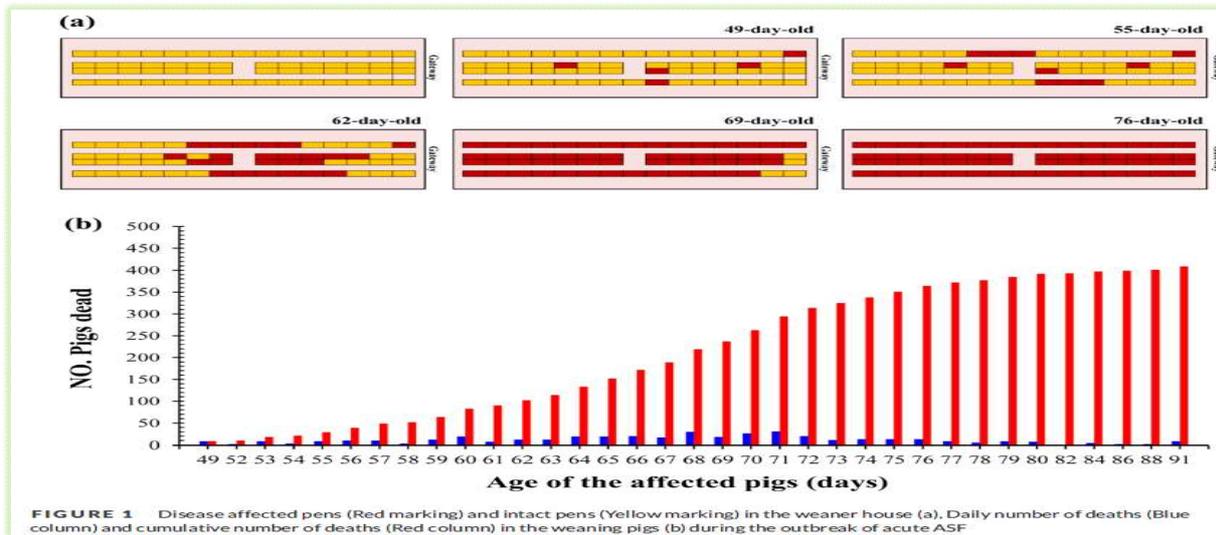


그림 99. ASFV 발생 농장 내 역학 조사

- 아프리카돼지열병으로부터 회복한 동물에 대한 장기적인 추적 연구
 - 생존한 70마리의 이유자돈 중 건강한 14마리의 암컷 자돈을 선별하여 14달 동안 장기적인 추적 관찰 조사를 실시하였고, 그 결과 70일 동안 돼지들의 혈액과 비강에서 바이러스가 검출되었고, 그 이후로는 모든 개체가 바이러스를 배출하지 않았으며 재감염되지 않았음(그림 21).
 - 해당 돼지들에서는 ASFV에 특이적인 항체가 혈청에서 높게 검출되었을 뿐만 아니라 관찰 기간 동안에 후보돈으로 선발되어 분만한 새끼들에서도 ASFV 특이 항체가 포유기간 동안 지속적으로 검출되었음(그림 22).
 - 이 연구를 통해 아프리카돼지열병이 농장내에서 급성으로 확산되는 양상을 파악할 수 있었고, 또한 아프리카돼지열병으로부터 회복된 동물이 바이러스를 배출하지 않고 높은 항체가를 갖는다는 점과 그 새끼들에서도 모체이행항체가 검출되었다는 점으로 미루어볼 때, 회복된 동물을 이용한 농장 재입식 전략의 가능성을 제시할 수 있음.

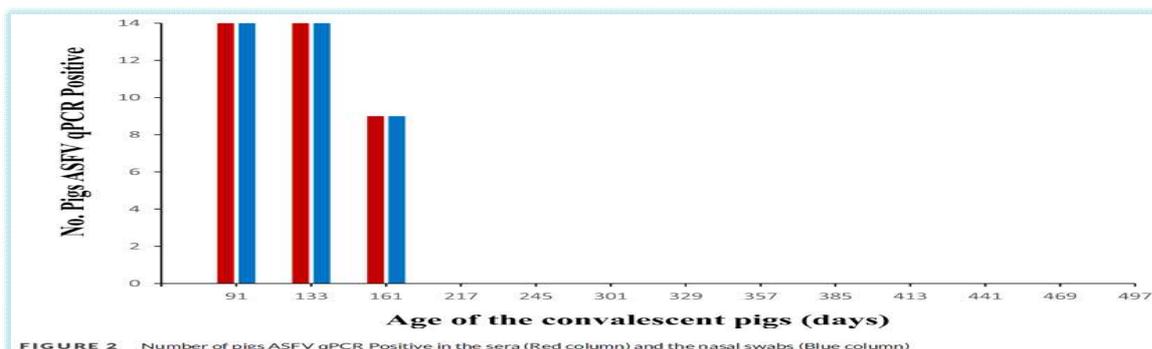


그림 100. ASFV 감염 돼지 내 바이러스 한계 검출 기한 확인 시험 (CT-value)

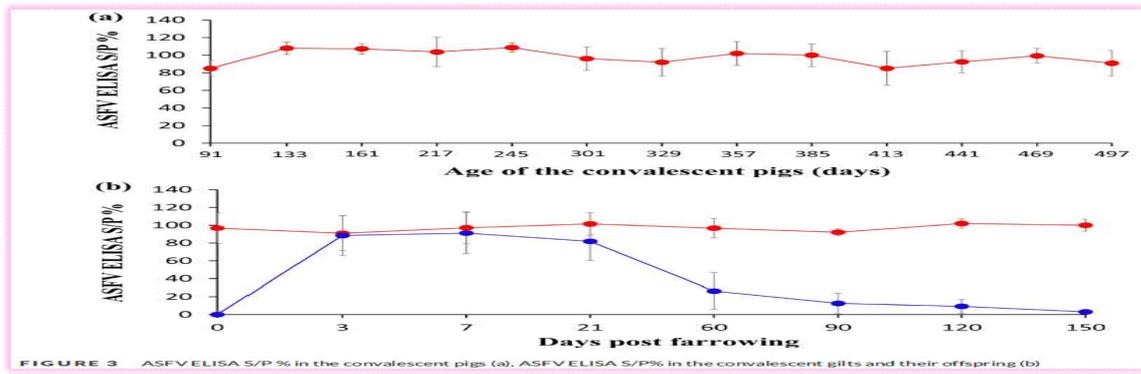


그림 101. ASFV 감염 돼지 내 특이 항체 검출 확인 시험

▶ ASFV 실험 감염모델 병인론 연구

- 지난 연구에서 분리한 베트남 ASFV 균주 (D/VN/BD/2019)를 1x10⁴ TCID₅₀/mL의 역가로 3ml씩 20마리의 8주령 돼지들에게 접종한 후, 1, 3, 5, 7, 10일에 4마리씩 돼지를 희생하고(그림14), 10일에 희생 예정된 개체들이 9일에 급성 아프리카돼지열병으로 사망함.

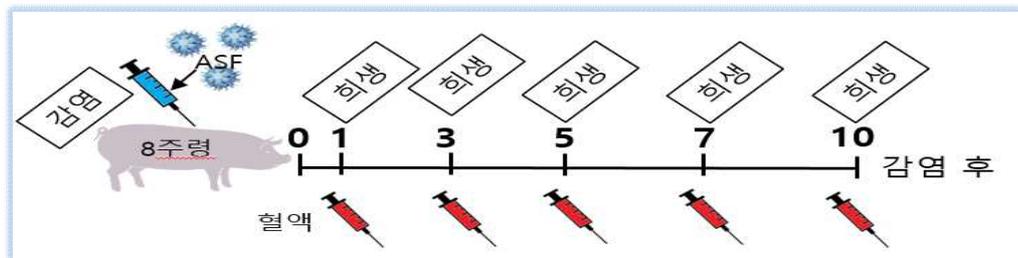


그림 102. ASFV 실험감염 모델 디자인

- 임상학적으로 감염 후 시간에 따른 직장온도와 임상증상을 관찰한 결과, 임상증상은 식욕부진, 운동불능, 출혈반점/청색증, 호흡곤란, 비루 항목에 대하여 0: 정상, 1:경미, 2: 보통, 3:심각으로 점수를 매겼다. 체온은 5dpi부터 41도 이상으로 고열을 보였고, 임상증상도 5dpi부터 눈에 띄게 나타나기 시작함.

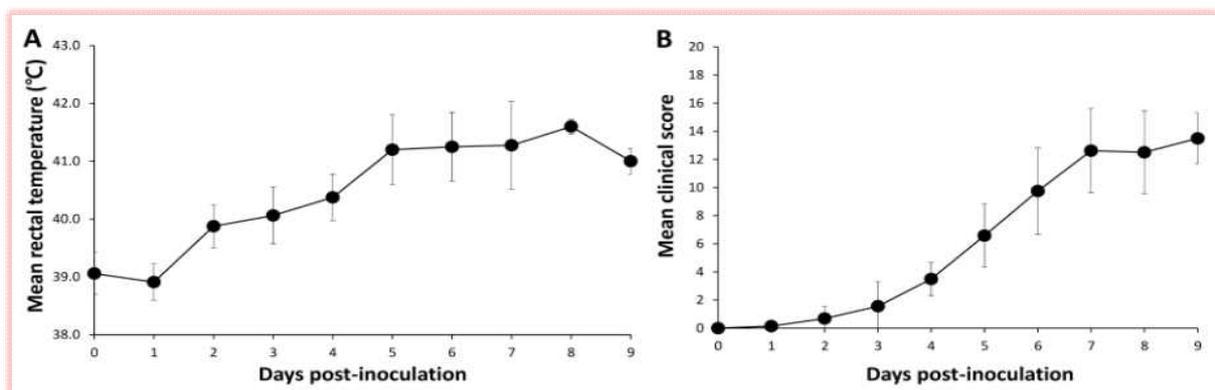


그림 103. 실험감염개체에서 직장온도(A)와 임상증상 스코어(B)

- 바이러스학적으로 시간에 따른 혈중 바이러스 농도 변화를 측정된 결과, 바이러스 혈증은 TCID₅₀로 나타냄.
- 혈중 감염력 있는 바이러스 농도는 3dpi에서부터 검출되기 시작하여 5 dpi에 급속히 증가하며

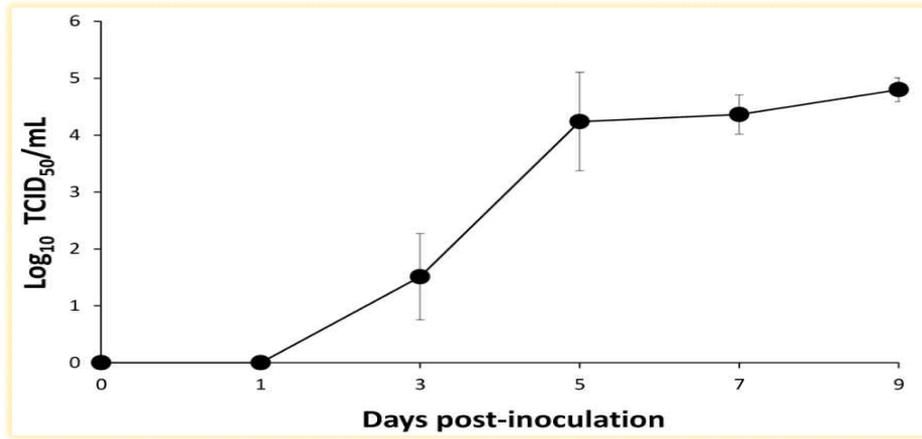


그림 104. 실험 감염 개체에서 혈중 ASFV 역가 7dpi, 9dpi 까지 지속적으로 증가함.

- 시간에 따른 조직내 ASFV 항원 발현을 알아보기 위하여 바이러스 단백질 p30과 p72 유전자에 대하여 역전사 실시간 중합효소 연쇄반응(RT-qPCR)을 시행하여 genomic copy number로 나타냄.
- 바이러스 단백질 유전자는 3dpi부터 조직내에서 발현되었으며, 9dpi까지 지속적으로 발현이 증가하였고, 두 바이러스 단백질 발현량 비교에서는 폐, 간, 비장, 림프절에서 P30유전자가 P72유전자에 비하여 유의적으로 많이 발현됨.
- 면역학적으로는 시간에 따른 혈청 내 ASFV 단백질 P32, P62, P72에 특이적인 항체 형성을 측정함.
- 그 결과, 9dpi에 오직 한 마리에서만 의심(30%<S/P%<40%) 범위를 보였고, 나머지 개체들은 모두 음성으로 나타남.
- 육안병변을 관찰한 결과, 5dpi부터 신장 출혈, 비장 종대, 림프절 출혈/괴사, 심장 점상 출혈, 방광 점상 출혈을 보임.

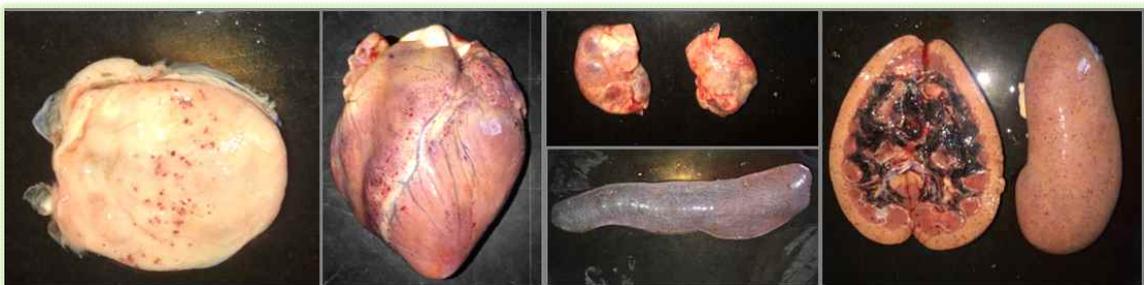


그림 105. 5dpi에서 ASFV에 감염된 개체의 부검후 육안병변 사진, 좌측부터 방광, 심장, 림프절/비장, 신장

- 조직 병변 내에서 ASFV 항원분포를 관찰하였고, ASFV 항원 분포를 알아보기 위하여 P30과 P72 바이러스 단백질 두 개를 대상으로 면역염색조직화학법(immunohistochemistry)를 실시함.
- 폐에서는 간질 내 단핵구계열세포의 침윤과 함께 기관지내 염증세포의 침윤도 함께 관찰한 결

과, 주로 간질 내 침윤된 단핵구 계열 세포 내에서 p30과 p72를 확인하였고, p30의 발현량이 5dpi에서 더 많았음.

- 간에서는 sinusoidal, portal 혈관 확장, 울혈이 관찰되었다. 주로 대식세포(쿠퍼셀), 간세포에서 p30과 p72를 확인하였고, p30의 발현량이 5dpi에서 더 많았음.

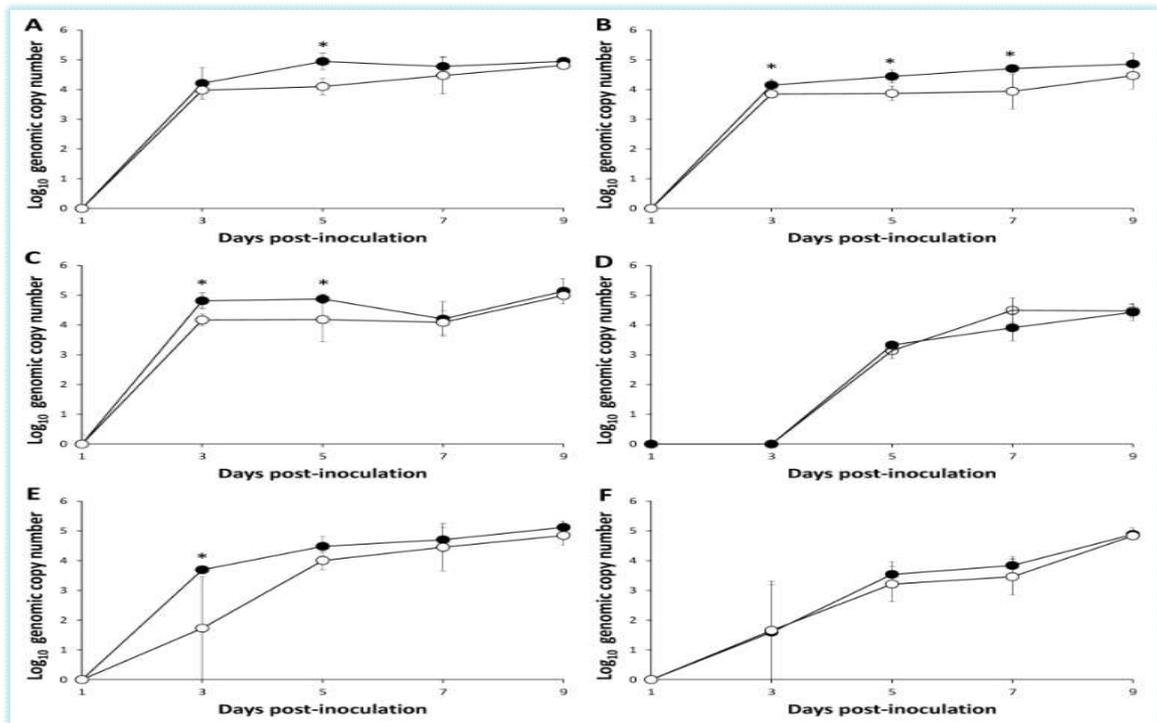


그림 106. 조직 내 p30 유전자(●)와 P72 유전자(○)의 발현양 비교, A: 폐, B: 간, C: 비장, D: 신장, E: 림프절, F: 가슴샘

- 비장에서는 적색수질과 백색수질내에 울혈과 함께 림프조직축소를 보였다. 주로 대식세포에서 p30과 p72가 확인되었으며 p30의 발현량이 5dpi에서 더 많았음.
- 신장에서는 출혈과 함께 hyaline cast가 관찰되었으며, 주로 세뇨관 상피세포에서 p30과 p72가 확인되었고, p30의 발현량이 5dpi에서 더 많았음.
- 림프절과 가슴샘에서 림프구 과소와 대식세포증이 관찰되었고, 주로 대식세포에서 p30과 p72 모두 확인되었으며, p30의 발현량이 5dpi에서 더 많았음.
- 이번 연구개발을 통해서 아시아에서 발생하는 ASF를 실험적으로 유발하여 아프리카돼지열병의 병인론을 연구한 결과, 실험적으로 유발한 아프리카돼지열병은 급성으로 진행되었으며 고열과 출혈반점, 부종의 증상을 동반하는 전형적인 출혈성 전염병의 특징을 보임.
- 바이러스 혈증은 3dpi부터 9dpi까지 관찰되었으며, 실험 종료시점까지 바이러스 특이적 항체는 관찰되지 않았고, 바이러스 단백질 p30과 p72의 유전자와 단백질 발현량을 모두 측정하였을 때, p30이 p72에 비해 유의적으로 높게 측정된다는 점을 발견함.
- 따라서 감염 조직내 바이러스 항원 분포는 p30을 지표로 측정하는 것이 더 정확하다는 결론을 얻음.
- 결과적으로 베트남 ASFV 균주를 동물에 접종하여 급성 아프리카돼지열병을 실험적으로 유발함으로써 아시아에 유행 위험이 있는 ASFV의 병인론을 분석해 볼 수 있었고, 이 연구를 통해 서울대학교에서는 추후에 개발될 시험 백신의 유효성 평가를 위한 동물실험 모델로의 가능성

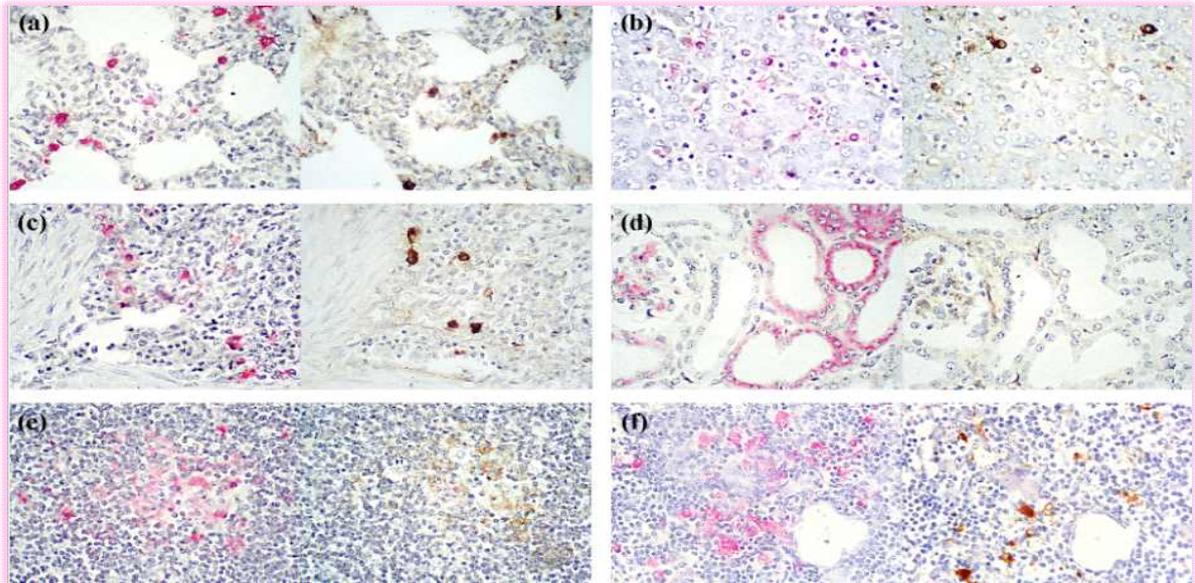


그림 107. 5dpi에서 ASFV에 감염된 개체의 조직내 p30(빨강색), p72(갈색) 분포. (a):폐, (b):간, (c):비장, (d):신장, (e):림프절, (f):가슴샘

도 마련함.

● ASFV 백신 유효성 평가 가이드라인 개발

- 서울대학교에서는 3차년도에서 자연적으로 발생하는 ASF를 병리, 역학적으로 분석하여 그 병인론에 대한 연구를 진행했다. 또한 4차년도에서 실험적으로 ASF를 유발하여 경시적 병리 모델을 토대로 바이러스학적/면역학적/병리학적 연구 결과를 얻은 바 있다. 최종 5차년도에서 지난 연구개발 결과를 토대로, 앞으로 개발될 ASFV 시험 백신의 유효성 평가에 대비하여 실험실내 공격접종 시험 모델을 개발함.
- 실험실내 공격접종 시험 모델 개발

✓ 시험 디자인

- 공격 접종 시험은 크게 3개 그룹(백신군, 대조군 2군)으로 아래와 같이 설정하여 시행.

표 III-1-1. 시험 디자인

그룹	실험두수	백신접종 (6주령)	공격접종 (9주령)	부검 (10주령)
백신군	5	O (2.0 mL)	ASFV	O
양성대조군	5	X	ASFV	O
음성대조군	5	X	X	O

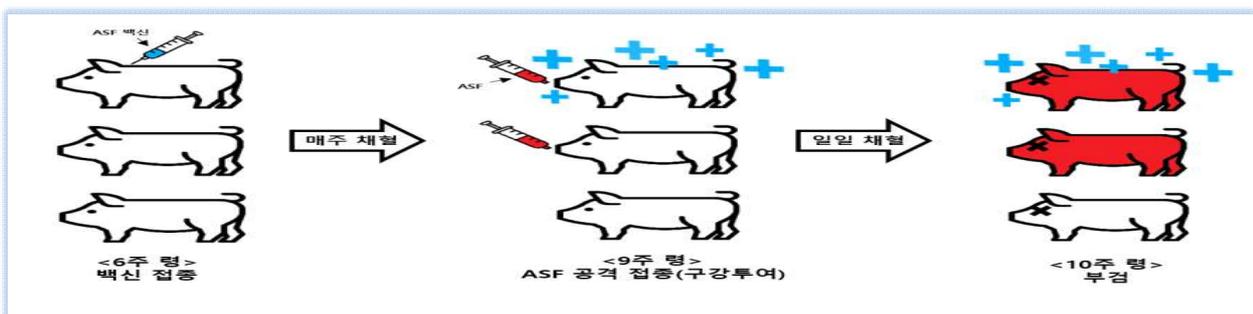


그림 108. ASF 백신 평가 디자인

✓ 평가항목

- 백신은 임상, 면역학적, 바이러스학적, 병리학적 평가 등 4가지 항목에 관하여 평가함.

평가 항목	검사방법	비고
임상학적 평가	직장 체온 측정	
	임상증상 관찰	
면역학적 평가	ASFV 항체 검사(IgG ELISA)	
	ASFV 중화 항체 검사	
	ASFV-인터페론-감마 분비 세포	
바이러스학적 평가	혈중 ASFV 바이러스 항원 정량분석	
병리학적 평가	ASFV에 의한 육안 병변 분석	
	ASFV에 의한 조직 병변 분석	
	조직내 ASFV 항원 분포 분석	

✓ 공시돈 선정 및 백신 접종

- ASFV 항체 음성인 건강한 6주령 자돈 15두를 공시한 후 백신군의 5두에게는 6주령에 ASFV 시험 백신을 2.0 ml를 이근부에 접종하고, 양성대조군 및 음성대조군의 각각 5두씩 총 10두에는 PBS를 2.0 ml 이근부에 접종함.

✓ 공격 접종 방법

- 돼지 접종 실험에 사용할 ASFV는 지난 3차년도에서 아프리카돼지열병 증상의 자돈의 림프절에서 분리한 ASFV (strain D/VN/BD/2019 genotype II 형)을 사용하고, 바이러스의 접종은 백신을 접종한 후 3주가 경과한 9주령 시점에서 실시함.
- 미리 준비된 양의 ASFV 1x10^{4.0} TCID₅₀/ml를 3ml씩 구강에 접종하고, 바이러스 공격 접종은 백신군, 양성대조군, 음성대조군의 총 15두에 시행함.

✓ 임상학적 평가

- 공시돈의 임상 증상은 호흡기 증상, 식욕부진, 운동불능 등의 정도에 따라 0(정상)~3(심각)등급으로 구분하여 매일 1회씩 관찰하고, 공격 접종 후 임상 증상 변화를 비교함.

✓ 면역학적 평가

- Anti-ASFV IgG Ab 측정 : 42일령(6주령), 49일령(7주령), 56일령(8주령), 63일령(9주령)까지 매주 1회씩, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72일령까지 매일 1회씩 채취한 혈액을 이용하여 ASFV에 대한 특이적인 항체 역가를 측정하고, 측정에는 상업화된 ID Screen African Swine Fever Indirect 키트를 사용함.
- ASFV 중화항체 검사 : 채취한 혈액의 ASFV에 대한 특이적인 중화항체 검사는 기존에 발표된 방법으로 시행함. 먼저 96 well plate에 검사할 혈청을 21~212까지 2배씩 DMEM 배지로 희석하여 50 µl씩 분주한다. 그다음 접종할 ASFV strain을 위에 기술한 TCID₅₀ titer 대로 50 µl씩 각 well에 분주하고 함께 1시간 배양한 후, 2×10⁴ freshly trypsinised pulmonary alveolar macrophage (PAM) cell을 각 well에 분주한다. 이 상태로 36, 42, 72시간동안 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양한 후 Anti-ASFV p30 polyclonal antibody 200배 희석액

[phosphate-buffered saline 포함 0.1% Tween 20 (PBS-Tween)]을 각 well에 분주하고 37°C에서 1시간 배양한다. PBS로 2회 washing 이후, anti-rabbit polyclonal antibody (AP)를 분주하고 37°C에서 1시간 배양한다. 이후 최종적으로 Fast red 시약을 이용하여 발색을 확인한다. 마지막으로, 무작위로 well상의 3군대를 선정하여 세포의 핵 혹은 세포질 혹은 핵과 세포질 모두가 염색된 세포의 개수를 수량화한다. 중화항체 판정 기준은 아래와 같다.

- %VN = [1 - (두개의 동일 혈청샘플 분주 well에서 측정된 양성 세포수의 평균/ 음성 대조군에서 측정된 양성 세포수)] X 100
- %VN이 50 이상을 양성인 최대 혈청역가로 정하고 이때 가장 희석된 배수의 역수를 중화항체가로 정해 VNT50이라 칭함.

- ASFV 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 측정 : 채취한 혈액으로부터 Ficoll-Paque를 이용하여 말초혈액 단핵구(peripheral blood monocyte)를 분리한 후, 상용화되어 있는 ELISPOT (Enzyme linked immunospot) 분석 키트(MABTECH, Mariemont, OH, USA)를 이용하여 ASFV에 특이적인 IFN- γ 분비 세포를 측정하고, 분리된 말초혈액 단핵구를 ASFV 항원으로 자극하여 IFN- γ 분비를 유도하고, ELISPOT Reader를 이용하여 ELISPOT kit에서 IFN- γ 분비 세포의 spot 개수를 산정함.

✓ 바이러스학적 평가

- 혈중 ASFV 항원 미생물적 평가 : 실시간 중합효소 연쇄반응으로 채취한 혈액에서 ASFV를 정량 분석한다. 각각의 실험은 standard TaqMan™ thermal cycling parameters를 이용하여 측정하며, The Sequence Detection System 1.7 software (Applied Biosystems)를 결과자료 분석을 위해 이용함.
- 샘플의 cycle threshold level이 40 미만이라면 양성으로 판단한다. 절대 정량을 위해 각 시료의 측정된 Ct값을 표준커브(standard curve)에 대입하여 DNA copy 수/ml을 산정함.

✓ 병리학적 평가

- ASFV와 관련된 병리조직학적 관찰 : 공격 접종 10일 경과된 시점인 약 72일령에 부검을 실시하여 폐, 간, 비장, 신장, 림프절을 채취하고, 각 장기의 육안적 소견(부검 결과)을 기록하고, 포르말린에 고정한 조직은 포매 과정을 거쳐 H&E염색을 실시하여 각각 현미경으로 병변을 관찰한다. 각 장기는 림프조직소실(lymphoid depletion) 정도 혹은 출혈(hemorrhage) 정도에 따라 0~3등급으로 구분하여: 스코어 3 = 아주 심한(severe) 경우; 스코어 2 = 중등도(moderate)의 경우; 스코어 1 = 경미한(mild)의 경우; 스코어 0 = 전혀 병변이 없는 경우 등으로 표시함.
- 각각의 그룹간의 병변을 기록하고 Kruskal-Wallis, Mann-Whitney test 방법을 이용하여 그룹간의 병리조직학적 병변의 차이를 비교함.

✓ 감염 조직내에서 ASFV 증식 평가

- 병변에서 ASFV 항원 검출 : ASFV 목표 장기에서 면역조직화학법을 이용한 ASFV의 증식정도

를 측정하고, 백신이 효과적이면 시험 종료 시점에 채취한 장기에서 ASFV 항원 양성인 세포가 감소하는 것을 확인할 수 있음.

- ASFV 항원 분석방법 : ASFV를 접종한 그룹에서 채취한 5가지 장기에서 면역염색법을 실시한다. 면역염색법은 지난 3차년도, 4차년도 과제에서 사용한 ASFV p30에 대한 다클론성 항체 (polyclonal antibody)를 사용한다. 면역조직화학법을 종료한 조직을 현미경상에서 임의로 0.25 mm²의 면적을 10곳 정하여 ASFV 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 세고, 각 그룹간 ASFV에 대한 양성감염세포수를 통계 처리하여 차이를 비교함.

✓ 통계 분석 방법

- 통계분석은 각 평가항목의 결과자료에 대하여 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포 (normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성 이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성 있음으로 간주함.

2.4. ASF 바이러스 재조합 subunit 백신 개발 시스템 구축(감수성 cell 포함)

○ 2 협동 최종 목표 : ASFV에 감수성을 보이는 transgenic cell line 개발

- ▶ ASF 바이러스 감수성 관련 수용체 검색 및 특이 수용체 CD163 단백질 유전자 확보
- 아프리카 돼지열병(ASF) 바이러스 감수성 세포주 개발을 위한 기반 연구(재조합 세포주 제작을 위한 체계 구축)
- ✓ 레트로바이러스 유전자 전달 시스템 구축
- 레트로바이러스 복제에서 특징적인 역전사와 DNA 삽입 기전을 이용하여 목표 유전자의 지속적인 발현을 유도하는 불멸화 및 재조합 세포주를 구축할 수 있는 체계를 구축함.

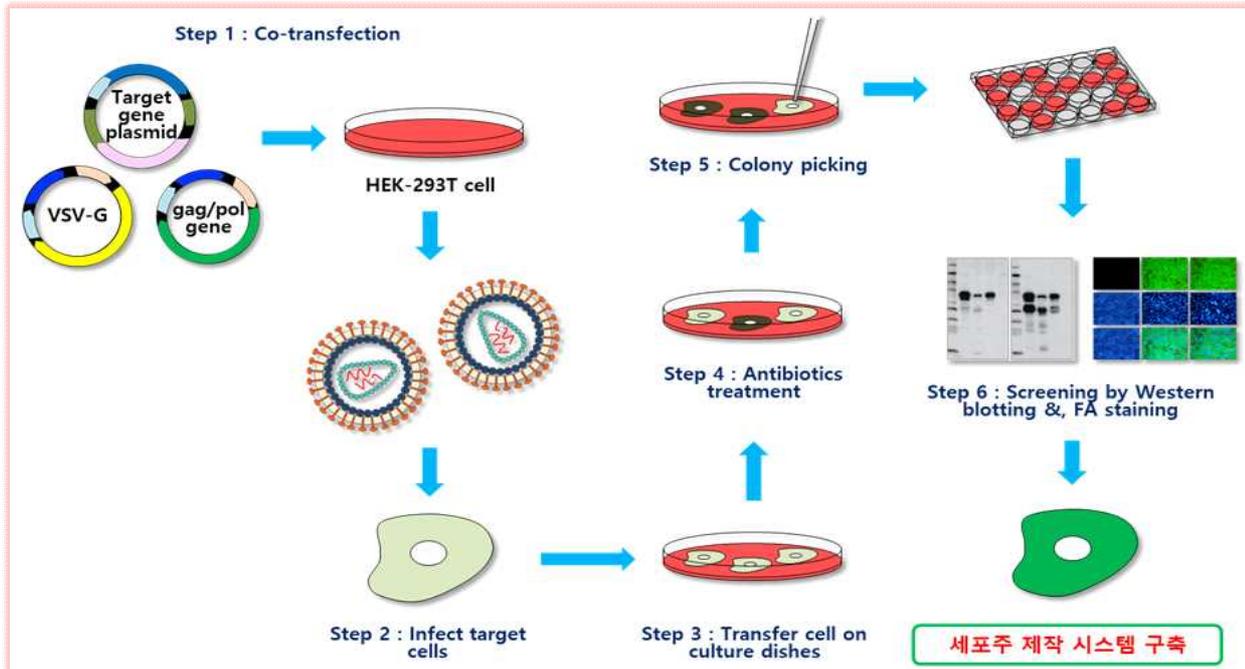


그림 106. 재조합 세포주 제작 체계 모식도

- ASF 바이러스 특이 수용체 단백질 유전자 및 재조합 단백질 확보
- ✓ 돼지 유래 CD163 단백질 유전자 확보
- ASF 바이러스가 Scavenger 수용체 중 하나인 CD163은 ASF 바이러스 진입에 중요한 역할을 한다고 밝혀져 있음. 따라서 돼지 유래 CD163 (pCD163) 유전자를 발현하는 세포주를 제작하기 위한 클로닝을 진행하였음. 돼지 폐포대식세포에서 전체 RNA를 추출하였고, pCD163 유전자를 증폭할 수 있는 특이 프라이머를 제작하여 PCR을 진행하였음. PCR 산물은 전기영동을 통하여 밴드를 확인하였으며, 이를 pGEM-T 벡터에 클로닝하여 pGEM-pCD163을 제작하였고, BamHI 및 PvuI으로 절단하여 약 3.3 kb에 해당하는 밴드를 확인하였음.

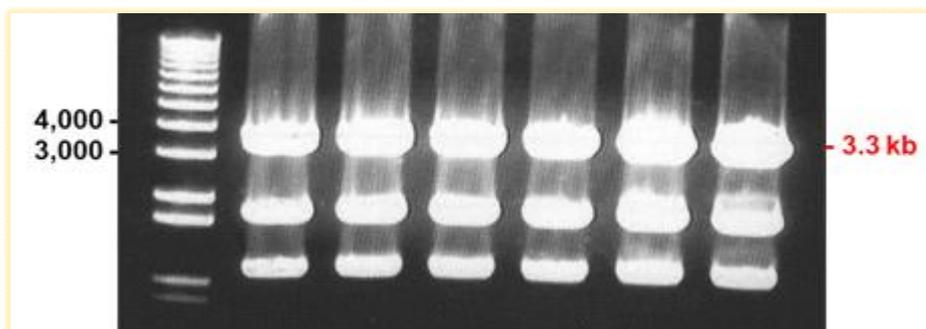


그림 107. pCD163 유전자 확인

- 제작한 플라스미드 pGEM-pCD163과 pFB-Zeo를 제한효소로 절단하고 전기영동을 통하여 밴드를 확인한 후 젤 추출 키트를 이용하여 절편을 분리하였음. 제한효소로 잘린 pCD163 (약 3.3 kb)과 pFB-Zeo 벡터(약 6.6 kb)를 결찰(ligation)시켜, pFB-Zeo-pCD163 (약 9.9 kb) 발현 벡터를 제작하였음.

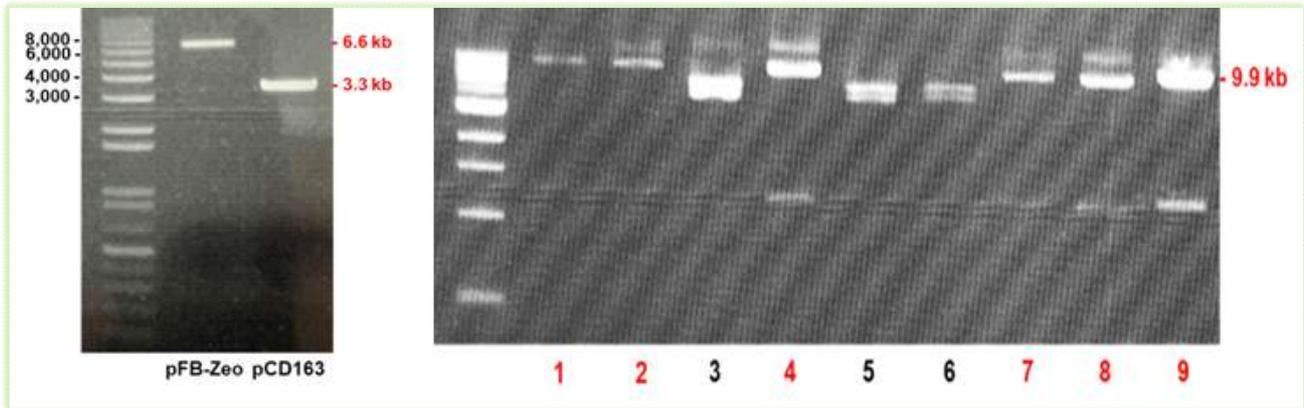


그림 111. pFB-Zeo-pCD163 발현 벡터 제작

- ✓ 돼지 CD163 기반 재조합 단백질 유전자 확보
- 돼지 유래 CD163 (pCD163) 유전자를 발현하는 세포주와 더불어 C 말단이 절단된(tailless) CD163을 발현하는 세포주를 제작하였음.

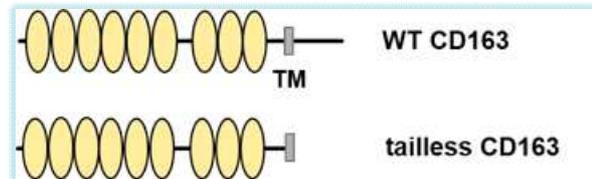


그림 112. pCD163 및 tailless CD163 모식도

- Site-directed mutagenesis PCR을 통해 wild-type CD163의 TM 도메인 말단에 stop 코돈을 만들어 C 말단을 제거한 tailless CD163 재조합 유전자를 제작하였음. tailless CD163은 클로닝을 통해 pFB-Neo 벡터에 삽입하였고 크기(약 9.9 kb) 및 염기서열 분석을 통해 tailless CD163 재조합 유전자를 확인하였음.

▶ ASF 바이러스 감수성 재조합 세포주 제작/불멸화

- 불멸화 세포주 제작을 위한 인체 유래 텔로머라제(telomerase) 유전자 확보
- 돼지 유래 초대배양 폐포대식세포의 불멸화 세포주 제작을 위하여 인체 유래 텔로머라제(telomerase) 유전자 (hTERT)를 확보하기 위한 클로닝을 진행하였음. hTERT 유전자를 증폭할 수 있는 특이 프라이머를 이용하여 HeLa 세포에서 유전자를 증폭시켰고, 유전자 산물은 전기영동을 통하여 확인하였음. 증폭된 유전자의 크기는 약 3.4 kb로, pGEM-T 벡터에 클로닝하

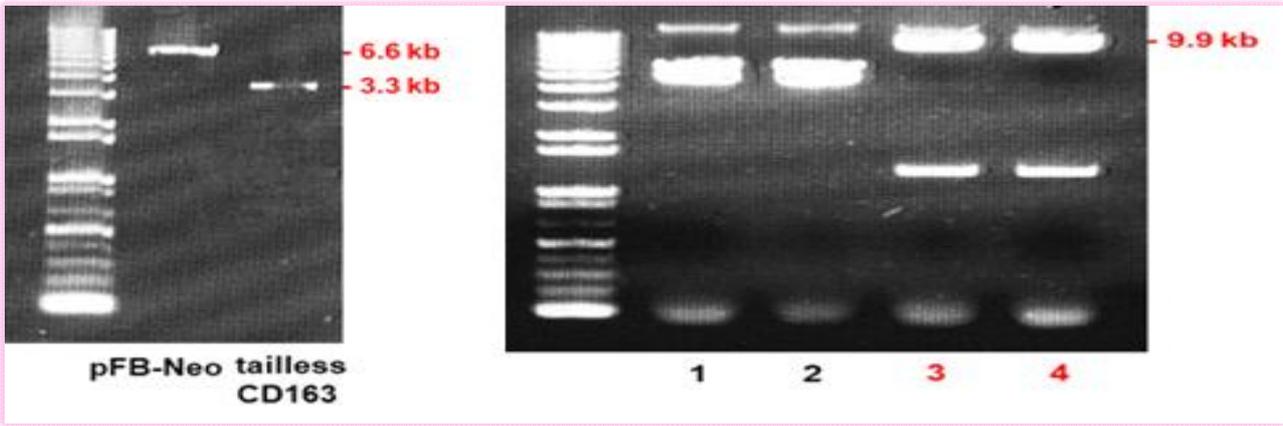


그림 113. pFB-Neo-tailless CD163 발현 벡터 제작
여 염기서열 분석을 통해 hTERT 유전자확인을 완료하였음.

- 외인성 돼지 CD163 과발현 재조합 세포주 제작
- 재조합 세포주 제작 완료 : iPAM 또는 기존 세포주(BHK, PK)를 이용하여 ASF 바이러스 특이 수용체 CD163 단백질 유전자를 과발현하는 재조합 세포주를 제작하였음. CD163 단백질 유전자의 발현은 웨스턴 블랏으로 확인하였으며, 시간대별로 발현정도도 확인하였음.

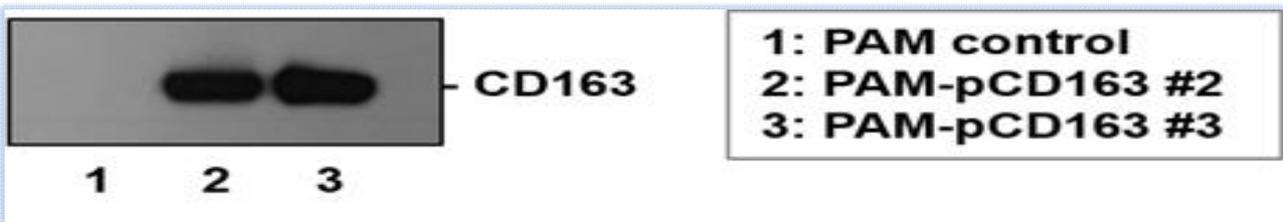


그림 114. PAM-pCD163 재조합 세포주 Western blot 결과

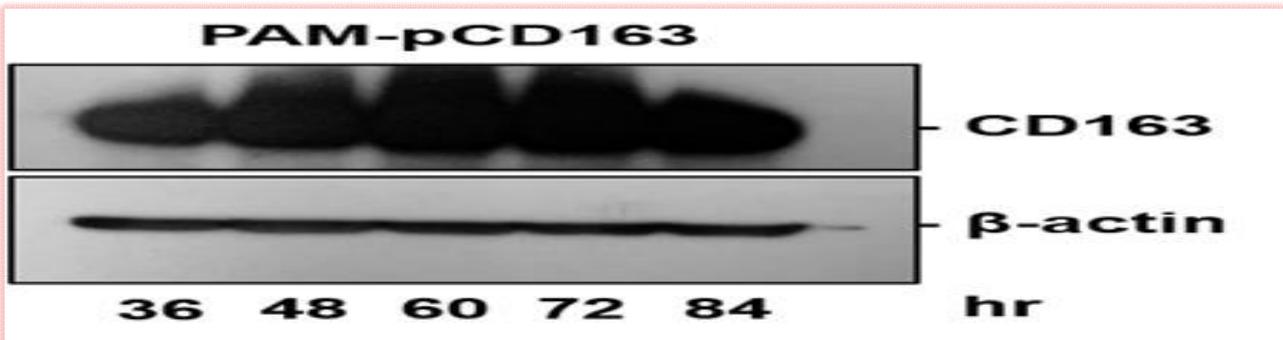


그림 115. PAM-pCD163 재조합 세포 시간대별 pCD163 발현 결과



그림 116. BHK-pCD163 재조합 세포주 웨스턴 블랏 결과

- 멧돼지 대식세포/조직세포 유래 iPAM 세포주 불멸화 시도함 : 멧돼지 폐포대식세포를 이용하여 초대세포배양법(Lavage)을 실시하였음. 멧돼지 폐포대식세포에 Hank's solution을 이용하여 폐에서 세포가 떨어져 나올 수 있도록 하였고, 수거한 세포는 4번의 세척과정을 거쳤음. 세척된 세포는 약 70개의 vial에 나누어 스타크를 만들고 초저온냉동고에 보관하였음. 확보한 멧돼지 유래 초대배양 폐포대식세포를 불멸화하기 위해 이미 확보된 인체 유래 텔로머라제 유전자를 이용하여 형질주입(transfection)을 시도하였음.



그림 117. 멧돼지 폐 및 기관지폐포세척액



그림 118. 멧돼지 유래 초대배양 폐포대식세포(P1)

▶ ASF 바이러스 재조합 서브유닛 백신 항원 개발

● 서브유닛 백신 항원 개발 체계 구축

- ASF 바이러스 구조단백질 클로닝 완료: ASF 바이러스 게놈 중 바이러스 복제 및 바이러스 게놈 중 바이러스 복제 및 바이러스 입자 형성에 주요한 구성요소로 작용하는 13개 유전자를 클로닝 하였음.

	유전자 합성	pGEM-T 클로닝	pET vector 클로닝
A238L	○	○	○
CD2v	○	○	○
p72	○	○	○
p30	○	○	○
p32	○	○	○
p15	○	○	○
p35	○	○	○
pp62	○	○	○
Cp312R	○	○	○
p12	○	○	○
G5R	○	○	○
p17	○	○	○
p54	○	○	○

그림 119. ASF 바이러스 유전자 클로닝 결과

- ASF 바이러스 재조합 단백질 항원 정제 및 농축 계속: ASF 바이러스 p30 및 p72 단백질 항원을 발현하였으며, 면역원성 평가를 위해 항원 정제 및 농축을 진행하였음. 다른 단백질 항원의 발현 실험을 계속 진행 중에 있음.

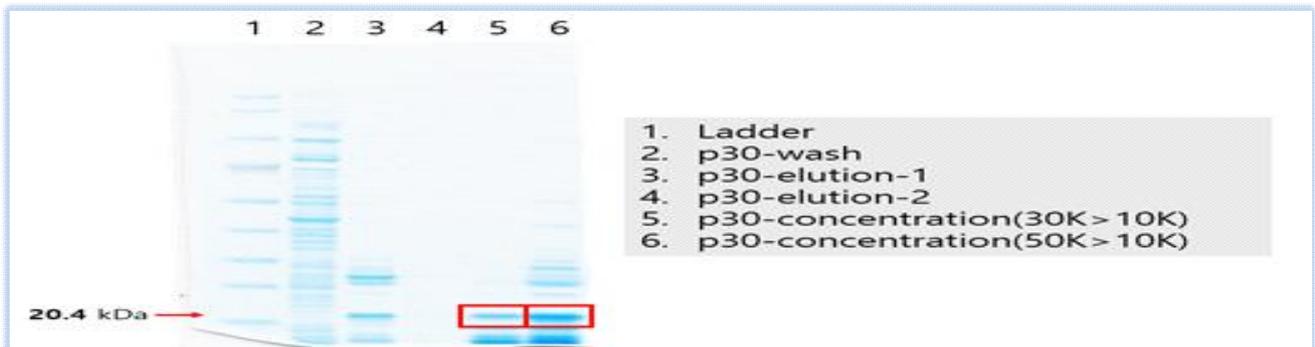


그림 120. ASF 바이러스 p30 단백질 항원 발현 결과

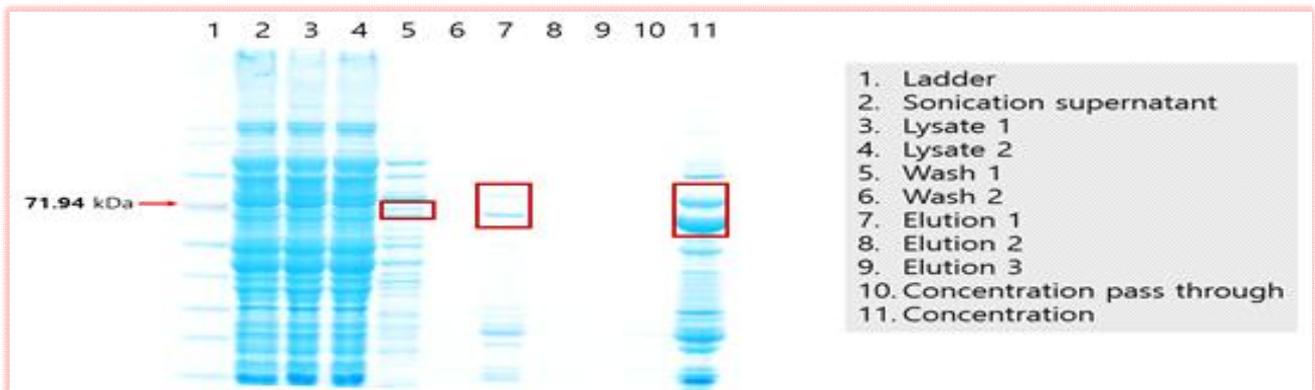


그림 121. ASF 바이러스 p72 단백질 항원 발현 결과

- 재조합 백신 항원 후보 물질 선별: 확보한 p30 및 p72 항원을 통한 마우스 접종 실험을 진행하여, 면역원성을 확인하는 과정에 있음. 추가로 확보되는 항원에 대해서도 면역원성 확인 실험을 계속 진행할 계획임.
- ASF 바이러스 재조합 단백질 항원 정제 및 농축 계속 : ASF 바이러스 P30 및 P72 단백질 항원은 정제 및 농축 후 면역원성 실험을 진행하였음. 다른 단백질 항원(A238L, CD2v, p32, p15, p35, pp62, Cp312R, p12, G5R, p17, p54)들의 발현 실험을 계속 진행중에 있음.

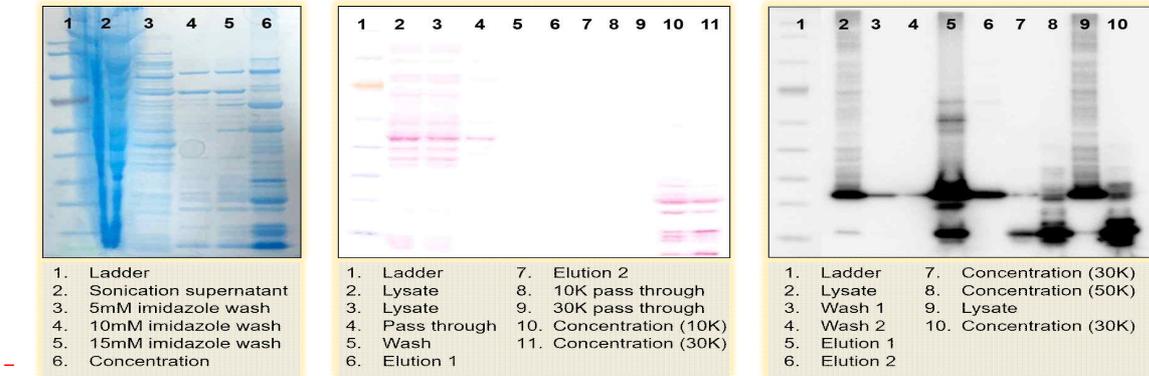


그림 122. ASF 바이러스 단백질 항원 발현 실험

- 재조합 백신 항원 마우스 접종 실험: ASF 바이러스 재조합 단백질 항원을 2주 간격으로 총 2회 복강에 투여하며, 투여 후 0, 7, 21, 28일에 꼬리정맥을 통해 채혈하여 마우스 혈청을 확보함.



그림 123. 재조합 단백질 항원 마우스 접종 실험

- 재조합 백신 항원 면역원성 평가: 재조합 단백질 항원에 대한 항체 반응은 ELISA 실험을 통해 확인함. ASF 바이러스 재조합 단백질 항원을 플레이트에 코팅하여 마우스 접종 실험을 통해 확보한 혈청과 반응시켜 면역원성을 평가함. 현재 확보한 마우스 혈청에 대한 항체 반응 확인 실험을 진행 중에 있음 추가로 확보되는 항원에 대해서도 면역원성 확인 실험을 계속 진행할 계획임.



그림 124. 재조합 단백질 항원 면역원성 평가 실험

- ASF 바이러스 13개 유전자의 구조단백질을 발현 벡터를 통해 항원을 확보: ASF 바이러스 유전자 중 바이러스 복제 및 입자 형성에 주요한 구성요소로 작용하는 13개 유전자를 클로닝 하였음. 13개 유전자를 pGEM-T 벡터에 클로닝하여 확보하였으며, 항원 발현을 위해 pET 벡터로 서브클로닝 하였음. ASF 바이러스 특이 단백질 중에는 p30 및 p72가 항원성이 높은 것으로 알려져 있으며, 따라서 P30 및 P72에 대한 항원을 제작하였음.
- ASF 바이러스 구조단백질 항원의 정제 및 농축: pET-p30 및 pET-p72 플라스미드를 BL21에 형질전환(transformation)하였음. LB배지 500 ml에 증균하며 OD550값이 0.6~0.7이 될 때, IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 5 ml 첨가한 뒤 30°C에서 6시간 배양하였음. E. coil에서 발현된 항원 단백질은 HiTrap talon crude 컬럼을 이용해 정제를 수행하였으며, Amicon Ultra 원심식필터유니트를 활용하여 농축하였음. pET 벡터는 타겟 항원 단백질 C 말단에 His-tag이 발현되게 디자인하였으며, 정제 및 농축한 p30 및 p72 항원 단백질은 SimplyBlue stain 및 Western blot을 통해 타겟 크기를 확인하였음.
- 확보된 ASF 바이러스 구조단백질 항원의 면역원성 평가를 진행: 재조합 백신 항원은 마우스 접종 실험을 통해 면역원성을 평가하였음. p30 및 p72 재조합 단백질 항원을 복강에 2주 간격으로 총 2회 투여하였으며, 꼬리 정맥 채혈을 통해 재조합 단백질 항원 투여 후 0, 7, 21, 28일의 혈청을 확보하였음. ELISA 실험을 수행하여 재조합 단백질 항원에 대한 항체 반응을 확인하였음. 재조합 단백질 항원을 ELISA 플레이트에 코팅한 뒤 마우스 접종 실험을 통해 확보한 혈청과 반응시켜 면역원성을 평가하였음.
- ASF 바이러스 재조합 서브유닛 백신에 활용할 수 있는 항원(p30 및 p72)을 선발하였으며, 후보 항원에 대한 재조합 서브유닛 백신을 개발할 수 있는 체계를 구축하였음.

2.5. 아프리카돼지열병(ASF) 연구 정책 조정 및 백신 개발 지원

○ 3 협동 최종 목표 : 아프리카돼지열병(ASF) 백신 개발 위한 세포주 및 항원 평가 연구

- ▶ ASF 바이러스 국내 분리주 특성 및 세포내 증식성 연구
- ASF 바이러스 국내 분리주 특성 조사 및 발생 역학 분석 연구(각 나라의 ASF 발생 역학을 조사하고 분석)
 - 유럽, 중국, 아시아 국가 등 ASF 발생 역학 정보 확보
 - 국내 ASFV 분리주는 중국에서 발생한 ASF 바이러스와 동일한 바이러스임을 확인함.

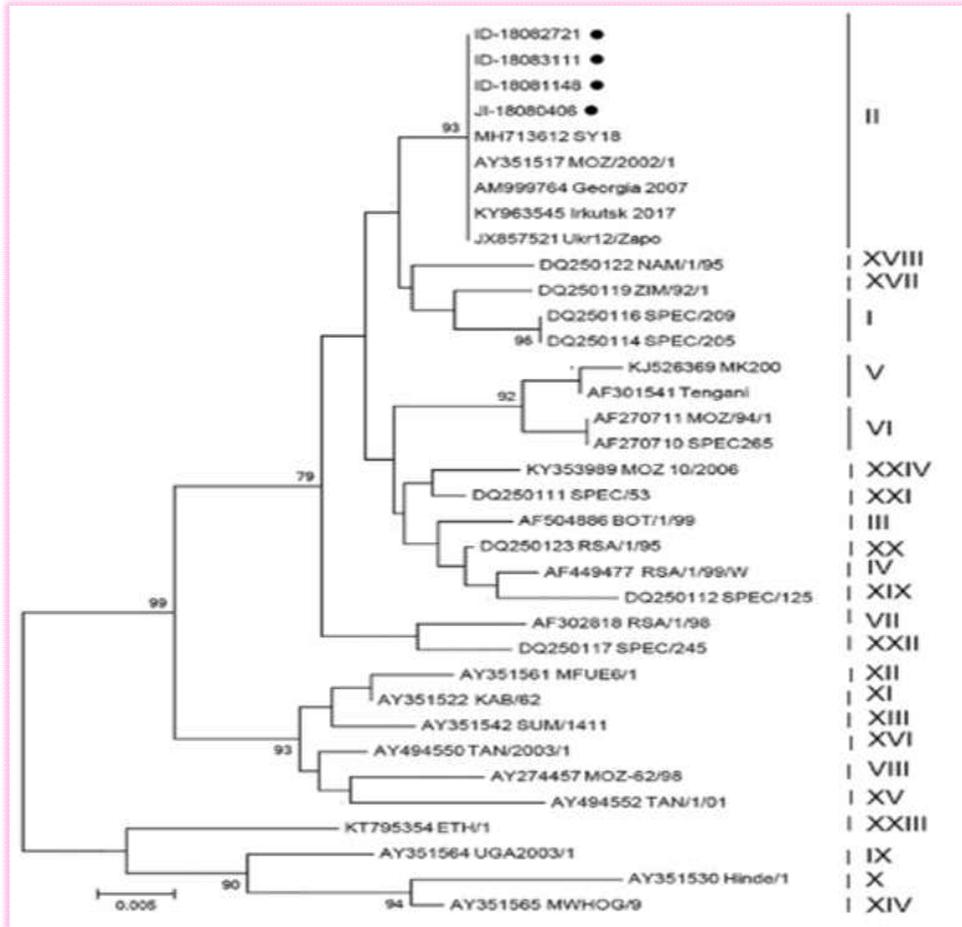


그림 125. 국내 발생 ASFV 계통도

- ASF 바이러스 국내 분리주의 특성을 조사
 - ASF 바이러스 국내 분리주 분리함(연천, 파주).
 - 현재 ASFV 바이러스가 분리 될 수 있는 cell line이 확보 되지 않은 상황으로 분리하는데 어려움이 있음.
 - Vero cell line에 adaptation이 된 스페인 ASF 바이러스를 분양 받음.
- ▶ 국내 분리 바이러스 및 해외 표준주 이용, 개발된 세포주의 감수성 등 평가
 - 돼지 폐포 대식세포에서 ASF 바이러스 분리 및 증식 최적 조건 확립
 - 2019년 국내 분리 ASF 바이러스 14건 유전자 특성 분석 완료
 - VP72, MGF 505 9R/10R 등 5개 특정 부위 유전자 비교 분석

- ▶ 보유 바이러스 이용, 개발된 항원의 면역원성 및 중화능 평가
- 국내 분리 ASF 바이러스를 이용하여 개발된 세포주 감수성 평가
 - 개발된 세포주에 ASF 바이러스 국내 분리주를 접종하여 증식성 등 감수성을 평가함.
 - CA-CAS-01-A cell line을 활용하여 국내 ASF 바이러스 2종을 확보함(파주, 연천)
 - 국내에서 발생한 ASF 바이러스도 CA-CAS-01-A 세포에 감수성이 있다고 판단됨.

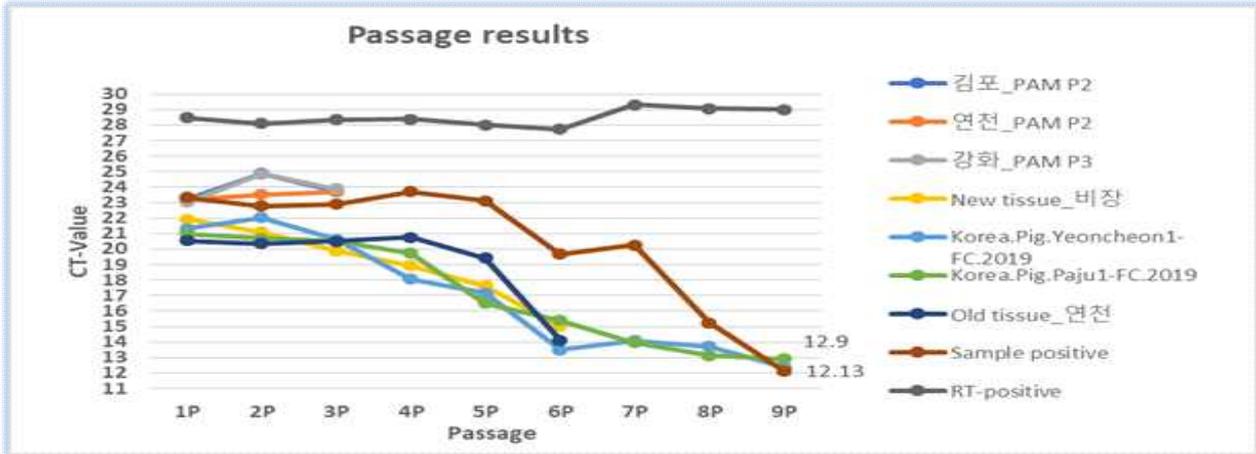


그림 126. 국내 ASF 바이러스 분리 및 계대 증식 비교 결과(P72 유전자 발현량)

- CA-CAS-01-A cell line 내에서 ASFV-P30 protein을 detection한 ALA test를 진행하여 유관으로 세포질에 ASF 감염 여부를 확인함.

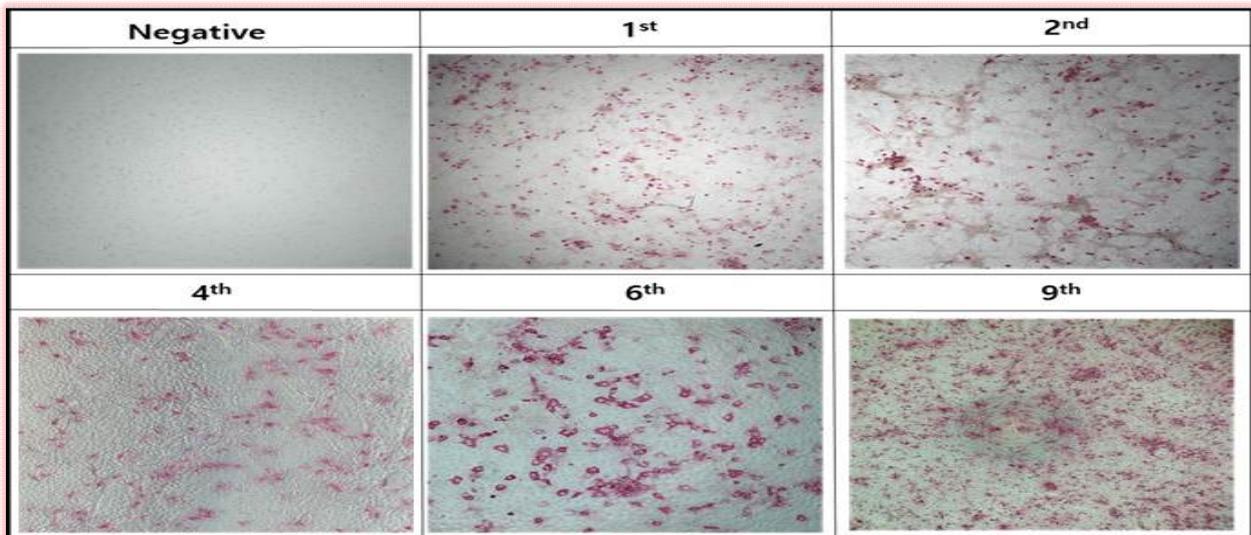


그림 127. CA-CAS-01-A cell내 Korea.Pig.Paju1-FC.2019의 계대 감염에 따른 ASFV P30 감작 결과

- 확립된 세포주를 이용한 계대 배양에 따른 국내 분리주의 유전자 변화 조사 및 이에 따른 특성 변화 분석
 - CA-CAS-01-A cell line 내 국내 분리 연천주를 계대 배양함.
 - 첫 번째 계대 바이러스와 9계대 바이러스를 NGS로 비교 분석함.
 - 1 계대 연천 바이러스는 wild type인 조지아주와 거의 유사한 sequence 패턴을 보였으나, 9계대 연천 바이러스에서는 양쪽에 deletion이 발생함.
 - Deleted virus의 병원성(약독화 여부)과 면역원성 여부 확인 필요.

- 국내 분리주 등 ASF 바이러스에 대한 중화능 시험
 - ASFV_CAP-01 항원에 대한 다양한 혈청을 확보하였고, 중화가 가능한지 확인하기 위하여 CA_CAS-01_A cell line에서 중화능 확인 시험(SN test)을 진행함.
 - 중화능 확인 시험을 진행한 결과, 적정 Background virus 함량의 setting이 필요하였고, 다양한 virus 함량으로 감염한 결과 약 300 TCID50 정도가 적정 함량임을 확인함.
 - 공격 접종에서 생존한 211 개체의 혈청에서 ASF 바이러스의 감염정도가 약한 것을 확인 하였지만, 5~25 SN titer를 보여, 폐사된 개체들과의 뚜렷한 차이를 확인하지 못함.

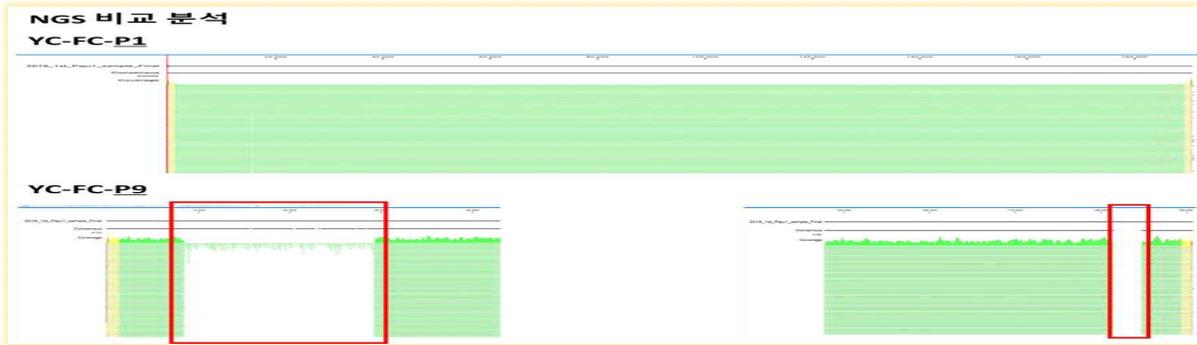


그림 128. CAS-01 세포에서 계대된 국내 ASF 연천 분리주에 대한 NGS 비교 분석

▶ ASF 예방을 위한 백신 개발 지원(ABSL3+)

- 국내/외 ASF 바이러스에 대한 교차 면역 확인
 - 국내에서 개발된 다양한 ASF 백신 후보주들의 교차 면역원성을 확인하기 위하여 해외 공동 연구 추진 중.
 - ASF 바이러스는 Genotype의 구분을 특정 유전자의 특성으로 구분을 하고 있기 때문에 정확한 계통학적 구분이 되어있지 않음.
 - 최근 Genotype I과 Genotype II가 혼종된 hybrid strain의 발생으로 인하여 다양하거나, 또는 교차 면역이 가능한 백신 후보주 확보가 더욱 필요할 것으로 판단됨.
- ASF 바이러스 국내 분리주 및 해외 표준주(조지아주)
 - 국내에서 2019년부터 현재까지 발생한 ASF 바이러스는 모두 해외 표준주(조지아주)와 동일한 Genotype으로 확인됨.
 - 전 세계 여러 나라에서 개발된 ASF 백신 후보주들이 동일한 genotype일지라도 방어능이 다르게 나타나는 경향을 보임.
 - 지속적인 공동연구를 통하여 다양한 ASF 바이러스들의 특성 분석 및 모니터링이 필요할 것으로 판단됨.

○ 향후 백신 개발 및 인허가, 상용화 로드맵

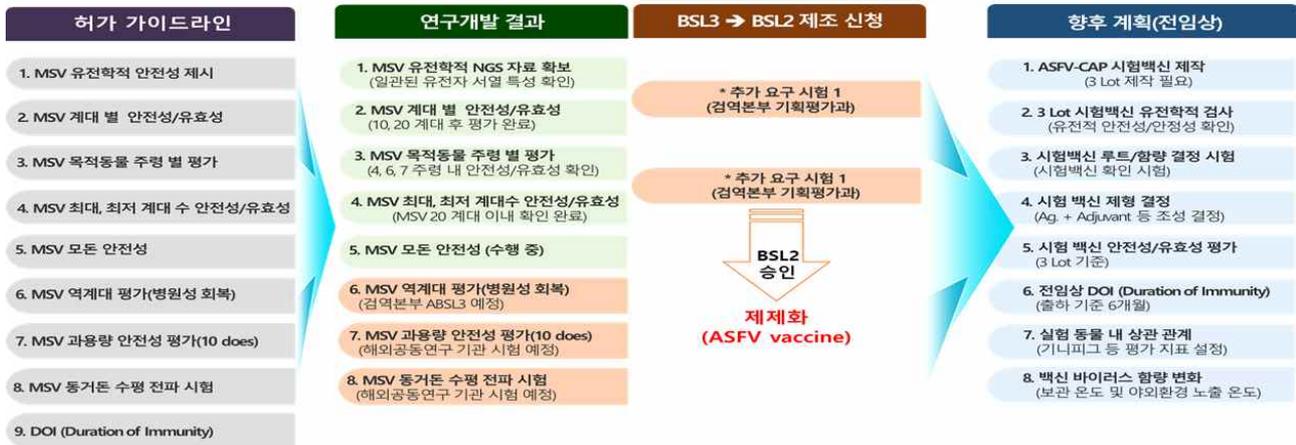
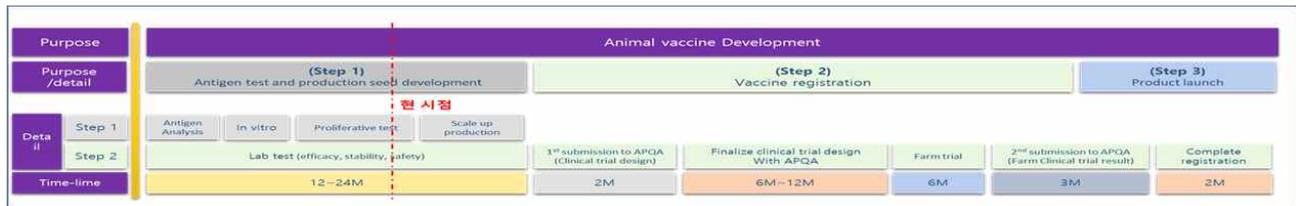


그림 129. 향후 백신 개발 계획 및 전략 모식도

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도	1단계 (2019~2023)		계	가중치 (%)
		목표(단계별)	실적(누적)		
전담기관 등록·기탁 지표1」		16	16	16	90
		26	26	26	90
연구개발과제 특성 반영 지표		1	1	1	10
		2	2	2	10
계		17	17	17	100
		28	28	28	100

* 1」 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[**에스시아이 Expanded(SCIE)**, 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], **특허**, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), **생명자원(생명정보, 생물자원)**, 표준화(국내, 국제), 화합물, 신제품 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

* 2」 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, **고용창출**, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, **인력양성**(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	The African Swine Fever Virus Virulence Determinant DP96R Suppresses Type I IFN Production Targeting IRF3	International journal of molecular sciences.	Niranjan Dodante nna		대한민국		SCIE	2024	1422-0067	
2	African swine fever virus B175L inhibits the type I interferon pathway by targeting STING and 2'3'-cGAMP	Journal of Virology	Niranjan Dodante nna		대한민국		SCIE	2023	1098-5514	
3	African Swine Fever Virus EP364R and C129R Target Cyclic GMPAMP To Inhibit the cGAS-STING Signaling Pathway	Journal of Virology	Niranjan Dodante nna		대한민국		SCIE	2022	1098-5514	
4	Chronological expression and distribution of African swine fever virus p30 and p72 proteins in experimentally infected pigs	Scientific Reports	오탈환		대한민국		SCIE	2022	2045-2322	
5	Development of optimized protocol for culturing African swine fever virus field isolates in MA104 cells	Canadian Veterinary Medical Association	권혁일		대한민국		SCIE	2022	0830-9000	
6	Complete genome sequence of a novel porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus strain identified in South Korea	Archives of Virology	김예은		대한민국		SCIE	2022	1381-1385	
7	Pathogenicity of a novel classical swine fever LOM vaccine-derived virus isolated on Jeju Island, South Korea	Veterinary Medicine and Science	장규환		대한민국		SCIE	2022	2053-1095	
8	Field evaluation of the safety and immunogenicity of a classical swine fever virus E2 subunit vaccine in breeding and nursery animals on Jeju Island, South Korea	Clinical and Experimental Vaccine Research	장규환		대한민국		SCIE	2022	2287-3651	
9	The Isolation and Replication	frontiers in	오탈환		대한민국		SCIE	2020	2297-1769	

	of African Swine Fever Virus in Primary Renal-Derived Swine Macrophages	Veterinary Science							
10	Long-term follow-up of convalescent pigs and their offspring after an outbreak of acute African swine fever in Vietnam	Transboundary and emerging diseases.	오탈환	대한민국	SCIE	2021	1865-1674		
11	Assessing the risk of recurrence of porcine epidemic diarrhea virus in affected farms on jeju island south korea	Journal of veterinary science.	장규환	대한민국	SCIE	2021	1229-845X		
12	Age-related viral load and severity of systemic pathological lesions in acute naturally occurring African swine fever virus genotype II infections	Comparative immunology, microbiology and infectious diseases.	오탈환	대한민국	SCIE	2021	0147-9571		

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2022.ASF 백신 개발 전문가 세미나	유성식	2022.07.06	농림축산검역본부	세포주를 이용한 국내 ASFV 분리 및 증식
2	2022.ASF 백신 개발 전문가 세미나	최준구	2022.07.06	농림축산검역본부	Research on African swine fever vaccine development APOA
3	2022.ASF 백신 개발 전문가 세미나	이종수	2022.07.06	농림축산검역본부	Characterization of ASFV genes for ASFV vaccine
4	2022 한국돼지수의사회 연례 세미나	최준구	2022.10.19	대전 라마다대전호텔	ASF 백신 개발 현황
5	Sustainable Agriculture and Environment (vietnam)	이주용	2022.11.18	베트남 Nonglam Uni.	Analysis of changes in African swine fever virus genetic structure AND biological properties during adaptation to continuous cell culture for develo
6	2023APVS	이주용	2023.08.01	대만 타이베이	THE 1ST ASF VIRUS CELL PASSAGE & SELECTING MASTER SEED CANDIDATES, USING NON-PRIMARY CELL LINE IN KOREA & VIETNAM
7	2023.ASF 백신 개발 전문가 세미나	유성식	2023.09.26	농림축산검역본부 생물안전연구동 국제회의실	The 1st ASF virus cell passage and selecting vaccine candidates, using non-primary cell line in Korea and Vietnam
8	2023.ASF 백신 개발 전문가 세미나	이종수	2023.09.26	농림축산검역본부 생물안전연구동 국제회의실	Attenuation of ASF virus and IFN evasion
9	2023APVS	최준구	2023.09.26	농림축산검역본부 생물안전연구동 국제회의실	Vero 세포 계대 ASF 바이러스 특성 분석

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	ASF 감수성 세포주/CA-CAS-01-A	KCTC14568BP	Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)	2021

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	신규한 아프리카돼지열병의 예방 및 치료를 위한 바이러스 백신 조성물	대한민국	(주)중앙백신연구소	2020.01.03	10-2020-0000986	1-1-2020-0007647-11	-	-	-	100	
2	아프리카돼지열병 바이러스 배양을 위한 세포주	대한민국	(주)중앙백신연구소	2020.01.03	10-2020-0001036	1-1-2020-0007917-33	-	-	-	100	
3	아프리카돼지열병 바이러스 배양을 위한 세포주 및 이를 이용한 백신	대한민국	(주)중앙백신연구소	2021.11.26	10-2021-0165015	1-1-2021-1367063-69	-	-	-	100	
4	아프리카돼지열병 바이러스 배양을 위한 세포주 및 이를 이용한 백신	대한민국	(주)중앙백신연구소	2021.11.26	10-2021-0165015	1-1-2021-1367063-69	(주)중앙백신연구소	2023.06.19	제 10-2546423호	100	

* 본 과제를 통하여 발굴된 ASF 감수성 세포주를 활용하여 다양한 백신 후보주 발굴이 가능함에 따라 후속적으로 다야한 ASF 백신 후보주에 대한 특허 출원이 가능함.

[경제적 성과]

고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2019년	2020년	
1	ASF 백신 연구	(주)중앙백신연구소	1	1	2
합계			1	1	2

[사회적 성과]

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	서울대학교	2019~2023	4	1	1		5	1	4	2			
2	경상국립대학교	2019~2023	2	3			2	3			5		
3	충남대학교	2019~2023	2				2			2			

5) 연구개발비 사용실적 (별지 제23호 서식을 활용하여 작성할 수 있습니다)

(단위 : 천원)

비목	세목				2023					합계	
					제1세부	제1위탁	제1협동	제2협동	제3협동		
직 접 비	인건비	참여 연구 원	내부 인건비	미지급		(5,040)	(66,240)	(33,060)		(104,340)	
				지 급	현금				36,538		36,538
					현물	81,000					81,000
		연구 지원 인력 인건비	외부 인건비	미지급							
				지 급	현금						
					현물						
	연구 지원인력인건비										
	학생인건비					5,250	11,020	19,920		30,940	
	인건비 소계				81,000	5,250	11,020	56,458	0	148,478	
	연구시설·장비비		현 금	일반							
				통합관리							
				현물							
	연구활동비				71,254.070	4,090.910	3,628	3,517	3,981	82,380.07	
	연구재료비				87,695.957	25,875.929	55,741	2,300	61,579	207,315.957	
	연구수당				10,000			8,900		18,900	
	위탁연구개발비				40,909.090					40,909.090	
	직접비 소계				290,859.117	37,016.839	70,389	71,175	65,560	497,983.117	
간접비					8,473	19,686	18,825	0	46,984		
연구개발비 총액				290,859.117	45,489.839	90,075	90,000	65,560	544,967.117		

4. 연구개발과제 수행 결과물

4.1. 연구노트 점검 결과 보고서

연구노트 점검 결과 보고서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

1. 연구노트 관리 지침 제정·운영 현황

지침 제정여부	<input checked="" type="checkbox"/> 제정·운영 중 <input type="checkbox"/> 아직 미제정
미제정 시 사유	
제정 계획	

2. 연구노트 작성·관리 현황

참여연구원수	_____2_____명
연구노트 작성	_____1_____건
사고 유무	<input type="checkbox"/> 분실 (____건) <input type="checkbox"/> 미작성 (____건) <input type="checkbox"/> 기타 (____건)
사고 사유	
조치 사항	

점검결과를 위와 같이 제출합니다.

2023 . 12 . 31 .

기관명 : (주) 중앙백신연구소

점검자 : 이 주 용 (서명)

농림식품기술기획평가원장 귀하

연구노트 점검 결과 보고서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

1. 연구노트 관리 지침 제정·운영 현황

지침 제정여부	<input checked="" type="checkbox"/> 제정·운영 중 <input type="checkbox"/> 아직 미제정
미제정 시 사유	
제정 계획	

2. 연구노트 작성·관리 현황

참여연구원수	3명
연구노트 작성	1건
사고 유무	<input type="checkbox"/> 분실 (___건) <input type="checkbox"/> 미작성 (___건) <input type="checkbox"/> 기타 (___건)
사고 사유	
조치사항	

점검결과를 위와 같이 제출합니다.

2023.12.5.

기관명 : 농림축산검역본부

점검자 : 최준구

최준구

농림식품기술기획평가원장 귀하

연구노트 점검 결과 보고서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

1. 연구노트 관리 지침 제정·운영 현황

지침 제정여부	<input checked="" type="checkbox"/> 제정·운영 중 <input type="checkbox"/> 아직 미제정
미제정 시 사유	
제정 계획	

2. 연구노트 작성·관리 현황

참여연구원수	_____ 2 _____명
연구노트 작성	_____ 1 _____건
사고 유무	<input type="checkbox"/> 분실 (____건) <input type="checkbox"/> 미작성 (____건) <input type="checkbox"/> 기타 (____건)
사고 사유	
조치사항	

점검결과를 위와 같이 제출합니다.

2023. 11. 20.

기관명 : 서울대학교

점검자 : 채 찬 희



농림식품기술기획평가원장 귀하

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)]

연구노트 점검 결과 보고서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

1. 연구노트 관리 지침 제정·운영 현황

지침 제정여부	<input checked="" type="checkbox"/> 제정·운영 중 <input type="checkbox"/> 아직 미제정
미제정 시 사유	
제정 계획	

2. 연구노트 작성·관리 현황

참여연구원수	4명
연구노트 작성	1건
사고 유무	<input type="checkbox"/> 분실 (____건) <input type="checkbox"/> 미작성 (____건) <input type="checkbox"/> 기타 (____건)
사고 사유	
조치사항	

점검결과를 위와 같이 제출합니다.

2023. 12. 5.

기관명 : 경상국립대학교 산학협력단

점검자 : 이 창 희 (서명)



농림식품기술기획평가원장 귀하

4.2. 특허 출원/등록 및 생물자원 관련 실적

1. 특허 출원 : 신규한 아프리카돼지열병의 예방 및 치료를 위한 바이러스 백신조성물(10-2020-0000986)

2020. 1. 5.

출원번호통지서

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2020.01.03
 특기사항 심사청구(우) 공개신청(우) 참조번호(CVA19P02KR)
 출원번호 10-2020-0000986 (접수번호 1-1-2020-0007647-11)
 출원인명칭 주식회사 중앙백신연구소(1-2001-001836-5)
 대리인성명 이종승(9-1999-000639-7)
 발명자성명 윤인중 이주용 유성식 이승철 권혁일 김민호
 발명의명칭 신규한 아프리카돼지열병의 예방 및 치료를 위한 바이러스 백신조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별시 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허담당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기점으로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련 법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 중업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

2. 특허 출원 : 아프리카돼지열병 바이러스 배양을 위한 세포주(10-2020-0001036)

2020. 1. 5.

출원번호통지서

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2020.01.03
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(CVA19P03KR)
 출원번호 10-2020-0001036 (접수번호 1-1-2020-0007917-33)
 출원인명칭 주식회사 중앙백신연구소(1-2001-001836-5)
 대리인성명 이종승(9-1999-000639-7)
 발명자성명 윤인중 이주용 유성식 이승철 권혁일 김민호
 발명의명칭 아프리카돼지열병 바이러스 배양을 위한 세포주

특 허 청 특 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허포(patent.gov.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허대당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권 주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교원허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련 법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 중업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

3. 특허 출원 : 아프리카돼지열병 바이러스 배양을 위한 세포주 및 이를 이용한 백신(10-2021-0165015)

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2021.11.26
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2021-0165015 (접수번호 1-1-2021-1367063-69)
(DAS접근코드3252)
출원인명칭 주식회사 중앙백신연구소(1-2001-001836-5)
대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)
발명자성명 윤인중 이주용 유성식 권혁일 이승철 김우종 김민호
발명의명칭 아프리카돼지열병 바이러스 배양을 위한 세포주 및 이를 이용한 백신

특 허 청 장

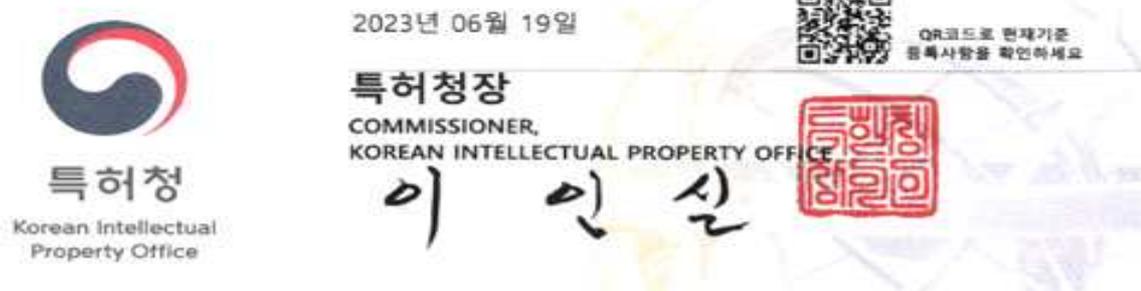
<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

4. 특허 등록 : 아프리카돼지열병 바이러스 배양을 위한 세포주 및 이를 이용한 백신(제 10-2546423호)



위의 발명은 「특허법」에 따라 특허원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



5. 생물자원 기탁 : ASF 감수성 세포주 CA-CAS-01-A(KCTC14568BP)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO: **Choong Ang Vaccine Laboratories**

Choong Ang Vaccine Laboratories Co., Ltd.
1476-37, Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon 34055
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: CA-CAS-01-A	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 14568BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on May 12, 2021 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 181, Ipsin-gil, Jeongeup-si, Jeollabuk-do 56212 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  KIM, Sang-Gun, Director Date: May 12, 2021

Form BP/4 (KCTC Form 17)

10/6 page

4.3. ASF 연구 관련 논문 실적

1. The African Swine Fever Virus Virulence Determinant DP96R Suppresses Type I IFN Production Targeting IRF3



Article

The African Swine Fever Virus Virulence Determinant DP96R Suppresses Type I IFN Production Targeting IRF3

Niranjana Dodantenna ¹, Ji-Won Cha ¹, Kiramaga Chaturanga ¹, W. A. Gayan Chaturanga ¹,
Asela Weerawardhana ¹, Lakmal Ranathunga ¹, Yongkwan Kim ², Weonhwa Jheong ² and Jong-Soo Lee ^{1,*}

- ¹ College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea; niranjan3k@gmail.com (N.D.); siniloon@naver.com (J.-W.C.); chaturangakiramaga@gmail.com (K.C.); gayachathu123@gmail.com (W.A.G.C.); aselasampath2009@gmail.com (A.W.); lakmalranathunga13@gmail.com (L.R.)
- ² Wildlife Disease Response Team, National Institute of Wildlife Disease Control and Prevention, Gwangju 62407, Republic of Korea; kyk5388@korea.kr (Y.K.); purify@korea.kr (W.J.)
- * Correspondence: jongsool@cnu.ac.kr

Funding: This research was funded by the Ministry of Environment (Grant No. NIWDC-2021-SF-02); National Research Foundation (Grant No. 2021R1A6A1A03045495), Institute for Basic Science (IBS) Research Program (Grant No. IBS-R801-D9-A01); and the Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (Grant No. 119081-5), Republic of Korea.

Institutional Review Board Statement: The authors declare that porcine bone marrow-derived macrophages were isolated from the bone marrow samples sourced from ChoongAng Vaccine Laboratories, Daejeon, 34055, Republic of Korea. Bone marrow isolation was performed according to the guidelines approved by the Institutional Review Board of Choong Ang Vaccine Laboratories Co., Ltd. (protocol code 211220-06, approval date 20 December 2021), Republic of Korea.

2. African swine fever virus B175L inhibits the type I interferon pathway by targeting STING and 2'3'-cGAMP



Journal of
Virology*

J. Virol. 2023 Nov; 97(11): e00795-23.

Published online 2023 Oct 30. doi: [10.1128/jvi.00795-23](https://doi.org/10.1128/jvi.00795-23)

PMCID: PMC10688321

PMID: [37902401](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37902401/)

African swine fever virus B175L inhibits the type I interferon pathway by targeting STING and 2'3'-cGAMP

Lakmal Ranathunga,^{# 1} Niranjan Dodantenna,^{# 1} Ji-Won Cha,¹ Kiramage Chathuranga,¹ W. A. Gayan Chathuranga,¹ Asela Weerawardhana,¹ Ashan Subasinghe,¹ D. K. Haluwana,¹ Nuwan Gamage,¹ and Jong-Soo Lee^{# 1}

Colin R. Parrish, Editor

Colin R. Parrish, Cornell University Baker Institute for Animal Health, Ithaca, New York, USA ;

• [Author information](#) • [Article notes](#) • [Copyright and License information](#) • [PMC Disclaimer](#)

ACKNOWLEDGMENTS

[Go to:](#) ▶

This work was supported by the Ministry of Environment (grant no. NIWDC-2021-SP-02), National Research Foundation (grant no. 2021R1A6A1A03045495), Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology Research Initiative Program (KGM9942011), and [the Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries \(grant no. 119081-5\), Republic of Korea.](#)

3. African Swine Fever Virus EP364R and C129R Target Cyclic GMPAMP To Inhibit the cGAS-STING Signaling Pathway



Journal of
Virology®

J. Virol. 2022 Aug; 96(15): e01022-22.

Published online 2022 Jul 21. doi: [10.1128/jvi.01022-22](https://doi.org/10.1128/jvi.01022-22)

PMCID: PMC9364804

PMID: [35861515](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35861515/)

African Swine Fever Virus EP364R and C129R Target Cyclic GMP-AMP To Inhibit the cGAS-STING Signaling Pathway

Niranjan Dodantenna,^{# a} Lakmal Ranathunga,^{# a} W. A. Gayan Chathuranga,^a Aseia Weerawardhana,^a Ji-Won Cha,^a Ashan Subasinghe,^a Nuwan Gamage,^a D. K. Haluwana,^a YongKwan Kim,^b WeonHwa Jheong,^b Haryoung Poo,^c and Jong-Soo Lee^{# a}

Jae U. Jung, Editor

Jae U. Jung, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic;

• [Author information](#) • [Article notes](#) • [Copyright and License Information](#) • [PMC Disclaimer](#)

ACKNOWLEDGMENTS

[Go to:](#) ▶

This work was supported by the Ministry of Environment (grant NIWDC-2021-SP-02), National Research Foundation (grants 2019R1A2C2008283 and 2021R1A6A1A03045495), Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology Research Initiative Program (KGM9942011), and the Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (grant 119081-5), Republic of Korea.

FOOTNOTES

[Go to:](#) ▶

Supplemental material is available online only.

4. Chronological expression and distribution of African swine fever virus p30 and p72 proteins in experimentally infected pigs

scientific reports

[Explore content](#) ▾ [About the journal](#) ▾ [Publish with us](#) ▾

[nature](#) > [scientific reports](#) > [articles](#) > [article](#)

Article | [Open access](#) | Published: 09 March 2022

Chronological expression and distribution of African swine fever virus p30 and p72 proteins in experimentally infected pigs

[Taehwan Oh](#), [Duy Tien Do](#), [Danb Cong Lai](#), [Lan Thi Nguyen](#), [Joo Young Lee](#), [Phan Van Le](#)  & [Chanhee Chae](#) 

Scientific Reports **12**, Article number: 4151 (2022) | [Cite this article](#)

2267 Accesses | 2 Altmetric | [Metrics](#)

Acknowledgements

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA, Gran no. 11908105). This work was also supported by contract research funds of the Research Institute for Veterinary Science (RIVS) from the College of Veterinary Medicine and by BK21 FOUR Future Veterinary Medicine Leading Education and Research Center (Grant no. A0449-20200100).

5. Development of optimized protocol for culturing African swine fever virus field isolates in MA104 cells



[Can J Vet Res](#), 2022 Oct; 86(4): 261–268.

PMCID: PMC9536354

PMID: [36211218](#)

Language: [English](#) | [French](#)

Development of optimized protocol for culturing African swine fever virus field isolates in MA104 cells

[Hyeok-il Kwon](#), [Duy Tien Do](#), [Hung Van Vo](#), [Seung-Chul Lee](#), [Min Ho Kim](#), [Dung Thi Thuy Nguyen](#), [Tan Minh Tran](#), [Quang Tin Vinh Le](#), [Tram Thi Ngoc Ngo](#), [Nam Minh Nguyen](#), [Joo Young Lee](#), and [Toan Tat Nguyen](#)[✉]

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ► [PMC Disclaimer](#)

Acknowledgments

[Go to:](#) ►

This work was funded by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through the Animal Disease Management Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA, Grant no. 11908105).

HIK, DTD, JYL, and TTN designed this study. HVV, QTVL, and TMT collected the samples. HIK, DTD, SCL, MHK, DTTN, TMT, QTVL, and TTNN conducted the viral isolation and molecular laboratory works. DDT, TTNN, and NMN conducted genetic analyses. JYL, SCL, TNT, and MHK provided technical assistance. DTD and HIK wrote the initial draft of the manuscript and JYL and TTN revised it. All authors read and approved the final manuscript.

6. Complete genome sequence of a novel porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus strain identified in South Korea

Provided to the PMC COVID-19 Collection by

Springer Nature

Arch Virol. 2022; 167(5): 1381–1385.

PMCID: PMC8994818

Published online 2022 Apr 10. doi: [10.1007/s00705-022-05414-w](https://doi.org/10.1007/s00705-022-05414-w)

PMID: [35397684](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35397684/)

Complete genome sequence of a novel porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus strain identified in South Korea

Yeeun Kim,¹ Kyung Min Lee,² Guehwan Jang,¹ and Changhee Lee^{✉1}

► Author information ► Article notes ► Copyright and License information ► [PMC Disclaimer](#)

Associated Data

Declarations

[Go to:](#) ►

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through the Animal Disease Management Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (119081-5).

Compliance with ethical standards

[Go to:](#) ►

Funding

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (119081-5).

7. Pathogenicity of a novel classical swine fever LOM vaccine-derived virus isolated on Jeju Island, South Korea

Veterinary Medicine and Science

Open Access

Vet Med Sci. 2022 Nov; 8(6): 2434–2443.

PMCID: PMC9677354

Published online 2022 Aug 9. doi: [10.1002/vms3.903](https://doi.org/10.1002/vms3.903)

PMID: [35944180](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35944180/)

Pathogenicity of a novel classical swine fever LOM vaccine-derived virus isolated on Jeju Island, South Korea

[Guehwan Jang](#), ¹ [Joo-Ah Kim](#), ² [Changnam Park](#), ³ [Kyungok Song](#), ³ [Won-Myoung Kang](#), ³ [Kyungsu Yang](#), ⁴ and [Changhee Lee](#)^{✉ 1}

▸ [Author information](#) ▸ [Copyright and License Information](#) [PMC Disclaimer](#)

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/vms3.903>.

ACKNOWLEDGEMENTS

[Go to: ▶](#)

This research was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (119081-5).

Notes

[Go to: ▶](#)

Jang, G., Kim, J.-A., Park, C., Song, K., Kang, W.-M., Yang, K., & Lee, C. (2022). Pathogenicity of a novel classical swine fever LOM vaccine-derived virus isolated on Jeju Island, South Korea. *Veterinary Medicine and Science*, 8, 2434–2443. [10.1002/vms3.903](https://doi.org/10.1002/vms3.903) [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

8. Field evaluation of the safety and immunogenicity of a classical swine fever virus E2 subunit vaccine in breeding and nursery animals on Jeju Island, South Korea



[Clin Exp Vaccine Res.](#) 2022 Sep; 11(3): 264–273.

PMCID: PMC9691865

Published online 2022 Sep 30. doi: [10.7774/cevr.2022.11.3.264](https://doi.org/10.7774/cevr.2022.11.3.264)

PMID: [36451667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36451667/)

Field evaluation of the safety and immunogenicity of a classical swine fever virus E2 subunit vaccine in breeding and nursery animals on Jeju Island, South Korea

[Guehwan Jang](#),¹ [Eun-Joo Kim](#),² [Seong-Cheol Cho](#),² [Sung-Up Moon](#),² [Byeong Soo Kim](#),³ [Jinhee Kim](#),³ [Kyoung Ju Jeong](#),³ [Kyungok Song](#),³ [Seong Hwan Mun](#),³ [Won-Myoung Kang](#),³ [Jonghoo Lee](#),⁴ [Changnam Park](#),⁵ [Hyoung-Seok Yang](#),⁵ and [Changhee Lee](#)^{✉1}

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ► [PMC Disclaimer](#)

Footnotes

[Go to:](#) ►

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

This research was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (119081-5).

9. The Isolation and Replication of African Swine Fever Virus in Primary Renal-Derived Swine Macrophages

Front Vet Sci. 2021; 8: 645456.

PMCID: PMC8017199

Published online 2021 Mar 19. doi: [10.3389/fvets.2021.645456](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.645456)

PMID: [33816588](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33816588/)

The Isolation and Replication of African Swine Fever Virus in Primary Renal-Derived Swine Macrophages

Taehwan Oh,^{1,†} Duy Tien Do,^{2,†} Hung Van Vo,³ Hyeok-Il Kwon,⁴ Seung-Chul Lee,⁴ Min Ho Kim,⁴ Dung Thi Thu Nguyen,² Quang Tin Vinh Le,³ Tan Minh Tran,³ Toan Tat Nguyen,² Joo Young Lee,⁴ and Chanhee Chae^{1,*}

• [Author information](#) • [Article notes](#) • [Copyright and License information](#) • [PMC Disclaimer](#)

Associated Data

• [Data Availability Statement](#)

Author Contributions

[Go to: ▶](#)

TO and DD performance of the experimental trials, data analysis, and writing of the manuscript, H-ik, S-CL, MK, DN, QL, and TT preparation of the inoculum and lab analysis. HV, TN, and JL development of protocol. CC design of the study, review of the final manuscript, and approval for publication. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of Interest

[Go to: ▶](#)

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Footnotes

[Go to: ▶](#)

Funding. This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA, Gran no. 11908105). This work was also supported by contract research funds of the Research Institute for Veterinary Science (RIVS) from the College of Veterinary Medicine and by BK21 FOUR Future Veterinary Medicine Leading Education and Research Center (Gran no. A0449-20200100).

10. Long-term follow-up of convalescent pigs and their offspring after an outbreak of acute African swine fever in Vietnam



RAPID COMMUNICATION

Long-term follow-up of convalescent pigs and their offspring after an outbreak of acute African swine fever in Vietnam

Taehwan Oh, Tien Manh Nguyen, Tram Thi Ngoc Ngo, Danh Thinh, Trang Thi Phuong Nguyen, Luc Duc Do, Duy Tien Do ✉

First published: 04 August 2021 | <https://doi.org/10.1111/tbed.14276> | Citations: 1

The authors Taehwan Oh and Tien Manh Nguyen contributed equally to this work.

Funding information

The research has received financial support from the Korea Institute of Planning and valuation for Technology in Food, **Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program.**       |  
and Rural Affairs (MAFRA, Gran no. 11908105).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study has received great technical support from The Research Laboratory, of the Faculty of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Nong Lam University.

11. Assessing the risk of recurrence of porcine epidemic diarrhea virus in affected farms on jeju island south korea



J Vet Sci. 2021 Jul; 22(4): e48.

PMCID: PMC8318795

Published online 2021 Jun 1. doi: [10.4142/jvs.2021.22.e48](https://doi.org/10.4142/jvs.2021.22.e48)

PMID: [34170089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34170089/)

Assessing the risk of recurrence of porcine epidemic diarrhea virus in affected farms on Jeju Island, South Korea

Guehwan Jang,^{1†} Sunhee Lee,^{2†} Changhee Lee^{✉1}

▶ [Author information](#) ▶ [Article notes](#) ▶ [Copyright and License information](#) ▶ [PMC Disclaimer](#)

[Associated Data](#)

ACKNOWLEDGMENTS

[Go to:](#) ▶

We gratefully thank local veterinarians for providing clinical samples and information on individual PED-affected farms.

[Footnotes](#)

[Go to:](#) ▶

Funding: This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (119081-5).

Conflict of Interest: The authors declare no conflicts of interest.



Age-related viral load and severity of systemic pathological lesions in acute naturally occurring African swine fever virus genotype II infections

[Taehwan Oh](#)^{a 1}, [Duy Tien Do](#)^{b 1}, [Danh Cong Lai](#)^b, [Thanh Che Nguyen](#)^b, [Hung Van Vo](#)^c,
[Chanhee Chae](#)^a  

Conflict of interest statement

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article....

Acknowledgements

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA, Gran no. 11908105). This work was also supported by contract research funds of the Research Institute for Veterinary Science (RIVS) from the College of Veterinary Medicine and by BK21 FOUR Future Veterinary Medicine Leading Education and...

4.4. 인력 양성 및 고용 창출 실적

1. 서울대학교 박사 졸업 및 국가영장류센터 취업 인력양성

No. 2023-39260-1

한국생명공학연구원

Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology

대전광역시 유성구 과학로 125

팩시밀리 : (042)861 - 1759

전화 : (042)860 - 4114

재 직 증 명 서

주 소 : 서울특별시 광진구 광나루로50길 19-9

소 속 : 국가영장류센터

직 급 : 박사후연구원

성 명 : [REDACTED]

생년월일 : [REDACTED]

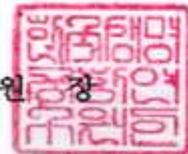
용 도 : 취업용

위 사람은 2022 년 6 월 16 일부터 본 연구원에 근무하고

있음을 증명함.

2023 년 8 월 28 일

한국생명공학연구원장



* 본 증명서는 자동발급된 것임.

2. 중앙백신연구소 고용 창출 1

출력일시: 2020.10.29 16:19

4대 사회보험 사업장 가입자 명부						
발급번호	20201029580489	발급일시	2020-10-29 16:18	사업장 관리번호	30581198490	
구분	국민연금	건강보험	산재보험	고용보험		
사업자등록번호	305-81-19849	305-81-19849	305-81-19849	305-81-19849		
사업장 명칭	(주)중앙백신연구소	(주)중앙백신연구소	(주)중앙백신연구소	(주)중앙백신연구소		
■ 가입 내역(발급일자 현재기준) 1 / 7						
연번	주민(외국인) 등록번호	성명	자 격 취 득 일			
			국민연금	건강보험	산재보험	고용보험
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						

1. 이 사업장 가입자 명부는 4대 사회보험 정보연계시스템이 국민연금공단, 국민건강보험공단, 근로복지공단 등의 가입자 정보를 실시간 연계하여 제공하는 것이며, 발급일자 이후는 월요일로부터 90일까지 4대 사회보험 보험사이에(www.4sure.or.kr)의 [발급일자 확인] 메뉴에서 확인 가능합니다.
*정밀한 정보연계서비스, 근로 사회보험이 함께 합니다.

■ 가입 내역(발급일자 현재기준)					발급번호: 20201029580489				출력일시: 2020.10.29 16:19				
연번	주민(외국인) 등록번호	성명	자 격 취 득 일										
			국민연금	건강보험	산재보험	고용보험							
83													
84													
85													
86													
87													
88													
89													
90													
91													
92													
93													
94													
95													
96													
97													
98													
99										2020.04.06	2020.04.06	2020.04.06	2020.04.06
100													
101													
102													
103													
104													
105													
106													
107													
108													
109													
110													
111													
112													
113													

1. 이 사업장 가입자 명부는 4대 사회보험 정보연계시스템이 국민연금공단, 국민건강보험공단, 근로복지공단 등의 가입자 정보를 실시간 연계하여 제공하는 것이며, 발급일자 이후는 월요일로부터 90일까지 4대 사회보험 보험사이에(www.4sure.or.kr)의 [발급일자 확인] 메뉴에서 확인 가능합니다.
*정밀한 정보연계서비스, 근로 사회보험이 함께 합니다.

3. 중앙백신연구소 고용 창출 2

출력일시: 2019.12.31.10:40

4대 사회보험 사업장 가입자 명부						
발급번호	20191231472961	발급일자	2019-12-31 10:39	사업장 관리번호	30581198490	
구분	국민연금	건강보험	산재보험	고용보험		
사업장등록번호	305-81-19849	305-81-19849	305-81-19849	305-81-19849		
사업장명칭	(주)중앙백신연구소	(주)중앙백신연구소	(주)중앙백신연구소	(주)중앙백신연구소		
■ 가입 내역(발급일자 현재기준) 1 / 7						
연번	주민(외국인) 등록번호	성명	자격취득일			
			국민연금	건강보험	산재보험	고용보험
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						

■ 가입 내역(발급일자 현재기준)						
연번	주민(외국인) 등록번호	성명	자격취득일			
			국민연금	건강보험	산재보험	고용보험
145			2018.08.01	2018.08.01	2018.08.01	2018.08.01
146						
147						
148						
149						
150						
151						
152						
153						
154			2019.11.01	2019.11.01	2019.11.01	2019.11.01
155						
156						
157						
158						
159						
160						
161						
162						
163						
164						
165						
166						
167						
168						

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술고도화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술고도화지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.