

최 중
연구보고서

주요 닭 전염병에 대한 in ovo vaccination용 항원
개발에 관한 연구

Studies on development of the
immunogens of major infectious poultry
diseases for in ovo vaccination

연구기관
충남대학교 수의과대학

농 립 부

최 중
연구보고서

주요 닭 전염병에 대한 in ovo vaccination용 항원
개발에 관한 연구

Studies on development of the
immunogens of major infectious poultry
diseases for in ovo vaccination

연구기관
충남대학교 수의과대학

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “주요 닭 전염병에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구” 과제 (세부과제 : “닭 뉴캐슬병에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구”, “전염성후두기관염에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구”; 협동과제 : “전염성기관지염에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 일

주관연구기관명 : 충남대학교 수의과대학

총괄연구책임자 : 전 무 형

세부연구책임자 : 전 무 형

김 현 수

연 구 원 : 장 승 익

연 구 원 : 김 지 영

연 구 원 : 박 지 용

연 구 원 : 공 신 국

협동연구기관명 : 전북대학교 수의과대학

협동연구책임자 : 송 희 중

요 약 문

I. 제 목

주요 닭 전염병에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

양계산업에서 많은 노동력의 동원과 인건비 지출을 요하는 예방약 접종을 보다 더 간편하고, 성력적으로 수행하여 양계농가의 생산성을 높이고, 국제 경쟁력을 고양하기 위해 부화계란의 계태아에 직접 백신을 접종하는 in ovo vaccination 기술의 핵심이 되는 항원물질 개발을 위한 기술을 확립하고자 한다. 본 연구에서는 국내 양계농장에서 발병하여 많은 경제적인 피해를 주고 있는 뉴캐슬병(ND), 전염성후두기관염(ILT) 및 전염성기관지염(IB)을 대상으로 부화계란에 접종시 안전하고 높은 방어 효능을 부여하는 항원물질을 개발하기 위해 바이러스의 계대 배양, 증식환경 변화, 항체처리 및 화학적 처리 등에 의해 무독 내지 약독화 바이러스 작제 및 유전자 재조합 DNA 백신 제조에 대한 연구를 수행한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

“주요 닭 전염병에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구” 과제 속에 2개 세부 과제 즉 “닭 뉴캐슬병에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구” 와 “전염성후두기관염에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구”를 수행하였고, 협동과제로써 “전염성기관지염에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구”를 수행하였다. 각 과제별로 불활화 항원 제조 및 안전성과 효능시험, 백신주 또는 야외 분리주 바이러스의 약독화 와 계태아 및 병아리에 대한 안전성 및 효능시험, 그리고 작제된 항원의 접종방법에 따른 면역반응 시험을 수행하였다. 또한 뉴캐슬병바이러스, 전염성후두기관염바이러스 및 전염성기관지염바이러스의 면역관련 유전자의 핵산구조 규명,, 재조합 DNA백신 작제 및 성장 시험, 그리고 재조합 DNA백신의 안전성과 면역원성 및 효능시험에 대한 연구를 수행하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

- 닭 뉴캐슬병에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구 ;

NDV CBP-1주를 부화계란에서 250대 연속계대하거나 저온 배양하여 약독화된 독주를 획득하였으며, NDV B1 및 CBP-1주를 formalin 또는 ethylmethane sulfate을 처리하여 불활화된 항원의 in ovo 접종에 의한 부화율과 면역원성을 규명하였다. 또한 NDV B1주와 NDV CBP-1주를 polyvalent antisera, 단클론성항체 및 IgY 항체로 처리한 항원이 in ovo 접종시 안전성이 높고, HI 및 ELISA 역가가 높게 나타났다.

NDV CBP-1주(250th) F gene과 HN gene의 염기 및 아미노산 서열을 결정하고, B1주, Lasota주, Texas G.B.주, Beaudette C주, Ulster주와 비교하였던 바, 상동성이 핵염기는 89% 이상, 아미노산은 91.3% 이상이었다. NDV CBP-1주(250th) F 및 HN gene이 재조합된 pSLIA-F와 pSLIA-HN을 작제하고 COS-7 cell에 transfection하고 형광항체법, SDS-PAGE 및 western blot으로 F 및 HN 단백질의 발현을 확인하였으며, 마우스에 접종하여 F 및 HN 단백질에 대한 항체 형성능을 ELISA법으로 시험하고 항체의 상승을 확인하였다. DNA vaccine pSLIA-tsF, pSLIA-tsHN 및 pSLIA-F+HN, pSLIA과 attenuated NDV CBP-1(250th)+IgY vaccine을 in ovo 접종하여 부화율, 안전성 및 면역원성을 시험한 바, DNA vaccine의 부화율과 안전성이 80~100%로 높았다. 시험군에 대한 NDV B1 음수백신의 booster 효과를 측정할 바, DNA vaccine과 attenuated NDV CBP-1(250th) +IgY vaccine 접종군에서 NDV B1 vaccine의 booster 효과가 높게 나타났고, wild type NDV CBP-1 virus로 challenge 시 면역원성과 방어율이 유의하게 높았다.

- 닭 전염성 후두기관지염에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구 ;

야외 분리 virus 주 ILTV-N91B01의 병원성을 감소시키기 위하여 ILT 바이러스를 LMH cell에 adaption 하였으며 181대 까지 연속 계대 배양하였다. 180대 연속 계대된 ILT virus의 LD₅₀ 값은 $1 \times 10^{-2.3}$ /0.1ml으로 초기의 계대배양 전에 비하여 LD₅₀ 값이 많이 감소되었음을 확인할 수 있었다. 화학제제 인 EMS 처리 항원, 다항체처리 항원 또는 단클론 항체 처리로 병원성의 감소는 확인 되었으나 접종된 병아리에서 항체 생산이 매우 미약하였다. Attenuated ILT virus의 계대아 접종 시험에서는 $1 \times 10^{1.25}$ TCID₅₀/0.1ml의 바이러스를 함유하는 배양액 계란 한개 당 100ul 씩 접종하였을 때 부화율, 부화후 10일 간 생존율이 PBS group와 유사하였다. 또한 면역원성 시험에서도 접종 후4주, 5주, 6주, 및 7주에서 SN 값이 각각 1:2~1:64, 1:2~1:64, 1:2~1:32, 1:2~1:32 으로 다소 낮은 항체가를 보였다. 이는 2 주 미만의 병아리는 ILT virus의 접종에 대하여 2주이상의 병아리보다 면역반응이 매우 낮

다는 사실 때문이다. 또한 hepes virus의 방어 기전은 단순한 humoral antibody에 의한 것보다는 local cell mediated immune response에 의존하는 것으로 알려져 있기 때문에 비록 본 시험에서 비록 다소 낮은 humoral antibody response가 나왔지만 ILT 감염방어에는 문제 없을 것으로 생각된다.

DNA 백신을 생산하기 위하여 pCI-neo-vector에 ILT gB gene을 PCR 기법으로 증폭하여 삽입한 결과 recombinant plasmid DNA vaccine pCI-neo-gB을 생산 할 수 있었으며 이를 18일령 SPF 계태아에 접종한 결과 안전성이 매우 높음을 알 수 있었다. SN test에서는 인식할 만한 항체는 생성되지 않았으나 plaque reduction neutralization test에서는 대조군과 비교할 때 전반적으로 50% plaque 감소 효과가 있었으며 circular DNA, linear DNA, 또는 lipofection 첨가군 사이에 특이한 면역원성의 차이는 없었다.

- 전염성기관지염에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구 ;

IBV-V주 및 IBV-KM91주는 in ovo 접종 시 병원성이 높고 이상란, dwarfing 또는 curling이 관찰되었으며, 부화계란에 10 내지 20대 계태함에 따라 약독화 및 순화 현상이 관찰되었으나 병원성은 남아 있었다. 이 IBV를 β -propiolactone으로 불활화시키면 in ovo 접종에서 안전성이 높았다. IBV에 대한 다가 및 단클론성 항체를 삭제하고 이 항체를 20대 순화된 IBV-V 및 IBV-KM91에 처리한 바 안전성 및 면역원성이 유의하게 인정되었다.

IBV-KM91p6주의 S1 유전자를 pCRII 벡터에 클로닝하고 핵산 염기서열 분석을 수행하였으며, Baculovirus transfer vector를 이용하여 S1유전자가 재조합된 rAc-KMp6S1을 삭제하고 발현성상을 확인하고 병아리에 접종하여 면역원성을 시험한 바 rAc-KMp6S1이 불활화 KM91p6보다 방어효과는 낮지만 반복면역하면 고병원성 IBV에 대한 방어면역이 유도됨을 확인했다. 또한 in ovo 접종용 DNA vaccine pCI-KMp6S1 DNA와 pTriEx-KMp6S1 DNA를 삭제하고 S1 당단백의 발현유무를 in vitro 배양 세포에서 확인하였다. pCI-KMp6S1과 pTriEx-KMp6S1을 18일령의 부화계란에 in ovo 접종한 결과 평균 70% 이상의 부화율을 보였다. DNA vaccine의 in ovo vaccination에 따른 IB 백신 booster 효과를 시험한 바 DNA 백신 접종한 계군에서 booster에 의한 항체역가 상승이 유의하게 나타났다.

본 연구를 통하여 얻어진 결과는 최근 닭 전염병 예방접종법으로 새롭게 대두되고 있는 in ovo vaccination 기법 개발에 유용한 자료로 활용될 것이며, 특히 바이러스와 항체 복합체를 이용한 in ovo 접종 시험에서 얻어진 성적과 재조합 DNA 백신 제조 연구에서 얻어진 결과들은 뉴캐슬병, 전염성후두기관염 및 전염성기관지염에 대한 in ovo 백신과 재조합 DNA 백신 개발에 유용한 자료로 활용될 것으로 예상된다.

본 연구를 통하여 얻어진 in ovo vaccination용 항원 및 DNA 백신 제조와 관련된 기술들은 초기단계 수준으로써 산업화시키고 현장에 활용하기 위해서는 보다 광범위한 지속적인추가 연구가 수반되어야 한다.

SUMMARY

I. Title

Studies on development of the immunogens of major infectious poultry diseases for in ovo vaccination

II. The objectives and necessity of study

Vaccination in poultry industries is a laborious – and high cost job, therefore, we will establish antigen production technologies for in ovo vaccination, which has been known to be simple and cost-saving method, to enhance productivity and international competitiveness by saving labor and time for vaccination.

In this study, we will conduct experiments to produce antigens, which can confer higher safety and effective protectivity when it is applied into egg embryos, by serial passage of antigen on tissue culture or egg embryo, modifying replication conditions, specific antibody treatment, and by chemical treatment to reduce or remove virulence of antigens. The vaccine antigens include Newcastle disease(ND) virus, Infectious laryngotracheitis (ILT) virus and Infectious broncheitis(IB) virus those have been big economic losses in poultry industries. We will also conduct study on production of recombinant DNA vaccine on DNV, ILTV, and IB.

III. Contents and field of study

The research project consists of 3 subjects including " Study on the development of ND virus antigen for inovo vaccination", " Study on the development of ILT virus antigen for inovo vaccination", and " Study on the development of IB virus antigen for inovo vaccination", The detail research contents in each research subject are production of inactivated antigens, safety and efficacies test on inactivated antigen,

vaccine virus, and attenuated field virus isolates in egg embryos and chicken. The immunogenicity studies using different inoculation methods were also conducted in egg embryos. Characterization of antibody inducing genes of NDV, ILTV and IB virus, production of DNA vaccines and test of their characteristics, safety, immunogenicity and efficacy were also carried out.

IV. Results and suggestion for application

The summary of this study is as follows;

- Study on the development of ND virus antigen for in ovo vaccination ;

A live attenuated NDV CBP-1 strain was produced by 250 times serial passage or cold adaption in egg embryos. The immunogenicity of the NDV B1 and CBP-1 strain inactivated by formalin or EMS treatment were determined by the in ovo vaccination into egg embryos. B1 strain, CBP-1 strain treated with polyvalent antisera, monoclonal antibody and IgY showed high safety and high titers in HI test and ELISA. Sequence of F gene, HN gene of NDV CBP-1 and its amino acid sequence was determined and were compared with B1 strain, Lasota strain, Texas G.B. strain, Beaudette C strain, and Ulster strain. CBP-1 strain share an homology more than 89% in nucleotide sequence and 91.3% in amino acid sequence with reference strains. The recombinant plasmid DNAs pSLIA-F and pSLIA-HN were constructed using F and HN genes obtained from CPB-1 strain. Expression of F and HN protein in COS-7 cell transfected with pSLIA-F or pSLIA-HN was confirmed by FA test, SDS-PAGE and Western blot. Antigenicity of pSLIA-F and pSLIA-HN in mouse was confirmed by ELISA. Hatchability and safety of DNA vaccines pSLIA-tsF, pSLIA-tsHN, pSLIA-F+HN, pSLIA, and attenuated NDV CBP-1(250th) reacted with IgY were up to 80 to 100%, when they were inoculated into egg embryo. High booster effects by administration of B1 oral vaccine were demonstrated in groups inoculated with the DNA vaccine and attenuated NDV CBP-1(250th) reacted with IgY. When the challenge injection with wild type CBP-1 virus was made into chicken administered with B1 oral vaccine, immunogenicity and protectivity were significantly high.

- Study on the development of ILT virus antigen for in ovo vaccination ;

The field isolate ILTV-N91B01 was adapted well to LMH cells and was passaged serially up to 181 passages. The LD₅₀ value of the ILT virus against 18 days old egg embryos was $1 \times 10^{-2.3}/0.1\text{ml}$, indicating a big loss of virulence. Treatment of ILT virus with EMS, polyclonal antibody, or monoclonal antibody resulted in loss of virulence, but antigenicity of ILT virus antigen was low. Hatchability, survivability for 10day after hatching of egg embryos inoculated with attenuated ILT virus ($1 \times 10^{1.25}\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$) were similar to those of egg embryos injected with PBS. Serum neutralization antibody titers at 4-, 5-, 6-, and 7 weeks post-inoculation were 1:2~1:64, 1:2~1:64, 1:2~1:32, and 1:2~1:32, respectively.

Immune response in chickens less than 2 weeks of age do not respond as well to vaccination as do older birds. It has been known that humoral immune responses to ILTV are not the primary mechanism for protection and a poor correlation generally has been found between serum antibody titer and immune status of flocks. The protection mechanism rely on a local cell mediated immune response, therefore, relative lower immune response may not be problems in protection of birds from ILT infection. Recombinant plasmid DNA vaccine pCI-neo-gB was constructed by inserting gB gene, which was amplified by PCR technique, into pC-neo-vector DNA. Safety of recombinant plasmid DNA vaccine pCI-neo-gB against 18 days old egg embryos was high. No perceivable SN antibody titer was demonstrated, but 50% plaque reduction effects was found in sera collected from chickens inoculated with recombinant plasmid DNA vaccine pCI-neo-gB at 18 days old SPF egg embryos.

- Study on the development of IB virus antigen for inovo vaccination :

IBV-V and IBV-KM91 strain is highly pathogenic and cause abnormal egg production, dwarfing or curling when they were inoculated in egg embryos. They were subjected 10 to 20 egg embryos passage. Virulence was reduced but not lost completely. IBV inactivated with β -propiolactone or polyclonal antibody or monoclonal antibody showed high safety and significant immune response in egg embryos, The S1 gene of IBV-KM91p6 strain was cloned into pCRII vector and the nucleotide sequence was analyzed. The S1 gene was expressed in Sf 9 cell using Baculovirus transfer vector and the

expression S1 gene protein was confirmed. The recombinant protein of rAc-KMp6S1 showed lower protectivity than that of inactivated KM91p6 virus antigen, but it induced protective immune response against high virulent IBV when it applied repeatedly. We constructed recombinant plasmid DNA pCI-KMp6S1 and pTriEx-KMp6S1 and examined the expression of their S1 gene protein in eukaryotic cells. The pCI-KMp6S1 and pTriEx-KMp6S1 had more than 70% hatchability on 18 days old egg embryos, The booster effects of DNA vaccine was significantly high in chicken flocks inoculated with IB vaccine.

The results obtained in this study may be useful data in developing antigens for in ovo vaccination which is an emerging new technology. Especially, the results obtained from the in ovo vaccination experiments using virus-antibody complex antigen and recombinant DNA vaccine will be used in production of antigens and DNA vaccine for in ovo vaccination to ND, ILT and IB.

This study is only first step in developing antigen for in ovo vaccination, therefore, it must be continued and be commercialized through a cooperative study with industry.

CONTENTS

Chapter 1. The outline of subject for research.....	14
Chapter 2. The present situation of development in techniques of Korea and foreign countries.....	15
Chapter 3, Contents and results of research.....	16
Section 1. Studies on development of the immunogens to be used for in ovo vaccination of Newcastle diseases.....	16
1. Materials and methods.....	16
2. Results	22
3. Conclusion.....	55
Section 2. Studies on development of the immunogens to be used for in ovo vaccination of infectious laryngotracheitis.....	57
1. Materials and methods.....	57
2. Results.....	67
3. Conclusion.....	83
Section 3. Studies on development of the immunogens to be used for in ovo vaccination of Infectious bronchitis.....	85
1. Materials and methods.....	85
2. Results.....	95
3. Conclusion.....	112
Chapter 4, The accomplishment of targets and devotion for associated area.....	114

Chapter 5. Application schedule of research results.....	114
Chapter 6. Foreign scientific technological information collected in process of the present study.....	115
Chapter 7. References.....	116

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	14
제 2 장	국내외 기술개발 현황	15
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	16
제 1 절	닭 뉴캐슬병에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구	16
1-1.	재료 및 방법	16
1-2.	결 과	22
1-3.	결 론	55
제 2 절	전염성후두기관지염에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구	57
2-1.	재료 및 방법	57
2-2.	결 과	67
2-3.	결 론	83
제 3 절	전염성기관지염에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구	85
3-1.	재료 및 방법	85
3-2.	결 과	95
3-3.	결 론	112
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	114
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	114
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	115

제 7 장 참고문헌.....116

제 1 장 연구개발과제의 개요

본 연구는 국내 양계농장에서 발병하여 많은 경제적인 피해를 주고 있는 뉴캐슬병, 전염성후두기관염 및 전염성기관지염을 대상으로 부화계란에 접종시 안전하고 높은 방어 효능을 부여하는 항원물질을 개발하기 위해 수행되었다. “주요 닭 전염병에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구” 과제 속에 2개 세부과제 즉 “닭 뉴캐슬병에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구” 와 “전염성후두기관염에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구”를 수행하였고, 협동과제로써 “전염성기관지염에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구”를 수행하였다. 각 과제별로 불활화 항원 제조 및 안전성과 효능시험, 백신주 또는 야외 분리주 바이러스의 약독화 와 계태아 및 병아리에 대한 안전성 및 효능시험, 그리고 작제된 항원의 접종방법에 따른 면역반응능 시험을 수행하였다. 또한 뉴캐슬병 바이러스, 전염성후두기관염바이러스 및 전염성기관지염바이러스의 면역관련 유전자의 핵산구조 규명,, 재조합 DNA백신 작제 및 성장 시험, 그리고 재조합 DNA백신의 안전성과 면역원성 및 효능시험에 대한 연구를 수행하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

국내의 닭 사육형태는 무창계사 시설과 첨단 자동시설을 갖춘 양계장에서 부터 비닐하우스에서 사육하는 재래식 농장 등 다양하고, 사양위생관리의 미숙, 노동력 부족과 경제적인 단점으로 백신 기술을 기피하는 현상 때문에 전염병 발생으로 인한 양계농가의 손실이 크다. 국내에서 추천되고 있는 백신접종 프로그램은 병아리가 부화된 직후부터 거의 1주일 간격으로 20여종의 백신을 투여해야하기 때문에 양계농가의 백신접종 기피 현상은 현 체제로는 쉽게 극복할 수 없는 문제점이다. 그러므로 미국 등 선진국에서 지난 20여 년간 연구하여 실용화되어 가고 있는 in ovo vaccination과 같이 새로운 개념의 백신접종 방법에 대한 개발이 절실히 요구되고 있으나 국내에서는 이에 대한 연구활동이 매우 미진한 실정이다.

미국에서는 미농립성, 아르칸사스대학, 캘리포니아대학, EMBREX Inc. 미네소타 주립대학, TriBio Lab. Pfizer 등, 그리고 호주에서는 Fort Dodge Australia Pty Limited, 네덜란드에서는 Lelystad 연구소 등에서 수의학, 분자생물학, 면역학, 생화학, 기계공학 및 조류 생리학자들이 지난 20여 년간에 걸쳐 부화계란에 백신을 직접 주사하는 in ovo vaccination 기법에 대한 연구를 해왔다. 이들은 주로 마렉크병, 전염성 F낭병(infectious bursal disease), 뉴켓슬병, 인플루엔자병, 전염성기관지염에 대한 시험을 수행하였고, 이중 마렉크병과 전염성 F낭병에 대한 in ovo 백신을 상품화하여 실용화 단계에 들어가고 있다. 그러나 외국 농장여건에서 개발된 백신은 국내 양계농장에서 발생하는 전염병의 병원체를 방어하는데 있어서 항원성상의 특성과 면역생물학적 환경 때문에 차이가 있을 수 있으며, 항원의 안전성, 안정성 및 적응성이 다르므로 효능을 적절히 발휘하지 못할 가능성도 높다.

그러므로 국내에서 쓰고 있는 백신 바이러스 또는 국내 분리주를 공시하여 in ovo vaccination 기법 개발에서 핵심이 되는 국내용 항원을 개발할 필요가 있다. 또한 NDV, ILTV 및 IBV에 대한 in ovo vaccination용 gene vaccine은 최근에 도입된 개념으로서 외국에서 일부 연구진이 기초적인 실험을 하고 있으나 아직 초보단계에 있으며, 기술적으로 취약한 분야이며 연구해야 할 사항들이 많다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 닭 뉴캐슬병에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구

1-1. 재료 및 방법

1) 공시 NDV 및 연속계대 약독화

뉴캐슬병에 이환된 꿩에서 분리하여 부화계란에서 150대 계대 배양한 내열성 NDV CBP-1주 및 생독백신주 Hitchner B1주를 공시하였다. 바이러스는 9~10일령된 SPF 부화계란의 요막강내 접종방법에 의해 증식하였으며, 부화계란에서 150~250대 연속 계대 배양하거나 29℃에서 72시간 저온배양(low temperature, LT)에서 30~ 50대 계대 약독화하여 공시하였다.

2) NDV의 화학제 및 항체 처리

Formalin과 ethylmethane sulfate처리법을 응용하였다. NDV B1주와 CBP-1(20th)주를 각각 부화계란에 증식한 다음 장노막강액을 무균적으로 채취하여 0.2% formaline 생리식염수에 6~7배로 유제하여 38℃에서 72시간 불활화 다음 인산완충식염액(PBS,pH 7.1)에서 48시간 투석하였다. 또한 0.5M sodium acetate(10ml)에 ethylmethane sulfate(100ml)를 가하고 31℃에서 2분간 혼합한 다음 동량의 바이러스 가검물을 넣고 31℃에서 30분간 감작한 다음 10배의 1% sodium thiosulfate로 가하였다. 최종액에 우태아혈청을 2%되게 가하였다.

NDV polyvalent antiserum(HI 역가: 256)을 NDV B1주(2×10^7 EID₅₀/0.1ml) 또는 CBP-1(240th; 2×10^7 EID₅₀/0.1ml)을 동량으로 혼합한 후 실온에서(23℃) 1시간동안 감작시켜 NDV immune complex(Igs) 항원을 제조하였다.

3) 부화계란 항원 접종(in ovo vaccination)

준비된 바이러스 항원 0.1ml(100 μ l)를 부화 18일령 껍데 접종하였으며, 예비시험을 거쳐 본시험을 수행하였다. 주사기(1ml)에 22게이지 주사침(길이1.5인치)을 사용하였으며, 기실부위에 구멍을 만들고 주사침을 삽입하여 항원을 주입하였으며 접종 후 계란을 부화기에 넣어 계속 부화시켰다.

4) 혈구응집반응(HA) , 혈구응집억제반응(HI), ELISA

96 well microplate(U-bottom)에서 일반법에 따라 실시하였다. PBS(pH 7.2)로 가검 바이러스를 2배 단계희석(25 μ l)한 후 닭적혈구(1%)를 각 well당 동량 가하여 실온에

서 30분간 정치한 후 HA가를 판독하였다. 또한 microplate에서 가검혈청을 PBS(pH7.2)로 2진 희석한 후 4 HAU의 NDV를 동량(25 μ l)가하고 실온에서 20분간 반응시킨 다음 1% 닭혈구액을 첨가하고 실온에서 정치한 후 최고희석배수의 역수를 log2값으로 표시한 HI역가를 산정하였다. ELISA은 Avian Newcastle Disease Virus Antibody측정용 ELISA kit (Jeno Biotech., Korea)로 면역원성을 측정하였다.

5) Polyvalent antibody 및 monoclonal antibody 생산

계태아에서 증식된 NDV B-1을 polyethylene glycol(MW:6000)에서 처리한 다음 sucrose gradient에서 초고속원심분리하여 NDV 특이밴드(1.175~1.185g/ml)을 수거하여 정제하였다. 정제된 항원을 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 SPF 병아리의 근육내에 1ml씩 접종하였다. 2주후 항원을 Freund's incomplete adjuvant와 혼합하여 1ml씩 추가 접종하고 2주후 채혈하여 혈청을 분리하여 polyvalent antibody로 공시하였고, 또한 2년차에는 IgY(HI titer = 2^{12-13} , SN titer = 3.0-3.2)를 대성미생물연구소에서 분양 받아 polyvalent antibody로 공시하였으며, HI역가는 각각 512로 조정하였다.

Monoclonal antibody는 위에서 준비된 NDV B-1 Freund's complete adjuvant와 동량 혼합한 항원을 4~5주령 Balb/c 마우스의 복강내에 0.3ml씩 주입하고, 2주후에 Freund's incomplete adjuvants와 혼합한 항원을 같은 경로로 접종하였다. 비장임파구와 SP2/0 mouse myeloma cell을 50% PEG(MW :3,350)을 매체로 하여 융합시켰다. 융합된 hybridoma는 간접형광항체법으로 스크린하고 limiting dilution 방법으로 클로닝하였고, isotypes 및 반응 polypeptides를 Western blotting으로 확인하였으며 대량 증식하여 액체질소탱크에 보관하여 사용하였다.

6) 안전성, 면역원성 및 효능시험

In ovo vaccination 후 부화된 1, 2 및 3주령 병아리의 혈청을 대상으로 HI, ELISA 및 세포독성 T 림프구 측정시험을 수행하였다. 또한 in ovo vaccination 에 대한 booster효과를 측정하기 위해 NDV B1 음수백신을 사용법에 따라 투여하고 HI항체가의 변동을 측정하였다. 약독화된 바이러스의 안전성 및 병원성 시험을 위해 MDT(mean death time) 및 ICPI(intracerebral pathogenicity index)를 측정하고, 가검 재료를 병아리에 구강 접종하여 1주간 관찰하였다.

7) Cell proliferation assay

96-well 마이클로플레이트에 splenocytes (2.0×10^6 cells/ml)와 NDV 항원을 가하고 3일간 배양후 [methyl- 3 H] thymidine 을 넣고 18시간 배양한 다음 수확하여 thymidine uptake치를 측정하고 stimulation index(SI)로 표현하였다.

8) NDV F, HN gene에 대한 primer 작제

Table 1과 같이 primer를 작성하였다.

Table 1. Nucleotide sequence of PCR primers for amplification of NDV F, HN gene

Primers	Nucleotide sequence 5' to 3'	Expected product size
F S	5'-GATTCTGGATCCCGGTTGGCGCTTTCTAGG-3'	1710 bp
F AS	5'-CGCGGATCCCATCTGTGTTACATTTTGT-3'	
HN S	5'-CGGGATCCAACCTCCGTTACCGACAACAGTCC-3'	1795 bp
HN AS	5'-CGGGATCCTTGACTCAACTAGCCAGACCTGGCTTCTCTAACC-3'	

* BamHI site added to F, HN gene for cloning

9) RT-PCR

RNA 추출, cDNA의 합성 및 PCR은 일반법에 따라 수행하였다.

10) cDNA cloning

Cloning vector로는 pSLIA vector를 사용하여 pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN를 구축하였다 (Fig. 1).

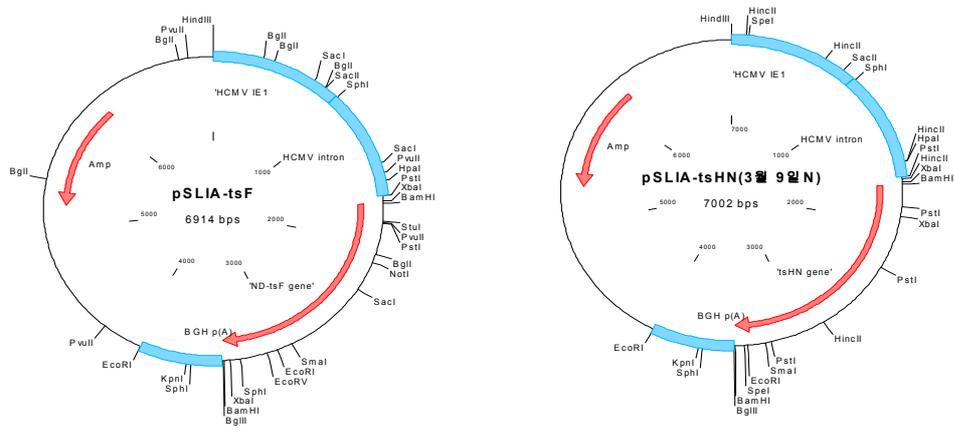


Fig 1. Schematic representation of plasmid pSLIA-tsF and pSLIA-tsHN.

11) 핵산염기 및 아미노산 서열 결정

Dye terminator cycle sequencing 방법으로 실시하였다. Clone Manager 6, version 6.00(Scientific & Educational Software)를 이용하여 핵염기 서열로부터 아미노산 서열을 결정하였으며, GenBank에서 얻어진 자료와 multialign에 의해 NDV CBP-1(250th)의 F와 HN gene의 염기서열을 다른 6개의 NDV strains들과 비교 분석하였다.

12) Transfection

Lipofectamine plus(GIBCO BRL)을 사용하여 COS-7 cell에 pSLIA-tsF, pSLIA-tsHN을 transfection하였다. 약술하면 tube에 plasmid DNA를 PLUS reagent(plasmid DNA 1 μ g, PLUS reagent 6 μ g and Opti-MEM 100 μ l)와 혼합하여 실온에서 15분 동안 반응시킨다. 다른 tube에 lipofectamine 4 μ l를 Opti-MEM 0.8ml에 희석시킨 다음, 이 두 tube를 혼합하고 실온에서 15분간 반응시킨다. 이 반응시간동안 세포가 들어있는 well에 Opti-MEM을 넣고 여기에 반응시킨 DNA-PLUS-lipofectamine complex를 한 방울씩 잘 섞이게 떨어뜨린 후 5% CO₂ incubator(37 $^{\circ}$ C)에서 3시간 반응시킨 다음, 10% FBS가 첨가된 새 MEM배지를 더 첨가하여 24시간 반응시키고 pSLIA-tsF, pSLIA-tsHN이 transfected 된 cell를 시험하

었다.

13) 발현 단백질 확인

1년 차에 작제한 monoclonal antibody를 이용하여 Indirect immunofluoresant antibody technique, SDS-PAGE, Western blot을 일반법에 따라 수행하여 발현단백질의 성상을 확인하였다.

14) pSLIA-tsF, pSLIA-tsHN의 마우스 접종시험

앞서 작제한 pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN을 *Escherichia coli*(DH5 α)에 transformation하고 대량 배양하여 plasmid mega kit(QIAGEN)로 plasmid를 추출하였다. 추출된 plasmid는 접종시의 안정성을 높이기 위하여 Triton X-114(Cotten et al. 1994)로 처리하여 lipopolysaccharide(LPS)를 제거하였고, UV spectrophotometer로 260nm에서 측정하여 정량하였다. 이렇게 준비된 plasmid는 pSLIA-F와 pSLIA-HN에 대하여 각각 2 group으로 나누어 개체 표시한 5마리의 C57B/6 mice (4~8 주령)의 왼쪽과 오른쪽 대퇴근에 50 μ g씩 접종하여 1마리당 100 μ g씩을 14일 간격으로 3차 근육 접종하였고, 같은 방법으로 1마리당 10 μ g씩을 14일 간격으로 꼬리부위에 3차 피내 접종하였으며 2마리는 무접종 대조군으로 사용하였다(Table 2). ELISA(Avian Newcastle Disease Virus Antibody ELISA kit, Jeno Biotech.)를 이용하여 면역원성을 측정하였다.

Table 2. Immunization strategy of mice against NDV DNA vaccines

Immunogen	Route	Dose at weeds (μ g)			
		0	1	3	5
Control					Sacrificed
pSLIA-tsF	IM(Quadriceps muscle)	100	100	100	Sacrificed
pSLIA-tsHN	IM(Quadriceps muscle)	100	100	100	Sacrificed
pSLIA-tsF	ID (Tail)	10	10	10	Sacrificed
pSLIA-tsHN	ID (Tail)	10	10	10	Sacrificed

*Mouse : C57BL/6

*IM : Intramuscularly, ID : Intradermally

15) In ovo 접종용 DNA vaccine 준비

앞서 작제한 pSLIA-tsF, pSLIA-tsHN을 *E. coli*(DH5 α)에 transformation 하여 대량 배양하고 plasmid mega kit(QIAGEN)로 plasmid를 대량으로 추출하고 Triton

X-114처리하여 lipopolysaccharide(LPS)를 제거하여 준비하였고, 대조군으로 NDV CBP-1주의 유전자가 삽입되지 않은 plasmid control pSLIA를 작제하였다.

16) In ovo vaccination 실험군 설정

DNA vaccine pSLIA-tsF(I), pSLIA-tsHN(II) 및 pSLIA-tsF+tsHN 접종군(III), pSLIA 접종군(IV) NDV CBP-1(250th)+IgY 접종군(V), Saline (VI) 및 무처치대조군(VII)으로 모두 7 군으로 설정하였으며, 각 군은 NDV B1 음수백신 투여에 따라 다시 각각 2군으로 세분하여 실험하였다. pSLIA-tsF, pSLIA-tsHN 및 pSLIA 는 앞서 작제하여 대량으로 준비한 것을 SPF 부화계란 1개당 100 μ g씩 접종하였고, pSLIA-tsF+tsHN 는 SPF 부화계란 1개당 pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN를 각각 100 μ g씩 혼합하여 접종하였으며, NDV CBP-1 (250th, 10^{5.0}EID₅₀)+IgY는 위에서 기술된 방법으로 작제하여 접종하였다. 접종 방법은 각 군별로 부화 18일령 SPF 부화계란 20개를 공시하였고, 22계이지 주사침(길이 1.5인치)을 사용하여 기실 부위에 구멍을 만들고 DNA를 주입하였으며 접종 후 부화계란을 부화기에 넣어 계속 부화시켰다 (Table 3).

Table 3. Grouping of in ovo vaccination with DNA vaccine and NDV CBP-1(250th) combined with IgY

Groups	Treatments	No. of embryonated	
		eggs	Doses
I	pSLIA-tsF	20	100 μ g/100 μ l
II	pSLIA-tsHN	20	100 μ g/100 μ l
III	pSLIA-tsF and tsHN	20	100 μ g+ 100 μ g/100 μ l
IV	pSLIA0	20	100 μ g/100 μ l
V	NDV CBP-1+ IgY*	20	100 μ l
VI	Saline	20	100 μ l
VII	Control	-	-

*NDV CBP-1(250th) virus at 10^{5.0}EID₅₀/0.1ml mixed with IgY(polyvalent, HI titer 512)

17) DNA vaccine의 안전성, 면역원성 및 효능시험

DNA vaccine과 NDV CBP-1(250th)+IgY 접종군과 대조군들은 부화 후 2주령 에서 부터 9주령까지 js 시험 기간 중 채혈하여 HI와 ELISA 시험을 수행하여 항체의 변동을 측정하였다. HI는 앞서 서술된 일반법에 따라서 실시하였고 ELISA는 Newcastle

Disease Virus Antibody 측정용 ELISA kit(Jeno Biotech., Korea)로 측정하였다. 또한 DNA vaccine과 NDV CBP-1(250th)+IgY 접종군에 대한 NDV B1음수백신의 booster효과를 측정하기 위해 부화후 3주령 병아리들을 다시 두 군으로 나누어서 한 군은 NDV B1음수백신을 사용법에 따라 투여하고, 다른 한 군은 B1백신을 투여하지 않았다. 부화후 7주 짜에 전 시험군에 대해 Wild type NDV CBP-1 virus(mesogenic strain)를 5.5×10^5 EID₅₀/0.2ml (HI titer;1024) 농도로 조정한 다음 0.2ml씩 구강접종하고 2주간 임상학적 관찰을 수행하였다.

1-2. 결 과

1) NDV CBP주의 약독화

부화계란에서 연속계대하여 약독화된 CBP-1주와 150대부터 저온배양 약독화 처리한 CBP-1LT 주의 병원성을 시험한 바 Table 3과 같은 결과를 얻었다.

부화계란에 150, 200 및 250대 계대 약독화한 CBP-1주의 MDT와 ICPI를 측정한 바 MDT는 84.8 89.2 및 92.3 그리고 ICPI는 1.59, 1.06 및 0.95로 MDT 및 ICPI 모두 parent stock에 비해 현저히 낮았다. 또한 150대부터 저온배양계대 약독화 하였을 때 10대와 30대에서 MDT는 88.5 및 89.2 그리고 ICPI는 1.12 및 0.98로 나타났다. 또한 1, 2 및 5주령 병아리에 대한 병원성 시험을 실시한 바 parent stock은 1 및 2주령에서 80%(4/5) 치사율을 보였고 5주령 병아리에서는 53.3%(8/15)의 치사율을 나타내었다. 150대 계대주는 임상례가 관찰되었으나 폐사례는 없었으며 200~245대 및 CBP-1LT 10대~30대에서는 특이한 임상례가 관찰되지 않았다. 따라서 parent주는 강독, 150대~200대 계대주는 중간독, 그리고 245대 계대주와 LT-30대는 약독주로 간주 되었으며, 본 시험에서는 주로 CBP-1 240대를 주로 공시하였다.

2) in ovo vaccination 기법 표준화

In ovo 접종기법을 표준화하기 위하여 주사바늘의 크기에 대한 시험을 수행하였다. $10^{-1} \sim 10^{-6}$ ELD₅₀/0.1ml의 NDV B-1주를 공시하여 needle gauge의 영향을 시험한바 25, 22 및 18 gauge 중 22 gauge를 사용하여 10^{-1} EID₅₀/0.1ml를 접종했을 때 부화율이 높게 나타났으며 18 gauge 사용시 가장 낮았으며 대조군에서도 유사한 경향이 나타났다. 또한 주사바늘의 길이에 따른 접종부위를 색소주입법으로 시험한 바 1.0 및 1.5 인치에서 amniotic sac에 68.0% 및 76.0%, Yolk sac 에 12.0% 및 16.0% 그리고 fetal body 에 20.0% 및 8.0% 주입되었다 (Table2). 22 gauge 1.5 인치 주사침을 이용하여 1.0, 3.0, 5.0 및 6.0 EID₅₀/0.1ml 역가(Log)의 NDV B1 virus 접종시 부화율은 80%, 20%, 40% 및 0% 이었다(Table 1).

Table 1. Effect of inoculum volume and needle gauge on hatchability of 18 day old-embryos inoculated with ND B1 virus

Needle gauge	Dose($\mu\ell$)	NDV B1 virus(log EID ₅₀ /0.1ml)			
		1.0	3.0	5.0	6.0
25	100	4/5(80)*	0/5(0)	1/5(20)	0/5(0)
	Control	4/5(80)	-	-	-
22	100	4/5(80)	1/5(20)	2/5(40)	0/5(0)
	Control	4/5(80)	-	-	-
18	100	2/5(40)	1/5(20)	0/5(0)	0/5(0)
	Control	3/5(60)	-	-	-

The control groups were inoculated with Hank's balance salt solution.

*No. hatched/No. inoculated(% hatchability)

Table 2. Deposition sites of inoculum by different depth of injection in 18 day old-embryos

Deposition site	1.0 inch*	1.5 inch
Amniotic sac	17(68.0)	19(76.0)
Yolk sac	3(12.0)	4(16.0)
Fetal body	5(20.0)	2(8.0)
Total	25(100)	25(100)

*22 gauge needle used.

Table 3. Changes of pathogenicity of Newcastle disease virus CBP-1 attenuated by chicken embryo passage at 37°C or 29°C

Treatment	Passage level	MDT	ICPI	Clinical signs in chicken(mortality) ⁺		
				1 ^{**}	2	5
Chicken embryo passage	parent (3rd)	50.6	1.94	5/5(4/5) ⁺⁺	5/5(4/5)	11/15(8/15)
	150th	84.8	1.59	3/5(0/5)	2/5(0/5)	0/15(0/15)
	200th	89.2	1.06	1/5(0/5)	1/5(0/5)	0/15(0/15)
	250th	92.3	0.95	0/5(0/5)	1/5(0/5)	0/15(0/15)
Low temperature (LT) [*]	10th	88.5	1.12	0/5(0/5)	1/5(0/5)	0/15(0/15)
	30th	89.2	0.98	0/5(0/5)	0/5(0/5)	0/15(0/15)

* Low temperature treatment from the embryo passage level at 150th

** Age of week old,

+ 1 and 2 weeks old ; SPF chickens. 5 weeks old; conventional chickens. Each group was given orally with a dose of 10^{6.0}EID₅₀/chicken

++ No. with clinical signs/No. injected (No. of death/No. injected)

MDT(mean death time for chicken embryo) and ICPI(intracerebral pathogenicity index in day-old chicken) were measured by standard methods.

3) 단클론성 항체생산

NDV CBP-1주로 면역시킨 마우스를 사용하여 5회의 세포융합을 실시하여 987개의 hybridoma를 획득하였다. 그중 NDV에 특이하게 반응하는 세포주는 13주이었다(Fig. 1). 이들 hybridoma가 생산하는 항체의 특성을 조사한 바, isotype은 IgG₁ 이 5개, IgG_{2a} 가 4개 및 IgM이 4개이었다(Table 4). 또한 Western blotting에서 54Kd에 반응하는 것이 5개, 57Kd, 48Kd 및 42Kd에 반응하는 것이 1개, 54Kd 및 48Kd에 반응하는 것이 1개이었고 나머지는 밴드가 나타나지 않았다. 혈구응집억제능을 가진 항체는 없었으며 18G9만이 중화항체능을 나타내었다. NDV B-1주 및 CBP-1주와 immune complex 형성 처리를 위해 5E14 클론을 선정하고 마우스 복강내 접종에 의해 대량생산하였다.

Table 4. Characterization of monoclonal antibodies against Newcastle disease virus

Mab	Isotypes	Antibody titers(ascites) by*			protein specificity
		IFA	HI	VN	
18A4	IgG2a	10 ⁶	<2	<2	54Kd
9B3	IgG1	10 ⁶	<2	<2	54Kd
10D4	IgG2a	10 ⁵	<2	<2	NR
11F17	IgG1	10 ⁵	<2	<2	54Kd
17F09	IgM	10 ⁴	<2	<2	54Kd
4A19	IgM	10 ⁵	<2	<2	NR
12E9	IgG1	10 ⁴	<2	<2	NR
13A32	IgG1	10 ⁵	<2	<2	NR
5E14	IgG1	10 ⁴	<2	<2	57,48& 42Kd
3F5	IgM	10 ⁵	<2	<2	NR
18G9	IgG2a	10 ⁶	<2	2 ¹³	NR
20H10	IgM	10 ⁵	<2	<2	54Kd
22E2	IgG2a	10 ⁶	<2	<2	54 & 48Kd

IFA : indirect fluorescence antibody assay, HI : hemagglutination inhibition test

VN : virus neutralization test

* NR : Not reacted

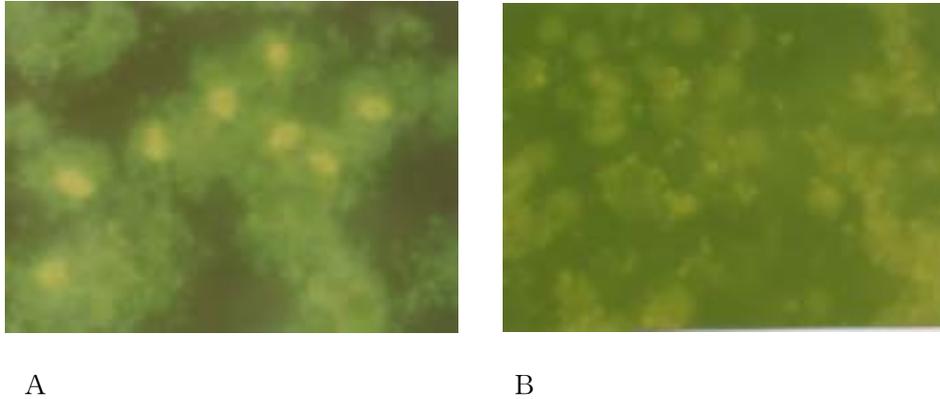


Figure 1. Immunofluorescent patterns of the CAM cells on coverslips were fixed with cold acetone and reacted with hybridoma supernatants.
A: positive reaction B: negative control

4) 화학제 및 항체처리에 따른 부화율과 면역원성

0.2% formalin(F) 또는 ethylmethane sulfate(EMS)를 각각 처리한 $10^{5.0}EID_{50}/0.1ml$ 역가의 B1 및 CBP-1(240th)주를 18일령 부화란에 접종한 바 formalin 처리군에서는 37.5~50.0% 그리고 ethyl-methane sulfate 처리군에서는 50.0%~75.0%의 부화율을 나타내었고 부화후 1주간 생존율은 75~100%이었다. HI역가는 $\leq 2\sim 8$ 로 나타났다 (Table 5). $2 \times 10^{5.0}EID_{50}/0.1ml$ 역가의 NDV B1주와 240대 계대된 CBP-1주를 동량의 polyvalent antisera와 단클론성항체와 각각 감작 처리한 다음 18일령 부화란에 접종하였던 바, 부화율은 polyvalent antiserum에서 75.0%~87.5%, 단클론성항체에서 33.5~62.5%로 나타났으며 부화후 1주간 생존율은 83.3(5/6)~66.6(2/3)%이었다. HI 항체가는 $\leq 2\sim 32$ 로 나타나서 화학제처리에서 보다 부화율과 HI항체가가 높게 나타났다 (Table 6). 또한 대조군으로 공시한 항체 처리하지 않은 $10^{1.0}EID_{50}/0.1ml$ 역가의 B-1 및 CBP-1주의 부화율은 80% 및 60%이었고, 부화 후 1주째 HI 항체가는 4~16 및 $\leq 2\sim 8$ 이었다.

5) 면역원성 및 효능 시험

본 시험 과정 중 in ovo vaccines을 접종하여 부화된 병아리는 모두 55수 이었으며 (Table 7), 격리된 사육상에서 1주 및 2주간 생존율을 조사하였던 바 1주에서는 66.6%~83.3%, 2주에는 33.3%~77.7%로써 대조군의 90%에 비해 현저히 낮았다. 부화 후 2주째 HI 역가를 조사한 바 B1+Igs와 CBP-1+Igs 군이 8~64 및 4~64로써 높게 나타났으며, B1 및 CBP-1(240th)은 4~16 및 8~32이었으며, B1-F와 B1-EMS군은

≤2~8 및 ≤2~16으로 낮았다 (Table 7).

위 시험성적을 토대로 하여 B1+Igs 와 CBP-1+Igs 항원을 선정하고 각각 30개의 부화란에 접종한 바 부화율은 76.7%(23 개) 및 73.3%(22개) 이었다 (Table 8). 그리고 부화 2주째 HI 역가를 측정한 바 B1+Igs군은 4~64, CBP-1+Igs군은 8~128 이었으며 대조군은 ≤2~16 이었다. 또한 부화 후 2주째 B1 생독 음수백신을 투여한 다음 1주 후 HI역가를 측정한 바 B1+Igs군은 16~128, CBP-1+Igs 군은 32~256 이었으며 대조군(8~64)에 비해 높았다 (Table 8).

Table 5. Effects of chemical treatment of NDV-B1 and CBP-1 on hatchability and immunogenicity to 18-day chick embryo

Treatment	Viruses*	Hatchability(%)	HI titer at 1 week after hatching (rate of survivals)
Formalin (0.2%)	B1	4/8 ⁺ (50.0)	≤2~4 (3/4) ⁺⁺
	CBP-1 ^{**}	3/8(37.5)	4~8 (3/3)
Ethymethane sulfate	B1	6/8(75.0)	≤2~4 (5/6)
	CBP-1	4/8(50.0)	≤2~4 (3/4)

** NDV CBP-1 at 240th passage level,

+ No. of eggs hatched / No. inoculated

++ Rates of chickens surviving for 1 week

Table 6. Effects of antibody treatment of NDV B1 and CBP-1 on hatchability and immunogenicity to 18-day chick embryo

Viruses*	Antisera treatment**	Inoculum	Hatchability(%)	HI titer at 1 week after hatching(rate of survivals)
B1	Poly	0.1ml	6/8 ⁺ (75.0)	4 ~ 32 (5/6) ⁺⁺
	Mab	0.1ml	3/8(37.5)	8 ~ 16 (2/3)
	Non-treated	0.1ml	1/5(20.0)	-
CBP-1 (240th)	Poly	0.1ml	7/8(87.5)	≤2 ~ 32 (5/7)
	Mab	0.1ml	5/8(62.5)	4 ~ 32 (4/5)
	Non-treated	0.1ml	2/7(28.6)	≤2 ~ 8 (3/3)

* $2 \times 10^{5.0} \text{EID}_{50}/0.1 \text{ml}$ for antisera treatment and $10^{1.0} \text{EID}_{50}/0.1 \text{ml}$ for non-treated control were used.

** polyvalent antisera at HI titer of 512 and monoclonal antibody at IFA titer of 10^3 were mixed with the viruses by equal volume.

+ No. of eggs hatched / No. inoculated

++ Rates of chickens surviving for 1 week

Table 7. Safety and immunogenicity of various vaccines on the chickens immunized by in ovo vaccination

In ovo vaccines	No. of hatched eggs	No. of surviving chicken at 1 week p.h.(%)	No. of surviving chicken at 2 week p.h.(%)	HI titers at 2 week p.h.
B1*	14	9 (64.3)	8 (57.1)	4 ~ 16
CBP-1*	3	2 (66.6)	1 (33.3)	8 ~ 32
B1+Igs	9	7 (77.8)	7 (77.7)	8 ~ 64
CBP-1+Igs	12	10 (83.3)	9 (75.0)	4 ~ 64
B1-F	4	3 (75.0)	3 (75.0)	≤2 ~ 8
B1-EMS	6	5 (83.3)	4 (66.6)	≤2 ~ 16
CBP-1-F	3	2 (66.6)	2 (66.6)	NT
CBP-1-EMS	4	3 (75.0)	2 (50.0)	NT
Total	55	41 (74.5)	36 (65.5)	-
Control	10	9 (90.0)	9 (90.0)	≤2 ~ 4

* $10^{1.0}EID_{50}/0.1ml$

+ Igs : polyvalent antiserum treated

CBP-1 at the 240th passage levels. p.h. = post hatching

Table 8. Effects of the polyvalent antiserum-treated vaccines on hatchability and antibody responses of the hatched chickens

In ovo vaccination	No. of embryonated eggs injected	No. of eggs hatched (%)	HI titers at 2 week p.h.	NDV B1 vaccination* at 2 week p.h.	HI titers at 2 week p.h.
B1+Igs	30	23 (76.7)	4 ~ 64	17	16 ~ 128
CBP-1+Igs	30	22 (73.3)	8 ~ 128	18	32 ~ 256
Control	30	28 (93.3)	≤2 ~ 16	20	8 ~ 64

*Vaccinated by drinking water.

p.h. = post hatching

6) 각종 항원의 부화율, 면역원성 및 항원의 안정성

1년차에서 공시한 0.2% formalin(F) 또는 ethylmethane sulfate(EMS)를 각각 처리한 $10^{5.0}$ EID₅₀/0.1ml 역가의 B1 및 CBP-1(240th)주를 4°C에서 10 개월간 저장 후 18일령 부화란에 동일한 요령으로 접종한 바 formalin 처리군에서는 39.7~48.9% 그리고 ethyl-methane sulfate 처리군에서는 48.2%~68.4%의 부화율을 나타내었고 부화후 1주간 생존율은 50~75%로 다소 낮았다.

CBP-1 (245대, $10^{5.0}$ EID₅₀/0.1ml)와 B1주 ($10^{6.0}$ EID₅₀/0.1ml)를 바이러스 단독 또는 동량의 polyvalent antisera(IgY)와 각각 감작 처리한 다음 18일령 부화계란에 접종하여 부화율을 측정하고 부화된 병아리에 대해 생후 5주간 HI 및 ELISA 항체가를 측정하였던 바 Table 9와 같이 CBP-1주 접종시 부화율이 현저히 떨어져 안전성이 낮았으나 항체반응은 높게 나타났다. 또한 다른 항원에 비해 IgY 항체처리한 CBP-1+IgY와 B1+IgY complex 항원에서 각각 부화율이 높았으며, 부화된 병아리에서 유의하게 높은 항체가가 관찰되었다. 부화된 병아리에 대한 cell proliferation assay에 의한 세포매개 반응 시험은 현재 진행 중에 있다.

7) RT-PCR에 의한 F와 HN gene의 증폭

NDV CBP-1(250th)주와 NDV라소타-IB백신(대성)주에서 추출한 cDNA로 F sense primer, F antisense primer와 HN sense primer, HN antisense primer를 각각 이용하여 RT-PCR을 수행한 바, Fig. 2와 같이 NDV라소타-IB백신에서 증폭된 1,710bp의 F gene에 대한 band가 관찰되었고, NDV CBP-1(250th)주에서 증폭된 1,710bp의 F gene과 1,795bp의 HN gene에 대한 band가 각각 관찰되었다 (Fig. 2). 또한 NDV CBP-1(250th)주의 F와 HN gene에 대한 제한효소 cleavage patterns과 pSLIA에 올바르게 cloning된 것을 확인하기 위해 앞서 작제하여 추출한 pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN plasmid를 여러 제한 효소로 처리한 결과, pSLIA-tsF plasmid는 *Bam*HI에서 5213bp, 1701bp가, *Eco*RI에서는 6003bp, 911bp, 그리고 *Pst*I에서는 6714b, 200bp에서 band가 관찰되었다(Fig. 3). pSLIA-tsHN plasmid는 *Eco*RV에서는 절단부위가 관찰되지 않았고, *Eco*RI에서는 6376bp, 636bp, *Pst*I에는 5394bp, 923bp, 466bp, 219bp, 그리고 *Bam*HI에서는 5213bp, 1789bp에서 band가 확인되었다(Fig. 4).

Table 9. Safety and immunogenicity of various NDV antigens on the chickens immunized by in ovo vaccination

Antigens	Hatchability(%)	Antibody responses of chickens	
		HI(log2)	ELISA(OD)
		1 ~ 5 wks old	1 ~ 5 wks old
CBP-1(250th)*	3/30 (10)	4 ~ 32	0.3 ~ 1.4
B1 *	2/30 (8)	2 ~ 16	0.3 ~ 0.8
CBP-1 ⁺ + IgY	21/30 (70)	8 ~ 32	0.2 ~ 0.9
B1 ⁺ + IgY	21/30 (70)	4 ~ 32	0.2 ~ 0.7
IgY	24/30 (80)	2.4 ~ 3.8	0.1 ~ 0.3
Control(saline)	30/30 (100)	≤2 ~ 3.2	0.1 ~ 0.2
Control	27/30 (90)	≤2 ~ 3.1	0.1 ~ 0.25

IgY = polyvalent IgY: HI titer ; 2⁹ (512)

* ; CBP-1(250th) and B1 = 10^{3.0} EID₅₀/0.1ml

+ ; CBP-1(250th) and B1 = 10^{5.0} EID₅₀/0.1ml

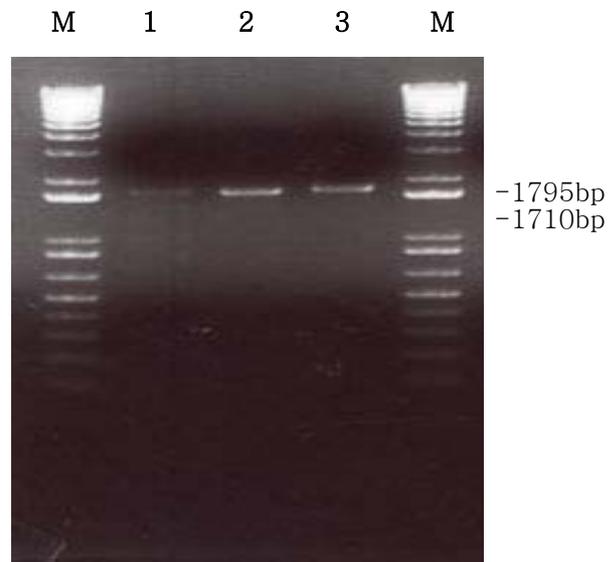


Fig. 2 Amplification patterns of NDV F gene and HN gene by RT-PCR using F sense/antisense primers and HN sense/antisense primers (lane M : 1 kb DNA ladder marker, lane 1 : NDV LaSota-IB vaccine, lane 2-3 : CBP-1).

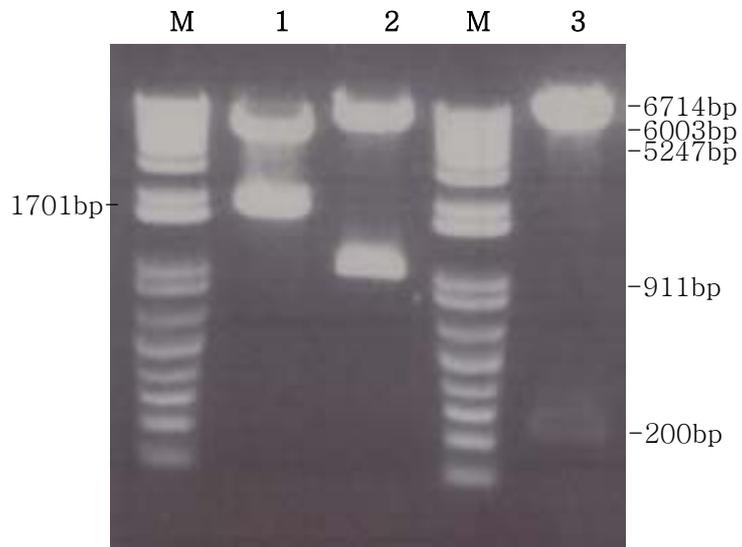


Fig. 3 Cleavage patterns of NDV CBP-1(250th) F gene inserted into pSLIA, DNA vaccine vector by various restriction endonucleases. (lane M : 1 kb DNA ladder marker, lane 1 : *Bam*HI, lane 2 : *Eco*RI, lane 3 : *Pst*I)

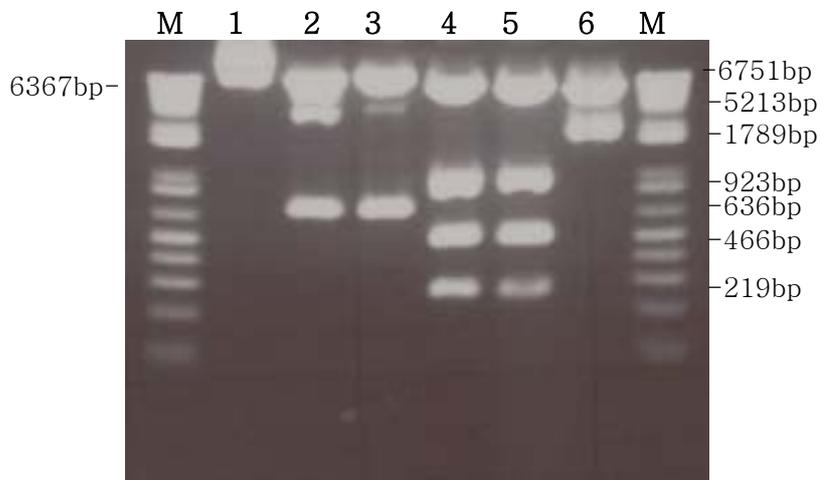


Fig. 4 Cleavage patterns of NDV CBP-1(250th) HN gene inserted into pSLIA, DNA vaccine vector by various restriction endonucleases.(lane M : 1 kb DNA ladder marker, lane 1 : *Eco*RV, lane 2, 3 : *Eco*RI, lane 4,5 : *Pst*I, lane 6 : *Bam*HI)

8) NDV CBP-1(250th)주의 F gene과 HN gene의 염기서열 비교

Dye terminator cycle sequencing법에 의해서 NDV CBP-1(250th)주 F gene의 1710bp의 염기서열과 HN gene의 1795bp의 염기서열을 결정하였다(Fig 3 & 4). 이 결과를 CBP-1주, B1주, Lasota주, Texas G.B.주, Beaudette C주, Ulster주와 비교하였던 바, NDV CBP-1(250th)주의 F gene은 CBP-1주와는 96%, B1주와는 98%, Lasota주와는 99%, Texas G.B.주와 Beaudette C주와는 97%의 상동성을 나타내었고 Ulster주와는 90%의 비교적 낮은 상동성을 나타내었다. HN gene은 CBP-1주와는 89%, B1주와는 90%, Lasota주와 Texas G.B.주와는 89%, Beaudette C주와는 90%, Ulster주와는 94%의 전체적으로 비교적 낮은 상동성을 나타내었다(Table 10 & 11).

NDV CBP-1	1	1	1	1	1	1	1
61	a		g	c			
131		g		a		a	
201			a	c			
271							
341	a		a	aaa	t		
411		t					
481					c		
551		a					
621	c	g	g		t		
691				c			
761	g		g				
831		c		g			
901							
971							
1041	t		c	g		a	

```

1114 tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt
1111-----a-----c-----g-----
1181 aattttttttt aaatttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt
1181-----c-----t-----
1251 tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt
1251-----g-----
1321 aattttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt
1321-a-----c-----
1391 atttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt
1391-----
1461 tttttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt
1461-----c-----c-----
1531 atttttttttt atttttttttt tttttttttttt atttttttttt tttttttttttt atttttttttt atttttttttt
1531-----a-----g-----
1601 atttttttttt atttttttttt aattttttttt aattttttttt atttttttttt aattttttttt atttttttttt
1601-----c-----
1671 atttttttttt atttttttttt tttttttttttt atttttttttt
1671-----atccc-----

```

Fig 3. Nucleotide sequence of the gene encoding F protein of NDV CBP-1(250th) strain compared with those of various NDV strains. A dash indicates an identical residue.

```

na M17F      1 ggatccaacc tccgttgtac cgtttcaccg acaacagttc tcagtchccgggcagt
CBP-1
 61 tttttttttttt tttttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt
 61-----t-----a-----
131 atttttttttt aaatttttttt atttttttttt atttttttttt tttttttttttt atttttttttt atttttttttt
131-t-----t-gaa-----t-ca-----t-----t-----c-----g-----t-----
201 aattttttttt tttttttttttt atttttttttt atttttttttt aattttttttt aattttttttt atttttttttt
201-----c-----ca g-----t-----g-----a-----t-----
271 tttttttttttt atttttttttt atttttttttt tttttttttttt aattttttttt atttttttttt atttttttttt
271-----g-----a-----a-----t-g-----gt-----t-----
341 aattttttttt atttttttttt aattttttttt tttttttttttt atttttttttt tttttttttttt atttttttttt
341-t-ga-c-----a-----g-t-a-----a-t-g-ac-a-----
411 aattttttttt aattttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt aattttttttt atttttttttt
411-g-g-g-----t-c-----t-c-g-----g-----c-----c-----t-----
481 tttttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt aattttttttt atttttttttt atttttttttt
481-t-t-----t-----a-t-----t-----t-----a-----a-----
551 aattttttttt atttttttttt aattttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt atttttttttt
551-----t-----t-----t-----t-----c-t-c-----t-----a-----
621 tttttttttttt atttttttttt atttttttttt tttttttttttt tttttttttttt atttttttttt atttttttttt
621-g-----a-----a-----c-g-----t-----c-----a-----
691 aattttttttt atttttttttt atttttttttt tttttttttttt atttttttttt aattttttttt atttttttttt
691-----a-----t-----g-----

```

```

761  aatcttacccttca  caaacacacatt  aacttttctactt  atctctctactct  ctcaaaccttcaa  caaacacaccaa  caaacacacattt
761 -----a-----a-----g-----g-----a-g-----
831  atctctctctcaa  ttctctctctcaa  ttctctctctcaa  atctctctctctt  aacttttctcaa  caaacacaccaa  caaacacaccaa
831 -----g-----t-----ct-----c-----g-----a-----
891  aacttctctctca  caaacacacatt  ttctctctctcaa  aacttctctctca  ttctctctctcaa  caaacacaccaa  aacttctctctt
891 -----t-----tg-----c-----t-----t-----a-----
971  caaacacaccaa  ttctctctctcaa  aacttttctcaa  caaacacaccaa  caaacacaccaa  caaacacaccaa  caaacacaccaa
971 --gg-----t-----c-----a-----g-----a-----t-----t-----
1041  caaacacacatt  caaacacaccaa  caaacacaccaa  caaacacaccaa  caaacacaccaa  caaacacaccaa  ttctctctctcaa
1041a -----c-----c-----c-----c-----c-----c-----
1111  caaacacacatt  ttctctctctcaa  caaacacaccaa  caaacacaccaa  caaacacaccaa  caaacacaccaa  ttctctctctcaa
1111 -----g-----ca-----t-----a-----t-----g-----
1181  ttctctctctcaa  caaacacaccaa  caaacacaccaa  aacttctctctca  caaacacacatt  caaacacaccaa  caaacacaccaa
1181 -----t-----a-a-----a-----c-----
1251  caaacacacatt  caaacacaccaa  caaacacacattt  ttctctctctcaa  caaacacaccaa  caaacacacatt  ttctctctctcaa
1251 -----a-----t-g-----t-c-gt-----
1321  aacttctctctca  atctctctctcaa  caaacacaccaa  caaacacacattt  caaacacacatt  atctctctctcaa  ttctctctctcaa
1321 -----c-----a-----c-----c-----
1391  caaacacaccaa  aacttctctctca  caaacacacatt  caaacacaccaa  caaacacacatt  ttctctctctcaa  aacttctctctca
1391 --g-----a-----c-----g-----t-----a-----
1461  atctctctctcaa  aacttctctctca  ttctctctctcaa  caaacacacatt  caaacacacatt  caaacacacatt  ttctctctctcaa
1461 -----c-aa-----a-----ag-g-----
1531  caaacacaccaa  aacttctctctca  ttctctctctcaa  atctctctctcaa  atctctctctcaa  aacttctctctca  caaacacacatt
1531 -----t-----t-----g-----c-----c-----a-----
1601  ttctctctctcaa  caaacacaccaa  atctctctctcaa  ttctctctctctt  ttctctctctctt  caaacacacatt  caaacacacatt
1601 -----a-----t-----t-----c-----c-----g-----
1671  aacttctctctca  caaacacaccaa  ttctctctctcaa  ttctctctctctt  atctctctctcaa  aacttctctctca  ttctctctctcaa
1671 -----t-----t-----t-----a-----g-----g-----t-----
1741  ttctctctctcaa  caaacacacatt  caaacacaccaa  aacttctctctca  ttctctctctcaa  gatcc
1741c --aa-----cc-----t-----

```

Fig 4. Nucleotide sequence of the gene encoding HN protein of NDV CBP-1(250th) strain compared with those of various NDV strains. A dash indicates an identical residue.

9) NDV CBP-1(250th)주의 F gene과 HN gene의 아미노산 서열 비교

NDV CBP-1(250th)주의 F 및 HN gene 염기서열 분석에서 얻어진 결과를 기초로 하여 F 및 HN protein에 대한 아미노산서열을 각각 추정하였던 바 Fig 5, 6과 같이 아미노산을 결정하였다. 이 결과를 CBP-1주, B1주, Lasota주, Texas G.B.주, Beaudette C주, Ulster주와 비교하였던 바, NDV CBP-1(250th)주의 F protein은 LaSota주, B1주와 약 99%의 높은 상동성을 나타내었고 Ulster주와 92.5%로 가장 낮은 상동성을 나타내었다. HN protein은 Ulster주와 96.0%의 가장 높은 상동성을, CBP-1주와는 91.3%로 가장 낮은 상동성을 나타내었으며, 전체적으로 비교적 낮은 상동성을 나타내었다(Table 10 & 11).

NYU CRP-1 (250th) 1 MESSKSTYMPADMMI TTUAI VI SOTYDAMSTYORRI AANCTUUTYKAV
 CRP-1 P V P
 Ri P P P
 Laota
 Tavoo C R D T V
 Raavlatte C P V V
 Ulster S . RI . V . L . . V A . . VR . TS . L

51 NYVYSSOTEST TUKI I PAI PAKIRAKAPI HAVNIRI TTI I TRI CHESTRITORSUTTSOC
 V

. I M E

111 (P)ROORI TICAT TOSUAI CUATAAOTTAAAI TOAKOMAANTI RI KEST AATMRAUMRUTTI
 D K P

D K P
 D K P

. . T Q S

171 (E) SOI AVAUKMOORUNTOENKTACET INYKT ACCUQUEI NI VI TRI ITTUOROTTSDAI
 C D

CC D
 C D

. T

231 NYI TTUAI VNI ACCUMYVI I TRI CUCMNOI SSI TOSCI ITTUMPTI VIKOTYI I CTOUTI P

T

. . Q S

291 SUCMI MMIRATVI RTI SUSTTIRASAI VIKUUTOUSSUTIRI NYSVYTRTI NI VOTRI
 M

. K R G

351 VTRAMSDI VSTI SINTSARVMSKTRAI ITTUMPTI KOSUT ANVUMPTYRUMPRAI TSD
 M

. L AD

411 NYORAKI THYORVNI SI COTTI RI SORRUTVONIT STORNYIT TOSI NI STER OMV
 n A

n A
 n A

. R D A V R

```

471 NMSTSNAT NKT ERSNRKT NKUMUKI TSTYSAT ITVTUI TTMSI URSTI SII TI ACVI MVKOK
      S      N      T      A      V
      T
      T
      S      T      V
      S      T      U
.....D.....S.....RHI.....VI...C...V.....
531 AADKTI IWI GNNTI NDRATTIM=TON
      =
      =
      =
      =
.....

```

Fig 5. A comparison of the deduced amino acid sequences of F protein of various strains of NDV. A dash indicates an identical residue.

```

NDV (FRP-1(250th) 1MURAVSQUAI ENHGRRAKNTWRI VERTATTI STUUTTI ATSAAT AVSMRA
FRP-1      h      K      T      I      M      T      U      S      V      G
Rt        h      T      ET      U      S      I      G
Lasota    h      T      ET      U      S      I      G
Tavao G B h      T      I      T      U      S      V      G
Reanforte C h      T      I      T      U      S      V      G
Ulster    .D.....L.....
51 STPSNI VCTPTAT SGARRITTSAT DSMOHUNRT VIGUAI ESPI AI I NTRETTMNAITSI
      D      T      T
      D      T      T
      D      T      T
      D      T      T
.....I.....H.....
111 SVDTSCAA SSSCYCAPT HNDVVT GGT GGRF IUTINA STUTSVVPSARDGMI NRT PAPTTC
      M      NM      W      P      V      P
      M      NM      W      P      P
      M      NM      W      P      P
      M      NM      W      P      P      W
      M      NM      W      P      P
.....N...N.....F.....
171 GRTT ESRHMSATHVWYHMANUTI SGRDHSKI HOVI AI GUT RPSATHGRURRRTI RSTNI h
      RV      S      P      T      T      S
      RV      SV
      RV      SV
      T      RV      T      S      SV      T      T
      CY.....S.....H.....
231 ITONRKSRSUSATPI RPTMI RSCUTETERRHVMASAT RPSMUGRI RPTGQVLRKNI IUTT
      A      V      I      A
      U      D
      U      D
      V      I
      V      I      A
.....K.....V.....
291 I RKTWUANVPSUCSSSPT ENRUMRPVVEI KRNPSRPTAQRGKVVUT VIKAVNITYRHRQIV
..E.....G...S..E.....V..E.....

```


Table 11. Comparison of nucleotide and amino acid sequence homology of HN protein of NDV CBP strain with six strains of Newcastle disease virus

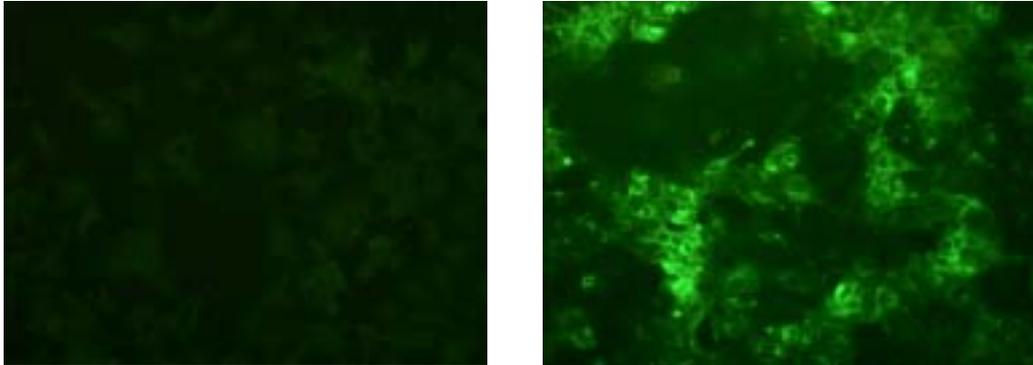
Strains	Homology	
	Nucleotide sequence	Amino acid sequence
CBP-1	89% (1576/1761)	91.3% (531/581)
B1	90% (1588/1761)	93.1% (541/581)
LaSota	89% (1581/1761)	93.5% (543/581)
Texas G.B.	89% (1583/1761)	92.2% (536/581)
Beaudette C	90% (1585/1761)	92.8% (539/581)
Ulster	94% (1664/1761)	96.0% (558/581)

10) pSLIA-F와 pSLIA-HN의 transfection

작성된 pSLIA-F와 pSLIA-HN을 COS-7 cell에 각각 transfection하여 각각의 monoclonal antibody를 사용하여 immunofluorescence assay한 결과, NDV CBP-1(250th) CBP-1(250th) F protein과 HN protein의 발현을 확인 할 수 있었다 (Fig. 7 & 8) 또한, SDS-PAGE와 Western blot를 수행한 결과, 55Kda의 F protein 과 74Kda의 HN protein을 확인 할 수 있었다(Fig. 9 & 10).

11) pSLIA-F와 pSLIA-HN의 마우스접종 실험

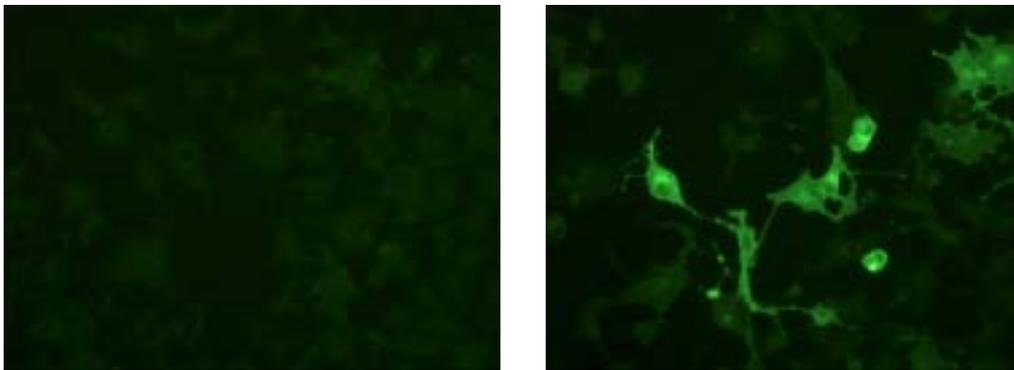
Table 2에서 제시된 각 group별 ELISA 항체가의 변동은 Fig. 9 와 같다. 모든 실험군에서 음성 대조군보다 유의하게 높은 항체가를 나타냄을 알 수 있었다. 근육접종군과 피내접종군 모두에서 pSLIA-tsF를 접종한 군이 pSLIA-tsHN을 접종한 군보다 더 높은 항체가를 나타내었으며, 근육 접종이 피내접종보다 더 높은 항체가를 나타냄을 알 수 있었다(Fig 11).



A.

B.

Fig. 7 Detection of recombinant protein in pSLIA-F transfected cells by immunofluorescent assay with anti-F monoclonal antibody. A : cell control, B : pSLIA-F transfected COS-7 cells.



A.

B.

Fig. 8 Detection of recombinant protein in pSLIA-HN transfected cells by immunofluorescent assay with anti-F monoclonal antibody. A : cell control, B : pSLIA-HN transfected COS-7 cells.

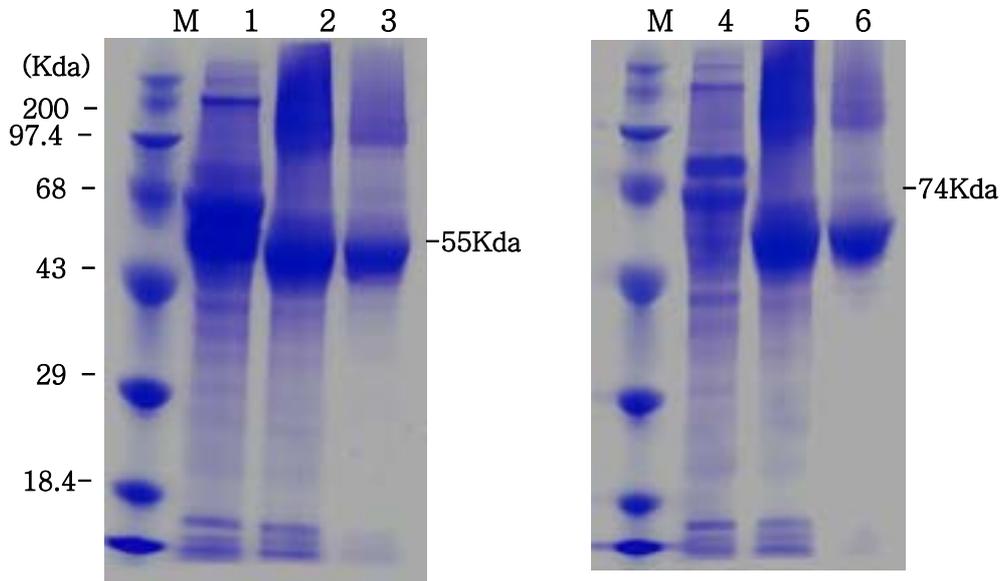


Fig. 9 SDS-PAGE patterns of NDV CBP-1(250th) F and HN protein in COS-7 cell transfected with pSLIA-tsF and pSLIA-tsHN. (lane M : pre-stain protein marker, lane 1: pSLIA-tsF, lane2,3: control, lane 4: pSLIA-tsHN, lane 5,6: control)

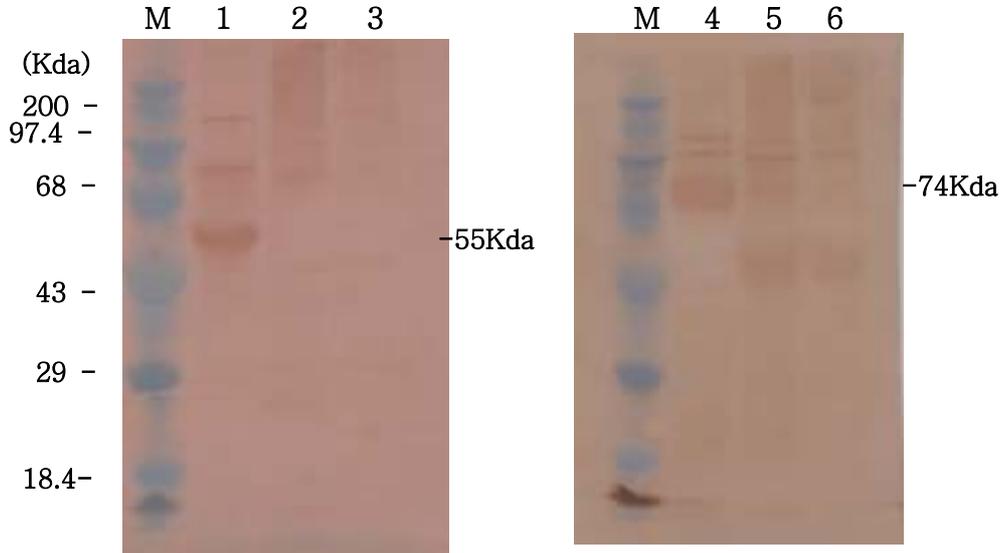


Fig. 10 Western blot analysis of NDV CBP-1(250th) F and HN protein in COS-7 cell transfected with pSLIA-tsF and pSLIA-tsHN. (lane M : pre-stain protein marker, lane 1: pSLIA-tsF, lane2,3: control, lane 4: pSLIA-tsHN, lane 5,6: control)

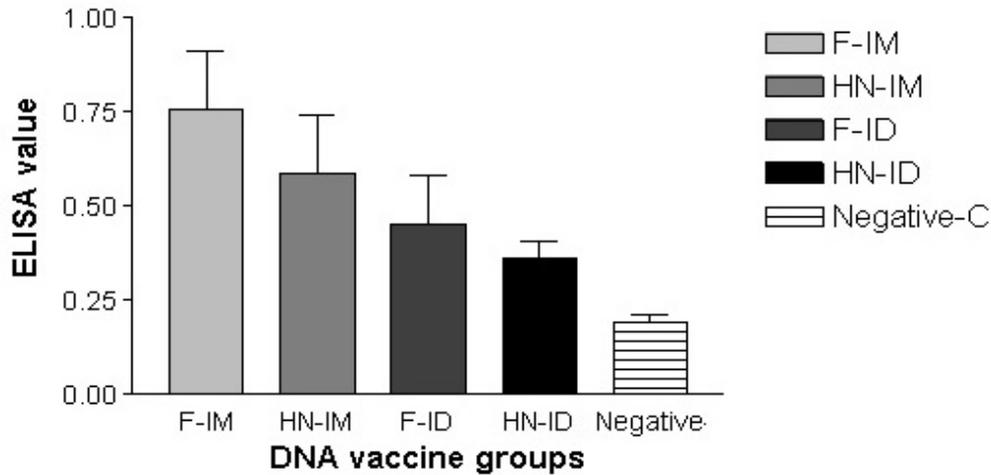


Fig 11. Comparisons of ELISA values in the mice given with the plasmids expressing F or HN of NDV by intramuscular(IM) and intradermal(ID) routes.

12) DNA vaccine과 attenuated NDV CBP-1(250th)+IgY vaccine의 부화율, 안정성 및 면역원성 시험

DNA vaccine pSLIA-tsF, pSLIA-tsHN 및 pSLIA-F+HN, pSLIA과 attenuated NDV CBP-1(250th)+IgY vaccine을 in ovo 접종한 결과, pSLIA-tsF, pSLIA-tsHN 및 pSLIA-F+HN, pSLIA 접종군은 80~100%의 부화율을 나타내었으며, attenuated NDV CBP-1(250th)+IgY vaccine 접종군은 70%의 부화율을 보였다(Table 12). 대조군은 모두 80%의 부화율을 보였다. 특히 DNA vaccine을 접종한 군에서 80~100%의 높은 부화율을 나타내어 DNA vaccine의 안전성이 높음을 알 수 있었다. 7개 군의 병아리를 부화 후 3주째 다시 두 군으로 나누어 총 14개 군으로 설정하고 NDV B1 생독 음수백신을 투여하여 booster 백신의 효과를 시험하였다. 또한 booster백신 투여 4주 후 14 개군 모두에 wild type NDV CBP-1 virus로 공격하였다. 그 결과 DNA vaccine 접종후 booster 백신을 투여한 I-2, II-2 및 III-2군은 모두 100%의 생존률을 나타내었으며, booster 백신을 하지 않은 I-1, II-1 및 III-1군은 25-30%의 생존률을 나타내었다. pSLIA+tsF와 pSLIA+tsHN를 공동 접종한 III-1군은 30%의 생존률을 나타내어 다른 DNA vaccine 접종군 보다 비교적 높은 생존률을 보였다. 그리고 attenuated NDV CBP-1(250th)+IgY를 투여한 후 booster 백신한 V-2군은 100%, booster 접종하지 않은 V-1군은 63%의 생존률을 나타내었다. plasmid 대조군(IV-1,

IV-2)과 비접종 대조군(VI-1, VI-2, VII-1, VII-2)에서 ND B1 vaccine 접종군의 생존율은 75-80%이고 ND B1 vaccine 비접종군은 생존율 0% 이었다(Table 12).

이 시험 결과 DNA vaccine과 attenuated NDV CBP-1(250th)+IgY vaccine 접종군의 in ovo 접종은 ND B1 vaccine의 booster 효과를 높여 주었으며, ND B1 음수백신을 접종하지 않은 경우는 pSLIA+tsF와 pSLIA+tsHN를 공동 접종한 III-1군에서 면역원성과 방어능이 높았다.

13) 실험용백신의 in ovo vaccination에 대한 면역원성

(가) HI 역가

① NDV B1백신 비접종군

pSLIA-tsF, pSLIA-tsHN 및 pSLIA-F+HN vaccine과 NDV CBP-1(250th)+IgY vaccine을 18일령 부화란에 in ovo vaccination하고 ND B1 vaccine을 접종하지 않은 I-1, II-1, III-1 및 V-1군에 대해 부화 후 7주째에 wild type NDV CBP-1 virus로 challenge한 병아리의 2주령에서 9주령까지의 HI 역가 변동을 측정한다(Table 13), 부화 후 6주에 I-1군 (pSLIA-tsF)과 대조군 IV-1(pSLIA0), VI-1(Saline), VII-1(Control)군은 평균 2.0~2.8의 HI 역가를 보였고, II-1, III-1 및 V-1군은 평균 24.0~24.6의 HI역가를 보였으며, pSLIA-tsHN 및 pSLIA-F+HN vaccine과 NDV CBP-1(250th)+IgY vaccine을 접종한 군이 pSLIA-tsF vaccine 접종군 및 대조군에 비해 높은 HI역가를 나타내었다. II-1, III-1 및 V-1군의 HI 역가의 주별 변동을 보면 부화 후 2주와 6주에서 높게 나타났다 (Fig. 12, 13). 또한 부화 7주째 challenge한 후 생존한 병아리의 HI 역가를 8주령과 9주령에 측정한다 I-1, II-1, III-1 및 V-1에서 512~> 1024로 매우 높게 나타났으며 (Table 13). 대조군 IV-1(pSLIA0), VI-1(Saline), VII-1(Control)군에는 생존 병아리가 없었다.

Table 12. Effects of in ovo vaccination of DNA vaccines and attenuated NDV CBP-1 combined with IgY on immunogenicity for NDV

Group	Treatments*	Hatchability (%)	Booster vaccine**	Challenge ***	No. of surviving chicken after challenge(%)
I -1	pSLIA-tsF	16/20(80)	No (8) ⁺	Yes	2/8 (25)
I -2	pSLIA-tsF		NDV B1 (8)	Yes	8/8 (100)
II -1	pSLIA-tsHN	18/20(90)	No (8)	Yes	2/8 (25)
II -2	pSLIA-tsHN		NDV B1 (10)	Yes	10/10 (100)
III-1	pSLIA-tsF+ tsHN	20/20(100)	No (10)	Yes	3/10 (30)
III-2	pSLIA-tsF+ tsHN		NDV B1 (10)	Yes	10/10 (100)
IV-1	pSLIA0	18/20(90)	No (8)	Yes	0/8 (0)
IV-2	pSLIA0		NDV B1 (10)	Yes	7/10 (70)
V-1	NDV CBP-1+ IgY	14/20(70)	No (8)	Yes	5/8 (63)
V-2	NDV CBP-1+ IgY		NDV B1 (6)	Yes	6/6 (100)
VI-1	Saline	16/20(80)	No (8)	Yes	0/8 (0)
VI-2	Saline		NDV B1 (8)	Yes	6/8 (75)
VII-1	Control	18/20(80)	No (8)	Yes	0/8 (0)
VII-2	Control		NDV B1 (10)	Yes	8/10 (80)

* : In ovo vaccination at embryonation day 18.

** : NDV B1 drinking vaccine administered at 3 week of age.

*** : Peroral challenge with wild type NDV CBP-1 virus (5.5×10^5 EID₅₀/0.2ml) at 4 week after booster vaccination (at 7 weeks of age).

+ : No. of booster vaccinated chickens.

Table 13. Effects of in ovo vaccination of DNA vaccines and attenuated NDV CBP-1 combined with IgY on the HI activity

Group	Treatment	HI titers by week post-hatching (average)							
		2	3	4	5	6	7*	8	9
I-1	pSLIA-tsF	2~4 (3.3)	2~8 (3.5)	2~4 (3.0)	2 (2.0)	2~4 (2.8)	2~4 (3.5)	1024	> 1024
II-1	pSLIA-tsHN	16~32 (21.3)	8~16 (9.8)	8~16 (14.0)	8~16 (14.0)	16~32 (24.0)	8~16 (12.0)	1024	512
III-1	pSLIA- tsF+ tsHN	16~32 (19.2)	8~16 (10.4)	8~16 (11.2)	8~16 (16.0)	8~32 (24.6)	8~16 (16.0)	> 1024	973
IV-1	pSLIA0	2~8 (4.9)	2~8 (3.8)	2~4 (3.0)	2~4 (2.5)	2~4 (2.5)	2 (2.0)	NT	NT
V-1	NDV CBP-1 + IgY	8~16 (14.0)	8~16 (14.0)	16~32 (19.2)	8~16 (21.0)	8~32 (24.0)	8~16 (16.0)	> 1024	512
VI-1	Saline	2~4 (3.0)	2~4 (3.3)	2 (2.0)	2 (2.0)	2 (2.0)	2 (2.0)	NT	NT
VII-1	Control	2~8 (4.0)	2~8 (2.4)	2~4 (3.0)	2 (2.0)	2 (2.0)	2~4 (2.5)	NT	NT

* : Peroral challenge with wild type NDV CBP-1 virus (5.5×10^5 EID₅₀/0.2ml) at 4 week after booster vaccination (at 7 weeks of age).

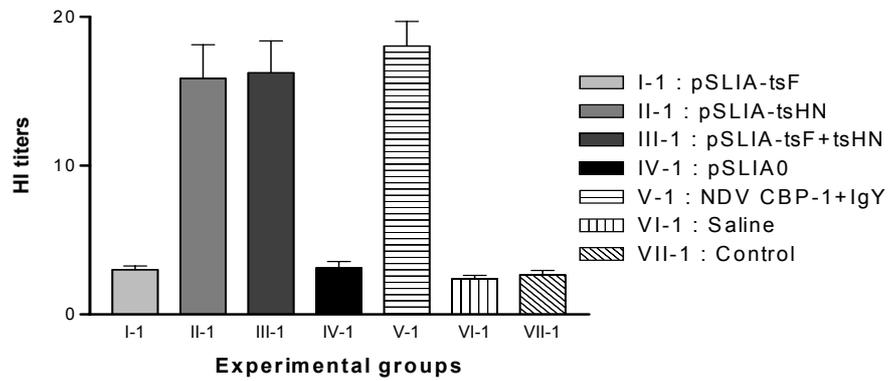


Fig 12. Comparisons of HI titers (Mean \pm SE of 2 to 7 weeks) in the chickens administered in ovo with DNA vaccines and attenuated NDV CBP-1 combined with IgY.

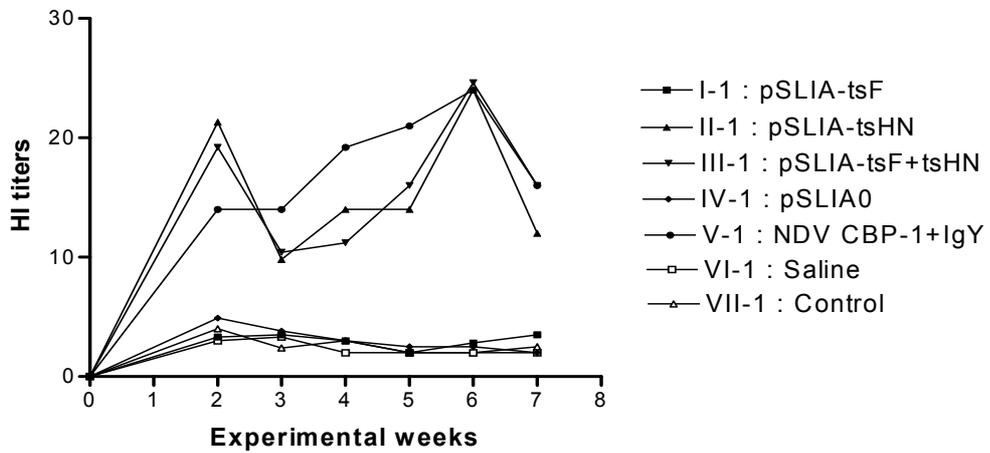


Fig 13. Changes of HI titers (average of each group) in the chicken administered in ovo with DNA vaccines and attenuated NDV CBP-1+IgY.

② NDV B1백신 접종군

DNA vaccine 접종군과 NDV CBP-1+ IgY 접종군에 대한 NDV B1 음수백신의 booster 접종에 따른 면역효과를 측정하기 위해 NDV B1음수백신을 투여한 병아리에 대해 4주령에서 9주령까지의 HI 역가를 측정한 바 challenge 전 6주째에 가장 높았고, DNA vaccine 이 접종된 I-2, II-2 및 III-2군과 NDV CBP-1+ IgY가 접종된 V-2는 대조군 IV-2, VI-2, VII-2에 비해 높은 HI 역가를 나타내어 6주째 I-2, II-2, III-2군 및 V-2는 74.7, 92.8, 105.6 및 114.0의 HI역가를 보였으며 대조군은 41.6~64.0로써 접종군이 대조군 보다 높았으며, 7주째는 감소되는 경향이 있었다(Table 14, Fig. 14, 15). 부화 7주째 challenge한 병아리의 8주령과 9주령의 HI 역가는 256~> 1024로 전반적으로 높게 나타났다(Table 14, Fig. 15).

(나) ELISA values

① NDV B1백신 비접종군

pSLIA-tsF, pSLIA-tsHN 및 pSLIA-F+HN vaccine과 NDV CBP-1(250th)+IgY vaccine을 18일령 부화란에 in ovo vaccination하고 NDV B1 vaccine을 접종하지 않은 I-1, II-1, III-1 및 V-1군에 대해 부화 후 7주째에 wild type NDV CBP-1 virus로 challenge한 병아리의 2주령에서 9주령까지의 ELISA치 변동을 측정한 바 (Table 15), 부화 후 6주에 대조군 IV-1(pSLIA0), VI-1(Saline) 및 VII-1(Control)군은 평균 0.180, 0.114 및 0.102의 ELISA 치를 보였고, 백신 접종군인 I-1, II-1, III-1 및 V-1군은 평균 0.678, 0.424, 0.969, 1.068의 ELISA치를 보였으며, pSLIA-F+HN vaccine과 NDV CBP-1 (250th)+IgY vaccine을 접종한 군이 가장 높은 ELISA치를 나타내었다(Fig. 16). I-1, II-1, III-1 및 V-1군의 ELISA치의 주별 변동을 보면 부화 후 5주 까지 증가하여 6주와 7주에서 가장 높게 나타났다 (Fig. 17). 또한 부화 7주째 challenge한 후 생존한 병아리의 ELISA 치를 8주령과 9주령에 측정한 바 I-1, II-1, III-1 및 V-1에서 2.13 이상의 높은 역가를 나타내었으며(Table 15). 대조군 IV-1(pSLIA0), VI-1(Saline), VII-1(Control)군에는 생존 병아리가 없어 측정이 불가능하였다.

그리고 부화 5주부터 6주령까지의 III-1군의 ELISA치는 I-1 및 II-1군의 항체가 보다 높게 나타나서 pSLIA-tsF와 pSLIA-tsHN을 각각 접종하는 것보다 혼합 접종하는 것이 더 높은 항체가를 나타냄을 알 수 있었으며, 각 군별 개체의 항체가를 살펴볼 때, ELISA치가 0.46이상을 나타내는 병아리만이 challenge후 생존함을 알 수 있었다 (Table 15, Fig 16, 17). 또한 HI 역가에서는 II-1이 I-1군보다 높게 나타났지만 ELISA치는 I-1군이 더 높은 항체가를 나타냈다(Fig. 12, Fig. 16).

Table 14. Effects of booster vaccination with NDV B1 vaccine on the chicken inoculated with DNA vaccines and attenuated NDV CBP-1 combined with IgY on the responses of HI activity

Group	Treatment	HI titers by week after booster vaccination* (average)					
		4**	5	6	7+	8	9
I-2	pSLIA-tsF	16 ~ 64 (37.3)	32 ~ 64 (53.4)	32 ~ 128 (74.7)	32 ~ 64 (53.4)	512 ~ > 1024 4 (853.4)	512 ~ 1024 (682.7)
II-2	pSLIA-tsHN	16 ~ 64 (41.6)	16 ~ 128 (54.0)	16 ~ 128 (92.8)	16 ~ 64 (35.2)	256 ~ 1024 (870.4)	256 ~ 1024 (665.6)
III-2	pSLIA- tsF+ tsHN	16 ~ 64 (35.2)	16 ~ 128 (67.2)	16 ~ 128 (105.6)	16 ~ 64 (41.6)	512 ~ 1024 (819.2)	512 ~ > 1024 4 (921.6)
IV-2	pSLIA0	4 ~ 32 (15.2)	8 ~ 64 (27.2)	16 ~ 64 (41.6)	8 ~ 32 (19.2)	512 ~ 1024 (614.4)	512 ~ 1024 (716.8)
V-2	NDV CBP-1 + IgY	32 ~ 64 (46.0)	64 ~ 128 (101.0)	64 ~ 128 (114.0)	32 ~ 128 (64.0)	> 1024 (> 1024)	> 1024 (> 1024)
VI-2	Saline	8 ~ 64 (34.7)	32 ~ 64 (53.3)	32 ~ 128 (64.0)	16 ~ 64 (32.0)	256 ~ 512 (426.7)	256 ~ 1024 (768.0)
VII-2	Control	16 ~ 32 (25.6)	16 ~ 64 (44.8)	16 ~ 64 (48.0)	4 ~ 32 (16.8)	128 ~ > 1024 4 (672.0)	256 ~ 1024 (704.0)

* NDV B1 drinking vaccine administered at 3 week of age.

** weeks post-hatching

+ : Peroral challenge with wild type NDV CBP-1 virus (5.5×10^5 EID₅₀/0.2ml) at 4 week after booster vaccination (at 7 weeks of age).

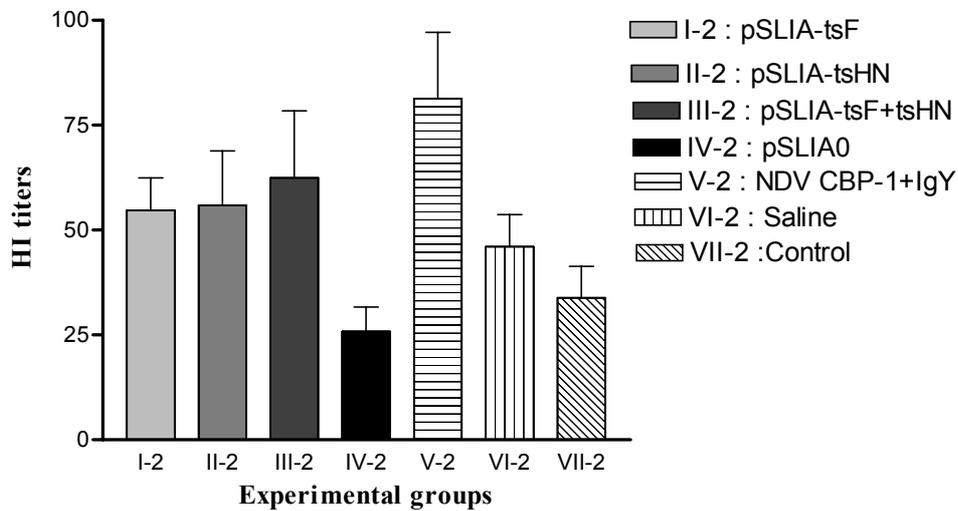


Fig 14. Comparisons of HI titers (Mean \pm SE of 4 to 7 weeks) in the chickens administered in ovo with DNA vaccines and attenuated NDV CBP-1 combined with IgY, followed with booster-vaccination with NDV B1 live drinking vaccine at 3 week age.

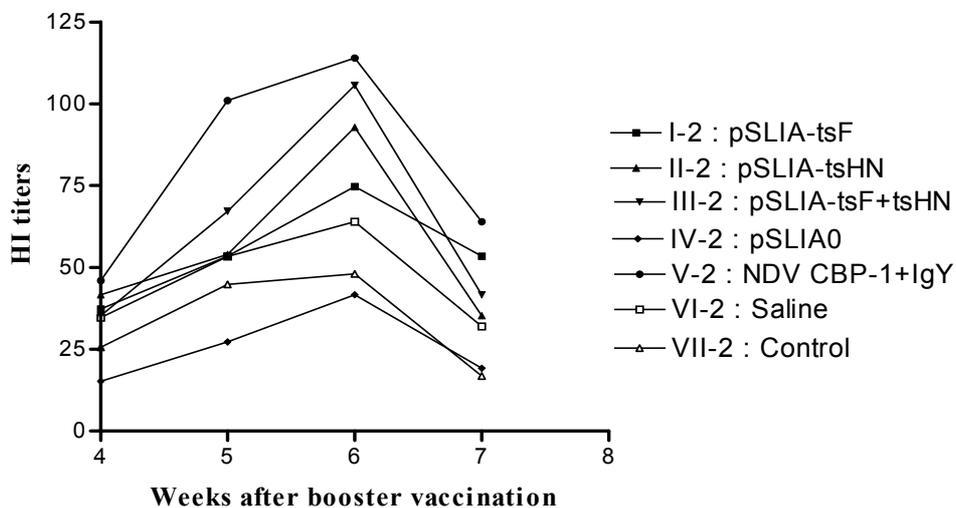


Fig 15. Changes of HI titers (average of each group) in the chickens administered in ovo with DNA vaccines and attenuated NDV CBP-1 combined with IgY, followed with booster-vaccination with NDV B1 live drinking vaccine at 3 week age.

Table 15. Effects of in ovo vaccination of DNA vaccines and attenuated NDV CBP-1 combined with IgY on the ELISA values

Group	Treatment	ELISA values by week post-hatching (average)							
		2	3	4	5	6	7*	8	9
I-1	pSLIA-tsF	0.131 ~	0.124 ~	0.154 ~	0.202 ~	0.271 ~	0.284 ~	1.548 ~	19811 ~
		0.658	0.385	0.323	0.969	1.433	1.386	2.427	2.987
		(0.270)	(0.233)	(0.236)	(0.520)	(0.678)	(0.698)	(2.179)	(2.709)
II-1	pSLIA-tsHN	0.188 ~	0.148 ~	0.187 ~	0.175 ~	0.235 ~	0.235 ~	1.748 ~	1.498 ~
		0.427	0.386	0.277	0.467	0.504	0.641	2.707	2.661
		(0.247)	(0.228)	(0.222)	(0.285)	(0.424)	(0.420)	(2.359)	(2.417)
III-1	pSLIA-tsF+ tsHN	0.152 ~	0.141 ~	0.183 ~	0.275 ~	0.457 ~	0.423 ~	1.648 ~	1.968 ~
		0.293	0.237	0.296	1.063	1.433	1.805	2.527	2.601
		(0.252)	(0.194)	(0.269)	(0.581)	(0.969)	(1.139)	(2.130)	(2.364)
IV-1	pSLIA0	0.121 ~	0.094 ~	0.099 ~	0.123 ~	0.127 ~	0.130 ~		
		0.287	0.360	0.207	0.183	0.229	0.188	NT	NT
		(0.164)	(0.150)	(0.141)	(0.154)	(0.180)	(0.158)		
V-1	NDV CBP-1 + IgY	0.132 ~	0.167 ~	0.288 ~	0.297 ~	0.401 ~	0.391 ~	1.587 ~	1.778 ~
		0.340	0.401	0.455	0.578	1.413	1.399	2.572	2.762
		(0.326)	(0.301)	(0.372)	(0.556)	(1.068)	(0.914)	(2.132)	(2.502)
VI-1	Saline	0.074 ~	0.091 ~	0.090 ~	0.111 ~	0.107 ~	0.122 ~		
		0.088	0.112	0.108	0.114	0.123	0.158	NT	NT
		(0.082)	(0.093)	(0.098)	(0.112)	(0.114)	(0.135)		
VII-1	Control	0.076 ~	0.087 ~	0.089 ~	0.085 ~	0.084 ~	0.112 ~		
		0.146	0.220	0.123	0.106	0.118	0.232	NT	NT
		(0.098)	(0.119)	(0.105)	(0.097)	(0.102)	(0.154)		

* : Peroral challenge with wild type NDV CBP-1 virus (5.5×10^5 EID₅₀/0.2ml) at 4 week after booster vaccination (at 7 weeks of age).

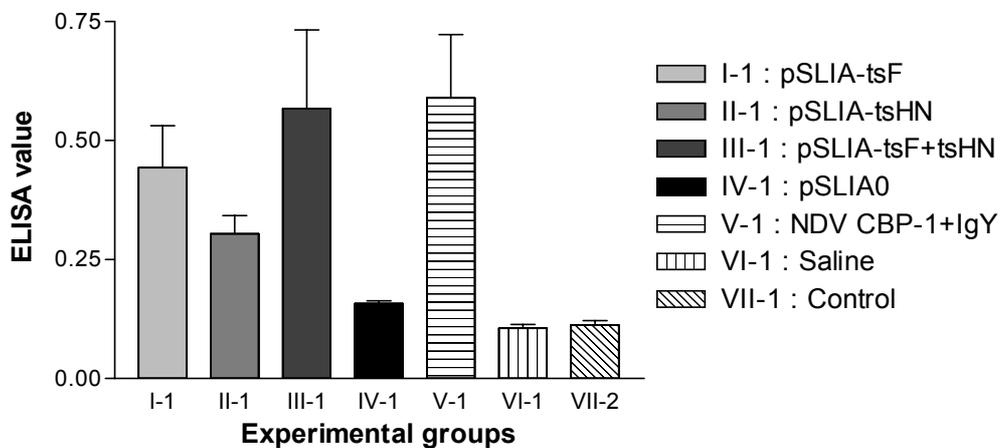


Fig 16. Comparisons of ELISA values (Mean \pm SE of 2 to 7 weeks) in the chickens administered in ovo with DNA vaccines and attenuated NDV CBP-1 combined with IgY.

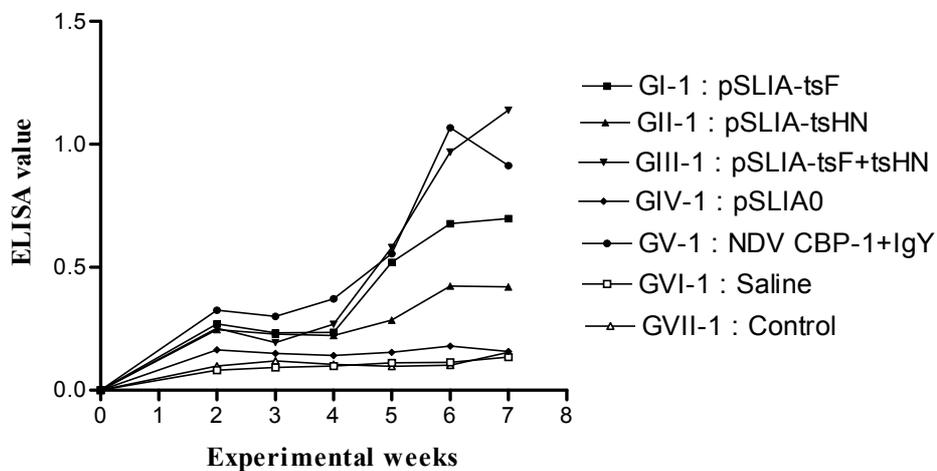


Fig 17. Changes of ELISA values (average of each group) in the chicken administered in ovo with DNA vaccines and attenuated NDV CBP-1+IgY.

② NDV B1백신 접종군

DNA vaccine 접종군과 NDV CBP-1+ IgY 접종군에 대한 NDV B1 음수백신의 booster 접종에 따른 면역효과를 측정하기 위해 NDV B1음수백신을 투여한 병아리에 대해 4주령에서 9주령까지의 ELISA치를 측정한 바 5주에서 증가하였고, challenge 전에 가장 높았고, DNA vaccine 이 접종된 I-2, II-2 및 III-2군과 NDV CBP-1+ IgY가 접종된 V-2는 대조군 IV-2, VI-2, VII-2에 비해 2배 정도 높은 ELISA치를 나타내어 6주째 I-2, II-2, III-2군 및 V-2는 2.532, 2.339, 2.801 및 2.860의 역가를 보였으며 대조군은 1.313이하 였다 (Table 16, Fig.18, 19). 부화 7주째 challenge한 병아리의 8주령과 9주령의 ELISA치는 1.735 이상으로 전반적으로 높게 나타났다(Fig. 18). 그러나 challenge후 급격한 증가를 나타냈던 HI 역가와와는 다르게 6에서 9주까지 ELISA치가 평형을 유지하는 경향이 있었다(Table 16, Fig. 19).

Table 16. Effects of booster vaccination with NDV B1 vaccine on the chicken inoculated with DNA vaccines and attenuated NDV CBP-1 combined with IgY on the ELISA values

Group	Treatment	ELISA values by week after booster vaccination* (average)					
		4	5	6	7*	8	9.
I-2	pSLIA-tsF	0.719 ~	1.739 ~	2.044 ~	2.399 ~	2.573 ~	2.526 ~
		1.043	2.366	3.106	3.090	2.828	2.804
		(0.909)	(2.082)	(2.532)	(2.571)	(2.726)	(2.683)
II-2	pSLIA-tsHN	0.688 ~	1.522 ~	2.016 ~	2.001 ~	2.463 ~	2.596 ~
		2.029	2.632	3.020	2.842	3.259	2.848
		(1.094)	(1.925)	(2.339)	(2.399)	(2.673)	(2.710)
III-2	pSLIA- tsF+ tsHN	0.844 ~	1.609 ~	1.961 ~	1.819 ~	1.888 ~	2.510 ~
		1.272	2.280	3.100	3.047	2.920	3.071
		(1.036)	(1.946)	(2.801)	(2.690)	(2.581)	(2.810)
IV-2	pSLIA0	0.275 ~	0.756 ~	0.947 ~	1.053 ~	0.992 ~	1.789 ~
		0.725	1.215	1.585	1.763	2.047	2.205
		(0.525)	(1.045)	(1.313)	(1.403)	(1.792)	(2.061)
V-2	NDV CBP-1 + IgY	0.687 ~	1.450 ~	2.601 ~	2.498 ~	1.998 ~	2.108 ~
		1.589	2.332	3.112	2.856	2.802	3.008
		(1.202)	(2.012)	(2.860)	(2.521)	(2.179)	(2.351)
VI-2	Saline	0.574 ~	0.813 ~	1.035 ~	1.210 ~	2.029 ~	2.223 ~
		0.856	1.390	1.482	2.007	2.390	2.557
		(0.631)	(1.112)	(1.176)	(1.534)	(2.179)	(2.334)
VII-2	Control	0.431 ~	0.450 ~	0.457 ~	0.454 ~	1.448 ~	1.737 ~
		0.824	1.324	1.340	1.644	2.257	2.368
		(0.624)	(0.891)	(1.186)	(1.410)	(1.735)	(2.035)

* : Peroral challenge with wild type NDV CBP-1 virus (5.5×10^5 EID₅₀/0.2ml) at 4 week after booster vaccination (at 7 weeks of age).

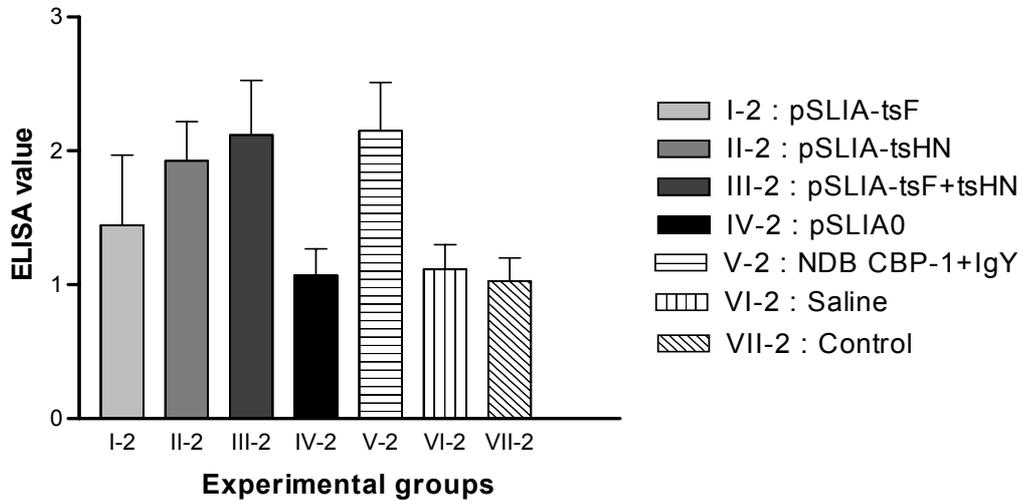


Fig 18. Comparisons of ELISA titers (Mean \pm SE of 4 to 7 weeks) in the chickens administered in ovo with DNA vaccines and attenuated NDV CBP-1 combined with IgY, followed with booster-vaccination with NDV B1 live drinking vaccine at 3 week age.

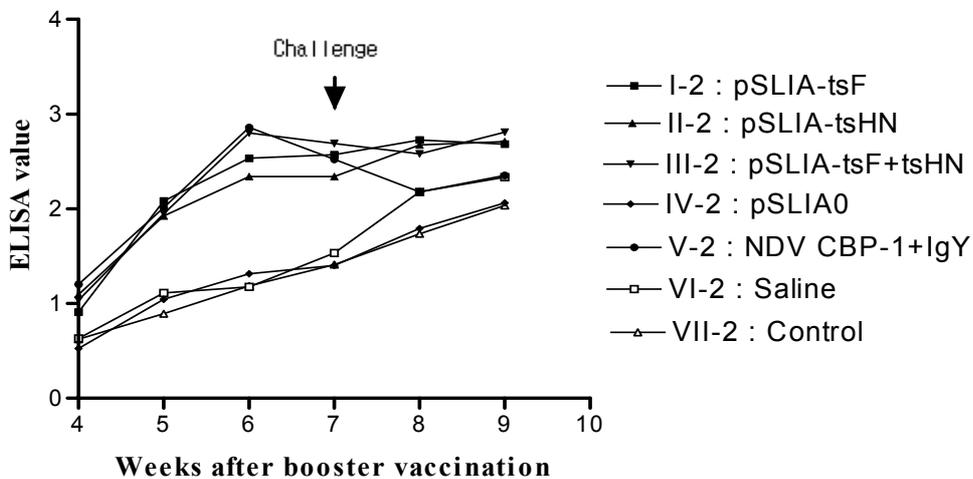


Fig 19. Changes of ELISA titers (average of each group) in the chickens administered in ovo with DNA vaccines and attenuated NDV CBP-1 combined with IgY, followed with booster-vaccination with NDV B1 live drinking vaccine at 3 week age.

1-3. 결 론

닭 뉴캐슬병에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. NDV CBP-1주를 부화계란에서 250대 연속계대하거나 저온 배양하여 약독화하고 병원성을 시험하여 MDT와 ICPI치를 측정할 때 wild type 보다 병원성이 현저히 낮았다.

2. NDV CBP-1주로 면역시킨 마우스를 사용하여 987개의 hybridoma를 획득하였으며, NDV에 특이하게 반응하는 13주의 단클성 항체를 작제하였다.

3. $10^{5.0}EID_{50}/0.1ml$ 역가의 B1 및 CBP-1(240th)주를 0.2% formalin 또는 ethylmethane sulfate를 처리하여 불활화 한 후 18일령 부화란에 접종한 바 formalin 처리군에서는 37.5~50.0% 그리고 ethyl-methane sulfate 처리군에서는 50.0%~75.0%의 부화율을 나타내었고 HI역가가 인정되었다.

4. $2 \times 10^{5.0}EID_{50}/0.1ml$ 역가의 NDV B1주와 NDV CBP-1주(240th)를 동량의 polyvalent antisera, 단클론성항체 및 IgY 항체를 각각 감작 처리한 다음 18일령 부화계란에 접종하였던 바, 부화율은 polyvalent antiserum과 IgY 항체 처리군이 단클론성항체 처리군 보다 높았으며, 불활화처리된 항원 접종군 보다 부화율과 HI 및 ELISA 역가가 높게 나타났다.

5. NDV CBP-1주(250th) F gene(1710bp)과 HN gene(1795bp)의 염기 및 아미노산 서열을 결정하고, B1주, Lasota주, Texas G.B.주, Beaudette C주, Ulster주와 비교하였던 바, 상동성이 핵염기는 89% 이상, 아미노산은 91.3% 이상이었다.,

6. NDV CBP-1주(250th) F 및 HN gene이 재조합된 pSLIA-F와 pSLIA-HN을 작제하고 COS-7 cell에 transfection하고 형광항체법, SDS-PAGE 및 western blot으로 F 및 HN 단백질의 발현을 확인하였다. 또한 마우스에 접종하여 F 및 HN 단백질에 대한 항체 형성능을 ELISA법으로 시험하고 항체가의 상승을 확인하였다.

7. DNA vaccine pSLIA-tsF, pSLIA-tsHN 및 pSLIA-F+HN, pSLIA과 attenuated NDV CBP-1(250th)+IgY vaccine을 in ovo 접종하여 부화율, 안전성 및 면역원성을 시험한 바, DNA vaccine의 부화율과 안전성이 80~100%로 높았다. 시험군에 대한 NDV B1 음수백신의 booster 효과를 측정할 때, DNA vaccine과 attenuated NDV CBP-1(250th) +IgY vaccine 접종군에서 NDV B1 vaccine의 booster 효과가 높게 나타났다, wild type NDV CBP-1 virus로 challenge시 방어율이 유의하게 높았다.

8. DNA vaccine과 NDV CBP-1(250th)+IgY vaccine으로 in ovo 접종되고 부화된 병아리에 대해 NDV B1 vaccine을 booster 접종하지 않은 군과 접종한 군에 대해 wild type NDV CBP-1 virus로 challenge하고 HI 및 ELISA 역가를 측정하고, 또한 생존율(방어율)을 시험하였다. 그 결과 DNA vaccine pSLIA-tsF, pSLIA-tsHN 및

pSLIA-F+HN, pSLIA과 attenuated NDV CBP-1(250th)+IgY vaccine을 in ovo 접종한 군에서는 현저한 booster 효과가 인정되었다.

9. 이상의 시험을 통해서 뉴캐슬병에 대한 in ovo vaccination에서 NDV CBP-1(250th) +IgY vaccine과 NDV B1+IgY vaccine의 안전성과 효능성이 비교적 높다고 인정되며, 삭제된 DNA vaccine은 in ovo vaccination에서 안전성이 매우 높고, 부화후 NDV B1 음수 백신의 면역효과를 증대 시켜주는 효과가 있음이 관찰되었다.

제 2 절 전염성 후두기관지염에 대한 in ovo vaccination 용 항원 개발에 관한 연구

2-1. 재료 및 방법

1) 세포배양, ILT virus이 계대배양을 통한 바이러스 약독화

가. LMH cell line의 배양

LMH cell line은 10% fetal bovine serum을 가한 Waymouth media 배지에 배양 및 유지하였으며, 세포배양 plate는 0.1% gelatin으로 coating한 다음 사용하였다.

나. LMH cell에 대한 ILT virus 의 cell adaption

국내 분리 ILT-N91B01 바이러스는 강 병원성 바이러스로 수의과학검역원에서 분양 받아 사용하였다. LMH cell에 바이러스를 adaption 시키기 위하여 24-well plate 에 cell monolayer를 만든 다음 culture media를 제거하고 ILT virus를 희석한 배지를 가하여

37°C, 5% CO₂ 에서 1시간 동안 흡착한 후 바이러스 희석 액을 제거한 후 3%의 fetal bovine serum을 가한 Waymouth media을 plate well 당 1ml 씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하면서 cytoplasmic fusion에 의하여 생긴 multinucleated giant cell을 관찰하였다.

다. 연속 계대 배양에 의한 ILT virus의 약독화(순화)

ILT virus의 약독화를 위하여 LMH cell에 연속 계대 배양하였다. 접종된 cell monolayer에 multinucleated giant cell이 관찰되면 freezing과 thawing를 2회 반복한 다음 새로 조성한 LMH cell monolayer에 위에 기술한 방법과 동일하게 접종하고 배양하여 병원성이 강한 바이러스를 약독 순화시켰다.

라. 연속계대 배양 약독화 virus의 부화계란에 대한 LD₅₀ 값 측정

순화된 ILT virus의 LD₅₀값의 측정은 Reed & Munch의 endpoint method에 의하여 실시하였다. 최종 181대 연속계대 ILT 바이러스에 대한 LD₅₀을 측정하기 위하여 바이러스 배양액을 10-fold법으로 희석한 다음 각 희석 단계별로 부화일령이 18일인 10개의 SPF egg embryo에 각각 100ul를 22GX1 1/4" 주사 needle로 주사바늘 끝까지 들어가도록 기공표면에 만든 hole을 통하여 접종한 다음 부화 후 10일 간 생존율을 조사하여 LD₅₀값을 산출하였다.

마. 혈청 중화시험 및 plaque reduction neutralization test를 위한 ILT virus의 monkey epithelial cell adaption.

LHM cell은 배양이 매우 까다롭고 monolayer를 만들기가 쉽지 않으므로 이러한 단점을 해결하기 위하여 ILT virus를 비교적 유지기 용이하고 cell monolayer의 안정성이 높은 monkey epithelial cell에 위에 기술한 LMH cell adaptation 방법과 동일하게 ILT virus를 배양하였다.

2) ILT virus의 단클론 항체 생산

가. 단클론 생산용 항원 생산

LMH cell에 배양한 ILT virus의 배양액 500ml을 10,000rpm에서 원심하여 cell debris를 제거한 다음 SW 28로타를 이용하여 25,000rpm에서 2시간 원심하여 virus pellet를 만들었다. Virus pellet를 PBS로 재부유한 다음 25% sucrose (in PBS) 1ml를 넣고 그 위에 virus 농축액을 overlay한 다음 SW41 rotor를 이용하여 35,000 rpm에서 2시간 동안 원심하여 상층 액 과 sucrose를 버리고 다시 1ml PBS로 재부유하여 마우스 접종용 항체용 항원으로 사용하였다.

나. 마우스 면역

1차접종: 일반적으로 2-3마리의 BALB/c mice에 순수 분리한 virus항원에 Freund's Complete Adjuvant를 동량 섞어 복강주사 하였다. 단 total volume이 0.5ml/mouse를 넘지 않도록 하였다.

2차접종:1차접종 1-2주 후 동량의 virus와 incomplete Freund's Adjuvant를 혼합 복강에 주사하였다.

2차 접종 후 7일 후에 항체 검사를 하였다.

3차접종: virus 항원을 미정맥과 복강으로 주사하였다.

다. 세포의 융합

배양된 Sp2/0 cell을 SFM(Serum free RPMI-1640 media)로 2-3회 washing한 다음 10ml의 SFM에 부유시켜 cell count 하고 37°C incubator에 보관하였다.

면역된 BALB/c mouse로부터 spleen을 적출하여 SFM가 들어 있는 멸균 dish에 넣고 SFM으로 3회 washing한 다음, SFM을 spleen에 주사기로 주입하여 spleen cell을 밀어 낸다. 세포 부유액을 원심분리하고 lysis buffer(Sigma, U.S.A)을 이용하여 적혈구를 파괴하고 10ml의 SFM을 첨가한 후 원심하여 상층액을 버리고 SFM 10ml을 가하여 spleen cell pellet을 재부유하여 세포수를 측정하였다.

세포의 융합을 위하여 spleen cell과 Sp2/0cell의 비율이 10:1 혹은 5:1이 되도록 50

ml centrifuge tube에 넣고 원심 분리한 다음 상층 액을 완전히 제거하고 부드럽게 충격을 주어 cell pellet이 시험관으로부터 떨어지게 하였다. Cell pellet에 PEG를 첨가하여 cell을 fusion 한 다음 1,000 rpm에서 5분간 원심하여 상층액을 버린다. Cell pellet에 HAT medium을 부드럽게 서서히 가한다. Final spleen cell concentration이 2.0×10^8 /ml 되도록 조정 한 다음 96-well plates이 well당 200ul씩 넣어 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 약 5일 정도 경과되면 fusion되지 못한 Sp2/O cell을 모두 사멸하고 대신 fusion cell이 성장하게 되는데 이때부터 각 well에 있는 배지의 반을 제거하고 신선한 HAT 배지를 2-3일 간격으로 채워준다.

라) Screening 및 Cloning

Hybridoma cell이 성장하여 조직배양plate의 well surface에 30% 이상을 차지하는 well을 선택하여 배지를 교환하고 2일 후 배지100ul를 취하여 VN test를 실시하여 virus에 대한 항체 유무를 검사하였다. 항체 양성으로 판명된 well의 cell clone을 각각 2-3 vials 씩 동결시켰다.

또한 항체 양성을 보인 well의 세포를 limiting dilution에 의하여 항체를 생산하는 single clone을 분리해 내었다.

마) 복수의 생산

약 10전부터 pristane을 복강주사하여 감염된 mouse에 cloning 된 hybridoma cell를 선택하여 배양한 후 원심 세척하고 SFM에 세포수가 4×10^6 cells/ml되도록 조정 한 다음 mouse 복강에 0.5ml 주사하였다. 주사된 mouse의 복강에 solid tumor가 형성되기 전에 복수를 채취하였다.

3) 항원용 바이러스의 화학적 처리에 의한 약독화

약물처리에 의한 ILT virus 유전자 상에 비 특이적으로 point mutation을 유발하여 병원성을 제거하기 위한 것으로 Ahmad(1991)등의 방법에 의거하여 LMH cell에 13대 계대 배양된 ILT-N91B01을 infectivity titer가 1×10^{-3} TCID₅₀/0.1ml 되게 희석된 바이러스 배양액 200ul을 200ul 0.5M sodium acetate와 2ul의 ethylmethane sulfat(EMS) 혼합하여 31°C에 2분간 진탕한 혼합액과 섞은 다음 31°C에서 30분간 방치한 다음 1% sodium thiosulfate 3.6ml을 가하여 4°C에 2시간 동안 방치한 다음 calf serum을 2% 되게 첨하여 inovo vaccination용 항원으로 사용하였다.

4) 항원용 바이러스에 대한 다가 항체 처리

바이러스 배양액을 희석하여 infectivity titer가 1×10^{-3} TCID₅₀/0.1ml 이 되도록 조정 한 다음 2ml의 희석된 virus 항원에 20ul의 고도 면역 ILT virus 혈청을 가하여 잘

혼합 한 다음 37℃에서 2시간 동안 감작시켰다.

5) 항원용 바이러스에 대한 단클론 항체 처리

위에 기술한 다가 혈청처리와 같은 방법으로 처리하여 inovo vaccination 항원으로 사용하였다.

6) 화학제제, 다가항체 및 단클론 항체의 항원의 안전성 시험

상기에서 생산된 다양한 항원을 Group 당 13개의 18일령 부화계란 계태에 22GX1 1/4" 주사 needle로 주사바늘 끝까지 들어가도록 기공표면에 만든 hole을 통하여 각각의 항원100ul을 접종한 다음 부화율, 미부화 계태아의 난황흡수 정도, 부화 후 10일 간 생존율, 증체율, 항체 생성검사, 미부화계태아 혹은 부화 후 폐사한 병아리로부터 바이러스 분리 등을 통하여 생산된 항원의 안전성 및 효능 등을 측정하였다.

7) 불활화 바이러스 항원제조 및 안전성 시험

LMH cell line에 67대 계대 배양한 바이러스($1 \times 10^{5.5}$ TCID₅₀/ml)를 formaldehyde 0.2%를 가하여 37℃ 항온기 에서 하룻밤 방치한 후 실험에 이용하였다. 항원의 안전성 시험은 아래 기술된 순화생독항원의 안전성 시험과 동일하게 실시하였다.

8) 약독화 바이러스 생독 항원의 안전성 시험 및 면역원성 시험

가. 항원의 접종

LMH cell에 181대 계대 배양된 ILT virus를 100ul ($1 \times 10^{1.25}$ TCID₅₀/ 0.1ml)를 각각의 18일령 부화계란 계태에 22GX1 1/4" 주사 needle로 주사바늘 끝까지 들어가도록 기공표면에 만든 hole을 통하여 접종하고 부화율 , 10일 간 생존율 및 면역원성을 조사하였다.

나. 면역원성 조사

면역원성을 조사하기 위한 serum neutralization 시험은 원숭이 epithelial cell에 19대 passage된 ILT virus를 이용하여 기존의 SN방법을 이용하였다.

간단히 설명하면 serum free MEM 50 ul을 96-well culture plate의 각 well에 병아리 혈청을 가하여 10배, 20배, 40배 또는 4배, 8배, 16배 되게 희석한 후 동량의 바이러스 희석액 50ul(1×10^6 TCID₅₀/0.1ml)넣고 한 시간 동안 37℃, 5% CO₂를 함유하는 culture chamber에 1시간동안 항체 항원 반응을 시킨 다음 monkey epithelial cell 부유액

100ul를 가한 후 37°C, 5% CO₂를 함유하는 culture chamber에 배양하면 서 CPE (cytopathic effects)를 관찰하여 CPE가 관찰된 최종 희석배수를 항체역가로 산정하였다.

9) 항원의 접종방법에 따른 안전성 및 체액면역 반응

22GX1 1/4" 주사 needle로 기공에 난 hole를 이용하여 주사침이 끝까지 들어가게 하여 항원을 난황 또는 다른 신체의 일부에 주사하는 방법과 기실부위와 계란의 측면 중간부위에 hole를 만들어 장노막강에 항원을 주사하는 두 가지 접종법을 비교 분석하였다. 항원 virus는 181대 계대 배양된 ILT virus로 항원량은 $1 \times 10^{-1.25}$ TCID₅₀/0.1ml로 각각의 18일령 부화계란에 100ul 씩 접종하였다. 부화율, 성장률, 항체생성 정도를 조사 하였다.

10) ILTV 면역관련 구조 유전자의 핵산 증폭 및 클로닝

가. ILTV virus 감염세포에서 ILT virus의 DNA 추출

LMH cell에 ILT virus를 접종하여 초기 CPE가 관찰될 무렵에 감염세포를 수확하여 TBS buffer(10mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 7.4)로 3회 원심 세척하였다. 감염 세포 pellet에 0.6% SDS와 proteinase K(400ug/ml)을 가하여 37°C에서 3hr 동안 방치한 다음 phenol :chloroform: isoamylalchol(25:24:1)로 ILT virus DNA를 추출하였다. ILT virus DNA를 TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)에 녹인 다음 RNase를 처리한 다음 proteinase K(200mg/ml)을 처리하여 37°C에서 3시간 방치한 후 phenol :chloroform: isoamylalchol(25:24:1)을 처리하여 ILT virus DNA를 다시 추출 하였다.

나. ILT virus로부터 중화항체가 유도 유전자의 증폭

1) Primer의 작제

ILT virus의 혈중 중화항체를 유도하는 것으로 밝혀진 ILT virus gB 유전자 염기 서열에 대한 정보를 Gen Bank(M64927: ILT virus SA2 strain)의 자료 검색을 통하여 얻었으며 이를 바탕으로 하여 gB 유전자를 증폭할 수 있는 primers를 작제하였다 (Table 1). Primer의 5' end 에 유전자의 cloning를 용이하게 하기 위하여 제한효소 *Sma*I site를 삽입하여 작제하였다.

Table 1. Oligonucleotide primer sequences

Primers	Sequences(5'→3')	Amplified gB gene regions	Remarks
ILTgB184	TCC CCC GGG ATG GCT AGC TTG AAA ATG CTG		
ILTgB2805	TCC CCC GGG TTA TTC GTC TTC GCT TTC	184-2805	DNA vaccine
ILTgB1F	GAA TTC GAC CTC GAC GGC CCG ATT TTG		
ILTgB902R	CCT GTC GCC ATT CCA AAG TAA TCA TAC G	1-902	Sequencing
ILTgB800F	TCA AAC CCT GGG ATA CCG AAC GTC TA		
ILTgB1700R	GGC GCT TAC TGG TTG TCC GAA CAA AG	800-1700	Sequencing
ILTgB1600F	TCG GAA ATT TGT TGG AAG CGT GGT		
ILTgB2500R	AAC AGA ACC TGA ACT GGG TTT GAT	1600-2500	Sequencing
ILTgB 2400F	TCT TTC TAA CCC GTT CGC CGC ACT		
ILTgB3032R	TCT TAA ATA GCT TCC AAT GCC GAT	2400-3032	Sequencing

2) ILT virus gB 유전자의 증폭

gB 유전자를 증폭하기 위하여 PCR tube에 ILT virus DNA 2ul, *Taq* polymerase 2ul(2U/ul), dNTP 4ul(2.5mM each), forward primer 1ul(100 pmol), reverse primer 1ul(100 pmol), 10X PCR buffer 5ul, DW 35ul을 가하여 50ul가 되게 하였다. 이와 같이 조성된 PCR 혼합액을 94℃에서 10분간 denaturation 한 다음 94℃ 1분, 62℃ 2분, 72℃ 2분간 40 cycles로 증폭한 다음, 마지막으로 72℃에서 7분간 final extension 하였다.

3) pCI -neo plasmid DNA의 준비

pCI-neo mammalian expression plasmid vector(Promega, USA)로 transformation 된 *E. coli* DH5 α cell의 colony를 LB media에 overnight 배양하고 mini prep Kit(Promega, USA)로 제조자의 설명에 따라 pCI-neo plasmid DNA를 분리하고 이를 *Sma* I restriction endoneclease로 처리하여 gB 유전자의 cloning에 이용하였다.

4) 재조합 DNA 구축 (gB 유전자의 cloning)

Fig. 1에서 보는 바와 같이 pCI-neo vector의 *Sma* I site에 ILT virus gB 유전자를 cloning 하기 위하여 *Sma* I으로 처리된 PCR gB product와 역시 *Sma* I으로 처리된 pCI-neo vector를 agarose gel에 elution하여 순수 분리하였으며 gB PCR product

6ul, pCI-neo DNA 1ul, T4 ligase 1ul, 10Xbuffer 1ul를 가하여 16°C에서 하루 밤 방치하여 ligation하였다. *E. coli* DH5α competent cells을 ice에서 녹인 다음 pCI-neo-gB 2ul을 가하여 ice위에 20분간 방치한 후 42°C water bath에 90 sec 간 heat-shock을 가한 다음 LB media 1ml를 가하여 37°C에서 1시간 배양한 후 ampicillin을 함유하는 LB agar에 100ul 를 도말하여 overnight 배양하였다.

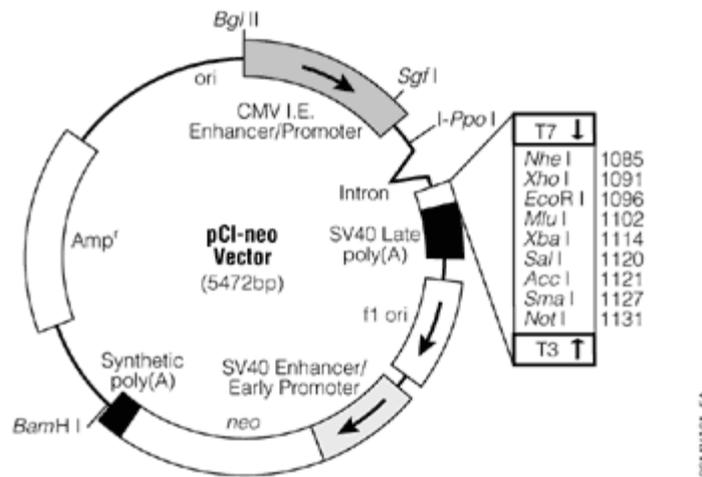


Fig. 1. The pCI-neo mammalian expression vector. The gB gene of ILT virus was inserted into *Sma* I site in the multicloning site.

Overnight 배양한 transformants를 선택하여 LB broth에 overnight 배양한 다음 plasmid DNA 순수 분리 Kit를 이용하여 recombinant plasmid를 순수 분리한 후 gB 유전자의 2.2kb 부위를 절단하는 *EcoRV*와 pCI-neo vector의 3385kb 부위를 절단하는 *Bam* HI으로 순수 분리된 recombinant plasmid DNA(pCI-neo-gB plasmid)를 처리 한 다음 agarose gel 전기영동으로 삽입된 gB 유전자의 orientation을 확인 하였다.

11) ILT virus gB 유전자의 characterization

ILT virus gB 유전자의 특성을 규명하기 위하여 gB 유전자의 염기 서열을 분석하고 이들 다른 ILT virus의 gB 유전자의 염기서열과 비교 분석하였다.

가. gB 유전자의 염기서열 분석

Table 1과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 약 900bp를 증폭할 수 있는 4 set의 primer

를 증폭되는 유전자간 100bp씩 중첩되게 작제하였다. 각각의 gB 유전자 fragment를 증폭하기 위하여 PCR tube에 ILT virus DNA 2ul, *Taq* polymerase 2ul(2U/ul), dNTP 4ul(2.5mM each), forward primer 1ul(100 pmol), reverse primer 1ul(100 pmol), 10X PCR buffer 5ul, DW 35ul을 가하여 50ul가 되게 하였다. 이와 같이 조성된 PCR 혼합액을 94℃에서 10분간 denaturation 한 다음 첫 번, 두 번째 fragment는 94℃ 1분, 63℃ 2분, 72℃ 2분간 40 cycles로 증폭한 다음, 마지막으로 72℃에서 7분간 final extension 하였고, 3번째 fragment는 94℃ 1분, 55℃ 2분, 72℃ 2분간 40 cycles로 증폭한 다음, 마지막으로 72℃에서 7분간 final extension 하였으며, 마지막 4번째 fragment는 94℃ 1분, 56℃ 2분, 72℃ 2분간 40 cycles로 증폭한 다음, 마지막으로 72℃에서 7분간 final extension 하였다.

각각의 PCR product를 pGEM-T vector(Promega, USA)에 ligation 한 이를 이용하여 *E. coli* DH5α cell을 transformation 하였다. 각각의 fragment를 포함하는 *E. coli* DH5α cell colony를 3개씩 채취하여 LB media에 일일 밤 배양한 다음 DNA isolation kit로 순수 분리하여 restriction enzyme *Sph*I을 처리하여 insert를 확인한 후 염기서열 분석에 사용하였다. 각각 3개의 gB fragment 가운데 2개의 sequence가 동일 할 경우 정확하게 sequencing 이 이루어진 것으로 간주 하였다.

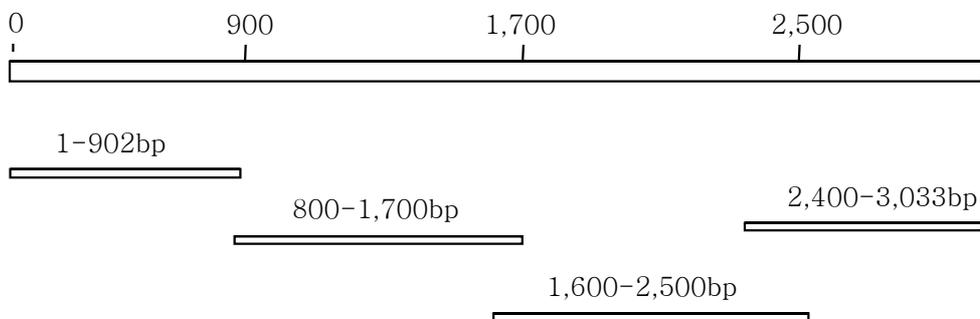


Fig. 2. Schematic diagram of gB gene indicating its nucleotide sequencing strategy. Each primer set was designed to be overlapped by 100 bp.

나. gB의 염기서열 분석

염기서열은 순수 분리된 gB gene fragment를 사용하여 M13 forward와 reverse primers을 이용하여 Big Dye Dideoxy cycle sequencing kit와 ABI 3700 DNA

analyzer(Applied Biosystem, USA)로 염기서열을 분석하였다. 염기서열의 alignment와 computer analysis는 genedoc 와 BLAST를 이용하여 실시하였다.

12) Recombinant plasmid DNA pCI-neo-gB 의 안전성 시험 및 효능시험

30개의 18일령의 SPF egg embryo를 10개씩 3개 group로 나누고 22GX1 1/4" 주사 needle로 주사바늘 끝까지 들어가도록 기공표면에 만든 hole을 통하여 1군에는 각 부화 계란 당 pCI-neo vector DNA 100ug 접종하고, 2군에는 pCI-neo-gB plasmid DNA 100ug을 접종하였으며 그리고 3군에는 PBS 100ul를 접종한 후 부화율, 10일 간 생존율, 성장성을 조사였다.

13) ILT virus gB 재조합 유전자백신의 계태아 접종시험

ILT virus gB 재조합 유전자의 동물 임상실험을 위하여 Table 2와 같이 실시 하였다.

재조합 유전자의 efficacy를 조사하기 위하여 Circular 형태, linear 형태의 DNA와 또한 linear형태에 lipofectin을 혼합한 형태로 계란 한 개당 100ug을 기공의 정점에 만든 hole를 통하여 접종하였다. 대조군에는 PBS 100ul/egg를 주사하였다. 각군은 6개의 18일령 계태아로 구성되었다. Circular 재조합 유전자를 linear 형태로 만들기 위하여 Bam HI를 처리하였다. 재조합 DNA vaccine의 efficacy를 조사하기 위하여 부화율, 부화 후 10일간 생존율, 기형유발 등을 관찰하고 또한 실험 마지막에 serum neutralizing antibody test 와 plaque reduction neutralization test로 항체가를 측정하였다.

가. Serum neutralizing antibody test

접종된 병아리로부터 얻은 serum을 56℃ 항온 수욕조에서 30분간 불활화 하였다. serum free MEM 50 ul을 96-well culture plate의 각 well에 병아리 혈청을 가하여 10배, 20배, 40배 또는 4배, 8배, 16배 되게 희석한 후 동량의 바이러스 희석액 50ul(1X100TCID₅₀/0.1ml)넣고 한 시간 동안 37℃, 5% CO₂를 함유하는 culture chamber에 1시간동안 항체 항원 반응을 시킨 다음 monkey epithelial cell 부유액 100ul를 가한 후 37℃, 5% CO₂를 함유하는 culture chamber에 배양하면서 CPE (cytopathic effects)를 관찰하여 CPE가 관찰된 최종 희석배수를 항체역가로 산정하였다.

나. Plaque reduction neutralization test

Tissue culture plate 당 50개의 plaque가 관찰되도록 예비시험을 통하여 virus희석 배수를 설정하였다. 접종된 병아리로부터 채취한 serum을 MEM으로 2-fold로 계단희

석 한 다음 동량의 virus 희석 액을 가하여 37°C incubator에 한 시간 동안 방치한 후 직경이 35mm 인 tissue culture plate에 조성된 monkey epithelial cell monolayer에 virus 와 serum 혼합액을 가하여 monolayer 표면에 골고루 퍼지게 한 후 1시간 동안 37°C incubator에 방치한 다음 serum virus혼합액을 제거하고 serum free MEM으로 1회 행군 한 다음 40°C의 overlay media(1.6% agar +동량의 2X MEM)를 plate 당 2ml 씩 가하여 실온에서 agar가 완전히 굳도록 20분간 방치한 다음 5% CO₂가 포함된 37°C cell culture chamber에서 4일간 배양 후 overlay media를 제거하고 1% crystal violet 1ml을 가하여 10분 동안 염색한 다음 흐르는 tap water에 행군 다음 plaque 숫자를 관찰하였다.. 대조 plate에서 관찰된 plaque을 숫자를 기준으로 시험 plate에서 관찰된 숫자 사이에 백분율을 산정하여 병아리 혈청 속에 존재하는 ILT virus에 대한 항체를 정량화하였다.

Table 2. Experimental design for efficacies of recombinant gB gene using 18 days old egg embryos.

Recombinant Genes	DNA volume	No. of Eggs
pCI-neo vector DNA, Circular DNA	100ug/100ul/egg	6
pCI-neo-gB DNA, Circular DNA	100ug/100ul/egg	6
pCI-neo-gB DNA, Linear DNA	100ug/100ul/egg	6
pCI-neo-gB DNA, Linear DNA+ Lipofectin	100ug/100ul/egg	6
PBS control	100ul/egg	10

2-2. 결 과

1) 세포배양, ILT virus이 계대배양을 통한 바이러스 약독화 ILT virus 항원 생산

가. LMH cell line 배양

LMH cell line 는 collagen 이나 gelatine등을 culture flask 표면에 coating 한 후에 LMH cell을 배양할 수 있었으며 culture media는 Waymouth media (Sigma, USA)에 우혈청 10%을 가하여 세포를 배양 유지할 수 있었다.

나. LMH cell에 대한 ILT virus의 적응시험(adaptation test)

국내 분리 ILT-N91B01 바이러스는 강 병원성 바이러스 LMH cell에 serial passage를 통하여 cell adaptation을 할 수 있었으며 passage number 가 증가함에 따라 cytoplasmic fusion에 의하여 생긴 multinucleated giant cell이 관찰되는 시간이 단축되었다 (Fig 3).



Fig. 3. Cytopathic effects of ILT virus. The normal LMH cells (A) and multinucleated giant cells of LMH (B) were seen at 3 days post-inoculation.

다. LMH cell에 대한 연속계대에 의한 ILT virus 의 순화 및 LD₅₀ 값 측정

본 실험을 통하여 실험기간 동안 181대 까지 연속 계대하였으며 181대 계대된 ILT-N91B01의 LD₅₀을 구하기 위한 실험관찰 내용 (Table 3)과 계산 방식(Box)은 아래와 같으며 181대 연속계대 배양된 ILT virus의 LD₅₀은 $1 \times 10^{-2.3}/0.1\text{ml}$ 이었다. 계대

배양 초기에 SPF egg가 아닌 일반 commercial egg로 실시한 간이 시험에서 $1 \times 10^{-5.0}/0.1\text{ml}$ 에 가까웠던 결과에 비하면 병원성이 많이 제거된 것으로 생각된다. 본 시험은 18일령의 계태아에 대한 시험이기 때문에 병원성이 약간 존재하는 것으로 결과가 나왔다. 그러나 SPF 부화 병아리에서는 병원성이 감지되지 않았다. ILT 바이러스는 DNA virus이기 때문에 연속계대에 의한 병원성 상실효과가 RNA virus에 비하여 매우 낮은 것으로 알려져 있다.

Table 3. Endpoint titration to determine LD₅₀ of ILT virus attenuated by serial passage on the LMH cell monolayer

Dilution Step	Mortality Ratio	Died	Survived	Total Dead	Total Survived	Mortality	
						Ratio	%
1	8/10	8	2	17	2	17/19	89.5
2	8/10	8	2	9	4	9/13	69.2
3	1/10	1	9	1	13	1/14	7.1
4	0/10	0	10	0	23	0/23	0
5	0/10	0	10	0	33	0/23	0
6	0/10	0	10	0	43	0/23	0
7	0/10	0	10	0	53	0/23	0

위 Table 1.에서 보는 바와 같이 50% 치사율을 유발할 것으로 예상되는 바이러스 희석배수는 10^{-2} 과 10^{-3} 사이 존재함을 알 수 있다. 따라서 정확한 희석배수를 계산하기 위하여 아래와 같이 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{Interpolated value} &= h \frac{\% \text{ animals affected at dilution next above } 50\% - 50\%}{\% \text{ animals affected at dilution next above } 50\% - \% \text{ animals affected at dilution below } 50\%} \\ &= h \frac{69.2 - 50}{69.2 - 7.1} = h \frac{19.2}{62.1} = 0.31h \quad (0.31 \text{은 약 } 0.3 \text{으로 함}) \end{aligned}$$

위에서 만일 $h=1/10$ 이면 $\log h=-1$ 이며 또한 위 표에서 두 번째 dilution step의 총 희석배수는 $(1/10)^2$ 이며 이 단계의 log dilution은 -2가 된다. 따라서 interpolated value는 $-1 \times 0.3 = -0.3$ 이 된다. $\log \text{LD}_{50} = -2 + (-0.3) = -2.3$. 따라서 $\text{LD}_{50} = 10^{-2.3}$ 으로 계산된다.

2) ILT virus에 대한 단클론 항체 생산

ILT-N91B01 virus strain 주로 면역시킨 마우스 spleen을 사용하여 1회의 세포융합을 실시하여 210개의 hybridoma를 획득하였다. 그중 ILT virus에 중화항체 능력을 가지는 hybridoma cell는 A5 세포주는 하나였다. A5 주를 한계희석법에 의하여 cloning 하여 A5 E7 클론을 생산하여 마우스 복강 내 접종용으로 사용하여 마우스 복수를 생산하였다. 중화 항체를 갖는 항체의 isotype은 IgG_{2a} 이 었다. 생산된 항체는 ILT virus antigen 처리에 사용되었다.

3) 화학제제, 다가항체 및 단클론 항체의 항원의 안전성 시험 및 면역원성 시험

다양하게 처리된 ILT virus 항원을 group 별로 18일령 부화계란 계태아 13개에 100 μ l씩 22GX1 1/4" 주사 needle로 주사바늘 끝까지 들어가도록 기공표면에 만든 hole을 통하여 항원100 μ l을 접종한 다음 부화율, 미부화계태아의 난황흡수, 부화 후 10일 간 생존율, 증체율, 항체 생성검사, 미부화계태아 혹은 부화 후 10이내 폐사한 병아리로부터 바이러스 분리 등을 통하여 생산된 항원의 안전성 및 효능 등을 측정한 결과 항원 group 별 부화율은 Table 4에서 보는 바와 같이 PBS group, 다가항체 처리 group, EMS처리 group, 단클론 항체 처리 group, 무처리 항원 group에서 각각 13개 중 10개(76.9%), 9개(70.0%), 7개(53.0%), 10개 및 9개(70.0%)가 부화되었다. 무처리 항원 group에서 부화율은 다른 group와 유사하였으나 10일간 생존율은 22%로 매우 낮았다. 이는 ILT 강독 바이러스가 LMH cell serial passage culture에 13대 계대 배양되었음에도 불구하고 병원성이 여전히 여전한 것으로 생각된다. 폐사한 병아리의 모든 Trachea에서 ILT 바이러스가 분리되었으며 임상증상과 더불어 판단할 때 병아리의 폐사는 ILT 바이러스 감염에 의한 것으로 생각된다(Table 6). 또한 EMS처리 group에서 무 처리 항원 group보다 부화율이 낮은 것은 처리과정에서 EMS의 중화가 완전히 이루어지지 못한 결과 계태아에 독성물질로 작용한 것으로 생각된다. 또한 EMS 처리 항원 group에서는 부화 후 2일령에서 1마리가 폐사하였으며, 폐사한 병아리의 기관지와 폐의 조직에서 ILT virus가 분리되었다(Table 6). 이러한 문제점에도 불구하고 EMS 처리 항원 group에서 증체가 다가항체 처리 항원 group나 단클론 항원처리group에 비하여 높은 것은 다른 group은 group당 9마리 이상인데 비하여 EMS 처리 항원 group는 6마리로 사육조건이 타 group보다 양호하였기 때문인 것으로 생각된다. 처리 군 간에 증체율의 차이는 각 케이지 속에 있는 group 별 병아리 마리수가 다른 데 주로 기인되는 것으로 생각된다(Table 5).

이상의 결과를 종합하여 보면 ILT virus 항원을 polyclonal antibody로 처리한 group이 가장 안전성과 효능면에서 우수하였으며, 그 다음이 단클론 체 처리 group이었으며 그 다음 이 EMS 처리 group 이며 무 처리 항원 group은 부화율에서는 별

차이가 없었으나 부화후에 10일 생존율이 겨우 22%정도 였다. 그러나 증체 정도는 PBS group, EMS 처치 group, 단클론 항체 처리 group, 다가 항체처리 group, 및 무 처치 항원 group 순이었다(Table 5). 계태아로부터 virus isolation 실험에서 부화병아 리에서만 바이러스가 분리된 것은 계태아에서도 부화병아리나 성계에서 처럼 주된 virus replication site가 trachea 인 것으로 생각된다.

항원의 안정성 평가에서 난황의 흡수정도를 관찰한 것은 난황의 흡수는 18-19일경에 흡수가 진전되어 부화 시점에서는 완전히 흡수되기 때문에 난황의 흡수정도를 면밀히 관찰함으로써 접종 후에 계태아의 폐사 시점을 간접적으로 추정할 수 있기 때문이다. 항원접종 병아리에서 면역원성 검사는 serum neutralization(SN) test로 실시하였으며 그 결과 접종 후 21일경에서 PBS group을 제외하고는 처치 group에 상관없이 SN antibody titer가 개체별로 1:2~1:8로 매우 낮은 항체를 보였다. 이는 EMS, 다가혈 청 및 단클론 항체 처리 시 항원의 농도가 높아야 함을 암시하고 있다.

Table 4. Evaluation of safety and efficacy of ILT virus antigens treated by various virus inactivation materials

Parameters Antigens	Hatchability(%)	Survival rate(%) at 10 days age	Degree(%) of egg yolk absorption (No)	Remarks (No. of death)
Control (PBS)	10/13(76.9)	100	50 (1)	
			100 (2)	
Polyvalent serum-treated	9/13(70.0)	100	<50% (1)	
			>50 (1)	
			100 (2)	
EMS-treated	7/13(53.0)	85.7	0 (3)	
			>50 (1)	1 (2 day old)
			100 (2)	
Monoclonal antibody-treated	10/13(76.9)	100	100 (2)	
			>50 (1)	
Non-treated control	9/13(70.0)	22	0 (1)	1 (2 day old)
			<50 (1)	3 (4 day old,
			>50 (1)	1 (5 day old),
			100 (1)	2 (7 day old)

Table 5. Average live body weight of chicken which were inovo-vaccinated with
ILT antigen prepared by different treatments.

Antigens \ Day-old	3	9	14	Remarks (No. of death)
Control (PBS)	47.7*	78.9	121.1	
Polyvalent serum-treated	46.9	75.7	114.0	
EMS-treated	47.8	79.9	116.4	1 (2 day old)
Monoclonal antibody-treated	46.5	76.1	114.3	
Non-treated control	48.7	70.3	112.2	1 (2 day old) 3 (4 day old), 1 (5 day old), 2 (7 day old)

*Body weight = gram

Table 6. Isolation of ILT virus from the infected chicken embryos and chicken
which showed clinical signs and then died

Antigens \ Classification	No. of* embryos tested	No. of embryos with virus	Embryo status at virus isolation(%)	Tissues for virus isolation
Control (PBS)	2	0	1; 100, 2; > 50	Trachea
Polyvalent serum-treated	3	0	3; 100, 4; 100 5; >50	Trachea
EMS-treated	3	1(dead chicken)	7; Dead at 2 days after incubation 8; 100,9; <50	Trachea
Monoclonal antibody-treated	3	0	10; 100, 11; 100 12; >50	
Non-treated control	3(dead embryo) 7(dead chicken)	7(dead chicken)	13; 100, 14; <50 15; >50 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22 : dead chicken	Trachea

* The number represents the embryo sample number

%; Degree of egg yolk absorption

4) 세포배양, ILT virus이 계대배양을 통한 바이러스 약독화 ILT virus 항원 및 불활화 항원의 안전성 시험

현재 ILT virus의 LMH cell에서의 계대배양은 181대까지 수행되었다. 위에서 LD₅₀ 값을 산출 함으로써 virus 병원성에 대한 순화 정도를 알아 보았다. 본 시험에서는 attenuated ILT virus를 실제로 사용하게 될 18일령의 commercial egg embryo 30개에 접종하여 attenuated virus의 안전성을 보았다. 총 30개중 27개가 부화하였으며 PBS 접종군에서는 28개가 부화하였다. 생후 10일간 생존을 관찰한 결과 PBS 접종군과 TILT virus 접종 군에서 각각 1마리씩 폐사하였다. 병아리의 폐사 원인은 부화시부터 다소 위축된 상태로 부화되어 먹이 섭취가 어려워 폐사한 것으로 생각된다 (Table 7). 시험결과 로 볼 때 ILT virus의 순화정도는 매우 양호한 것으로 생각된다. 한 편 불활화 virus의 항원에서도 30개중 28개가 부화하였으며, 관찰기간 10일 동안 폐사한 병아리가 관찰되지 않았다.

Table 7. Evaluation of safety of ILT virus antigen against 18 days old embryonating eggs

Parameters Antigen	Total No. of Egg	No. of Hatched eggs (%)	Survival Rates at 10 days old(%)
Control (PBS)	30	28 (93.5)	27 (96.4)
ILT virus antigen	30	27 (90.0)	26 (96.2)
Inactivated ILT virus antigen	30	28 (93.5)	28 (100)

5) Live attenuated ILTvirus 항원 및 불활화 항원의 효능시험

Attenuated live ILT virus와 불활화 ILT virus의 면역원성을 조사하기 위하여 18일령의 SPF 계태아 20개에 접종하여 항체가를 조사한 결과는 아래 Table 8과 같았다.

Table 8에서 보는 바와 같이 ILT 순화 virus 항원으로 접종된 병아리의 혈중 중화항체가는 접종 3주에서 항체의 분포범위가 1:2~1:64로 관찰기간 7주 동안 큰 변화 없

이 항체가 지속되었다. 그러나 대조군의 병아리에서는 중화항체가 검출되지 않았다. 또한 불활화 항원을 접종한 병아리에서는 실험 기간동안 인정할 만한 SN titer가 관찰되지 않았으며 이는 생독항원이 접종 후 부화 계란 내에서 다소 증식하는 반면 불활화 항원은 증식하지 못하므로 차후 보완 실험에서는 항원의 양을 높이는 조치가 필요할 것으로 생각된다.

6) 항원의 접종방법에 따른 안전성 및 체액면역 반응

Table 9에서 보는 바와 같이 서로 다른 접종 방법이 부화율과 항체 생성에는 영향을 영향을 크게 미치지 못하였다. 그러나 관찰 기간 중 기공을 통한 접종 군이 장노막강 접종 군보다 사료의 섭취가 많고 또한 음수의 소모량도 많았다. 그러나 항체 생산은 유사하였다.

Table 8. Evaluation of immunogenicity (efficacy of antigen) of ILT virus antigen against 18 days old egg embryos.

Antigen	Para- meters	Total No. of Egg	No. of Hatched eggs (%)	Survival Rates at 10 days old (%)	SN titers by weeks			
					4	5	6	7
PBS control		10	9 (90)	8 (89)	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
Live attenuated ILT virus antigen		20	20 (100)	19 (95)	1:2~1:64	1:2~1:64	1:2~1:32	1:2~1:32
Inactivated ILT virus antigen		20	20 (100)	20 (100)	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2

Table 9. Effect of injection route on hatchability and antibody production in 18 day olds egg embryos inoculated with attenuated ILT virus

Inoculation route	Total No. of Egg	No. of Hatched eggs	Survival Rates at 10 days old	SN titers by weeks		
				4	5	6
Air sac route	6	5	5	1:2~1:32	1:2~1:32	1:2~1:32
Chorioallantoic route	6	6	5	1:2~1:32	1:2~1:32	1:2~1:16

7) ILTV 면역관련 구조 유전자의 핵산 증폭 및 클로닝

가. ILTV virus 감염세포에서 ILT virus의 DNA 추출

Materials and Methods에서 기술한 방법에 의하여 감염 세포로부터 ILT virus 의 DNA를 추출할 수 있었으며, 이를 PCR을 이용하여 gB 유전자를 증폭하는데 어려움이 없었다.

나. ILT virus gB 유전자의 증폭

gB 유전자를 증폭하기 위하여 PCR tube에 ILT virus DNA 2ul, *Taq* polymerase 2ul(2U/ul), dNTP 4ul(2.5mM each), forward primer 1ul(100 pmol), reverse primer 1ul(100 pmol), 10X PCR buffer 5ul, DW 35ul을 가하여 50ul가 되게 하였다. 이와 같이 조성된 PCR 혼합액을 94℃에서 10분간 denaturation 한 다음 94℃ 1분, 62℃ 2분, 72℃ 2분간 40 cycles로 증폭한 다음, 마지막으로 72℃에서 7분간 final extension 한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 약 2.6kb의 gB 유전자를 증폭할 수 있었다.

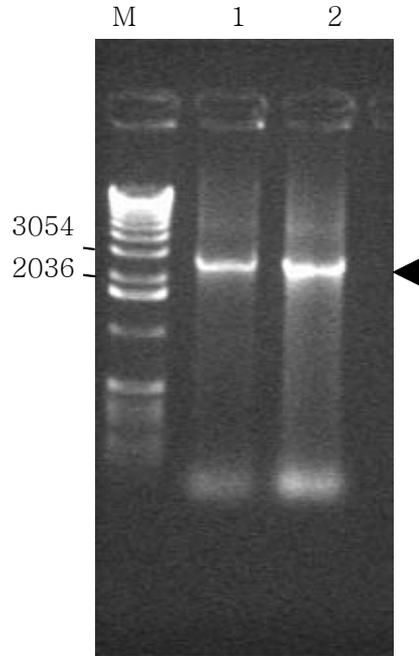


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of PCR products of gB gene of ILT virus. Lanes M, 1 and 2 represent 12,2kb DNA ladder and ILT virus gB genes, respectively. The arrow head indicates the 2.6kb gB gene.

다. pCI -neo plasmid DNA의 준비 및 재조합 DNA 구축 (gB 유전자의 cloning)

pCI-neo plasmid DNA와 gB 유전자 PCR product를 restriction endonuclease *Sma*I 을 처리하여 agarose gel elution하여 ILT virus gB 유전자의 PCR product와 pCI-neo vector를 ligation 한 후 이를 이용하여 얻은 *E. coli* DH5 α transformants로부터 plasmid DNA를 분리하고 *Sma*I을 처리하여 insert DNA 포함하는지 여부를 확인하였다(Fig. 5, Fig. 6). Inert DNA가 확인된 재조합 plasmid DNA를 restriction endonuclease *Bam*HI과 *Eco*RV를 동시에 처리하여 삽입된 gB유전자의 orientation을 확인하고 바르게 삽입된 것으로 확인된 재조합 plasmid DNA를 이를 pCI-neo-ILT gB로 명명하였다. Fig. 7)

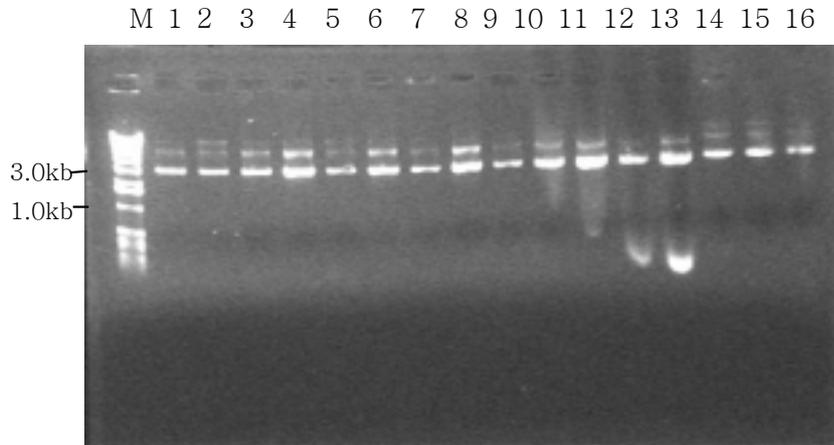


Fig. 5. Screening of clones for the insert DNA of gB gene
Lane M: 12.2kb ladder, lanes 1 to 16 represent *E. coli* transformants 1 to 16, respectively.

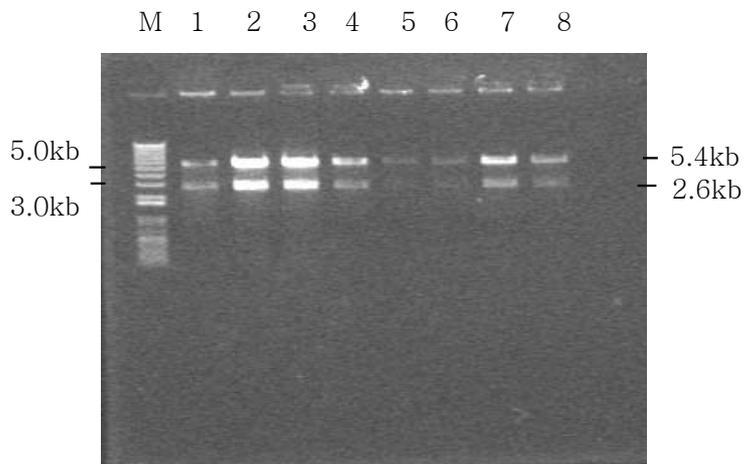


Fig. 6. Identification of insert DNA of gB. Purified recombinant plasmid DNA was treated with restriction endonuclease *Sma* I. About 2.6kb insert DNAs of gB and Vector DNAs were confirmed

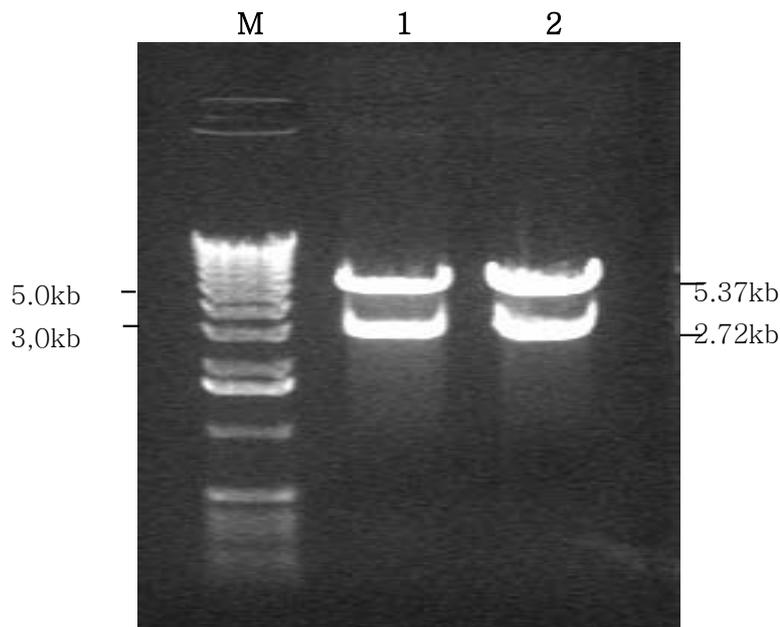


Fig. 7. Conformation of insert DNA orientation.
 Recombinant plasmid DNAs were treated with *Bam* HI and *EcoRV* and electrophoresized on agarose gel. The 5.37kb and 2.72kb DNA fragments observed on 1.2% agarose gel indicate right orientation of insert DNA.

8) gB 유전자의 characterization

ILT virus gB 유전자의 특성을 규명하기 위하여 gB 유전자의 염기 서열을 분석하고 이들 다른 ILT virus의 gB 유전자의 염기서열과 비교 분석한 결과는 아래와 같다.

가. gB 유전자의 증폭 및 cloning

Table 1에서 보는 바와 같이 4 set의 primer를 이용하여 각각의 primer에 상응하는 ILT virus gB 유전자를 증폭한 결과 LTgB 2400F와 ILTgB3032R set(약 600bp)를 제외한 3 primer set에서 900bp의 유전자를 증폭할 수 있었다 (Fig. 8).

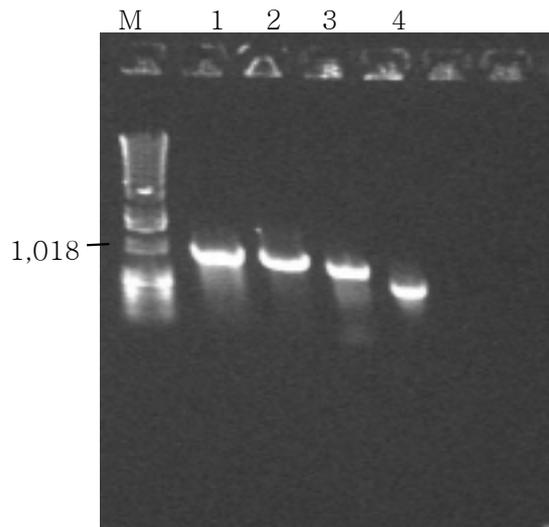


Fig. 8. The PCR products of gB gene of ILT virus.
Lane M: 12.2kb ladder, lanes 1, 2, 3 and 4 represent each DNA fragment amplified using 4 different primer sets.

각각의 PCR product fragment를 pGEM-T vector(Promega, USA)와 *E. coli* DH5 α cell을 host cell로 하여 cloning 한 후 *Sph* I을 처리한 후 약 3.9kb와 3.6kb의 DNA band를 확인함으로써 PCR product가 삽입되어 있음을 확인하였다.

나. gB의 염기서열 분석

Fig. 9 에서 나타난 바와 같이 ILT virus glycoprotein B유전자의 크기는 2621(184-2803) bp였으며, 각 reference strain 사이의 상응하는 부위의 유전자의 homology는 Table 9에서 보는 바와 같이 본 시험에 공시된 N91B01 strain과 ILTV32, ILTV SA2, 및 ILTV Thorne strain간의 homology는 각각 99.5, 99.2, 99.5 % 로 매우 높은 homology를 나타내었다.

```

GAATTCGACCTCGACGGCCCGATTTTGGAAAAACGGGCTATATTTAACATTTGAAGAGGAA 60
CATCCATTAGTTGCAGTGTGGGGCTCGATGACCCGGGAACTGGGTCCAGCGTCTACT 120
ATCATAGTAGAGAAAAGATTTATACGGGTCCTGTATGCAATCCTACATCGCCGTGAACAT 180
TGACATGGCTAGCTTGAAAATGCTGATCTGCGTGTGCGTGGCAATCCTGATCCCATCTAC 240
CCTATCTCAAGATTACACCGGAATTGCTGGAATAATAGACCCCTCATGATACAGCCAGCAT 300
GGATGTTGAAAAAATCTTTTCTCCGAAGCCATTGGGTGCGGGGCACCGAAAGAACCCCA 360
GATTAGAAAACAGAATTTTTGCGTGTCTATCTCCAACGGCCAGTGTGCGAGGCTTGC 420
CCAGCCAGCATTTGTCACCGACATGCGGATTCGACTAACATGACTGAAGGAATGTCTGT 480
AGTCTTCAAGCAAAACATTGCCCCGTACGCTTTTAAATGTGACCCCTATACTATAAACATAT 540
AACCCAGTTACTACGTGGGCATTATTCTCAAGACCCCAATAACAATGAGTACGTGAC 600
CAGGGTTCCAATAGACTATCATGAAATGTTAGGATTGATCGATCGGGAATGCTCATC 660
CAAAGCAACGTATCATAAAATTTTATGTTTGTGAGCTTACGACAATGATGAAGCAGA 720
AAAAAATTTGCCCTGGTTCATCACTGTTAAGATCAACTGTCTCCAAGGCGTTTCATAC 780
AACTAACTTTACTAAGCGACATCAAACCTGGGATACCGAACGTCTACATCGTGCAGT 840
TGTTGTGGGAATATCTACAGGCTAGATCTGTATACCCGTATGATTACTTTGGAATGGCGAC 900
AGGTGATACAGTAGAAAATTTCTCTTTTATACAAAAACAGCCGGACCAAGGCGTCA 960
CAGTGTCTACAGAGACTATAGATTTCTCGAAATCGAAAATATCAAGTCAGGGAATTTGGA 1020
AACCGGACAAAATAGACCCCTAAAAAAGAAAATTTCTAACAGATGAACAATTCACATAT 1080
AGGCTGGGATGCAATGGAAAGAAAAGGAATCTGTATGTACTTCAGTAAATGGATTGAAGT 1140
CCCGAAGCAGTTCGTGTTTCGTACAAAAACAGTTACCCTTTTCACTTAAAGATATGAC 1200
TATGACGTTCTCGTCCGGAAAACAACCTTTTAAACATCAGCAGGCTTCATTTGGCTGAATG 1260
CGTCTCACCATAGCCTCGGAGGCCATAGATGGCATCTTTGCCAGAAAGTATAGTTTCGAC 1320
TCATGTCAGTCTTCTGGGGACATCGAATACTATCTCGGTAGTGGCGGATTTCTGATCGCACT 1380
TCAGAAACTCATGAGCCATGGCTTGGTGAATGTACCTAGAAGAGGCACAAAGACAAAA 1440
TCATCTCCAGAGAGGAGAGAGCGTCGCCAAGCCGAGTCCGCCGACCGCGCTCGCTGCA 1500
GTCTGGACCTCAGGTGATAGAATTACTACCCACAGTTCTGCAACATTTGCCATGTTACA 1560
ATTTGTAGACAAGTAAATGCTTCCGAGATCGAAGAAGTGAAGCATTTCACACTTGAA 1620
GTGGTGTGAGCTTCAGAACCCCACTGATTGTATGGCAGAGATGAAGAACTAAACCC 1680
GAACTCACTGATGACATCTTTGTTCCGACAACCTGAAGCGCCAGGCTATTGGGAGACAT 1740
CGTAGCGGTATCAAAATGTATAGAAATTTCAATCGAAAATATTAGGATGCAGGATTCAT 1800
GGCGTGGCAGGGGACCAACCATGTGCTATACCAGACAGTACTTATTTTCAGGTATTC 1860
GTCCTCCCTGAGTACAGTTTTCTGCGAACTCAACAGAAAACCAATCTTGACATATT 1920
AGGCCAACTCGGAGAACATAATGAAATTTTACAAGGGCGGAATTTGATAGAACCATGCAT 1980
GATCAATCACAGACGGTACTTTCTGTTGGGAGAAAACTACCTCTTTTACGAAGACTATAC 2040
ATTTGTAGACAAGTAAATGCTTCCGAGATCGAAGAAGTGAAGCATTTCACACTTGAA 2100
CGCCACTATACTAGAAGATTTGGACTTTGTGCCCGTCAAGTATACACTCGCGAGGAACT 2160
CAGAGATACTGGGACTTTAACTATGATGATGTGGTCAGATATCAAAATATTATAACAA 2220
AAGGTTCAAGACATTGACACTGTAATACGTGGAGATAGGGGAGATGCAATCTTTAGAGC 2280
AATAGCAGATTTTTTTGGCAACACTCTTGGAGAAGTAGGAAAGGCATTGGGAACGTAGT 2340
GATGACAGCCGCGCAGCAGTAATTTCTACAGTATCTGGCATCGCCTCATTCTTTCTAA 2400
CCCCTTCGCCGCACTCGGAATTGGGATAGCGGTGGTGGTGCATTTTATAGGACTGCT 2460
GGCGTTCAAAATATGTAATGAACCTGAAATCAAACCCAGTTACAGTTCTGTTCCAGGCGC 2520
AGTTCCCCCGGCGGAACCTCCTCCAGACCTCTAGACGTTACNACAAGGATGAGGAGGA 2580
GGTTGAGGAGGATAGTGATGAGGACGACAGGATACTTGCCACCAGAGTTCTGAAAGGCT 2640
TGAGCTTCTACACAAGGATGAACAGAAAAGTCGAAGACAGAAAGCGGTTTTCTGCTTT 2700
TGCTAAAAATATGAGAAACCTATTTCGCAGAAAACCCGAAACCAAGGAAGTACTACC 2760
CCTGCTCGAATAACCTTCGTGGCAGAAGAAGCGAAGACGAATTAAGTTTAAATGCAGTT 2820
TATTTAATAAAAATGACATTACTATTACATGACTCAGTCTGCCATCATTTCGCAGAAATGC 2880
GGCTGCTCTTTCTTTCTTTCAATTTTGTCTGAGCATCTTTCAGTCTTTTGGCATAGA 2940
AGCGTCGACTGTCTCCGAGCAGACTCTTGATTACTATTTTCTAGTTCCTCTTTTCTCTC 3000
TGAAGACGAATCGGCATTTGGAAGCTATTTAAGA 3033

```

Fig. 9. The nucleotide sequence of ILT virus glycoprotein B gene. The underlined sequences, ATG(nucleotide position 185)and TAA (nucleotide position 2805) indicate start- and stop codon.

Table 9. Nucleotide sequence homology of ILT virus glycoprotein B gene between N91B01 and reference strains

	1	2	3	4		
1	██████	99.5	99.1	100.0	1	1: ILTV632
2	0.3	██████	99.2	99.5	2	2: N91B01
3	0.2	0.2	██████	99.1	3	3: SA2
4	0.0	0.3	0.2	██████	4	4: Thorne
	1	2	3	4		

9) Recombinant plasmid DNA pCI-neg-gB의 안전성 험 및 효능시험

30개의 18일령의 SPF egg embryo를 10개씩 3개 group로 나누고 22GX1 1/4" 주사 needle로 주사바늘 끝까지 들어가도록 기공표면에 만든 hole을 통하여 1군에는 각 부화 계란 당 pCI-neo vector DNA 100ug/100ul 접종하고, 2군에는 pCI-neo-gB plasmid DNA 100ug(total volume 100ul)을 접종하였으며 그리고 3군에는 PBS 100ul를 접종한 후 부화율, 10일 간 생존율, 성장성을 조사한 결과 pCI-neg-gB plasmid DNA 와 pCI-neg plasmid vector접종 group는 PBS 접종 군과 부화율, 부화 후 10일간 생존율 및 성장 등에도 차이를 발견할 수 없었다(Table 10).

10) ILT virus gB 재조합 유전자백신의 계태아 접종시험

가. 중화항체가 측정

아래 Table 11에서 보는 바와 같이 각 군별 6개의 계란에 ILT DNA vaccine을 접종하여 접종 후 4주, 5주, 6주에 채혈하여 바이러스 중화항체 시험을 실시한 결과 모든 실험군의 병아리에서 인정할 만한 ILT virus에 대한 중화항체가 발견되지 않았다.

Table 10. The results of animal test using recombinant gene in the 18-day old embryonating eggs.

Plamid DNAs	No. of Eggs inoculated	No. of Eggs hatched(%)	Live chickens at 10-day old(%)
PBS control	10	10(100)	10(100)
pCI-neg plasmid vector	10	10(100)	10(100)
pCI-neg-gB plasmid DNA	10	10(100)	10(100)

Table 11. The results of animal test using recombinant DNA vaccine in the 18-day old egg embryos

Recombinant DNA	No. of Eggs	No. of Eggs hatched	Live chickens at 10-day old	SN titers by weeks		
				4	5	6
pCI-neo vector DNA, Circular DNA	6	6	6	<1: 4	<1: 4	<1: 4
pCI-n대-gB DNA, Circular DNA	6	6	6	<1: 4	<1: 4	<1: 4
pCI-neo-gB DNA, Linear DNA	6	6	6	<1: 4	<1: 4	<1: 4
pCI-neo-gB DNA, Linear DNA+ Lipofectin	6	6	5	<1: 4	<1: 4	<1: 4
PBS control	6	6	6	<1: 4	<1: 4	<1: 4

나. Plaque reduction neutralization test

위에서 SN titer로 면역의 효과를 측정할 수 없었기 때문에 이를 정량화하기 위하여 plaque reduction neutralization test를 실시한 결과 아래 Table 11과 같다. Plaque reduction neutralization test의 표본은 Fig. 10에 나타나 있다.

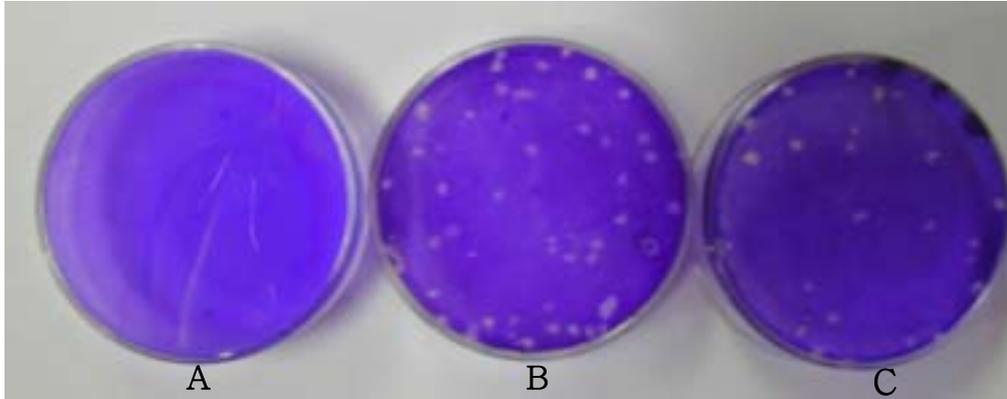


Fig. 10. An example fo plaque reduction neutralization test. Panel A, B, and C represent a normal cell monolayer, virus control and ILT antibody positive reference serum, respectively. More than 50% plaque reduction was seen on panel C cell monolayer.

Table 12. Plaque reduction neutralization test of chicken which were inoculated with recombinant DNA vaccine.

Recombinant plasmid DNA	Number of Plaque
pCI-neo vector DNA,Circular DNA	41~45
pCI-neo-gB DNA, Circular DNA	26~32
pCI-neo-gB DNA, Linear DNA	16~27
pCI-neo-gB DNA, Linear DNA+ Lipofectin	21~34
ILT antibody positive reference serum	25
PBS control	40~45
Virus control	50

위의 Table 12에서 보는 바와 같이 무처리 virus control에서는 약 50개의 plaque가 관찰되었으며 PBS 접종 군과 pCI-neo vector DNA를 접종한 군에서는 최저 41개에서 최고 45개의 plaque가 관찰되었다. 그 외 DNA 백신 접종군에서는 DNA 백신의 형태, 즉 circular, linear 혹은 DNA를 세포내로 전달하는 물질인 Lipopectin의 사용유무에 관계없이 최고 60%의 plaque 수 감소에서 최저 35%의 감소가 관찰되어 SN test에는 인지할 만한 항체의 검출이 불가능 하였으나 plaque test에서는 유의성 있는 결과를 얻을 수 있었다. 일반적으로 50%의 plaque reduction이 있을 경우 항체는 항원에 대하여 특이성이 높은 것으로 여겨진다. 본 시험에서 혈청 희석배수는 1:16이었다.

2-3. 결 론

전염성 후두 기관지염 바이러스(laryngotracheitis (ILT virus)는 닭의 기관지에 감염되어 높은 폐사와 계란생산의 감소로 인하여 양계산업에 많은 손실을 주는 질병이다. ILT의 증상은 호흡곤란, gasping, 혈액섞인 점액 분비 등의 특이 증상을 보인다. 이러한 치명적인 닭 질병 ILT예방을 위한 백신 개발 전략으로 - 기존의 강독 바이러스를 cell culture 계대배양을 통한 attenuated live virus 생산, - 화학약품, 다가 항체, 단클론 항체 등을 이용한 병원성 제거, - 특정 중화항체 유발 유전자를 이용한 DNA vaccine 생산 등 3가지를 선택하여 동시에 수행하였다.

본 연구에서 강병원성 ILT virus를 순화시키는 방법으로 계란에서 계대배양하는 대신 LMH cell 계대배양 법을 선택한 것은 이미 밝혀진 바와 같이 계란 계대배양에 의하여 약독화된 ILT virus는 접종 후 계군에서 전파되어 쉽게 병원성을 재 획득하는 반면 조직 배양에 의하여 순화된 바이러스는 병원성 재획득이 잘 일어나지 않기 때문이다. 이러한 바이러스 병원성 순화 목적을 달성하기 위하여 강 병원성 바이러스를 LMH cell에 계대배양을 시도한 결과 성공적으로 adaption시킬 수 있었으며 LMH cell 연속 계대배양을 통하여 181대 까지 배양하였으며 LD₅₀ 값 산출을 통하여 병원성이 많이 감소됨을 알 수 있었으나 100% 병원성이 감소된 것은 아니다. 따라서 계속 계대배양을 수행하여 virus 배양액 원액을 희석 없이 접종할 경우에도 계태아의 폐사가 없는 완전한 병원성 제거가 필요하다고 생각된다. 본 연구에서 ILT virus의 병원성이 현재 까지 완전히 제거되지 못한 것은 DNA virus는 대체로 RNA virus에 비하여 계대배양에 의한 유전자의 변이가 잘 일어나지 않기 때문으로 생각된다.

화학약품인 EMS 처리 항원, 다가 항체처리 항원 또는 단클론 항체 처리로 병원성의 감소는 확인 되었으나 접종된 병아리에서 항체 생산이 매우 미약하였다. 이는 처리된 항원이 접종 후에 계태아에서 효과적으로 증식이 되지 못하여 면역 반응에 필요한 항원이 충분하지 못하였기 때문으로 생각된다.

Attenuated ILT virus의 계태아 접종 시험에서는 $1 \times 10^{1.25} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ml}$ 의 바이러스를 함유하는 배양액 계란 한개 당 100ul 씩 접종하였을 때 부화율, 부화후 10일 간 생존율이 PBS group와 유사하였다. 또한 면역원성 시험에서도 접종 후 4주, 5주, 6주, 및 7주에서 SN 값이 각각 1:2~1:64, 1:2~1:64, 1:2~1:32, 1:2~1:32 으로 다소 낮은 항체가를 보였다. 이는 2 주 미만의 병아리는 ILT virus의 접종에 대하여 2주이상의 병아리보다 면역반응이 매우 낮다는 사실 때문이다. 또한 hepes virus의 방어 기전은 단순한 humoral antibody에 의한 것보다는 local cell mediated immune response에 의존하는 것으로 알려져 있기 때문에 비록 본 시험에서 비록 다소 낮은 humoral antibody response가 나왔지만 ILT 감염 방어에는 문제가 없을 것으로 생각된다.

DNA 백신을 생산하기 위하여 pCI-neo-vector에 ILT gB gene을 PCR 기법으로 증폭하여 삽입하였으며 18일령 계태아 접종시험에서 안전성이 매우 높음을 알 수 있었다. SN test에서는 인식할 만한 항체는 생성되지 않았으나 plaque reduction neutralization test에서는 대조군과 비교할 때 전반적으로 50% plaque 감소 효과가 있었으며 circular DNA, linear DNA, 또는 lipofection 첨가군 사이에 특이할 만한 면역원성의 차이는 없었다. 그러나 DNA 백신의 생산 비용을 생각할 때 ILT 백신은 attenuated live virus vaccine가 유일한 선택이 될 것이다.

제 3 절 전염성기관지염에 대한 in ovo vaccination용 항원 개발에 관한 연구

3-1. 재료 및 방법

1) 공시 바이러스 및 계대배양 약독화

전염성기관지염바이러스(IBV) 생독백신주(IBV-V: Mass. Type Live vaccine, Fort Dodge Animal Health, Iowa USA, U. S. Veterinary License No. 112)와 국내 분리주 IBV-KM91주를 공시하였다. 바이러스의 배양은 chicken embryo kidney cell 과 부화계란 접종법을 이용하여 실시하였다. 백신주 인 IBV-V와 분리주 IBV-KM91를 각각 10일령 부화계란의 뇨막강내 접종 방법으로 5회 계대하여 부화계란에 적응시킨 후 계태아신장세포에서 31대까지 계대배양하였다.

2) IBV의 β -propiolactone 처리에 의한 약독화

계태아신장세포에 20대 계대 배양된 10^7 EID₅₀/ml 역가의 IBV-V주와 IBV-KM91를 0.2% β -propiolactone (Sigma)과 동량으로 혼합하여 25 °C에서 3시간 처리하고 난 후 인산완충염수(PBS, pH 7.2)에 대해 투석한 후 계태아신장세포 또는 10일령의 부화계란에 접종하고 바이러스의 불활화를 확인하였다.

3) IBV의 다가항체 및 단클론성 항체 생산

가) 실험동물

전염성기관지염 바이러스에 대한 다가항체를 얻기 위해서는 환경제어장치(Environmental control system, 명진공업)에서 사육하였던 백신을 접종하지 않은 병아리군을 공시하였고, 단클론성 항체 생산을 위해서는 SPF Balb/c 마우스를 공시하였다.

나) 다가항체 생산

환경제어장치내에서 사육중인 병아리 10수를 선별하고 10^7 EID₅₀/ml 역가의 IBV-V주를 1일령 (점비, 점안), 12일령 (근육) 및 28일령 (점비, 점안)에 각각 접종하였다. 12일령에는 oil emulsion adjuvants를 가한 항원을 투여하였다. 혈청항체가 의 상승 여부를 확인하고자 항원접종하기 직전에 소량의 혈액을 채취하고 혈청을 분리한 다음, 56 °C에 30분간 비동화시켜 각각의 혈중항체를 측정하였다. 최종 접종한 후 7일째에 채혈하고, 혈청을 분리하여 IBV에 대한 다가항체로 하였으며, 혈중항체는 ELISA와 HI test를 이용하여 측정하였다.

다) 단클론성 항체 및 isotyping

10^7 EID50/ml 역가의 IBV-V주를 일주일 간격으로 Balb/c 마우스의 복강내에 2회, 정맥내에 1회 주사하여 면역시켰다. 최종 면역 후 3일에 마우스 비장을 적출, 유리세포를 얻은 다음 50 % polyethylene glycol 4000 (Gibco) 존재하에서 9×10^7 세포를 3×10^7 P3/NS-1/1-Ag-4-1 골수종세포와 체세포 융합을 실시하였고, 96 well plate에 각 well당 1×10^6 세포를 분주하고 hypoxanthine-aminopterin-thymidine(HAT, Gibco)을 첨가한 15 % FCS-RPMI 배지로 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다. 그 후 자라난 hybridoma는 indirect ELISA법으로 항원으로 사용된 IBV-V주에 대한 항체생산 여부를 검색하였고, 항체생성이 확인된 hybridoma는 limiting dilution 방법으로 recloning하였다.

Recloning한 hybridoma cell로부터 고역가의 항체를 얻기 위하여, hybridoma cell을 pristane (2, 6, 10, 14-tetra-methyl-pentadecane)으로 전처리한 Balb/c 마우스의 복강내에 주사하였고 고농도의 항체가 존재하는 복수를 얻었으며, mouse monoclonal antibody isotyping kit (ImmunoType™ Stock No. ISO-1, Sigma)를 사용하여 마우스 복수에서 얻은 단클론성항체의 isotype을 결정하였다.

4) ELISA

가검혈청내의 항체가는 시판중인 ELISA kit (ProFLOK IB, ND ELISA kit; Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD)를 이용하여 kit의 방법에 준하여 검사하였다. 요약하면, 먼저 희석용 plate (96 well)을 준비하여 각 well에 가검혈청 6 μ l를 넣어 희석용액 300 μ l로 희석하고, eppendorf tube에 표준음성혈청 및 표준양성혈청을 동일하게 희석하였다. 그 후, IBV항원이 코팅된 ELISA plate의 각 well에 희석용액 50 μ l를 첨가하고, 전술한 바와 같이 희석한 가검혈청 50 μ l와 표준양성혈청 (A1, A3, H11 well), 표준음성혈청 (A2, H10, H12 well)을 동량 분주한 다음 30분간 상온에서 반응시켰다. 그 후, 각 well의 반응액을 제거하고, 세척용액으로 3회 세척한 후, peroxidase conjugated anti-chicken Ig G (H+L, 1:100 dilution) 100 μ l를 각 well에 첨가하여, 상온에서 30분간 반응시켰다. 다시 세척용액으로 3회 세척하고, ABTS-hydrogen peroxidase substrate solution 100 μ l를 첨가하여 15분간 발색시킨 후, 4N H₂SO₄ 100 μ l를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 발색정도는 ELISA reader (SpectraMax Pro, Molecular Device, Sunnyvale, CA)를 이용하여 405 nm에서 Optical density (OD)값을 측정하였다.

5) Haemagglutination inhibition (HI) test

IBV에 대한 HI항체가 측정은 기존의 술식에 따라 수행하였다. IBV에 대한 가검혈

청의 HI 항체는 V-bottomed microplate (96 well)에서 phospholipase C로 전처리 된 항원 4 HA units와 1% 닭적혈구 부유액을 이용하여 측정하였다. 이때 가검혈청 (0.1 ml)은 12.5% kaolin현탁액 (0.3 ml)으로 전처리 (혈청희석 1:4)한 후 0.025 ml 가하고 Herpes buffer solution (pH 6.5)으로 2배 계단희석하였고, 여기에 4 HA unit로 희석한 항원을 동량 (0.025 ml) 가하여 혼합한 다음 실온에서 60분간 감작시켰다. 여기에 1% 닭 적혈구 부유액 (0.025 ml)을 첨가-혼합하고 30-60분간 정치한 후에 판독하였다.

6) IBV에 대한 다가 항체 및 단클론성 항체 처리

2×10^7 EID₅₀/ml가 되도록 조정된 IBV와 다가 면역혈청 (HI titer: 128) 또는 단클론성 항체 (ELISA titer: 1,024)를 1:1로 혼합한 다음 37°C에서 2시간 정치한 후 부화계란에 접종하였다.

7) 약독화 바이러스의 in ovo 접종에 따른 안전성 및 면역원성

연속계대 약독화 IBV 또는 다가항체, 단클론성 항체 및 β -propiolactone을 처리하여 작제된 IBV항원 100 μ l를 18일령 SPF부화계란의 기공부위에 22-gauge 주사침 (2.5 cm)을 이용하여 바늘 끝까지 삽입하여 주입한 다음 부화기에 유지하면서 부화율, 폐사율, 부화 후 10일 간 생존율, 항체 생성 등을 측정하여 작제된 항원의 안전성 및 면역원성을 측정하였다.

8) 공시 바이러스 및 세포

국내 분리주 IBV-KM91주를 37°C에서 48시간동안 10일령 SPF 부화계란에서 120대 연속계대 배양하여 공시하였다. 계태아섬유아세포 (CEF)와 계태아신장세포 (CEK)는 각각 10일령과 18일령의 SPF 부화계란을 이용하여 5%-10% FCS를 가한 Medium 199와 HAM F-10 배지 (Gibco BRL)에 유지배양하며 사용하였다. 야생형 Baculovirus AcNPV (wAcNPV)와 재조합 Baculovirus AcNPV (rAc-KMp6S1)는 Sf21 세포에서 배양하여 공시하였다.

9) 공격접종용 IBV 및 booster용 백신

고병원성 IBV-KM91주를 10일령 SPF 부화계란에서 6대 연속계대 배양한 IBV-KM91p6주를 공격접종용 바이러스로 공시하였다. In ovo DNA vaccination에 따른 booster용 백신으로는 Intervet사의 live attenuated IB vaccine을 제조사의 설명서에 준하여 공시하였다.

10) 부화계란 및 실험동물

White Leghorn SPF 계군에서 유래한 계란을 38℃, 상대습도 60-70%의 부란기에 서 부화했으며, 이 후 환경제어장치 (Positive Pressure Isolator) 내에 사육하며 본 실험을 수행하였다.

11) IBV 중화항체 유도 S1 당단백 유전자 클로닝 및 발현벡터 구축

IBV에 대한 혈중 중화항체를 유도하는 것으로 밝혀진 S1 당단백 유전자를 클로닝 하여 핵산 염기서열의 분석, Baculovirus 발현벡터 구축 및 in ovo vaccination용 DNA plasmid를 구축하기 위하여 공시한 primer는 Table 1에 보인 바와 같다.

Table 1. Oligonucleotide PCR primer sequences for cloning and sequencing of the IBV-KM91p6 S1 gene, and for construction of the DNA plasmid expressing the IBV S1 glycoprotein

Primers*	Nucleotide sequence 5' to 3'	Sizes (bp)	Remarks
pCR-S1F	5'-CGGGATCCATGTCGGGGAAGTTACTG-3'	1,611	DNA sequencing
pCR-S1R	5'-CGGGATCCTTAACGTCTAAAACGACGTGT-3'		
pCI-S1F	5'-CCGCTCGAGCGGATGTCGGGGAAG-3'	1,611	DNA vaccine
pCI-S1R	5'-GGGTCGACTCACGTCTAAAACGACG-3'		
pTriEx-S1F	5'-GCGATATCCATGTCGGGGAAGTTA -3'	1,611	DNA vaccine
pTriEx-S1R	5'-GCAAGCTTCGAACGTCTAAAACGACG-3'		

**Bam*HI sites for pCR, *Xho*I and *Sa*I sites for pCI, and *Eco*RV and *Hind*III sites for pTriEx were added to the 5' end of each primer to facilitate cloning.

가) 고병원성 IBV S1 유전자 증폭 및 클로닝

상기 공격접종용 IBV-KM91p6 바이러스 stock으로부터 RNA 추출, cDNA 합성 및 PCR을 Table 1의 primer (pCR-S1F와 pCR-S1R)를 이용하여 일반법에 따라 수행하였다. 증폭된 S1 유전자 PCR 산물은 제조사의 protocol에 준하여 TA cloning kit의 pCRII Vector (Invitrogen)에 클로닝 하여 pCR-KMp6S1을 구축하고 JetStar midi kit (Genomed)로 정제하여, 이 후 염기서열 결정, 재조합 Baculovirus 제작을 위한 transfer vector 및 in ovo DNA vaccination용 plasmid 구축에 template DNA로서 공시하였다.

나) IBV S1 당단백 발현 Baculovirus transfer vector 구축

IBV-KM91p6 S1 당단백을 발현하는 재조합 Baculovirus의 제작을 위한 transfer vector는 pCR-KMp6S1을 *Bam*HI으로 소화하여 얻은 S1 유전자를 pVL1393 vector의 동일 위치에 클로닝하여 Fig. 1과 같이 pVL-KMp6S1을 구축하였다.

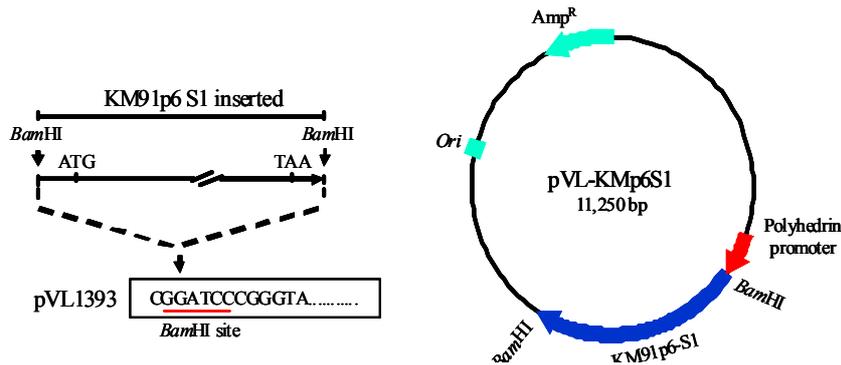


Fig 1. Schematic representation of the transfer vector plasmid pVL-KMp6S1 used to produce the recombinant baculovirus with the S1 gene of IBV strain KM91p6.

다) IBV S1 당단백 발현 DNA plasmid 구축

IBV S1 당단백을 발현하는 in ovo vaccination용 DNA plasmid를 구축하기 위하여, Fig. 2에 보인 바와 같이 pCI-neo (Promega) 또는 pTriEx-1.1 (Invitrogen) mammalian expression plasmid vector로 형질전환 된 *E. coli* XL1-Blue (Stratagen)를 ampicillin을 포함하는 LB배지에 배양하고, JetStar midi kit로 제조자의 설명에 따라 벡터 DNA를 준비하였다. pCI-neo 벡터는 제한효소 *Xho*I과 *Sa*I으로, pTriEx-1.1 벡터는 *Eco*RV와 *Hind*III로 각각 처리하여 S1 유전자의 클로닝에 이용하였다. IBV S1 유전자는 일반 PCR법에 따라 증폭하였다. 요약하면, template DNA로서 100ng pCR-KMp6S1에 0.5µl Ex Taq polymerase (2U/ul; TaKaRa), 4µl dNTP mix (2.5mM each), 1µl primers (50 pmole each), 5µl 10X PCR buffer, 36.5µl DW를 가하여 총 50µl로 조정하여, 94°C 5분간 pre-heating한 다음 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 90초를 35회 증폭시킨 후, 72°C에서 5분간 final extension을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 Wizard PCR Preps DNA Purification System(Promega)을 이용하여 정제하여 각각의 해당 제한효소 처리 및 agarose 겔

계통주를 작성하였다.

13) IBV-KM91p6 S1 당단백 발현 재조합 Baculovirus 제작

AcNPV DNA에 S1 유전자를 재조합시키기 위하여 BaculoGold-Linearized Baculovirus DNA (Pharming)와 pVL-KMp6S1 transfer DNA를 Lipofectamine Plus (Gibco BRL)를 이용하여 Sf21 세포에 cotransfection 시켰다(3-1-17항 참조). 연속 3회에 걸친 plaque purification을 통해 재조합 AcNPV 바이러스 stock을 Sf21 세포를 통해 확보하였으며, 이 재조합 Baculovirus (rAc-KMp6S1)는 IBV S1 당단백의 면역원성 시험에 공시하였다.

14) 재조합 Baculovirus S1 당단백의 검출 및 동정

rAc-KMp6S1과 wAcNPV를 Sf21 세포에 접종하여 26.8°C에서 48시간 동안 배양하여 PBS로 3회 세척한 후, IBV KM91주에 대한 hyperimmune sera와 형광항체 (FITC-conjugated goat anti-chicken immunoglobulin; Cappel)를 이용하여 형광항체분석을 수행하였다. 또한 IBV S1 당단백 특이 단클론성 항체 (JNU-IB-2002-1)를 이용하여 SDS-PAGE, Western blot 분석법을 통해 발현단백질의 성상을 확인하였다.

15) 재조합 S1 당단백의 면역원성 시험

Sonication 한 재조합 IBV S1 당단백을 발현하는 Sf21 세포와 β -propiolactone 처리에 의해 불활화 시킨 IBV-KM91p6을 각각 동량의 montanide incomplete sepic adjuvant (ISA-50)와 혼합하여 Table 2에 보인 바와 같이 재조합 IBV S1 당단백에 대한 면역원성 시험을 수행하였다.

16) 통계 및 유의성 검정

공격접종에 따른 방어면역 및 booster 효과의 유의성 검정은 one-tailed fisher's exact test로 분석하였다. wAcNPV로 면역한 그룹과 각각 비교하여 *P* value가 0.05 이하인 경우에 한하여 통계학적 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

Table 2. Immunization strategy of chickens with rAc-KMp6S1 and inactivated IBV-KM91p6 vaccines*

Immunogen	Route	Dose vaccinated (per chicken)		
		1st	2nd	3rd
Control	Intramucularly	Uninoculated	Uninoculated	Uninoculated
wAcNPV	Intramucularly	1 x 10 ⁷ cells	1 x 10 ⁷ cells	1 x 10 ⁷ cells
rAc-KMp6S1	Intramucularly	1 x 10 ⁷ cells	1 x 10 ⁷ cells	1 x 10 ⁷ cells
Inact. KM91p6	Intramucularly	1 x 10 ^{6.0} EID ₅₀	1 x 10 ^{6.0} EID ₅₀	1 x 10 ^{6.0} EID ₅₀
Attu. KM91p120	Intraocularly	1 x 10 ^{3.0} EID ₅₀	1 x 10 ^{3.0} EID ₅₀	1 x 10 ^{3.0} EID ₅₀
IBV-V**	Intraocularly	1 x 10 ^{3.0} EID ₅₀	1 x 10 ^{3.0} EID ₅₀	1 x 10 ^{3.0} EID ₅₀
KM91p6***	Intraocularly	Uninoculated	Uninoculated	Uninoculated

*The protective efficacy of the recombinant S1 glycoprotein was examined and compared with inactivated KM91p6 using 6-week-old chickens (Table 4, Experiment 1) and 9-week-old chickens pre-immunized at 6 weeks old with live IBVs (Table 4, Experiment 2).

**IBV-V: Masaa. type commercial live vaccine producing Fort Dodge Animal Health, USA

***Chickens for challenge were inoculated with 1 x 10^{4.5} EID₅₀ of KM91p6.

17) In ovo vaccination용 DNA plasmid의 IBV S1 당단백 발현유무 확인

약 50%~80% 정도의 단층상태로 형성된 CEF 세포에 pCI-KMp6S1과 pTriEx-KMp6S1의 IBV S1 당단백 발현유무를 Lipofectamine Plus Kit (GIBCO BRL)를 사용하여 transient transfection 분석법으로 확인하였다. 요약하면, 25µl의 Opti-MEM (Gibco BRL)을 분주해 둔 1.5ml effendorf tube에 600ng의 plasmid DNA와 4µl의 Plus reagent를 첨가하고 가볍게 혼합하여 15분간 실온에 방치했다. 다른 25µl의 Opti-MEM이 분주된 tube에는 1µl의 Lipofectamine을 첨가해 두었다가 15분 후에 두 tube의 반응액을 혼합하여 더욱이 실온에 15분간 반응시켰다. 이 반응시간동안 세포가 들어있는 well에 Opti-MEM을 넣어두고 여기에 반응시킨 DNA-Plus-Lipofectamine liposome을 적하 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 3시간 transfection 반응을 시킨 다음, 5% FCS가 첨가된 CEF용 배지를 첨가하고 약 40-48시간 배양 후에 IBV S1 특이 단크론항체를 이용해 제조사의 protocol에 준해 ABC 염색 (Vector Inc.)을 실시하였다.

18) IBV S1 당단백 발현 DNA의 in ovo vaccination

Table 3에 보인 바와 같이 in ovo vaccination을 18일령의 SPF 부화계란에 실시하였다. 요약하면, 부화 18일령 썬의 계란을 검란하여, 발육중의 84개를 무작위로 12개 그룹(7개/그룹)으로 나누어 계태아 두부를 확인 후, 45 정도 돌려서 가능한 혈관 분포가 적은 쪽의 기실부위에 선을 긋고, 선 위로 약 3mm 부위에 표시를 해두었다. 기실부위를 70% 알코올 소독면으로 2-3회 닦아내고 allantoic cavity용 egg punch로 표시된 부위에 구멍을 뚫어 접종부위를 만들었다. 1 μ g/ μ l의 TE buffer로 조정된 DNA는 23G needle을 끼운 1ml syringe를 이용해 취한 후, 약 45 각도로 기울여 needle의 2/3 정도가 들어가게 삽입한 후 0.2ml씩 allantoic sac에 접종했다. 접종부위를 paraffin으로 밀봉하여 38 $^{\circ}$ C의 부란기에서 약 72시간 정제 부화시키며 부화된 병아리는 따로 분리된 장소에서 사육했다. 세포에 의해 DNA의 흡수를 증진시키는 것으로 알려진 SuperFect (Qiagen)가 in ovo DNA vaccination에 미치는 효과를 조사하기 위하여 6, 7, 11, 12 그룹 DNA 조정액에 각각 1.0 mg/ml 되게 첨가해 주었다. 또한, in ovo DNA vaccination 후, 현행 IB 백신의 booster 효과를 조사하기 위해, 2, 5, 7, 10, 12 그룹의 7일령 병아리에는 live attenuated IBV vaccine (Intervet)으로 제조사의 사용법에 준해 2차 백신을 실시하였다.

19) 혈청학적 검사 및 판정

In ovo DNA vaccination에 따른 항체형성의 변동추이를 확인하기 위해, 혈구응집 저지시험 (hemagglutination inhibition test; HI), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), 바이러스 중화시험 (virus neutralization test; VN) 및 간접형광항체 분석법 (indirect immunofluorescence assay; IFA)을 이용해 부화 후 1, 2 및 3주령 병아리의 혈청을 분석하였다. 각 주령별 및 그룹별 경정맥으로부터 채혈한 혈액은 실온에 3시간 방치 후 3000rpm에서 10분간 원심분리 하여 혈청을 분리했으며, 모든 혈청시료는 56 $^{\circ}$ C에서 30분간 비동화 시켜 각 분석시험에 공시하였다. IBV에 대한 HI는 50 μ l의 혈청시료와 150 μ l의 12.5% kaolin (in HBS buffer) 현탁액을 혼합하여 실온에 1시간 방치한 후 3000rpm에서 10분간 원심분리 한 상층액을 일반법 (microtiter method)에 따라 분석하였고, ELISA은 IBV 항체측정용 ELISA Kit (Flockcheck; IDEXX Laboratories)를 사용하여 제조사의 protocol에 준해 수행하였다. ELISA 역가에 대한 분석은 1:500으로 희석한 혈청시료의 IBV 항원에 대한 반응 정도로서 xCheck Assay Management System (IDEXX Laboratories)을 이용하여 수행하였다. IFA는 아세톤 고정 항원에 균일하게 희석한 혈청시료의 반응결과를 형광

Table 3. Experimental procedure for in ovo vaccination with the DNA plasmid harboring the IBV-KM91p6 S1 gene

Group	In ovo vaccine*	SuperFect supplemented**	Secondary IBV vaccination***	No. of SPF eggs vaccinated
1	TE buffer	No	No	7
2	TE buffer	No	Yes	7
3	pCI-neo	No	No	7
4	pCI-KMp6S1	No	No	7
5	pCI-KMp6S1	No	Yes	7
6	pCI-KMp6S1	Yes	No	7
7	pCI-KMp6S1	Yes	Yes	7
8	pTriEx-1.1	No	No	7
9	pTriEx-KMp6S1	No	No	7
10	pTriEx-KMp6S1	No	Yes	7
11	pTriEx-KMp6S1	Yes	No	7
12	pTriEx-KMp6S1	Yes	Yes	7

*Embryonating eggs were inoculated on the 18th day of embryonation with 0.2 ml (1.0 µg/µl) each of the DNA plasmid in groups 3 to 12, and sterile TE buffer in groups 1 and 2.

**Embryos in groups 6, 7, 11, and 12 received 200 µg DNA plasmid mixed with 1.0 mg/ml of an activated dendrimer molecule (SuperFect; Qiagen) that promotes uptake of DNA by eukaryotic cells.

***At 1 week of age, chicks in groups 2, 5, 7, 10, and 12 were given a secondary vaccination with commercial live attenuated IBV vaccine (Intervet).

항체 (FITC-conjugated goat anti-chicken immunoglobulin; Cappel) 반응 및 검경을 통해 수행하였다. 바이러스 중화시험(VN)은 단층상태의 CEK 세포에 37°C에서 1 시간 동안 2배수 단계희석 한 혈청시료와 IBV (200 TCID₅₀)를 반응시킨 혈청-바이러스 혼합액을 접종하여 배양하며 IBV 특이 세포변성효과의 형성유무로 본 혈청시료에 의한 바이러스 중화항체를 Karber 공식을 응용하여 측정하였다.

3-2. 결 과

1) IB virus의 부화계란에 대한 병원성

약독화 처리된 stock IBV-V주 및 IBV-KM91주를 각각 10개의 10일령 발육란의 노막강내에 0.2ml씩 접종하여 부화하면서 IBV의 특이 병변과 바이러스 증식능을 관찰하였다. 부화란은 매일 2회 검란하여 태아의 이상 상태와 생사를 확인하였다. 접종 후 2일부터 IBV-V주는 20% 그리고 IBV-KM91주는 40%에서 이상란(dwarfing 또는 curling)이 관찰되기 시작하여 4일째는 모두 폐사하였으며 대조군에서는 폐사례가 관찰되지 않았다(Table 4).

Table 4. Pathogenicity of the candidated IB viruses in the developing chick embryos

Groups	Days after virus inoculation					Embryo mortality%
	1	2	3	4	5	
IBV-V	0/10*	2/10	6/10	10/10	10/10	100.0
IBV-KM91	0/10	4/10	8/10	10/10	10/10	100.0
PBS control	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0.0

* Cumulative No. of death or abnormality (dwarfing & curling) / No. of eggs inoculated

2) 공시바이러스 의 계대배양 약독화

부화계란 접종법에 의해 병원성이 확인된 IB virus를 약독화시키기 위하여 부화계란에서 5대 계대시킨 다음 계태아 신장세포에서 31대까지 약독 순화 계대 배양하였다. In ovo 접종에서 부화율과 생존율을 시험하기 위해 계태아 신장세포에서 10대 및 20대 계대배양한 10^5 EID₅₀/ml 역가의 IBV-V (10th 또는 20th)와 IBV-KM91 (10th 또는 20th) 100 μ l씩을 18일령의 부화계란 각각 10개에 in ovo 접종한 결과 IBV-V (10th)는 10%, IBV-V (20th)는 30%, 그리고 IBV-KM91 (10th)는 0%, IBV-KM91 (20th)는 10%의 부화율을 나타냈으며, 계태아 폐사율은 IBV-V (10th)는 90%, IBV-V (20th)는 70%, 그리고 IBV-KM91 (10th)는 100%, IBV-KM91 (20th)는 90%로 나타났고, 대조군에서는 90%의 부화율과 10%의 폐사율을 나타냈다. IB 바이러스 접종군에서 부화된 병아리의 10일간 생존율은 모두 0% 이었고, 대조군에서는 모두 생존하였다(Table 5).

따라서 IBV-V (20th)와 IBV-KM91 (20th)는 stock virus 및 IBV-V (10th)와 IBV-KM91 (10th)에 비해 약독화 순화되었으나 다소 병원성이 있음을 알 수 있었다.

Table 5. Hatchability of the embryonated eggs inoculated IB virus at various passage levels

Groups	Hatchability* (%)	Embryo mortality (%)	Survival of hatched chickens** (%)
IBV-V (10th)	1 / 10 (10)	90	0/1 (0)
IBV-VKM91 (10th)	0 / 10 (0)	100	-
IBV-V (20th)	3 / 10 (30)	70	0/3 (0)
IBV-VKM91 (20th)	1 / 10 (10)	90	0/1 (0)
PBS control	9 / 10 (90)	10	9/9 (100)

* No. of eggs hatched/No. eggs inoculated at 18 days-embryonation

** 10 days survivals

3) β -propiolactone 처리한 IBV의 안전성

계태아 신장세포에서 20대 계대배양한 10^5 EID₅₀/ml역가의 IBV-V (20th)와 IBV-KM91 (20th)를 β -propiolactone으로 처리하여 불활화한 후 항원 100 μ l씩을 18 일령의 부화계란 15개에 각각 in ovo 접종한 결과 IBV-V (20th)는 74.4%, IBV-KM91 (20th)는 86.7%의 부화율을 나타내었으며, 계태아 폐사율은 IBV-V (20th)는 25.6%, IBV-KM91 (20th)는 13.3%이었으며 대조군은 6.7%이었다. 부화된 병아리의 10일간 생존율은 각각 72.7%, 76.9% 및 92.8%로 나타났다 (Table 6).

이 시험에서 β -propiolactone으로 처리하여 불활화한 IBV-V(20th)와 IBV-KM91(20th)는 in ovo 접종에서 병원성이 거의 없음을 알 수 있었다,

Table 6. Hatchability of the embryonated eggs inoculated IB virus treated with β -propiolactone

Viruses treated with β -propiolactone	Hatchability* (%)	Embryo mortality (%)	Survival of hatched chickens** (%)
IBV-V (20th)	11 / 15 (74.4)	25.6	8/11 (72.7)
IBV-VKM91 (20th)	13 / 15 (86.7)	13.3	10/13 (76.9)
PBS control	14 / 15 (93.3)	6.7	13/14 (92.8)

* No. of eggs hatched / No. eggs inoculated at 18 days-embryonation

** 10 days survivals

4) IB virus 단클론성 항체 생산 및 성장

세포융합 실시 결과 30개의 hybridoma를 선정하였고, 간접ELISA법으로 항체생성 여부를 확인한 결과 14개의 hybridoma 배양액이 IBV-V주에 대해 양성 반응을 보였으며, 이중 ELISA titers (Log 2) 5~9의 양성반응을 보이고 특이성이 높은 3개 clones을 선택하여 recloning을 수행하였으며, isotyping을 한 결과 IgG1 1개와 IgG2a 2개로 확인되었다 (Table 7). 본 시험에서는 ELISA역가가 가장 높은 JNU-IB-2002-1을 선택하여 공시하였다.

Table 7. Monoclonal antibodies against IB virus

Clones	Isotypes	ELISA titers (Log 2)
JNU-IB-2002-1	IgG1	9
JNU-IB-2002-2	IgG2a	5
JNU-IB-2002-3	IgG2a	6

5) 다가 항체 및 단클론성 항체 처리된 IBV의 안전성 및 면역원성

작제된 단클론성 항체 JNU-IB-2002-1과 2×10^7 EID₅₀/ml가 되도록 조정된 IBV-V(20th) 및 IBV-KM91(20th)를 각각 혼합하여 37°C에 2시간 감작시킨 다음 18 일령의 부화계란 10개에 접종한 결과 IBV-V(20th)에 다가항체와 단클론성 항체를 처리한 군에서 부화율은 각각 80% 및 60%이었고 비처리 대조군은 40% 이었으며 부화된 병아리의 10일령째 혈청 HI 항체가는 $\leq 2 \sim 8$ 및 $4 \sim 8$ 로 나타났다. 한편, IBV-KM91(20th)에 다가항체와 단클론성 항체를 처리한 군에서 부화율은 각각 70% 및 50%로 나타났고 비처리 대조군은 60% 이었으며, 부화된 병아리의 10일령째 혈청 HI 항체가는 $\leq 2 \sim 16$ 및 $4 \sim 16$ 으로 나타났다 (Table 8). 이 시험 결과 단클론성 항체 처리된 IBV-V(20th) 및 IBV-KM91(20th)는 병원성이 유의하게 감소되었고 면역원성이 인정되었다.

Table 8. Effects of antibody treatment of IBV-V(20th) and IBV-KM91(20th) on hatchability and immunogenicity to 18-day chick embryo

Viruses*	Antisera treatment**	Inoculum	Hatchability(%)	HI titer at 10 days after
				hatching(rate of survivals)
IBV-V (20th)	Poly	0.1ml	8/10 ⁺ (80.0)	$\leq 2 \sim 8$ (7/8) ⁺⁺
	Mab	0.1ml	6/10 (60.0)	4 ~ 8 (3/6)
	Non-treated	0.1ml	2/5 (40.0)	NT (0/2)
IBV-KM91(20th)	Poly	0.1ml	7/10 (70.0)	$\leq 2 \sim 16$ (5/7)
	Mab	0.1ml	5/10 (50.0)	4 ~ 16 (4/5)
	Non-treated	0.1ml	3/5 (60.0)	NT (1/3)

* 2×10^7 EID₅₀/ml for antisera treatment and 10^7 EID₅₀/ml for non-treated control were used.

** Polyvalent antisera at HI titer of 128 and monoclonal antibody at ELISA titer of 1,024 were mixed with the viruses by equal volume.

+ No. of eggs hatched / No. inoculated

++ Rates of chickens surviving for 10 days

6) IBV-KM91p6 S1 유전자의 계통주 작성 및 병원성

IB in ovo vaccination용 항원을 확보하기 위하여 IBV-KM91주를 부화계란에서 연속 6대 계대한 KM91p6주로부터 S1 유전자를 pCRII 벡터에 클로닝하여 (Fig. 3), 핵산 염기서열 분석, 재조합 Baculovirus transfer vector 및 S1 당단백 발현 DNA plasmid 구축의 template DNA로 공시하였다. pCRII TA 클로닝벡터 내의 insert S1

유전자의 크기를 확인하기 위하여 정제한 pCR-KMp6S1 DNA를 *Bam*HI으로 잘라 확인한 결과, 예상대로 *Bam*HI으로 처리를 하지 않은 supercoiled DNA (Fig. 3-lane 3)의 크기보다 적은 약 1.6 kb의 S1 유전자 band와 3.9 kb의 pCRII 벡터 band를 확인할 수 있었다 (Fig. 3-lane 2).

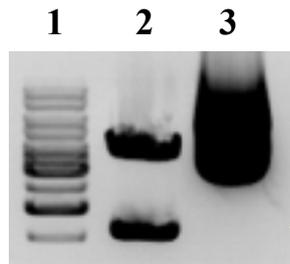


Fig. 3. Confirmation of the cloned S1 gene of IBV KM91p6 by digestion of the pCR-KMp6S1 DNA with *Bam*HI restriction endonuclease. Lane 1, commercial 1 kb DNA size markers; lane 2, pCR-KMp6S1 DNA digested with *Bam*HI; lane 3, supercoiled pCR-KMp6S1 DNA.

또한 pCR-KMp6S1 DNA에 대한 핵산 염기서열을 결정하여 기존에 국내에서 분리 보고 된 14종의 IBV S1 유전자와 외국에서 발표된 20종의 기존의 IBV S1 유전자와의 염기서열을 비교분석하여 계통수를 작성하였다. Fig. 4에 보인 바와 같이 IBV S1 유전자의 핵산 염기서열로 작성한 계통수를 분석한 결과, IBV 국내 분리주들 중 RB86주는 Massachusetts 그룹에 속하였으나 KM91p6을 비롯한 15종의 국내 분리주들은 외국에서 분리된 기존의 IBV와는 계통발생학적으로 상이한 두 개의 유전자 그룹 (Korean group 1, 2)으로 분류되었다. 그 중 국내에서 분리된 호흡기형 IBV들은 모두 Korean group 1에, 그리고 신장형 IBV들은 모두 Korean group 2에 속하는 IBV들로 확인되었다. 신장형으로 분류되는 국내 분리주 IBV KM91을 부화계란에서 6대 계대한 KM91p6주는 계대배양을 통해 소수의 염기치환에 의한 변이가 있는 것으로 확인되었으나, Table 9에 나타낸 바와 같이 닭에 대한 병원성에는 유의성이 관찰되지 않았다.

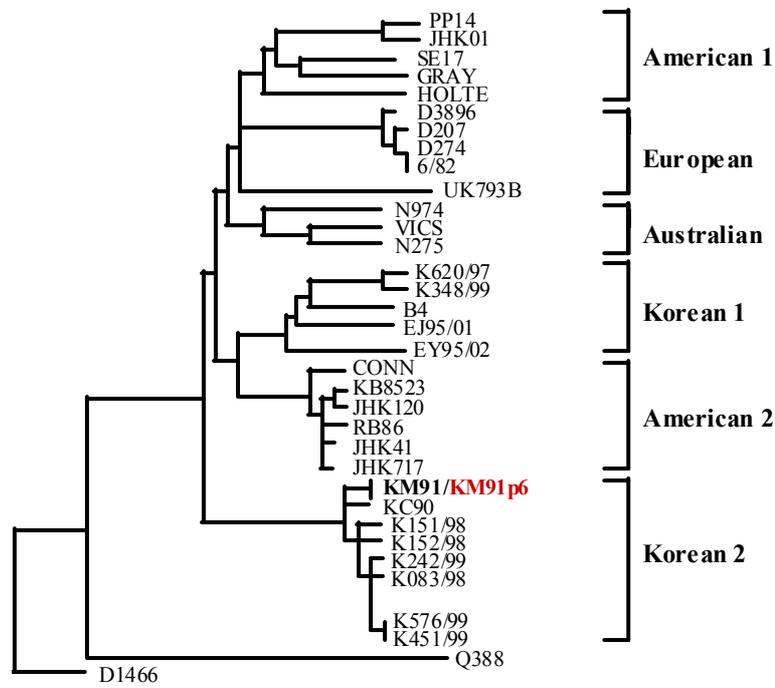


Fig. 4. Phylogenetic tree and genomic relatedness based on the nucleotide sequences of the S1 gene of KM91p6 compared with published sequences for 14 Korean strains and 20 other strains of IBV.

Table 9. Comparison of pathogenicity between KM91p6 and KM91 strains of IBV

Strain*	Chicks inoculated	Respiratory signs**	Nephritis*** and urate deposition	Mortality (%)	No. of chicks with positive virus isolation****				
					Trachea	Lung	Kidney	Cecal tonsil	Bursa of Fabricius
Control	10	-	-	0	0	0	0	0	0
KM91p6	10	++	+++	50	8	8	10	9	10
KM91	10	++	+++	50	7	8	10	10	10

*All 1-day-old chicks, except those in control group, were inoculated with a dose of $10^{4.5}$ EID₅₀.

**+++ : All chicks showed coughing with some dyspnea.

++ : Coughing more than 30% without dyspnea.

- : Coughing less than 30% without dyspnea.

***Examined dead chicks only (+++ : severe; - : mild).

****Chicks that died including the chicks alive at 2 weeks after challenge were used for virus recovery.

7) 재조합 Baculovirus S1 당단백의 발현 확인

IBV KM91주의 hyperimmune sera를 이용하여 rAc-KMp6S1을 접종한 Sf21 세포에서 재조합 S1 당단백의 발현여부와 발현부위를 IFA를 통하여 확인하였다 (Fig. 5). 그 결과, 아세톤으로 고정된 세포에서 강한 형광반응을 확인할 수 있었으며 (Fig. 5A), 생세포를 이용한 IFA에서는 주로 세포표면에서 강한 형광반응을 확인할 수 있었다 (Fig. 5B). 그러나 wAcNPV를 접종한 세포에서는 특이 형광반응을 보이고 있지 않아 본 시험에서 공시험한 IBV KM91주에 대한 hyperimmune sera의 특이성을 재차 확인할 수 있었다 (Fig. 5C). 이와 같은 결과는 IBV KM91주에 대한 항체와 반응한 재조합 Baculovirus S1 당단백은 rAc-KMp6S1 감염세포의 세포질 내뿐만 아니라 세포표면에서도 발현하고 있음을 보여주고 있다.

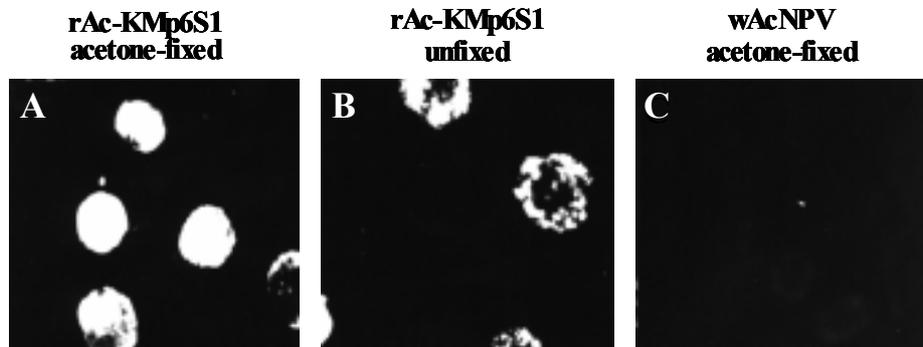


Fig. 5. Indirect immunofluorescence analyses of rAc-KMp6S1- or wAcNPV-infected cells. Acetone-fixed (panels A and C) or unfixed (panel B) infected Sf21 cells were reacted with anti-IBV KM91-specific hyperimmune sera as first antibody and with a fluorescence isothiocyanate-conjugated goat anti-chicken immunoglobulin as second antibody.

8) 재조합 Baculovirus S1 당단백의 검출 및 동정

실제적으로 rAc-KMp6S1 감염세포에서 발현하고 있는 재조합 S1 당단백이 IBV-KM91p6 감염세포에서 발현하고 있는 본 바이러스 유래의 S1 당단백질과 유사한 성상으로 발현하고 있는지의 여부를 확인하기 위하여 IBV KM91 S1 당단백 특이 단클론성 항체를 이용하여 Western blot 분석법을 통한 재조합 Baculovirus S1 당단백의 검출을 시도하였다. Fig. 6에 보인 바와 같이, 약 92 kDa의 재조합 Baculovirus S1 당단백 (Fig. 6-lane 3)이 검출되어 IBV-KM91p6 유래의 S1 당단백 (Fig. 6-lane 2)과 유사한 분자량의 당단백으로 발현하고 있음이 동정되었다. 그러나 wAcNPV 감염세포로부터는 어떠한 비특이 단백질도 검출되지 않았다 (Fig. 6-lane 4).

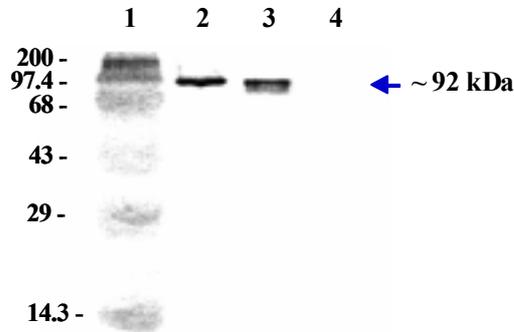


Fig. 6. Western blot analysis of the recombinant baculovirus S1 glycoprotein expressed by rAc-KMp6S1. Sf21 cells, infected with rAc-KMp6S1 or wAcNPV, and allantoic fluid from eggs infected with the KM91p6 strain of IBV, were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. The transferred cellular proteins were reacted with monoclonal antibody specific to strain KM91p6 S1 glycoprotein. Lane 1. molecular markers (kDa); lane 2, KM91p6-infected allantoic fluid; lane 3, rAc-KMp6S1-infected cells; lane 4, wAcNPV-infected cells. A band with an molecular size of approximately 92 kDa was detected in lanes 2 and 3. The positions of molecular size markers are indicated on the left.

9) 공격접종에 따른 재조합 Baculovirus S1 당단백의 방어면역능

IB에 대한 in ovo vaccination용 항원확보를 위한 선행시험으로서, IBV에 대한 중화항체를 유도하는 것으로 알려진 S1 당단백의 고병원성 IBV에 대한 방어면역 여부를 확인하기 위하여 재조합 Baculovirus S1 당단백을 이용한 면역원성 시험을 실시하여 Table 10와 같은 결과를 얻었다. rAc-KMp6S1으로 두 번 면역한 계군에서는 고병원성 KM91p6 공격접종에 따른 신장과 기관에 대한 유의성 있는 방어효과를 보이지 못하였다 ($P > 0.05$). 그러나 rAc-KMp6S1으로 세 번 면역한 계군에서는 신장에 대하여 50%의 방어효과가 유도되었다 ($P < 0.05$; Expt. 1, group 1). 한편, 불활화 KM91p6으로 두 번 면역한 계군에서는 신장에 대하여 50%의 방어효과가 인정되었고 ($P < 0.05$; Expt. 1, group 2), 세 번 면역한 계군에서는 대조군에 비하여 신장 ($P < 0.001$)과 기관 ($P < 0.05$)에 대하여 월등히 높은 방어효과가 인정되었다. 이러한 결과는 비록 rAc-KMp6S1이 불활화 KM91p6 바이러스 보다 방어효과는 떨어지지만 면역접종 횟수를 늘려주면 고병원성 KM91p6에 대한 방어면역이 유도될 수 있다는 것을 보여주고 있다. 또한 rAc-KMp6S1이나 불활화 MK91p6나 모두 기관에 대한 방어효과 보다 신장에 대한 방어효과가 분명히 뛰어나다는 점을 보여주고 있다. 이는 국내 IBV의 유행이 호흡기형 보다는 신장형이 주류를 이루며 문제가 되고 있다는 점

에 주목할 때 고무적인 결과로 사료된다.

한편, 현행 백신주로 사용되고 있는 IBV-V (Mass. type)로 선행면역하고 rAc-KMp6S1으로 한 번 booster 한 계군에 대한 고병원성 KM91p6 공격접종에서는 유의성 있는 방어효과를 볼 수 없었지만 ($P < 0.1$), 두 번 booster 한 계군에서는 신장에 대하여 83%의 우수한 booster 효과가 인정되었다 ($P < 0.05$; Expt. 2, group 1). 불활화 KM91p6의 booster 효과는 한 번만으로도 신장에 대하여 100%의 방어효과가 유도되었다 ($P < 0.05$). 더욱이, 불활화 KM91p6을 두 번 booster 면역할 경우에는 rAc-KMp6S1의 경우보다도 더욱이 강한 booster 효과가 신장 ($P < 0.01$)과 기관 ($P < 0.05$) 모두에서 관찰되었다 (Expt. 2, group 2). 이러한 결과는 IBV-V strain이 국내에 유행하는 KM91주와는 이종형이지만, rAc-KMp6S1과 불활화 KM91p6으로 booster를 할 경우 고병원성 KM91p6에 대한 방어효과를 보다 강화시킬 수 있다는 것을 나타내고 있다.

다른 한편, KM91을 부화계란에서 120대 연속 계대배양 한 live-KM91p120으로 선행면역하고 rAc-KMp6S1 또는 불활화 KM91p6의 추가면역에 따른 booster 효과 시험을 수행한 결과, 고병원성 KM91p6의 공격접종에 대하여 신장 및 기관에서 완벽한 방어효과를 나타내었으나, 대조군인 wAcNPV로 booster 했던 계군에서 조차도 비슷한 결과가 인정되어 live-KM91p120에 대한 booster 효과는 판단할 수 없었다 (Expt. 2, groups 4, 5 and 6).

위의 방어면역 시험결과를 종합해 볼 때, IB in ovo vaccination용 항원으로서 IBV의 주요면역원인 S1 당단백의 활용 및 응용이 기대되었다.

Table 10. Protective effects in chickens immunized with recombinant baculovirus S1 glycoprotein against challenge with the highly pathogenic KM91p6 strain of IBV using SPF chickens or live-IBV-primed chickens

Expt.	Group	Live IBV pre- immunized	Antigen immunized	No. of chickens from which the challenge virus was re-isolated/ No. of chickens challenged (% protected)					
				1st immunization		2nd immunization		3rd immunization	
				Kidney	Trachea	Kidney	Trachea	Kidney	Trachea
1	1	ND*	rAc-KMp6S1	ND	ND	4/7(43)	7/7(0)	4/8(50) ..	6/8(25)
	2	ND	Inactivated KM91p6	ND	ND	4/8(50)**	7/8(13)	1/8(88) ****	4/8(50) ..
	3	ND	wAcNPV	ND	ND	7/7(0)	7/7(0)	8/8(0)	8/8(0)
	4	ND	Control	ND	ND	8/8(0)	8/8(0)	8/8(0)	8/8(0)
2	1	IBV-V	rAc-KMp6S1	2/6(67)	4/6(33)	1/6(83)**	2/6(67)	ND	ND
	2	IBV-V	Inactivated KM91p6	0/6(100) ..	2/6(67)	0/6(100)* ..	1/6(83)**	ND	ND
	3	IBV-V	wAcNPV	4/6(33)	4/6(33)	5/6(17)	5/6(17)	ND	ND
	4	KM91p120	rAc-KMp6S1	0/6(100)	0/6(100)	0/6(100)	0/6(100)	ND	ND
	5	KM91p120	Inactivated KM91p6	0/6(100)	0/6(100)	0/6(100)	0/6(100)	ND	ND
	6	KM91p120	wAcNPV	0/6(100)	0/6(100)	0/6(100)	0/6(100)	ND	ND

*ND, Not done

** $P < 0.05$ by Fisher's exact test.

*** $P < 0.01$ by Fisher's exact test.

**** $P < 0.001$ by Fisher's exact test.

10) In ovo vaccination용 IBV-KM91p6 S1 당단백 발현 DNA plasmid 구축

Fig. 7에 보인 바와 같이 IBV-KM91p6 S1 당단백을 발현하는 in ovo vaccination용 DNA plasmid를 구축하기 위해, pCR-KMp6S1을 template DNA로 사용하여 PCR을 수행하였다. Table 1에 보인 pCI-S1F와 pCI-S1R (Fig. 7A-lane 2) 및 pTriEx-S1F와 pTriEx-S1R (Fig. 7A-lane 3) primer 쌍으로 PCR을 수행한 결과, 각각 예상크기의 약 1.6 kb의 IBV-KM91p6 S1 유전자의 증폭을 확인할 수 있었다. 더욱이 각각의 PCR 증폭 S1 유전자 DNA를 pCI-neo 벡터의 *XhoI*-*SaI* 부위 및 pTriEx-1.1 벡터의 *EcoRV*-*HindIII* 부위에 클로닝하기 위하여 동일 제한효소로 처리하여 클로닝 한 결과, pCI-KMp6S1 (Fig. 7B) 및 pTriEX-KMp6S1 (Fig. 7C) 발현 DNA plasmid를 구축할 수 있었다.

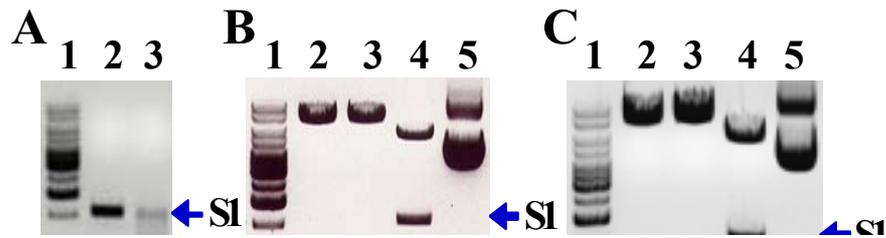


Fig. 7. Construction of two mammalian expression DNA plasmid harboring the S1 gene of IBV-KM91p6. Lane 1 of each panel was loaded a commercial 1 kb DNA ladder markers. Panel A shows the amplified S1 gene by PCR using primer pairs pCI-S1F and -S1R (lane 2) and pTriEx-S1F and S1R (lane 3). Panel B indicates digestion results of the pCI-KMp6S1 DNA with *XhoI* (lane 2), *SaI* (lane 3), and *XhoI* and *SaI* (lane 4), respectively. Panel C represents digestion results of the pTriEx-KMp6S1 DNA with *EcoRV* (lane 2), *HindIII* (lane 3), and *EcoRV* and *HindIII* (lane 4), respectively. Lane 5 of panels B and C show undigested supercoiled plasmid pCI-KMp6S1 or pTriEx-KMp6S1 DNA as a control.

11) In ovo vaccination용 DNA plasmid의 IBV S1 당단백 발현 확인

In ovo vaccination에 적용 전, 구축된 pCI-KMp6S1 DNA와 pTriEx-KMp6S1 DNA에 의한 S1 당단백의 발현유무를 in vitro 배양 세포에서 확인하기 위해 CEF 세

포에 각각 transfection한 후, 발현단백의 검출을 위하여 IBV-KM91 S1 당단백에 특이적인 단클론성 항체를 이용한 ABC 염색을 실시한 결과, 두 클로닝 벡터를 동시에 transfection 한 경우 (Fig. 8C)와는 대조적으로 pCI-KMp6S1 (Fig. 8A)만을, 또는 pTriEx-KMp6S1 (Fig. 8B)만을 transfection 한 세포에서 각각 IBV S1 당단백을 실제로 발현하고 있음을 확인할 수 있었다.

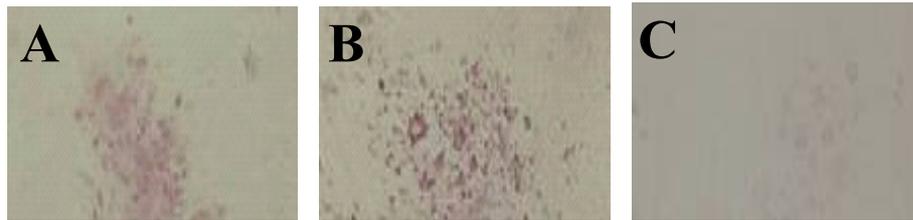


Fig. 8. Detection of IBV S1 glycoprotein in CEF cells transfected with pCI-KMp6S1 (panel A), pTriEx-KMp6S1 (panel B), and the cloning plasmid vectors pCI-neo and pTriEx-1.1, simultaneously (panel C). ABC stain was performed with anti-IBV S1 monoclonal antibody for specifically detection of the expressed S1 glycoprotein as pinkish-dark blue colors.

12) pCI-KMp6S1과 pTriEx-KMp6S1의 in ovo DNA vaccination 결과

18일령의 부화계란 (7개/그룹)에 in ovo DNA vaccination을 실시한 결과, Table 11과 같이 전 그룹이 평균적으로 약 70% 이상의 부화율을 보여, 12번 그룹을 제외한 전 그룹에 최소한 5마리 이상의 동일 실험개체를 둘 수 있었다. 또한 부화 후 2-3주 사이에 사고사로 1마리가 폐사한 5번 그룹을 제외하고는 전 그룹의 계군은 실험종료 3주째까지 본 시험에 공시할 수 있었다.

Table 11. Hatchability and survival rate following in ovo vaccination with pCI-KMp6S1 and pTriEx-KMp6S1 DNA

Group	In ovo vaccine	SuperFect supplemented	Secondary IBV vaccination	Hatchability (%) [*]	Survival rate (%) ^{**}
1	TE buffer	No	No	6/7 (85.7)	6/6 (100.0)
2	TE buffer	No	Yes	6/7 (85.7)	6/6 (100.0)
3	pCI-neo	No	No	6/7 (85.7)	6/6 (100.0)
4	pCI-KMp6S1	No	No	5/7 (71.4)	5/5 (100.0)
5	pCI-KMp6S1	No	Yes	6/7 (85.7)	5/6 (83.0)
6	pCI-KMp6S1	Yes	No	5/7 (71.4)	5/5 (100.0)
7	pCI-KMp6S1	Yes	Yes	6/7 (85.7)	6/6 (100.0)
8	pTriEx-1.1	No	No	5/7 (71.4)	5/5 (100.0)
9	pTriEx-KMp6S1	No	No	5/7 (71.4)	5/5 (100.0)
10	pTriEx-KMp6S1	No	Yes	5/7 (71.4)	5/5 (100.0)
11	pTriEx-KMp6S1	Yes	No	5/7 (71.4)	5/5 (100.0)
12	pTriEx-KMp6S1	Yes	Yes	4/7 (51.4)	4/4 (100.0)

^{*}No. of 1-day-old chicks/no. of 18-day-old SPF eggs received in ovo DNA vaccine (% hatched)

^{**}No. of 3-week-old chicks/no. of hatched chicks after receiving in ovo DNA vaccine (% survived)

본 실험은 IBV S1 당단백을 발현하는 DNA의 in ovo vaccination에 따른 혈청학적 변동추이를 조사하고자 다음과 같이 계획되었다. (1) Group 1은 전체 실험계군의 음성대조군으로서 plasmid DNA를 용출하는데 사용된 TE buffer만을 접종했으며, (2) Group 2는 2종의 DNA vaccine에 의한 IB 약독백신의 booster 효과를 조사하기 위한 대조군이고, (3) Group 3과 8은 2종의 DNA vaccine에 대한 음성대조군으로서 각각의 클로닝 벡터만을 접종했다. 또한, (4) Group 4와 9는 2종의 DNA vaccine 단독에 의한 in ovo vaccination 효과를 조사하기 위한 실험계군이고, (5) Group 5와 10은 2종의 DNA vaccine에 따른 IB 약독백신의 booster 효과를 조사하기 위한 실험계군이며, (6) Group 6과 11은 SuperFect의 첨가에 따른 2종의 DNA vaccine의 in ovo vaccination 상승효과를 조사하기 위한 실험계군이며, (7) Group 7과 12는 SuperFect와 2종의 DNA vaccine에 따른 IB 약독백신의 booster 효과를 조사하기 위한 실험계군으로 구성되었다. 이에 대한 혈청학적 분석결과는 Table 12에 나타내었다.

가) In ovo DNA vaccination에 의한 IBV 특이항체 유도능 분석

2종의 IBV S1 당단백 발현 DNA plasmid (pCI-KMp6S1 및 pTriEx-KMp6S1)를 이용한 in ovo vaccination에 따른 IBV 특이항체 유도능을 조사하기 위하여, 각 그룹의 부화 1주째의 혈청시료를 IFA, HI, ELISA 및 VN법으로 분석하였다. 그 결과, 대조군(1, 2, 3, 8번 그룹)의 평균적인 각 그룹의 IFA 양성개체는 0%, HI역가는 1.57-2.60, ELISA 역가는 10-30, 그리고 VN 항체역가는 0 등으로 모든 분석결과가 background 수준을 나타낸 반면에, 2종의 DNA로 각각 in ovo vaccination한 시험계군(4, 5, 9, 10번 그룹)의 평균적인 각 그룹의 IFA 항체양성개체가 0-20%로, HI역가가 2.80-3.60으로, ELISA 역가는 시험계군에 따라 역가의 변동폭은 크지만 18-216으로, VN 항체역가는 2.5-6.5로 시험계군 및 분석법에 따라서는 최소한 수배 이상의 높은 항체역가를 보였다. 이들의 결과로부터 IBV S1 당단백 발현 DNA의 in ovo vaccination에 따른 IBV 특이항체가 효과적으로 유도되었음을 확인할 수 있었다.

나) SuperFect의 in ovo DNA vaccination에 미치는 효능 분석

SuperFect에 의한 in ovo DNA vaccination의 면역증강효과에 미치는 영향을 조사하기 위해 SuperFect와 함께 각각 2종의 DNA로 vaccination한 6, 7, 11, 12번 그룹의 부화 후 1주째의 혈청시료를 분석하였다. 그 결과, 평균적인 각 그룹의 IFA 양성 혈청시료는 0-20%를, HI 역가는 2.17-3.84를, ELISA 항체역가는 1-207로 역시 그룹에 따라 변동폭이 크게 나타났으며, 그리고 VN 항체역가는 3-5.5를 나타냈다. 한편, SuperFect의 첨가 없이 DNA만 접종한 4, 5, 9, 10번 그룹의 부화 후 1주째의 혈청시료의 IFA 양성개체는 0-20%로, HI 평균역가는 2.80-3.60으로, ELISA 역가는 18-216으로, VN 항체역가는 2.5-6.5로 SuperFect를 첨가해 vaccination한 시험계군과 어느 분석결과에서도 유의성을 보이지 않았다. 따라서 본 시험에서의 in ovo DNA vaccination에 따른 SuperFect의 항체형성 상승효과는 인정되지 않았다.

다) In ovo DNA vaccination에 따른 IB 백신 booster 효과 분석

In ovo DNA vaccination에 따른 IB 약독백신의 booster 효과를 조사하기 위하여 부화 1주 후에 시판용 IB 생독백신을 2, 5, 7, 10, 12번 그룹에 각각 접종 후, 혈청시료를 위의 4가지 혈청학적 분석법을 이용해 항체의 형성분포를 조사하였다. Booster 전 1주째의 DNA 백신 면역계군(4-7번 그룹과 9-12번 그룹)의 IBV에 대한 특이적인 평균적인 항체 양성을 및 역가를 분석한 결과, IFA에 의한 항체양성개체는 0-20%로, HI 역가는 2.17-3.84로, ELISA 역가는 1-216으로, 그리고 VN 역가는 2.5-6.5로 검출되었다. 이에 비해 IB 백신 booster 후인 3주째까지의 혈청시료(5, 7, 10, 12번 그룹)에 대한 분석결과, IFA에 의한 항체양성비율은 20-50%로, HI 평균역가는 4.50-5.25로, ELISA 역가는 107-355로, 더욱이 VN 역가도 7.5-13의 큰 폭으로 대조군(2, 3, 8번 그룹) 및 DNA 백신 단독만(4, 6, 9, 11번 그룹)으로 in ovo

vaccination한 계군의 각 혈청분석결과보다 booster에 의한 항체역가의 상승이 있었음이 인정되었다.

라) 2종의 IBV S1 당단백 발현백터의 항체 유도능 비교 분석

또한 본 in ovo DNA vaccination 시험에서는 공시한 2종의 발현백터의 항체형성 유도능도 비교 분석하였다. IBV S1 당단백을 CMV IE promoter에 의해 발현 조절되고 있는 pCI-KMp6S1으로 vaccination한 그룹(4-7번)의 부화 후 1주째 혈청시료에 대한 IFA 항체양성개체는 0-20%로 chicken β -actin promoter에 의해 발현 조절되고 있는 pTriEx-KMp6S1에 의한 그룹(9-12번)의 항체양성개체 비율(0-20%)과 차이를 보이지 않았다. 또한 IB 백신의 booster에 따른 3주째까지의 IFA에 의한 혈청양성개체의 비율(pCI-KMp6S1, 0-50%; pTriEx-KMp6S1, 0-40%)에도 현격한 차이를 관찰할 수 없었다. 더욱이 Table 12에 보인 바와 같이 각 그룹의 혈청시료에 대한 HI, ELISA 및 VN 혈청분석에 의해서도 두 발현백터간의 항체형성 유도능에 유의적인 차이를 보이고 있지 않음이 확인되어, 2종의 발현백터 모두 금후 효과적인 in ovo DNA vaccination용 백터로서 활용가치가 크게 기대되었다.

Table 12. Serological examination after in ovo DNA vaccination determined by indirect immunofluorescence assay (IFA), hemagglutination inhibition (HI), ELISA and virus neutralization (VN)

Group	Vaccination			IFA(%)			HI			ELISA			VN		
	DNA vaccine	Super Fect	IB vaccine	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd
1	TE buffer	No	No	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	1.57	3.00	2.70	10	20	78	0	0	2.5
2	TE buffer	No	Yes	0/6(0)	0/6(0)	1/6(16)	2.20	3.25	4.00	20	50	160	0	2	3
3	pCI-neo	No	No	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	2.25	3.83	3.60	30	97	55	0	1	2
4	pCI-KMp6S1	No	No	1/5(20)	1/5(20)	2/5(40)	2.80	4.20	5.30	216	104	102	6.5	6	5
5	pCI-KMp6S1	No	Yes	0/6(0)	0/6(0)	1/5(20)	3.00	4.80	5.25	48	46	156	5.5	7	7.5
6	pCI-KMp6S1	Yes	No	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)	2.17	3.80	4.85	4	7	25	3	4	3.5
7	pCI-KMp6S1	Yes	Yes	1/6(16)	3/6(50)	3/6(50)	3.40	4.50	4.50	207	356	355	5.5	9	13
8	pTriEx-1.1	No	No	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)	2.60	2.83	3.20	29	91	48	0	0	1.4
9	pTriEx-KMp6S1	No	No	0/5(0)	0/5(0)	2/5(40)	3.60	3.80	3.40	18	181	1	4	8	3
10	pTriEx-KMp6S1	No	Yes	1/5(20)	1/5(20)	2/5(40)	3.60	4.40	4.50	47	143	107	2.5	7	8.1
11	pTriEx-KMp6S1	Yes	No	1/5(20)	1/5(20)	2/5(40)	3.84	4.30	4.00	103	48	300	3.5	7.5	9
12	pTriEx-KMp6S1	Yes	Yes	0/4(0)	0/4(0)	1/4(25)	3.00	4.50	4.50	1	30	232	4	7	9

3-3. 결 론

IB virus의 in ovo용 항원을 개발하기 위하여 IBV-V(Mass., Type Live vaccine)과 IBV-KM91를 chicken embryo kidney cell과 10일령의 부화계란의 뇨막강내 계대접종하여 부화계란에 적응시키면서 1) 부화계란에 대한 병원성, 2) β -propiolactone 처리 후 IBV의 안전성, 3) 혈구응집억제반응, 4) 다가 및 단클론항체 생산과 이들 항체 처리에 의한 IBV의 병원성, 5) 약독화시킨 IBV의 in ovo 접종에 따른 안전성 및 면역원성 등의 기초실험을 수행하였다. 그 후 IBV-KM91주를 120대 계대배양하고, 6) IBV 중화항체유도 S1 당단백 유전자 클로닝, 발현백터 및 DNA plasmid 구축, 7) IBV-KM91p6 S1유전자의 핵산염기서열 확인 및 계통수 작성, 8) S1 당단백 발현 재조합 Baculovirus 제작, S1 당단백의 검출 및 동정, 9) 재조합 S1 당단백의 면역원성 시험, 10) IBV S1 당단백 발현 DNA의 in ovo vaccination 이후 live attenuated IBV vaccine의 병용효과에 대해 시험하였다.

1. IBV-V주 및 IBV-KM91주의 부화계란에 대한 병원성은 부화계란에 접종 후 2일부터 각각 20% 및 40%에서 이상란(dwarfing 또는 curling)이 관찰되기 시작하여 4일째에 모두 폐사하였다. 병원성이 확인된 IB virus를 순화시키기 위하여 계대 배양한 다음, 10^5 EID₅₀/ml역가의 IBV-V(10th 또는 20th)와 IBV-KM91(10th 또는 20th) 100 μ l씩을 18일령의 부화계란 각각 10개에 in ovo 접종한 결과 IBV-V(20th)와 IBV-KM91(20th)는 약독화 순화되었으나 병원성은 남아 있었다. 이 IBV를 β -propiolactone으로 불활화시키고 18일령의 부화계란에 각각 in ovo 접종한 결과 병원성을 소실되었다.

2. IBV를 면역시킨 Balb/c 마우스로부터 특이성이 있고, ELISA역가가 가장 높은 JNU-IB-2002-1(IgG1)을 선발하였고, 다가 및 단클론성 항체를 처리한 IBV-V(20th) 및 IBV-KM91(20th)의 안전성 및 면역원성 실험결과 병원성이 유의하게 감소되었고 면역원성이 인정되었다.

3. IBV in ovo vaccination용 항원확보를 위해 KM91p6주의 S1 유전자를 pCRII(3.9kb) 백터에 클로닝하여, 핵산 염기서열 분석, 재조합 Baculovirus transfer vector 및 S1 당단백 발현 DNA plasmid 구축의 template DNA로 공시하였다.

4. IBV KM91주에 대한 항체와 반응한 재조합 Baculovirus S1 당단백은 rAc-KMp6S1 감염세포의 세포질 내뿐만 아니라 세포표면에서도 발현하였다.

5. Western blot 분석법을 통한 재조합 Baculovirus S1 당단백의 검출을 시도한바 약 92 kDa의 재조합 Baculovirus S1 당단백이 검출되어 IBV-KM91p6 유래의 S1 당단백과 유사한 분자량의 당단백으로 발현하고 있음을 확인되었다.

6. 공격접종의 방어면역능은 불활화 KM91p6의 booster 효과는 1회만으로도 신장에 대하여 100%($P < 0.05$), 2회 booster한 경우 rAc-KMp6S1의 경우보다도 더욱이 강한 효과가 신장($P < 0.01$)과 기관($P < 0.05$)에서 관찰되었다

7. pCI-KMp6S1 DNA와 pTriEx-KMp6S1 DNA에 의한 S1 당단백의 발현유무를 in vitro 배양 세포에서 확인한바, transfection한 세포에서 각각 IBV S1 당단백이 발현되었다.

8. pCI-KMp6S1과 pTriEx-KMp6S1을 18일령의 부화계란에 in ovo DNA vaccination 결과 전 그룹이 평균적으로 약 70% 이상의 부화율을 보였다. SuperFect의 in ovo DNA vaccination에 미치는 효능은 인정되지 않았지만, in ovo DNA vaccination에 따른 IB 백신 booster 효과는 대조군 및 DNA 백신 단독 접종한 계군의 각 혈청분석결과보다 booster에 의한 항체역가의 상승되었다.

이상의 결과에서 2종의 IBV S1 당단백 발현벡터의 항체 유도능 비교 분석 결과 2종의 발현벡터간에 유의한 차이를 보이지 않아, 발현벡터 모두 금후 효과적인 in ovo DNA vaccination용 벡터로서 활용가치가 크게 기대되었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구에서는 국내 양계농장에서 발병하여 많은 경제적인 피해를 주고 있는 뉴캐슬병(ND), 전염성후두기관염(ILT) 및 전염성기관지염(IB)을 대상으로 부화계란에 접종시 안전하고 높은 방어 효능을 부여하는 항원물질을 개발하기 위해 바이러스의 계대 배양, 증식환경 변화, 항체처리 및 화학적 처리 등에 의해 무독 내지 약독화 바이러스 작제 및 유전자 재조합 DNA 백신 개발을 위한 기초 기술을 확립하기 위해 수행하였다. 2개 세부과제와 1개 협동연구과제를 수행하여, ND virus, ILT virus 및 IB virus를 약독화시키는 방법을 시험하였고, 시제 항원의 계태아에 대한 안전성, 면역원성 및 효능성 시험을 하여 관련된 결과를 얻었다. 또한 각 바이러스의 면역관련 구조 유전자의 염기구조를 밝히고 재조합 DNA 백신을 작제하여 특성을 확인하였다. 아울러 재조합 DNA 백신의 안전성, 면역원성 및 효능시험을 수행하여 유의한 결과를 획득하였다. 계획된 연구계획을 100% 달성하였다.

본 연구를 통해 얻어진 결과들은 뉴캐슬병, 전염성후두기관염 및 전염성기관지염에 대한 in ovo 백신과 재조합 DNA 백신 개발에 유용한 자료로 활용될 것으로 예상된다. 또한 얻어진 결과들을 국내 및 국외 학술대회에 발표하고 전문학술지에 게재함으로써 이 분야 연구에 폭 넓게 활용될 것이다..

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통하여 얻어진 결과는 최근 닭 전염병 예방접종법으로 새롭게 대두되고 있는 in ovo vaccination 기법 개발에 유용한 자료로 활용될 것이며, 특히 바이러스와 항체 복합체를 이용한 in ovo 접종 시험에서 얻어진 성적과 재조합 DNA 백신 제조 연구에서 얻어진 결과들은 뉴캐슬병, 전염성후두기관염 및 전염성기관지염에 대한 in ovo 백신과 재조합 DNA 백신 개발에 유용한 자료로 활용될 것으로 예상된다. 연구를 통해 얻어진 일부 기술들은 특허출원 대상이 된다

본 연구를 통하여 얻어진 in ovo vaccination용 항원 및 DNA 백신 제조와 관련된 기술들은 초기단계 수준으로써 산업화시키고 현장에 활용하기 위해서는 보다 광범위한 지속적인추가 연구가 수반되어야 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

미국에서는 미농림성, 아칸사스대학, 캘리포니아대학, EMBREX Inc. 미네소타 주립대학, TriBio Lab. Pfizer 등, 그리고 호주에서는 Fort Dodge Australia Pty Limited, 네덜란드에서는 Lelystad 연구소 등에서 수의학, 분자생물학, 면역학, 생화학, 기계공학 및 조류 생리학자들이 지난 20여 년간에 걸쳐 부화계란에 백신을 직접 주사하는 in ovo vaccination 기법에 대한 연구를 해왔다. 이들은 주로 마렉크병, 전염성 F낭병(infectious bursal disease), 뉴켓슬병, 인플루엔자병, 전염성기관지염에 대한 시험을 수행하였고, 이중 마렉크병과 전염성 F낭병에 대한 in ovo 백신을 상품화하여 실용화 단계에 들어가고 있다.

최근에는 약독화 바이러스의 in ovo vaccination 경우 발생하는 병원성 문제를 극복하기 위해 in ovo 용 재조합 DNA vaccine의 개발과 응용에 대한 연구가 진행 중에 있다. 닭에 직접 접종하는 DNA vaccine의 개발 연구는 avian influenza virus, Newcastle disease virus, infectious bursal disease virus, Marek's disease virus 등에 대해 연구되었고, DNA vaccine의 효능을 증대하는데 필수적인 백터, 프로모터, 발현시스템 등에 연구가 수행중에 있다. 그러나 in ovo 접종에 대한 DNA vaccine의 개발 연구는 influenza virus, IB virus, Marek's disease virus 등 극히 제한된 병원체에 대해 수행된 바 있으나 아직 초보단계에 있다.

제 7 장 참고문헌

1. Gagic M., Catherine A., Hill S. T. and Sharma J. M.: In ovo vaccination of Specific-pathogen-free chickens with vaccines containing multiple agents. *Avian Diseases*, 43: 293-301, 1999.
2. Ahmad J. and Sharma J. M.: Evaluation of a modified-live virus vaccine administered in ovo to protect chickens against Newcastle disease. *Am. J. Vet. Res.* 53: 1999-2004, 1992.
3. Johnston P. A., Liu H., O'connel T., Phelps P., Bland M., Tyczkowski J., Kempb A. Harding T., Avakian A., Haddad E., Whitfill C., Gildersleeve R. and Rick A. C.: Application in in ovo technology. *Poult. Sci.* 76: 165-178, 1997.
4. Karaca K., Sharma J. M., Winslow B. J., Junkert D. E., Reddy S., Cochran J. and McMillen J.: Recombinant fowlpox viruses coexpressing chickens type I IFN and Newcastle disease virus HN and F genes: influence of IFN on protective efficacy and humoral responses of chickens following in ovo or post-hatch administration of recombinant viruses. *Vaccine* 16: 1-7, 1988.
5. Sharma J. M.: Embryo vaccination of specific-pathogen-free chickens with infectious bursal disease virus: tissue distribution of the vaccine and protection of hatched chickens against disease. *Avian Dis.* 30: 776-781, 1986.
6. Sharma J. M.: Delayed replication of Marek's disease virus following in ovo inoculation during late stage of embryonal development. *Avian Dis.* 31: 570-576, 1987.
7. Wakenell P. S. and Sharma J. M.: Chicken embryonal vaccination with avian infectious bronchitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 47: 933-938, 1986.
8. Jeurissen S. H. M., Janse E. M., Lehrbach P. R., Haddad E. E., Avakian A. and Whitfill C. E.: The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease. *Immunology.* 95: 494-500, 1998.
9. Whitfill C. E., Haddad E. E., Ricks C. A. *et al.*: Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus(IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV. *Avian Dis.* 39: 687, 1995.
10. Haddad E. E., Whitfill C. E., Avakian A. P. *et al.*: Efficacy of a novel

- infectious bursal disease virus (IBDV) immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Dis.* 41: 882-889, 1997.
11. Stone H., Mitchell B., and Brugh M.: In ovo vaccination of chicken embryos with experimental Newcastle disease and Avian influenza oil-emulsion vaccines. *Avian Dis.* 41: 856-863, 1997.
 12. Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald, L.R. and Saif, Y.M.: *Diseases of Poultry*. 10th edition, Iowa State Univ. Press, Ames Iowa, U.S.A. 1997.
 13. Sharma J. M., Lee L. F. and Wakenell P. S.: Comparative viral, immunologic, and pathologic responses of chickens inoculated with herpesvirus of turkeys as embryos or at hatch. *Am. J. Vet. Res.* 45: 1619-1623, 1984.
 14. Whitfill C. E., Haddad E. E., Ricks C. A., Skeeles J. K., Newberry L. A., Beasley J. N., Andrews P. D., Thoma J. A. and Wakenell P. S.: Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antisera with IBDV. *Avian Dis.* 39: 687-699, 1995.
 15. Avkian A. P., Whitfill C. E., Haddad E. E., and Ricks C. A.: Efficacy of a novel infectious bursal disease (IBD) vaccine administered in ovo to broiler chickens. *Poultry Sci.* 72: 49, 1993.
 16. Fynan E. F., Robinson H. L., and Webster R. G.: Use of DNA encoding influenza hemagglutinin as an avian influenza vaccine DNA. *Cell Biol.* 12(9): 785-789, 1993.
 17. Fynan E. F., Webster R. G., Fuller D. H., Haynes J. R., Santoro J. C., and Robinson H. L.: DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11478-11482, 1993.
 18. Gildersleeve R. P.: In ovo technology update. *Zootec. Int.* 73-77, 1993.
 19. Gildersleeve R. P., Hoyle C. M., Miles A. M., Murray D. L., Ricks C. A., Secrest M. N., Williams C. J. and Womack C. L.: Developmental performance of an egg injection machine for administration of Marek's disease vaccine. *J. Appl. Poult. Res.* 2: 337-346, 1993.
 21. Sarma G., Greer W., Gildersleeve R. P., Murray D. L., and Miles A. M.: Field safety and efficacy of in ovo administration of HVT + SB-1 bivalent Marek's disease vaccine in commercial broilers. *Avian Dis.* 39: 211-217, 1995.
 22. Sharma J. M., Dohms J. E., and Metz A. L.: Comparative pathogenesis of

- serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and the effect of those viruses on humoral and cellular immune competence of specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis.* 33: 112-124, 1989.
23. Taylor J, Edbauer C., Rey-Senelonge A., Francois Bouquet J., Norton E., Goebel S., Desmettre P., and Paoletti E.: Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. *J. Virol.* 64: 1441-1450, 1990.
 24. Sharma J. M. and Witter R. L.: Embro vaccination against Marek's disease with serotypes 1, 2 and 3 vaccines administered singly or in combination. *Avian Dis.* 27: 453-463, 1983.
 25. Azad A. A., McKern N. M., Macreadie I. G., Failla P., Heine H. G., Chapman A., Ward C. W., and Fahey K. J.: Physicochemical and immunological characterization of recombinant host-protective antigen(VP2) of infectious bursal disease virus. *Vaccine* 9: 715-722, 1991.
 26. Bloom B. D.: New approaches to vaccine development. *Rev. Infect. Dis.* 11: s460-s466, 1989.
 27. Oshop G. L., Elankumaran, S., Vakharia V. N., Heckert, R. A.; In ovo delivery of DNA to the avian embryo. *Vaccine*, 21: 1275-1281. 2003.
 28. Fahey K. J., Chapman A. J., Macreadie I. G., Vaughan P. R., McKern N. M., Skicko J. I., Ward C. W., and Azad A. A.: A recombinant subunit vaccine that protects progeny chickens from infectious bursal disease. *Avian Pathol.* 20: 447-460, 1991.
 29. Kapczynski, D. R., Hilt, D.A., Shapiro, D., Sellers, H.S., Jackwood, M.W.: Protection of chickens from infectious bronchitid by in dvo and intramuscular vaccination with a DNA vaccine expressing the S1 glycoprotein. *Avian Diseases*, 47: 272-285, 2003.
 30. Tsipis J. E., Bratt M. A.: Isolation and preliminary characterization of temperature sensitive mutants of Newcastle disease virus. *J. Virol.* 18: 848-855, 1976.
 31. Auerbach C.: The chemical production of mutations: the effect of chemical mutagens on cells and their genetic material is discussed. *Science* 158: 1141-1147, 1967.
 32. Baut E., and Freese E.: On the mutagenic effect of alkylating agents. *Proc. Natl Acad Sci.* 46: 1585-1594, 1960.
 33. Zhao W. R., Hasi W., Qin Y. X. et al.: Selection of *Brucella* vaccine strain of

- low residual virulence by chemical mutagenesis. *J. Med Microbiol.* 30: 143-148, 1989.
34. Wakenell P. S., and Sharma J. M.: Chicken embryonal vaccination with avian infectious bronchitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 47(4): 933-938, 1986.
 35. Chang H. C., Lin T. L., Wu C.C.: DNA-mediated vaccination against infectious bursal disease in chickens. *Vaccine*, 20:328-325, 2001.
 36. Sambrook J. and Russell D. W.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* Vol 1, 2 & 3, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A. 2001.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.