

발간등록번호

11-1543000-000138-01

동물 백신 사업단

(Animal Vaccine Center)

서울대학교

농림축산식품자료실



0000115

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “동물백신 사업단” 과제(3년차 완결보고서)의 보고서로 제출합니다.

2013년 7월 30일

주관연구기관명 : 서울대학교
주관연구책임자 : 채 찬 희
세부연구책임자 : 채 찬 희
연 구 원 : 오 연 수
연 구 원 : 박 창 훈
세부연구기관명 : (주) 코미팜
세부연구책임자 : 장 현, 김주현
세부연구기관명 : 제주대학교
세부연구책임자 : 황 규 계
세부연구기관명 : 서울대학교
세부연구책임자 : 황 철 용
세부연구기관명 : 중앙대학교
세부연구책임자 : 최 창 순
세부연구기관명 : 원광대학교
세부연구책임자 : 김 옥 진

요 약 문

I. 제 목

동물 백신 사업단

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내에서 수입백신회사의 썬코백신이 처음 시장에 출시된 시기는 2008년이고, 국내 백신 회사는 2009년에 시장에 처음 출시하였다. 썬코백신의 매출액인 사단법인 한국동물약품에 의하면 2009년 209억원 매출 중에서 국내 제조회사의 백신은 약17억원으로 전체의 8.1%에 지나지 않는다. 국내 백신의 매출액이 8.1%에 지나지 않는 이유는 사육가의 국산백신에 대한 인식 부족과 수입품에 비해 효능이 우수하다는 확신이 없기 때문이다. 또한 2010년 농림식품부에서 실시하는 돼지 썬코백신 배정 정책에서도 국내 사육가들은 대부분 수입품을 선택하였고, 국내 백신은 외면하고 있다. 2010년 2분기에서도 국내 사육가의 80% 이상이 수입백신을 선택한 점을 보더라도 국내 백신의 외면 현상은 지속될 수밖에 없을 것이다. 따라서 가격과 효능 면에서 경쟁력 있는 제품의 출시가 시급한 실정이다.

국내에서 수입백신 회사와 국내 백신 회사가 썬코백신을 이미 출시하였지만, 돼지 썬코바이러스에 의한 소모성 질병의 경우, 신종플루와 다르게 유행을 타는 질병이 아니라, 국내에서는 1998년 이후에 꾸준히 농장에 큰 피해를 준 질병이고, 향후 10여년 동안 지속적으로 경제적 피해를 줄 질병이기 때문에 1-2년 늦게 출시하는 것이 시장에서 시의성이 없다고 판단하기에는 무리가 있다. 오히려 확실한 효과를 가진 백신을 개발하는 것이 더욱 중요하다고 판단된다.

본 연구에서는 현재의 국산 썬코백신 보다 가격면에서는 30%의 가격 경쟁력을 가지고, 효능면에서는 기존의 수입백신보다 20% 효과가 증가한 돼지 썬코바이러스 단일백신을 개발하고자 한다. 비록 이미 백신이 시장에 출시되어 시기성이 늦었다고 볼 수 있지만, 본 연구에서는 돼지 썬코바이러스를 배양하는 새로운 세포주를 개발하여 개발 효율을 높이면 현재의 국내 백신 회사의 가격을 30% 낮추어서 가격 경쟁력을 가질 수 있다.

현재 국내에서는 돼지 썬코바이러스가 4-6주령에서는 이유후 전신성 소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS)라고 하는 소모성 증후군을 유발하고 10-15주령사이에서는 돼지 썬코바이러스가 흉막폐렴균과 함께 감염이 되어서 돼지 호흡기 질병(porcine respiratory disease complex; PRDC)을 유발한다. 현재 사용 중인 썬코백신

만 가지고는 소모성 증후군은 예방이 가능하여도 10-15주령에서 유발되는 쉼코바이러스와 흉막폐렴의 질병은 예방할 수가 없다. 현재의 상황에서는 소위 돼지 호흡기 질병을 예방하려면 쉼코바이러스 단일백신과 흉막폐렴 백신을 각각 구입해서 접종해야 되는 번거로움과 경비부담이 되고 있는 실정이다.

따라서 쉼코바이러스와 흉막폐렴 백신을 개발하면 이러한 번거로움도 없어지고 현재 수입백신에도 없기 때문에 가장 경쟁력이 있는 백신이 될 수 있다. 현재 돼지 쉼코바이러스에 다른 세균을 복합하는 기술은 본 사업단이 보유중인 기술로서 바이러스와 세균 항원을 복합 하였을 때 항원의 면역원성이 감소하지 않게 하는 기술이다. 이러한 기술을 본 연구 과제를 통하여 완벽히 개발하면 돼지 쉼코바이러스와 세균 또는 다른 바이러스와의 기술을 확보 할 수 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 돼지 쉼코바이러스 단일백신과 흉막폐렴 백신 제조 기술 이전 표준화 연구 및 품목허가 시험

가. 돼지 쉼코바이러스 단일 백신 시제품 부표 확립

나. PK-15 세포 배양 표준화 연구

1) 돼지 쉼코바이러스 2형 증식을 위한 배양 방법 확립

- 재료 : 클로닝한 PK-15 및 세포 배양 관련 시약
- 방법 : 다양한 시약 조성을 통한 PK-15 세포 배양
- 활용 : 바이러스 증식을 위한 세포 확립

다. 돼지 쉼코바이러스 2형 증식 표준화 연구

1) 돼지 쉼코바이러스 2형 증식 및 회수

- 재료 : PK-15 및 분리된 돼지 쉼코바이러스 2형 바이러스
- 방법 : 최적의 바이러스 증식 과정 확립

2) 배양된 돼지 쉼코바이러스 2형 역가 측정 방법

- 재료 : PK-15 세포 및 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 다클론 항체
- 방법 : Immunoperoxidase monolayer method (IPMA) 방법 활용
- 활용 : 백신에 사용된 바이러스 역가 측정

라. 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신의 시제품 제작

1) 단일 백신용 사용균주 확립

- 재료 : 돼지에서 분리된 돼지 쉼코바이러스 2형 바이러스
- 방법 : 분리된 바이러스 염기서열 분석 및 특성 확인
- 활용 : 단일 백신 균주로 사용하며, 향후 다른 분리주와 비교분석

2) 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신 불활화 및 부형제

- 포르말린 및 알루미늄 젤 첨가

마. 돼지 쉰코바이러스 단일백신 제품 품목허가를 위한 예비 실험

- 1) 시험백신 제조 및 안전성 시험
 - 재료 : 3가지 항원 농도의 백신 및 자돈 9두
 - 방법 : 규정량의 2배 접종 후 부작용 검사
- 2) 목적 동물에 대한 면역원성 시험
 - 방법 : 백신 접종 후 채혈하여 항체가 검사
 - 활용 : 백신의 항체 형성 능력 평가

바. 국가검정 동물용의약품검정기준에 의한 돼지 쉰코바이러스 2형 단일백신 안정성 검사

- 1) 실험동물에 대한 안전성 시험
 - 재료 : 마우스 및 기니픽
 - 방법 : 각 실험동물에 접종하고 병변 및 부작용 검사
 - 활용 : 백신으로 인한 독성 부작용 등 평가
- 2) 돼지를 이용한 안전성 시험
 - 방법 : 돼지 근육에 단일 백신 접종
 - 활용 : 과민 반응 등 발생할 수 있는 부작용 평가

사. 돼지 쉰코바이러스 2형 단일백신 공격실험 실시

- 재료 : 시험 백신 및 3주령 자돈
- 방법 : 백신 접종 후 바이러스 공격 접종을 통해 백신 효과 분석
- 활용 : 백신으로 생성된 면역반응의 실제 효과 분석

아. 돼지 흉막폐렴균 배양 표준화 연구

- 1) 백신 후보 균주 선정
 - 재료 : 국내에서 분리된 흉막폐렴균 2형 및 5형
 - 방법 : APX 1형 및 3형 유전자 염기서열 분석을 통한 비교
 - 활용 : 개발 백신에 사용할 국내 분리주 확정
- 2) 백신 표준 균주 계대 방법 확립
 - 재료 : 흉막폐렴균 전용 배양 배지
 - 방법 : 30 계대 이후 균주와 1계대 균주 비교를 통한 균주 안전성 평가

자. 돼지 쉰코바이러스 2형과 흉막폐렴 백신 시작품 제작 및 공격접종 실험

- 1) 백신 제조방법
 - 재료 : 국내에서 분리된 돼지 쉰코바이러스 2형 및 흉막폐렴 2형, 5형
 - 방법 : 1회 접종 분량의 백신 조성을 위한 항원과 부형제 함량 결정
- 2) 백신의 면역 유도 실험

- 재료 : 항체가 음성인 5주령 돼지
 - 방법 : 시험 백신 접종 후 돼지 쉼코바이러스 및 흉막폐렴 균주에 대한 항체가 측정
 - 활용 : 백신의 각 항원 자극에 대한 항체 생산 능력 분석
- 3) 백신의 공격 접종을 통한 예비 효능 검사
- 재료 : 항체가 음성인 5주령 돼지 실험군 및 대조군
 - 방법 : 백신 접종 후 공격접종을 통하여 백신 효능 평가
 - 활용 : 개발 백신 효능의 평가 지표
- 4) 백신의 안전성 시험
- 재료 : 마우스, 기니픽, 돼지
 - 방법 : 각 실험동물에 개발 백신을 접종하고 조직 병변 또는 부작용 평가
 - 활용 : 개발 백신의 안전성 확립
- 5) 실험실내 공격접종을 통한 다양한 효능 검사
- 재료 : 항체가 음성인 5주령 돼지
 - 방법 : 백신 접종 및 공격 접종 후 임상학, 바이러스학, 면역학적 효능평가
 - 활용 : 개발 백신의 실제 예방 효과 예측

차. 옹돈을 이용한 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신의 차별화된 효능 평가 연구

- 1) 돼지 쉼코바이러스 2형 감염 옹돈에서 정액 내 분비 억제효과
- 재료 : 8개월령 옹돈
 - 방법 : 단일백신과 바이러스 접종 후 정액 내 분비되는 바이러스양 분석
 - 활용 : 개발된 백신의 바이러스 수직 전파 예방 가능성
- 2) 개발된 단일 백신과 일반 상용화 백신의 옹돈 정액 내 바이러스 분비 감소 효과 비교
- 재료 : 8개월령 옹돈
 - 방법 : 개발된 단일 백신과 현재 상용화된 2개의 백신 효과 비교 분석
 - 활용 : 개발된 백신의 수입 백신 대체 가능성

카. 돼지 쉼코바이러스 항원과 마이코플라즈마균 항원의 복합 기술 개발 연구

- 1) 백신의 조성 및 면역 유도 분석
- 재료 : 단일 백신 균주에 사용되는 각 바이러스 및 마이코플라즈마균
 - 방법 : 백신을 3주령 자돈에 접종하여 면역 반응 평가
 - 활용 : 공격접종 실험 전 면역원성 평가

2. 돼지 쉼코바이러스 증식 최적화 연구

가. 돼지 쉼코바이러스 생산용 돼지 세포주 개발

- 1) 돼지 유래 신장 조직의 초대 배양
- 재료 : 돼지 태아의 신장 조직
 - 방법 : 돼지 태아 신장 세포의 초대배양 확립

2) 초대 배양 세포의 불멸화

- 방법 : 세포 내 유전자 도입을 통해 불멸화 세포 확립
- 활용 : PK-15 세포와 같이 안정적인 세포주 확립 및 바이러스 배양

3) 세균 및 마이코플라즈마 감염 확인

- 방법 : 확립된 세포주의 중합효소 연쇄반응을 통한 세균감염 확인
- 활용 : 돼지 썬코바이러스 2형 이외의 다른 병원체 오염 방지

나. 돼지 썬코바이러스 2형 생산용 돼지 세포주 개발

1) 세포주 개발 및 바이러스 감수성 검사

- 재료 : 불멸화된 돼지 태아 유래 신장세포주
- 방법 : 개발된 세포주와 기타 감수성 있는 세포주의 바이러스 증식 비교
- 활용 : 향후 역가 높은 바이러스 생산에 적용

2) seed virus 의 제작

- 방법 : 개발된 세포주에서 역가 높은 초기 seed 바이러스 생산
- 활용 : 높은 역가의 seed 바이러스 확보하여 대량 생산시 사용

3) 세포주에 적응된 돼지 썬코바이러스 2형 확립

- 방법 : 바이러스에 감염된 세포의 반복 계대를 통한 바이러스 적응 확립
- 확립 : 증식에 한계가 나타나는 seed 바이러스 증식에 적용

4) 돼지 썬코바이러스 2형 증식 최적화를 위한 특성 조사

- 방법 : 환경 변화에 따른 바이러스 역가 분석
- 활용 : 최적의 보관 환경 유지로 바이러스 역가 유지

3. 백신 품목 허가를 위한 야외임상 실험

가. 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신의 야외임상 실험

1) 안전성 확인 시험

- 재료 : 3개 시험 농장 실험군 각 20두
- 방법 : 실험군에 개발된 백신 접종 후 안전성 확인
- 활용 : 발생 가능한 목적 동물에서의 개발 백신에 대한 부작용 평가

2) 백신 효능 평가

- 재료 : 3개 시험 농장 실험군 및 대조군 각 30두
- 방법 : 실험군에 개발된 백신 1,3주령 접종 후 다양한 측면의 효능 평가
- 활용 : 개발된 단일 백신의 실제 농장에서의 효과 분석

나. 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신의 면역학적 반응 연구

1) 백신의 체액성 및 세포성 면역학적 반응 평가

- 재료 : 1주령 자돈
- 방법 : 1주 및 3주령에 백신 접종 후 항체 반응 및 세포성 면역 반응 측정

- 활용 : 항체 생성 능력 이외 세포 매개성 면역 측정의 지표
- 2) 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신과 수입 백신 효능 비교
 - 재료 : 1주령 및 3주령 자돈
 - 방법 : 각 백신 접종 후 양적, 질적 백신 효과 비교 분석
 - 활용 : 개발된 백신이 보편적으로 사용되고 있는 수입백신 대체 가능성
- 3) 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신과 국내 백신 효능 비교
 - 재료 : 1주령 및 3주령 자돈
 - 방법 : 각 백신 접종 후 양적, 질적 백신 효과 비교 분석
 - 활용 : 개발된 백신이 상용화 되어 있는 국내 백신 대체 가능성

다. 돼지 썬코바이러스 2형 및 홍막페렴균 복합백신 야외임상 실험

- 1) 안전성 확인 시험
 - 재료 : 3개 시험 농장 실험군 각 25두
 - 방법 : 실험군에 개발된 백신 접종 후 안전성 확인
 - 활용 : 발생 가능한 목적 동물에서의 개발 백신에 대한 부작용 평가
- 2) 백신 효능 평가
 - 재료 : 3개 시험 농장 실험군 및 대조군 각 35두
 - 방법 : 실험군에 개발된 백신을 5주령에 접종 후 다양한 측면의 효능 평가
 - 활용 : 개발된 복합 백신의 실제 농장에서의 효과 분석

4. 마이코플라즈마균 분리 및 배양법 연구

가. 마이코플라즈마균 분리

- 1) 마이코플라즈마균 분리를 위한 배양액 비교
 - 재료 : 기본 배양액 및 그 외 첨가물
 - 방법 : 5가지 다양한 조성을 비교하여 최적 배양액 확립
 - 활용 : 백신 제조를 위한 대량 배양시 활용
- 2) 가검물에서 마이코플라즈마균 분리 및 배양
 - 재료 : 도축장 돼지의 폐장 가검물 채취
 - 방법 : 가검물 채취 후 샘플 이동 및 유제를 통한 균 접종
 - 활용 : 다양한 야외 분리주를 확보하여 병원성 비교

나. 마이코플라즈마균 검출기법

- 1) 중합효소 연쇄반응기법을 통한 진단
 - 재료 : 진단용 프라이머
 - 방법 : 마이코플라즈마균 검출을 위한 다양한 프라이머 개발
- 2) 등온증폭반응기법을 이용한 마이코플라즈마균 검출 기법 개발
 - 재료 : 등온증폭법 진단 프라이머 6개
 - 방법 : 일정한 반응 온도를 적용하여 60분만에 신속 검출

- 활용 : 신속한 마이코플라즈마 검출을 통한 다양한 분리주 확보

5. 돼지 썬코바이러스 2형과 마이코플라즈마균 복합백신 연구

가. 마이코플라즈마균 최적 배양 조건 확립

1) 배양 배지의 비교 연구

- 재료 : 기본 배양 배지, 포도당 및 Thallium
- 방법 : 포도당 및 Thallium 의 첨가로 나타나는 배양 효과 분석
- 활용 : 최적의 마이코플라즈마 배양액 조성

2) 배양 최적 환경에 관한 연구

- 재료 : ATCC 마이코플라즈마 균주
- 방법 : 온도와 CO₂ 농도 차이가 마이코플라즈마 배양에 미치는 영향 분석
- 활용 : 최적의 배양 환경을 확립하여 대량 생산 방법에 적용

나. 돼지 마이코플라즈마 야외 균주 분리 방법 확립

1) 양돈 농장 폐렴 돼지의 비강 면봉 샘플링

- 재료 : 호흡기 증상을 나타내는 돼지, 멸균 비강 면봉
- 방법 : 돼지 비강으로부터 균을 채취하여 배지에 증식 및 신속 진단
- 활용 : 증상을 나타내는 생축에서 직접 균을 채취하여 신속한 진단 및 균주 확보

2) 폐장 가검물의 마이코플라즈마 감염 여부 신속진단 확립

- 재료 : 샘플링 폐장 및 중합효소 연쇄반응 키트
- 방법 : 키트를 사용하여 별도의 DNA 추출과정 없이 중합효소 연쇄반응 실시
- 활용 : 2시간 이내 진단이 가능해짐에 따라 효율적인 샘플 선정

다. 가검물의 유제화 프로토콜 확립

1) 폐장 가검물의 유제화

- 재료 : 돼지의 폐장 가검물
- 방법 : 양성 샘플을 무균적으로 채취하여 세절 및 멸균 막대로 유제화

2) 유제의 분리 및 배양법 확립

- 재료 : 유제화된 가검물
- 방법 : 조성된 분리 배지에 유제액을 접종하여 다양한 조건에서 배양
- 활용 : 최초 양성 가검물에서 마이코플라즈마를 증식시키는 프로토콜 확립

6. 백신 제조 기술 및 대량 생산 공정 연구

가. PK-15 세포주 및 바이러스 종독의 seed lot 확립 및 배양기술 확립

1) 접종 바이러스 농도와 생산되는 양 비교

- 방법 : 0.01-2까지의 MOI 로 접종하여 생산되는 바이러스 양 비교

- 활용 : 대량 생산할 때 최적의 접종량 결정

나. 돼지 썬코바이러스 2형 대량 생산 증식 방법 확립

- 1) 세포 factory 시스템 배양
 - 재료 : factory 배양 플라스크 및 기본 배양액, 첨가물
 - 방법 : 10층 규모의 factory 플라스크에 세포 배양 후 바이러스 대량 증식
 - 활용 : 백신 균주 대량 생산
- 2) factory 시스템에서 바이러스 회수
 - 초저온 냉동고에서의 동결 및 용해를 통한 바이러스 회수

다. 항원 정제 기술 확립

- 1) 돼지 썬코바이러스 2형 항원 정제 및 농축
 - 방법 : 여과 filter (미세여과) 및 membrane (초여과) 을 사용하여 정제
 - 활용 : 백신 제조 시 순수 정제로 면역반응 최대화
- 2) 흉막폐렴 항원 정제기술 확립
 - 방법 : 투석 여과 방법을 통한 LPS 제거율 측정
 - 활용 : 그람 음성균 백신 제조시 LPS로 인한 독성 최소화

라. 백신의 제조 기술 확립

- 1) 백신 부형제 후보 물질에 대한 효과 확인 및 선정
 - 재료 : 오일 및 알루미늄 젤, 카보폴 등 부형제
 - 방법 : 백신주 항원에 각 후보 물질을 첨가한 후 실험동물에 접종
 - 활용 : 항체 형성능이 가장 높은 물질 선정
- 2) 백신의 돼지 썬코바이러스 2형 항원량 결정 시험
 - 방법 : 백신 내 바이러스 항원량의 변화에 따른 면역원성 분석
 - 활용 : 백신 내 최적의 바이러스 항원량 결정
- 3) 백신의 흉막폐렴균 항원량 결정
 - 방법 : 백신 내 흉막폐렴균 항원량 농도에 따른 면역반응 비교
 - 활용 : 백신 내 최적의 흉막폐렴균 항원량 결정

마. 복합 공정 개발

- 1) 벌크의 제조
 - 재료 : 백신에 생산에 사용할 종독주 및 종균주
 - 방법 : 세포 및 배양액에 대량 배양, 회수 및 균체의 불활화
- 2) 벌크의 검사
 - 방법 : 불활화 균주 배양시 발육 유무 판정
 - 균체의 경우 항원을 2진 희석하여 optical density를 측정하여 희석배수 산정
- 3) 제품의 표준화

- 1회 접종량에 적합한 항원 조성 표준화

7. 백신 등록허가 시험

가. 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신 품목허가 시험 실시

1) 백신 조성

- 항원 및 불활화 첨가제, 부형제 농도 조성

2) 백신의 기본 시험

- 특성 시험 : 색, 혼탁도, 침전물 유무 및 이취 검사
- 무균 시험 : 동물용의약품 기준에 따라 배지에 접종하여 세균 감염 여부 확인
- 수소이온 농도 시험 : 개발 백신의 수소이온농도 변화 측정
- 방부제 정량시험 : 포르말린 기준치 함량 여부 검사
- 불화화 확인시험 : 개발 백신의 세포 접종 후 변성 여부 확인

3) 기니피그를 통한 백신의 면역원성 시험

- 재료 : 실험군 4마리 및 대조군 2마리
- 방법 : 1두 분량의 백신을 2주 간격으로 2회 근육 접종하고 2주 후 항체가 측정
- 활용 : 개발 백신의 면역원성이 국가 검정 기준에 부합하는지 여부 확인

4) 3주령 자돈을 통한 면역원성 시험

- 재료 : 시험 자돈 6두 및 대조군 4두
- 방법 : 1두 분량의 백신을 2주 간격으로 2회 근육 접종 후 ELISA 검사
- 활용 : 목적 동물에 대한 개발 백신 면역 효과 분석

5) 장기 특성 및 무균시험

- 방법 : 개발 백신을 제조 후 24개월까지 국가검정기준에 따라 기본시험 및 무균시험 수행
- 활용 : 개발 백신 성상의 균일성 및 안전성에 대한 분석

나. 돼지 썬코바이러스 2형 및 흉막폐렴 백신 품목허가 시험 실시

1) 백신의 조성

- 각 항원 함량 및 부형제 표준화

2) 백신의 특성 시험

- 색조 및 투명도, 혼탁도
- 이물, 이취, 내용물의 균일성 시험

3) 백신 무균 시험

- 방법 : 3개 이상의 백신에 대하여 액상 체제를 직접 배양
- 활용 : 백신의 오염에 대한 안전성 측정

4) 수소이온 농도 시험

- 5회 반복 측정하여 기준치 여부 확인

5) 방부제 정량시험

- 섯프 시약을 이용하여 포르말린 정량시험 실시
 - 국가 검정 함량 기준치 미만 확인
- 6) 불활화 확인 시험
- 재료 : 불활화제 제거한 시험 재료
 - 방법 : 시험 재료를 세포에 접종하여 세포변성 및 혈구 응집반응 확인
- 7) 백신 내 돼지 썬코바이러스 2형 면역원성 시험
- 재료 : 기니픽
 - 방법 : 1회 분량을 기니픽 근육에 접종하여 ELISA 항체가 측정
 - 판정 : 국가 검정기준인 항체가 320배 이상 여부
- 8) 백신 내 흉막폐렴균에 대한 면역원성 시험
- 재료 : 토끼
 - 방법 : 1회 분량을 토끼 근육에 접종하여 ELISA 항체가 측정
 - 판정 : 국가 검정기준인 항체가 320배 이상 여부
- 9) 목적동물 접종시험 (돼지)
- 재료 : 3주령 자돈
 - 방법 : 5주령에 백신 접종하여 2주 후 항체가 측정
 - 활용 : 목적 동물에서의 면역 반응 지표
- 10) 장기 확인시험
- 기본 시험: 안정성 및 균일성 확보
 - 면역원성 시험 : 제조일로부터 12개월간 면역원성 변화 여부 측정

IV. 연구개발 결과

각 세부 과제별 연구 내용이 유기적으로 수행되어 백신 제조에 필요한 균주 확보에서 효능 평가까지 성공적인 결과를 도출할 수 있었다. 과제 1차년도에는 돼지 썬코바이러스 2형 단일 백신을 제조하여 품목 허가를 받고, 야외 임상 실험까지 수행하였다. 먼저 국내에서 분리된 돼지 썬코바이러스 2형 바이러스를 백신주로 선정하여 특성을 분석하고 증식 능력을 최적화하였으며, 아울러 향후 바이러스 역가를 높일 수 있는 세포주의 개발을 수행하였다. 선정된 백신주와 부형제의 다양한 조성을 통해 최대 효과를 낼 수 있는 조성 비율로 시작품을 제조하여 기본 정상 시험 및 실험동물에서 안전성, 면역원성 시험에서 국가 검정 기준에 적합함을 확인하였고 백신의 대량 생산 공정을 마련하였다. 또한 목적 동물인 돼지에 접종 실험을 실시하여 바이러스 공격 접종에 대한 예방 효과를 확인하였고 실제 농장 실험에 적용하여 생산성 향상에도 효과를 나타냈다. 향후 썬코-마이코 백신 제조를 위하여 마이코플라즈마에 대한 분리 및 진단 프로토콜을 확립하여 백신 균주로 사용할 후보 균주를 선별하였다. 과제 2차년도에는 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 백신을 사용하여 다양한 효능 평가를 실시하였다. 웅돈에서의 정액 내 바이러스 배출 감소 효과를 확인하였고, 수입백신과의 비교 효능 평가에서 대등한 효과를 나타냄으로써 보편적으로 상용화된 수입백신을 대체할 수 있는 가능성을 보였다. 특히 2차

년도에는 백신의 단순한 항체 형성 능력 이외에 최근 중요한 면역 지표로 사용되고 있는 세포 매개성 면역 유도에 대한 연구를 수행하였다. 이를 통해 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 백신이 항체 형성 능력, 뿐만 아니라 임파구를 통한 세포 매개성 면역을 충분히 유도하는 것을 확인하였다. 또한 썬코-홍막 복합백신의 시작품을 제작하여 기본 정상 시험 및 안전성 시험, 면역원성 시험 등 품목 허가 시험을 실시하여 국가 검정 기준에 부합함을 확인하였고, 백신 내의 각 항원에 대한 면역 반응 및 예비 효능 실험을 통하여 목적 동물인 돼지에서 예방 효과를 확인하였다. 아울러, 1차년도에 분리한 마이코플라즈마를 이용하여 썬코-마이코 복합백신을 개발하여 목적 동물에 대한 체액성, 세포성 면역 반응을 확인하였다.

3차년도에는 썬코-홍막 복합백신의 실험실 내 공격 접종 및 야외 농장 실험을 통하여 백신이 각 바이러스 및 세균을 각각 방어할 수 있음을 확인하였고, 농장의 생산성 향상 측면에서도 우수한 효능을 나타냈다. 또한 2차년도에 개발된 썬코-마이코 복합백신에 대한 실험실 내 공격 접종 실험을 실시하여, 각 단일 백신이 나타내는 효과를 백신이 충분히 유도할 수 있음을 확인하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구를 통하여 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일 백신 및 돼지 썬코-홍막 복합백신에 대한 품목허가를 취득하였고, 다양한 실험을 실시하여 그 결과를 국제 전문 학술지에 다수 게재하여 효능을 입증하였다. 현재 국내에서 가장 보편적으로 사용되고 있는 돼지 썬코바이러스 2형 수입백신의 경우 본 과제에서 개발된 백신과는 달리 단백질을 정제하여 항원으로 사용하고 있기 때문에 생산 비용이 높다. 본 과제에서 개발된 백신은 최적화된 세포에서 증식된 높은 역가의 바이러스를 항원으로 사용하여 저비용으로 백신을 생산할 수 있게 되었다. 특히 수입백신과의 비교실험에서도 대등한 효능이 입증되어 저비용으로 고효율의 백신을 상품화할 수 있게 되었다. 돼지 유행성 폐렴을 일으키는 마이코플라즈마의 경우 대부분의 농가에 상재하여 많은 손실을 주고 있는 병원체로 많은 농가에서 백신을 접종하고 있지만, 돼지 썬코바이러스 2형 백신 등 타 백신과 접종 연령이 비슷하여 접종 시기나 인력 부담 등으로 어려움이 있다. 본 과제에서는 국내에서 분리된 균주를 이용하여 돼지 썬코-마이코 복합백신을 최적의 항원 조성으로 제작하여 그 백신 효과를 입증하였다. 이 과정에서 마이코플라즈마에 대한 진단 기법 등 4개의 특허를 출원하였으며, 국내 학술지에 다수의 논문을 게재하였다. 향후 축적된 기술을 통하여 돼지 썬코-마이코 복합백신에 대한 품목 허가를 취득하고 상품화할 예정이다.

SUMMARY

Porcine circovirus-associated disease (PCVAD), which is caused by porcine circovirus type 2 (PCV2), has been recognized as one of the most economically important diseases in the global swine industry, including in Korea. The annual economic loss from severe PCVAD (10-15% mortality) is approximately estimated 350 billion Won according to the Korea Rural Economic Institute. Since PCV2 vaccines were introduced into the world market in 2006, vaccination is a major tool for the control of PCV2 infection. In Korea, since the first PCV2 vaccine was introduced in 2008, now five fully licensed commercial vaccines from international companies and six fully licensed commercial vaccines from Korean companies are available in Korea. The Korean pharmaceutical companies started producing PCV2 vaccine in 2009, but market share was only 8.1 % in total marketing. This is because most farms choose the imported PCV2 commercial vaccines as they didn't have confidence in the effect of the PCV2 vaccine produced from Korean companies. The effects of imported commercial PCV2 vaccine have been demonstrated in numerous field and laboratory studies. But because of the antigen purification system, imported PCV2 vaccine used the most in Korea was produced at high manufacturing cost so vaccine price was relatively high. Therefore, the main purpose of this research is the development of PCV2 vaccine that has highly protective effects as much as the imported PCV2 vaccine and produced at lower cost.

Actinobacillus pleuropneumoniae induced porcine respiratory disease complex (PRDC) in pigs of 10-15 weeks of age infected with PCV2 and thus each vaccination against PCV2 and *A. pleuropneumoniae* is needed to prevent PRDC. But vaccination respectively, was expense-bearing and causing labor problems. Therefore, in addition to development of single PCV2 vaccine, we developed the combined PCV2-*A. pleuropneumoniae* vaccine in this research. This combined vaccine can be the most competitive vaccine in Korea since no other this type of vaccine was produced and resolved the problem with each of single vaccination.

This project of the Animal Vaccination Center covers the investigation of diverse vaccine effects as well as the development of the vaccine. Generally, humoral immune response against PCV2 vaccination was demonstrated in many previous studies, but the information of cell-mediated immune response against PCV2 vaccination was relatively little. Therefore we evaluated the interferon- γ secreting cell, proportion of T-cell lymphocyte, and DTH test to analyze a level of cell-mediated immune response against developed PCV2 vaccine. In virus challenging study, the developed PCV2 vaccine significantly induced the cell-mediated immune responses as well as the

production of neutralizing antibody and these effects of vaccination reduced the viremia, virus excretion, and histopathologic lesion. Concurrently, conventional farm study was performed to evaluate the improvement of economical aspect followed by the developed PCV2 vaccination. In addition, experimental vaccination study with boar was performed to identify the effects of vaccination on reducing virus excretion in semen. In this study, the shedding of virus in semen in vaccinated boar were significantly lower than non-vaccinated boars. Also, comparison studies between the developed PCV2 vaccine and the commercial imported vaccine were also performed to compare the level of protective immune responses by the vaccines. As a results, the developed PCV2 vaccine induced equal or more effects on prevention of PCV2 compared to the commercial imported vaccine and thus we expect that the developed PCV2 vaccine can substitute the commercial imported vaccine.

Generally, PK-15 cell was used to replicate PCV2 virus. but PCV2 virus can not be replicated in most PK-15 cell more than titer of 10^4 TCID₅₀/ml. To resolve this problem, we developed the cell line derived from swine kidney that have the ability of replicating PCV2 more than titer of 10^6 TCID₅₀/ml. Therefore we can produce the PCV2 vaccine with high titer of PCV2 antigen in low cost of production.

In case of the combined PCV2 - *A. pleuropneumoniae* vaccine, the most important issue was a proportion of each antigen in 1 dose vaccine. Through a diverse study with different antigen proportion, the optimal composition of the combined vaccine could be determined. The developed combined vaccine could induce the immune response against PCV2 and *A. pleuropneumoniae* respectively, as much as each of the single vaccination did. Also, in conventional farm study, vaccination of the developed combined vaccine improve the mortality and average weight gain as reduced the occurrence of PMWS and PRDC. As a result, this vaccine will offer new strategy of vaccination to conventional farm, satisfying the efficacy, convenience, and economic properties.

Mycoplasma hyopneumoniae is a causative pathogen of porcine epizootic pneumoniae. *M. hyopneumoniae* induced the PRDC concurrently infected with PCV like *A. pleuropneumoniae*. *M. hyopneumoniae* also may cause the PMWS to potentiate the PCV2 replication. In first year of the research like PCV2-*A. pleuropneumoniae* combined vaccine, PCV2-*M. hyopneumoniae* combined vaccine was developed and used in various experimental studies to demonstrate effects of the vaccination. In case of *M. hyopneumoniae*, unlike other bacteria it is difficult to diagnosis, isolation and culture. Therefore in first year of the project, we mainly tried to develop the methods associated to rapid diagnosis, isolation from samples, and culture. In previous studies, it was demonstrated that humoral immune responses were not critical to prevent against *M. hyopneumoniae*, and thus cell-mediated immune response by the

developed combined vaccine was mainly evaluated in a diverse experimental studies such as ELISPOT, flow cytometry, and DTH test. The PCV2 single and PCV2-*A. pleuropneumoniae*, PCV2-*M. hyopneumoniae* combined vaccines developed from this project were relatively low cost of production and the efficacy in prevention of disease were demonstrated by various clinical and field studies. Therefore, these vaccines were expected to be competitive in marketing of vaccine and contribute to increase of productivity in pig industry.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction

Part 1. Objectives and the scope

Chapter 2. Status of domestic and international technology developments

Chapter 3. Transfer the standardized production methods of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccine and PCV2-*Actinobacillus pleuropneumoniae* combined vaccine into vaccine company an registration test

Part 1. Introduction

Part 2. Material and Methods

1. Establishment of trial product tag of PCV2 vaccine
2. Standardization of culture for Porcine Kidney (PK)-15 cell
3. Standardization of PCV2 replication
4. Development of trial product of PCV2
5. Preliminary test of PCV2 vaccine for registration
6. Safety test of developed PCV2 vaccine
7. Experiment of PCV2 challenge with developed PCV2 vaccine
8. Replication of PCV2 with porcine fetal kidney derived SK cell
9. Standardization of culture for *A. pleuropneumoniae*
10. Development of trial product for PCV2-App combined vaccine
11. Experiment of PCV2-*A. pleuropneumoniae* challenge with PCV2-*A. pleuropneumoniae* combined vaccine
12. Safety test of developed PCV2-*A. pleuropneumoniae* combined vaccine
13. Differentiated evaluation of PCV2 vaccine efficacy through a experimental study with boar
14. Development of skill for combining PCV2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen

Part 3. Results and Discussion

1. Standardization of porcine circovirus type 2 (PCV2) replication
2. Development of trial product of PCV2
3. Preliminary test of PCV2 vaccine for registration
4. Safety test of developed PCV2 vaccine
5. Experiment of PCV2 challenge with developed PCV2 vaccine

6. Replication of PCV2 with porcine fetal kidney derived SK cell
7. Standardization of culture for *A. pleuropneumoniae*
8. Development of trial product for PCV2-*A. pleuropneumoniae* combined vaccine
9. Experiment of immunity induced with PCV2-*A. pleuropneumoniae* combined vaccine
10. Experiment of PCV2-*A. pleuropneumoniae* challenge with PCV2-*A. pleuropneumoniae* combined vaccine
11. Safety test of PCV2-*A. pleuropneumoniae* combined vaccine
12. Differentiated evaluation of PCV2 vaccine efficacy through a experimental study with boar
13. Development of skill for combining PCV2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen

Chapter 4. High titer production of porcine circovirus type 2 (PCV2) using adaptive cell culture

Part 1. Introduction

Part 2. Material and Methods

1. Production of cell strain for PCV2 replication
2. Development of cell strain and test for sensitivity to PCV2
3. Establishment of optimal culture condition for PCV2 replication

Part 3. Results and Discussion

1. Production of cell strain for PCV2 replication
2. Development of cell strain and test for sensitivity to PCV2
3. Establishment of optimal culture condition for PCV2 replication

Chapter 5. Field clinical study for vaccine registration

Part 1. Introduction

Part 2. Material and Methods

1. Field study of developed porcine circovirus 2 (PCV2) vaccine
2. Immune responses induced with developed PCV2 vaccine
3. Comparative study between developed PCV2 vaccine and import vaccine
4. Comparative study between developed PCV2 vaccine and domestic vaccine
5. Field study of PCV2-*Actinobacillus pleuropneumoniae* combined vaccine

Part 3. Results and Discussion

1. Field study of developed PCV2 vaccine
2. Immune responses induced with developed PCV2 vaccine
3. Comparative study between developed PCV2 vaccine and import vaccine

4. Comparative study between developed PCV2 vaccine and domestic vaccine
5. Field study of PCV2-*Actinobacillus pleuropneumoniae* combined vaccine

Chapter 6. Development of isolation and passage of *Mycoplasma hyopneumoniae*

Part 1. Introduction

Part 2. Materials and Methods

1. Isolation of *M. hyopneumoniae*
2. Establishment of methods for isolating *M. hyopneumoniae*
3. Toxicological evaluation of *M. hyopneumoniae*

Part 3. Results and Discussion

1. Results of comparison among Mhp culture media
2. Detection of *M. hyopneumoniae* with LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) test
3. Detection of *M. hyopneumoniae* strain isolated from field
4. Toxicological evaluation of *M. hyopneumoniae*

Chapter 7. Development of initial porcine circovirus 2 (PCV2) and *Mycoplasma hyopneumoniae* combined vaccine

Part 1. Introduction

Part 2. Material and Methods

1. Development of methods for *M. hyopneumoniae* culture
2. Development of methods for detection of *M. hyopneumoniae*
3. Development of methods of rapid isolation and culture for *M. hyopneumoniae*
4. Establishment of methods to isolate field strains of *M. hyopneumoniae*
5. Development of Consensus PCR to diagnosis *M. hyopneumoniae*
6. Isolation of field strains of *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis*
7. Development of methods to inoculate *M. hyopneumoniae*
8. Comparison of pathogenicity among field strains of *M. hyopneumoniae*
9. Evaluation of *M. hyopneumoniae* vaccine efficacy
10. Evaluation of PCV2 and *M. hyopneumoniae* combined vaccine efficacy

Part 3. Results and Discussion

1. Development of methods for *M. hyopneumoniae* culture
2. Development of methods for detection of *M. hyopneumoniae*
3. Development of methods of rapid isolation and culture for *M. hyopneumoniae*
4. Establishment of methods to isolate field strains of *M. hyopneumoniae*
5. Development of Consensus PCR to diagnosis *M. hyopneumoniae*
6. Isolation of field strains of *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis*

7. Development of methods to inoculate *M. hyopneumoniae*
8. Comparison of pathogenicity among field strains of *M. hyopneumoniae*
9. Evaluation of *M. hyopneumoniae* vaccine efficacy
10. Evaluation of PCV2 and *M. hyopneumoniae* combined vaccine efficacy

Chapter 8. Development of porcine circovirus 2 (PCV2) production and
Research of large scale production technology and process

Part 1. Introduction

Part 2. Material and Methods

1. Establishment of culture technique of PK-15 cell and PCV2 virus
2. Establishment of technique for PCV2 purification
3. Establishment of technique for *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigen purification
4. Establishment of technique for production of PCV2-*A. pleuropneumoniae* combined vaccine
5. Mass Production of PCV2 for development of vaccine
6. Mass Production of *A. pleuropneumoniae* for development of vaccine
7. Standardization of production protocol for PCV2-*A. pleuropneumoniae* combined vaccine

Part 3. Results and Discussion

1. Establishment of culture technique of PK-15 cell and PCV2 virus
2. Establishment of technique for PCV2 purification
3. Establishment of technique for *A. pleuropneumoniae* antigen purification
4. Establishment of technique for production of PCV2-*A. pleuropneumoniae* combined vaccine
5. Mass Production of PCV2 for development of vaccine
6. Mass Production of *A. pleuropneumoniae* for development of vaccine

Chapter 9. Clinical test and licencing of the Porcine circovirus 2 (PCV2) and
Actinobacillus pleuropneumoniae combined vaccine

Part 1. Introduction

Part 2. Material and Methods

1. Test for licencing of developed PCV2 vaccine (Post production)
2. Safety test for licencing of developed PCV2 vaccine
3. Document for registration for developed PCV2 vaccine
4. Test for licencing of developed PCV2-*A. pleuropneumoniae* combined vaccine (Post production)

5. Safety test for licencing of developed PCV2-*A. pleuropneumoniae* combined vaccine
6. Document for licencing for developed PCV2-*A. pleuropneumoniae* combined vaccine

Part 3. Results and Discussion

1. Test for licencing of developed PCV2 vaccine (Post production)
2. Safety test for licencing of developed PCV2 vaccine
3. Test for licencing of developed PCV2-*A. pleuropneumoniae* combined vaccine (Post production)
4. Safety test for licencing of developed PCV2-*A. pleuropneumoniae* combined vaccine

Chapter 10. Results of research performance and Plans for Application of development

Chapter 11. References

목 차

제 1 장 서 론

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신과 흉막폐렴균 백신 제조 기술 이전 표준화 연구 및 품목 허가 시험

제 1 절 서 설

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신 시제품 부표 확립
2. PK-15 세포 배양 표준화 연구
3. 돼지 쉼코바이러스 2형 증식 표준화 연구
4. 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신의 시제품 제작
5. 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신 품목허가를 위한 예비 실험
6. 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신 안전성 검사
7. 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신 공격접종 실험
8. 돼지 태아 신장 유래 초대 배양 세포(SK cell)를 이용한 바이러스 증식
9. 돼지 흉막폐렴균 배양 표준화 연구
10. 돼지 쉼코바이러스 2형과 흉막폐렴균 복합백신 시제품 제작
11. 돼지 쉼코바이러스 2형과 흉막폐렴균 복합백신 공격접종 실험
12. 쉼코흉막 복합백신 안전성 시험
13. 옹돈을 이용한 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신의 차별화된 효능 평가 연구
14. 돼지 쉼코바이러스 2형 항원과 마이코플라즈마균 항원의 복합 기술 개발 연구

제 3 절 결 과 및 고 찰

1. 돼지 쉼코바이러스 2형 증식 표준화 연구 결과
2. 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신의 시제품 제작
3. 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신 품목허가를 위한 예비 실험 결과
4. 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신 안전성 검사 결과
5. 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신 공격접종 실험 결과
6. 돼지 태아 신장 유래 초대 배양 세포(SK cell)를 이용한 바이러스 증식 결과
7. 돼지 흉막폐렴균 배양 표준화 연구
8. 돼지 쉼코바이러스 2형과 흉막폐렴균 복합백신 시제품 제작 결과
9. 돼지 쉼코바이러스 2형과 흉막폐렴균 복합백신 면역 유도 실험
10. 돼지 쉼코바이러스 2형과 흉막폐렴균 복합백신 공격접종 실험 결과

11. 복합 시험백신 안전성 시험 결과
12. 옹돈을 이용한 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신의 차별화된 효능 평가 연구 결과
13. 돼지 쉼코바이러스 2형 항원과 마이코플라즈마 항원의 기술 개발 연구 결과

제 4 장 돼지 쉼코바이러스 2형 증식 최적화 연구

제 1 절 서 설

제 2 절 재료 및 방법

1. 돼지 쉼코바이러스 2형 증식용 세포주의 제작
2. 세포주의 개발 및 돼지 쉼코바이러스 2형 감수성 검사
3. 돼지 쉼코바이러스 2형 생산을 위한 최적의 배양조건 탐색

제 3 절 결과 및 고찰

1. 돼지 쉼코바이러스 2형 증식용 세포주의 제작
2. 세포주의 개발 및 돼지 쉼코바이러스 2형 감수성 검사
3. 돼지 쉼코바이러스 2형 생산을 위한 최적의 배양조건 탐색

제 5 장 백신 품목 허가를 위한 야외임상 실험

제 1 절 서 설

제 2 절 재료 및 방법

1. 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신의 야외임상 실험
2. 개발된 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신의 면역학적 반응 연구
3. 개발된 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신과 수입 쉼코바이러스 백신 비교
4. 개발된 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신과 국내 쉼코바이러스 백신 비교
5. 돼지 쉼코바이러스 2형 및 홍막페렴균 복합백신 야외임상 실험

제 3 절 결과 및 고찰

1. 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신의 야외임상 실험 결과
2. 개발된 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신의 면역학적 반응 연구 결과
3. 개발된 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신과 수입 쉼코바이러스 백신 비교
4. 개발된 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신과 국내 쉼코바이러스 백신 비교
5. 돼지 쉼코바이러스 2형 및 홍막페렴균 복합백신 야외임상 실험 결과

제 6 장 마이코플라즈마균 분리 및 배양법 연구

제 1 절 서 설

제 2 절 재료 및 방법

1. 마이코플라즈마균 분리
2. 마이코플라즈마균 분리법 프로토콜

3. 마이코플라즈마균 독성 평가

제 3 절 결과 및 고찰

1. 마이코플라즈마균 표준 균주를 이용한 분리 배양액 비교 결과
2. 등온증폭반응기법을 이용한 검출 결과 확인
3. 마이코플라즈마균 야외 분리 균주 확인
4. 마이코플라즈마균 독성 평가 결과

제 7 장 돼지 썬코바이러스 2형과 마이코플라즈마균 복합백신 연구

제 1 절 서 설

제 2 절 재료 및 방법

1. 돼지 마이코플라즈마균 최적 배양법 개발
2. 돼지 마이코플라즈마균 검출법 개발
3. 돼지 마이코플라즈마균 신속 분리 배양법 개발
4. 돼지 마이코플라즈마균 야외 균주 분리 방법 확립
5. 마이코플라즈마균에 대한 Consensus PCR의 개발
6. 마이코플라즈마 하이오뉴모니에와 하이오라이니스 야외 분리 균주 확보
7. 돼지 마이코플라즈마균 최적 접종방법 개발
8. 돼지 마이코플라즈마균 야외분리 균주 병원성 비교방법 확립
9. 마이코플라즈마균 단일백신 효능평가
10. 돼지 썬코바이러스 2형과 마이코플라즈마균 복합백신의 공격접종을 통한 효능 검사

제 3 절 결과 및 고찰

1. 돼지 마이코플라즈마균 최적 배양법 개발 결과
2. 돼지 마이코플라즈마균 검출법 개발 결과
3. 돼지 마이코플라즈마균 신속 분리 배양법 개발 결과
4. 돼지 마이코플라즈마균 야외 균주 분리 방법 확립 결과
5. 돼지 마이코플라즈마균에 대한 Consensus PCR의 개발 결과
6. 마이코플라즈마 하이오뉴모니에와 하이오라이니스 야외 분리 균주 확보 결과
7. 돼지 마이코플라즈마균 최적 접종방법 개발 결과
8. 돼지 마이코플라즈마균 야외분리 균주 병원성 비교방법 확립 결과
9. 마이코플라즈마균 단일백신 효능평가
10. 돼지 썬코바이러스 2형과 마이코플라즈마균 복합백신의 공격접종을 통한 효능 검사

제 8 장 백신 제조 기술 및 대량 생산 공정 연구

제 1 절 서 설

제 2 절 재료 및 방법

1. PK-15 세포주 및 바이러스 증독 확립 및 배양기술 확립
2. 돼지 썬코바이러스 2형의 정제 기술 확립

3. 홍막페렴균 항원 정제 기술 확립
4. 복합백신의 제조 기술 확립
5. 돼지 썬코바이러스 2형 대량 생산 증식 방법 확립
6. 홍막페렴균 대량 증식 방법 확립
7. 복합백신 제조 공정의 표준화

제 3 절 결과 및 고찰

1. PK-15 세포주 및 바이러스 종독 확립 및 배양 결과
2. 돼지 썬코바이러스 2형의 정제 결과
3. 항원 정제 기술 실험 결과
4. 복합 백신의 제조 기술 실험 결과
5. 돼지 썬코바이러스 2형 대량 생산 증식 실험 결과
6. 홍막페렴균 대량 증식 실험 결과

제 9 장 백신 등록허가 시험

제 1 절 서 설

제 2 절 재료 및 방법

1. 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신 품목허가 시험 실시 (제조 직후)
2. 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신 품목허가 시험 실시 (안정성 확인)
3. 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신 등록 허가서 제출
4. 돼지 썬코바이러스 2형 및 홍막페렴균 복합백신 품목허가 시험 실시 (제조 직후)
5. 돼지 썬코바이러스 2형 및 홍막페렴균 복합백신 품목허가 시험 실시 (안정성)
6. 돼지 썬코바이러스 2형 및 홍막페렴균 복합백신 품목허가 제출

제 3 절 결과 및 고찰

1. 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신 품목허가 시험 결과 (제조 직후)
2. 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신 품목허가 시험 결과 (안정성 확인)
3. 돼지 썬코바이러스 2형 및 홍막페렴균 복합백신 품목허가 시험 결과 (제조 직후)
4. 돼지 썬코바이러스 2형 및 홍막페렴균 복합백신 품목허가 시험 결과 (안정성)

제 10 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 11 장 참고문헌

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

본 동물백신 사업단의 연구개발 목적은 돼지 소모성 질환의 주된 원인이 되고 있는 돼지 썩코바이러스 2형에 대한 백신과 돼지 썩코바이러스 2형-홍막페렴균 복합백신 및 돼지 썩코바이러스 2형-마이코플라즈마 복합백신을 개발하고 다양한 측면의 효능까지 입증하는 것이다. 특히 돼지 썩코바이러스 2형 단일백신 및 돼지 썩코바이러스 2형-홍막페렴균 복합백신의 경우 기술이전 및 품목허가를 취득하여 상품화하고자 한다. 돼지 썩코바이러스 2형 백신은 국내에 2008년 수입백신이 처음 도입되었고, 2009년부터 국내 백신 회사 제품이 출시되기 시작했다. 하지만 다양한 국내 백신의 출시에도 불구하고 2009년 국내 백신의 점유율은 전체 돼지 썩코바이러스 2형 백신 시장에 8.1 % 에 머물렀다. 이것은 양돈농가에 대한 국산 백신에 대한 인식 부족과 수입백신 만큼의 효능을 확신시킬 수 없었기 때문이다. 2010년 정부의 돼지 썩코바이러스 2형 백신 보조 사업에서도 농가의 80% 이상이 수입백신을 선택하였고, 획기적인 전환이 없다면 국내 백신의 외면은 지속될 수 밖에 없다. 국내 돼지 썩코바이러스 2형 백신 시장에서 가장 점유율이 높은 수입백신의 경우, 바이러스의 주요 항원 부위만을 정제하여 사용하기 때문에 생산 비용이 높고 이에 따라 가격이 상대적으로 높다. 따라서 본 연구를 통해 저비용 고효율의 백신을 개발하여 국내 백신의 외면 현상을 극복하고 농가 생산성 증대에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

본 동물백신 사업단의 크게 2가지 핵심 과제로 구분된다. 첫 번째는 원천기술을 확보하고 있는 대학 연구소가 주관하여 수행되는 세부 과제들로 바이러스 증식을 위한 세포주 개발에서부터 생산된 백신의 효능 평가까지 포함되며, 두 번째는 국내 백신 회사가 주관하여 생산된 백신의 대량화 기술 및 국가 검정기준의 품목허가 시험을 수행하게 된다.

1차 목표인 돼지 썩코바이러스 2형에 대한 백신 개발의 특성은 높은 역가의 백신을 생산하기 위해 세포 배양을 최적화하고, 아울러 기존의 세포보다 우월한 바이러스 증식 능력을 갖는 세포주를 개발부터 시작된다. 생산된 백신은 다양한 측면의 효능 입증 시험을 거치게 되는데, 일반적으로 시장에 판매되고 있는 제품의 경우 혈중 항체가 측정 위주로 효능 평가가 이루어졌지만, 본 연구 과제에서는 보편적인 체액성 면역 평가, 뿐만 아니라 세포 매개성 면역에 대한 효능평가 및 병리학적 효능평가 등 다룰 수 있는 모든 측면을 수행함에 따라 기존 백신과 차별화를 두었다. 또한 수입백신과의 비교 효능 실험은 본 과제에서 개발된 백신이 기존 수입 백신을 대체할 수 있는 가능성을 제시할 수 있을 것이다.

2차 목표인 돼지 썩코바이러스 2형과 홍막페렴균 복합백신의 개발은 현재 이와 같은 종류의 복합백신이 존재하지 않는다는 점에서 의미가 있다. 홍막페렴균의 경우 돼지 썩코바이러스 2형과 복합 감염되어 10-15주령 사이에 돼지 호흡기 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 하지만 각각의 질병을 예방하기 위해 서로 다른 백신을 따로 접종하기에는 비용 측면에서 뿐만

아니라, 스트레스 유발로 인한 생산성 감소에도 영향을 미칠 수 있다. 따라서 본 과제에서는 돼지 쉼코바이러스 2형과 흉막폐렴균 복합백신을 개발하여 복합된 항원이 각 병원체에 대한 면역반응을 충분히 유도하는지 입증하고 상품화하려 한다. 단일 백신 및 복합 백신 모두 연구 개발 기간 3년 동안 야외 농장 임상 실험을 실시하게 되는데, 이를 통해 농가에 실제적으로 경제적인 이익의 기준이 될 수 있는 일일 증체량 및 폐사율, 사료 섭취 효율 개선 효과를 확인하고자 한다.

마지막으로 돼지 쉼코바이러스 2형과 흉막폐렴균 복합백신과 같은 맥락으로 돼지 쉼코바이러스 2형과 마이코플라즈마 복합 백신을 개발하고자 한다. 흉막폐렴균과 마찬가지로 마이코플라즈마도 돼지 쉼코바이러스 2형 바이러스와 복합감염 될 때 돼지 호흡기 질병을 유발하는 것으로 밝혀졌으며, 이유 후 전신 소모성 증후군에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 기존 마이코플라즈마균 백신들은 보통 1주령 또는 3주령에 접종하는데 이는 돼지 쉼코바이러스 2형과 접종 시기가 유사하지만 아직 1회 복합백신은 개발되지 않았으며 따라서 본 연구에서는 1회 복합 백신을 개발하여 농가의 인력 및 경제적 부담을 줄이고자 한다. 특히 마이코플라즈마는 병원성이 분리주마다 차이가 크고, 분리 및 진단, 배양을 통한 대량 생산이 어려운 점이 있기 때문에 본 연구에서는 국내 감염돼지에서 다양한 균주를 분리하여 면역형성에 가장 적합한 균주를 백신주로 선택하면서 이와 함께 최적의 배양 환경, 신속한 진단 조건을 확립하고자 한다.

본 연구를 통해 개발되는 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신 및 흉막폐렴균, 마이코플라즈마 복합 백신은 저비용 고효율의 백신으로서, 1회 접종으로 충분한 면역 효과를 나타낼 수 있기 때문에 가격 및 효능 측면에서 경쟁력을 갖출 수 있고 특히 복합백신의 경우 개발된 타 백신이 없기 때문에 국내 시장 점유가 용이하며 농가의 인력 및 경제적 부담을 줄일 수 있는 장점을 갖는다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 제품생산 및 시장 현황

1. 2008년 돼지 쉰코바이러스 2형 수입 백신이 국내에 도입된 이후, 2009년에 처음 국내 회사에서 생산된 백신이 출시되었다. 2009년 이후로 5가지 국내 제품이 상품화되어 있으며, 그 중 2가지 제품은 돼지 쉰코바이러스 2형 capsid 단백질을 항원으로 사용하는 백신이고 나머지 3가지 제품은 전체 돼지 쉰코바이러스 2형 바이러스를 약독화한 백신이다.
2. 코미팜에서 생산하는 PROVAC Circomaster 백신은 돼지 쉰코바이러스 2형 capsid 단백질을 항원으로 사용하는 백신으로 모돈 및 자돈 모두 접종할 수 있으며 자돈의 경우 1ml 용량으로 3주와 5주에 2회 접종하게 되어 있다.
3. 고려비엔피에서 생산하는 Donhoban-Circono 백신도 마찬가지로 돼지 쉰코바이러스 2형 capsid 단백질을 항원으로 사용하며, 3주령 자돈에 2ml 1회 접종하게 되어 있다.
4. 대성미생물연구소에서 생산하는 Circo pigvac 백신은 약독화된 전체 돼지 쉰코바이러스 2형을 항원으로 사용하며 1ml 용량으로 3주령 자돈에 1회 접종용으로 출시되었다.
5. 중앙백신연구소에서 생산하는 Suishot Circo One 백신은 약독화된 전체 돼지 쉰코바이러스 2형을 항원으로 사용하고 있으며 2ml 용량으로 3주령 자돈에 1회 접종하게 되어 있다.
6. 마지막으로 녹십자에서 생산하는 Circoshield 백신은 약독화된 전체 돼지 쉰코바이러스 2형을 항원으로 사용하고 있으며 1ml 용량으로 3주령과 5주령에 2회 접종용으로 출시되었다.

제 2 절 국외 제품생산 및 시장 현황

1. 돼지 쉰코바이러스 백신과 관련된 유사제품에는 총 5가지가 있다. 먼저 베링거인겔하임(Boehringer Ingelheim) 독일 회사는 돼지 쉰코바이러스 2형 단백질을 배쿨러바이러스(baculovirus)에서 발현한 재조합 백신을 생산하고 있으며, 국내에서는 2008년부터 자돈용으로 현재까지 판매되고 있다.

2. 두 번째 백신은 조에티스(Zoetis) 동물약품에서 생산한 돼지 썬코바이러스 1형에 돼지 썬코 바이러스 2형의 주요 항원 부위를 삽입한 키메라백신(PCV1-2 chimera) 으로서, 국내에서는 2012년 도입되어 포스테라 썬코백신이라는 제품으로 판매되고 있다.

3. 세 번째 백신은 MSD 동물약품에서 생산하는 제품으로 베링거인겔하임에서 생산하는 백신과 마찬가지로 재조합 단백질을 항원으로 사용하고 있으며, 유일하게 2 회 접종 백신이다.

4. 네 번째 백신도 MSD 동물약품 제품으로 같은 항원을 백신 생산에 사용하였으며, 1회 접종으로 출시된 제품이다.

5. 마지막으로 메리알 (Merial)에서 생산하는 국외 제품 중 유일한 모돈용 불활화 돼지 썬코바이러스 2형 백신으로 세계 시장에 가장 먼저 출시되었으며, 도입 처음에는 모돈용으로만 사용되다가 최근에는 모돈 뿐만 아니라 자돈에도 접종할 수 있도록 변경되었다.

제 3 절 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

본 연구와 관련한 백신 개발은 다양한 기술이 적으로 수행되어져야 하는데, 먼저 돼지 썬코바이러스 2형 배양을 위한 세포 관리 기술은 미국이 최고 기술 보유국으로써 최적 배양 세포 개발에서부터 대량 배양까지 다양한 기술이 개발되어 있다. 우리나라는 이와 관련하여 25-40 %의 기술 수준을 갖고 있으며 본 연구 과제를 통하여 최적의 세포 배양 기술, 뿐만 아니라 새로운 세포주를 개발하는 등 기술 수준을 60-85 % 까지 높이고자 한다. 두 번째로 세포를 이용한 돼지 썬코바이러스 2형 증식 기술과 관련하여 최적 배양 배지 조성 및 최적 증식 환경 조건 확립 등의 분야에서는 프랑스가 최고 기술을 보유하고 있으며 우리나라는 35% 정도의 기술수준을 갖고 있다. 본 연구 과제에서는 바이러스의 분리 및 바이러스의 대량증식에 최적화된 증식 환경 조성 등을 중점적으로 연구하여 백신 대량 생산의 기반을 마련하고 80 %의 기술수준을 목표로 하고 있다. 다음으로 백신 생산에서 항원과 더불어 면역 반응을 강화시켜 줄 부형제에 대한 기술은 현재 미국이 가장 높은 기술력을 보유하고 있으며 우리나라는 55% 수준을 나타내고 있다. 다양한 부형제에 대한 안전성 및 면역원성을 시험하고 최적의 항원과 부형제 조성 기술을 연구하여 95 % 기술 수준을 달성을 목표로 하였다. 또한 개발된 백신을 검증하는 검사의 경우 프랑스 및 영국에서 혈청을 통해 항체가 검사 등 가장 최신의 기술을 보유하고 있으며, 본 연구 과제에서는 다양한 ELISA 기법을 비교하고 아울러 세포 매개성 면역 검사 방법을 도입하는 등 95 % 기술 수준을 목표로 하였다. 마지막으로 돼지 썬코바이러스 2형과 홍막페렴균 복합백신의 경우 아직 세계적으로 개발된 적이 없으며 본 연구 과제를 통해 홍

막페렴균 최적 배양 기술 수준을 미국의 95% 까지 달성하고자 하며, 복합백신의 경우 세계 최초 상품화를 목표로 한다.

2. 특허분석 및 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

가. 돼지 썬코바이러스 2형 사독백신의 특허 관련하여 최초로 등록된 것은 2005년 10월 미국 메리알 회사에서 개발한 것으로 본 연구 사업단이 개발하고자 백신과 같이 세포를 통해 바이러스를 증식하여 사독화하는 방식을 이용한다. 하지만 메리알 백신의 경우 모돈용으로 출시가 된 백신으로 초기 연령의 돼지에 대한 질병 예방에 더욱 효과를 갖는 반면, 본 연구 과제에서 개발하고자 하는 백신은 자돈용으로써 12주령 이상에서 발생하는 돼지 호흡기 질병까지 예방할 수 있다.

나. 돼지 썬코바이러스 2형 재조합 백신 기술과 관련하여 2006년 12월 미국에서 특허를 등록하였으며 이를 바탕으로 베링거 잉겔하임 회사에서 백신을 생산하였다. 돼지 썬코바이러스 2형의 주된 면역원성을 나타내는 ORF2 capsid 부분만을 정제하여 생산한 백신으로써, 본 연구 과제에서 개발하는 백신과 같이 자돈 접종용으로 출시되었다. 재조합 백신의 경우 단백질만을 정제하여 사용해야 하기 때문에 생산비용이 높아 가격이 상대적으로 높은 반면, 본 연구 과제에서 개발하는 백신의 경우 최적화된 세포를 통해 높은 역가로 증식된 전체 바이러스를 사독화하여 생산하기 때문에 저렴한 가격으로 판매될 수 있다.

다. 또 다른 돼지 썬코바이러스 2형 바이러스 재조합 기술을 이용한 백신 중 인터넷에서 생산되는 백신의 경우 네덜란드에서 2007년 3월 특허 등록을 하였고, 3주령 이상의 자돈에 2회 접종용으로 출시되었다. 마찬가지로 재조합 백신이기 때문에 본 연구 과제 개발 백신이 가격 경쟁력을 가질 수 있다.

라. 병원성이 없는 것으로 알려져 있는 돼지 썬코바이러스 1형 바이러스를 기본으로 하고 돼지 썬코바이러스 2형의 ORF2 유전자만을 도입한 기술을 바탕으로 개발된 백신의 경우 미국에서 2007년 10월 특허 등록이 되었다. 이 백신은 본 연구과제에서 개발하는 백신과 같이 전체 바이러스를 사독화하여 생산하는 방식이지만 출시되고 바이러스 안전성 등의 문제로 잠시 판매를 금지하기도 하였다.

제 3 장 돼지 쉼코바이러스 단일백신과 흥막페렘 제조 기술 이전 표준화 연구 및 품목허가 시험

제 1 절 서 설

돼지 쉼코바이러스 2형 바이러스는 돼지에 감염되어 이윽 후 전신 소모성 증후군을 유발하는 주 원인체이다. 1996년 캐나다에서 처음 확인이 되었고, 이윽 후 전신 소모성 증후군 이외에 돼지 호흡기 질병, 돼지 피부염 신증후군, 유산과 관련된 생식기 질환 등 다양한 질병과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다. 2007년 모돈 접종용으로 처음 예방 백신이 출시되었고, 그 후 현재까지 세계적으로 5개의 백신이 판매되고 있다. 돼지 쉼코바이러스 2형의 예방은 백신 접종이 가장 효과적인 것으로 여러 실험 등을 통해 입증되고 있다. 국내에서는 수입백신 이외에 국내 6개 백신 회사에서 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 백신을 생산하고 있지만 2009년 전체 시장 중 8.1 % 만을 점유하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구 과제를 통하여 높은 효능의 돼지 쉼코바이러스 2형 백신을 개발하고 상품화하여 수입 백신을 대체할 수 있는 가능성을 높이고자 한다. 이를 위해서 본 연구사업단의 제 1 세부과제에서는 국내에서 가장 유행하는 돼지 쉼코바이러스 2형을 분리, 선별하여 백신주로 선정하고 증식 최적화 배양 시험을 하였다. 높은 역가의 항원과 부형제를 첨가하여 백신을 생산하고 품목허가를 위한 예비 효능 실험 및 실험동물에 대한 접종실험을 통해 안전성 및 면역원성을 확보하였으며, 공격접종 실험을 통하여 질병 예방 효과를 확인하였다. 또한 자돈, 뿐만 아니라 웅돈에서 공격 접종 실험을 통하여 정액으로 배출되는 바이러스 양에 미치는 효과를 확인하여 현재 출시된 백신들과 차별화를 두었다. 다음으로 돼지 쉼코바이러스 2형과 흥막페렘 복합백신 개발의 경우 현재 같은 종류의 복합백신 기술이 존재하지 않기 때문에 경쟁력이 있으며, 농가 인력 및 경제적 부담을 줄일 수 있는 장점이 있다. 돼지 흥막페렘균 배양 표준화 연구에서는 먼저 국내에서 가장 문제가 되고 있는 2형과 5형을 분리하여 염기서열을 분석하고 백신주로 선정하였다. 균의 반복적인 계대를 통하여 안전성을 확보하였고 개발된 돼지 쉼코바이러스 2형 백신과의 다양한 복합 조성을 통해 최적의 항원 조성 비율을 확인하여 개발하였다. 실험 동물을 통한 접종 실험과 예비 효능 실험을 통해 안전성과 각각의 항원에 대한 면역원성을 확보하고 목적 동물인 돼지 5주령에 접종하여 실제 효과를 측정하였다. 마지막으로 돼지 쉼코바이러스 2형과 마이코플라즈마 복합 백신 개발을 위한 항원 복합 기술에 대한 연구에서는 국내 돼지에서 분리된 다양한 마이코플라즈마 야외 균주 중에서 가장 면역원성이 높은 균주를 선별하여 복합백신을 조성하고 각각의 항원에 대한 면역 반응을 분석하였다. 특히 보편적인 항체가 생성 능력 이외에 세포성 면역 반응을 측정하여 다양한 백신 효능을 평가하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 돼지 썬코바이러스 단일 백신 시제품 부표 확립

부 표		
업 체 명	(주)코미팜	허가일자
제 품 명	썬코프라임 CircoPrime	
허가번호	제 33 - 호	
1. 원료약품 및 분량 (1 ml/dose)		
· PCV2 whole virus 항원	-----	10 ^{5.0} FAID ₅₀ 이상
· 수산화알루미늄 겔	-----	10 %
· Formalin	-----	0.2 % 이하
2. 성상		
담황색의 혼탁한 부유액이며 내용물이 균일하고 정치하면 내용물의 침전이 생기나 흔들면 쉽게 균등액이 된다.		
3. 제조방법 : 별첨 1		
4. 효능 및 효과		
돼지 썬코바이러스 2형(PCV2) 감염으로 인한 질병 예방.		
5. 용법 및 용량		
생후 1주령, 3주령에 각각 1 ml씩 2회 근육 접종한다.		
6. 포장 단위		
20 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml		
7. 저장 방법 및 유효 기간		
2~10°C 냉암소에 보관하여야 하며, 제조일로부터 21개월간 유효하다.		
8. 주의사항		
가. 부작용		

투여 후 개체에 따라 식욕부진, 구토, 피부발진, 허탈, 경련 등의 과민반응이 일어날 수 있습니다. 이런 경우 충분한 맛사지, 에피네프린 투여가 권장되므로 수의사와 상담하여 적절한 처치를 하십시오.

나. 금기사항

다음 동물에는 투여하지 마십시오.

- 1) 열이 있거나 영양장애가 심한 돼지
- 2) 전염성 질병 및 기생충감염, 스트레스를 받은 돼지
- 3) 곰팡이 및 세균의 독소 등(아플라톡신, 대장균 및 살모넬라 독소)에 의해 면역기능이 저하된 돼지
- 4) 이전에 본 백신에 과민반응이나 쇼크를 일으킨 일이 있는 돼지

다. 사용방법상의 주의사항

- 1) 사용설명(주의사항)을 충분히 읽어본 후 사용하십시오.
- 2) 오·남용에 의한 약화사고 및 경제적 손실을 초래할 수 있으므로 정해진 용법·용량을 준수하십시오.
- 3) 남용에 의한 약화사고와 경제적 손실을 초래할 수 있으므로 본제를 투여하면서 동시에 동일 성분의 약품을 중복 투여하지 마십시오.
- 4) 본 약제에 대한 쇼크나 과민반응이 있었던 동물에게는 사용하지 마십시오.
- 5) 백신을 접종하기 전에 백신의 온도가 상온(15~25°C)이 될 때까지 놓아두었다가 사용하십시오.
- 6) 접종 전에는 반드시 백신의 성상을 관찰한 후 이상이 있으면 사용하지 마십시오.
- 7) 얼었다 녹은 제품은 효력이 없으므로 사용하지 마십시오.
- 8) 다른 백신 또는 약제와 복합하는 경우 상호 간섭현상, 침전, 이물형성 등이 나타날 수 있으므로 절대 복합하여 사용하지 마십시오.
- 9) 사용 후 남은 백신과 빈 용기는 소독 또는 소각하는 등 안전하게 폐기하십시오.
- 10) 백신 접종 후 최소한 3~5일간 돼지가 안정을 취하도록 하십시오.
- 11) 백신 접종 후 몸을 깨끗이 씻고 접종기구는 소독하십시오.
- 12) 투여경로를 달리하는 경우 주사부위의 통증, 종창, 경결 및 쇼크 등이 나타날 수 있으므로 반드시 권장된 투여경로에 따라 주사하십시오.
- 13) 사용할 때마다 충분히 흔들어서 사용하십시오.
- 14) 멸균된 주사기와 주사바늘을 사용하고 주사기구나 백신병을 알코올 등의 소독약품으로 소독하지 마십시오.
- 15) 주사바늘은 1두1침을 원칙으로 사용하십시오.
- 16) 불량한 환경 및 주사부위가 오염된 경우에는 주사부위에 염증이 생길 수 있으므로 주사부위를 70% 알코올 등으로 소독 후 접종하십시오.

라. 기타 주의사항

- 1) 본 제품은 동물용의약품이므로 사람에게 절대 사용하지 마십시오.
- 2) 수의사의 지시에 따라 사용하십시오.
- 3) 지정된 축종 이외에는 안전성 및 유효성이 확립되어 있지 않으므로 사용하지 마십시오.
- 4) 안전사고 방지를 위하여 어린이의 손이 닿지 않고 동물의 접근이 불가능한 곳에 보관하십시오.
- 5) 안전성 및 유효성에 변화를 초래할 수 있으므로 정하여진 저장방법을 준수하십시오.
- 6) 유효기간이 경과한 제품은 사용하지 마시고 안전하게 폐기 처리하십시오.

- 7) 오·남용 및 내성출현 예방을 위하여 동물약품의 사용내역을 빠짐없이 기록하여 주십시오.
- 8) 다 쓴 용기나 포장지는 안전하게 폐기하고 다른 용도로 사용하지 마십시오.
- 9) 피부나 눈에 접촉시에는 물로 깨끗이 씻어낸 후 이상증상이 있을 경우에는 즉시 의사의 진료를 받으십시오.
- 10) 접종시 주사바늘에 찔리지 않도록 주의하십시오.
- 11) 실수로 사람에게 주사한 경우에는 사용설명(주의사항)을 지참하여 즉시 의사의 진료를 받으십시오.
- 12) 주사시 동물의 공격을 받을 수 있으므로 안전사고에 주의하십시오.
- 13) 접종시기 산정 및 만일의 경우를 위하여 사용백신의 제조번호, 유효기간, 구입일, 백신접종일, 접종장소, 접종 후 반응 등을 정확히 기록하십시오.
- 14) 기타 제품에 대하여 문의하실 사항이 있으신 경우 제조사로 연락하여 주시기 바랍니다.

2. PK-15 세포 배양 표준화 연구

가. 돼지 쉐코바이러스 2형 증식을 PK-15 세포 위한 배양 방법

(1) 세포배양과 관련된 시약

1) DMEM

3차 증류수 5 L에 DMEM 과우더를 67.4 g 넣고 여기에 sodium bicarbonate(sigma S5761)를 18.5 g 넣은 후 1시간이상 충분히 녹인 후 섞어준다. 그 후에 gelman filter(0.2 μ m pore)를 이용하여 멸균된 1000 ml병에 분주하여 냉장 보관한다.

2) Glucosamine solution (300 mM)

3차 증류수 900 ml과 Hank's balanced salt solution 100 ml을 섞고 glucosamine 64.6 g을 녹인다. 그 후에 gelman filter(0.2 μ m pore)를 이용하여 멸균된 1000 ml 병에 냉장 보관한다.

3) Growth media

PK-15 cell의 계대할 때에는 growth media를 사용한다. 조성은 5% FBS supplemented DMEM(media A)이다. Antibiotic Antimycotic을 1X가 되게 포함한다.

4) Maintenance media

바이러스 접종 후에 세포 유지에 사용한다. 조성은 2.5% FBS supplemented DMEM(media B)이다. Antibiotic Antimycotic을 1X가 되게 포함한다.

5) Freezing media

세포를 동결하여 보존하거나 동결시킨 세포를 다시 회복시킬 때 사용한다. 조성은 10% FBS

supplemented DMEM(media C)이다. Antibiotic Antimycotic을 1X가 되게 포함한다.

6) Washing media

시약처리 할 때 이전에 사용한 media의 washing에 사용한다. 조성은 0% FBS supplemented DMEM(media D)이다. 또한 항생제(antibiotic)와 항곰팡이제(antimycotic)를 1X가 되게 포함한다.

(2) PK-15 세포배양

PK-15 세포가 단층(monolayer)으로 배양되어 있는 플라스크(10 ml)를 준비한다. 플라스크 안의 PK-15 배양에 사용된 media A를 버린다. 멸균 PBS 5 ml을 넣고 좌우로 흔든 후, 버린다. Trypsin-EDTA를 2 ml 넣는다. Trypsin-EDTA(10X)를 15 ml tube에 5 ml씩 분주하여 냉동 보관하여 사용한다. 여기서 사용하는 Trypsin은 PBS 10 ml을 첨가하여 3.3X를 사용한다. 37°C 인큐베이터에 넣은 후, 3분간 처리하여 플라스크에 부착되어 있는 세포(cell)를 분리한다. 현미경 상으로 cell의 분리 여부를 확인한 후, 물리적인 힘을 가하여(플라스크를 손바닥으로 두들김) 완전히 떼어낸다. 먼저 media A를 3 ml 첨가한다. 그 후 10 ml 피펫으로 모두 빨아들인 후 15 ml tube로 옮긴다. 3000 rpm 10분 동안 원심을 돌린다. 상층액을 버린 후에 4 ml의 media A를 넣는다. 피펫으로 PK-15세포를 부유한 후, 175배양플라스크(28 ml) 두개와 75배양플라스크(10 ml)하나를 준비한다. 175배양플라스크(28 ml) 두개는 바이러스 증식에 사용되며, 75 배양플라스크(10 ml) 하나는 PK-15 세포 계대에 이용된다.

3. 돼지 썬코바이러스 증식 표준화 연구

가. 세포배양용 플라스크에서 돼지 썬코바이러스 2형 증식과정

PK-15 세포가 단층(monolayer)된 175배양플라스크(28 ml)를 준비한다. 먼저 media A인 상층액을 버린 후에 media D 5 ml을 넣는다. 그 후 다시 좌우로 흔든 후에 상층액을 버린 후에 준비된 돼지 썬코바이러스 2형을 5 ml 접종한다. 바이러스 접종 후 1시간동안 incubation(37°C) 시킨다. 이때, 10분마다 한번 씩 좌우로 흔들어 준다. 1시간 후, 15 ml의 media B를 첨가한다. 24시간 후, 플라스크 안의 20 ml의 media를 버린다. 그 후 media D를 10 ml 첨가한 후에 다시 버린다. 준비된 glucosamine 3 ml(300 mM; Sigma G1514)을 첨가한다. 다시 1시간동안 incubation(37°C) 시킨다. 이때, 10분마다 한번씩 좌우로 흔들어 준다. 그 후 glucosamine을 전부 버린 후, media D를 10 ml를 다시 첨가한다. 플라스크를 좌우로 흔들고 media D를 버리고 media B를 50 ml 첨가한다. 그 후 4-5일간 37°C에서 incubation 시킨다.

나. 세포배양용 플라스크에서 배양된 돼지 썬코바이러스 2형 회수

돼지 썬코바이러스 2형이 담긴 175플라스크를 -80°C 초저온 냉동고에 넣는다. 2시간 후, 꺼내어 상온에서 녹인다. 다 녹은 후, 다시 -80°C 초저온 냉동고에 넣는다. 2시간 후, 꺼내어

상온에서 녹인다. 다 녹은 후, 다시 -80°C 초저온 냉동고에 넣는다. 총 3회가 되게 반복한다. 완전히 녹은 후, 50 ml tube로 이동한다. 7000 rpm 10분 원심을 돌린다. 상층액을 회수한 후, 0.8 μm , 0.45 μm 실린지 필터를 이용하여 필터링한다.

다. 배양된 돼지 썬코바이러스 2형 역가 측정 방법

Indirect Immunofluorescence antibody(IFA) 기법을 이용하여 배양된 돼지 썬코바이러스 2형의 역가(titer)를 50% Tissue Cell Infectious Dose (TCID₅₀) 로 측정한다. PK-15 cell을 96 well에 배양하여 단층(monolayer)이 되면 돼지 썬코바이러스 2형을 10배씩 차이가 나게 접종한다. 그 후 media B를 이용하여 희석한다. 10배씩 차이가 나게 돼지 썬코바이러스 2형을 각각 접종하고, 2-3일간 키운다. 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 다클론성 항체(polyclonal antibody)를 이용하여 96 well plate에 반응이 얼마나 진행되는지 항원항체 반응에 의해 확인한다. 역가의 결정은, 감염된 well 이 50% 가 되는 지점의 희석 배율로써 나타내며 TCID₅₀/ml 로 표시한다.

4. 돼지 썬코바이러스 단일백신의 시제품 제작

가. 단일백신용 백신균주

(1) 사용균주

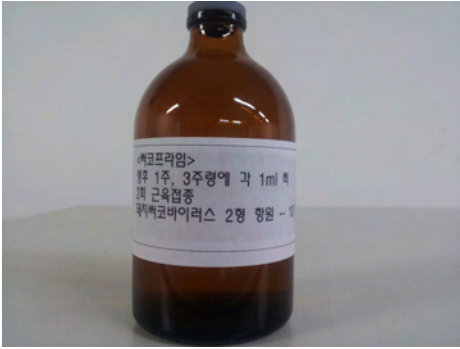
서울대학교 병리실에 의뢰된 이유후 전신성 소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome) 증상이 있는 돼지에서 분리된 porcine circovirus type 2 (PCV2; SNUVR000463)로서 5계대 배양한 바이러스로 (사)한국중균협회에 기탁번호 KCCM-10575 번호로 기탁되어있다.

(2) 백신균주의 염기배열 특성

백신주로 선정된 돼지 썬코바이러스 2형의 염기배열 순서를 분석하여 유전자 크기 및 다른 바이러스와의 상동성을 비교하였다.

나. 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신 불활화 및 부형제 첨가

2 L 플라스크에 바이러스 1200 ml에 포르말린 120 ml을 넣는다. 4도의 shaking incubator에서 24시간동안 바이러스를 불활화 한다. 24시간 후, 알루미늄 젤을 ($1320 \times 1/9 = 146.7$) 146.7 ml첨가한다. 12시간 동안 shaking incubator에서 잘 복합한 후, 멸균된 100 ml 병에 담는다.



5. 돼지 썬코바이러스 단일백신 제품 품목허가를 위한 예비 실험

가. 시험백신 제조

본 예비시험에 공시할 시험백신은 항원 함량을 각각 10^5 TCID₅₀/ml, 10^6 TCID₅₀/ml, 10^7 TCID₅₀/ml로 하여 3룻트를 제조하여 돼지 포유자돈을 이용한 항체 형성 시험을 실시하였다.

나. 목적동물에 대한 안전성 시험(과용량 안전확인시험)

(1) 공시동물

3개 농장으로부터 생후 7일령 포유자돈 3 마리씩 총 9마리를 사용하였다.

(2) 시험방법

포유자돈에 시험백신 2 ml(규정량의 2배)을 접종하고 이상여부를 10일간 관찰하여 접종후 1-2시간 내에 과민 반응이 관찰되지 않았으며 10일간 주사부위에 화농 및 괴사 등의 부작용이 없이 생존하였다.

다. 목적동물에 대한 면역원성 시험

(1) 공시동물

3주령 자돈 7마리를 사용하였다.

(2) 시험방법

자돈 5마리에 시험백신 1 ml를 2주 간격으로 2회 근육접종, 나머지 2두는 대조군. 접종전, 1차 접종 2주후와 2차 접종 3주후에 채혈하여 항체를 확인하였다.

1) 백신접종

접종량	접종부위	1차접종	2차접종
1 ml	근육	분만후 1주	분만후 3주

2) 채혈

1차	2차	3차	기타
1차 접종전	2차 접종전	2차 접종후 3주	

라. 공격 접종 실험

(1) 실험 디자인

30마리의 5일령 돼지를 구입하여, 혈청검사를 통하여 이미 돼지 썬코 바이러스 2형의 항체를 가지고 있는 (즉, 돼지 썬코바이러스 2형에 감염이 된 것을 의미함) 것을 확인 한 후, 임의로 10마리씩 3개 그룹으로 나누었다. 제1그룹의 돼지는 백신 접종군으로 1주령과 3주령에 개발한 백신을 접종하고 4주령에 돼지 썬코바이러스 2형을 공격 접종하였다. 제 2그룹의 돼지는 양성 대조군으로 개발한 백신을 접종하지 않고 4주령에만 돼지 썬코바이러스 2형을 공격 접종하였다. 제 3그룹의 돼지는 음성 대조군으로 개발한 백신을 접종하지 않았을 뿐만 아니라, 돼지 썬코바이러스 2형을 공격 접종도 시행하지 않았다. 4주령 때에 제1그룹과 제2그룹의 돼지에게 돼지 썬코바이러스 2형을 공격 접종 후부터 매주 1회씩 5주 동안 3개 그룹의 돼지 체중을 측정하고, 혈액을 채취하여 tumor necrosis factor- α (TNF- α)를 측정하였다. 최종 5주가 경과(이때 돼지의 연령9주령 돼지)된 후에 3개 그룹의 모든 돼지를 안락사 시켜 병변을 검사하였다. 이러한 실험을 독립적으로 3회 수행하였다.

(2) 실험 방법

공격접종을 시행한 3개 그룹의 최종 5주가 경과(이때 돼지의 연령9주령 돼지)된 후에 3개 그룹의 모든 돼지를 안락사 시킨 돼지들의 임파절을 이용하여 백신 접종군에서 돼지 썬코바이러스 2형과 파보 바이러스의 증식 정도를 조직내 교잡법을 이용하여 측정하였다. 돼지 썬코 바이러스 2형과 파보 바이러스에 의해 유발되는 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 중요한 병변은 임파절에서 관찰되기 때문에 임파절에서 바이러스의 증식정도를 확인하는 것은 백신의 효과를 판명하는 중요한 방법이다. 또한 조직내 교잡법을 이용하면 조직내에서 바이러스의 증식 정도를 감염세포의 숫자를 판별 할 수 있기 때문에 객관적으로 바이러스의 증식 정도를 확인할 수 있다.

6. 국가검정 동물용의약품검정기준에 의한 돼지 썬코바이러스 단일백신 안전성 검사 실시

가. 실험동물에 대한 안전성 시험

(1) 공시동물

체중 15-20 g 마우스 15마리와 체중 300-400 g 기니픽 6마리를 이용하여 안전성 시험을 실시하였다.

(2) 마우스를 이용한 안전성 시험

백신 접종 할 때 일어날 수 있는 접종 부위의 병변 또는, 그 외에 생길 수 있는 부작용을 확인하기 위하여 특정 병원체 부재(specific pathogen free) ICR 마우스를 이용하여 안전성 실험을 시행하였다. 15-20 g의 마우스 15마리에서 5마리씩 각각 0.25, 0.5, 1 ml의 돼지 썬코 바이러스 2형 백신을 복강에 접종하고, 같은 조건의 마우스 15마리에서 5마리씩 각각 0.25, 0.5, 1 ml을 피하에 접종하였다. 이 후, 7일간 증상 및 병변을 관찰하고, 마지막 날 에테르(ether) 마취 후, 경추탈골법으로 안락사 시켜 부검하여 조직을 중성포르말린으로 고정시켜 HE 염색을 거쳐 조직슬라이드를 만들어 병변을 관찰하였다.

(3) 기니픽을 이용한 안전성 시험

백신 접종 할 때 일어날 수 있는 접종 부위의 병변 또는, 그 외에 생길 수 있는 부작용을 확인하기 위하여 특정 병원체 부재(specific pathogen free) 기니픽을 이용하여 안전성 실험을 시행하였다. 300-400 g의 기니픽 6마리에서 2마리씩 각각 0.5, 1, 2 ml의 돼지 썬코바이러스 2형 백신을 근육에 접종하고, 같은 조건의 기니픽 6마리에서 2마리씩 각각 0.5, 1, 2 ml을 피하에 접종하고, 같은 조건의 기니픽 2마리에 0.1 ml을 피내에 접종하여 7일간 주사부위의 화농 및 괴사 없이 생존하는지 관찰하였다.

(4) 돼지 자돈을 이용한 안전성 시험

국가검정동물약품검정기준 (사단법인 한국동물약품협회)에 의하여 백신 접종 할 때 일어날 수 있는 접종 부위의 병변 또는, 그 외에 생길 수 있는 부작용을 확인하기 위하여 자돈을 이용하여 안전성 실험을 시행하였다. 4주령의 자돈 4마리에 백신규정량의 2배인 2 ml의 돼지 썬코바이러스 2형 백신을 근육에 접종하여, 1~2시간 내 과민반응의 유무 관찰과 이후 10일간 관찰하여 주사부위에 화농 및 괴사가 없는지 관찰하였다.

7. 돼지 썬코바이러스 단일백신 공격실험 실시

가. 실험 디자인

실험실내 공격 시험을 위하여 총 4개 그룹으로 실험 디자인을 설정하여 시행하였다. 음성대조군은 백신 접종과 공격접종을 하지 않은 돈군, 시험군1은 백신 접종후 돼지 썬코바이러스 2형(porcine circovirus 2; PCV2)과 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV) 공격 접종을 하는 돈군, 시험군2은 백신 접종후 돼지 썬코바이러스 2형만 공격접종을 하는 돈군, 대조군은 백신 접종을 하지 않고 공격 접종만 하는 돈군으로 구성되어 있다. 음성대조군과 대조군은 2차 백신 접종 후 2주가 경과되는 시점에서 돼지 썬코바이러스 2형과 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 실험 감염시킨 후 4주 동안 임상증상을 관찰한다.

표 1. 실험디자인

그룹	실험두수	백신접종		PCV2	PRRSV	부검 실시 (9주령)
		1차접종 (1주령)	2차접종 (3주령)	공격접종 (5주령)	공격접종 (5주령)	
음성대조군	5	X	X	X	X	O
시험군1	5	O	O	O	O	O
시험군2	5	O	O	O	X	O
대조군	5	X	X	O	O	O

나. 공시돈 선정 및 백신 접종

돼지 쉼코바이러스 2형과 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 항체 음성인 건강한 5일령 자돈 20두를 공시한 후 10두씩 시험군과 대조군으로 구분한다. 실험군의 자돈에는 1주령에 시험백신 1.0 ml를 후지 근육에 접종하고, 2주 후인 3주령에 다시 1.0 ml를 이근부에 접종한다.

다. 사육 환경

공시돈은 23~24℃, 습도 60%가 유지되는 사육실에서 사육한다. 또한 사육 기간 동안 사료와 음수는 무제한으로 공급한다.

라. 공격 접종용 바이러스 및 접종 방법

돼지에게 접종실험에 사용할 바이러스는 수의과학 검역원에서 분양 받은 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 야외 분리주와 자체 분리한 돼지 쉼코바이러스 2형 야외 분리주를 이용한다. 접종을 위하여 돼지 쉼코바이러스 2형은 $1 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀/ml, 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 $1 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀/ml으로 준비한다.

바이러스의 접종은 2차 시험백신을 접종한 후 2주가 경과하는 시점에서 실시한다. 미리 준비된 양의 돼지 쉼코바이러스 2형과 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 2 ml씩 비강에 접종한다. 바이러스 공격 접종은 시험군1(돼지 쉼코바이러스 2형과 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스), 시험군2(돼지 쉼코바이러스 2형)과 대조군(돼지 쉼코바이러스 2형과 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스)에만 시행한다.

마. 관찰 및 시료 채취

(1) 채혈

1주령(1차 백신 접종 전), 3주령(2차 백신 접종 전), 5주령(2차 백신 접종 2주후 공격접종 시기), 6주령, 7주령, 8주령, 9주령(부검)에 채혈을 실시하여 혈청을 분리한 후 실험시점까지 4℃에 보관한다.

(2) 증체량

1주령(1차 백신 접종 전), 3주령(2차 백신 접종 전), 5주령(2차 백신 접종 2주후 공격접종 시기), 6주령, 7주령, 8주령, 9주령(부검)에 공시돈의 체중을 측정하여 주당 증체량을 비교한다. 증체량은 ANOVA test와 사후검사로 Bonferroni correction을 이용하여 4개 그룹간의 체중 증체량을 비교하였다.

(3) 임상 증상

공시돈의 임상 증상은 'V. 야외임상 실험의 임상검사 표1'의 기준에 따라 동일하게 매주 1회씩 관찰하고, 공격 접종 후 개체에 따른 임상 증상 변화를 기록한다. 매주 관찰된 임상 검사 점수는 4개 그룹 간 Kruskal-Wallis 검사방법으로 비교한 후, 유의성이 있으면 그룹 간에 Mann-Whitney 검사방법으로 유의성을 분석하였다.

바. 병리조직 제작 및 관찰

(1) 병리조직 샘플

공격 접종 3주 후 부검을 실시하여 각 장기의 육안적 소견(부검 결과)을 기록하고, 실질장기의 조직표본 제작을 위해 폐장, 서혜임파절 등 주요 장기를 10% 포르말린에 고정한다.

(2) 병리조직학적 관찰

포르말린에 고정한 조직은 포매 과정을 거쳐 H&E염색을 실시한다. H&E 염색이 된 장기는 각각 현미경으로 관찰하여 병변을 관찰한다. 또한 서혜임파절의 경우 임파구의 감소(lymphoid depletion)의 정도에 따라 4등급으로 구분하며, 아주 심한(severe) 경우 '스코어 3', 중등도(moderate)의 경우 '스코어 2', 경미한(mild)의 경우 '스코어 1', 전혀 병변이 없는 경우 '스코어 0'로 표시한다. 각각의 4개 그룹간의 병변을 기록하고 Kruskal-Wallis방법으로 통계 처리한 후 유의성이 있으면 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 4개 그룹간의 병리조직학적 임파구 감소(lymphoid depletion) 병변의 차이를 비교한다.

사. 조직내 돼지 썬코바이러스 2형 증식 정도 확인

(1) 조직내 돼지 썬코바이러스 2형 증식 정도 확인

4개 그룹의 조직에서 면역조직화학법을 이용하여 임파절 조직에서 돼지 썬코바이러스 2형의 증식 정도를 확인한다.

(2) 면역조직화학법 검사 방법

4개 그룹에서 채취한 서혜임파절을 이용하여 면역염색법을 실시한다. 면역염색법은 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 다클론성 항체(polyclonal antibody)를 사용하였다. 면역조직화학법의 실시가 종료된 서혜임파절 조직은 현미경상에서 임의로 0.25 mm²의 면적을 5곳 정하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 세어서 각각의 간의 돼지 썬코바이러스

2형에 대한 양성감염세포수의 Mann-Whitney test방법에 의하여 통계 처리 하여 4개 그룹간의 양성감염 세포 수의 차이를 비교한다.

8. 돼지 태아 신장 유래 초대 배양 세포(SK cell)를 이용한 바이러스 증식 연구

가. 돼지 신장 세포 배양

세포를 25배양 플라스크에서 90%~100%의 세포단층이 형성되면 세포세척용 PBS를 한번에 5 ml씩 사용하여 2~3회 세척을 한다. 세척이 끝나면 PBS를 완전히 제거한다. 그 다음에 trypsin-EDTA 1x를 0.5 ml 첨가하고 배양기에서 2~3분간 방치하며 30초마다 플라스크를 가볍게 두드려 세포가 떨어지는지 확인한다. 일반적으로 2분 이내에 90% 이상 떨어지게 된다. 세포의 탈락이 확인되면 5 ml의 DMEM(10% FBS 포함) 배지를 플라스크에 바닥으로 흘려주어 세포를 현탁하고 15 ml conical tube에 옮긴다. 그후 3분 동안 원심분리(160 g) 후에 상층 배지를 흡인해 내고 2 ml의 DMEM(10% FBS) 배지를 첨가한 후 피펫팅 하여 세포를 부유 시킨다. 원하는 희석비율로 희석하고 25배양 플라스크로 옮긴다. 이 때 빠른 배양할 때에는 1:2로 세포를 희석하여 계대하며, 일반적으로는 1:3을 기준으로 희석한다.

나. SK cell 을 이용한 돼지 썬코바이러스 2형 증식과정

SK 세포가 단층(monolayer)된 175배양플라스크(30 ml)를 준비한다. 먼저 세포를 배양한 상층의 배양액을 버린 후에 세포 세척용 PBS 로 2-3회 세척한다. 준비된 돼지 썬코바이러스 2형 바이러스를 세포에 5 ml 접종하고 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양한다. 바이러스 접종 15-30분 후 20 ml 의 5% FBS가 포함된 배양액을 첨가한다. PK-15 세포와는 다르게 SK 세포의 경우 바이러스 증식 시에 CPE가 발생하기 때문에 바이러스 접종 24시간 후 CPE 생성 유무와 세포 상태를 관찰한다. 접종 후 4-5일 배양하면서 CPE 70% 이상 나타나는 시점에 배양을 멈추고 바이러스를 회수한다.

다. 세포배양용 플라스크에서 배양된 돼지 썬코바이러스 2형 회수

돼지 썬코바이러스 2형이 담긴 175플라스크를 -80°C 초저온 냉동고에 넣는다. 2시간 후, 꺼내어 상온에서 천천히 녹이고, 다시 -80°C 초저온 냉동고에 넣는다. 동결 및 용해 과정을 3번 반복하여 완전히 녹인 후 50 ml tube로 옮긴다. 원심기에서 7000 rpm 10분 원심한 후에 상층액을 회수하고, 0.8 µm, 0.45 µm 실린지 필터를 이용하여 필터링한다. 필터링 한 바이러스 용액은 다음 접종을 위해 15 ml tube 에 5 ml 씩 분주하여 액화 질소 탱크에 보관한다.

라. SK 세포를 이용하여 배양된 돼지 썬코바이러스 2형 역가 측정 방법백신

면역형광법(Immunofluorescence assay)를 이용하여 SK 세포로 증식한 돼지 썬코바이러스 2형의 역가(titer)를 측정한다. SK cell을 96 well에 배양하여 단층(monolayer)이 되면 100 µl 의 돼지 썬코바이러스 2형을 96 well의 각 행에 10⁻¹부터 10⁻⁸까지 희석하여 접종한다. 5% FBS가 포함된 배양액을 100 ul 씩 추가한 후 48-72시간 배양하여 바이러스를 증식시킨다.

돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 다클론성 항체(polyclonal antibody)를 1:200 으로 희석하여 1차 항체로 사용하고, 37°C에서 1시간 배양한 후 FITC 형광물질이 표지된 2차 항체를 1:200 으로 희석하여 각 well에 분주한다. 30분간 반응 시킨 후 형광 현미경을 이용하여 각 well의 돼지 쉼코바이러스 2형 양성 세포를 확인한다. 역가의 결정은 Reed-Muench and Spearman-Karber method 이용하여 산정하며 감염율이 50% 가 되는 희석배율을 TCID₅₀/ml 로 표현한다.

9. 돼지 흉막폐렴균 배양 표준화 연구

가. 백신 후보 균주 선정

국내에서 흉막폐렴에서 분리한 흉막폐렴균중 발생 빈도가 높고 Apx독소 유전자 보유 상태와 토끼를 이용한 항체 형성 능력을 확인하여 흉막폐렴균 2형과 5형 각각 1개씩 총 2개의 흉막 폐렴균을 선별하였다.

나. 흉막폐렴 혈청형 2형 *apxIIICA*와 *apxIIIBD* 유전자 염기배열 순서

흉막폐렴균 2형의 기본이 되는 독소는 APXIII이며, 이러한 독소의 유전자적 구조는 *apxIIICA*와 *apxIIIBD*이다. 유전자의 Genbank (L12145)을 바탕으로 아래의 12가지의 전방향(forward)과 역방향(reverse) 프라이머를 작성하였다.

전방향	프라이머	역방향	프라이머	유전자크기
F1	TCAAGGTGAATTTGGATTGCAG	R1	AACGCGAAAAGCAGCTCACT	822
F2	TTGGACTGTGCCTGATACTGG	R2	CACGGCTGATCGCTTATTTG	845
F3	TGTCTGCATCGGCACCAAGT	R3	GGCAAAATTAGCAGGAGCACA	808
F4	AAGCTCGTGCAATAGCAATCC	R4	ACGATCAAGGCTCTTGCTGTAA	835
F5	CACCTTGCTGTCCAATAGTTGC	R5	AGTGCGGCTGAATTTACGA	814
F6	TTTGCCACACCAAAATTACCTG	R6	TCCAAAAGCTGACAATTTGCTT	802
F7	TTTGCCACACCAAAATTACCTG	R7	GGTGCCGATGGTGATGATCTA	731
F8	GCCACGAAGCACATTTAAAACC	R8	GCCAAACGTCAACGTTGTTAAA	851
F9	TCACCACGTGCTACTGATGAAC	R9	GCTGCAGCACTAATTGCGTCT	914
F10	TATCGCCGTCATAGCCCAAT	R10	CGGAAGTGTTGGTAACGGTTT	875
F11	CTGATCTAGTTGCGGTGCAAA	R11	ATGGTTGATCGACTGGATTGC	622
F12	GGCCCGGAATACTTCATTAGG	R12	CCATCAATTTGGGCTGAAGTTA	709

다. 흉막폐렴 혈청형 5형 *apxICA*와 *apxIBD* 유전자 염기배열 순서

흉막폐렴균 5형의 기본이 되는 독소는 APXI이며, 이러한 독소의 유전자적 구조는 *apxICA*와 *apxIBD*이다. 유전자의 Genbank (X98595)을 바탕으로 아래의 8가지의 전방향(forward)과 역방향(reverse) 프라이머를 작성하였다.

전방향	프라이머	역방향	프라이머	유전자 크기
F1	TAATTTACCGTAATTGAATAAAA	R1	ACACCTGCTTTAGCTAATTCC	1289
F2	TCAGTTTGATAAGTTACTGAATA	R2	AAACGATCCGGTTCTTTCTCT	1221
F3	ATCCGCATTCTTAGAAGATACC	R3	TGTAGCGATAAATATCCTTACC	1215
F4	CGGAAACGACCGATTAATCG	R4	CCTACGATGGAAGCTCTTGAT	1217
F5	AAGCGATTGATCGTTTGCGGT	R5	TCGCCTTTAATTTCCGGTAAC	1216
F6	TATGGCTAGGCGCACATTTAG	R6	TTGCGGTCGCCACAATTTCTA	1214
F7	AACGGTTTGACGGAGATCTG	R7	ACTAGACCGAGTTGCGGATGTT	1212
F8	TCGTGACGACTGCCGAAACCTT	R8	CGGCCGACTGTGCAAGTATCTTA	1222

라. 백신 표준 균주 계대 방법 확립

홍막폐렴균 배양 전용 배지인 1% nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)를 첨가한 Casman 배지와 trypticase soy 배지(TSA)에 표준 홍막폐렴균주를 백금으로 바른 후, 37℃의 배양기에서 24시간 동안 호기성 배양한다. 이 후 TSA에서 균이 자랐는지 확인하고, 자라지 않았다면 오염되었을 가능성은 매우 희박하므로, 균의 독립된 콜로니를 확인한 후, 다시 같은 방법으로 계대한다.

10. 돼지 쉼코바이러스와 홍막폐렴 복합백신 시작품 제작

가. 돼지 쉼코바이러스와 홍막폐렴 복합백신 제조방법

(1) 돼지 쉼코바이러스 2형 사용균주

서울대학교 병리실에 의뢰된 이유후 전신성 소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome) 증상이 있는 돼지에서 분리된 porcine circovirus type 2 (PCV2; SNUV1000401)로서 5계대 배양한 바이러스를 백신주로 사용한다.

(2) 돼지 쉼코바이러스 2형 백신균주의 염기배열 특성

백신주로 사용되는 돼지 쉼코바이러스 2형의 염기배열 순서를 분석하여 Genbank 에 대표적으로 등록된 분리주와 상동성을 비교한다.

(3) 홍막폐렴 백신 사용균주

2009년 서울대학교 수의과대학에 의뢰된 홍막폐렴이 유발된 가검물에서 홍막폐렴균을 분리 동정한 결과 총 25개의 홍막폐렴균을 분리하였다. 분리된 홍막폐렴균의 혈청형을 항원-항체 응집반응을 통해 분석한 결과 2형이 가장 흔하게 분리되었으며 5형이 다음으로 많았다. 또한 국내 홍막폐렴균의 분포를 조사한 논문의 경우에도 홍막폐렴균주 중에서도 병원성과 밀접하게 연관된 APX 독소를 가진 97개의 홍막폐렴균주 중 2형, 5형이 87%를 차지한다는 보고가 있으

며(참고문헌: K Min, C Chae. 1999. Serotype and apx genotype profiles of *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates in Korea. The Veterinary Record, 145: 251-254), 이러한 결과를 토대로 흉막폐렴균 혈청형 2, 5형을 백신균주로 선택하여 진행하였다.

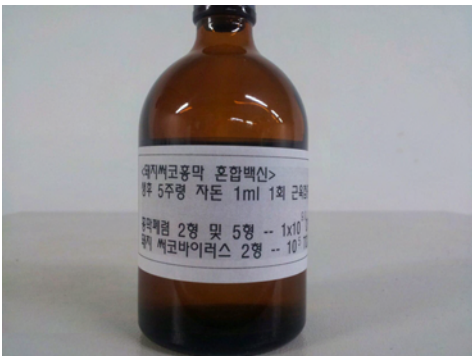
(4) 백신 표준 흉막폐렴 균주 대량 배양 방법 확립

표준 흉막폐렴균을 냉동보관에서 꺼내어 가능한 빠르게 녹인 후 바로 백금이로 1% NAD 첨가 Casman 배지와 trypticase soy agar(TSA)에 각각 바른다. 둘째 날, TSA의 오염 유무를 확인하고 오염이 되지 않았다면 Casman 배지에서 독립된 콜로니를 멸균 면봉으로 수거하여 다시 1% NAD 첨가 Casman 배지 1개에 바르고, brain heart infusion(BHI) 배양액을 200 ml 제조하여 멸균시켜 준비한다. 셋째 날, 클린벤치 안에서 1% NAD와 1% yeast extract를 멸균시킨 BHI 배양액 200 ml에 첨가하고, 그 중 5 ml을 뽑아 배양된 세균을 멸균 면봉으로 풀어 부유시킨다. 이를 배양액에 넣은 후 toxin의 생성이 최소한으로 억제되도록 최대 8시간이 넘지 않도록 37°C의 배양기에서 150 rpm의 속도로 교반하면서 증균 시킨다. 그 후, 500 ml의 같은 BHI 배양액에 증균 된 200 ml을 넣어 다시 최대 8시간 동안 배양하고 조금 남은 배양액 일부는 백금이에 묻혀서 다시 오염 유무를 확인한다. 이러한 방법을 반복하여 증균시켜 대량 배양한다.

(5) 백신 표준 균주 이용한 복합백신 제조

1차년도 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신 제조에 사용한 방법으로 복합백신에 사용할 돼지 쉼코바이러스 2형 항원을 제조하여 항원 농도가 10^5 TCID₅₀/ml 이상이 함유될 수 있도록 조성한다.

앞서 대량 배양한 흉막폐렴균 2형 및 5형 배양액을 4°C로 냉장시키기 전 TSA에 발라 오염 여부 검사와 함께 단계적으로 10배 희석시켜서 1% NAD 첨가된 Casman 배지에 발라 생성되는 콜로니의 수를 확인하여 1 ml 당 1×10^9 colony forming unit(CFU) 이상이 되는지 검사한다. 검사를 통과하면 아래 표의 백신 조성에 따라 전체 양의 0.2% 정도의 포르말린을 첨가하고, 4°C의 교반 배양기로 이동시켜 불활화 시킨다. 24시간 이상 교반한 후, 일부 불활화된 배양액을 뽑아 1% NAD 첨가 Casman 배지에 발라서 불활화 되었는지 검사한다. 다음 날 완전히 불활화된 것이 확인되면, 부형제(adjuvant)로서 IMS1313을 30% 이하로 첨가하여 4°C에서 12시간 동안 교반시킨다.



나. 돼지 썬코바이러스 2형과 흉막폐렴 복합백신 면역 유도 실험

(1) 복합백신의 돼지 썬코바이러스 2형 항체가 측정 실험

1) 공시동물

돼지 썬코바이러스 2형 항체가 음성인 5주령 자돈 7마리를 사용하였다.

2) 시험방법

자돈 5마리에 시험백신 1 ml를 5주령에 이근부 근육 접종하고, 대조군 2마리에는 식염수 (saline)를 5주령에 이근부 근육 접종한다. 백신 접종 전과 백신 접종 2주후에 채혈하여 IPMA(Immunoperoxidase monolayer assay)를 이용하여 항체를 확인하였다.

(2) 복합백신의 돼지 흉막폐렴균에 대한 항체가 측정 실험

1) 공시동물

흉막폐렴균 2형 및 5형 항체가 음성인 5주령 자돈 7두를 사용하였다.

2) 시험방법

① 접종 및 채혈

5주령 자돈 5두에 시험백신 1 ml를 이근부 근육 접종하고, 대조군 2마리에는 생리식염수 (saline)를 5주령에 이근부 근육 접종한다. 백신 접종 전과 백신 접종 2주후에 채혈하고 혈청을 채취하여 평판 응집반응(microplate agglutination test) 및 용혈억제 검사를 실시하였다.

② 평판 응집반응(microplate agglutination test)

4배 희석한 혈청을 멸균 PBS에 2배씩 10번 희석하여 마지막이 2048배가 되도록 혈청 희석액을 준비하였다. 그리고 brain heart infusion broth에서 배양한 흉막폐렴균을 사독화하여 원심분리한 후, 멸균 PBS로 희석하여 항원 희석액을 준비하였다. 그리고 96 well 플레이트에 준비된 혈청 희석액을 각각 60 μ l씩 넣고, 마지막 2개의 well은 PBS만 60 μ l씩 넣은 후, 항원 희석액을 모든 well에 60 μ l씩 분주하였다. 그리고 24시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 결과를 확인하였다.

③ 용혈 억제 반응을 통한 Apx 항체의 역가 측정

흉막폐렴균에서 생산되는 APX에 대한 용혈 억제 반응을 통하여 APX에 대한 항체 역가를 개발한 백신을 자돈 6두에 접종 한 후에 용혈 억제 능력 항체 수준을 측정하였다. 실험방법은

제3세부과제의 방법을 동일하게 사용하였다. 실험은 동일 혈청을 가지고 3회 반복실험 하였으며, 역가 측정 결과는 50%의 용혈억제가 관찰되는 희석배수를 측정하였다.

④ 세포 독성 억제 반응을 통한 Apx 항체의 역가 측정

말초혈액 단핵구를 이용하여 흉막폐렴균의 APX에 대한 세포독성 억제 실험을 실시하였다. 실험은 동일 혈청을 가지고 3회 반복실험 하였으며, 역가 측정 결과는 50%의 세포 독성 억제가 관찰되는 희석배수를 측정하였다.

11. 돼지 썬코바이러스와 흉막폐렴 복합백신의 공격접종을 통한 효능 검사

가. 실험 디자인

실험실내 공격 시험을 위하여 2개 그룹(백신군, 대조군)으로 실험 디자인을 설정하여 시행하였다. 백신군은 백신 접종 후 돼지 썬코바이러스 2형(PCV2)으로 공격 접종하는 돈군과 돼지 썬코바이러스 2형과 흉막폐렴균을 함께 공격 접종하는 그룹으로 나뉘며, 대조군은 백신 접종을 하지 않고 돼지 썬코바이러스 2형(PCV2)으로만 공격 접종하는 돈군과 돼지 썬코바이러스 2형과 흉막폐렴균을 함께 공격 접종하는 돈군으로 구성한다.

표 1. 실험디자인

그룹	실험두수	백신접종	공격접종 (7주령)	부검 실시 (11주령)
		5주령 1회접종		
백신군1	5	O	PCV2	O
백신군2	5	O	PCV2 + App	O
대조군1	3	X	PCV2	O
대조군2	3	X	PCV2 + App	O

나. 공시돈 선정 및 백신 접종

돼지 썬코바이러스 2형 (porcine circovirus 2; PCV2)와 흉막폐렴균의 항체가 음성인 건강한 5주령 자돈 16두를 공시한 후 10두는 백신군으로 6두는 대조군으로 구분한다. 백신군의 자돈에는 5주령에 시험백신 1.0 ml를 이근부에 접종한다.

다. 사육 환경

공시돈은 23~24℃, 습도 60%가 유지되는 사육실에서 사육한다. 사육 기간 동안 음수는 무제한으로 공급한다.

라. 공격 접종용 바이러스 및 접종 방법

돼지에게 접종실험에 사용할 바이러스는 서울대학교 수의과대학 병리학실에서 분리한 돼지

썬코바이러스 2형(PCV2)와 흉막폐렴균 2형과 5형을 이용한다. 접종을 위하여 돼지 썬코바이러스 2형은 $1 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀/ml, 흉막폐렴균 2형과 5형은 각각 1×10^5 CFU/ml으로 준비한다. 돼지 썬코바이러스 2형과 흉막폐렴균의 접종은 5주령에 시험백신을 접종한 후 2주가 경과한 7주령 시점에서 실시한다. 미리 준비된 양의 돼지 썬코바이러스 2형 2 ml와 흉막폐렴균 2형과 5형 각각 1 ml씩을 비강에 접종한다. 돼지 썬코바이러스 2형과 흉막폐렴균의 공격 접종은 백신균과 대조균 모두에게 시행한다.

마. 관찰 및 시료 채취

(1) 채혈

5주령(백신 접종 전), 7주령(백신후 2주 경 접종전 경과 시점; 공격 접종 시기), 9주령 (백신 접종후 4주 경과 시점; 공격 접종후 2주 경과 시기), 11주령(부검 전)에 채혈을 실시하여 혈청을 분리한 후 실험시점까지 4°C에 보관한다.



그림 1. 5주령 백신 접종 사진



그림 2. 채혈 사진

(2) 증체량

5주령(백신 접종 전), 7주령(백신후 2주 경 접종전 경과 시점; 공격 접종 시기), 9주령 (백신 접종후 4주 경과 시점; 공격 접종후 2주 경과 시기), 11주령(부검 전)

(3) 직장 체온 측정

백신 접종 후 각각 7일간 체온을 측정하여 기재한다.

표 2. 체온 측정

개체번호	0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일
1								
...								
...								
16								

(4) 임상 증상

공시돈의 임상 증상은 표3의 임상 점수 기준에 따라 동일하게 매주 1회씩 관찰하고, 공격 접종 후 개체에 따른 임상 증상 변화를 기록한다.

표 3. 임상점수

임상 점수	임상 증상	비고
0	건강하다.	
1	피모가 거칠다. 창백하다.	
2	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다.	비정상적인 체형 호흡기 증상
4	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다. 등뼈가 돌출되어 수척하다.	심한 황달 호흡기 증상
6	상기 4의 증상을 보이다 폐사한다.	호흡기 증상을 동반한 폐사

바. 혈청검사

채취한 혈액을 이용하여 돼지 썬코바이러스 2형에 특이적인 항체는 상업화된 Serelisa PCV2 Ab Mono Blocking ELISA 키트(Synbiotics, Lyon, France)를 이용하여 측정하고, 흉막페렴균 2형과 5형의 경우 각각의 특이적인 항체는 상업화된 Swinecheck App 2형과 5형 ELISA 키트(Biovet Inc, St-Hyacinthe, Canada)를 이용하여 측정한다.

사. 병리조직 제작 및 관찰

(1) 병리조직 샘플

공격 접종 6주가 경과된 시점인 11주령에 부검을 실시하여 각 장기의 육안적 소견(부검 결과)을 기록하고, 실질장기의 조직표본 제작을 위해 폐장, 서혜임과절 등 주요 장기를 10% 포르말린에 고정한다.

(2) 병리조직학적 관찰

1) 돼지 썬코바이러스 2형에 의한 임과절 병변 분석

포르말린에 고정된 조직은 포매 과정을 거쳐 H&E염색을 실시한다. H&E 염색이 된 장기는 각각 현미경으로 관찰하여 병변을 관찰한다. 돼지 썬코바이러스 2형에 의하여 서혜 임파절에서 관찰되는 병변의 경우 임파구의 감소(lymphoid depletion)의 정도에 따라 0-5 등급으로 구분하며, 매우 심하고 육아종성 염증을 동반한 경우 '스코어 5', 매우 심한(severe) 경우 '스코어 4', 아주 심한(severe) 경우 '스코어 3', 중등도(moderate)의 경우 '스코어 2', 경미한(mild)의 경우 '스코어 1', 전혀 병변이 없는 경우 '스코어 0'로 표시한다. 각각의 4개 그룹간의 병변을 기록하고 Kruskal-Wallis방법으로 통계 처리한 후 유의성이 있으면 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 4개 그룹간의 병리조직학적 임파구 감소(lymphoid depletion) 병변의 차이를 비교한다.

2) 흉막폐렴균에 의한 폐렴 병변 분석

흉막폐렴균에 의한 폐렴의 병변은 병변의 정도에 따라 0-5 등급으로 구분하는 실험방법[참고 문헌 5]에 따라서 구분한다. 등급을 판정할 때에는 폐장의 괴사정도, 출혈 정도, 폐포강의 염증세포 침윤 정도, 폐포벽 혈관의 혈전 정도, 흉막염(pleuritis) 정도를 판단하여 폐렴의 정도가 아주 매우 심한 경우 '스코어 5', 매우 심한(severe) 경우 '스코어 4', 아주 심한(severe) 경우 '스코어 3', 중등도(moderate)의 경우 '스코어 2', 경미한(mild)의 경우 '스코어 1', 전혀 병변이 없는 경우 '스코어 0'로 표시한다. 각각의 4개 그룹간의 병변을 기록하고 Kruskal-Wallis방법으로 통계 처리한 후 유의성이 있으면 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 4개 그룹간의 병리조직학적 폐렴 병변의 차이를 비교한다.

아. 혈액 내 돼지 썬코바이러스 2형 항원 정량 분석

(1) 실시간 중합효소 연쇄반응

실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 채취한 혈액과 정액 내 돼지 썬코바이러스 2형을 정량 분석한다.

(2) 실시간 중합효소 연쇄반응 검사방법

실시간 중합효소 연쇄반응은 이미 발표되어 있는 검사 방법을 이용하여 실시하였다(Gagnon et al., 2008). 먼저 cloning vector(pCR 2.1 TOPO, Invitroge)를 이용하여 PCV2 ORF2 를 vector 에 삽입하고 10^8 에서 10^1 개/ml 로 10^{-1} 씩 단계별로 희석한 후, ORF2 부분(GenBank Accession: HQ148879)을 확인하기 위한 프라이머(전방향: 5' GCACAGAGCGGGGGTTTG, 역방향: 5' ACCGCTGGAGAAGGAAAAT)를 이용하여 standard curve를 작성하여 측정 한다.

시료에서 추출된 DNA 2 μ l를 주형으로, 1x SYBR green reaction mixture(Applied Biosystems), 각각의 프라이머 0.2 μ M, 증류수와 복합하여 최종 25 μ l 로 만든다. 반응 조건은 95°C에서 10분간 denaturation 시킨 후, 95°C에서 30초, 59°C에서 1분, 72°C에서 30초간 총 40회 반복하여 반응 시킨다. 모든 반응이 끝난 후 59°C에서 95°C까지 점진적으로 온도를 올리면서 해리 곡선(dissociation curve)을 측정한다. 절대 정량을 위해 각 시료의 측정된 Ct 값을 표준 곡선(standard curve)에 대입하여 DNA copy 수/ml 을 산정한다.

차. 임파절에서 돼지 썬코바이러스 2형 증식 정도 확인

(1) 임파절에서 돼지 썬코바이러스 2형 증식 정도 확인

돼지 썬코바이러스 2형을 접종한 2개 그룹의 돼지 서혜임파절에서 돼지 썬코바이러스 2형의 다크론항체(polyclonal antibody) [참고문헌 6]를 이용하여 조직에서 면역조직화학법을 시행하여 서혜임파절에서 돼지 썬코바이러스 2형의 증식 정도를 확인한다.

(2) 면역조직화학법 검사 방법 (immunohistochemistry; IHC)

면역염색법은 이미 많은 문헌에서 사용한 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 다크론성 항체(polyclonal antibody)를 사용하였다 [참고문헌 6]. 면역조직화학법의 실시 방법도 이미 발표되어 있는 방법대로 시행하였다 [참고문헌 10, 11, 12]. 슬라이드 상의 조직 절편을 xylene 으로 탈파라핀 후, 100%, 70%, 50% 알코올로 점진적으로 함수 시킨다. 3차 증류수 1분, PBTS (0.1% Tween 20 이 포함된 PBS) 5분 세척 후, 항원 노출을 위해 1:200으로 희석한 proteinase K (Promega)를 37°C 에서 25분간 처리한다. 내인성 alkaline phosphatase 제거를 위해 20% glacial acetic acid를 4°C에서 2분간 처리한 후 비특이 반응 억제를 위해 5% normal goat serum 을 15 분간 실온에서 처리한다. 슬라이드 상의 goat serum을 버리고 PBTS에 1:200으로 희석된 polyclonal rabbit anti-PCV2 1차 항체를 조직이 덮일 정도로 분주하고 37°C 에서 1시간 동안 반응시킨다. 슬라이드를 PBTS로 세척 후, alkaline phosphatase가 표지된 goat anti-rabbit(Dako) 2차 항체를 PBTS에 1:250 으로 희석하여 분주하고 37°C 에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응 후 PBTS로 세척하고, Fast red tablet(Roche) 으로 발색하여 PCV2 항원을 확인한다. 발색이 충분히 나타나면 3차 증류수로 세척하여 발색을 끝내고, Mayer's Hematoxylin 으로 배경을 염색한 후, crystal mount를 이용하여 조직을 덮어 현미경으로 관찰한다.

(3) 면역조직화학법 결과 분석 방법

2개 그룹에서 채취한 서혜임파절을 이용하여 면역염색법을 실시한다. 면역염색법은 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 다크론성 항체를 사용하였다. 면역조직화학법의 실시가 종료된 서혜임파절 조직은 현미경상에서 임의로 0.25 mm²의 면적을 3곳 정하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 세어서 각각의 그룹간의 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 양성감염세포수를 통계 처리 하여 2개 그룹간의 양성감염 세포 수의 차이를 비교한다.

차. 폐장에서 흉막폐렴균 증식 정도 확인

(1) 조직내 교잡법을 이용한 흉막폐렴균 증식 정도 확인

흉막폐렴균의 특이적인 유전자를 이용하여 탐색자(probe)를 제작한 후에 폐장 조직에서 조직내 교잡법(in situ hybridization)를 이용하여 흉막폐렴균의 특이적인 유전자(DNA)를 발생시켜 증식 정도를 확인한다.

(2) 조직내 교잡법 검사 방법

① 흉막폐렴균 특이 탐색자(probe) 제작

흉막폐렴균로부터 DNA를 추출한다. 전방향 프라이머(5'-GAA CAGTTGTTTCGCTAA-3')와 역방향 프라이머 (5'-CCGACTTTTAAATCCGT-3')를 이용하여, 94°C 5분간 denaturation 후 94°C 20초, 61°C 20초, 72°C 45초 조건으로 35회 반복하고 72°C 10분간 elongation하는 중합효소 연쇄반응을 실시하여 610 bp의 DNA product를 얻는다 [참고문헌 7]. DNA purification kit를 이용하여 정제한다. DIG-labelling kit를 이용하여 digoxigenin을 임의 표지하여 probe를 제작, detection 과정을 통해 농도를 결정하고 probe를 사용한다.

② 돼지 흉막폐렴균 핵산 검출 조직내 교잡법

돼지 흉막폐렴균 핵산을 검출하기 위한 조직내 교잡법을 실시한다 [참고문헌 8]. Xylene에 탈파라핀 과정 후, 단계적인 함수과정을 실시한다. 0.2 N HCl에 20분간 처치한다. DW에 30초간 세척 후 100 µg/ml Proteinase K를 37°C에서 30분간 처치한다. 그후 4% paraformaldehyde에 10분간 처리한다. PBS 세척 후, Triethanolamine-HCl buffer에 acetic anhydride를 넣어 10분간 acetylation시킨다. 2× SSC에 10분간 처치한다. 조직상에 돼지 썬코바이러스 2형 probe를 1 µg/µl의 농도로 hybridization buffer에 희석하여 조직당 20-30 µl씩 적용하고, cover slip을 덮고 sealing한다. 각각의 조직을 hybridization machine상에서 94°C 10분간 처치후, 45°C incubator에 15시간 배양한다. Cover slip을 제거한 후 4×SSC, 2×SSC, 0.2×SSC에 각 10분씩 세척단계를 실시한다. 그 후 maleic acid buffer에 5분간 처리하고 다시 blockig buffer로 10분간 처리한다. Blocking buffer에 1:250-500으로 희석된 anti-DIG AP conjugate를 적용하여 36°C에서 1-2시간 incubation한다. 그 후 다시 maleic acid buffer 10분간 처리하고, 곧장 blocking buffer에 5분간 처리한다. NBT/BCIP 및 Fast RED를 이용 흉막폐렴균의 핵산(DNA)을 검출한다.

(3) 조직내 교잡법 결과 분석 방법

조직내 교잡법의 실시가 종료된 폐장 조직은 현미경상에서 임의로 0.25 mm²의 면적을 3곳 정하여 흉막폐렴균에 대한 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 세어서 각각의 그룹간의 흉막폐렴균에 대한 양성감염세포수를 통계 처리 하여 2개 그룹간의 양성감염 세포 수의 차이를 비교한다.

12. 국가검정 동물용의약품검정기준에 의한 돼지 썬코흉막 복합백신 안전성 시험

(1) 공시동물

체중 15-20 g 마우스 15마리와 체중 300-400 g 기니픽 6마리를 이용하여 안전성 시험을 실시하였다.

(2) 마우스를 이용한 안전성 시험

백신 접종 할 때 일어날 수 있는 접종 부위의 병변 또는, 그 외에 생길 수 있는 부작용을 확인하기 위하여 특정 병원체 부재(specific pathogen free) ICR 마우스를 이용하여 안전성 실험을 시행하였다. 15-20 g의 마우스 15마리에서 5마리씩 각각 0.25, 0.5, 1 ml의 돼지 썬코 바이러스 2형 백신을 복강에 접종하고, 같은 조건의 마우스 15마리에서 5마리씩 각각 0.25, 0.5, 1 ml을 피하에 접종하였다. 이 후, 7일간 증상 및 병변을 관찰하고, 마지막 날 에테르(ether) 마취 후, 경추탈골법으로 안락사 시켜 부검하여 조직을 중성포르말린으로 고정시켜 HE 염색을 거쳐 조직슬라이드를 만들어 병변을 관찰하였다.

(3) 기니픽을 이용한 안전성 시험

백신 접종 할 때 일어날 수 있는 접종 부위의 병변 또는, 그 외에 생길 수 있는 부작용을 확인하기 위하여 특정 병원체 부재(specific pathogen free) 기니픽을 이용하여 안전성 실험을 시행하였다. 300-400 g의 기니픽 6마리에서 2마리씩 각각 0.5, 1, 2 ml의 돼지 썬코 바이러스 2형 백신을 근육에 접종하고, 같은 조건의 기니픽 6마리에서 2마리씩 각각 0.5, 1, 2 ml을 피하에 접종하고, 같은 조건의 기니픽 2마리에 0.1 ml을 피내에 접종하여 7일간 주사부위의 화농 및 괴사 없이 생존하는지 관찰하였다.

(4) 돼지 자돈을 이용한 안전성 시험

국가검정동물약품검정기준(사단법인 한국동물약품협회)에 의하여 백신 접종 할 때 일어날 수 있는 접종 부위의 병변 또는, 그 외에 생길 수 있는 부작용을 확인하기 위하여 자돈을 이용하여 안전성 실험을 시행하였다. 4주령의 자돈 4마리에 백신규정량의 2배인 2 ml의 돼지 썬코 바이러스 2형 백신을 근육에 접종하여, 1~2시간 내 과민반응의 유무 관찰과 이후 10일간 관찰하여 주사부위에 화농 및 괴사가 없는지 관찰하였다.

13. 옹돈을 이용한 돼지 썬코바이러스 단일백신의 차별화된 효능 연구

가. 돼지 썬코바이러스 감염 옹돈에서 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신에 의한 정액에서의 바이러스 분비 억제효과 연구

(1) 시험 배경 및 목적

돼지 썬코바이러스 2형은 이유후 전신성 소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting disease; PMWS)을 포함하여 돼지 피부염 신장염 증후군(porcine dermatitis and nephropathy syndrome; PDNS), 생식기 질환 및 돼지 호흡기 질병 등의 유발과 관련이 있다. 바이러스가 감염된 모돈을 통해 자돈으로 수직 전파가 발생할 수 있으며, 유산 등의 생식기 질환에 대한 보고가 있다. 또한 돼지 썬코바이러스 2형에 감염된 옹돈의 정액으로 바이러스가 배출되며, 실험적으로 바이러스가 포함된 정액으로 유산이 발생하였다. 이러한 정액을 통한 모돈으로의 감염은 정액에 포함된 바이러스의 양과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.

따라서 본 과제에서 개발된 불활화 돼지췌코바이러스 2형 단일 백신이 옹돈의 정액에서 배출되는 바이러스 양에 미치는 효과를 확인 하고자 한다.

(2) 실험 방법

1) 실험 디자인

백신 효과를 확인하고자 2개 그룹(백신군, 대조군)으로 실험 디자인을 설정하여 시행하였다. 백신군은 백신 접종 후 돼지 췌코바이러스 2형(PCV2)으로 공격 접종하는 돈군으로, 대조군은 백신 접종을 하지 않고 돼지 췌코바이러스 2형으로 공격 접종을 하는 돈군으로 구분한다(표 1).

표 1. 실험디자인

그룹	실험두수	1차 백신접종 (공격접종 6주전)	2차 백신접종 (공격접종 3주전)	공격접종
백신군	4	2.0 ml	2.0 ml	PCV2
대조군	4	X	X	PCV2

2) 공시돈 선정 및 백신 접종

돼지 췌코바이러스 2형과 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 대한 항체 음성인 8개월령의 옹돈 8두를 공시한 후 4두는 백신군으로 4두는 대조군으로 구분한다. 백신군의 옹돈에는 공격접종 6주전과 3주전에 각각 시험백신 2.0 ml을 이근부에 접종한다.

3) 사육 환경

공시돈은 각 실험 옹돈마다 칸막이가 설치되어 있는 분리된 방에서 사육하며, 23~24°C, 습도 60%를 유지시킨다. 사육 기간 동안 음수는 무제한으로 공급한다.

4) 공격 접종용 돼지 췌코바이러스 2형 및 접종 방법

가) 접종 바이러스

돼지에게 접종실험에 사용할 돼지 췌코바이러스는 서울대학교 수의과대학 병리학실에 의뢰된 소모성 증후군의 증상을 나타내는 이유자돈의 임파절에서 분리한 돼지 췌코바이러스 2형 (strain SNUVR000463; b형타입)을 사용하였다. 이 바이러스를 자돈에 접종하면 전형적인 소모성 증후군이 유발되는 것을 확인하였다.

나) 바이러스 접종

접종을 위한 돼지 췌코바이러스 2형은 $1 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀/ml으로 준비하고 2차 백신 접종 후 3주가 경과한 시점에 바이러스를 접종한다. 미리 준비된 양의 돼지 췌코바이러스 2형을 3 ml 비강에 접종한다. 바이러스 공격 접종은 백신군과 대조군 모두에게 시행한다.

5) 시료 채취

가) 채혈

1차 백신 접종(공격접종 6주전), 2차 백신 접종(공격접종 3주전), 공격접종 시점에 채혈을 실시하며, 공격접종 60일 후까지 주 1회 채혈을 실시하여 혈청을 분리한 후 실험시점까지 4°C에 보관한다.

나) 정액 채취

공격접종 시점부터 정액 채취를 시작하여 공격접종 60일 후까지 주 1회 정액을 채취하고 채취 후 24시간 이내 바이러스 분리와 DNA 추출을 실시한다.



그림 1. 옹돈 채혈



그림 2. 옹돈 정액 채취

6) 돼지 썬코바이러스 2형 항체 혈청검사

가) ELISA 검사

채취한 혈액을 이용하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 특이적인 항체는 상업화된 PCV2 ELISA IgG kit (Ingezim Circovirus IgG, Ingenasa, Madrid, Spain)를 이용하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 항체를 측정한다. 돼지 썬코바이러스 2형의 ORF2 흡착 플레이트를 실온에서 10~20분간 방치하였다. 혈청 희석용 플레이트에 400배 희석한 양성대조혈청, 음성대조혈청 및 가검물 혈청을 각각 100 µl씩 돼지 썬코바이러스 2형 항원이 코팅되어 있는 plate에 분주하고 실온(22~27°C)에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 1x 세척액을 300 µl씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척하였다. 세척후 HRPO anti-swine IgG conjugate를 각 well에 100 µl씩 분주하고 실온에서 30분 동안 반응하였다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 1x 세척액을 300 µl씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척하였다. 그 후 발색제를 각 well에 100 µl씩 분주하고 15분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 정지액을 각 well

에 50 μ l씩 분주하여 반응을 정지시키고 ELISA reader에서 450 nm의 흡광도로 측정하였다. 키트와 함께 제공되는 양성대조 혈청은 O.D 수치가 0.7이상이었으며, 음성대조 혈청은 0.3이하로 결과 판정 조건을 모두 충족하였다. 결과는 SP(= 가검혈청 평균 흡광도/ 양성대조 평균 흡광도)값 0.4이상일 경우 양성으로 판정하며, 본 실험에서는 SP값의 변화 추이를 비교하였다.

7) 혈액 및 정액 내 돼지 썬코바이러스 2형 항원 정량 분석

가) 실시간 중합효소 연쇄반응

실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 채취한 혈액과 정액 내 돼지 썬코바이러스 2형을 정량 분석한다.

나) 실시간 중합효소 연쇄반응 검사방법

실시간 중합효소 연쇄반응은 이미 발표되어 있는 검사 방법을 이용하여 실시하였다(Gagnon et al., 2008). 먼저 cloning vector(pCR 2.1 TOPO, Invitroge)를 이용하여 PCV2 ORF2 를 vector 에 삽입하고 10^8 에서 10^1 개/ml로 10^{-1} 씩 단계별로 희석한 후, ORF2 부분(GenBank Accession: HQ148879)을 확인하기 위한 프라이머(전방향: 5' GCACAGAGCGGGGGTTTG, 역방향: 5' ACCGCTGGAGAAGGAAAAAT)를 이용하여 standard curve를 작성하여 측정 한다.

시료에서 추출된 DNA 2 μ l를 주형으로, 1x SYBR green reaction mixture(Applied Biosystems), 각각의 프라이머 0.2 μ M, 증류수와 복합하여 최종 25 μ l로 만든다. 반응 조건은 95°C에서 10분간 denaturation 시킨 후, 95°C에서 30초, 59°C에서 1분, 72°C에서 30초간 총 40회 반복하여 반응시킨다. 모든 반응이 끝난 후 59°C에서 95°C까지 점진적으로 온도를 올리면서 해리 곡선 (dissociation curve)을 측정한다. 절대 정량을 위해 각 시료의 측정된 Ct 값을 표준 곡선(standard curve)에 대입하여 DNA copy 수/ml 을 산정한다.

8) 정액 내 배출되는 돼지썬코바이러스 2형 분리

가) 조직내 교잡법(in situ hybridization)을 이용한 바이러스 분리

채취한 정액내 바이러스의 감염성 여부를 확인하기 위하여 PK-15 세포에 접종하고 조직내 교잡법을 실시한다.

나) 실험 방법

동결된 정액 2 ml을 해동시킨 후 20 ml의 Hank's balanced salt solution에 복합하여 40,000 g에서 1시간 동안 원심 분리한다. 상층액을 버린 후 침전된 정액을 소 태아 혈청이 포함된 배지를 복합하여 단층이 형성된 PK-15 세포에 접종한다. 접종 5일 후 80% 아세톤으로 세포를 고정시키고, 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 DNA 탐침자를 사용하여 In situ hybridization을 실시함으로써 감염 여부를 확인한다.

나. 돼지 썬코바이러스 감염 옹돈에서 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신과 일반 돼지 썬코백신

의 정액에서 바이러스 분비 억제효과 비교 연구

(1) 시험 배경 및 목적

이유후 전신성 소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting disease; PMWS)의 원인이 되는 돼지 썩코바이러스 2형은 모돈에 감염되어 자돈으로 전파되면서 유산 등의 생식기 질환을 일으킬 수 있다. 또한 감염된 웅돈의 정액으로 돼지 썩코바이러스 2형이 배출되는 것으로 밝혀져 있으며, 바이러스가 포함된 정액으로 인공수정을 실시한 결과, 모돈으로 감염이 유발되어 유산 등의 생식기 질환이 발생한 보고가 있다. 이러한 정액을 통한 모돈으로의 감염은 정액에 포함된 바이러스 양이 중요한 요소로 보고되고 있다. 이전 실험을 통하여 본 과제에서 개발된 돼지 썩코바이러스 2형 단일백신이 웅돈 정액 내 바이러스 배출을 감소시키는 것으로 확인되어 본 실험에서는 상품화 되어 있는 돼지 썩코바이러스 2형 백신과 효과를 비교해 보고자 한다.

(2) 실험 방법

1) 실험 디자인

두 가지 백신의 효과를 비교하고자 3개 그룹(백신군 1, 백신군 2, 대조군)으로 실험 디자인을 설정하여 시행하였다. 백신군1은 본 과제에서 개발된 돼지 썩코바이러스 2형 단일 백신 2 ml을 1회 근육 접종하였고, 백신군2는 모돈과 자돈용으로 상품화 되어 있는 불활화 돼지썩코바이러스 2형 백신 2 ml을 1회 근육 접종하였다. 백신군은 백신 접종 3주 후 돼지 썩코바이러스 2형으로 공격 접종하였고, 대조군은 백신 접종 없이 돼지 썩코바이러스 2형만 공격접종 하는 군으로 구분한다(표 1).

표 2. 실험디자인

그룹	실험두수	백신접종 (공격접종 3주전)	공격접종
백신군1	4	2.0 ml	PCV 2b
백신군2	4	2.0 ml	PCV 2b
대조군	4	X	PCV 2b

2) 공시돈 선정 및 백신 접종

돼지 썩코바이러스 2형과 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 대한 항체 음성인 8개월령의 웅돈 12두를 공시한 후 4두는 백신군1로 4두는 백신군2, 4두는 대조군으로 구분한다. 백신군의 웅돈에는 공격접종 3주전에 시험백신 2.0 ml을 이근부에 접종한다.

3) 사육 환경

공시돈은 각 실험 용돈마다 칸막이가 설치되어 있는 분리된 방에서 사육하며, 23~24°C, 습도 60%를 유지시킨다. 사육 기간 동안 음수는 무제한으로 공급한다.

4) 공격 접종용 돼지 썬코바이러스 2형 및 접종 방법

가) 접종 바이러스

돼지에게 접종실험에 사용할 돼지 썬코바이러스 2형은 서울대학교 수의과대학 병리학실에 의뢰된 소모성 증후군의 증상을 나타내는 이유자돈의 임과절에서 분리한 돼지 썬코바이러스 2형 (strain SNUVR000463; b형타입)을 사용하였다. 이 바이러스를 자돈에 접종하면 전형적인 소모성 증후군이 유발되는 것을 확인하였다.

나) 바이러스 접종

접종을 위한 돼지 썬코바이러스 2형은 $1 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀/ml로 준비하고 백신 접종 후 3주가 경과한 시점에 바이러스를 접종한다. 미리 준비된 양의 돼지 썬코바이러스 2형을 3ml 비강에 접종한다. 바이러스 공격 접종은 백신군과 대조군 모두에게 시행한다.

5) 시료 채취

가) 채혈

백신 접종(공격접종 3주전), 공격접종 시점에 채혈을 실시하며, 공격접종 60일 후까지 주 1회 채혈을 실시하여 혈청을 분리한 후 실험시점까지 4°C에 보관한다.

나) 정액 채취

공격접종 시점부터 정액 채취를 시작하여 공격접종 60일 후까지 주 1회 정액을 채취하고 채취 후 24시간 이내 바이러스 분리와 DNA 추출을 실시한다.

6) 돼지 썬코바이러스 2형 항체 혈청검사

가. ELISA 검사

채취한 혈액을 이용하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 특이적인 항체는 상업화된 PCV2 ELISA IgG kit (Ingezim Circovirus IgG, Ingenasa, Madrid, Spain)를 이용하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 항체를 측정한다. 돼지 썬코바이러스 2형의 ORF2 흡착 플레이트를 실온에서 10~20분간 방치하였다. 혈청 희석용 플레이트에 400배 희석한 양성대조혈청, 음성대조혈청 및 가검물 혈청을 각각 100 µl씩 돼지 썬코바이러스 2형 항원이 코팅되어 있는 plate에 분주하고 실온(22~27°C)에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 1x 세척액을 300 µl씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척하였다. 세척 후에 HRPO anti-swine IgG conjugate를 각 well에 100 µl씩 분주하고 실온에서 30분 동안 반응하였다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 1x 세척액을 300 µl씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척하였다. 그 후 발색제를 각 well에 100 µl씩 분주하고 15분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 정지액을 각 well

에 50 μ l씩 분주하여 반응을 정지시키고 ELISA reader에서 450 nm의 흡광도로 측정하였다. 키트와 함께 제공되는 양성대조 혈청은 O.D. 수치가 0.7 이상이었으며, 음성대조 혈청은 0.3 이하로 결과 판정 조건을 모두 충족하였다. 결과는 SP(가검혈청 평균 흡광도/ 양성대조 평균 흡광도)값 0.4이상일 경우 양성으로 판정하며, 본 실험에서는 SP값의 변화 추이를 비교하였다.

7) 혈액 및 정액 내 돼지 썬코바이러스 2형 항원 정량 분석

가) 실시간 중합효소 연쇄반응

실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 채취한 혈액과 정액에서 돼지 썬코바이러스 2형을 정량 분석한다.

나) 실시간 중합효소 연쇄반응 검사방법

실시간 중합효소 연쇄반응은 이미 발표되어 있는 검사 방법을 이용하여 실시하였다. 먼저 cloning vector(pCR 2.1 TOPO, Invitroge)를 이용하여 PCV2 ORF2 를 vector 에 삽입하고 10^8 에서 10^1 개/ml로 10^{-1} 씩 단계별로 희석한 후, ORF2 부분(GenBank Accession: HQ148879)을 확인하기 위한 프라이머(전방향: 5' GCACAGAGCGGGGGTTTG, 역방향: 5' ACCGCTGGAGAAGGAAAAT)를 이용하여 standard curve를 작성하여 측정 한다.

시료에서 추출된 DNA 2 μ l를 주형으로, 1x SYBR green reaction mixture(Applied Biosystems), 각각의 프라이머 0.2 μ M, 증류수와 복합하여 최종 25 μ l 로 만든다. 반응 조건은 95°C에서 10분간 denaturation 시킨 후, 95°C에서 30초, 59°C에서 1분, 72°C에서 30초간 총 40 회 반복하여 반응시킨다. 모든 반응이 끝난 후 59°C에서 95°C까지 점진적으로 온도를 올리면서 해리 곡선(dissociation curve)을 측정한다. 절대 정량을 위해 각 시료의 측정된 Ct 값을 표준 곡선(standard curve)에 대입하여 DNA copy 수/ml 을 산정한다.

8) 정액 내 배출되는 돼지썬코바이러스 2형 분리

가) 조직내 교잡법을 이용한 바이러스 분리

채취한 정액내 바이러스의 감염성 여부를 확인하기 위하여 PK-15 세포에 접종하고 I조직내 교잡법을 실시한다.

나) 실험 방법

동결된 정액 2 ml을 해동시킨 후 20 ml의 Hank's balanced salt solution에 복합하여 40,000 g에서 1시간 동안 원심 분리한다. 상층액을 버린 후 침전된 정액을 소 태아 혈청이 포함된 배지를 복합하여 단층이 형성된 PK-15 세포에 접종한다. 접종 5일 후 80% 아세톤으로 세포를 고정시키고, 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 DNA 탐침자를 사용하여 조직내 교잡법을 실시함으로써 감염 여부를 확인한다.

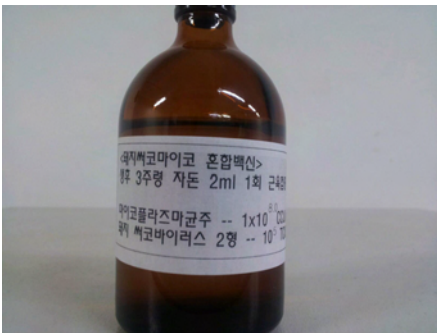
14. 돼지 쉼코바이러스 항원과 마이코플라즈마 항원의 복합 기술 개발 연구

가. 복합 백신의 조성

돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신과 마이코플라즈마 단일백신 각각의 항원 함량 및 조성에 따라 복합하여 면역 유도 효과를 측정하여 비교한다.

표1. 복합 백신의 조성 비율

구 분	항원 함량 (2 ml/dose)
PCV2 whole virus 항원	10^5 TCID ₅₀ 이상
마이코플라즈마균 항원	$1.0 \times 10^{8.0}$ CCU/ml 이상
알루미늄 젤	10%
Formalin	0.2% 이하



나. 복합 백신의 면역 유도 분석

(1) 실험 디자인

돼지쉼코바이러스 2형 및 마이코플라즈마 항체 음성인 3주령 돼지 7두를 선발하여 5두는 백신군으로 복합 백신을 이근부에 2.0 ml 접종하고, 2두는 대조군으로 PBS를 이근부에 2.0 ml 접종한다.

(2) 실험 방법

1) 채혈

백신 접종(3주령), 백신 접종 후 2주(5주령), 백신 접종 후 4주(7주령), 백신 접종 6주(9주령)에 각각 채혈하여 혈청 및 말초혈액 단핵구 등을 채취한다.

2) 항체 생성 능력 시험

돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 항체 생성 수준은 PCV2 ELISA IgG kit (Ingezim Circovirus IgG, Ingenasa, Madrid, Spain)를 이용하여 측정하였다.

3) 세포성 면역 유도 평가

각 채혈 시기에 말초혈액 단핵구(PBMC)를 분리하여 각 항원에 대한 임파구 자극 시험 및 IFN- γ 분비 세포를 측정하고 백신 접종 2주 후인 5주령에 지연형 과민반응 검사를 실시하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 돼지 쉼코바이러스 2형 증식 표준화 연구

가. 배양된 돼지 쉼코바이러스 2형 역가 측정

IFA 를 통한 돼지 쉼코바이러스 2형 역가를 측정한 결과는 아래 그림과 같다. 감염된 세포의 수가 희석 배율에 따라 감소하여 10^5 - 10^6 배율까지 바이러스 감염이 확인되어 최종 역가는 10^5 TCID₅₀/ml 이상을 나타냈다.

2. 돼지 쉼코바이러스 단일백신의 시제품 제작

가. 백신 균주의 염기배열 특성

백신주로 사용되는 돼지 쉼코바이러스 2형의 염기배열 순서를 분석한 결과 전체 유전자 크기는 1768 base pair로서 기존의 유전자 배열 순서가 밝혀진 다른 돼지 쉼코바이러스 2형과의 관계를 분석해본 결과 캐나다에서 분리된 돼지 쉼코바이러스 2형(GU049340.1, Imp.1010-Stoon)과 가장 유전자적 특성의 유사성(99.1%)이 높은 것으로 확인되었다.

나. 백신균주의 염기배열 순서

본 돼지 쉼코바이러스 단일백신에 사용한 바이러스의 유전자 배열은 아래와 같다.

```
ACCAGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CGGCAGCAAC
ATGCCCAGCA AGAAGAATGG AAGAAGCGGA CCCCAACCAC ATAAAAGGTG
GGTGTTACAG CTGAATAATC CTTCCGAAGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG
AGCTCCCAAT CTCCCTATTT GATTATTTTA TTGTTGGCGA GGAGGGTAAT
GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT TTGTGAAGAA
GCAAACTTTT AATAAAGTCA AGTGGTATTT GGGTGCCCGC TGCCACATCG
AGAAAGCCAA AGGAACTGAT CAGCAGAATA AAGAATATTG CAGTAAAGAA
GGCAACTTAC TTATTGAATG TGGAGCTCCT CGATCTCAAG GACAACGGAG
TGACCTGTCT ACTGCTGTGA GTACCTTGTT GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA
```

CCGTTGCAGA GCAGCACCTT GTAACGTTTG TCAGAAATTT CCGCGGGCTG
GCTGAACTTT TGAAAGTGAG CGGGAAAATG CAGAAGCGTG ATTGGAAGAC
CAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG
CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCCAGAAAC
AAGTGGTGGG ATGGTTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTTA TTGATGACTT
TTATGGCTGG CTGCCGTGGG ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGGTATC
CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAAGTAC TACCTTTTTT GGCCCGCAGT
ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT CCTCAACTGC
TGTCCAGCT GTAGAAGCTC TCTATCGGAG GATTACTTCC TTGGTATTTT
GGAAGAATGC TACAGAACAA TCCACGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTCACC
CTTTCCCCC CATGCCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT
TTTTATCACT TCGTAATGGT TTTTATTATT CATTTAGGGG TTAAGTGGGG
GGTCTTTAAG ATTAATTTCT CTGAATTGTA CATAATGGT TACACGGATA
TTGTAGTCCT GGTCGTATTT ACTGTTTTTCG AACGCAGTGC CGAGGCCTAC
GTGGTCTACA TTTCTAGAGG TTTGTAGCCT CAGCCAAAGC TGATTCCTTT
TGTTATTTGG TTGGAAGTAA TCAATAGTGG AGTCAAGAAC AGGTTTGGGT
GTGAAGTAAC GGGAGTGGTA GGAGAAGGGT TGGGGGATTG TATGGCGGGA
GGAGTAGTTT ACATATGGGT CATAGGTTAG GGCTGTGGCC TTTGTTACAA
AGTTATCATC TAGAATAACA GCAGTGGAGC CCACTCCCCT ATCACCTTGG
GTGATGGGGG AGCAGGGCCA GAATTC AAC TTAGACCTTTC TTATTCTGTA
GTATTCAAAG GGTATAGAGA TTTTGTGGT CCCCCCTCCC GGGGGAACAA
AGTCGTCAAT ATTAATCTC ATCATGTCCA CCGCCAGGA GGGCGTTCTG
ACTGTGGTAG CCTTGACAGT ATATCCGAAG GTGCGGGAGA GGCGGGTGTT
GAAGATGCCA TTTTTCCTTC TCCAACGGTA GCGGTGGCGG GGGTGGACGA
GCCAGGGGCG GCGGCGGAGG ATCTGGCCAA GATGGCTGCG GGGGCGGTGT
CTTCTTCTGC GGTAACGCCT CCTTGGATAC GTCATAGCTG AAAACGAAAG
AAGTGCGCTG TAAGTATT

3. 돼지 쉼코바이러스 단일백신 제품 품목허가를 위한 예비 실험

가. 목적동물에 대한 안전성 시험 결과

3개 농장 9마리 모두 접종 후 1-2시간 내 과민 반응이 나타나지 않았으며, 10일간 관찰결과 주사부위에 화농 및 괴사 등의 부작용은 나타나지 않았다.

나. 목적동물에 대한 면역원성 시험 결과

목적 동물인 돼지 5두의 1주 및 3주령에 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신을 접종하고 3주

후 채혈하여 혈청 내 항체를 검사한 결과는 아래 표와 같다. 백신군 5두 모두 1:256 이상의 높은 항체를 나타내며 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신이 면역 형성을 충분히 유발함을 확인하였다.

표 1. 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신 항체 형성 실험 결과

시험군	포유자돈 번호	주기별 항체		
		1차 접종전	2차 접종전	2차 접종 후 3주
백신군	1290-1	0	1:128	1:512
	1290-2	0	1:128	1:512
	1290-3	0	1:256	1:512
	1290-4	0	1:128	1:256
	1290-5	0	1:64	1:256
대조군	1211-1	0	0	0
	1211-2	0	0	0

다. 예비 공격 접종 실험 결과

백신을 접종한 제1그룹의 돼지가 백신을 접종하지 않은 제2그룹의 돼지보다 체중의 증체에서 23%가 증가된 것으로 확인 되었다 (표 1). 또한 TNF- α 의 분비 양상을 보면, 백신을 접종한 제1그룹의 돼지가 백신을 접종하지 않은 제2그룹의 돼지보다 TNF- α 의 분비가 23% 감소한 것으로 확인 되었다 (표 2). 이러한 사실을 분석하면, 개발한 돼지 예방백신은 돼지 체내에서 TNF- α 의 분비를 감소시켜 성장 억제를 예방하는 것으로 확인되었다. 따라서 개발한 돼지 썬코바이러스 단일백신은 돼지 썬코바이러스 2형에 이미 감염된 돼지에서도 이유포성 증후군의 예방 효과가 있으며, 이러한 효과 중에 하나가 식욕을 억제하는 TNF- α 의 분비를 상대적으로 감소시키는 것으로 확인 되었다. 또한 백신의 효과를 직접적으로 확인 하여기 위하여 임파절에서의 돼지 썬코바이러스 2형과 파보 바이러스에 감염된 세포의 숫자를 분석하여 본 결과 백신을 접종한 제 1그룹의 돼지의 임파절에서 통계학적으로 유의성이 있게 돼지 썬코바이러스 2형 (표 3)의 감염 세포수가 감소하였다.

표 1. 그룹간의 체중변화 (단위; kg)

그룹	처리방법	개체숫자(두)	4주령 접종전 체중	백신 접종후 5주 경과 체중
제1그룹	백신접종 + 공격접종	30	7.08±0.93	19.01±5.31
제2그룹	공격접종	30	6.80±1.25	14.62±3.31
제3그룹	무처리	30	6.95±0.19	22.48±1.14

표 2. 그룹간의 TNF-α 변화 (단위; pg/ml)

그룹	처리방법	개체숫자(두)	4주령 접종전 TNF-α 농도	백신 접종후 5주 경과 TNF-α 농도
제1그룹	백신접종 + 공격접종	30	125±37.32	291.667±53.23
제2그룹	공격접종	30	137.23±47.42	377.41±22.92
제3그룹	무처리	30	159.722±51.240	356.25±65.230

표 3. 그룹간 임파절에서 돼지 썬코 바이러스 2형 증식 정도 비교 (단위; 개)

그룹	처리방법	개체숫자(두)	돼지 썬코 바이러스 2형 양성세포 숫자
제1그룹	백신접종 + 공격접종	30	8.5±4.9
제2그룹	공격접종	30	164.3±42.5
제3그룹	무처리	30	0

4. 국가검정 동물용의약품검정기준에 의한 돼지 쉐코바이러스 2형 단일백신 안전성 검사 실시

가. 마우스를 이용한 안전성 시험

마우스 30마리를 사용하여 개발된 백신을 복강 및 피하에 접종하여 7일간 관찰한 결과는 아래와 같다. 접종한 개체 모두 임상 증상 없이 생존하였으며, 부검 결과에서도 접종 부위의 피부를 비롯한 근육, 장기 등에 병변이 유발되지 않았다.

표 1. 안전성 시험 결과

접종부위	접종량(ml)	개체번호	임상증상	병변
복강	0.25	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	0.5	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	1	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
피하	0.25	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	0.5	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	1	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	접종부위 탈모
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변



그림 1. 마우스 내 접종 시험 사진

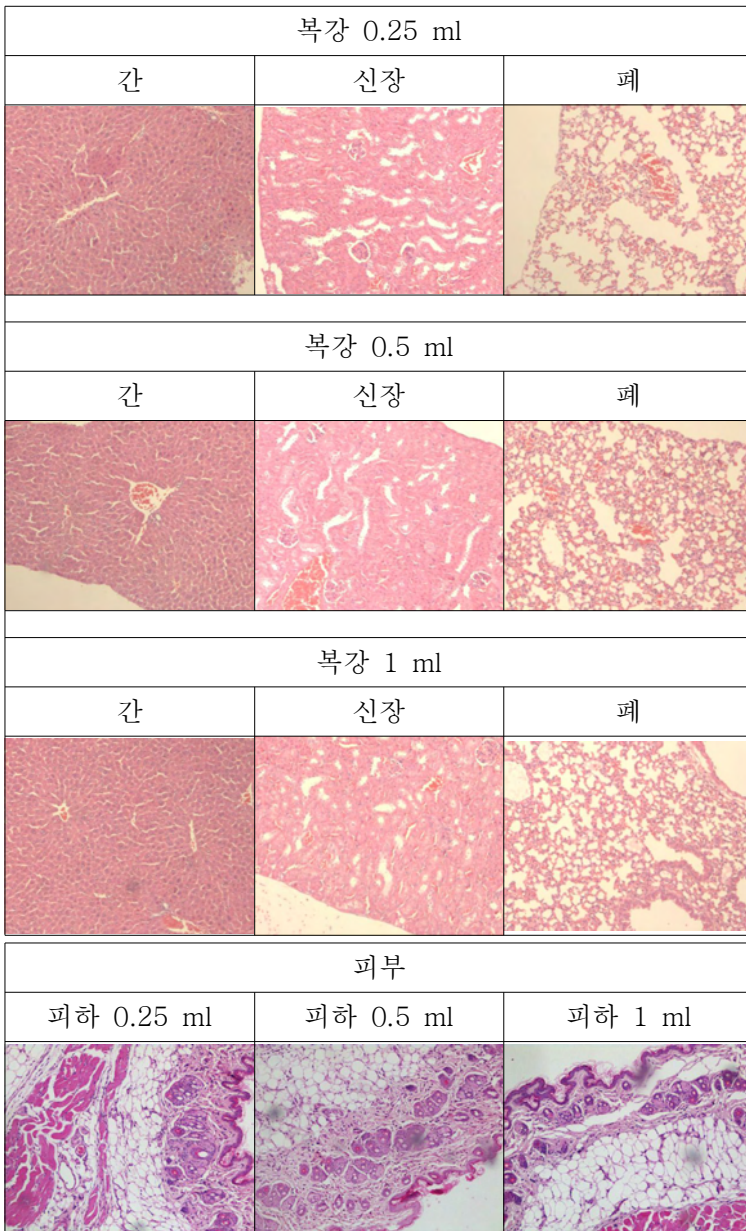


그림 2. 마우스 HE 염색 슬라이드 사진

나. 기니픽을 이용한 안전성 시험

기니픽 6마리의 근육, 피하 및 피내에 접종하여 7일간 관찰한 결과는 아래의 표 및 사진과 같다. 관찰 기간 동안 부작용으로 인한 임상 증상은 나타나지 않았으며, 부검 결과에서도 주사 부위에 병변은 관찰되지 않았다.

표 1. 기니픽 안전성 시험 결과

접종부위	접종량(ml)	개체번호	임상증상	병변
근육	0.5	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	1	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	2	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
피하	0.5	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	1	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	2	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
피내	0.1	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변



그림 1. 접종 부위 사진

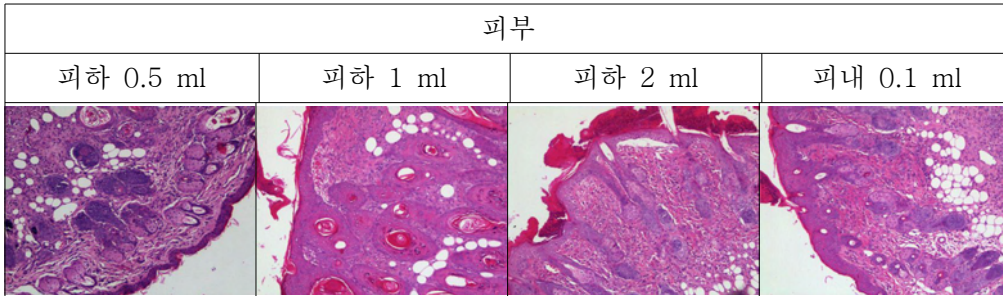
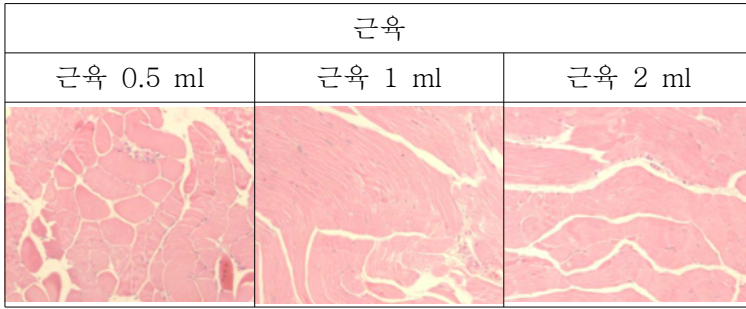


그림 2. 기니픽 마우스 HE 염색 슬라이드 사진

라. 돼지 자돈을 이용한 안전성 시험

목적 동물인 자돈을 이용한 안전성 시험 결과는 아래 표 및 사진과 같다. 접종 부위에 과민 반응은 나타나지 않았으며, 10일간 관찰 결과 부작용으로 보이는 임상증상은 나타나지 않았으며 접종 부위 근육에도 병변이 관찰되지 않았다. .

표 1. 돼지 안전성 시험 결과

접종부위	접종량(ml)	개체번호	과민반응	병변
근육	2	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변

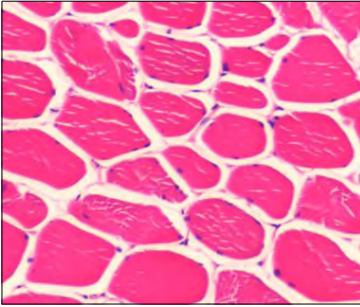


그림 1. 돼지 근육 HE 염색 슬라이드

5. 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신 공격실험 실시

가. 항체 역가 측정 결과

백신 접종 전, 2차 접종 전, 공격접종전 및 부검전 채혈한 혈액의 항체가 검사 결과는 아래 표와 같다. 항체가는 ELISA 검사의 S/P 비율로 표시하였으며, 수치가 0.4 이상일 때 양성으로 판정한다.

표 1. 항체가 검사 결과

실험 구분	채혈 일령	공시두수	S/P 값					
			1	2	3	4	5	평균
음성 대조군 ¹	백신 접종전	5	0.342	0.241	0.074	0.154	0.167	0.196
	2차 접종전	5	0.154	0.094	0.054	0.087	0.105	0.099
	공격접종전	5	0.064	0.003	0.014	0.145	0.234	0.092
	부검전 (공격접종 후 4주)	5	0.024	0.145	0.201	0.124	0.078	0.114
시험군1 ²	백신 접종전	5	0.264	0.364	0.454	0.127	0.247	0.291
	2차 접종전	5	0.341	0.654	0.241	0.542	0.574	0.470
	공격접종전	5	0.874	0.456	1.241	0.647	0.785	0.801
	부검전 (공격접종 후 4주)	5	1.264	1.678	2.154	1.742	2.412	1.850
시험군2 ³	백신 접종전	5	0.167	0.245	0.128	0.237	0.065	0.168
	2차 접종전	5	0.425	0.654	0.547	0.346	0.502	0.495
	공격접종전	5	0.874	0.974	1.241	0.784	1.067	0.988
	부검전 (공격접종 후 4주)	5	2.241	2.641	1.845	1.254	2.041	2.004
대조군 ⁴	백신 접종전	5	0.287	0.346	0.094	0.145	0.317	0.238
	2차 접종전	5	0.152	0.264	0.148	0.201	0.137	0.180
	공격접종전	5	0.245	0.178	0.226	0.007	0.098	0.151
	부검전 (공격접종 후 4주)	5	1.654	1.254	0.987	1.501	2.364	1.552

¹음성대조군:백신 접종 및 공격 접종을 하지 않은 돈군.

²시험군1: 백신 접종후 썬코 바이러스 2형과 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 공격 접종을 하는 돈군.

³시험군2:백신 접종 후 썬코 바이러스 2형 단독 공격 접종을 하는 돈군.

⁴대조군:백신 접종을 하지 않고 공격 접종만 하는 돈군.

※ 공격접종 : 2차 접종 2주 후 실시.

나. 공격접종 후 임상 증상

공시돈의 임상 증상은 매주 1회씩 관찰하였다. 6주령에서는 대조군이 음성대조군($P=0.016$)과 시험군2($P=0.016$)보다 통계학적으로 유의성 있게 임상증상 점수가 높게 나타났다. 7주령에서는 대조군이 음성 대조군($P=0.008$)과 시험군2($P=0.016$)보다 통계학적으로 유의성 있게 임상 증상 점수가 높게 나타났다. 8주령에서는 대조군이 음성대조군($P=0.008$)과 시험군1($P=0.032$)과 시험군2($P=0.016$)보다 통계학적으로 유의성 있게 임상증상 점수가 높게 나타났다. 9주령에서는

대조군이 음성대조군($P=0.008$)과 시험군1($P=0.008$)과 시험군2($P=0.008$)보다 통계학적으로 유의성 있게 임상증상 점수가 높게 나타났다.

표 2. 각 그룹별 임상 점수

구분	공시두수	임상 점수 (시험두수의 임상 증상의 합계)					비 고
		5주 (접종시)	6주	7주	8주	9주 (부검진)	
음성대조군	5	1	1	0	0	0	
시험군1	5	1	3	3	2	1	
시험군2	5	1	1	2	2	1	
대조군	5	1	7	11	11	13	

다. 증체량 결과

1주령(1차 백신 접종 전), 3주령(2차 백신 접종 전), 5주령(2차 백신 접종 2주후, 공격접종시기), 6주령, 7주령, 8주령, 9주령에 공시돈의 체중을 측정하여 주당 증체량을 비교 시험시작 시점인 1차 백신 접종 전의 1주령 공시돼지에서는 4개 그룹간의 체중의 유의성이 없었다. 그 후 2차 백신 접종시기인 3주령, 공격접종을 실시한 5주령, 6주령, 7주령까지는 4개 그룹간의 체중의 변화가 없었다. 공격 접종 후 3주가 되는 8주령에서는 대조군의 체중이 시험군1($P<0.001$), 시험군2($P<0.001$), 음성대조군($P<0.001$)보다 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다. 또한 9주령에서는 대조군의 체중이 시험군1($P<0.001$), 시험군2($P<0.001$), 음성대조군($P<0.001$) 보다 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다. 하지만 8주령과 9주령에서 음성대조군과 시험군1($P=1.000$), 시험군2($P=1.000$) 간의 통계학적으로 유의성 있는 체중의 차이는 관찰되지 않았다. 또한 시험군1과 시험군2 사이에서도 통계학적 차이는 관찰되지 않았다($P=1.000$).

표 3. 증체량의 변화

구 분		주 령									증체율(%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
음성대조군	공시두수	5	5	5	5	5	5	5	5	5	724
	평균체중	2.5	3.78	5.36	6.34	7.16	8.2	10.14	14.22	18.1	
	표준편차	0.26	0.3	0.42	0.44	0.75	0.82	1.49	1.99	1.73	
시험군 1	공시두수	5	5	5	5	5	5	5	5	5	710.4
	평균체중	2.5	3.94	5.28	6.24	7.22	8.32	10.24	13.96	17.76	
	표준편차	0.2	0.3	0.48	0.5	0.7	1.14	2.29	2.09	3.08	
시험군 2	공시두수	5	5	5	5	5	5	5	5	5	713.5
	평균체중	2.52	3.9	5.4	6.38	7.36	8.5	10.44	14.02	17.98	
	표준편차	0.13	0.31	0.35	0.4	0.54	0.75	1.57	1.48	1.97	
대조군	공시두수	5	5	5	5	5	5	5	5	5	339.5
	평균체중	2.58	3.98	5.4	6.72	7.54	7.56	7.64	8.06	8.76	
	표준편차	0.23	0.43	0.47	0.48	0.8	0.83	0.48	1.15	2.38	

¹음성대조군:백신 접종 및 공격 접종을 하지 않은 돈군.

²시험군1: 백신 접종후 썬코 바이러스 2형과 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 공격 접종을 하는 돈군.

³시험군2:백신 접종 후 썬코 바이러스 2형 단독 공격 접종을 하는 돈군.

⁴대조군:백신 접종을 하지 않고 공격 접종만 하는 돈군.

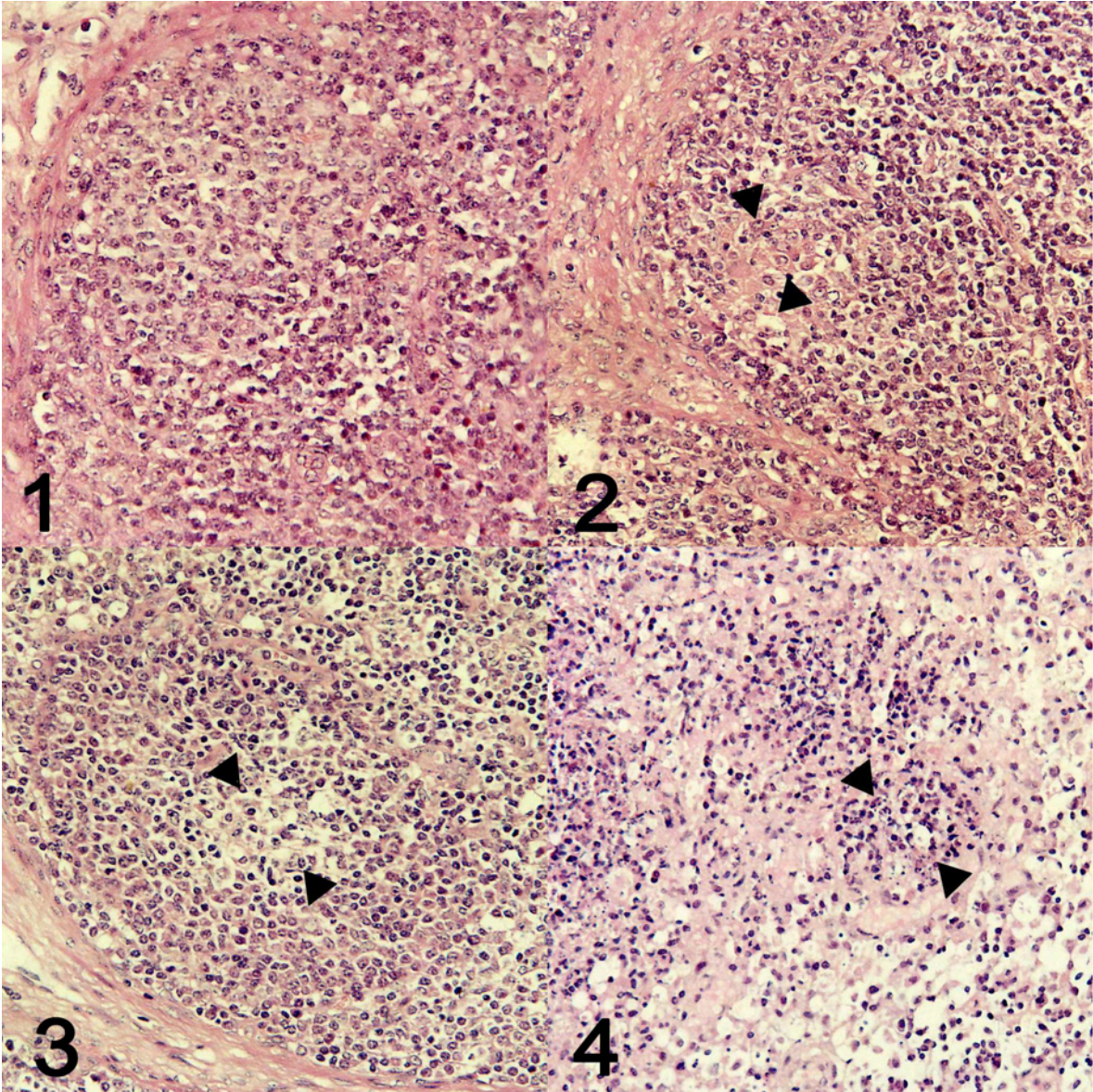
라. 병리조직학적 검사 결과

4개 그룹의 서혜임파절의 경우 돼지 썬코바이러스 2형 감염 때에 나타나는 전형적인 병변인 임파구의 감소(lymphoid depletion)에 대한 비교에서 음성대조군에서는 임파구의 감소를 포함한 어떠한 병리조직학적 병변이 관찰되지 않았다(스코어 0; 그림 1). 반면 시험군1의 경우 3두에서 경미한 임파구의 감소(스코어 1; 그림 2)가 관찰되었으며, 시험군2의 경우 1두에서 경미한 임파구의 감소(스코어 1; 그림 2)가 관찰되었고, 백신을 접종하지 않고 바이러스만 접종한 대조군에서 3두에서는 중등도 임파구의 감소(스코어 2; 그림 3)가, 2두에서는 아주 심한 임파구의 감소(스코어 3; 그림 4)가 관찰되었다. 이들 4개 그룹의 통계처리 결과, 시험군1($P=0.008$)과 시험군2($P=0.008$)가 대조군보다 통계학적 유의성 있게 병변이 경미하였다. 또한 음성대조군과 시험군1($P=0.151$), 시험군2($P=0.690$) 사이에서는 통계학적 유의성이 없었으며, 시험군1과 시험군2 사이에서도 통계학적 유의성이 없었다($P=0.310$).

표4. 병리조직학적 병변 결과

평균 병리조직학적 병변 스코어

개체번호	그 룩			
	음성대조군	시험군1	시험군2	대조군
1	0	1	0	2
2	0	0	1	2
3	0	1	0	2
4	0	0	0	3
5	0	1	0	3
평균 ± 표준편차	0.0±0.000	0.6±0.548	0.2±0.447	2.4±0.548



병리조직학적 병변 스코어

그림 1. 병변 스코어 0, 음성대조군 개체 1번의 임파절에서 follicle이 정상으로 관찰되었다.

그림 2. 병변 스코어 1, 시험군1 개체 3번의 임파절에서 follicle이 경미한 감소(depletion)가 관찰되었다.

그림 3. 병변 스코어 2, 대조군 개체 1번의 임파절에서 follicle에 있는 임파구가 피사되어서 중증도의 감소 (depletion)가 관찰되었다.

그림 4. 병변 스코어 3, 대조군 개체 5번의 임파절에서 follicle에 있는 임파구가 거의 모두 피사되어서 follicle의 형태가 거의 남아있지 않는 소실(depletion)이 관찰되었다.

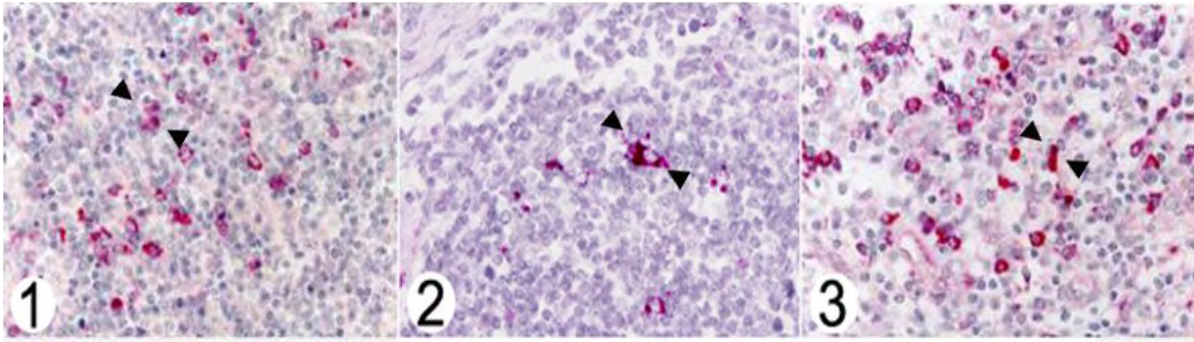
마. 면역조직화학법 염색 결과

4개 그룹의 돼지에서 채취한 서혜임과절을 이용하여 면역염색법을 실시한다. 면역염색법은 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 다클론성 항체(polyclonal antibody)를 사용하였다. 4개 그룹 중에서 돼지 쉼코바이러스 2형의 공격접종을 실시하지 않은 음성대조군에서는 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 항원을 서혜임과절에서 전혀 관찰할 수가 없었다. 따라서 돼지 쉼코바이러스 2형을 접종한 시험군1, 시험군2와 대조군의 서혜임과절 조직에서 관찰되는 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 항원을 현미경상에서 0.25 mm²의 면적을 5곳을 임의로 정하여 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 측정하였다. 돼지 쉼코바이러스 2형의 항원은 감염세포의 세포질에서 관찰되었으며, 통계학적으로 시험군1에서는 평균 12.38±4.81개의 양성세포가 측정되었으며 (그림 1), 시험군2에서는 평균 9.2±3.34개 (그림 2), 대조군에서는 평균 73.64±35.75개로 측정 (그림 3)되어 3개 그룹 간에 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 양성 세포수는 시험군1($P<0.001$)과 2($P<0.001$) (백신 접종후 공격접종을 한 그룹)에서 대조군 (백신 접종을 하지 않고 공격 접종만 시행한 그룹)보다 유의성 있게 적은 숫자가 측정되었다. 하지만 시험군1과 시험군2 사이에서는 통계학적 유의성이 없었다($P=0.170$).

표 5. 면역조직화학법 검사 결과

평균 PCV2 양성 감염 세포수 (0.25 mm² 내 평균)

개체번호	그룹			
	음성대조군	시험군1	시험군2	대조군
1	0	6	12	31
2	0	9.8	8.6	112.6
3	0	16	7.6	98.4
4	0	11.6	13	41.4
5	0	18	4.8	84.8
평균 ± 표준편차	0.00±0.000	12.28 ± 4.81	9.2 ± 3.34	73.64 ± 35.75



면역조직화학법 실시한 조직 표본

그림 1. 시험군1의 서혜임파절에서 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 면역조직화학법.

그림 2. 시험군2의 서혜임파절에서 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 면역조직화학법.

그림 3. 대조군의 서혜임파절에서 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 면역조직화학법.

바. 고찰

돼지 썬코바이러스 2형 불활화백신의 경우 마우스, 기니픽, 자돈 등을 이용한 안전성 검사에서 마우스, 기니픽, 자돈에서 쇼크, 폐사 등의 전신적인 증상 및 접촉부위 부종, 화농, 괴사 등의 국소부위 증상도 관찰 할 수가 없었다. 따라서 돼지 썬코바이러스 2형 불활화백신의 안전성은 본 시험을 통하여 증명하였다.

자돈을 이용한 돼지 썬코바이러스 2형 불활화백신의 항체 형성능에서도 대조군(ELISA S/P 0.122, 음성대조 및 대조군 평균)에 비하여 백신을 접종한 시험군(ELISA S/P 0.895, 시험군1, 2 평균)에서 통계학적으로 유의성 있는 높은 항체가를 형성하였다. 또한 롯데(lot) 넘버가 다른 3개의 롯데 사이에서는 자돈에서 항체 형성에서는 통계학적 유의성이 없는 것을 나타냈다.

돼지 썬코바이러스 감염증인 이유후 전신성 소모성 증후군의 정의는 (i) 성장정체와 같은 임상 증상, (ii) 임파절등에서 육아종성 염증반응(granulomatous inflammation) 또는 임파구의 감소(lymphoid depletion)와 같은 병리조직학적 병변 (iii) 이러한 병변에서 면역조직화학법 등을 이용한 돼지 썬코바이러스 2형 항원 검출에 있다 [참고문헌 1, 2]. 이러한 정의를 근거로 본 돼지 썬코바이러스 2형 불활화 백신의 효능을 분석해 보면 백신을 접종한 후에 돼지 썬코바이러스 2형과 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 돈군에서는 백신을 접종하지 않은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 돼지 썬코바이러스 감염증에서 관찰되는 임상증상을 관찰 할 수 없었다. 둘째, 병리조직학적 비교에서도 돼지 썬코바이러스 2형 불활화 백신을 접종한 후에 돼지 썬코바이러스와 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 돈군에서 돼지 썬코바이러스 감염증 때에 특징적으로 관찰되는 육아종성 염증반응을 관찰 할 수가 없었으며, 아주 경미한 임파구의 감소 병변이 관찰되었다. 하지만 백신을 접종하지 않은 대조군에서는 일반 야외농장에서 관찰되는 전형적인 매우 심한 육아종성 염증과 임파구의 감소가 임파절에서 관찰되었으며, 이러한 병변을 스코어를 전환하여 통계적인 분석을 시도하면 그 차이는 더욱 뚜렷하게 나타났다. 셋째, 병변이 있는 임파절 또는 일반적인 임파절에서 돼지 썬코바이러스의 항원을 면역조직화학법을 이용하여 검출해 본 결과 돼지 썬코바이러스 2형 불활화 백신

을 접종한 후에 돼지 쉼코바이러스와 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 돈군에서는 백신을 접종하지 않은 대조군에 비하여 돼지 쉼코바이러스 항원의 검출 정도가 통계학적으로 유의성 있게 감소된 것을 확인하였다.

실험실내 공격접종의 결과 쉼코바이러스 2형 불활화 백신을 접종한 후에 돼지 쉼코바이러스와 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 돈군에서 대조군에 비하여 돼지 쉼코바이러스 감염증과 관련된 임상증상이 관찰되지 않았으며, 병리조직학적 병변도 거의 음성대조군과 같이 병변이 관찰되지 않았으며, 면역조직화학법에서 돼지 쉼코바이러스 2형의 항원이 바이러스만 접종한 대조군에 비하여 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 돼지 쉼코바이러스 2형 불활화백신이 돼지 쉼코바이러스 감염증과 관련된 임상증상, 병리조직학적 병변, 돼지 쉼코바이러스 항원을 유의성 있게 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 돼지 쉼코바이러스 감염증의 정의와 관련된 항목이외에도, 증체량의 비교에서도 백신 접종군이 대조군에 비하여 약 2배 이상의 증체가 되었기 때문에 백신의 효과가 매우 뛰어난 것을 확인 할 수가 있다.

본 시험을 통하여 돼지 쉼코바이러스 2형 불활화백신은 안전성이 높고 면역학적으로 항체형성을 충분히 유도하여 실험실내의 공격접종에서도 돼지 쉼코바이러스 2형과 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 의하여 유발되는 이유후 전신성 소모성 증후군을 효과적으로 예방하는 것으로 확인되었다. 또한 실험실내 공격실험에서 백신 접종한 돈군에서 백신을 접종하지 않은 돈군에 비하여 돼지 쉼코바이러스의 항원이 유의성 있게 낮게 나타났기 때문에 이번에 개발한 돼지 쉼코바이러스 2형 불활화백신이 효과적으로 돼지 체내에서 효과적으로 돼지 쉼코바이러스 2형의 증식을 효과적으로 억제하는 것을 의미한다. 현재 국내 농장에서 이유후 전신성 소모성 증후군에 의하여 많은 경제적 피해가 유발되고 있는 농장에서 매우 효과적으로 돼지 쉼코바이러스 감염증을 예방 할 수 있을 것이다.

6. 돼지 태아 신장 유래 초대 배양 세포(SK cell)를 이용한 배양된 돼지 쉼코바이러스 2형 역가 측정

IFA 를 통한 돼지 쉼코바이러스 2형 역가를 측정한 결과는 아래 그림과 같다. 감염된 세포의 수가 희석 배율에 따라 감소하여 10^6 - 10^7 배율까지 바이러스 감염이 확인되어 최종 역가는 10^6 TCID50/ml 이상을 나타냈다.

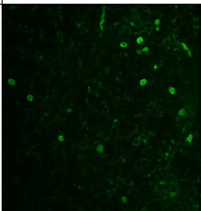
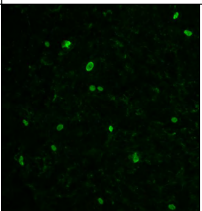
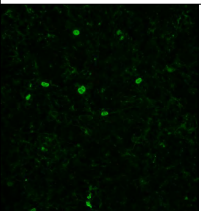
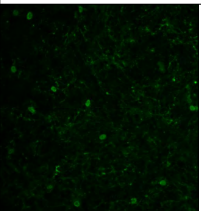
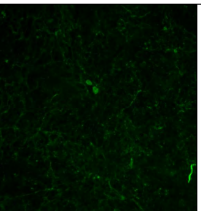
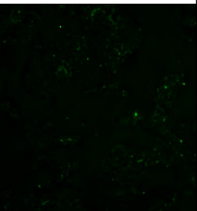
번호	1	2	3	4	5	6
결과						
희석배율	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	대조군

그림 1. IFA 를 이용한 바이러스 역가 측정 결과

7. 돼지 흉막폐렴균 배양 표준화 연구

가. 흉막폐렴 혈청형 5형 *apxICA*와 *apxIBD* 유전자 염기배열 순서

총 8쌍의 프라이머를 이용하여 8292 bp의 전체 유전자중 8415 bp을 증폭하였으며 증폭된 부분은 Genbank에 등록된 *apxICABD* 유전자(등록번호 X98595)의 1-8292부분에 해당하며, 염기서열 비교 시 37개 base pair의 차이를 보인다. 차이를 보이는 염기서열 번호와 염기의 종류는, Genebank code X98595의 염기서열 중315번의 A가 본 흉막폐렴균 5형의 염기서열에서는 T로, 317-318번의 AA가 CC로, 508-509번의 TT가 AG로, 694-695번의 AA가 TT로, 1239-1240번의 CC가 GG로, 1647-1647번의 AA가 TC로, 1826-1827번의 AA가 TT로 대체되었다. 그리고 1964-1965번의 AT가 CA로, 2185-2186번의 GG가 CC로, 2861-2862번의 AC가 TG로, 3260-3261번의 AC가 TG로, 3668의 A가 T로, 3827-3828번의 TT가 AG로, 4078-4079번의 AA가 CG로 대체되었다. 또한 4284번의 T는 A로, 4647번의 A가 T로, 4848번의 C가 G로, 5370-5371의 AT가 TG로, 5959번의 A가 GG로, 7465-7466번의 AA가 TC로 대체되었다. 마지막으로 7499-7500번의 TT는 AC로 대체되었다. 본 연구에서 분석한 *apxICABD* 유전자의 염기배열 순서는 아래와 같다.

```
TAATTTACCGTAATTGAATAAAAAATACCGTGAAGCAGTTTACAAAATACGAGATTAATGAGCG  
ATATTGTTATAAAATCATAATGTAAACCTCATTTGTAATGAATTGGTAAATTATATAAATAAT  
CAAAAACTTACTTTTTTTTATTTTTATCGGTAAGTATTTACAATCAAGTCAGACAAACGGCAA  
TATTGTTATAAATCTGGGGGATGAATGAGTAAAAAATTAATGGATTTGAGGTTTTAGGAGA  
GGTGGCATGGTTATGGGCAAGTTCTCCTTTACATCGAAAGTGGCCGCTTTCTTTGTTAGCTAAA  
TGTGCTACCTGCGATTGAGAGTAATCAATATGTTTTGTTAAAGCGTGACGGTTTTCTATTGCA  
TTTTGTAGCTGGGCAAATTTGAATTTGGAAAATGAAATTAATACCTTGATGATGTTGCCTCGC  
TAGTTGCGGATGATTGGACTTCCGGCGATCGTCGATGGTTTATAGATTGGATAGCACCGAGCGG  
AGACAGTGCCGCATTATACAAACATATGCGAGATAACTTCCCGAATGAGCTGTTTAGGGCTATT  
CGAGTTGATCCGGACTCTCGAGTAGGGAAAATTTTCAGAATTTTCATGGAGGAAAAATTGATAAGA  
AACTGGCAAGTAAAATTTTTCAACAATATCACTTTGAATTAATGAGTGAGCTATTAATAAACA  
AAATTTTAAATTTTCATTAGTAAATAGCTAAGGAGACAACATGGCTAACTCTCAGCTCGATAGA  
GTCAAAGGATTGATTGATTCACTTAATCAACATACAAAAAGTGCAGCTAAATCAGGTGCCGGCG  
CATTA AAAAATGGTTTGGGACAGGTGAAGCAAGCAGGGCAGAAATTAATTTTATATATCCGAA  
AGATTATCAAGCTAGTACCGGCTCAAGTCTTAATGATTTAGTGAAAGCGGCGGAGGCTTTAGGG  
ATCGAAGTACATCGCTCGGAAAAAACGGTACCGCACTAGCGAAAGAATTATTCGGTACAACGG  
AAAACTATTAGGTTTCTCGGAACGAGGCATCGCATTATTTGCACCTCAGTTTGATAAGTTACT  
GAATAAGAACCAAAAATTAAGTAAATCGCTCGGCGGTTTCATCGGAAGCATTAGGACAACGTTTA  
AATAAACGCAAACGGCACTTTCAGCCTTACAAAGTTTCTTAGGTACGGCTATTGCGGGTATGG  
ATCTTGATAGCCTGCTTCGTCGGGGTAGAAACGGTGAGGACGTCAGTGGTTCGGAATTAGCTAA  
AGCAGGTGTGGATCTAGCCGCTCAGTTAGTGATAACATTGCAAGTGCAACGGGTACGGTGGAT  
GCGTTTGCCGAACAATTAGGTAAATTGGCAATGCCTTATCTAACACTCGCCTTAAGCGGTTTAG  
CAAGTAAGTTAAATAACCTTCCAGATTTAAGCCTTGCAGGACCTGGGTTTGTATGCCGTATCAGG
```

TATCTTATCTGTTGTTTCGGCTTCATTCATTTTAAGTAATAAAGATGCCGATGCAGGTACAAAA
GCGGCGGCAGGTATTGAAATCTCAACTAAAATCTTAGGCAATATCGGTAAAGCGGTTTCTCAAT
ATATTATTGCGCAACGTGTGGCGGCAGGCTTATCCACAACCTGCGGCTCCCGGTGGTTTAATCGG
TTCGGTCGTAGCATTAGCGATTAGCCCGCTTTCGTTCTTAAATGTTGCGGATAAGTTTGAACGT
GCGAAACAGCTTGAACAATATTCGGAGCGCTTTAAAAAGTTTCGGTTATGAAGGTGATAGTTTAT
TAGCTTCATTCTACCGTGAACCCGGTGCATTGTTGCGGCATTAACCACGATTAACAGTGTGTT
AAGTGCAGCTTCCGCAGGTGTTGGGGCTGCTGCAACCCGGCTCATTAGTCGGTGCGCCGGTAGCA
GCTTTAGTTAGTGCAATCACCGGTATTATTTAGGTTATTTAGCAGCTTCTAAACAGGCAATCT
TCGAACGAGTTGCAACGAAATTAGCGAATAAGATTGACGAATGGGAGAAAAAACACGGTAAAA
CTATTTTGAAAACGGTTATGACGCCCGCCATTCCGCATTCTTAGAAGATACCTTTGAATTGTTA
TCACAATAACAATAAAGAGTATTCGGTAGAGCGTGTGCTTATTACGCAACAGCGTTGGGATG
TCAATATCCCTGAACTTGCCGGCATTACTCGCAAAGGTTCTGATACGAAAAGCGGTAAAGCTTA
CGTTGATTTCTTTGAAGAAGGAAAACCTTTAGAGAAAAGAACCGGATCGTTTTGATAAAAAAGTG
TTTGATCCGCTTGAAGGTAAAATCGACCTTTCTTCAATTAACAAAACCACTTTATTGAAATTTG
TTACGCCGGTCTTTACCGCAGGTGAAGAGATTTCGTGAGCGTAAGCAAACCGGTAAATACCAATA
TATGACCGAATTATTCGTTAAAGGTAAAGAAAAATGGGTGGTAACCGGTGTGCAGTCACATAAT
GCGATTTATGACTATACGAATCTTATCCAATTAGCGATAGATAAAAAAGGTGAAAAACGTCAAG
TGACCATTGAATCTCATTGTTGGGTGAGAAAAATGATCGTATATATCTTTCATCCGGTTCATCTAT
CGTATATGCGGGTAACGGACATGATGTAGCATATTACGATAAAACCGATACAGGTTACTTAACA
TTTGACGGACAAAGTGACAGAAAGCCGGTGAATATATTGTCACTAAAGAACTTAAAGCTGATG
TAAAAGTTTTAAAAGAAGTGGTTAAAACCTCAGGATATTTAGTTGGAAAAACGTGCAGTGAAAA
ATTAGAATATCGTGATTATGAGTTAAGCCATTTCGAACTTGGGATGGGTATCAGAGCTAAAGAT
GAATTACATTCTGTTGAAGAAATTATCGGTAGTAATCGTAAAGACAAATTCTTTGGTAGTCGCT
TTACCGATATTTCCATGGTGCGAAAGGCGATGATGAAATCTACGGTAATGACGGCCACGATAT
CTTATACGGAGACGACGGTAATGATGTAATCCATGGCGGTGACGGTAACGACCATCTTGTTGGT
GGTAACGGAAACGACCGATTAATCGGCGGAAAAGGTAATAATTTCTTAATGGCGGTGATGGTG
ACGATGAGTTGCAGGTCTTTGAGGGTCAATACAACGTATTATTAGGTGGTGCGGGTAATGACAT
TCTGTATGGCAGCGATGGTACTAACTTATTTGACGGTGGTGTAGGCAATGACAAAATCTCGGGT
GGTTTAGGTAAGGATATTTATCGCTACAGTAAGGAGTACGGTTCGTCATATCATTATTGAGAAAG
GCGGTGATGATGATACGTTATTGTTATCGGATCTTAGTTTTAAAGATGTAGGATTTATCAGAA
TCGGTGATGATCTTCTTGTGAATAAAAGAATCGGAGGAACACTGTATTACCATGAAGATTACAA
TGGAATGCGCTCACGATTAAGATTGGTTCAAGGAAGGTAAAGAAGGACAAAATAATAAAATT
GAAAAAATCGTTGATAAAGATGGAGCTTATGTTTTAAGCCAATATCTGACTGAACTGACAGCTC
CTGGAAGAGGTATCAATTACTTTAATGGGTTAGAAGAAAAATTGTATTATGGAGAAGGATATA
ATGCACTTCCTCAACTCAGAATAGATATTGAACAAATCATTTTCATCTACGGGTGCATTTACCGG
TGATCACGGAAAAGTATCTGTAGGCTCAGGCGGACCGTTAGTCTATAATAACTCAGCTAACAAAT
GTAGCAAATTCCTTGAGTTATTCTTTAGCACAAGCAGCTTAAGATAGTTATTAGTAGATGATAA
ATAGCAATCCTATATATATTAGGTGTGTAGGATTGCTATTTTATTTATGGAGGAGCAAATGGA
TTTTTATCGGGAAGAAGACTACGGATTATACGCACTGACGATTTTAGCCCAGTACCATAATATT
GCTGTAAATCCGGAAGAATAAAACATAAAATTCGACCTTGAAGGAAAAGGCTTAGATCTAACCG
CTTGGCTATTAGCCGCAAATCATTAGAACTTAAAGCAAACAAGTAACGAAAGCGATTGATCG
TTTGCGCTTTATCGCACTACCGGCACCTGTATGGCGAGAAGACGGTAAACATTTTATTTTACT

AAAATTGATAATGAAGCAAAAAAATATTTAATTTTTGATTTGGAAACGCATAATCCTCGTATTT
TGGAACAAGCGGAATTCGAGAGCTTATACCAAGGAAAACCTGATTTTAGTTGCATCAAGAGCTAC
CATCGTAGGTAAGCTGGCAAAGTTTACTTCACTTGGTTTATACCGGCGGTAATTAAGTATCGT
AAGATTTTTATTGAAACGTTAATTGTTTCAATTTTTTTGCAAATTTTCGCACTAATTACACCGC
TTTTTTTCCAAGTCGTGATGGATAAAGTCTTGGTACACCGAGGTTTTTCAACCTTAAATGTGAT
TACGGTGGCATTAGCGATCGTCGTGCTGTTTCAAATTGTGCTAAACGGTTTACGTACCTATATT
TTTGCGCATAGTACCAGCCGATTGATGTGGAGTTGGGAGCAAGATTATTCAGACATTTATTAG
CACTCCCAATCTCTTATTTTTGAAAATCGTCGAGTCGGCGATTTCGGTGGCTCGTGTACGAGAACT
CGATCAAATTCGTAACCTCTTAACCGGGCAGGCACTTACTTCCGTGTTGGATTTAATGTTTTCC
TTTATCTTCTTTGCAGTGATGTGGTATTACAGCCCTAACTTACTCTTGTGATTTTAGGCTCGT
TACCGTTTTATATGGGGTGGTTCGATTTTTATCAGCCCTATTTTACGTGCGGTTTTAGATGAAAA
ATTCGCACGTGGTGGGACAATCAGTCATTCTTAGTGGAATCGGTGACTGCAATCAATACGATT
AAAGCGTTGCCGTTACCCCTCAAATGACTAATACCTGGGATAAGCAATTAGCCAGCTATGTAT
CGGCGGGATTCCGTGTAACCACATTAGCTACTATCGGACAGCAAGGTGTACAATTTATTCAAAA
AGTCGTGATGGTTATTACCTTATGGCTAGGCGCACATTTAGTGATTTTACGGCGATTTAAGTATC
GGACAATTAATCGCATTAAATATGTTATCCGGTCAAGTGATTGCACCGGTGATTTCGTTTAGCGC
AACTTTGGCAAGATTTCCAACAAGTGGGAATTTTCGGTAACCGGTTTAGGTGATGTTTTAAACTC
TCCGACCGAGAGCTATCAAGGAAAATTGGCGTTACCGGAAATTAAGGGCGATATTACCTTCGCT
AATATACGCTTCGCTACAAACCGGATGCGCCGGTGATTTTAAATGATGTGAATTTATCGTGTG
AGCAAGGTGAAGTGATCGGTATCGTAGGACGTTTACGGCTCAGGGAAGAGCACCTTAACGAAATT
AATTC AACGTTTTTATATTCCGAAAACGGTTCAGGTATTAATAGATGGGCATGATTTAGCATTG
GCGGATCCGAACTGGCTACGTCGTCAAGTCGGGGTGGTATTACAAGATAACGTACTATTAATC
GTAGTATTCGAGATAAATATTGCCTTAGCGGATCCGGGTATGCCAATGGAAAAAATTGTCCATGC
GGCAAAATTAGCCGGCGCACATGAATTTATTTCTGAATTGCGTGAGGGATATAACACGATTGTT
GGTGAGCAAGGTGCGGGGCTATCTGGCCGGGCAACGCAACGTATTGCGATTGCACGCGCTTTGG
TGAATAACCCGAAAATCTTAATTTTTGATGAAGCGACCAGCGCATTAGATTATGAATCCGAGCA
TATTATCATGCGCAATATGCACCAGATTTGTAAAGGGAGAACGGTAATTATCATTGCACACCGT
TTATCTACGGTAAAAATGCCGACCGTATTATTGTGATGGAAAAAGGTCAGATTGTGGAACAAG
GTAAGCATAACAGAGCTGCTTGTGATCCAAACGGCTTATATCACTACTTACACCAATTACAATC
GGAATAGGAGGACTTATGAAAACATGGCTAATGGGTTTATATGAGTTTTTCCAACGCTATAAAA
CGGATTGGACGGAGATCTGGAATATTCGTCATCAATTGGATACGCCGGATCGAGAAAAGGATGA
AAATGAATTTTTACCTGCACACTTAGAGCTGATTGAAACACCGGTGTCAAAAAAACCGAGATTG
ATCGCTTATTTAATTATGCTGTTCCATTTTTTGGCATTAGTTATTTCAATTGTCAGTCACGTA
GAAATTGTGGCGACCGCAACGGGTAAATTAGCGTTTAGCGACCGTAGCAAAGAAATTAAGCCGA
TTGAAAACGCCTTGGTTAAAGAAATCTTTGTGCAAGACGGACAATTTGTTGAGAAAGATCAGTT
GCTGTTACACTTGACCGCATTGGGAGCCGATGCGGATCAACAAAAAACCAAAAGTTCGTTATCG
CTGACTAAATTGGAACGTTATCGTTATGAAATTTTATTAGAGGCGGTTGCGGCGGATAGGTTGC
CGCTCATTGAACTGACAAAGGATGAATTTAAACATGCTACGGAAGAAGATAAAACCAGAATTCG
CTATTTGATCACCGAGCAATTTGAAGCTTGGCAAAAGCAAAAGTATCAAAAAGAATTAGCTTTG
CAACGTAGAGAAGCAGAAAAACAACGGTTCTAGCTAATATTCGTAAATATGAGGGAATCAGTC
GAGTTGAAAATGAAAGATTAAGAAATCTTAAAAAATTAATTTAATTCGAAATCGACTTCTAAACA
TGATGTCTTACTCAAGAAAATCGTCATATCGAAGCGGTAAATGAGTTGGCGGTGTATAAATCT

CGGTTGAATGAAGTGGAAAGTGAAGTACTTACGTCAAGCCAAAGAGGAAATACATTTAATAACTCAGT
 TGTTTTAGAGCCGATATTCTGGAGAAGTTGAAACAAAATGTTGAAGCGGAGAAACAGCTTTCGCT
 CGAATTAGAAAAAATGAGCAGCGTCAAATTGCTTCGGTGATTCGTGCGCCGGTTTCCGGTACG
 GTTCAGCAACTTAAACCCATACGGTAGGCGGCGTCGTGACGACTGGGGAAACCTTGATGGTAA
 TTGCTCCGGAAGATGATGTTTTAGAGGTAACGGCGTTAATTCAAATAAGGATATCGGTTTTAT
 CGAGGTCGGTCAGGATGCGGTGATTAAGTAGAACTTTTCCTTATACTCGTTACGGCTATTTA
 ATGGGTAAAGTAAAAATATCACGCTGGAAGCCATCGAACATCCGCAACTCGGTCTAGTTTTTA
 ACTCGATTATTTCTATTGATAGAAAACTTTATCCGGCAAAGACGGCAAAGAAATTGAACTTGG
 ATCAGGTATGAGTGTGACGGCGGAAATTAAACTGGAGAACGTAGCGTTATTAGTTATTTACTC
 AGTCCGTTGGAAGAATCCGTTTCGGAGAGTTAAGAGAACGCTATCGCAGATAAAATAAGCGGC
 CATATTTTCTTACTACTTTGCAAAAAACGTATGAAATATGACCGCTTGTCGTTTGTAAAAGACT
 ATTTATTTACAATAATTTTAGCACCGTTAGAAAATACGATCTGACGAGCTTCAAATTGAGCGGA
 GAGCTGTGCTTGCGGGTTTAGAAATACGGCTTGTGCTTCTTGCGGTAAGTCTGAAACCGGTACG
 CAAAGGCAAGTTCGCGCGTGGTTTTGGCGTTTTAAGTTATCTTTAAAGGTAACGGGCGCATCTTG
 CGTGAGGATAACTTTATCATTGTAAACATAGTTTACCGCCATTGAACGATACGAATATTGCGT
 TTGGTTTTATTTTCAATACTGTATTTAAAGCTAACCATCGGCTGCCCTTCTTTATTTTATGCCA
 ATTCATAACCGAAAAACGTAACCCGATACTGTCATTAATTTGTTTAAGGCGTTTTTCTTTAGC
 CGAAAGAGGTGCATTTTTTCGTTACTGATTTATGTTCAACCGTCGGTTGAATTTTATTGCCTTCA
 GCTTGAGCATTAAACGCTAAAAAGAATGATGCTACCGCCGTGCTAAGTAATTTAATGTGTTTCA
 TAATTCACCTCGTAATGAGAGCTAAAAGCCGACTTGATATATTACGCTATATATTGTCAGATTT
 ACGGCACAGTTGCAATGACCGCATAACCGTCCGATTCGGCAATAATCTCGACTTGGCTTTCGCG
 CGCAATGAAAATCGCTTCGCTTGTGGAGATAAATGGACTCTTCACCGAGGTGATATAGATA
 CTGCCTTTCATCACCAATAAGATACTTGCACAGTCGGCCG

나. 백신 표준 균주 계대 방법 확립

홍막폐렴균 배양 전용 배지인 1% nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)를 첨가한 Casman 배지와 trypticase soy 배지(TSA)에 표준 홍막폐렴균주를 백금으로 바른 후, 37°C의 배양기에서 24시간 동안 호기성 배양한다. 이 후 TSA에서 균이 자랐는지 확인하고, 자라지 않았다면 오염되었을 가능성은 매우 희박하므로, 균의 독립된 콜로니를 확인한 후, 다시 같은 방법으로 계대한다. 또한 각각의 연속 계대 사이에 중합효소 연쇄반응을 통하여 백신 후보로 선정한 균주인 홍막폐렴균 2형, 5형의 홍막폐렴균에 중요한 인자인 *apx*유전자를 30 계대 동안 지속적으로 보유하는 것을 확인하였다. 또한 제1계대후의 균주로 제작한 백신과 연속 30 계대후의 균주로 제작한 백신을 토끼에게 접종한 결과 형성되는 항체생성 수준은 변화가 없는 것을 확인하였다. 이러한 결과 본 연구에서 사용하는 백신주의 계대 방법이 백신 균주의 유전적 또는 면역원성의 변화를 일으키지 않는 매우 안정적인 균주로 확인되었다.

백신 후보균주	항체 역가	
	제 1계대후	제 50계대후
2형	1:1024	1:1024
5형	1:1024	1:1024

백신 후보균	apx 유전자									
	<i>apxICA</i>		<i>apxIIICA</i>		<i>apxIIIICA</i>		<i>apxIBD</i>		<i>apxIIIBD</i>	
	1계대	50계대	1계대	50계대	1계대	50계대	1계대	50계대	1계대	50계대
2형	X	X	O	O	O	O	X	O	O	O
5형	X	X	O	O	X	O	O	O	X	X

8. 돼지 썬코바이러스와 흉막폐렴 복합백신 시작품 제작

가. 돼지 썬코바이러스 2형 백신균주의 염기배열 특성

백신주로 사용되는 돼지 썬코바이러스 2형의 염기배열 순서를 분석한 결과 전체 유전자 크기는 1767 base pair로서 기존의 유전자 염기 배열순서가 밝혀진 다른 돼지 썬코바이러스 2형과의 관계를 분석해본 결과 스페인에서 분리된 돼지 썬코바이러스 2b형(AF055394)과 가장 유전자적 특성의 유사성(99.6%)이 높은 것으로 확인하였다.

나. 돼지 썬코바이러스 2형 백신균주의 염기배열 순서

본 돼지 썬코흉막 복합백신에 사용한 돼지 썬코바이러스 2형의 유전자 배열은 아래와 같다.

```

ACCAGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CAGCAGCAAC
ATGCCCAGCA AGAAGAATGG AAGAAGCGGA CCCCAACCCC ATAAAAGGTG
GGTGTTCACT CTGAATAATC CTTCCGAAGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG
ATCTTCCAAT ATCCCTATTT GATTATTTTA TTGTTGGCGA GGAGGGTAAT
GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT TTGTGAAGAA
GCAGACTTTT AATAAAGTGA AGTGGTATTT GGGTGCCCGC TGCCACATCG
AGAAAGCGAA AGGAACAGAT CAGCAGAATA AAGAATACTG CAGTAAAGAA
GGCAACTTAC TGATCGAGTG TGGAGCTCCT AGATCTCAGG GACAACGGAG
TGACCTGTCT ACTGCTGTGA GTACCTTGTT GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA
CCGTTGCAGA GCAGCACCTT GTAACGTTTG TCAGAAATTT CCGCGGGCTG
GCTGAACTTT TGAAAGTGAG CGGGAAAATG CAGAAGCGTG ATTGGAAGAC
TAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG
CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCTAGAAAC
AAGTGGTGGG ATGGTTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTTA TTGATGACTT
TTATGGCTGG CTGCCCTGGG ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGATATC
CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAACTG TACCTTTTTT GGCCCGCAGT
ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT CCTCAACTGC
TGTCCCAGCT GTAGAAGCTC TTTATCGGAG GATTACTTCC TTGGTATTTT

```

GGAAGAATGC TACAGAACAA TCCATGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTCACC
CTTCCCCC CATGCCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT
TTTTATCACT TCGTAATGGT TTTTATTATT CATTAAAGGGT TAAGTGGGGG
GTCTTTAAGA TTAAATTCTC TGAATTGTAC ATACATGGTT ACACGGATAT
TGTATTCCTG GTCGTATATA CTGTTTTCGA ACGCAGTGCC GAGGCCTACG
TGGTCTACAT TTCCAGCAGT TTGTAGTCTC AGCCACAGCT GATTTCTTTT
GTTGTTTGGT TGGAAGTAAT CAATAGTGGA ATCTAGGACA GGTTTGGGGG
TAAAGTAGCG GGAGTGGTAG GAGAAGGGCT GGGTTATGGT ATGGCGGGAG
GAGTAGTTTA CATAGGGGTC ATAGGTGAGG GCTGTGGCCT TTGTTACAAA
GTTATCATCT AGAATAACAG CACTGGAGCC CACTCCCCTG TCACCCTGGG
TGATCGGGGA GCAGGGCCAG AATTCAACCT TAACCTTTCT TATTCTGTAG
TATTCAAAGG GCACAGAGCG GGGGTTTGAG CCCCCTCCTG GGGGAAGAAA
GTCATTAATA TTGAATCTCA TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GCGGTTTTGA
CTGTGGTTCG CTTGATAGTA TATCCGAAGG TGCGGGAGAG GCGGGTGTG
AAGATGCCAT TTTTCCTTCT CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG
CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC
TTCTTCTCCG GTAACGCCTC CTTGGATACG TCATATCTGA AAACGAAAGA
AGTGCGCTGT AAGTATT

9. 돼지 쉼코바이러스 2형과 홍막페렴 복합백신 면역 유도 실험

가. 복합백신의 돼지 쉼코바이러스 2형 항체가 측정 실험

(1) 항체 검사 결과

시험군	개체번호	주기별 항체가	
		백신 접종 전	백신 접종 2주후
백신군	1	0	1:128
	2	0	1:64
	3	0	1:256
	4	0	1:128
	5	0	1:128
대조군	1	0	0
	2	0	0

나. 복합백신의 돼지 홍막페렴균에 대한 항체가 측정 실험

(1) 홍막페렴균 2형 응집반응 검사 결과

홍막페렴균 2형에 대한 응집반응 결과 백신 접종군 2두의 개체에서 백신 접종 2주 후 2두에서 1:256의 항체 역가가 측정되었고 3두에서 1:512의 항체 역가가 확인되었다.

시험군	개체번호	주기별 항체 역가	
		백신 접종 전	백신 접종 2주후
백신군	1	0	1:256
	2	0	1:512
	3	0	1:512
	4	0	1:256
	5	0	1:512
대조군	1	0	0
	2	0	0

(2) 홍막페렴균 5형 응집반응 검사 결과

홍막페렴균 5형에 대한 응집반응 결과 백신 접종군 2두의 개체에서 백신 접종 2주 후 1두에서 1:256의 항체 역가가 측정되었고 4두에서 1:512의 항체 역가가 확인되었다.

시험군	개체번호	주기별 항체 역가	
		백신 접종 전	백신 접종 2주후
백신군	1	0	1:512
	2	0	1:512
	3	0	1:256
	4	0	1:512
	5	0	1:512
대조군	1	0	0
	2	0	0

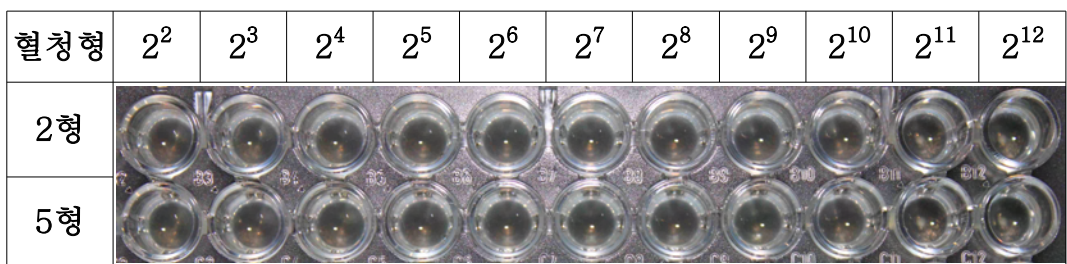


그림 1. 평판 응집반응 결과

(3) 용혈 억제 반응을 통한 Apx 항체의 역가 측정 결과

측정 결과, 자돈 1두에서 채취한 혈청의 경우 160배 혈청 희석액까지 완전히 용혈이 억제되었고, 나머지 4두에서 채취한 혈청의 경우 640배 혈청 희석액까지 완전히 용혈이 억제되었다. 이를 통해 돼지 썬코홍막 복합 백신이 충분한 Apx 독소의 용혈을 억제하는 Apx 항체를 형성하는 것을 확인하였다.

시험군	개체번호	역가 (50% 용혈 억제 희석 배수)	
		백신 접종 전	백신 접종 2주후
백신군	1	0	1:160
	2	0	1:640
	3	0	1:640
	4	0	1:640
	5	0	1:640
대조군	1	0	0
	2	0	0

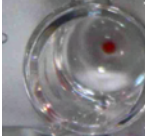

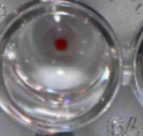
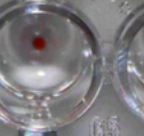

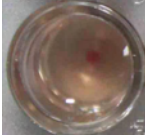
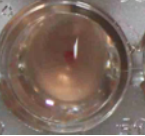
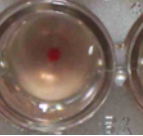
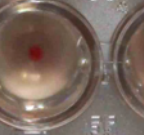

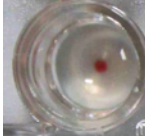
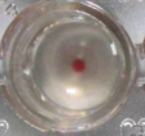
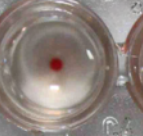
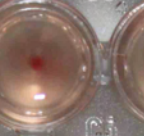

구분	1:10	1:40	1:160	1:640	1:2560
1					
2					
3					
1 : 무균 배양액이 포함된 용혈 음성 대조군 2 : 백신균 배양액이 포함된 용혈 양성 대조군 3 : 백신균 배양액과 혈청 희석액이 포함된 용혈 억제 시험군					

그림 2. 세포용혈 억제시험 결과

(4) 세포 독성 억제 반응을 통한 Apx 항체의 역가 측정 결과

역가 측정 결과는 50%의 세포 독성 억제가 관찰되는 희석배수를 측정하였다. 측정 결과, 2두의 자돈에서 채취한 4개 혈청에서 160배 혈청 희석액까지 완전히 세포 독성이 억제되었고, 4두의 자돈에서 채취한 2개의 혈청에서는 640배에서 완전히 세포 독성이 억제되었다. 이러한 실험 결과 본 연구에서 개발 중인 흉막폐렴 백신이 충분한 Apx 독소의 세포 독성을 중화하는 Apx 항체를 형성하는 것을 확인하였다.

시험군	개체번호	역가 (50% 세포독성 억제 희석 배수)	
		백신 접종 전	백신 접종 2주후
백신군	1	0	1:160
	2	0	1:160
	3	0	1:640
	4	0	1:640
	5	0	1:640
대조군	1	0	0
	2	0	0

10. 돼지 쉐코바이러스와 흉막폐렴 복합백신의 공격접종을 통한 효능 검사

가. 임상증상 관찰 결과

백신군과 대조군 각 군의 임상 증상 점수를 측정하여 표와 그래프로 표현하고, 두 그룹간의 차이를 통계적 유의성으로 설명한다(표 1). 유의성 검사는 일반 선형 모델(generalized linear mixed model)을 이용하여 백신군과 대조군의 연령에 따른 임상증상 점수의 차이를 분석하고 각 연령 별 차이는 아래 표의 백신군과 대조군의 임상증상 합계를 사용하지 않고, 백신군과 대조군의 임상증상 합계의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

유의성 분석 결과, 백신군1, 백신군2는 대조군1에 비하여 공격 접종 후 2주가 지난 9주령부터 실험이 종료되는 11주령까지 유의성을 보이며 임상점수 차이가 나타났으며($P<0.05$), 대조군 2와 비교하였을 때 공격접종 후 1주가 지난 8주령부터 실험이 종료되는 11주령까지 유의성을 보이며 임상 점수가 낮게 나타났다($P<0.05$). 백신 접종 시기인 5주령과 백신 접종 후 1주가 지난 6주령, 공격접종 시기인 7주령에서는 백신군과 대조군의 임상점수가 유의성을 나타내지 않았다.

표 1. 각 군별 임상 점수 결과

구분	시험 두수	임상 점수 (각 군별 개체의 임상증상 합계; 주령)						
		5 (백신접종)	6	7 (공격접종)	8	9	10	11 (부검전)
백신군1	5	0	0	0	0.2±0.4	0.3±0.5	0.3±0.5	0.2±0.4
백신군2	5	0	0	0	0.5±0.7	0.6±0.4	0.6±0.6	0.5±0.4
대조군1	3	0	0	0	0.3±0.4	0.8±0.6	1.7±0.8	1.9±0.9
대조군2	3	0	0	0	1.1±0.7	2.1±0.9	2.4±1.1	2.8±0.8
유의성 ¹ (P value)		-	-	-	$P=0.04$	$P=0.03$	$P=0.02$	$P=0.02$

¹백신군 전체 평균과 대조군 전체 평균 유의성 평가

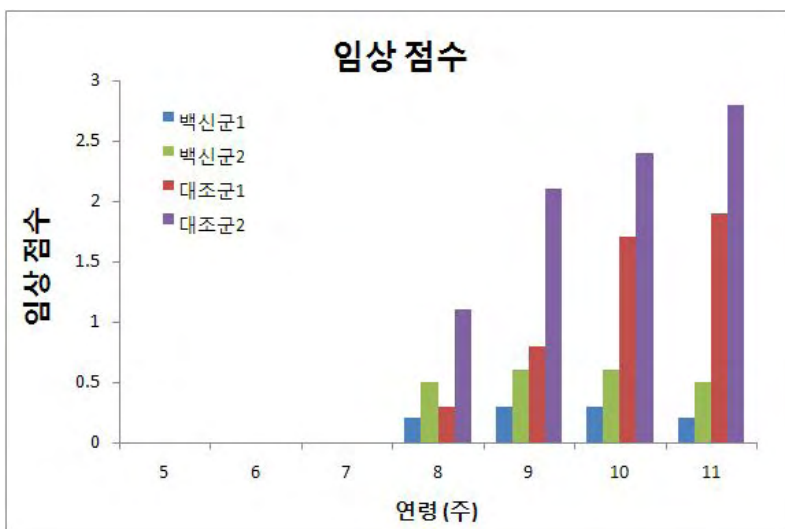


그림 1. 각 군별 임상 점수 결과

나. 백신 접종 후 7일간 체온 변화

5주령에 백신 접종 후 7일간 백신군 모든 개체에 대하여 직장 체온을 측정한 결과 모두 정상

체온 범위 내에서 변화를 보였다.

표 2. 백신군 직장 체온 변화

개체 번호	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일
1	39.19	39.35	39.13	39.21	39.01	39.22	38.78
2	38.21	39.23	39.09	38.78	38.87	39.25	39.29
3	39.35	38.21	38.87	38.56	38.81	39.21	39.52
4	39.28	38.97	39.22	39.24	39.11	39.51	39.33
5	39.61	39.35	39.48	38.36	39.22	39.42	39.05
6	39.50	39.29	39.52	38.76	39.42	39.33	38.93
7	39.19	38.85	39.32	39.11	39.19	38.89	39.11
8	39.52	39.59	39.12	38.67	39.28	38.78	38.78
9	39.30	38.96	39.86	38.55	38.91	39.13	39.01
10	39.25	39.22	39.15	39.12	38.92	39.21	38.68
평균	39.24	39.17	39.27	38.83	39.07	39.15	39.20

다. 증체량 비교

백신군과 대조군의 5주령(백신 접종 전), 7주령(공격접종시기), 8주령, 9주령, 10주령, 11주령(부검전)에 공시돈의 체중을 측정하여 주당 증체량을 비교하고(표 3), 일반 선형복합 모델(generalized linear mixed model)을 이용하여 백신군과 대조군 사이의 주령별 체중 변화를 분석하였다. 각 연령별 백신군과 대조군의 증체량 차이는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통하여 유의성을 분석하였다. 실험 시작 시점인 백신 접종 전의 5주령, 백신 접종 시기인 7주령, 공격 접종 후 1주가 지난 8주령에서는 백신군과 대조군 사이에 체중의 유의성이 나타나지 않았다. 공격접종 후 2주가 지난 9주령부터 실험이 종료되는 공격접종 후 4주까지 백신군은 대조군에 비하여 유의성을 보이며 체중이 높게 나타났다($P < 0.05$).

표 3. 각 군별 체중 변화

	구 분	주 령						증체율 (%)
		5	7	8	9	10	11	
백신군 1	공시두수	5	5	5	5	5	5	334
	평균체중	10.05	16.21	19.95	24.12	29.13	33.54	
	표준편차	1.28	2.08	2.57	2.95	3.16	3.43	
	구간평균증체	-	+6.16	+3.74	+4.17	+5.01	+4.41	+23.49
백신군 2	공시두수	5	5	5	5	5	5	327
	평균체중	10.11	16.17	19.12	23.95	28.11	33.11	
	표준편차	1.75	2.35	2.59	1.94	2.16	3.52	
	구간평균증체	-	+6.06	+2.95	+4.83	+4.16	+5.00	+23.0
대조군 1	공시두수	3	3	3	3	3	3	304
	평균체중	9.95	16.31	18.35	22.19	26.51	30.21	
	표준편차	1.35	2.92	2.42	3.11	3.25	2.98	
	구간평균증체	-	+6.36	+2.04	+3.84	+4.32	+3.70	+2026
대조군 2	공시두수	3	3	3	3	3	3	281
	평균체중	10.02	16.22	17.82	21.11	24.72	28.12	
	표준편차	1.21	2.39	2.21	3.12	3.27	3.15	
	구간평균증체	-	+6.20	+1.60	+3.29	+3.61	+3.40	+18.10
유의성 ¹ (P value)		P=0.89	P=0.75	P=0.61	P=0.04	P=0.03	P=0.02	

¹백신군 전체 평균과 대조군 전체 평균 유의성 평가

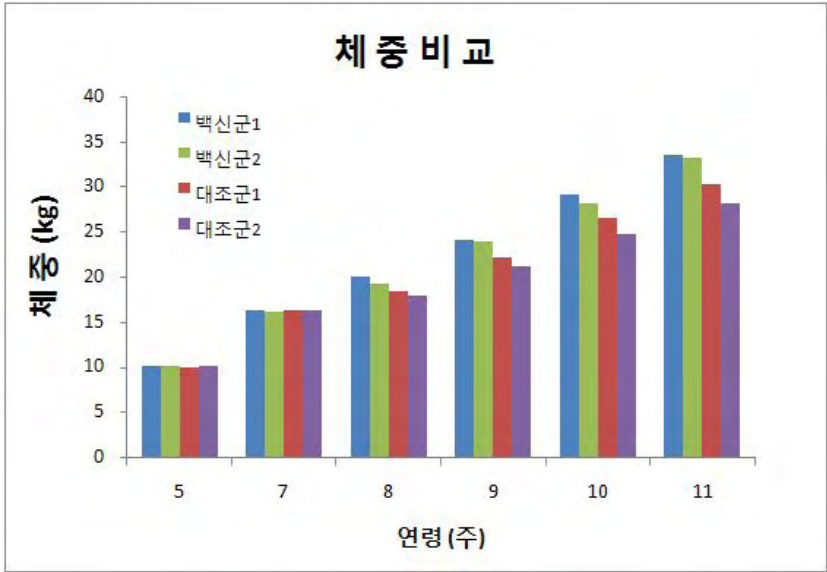


그림 2. 각 군별 체중 변화 비교



그림 3. 부검 전 백신군과 대조군 개체 비교 사진

라. 항체 형성능 확인 실험 결과

일반 선형복합 모델(generalized linear mixed model)을 이용하여 백신군과 대조군의 연령 변화에 따른 항체 형성 차이를 분석하였으며, 각 연령별 백신군과 대조군의 항체 형성 차이는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통해 유의성을 분석하였다(표 4,5,6). 먼저 돼지췌코바이러스 2형 항체가 비교에서는 백신 접종 전인 5주령에서는 백신군과 대조군 사이에 항체가의 유의성이 나타나지 않았다. 백신군의 경우 백신 접종 후 2주가 공격접종 시점인 7주령부터 항체가 생성되어 실험이 종료되는 11주령까지 높게 유지되었고 이 시기에 대조군에 비하여 유의성을 보이며 높게 확인되었다($P < 0.05$).

홍막폐렴 2형 항체 생성의 경우, 백신군은 백신 접종 후 2주 후부터 항체가 생성되었고, 백신군1은 대조군에 비하여 백신 접종 후 2주가 지난 공격접종 시기인 7주령부터 공격 접종 후 2주가 지난 9주령까지 유의성을 보이며 높은 항체 생성을 나타냈고($P < 0.05$) 백신군2는 백신

접종 후 2주부터 실험이 종료되는 공격 접종 후 4주가 지난 11주령까지 대조군에 비하여 높은 항체를 유지하였다($P<0.05$). 흉막폐렴 5형 항체 생성의 경우도, 백신군은 백신 접종 후 2주 후부터 항체가 생성되었고, 백신군1은 대조군에 비하여 백신 접종 후 2주가 지난 공격접종 시기인 7주령부터 공격 접종 후 2주가 지난 9주령까지 유의성을 보이며 높은 항체 생성을 나타냈으며($P<0.05$), 백신군2는 백신 접종 후 2주부터 실험이 종료되는 공격 접종 후 4주가 지난 11주령까지 대조군에 비하여 높은 항체를 유지하였다($P<0.05$).

표 4. 각 군별 돼지 쉐코바이러스 2형 항체 형성가 비교

실험 구분	공시 두수	연령 별 ELISA S/N 값 (평균±표준편차)			
		5주령	7주령	9주령	11주령
백신군1	5	0.812±0.175	0.398±0.103	0.125±0.055	0.152±0.095
백신군2	5	0.792±0.131	0.405±0.112	0.145±0.082	0.173±0.038
대조군1	3	0.811±0.163	0.792±0.012	0.515±0.103	0.365±0.121
대조군2	3	0.802±0.159	0.795±0.122	0.538±0.124	0.388±0.093
유의성 (P value)		$P=0.42$	$P=0.001$	$P=0.015$	$P<0.05$

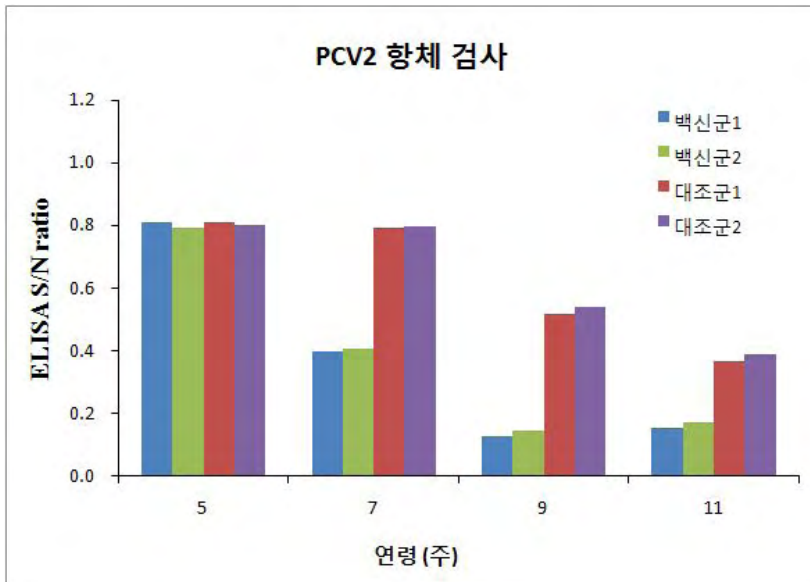


그림 4. 각 군별 PCV2 항체 형성가 비교

표 5. 각 군별 홍막페렴 2형 항체 형성가 비교

실험 구분	공시 두수	연 령 별 ELISA S/P 값 (평균±표준편차)			
		5주령	7주령	9주령	11주령
백신군1	5	0.121± 0.052	0.285± 0.121	0.652± 0.153	0.635± 0.192
백신군2	5	0.111± 0.015	0.292± 0.135	0.892± 0.181	0.912± 0.235
대조군1	3	0.115± 0.042	0.119± 0.012	0.123± 0.048	0.131± 0.051
대조군2	3	0.119± 0.038	0.121± 0.032	0.291± 0.114	0.618± 0.171
유 의 성 (P value)		$P=0.42^1$	$P<0.05^1$	$P=0.013^1$	$P<0.05^2$

¹백신군 전체와 대조군 전체 평균의 유의성 평가

²백신군2와 대조군2 평균의 유의성 평가

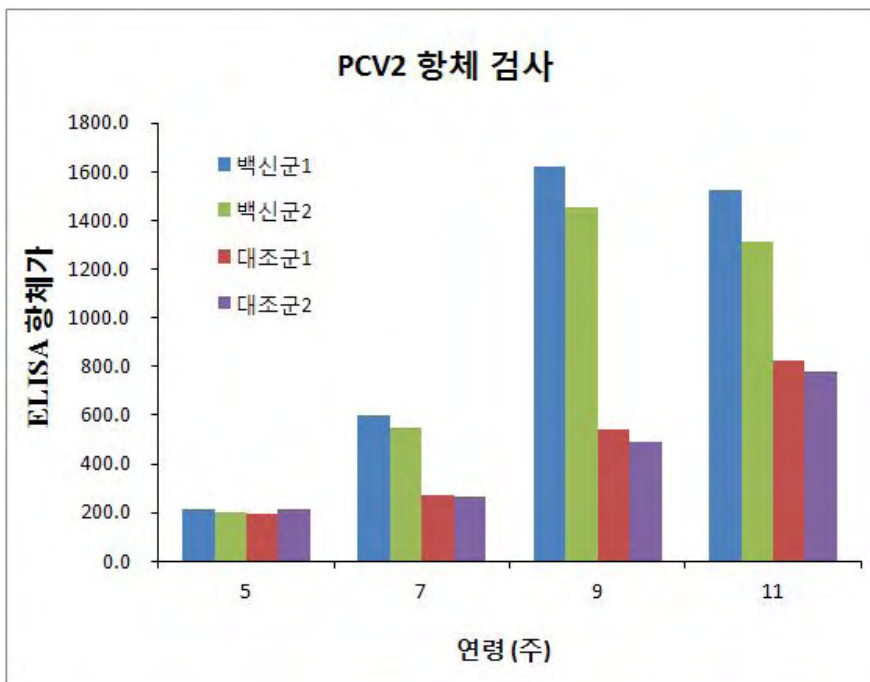


그림 5. 각 군별 홍막페렴 2형 항체 형성가 비교

표 6. 각 군별 흉막폐렴 5형 항체 형성가 비교

실험 구분	공시 두수	연 령 별 ELISA S/P 값 (평균±표준편차)			
		5주령	7주령	9주령	11주령
백신군1	5	0.119± 0.032	0.315± 0.121	0.632± 0.137	0.613± 0.192
백신군2	5	0.121± 0.028	0.332± 0.156	0.853± 0.213	0.915± 0.211
대조군1	3	0.124± 0.049	0.121± 0.042	0.125± 0.061	0.134± 0.057
대조군2	3	0.116± 0.026	0.125± 0.055	0.294± 0.131	0.718± 0.154
유 의 성 (P value)		$P=0.44^1$	$P<0.05^1$	$P=0.012^1$	$P<0.05^2$

¹백신군 전체와 대조군 전체 평균의 유의성 평가

²백신군2와 대조군2 평균의 유의성 평가

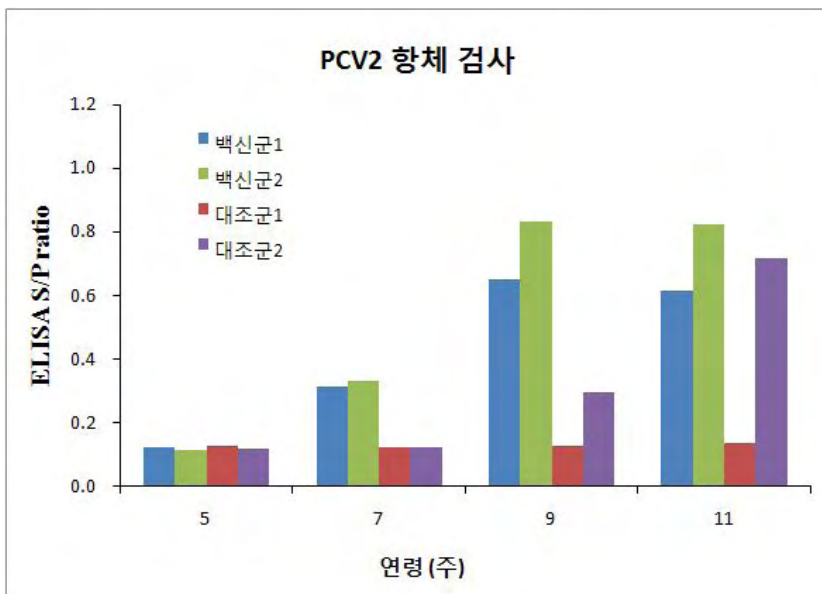


그림 6. 각 군별 흉막폐렴 2형 항체 형성가 비교

마. 병리조직학적 병변 형성 비교

(1) 돼지 썬코바이러스 2형에 의한 임파절 병변 분석

돼지 썬코바이러스 2형 감염 때에 나타나는 전형적인 병변인 서혜 임파절에서 임파구의 감소 (lymphoid depletion)에 대한 백신군과 대조군의 비교에서 백신군1의 경우 공시된 5두 중 3두에서 어떠한 병리조직학적 병변이 관찰되지 않았으며(스코어 0; 그림 7-1), 2두에서 경미한 임파구의 감소(스코어 1)가 관찰되었다. 백신군2의 경우 2두에서는 2두는 병변이 관찰되

지 않았으며, 3두에서 경미한 임파구 감소가 나타났다. 대조군1의 공시돈 3두 중 2두에서는 중등도의 임파구의 감소(스코어 2; 그림 7-2)가 나타났으며. 나머지 1두에서는 심한 임파구의 감소(스코어 3; 그림 7-3)를 보였다. 대조군 2의 경우 공시돈 3두 중 2두에서 심한 임파구의 감소가 관찰되었고, 나머지 1두에서는 매우 심한 임파구의 감소(스코어 4; 그림 7-4)가 확인되었다.

백신군과 대조군의 병변 정도 차이는 Fisher's exact test를 통해 각 병변 스코어의 빈도를 분석하여 유의성을 측정하였다. 그 결과 전체적으로 백신군은 대조군에 비하여 서혜 임파절 병변이 유의성($P=0.015$)을 보이며 낮게 나타났다(표 7).

표 7. 각 군별 서혜 임파절 병변 스코어

개체번호	백신군1	백신군2	대조군1	대조군2
1	0	1	2	3
2	1	1	2	4
3	1	1	3	3
4	0	0	-	-
5	0	0	-	-
평균 ± 표준편차	0.40±0.54	0.60±0.54	2.33±0.57	3.33±0.57
유의성 (<i>P</i> value)	$P=0.015$			

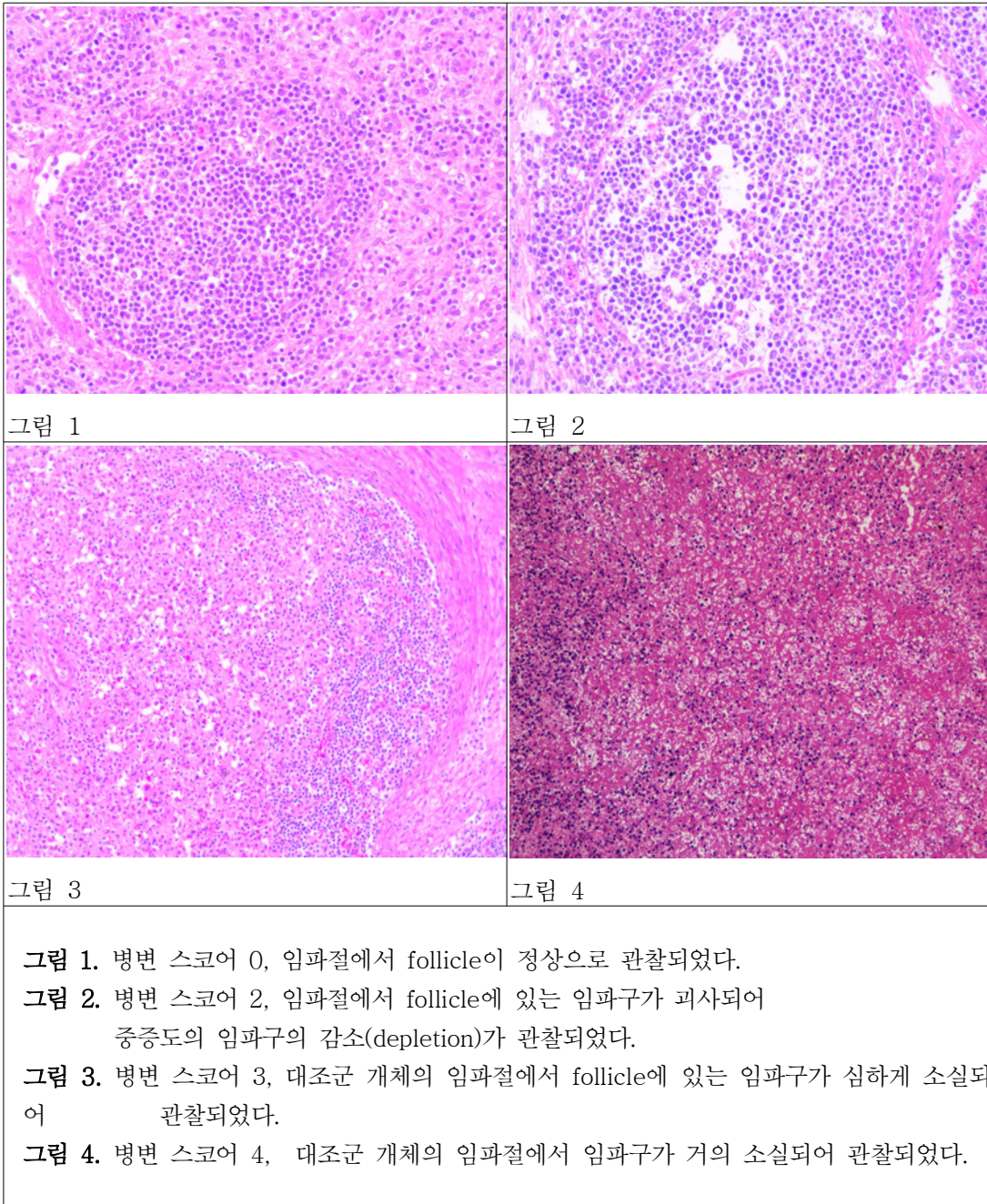


그림 7. 서혜 임파절 병변 비교 슬라이드

(2) 흉막폐렴균에 의한 폐렴 병변 분석

흉막폐렴에 의한 폐렴 병변 정도에 따라 점수를 측정한 결과, 흉막폐렴균을 접종하지 않은 백신균1과 대조군1에서는 폐렴 병변이 나타나지 않았다. 백신균2의 경우 공시돈 5두 중 2두에서는 폐렴 병변 소견이 나타나지 않았으며(스코어 0), 2두에서는 일부에서 폐포강내 염증세포가 관찰된 경미한 폐렴 소견(스코어 1)이 나타났고, 나머지 1두에서는 중증도의 폐포강내 염증세포 침윤 및 출혈 소견이 관찰되었다(스코어 2). 대조군 2의 경우 공시돈 3두 중 1두에서는 넓은 범위에서 폐포강내 염증세포가 침윤이 심하게 관찰되었고(스코어 3), 나머지 2두에서는 흉막염 소견과 함께 폐포강내 염증세포가 매우 심하게 침윤된 것으로 확인되었다(스코어 4).

폐렴 병변 점수 결과, 백신군은 대조군에 비하여 유의성을 보이며 병변이 적게 관찰된 것으로 확인되었다($P=0.021$)

표 8. 각 군별 폐장 조직 병변 스코어

개체번호	백신군1	백신군2	대조군1	대조군2
1	0	1	0	3
2	0	1	0	4
3	0	2	0	4
4	0	0	-	-
5	0	0	-	-
평균 ± 표준편차	0	0.80±0.83	0	3.66±0.58
유의성 (P value)	$P=0.021$			

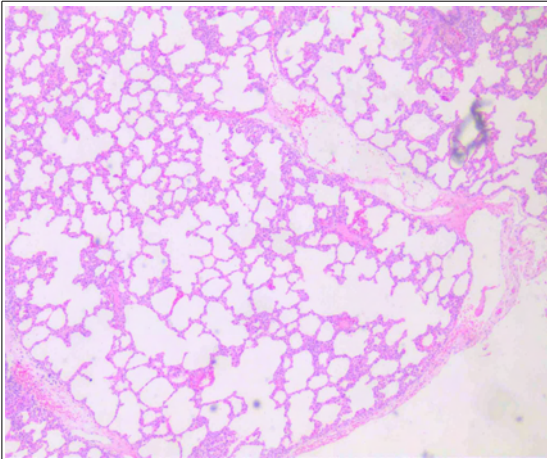


그림 1.

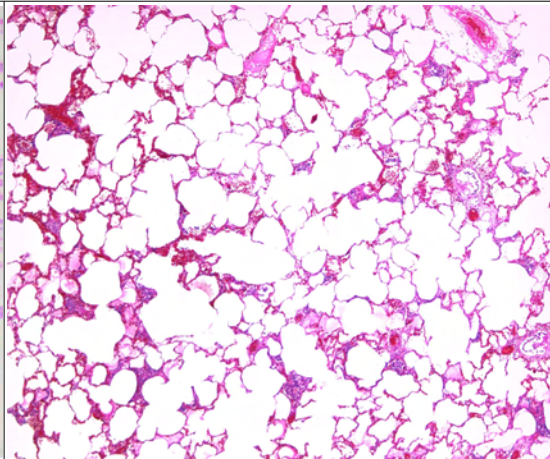


그림 2.

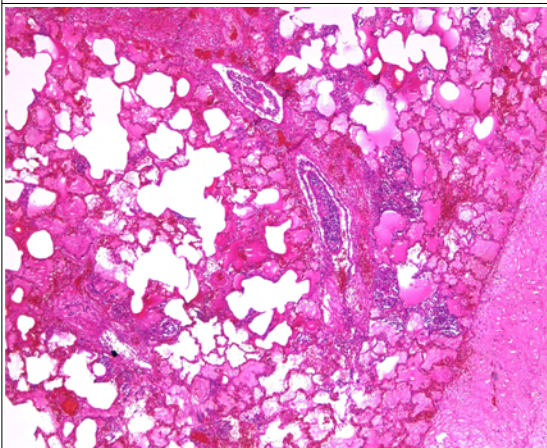


그림 3.

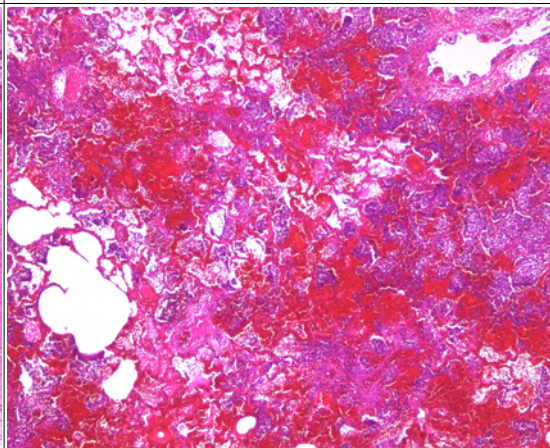


그림 4.

그림 1. 병변 스코어 0, 폐렴 소견없이 정상을 나타내었다.

그림 2. 병변 스코어 1, 일부에 출혈 소견과 염증세포 침윤이 관찰되었다.

그림 3. 병변 스코어 3, 전반적인 출혈 소견과 함께 심한 염증세포 침윤이 관찰되었다.

그림 4. 병변 스코어 4, 흉막염이 동반되었으며, 광범위한 폐장 출혈 소견과 염증세포 침윤이 관찰되었다.

그림 8. 폐장 조직 병변 비교 슬라이드

바. 혈중 돼지 쉼코바이러스 2형 항원 비교

백신군과 대조군 5주, 7주, 9주, 11주령에 각 개체별로 채혈하고 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 혈액 중에서 돼지 쉼코바이러스 2형의 양을 정량 분석한 결과는 아래 표와 같다(표 9). 일반 선형복합 모델(generalized linear mixed model)을 통하여 백신군과 대조군의 연령 변화에 따른 혈중 돼지 쉼코바이러스 2형의 항원양의 차이를 분석하였고, 각 군의 연령별 항원양의 차이는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통해 유의성을 분석하였다.

백신 접종시기인 5주령과 공격접종 시기인 7주령에서는 모두 혈액 내 항원이 검출되지 않았으며, 공격접종(5주령)을 실시한 후 2주가 지난 7주령, 시험이 종료되는 9주령에서 백신군이 대조군에 비하여 유의성($P=0.001$)을 보이며 항원양이 감소되는 것으로 나타났다.

표 9. 각 군별 혈중 돼지 쉼코바이러스 2형 항원 정량

실험 구분	공시 두수	연령별 Log ₁₀ PCV2 genomic copy 수 (평균±표준편차)			
		5주령	7주령	9주령	11주령
백신군1	5	0	0	1.39±0.51	0.93±0.38
백신군2	5	0	0	1.85±0.34	1.31±0.41
대조군1	3	0	0	5.96±0.95	5.25±0.85
대조군2	3	0	0	6.38±1.12	5.82±0.93
유의성 (P value)		$P=1.00$	$P=1.00$	$P=0.001$	$P=0.001$

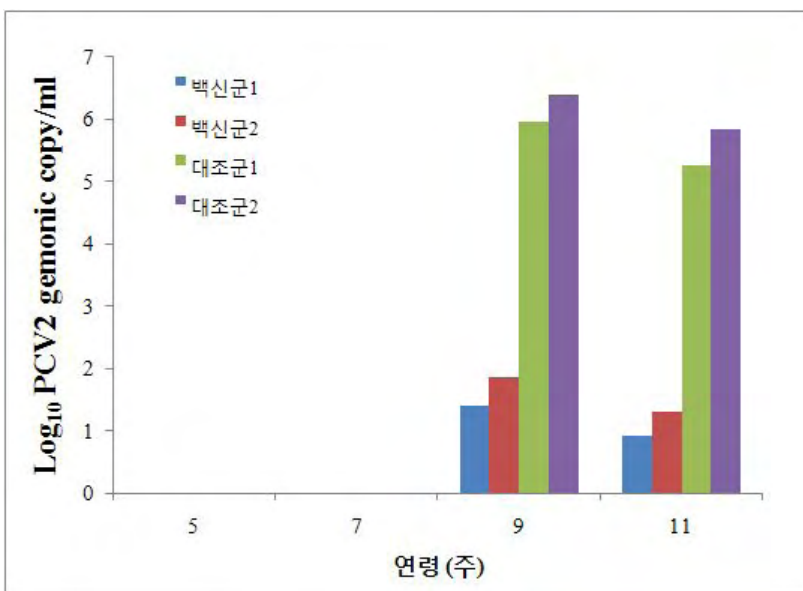


그림 9. 각 군별 혈중 돼지 쉼코바이러스 2형 항원 정량

사. 조직 내 돼지 쉼코바이러스 2형 증식 비교

백신군과 대조군 11주령 돼지에서 채취한 서혜 임파절을 이용하여 면역염색법을 실시한다. 면역염색법은 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 다클론성 항체(polyclonal antibody)를 사용하였고, 서혜 임파절 조직에서 관찰되는 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 항원을 현미경상에서 0.25 mm²의 면적 5곳을 임의로 정하여 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 측정된 결과 아래 표와 같다(표 10). 돼지 쉼코바이러스 2형의 항원은 감염세포의 세포질에서 관찰되었으며, 백신군1에서는 평균 5.46±5.97 개의 양성세포가 측정되었으며(그림 10-1), 백신군2는 평균 6.90±4.87 개의 양성세포가 측정되었다. 대조군1에서는 평균 57.33±12.27개로 측정되었으며, 대조군2에서는 평균 61.50±19.59개의 양성세포가 관찰되었다(그림 10-2). 백신군과 대조군 사이의 서혜 임파절의 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 양성 세포 수는 백신군이 대조군에 비해 통계학적으로 유의성(P=0.011)을 보이며 적게 나타났다.

표 10. 서혜 임파절 돼지 쉼코바이러스 2형 양성 세포 수

개체번호	백신군1	백신군2	대조군1	대조군2
1	0	12.5	71.3	43.7
2	4.9	8.2	52.4	58.3
3	8.3	0	48.3	82.5
4	0	4.2	-	-
5	14.1	9.6	-	-
평균±표준편차	5.46±5.97	6.90±4.87	57.33±12.27	61.50±19.59
유의성 (P value)	P=0.011			

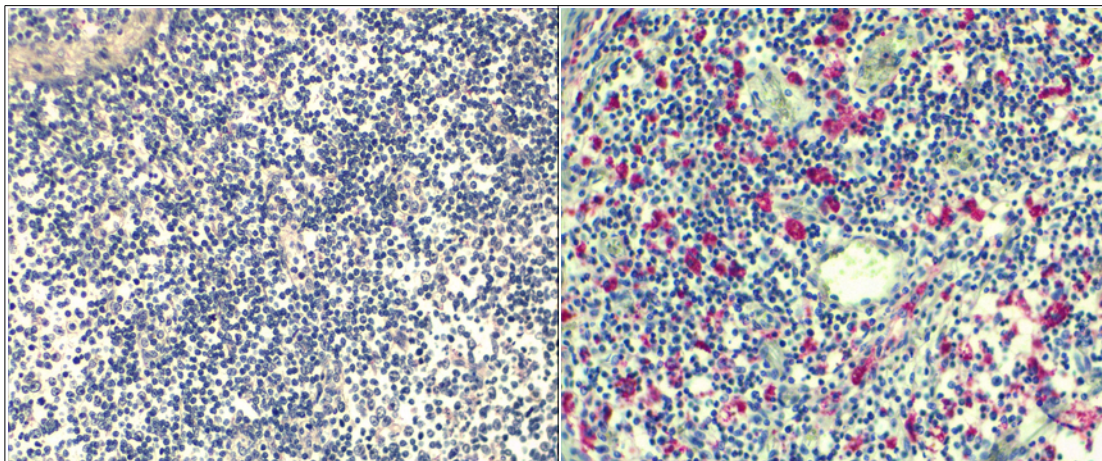


그림 1. 백신군의 서혜 임파절에서 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 면역조직화학법.

그림 2. 대조군의 서혜 임파절에서 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 면역조직화학법.

그림 10. 서혜 임파절 면역조직화학염색 슬라이드

아. 폐장 조직 내 흉막폐렴균 증식 비교

모든 백신군과 대조군 11주령 돼지에서 채취한 폐장을 이용하여 흉막폐렴균 항원에 대한

조직내 염색법을 실시한 결과는 아래 표 11과 같다. Mann-Whitney test 방법을 이용한 통계학적 기법으로 분석한 결과 백신군2 가 대조군2 보다 유의성을($P<0.05$) 보이며 폐장에서 흉막폐렴균 항원이 적게 관찰되고 있다.

표 11. 폐장 조직 내 흉막폐렴균 양성 세포 수

개체번호	백신군1	백신군2	대조군1	대조군2
1	-	0	-	32.3
2	-	11.2	-	26.1
3	-	0	-	22.4
4	-	9.2	-	-
5	-	11.6	-	-
평균±표준편차	-	6.94±4.31	-	29.27±11.8
유의성 (P value)	$P<0.05$			

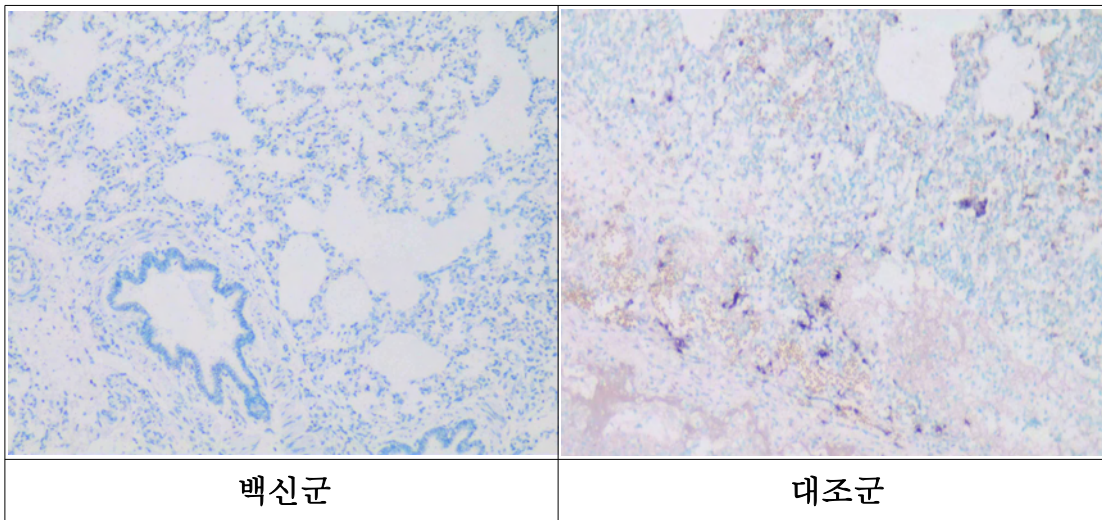


그림 11. 폐장 조직 내 흉막폐렴균 조직내 교잡법 슬라이드

자. 고 찰

돼지 쉰코바이러스 2형 바이러스는 이유 후 만성 소모성 질환을 일으키는 주 원인체로 다른 호흡기 관련 세균 감염과 동반되어 돼지 호흡기 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다. 흉막폐렴균의 경우 12-18주령의 육성돈에 주로 발병하며 돼지 쉰코바이러스 2형 등과 감염되어 돼지 호흡기 질병을 일으킨다. 돼지 쉰코바이러스 2형 백신의 경우 포유가 끝나는 3주령에 접종하여 이유자돈 시기에 질병을 예방하고 있지만, 흉막폐렴 백신의 경우 돼지열병 백신 접종 등으로 인해 접종 시기를 결정하는 것이 힘들 뿐만 아니라 흉막폐렴 백신만 따로 접종하는데 노동력 부족 등의 문제가 발생한다. 따라서 본 실험은 개발된 돼지쉰코흉막 복합 백신을 5

주령 자돈에 접종하여 돼지 호흡기 질병에 대한 효과에 대해서 알아보고자 하였다. 먼저 임상 관찰에서는 흉막 폐렴을 복합 접종한 대조군의 경우 공격 접종 1주 후부터 호흡기 증상을 보이며 백신군 개체보다 임상 증상 정도가 높게 나타났으며, 증체량의 경우에도 백신군이 대조군에 비하여 공격접종 2주 후부터 높게 나타났다. 이는 복합백신이 호흡기 증상과 소모성의 체중감소에 효과를 나타낸 것으로 보인다. 항체 생성 능력의 경우 백신군은 백신 접종 2주 후부터 돼지 쉼코바이러스 2형 및 흉막폐렴균에 대한 항체가 생성되기 시작하여 실험이 종료되는 11주령까지 유지되는 것을 확인하였으며, 공격 접종 후에도 대조군보다 높은 항체가를 나타낸 것으로 확인되어, 이를 통해 복합백신이 돼지 쉼코바이러스 2형 및 흉막폐렴 2형, 5형균에 대한 체액성 면역을 충분히 유도할 수 있음을 확인하였다. 혈액 내 바이러스 양도 공격 접종 후 대조군에 비하여 낮게 유지되었으며 조직 내 병변 및 바이러스 양성 세포도 감소시킨 것으로 나타났다. 흉막폐렴균에 의한 폐렴 병변 측정에서도 대조군이 흉막염 및 폐출혈 소견을 보인 반면 백신군의 경우 경미한 염증세포 침윤 외에 심한 병변은 나타나지 않았다. 본 실험을 통하여 5주령에 접종한 돼지 쉼코흉막 복합백신이 돼지 쉼코바이러스 2형과 흉막폐렴 각각에 대한 예방 효과가 있음을 확인할 수 있었고, 향후 야외임상 실험을 통하여 비육 시기의 생산성에 미치는 효과와 백신 효과가 지속되는 기간에 대한 검증을 기대할 수 있겠다.

11. 돼지 쉼코바이러스 2형과 흉막폐렴 복합 시험백신 안전성 시험 및 결과

가. 마우스 시험

체중 15~20 g의 마우스 8마리를 준비하여, 8마리의 마우스 복강에 백신 0.5 ml를 접종하고 이 후 7일간 증상 및 병변을 관찰하였다. 마지막 날 에테르(ether) 마취 후, 경추탈골 법으로 안락사 시켜 부검하여, 중성 포르말린으로 고정시켜 H&E 염색을 통해 병변을 관찰하였다.

관찰 결과 복강으로 백신을 접종 한 후에 접종 후 1시간이 경과 되었을 때 2마리에서 침울한 상태가 관찰되었으나 이후 7일간 발열, 설사, 쇼크, 구토, 경련과 같은 백신에 의한 부작용을 관찰할 수가 없었다. 7일후 안락사 시킨 후에 병리조직검사에서도 근육, 피하, 복막, 간, 신장, 폐장 등의 모든 내부 장기에서 어떠한 병변도 관찰 할 수가 없었다.

표 1. 마우스 백신 접종 후 관찰 결과

접종부위	접종양(ml)	개체번호	임상증상	병변
복강	0.5	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
		6	무증상	무병변
		7	무증상	무병변
		8	무증상	무병변



그림 1. 마우스 백신 접종 후 관찰 사진

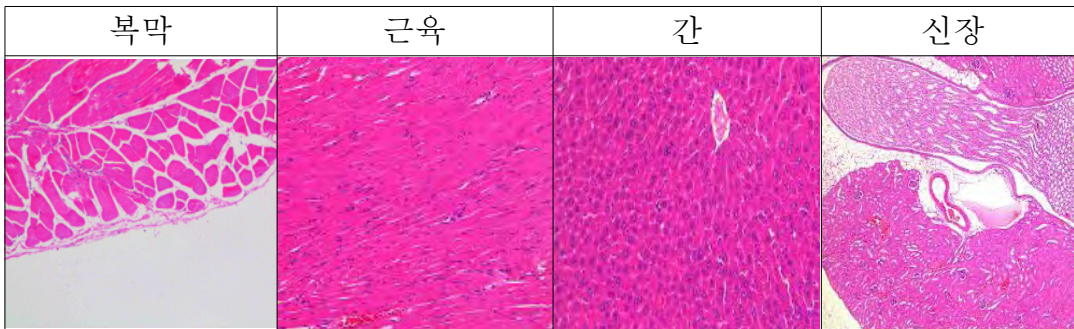


그림 2. 마우스 H&E 염색 슬라이드 사진

나. 기니픽 시험

백신 접종 할 때 일어날 수 있는 접종 부위의 병변 또는, 그 외에 생길 수 있는 부작용을 확인하기 위하여 체중 300~350 g의 기니픽 4마리를 준비하여, 2마리의 기니픽 근육 또는 피하에 2 ml를, 다른 2마리의 기니픽 복강에 2 ml를 접종하고 7일간 관찰하였다.

관찰 결과 근육, 피하, 복강으로 백신을 접종 한 후에 7일간 발열, 설사, 쇼크, 구토, 침울, 경련과 같은 백신에 의한 부작용을 관찰할 수가 없었으며, 7일후 안락사 시킨 후에 병리조직검사에서 근육, 피하, 복막, 간, 신장, 폐장 등의 모든 내부 장기에서 어떠한 병변도 관찰 할 수가 없었다.

표 2. 기니픽 백신 접종 후 관찰 결과

접종부위	접종양(ml)	개체번호	임상증상	병변
근육	2	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
피하	2	3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
복강	2	5	무증상	무병변
		6	무증상	무병변



그림 3. 기니픽 백신 접종 사진

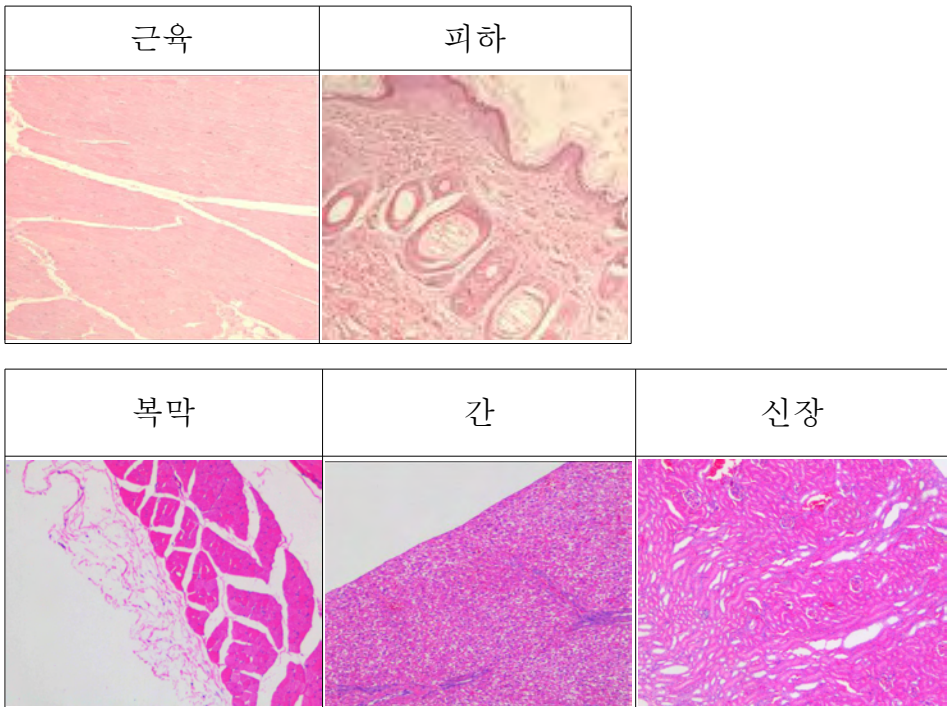


그림 4. 기니픽 H&E 염색 슬라이드 사진

다. 돼지 시험

국가검정동물약품검정기준에 따라 과거 돼지 쉐코바이러스 2형 관련 백신을 접종하지 않았고, 돼지 쉐코바이러스 2형에 노출되지 않은 3-4주령 돼지 2마리를 이용하여 백신 접종 후 발생할 수 있는 부작용을 확인하고자 안전성 검사를 실시하였다. 각 접종돈에 기존 백신 접종량의 2배인 2 ml을 근육에 접종하고 접종 후 1-2시간 내에 과민반응의 유무를 확인하였으며, 21일간의 관찰기간 동안 주사부위의 화농, 괴사, 발열 및 피부병변 등의 부작용 여부를 확인하였다.

관찰 결과 근육으로 백신을 접종 한 후에 1-2시간 내에 과민반응이 관찰되지 않았으며, 21일간의 관찰기간 동안 주사부위의 화농, 괴사가 관찰되지 않았으며, 21일간 발열, 설사, 쇼크, 구토, 침울, 경련과 같은 백신에 의한 부작용을 관찰할 수가 없었다. 또한 21일이 경과된 후에 안락사 시킨 후 병리조직검사에서도 근육, 피하, 복막, 간, 신장, 폐장 등의 모든 내부 장기에 서 어떠한 병변도 관찰 할 수가 없었다.

표 3. 돼지 백신 접종 후 관찰 결과

접종부위	접종양(ml)	개체번호	과민반응	병변
근육	2	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변

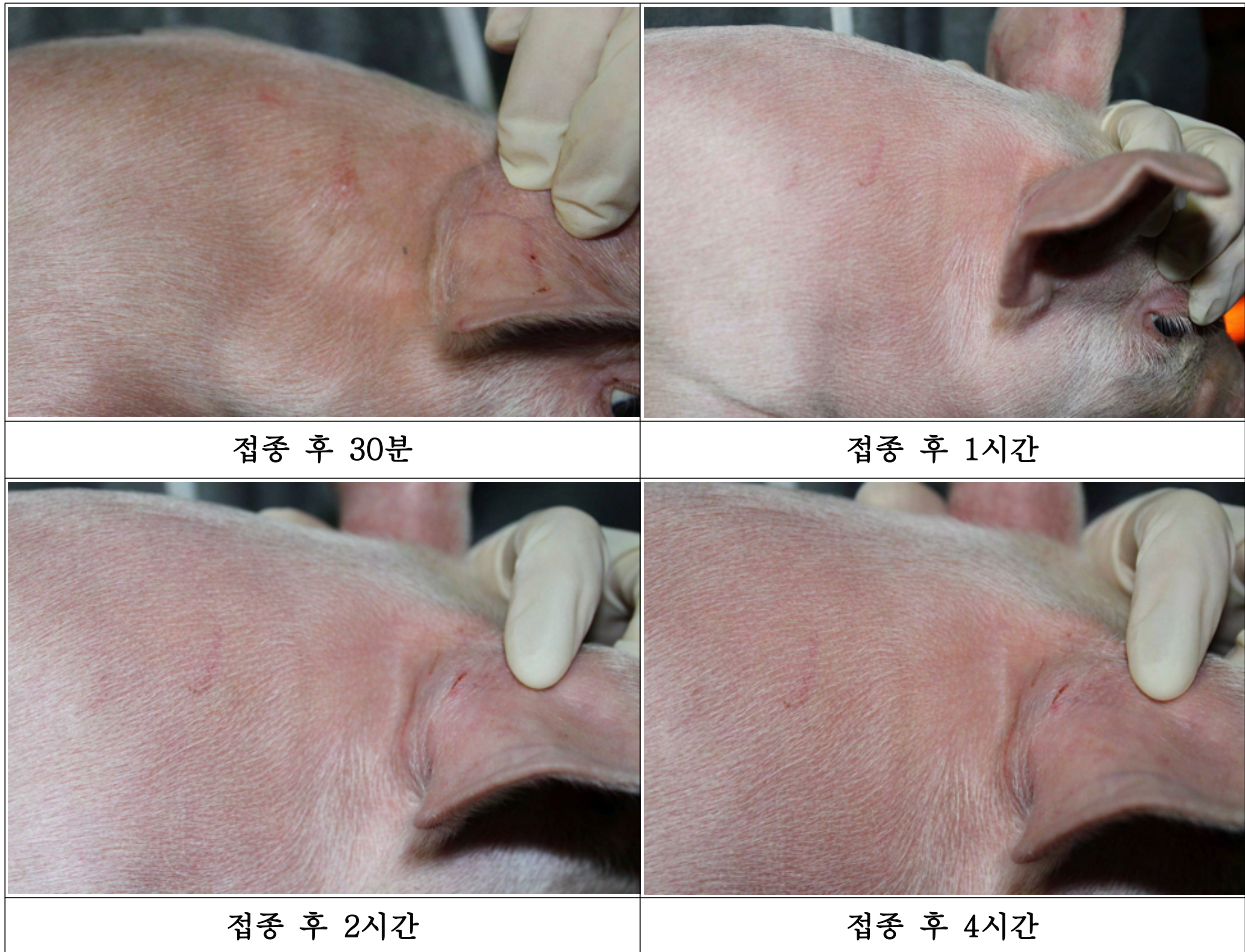


그림 5. 돼지 접종 부위 사진

12. 용돈을 이용한 돼지 쉼코바이러스 단일백신의 차별화된 효능 연구

가. 돼지 쉼코바이러스 감염 용돈에서 돼지 쉼코바이러스 단일백신에 의한 정액에서의 바이러스 분비 억제효과 연구

(1) 항체 형성 비교 결과

백신군과 대조군 모든 개체를 1차 백신 접종(공격 접종 6주전)과 2차 백신 접종(공격 접종 3주전), 공격접종 시점, 공격접종 60일 후까지 주 1회 채혈하고 혈액 내 쉼코바이러스 2형에 대한 ELISA 항체검사를 실시하였다. 각 연령별 백신군과 대조군의 항체 형성 차이는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통해 유의성을 분석하였다. 1차 백신 접종 전 시점에는 백신군과 대조군 사이에 항체가 유의성이 나타나지 않았다. 2차 백신 접종 시기(1차 백신 접종 후 3주)와 공격접종 시기, 공격접종 7일 후의 항체검사 결과에서는 백신군이 대조군에 비해 항체가 유의성($P < 0.05$)을 보이며 증가한 것으로 나타났다(그림 1).

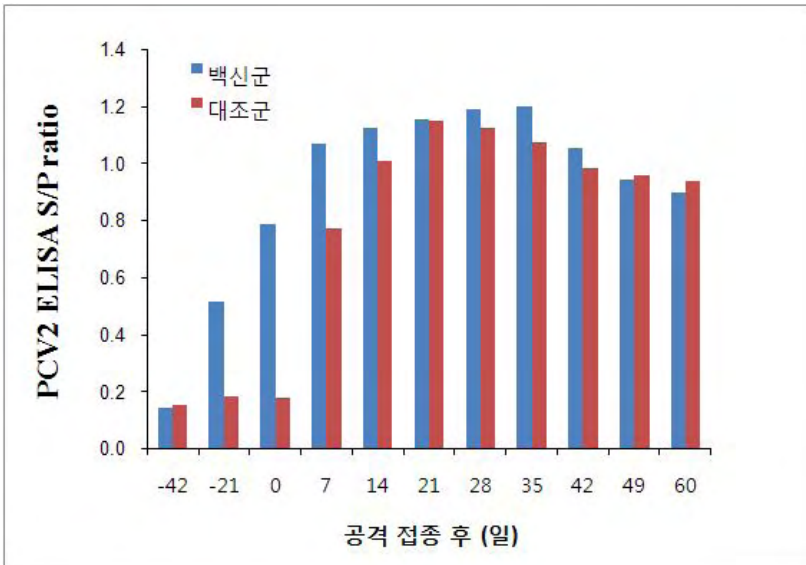


그림 1. 각 군별 항체 형성가 비교

(2) 혈액 및 정액 내 돼지 쉼코바이러스 2형 항원 비교

각 개체별로 채취한 혈액과 정액에서 DNA를 추출하고 실시간 중합효소 연쇄반응을 통해 돼지 쉼코바이러스 2형의 양을 정량 분석한 결과는 아래 표와 같다(표 1,2). 각 군의 시기별 항원량의 차이는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통해 유의성을 분석하였다

혈액 내 바이러스 항원양 측정 결과 공격접종 시기에는 백신군과 대조군 모두 바이러스 항원이 검출되지 않았으며, 공격 접종 7일 후부터 실험이 종료되는 60일 후 시기 중에서 공격 접종 28일 후를 제외한 나머지 시점에서 백신군이 대조군에 비하여 유의성($P < 0.05$)을 보이며 항원량이 감소한 것으로 나타났다.

표 1. 각 군별 혈중 돼지 쉼코바이러스 2형 항원 정량

실험 구분	공시 두수	시기별 Log ₁₀ PCV2 genomic copy 수 (평균±표준편차)								
		공격 접종	7일	14일	21일	28일	35일	42일	49일	60일
백신군	4	0	4.16±0.25	3.90±0.24	3.62±0.41	3.87±0.16	3.38±0.33	3.51±0.21	3.01±0.38	2.41±0.22
대조군	4	0	5.24±0.25	4.99±0.31	4.65±0.43	4.36±0.49	4.49±0.14	4.46±0.33	3.78±0.35	3.48±0.25
유의성 (P value)	-	-	P=0.02	P=0.03	P=0.03	P=0.07	P=0.04	P=0.03	P=0.04	P=0.02

표 2. 각 군별 정액 내 돼지 쉼코바이러스 2형 항원 정량

실험 구분	공시 두수	시기별 Log ₁₀ PCV2 genomic copy 수 (평균±표준편차)								
		공격 접종	7일	14일	21일	28일	35일	42일	49일	60일
백신군	4	0	3.49± 0.38	3.31± 0.22	3.49± 0.24	3.19± 0.59	3.16± 0.36	2.79± 0.20	2.78± 0.23	2.31± 0.24
대조군	4	0	4.10± 0.21	4.19± 0.23	4.09± 0.16	4.07± 0.29	3.58± 0.18	3.73± 0.28	3.49± 0.25	2.83± 0.37
유의성 (P value)	-	-	P=0.11	P=0.03	P=0.04	P=0.06	P=0.08	P=0.02	P=0.03	P=0.07

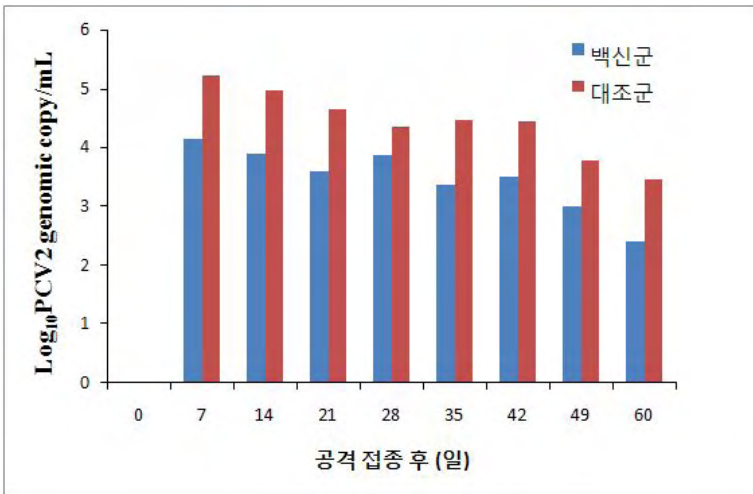


그림 2. 혈액 내 바이러스 양 비교

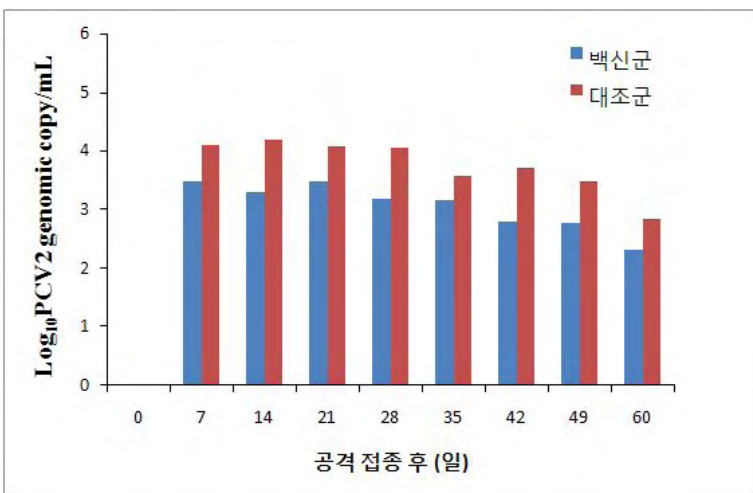


그림 3. 정액 내 바이러스 양 비교

(3) 정액 내 바이러스 분리 결과

정액 내로 배출되는 바이러스의 분리를 통하여 감염력이 있는 바이러스를 확인한 결과, 백신

군의 경우 공격 접종 14일 후 2두의 실험돼지 정액에서 바이러스가 확인되었고, 공격 접종 39일 후 1두의 실험돼지 정액에서 바이러스가 확인되었다. 대조군의 경우 공격접종 후 10일, 14일에서 모든 실험돼지 정액 내에서 바이러스가 확인되었으며, 공격접종 후 21일에 3두, 공격접종 후 32일에 2두, 공격접종 후 42일과 49일에 1두의 정액 내에서 바이러스가 확인되었다.

나. 돼지 썬코바이러스 감염 옹돈에서 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신과 일반 돼지 썬코백신의 정액에서 바이러스 분비 억제효과 비교 연구

(1) 항체 형성 비교 결과

백신군과 대조군 모든 개체를 백신 접종(공격 접종 3주전), 공격접종 시점, 공격접종 60일 후 까지 주 1회 채혈하고 혈액 내 썬코바이러스 2형에 대한 ELISA 항체검사를 실시하였다. 각 연령별 백신군과 대조군의 항체 형성 차이는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통해 유의성을 분석하였다. 백신 접종 전 측정에서는 백신군과 대조군의 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다. 공격접종 시기(백신 접종 3주 후), 공격접종 후 7일, 14일, 21일의 항체검사 결과에서는 백신군이 대조군에 비해 항체가가 유의성($P<0.05$)을 보이며 증가한 것으로 나타났다. 백신군1과 백신군2 사이에 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다.

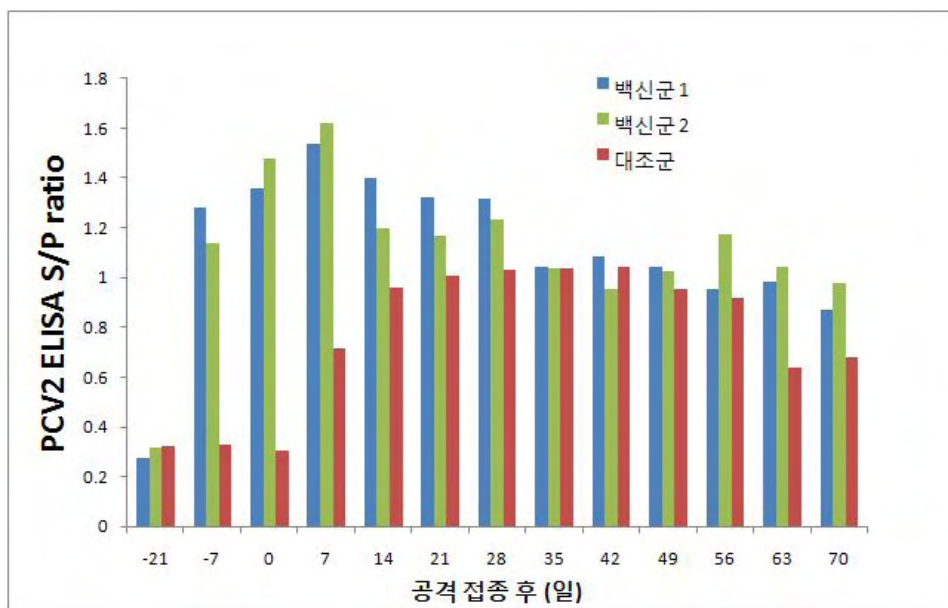


그림 4. 각 군별 항체 형성가 비교

(2) 혈액 및 정액 내 돼지 썬코바이러스 2형 항원 비교

각 개체별로 채취한 혈액과 정액에서 DNA를 추출하고 실시간 중합효소 연쇄반응을 통해 돼지 썬코바이러스 2형의 양을 정량 분석한 결과는 아래 표와 같다(표 3,4). 각 군의 시기별 항원량의 차이는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통해 유의성을 분석하였다. 혈액 내 바이러스 항원양 측정 결과 공격접종 시기에는 백신군과 대조군 모두 바이러스 항원이 검출되지 않았으며, 공격 접종 14일 후부터 실험이 종료되는 60일 후까지 백신군이 대조군

에 비하여 유의성($P<0.05$)을 보이며 항원량이 감소한 것으로 나타났다.

표 3. 각 군별 혈중 돼지 쉼코바이러스 2형 항원 정량

실험 구분	공시 두수	시기별 Log ₁₀ PCV2 genomic copy 수 (평균±표준편차)								
		공격 접종	7일	14일	21일	28일	35일	42일	49일	60일
백신군1	4	0	3.76± 0.15	3.90± 0.23	3.32± 0.41	2.37± 0.43	2.15± 0.52	2.13± 0.61	1.79± 0.11	1.59± 0.24
백신군2	4	0	3.86± 0.25	3.50± 0.58	3.23± 0.39	2.90± 0.51	2.76± 0.44	2.56± 0.78	2.20± 0.69	1.90± 0.26
대조군	4	0	3.94± 0.28	5.19± 0.42	5.55± 0.33	5.36± 0.41	5.53± 0.38	4.46± 0.68	4.28± 0.39	4.15± 0.42
유 의 성 (P value)	-	-	$P=0.23$	$P=0.02$	$P=0.01$	$P=0.03$	$P=0.04$	$P=0.01$	$P=0.01$	$P=0.02$

표 4. 각 군별 정액 내 돼지 쉼코바이러스 2형 항원 정량

실험 구분	공시 두수	시기별 Log ₁₀ PCV2 genomic copy 수 (평균±표준편차)								
		공격 접종	7일	14일	21일	28일	35일	42일	49일	60일
백신군1	4	0	3.19± 0.33	2.51± 0.51	2.32± 0.39	2.33± 0.33	2.16± 0.84	1.85± 0.68	1.46± 0.29	1.21± 0.83
백신군2	4	0	3.29± 0.32	3.09± 0.74	2.53± 0.52	2.49± 0.83	2.22± 0.33	2.15± 0.41	1.76± 0.52	1.55± 0.27
대조군	4	0	3.40± 0.23	4.29± 0.65	4.24± 0.75	4.22± 0.38	4.12± 0.22	4.17± 0.38	3.55± 0.62	3.45± 0.29
유 의 성 (P value)	-	-	$P=0.08$	$P=0.01$	$P=0.03$	$P=0.02$	$P=0.01$	$P=0.01$	$P=0.01$	$P=0.01$

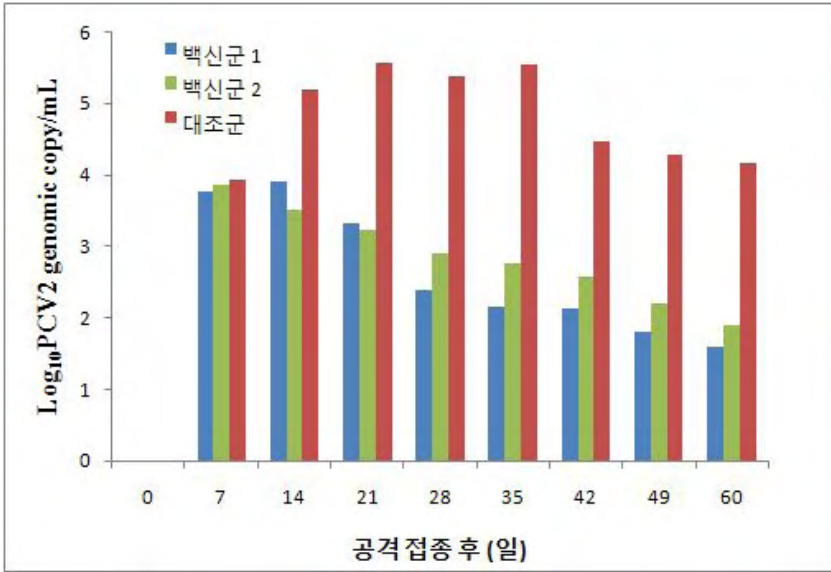


그림 5. 혈액 내 바이러스 양 비교

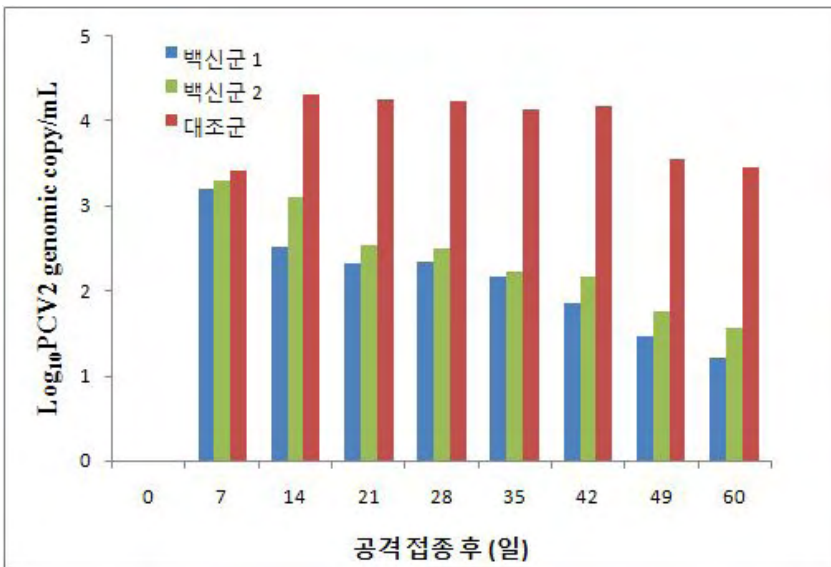


그림 6. 정액 내 바이러스 양 비교

(3) 정액 내 바이러스 분리 결과

정액 내로 배출되는 바이러스의 분리를 통하여 감염력이 있는 바이러스를 확인한 결과, 백신군1의 경우 공격 접종 7일 후 2두의 실험돼지 정액에서 바이러스가 확인되었고, 공격 접종 14일 후 1두의 실험돼지 정액에서 바이러스가 확인되었다. 백신군2의 경우 공격 접종 7일 후 3두의 실험돼지 정액에서 바이러스가 확인되었고, 공격 접종 후 14일과 21일에 각 1두에서 바이러스가 분리되었다. 대조군의 경우 공격접종 후 7일, 14일에서 모든 실험돼지 정액 내에서 바이러스가 확인되었으며, 공격접종 후 21일에 3두, 공격접종 후 28일과 35일에 각각 2두, 공격접종 후 42일과 49일에 1두의 정액 내에서 바이러스가 확인되었다.

13. 돼지 썬코바이러스 항원과 마이코플라즈마 항원의 복합 기술 개발 연구

가. 복합 백신의 면역 유도 분석

(1) 항체 생성 능력

1) 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 항체가 변화

복합 백신 접종 후 2주가 지난 5주령부터 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 항체가 생성되기 시작하여 7주까지 증가하다가 유지되는 양상을 나타냈다.

표 1. 각 군별 ELISA S/P 값 비교

실험 구분	공시 두수	연 령 별 ELISA S/P 값 (평균±표준편차)			
		3주령	5주령	7주령	9주령
백신군	5	0.121± 0.032	0.391± 0.082	0.747± 0.178	0.715± 0.275
대조군	2	0.127± 0.015	0.149± 0.011	0.147± 0.013	0.142± 0.012
유의성 (P value)		P=0.87	P<0.05	P=0.001	P=0.001

(2) 세포성 면역 유도 평가

1) 임파구 자극 시험

각 개체의 혈액에서 분리된 말초혈액 단핵구를 돼지 썬코바이러스 2형 항원(표2) 및 마이코플라즈마 항원(표3)으로 자극한 결과 백신 접종 후 2주가 지난 5주령부터 9주령까지 각각의 항원에 대한 자극 반응이 대조군에 비하여 유의성을 보이며 높게 나타났다(P<0.05)

표2. 돼지 썬코바이러스 2형 항원에 대한 임파구 자극 반응 결과

실험 구분	공시 두수	임파구 자극 반응 Index			
		3주령	5주령	7주령	9주령
백신군	5	1.01± 0.02	1.31± 0.02	1.51± 0.02	1.43± 0.02
대조군	2	0.95± 0.07	1.08± 0.02	1.09± 0.02	1.04± 0.02
유의성 (P value)		P=0.83	P<0.05	P<0.05	P<0.05

표3. 마이코플라즈마 항원에 대한 임파구 자극 반응 결과

실험 구분	공시 두수	임파구 자극 반응 Index			
		3주령	5주령	7주령	9주령
백신군	5	0.95± 0.07	1.28± 0.12	1.44± 0.13	1.41± 0.12
대조군	2	0.98± 0.09	1.08± 0.08	1.09± 0.11	1.04± 0.09
유의성 (P value)		P=0.91	P<0.05	P<0.05	P<0.05

2) IFN- γ 분비세포 측정 결과

ELISOPT을 통하여 돼지 썬코바이러스 2형 항원과 마이코플라즈마 항원 자극에 반응하는 IFN- γ 분비세포 수를 측정한 결과 백신 접종 후 2주가 지난 5주령부터 IFN- γ 분비 세포가 증가하기 시작하여, 돼지 썬코바이러스 2형 항원 자극의 경우 7주령(표4)에 가장 높게 나타났다가 감소하는 양상을 나타냈고, 마이코플라즈마 항원 자극의 경우 9주령까지(표5) 점차 증가하는 양상을 보였다.

표4. 돼지 썬코바이러스 2형 항원에 대한 임파구 자극 반응 결과

실험 구분	공시 두수	IFN- γ 분비세포 측정 결과			
		3주령	5주령	7주령	9주령
백신군	5	0	27±6.1	43±9.5	40±7.2
대조군	2	0	0	0	0

표5. 마이코플라즈마 항원에 대한 임파구 자극 반응 결과

실험 구분	공시 두수	IFN- γ 분비세포 측정 결과			
		3주령	5주령	7주령	9주령
백신군	5	0	14±4.1	24±6.5	31±6.2
대조군	2	0	0	0	0

3) 지연형 과민반응 검사(delayed type hypersensitivity test) 결과

백신 접종 2주 후인 5주령에 각 개체의 서혜 임파절에 돼지 썬코바이러스 2형 항원 및 마이코플라즈마 항원을 피내 접종하여 반응을 측정한 결과, 돼지 썬코바이러스 2형 항원에 의해서 백신군은 16±2.1mm, 대조군은 2.1±1.1mm 의 반응 길이를 보였다. 마이코플라즈마 항원 접종의 경우 백신군은 13±2.1mm, 대조군은 1.8±1.3mm 의 반응 길이가 측정되었다.

제 4 장 돼지 썬코바이러스 증식 최적화 연구

제 1 절 서 설

동물의 태아조직으로부터 배양 된 세포는 그 동물의 근원적 생물학적 특성을 그대로 보유하고 있어서 기존의 세포주로는 검출하기 어려운 바이러스의 검출 및 증식 등에 사용될 수 있을 뿐만 아니라 생물학적 연구에 다양하게 사용될 수 있는 가치가 있다. 세포배양기술이 발전하면서 여러 가지 조직에서의 세포배양이 가능하게 되었는데, 배양하고자 하는 조직의 종류와 동물이 다를 경우 세포배양 방법도 서로 상이하게 된다. 따라서 그에 적합한 초대배양 방법이 연구되어지고 있다. 초대배양법에는 크게 조직절편을 그대로 배양하는 조직소편배양법(explant cell culture)과 조직을 단일세포로 분리하여 배양하는 분리세포배양법(dissociation cell culture)의 두 가지가 있다. 조직소편배양법은 간편하고 극히 적은 양의 조직으로도 배양할 수 있다는 장점이 있으나 대부분이 섬유아세포로 분화가 일어나며, 초대배양 후 원하는 세포종류의 cloning이 어렵다는 문제점이 있다. 반면 분리세포배양법은 효소에 의한 처리를 통하여 원하는 세포만을 조직에서 분리 배양하는데 유리하지만 섬유아세포가 다수 포함되어 있고, 효소의 종류와 처리 농도 그리고 시간이 조직별로 다르기 때문에 처리조건을 일률적으로 적용하기가 힘들다는 문제점이 있다. 태아를 이용한 초대배양은 분열기에 있는 세포가 풍부하여 초대배양 시 오랜 기간 세포가 생존하고 분열속도도 왕성한 많은 장점을 지니고 있다. 초대배양 시 사용하는 많은 효소들 가운데 collagenase와 dispase는 trypsin과 달리 세포 독성이 적어서 장시간동안 조직이나 세포에 적용이 가능하고 세포간의 연결을 효과적으로 절단 할 수 있으며 농도와 처리시간을 잘 조정하면 상피세포만을 분리 할 수 있어 초대배양 세포에서 섬유아세포의 포함을 최소화 할 수 있다. 이러한 태아세포의 초대배양을 통하여 세포불멸화를 통한 새로운 세포주를 작성할 수 있다. 바이러스의 생산은 숙주세포를 배양하고 배양된 세포에 바이러스를 감염시켜 바이러스를 증식시키는 것인데, 얼마나 고역가의 바이러스를 생산할 수 있는가가 바이러스 백신 개발에 있어서 상품화 가능성을 결정짓는 가장 중요한 요소 중의 하나이다. 현재까지 발표된 논문들에서는 돼지 썬코바이러스 2형이 세포배양액 1ml당 약 10,000개 정도 생산되는 것으로 되어 있는데, 이는 백신으로 개발하기에는 역가가 너무 낮은 수준이다. 또한 돼지 썬코바이러스 2형의 증식을 위하여 여러 종류의 돼지 신장 유래 세포들이 이용되고 있는데, 이들 세포는 대부분 초대배양세포의 성격이 다소 변화되어 무한히 계대배양이 가능한 line화 되어있는 세포들이다. 이와 같이 변형된 세포주들을 사용할 경우 돼지 썬코바이러스 2형의 감염 및 증식이 자연상태와 다를 수 있으므로 초대배양을 통하여 돼지 신장 유래의 세포주를 확립하고, 기존의 세포주들과 비교하여 돼지 썬코바이러스 2형의 증식성이 가장 좋은 세포주를 개발하고자 하였다. 이에 초대배양을 통하여 돼지 신장 유래의 세포주를 확립하고, 기존의 세포주들과 비교하여 PCV-2의 증식성이 가장 좋은 세포주를 개발하고자 하였다. 이렇게 돼지 태아의 신장조직을 순수하게 상피세포만을 초대배양하고 telomere reverse transcriptase를 이용하여 영구적으로 불멸화시킨 돼지상피세포주를 만들어 JNUSK-1과 JNUSK-2라고 명명했

다. PCV-2 분리와 증식에 주로 사용되는 세포주인 PK-15와 감수성이 있다고 알려진 vero 세포주 그리고 돼지신장유래 불멸화상피세포주인 JNUSK-1과 JNUSK-2 세포주의 감수성 검사를 실시하여 돼지 쉰코바이러스에 가장 감수성이 뛰어난 세포주를 선별하였다. 선별된 세포주의 특성 및 바이러스 증식 조건을 탐색하여 돼지 쉰코바이러스 백신의 상품화를 위하여 바이러스 배양 조건을 최적화하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 돼지 썬코바이러스 증식용 세포주의 제작

가. 돼지 유래 신장 조직의 초대배양

돼지의 태아를 확보하고 척출 이후 무균 비닐봉지 등을 이용하여 냉장상태에서 신속히 실험실로 이송하고 초대배양 재료로 사용하였다. 태아사체를 생리식염수 등으로 세척하고 인후두강 점막, 갑상선 그리고 신장을 무균적으로 척출하였다. 척출한 조직을 무균 가위 등으로 유리 비이커 안에서 가능한 잘게 자른 후 생리식염수로 세척하여 혈액성분을 제거하고 삼각플라스크에 옮겼다. Collagenase와 trypsin 등 단백분해효소를 적정 농도로 첨가하고 천천히 섞어주면서 37°C에서 배양하면서 세포를 조직으로부터 분리하였다. 약 5분 간격으로 분리된 세포를 혈청이 첨가된 배지가 담긴 용기에 옮겨서 단백분해효소의 작용을 정지시키고, 반응 시간별로 모은 유리된 세포는 원심분리를 이용하여 분해되지 않은 조직덩어리로부터 분리한 후 새로운 배지에 섞어 37°C CO₂배양기에서 배양하였다. 다음 날 배지를 새로 갈아주고 하루 더 배양한 후 세포를 관찰하여 세포 모양과 증식성 등을 확인하였다.

나. 초대배양 세포에서의 섬유아세포 제거

초대 배양된 세포를 수확한 후 새로운 배양용기에 세포수를 단계적으로 희석하여 2-3일간 배양하였다. 현미경을 통하여 세포가 용기표면에 약 50-80% 정도의 단층을 형성하고 상피세포가 많이 있는 배양용기를 1차로 선별한 후 섬유아세포 제거 작업을 다음과 같이 실시하였다. 배지를 제거하고 0.01% edetate disodium dihydrate(Na₂EDDA)용액을 천천히 세포층에 떨어뜨려 첨가하였다. 2-3분 후 새로운 배지를 조심스럽게 첨가하고 현미경으로 섬유아세포가 박리되는지를 관찰한다. 섬유아세포가 박리되면 배지를 제거한 후 새로운 배지를 첨가하고 현미경 관찰을 통하여 섬유아세포 제거 여부를 확인하였다. 이와 같은 작업의 반복을 통하여 가능한 섬유아세포는 제거를 하고 상피세포가 많이 증식하게 유도하였다. 위의 작업을 통하여 제거되지 않고 섞여있는 섬유아세포는 세포 불멸화 과정이 끝난 후 같은 방법으로 다시 제거하였다.

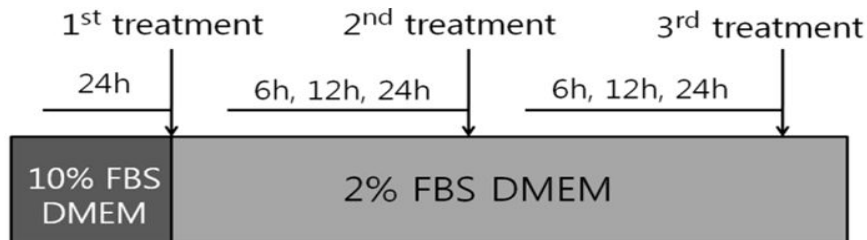


그림 1. 상피세포와 섬유아세포가 복합되어 있는 상태에서 섬유아세포만을 제거하기 위한 Na₂EDDA의 처리 일정표.

다. 초대배양 세포의 불멸화

초대배양된 돼지유래 세포에 Telomerase의 과발현을 통한 세포의 불멸화 유도를 하였다. 레트로바이러스 벡터는 Michiie Sakamoto(Department of Pathology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku 160-8582, Tokyo)로부터 공여 받아 실험에 사용하였다. 벡터의 제작과정은 다음과 같다. 안정적으로 세포내로 유전자를 도입시키기 위하여 불멸화에 사용할 레트로바이러스 입자를 Retrovirus Packing System(TAKARA Bio, Osaka, Japan)을 사용하여 co-transfection을 통하여 제작하였다. 293cell에 recombinant retrovirus vector와 pGP vector 그리고 pE-ampho vector를 Calcium phosphate transfection method로 co-transfection을 하였다. co-transfection 후 7~11시간동안 5% CO₂, 37°C로 incubating한 후 새로운 배지로 교환해 주었다. Transfection 48시간 후 원심분리로 상층액을 수거하고 0.45 μm sterilized filter를 사용하여 filter후 -80°C에 보관하고 transduction에 사용하였다.

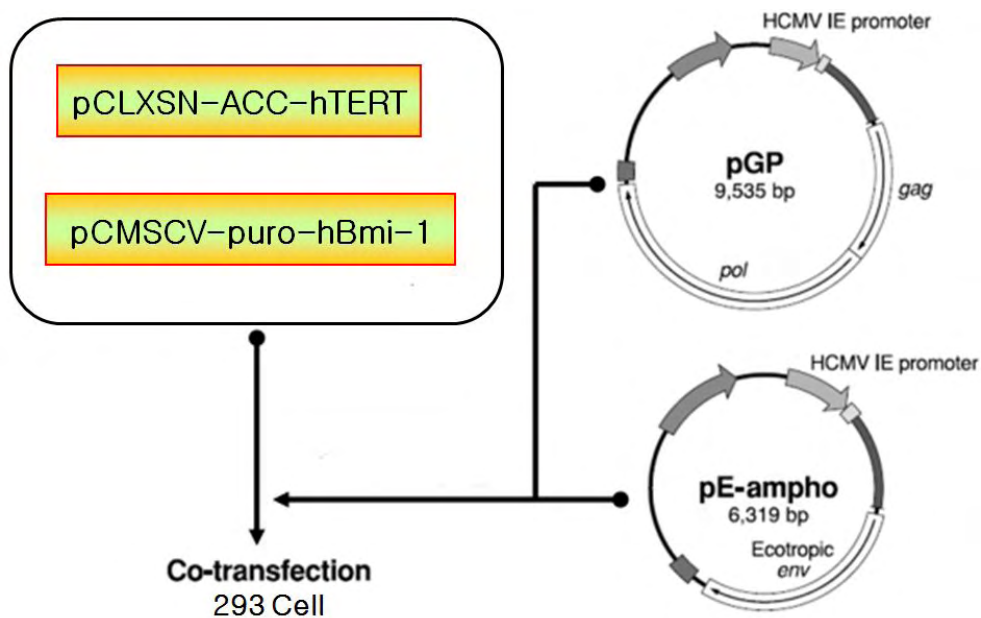


그림 2. 세포의 불멸화를 위한 재조합 레트로바이러스 입자를 생산하기 위하여 실시한 벡터들의 동시 접종의 모식도.

Telomerase가 발현되는 세포를 선별하기 위해 G418 (geneticin)을 배지에 500 ug/ml로 첨가하고 매일 G418이 첨가된 배지로 갈아주면서 2주일 정도 배양을 지속하였다. 살아남은 세포는 G418 농도를 반으로 줄인 배지를 이용하여 배양하면서 불멸화 여부를 확인하였다.

2. 세포주의 개발 및 돼지 쉼코바이러스 2형 감수성 검사

가. 제작된 세포주의 바이러스 감수성 검사

Vero cell, PK-15, JNUSK-1과 JNUSK-2 세포주를 96-well plate에 배양하여 다음날 80%의 monolayer가 형성되도록 배양하였다. 하루가 지나고 80%의 monolayer가 형성되어 있을 때 배지를 제거하고 PBS 15 ml로 3회 세척한 후 DMEM배지 1.95 ml에 위에서 얻어낸 seed virus를 50 μ l 희석한 후 각 well에 200 μ l를 접종하고 다음 well은 200 μ l가 되도록 단계별로 1/10씩 희석시키며 접종했다. 3일 동안 36°C, CO₂ 인큐베이터에서 배양시켜 IFA로 돼지 쉼코바이러스 2형의 titer를 확인하였다. 감염된 세포를 PBS로 세척하고 PBS 완충액에 4%의 paraformaldehyde(PFA)를 첨가한 고정액을 사용하여 실온에서 30분간 고정하였다. 고정 후, 세포를 0.1% Triton 용액에 15분간 정치시킨 후 3%의 bovine serum albumin (BSA)을 첨가한 PBS-Tween(PBS-T)을 사용하여 실온에서 1시간동안 반응을 시켰다. 1차 항체로 PCV-2 antibody(rabbit 유래)를 1:500으로 희석하여 37°C에서 1시간동안 처리하였다. PBS로 3번 세척 후 anti-rabbit fluorescein isothiocyanate(FITC)가 부착된 2차 항체를 3% BSA가 첨가된 PBS에 희석 후 37°C에서 1시간 반응 시켰다. PBS로 세척 후 형광현미경을 통하여 관찰하였다.

나. Seed virus의 제작

연구에 사용하기 위하여 같은 연구사업단의 세부연구수행자에게 바이러스를 공여받아 seed virus를 제작하였다. T75 세포배양용 flask에 JNUSK-1 세포를 계대배양 하고 24시간 후 70~80% 정도로 monolayer를 형성하도록 하였다. 배지를 제거하고 세포세척용 PBS 15 ml로 3회 세척하였다. 세척된 세포에 PCV-2 virus 2 ml를 접종하고 2 ml의 DMEM 배지를 추가해주었다. 36°C, CO₂ 인큐베이터에서 5시간동안 배양시킨 후 2% FBS가 첨가된 11 ml의 DMEM 배지를 첨가하여 지속적인 배양을 하였다. 바이러스 접종 후 5일이 경과한 후 배지를 수거하여 50 ml cornical tube에 넣고 130 x g에서 5분간 원심분리를 하고 상층액만을 수거하였다. 수거한 상층액을 3000 x g에서 10분간 원심 분리하여 다시 상층액만 수거하였다. 수거된 상층액은 45 μ m필터를 사용하여 바이러스를 정제 후 0.5 ml씩 1.5 ml microtube에 나누어 -80°C 냉동고에 보관하여 사용하였다.

다. 제작된 세포주의 크로닝

제작된 세포주는 초대배양된 돼지태아 신장세포 유래로 배양을 지속하면 여러 가지 성격이 다른 세포들로 분화가 이루어진다. 따라서 돼지 쉼코바이러스 2형을 가장 효율적으로 생산할 수 있는 세포주를 크로닝하였다. JNUSK-2 세포주를 96-well 세포배양용 plate에 각 well당 하나씩의 세포만이 들어가도록 계대배양을 하였다. 각 well에 하나씩의 세포만이 들어 있는 것을 확인한 후 3일 동안 배양을 하였다. 각각의 well에 고유한 이름을 명명한 후 24-well 세포배양용 plate에 계대배양하여 3일 동안 배양을 한 후 8-well 세포배양용 plate에 계대배양을 하였다. 크로닝이 끝난 후 각각의 세포주에 대하여 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 역가를 검사한 후 역가가 가장 높았던 JNUSK-2b를 최종 후보주로 선택 하였다.

라. 세포주에 적응된 돼지 썬코바이러스 2형의 크로닝(cloning)

대부분의 바이러스들은 세포배양을 계속 할 경우 특정 세포주에서 증식성의 변화가 나타나는데, 장기간의 계대배양을 통하여 돼지 썬코바이러스 2형을 돼지 신장세포에서 적응시키고 증식성이 가장 좋은 돼지 썬코바이러스 2형을 크로닝(cloning)하고자 하였다. JNUSK-2b 세포주를 T25 세포배양용 flask에 계대배양 24시간이 지나서 80%의 monolayer를 형성하도록 계대배양하였다. 배지를 제거하고 세포세척용 PBS 5 ml로 3회 세척하였다. 세척된 세포에 PCV-2 virus 0.5 ml을 접종하고 1시간이 지난 후 4.5 ml의 DMEM 배지를 추가하여, 36°C, CO₂ 인큐베이터에서 4일 동안 배양시켰다. 4일 동안 배양 후 trypsin/EDTA(0.05%/0.53 M)를 500 µl 첨가하여 2분간 반응시켜 단일세포로 분리하였다. 수거된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM배지를 5 ml 첨가하여 원심분리 하고, 3ml의 배지를 첨가하여 다시 부유시켰다. 전날 30% 정도의 monolayer를 형성하도록 계대배양한 JNUSK-2b 세포주가 자라고 있는 T25 세포배양용 flask에 앞에서 부유시킨 세포(돼지 썬코바이러스 2형이 감염된 세포)를 1 ml 첨가한 후 3일간 배양을 하였다. 이렇게 감염되지 않은 세포에 감염된 세포를 첨가하여 계대배양하는 과정을 20회 반복하였다.

3. 돼지 썬코바이러스 생산을 위한 최적의 배양조건 탐색

가. 바이러스배양 최적화를 위한 돼지 썬코바이러스 2형의 특성조사

돼지 썬코바이러스 2형은 다른 돼지발병 바이러스에 비하여 그 연구가 미비한 실정이다. 따라서 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 기본적인 정보가 많이 부족하기 때문에 바이러스의 배양 최적화 실험에 앞서 기초적인 실험을 우선적으로 수행하였다. 안정적이고 성공적인 바이러스 배양을 위하여 최적의 multiplicity of infection(MOI)을 선정하여야 되는데 바이러스는 일반적으로 환경에 노출이 되면 온도, 노출 시간, pH 등에 의하여 역가가 변하게 된다. JNUSK-2b 세포주를 이용하여 돼지 썬코바이러스 2형의 대량배양 조건을 탐색하기 위하여 돼지 썬코바이러스 2형의 보관 온도에 따른 역가 변화를 실험하였다.

나. 돼지 썬코바이러스 2형의 MOI 선정

JNUSK 세포를 20시간 배양하여 약 50%, 70%, 90%, 100%의 세포단층이 형성되도록 한 후 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 seed 바이러스(1.6×10^4 TCID₅₀/ml)를 FBS가 2%로 첨가된 DMEM배지로 희석하여 접종량을 달리하여 MOI 0.5, 1, 2, 4, 8 별로 접종하였다. virus seed 접종 4시간 후에 접종액을 제거하고 PBS로 2번 세척 후(2분간 정치) 각각 2% FBS가 첨가된 DMEM배지를 첨가하여 72시간 동안 배양 후 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 역가를 측정하였다.

다. 돼지 썬코바이러스의 역가 검정

JNUSK 세포주를 96-well plate에 배양하여 다음날 80%의 monolayer가 형성되도록 배양하였다. 하루가 지나고 80%의 monolayer가 형성되어 있을 때 배지를 제거하고 PBS 15 ml로 3회 세척한 후 DMEM배지 1.95 ml에 수거한 배지를 50 µl 희석한 후 각 well에 200 µl를 접

중한 다음 각각의 well은 200 μ l가 되도록 단계별로 1/10씩 희석시키며 접종했다. 3일 동안 36°C, CO₂ 인큐베이터에서 배양시켜 IFA로 PCV-2의 titer를 확인하였다. 감염된 세포를 PBS로 세척하고 PBS 완충액에 4%의 paraformaldehyde (PFA)를 첨가한 고정액을 사용하여 실온에서 30분간 고정하였다. 고정 후, 세포를 0.1% Triton 용액에 15분간 정치시킨 후 3%의 bovine serum albumin(BSA)을 첨가한 PBS-Tween(PBS-T)을 사용하여 실온에서 1시간동안 반응을 시켰다. 1차 항체로 돼지 썬코바이러스2형에 대한 다크론항체(토끼 유래)를 1:500으로 희석하여 37°C에서 1시간동안 처리하였다. PBS로 3번 세척 후 anti-rabbit fluorescein isothiocyanate(FITC)가 부착된 2차 항체를 3% BSA가 첨가된 PBS에 희석 후 37°C에서 1시간 반응 시켰다. PBS로 세척 후 형광현미경을 통하여 관찰하였다.

라. 대량생산 배양조건의 탐색

JNUSK 세포주를 이용하여 PCV-2를 대량생산하기 위한 조건을 탐색하였다. 바이러스를 대량배양하기 위하여 바이러스 접종전 JNUSK 세포주의 배양 시간 및 세포단층의 비율과 각각의 세포단층의 비율에서의 바이러스 접종 MOI를 측정하였다. 이를 바탕으로 최적의 바이러스 수거 타이밍을 비교하여 보았다. JNUSK 세포주를 계대배양 후 20시간 후에 90%의 세포단층이 형성되도록 배양을 한 후 MOI 2로 돼지 썬코바이러스 2형을 접종하였다. 바이러스 접종 후 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간 그리고 120 시간 후에 배지를 수거하여 바이러스 역가를 측정하였다.

제 3 절 결과와 고찰

1. 돼지 썬코바이러스 2형 증식용 세포주의 제작

가. 초대배양 세포의 불멸화 결과

초대배양된 돼지유래 세포에서 효과적으로 섬유아세포를 제거하고 Telomerase의 과발현을 통한 세포의 불멸화 유도를 한 결과 불멸화된 세포주를 제작할 수 있었다.

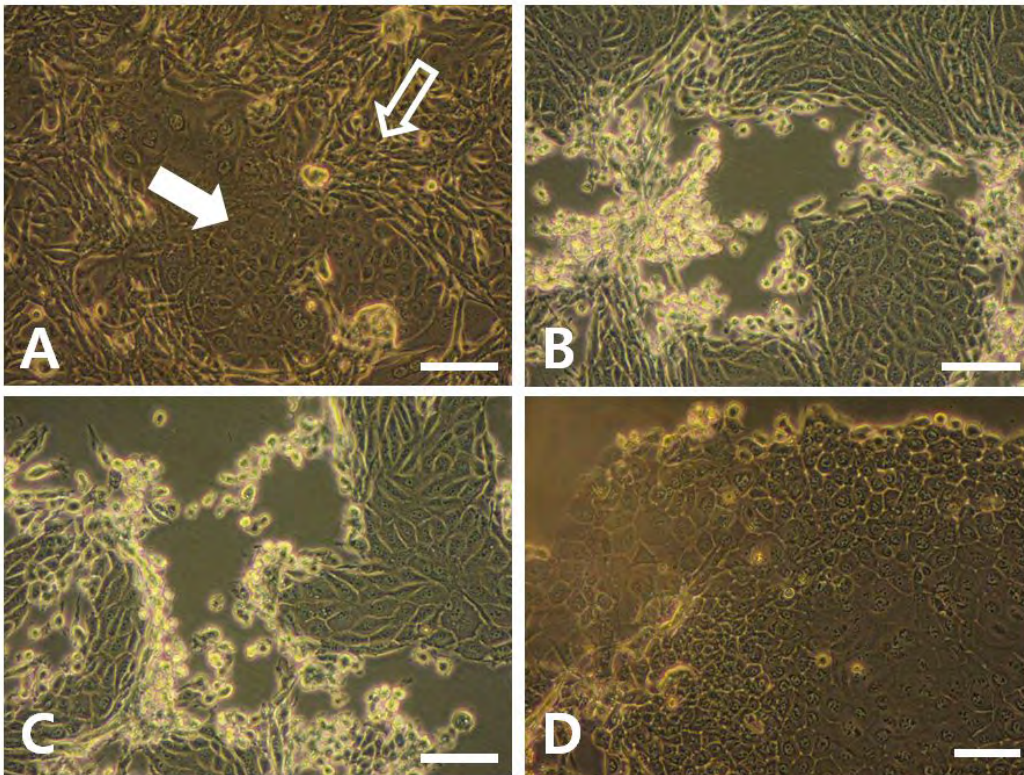


그림 3. Na₂EDDA를 이용한 섬유아세포 제거 그림. A: 섬유아세포를 제거하기 전의 모습 섬유아세포와 상피세포가 복합되어 콜로니를 형성하고 있다. 빈 화살이 형태학적으로 섬유아세포이며 화살표는 형태학적으로 상피세포의 콜로니이다. B-D: 단계적으로 섬유아세포의 콜로니만 제거되는 모습. Scale-bar: 40 μ m.

나. 세포주의 불멸화 확인 및 잡균감염 검증

불멸화된 돼지유래 세포들을 5세대별로 나누어 telomerase 발현양상을 Real Time PCR을 통하여 조사하고 불멸화된 세포의 마이코플라즈마 감염여부를 PCR을 통하여 확인하였다. 마이코플라즈마 감염여부는 PCR kit(Mycoplasma PCR detection kit. iNtRON, Seoul, Korea)을 통하여 확인하였다.

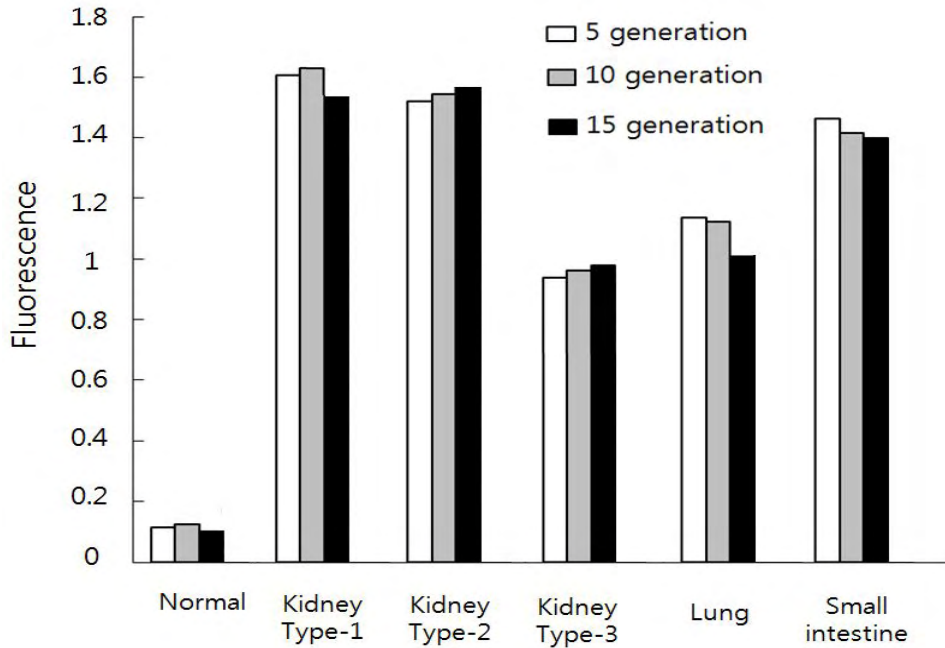


그림 4. 불멸화를 시도한 돼지유래 세포에서의 telomerase 발현 양의 Real-time PCR 결과

불멸화된 세포의 마이코플라스마 감염여부와 바이러스 감염여부를 PCR을 통하여 확인하였다. 검사결과 모두 음성으로 나왔다.

2. 세포주의 개발 및 돼지 썬코바이러스 2형 감수성 검사

가. 제작된 세포주의 바이러스 감수성 검사

간접 형광항체반응을 통하여 돼지 썬코바이러스 2형의 감수성을 확인하였다. 감염된 세포를 PBS로 세척하고 PBS 완충액에 4%의 paraformaldehyde(PFA)를 첨가한 고정액을 사용하여 실온에서 30분간 고정하였다. 고정 후, 세포를 0.1% Triton 용액에 15분간 정치시킨 후 3%의 bovine serum albumin (BSA)을 첨가한 PBS-Tween (PBS-T)을 사용하여 실온에서 1시간동안 반응을 시켰다. 1차 항체로 돼지 썬코바이러스 2형 다크론 항체(토끼 유래)를 1:500으로 희석하여 37°C에서 1시간동안 처리하였다. PBS로 3번 세척 후 anti-rabbit fluorescein isothiocyanate(FITC)가 부착된 2차 항체를 3% BSA가 첨가된 PBS에 희석 후 37°C에서 1시간 반응 시켰다. PBS로 세척 후 형광현미경을 통하여 관찰하였다.

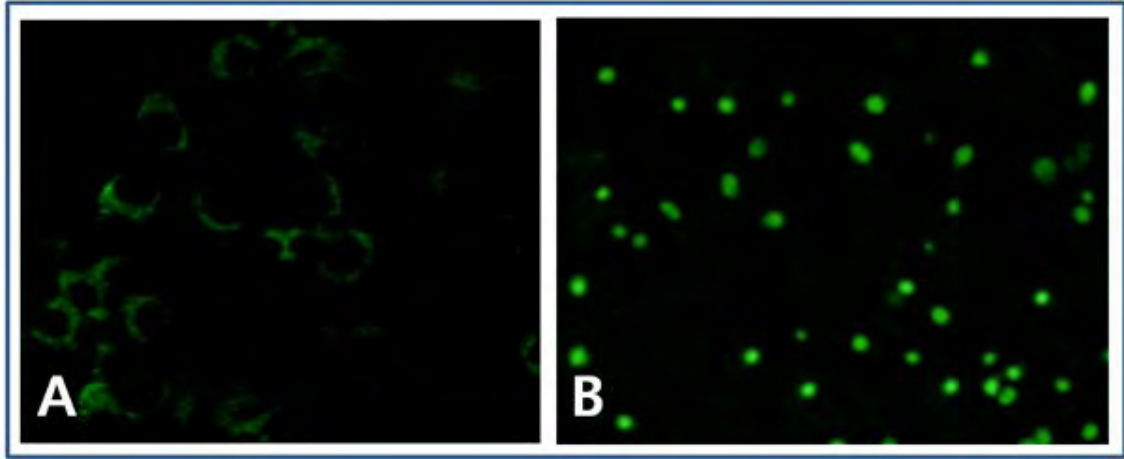


그림 5. 돼지 썩코바이러스 2형을 접종한 JNUSK-2 세포주에서 형광현미경사진. A: 접종 후 24시간, B: 접종 후 72시간.

나. 제작된 세포주의 크로닝

제작된 세포주는 초대배양된 돼지태아 신장세포 유래로 배양을 지속하면 여러 가지 성격이 다른 세포들로 분화가 이루어진다. 따라서 돼지 썩코바이러스 2형을 가장 효율적으로 생산할 수 있는 세포주를 크로닝하였다. JNUSK-2 세포주를 96-well 세포배양용 plate에 각 well당 하나씩의 세포만이 들어가도록 계대배양을 하였다. 각 well에 하나씩의 세포만이 들어 있는 것을 확인한 후 3일 동안 배양을 하였다. 각각의 well에 고유한 이름을 명명한 후 24-well 세포배양용 plate에 계대배양하여 3일 동안 배양을 한 후 8-well 세포배양용 plate에 계대배양을 하였다. 크로닝이 끝난 후 각각의 세포주에 대하여 돼지 썩코바이러스 2형에 대한 역가를 검사한 후 역가가 가장 높았던 JNUSK-2b를 최종 후보주로 선택 하였다.

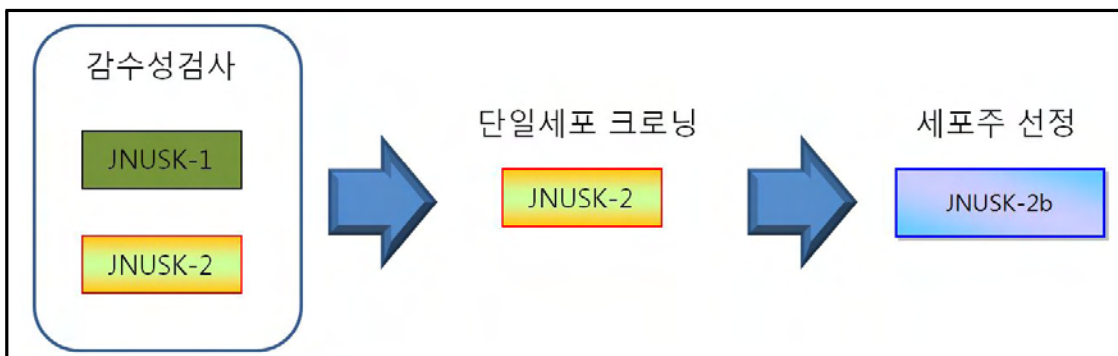


그림 6. JNUSK 세포주의 크로닝 단계 모식도. 크로닝을 통하여 돼지 썩코바이러스 2형 배양용 최종후보 세포주로 JNUSK-2b를 선정하였다.

다. 돼지 썩코바이러스 2형의 크로닝(cloning) 및 특성 조사

대부분의 바이러스들은 세포배양을 계속 할 경우 특정 세포주에서 증식성의 변화가 나타나는데, 장기간의 계대배양을 통하여 돼지 썩코바이러스2형을 돼지 신장세포에서 적응시키고 증식성이 가장 좋은 PCV-2를 크로닝(cloning)하고자 하였다. 전날 30% 정도의 monolayer를 형

성하도록 계대배양한 JNUSK-2b 세포주가 자라고 있는 T25 세포배양용 flask에 앞에서 부유시킨 세포(돼지 쉰코바이러스 2형이 감염된 세포)를 1 ml 첨가한 후 3일간 배양을 하였다. 이렇게 감염되지 않은 세포에 감염된 세포를 첨가하여 계대배양하는 과정을 20회 반복하였다.

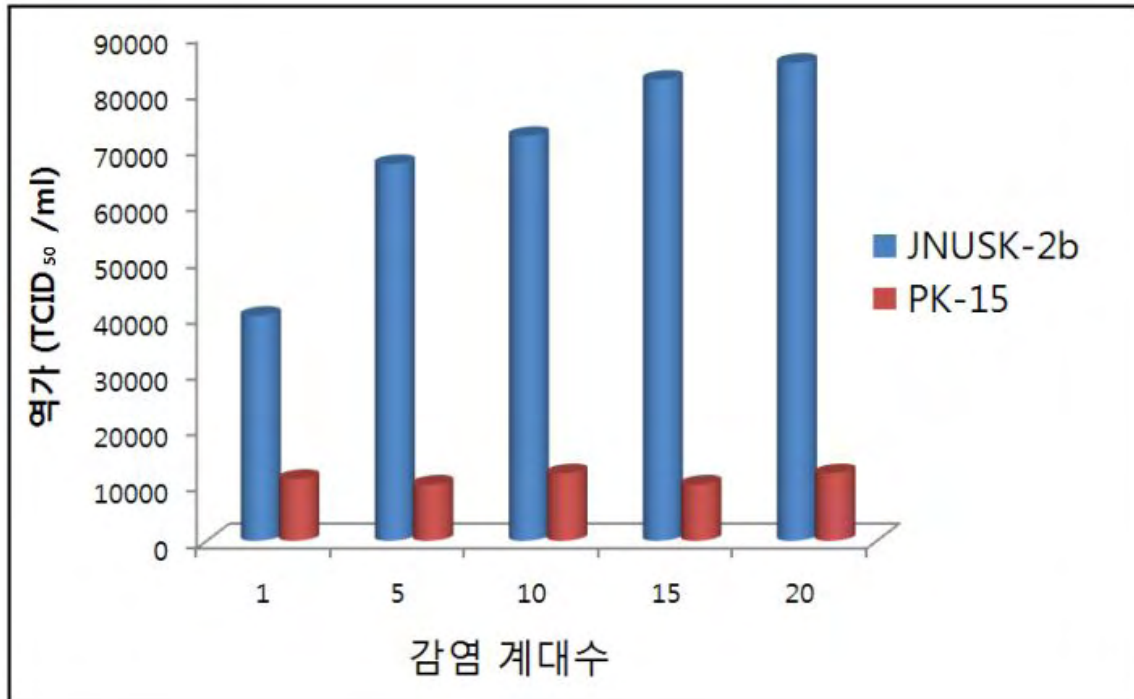


그림 7. 돼지 쉰코바이러스2형의 JNUSK-2b와 PK-15 세포주에서 adaptation 결과.

3. 돼지 쉰코바이러스 2형 생산을 위한 최적의 배양조건 탐색

가. 바이러스배양 최적화를 위한 돼지 쉰코바이러스 2형의 특성조사

돼지 쉰코바이러스 2형은 다른 돼지발병 바이러스에 비하여 그 연구가 미비한 실정이다. 따라서 돼지 쉰코바이러스 2형에 대한 기본적인 정보가 많이 부족하기 때문에 바이러스의 배양 최적화 실험에 앞서 기초적인 실험을 우선적으로 수행하였다. 안정적이고 성공적인 바이러스 배양을 위하여 최적의 multiplicity of infection(MOI)을 선정하여야 되는데 바이러스는 일반적으로 환경에 노출이 되면 온도, 노출 시간, pH 등에 의하여 역가가 변하게 된다. JNUSK-2b 세포주를 이용하여 돼지 쉰코바이러스 2형의 대량배양 조건을 탐색하기 위하여 돼지 쉰코바이러스 2형의 보관 온도에 따른 역가 변화를 실험하였다.

표 1. -80℃에 보관한 돼지 쉰코바이러스 2형 seed의 역가변화

	20110714	20110820	20110918	20111108	20111214	20120109
최초 제작 역가	4×10^4 TCID ₅₀ /ml	6×10^4 TCID ₅₀ /ml	2.4×10^4 TCID ₅₀ /ml	1.2×10^5 TCID ₅₀ /ml	8×10^4 TCID ₅₀ /ml	2.6×10^4 TCID ₅₀ /ml
보관에 따른 역가 (보관 개월 수)	2×10^3 (7개월)	1.8×10^3 (6개월)	8×10^3 (5개월)	3×10^4 (3개월)	4×10^4 (2개월)	2.2×10^4 (1개월 미만)
역가의 차이 (감소율%)	95%	97%	67%	75%	50%	16%

최초에 제작한 바이러스 seed의 역가가 보관 시간에 따라서 많은 감소를 보이는 것을 확인할 수 있었다(표 1). 이처럼 냉동 보관에 따른 역가의 변화가 크다면 seed의 안정적인 보관을 위하여 액체질소 속에 보관을 한다거나 바이러스를 보관하기 위한 DMEM 배지 이외의 완충 용액을 탐색해 보아야 할 것으로 생각된다.

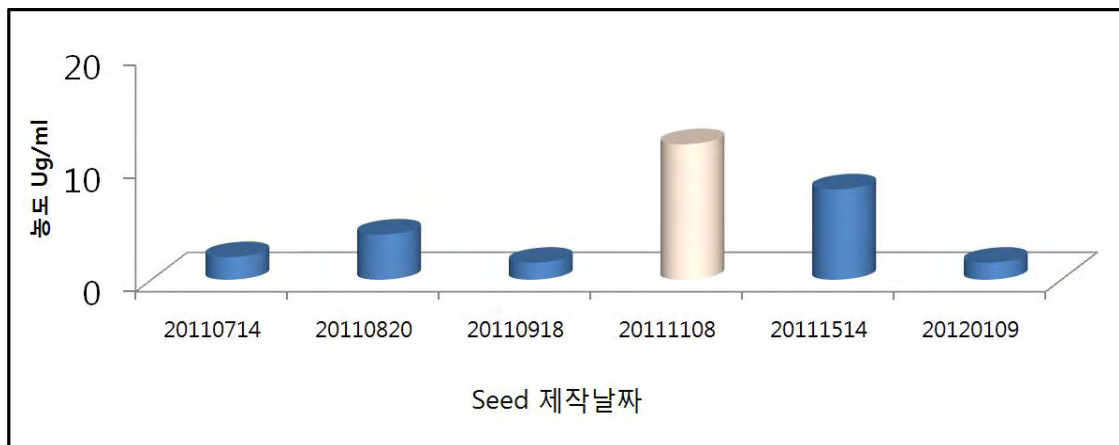


그림 8. -80°C에 보관한 돼지 썩코바이러스 2형 seed의 전체의 바이러스 농도.

제작된 바이러스 seed의 전체 바이러스 농도(그림 8)와 보관 후 바이러스의 역가 변화(표 1)를 비교하여 보면 -80°C에서 장기간의 보관은 바이러스 항원자체의 소실이 아닌 감염력이 있는 바이러스가 줄어들고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 바이러스 증식용 seed가 아닌 항원제 작용인 경우에는 -80°C에 보관을 하여도 무방하다고 판단이 된다.

표 2. 실험실적 환경 노출에 의한 돼지 썬코바이러스 2형의 역가 감소량

	1시간	4시간	8시간	12시간	24시간	48시간	5일
4°C	5% 미만	5% 미만	5% 미만	5% 미만	5% 미만	10% 이내	30% 이상
실내 (24°C)	5% 미만	5% 미만	5% 미만	10% 이내	10% 이내	20% 이내	80% 이상
Incubator	5% 미만	5% 미만	5% 미만	5% 미만	5% 미만	15% 이내	60% 이상

실험실에서 바이러스를 취급할 때 주로 사용되어지는 온도인 4°C, 실내용도(기준은 25°C) 그리고 인큐베이터(36°C)에서의 시간에 따른 돼지 썬코바이러스 2형의 역가 감소량을 알아보았다. 표 2에서 보는 것과 같이 4°C와 36°C에서 24시간 까지 변화가 미미 하였으며, 실내에서는 8시간 동안 역가가 잘 보존되는 것을 확인할 수 있었다.

나. 돼지 썬코바이러스 2형의 MOI 선정

JNUSK 세포를 20시간 배양하여 약 50%, 70%, 90%, 100%의 세포단층이 형성되도록 한 후 돼지 썬코바이러스 2형의 seed 바이러스 (1.6×10^4 TCID₅₀/ml)를 FBS가 2%로 첨가된 DMEM배지로 희석하여 접종량을 달리하여 MOI 0.5, 1, 2, 4, 8 별로 접종하였다. virus seed 접종 4시간 후에 접종액을 제거하고 PBS로 2번 세척 후(2분간 정치) 각각 2% FBS가 첨가된 DMEM배지를 첨가하여 72시간 동안 배양 후 virus 역가를 측정하였다.

표 3. 바이러스 접종량과 세포의 조밀도 그리고 배양시간에 따른 바이러스 수확량의 비교

접종 MOI	바이러스 수확량 (TCID ₅₀ /ml)			
	JNUSK 50% seat	JNUSK 70% seat	JNUSK 90% seat	JNUSK 100% seat
0.5	1.8×10^4	1.6×10^4	2.0×10^4	2.2×10^4
1	2.8×10^4	4.0×10^4	4.5×10^4	5.2×10^4
2	4.6×10^4	6.0×10^4	6.2×10^4	6.5×10^4
4	7.0×10^4	1.6×10^5	3.2×10^5	2.8×10^5
8	9.5×10^4	1.1×10^5	1.4×10^5	1.4×10^5

다. 대량생산 배양조건 탐색

JNUSK 세포주를 이용하여 돼지 쉼코바이러스 2형을 대량생산하기 위한 조건을 탐색하였다. 바이러스를 대량배양하기 위하여 바이러스 접종 전 JNUSK 세포주의 배양 시간 및 세포단층의 비율과 각각의 세포단층의 비율에서의 바이러스 접종 MOI를 측정하였다. 이를 바탕으로 최적의 바이러스 수거 타이밍을 비교하여 보았다. JNUSK 세포주를 계대배양 후 20시간 후에 70%와 90%의 세포단층이 형성되도록 배양을 한 후 MOI 4로 돼지 쉼코바이러스 2형을 접종하였다. 바이러스 접종 후 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간 그리고 120 시간 후에 배지를 수거하여 바이러스 역가를 측정하였다.

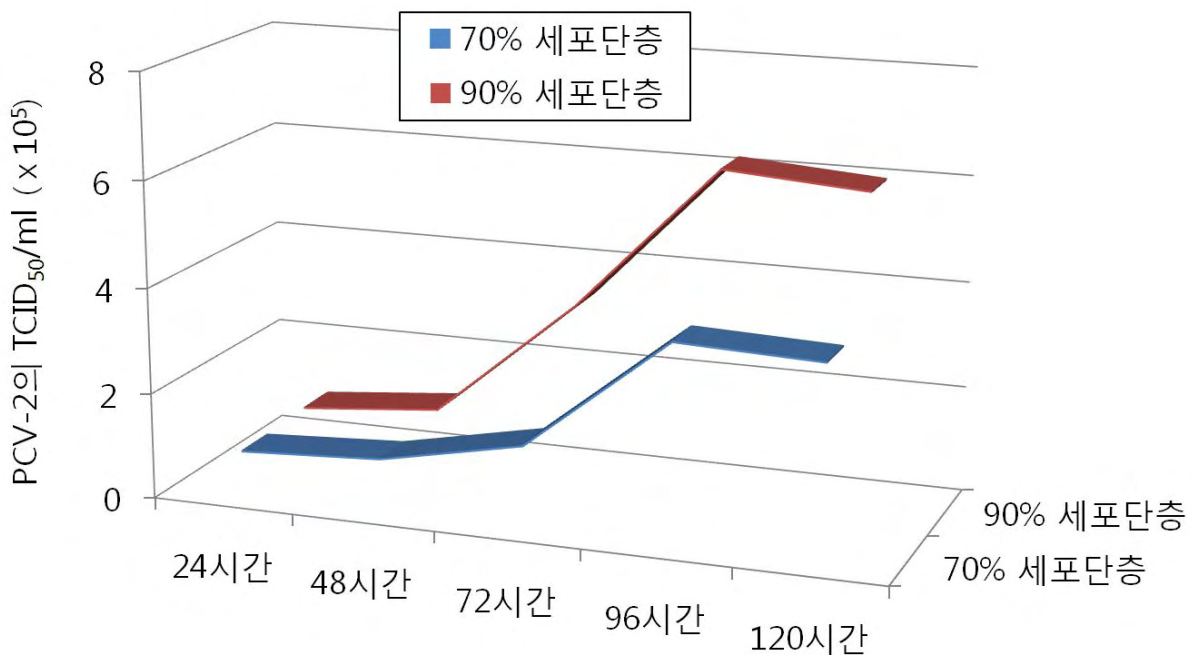


그림 9. JNUSK 세포주를 70%와 90%의 세포단층이 형성되도록 배양을 한 후 돼지 쉼코바이러스 2형을 MOI 4로 접종을 하여 시간에 따른 바이러스 수율을 측정된 값.

바이러스의 수율을 측정결과 접종 후 96시간이 가장 높은 역가를 보였으며 96시간 이후에는 바이러스의 역가가 일정하게 유지됨을 알 수 있었다. 따라서 바이러스를 대량생산하기 위해서는 신선한 seed를 사용하여 JNUSK 세포가 계대 후 20시간 후 90%의 단층이 형성되도록 배양 한 후 배양 18~24시간 사이에 MOI 4로 접종을 하여 96시간동안 배양을 한 후 배지를 수거하는 것이 가장 효율적이라고 사료가 되어진다.

제 5 장 백신 품목허가를 위한 야외임상 실험

제 1 절 서 설

실제 농장에서의 야외임상 실험을 통하여 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신 및 돼지 썬코바이러스 2형과 흉막폐렴균 복합백신의 효능을 평가하였다. 현재 상품화되어 판매되고 있는 수입백신들의 경우 다양한 실험 등을 통해 효능이 입증되어 왔다. 특히 실제 농장에서 바이러스 감소 효과나 항체 형성 능력, 그리고 증체량의 증가 등을 중점적으로 측정하여 백신의 효능을 평가하고 있다. 실험실 내 공격접종 실험의 경우에는 백신 접종 후 돼지 썬코바이러스 2형만을 접종하여 단일 바이러스에 대한 면역 반응 및 방어 효과를 측정하기 때문에 그 결과를 적인 감염이 유발될 수 있는 실제 농장에 그대로 적용하기는 어렵다. 또한 농장에서는 백신을 접종함으로써 얻을 수 있는 경제적 이익이 가장 중요한 지표가 될 수 있기 때문에 장기간 증체량을 비교할 수 있는 야외 임상 실험이 필수적이다.

백신의 안전성 검사를 통해서 백신 접종 후 접종 부위의 과민 반응이나 부작용으로 인한 임상 증상 등을 평가하였으며, 개발된 백신의 임상학적, 바이러스학적, 면역학적, 병리학적 효능이 실제 농장에서도 적용될 수 있는지 평가하였다. 이전의 수입 백신에 대한 야외 임상 실험들의 평가 항목을 보면 보편적으로 혈중 바이러스 감소 및 항체가 측정이 대부분으로써 적으로 나타나는 백신 면역 반응에 대한 효과를 평가하기에는 미흡할 수 있다. 따라서 본 연구과제에서는 야외 실험에 들어가기 전에 개발 백신의 다양한 면역 반응 측정 기법을 확립하였으며, 개발 백신의 면역 반응 수준을 수입 백신과 비교하여 확인하였다. 이러한 효능 평가 방법을 통해 야외 임상 실험에서는 중화항체 생성 능력 및 세포 매개성 면역 반응, 실제 조직을 통한 바이러스 감소량 등을 확인하여 백신에 의한 방어 효과가 어떻게 적으로 작용하는지 평가하였다.

돼지 썬코바이러스 2형과 흉막폐렴균 복합 백신은 현재 상품화되어 있는 제품이 없기 때문에 실제 농장 실험에서 효능이 입증된다면 높은 경쟁력을 가질 수 있다. 복합백신의 제조가 어려운 이유는 각각의 단일 백신이 함께 투여될 때 상호 면역반응에 영향을 줄 수 있기 때문이다. 따라서 복합백신의 제조에서 가장 중요한 부분은 각각의 항원을 최적의 비율로 복합하여 각 단일 백신이 나타낼 수 있는 최대한의 효능을 유도하는 것이다. 본 돼지 썬코-흉막 복합백신의 야외임상 실험에서는 3개의 농장을 선정하고 개발된 복합백신을 5주령에 접종하여 우선 백신 접종에 대한 부작용을 평가하였으며, 18주령까지 추적하면서 돼지 썬코바이러스 2형 및 흉막폐렴균 각각에 대한 체액성 및 세포성 면역반응을 측정하였고, 또한 임상 증상 및 증체율, 장기 및 조직에서의 병변 억제 정도 등을 평가하여 복합백신이 두 질병 모두를 유의성 있게 예방할 수 있는지 확인하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 돼지 썬코바이러스 단일백신의 야외 임상 실험

가. 임상 시험 농장 선정

병성감정 기관으로부터 과거 또는 현재 돼지 썬코바이러스 2형 감염 진단을 받았으며, 이유후 전신성 소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS)로 인해 피해를 입었거나, 피해를 입고 있는 농장을 대상으로 임상시험을 진행한다. 제 1단계에서 농장 선정을 위해 농가의 폐사기록 및 생산기록을 바탕으로 피해 정도를 추정한다. 제 2단계에서 돼지 성장 단계별 임상증상 발현율과 증체율을 확인한다. 제 3단계에서 임상 증상을 나타내는 돼지를 부검하여 각 조직을 채취하여, 조직병리 및 바이러스 유전자 확인 실험을 한다. 그리고 농장 전체 일령에 대한 혈청 검사를 실시하여 일령별 (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140일령) 혈중 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 항체 출현율을 확인한다. 이상의 3단계 요건을 충족한 농장을 임상 시험농장으로 선정 후 각 시험에 필요한 개체를 선발한다.

나. 공시돈 선정

(1) 안전성 확인 시험

각 시험 농장별로 사육중인 건강한 자돈 각 20두를 시험군으로 선정하고, 동일 사육 공간의 시험군을 제외한 자돈을 대조군으로 정한다.

(2) 항체 형성능 및 임상 증상 발현율

각 시험 농장별로 사육중인 건강한 자돈(1주령) 30두를 시험군으로 선정하고 동일 사육공간에서 사육중인 건강한 자돈(1주령) 30두를 대조군으로 선정하여 이표를 부착한다. (채혈 및 임상 증상 관찰)

다. 시험 백신 접종

(1) 안전성 확인 시험

각 농장별로 기준 용량의 2배에 해당하는 2 ml를 이근부에 1회 접종한다.

(2) 항체 형성능 및 임상 증상 발현율

1주령 시험군 자돈의 후지 근육에 1 ml(접종 규정량)을 접종하고, 접종 2주 후에 3주령 자돈의 이근부에 동일 용량을 접종한다.

라. 관찰 및 시료 채취

(1) 안전성 확인 시험

접종 전 공시돈의 건강상태와 직장체온을 측정한다. 접종 후 1~2시간 이내 쇼크, 발열, 발적 유무를 관찰하고, 10일 후 실험군의 식욕변화, 유산 발생 유무, 접종 부위의 화농소, 발열반응, 종창 유무를 관찰하고 기록한다.

시험 기간 중 폐사한 목적 동물에 대해 부검을 실시하고, 각 장기를 채취하여 조직학적 검사를 실시한다.

(2) 항체 형성능 및 임상 증상 발현율

1) 혈청

자돈의 시험군과 대조군에서 1주령(1차 접종 전), 3주령(2차 접종 전), 5주령(2차 접종 후 2주 경과), 7주령(2차 접종 후 4주 경과), 10주령(2차 접종 후 7주 경과), 16주령(2차 접종 후 13주 경과)에 경정맥을 통하여 5 ml의 혈액을 취하여 혈청을 분리한다.

2) 임상 증상

공시된 자돈을 16주령(112일령 ; 2차 백신 접종 후 13주)까지 매주 1회 임상증상을 관찰한다. 임상 증상이 관찰되는 경우, 증상의 정도에 따라 표1의 기준에 의거 개체수를 임상 점수를 부여한다.

표1. 임상 점수

임상 점수	임상 증상	비고
0	건강하다.	
1	피모가 거칠다. 창백하다.	
2	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다.	비정상적인 체형 호흡기 증상
4	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다. 등뼈가 돌출되어 수척하다.	심한 황달 호흡기 증상
6	상기 4의 증상을 보이다 폐사한다.	호흡기 증상을 동반한 폐사

3) 생산성 지수

가) 공시돈의 1주령(1차 접종 전), 3주령(2차 접종 전), 5주령(2차 접종 후 2주 경과), 7주령(2차 접종 후 4주 경과), 10주령(2차 접종 후 7주 경과), 16주령(2차 접종 후 13주 경과)의 체중을 측정한다.

시험군과 대조군에 대해 각 시점의 평균체중 및 편차를 비교한다.

나) 구간별 증체 평균을 비교한다.

다) 실험개시 후 시험군과 대조군의 폐사 두수를 기록하여 시기별 폐사 두수를 기록한다.

라) 실험기간 중 발생하는 폐사돈에 대해 부검을 실시하고, 폐사 원인 검사 후 결과를 기록한다.

마) 시험군과 대조군간의 사료섭취량을 기록한다.

(3) 서혜임과절 채취

시험 농장 3개에서 시험군과 대조군 각 5두씩을 시험 종료시기인 16주령에서 안락사 시킨 후 서혜임과절을 채취하여 면역조직화학법을 이용하여 돼지 썬코바이러스 2형의 존재 유무를 비교 하였다. 면역조직화학법의 실시가 종료된 서혜임과절 조직은 현미경상에서 임의로 0.25 mm^2 의 면적을 3곳 정하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 세어서 통계 처리 하여 시험군과 대조군 그룹간의 양성감염 세포 수의 차이를 비교한다.

마. 조직내 돼지 썬코바이러스 2형 항원 검출법

(1) 공시동물

시험 농장 3개에서 시험군과 대조군 각 5두씩을 시험 종료시기인 16주령에서 안락사 시킨 후 서혜임과절을 채취하여 면역조직화학법(immunohistochemistry)을 이용하여 돼지 썬코바이러스 2형의 존재 유무를 비교하였다.

(2) 면역조직화학법

면역염색법은 이미 많은 문헌에서 사용한 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 다클론성 항체 (polyclonal antibody)를 사용하였다. 면역조직화학법의 실시 방법도 이미 발표되어 있는 방법 대로 시행하였다. 슬라이드 상의 조직 절편을 자일렌으로 탈파라핀 한 후, 100 %, 70 %, 50 % 알코올로 점진적으로 함수 시킨다. 3차 증류수 1분, PBTS(0.1% Tween 20 이 포함된 PBS) 5분 세척 후, 항원 노출을 위해 1:200으로 희석한 proteinase K (Promega)를 37°C에서 25분간 처리한다. 내인성 alkaline phosphatase 제거를 위해 20% glacial acetic acid를 4°C에서 2분간 처리한 후 비특이 반응 억제를 위해 5% normal goat serum 을 15분간 실온에서 처리한다. 슬라이드 상의 goat serum을 버리고 PBTS에 1:200으로 희석된 polyclonal rabbit anti-PCV2 1차 항체를 조직이 덮일 정도로 분주하고, 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 슬라이드를 PBTS로 세척 후, alkaline phosphatase가 표지된 goat anti-rabbit(Dako) 2차 항체를 PBTS에 1:250으로 희석하여 분주하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응 후 PBTS로 세척하고, Fast red tablet(Roche)으로 발색하여 돼지 썬코바이러스 2형 항원을 확인한다. 발색이 충분히 나타나면 3차 증류수로 세척하여 발색을 끝내고, Mayer's Hematoxylin으로 배경을 염색한 후, crystal mount를 이용하여 조직을 덮어 현미경으로 관찰한다.

바. 돼지 썬코바이러스 2형 항체 역가 측정법

(1) 검사 혈청

각 시기별로 얻은 혈청 샘플을 처리하여 항체 출현과 항체 출현 시기와 항체 역가를 ELISA Kit을 이용해 검사하고, 시험군과 대조군의 차이를 비교한다.

(2) ELISA법

- 1) PCV2 ORF2 흡착 플레이트를 실온에서 10~20분간 방치하였다.
- 2) 혈청 희석용 플레이트에 400배 희석한 양성대조혈청, 음성대조혈청 및 가검물 혈청을 각각 100 μ l씩 PCV2 Antigen coated plate에 분주하였다.
- 3) 실온(22~27°C)에서 30분간 반응시켰다.
- 4) 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 1x 세척액을 300 μ l씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척하였다.
- 5) HRPO anti-swine IgG conjugate를 각 well에 100 μ l씩 분주하고 실온에서 30분 동안 반응하였다.
- 6) "4)"번과 동일한 방법으로 3회 세척하였다.
- 7) 발색제를 각 well에 100 μ l씩 분주하고 15분간 반응시켰다.
- 8) 반응이 끝나면 정지액을 각 well에 50 μ l씩 분주하여 반응을 정지시키고 ELISA reader에서 450 nm의 흡광도로 측정하였다.
- 9) Kit와함께 제공되는 양성대조 혈청은 O.D, 수치가 0.7이상이었으며, 음성대조 혈청은 0.3이하로 결과 판정 조건을 모두 충족하였다.
- 10) 결과는 SP(= 가검혈청 평균 흡광도/ 양성대조 평균 흡광도)값 0.4이상일 경우 양성으로 판정하며, 본 실험에서는 SP값의 변화 추이를 비교하였다.

사. 혈액(EDTA)에서 돼지 쉐코바이러스 2형 검출법

(1) 검사 혈청

각 시기별로 얻은 혈액(EDTA) 샘플을 처리하여 혈액 성분 중 항원 출현 유무를 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)을 통하여 검사한 후, 시험군과 대조군의 임상 증상 발현 시기와 정도를 비교한다.

(2) 샘플 처리

혈액샘플 100 μ l에 1 ml의 DNAzol을 첨가한 후, 피펫을 이용해 세포를 파괴시킨다. 이때 형성된 pellet을 0.9% NaCl로 세척한 후, 4°C의 hypotonic 용액(20 mM Tris HCl, pH8.0, 10 mM EDTA)에 반응시킨다. 4000 rpm에 10분간 원심 처리하여 상층액을 제거한 후 1 ml DNAzol을 첨가하여 복합한 후, 10,000 rpm에서 10분간 원심 처리한다. 상층액을 새로운 튜브로 옮긴 후 100% cold EtOH 1 ml을 첨가하고 tapping한 후, 6500 rpm에서 2분간 원심 처리한다. 이 과정을 2회 반복한다.

상층액을 제거하고 튜브를 완전히 건조시킨 후 8 mM NaOH용액을 200 μ l 첨가하여 tapping한다. 이 튜브를 5분간 끓는 물에 넣은 후, 다시 5분간 얼음에 넣는다.

위의 과정으로 생성된 DNA product 5 μ l, D.W. 43 μ l, Primer F; 1 μ l R; 1 μ l (Total 50 μ l)을 premix tube에 복합한 후, PCR기계(Thermocycler)에 넣어 반응시킨다.

(3) PCR primer 구성 및 조건

PCR 진단에 이용되는 primer는 아래 표와 같다. PCR condition은 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분간 반응 사이클을 30회 반복하고, 최종 72°C에서 5분간 반응시킨다.

표 2. 썬코바이러스 2형 진단용 프라이머(primer)

	Name	Sequence	Coding site	Product size
F	PPCKF2	5'-CATGGTTACACGGATATTG-3'	1085-1093	501 bp
R	PPCKR2	5'-CGCACCTTCGGATATACTG - 3'	1467-1585	

(4) 결과 확인

PCR 반응이 완료된 후, 각 반응액 10 μ l씩 취하여 1.5% 아가로스젤에 전기영동을 실시한다. 해당 젤은 ethidium bromide용액(0.5 μ l/ml in DW)으로 염색하여 자외선 하에서 특이 밴드 (501 bp) 유무를 관찰하여 판독한다.

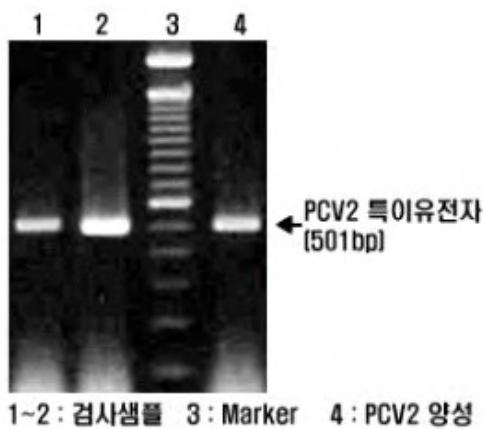


그림 1. PCV 유전자 검출(양성)

2. 개발된 돼지 썬코바이러스 단일백신의 면역학적 반응 연구

가. 시험 배경 및 목적

돼지 썬코바이러스 2형 (porcine circovirus 2; PCV2)에 의하여 유발되는 이유후 전신성 소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS)은 1998년 국내에서 정식으로 발병이 확인된 이래로 천문학적인 경제적 피해를 유발하였다. 현재까지 세계적으로 5가지 돼지 썬코바이러스 2형 백신이 상용화되어 있으며 여러 실험을 통하여 효과가 입증되고

있다. 백신 효과는 크게 두 가지로 분류할 수 있는데 먼저 항체 생성 능력을 통해 체액성 면역 효과를 확인할 수 있으며, 면역 세포에 의한 세포 매개성 면역 효과를 측정할 수 있다. 이 중 항체 생성 능력과 관련된 체액성 면역 효과는 많은 실험을 통하여 입증되어 왔지만, 돼지 쉰코바이러스 2형 백신의 세포 매개성 면역 효과에 대한 연구보고는 많지 않다. 따라서 본 실험에서는 개발된 돼지 쉰코바이러스 2형 단일백신의 항체 생성 능력, 뿐만 아니라 세포 매개성 면역 능력을 함께 확인하고자 한다.

나. 실험 방법

(1) 실험 디자인

백신의 면역학적 반응 측정을 위하여 2개 그룹(백신군, 대조군)으로 실험 디자인을 설정하여 시행하였다. 백신군은 개발된 돼지 쉰코바이러스 2형 단일 백신을 접종하며 대조군은 백신 접종 대신 PBS를 접종하는 돈군으로 구분한다(표 1).

표 1. 실험디자인

그룹	실험두수	백신 접종		접종 방법
		1차(1주령)	2차(3주령)	
백신군	5	돼지 쉰코바이러스 2형 단일백신		이근부 2 ml
대조군	5	PBS		이근부 2 ml

(2) 공시돈 선정 및 백신 접종

돼지 쉰코바이러스 2형에 대한 항체 음성인 건강한 3주령 자돈 10두를 공시한 후 5두는 백신군으로 5두는 대조군으로 구분한다. 백신군의 자돈에는 1주령과 3주령에 시험백신 2.0 ml를 이근부에 접종한다.

(3) 사육 환경

공시돈은 23~24°C, 습도 60%가 유지되는 사육실에서 사육한다. 사육 기간 동안 음수는 무제한으로 공급한다.

(4) 시료 채취

1주령(1차 백신 접종 전), 3주령(2차 백신 접종 전), 5주령(2차 백신 접종 2주 후), 7주령(2차 백신 접종 4주 후), 9주령(2차 백신 접종 6주 후)에 채혈을 실시하여 즉시 말초혈액 단핵구(peripheral blood monocyte) 분리하고 혈청은 분리 후 실험시점까지 4°C에 보관한다.

(5) 돼지 쉰코바이러스 2형 항체 혈청검사

1) ELISA IgG 검사

채취한 혈액을 이용하여 돼지 쉰코바이러스 2형에 대한 특이적인 항체는 상업화된 PCV2 ELISA IgG kit (Ingezim Circovirus IgG, Ingenasa, Madrid, Spain)를 이용하여 돼지 쉰코바이러스 2형에 대한 항체를 측정한다. 돼지 쉰코바이러스 2형의 ORF2 흡착 플레이트를 실온에서 10~20분간 방치하였다. 혈청 희석용 플레이트에 400배 희석한 양성대조혈청, 음성대조혈청 및 가검물 혈청을 각각 100 µl씩 돼지 쉰코바이러스 2형 항원이 코팅되어 있는 plate에 분주하고 실온(22~27°C)에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 1 x 세척액을 300 µl씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척하였다. 세척후 HRPO anti-swine IgG conjugate를 각 well에 100 µl씩 분주하고 실온에서 30분 동안 반응하였다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 1x 세척액을 300µl씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척하였다. 그 후 발색제를 각 well에 100 µl씩 분주하고 15분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 정지액을 각 well에 50 µl씩 분주하여 반응을 정지시키고 ELISA reader에서 450 nm의 흡광도로 측정하였다. 키트와 함께 제공되는 양성대조 혈청은 O.D. 수치가 0.7 이상이었으며, 음성대조 혈청은 0.3이하로 결과 판정 조건을 모두 충족하였다. 결과는 S/P(= 가검혈청 평균 흡광도/ 양성대조 평균 흡광도)값 0.4이상일 경우 양성으로 판정하며, 본 실험에서는 S/P값의 변화 추이를 비교하였다.

2) 중화항체 검사

돼지 쉰코바이러스 2형이 PK-15 세포에 감염되는 것을 억제하는 혈청 내 중화항체 역가를 측정한다. 검사할 혈청 50 ul를 96 well plate에 1:2부터 1:2¹²까지 희석하고 음성 대조군 well에는 50 µl의 PBS를 분주한다. 그후 4 x 10³ TCID₅₀/ml의 바이러스가 포함된 5% DMEM 배지 50 µl를 각 well에 분주하고 37°C에서 1시간 배양 후, 2 X 10⁴ PK 15 cell을 첨가한다. 그 다음에는 CO₂ 배양기에서 48~72시간 배양하고 PBS 100 µl로 세척한다. 세척한 후 냉동 보관된 100% EtOH를 50 µl씩 분주하여 -20°C에서 30분간 고정한다. PBS와 1:200으로 희석된 rabbit anti-PCV2 항체를 50µl씩 분주하고 37°C에서 1시간 배양하고 PBS-Tween(0.1%)으로 세척한다. 세척한 후 peroxidase-labelled goat anti-rabbit(1:500) 2차 항체를 50 µl씩 분주하고 37°C에서 1시간 배양한다. 그 후 다시 PBS-Tween(0.1%)로 세척한다. 세척한 후에는 AEC(amino-ethyl-carbazole)을 첨가하여 상온에서 15~20분간 반응

하고 발색을 확인한다. 각 세포에 항원이 확인되기 시작하는 희석 배율을 중화항체 역가로 측정한다.

(6) 세포성 면역학적 반응 검사

1) 말초혈액 단핵구(Peripheral blood monocyte) 분리

EDTA tube에 채혈한 혈액을 1:1로 Hank's balanced salt solution(HBSS)에 희석한다. 희석한 혈액 4 ml 을 15 ml tube에 준비한 Ficoll-Paque 3 ml 위에 분주하여 아래층은 Ficoll 위층은 혈액으로 나뉘게 한다. 18-20°C에서 400 g의 속도로 30-40분간 원심 분리하여 층을 분리한다. 가장 위층의 혈장과 중간층의 Ficoll층 사이에 분리되어 부유된 PBMC를 피펫을 이용하여 채취한다. 채취된 말초 혈액 단핵구를 HBSS로 세척하여 300 g에서 10분간 원심한 후 세포성 면역 반응 실험에 이용한다.

2) 유세포 분석(Flow cytometry)

분리된 말초혈액 단핵구(PBMC)의 면역학적 표현형을 확인하기 위하여 FACS(fluorescence-activated cell sorting)을 이용하여 분석한다. 분리된 말초혈액 단핵구를 10^6 cell/ml 의 농도로 유세포 분석 배지로 희석한다. 희석된 세포를 500 μ l씩 15 ml tube에 분주한다. 말초혈액 단핵구 중에서 전체 림프구 비율과 helper T cell 비율을 확인하기 위해 분주된 세포에 anti-swine CD3(R-PE)와 anti-swine CD4(FITC) 항체 1.5 μ l 씩 분주하여 각 세포와 반응 시킨다. 30분간 4°C에서 반응시킨 후 유세포 분석 배지로 세척하여 300 g에 10분간 원심 분리한다. 상층액을 버리고 펠렛을 1% 포르말린이 함유된 유세포 분석 배지 1 ml로 부유시켜 FACS tube에 분주하고, 분석 전까지 4°C에 보관한다.

3) IFN- γ 분비세포 측정

분리된 말초혈액 단핵구를 돼지 쉼코바이러스 2형 항원으로 자극하여 IFN- γ 분비세포의 수를 확인한다. 상용화 되어 있는 ELISPOT (Enzyme linked immunospot) 분석 키트(MABTECH, Mariemont, OH, USA)에 IFN- γ 단클론 항체를 8.3 μ g/ml 분주하여 24시간 부착시킨다. 분리된 PBMC를 10% FBS를 포함한 RPMI 배지에 1×10^7 cell/ml 의 농도로 희석한다. 준비된 ELISPOT 키트에 PBMC가 1×10^6 cell/ml 포함된 100 μ l 씩 분주하고 MOI가 0.01 인 돼지 쉼코바이러스 2형 항원으로 자극하여 5% CO₂, 37°C에서 20시간 반응시킨다. 각각의 well을 PBS로 세척 후, biotin이 표지된 anti-IFN- γ 1차 항체를 50 μ l 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 각각의 well을 PBTS로 세척 후, streptavidin-HRP가 표지된 2차 항체를 50 μ l 씩 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 마지막으로 TMB 용액을 100 μ l 씩 분주하여 발색시키고 ELISPOT Reader를 이용하여 spot의 개수를 산정한다.

4) 지연형 과민반응 검사 (delayed type hypersensitivity test)

백신 접종 2주 후가 경과되는 시점에서 서혜부 피내에 돼지 쉼코바이러스 2형 항원을 접종하여 면역반응을 확인한다. 먼저 300 μ g/ml 농도의 돼지 쉼코바이러스 2형 항원을 준비한다. 백신군과 대조군의 서혜부 피내에 준비된 돼지 쉼코바이러스 2형 항원을 100 μ l 씩 주입한다.

각 군의 1두에는 phytohemagglutinin (PHA)를 20 µg/ml 의 농도로 100 µl 주입하여 양성 대조군으로 사용하고, 생리식염수(saline) 0.1 ml를 주입하여 음성 대조군으로 사용한다. 항원 주입 24-36시간 후에 피부 발적, 두께 변화 등을 측정하여 비교한다.

3. 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신과 수입 썬코바이러스 단일백신과의 비교 효능 검사

가. 시험 배경 및 목적

돼지 썬코바이러스 2형에 의하여 유발되는 이유후 전신성 소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting disease; PMWS)은 1998년 국내에서 정식으로 발병이 확인된 이래로 천문학적인 경제적 피해를 유발하였다. 현재 많은 기업에서 돼지 썬코바이러스 2형 감염을 예방하고자 백신을 개발하여 판매하고 있다. 이중 수입백신을 하나 선정하여 과제에서 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신의 효능을 수입 백신과 비교해 보고자 한다.

나. 실험실내 공격 접종 시험

(1) 실험 디자인

두 가지 돼지 썬코바이러스 2형 백신의 효능을 비교하고자 3개 그룹(백신군1, 백신군2, 대조군)으로 실험 디자인을 설정하여 시행하였다. 백신군1은 본 과제에서 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신 1 ml을 1주령과 3주령에 각각 근육 접종하였고, 백신군2는 자돈용으로 상품화 되어 있는 수입백신 1 ml을 3주령에 1회 근육 접종하였다. 백신군은 백신 접종 3주 후 돼지 썬코바이러스 2형으로 공격 접종하였고, 대조군은 백신 접종 없이 돼지 썬코바이러스 2형만 공격접종 하는 돈군으로 구분한다. (표 1)

표 1. 실험디자인

그룹	실험두수	백신접종		공격접종 (7주령, 2차 백신 후 4주)	부검 실시 (10주령)
		1차 접종 (1주령)	2차 접종 (3주령)		
백신군1	10	1.0 ml	1.0 ml	PCV2b	O
백신군2	10	X	1.0 ml	PCV2b	O
대조군	5	X	X	PCV2b	O

(2) 공시돈 선정 및 백신 접종

돼지 썬코바이러스 2형과 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 대한 항체 음성인 건강한 3주령 자돈 25두를 공시한 후 10두는 백신군1로 10두는 백신군2, 5두는 대조군으로 구분한다.

백신군1의 자돈에는 1주령과 3주령에 시험백신 1.0 ml를 백신군2의 자돈에는 3주령에 1.0 ml를 이근부에 접종한다.

(3) 사육 환경

공시돈은 23~24°C, 습도 60%가 유지되는 사육실에서 사육한다. 사육 기간 동안 음수는 무제한으로 공급한다.

(4) 공격 접종용 바이러스 및 접종 방법

1) 돼지 썬코바이러스 2형

돼지에게 접종실험에 사용할 돼지 썬코바이러스 2형은 서울대학교 수의과대학 병리학실에 의뢰된 소모성 증후군의 증상을 나타내는 이유자돈의 임파절에서 분리한 돼지 썬코바이러스 2형 (strain SNUVR000463; b형타입)을 사용하였다. 이 바이러스를 자돈에 접종하면 전형적인 소모성 증후군이 유발되는 것을 확인하였다.

2) 바이러스 접종

접종을 위하여 돼지 썬코바이러스 2형은 $1 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀/ ml으로 준비하고, 이들 바이러스는 3주령에 백신을 접종한 후 4주가 경과한 7주령에서 접종한다. 미리 준비된 양의 돼지 썬코바이러스 2형을 2 ml 비강에 접종한다. 바이러스 공격 접종은 백신군과 대조군 모두에게 시행한다.

3) 관찰 및 시료 채취

① 채혈

1주령(1차 백신 접종 전), 3주령(2차 백신 접종 전), 7주령(2차 백신 접종 4주후; 공격접종 시기), 8주령(공격 접종 1주후), 9주령(공격 접종 2주후), 10주령(부검 전)에 채혈을 실시하여 혈청을 분리한 후 실험시점까지 4°C에 보관한다.

② 증체량

1주령(1차 백신 접종 전), 3주령(2차 백신 접종 전), 7주령(2차 백신 접종 4주후; 공격접종 시기), 8주령(공격 접종 1주후), 9주령(공격 접종 2주후), 10주령(부검 전)에 공시돈의 체중을 측정하여 주당 증체량을 비교한다.

③ 임상 증상

공시돈의 임상 증상은 표3의 임상 점수 기준에 따라 동일하게 매주 1회씩 관찰하고, 공격 접종 후 개체에 따른 임상 증상 변화를 기록한다.

표 2. 임상점수

임상 점수	임상 증상	비고
0	건강하다.	
1	피모가 거칠다. 창백하다.	
2	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다.	비정상적인 체형 호흡기 증상
4	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다. 등뼈가 돌출되어 수척하다.	심한 황달 호흡기 증상
6	상기 4의 증상을 보이다 폐사한다.	호흡기 증상을 동반한 폐사

(4) 돼지 썬코바이러스 2형 항체 혈청검사

1) ELISA IgG 검사

채취한 혈액을 이용하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 특이적인 항체는 상업화된 PCV2 ELISA IgG kit (Ingezim Circovirus IgG, Ingenasa, Madrid, Spain)를 이용하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 항체를 측정한다. 돼지 썬코바이러스 2형의 ORF2 흡착 플레이트를 실온에서 10~20분간 방치하였다. 혈청 희석용 플레이트에 400배 희석한 양성대조혈청, 음성대조혈청 및 가검물 혈청을 각각 100 µl씩 돼지 썬코바이러스 2형 항원이 코팅되어 있는 plate에 분주하고 실온(22~27°C)에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 1x 세척액을 300 µl씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척하였다. 세척한 후 HRPO anti-swine IgG conjugate를 각 well에 100 µl씩 분주하고 실온에서 30분 동안 반응하였다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 1x 세척액을 300 µl씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척하였다. 그 후 발색제를 각 well에 100 µl씩 분주하고 15분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 정지액을 각 well에 50 µl씩 분주하여 반응을 정지시키고 ELISA reader에서 450 nm의 흡광도로 측정하였다. 키트와 함께 제공되는 양성대조 혈청은 O.D. 수치가 0.7이상이었으며, 음성대조 혈청은 0.3이하로 결과 판정 조건을 모두 충족하였다. 결과는 S/P(= 가검혈청 평균 흡광도/ 양성대조 평균 흡광도)값 0.4이상일 경우 양성으로 판정하며, 본 실험에서는 S/P값의 변화 추이를 비교하였다.

2) 중화항체 검사

돼지 썬코바이러스 2형이 PK-15 세포에 감염되는 것을 억제하는 혈청 내 중화항체 역가를 측정한다. 검사할 혈청 50µl를 96 well plate에 1:2부터 1:2¹²까지 희석하고 음성 대조군 well

에는 50 μ l의 PBS를 분주한다. 그 후 4×10^3 TCID₅₀/ ml의 바이러스가 포함된 5% DMEM 배지 50 μ l를 각 well에 분주하고 37°C에서 1시간 배양 후, 2×10^4 PK 15 cell을 첨가한다. 그 다음에는 CO₂ 배양기에서 48~72시간 배양하고 PBS 100 μ l로 세척한다. 세척한 후 냉동 보관된 100% EtOH를 50 μ l씩 분주하여 -20°C에서 30분간 고정한다. PBS와 1:200으로 희석된 rabbit anti-PCV2 항체를 50 μ l씩 분주하고 37°C에서 1시간 배양하고 PBS-Tween(0.1%)으로 세척한다. 세척한 후 peroxidase-labelled goat anti-rabbit(1:500) 2차 항체를 50 μ l씩 분주하고 37°C에서 1시간 배양한다. 그 후 다시 PBS-Tween(0.1%)로 세척한다. 세척한 후에는 AEC(amino-ethyl-carbazole)을 첨가하여 상온에서 15~20분간 반응하고 발색을 확인한다. 각 세포에 항원이 확인되기 시작하는 희석 배율을 중화항체 역가로 측정한다.

(5) 세포성 면역학적 반응 검사

1) 말초혈액 단핵구(Peripheral blood monocyte) 분리

EDTA tube에 채혈한 혈액을 1:1로 Hank's balanced salt solution(HBSS)에 희석한다. 희석한 혈액 4 ml를 15 ml tube에 준비한 Ficoll-Paque 3 ml 위에 분주하여 아래층은 Ficoll 위층은 혈액으로 나뉘게 한다. 18-20°C에서 400 g의 속도로 30-40분간 원심 분리하여 층을 분리한다. 가장 위층의 혈장과 중간층의 Ficoll층 사이에 분리되어 부유된 PBMC를 피펫을 이용하여 채취한다. 채취된 말초 혈액 단핵구를 HBSS로 세척하여 300 g에서 10분간 원심한 후 세포성 면역 반응 실험에 이용한다.

2) 유세포 분석(Flow cytometry)

분리된 말초혈액 단핵구(PBMC)의 면역학적 표현형을 확인하기 위하여 FACS(Fluorescence-activated cell sorting)을 이용하여 분석한다. 분리된 말초혈액 단핵구를 10^6 cell/ml 의 농도로 유세포 분석 배지로 희석한다. 희석된 세포를 500 μ l씩 15 ml tube에 분주한다. 말초혈액 단핵구 중에서 전체 림프구 비율과 helper T cell 비율을 확인하기 위해 분주된 세포에 anti-swine CD3 [R-PE]와 anti-swine CD4 [FITC] 항체 1.5 μ l 씩 분주하여 각 세포와 반응 시킨다. 30분간 4°C에서 반응시킨 후 유세포 분석 배지로 세척하여 300 g에 10분간 원심 분리한다. 상층액을 버리고 펠렛을 1% 포르말린이 함유된 유세포 분석 배지 1 ml로 부유시켜 FACS tube에 분주하고, 분석 전까지 4°C에 보관한다.

3) IFN- γ 분비세포 측정

분리된 말초혈액 단핵구를 돼지 썬코바이러스 2형 항원으로 자극하여 IFN- γ 분비세포의 수를 확인한다. 상용화 되어 있는 ELISPOT (Enzyme linked immunospot) 분석 키트 (MABTECH, Mariemont, OH, USA)에 IFN- γ 단클론 항체를 8.3 μ g/ml 분주하여 24시간 부착시킨다. 분리된 PBMC를 10% FBS를 포함한 RPMI 배지에 1×10^7 cell/ml 의 농도로 희석한다. 준비된 ELISPOT 키트에 PBMC 가 1×10^6 cell/ml 포함된 100 μ l 씩 분주하고 MOI가 0.01인 돼지 썬코바이러스 2형 항원으로 자극하여 5% CO₂, 37°C에서 20시간 반응시킨다. 각각의 well을 PBS로 세척 후, biotin이 표지된 anti-IFN- γ 1차 항체를 50 μ l 분주하여 37°C에

서 1시간 배양한다. 각각의 well을 PBTS로 세척 후, streptavidin-HRP가 표지된 2차 항체를 50 μ l 씩 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 마지막으로 TMB 용액을 100 μ l 씩 분주하여 발색시키고 ELISPOT Reader를 이용하여 spot의 개수를 산정한다.

4) 지연형 과민반응 검사(delayed type hypersensitivity test)

백신 접종 2주 후가 경과되는 시점에서 서혜부 피내에 돼지 썬코바이러스 2형 항원을 접종하여 면역반응을 확인한다. 먼저 300 μ g/ml 농도의 돼지 썬코바이러스 2형 항원을 준비한다. 백신군과 대조군의 서혜부 피내에 준비된 돼지 썬코바이러스 2형 항원을 100 μ l 씩 주입한다. 각 군의 1두에는 phytohemagglutinin (PHA)를 20 μ g/ml 의 농도로 100 μ l 주입하여 양성 대조군으로 사용하고, 생리식염수(saline) 0.1 ml를 주입하여 음성 대조군으로 사용한다. 항원 주입 24-36시간 후에 피부 발적, 두께 변화 등을 측정하여 비교한다.

(6) 병리조직학적 검사

1) 병리조직 샘플

공격 접종 4주가 경과된 시점인 9주령에 부검을 실시하여 각 장기의 육안적 소견(부검 결과)을 기록하고, 실질장기의 조직표본 제작을 위해 폐장, 서혜 임파절 등 주요 장기를 10% 포르말린에 고정한다.

2) 병리조직학적 관찰

포르말린에 고정한 임파절 조직은 포매 과정을 거쳐 H&E염색을 실시한다. H&E 염색이 된 장기는 각각 현미경으로 관찰하여 병변을 관찰한다. 또한 서혜 임파절의 경우 임파구의 감소(lymphoid depletion)의 정도에 따라 0-5등급으로 구분하며, 매우 심하고 육아종성 염증을 동반한 경우 '스코어 5', 매우 심한(severe) 경우 '스코어 4', 아주 심한(severe) 경우 '스코어 3', 중등도(moderate)의 경우 '스코어 2', 경미한(mild)의 경우 '스코어 1', 전혀 병변이 없는 경우 '스코어 0'로 표시한다. 각각의 2개 그룹간의 병변을 기록하고 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 2개 그룹간의 병리조직학적 임파구의 감소(lymphoid depletion) 병변의 차이를 비교한다.

(7) 혈중 돼지 썬코바이러스 2형 항원 정량 분석

1) 실시간 중합효소 연쇄반응

실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 채취한 혈액에서 돼지 썬코바이러스 2형을 정량 분석한다.

2) 실시간 중합효소 연쇄반응 검사방법

실시간 중합효소 연쇄반응은 이미 발표되어 있는 검사 방법을 이용하여 실시하였다(Gagnon et al., 2008). 먼저 cloning vector(pCR 2.1 TOPO, Invitroge)를 이용하여 PCV2 ORF2 를 vector 에 삽입하고 10^8 에서 10^1 개/ml로 10^{-1} 씩 단계별로 희석한 후, ORF2 부분(GenBank Accession: HQ148879)을 확인하기 위한 프라이머(전방향: 5' GCACAGAGCGGGGGTTTG, 역

방향: 5' ACCGCTGGAGAAGGAAAAAT)를 이용하여 standard curve를 작성하여 측정 한다.

시료에서 추출된 DNA 2 µl를 주형으로, 1x SYBR green reaction mix (Applied Biosystems), 각각의 프라이머 0.2 µM, 증류수와 복합하여 최종 25 µl로 만든다. 반응 조건은 95°C에서 10분간 denaturation 시킨 후, 95°C에서 30초, 59°C에서 1분, 72°C에서 30초간 총 40회 반복하여 반응 시킨다. 모든 반응이 끝난 후 59°C에서 95°C까지 점진적으로 온도를 올리면서 해리 곡선 (dissociation curve)을 측정한다. 절대 정량을 위해 각 시료의 측정된 Ct 값을 표준 곡선 (standard curve)에 대입하여 DNA copy 수/ml 을 산정한다.

(8) 조직내 돼지 썬코바이러스 2형 증식 확인

1) 면역조직화학법 유용성

면역조직화학법을 이용한 서혜 임파절에서 돼지 썬코바이러스 2형의 증식정도를 측정하는 방법은 돼지 썬코바이러스 효능 실험에서 널리 사용하는 방법이다. 백신이 효과적이면 시험 종료 시점에서 채취한 서혜 임파절에서 돼지 썬코바이러스 2형의 항원이 양성인 세포가 감소하는 것을 확인 할 수가 있다.

2) 면역조직화학법 실시 방법

면역염색법은 이미 많은 문헌에서 사용한 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 다클론성 항체 (polyclonal antibody)를 사용하였다. 면역조직화학법의 실시 방법도 이미 발표되어 있는 방법 대로 시행하였다. 슬라이드 상의 조직 절편을 자일렌으로 탈파라핀 한 후, 100%, 70%, 50% 알코올로 점진적으로 함수 시킨다. 3차 증류수 1분, PBTS(0.1% Tween 20 이 포함된 PBS) 5분 세척 후, 항원 노출을 위해 1:200으로 희석한 proteinase K (Promega)를 37°C에서 25분간 처리한다. 내인성 alkaline phosphatase 제거를 위해 20% glacial acetic acid를 4°C에서 2분간 처리한 후 비특이 반응 억제를 위해 5% normal goat serum 을 15분간 실온에서 처리한다. 슬라이드 상의 goat serum을 버리고 PBTS에 1:200으로 희석된 polyclonal rabbit anti-PCV2 1차 항체를 조직 이 덮일 정도로 분주하고, 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 슬라이드를 PBTS로 세척 후, alkaline phosphatase가 표지된 goat anti-rabbit(Dako) 2차 항체를 PBTS에 1:250으로 희석하여 분주하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응 후 PBTS로 세척하고, Fast red tablet(Roche)으로 발색하여 돼지 썬코바이러스 2형 항원을 확인한다. 발색이 충분히 나타나면 3차 증류수로 세척하여 발색을 끝내고, Mayer's hematoxylin으로 배경을 염색한 후, crystal mount를 이용하여 조직을 덮어 현미경으로 관찰한다.

3) 면역조직화학법을 이용한 분석방법

돼지 썬코바이러스를 접종한 그룹에서 채취한 서혜 임파절을 이용하여 면역염색법을 실시한다. 분석방법은 이미 문헌에 보고된 방법을 사용한다. 면역조직화학법의 실시가 종료된 서혜 임파절 조직은 현미경상에서 임의로 0.25 mm²의 면적을 3곳 정하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 세어서 각각의 그룹간의 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 양성감염세포수를 통계 처리 하여 2개 그룹간의 양성감염 세포 수의 차이를 비교한다.

4. 개발된 돼지 썬코바이러스 단일백신과 국내 썬코바이러스 단일백신과의 비교 효능 검사

가. 시험 배경 및 목적

돼지 썬코바이러스 2형에 의하여 유발되는 이유후 전신성 소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting disease; PMWS)은 1998년 국내에서 정식으로 발병이 확인된 이래로 천문학적인 경제적 피해를 유발하였다. 본 과제에서 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신과 국내 백신회사에서 판매하는 유사한 불활화 돼지 썬코바이러스 2형 백신과 백신의 효능을 비교해 보고자 한다.

나. 실험실내 공격 접종 시험

(1) 실험 디자인

두 가지 돼지 썬코바이러스 2형 백신의 효능을 비교하고자 3개 그룹(백신군1, 백신군2, 대조군)으로 실험 디자인을 설정하여 시행하였다. 백신군1은 본 과제에서 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일 백신 2 ml을 3주령에 1회 근육 접종하였고, 백신군2는 자돈용으로 상품화 되어 있는 불활화 돼지 썬코바이러스 2형 백신 1 ml을 3주령에 1회 근육 접종하였다. 백신군은 백신 접종 3주 후 돼지 썬코바이러스 2형으로 공격 접종하였고, 대조군은 백신 접종 없이 돼지 썬코바이러스 2형만 공격접종 하는 돈군으로 구분한다. (표 1)

표 1. 실험디자인

그룹	실험두수	백신접종		공격접종 (7주령, 백신 후 4주)	부검 실시 (10주령)
		1차 접종 (1주령)	2차 접종 (3주령)		
백신군 1	10	1.0 ml	1.0 ml	PCV 2b	O
백신군 2	10	X	1.0 ml	PCV 2b	O
대조군	5	X	X	PCV 2b	O

(2) 공시돈 선정 및 백신 접종

돼지 썬코바이러스 2형에 대한 항체 음성인 건강한 3주령 자돈 25두를 공시한 후 10두는 백신군1로 10두는 백신군2, 5두는 대조군으로 구분한다. 백신군1의 자돈에는 1주령과 3주령에 시험백신 1.0 ml를 백신군 2의 자돈에는 3주령에 1.0 ml를 이근부에 접종한다.

(3) 사육 환경

공시돈은 23~24°C, 습도 60%가 유지되는 사육실에서 사육한다. 사육 기간 동안 음수는 무제한으로 공급한다.

(4) 공격 접종용 바이러스 및 접종 방법

1) 돼지 썬코바이러스 2형

돼지에게 접종실험에 사용할 돼지 썬코바이러스 2형은 서울대학교 수의과대학 병리학실에 의뢰된 소모성 증후군의 증상을 나타내는 이유자돈의 임파절에서 분리한 돼지 썬코바이러스 2형 (strain SNUVR000463; b형타입)을 사용하였다. 이 바이러스를 자돈에 접종하면 전형적인 소모성 증후군이 유발되는 것을 확인하였다.

2) 바이러스 접종

접종을 위하여 돼지 썬코바이러스 2형은 $1 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀/ml으로 준비하고, 이들 바이러스는 3주령에 백신을 접종한 후 4주가 경과한 7주령에서 접종한다. 미리 준비된 양의 돼지 썬코바이러스 2형을 2 ml 비강에 접종한다. 바이러스 공격 접종은 백신군과 대조군 모두에게 시행한다.

3) 관찰 및 시료 채취

① 채혈

1주령(1차 백신 접종 전), 3주령(2차 백신 접종 전), 7주령(2차 백신 접종 4주후; 공격접종 시기), 8주령(공격 접종 1주후), 9주령(공격 접종 2주후), 10주령(부검 전)에 채혈을 실시하여 혈청을 분리한 후 실험시점까지 4°C에 보관한다.

② 증체량

1주령(1차 백신 접종 전), 3주령(2차 백신 접종 전), 7주령(2차 백신 접종 4주후; 공격접종 시기), 8주령(공격 접종 1주후), 9주령(공격 접종 2주후), 10주령(부검 전)에 공시돈의 체중을 측정하여 주당 증체량을 비교한다.

③ 임상 증상

공시돈의 임상 증상은 표3의 임상 점수 기준에 따라 동일하게 매주 1회씩 관찰하고, 공격 접종 후 개체에 따른 임상 증상 변화를 기록한다.

표 2. 임상점수

임상 점수	임상 증상	비고
0	건강하다.	
1	피모가 거칠다. 창백하다.	
2	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다.	비정상적인 체형 호흡기 증상
4	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다. 등뼈가 돌출되어 수척하다.	심한 황달 호흡기 증상
6	상기 4의 증상을 보이다 폐사한다.	호흡기 증상을 동반한 폐사

(5) 돼지 썬코바이러스 2형 항체 혈청검사

1) ELISA IgG 검사

채취한 혈액을 이용하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 특이적인 항체는 상업화된 PCV2 ELISA IgG kit (Ingezim Circovirus IgG, Ingenasa, Madrid, Spain)를 이용하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 항체를 측정한다. 돼지 썬코바이러스 2형의 ORF2 흡착 플레이트를 실온에서 10~20분간 방치하였다. 혈청 희석용 플레이트에 400배 희석한 양성대조혈청, 음성대조혈청 및 가검물 혈청을 각각 100 µl씩 돼지 썬코바이러스 2형 항원이 코팅되어 있는 plate에 분주하고 실온(22~27°C)에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 1x 세척액을 300 µl씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척하였다. 세척후 HRPO anti-swine IgG conjugate를 각 well에 100 µl씩 분주하고 실온에서 30분 동안 반응하였다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 1x 세척액을 300 µl씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척하였다. 그 후 발색제를 각 well에 100 µl씩 분주하고 15분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 정지액을 각 well에 50 µl씩 분주하여 반응을 정지시키고 ELISA reader에서 450 nm의 흡광도로 측정하였다.

키트와 함께 제공되는 양성대조 혈청은 O.D. 수치가 0.7이상이었으며, 음성대조 혈청은 0.3이하로 결과 판정 조건을 모두 충족하였다. 결과는 S/P(= 가검혈청 평균 흡광도/ 양성대조 평균 흡광도)값 0.4이상일 경우 양성으로 판정하며, 본 실험에서는 S/P값의 변화 추이를 비교하였다.

2) 중화항체 검사

돼지 썬코바이러스 2형이 PK-15 세포에 감염되는 것을 억제하는 혈청 내 중화항체 역가를 측정한다. 검사할 혈청 50 µl를 96 well plate에 1:2부터 1:2¹²까지 희석하고 음성 대조군 well에는 50 µl의 PBS를 분주한다. 그후 4x10³ TCID₅₀/ml의 바이러스가 포함된 5% DMEM 배지 50 µl를 각 well에 분주하고 37°C에서 1시간 배양 후, 2x10⁴ PK 15 cell을 첨가한다.

그 다음에는 CO₂ 배양기에서 48~72시간 배양하고 PBS 100 µl로 세척한다. 세척한 후 냉동 보관된 100% EtOH를 50 µl씩 분주하여 -20°C에서 30분간 고정한다. PBS와 1:200으로 희석된 rabbit anti-PCV2 항체를 50 µl씩 분주하고 37°C에서 1시간 배양하고 PBS-Tween(0.1%)으로 세척한다. 세척한 후 peroxidase-labelled goat anti-rabbit(1:500) 2차 항체를 50 µl씩 분주하고 37°C에서 1시간 배양한다. 그 후 다시 PBS-Tween(0.1%)로 세척한다. 세척한 후에는 AEC(amino-ethyl-carbazole)을 첨가하여 상온에서 15~20분간 반응하고 발색을 확인한다. 각 세포에 항원이 확인되기 시작하는 희석 배율을 중화항체 역가로 측정한다.

(6) 세포성 면역학적 반응 검사

1) 말초혈액 단핵구(Peripheral blood monocyte) 분리

EDTA tube에 채혈한 혈액을 1:1로 Hank's balanced salt solution(HBSS)에 희석한다. 희석한 혈액 4 ml 을 15 ml tube에 준비한 Ficoll-Paque 3 ml 위에 분주하여 아래층은 Ficoll 위층은 혈액으로 나뉘게 한다. 18-20°C에서 400 g의 속도로 30-40분간 원심 분리하여 층을 분리한다. 가장 위층의 혈장과 중간층의 Ficoll층 사이에 분리되어 부유된 PBMC를 피펫을 이용하여 채취한다. 채취된 말초 혈액 단핵구를 HBSS로 세척하여 300 g에서 10분간 원심한 후 세포성 면역 반응 실험에 이용한다.

2) 유세포 분석(Flow cytometry)

분리된 말초혈액 단핵구(PBMC)의 면역학적 표현형을 확인하기 위하여 FACS(Fluorescence-activated cell sorting)을 이용하여 분석한다. 분리된 말초혈액 단핵구를 10⁶ cell/ml 의 농도로 유세포 분석 배지로 희석한다. 희석된 세포를 500 µl씩 15 ml tube에 분주한다. 말초혈액 단핵구 중에서 전체 림프구 비율과 helper T cell 비율을 확인하기 위해 분주된 세포에 anti-swine CD3 [R-PE]와 anti-swine CD4 [FITC] 항체 1.5 µl 씩 분주하여 각 세포와 반응 시킨다. 30분간 4°C에서 반응시킨 후 유세포 분석 배지로 세척하여 300 g에 10분간 원심 분리한다. 상층액을 버리고 펠렛을 1% 포르말린이 함유된 유세포 분석 배지 1 ml로 부유시켜 FACS tube에 분주하고, 분석 전까지 4°C에 보관한다.

3) IFN-γ 분비세포 측정

분리된 말초혈액 단핵구를 돼지 썬코바이러스 2형 항원으로 자극하여 IFN-γ 분비세포의 수를 확인한다. 상용화 되어 있는 ELISPOT (Enzyme linked immunospot) 분석 키트 (MABTECH, Mariemont, OH, USA)에 IFN-γ 단클론 항체를 8.3 µg/ml 분주하여 24시간 부착시킨다. 분리된 PBMC를 10% FBS를 포함한 RPMI 배지에 1x10⁷ cell/ml 의 농도로 희석한다. 준비된 ELISPOT 키트에 PBMC 가 1x10⁶ cell/ml 포함된 100 µl 씩 분주하고 MOI가 0.01인 돼지 썬코바이러스 2형 항원으로 자극하여 5% CO₂, 37°C에서 20시간 반응시킨다. 각각의 well을 PBS로 세척 후, biotin이 표지된 anti-IFN-γ 1차 항체를 50 µl 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 각각의 well을 PBTS로 세척 후, streptavidin-HRP가 표지된 2차 항체를 50 µl 씩 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 마지막으로 TMB 용액을 100 µl 씩 분주하여 발색시키고 ELISPOT Reader를 이용하여 spot의 개수를 산정한다.

4) 지연형 과민반응 검사(delayed type hypersensitivity test)

백신 접종 2주 후가 경과되는 시점에서 서혜부 피내에 돼지 썬코바이러스 2형 항원을 접종하여 면역반응을 확인한다. 먼저 300 µg/ml 농도의 돼지 썬코바이러스 2형 항원을 준비한다. 백신군과 대조군의 서혜부 피내에 준비된 돼지 썬코바이러스 2형 항원을 100 µl 씩 주입한다. 각 군의 1두에는 phytohemagglutinin (PHA)를 20 µg/ml 의 농도로 100µl 주입하여 양성 대조군으로 사용하고, 생리식염수(saline) 0.1 ml를 주입하여 음성 대조군으로 사용한다. 항원 주입 24-36시간 후에 피부 발적, 두께 변화 등을 측정하여 비교한다.

(7) 병리조직학적 검사

1) 병리조직 샘플

공격 접종 3주가 경과된 시점인 10주령에 부검을 실시하여 각 장기의 육안적 소견(부검 결과)을 기록하고, 실질장기의 조직표본 제작을 위해 폐장, 서혜 임파절 등 주요 장기를 10% 포르말린에 고정한다.

2) 병리조직학적 관찰

포르말린에 고정한 임파절 조직은 포매 과정을 거쳐 H&E염색을 실시한다. H&E 염색이 된 장기는 각각 현미경으로 관찰하여 병변을 관찰한다. 또한 서혜 임파절의 경우 임파구의 감소(lymphoid depletion)의 정도에 따라 0-5등급으로 구분하며, 매우 심하고 육아종성 염증을 동반한 경우 '스코어 5', 매우 심한(severe) 경우 '스코어 4', 아주 심한(severe) 경우 '스코어 3', 중등도(moderate)의 경우 '스코어 2', 경미한(mild)의 경우 '스코어 1', 전혀 병변이 없는 경우 '스코어 0'로 표시한다. 각각의 2개 그룹간의 병변을 기록하고 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 2개 그룹간의 병리조직학적 임파구의 감소 병변의 차이를 비교한다.

(8) 혈중 돼지 썬코바이러스 2형 항원 정량 분석

1) 실시간 중합효소 연쇄반응

실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 채취한 혈액에서 돼지 썬코바이러스 2형을 정량 분석한다.

2) 실시간 중합효소 연쇄반응 검사방법

실시간 중합효소 연쇄반응은 이미 발표되어 있는 검사 방법을 이용하여 실시하였다(Gagnon et al., 2008). 먼저 cloning vector(pCR 2.1 TOPO, Invitroge)를 이용하여 PCV2 ORF2를 vector 에 삽입하고 10^8 에서 10^1 개/ml로 10^{-1} 씩 단계별로 희석한 후, ORF2 부분(GenBank Accession: HQ148879)을 확인하기 위한 프라이머(전방향: 5' GCACAGAGCGGGGGTTTG, 역방향: 5' ACCGCTGGAGAAGGAAAAAT)를 이용하여 standard curve를 작성하여 측정 한다.

시료에서 추출된 DNA 2µl를 주형으로, 1x SYBR green reaction mixture(Applied Biosystems), 각각의 프라이머 0.2 µM, 증류수와 복합하여 최종 25µl로 만든다. 반응 조건은 95°C에서 10분간 denaturation 시킨 후, 95°C에서 30초, 59°C에서 1분, 72°C에서 30초간 총 40

회 반복하여 반응시킨다. 모든 반응이 끝난 후 59°C에서 95°C까지 점진적으로 온도를 올리면서 해리 곡선 (dissociation curve)을 측정한다. 절대 정량을 위해 각 시료의 측정된 Ct 값을 표준 곡선(standard curve)에 대입하여 DNA copy 수/ml 을 산정한다.

(9) 조직내 돼지 썬코바이러스 2형 증식 확인

1) 면역조직화학법 유용성

면역조직화학법을 이용한 서혜 임파절에서 돼지 썬코바이러스 2형의 증식정도를 측정하는 방법은 돼지 썬코바이러스 효능 실험에서 널리 사용하는 방법이다. 백신이 효과적이면 시험 종료 시점에서 채취한 서혜 임파절에서 돼지 썬코바이러스 2형의 항원이 양성인 세포가 감소하는 것을 확인 할 수가 있다.

2) 면역조직화학법 실시 방법

면역염색법은 이미 많은 문헌에서 사용한 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 다클론성 항체 (polyclonal antibody)를 사용하였다. 면역조직화학법의 실시 방법도 이미 발표되어 있는 방법 대로 시행하였다. 슬라이드 상의 조직 절편을 자일렌으로 탈파라핀 한 후, 100 %, 70 %, 50 % 알코올로 점진적으로 함수 시킨다. 3차 증류수 1분, PBTS(0.1% Tween 20 이 포함된 PBS) 5분 세척 후, 항원 노출을 위해 1:200으로 희석한 proteinase K(Promega)를 37°C에서 25분간 처리한다. 내인성 alkaline phosphatase 제거를 위해 20% glacial acetic acid를 4°C에서 2분간 처리한 후 비특이 반응 억제를 위해 5% normal goat serum 을 15분간 실온에서 처리한다. 슬라이드 상의 goat serum을 버리고 PBTS에 1:200으로 희석된 polyclonal rabbit anti-PCV2 1차 항체를 조직이 덮일 정도로 분주하고, 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 슬라이드를 PBTS로 세척 후, alkaline phosphatase가 표지된 goat anti-rabbit(Dako) 2차 항체를 PBTS에 1:250으로 희석하여 분주하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응 후 PBTS로 세척하고, Fast red tablet(Roche)으로 발색하여 돼지 썬코바이러스 2형 항원을 확인한다. 발색이 충분히 나타나면 3차 증류수로 세척하여 발색을 끝내고, Mayer's Hematoxylin으로 배경을 염색한 후, crystal mount를 이용하여 조직을 덮어 현미경으로 관찰한다.

3) 면역조직화학법을 이용한 분석방법

돼지 썬코바이러스를 접종한 그룹에서 채취한 서혜 임파절을 이용하여 면역염색법을 실시한다. 분석방법은 이미 문헌에 보고된 방법을 사용한다. 면역조직화학법의 실시가 종료된 서혜 임파절 조직은 현미경상에서 임의로 0.25 mm²의 면적을 3곳 정하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 세어서 각각의 그룹간의 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 양성감염세포수를 통계 처리 하여 2개 그룹간의 양성감염 세포 수의 차이를 비교한다.

5. 돼지 쉼코바이러스 2형 및 돼지 흉막폐렴균 복합백신 야의 임상 시험

가. 목적

목적 동물에 대한 확대 시험을 통한 안전성 확보와 효과 검증을 위해 야의 임상 시험을 실시한다.

주요 검증 포인트는 다음과 같다.

- 가. 백신 접종 후 목적 동물에서 부작용 발생 유무
- 나. 백신 접종 그룹(백신군)과 비접종 그룹(대조군)간에 임상 증상 발현 비율 차이
- 다. 백신군과 대조군의 증체율, 폐사율 등의 차이 분석

나. 임상 시험 농장 선정

병성감정 기관으로부터 과거 또는 현재 돼지 쉼코바이러스 2형 감염과 흉막폐렴균의 감염에 의한 호흡기 질환이 발생하여 항생제 주사 또는 사료에 첨가하여 호흡기 질환이 개선되지 않고 폐사 등에 의하여 피해를 입었거나, 피해를 입고 있는 농장을 대상으로 임상시험을 진행한다. 농장 선정 기준에는 다음과 같은 임상증상과 병변이 있는 농장을 선정하였다. 돼지 쉼코바이러스 2형과 흉막폐렴균의 감염의 경우 심한 기침을 하고, 갑작스럽게 비강에서 출혈이 관찰되면서 폐사된 개체를 관찰한다. 또한 항생제 치료할 경우 치료 할 때만 조금 효과가 있고 항생제 치료를 멈추면 다시 복식 호흡 등이 관찰된다. 또한 폐사된 개체를 부검하게 되면 폐장이 흉곽에 유착되어 있으며, 폐장의 장막에는 섬유소가 덮여 있으며, 폐장을 만져보는 경우 매우 딱딱하며, 감염초기의 병변으로는 붉은색을 나타내고, 시간이 경과된 경우 노란색의 농을 동반하고 폐장이 전체적으로 검붉은 색을 나타낸다.

다. 공시동물

선정된 시험농장 3곳에서 각각 50두를 선정하여 백신군에 25두, 대조군에 25두를 선정한다.

라. 백신 접종

선정된 3개 농장의 백신군에게 5주령에 1.0 ml씩 이근부에 접종한다.

마. 평가 항목

(1) 시험기간 선정 및 배경 자료

흉막폐렴이 국내에서 발병하는 시기는 7-12주령 사이이며, 이시기에 육성초기 돼지의 경우 쉼코바이러스 2형에 대한 감염도 시작된다. 따라서 주로 발병하는 시기보다 2주령 앞당겨서 5주령에 백신을 접종한다. 그리고 돼지 쉼코바이러스 2형과 흉막폐렴균의 감염은 7-12주령에 다발하기 때문에 백신을 접종 한 후에 18주령까지 관찰하면 돼지 쉼코바이러스 2형과 흉막폐렴균의 감염 발병 여부를 충분히 관찰 할 수 있는 시기이다.

(2) 임상 증상

시험이 시작되는 5주령에서부터 시험이 종료되는 18주령까지 매주 1회씩 선정된 3개 농장의 백신군과 대조군의 임상증상을 수의사가 관찰하여 표 1.에 있는 임상점수를 기입한다.

표 1. 임상점수

임상 점수	임상 증상	비고
0	건강하다.	
1	피모가 거칠다. 창백하다.	
2	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다.	비정상적인 체형 호흡기 증상
4	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다. 등뼈가 돌출되어 수척하다.	심한 황달 호흡기 증상
6	상기 4의 증상을 보이다 폐사한다.	호흡기 증상을 동반한 폐사

(3) 생산성 지수

1) 체중 측정

공시돈의 5주령(백신 접종 시기), 9주령(백신 접종 후 4주 경과), 12주령(백신 접종 후 7주 경과) 18주령(백신 접종 후 13주 경과)의 체중을 측정한다. 백신군과 대조군에 대해 각 시점의 평균체중 및 편차를 비교한다. 또한 구간별 증체 평균을 비교한다.

2) 폐사율

실험개시 후 종료까지 백신군과 대조군의 폐사 두수를 기록하여 시기별 폐사 두수를 기록한다. 또한 실험기간 중 발생하는 폐사돈에 대해 부검을 실시하고, 폐사 원인 검사 후 결과를 기록한다. 또한 폐사돈의 폐장과 서혜 임파절에서는 돼지 쉼코바이러스 2형의 면역조직화학법과 흉막폐렴균의 조직내 교잡법을 시행하여 돼지 쉼코바이러스의 항원의 개수와 흉막폐렴균 유전자 양성의 개수를 측량한다.

바. 백신 안전성 검사

선정된 3개 농장에서 백신 안전성 검사를 실시한다. 안전성 시험은 21일령자돈에 백신 접종 후 30분, 1시간, 4시간 후에 측정하고, 그 후 매일 7일 동안 동일한 시간에 안정성 여부를 확인

한다.

사. 돼지 썬코바이러스 2형 항체 역가 측정

선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 5주령(백신 접종 시기), 9주령(백신 접종 후 4주 경과), 12주령(백신 접종 후 7주 경과), 18주령(백신 접종 후 13주 경과)가 경과된 시점에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 Serelisa PCV2 Ab Mono Blocking ELISA (Synbiotics, Lyon, France) 키트를 이용하여 돼지 썬코바이러스 2형의 항체가를 측정하고, 백신군과 대조군의 차이를 비교한다.

아. 혈중 돼지 썬코바이러스 2형 항원 역가 측정

선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 5주령(백신 접종 시기), 9주령(백신 접종 후 4주 경과), 12주령(백신 접종 후 7주 경과), 18주령(백신 접종 후 13주 경과)에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 realtime PCR (polymerase chain reaction)을 이용하여 돼지 썬코바이러스 2형을 정량 분석하여, 백신군과 대조군의 혈중 돼지 썬코바이러스 2형의 농도를 비교한다.

혈중에서 돼지 썬코바이러스 2형의 DNA 함량을 측정하는 realtime PCR은 이미 발표되어 있는 방법을 이용하여 실시한다.

간략하게 프라이머로 Primer-F: GGCCACCTGGGTGTGGTAAA (Applied biosystems)와 Primer-R: CCCACCACTTGTCTTAGGTGGTT (Applied biosystems)를 사용하며, probe로는 6-FAM-TTTCAGACCCGGAACACATACTGGA-BHQ-1 (Applied biosystems)를 사용한다. Realtime PCR법은 Taqman universal PCR master mix 10 μ l에 sample DNA(DNA extraction kit, bioneer) 5 μ l를 넣고 primer가 각각 400 nM, probe는 120 nM이 되도록 넣은 후, DNase, RNase free DW로 총량 20 μ l를 맞춘다. 위의 reaction mixture를 95°C에서 10분 반응 후, 95°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분 동안 반응시키는 3-step cycle로 40회 반복하여 realtime PCR을 시행한다.

자. 흉막폐렴균 2형과 5형 항체 역가 측정

선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 5주령(백신 접종 시기), 9주령(백신 접종 후 4주 경과), 12주령(백신 접종 후 7주 경과) 18주령(백신 접종 후 13주 경과)에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 Swinecheck App 2형과 5형 ELISA (Biovet Inc, St-Hyacinthe, Canada) 키트를 이용하여 혈청형 2형과 5형에 대한 특이 항체의 수준을 측정하고, 백신군과 대조군의 차이를 비교한다.

차. 병리조직 제작 및 관찰

(1) 병리조직 샘플

야외 임상 실험의 종료 시점은 18주령에서 각각의 농장에서 백신군 5두와 대조군 5두씩을 임의로 선정해서 안락사 시킨 후에 각각의 주요 장기의 육안적 소견(부검 결과)을 기록하고, 실질장기의 조직표본 제작을 위해 폐장, 서혜 임파절 등 주요 장기를 10% 포르말린에 고정한다.

다.

(2) 병리조직학적 관찰

병리조직학적 관찰은 실험실내 공격접종 실험의 병리조직학적 관찰 방법에 준하여 실시한다.

카. 조직 내 돼지 썬코바이러스 2형 증식 정도 확인

(1) 조직 내 돼지 썬코바이러스 2형 증식 정도 확인

야외 임상 실험의 종료 시점은 18주령에서 각각의 농장에서 백신군 5두와 대조군 5두씩을 임의로 선정해서 안락사 시킨 후에 채취한 폐장과 서혜 임파절을 이용하여 면역조직화학법을 이용하여 조직 내 돼지 썬코바이러스 2형의 증식 정도를 백신군과 대조군에서 비교 확인한다.

(2) 면역조직화학법 검사 방법 (immunohistochemistry; IHC)

면역조직화학법은 실험실내 공격접종 실험에 수행한 방법에 준하여 실시한다.

(3) 면역조직화학법 검사 방법

2개 그룹에서 채취한 서혜 임파절을 이용하여 면역염색법을 실시한다. 면역염색법은 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 다클론성 항체(polyclonal antibody)를 사용하였다. 면역조직화학법의 실시가 종료된 서혜 임파절 조직은 현미경상에서 임의로 0.25 mm²의 면적을 3곳 정하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 세어서 각각의 그룹간의 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 양성감염세포수를 통계 처리 하여 백신군과 대조군의 2개 그룹간의 양성감염 세포 수의 차이를 비교한다.

타. 조직 내 홍막페렴균 증식 정도 확인

(1) 조직 내 홍막페렴균 증식 정도 확인

야외 임상 실험의 종료 시점은 18주령에서 각각의 농장에서 백신군 5두와 대조군 5두씩을 임의로 선정해서 안락사 시킨 후에 채취한 폐장을 이용하여 조직내 교잡법을 이용하여 폐장 조직내에서 홍막페렴균의 증식 정도를 백신군과 대조군에서 비교 확인한다.

(2) 조직내 교잡법(in situ hybridization; ISH)

조직내 교잡법은 실험실내 공격접종 실험에 수행한 방법에 준하여 실시한다.

(3) 조직내 교잡법 검사 방법

백신군과 대조군에서 채취한 폐장을 이용하여 조직내 교잡법을 실시한다. 조직내 교잡법은 홍막페렴균의 특이적인 DNA을 이용하여 탐색자(probe)를 제작하여 조직내 교잡법을 실시하였다. 조직내 교잡법의 실시가 종료된 폐장 조직은 현미경상에서 임의로 0.25 mm²의 면적을 3곳 정하여 홍막페렴균에 대한 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 세어서 각각의 그룹간의 홍막

폐렴균에 대한 양성감염세포수를 통계 처리 하여 백신군과 대조군의 2개 그룹간의 양성감염 세포 수의 차이를 비교한다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신의 야외 임상 실험

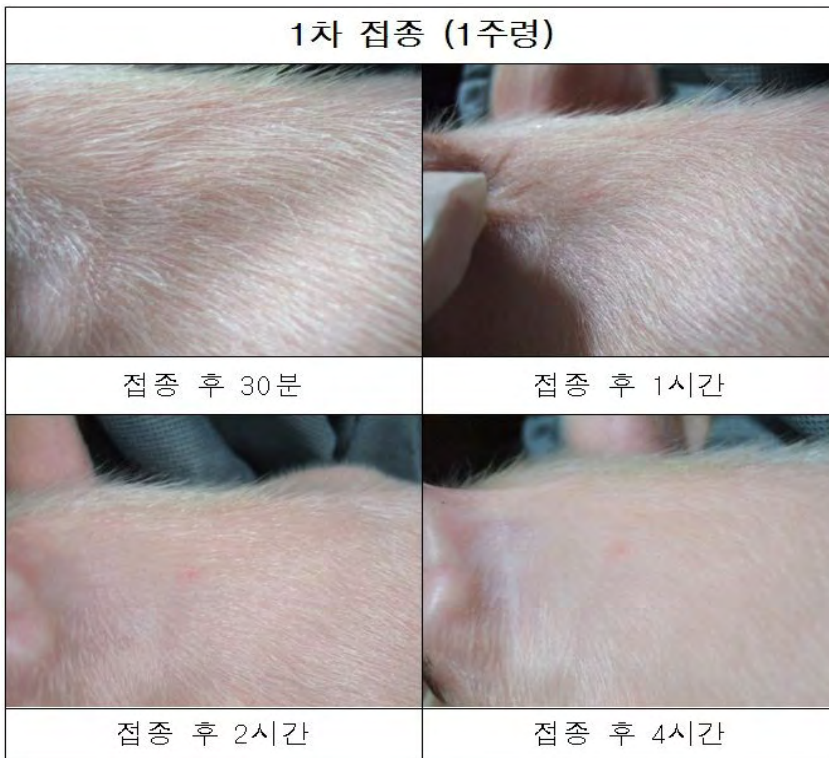
가. 안전성 시험 결과

(1) 1차 백신 접종 후 안전성 시험 결과

1) 1차 백신 접종 후 전체 안전성 시험 결과

안전성 시험은 7일령에 1차 백신 접종 후 30분, 1시간, 4시간 후에 측정하고, 그 후 매일 동일한 시간에 안정성 여부를 확인하였다. 안전성 시험 기관동안 3개 시험농장의 20두씩의 자돈에서 어떠한 부작용도 관찰되지 않았다.

2) 시험농장 1의 1차 백신 접종 후 안전성 시험 결과 사진



3) 시험농장 3의 1차 백신 접종 후 안전성 시험 결과 사진



4) 접종 30분 후 전체 안전성 실험 결과

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	39.48
농장2	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	39.22
농장3	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	39.40

5) 접종 1시간 후 전체 안전성 실험 결과

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	39.52
농장2	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	39.25
농장3	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	39.36

6) 접종 2시간 후 전체 안전성 실험 결과

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수								
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온	
농장1	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	0	39.52
농장2	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	0	39.32
농장3	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	0	39.48

7) 접종 4시간 후 전체 안전성 실험 결과

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수								
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온	
농장1	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	0	39.61
농장2	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	0	39.43
농장3	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	0	39.55

8) 접종 1일후부터 14일간 전체 안전성 실험 결과

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수								
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	기타	
농장1	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	0	0
농장2	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	0	0
농장3	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	0	0

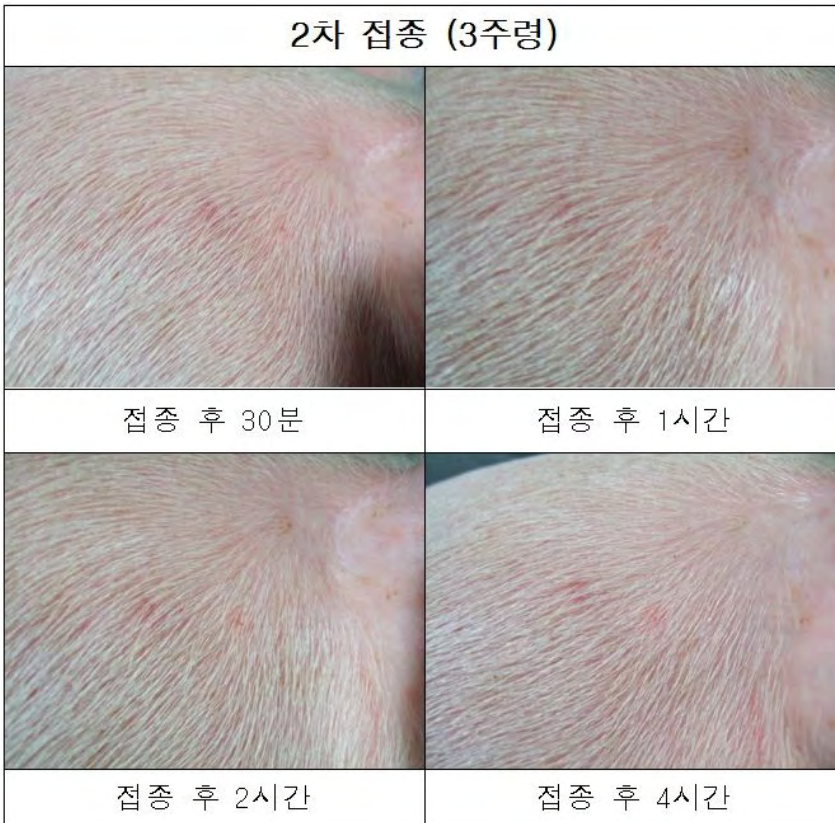
※ 관찰일: 접종 후 14일간

(2) 2차 백신 접종 후 안전성 시험 결과

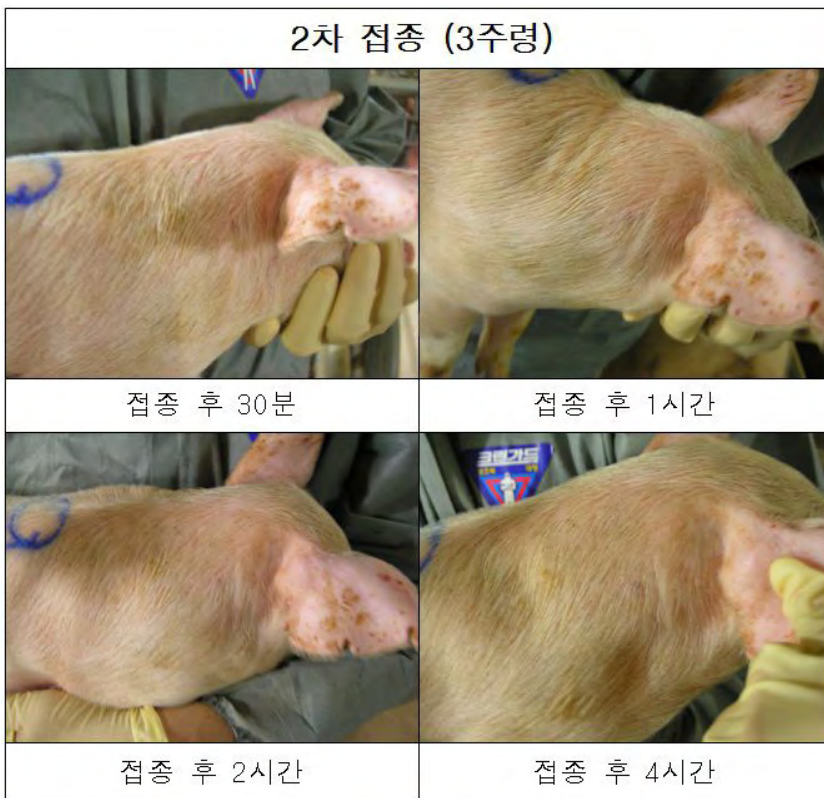
1) 2차 백신 접종 후 전체 안전성 시험 결과

안전성 시험은 21일령에 2차 백신 접종 후 30분, 1시간, 4시간 후에 측정하고, 그 후 매일 동일한 시간에 안정성 여부를 확인하였다. 안전성 시험 기관동안 3개 시험농장의 20두씩의 자돈에서 어떠한 부작용도 관찰되지 않았다.

2) 시험농장 1의 2차 백신 접종 후 안전성 시험 결과 사진



3) 시험농장 2의 2차 백신 접종 후 안전성 시험 결과 사진



4) 시험농장 3의 2차 백신 접종 후 안전성 시험 결과



5) 접종 30분 후 전체 안전성 실험 결과

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	39.50
농장2	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	39.22
농장3	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	39.61

6) 접종 1시간 후 전체 안전성 실험 결과

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	39.55
농장2	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	39.29
농장3	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	39.68

7) 접종 2시간 후 전체 안전성 실험결과

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	39.52
농장2	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	39.33
농장3	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	39.75

8) 접종 4시간 후 전체 안전성 실험결과

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	39.51
농장2	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	39.27
농장3	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	39.73

7) 접종 1일 후부터 전체 14일간 안전성 실험결과

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	기타
농장1	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	0
농장2	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	0
농장3	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	0

※ 관찰일: 접종 후 14일간

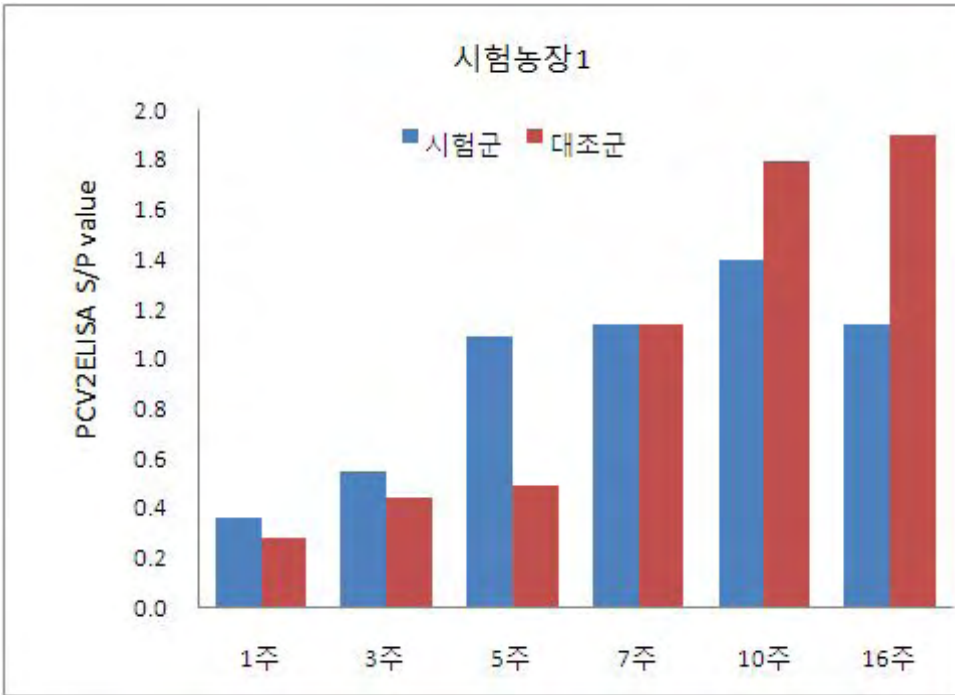
나. 항체 형성능 확인 시험 결과

(1) 검사 샘플

각 시험 농장마다 시험군과 대조군 20마리를 지정하여 시험기간 동안 채혈하며, 혈액 중 썬코바이러스 2형에 대한 ELISA 항체검사 결과 및 시험군과 대조군의 유의성을 검사하여 다음 표와 같이 정리한다.

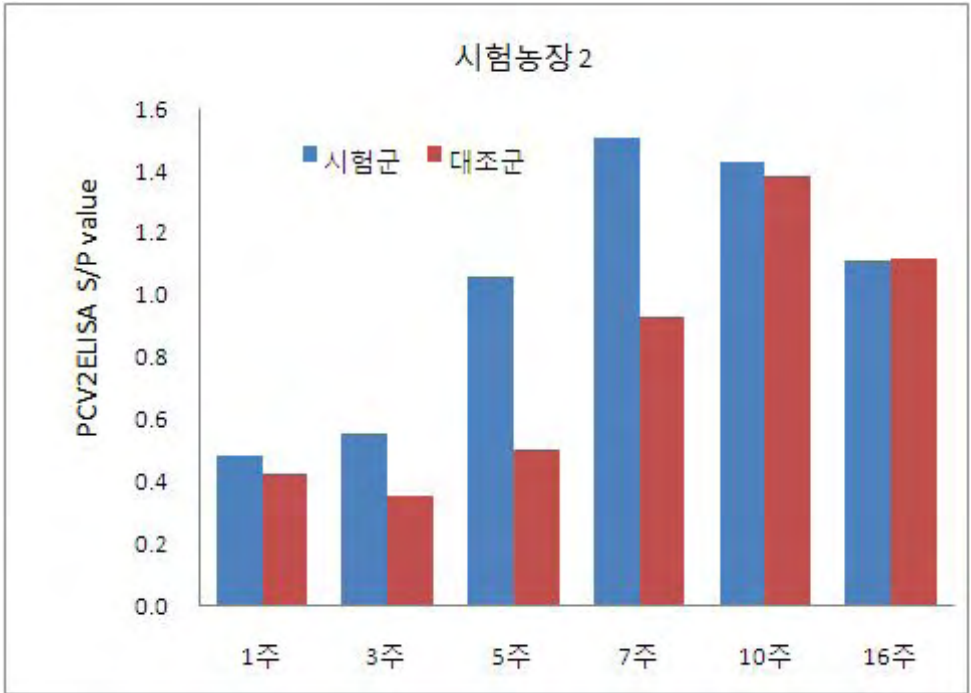
(2) 시험농장 1

실험 구분	공시 두수	채혈 시기 별 S/P 값 (평균±표준편차)					
		1주령	3주령	5주령	7주령	10주령	16주령
시험군	20	0.357±0.233	0.549±0.194	1.086±0.307	1.141±0.306	1.398±0.351	1.137±0.322
대조군	20	0.282±0.196	0.441±0.206	0.487±0.271	1.136±0.573	1.790±0.655	1.896±0.721
유의성		0.28	0.09	0.00	0.97	0.03	0.00



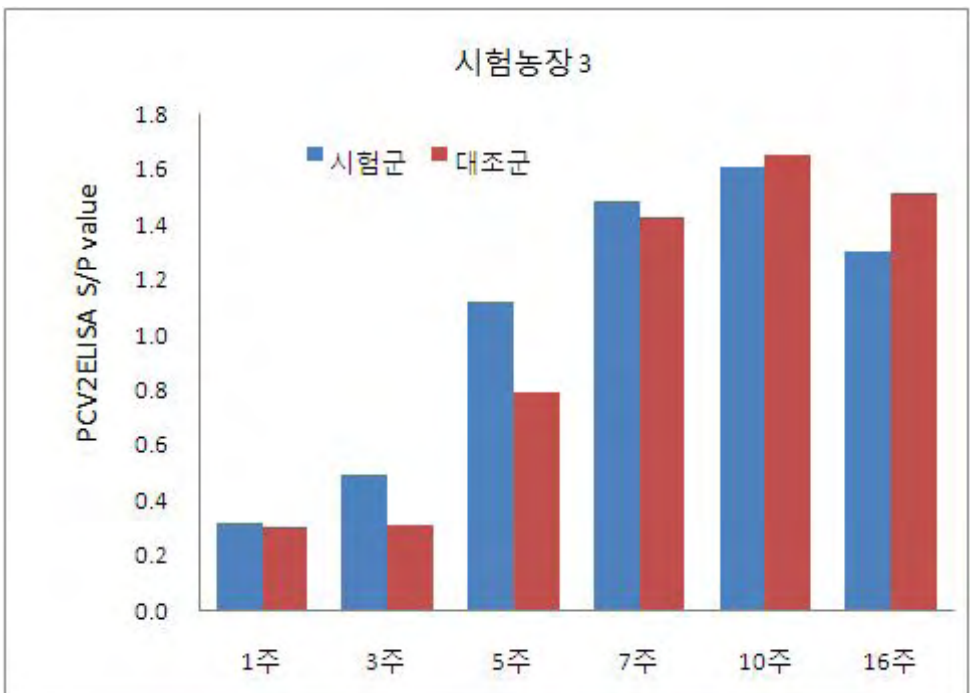
(3) 시험농장 2

실험 구분	공시 두수	채혈 시기 별 S/P 값 (평균±표준편차)					
		1주령	3주령	5주령	7주령	10주령	16주령
시험군	20	0.486±0.311	0.555±0.201	1.058±0.352	1.504±0.493	1.428±0.580	1.114±0.408
대조군	20	0.425±0.209	0.352±0.175	0.505±0.247	0.932±0.474	1.383±0.774	1.116±0.625
유의성		0.42	0.00	0.00	0.00	0.86	0.97



(4) 시험농장 3

실험 구분	공시 두수	채혈 시 기 별 S/P 값 (평균±표준편차)					
		1주령	3주령	5주령	7주령	10주령	16주령
시험군	20	0.319±0.189	0.491±0.177	1.117±0.311	1.486±0.462	1.608±0.638	1.301±0.417
대조군	20	0.303±0.187	0.310±0.199	0.792±0.434	1.426±0.505	1.653±0.573	1.516±0.527
유의성		0.77	0.00	0.02	0.69	0.91	0.30



다. 임상 증상 관찰 결과

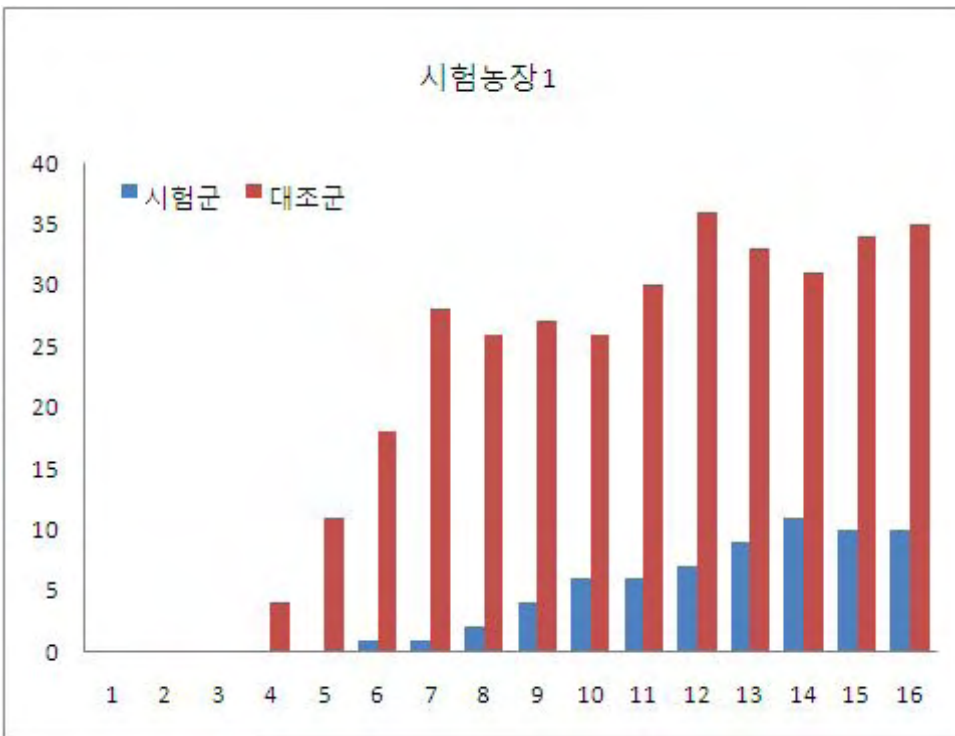
(1) 검사 방법

각 농장별 시험군과 대조군의 임상 점수를 표와 그래프로 표현하고, 차이를 두 그룹간의 유의성으로 설명한다. 유의성 검사는 아래 표의 시험군과 대조군의 임상증상 합계를 사용하지 않고, 시험군과 대조군의 임상증상 합계의 평균값을 계산하여 t 검정을 이용하여 통계처리 하였다

(2) 시험농장 1

시험농장 1의 경우 6, 7, 8, 9주령 및 11, 12주령에서 유의적인 임상점수 감소 현상이 관찰되었다.

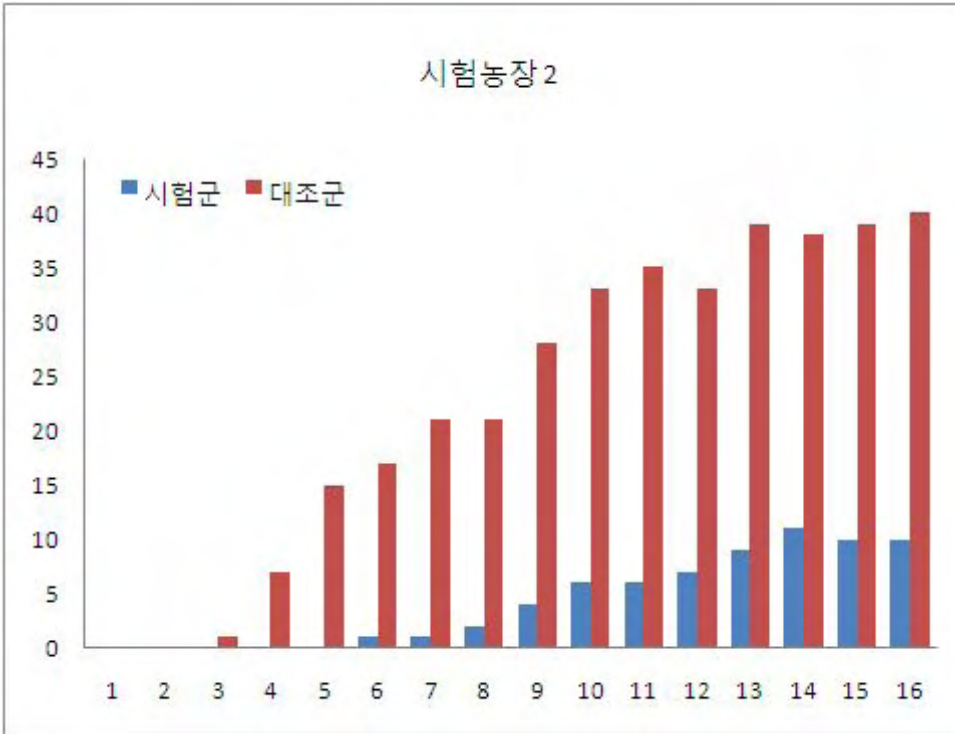
구분	시험 두수	임상 점수 (각 농장별 시험두수의 임상증상의 합계; 주령)															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
시험군	30	0	0	0	0	0	1	1	2	4	6	6	7	9	11	10	10
대조군	30	0	0	0	4	11	18	28	26	27	26	30	36	33	31	34	35
유의성		1.00	1.00	1.00	0.10	0.09	0.03	0.02	0.02	0.03	0.09	0.04	0.02	0.06	0.14	0.08	0.06



(3) 시험농장 2

시험농장2의 경우 시험기간 동안 시험군과 대조군 사이에 6주령부터 16주령까지 유의성이 관찰되었다.

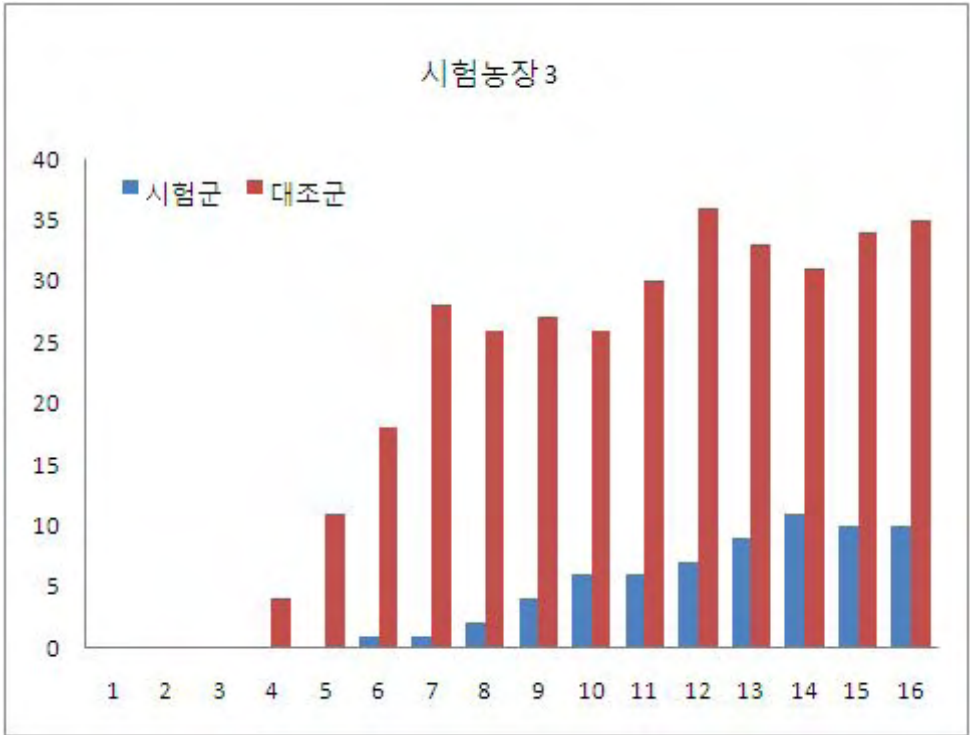
구분	시험 두수	임상 점수 (각 농장별 시험두수의 임상증상의 합계; 주령)															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
시험군	30	0	0	0	0	0	0	1	2	4	6	5	5	5	5	5	5
대조군	30	0	0	1	7	15	17	21	21	28	33	35	33	39	38	39	40
유의성		1.00	1.00	0.34	0.27	0.07	0.03	0.02	0.03	0.04	0.04	0.02	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01



(4) 시험농장 3

시험농장 3의 경우 11주령부터 시험이 종료되는 16주령까지에서 시험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 임상 점수가 감소한 것이 관찰되었다.

구분	시험 두수	임상 점수 (각 농장별 시험두수의 임상증상의 합계; 주령)															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
시험군	30	0	1	3	8	12	11	12	14	16	15	15	15	15	15	15	15
대조군	30	0	4	12	24	37	35	33	33	38	40	46	56	61	63	63	66
유의성		1.00	0.25	0.20	0.11	0.10	0.08	0.19	0.17	0.15	0.09	0.04	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00



라. 생산성 지수 비교

(1) 증체율

1) 전체 공시돈의 증체율 비교

임상 시험이 실시된 전체 공시돈에 대한 증체율을 다음과 같이 정리한다.

	구 분	주 령							증체율 (%)
		1	3	5	7	10	14	16	
시험군	공시두수	90	90	88	88	85	84	84	1892.70%
	평균체중	2.74	5.84	8.50	13.20	22.46	40.16	51.86	
	표준편차	0.49	1.25	1.55	2.56	4.25	7.96	8.75	
	구간평균증체	0	+ 3.10	+ 2.66	+ 4.70	+ 9.26	+ 17.70	+ 11.7	
대조군	공시두수	90	89	84	78	75	68	66	1759.39%
	평균체중	2.61	5.58	7.95	11.90	20.24	36.55	45.92	
	표준편차	0.43	1.20	1.62	2.27	4.30	7.23	7.60	
	구간평균증체	0	+ 2.97	+ 2.37	+ 3.95	+ 8.34	+ 16.31	+ 9.37	

2) 각 농장별 증체율 비교

각 농장의 구간별 평균체중을 이용하여 증체율을 정리하여 시험군과 대조군을 독립 t-검정 통계학적 검사를 통하여 유의성을 나타내었다.

가) 시험농장 1

시험농장 1의 경우 7주령부터 시험이 종료되는 16주령까지에서 시험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증체율이 증가하였다.

	구 분	주 령							증 체 율 (%)
		1	3	5	7	10	14	16	
시 험 군	공시두수	30	30	30	30	29	28	28	1786.94%
	평균체중	2.68	5.52	8.25	12.92	19.71	35.75	47.89	
	표준편차	0.34	0.83	1.41	1.91	2.47	5.85	7.88	
	구간평균증체	0	+ 2.84	+ 2.73	+ 4.67	+ 6.79	+ 16.04	+ 12.14	
대 조 군	공시두수	30	30	30	26	26	25	24	1642.64%
	평균체중	2.65	5.51	8.41	11.72	18.20	32.67	43.53	
	표준편차	0.29	1.02	1.30	1.72	2.71	4.45	4.64	
	구간평균증체	0	+ 2.86	+ 2.90	+ 3.31	+ 6.48	+ 14.47	+ 10.86	
유 의 성(p value)		0.71	0.96	0.66	0.02	0.04	0.04	0.02	

시험군



대조군



16주령의 동일 연령의 돼지에서 시험군과 대조군의 사진으로 시험군이 대조군에 비하여 증체가 잘되었다.

나) 시험농장 2

시험농장 2의 경우 5주령부터 시험이 종료되는 16주령까지에서 시험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증체율이 증가하였다.

	구 분	주 령							증체율 (%)
		1	3	5	7	10	14	16	
시험군	공시두수	30	30	30	30	29	29	29	1986.91%
	평균체중	2.98	6.71	9.18	14.64	25.98	46.64	59.21	
	표준편차	0.49	1.12	1.41	2.42	3.50	6.61	7.13	
	구간평균증체	0	+ 3.73	+ 2.47	+ 5.46	+ 11.34	+ 20.66	+ 12.57	+ 56.22
대조군	공시두수	30	30	29	28	26	24	24	1915.83%
	평균체중	2.78	6.15	8.22	12.80	23.97	42.92	53.26	
	표준편차	0.54	1.11	1.43	2.40	3.45	4.92	4.22	
	구간평균증체	0	+ 3.37	+ 2.07	+ 4.58	+ 11.17	+ 18.95	+ 10.34	+ 50.48
유의성(p value)		0.13	0.06	0.01	0.01	0.04	0.03	0.00	

시험군



대조군



16주령의 동일 연령의 돼지에서 시험군과 대조군의 사진으로 시험군이 대조군에 비하여 증체가 잘 되었다.

다) 시험농장 3

시험농장 3의 경우 10주령부터 시험이 종료되는 16주령까지에서 시험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증체율이 증가하였다.

	구 분	주 령							증 체 율 (%)
		1	3	5	7	10	14	16	
시 험 군	공시두수	30	30	28	28	27	27	27	1877.73%
	평균체중	2.56	5.30	8.03	11.95	21.61	37.77	48.07	
	표준편차	0.52	1.27	1.62	2.64	3.95	6.81	5.75	
	구간평균증체	0	+ 2.74	+ 2.73	+ 3.92	+ 9.66	+ 16.16	+ 10.30	
대 조 군	공시두수	30	29	25	24	23	19	18	1631.95%
	평균체중	2.41	5.04	7.10	11.07	18.33	33.59	39.33	
	표준편차	0.34	1.23	1.89	2.35	3.90	7.30	6.12	
	구간평균증체	0	+ 2.63	+ 2.06	+ 3.97	+ 7.26	+ 15.26	+ 5.74	
유 의 성(p value)		0.11	0.58	0.06	0.12	0.03	0.05	0.00	

시 험 군



대 조 군



16주령의 동일 연령의 돼지에서 시험군과 대조군의 사진으로 시험군이 대조군에 비하여 증체가 잘되었다.

(2) 폐사율

1) 전체 공시돈의 폐사 발생율

전체 공시돈의 폐사두수와 폐사율을 아래와 같이 정리한다.

	구 분	농 장		
		1	2	3
시 험 군	공시두수	30	30	30
	폐사두수	2	1	3
	폐 사 율	6.7%	3.3%	10%
대 조 군	공시두수	30	30	30
	폐사두수	6	6	12
	폐 사 율	20%	20%	40%

2) 각 농장별 폐사 원인

가) 시험농장 1

시험농장 1에서는 시험군 2두와 대조군 6두가 폐사되었으며, 폐사일령과 폐사의 원인을 아래 표에 정리하였다.

시험구분	개체 번호	폐사일시	폐사일령	진단 (폐사 원인)
대조군	11	7월 14일	35일령	살모넬라증
대조군	7	7월 23일	44일령	이유후 전신성 소모성 증후군
대조군	9	7월 25일	46일령	돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스와 파스튜렐라균 감염 폐렴
대조군	16	7월 25일	46일령	살모넬라증
시험군	2	8월 13일	65일령	대장염(원인체불명)
대조군	18	8월 30일	82일령	돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스와 파스튜렐라균 감염 폐렴
시험군	15	9월 14일	100일령	글래서씨병
대조군	6	9월 18일	101일령	파스튜렐라성 폐렴

나) 시험농장 2

시험농장 2에서는 시험군 1두와 대조군 6두가 폐사되었으며, 폐사일령과 폐사의 원인 아래 표에 정리하였다.

시험구분	개체번호	폐사일시	폐사일령	진단 (폐사 원인)
대조군	15	7월 8일	27일령	글래서씨병
대조군	1	7월 16일	35일령	글래서씨병
대조군	3	8월 12일	62일령	이유후 전신성 소모성 증후군과 글래서씨병 증
대조군	14	8월 14일	64일령	이유후 전신성 소모성 증후군과 글래서씨병 증
시험군	6	8월 20일	70일령	전신장기에서 뚜렷한 병변이 관찰되지 않음
대조군	8	8월 23일	73일령	파스튜렐라성 폐렴
대조군	9	9월 3일	84일령	파스튜렐라성 폐렴

다) 시험농장 3

시험농장 3에서는 시험군 3두와 대조군 12두가 폐사되었으며, 폐사 일령과 폐사의 원인 아래 표에 정리하였다.

시험구분	개체번호	폐사일시	폐사일령	진단
대조군	1	6월 24일	16일령	대장균 설사증
대조군	19	7월 7일	29일령	이유자돈 대장균 설사증
대조군	13	7월 8일	30일령	이유자돈 대장균 설사증
시험군	4	7월 8일	30일령	이유자돈 대장균 설사증
시험군	5	7월 9일	31일령	이유자돈 대장균 설사증
대조군	5	7월 9일	31일령	살모넬라증
대조군	14	7월 10일	32일령	이유자돈 대장균 설사증
대조군	4	7월 19일	41일령	살모넬라증
시험군	12	8월 5일	58일령	살모넬라증
대조군	15	8월 10일	63일령	글래서씨병
대조군	18	8월 27일	80일령	이유후 전신성 소모성 증후군
대조군	3	8월 28일	81일령	이유후 전신성 소모성 증후군 과 파스튜렐라성 폐렴 증
대조군	8	8월 28일	81일령	글래서씨병
대조군	6	9월14일	98일령	이유후 전신성 소모성 증후군 과 글래서씨병 증
대조군	16	9월25일	109일령	파스튜렐라성 폐렴

(3) 사료 섭취량

1) 각 농장별 사료섭취량 비교

각 농장의 구간별 사료섭취량을 정리하여 시험군과 대조군을 비교하여, 유의성을 나타낸다.

주 령	시험농장 1			시험농장 2			시험농장 3		
	시험군	대조군	유의성	시험군	대조군	유의성	시험군	대조군	유의성
4	50.04	49.92	0.80	58.35	56.4	0.90	41.3	41.4	0.90
5	79.92	76.32	0.46	80.9	73.2	0.26	63.6	56.2	0.26
6	78.00	78.24	1.00	93.1	89.0	0.53	69.2	60.2	0.07
7	93.84	84.38	0.26	120.0	114.5	0.71	80.8	67.2	0.03
8	136.6	127.2	0.46	162.0	147.6	0.13	114.6	95.5	0.07
9	187.4	141.5	0.00	171.6	149.6	0.53	131.1	110.9	0.16
10	220.4	191.6	0.04	204.0	186.0	0.16	175.7	143.8	0.01
11	235.2	217.2	0.32	260.0	223.8	0.07	196.4	143.5	0.00
12	242.4	216.4	0.07	320.4	269.8	0.00	218.4	153.8	0.00
13	288.0	266.6	0.10	376.8	325.0	0.00	264.8	213.2	0.01
14	333.6	306.6	0.01	432.6	367.2	0.00	318.5	273.8	0.00
15	384.0	334.3	0.00	495.2	402.0	0.00	358.4	269.3	0.00
16	446.4	366.1	0.00	569.0	472.6	0.00	413.6	279.2	0.00

가) 시험농장 1

시험농장 1에서는 실험기간동안 시험군과 대조군의 사료 섭취량에서는 9주령, 10주령, 14주령, 15주령, 16주령에서 유의성이 관찰되었다.

나) 시험농장 2

시험농장 2에서는 12주령부터 시험이 종료된 16주령까지에서 시험군과 대조군의 사료 섭취량에서 유의성이 관찰되었다.

다) 시험농장 3

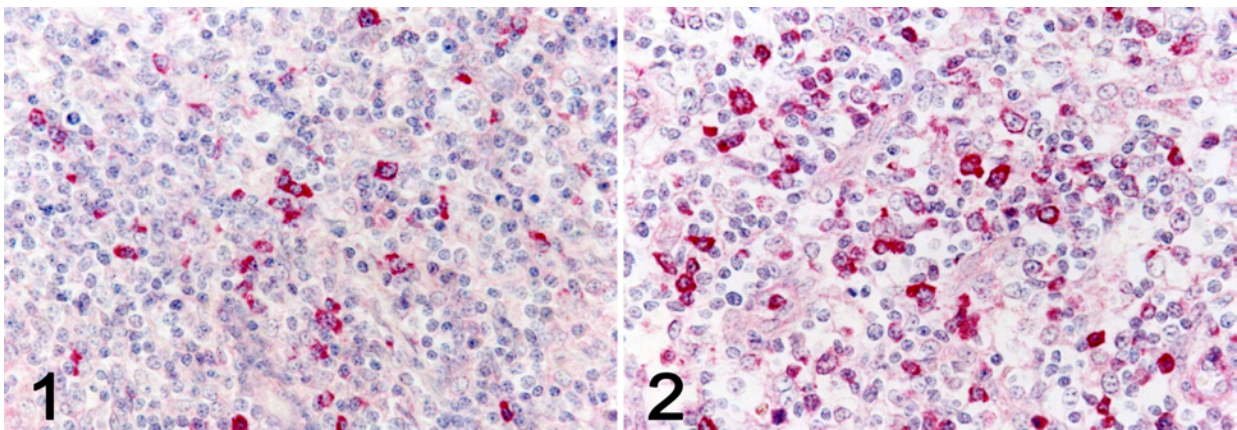
시험농장 3에서는 7주령, 10주령부터 16주령에서 시험군과 대조군의 사료 섭취량에서는 유의성이 관찰되었다.

라. 조직내 돼지 쉼코바이러스 2형 항원 비교

각 시험 농장 3개에서 시험군과 대조군 각 5두씩을 16주령에서 안락사 시킨 후 서혜 임파절을 채취하여 면역조직화학법을 이용하여 돼지 쉼코바이러스 2형의 존재 유무를 비교하였다. 아래 표1에 시험 농장 3개의 결과를 나타내고 있다. 각각의 시험 농장마다 Mann-Whitney test 방법을 이용한 통계학적 기법으로 분석한 결과 3개 농장 모두에서 대조군(그림 2)보다 시험군(그림 1)에서 유의성 있게 서혜 임파절에서 돼지 쉼코바이러스 2형의 항원이 적게 관찰되고 있다.

표1. 시험농장 3개에서 시험군과 대조군의 면역화학조직법 결과

	구 분	시험농장		
		1	2	3
시험군	공시두수	5	5	5
	돼지 쉼코바이러스 2형 양성세포 평균	12.2	21.96	31.08
	표준편차	2.494	5.794	8.299
대조군	공시두수	5	5	5
	돼지 쉼코바이러스 2형 양성세포 평균	61.32	78.8	74.44
	표준편차	13.584	16.581	17.892
유의성(p value)		$p < 0.001$	$p = 0.003$	$p < 0.001$



면역조직화학법 슬라이드

그림 1. 시험군의 서혜 임파절에서 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 면역조직화학법 결과

그림 2. 대조군의 서혜 임파절에서 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 면역조직화학법 결과.

마. 혈중 돼지 쉼코바이러스 2형 존재 유무

각 시험 농장 3개에서 시험군과 대조군 1번부터 20번을 대상으로 동일 개체를 시험기간 동안 채혈하여 혈액 중 쉼코바이러스 2형 유전자 검출을 실시한 결과를 다음 표와 같이 정리한다.

실험구분	채혈 일령	양 성 수 / 검 사 수		
		시험농장1	시험농장2	시험농장3
시험군	1주령	0 / 20 (0.0%)	0 / 20 (0.0%)	1 / 20 (5.0%)
	3주령	0 / 20 (0.0%)	3 / 20 (15.0%)	1 / 20 (5.0%)
	5주령	2 / 20 (10.0%)	3 / 20 (15.0%)	3 / 19 (15.8%)
	7주령	3 / 20 (15.0%)	4 / 20 (20.0%)	4 / 19 (21.1%)
	10주령	2 / 19 (10.5%)	3 / 19 (15.8%)	2 / 19 (10.5%)
	16주령	1 / 18 (5.5%)	2 / 19 (10.5%)	1 / 19 (5.3%)
대조군	1주령	0 / 20 (0.0%)	1 / 20 (5.0%)	0 / 20 (0.0%)
	3주령	1 / 20 (5.0%)	4 / 20 (20.0%)	2 / 19 (10.5%)
	5주령	3 / 20 (15.0%)	5 / 19 (26.3%)	4 / 16 (25.0%)
	7주령	5 / 16 (31.3%)	3 / 18 (16.7%)	3 / 15 (20.0%)
	10주령	4 / 16 (25.0%)	2 / 16 (12.5%)	3 / 14 (21.4%)
	16주령	2 / 15 (13.3%)	3 / 15 (20.0%)	2 / 11 (18.2%)

바. 종합평가

백신 개발에서 가장 중요한 부분 중의 하나는 안전성 평가이다. 따라서 본 시험방법에서는 국가검정동물용의약품검정기준에 의하여 시험농장 3개에서 안전성 평가를 실시하였다. 먼저 7일령에 1차 백신을 접종한 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간동안 백신 접종 돼지에서 쇼크, 발열, 구토, 식욕저하, 화농, 위축, 폐사 등의 관찰을 실시하여 어떠한 접종 돼지에서도 이러한 증상을 관찰 할 수가 없었다. 또한 접종후 1일부터 14일간 수의사에 의한 상기와 같은 임상증상의 발병 여부를 관찰하였지만 어떠한 부작용도 관찰 할 수가 없었다. 또한 21일령에 2차 백신을 접종한 후에도 1차 백신을 접종한 후에 시행하였던 안전성 평가를 동일하게 시행하여 어떠한 부작용도 관찰 할 수가 없었다.

돼지 쉐코바이러스 3형 불활화 백신의 항체 형성 능력의 검사에서도 시험군의 경우 3주령에 2차 백신을 접종한 후 2주가 경과되는 5주령부터 돼지 쉐코바이러스 2형에 의한 항체가 증가하기 시작하였으며, 3개 시험농장 모두에서 7주령(2차 백신접종후 4주후) 또는 10주령 (2차 백신접종후 7주후)에서 항체가가 가장 높게 형성되었으며 시험 종료인 16주령 (2차 백신접종후 13주후)까지 항체 수준이 유지됨을 확인 할 수가 있었다. 각각의 농장별로 항체가 형성 추이를 분석하면 시험군의 경우 3주령에 2차 백신을 접종한 후부터 항체수준이 증가하기 시작하여 7주령에부터 높은 항체 수준을 유지하며 16주령까지 완만하게 지속적으로 항체수준이 증가됨을 확인 할 수가 있었다. 따라서 시험군에서 이러한 항체가의 변화 양상은 백신에 의하여 형성된 항체의 변화로 이러한 경향을 보여준다. 반면에 대조군의 경우 전혀 다른 항체가 변화 양

성을 나타나는데 아미도 3주령부터 지속적으로 농장에 순환하는 돼지 썬코바이러스의 감염이 이루어져 항체가 형성되는 것으로 추정되던 7주령부터 높은 항체를 형성하는데 이시기가 농장에서 임상증상의 관찰수치가 증가하는 것과 일치하며, 증체율도 이시기에 시험군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 낮아지는 것을 확인 할 수가 있었다.

시험농장 2의 시험군은 시험농장1의 시험군과 매우 유사한 항체가 변화 양성을 나타내고 있다. 3주령에 2차 백신을 접종한 후부터 항체수준이 지속적으로 증가하여 7주령에서는 가장 높은 항체수준을 나타내고 있으면 그 후 완만하게 16주령까지 감소하고 있다. 반면에 대조군의 항체 변화 경향을 분석해 보면 1주령 항체가 3주령보다 높는데 이는 모돈에서 이행된 항체로 추정된다. 그 후 5주령에 다시 항체수준이 증가하는데 이러한 항체가 변화 추이를 보면 시험농장2의 경우 모돈의 이행항체가 감소함과 동시에 3-4주령에 농장에 순환하는 돼지 썬코바이러스 2형에 자연감염이 되는 것으로 추정된다. 그 후 자연 감염에 의한 항체수준이 10주령에서 가장 높게 나타나는데 이시기는 임상증상 관찰에서도 가장 심한 임상증상이 관찰되는 시기와 일치하는 것을 확인되고 있다.

시험농장 3의 시험군은 시험농장1과 2의 시험군과 매우 유사한 항체가 변화 양성을 나타내고 있다. 3주령에 2차 백신을 접종한 후부터 항체수준이 지속적으로 증가하여 10주령에서는 가장 높은 항체수준을 나타내고 있으면 그 후 완만하게 16주령까지 감소하고 있다. 반면에 대조군의 항체 변화 경향을 분석해 보면 1주령과 3주령에서는 낮은 항체수준을 지속하다 5주령부터 급격하게 항체수준이 증가하고 있다. 이는 이시기에 농장에 순환하는 돼지 썬코바이러스 2형에 자연 감염이 된 것으로 추정 된다. 이러한 자연 감염에 의한 항체는 지속적으로 10주령까지 증가한다. 이시기는 임상증상 관찰에서도 가장 심한 임상증상이 관찰되는 시기와 일치하는 것을 확인되고 있다.

야외임상 실험을 통한 백신의 효과의 판정 기준은 돼지 썬코바이러스 감염증(porcine circovirus-associated diseases)인 이유후 전신성 소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome)의 정의를 기준으로 하는 것이 가장 효과적이다 (Chae 등, 2004, 2005). 이러한 정의를 기준으로 보면 백신을 접종한 시험군의 경우 실험을 실시한 3개 농장에서 모두 증체율을 비교해 보면 시험농장1의 경우 이유후 전신성 소모성 증후군의 증상이 나타나기 시작하는 7주령부터 시험군과 대조군의 증체율이 통계학적인 유의성을 나타내기 시작하여 시험 종료 연령인 16주령까지 지속적으로 증체율의 차이를 관찰할 수가 있었다. 또한 시험농장2의 경우도 5주령부터 시험 종료 연령인 16주령까지 지속적으로 증체율의 차이를 관찰할 수가 있었다. 마지막으로 시험농장3의 경우 10주령부터 시험 종료 연령인 16주령까지 지속적으로 증체율의 차이를 관찰할 수가 있었다. 이러한 증체율의 차이는 사료섭취량의 차이와 연관이 있는 것으로 관찰되고 있다. 사료섭취량의 경우 구간별로 차이는 있지만 전반적인 경향은 시험군이 대조군보다 사료섭취를 많이 하였다. 이는 시험군에서 상대적으로 이유후 전신성 소모성 증후군의 증상이 발병하지 않았기 때문에 질병으로 인한 사료섭취 감소가 없었다. 임상증상 관찰 결과가 이유후 전신성 소모성 증후군의 증상 여부 및 정도의 차이를 뚜렷이 보여 주어 사료섭취량의 차이 결과를 충분히 설명하고 있다.

매주 수의사에 의하여 실시된 임상증상 관찰 결과에서도 2차 백신을 접종하는 3주령까지는 시험군과 대조군사이에 뚜렷한 임상증상의 차이가 없다. 다만 시험농장3의 경우 3주령전후에

서부터 대조군의 경우 대장균의 설사가 심하게 관찰되었다. 3주령 전후에 대장균이 발병한 정확한 원인은 알 수가 없지만 항체 형성능 검사 결과를 보면 3주령 이후부터 돼지 쉰코바이러스 2형의 자연 감염 양상이 나타나고 있는데 자연 감염된 돼지 쉰코바이러스 2형에 의하여 감염된 대장균에 의한 증상이 악화된 것으로 추정된다. 시험농장 3개 모두에서 매우 유사한 임상증상 관찰 양상이 관찰되었으며, 2차 백신 접종후 2주가 경과된 5주령부터 점진적으로 임상증상의 차이가 나타나기 시작하였다. 즉, 이유후 전신성 소모성 증후군의 전형적인 임상증상인 위축 등이 약 5-6주령부터 서서히 나타나서 7주령 이후에 임상증상이 매우 심해지고 증상이 심한 개체의 경우 지속적으로 폐사되는 것으로 관찰되었다.

본 야외임상 시험 기간 동안 각각의 농장에서 시험돼지의 폐사가 관찰되었다. 폐사된 시험동물의 경우 대부분 대조군에서 발병하였으며 돼지 쉰코바이러스와 관련된 질병이었다. 대조군에서 돼지 쉰코바이러스와 관련된 질병으로 폐사되었기 때문에 본 시험에서 선정한 3개의 시험농장은 이유후 전신성 소모성 증후군이 발병이 있는 농장임이 확인되었으며 시험농장의 선정도 적절하였다고 본다. 또한 대조군에서 돼지 쉰코바이러스와 관련된 질병이 발병하였고 시험군에서 대부분 대장균 설사증에 의한 이유초기의 탈수로 인한 폐사가 관찰되었기 때문에 폐사된 돼지의 분석에서도 본 시험의 돼지 쉰코바이러스 2형 불활화백신의 효과를 입증 할 수가 있었다.

돼지 쉰코바이러스 불활화백신에 의한 돼지 쉰코바이러스 증식 억제 효과를 가장 효과적으로 분석하기 위하여 시험 종료인 16주령 돼지의 서혜 임파절에서 부터 돼지 쉰코바이러스 2형 항체를 이용하여 면역조직화학법을 시행하였다. 이전 시험에서 서혜임파절은 다른 임파절에서 보다 돼지 쉰코바이러스의 항원 검출율이 높기 때문에 서혜임파절을 선정하여 면역조직화학법을 시행하였다 (Kim 등, 2003). 면역조직화학법의 결과 시험농장 3개 모두에서 시험군에서 대조군에 비하여 돼지 쉰코바이러스 감염 세포의 수가 통계학적으로 유의성 있게 적은 숫자가 나타났다. 이러한 결과는 돼지 쉰코바이러스 2형 불활화 백신이 효과적으로 임파절에서 돼지 쉰코바이러스의 증식을 억제한 것으로 확인되었다.

결론적으로 본 연구에서 개발한 돼지 쉰코바이러스 2형 불활화백신은 실험한 실시한 3개 농장에서 모두 안전성이 입증되었고, 백신을 접종한 시험군에서만 규칙적인 항체형성 양상이 관찰되었으며 2차 백신 접종후 2주가 경과된 5주령부터 점진적으로 항체가 형성되어 점진적으로 증가되어 2차 백신 접종후 4주 또는 7주가 경과된 7주령 또는 10주령에서 가장 높은 항체 수준이 관찰되었으며 그후 점진적으로 시험 종료시점까지 감소하였다. 또한 증체율, 임상증상 관찰, 폐사율, 면역조직화학법을 이용한 임파절에서 바이러스 감염 양성수의 분석에서도 시험군이 대조군에 비하여 통계학적인 유의성이 있기 때문에 돼지 쉰코바이러스 2형 불활화백신의 효능을 본 야외 임상 시험 결과로 명확하게 증명하였다.

2. 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신의 면역학적 반응 연구 결과

가. ELISA 항체 검사

각 연령별 두 백신군과 대조군의 항체 형성 차이는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통해 유의성을 분석하였다. 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 항체 검사 결과, 대조군의 경우 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 항체가 실험이 종료되는 시점까지 나타나지 않았다. 백신군의 경우 1차 백신 접종 후 14일이 지난 3주령부터 항체가 생성되기 시작하여 실험이 종료되는 2차 백신 접종 후 42일이 지난 9주령까지 IgG 수준이 유지되는 것으로 나타났다(그림 1).

표 1. 연령별 돼지썬코바이러스 항체 수준 비교

실험 구분	공시 두수	연령별 ELISA S/P 값 (평균±표준편차)				
		1주령	3주령	5주령	7주령	9주령
백신군	5	0.112±0.061	0.312±0.112	0.656±0.146	0.843±0.185	0.854±0.221
대조군	5	0.106±0.038	0.153±0.032	0.122±0.068	0.113±0.045	0.135±0.033
유의성 (P value)		P=0.78	P<0.05	P<0.05	P=0.01	P=0.01

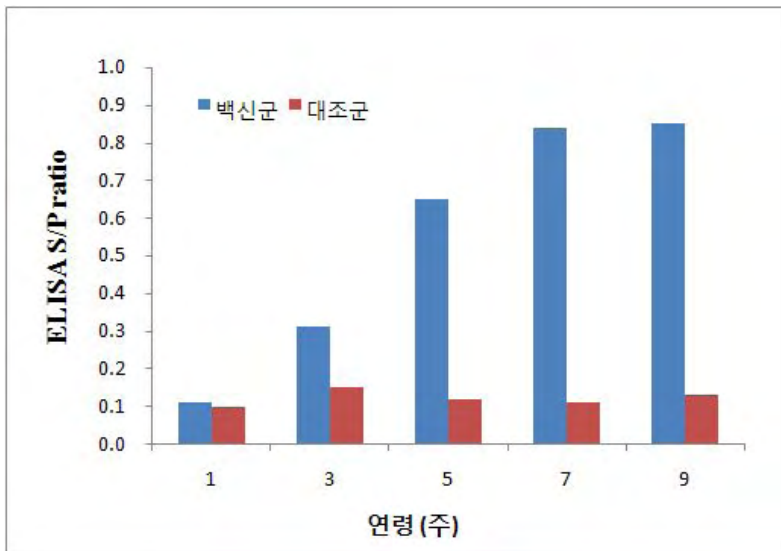


그림 1. 각 군별 돼지 썬코바이러스 2형 IgG 생성 수준

나. 중화항체 역가 검사

각 연령별 두 백신군과 대조군의 중화 항체 형성 차이는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통해 유의성을 분석하였다. PK-15 세포에 돼지 썬코바이러스 2형이 감염되는 것을 막는 혈청 내 중화항체 검사에서는 대조군의 경우 실험이 종료되는 시점까지 중화항체가 나타나

지 않았다. 백신군의 경우 1차 백신 접종 2주 후부터 중화항체가 나타나기 시작하여 실험이 종료되는 2차 백신 접종 후 42일이 지난 9주령 까지 유지되는 것으로 나타났다(그림 2)

표 2. 각 연령별 중화항체 역가 비교

실험 구분	공시 두수	중화항체 역가 Log ₂ (평균±표준편차)				
		1주령	3주령	5주령	7주령	9주령
백신군	5	0.2±0.42	1.2±0.44	2.6±0.54	3.6±0.55	3.4±0.54
대조군	5	0.2±0.42	0.2±0.42	0.4±0.89	0.2±0.42	0.2±0.42
유의성 (P value)		P=1.00	P<0.05	P<0.05	P=0.01	P=0.01

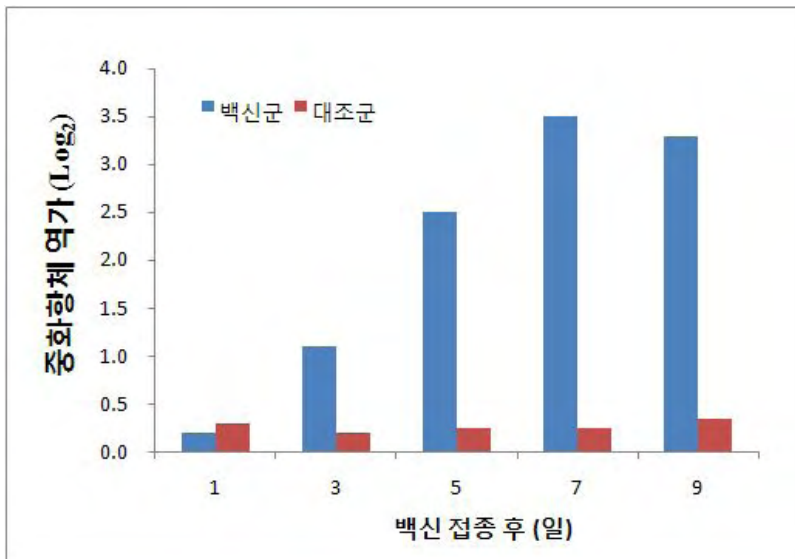


그림 2. 각 군별 돼지 쉐코바이러스 2형 중화항체 역가

다. 유세포 분석 결과

각 연령별 두 백신군과 대조군의 CD3 및 CD4 비율은 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통해 유의성을 분석하였다. T 림프구를 대표하는 CD3 양성세포와 helper T 림프구를 대표하는 CD4 양성세포를 측정하였다. CD3 양성세포의 비교에서는 1차, 2차 백신 접종 전과 2차 백신 접종 후 42일이 지난 9주령에는 백신군과 대조군 사이에 유의성 있는 차이가 나타나지 않았으며 2차 백신 접종 후 14일, 28일이 지난 5주령과 7주령에 백신군이 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 나타냈다(P<0.05).

CD4 양성세포의 비교에서도 1차, 2차 백신 접종 전과 백신 접종 42일 후에는 두 군별 유의성 있는 차이가 나타나지 않았고 백신 접종 후 14일, 28일이 지난 5주령, 7주령에 백신군이 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보였다(P<0.05).

표 3. 각 연령별 CD3 양성세포 비율 비교

실험 구분	공시 두수	CD3 양성세포 비율 % (평균±표준편차)				
		1주령	3주령	5주령	7주령	9주령
백신군	5	47.3±5.41	53.1± 5.24	68.7± 7.56	70± 5.35	67.5± 6.14
대조군	5	46.5±4.43	54.3± 6.12	56.5± 6.29	61.2± 6.12	61.4± 5.92
유의성 (P value)		P=0.76	P=0.87	P<0.05	P<0.05	P=0.08

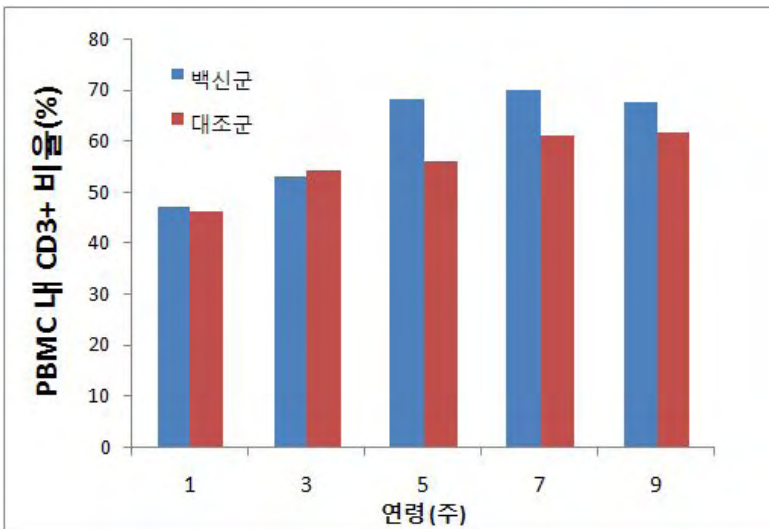


그림 3. 각 군별 CD3 양성 세포 비교

표 4. 각 연령별 CD4 양성세포 비율 비교

실험 구분	공시 두수	CD4 양성세포 비율 % (평균±표준편차)				
		1주령	3주령	5주령	7주령	9주령
백신군	5	17.1±3.47	20.1± 3.24	28.4± 3.63	29.2± 4.15	26.6± 5.24
대조군	5	17.5±2.52	19.3± 4.45	20.1± 3.27	23.1± 3.21	22.9± 4.51
유의성 (P value)		P=0.82	P=0.79	P<0.05	P<0.05	P=0.15

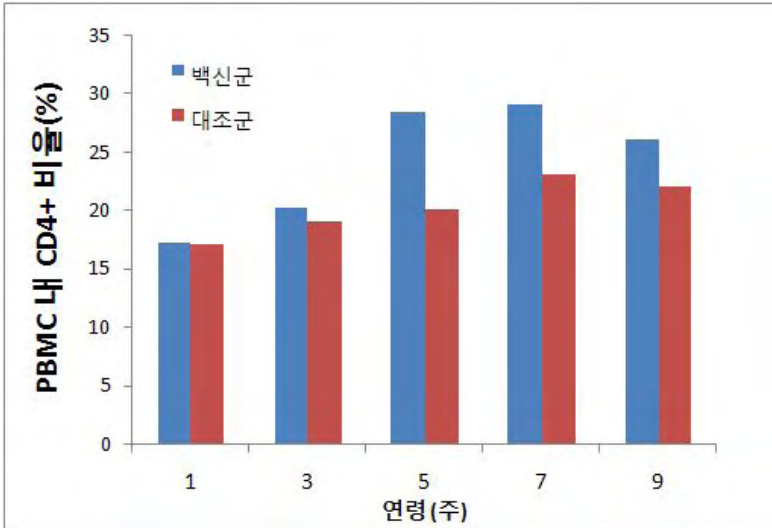


그림 4. 각 군별 CD4 양성 세포 비교

라. IFN- γ 분비 세포 수 측정

각 연령별 두 백신군과 대조군의 IFN- γ 분비 세포 수 비교는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통해 유의성을 분석하였다. IFN- γ 분비 세포 개수를 측정하여 백신 접종 후 IFN- γ 분비 세포 변화 양상을 확인하였다. 대조군에서 채취한 말초혈액 단핵구(PBMC)의 경우 모든 실험 시점에서 돼지 쉼코바이러스 2형 항원에 대한 자극에 반응이 없는 것으로 확인되었다. 백신군의 경우 1차 백신 접종 후 14일부터 확인되기 시작하여 2차 백신 접종 후 28일인 7주령에 가장 높게 나타났으며 실험이 종료되는 2차 백신 접종 후 42일이 지난 9주령까지 유지되는 것으로 확인되었다(그림 5).

표 5. IFN- γ 분비 세포 수 비교

실험 구분	공시 두수	IFN- γ 분비 세포 개수 (평균±표준편차)				
		1주령	3주령	5주령	7주령	9주령
백신군	5	0	14.4±6.13	42.1±8.62	62.3±9.52	59.1±8.55
대조군	5	0	0	0	0	0
유의성 (P value)		-	P=0.01	P=0.01	P=0.01	P=0.01

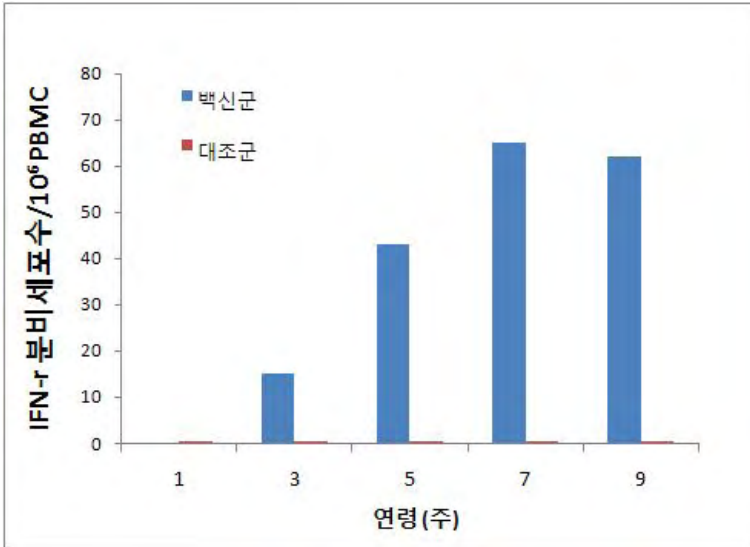


그림 5 . IFN- γ 분비세포 수

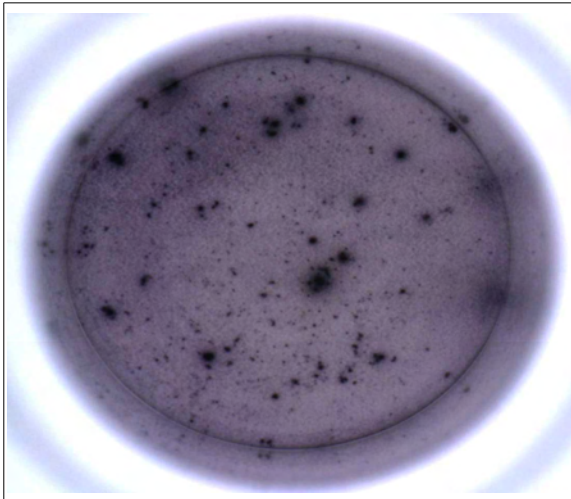


그림 6. 백신군 IFN- γ 분비세포 측정

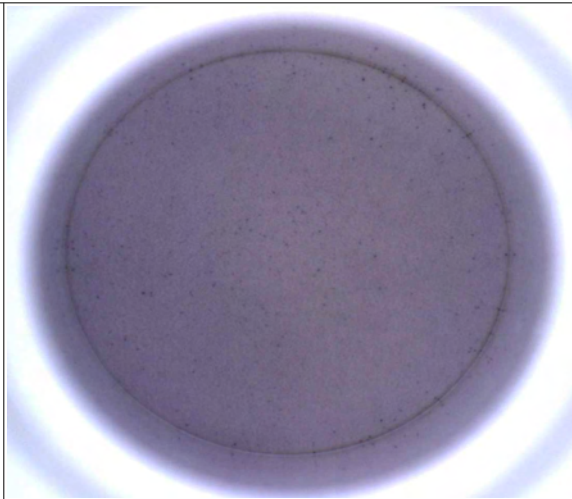


그림 7. 대조군 IFN- γ 분비세포 측정

마. 지연형 과민반응 검사(delayed type hypersensitivity) 측정

피내 항원 주입을 통해 면역 반응을 측정된 결과, 2차 백신 접종 후 2주가 경과된 백신군의 경우 대조군과 유의성을 보이며 반응이 높게 나타났다($P < 0.01$). 백신군의 경우 백신 접종 36 시간 후 가장 높게 나타났으며, 피부 발적과 함께 융기가 관찰되었다.

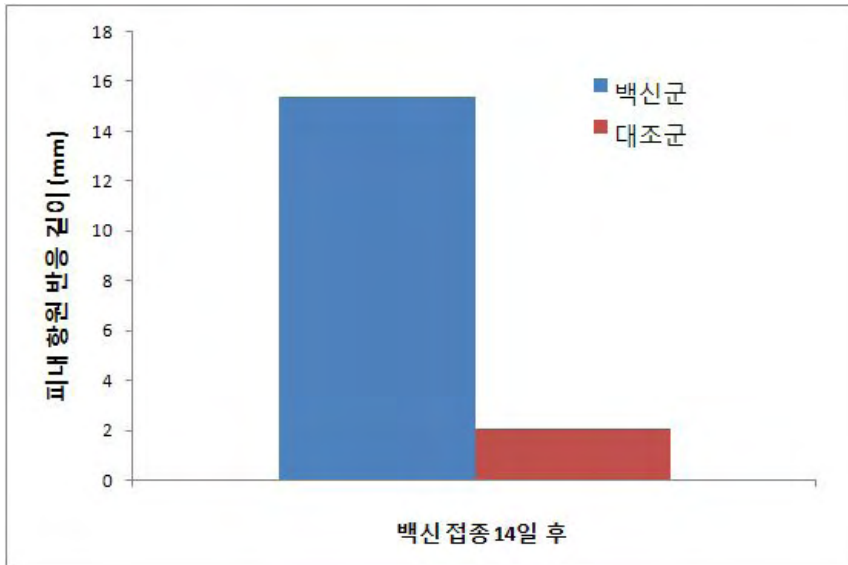


그림 8. 백신 접종 14일 후 DTH 반응 비교

바. 고찰

체액성 면역(humoral immunity)중에서 IgG와 더불어 중화항체가 돼지 썬코바이러스 2형 감염 예방에 중요한 역할을 한다. 특히 체액성 면역으로 유도되는 혈청 중화 항체(serum neutralizing antibody)는 돼지 썬코바이러스 2형 바이러스를 감소시키는 데 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 실험에서는 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신의 IgG 생성 수준과 더불어 중화항체 생성 효과를 확인하였다. 또한 세포성 면역(cell-mediated immunity)도 돼지 썬코바이러스 2형 감염 예방에 중요한 역할을 한다. 체액성 면역(humoral immunity)의 경우 항체를 측정하면 객관적인 면역 여부를 확인 할 수가 있지만 세포성 면역의 경우 세포성 면역의 유도 여부를 정확히 분석하는 보편적으로 공인된 검사 방법이 없기 때문에 본 실험에서는 FACS(fluorescence-activated cell sorting)를 통한 T-림프구의 반응 실험과 enzyme-linked immunospot (Elispot) assay를 이용한 인터페론-감마(interferon- γ)를 분비하는 세포의 수, 지연형 과민반응(delayed-type hypersensitivity) 등의 실험 방법을 이용하여 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신의 세포성 면역 유도 여부를 확인하고자 하였다.

먼저 체액성 면역 유도 실험에서는 백신 접종군의 경우 2차 백신 접종 후 14일이 지난 5주령부터 IgG 형성 수준이 양성을 나타내었으며 실험이 종료되는 8주령까지 유지가 되었다. 이를 통하여 바이러스가 유입되지 않아도 IgG의 수준이 2차 백신 접종 42일 이후까지 높게 유지될 수 있음을 확인할 수 있었다. 중화항체 역가 실험에서는 IgG와 마찬가지로 2차 백신 접종 14일 후부터 중화항체가 나타나기 시작하여 2차 백신 접종 28일 후에 가장 높게 나타났으며 42일 후에도 유지되는 양상을 나타내었다. 두 가지 항체 형성 수준을 통해서 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신이 체액성 면역 효과가 있음을 입증하였다.

세포성 면역 유도 확인을 위한 실험에서 먼저 CD3와 CD4 림프구의 비율의 변화 양상을 측정한 결과 대조군에 비하여 백신군에서 2차 백신 접종 후 14일, 28일에 각각 유의성을 보이며 높게 나타났다. 이를 통해 백신 접종군의 혈액 내 림프구가 증가하였음을 확인할 수가 있었고

그 중 IFN- γ 를 분비하여 세포 매개성 면역반응에 중요한 역할을 하는 CD4 세포가 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다.

IFN- γ 는 세포성 면역 반응에 가장 중요한 반응을 이끄는 사이토카인으로 직접적으로 바이러스 증식을 억제할 뿐만 아니라 대식 세포, 임파구 등 면역세포가 증식하거나 활성화하는 데 결정적인 역할을 한다. 본 실험에서는 IFN- γ 를 분비하는 세포를 직접 확인하여 백신군에서 분비 세포 수의 양상을 확인하였다. 1차 백신 접종 14일 후부터 분비세포가 증가하기 시작하였고 2차 백신 접종 28일 후에 가장 높게 나타났으며 42일 후부터 감소하는 양상을 나타냈다. 이는 앞선 유세포 분석의 CD4 양성 세포의 증가와 유사한 양상을 보였다. 지연형 과민반응(DTH) 측정에서는 2차 백신 접종 14일 후에 피내에 항원을 주입하여 면역 반응을 확인하였다. 백신군의 경우 항원 주입 36시간 후에 피부의 발적 반응과 피부가 융기되어 두꺼워졌으며 대조군과 유의성 있는 차이를 보였다. 이러한 면역 반응은 백신 접종에 의해 감작된 T 임파구가 항원에 반응하여 IFN- γ 를 분비하고 이에 따라 항원 주입 부위에 면역 세포들이 빠르게 유입되어 발생한 것이다. 백신군의 이러한 면역반응을 통해서 개발된 돼지 썩코바이러스 2형 단일백신이 T 임파구를 충분히 자극하여 효과를 나타냈음이 입증되었다. 이번 실험을 통하여 개발된 돼지 썩코바이러스 2형 단일백신이 항체 생성 능력을 증가시키는 체액성 면역 효과, 뿐만 아니라 더불어 T 임파구 증식, IFN- γ 분비세포를 증가시키는 등 세포성 면역에도 효과가 있음이 확인되었다.

3. 개발된 돼지 썩코바이러스 2형 단일백신과 수입 썩코바이러스 단일백신의 비교 효능 검사

가. 임상증상 관찰 결과

백신군과 대조군 각 개체의 임상 증상 점수를 측정하여 표와 그래프로 표현하고, 두 그룹간의 차이를 통계적 유의성으로 설명한다(표 1). 유의성 검사는 일반 선형 모델(generalized linear mixed model)을 이용하여 백신군과 대조군의 연령에 따른 임상증상 점수의 차이를 분석하고 각 연령별 차이는 아래 표의 백신군과 대조군의 임상증상 합계를 사용하지 않고, 백신군과 대조군의 임상증상 합계의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

유의성 분석 결과, 실험 종료 할 때까지 백신군1과 백신군2 사이에 각 시기별 임상증상은 유의성을 나타내지 않았다. 백신 접종 시기인 1, 3주령과 공격접종 시기인 7주령에서는 두 백신군과 대조군의 임상점수가 유의성을 나타내지 않았고, 공격접종을 실시한 한 후 1주가 지난 8주령에서 시험이 종료되는 10주령까지 두 백신군이 대조군에 비하여 임상점수가 유의성 ($P<0.05$)을 보이며 낮게 나타났다.

표 1. 각 군별 임상 점수 결과

구분	시험 두수	임상 점수 (각 군별 개체의 임상증상 합계; 주령)					
		1 (1차 백신접종)	3 (2차 백신접종)	7 (공격접종)	8	9	10 (부검전)
백신군1	10	0	0	0	0	0.3±0.5	0.2±0.4
백신군2	10	0	0	0	0.6±0.4	0.6±0.4	0.4±0.5
대조군	5	0	0	0	1.0±0.8	1.6±0.7	2.0±1.5
유의성 (P value)		P=1.0	P=1.0	P=0.81	P=0.04	P=0.02	P=0.02

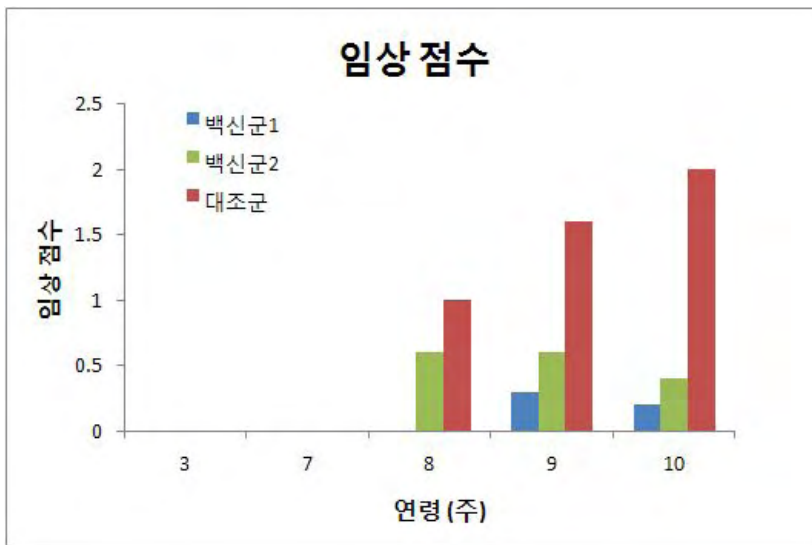


그림 1. 각 군별 임상 점수 결과

나. 증체량 비교

백신군과 대조군의 1주령(1차 백신 접종 전), 3주령(2차 백신 접종 전), 5주령(2차 백신 접종 2주 후), 7주령(공격접종시기), 8주령, 9주령, 10주령(부검전)에 공시돈의 체중을 측정하여 주당 증체량을 비교하고(표 6), 일반 선형복합 모델(generalized linear mixed model)을 이용하여 백신군과 대조군 사이의 주령별 체중 변화를 분석하였다. 체중과 대조군의 증체량 차이는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통하여 유의성을 분석하였다. 실험이 종료되는 10주령까지 각 연령별 두 백신군 사이에는 유의성이 나타나지 않았다. 실험 시작 시점인 1차 백신 접종 전의 1주령과 2차 백신 접종 전인 3주령, 백신 접종 2주 후인 5주령, 공격 접종 시기인 7주령, 공격 접종 1주 후인 8주령 돼지에서는 백신군과 대조군 사이에 체중의 유의성이 나타나지 않았다. 공격접종을 실시한 후 2주가 지난 9주령, 시험이 종료되는 10주령에서는 백신군이 대조군에 비하여 증체율이 유의성($P<0.05$) 있게 증가하였다.

표 2. 각 군별 체중 변화

	구 분	주 령							증체율 (%)
		1	3	5	7	8	9	10	
백신군 1	공시두수	10	10	10	10	10	10	10	1080
	평균체중	2.65	6.45	10.60	17.30	21.53	25.51	28.62	
	표준편차	0.11	0.25	2.08	1.99	1.76	2.33	2.49	
	구간평균증체	-	3.8	+4.15	+6.70	+4.23	+3.98	+3.11	+25.9
백신군 2	공시두수	10	10	10	10	10	10	10	1050
	평균체중	2.68	6.45	10.86	17.35	21.42	25.31	28.15	
	표준편차	0.27	0.25	2.08	1.99	1.76	2.33	2.82	
	구간평균증체	-	3.77	+4.41	+6.49	+4.07	+3.89	+2.84	+25.5
대조군	공시두수	5	5	5	5	5	5	5	958
	평균체중	2.70	6.37	10.58	17.35	20.49	23.79	25.89	
	표준편차	0.18	0.16	2.18	2.57	3.06	3.92	3.52	
	구간평균증체	-	3.67	+4.21	+6.77	+3.14	+3.30	+2.10	+23.19
유의성 (P value)		-	<i>P</i> =0.78	<i>P</i> =0.62	<i>P</i> =0.83	<i>P</i> =0.06	<i>P</i> =0.04	<i>P</i> =0.03	

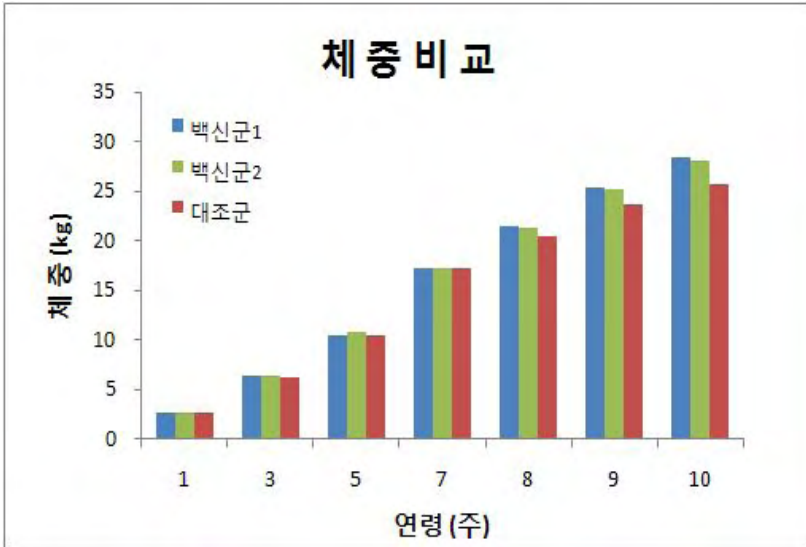


그림 2. 각 군별 체중 변화 비교



그림 3. 부검 전 백신군과 대조군 비교 사진

다. 항체 형성능 확인 실험 결과

백신군과 대조군 모든 개체를 백신 접종 전(1,3주령)과 2차 백신 접종 2주 후(5주령), 공격접종(7주령), 공격접종 후 1주(7주령), 공격접종 후 2주(8주령), 공격접종 후 3주(10주령)에 채혈하고 혈액 중에서 썬코바이러스 2형에 대한 ELISA 항체검사를 실시하였다. 일반 선형복합 모델(generalized linear mixed model)을 이용하여 백신군과 대조군의 연령 변화에 따른 항체 형성 차이를 분석하였으며, 각 연령별 백신군과 대조군의 항체 형성 차이는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통해 유의성을 분석하였다(표 3). 백신 접종 전인 1주령, 3주령에서는 각 백신군과 대조군 사이에 항체형성의 유의성이 나타나지 않았다. 백신 접종 시기부터 실험이 종료되는 10주령까지 백신군1과 백신군2 사이에 항체 형성 수준은 유의성을 나타내지 않았다. 2차 백신 접종 후 2주가 지난 5주령부터 실험이 종료되는 공격접종 3주 후인 10주령까지 백신군이 대조군에 비해 항체형성이 유의성($P < 0.05$)을 보이며 증가한 것으로 나타났다.

다.

표 3. 각 군별 항체 형성가 비교

실험 구분	공시 두수	연 령 별 ELISA S/P 값 (평균±표준편차)						
		1주령	3주령	5주령	7주령	8주령	9주령	10주령
백신군1	10	0.141± 0.015	0.241± 0.042	0.387± 0.078	0.647± 0.178	0.983± 0.238	1.153± 0.275	1.135± 0.231
백신군2	10	0.132± 0.011	0.132± 0.011	0.373± 0.128	0.519± 0.159	0.854± 0.211	1.093± 0.215	1.095± 0.312
대조군	5	0.143± 0.008	0.143± 0.008	0.149± 0.008	0.147± 0.008	0.252± 0.078	0.392± 0.112	0.765± 0.213
유 의 성 (P value)		P=1.00	P=1.00	P<0.05	P=0.001	P=0.001	P=0.001	P<0.001

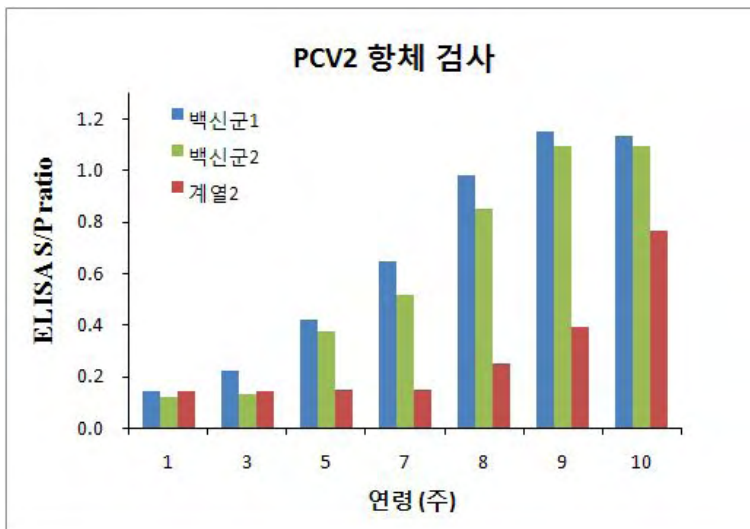


그림 4. 각 군별 돼지 쉐코바이러스 2형 항체 형성가 비교

라. 유세포 분석 결과

T 림프구를 대표하는 CD3 양성세포와 helper T 림프구를 대표하는 CD4 양성세포를 측정한 결과, CD3 양성세포의 비교에서는 백신 접종시기인 1주령, 3주령부터 실험이 종료되는 10주령까지 백신군1과 백신군2 사이에 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다. 2차 백신 접종 2주 후부터 실험이 종료되는 10주령까지 두 백신군이 대조군에 비하여 CD3 양성세포 비율이 유의성 있게 증가한 것으로 나타났다($P<0.05$).

CD4 양성세포의 비교에서는 CD3와 마찬가지로 두 백신군 사이에 유의성 있는 차이가 나타나지 않았으며 2차 백신 접종 2주 후부터 실험이 종료되는 10주령까지 두 백신군이 대조군에 비하여 CD4 양성세포 비율이 유의성 있게 증가한 것으로 나타났다($P<0.05$).

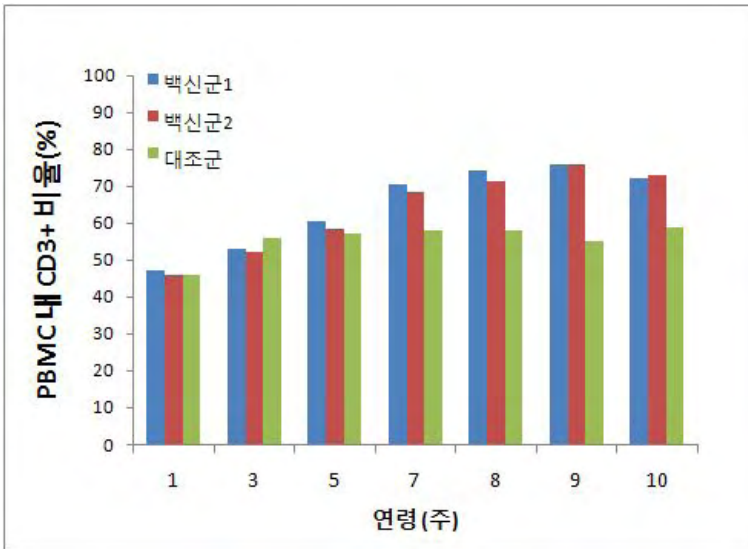


그림 5. 각 군별 CD3 양성 세포 비교

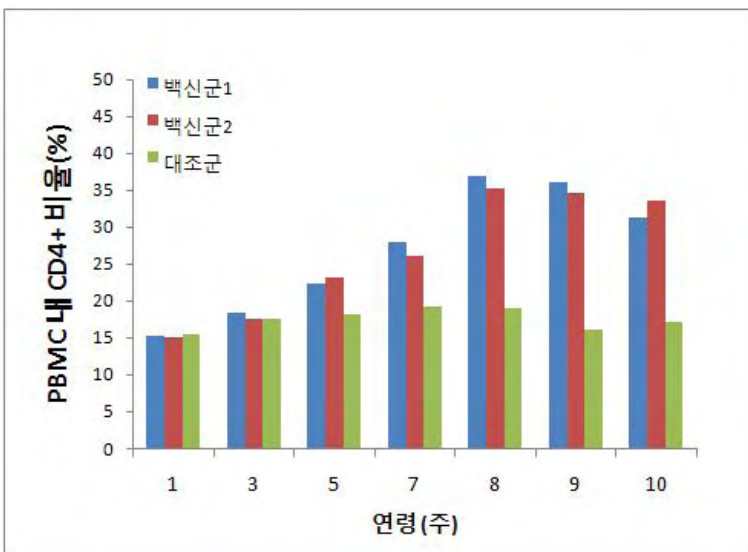


그림 6. 각 군별 CD4 양성 세포 비교

마. IFN- γ 분비 세포 수 측정

돼지 쉼코바이러스 2형에 특이적으로 반응하는 IFN- γ 분비 세포 개수를 측정하여 백신 접종 후 IFN- γ 분비 세포 변화 양상을 확인하였다. 2차 백신 접종시기인 3주령부터 실험이 종료되는 공격 접종 3주후인 10주령까지 두 백신군 사이에 IFN- γ 분비 세포 수는 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다. 대조군의 경우 공격 접종 시기인 7주령까지 돼지 쉼코바이러스 2형 항원에 대한 자극에 반응이 없는 것으로 확인되었으며, 공격 접종 2주 후인 5주령부터 실험이 종료되는 10주령까지 두 백신군이 대조군에 비하여 IFN- γ 분비 세포가 유의성 있게 증가한 것으로 나타났다($P < 0.05$).

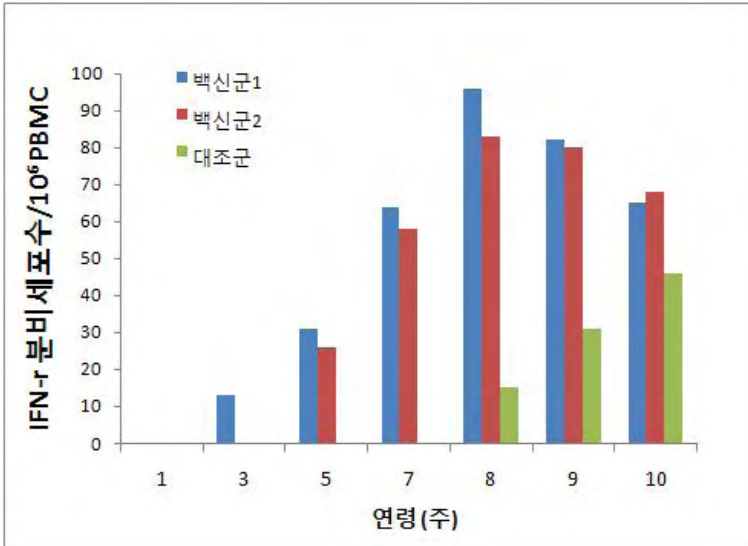


그림 7. IFN- γ 분비 세포 수

바. 지연형 과민반응(delayed type hypersensitivity) 측정

2차 백신 접종 후 2주가 경과된 시점에서 지연형 과민반응 유도를 위해 돼지 썬코바이러스 2형 항원을 피내 주입하여 면역 반응을 측정된 결과, 두 백신군 사이에 반응 차이는 유의성이 나타나지 않았으며, 두 백신군은 대조군과 유의성을 보이며 반응이 높게 나타났다($P < 0.01$). 두 백신군 모두 항원 주입 24-36시간 후에 반응이 가장 높게 나타났으며, 피부 발적과 함께 융기가 관찰되었다 (그림 9,10)

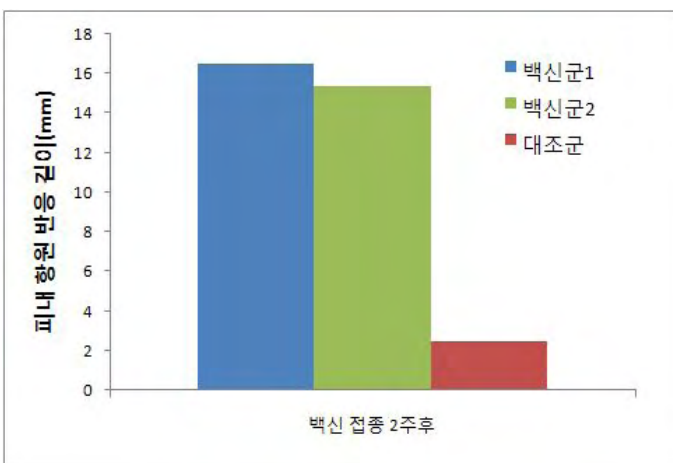


그림 8. 2차 백신 접종 14일 후 DTH 반응 비교



그림 9. 백신군1 DTH 반응 사진



그림 10. 대조군 DTH 반응 사진

사. 병리조직학적 병변 형성 비교

돼지 쉼코바이러스 2형 감염 때에 나타나는 전형적인 병변인 서혜 임파절에서 임파구의 감소 (lymphoid depletion)에 대한 두 백신군과 대조군의 비교에서 백신군1의 경우 공시돈 10두 중 7두에서 어떠한 병리조직학적 병변이 관찰되지 않았으며(스코어 0; 그림 11-1), 3두에서 경미한 임파구의 감소(스코어 1)가 관찰되었다. 백신군 2의 경우는 공시돈 10두 중 6두에서 병리조직학적 병변이 관찰되지 않았으며, 3두에서 경미한 임파구의 감소, 1두에서 중등도의 임파구 감소가 관찰되었다(스코어 2; 그림 11-2). 대조군의 경우 공시돈 5두 중 2두에서 경미한 임파구의 감소가 관찰되었으며, 1두에서 중등도의 임파구의 감소가 관찰되었고, 1두에서 매우 심한 임파구의 감소(스코어 4; 그림 11-3)를 보였으며, 나머지 1두에서는 육아종성 염증 병변을 동반한 심한 임파구 감소(스코어 5; 그림 11-4)가 나타났다.

백신군과 대조군의 병변 정도 차이는 Fisher's exact test를 통해 각 병변 스코어의 빈도를 분석하여 유의성을 측정하였다. 그 결과 두 백신군 사이에 병변의 차이는 유의성을 나타내지 않았으며 백신군은 대조군에 비하여 서혜 임파절 병변이 유의성($P < 0.05$)을 보이며 낮게 나타났다(표 6).

표 4. 각 군별 서혜 임파절 병변 스코어

개체번호	백신군1	백신군2	대조군
1	0	0	1
2	0	1	2
3	1	1	1
4	0	2	5
5	0	0	3
6	1	0	-
7	1	0	-
8	0	1	-
9	0	0	-
10	0	0	-
평균 ± 표준편차	0.30±0.48	0.40±0.69	2.40±1.33
유의성 (<i>P</i> value)	<i>P</i> <0.05		

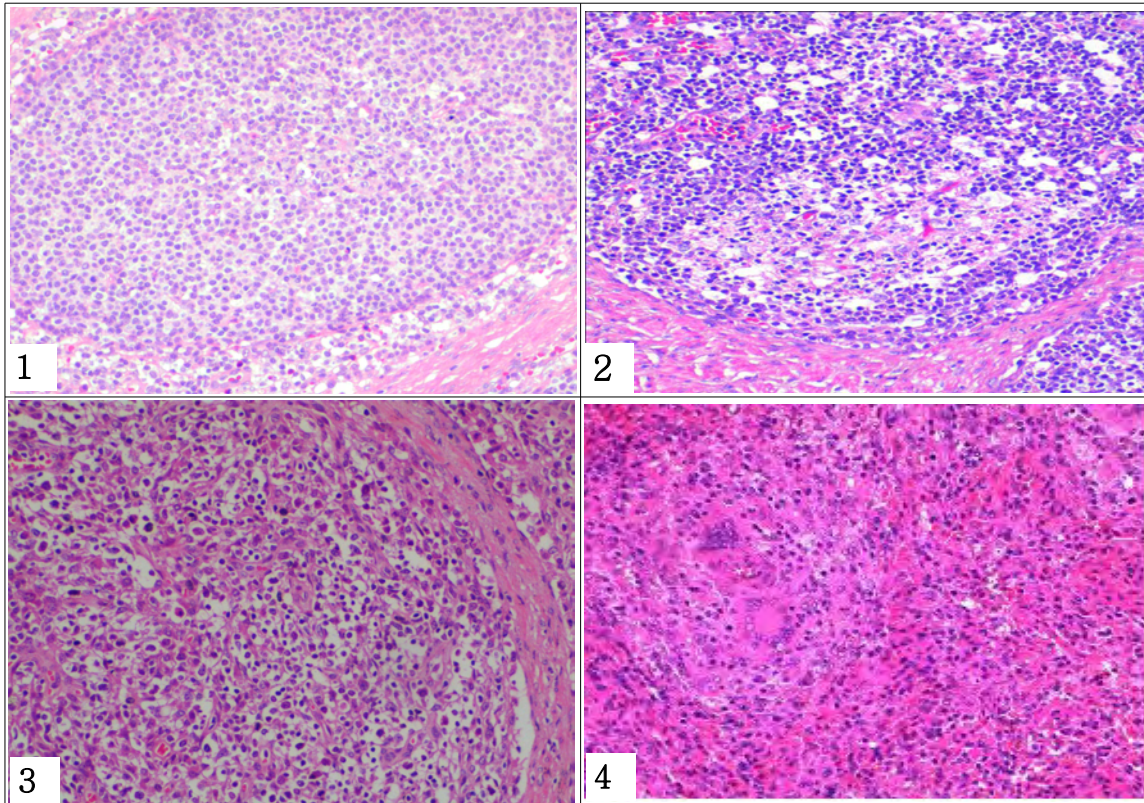


그림 1. 병변 스코어 0, 임파절에서 follicle이 정상으로 관찰되었다.
 그림 2. 병변 스코어 2, 임파절에서 follicle에 있는 임파구가 과사되어
 중증도의 임파구의 감소(depletion)가 관찰되었다.
 그림 3. 병변 스코어 3, 대조군 개체의 임파절에서 follicle에 있는 임파구가 심하게 소실되어
 관찰되었다.
 그림 4. 병변 스코어 5, 대조군 개체의 임파절에서 다핵 거대세포가 나타난 육아종성 염증이
 관찰되었다.

그림 11. 서혜 임파절 병변 비교 슬라이드

아. 혈중 돼지 쉼코바이러스 2형 항원 비교

백신군과 대조군 3주, 7주, 8, 9, 10주령에 각 개체별로 채혈하고 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 혈액 중에서 돼지 쉼코바이러스 2형의 양을 정량 분석한 결과는 아래 표와 같다(표 7). 일반 선형복합 모델(generalized linear mixed model)을 통하여 백신군과 대조군의 연령 변화에 따른 혈중 돼지 쉼코바이러스 2형의 항원양의 차이를 분석하였고, 각 군의 연령별 항원양의 차이는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통해 유의성을 분석하였다.

2차 백신 접종시기인 3주령과 공격접종 시기인 7주령에서는 모든 개체에서 혈액 내 항원이 검출되지 않았다. 두 백신군의 비교에서 공격접종 후 1주가 지난 8주령에서 백신군1이 백신군 2에 비하여 혈액 내 항원이 유의성을 나타내며 감소하였으며($P < 0.05$), 나머지 시기에서는 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다. 공격접종 후 1주가 지난 8주령부터 실험이 종료되는 10주령까지 백신군이 대조군에 비하여 유의성을 보이며 혈액 내 항원이 감소한 것으로 나타났다($P < 0.01$).

표 7. 각 군별 혈중 돼지 썬코바이러스 2형 항원 정량

실험 구분	공시 두수	연령별 Log ₁₀ PCV2 genomic copy 수 (평균±표준편차)				
		3주령	7주령	8주령	9주령	10주령
백신군1	10	0	0	1.15± 0.15	1.71± 0.31	0.85± 0.19
백신군2	10	0	0	1.61± 0.26	1.95± 0.29	0.96± 0.14
대조군	5	0	0	4.36± 0.51	6.59± 0.69	6.12± 0.85
유의성 (P value)		P=1.00	P=1.00	P=0.001	P=0.001	P<0.001

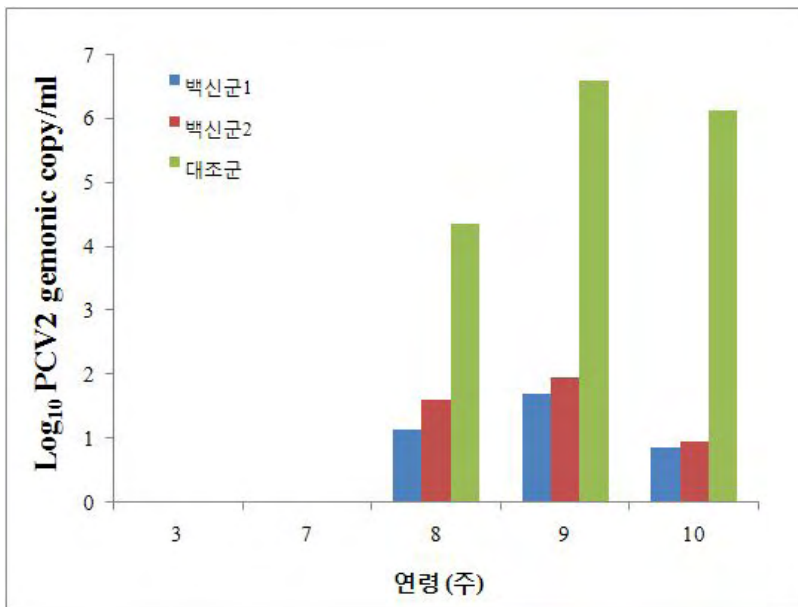


그림 12. 각 군별 혈중 돼지 썬코바이러스 2형 항원 정량

자. 조직 내 돼지 썬코바이러스 2형 증식 비교

백신군과 대조군 9주령 돼지에서 채취한 서혜 임파절을 이용하여 면역염색법을 실시한다. 면역염색법은 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 다클론성 항체(polyclonal antibody)를 사용하였고, 서혜 임파절 조직에서 관찰되는 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 항원을 현미경상에서 0.25mm²의 면적 5곳을 임의로 정하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 측정된 결과 아래 표와 같다(표 8). 돼지 썬코바이러스 2형의 항원은 감염세포의 세포질에서 관찰되었으며, 백신군1에서는 평균 5.51±8.1 개의 양성세포가 관찰되었고(그림 13-1), 백신군2에서는 평균 6.41±7.9 개의 양성세포가 측정되었다. 대조군의 경우에는 평균 59.28±27.76 개의 양성세포가 관찰(그림 13-2) 되었다. 두 백신군 사이에 서혜 임파절의 돼지 썬코바이러스

2형에 대한 양성 세포수는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았으며, 두 백신군은 대조군에 비해 통계학적으로 유의성($P<0.01$)을 보이며 양성세포 수가 적게 나타났다.

표 8. 서혜 임파절 돼지 쉼코바이러스 2형 양성 세포 수

개체번호	백신군1	백신군2	대조군
1	0	6.2	45.9
2	5.9	0	35.2
3	0	0	37.1
4	0	11.2	83.9
5	0	0	94.3
6	10.6	0	-
7	0	0	-
8	21.5	15.3	-
9	17.1	8.9	-
10	0	13.2	-
평균±표준편차	5.51±8.1	6.41±7.9	59.28±27.76
유의성 (P value)	$P<0.01$		

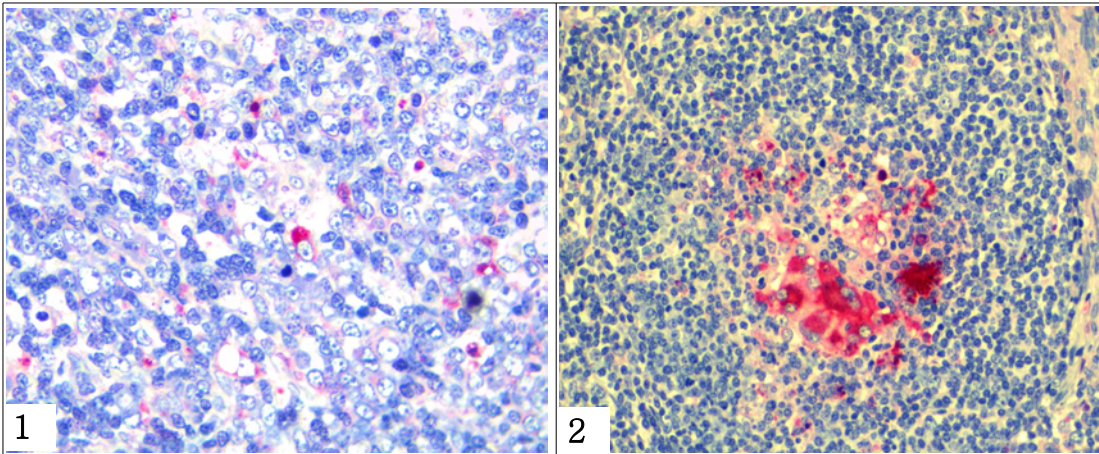


그림 1. 백신군의 서혜 임파절에서 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 면역조직화학법.

그림 2. 대조군의 서혜 임파절에서 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 면역조직화학법.

그림 13. 서혜 임파절 면역조직화학염색 슬라이드

차. 고찰

돼지 쉼코바이러스 2형은 이유후 만성 소모성 증후군을 일으키는 원인체로 현재까지 백신만이 가장 효과적으로 질병을 예방하는 것으로 보고되고 있다. 세계적으로 5개의 상업화된 백신이 출시되어 있으며, 임상실험을 통하여 그 효과가 입증되어 왔다. 백신 효과는 크게 항체 생

성과 관련한 체액성 면역 효과와 림프구 등 면역세포와 관련된 세포성 면역 효과로 나눌 수 있다. 현재까지 항체 생성과 관련한 면역 효과는 이전의 많은 실험을 통하여 입증되어 왔지만, 돼지 쉐코바이러스 백신 접종이 세포성 면역에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 실험은 많지 않다. 특히 돼지 쉐코바이러스 2형은 면역세포인 림프구를 감소시키는 특징이 있기 때문에 세포성 면역에 대한 영향이 매우 중요하다. 이번 실험은 이미 효과가 입증되어 상용화되고 있는 돼지 쉐코바이러스 2형 수입백신과 개발된 단일 돼지 쉐코바이러스 2형 백신을 실험실내 공격 접종을 통하여 체액성 면역효과 뿐만 아니라 세포성 면역효과까지 비교해 보았다.

임상증상 관찰에서 두 백신군 사이에는 차이가 나타나지 않았고, 두 백신군 모두 대조군에 비하여 임상 증상이 적게 나타난 것으로 나타났다. 증체량의 경우에도 두 백신군 사이에는 차이가 나타나지 않았고 공격 접종 후 2주가 지난 후부터 백신군이 대조군 보다 체중이 증가하는 것으로 나타났다. 체액성 면역 효과를 알아보려고 실시한 항체 검사에서는 백신군의 경우 2차 백신 접종 후 2주가 지난 5주령부터 두 백신군 모두 항체를 유도하는 것으로 나타났으며, 공격 접종 후 같은 양상으로 항체가 증가되었다. 같은 시기에 채혈하여 실시한 세포성 면역 효과 측정에서는 두 백신군 모두 CD3, CD4 양성 임파구가 2차 백신 접종 2주 후부터 증가하기 시작하여 공격 접종 시기에도 유지되는 것으로 나타났으며, 반면 대조군의 경우에는 공격 접종 2주 후에 CD3, CD4 양성 임파구가 감소한 것으로 나타났다. 또한 IFN- γ 분비 세포 측정에서도 두 백신군 모두 2차 백신 접종 2주 후부터 IFN- γ 분비 양성 세포가 관찰되기 시작하였으며, 실험이 종료되는 시점까지 대조군에 비하여 높게 유지되었다. 이러한 다양한 면역 효과가 혈액 내 바이러스 감소 및 조직 병변과 조직 내 바이러스 양성 세포의 감소로 이어졌다. 혈액 내 바이러스 항원양의 경우 두 백신군 모두 공격 접종 후 1주가 지난 시기부터 대조군에 비하여 낮게 나타났으며 실험이 종료되는 시점까지 더욱 감소하였다. 반면 대조군의 경우 공격 접종 후 2주가 지난 시점까지 계속 증가하였고 바이러스가 높게 유지되면서 CD3, CD4 임파구 감소에 영향을 미친 것으로 보인다. 2차 백신 접종 후 2주가 지난 5주령에 실시한 지연형 과민반응에서도 두 백신군 사이에는 반응성에 차이가 나타나지 않았으며 대조군에 비하여 높은 피내 면역 반응을 보였다.

전체적으로 두 백신군 모두 바이러스 감소 및 항체 생성, 세포성 면역 증가 등에 효과가 있는 것으로 나타났고 공격 접종 후 1주가 지난 8주령에 백신군 1이 백신군 2에 비하여 혈액 내 바이러스 양이 낮게 나타난 것을 제외하고 유사한 효과를 나타냈다. 본 실험을 통하여 개발된 단일 돼지 쉐코바이러스 2형 백신이 항체 생성에 관련된 체액성 면역 효과, 뿐만 아니라 임파구 등 면역 세포와 관련된 세포성 면역 효과도 충분히 유도함을 확인할 수 있었으며, 다양한 실험을 통하여 효과가 입증되어 판매되고 있는 수입백신과도 유사한 효능을 나타냄을 확인할 수 있었다.

4. 개발된 돼지 쉼코바이러스 2형 단일백신과 국내 쉼코바이러스 단일백신의 비교 효능 검사

가. 임상증상 관찰 결과

백신군과 대조군 각 개체의 임상 증상 점수를 측정하여 표와 그래프로 표현하고, 두 그룹간의 차이를 통계적 유의성으로 설명한다(표 1). 유의성 검사는 일반 선형 모델(generalized linear mixed model)을 이용하여 백신군과 대조군의 연령에 따른 임상증상 점수의 차이를 분석하고 각 연령별 차이는 아래 표의 백신군과 대조군의 임상증상 합계를 사용하지 않고, 백신군과 대조군의 임상증상 합계의 평균값을 계산하여 t-검정(Student's t-test)을 통해 통계처리 하였다.

유의성 분석 결과, 실험 종료 할 때까지 백신군1과 백신군2 사이에 각 시기별 임상증상은 유의성을 나타내지 않았다. 백신 접종 시기인 1주령 및 3주령과 공격접종 시기인 7주령에서는 두 백신군과 대조군의 임상점수가 유의성을 나타내지 않았고, 공격접종을 실시한 한 후 1주가 지난 8주령에서 시험이 종료되는 10주령까지 두 백신군이 대조군에 비하여 임상점수가 유의성 ($P<0.05$)을 보이며 낮게 나타났다.

표 1. 각 군별 임상 점수 결과

구분	시험 두수	임상 점수 (각 군별 개체의 임상증상; 주령)					
		1 (1차 백신접종)	3 (2차 백신접종)	7 (공격접종)	8	9	10 (부검진)
백신군1	10	0	0	0	0.1±0.4	0.2±0.5	0.2±0.6
백신군2	10	0	0	0	0.2±0.5	0.3±0.4	0.5±0.6
대조군	5	0	0	0	0.7±0.8	1.5±0.7	1.7±1.5
유의성 (P value)		P=1.0	P=1.0	P=1.0	P<0.05	P=0.03	P=0.02

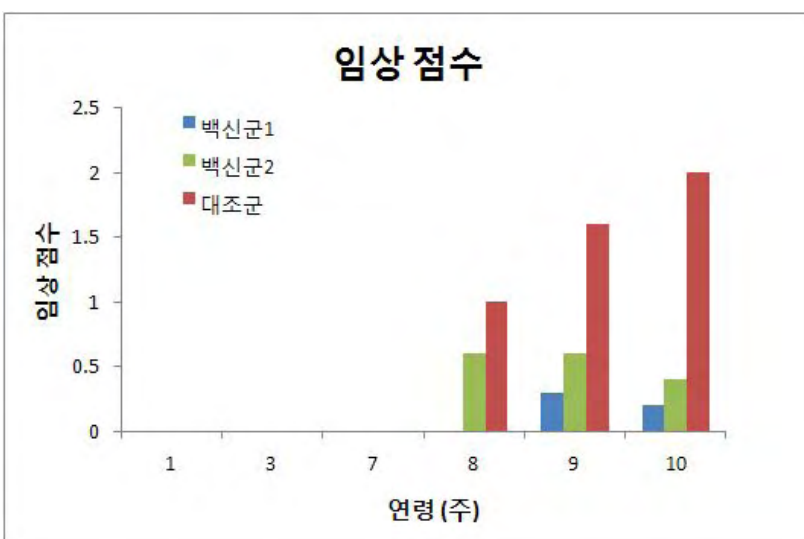


그림 1. 각 군별 임상 점수 결과

나. 증체량 비교

두 백신군과 대조군의 1주령(1차 백신 접종 전), 3주령(2차 백신 접종 전), 5주령(2차 백신 접종 2주 후), 7주령(공격접종시기), 8주령, 9주령, 10주령(부검전)에 공시돈의 체중을 측정하여 주당 증체량을 비교하고(표 2), 일반 선형복합 모델(generalized linear mixed model)을 이용하여 백신군과 대조군 사이의 주령별 체중 변화를 분석하였다. 체중과 대조군의 증체량 차이는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통하여 유의성을 분석하였다. 두 백신군의 비교에서는 실험이 종료되는 10주령까지 각 연령별 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다. 두 백신군과 대조군의 비교에서는 실험 시작 시점인 백신 접종 전의 1주령, 3주령과 2차 백신 접종 2주 후인 5주령, 공격 접종 시기인 7주령, 공격 접종 1주 후인 8주령 돼지에서는 체중의 유의성 있는 차이가 나타나지 않았으며, 공격접종을 실시한 후 2주가 지난 9주령, 실험이 종료되는 10주령에서 백신군이 대조군에 비하여 증체율이 유의성($P<0.05$) 있게 증가하였다.

표 2. 각 군별 체중 변화

	구 분	주 령							증체율 (%)
		1	3	5	7	8	9	10	
백신군 1	공시두수	10	10	10	10	10	10	10	1096
	평균체중	2.48	6.38	10.05	15.99	19.85	24.51	27.19	
	표준편차	0.11	0.22	1.85	2.01	2.74	3.11	2.49	
	구간평균증체	-	+3.90	+3.67	+5.94	+3.86	+4.66	+2.681	
백신군 2	공시두수	10	10	10	10	10	10	10	1078
	평균체중	2.50	6.42	10.11	15.85	19.56	24.91	26.95	
	표준편차	0.18	0.28	2.01	2.29	2.56	2.94	2.82	
	구간평균증체	-	+3.92	+3.69	+5.74	+3.71	+3.89	+2.84	
대조군	공시두수	5	5	5	5	5	5	5	992
	평균체중	2.47	6.51	9.95	16.05	19.12	22.85	24.51	
	표준편차	0.14	0.21	1.75	2.36	2.02	3.12	3.33	
	구간평균증체	-	+4.04	+4.21	+6.77	+3.07	+3.73	+1.66	
유의성 (P value)		-	$P=0.87$	$P=0.82$	$P=0.63$	$P=0.08$	$P<0.05$	$P<0.05$	

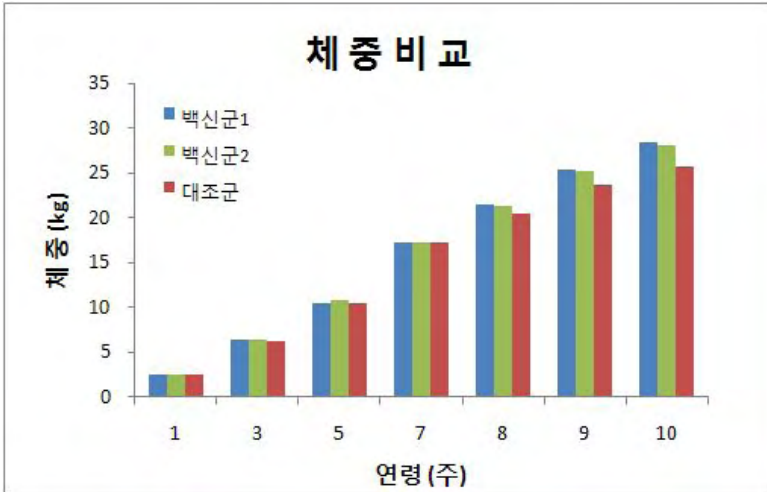


그림 2. 각 군별 체중 변화 비교



그림 3. 부검 전 백신군과 대조군 비교 사진

다. 항체 형성능 확인 실험 결과

일반 선형복합 모델(generalized linear mixed model)을 이용하여 백신군과 대조군의 연령 변화에 따른 항체 형성 차이를 분석하였으며, 각 연령별 두 백신군과 대조군의 항체 형성 차이는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통해 유의성을 분석하였다(표 3). 백신 접종 전인 1주령, 3주령에서는 두 백신군 및 대조군 사이에 항체 생성 수준 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다. 백신군1과 백신군2의 비교에서는 공격 접종 시기인 7주령과 공격 접종 1주가 지난 8주령에서 백신군1이 백신군2에 비하여 항체 생성 수준이 유의성 있게 높은 수치를 나타냈고($P < 0.05$), 나머지 채혈 시기에서는 두 백신군 사이에 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다. 두 백신군과 대조군의 비교에서는 두 백신군 모두 2차 백신 접종 후 2주가 지난 5주령부터 실험이 종료되는 10주령까지 백신군이 대조군에 비해 항체 수준이 유의성($P < 0.05$)을 보이며 증가한 것으로 나타났다.

표 3. 각 군별 항체 형성가 비교

실험 구분	공시 두수	연 령 별 ELISA S/P 값 (평균±표준편차)						
		1주령	3주령	5주령	7주령	8주령	9주령	10주령
백신군1	10	0.151± 0.015	0.225± 0.015	0.375± 0.112	0.652± 0.195	1.167± 0.215	1.215± 0.317	1.129± 0.295
백신군2	10	0.115± 0.011	0.113± 0.011	0.316± 0.098	0.501± 0.131	0.952± 0.262	1.051± 0.322	1.092± 0.312
대조군	5	0.124± 0.008	0.132± 0.008	0.149± 0.012	0.143± 0.085	0.241± 0.101	0.388± 0.152	0.752± 0.236
유 의 성 (P value)		P=0.92	P=0.88	P<0.05	P<0.001	P=0.001	P=0.001	P<0.05

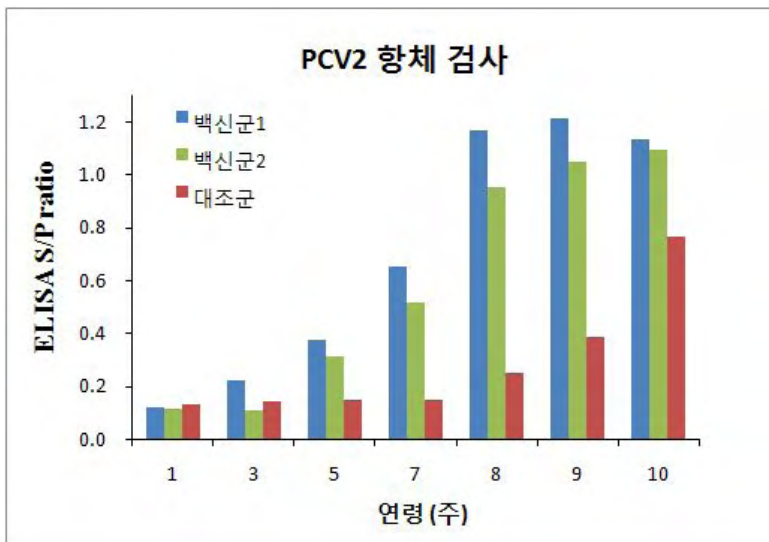


그림 4. 각 군별 돼지 쉼코바이러스 2형 항체 형성가 비교

라. 유세포 분석 결과

혈액 내 PBMC를 분리하여 T 림프구를 대표하는 CD3 양성세포와 helper T 림프구를 대표하는 CD4 양성세포의 비율을 측정하였다. CD3 양성세포 비율의 경우 먼저 두 백신군의 비교에서는 백신 접종시기인 1주령, 3주령부터 실험이 종료되는 10주령까지 백신군1과 백신군2 사이에 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다. 백신군과 대조군의 비교에서는 두 백신군 모두 공격접종 시기인 7주령부터 실험이 종료되는 10주령까지 두 백신군이 대조군에 비하여 CD3 양성세포 비율이 유의성 있게 증가한 것으로 나타났다($P<0.05$).

CD4 양성세포 비율의 경우, 먼저 두 백신군의 비교에서는 2차 백신 접종 후 2주가 지난 5주령에서 백신군1이 백신군2에 비하여 유의성을 보이며 높은 비율을 보였지만($P<0.05$), 다른 구간에서는 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다. 두 백신군과 대조군 사이의 비교에서는 백신군 1은 대조군에 비하여 2차 백신 접종 2주 후부터 실험이 종료되는 10주령까지 CD4 양성세포

비율이 유의성 있게 높게 나타났으며($P<0.05$), 백신군2는 대조군에 비하여 공격접종 시기인 7주령부터 실험이 종료되는 10주령까지 유의성 있게 높은 것으로 확인되었다($P<0.05$).

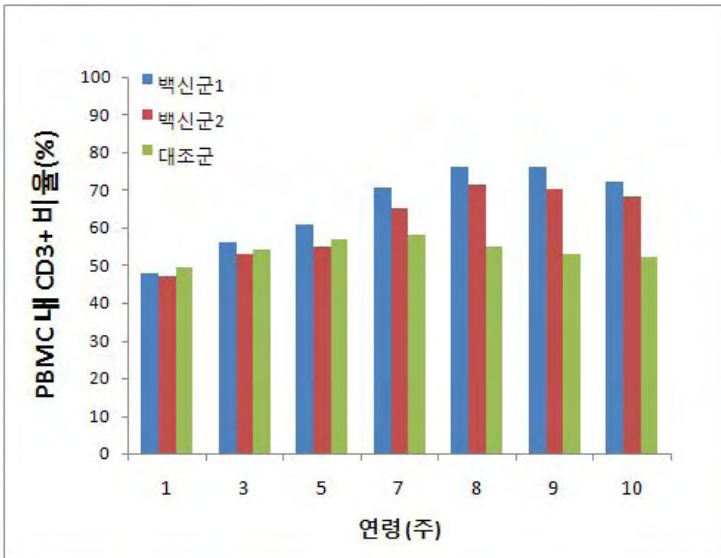


그림 5. 각 군별 CD3 양성 세포 비교

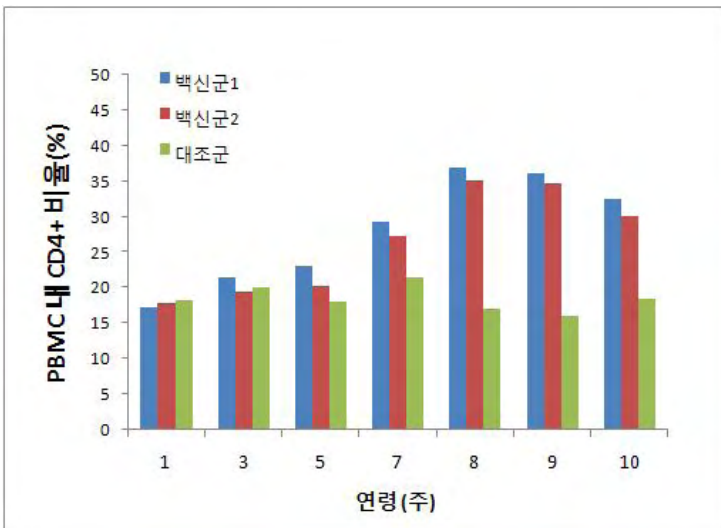


그림 6. 각 군별 CD4 양성 세포 비교

마. IFN- γ 분비 세포 수 측정

돼지 쉼코바이러스 2형을 항원으로 사용하여 분리된 말초혈액 단핵구중에서 IFN- γ 분비 세포 개수를 측정하여 백신 접종 후 IFN- γ 분비 세포 변화 양상을 확인하였다. 두 백신군의 비교에서는 2차 백신 접종 후 2주가 지난 5주령과 공격 접종시기인 7주령, 공격 접종 1주 후인 8주령에서 백신군1이 백신군2에 비하여 IFN- γ 분비 세포가 유의성을 보이며 많게 나타났다($P<0.05$). 대조군의 경우 공격 접종 시기인 7주령까지는 돼지 쉼코바이러스 2형 항원에 대한

자극에 반응이 없는 것으로 확인되었으며, 2차 백신 접종 2주 후인 5주령부터 실험이 종료되는 10주령까지 두 백신군 모두 대조군에 비하여 IFN- γ 분비 세포가 유의성 있게 증가한 것으로 나타났다($P < 0.05$).

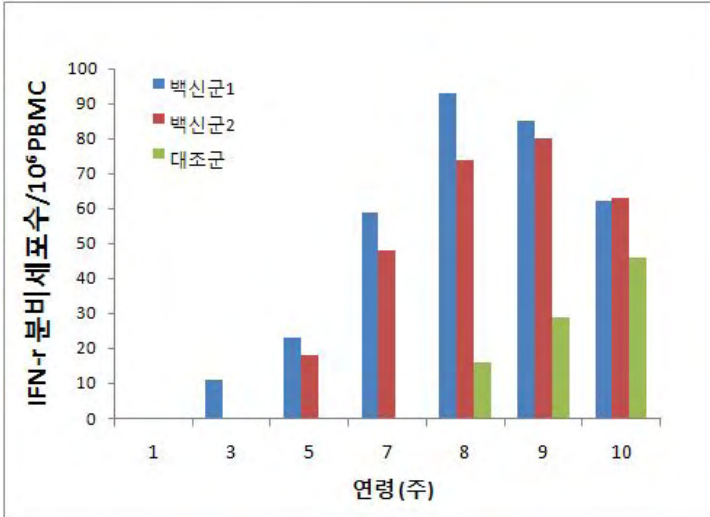


그림 7. IFN- γ 분비세포 수

바. 지연형 과민반응 (delayed type hypersensitivity) 측정

2차 백신 접종후 2주가 경과된 시점에서 지연형 과민반응 유도를 위해 돼지 쉼코바이러스 2형 항원을 서혜부위의 피내에 주입하여 면역 반응을 측정한 결과, 두 백신군 사이에 반응 차이는 유의성이 나타나지 않았으며, 두 백신군은 대조군과 유의성을 보이며 반응이 높게 나타났다($P=0.01$). 두 백신군 모두 항원 주입 24-36시간 후에 반응이 가장 높게 나타났으며, 피부 발적과 함께 단단한 융기를 확인할 수 있었다(그림 9,10).

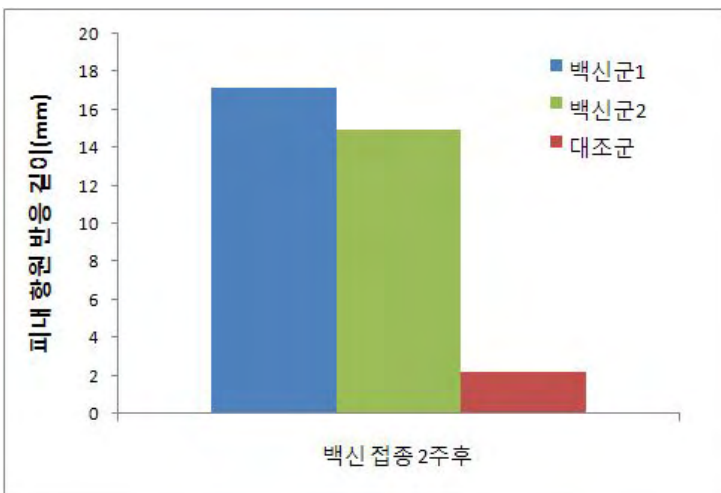


그림 8. 백신 접종 14일 후 DTH 반응 비교

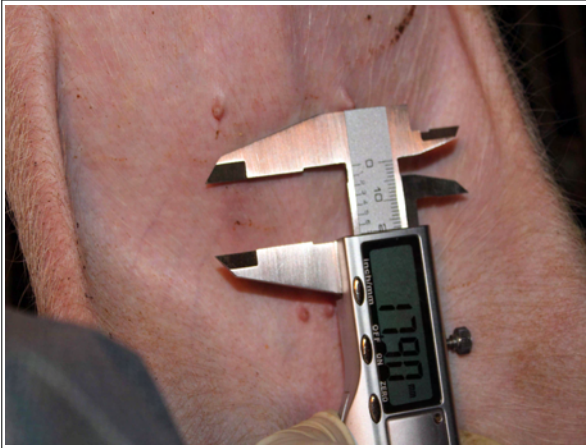


그림 9. 백신군1 DTH 반응 사진

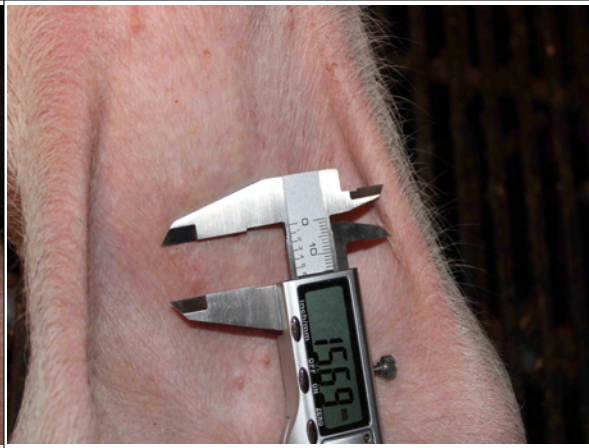


그림 10. 백신군2 DTH 반응 사진

사. 병리조직학적 병변 형성 비교

돼지 쉼코바이러스 2형 감염 때에 나타나는 전형적인 병변인 서혜 임파절에서 임파구의 감소(lymphoid depletion)에 대한 두 백신군과 대조군의 비교에서 백신군1의 경우 공시돈 10두 중 6두에서 어떠한 병리조직학적 병변이 관찰되지 않았으며(스코어 0; 그림 11-1), 4두에서 경미한 임파구의 감소(스코어 1)가 관찰되었다. 백신군2의 경우는 공시돈 10두 중 6두에서 병리조직학적 병변이 관찰되지 않았으며, 3두에서 경미한 임파구의 감소, 1두에서 중등도의 임파구 감소가 관찰되었다(스코어 2; 그림 11-2). 대조군의 경우 공시돈 5두 중 1두에서 경미한 임파구의 감소가 관찰되었으며, 2두에서 중등도의 임파구의 감소가 관찰되었고, 1두에서 심한 임파구의 감소(스코어 3; 그림 11-3)를 보였으며, 나머지 1두에서는 육아종성 염증을 동반한 임파구의 소실이(스코어 5; 그림 11-4) 나타났다.

백신군과 대조군의 병변 정도 차이는 Fisher's exact test를 통해 각 병변 스코어의 빈도를 분석하여 유의성을 측정하였다. 그 결과 두 백신군 사이에 병변의 차이는 유의성을 나타내지 않았으며 백신군은 대조군에 비하여 서혜 임파절 병변이 유의성($P < 0.05$)을 보이며 낮게 나타났다(표 4).

표 4. 각 군별 서혜 임파절 병변 스코어

개체번호	백신군1	백신군2	대조군
1	0	1	1
2	0	0	2
3	1	1	2
4	0	0	5
5	0	0	3
6	1	2	-
7	1	0	-
8	0	1	-
9	0	0	-
10	1	0	-
평균 ± 표준편차	0.40±0.51	0.50±0.71	2.40±1.14
유의성 (P value)	P<0.05		

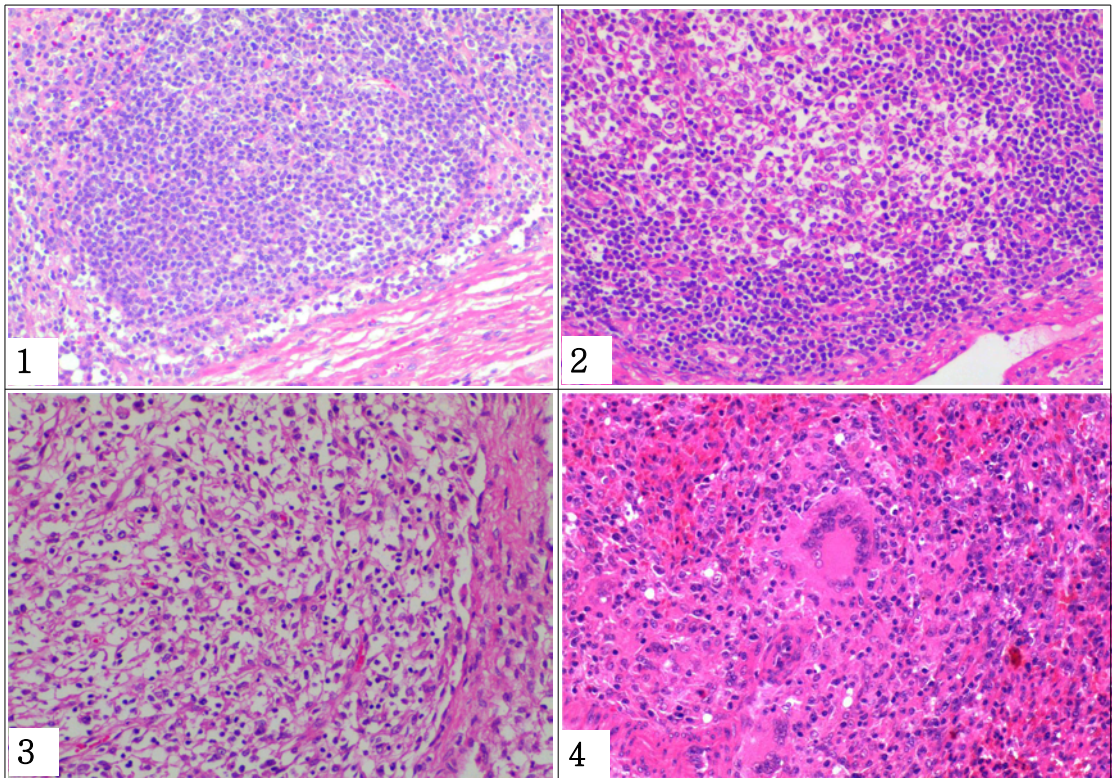


그림 1. 병변 스코어 0, 임파절에서 follicle이 정상으로 관찰되었다.
 그림 2. 병변 스코어 2, 임파절에서 follicle에 있는 임파구가 과사되어 중증도의 임파구의 감소(depletion)가 관찰되었다.
 그림 3. 병변 스코어 3, 대조군 개체의 임파절에서 follicle에 있는 임파구가 심하게 소실되어 관찰되었다.
 그림 4. 병변 스코어 5, 대조군 개체의 임파절에서 거대 다핵세포를 포함한 육아종성 염증 소견이 동반 임파구의 감소가 관찰되었다.

그림 11. 서혜 임파절 병변 비교 슬라이드

아. 혈중 돼지 쉼코바이러스 2형 항원 비교

일반 선형복합 모델(generalized linear mixed model)을 통하여 백신군과 대조군의 연령 변화에 따른 혈중 돼지 쉼코바이러스 2형의 항원양의 차이를 분석하였고, 각 군의 연령별 항원양의 차이는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통해 유의성을 분석하였다.

백신 접종시기인 1주령, 3주령과 공격접종 시기인 7주령에서는 모든 개체에서 혈액 내 항원이 검출되지 않았다. 두 백신군의 비교에서 공격접종 후 1주가 지난 8주령에서 백신군1이 백신군2에 비하여 혈액 내 항원이 유의성을 나타내며 감소하였으며($P<0.05$), 나머지 시기에서는 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다. 두 백신군 모두 공격접종 후 1주가 지난 8주령부터 실험이 종료되는 10주령까지 대조군에 비하여 유의성을 나타내며 혈액 내 항원이 낮게 나타났다($P<0.01$).

표 5. 각 군별 혈중 돼지 쉼코바이러스 2형 항원 정량

실험 구분	공시 두수	연령별 Log ₁₀ PCV2 genomic copy 수 (평균±표준편차)					
		1주령	3주령	7주령	8주령	9주령	10주령
백신군1	10	0	0	0	1.23±0.45	1.35±0.52	0.85±0.69
백신군2	10	0	0	0	2.15±0.37	1.72±0.69	0.96±0.72
대조군	5	0	0	0	4.19±1.15	6.29±1.72	6.05±1.49
유의성 (P value)		-	-	$P=1.00$	$P=0.001$	$P=0.001$	$P<0.001$

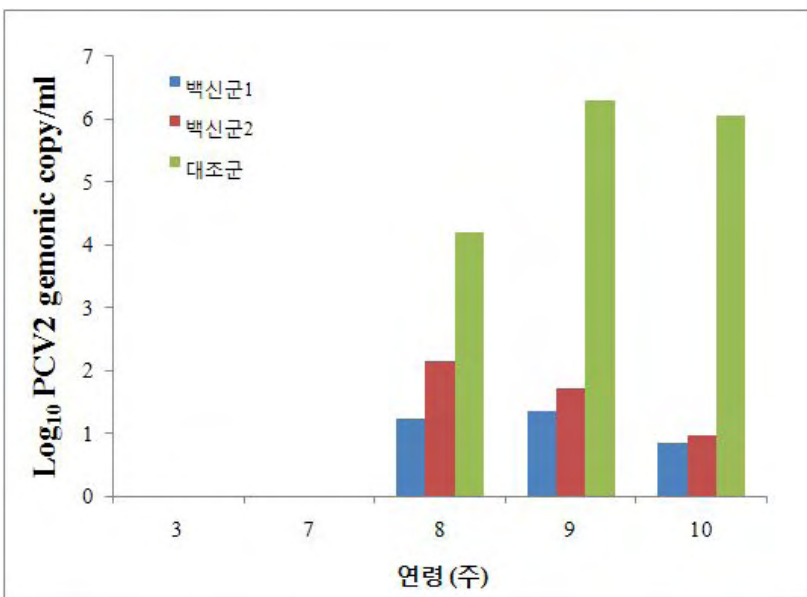


그림 12. 각 군별 혈중 돼지 쉼코바이러스 2형 항원 정량

자. 조직에서 돼지 썬코바이러스 2형 증식 비교

백신군과 대조군 10주령 돼지에서 채취한 서혜 임파절을 이용하여 면역염색법을 실시한다. 면역염색법은 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 다클론성 항체(polyclonal antibody)를 사용하였고, 서혜 임파절 조직에서 관찰되는 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 항원을 현미경상에서 0.25 mm²의 면적 5곳을 임의로 정하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 측정하여 아래 표와 같다(표 6). 돼지 썬코바이러스 2형의 항원은 감염세포의 세포질에서 관찰되었으며, 백신군1에서는 평균 5.11±7.32개의 양성세포가 관찰되었고(그림 13-1), 백신군2에서는 평균 8.51±7.73 개의 양성세포가 측정되었다. 대조군의 경우에는 평균 65.20±21.33개의 양성세포가 관찰(그림 13-2) 되었다. 두 백신군 사이에 서혜 임파절의 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 양성 세포수는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았으며, 두 백신군은 대조군에 비해 통계학적으로 유의성($P<0.01$)을 보이며 양성세포 수가 적게 나타났다.

표 6. 서혜 임파절 돼지 썬코바이러스 2형 양성 세포 수

개체번호	백신군1	백신군2	대조군
1	4.7	11.2	55.1
2	0	0	45.7
3	14.1	0	85.1
4	0	21.1	48.9
5	15.2	6.2	91.2
6	0	19.3	-
7	0	0	-
8	0	8.9	-
9	17.1	5.2	-
10	0	13.2	-
평균±표준편차	5.11±7.32	8.51±7.73	65.20±21.33
유의성 (P value)	P<0.01		

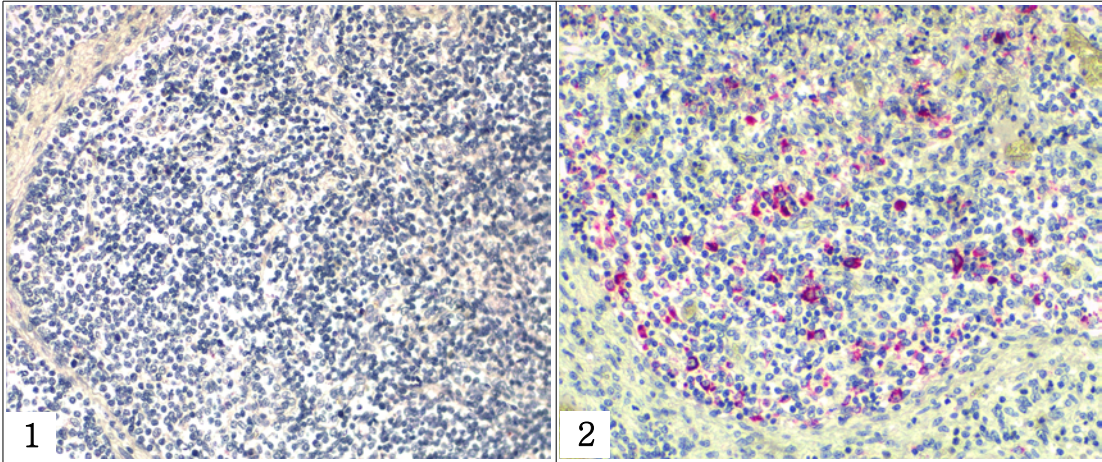


그림 1. 백신군의 서혜 임파절에서 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 면역조직화학법
 그림 2. 대조군의 서혜 임파절에서 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 면역조직화학법

그림 13. 서혜 임파절 면역조직화학염색 슬라이드

차. 고 찰

이번 실험에서는 국내에서 출시되어 판매되고 있는 백신 중 본 과제에서 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신과 현재 국내에서 시판중인 국내 백신제조회사가 생산한 불활화 돼지 썬코바이러스 2형 백신을 이용하여 백신 효과를 비교해 보았다. 백신 효과 평가는 크게 체액성 면역 효과와 세포성 면역 효과를 측정하였으며, 그에 따른 임상증상과 증체량, 혈액 내 바이러스 양, 조직내 바이러스 증식 정도를 비교하였다. 특히 돼지 썬코바이러스 2형의 경우 면역 세포인 임파구의 감소를 유발하기 때문에 최근 세포성 면역 효과에 대한 평가가 중요하다.

임상증상과 증체량에서 두 백신군 사이에는 차이가 나타나지 않았고, 두 백신군 모두 대조군에 비하여 임상 증상이 감소하였으며 공격 접종 후 2주가 지난 후부터 백신군이 대조군 보다 체중이 증가하는 것으로 나타났다. 항체 검사에서는 백신군의 경우 백신 접종 후 2주가 지난 5주령부터 두 백신군 모두 항체를 유도하는 것으로 나타났으며 대조군에 비하여 높은 항체가를 유지하였다. 하지만 공격접종 시기인 7주령과 공격 접종 후 1주가 지난 8주령에서 백신군1이 백신군2에 비하여 높은 항체가를 나타내어 백신 접종에 의한 체액성 면역 유도 효과가 다소 높은 것으로 관찰되었다. 세포성 면역 효과 측정에서는 두 백신군 모두 CD3, CD4 양성 임파구가 백신 접종 2주 후부터 증가하기 시작하여 공격 접종 시기에도 유지되는 것으로 나타났지만, 백신군1이 백신군2에 비하여 백신 접종 2주 후에 CD4 비율이 더 높게 나타났다. 반면 대조군의 경우에는 공격 접종 2주 후에 CD3, CD4 양성 임파구가 감소한 것으로 나타났다. 또한 IFN- γ 분비 세포 측정에서도 두 백신군 모두 백신 접종 2주 후부터 IFN- γ 분비 양성 세포가 관찰되기 시작하였으며, 실험이 종료되는 시점까지 대조군에 비하여 높게 유지되었다. 백신군1이 백신군2에 비하여 백신 접종 2주 후 및 공격 접종 시기에 더 높게 관찰되었으며, 이는 IFN- γ 을 분비하는 주요 세포인 CD4 세포의 차이로 인해 나타난 것으로 판단된다. 혈액 내 바이러스 항원양의 경우 두 백신군 모두 공격 접종 후 1주가 지난 시기부터 대조군에 비하여 낮게 나타났으며 실험이 종료되는 시점까지 더욱 감소하였다. 반면 대조군의 경우 공격 접종 후 2주가 지난 시점까지 계속 증가하였고 바이러스가 높게 유지되면서 CD3, CD4 임파구 감

소에 영향을 미친 것으로 보인다. 백신 접종 후 2주가 지난 5주령에 실시한 지연형 과민반응에서도 두 백신군 사이에는 반응성에 차이가 나타나지 않았지만 대조군에 비하여 높은 피내면역 반응을 보였다.

전체적으로 두 백신군 모두 바이러스 감소 및 항체 생성, 세포성 면역 증가 등에 효과가 있는 것으로 나타났지만, 백신 접종 2주 후부터 공격접종 시기에 백신군1이 항체 생성 능력, 뿐만 아니라 세포성 면역 평가에서도 효과가 높게 나타났다. 본 실험을 통하여 개발된 단일 돼지 썬코바이러스 2형 백신과 국내에서 생산, 판매되고 있는 불활화 돼지 썬코바이러스 2형 백신이 항체 생성에 관련된 체액성 면역 효과, 뿐만 아니라 임파구 등 면역 세포와 관련된 세포성 면역 효과도 유도함을 확인할 수 있었으며, 다양한 평가를 통하여 본 과제에서 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신이 항체 생성, 세포성 면역 유도, 바이러스 감소 효과가 높은 것으로 확인되었다.

5. 돼지 썬코바이러스 및 돼지 흉막폐렴균 복합백신 야의 임상 시험 결과

가. 임상 증상 관찰 결과

각 농장별 백신군과 대조군의 임상 점수를 표와 그래프로 표현하고, 일반 선형복합 모델 (generalized linear mixed model)을 이용하여 두 그룹간 연령 변화에 따른 차이를 분석하였다. 백신군과 대조군의 각 연령별 임상 점수의 유의성은 Chi-square test를 통해 각 스코어의 빈도를 분석하여 측정하였다.

(1) 시험농장 1

시험농장 1의 경우 백신군이 대조군에 비해 백신 접종 후 4주가 지난 9주령에서 시험이 종료되는 18주령까지 유의적인 ($P < 0.05$) 임상점수 감소 현상이 관찰되었다.

표 1. 시험 농장 1 임상 점수

구분	시험 두수	임상 점수 (각 농장별 시험두수의 임상증상의 합계; 주령)													
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
백신군	25	0	0	1	1	1	4	3	5	3	3	3	2	4	3
대조군	25	0	0	4	6	9	15	17	21	16	15	14	14	13	16
유의성 (P value)		1.00	1.00	0.31	0.08	0.03	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01

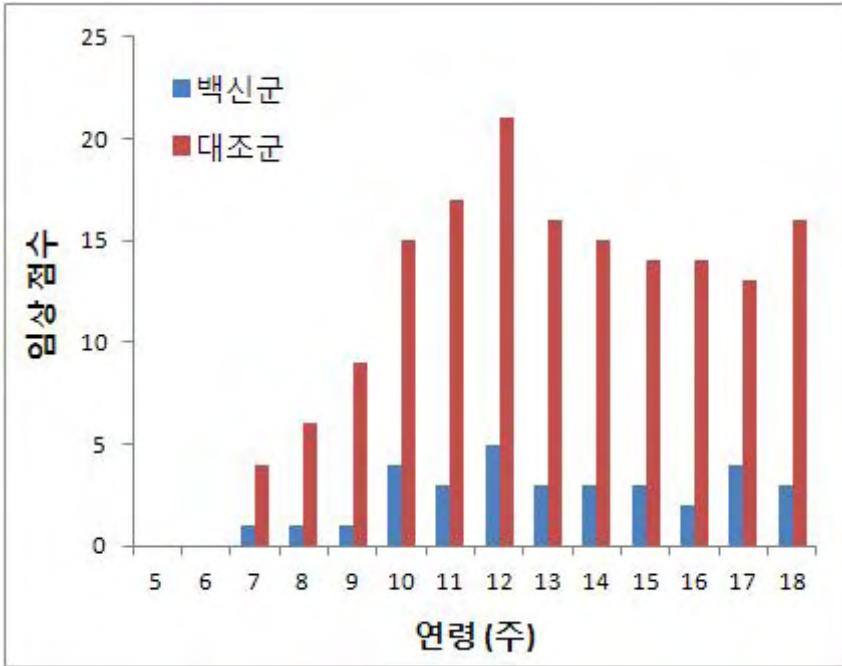


그림 1. 시험 농장 1 임상 점수

(2) 시험농장 2

시험농장2의 경우 백신군이 대조군에 비해 백신 접종 후 4주가 지난 9주령부터 17주령까지 유의적인 ($P < 0.05$) 임상점수 감소 현상이 관찰되었다..

표 2. 시험 농장 2 임상 점수

구분	시험 두수	임상 점수 (각 농장별 시험두수의 임상증상의 합계; 주령)													
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
백신군	25	0	1	2	2	2	4	4	5	4	4	3	3	4	3
대조군	25	0	1	6	7	13	17	16	18	16	13	11	12	14	10
유의성 (P value)		1.00	1.00	0.27	0.09	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.03	0.03	0.03	0.02	0.06

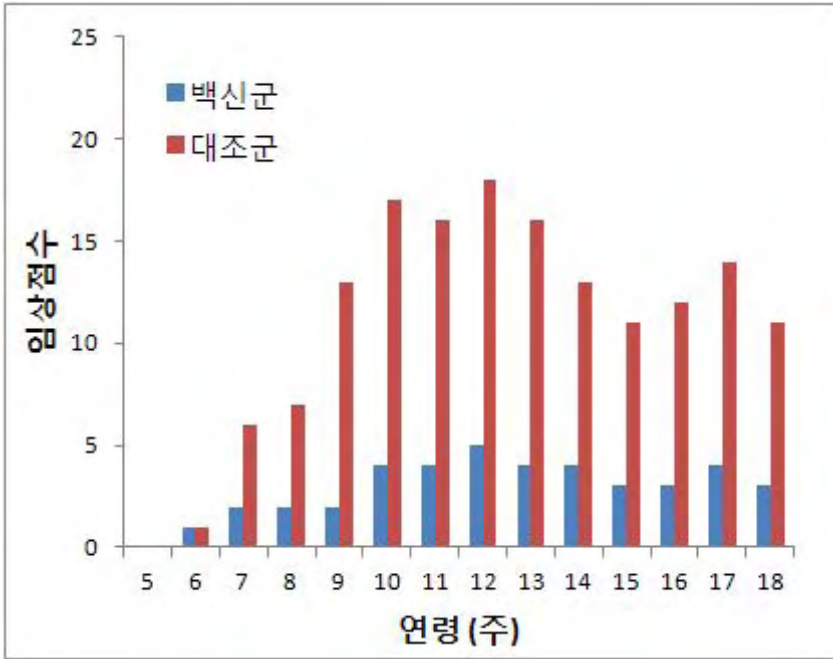


그림 2. 시험 농장 2 입상 점수

(3) 시험농장 3

시험농장 3의 경우 백신군이 대조군에 비해 백신 접종 후 4주가 지난 9주령에서 시험이 종료되는 18주령까지 유의적인 ($P < 0.05$) 입상점수 감소 현상이 관찰되었다.

표 3. 시험 농장 3 입상 점수

구분	시험 두수	입상 점수 (각 농장별 시험두수의 입상증상의 합계; 주령)														
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
백신군	25	0	1	1	2	6	6	5	6	5	3	5	6	5	5	
대조군	25	0	3	9	7	15	22	24	22	18	14	20	19	19	16	
유의성 (P value)		1.00	0.39	0.06	0.09	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	0.03

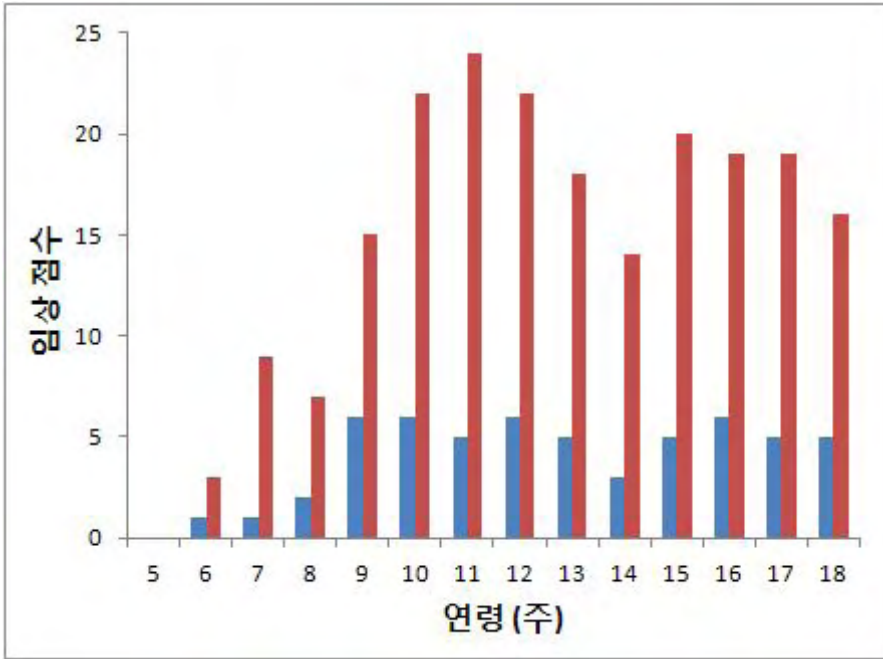


그림 3. 시험 농장 3 임상 점수

나. 생산성 지수 비교

(1) 증체율

1) 전체 공시돈의 증체율 비교

임상 시험이 실시된 전체 공시돈에 대한 증체율은 다음과 같이 정리한다.

표 4. 전체 공시돈 증체율 비교

	구 분	주 령				증체율 (%)
		5	9	12	18	
백신군	공시두수	75	75	73	72	839.4
	평균체중	8.72	26.94	39.57	73.20	
	표준편차	0.78	2.35	3.76	5.82	
	구간평균증체	-	+ 18.22	+ 12.63	+ 33.63	
대조군	공시두수	75	73	71	65	752.9
	평균체중	8.98	26.14	37.37	67.61	
	표준편차	0.74	2.44	2.54	5.57	
	구간평균증체	-	+ 17.16	+ 11.23	+ 30.24	
유의성 (P value)		-	P=0.06	P=0.02	P<0.01	

2) 각 농장별 증체율 비교

각 농장의 구간별 평균체중을 이용하여 증체율을 정리하고 백신군과 대조군의 연령에 따른 체중 변화를 일반 선형복합 모델(generalized linear mixed model)을 이용하여 분석하였으며, 각 그룹의 연령별 증체량의 차이는 t-검정(Student's t-test) 통계학적 검사를 통하여 유의성을 나타내었다.

(가) 시험농장 1

시험농장 1의 경우 백신 접종 후 7주가 지난 12주령부터 시험이 종료되는 18주령까지에서 백신군이 대조군에 비하여 유의성($P < 0.05$) 있게 증체율이 증가하였다.

표 5. 시험 농장 1 증체율 비교

	구 분	주 령				증체율 (%)
		5	9	12	18	
백신군	공시두수	25	25	25	24	863.9
	평균체중	8.12	25.81	37.91	70.15	
	표준편차	0.62	2.14	3.98	4.93	
	구간평균증체	-	+ 17.69	+ 12.10	+ 32.24	
대조군	공시두수	25	25	24	23	766.3
	평균체중	8.42	25.17	36.11	64.52	
	표준편차	0.59	1.97	3.41	4.45	
	구간평균증체	-	+ 16.75	+ 10.94	+ 28.41	
유 의 성 (P value)		$P=0.4$	$P=0.07$	$P=0.03$	$P < 0.01$	



그림 1.



그림 2.

그림 1. 백신군 돈방 사진으로 위축 없이 증체가 잘 되었다.

그림 2. 대조군 위축돈.

그림 4. 시험 농장1 18주령 백신군 및 대조군 사진

(나) 시험농장 2

시험농장 2의 경우 백신 접종 후 7주가 지난 12주령부터 시험이 종료되는 18주령까지에서 백신군이 대조군에 비하여 유의성($P<0.05$) 있게 증체율이 증가하였다.

표 6. 시험농장 2 증체율 비교

	구 분	주 령				증체율 (%)
		5	9	12	18	
백신군	공시두수	25	25	24	24	827.3
	평균체중	8.91	26.88	39.95	73.71	
	표준편차	0.71	2.73	4.13	5.14	
	구간평균증체	-	+ 17.97	+ 13.07	+ 33.76	
대조군	공시두수	25	24	24	22	741.5
	평균체중	9.15	27.31	37.51	67.85	
	표준편차	0.75	2.95	3.75	4.63	
	구간평균증체	-	+ 18.16	+ 10.20	+ 30.34	
유 의 성 (P value)		$P=0.37$	$P=0.06$	$P=0.02$	$P<0.01$	



그림 1.

그림 2.

그림 1. 백신군 돈방 사진으로 위축 없이 증체가 잘 되었다.

그림 2. 대조군 위축돈.

그림 5. 시험 농장2 18주령 백신군 및 대조군 사진

(다) 시험농장 3

시험농장 3의 경우 백신 접종 후 4주가 지난 9주령부터 시험이 종료되는 18주령까지에서 백신군이 대조군에 비하여 유의성($P < 0.05$)을 보이며 증체율이 증가하였다.

표 7. 시험농장 3 증체율 비교

	구 분	주 령				증체율 (%)
		5	9	12	18	
백신군	공시두수	25	25	24	24	831.3
	평균체중	9.12	28.11	40.85	75.81	
	표준편차	0.75	3.15	4.69	5.81	
	구간평균증체	-	+ 18.99	+ 12.74	+ 34.96	
대조군	공시두수	25	24	23	20	753.4
	평균체중	9.35	26.01	38.41	70.44	
	표준편차	0.68	3.19	4.31	4.98	
	구간평균증체	-	+ 16.66	+ 12.40	+ 32.03	
유 의 성 (P value)		$P=0.49$	$P=0.04$	$P=0.03$	$P < 0.01$	



그림 1.

그림 2.

그림 1. 백신군 돈방 사진으로 위축 없이 증체가 잘 되었다.

그림 2. 대조군 위축돈.

그림 6. 시험 농장3 18주령 백신군 및 대조군 사진

(2) 폐사율

1) 전체 공시돈의 폐사율

백신 접종한 5주령에서 시험이 종료되는 18주령까지 전체 공시돈의 폐사두수와 폐사율을 아래 표 8과 같이 정리하였다.

표 8. 전체 공시돈의 폐사두수와 폐사율

	구 분	농 장		
		1	2	3
백 신 군	공시두수	25	25	25
	폐사두수	1	1	2
	폐 사 율	4%	4%	8%
대 조 군	공시두수	25	25	25
	폐사두수	3	5	6
	폐 사 율	12%	20%	24%

2) 각 농장별 폐사 원인

(가) 시험농장 1

시험농장 1에서는 백신군 1두와 대조군 3두가 폐사되었으며, 폐사 일령과 폐사의 원인 아래 표 9에 정리하였다.

표 9. 시험농장1 폐사 현황

시험구분	개체 번호	폐사일령	진단 (폐사 원인)
백신군	4	64일령	전신장기에서 뚜렷한 병변이 관찰되지 않음
대조군	7	65일령	이유후 전신성 소모성 증후군
대조군	11	70일령	글래서씨병, 이유후 전신성 소모성 증후군
대조군	22	112일령	홍막염, 돼지 호흡기 질병

(나) 시험농장 2

시험농장 2에서는 백신군 1두와 대조군 5두가 폐사되었으며, 폐사 일령과 폐사의 원인 아래 표 10에 정리하였다.

표10. 시험농장 2 폐사 현황

시험 구분	개체 번호	폐사일령	진단 (폐사 원인)
백신군	4	66일령	전신장기에서 뚜렷한 병변이 관찰되지 않음
대조군	2	57일령	연쇄상 구균성 다발성 장막염 이유후 전신 소모성 증후군
대조군	9	108일령	돼지 호흡기 질병
대조군	13	73일령	이유후 전신 소모성 증후군
대조군	17	98일령	홍막염 및 세균성 폐렴
대조군	18	69일령	이유후 전신 소모성 증후군

(다) 시험농장 3

시험농장 3에서는 백신군 1두와 대조군 5두가 폐사되었으며, 폐사 일령과 폐사의 원인 아래 표 11에 정리하였다.

표 11. 시험농장 3 폐사 현황

시험 구분	개체 번호	폐사 일령	진단 (폐사 원인)
백신군	14	62일령	이유후 전신성 소모성 증후군
대조군	2	71일령	이유후 전신성 소모성 증후군
대조군	4	61일령	글래서씨병, 이유후 전신성 소모성 증후군
대조군	9	111일령	돼지 호흡기 질병
대조군	11	108일령	돼지 호흡기 질병
대조군	22	74일령	파스튜렐라 패렴, 이유후 전신성 소모성 증후군
대조군	24	80일령	다발성 장막염 이유후 전신성 소모성 증후군

다. 백신 안전성 시험 결과

(1) 접종 30분 후 안전성 시험 결과

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	25	5주령	0	0	0	0	0	0	0	39.91
농장2	25	5주령	0	0	0	0	0	0	0	39.77
농장3	25	5주령	0	0	0	0	0	0	0	39.68

(2) 접종 1시간 후 안전성 시험 결과

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	25	5주령	0	0	0	0	0	0	0	39.42
농장2	25	5주령	0	0	0	0	0	0	0	39.63
농장3	25	5주령	0	0	0	0	0	0	0	39.52

(3) 접종 4시간 후 안전성 시험 결과

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수								
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온	
농장1	25	5주령	0	0	0	0	0	0	0	0	39.37
농장2	25	5주령	0	0	0	0	0	0	0	0	39.41
농장3	25	5주령	0	0	0	0	0	0	0	0	39.48

(4) 접종 1일후부터 7일간 안전성 시험 결과

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수								
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	기타	
농장1	25	5주령	0	0	0	0	0	0	0	0	0
농장2	25	5주령	0	0	0	0	0	0	0	0	0
농장3	25	5주령	0	0	0	0	0	0	0	0	0

※ 관찰일: 접종 후 7일간

라. 돼지 쉼코바이러스 2형 항체 형성능 결과

각 시험 농장의 백신군과 대조군 25마리를 지정하여 시험기간 동안 채혈하며, 혈액 중 쉼코 바이러스 2형에 대한 ELISA 항체검사 결과 및 백신군과 대조군의 유의성을 검사한 결과는 아래와 같다.

(1) 시험농장 1

백신 접종 전인 5주령에서는 두 그룹 모두 ELISA 항체가 평균이 550 이하로 음성을 보였으며, 유의적인 차이는 없었다. 백신군의 경우 백신 접종 4주 후인 9주령 및 12주령에서 ELISA 항체가 값이 550 이상으로 양성을 보였고, 대조군에 비해 유의성($P<0.01$)을 보이며 항체 형성이 높은 것으로 나타났다. 시험이 종료되는 18주령에서는 백신군과 대조군 사이의 항체 형성에 대한 차이가 유의성($P=0.19$)을 보이지 않았다.

표 12. 시험농장 1 항체 형성 비교

실험 구분	공시 두수	연 령 별 ELISA 항체가 (평균±표준편차)			
		5주령	9주령	12주령	18주령
백신군	25	491±102	1,039±181	1,392±231	949±211
대조군	25	528±132	672±138	841±171	1,151±243
유 의 성 (P value)		$P=0.37$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P=0.19$

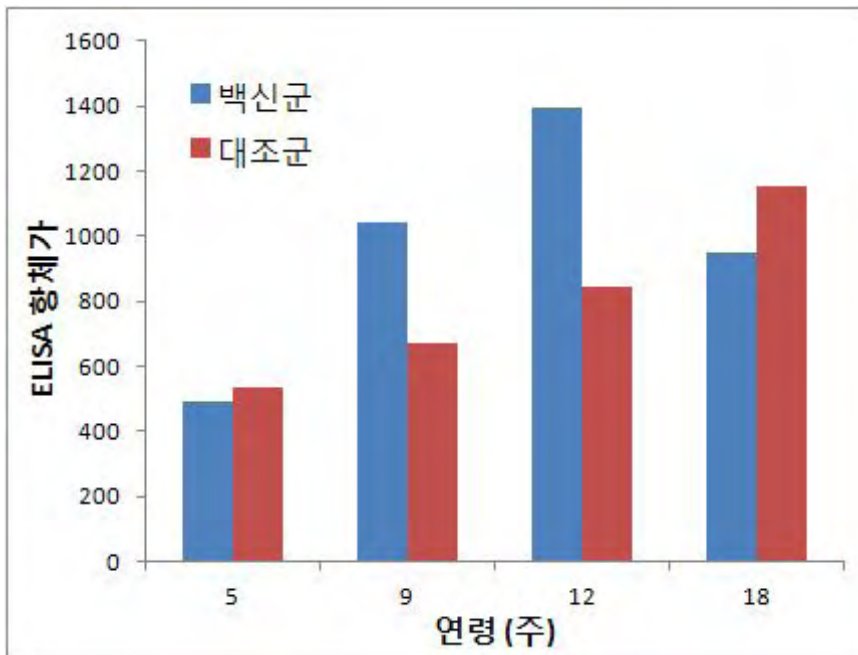


그림 7. 시험농장 1 항체 형성 비교

(2) 시험농장 2

백신 접종 전인 5주령에서는 두 그룹 모두 ELISA 항체가 평균이 550 이하로 음성을 보였으며, 유의적인 차이는 없었다. 백신군의 경우 백신 접종 4주 후인 9주령 및 12주령에서 ELISA 항체가 값이 550 이상으로 양성을 보였고, 대조군에 비해 유의성($P<0.01$)을 보이며 항체 형성이 높은 것으로 나타났다. 시험이 종료되는 18주령에서는 백신군과 대조군 사이의 항체 형성에 대한 차이가 유의성($P=0.10$)을 보이지 않았다.

표 13. 시험농장 2 항체 형성 비교

실험 구분	공시 두수	연 령 별 ELISA 항체가 (평균±표준편차)			
		5주령	9주령	12주령	18주령
백신군	25	511±109	1,421±211	1,712±271	1,051±231
대조군	25	541±131	521±113	692±134	941±195
유 의 성 (<i>P</i> value)		<i>P</i> =0.29	<i>P</i> <0.01	<i>P</i> <0.01	<i>P</i> =0.10

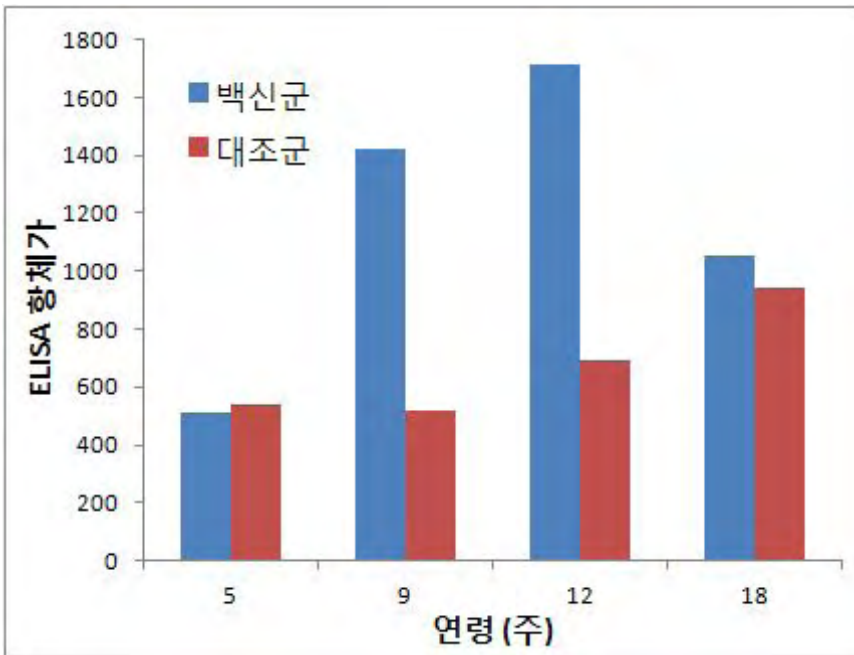


그림 8. 시험농장 2 항체 형성 비교

(3) 시험농장 3

백신 접종 전인 5주령에서는 두 그룹 모두 ELISA 항체가 평균이 550 이하로 음성을 보였으며, 유의적인 차이는 없었다. 백신군의 경우 백신 접종 4주 후인 9주령 및 12주령에서 ELISA 항체가 값이 550 이상으로 양성을 보였고, 대조군에 비해 유의성($P < 0.01$)을 보이며 항체 형성이 높은 것으로 나타났다. 시험이 종료되는 18주령에서는 백신군과 대조군 사이의 항체 형성에 대한 차이가 유의성($P = 0.16$)을 보이지 않았다.

표 14. 시험농장 3 항체형성 비교

실험 구분	공시 두수	연 령 별 ELISA 항체가 (평균±표준편차)			
		5주령	9주령	12주령	18주령
백신군	25	533±126	1,251±231	1,411±239	1,112±219
대조군	25	521±118	592±135	955±221	1,231±241
유 의 성 (P value)		P=0.63	P<0.01	P<0.01	P=0.16

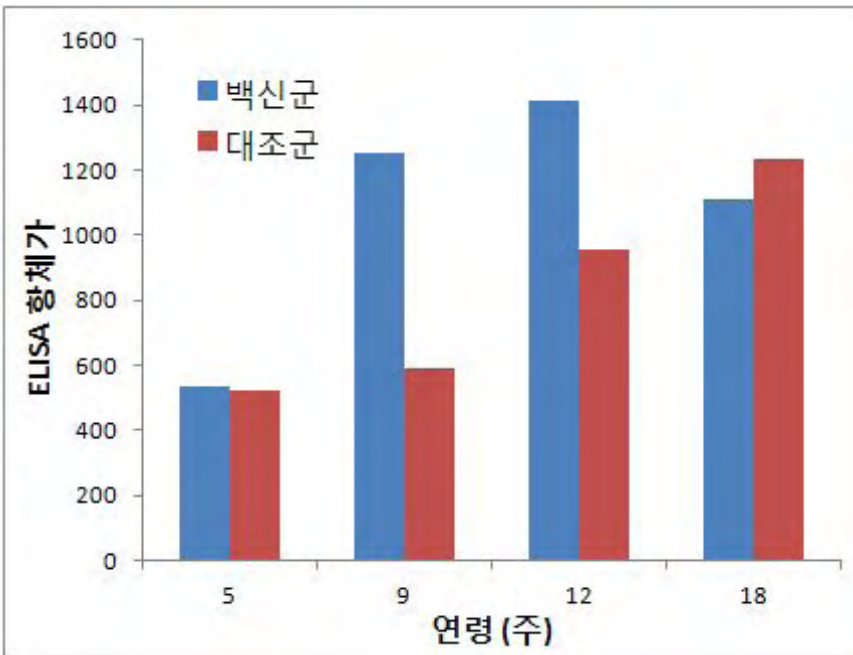


그림 9. 시험농장 2 항체 형성 비교

마. 돼지 흉막폐렴균에 대한 항체 형성능 결과

각 시험 농장의 백신군과 대조군 25마리를 지정하여 시험기간 동안 채혈하며, 혈액 중 돼지 흉막폐렴균 2형 및 5형에 대한 ELISA 항체검사 결과 및 백신군과 대조군의 유의성을 검사한 결과는 아래와 같다.

(1) 시험농장 1

백신 접종 전인 5주령에서는 두 그룹 모두 2형 및 5형에 대한 ELISA S/P ratio 평균이 0.33 이하로 음성을 보였으며, 유의적인 차이는 없었다. 백신군의 경우 백신 접종 4주 후인 9주령 및 12주령, 18주령에서 2형 및 5형에 대한 ELISA S/P ratio 값이 0.5 이상으로 양성을 보였고, 대조군에 비해 유의성(P<0.05)을 보이며 항체 형성이 높은 것으로 나타났다.

표 15. 시험농장 1 흉막폐렴균 2형에 대한 항체 형성 비교

실험 구분	공시 두수	연 령 별 ELISA S/P ratio (평균±표준편차)			
		5주령	9주령	12주령	18주령
백신군	25	0.151±0.042	0.512±0.142	0.612±0.154	0.652±0.139
대조군	25	0.162±0.037	0.191±0.072	0.282±0.081	0.413±0.115
유 의 성 (P value)		<i>P</i> =0.33	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05

표 16. 시험농장 1 흉막폐렴균 5형에 대한 항체 형성 비교

실험 구분	공시 두수	연 령 별 ELISA S/P ratio (평균±표준편차)			
		5주령	9주령	12주령	18주령
백신군	25	0.168±0.052	0.637±0.135	0.681±0.152	0.772±0.198
대조군	25	0.145±0.043	0.232±0.093	0.345±0.128	0.532±0.141
유 의 성 (P value)		<i>P</i> =0.27	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05

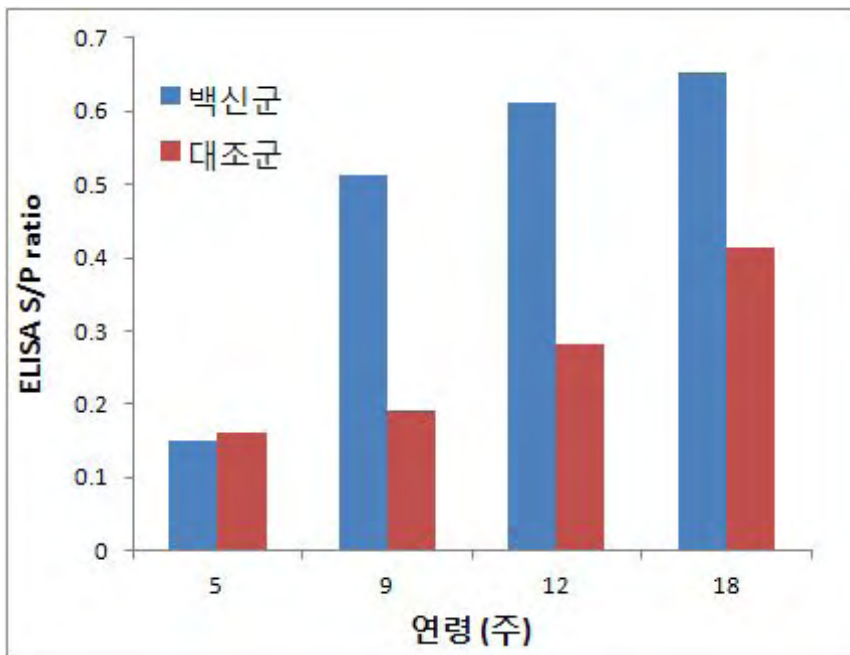


그림 10. 시험농장 1 흉막폐렴균 2형에 대한 항체 형성 비교

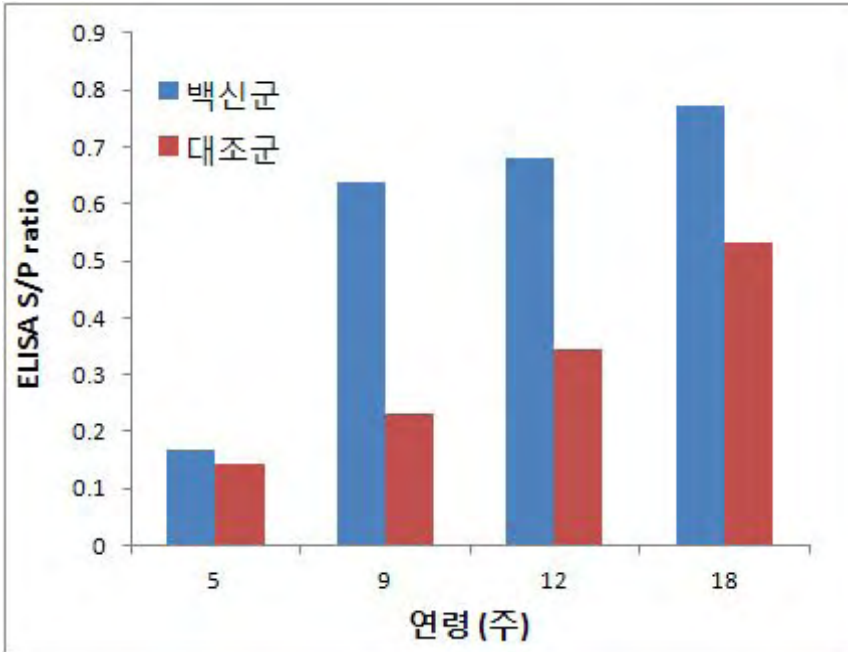


그림 11. 시험농장 1 홍막페렴균 5형에 대한 항체 형성 비교

(2) 시험농장 2

백신 접종 전인 5주령에서는 두 그룹 모두 2형 및 5형에 대한 ELISA S/P ratio 평균이 0.33 이하로 음성을 보였으며, 유의적인 차이는 없었다. 백신군의 경우 백신 접종 4주 후인 9주령 및 12주령에서 2형 및 5형에 대한 ELISA S/P ratio 값이 0.5 이상으로 양성을 보였고, 대조군에 비해 유의성($P<0.05$)을 보이며 항체 형성이 높은 것으로 나타났다. 18주령에서는 2형의 경우 백신군과 대조군 간에 유의성 있는 차이가 나타나지 않았고($P=0.062$), 5형의 경우 백신군과 대조군 간에 유의성 있는 차이를 보였다($P<0.05$).

표 17. 시험농장 2 홍막페렴균 2형에 대한 항체 형성 비교

실험 구분	공시 두수	연 령 별 ELISA S/P ratio (평균±표준편차)			
		5주령	9주령	12주령	18주령
백신군	25	0.121±0.034	0.541±0.138	0.722±0.184	0.681±0.187
대조군	25	0.133±0.025	0.331±0.114	0.461±0.127	0.551±0.142
유 의 성 (P value)		$P=0.38$	$P<0.05$	$P<0.05$	$P=0.062$

표 18. 시험농장 2 흉막폐렴균 5형에 대한 항체 형성 비교

실험 구분	공시 두수	연 령 별 ELISA S/P ratio (평균±표준편차)			
		5주령	9주령	12주령	18주령
백신군	25	0.151±0.052	0.594±0.143	0.795±0.164	0.778±0.175
대조군	25	0.143±0.043	0.312±0.124	0.435±0.135	0.542±0.152
유의성 (P value)		$P=0.31$	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$

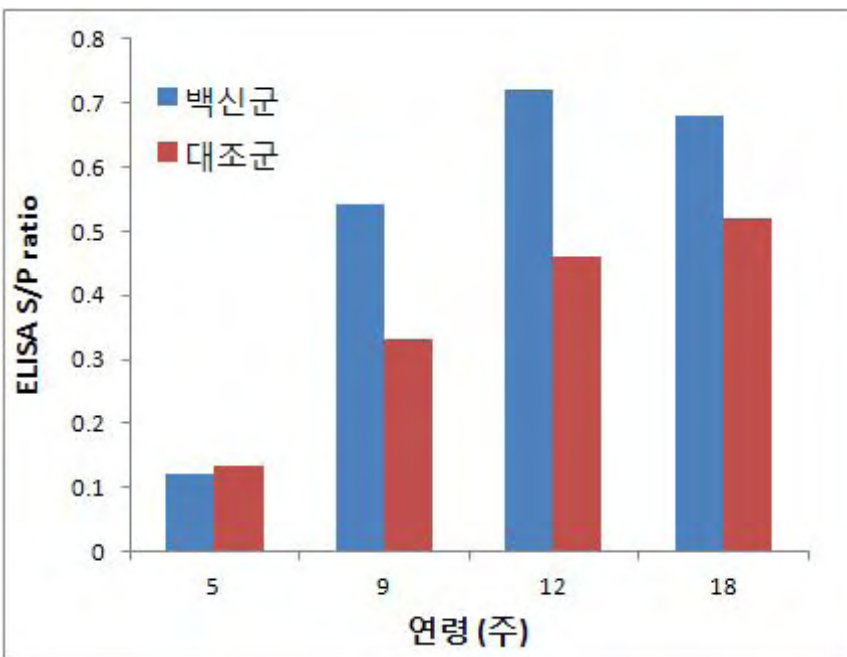


그림 12. 시험농장 2 흉막폐렴균 2형에 대한 항체 형성 비교

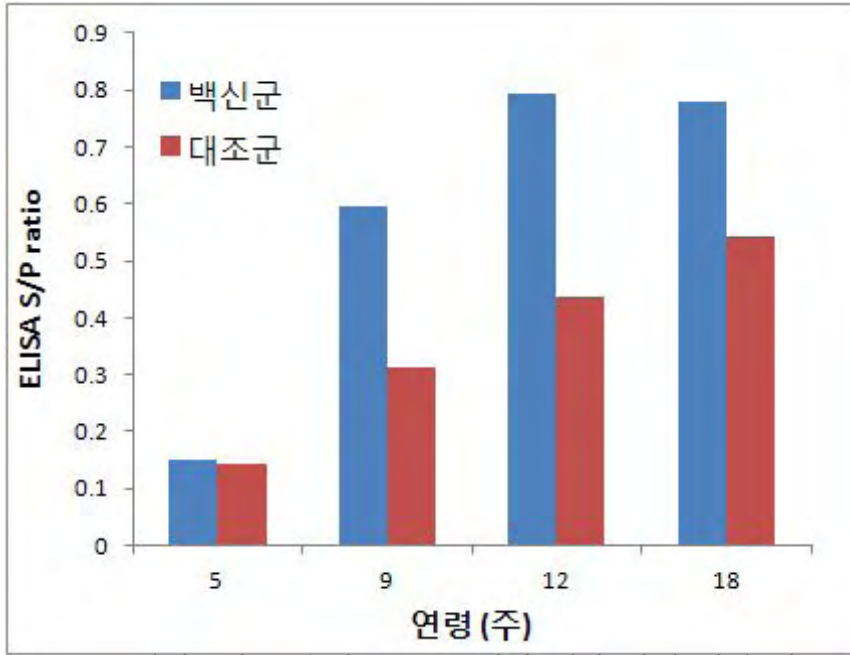


그림 13. 시험농장 2 홍막페렴균 5형에 대한 항체 형성 비교

(3) 시험농장 3

백신 접종 전인 5주령에서는 두 그룹 모두 2형 및 5형에 대한 ELISA S/P ratio 평균이 0.33 이하로 음성을 보였으며, 유의적인 차이는 없었다. 백신군의 경우 백신 접종 4주 후인 9주령 및 12주령, 18주령에서 2형 및 5형에 대한 ELISA S/P ratio 값이 0.5 이상으로 양성을 보였고, 대조군에 비해 유의성($P < 0.05$)을 보이며 항체 형성이 높은 것으로 나타났다.

표 19. 시험농장 3 홍막페렴균 2형에 대한 항체 형성 비교

실험 구분	공시 두수	연령 별 ELISA S/P ratio (평균±표준편차)			
		5주령	9주령	12주령	18주령
백신군	25	0.251±0.042	0.611±0.149	0.671±0.159	0.622±0.165
대조군	25	0.238±0.054	0.292±0.071	0.418±0.125	0.461±0.141
유의성 (P value)		$P=0.29$	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$

표 20. 시험농장 3 흉막폐렴균 5형에 대한 항체 형성 비교

실험 구분	공시 두수	연 령 별 ELISA S/P ratio (평균±표준편차)			
		5주령	9주령	12주령	18주령
백신군	25	0.233±0.088	0.672±0.172	0.772±0.185	0.697±0.161
대조군	25	0.227±0.054	0.292±0.081	0.342±0.107	0.441±0.134
유의성 (P value)		$P=0.21$	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$

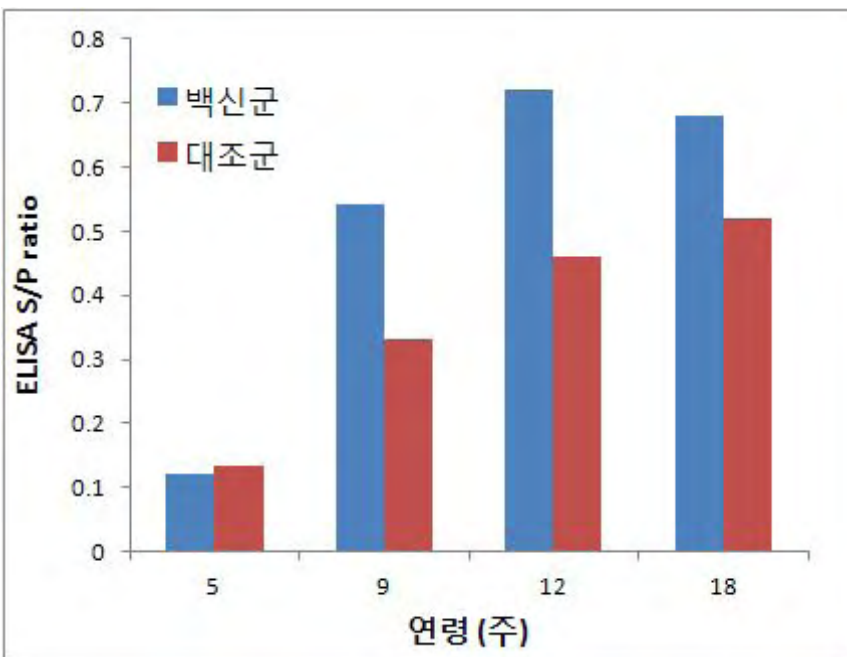


그림 14. 시험농장 3 흉막폐렴균 2형에 대한 항체 형성 비교

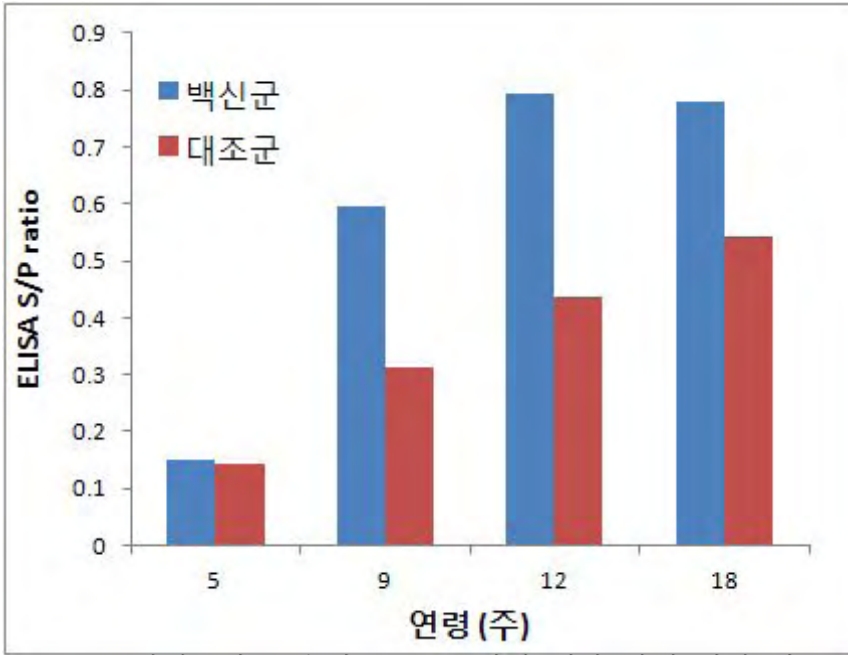


그림 15. 시험농장 3 흉막폐렴균 5형에 대한 항체 형성 비교

바. 혈중 돼지 썬코바이러스 2형 항원 비교

각 시험 농장마다 백신군과 대조군 25마리를 지정하여 시험기간 동안 채혈하며, 실시간 중합 효소 연쇄반응을 이용하여 혈액 중에서 돼지 썬코바이러스 2형의 양을 정량하고 유의성을 측정된 결과는 아래와 같다.

(1) 시험농장 1

백신 접종 전인 5주령에서는 두 그룹 모두 혈중 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 항원은 검출 되지 않았으며, 백신 접종 후 4주가 지난 9주령부터 백신군이 대조군에 비해 유의성($P < 0.05$)을 보이며 바이러스 항원양이 감소하였으며, 12주령 및 시험 종료일인 18주령에서도 백신군이 대조군에 비해 유의성($P < 0.01$)을 보이며 바이러스 항원양이 감소한 것으로 나타났다.

표 21. 시험 농장 1 혈중 돼지 썬코바이러스 2형 항원양 비교

실험 구분	공시 두수	연 령 별 Log ₁₀ PCV2 genomic copy 수 (평균±표준편차)			
		5주령	9주령	12주령	18주령
백신군	25	-	2.36±0.47	2.41±0.42	1.86±0.43
대조군	25	-	3.82±0.52	5.11±0.71	4.22±0.59
유의성 (P value)		-	P<0.05	P<0.01	P<0.01

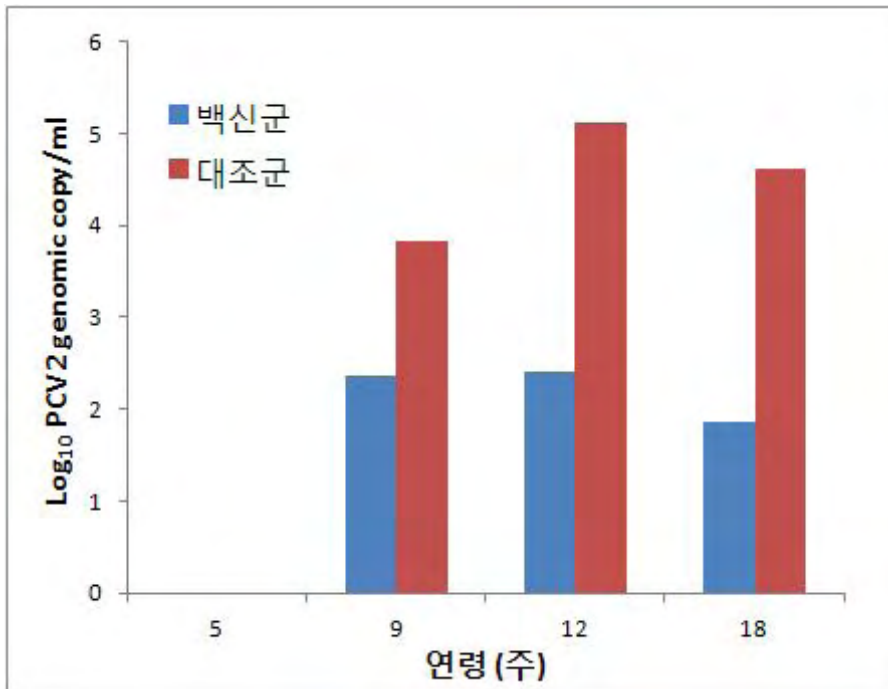


그림 16. 시험 농장 1 혈중 돼지 썬코바이러스 2형 항원양 비교

(2) 시험농장 2

백신 접종 전인 5주령에서는 두 그룹 모두 혈중 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 항원은 검출되지 않았으며, 백신 접종 후 4주가 지난 9주령에는 백신군과 대조군 사이에 유의성(P=0.067) 있는 차이는 나타나지 않았다. 12주령 및 시험 종료일인 18주령에서는 백신군이 대조군에 비해 유의성(P<0.01)을 보이며 바이러스 항원양이 감소한 것으로 나타났다. .

표 22. 시험 농장 2 혈중 돼지 썬코바이러스 2형 항원양 비교

실험 구분	공시 두수	연 령 별 Log ₁₀ PCV2 genomic copy 수 (평균±표준편차)			
		5주령	9주령	12주령	18주령
백신군	25	-	2.43±0.31	3.17±0.39	2.15±0.35
대조군	25	-	3.05±0.62	5.41±0.83	4.39±0.71
유 의 성 (P value)		-	P=0.067	P<0.01	P<0.01

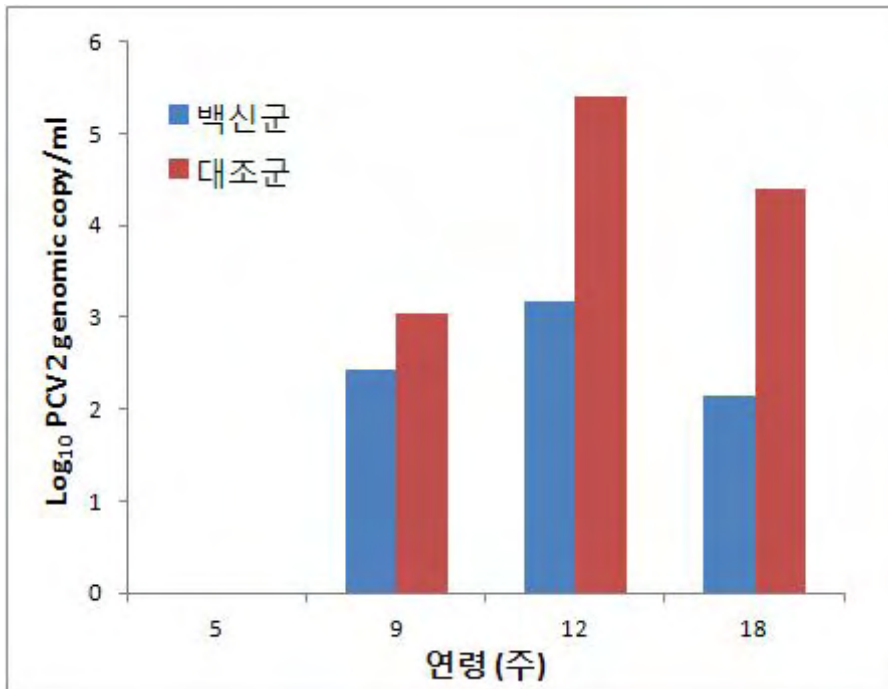


그림 17. 시험 농장 2 혈중 돼지 썬코바이러스 2형 항원양 비교

(3) 시험농장 3

백신 접종 전인 5주령에서는 두 그룹 모두 혈중 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 항원은 검출되지 않았으며, 백신 접종 후 4주가 지난 9주령부터 백신군이 대조군에 비해 유의성($P<0.01$)을 보이며 바이러스 항원양이 감소하였으며, 12주령 및 시험 종료일인 18주령에서도 백신군이 대조군에 비해 유의성($P<0.01$)을 보이며 바이러스 항원양이 감소한 것으로 나타났다.

표 23. 시험 농장 3 혈중 돼지 썬코바이러스 2형 항원양 비교

실험 구분	공시 두수	연 령 별 Log ₁₀ PCV2 genomic copy 수 (평균±표준편차)			
		5주령	9주령	12주령	18주령
백신군	25	-	2.47±0.43	2.51±0.34	2.28±0.27
대조군	25	-	4.59±0.76	5.23±0.69	4.14±0.58
유의성 (P value)		-	P<0.01	P<0.01	P<0.01

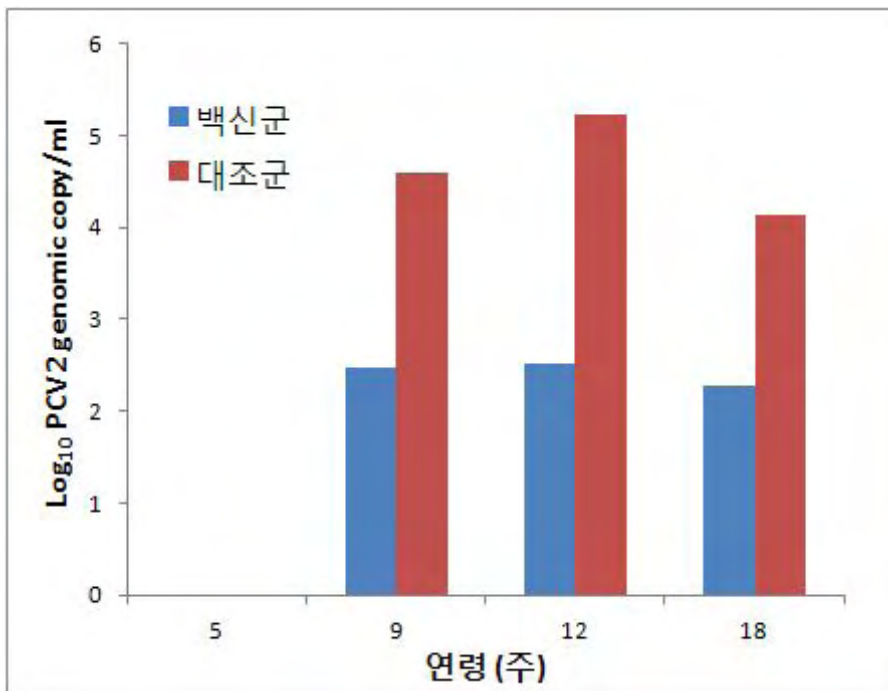


그림 18. 시험 농장 3 혈중 돼지 썬코바이러스 2형 항원양 비교

사. 서혜임파절의 병리조직학적 병변 형성 비교

각 시험 농장 3개에서 백신군과 대조군에서 각 5두씩을 18주령에서 안락사 시킨 후 서혜 임파절을 채취하여 돼지 썬코바이러스 2형 감염 될 때 나타나는 전형적인 병변인 임파구의 감소(lymphoid depletion)의 정도에 따라 스코어를 측정하여 비교하였다. 백신군과 대조군의 병변 정도 차이는 Fisher's exact test를 통해 각 병변 스코어의 빈도를 분석하여 유의성을 측정하였다.

시험농장 1의 백신군과 대조군의 비교에서 백신군의 경우 부검 돼지 5두 중 3두에서 어떠한 병리조직학적 병변이 관찰되지 않았으며(스코어 0), 3두에서 경미한 임파구의 감소(스코어 1)가 관찰되었다. 대조군의 경우 5두 중 2두가 중등도의 임파구의 감소(스코어 2)가 관찰되었고, 나머지 3두에서는 심한 임파구의 감소(스코어 3)가 나타났다. 전체적으로 백신군이 대조군에 비해 서혜 임파절 병변 스코어가 유의성(P=0.018)을 보이며 낮게 나타났다. 시험 농장 2의 경우, 백신군 돼지 3두에서는 서혜 임파절에 어떠한 병리조직학적 병변이 관찰되지 않았고 2두에서만 경미한 임파구의 감소가 나타났다. 대조군에서는 1두가 중등도의 임파구의 감

소를 보였으며, 3두에서 심한 임파구의 감소가 관찰되었다. 시험농장 2의 경우도 전체적으로 백신균이 대조군에 비하여 서혜 임파절 병변 스코어가 유의성($P=0.018$)을 보이며 낮게 나타났다. 시험농장 3에서는 백신균의 경우 5두 중 1두에서 어떠한 병리조직학적 병변도 관찰되지 않았고, 3두에서는 경미한 임파구의 감소를 보였으며, 1두에서 중등도의 임파구의 감소가 나타났다. 대조군의 경우 5두 중 2두에서 중등도의 임파구의 감소가 관찰되었고, 1두에서 심한 임파구의 감소를 보였으며 2두에서 매우 심한(스코어 4) 임파구의 감소가 나타났다. 시험농장 3의 경우도 백신균이 대조군에 비하여 전체적으로 유의성($P=0.048$)을 보이며 서혜 임파절 병변 스코어가 낮게 나타났다.

표 24. 3개 시험농장 서혜임파절 병변 스코어 비교

	구 분	시험농장		
		1	2	3
백신균	공시두수	5	5	5
	서혜임파절 병변 score 평균	0.6	0.4	1.0
	표준편차	0.55	0.45	0.70
대조군	공시두수	5	5	5
	서혜임파절 병변 score 평균	2.4	2.2	3.0
	표준편차	0.54	0.44	0.70
유의성 (P value)		$P=0.018$	$P=0.018$	$P=0.048$

아. 흉막폐렴에 의한 폐장의 병리조직학적 병변 형성 비교

흉막폐렴에 의한 폐렴 병변 정도에 따라 점수를 측정한 결과, 시험농장 1의 경우, 백신균은 공시돈 5두 중 3두에서는 폐렴 병변 소견이 나타나지 않았으며(스코어 0), 2두에서는 일부에서 폐포강내 염증세포가 관찰된 경미한 폐렴 소견(스코어 1)이 나타났으며, 대조군의 경우 공시돈 5두 중 2두에서는 중등도의 폐포강내 염증세포 침윤 및 출혈 소견이 관찰되었고(스코어 2), 나머지 2두에서 넓은 범위에서 폐포강내 염증세포가 침윤이 심하게 관찰되었다(스코어 3). 시험농장 2의 경우 백신균은 공시돈 5두 중 2두에서는 폐렴 병변 소견이 나타나지 않았고, 3두에서는 일부에서 폐포강내 염증세포가 관찰된 경미한 폐렴 소견이 나타났으며, 대조군에서는 5두 중 1두에서는 일부에서 폐포강내 염증세포가 관찰된 경미한 폐렴 소견이 나타났으며, 2두에서 중등도의 폐포강내 염증세포 침윤 및 출혈 소견이 관찰되었고, 1두에서 넓은 범위에서 폐포강내 염증세포가 침윤이 심하게 관찰되었다. 시험 농장 3의 경우, 백신균은 공시돈 5두 중 2두에서는 폐렴 병변 소견이 나타나지 않았고, 3두에서는 일부에서 폐포강내 염증세포가 관찰된 경미한 폐렴 소견이 나타났으며, 대조군은 공시돈 5두 중 3두에서는 중등도의 폐포강내 염증세포 침윤 및 출혈 소견이 관찰되었고, 1두에서는 넓은 범위에서 폐포강내 염증세포가 침윤이 심하게 관찰되었다.

폐렴 병변 점수 결과, 3개의 시험농장 부검 돼지 모두 백신군이 대조군에 비하여 유의성을 보이며 병변이 적게 관찰된 것으로 확인되었다($P<0.05$)

표 25. 3개 시험농장 폐장 병변 스코어 비교

	구 분	시험농장		
		1	2	3
백신군	공시두수	5	5	5
	홍막폐렴병변 score 평균	0.4	0.6	0.6
	표준편차	0.54	0.55	0.72
대조군	공시두수	5	5	5
	홍막폐렴병변 score 평균	2.0	1.6	1.8
	표준편차	0.71	0.52	0.45
유의성 (<i>P</i> value)		$P=0.038$	$P=0.044$	$P=0.041$

자. 조직내 돼지 썬코바이러스 2형 증식 비교

시험 농장 3개에서 시험군과 대조군 18주령 각 5두를 안락사 시킨 후 서혜 임파절을 채취하여 면역조직화학법을 통해 돼지 썬코바이러스 2형 항원을 비교한 결과는 아래 표 26와 같다. 각각의 시험 농장마다 Mann-Whitney test 방법을 이용한 통계학적 기법으로 분석한 결과 3개 농장 모두에서 백신군이 대조군 보다 유의성을($P<0.01$) 보이며 서혜 임파절에서 돼지 썬코바이러스 2형의 항원이 적게 관찰되고 있다.

표 26. 시험농장 3개 백신군과 대조군의 면역화학조직법 결과

구 분	시험농장			
	1	2	3	
백신군	공시두수	5	5	5
	돼지 썬코바이러스 2형 양성세포수 평균	8.31	5.12	12.19
	표준편차	4.55	4.61	7.14
대조군	공시두수	5	5	5
	돼지 썬코바이러스 2형 양성세포수 평균	25.54	21.19	31.45
	표준편차	13.52	11.61	13.95
유의성 (P value)	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	

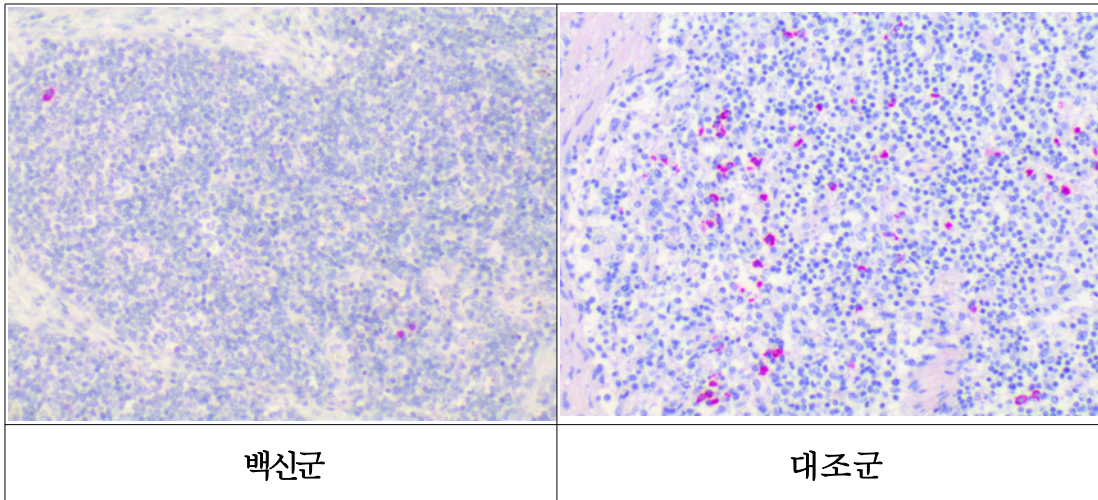


그림 19. 백신군과 대조군 돼지썬코바이러스 2형에 대한 면역화학조직법 슬라이드

차. 폐장 조직내 돼지 흉막폐렴균 증식 비교

시험 농장 3개에서 시험군과 대조군 18주령 각 5두를 안락사 시킨 후 폐장을 채취하여 조직내 교잡법을 통해 흉막폐렴균 항원을 비교한 결과는 아래 표 27와 같다. 각각의 시험 농장마다 Mann-Whitney test 방법을 이용한 통계학적 기법으로 분석한 결과 3개 농장 모두에서 백신군이 대조군 보다 유의성을($P < 0.01$) 보이며 폐장에서 흉막폐렴균 항원이 적게 관찰되고 있다.

표 27. 시험농장 3개 백신군과 대조군의 폐장 조직내 교잡법 결과

구 분	시험농장			
	1	2	3	
백신군	공시두수	5	5	5
	폐장조직내 흉막폐렴균 양성세포수 평균	6.31	7.18	14.53
	표준편차	4.18	6.43	9.87
대조군	공시두수	5	5	5
	폐장조직내 흉막폐렴균 양성세포수 평균	25.33	32.51	39.52
	표준편차	11.41	18.61	16.95
유의성 (P value)	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	

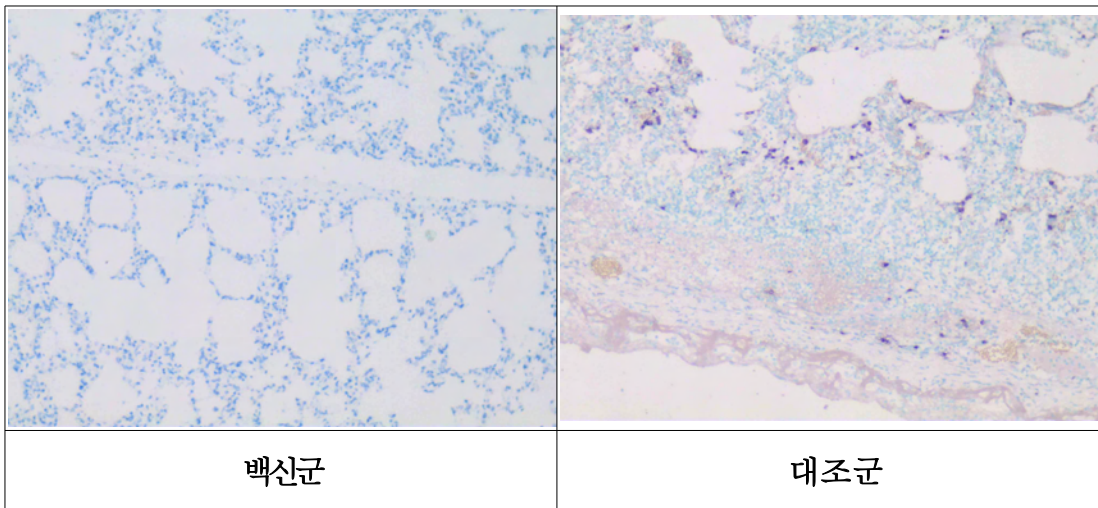


그림 20. 백신군과 대조군의 흉막폐렴균에 대한 조직내 교잡법 슬라이드

카. 고 찰

이전의 실험실 내 공격 접종 실험을 통하여 5주령에 접종한 개발된 돼지 썬코흉막 복합백신이 돼지 썬코바이러스 2형과 흉막폐렴균에 대하여 각각에 대한 예방 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 하지만 실험실 내 공격접종 실험의 결과는 적인 질병 가능성이 있는 실제 농장에 그대로 적용하기는 어렵다. 또한 농장에서는 백신을 접종함으로써 얻을 수 있는 경제적 이익이 가장 중요한 지표가 될 수 있기 때문에 장기간 증체량을 비교할 수 있는 야외 임상 실험이 필수적이다. 3개 농장을 통해 실시한 이번의 야외임상 실험 결과, 공격접종 실험에서와 같이 8-9주령부터 백신군의 임상 증상이 대조군에 비해 감소하기 시작하였으며 시험이 종료되는 18주령까지의 폐사율이 감소하였다. 또한 일일 증체량의 경우도 백신군이 유의성을 보이며 대조군에 비하여 높게 나타남에 따라 본 돼지 썬코 흉막 복합백신이 실제 농장에 경제적 이익을 높

인 것으로 확인되었다.

본 돼지 썬코흥막 복합백신의 야외임상 실험을 통하여 복합백신이 각각의 항원에 대한 면역 반응을 충분히 유도하여 각 질병을 방어할 수 있음을 입증하였으며, 실제 농장에서도 복합백신 접종으로 각 질병에 대한 개선효과가 있음이 입증되었다.

제 6 장 마이코플라즈마 분리 및 배양법 연구

제 1 절 서 설

본 연구 과제를 통하여 돼지 마이코플라즈마 분리법 프로토콜을 확립함으로써 국내 양돈 농가에서 발생하고 있는 마이코플라즈마균을 확보하고자 하며, 아울러 돼지 마이코플라즈마의 효과적인 배양법을 개발함으로써, 산업적 백신 생산에 적용가능한 배양법을 개발하고, 병원성과 항원성이 높은 균주를 선발 배양하고자 한다.

본 사업단은 항원성 및 분리주 특성 분석을 수행하여 국내와 국외에서 가장 심각한 문제를 유발하는 돼지 마이코플라즈마 예방 백신을 상품화하고자 한다. 본 연구 수행을 통하여 얻어진 다수의 마이코플라즈마균 분리주는 백신개발 및 연구분야의 큰 자산이 될 수 있을 것이다.

또한 국내에서 개발된 마이코플라즈마 분리법 프로토콜과 배양법은 수의과학기술 분야에서 세계적인 기술 우위를 점할 수 있다. 양돈 산업의 새로운 트렌드는 청정 돈육의 생산이다. 이를 위하여 사료 내 복합 가능 동물용의약품 25종 가운데 7종이 2009년부터 사료 복합이 금지된다. (농림부 고시 개정 제 2007-88호). 완벽한 질병 예방 없이는 청정 돈육 생산이 불가능하므로, 농장에 만성적인 경제적 피해를 입히는 돼지 유행성 폐렴의 예방은 반드시 필요한 선결조건이다.

돼지 유행성 폐렴을 일으키는 마이코플라즈마 예방 백신을 이용한 청정 돈육이 생산되면 국내 돼지고기의 생산성을 증가시키고, 소비 증가에 기여할 수 있다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 마이코플라즈마 분리

가. 마이코플라즈마 분리를 위한 배양액 비교

(1) 기본 배양액(Friis) 조성

Friis 배양액	조성
Modified Hanks BBS	50 ml(10x)
Brain heart infusion	8.2 g
PPLO broth	8.7 g
Mycoplasma broth base	7.5 g
Deionized water	750 ml
Fresh yeast extract	5%
Yeast extract	0.5 g
Phenol red	4.5 ml(0.5%)
Bacitracin	
Methicillin	
Thallos acetate	0.08 mg/ml
Swine or horse serum	100 ml
Horse serum	200 ml

(2) 그 외 마이코플라즈마 배양액 조성 비교

배양액 조성물	배양액 1	배양액 2	배양액 3	배양액 4	배양액 5
PPLO broth	16.8 g	16.8 g	15 g	15 g	21g
PPLO agar	28 g	28 g	34 g	34 g	
D.W	800 ml	700 ml	750 ml	750 ml	787 ml
Horse serum	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml	50 ml
Swine serum		100 ml			75 ml
Fresh yeast extract	10 ml (50% yeast extract)	10 ml(50%)	50 ml/L	50 ml/L	36.5 ml
NAD	0.02 g	0.0 2g	0.01 g	0.01 g	
Penicillin G sodium salt	2 MU	500 unit/ml	500 unit/ml		
Thallium acetate	0.1 g	0.1 g			5.5 ml(2%)
phenol red		1.3 ml(1%)	1.3 ml(1%)	1.3 ml(1%)	3 ml(0.2%)
bacitracin					
methicillin					
glucose					2.5 ml(50%)
Hank's balanced salt solution					30 ml(10x)
Yeast extract powder					0.5 g
Brain heart infusion broth					1.25 g
Lactalbumin hysrolysate					1.25 g
glucose solution(50%)					2.5 ml

나. 가검물에서 마이코플라즈마 분리 배양

경기도 평택시 소재 도축장에서 마이코플라즈마 감염이 의심되는 폐장 가검물을 채취하였으며, 가검물은 오염 방지를 위하여 10-20개씩 나누어 총 100여개를 확보하였다. 2010년 11월 구제역(Foot-and-Mouth Disease: FMD) 발생으로 인하여 가축의 이동제한 조치가 실시됨에 따라 안성/평택을 포함한 경기도 지역의 축산농가의 방문 자제 명령 및 도축제한 등으로 인하여 추가적인 마이코플라즈마 가검물 채취에 어려움이 있어 구제역 제한 조치 이후 연구 수행을 위한 마이코플라즈마 분리법 비교 연구와 신속검출법 개발이 수행되었으며, 향후 국내 분리주 확보를 위한 분리 배양을 지속적으로 시도하였다.

다. 마이코플라즈마 검출기법

(1) 중합효소연쇄반응기법(Polymerase Chain Reaction: PCR), 이중 중합효소연쇄반응기법(Nested-PCR) 및 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)을 통해 마이코플라즈마를 확인할 수 있으며, 각 진단에 사용되는 프라이머(primer)는 아래 표와 같다.

	Primer set	Sequence	Reference
PCR	F	5'-GAG CCT TCA AGC TTC ACC AAG A-3'	Journal of Clinical, Microbiology, Apr. 1995, p. 893-897
	R	5'-TGT GTT AGT GAC TTT TGC CAC C-3'	
Nested-PCR	F	5'-TTC AAA TTA TAA CCT CGG TC-3' 5'-AGC AAA TTT AGT CTC TCT GC-3'	Veteinary Microbiology (2000) 69: 31-40
	R	5'-CGC TTT AGT ACC GAT ATG GG-3' 5'-GCC ATT CGC TTA TAT GGT GA-3'	
Real-time PCR	F	5'-TGC CCA GGA TAT TTC CGA TCC AGA-3'	Journal of Clinical Microbiology. Aug(2008) 2491-2498
	R	5'-AGA CCT GAA GAA CGT GCA TGG AGA-3'	

표1. 마이코플라즈마 진단용 프라이머(primer)

(2) 등온증폭반응기법(Loop Mediated Isothermal Amplification: LAMP)을 이용한 마이코플라즈마 검출 기법 개발

1) 등온증폭반응기법(Loop Mediated Isothermal Amplification: LAMP)

돼지에게 폐렴을 일으키는 마이코플라즈마를 검출하기 위해 일반적으로 사용되고 있는 PCR,

Nested-PCR, Real time-PCR, 조직내 교잡법 등의 방법은 시간이 오래 걸리고, 고가의 장비와 능숙한 연구원이 필요하다는 단점이 있어, 이를 보완하기 위한 기법으로 고가의 장비나 숙련된 실험자 없이도 쉽고 빠르게 실시할 수 있고 민감도와 특이도가 뛰어난 등온증폭법(LAMP)을 이용한 마이코플라스마 검출 기법을 개발하여 특허 출원하였다.

2) LAMP primer 구성 및 반응 조건

LAMP 진단에 이용되는 primer 구성과 반응 조건은 아래 표와 같다.

표 2. 등온증폭법(LAMP)에 이용한 primer의 구성

Primer set	Sequence
FIP	5'-CGT CCC TTA GTG TCA ATA TAT GAC CTT TTG AAT ACG TAG ATA TTA GG-3'
BIP	5'-CGT GGG GAG CAA ACA GGA TTT TTT CAC CAA CTA ATG ATC ATC GTT TA-3'
LF	5'-GCT GCC TTC GCC TAT TGG-3'
LB	5'-GAT ACC CTG GTA GTC CAC GC-3'
F3	5'-GGA ATT CCT AGT GGA GTG G-3'
B3	5'-CGT TAG CTG TGT TAG TGA CTT-3'

표 3. 등온증폭법(LAMP)을 실시하기 위한 반응 조건

구성	용량	반응 온도	반응 시간
FIP (10pmol)	1.4 µl	57~63°C	60분
BIP (10pmol)	1.4 µl		
LF (10pmol)	0.6 µl		
LB (10pmol)	0.6 µl		
F3 (10pmol)	0.6 µl		
B3 (10pmol)	0.6 µl		
Bst polymerase (8 Unit/ul)	1 µl		
Bst 10x reaction buffer	2 µl		
dNTP(10mM)	2 µl		
DEPC	7.8 µl		
DNA	2 µl		
Total	20 µl		

2. 마이코플라즈마 분리법 프로토콜

가. 배양액 준비

(1) Broth media for 1L

(1) Mycoplasma broth base	BBL-211458	16.8 g
	OXOID-CM0304	8.4 g
(2) DW		700 ml
(3) Thallium acetate (sigma-T8266)		0.1g
(4) Phenol Red (sigma-P3532)		4 ml(1%)
(5) Horse serum (Gibco-16050)		200 ml
(6) Porcine serum (Gibco-26250)		100 ml
(7) Fresh yeast extract (50%)		10 ml
(8) Penicillin G sodium salt (Sigma-p3032)		500U/ml

- 1) (1)~(4) 흰색 부분의 시약들을 섞은 후 pH 7.7로 맞춘 후 멸균한다.
- 2) 1번의 시약을 50°C 정도까지 식힌 후 (5)~(6)부분의 supplements들을 섞어준다.
- 3) 2번 과정 후의 시약을 0.2 µm filter로 멸균 후 4°C 냉장 보관하여 사용한다.

(2) Agar media for 1L

Mycoplasma Agar Media for 1L		
(1) Mycoplasma agar base (BBL-211456)		28 g
(2) DW		700 ml
(3) Thallium acetate (sigma-T8266)		0.1 g
(4) Phenol Red (sigma-P3532)		4 ml(1%)
(5) Horse serum (Gibco-16050)		200 ml
(6) Porcine serum (Gibco-26250)		100 ml
(7) Fresh yeast extract (50%)		10 ml
(8) Penicillin G sodium salt (Sigma-p3032)		500 U/ml

- 1) (1)~(4) 흰색 부분의 시약들을 섞은 후 pH 7.7로 맞추고 후 멸균한다.
- 2) 1번의 시약을 50°C 정도까지 식힌 후 (5)~(6)부분의 supplements을 섞어준다. Supplements를 섞을 때 거품이 많이 생기므로 pipet aid를 이용하여 조심스럽게 섞는다.
- 3) Petri dish(90x15 mm size 기준) 약 40 ml 정도 두께 1 cm 정도로 나눠담는다.

(3) Agar media 배양 할 때 주의점

*Mycoplasma hyopneumoniae*는 배양 후 colony 형성까지 최소 2주 이상의 시간이 걸린다. 배양기간이 길기 때문에 agar media가 두꺼워야 하며 또한 마르는 기간을 늦추기 위해서 보통 인큐베이터 바닥에 있는 스테인레스 볼 같은 용기에 물을 담아 습도를 조절해주는 경우가 있는데 이때는 세심한 주의가 필요하다. *Mycoplasma media*의 영양성분이 일반 배지보다 많기 때문에 곰팡이나 다른균에 의한 오염이 쉽게 일어나고 이러한 오염은 agar media에서 발생하기 시작하면 broth media에도 전파되기 때문에 되도록 따로 물을 넣어주기보다는 처음부터 agar의 두께를 충분히 만드는 것을 추천한다.

(4) Supplements preparation

1) Horse and porcine(swine) serum

- 가) 냉동상태의 serum을 water bath에 넣고 56°C에서 30분 동안 열을 이용하여 불활화 시킨다.
- 나) 8000 rpm에서 10분 원심분리 후 상층액만 취해 1.2-0.8-0.45-0.2 µm 필터로 필터링 한 후 -70°C에서 냉동 보관하여 사용한다.

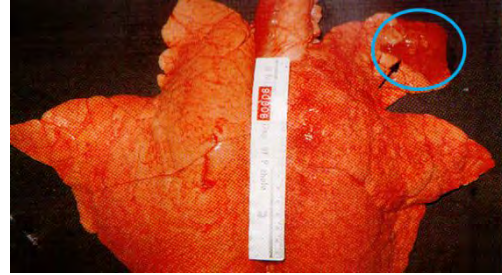
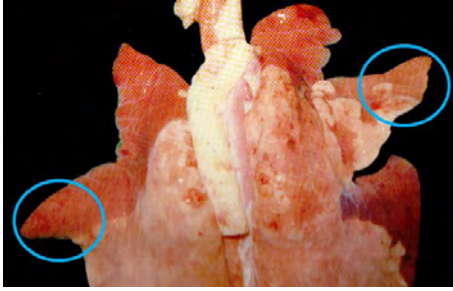
2) Fresh yeast extract

- 가) DW 100 ml에 yeast extract를 25 g 넣고 100°C에서 5분 동안 끓인다.
- 나) 10,000 rpm 40분 4°C 원심 분리한다.
- 다) 5-1.2-0.8-0.45-0.2 µm 단계로 필터링 후 -70°C 보관하여 사용한다.

3) Penicillin G

- 가) 시그마 제품은 1652 unit/mg 농도이다.
- 나) 500 unit/ml로 만들려면 500,000 unit/L --> 302.6 mg/L
- 다) 907.8 mg을 9 ml의 DW에 녹인 후 3 ml을 0.2 µm 필터링 후 1L broth media에 넣으면 500 unit/ml 농도가 된다. (증류수의 양이 적으면 잘 녹지 않고 powder의 형태로 넣으면 오염되기 쉬우므로 증류수에 농도 맞춰 녹인 후 넣는다.)

나. *Mycoplasma hyopneumoniae* isolation protocol



(1) 도축장 가검물 채취단계

- 1) 검사관실에 들어가 인사를 드리고 방역복으로 갈아입고 작업장으로 내려간다.
- 2) 폐장이 돼지로부터 적출 되면 최대한 다른 부위나, 물, 주변 사물에 오염되지 않도록 주의 하면서 위의 사진에 표시된 부위를 가위로 절단하여 1개당 1개의 샘플을 specimen cup에 채 취한다.
- 3) 이동 할 때 샘플관리

비강면봉(nasal swab) 또는 폐장 조직을 이용한 *Mycoplasma hyopneumoniae* 분리법 (isolation)을 다룬 몇 편의 관련 논문에서는 4°C 저온상태로 보관하여 운송하라고 하지만 실제 본 실험에서는 온도가 낮아지면 균 회수율이 현저히 낮아지는 현상을 보였다. 따라서 저온 상태보다는 최대한 빠른 시간에 분리작업을 하는 것이 좋은 방법이라고 생각되어진다.

(2) 균 접종

- 1) 학교에 도착하면 각각의 샘플에 번호를 부여하고 가로세로 2 cm (약2~3 g) 크기로 병변 부위를 잘라 낸 후 잘게 자른 후 15 ml의 media에 부유시킨 뒤 stomach bag에 넣고 3단계 3분으로 stomaching 한다. (Media는 접종 1~2시간 전에 37°C incubator에 보관하여 30°C 이상 올린 후 사용한다.)
- 2) 유제를 1.2, 0.8, 0.45 µl 필터로 필터링 한 후 conical tube에 넣는다. (필터링 과정 중의 손실 양과 PCR등의 다른 실험을 위해 4 ml 정도 준비한다.)
- 3) 필터링을 모두 하고 난 후 fresh media 5 ml 에 필터링한 유제 1 ml를 접종한다.
- 4) 각각의 시험관에 labeling을 하고 37°C 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양한다.
- 5) 위의 작업을 최대한 빠르게 이뤄져야 하며 샘플링 후 3시간 이내 끝내야 균의 생존율이 높음.

* *Mycoplasma hyopneumoniae*는 온도가 낮으면 회수율이나 생존율이 낮아지므로 사용하는 media는 항상 따뜻한 온도로 맞추고 실험에 임한다.

(3) 균 배양

- 1) 접종 후 남은 유제를 kit를 이용하여 DNA 추출 후 PCR 실시 양성샘플 기록한다. 특히

boiling, phenol-chloroform 방법으로 DNA 추출시 PCR 밴드가 잘 안 나올 반드시 kit 사용 권장한다.

2) 접종 후 일주일 이내에 부유물이 많이 생기고 심한 부패취가 생기는 것은 폐기한다.

3) 약 10일에서 2주 사이 PCR 실시한다. (이때부터는 boiling method로 DNA 추출하여도 PCR밴드 잘 나온다.)

4) 처음의 유제를 가지고 한 PCR 결과와 비교하여 전기영동상의 밴드를 비교하여 균이 자랐는지 여부를 1차적으로 가늠할 수 있다. (유제에서는 양성이었는데 음성으로 나오는 경우가 많으며 간혹 유제에서는 음성이었는데 양성반응이 나오는 경우도 있다.)

5) 약 10일에서 2주 사이 새로운 fresh media 5 ml에 1차 접종 media를 1 ml 0.45 µl 필터로 필터링 한 후 접종한다.

6) 2차 계대 후 2~3주 사이에 positive의 경우 control에 비해 노랗게 변하기 시작함. 균주별로 변하는 속도차이가 있으나 계대 차수가 높아질수록 그 차이는 줄어든다.

7) PCR로 positive 확인 후 2차 계대와 같은 방법으로 3차 계대 실시한다.

8) 3차 계대 2주 후 색변화 확인 후 PCR 밴드 확인되면 균주명을 부여하고 stock solution을 이용하여 샘플당 3개씩 stock해 놓는다.

9) 3차 계대배양까지 양성반응이 나온 broth에서 100 µl를 취하여 Agar media에 도말한 후 5% CO₂ incubator에서 배양하면 3~4주 사이에 작은 흰점 같은 colony가 생긴다. Colony가 아주 작고 colony가 육안으로 확인되기까지는 오랜 시간이 걸리므로 도말 2주 후부터는 세심히 관찰하는 것이 좋다.

10) Agar위에 colony를 멸균 면봉을 이용하여 채취한 후 DNA추출하여 중합효소 연쇄반응을 실시하여 확인 작업을 실시한다.

(4) DNA extraction

유제에는 target DNA외에 여러 이물질이 많이 섞여있으므로 시판되는 DNA extraction kit를 이용하여 DNA를 채취하는 것을 추천한다. 하지만 유제 이외의 broth는 boiling method를 이용하여 DNA를 채취하여도 충분한 양의 DNA 회수율을 보이므로 boiling method를 이용한다.

1) Broth

가) Broth media를 1 ml 채취하여 eptube에 옮겨 담는다.

나) 12,000 rpm으로 30분간 원심분리 한다.

다) 상층액을 조심히 버리고 DW로 pellet이 떨어지지 않도록 조심하며 3회 세척한다.

라) DW를 제거하고 pellet에 100 µl의 DEPC water를 넣고 vortex하여 pellet을 부유시킨다.

마) floating lack에 tube를 끼운 후에 100°C 끓는 물에 10분간 중탕한다.

바) ice나 냉동실에서 급랭시킨 후 -20°C에 보관하며 DNA로 사용한다.

2) Agar

가) 멸균 면봉으로 agar plate위에 colony를 채취한다. Plate의 약 1/4 정도 표면을 긁는다.

- 나) eptube에 100 µl의 DEPC water를 넣고 그 안에 면봉의 흰 부분만 절단하여 넣고 vortex
- 다) 면봉을 제거하고 eptube를 floating lack에 tube를 끼운 후에 100°C 끓는 물에 10분간 증탕한다.
- 라) ice나 냉동실에서 급랭시킨 후 -20°C에 보관하며 DNA로 사용한다.

(5) 분리 균주 PCR 확인

1) Primer sequence

(전방향 프라이머; F) 3'-GAGCCTTCAAGCTTCACCAGGA-5'
 (후방향 프라이머; R) 3'-TGTGTTAGTGACTTTTGCCACC-5'

가) PCR tube에 10 pmol의 Forward and Reverse primer 1 µl씩, 1 Unit의 Top polymerase 1 µl, dNTP(2 mM each) 2 µl, 10X reaction buffer 2 µl, target DNA 2 µl, DEPC water 11 µl를 섞어 총 20 µl volume의 PCR premix를 만든다. 작업은 ice 또는 ice lack에서 실시한다.

- 나) 뚜껑을 확실히 닫은 상태에서 손가락으로 툭툭 치면서 섞어준다.
- 다) spindown 시킨 후 PCR 실시한다.
- 라) PCR 반응은 94°C에서 5분간 반응시킨 후 94°C에서 30초, 51°C에서 30초, 72°C에서 30초 반응을 45회 반복한 후 72°C에서 5분간 반응시킨 후 4°C에서 안정시킨다.
- 마) PCR반응이 끝난 PCR product를 1% agarose gel에 전기영동을 실시한다.

(6) Genotyping of *Mycoplasma hyopneumoniae* using PCR-RFLP

PCR반응이 끝난 PCR product를 이용하여 제한효소 실험을 실시하였다. - PCR-RFLP-

- 1) PCR tube에 PCR product 5 µl, 10x reaction buffer 1 µl, HinfI 1 µl, DEPC water 3 µl를 넣어 총 10 µl volume을 만든다.
- 2) Spindown 후에 37°C에서 2시간동안 반응시킨다.
- 3) 65°C에서 20분간 반응시켜서 효소를 불활성화 시킨다.
- 4) 결과물을 1% agarose gel에 전기영동을 실시한다.

HinfI (20 u/ul)	1 µl
10x redbuffer	1 µl
PCR product	8 µl
Total	10 µl

37°C	120 min
65°C	20 min

3. 마이코플라즈마 독성 평가

가. Bacteria strains, culture condition, and nucleic acid extraction

M. hyopneumoniae ATCC 25934 strain과 국내 돼지로부터 분리한 *M. hyopneumoniae* 27개 strain을 37°C 5% CO₂ 조건에서 2주간 배양하였다. DNA 추출을 위하여 배양된 *M. hyopneumoniae*를 1.5 ml tube에 각각 1 ml씩 분주한 후 14,000 rpm에서 40분 원심분리 하였다. 상층액 제거 후 DEPC DW로 2번 washing하였으며, 100°C에서 10분 가열 후 실험에 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였다. DNA 농도는 Epoch(BioTech)로 260nm에서 측정하여 모든 샘플들의 농도를 동일하게 맞추었다.

나. Real-time PCR condition

M. hyopneumoniae virulence factor screening을 위하여 *M. hyopneumoniae* ATCC 25934 strain과 국내 돼지로부터 분리한 27개의 *M. hyopneumoniae* strain에 대하여 *sipS*, *Mhp*, p46 유전자를 real-time PCR로 상대정량 하였다. *sipS*와 *Mhp* 유전자는 SYBR Green 법으로 상대정량 하였으며, p46 유전자는 TaqMan probe법으로 상대정량 하였다. *sipS*와 *Mhp* 유전자의 상대정량을 위해 2X SYBR Green premix(TAKARA) 12.5 µl, forward, reverse primer를 각각 2.5 pmol씩, DNA 10 ng을 포함하여 총 볼륨을 25 µl로 하였다. SYBR Green Real-time PCR의 수행 조건은 95°C 5분 후, 40 cycle의 95°C 15초, 60°C 30초를 진행한 직후, dissociation cycle을 진행하여 melting curve를 확인하였다. p46 유전자의 상대정량을 위해 2X TaqMan probe premix(TAKARA) 12.5 µl, 각각의 primer와 probe를 5 pmol씩, DNA 10 ng을 포함하여 총 볼륨을 25 µl로 하였다. TaqMan probe Real-time PCR의 수행 조건은 95°C 3분 후, 40 cycle의 95°C 15초, 60°C 1분을 진행하였다. Probe의 5' 말단에 FAM을, 3' 말단에 BHQ1을 표지하였다. 각각의 primer와 probe의 정보는 아래 표에 나타내었다.

표 4. primer 및 probe 정보

Method	Name	Sequence	Reference
SYBR Green	<i>sipS</i> (F)	5'- TCC TGG TGA TAA ATT AGA AGT TAC TG -3'	Moitinho-Silva et al., 2012
	<i>sipS</i> (R)	5'- TCC AAA AGT ACG GCT ATC ATT AC -3'	
SYBR Green	<i>Mhp</i> (F)	5'- TGG GCA ATC AAG AAG CAA C -3'	Moitinho-Silva et al., 2012
	<i>Mhp</i> (R)	5'- TGA AAA CGG AAA ACA CCT TG -3'	
TaqMan probe	p46 (F) p46 (R) probe	5'- ATT CCG ATT GTT GCC TAT GAT C -3' 5'- AAT TGA ATC AAA AGC ACC ATC TTC -3' (FAM) 5'-ATA GAC CCG CCG CAA GTG AAA GAC - 3' (BHQ1)	Marois et al., 2009

제 3 절 결과와 고찰

1. 마이코플라즈마 표준 균주를 이용한 분리 배양액 비교 결과

표준 균주인 *Mycoplasma hyopneumoniae* ATCC 25934 와 *Mycoplasma hyorhinis* ATCC 27717 를 이용한 분리 배양시 위 배양액 조성 중 yeast extract, glucose 등이 포함된 배양액 5가 가장 우수한 것으로 조사되었다.

2. 등온증폭반응기법(Loop Mediated Isothermal Amplification: LAMP)을 이용한 검출 결과 확인

LAMP 반응이 완료된 후, 각 반응액 3 μ l를 취하여 1 μ l Loading buffer(TAKARA, A157)와 복합하여 1X TAE로 만든 1% agarose gel에 전기영동을 실시하였고 그 결과 아래와 같이 LAMP 기법의 경우가 일반 PCR에 비해 10배정도 높은 민감도를 보였다. 또한 특이도 실험을 하기위해 *M. hyorhinis*를 이용하여 같은 실험을 반복한 결과, 아래 그림에서와 같이 밴드가 나타나지 않았으며 이를 통해 *M. hyopneumoniae*에만 특이적으로 반응하는 것을 확인하였다.

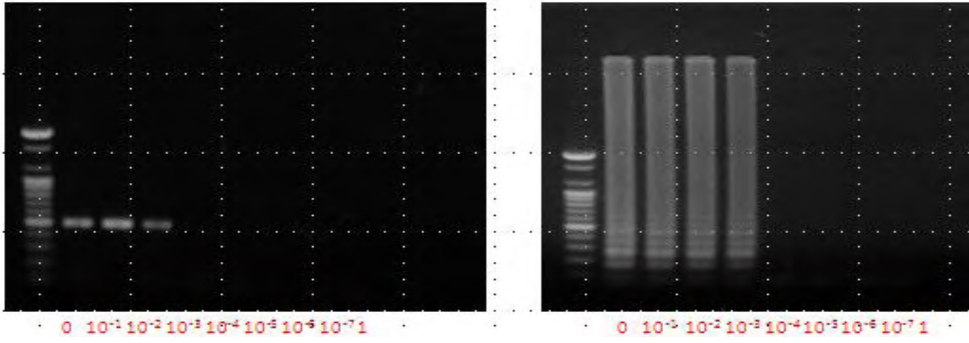


그림 1. 일반 PCR방법과 등온증폭법(LAMP)의 전기영동 비교사진

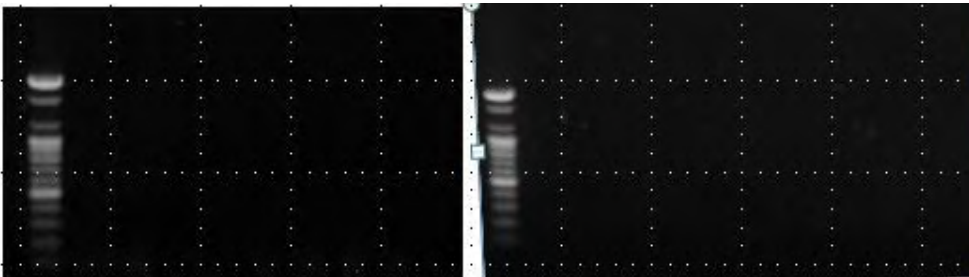


그림 2. *Mycoplasma hyorhinis* DNA로 PCR과 등온증폭법(LAMP)를 실시하였을 때의 전기영동 사진

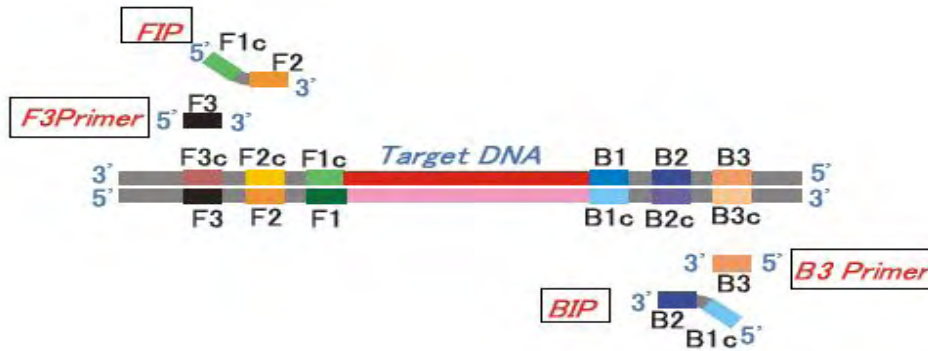


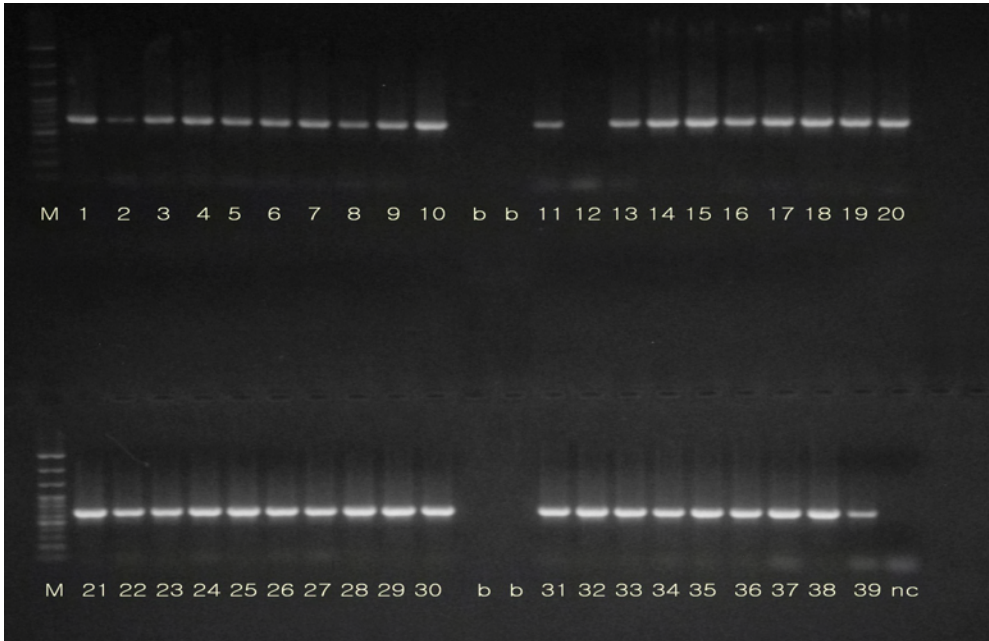
그림 3. 등온증폭법(LAMP)에 사용되는 primer의 구성 기본 구성

3. 마이코플라즈마 야외 분리 균주 확인

가. 분리 균주 목록

관리번호	분류	병원체명 (잠정)	분리일	분리원
CAU20110001	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.08.10	pork lung tissue
CAU20110002	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.08.10	pork lung tissue
CAU20110003	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.08.10	pork lung tissue
CAU20110004	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.08.10	pork lung tissue
CAU20110005	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.08.10	pork lung tissue
CAU20110006	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.08.10	pork lung tissue
CAU20110007	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.08.10	pork lung tissue
CAU20110008	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.08.10	pork lung tissue
CAU20110009	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.08.10	pork lung tissue
CAU20110010	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.10.11	pork lung tissue
CAU20110011	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.10.11	pork lung tissue
CAU20110012	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.08	pork lung tissue
CAU20110013	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.08	pork lung tissue
CAU20110014	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.10.25	pork lung tissue
CAU20110015	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.10.25	pork lung tissue
CAU20110016	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.10.25	pork lung tissue
CAU20110017	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.10.25	pork lung tissue
CAU20110018	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.10.25	pork lung tissue
CAU20110019	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.10.25	pork lung tissue
CAU20110020	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.10.25	pork lung tissue
CAU20110021	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.10.25	pork lung tissue
CAU20110022	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.10.25	pork lung tissue
CAU20110023	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.10.25	pork lung tissue
CAU20110024	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.10.25	pork lung tissue
CAU20110025	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.27	pork lung tissue
CAU20110026	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.27	pork lung tissue
CAU20110027	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.27	pork lung tissue
CAU20110028	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.27	pork lung tissue
CAU20110029	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.27	pork lung tissue
CAU20110030	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.27	pork lung tissue
CAU20110031	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.27	pork lung tissue
CAU20110032	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.27	pork lung tissue
CAU20110033	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.27	pork lung tissue
CAU20110034	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.27	pork lung tissue
CAU20110035	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.27	pork lung tissue
CAU20110036	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.27	pork lung tissue
CAU20110037	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.27	pork lung tissue
CAU20110038	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.27	pork lung tissue
CAU20110039	bacteria	<i>M.hyo</i> pneumonia	2011.11.27	pork lung tissue

나. 분리 균주 PCR 확인결과



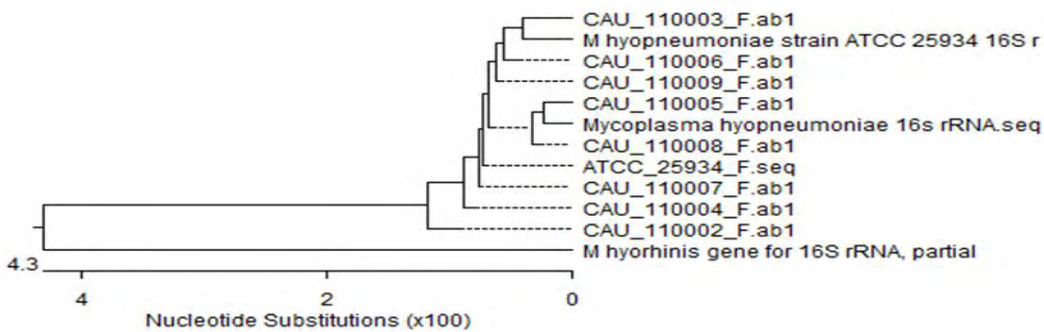
M: 100bp DNA ladder, Sample 1~39: CAU110001~CAU110039

Primer-F (10p)	1 μ l
Primer-R (10p)	1 μ l
Polymerase (1U)	1 μ l
dNTP (2.5 mM each)	2 μ l
10x buffer	2 μ l
DNA	2 μ l
DEPC	11 μ l
Total	20 μ l

다. 분리균주 sequencing

(1) 1차 분리균주 9개 샘플의 PCR product를 가지고 sequencing 실시한다.

(2) *Mycoplasma hyopneumoniae* 16S rRNA gene GenBank: Y00149.1와 *Mycoplasma hyorhinis* 16S rRNA gene GenBank: AB680688.1 CAU110002~CAU110009를 가지고 sequence 비교 결과.



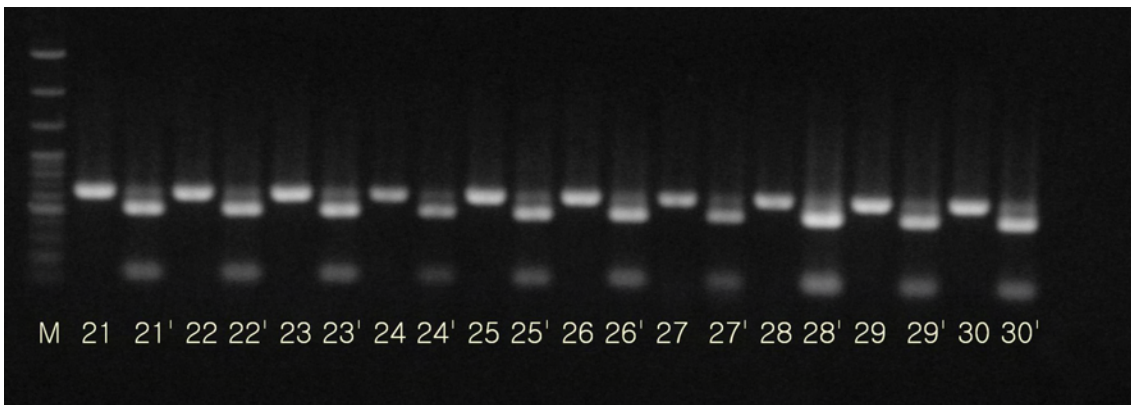
라. 흡광도를 이용한 확인법

	샘플번호	405 nm	샘플번호	595 nm	샘플번호	620 nm
PS	1	0.420	1	0.090	1	0.064
	2	0.417	2	0.107	2	0.071
	3	0.417	3	0.099	3	0.061
	5	0.435	5	0.103	5	0.075
	6	0.418	6	0.092	6	0.065
	8	0.433	8	0.093	8	0.065
	12	0.420	12	0.091	12	0.065
	13	0.439	13	0.113	13	0.088
	14	0.422	14	0.113	14	0.080
NS	4	0.426	4	0.093	4	0.063
	7	0.409	7	0.099	7	0.063
	9	0.402	9	0.093	9	0.060
	11	0.399	11	0.091	11	0.061
	15	0.387	15	0.096	15	0.062
NC		0.391		0.098		0.065
PS	평균	0.425	평균	0.100	평균	0.070
NS	평균	0.405	평균	0.094	평균	0.062

PS: positive sample NS: negative sample NC: negative control

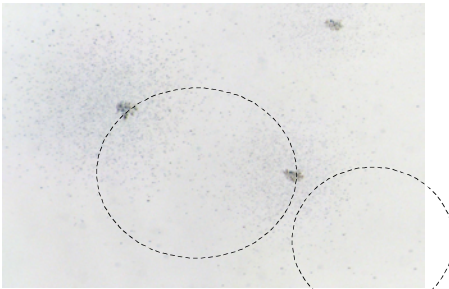
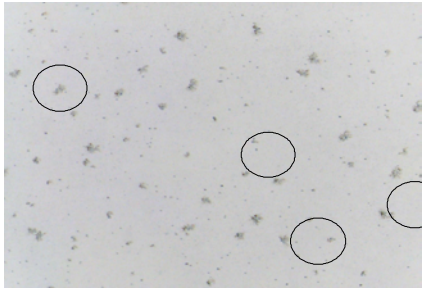
0810샘플 15개를 가지고 흡광도 실험을 한 결과 PCR로 양성으로 확인된 샘플의 흡광도 값과 음성으로 확인된 샘플간의 흡광도 값 차이가 유의적이지 않은 것으로 나타남.

마. 분리균주 CAU110021~CAU110030번 균주를 HinfI을 이용하여 제한효소 처리결과



21~30: CAU110021~CAU110030

바. Agar plate에 배양 후 colony 확인

확대 비율	ATCC 29534	분리균주 CAU110004
40X		

3차 계대배양 후 2주 배양한 broth에서 100 μ l를 도말한 후 3~4주후에 colony 촬영한 사진이다. 동일한 방법으로 3차 계대 배양한 broth를 동량 분주하여 agar plate에 도말하였을 때 ATCC균주보다 필드에서 분리한 균주에서 더 많은 수의 colony를 확인함으로써 ATCC J strain 보다 배양성이 우수함을 육안으로 확인할 수 있었

4. 마이코플라즈마 독성 평가

가. sipS 유전자의 상대정량 평가

sipS 유전자의 상대정량 평가 결과, reference strain인 *M. hyopneumoniae* ATCC 25934에 비하여 *M. hyopneumoniae* CAU110003, CAU110015, CAU110016, CAU110021, CAU110023 strain이 5.26배-7.29배 높은 것으로 나타났다. *M. hyopneumoniae* CAU110019와 CAU110020 strain은 dissociation curve를 확인한 결과, melting point가 양성 판단 균주와 다른 것으로 판단되어 sipS 유전자 상대정량 평가에서 음성으로 판정하였다.

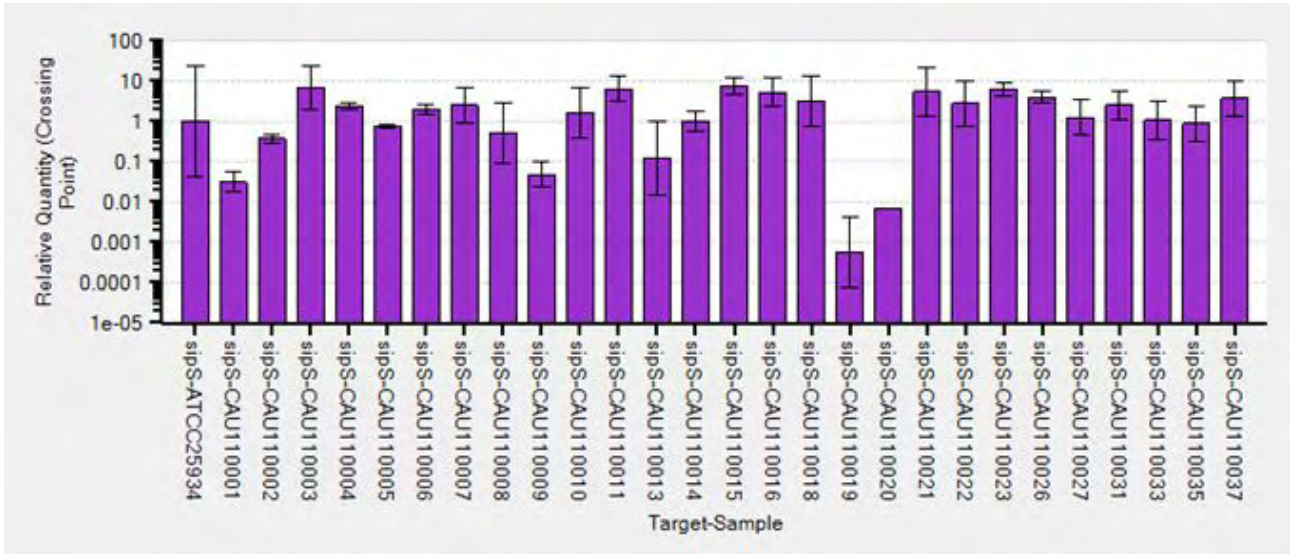


그림 4. sipS 유전자의 상대정량 결과

나. Mhp 유전자의 상대정량 평가

Mhp 유전자의 상대정량 평가 결과, reference strain인 *M. hyopneumoniae* ATCC 25934에 비하여 *M. hyopneumoniae* CAU110011과 CAU110016 strain이 각각 5.03배, 8.31배 높은 것으로 나타났으며 특히 CAU110037 strain의 경우 reference strain에 비하여 33.01배 높게 발현한 것으로 나타났다. *M. hyopneumoniae* CAU110019와 CAU110020 strain은 dissociation curve를 확인한 결과, melting point가 양성 판단 균주와 다른 것으로 판단되어 Mhp 유전자 상대정량 평가에서 음성으로 판정하였다.

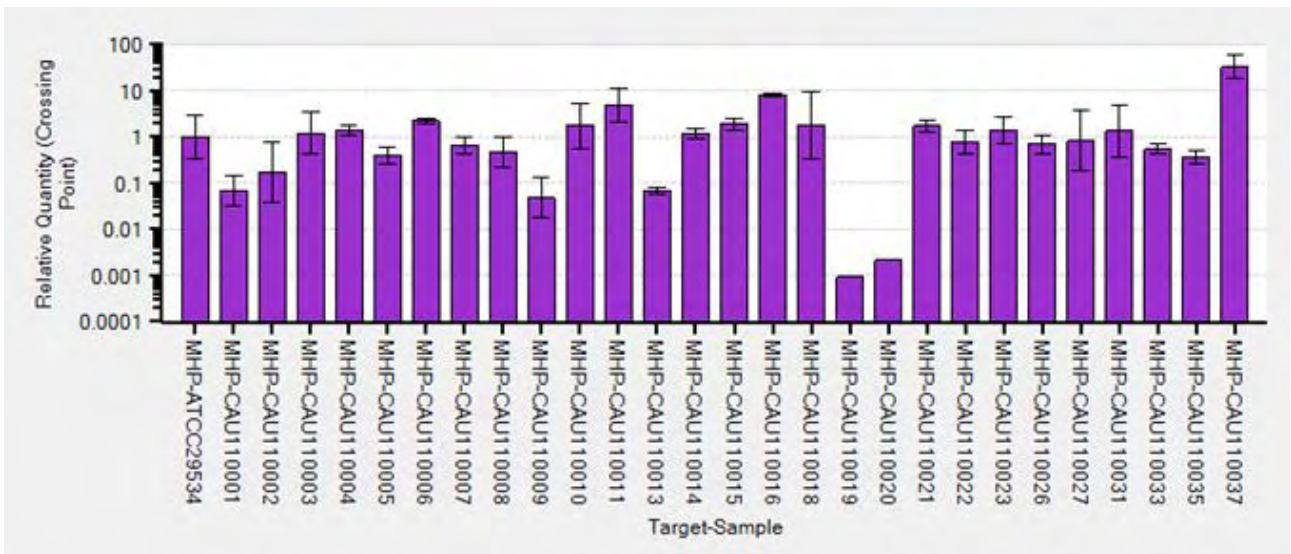


그림 5. Mhp 유전자의 상대정량 결과

다. p46 유전자의 상대정량 평가

p46 유전자의 상대정량 평가 결과, reference strain인 *M. hyopneumoniae* ATCC 25934에 비하여 *M. hyopneumoniae* CAU110015와 CAU110016 strain이 각각 5.02배, 3.20배 높게 발현한 것으로 나타났다. 또한, *M. hyopneumoniae* CAU110001, CAU110009, CAU110027 strain은 reference strain에 비해 각각 0.008, 0.005, 0.085배 발현하여 이 세 균주는 p46 유전자가 매우 적게 발현하는 것으로 판단되었다. *M. hyopneumoniae* CAU110019와 CAU110020 strain은 p46 유전자에 대하여 음성으로 나타났다.

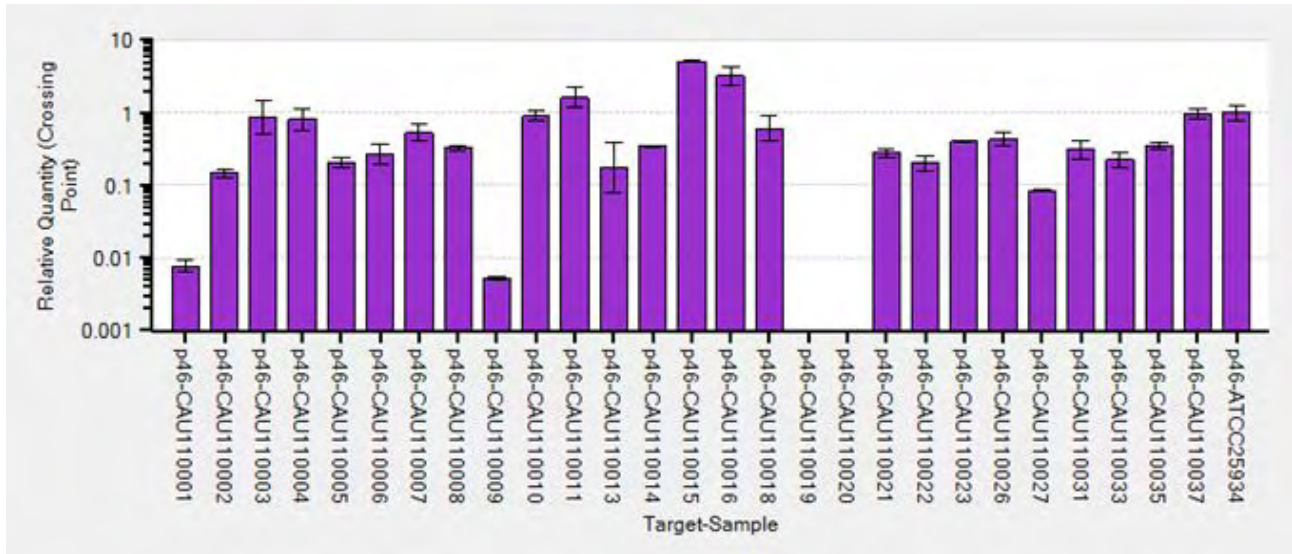


그림 6. p46 유전자의 상대정량 결과

표 1. *M. hyopneumoniae*의 reference strain 및 분리 균주에 대한 virulence factor screening 결과

Sample	sipS	Mhp	p46
ATCC25934	○	○	○
CAU110001	○	○	○
CAU110002	○	○	○
CAU110003	○	○	○
CAU110004	○	○	○
CAU110005	○	○	○
CAU110006	○	○	○
CAU110007	○	○	○
CAU110008	○	○	○
CAU110009	○	○	○
CAU110010	○	○	○
CAU110011	○	○	○
CAU110013	○	○	○
CAU110014	○	○	○
CAU110015	○	○	○
CAU110016	○	○	○
CAU110018	○	○	○
CAU110019	X	X	X
CAU110020	X	X	X
CAU110021	○	○	○
CAU110022	○	○	○
CAU110023	○	○	○
CAU110026	○	○	○
CAU110027	○	○	○
CAU110031	○	○	○
CAU110033	○	○	○
CAU110035	○	○	○
CAU110037	○	○	○

제 7 장 돼지 썬코바이러스와 마이코플라즈마균 복합 백신 연구

제 1 절 서 설

1. 연구의 필요성

마이코플라즈마는 동물에 호흡기 폐렴, 유방염, 결막염, 관절염과 유산을 유발하는 병원성 병원체로서 사람에게 또한 폐렴을 유발하는 인수공통병원체로서 심각한 임상결과를 초래하는 병원체이다. 양돈에서 특히 마이코플라즈마는 폐렴을 유발하여 축산 농가에 막대한 경제적 피해를 입히는 병원체로 알려져 있다. 또한 마이코플라즈마는 다른 세균과 다르게 세포내 기생하기 때문에 배양이 까다롭고 대량 배양법이 개발되어있지 않은 상황이다. 현재까지도 마이코플라즈마 배양의 어려움 때문에 마이코플라즈마 배양을 하는 연구실이 거의 없기 때문에 국내 임상 분리주의 확보가 어려운 실정이다. 또한 효과적인 백신 개발이 되어있지 않아 매년 마이코플라즈마 폐렴에 의한 축산 농가의 경제적 손실이 줄어들고 있지 않은 상황이다. 따라서 효과적인 마이코플라즈마 분리 방법의 개량과 배양법의 최적화로 국내에서 실제 문제되고 있는 임상 야외 마이코플라즈마 균주를 다수 확보하고 특성 분석을 통하여 면역원성이 높은 마이코플라즈마 균주를 선별한 후 이를 백신 균주로 개발하는 전략이 시급히 필요하다.

2. 연구목표

본 연구과제의 당해 연도 목표는 국내 축산 농가에 막대한 경제적 손실을 끼치는 마이코플라즈마 폐렴의 원인균인 마이코플라즈마를 배양하는 최적의 방법을 확립하는 것이며, 년차별 단계를 거쳐 이룩하고자 하는 최종 목표는 국내 양돈 농가에서 문제가 되는 마이코플라즈마 폐렴에 대한 효과적인 백신을 개발하는 것이다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 돼지 마이코플라즈마 최적 배양법 개발

가. 배지 조성 최적화 연구 수행

Culture media A ~ D까지 4가지 다른 조성의 마이코플라즈마 배양 배지를 제작하여 배양의 최적 조건을 비교 연구하였다.

나. 마이코 플라즈마 배양을 위한 4개 formula를 이용하여 비교 연구 수행

Culture media A ~ D까지 4가지 다른 조성의 마이코플라즈마 배양 배지를 제작하여 *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934)와 *M. hyorhinae* (ATCC 27717)를 배양하고 배양의 최적 조건을 비교 연구하였다.

배양은 37°C에서 5% CO₂ 함유 incubator에서 배양하며, 12일 동안 배양 상태를 확인한 결과 Figure 1과 2에서 확인할 수 있듯이 Culture media D에서 배양이 가장 잘 되는 것을 확인 하였다.

다. Glucose와 Thallium의 첨가 여부 및 배지 제작시 멸균 과정의 가열에 의한 영향 평가

Culture media D에 대한 조성 변화와 제조 과정의 변화에 따른 *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934)와 *M. hyorhinae* (ATCC 27717)를 배양 상태를 확인하였다.

라. *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinae*의 배양 최적 온도와 최적 CO₂ 농도 및 최적 배양기 확인 실험

온도와 CO₂ 농도 및 배양기간에 따른 *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934)와 *M. hyorhinae* (ATCC 27717)를 배양 상태를 확인하였다. 실험 결과는 Table 6과 Table 7과 같았다. 실험 결과로서 마이코플라즈마 배양은 Fig. 3에서와 같이 5% CO₂ 농도에서 37°C로 2-3주 배양 하는 것이 최적의 배양 조건임을 확인하였다.

마. 최적 배양법 확립 후 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinae*의 배양에 따른 증식곡선 확인

Culture media D로 *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934)와 *M. hyorhinae* (ATCC 27717)를 5% CO₂ 농도에서 37°C로 4주간 배양하면서 증식곡선 (growth curve)을 확인하였다. *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinae*의 증식 정도는 배양 1주, 2주, 3주 및 4주 시점에 배양액의 color change unit (CCU)와 turbidity (OD값) 및 배양액 ml 당 마이코플라즈마 DNA양을 측정하였다.

2. 돼지 마이코플라즈마 검출법 개발

마이코플라즈마 하이오뉴모니에를 검출하기 위하여 종 특이적인 중합효소연쇄반응 프라이머 세트를 제공하고, 돼지 폐렴 병변으로부터 중합효소연쇄반응을 이용한 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 검출 방법을 제공하기 위하여 중합효소연쇄반응(PCR; polymerase chain reaction)을 이용하여 마이코플라즈마 하이오뉴모니에(*Mycoplasma hyopneumoniae*), 특히 돼지의 유행성 폐렴을 일으킬 뿐만 아니라, 세포배양 또는 기타 생물의약품의 제조, 보관 및 투여과정에서 오염될 수 있는 마이코플라즈마 하이오뉴모니에에 특이적인 PCR용 프라이머를 개발하였고, 이를 사용한 PCR 방법을 이용하면 마이코플라즈마 하이오뉴모니에를 신속하고 정확하게 검출할 수 있음을 실험적으로 확인하였다.

가. 중합효소연쇄반응 프라이머의 개발

마이코플라즈마 하이오뉴모니에 게놈서열 중에서 종(species)에 특이적인 마이코플라즈마 염기서열 protein P97 영역을 표적으로 하여 아래와 같은 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 만을 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 셋트를 제조하였다.

나. 마이코플라즈마 균 준비와 배양

본 연구에서 protein P97 영역을 표적으로 하여 아래와 같은 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 만을 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 셋트의 민감도와 특이도를 확인하기 위한 비교 시료를 얻기 위하여 하기와 같은 마이코플라즈마 종 별 균주들을 구입하여 배양하여 배양하였다.

Mycoplasma hyopneumoniae (ATCC strain 25934), *Mycoplasma hyorhinis* (ATCC strain 27717), *Mycoplasma pneumoniae* (ATCC15531), *Mycoplasma pulmonis* (ATCC19612), *Mycoplasma hominis* (ATCC23114), *Mycoplasma arthritidis* (ATCC19611)

상기 마이코플라즈마 배양은 modified Friis 배지(Zhang 등, 1994)를 이용하여 37°C에서 58 rpm으로 1주일간 배양하여 13,000 g에서 30분 동안 원심 분리하여 Friis 배지성분을 제거하였다.

다. 마이코플라즈마 균주 별 DNA 추출 시료 준비

배양한 각각의 마이코플라즈마 균주들의 DNA 추출은 bead beater-phenol extraction method를 사용하였다. 배양된 균주들을 13,000 g에서 30분 동안 원심 분리하여 얻은 펠렛 검체를 1 ml 멸균 증류수가 들어있는 Mini-Bead Beater(Biospec product) 전용 2 ml 튜브에 무균 채취하여 세절한 후 멸균 3차 증류수에 부유시킨 glass bead(0.1 mm size, Biospec product) 200 μ l와 phenol-chloroform-isoamyl alcohol 용액(50:49:1(v/v/v)) 200 μ l를 넣어 Mini-Bead Beater(Biospec product)로 30초간 5,000 rpm으로 진탕하였다. 진탕 후 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액을 멸균 2 ml 튜브에 옮겼다. 3 M 초산나트륨(sodium acetate) 10 μ l와 ice-cold 에탄올 250 μ l를 넣어 -20°C에서 10분간 정제시킨 후, 15,000rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 침전물은 70% 알코올로 세척하여

실온에서 건조시키고 Tris EDTA(pH 8.0) 60 μ l에 용해시켜 실험에 사용하였다.

라. 중합효소연쇄반응 조건

개발한 프라이머 키트는 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 계놈서열 중에서 종(species)에 특이적인 protein P97 영역을 표적으로 하였기 때문에 다양한 마이코플라즈마 종 중에서 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 만을 특이적으로 검출할 수 있다.

마. 특이도 확인 실험

개발한 프라이머 키트의 특이도(specificity)를 알아보기와 하기과 같은 실험이 수행되었다. *Mycoplasma hyopneumoniae*(ATCC strain 25934), *Mycoplasma hyorhinis*(ATCC strain 27717), *Mycoplasma pneumoniae*(ATCC15531), *Mycoplasma pulmonis*(ATCC19612), *Mycoplasma hominis*(ATCC23114), *Mycoplasma arthritidis*(ATCC19611) 균주를 10일간 modified Friis 배지를 이용하여 37°C에서 58 rpm으로 배양하여 13,000 g에서 30분 동안 원심분리하여 Friss 배지성분을 제거하고 얻은 펠렛 검체를 1 ml 멸균 증류수가 들어있는 Mini-Bead Beater(Biospec product) 전용 2 ml 튜브에 무균 채취하여 세절한 후 멸균 3차 증류수에 부유시킨 glass bead(0.1 mm size, Biospec product) 200 μ l와 phenol-chloroform-isoamyl alcohol 용액(50:49:1(v/v/v)) 200 μ l를 넣어 Mini-Bead Beater(Biospec product)로 30초간 5,000 rpm으로 진탕하였다. 진탕 후 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액을 멸균 2 ml 튜브에 옮겼다. 3 M 초산나트륨(sodium acetate) 10 μ l와 ice-cold 에탄올 250 μ l를 넣어 -20°C에서 10분간 정체시킨 후, 15,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 침전물은 70% 알코올로 세척하여 실온에서 건조시키고 Tris EDTA(pH 8.0) 60 μ l에 용해시켜 실험에 사용하였다.

바. 민감도 확인 실험

개발한 프라이머 키트의 민감도(sensitivity)를 알아보기와 하기과 같은 실험이 수행되었다. *Mycoplasma hyopneumoniae*(ATCC strain 25934) 균주를 10일간 modified Friis 배지를 이용하여 37°C에서 58 rpm으로 배양하여 13,000 g에서 30분 동안 원심 분리하여 Friss 배지성분을 제거하고 얻은 펠렛 검체를 1 ml 멸균 증류수가 들어있는 Mini-Bead Beater(Biospec product) 전용 2 ml 튜브에 무균 채취하여 세절한 후 멸균 3차 증류수에 부유시킨 glass bead(0.1 mm size, Biospec product) 200 μ l와 phenol-chloroform-isoamyl alcohol 용액(50:49:1(v/v/v)) 200 μ l를 넣어 Mini-Bead Beater(Biospec product)로 30초간 5,000 rpm으로 진탕하였다. 진탕 후 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액을 멸균 2 ml 튜브에 옮겼다. 3 M 초산나트륨(sodium acetate) 10 μ l와 ice-cold 에탄올 250 μ l를 넣어 -20°C에서 10분간 정체시킨 후, 15,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 침전물은 70% 알코올로 세척하여 실온에서 건조시키고 Tris EDTA(pH 8.0) 60 μ l에 용해시켜 실험에 사용하였다.

사. 임상 샘플을 이용한 마이코플라즈마 병원체 검사

임상적으로 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 감염에 의한 돼지 유행성폐렴에 감염된 돼지의 폐장으로부터 본 발명으로 개발한 프라이머 키트의 효용성을 확인하고자, 임상샘플을 이용한 마이코플라즈마 병원체 검사 실험을 수행하였다. 전북 익산에 소재하고 있는 도축장에서 도축전 혈액 검사를 통하여 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 감염이 확인된 돼지로부터 육안적으로 폐렴이 확인된 폐장의 일부를 무균 채취하여 1 ml 멸균 증류수가 들어있는 Mini-Bead Beater(Biospec product) 전용 2 ml 튜브에 무균 채취하여 세절한 후 멸균 3차 증류수에 부유시킨 glass bead(0.1 mm size, Biospec product) 200 μ l와 phenol-chloroform-isoamyl alcohol 용액(50:49:1(v/v/v)) 200 μ l를 넣어 Mini-Bead Beater(Biospec product)로 30초간 5,000 rpm으로 진탕하였다. 진탕 후 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액을 멸균 2 ml 튜브에 옮겼다. 3 M 초산나트륨(sodium acetate) 10 μ l와 ice-cold 에탄올 250 μ l를 넣어 -20°C에서 10분간 정체시킨 후, 15,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 침전물은 70% 알코올로 세척하여 실온에서 건조시키고 Tris EDTA(pH 8.0) 60 μ l에 용해시켜 실험에 사용하였다. 실험실에서 추출된 DNA 샘플을 가지고 본 발명으로 개발된 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 protein P97 영역을 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 쌍을 사용하여 PCR을 수행하였다.

3. 돼지 마이코플라즈마 신속 분리 배양법 개발

가검물 검체에서 마이코플라즈마 감염 여부를 신속히 검출하는 것은 분리 배양 성공의 가장 큰 핵심 요인이 될 수 있다. 양돈장의 폐렴 돼지 비강 swab 샘플이나 도축 돼지의 폐렴 폐장 조직으로부터 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*와 같은 마이코플라즈마 세균 야외 균주를 분리하기 위하여, 샘플로부터 신속히 분리 배양이 이루어져야 한다. 그러나, 많은 가검물을 분리를 위한 배양 배지에 접종하는 것은 작업 과정이 많고, 오랜 시간이 소요되며, 많은 수의 배양 샘플을 관리하여야 하는 어려움이 있다. 따라서, 배양 전에 샘플 내에 마이코플라즈마 세균 감염 여부를 신속히 알아낼 수 있다면, 야외 균주 분리 배양을 위한 신속한 배양 접종이 이루어질 수 있으며, 마이코플라즈마 감염 샘플만을 가지고 직접 배양을 시작하기 때문에 마이코플라즈마 야외 분리주를 분리해낼 확률이 높다고 할 수 있다.

샘플에서 마이코플라즈마 감염 여부를 신속히 알아낼 수 있는 방법은 현재 PCR이 알려져 있으나, 마이코플라즈마는 수백 종의 species를 가지고 있어, 각각을 검출하는 프라이머 셋트를 가지고 PCR 분석을 하는데 어려움이 있어왔다.

최근에 마이코플라즈마 세균에 공통적인 유전자 부위를 검출할 수 있는 consensus 프라이머 셋트가 개발되어 보고되고 있는바, 이를 적용하여 여러 번의 종 특이 PCR 분석을 하지 않고, 마이코플라즈마 감염 여부를 확인하는 방법을 확립하고자 하였다.

PCR 분석은 필연적으로 DNA 추출을 먼저 수행하여야 하는 번거로움이 있으며, 이에 따른 시간 소요가 또한 본 연구를 위한 샘플의 마이코플라즈마 감염 여부의 신속한 검사에 장애 요인이 된다. 이러한 장애요인을 해결할 수 있는 방법으로 최근에 DNA 추출 과정이 동시에 이루어질 수 있는 Direct PCR이 개발되어 보고되고 있는 바, 이를 이용하여 샘플 마이코플라즈

마 감염 여부를 별도의 DNA 추출 없이 바로 검사하고자 하였다.

4. 돼지 마이코플라즈마 야외 균주 분리 방법 확립

가. 양돈 농장 폐렴 돼지의 비강 swab 샘플링 방법 확립

양돈장의 호흡기 증상을 가진 돼지의 비강으로부터 swab을 통한 가검물 채취방법을 확립하였다. 가검물로부터 면봉을 이용하여 swab하여 멸균 배지에 옮겨 실험실에서 Hayflick's medium에 배양하는 방법을 사용하였다. 샘플링 시 2개의 면봉을 사용하여 1개의 면봉에 샘플은 DNA를 추출 후 PCR을 이용하여 마이코플라즈마 신속 진단을 실시하고 양성 결과가 나온 다른 pair의 샘플을 가지고 균 분리를 시도하였다.

나. 도축장 폐장 샘플링 매뉴얼 완성

익산시에 소재하고 있는 (주)축림 도축장과 업무협약을 통하여 도축 돼지의 폐장으로부터 가검물 샘플링을 실시하였다. 도축 돼지의 폐장으로부터 효율적으로 마이코플라즈마 분리할 수 있도록 과학적인 샘플링 매뉴얼을 또한 완성하였다. 간략히는 매뉴얼은 준비사항과 도축 폐장의 마이코플라즈마 병소 확인 방법, 마이코플라즈마 폐렴 병소 폐 병변 부위 샘플링 방법, 샘플링 폐장의 실험실 내 무균 작업으로 나누어 작성되었다.

다. 가검물의 마이코플라즈마 함유 여부 신속진단 확인 방법 확립

샘플링 폐장의 일부 미소량 0.5g을 이용하여 마이코플라즈마 함유 여부를 신속진단하는 방법을 확립하였다. 마이코플라즈마 신속 진단을 위하여 Mycoplasma universal primer 쌍과 Phire® Animal Tissue Direct PCR Kit를 이용하여 별도의 DNA 추출과정이 필요 없이, 순수하게 마이코플라즈마 universal primer 쌍에 기초한 중합효소연쇄반응 시간만 소요되기 때문에 2시간의 PCR 과정을 거쳐 바로 전기영동 하여 가검물로부터 바로 마이코플라즈마 감염 여부를 확인할 수 있는 방법을 확립하였다. 본 방법을 이용하여 도축장으로부터 샘플링해온 마이코플라즈마 병변 부위의 샘플로부터 마이코플라즈마 세균 함유 여부를 2시간 이내에 확인할 수 있기 때문에, 분리 배양 대상 가검물 샘플의 선정이 용이하며, 분리 배양 성공 가능성을 극대화할 수 있다.

라. 가검물의 유제화 프로토콜 확립

마이코플라즈마 신속진단을 통하여 함유되지 않은 샘플 가검물은 폐기하고, 마이코플라즈마 양성인 가검물을 유제화하는 프로토콜을 확립하였다. 실험실 내 무균 작업으로 마이코플라즈마 양성인 샘플 폐장의 1g을 무균적으로 채취하여 사전 멸균된 유발에 넣고 멸균 가위로 세절하고 2 ml의 마이코플라즈마 배지를 넣은 후, 멸균 막대로 갈아 유제(homogenate)를 만드는 방법의 프로토콜을 확립하였다.

마. 마이코플라즈마 함유 가검물 유제의 분리 시도 및 배양법 확립

유제화된 가검물은 상온에 1분간 정제하여 폐장 조직 잔여물을 침전시킨 후, 상층액은 마이코플라즈마 분리 배지에 접종하였다. 마이코플라즈마 분리 배지는 Hanks' Balanced salt solution without Phenol Red (Gibco), Mycoplasma Broth Base (Oxoid), Brain Heart Infusion (Oxoid), Yeast Extraction (Duchefa), Thallium Acetate (Sigma), Ampicillin (Sigma), Porcine serum (Gibco), Glucose (Sigma), phenol red (Sigma)를 함유하여 조제하였다.

가검물 유제를 분리 배지에 접종한 후, 5% CO₂ 농도에서 37°C로 2주 배양하고, 계대 배양을 실시하였다.

바. 배양 가검물의 계대 배양을 통한 분리 여부 확인 프로토콜 완성

가검물 유제를 분리 배지에 접종한 후, 5% CO₂ 농도에서 37°C로 2주 배양하고, 계대 배양은 2번에 걸쳐 추가로 새로운 마이코플라즈마 배지에 접종하여 수행되었다. 배양 동안에 배지 색조의 변화를 기반으로 한 Color Change Unit (CCU)를 주기적으로 관찰 기록하였다.

가검물 유제의 분리 배지 접종 후 2주 배양과 2번에 걸친 계대 배양 후, 가검물의 마이코플라즈마 세균의 증식 여부를 확인하였다. 마이코플라즈마의 증식여부는 배양 배지로부터, DNA를 추출한 후, Mycoplasma universal primer 쌍을 이용한 PCR을 수행하여 결과를 확인하였다.

사. 분리 마이코플라즈마의 species 확인 동정 프로토콜 완성

가검물 유제를 분리 배지에 접종한 후, 5% CO₂ 농도에서 37°C로 2주 배양하고, 계대 배양은 2번에 걸쳐 추가로 새로운 마이코플라즈마 배지에 접종하여 수행한 후, 실시한 마이코플라즈마 증식 여부 확인 Mycoplasma universal primers를 이용한 PCR에서 양성인 배양액은 마이코플라즈마 세균이 분리 배양된 것으로 분류하였다.

분리 배양된 마이코플라즈마 세균은 추가로 species를 분류하기 위한 분석을 시행하였다. 마이코플라즈마 species의 분석은 *Mycoplasma hyopneumoniae*와 *Mycoplasma hyorhinis*에 특이적인 프라이머쌍을 이용하여 species specific PCR을 수행하였다.

5. 마이코플라즈마 Consensus PCR의 개발

가. 양돈 농장에서 폐렴 병변 있는 폐장을 샘플링하여 PCR의 수행

익산시에 소재하고 있는 (주)축림 도축장과 업무협약을 통하여 도축 돼지의 폐장으로부터 가검물 샘플링을 실시한다. 도축 돼지의 폐장으로부터 마이코플라즈마 육안 병변이 확인된 폐장의 일부를 샘플링하여 실험실 내에서 무균적으로 재료를 채취하고 0.1 g의 가검물 일부를 이용하여 마이코플라즈마 세균 함유 여부를 2시간 이내에 확인한다.

나. 중합효소연쇄반응 프라이머 개발

마이코플라즈마 계놈서열 중에서 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 16S rRNA(ribosomal RNA) 유전자 영역을 표적으로 하는 마이코플라즈마 속(genus)에 속하는 세균을 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 세트를 제조하였다.

다. 마이코플라즈마 균 준비와 배양

본 연구에서 마이코플라즈마 계놈서열 중에서 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 16S rRNA(ribosomal RNA) 유전자 영역을 표적으로 하는 마이코플라즈마 속(genus)에 속하는 세균의 프라이머의 민감도 및 특이도 등을 확인하기 위한 실험을 수행하기 위하여 아래와 같이 총 9개 종류의 마이코플라즈마 종 별 균주들을 구입하여 배양하였다.

상기 마이코플라즈마 배양은 modified Friis 배지(Zhang 등, 1994)를 이용하여 37°C에서 58 rpm으로 1주일간 배양하여 13,000 g에서 30분 동안 원심 분리하여 Friis 배지성분을 제거하였다.

라. 마이코플라즈마 균주 준비

본 연구에서 마이코플라즈마 계놈서열 중에서 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 16S rRNA(ribosomal RNA) 유전자 영역을 표적으로 하는 마이코플라즈마 속(genus)에 속하는 세균의 프라이머의 민감도 및 특이도 등을 확인하기 위한 비교 실험을 수행하기 위하여 총 7개 종류의 비교대상 균주들을 구입하여 실험하였다.

마. 마이코플라즈마 균주 별 DNA 추출 시료 준비

배양한 각각의 마이코플라즈마 균주들의 DNA 추출은 bead beater-phenol extraction method를 사용하였다. 배양한 균주들을 13,000 g에서 30분 동안 원심 분리하여 얻은 펠렛 검체를 1 ml 멸균 증류수가 들어있는 Mini-Bead Beater(Biospec product) 전용 2 ml 튜브에 무균 채취하여 세절한 후 멸균 3차 증류수에 부유시킨 glass bead(0.1 mm size, Biospec product) 200 μ l와 phenol-chloroform-isoamyl alcohol 용액(50:49:1(v/v/v)) 200 μ l를 넣어 Mini-Bead Beater(Biospec product)로 30초간 5,000 rpm으로 진탕하였다. 진탕 후 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심 분리한 후 상층액을 멸균 2 ml 튜브에 옮겼다. 3 M 초산나트륨(sodium acetate) 10 μ l와 ice-cold 에탄올 250 μ l를 넣어 -20°C에서 10분간 정제시킨 후, 15,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다.침전물은 70% 알코올로 세척하여 실온에서 건조시키고 Tris EDTA(pH8.0) 60 μ l에 용해시켜 실험에 사용하였다.

바. 중합효소연쇄반응 조건

개발한 프라이머 키트는 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 프라이머를 이용하며, 이는 마이코플라즈마 계놈서열 중에서 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 16S rRNA(ribosomal RNA) 유전자 영역을 표적으로 하고있다.

사. 특이도 확인실험

개발한 프라이머 키트의 특이도(specificity)를 알아보고자 하기와 같은 실험이 수행되었다. 마이코플라즈마 균주는 마이코플라즈마 하이오뉴모니에(*M. hyopneumoniae*) 및 마이코플라즈마 하이오라이니스 (*M. hyorhinis*) 2개 종류를 준비하였다. 마이코플라즈마 및 비교대상 균주 102pg의 DNA 샘플들을 준비하였다.

아. 민감도 확인실험

개발한 프라이머 키트의 민감도(sensitivity)를 알아보고자 하기와 같은 실험이 수행되었다. 총 9개 종류의 마이코플라즈마 균주들인 마이코플라즈마 하이오뉴모니에(*M. hyopneumoniae*), 마이코플라즈마 하이오라이니스(*M. hyorhinis*), 마이코플라즈마 뉴모니에(*M. pneumoniae*), 마이코플라즈마 호미니스(*M. hominis*), 마이코플라즈마 펄모니스(*M. Pulmonis*), 마이코플라즈마 아쓰라이티디티스(*M. arthritiditis*), 마이코플라즈마 보비스(*M. bovis*), 마이코플라즈마 플루큐라레(*M. fluccurare*), 마이코플라즈마 마이코이데스(*M. mycoides*) 균주에서 10² pg의 DNA 샘플들을 준비하였다.

6. 마이코플라즈마 하이오뉴모니에와 하이오라이니스 아외 분리 균주 확보

가. 양돈 농장에서 폐렴돼지의 폐장 샘플링 방법 확립

익산시에 소재하고 있는 (주)축림 도축장과 업무협약을 통하여 도축 돼지의 폐장으로 부터 가검물 샘플링을 실시한다. 도축 돼지의 폐장으로 부터 마이코플라즈마 육안 병변이 확인된 폐장의 일부를 샘플링하여 실험실 내에서 무균적으로 재료를 채취하고 0.1 g의 가검물 일부를 이용하여 마이코플라즈마 세균 함유 여부를 2시간 이내에 확인한다.

나. 도축장 폐장 샘플링 매뉴얼 완성

익산시에 소재하고 있는 (주)축림 도축장과 업무협약을 통하여 도축 돼지의 폐장으로 부터 가검물 샘플링을 실시하였다. 도축 돼지의 폐장으로 부터 효율적으로 마이코플라즈마 분리할 수 있도록 과학적인 샘플링 매뉴얼을 또한 완성하였다. 간략히는 매뉴얼은 준비사항과 도축 폐장의 마이코플라즈마 병소 확인 방법, 마이코플라즈마 폐렴 병소 폐 병변 부위 샘플링 방법, 샘플링 폐장의 실험실 내 무균 작업으로 나누어 작성되었다. 마이코플라즈마는 낮은 온도에서 잘 자라지않기 때문에 아이스보관하지 않는다.

마이코플라즈마 신속진단을 위하여 도축장에서 폐장을 분리한후 바로 실험실에 도착하여 샘플링 해온 돼지폐장을 꺼내어 육안병변을 관찰하고 사진을 찍는다. 육안병변을 확인 후, 무균적으로 돼지 폐장을 트리밍하는데 이때 병리조직용과 DNA추출용으로 트리밍하여 마이코플라즈마 감염여부를 신속하게 진단할 수 있다.

샘플링 폐장의 일부 미소량 0.5 g을 이용하여 마이코플라즈마 함유 여부를 신속진단하는 방법을 확립하였다. 마이코플라즈마 신속 진단을 위하여 Mycoplasma universal primer 쌍과 Phire® Animal Tissue Direct PCR Kit를 이용하여 별도의 DNA 추출과정이 필요 없이, 순수하게 마이

코플라즈마 universal primer 쌍에 기초한 중합효소연쇄반응 시간만 소요되기 때문에 2시간의 PCR 과정을 거쳐 바로 전기영동 하여 가검물로부터 바로 마이코플라즈마 감염 여부를 확인할 수 있는 방법을 확립하였다. 본 방법을 이용하여 도축장으로부터 샘플링해온 마이코플라즈마 병변 부위의 샘플로부터 마이코플라즈마 세균 함유 여부를 2시간 이내에 확인할 수 있기 때문에, 분리 배양 대상 가검물 샘플의 선정이 용이하며, 분리 배양 성공 가능성을 극대화할 수 있다.

마이코플라즈마 신속진단을 통하여 함유되지 않은 샘플 가검물은 폐기하고, 마이코플라즈마 양성인 가검물을 유제화하는 프로토콜을 확립하였다. 실험실 내 무균 작업으로 마이코플라즈마 양성인 샘플 폐장의 1 g을 무균적으로 채취하여 사전 멸균된 유발에 넣고 멸균 가위로 세절하고 2 ml의 마이코플라즈마 배지를 넣은 후, 멸균 막대로 갈아 유제(homogenate)를 만드는 방법의 프로토콜을 확립하였다.

유제화된 가검물은 상온에 1분간 정제하여 폐장 조직 잔여물을 침전시킨 후, 상층액은 마이코플라즈마 분리 배지에 접종하였다. 마이코플라즈마 분리 배지는 Hanks' Balanced salt solution without Phenol Red(Gibco), Mycoplasma Broth Base(Oxoid), Brain Heart Infusion(Oxoid), Yeast Extraction(Duchefa), Thallium Acetate(Sigma), Ampicillin (Sigma), Porcine serum(Gibco), Glucose(Sigma), Phenol red(Sigma)를 함유하여 조제하였다.

가검물 유제를 분리 배지에 접종한 후, 5% CO₂ 농도에서 37°C로 2주 배양하고, 계대 배양을 실시하였다.

다. 폐렴 돼지의 폐장에서 분리 마이코플라즈마 species 확인과 stock법 확립

가검물 유제를 분리 배지에 접종한 후, 5% CO₂ 농도에서 37°C로 2주 배양하고, 계대 배양은 2번에 걸쳐 추가로 새로운 마이코플라즈마 배지에 접종하여 수행한 후, 실시한 마이코플라즈마 증식 여부 확인 Mycoplasma universal primers를 이용한 PCR에서 양성이 확인된 배양액은 마이코플라즈마 세균이 분리 배양된 것으로 분류하였다.

분리 배양된 마이코플라즈마 세균은 추가로 species를 분류하기 위한 분석을 시행하였다. 마이코플라즈마 species의 분석은 마이코플라즈마 게놈서열 중에서 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 16S rRNA(ribosomal RNA) 유전자 영역을 표적으로 하는 마이코플라즈마 속(genus)에 속하는 세균을 특이적인 프라이머 쌍을 이용하여 Consensus PCR을 수행하였다.

개발된 프라이머 쌍은 Forward primer[5'-CTC TTT GTA CCG GCC ATT GT-3'(20 mer, 뉴클레오타이드 699283 ~ 699302)]와 Reverse primer[5'-GAA TGA CAG ATG GTG CAT GG-3'(20 mer, 뉴클레오타이드 699478 ~ 699497)]를 사용하였고, 중합효소연쇄반응 PCR을 위한 반응시약의 조성은, 1 µl 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/ µl), 2.5 µl 10× 반응버퍼, 500 µM 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 µl의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞어 제조하였다.

중합효소연쇄반응은 DNA 반응조건은 95°C에서 5 분간 프리디내츄레이션(predenaturation)을 실시한 후 95°C에서 1 분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서 3분간 포스트폴리머라이제이션(post-polymerization)을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 2% 아가로스겔에 전기 영동하여 특이 밴드의 유무를 확인하였다.

라. 양돈 농장 폐렴돼지의 비강 swab 샘플링 가검물로부터 분리방법 확립

익산시에 소재하고 있는 (주)축림 도축장과 업무협약을 통하여 도축 폐렴돼지의 비강 swab으로부터 샘플링을 실시하였다.

양돈장의 호흡기 증상을 가진 돼지의 비강으로부터 면봉을 이용하여 swab을 통한 가검물로부터 멸균 배지에 옮겨 실험실에서 마이코플라즈마 분리 배지에 배양하는 방법을 사용한다. 샘플링 시 2개의 면봉을 사용하여 1개의 면봉에 샘플은 DNA를 추출 후 PCR을 이용하여 마이코플라즈마 신속 진단을 실시하였다.

마이코플라즈마 species의 분석은 마이코플라즈마 계놈서열 중에서 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 16S rRNA(ribosomal RNA) 유전자 영역을 표적으로 하는 마이코플라즈마 속(genus)에 속하는 세균을 특이적인 프라이머 쌍을 이용하여 Consensus PCR을 수행하였다.

7. 돼지 마이코플라즈마 세균 접종방법 개발

가. 마이코플라즈마 측정방법인 CCU (color change unit)로 최적의 세균측정방법 확인

익산시에 소재하고 있는 (주)축림 도축장과 업무협약을 통하여 도축 돼지의 폐장으로부터 샘플링을 실시하였다. 가검물 유제를 분리 배지에 접종한 후, 5% CO₂ 농도에서 37°C로 2주 배양하고, 계대 배양은 2번에 걸쳐 추가로 새로운 마이코플라즈마 배지에 접종하여 수행되었다. 배양 동안에 배지 색조의 변화를 기반으로 한 Color Change Unit (CCU)를 주기적으로 관찰 기록하였다.

나. *M. hyopneumoniae* 와 *M. hyorhinis* 를 배양하여 양돈에 네블라이저와 점적법으로 투여 실험

돼지에서 마이코플라즈마 감염 실험을 하기 위해서 돼지에 감염실험을 할때 배양액을 어떻게 접종하는가에 따라서 마이코플라즈마 감염여부를 신속하게 알 수 있다. 그러나 돼지에 마이코플라즈마를 감염시키는 것은 배양 배지에 접종하는 것보다 작업 과정이 많고, 오랜 시간이 소요되는 어려움이 있다. 따라서 돼지에 마이코플라즈마를 신속하게 감염시킨다면 마이코플라즈마 감염 여부를 신속히 알아낼 수 있을 것이다.

돼지에 *M. hyopneumoniae* 감염 실험을 하기 위해 출생 7 일령의 랜드레이스 교잡종 돼지를 실험에 사용하였다. 실험기간 동안 사육환경은 오전9시부터 오후12시까지는 28°C를 유지하고 오후 12시부터 오전 9시까지는 온도를 18°C를 유지하여 마이코플라즈마 감염 실험 진행을 촉진하기 위하여 cold 스트레스를 주기 위함이다. 돼지사료는 (주)팜스토리한냉(정읍)에서 젓먹이 돼지사료6 을 사용하였고 증류수 200 ml에 사료 20 g을 타서 젓병으로 급여하였다. 돼지 실험은 아래 표 6과 같이 돈군을 구성하였다.

상기 마이코플라즈마 배양은 modified Friis 배지(Zhang 등, 1994)를 이용하여 37°C에서 58 rpm으로 2주일간 배양하여 13,000 g에서 30분 동안 원심 분리하여 Friis 배지성분을 제거하였다.

배양 동안에 배지 색조의 변화를 기반으로 한 Color Change Unit (CCU)를 관찰후 계산하여

pellet화 하여 modified Friis 배지(Zhang 등, 1994)를 이용하여 희석한다. 돼지 한쪽 코에 3 ml씩 총 6 ml을 투여한다. 네블라이저(THOMAS, USA) 접종 High dose균은 4×10^8 CCU/ml 로 10분에 6 ml을 투여하였고 Rapid intra nasal 균 Low dose : 4×10^6 CCU/ml 로 총 6 ml을 2분에 돼지에 감염시켰고 Intra nasal dropping 균은 4×10^8 CCU/ml 로 총 6 ml을 10분에 돼지에 감염시켰다.

다. 마이코플라즈마 세균 감염 후, swab하여 감염여부 확인 실험

양돈장의 호흡기 증상을 가진 돼지의 비강으로부터 면봉을 이용하여 swab을 통한 가검물로부터 멸균 배지에 옮겨 실험실에서 마이코플라즈마 분리 배지에 배양하는 방법을 사용한다. 샘플링 시 2개의 면봉을 사용하여 1개의 면봉에 샘플은 DNA를 추출 후 PCR을 이용하여 마이코플라즈마 신속 진단을 실시하고 양성 결과가 나온 다른 pair의 샘플을 가지고 균 분리를 시도한다. 분리 배양 마이코플라즈마의 동정을 통하여 마이코플라즈마 하이오뉴모니에와 하이오라이니스 야외 분리 균주를 확보한다.

마이코플라즈마 species의 분석은 마이코플라즈마 계놈서열 중에서 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 16s rRNA(ribosomal RNA) 유전자 영역을 표적으로 하는 마이코플라즈마 속(genus)에 속하는 세균을 특이적인 프라이머 쌍을 이용하여 Consensus PCR을 수행하였다.

개발된 프라이머 쌍은 Forward primer[5'-CTC TTT GTA CCG GCC ATT GT-3'(20 mer, 뉴클레오타이드 699283 ~ 699302)]와 Reverse primer[5'-GAA TGA CAG ATG GTG CAT GG-3'(20 mer, 뉴클레오타이드 699478 ~ 699497)]를 사용하였고, 중합효소연쇄반응 PCR을 위한 반응시약의 조성은, 1 μ l 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/ μ l), 2.5 μ l $10 \times$ 반응버퍼, 500 μ M 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 μ l의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞어 제조하였다.

마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 16S rRNA(ribosomal RNA) 유전자 영역을 표적으로 하는 마이코플라즈마 속(genus)에 속하는 세균을 특이적인 프라이머 쌍을 이용하여 Consensus PCR을 수행한 결과 양성 결과가 나왔다. 양성 결과가 나온 다른 pair의 샘플을 가지고 균 분리를 시도한다. 분리 배양 마이코플라즈마의 동정을 통하여 마이코플라즈마 하이오뉴모니에와 하이오라이니스 야외 분리 균주를 확보한다.

마이코플라즈마 species의 분석은 *Mycoplasma hyopneumoniae*와 *Mycoplasma hyorhinis*에 특이적인 프라이머쌍을 이용하여 species specific PCR을 수행하였다.

라. 마이코플라즈마 세균 감염 후, 병리조직 검사로 감염여부 확인 실험

각 개체들을 안락사한 후 부검하여 병변부위가 있는 폐장을 채취하여 10% 포르말린에 고정하고 병리조직 제작을 위한 통상적인 과정을 거쳐 각 조직의 hematoxylin & eosin 염색 슬라이드를 가지고 병리조직검사를 수행하였다. 병리조직검사는 샘플 위치에 따른 변수를 줄이고자 한 개체 당 병변이 보이는 부분중 여러 부위를 각각 제작하여 검사하였다.

8. 돼지 마이코플라즈마 야외분리균주 병원성 비교방법 확립

가. 분리 마이코플라즈마 배양 및 계대배양 실험

가검물 검체에서 마이코플라즈마 감염 여부를 신속히 검출하는 것은 분리 배양 성공의 가장 큰 핵심 요인이 될 수 있다. 양돈장의 폐렴 돼지 비강 swab 샘플이나 도축 돼지의 폐렴 폐장 조직으로부터 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*와 같은 마이코플라즈마 세균 야외 균주를 분리하기 위하여, 샘플로부터 신속히 분리 배양이 이루어져야 한다. 그러나, 많은 가검물을 분리를 위한 배양 배지에 접종하는 것은 작업 과정이 많고, 오랜 시간이 소요되며, 많은 수의 배양 샘플을 관리하여야 하는 어려움이 있다. 따라서, 배양 전에 샘플 내에 마이코플라즈마 감염 여부를 신속히 알아낼 수 있다면, 야외 균주 분리 배양을 위한 신속한 배양 접종이 이루어질 수 있으며, 마이코플라즈마 감염 샘플만을 가지고 직접 배양을 시작하기 때문에 마이코플라즈마 야외 분리주를 분리해낼 확률이 높다고 할 수 있다.

샘플에서 마이코플라즈마 감염 여부를 신속히 알아낼 수 있는 방법은 현재 PCR이 알려져 있으나, 마이코플라즈마는 수백 종의 species를 가지고 있어, 각각을 검출하는 프라이머 셋트를 가지고 PCR 분석을 하는데 어려움이 있어왔다.

최근에 마이코플라즈마 세균에 공통적인 유전자 부위를 검출할 수 있는 consensus 프라이머 셋트가 개발되어 보고되고 있는바, 이를 적용하여 여러 번의 종 특이 PCR 분석을 하지 않고, 마이코플라즈마 감염 여부를 확인하는 방법을 확립하고자 하였다.

PCR 분석은 필연적으로 DNA 추출을 먼저 수행하여야 하는 번거로움이 있으며, 이에 따른 시간 소요가 또한 본 연구를 위한 샘플의 마이코플라즈마 감염 여부를 신속한 검사에 장애 요인이 된다. 이러한 장애요인을 해결할 수 있는 방법으로 최근에 DNA 추출 과정이 동시에 이루어질 수 있는 Direct PCR이 개발되어 보고되고 있는 바, 이를 이용하여 샘플 마이코플라즈마 감염 여부를 별도의 DNA 추출 없이 바로 검사하고자 하였다.

마이코플라즈마 신속 진단은 Fig. 6와 같이 Phire® Animal Tissue Direct PCR Kit (Thermo Fisher Scientific Dharmacon Products, Lafayette, CO)를 이용하여 마이코플라즈마 감염 돼지의 폐장의 폐렴 병변 부위 일부를 채취하여 Kit의 tube 안에 넣고 마이코플라즈마 universal primer 쌍과 kit buffer를 넣은 후, 중합효소연쇄반응을 바로 실시하였다.

Kit에는 Phire Hot Start II DNA Polymerase 200 µl, 2x Phire Animal Tissue PCR Buffer 5 x 1 ml (includes dNTPs and MgCl₂), Universal control primer mix (25 µM each) 40 µl, Dilution Buffer 5 ml, DNARElease™ Additive 3 x 100 µl, Gel loading dye 3 x 1 ml, Harris Uni-Core 0.50 mm, Harris Cutting Mat가 포함되어 있다.

Phire® Animal Tissue Direct PCR Kit를 이용하여 별도의 DNA 추출과정이 필요 없이, 순수하게 마이코플라즈마 universal primer 쌍에 기초한 중합효소연쇄반응 시간만 소요되기 때문에 2시간의 PCR 과정을 거쳐 바로 전기영동 하여 가검물로부터 바로 마이코플라즈마 감염 여부를 확인할 수 있다. 별도의 DNA 추출과정이 필요 없는 이유는 kit에 포함되어 DNARElease™ Additive의 작용에 의해서 별도의 과정 없이 Thermocycler에서 바로 DNA 추출이 이루어지고 계속하여 중합효소 연쇄반응이 수행되기 때문이다. 또한 DNA binding domain과 함께 특별히 고안된 Phire® Hot Start II DNA Polymerase는 동물 조직 내에 다량 존재하는 많은 양의 PCR inhibitors들의 영향을 효과적으로 제거해준다.

마이코플라즈마 신속 진단을 위하여 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 16s rRNA(ribosomal RNA) 유전자 영역을 표적으로 하는 마이코플라즈마 속(genus)에 속하는 세균을 특이적인 프라이머 쌍을 이용하여 Consensus PCR을 수행하였다.

나. 야외 분리균주 배양 후 돼지에 접종하여 고병원성 야외분리주 분리 및 대양 배양 시스템 확립

마이코플라즈마 병변이 확인된 도축 돼지 폐장으로부터 폐렴 병소의 조직을 채취하여 마이코플라즈마 direct PCR을 수행한 결과, 여러 도축 돈중 9마리에서만 마이코플라즈마에 특이적인 464 bp의 PCR산물의 증폭을 확인할 수 있었다. 확인 WKMH1~WKMH9 균주를 가지고 배지에 접종한 후, 5% CO₂ 농도에서 37℃로 2주 배양하고, 계대 배양은 2번에 걸쳐 추가로 새로운 마이코플라즈마 배지에 접종하여 수행되었다. 배양 동안에 배지 색조의 변화를 기반으로 한 Color Change Unit (CCU)를 주기적으로 관찰 기록하였다. 마이코플라즈마의 증식여부는 배양 배지로부터, DNA를 추출한 후, Mycoplasma universal primer 쌍을 이용한 PCR을 수행하여 결과를 확인하였다.

다. 마이코플라즈마 감염 후 병리조직 검사로 감염여부 확인 실험

각 개체들을 안락사한 후 부검하여 병변부위가 있는 폐장을 채취하여 10% 포르말린에 고정하고 병리조직 제작을 위한 통상적인 과정을 거쳐 각 조직의 hematoxylin & eosin 염색 슬라이드를 가지고 병리조직검사를 수행하였다.

9. 마이코플라즈마 백신 제작 및 세포성 면역 유도 실험 효능 연구

가. 단일백신용 백신균주

(1) 사용균주

2011년 8월 도축장에서 채취한 마이코플라즈마 폐렴 병소를 나타낸 돼지 폐장 조직으로부터 분리한 WKMH-9 마이코플라즈마 균주를 백신균주로 사용하였다.

(2) 백신균주의 염기배열 특성

WKMH-9 마이코플라즈마균주의 16S rRNA 유전자 분석 결과 GenBank 번호 Y00149.1 와 가장 유사한 것으로 나타났다.

나. 마이코플라즈마 단일백신 불활화 및 부형제 첨가

1L 플라스크에 배양한 10⁸ CCU/ml의 마이코플라즈마 균주 300 ml에 포르말린을 0.2% 농도(6 ml)로 넣는다. 4도의 shaking incubator에서 24시간 이상 마이코플라즈마 균주를 불활화시킨다. 24시간 후, 알루미늄 젤을 10% 농도(30 ml)로 첨가한다. 12시간 동안 shaking incubator에서 잘 혼합한 후, 멸균된 100 ml 병에 담는다.

다. 마이코플라즈마 단일백신의 효능 평가

(1) 실험 방법

1) 실험 디자인

백신의 면역학적 반응 측정을 위하여 2개 그룹(백신군, 대조군)으로 실험 디자인을 설정하여 시행하였다. 백신군은 불활화 마이코플라즈마 단일 백신을 접종하며 대조군은 백신 접종 대신 PBS를 접종하는 돈군으로 구분한다(표 1).

표 1. 실험디자인

그룹	실험두수	백신 접종	접종 방법	접종 시기
백신군	5	불활화 마이코플라즈마 백신	이근부 2 ml	3주령 1회
대조군	5	PBS	이근부 2 ml	3주령 1회

2) 공시돈 선정 및 백신 접종

돼지 마이코플라즈마에 대한 항체 음성인 건강한 3주령 자돈 10두를 공시한 후 5두는 백신군으로 5두는 대조군으로 구분한다. 백신군의 자돈에는 3주령에 시험백신 2.0 ml를 이근부에 접종한다.

3). 사육 환경

공시돈은 23~24°C, 습도 60%가 유지되는 사육실에서 사육한다. 사육 기간 동안 음수는 무제한으로 공급한다.

4) 관찰 및 시료 채취

가) 채혈

3주령(백신 접종 전), 5주령(백신 접종 2주후), 7주령(백신 접종 4주후), 9주령(백신 접종 6주후)에 채혈을 실시하여 즉시 말초혈액 단핵구(peripheral blood monocyte)를 분리하고 혈청은 분리 후 실험시점까지 4°C에 보관한다.

나) 직장 체온 측정

백신 접종 후 7일간 체온을 측정하여 기재한다.

표 2. 체온 측정

개체번호	0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일
1								
2								
...								
5								

5) 마이코플라즈마 항체 혈청검사

가) ELISA IgG 검사

채취한 혈액을 이용하여 마이코플라즈마에 대한 특이적인 항체를 상용화된 Mycoplasma hyopneumoniae Antibody Test Kit(The herdChek M.hyo, Westbrook, ME, USA)를 이용하여 마이코플라즈마에 대한 항체를 측정한다. 측정하기 10-20분 전 마이코플라즈마 kit를 미리 상온에서 방치한다. 항원이 흡착된 plate에 원액의 양성대조혈청 및 음성대조혈청을 100 µl씩 각 2개의 well에 분주하고, 가검물 혈청을 40배 희석하여 각각 100 µl씩 에 분주하였다. 실온(18~25°C)에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 1x 세척액을 350 µl씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척하였다. 세척 후에 HRP anti-porcine IgG conjugate 를 각 well에 100 µl씩 분주하고 실온에서 30분 동안 반응하였다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 1x 세척액을 350 µl씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척하였다. 세척 후에 TMB 발색제를 각 well에 100 µl씩 분주하고 15분간 실온에서 반응시켰다. 반응이 끝나면 정지액을 각 well에 1000 µl씩 분주하여 반응을 정지시키고 ELISA reader에서 650 nm의 흡광도로 측정하였다. 키트와 함께 제공되는 음성대조 혈청은 O.D.값이 0.150 이하로 나타났고, 양성대조 혈청 O.D.값과 0.150 이상의 차이를 보여 판정 조건을 모두 충족하였다. 결과는 S/P값이 0.4이상일 경우 양성으로 판정하며, 본 실험에서는 SP값의 변화 추이를 비교하였다.

6) 세포성 면역학적 반응 검사

가) 말초혈액 단핵구(Peripheral blood monocyte) 분리

EDTA tube에 채혈한 혈액을 1:1로 Hank's balanced salt solution(HBSS)에 희석한다. 희석한 혈액 4 ml 을 15 ml tube에 준비한 Ficoll-Paque 3 ml 위에 분주하여 아래층은 Ficoll 위층은 혈액으로 나뉘게 한다. 18-20°C에서 400 g의 속도로 30-40분간 원심 분리하여 층을 분리한다. 가장 위층의 혈장과 중간층의 Ficoll층 사이에 분리되어 부유된 PBMC를 피펫을 이용하여 채취한다. 채취된 말초 혈액 단핵구를 HBSS로 세척하여 300 g에서 10분간 원심한 후 세포성 면역 반응 실험에 이용한다.

나) 마이코플라즈마 특이 임파구 자극 시험

MTT 검사법을 사용하여 분리된 말초혈액 단핵구 중에서 마이코플라즈마 항원에 특이적인 임파구를 자극하여 임파구의 증식 정도를 측정한다. 분리된 세포를 각 well에 2×10^6 씩 분주

한다. 미리 준비한 마이코플라즈마 항원을 각 well의 20 μ l 씩 분주하여 자극하고, 음성대조군으로 PBS를 20 μ l 씩 분주한 후 60시간 동안 37°C 5% CO₂ 상태에서 배양한다. 배양 후, 0.5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 100 μ l 씩 각 well 에 분주하고, 4시간 동안 37°C 5% CO₂ 상에서 배양한다. 그후 Formazan 이 첨가된 dimethyl sulfoxide 100 μ l를 첨가하고 30분 동안 가볍게 교반한다. 결과 판정은 ELISA reader(Model-550, Bio-Rad laboratories, Hercules, USA)를 사용하여 550 nm 파장에서의 흡광도를 측정 한 후 Stimulation index 로 표기한다.

- Stimulation index = 항원 자극한 세포의 흡광도 / 항원 자극하지 않은 세포의 흡광도

다) IFN- γ 분비 세포 수 측정

분리된 말초혈액 단핵구를 돼지 쉰코바이러스 2형 항원으로 자극하여 IFN- γ 분비세포의 수를 확인한다. 상용화 되어 있는 ELISPOT (Enzyme linked immunospot) 분석 키트 (MABTECH, Mariemont, OH, USA)에 IFN- γ 단클론 항체를 8.3 μ g/ml 분주하여 24시간 부착시킨다. 분리된 PBMC를 10% FBS를 포함한 RPMI 배지에 1×10^7 cell/ml 의 농도로 희석한다. 준비된 ELISPOT 키트에 PBMC 가 1×10^6 cell/ml 포함된 100 μ l 씩 분주하고 MOI가 0.01인 돼지 쉰코바이러스 2형 항원으로 자극하여 5% CO₂, 37°C에서 20시간 반응시킨다. 각각의 well을 PBS로 세척 후, biotin이 표지된 anti-IFN- γ 1차 항체를 50 μ l 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 각각의 well을 PBTS로 세척 후, streptavidin-HRP가 표지된 2차 항체를 50 μ l 씩 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 마지막으로 TMB 용액을 100 μ l 씩 분주하여 발색시키고 ELISPOT Reader를 이용하여 spot의 개수를 산정한다.

라) 지연형 과민반응 검사(delayed type hypersensitivity test)

백신 접종 2주 후가 경과되는 시점에서 서혜부 피내에 돼지 쉰코바이러스 2형 항원을 접종하여 면역반응을 확인한다. 먼저 300 μ g/ml 농도의 돼지 쉰코바이러스 2형 항원을 준비한다. 백신군과 대조군의 서혜부 피내에 준비된 돼지 쉰코바이러스 2형 항원을 100 μ l 씩 주입한다. 각 군의 1두에는 phytohemagglutinin (PHA)를 20 μ g/ml 의 농도로 100 μ l 주입하여 양성 대조군으로 사용하고, 생리식염수(saline) 0.1 ml를 주입하여 음성 대조군으로 사용한다. 항원 주입 24-36시간 후에 피부 발적, 두께 변화 등을 측정하여 비교한다.

10. 돼지 쉰코바이러스와 마이코플라즈마 복합백신의 공격접종을 통한 효능 검사

가. 실험 디자인

복합백신의 효능 평가를 위하여 백신군과 대조군으로 실험디자인을 설정하여 실험실내 공격 시험을 실시하였다. 백신군은 복합백신 접종 후 돼지 쉰코바이러스 2형(PCV2)과 마이코플라즈마균을 함께 공격 접종하는 돈군으로, 대조군은 백신 접종을 하지 않고 돼지 쉰코바이러스 2형과 마이코플라즈마를 함께 공격 접종하는 돈군으로 구성한다.

표 1. 실험디자인

그룹	실험두수	백신접종	공격접종 (7주령)	부검 실시 (11주령)
		3주령 1회접종		
백신군	5	O	PCV2 + Mhp	O
대조군	3	X	PCV2 + Mhp	O

나. 공시돈 선정 및 백신 접종

돼지 썬코바이러스 2형 (porcine circovirus 2; PCV2)와 마이코플라즈마의 항체가 음성인 건강한 5주령 자돈 8두를 공시한 후 5두는 백신군으로 3두는 대조군으로 구분한다. 백신군의 자돈에는 5주령에 시험백신 2.0 ml를 이근부에 접종한다.

다. 공격 접종용 바이러스 및 접종 방법

돼지에게 접종실험에 사용할 바이러스는 서울대학교 수의과대학 병리학실에서 분리한 돼지 썬코바이러스 2형(PCV2)와 마이코플라즈마를 이용한다. 접종을 위하여 돼지 썬코바이러스 2형은 $1 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀/ml, 마이코플라즈마는 각각 5×10^5 CFU/ml로 준비한다. 돼지 썬코바이러스 2형과 마이코플라즈마의 접종은 3주령에 시험백신을 접종한 후 4주가 경과한 7주령 시점에서 실시한다. 미리 준비된 양의 돼지 썬코바이러스 2형 2 ml를 비강에 접종하고 마이코플라즈마 6 ml 을 기관지내에 접종한다.

라. 혈청검사

(1) 채혈

3주령(백신 접종 전), 7주령(백신 후 4주 경과 시점; 공격 접종 시기), 9주령 (백신 접종 후 6주 경과 시점; 공격 접종 후 2주 경과 시기), 11주령(부검 전)에 채혈을 실시하여 혈청을 분리한 후 실험시점까지 4°C에 보관한다.

(2) 검사방법

채취한 혈액을 이용하여 돼지 썬코바이러스 2형에 특이적인 항체는 상업화된 Serelisa PCV2 Ab Mono Blocking ELISA 키트 (Synbiotics, Lyon, France)를 이용하여 측정하고, 마이코플라즈마균의 경우 상업화된 Herdchek M. hyo. Ab ELISA 키트 (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA)를 이용하여 측정한다.

마. 세포 매개성 면역 측정

(1) 마이코플라즈마 특이 임파구 자극 시험

MTT 검사법을 사용하여 분리된 말초혈액 단핵구 중에서 마이코플라즈마 항원에 특이적인 임파구를 자극하여 임파구의 증식 정도를 측정한다. 분리된 세포를 각 well에 2×10^6 씩 분주

한다. 미리 준비한 마이코플라즈마 항원을 각 well의 20 μ l 씩 분주하여 자극하고, 음성대조군으로 PBS를 20 μ l 씩 분주한 후 60시간 동안 37°C 5% CO₂ 상태에서 배양한다. 배양 후, 0.5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 100 μ l 씩 각 well에 분주하고, 4시간 동안 37°C 5% CO₂ 상에서 배양한다. 그후 Formazan 이 첨가된 dimethyl sulfoxide 100 μ l를 첨가하고 30분 동안 가볍게 교반한다. 결과 판정은 ELISA reader(Model-550, Bio-Rad laboratories, Hercules, USA)를 사용하여 550 nm 파장에서의 흡광도를 측정 후 Stimulation index 로 표기한다.

- Stimulation index = 항원 자극한 세포의 흡광도 / 항원 자극하지 않은 세포의 흡광도

(2) IFN- γ 분비 세포 수 측정

분리된 말초혈액 단핵구를 돼지 쉰코바이러스 및 마이코플라즈마 항원으로 자극하여 IFN- γ 분비세포의 수를 확인한다. 상용화 되어 있는 ELISPOT (Enzyme linked immunospot) 분석 키트(MABTECH, Mariemont, OH, USA)에 IFN- γ 단클론 항체를 8.3 μ g/ml 분주하여 24시간 부착시킨다. 분리된 PBMC를 10% FBS를 포함한 RPMI 배지에 1x10⁷ cell/ml 의 농도로 희석한다. 준비된 ELISPOT 키트에 PBMC 가 1x10⁶ cell/ml 포함된 각 well에 MOI가 0.01인 돼지 쉰코바이러스 2형 항원 또는 마이코플라즈마 항원 4 μ g/ml 의 농도로 자극하여 5% CO₂, 37°C에서 20시간 반응시킨다. 각각의 well을 PBS로 세척 후, biotin이 표지된 anti-IFN- γ 1차 항체를 50 μ l 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 각각의 well을 PBTS로 세척 후, streptavidin-HRP가 표지된 2차 항체를 50 μ l 씩 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 마지막으로 TMB 용액을 100 μ l 씩 분주하여 발색시키고 ELISPOT Reader를 이용하여 spot의 개수를 산정한다.

바. 병리조직 제작 및 관찰

(1) 병리조직 샘플

공격 접종 4주가 경과된 시점인 11주령에 부검을 실시하여 각 장기의 육안적 소견(부검 결과)을 기록하고, 실질장기의 조직표본 제작을 위해 폐장, 서혜 임파절 등 주요 장기를 10% 포르말린에 고정한다.

(2) 병리조직학적 관찰

1) 돼지 쉰코바이러스 2형에 의한 임파절 병변 분석

포르말린에 고정한 조직은 포매 과정을 거쳐 H&E염색을 실시한다. H&E 염색이 된 장기는 각각 현미경으로 관찰하여 병변을 관찰한다. 돼지 쉰코바이러스 2형에 의하여 서혜 임파절에서 관찰되는 병변의 경우 임파구의 감소(lymphoid depletion)의 정도에 따라 0-5 등급으로 구분하며, 매우 심하고 육아종성 염증을 동반한 경우의 스코어 5부터 전혀 병변이 없는 경우 '스코어 0' 으로 표시한다. 각 2개 그룹간의 병변을 기록하고 교차분석 방법을 이용하여 2개 그룹간의 병리조직학적 임파구 감소 병변의 차이를 비교한다.

2) 마이코플라즈마에 의한 폐렴 병변 분석

마이코플라즈마에 의한 폐렴의 병변은 병변의 정도에 따라 0-5 등급으로 구분한다. 등급을 판정할 때에는 기관지 주위 림프조직의 증식 정도 및 폐포벽 증식 등을 판단하여 특이 소견이 없는 정상 조직을 0 등급으로 하여 폐포 허탈 및 기관지 주위 림프소절 형성에 의한 기관지 폐쇄 등의 정도가 매우 심한 병변을 5등급으로 한다. 각각의 2개 그룹간의 병변을 기록하고 교차분석 방법을 이용하여 2개 그룹간의 병리조직학적 폐렴 병변의 차이를 비교한다.

제 3 절 결과와 고찰

1. 돼지 마이코플라즈마 최적 배양법 개발

가. 배지 조성 최적화 연구 수행

Culture media A ~ D까지 4가지 다른 조성의 마이코플라즈마 배양 배지를 제작하여 배양의 최적 조건을 비교 연구하였다.

○ Culture media A

<p>①마이코플라즈마 부정시험용 PPLO 액체배지 I (기초배지)</p> <p>PPLO broth.....2.1 g.....70 ml 포도당.....1.0 g 1.0 w/v% 페놀레드 용액.....0.1 ml Autoclave 121℃, 15Lb, 15분 (첨가물)</p> <p>마혈청.....20 ml 25% 신선 효모엑기스 (pH 7.3~7.5).....10 ml 2.5% Thallium acetate.....0.5 ml 페니실린 G 칼륨 10만 단위.....1.0 ml pH 7.2~7.4</p>	<p>②마이코플라즈마 부정시험용 PPLO 액체배지 II (기초배지)</p> <p>PPLO broth2.1 g.....70 ml 염산 아르기닌.....0.2 g 1.0 w/v% 페놀레드 용액.....0.1 ml Autoclave 121℃, 15Lb, 15분. (첨가물)</p> <p>마혈청.....20 ml 25% 신선 효모엑기스 (pH 7.3~7.5).....10 ml 2.5% Thallium acetate0.5 ml 페니실린 G 칼륨 10만 단위1.0 ml pH 7.0~7.2</p>
<p>③ 마이코플라즈마 부정시험용 PPLO 한천배지 (기초배지)</p> <p>PPLO agar.....3.5 g.....70 ml 포도당.....1.0 g 1.0w/v% 페놀레드 용액.....0.1 ml Autoclave 121℃, 15 Lb, 15분 (첨가물)</p> <p>마혈청.....20 ml 25% 신선 효모엑기스 (pH 7.3~7.5).....10 ml 2.5% Thallium acetate.....0.5 ml 페니실린 G 칼륨10만 단위.....1.0 ml pH 7.2~7.4</p>	

○ Culture media B

① T Broth (100 ml 기준)

A) Base medium

(a) 200 ~ 250 ml flask에

- PPLO broth powder 2.1 gm
- 3th Distilled water 70 ml를 넣는다

(b) stirring 하여 충분히 녹인다. (PH 5.5로 맞춘다)

(c) autodave (121°C, 15 min) 시킨다.

B) Complete medium

(a) autoclave가 끝난 base medium을 상온 정도로 식힌 후

- Horse serum (filtered, 0.45 um) 20 ml
- 25y · Yeast extract 10 ml
- ly · Phenol red solution 0.2 ml
 <0.2% Phenol red Solution 사용시 ... 1 ml>
- Lincomycin 5-10 µg/ml
 (x)→다른 My(oopla)ma억제
- Penicillin G (10만 unit/ml) 1 ml
- Thallium acetate (2.5%) 0.5 ml
- 10% Urea Solution 1 ml를 넣어서 잘 섞는다.

(b) PH 6.0 ~ 6.2로 맞춘다.

(c) 멸균된 병에 넣어서 냉장 보관한다.

② Chaock Liquid Medium(Mycoplasma 증균용 배지)

& Chanock Agar Medium(Mycoplasma 분리용 배지)

; Glucose / Arginine Liquid & Agar Medium for Mycoplasma Culture

(1) Chanock Liquid Medium (100 ml 기준)

A) Base medium

(a) 200 ml beaker 에

- PPLO broth powder 2.1 gm
- X · Dextrose (D-Glucose) 1.0 gm (for *M. pneumoniae*, *M. penetrant*)

※ Arginine 0.2 gm <for *M. fermentans*, *M. hyominis*>

(b) stirring하여 충분히 녹인다.

(c) Arginine broth는 IN HCL를 이용하여 PH 7.0 ~ 7.2로, Glucose broth는 IN(또는 5N) NaOH를 이용하여 PH 7.2 ~ 7.4 정도로 맞춘다.

(d) flask에 옮겨 붓고 멸균 (121°C, 15min)시킨다.

(2) Complet medium

- (a) autoclave가 끝난 base medium을 상온 정도로 식힌 후
 - ly Phenol red solution 0.1 ml(0.1 ~ 0.15 ml)
 - Horse serum 20 ml
 - Yeast extract 0.5 ml
 - 2.5% Thallium acetate 0.5 ml
 - Penidillin G (10만 unit. ml) 1.0 ml를 넣어서 잘 섞는다.
- (b) 멸균된 병에 넣어서 냉장 보관한다.

나. Chanock Agar Medium (100 ml 기준)

(1) Base medium

(a) 200 ml beaker에

- PPLO Agar powder 3.5 gm
- Dextrose(D-Glucose) 1.0 gm<for *M. pneumoniae*, *M. penetrant*>
- * Arginine 0.2 gm <for *M. fermentans*, *M. hyominis*>

(b) stirring하여 충분히 녹인다.

(c) Arginine broth는 IN HCL를 이용하여 PH 7.0 ~ 7.2로, Glucose broth는 IN(또는 5N) NaOH를 이용하여 PH 7.2 ~ 7.4 정도로 맞춘다.

(d) flask에 옮겨 붓고 멸균 (121°C, 15 min)시킨다.

(2) Complete medium

(a) autoclave가 끝난 base medium을 water bath에서 50 ~ 55°C정도로 식힌다.

(b) 50 ml tube에 liquid medium과 동일하게 첨가물을 미리 준비한다.

※ 첨가물을 넣을 때의 시간 경과로 배지가 지나치게 식는 것을 방지할 수 있다.

(c) (1)에 (2)를 넣고 거품이 생기지 않도록 주의하여 골고루 섞는다.

(d) petri dish (50mm diameter)에 분주한다.

(e) 굳은 후 냉장 보관한다.

첨가물 준비

▷ Horse Serum

; 냉동 (-20°C) 보관한다.

▷ 2.5% Thallium acetate solution

1) 15 ml tube에

- Thallium acetate 2.5 gm
- Distilled water 100 ml를 넣는다.

- 2) 흔들어서 완전히 녹인다.
- 3) 멸균시킨다.
- 4) 멸균된 병에 넣어서 냉장 보관한다.

▷ 10만 Unit Penicillin G Kalium solution → 500만 unit battlet 50 ml D.W
→ 0.2 μ m Syringe filtration

(1) 주사용 Penicillin G Kalium powder를 distilled water(autoclave)로 녹인다

▷ 10% Urea solution

- 1) 15 ml tube에
 - Urea 1 gm
 - Distilled water 10 ml를 넣는다.
- 2) 흔들어서 완전히 녹인다.
- 3) syringe filtration (0.2 μ m)시킨다.
- 4) 멸균된 tube 또는 병에 넣어서 냉장 보관한다.

▷ 2% L - Cysteine

- 1) 15 ml tube에
 - L - Cysteine 0.2 gm
 - Distilled water 10 ml를 넣는다.
- 2) 흔들어서 완전히 녹인다.
- 3) Syringe filtration (0.2 μ m)시킨다.
- 4) 멸균된 tube 또는 병에 넣어서 냉장 보관한다.

○ Culture media C

(Base Medium)

(1) 1L Bottle 에 DW(3차) 500 ml을 넣는다.

(2) Hank's balanced salt solution(10x) ----30 ml
 PPLO broth -----21 g
 Lactalbumin hydrolysate -----1.25 g
 Yeast extract powder -----0.5 g
 0.2% Phenol red(W/V) -----3 ml
 Brain heart infusion broth -----1.25 g
 을 넣는다.

(3) 2번과정 후에 pH 7.45 를 맞춘다 (1N NaOH or 1N HCl)

(4) pH를 맞춘 후에 DW(3차) 287 ml 을 넣는다.(Total DW 787 ml)

(5) 121°C 15분 Autoclave.

(Supplements)

(1) Fresh yeast extract ----- 36.5 ml
50% Glucose solution(W/V) ----- 2.5 ml
2% Thallium acetate(W/V) ----- 5.5 ml
Horse serum ----- 50 ml
Porcine serum ----- 75 ml

2). 1번을 Mix한 후 필터에 거른다. (펌프필요)
(필터는 5-3-1-0.8-0.45 μm 순으로 한다)

3) 위에 필터로 거른 배지와 멸균한 Base Medium 배지를 복합한 후
0.2 μm 필터로 한번 더 거른다.

4) 모든 과정이 끝난 액체배지는 4°C에 보관한다.

첨가물 준비

▷ Horse Serum

; 냉동 (-80°C) 보관한다.

▷ 2% Thallium acetate

▷ Fresh yeast extract

1) DW 100 ml 에 Fresh yeast powder 25g 을 넣는다.

2) 100°C에서 5분 동안 boiling.

3) boiling 한 후 식힌다.

4) Centrifuge 에 10,000 rpm for 40 min at 4°C.

5) (4)과정 후 필터 (5-3-1.2-0.8-0.45 μm 순으로) 한다.

6) 만들어진 Fresh yeast extract 는 -80°C에서 보관한다.

▷ 2% Thallium acetate(W/V)는 제조한 후 은박지에 싸서 보관.

▷ Porcine serum(Swine serum)

1) swine serum 을 pH 4.3 -4.5 로 맞춘다.(1N HCl)

- 2) serum for overnight at 4°C (overnight is best)
- 3) Centrifuge serum at 10,000 rpm for 40 min at 4°C.
- 4) Pull of serum
- 5) (4)과정 후 필터 (5-3-1.2-0.8-0.45 μm 순으로) 한다.
- 6) pH 7.0을 맞춘다(1N NaOH)
- 7) 56°C에서 30분 동안 boiling
- 8) 무균상태로 -80°C에서 보관

○ Culture media D

① Addition of dry ingredients

Ingredient	Brand & Batch Number	Quality per 600 ml
10X Hanks' Balanced salt solution without Phenol Red	Gibco 14065	25 ml
Mycoplasma Broth Base	Oxoid CMO403	4.35 g
Brain Heart Infusion	Oxoid CM0225	4.1 g
Yeast Extraction	Duchefa Y1333	5 g
2% Thallium Acetate		3.3 ml
Distilled Water		up to 600 ml

pH 7.2로 맞추고 121°C 15분간 autoclave한 후 50°C에서 식힌다.

② Addition of liquid ingredients

- + Ampicillin(total volume의 0.1%)
- + Porcine serum 162.5 ml - horse serum과 1:1로 섞어도 좋다.
- + 10% Glucose (total volume의 0.1%)
- + 1.6% phenol red 2.4 ml

표 1. 마이코플라즈마 culture media A, B, C, D의 조성 비교

Medium	Culture media			
	A	B	C	D
Hank's balanced salt solution(10x)			O	O
PPLO broth	O	O	O	

Lactalbumin hydrolysate			O	
Yeast extract powder		O	O	
Fresh yeast extract			O	O
Phenol red	O	O	O	O
Brain heart infusion broth			O	O
Glucose solution	O	O	O	O
Arginine		O		
2% Thallium acetate	O	O	O	O
Horse serum	O	O	O	O
Porcine serum			O	O
Penicillin G	O	O		
Lincomycin		O		
Ampicillin				O
Mycoplasma Broth Base				O
Urea solution		O		
L - Cysteine		O		

나. 마이코플라즈마 배양을 위한 4개 formula를 이용하여 비교 연구 수행

Culture media A ~ D까지 4가지 다른 조성의 마이코플라즈마 배양 배지를 제작하여 *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934)와 *M. hyorhinis* (ATCC 27717)를 배양하고 배양의 최적 조건을 비교 연구하였다.

배양은 37°C에서 5% CO₂ 함유 incubator에서 배양하며, 12일 동안 배양 상태를 확인한 결과 그림 1과 2에서 확인할 수 있듯이 Culture media D에서 배양이 가장 잘 되는 것을 확인

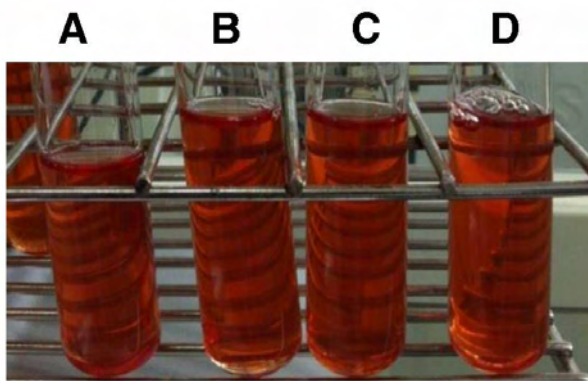


Fig. 1. Culture media A, B, C, D. *M. hyopneumoniae* 배양 1 day. 배지의 Color change unit (CCU)=0

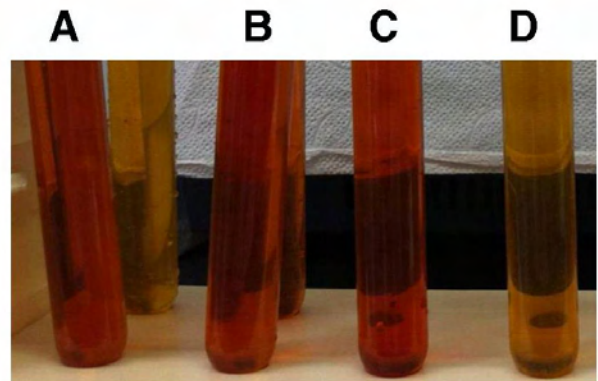


Fig. 2. Culture media A, B, C, D. *M. hyopneumoniae* 배양 8 days. Culture media D에서 가장 강한 변색 (노란색)을 볼 수 있음. CCU의 증가.

하였다.

Culture media A ~ D까지 4가지 다른 조성의 마이코플라즈마 배양 배지를 제작하여 *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934)와 *M. hyorhinis* (ATCC 27717)를 배양하고 배양의 최적 조건을 비교 연구한 결과 표 2 및 표 3과 같이 Culture media D에서 가장 배양이 잘되는 것으로 확인할 수 있었다.

표 2. *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934)의 Culture media A, B, C, D에서의 배양 상태 비교

Media	Culture period (day)			
	1	4	8	12
A	-	-	-	+
B	-	-	-	+
C	-	-	-	+
D	-	+	+	++

-: No culture, +: slight, ++: moderate, +++: remarkable

표 3. *M. hyorhinis* (ATCC 27717)의 Culture media A, B, C, D에서의 배양 상태 비교

Media	Culture period (day)			
	1	4	8	12
A	-	-	-	+
B	-	-	-	+
C	-	-	+	+
D	-	+	+	++

-: No culture, +: slight, ++: moderate, +++: remarkable

다. Glucose와 Thallium의 첨가 여부 및 배지 제작시 멸균 과정의 가열에 의한 영향 평가

Culture media D에 대한 조성 변화와 제조 과정의 변화에 따른 *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934)와 *M. hyorhinis* (ATCC 27717)를 배양 상태를 확인하였다. 실험 결과는 표 4와 표 5와 같았다. 실험 결과로서 마이코플라즈마 배양에 glucose와 thalium이 필수 요소인 것을 알 수 있었다. 또한 glucose의 조제시 멸균을 하는 경우, 마이코플라즈마 배양이 안 되는 것을 확인하였다. 이러한 결과로부터, 마이코플라즈마 배양을 위한 배지 제조 할 때 glucose는 filter를 하여 사용하여야 하는 것을 확인하였다.

표 4. *M. hyopneumoniae*(ATCC 25934)의 Culture media D에서 여러 조건에서의 배양 상태 비교

Media		Culture period (day)			
		1	4	8	12
Glucose	x	-	-	-	-
	O	-	+	+	++
Thalium	x	-	-	-	-
	O	-	+	+	++
Glucose	Autoclave	-	-	-	-
	Filter	-	+	+	++

-: No culture, +: slight, ++: moderate, +++: remarkable

표 5. *M. hyorhinis* (ATCC 27717)의 Culture media D에서 여러 조건에서의 배양 상태 비교

Media		Culture period (day)			
		1	4	8	12
Glucose	x	-	-	-	-
	O	-	+	+	++
Thalium	x	-	-	-	-
	O	-	+	+	++
Glucose	Autoclave	-	-	-	-
	Filter	-	+	+	++

-: No culture, +: slight, ++: moderate, +++: remarkable

라. *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 배양 최적 온도와 최적 CO₂ 농도 및 최적 배양기간 확인 실험

온도와 CO₂ 농도 및 배양기간에 따른 *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934)와 *M. hyorhinis* (ATCC 27717)를 배양 상태를 확인하였다. 실험 결과는 Table 6과 Table 7과 같았다. 실험 결과로서 마이코플라즈마 배양은 그림 3에서와 같이 5% CO₂ 농도에서 37°C로 2-3주 배양 하는 것이 최적의 배양 조건임을 확인하였다.

표 6. *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934)의 온도와 CO₂ 농도 및 배양기간에 따른 상태 비교

Media		Culture period (week)			
		1	2	3	4
Temperature (°C)	30				
	35	-	+	+	-
	37	+	++	+++	+
CO ₂ (%)	0	-	-	+	-
	5	+	++	+++	+
	10	-	-	+	-

-: No culture, +: slight, ++: moderate, +++: remarkable

표 7. *M. hyorhinis* (ATCC 27717)의 온도와 CO₂ 농도 및 배양기간에 따른 상태 비교

Media		Culture period (week)			
		1	2	3	4
Temperature (°C)	30				
	35	-	+	+	-
	37	+	+++	+++	+
CO ₂ (%)	0	-	-	+	-
	5	+	+++	+++	+
	10	-	-	+	-

-: No culture, +: slight, ++: moderate, +++: remarkable

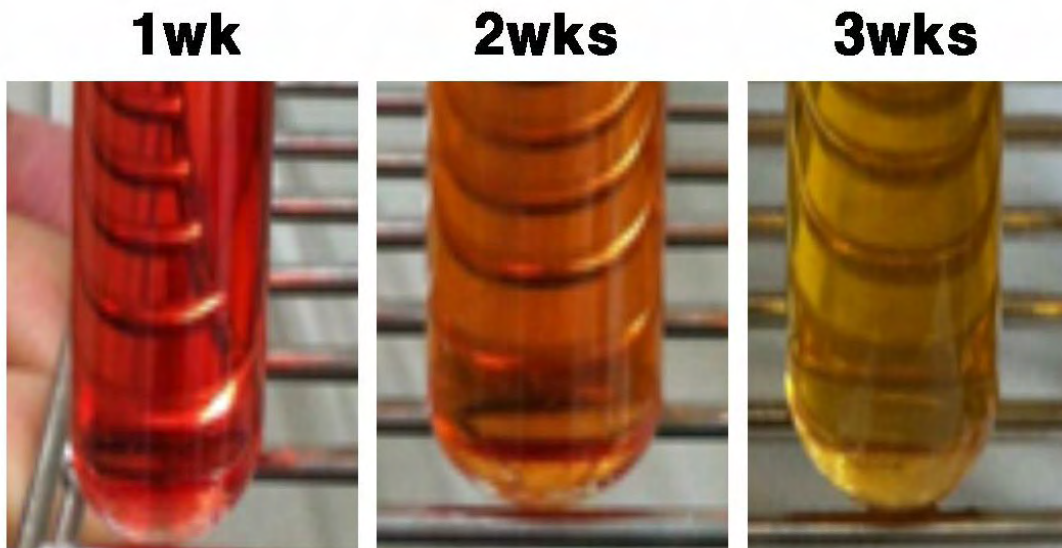


그림 3. *M. hyopneumoniae* 최적 배양기간 확인. 배양 기간에 따라 변색반응 CCU가 증가하는 것을 알 수 있다.

마. 최적 배양법 확립 후 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 배양에 따른 증식곡선 확인

Culture media D로 *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934)와 *M. hyorhinis* (ATCC 27717)를 5% CO₂ 농도에서 37°C로 4주간 배양하면서 증식곡선 (growth curve)를 확인하였다. *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 증식 정도는 배양 1주, 2주, 3주 및 4주 시점에 배양액의 color change unit (CCU)와 turbidity (OD값) 및 배양액 ml 당 마이코플라즈마 DNA양을 측정하였다. 실험 결과는 그림 4와 그림 5와 같았다. 실험 결과로서 마이코플라즈마 배양은 5% CO₂ 농도에서 37°C로 3주 배양 할 때, 3주까지 증식하다가, 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 배양은 2~3주의 기간 배양이 최적 조건

임을 규명하였다.

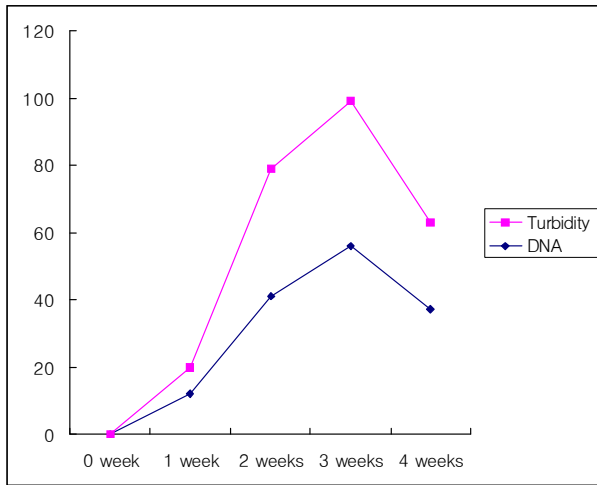


그림 4. *M. hyopneumoniae* 증식곡선. 3주까지 증가하다 하강하는 것을 확인할 수 있다.

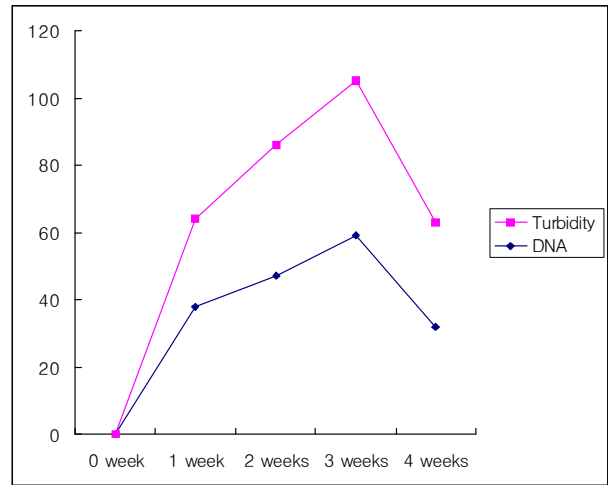


그림 5. *M. hyorhinis* 증식곡선. 3주까지 증가하다 하강하는 것을 확인할 수 있다.

2. 돼지 마이코플라즈마 검출법 개발

가. 중합효소연쇄반응 프라이머의 개발

전방향 프라이머(Forward primer)

5'-TCC AGT CAT ACC AAG GCA GAA ATT-3' (24 mer, 뉴클레오타이드 223070 ~ 223093)

역방향 프라이머(Rreverse primer)

5'-CGG GCA CTT TGA CTA AGA TCT GC-3' (23 mer, 뉴클레오타이드 222827 ~ 222849)

위 중합효소연쇄반응용 프라이머는 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 계놈서열 중에서 종(species)에 특이적인 proteine P97 영역을 표적으로 하였기 때문에 다양한 마이코플라즈마 종(species)들 중에서 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 만을 특이적으로 검출할 수 있다. 상기 두 프라이머는 합성 후 OPC 방법으로 정제하여 사용하였다.

PCR을 위해서 1 μ l 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/ μ l), 2.5 μ l 10 \times 반응버퍼, 500 μ M 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 μ l의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 써모사이클러(Thermocycler; ABI, USA)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.

반응조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation을 실시 한 후 95°C에서 1분, 60°C에서 1분,

72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다.

중합효소 연쇄반응의 산물은 2% 아가로즈겔에 전기 영동하여 240 bp의 밴드를 확인하였다.

나. 마이코플라즈마 준비와 배양

본 연구에서 protein P97 영역을 표적으로 하여 아래와 같은 마이코플라즈마 하이오뉴모니에만을 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 셋트의 민감도와 특이도를 확인하기 위한 비교 시료를 얻기 위하여 하기와 같은 마이코플라즈마 종 별 균주들을 구입하여 배양하여 배양하였다.

Mycoplasma hyopneumoniae (ATCC strain 25934), *Mycoplasma hyorhinis* (ATCC strain 27717), *Mycoplasma pneumoniae* (ATCC15531), *Mycoplasma pulmonis* (ATCC19612), *Mycoplasma hominis* (ATCC23114), *Mycoplasma arthritidis* (ATCC19611)

상기 마이코플라즈마 배양은 modified Friis 배지(Zhang 등, 1994)를 이용하여 37°C 에서 58 rpm으로 1주일간 배양하여 13,000 g에서 30분 동안 원심분리하여 Friis 배지성분을 제거하였다.

다. 마이코플라즈마 균주 별 DNA 추출 시료 준비

배양한 각각의 마이코플라즈마 균주들의 DNA 추출은 bead beater-phenol extraction method를 사용하였다. 배양된 균주들을 13,000 g에서 30분 동안 원심분리하여 얻은 펠렛 검체를 1 ml 멸균 증류수가 들어있는 Mini-Bead Beater(Biospec product) 전용 2 ml 튜브에 무균 채취하여 세절한 후 멸균 3차 증류수에 부유시킨 glass bead(0.1 mm size, Biospec product) 200 μ l와 phenol-chloroform-isoamyl alcohol 용액(50:49:1(v/v/v)) 200 μ l를 넣어 Mini-Bead Beater(Biospec product)로 30초간 5,000rpm으로 진탕하였다. 진탕 후 4°C 에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액을 멸균 2 ml 튜브에 옮겼다. 3 M 초산나트륨(sodium acetate) 10 μ l와 ice-cold 에탄올 250 μ l를 넣어 -20°C에서 10분간 정제시킨 후, 15,000rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 침전물은 70% 알코올로 세척하여 실온에서 건조시키고 Tris EDTA(pH 8.0) 60 μ l에 용해시켜 실험에 사용하였다.

라. 중합효소연쇄반응 조건

개발된 프라이머 쌍은 Forward primer[5'-TCC AGT CAT ACC AAG GCA GAA ATT-3'(24 mer, 뉴클레오타이드 223070~223093)]와 Reverse primer[5'-CGG GCA CTT TGA CTA AGA TCT GC-3'(23 mer, 뉴클레오타이드 222827~222849)]이었다.

중합효소연쇄반응 PCR을 위한 반응시약의 조성은 1 μ l 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/ μ l), 2.5 μ l 10 \times 반응버퍼, 500 μ M 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 μ l의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞어 제조하였다.

중합효소연쇄반응은 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 반응을 실시하였다. 반응조건은 95°C 에서 5분간 pre-denaturation을 실시 한 후 95°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서

3분간 post-polymerization을 실시하였다.

중합효소 연쇄반응의 산물은 2% 아가로즈겔에 전기 영동하여 240 bp의 밴드를 확인하였다.

마. 특이도 확인 실험

추출된 *Mycoplasma hyopneumoniae*(ATCC strain 25934), *Mycoplasma hyorhinis*(ATCC strain 27717), *Mycoplasma pneumoniae*(ATCC15531), *Mycoplasma pulmonis*(ATCC19612), *Mycoplasma hominis*(ATCC23114), *Mycoplasma arthritidis*(ATCC19611) 균주들의 10² pg의 DNA 샘플들을 본 발명에서 개발된 *Mycoplasma hyopneumoniae* protein P97 영역을 표적 프라이머 키트를 가지고 각각의 중합효소연쇄반응이 수행되었다.

개발된 *Mycoplasma hyopneumoniae* protein P97 영역을 표적 프라이머 키트 쌍은 Forward primer[5'-TCC AGT CAT ACC AAG GCA GAA ATT-3'(24 mer, 뉴클레오타이드 223070~223093)]와 Reverse primer[5'-CGG GCA CTT TGA CTA AGA TCT GC-3'(23 mer, 뉴클레오타이드 222827~222849)]을 사용하였고, 중합효소연쇄반응 PCR을 위한 반응시약의 조성은 1 µl 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/µl), 2.5 µl 10× 반응버퍼, 500 µM 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 µl의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞어 제조하였다. 중합효소연쇄반응은 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 반응을 실시하였다. 반응조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation을 실시 한 후 95°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 2% 아가로즈겔에 전기 영동하여 특이 밴드의 유무를 확인하였다.

실험 결과 Table 8과 Fig. 6에 나타난 것과 같이 개발한 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 게놈서열 protein P97 영역 표적 프라이머 키트는 *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA에만 특이적으로 반응하여 검출되었으며, 다른 마이코플라즈마 균주들인 *Mycoplasma hyorhinis*(ATCC strain 27717), *Mycoplasma pneumoniae* (ATCC15531), *Mycoplasma pulmonis* (ATCC19612), *Mycoplasma hominis* (ATCC23114), *Mycoplasma arthritidis* (ATCC19611) 균주와는 반응이 일어나지 않음을 확인할 수 있었다.

상기와 같은 결과로 본 발명에서 개발된 *Mycoplasma hyopneumoniae* protein P97 영역을 표적 프라이머 키트는 *Mycoplasma hyopneumoniae*에 특이적으로 반응하는 것을 확인할 수 있었다.

표 8. 특이도검사 결과

Mycoplasma species	PCR result
<i>M. hyopneumoniae</i>	+++
<i>M. hyorhinitis</i>	-
<i>M. pneumoniae</i>	-
<i>M. pulmonis</i>	-
<i>M. hominis</i>	-
<i>M. arthritidis</i>	-

+++ : Strong reaction, - : No reaction

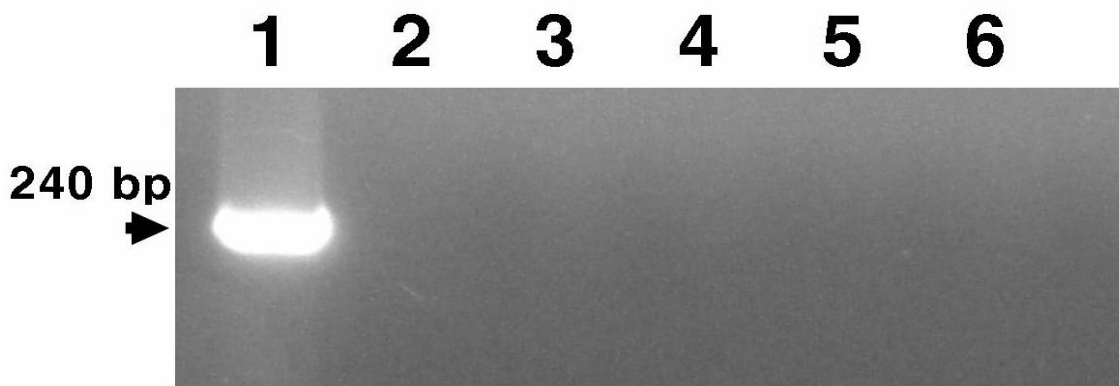


그림 6. 특이도 검사 결과. Lanes: 1, DNA of *M. hyopneumoniae* 2, DNA of *M. hyorhinitis* 3, DNA of *M. pneumoniae* 4, DNA of *M. pulmonis* 5, DNA of *M. hominis* 6, DNA of *M. arthritidis*

바. 민감도 확인 실험

추출된 *Mycoplasma hyopneumoniae*는 Spectrophotometer를 이용하여 DNA 정량을 한 후 단계 희석하여 준비한 purified *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA 샘플들인 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1 pg의 *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA 샘플들을 가지고 각각의 중합효소연쇄반응이 수행되었다.

개발된 프라이머 쌍은 Forward primer[5'-TCC AGT CAT ACC AAG GCA GAA ATT-3'(24 mer, 뉴클레오타이드 223070~223093)]와 Reverse primer[5'-CGG GCA CTT TGA CTA AGA TCT GC-3'(23 mer, 뉴클레오타이드 222827~222849)]을 사용하였고, 중합효소연쇄반응 PCR을 위한 반응시약의 조성은 1 μ l 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/ μ l), 2.5 μ l $10\times$ 반응버퍼, 500 μ M 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 μ l의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞어 제조하였다. 중합효소연쇄반응은 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 반응을 실시하였

다. 반응조건은 95°C에서 5 min간 pre-denaturation을 실시 한 후 95°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다. 증합효소 연쇄반응의 산물은 2% 아가로스겔에 전기영동하여 특이 밴드의 유무를 확인하였다.

실험 결과 표 9와 그림 7과 같이 개발한 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 계놈서열 protein P97 영역 표적 프라이머 키트는 10 pg 이상의 *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA를 검출할 수 있었다.

표 9. 민감도검사 결과

Template DNA(pg)	10 ³	10 ²	10	1
Positive reaction	+++	++	+	-

+++ : Strong band, ++ : moderate band, + : mild band, - : No reaction

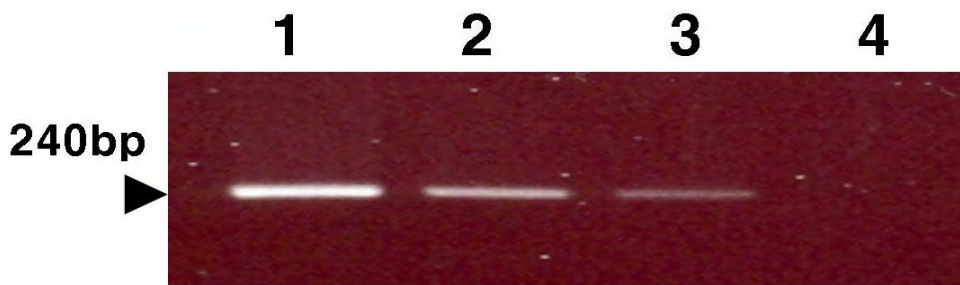


그림 7. 민감도검사 결과. Lanes: 1, 10³ pg DNA of *M. hyopneumoniae* 2, 10² pg DNA of *M. hyopneumoniae* 3, 10 pg DNA of *M. hyopneumoniae* 4, 1 pg DNA of *M. hyopneumoniae*

사. 임상 샘플을 이용한 마이코플라즈마 병원체 검사

전북 익산에 소재하고 있는 도축장에서 도축전 혈액 검사를 통하여 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 감염이 확인된 돼지로부터 육안적으로 폐렴이 확인된 폐장의 일부를 무균 채취하여 1 ml 멸균 증류수가 들어있는 Mini-Bead Beater(Biospec product) 전용 2 ml 튜브에 무균 채취하여 세절한 후 멸균 3차 증류수에 부유시킨 glass bead(0.1 mm size, Biospec product) 200 µl와 phenol-chlorform-isoamyl alcohol 용액(50:49:1(v/v/v)) 200 µl를 넣어 Mini-Bead Beater(Biospec product)로 30초간 5,000 rpm으로 진탕하였다. 진탕 후 4 °C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액을 멸균 2 ml 튜브에 옮겼다. 3 M 초산나트륨(sodium acetate) 10 µl와 ice-cold 에탄올 250 µl를 넣어 -20°C에서 10분간 정제시킨 후, 15,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 침전물은 70% 알코올로 세척하여 실온에서 건조시키고 Tris EDTA(pH 8.0) 60 µl에 용해시켜 실험에 사용하였다. 실험실에서 추출된 DNA 샘플을 가지고 본 발명으로 개발된 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 protein P97

영역을 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 쌍을 사용하여 PCR을 수행하였다.

사용된 프라이머 쌍은 Forward primer[5'-TCC AGT CAT ACC AAG GCA GAA ATT-3'(24 mer, 뉴클레오타이드 223070~223093)]와 Reverse primer[5'-CGG GCA CTT TGA CTA AGA TCT GC-3'(23 mer, 뉴클레오타이드 222827~222849)]이었다.

중합효소연쇄반응 PCR을 위한 반응시약의 조성은 1 µl 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/µl), 2.5 µl 10× 반응버퍼, 500 µM 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 µl의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞어 제조하였다.

중합효소 연쇄반응의 산물은 2% 아가로즈겔에 전기 영동하여 240 bp의 밴드를 확인하였다.

실험 결과 표 10과 그림 8에 나타난 것과 같이 본 발명에서 개발한 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 계놈서열 protein P97 영역 표적 프라이머 키트는 임상적으로 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 감염에 의한 돼지유행성폐렴에 감염된 돼지의 폐렴으로부터 마이코플라즈마 하이오뉴모니에를 검출할 수 있었다. 반면 도축전 혈청 검사에서 음성인 개체인 No. 5와 No. 6의 돼지 폐장 조직에서 마이코플라즈마 하이오뉴모니에를 검출할 수 없었다.

상기 결과로부터, 본 발명에서 개발한 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 계놈서열 protein P97 영역 표적 프라이머 키트는 임상적으로 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 감염에 의한 돼지유행성폐렴에 감염된 돼지의 폐렴으로부터 마이코플라즈마 하이오뉴모니에를 효과적으로 검출할 수 있음을 확인할 수 있었다.

표 10. 임상샘플을 이용한 검사 결과

Clinical samples (Lung)	PCR result
No. 1(sero-positive)	++
No. 2(sero-positive)	++
No. 3(sero-positive)	++
No. 4(sero-positive)	++
No. 5(sero-negative)	-
No. 6(sero-negative)	-

++: Strong reaction, -: No reaction

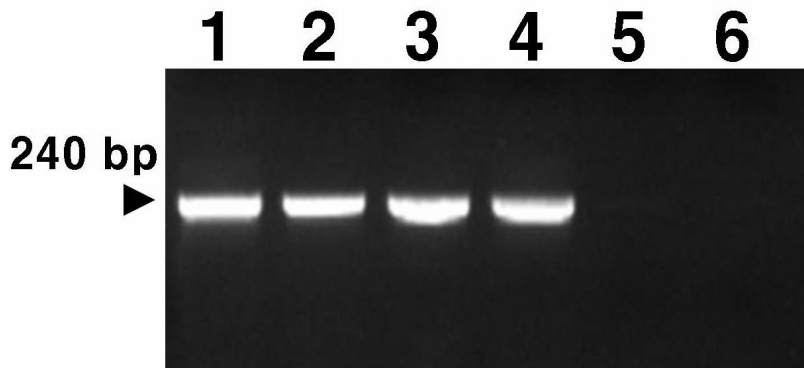


그림 8. 임상샘플 검사 결과. Lanes: 1, No. 1.(sero-positive) 2, No. 2.(sero-positive) 3, No. 3.(sero-positive) 4, No. 4.(sero-positive) 5, No. 5.(sero-negative) 6, No. 6.(sero-negative)

3. 돼지에서 마이코플라즈마 신속 분리 배양법 개발

샘플에서 마이코플라즈마 감염 여부를 신속히 알아낼 수 있는 방법은 현재 PCR이 알려져 있으나, 마이코플라즈마는 수백 종의 species를 가지고 있어, 각각을 검출하는 프라이머 셋트를 가지고 PCR 분석을 하는데 어려움이 있어왔다.

마이코플라즈마 신속 진단은 그림 9와 같이 Phire® Animal Tissue Direct PCR Kit (Thermo Fisher Scientific Dharmacon Products, Lafayette, CO)를 이용하여 마이코플라즈마 감염 돼지의 폐장의 폐렴 병변 부위 일부를 채취하여 Kit의 tube 안에 넣고 마이코플라즈마 universal primer 쌍과 kit buffer를 넣은 후, 중합효소연쇄반응을 바로 실시하였다.

Kit에는 Phire Hot Start II DNA Polymerase 200 μ l, 2x Phire Animal Tissue PCR Buffer 5 x 1 ml (includes dNTPs and MgCl₂), Universal control primer mix (25 μ M each) 40 μ l, Dilution Buffer 5 ml, DNARElease™ Additive 3 x 100 μ l, Gel loading dye 3 x 1 ml, Harris Uni-Core 0.50 mm, Harris Cutting Mat가 포함되어 있다.

Phire® Animal Tissue Direct PCR Kit를 이용하여 별도의 DNA 추출과정이 필요 없이, 순수하게 마이코플라즈마 universal primer 쌍에 기초한 중합효소 연쇄반응 시간만 소요되기 때문에 2시간의 PCR 과정을 거쳐 바로 전기영동 하여 가검물로부터 바로 마이코플라즈마 감염 여부를 확인할 수 있다. 별도의 DNA 추출과정이 필요 없는 이유는 kit에 포함되어 DNARElease™ Additive의 작용에 의해서 별도의 과정 없이 Thermocycler에서 바로 DNA 추출이 이루어지고 계속하여 중합효소 연쇄반응이 수행되기 때문이다. 또한 DNA binding domain과 함께 특별히 고안된 Phire® Hot Start II DNA Polymerase는 동물조직 내에 다량 존재하는 많은 량의 PCR inhibitors들의 영향을 효과적으로 제거해준다.

마이코플라즈마 신속 진단을 위하여 Mycoplasma universal primers는 Table 11과 같이 유전자 변이가 거의 없는 것으로 알려진 16S rRNA 유전자를 기초로 하여 464 bp의 PCR산물이 증폭되도록 고안된 Wong-Lee와 Lovett (1993)의 방법에 준하여 작성하였으며, 반응조건은 Denaturation 94°C, 1 min, Annealing 60°C, 1 min, Extension 72°C, 1 min으로 30 cycle

을 실시하였다.

PCR 반응액은 Phire® Animal Tissue Direct PCR Kit에 들어있는 buffer에 각각 1 µl의 universal primer A와 B(10 pM/µl), 2 µl sample DNA를 복합하여 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 반응을 실시하였다. PCR 증폭산물은 ethidium bromide (0.5 µg/ml)이 첨가된 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 UV transilluminator에서 464 bp의 특이 band를 관찰하였다.

표 11. PCR conditions for detection of mycoplasma DNA by using universal primers

Primer	Primers Nucleotide sequence(5'→3')
A (Forward)	GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG
B (Reverse)	CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G

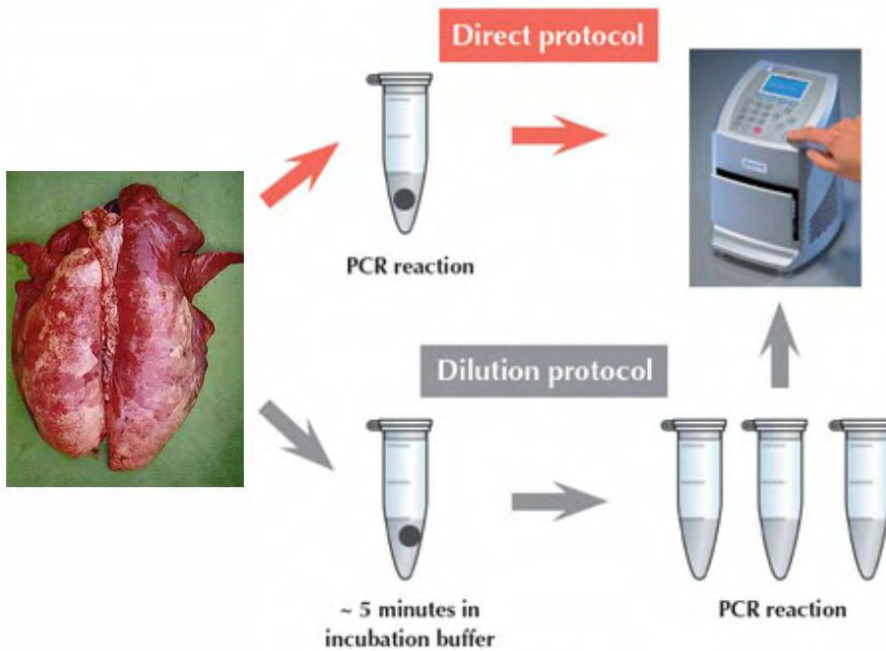


그림 9. 마이코플라즈마 direct PCR 모식도

마이코플라즈마 병변이 확인된 도축 돼지 7두의 폐장으로부터 폐렴 병소의 조직을 채취하여 마이코플라즈마 direct PCR을 수행한 결과 Fig. 10과 같이, 마이코플라즈마에 특이적인 464 bp의 PCR산물의 증폭을 확인할 수 있었다.

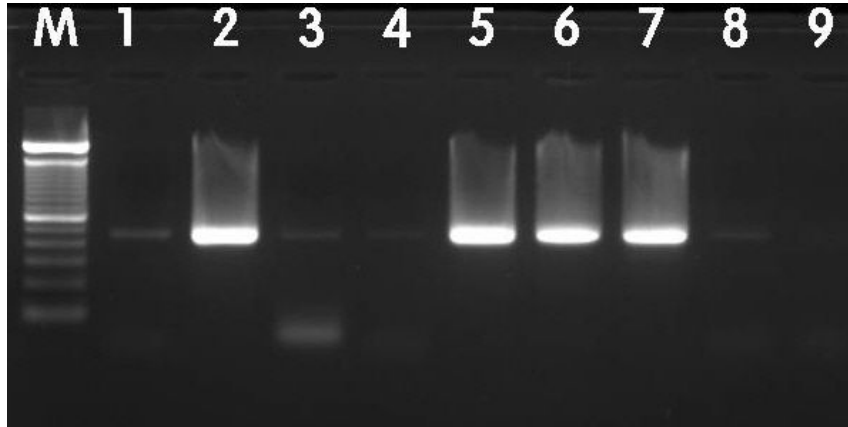


그림 10. 마이코플라즈마 신속진단 direct PCR 결과. M : 1Kb ladder, 1: Sample-1, 2: Sample-2, 3: Sample-3, 4: Sample-4, 5: Sample-5, 6: Sample-6, 7: Sample-7, 8: *M. hyopneumoniae* DNA, 9: D.W

4. 돼지 마이코플라즈마 야외 균주 분리 방법 확립 결과

가. 양돈 농장 폐렴 돼지의 비강 swab 샘플링 방법 확립

양돈장의 호흡기 증상을 가진 돼지의 비강으로부터 swab을 통한 가검물 채취방법을 확립하였다. 가검물로부터 면봉을 이용하여 swab하여 멸균 배지에 옮겨 실험실에서 Hayflick's medium에 배양하는 방법을 사용하였다. 샘플링 시 2개의 면봉을 사용하여 1개의 면봉에 샘플은 DNA를 추출 후 PCR을 이용하여 마이코플라즈마 신속 진단을 실시하고 양성 결과가 나온 다른 pair의 샘플을 가지고 균 분리를 시도하였다.

나. 도축장 폐장 샘플링 매뉴얼 완성

익산시에 소재하고 있는 (주)축림 도축장과 업무협약을 통하여 도축 돼지의 폐장으로부터 가검물 샘플링을 실시하였다. 도축 돼지의 폐장으로부터 효율적으로 마이코플라즈마 분리할 수 있도록 과학적인 샘플링 매뉴얼을 또한 완성하였다. 간략히는 매뉴얼은 준비사항과 도축 폐장의 마이코플라즈마 병소 확인 방법, 마이코플라즈마 폐렴 병소 폐 병변 부위 샘플링 방법, 샘플링 폐장의 실험실 내 무균 작업으로 나누어 작성되었다.

다. 가검물의 마이코플라즈마 함유 여부 신속진단 확인 방법 확립

샘플링 폐장의 일부 미소량 0.5g을 이용하여 마이코플라즈마 함유 여부를 신속 진단하는 방법을 확립하였다. 마이코플라즈마 신속 진단을 위하여 Mycoplasma universal primer 쌍과 Phire® Animal Tissue Direct PCR Kit를 이용하여 별도의 DNA 추출과정이 필요 없이, 순수하게 마이코플라즈마 universal primer 쌍에 기초한 중합효소 연쇄반응 시간만 소요되기 때문에 2시간의 PCR 과정을 거쳐 바로 전기영동 하여 가검물로부터 바로 마이코플라즈마 감염 여부를 확인할 수 있는 방법을 확립하였다. 본 방법을 이용하여 도축장으로부터 샘플링해온 마이코플라즈마 병변 부위의 샘플로부터 마이코플라즈마 세균 함유 여부를 2시간 이내에 확인할

수 있기 때문에, 분리 배양 대상 가검물 샘플의 선정이 용이하며, 분리 배양 성공 가능성을 극대화할 수 있다.

라. 가검물의 유제화 프로토콜 확립

마이코플라즈마 신속진단을 통하여 함유되지 않은 샘플 가검물은 폐기하고, 마이코플라즈마 양성인 가검물을 유제화하는 프로토콜을 확립하였다. 실험실 내 무균 작업으로 마이코플라즈마 양성인 샘플 폐장의 1 g을 무균적으로 채취하여 사전 멸균된 유발에 넣고 멸균 가위로 세절하고 2 ml의 마이코플라즈마 배지를 넣은 후, 멸균 막대로 갈아 유제(homogenate)를 만드는 방법의 프로토콜을 확립하였다.

마. 마이코플라즈마 함유 가검물 유제의 분리 시도 및 배양법 확립

유제화된 가검물은 상온에 1분간 정체하여 폐장 조직 잔여물을 침전시킨 후, 상층액은 마이코플라즈마 분리 배지에 접종하였다. 마이코플라즈마 분리 배지는 Hanks' Balanced salt solution without Phenol Red(Gibco), Mycoplasma Broth Base(Oxoid), Brain Heart Infusion(Oxoid), Yeast Extraction(Duchefa), Thallium Acetate(Sigma), Ampicillin (Sigma), Porcine serum(Gibco), Glucose(Sigma), Phenol red(Sigma)를 함유하여 조제하였다.

가검물 유제를 분리 배지에 접종한 후, 5% CO₂ 농도에서 37°C로 2주 배양하고, 계대 배양을 실시하였다.

바. 배양 가검물의 계대 배양을 통한 분리 여부 확인 프로토콜 완성

가검물 유제의 분리 배지 접종 후 2주 배양과 2번에 걸친 계대 배양 후, 가검물의 마이코플라즈마 세균의 증식 여부를 확인하였다. 마이코플라즈마의 증식여부는 배양 배지로부터, DNA를 추출한 후, Mycoplasma universal primer 쌍을 이용한 PCR을 수행하여 결과를 확인하였다.

배양 배지에 마이코플라즈마 세균의 증식 여부를 판단하기 위하여 Mycoplasma universal primers A와 B를 이용하여 마이코플라즈마 세균의 16S rRNA 유전자 부위 464 bp의 특이 밴드 존재 여부를 확인하기 위한 PCR을 수행하였다.

중합효소연쇄반응 PCR을 위한 반응시약의 조성은 1 μ l 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/ μ l), 2.5 μ l 10 \times 반응버퍼, 500 μ M 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 μ l의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞어 제조하였다.

중합효소연쇄반응은 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 반응을 실시하였다. 반응조건은 94°C에서 5min간 pre-denaturation을 실시한 후 94°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다.

중합효소연쇄반응 산물은 ethidium bromide (0.5 μ g/ml)이 첨가된 1.5 % agarose gel에서 전기영동한 후 UV transilluminator에서 464 bp의 특이 band를 관찰하였다.

사. 분리 마이코플라즈마의 species 확인 동정 프로토콜 완성

*Mycoplasma hyopneumoniae*를 검출하기 위한 PCR은 마이코플라즈마 protein P97 영역을 표적으로 하여 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 만을 특이적으로 검출할 수 있는 전방향 프라이머(Forward primer) 5'-TCC AGT CAT ACC AAG GCA GAA ATT-3' (24 mer, 뉴클레오타이드 223070 ~ 223093)와 역방향 프라이머(Rreverse primer) 5'-CGG GCA CTT TGA CTA AGA TCT GC-3' (23 mer, 뉴클레오타이드 222827 ~ 222849)를 이용하여 PCR을 위해서 1 µl 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/µl), 2.5 µl 10× 반응버퍼, 500 µM 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 µl의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 DNA thermal cycler(PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응조건은 95°C에서 5min간 pre-denaturation을 실시 한 후 95°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 2% 아가로스겔에 전기영동하여 240 bp의 밴드를 확인하였다.

*Mycoplasma hyohyorhinis*를 검출하기 위한 PCR은 universal mycoplasmal primers (P1: 5'-ACACCATGGGAGCTGGTAAT-3', P2: 5'-CTTCATCGACTTTCAGACCCAAGGCAT-3)를 이용하여 PCR을 위해서 1 µl 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/µl), 2.5 µl 10× 반응버퍼, 500 µM 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 µl의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation을 실시 한 후 95°C에서 1min, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다. Nested PCR로 *Mycoplasma hyorhinis* 프라이머 쌍(P1: 5'-CAAGATAAAATCATTTTCCT-3', P2:5'-AGTAATAGAAAGGAGCTTC-3)을 이용하여 1 µl 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/µl), 2.5 µl 10× 반응버퍼, 500 µM 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 µl의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응조건은 95°C에서 5min간 pre-denaturation을 실시 한 후 95°C에서 1분, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 1.5 % 아가로스겔에 전기 영동하여 280 bp의 특이 밴드를 확인하였다.

검출된 분리한 마이코플라즈마 세균 DNA를 nucleotide sequences를 model 373A automatic sequencer와 BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom)을 사용하여 직접 분석한다. Sequencing reaction은 60 ng PCR-amplified DNA, 3.2 pmol의 forward와 reverse primer, 4 µl BigDye Terminator RR mix (part no. 4303153; Perkin-Elmer, Applied Biosystems)을 복합하여 사용하였다. 최종 반응양은 증류수를 사용하여 10µl로 맞추었다. 반응은 5% (vol/vol) dimethyl sulfoxide와 함께 수행하며, 30 cycles의 95°C/15 초, 50°C/10 초, 60°C/4 분간 반

응을 수행하였다. Sequences는 multiple-alignment algorithm in the MegAlign package (Windows version 3.12e; DNASTAR, Madison, Wis.)를 사용하여 align하여 마이코플라즈마 염기서열을 확인하고, species를 확인하였다.

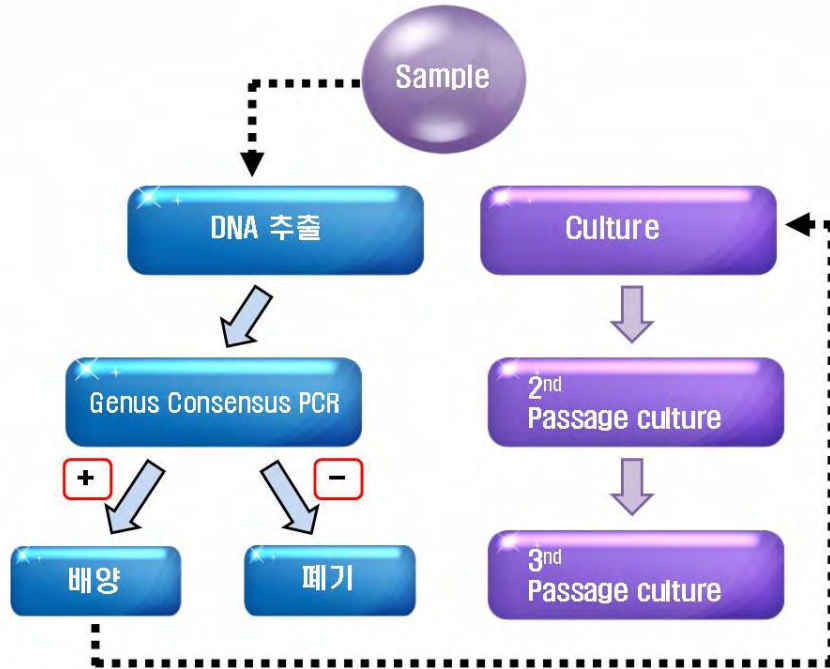


그림 11. 마이코플라즈마의 분리 배양 전략 도식도

5. 마이코플라즈마 Consensus PCR 개발 결과

가. 양돈 농장에서 폐렴 병변 있는 폐장을 샘플링하여 PCR의 수행

배양된 균주들을 13,000 g에서 30분 동안 원심 분리하여 얻은 펠렛 검체를 1 ml 멸균 증류수가 들어있는 Mini-Bead Beater(Biospec product) 전용 2 ml 튜브에 무균 채취하여 세절한 후 멸균 3차 증류수에 부유시킨 glass bead(0.1 mm size, Biospec product) 200 μ l와 phenol-chlorform-isoamyl alcohol 용액(50:49:1(v/v/v)) 200 μ l를 넣어 Mini-Bead Beater(Biospec product)로 30초간 5,000 rpm으로 진탕하였다. 진탕 후 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액을 멸균 2 ml 튜브에 옮겼다. 3 M 초산나트륨(sodium acetate) 10 μ l와 ice-cold 에탄올 250 μ l를 넣어 -20 $^{\circ}$ C에서 10분간 정체시킨 후, 15,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 침전물은 70% 알코올로 세척하여 실온에서 건조시키고 Tris EDTA(pH 8.0) 60 μ l에 용해시켜 실험에 사용하였다.

나. 중합효소연쇄반응 프라이머 개발

전방향 프라이머(Forward primer)

5'-CTC TTT GTA CCG GCC ATT GT-3'(20 mer, 뉴클레오타이드 699283 ~ 699302)

역방향 프라이머(Reverse primer)

5'-GAA TGA CAG ATG GTG CAT GG-3'(20 mer, 뉴클레오타이드 699478 ~ 699497)

위 중합효소연쇄반응용 프라이머는 마이코플라즈마 계놈서열 중에서 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 16S rRNA(ribosomal RNA) 유전자 영역을 표적으로 하는 마이코플라즈마 속(genus)에 속하는 세균을 특이적으로 검출할 수 있다. 상기 두 프라이머는 합성 후 OPC 방법으로 정제하여 사용하였다.

PCR을 위한 반응시약의 조성은, 1 μ l 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/ μ l), 2.5 μ l 10 \times 반응버퍼, 500 μ M 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 μ l의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞어 제조한다.

반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분(min)간 프리 디내츄레이션(predenaturation)을 실시 한 후 95 $^{\circ}$ C에서 1분(min), 55 $^{\circ}$ C에서 1분(min), 72 $^{\circ}$ C에서 1분(min)을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 3분(min)간 포스트 폴리머라이제이션(post-polymerization)을 실시한다.

중합효소 연쇄반응의 산물은 2% 아가로스겔에 전기영동하여 215 bp의 밴드를 확인한다.

다. 마이코플라즈마 준비와 배양

본 연구에서 마이코플라즈마 계놈서열 중에서 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 16s rRNA(ribosomal RNA) 유전자 영역을 표적으로 하는 마이코플라즈마 속(genus)에 속하는 세균의 프라이머의 민감도 및 특이도 등을 확인하기 위한 실험을 수행하기 위하여 아래와 같이 총 9개 종류의 마이코플라즈마 종 별 균주들을 구입하여 배양하였다.

상기 마이코플라즈마 배양은 modified Friis 배지(Zhang 등, 1994)를 이용하여 37 $^{\circ}$ C에서 58 rpm으로 1주일간 배양하여 13,000 g에서 30분 동안 원심분리하여 Friis 배지성분을 제거하였다.

표 1. 마이코플라즈마 속 9개 종의 균주 샘플

	Mycoplasma species
1	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
2	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
3	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
4	<i>Mycoplasma hominis</i>
5	<i>Mycoplasma pulmonis</i>
6	<i>Mycoplasma arthritidis</i>
7	<i>Mycoplasma bovis</i>
8	<i>Mycoplasma fluccurare</i>
9	<i>Mycoplasma mycoides</i>

라. 마이코플라즈마 준비

본 연구에서 마이코플라즈마 게놈서열 중에서 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 16s rRNA(ribosomal RNA) 유전자 영역을 표적으로 하는 마이코플라즈마 속(genus)에 속하는 세균의 프라이머의 민감도 및 특이도 등을 확인하기 위한 비교 실험을 수행하기 위하여 총 7개 종류의 비교대상 균주들을 구입하여 실험하였다.

표 2. 마이코플라즈마 속에 포함되지 않는 7개 균주

	Mycoplasma species
1	<i>Staphylococcus aureus</i>
2	<i>Escherichia coli</i>
3	<i>Helicobacter pylori</i>
4	<i>Pasteurella multocida</i>
5	<i>Salmonella pullorum</i>
6	<i>Salmonella gallinarum</i>
7	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>

마. 마이코플라즈마 균주 별 DNA 추출 시료 준비

개발한 프라이머 키트는 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 프라이머를 이용하며, 이는 마이코플라즈마 게놈서열 중에서 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 16s rRNA(ribosomal RNA) 유전자 영역을 표적으로 하고있다.

개발된 프라이머 쌍은 Forward primer[5'-CTC TTT GTA CCG GCC ATT GT-3'(20 mer, 뉴클레오타이드 699283 ~ 699302)]와 Reverse primer[5'-GAA TGA CAG ATG GTG CAT GG-3'(20 mer, 뉴클레오타이드 699478 ~ 699497)]이었다.

중합효소연쇄반응 PCR을 위한 반응시약의 조성은, 1 μ l 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/ μ l), 2.5 μ l 10 \times 반응버퍼, 500 μ M 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 μ l의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞어 제조하였다.

중합효소연쇄반응은 DNA 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5 분(min)간 프리디내츄레이션 (pre-denaturation)을 실시 한 후 95 $^{\circ}$ C에서 1 분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 포스트폴리머라이제이션(post-polymerization)을 실시 한다.

바. 특이도 확인실험

개발된 프라이머 쌍은 Forward primer[5'-CTC TTT GTA CCG GCC ATT GT-3'(20 mer, 뉴클레오타이드 699283 ~ 699302)]와 Reverse primer[5'-GAA TGA CAG ATG GTG CAT GG-3'(20 mer, 뉴클레오타이드 699478 ~ 699497)]이었다.

중합효소 연쇄반응을 위한 반응시약의 조성은, 1 μ l 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/ μ l), 2.5 μ l 10 \times 반응버퍼, 500 μ M 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 μ l 의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞어 제조하였다.

중합효소 연쇄반응은 DNA 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5 분간 프리 디내츄레이션 (pre-denaturation)을 실시 한 후 95 $^{\circ}$ C에서 1 분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 포스트 폴리머라이제이션(post-polymerization)을 실시 하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 2% 아가로즈겔에 전기 영동하여 특이 밴드의 유무를 확인하였다.

실험 결과 표 3과 그림 2에 나타난 것과 같이 개발한 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 16S rRNA(ribosomal RNA) 유전자 영역을 표적으로 하는 프라이머는 마이코플라즈마 속(genus) 세균인 마이코플라즈마 하이오뉴모니에(*M. hyopneumoniae*) 및 마이코플라즈마 하이오라이니스(*M. hyorhinis*)의 DNA에 특이적으로 반응하였음을 알 수 있었다.

반면에 마이코플라즈마 속(genus)에 속하지 않은 총 7개 종류의 비교대상 균주의 DNA와는 반응이 일어나지 않았음을 알 수 있었다.

표 3. 마이코플라즈마 특이도 검사 결과

	Mycoplasma species	PCR result
1	<i>M. hyopneumoniae</i>	++
2	<i>M. hyorhinis</i>	++
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
4	<i>Escherichia coli</i>	-
5	<i>Helicobacter pylori</i>	-
6	<i>Pasteurella multocida</i>	-
7	<i>Salmonella pullorum</i>	-
8	<i>Salmonella gallinarum</i>	-
9	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	-

+++ : Strong reaction, ++ : moderate, + : mild, - : No reaction

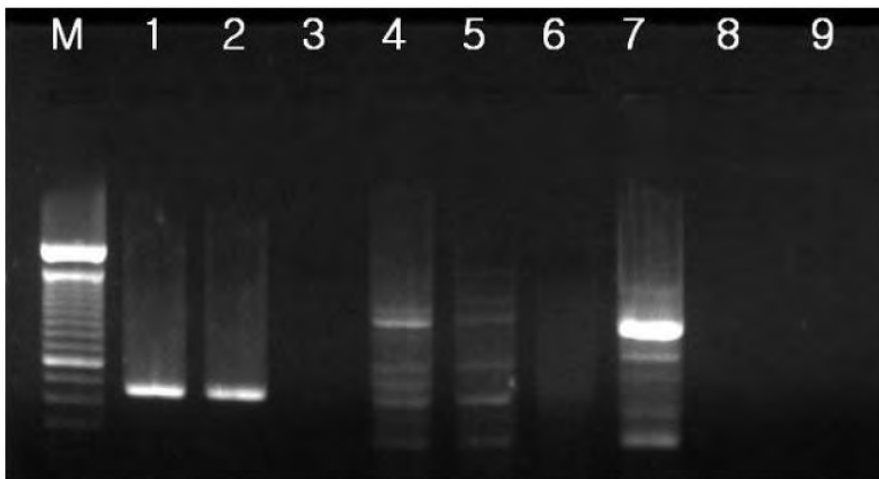


그림 2. 특이도 검사 결과. Lanes: M, size marker, 1, DNA of *M. hyopneumoniae* 2, DNA of *M. hyorhinis* 3, DNA of *Staphylococcus aureus* 4, DNA of *Escherichia coli* 5, DNA of *Helicobacter pylori* 6, DNA of *Pasteurella multocida* 7, DNA of *Salmonella pullorum* 8, DNA of *Salmonella gallinarum* 9, DNA of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

사. 민감도 확인실험

개발된 프라이머 쌍은 Forward primer[5'-CTC TTT GTA CCG GCC ATT GT-3'(20 mer, 뉴클레오타이드 699283 ~ 699302)]와 Reverse primer[5'-GAA TGA CAG ATG GTG CAT GG-3'(20 mer, 뉴클레오타이드 699478 ~ 699497)]를 사용하였고, 중합효소연쇄반응 PCR을 위한 반응시약의 조성은, 1 µl 전방향, 역방향 프라이머 (10pmol/µl), 2.5 µl 10× 반응버퍼, 500 µM 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 µl의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞어 제조하였다.

중합효소 연쇄반응은 DNA 반응조건은 95°C에서 5 분(min)간 프리 디내츄레이션 (pre-denaturation)을 실시 한 후 95°C에서 1 분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서 3분간 포스트 폴리머라이제이션(post-polymerization)을 실시 하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 2% 아가로스젤에 전기 영동하여 특이 밴드의 유무를 확인하였다.

실험 결과 표 4와 그림 3과 같이 개발한 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 16S rRNA(ribosomal RNA) 유전자 영역을 표적으로 하는 프라이머는 3, 4 및 8번 균주(*M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. fluccurare*)의 DNA와는 강하게 반응하였음을 알 수 있다.

또한 5 및 9번 균주(*M. pulmonis*, *M. mycoides*) 의 DNA와는 다소 강한 정도로, 나머지 균주(*M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. arthritiditis*, *M. bovis*)의 DNA 와는 일반적인 정도로 반응하였음을 알 수 있다.

표 4. 민감도검사 결과

	Mycoplasma species	PCR result
1	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	+
2	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	+
3	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	+++
4	<i>Mycoplasma hominis</i>	+++
5	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	++
6	<i>Mycoplasma arthritiditis</i>	+
7	<i>Mycoplasma bovis</i>	+
8	<i>Mycoplasma fluccurare</i>	+++
9	<i>Mycoplasma mycoides</i>	++

+++ : Strong reaction, ++ : moderate, + : mild, - : No reaction

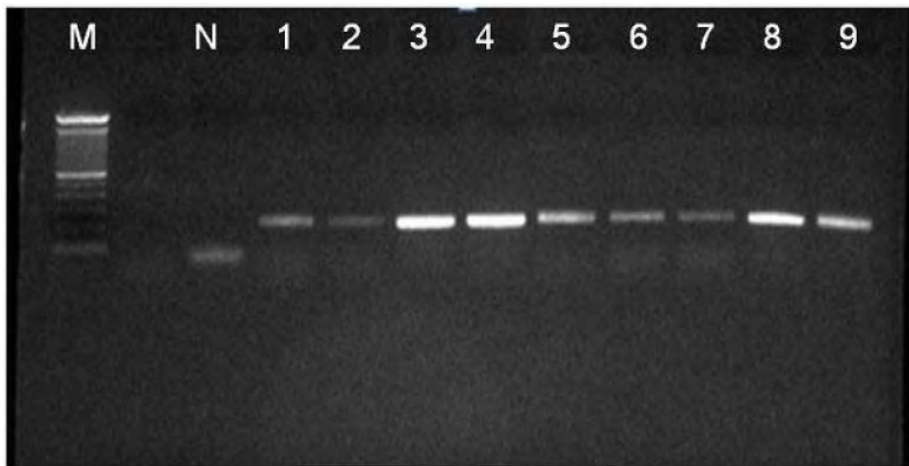


그림 3. 민감도 검사 결과. Lanes: M, size marker, 1, DNA of *M. hyopneumoniae* 2, DNA of *M. hyorhinis* 3, DNA of *Mycoplasma pneumoniae* 4, DNA of *Mycoplasma hominis* 5, DNA of *Mycoplasma pulmonis* 6, DNA of *Mycoplasma arthritidis* 7, DNA of *Mycoplasma bovis* 8, DNA of *Mycoplasma fluccurare* 9, DNA of *Mycoplasma mycoides*

6. 마이코플라즈마 하이오뉴모니에와 하이오라이니스 야의 분리 균주 확보 결과

가. 양돈 농장에서 폐렴돼지의 폐장 샘플링 방법 확립

마이코플라즈마 분리 배지는 Hanks' Balanced salt solution without Phenol Red(Gibco), Mycoplasma Broth Base(Oxoid), Brain Heart Infusion(Oxoid), Yeast Extraction (Duchefa), Thallium Acetate(Sigma), Ampicillin(Sigma), Porcine serum(Gibco), Glucose(Sigma), Phenol red(Sigma)를 함유하여 조제한다. 가검물 유체를 분리 배지에 접종한 후, 5% CO₂ 농도에서 37°C로 2주 배양하고, 계대 배양을 실시한다. 분리 배양 마이코플라즈마의 동정을 통하여 마이코플라즈마 하이오뉴모니에와 하이오라이니스 야의 분리 균주를 확보한다.

나. 도축장 폐장 샘플링 매뉴얼 완성

도축 돼지의 폐장으로부터 효율적으로 마이코플라즈마 분리할 수 있도록 과학적인 샘플링 매뉴얼을 또한 완성하였다. 간략히는 매뉴얼은 준비사항과 도축 폐장의 마이코플라즈마 병소 확인 방법, 마이코플라즈마 폐렴 병소 폐 병변 부위 샘플링 방법, 샘플링 폐장의 실험실 내 무균 작업으로 나누어 작성되었다. 마이코플라즈마는 낮은 온도에서 잘 자라지 않기 때문에 아이스 보관하지 않는다.

마이코플라즈마 신속진단을 위하여 도축장에서 폐장을 분리한후 바로 실험실에 도착하여 샘플링 해온 돼지폐장을 꺼내어 육안병변을 관찰하고 사진을 찍는다. 육안병변을 확인후, 무균적으로 돼지 폐장을 트리밍하는데 이때 병리조직용과 DNA추출용으로 트리밍하여 마이코플라즈마 감염여부를 신속하게 진단할 수 있다.

샘플링 폐장의 일부 미소량 0.5g을 이용하여 마이코플라즈마 함유 여부를 신속진단하는 방법

을 확립하였다. 마이코플라즈마 신속 진단을 위하여 Mycoplasma universal primer 쌍과 Phire® Animal Tissue Direct PCR Kit를 이용하여 별도의 DNA 추출과정이 필요 없이, 순수하게 마이코플라즈마 universal primer 쌍에 기초한 중합효소연쇄반응 시간만 소요되기 때문에 2시간의 PCR 과정을 거쳐 바로 전기영동 하여 가검물로부터 바로 마이코플라즈마 감염 여부를 확인할 수 있는 방법을 확립하였다. 본 방법을 이용하여 도축장으로부터 샘플링해온 마이코플라즈마 병변 부위의 샘플로부터 마이코플라즈마 세균 함유 여부를 2시간 이내에 확인할 수 있기 때문에, 분리 배양 대상 가검물 샘플의 선정이 용이하며, 분리 배양 성공 가능성을 극대화할 수 있다.

마이코플라즈마 신속진단을 통하여 함유되지 않은 샘플 가검물은 폐기하고, 마이코플라즈마 양성인 가검물을 유제화하는 프로토콜을 확립하였다. 실험실 내 무균 작업으로 마이코플라즈마 양성인 샘플 폐장의 1 g을 무균적으로 채취하여 사전 멸균된 유발에 넣고 멸균 가위로 세절하고 2 ml의 마이코플라즈마 배지를 넣은 후, 멸균 막대로 갈아 유제(homogenate)를 만드는 방법의 프로토콜을 확립하였다.

유제화된 가검물은 상온에 1분간 정제하여 폐장 조직 잔여물을 침전시킨 후, 상층액은 마이코플라즈마 분리 배지에 접종하였다. 마이코플라즈마 분리 배지는 Hanks' Balanced salt solution without Phenol Red(Gibco), Mycoplasma Broth Base(Oxoid), Brain Heart Infusion(Oxoid), Yeast Extraction (Duchefa), Thallium Acetate(Sigma), Ampicillin(Sigma), Porcine serum(Gibco), Glucose(Sigma), Phenol red(Sigma)를 함유하여 조제하였다.

다. 폐렴 돼지의 폐장에서 분리 마이코플라즈마 species 확인과 stock법 확립

개발된 프라이머 쌍은 Forward primer[5'-CTC TTT GTA CCG GCC ATT GT-3'(20 mer, 뉴클레오타이드 699283 ~ 699302)]와 Reverse primer[5'-GAA TGA CAG ATG GTG CAT GG-3'(20 mer, 뉴클레오타이드 699478 ~ 699497)]를 사용하였고, 중합효소연쇄반응 PCR을 위한 반응시약의 조성은, 1 µl 전방향, 역방향 프라이머 (10pmol/µl), 2.5 µl 10× 반응버퍼, 500 µM 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 µl의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞어 제조하였다.

중합효소연쇄반응은 DNA 반응조건은 95°C에서 5분간 프리디내츄레이션(predenaturation)을 실시 한 후 95°C에서 1 분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서 3분간 포스트폴리머라이제이션(post-polymerization)을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 2% 아가로스겔에 전기 영동하여 특이 밴드의 유무를 확인하였다.

분리 배양된 마이코플라즈마 세균은 추가로 species를 분류하기 위한 분석을 시행하였다. 마이코플라즈마 species의 분석은 *Mycoplasma hyopneumoniae*와 *Mycoplasma hyorhinae*에 특이적인 프라이머쌍을 이용하여 species specific PCR을 수행하였다.

*Mycoplasma hyopneumoniae*를 검출하기 위한 PCR은 마이코플라즈마 protein P97 영역을 표적으로 하여 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 만을 특이적으로 검출할 수 있는 전방향 프라이머(Forward primer) 5'-TCC AGT CAT ACC AAG GCA GAA ATT-3' (24 mer, 뉴클레오타이드 223070 ~ 223093)와 역방향 프라이머(Reverse primer) 5'-CGG GCA CTT TGA CTA AGA TCT GC-3' (23 mer, 뉴클레오타이드 222827 ~ 222849)를 이용하여 PCR을 위

해서 1 μ l 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/ μ l), 2.5 μ l 10 \times 반응버퍼, 500 μ M 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 μ l의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation을 실시 한 후 95 $^{\circ}$ C에서 1min, 60 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 2% 아가로즈겔에 전기 영동하여 240 bp의 밴드를 확인하였다.

*Mycoplasma hyohyorhinitis*를 검출하기 위한 PCR은 universal mycoplasmal primers (P1: 5'-ACACCATGGGAGCTGGTAAT-3', P2: 5-CTTCATCGACTTTCAGACCCCAAGGCAT-3)를 이용하여 PCR을 위해서 1 μ l 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/ μ l), 2.5 μ l 10 \times 반응버퍼, 500 μ M 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 μ l의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation을 실시 한 후 95 $^{\circ}$ C에서 1 분, 55 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다. Nested PCR로 *Mycoplasma hyorhinitis* 프라이머 쌍(P1: 5'-CAAGATAAAATCATTTCCT-3', P2:5-AGTAATAGAAAGGAGCTTC-3)을 이용하여 1 μ l 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/ μ l), 2.5 μ l 10 \times 반응버퍼, 500 μ M 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 μ l의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation을 실시 한 후 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 30 초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 1.5 % 아가로즈겔에 전기 영동하여 280 bp의 특이 밴드를 확인하였다.

검출된 분리한 마이코플라즈마 세균 DNA를 nucleotide sequences를 model 373A automatic sequencer와 BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom)을 사용하여 직접 분석한다. Sequencing reaction 은 60 ng PCR-amplified DNA, 3.2 pmol의 forward와 reverse primer, 4 μ l BigDye Terminator RR mix (part no. 4303153; Perkin-Elmer, Applied Biosystems)을 복합하여 사용하였다. 최종 반응양은 증류수를 사용하여 10 μ l로 맞추었다. 반응은 5% (vol/vol) dimethyl sulfoxide와 함께 수행하며, 30 cycles의 95 $^{\circ}$ C/15 초, 50 $^{\circ}$ C/10 초, and 60 $^{\circ}$ C/4 min 반응을 수행하였다. Sequences는 multiple-alignment algorithm in the MegAlign package (Windows version 3.12e; DNASTAR, Madison, Wis.)를 사용하여 align하여 마이코플라즈마 염기서열을 확인하고, species를 확인하였다.

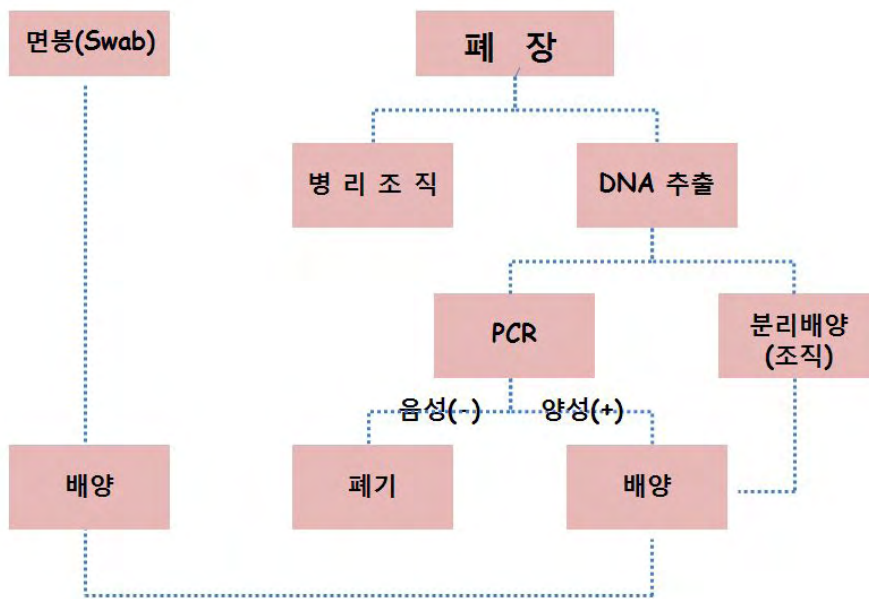


그림 4. 마이코플라즈마의 분리 배양 전략 도식도

라. 양돈 농장 폐렴돼지의 비강 swab 샘플링 가검물로부터 분리방법 확립

*Mycoplasma hyopneumoniae*를 검출하기 위한 PCR은 마이코플라즈마 protein P97 영역을 표적으로 하여 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 만을 특이적으로 검출할 수 있는 전방향 프라이머(Forward primer) 5'-TCC AGT CAT ACC AAG GCA GAA ATT-3' (24 mer, 뉴클레오타이드 223070 ~ 223093)와 역방향 프라이머(Reverse primer) 5'-CGG GCA CTT TGA CTA AGA TCT GC-3' (23 mer, 뉴클레오타이드 222827 ~ 222849)를 이용하여 PCR을 위해서 1 μ l 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/ μ l), 2.5 μ l 10 \times 반응버퍼, 500 μ M 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 μ l의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation을 실시 한 후 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 60 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 2% 아가로즈겔에 전기 영동하여 240 bp의 밴드를 확인하였다.

*Mycoplasma hyorhinis*를 검출하기 위한 PCR은 universal mycoplasmal primers (P1: 5'-ACACCATGGGAGCTGGTAAT-3', P2: 5'-CTTCATCGACTTTCAGACCCAAGGCAT-3)를 이용하여 PCR을 위해서 1 μ l 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/ μ l), 2.5 μ l 10 \times 반응버퍼, 500 μ M 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 μ l의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation을 실시 한 후 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다. Nested PCR로

Mycoplasma hyorhinis 프라이머 쌍(P1: 5'-CAAGATAAAATCATTTCCT-3', P2:5-AGTAATAGAAAGGAGCTTC-3)을 이용하여 1 μ l 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/ μ l), 2.5 μ l 10 \times 반응버퍼, 500 μ M 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 μ l의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation을 실시 한 후 95°C에서 1분, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 1.5 % 아가로즈겔에 전기 영동하여 280 bp의 특이 밴드를 확인하였다.

검출된 분리한 마이코플라즈마 세균 DNA를 nucleotide sequences를 model 373A automatic sequencer와 BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom)을 사용하여 직접 분석한다. Sequencing reaction 은 60 ng PCR-amplified DNA, 3.2 pmol의 forward와 reverse primer, 4 μ l BigDye Terminator RR mix (part no. 4303153; Perkin-Elmer, Applied Biosystems)을 복합하여 사용하였다. 최종 반응양은 증류수를 사용하여 10 μ l로 맞추었다. 반응은 5% (vol/vol) dimethyl sulfoxide와 함께 수행하며, 30 cycles의 95°C/15 초, 50°C/10 초, and 60°C/4 min 반응을 수행하였다. Sequences는 multiple-alignment algorithm in the MegAlign package (Windows version 3.12e; DNASTAR, Madison, Wis.)를 사용하여 align하여 마이코플라즈마 염기서열을 확인하고, species를 확인하였다.

7. 돼지 마이코플라즈마 세균 최적 접종방법 개발 결과

가. 마이코플라즈마 세균의 측정방법인 CCU(color change unit)로 최적의 세균측정방법 확인
배양한 마이코플라즈마를 0.3 ml을 broth에 복합하여 10⁻¹부터 10⁻⁹까지 십진희석하여 96 well plate의 12 well에 negative control로 broth를 100 μ l 씩 분주한다. 습기상자를 만들어 (멸균지퍼백에 1차 증류수로 적신 페이퍼 타올을 넣어 만든다) 37°C incubator에서 7일 동안 배양하면서 관찰한다. 7일 후 노란색으로 변한 균을 count하여 표 5와 같이 판정한다.

Numbers of turbid tubes observed at three successive dilutions			M.P.N (per inoculum of the first dilution)	Numbers of turbid tubes observed at three successive dilutions			M.P.N (per inoculum of the first dilution)
8	8	7	208	8	6	2	16.3
8	8	6	139	8	6	1	13.8
8	8	5	98.2	8	6	0	11.5
8	8	4	70.2	8	5	6	21.3
8	8	3	51.0	8	5	5	18.9
8	8	2	38.5	8	5	4	16.6
8	8	1	30.1	8	5	3	14.4
8	8	0	24.0	8	5	2	12.3
8	7	8	59.6	8	5	1	10.30
8	7	7	50.8	8	5	0	8.42
8	7	6	43.3	8	4	5	14.8
8	7	5	36.9	8	4	4	13.0
8	7	4	31.4	8	4	3	11.1
8	7	3	26.7	8	4	2	9.40
8	7	2	22.6	8	4	1	7.74
8	7	1	19.1	8	4	0	6.22
8	7	0	15.9	8	3	5	11.8
8	6	6	28.4	8	3	4	10.2
8	6	5	25.0	8	3	3	8.67
8	6	4	21.8	8	3	2	7.18
8	6	3	18.9	8	3	1	5.82
8	3	0	4.67	7	3	1	2.98
8	2	4	8.07	7	3	0	2.59
8	2	3	6.72	7	2	3	3.33
8	2	2	5.50	7	2	2	2.92
8	2	1	4.45	7	2	1	2.55
8	2	0	3.62	7	2	0	2.20
8	1	3	5.22	7	1	3	2.87
8	1	2	4.27	7	1	2	2.51
8	1	1	3.50	7	1	1	2.17
8	1	0	2.87	7	1	0	1.86
8	0	2	3.38	7	0	2	2.14
8	0	1	2.80	7	0	1	1.83
8	0	0	2.31	7	0	0	1.55

Numbers of turbid tubes observed at three successive dilutions			M.P.N (per inoculum of the first dilution)	Numbers of turbid tubes observed at three successive dilutions			M.P.N (per inoculum of the first dilution)
8	0	1	2.80	7	0	1	1.83
8	0	0	2.31	7	0	0	1.55
7	7	1	5.47	6	6	1	3.08
7	7	0	4.84	6	6	0	2.77
7	6	2	5.30	6	5	1	2.73
7	6	1	4.71	6	5	0	2.44
7	6	0	4.15	6	4	2	2.69
7	5	2	4.58	6	4	1	2.41
7	5	1	4.04	6	4	0	2.14
7	5	0	3.55	6	3	2	2.38
7	4	3	4.46	6	3	1	2.11
7	4	2	3.95	6	3	0	1.86
7	4	1	3.47	6	2	2	2.09
7	4	0	3.04	6	2	1	1.84
7	3	3	3.86	6	2	0	1.60
7	3	2	3.40	6	1	2	1.82
6	1	1	1.58	4	1	1	0.92
6	1	0	1.35	4	1	0	0.76
6	0	2	1.56	4	0	2	0.91
6	0	1	1.34	4	0	1	0.75
6	0	0	1.13	4	0	0	0.60
5	5	1	2.07	3	4	0	1.01
5	5	0	1.85	3	3	1	1.00
5	4	1	1.84	3	3	0	0.85
5	4	0	1.63	3	2	1	0.85
5	3	2	1.82	3	2	0	0.70
5	3	1	1.61	3	1	2	0.84
5	3	0	1.41	3	1	1	0.70
5	2	2	1.60	3	1	0	0.56
5	2	1	1.40	3	0	2	0.69
5	2	0	1.21	3	0	1	0.55
5	1	2	1.39	3	0	0	0.41
5	1	1	1.20	2	4	0	0.79
5	1	0	1.01	2	3	1	0.79
5	0	2	1.19	2	3	0	0.66
5	0	1	1.01	2	2	1	0.65
5	0	0	0.83	2	2	0	0.52
4	4	0	1.28	2	1	1	0.52

4	3	1	1.27	2	1	0	0.39
4	3	0	1.10	2	0	2	0.51
4	2	1	1.09	2	0	1	0.38
4	2	0	0.93	2	0	0	0.26
4	1	2	1.08	1	3	0	0.49
1	2	1	0.49	1	0	0	0.12
1	2	0	0.36	0	2	0	0.23
1	1	1	0.36	0	1	1	0.23
1	1	0	0.24	0	1	0	0.11
1	0	2	0.36	0	0	1	0.11
1	0	1	0.24				

표 4. Values of the M.P.N for 8tubes inoculated from each of three successive 10-fold dilutions

나. *M. hyopneumoniae* 와 *M. hyorhinis* 를 배양하여 양돈에 네블라이저와 점적법으로 투여 실험

돼지에서 마이코플라즈마 감염 실험을 하기 위해서 돼지에 감염실험을 할때 배양액을 어떻게 접종하는가에 따라서 마이코플라즈마 감염여부를 신속하게 알수있다. 그러나, 돼지에 마이코플라즈마를 감염시키는 것은 배양 배지에 접종하는 것보다 작업 과정이 많고, 오랜 시간이 소요되는 어려움이 있다. 따라서 돼지에 마이코플라즈마 세균을 신속하게 감염시킨다면 마이코플라즈마 감염 여부를 신속히 알아낼 수 있을 것이다.

다. 마이코플라즈마 감염 후, swab하여 감염여부 확인 실험

*Mycoplasma hyopneumoniae*를 검출하기 위한 중합효소 연쇄반응은 마이코플라즈마 protein P97 영역을 표적으로 하여 마이코플라즈마 하이오뉴모니에 만을 특이적으로 검출할 수 있는 전방향 프라이머(Forward primer) 5'-TCC AGT CAT ACC AAG GCA GAA ATT-3' (24 mer, 뉴클레오타이드 223070 ~ 223093)와 역방향 프라이머(Rreverse primer) 5'-CGG GCA CTT TGA CTA AGA TCT GC-3' (23 mer, 뉴클레오타이드 222827 ~222849)를 이용하여 PCR을 위해서 1 µl 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/µl), 2.5 µl 10× 반응버퍼, 500 µM 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 µl의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation을 실시 한 후 95°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 2% 아가로즈겔에 전기 영동하여 240 bp의 밴드를 확인하였다.

*Mycoplasma hyohyohrhinis*를 검출하기 위한 PCR은 universal mycoplasmal primers (P1: 5'-ACACCATGGGAGCTGGTAAT-3', P2: 5'-CTTCATCGACTTTCAGACCCAAGGCAT-3)를 이용하여 PCR을 위해서 1 µl 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/µl), 2.5 µl 10× 반응버퍼, 500 µM 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 µl의 반응량이 되

도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation을 실시 한 후 95°C에서 1분, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다. Nested PCR로 *Mycoplasma hyorhinitis* 프라이머 쌍(P1: 5'-CAAGATAAAATCATTTCCT-3', P2:5-AGTAATAGAAAGGAGCTTC-3)을 이용하여 1 µl 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/µl), 2.5 µl 10× 반응버퍼, 500 µM 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 µl의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation을 실시 한 후 95°C에서 1분, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 1.5 % 아가로즈겔에 전기 영동하여 280 bp의 특이 밴드를 확인하였다.

검출된 분리한 마이코플라즈마 세균 DNA를 nucleotide sequences를 model 373A automatic sequencer와 BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom)을 사용하여 직접 분석한다. Sequencing reaction 은 60 ng PCR-amplified DNA, 3.2 pmol의 forward와 reverse primer, 4µl BigDye Terminator RR mix (part no. 4303153; Perkin-Elmer, Applied Biosystems)을 복합하여 사용하였다. 최종 반응양은 증류수를 사용하여 10µl로 맞추었다. 반응은 5% (vol/vol) dimethyl sulfoxide와 함께 수행하며, 30 cycles의 95°C/15 초, 50°C/10 초, and 60°C/4 min 반응을 수행하였다. Sequences는 multiple-alignment algorithm in the MegAlign package (Windows version 3.12e; DNASTAR, Madison, Wis.)를 사용하여 align하여 마이코플라즈마 염기서열을 확인하고, species를 확인하였다.

라. 마이코플라즈마 세균 감염 후, 병리조직 검사로 감염여부 확인 실험

각 개체들을 안락사한 후 부검하여 병변부위가 있는 폐장을 채취하여 10% 포르말린에 고정하고 병리조직 제작을 위한 통상적인 과정을 거쳐 각 조직의 hematoxylin & eosin 염색 슬라이드를 가지고 병리조직검사를 수행하였다. 병리조직검사는 샘플 위치에 따른 변수를 줄이고자 한 개체 당 병변이 보이는 부분중 여러 부위를 각각 제작하여 검사하였다.

마이코플라즈마 야외분리균주를 돼지에 접종한 후 접종유무를 확인하기 위하여 부검시 폐장에서 멸균핀셋과 가위를 사용하여 육안상 마이코플라즈마 병변이 보이는 곳을 잘라 병리조직을 제작하였다.

마이코플라즈마 폐렴의 특징은 폐포 간질의 증식(Thickness of interstitial tissue)과 기관지 주위 임파양조직의 증식(peribronchiolar lymphoid hyperplasia)으로, 검체 9두의 폐장의 병리조직 소견으로 모두 마이코플라즈마 폐렴의 소견을 가지고 있었고 그중에서 Intranasal dropping 방법을 사용한 군에서 폐렴 병변이 가장 심한 것으로 관찰되었다.(Table 5)

표 5. Histopathological findings of pulmonary lesions

Lesions	Sample No.		
	M1	M2	M3
Thickness of interstitial tissue	+	++	+++
Peribrochiolar lymphoid hyperplasia	+	+	++

+: mild, ++: moderate, +++: severe

8. 돼지 마이코플라즈마 야외분리균주 병원성 비교방법 확립 결과

가. 분리 마이코플라즈마 세균 배양 및 계대배양 실험

마이코플라즈마 신속 진단은 그림 6와 같이 Phire® Animal Tissue Direct PCR Kit (Thermo Fisher Scientific Dharmacon Products, Lafayette, CO)를 이용하여 마이코플라즈마 감염 돼지의 폐장의 폐렴 병변 부위 일부를 채취하여 Kit의 tube 안에 넣고 마이코플라즈마 universal primer 쌍과 kit buffer를 넣은 후, 중합효소 연쇄반응을 바로 실시하였다.

Kit에는 Phire Hot Start II DNA Polymerase 200 µl, 2x Phire Animal Tissue PCR Buffer 5 x 1 ml (includes dNTPs and MgCl₂), Universal control primer mix (25 µM each) 40 µl, Dilution Buffer 5 ml, DNARELEASE™ Additive 3 x 100 µl, Gel loading dye 3 x 1 ml, Harris Uni-Core 0.50 mm, Harris Cutting Mat가 포함되어 있다.

Phire® Animal Tissue Direct PCR Kit를 이용하여 별도의 DNA 추출과정이 필요 없이, 순수하게 마이코플라즈마 universal primer 쌍에 기초한 중합효소연쇄반응 시간만 소요되기 때문에 2시간의 PCR 과정을 거쳐 바로 전기영동 하여 가검물로부터 바로 마이코플라즈마 감염 여부를 확인할 수 있다. 별도의 DNA 추출과정이 필요 없는 이유는 kit에 포함되어 DNARELEASE™ Additive의 작용에 의해서 별도의 과정 없이 Thermocycler에서 바로 DNA 추출이 이루어지고 계속하여 중합효소 연쇄반응이 수행되기 때문이다. 또한 DNA binding domain과 함께 특별히 고안된 Phire® Hot Start II DNA Polymerase는 동물조직 내에 다량 존재하는 많은 양의 PCR inhibitors들의 영향을 효과적으로 제거해준다.

마이코플라즈마 신속 진단을 위하여 마이코플라즈마 속(genus) 세균에 특이적인 16s rRNA(ribosomal RNA) 유전자 영역을 표적으로 하는 마이코플라즈마 속(genus)에 속하는 세균을 특이적인 프라이머 쌍을 이용하여 Consensus PCR을 수행하였다.

개발된 프라이머 쌍은 Forward primer[5'-CTC TTT GTA CCG GCC ATT GT-3'(20 mer, 뉴클레오타이드 699283 ~ 699302)]와 Reverse primer[5'-GAA TGA CAG ATG GTG CAT GG-3'(20 mer, 뉴클레오타이드 699478 ~ 699497)]를 사용하였고, 중합효소연쇄반응 PCR을 위한 반응시약의 조성은, 1 µl 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/µl), 2.5 µl 10× 반응버퍼, 500 µM 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 µl의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞어 제조하였다.

중합효소 연쇄반응은 DNA 반응조건은 95°C에서 5분간 프리디내츄레이션(predenaturation)

을 실시 한 후 95°C에서 1 분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서 3분간 포스트폴리머라이제이션(post-polymerization)을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 2% 아가로스젤에 전기 영동하여 특이 밴드의 유무를 확인하였다.

마이코플라즈마 병변이 확인된 도축 돼지 폐장으로부터 폐렴 병소의 조직을 채취하여 마이코플라즈마 direct PCR을 수행한 결과, 여러 도축 돈중 9마리에서만 마이코플라즈마에 특이적인 464 bp의 PCR산물의 증폭을 확인할 수 있었다.

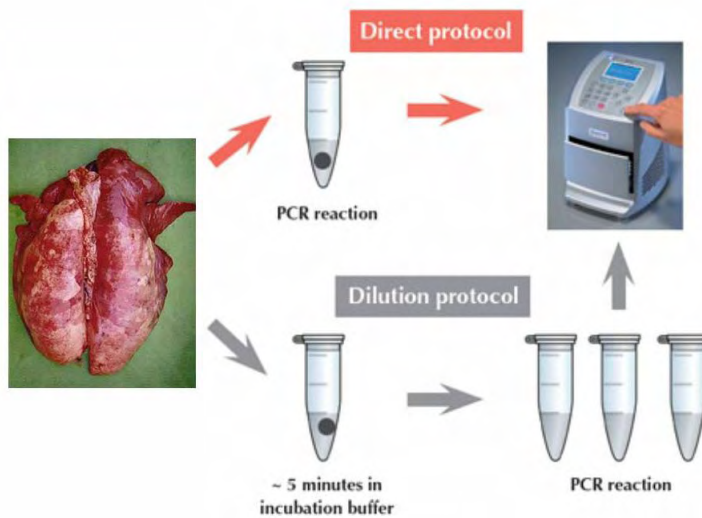


그림 6. 마이코플라즈마 direct PCR 모식도

나. 야외 분리균주 배양 후 돼지에 접종하여 고병원성 야외분리주 분리 및 대양 배양 시스템 확립

마이코플라즈마 병변이 확인된 도축 돼지 폐장으로부터 폐렴 병소의 조직을 채취하여 마이코플라즈마 direct PCR을 수행한 결과, 여러 도축 돈중 9마리에서만 마이코플라즈마에 특이적인 464 bp의 PCR산물의 증폭을 확인할 수 있었다. 확인 WKMH1~WKMH9 균주를 가지고 배지에 접종한 후, 5% CO₂ 농도에서 37°C로 2주 배양하고, 계대 배양은 2번에 걸쳐 추가로 새로운 마이코플라즈마 배지에 접종하여 수행되었다. 배양 동안에 배지 색조의 변화를 기반으로 한 Color Change Unit (CCU)를 주기적으로 관찰 기록하였다. 마이코플라즈마의 증식여부는 배양 배지로부터, DNA를 추출한 후, Mycoplasma universal primer 쌍을 이용한 PCR을 수행하여 결과를 확인하였다.

DNA 추출은 bead beater-phenol extraction method를 사용하였다. 배양된 균주들을 13,000 g에서 30분 동안 원심분리하여 얻은 펠렛 검체를 1 ml 멸균 증류수가 들어있는 Mini-Bead Beater(Biospec product) 전용 2 ml 튜브에 무균 채취하여 세절한 후 멸균 3차 증류수에 부유시킨 glass bead(0.1 mm size, Biospec product) 200 µl와 phenol-chloroform-isoamyl alcohol 용액(50:49:1(v/v/v)) 200 µl를 넣어 Mini-Bead Beater(Biospec product)로 30초간 5,000 rpm으로 진탕하였다. 진탕 후 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액을 멸균 2 ml 튜브에 옮겼다. 3 M 초산나트륨(sodium acetate) 10 µl와 ice-cold 에탄올 250 µl를 넣어 -20°C에서 10분간 정체시킨 후,

15,000rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 침전물은 70% 알코올로 세척하여 실온에서 건조시키고 Tris EDTA(pH 8.0) 60 μ l에 용해시켜 실험에 사용하였다.

중합효소 연쇄반응을 위한 반응시약의 조성은 1 μ l 전방향, 역방향 프라이머 (10 pmol/ μ l), 2.5 μ l 10 \times 반응버퍼, 500 μ M 디옥시뉴클레오타이드, 1.5 U Taq 중합효소를 각각 넣고, 25 μ l의 반응량이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞어 제조하였다.

중합효소연쇄반응은 DNA thermal cycler (PTC-100 Thermocycler; MJ Research, USA)를 이용하여 반응을 실시하였다. 반응조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation을 실시 한 후 94°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분을 30 주기로 시행하고 마지막으로 72°C에서 3분간 post-polymerization을 실시하였다.

중합효소 연쇄반응 산물은 ethidium bromide (0.5 μ g/ml)이 첨가된 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 UV transilluminator에서 464bp의 특이 band를 관찰하였다.

마이코플라즈마 야외 분리 균주를 돼지에 접종한 후에 접종유무를 확인하기 위하여 감염 1주일 후 돼지 비강 swab를 통하여 확인하였다. 확인한 결과 그림 7 과 같이 마이코플라즈마가 감염된 것을 확인 할 수 있었다.

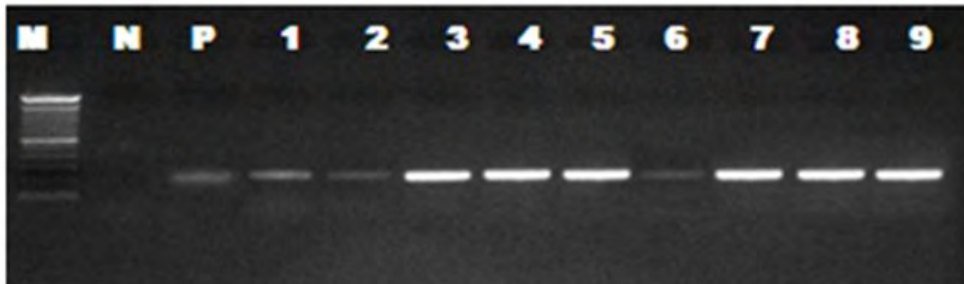


그림 7. DNAs from nasal swab. M: 100bp ladder. N: negative control, P: positive control *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934), 1: WKMH-1, 2: WKMH-2, 3: WKMH-3, 4: WKMH-4, 5: WKMH-5, 6: WKMH-6, 7: WKMH-7, 8: WKMH-8, 9: WKMH-9

마이코플라즈마 야외 분리 균주를 돼지에 접종한 후 접종유무를 확인하기 위하여 부검할 때 폐장에서 멸균된 면봉을 사용하여 균주분리 확인한 결과 그림 8 과 같이 마이코플라즈마가 감염된것을 확인 할 수 있었다.

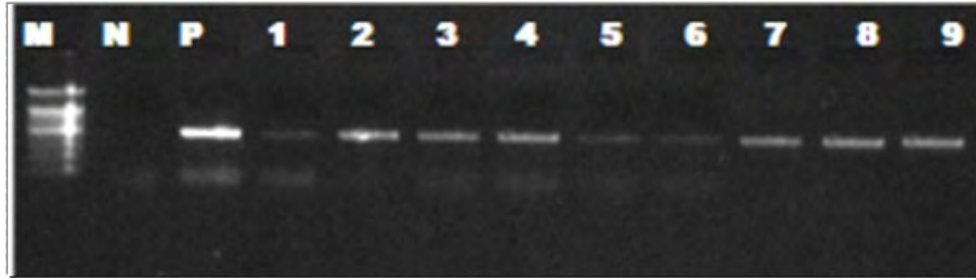


그림 8. DNAs from Lung tissues. M: 100bp ladder. N: negative control, P: positive control *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934), 1: WKMH-1, 2: WKMH-2, 3: WKMH-3, 4: WKMH-4, 5: WKMH-5, 6: WKMH-6, 7: WKMH-7, 8: WKMH-8, 9: WKMH-9

다. 마이코플라즈마 감염 후, 병리조직 검사로 감염여부 확인 실험

각 개체들을 안락사한 후 부검하여 병변부위가 있는 폐장을 채취하여 10% 포르말린에 고정하고 병리조직 제작을 위한 통상적인 과정을 거쳐 각 조직의 hematoxylin & eosin 염색 슬라이드를 가지고 병리조직검사를 수행하였다. 병리조직검사는 샘플 위치에 따른 변수를 줄이고자 한 개체 당 병변이 보이는 부분중 여러 부위를 각각 제작하여 검사하였다.(그림 9)

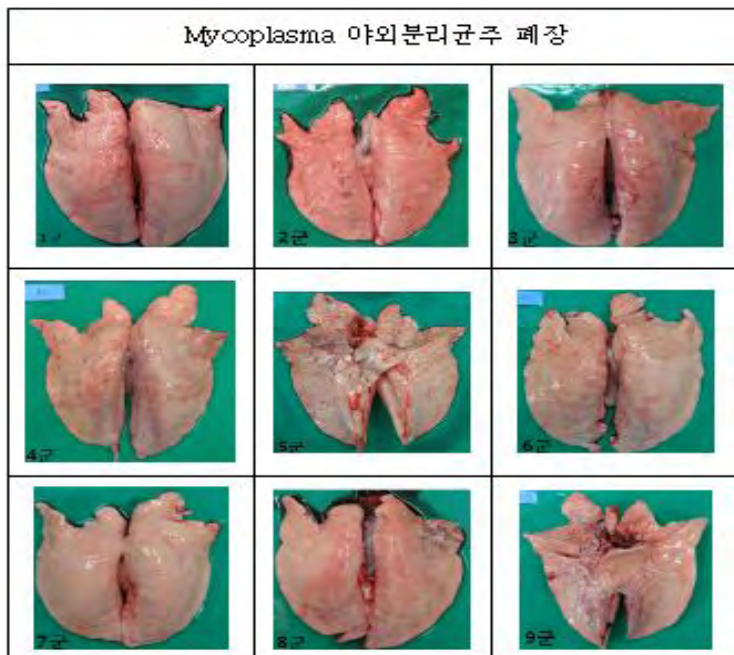


그림 9. 마이코플라즈마 야외분리균주 폐장

마이코플라즈마 야외 분리 균주를 돼지에 접종한 후 접종유무를 확인하기 위하여 부검시 폐장에서 멸균핀셋과 가위를 사용하여 육안적으로 마이코플라즈마 병변이 보이는 곳을 잘라 병리조직을 제작한 결과 9번군에서 마이코플라즈마 세균 감염이 가장 많이 된 것을 확인 할 수 있었다.

마이코플라즈마 폐렴의 특징은 폐포 간질의 증식(thickness of interstitial tissue)과 기관지

주위 임파양조직의 증식(peribrochiolar lymphoid hyperplasia)으로, 검체 9두의 폐장의 병리조직 소견으로 모두 마이코플라즈마 폐렴의 소견을 가지고 있었고 그중에서 9번 균주에서 폐렴 병변이 가장 심한 것으로 관찰되었다.(그림 10)

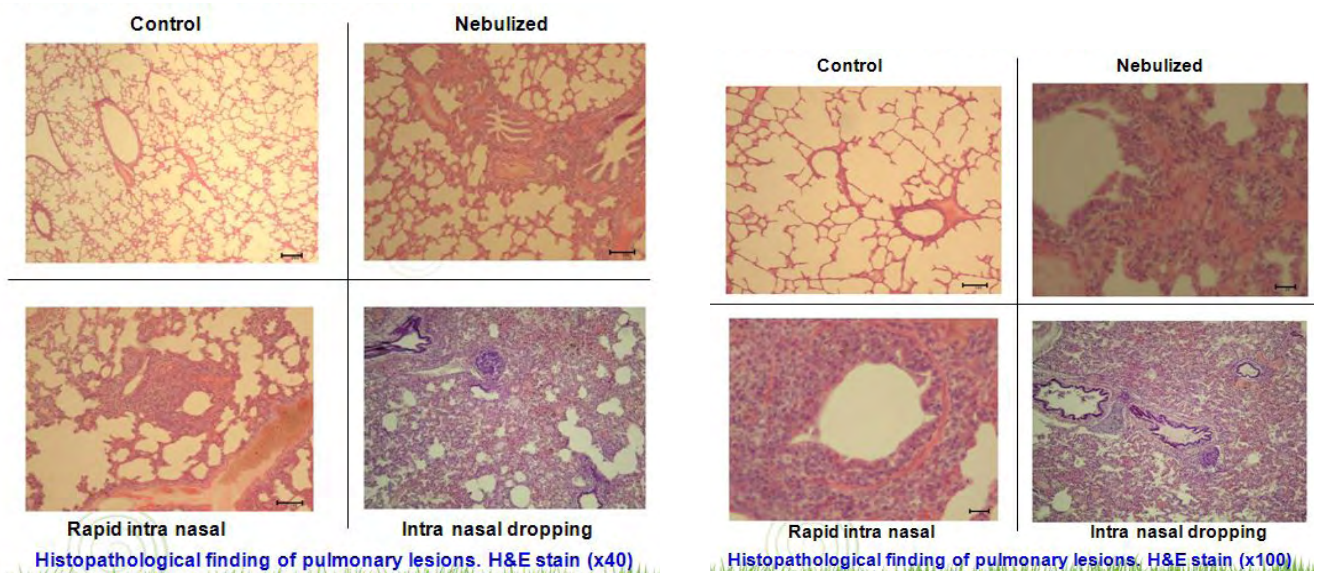


그림 10. 마이코플라즈마 야외 분리 균주 폐장 병리조직 (x40)

9. 마이코플라즈마 단일백신의 효능 평가 실험 결과

가. ELISA 항체 검사

백신군과 대조군 모든 개체를 백신 접종 전(3주령)과 백신 접종 후 14일, 28일, 42일 후에 채혈하고 혈청 내 마이코플라즈마에 대한 IgG 형성 수준을 ELISA를 통해 측정하였다. 대조군의 경우 항체 형성이 실험 종료 할 때까지 나타나지 않았다. 백신군의 경우 백신 접종 14일 후부터 항체가 생성되기 시작하여 백신 접종 28일 후 가장 높게 나타났으며 실험이 종료되는 백신 접종 42일 후부터 감소되는 것으로 나타났다(그림 1).

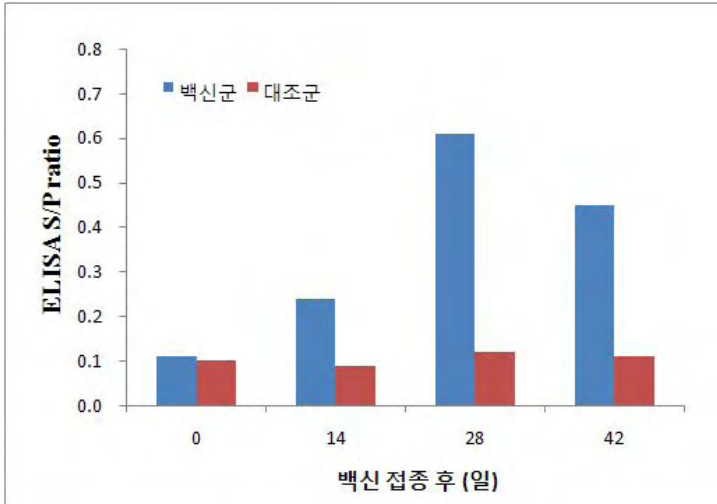


그림 1. 각 군별 마이코플라즈마 IgG 생성 수준.

나. 마이코플라즈마 특이 임파구 자극 시험 결과

분리된 세포의 마이코플라즈마 항원 자극에 대한 반응 결과, 백신군의 경우 백신 접종 후 14일 후부터 임파구 자극반응이 증가하기 시작하여 백신 접종 후 42일까지 유지가 되었으며 모든 시기에 대조군에 비하여 유의성을 보이며 반응이 높게 나타났다($P < 0.05$).

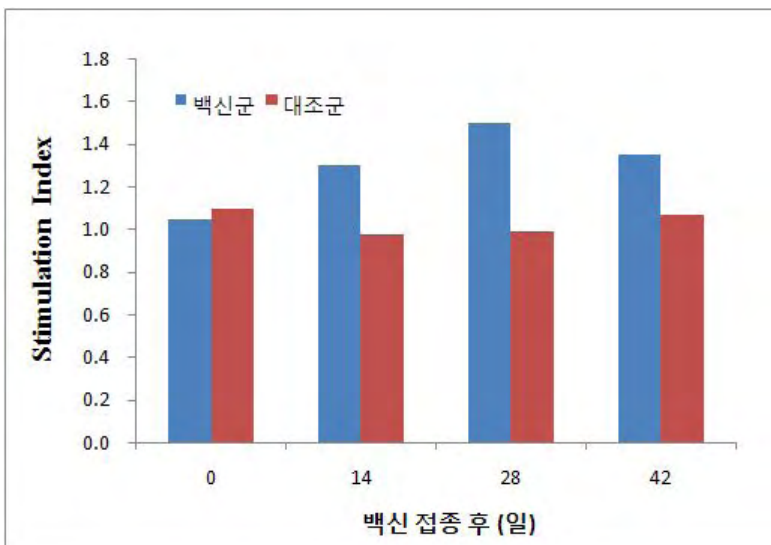


그림 2. 백신 접종 후 임파구 자극 반응 결과 비교.

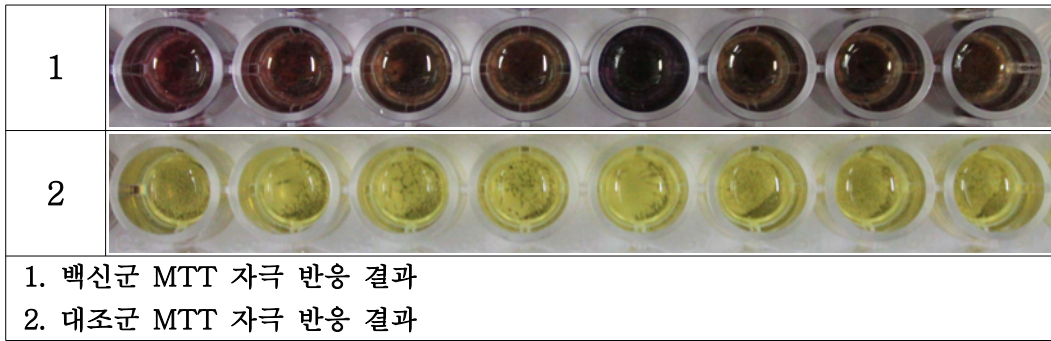


그림 3. 임파구 MTT 자극 반응 결과

다. IFN- γ 분비 세포 수 측정

IFN- γ 분비세포 개수를 측정하여 백신 접종 후 IFN- γ 분비 세포 변화 양상을 확인하였다. 대조군에서 채취한 말초혈액 단핵구(PBMC)의 경우 모든 실험 시점에서 마이코플라즈마 항원에 대한 자극에 반응이 없는 것으로 확인되었다. 백신군의 경우 백신 접종 후 14일부터 증가되기 시작하여 실험이 종료되는 백신 접종 후 42일까지 높은 수준을 유지하는 것으로 나타났다(그림 4).

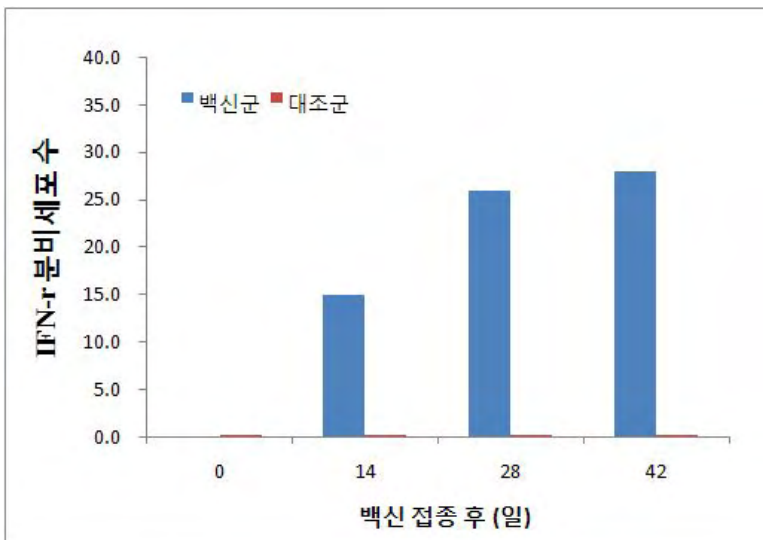


그림 4 . IFN- γ 분비세포 수

라. 지연형 과민반응(delayed type hypersensitivity) 측정

피내 항원 주입을 통해 면역 반응을 측정된 결과, 백신 접종 후 2주가 지난 백신군의 경우 대조군과 유의성을 보이며 반응이 높게 나타났다($P < 0.01$). 백신군의 경우 백신 접종 36시간 후 가장 높게 나타났으며, 피부에 발적과 함께 용기가 관찰되었다(그림 9).

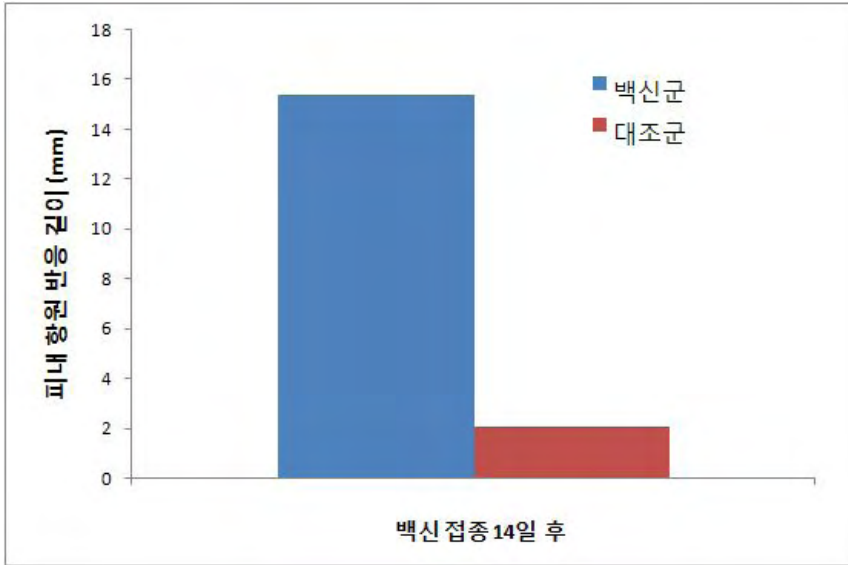


그림 8. 백신 접종 14일 후 DTH 반응 비교

10. 돼지 썬코바이러스와 마이코플라즈마균 복합백신의 공격접종을 통한 효능 검사 결과

가. 항체 형성능 확인 실험 결과

돼지 썬코바이러스 2형 항체가 비교에서는 백신 접종 전인 3주령에서는 백신군과 대조군 사이에 항체의 유의성이 나타나지 않았다. 백신군의 경우 백신 접종 후 4주가 지난 7주령부터 항체가 생성되어 실험이 종료되는 11주령까지 높게 유지되었고 대조군에 비해 유의성 있게 높은 것으로 나타났다($P < 0.05$).

마이코플라즈마균에 대한 항체 수준에서 백신 접종 후 4주 후부터 항체 수준이 증가되었고, 공격 접종 후 4주가 지난 11주령까지 증가하는 양상을 보였으며 유의성을 나타내며 대조군에 비하여 높은 항체를 유지하였다. ($P < 0.05$).

표 1. 각 군별 돼지 쉐코바이러스 2형 항체 형성가 비교

실험 구분	공시 두수	연령 별 항체가 값 (평균±표준편차)			
		3주령	7주령	9주령	11주령
백신군	5	151±89	948±219	1,512±263	1,321±203
대조군	3	211±104	269±121	486±109	812±181
유의성 (P value)		P=1.00	P<0.01	P<0.01	P<0.05

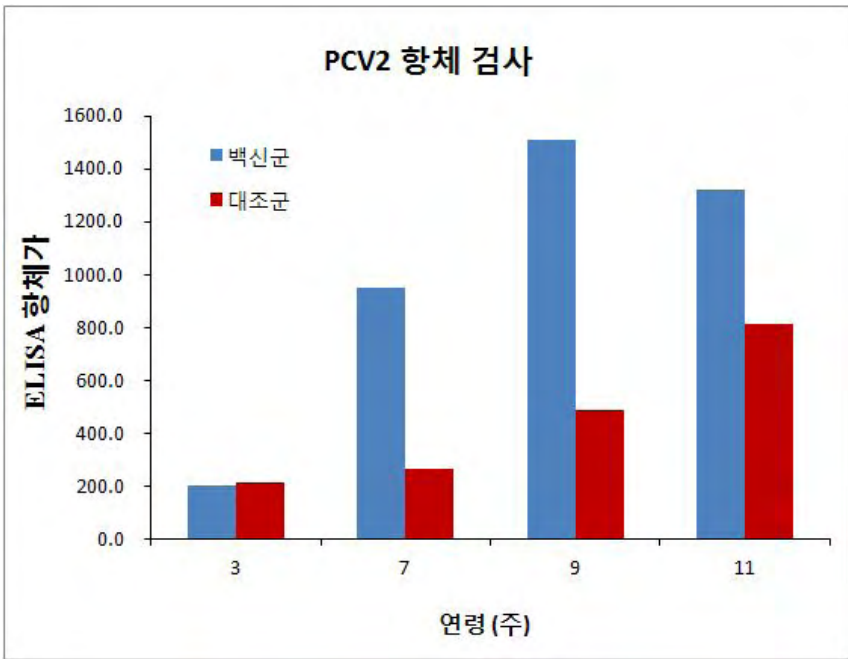


그림 1. 돼지쉐코바이러스 2형에 대한 항체가 형성 수준

표 2. 각 군별 마이코플라즈마 항체 형성가 비교

실험 구분	공시 두수	연령 별 ELISA S/P 값 (평균±표준편차)			
		3주령	7주령	9주령	11주령
백신군	5	0.082±0.031	0.332±0.115	0.349±0.141	0.612±0.184
대조군	3	0.104±0.042	0.113±0.064	0.181±0.122	0.318±0.135
유의성 (P value)		P=1.00	P=0.05	P=0.013	P<0.05

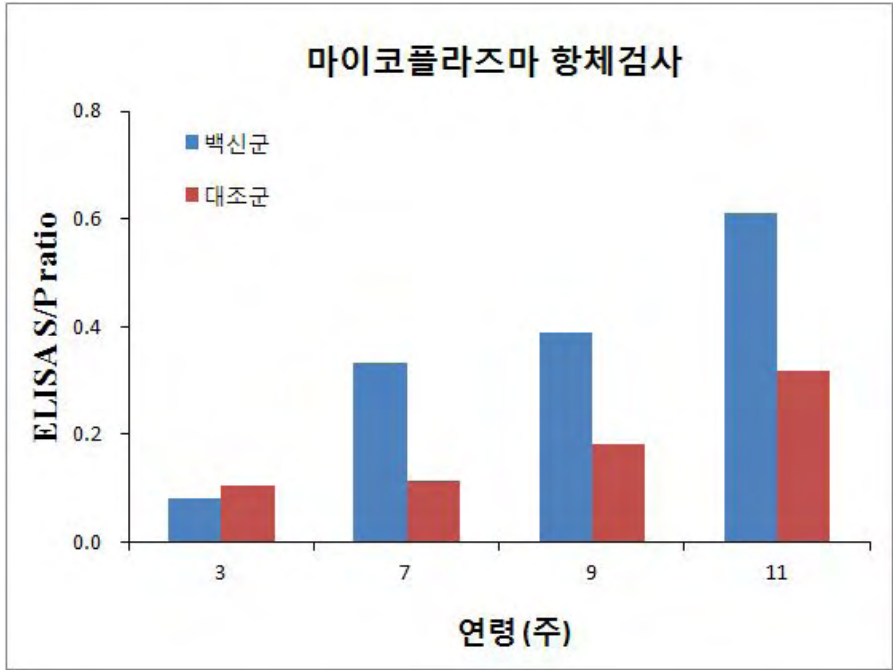


그림 2. 마이코플라즈마 항체가 형성 수준

나. 마이코플라즈마 특이 임파구 자극 시험 결과

분리된 세포의 마이코플라즈마 항원 자극에 대한 반응 결과, 백신군의 경우 백신 접종 후 4주 후인 7주령부터 임파구 자극반응이 증가하기 시작하여 공격 접종 후 4주가 지난 11주령까지 높게 유지 되었으며 7주령부터 11주령까지 대조군에 비하여 유의성을 보이며 반응이 높게 나타났다($P < 0.05$).

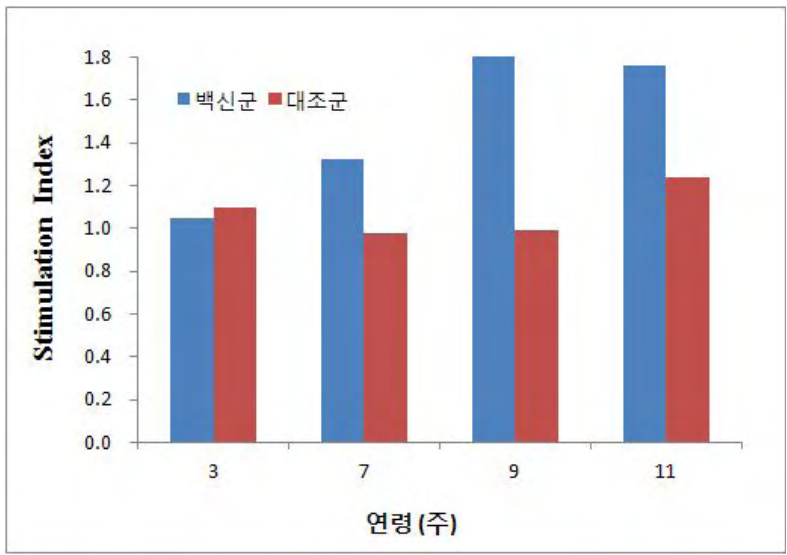


그림 3. 임파구 자극 반응 비교

다. 돼지썩코바이러스 2형 및 마이코플라즈마 특이 IFN- γ 분비세포 측정결과

분리된 세포의 돼지 썩코바이러스 2형 항원 자극에 대한 IFN- γ 분비세포 수의 변화를 보면 먼저 백신군의 경우 백신 접종 4주 후인 7주령부터 백신에 대한 반응으로 증가하기 시작하여 공격접종 2주가 지난 7주령에 가장 높게 나타나고 그 후에 감소하는 양상을 나타냈으며, 7주와 9주령에 대조군에 비하여 유의성을 보이며 높게 나타났다($P < 0.05$). 마이코플라즈마 항원 자극에 대한 반응 결과에서는 백신 접종 후 4주 후인 7주령부터 IFN- γ 분비세포가 증가하기 시작하여 공격 접종 후 4주가 지난 11주령까지 점차 증가하는 양상을 보였으며 7주령부터 11주령까지 대조군에 비하여 유의성을 보이며 세포수가 높게 나타났다($P < 0.05$).

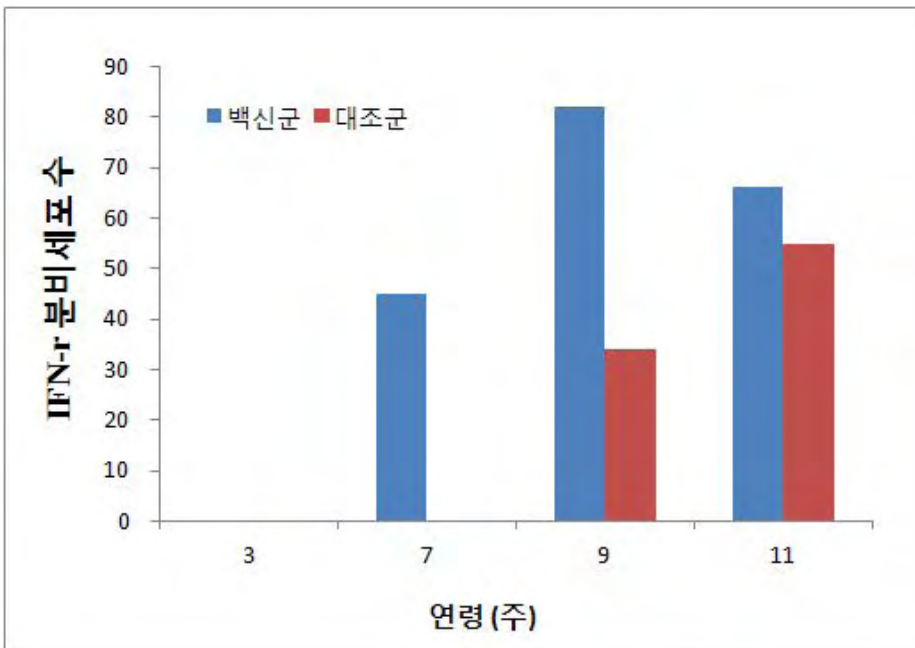


그림 4. 각 군의 돼지 썩코바이러스 2형의 특이적 IFN- γ 분비세포 수 비교

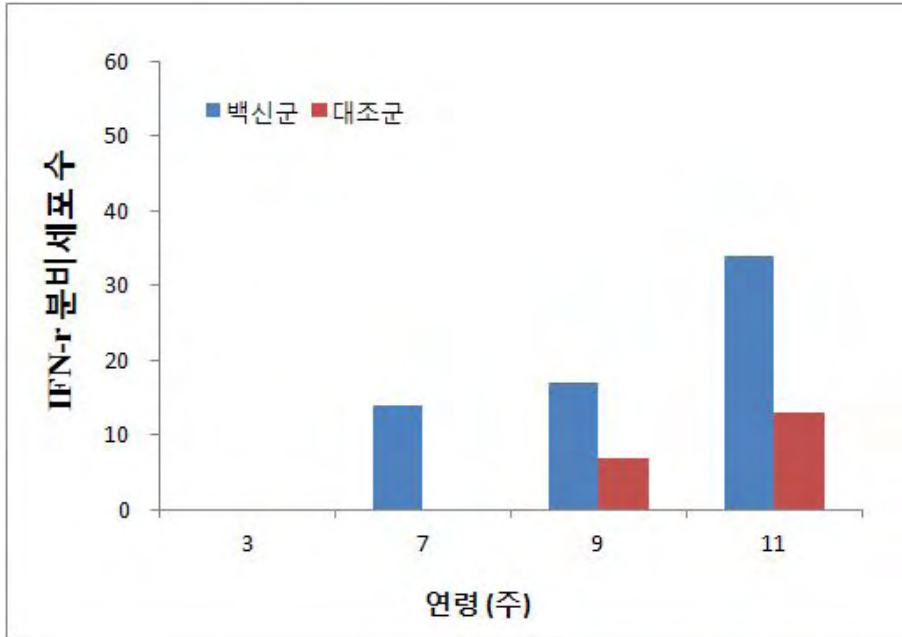


그림 5. 각 군의 마이코플라즈마 특이적 IFN- γ 분비세포 수 비교

라. 병리조직학적 병변 형성 비교

(1) 돼지 쉐코바이러스 2형에 의한 임파절 병변 분석

복합백신을 접종한 백신군의 경우 5두 중 3두에서 특이적인 병변이 나타나지 않았으며(스코어 0), 나머지 2두는 약한 림프구 소실(스코어 1)을 나타냈다. 대조군의 경우 3두 중 1두에서 림프소절의 심한 림프구 소실을 보였으며(스코어 3), 나머지 2두에서는 림프소절 등 전체적으로 매우 심한 림프구 소실을 나타냈다(스코어 4). 백신군과 대조군의 병변 정도 차이는 교차분석을 통해 각 병변 스코어의 빈도를 분석하여 유의성을 측정하였다. 그 결과 전체적으로 백신군은 대조군에 비하여 서혜 임파절 병변이 유의성($P < 0.01$)을 보이며 낮게 나타났다(표 6).

표 3. 각 군별 서혜 임파절 병변 스코어

개체번호	백신군	대조군
1	0	4
2	1	4
3	0	3
4	1	-
5	0	-
평균 ± 표준편차	0.40±0.55	3.67±0.58
유의성 (P value)	P<0.01	

(2) 마이코플라즈마에 의한 폐장 병변 분석

마이코플라즈마에 의한 병변 정도에 따라 점수를 측정한 결과 백신군의 경우 공시돈 5두 중 3두에서는 병변 소견이 나타나지 않았으며(스코어 0), 1두에서는 일부에서 기관지 주위에 약한 림프구 증식 소견이 관찰되었고(스코어 1), 나머지 1두에서는 일부에서 기관지 주위에 약한 림프구 증식과 함께 기관지염이 관찰되었다(스코어 2). 대조군의 경우 공시돈 3두 중 2두에서는 다발적으로 기관지 주위 림프조직의 증식이 관찰되었고(스코어 3), 나머지 1두에서는 기관지 상피세포의 괴사와 기관지 주위 림프조직의 증식, 폐포 허탈 등이 관찰되었다(스코어 4). 병변 점수 결과, 백신군은 대조군에 비하여 유의성을 보이며 전체적으로 병변이 적게 관찰된 것으로 확인되었다(P<0.01)

표 4. 각 군의 폐렴 병변 점수 비교

개체번호	백신군	대조군
1	0	3
2	1	3
3	2	4
4	0	-
5	0	-
평균 ± 표준편차	0.60±0.89	3.33±0.57
유의성 (P value)	P<0.01	



특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1279395 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2011-0083293 호
	출원일 (FILING DATE:YY/MM/DD)	2011년 08월 22일
	등록일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD)	2013년 06월 21일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)

마이코플라즈마 하이오라이니스를 검출하기 위한 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 이용한 마이코플라즈마 하이오라이니스 검출키트, 및 상기 프라이머 세트를 이용한 돼지 유행성 폐렴 진단키트

특허권자 (PATENTEE)

원광대학교산학협력단(214971-0*****)
전북 익산시 신용동 344-2

발명자 (INVENTOR)

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2013년 06월 21일



특 허 청 장 김 영

COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



연차등록료 납부일은 설정등록일 이후 4년차부터 매년 06월 21일까지이며 등록원부로 권리관계를 확인바랍니다.



특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1279396 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2011-0083275 호
	출원일 (FILING DATE:YY/MM/DD)	2011년 08월 22일
	등록일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD)	2013년 06월 21일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)

마이크플라즈마를 검출하기 위한 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 이용한 마이크로플라즈마 검출 방법 및 키트

특허권자 (PATENTEE)

원광대학교산학협력단(214971-0*****)
전북 익산시 신용동 344-2

발명자 (INVENTOR)

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2013년 06월 21일



특 허 청 장 김 영

COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



연차등록료 납부일은 설정등록일 이후 4년차부터 매년 06월 21일까지이며 등록원부로 권리관계를 확인바랍니다.

제 8 장 백신 제조 기술 및 대량 생산 공정 연구

제 1 절 서 설

돼지 쉰코바이러스 2형(이하 쉰코바이러스) 단일백신과 홍막폐렴 복합 백신 제품화를 위하여 본 세부과제에서는 백신의 상품화를 위한 기초 연구에 주력하였다. 가장 중점을 두고 연구한 것은 백신주의 배양 방법 확립 및 scale up을 통한 대량 배양 생산 체계 확립이었고, 이를 위하여 1년차 연구 과제에서는 쉰코바이러스 종독주 및 PK-15 세포주를 확립하였으며, 2년차 연구 과제에서는 이를 분리 정제하기 위한 공정을 성공적으로 확립하였다. 홍막폐렴균 세균의 경우, 2형과 5형 혈청형에 대하여 flask 배양을 통한 성장 특성 확인이 선행되었으며, 그 후 퍼멘터 배양을 통한 scale up을 진행하였다. 더불어 adjuvant 선정 시험과 백신 복합 공정 연구를 통하여 백신의 조성 결정 및 제조 공정의 표준화를 위한 준비를 진행하였다. 마지막 3차년도 연구과제에서는 이미 확립된 배양 조건하에서 산업화를 위한 대량 생산 공정 연구가 주가 되었으며, 돼지 쉰코바이러스의 경우 cell factory, roller bottle, microcarrier 배양 방법을 통한 연구를 수행하였고, 최종적으로 roller bottle 배양법을 선택하였으며, 홍막 폐렴균의 경우 계획했던 대로 퍼멘터 배양을 통해서 백신 조성에 필요한 충분한 양의 균체를 확보할 수 있었다. 결론적으로, 3년에 걸친 단계적 연구를 통해서 돼지 쉰코바이러스 및 홍막폐렴균의 대량 생산 공정 확립에 성공하였으며, 이를 바탕으로 돼지 쉰코바이러스 단일 백신 및 홍막폐렴균과의 복합 백신 산업화를 위한 기술적 토대를 마련할 수 있었다.

제 2 절 재료 및 방법

1. PK-15 세포주 및 바이러스 종독의 seed lot 확립 및 배양기술 확립

돼지 썬코바이러스 사독백신의 경우, 1두 당 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 이상의 바이러스를 함유하도록 되어 있다. 1두당 1 ml의 백신을 접종한다고 할 때, 생산 시 요구되는 바이러스의 농도는 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml 이상이다. 돼지 썬코바이러스 사독백신의 경우에도 기준을 1두당 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml 이상으로 설정하고, 원하는 농도의 돼지 썬코바이러스를 얻기 위해서는 어떠한 배양 조건이 필요한지 실험하였다. 구체적으로, PK-15 세포주에 돼지 썬코바이러스형을 서로 다른 MOI(multiplicity of infection)로 접종하여, 얻어지는 돼지 썬코바이러스의 titer를 확인하였다. 실험은 75T 플라스크에서 배양된 PK-15 세포를 사용하였으며, 플라스크 당 3×10^6 개의 PK-15 세포를 seeding 하고, 3일이 경과 후 세포가 플라스크에 mono-layer 되면, 돼지 썬코바이러스 2형을 각각 MOI 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 로 설정하여 세포에 접종하고 CPE를 관찰하였다.

2. 돼지 썬코바이러스의 정제 기술 확립

가. 실험 목적

백신 제조에 사용되는 돼지 썬코바이러스의 whole virus는 세포배양을 통해 대량으로 배양되어 항원으로 사용되게 된다. 일반적으로 세포배양에 사용되는 배지는 각종 amino acid를 비롯한 화학적으로 규명된 영양소가 주성분인 media 와 세포 증식에 필수적인 소태아혈청 (fetal bovine serum)이 5~10% 첨가되어 사용되고 있다. 바이러스 배양이 완료된 후 harvest 과정에서 바이러스 항원을 제외한 다른 성분은 대부분 면역반응과는 관련 없는 불순물로 충분히 제거되지 않을 경우 백신 접종에 의한 부작용과 백신의 효능에 영향을 미치게 된다. 이러한 이유로 인해 최근 백신 제조시 항원만을 분리 정제하기 위한 여러 가지 공정이 개발 사용되고 있다. 바이러스 항원을 분리정제 하기 위한 대표적인 방법으로는 초원심분리, 액체크로마토그래피, 투석 등의 방법이 있으나 고가의 공정으로 동물백신 제조에 그대로 적용하기에는 문제점이 있다.

돼지 썬코바이러스는 지금까지 밝혀진 바이러스 중 가장 작은 바이러스 중 하나로 바이러스의 직경은 대략 20 nm 정도이고 capsid protein으로 만들어진 바이러스 coat를 가지고 있으며 envelop는 없는 바이러스 이다. 유전자는 double strand DNA로 약 1.5 kb 정도이다. 따라서 초원심 분리와 액체크로마토그래피 등의 공정을 이용한 정제 공정을 적용하기에는 어려움이 있을 것으로 판단된다. 썬코바이러스 정제를 위한 공정은 harvest 후 원심 분리를 통한 cell debris 제거, 그리고 microfiltration 과 ultrafiltration 공정을 이용한 정제 및 농축 과정을 이용해 정제 하고자 한다.

나. 실험 방법

썬코바이러스 배양 후 세포 배양체를 제거하기 위해 원심분리를 실시한다. (7,000 g , 30분), 원심분리 후 상층액은 cross-flow filtration system 을 이용하여 microfiltration(membrane pore size 0.2 μ m)을 실시한다. Microfiltration이 끝난 permeate 용액은 ultrafiltration 공정을 통해 농축한다. Ultrafiltration 공정에 사용되는 membrane의 cut-off size는 molecular cut off size로서 5, 10, 50 kDa 을 사용하여 최적의 membrane을 선정할 것이다.

공정 중 썬코바이러스의 정제도와 농축 정도는 바이러스 정량은 sandwich ELISA 방법을 사용하였으며 사용된 ELISA kit는 Synbiotech사의 SERELISA[®]PCV2 Antigen capture ELISA 를 사용하였으며 양성 대조군은 썬코바이러스의 ORF2 단백질을 사용하였다.

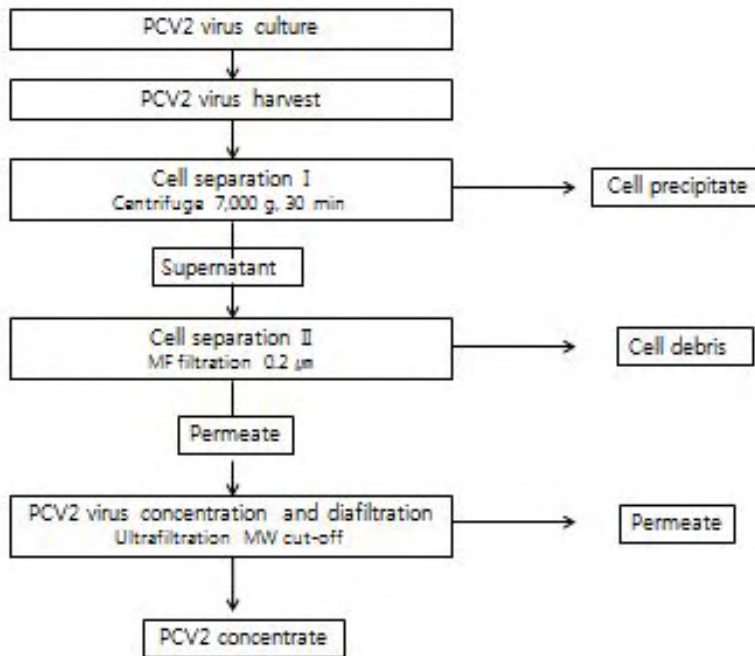


그림 1. 돼지 썬코바이러스 정제 및 농축 공정 흐름도

3. 흉막폐렴 항원 정제기술 확립

가. 실험 목적

그람 음성균(gram negative)을 이용한 백신제조에 사용하는 경우 LPS(lipopolysaccharide) 오염으로 인한 부작용이 가장 큰 위험 요소 중에 하나다. LPS는 그람 음성균의 외막에 존재하

는 분자로 세포벽에서 유리되었을 경우 독성을 보여준다. LPS의 lipid A 부분이 실제 독성을 나타내는 부위로 정상적인 경우 세포막의 안쪽에 위치하여 있다가 세포막이 분해되거나 세균이 증식하는 과정중에 배양액으로 유리되게 된다. LPS 분자는 평균 분자량이 10-30 kDa 사이의 분자로 saccharide 부위와 Lipid 부위가 공존하는 분자이다

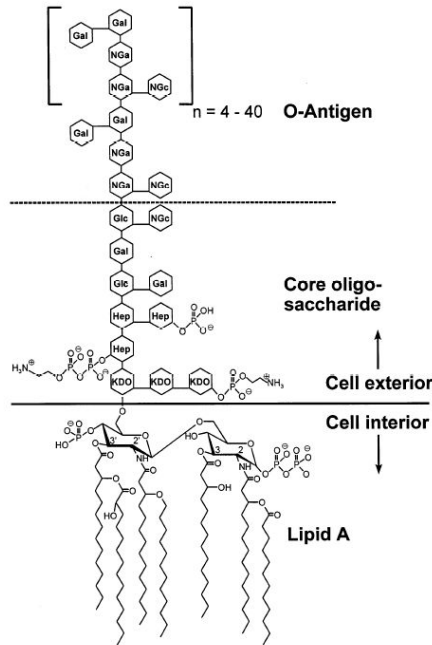


그림 2. LPS의 분자구조

LPS 분자의 특성에 의해 LPS는 단일 분자로 존재하기 보다는 수용액상에서 다양한 형태의 구조를 가지게 된다.

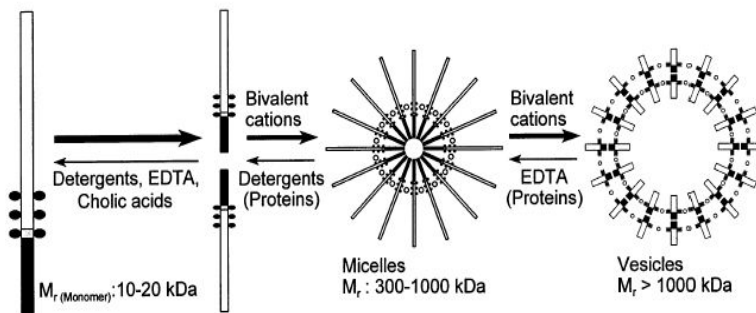


그림 3. 수용액상에서 LPS 분자의 결합 구조>

소수성 부위를 중심으로 하는 micelles구조 또는 세포 형태와 유사한 vesicle형태를 보여주기 도 한다. 이러한 특성으로 인해 배양액으로 방출된 LPS는 쉽게 제거되지 않고 백신제조에 들어갈 경우 여러 가지 부작용을 나타내게 된다.

홍막폐렴균(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)은 그람 음성균으로써 Whole bacteria 항원을 이용하여 백신이 제조되게 된다. 본 실험을 통해 박테리아 배양 후 배양액에 잔류하는 배지 성분, 대사 성분, 그리고 박테리아 세포벽에서 유리되는 LPS를 제거하여 백신의 효능과 부작용을 개선하고자 한다.

나. 실험 방법

홍막폐렴균 혈청형 2형 균주를 Tryptic soy broth에서 배양하여 일반적인 원심 방법과 연속 원심분리기를 이용하여 균체를 수집하고 수집된 균체를 다시 PBS buffer에 부유하여 cross-flow filtration 방법을 이용하여 diafiltration을 수행하여 LPS 제거율을 실험하였다. 샘플의 LPS 농도 측정은 limulus amebocyte lysate (LAL) test 방법을 이용하여 측정하였다. Cross-flow filtration은 0.2 µm pore size의 membrane filter를 이용하여 diafiltration 방식으로 수행하였으며 buffer exchange volume은 filtration초기 샘플의 volume을 기준으로 동량의 buffer가 permeate로 배출된 경우 1회 buffer exchange로 결정하였다. LPS의 특성 상 박테리아 세포에 영향이 없는 detergent를 이용한 LPS 제거 효율도 측정하였다.

(1) Diafiltration 공정을 통한 LPS의 제거

원심분리 공정을 통해 수집된 세균항원을 이용하여 투석여과 방법을 통해 LPS 제거 시험을 실시하였다.

4. 돼지 썬코바이러스 단일백신과 홍막폐렴 복합백신 제조 기술 확립

가. Adjuvant 후보 물질에 대한 효능 증대 효과 확인 및 adjuvant 선정

불활화 백신의 경우 생백신보다 효능 측면에서 약점을 가지고 있기 때문에 이를 보완하기 위한 안전하고 효능이 뛰어난 adjuvant 선정이 매우 중요하다. 사용 가능한 adjuvant 중 IMS1313 oil adjuvant, aluminum hydroxide gel 그리고 Carbopol 971P NF의 세 가지 후보를 선정하여 시험백신을 제조한 후 각각의 항체 형성능을 비교하여 최적의 adjuvant를 선정하고자 하였다.

(1) 시험백신의 제조

아래 표와 같이 시험백신을 제조하였다. 1회 용량은 1 ml 이며, 사용되는 adjuvant의 종류 및 volume에 따라서 시험 백신 1 ml 당 홍막폐렴균 혈청형 2형, 홍막폐렴균 혈청형 5형이 각각 1×10^9 CFU/ml 씩 포함되며, 돼지 썬코바이러스의 whole virus 항원이 Real Time PCR Threshold Cycle 값으로 14.5 이하 함유되도록 시험 백신을 제조하였다.

시험 백신	백신의 조성 (ml 당)	부형제 종류	부형제 함량
A	<ul style="list-style-type: none"> <i>A.pleuropneumoniae</i> type 2 (1×10^9cfu) <i>A.pleuropneumoniae</i> type 5 (1×10^9cfu) 	IMS 1313 oil	30%

B	• PCV2 whole virus (Ct값 14.5 이하)	Aluminium hydroxide gel	10%
C		Carbopol 971P NF	2 mg/ml

<시험 백신의 조성 및 부형제 함량>

(2) 효능 확인 실험

세균과 바이러스의 복합 백신이라는 특성 때문에 부형제에 따른 효능 시험은 각각의 항원에 대하여 감수성을 지니는 서로 다른 실험동물을 대상으로 실시하였으며, 복합 백신 A, B, C를 각각 토끼와 기니픽에 접종한 후, 토끼에서는 부형제에 따른 흉막폐렴균에 대한 항체가 변화를, 기니픽에서는 부형제에 따른 썬코 바이러스에 대한 항체가 변화를 관찰하였다. 이들 결과를 참고하여 가장 항체형성능이 뛰어난 adjuvant를 최종적으로 선정하였다.

① 썬코바이러스에 대한 기니픽 효능 시험

면역원성 시험은 국가검정기준을 참고하여 진행하였으며, 각각의 그룹 당 실험군 4마리와 대조군 2마리를 실험동물로 사용하였으며, 실험군에는 백신 1두 분을 근육접종 하였다. 접종 4주후에 채혈을 실시하여 돼지 썬코바이러스에 대한 ELISA 항체가를 측정하였다.

② 흉막폐렴균에 대한 토끼 효능 시험

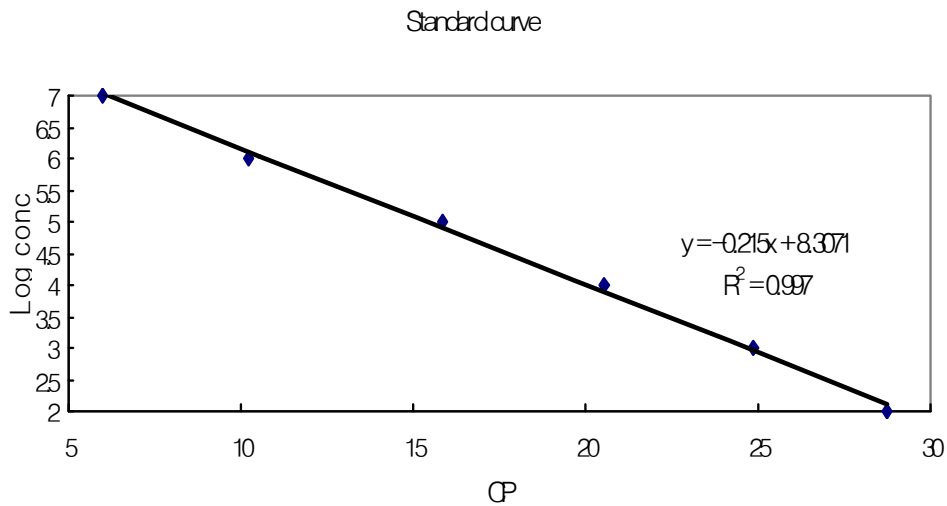
흉막폐렴균 혈청형 2형과 5형에 대한 항체가 시험은 감염되지 않은 1.5~2.0 kg의 건강한 토끼를 사용하였고, 그룹 당 실험군 4마리와 대조군 2마리를 사용하였고, 실험군에는 백신 1두 분 용량을 1회 근육 접종하였다. 접종 2주 후에 각각 채혈하여 흉막폐렴균 혈청형 2형과 흉막폐렴균 혈청형 2형에 대한 항체가를 ELISA법으로 측정하였다.

나. 흉막폐렴균 항원과 돼지 썬코바이러스 2형 항원간의 간섭 현상 확인을 위한 면역원성 시험

(1) Real-time PCR 을 이용한 돼지 썬코바이러스 항원량 결정 시험

Real time PCR에 의한 Threshold cycle 값과 돼지 썬코바이러스의 whole virus 항원의 함량 사이의 관계를 실험을 통하여 standard curve로 아래와 같이 나타내었다.

	CP	Conc.	Log conc.
Standard-1	28.74	100	2
Standard-2	24.87	1000	3
Standard-3	20.54	10000	4
Standard-4	15.87	100000	5
Standard-5	10.24	1000000	6
Standard-6	5.99	10000000	7



위의 그래프를 기준으로 하여 면역에 충분한 시험백신 내 돼지 쉼코바이러스의 함량을 결정하기 위해서 기니픽을 이용한 시험을 실시하였다.

① 시험동물의 선정 및 방법

체중 300~350 g 의 기니픽을 각각 4마리씩 총 6개의 그룹을 준비한 후, 시험백신을 접종하기 전에 전채혈을 통하여 돼지 쉼코바이러스 음성 여부를 확인한다. 또한, 그룹의 분류는 Ct 값에 따라 13, 13.5, 14, 14.5, 15, 15.5 의 6그룹으로 나누며, 각각의 시험백신을 기니픽에 1회 접종하고 4주 후에 항체가를 구하고자 하였다.

• ELISA의한 혈청 역가시험

- a. 돼지 쉼코바이러스에 대한 특이 항체를 5~10 $\mu\text{l/ml}$ 로 coating buffer에 희석하여 100 μl 씩 ELISA plate에 분주하고 37°C에서 2시간 흡착한다.
- b. 항원이 흡착된 ELISA plate를 PBS-T로 3회 세척한다.

- c. Blocking buffer 200 μ l씩 모든 well에 넣고 37°C에서 2시간 반응시킨다.
- d. Plate를 3회 세척한다.
- e. 돼지 썬코바이러스 항원을 PBS로 10배~20배 희석한 뒤 모든 well에 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨다.
- f. Plate를 3회 세척한다.
- g. 항원이 감작된 plate에 검사시료(혈청)을 dilution buffer를 이용하여 1:50으로 희석하여 well에 분주한 후 37°C에서 1시간 반응시킨다.
- h. Washing buffer로 5회 세척하고 dilution buffer로 희석된 anti-GP IgG HRP conjugate를 100 μ l씩 첨가한 후 37°C에서 1시간 반응시킨다.
- i. Plate를 5회 세척한다.
- j. 100 μ l OPD substrate를 각 well에 분주하고 실온에서 10분간 반응시킨다.
- k. 50 μ l stop solution을 첨가 한 후 492 nm에서 흡광도를 측정한다.

② ELISA 검사 결과

기니피그 혈청을 이용한 ELISA 검사는 (주)제노바이오텍의 PCV2 ELISA kit를 이용하였으며, 혈청의 희석배수를 이용하여 항체가를 표시하였다.

- 기니피그 각 그룹의 개체별 ELISA antibody titer

No. of guinea pigs	A group (Ct 13)	B group (Ct 13.5)	C group (Ct 14)	D group (Ct 14.5)	E group (Ct 15)	F group (Ct 15.5)
1	20480	20480	20480	20480	2560	1280
2	40960	20480	10240	40960	5120	2560
3	40960	40960	40960	20480	2560	5120
4	20480	20480	20480	20480	2560	1280

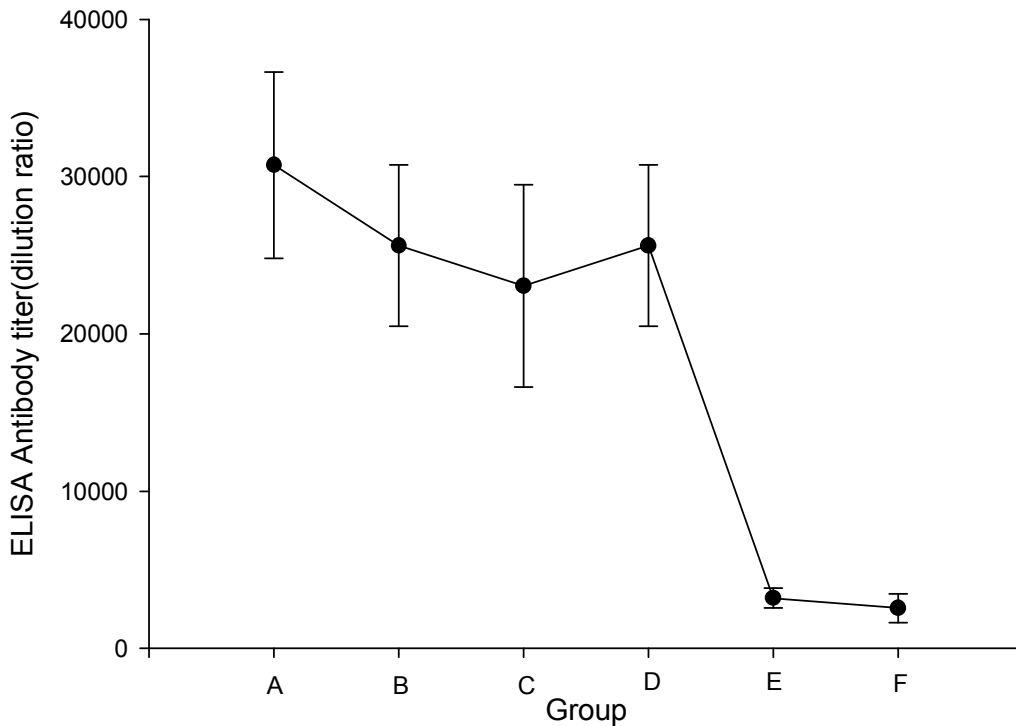


그림 4. 그룹에 따른 항체의 변화 곡선

③ 항원량 결정 시험의 결론

각기 다른 Ct값을 가진 백신을 이용하여 기니픽에서의 항체가 형성을 확인하였을 때, Threshold cycle 값이 작아짐에 따라 지속적인 항체가의 상승을 보이다가 14.5 값을 가진 D 그룹에서 항체가가 포화를 이루었으며, 14.5 이하의 그룹에서도 큰 차이가 없었다. 따라서, 이때의 값을 백신의 효능을 나타낼 수 있는 유효값으로 판단하여 백신의 함량 기준을 Threshold cycle 14.5 이하로 지정하였다.

(2) 흉막폐렴균 혈청형 2형과 5형의 항원량 결정 시험

시험백신의 항원량 결정을 위해 흉막폐렴균 혈청형 2형과 5형을 각각의 항원량을 조합하여 균체 농도별로 A, B, C, D의 4개의 그룹으로 시험 백신을 제조하였다. 시험백신의 항원별 농도는 다음의 표와 같다.

시험백신	항원	
	App2 (CFU/ml)	App5 (CFU/ml)
A	$1 \times 10^{7.0}$	$1 \times 10^{7.0}$
B	$1 \times 10^{8.0}$	$1 \times 10^{8.0}$
C	$1 \times 10^{9.0}$	$1 \times 10^{9.0}$
D	$1 \times 10^{10.0}$	$1 \times 10^{10.0}$

① 실험동물 및 실험 방법

홍막폐렴균 혈청형 2형과 5형에 대한 항체가 시험은 감염되지 않은 1.5~2.0 kg의 건강한 토끼 6마리를 선정하여 4마리에는 돼지 1두분 용량을 1회 근육 접종하고, 2마리는 대조군으로 설정한 후, 4주 후에 각각 채혈하여 혈청형별 항체가는 ELISA법으로 측정하였다. [국가검정 동물용의약품 검정기준 (농림수산검역검사본부고시 제 2009-5호) 1-2-02-28 참조]

② ELISA 검사법을 이용한 홍막폐렴균 항체가 측정

- a. *A. pleuropneumoniae* 균체에 대한 항원을 각각 coating buffer에 100 ng/ml로 희석하여 100 µl 씩 ELISA plate에 분주하고, 37°C (30분간 흡착시킨 뒤) 4°C overnight 시킨다.
- b. 항원이 흡착된 ELISA plate를 실온에 30분 둔 뒤 PBS로 3회 씻어 낸다.
- c. 100 µl 씩 blocking buffer를 모든 well에 분주한 뒤 37°C 1시간 둔다.
- d. Washing buffer로 3회 세척한다.
- e. PBS로 100 µl를 각 plate well에 분주한 뒤 A well은 blank well, B와 C의 첫 well에 음성혈청과 양성혈청을 100 µl 씩 분주하여 2배에서 1,024배까지 2진 희석하고 D well부터는 Sample 혈청을 같은 방법으로 2배에서 1,024배까지 2진 희석한다.
- f. ELISA plate를 125 rpm/1~3분 shaking시킨 뒤 37°C에서 1시간 둔다.
- g. Washing buffer로 3회 씻어내고 blocking buffer로 적당히 희석된 anti-rabbit IgG HRP conjugate를 100 µl씩 분주한 뒤 37°C 1시간 둔다.
- h. Washing buffer로 3회 세척한다.
- i. 100 µl OPD substrate를 각 well에 분주하여 실온에서 15분 정치시킨다.
- j. 50 µl의 stop solution으로 반응을 중지시키고 각 well의 흡광도(O.D.)를 492 nm에서 측정한다.

(3) 복합 백신의 항원량 결정 시험

각각의 항원을 복합하였을 때에 흉막폐렴균의 항원과 돼지 썬코바이러스의 불활화 whole virus 항원에 대한 항체역가 수준이 일정 이상으로 유지 되는지 혹은 간섭효과에 의하여 항체역가가 떨어지는지 살펴보기 위해 복합백신의 항체가를 측정하였다. 각각의 항원에 대한 항체가 측정 방법은 이전 시험 방법들과 동일하게 하였다.

다. 선정 된 Adjuvant의 복합 공정 개발

(1) 벌크의 제조

① 돼지 썬코바이러스의 whole virus

- 사용독주 : 돼지 썬코바이러스 2형 주
- 원종독의 계대 및 보존

돼지 썬코바이러스의 whole virus를 PK15 세포에 접종하여 37°C에서 5일간 배양한 후 바이러스 감염세포 상층액을 채득하여 바이러스 역가를 측정한 후 동결건조 하거나 -80°C이하의 냉동고에 동결 보존하여 원종독으로 사용한다.

2) 본배양 및 채득

가) 세포 배양

PK15 cell을 증식용 배지에 부유시켜 37°C에서 배양한다.

나) 바이러스 배양 및 채득

PK15 cell 단층이 형성되면 배양액을 제거하고 돼지 썬코바이러스의 whole virus를 접종한다. 1시간 동안 흡착 후 증식용 배지를 첨가하여 5-6일 동안 37°C에서 배양 후 상층액을 채득하여 항원 제조에 사용한다.

다) 항원의 불활화

감염 배양액에서 일부를 공정검사용으로 채취하고 나머지 배양액은 포르말린 0.2%이하로 가하여 실온에서 5일 동안 불활화 시킨 후 2~8°C 냉암소에 보관한다.

4) 불활화 확인

불활화 확인을 위해 포르말린 처리된 PCV2 whole virus 항원의 적당량을 투석막에 넣고 4°C 인산완충액에서 투석하여 불활화제를 제거한 후, PK15 cell에 0.1 ml씩 10개 이상 접종하고 37°C에서 5~6일간 배양 후 세포를 고정하여 형광항체법을 이용하여 돼지 썬코바이러스가 감염되지 않는 것을 확인 후 백신 제조에 제공한다.

(2) 흉막폐렴균 혈청형 2형과 5형의 사균체 제조

1) 사용균주 : 흉막폐렴균 혈청형 2형과 5형을 백신의 종균으로 사용

2) 종균주의 계대 및 보존

분리동정 시험을 통해 확인된 원종균주를 chocolate배지에 도말하여 혐기조건하에서 37°C, 24시간 배양하여 순수집락을 NAD (40 µl/ml)가 첨가된 Tryptic soy broth (TSB)에 옮겨 접종한 뒤 37°C, 18시간 배양한 것을 동결 건조하여 -20°C에서 보존하면서 사용한다.

3) 종균배양

동결 건조하여 보관중인 원종균을 chocolate배지에 도말하여 혐기조건하에서 37°C, 24시간 배양하여 순수집락을 NAD (40 µl/ml)가 첨가된 TSB에 옮겨 접종한 뒤 37°C, 18시간 배양하여 제조용 종균으로 사용한다.

4) 종균접종

NAD가 첨가된 TSB에서 증식된 종균을 본 배양배지에 1/100되게 접종한다.

5) 본배양

TSB 배지를 Fermenter에 완전히 용해 후 121°C에서 20분간 고압증기 멸균하고 멸균이 끝나면 냉각수를 이용하여 냉각을 하고 37°C를 유지하면서 미리 준비한 NAD (40 µl/ml)와 종균 배양액을 접종하고 37°C에서 18~24시간 (통기량 : 1vvm, rpm : 100) 배양하면서 UV-spectrophotometer (SHIMADZU Co.)를 이용하여 3시간 간격으로 O.D치를 측정하여 최고점에 이를 때까지 배양한다.

6) 채균 및 처리방법

배양이 종료되면 잡균 혼입여부를 조사하고 연속원심분리기 (Tomoe-sharples centrifuges)를 사용하여 균체만을 수집하고 멸균된 phosphate buffered saline (PBS)으로 균배양액의 1/20양이 되게 재부유한다.

7) 균체의 불활화

원심 분리하여 재부유한 bulk에 formalin을 0.3% 첨가하여 37°C 항온실에서 72시간 불활화시킨 후 5°C에 보관한다.

(3) 벌크의 검사

1) 균체의 불활화 확인시험

불활화시킨 각 균체의 bulk는 각 균주에 해당하는 선택배지에서 37°C 3일간 배양하여 어떠한 세균의 발육도 없어야 한다.

2) 균체 bulk의 농도측정

각 균주별 불활화 균체항원을 2진 희석하여 Optical density (O.D)를 측정하고 해당 균함량에 맞는 희석배수를 정한다.

(4) 제품의 표준화

불활화 확인 시험이 끝난 PCV2 whole virus 항원 및 흉막폐렴 항원을 이용하여 다음과 같은 조성으로 백신을 제조한다.

1) 조성 (1 ml 당)

- PCV2 whole virus 항원 ----- Real Time PCR Threshold Cycle값이 14.5 이하
- A. pleuropneumoniae* 2 type 불활화균체항원 (KOMI-App2) ----- 1.0 x 10^{9.0} CFU
- A. pleuropneumoniae* 5 type 불활화균체항원 (KOMI-App5) ----- 1.0 x 10^{9.0} CFU
- IMS1313 ----- 30%
- Formalin -----0.2% 이하

상기 용량을 잘 교반하여 멸균병에 분주한 후, 2~5°C 냉암소에 보존한다.

5. 돼지 썩코 바이러스 대량 생산 증식 방법 확립

가. Cell factory 배양 방법

(1) Cell factory 시스템 배양에 필요한 배지

1) Media A

PK-15 cell의 계대할 때에는 growth media를 사용한다. 조성은 5% FBS supplemented DMEM이다. Antibiotic Antimycotic을 1X가 되게 포함한다.

2) Media B

바이러스 접종 후에 세포 유지에 사용한다. 조성은 2.5% FBS supplemented DMEM이다. Antibiotic Antimycotic을 1X가 되게 포함한다.

3) Media C

세포를 동결하여 보존하거나 동결시킨 세포를 다시 회복시킬 때 사용한다. 조성은 10% FBS supplemented DMEM이다. Antibiotic Antimycotic을 1X가 되게 포함한다.

4) Media D

시약처치 할 때 이전에 사용한 media의 washing에 사용한다. 조성은 0% FBS supplemented DMEM이다. Antibiotic Antimycotic을 1X가 되게 포함한다.

(2) Cell factory 시스템을 이용한 돼지 썬코바이러스 2형 대량 증식 방법

Cell Factory는 Nunc 70009을 사용한다. Cell Factory는 바닥면적 633 cm^2 10층이다. 총 면적은 6330 cm^2 이다. 175 플라스크 6개에 PK-15 세포를 단층(monolayer)으로 배양한다. 175 플라스크 6개는 PK-15 세포가 단층이 된 75플라스크 3개를 이용하여 2일 배양으로 만든다. Trypsin-EDTA를 이용하여 6개의 플라스크에서 채취한 세포를 떼어낸 후, Cell Factory로 이동한다. 사용하는 배지는 media A이며 총 1200 ml이 필요하다. 2일이 경과하면 Cell Factory 안의 PK-15 cell이 monolayer가 된다. 상층액인 media A를 제거한 후, 준비된 바이러스 200 ml을 접종한다. 1시간의 incubation을 가지며, 매 10분마다 cell표면에 고무 분포하도록 상하좌우로 흔들어 준다. 1시간 후, media B를 800 ml 추가한다. Overnight후, 상층액 1000 ml을 버린 후, glucosamine을 110 ml 넣는다. 30분의 incubation을 가지며, 매 10분마다 cell표면에 고무 분포하도록 상하좌우로 흔들어 준다. 상층액을 제거한 후, 0% DMEM(media D)를 200 ml 이용하여 cell 표면의 남겨진 glucosamine을 제거한다. Media B를 1800 ml 채운다. 3~4일 37°C incubator에서 돼지 썬코바이러스 2형을 증균한다.



Cell Factory를 이용한 세포 생산 시스템

(3) Cell factory 시스템에서 배양된 돼지 썬코바이러스 2형 회수

Cell Factory를 -80° 초저온 냉동고에 넣는다. 12시간 후, 꺼내어 상온에서 녹인다. 다 녹은 후(12시간 소요), 다시 -80° 초저온 냉동고에 넣는다. 12시간 후, 꺼내어 상온에서 녹인다. 다 녹은 후, 다시 -80° 초저온 냉동고에 넣는다. 3회 반복 후, 완전히 녹은 것을 확인 한 후에 2L 플라스크로 이동한다.

나. Roller bottle을 배양 방법

PK-15 세포처럼 suspension culture 방법을 사용할 수 없는 부착형 세포의 경우 bioreactor를 사용한 배양이 용이하지 않기 때문에, 산업화를 목적으로 대량 생산에 들어갈 때, roller bottle을 이용한 방법이 주로 사용된다. 사용되는 배지 조건이나 환경은 flask 배양 조건과 동일하며, 다만, roller bottle에 일정 수준의 회전이 가해져야 한다.

(1) 전 배양

Roller bottle에 접종할 세포를 준비하기 위하여 T-flask에서 세포를 미리 배양한다. 175 cm² 크기의 T-flask 여러 개를 준비하여 flask 당 2×10^6 개의 PK-15 세포를 seeding 하고, 30 ml의 세포 배양용 배지 (5% FBS를 포함한 DMEM 배지)를 넣어 3일간 배양한다. 3일 경과 후, 세포 배양 배지를 걷어 내고, PBS buffer로 세포를 세척한 후, trypsin-EDTA를 사용하여 flask 바닥에 부착된 세포를 떼어내고, hemacytometer를 이용하여 세포수를 counting 한다.

(2) Roller bottle을 이용한 본 배양

PK-15 세포 배양에 사용되는 roller bottle의 규격은 총 면적 840 cm² 이며, 지름과 높이는 110 × 285 mm이다. Roller bottle 하나 당 세포 접종량은 roller bottle 높이 1 inch 당 $2 \times 10^6/20$ ml 이며, 175T flask에서 배양하여 준비한 PK-15 세포 3×10^7 개를 300 ml의 세포 배양용 배지에 희석하여 roller bottle에 접종한다. 접종 후 24시간 동안은 세포가 roller bottle 표면에 부착될 시간이므로 회전 rpm을 0.1~0.3으로 조정하고, 그 후부터는 2 rpm까지 올려준다. 세포를 접종한 시점에서 3일 정도 경과 후 roller bottle 표면에 PK-15 세포가 mono-layer 되었고, roller bottle 1개 당 세포의 총 양은 3×10^8 개 수준이었다.



<Roller bottle 예시>

(3) Roller bottle 시스템을 이용한 돼지 썬코바이러스 2형 대량 증식 방법

바이러스 접종 방법 또한 일반 flask 배양 방법과 동일하다. 바이러스 접종 전 FBS가 포함되어 있는 세포 배양용 배지를 제거하고, PBS buffer를 사용하여 세포를 2회 washing 한다. 바이러스 희석에는 FBS를 포함하지 않은 DMEM 배지를 사용하며, 접종 M.O.I가 0.01~0.1 사이가 되도록 PCV2 바이러스를 희석 후, 100 ml volume으로 세포에 접종한다. 바이러스를 접



종하는 동안 회전 rpm은 2 rpm을 그대로 유지하고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 1시간 30분 동안 세포를 감각시킨다. 그 후 바이러스 희석액을 제거하고, 2.5% FBS를 함유한 DMEM 배지 500 ml을 넣고 바이러스를 증식시킨다.

(4) Roller bottle 시스템을 이용한 돼지 썬코바이러스 2형 회수

바이러스 접종 후, 5~7일 동안 세포를 추가로 배양하면서 바이러스를 증식시킨다. 바이러스의 harvest에는 freeze and thaw 방법을 이용한다. 바이러스 접종 후 7일이 경과한 roller bottle을 그대로 -80°C deep freezer에 넣고 완전히 얼린 후, 다시 상온으로 꺼내 녹이는 과정을 3회 반복한다. 이러한 과정에서 PK-15 세포가 완전히 깨어져 세포내에 포함되어 있던 PCV2 바이러스들도 모두 상등액으로 나오게 되고, 이것을 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 pellet만을 따로 제거한 후, 상등액을 바이러스 bulk로 사용한다.

<Roller bottle 배양 모습>

(5) Roller bottle 시스템에서 배양한 PCV2 바이러스의 역가 측정

Roller bottle 시스템을 이용하여 배양한 PCV2 바이러스의 역가 측정은 IFA를 이용하여 TCID₅₀의 방법으로 측정하였다.

1) IFA를 이용한 TCID₅₀ 측정

- ① 실험 전 날, 8 well 챔버 슬라이드 각 well에 PK-15 세포를 seeding 후, 80~90% 단층 형성을 확인 한다.
- ② 다음 날, 증식된 바이러스를 10⁻¹부터 10⁻⁸까지 10배씩 희석하여 200 µl씩 각 well에 접종한 후 48시간 동안 배양한다.
- ③ 48시간 경과 후, 바이러스 접종 액을 제거하고, PBS로 1회 washing 후, 4% Paraformaldehyde를 이용하여 각 well의 세포를 고정한다. (15분간 배양)
- ④ PBST로 세척 후, 0.1% Triton X-100을 50 µl씩 각 well에 분주하고 37°C에서 10분간 배양한다.
- ⑤ PBST로 세척 후, blocking buffer를 100 µl씩 각 well에 분주하고 37°C에서 10분간 배양한다.
- ⑥ PBST로 세척 후, PCV2 ORF2 polyclonal antibody (ISU-1) 를 1:200으로 희석하여 준비하고, 각 well에 100 µl씩 분주 후, 37°C에서 1시간 동안 배양한다.
- ⑦ PBST로 세척 후, anti rabbit IgG antibody FITC conjugated 를 1:200으로 희석하여 준비하고, 각 well에 100 µl씩 분주 후, 37°C에서 1시간 동안 배양한다.
- ⑧ PBST로 세척 후, 형광 현미경을 이용하여 발광을 확인하여 항원이 검출되는 최종 희석 배율을 통해 TCID₅₀을 계산한다.

다. Micro carrier를 이용한 배양 방법

Roller bottle 배양을 통해 만족스러운 결과를 얻었지만, 좀 더 효과적인 방법이 있는지 찾아보는 과정에서 스피너 배설을 이용한 micro carrier culture 방법을 적용시켜보게 되었다.

(1) 재료 준비

1) Microcarrier

통상 Cytodex라고 불리우며, Cytodex1과 Cytodex3가 있다. 본 실험에서는 GE health에서 구입한 cytodex 1을 이용하였다.

2) Ca²⁺, Mg²⁺ free PBS

3) 스피너배설

Bellco에서 구입한 1L 스피너 배설을 이용하였다.

(2) Microcarrier의 준비

1) Microcarrier는 건조된 분말 형태로 포장되어 있다. 사용하기 전에 Ca^{2+} , Mg^{2+} free PBS (50~100 ml/g cytodex)에서 3시간 정도 적셔준다. (상온)

2) 상등액을 제거하고, 가라앉은 Microcarrier를 새로운 Ca^{2+} , Mg^{2+} free PBS (30~50 ml/g cytodex)로 몇 분간 세척한다.

3) PBS를 제거하고, 세척된 Microcarrier에 Ca^{2+} , Mg^{2+} free PBS (30~50 $\mu\text{l/g}$ cytodex)를 첨가하고, Autoclave로 멸균한다. (115°C, 15 min, 15 psi)

4) 멸균된 Microcarrier를 사용하기 전에, 가라앉은 Microcarrier 위의 상등액을 제거하고, 따뜻한 세포 배양액 (20~50 ml/g cytodex)로 한 번 세척하고, 상등액 제거 후, 스피너 배슬로 옮긴다.

(3) 배양 순서

1) 일반적으로 세포 배양액 1L 당 1~5 g의 cytodex를 사용하며, 세포 배양액 1 ml 당 $5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ 개의 세포를 접종한다.

2) Stir는 20~60 rpm으로 유지한다.

3) 100 ml 배양을 기준으로 자세한 배양 방법은 아래와 같다.

4) 우선, 스피너 배슬에 30 ml의 세포 배양액을 넣고, 0.3 g의 cytodex를 넣어준다.

5) 10^7 개의 세포를 접종하고, 부드럽게 섞어준 후, 37°C배양한다. 세포가 Microcarrier에 붙을 수 있도록 하는 과정으로, 일단, 세포가 다 붙으면, stir를 꾸준히 돌려준다. 세포가 결합하는데 시간이 오래 걸리는 경우는, 매 30분마다, 분씩 stir를 돌려 세포와 stir가 가라앉지 않고 잘 결합할 수 있도록 해준다.

6) 세포배양액의 양을 50 ml로 증가시킨다.

7) 1~2일 정도 50 ml의 volume을 유지한 후, 총 volume을 100 ml로 증가시키고, 3~5일이 경과하면, 부분적으로 배지를 교체해 줄 필요가 있다.

(4) 세포의 성장 정도 관찰

Microcarrier culture 도중에 세포가 얼마만큼 자랐는지를 확인하는 과정으로 일정량의 배양액을 꺼내어 trypsin-EDTA로 microcarrier에 붙어 있는 세포를 떼어낸 후, 메틸렌 블루 시약

으로 세포핵을 염색하여 hemacytometer로 세포수를 측정한다.

6. 흉막폐렴균 대량 증식방법 확립

가. 흉막폐렴균 혈청형 2형 배양 실험

(1) Optical density 와 생균수의 상관관계

야외 분리주로부터 분리 동정을 통해 확인된 흉막폐렴균 혈청형 2형 균주를 chocolate 배지에 도말하여 혐기조건하에서 배양한 후, NAD가 첨가된 TSB(Tryptic soy broth) 배지에 접종한 뒤, 흉막폐렴균 혈청형 2형 균주의 증식성 및 생균수와 상관관계를 구하기 위한 실험을 수행하였으며, 최종적으로 균주의 증식 곡선을 제작하고, 생균수를 측정하여 O.D와 생균수와의 상관관계를 확인하였다.

나. 흉막폐렴균 혈청형 5형 배양실험

(1) Optical density 와 생균수의 상관관계

야외 분리주로부터 분리 동정을 통해 확인된 흉막폐렴균 혈청형 5형 균주를 chocolate 배지에 도말하여 혐기조건하에서 배양한 후, NAD가 첨가된 TSB(Tryptic soy broth) 배지에 접종한 뒤, 흉막폐렴균 혈청형 5형 균주의 증식성 및 생균수와의 상관관계를 구하기 위한 실험을 수행하였으며, 최종적으로 균주의 증식 곡선을 제작하고, 생균수를 측정하여 O.D와 생균수와의 상관관계를 확인하였다.

다. 흉막폐렴균 혈청형 2형 퍼멘터 배양 실험

(1) 종균 배양

동결 건조하여 보관중인 원종균을 chocolate 배지에 도말하여 혐기조건하에서 37°C, 24시간 배양하여 얻은 순수집락을 NAD (40 µg/ml)가 첨가된 TSB broth에 옮겨 접종한 뒤 37°C, 18시간 배양하여 제조용 종균으로 사용한다.

(2) 종균 접종

NAD가 첨가된 TSB broth에서 증식된 종균을 본 배양배지에 1/100이 되게 접종 한다.

(3) 본 배양

TSB 배지를 fermenter에 완전히 용해 후 121°C에서 20분간 고압증기 멸균하고 멸균이 끝나면 냉각수를 이용하여 냉각을 하고 37°C를 유지하면서 미리 준비한 NAD (40 µl/ml)와 종균 배양액을 접종하고 37°C, 18~24시간 (통기량 : 1vvm, rpm : 100) 배양하면서 UV

spectrophotometer (SHIMADZU Co.)를 이용하여 3시간 간격으로 O.D.치를 측정하여 최고점에 이를 때까지 배양한다.

(4) 채균 및 처리방법

배양이 종료되면 잡균 혼입여부를 조사하고 연속원심분리기 (Tomoe-sharples centrifuges)를 사용하여 균체만을 수집하고 멸균된 phosphate buffered saline (PBS) 으로 균 배양액의 1/20 양이 되게 재 부유한다.

(5) 균체의 불활화

원심 분리하여 재부유한 bulk에 formalin을 0.3% 첨가하여 37°C 항온실에서 72시간 불활화시킨 후 5°C보관한다.

라. *Actinobacillus pleuropneumoniae* 2 type 퍼멘터 배양 실험

(1) 종균 배양

동결 건조하여 보관중인 원종균을 chocolate 배지에 도말하여 혐기조건하에서 37°C, 24시간 배양하여 얻은 순수집락을 NAD (40 µg/ml)가 첨가된 TSB broth에 옮겨 접종한 뒤 37°C, 18시간 배양하여 제조용 종균으로 사용한다.

(2) 종균 접종

NAD가 첨가된 TSB broth에서 증식된 종균을 본 배양배지에 1/100이 되게 접종 한다.

(3) 본 배양

TSB 배지를 fermenter에 완전히 용해 후 121°C, 20분간 고압증기 멸균하고 멸균이 끝나면 냉각수를 이용하여 냉각을 하고 37°C유지하면서 미리 준비한 NAD (40 µg/ml)와 종균 배양액을 접종하고 37°C에서 18~24시간 (통기량: 1vvm, rpm: 100) 배양하면서 UV spectrophotometer (SHIMADZU Co.)를 이용하여 3시간 간격으로 O.D치를 측정하여 최고점에 이를 때까지 배양한다.

(4) 채균 및 처리방법

배양이 종료되면 잡균 혼입여부를 조사하고 연속 원심리기(Tomoe-sharples centrifuges)를 사용하여 균체만을 수집하고 멸균된 phosphate buffered saline(PBS)으로 균 배양액의 1/20 양이 되게 재 부유한다.

(5) 균체의 불활화

원심 분리하여 재부유한 bulk에 formalin을 0.3% 첨가하여 37°C 항온실에서 72시간 불활화시킨 후 5°C에 보관한다.

7. 복합백신 제조 공정의 표준화

불활화 확인 시험이 끝난 돼지 쉼코바이러스 whole 바이러스 항원 및 홍막폐렴 항원을 이용하여 다음과 같은 조성으로 백신을 제조한다.

가. 조성 (백신 1 ml 당)

PCV2 whole virus 항원 -----	$2 \times 10^{5.0}$ FAID ₅₀ 이상
<i>A.pleuropneumoniae</i> 2 type 불활화 균체항원 -----	$1.0 \times 10^{9.0}$ CFU
<i>A.pleuropneumoniae</i> 5 type 불활화 균체항원 -----	$1.0 \times 10^{9.0}$ CFU
IMS1313 -----	30%
Formalin -----	0.2% 이하

나. 제조 방법

$1 \times 10^{6.0}$ FAID₅₀/ml 이상의 PCV2 whole virus 불활화 항원을 최종 농도 $2 \times 10^{5.0}$ FAID₅₀/ml이 되도록 20% 비율로 준비하고, 불활화 확인 된 홍막폐렴 혈청형 2형 및 5형 균체 bulk는 $5 \times 10^{9.0}$ CFU의 농도로 농축 후, 동일하게 각각 20% 비율로 섞어준다. 항원을 복합한 후 IMS1313 oil adjuvant를 30% 비율로 첨가하며, 나머지 비율은 멸균된 PBS를 첨가하여 최종 volume을 맞춰준다. 상기 용량을 잘 교반하면서 멸균병에 분주한 후, 냉장소에 잘 보관한다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. PK-15 세포주 및 바이러스 종독의 seed lot 확립 및 배양기술

접종 하루째 CPE가 나타나기 시작하여 이틀째에 모든 세포에 CPE가 일어나고, 플라스크 바닥에서 세포가 탈락하였다. 접종 후, 이튿날 저녁에 바이러스를 채독하고, 4°C에 보관 후, 다음날 바로 titration을 시작하였다. Titer를 확인해 본 결과, 접종 MOI에 따라서 돼지 썬코바이러스 2형의 농도는 $10^{3.75} \sim 10^{6.0}$ TCID₅₀/ml로 나왔으며, 접종 MOI가 0.1 이상일 때 돼지 썬코바이러스 2형의 titer가 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml 이상으로 나왔고, 접종 MOI가 1이상으로 높아져도 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml 이상으로는 잘 올라가지 않았다. 아래의 결과를 토대로, 시험백신을 생산하였다.

접종 MOI (돼지 썬코바이러스 2형)	얻어진 돼지 썬코바이러스 2형의 titer
0.01	$10^{3.75}$ TCID ₅₀ /ml
0.05	$10^{4.0}$ TCID ₅₀ /ml
0.1	$10^{5.5}$ TCID ₅₀ /ml
0.5	$10^{6.0}$ TCID ₅₀ /ml
1	$10^{6.0}$ TCID ₅₀ /ml
2	$10^{6.0}$ TCID ₅₀ /ml

2. 돼지 썬코바이러스의 정제 기술 확립

가. 실험 결과

돼지 썬코바이러스 배양액을 원심분리한 후 microfiltration과 ultrafiltration 공정을 이용하여 돼지 썬코바이러스를 농축 정제하였다.

공정	sample	total protein	PCV2 protein	Purity	Yield
Centrifuge	cell precipitate	24 mg/ml	0.03 µg/ml	-	-
	supernatant	0.92 µg/ml	0.67 µg/ml	72.8%	88.4%
Microfiltration	Cell debris	0.12 µg/ml	0.01 µg/ml	-	-
	permeate	0.87 µg/ml	0.69 µg/ml	79.3%	86.2%
Ultrafiltration	permeate	0.02 µg/ml	0.0 µg/ml	-	-
	PCV2 concentrate	7.4 µg/ml	7.12 µg/ml	96.2%	79.1%

원심분리 공정 후 돼지 썬코바이러스 단백질 농도는 0.67 µg/ml, 순수도는 72%로 측정되었다. Microfiltration 을 한 후 permeate 안에 있는 돼지 썬코바이러스 단백질 농도는 0.69 µg/ml 이며 순수도는 79.3%로 상승하였다. 마지막 ultrafiltration 공정을 거친 돼지 썬코바이러스 단백질 농도는 7.12 µg/ml 이었으며 순수도는 96.2%까지 상승하였다. 정제 과정을 거치는 동안 돼지 썬코바이러스 단백질 생산 yield는 79.1%였다.

3. 흉막폐렴 항원 정제기술 확립

가. 실험 결과

(1) 원심분리 공정 비교 시험

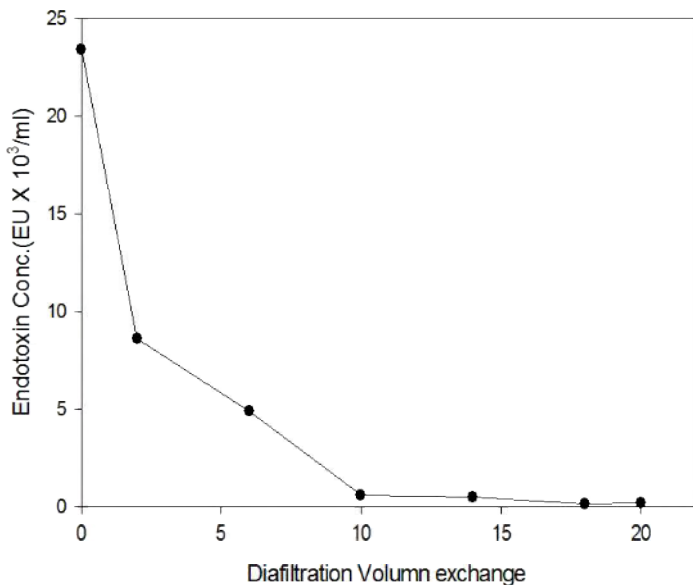
일반 원심분리 공정과 연속식 원심분리 공정 사용에 따른 생산효율성은 공정 후 생균수 측정과 단위 용량의 처리 시간을 비교하였다. 원심 분리 후 균수 계산은 농축전과 같은 양의 PBS에 균주를 부유하여 측정하였다.

공정	농축 전 생균수 (CFU/ml)	농축 후 생균수 (CFU/ml)	공정 시간 (50 liter)
Centrifuge	2.7×10^{11}	2.5×10^{11}	4.2 hr
Continuous Centrifuge (Tomoe Shaftless centrifuge)	2.7×10^{11}	1.7×10^{11}	0.5 hr

농축 전 후 각각의 공정에 따른 생균수의 변화는 공정 중 박테리아가 얼마나 영향을 받는지

간접적으로 확인할 수 있는 방법으로 이번 실험을 통해 일반적인 원심 공정이 연속 원심분리 공정에 비해 박테리아 세포에 영향이 덜 한 것으로 관찰되었다. 일반적인 원심 분리 공정을 사용한 경우 박테리아 생존율은 92.5%였으며 연속원심분리 공정 후 박테리아 생존율은 62.9%로 낮게 측정되었다. 이러한 결과는 연속원심분리공정이 진행되는 동안 세포가 받는 열과 마찰 스트레스에 의해 보다 많은 영향을 받는 것으로 판단된다. 공정에 필요한 시간은 연속원심 분리 공정이 50 liter를 처리하는 경우 0.5 시간으로 원심분리 공정에 비해 매우 짧게 측정되었다. 따라서 세균 항원의 harvest는 연속 원심분리공정을 사용하는 것이 보다 효율적인 방법으로 판단된다.

(2) Diafiltration 공정을 통한 LPS의 제거



<Diafiltration 과정 중 buffer exchange volume에 따른 LPS 감소 >

투석여과 과정에 따라 LPS 농도는 감소되었다. 초기 2회 buffer exchange volume에서 LPS의 농도는 7.2 X 10³ EU/ml로 감소하였으며 10 volume exchange에서 초기 LPS의 99.6% 제거되었다. 이러한 결과에 따라 투석여과 방법을 통해 효과적으로 LPS가 제거되는 것을 확인할 수 있었다.

* Buffer 조건에 따른 LPS 제거 효과

Detergent (EU/ μ g)	LPS of bacterial harvest (EU/ μ g)	LPS of final retentate	removal efficiency
0.5% tween20	400.88	17.85	95.5%
1.0% Triton X-100	426.9	8.2	98.1%

1.0% TDC	385.0	1.75	99.5%
----------	-------	------	-------

※ 초기 bacterial harvest 샘플을 1/100으로 희석하여 실험에 사용

투석여과에 사용된 buffer에 박테리아에 영향이 없는 수준의 detergent를 첨가한 후 투석여과를 실시하여 LPS 제거 효율을 비교하였다. 1% Taurodeoxycolate를 이용한 실험에서 LPS 제거 효율은 99.9%로 가장 높게 나왔으며 0.5% Tween 50을 사용한 경우에 98.1%로 가장 낮은 제거율을 보여주었다.

(3) 결론

홍막폐렴균 혈청형 2형 균주를 이용한 세균체 harvest 공정과 투석여과 방법을 이용한 LPS 제거 실험을 통해 세균 항원제조 공정을 확립하였다. 연속원심분리 공정을 통해 62.9% 이상의 생균이 보존되는 결과를 얻었으며 투석여과 공정을 통해 LPS의 99% 이상이 제거되는 것을 확인하였다. 따라서 그람 음성균을 이용한 백신 제조 공정 중 연속 원심 분리공정과 투석여과 공정을 통해 효율적으로 항원 생산이 가능한 것을 확인할 수 있었으며 LPS가 제거된 항원의 사용으로 백신의 부작용을 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

4. 돼지 썬코바이러스 단일백신과 홍막폐렴 복합백신 제조 기술 확립

가. Adjuvant 후보 물질에 대한 효능 증대 효과 확인 및 adjuvant 선정

(1) 효능 확인 실험 결과

1) 썬코 바이러스에 대한 ELISA 항체가

	ELISA 항체 역가			
	1-1	1-2	1-3	1-4
A (IMS 1313)	1280 배	1280 배	640 배	1280 배
B (gel)	320 배	320 배	640 배	320 배
C (Carbopol)	640 배	640 배	320 배	320 배
Control	1-1	1-2		
	< 10 배	< 10 배		

실험결과 백신 제조에 사용한 adjuvant의 종류에 따라 서로 다른 항체가 결과를 얻을 수 있었다. 세 가지 adjuvant 모두 국가검정기준인 320배 수준의 항체를 형성하는 데에는 무리가

없었으며, 이중에서 특히 IMS 1313 adjuvant를 사용한 그룹에서 높은 혈중 항체를 보였다.

2) 홍막페렴균에 대한 ELISA 항체 결과

	ELISA 항체 역가				
	혈청형	1-1	1-2	1-3	1-4
A (IMS 1313)	App2	640 배	640 배	1280 배	640 배
	App5	1280 배	1280 배	640 배	640 배
	혈청형	1-1	1-2	1-3	1-4
B (Gel)	App2	320 배	320 배	320 배	640 배
	App5	640 배	320 배	320 배	640 배
	혈청형	1-1	1-2	1-3	1-4
C (Carbopol)	App2	320 배	640 배	640 배	640 배
	App5	640 배	640 배	640 배	640 배
	혈청형	1-1	1-2		
Control	App2	< 10 배	< 10 배		
	App5	< 10 배	< 10 배		

앞선 결과와 마찬가지로 홍막페렴균에 대한 항체가 측정 결과 역시 백신 제조에 사용한 adjuvant의 종류에 따라 다른 양상을 보여주었다. 홍막페렴균 혈청형 2형과 5형에 대하여 각각 ELISA 항체를 측정하였고, 그 결과 혈청형에 상관없이 IMS 1313, Carbopol 971P NF, Aluminium hydroxide gel 순서로 높은 항체를 나타내었다.

3) 최종 결과

위의 두 가지 실험 결과를 토대로 백신 제조에 사용될 adjuvant를 최종적으로 결정하였다. 복합 백신 접종 후, 썬코 바이러스와 홍막페렴균에 대한 혈중 항체를 서로 다른 실험동물에서 확인하였으나, 그 결과는 동일한 양상을 나타내었다. 실험에 사용된 3 가지 adjuvant에서 모두 국가검정기준에는 부합하는 항체를 나타내었으며, 이 중에서 특히 IMS 1313을 백신의 adjuvant로 사용한 경우, 썬코 바이러스와 홍막 페렴균에 대해서 모두 640~1280배 이상의 높은 항체를 보였다. 이 결과를 바탕으로 부형제로 IMS 1313을 최종적으로 선정하였다.

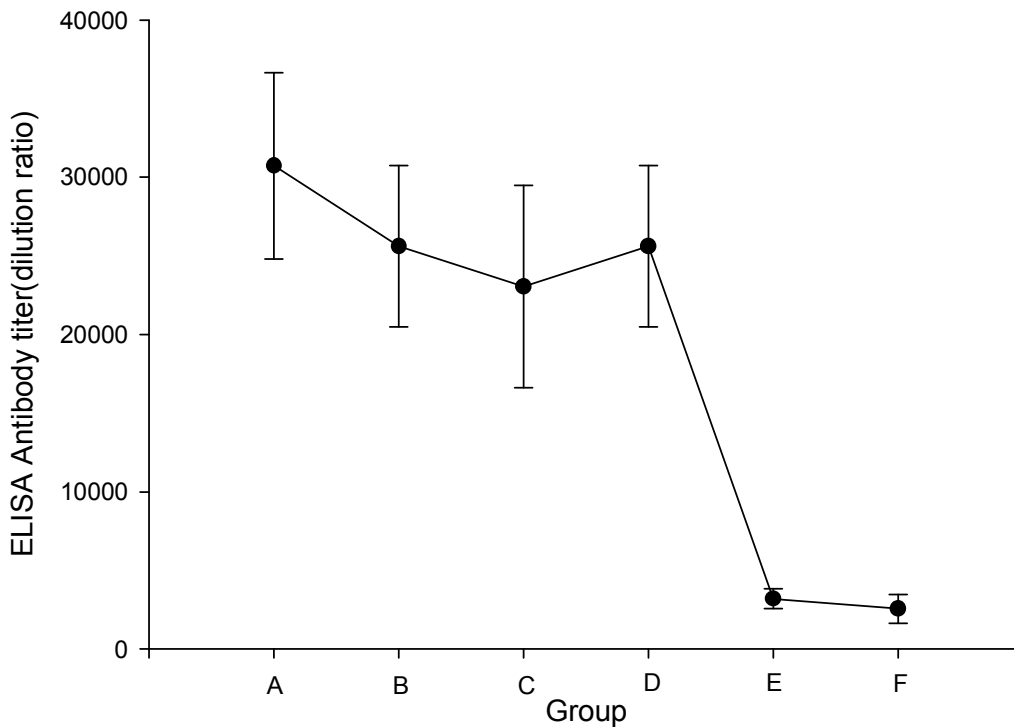
나. 홍막페렴균 항원과 돼지 썬코바이러스 항원간의 간섭 현상 확인을 위한 면역원성 시험

(1) Real-time PCR 을 이용한 돼지 썬코바이러스 항원량 결정 시험 ELISA 검사 결과

기니픽 혈청을 이용한 ELISA 검사는 (주)제노바이오텍의 PCV2 ELISA kit를 이용하였으며, 혈청의 희석배수를 이용하여 항체를 표시하였다.

- 기니피그 각 그룹의 개체별 ELISA antibody titer

No. of guinea pigs	A group (Ct 13)	B group (Ct 13.5)	C group (Ct 14)	D group (Ct 14.5)	E group (Ct 15)	F group (Ct 15.5)
1	20480	20480	20480	20480	2560	1280
2	40960	20480	10240	40960	5120	2560
3	40960	40960	40960	20480	2560	5120
4	20480	20480	20480	20480	2560	1280



그룹에 따른 항체가의 변화 곡선

다. 돼지 썬코바이러스 항원량 결정 시험의 결론

각기 다른 Ct값을 가진 백신을 이용하여 기니픽에서의 항체가 형성을 확인하였을 때, Threshold cycle 값이 작아짐에 따라 지속적인 항체가의 상승을 보이다가 14.5 값을 가진 D 그룹에서 항체가가 포화를 이루었으며, 14.5 이하의 그룹에서도 큰 차이가 없었다. 따라서, 이때의 값을 백신의 효능을 나타낼 수 있는 유효값으로 판단하여 백신의 함량 기준을 Threshold cycle 14.5 이하로 지정하였다.

(1) 흉막폐렴균 혈청형 2형과 5형의 항원량 결정 시험

1) 흉막폐렴균 혈청형 2형과 5형에 대한 ELISA 검사 결과

마우스 혈청을 이용한 ELISA 검사는 백신에 이용되는 항원을 정제하여 ELISA 검사에 이용하였으며, 혈청의 희석배수를 이용하여 항체가를 표시하였다.

시험백신	시험군	토끼 No.	접종량/ 접종부위	접종 방법	항체가 (2차접종 2주후)	
					App 2	App 5
A	접종군	1	1.0 ml/ 근육	1회 접종	80	80
		2			80	160
		3			160	80
		4			80	160
		평균/표준 편차			100/40	120/46.2
B	접종군	1	1.0 ml/ 근육	1회 접종	320	320
		2			160	160
		3			320	320
		4			320	160
		평균/표준 편차			280/80	240/92.4
C	접종군	1	1.0 ml/ 근육	1회 접종	1280	320
		2			640	640
		3			640	1280
		4			320	1280
		평균/표준 편차			800/320	880/480
D	접종군	1	1.0 ml/ 근육	1회 접종	640	640
		2			640	1280
		3			1280	1280
		4			640	640
		평균/표준 편차			800/320	960/369.5
대조군	무접종군	1		-	10	10
		2			10	10

각기 다른 흉막폐렴균 항원 함량을 가진 백신을 이용하여 마우스에서의 항체가 형성을 확인하였을 때, 항원 함량이 10배가 커짐에 따라 지속적인 항체가의 상승을 보였으며, C 시험백신에서 각각의 흉막폐렴균 $10^{9.0}$ CFU/ml 농도에서 640~1,280배 이상의 ELISA 항체가를 나타내었

다. 따라서 흉막폐렴균 함량이 $10^{9.0}$ CFU/ml으로 지정하였다.

(2) 복합 백신의 항원량 결정 시험

1) 돼지 썬코바이러스 불활화 whole virus 항원 ELISA 검사 결과

- 기니피그 개체별 ELISA antibody titer

No. of guinea pigs	복합백신 (Ct 14.5)
1	20480
2	20480
3	40960
4	20480

2) 흉막폐렴균 항원 ELISA 검사 결과

시험백신	시험군	토끼 No.	접종량/ 접종부위	접종 방법	항체가 (2차접종 2주후)	
					App 2	App 5
복합백신	접종군	1	1.0 ml/ 근육	1회 접종	640	640
		2			640	1280
		3			1280	640
		4			640	640
		평균/표준 편차			800/320	800/320
대조군	무접종군	1		-	10	10
		2		-	10	10

복합백신을 제조하여 각 항원별 ELISA 항체가를 측정 한 결과 흉막폐렴균 혈청형 2형과 5형은 각각 640~1,280, 320~1,280의 ELISA 항체가를 나타냈으며, 돼지 썬코바이러스 불활화 whole 바이러스 항원의 경우, 단일 항원 백신의 경우와 같이 ELISA 항체가를 나타내었다. 따라서, 각각의 항원을 조합하여 만든 복합 백신의 경우에서도 항원의 간섭 효과나 항체가 저하는 나타나지 않았다.

5. 돼지 썬코바이러스 대량 생산 증식 방법 확립

가. Roller bottle 시스템에서 배양한 돼지 썬코바이러스의 역가 측정 결과

희석배수	FITC 형광 유무			
	A	B	C	D
10^{-1}	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+
10^{-6}	+	+	+	-
10^{-7}	-	-	-	-
대조군	-	-	-	-

(+ : FITC 특이 형광 관찰됨, - : FITC 특이 형광 관찰 안 됨)

<바이러스 희석 배수별 FITC 형광 이미지>

10^{-1} ~ 10^{-7} 까지 10배씩 단계 희석하여 준비한 바이러스 샘플 당 4개의 well에 접종하였고, Karber method를 이용하여 최종 바이러스 역가를 확인하였다. 그 결과 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml 이상의 역가를 확인하였다.

<h1>Technical Report</h1>	
실험 목적	써코 흥막 폐렴 불활화 백신 생산을 위한 PCV2 바이러스 역가 확인
실험 방법	제주대에서 분양받은 SK 2b cell을 이용한 IFA (Immuno fluorescent assay) 방법
실험 일정	1차 실험 : 2013.01.03~2013.01.07 2차 실험 : 2013.01.29~2013.01.31
실험 장소	서울대학교 수의과대학 수의 병리학 실험실
참석인	서울대학교 : 서휘원 수의사, 오연수 수의사 코미팜 : 장현 부장, 김주헌 차장
내용	<ul style="list-style-type: none"> • Material & Method • 실험 protocol (IFA) • 실험 결과 및 결론

1. Material & Method

- 가. PCV2 바이러스 : 서울대학교 채찬희 교수님이 분리한 PCV2 바이러스
 나. 세포주 : 제주대학교에서 분양받은 SK-2b cell
 다. IFA용 항체 : PCV2 ORF2 polyclonal antibody (ISU-1) (1차 항체)
 Anti rabbit IgG antibody FITC conjugated (2차 항체)

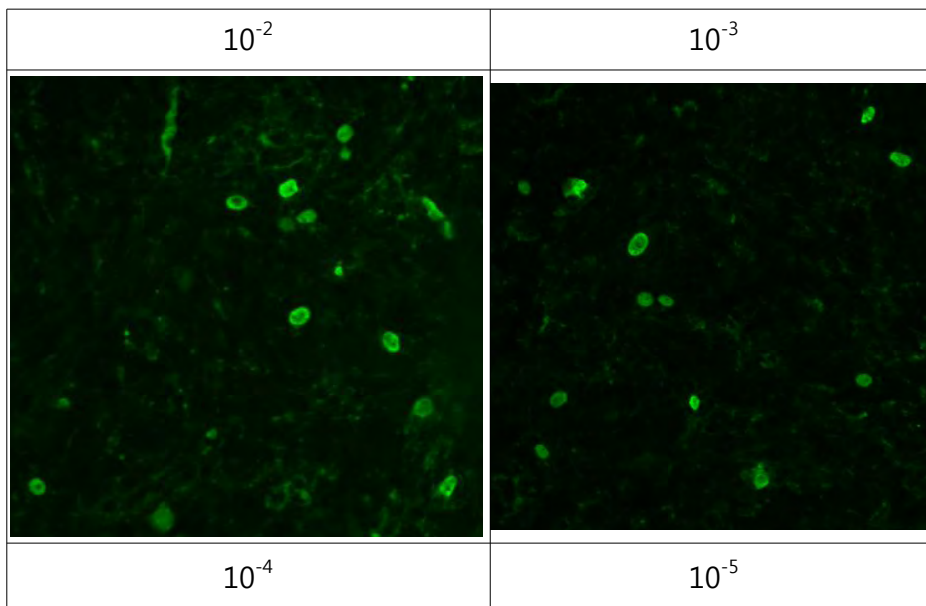
2. 실험 방법

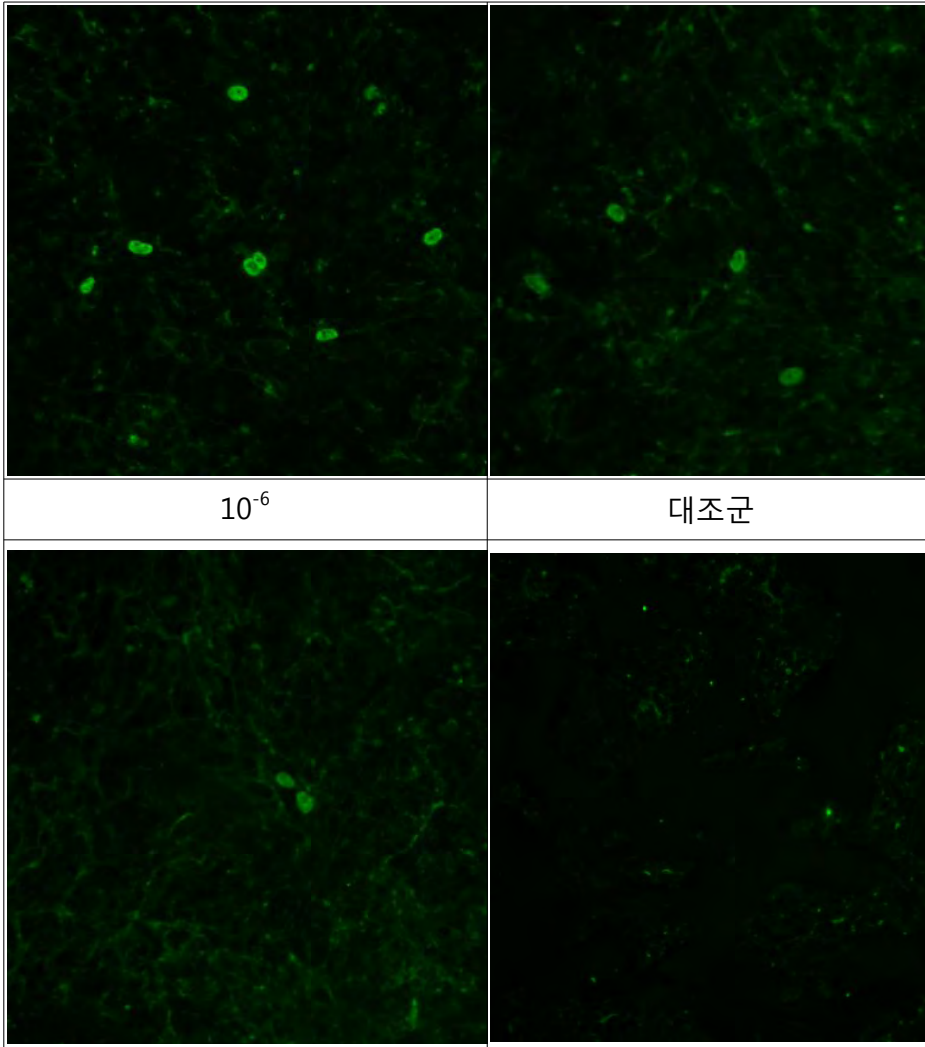
가. 돼지 써코바이러스 배양 : 세포주는 제주대학교에서 분양받은 SK-2b cell을 이용하며, 세포 배양에는 DMEM media를 사용한다. 역가 측정에 사용한 바이러스는 5번째 passage 한 바이러스이다.

나. IFA를 이용한 TCID₅₀ 측정

- ① 실험 전 날, 8 well 챔버 슬라이드 각 well에 SK-2b 세포를 seeding 후, 80~90% 단층 형성을 확인 한다.
- ② 다음 날, 증식된 바이러스를 10^{-1} 부터 10^{-8} 까지 10배씩 희석하여 200 μ l씩 각 well에 접종한 후 48시간 동안 배양한다.
- ③ 48시간 경과 후, 바이러스 접종 액을 제거하고, PBS로 1회 washing 후, 4% Paraformaldehyde를 이용하여 각 well의 세포를 고정한다. (15분간 배양)
- ④ PBST로 세척 후, 0.1% Triton X-100을 50 μ l씩 각 well에 분주하고 37°C에서 10분간 배양한다.
- ⑤ PBST로 세척 후, blocking buffer를 100 μ l씩 각 well에 분주하고 37°C에서 10분간 배양한다.
- ⑥ PBST로 세척 후, PCV2 ORF2 polyclonal antibody (ISU-1)를 1:200으로 희석하여 준비하고, 각 well에 100 μ l씩 분주 후, 37°C에서 1시간 동안 배양한다.
- ⑦ PBST로 세척 후, anti rabbit IgG antibody FITC conjugated를 1:200으로 희석하여 준비하고, 각 well에 100 μ l씩 분주 후, 37°C에서 1시간 동안 배양한다.
- ⑧ PBST로 세척 후, 형광 현미경을 이용하여 발광을 확인하여 항원이 검출되는 최종 희석 배율을 통해 TCID₅₀을 계산한다.

3. 실험 결과 (2차 실험 결과)





① 1차 실험에서는 실험 중 생긴 일부 오류로 인하여, 명확한 결과를 확인할 수 없었고, 이에 대한 실험 결과는 제외시켰습니다.

② 2차 실험 결과, 위의 형광 사진에서 확인할 수 있듯이 대조군에서는 돼지 썬코바이러스 단백질 발현으로 인한 특이 형광이 나타나지 않고, 바이러스의 희석 배수가 증가할수록 이에 비례하여 돼지 썬코바이러스에 의한 특이 형광이 감소하는 것으로 미뤄볼 때 실험이 성공적으로 잘 이루어진 것으로 판단됩니다. 역가 확인을 위해 희석배수에 따른 형광 유무를 관찰한 결과 10^{-2} 부터 10^{-6} 의 바이러스 희석 단계에서는 돼지 썬코바이러스 단백질 발현으로 인한 FITC 특이 형광이 잘 나타나고 있습니다.

(10^{-1} 바이러스 희석 액 접종 well에서는 바이러스 탈락이 많아서 형광을 제대로 확인할 수가 없어 결과에서 제외하였음)

③ 결론적으로, 제주대에서 분양받은 SK-2b 세포를 이용하여 서울대에서 분리한 돼지 썬코바이러스의 배양이 원활하게 이루어지는 것을 확인하였고, 바이러스 역가는 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml 전후로 확인되었습니다.

다. Micro carrier를 이용한 배양

(1) 세포 배양 결과

Roller bottle 배양의 경우 세포 배양 배지 ml 당 약 10^6 개의 비율로 PK-15 세포가 성장하였다. Microcarrier culture의 경우 이론적으로 ml 당 10^6 개 이상의 세포를 배양할 수 있지만, 아직 배양 조건이 최적화되지 못하였고, 세포 종류에 따른 차이도 존재하여 PK-15 세포의 경우 그 정도까지 배양하는 데에는 실패하였다.

6. 흉막폐렴균 대량 증식방법 확립

가. 흉막폐렴균 혈청형 2형 배양 실험

(1) Optical density와 생균수의 상관관계

1) 배양 시간에 따른 Optical density 변화

배양 시간 (hr)	0 hr	2 hr	4 hr	6 hr
O.D 값	0.021	0.427	0.968	1.865

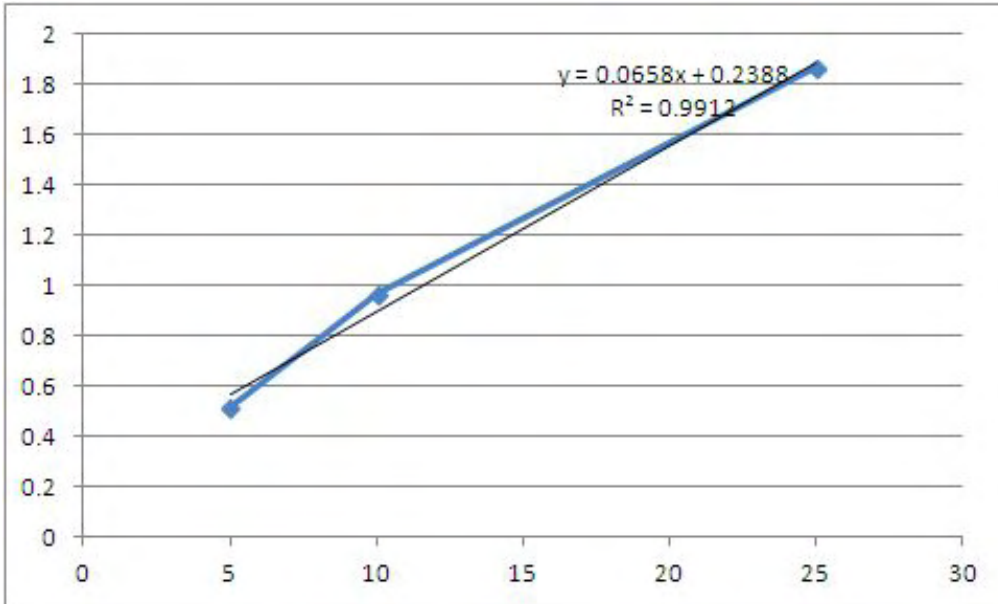
2) 생균수 측정

2, 4, 6 시간에 배양된 세균 배양액을 10배씩 희석하여 최종적으로 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 희석배수의 sample을 만들어 plate에 도말하고 NAD가 첨가된 chocolate 배지에서 혐기배양한 후 plate의 colony 개수를 세어 균수를 측정하였다.

배양시간 (hr)	2 hr		4 hr		6 hr	
O.D 값 (600nm)	0.427		0.968		1.865	
생균수	plate 당	평균	plate 당	평균	plate 당	평균
10^{-6}	50	56	98	126	314	358
	62		154		402	
10^{-7}	4	6	11	15	56	48
	8		19		40	
10^{-8}	1	1	3	2	3	5
	1		1		7	

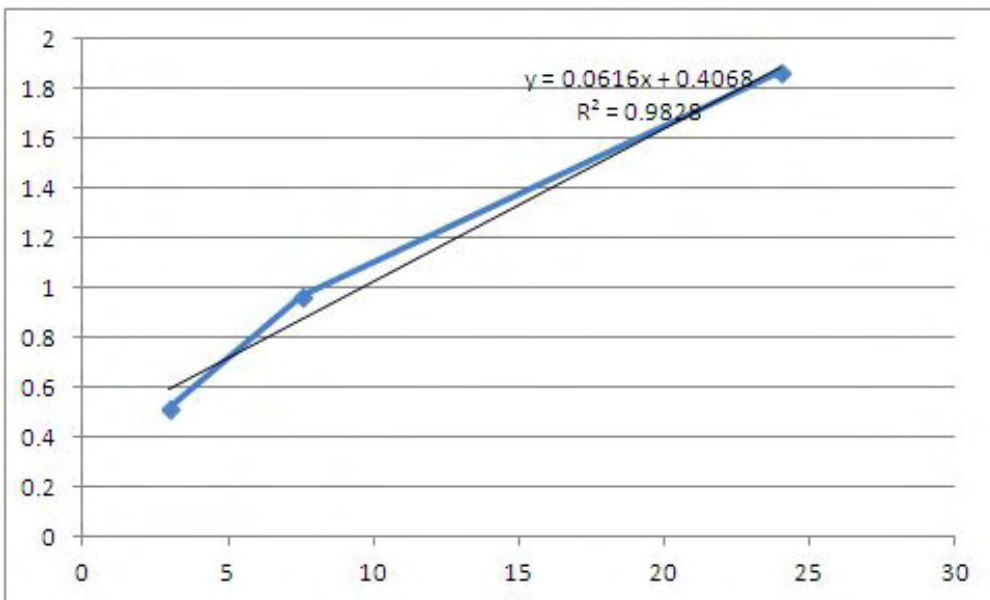
10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 각각의 희석배수 sample에 대하여 OD 값과 생균수와의 상관관계를 구한 후, OD 1에 대한 각각의 생균수를 구하고, 이들의 평균값을 최종 값으로 결정한다.

가) 10^{-8} 희석배수에서의 상관관계



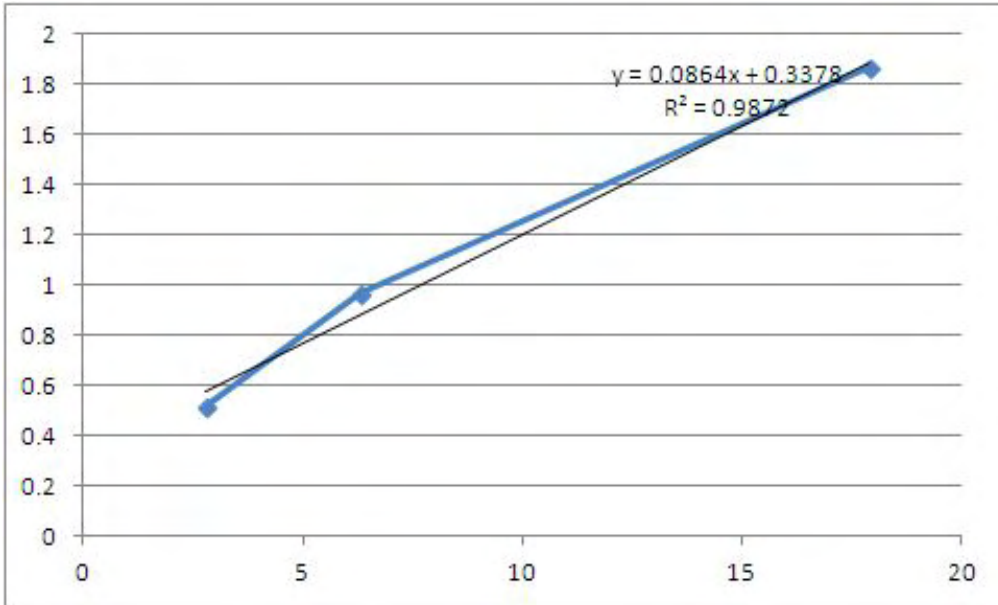
이를 통해 아래와 같은 방정식을 유도하였으며, OD 1 당 생균수는 다음과 같다.
 $y = 0.0658x + 0.2388$, OD = 1일 때, 생균수는 1.156×10^9 CFU/ml

나) 10^{-7} 희석배수에서의 상관관계



이를 통해 아래와 같은 방정식을 유도하였으며, OD 1 당 생균수는 다음과 같다.
 $y = 0.0616x + 0.4068$, OD = 1일 때, 생균수는 9.26×10^8 CFU/ml

다) 10^{-6} 희석배수에서의 상관관계



이를 통해 아래와 같은 방정식을 유도하였으며, OD 1 당 생균수는 다음과 같다.

$$y = 0.0864x + 0.3378, \text{ OD} = 1 \text{ 일 때, 생균수는 } 7.66 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$$

위의 결과들을 종합하여 흉막폐렴균 혈청형 2형의 OD 1 당 최종 생균수는 9.49×10^8 CFU/ml로 결정하였다.

나. 흉막폐렴균 혈청형 5형 배양실험

(1) Optical density와 생균수의 상관관계

1) 배양 시간에 따른 optical density 변화

배양 시간 (hr)	0 hr	2 hr	4 hr	6 hr
O.D 값	0.023	0.695	1.241	1.865

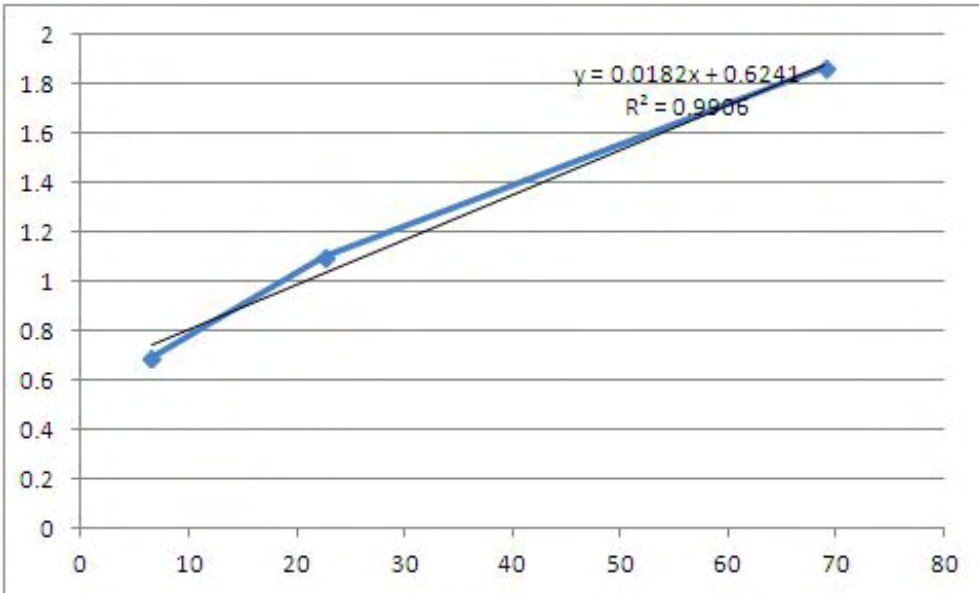
2) 생균수 측정

2, 4, 6 시간에 배양된 세균 배양액을 10배씩 희석하여 최종적으로 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 희석배수의 sample을 만들어 plate에 도말하고 NAD가 첨가된 chocolate 배지에서 혐기배양한 후 plate의 colony 개수를 세어 균수를 측정하였다.

배양시간 (hr)	2 hr		4 hr		6 hr	
O.D 값 (600nm)	0.695		1.241		1.865	
생균수	plate 당	평균	plate 당	평균	plate 당	평균
10^{-6}	132	150	553	512	1481	1570
	168		471		1659	
10^{-7}	10	13	52	45	117	138
	16		38		159	
10^{-8}	3	2	6	5	15	16
	1		4		17	

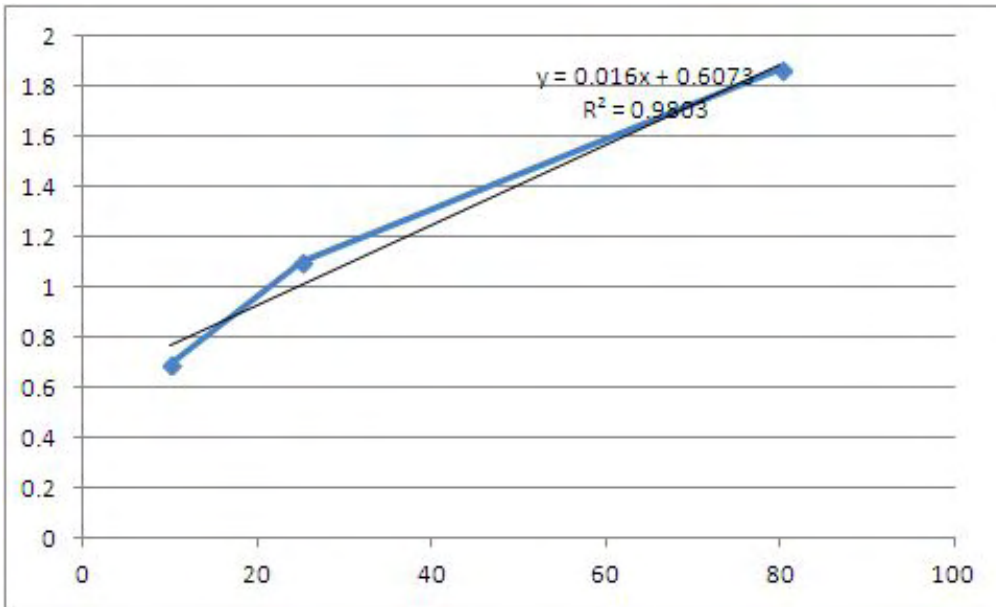
10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 각각의 희석배수 sample에 대하여 OD 값과 생균수와의 상관관계를 구한 후, OD 1에 대한 각각의 생균수를 구하고, 이들의 평균값을 최종 값으로 결정한다.

3) 10^{-8} 희석배수에서의 상관관계



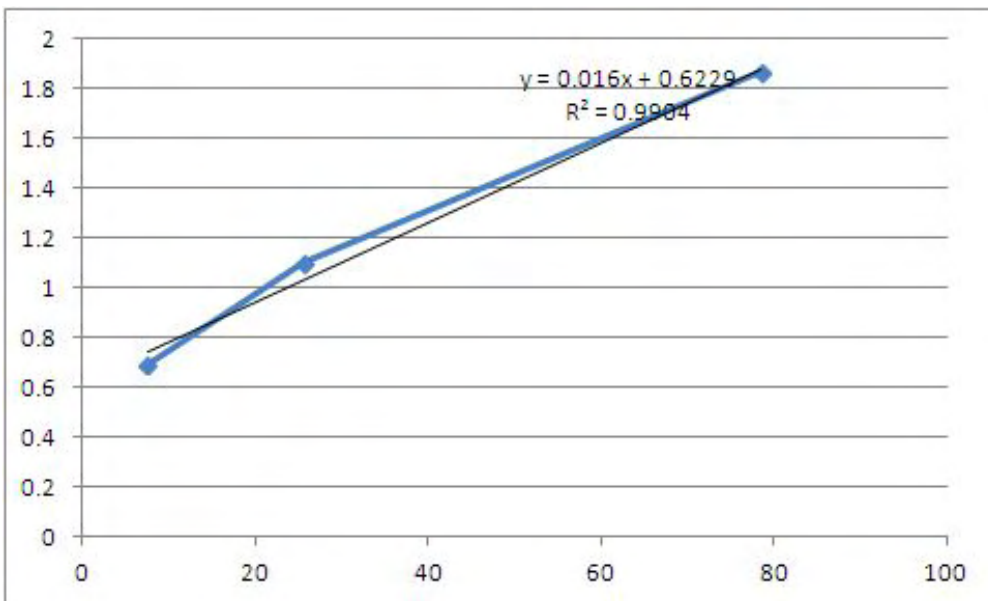
이를 통해 아래와 같은 방정식을 유도하였으며, OD 1 당 생균수는 다음과 같다.
 $y = 0.016x + 0.6073$, OD = 1일 때, 생균수는 2.454×10^9 CFU/ml

4) 10^{-7} 희석배수에서의 상관관계



이를 통해 아래와 같은 방정식을 유도하였으며, OD 1 당 생균수는 다음과 같다.
 $y = 0.0182x + 0.6241$, OD = 1일 때, 생균수는 2.065×10^9 CFU/ml

5) 10^{-6} 희석배수에서의 상관관계



이를 통해 아래와 같은 방정식을 유도하였으며, OD 1 당 생균수는 다음과 같다.
 $y = 0.016x + 0.6229$, OD = 1일 때, 생균수는 2.356×10^9 CFU/ml

위의 결과들을 종합하여 흉막폐렴균 혈청형 5형 균주의 OD 1 당 최종 생균수는 2.29×10^9 cfu/ml로 결정하였다.

제 9 장 백신 등록 허가 시험

제 1 절 서 설

돼지 쉰코바이러스 2형 단일 백신 및 홍막페렘 복합 백신 제품화를 위한 대량 생산 체계를 확립한 것을 토대로 백신 등록 허가 시험 과제에서는 이러한 기술적 성과를 바탕으로 백신의 산업화를 위한 품목허가 시험 및 대관 업무를 수행하였다. 백신의 품목허가 과정에 있어 반드시 포함되어야 할 자료들이 있는데, 백신주의 특성 및 전 임상 실험을 통한 백신의 조성 결정, 실험동물에서의 안전성 및 효능 확인, 야외 임상실험을 통한 목적 동물에서의 안전성 및 효능 확인, 백신의 유효기간 설정을 위한 안정성 데이터가 그것이다. 앞에 언급된 내용들은 기타 다른 세부 과제들을 통해서 충실히 이행되었고, 본 세부과제에서는 백신의 안정성 실험을 직접 실시하고, 그 외 모든 자료를 취합하여 농림축산검역본부로부터 돼지 쉰코바이러스 2형 단일 백신 및 홍막페렘 복합 백신의 제조품목허가 승인을 얻는데 주력하였다.

1차년도 연구과제를 통해서 돼지 쉰코바이러스 2형 단일 백신의 제조 품목허가 승인을 얻어 낸 바 있으며, 2,3차년도 연구과제를 통해서 약 15개월 동안 복합 백신의 안정성을 확인하였다. 안정성 지표에는 복합 백신의 물리적 특성, 무균시험, 수소이온농도, 방부제 정량시험, 불활화 확인시험, 면역원성 시험이 있으며, 제조 직후부터 15개월 동안 3개월 단위로 동일한 실험을 반복하여 실험 결과를 비교 평가하도록 되어 있다. 그 결과, 복합 백신의 색조나 내용물의 균일성 등이 15개월 동안 변함없이 그대로 유지되었고, 수소이온 농도와 포르말린 함량도 규정 범위 내에서 변함없이 유지되었다. 백신의 무균 상태 역시 변화 없었으며, 면역원성은 15개월이 경과 하면서 일부 감소하는 경향을 보이기는 하였지만, 국가검정 기준을 충분히 만족시키는 결과를 얻을 수 있었다. 이상의 결과들을 바탕으로 “쉰코 프라임-S”라는 제품명의 복합 백신에 대한 제조품목허가 서류를 제출하여 승인 심사가 진행 중에 있으며, PCV2 whole 바이러스 단일 백신처럼 큰 문제없이 제품 판매 승인을 얻을 수 있으리라 생각된다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 돼지 썬코바이러스 2형 단일백신 품목허가 시험 실시 (제조 직후)

가. 백신의 조성

내 용 물	함 량 (1 ml/dose)
PCV2 whole virus 항원	Real Time PCR Threshold Cycle값이 14.5 이하
수산화 알루미늄 겔	10%
Formalin	0.2% 이하

나. 특성시험

동물용의약품 생물학 제재 일반검정기준에 따라 시험백신에 대한 색, 혼탁도, 침전물의 유무와 색채 이물에 대하여 100룩스 광도에서 검사하고, 이취에 대해서도 검사한다.

다. 무균시험

동물용의약품 생물학제재 일반검정기준에 따라 nutrient agar(NA), nutrient broth(NB), thioglycollate(Thio) 배지에 각각 접종하여 22°C 및 37°C에서 각각 배양 관찰 하며, Mycoplasma는 PCR을 통한 확인을 감염여부를 확인하고 양성이 나타 날 경우 배양을 실시한다.

라. 수소이온 농도 시험

동물용의약품 생물학적 제재 일반검정기준에 따라 12개월 경과 시점에서 수소이온농도를 측정하였다.

마. 방부제 정량시험

동물용의약품 생물학적 제재 일반 검정기준에 준하여 섯프시약을 이용한 포르말린 함량 조사를 실시하였다.

바. 불활화 확인시험

동물용의약품 생물학적 제재 국가검정기준에 따라 공시품을 원심한 후 적당량을 투석막에 넣고 4°C에서 공시품 100배량 이상의 인산완충액(PBS, pH 7.4)에서 투석하여 불활화제를 제거한 것을 시험재료로 한다. 불활화제를 제거한 시험재료를 PK15세포에 0.1 ml씩 각각 2 well 이상 접종하고 37°C에서 1시간 정치한 다음 세포유지용 배양액을 가하여 37°C에서 7일간 배양하여 배양세포에서 세포변성효과(CPE) 및 혈구응집(HA)을 확인한다.

사. 면역원성 시험

(1) 기니픽

면역원성 시험은 국가검정을 기준으로 진행하였으며, 제조직후부터 6개월 경과 시점까지는 안전시험에 공시된 1두분 근육접종 기니픽 4마리와 대조군 2마리를 사용하였고, 검정기준 변경 후에는 안전시험 기니픽과 따로 공시하여 역가 시험을 실시하였다. 역가시험 방법 자체는 변경전과 변경후가 동일하며, 공시백신 1두분을 2주 간격으로 2회 접종하였다. 2차접 종 2주 후에 채혈을 실시하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 ELISA 항체가를 측정한다.

(2) 자 돈

자돈에 대한 실험은 국가 검정기준에는 없으나, 목적동물에 대한 면역원성을 확인하고자 실시하였다. 단, 기니픽에 대한 실험은 시간경과 별로 진행하였으나, 돼지에 대한 역가시험은 일회성으로 실시하였다. 실험방법은 생후 3주령 이유자돈 10마리를 공시하여, 6마리는 시험군으로, 나머지 4마리는 대조군으로 사용하였다. 공시백신 1두분을 2주 간격으로 2회 접종하며, 2차접종 2주후에 채혈하여 PCV2에 대한 ELISA 항체가를 측정하였다. 단, 돼지를 대상으로 한 ELISA 항체가는 S/P 값으로 표기했으며, ELISA Kit는 JENO Biotech에서 제조한 것으로 하였다. S/P값이 0.4 이상일 때 양성으로 판정하였다. 항체역가를 분석하기 위하여 Lot별 시험군과 대조군의 항체수준을 Mann-Whitney 검사법을 이용하여 비교하였으며, 시험군 또는 대조군 끼리 Lot별 항체가 차이는 Wilcoxon paired t test를 실시하였다.

2. 돼지 썬코바이러스 단일백신품목허가 시험 실시 (안정성 확인)

가. 장기(24개월) 특성시험

동물용의약품 생물학적 제재 일반검정기준에 따라 제조직후부터 제조 후 24개월까지 국가검정기준에 따라 시험백신에 대한 색, 혼탁도, 침전물과 이물의 유무를 100룩스 광도에서 검사하고, 이취에 대해서도 검사한다.

나. 장기(24개월) 무균시험

(1) 일반세균 무균시험

동물용의약품 생물학적 제재 일반검정기준에 준하여 각각의 Lot에 대하여 제조직후부터 24개월 까지 무균검사법에 따라 Lot별로 nutrient agar(NA), nutrient broth(NB), thioglycollate(Thio) 배지에 각각 접종하여 22°C 및 37°C에서 각각 배양 관찰한다.

(2) 마이코플라즈마 무균시험

동물용의약품 생물학적 제재 일반검정기준에 따라, 일반세균 검사와 동시에 마이코플라즈마

검사도 실시한다. 마이코플라즈마에 대한 확인은 제조직후와 3개월 경과 시점에서는 직접배양을 통한 확인을 실시하였으며, 이후에는 PCR을 통해 확인하였다. (단, PCR결과가 양성으로 나왔을 경우 PPLO배지를 통한 발육시험을 통해 재확인 실험을 실시하고, 음성이 나왔을 경우 마이코플라즈마 음성으로 간주한다.)

다. 장기(24개월) 방부제 함량 시험

동물용의약품 생물학적 제재 일반검정기준에 따라 제조직후부터 24개월경과 시점까지 섯프시약을 이용한 포르말린 함량시험을 실시한다.

라. 장기(24개월) 수소이온 농도

동물용의약품 생물학적 제재 일반검정기준에 따라 각 Lot에 대한 수소이온농도를 측정하였다. 검정기준의 변경으로 인해 제조 9개월 경과시점부터 측정을 시작하였다.

마. 장기(24개월) 불활화 확인시험

동물용의약품 생물학적 제재 일반검정기준에 따라 각 Lot에 대한 불활화 확인시험을 제조직후부터 24개월 까지 PK15 세포를 이용하여 실시한다.

바. 장기(24개월) 면역원성 시험

제조직후부터 6개월 경과까지 역가시험은 안전시험에 공시된 기니픽을 이용하여 실시하였으며, 안전시험에 공시된 근육 접종군 4마리와 대조군 2마리를 역가시험에 공시하였다. 이후에는 안전시험과 역가시험에 사용된 기니픽이 따로 공시되었으며, 접종방법에 있어서는 변경 없이 동일하였다.

3. 돼지 쉐코바이러스 단일백신 등록 허가서 제출

"국민이 신뢰하고 세계가 인정하는 글로벌 검역원"



국립수의과학검역원



수신자 수신자 참조
(경유)

제목 동물용의약품 제조품목 허가(알림)

1. 동물용의약품등 제조품목 허가 신청(2010.09.27)과 관련됩니다.
2. 귀 사의 동물용의약품 제조품목 허가신청 건에 대하여는 불임과 같이 허가하오니 제조 및 품질관리에 안전을 기하시기 바라며, 동 품목은 「동물용의약품등 취급규칙」 제7조의2 및 「신약 등의 재심사 기준(검역원고시)」에 따라 **시판 14일 전까지 사용성적조사 및 특별조사계획서(동 고시 별지 제2호 서식)**를 우리원(동물약품관리과)으로 제출하여 주시기 바랍니다.
3. 아울러, 관련과 및 한국동물약품협회에서는 업무에 참고하시기 바랍니다.

- 아 래 -

업체명	제품명	원료약품	효능 및 효과	비고
(주) 코미팜	써코프라임 (CircoPrime)	<ul style="list-style-type: none"> • PCV2 whole virus 항원 • 수산화알루미늄 겔 • Formalin 	돼지 쉐코바이러스 2형(PCV2) 감염으로 인한 질병 예방	신약

- 불임
1. 제조품목 허가증 1부(별첨)
 2. 써코프라임(33-293) 공개부표
 3. 써코프라임(33-293) 비공개부표. 끝.

국립수의과학검역원



수신자 (주)코미팜(경기도 시흥시 정왕동 1236-6, 대표:문성철), 질병관리과장, 동물약품평가과장, 바이러스과장, 한국동물약품협회장

제 033 - 293 호

동물용의약품등 제조 품목 허가(신고)증

업 체 명 : (주)코미팜

업 종 : 동물용의약품등 제조업

제 품 명 : 씨코프라임(CircoPrime)

구 분 : 동물용의약품

허 가 조 건 : 재심사 신청기간 : 2017.05.02-2017.05.01

허가(신고수리)번호 : 제 033 - 293 호

최 초 허 가 년 월 일 : 2011.05.02

부 표 : 별 첨

동물용의약품등취급규칙 제 5 조 · 제 9 조 제 4 항 · 제 11 조 및 제 16 조
제 3 항 규정에 의하여 위와 같이 허가합니다.

2011 년 05 월 02 일

국립수의과학검역원장 인



4. 돼지 쉼코바이러스 및 흉막폐렴 백신 품목허가 시험 실시 (제조 직후)

가. 백신의 조성

제조번호 (Lot No.)	항원 함량 (1 ml/dose)	생산 수량
Lot-01	<ul style="list-style-type: none"> • <i>A. pleuropneumoniae</i> 2 type ----- -----1.0 x 10^{9.0} CFU/ml 이상 • <i>A. pleuropneumoniae</i> 5 type ----- -----1.0 x 10^{9.0} CFU/ml 이상 • PCV2 whole virus 항원 ----- ----- Real Time PCR Threshold Cycle값이 14.5 이하 • IMS1313 adjuvant ----- 30 % • Formalin ----- 0.2 % 이하 	50 ml x 1,000병
Lot-02	<ul style="list-style-type: none"> • <i>A. pleuropneumoniae</i> 2 type ----- -----1.0 x 10^{9.0} CFU/ml 이상 • <i>A. pleuropneumoniae</i> 5 type ----- -----1.0 x 10^{9.0} CFU/ml 이상 • PCV2 whole virus 항원 ----- ----- Real Time PCR Threshold Cycle값이 14.5 이하 • IMS1313 adjuvant ----- 30 % • Formalin ----- 0.2 % 이하 	50 ml x 1,000병
Lot-03	<ul style="list-style-type: none"> • <i>A. pleuropneumoniae</i> 2 type ----- -----1.0 x 10^{9.0} CFU/ml 이상 • <i>A. pleuropneumoniae</i> 5 type ----- -----1.0 x 10^{9.0} CFU/ml 이상 • PCV2 whole virus 항원 ----- ----- Real Time PCR Threshold Cycle값이 14.5 이하 • IMS1313 adjuvant ----- 30 % • Formalin ----- 0.2 % 이하 	50 ml x 1,000병

나. 특성시험

(1) 특성시험 방법

국가검정 동물용의약품 생물학제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를 5±3℃ 냉암소에 보관하면서 각 제조번호 별로 색, 혼탁도, 침전물의 유무와 색채 이물에 대하여

1000룩스 광도에서 검사하고, 이취에 대해서도 검사한다.

1) 색조시험

자연광 또는 1,000 룩스 이상의 백색광원 아래에서 백색의 배경을 바탕으로 백신의 색조를 관찰한다.

2) 투명도시험 또는 혼탁도시험

자연광 또는 1,000 룩스 이상의 백색광원에 의한 투과광선 아래에서 투명도를 관찰한다. 단, 이 시험에서 투명이라 함은 액체 중의 미립자에 의한 광선 산란이 없는 경우를, 불투명이라 함은 배경이 인정되지 않는 경우를 말한다.

3) 이물시험

자연광 또는 1,000 룩스 이상의 백색광선 아래에서 백색 또는 흑색의 배경을 이용하여 육안으로 관찰한다.

4) 이취시험

코를 이용하여 개봉된 백신의 냄새를 맡아 본다.

5) 내용물의 균일성시험

불투명한 용기에 들어있는 불활화백신은 투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰한다.

다. 무균시험

(1) 무균시험 방법

국가검정 동물용의약품 생물학제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 냉암소에 보관하면서 Lot 별로 무균시험을 실시하였다. Nutrient agar(NA), Nutrient broth(NB), thioglycollate(Thio) 배지에 각각 접종하여 22°C 및 37°C 에서 각각 배양 관찰 하며, Mycoplasma는 PCR을 통한 확인을 감염여부를 확인하고 양성이 나타 날 경우 배양을 실시하였다.

1) 백신의 개봉

시험은 무균실에서 엄격한 무균 조작법에 의하여 실시한다. 백신의 개봉할 때에 내용이 오염 되든가, 소독제가 내부에 침입하지 않도록 주의하여야 한다.

2) 배 지

배지는 nutrient broth, nutrien agar 사면 및 액체 thioglycolate 배지를 사용한다. 액체 thioglycolate 배지의 상부에서 30% 이상이 핑크색으로 변한 것은 사용하여서는 안 되며 가열

하여 산소를 제거하였을 때에는 무방하다.

단, 무균시험에 필요하다고 인정될 때에는 마이코플라즈마 배지등 각종 다른 배지를 사용할 수 있다.

3) 배양재료

3개 이상의 백신에 대하여 액상 제제는 그대로, 건조제제는 침부된 희석액으로, 침부 희석액이 없는 건조제제는 규정량의 멸균 생리식염수로 용해한 후 다음 표와 같이 배양한다.

검사품의 표시량	배 양 량	배 지 개 수	배 양 내 역
30 ml 이 상	6 ml	4개	2 ml - 2 개 1 ml - 2 개
30 ml 미 만	3 ml	4개	1 ml - 2 개 0.5 ml - 2 개

1개당 배지량은 nutrien agar는 10 ml, nutrient broth는 10 ml, 액체 Thioglycolate 배지는 10 ml 이상으로 한다.

4) 배 양

접종 후 충분히 복합한 배양 시험관을 양분하여 37°C 및 22°C 각각 7일간 배양 관찰한다. 단, 세균의 발육이 의심될 때 또는 제제에 의하여 배지가 혼탁할 경우 등 필요하다고 인정될 때에는 새로운 배지에 이식하여 4일간 관찰할 수 있다.

라. 수소이온 농도 시험

(1) 수소이온 농도 시험 방법

국가검정 동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 준하여 공시백신 각각의 제조번호를 5±3°C 냉암소에 보관하면서 수소이온농도시험을 실시하였다.

1) pH 표준액

pH 표준액은 pH의 기준으로 쓴다. pH 표준액의 조제에 쓰는 물은 정제수를 증류하여 유액을 15분 이상 끓여서 이산화탄소를 날려 보내고 이산화탄소흡수관(소오다석회)을 달고 식힌다. 표 2의 pH 표준액은 경질유리병 또는 폴리에틸렌병에 보관한다.

장기간의 보관에 의해 pH가 변화될 때가 있으므로 보통 산성의 pH 표준액은 3개월 이내에 쓰고 염기성의 pH 표준액은 이산화탄소흡수관(소오다석회)을 달아 보관하며 1개월 이내에 쓴다. 제조한지 오래된 것은 새로 만든 것과 비교하여 pH가 같은지 확인 한 다음 쓴다.

2) 장 치

pH 측정기는 다음 조작법에 따라 임의의 한 종류의 pH 표준액의 pH를 매회 검출부를 물로 잘 씻은 다음 5 회 반복하여 측정 했을 때 그 재현성이 ±0.05 pH 이내의 것을 쓴다.

3) 조 작 법

유리전극은 미리 물에 수 시간 이상 담구어 둔다. pH 측정기는 전원을 넣어 장치가 안정된 것을 확인한 다음에 쓴다. 검출부를 물로 잘 씻고 부착한 물은 여과지 등으로 가볍게 닦아 낸다. 두 종류의 pH 표준액을 써서 pH 측정기를 보정하며, 다음과 같이 한다. 전극을 인산염 pH 표준액에 담그고 영점교정용다이얼로 표의 pH에 일치시킨다. 다음에 예상되는 검액의 pH에 가까운 pH를 갖는 두 번째 pH 표준액을 사용하여 같은 조건으로 pH를 측정한다. 장치의 교정이 끝난 다음 검출부를 물로 잘 씻고 여과지 등으로 가볍게 닦아낸다. 검출부를 검액에 담그고 안정된 지시 값이 얻어지는지를 확인한 다음 그 값을 읽는다. 또한 검액의 온도는 교정에 쓴 pH 표준액의 온도와 같게 한다($\pm 2^{\circ}\text{C}$).

마. 방부제 정량시험

(1) 방부제 정량시험 방법 (포르말린의 정량)

동물용의약품 생물학적제제 일반 검정기준에 준하여 섯프시약을 이용한 비색법으로 포르말린 함량 조사를 실시하였다.

1) 시 약

가) 섯프(Schiff)시약

잘 마쇄된 염기성 푸크신(Basic fuchsin : 분석시약) 0.5 g을 뜨거운 증수에 용해하여 실온으로 방치한 다음 증류수를 가하여 300 ml로 한다(이하 "a"액이라 한다). 별도로 무수 아황산나트륨(분석시약) 5 g을 증류수에 용해시키고 증류수를 가하여 50 ml로 한다(이하 "b"액이라 한다). b액에 a액을 소량씩 교반하면서 전량을 가하여 복합한다. 이 복합액에 염산(분석시약) 5 ml를 가하여 액이 연분홍색에서 담황색으로 변화하면 증류수를 가하여 500 ml로 한 다음 착색병에 넣어 냉암소에 보존하여 1주일 후에 사용한다. 액의 색은 무색 투명하게 되나 담황색이 남아 있어도 사용할 수 있으며 연분홍색을 나타낼 때에는 소량의 활성탄으로 탈색한다.

나) 포름알데히드(Formaldehyde)

파라포름알데히드(Paraformaldehyde) 또는 포르말린(증류한 것, 포름알데히드 37%)을 표준품으로 사용한다.

표준 용액 0.004% (ml)	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
정제수 (ml)	9.5	9.0	8.0	7.0	6.0	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0
포르말린 농도 (%)	0.0002	0.0004	0.0008	0.0012	0.0016	0.0020	0.0024	0.0028	0.0032	0.0036

2) 시 험

가) 시험 표준 용액의 조제

표준용액계열은 포름알데히드로서 1-20 µg/ml 농도가 되게 아래와 같이 조제한다.

나) 검액의 조제

공시품을 위의 표준용액계열 중간 농도가 되게 증류수 또는 적정 회석액으로 희석하여 검액으로 한다.

다) 시험 조작

위의 검액 및 포르말린 표준용액 각각 1 ml에 섯프(schiff)시약 0.2 ml을 가하여 실온에서 30분간 정확히 반응시킨 후 파장 520 nm에서 흡광도를 측정하고, 위와 동일하게 검액 1 ml에 섯프(Schiff)시약 대신 증류수 또는 적정 회석액 0.2 ml을 가하여 대조시료로 한다.

라) 함량계산

위의 표준용액 계열에서 측정된 흡광도를 이용하여 다항식 표준곡선(polynomial regression)을 작성하고 검액 흡광도에서 대조시료흡광도를 뺀 값을 위의 표준곡선에 대입하여 포르말린 함량을 산출한다.

마. 불활화 확인 시험

동물용의약품 생물학적 제재 국가검정기준에 따라 시험백신에 대한 불활화 확인 시험을 실시하였다.

(1) 불활화 확인 시험 방법

1) 시험 재료

공시품을 원심한 후 적당량을 투석막에 넣고 4°C에서 공시품 100배량 이상의 인산완충액(PBS, pH 7.4)에서 투석하여 불활화제를 제거한 것을 시험재료로 한다.

2) 시험 방법

불활화제를 제거한 시험재료를 PK15세포에 0.1 ml씩 각각 2 well 이상 접종하고 37°C에서 1시간 정치한 다음 세포유지용 배양액을 가하여 37°C에서 7일간 배양하여 배양세포에서 세포 변성효과(CPE) 및 혈구응집(HA)을 확인한다.

3) 판정

시험백신에 대한 불활화 확인시험 결과 세포 변성(CPE) 및 닭, 돼지의 적혈구에 대한 혈구응집(HA)을 확인한다.

사. 면역원성 시험

동물용의약품 생물학적 제제 국가검정기준에 따라 시험백신에 대한 면역원성 시험을 실시하였다. 또한 목적동물에 대한 면역원성 시험을 실시하였다.

(1) 실험동물 시험

1) 돼지 썬코바이러스

가) 기니픽 접종 시험

면역원성 시험은 국가검정을 기준으로 진행하였으며, 기니픽 4마리와 대조군 2마리를 실험동물로 사용하여 공시된 시험백신을 1두분 근육접종 하였다. 접종 후 4주후에 채혈을 실시하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 ELISA 항체가를 측정한다. 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 국가검정기준은 ELISA 항체가 320배 이상이다.

2) 흉막폐렴균 실험동물 접종 시험

가) 토끼 접종 시험

흉막폐렴균의 각각 혈청형에 대한 항체가 시험은 감염되지 않은 1.5~2.0 kg의 건강한 토끼 6마리를 선정하여 4마리에는 돼지 1두분 용량을 1회 근육 접종하고, 2마리는 대조군으로 설정한 후, 접종 2주 후에 각각 채혈하여 혈청형별 항체가를 ELISA법으로 측정하였다. 국가검정기준은 시험군은 ELISA 항체가 320배 이상이며 대조군은 10배 이하의 항체가 이다.

(2) 목적동물 접종 시험(자돈)

자돈에 대한 실험은 국가 검정기준에는 없으나, 목적동물에 대한 면역원성을 확인하고자 실시하였다. 실험은 시간경과 별로 진행하였으나, 역가시험은 일회성으로 실시하였다. 실험방법은 생후 3주령 이유자돈 10마리를 공시하여, 6마리는 시험군으로, 나머지 4마리는 대조군으로 사용하였다. 공시백신 1 ml을 자돈 5주령에 1회 접종하였고, 접종 2주후에 채혈하여 흉막폐렴균 및 돼지 썬코바이러스에 대한 ELISA 항체가를 측정하였다. 단, 돼지를 대상으로 한 돼지 썬코바이러스에 대한 ELISA 항체가는 S/P 값으로 표기했으며, ELISA Kit는 JENO Biotech에서 제조한 것으로 하였다. S/P값 \geq 0.4일 때 양성으로 판정하였다.

5. 돼지 썬코바이러스 및 흉막폐렴 백신 품목허가 시험 실시 (안정성)

가. 장기(15개월) 특성시험

동물용의약품 생물학적 제제 일반검정기준에 따라 제조직후부터 제조 후 15개월까지 국가검정기준에 따라 시험백신에 대한 색, 혼탁도, 침전물과 이물의 유무를 1000 룩스 광도에서 검사하고, 이취에 대해서도 검사한다.

나. 장기(15개월) 무균시험

(1) 일반세균 무균시험

동물용의약품 생물학적 제재 일반검정기준에 준하여 각각의 Lot에 대하여 제조직후부터 15개월 까지 무균검사법에 따라 Lot별로 nutrient agar(NA), nutrient broth(NB), Thioglycollate(Thio) 배지에 각각 접종하여 22°C 및 37°C 각각 배양 관찰한다.

(2) 마이코플라즈마 무균시험

동물용의약품 생물학적 제재 일반검정기준에 따라, 일반세균 검사와 동시에 마이코플라즈마 검사도 실시한다. 마이코플라즈마에 대한 확인은 제조직후와 3개월 경과 시점에서는 직접배양을 통한 확인을 실시하였으며, 이후에는 PCR을 통해 확인하였다. (단, PCR결과가 양성으로 나왔을 경우 PPLO배지를 통한 발육시험을 통해 재확인 실험을 실시하고, 음성이 나왔을 경우 마이코플라즈마 음성으로 간주한다.)

(3) 장기(15개월) 방부제 함량 시험

동물용의약품 생물학적 제재 일반검정기준에 따라 제조직후부터 15개월경과 시점까지 섯프시약을 이용한 포르말린 함량시험을 실시한다.

(4) 장기(15개월) 수소이온 농도

동물용의약품 생물학적 제재 일반검정기준에 따라 각 Lot에 대한 수소이온농도를 측정하였다. 검정기준의 변경으로 인해 제조 9개월 경과시점부터 측정을 시작하였다.

(5) 장기(15개월) 불활화 확인시험

동물용의약품 생물학적 제재 일반검정기준에 따라 각 Lot에 대한 불활화 확인시험을 제조직후부터 15개월 까지 PK15 세포를 이용하여 실시한다.

(6) 장기(15개월) 면역원성 시험

제조직후부터 15개월 경과까지 역가시험을 실시하였으며, 돼지 썬코바이러스에 대한 시험은, 기니픽 4마리와 대조군 2마리를 각 Lot 별로 역가시험에 공시하였다. 또한 흉막폐렴균에 대한 장기 면역원성 시험을 위해 각 Lot 별로 흉막폐렴균에 감염되지 않은 1.5~2.0 kg의 건강한 토끼 6마리를 선정하여 사용했다. 돼지 썬코바이러스에 대한 국가검정기준은 ELISA titer 320 배 이상이며, App에 대한 혈청형별 ELISA 항체가는 320배 이상이어야 하며, 대조군은 10배 이하이어야 한다.

6. 돼지 쉼코바이러스 및 흥막폐렴 백신 품목허가 제출

* 품목허가서류 제출 확인 공문 첨부

제 3 절 결과 및 고찰

1. 돼지 썬코바이러스 단일백신 품목허가 시험 실시 (제조 직후)

가. 특성시험 결과

3 Lot 모두 담홍색의 혼탁한 부유액이며, 정치하면 내용물의 침전이 생기나 흔들면 쉽게 균등액이 되며 소분된 내용물의 성상이 균일하고 이물이 존재하지 않는다.

Lot No.	결 과
Lot 1	적 합
Lot 2	적 합
Lot 3	적 합

나. 무균시험 결과

Lot No.	일반 세균			마이코플라즈마 (PCR 결과)
	시험배지	결 과 (7일간)		
		22°C	37°C	
Lot 1	NA	-*	-	음 성
	NB	-	-	
	Thio	-	-	
Lot 2	NA	-	-	음 성
	NB	-	-	
	Thio	-	-	
Lot 3	NA	-	-	음 성
	NB	-	-	
	Thio	-	-	

※ -* : 세균의 발육이 인정되지 않음

동물용 의약품 생물학제제 일반검정기준에 따른 시험백신의 무균시험 결과 3 Lot 모두 NA, NB, Thio에서 7일간 배양하였을 때 어떠한 세균 및 곰팡이의 발육도 나타나지 않았으며, 마이코플라즈마는 PCR 음성으로 확인되었다 (9개월 경과 이후).

다. 수소이온 농도 시험

측정된 수소이온농도는 Lot 별로 큰 차이 없이 7.14~7.24로 측정되었으며, 국가검정기준은 pH 6.0~8.0으로, 모두 이상이 없이 정상범위 안에 있었다.

Lot No.	결 과 (pH)
Lot 1	7.16
Lot 2	7.24
Lot 3	7.14

라. 방부제 정량시험

측정된 포르말린 함량은 0.17~0.19%로 국가검정기준인 0.2% 범위 안에 있었다.

Lot No.	포르말린함량 (%)
Lot 1	0.17%
Lot 2	0.19%
Lot 3	0.17%

마. 불활화 확인시험

시험백신에 대한 불활화 확인시험결과 세포변성(CPE) 및 닭, 돼지의 적혈구에 대한 혈구응집(HA)이 나타나지 않았다.

Lot No.	CPE	혈구응집 (HA)	
		닭 적혈구	돼지 적혈구
Lot 1	-	-	-
Lot 2	-	-	-
Lot 3	-	-	-

바. 면역원성 시험

(1) 기니픽

돼지 썬코 바이러스 2형에 대한 국가검정기준은 ELISA 항체가 320배 이상이며, 공시백신의 면역원성은 위 표에서 보는 바와 같이 기준치에 적합한 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 대조군의 경우 항체 음성으로 유지하고 있는 것으로 보아 실험에 대한 결과는 신뢰할 수 있다.

구분	개체번호	ELISA Titer		
		Lot1	Lot2	Lot3
시험군	1	1280	1280	640
	2	1280	1280	1280
	3	640	1280	1280
	4	640	640	640
평균		960	1120	960
대조군	1	<10	<10	<10
	2	<10	<10	<10
평균		<10	<10	<10

(2) 자 돈

검사결과 시험군과 대조군 사이에 Lot별로 시험군에서 대조군보다 통계학적으로 유의성 있게 높은 항체가 형성되었다. 동일 그룹간의 비교에서는 Lot별로 시험군 끼리 비교에서 Lot1와 Lot2($P=0.917$), Lot1와 Lot3($P=0.173$), Lot2와 Lot3($P=0.249$)로 유의성이 없는 것으로 확인되었다. 또한 대조군 끼리 비교에서는 Lot1와 Lot2($P=0.144$), Lot1와 Lot3($P=0.068$), Lot2와 Lot3($P=0.109$)로 유의성이 없는 것으로 확인되었다.

구분	개체번호	S/P 값		
		Lot 1	Lot 2	Lot 3
시험군	1	1.572	1.034	1.332
	2	0.874	1.256	1.257
	3	1.254	0.942	0.753
	4	0.698	0.734	0.648
	5	1.067	0.973	0.597
	6	0.883	1.346	0.834
평균		1.058	1.048	0.904
대조군	1	0.027	0.125	0.245
	2	0.224	0.264	0.264
	3	0.063	0.037	0.097
	4	0.045	0.074	0.168
평균		0.090	0.125	0.194
유의성 (p 값)		0.01	0.01	0.01

2. 돼지 썬코바이러스 단일백신품목허가 시험 실시 (안정성 확인)

가. 장기(24개월) 특성시험

제조직후부터 제조 후 24개월 경과까지 특성시험을 진행한 결과 성상의 변화없이 균일하게 유지되고 있음을 확인하였다.

Lot No.	제조직후	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월
Lot 1	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합
Lot 2	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합
Lot 3	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합

나. 장기(24개월) 무균시험

(1) 일반세균 무균시험

아래 표에서 보는 바와 같이 시간경과에 따른 세균발육이 없었으며, 3 Lot 모두 24개월 경과 시점까지 무균상태가 유지되고 있었다.

Lot No.	온도	배지	제조 직후	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월
Lot 1	22°C	NA	-*	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-	-
	37°C	NA	-	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-	-
Lot 2	22°C	NA	-	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-	-
	37°C	NA	-	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-	-
Lot 3	22°C	NA	-	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-	-
	37°C	NA	-	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-	-

(2) 마이코플라즈마 무균시험

마이코플라즈마에 대한 PCR검사 결과 모두 음성으로 나타났으며, 모두 음성으로 나타났기 때문에, PPLO배지를 통한 발육시험은 실시하지 않았다.

Lot No.	제조직후 (배양확인)	3개월 (배양확인)	6개월 (PCR)	9개월 (PCR)	12개월 (PCR)	18개월 (PCR)	24개월 (PCR)
Lot 1	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성
Lot 2	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성
Lot 3	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성

다. 장기(24개월) 방부제 함량 시험

3 Lot에 대한 포르말린 함량 0.16~0.19%로 비슷한 결과를 나타냈으며, 같은 Lot의 생산품의 경우에도 측정 시기별로 0.01~0.02% 오차가 나타나고 있으나, 모두 포르말린 함량 0.2%이내에서 측정되고 있었다.

Lot No.	포르말린 함량 (%)						
	제조 직후	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월
Lot 1	0.17	0.16	0.17	0.17	0.18	0.17	0.18
Lot 2	0.19	0.18	0.17	0.17	0.17	0.18	0.18
Lot 3	0.17	0.16	0.17	0.17	0.16	0.17	0.16

라. 장기(24개월) 수소이온 농도

측정된 수소이온농도는 Lot 별, 측정시기별로 큰 차이가 없었으며, 국가검정기준은 pH 6.0~8.0으로 모두 정상 범위내로 측정되었다.

Lot No.	9개월	12개월	18개월	24개월
Lot 1	7.16	7.15	7.12	7.17
Lot 2	7.24	7.16	7.18	7.15
Lot 3	7.14	7.12	7.15	7.13

마. 장기(24개월) 불활화 확인시험

3 Lot 모두 시간 경과에 따른 세포변성 및 혈구응집이 나타나지 않았으며, 혈구응집은 닭 적혈구와 돼지 적혈구를 이용하여, 확인하였다.

Lot No.	시험구분	제조직후	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월
Lot 1	CPE	-	-	-	-	-	-	-
	혈구응집 (닭/돼지)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Lot 2	CPE	-	-	-	-	-	-	-
	혈구응집 (닭/돼지)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Lot 3	CPE	-	-	-	-	-	-	-
	혈구응집 (닭/돼지)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

바. 장기(24개월) 면역원성 시험

돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 국가검정기준은 ELISA titer 320배 이상이며, 공시 백신에 대한 역가검사 결과 24개월 경과 후에도 기준이상의 결과를 확인할 수 있었다.

Lot No.	구분	ELISA Titer						
		제조직후	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월
Lot 1	시험군	960	880	1280	960	640	640	560
Lot 2	시험군	1120	960	880	800	720	640	480
Lot 3	시험군	960	960	720	800	960	960	640
대 조 균		< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

4. 돼지 쉼코바이러스 및 흉막폐렴 복합백신 품목허가 시험 실시 (제조 직후)

가. 특성시험 결과

제조번호	결 과
Lot 1	적 합
Lot 2	적 합
Lot 3	적 합

연한 백색에 가까운 홍색의 혼탁한 부유액이며 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하게 나타났다.

나. 무균시험 결과

Lot No.	일반 세균			마이코플라즈마 (PCR 결과)
	시험배지	결 과 (7일간)		
		22℃	37℃	
Lot 1	NA	-*	-	음 성
	NB	-	-	
	Thio	-	-	
Lot 2	NA	-	-	음 성
	NB	-	-	
	Thio	-	-	
Lot 3	NA	-	-	음 성
	NB	-	-	
	Thio	-	-	

※ - : 세균의 발육이 인정되지 않음

동물용 의약품 생물학제제 일반검정기준에 따른 시험백신의 무균시험 결과 각각의 제조번호 모두 NA, NB, Thio에서 7일간 배양하였을 때 어떠한 세균 및 곰팡이의 발육도 나타나지 않았다.

다. 수소이온 농도 시험 결과

제조번호	결 과 (pH)
Lot 1	7.12
Lot 2	7.13
Lot 3	7.11

측정된 수소이온농도는 Lot 별로 큰 차이 없이 7.11~7.13로 측정되었으며, 국가검정기준은 pH 6.0~8.0으로, 모두 이상이 없이 정상범위 안에 있었다.

라. 방부제 정량시험 결과

Lot No.	포르말린함량 (%)
Lot 1	0.18%
Lot 2	0.17%
Lot 3	0.17%

측정된 포르말린 함량은 국가검정기준인 0.2% 범위 안에 있었다. 위 시험항목에 대한 결과를 종합하여 볼 때, 시험백신은 백신으로서 갖춰야 할 기본적인 성상에 대한 조건을 충족하고 있으며, 무균 및 불활화가 확인된 백신임이 확인되었다.

마. 불활화 확인 시험 결과

Lot No.	CPE	혈구응집 (HA)	
		닭 적혈구	돼지 적혈구
Lot 1	-	-	-
Lot 2	-	-	-
Lot 3	-	-	-

시험 백신에 대한 불활화 확인시험결과 세포 변성 (CPE) 및 닭, 돼지의 적혈구에 대한 혈구 응집(HA)이 나타나지 않았다.

바. 면역원성 시험

(1) 실험동물 시험

1) 돼지 썬코바이러스

가) 기니픽 접종 시험

구분	개체번호	ELISA Titer		
		Lot1	Lot2	Lot3
시험군	1	1280	1280	1280
	2	1280	640	1280
	3	640	1280	1280
	4	640	1280	640
평균		960	1120	1120
대조군	1	<10	<10	<10
	2	<10	<10	<10
평균		<10	<10	<10

공시백신의 면역원성은 위 표에서 보는 바와 같이 기준치에 적합한 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 대조군의 경우 항체 음성으로 유지하고 있는 것으로 보아 실험에 대한 결과는 신뢰할 수 있다.

2) 흉막폐렴균 실험동물 접종 시험

가) 토끼 접종 시험

시험백신	시험군	토끼 No.	접종량/ 접종부위	접종 방법	항체가	
					App 2	App 5
Lot 1	접종군	1	1.0 ml/ 근육	1회접종	640	320
		2			1280	640
		3			640	1280
		4			320	640
Lot 2	접종군	1	1.0 ml/ 근육	1회접종	320	640
		2			1280	640
		3			640	640
		4			640	320
Lot 3	접종군	1	1.0 ml/ 근육	1회접종	320	320
		2			1280	640
		3			320	640
		4			1280	1280
대조군	무접종군	1		-	<10	<10
		2			<10	<10

ELISA 항체가 검사 결과 흉막폐렴균의 각 혈청형 별 항체가는 320~1280배로 나타났다. 대조군의 경우 모두 10배의 항체가로 시험백신 접종군에 있어서 높은 수준의 항체가를 형성하였

음을 확인 할 수 있었다.

(2) 목적동물 접종 시험(자돈)

1) 돼지 썬코바이러스 S/P ratio 결과

구분	개체번호	S/P 값		
		Lot 1	Lot 2	Lot 3
시험군	1	0.672	0.987	1.121
	2	1.023	1.112	1.257
	3	0.573	0.978	0.897
	4	0.897	0.652	0.987
	5	1.121	1.212	1.231
	6	0.835	0.895	0.673
평균		0.854	0.973	1.028
대조군	1	0.032	0.031	0.221
	2	0.026	0.164	0.122
	3	0.121	0.026	0.141
	4	0.045	0.037	0.168
평균		0.056	0.065	0.163
유의성 (p 값)		0.01	0.01	0.01

2) 홍막페렴균 ELISA 항체가 결과

구분	개체번호	항체가	
		홍막페렴균 혈청형 2형	홍막페렴균 혈청형 5형
시험군	1	1280	640
	2	640	1280
	3	640	640
	4	640	640
	5	320	320
	6	1280	1280
대조군	1	< 10	< 10
	2	< 10	< 10
	3	< 10	< 10
	4	< 10	< 10

백신 접종 시험군은 모두 양성 S/P 값이 나타났으며, 대조군은 모두 음성의 S/P 값을 나타내었다. 따라서 목적 동물에서도 돼지 쉰코바이러스에 대한 충분한 면역을 유도하는 것으로 생각된다. 또한 홍막페렴균의 각각의 혈청형에 대한 ELISA 항체가 검사 결과를 보면 시험군은 320 ~ 1280 배의 높은 항체가를 나타내었으며, 대조군은 10배 이하의 결과를 나타내어 백신의 효능을 확인하였다.

5. 돼지 쉰코바이러스 및 홍막페렴 복합백신 품목허가 시험 실시 (안정성)

가. 장기(15개월) 특성시험

제조직후부터 제조 후 15개월 경과까지 특성시험을 진행한 결과 성상의 변화 없이 균일하게 유지되고 있음을 확인하였다.

Lot No.	제조직후	3개월	6개월	9개월	12개월	15개월
Lot 1	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합
Lot 2	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합
Lot 3	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합

나. 장기(15개월) 무균시험

(1) 일반세균 무균시험

아래 표에서 보는 바와 같이 시간경과에 따른 세균발육이 없었으며, 3 Lot 모두 12개월 경과 시점까지 무균상태가 유지되고 있었다.

Lot No.	온도	배지	제조 직후	3개월	6개월	9개월	12개월	15개월
Lot 1	22°C	NA	-*	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-
	37°C	NA	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-
Lot 2	22°C	NA	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-
	37°C	NA	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-
Lot 3	22°C	NA	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-
	37°C	NA	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-

(2) 마이코플라즈마 무균시험

마이코플라즈마에 대한 PCR검사 결과 모두 음성으로 나타났으며, 모두 음성으로 나타났기 때문에, PPLO배지를 통한 발육시험은 실시하지 않았다.

Lot No.	제조직후 (배양확인)	3개월 (배양확인)	6개월 (PCR)	9개월 (PCR)	12개월 (PCR)	15개월 (PCR)
Lot 1	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성
Lot 2	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성
Lot 3	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성

다. 장기(15개월) 방부제 함량 시험

3 Lot 에 대한 포르말린 함량 0.16~0.18%로 비슷한 결과를 나타냈으며, 같은 Lot의 생산품의 경우에도 측정 시기별로 0.01~0.02% 오차가 나타나고 있으나, 모두 포르말린 함량 0.2%

이내에서 측정되고 있었다.

Lot No.	포르말린 함량 (%)					
	제조 직후	3개월	6개월	9개월	12개월	15개월
Lot 1	0.16	0.16	0.17	0.18	0.17	0.16
Lot 2	0.18	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
Lot 3	0.17	0.17	0.17	0.16	0.16	0.16

라. 장기(15개월) 수소이온 농도

측정된 수소이온농도는 Lot 별, 측정시기별로 큰 차이가 없었으며, 국가검정기준은 pH 6.0~8.0으로 모두 정상 범위내로 측정되었다.

Lot No.	9개월	12개월	15개월
Lot 1	7.10	7.14	7.04
Lot 2	7.11	7.12	7.12
Lot 3	7.20	7.11	6.95

마. 장기(15개월) 불활화 확인시험

3 Lot 모두 시간 경과에 따른 세포변성 및 혈구응집이 나타나지 않았으며, 혈구응집은 닭 적혈구와 돼지 적혈구를 이용하여, 확인하였다.

Lot No.	시험구분	제조직후	3개월	6개월	9개월	12개월	15개월
Lot 1	CPE	-	-	-	-	-	-
	혈구응집 (닭/돼지)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Lot 2	CPE	-	-	-	-	-	-
	혈구응집 (닭/돼지)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Lot 3	CPE	-	-	-	-	-	-
	혈구응집 (닭/돼지)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

바. 장기(15개월) 면역원성 시험

공시 백신에 대한 역가검사 결과 15개월 경과 후에도 기준이상의 결과를 확인할 수 있었다.

(1) 돼지 썬코바이러스에 대한 항체가 검사 결과

Lot No.	구 분	ELISA Titer					
		제조직후	3개월	6개월	9개월	12개월	15개월
Lot 1	시험군	960	1280	960	960	720	720
Lot 2	시험군	960	960	880	800	640	640
Lot 3	시험군	960	960	720	960	800	800
대 조 군		< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

(2) 흥막폐렴균 균주에 대한 항체가 검사 결과

Lot No.	동 물 No.	제조직후		3개월		6개월		9개월		12개월		15개월	
		App 2	App 5	App 2	App 5	App 2	App 5	App 2	App 5	App 2	App 5	App 2	App 5
Lot 1	1	1280	640	320	1280	1280	320	1280	320	640	320	640	320
	2	320	640	1280	640	640	640	640	1280	640	640	640	320
	3	640	1280	640	640	640	640	640	640	320	640	320	640
	4	640	640	640	320	320	640	320	640	320	640	320	640
Lot 2	1	320	640	320	320	640	320	640	1280	640	320	320	320
	2	640	320	640	640	640	1280	320	640	1280	640	640	320
	3	640	320	640	320	640	640	320	320	320	640	320	640
	4	640	1280	640	640	320	1280	320	320	640	320	640	320
Lot 3	1	320	320	320	640	320	320	320	1280	640	640	320	320
	2	1280	640	1280	320	320	640	1280	320	640	640	640	640
	3	640	1280	640	320	1280	640	640	640	640	640	320	640
	4	320	1280	320	1280	640	640	320	1280	320	320	320	320
대 조 균	1	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	2	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

6. 돼지 쉐코바이러스 및 흉막폐렴 백신 품목허가 제출

□ 동물용의약품등 [제조품목·수입품목][허가·조건부허가] 신청서

제조품목 허 가 수입품목 조건부허가

신청 **처리기간** 안전·무효성 심사 품목요율부 : 10일
 자료제출 품목요율부 : 80일
 산출물 또는 신약제 품부 : 80일

수수료 10,000원

신청인	제조(수입)업허가번호	계033호		
	업소명	(주)코미팜		
	대표자/주민등록번호	문성철 681113 - *****		
	소재지	회사 429 - 429 경기도 시흥시 갈매로 17 (정자동 1236-6 시화공단 1차 107) Tel : 031 - 498 - 6104 제조소 (참고) 429 - 848 경기도 시흥시 갈매로 17 (정자동 1236-6 시화공단 1차 107) Tel : 041 - 333 - 4262		
제조(수입)관리자	성명	문성철		
	면허 또는 승인번호	수리사	제6008호	
품목	제제명	제제명	제제명	제제명
	상표구분	상표구분	상표구분	상표구분

맞음 옳지 않음

구비서류 ※ 민원신청시 파일업로드 에러발생시 설정 방법 안내

1. 당해 품목의 제제명, 원료약품의 명명, 용량·제제방법, 용량·용도, 유효기간, 보관방법, 제조방법, 무효기간, 주의사항, 시험기준 및 시험방법 등에 관한 서류
 1-1. (공개자료)부표_기준 및 시험법 제외한 일반사항
 파일 1-1. Provac 쉐코-A 부표(공개).hwp
 1-2. (비공개부표)부표_기준 및 시험법
 파일 1-2. Provac 쉐코-A 부표(비공개).hwp

동물용의약품정보관리시스템 - Windows Internet Explorer

□ 처리내역

접수번호	A131162	접수자	박연주	접수일자	2013.07.03
민원구분	(주)코미팜 동물용의약품등 [제조품목·수입품목][허가·조건부허가] 신청서				
기술요청과	동약관리과	기술요청일	2013.07.03	기술요청자	박연주
기술검토과	동약평가과 처리중	동약관리과 처리중	세균질병과 처리중	바이러스질병과 처리중	
기술검토기간	2013.10.22 (90)				

[닫기]

5

제 10 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연차별 연구개발 목표 및 달성도

1. 1차년도

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
돼지 쉰코바이러스 단일백신 부표 확립	- 품목허가용 목표 제작	100
PK-15 배양세포 배양 표준화 연구	- 일정 시간에 단층(monolayer) 형성 시스템 확립	90
돼지 쉰코바이러스 증식 표준화 연구	- 일정 시간에 균질화된 돼지 쉰코바이러스 증식 조건 확립 - 동일조건하에서 최대 바이러스 배양 시스템 확립	90
돼지 쉰코바이러스 단일백신 시작품 제작	- 효율적인 돼지 쉰코바이러스 항체 형 능력 시작품 백신 제작	100
돼지 쉰코바이러스 단일백신 제품 품목 허가 예비 실험 및 기술 이전	- 공격접종을 통한 예비 실험 실시 - 돼지 임과절에서 돼지 쉰코바이러스 2형에 의한 병변 억제 확인 - 돼지 임과절에서 돼지 쉰코바이러스 2형 증식 억제 확인	100
국가검정 동물용의약품검정기준에 의한 돼지 쉰코바이러스 단일백신 안전성 검사 실시	- 국가 검정기준에 의한 마우스에 백신을 접종하여 안전성 확인 - 국가 검정기준에 의한 기니픽에 백신을 접종하여 안전성 확인 - 국가 검정기준에 의한 돼지에 백신을 접종하여 안전성 확인	100
돼지 쉰코바이러스 단일백신의 공격접종을 통한 효능실험	- 4개의 실험군 설정 - 음성대조군: 백신 비접종 및 바이러스 공격접종 비실시 - 시험군1: 1주령과 4주령에 백신접종 및 5주령에 돼지 쉰코바이러스와 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 공격접종 - 시험군2: 1주령과 4주령에 백신접종 및 5주령에 돼지 쉰코바이러스 공격접종 - 대조군: 백신비접종 및 5주령에 돼지 쉰코바이러스와 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 공격접종	100
돼지 쉰코바이러스 생산용 돼지 세포주 개발	- 돼지 신장 세포주를 이용한 새로운 돼지 쉰코바이러스 증식 세포주 개발	90

돼지 쉼코바이러스 단일백신 야외 임상 실험 허가서 제출용 예비 준비 시험	-이유후 전신성 소모성 증후군으로 인한 폐사율이 20% 이상인 농장 3개 선정 -선정된 3개 농가에서 돼지 쉼코바이러스 2형에 의한 이유후 전신성 소모성 증후군 -선정된 3개 농가에서 임상 실험 실시 동의 확보	100
돼지 쉼코바이러스 단일백신의 야외 임상 실험	-이유후 전신성 소모성 증후군의 피해가 높은 3개 농장에서 야외 임상 실험 실시 -임상시험 농장 선정 -백신 접종후 안전성 검사 실시 -돼지 쉼코바이러스 2형 항체 형성 확인 -증체율 비교 분석 -폐사율 비교 분석 -주간 단위별 임상증상 관찰 및 비교 -혈중 돼지 쉼코바이러스 2형 감소 비교 분석 -면역조직화학법을 이용한 임파절에서 돼지 쉼코바이러스 증식 억제 능력 비교 분석	100
마이코플라즈마균 분리법 개발	-가장 효율적인 분리법 개발	95
마이코플라즈마균 분리	-마이코플라즈마성 폐렴에서 마이코플라즈마균 분리	95
분리균주 특성 분석	-국내 분리 마이코플라즈마균 특성	100
PK-15 세포주 및 바이러스 종독의 seed lot 확립	-변이가 없는 PK-15 세포주 확립 -돼지 쉼코바이러스 2형의 염기배열순서 분석을 통한 바이러스 종독주 확립	85
PK-15 세포주 배양기술 확립 및 바이러스 배양기술 확립	-PK-15 세포주 배양기술 확립 -돼지 쉼코바이러스 2형 배양기술 확립	85
돼지 쉼코바이러스 분리정제 기술 확립	-배양액에서 돼지 쉼코바이러스 2형 분리정제 기술 확립	85
돼지 바이러스 대량 생산을 위한 세포주 증식 방법 확립	-Cell factory 방법을 이용한 세포주 대량 배양법 확립	85
돼지 쉼코바이러스 대량 분리정제 기술 확립	-Freezing and thawing 방법을 이용한 최대 생산 분리 공정 연구	90
제형에 맞는 돼지 쉼코바이러스 단일백신 제조 방법 확립	-최적의 부형제 함량 연구 -최적의 불활화 함량 연구	100
국립 수의과학 검역원으로부터 돼지 쉼코바이러스 단일백신 야외 임상 실시 허가서 승인	-예비 실험 결과를 바탕으로 야외 임상 실험 허가서 제출 및 승인 취득	100
돼지 쉼코바이러스 단일백신 품목허가 시험 실시	-특성시험 -무균시험 -수소이온 농도 시험 -방부제 정량 시험 -불활화 확인 시험 -면역원성 시험 -마이코플라즈마균 무균 시험	100

돼지 쉼코바이러스 단일백신 품목허가 시험 결과 보고서 국립 수의과학 검역원 제출 및 등록 취득	-돼지 쉼코바이러스 단일백신 품목허가 시험 결과 보고서 제출 -돼지 쉼코바이러스 단일백신 품목허가 시험 결과 보완 서류 제출	
--	--	--

2. 2차년도

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
돼지 쉼코바이러스 증식 표준화 연구	-돼지 신장 유래 초대계대 배양 세포를 이용한 돼지 쉼코바이러스 증식 연구 및 다크론 항체(또는 다크론 항체)를 이용한 면역조직화학법을 이용한 바이러스 역가 측정법 확립	100
돼지 쉼코바이러스와 홍막페렴 복합백신 시제품 제작	-돼지 쉼코바이러스와 홍막페렴균의 항원 최적의 비율을 결정하여 최소 항원량으로 최대의 면역 유도 -돼지 쉼코바이러스과 홍막페렴 복합백신에 의해 유도된 돼지 쉼코바이러스와 홍막페렴균의 항체가 측정	95
돼지 홍막페렴균 배양 표준화 연구	-배양 조건과 다양한 배지를 이용한 홍막페렴균 독소와 외막 단백질의 최대 발현 조건 확립	95
돼지 쉼코바이러스와 홍막페렴 복합백신의 공격접종을 통한 예비 효능실험	-임상적, 병리적, 면역학적 평가 방법을 이용한 정확한 효능 평가 -품목허가를 위한 야외임상실험 제출용 자료 확립	100
국가검정기준에 의한 돼지 쉼코바이러스와 홍막페렴 복합백신 안전성 검사 실시	-국가 검정기준에 의한 마우스, 기니픽, 돼지를 이용한 백신 안전성 분석 및 확인	100
돼지 쉼코바이러스 항원과 마이코플라즈마균 항원의 최적화된 복합기술 개발 연구	-백신에 의한 마이코플라즈마 예방에 중요한 세포성 면역효과 효과 유도 분석 -백신에 의한 인테페론-감마 유도 비교 분석	100
용돈을 이용한 돼지 쉼코바이러스 단일백신의 차별화된 효능 연구	-용돈의 정액을 통한 돼지 쉼코바이러스 분비 억제 또는 감소 능력 확인	100
확립된 세포주의 표준 관리법 확립	-기존 PK-15세포주와 새로 확립된 세포주의 바이러스 증식 정도 비교 실험	93
세포주에 적용된 돼지 쉼코바이러스 백신주의 크로닝(cloning) 확립	-크로닝을 통한 동일한 세포 주의 지속적 배양 시스템 확립	93
돼지 쉼코바이러스 단일백신의 면역학적 반응 연구	-백신에 의한 세포성 면역 유도 효과 실험 -CD3 ⁺ 과 CD4 ⁺ 의 변화 연구와 인테페론 감마 분비 세포 분비 연구 -지연형 과민반응 유도 여부 연구	100

개발된 돼지 썬코바이러스 단일백신과 수입 및 국내 썬코바이러스 단일백신과의 비교 효능 검사 및 경제성 분석 실험	-임상학적으로 체중 증체와 사료 효율 분석을 통한 경제성 비교 분석 -병리적으로 육아중성 병변과 임파구 소실 정도의 비교 분석 -바이러스학적으로 혈중 바이러스의 실시간 중합효소 연쇄반응을 통한 정량 비교 분석 -면역학적으로 CD3 ⁺ 과 CD4 ⁺ 의 변화 연구와 인테페론 감마 분비 세포 분비 비교 분석 -지연형 과민반응 유도 여부 연구	100
마이코플라즈마 분리법 프로토콜 확립	-가검물에서 효과적인 분리 배양 표준법 작성 및 확립	92
마이코플라즈마 배양법 개발	-배양 조건과 다양한 배지를 이용한 마이코플라즈마 최대 증식 조건 확립	94
마이코플라즈마 백신을 이용한 세포성 면역 유도 시험	-세포성 면역 유도 여부 실험 -인테페론 감마 분비 유도 실험 -지연형 과민반응 유도 여부 연구	100
돼지 썬코바이러스 정제 기술 확립	-원심분리 공정, 미세여과(microfiltration), 초여과(ultrafiltration) 공정을 통해 바이러스 정제 공정을 확립	100
홍막폐렴균 항원 정제 기술 확립	-일반적인 원심분리방법과 연속원심분리 방법을 이용한 항원 harvest와 투석여과 방법을 이용한 불순물(impurity) 제거 시험을 통해 홍막폐렴균 항원 정제 공정을 확립 및 LPS 농도 측정	100
돼지 썬코바이러스 단일백신과 홍막폐렴 복합백신 조제 기술 확립	-돼지 썬코바이러스 항원과 홍막폐렴균 항원의 복합 후 항체 형성에 미치는 영향 비교시험 -돼지썬코바이러스 항원과 홍막폐렴균 항원간의 간섭현상 확인 시험 실시	100
백신 부형제(adjuvant) 선정 시험	-불활화 백신제조에 사용되는 백신 부형제를 이용하여 각각의 항체를 측정 비교하여 최적의 백신 부형제 선정	100
백신 부형제(adjuvant) 복합 공정 개발	-돼지 썬코바이러스 항원과 홍막폐렴균 항원 복합 그리고 백신 부형제 복합 공정 확립	100
돼지 썬코바이러스과 홍막폐렴 복합백신 품목허가 시험	공격접종과 야외 임상 실험 계획서 제출을 위한 실험실 품목허가 실험 실시	100

3. 3차년도

세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
돼지 쉼코바이러스와 홍막페렴 복합 백신 개발 기술 이전	-원심분리 공정, 미세여과(microfiltration), 초여과(ultrafiltration) 공정을 통해 바이러스 정제 공정 기술 이전 -일반적인 원심분리방법과 연속원심분리 방법을 이용한 항원 harvest와 투석여과 방법을 이용한 불순물(impurity) 제거 시험을 통해 홍막페렴균 항원 정제 공정을 확립 및 LPS 농도 측정	100
돼지 쉼코바이러스 2형 역가 측정위한 고역가 항체 생산	-돼지에 2주간 3회 연쇄 접종하여 고역가 항체(hyperimmune serum) 생산	95
돼지 쉼코바이러스와 홍막페렴 복합백신 공격접종 시험을 통한 임상학적 예방 효과 분석	-백신을 접종한 돼지에게 돼지 쉼코바이러스와 홍막페렴균 공격 접종 후 임상 증상 -백신을 접종한 돼지에게 돼지 쉼코바이러스와 홍막페렴균 공격 접종 후 3주령에서 18주령까지의 일당 증체량 분석	100
돼지 쉼코바이러스와 홍막페렴 복합백신 공격접종 시험을 통한 바이러스학적 및 세균학적 예방 효과 분석	-백신을 접종한 돼지에서 돼지 쉼코바이러스와 홍막페렴균 공격 접종한 돼지에서 실시간 중합효소 연쇄반응을 통한 돼지 쉼코바이러스 2형에 대한 혈중 바이러스의 감소 정도를 정량분석 -백신을 접종한 돼지에서 돼지 쉼코바이러스와 홍막페렴균 공격 접종한 돼지에서 홍막페렴균에 대한 중합효소 연쇄반응을 통한 비강에서의 홍막페렴균 감소 정도를 정량 분석	100
돼지 쉼코바이러스와 홍막페렴 복합백신 공격접종 시험을 통한 병리학적 예방 효과 분석	-폐장과 임과절에서 쉼코바이러스와 홍막페렴균에 의한 병변의 정도 비교 분석 검사 -폐장과 임과절에서 쉼코바이러스와 홍막페렴균의 항원 및 DNA 분포 조사	100
돼지 쉼코바이러스와 홍막페렴 복합백신 공격접종 시험을 통한 면역학적 예방 효과 분석	-백신을 접종한 돼지에서 돼지 쉼코바이러스와 홍막페렴균 공격 접종한 돼지에서 CD3 ⁺ 와 CD4 ⁺ 세포의 변화 분석 -백신을 접종한 돼지에서 Elispot를 이용한 인터페론 감마 분비 세포 분석 -피부에 항원 접종을 통한 지연형 과민반응 분석	95
돼지 쉼코바이러스와 마이코플라즈마 복합백신 시작품 공격접종을 통한 병리조직학적 효능 검사	-백신을 접종한 돼지에게 돼지 쉼코바이러스와 마이코플라즈마를 공격 접종한 후 임상 증상 및 일당 증체량 분석 -폐장과 임과절에서 쉼코바이러스와 마이코플라즈마에 의한 병변 검사 -폐장과 임과절에서 쉼코바이러스와 마이코플라즈마에 대한 항원 분포 조사	100
돼지 쉼코바이러스와 마이코플라즈마 복합백신 시작품의 공격접종을 통한 면역학적 효능 검사	-백신을 접종한 돼지에서 CD3 ⁺ 와 CD4 ⁺ 세포의 변화 분석 -백신을 접종한 돼지에서 Elispot를 이용한 인터페론 감마 분비 세포 분석 -피부에 항원 접종을 통한 지연형 과민반응 분석	95
백신제조를 위한 돼지 쉼코바이러스 2형 역가 측정법	-돼지 쉼코바이러스 세포 배양 후 바이러스 역가 측정	100

마이코플라즈마 대량 배양법 확립	-백신제조를 위한 다양한 배지와 환경 조건을 이용한 마이코플라즈마 대량 배양	95
돼지 쉰코바이러스와 마이코플라즈마 복합백신 시작품 제작	-돼지 쉰코바이러스 항원과 마이코플라즈마 항원의 복합 후 항체 형성에 미치는 영향 비교시험 -돼지쉰코바이러스 항원과 마이코플라즈마 항원간의 간섭현상 확인 시험 실시	100
돼지 쉰코바이러스와 홍막페렴 복합백신 품목허가위한 야외임상시험에서 임상학적 평가	-3개 농장 선정/농장단 백신군과 대조군 각각 20두씩 선정 -접종후 7일간 야외 백신 안전성 검사 실시 -매주 1회 임상 증상을 점수화하여 관찰한후 비교 분석 -백신군과 대조군의 0, 3, 7, 10, 16주령의 체중 측정을 통한 일당증체량의 비교 분석	100
돼지 쉰코바이러스와 홍막페렴 복합백신 품목허가위한 야외임상시험에서 면역학적 평가	-백신군과 대조군에서 0, 3, 7, 10, 16주에 혈액에서의 바이러스 혈증 비교 분석 -실시간 중합효소를 통한 백신군과 대조군의 혈청에서 ELISA 검사법을 이용한 돼지 쉰코바이러스 항체 형성 비교 측정 -실시간 중합효소를 통한 백신군과 대조군의 혈청에서 ELISA 검사법을 이용한 돼지 홍막페렴균 항체 형성 비교 측정	100
돼지 쉰코바이러스와 홍막페렴 복합백신 품목허가위한 야외임상시험에서 바이러스학적 평가	-백신군과 대조군에서 0, 3, 7, 10, 16주에 혈액에서의 바이러스 혈증 비교 분석 -실시간 중합효소를 통한 백신군과 대조군 사이의 혈증에서 돼지 쉰코바이러스 감소 비교 측정	100
돼지 쉰코바이러스와 홍막페렴 복합백신 품목허가위한 야외임상시험에서 병리학적 평가	-시험 종료 시점인 16주령 돼지의 백신군과 대조군에서 에서 임파절과 폐장 채취 -병리조직검사법을 통한 백신군과 대조군의 임파절에서 돼지 쉰코바이러스에 의한 병변 비교 분석 -병리조직검사법을 통한 백신군과 대조군의 폐장에서 돼지 홍막페렴균에 의한 병변 비교 분석 -면역조직화학법을 통한 백신군과 대조군의 임파절에서 돼지 쉰코바이러스 항원 비교 분석 -조직내 교잡법을 통한 백신군과 대조군의 폐장에서 홍막페렴균의 DNA 비교 분석	100

<p>돼지 썬코바이러스와 흥막페렴 복합백신 제조 방법 표준화</p>	<p>-돼지 썬코바이러스 항원과 흥막페렴 항원의 복합 후 항체 형성에 미치는 영향 비교시험 -돼지 썬코바이러스 항원과 흥막페렴 항원간의 간섭현상 확인 시험 실시 -개발한 백신 부형제를 복합한 최종 백신 제조 공정 시스템 표준화 확립</p>	<p>100</p>
<p>돼지 썬코바이러스와 흥막페렴 복합백신 대량 생산 시스템 확보</p>	<p>-제조 공정에 따른 돼지 썬코바이러스 항원과 흥막페렴균 항원 수율과 각각의 공정에 따른 항원의 안전성과 정제도를 확인 -각 공정에서 생산된 백신에 대한 생물학적 면역학적 평가를 수행하여 효능을 동반한 안전한 백신 대량 생산 시스템 확립</p>	<p>95</p>
<p>돼지 썬코바이러스와 흥막페렴 복합백신 품목허가를 위한 실험실내 시험</p>	<p>-야외임상 실험을 제외한 모든 시험 실시 -백신 유효 기관 시험 및 기타 필요한 모든 실험 실시</p>	<p>100</p>

제 2 절 산업화 방향

1. 본 연구에서 개발하는 백신은 돼지 쉰코바이러스 2형 단독 백신, 뿐만 아니라 돼지 흉막폐렴균 및 마이코플라즈마 등을 복합한 복합백신이 포함된다. 반면 국외 제품 4종은 모두 돼지 쉰코바이러스만 함유한 백신을 판매하고 있다. 하지만 국내 역학 조사에 따르면 국내에서 돼지 쉰코바이러스에 의한 쉰코바이러스 관련 질병(porcine circovirus 2-associated disease)에서 마이코플라즈마균, 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 등의 복합 감염이 다발할 뿐만 아니라(출처; Kim J, Chung H-K, Jung T, Cho W-S, Choi C, Chae C : Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganism는. Journal of Veterinary Medical Science 64(1): 57-62, 2002), 백신 접종에 드는 노동력 및 경제적 손실에 대한 부담이 있다. 따라서 본 연구의 백신은 돼지 쉰코바이러스와 흉막폐렴균 및 마이코플라즈마를 복합하여 백신 효과를 극대화 하였다.
2. 본 연구에서 상품화 예정인 돼지 쉰코바이러스 예방 백신을 포유자돈에게 접종할 때, 접종 후 백신 면역반응에 의한 소모성 증후군의 발현이 거의 나타나지 않는다. 최근의 연구에 의하면 오일보강제를 함유한 마이코플라즈마 백신을 포유자돈에게 접종하면 백신에 함유된 오일 성분에 의하여 심한 면역반응이 유발되어, 백신 부작용에 의한 소모성 증후군이 발병하는 것으로 알려져 있다. 하지만 본 연구에서 상품화 예정인 백신은 포유자돈에게 접종하여도 백신 면역반응으로 인한 부작용이 전혀 없다.
3. 본 연구에서 상품화 예정인 돼지 쉰코바이러스 예방 백신은 포유자돈에게 1주령과 3주령에 2회 백신을 접종할 예정이다. 본 백신은 농장에서 이유자돈에서 성장이 지연되고 호흡기와 소화기 질환의 발병이 높은 농장에서 사용할 예정이다. 현재 국내 연간 사육두수가 1,370만두이므로 접종할 수요처는 충분하다. 현재 국내에서 판매되고 있는 돼지 쉰코바이러스 예방 백신은 돼지 1두당 1,500 - 2,700원에 판매되고 있으며, 본 연구에서 개발된 백신은 돼지 쉰코백신의 경우 돼지 1두당 1,000 - 1,500원 판매 할 예정이다.
4. 본 연구에서 상품화 예정인 돼지 쉰코바이러스와 흉막폐렴 예방 복합백신은 이유자돈 5주령 접종할 예정이다. 특히 농장에서 육성돈 시기인 80일령에서 120일령 사이에 호흡기 질병이 다발하는 농장에서 사용 할 예정이다. 현재 국내 연간 사육두수가 1,370만두이므로 접종할 수요처는 충분하다. 현재 국내에서 상품화된 돼지 쉰코바이러스와 흉막폐렴 예방 복합백신은 없으며, 기타 다른 세균과의 복합백신은 1두당 1,600 원에 판매되고 있으며, 본 연구에서 개발된 복합 백신은 돼지 1두당 1,200 - 1,500원 판매 할 예정이다.

5. 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	350	450	500	550	5,500	7,350
경제적 파급효과	30,000	100,000	150,000	200,000	300,000	780,000
부가가치 창출액	10,000	20,000	30,000	50,000	76,000	186,000
합계	40,350	120,450	180,500	250,550	381,500	973,350

※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치

※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치

※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

제 3 절 특허분석 측면

1. 기존의 약독화 돼지 쉰코바이러스 2형 백신의 경우 PK-15 세포를 이용하여 바이러스를 배양하여 백신을 제조하였지만, 본 과제에서는 PK-15 세포의 증식 한계를 극복하기 위해 돼지 태아의 신장 유래 세포를 개발하여 높은 역가의 바이러스를 생산할 수 있었다. 따라서 개발된 세포를 이용한 바이러스 증식 및 백신 생산 관련 기술을 국내 특허를 출원하였다.
2. 기존 특허는 돼지 쉰코바이러스만을 함유한 백신 개발에 대한 특허에 치중하였지만, 본 연구 사업에서는 돼지 쉰코바이러스와 홍막페렴균의 복합백신 등· 개발 경제성을 극대화한 백신을 개발하여 국내 사양가들이 저비용 고효율의 백신을 사용할 수 있게 하고, 이러한 개발 기술을 국내에 출원할 계획이다.
3. 마이코플라스마의 경우 진단, 분리 및 배양 조건이 까다로워 백신 생산을 위해 관련 기술의 프로토콜을 확립하는 것이 중요하다. 본 과제를 통해 마이코플라스마의 신속한 진단 및 최적의 배양 조건 등에 관한 기술을 확립하여 특허를 출원하였고, 다양한 백신 항원 복합 기술을 국내에 출원하였다.
4. 돼지 쉰코바이러스 2형과 마이코플라스마의 백신을 개발하여 백신 효능을 입증하였고, 이러한 결과를 바탕으로 돼지 쉰코바이러스와 마이코플라스마 백신 개발 기술의 특허를 출원하였다.

제 4 절 논문분석 측면

1. 기존 논문은 백신 제조업체의 프로토콜에 맞추어 돼지 쉰코바이러스 2형 백신을 대부분 3주령 이상의 자돈에 접종하여 효능을 실험하고 있다. 이에 본 연구에서는 개발된 백신의 1주와 3주령 2회 접종 실험 등 다양한 연령에 대한 효능 평가를 “Efficacy of a piglet-specific commercial inactivated vaccine against porcine circovirus type 2 in clinical field trials”으로 Canadian Journal of Veterinary Research에 투고하여 게재예정이다.
2. 현재 개발된 돼지 쉰코 단일 백신에 대한 수컷 돼지에서의 정액으로의 돼지 쉰코바이러스 2형의 분비 예방 효과에 관한 연구를 수행하여 “Effects of an inactivated porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccine on PCV2 virus shedding in semen from experimentally infected boars”이라는 연구 제목으로 Clinical and Vaccine Immunology (18:1091-1096, 2011)에 게재하여 발표였다.
3. 본 연구에서 개발된 백신은 저비용으로 생산할 수 있는 약독화 백신에 해당되며 기존의 수입 백신과 효능 비교 실험을 통해 우수한 효과를 확인하여 “Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on PCV2-viremic piglets after experimental PCV2 challenge” 논문을 Veterinary Research 저널에 투고하였다.
4. 국내에서 돼지 쉰코바이러스의 상황과 비해 정도, 발병 양상, 사용하는 백신의 종류, 백신 효능 등에 관한 연구 논문을 “Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in Korea”이라는 연구제목으로 Virus Research(164:107-113, 2012)에 게재하여 발표하였다.
5. 본 연구를 통하여 얻어진 노하우를 바탕으로 쉰코 백신의 효능 및 임상학적 적용 방법에 관한 연구 논문을 “Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical Application”이라는 연구제목으로 Veterinary Journal(194:151-157, 2012)에 게재하여 발표하였다.

제 5 절 제품 및 시장분석 측면

1. 2008년 돼지 썬코바이러스 2형 수입백신이 국내에 처음 도입되었고, 2009년부터 국내 백신 회사 제품이 출시되기 시작했다. 하지만 다양한 국내 백신의 출시에도 불구하고 2009년 국내 백신의 점유율은 전체 돼지 썬코바이러스 2형 백신 시장에 8.1%에 머물렀다. 이러한 낮은 점유율은 농가의 국내 백신에 대한 불신과 효능에 대한 인식 부족이 주요 원인이다. 따라서 본 연구에서 개발된 돼지 썬코바이러스 2형 백신은 다양한 측면의 효능 평가를 통하여 기존 수입 백신과 동등한 효과가 입증되었고, 상대적으로 낮은 비용으로 생산이 가능함에 따라 국내 백신 시장에서 경쟁력이 높다.
2. 현재 국내외 시장에서 돼지 썬코바이러스 2형과 흉막폐렴균에 대한 복합백신은 판매되지 않고 있기 때문에 국내, 뿐만 아니라 국외에서도 높은 경쟁력을 나타낼 수 있을 것이며, 개발된 복합백신의 다양한 접종 프로그램을 실시하고 최적의 효과를 나타낼 수 있는 프로그램을 설정하여 상품화 할 예정이다.
3. 후기 육성돼지에 다발하는 돼지 호흡기 질병(PRDC)은 돼지 썬코바이러스 2형 등의 바이러스와 돼지 유행성 폐렴의 원인체인 마이코플라즈마 등의 세균이 감염하여 유발되는 것으로 양돈 생산성에 큰 손해를 끼친다. 현재 국내외 시장에서 돼지 썬코바이러스 2형과 마이코플라즈마를 동시에 예방하는 복합백신 제품이 없기 때문에 본 연구에서 개발한 복합백신이 높은 경쟁력을 나타낼 수 있으며, 생산성 증대 및 비용 절감을 통해 농가 소득을 개선시킬 수 있을 것으로 예상된다.

제 11 장 참고 문헌

- Baumeister AK, Runge M, Ganter M, Feenstra AA, Delbeck F, Kirchhoff H. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids of pigs by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1998 36:1984-1988.
- Bentley OE, Farrington DO. Evaluation of an Induced *Pasteurella multocida* Swine Pneumonia Model. *American Journal of Veterinary Research* 1980 41:1870-1873.
- Benya RV, Schmidt LN, Sahi J, Layden TJ, Rao, MC. Isolation, characterization, and attachment of rabbit distal colon epithelial cells. *Gastroenterology* 1991 101:692-702.
- Boettcher TB, Thacker BJ, Halbur PG, Waters WR, Nutsch R, Thacker EL. Vaccine efficacy and immune response to *Mycoplasma hyopneumoniae* challenge in pigs vaccinated against porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *M hyopneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production* 2002 10:259-264.
- Chae C. Postweaning multisystemic wasting syndrome; A review of aetiology, diagnosis and pathology. *The Veterinary Journal* 2004 168:41-49.
- Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *The Veterinary Journal* 2005 169:326-336.
- Chae C. Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in Korea. *Virus Research* 2012 164:107-113.
- Chae C. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical Application. *The Veterinary Journal* 2012 194:151-157.
- Chen AY, Fry SR, Forbes-Faulkner J, Daggard G, Mukkur TKS. Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. *Journal of Medical Microbiology* 2006 55:923-929.
- Chen XB, Xu ZF, Li L, Chen HC, Zhou R. Identification of conserved surface proteins as novel antigenic vaccine candidates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal*

of Microbiology 2012 50:978–986.

- Chiang CH, Huang WF, Huang LP, Lin SF, Yang WJ. Immunogenicity and protective efficacy of ApxIA and ApxIIA DNA vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* lethal challenge in murine model. *Vaccine* 2009 27:4565–4570.
- Choi C, Chae C. Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephropathy syndrome by double-labeling technique. *Veterinary Pathology* 2001 38:436–441.
- Choi C, Chae C, Clark EG. Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2000 12:151–153.
- Dawson A, Harvey RE, Thevasagayam SJ, Sherington J, Peters AR. Studies of the field efficacy and safety of a single-dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine for pigs. *Veterinary Record* 2002 151:535–538.
- Feng ZX, Shao GQ, Liu MJ, Wu XS, Zhou YQ, Gan YA. Immune Responses to the Attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* 168 Strain Vaccine by Intrapulmonic Immunization in Piglets. *Agricultural Sciences in China* 2010 9:423–431.
- Fort M, Sibila M, Nofrarias M, Perez–Martin E, Olvera A, Mateu E, Segales J. Evaluation of cell-mediated immune responses against porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins after vaccination with a commercial PCV2 sub-unit vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2012 150:128–132.
- Fort M, Sibila M, Perez–Martin E, Nofrarias M, Mateu E, Segales J. One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine* 2009 27:4031–4037.
- Fraille L, Grau–Roma L, Sarasola P, Sinovas N, Nofrarias M, Lopez–Jimenez R, Lopez–Soria S, Sibila M, Segales J. Inactivated PCV2 one shot vaccine Applied in 3-week-old piglets: Improvement of production parameters and interaction with maternally derived immunity. *Vaccine* 2012 30:1986–1992.

- Fuller TE, Thacker BJ, Duran CO, Mulks MH. A genetically-defined riboflavin auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* as a live attenuated vaccine. *Vaccine* 2000 18:2867-2877.
- Gagnon CA, del Castillo JR, Music N, Fontaine G, Harel J, Tremblay D. Development and use of a multiplex real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of porcine circovirus-2 genotypes 2a and 2b in an epidemiological survey. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2008 20:545-558.
- Genzow M, Lange S. Efficacy of stellamune one, a single-dose vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* under field conditions in vaccination of hogs at an age of one week. *Tierärztliche Umschau* 2003 58:554-555.
- Gillespie J, Juhan NM, DiCristina J, Key KF, Ramamoorthy S, Meng X. A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) is genetically stable in vitro and in vivo. *Vaccine* 2008 26:4231-4236.
- Haga K, Ohno S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Fujita M, Sakamoto M, Galloway DA, Kiyono T. Efficient immortalization of primary human cells by p16INK4a-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Science* 2007 98:147-154.
- Hayes S, Gamage LNA, Hayes C. Dual expression system for assembling phage lambda display particle (LDP) vaccine to porcine Circovirus 2 (PCV2). *Vaccine* 2010 28:6789-6799.
- Horst I, Reynolds SC, Cooper J, Andrews SJ, Salt JS, Peters AR. Recent studies of the vaccination of pigs against *Mycoplasma hyopneumoniae* with the vaccine Stellamune (R) One (Pfizer GmbH) relevant to the use of the vaccine in veterinary practice. *Tieraerztliche Umschau* 2006 61:316-321.
- Huter V, Hensel A, Brand E, Lubitz W. Improved protection against lung colonization by *Actinobacillus pleuropneumoniae* ghosts: characterization of a genetically inactivated vaccine. *Journal of Biotechnology* 2000 83:161-172.
- Intraraksa Y, Engen RL, Switzer WP. Pulmonary and Hematologic Changes in Swine with *Mycoplasma hyopneumoniae* Pneumonia. *American Journal of Veterinary Research* 1984 45:474-477.

- Jirawattanapong P, Stockhofe-Zurwieden N, van Leengoed L, Binnendijk G, Wisselink HJ, Raymakers R, Cruijssen T, van der Peet-Schwering C, van Nes A, Nielen M. Efficacy of a subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in an endemically infected swine herd. *Journal of Swine Health and Production* 2008 16:193-199.
- Kasza L, Hodges RT, Betts AO, Trexler PC. Pneumonia in Gnotobiotic Pigs Produced by Simultaneous Inoculation of a Swine Adenovirus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Record* 1969 84:262.
- Kei H, Shin-ichi O, Takashi Y, Narisawa-Saito M, Masatoshi F, Michiie S, Denise A, Tohru K. Efficient immortalization of primary human cells by p16INK4a-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Science* 2006 98:147-154.
- Kim J, Chae C. Differentiation of porcine circovirus 1 and 2 in formalin-fixed, paraffin-wax-embedded tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by in-situ hybridisation. *Research in Veterinary Science* 2001 70:265-269.
- Kim J, Chae C. Double in situ hybridization for simultaneous detection and differentiation of porcine circovirus 1 and 2 in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Journal* 2002 164:247-253.
- Kim J, Chae C. Simultaneous detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in naturally and experimentally coinfecting pigs by double in situ hybridization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2002 14:236-240.
- Kim J, Choi C, Chae C. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology* 2003 128:52-59.
- Kim J, Choi C, Han DU, Chae C. Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR. *Veterinary Record* 2001 149:304-305.
- Kim J, Chung HK, Chae C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory

disease complex. *Veterinary Journal* 2003 166:251-256.

Kim J, Han DU, Choi C, Chae C. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 2001 98:25-31.

Kimura M, Araki S, Nakai T, Kume K. Protective Effect of Dihydroheptaprenol in Combination with Vaccine to Experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* Infection in Guinea-Pigs and Pigs. *Journal of Veterinary Medical Science* 1993 55:627-630.

Kwon D, Chae C. Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in lungs from naturally infected pigs by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *Veterinary Pathology* 1999 36:308-313.

Lam KM, Switzer WP. Mycoplasmal Pneumonia of Swine - Serologic Response in Pigs. *American Journal of Veterinary Research* 1972 33:1329.

LeRoith T, Hammond S, Todd SM, Ni Y, Cecere T, Pelzer KD. A modified live PRRSV vaccine and the pathogenic parent strain induce regulatory T cells in pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2011 140:312-316.

Lillie K, Palzer A, Ritzmann M, Heinritzi K. Influence of maternal antibodies on efficacy of a one-shot vaccine for *Mycoplasma hyopneumoniae* - 2nd communication. *Praktische Tierarzt* 2007 88:102.

Lillie K, Ritzmann M, Erber M, Heinritzi K. Study on the effect and tolerance of an inactivated one-shot-vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* at different ages - first communication. *Praktische Tierarzt* 2006 87:548-552.

Lin JH, Weng CN, Liao CW, Yeh KS, Pan MJ. Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. *Journal of Veterinary Medical Science* 2003 65:69-74.

Liu XJ, Wang XB, Song Y, Fan J, Gao S, Liu XF. A candidate inactivated chimeric vaccine PCV1-2 constructed based on PCV1 and PCV2 isolates originating in

China and its evaluation in conventional pigs in regard to protective efficacy against PCV2 infection. *Microbiology and Immunology* 2011 55:254-266.

Lu YC, Li MC, Chen YM, Chu CY, Lin SF, Yang WJ. DNA vaccine encoding type IV pilin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* induces strong immune response but confers limited protective efficacy against serotype 2 challenge. *Vaccine* 2011 29:7740-7746.

Maas A, Jacobsen ID, Meens J, Gerlach GF. Use of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* multiple mutant as a vaccine that allows differentiation of vaccinated and infected animals. *Infection and Immunity* 2006 74:4124-4132.

Maas A, Meens J, Baltés N, Hennig-Pauka I, Gerlach GF. Development of a DIVA subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Vaccine* 2006 24:7226-7237.

Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T. Effect of natural or vaccine-induced porcine circovirus type 2 (PCV2) immunity on fetal infection after artificial insemination with PCV2 spiked semen. *Theriogenology* 2009 72:747-754.

Marchioro SB, Maes D, Flahou B, Pasmans F, Sacristan RDP, Vranckx K, et al. Local and systemic immune responses in pigs intramuscularly injected with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. *Vaccine* 2013 31:1305-1311.

Mariotti E, Mirabelli P, Di Noto R, Fortunato G, Salvatore F. Rapid detection of mycoplasma in continuous cell lines using a selective biochemical test. *Leukemia Research* 2008 32:323-326.

Marois C, Dory D, Fablet C, Madec F, Kobisch M. Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. *Journal of Applied Microbiology* 2010 108:1523-1533.

Moitinho-Silva L, Heineck BL, Reolon LA, Paes JA, Klein CS, Rebelatto R, Schrank IS, Zaha A, Ferreira HB. *Mycoplasma hyopneumoniae* type I signal peptidase: expression and evaluation of its diagnostic potential. *Veterinary Microbiology* 2012 154:282-291.

- Moreau IA, Miller GY, Bahnson PB. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine on pigs naturally infected with *M.hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 2004 22:2328-2333.
- Nanjiani IA, Nutsch RG, Taylor LP, Doncecchi P, Banholzer E. Evaluation of Immunogenicity of a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine in maternally derived antibody positive, one week old pigs. *Tieraerztliche Umschau* 2010 65:376.
- Oishi E, Kitajima T, Koyama Y, Ohgitani T, Katayama S, Okabe T. Protective effect of the combined vaccine prepared from cell-free-antigen of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2 and 5 in pigs. *Journal of Veterinary Medical Science* 1995 57:1125-1128.
- Oishi E, Kitajima T, Nakamura H, Matsuda C, Amimoto K, Yasuhara H. A field trial of oil adjuvanten trivalent *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccine. *Journal of Veterinary Medical Science* 1997 59:421-423.
- Okada M, Asai T, Ono M, Sakano T, Sato S. Cytological and immunological changes in bronchoalveolar lavage fluid and histological observation of lung lesions in pigs immunized with *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivated vaccine prepared from broth culture supernate. *Vaccine* 2000 18:2825-2831.
- Okamba FR, Arella M, Music N, Jia JJ, Gottschalk M, Gagnon CA. Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. *Vaccine* 2010 28:4802-4809.
- Oldfield NJ, Donovan EA, Worrall KE, Wooldridge KG, Langford PR, Rycroft AN, Ala'Aldeen DAA. Identification and characterization of novel antigenic vaccine candidates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vaccine* 2008 26:1942-1954.
- Opriessnig T, O'Neill K, Gerber PF, de Castro AMMG, Gimenez-Lirola LG, Beach NM, Zhou L, Meng XJ, Wang C, Halbur PG. A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection. *Vaccine* 2013 31:487-494.

- Opriessnig T, Patterson AR, Madson DM, Pal N, Ramamoorthy S, Meng XJ, Halbur PG. Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. *Veterinary Microbiology* 2010 142:177-183.
- Opriessnig T, Shen HG, Pal N, Ramamoorthy S, Huang YW, Lager KM, Beach NM, Halbur PG, Meng XJ. A live-attenuated chimeric porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccine is transmitted to contact pigs but is not upregulated by concurrent infection with porcine parvovirus (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and is efficacious in a PCV2b-PRRSV-PPV challenge model. *Clinical and Vaccine Immunology* 2011 18:1261-1268.
- Piffer IA, Ross RF. Effect of Age on Susceptibility of Pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae* Pneumonia. *American Journal of Veterinary Research* 1984 45:478-481.
- Pointon AM, Sloane M. An Abattoir Survey of the Prevalence of Lesions of Enzootic Pneumonia of Pigs in South-Australia. *Australian Veterinary Journal* 1984 61:408-409.
- Pommier P, Keita A, Pagot E, Flochlay A. Field efficacy of a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine in the control of enzootic pneumonia in swine. *Revue De Medecine Veterinaire* 2000 151:835-840.
- Prideaux CT, Lenghaus C, Krywult J, Hodgson ALM. Vaccination and protection of pigs against pleuropneumonia with a vaccine strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* produced by site-specific mutagenesis of the ApxII operon. *Infection and Immunity* 1999 67:1962-1966.
- Resendes A, Segales J, Balasch M, Calsamiglia M, Sibila M, Ellerbrok H, Mateu E, Plana-Duran J, Mankertz A, Domingo M. Lack of an effect of a commercial vaccine adjuvant on the development of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in porcine circovirus type 2 (PCV2) experimentally infected conventional pigs. *Veterinary Research* 2004 35:83-90.
- Reynolds SC, St Aubin LB, Sabbadini LG, Kula J, Vogelaar J, Runnels P, Peters AR. Reduced lung lesions in pigs challenged 25 weeks after the administration of a

single dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine at Approximately 1 week of age. Veterinary Journal 2009 181:312-20.

Roberts DH, Pijoan C. Identification of *Mycoplasma hyorhinis*. British Veterinary Journal 1971 127:582.

Rousseau P, Assaf R, Boulay G, Desy M. Immune-Response to an *Actinobacillus pleuropneumoniae* Vaccine in Swine. Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne 1988 29:989-992.

Rycroft AN, Assavacheep P, Jacobs M, Langford PR. Necrosis from needlestick injury with live *Actinobacillus pleuropneumoniae* porcine vaccine. British Medical Journal 2011 343:6261.

Sashikumar A, Desai PV. Development of primary cell culture from *Scylla serrata*: Primary cell cultures from *Scylla serrata*. Cytotechnology 2008 56:161-169.

Segales J, Urniza A, Alegre A, Bru T, Crisci E, Nofrarias M, Lopez-Soria S, Balasch M, Sibila M, Xu Z, Chu HJ, Fraile L, Plana-Duran J. A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. Vaccine 2009 27:7313-7321.

Seo HW, Han K, Kim D, Oh Y, Kang I, Park C, Jang H, Chae C. Effects of an Inactivated Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccine on PCV2 Virus Shedding in Semen from Experimentally Infected Boars. Clinical and Vaccine Immunology 2011 Jul;18(7):1091-6.

Seo HW, Oh Y, Han K, Park C, Chae C. Reduction of porcine circovirus type 2 (PCV2) viremia by a reformulated inactivated chimeric PCV1-2 vaccine-induced humoral and cellular immunity after experimental PCV2 challenge. BMC Veterinary Research 2012 8:1-9.

Shimoji Y, Oishi E, Muneta Y, Nosaka H, Mori Y. Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. Vaccine 2003 21:532-537.

- Shin MK, Jung MH, Lee WJ, Choi PS, Jang YS, Yoo HS. Generation of transgenic corn-derived *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIIA fused with the cholera toxin B subunit as a vaccine candidate. *Journal of Veterinary Science* 2011 12:401-403.
- Smith S, Pommier P, Keita A, Pagot E, Thevasagayam SJ, Salt JS, Peters AR. Efficacy of Stellamune((R)) one, a single dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine, administered in pigs at one week of age under field conditions. *Tierarztliche Umschau* 2003 58:316.
- Tajima M, Yagihashi T. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the Porcine Respiratory Epithelium as Observed by Electron-Microscopy. *Infection and Immunity* 1982 37:1162-1169.
- Tonpitak W, Baltés N, Hennig-Pauka I, Gerlach GF. Construction of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 prototype live negative-marker vaccine. *Infection and Immunity* 2002 70:7120-7125.
- Tzivara A, Kritas SK, Bourriel AR, Alexopoulos C, Kyriakis SC. Efficacy of an inactivated aqueous vaccine for the control of enzootic pneumonia in pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Record* 2007 160:225-229.
- Van Overbeke I, Chiers K, Ducatelle R, Haesebrouck F. Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with a vaccine containing Apx toxins and transferrin-binding proteins. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 2001 48:15-20.
- Walders B, Raschke A, Neugebauer M, Geuther E, Bertling W, Reiser C, Buck A, Strich S, Hess J. Blending of a conventional *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine with a positive marker: tracking of immunised pigs by peptide-specific antibodies raised to the marker component. *Research in Veterinary Science* 2005 78:135-141.
- Wang YP, Liu D, Guo LJ, Tang QH, Wei YW, Wu HL, Liu JB, Li SB, Huang LP, Liu CM. Enhanced protective immune response to PCV2 subunit vaccine by co-administration of recombinant porcine IFN-gamma in mice. *Vaccine* 2013 31:833-838.
- Willson PJ, Gerlach GF, Klashinsky S, Potter AA. Cloning and characterization of the

gene coding for NADPH-sulfite reductase hemoprotein from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and use of the protein product as a vaccine. Canadian Journal of Veterinary Research 2001 65:206-212.

Wilson S, Van Brussel L, Saunders G, Runnels P, Taylor L, Fredrickson D, Salt J. Vaccination of piglets up to 1 week of age with a single-dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine induces protective immunity within 2 weeks against virulent challenge in the presence of maternally derived antibodies. Clinical and Vaccine Immunology 2013 20:720-724.

Wilson S, Van Brussel L, Saunders G, Taylor L, Zimmermann L, Heinritzi K, Ritzmann M, Banholzer E, Eddicks M. Vaccination of piglets at 1 week of age with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine reduces lung lesions and improves average daily gain in body weight. Vaccine 2012 30:7625-7629.

Wongnarkpet S, Pfeiffer DU, Morris RS, Fenwick SG. An on-farm study of the epidemiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs as part of a vaccine efficacy trial. Preventive Veterinary Medicine 1999 39:1-11.

Wu PC, Lin WL, Wu CM, Chi JN, Chien MS, Huang CJ. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid particle assembly and its Application to virus-like particle vaccine development. Applied Microbiology and Biotechnology 2012 95:1501-1507.

Xu XG, Wang ZS, Zhang Q, Li ZC, Ding L, Li W, Wu HY, Chang CD, Lee LH, Tong DW, Liu HJ. Baculovirus as a PRRSV and PCV2 bivalent vaccine vector: Baculovirus virions displaying simultaneously GP5 glycoprotein of PRRSV and capsid protein of PCV2. Journal of Virological Methods 2012 179:359-366.

Young TF, Ross RF. Assessment of antibody-response of swine infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by Immunoblotting. American Journal of Veterinary Research 1987 48:651-656.

Zhang Q, Young TF, Ross RF. Glycolipid receptors for attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine respiratory ciliated cells. Infection and Immunity 1994 10:4367-4373.

Zhou Y, Li L, Chen ZH, Yuan H, Chen HC, Zhou R. Adhesion protein ApfA of

Actinobacillus pleuropneumoniae is required for pathogenesis and is a potential target for vaccine development. *Clinical and Vaccine Immunology* 2013 20:287–294.