최 종
연구보고서

오리 바이러스성 간염의 역학조사와 백신개발

Epidemiological Survey on and Development of Vaccine for the Duck Viral Hepatitis Disease

연 구 기 관

전 남 대 학 교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “오리 바이러스성 간염의 역학조사와 백신개발” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2006년 7월 일

주관연구기관명 : 전남대학교
총괄연구책임자 : 이 채 용
제 1세부책임자 : 조 경 오
연 구 원 : 성 환 우
연 구 원 : 박 성 희
연 구 원 : 김 유 정
연 구 원 : 김 희 정
연 구 원 : 강 보 규
제 2세부책임자 : 이 채 용
연 구 원 : 권 용 국
연 구 원 : 이 태 욱
연 구 원 : 김 양 하
연 구 원 : 고에스더
연 구 원 : 이 민 희

요 약 문

Ⅰ. 제 목

오리 바이러스성 간염의 역학조사와 백신개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 연구의 목표는 국내에서 발생하고 있는 오리 바이러스성 간염에 대한 역학조사, 바이러스 분리·동정 및 이의 계대배양을 통한 약독화로 오리 바이러스성 간염에 대한 백신을 개발하는데 있다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

국내 오리 산업은 90년대 중반 이후부터 영세 사육형태에서 대규모 전업 사육형태로 빠르게 변화하고 있다. 따라서 사육형태가 변화함에 따라 전염성 질병으로 인한 오리의 집단 폐사로 사육농가의 엄청난 경제적 피해를 주고 있는 실

정이다. 특히 국내 오리 산업에서 가장 문제시 되고 있는 질병으로는 집단 누적 폐사율이 높은 오리바이러스성 간염을 비롯한 라이메리아증, 대장균성 오리폐혈증 등을 들 수 있다. 이 원인체 중에서도 다른 원인체들은 세균임에 비하여 오리바이러스성 간염은 유일한 바이러스성 원인체로서 강력한 전파력으로 폭발적으로 발생하며 그 역학적 발생기전이 다양하다고 알려져 있다. 따라서 오리 사육의 대단위화 전업화 경향에 따라 과학적이고 정밀한 질병발생의 역학조사와 오리 간염 바이러스의 예방을 위한 백신 개발이 시급한 실정이다.

국내 오리바이러스성 간염은 계태아 배양을 통한 단일형 분리 병원체 백신 개발로 인해 퇴치 가능한 것으로 생각되었다. 하지만 최근 기존에 백신을 하였음에도 불구하고 이 질환의 발생이 그치지 않고 발생되고 있어 오리 농가에서 백신의 효과와 그 효능범위를 포함한 여러 의문들이 제기되고 있다. 즉, 백신 제조상의 문제나 Type I 내에서의 오리바이러스성 간염의 변이주 발생, 또는 영국이나 미국에서 발생한 새로운 type의 오리 간염 바이러스의 출현을 의심하였다. 지금까지 오리 바이러스성 간염은 크게 세가지 유형으로 구분되고 있다. Type I은 picornavirus에 의해 발생하며, Type II은 asterovirus, Type III는 type I과 항원성이 전혀 다른 picornavirus에 의한다고 알려져 있다. 하지만각 type 별 단일 백신은 교차 방어가 되지 않는 것으로 알려져 있다. 또한 Type 1 오리바이러스성 간염 내에서도 상당한 변이주가 발생하는 것으로 보고 되었다.

따라서 과학적이고 정밀한 질병발생 역학 연구를 통해서 국내에서 다발하는 주요한 오리의 질병을 파악하는 것은 질병에 대한 올바른 방역 대책을 마련하기

위한 첫 과제일 것이다. 또한, 현재 발생하고 있는 오리 바이러스성 간염의 분리 및 동정을 통한 백신의 개발이야말로 질병을 근원적으로 차단할 수 있는 유일한 방법이므로 절실히 백신개발의 필요성이 대두되고 있다.

나. 경제·산업적 측면

91년 오리고기의 수입자유화 이후 국내 오리 산업은 국제적인 시장개방의 경쟁체제 아래에 놓여 있다. 수입자유화에 따른 저렴한 외국산 오리고기 수입으로 점점 국내 오리 산업이 어려워지고 있다. 특히 1993년 이후 수입물량이 급격히 증가하였을 뿐 아니라, 1998년에 중국산 오리고기의 수입이 중단되었던 것이 1999년에 재 허용됨으로써 국내의 산지 가격은 그리 전망이 밝지 못하였다. 따라서 국내 오리 사육 농가들의 경쟁력 향상이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

이러한 자구책으로 국내 오리 산업은 영세 부업농에서 전업농으로의 전환이 가속화되고 있다. 즉, 94년 이후 전업농의 농가수가 꾸준히 증가하고 있을 뿐 아니라 전업농의 사육두수 또한 증가되어 점점 대규모화 되어 가고 있다. 또한, 오리의 생산과 소비 분야에도 괄목할 만한 증가를 보였는데, 2002년 오리의 도압수수는 22,746,626두 (암 11,995,510, 수 10,751,116)이로써 2001년도 11,857,772두에 비해 무려 92%의 증가를 보였다.

이렇게 급속도로 선진화되고 있는 국내 오리 산업에서 가장 큰 걸림돌은 바로 **“질병”** 문제이다. 국내 연간 축산 총생산액 (53,112억) 가운데 질병으로 인해 최소한 약 20%인 10,622억원의 경제적 손실을 낳고 있다. 아직까지 오리에서 발

생한 질병에 의한 경제적 피해의 산출은 파악된 바 없으나 연간 도축두수인 23백만 수 (2002년도)를 기준으로 보고 최소피해정도를 20%로 추산할 경우 년간 25억원 이상으로 추정된다. 따라서 오리의 질병문제에 보다 적극적이고 과학적인 기술 확보는 우리 축산업 기반강화에 반드시 필요한 과제가 아닐 수 없다.

이와 같이 개방화시대를 맞아 우리 오리 축산이 살아남기 위해서 외국의 축산물에 대한 경쟁력 강화를 지속적으로 시도하여 왔으며, 이러한 규모화를 통한 규모경제는 반드시 성공되어야 한다. 하지만 예전의 소규모·영세성에선 문제되지 않았던 질병들이 아직껏 다발하고 있으며 수입 자율화가 되면서 외래성 질병들까지 노출위험이 가중되고 있는 실정이다. 더욱이, 현재 사육규모의 변화에 따른 지금까지 예상하지 못했던 기존의 집단적이고도 고질적인 질병들의 발병형태가 더 큰 문제시 되고 있다. 즉, 사육의 대규모화에 따라 급성의 질병이 발생하면 강한 전파력에 의해서 대규모로 질병이 발생하여 심각한 경제적 피해를 야기할 수 있으며, 그 대표적인 예가 오리 바이러스성 간염이라 할 수 있다.

또한 급성 전염병에 의한 문제에 대해서 반면교사로 삼아야 할 나라가 중국이라 할 수 있다. 중국으로부터 국내 수입자유화 원년인 91년에 수입량이 1,283톤에서 96년 8,368톤으로 증가되었다. 하지만 97년 12월 중국에서 가금 인플루엔자가 발생함으로써 1998에는 중국산 오리고기의 한국 수출이 전면 금지되었다. 이것은 하나의 전염병 발생이 나라의 경제력에 얼마나 큰 영향을 미치는지 보여주는 단면인 것이다. 따라서 국내 DVH 등 급성 전염성 질환에 대해 철저한 연구와 백신의 개발에 의한 차단의 필요성은 국가 축산 산업의 경영에 있어 아무

리 강조해도 지나치지 않은 것이다.

오리 바이러스성 간염은 오리의 질환 중에서 가장 전파력이 강하여, 한번 감염되면 폭발적으로 발생하여 높은 폐사율을 일으키기 때문에 경제적으로 심각한 피해를 유발한다. 1주 이내의 어린 오리에 감염될 경우 95% 정도가 죽게 되는 무서운 오리의 전염병이다. 따라서 본 질환에 대한 자세한 연구와 새로운 백신 개발이 절실한 실정이다. 특히, 오리 바이러스성 간염의 예방대책을 수립하는데 있어서는 질병에 대한 정확한 역학조사 및 병인론이 규명되어야 백신의 사용에 대한 정확한 지식을 확보할 수 있다.

국내에서는 지금까지 오리 바이러스성 간염에 대해 단발적·소규모로 연구가 수행되어 왔다. 따라서 대규모 농장을 대상으로 다양한 역학적 요인을 분석하여 과학적이고 정밀한 질병 발생 정보를 획득할 수 있는 연구가 절실하다. 이러한 역학조사를 통해 수집한 데이터와 재료를 바탕으로 원인체의 분리·동정을 통한 백신의 개발함으로서 예방대책과 치료대책의 확립이 가능할 것이다.

다. 사회·문화적 측면

예로부터 오리고기는 중풍, 고혈압을 예방하고 혈액순환을 좋게 하며 몸을 보양하고 빈혈을 없애주는 효능이 있다는 기록이 있다. 영양적인 측면에서 오리고기는 닭고기에 비해서 떨어지지 않으며 중성지방을 가지고 있어 일반 육류와는 달리 현대인의 대사성 질환의 유발요인과는 거리가 먼 것으로 간주되고 있다.

국내에서 오리 고기의 소비가 21세기에 들어서면서 급증하여, 이에 대한 산업

적 규모화와 더불어 이에 대한 질병피해가 속출하여 이의 대책마련이 중요한 축산현장의 사안으로 대두되며 또한 우리 국민들의 급격한 보건인식 향상으로 위생적이고 안전한 식품에 대한 요구가 증가되고 있다. 최근 구제역 파동으로 사람에게는 피해가 거의 전무함에도 불구하고 소고기 소비와 가격이 폭락하여 축산업계에 막대한 경제적 손실이 발생한 쓰디쓴 경험이 있다. 중국산 오리고기에서 강독형 가금 인플루엔자 바이러스가 검출되어 수입중지 보도가 나온 이후 오리고기 소비가 적게는 30% 많게는 50%까지 격감한 것으로 나타났다. 이러한 강독형 가금 인플루엔자 바이러스가 사람에게는 병원성이 낮음에도 불구하고 소비가 격감하는 것을 보아 대책마련이 시급한 것으로 나타났다. 즉, 비전문가인 국민들의 눈에는 오리바이러스성 간염의 연중 대량 발생이 구제역이나 인플루엔자와 같은 부정적 시각으로 연상시켜 오리의 소비를 감소시킬 수 있고 이로 인해 관련 산업의 성장둔화를 예견할 수 있다.

이렇게 우리나라 국민의 급격한 보건인식 향상에 발맞추어, 안정성이 확보된 위생적인 오리고기를 제공하기 위해서는 오리 바이러스성 간염에 대해 대규모 농장을 대상으로 계절별, 성별, 연령별, 지역별로 과학적이고 정밀한 발생역학 연구가 수행되어야 할 것이다. 또한 원인체의 분리·동정을 통해 야외에서 효과적인 백신을 개발하여 이 질병을 근원적으로 차단할 수 있어야할 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 제1세부과제

가. 오리 바이러스성 간염의 분리 및 동정

1) 바이러스의 분리 : 오리 바이러스성 간염이 발생한 6개 농장의 오리 간을 바이러스분리의 재료로 하였다. 계태아 섬유아세포, duck embryo liver cell 등 다양한 세포주를 이용하여 바이러스를 성공적으로 분리하였다. 특히 duck embryo liver cell을 이용한 바이러스 분리는 국내에서 처음으로 시도되었으며, 다른 세포주를 이용하는 것 보다 좋은 성과를 얻을 수 있었다. 이렇게 세포주를 이용한 바이러스 배양으로 향후 오리 바이러스성 간염 백신 개발의 대량생산에 크게 기여할 수 있게 되었다.

2) 바이러스의 동정 : 분리한 바이러스주의 물리 화학적 성상을 알아본 결과 RNA 바이러스로 외막이 없고 산과 유기 화합물 같은 외부 환경에도 상당히 강한 저항성을 가지고 있었다. 이것은 picornavirusm이 전형적인 특징으로 분리한 바이러스가 오리바이러스성 간염임을 확인하였다. 면역형광 항체법과 전자현미경을 이용하여 바이러스 입자를 눈으로 확인 할 수 있었다.

나. 오리 바이러스성 간염의 순응주 개발

1) Duck embryo liver cell에서의 연속계대배양 : 세포변성효과가 나타난 바이러스는 duck embryo liver cell에 60대 이상 연속 계대 배양하여 각 계대별 바이러스를 대량 확보하여 백신 개발에 활용할 수 있었다.

다. 상용화된 오리바이러스성 간염 백신의 효능 검사

1) 상용화된 오리 바이러스성 간염 백신의 방어능 시험 : 상용화 되고 있는 백신을 구입한 후 1일령 Pekin duck에 접종 후 type I 표준주와 분리주를 공격접종 하였다. 시판 백신은 Type I 표준주 공격접종 시에서는 15% 폐사율, 분리주 공격접종에서는 25% 폐사율을 나타내어 100%방어는 하지 못했다. 따라서 현 시판 백신 자체의 문제점을 확인 하였다. 하지만 Type I에 대한 어느 정도의 방어능이 있는 것으로 보아 새로운 type의 바이러스 출현은 아닌 것으로 추정되었다.

2) 상용화된 오리 바이러스성 간염 백신의 세포주를 이용한 연속계대배양 : 상용화된 백신의 문제점은 아마도 백신역가가 낮은 것으로 추정되었기 때문에 이를 개선하기 위해 duck embryo liver cell에 연속 계대 배양하여, 높은 역가로 만들 수 있었다. 이에 대한 방어능 및 안정성 결과는 아래에 기술하였다.

라. 오리 바이러스성 간염의 백신주 선발

1) 연속 계대 배양된 바이러스의 역가 : duck embryo liver cell을 이용하여 국내 분리주는 60대 이상, 시판 백신주는 40대이상 연속 계대 배양하였다. 계대별 $TCID_{50}$을 측정한 결과 계대가 거듭할수록 바이러스 역가가 높아짐을 확인 하였다. 특히 두 바이러스 모두 첫 계대 보다 1000배 정도 바이러스 역가가 높아지는 것을 확인하였다. 따라서 세포주에 계대함으로써 낮은 역가의 바이러스를 개선할 수 있었다.

2) 연속 계대 배양된 바이러스주들의 병원성 비교 : 세포주에 연속 계대함으로써 바이러스가 얼마나 약독화 되었는지 확인하기 위해 1대에서 60대 (국내 분리주) 및 40대 (백신주)까지 10계대 간격으로 1일령 오리 새끼에게 주사하였다. 분리한 바이러스는 1계대에서는 90%의 높은 병원성을 나타내었지만 40대 이상에서는 전혀 폐사가 나타나지 않았다. 또한 백신주 계대주에서는 어느 계대에서도 임상증상이나 치사율을 보이지 않았다. 따라서 세포주를 이용한 연속 계대된 바이러스는 성공적으로 약독화 되었으며, 백신주는 바이러스 역가를 효과적으로 높였음을 확인 하였다.

마. 오리 바이러스성 간염의 생백신 개발

1) 계대별 방어능 시험 : 세포주에서 순응된 분리주는 40대에서 60대까지 모두 100%의 방어율을 보였다. 시판 백신의 경우 40대 연속 계대한 경우 100% 방어율을 보였다. 따라서 세포 주에서 약독화 된 바이러스는 성공적으로 오리 바이러스성 간염을 방어하였다. 뿐만 아니라 시판 백신은 본 연구진에 의해 분리된 바이러스 보다 효능은 낮지만 기존의 문제점이 개선된 것을 확인 하였다.

2) 접종 경로별 방어능 시험 : 본 연구진에 의해 개발된 야외 분리주 및 상용화된 백신주을 세포에서 계대 배양하여 약독화 된 백신주를 감수성의 오리에 음수 접종과 복강으로 백신 후 공격 접종한 실험 결과 모든 경로에서 100% 방어율을 나타내었다. 특히 음수접종은 복강 접종에 비하여 백신 접종이 간편한 장점이 있으므로 일반적으로 이 방법으로 백신을 접종하면 무난할 것이다.

특히 음수접종은 특별한 도구나 기술이 없이도 사용가능하기 때문에 훨씬 편리한 백신접종 방법이 될 것이라 예상된다. 하지만 오리 바이러스성 간염 의 발생이 빠른 농장 또는 발생을 하고 있는 농장에서는 음수접종보다 방어능 발휘시간이 더 빠른 복강접종이나 근육접종이 더 효과적일 것이다. 이러한 경로별 방어능 실험은 실제 농장의 지도와 예방 관리에 응용할 수 있는 것으로 중요한 결과임을 알 수 있었다.

3) 최소 면역량 측정 시험: 세포주에 순응된 시험 백신주의 경우 $1x\ 10^{2.0}$ $TCID_{50}$를 구강으로 접종한 경우 방어율이 90%로 이 역가에서는 100% 방어율을 보이지 않았다. 하지만 $1x\ 10^{3.0}$ $TCID_{50}$이상에서는 100% 방어율이 발휘되었다. 따라서 100% 방어능이 발휘되는 최소 면역량은 마리당 $1x\ 10^{3.0}$ $TCID_{50}$임을 확인하였다. 시판 백신 계대 주에서도 $1x\ 10^{3.0}$ $TCID_{50}$이상에서는 100% 방어율이 발휘하여 최소 면역량은 시험 백신주와 비슷한 당 $1x\ 10^{3.0}$ $TCID_{50}$인 것으로 확인 되었다.

4) 안전성 시험 : 연구진에 의해 개발된 시험 백신주는 1수분과 10수분 뿐 아니라 100수분 접종에서도 전혀 폐사가 일어나지 않아 상당히 안정성이 높은 것으로 나타났다. 또한 백신을 접종한 후에도 활발한 움직임을 보였고, 식욕도 아주 왕성하였다. 따라서 본 연구 과제를 통해 개발된 시험 백신은 안전성이 높고, 좋은 방어 효과를 나타낼 것이라는 결론을 내릴 수 있다.

2. 제 2세부과제

가. 질병발생 오리 농장의 재료 수집

1) 전국적인 규모로 장기간에 대량의 가검물을 확보함으로써 오리 질병에 대한 역학 조사가 성공적으로 진행되었다. 수의과학검역원과 본 대학의 병성 감정기관, 축산기술연구소 및 보건환경연구원에 의뢰된 오리의 가검물은 전국적으로 총 244건이었다. 이중 오리 바이러스성 간염은 2004년에 128건 중 29건(23%), 2005과 2006년에는 116건 중 25건 (22%)으로 다른 어떤 원인체들에 비해 월등히 높은 감염률을 나타내었다. 따라서 오리 질병 중 오리 바이러스성 감염증이 가장 중요한 질병임을 시사할 뿐만 아니라, 오리 질병 중 유일하게 바이러스성 원인체 질병이므로 백신 개발의 절실함을 알 수 있다.

특히, 후궁반장 등의 신경증상을 보이며 높은 폐사율을 나타내는 농가에서 의뢰되거나, 백신을 접종하였음에도 전형적인 오리 바이러스성 간염 증상을 보이는 농가를 직접 방문하여 재료를 수집하였다. 이러한 공시물은 바이러스를 분리하고 동정하는 재료로 활용하였다.

나. 오리 바이러스성 간염의 역학조사

1) 축사 내에서의 전파속도 및 인근농장으로 전파유무 검사 : 방문한 축사 내에서의 전파속도는 폭발적이었으며, 2-3일 이내에 거의 대부분의 오리들이 감염되는 경향이 관찰되었으나, 다행히 인근 농장으로의 전파는 없었다.

2) 전파 매개체의 조사 : 전파 매개체에 대한 조사결과, 확실한 증거는 관찰되

지 않았으나, 차량, 사료, 사람 등에 의해서 전파된 것으로 추정되었다.

3) 다른 병원체들의 혼합감염 조사 : 위에서 기술한 바와 같이 오리 농장에서 가장 중요한 질병은 오리 바이러스성 간염이며, 그 외에도 세균성 감염증이 자주 관찰되었다. 즉 오리의 질병이 발생한 농가를 방문하여 원인체를 검사한 결과, 오리 바이러스성 간염이 주로 관찰되었으며, 그 외에도 대장균 혹은 라이멜리아 아나티페스티퍼 감염증들이 단독 혹은 오리 바이러스성 간염과 혼합 감염 양상으로 관찰되었다. 또한 오리 바이러스성 간염 백신을 한 농장에서 대량의 폐사가 발생한 경우, 대부분 대장균증 혹은 라이멜리아 아나티페스티퍼 감염증들이 발생하였거나, 아니면 오리 바이러스성 간염과 위의 질병들이 혼합 감염되어 높은 폐사율이 발생하였다.

방문한 농가 또는 의뢰된 가검물에서 분변을 채취하여 부유법 또는 직접 도말법을 이용하여 기생충 검사 시 어떠한 기생충 충란도 검출되지 않았다. 따라서 오리의 대량 폐사의 주요인은 오리 바이러스성 간염의 단독 감염 혹은 세균성 질병과의 혼합감염에 의한 것으로 확인되었다.

다. 오리 바이러스성 간염 증례의 병리학적 연구

1) 병리해부검사: 특히 오리바이러스성이 의심되는 의뢰된 검사체 또는 유사한 임상증상을 보였던 농가를 방문하여 폐사 혹은 폐사 직전의 오리를 대상으로 자세한 부검을 실시하였다. 특징적으로 후궁반장 등의 임상증상을 보였고, 부검시 간 종대 및 출혈과 괴사가 관찰되었다. 이런 특징적 육안 병변을

기록하고, 장기 및 조직재료를 채취하여 아래 항목의 검사에 활용할 수 있었다.

2) 병리조직검사: 병리해부검사에서 채취한 조직들은 상법에 준하여 H&E stain 이 사용하여 병리조직검사를 성공적으로 수행하였다. 특징적으로 간에서 미만성의 심한 간세포 변성 및 괴사가 관찰되었다. 괴사된 세포에서는 세포질막이 파괴되었으며, 다수의 공포가 관찰되었다. 신장에서도 세뇨관 상피의 변성 또는 괴사와 충혈이 관찰되었다. 병리조직 검사를 통해 오리 바이러스성 간염의 전형적인 병변을 확인할 수 있었다.

3) 면역형광항체 검사 : 부검 시 일부 조직은 냉동조직으로 보관하여 고정된 절편을 오리 바이러스성 간염 특이 항체로 염색하여 검사를 실시하였다. 특히 야외 증례의 간과 신장에서 미만성내지 다발성의 특이적인 양성 반응이 세포질에서 관찰하였다. 따라서 국내 최초로 항체를 이용한 오리 간염 바이러스의 항원 분포를 성공적으로 확인할 수 있었다.

4) 전자현미경적 검사 : 전자현미경적으로 간세포는 심하게 파손되어 있었으며, 내부의 미세소기관도 종창내지 파괴되어 있었다. 핵은 종창되어 있었고, 염색질은 분해되는 소견을 보였다. 이러한 괴사된 간세포 세포질 내에서 30 nm 크기의 picornavirus 입자들이 덩어리 혹은 산재되어 있었으며, smooth endoplasmic reticulum 내에서도 picronavirus 입자들을 확인할 수 있었다

3. 관련분야에의 기여도

본 연구가 수행되면 기술적 측면에서의 기대효과는 다음과 같이 요약된다.

가. 국내 오리 사육 농가 및 부화장에서 발생하고 있는 오리 바이러스성 간염, 라이메리아 감염증, 대장균 감염증, 살모넬라 감염증, 파스튜렐라 감염증, 아스퍼질러스 감염증 등의 발생 역학 조사를 함으로써 향후 이러한 질병들에 대한 발생억제 및 치료 뿐 아니라, 농장관리와 질병 예방 대책을 세우는 기본적인 자료로 활용할 수 있게 되었다.

나. 기존의 계태아를 이용한 오리 바이러스성 간염 백신은 계대가 상당히 복잡하고 힘들뿐 아니라, 낮은 바이러스 역가를 나타내었다. 국내 최초로 시도한 duck embryo liver cell을 이용한 바이러스 분리 및 백신 개발은 훨씬 용이하게 바이러스를 증폭하고, 높은 바이러스 역가를 나타내었다. 뿐 아니라, 세포주를 이용함으로써 대량의 백신 생산을 가능하게 함으로써 기존의 문제점을 극복할 수 있게 되었다.

다. 국내에서 현재 발생되고 있는 바이러스를 분리 및 백신개발을 함으로써 오리 질병 중 가장 무서운 질병인 오리 바이러스성 간염을 예방하여 농가의 소득을 올릴 수 있게 되었다.

라. 국내에서 시판되고 있는 백신의 문제점을 알아내고, 개선함으로써 새로운 백신 개발에 들어가는 비용을 절감하였을 뿐 아니라, 향후에도 지속적인 백신의 monitoring을 통해 백신이 나타낼 수 있는 문제점을 극복할 수 있게 되었다.

마. 특히 요즘 신생 또는 재 발생 되는 많은 바이러스 감염증의 창궐로 인해 백신 개발 연구의 중요성이 높아지고 있으며, 이와 더불어 백신 연구 인력 또한 많은 수요가 요구되어지고 있다. 본 연구를 통해서 백신 전문 기술 인력을 양성할 수 있어서 향후 새로운 생물 산업군의 활성화에 기여할 것으로 생각된다.

바. 본 연구 과정 중에서 모든 기술의 국산화로 국내 기술의 향상을 할 수 있었다.

사. 본 연구를 통해 농가를 관리함으로써 위생적이고 건강한 오리 고기공급으로 식품의 안정성을 제고하여 소비를 획기적으로 늘릴 수 있게 되었다.

아. 또한 본 연구에서 획득한 백신개발 노하우는 타 백신 개발 분야에 응용되어 백신 분야의 개발 활성화를 기대할 수 있게 되었다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 본 연구를 통하여 개발된 시험 백신주은 향후 직접 농장에서 오리 바이러스성 간염이 발생한 농장 또는 백신을 하였음에도 발병한 농장을 선정하여 시험 백신 효능 검사를 실시함으로써 시험 백신주의 실제 야외 농장에서의 백신 효능을 검증하는 연구가 수행되어야 할 것이다.

나. 본 연구결과에서 보는 것처럼 오리 바이러스성 간염의 주로 표적 장기인 간과 신장에서도 병변을 유발하였다. 하지만 정확한 기병론 연구는 되어있지 않은 실정이다. 따라서 국내에서 분리한 오리 바이러스성 간염 바이러스를 감수성 연령의 실험용 오리에 경로별로 접종하여 시간대 별로 바이러스의 전파양식과 각 장기별 항원의 발현 정도를 파악, 바이러스가 배출되는 경로 등 기병론 연구를 수행하여야할 것으로 사료된다. 이러한 기병론 연구는 향후 바이러스의 전파양식 등을 규명할 수 있을 것이다.

다. 오리 바이러스성 간염은 전 세계적으로 병리 해부검사와 병리 조직학적 점사, 계태아에 접종 방법 등을 제외한 진단법이 개발되어 있지 않은 실정이다. 본 연구진은 특이적인 항체를 이용한 면역형광항체법과 전자현미경 검사법을 이용하여 더욱 정확한 진단을 하였다. 하지만 이러한 진단법은 많은 비용이 들고, 진단하는 기간도 길어지며 전문가가 아니면 정확한 진단이 내릴 수 없다는 단점이 대두되었다. 따라서 각 병성감정 기관에서 쉽고 빠르며 효과적인 진단법을 개발하는 연구가 수행되어야 할 것이다.

라. 본 연구의 역학 조사를 통하여 오리 바이러스성 간염 외에도 대장감염증과 라이메리아 감염증, 아스퍼질러스 감염증 등 다양한 세균성 또는 진균성 질병 등이 발병하고 있는 것을 확인하였다. 이들에 각각의 원인체에 대한 자세한 역학조사가 수행되어 농가 질병관리 및 사양관리의 자료로 활용되어야 할 것이다.

마. 본 연구를 통하여 국내에서 최초로 세포주를 이용하여 개발한 시험 백신주를 상용화 백신으로 개발하여 오리 바이러스성 간염의 감염 및 전파를 차단하는데 활용할 수 있도록 한다. 기존의 계태아를 이용한 백신 생산의 복잡함, 인력 낭비, 비용 증가 등의 단점을 극복하여 보다 쉽게 대량 확보할 수 있는 백신을 생산할 수 있어, 오리 백신 생산의 수준을 향상시키는데 이바지 할 수 있을 것이다.

SUMMARY

Ⅰ. Title

Epidemiological Survey on and Development of Vaccine for the Duck Viral Hepatitis Disease

Ⅱ. Purpose and Rationale of Research and Development

1. Purpose of Research and Development

The final goals of this study are development of vaccine against the duck viral hepatitis virus (DVHV). In order to develop vaccine against DVHV, this study includes epidemiological survey on, and virus isolation, identification and attenuation of DVHV.

2. Rationale

Technical Aspect

After middle of 1990, the Korean duck industry has been rapidly changed from small to large scale. The problems of large scale farms are rapid spread of malignant infectious diseases, resulting in huge economic losses. Those malignant infectious duck diseases are duck viral hepatitis (DVH), *Riemerella*

anatipestifer infection, *E. coli* infection, etc. Of these, the DVH is caused by DVHV and rapid spreading and explosive contagious. Therefore, the precise epidemiological survey and the effective vaccine development should be done.

In Korea, the DVH has been thought to prevent by vaccine developed by the attenuation through the fertile eggs of chickens. However its efficacy is doubtable because DVH has been occurring in duck farms vaccinated with DVHV. This problem may be caused by the failure of vaccine development, the occurrence of mutant DVHV in the field, or emerging new viruses. The DVH can be caused by three viruses: Type I DVH is caused by picornavirus, type II is caused by asterovirus, and type III is induced by picronavirus which is different serologically from type I picornavirus. These viruses are known to no have cross-protection.

In order to establish prevention strategy to DVH, the epidemiological survey on the DVH in Korea should be performed. Moreover, the vaccine promising high efficacy and safety should be developed to eradicate the DVH In Korea.

Social and public health aspect

After liberalization of duck-meat imports from 1991, Korean duck industry must compete with foreign chief duck products. Consequently, the Korean duck industry is falling down and down. Especially, huge imports of duck

products at 1993 and restarting the imports of duck meat from China stunned the Korean duck industry. Therefore, the competitive power of Korean duck industry is essentially needed.

In order to increase the competitive power, the Korean duck industry take the initiative to increase the farm size: the number of monopoly and ducks are gradually increased from 1994. In addition, the rate of production and consumption has been markedly increased. The problems of large scale farms are diseases. The disease is known to cause 20% losses (1,0622.2 billion Won) of the total farm animal product output (5,311.2 billion Won). Therefore, improved technical approaches should be performed to strengthening the duck industry in Korea.

In order to survive in the condition of liberalization of duck-meat imports, Korean duck industry intensify the competitive power. However, there are malignant infectious diseases in the duck farms which were not problem in the small scale farms. Especially, these diseases are suspected to emerge from foreign imported duck products. Moreover, the malignant infectious diseases fastidious to prevent and treat are unexpectably occurred after changing the farm scale. The good example is the DVH.

The DVH is the most contagious disease of duck infectious diseases. The DVH is explosively occurring and causes high mortality, resulting in serious

economic problems. This disease can cause 95% mortality within the flocks of one week old age. Therefore, the precise pathogenesis as well as vaccine development should be performed. In order to establish prevention strategy including vaccine use, the epidemiological survey on and etiological studies are essential.

In Korean, the studies on the DVH is in small scales. Therefore, the massive studies on the DVH should be done. These studies are very helpful to establish the preventive and treatment strategies.

Social and public health aspect

Traditionally, the duck meat is known to prevent the stroke and hypertension, and good for the anemia. Nutritionally, duck meat is almost equal nutrition with chicken that and contains unsaturated fatty acid. Therefore, duck meat hardly causes metabolic diseases. Although duck meats are known for nutritionally very good, duck industry are not considered to important in Korean so that research on diseases has not been carried out in detail.

Since Korean have been considering their health very deeply, the safety- and efficacy-promising foods are essential in Korea. For example, the occurrences of highly pathogenic avian influenza and foot and mouth disease

stunts Korean. After consequence, meat consumption is markedly decreased and then livestock industry fall down dramatically. The DVHV causes hepatitis which is one of the most popular diseases in Korea. Although the DVH can not transmit to humans, Korean rejects to eat the duck meat when they know the DVH is hepatitis disease. For this reason, the vaccine against the DVHV should be developed as soon as possible.

Ⅲ. Results and Extents of Research and Development

A. Isolation and identification of DVHV

1) Isolation of DVHV: From the ducks of 6 farms with DVH, the liver specimens were sampled. The virus isolation was attempted with chicken embryo fibroblast cells, duck embryo liver (DEL) cells and finally isolated DVHV. Particularly, virus isolation using DEL cells is the first trial in Korea and more effective to isolate DVHV than that of the other cells. This result imply that virus isolation using DEL cells may contribute mass products of vaccines in future.

2) Identification of DVHV: The biophysical tests on the DVHV isolates showed that the DVHV isolated in the present study was non-enveloped

RNA virus and resisted to acid and organic compounds. These properties are typical of picornavirus. Immunofluorescence test and electron micropical observation confirmed these viruses were DVHV.

B. Attenuation of DVHV isolates

1) Serial attenuation in the DEL cells: The liver homogenates obtained from DVHV-infected ducklings were passaged over 60 times serially in the DEL cells. Each passage was stored at -80℃.

C. Vaccine efficacy test with commercialized DVH vaccine.

1) Vaccine protection test with commercialized DVH vaccine: The 1-day-old ducklings were challenged with DRL-69 and DVH isolates after vaccination with commercialized DVH. The commercialized DVH vaccine protected 85% protection after DRL-69 and 75% protection after DVH isolates. These results imply that currently used vaccine can not protect perfectly each prototype and wild type DVHV but have cross-protection to DVHV type 1, indicating that the currently occurred DVH is caused by DVHV type 1.

2) Serial cultivation of commercialized DVHV vaccine in the DEL cells: The

problem of currently used vaccine might be caused by the use of low titer of vaccine. Therefore, we cultivated the commercialized DVHV vaccine serially in the DEL cells. Consequently, we made high titer vaccine virus and its efficacy and safety is described below.

D. Development of DVH vaccine using field isolates

1) Virus titration of serially passaged DVHV isolates: Using DEL cells, the Korean DVHV isolates and commercialized DVHV vaccine strain were serially passaged over 60 and 40 times, respectively. With increasing the passage, the titer of each virus increased: each virus titers was increased over 1000 times. Using serial passages of each virus, the problem of low titer is improved.

2) The comparison of pathogenecity of each serially passaged virus: In order to evaluate the attenuation of serially passaged DVHV in the DEL cells, the 1st, 10th, 20th, 30th, 50th and 60th passages were incoulated into 1-day-old ducklings. The 1st passage caused 90% mortality and the other passages in order caused gradually decreased mortality. Finally, over 50th passages did not cause mortality to inoculated ducklings. In addition, each passage of vaccine strain did not cause mortality to inoculated ducklings.

From these results, over 50th passages of Korean DVHV isolate were successfully attenuated and the virus titration of currently used vaccine virus was markedly increased.

E. Development of live-attenuated vaccine against the DVHV

1) Evaluation of protection rate with each passage: Cell-adapted and -attenuated over 40th passages showed 100% protection in the duckling challenged with prototype DVHV after 1 week post-vaccination. The currently used commercialized DVH vaccine revealed 80% protection in the ducklings challenged with prototype DVHV after 1 week post-vaccination. However, 40th passage of commercialized DVH vaccine protected 100% in the ducklings challenged with prototype DVHV. These results suggested that cell-adapted and -attenuated Korean DVHV and commercialized vaccine strain protect successfully the virulence prototype DVHV so that these attenuated isolate and strain can be used vaccine for DVHV.

2) Protection test using the different vaccination routes: The attenuated 50th and 60th passages of field DVHV isolate as well as the attenuated 40th passage of currently used commercialized DVHV vaccine strain were

inoculated orally or intra-abdominally into 1-day-old ducklings and challenged with prototype DVHV after 1 week post-vaccination. All the attenuated passages protected 100%. Particularly, oral adminstration was suitable for the vaccination because of easier to adminstration without any special instruments or techniques than intra-abdominal adminstration. However, the farms in which the DVH was occurred or suspected might use intra-abdominal or intra-muscular adminstration because these methods elicited more quickly the protection ability than that of oral adminstration.

3) Evaluation of minimum vaccine dose: Using serial titers of cell-adapted vaccine strain or cell-attenuated isolate from 1x $10^{2.0}$ $TCID_{50}$ to 1x $10^{4.0}$ $TCID_{50,}$ minimum vaccine dose was evaluated in the ducklings. The virus inoculum of 1x $10^{2.0}$ $TCID_{50}$ protected 90%, whereas over 1x $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ protected 100%. Therefore, over 1x $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ can be used for the vaccine against the DVHV.

4) Evaluation of vaccine safety: In order to evaluate the vaccine safety, we inoculated 1 dose, 10 doses and 100 doses to each ducklings and observed side effects including the clinical signs and mortality. There were no side

effects in the ducklings administrated with each 1, 10 or 100 doses. These experiment ducklings were in good form and showed a hearty appetite. Overall, the vaccine we developed is highly safe and has good protection efficacy.

F. Sampling of DVHV-infected specimens

1) We sampled DVHV-infected specimens throughout the Korea, indicating that epidemiological survey on DVH in Korea was successful. The DVH incidence in Korea was 29 cases (23%) out of 128 in 2004, 25 cases (22%) in 2005 and 2006. These data indicated that the DVH was the most important disease in the duck industry in Korea. These samples were used for virus isolation and vaccine development.

G. Epidemiological survey

1) Spread time in the stall and transmission into neighbor farms: Spread time in the stall we visited was explosive and almost all ducklings were infected within 2-3 days after occurrence. However, the transmission into the neighbor farms was not observed.

2) Detection of carrier: In the present study, we could not detect the exact

carrier to DVHV. Therefore, we suspected feed, vehicles or humans might be carrier to DVHV.

3) Concurrent infection: As above mentioned, the DVH was the most prevalent disease in the Korean duck industry. The *E. coli* and *R. anatifestifer* infections were also frequently observed infections causing massive economic losses. These diseases were observed as a single infection or concurrent infections. Especially, the farms DVHV-vaccinated but severe DVH occurred had usually co-infected with *E. coli* and *R. anatifestifer* infections. Fecal specimens obtained from ducklings did not have any parasite eggs, indicating that the massive mortality of ducklings might be caused by DVHV.

H. Pathological study on DVHV

1) Macroscopic observation: We necropsied the ducklings suspected to be infected with DVHV. These ducklings showed typical opisthotonos and hepatomegaly with multiple pinpoint necrosis and hemorrhages. We recorded these typical clinical signs and necropsy findings, individually, sampled each organs and tissues, and used for studies as below mentioned.

2) Histopathological observation: Necropsied samples were fixed in 10%

neutral formalin, paraffin-embedded, cut at 3 ㎛, and stained with H&E stain. DVHV-infected ducklings showed typically diffuse severe hepatocyte necrosis. Necrotic hepatocytes exhibited the rupture of cell membrane and contained variable number of vacuoles. The kidney had multiple tubular degeneration and necrosis, and multiple congestions.

3) The liver and kidney specimens obtained from the ducklings which were suspected to be infected with DVHV were frozen-sectioned and immunofluorescence test with polyclonal antibodies specific to DVHV type 1 was performed. The specific positive fluorescence reaction was observed in the cytoplasm of liver and kidney cells. We used this technique to diagnosis the DVH in the first time in Korea.

4) Electron microscope: The liver and kidney specimens obtained from the ducklings which were suspected to be infected with DVHV were double-fixed with glutaraldehyde and osumium tetraoxide, thin-sectioned, and double-stained. The hepatocytes had severely dilated organelles and dilated nuclei with destructed chromatin. These hepatocytes had picornavirus particles measuring 30 nm in diameter which were present as cluster.

Ⅳ. Suggestions for the Application of Research Results

A. The vaccine we developed should be commercialized to prevent the field occurrence of DVH. We have proved that these new vaccines against the DVHV promised efficacy and safety. Therefore, these vaccines will decrease the huge economic losses due to DVH in Korea.

B. The DVHV infected the liver and kidney. However, the precise pathogenesis is not studied. In order to evaluate the precise pathogenesis of DVHV including what the target organs are, how DVHV reach the target organs, how long DVHV excrete, etc., the virus should be inoculated by various routes into ducklings.

C. The diagnostic tools developed and used currently include only gross and histological methods as well as inoculation of liver homogenates into fertile eggs of chickens. In the present study, we used immunofluorescence test and electron microscope to diagnosis the DVHV as a more accurate diagnostic method. However, these diagnostic methods are expensive and time-consuming, and need a expert knowledge. Therefore, the methods, which can solve these weak points, should be

developed including RT-PCR, nested PCR, ELISA, etc.

D. In the present study, collibacillosis, *Riemerella anatipestifer* infection, Aspergillosis, etc., are occurred frequently in duck farms in Korea. Therefore, the epidemiological studies on these diseases should be performed in order to establish the disease inhibition or control programs.

E. We developed DVHV vaccine using cell culture systems. Therefore, these vaccines should be commercialized in order to control and prevent the DVH in Korea. These vaccines can solve the defects of currently used commercialized DVHV vaccine.

CONTENTS

Chapter I Purpose and Rationale of Research and Development ---------- 39
Section 1. Purpose and contents of Research and Development ------- 39
Section 2. Ratiouale of Research and Development ---------- 39
1. Technical Aspect ---------- 39
2. Industrial Aspect ---------- 42
3. Social and Public Health Aspects ---------- 46
Chapter II Status of the Technology in Domestic and Foreign Countries ---------- 48
Section 1 Status of the Technology in Korea ---------- 48
Section 2 Status of the Technology in Foreign Countries ---------- 49
Chapter III Contents and Results of the Research and Development ---------- 51
Section 1 Contents of the Research and Development ---------- 51
The first research teem ---------- 51
1. Isolation and identification of DVH ---------- 51
2. Development of attenulated DVH virus ---------- 54
3. Efficacy test of commercial DVH vaccine and isolation in DEL cells--- 54
4. Selection of vaccine strain from Korean DVH isolates and cell-attenulated commercial vaccine ---------- 55
5. Live vaccine development of DVH ---------- 56
The second research teem ---------- 58
1. Nationwide sampling---------- 58

2. Epidemic survey of DVH---------- 58
3. Pathological study ---------- 59
Section 2 Results of the Research and Development ---------- 60
1. A study of Epidemiology ---------- 60
1. Prevalence of duck disease in South Korea ---------- 60
2. Pathological Observation of field cases---------- 67
1. Clincal sign and gross lesion ---------- 67
2. Histopathological observation---------- 68
3. Antigen distribution by IFA test---------- 69
4. Electron microscope ---------- 71
3. Isolation and Characterization of DVH ---------- 72
1. Virus isolation in various cell culture---------- 72
2. Pysicochemical characterization---------- 76
3. Immunofluorescent assay ---------- 78
4. Electron microscope ---------- 80
5. Pathogenicity assay of Korean isolate---------- 81
4. Development of cell attenulated DVH isolate according to serial passage---------- 88
1. Efficacy examination of commercial DVH vaccine ---------- 88
2. Virus titer of serial passage in cell culture ---------- 90
3. Pathogenicity of DVH isolate in duckling in each serial passaged isolate---------- 92
4. Protective examination of cell attenulated DVHV isolate and commercial vaccine---------- 101
5. Development of Live vaccine ---------- 102

1. Protective examination according to inoculated routes---------- 102
2. Minimum immunizing dose test---------- 110
3. Safety evaluation---------- 117
Chapter IV Achievement and Contribution of the Research and Development ---------- 126
Section 1 Achievement of the first research teem ---------- 127
Section 2 Achievement of the second research teem ---------- 133
Section 3 Contribution ---------- 135
Chapter V Plan to Apply the Results and Development -------- 137
Section 1 Suggestions for the application of research results ---------- 137
Chapter VI Information Acquired during Research and Development from Foreign Countries ---------- 139
Chapter VII References ---------- 142

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ---------- 39

제 1 절 연구개발 목표와 내용 ---------- 39

제 2 절 연구개발의 필요성 ---------- 39

1. 기술적 측면 ---------- 39

2. 경제·산업적 측면 ---------- 42

3. 사회·문화적 측면 ---------- 46

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ---------- 48

제 1 절 국내 기술개발 현황 ---------- 48

제 2 절 국외 기술개발 현황 ---------- 49

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 ---------- 51

제 1 절 연구개발 수행내용 ---------- 51

제1세부과제 ---------- 51

가. 오리 바이러스성 간염의 분리 및 동정 ---------- 51

나. 오리 바이러스성 간염의 순응주 개발 ---------- 54

다. 상용화된 오리 바이러스성 간염 백신의 효능 검사 및 세포 주에서의 분리 54

라. 야외 분리 주와 시판백신의 세포 계대주에서 백신주 선발 ---------- 55

마. 오리 바이러스성 간염의 생백신 개발 ---------- 56

제2세부과제 ---------- 58

가. 질병발생 오리 농장의 재료 수집---------- 58

나. 오리 바이러스성 간염 의 역학조사 ---------- 58

다. 오리 바이러스성 간염 증례의 병리학적 연구 ---------- 59

제 2 절 연구개발 수행결과 ---------- 60

1. 오리 바이러스성 간염의 역학조사 ---------- 60

가. 오리 질병의 전국적인 발생현황 ---------- 60

2. 야외증례에서의 오리 바이러스성 간염의 병리학적 검사---------- 67
가. 임상 증상 및 육안소견---------- 67
나. 병리조직학적 소견---------- 68
다. 면역형광항체법에 의한 오리 바이러스성 간염 바이러스 항원의 분포조사 69
라. 전자현미경적 소견 ---------- 71
3. 오리 가검물에서 오리 바이러스성 간염의 분리 및 동정 ---------- 72
가. 다양한 세포주을 이용한 바이러스 분리---------- 72
나. 분리한 바이러스의 물리화학적 성상확인---------- 76
다. 면역형광항체법을 이용한 세포분리주의 동정---------- 78
라. 전자현미경 기법을 이용한 세포분리주의 동정---------- 80
마.오리 바이러스성 간염 분리주의 오리에서 병원성 시험 ---------- 81
4. 세포주의 연속계대 배양을 이용한 오리 바이러스성 간염의 순응주 개발--- 88
가. 상용화된 오리 바이러스성 간염 백신의 효능 검사---------- 88
나. 세포주에 연속계대한 배양한 바이러스의 역가 측정---------- 90
다. 계대별 세포 순응주의 오리에서의 병원성 시험---------- 92
라. 상용화된 백신과 세포주에서 계대 배양된 순응주의 계대별 방어능 시험- 101
5. 세포주를 이용한 계대된 순응주의 생백신 개발 ---------- 102
가. 접종 경로별 방어능 시험 ---------- 102
나. 최소 면역량 측정 ---------- 110
다. 안전성 시험 ---------- 117
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ---------- 126
제 1 절 제1세부과제 연구목표 달성도 ---------- 127
제 2 절 제2세부과제 연구 목표 달성도 ---------- 133

제 3 절 관련분야에의 기여도 ---------- 135
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ---------- 137
제 1 절 추가연구의 필요성 및 타 연구에의 응용 ---------- 137
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ---------- 139
제 7 장 참고문헌 ---------- 142

제 1 장　연구개발과제의 개요

제1절 연구개발 목표와 내용

1. 본 연구의 목표는 국내에서 발생하고 있는 오리 바이러스성 간염에 대한 역학조사, 바이러스 분리·동정 및 이의 계대배양을 통한 약독화로 오리 바이러스성 간염에 대한 백신을 개발하는데 있다.

2. 또한 오리 바이러스성 간염 이외에도 국내에서 발생하고 있을 것으로 예상되는 다른 질병들에 대한 역학 조사를 통해 국내에서 사육 중인 오리에 대한 질병 모니터링을 하여 향후 이에 대한 예방, 치료, 방역 대책에 대한 기본 자료로 활용함에 있다.

제2절 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

▣ 국내 오리 산업은 90년대 중반 이후부터 영세 사육형태에서 대규모 전업 사육형태로 빠르게 변화하고 있다.

▣ 따라서 사육형태가 변화함에 따라 전염성 질병으로 인한 오리의 집단 폐사로 사육농가의 엄청난 경제적 피해를 주고 있는 실정이다.

▣ 특히 국내 오리 산업 내 가장 문제시 되고 있는 질병으로는 집단 누적 폐사율이 높은 오리 바이러스성 간염 을 비롯 라이메리아증, 대장균성 오리폐혈

정등을 들 수 있다.

▣ 하지만, 이 원인체 중에서도 다른 원인체는 세균임에 비하여 오리 바이러스성 간염 은 유일한 바이러스성 원인체로서 강력한 전파력으로 폭발적으로 발생하며 그 역학적 발생기전이 다양하다고 알려져 있다.

▣ 따라서 오리 사육의 대단위화 전업화 경향에 따라 질병발생의 역학조사와 오리 바이러스성 간염의 백신 개발을 통한 오리 바이러스 간염을 예방하는 것이 시급한 실정이다.

▣ 국내 오리 바이러스성 간염 은 계태아 배양을 통한 단일형 분리 병원체 백신 개발로 퇴치 가능한 것으로 생각되었다.

▣ 하지만 최근 기존에 백신을 하였음에도 불구하고 이 질환의 발생이 그치지 않고 발생되고 있어 오리 농가에서 백신의 효과와 그 효능범위를 포함한 여러 의문들이 제기되고 있다.

▣ 즉, 백신 제조상의 문제나 같은 Type 1 내에서의 오리 바이러스성 간염 의 변이주 발생, 또는 영국이나 미국에서 발생한 새로운 type의 오리 간염 바이러스의 출현을 의심하였다.

Table 1. Incidence of duck viral hepatitis in three farms

Farm No.	Breed	House No.	No. of birds	Morbidity (%)	Mortality (%)	Age (day)
A	Mallard	9	20,000	10,000 (50.0)	5,000 (25.0)	1, 5
B	Pekin	7	7,000	1,000 (14.2)	300 (4.3)	8
C	Pekin	2	12,000	6,000 (50.0)	801 (6.7)	9

자료: 한국 수의병리학회, Vol 2, 2001년.

▣ 오리 바이러스성 간염은 전세계적으로 세가지 유형으로 구분되고 있다. Type I은 picornavirus에 의해 발생하며, Type II은 asterovirus, Type III는 type I 과 항원성이 전혀 다른 picornavirus에 의한다고 알려져 있다. 각 type 별 단일 백신은 교차 방어가 되지 않는 것으로 알려져 있다.

▣ 또한 type 1 오리 바이러스성 간염 내에서도 상당한 변이주가 발생하는 것으로 보고 되어 지고 있다.

▣ 따라서 과학적이고 정밀한 질병발생 역학 연구를 통해서 국내에서 다발하는 주요한 질병을 파악하는 것이 급선무 일 것이다.

▣ 특히 현재 발생하고 있는 오리 바이러스성 간염의 분리·동정을 통한 백신 개발이야말로 질병을 근원적으로 차단할 수 있으므로 절실히 백신개발의 필요성이 대두되고 있다.

2. 경제・산업적 측면

▣ 91년 오리고기의 수입자유화 이후 국내 오리 산업은 국제적인 시장개방의 경쟁체제 아래에 놓여 있다. 즉 수입자유화에 따른 저렴한 외국산 오리고기 수입으로 점점 국내 오리 산업이 어려워지고 있다.

▣ 특히 1993년 이후 수입물량이 급격히 증가 하였을 뿐만 아니라, 1998년에 중국산 오리고기의 수입이 중단되었던 것이 1999년에 재 허용됨으로써 국내산지 가격은 그리 전망이 밝지 못하였다. 따라서 국내 오리 사육 농가들의 경쟁력 향상이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

▣ 이러한 자구책으로 국내 오리 산업은 영세 부업농에서 전업농으로의 전환이 가속화되고 있다 (Table 2). 즉, 94년 이후 전업농의 농가수가 꾸준히 증가하고 있을 뿐 아니라 전업농의 사육두수 또한 증가되어 점점 대규모화 되어 가고 있다.

▣ 또한, 오리의 생산과 소비 분야에도 괄목할 만한 증가를 보였는데, 2002년 오리의 도압 수수는 22,746,626두 (암 11,995,510, 수 10,751,116)이로써 2001년도 11,857,772두에 비해 무려 92%의 증가를 보였다.

Table 2. Number of ducks and farms in each year

Year	No. of farms	No. of ducks	No. of ducks/No. of farms	No. of Profession farms	No. of ducks/No. of Profession farms
91	14,522	1,457,565	100	-	-
92	12,706	1,045,003	82	-	-
93	9,861	1,031,927	104	-	-
94	8,317	1,698,041	204	305	5,053
95	9,485	2,356,903	248	418	5,144
96	8,624	3,464,872	401	533	6,092
97	9,028	2709431	300	312	7,601
98	8,820	3,167,214	359	343	8,195
99	12,673	4,787,207	377	474	9,035
00	14,258	5,404,551	379	555	8,525

자료: 오리협회 (축산연감2000)

▣ 이렇게 급속도로 선진화되고 있는 국내 오리 산업에서 가장 큰 걸림돌은 바로 **"질병"** 문제이다.

▣ 국내 연간 축산 총생산액 (53,112억) 가운데 질병으로 인해 최소한 약 20%인 10,622억원의 경제적 손실을 낳고 있다.

▣ 하지만 아직까지 오리에서 발생한 질병에 의한 경제적 피해의 산출은 파악된 바 없으나 연간 도축두수인 23백 만 수 (02년도)를 기준으로 보고 최소피해 정도를 20%로 추산할 경우 년간 25억원 이상으로 추정된다. 따라서 오리의 질병문제에 보다 적극적이고 과학적인 기술 확보는 우리 축산업 기반강화에

반드시 필요한 과제가 아닐 수 없다.

▣ 이와 같이 개방화시대에 있어 우리 오리 축산이 살아남기 위해서 외국의 축산물에 대한 경쟁력 강화를 시도하여 왔으며, 이러한 규모화를 통한 규모경제는 반드시 성공되어야 한다.

▣ 하지만 예전의 소규모·영세성에서 문제되지 않았던 질병들이 아직껏 다발하고 있으며 외래성 질병들의 노출에도 노출위험이 가중되고 있는 실정이다. 더욱이, 현재 사육규모의 변화에 따른 지금까지 예상하지 못했던 기존의 집단적이고도 고질적인 질병들의 발병형태가 더 큰 문제가 되고 있다.

▣ 즉, 사육의 대규모화에 따라 급성의 질병이 발생하면 강한 전파력에 의해서 대규모로 질병이 발생하여 심각한 경제적 피해를 야기 할 수 있으며, 그 대표적인 예가 오리 바이러스성 간염이라 할 수 있다.

▣ 또한 급성 전염병에 의한 문제에 대해서 반면 교사로 삼아야 할 나라가 중국이라 할 수 있다. 중국으로부터 국내 수입자유화 원년인 91년에 1,283톤이 96년 8,368톤으로 증가되었다 (Table 3). 하지만 97년 12월 중국에서 가금 인플루엔자가 발생함으로써 1998에는 중국산 오리고기의 한국 수출이 전면 금지되었다. 이것은 하나의 전염병 발생이 나라의 경제력에 얼마나 큰 영향을 미치는지 보여주는 단면인 것이다.

▣ 따라서 국내 DVH 등 급성 전염성 질환에 대해 철저한 연구와 백신의 개발에 의한 차단이 필요성은 국가 축산 산업의 경영에 있어 아무리 강조해도 지나치지 않은 것이다.

Table 3. The trend of duck-meat imports in korea (Unit: ton)

Year	USA	China	Thailand	France	Taiwan	Vietnam	Japan	Total
'91	117	228	517	-	299	122	-	1,283
'92	114	1,203	840	-	161	1,471	-	3,789
'93	107	713	1,280	-	12	571	10	2,693
'94	133	2,936	371	1	-	-	-	3,441
'95	136	4,642	143	-	-	-	-	4,921
'96	218	7,966	183	1	-	-	-	8,368
'97	270	6,134	211	-	-	-	-	6,615
'98	141	507	1,522	1	-	-	-	2,171
'99	98	-	1,962	4	-	-	-	2,063
계	1,334	24,329	7,029	7	472	2,164	10	35,344

(농림부 무역진흥과)

▣ 오리 바이러스성 간염은 오리의 질환 중에서 가장 전파력이 강하여, 한번 감염되면 폭발적으로 발생하여 높은 폐사율을 일으키기 때문에 경제적으로 심각한 피해를 유발한다. 1주 이내의 어린 오리에 감염될 경우 95% 정도가 죽게 되는 무서운 오리의 전염병이다. 따라서 본 질환에 대한 자세한 연구와 새로운 백신 개발이 절실한 실정이다.

▣ 특히, 오리 바이러스성 간염의 예방대책을 수립하는데 있어서는 질병에 대한 정확한 역학조사 및 병인론이 규명되어야 백신의 사용에 대한 정확한 지식을 확보할 수 있다. 더구나, 기존의 백신을 투여함에도 불구하고 질병이 발생하는 경우가 있어 결과적으로 오리 사육농가에 대한 경제적 피해를 효과적으로 차단시키지 못하고 있는 실정이다.

▣ 국내에서는 지금까지 오리 바이러스성 간염에 대해 지금까지 단발적·소규모로 연구가 수행되어 왔다. 따라서 대규모 농장을 대상으로 다양한 역학적 요

인을 분석하여 과학적이고 정밀한 질병 발생 정보를 획득할 수 있는 연구가 절실하다.

▣ 이러한 역학조사를 통해 수집한 데이터와 재료를 바탕으로 원인체의 분리·동정을 통한 백신의 개발함으로서 예방대책과 치료대책의 확립이 가능할 것이다.

3. 사회·문화적 측면

▣ 예로부터 오리고기는 중풍, 고혈압을 예방하고 혈액순환을 좋게 하며 몸을 보양하고 빈혈을 없애주는 효능이 있다는 기록이 있다 (동의보감).

▣ 영양적인 측면에서 오리고기는 닭고기에 비해서 떨어지지 않으며 중성지방을 지녀 일반 육류와는 달리 현대인의 대사성 질환의 유발요인과는 거리가 먼 것으로 간주되고 있다.

▣ 국내에서 오리 고기의 소비가 21세기에 들어서면서 급증하여, 이에 대한 산업적 규모화와 더불어 이에 대한 질병피해가 속출하여 이의 대책마련이 중요한 축산현장의 사안으로 대두되었다.

▣ 우리 국민들의 급격한 보건인식 향상으로 위생적이고 안전한 식품에 대한 요구가 증가되고 있다.

▣ 최근 구제역 파동으로 사람에게는 피해가 거의 전무함에도 불구하고 소고기 소비와 가격이 폭락하여 축산업계에 막대한 경제적 손실이 발생한 경험이 있다.

▣ 또한, 중국산 오리고기에서 강독형 가금 인플루엔자 바이러스가 검출되어 수입중지 보도가 나온 이후 오리고기 소비가 적게는 30% 많게는 50%까지 격감한 것으로 나타나 대책마련이 시급한 것으로 나타났다.

▣ 하지만 이러한 강독형 가금 인플루엔자 바이러스가 사람에게는 병원성이 낮음에도 불구하고 소비가 격감하였다.

▣ 즉, 비전문가인 국민들의 눈에는 오리 바이러스성 간염 의 연중 대량 발생이 구제역이나 인플루엔자과 같은 부정적 시각으로 연상시켜 오리의 소비를 감소시킬 수 있고 이로 인해 관련 산업의 성장둔화를 예견할 수 있다.

▣ 이렇게 우리나라 국민의 급격한 보건인식 향상에 발맞추어, 안정성이 확보된 위생적인 오리고기를 제공하기 위해서는 오리 바이러스성 간염에 대해 대규모 농장을 대상으로 계절별, 성별, 연령별, 지역별로 과학적이고 정밀한 발생역학 연구가 수행되어야 할 것이다. 또한 원인체의 분리·동정을 통해 야외에서 효과적인 백신을 개발하여 이 질병을 근원적으로 차단할 수 있어야할 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술개발 현황

▣ 오리 바이러스성 간염에 대한 국내 최초 연구는 1985년 국내에서 발생한 오리 바이러스성 간염에 대한 병리학적인 연구였다. 자연 발생한 오리 바이러스성 간염에 대한 병리학적 연구와 간단한 인공접종에 의한 재현 실험이 전부였으나 국내에서 최초로 보고한 것이 인정되었다.

▣ 국내 오리 바이러스성 간염에 대한 백신 개발은 본 연구팀의 연구원들에 의해서 2000년에 수행되었다. 국내에서 처음으로 계태아를 이용하여 오리 간염 바이러스 중에서 type I으로 생각되는 바이러스 주를 분리하였다. 또한 계태아에 연속계대 배양으로 약독화 생균 백신이 개발 되었다.

▣ 하지만 국내에서 개발된 약독화 백신을 사용하였음에도 불구하고 이 질환이 지속적으로 발생되어 오리 축산농가에서 백신의 효능성에 대해서 강력한 의문이 제기되고 있다. 특히 백신 제조상의 문제점이나 오리 바이러스성 간염의 변이주 발생 또는 새로운 type의 오리 간염 바이러스의 출현을 의심하게 되었다.

▣ 즉, 오리에서 가장 문제시 되고 있는 오리 바이러스성 간염의 특별한 근절 대책이 없는 한 이 질병은 발생 농장의 근접 농장으로 전파되어 피해가 증폭화 되고 결과적으로 농가에 막대한 경제적 손실을 유발할 수 있다.

▣ 따라서 역학조사를 통해서 국내 오리 농장에서의 정확한 질병 발생양상을 파

악 하고, 백신에 의해서도 재발하는 오리 간염 바이러스를 정확히 규명할 수 있을 것이다.

▣ 더불어 오리 간염 바이러스의 types I 변이주 및 II와 III의 발생여부를 조사할 뿐 아니라 현 발생하는 오리 바이러스성 간염 을 분리·동정함으로써 효과 적인 백신을 개발할 수 있을 것이다. 이렇게 효과적인 생균 백신을 개발함으로써 질병 발생 전 근본적인 예방 대책 수립 및 질병 확산을 방지할 수 있을 것이다.

제 2 절 국외 기술개발 현황

▣ 오리 바이러스성 간염에 대한 연구 및 그 결과는 국내는 물론 전 세계적으로 아주 미미하다. 미국을 비롯한 많은 선진국에서도 이 질병에 대한 연구는 1980년대 전 후였다.

▣ 전 세계적으로 발생하고 있는 오리 바이러스성 간염은 세 가지 유형으로 구분되고 있다. Type I은 picornavirus, Type II는 asterovirus, Type III는 type I과 항원성이 전혀 다른 picornavirus에 의해 발병된다고 보고 되었다. 각 type에 대한 백신은 서로 교차방어를 할 수 없다 (Haider et al., 1979).

▣ 오리 바이러스성 간염 Type 1을 제외한 다른 Type의 바이러스는 실제로 분리 시도만 있을 뿐 백신 개발의 시도는 되어 있지 않은 실정이다.

▣ 오리 바이러스성 간염 Type 1 또한 고전적으로 계태아를 이용한 바이러스의 약독화로 인한 백신 개발은 진행되었다. 하지만 Woolcock PR가 Type I 오

리 바이러스성 간염을 이용하여 다양한 세포주에서 바이러스 분리를 시도하였고, 이중 duck embryo liver cell에서 오리 바이러스성 간염 이 가장 잘 자라며 이를 이용하여 종오리 백신에 사용하여 좋은 결과를 얻었다.

▣ 또한, 아직 논문이 개재되지 않았지만 같은 피코나 바이러스 그룹에 속한 porcine enterovirus type 8을 이용하여 duck picronavirus를 유전자 분석하여 NCBI에 보고한 바 있다. 이것은 오리 바이러스성 간염의 유전자 분석에 대한 가능성을 제시해 줄 뿐 아니라 향후 이를 이용한 오리 바이러스성 간염의 진단법 개발 및 다양한 연구 분야의 가능성을 제시해 주었다고 할 수 있다. (Tseng CH et al., 2004)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발수행 내용

1. 제1세부과제

가. 오리 바이러스성 간염의 분리 및 동정

▣ 바이러스의 분리

- 오리 바이러스성 간염이 발생한 6개 농장의 오리 간을 바이러스 분리의 재료로 이용한다. 각각의 농장은 사육 중인 2주령 미만의 새끼 오리들이 50%이상의 높은 폐사율을 보였으며, 부검 시 간의 충·출혈과 조직학적으로 미만성의 심한 간세포 괴사가 보였다.
- 냉동보관 중인 간장을 항생제가 포함된 PBS로 20% 정도 되도록 간 유제를 만든 후 1000x g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 0.2 ㎛ syringe filter로 여과하여 monolayer가 형성된 계태아 섬유아세포 (chicken embryo fibroblast; CEF)와 duck embryo liver (DEL) cell에 각각 0.2 ml 씩 접종한다.
- 이러한 세포에서 연속 3대 계대 배양하여 세포변성효과 (cytopathic effect; CPE)가 나오는 것은 동결과 해동을 3회 반복한 후, monolayer가 형성된 세포에 바이러스 배양 상층액을 계대 희석한 것을 분주하고, 여기에 1.5% agarose로 overlaying 한 후, CPE가 형성되면 한 개의 plaque를 선택하여 연속적으로 계대 배양한다.

● CPE가 관찰되지 않으면, CPE가 관찰될 때까지 10대 까지 연속 계대 배양한다.

▣ 바이러스의 동정

● 바이러스의 핵산 유형을 확인하기 위해 분리한 바이러스에 5-iodo-2-deoxyuridine 50 μg/ml을 한 시간 처리한 후 DEL cell에 접종하였다.

● 산에 대한 저항성 검사는 분리한 바이러스에 glycine-HCL buffer (pH 3.0)를 혼합 후 4℃에서 한 시간 배양 후 DEL cell에 접종하였다.

● 바이러스 외막의 유무 확인을 위해 분리한 바이러스에 5% chloroform을 10분간 처리 한다. 이것을 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액만 취하여 DEL cell에 접종하였다.

● Trypsin resistant를 검사하기 위해서 0.5% trypsin를 분리한 바이러스에 처리한 후 37℃에서 한 시간 배양한 후 1 ml의 chicken serum을 첨가하여 trypsin 활성을 제거한 후 DEL 세포에 접종하였다.

● 온도에 따른 바이러스 증식 유무를 확인하기 위해 바이러스를 50℃에 30분, 56℃에 1시간, 56℃에 overnight, 62℃에 30분 배양 후 DEL cell에 접종하였다.

● 이렇게 DEL cell에 접종한 바이러스들은 18-24시간 배양하였다. 배양이 끝나면 상층액을 버리고 아세톤으로 고정한 후, 오리 바이러스성 간염의 특이 항체를 이용하여 면역 형광 항체법을 수행하였다.

● 각 단계의 바이러스와 혼합액 일부를 바이러스 역가 측정을 위해 일부 사용하였다.

▣ 면역형광항체 검사

● DEL cell을 8 well 슬라이드에 monolayer가 되도록 3일간 배양하였다. 항생제만 포함된 PBS 또는 M199배지로 2회 세척 한 후 37℃ 배양기에 3시간 동안 정치하여, 각 well 내의 혈청을 완전히 제거하였다. 각각의 plate를 세척한 후, 각 well에 바이러스를 접종한 후, 18시간 동안 배양하였다.

● 배양이 끝나면, 상층액을 버리고 아세톤으로 고정한 후, 미국 코넬 대학의 오리질병 연구센터에서 구입한 닭에서 생산한 type 1 오리 바이러스성 간염 바이러스에 특이적인 polyclonal antibodies로 1차 염색을 수행하였고, anti-chicken IgG, IgM, IgA 형광항체를 이용하여2차 염색을 수행한 후 형광현미경으로 검경하였다.

▣ 전자현미경적 검사

● 분리된 오리 바이러스성 간염 바이러스 상층액을 50,000 rpm에서 2시간 초고속 원심분리한 후, pellet을 멸균한 DDW에 희석하여 다시 한번 초고속 원심 분리한다. Pellet을 멸균한 DDW 약 2 ml로 희석한다.

● 이후 10-50% sucrose density를 걸어 25,000 rpm에서 3시간 초고속 원심분리한 후 10% sucrose density에서 바이러스를 주사기로 뽑아낸다. 이 바이러스 정제 액을 50,000 rpm에서 2시간 초고속 원심분리한 후 pellet을

멸균된 DDW 1 ml로 희석한다. 이것을 phosphotungstic acid로 negative 염색하여 전자현미경으로 검경한다.

나. 오리 바이러스성 간염의 순응주 개발

▣ Duck embryo liver cell에서의 연속계대배양 : 상술한 바와 같이 DEL cell에서 CPE를 유발하고, 오리 바이러스성 간염 바이러스에 대한 면역형광항체법에 양성인 야외 분리주 각각을 10배 계단희석한 후, 각각의 계단 희석액을 monolayer가 형성된 6 well plate의 각 well에 접종하였다. 바이러스를 1시간 동안 흡착 시킨 후 37℃에서 2-3일간 배양한다. CPE가 형성된 최소 희석 well에서 상층액을 채취한 후, 이와 같은 방법을 반복적으로 계대 배양한다.

다. 상용화된 오리 바이러스성 간염 백신의 효능 검사 및 세포 주에서의 분리

▣ 상용화된 오리 바이러스성 간염 백신의 방어능 시험 : 상용화 되고 있는 백신을 구입한 후 1일령 Pekin duck에 추천 방법에 따라 0.2 ml씩 근육접종한다. 접종 7일 후 DEL cell에서 분리된 병원성 야외주 (DVH04-102, 1x $10^{3.6}$ $TCID_{50}$) 및 표준주 (DRL-62, 1x 10^{4} $TCID_{50}$)를 공격접종한 후, 2주간 임상증상 및 폐사율 등을 관찰하였다. 본 실험과정은 모두 무균상자에서 이루어졌으며, 음수와 사료는 무제한 공급하였다.

▣ 상용화된 오리 바이러스성 간염 백신에서 세포주를 이용한 바이러스 분리 및 연속계대배양 : 상용화된 백신을 10배 계단희석한 후, 각각의 계단 희석액을

monolayer가 형성된 6 well plate의 각 well에 접종하였다. 바이러스를 1시간 동안 흡착 시킨 후 37℃에서 2-3일간 배양한다. CPE가 형성된 최소 희석 well에서 상층액을 채취한 후, 이와 같은 방법을 반복적으로 계대 배양한다.

라. 야외 분리주와 시판백신의 세포 계대주에서 백신주 선발

▣ 연속 계대 배양된 바이러스의 성상 : DEL cell에서 연속 계대된 바이러스의 물리화학적 성상을 알아보기 위해, 상술한 바와 같이 5-iodo-2-deoxyuridine, chloroform, glycine-HCL buffer (pH 3.0)와 trypsin 를 처리한다.

▣ 연속 계대 배양된 바이러스의 역가

- 야외 분리주를 연속 계대 배양된 바이러스를 1대부터 시작하여 60대까지 10대 간격으로 DEL cell이 monolayer된 에 96 well plate에 10진 희석하여 접종한다. 37℃에서 7-10일간 배양하여 매일 CPE를 관찰하고, Reed & Muench의 방법에 따라 $TCID_{50}$를 계산한다.
- 또한, 시판 백신주의 DEL cell에서의 연속 계대 배양된 바이러스를 1대부터 40대까지 10대 간격으로 상술한 바와 같이 실험하여 바이러스 역가를 측정한다.

▣ 연속 계대 배양된 바이러스 주들의 병원성 비교

- DEL cell에서 연속 계대 배양된 6개의 국내 분리주 중 1주 (DVH03-21)를 선발한다. 선발한 국내 분리주를 1대부터 60대 까지 10대 간격으로 1일령 Pekin duck에 ($1x\ 10^4\ TCID_{50}$)근육 주사한 후 무균상자에서 2주간 사육하

며 폐사수를 조사한다.

- 시판 백신의 세포 계대주도 1대부터 40대 까지 10대 간격으로 1일령 Pekin duck에 (1x 10^3 $TCID_{50}$)근육 주사한 후 무균상자에서 2주간 사육하며 폐사수를 조사한다.

바. 오리 바이러스성 간염의 생백신 개발

▣ 백신주의 선발 : 상술한 방법에 의해서 선발한 것을 오리 바이러스성 간염 바이러스 생백신주로 사용 한다 .

▣ 표준주 바이러스 : 백신주의 방어능 시험이나 최소면역량 시험에 사용한 공격 접종 바이러스는 ATCC로부터 구입한 DRL-62 (duck hepatitis Type I, VR1313)를 사용한다.

▣ 계대별 방어능 시험

- 선발된 세포 순응주 (DVH03-21)를 40대에서 60대 까지 10대 간격으로 1일령 Pekin duck에 마리당 1x $10^{3.5}$ $TCID_{50}$씩 구강으로 접종한다.
- 시판 백신는 계대하지 않은 0대부터 시작하여 세포에서 계대한 40계대까지 10대 간격으로 1일령 Pekin duck에 마리당 1x $10^{3.2}$ $TCID_{50}$씩 구강으로 접종한다.
- 접종 일주일 후에 무처지 대조군과 함께 표준주 DRL-62를 1x 10^4 $TCID_{50}$씩 구강으로 접종한 후 2주간 사육하면서 폐사수를 조사한다.

▣ 접종 경로별 방어능 시험

- 1일령 Pekin duck에 세포주에서 40에서 60대 계대된 순응주 바이러스를 마리당 1x $10^{3.5}$ $TCID_{50}$씩 음수접종 혹은 복강접종 한다.
- 시판 백신 계대주는 계대하지 않은 20대부터 40계대까지 10대간격으로 1일령 Pekin duck에 마리당 1x $10^{3.2}$ $TCID_{50}$씩 음수접종 혹은 복강접종 한다.
- 백신 접종 일주일 후에 표준주인 DRL-62 바이러스로 무처치 대조군과 함께 10^4 $TCID_{50}$씩 경구로 공격 접종한 후 2주간 동안 폐사율을 조사한다.

▣ 최소 면역량 측정 시험

- 국내에서 분리한 바이러스 중 우수한 효과를 같은 한 바이러스주를 선정하여 시험 백신주로 선정한다. 이 시험 백신주는 DEL cell에서 60대 계대된 것으로 1일령 Pekin duck에 마리당 10^2에서 10^5 $TCID_{50}$로 경구 접종한다.
- 시판 백신을 DEL cell에서 40대 계대한 바이러스를 1일령 Pekin duck에 마리당 10^2에서 10^4 $TCID_{50}$로 경구 접종한다.
- 이 후 7일령에 무처치 대조군과 함께 각 군에 DRL-62 바이러스로 마리당 10^4 $TCID_{50}$ 씩 구강으로 공격접종 한다. 공격접종 후 2주간의 방어율을 조사한다.

▣ 안전성 시험 : 선발된 60계대된 시험 백신주와 상용화된 백신주를 40계대한 바이러스를 1일령 Pekin duck에 각각 1수분 ($10^{3.0}$ $TCID_{50}$), 10수분 ($10^{4.0}$

$TCID_{50}$), 100수분 ($10^{5.0}$ $TCID_{50}$)으로 음수 접종한 실험군과, 병원성 국내분리주를 접종한 실험군 및 무 접종 대조군을 대상으로 2주간의 폐사수를 조사한다.

2. 제 2세부과제

가. 질병발생 오리 농장의 재료 수집

- 본 대학의 병성감정기관을 비롯하여, 수의과학 검역원, 가축위생시험소 및 녹십자수의약품 등의 기타 기관들과 유기적인 연락망을 통해 전국적인 규모로 오리 바이러스성 간염 의 동태를 파악하고 재료를 수집 한다.
- 공시동물: 후궁반장 등의 신경증상을 보이며 높은 폐사율을 보이는 농가에서 의뢰되거나, 백신을 접종하였음에도 전형적이 오리 바이러스성 간염증상을 보이는 농가를 직접 방문하여 재료를 수집한다.

나. 오리 바이러스성 간염의 역학조사

- 축사 내에서의 전파속도 및 인근농장으로 전파유무 검사 : 방문한 농가에서의 질병발생속도와 폐사율, 인근 농장의 전파 양상을 조사한다.
- 전파 매개체의 조사 : 방문한 농가에 출입되는 차량, 사료, 사람 등을 조사하여 전파매개체를 조사한다.
- 다른 병원체들의 혼합감염 조사 : 오리에서 문제를 일으키는 세균성 질병인 대장균증과 라이메리아 아니티페스티퍼 감염증 등을 상법에 준하여 세

균분리 및 동정을 실시한다. 방문한 농가 또는 의뢰된 가검물에서 분변을 채취하여 부유법과 같은 기생충의 충란 검사를 실시한다. 특히 폐사체를 부검하였을 경우에는 직접 도말법을 이용하여 기생충 충란 검사를 실시한다.

다. 오리 바이러스성 간염 증례의 병리학적 연구

- 병리해부검사: 오리 바이러스성 간염이 의심되어 의뢰된 검사체 또는 유사한 임상증상을 보였던 농가를 방문하여 폐사 혹은 폐사 직전의 오리를 대상으로 자세한 부검을 실시한다. 부검 시 특이한 육안소견을 기록하고, 각각의 장기 및 조직 특히 오리의 간을 바이러스 분리용, 병리조직학적 검사에 필요한 것들을 채취하여 각각의 목적에 맞도록 보관한다. 병리조직검사용 장기 및 조직은 10% 중성 포르말린에 보관하여 병리조직학적 검사용으로 사용한다.
- 병리조직검사: 10% 중성 포르말린에 고정된 조직을 상법에 준하여 탈수 및 파라핀 포매 후에, 세절한 후, H&E 염색 기법을 이용하여 염색한다. 염색 후 광학현미경으로 자세한 조직학적 변화를 검사한다.
- 명역형광항체 검사 : 부검 시 일부 조직은 냉동조직으로 보관하여 5 ㎛로 세절하여 절편을 제작한 후 80% 아세톤 고정을 한다. 이 고정된 절편을 오리 바이러스성 간염 바이러스의 특이적 항체를 이용하여 염색한 후 항원 유무를 확인한다.

- 전자현미경적 검사 : 부검 시 병변이 심하게 발생한 부위를 얼음위에서 세절한 후 3% glutaraldehyde 용액과 osumium tetraoxyde 용액으로 2중 고정하고, 상법에 준하여 각급 알코올과 에폰수지를 통해서 탈수와 봉입을 수행한다. 초박절편을 제작한 후, Uranum actate와 Lead citrate로 이중 염색을 하고 전자현미경하에서 검경한다.

제 2 절 연구개발 수행결과

1. 오리 바이러스성 간염의 역학조사

가. 오리 질병의 전국적인 발생현황

▣ 수의과학 검역원과 본 대학의 병성 감정기관, 축산기술 연구소 및 보건 환경 연구원을 통해 전국적로 의뢰된 가검물은 2004년 1월부터 2006년 4월 까지 총 244건 이었다 (Tables 1 and 2).

▣ 의뢰된 오리의 품종은 모두 육용 오리였다. 이러한 오리들은 주로 2주령 미만에서 높은 폐사율을 보였으며, 2주령 이상에서는 폐사율이 그리 높지 않았다. 농장에 따라서 혹은 백신투여 여부에 따라서 폐사율은 15%에서 90%에 이르기까지 다양하였다.

▣ 모든 가검물은 부검을 실시하여 육안 검사 후 병리 조직검사, 세균검사, 기생충 검사를 실시하였다.

▣ 오리 바이러스성 간염은 2004년에 29건 (23%), 2005과 2006년에 걸쳐 25건

(22%)으로 바이러스성, 세균성, 진균성, 기타 원인체들이 비해 월등히 높은 감염률을 나타내었다 (Figs. 1 and 2).

▣ 월별 발생현황에서도 2004년에서 2006년에 걸쳐, 매년 각 달에 상관없이 모든 달에 오리 바이러스성 간염 이 발생하였고, 특히 무더운 여름에서도 높은 발생율을 나타내었다.

▣ 이 표에서는 나타내지 않았지만, 오리 바이러스성 간염이 발생한 농장에서 지속적, 반복적으로 다시 발생한 경우도 있었다.

▣ 이것은 오리 바이러스성 간염이 한 번 발생한 농가는 재발의 위험이 높고, 상당히 제거하기 어렵다는 것을 시사한다.

▣ 이 밖에, 오리 바이러스성 간염 외에도 대장균 감염증, 파스튜렐라, 라이메리아 감염증, 살모넬라 감염증등 다양한 세균 감염증도 어린 오리에 감염되어 있었다.

▣ 농장의 관리상의 문제로 인한 오리 질병의 발생과 진균성 질병인 아스퍼질러스 감염증도 발생하였다.

Table 1. Prevalence of duck diseases during 2004 in Korea

질병명	2004												Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Duck viral hepatitis	4	4	3	6	1	2	4	3	1		1		29
Colibacillosis	5	2		2				1	2	1	2		15
Pasteurellosis	4	2			1			2	1			4	14
Riemerella infection	2	1		1	1		1	1	2			1	10
Salmonellosis	1		1	2		1	1				2		8
Mismanagement	4	3							1				8
Aspergillosis	1			4									5
AI	1	1	1									2	5
Botulism							1	2					3
Yolk sac infection			2		1								3
Others	8	3	2	1	2			2	1	1	1	7	28
Total	30	16	9	16	6	3	7	11	8	2	6	14	128

Table 2. Prevalence of duck diseases during 2005-2006 in Korea

질병명	2005												2006				Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	
Duck viral hepatitis						2	1	6	4	4		3	2		1	2	25
Salmonellosis			1		2	1	2		3			1	1	1	1	3	16
Colibacillosis		1		1			1	1	1	2	1		2	1	1		12
Riemerella infection			1			2				2	1		1	2		2	11
Pasteurellosis				1	1	1		4		1						1	9
Mismanagement				1					1		2				1		5
Peritonitis				3													3
Yolk sac infection											1	1		1			3
Aspergillosis													1			2	3
Coccidiosis							2										2
Others	1		1	1		3	1	2	1	2	3	2	1	2	3	4	27
Total	1	1	3	7	3	9	7	13	10	11	8	7	8	7	7	14	116

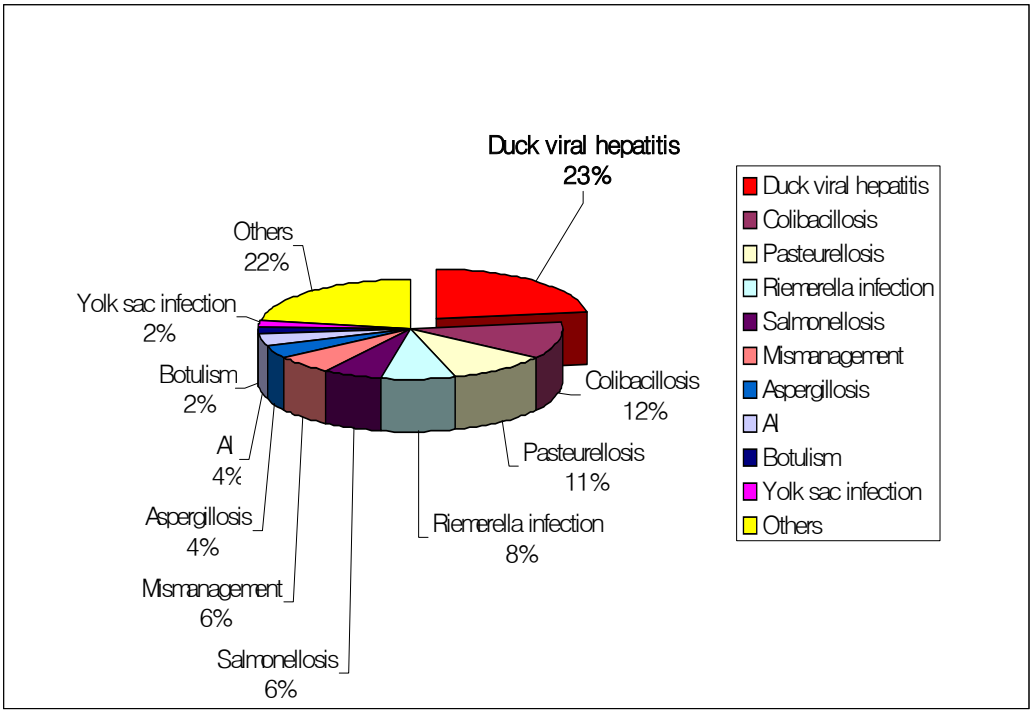

Fig. 1. Incidence of duck diseases in 2004.

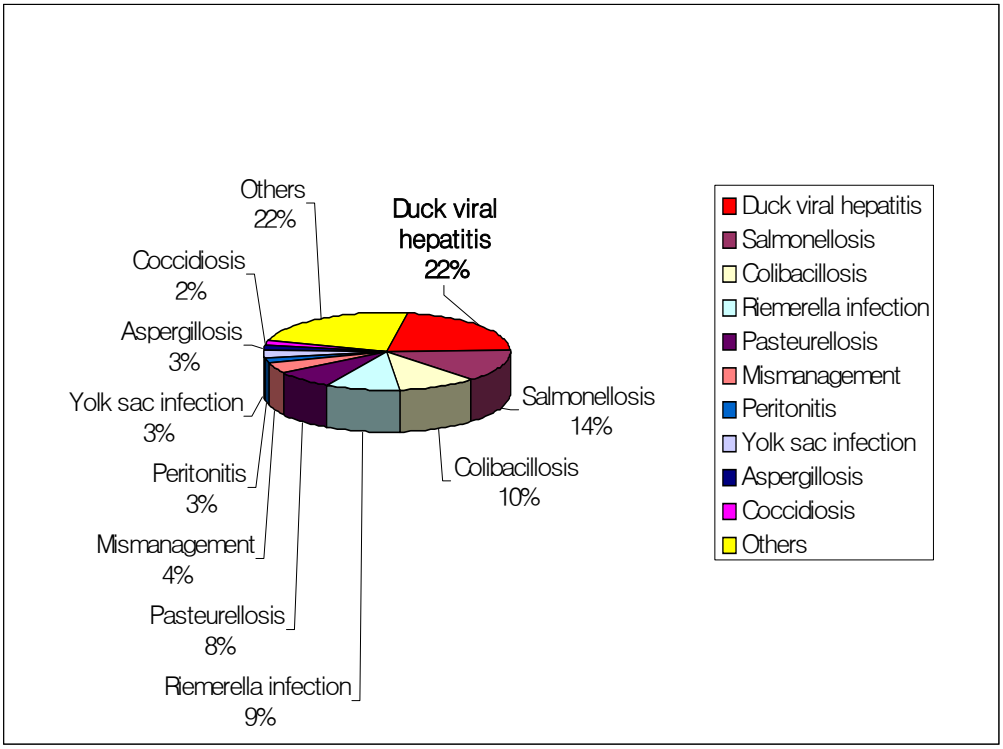

Fig. 2. Incidence of duck disease in 2005-2006.

▣ 축사 내에서의 전파속도 및 인근농장으로 전파유무 검사: 오리 바이러스성 간염이 발생한 농장의 축사 내에서의 전파속도는 폭발적이었으며, 2-3일 이내에 거의 대부분의 오리들이 감염되는 경향이 관찰되었으나, 다행히 인근 농장으로의 전파는 없었다.

▣ 전파 매개체 (차량, 사료, 사람)의 조사: 전파 매개체에 대한 조사결과, 확실한 증거는 관찰되지 않았으나, 차량, 사료, 사람 등에 의해서 전파된 것으로 추정되었다.

▣ 다른 병원체들의 혼합감염 조사:

- 세균과의 혼합감염 조사: 조사한 농장에서는 오리 바이러스성 간염이 자주 관찰되었으며, 그 외에도 대장균 혹은 라이멜리아 아나티페스티퍼 감염증들이 단독 혹은 오리 바이러스성 간염과 혼합 감염 양상으로 관찰되었다. 또한 오리 바이러스성 간염 백신을 한 농장에서 대량의 폐사가 발생한 경우, 대부분 대장균증 혹은 라이멜리아 아나티페스티퍼 감염증들이 발생하였거나, 아니면 오리 바이러스성 간염과 위의 질병들이 혼합 감염되어 높은 폐사율이 발생하였다.
- 기생충과의 혼합감염 등: 기생충 등의 검사에서 어떠한 원인체도 관찰되지 않았다.

▣ 이런 많은 오리 질병을 일으키는 원인체들 중에도 Tables 1-2.와 Figs. 1-2에서 보는 것처럼 단연 높게 발병하는 것은 오리 바이러스성 간염이다. 유일한 바이러스성 원인체로 단독으로 발생하여 높은 폐사율을 나타내며 농가에 심각한 피해를 주고 있는 실정임을 역학 조사를 통해 확인 하였다.

▣ 그럼에도 불구하고 많은 농가들은 경제상의 이유로 백신을 하고 있지 않은 실정이었고, 설령 백신을 한다고 해도 100% 예방할 수 없거나, 재발하는 경향이 있어서 백신에 대한 불신이 컸다.

▣ 이러한 역학 조사를 통해 볼 때 값싸고, 투여방법이 용이하며 높은 방어 효과를 갖는 오리 바이러스성 간염 의 백신 개발이 시급한 실정이었다.

2. 야외증례에서의 오리 바이러스성 간염의 병리학적 검사

가. 임상 증상 및 육안소견

▣ 본 실험실에 의뢰된 오리 바이러스성 간염에 감염된 새끼 오리의 특징적인 외부 소견은 후궁반장이었다 (Fig. 3).

▣ 이러한 의뢰된 가검물을 육안적으로 검사한 결과, 특징적으로 종대 된 간에서 출혈 및 괴사가 관찰되었다 (Fig. 3).

▣ 일반적으로 신장은 창백하였고, 충혈 되어 있었다. 어떤 증례에서는 폐의 심한 충혈 및 부종이 관찰되었다 (Fig. 4).

Fig. 3. Left : Typical opisthotonus of ducklings infected with duck viral hepatitis virus. Right : Multiple ecchymotic hemorrhages in the enlarged liver of duckling infected with duck viral hepatitis virus.

Fig. 4. Left : Diffusely paleness of kidney of a duckling infected with duck viral hepatitis virus. Right : Marked congestion and edema of lung from a duckling infected with duck viral hepatitis virus.

나. 병리조직학적 소견

▣ 병리조직학적으로 야외 증례의 오리 바이러스성 간염의 특징적인 소견은 간과 신장에서 관찰되었다.

▣ 급성의 증례에서는 미만성의 심한 간세포 변성 및 괴사가 특징이었다. 괴사된 세포는 세포질 막이 파괴되었으며, 다수의 공포가 관찰되었다 (Fig. 5). 핵은 종창되었고, 어떠한 것들은 핵농축, 핵융합, 핵소실의 소견을 수반하고 있었다. 아급성의 증례에서는 미만성의 심한 간세포 변성 및 괴사와 더불어 담세관의 심한 증식이 특징적으로 관찰되었다.

▣ 또한 신장의 세뇨관 상피는 다발성으로 심하게 변성 내지 괴사되어 있었으며,

충혈 되어 있었다 (Fig. 5).

▣ 어떤 증례에서는 폐에서 화농성 기관지염 및 미만성의 충혈과 부종이 관찰되었다. 이러한 증례들은 육아종성 병변이 형성되어 있었고, 병변 내에서는 아스퍼질러스 균사가 관찰되어 오리 바이러스성 간염과 아스퍼질러스증의 혼합감염으로 판정되었다.

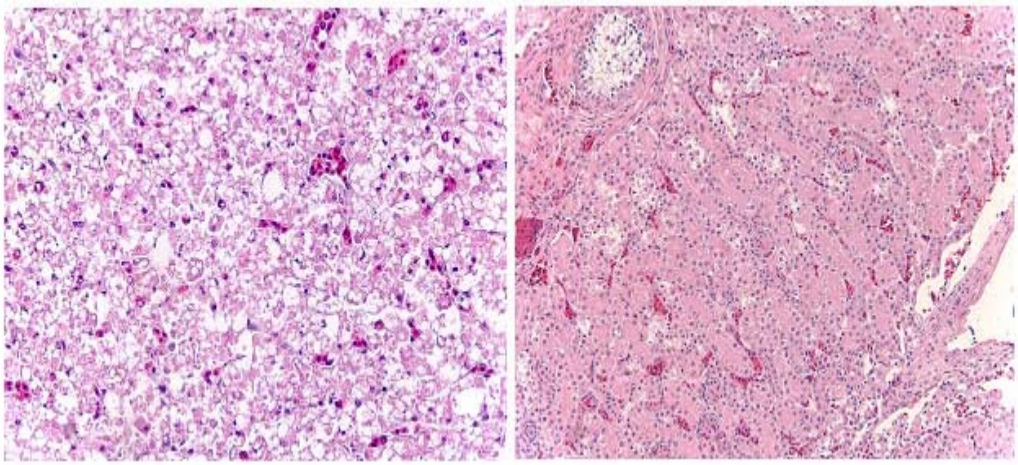

Fig. 5. Left : Diffuse necrosis of hepatocytes characterizing by membrane rupture, cytoplasmic vacuolization, and chromatin condensation is observed in ducklings infected with duck viral hepatitis virus (DVHV). H&E stain. Right : Multiple degeneration and necrosis of tubular epithelial cells in the kidney of ducklings infected with DVHV. H&E stain.

다. 면역형광항체법에 의한 오리 바이러스성 간염 바이러스 항원의 분포조사

▣ 야외 증례에서 간과 신장의 조직을 이용하여 냉동절편을 제작한 후에 아세톤으로 고정하고 오리 바이러스성 간염 바이러스에 특이적인 항체를 이용하여 면역형광항체법을 수행한 후 confocal microscope로 관찰하였다..

▣ 그 결과 야외 증례의 간과 신장에서 미만성 내지 다발성으로 특이적인 양성반응이 세포질에서 관찰되었다 (Fig. 6).

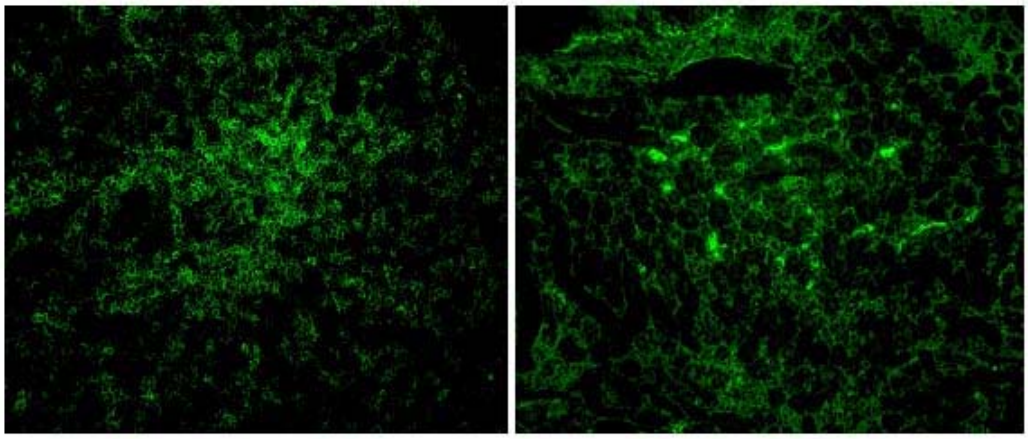

Fig. 6. Confocal microscope of liver (left) and kidney (right) of ducklings from farms with duck viral hepatitis infection (DVH). Immunofluorescence staining is performed with fluorescein-conjugated rabbit anti-chicken IgG, IgM, IgA after the treatment of chicken antisera to the DVH virus. Immunofluorescece positive reaction was restricted to the cytoplasm.

라. 전자현미경적 소견

▣ 오리 바이러스성 간염에 감염된 야외 오리에서 오리 바이러스성 간염 바이러스의 세포 내 국재를 확인하기 위하여 전자현미경 연구를 수행하였다.

▣ 전자현미경적으로 간세포는 심하게 파손되어 있었으며, 내부의 미세소기관도 종창 내지 파괴되어 있었다. 핵은 종창되어 있었고, 염색질은 분해되는 소견을 보였다. 이러한 괴사된 간세포 세포질 내에서 30 nm 크기의 picornavirus 입자들이 덩어리 혹은 산재되어 있었으며, smooth endoplasmic reticulum 내에서도 picronavirus 입자들을 확인할 수 있었다 (Fig. 7).

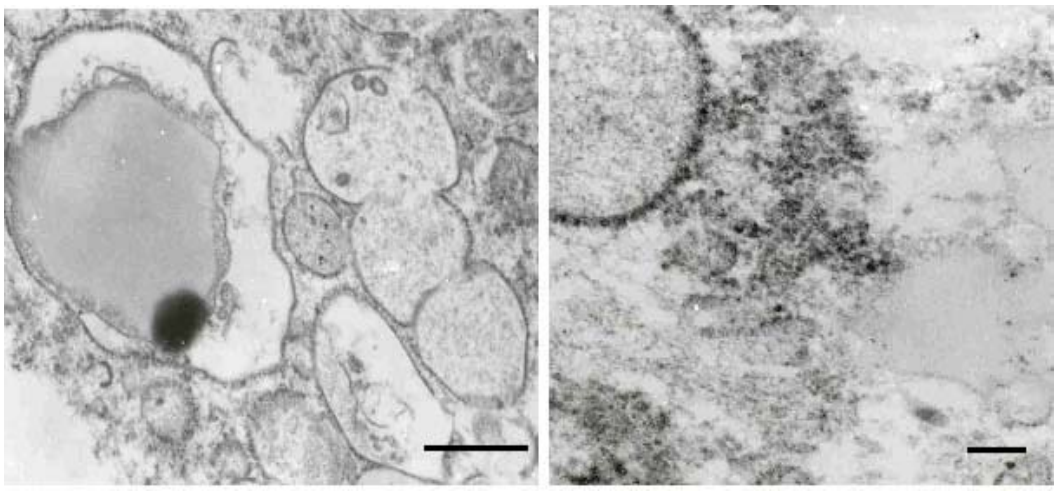

Fig. 7. left : Organelles including smooth and rough endoplasmic reticulums were markedly dilated. Uranyl acetate and lead citrate. Bar = 1 um. right : Duck viral hepatitis picornavirus particles were aggregated in the cytoplasm. Uranyl acetate and lead citrate. Bar = 100 nm.

3. 오리 바이러스성 간염 바이러스의 분리 및 동정

가. 다양한 세포주을 이용한 바이러스 분리

▣ 상술한 20% 간 유제액을 monolayer가 형성된 각각의 세포배양액에 접종하고, 매일 CPE 발생유무를 검사하였다. 각각의 세포에서 CPE가 관찰되지 않아도 최소 10대 동안 blind passage를 실시하였다.

▣ 그 결과 CEF cell에서는 2대 계대 배양부터 CPE가 관찰되기 시작하였고, 3대 때 가장 저명하였다. CPE는 세포의 원형화와 탈락이 특징 이었다 (Fig. 8).

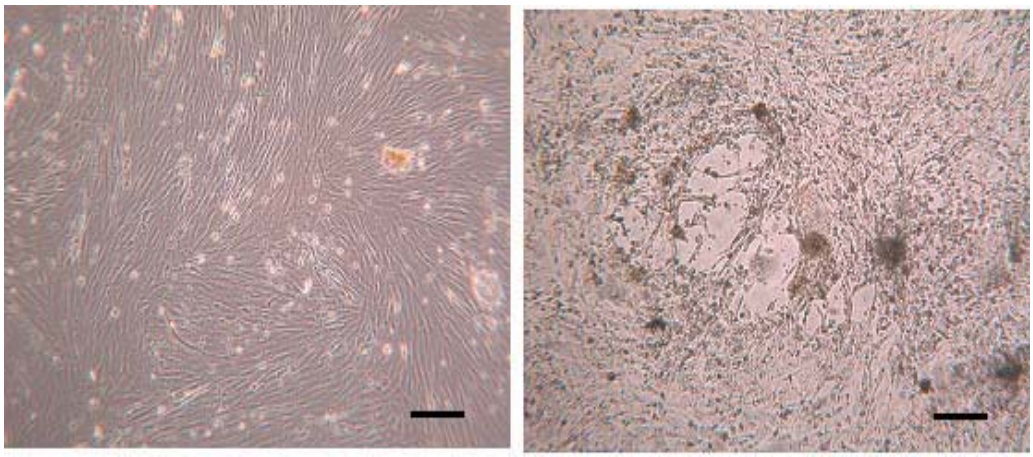

Fig. 8. Left : Uninoculated monlayer of chikcen embryo fibroblast (CEF)cells 4 days after seeding. Right : Cytopathic effect 3 days postinoculation induced by the duck viral hepatitis virus isolate on passage 2 in CEF cells. The CPE were characterized by small rounded cells or disattachment of cells. Bar = 50 um.

▣ 하지만 CEF cell에서의 바이러스 역가는 3계대에서는 $10^{2.1}$ $TCID_{50}$이였으나 계대가 증가할수록 감소하다가 7계대에서는 $10^{1.1}$ $TCID_{50}$로 급격히 낮아졌다. 이 후 8계대 이상에서는 전혀 역가를 나타내지 않았다(Table 3). CPE 또한 계대가 증가할수록 점점 감소하다가 역시 8계대이상에서는 관찰할 수 없었다. 즉, 오리 바이러스성 간염 바이러스는 CEF cell로 분리가 가능하기는 하지만 매우 비효율적이었다.

▣ 따라서 CEF cell은 야외에서 발생한 바이러스를 분리하고 순화시키고 증폭하는 데에는 적당한 세포주가 아님을 확인하였다.

Table 3. Titers of duck viral hepatitis virus in chicken embryo fibroblast cell culture versus duck embryo liver cell culture

Passage no	Titer : $TCID_{50}$ (log_{10}/0.1 ml)*	
	In CEF	In DEL
3	2.1	3.4
4	2.4	3.2
5	2.0	4.1
6	1.2	4.2
7	1.1	4.0
8	0	4.0
9	0	4.3

*CEF : chicken embryo fibroblast cells, DEL: duck embryo liver cells.

▣ 또한 오리 바이러스성 간염 이 발생한 농장에서 채취한 간을 유제하여 DEL cell에서 배양하였다.

▣ 그 결과 2대 계대배양부터 CPE가 형성되었으며, 계대 배양 횟수가 증가할수록 CPE의 개수는 증가하였고, 더욱 뚜렷하여졌다 (Fig. 9). CPE는 세포의 원형화와 탈락이 특징이었다.

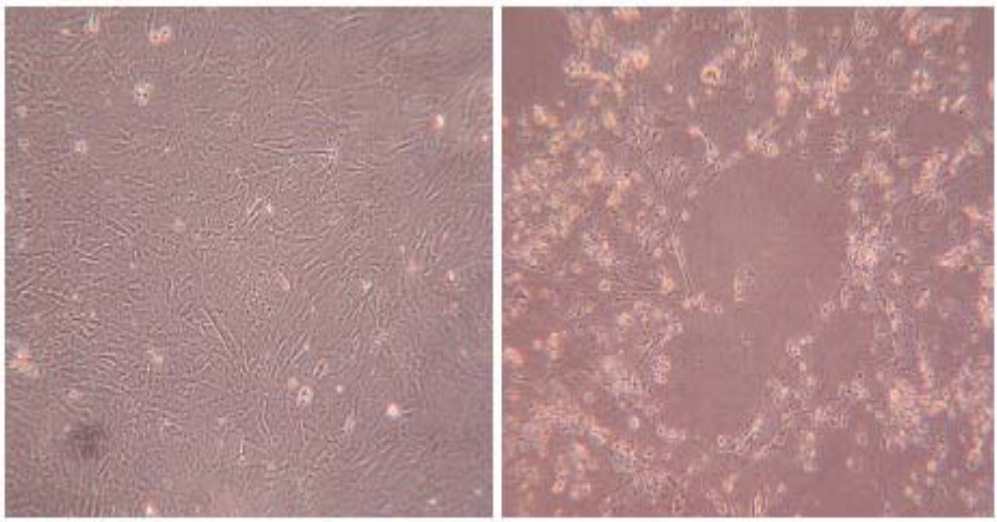

Fig. 9. Serial passage of duck viral hepatitis virus in duck embryo liver cells. Left : mock infected duck embryo liver cells. Right : 60th passaged duck viral hepatitis virus in duck embryo liver cells. Cytopathic effect characterized by cell rounding and detachment are observed in right panel.

▣ 이상의 결과 오리 바이러스성 간염 바이러스는 DEL cell에서 쉽게 분리된 것으로 보아, 백신주와 같이 계태아에서 순화된 바이러스뿐만 아니라 야외에서 발생한 오리 바이러스성 간염 바이러스의 분리에도 적당한 세포주로 생각되어 진다.

▣ 뿐만 아니라 오리 바이러스성 간염 바이러스를 원래 숙주의 변형이 없이 간세포에서 바이러스를 분리함으로써 숙주가 다른 계태아 순화된 바이러스에서 문제가 되는 병원성의 회복 등을 줄일 수 있을 것으로 예상된다.

▣ 이상의 결과 본 연구진은 DEL cell을 이용하여 오리 바이러스성 간염 이 발생한 농장에서 총 6주의 바이러스를 분리하였다.

▣ 분리한 바이러스는 Table 4에서 보는 바와 같이 높은 바이러스 역가를 나타내었다.

▣ DEL cell을 이용한 바이러스 분리는 계태아 계대에서 오는 번거로운 방법을 더 용이하게 활용할 수 있으며, 추후 백신 개발에 이용될 바이러스의 대량 생산에도 크게 기여할 것이다.

Table 4. Virus titer of Korean duck viral hepatitis virus isolates in duck embryo liver cell culture in 3rd passage

Isolates	Virus titer ($TCID_{50}$/0.1 ml)
03-21	$10^{4.3}$
04-61	$10^{3.5}$
04-88	$10^{4.0}$
04-102	$10^{3.6}$
04-109	$10^{3.4}$
04-144	$10^{3.2}$

나. 분리한 바이러스의 물리화학적 성상확인

▣ 분리한 바이러스주의 물리화학적 성상을 알아보기 위해,

5-iodo-2-deoxyuridine, chloroform, pH 3.0 및 trypsin 처리에 대한 바이러스 역가를 조사하였다 (Table 5).

▣ 분리한 바이러스의 핵산 유형을 알아보기 위해 바이러스에 5-iodo-2-deoxyuridine 50 ㎍/ml을 한 시간 처리한 후 DEL에 접종하여 18시간 배양 후 80%아세톤 고정하여 면역형광항체 검사를 하였다. 그 결과, 5-iodo-2-deoxyuridine는 분리한 바이러스의 CPE형성과 바이러스 증식에 전혀 영향을 주지 않아 분리한 바이러스가 RNA바이러스였음을 확인하였다.

▣ 또한 분리한 바이러스가 외막을 소유하고 있는지 확인하기 위해서 바이러스에 5% chloroform을 10분간 처리한 후 배양한 결과, 바이러스 증식에 전혀 문제가 없어서 분리한 바이러스가 외막을 가지고 있지 않음을 알 수 있었다.

▣ 분리한 바이러스의 acid resistant를 검사하기 위해서 glycine-HCL buffer (pH 3.0)를 바이러스에 한 시간 처리 한 후 배양한 결과, 바이러스 증식에 전혀 문제가 없어서 국내 분리주는 acid resistant함을 알 수 있었다.

▣ 분리한 바이러스의 trypsin resistant를 검사하기 위해 0.5% trypsin을 처리한 후 배양한 결과, 바이러스 증식에 영향을 주지 않는 것으로 보아 모두 trypsin에 저항성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

▣ 각 온도에 따른 실험결과에서도 50℃에 30분과 56℃ 60분에서는 바이러스 증식에 영향을 주지 않는 반면 56℃ overnight이나 62℃ 30분에서는 바이러스 증식을 억제하였다.

▣ 이러한 물리 화학적 성상을 통하여 분리한 바이러스는 외막이 없으며 유기용

매, 산, 효소 등에 저항성을 가지고 있고, 더운 환경에도 잘 억제되지 않는 오리 바이러스성 간염 바이러스의 특성을 가지고 있음을 확인하였다.

Table 5. Physiochemical properties of duck viral hepatitis virus isolate

Chemical tests		
pH 3.0	Resistant	$10^{4.5}$ 1)
0.5% Trypsin	Resistant	$10^{4.2}$
5% Chloroform	Resistant	$10^{4.0}$
5-iodo-2-deoxyuridine (IUdR)	Resistant	$10^{4.5}$
Untreated		$10^{4.1}$
Temperature sensitivity test		
50℃, 30 min	Resistant	$10^{4.2}$
56℃, 60 min	Resistant	$10^{4.0}$
56℃, overnight	Inactive	0
62℃, 30 min	Inactive	$10^{1.1}$

1) Virus titer ($TCID_{50}$/0.1 ml)

다. 면역형광항체법을 이용한 세포분리주의 동정

▣ 슬라이드 위에서 배양한 바이러스 감염 세포 주를 감염 18시간 후에 아세톤으로 고정하고, 미국 코넬 대학의 오리질병연구센터에서 구입한 닭에서 생산

한 오리 바이러스성 간염에 특이적인 polyclonal antibody와 anti-chicken IgG, IgM, IgA 형광항체를 이용하여 면역형광항체법을 실시하였다.

▣ 오리 바이러스성 간염 바이러스에 대한 양성의 형광반응은 오직 세포질에서만 확인되어, 오리 바이러스성 간염 바이러스는 세포질에서 증식한다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3).

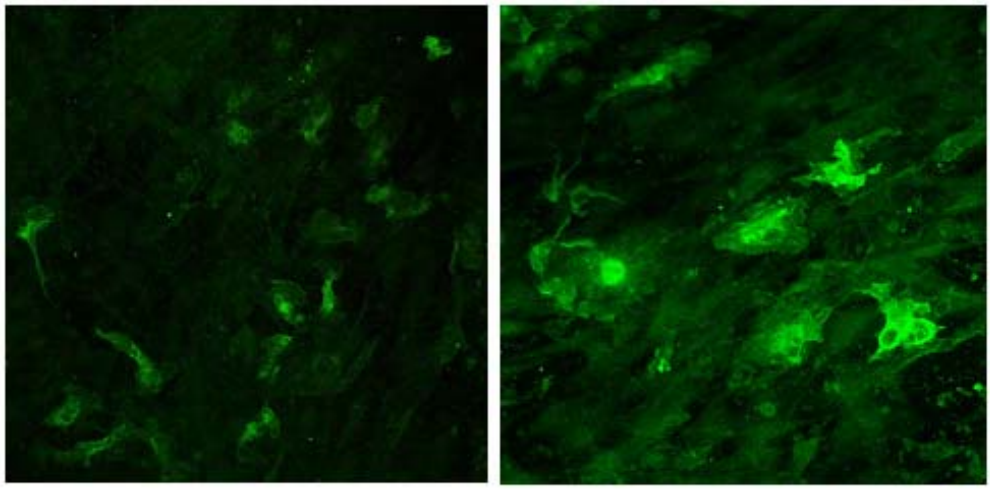

Fig. 10. Confocal microscope of duck embryo liver cells 18 hours after inoculation with the duck viral hepatitis virus (DVHV) isolate. Cells were stained with fluorescein-conjugated rabbit anti-chicken IgG, IgM, IgA after the treatment of chicken antisera to the DVHV. Immunofluorescece positive reaction was restricted to the cytoplasm.

라. 전자현미경 기법을 이용한 세포분리주의 동정

▣ 분리된 오리 간염 바이러스 상층액을 negative 염색하여, 전자현미경으로 관찰한 결과, 약 30 nm 크기의 피코나바이러스가 관찰되었다 (Fig. 11).

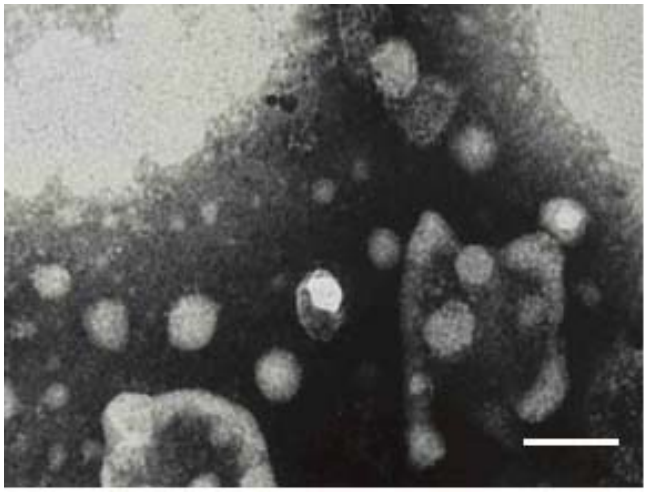

Fig. 11. Electron micrograph of characteristic duck viral hepatitis picornavirus (DVHV) particles isolated from a duckling infected with DVHV. Phosphotungstic acid negative staining. Bar = 100 nm.

▣ 또한 오리 바이러스성 간염 바이러스임을 확진하기 위해, 바이러스 배양 상층액을 DVH에 특이적인 항체를 작용시킨 후, 초고속 원심과 및 PTH로 염색한 후 전자현미경으로 관찰하였다.

▣ 그 결과 다수의 30 nm 크기의 피코나바이러스 응집체가 관찰되었다 (Fig. 12).

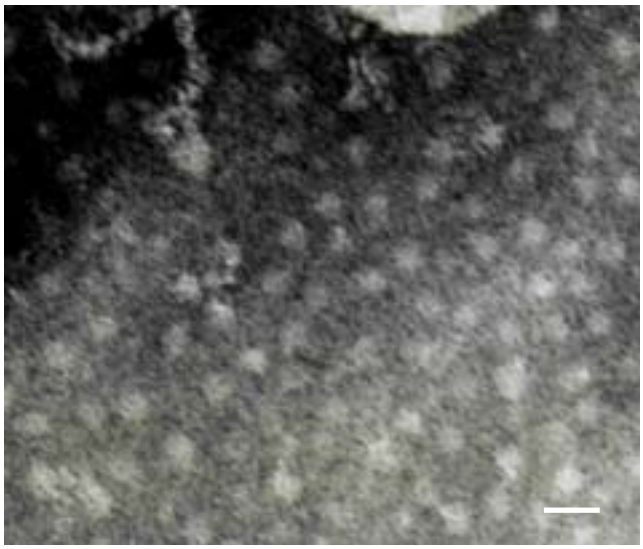

Fig. 12. Electron micrograph of IEM of the duck viral hepatitis virus (DVHV) and a hyperimmune chkicken anti-DVHVserum. Noted typical aggregation containing many DVHV-positive virions. Phosphotungstic acid negative staining. Bar = 300 nm.

마. 오리 바이러스성 간염 분리주의 오리에서 병원성 시험

▣ DEL cell에서 분리된 오리간염 바이러스의 병원성 유무를 확인하기 위해 감수성이 있는 연령 즉, 3일령, 1주령, 2주령의 오리에 초대 계대된 바이러스주인 03-21주와 표준주인 DRL-62를 10^4 $TCID_{50}$ /0.2 ml씩 근육에 접종하여 2주간 무균적으로 사육하면서 폐사율을 조사하였다.

▣ 각 오리에 접종하여 폐사율을 확인한 결과 세포에서 초대 계대된 03-21주는 3일령과 1주령에서는 각각 100%의 폐사율을 보였다. 하지만 2주령에서는

80%로 낮아지는 것을 확인하였다 (Table 6).

▣ 표준주인 DRL-62주를 접종한 3일령과 1주령의 오리는 100%의 폐사율을 보였으며, 2주령의 오리도 90%의 폐사율을 보였다 (Table 6).

▣ 이것은 2주령 이하의 어린 오리에 강한 병원성을 나타내는 오리 바이러스성 간염 의 전형적인 양상을 보여주는 것이다.

▣ 또한 세포주에서 분리한 국내 오리 바이러스성 간염 바이러스가 1주령 이하에서 100%의 폐사율을 유발하여 표준주와 같이 강한 병원성을 지니고 있다고 추측된다.

Table 6. Pathogenicity of duck viral hepatitis virus isolate to duckling

Age at inoculation	Isolate[1)] (DVH03-21)	DRL-62[1)]
3 days old	10/10 (100%)[1)]	10/10 (100%)
1 week old	10/10 (100%)	10/10 (100%)
2 weeks old	8/10 (80%)	9/10 (90%)

1) No of the dead ducks/No of the inoculated duck (% mortality)

▣ 접종 후 보인 특징적인 임상소견은 눈을 반쯤 감고, 양쪽 발을 차는 신경증상을 보이며 머리를 등 뒤로 활모양으로 구부리는 후궁반장이었다 (Fig. 13).

Fig. 13. Typical opisthotonus of ducklings infected with duck viral hepatitis virus (DVH). Left : ducklings infected with DRL-62. Right : ducklings infected 1st passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate.

▣ 폐사한 사체를 부검하여 병변의 발생유무를 조사한 결과, 폐사된 새끼 오리들은 간 종창 및 출혈이 특징적으로 관찰되었다. 또한 신장은 미만성의 중등도 창백한 소견이 보였다 (Fig. 14).

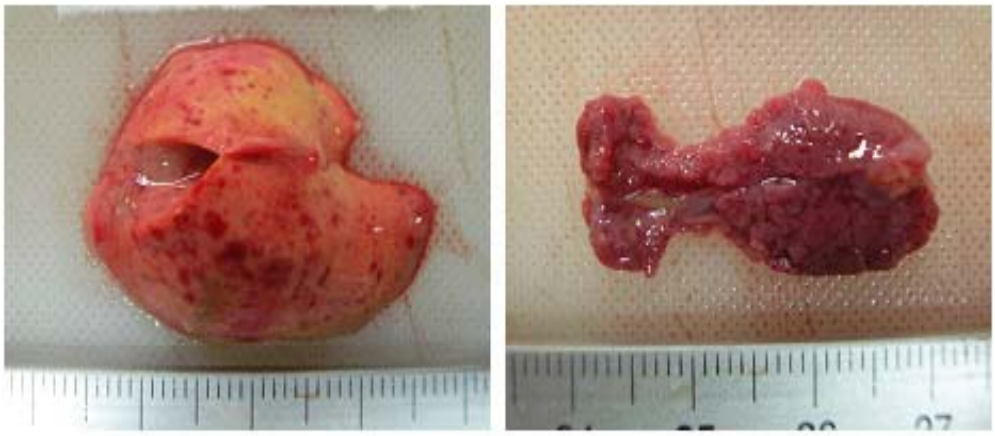

Fig. 14. Left : Multiple ecchymotic hemorrhages in the enlarged liver of duckling infected with 1st passage of cell attenuated duck viral hepatitis virus. Right : Diffuse paleness of kidney of a duckling infected 1st passage of cell attenuated duck viral hepatitis virus.

▣ 세포 분리주를 각각 접종한 새끼오리에서 각각의 장기 및 조직을 채취하여 병리조직학적으로 병변의 발생유무 조사하였다.

▣ 그 결과 특이적으로 간 세포의 미만성 괴사가 심하게 관찰되었으며, 신장에서도 신 세뇨관 상피세포의 다발성의 중등도 변성 내지 괴사가 관찰되었다 (Fig. 15).

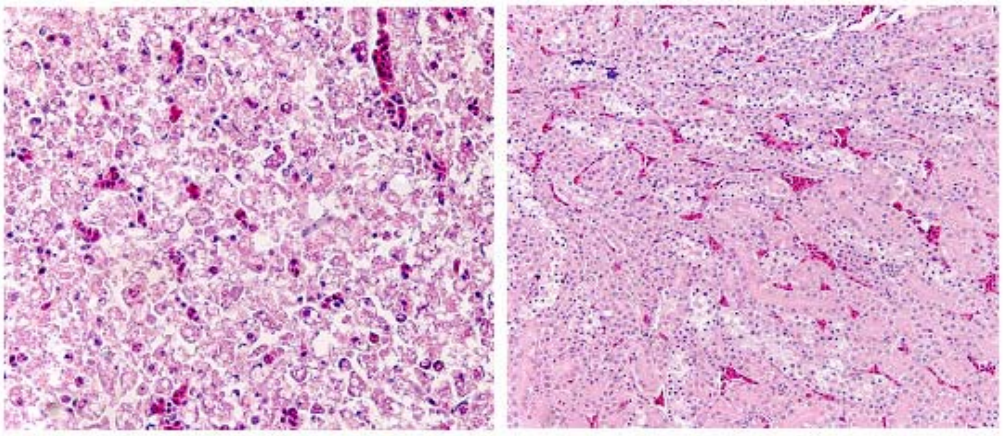

Fig. 15. Left : Diffuse necrosis of hepatocytes characterizing by membrane rupture, cytoplasmic vacuolization, and chromatin condensation is observed in ducklings infected with 1st passage of cell attenuated duck viral hepatitis virus. H&E stain. Right : Multiple degeneration and necrosis of tubular epithelium in the kidney of ducklings infected with 1st passage of cell attenuated duck viral hepatitis virus. H&E stain.

▣ 세포 분리주를 접종한 새끼 오리에서 오리 바이러스성 간염 항원의 분포를 검사하기 위해서 각각의 장기에서 냉동절편을 제작한 후, 오리 바이러스성 간염 바이러스 항체를 이용하여 면역형광항체법을 수행하였다.

▣ 그 결과 항원의 분포는 육안소견 및 조직소견과 평행하게 1대 계대주를 접종한 간과 신장에서는 강한 양성반응이 간과 신장에서 모두 미만성 다발성으로 관찰되었다 (Fig. 16).

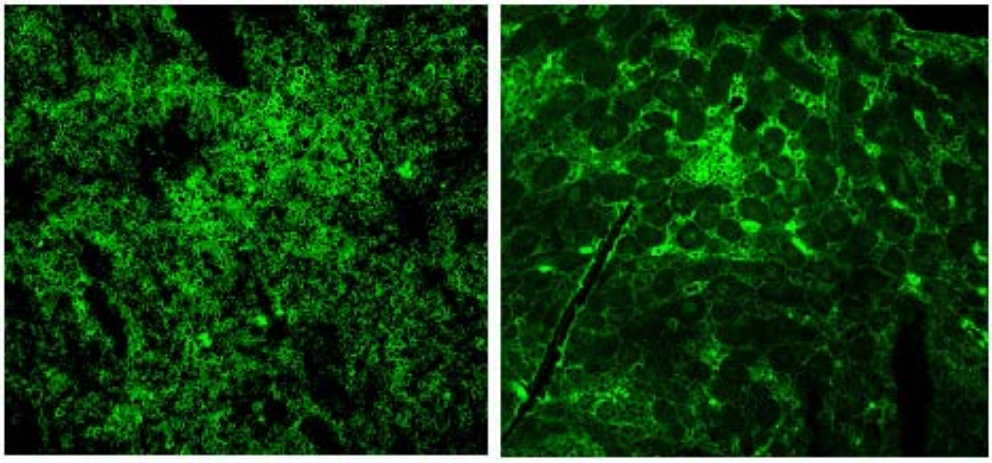

Fig. 16. Confocal microscope of liver (left) and kidney (right) of ducklings infected with 1st passage of cell attenuated duck viral hepatitis virus (DVHV). Immunofluorescence staining is performed with fluorescein-conjugated rabbit anti-chicken IgG, IgM, IgA after the treatment of chicken antisera to the DVHV. Immunofluorescece positive reaction was restricted to the cytoplasm.

▣ 세포에서 분리한 바이러스의 접종오리에서 오리 바이러스성 간염 바이러스의 세포 내 존재를 확인하기 위하여 전자현미경 연구를 수행하였다.

▣ 즉 오리 바이러스성 간염에 이환된 오리의 간 조직을 glutaraldehyde로 고정 후, osumium tetraoxyde로 후고정하였다. 각급 알코올로 탈수 후에 에폰수지 봉입한 후에 초박절편을 제작하였다. 초박절편은 uranium acetate와 lead citrate로 이중 염색을 하여 전자현미경으로 관찰하였다.

▣ 전자현미경적으로 간 세포는 심하게 파손되어 있었으며, 내부의 미세소기관도 종창 내지 파괴되어 있었다. 핵은 종창되어 있었고, 염색질은 분해되는 소견을 보였다. 이러한 괴사된 간세포 세포질 내에서 30 nm 크기의 picornavirus 입자들이 덩어리 혹은 산재되어 있었으며, smooth endoplasmic reticulum 내에서도 picronavirus 입자들을 확인할 수 있었다 (Fig. 17).

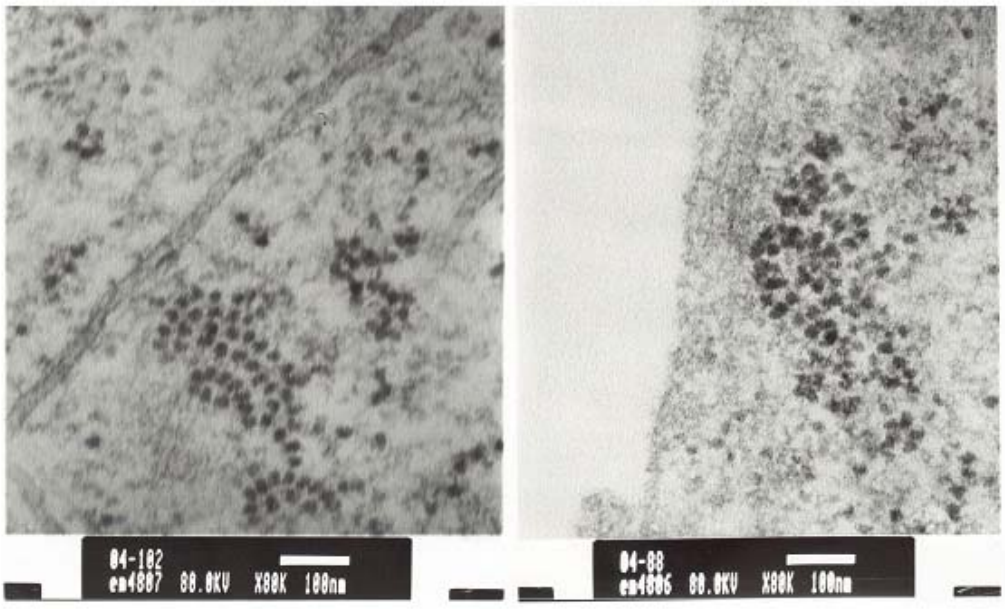

Fig. 17. Duck viral hepatitis picornavirus particles are aggregated in the cytoplasm. Uranyl acetate and lead citrate.

4. 세포주의 연속계대 배양을 이용한 오리 바이러스성 간염의 순응주 개발

가. 상용화된 오리 바이러스성 간염 백신의 효능 검사

▣ 국내에서 개발된 오리 바이러스성 간염 백신 (DVH type 1)을 투여한 농가에서 지속적으로 오리 바이러스성 간염 이 발생한 것을 역학 조사결과 나타났다.

▣ 이렇게 백신에 의해서 완벽히 방어가 되지 않는 이유는 1) 국내에서 주로 발생하는 오리 바이러스성 간염 바이러스는 아마도 type 1 바이러스가 아니라 다른 type의 간염이 발생하거나, 2) 시판되는 백신의 낮은 면역원성, 3) 백신 제조의 문제점에 의한 것으로 추측할 수 있었다.

▣ 따라서 상용화 되고 있는 백신을 구입한 후 1일령, 1주령 그리고 2주령 Pekin duck에 추천 방법에 따라 0.2 ml씩 근육 접종하였다. 접종 7일 후 백신을 투여한 농장에서 분리된 병원성 야외주와 표준주 (DRL-62)를 공격 접종한 후, 무균상자에서 2주간 사육하며 폐사수를 조사를 실시하였다.

▣ 그 결과 1일령 오리에서 국내 분리주 (DVH04-102) 공격 접종시 20마리 접종한 것 중 5마리 사망으로 폐사율 25%, 방어율 75%를 보였고, 표준주 공격 접종시에는 20마리 접종 중 3마리 폐사로 폐사율 15%, 방어율 85%을 보였다 (Table 7).

▣ 이 결과는 Type I에 대한 방어능을 보여주는 것으로 새로운 type의 바이러스 출현이 아니라 기존에 발생한 것과 같이 Type 1 오리 바이러스성 간염이 발생하였다는 것을 추측된다.

▣ 왜냐하면, types 1, 2, 3 오리 바이러스성 간염 바이러스는 혈청학적으로 전혀 교차반응을 하지 않기 때문이다.

▣ 폐사한 오리는 후궁반장 등 오리 바이러스성 간염 의 전형적인 증상을 보였고, 부검결과에서도 간의 출혈과 간 종대, 신장의 충혈 등을 보였다.

▣ 특히 시판되고 있는 백신으로는 1주령 이하의 오리에서 100% 오리 바이러스성 간염 을 예방 할 수 없었다.

▣ 실제로 오리 바이러스성 간염 은 1주령미만에서는 95%이상, 1주령에서 3주령 미만에서는 50%의 폐사율을 보인다고 알려져 있다. 따라서 오리 바이러스성 간염 백신은 1주령 미만의 오리에서 좋은 백신효과를 나타내어야 한다.

▣ 따라서 본 연구진은 시판되는 백신을 재개발과 동시에 새로 분리된 바이러스로의 백신개발이 절실함을 알 수 있었다.

Table 7. Protection rate of currently used commercial vaccine against Korean DVH isolate and DRL-62

Vaccine	Inoculated age	Challenge inoculum	
		DVH04-102	DRL-62
Commercial vaccine against the DVH 1	1 day old	5/20 (25%)	3/20 (15%)
	1 week old	1/19 (5.3%)	0/20 (0%)
	2 weeks old	0/20 (0%)	0/19 (0%)

나. 세포주에 연속계대한 배양한 바이러스의 역가 측정

▣ DEL cell에서 분리한 오리 바이러스성 간염 바이러스 6개 분리주를 1대부터 시작하여 10대 간격으로 confluent 한 96 well plate에 10진 희석하여 접종하였다. 37℃에서 7-10일간 배양하여 매일 세포 변성효과를 관찰하고, Reed & Muench의 방법에 따라 $TCID_{50}$를 측정하였다.

▣ 뿐만 아니라 상용화된 백신의 역가를 높이기 위해 DEL cell에서 연속 계대 배양한 것을 위와 같은 방법으로 $TCID_{50}$를 측정하였다.

▣ 야외 분리주와 시판백신 모두 DEL cell에 계대가 증가할수록 더 높은 역가를 나타내었다 (Table 8).

▣ 밑에 기술하였듯이 시판 백신의 경우 백신을 투여하였음에도 오리 바이러스성 간염 을 100% 방어할 수 없었던 것은 낮은 역가 때문임으로 추정된다.

▣ 이러한 시판 백신의 문제점을 개선하기 위해 duck embryo liver cell을 이용하여 연속계대 배양하는 경우 바이러스 역가를 충분히 높였음을 확인 할 수 있었다.

▣ 또한 본연구진이 분리한 바이러스 또한 처음의 낮은 바이러스 역가가 계대수가 증가 할수록 점점 높은 역가를 나타냄을 알 수 있었다 (Table 8).

▣ 이것은 세포주를 이용한 연속 계대한 바이러스의 역가를 높임으로써 시판백신에서 나타난 낮은 역가를 극복하여 더 좋은 백신의 효능을 얻을 수 있음을 시사한다.

Table 8. Virus titration of Korean duck viral heptatitis virus (DVH) isolate and attenulated DVH vaccine according to serial passage in duck embryo liver cell culture

No. of passage	Virus titration ($TCID_{50}$/0.1 ml)	
	03-21 Korean DVH isolate	Vaccine strain
1	$10^{4.1}$	$10^{2.1}$
10	$10^{4.3}$	$10^{2.5}$
20	$10^{4.7}$	$10^{3.2}$
30	$10^{5.5}$	$10^{4.1}$
40	$10^{5.3}$	$10^{4.5}$
50	$10^{6.4}$	NT
60	$10^{6.9}$	NT

NT : not tested

다. 계대별 세포 순응주의 오리에서의 병원성 시험

▣ Duck embryo liver cell에서 순응된 6개의 바이러스 중 1주를 선발하였다. 선발된 바이러스를 1대에서 60대까지 10개 간격으로 1일령 Pekin duck에 마리당 1x 10^4 $TCID_{50}$씩 근육 주사하였다. 접종한 후 2주간 사육하면서 폐사수를 조사하였다.

▣ 시판되는 백신 또한 DEL cell에 40대 까지 계대한 바이러스를 10대 간격으로 1일령 Pekin duck에 1x 10^3 $TCID_{50}$씩 근육 접종하였다. 이것은 시판 백신을 DEL cell 계대함으로써 병원성의 회복이 있는지 여부와 백신으로의 활용 여부를 확인해 보기 위한 것이었다.

▣ 본 연구진에 분리한 오리 바이러스성 간염 은 1대에서는 접종한 20마리 1일령 오리 중 18마리가 폐사하여 90%의 높은 병원성을 나타내었지만 10대에서는 18마리 접종 중 8마리 폐사로 폐사율 44.4%, 20대에서는 18마리 접종 중 5마리 폐사로 폐사율 27.7%, 30대에서는 20마리 접종 중 3마리 폐사로 폐사율 15%를 나타내었다. 하지만 그 이후의 계대 군에서는 폐사가 없었다.

▣ 폐사한 오리에서는 전형적인 후궁반장을 보였으며, 부검 시에도 간종대와 점상출혈이 특징적으로 나타내었다.

▣ 세포주에 순응된 바이러스는 세포배양에 의해 계대가 증가할수록 병원성이 현저히 감소함을 알 수 있었다. 특히 40계대 이후에서 감수성 있는 1일령 오리에 전혀 영향을 주지 않음을 확인하였다.

▣ 시판되는 백신에서도 DEL cell에 연속 계대배양 시 바이러스 역가는 높아졌지만, Table 9와 Fig. 18에서 보는 바와 같이 다시 병원성의 회귀는 보이지 않았다.

▣ 세포주에 순응된 바이러스 주나 시판되는 백신 모두 DEL cell에 계대가 증가할수록 바이러스 역가는 높아지지만 감수성 있는 오리에서 병원성은 낮아짐을 확인하였다. 또, 순응된 바이러스에서 40계대 이후에는 전혀 폐사를 유발

하지 않으므로 병원성이 소실된 것으로 판단된다 (Fig. 18).

▣ 따라서 DEL cell에서 순응된 바이러스는 40대 이후의 바이러스에는 면역원성이나 안전성이 확보되면 백신주로서의 선발 가능성이 있을 것으로 예상된다. 시판 백신을 계대 배양한 것 또한 세포에서 30계대 이후에는 바이러스 역가도 높아졌으며, 감수성 오리에도 병원성을 나타내지 않으므로 30계 이후의 것 또한 시판 백신의 개량주로서의 선발 가능성을 시사한다고 할 수 있다.

Table 9. Pathogenicity of each passage of duck viral hepatitis virus (DVHV) isolate and commercial vaccine DVHV strain in the duck embryo liver cell to the ducklings

Inoculum	No. of passage	No. of dead/No. of the inoculated (% mortality)	Inoculum	No. of passage	No. of dead/No. of the inoculated (% mortality)
Isolate (03-21)	1	18/20 (90.0%)	Commercial Vaccine	1	0/20 (0%)
	10	8/18 (44.4%)		10	0/19 (0%)
	20	5/18 (27.7%)		20	0/20 (0%)
	30	3/20 (15%)		30	0/18 (0%)
	40	0/19 (0%)		40	0/20 (0%)
	50	0/19(0%)	Control		0/20 (0%)
	60	0/20 (0%)			

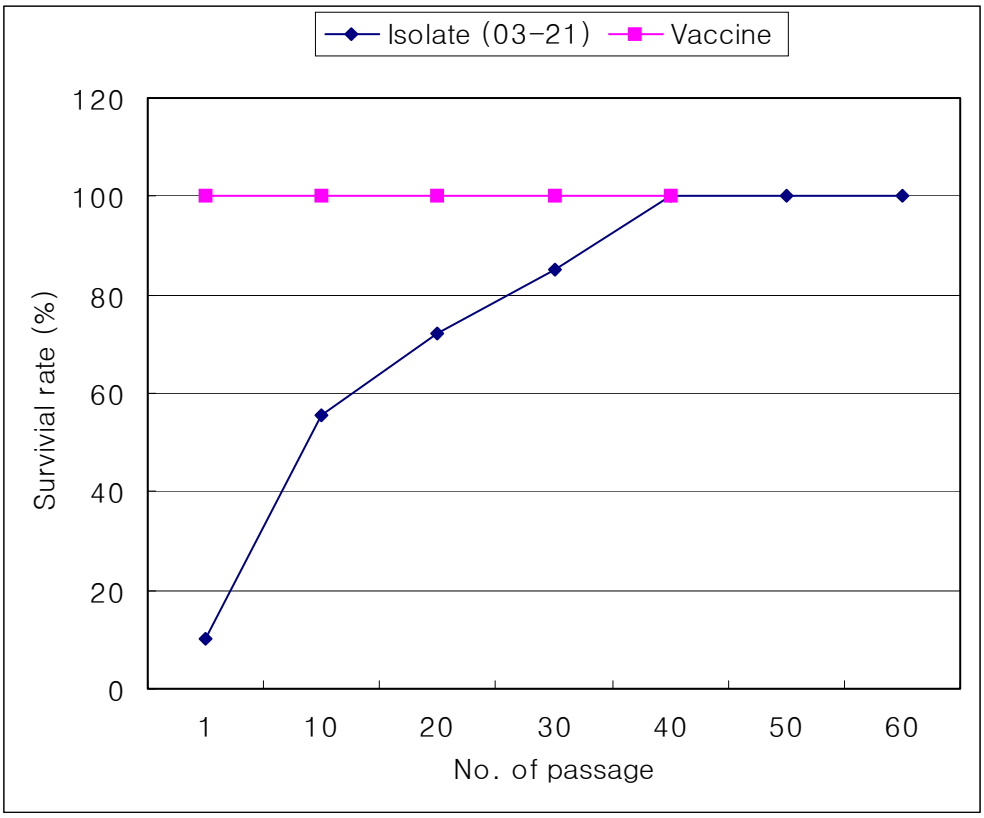

Fig. 18. Survival rate of the duck embryo liver cell passaged DVHV isolate and commercial vaccine in duckling.

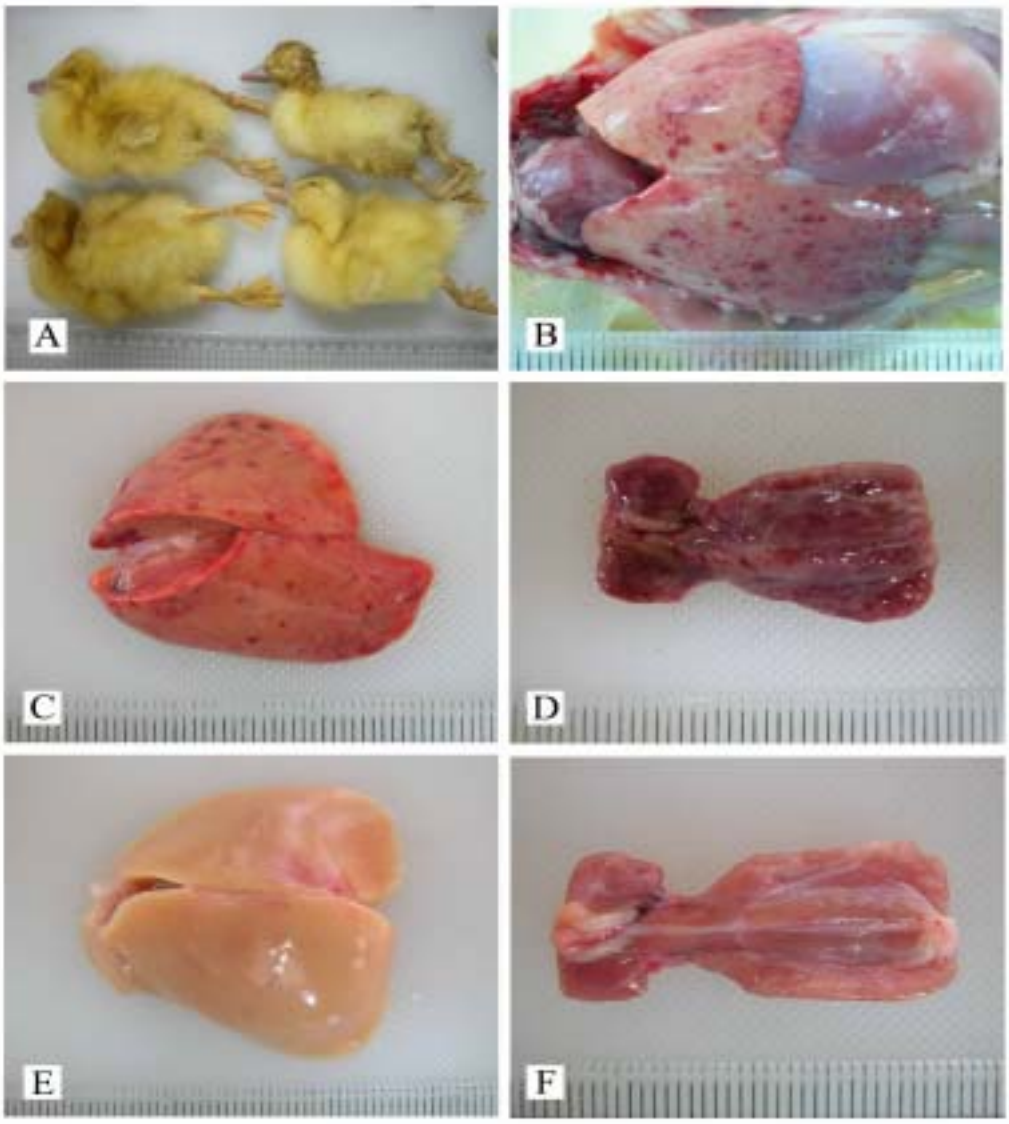

Fig. 19. (A) Typical opisthotonus of ducklings inoculated 10th passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate. (B) and (C) Multiple ecchymotic hemorrhages in the enlarged liver of duckling inoculated 10th passage of attenuated DVH isolate. (D) Diffuse congestion of kidney of a

duckling inoculated 10th passage of cell attenuated DVH isolate. (E) Liver of 14-day-old duckling inoculated 60th passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate. (F) Kidney of 14-day-old duckling inoculated 60th passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate. (6) Diffuse congestion of kidney of a duckling inoculated 10th passage of cell attenuated DVH isolate.

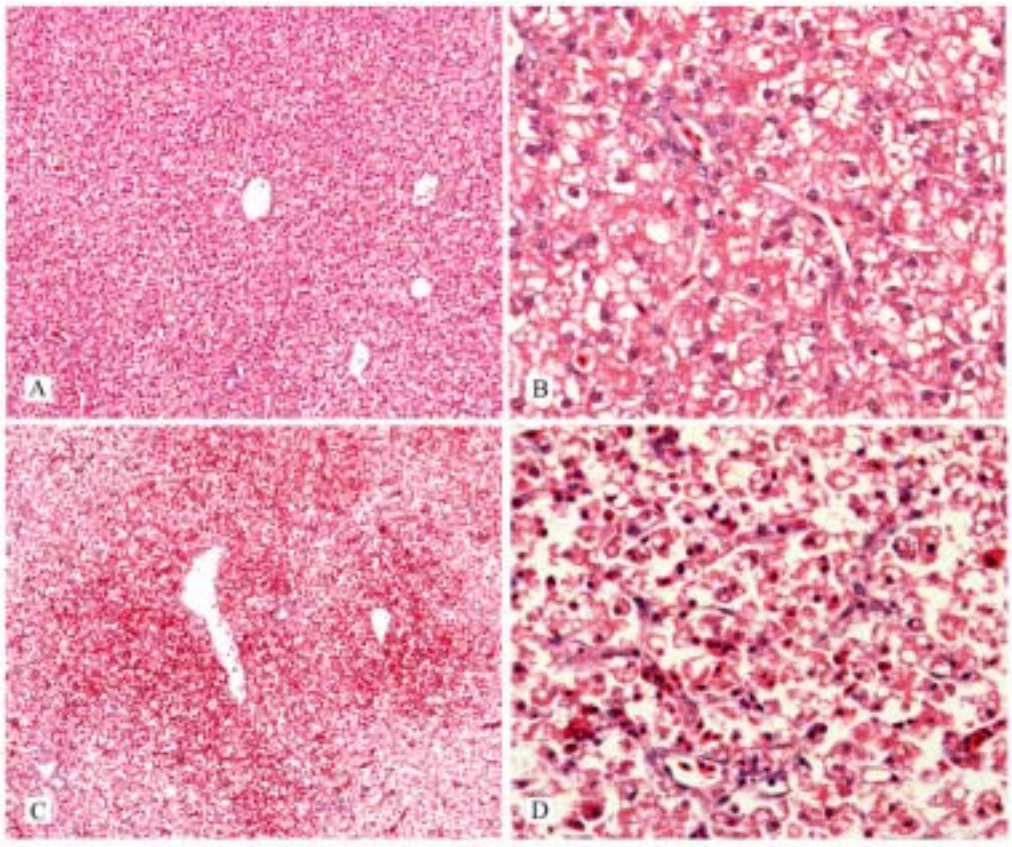

Fig. 20. (A) Section of liver from 14-day-old duckling infected 60th passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate. Cytoplasm of parenchymal

cells appears clear and vaculoated because of lipid. (B) Magnification of Fig. 20A. (C) Diffuse necrosis and hemorrhage of a duckling liver inoculated 10th passage of cell attenuated DVH isolate. (D) Magnification of Fig. 20C. Diffuse necrosis and hemorrhage of hepatocytes by membrane rupture, cytoplasmic vacuolization, and chromatin condensation is observed in ducklings inoculated with 10th passage of cell attenuated DVH isolate. H&E stain.

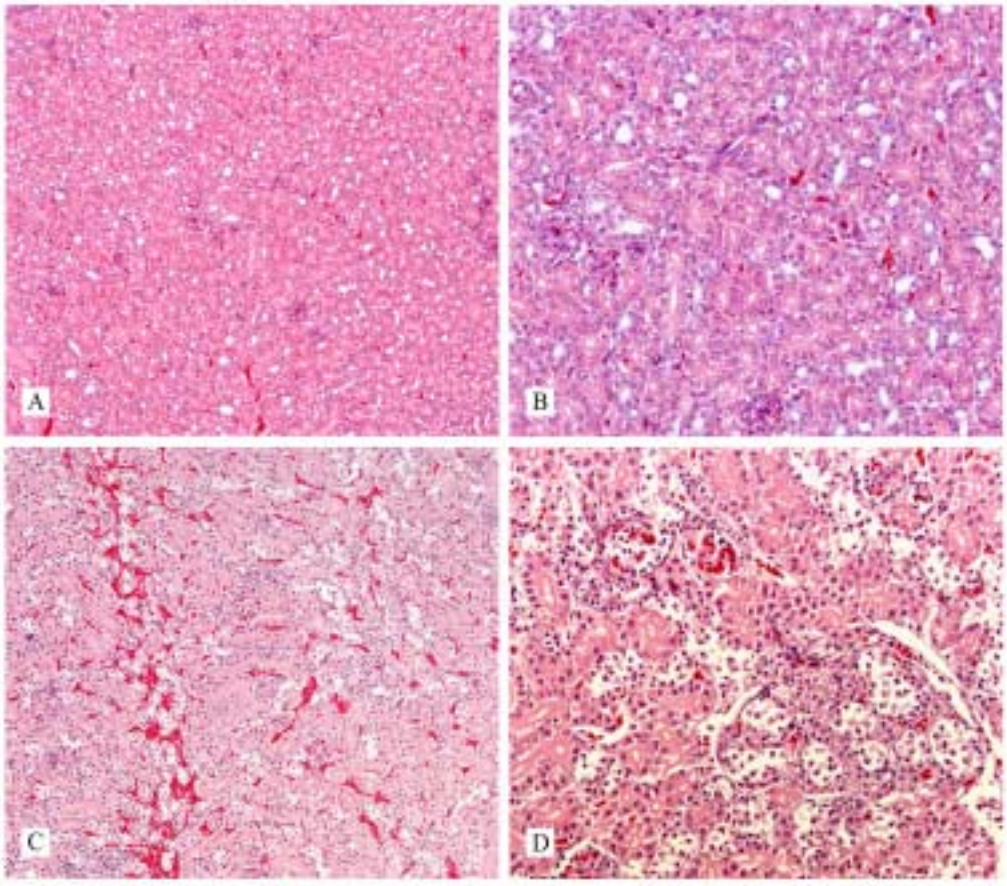

Fig. 21. (A) Section of kidney from 14-day-old duckling infected 60th passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate. Tubular epithelium have apparent cytoplasm and nuclei in kidney. (B) Magnification of Fig. 21A. (C) Severe congestion of tubular epithelium in kidney of ducklings inoculated with 10th passage of cell attenuated DVH isolate. (D) Magnification of Fig. 21C. Multiple degeneration and necrosis of tubular epithelium in the kidney. H&E stain.

라. 상용화된 백신과 세포주에서 계대 배양된 순응주의 계대별 방어능 시험

▣ 40대에서 60대 까지 세포주에 순응된 바이러스를 대상으로 계대된 순응주를 10개 간격으로 1일령 Pekin duck에 마리당 1x $10^{3.5}$ $TCID_{50}$씩 구강으로 접종하였다. 백신 접종 후 6일령 때 무접종 대조군과 함께 표준주 DRL-62 1x $10^{4.0}$ $TCID_{50}$를 구강으로 공격접종한 후 2주간 사육하면서 폐사수를 조사하였다.

▣ 시판 백신주 또한 0대에서 40대까지 계대별 10대 간격으로 1일령 Pekin duck에 접종한 후 세포 순응주와 같이 6일 후 표준주 DRL-62를 1x 10^{4} $TCID_{50}$씩 구강으로 공격접종한 후 2주간 사육하면서 폐사수를 조사하였다.

▣ 40대 계대 배양한 세포 순응주로 백신 후 표준주 공격 접종시 14마리 접종 중 14마리 생존, 50대에서 15마리 접종 중 15마리 생존, 60대 계대에서 15마리 접종 중 15마리 생존으로 모두 100% 방어율을 보였다.

▣ 시판 백신주는 세포주에 계대하지 않은 경우 15마리 중 3마리가 폐사하여 20%의 폐사율을 보였지만, 10대 계대 주에서는 15마리 접종 중 1마리 폐사로 폐사율이 6%로 낮아졌고, 20대 계대주 이상에서는 전혀 폐사율이 보이지 않아 100% 방어능을 보였다 (Table 10).

▣ 이러한 결과를 분석해 보면, 계대수가 증가할수록 감수성 오리에서 병원성은 낮으며, 방어능은 높아짐을 알 수 있었다. 시판 백신주 또한 세포주에의 계대가 증가할수록 세포 순응주과 비슷한 결과를 보였다.

▣ 따라서 본 연구에서 개발한 세포계대 약독화 백신주는 시판 백신의 문제점인

낮은 면역원성을 개선하였을 뿐만 아니라, 안전성과 그 효능이 확보되었다고 할 수 있다.

Table 10. Comparison of protective ability between an attenuated Korean DVHV isolate and commercial vaccine in duckling

Inoculated virus	No. of passage	Challenge result	Inoculated virus	No. of passage	Challenge result
		DRL-62			DRL-62
Isolate (03-21)	40	14/14 (100%)	Commercial Vaccine	0	12/15 (80%)
	50	15/15 (100%)		10	14/15 (94%)
	60	15/15 (100%)		20	13/13 (100%)
Unvaccinated control		2/20 (10%)		30	15/15 (100%)
				40	15/15 (100%)

No. of the survived/ No. of the challenged (%)

5. 세포주를 이용한 계대된 순응주의 생백신 개발

가. 접종 경로별 방어능 시험

▣ 1일령 Pekin duck에 세포주에서 40대에서 60대까지 계대된 순응주 바이러스는 마리당 1x $10^{3.5}$ $TCID_{50}$씩와 20대에서 40대까지 계대된 시판 백신은 마리당 1x $10^{3.2}$ $TCID_{50}$씩 경구접종 또는 복강 접종하였다. 백신 접종 7일 후 표준주 DRL-62를 1x $10^{4.0}$ $TCID_{50}$씩 공격 접종하여 백신 접종 경로에 따른 방어

능을 조사하였다.

▣ 음수 접종의 경우 세포 순응주의 40계대에서 10마리 중 10마리 생존, 50계대에서는 8마리 중 8마리 생존, 60계대에서는 10마리 중 10마리 생존으로 모두 100% 방어능을 발휘하였다 (Table 11).

▣ 복강으로의 접종에서도 세포 순응주의 음수 접종과 마찬가지로 40계대에서 10마리 중 10마리, 50계대에서는 10마리 중 10마리, 60계대에서 9마리 중 9마리모두 생존하였다. 따라서 복강접종에서도 모든 계대에서 100% 방어능을 발휘하였다.

▣ 따라서 세포에서 계대된 순응주는 경구접종과 복강접종 어떤 경로로도 100% 방어할 수 있음을 확인하였다.

▣ 세포에서 계대한 시판 백신주는 20대 계대의 경우, 경구 접종시 9마리 중 9마리, 복강 접종시 10마리 접종 중 10마리 생존으로 모든 경로에서 100% 방어율을 보였다. 30대 계대와 40대 계대 또한 경구 접종과 복강접종 모두 10마리 접종 중 10마리 생존으로 모두 100% 방어율을 보여, 세포에서 계대한 시판 백신 또한 국내 분리주와 마찬가지로 모든 접종 경로로도 오리 바이러스성 간염을 100% 방어할 수 있음을 확인하였다.

▣ 하지만 백신하지 않은 대조군에서는 음수로 공격접종 후 2틀 안에 10마리 중 8마리가 폐사하여 80%의 폐사율을 보였고, 복강 접종 시 10마리 모두 사망하여 100% 폐사율을 보였다.

▣ 이러한 백신을 하지 않은 군에서는 공격 접종 시 전형적인 오리 바이러스성

간염의 임상증상인 후궁반장을 보였으며, 부검 시 육안소견도 간 종대 및 간의 점·반상 출혈, 신장의 출혈 등을 보였다.

▣ 하지만, 세포 순응주를 백신한 군에서 2주 후 생존한 오리들을 부검한 결과에서는 간과 신장의 특이적인 소견을 관찰할 수 없었다.

▣ 병리 조직학적 검사 결과 또한 백신 하지 않은 군에서는 간세포의 괴사와 변성, 출혈이 관찰되었고, 신장에서의 충혈과 괴사가 보였다. 하지만 세포 순응주와 시판 백신 세포 계대주를 백신한 군에서는 모두 이 연령대의 정상 오리 간의 조직 소견과 같이 간에서는 약간의 지방간 소견을 보일 뿐 특이 소견을 관찰할 수 없었다. 신장의 세뇨관 세포들은 모두 핵이 뚜렷하며 세포막이 선명하였으며, 어떠한 비정상적인 병변은 보이지 않았다 (Fig. 22 and 23).

▣ 이러한 결과는 세포주에 순응된 오리 바이러스성 간염 바이러스를 접종한 경우 각 장기에 어떠한 병변을 일으키지 않고 면역반응을 유도함을 추측할 수 있다.

▣ Hwang은 81대 계대된 약독주를 이용하여 1일령 오리에 경구접종, 근육접종, 점안접종 및 발바닥 접종으로 각각 백신을 접종한 후 병원성 주를 공격접종한 결과 모두 3-5일 이내에 방어능이 발휘됨을 확인한 바 있다. 또, Freind의 경우도 오리에 비강, 복강, 근육, 경구 접종하여 여러 가지 경로별 오리 바이러스성 간염 의 투여 경로별 연구를 진행한 사례가 있다.

▣ 본 실험에서도 세포주에서 계대된 순응주와 시판백신의 세포 계대주 모두 오리 바이러스성 간염 의 백신 접종방법으로는 음수접종과 복강접종 모두가 가

능한 것으로 나타났다.

▣ 실제로, 농장에서 지금까지의 오리 바이러스성 간염 백신의 문제점은 특히 투여방법의 어려움을 호소하고 있다.

▣ 따라서 본연구진의 결과에 따르면, 특히 음수접종은 복강 접종에 비하여 백신 접종이 간편한 장점이 있으므로 일반적으로 이 방법으로 백신을 접종하면 무난할 것으로 사료된다. 음수접종은 특별한 도구나 기술이 없이도 사용가능하기 때문에 훨씬 편리한 백신접종 방법이 될 것이라 예상된다.

▣ 하지만 오리 바이러스성 간염 의 발생이 빠른 농장에서는 음수접종보다 방어능 발휘시간이 더 빠른 복강접종이나 근육접종이 더 효과적으로 생각되었다.

▣ 따라서 각 농가의 상황에 따라 백신의 접종방법을 적절히 선택하는 것이 중요하다고 판단되어 진다.

Table 11. The protective rate of an attenulated strains according to the route of vaccination

Inoculated virus	No. of passage	Route of vaccination	
		Oral	Intraperitoneal
Isolate (03-21)	40	10/10 (100%)	10/10 (100%)
	50	8/8 (100%)	10/10 (100%)
	60	10/ 10 (100%)	9/9 (100%)
Commercial Vaccine	20	9/9 (100%)	10/10 (100%)
	30	10/10 (100%)	10/10 (100%)
	40	10/10 (100%)	10/10 (100%)
Unvaccinated control		2/10 (20%)	0/10 (0%)

No. of the survived/ No. of the challenged (%)

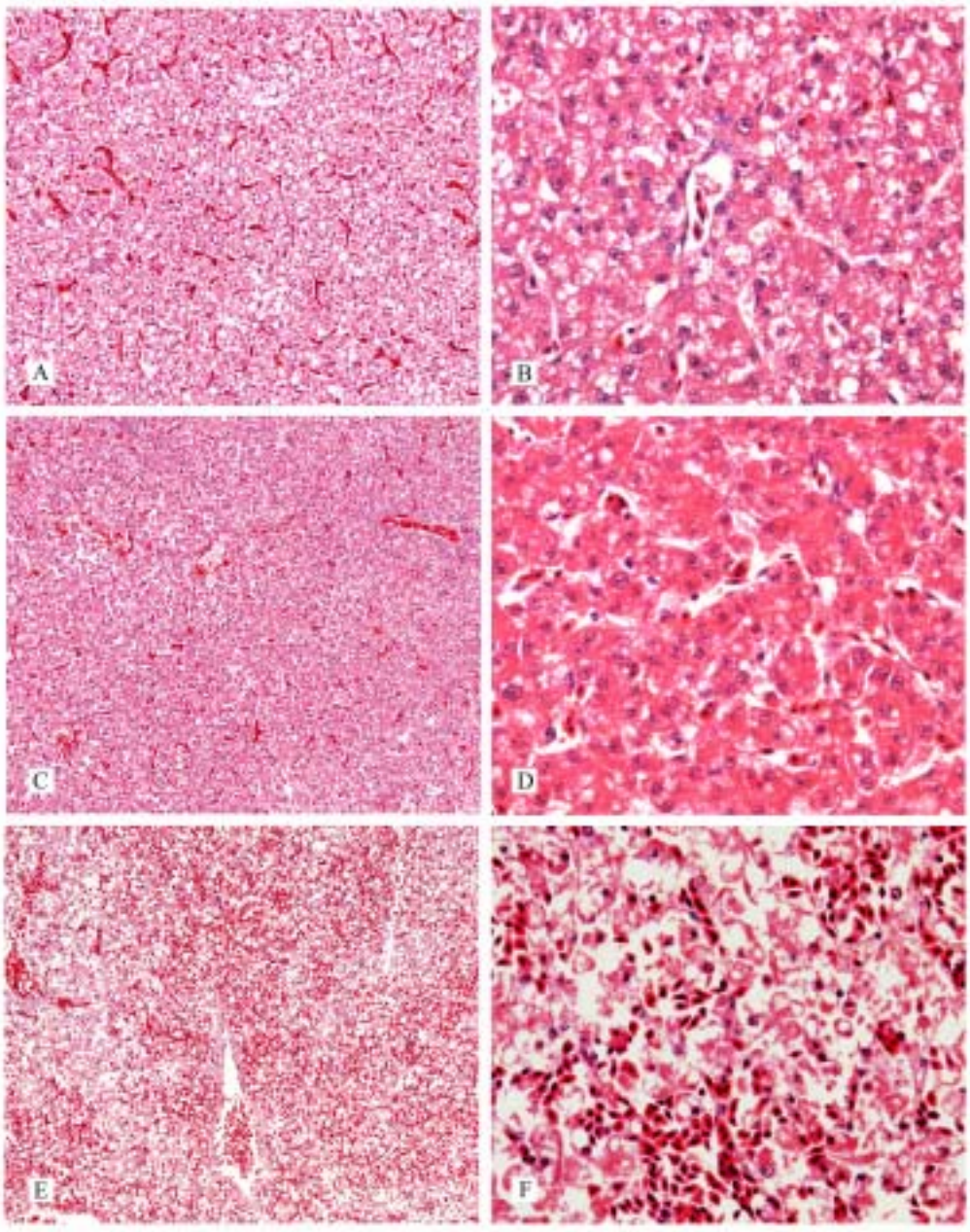

Fig. 22. (A) Histologically, any specific lesions were not observed in the liver from duckling vaccinated 60th passage of duck embryo liver cell attenuated

DVH isolate in oral route. (B) Magnification of Fig. 22A. Cytoplasm of parenchymal cells appears clear and vaculoated because of lipid. (C) Section of liver from duckling vaccinated 40th passage of duck embryo liver cell attenuated commercial vaccine in oral route. (D) Magnification of Fig. 22C. (E) Diffuse necrosis and hemorrhage of a duckling liver in unvaccinated group. (F) Magnification of Fig. 22E. Diffuse necrosis and hemorrhage of hepatocytes by membrane rupture, cytoplasmic vacuolization, and chromatin condensation is observed H&E stain.

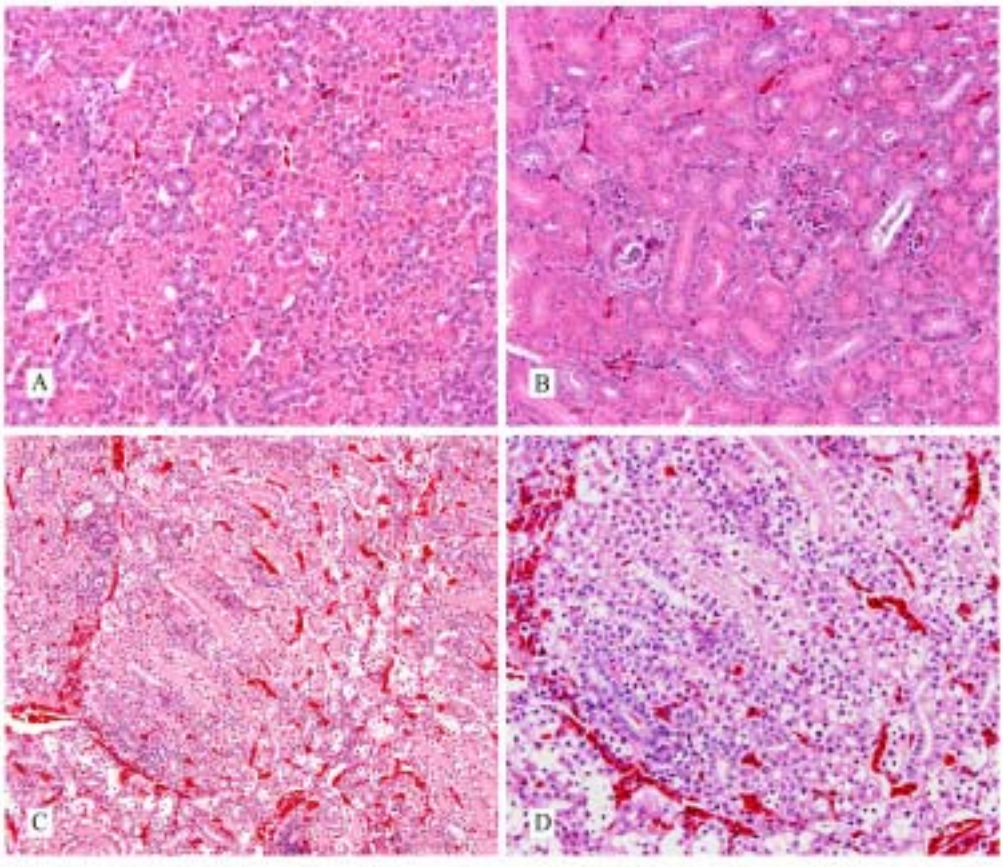

Fig. 23. (A) Section of kidney from 1 duckling vaccinated 60th passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate in oral route. (B) Section of kidney from 1 duckling vaccinated 40th passage of duck embryo liver cell attenuated commercial vaccine in oral route. (C) Severe congestion of tubular epithelium in kidney of ducklings in unvaccinated group. (D) Magnification of Fig. 23C. Multiple degeneration and necrosis with hemorrhage of tubular epithelium in the kidney. H&E stain.

나. 최소 면역량 측정

▣ 국내에서 분리한 시험 백신주는 DEL cell에서 60대 계대된 것을, 시판 백신주는 40대 계대한 것을 1일령 Pekin duck에 마리당 10^2에서 10^5 $TCID_{50}$로 경구 접종한 후 7일령에 무처치 대조군과 함께 각 군에 DRL-62 바이러스로 수당 10^4 $TCID_{50}$ 씩 구강으로 공격 접종하였다. 공격접종 후 2주간의 방어율을 조사하였다.

▣ 세포주에 순응된 시험 백신주의 경우 $10^{2.0}$ $TCID_{50}$를 구강으로 접종한 경우 10마리 중 9마리가 생존하여 방어율이 90%로 이 역가에서는 100% 방어율을 보이지 않았다 (Table 12).

▣ 하지만 이후 $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ 이상에서는 10마리 중 10마리가 생존하여 100% 방어율이 발휘 되었다. 따라서 100% 방어능이 발휘되는 최소 면역량은 마리당 $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ 인 것으로 추정된다.

▣ 세포 순응주 60계대와 시판 백신주 40계대를 $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ 접종한 군은 2주 관찰 후 살아남은 오리를 부검해본 결과, 정상 간과 신장이 관찰되었으며 별다른 특별한 소견이 관찰되지 않았다. 하지만, 백신을 하지 않은 군에서는 표준주 공격 접종 시 심한 간 종대와 점상출혈을 보였고 신장에도 병변이 관찰되었으며 총 10마리 접종시 8마리가 폐사하여 폐사율도 80%로 높게 나타났다 (Table 12 and Fig. 24).

▣ 병리 조직학적 관찰에서도 육안소견과 같이 백신하지 않은 군에서는 간세포의 출혈과 세포막이 터지는 괴사가 관찰되었지만 시험 백신주와 시판 백신

계대주를 접종한 군에서는 동일 연령대의 정상 오리와 같은 정상 간과 신장의 소견을 보였다 (Fig. 25 and 26).

▣ 시판되는 백신의 경우에서는 방어율이 $10^{2.0}$ $TCID_{50}$ 에서는 총 10마리 접종 중 5마리만이 생존하여 생존률이 50%로 매우 낮게 나타났다. 따라서 $10^{2.0}$ $TCID_{50}$에서는 오리 바이러스성 간염 을 효과적으로 방어할 수 없을 것으로 생각된다.

▣ 앞에서 언급한 것처럼 세포주 순응주에서는 $10^{2.0}$ $TCID_{50}$ 역가에서 시판 백신보다 방어율이 월등히 높게 나타났다. 이러한 결과는 시판 백신주가 duck embryo liver cell에서 계대배양으로 상당히 개선 및 발전 되었지만, 본 연구실에서 분리하여 계대한 바이러스가 월등히 좋은 방어능을 나타냄을 알 수 있었다.

▣ 하지만 $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ 이상에서는 시판 백신 계대주에서도 10마리 중 10마리 모두 생존으로 100% 방어율을 보였다. 즉, $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ 이후에는 시판 백신 계대주 또한 100% 방어능을 발휘하므로 최소 면역량은 세포 순응주와 비슷하게 $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ 일 것으로 추정된다.

Table 12. The minimum immunizing dose of attenulated isolate and cell attenulated commercial vaccine

Dose of inoculation ($TCID_{50}$/duck)	No. of the survived/No. of the challenged (%)	
	Isolate (03-21)	Commercial vaccine
$10^{2.0}$	9/10 (90%)	5/10 (50%)
$10^{3.0}$	10/10 (100%)	10/10 (100%)
$10^{4.0}$	9/9 (100%)	10/10 (100%)
$10^{5.0}$	10/10 (100%)	NT
Unvaccinated control	2/10 (20%)	

NT : not tested

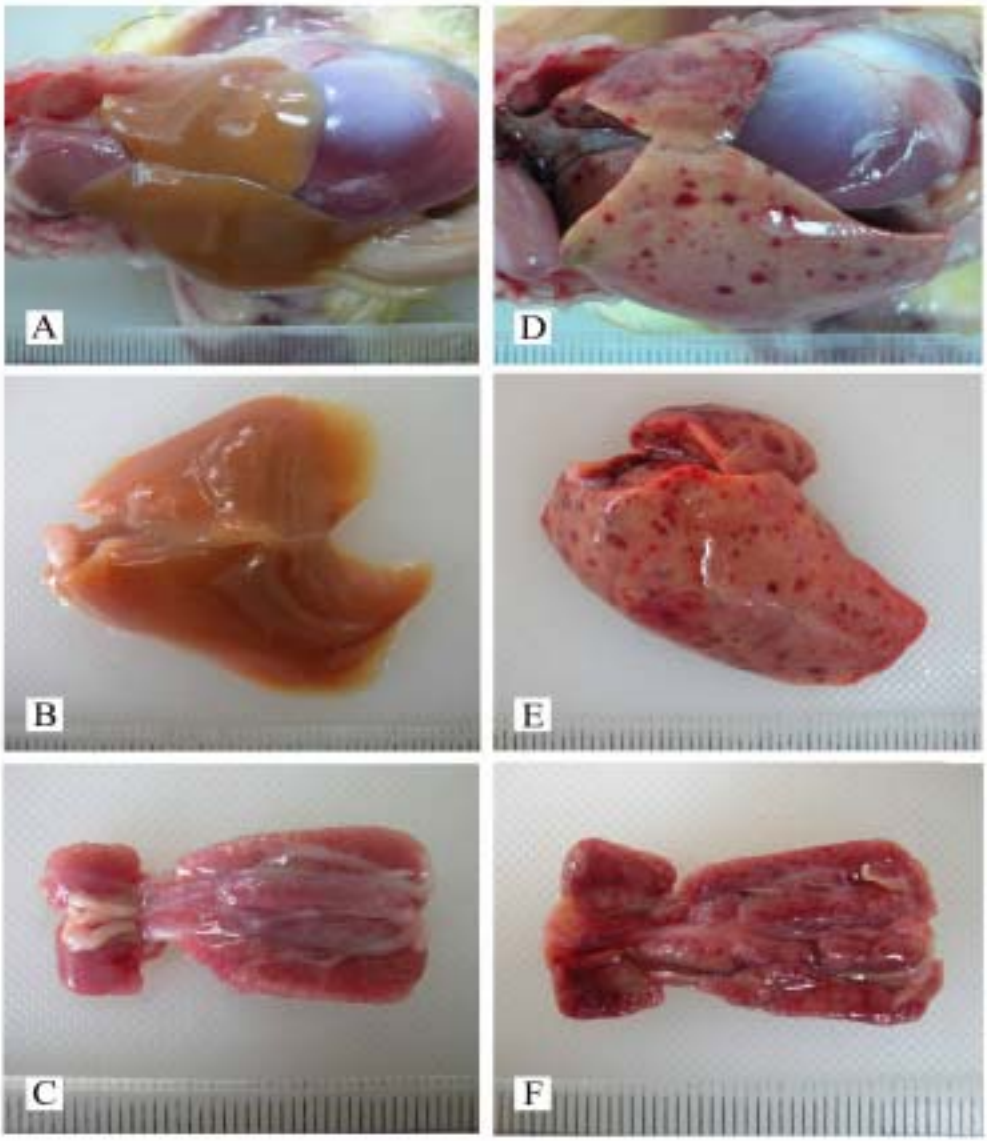

Fig. 24. (A) and (B) Liver of duckling vaccinated $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ 60th passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate. (C) Kidney of duckling vaccinated $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ 60th passage of duck embryo liver cell attenuated

DVH isolate. (D) and (E) Severe multiple ecchymotic hemorrhages in the enlarged liver of duckling in unvaccinated group. (F) Diffuse congestion and of kidney of a duckling in unvaccinated group.

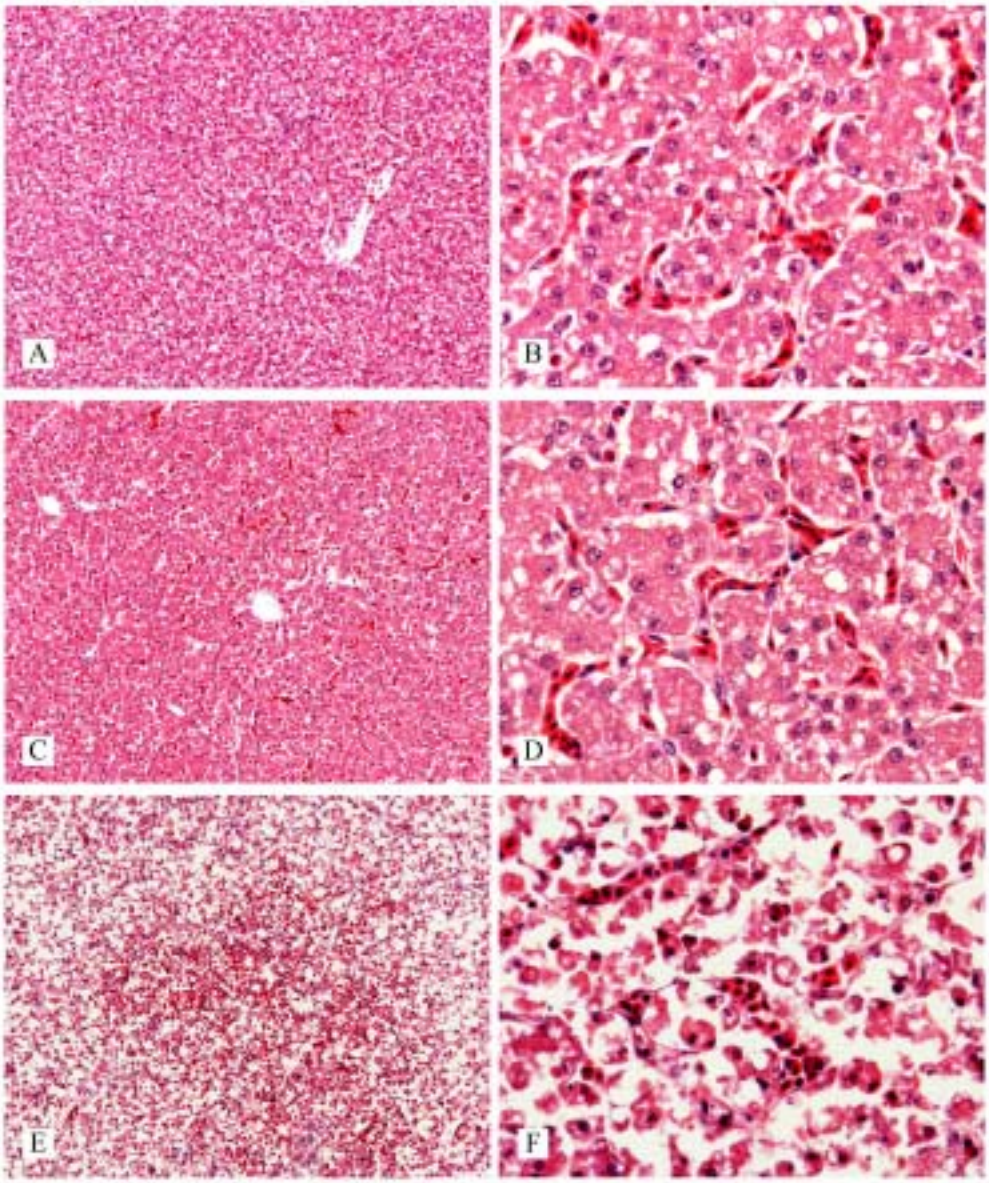

Fig. 25. (A) Liver from duckling vaccinated $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ 60th passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate. (B) Magnification of Fig. 25A. Cytoplasm of parenchymal cells appears clear and vaculoated because of lipid. (C) Liver from duckling vaccinated $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ 40th passage of duck embryo liver cell attenuated commercial vaccine. (D) Magnification of Fig. 25C. (E) Diffuse necrosis and hemorrhage of a duckling liver in unvaccinated group. (F) Magnification of Fig. 25E. Diffuse necrosis and hemorrhage of hepatocytes by membrane rupture, cytoplasmic vacuolization, and chromatin condensation is observed. H&E stain.

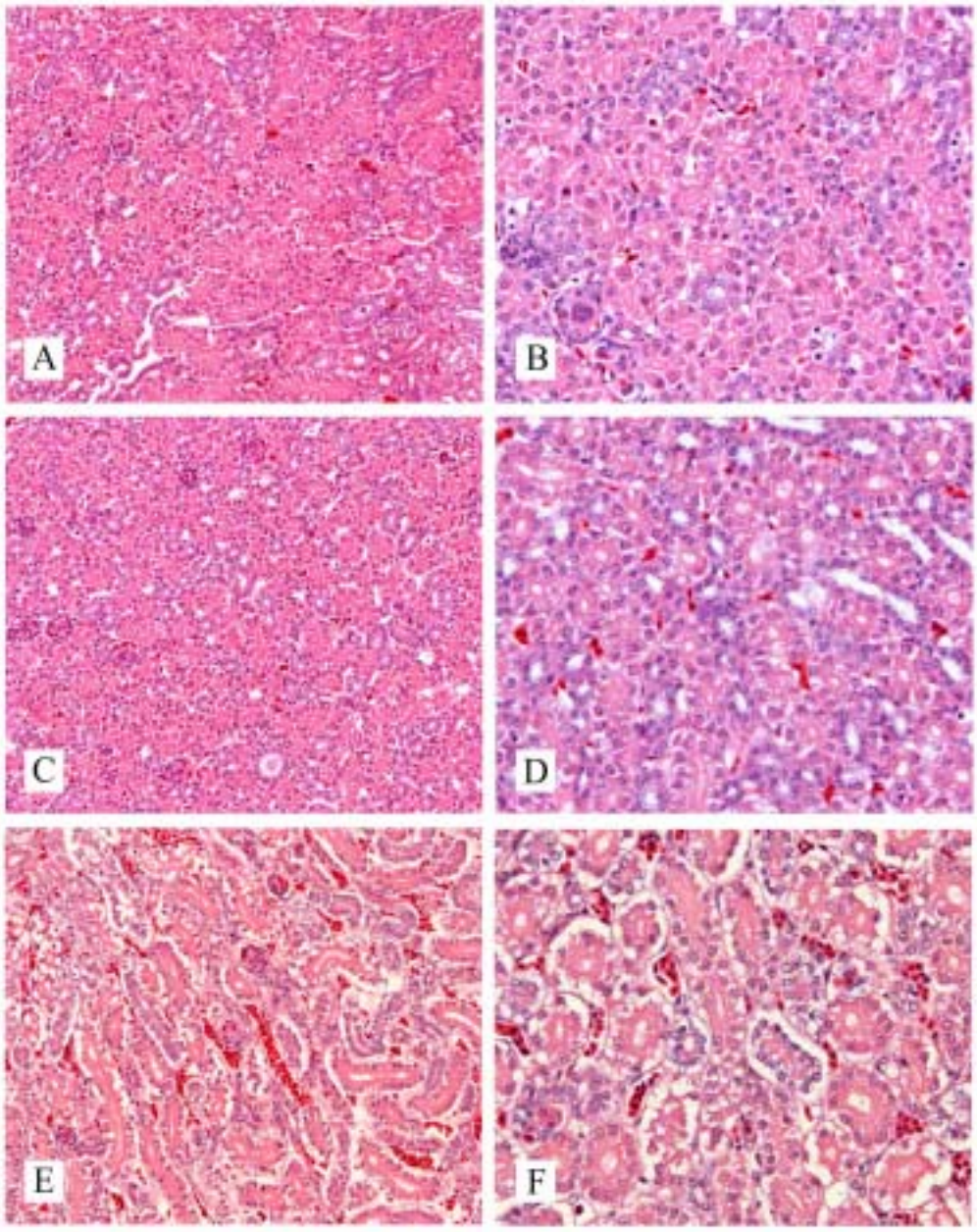

Fig. 26. (A) Kidney from duckling vaccinated $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ 60th passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate. (B) Magnification of Fig. 26A.

(C) Kidney from duckling vaccinated $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ 40th passage of duck embryo liver cell attenuated commercial vaccine. (D) Magnification of Fig. 26C. (E) Severe congestion of tubular epithelium in kidney of ducklings in unvaccinated group. (F) Magnification of Fig. 26E. Multiple degeneration and necrosis with hemorrhage of tubular epithelium in the kidney. H&E stain.

다. 안전성 시험

▣ 선발된 60계대된 시험 백신주와 시판 백신주를 40계대한 바이러스를 1일령 Pekin duck에 각각 1수분, 10수분, 100수분으로 음수 접종한 실험군과, 병원성 국내 분리주를 접종한 실험군 및 무 접종 대조군을 대상으로 2주간의 폐사수를 조사하였다.

▣ 최소 면역량 실험을 참고로 하여 시판 백신주를 40계대한 바이러스와 선발된 60계대된 시험 백신주의 백신 1수분 용량을 $10^{3.0}$ $TCID_{50}$으로 가정하여 안전성 시험을 하였다.

▣ 안전성 시험은 최소 면역량 1일령 Pekin duck에 각각 1수분 ($10^{3.0}$ $TCID_{50}$), 10수분 ($10^{4.0}$ $TCID_{50}$), 100수분 ($10^{5.0}$ $TCID_{50}$)으로 경구 접종한 실험군을 대상으로 10일간의 폐사수를 조사하였다.

▣ 병원성 국내 분리주를 접종한 실험군은 20수 중 14수가 폐사하여 70%의 폐

사율을 나타내었다 (Table 13).

▣ 뿐만 아니라 병원성 국내 분리주를 접종한 실험군은 전형적인 후궁반장 등의 임상증상을 보였고, 부검소견에서도 간 종대와 점상출혈, 신장의 충혈 등을 보였다 (Fig. 27). 또한 병리 조직학적 검사는 세포주에 3대 순화된 바이러스는 병원성을 강하게 가지고 있어 간세포의 출혈과 신장 세뇨관 세포의 괴사가 관찰 되었다 (Fig. 28 and 29).

▣ 하지만 선발된 시험 백신주에서는 1수분(총 9마리 접종하여 9마리 생존) 과 10수분(총 9마리 접종시 9마리 생존) 뿐 아니라 100수분(총 10마리 접종하여 10마리 생존) 접종에서도 전혀 폐사는 나타나지 않아 안정성이 있는 것으로 판단된다 (Table 13).

▣ 시판 백신의 세포 계대 배양한 바이러스 또한 1수분, 10수분, 100수분 모두 폐사가 나타나지 않아 안정성이 높은 것으로 판단된다.

▣ 시험 백신주와 시판 백신 계대주를 접종한 후에도 활발한 움직임을 보였고, 식욕도 아주 왕성하였다. 따라서 백신 접종으로 인한 침울, 식욕감퇴 등의 백신 부작용 또한 관찰 할 수 없었다 (Fig. 27).

▣ 병리 조직학 검사에서 선발된 시험 백신주와 시판 백신 계대주 모두 100수분을 접종한 개체에서도 동일 연령대의 오리의 간과 신장의 소견을 보여 특이적 병변을 관찰 할 수 없었다 (Fig. 28 and 29).

▣ 따라서, 본 연구진에 의해 개발된 시험 백신주는 고용량 투여 시에도 전혀 병원성을 나타내지 않으므로 안정성이 높아 상업용 백신으로서의 개발에 적당

할 것으로 사료된다.

Table 13. Safety evaluation of an attenuated isolate in duckling

Group	No. of the dead/No. of the inoculated (mortality %)	
	Isolate (03-21)	Commercial Vaccine
1 dose	0/9 (0%)	0/10 (0%)
10 dose	0/9 (0%)	0/10 (0%)
100 dose	0/10 (0%)	0/10 (0%)
Unvaccinated control	0/10 (0%)	0/9 (0%)
Adapted isolate of 3rd passage	14/20 (70%)	

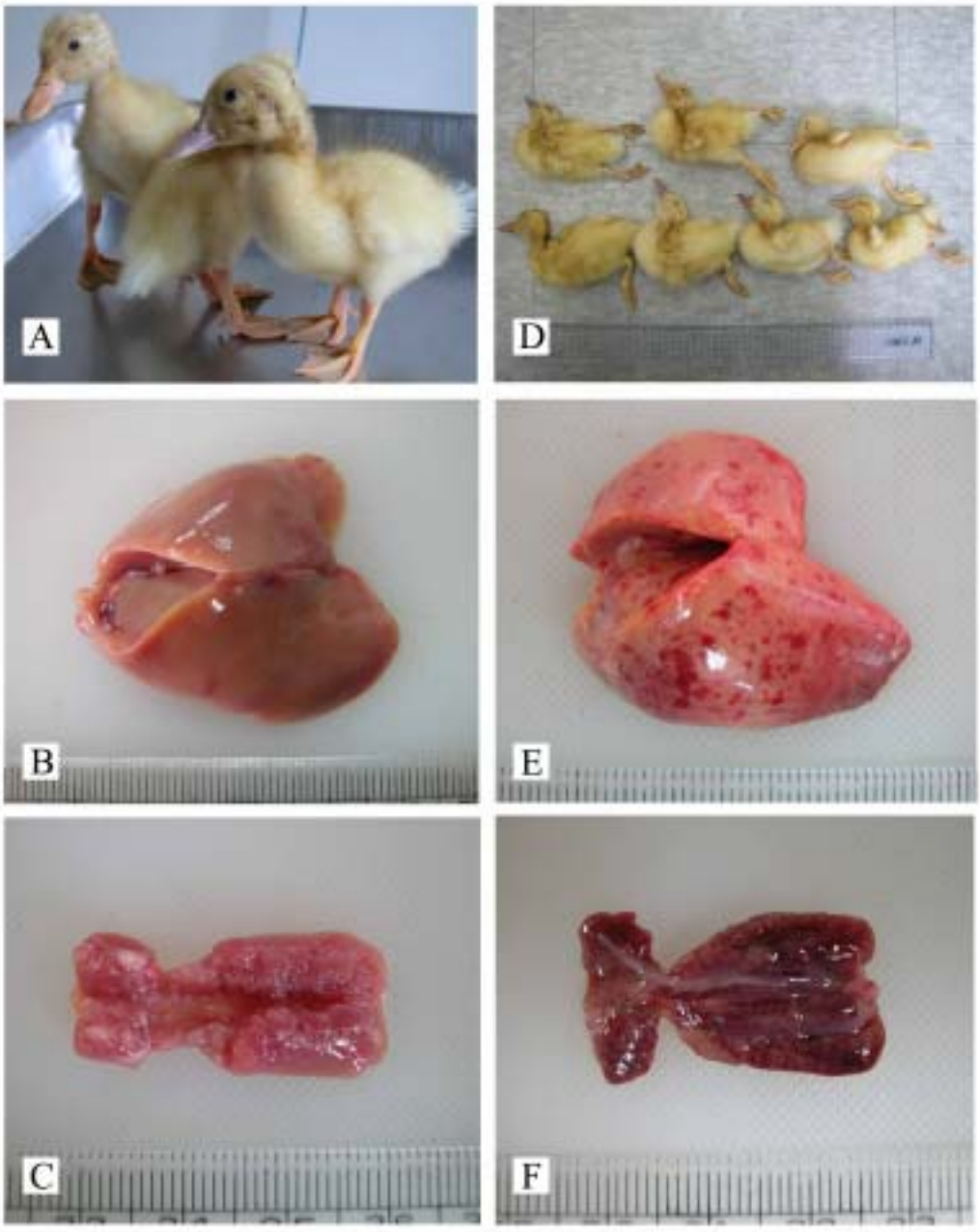

Fig. 27. (A) Healthy Duckling inoculated 100 dose ($10^{5.0}$ $TCID_{50}$) 60th passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate. (B) Gross lesion of Liver is

not observed any hemorrhage and necrosis in duckling inoculated 100 dose ($10^{5.0}$ $TCID_{50}$) 60th passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate after euthanasia. (C) Gross lesion of Kidney is not observed congestion and looks like normal kidney in duckling inoculated 100 dose ($10^{5.0}$ $TCID_{50}$) 60th passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate after euthanasia. (D) Typical opisthotonus of ducklings inoculated 3rd passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate. (E) Multiple ecchymotic hemorrhages in the enlarged liver of duckling inoculated 3rd passage of attenuated DVH isolate. (F) Diffuse congestion of kidney of a duckling inoculated 3rd passage of cell attenuated DVH isolate.

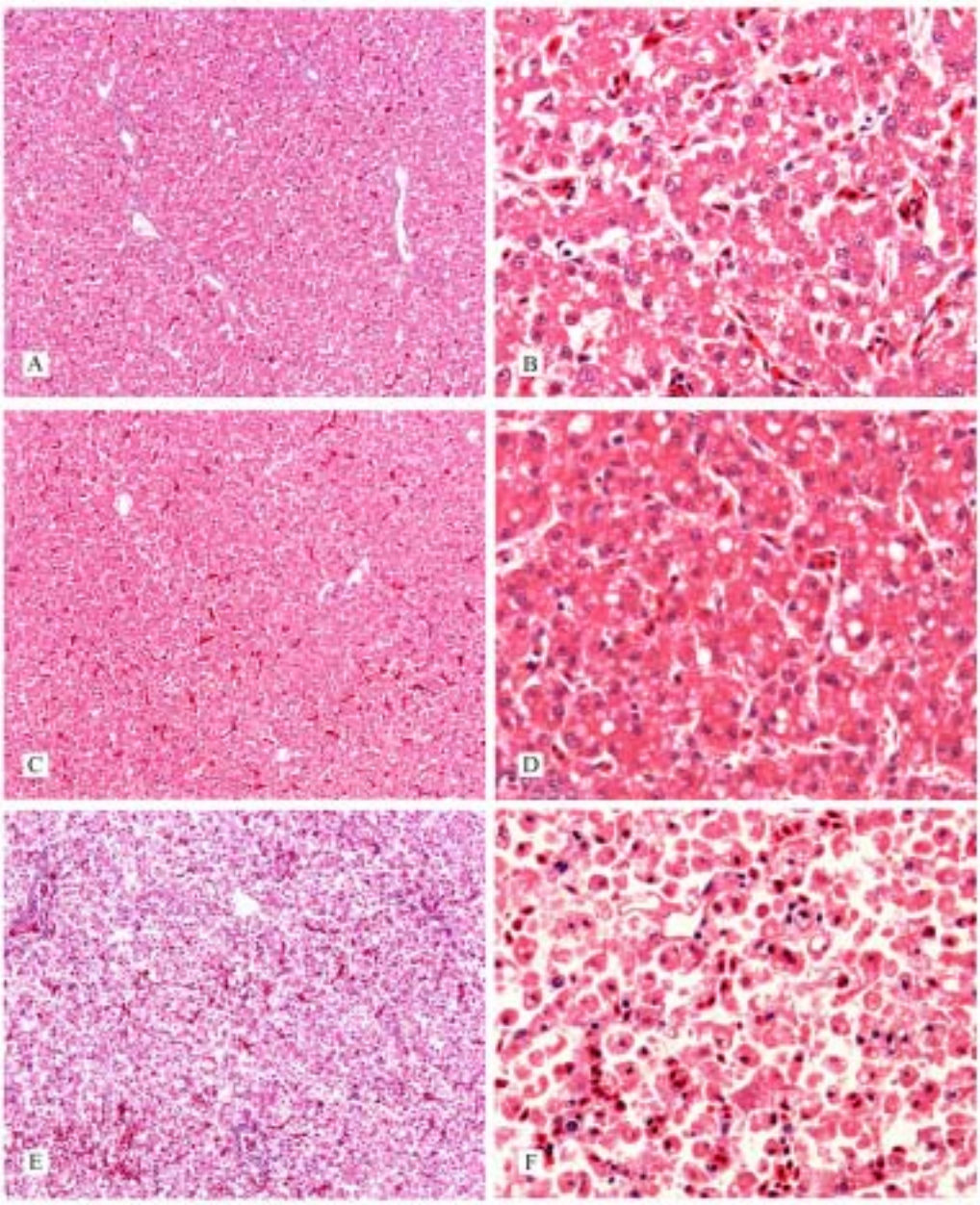

Fig. 28. (A) Histological lesion of liver from duckling inoculated 100 dose ($10^{5.0}$ $TCID_{50}$) 60th passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate.

(B) Magnification of Fig. 28A. (C) Histological lesion of liver from duckling inoculated 100 dose ($10^{4.0}$ $TCID_{50}$) 40th passage of duck embryo liver cell commercial vaccine. (D) Magnification of Fig. 28C. (E) Diffuse necrosis and hemorrhage of a duckling liver of 3rd passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate. (F) Magnification of Fig. 28E. Diffuse necrosis and hemorrhage of hepatocytes by membrane rupture, and chromatin condensation is observed. H&E stain.

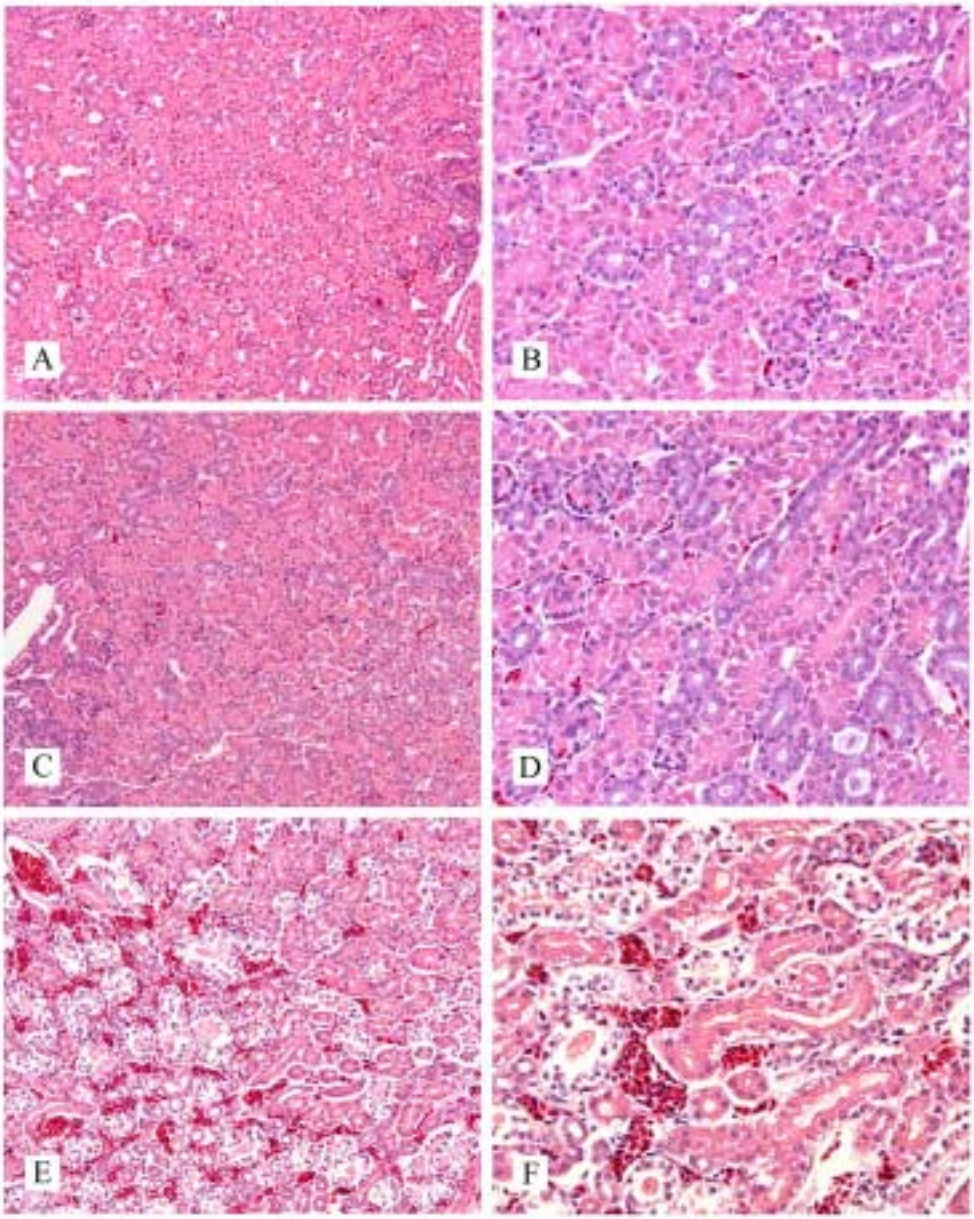

Fig. 29. (A) Histological lesion of kidney from duckling inoculated 100 dose ($10^{5.0}$ $TCID_{50}$) 60th passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate.

(B) Magnification of Fig. 29A. (C) Histological lesion of kidney from duckling inoculated 100 dose ($10^{4.0}$ $TCID_{50}$) 40th passage of duck embryo liver cell commercial vaccine. (D) Magnification of Fig. 29C. (E) Severe congestion of tubular epithelium in kidney of ducklings inoculated 3rd passage of duck embryo liver cell attenuated DVH isolate. (F) Magnification of Fig. 29E. Multiple degeneration and necrosis with hemorrhage of tubular epithelium in the kidney. H&E stain.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연도 세부과제 및 주요내용	2004년도 (1차년도)	2005년 (2차년도)	2006년 (3차년도)
제1세부과제			
▣ 오리 가검물에서 오리 바이러스성 간염의 분리 및 동정			
● 다양한 세포주을 이용한 바이러스 분리			
● 분리한 바이러스의 물리화학적 성상확인			
● 면역형광항체법을 이용한 세포분리주의 동정			
● 전자현미경 기법을 이용한 세포분리주의 동정			
● Duck embryo liver 세포에서의 오리 바이러스성 간염 분리주의 오리에서 병원성 시험			
▣ 세포주의 연속계대 배양을 이용한 오리 바이러스성 간염의 순응주 개발			
● 상용화된 오리 바이러스성 간염 백신의 효능 검사			
● 세포주에 연속계대한 배양한 바이러스의 역가 측정			
● 계대별 세포 순응주의 오리에서의 병원성 시험			
● 상용화된 백신과 세포주에서 계대 배양된 순응주의 계대별 방어능 시험			

▣ 세포주를 이용한 계대된 순응주의 생백신 개발			
● 접종 경로별 방어능 시험			
● 최소 면역량 측정			
● 안전성 시험			
제2세부과제			
▣ 오리 바이러스성 간염의 역학조사			
● 오리 질병의 전국적인 발생현황			
▣ 야외증례에서의 오리 바이러스성 간염의 병리학적 검사			
● 임상 증상 및 육안소견			
● 병리조직학적 소견			
● 면역형광항체법에 의한 오리 바이러스성 간염 바이러스 항원의 분포조사			
● 전자현미경적 소견			

계획: 성과:

제 1 절 제1세부과제 연구목표 달성도

▣ 오리 가검물에서 오리 바이러스성 간염의 분리 및 동정

● 다양한 세포주을 이용한 바이러스 분리 : 오리 바이러스성 간염 의 발생 또는 의심되는 6개 농장으로부터 채취한 간을 유제하여 계태아 섬유아세포 (chicken embryo fibroblast; CEF)와 duck embryo liver (DEL) cell

등 다양한 세포주에 접종함으로써 이용하여 바이러스 분리를 성공적으로 수행하였다. 특히 DEL cell을 이용한 바이러스 분리는 국내에서 처음으로 시도 되었으며, 다른 세포주를 이용하는 것 보다 좋은 성과를 얻을 수 있었다. 이것은 추후 백신 개발에 이용될 바이러스의 대량 생산에도 크게 기여할 것으로 사료 된다.

- 분리한 바이러스의 물리화학적 성상확인 : 분리한 바이러스는 5-iodo-2-deoxyuridine 처리하여 RNA 바이러스임을 확인하였고, chloroform, glycine-HCL buffer, trypsin에 모두 저항성을 가지고 있었다. 또한 온도 저항성을 나타내었다. 이렇게 분리한 바이러스의 물리화학적 성상은 오리 바이러스성 간염 바이러스의 전형적인 성상을 나타내었다.
- 면역형광항체법을 이용한 세포분리주의 동정 : 미국 코넬 대학의 오리질병연구센터에서 구입한 오리 바이러스성 간염에 특이적인 polyclonal antibody와 anti-chicken IgG, IgM, IgA 형광항체를 이용한 결과 6개 분리주 모두 양성 반응을 보여 성공적으로 바이러스가 분리됨을 확인 할 수 있었다. 오리 바이러스성 간염의 특이적 항체를 이용하여 성공적으로 오리 바이러스성 간염 을 동정하였다.
- 전자현미경 기법을 이용한 세포분리주의 동정 : 분리한 바이러스의 세포상층액을 negative stain을 한 결과 30 nm의 피코나 바이러스가 관찰되었고, 오리 바이러스성 간염 의 특이적인 항체를 이용한 결과에서도 30

nm의 피코나 바이러스 응집체가 관찰되었다. 바이러스 입자를 확인함으로써 성공적인 바이러스 분리를 재확인 하였다. 따라서 전자현미경 기법을 이용한 바이러스 동정도 성공적으로 진행되었다.

- DEL cell에서의 오리 바이러스성 간염 분리주의 오리에서 병원성 시험 : 분리한 바이러스를 1일령, 1주령, 2주령 오리에 접종한 결과 표준주를 접종한 것과 유사하게 1주령이하 에서는 100% 폐사, 2주령에서는 50%의 폐사를 나타내었다. 폐사체를 부검 시 간의 점상출혈, 신장의 미만성 창백한 소견은 전형적인 오리 바이러스성 간염 의 소견을 보였다. 병리 조직 검사에서도 세포막 파괴를 인한 간세포의 괴사 및 출혈, 신 세뇨관 상피세포의 다발성의 중등도 변성 내지 괴사가 관찰되었다. 면역형광항체 검사법에서도 간과 신장에서 양성반응을 보였다. 전자현미경 상에서도 괴사된 간세포 세포질 내에서 30 nm 크기의 picornavirus 입자들이 덩어리 혹은 산재되어 있었으며, smooth endoplasmic reticulum 내에서도 picronavirus 입자들을 확인할 수 있었다. 이처럼 국내에서 분리된 오리 바이러스성 간염 은 표준주와 비슷하게 높은 폐사율와 병원성을 을 나타냄을 확인하였다. 이런 병원성 시험은 향후 오리 바이러스성 간염 의 병원성 기병론을 연구하는데 기본 자료가 될 것으로 사료된다.

▣ 세포주의 연속계대 배양을 이용한 오리 바이러스성 간염의 순응주 개발

- 상용화된 오리 바이러스성 간염 백신의 효능 검사 : 역학조사 결과 백신을 한 후에도 지속적으로 오리바이러스성 감염이 발생 하였다. 따라서

백신의 효능을 검증한 결과 현 시판 백신은 공격 접종한 표준주에 대해 85% , 백신한 농장에서 발생한 오리 바이러스성 간염 바이러스 분리주에서 75% 방어율 나타내었다. 본 연구를 통해 시판 백신이 type 1 오리 바이러스성 간염에 대해 어느 정도 방어능이 있기 때문에 국내에서 새로운 type의 바이러스 출현이 아님을 확인하였고, 현 시판 백신 자체의 문제점을 제기하였다.

- 세포주에 연속계대한 배양한 바이러스의 역가 측정 : 시판백신과 국내 분리된 6개 바이러스를 모두 duck embryo liver cell에 연속 계대 배양하였다. 분리주 모두 처음 계대할 때보다 60계대 이후에 약 1000배 정도 역가가 증가하였다. 또한 시판 백신 역가 측정 결과 상당히 낮은 역가를 갖고 있음을 확인하였다. 이것은 시판 백신의 농장에서 오리 바이러스성 간염을 100% 방어 할 수 없는 원인이 낮은 바이러스 역가 때문임을 확인한 것이다. 시판 백신 또한 세포주에 연속 계대하여 바이러스 역가를 높임으로써 문제점을 개선 할 수 있었다.
- 계대별 세포 순응주의 오리에서의 병원성 시험 : 연속계대 배양한 바이러스를 감수성 오리에 접종한 결과, 초대 계대한 것에서는 90%의 폐사가 나왔지만 40계대이상에서는 더 이상 폐사가 나오지 않았다. 즉, 세포주에 순응된 바이러스 주는 duck embryo liver cell에 계대가 증가할수록 바이러스 역가는 높아지지만 감수성 있는 오리에서 병원성은 낮아짐을 확인하였다. 또, 순응된 바이러스에서 40계대 이후에는 전혀 폐사

를 유발하지 않으므로 성공적으로 약독화된 것으로 사료된다. 이렇게 40대 계대 이상의 세포 순응주는 면역원성이나 안전성이 확보되면 백신주로서의 선발 가능성을 보여주고 있다. 시판 백신 또한 연속적으로 계대한 후 접종한 결과, 30계대 이후에는 바이러스 역가도 높아졌으며, 감수성 오리에도 병원성을 나타내지 않으므로 30계대 이후의 것 또한 시판 백신의 개량주로서의 선발 가능성을 시사한다고 할 수 있다.

- 상용화된 백신과 세포주에서 계대 배양된 순응주의 계대별 방어능 시험 : 세포 순응주에서는 40대, 50대, 60대 계대 모두 100% 방어율을 보여 방어능이 시판 백신주에 비해 월등히 뛰어난 결과를 보였다. 시판 백신주는 세포주에 계대하지 않은 경우 20%의 폐사율을 보였지만, 10계대에서는 6%로 낮아졌고, 20계대 이후에는 전혀 폐사율이 보이지 않아 100% 방어능을 보였다. 국내에서 분리한 세포 순응주 세포와 시판 백신 모두 세포 연속 계대배양을 통해 성공적으로 100%방어할 수 있었다.

▣ 세포주를 이용한 계대된 순응주의 생백신 개발

- 접종 경로별 방어능 시험 : 선발된 시험 백신주와 시판 백신 계대주는 본 연구 과제를 통해 음수 접종과 복강 접종 모두 100%의 방어율을 보였다. 따라서 음수 접종으로 충분한 백신 효과를 발휘할 뿐 아니라, 이 방법은 특별한 도구나 기술이 없이도 사용가능하기 때문에 농가에서 쉽고 편리하게 사용할 수 있는 백신접종 방법이 될 것이다. 하지만 오리 바이러스성 간염의 발생이 빠른 농장에서는 음수접종보다 방어능 발휘시간이 더

빠른 복강접종이나 근육접종이 더 효과적으로 사료된다.

- 최소 면역량 측정 : 세포주에 순응된 시험 백신주의 경우 $10^{2.0}$ $TCID_{50}$를 구강으로 접종한 경우 방어율이 90%로 이 역가에서는 100% 방어율을 보이지 않았다. 하지만 이후 $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ 이상에서는 100% 방어율이 발휘되었다. 따라서 100% 방어능이 발휘되는 최소 면역량은 마리당 $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ 인 것으로 추측되었다. 시판 백신 계대주에서도 $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ 이상에서는 100% 방어율이 발휘하여 최소 면역량은 시험 백신주와 비슷한 마리당 $10^{3.0}$ $TCID_{50}$ 인 것으로 사료된다.
- 안전성 시험 : 본 연구진에 의해 개발된 시험 백신주는 1수분과 10수분 뿐 아니라 100수분 접종에서도 전혀 폐사는 일으키지 않아 상당히 안정성이 높은 것으로 나타났다. 또한 백신을 접종한 후에도 활발한 움직임을 보였고, 식욕도 아주 왕성하였다. 따라서 본 연구 과제를 통해 개발된 백신은 안전성이 매우 높고, 좋은 방어 효과를 나타낼 것이라는 결론을 내릴 수 있다.

제 2 절 제2세부과제 연구목표 달성도

▣ 오리 바이러스성 간염의 역학조사

- 오리 질병의 전국적인 발생현황 : 수의과학 검역원과 본 대학의 병성 감정기관, 축산기술 연구소 및 보건 환경연구원에 의뢰된 오리의 가검물은 전국적으로 총 244건이었다. 이중 오리 바이러스성 간염은 2004년에 128건 중 29건 (23%), 2005과 2006년에는 116건 중 25건 (22%)으로 다른 어떤 원인체들에 비해 월등히 높은 감염률을 나타내었다. 따라서 오리 질병 중 오리 바이러스성 감염증 가장 중요한 질병임을 시사할 뿐 아니라, 오리 질병 중 유일하게 바이러스성 원인체 질병이므로 백신 개발의 절실함을 시사한다고 할 수 있다. 이 밖에, 대장균 감염증, 파스튜렐라, 라이메리아 감염증, 살모넬라 감염증등 다양한 세균 감염증과 곰팡이성 질병들에 대한 역학 조사는 실제 농가의 관리와 지도에 바로 응용할 수 있는 자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.
- 세균과의 혼합감염 조사: 본 대학 병성 감정실에 의뢰된 오리 가검물에서는 오리 바이러스성 간염 이외에도 대장균 혹은 라이멜리아 아나티페스티퍼 감염증들이 단독 혹은 오리 바이러스성 간염과 혼합 감염 양상으로 관찰되었다. 또한 오리 바이러스성 간염 백신을 한 농장에서 대량의 폐사가 발생한 경우, 대부분 대장균증 혹은 라이멜리아 아나티페스티퍼 감염증들이 발생하였거나, 아니면 오리 바이러스성 간염과 위의 질병들이 혼합 감

염되어 높은 폐사율이 발생하였다.

- 기생충과의 혼합감염 등: 본 대학 병성 감정실에 의뢰된 오리 가검물에서는 기생충 등의 검사에서 어떠한 원인체도 복합 감염이 관찰되지 않았다.

▣ 야외증례에서의 오리 바이러스성 간염의 병리학적 검사

- 임상 증상 및 육안소견 : 의뢰된 가검물의 특징적인 외부 소견은 후궁반장이었다. 육안적으로 자세히 검사한 결과, 특징적으로 종대 된 간에서 출혈 및 괴사가 관찰 되었고, 일반적으로 신장은 창백하였고, 충혈 되어 있었다. 이것은 오리 바이러스성 간염의 특징적인 소견을 보임을 확인하였다. 육안적 병변들은 잘 기록하고, 장기 및 조직을 채취하여 여러 검사에 이용하였다.
- 병리조직학적 소견 : 병리 해부 검사에서 채취한 조직들을 H&E 염색하여 병리 조직하적 검사를 성공적으로 수행하였다. 그 결과 미만성의 심한 간세포 변성 및 괴사가 특징이었다. 괴사된 세포는 세포질 막이 파괴되었으며, 다수의 공포가 관찰되었다.
- 면역형광항체법에 의한 오리 바이러스성 간염 바이러스 항원의 분포조사 : 특이적 항체를 이용하여 항원분포를 조사한 결과, 야외 증례의 간과 신장에서 미만성 내지 다발성으로 특이적인 양성 반응이 세포질에서 관찰하였다. 따라서 국내 최초로 항체를 이용한 오리 간염 바이러스의 항원 분포를 성공적으로 조사하였다.
- 전자현미경적 소견 : 오리 바이러스성 간염에 감염된 야외 오리의 괴사된

간세포 세포질 내에서 30 nm 크기의 picornavirus 입자들이 덩어리 혹은 산재되어 있었으며, smooth endoplasmic reticulum 내에서도 picronavirus 입자들을 전자현미경 검사를 통해 성공적으로 확인하였다.

제 3 절 관련분야에의 기여도

- 본 연구가 수행되면 기술적 측면에서의 기대효과는 다음과 같이 요약된다.
- 기존의 계태아를 이용한 오리 바이러스성 간염 백신은 계대가 상당히 번거럽고 어려울 뿐 아니라, 낮은 바이러스 역가를 나타내었다. 국내 최초로 시도한 duck embryo liver cell을 이용한 바이러스 분리 및 백신 개발은 훨씬 용이하게 바이러스를 증폭하고, 높은 바이러스 역가를 나타낼 뿐 아니라, 세포주를 이용함으로써 대량의 백신 생산을 가능하게 함으로써 기존의 문제점을 극복할 수 있게 되었다.
- 국내에서 현재 발생되고 있는 바이러스를 분리 및 백신개발을 함으로써 오리 질병 중 가장 무서운 질병인 오리 바이러스성 간염을 예방하여 농가의 소득을 올릴 수 있게 되었다.
- 국내에서 시판되고 있는 백신의 문제점을 알아내고, 개선함으로써 새로운 백신 개발에 들어가는 비용을 절감하였을 뿐 아니라, 향후에도 지속적인 백신의 monitoring을 통해 백신이 나타낼 수 있는 문제점을 극복 할 수 있게

되었다.

- 특히 요즘 많은 신생 또는 재 발생 되는 많은 바이러스 감염증으로 인해 백신 개발 연구의 중요성이 높아지고 있으며, 이와 더불어 백신 연구 인력에 대한 수요가 많이 요구되어지고 있다. 따라서 본 연구를 통해서 백신 전문 기술인력을 양성할 수 있어서 향후 새로운 생물 산업군의 활성화에 기여할 것으로 생각된다.

- 본 연구 과정 중에서 모든 기술의 국산화로 국내 기술의 향상을 할 수 있었다.

- 본 연구를 통해 얻은 자료를 기초로 농가를 관리함으로써 위생적이고 건강한 오리 고기공급으로 식품의 안정성을 제고하여 소비를 획기적으로 늘릴 수 있게 되었다.

- 또한 본 연구에서 획득한 백신개발 노하우는 타 백신 개발 분야에 응용되어 백신 분야의 개발 활성화를 기대할 수 있게 되었다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성 및 타연구에의 응용

▣ 본 연구를 통하여 개발된 시험 백신주은 향후 직접 농장에서 오리 바이러스성 간염이 발생한 농장 또는 백신을 하였음에도 발병한 농장을 선정하여 시험 백신 효능 검사를 실시함으로써 시험 백신주의 실제 야외 농장에서의 백신 효능을 검증하는 연구가 수행되어야 할 것이다.

▣ 본 연구결과에서 보는 것처럼 오리 바이러스성 간염의 주요 표적 장기는 간이며 신장에서도 병변을 유발 하였다. 하지만 정확한 기병론 연구는 되어있지 않은 실정이다. 따라서 국내에서 분리한 오리 바이러스성 간염 바이러스를 감수성 연령의 실험용 오리에 경로별로 접종하여 시간대 별로 바이러스의 전파양식과 각 장기별 항원의 발현 정도를 파악, 바이러스가 배출되는 경로 등 기병론 연구를 수행하여야 할 것으로 사료된다. 이러한 기병론 연구는 향후 바이러스의 전파양식 등을 규명할 수 있을 것이다.

▣ 오리 바이러스성 간염은 전 세계적으로 병리 해부검사와 병리 조직학적검사, 계태아에 접종 방법 등을 제외한 진단법이 개발되어 있지 않은 실정이다. 본 연구진은 특이적인 항체를 이용한 면역형광항체법과 전자현미경 검사법을 이용하여 더욱 정확한 진단을 하였다. 하지만 이러한 진단법은 많은 비용이 들고, 진단하는 기간도 길어지며 전문가가 아니면 정확한 진단을 내릴 수 없

다는 단점이 대두 되었다. 따라서 각 병성감정 기관에서 쉽고 빠르며 효과적인 진단법을 개발하는 연구가 수행되어야 할 것이다.

▣ 본 연구를 통하여 국내에서 최초로 세포주를 이용하여 개발한 시험 백신주를 상용화 백신으로 개발하여 오리 바이러스성 간염 바이러스의 감염 및 전파를 차단하는데 활용할 수 있도록 한다. 기존의 계태아를 이용한 백신 생산의 복잡함, 인력 낭비, 비용 증가 등의 단점을 극복하여 보다 쉽게 대량 확보할 수 있는 백신을 생산할 수 있어, 오리 백신 생산의 수준을 향상시키는데 이바지 할 수 있을 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

▣ Chalmers WSK et al.은 4에서 6주된 오리에서 발생한 오리 바이러스성 간염(Type I)이 Chlamydia psittaci와 함께 발생함으로써 15% 이상의 지속적인 폐사율을 나타내는 상승 작용 가지고 왔다는 보고를 Vet Rec에 개재하였다. 또한 Gough는 influenza 바이러스와 함께 감염 되었을 때 오리바이러스성 감염을 증가시킨다는 보고를 하였다. 따라서 본 연구를 통해 진행된 역학 조사를 통해 오리 바이러스성 간염 과 함께 감염된 다른 원인체들과의 사이에 어떠한 상호작용을 통해 바이러스성 감염에 영향을 줄 수 있는지에 대한 자세한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

▣ 아직까지 오리 바이러스성 간염 에 대한 유전자적 연구는 되어있지 않은 실정이다. 따라서 오리 바이러스성 간염을 진단에는 고전적인 방법 이외에는 정확한 진단을 위한 기법이 개발되어 있지 않다. 하지만 최근 Tseng CH et al.은 아직 논문이 개재되지 않았지만 같은 피코나 바이러스 그룹에 속한 porcine enterovirus type 8을 이용하여 duck picronavirus를 유전자 분석하였다. 이것은 오리 바이러스성 간염의 유전자 분석에 대한 가능성을 제시해주었다고 할 수 있다. 따라서 국내에서도 오리 바이러스성 간염의 유전자 분석을 통한 연구를 수행하여 보다 쉽고 빠르게 진단 내릴 수 있는 기법을 확립할 수 있는 연구

가 진행되어야 할 것이다.

▣ Woolcock PR은 오리 바이러스성 간염의 분리에서 duck embryo fibroblast에서는 높은 역가를 가진 약독화된 조금 자라거나 거의 자라지 않고, duck embryo kidney cell에서는 약독화 된 바이러스나 병원성 바이러스 모두 자라지만 역가가 낮다고 보고하였다. 하지만, duck embryo liver cell에서는 약독화 바이러스나 병원성 바이러스 모두 성공적으로 배양할 수 있었다고 한다. 또한, 세포를 배양할 때 배양액에 넣어주는 fetal bovine serum이 바이러스 증식을 막는다는 것을 밝혀내었다. 따라서 이 연구 결과를 이용함으로써 성공적으로 바이러스를 분리 할 수 있었다.

▣ Asplin FD등은 계태아에서 약독화된 바이러스를 산란전 2-4주령 종오리에 근육 접종으로 백신하여 부화된 새끼 오리에 항체가를 높임으로써 어린 오리의 오리 바이러스성 간염의 감수성을 낮추었다고 보고 하였다. 이는 어린 오리에 직접 백신 하는 것 보다 효과는 낮지만 한번 오리 바이러스성 간염 이 발생한 후 살아남은 오리들이 지속적으로 바이러스를 배출함으로써 생기는 바이러스의 전파를 차단하기 위해서는 종오리에의 오리 바이러스성 간염 백신을 고려하는 것도 좋은 방법이라 사료된다. 하지만, 백신의 시기와 양에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이므로 더 많은 연구가 필요할 것이다.

▣ 본 연구를 통해 다른 Type의 오리 바이러스성 간염 을 찾지는 못했지만, 영국과 미국등과 지속적인 교역이 이루어지고 있으므로, 영국에서 발생 보고된 type II나 미국에서 보고된 type III에 대한 지속적인 monitoring을 해야 할 것

이며, 뿐만아니라 type I의 변이주에 대한 연구 또한 지속적으로 수행하여 만약 발생할 경우 각 type에 맞는 효과적인 백신 개발을 준비해야 할 것이다.

제 7 장 참고문헌

1. Ahmed AAS, Abdin YZ, Hamza S and Saad FE. Effect of experimental duck virus hepatitis infection on som biochemical constituents and enzymes in the serum of white Peking ducklings. Avian Dis 1975; 19:305-310.
2. Asplin, FD. Examination of sera from wildfowl for antibodies against the viruses of duck plague, duck hepatitis and duck influenza. Vet Rec 1970; 87:182-183.
3. Asplin FD. Duck hepatitis virus: Vaccination against two serological types. Vet Res 1965; 77:1529-1530.
4. Asplin FD. Notes on epidemiology and vaccination for virus hepatitis of ducks. Off Int Epizoot Bull 1961; 56:793-800.
5. Asplin FE. An attenuated strain of duck hepatitis virus. Vet Rec 1958; 70:1226-1230.
6. Asplin FD, McLauchlan. Duck virus hepatitis. Vet Rec 1954; 66:456-458.
7. Chalmers WSK, Farmer H, and Woocock PR. Duck hepatitis virus and Chlamydia psittaci outbreak. Vet Rec 1985; 116:223.
8. Chalmers WSK and Woocock PR. The effect of animal sera on duck hepatitis virus. Avian Dis 1984; 13:727-732.
9. Crighton GW and Woolcock PR. Active immunization of ducklings against duck virus hepatitis. Vet Rec 1978; 102:358-361.

10. Davis D. Triple plaque purified strains of duck hepatitis virus and their potential as vaccines. Res Vet Sci 1987; 43:44-48.
11. Davis D and Hannant D. Fractionation of neutralising antibodies in serum of ducklings vaccinated with live duck hepatitis virus vaccine. Res Vet Sci 1987; 43:276-277.
12. Davis D and Woolcock PR. Passage of duck hepatitis virus in cell cultures derived from avian embryos of different species. Res Vet Sci 1986; 41:133-134.
13. Fabricant J, Rickard CG, Levin PP. The pathology of duck virus hepatitis. Avian Dis 1957; 1:256-275.
14. Farmer F, Chalmers WSK and Woolcock PR. The duck fatty kidney syndromes-an aspect of duck viral hepatitis. Avian Pathol 1987; 16:227-236.
15. Fitzgerald JE, Hanson LE, and Simon J. Histopathologic changes induced with duck hepatitis virus in the developing chicken embryo. Avian Dis 1969; 13:147-157.
16. Fitzgerald JE and Hanson LE. Certain properties of a cell-culture-modified duck hepatitis virus. Avian Dis 1966; 10:157-161.
17. Fitzgerald JE, Hanson LE, and Wingard M. Cytopathic effects of duck hepatitis virus in duck embryo kidney cell cultures. Proc Soc Exp Biol

Med 1963; 114:814-816.

18. Friend M and Trainer DO. Experimental duck virus hepatitis in the mallard. Avian Dis 1972; 16:692-699.
19. Gough RE and Spackman D. Studies with inactivated duck virus hepatitis vaccines in breeder ducks. Avian Pathol 1985; 10:471-479.
20. Gough RE, Collins MS, Borland E, et al. Astrovirus-like particles associated with heptitis in ducklings. Vet Record 1984; 114:279.
21. Gough RE, Borland ED, Keymer IF, et al. An outbreak of duck hepatitis type II in commercial ducks. Avian Pathol 1985; 14:227-236
22. Haider SA, Calnek BW. *In vitro* isolation, propagation and characterization of duck hepatitis virus type III. Avian Dis 1979; 23:715-729.
23. Hanson LE, Rhoades HE and Schricker RL. Properties of duck hepatitis virus. Avian Dis 1964; 8:196-202.
24. Hwang J. A chicken-embryo-lethal strain of duck hepatitis virus. Avian Dis 1965; 9:417-422.
25. Hwang J. Duck hepatitis virus in duck embryo fibroblast cultures. Avain Dis 1965; 9:285-290.
26. Hwang J. Duck hepatitis virus in duck embryo liver cell cultures. Avian Dis 1966; 10:508-512.
27. Hwang J. Duck hepatitis virus-neutralization test in chicken embryos. Am

J Vet Res 1969; 30:861-864.

28. Hwang J. Immunizing breeder ducks with chicken embryo-propagated duck hepatitis virus for production of parental immunity in their progenies. Am J Vet Res 1970; 31:805-807.

29. Hwang J. Active immunization against duck hepatitis virus. Am J Vet Res 1972; 33:2539-2544.

30. Hwang J and Dougherty E. Serial passage of duck hepatitis virus in chicken embryos. Avian Dis 1962; 6:435-440.

31. Hwang J and Dougherty. Distribution and concentration of duck hepatitis virus in inoculated ducklings and chicken embryos. Avian Dis 1964; 8:264-268.

32. Jylling B. Duck virus hepatitis. Vet Med 1977; 29(1):23-9.

33. Kaeberle ML, Drake JW, and Hanson LE. Cultivation of duck hepatitis virus in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med 1961; 106:755-757.

34. Kaleta EF. Duck viral hepatitis type I vaccination: monitoring of the immune response with a microneutralization test in Pekin duck embryo kidney cell culture. Avian Pathol 1988; 17:325-332.

35. Korolkov VI, Golubnichi VP, Khandogin PS, and Karvus MA. Aerosol vaccination method for virus hepatitis in ducklings. Vet Nauk Proiz Tr

1979; 17:82-83.

36. Korolkov VI, and Tishchenko GP. Laboratory trials of duck hepatitis vaccine. Tr Beloruss NI Vet Inst 1975; 13:79-83.

37. Luff PR and Hopkins IG. Live duck virus hepatitis vaccination of maternally immune ducklings. Vet Rec 1986; 119:502-503.

38. Mason RA, Taurason NM and Ginn RK. Growth of duck hepatitis virus in chicken embryos and in cell cultures derived from infected embryos. Avian Dis 1972; 16:973-979.

39. Panikar II. Eradication of viral hepatitis of ducklings on farms. Veterinariia 1979; 4:35-36.

40. Park NY. Occurrence of duck virus hepatitis in Korea. Korean J Vet Res 1985; 25:171-174.

41. Prip M, Jylling B, Flensburg J, Bloch B. An outbreak of duck virus enteritis among ducks and geese in Denmark. Vet Med 1983; 35(11):385-396.

42. Richter WR, Rozok EJ, Moize SM. Electron microscopy of virus like particles associate with duck viral hepatitis. Virology 1964; 24:114-116.

43. Sandhu TS, Calnek BW and Zeman L. Pathologic and serologic characterization of a variant of duck hepatitis type I virus. Avian Dis 1992; 36:932-936.

44. Tauraso NM, Coghill GE, Klutch MJ. Properties of the attenuated vaccine strain of duck hepatitis virus. Avian Dis 1969; 13:321-329.

45. Toth TE. Chicken-embryo-adapted duck hepatitis virus growth curve in embryonated chicken eggs. Avian Dis 1969; 13:535-539.

46. Toth TE. Studies of an agent causing mortality among ducklings immune to duck virus hepatitis. Avian Dis 1969; 13:834-846.

47. Tripathy DN and Hanson LE. Impact of oral immunization against duck viral hepatitis in passively immune ducklings. Prevent Vet Med 1969; 4:355-360.

48. Tseng,CH. and Tsai HJ. Sequence analysis of a duck picornavirus isolate indicates that it together with porcine enterovirus type 8 and simian picornavirus type 2 should be assigned a new picornavirus genus. Unpublished (Submitted (17-DEC-2004) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA)

49. Tsimokh PF. Vaccination of ducklings against pasteurellosis and viral hepatitis. Veterinariia 1979; 4:37-38.

50. Woolcock PR. An assay for duck hepatitis virus type I in duck embryo liver cells and a comparison with other assays. Avian Pathol 1986; 15:75-82.

51. Woolcock PR. Duck hepatitis virus type I: studies with inactivated

vaccines in breeder ducks. Avian Pathol 1991; 20:509-522.

52. Woolcock PR, Fabricant J. Duck hepatitis. In *Disease of poultry*, 10th ed. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR and Saif YM, eds, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 1997; 661-673.

53. Woolcock PR and Crighton GW. Duck virus hepatitis: Serial passage of attenuated virus in ducklings. Vet Rec 1979; 105:30-32.

54. Woolcock PR and Grighton GW. Duck virus hepatitis: The effect of attenuation on virus stability in ducklings. Avian Pathol 1981; 10:113-119.

55. 고바라다, 김용환, 김계엽. 오리에서 발생한 바이러스성 간염과 살모넬라균증의 혼합감염. 한국수의병리학회지 2001; 5(2):43-48.

56. 성환우, 김재홍, 송창선, 한명국, 이윤정, 모인필, 김기석. 국내 분리주를 이용한 오리 바이러스성 간염 생백신주의 개발. 대한수의학회지 2000; 40(1):110-116.

57. 성환우, 김재홍. 오리간염바이러스의 분리와 국내 분리주의 약독화. Korean J Vet Res 2000; 40(1):101-109.

58. 강문일, 고홍범. 국내 *Pasteurella anatipestifer* 분리주이ㅡ 오리에 대한 실험병리학적 관찰. 한국수의공중보건학회지 1993; 17(1):51-61.

59. 최정옥, 김경년. 오리 패혈증의 원인 *Pasteurella anatipestifer* 발생. 대한수의학회지 1993; 33:93-99.

60. 김태순, 이정길, 고홍범. 오리 패혈증의 원인 *Pasteurella anatipestifer*의

백신개발에 관한 기초연구. 대한수의학회지. 1992; 32(4,부록):26.

61. 박남용, 김정주,조성만 등. 오리 패혈증의 원인 *Pasteurella anatipestifer* 발생 1985 대한수의학회지(부록) 24.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.