

315021

농생명산업기술개발 사업 제4차 연도 최종 보고서

발간등록번호

11-1543000-002902-01

산  
업  
동  
물  
및  
치  
료  
제  
산  
업  
화  
최  
종  
보  
고  
서  
2019  
농  
림  
축  
산  
식  
품  
부

농  
림  
축  
산  
식  
품  
부  
농  
림  
식  
품  
기  
술  
기  
획  
평  
가  
원

# 산업동물 바이러스성 장염 백신 및 치료제 산업화 최종보고서

2019. 11. 18.

주관연구기관 / 전남대학교 산학협력단  
협동연구기관 / (주)중앙백신연구소  
경북대학교 산학협력단  
한국생명공학연구원  
단국대학교 산학협력단  
바이오텐(주)

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

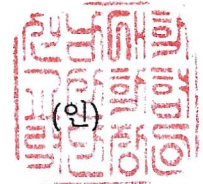
# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농생명산업기술개발사업”(개발기간 : 2015. 08. ~ 2019. 08.)과제의 최종  
보고서로 제출합니다.

2019. 11. 18.

주관연구기관명 : 전남대학교 산학협력단



협동연구기관명 : ㈜중앙백신연구소



협동연구기관명 : 경북대학교 산학협력단



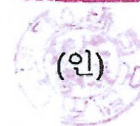
협동연구기관명 : 한국생명공학연구원



협동연구기관명 : 단국대학교 산학협력단



협동연구기관명 : 바이오젠(주)



주관연구책임자 : 조경오

협동연구책임자 : 조경오, 강문일, 김은희, 이창희,  
권형준, 이상인, 김영민

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

## 보고서 요약서

과제고유번호	310521-04	해 당 단 계 연 구 기 간	4년	단 계 구 분	4/4
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	산업동물 바이러스성 장염 백신 및 치료제 산업화			
연구책임자	조경오	해당단계 참여연구원 수	총: 58명 내부: 29명 외부: 29명	해당단계 연구개발비	정부: 667,000천원 민간: 222,334천원 계: 889,334천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 223명 내부: 115명 외부: 108명	총 연구개발비	정부: 3,000,00천원 민간: 1,000,002천원 계: 4,000,002천원
연구기관명 및 소속부서명	전남대학교 산학협력단 (주)중앙백신연구소 경북대학교 산학협력단 한국생명공학연구원 단국대학교 산학협력단 바이오텐(주)			참여기업명 (주)중앙백신연구소 바이오텐(주)	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의  
보안등급 및  
사유

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	14	11									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

- 연구개발 목표 및 성과
  - 본 연구과제의 개발 목표는 산업동물 바이러스성 장염 백신 및 치료제를 개발하는 것임.
- 연구내용 및 결과
  - 소 로타바이러스 및 소 코로나바이러스 각각의 불활화 백신을 개발하였음.
  - 소 로타바이러스 및 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신을 개발 후, 예비 임상시험을 성공적으로 완수하였음.
  - 돼지 로타바이러스, 돼지 유행성 설사 바이러스 각각의 불활화 백신을 개발하였음.
  - 돼지 로타바이러스 및 TGEV 생건조 4종 혼합백신과 PEDV 생건조 백신을 개발하였음.
  - 돼지 유행성 설사 치료제를 개발하였고, 현재 액상 및 분말 타입의 2개를 제품화 하여 판매하고 있음.
- 연구성과 활용실적 및 계획
  - 특허를 산업체에 기술이전 함으로써 매출창출 및 고용창출에 의한 수의동물약품 산업의 활성화가 기대됨.
  - 국내 축산업 발전에 걸림돌이 되고 있는 이러한 바이러스성 장염을 제어할 수 있어 농가소득 증대를 통한 국가 경제에 기여가 기대됨.

보고서 면수  
428쪽



<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 연구과제의 개발 목표는 돼지(변이형 돼지 유행성 설사 바이러스와 돼지 로타바이러스) 및 소(소 코로나바이러스와 소 로타바이러스) 바이러스성 장염을 예방할 수 있는 백신(불활화혼합백신 혹은 생혼합건조백신)과 변이형 돼지 유행성 설사 치료제를 개발하여 산업화 시키는데 있다.</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>산업동물 바이러스성 장염 백신개발을 위해 백신주 (변이형 PEDV, 돼지 로타, 소 코로나 및 소 로타의 계대별 역가, 유전형, 병원성(ED50 포함)의 특성을 분석하였다. PEDV 불활화, 돼지 로타 불활화, 로타+TGEV 불활화혼합백신 및 생건조혼합백신 개발을 위해 농림축산검역본부(검역본부) 국가검정 기준에 따라 안전시험, 효력시험을 수행하였다. 소 코로나 불활화, 소 로타 불활화, 소 코로나+로타 불활화혼합백신 및 생건조혼합백신 개발을 위해 검역본부 국가검정 기준에 따라 안전시험, 효력시험 등을 수행하였다. 현재 소 로타바이러스 및 소 코로나바이러스 각각의 불활화 백신에 대한 전임상 시험이 완료되었다. 하지만, 국내는 물론 전 세계적으로 불활화 백신보다 생건조 혼합백신의 사용이 우세하여 소 로타바이러스 및 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신에 대한 예비 임상시험을 성공적으로 완수되어, 이러한 결과를 바탕으로 농림축산검역본부에 야외 임상시험계획서를 제출하여, 2020년 하반기에 제품으로 출시하려고 한다. 돼지 바이러스성 장염 백신도 현재 돼지 로타바이러스, PEDV에 대한 각각의 불활화 백신에 대한 전임상 시험이 완료되었지만, 국내는 물론 전 세계적으로 생건조 혼합백신의 사용이 우세하다. 이에 돼지 로타바이러스 및 TGEV 생건조 4종 혼합백신과 PEDV 생건조 혼합백신에 대한 예비 임상시험을 성공적으로 완수되어, 이러한 결과를 바탕으로 농림축산검역본부에 야외 임상시험계획서를 제출하여, 2020년 하반기에 제품으로 출시하려고 한다. 돼지 유행성 설사 치료제 개발을 위해 천연물 라이브러리를 확보하고 항PEDV 타깃을 도출하였다. 보유한 라이브러리에서 선발한 단일소재(감초, 강황) 및 복합생물소재(감초추출물/커큐민) 대한 항바이러스 및 항염 효능검증과 예비 안전성 검사를 수행 후, 치료제에 대한 유효성 실험과 생산 성적, 번식성적, 영양소 소화율, 혈액특성, 분내 미생물 영향 등 농장 사양실험을 통해 동물의약품 승인준비를 위한 임상시험 효능결과를 확보하였다. 경제성 분석을 통해 최종적으로 각각의 치료 및 개선효능을 갖는 액상 및 분말 타입의 사료첨가제 제품에 대한 사용매뉴얼 작성하고, 2개 제품에 대하여, 품목허가 취득 후 제품으로 출시하였다.</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>본 연구를 통해 얻어진 산업동물 바이러스성 장염에 대한 백신 및 치료제에 대한 특허를 산업체에 기술이전 함으로써 매출창출 및 고용창출에 의한 수의동물약품 산업의 활성화가 기대된다. 또한 국내 축산업 발전에 걸림돌이 되고 있는 이러한 바이러스성 장염을 제어할 수 있어 농가소득 증대를 통한 국가 경제에 기여가 기대된다.</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>산업동물</p>	<p>바이러스성 장염</p>	<p>백신</p>	<p>치료제</p>	<p>산업화</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Livestock</p>	<p>Viral enteritis</p>	<p>Vaccines</p>	<p>Drugs</p>	<p>Industrialization</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

# 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
1-1. 연구개발 목적 .....	1
1-2. 연구개발의 필요성 .....	2
1-3. 연구개발 범위 .....	104
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	111
1절. 소 로타바이러스 특성 분석 및 백신 전임상 시험 .....	111
2절. 소 코로나바이러스 특성 분석 및 백신 전임상 시험 .....	142
3절. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 전임상 시험	161
4절. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 임상 시험 ..	188
5절. 돼지 로타바이러스 백신주 특성 분석 및 불활화 백신 전임상 시험 .....	195
6절. 돼지 PEDV 백신주 특성 분석 및 불활화 백신 전임상 시험 .....	208
7절. 돼지 로타바이러스 생건조 혼합백신 전임상 시험 .....	221
8절. 돼지 로타바이러스, TGEV 생건조 4종 혼합백신 전임상 시험 .....	239
9절. 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 4종 혼합백신 임상 시험 .....	249
10절. 돼지 PEDV 약독화 생건조 백신주 특성 분석 및 전임상 시험 .....	254
11절. 돼지 PEDV 약독화 생건조 백신 임상 시험 .....	273
12절. 돼지 유행성 설사 치료제 개발 .....	294
13절. 돼지 유행성 설사 치료제 사양시험 .....	347
14절. 돼지 유행성 설사 치료제 산업화 .....	355
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	392
3-1. 목표 .....	392
3-2. 목표 달성 여부 .....	393
3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등) .....	395
4. 연구결과의 활용 계획 .....	400
붙임.    참고문헌 .....	402
[별첨 1] 연구개발보고서 초록 .....	416
[별첨 2] 자체평가의견서 .....	418
I. 연구개발실적 .....	419
II. 연구목표 달성도 .....	421
III. 종합의견 .....	421
IV. 보안성 검토 .....	423
[별첨 3] 연구성과 활용계획서 .....	424

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

○ 산업동물 바이러스성 장염 백신 산업화

- 돼지(변이형 PEDV+로타바이러스) 및 소(코로나바이러스+로타바이러스) 바이러스성 장염을 예방할 수 있는 백신(불활화혼합백신 혹은 생혼합건조백신)을 개발하여 산업화 시키는데 있음.

○ 돼지 유행성 설사(PED) 치료제 산업화

- 국내 천연물 자원 유래 생물소재 및 이의 단일 혹은 복합물질을 이용한 변이형 돼지 PED 치료제를 개발하여 산업화 시키는데 있음.

### 연구개발의 최종목표·연구내용·기대효과



## 1-2. 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

#### 가. 코로나바이러스의 중요성

코로나바이러스는 인간과 가축에 장염, 기관염, 뇌염, 간염 등을 일으키는 무서운 악성 전염병임. 특히 돼지 유행성 설사 바이러스(PED) 및 소 코로나바이러스(BCoV)는 전 세계적으로 발생하여 막대한 경제적 피해를 일으키고 있어 이에 대한 제어대책 개발이 시급함.

#### 1) 코로나바이러스 분류[표 1-1]

니도바이러스목(Nidovirales)							
Arteviridae		코로나바이러스과(Coronaviridae)		Roniviridae		Mesoniviridae	
코로나바이러스아과(Coronavirinae)				Torovirinae			
알파코로나바이러스속 (Alphacoronavirus)		베타코로나바이러스속 (Betacoronavirus)		감마코로나바이러스속 (Gammacoronavirus)		델타코로나바이러스속 (Deltacoronavirus)	
바이러스 <sup>1</sup>	숙주	바이러스 <sup>1</sup>	숙주	바이러스 <sup>1</sup>	숙주	바이러스 <sup>1</sup>	숙주
PEDV	Pig	HCoV OC43	Human	IBV	Chicken	PDCoV	Pig
TGEV	Pig	<b>BCoV</b>	Cow	IBV-partridge	Partridge	MunCoV	Munia
PRCV	Pig	ECoV	Horse	TCoV	Turkey	NHCoV	Night heron
FeCoV	Cat	PHEV	Pig	IBV-peafowl	Peafowl	MRCoV	Magpie robin
FIPV	Cat	MHV	Mouse			CMCoV	Common moorhen
CCoV	Dog	HCoV HKU1	Human			SpCoV	Sparrow
HCoV 229E	Human	SARS-CoV	Human			BuCoV	Bulbul
HCoV NL63	Human	MERS-CoV	Human			ThCoV	Thrush
						WECoV	White-eye
						WiCoV	Wigeon

<sup>1</sup>PEDV: 돼지 유행성 설사 바이러스; TGEV: 돼지 전염성 위장염 바이러스; PRCV: 돼지 호흡기 코로나바이러스; FeCoV: 고양이 코로나바이러스; FIPV: 고양이 전염성 복막염 바이러스; CCoV: 개 코로나바이러스; HCoV: 인간 코로나바이러스; BCoV: 소 코로나바이러스; ECoV: 말 코로나바이러스; PHEV: 돼지 혈구응집성 뇌척수염 바이러스; MHV: 쥐 간염 바이러스; SARS-CoV: 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스; MERS-CoV: 중등 호흡기 증후군 코로나바이러스; IBV: 전염성 기관지염 바이러스; TCoV: 칠면조 코로나바이러스; IBV-partridge: 자고새 IBV; IBV-peafowl: 공작 IBV; PDCoV: 돼지 델타코로나바이러스; MunCoV: 십자매 델타코로나바이러스; NHCoV: 해오라기 델타코로나바이러스; MRCoV: 지빠귀 델타코로나바이러스; CMCoV: 쇠물닭 델타코로나바이러스; SpCoV: 참새 델타코로나바이러스; BuCoV: 불불새 델타코로나바이러스; ThCoV: 개똥지빠귀 델타코로나바이러스; WECoV: 동박새 델타코로나바이러스; WiCoV: 흥머리오리 델타코로나바이러스.

- 코로나바이러스는 니도바이러스목(*Nidovirales*)의 코로나바이러스과(*Coronaviridae*) 내의 코로나바이러스아과(*Coronavirinae*)에 속해 있음.
- 코로나바이러스아과의 분류(Adams and Carstens, 2012; Perlman and Netland, 2009)
  - 알파코로나바이러스속(*Alphacoronavirus*): PEDV, TGEV, PRCV, 고양이 전염성 복막염 바이러스 등.
  - 베타코로나바이러스속(*Betacoronavirus*): BCoV, SARS-CoV, MERS-CoV, 돼지 혈구응집성 뇌척수염 바이러스 등.
  - 감마코로나바이러스속(*Gammacoronavirus*): 닭 전염성 기관지염 바이러스, 칠면조 코로나바이러스 등.
  - 델타코로나바이러스속(*Deltacoronavirus*): 돼지 델타코로나바이러스, 개똥지빠귀 코로나바이러스, 참새 코로나바이러스 등

## 2) 코로나바이러스에 의해 발생하는 주요 질병 요약

### ■ 사 랫

- 인간 코로나바이러스(human coronavirus, HCoV)는 지난 세기동안 단지 가벼운 감기를 일으키는 원인체로서 그리 주목을 받지 못했음(Weiss and Navas-Martin, 2005).
- 인간 사회에서 코로나바이러스가 크게 주목을 받게 된 것은 **SARS-CoV**가 출현한 후 임.
- 사스는 중국에서 처음 발병된 후, 아시아 많은 나라를 포함하여 미국과 캐나다까지 전파되었음(Poon et al., 2004).
- 미국 질병관리국 및 세계보건기구에 따르면 8000명 이상의 사스 환자가 전 세계에서 발생되었고, 이 중 800명 이상이 사망함(Weiss and Navas-Martin, 2005).
- 2012년 사스와 유사한 질병인 중동 호흡기 증후군 (Middle East respiratory syndrome; MERS, 메르스)가 중동에서 발생하였음(Zaki et al., 2013).
- 세계보건기구에 의하면 메르스에 의해 2014년 7월 14일까지 834명의 환자가 발병하였고, 이 중 288명(34.5%)이 사망하였다고 함.
- 사스와 메르스 발생의 근원으로는 둘 다 모두 박쥐인 것으로 추정되고 있음(Memish et al., 2013; Yang et al., 2014).

### ■ 돼지

- 돼지에 질병을 일으키는 코로나바이러스로는 알파코로나바이러스속의 PEDV, TGEV와 PRCV, 베타코로나바이러스속의 돼지 혈구응집성 뇌척수염 바이러스, 델타코로나바이러스속의 돼지 델타코로나바이러스가 있음.
- 이 중 돼지에서 심각한 문제를 일으키고 있는 것은 PED이며, 그 외 돼지 코로나바이

러스는 국내는 물론 전 세계적으로 크게 문제되지 않고 있음(Miyazaki et al., 2010; Quiroga et al., 2008; Rho et al., 2011; Saif et al., 2012; Yaeger et al., 2002).

#### ■ 소

- 베타코로나바이러스속의 BCoV는 송아지 설사의 원인체로 규명되었음(Bridger et al., 1978; Clark, 1993; Langpap et al., 1979)
- BCoV는 임상형에 따라 송아지 설사형(type of calf diarrhea), 동절기 적리형(type of winter dysentery), 비육우 호흡기 감염형(type of respiratory infections) 및 온절기 적리형(type of warmer dysentery)로 구분됨(Boileau and Kapil, 2010; Park et al., 2006; Saif, 2010).

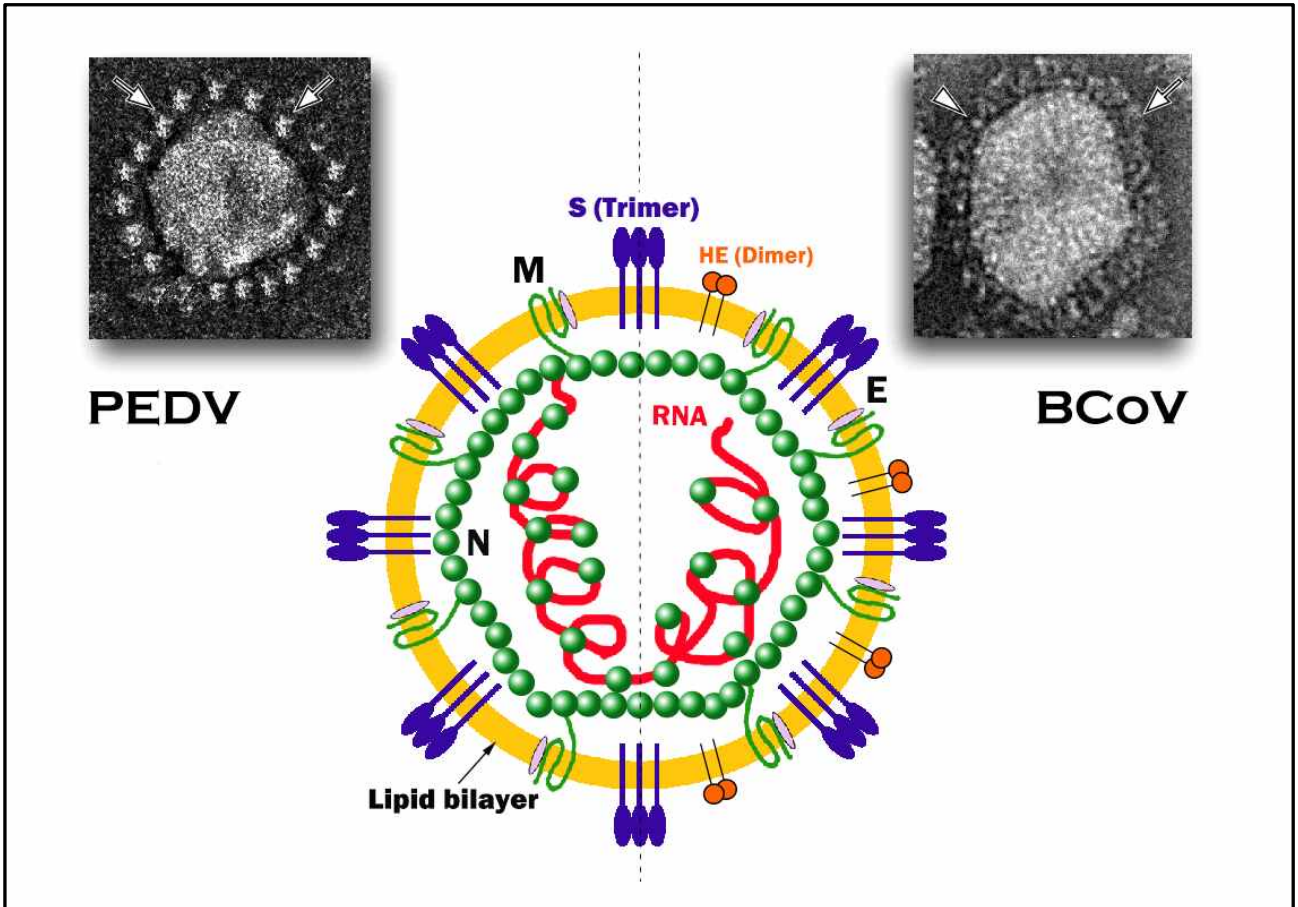
#### ■ 조류

- 조류의 대표적인 코로나바이러스 감염증으로는 감마코로나바이러스속의 우리나라에서 발생하고 있는 닭 전염성 기관지염과 설사를 일으키는 칠면조 코로나바이러스가 있음(Jackwood and de Wit, 2013).
- 델타코로나바이러스속의 개똥지빠귀 코로나바이러스, 참새 코로나바이러스 등 다양한 조류 코로나바이러스가 다양한 조류에서 검출되었지만 그 병원성에 대해서는 알려져 있지 않음(Woo et al., 2012).

### 3) 코로나바이러스 입자 구조[그림 1-1]

#### ■ 바이러스 입자 구조

- PEDV를 포함한 코로나바이러스아과의 바이러스들은 80-220 nm 크기의 원형에서 타원형 구조를 가지고 있음(Weiss and Navas-Martin, 2005).
- 코로나바이러스는 세포막에서 유래한 지질 이중층의 외막에 20 nm 길이의 곤봉모양(club-shaped)의 돌출물인 spike 단백질이 붙어 있음.
- BCoV가 속해 있는 베타코로나바이러스속의 많은 바이러스들은 외막에 spike 단백질 외에도 5 nm 길이의 혈구응집-에스테라아제(hemagglutinin- esterase; HE)가 있음.
- 코로나바이러스 외막에는 소수성으로 외막을 3번 감싸는 transmembrane protein인 막 당단백질(membrane glycoprotein), 외막 단백질(envelop protein)이 있음.
- 외막 내에는 바이러스의 유전체를 나선상으로 둘러싸고 있는 nucleocapsid protein이 있음(Lai et al., 2007).
- 또한 최소한 2종의 코로나바이러스(TGEV, 쥐 간염 바이러스)는 나선상의 nucleocapsid protein을 둘러싸고 있는 원형에서 정이십면체의 capsid가 있음.



[그림 1-1] 코로나바이러스 입자 모양 및 모식도. (위 왼쪽 판넬) 코로나바이러스는 80 nm - 220 nm의 구형에서 타원형의 바이러스로서 외막에 20 nm 크기의 spike 단백질(화살표)이 붙어 있음. [오른쪽 위 사진은 신청자가 분리한 국내 소 코로나바이러스\(BCoV\)의 전자 현미경 사진](#). 베타코로나바이러스의 대부분은 외막에 spike 단백질(화살표) 외에도 5 nm 크기의 짧은 spike 단백질인 hemagglutinin-esterase (HE) 단백질(화살표 머리)이 붙어 있음. [왼쪽 위 사진은 신청자가 국내분리 돼지 유행성 설사 바이러스\(PEDV\) 전자현미경 사진](#). 아래 중앙은 코로나바이러스 모식도임. 모식도의 왼쪽은 일반적인 코로나바이러스이며, 모식도 오른쪽은 HE 단백질이 외막에 붙어 있는 대부분의 베타코로나바이러스임. 세포막의 지질 이중층(lipid bilayer)에서 유래한 바이러스 외막에는 spike 단백질 (S), HE 단백질, 막 단백질(M), 외막 단백질(E)이 존재함. 최소한 [돼지 유행성 전염성 위장염 바이러스](#) 및 쥐 간염 바이러스는 외막 내부에 정이십면체 혹은 구형의 캡시드 층이 있음. 일반적으로 외막 내에는 뉴클레오캡시드 단백질(N)이 바이러스 유전체를 나선상으로 둘러싸고 있음.



#### 4) 코로나바이러스 유전체 구조[그림 1-2]

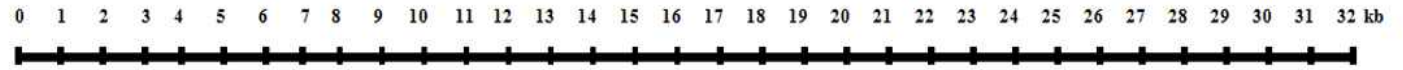
##### ■ 바이러스 유전체 구조

- 코로나바이러스는 지금까지 알려진 RNA 바이러스 중에서 가장 긴 유전체[26.4 kb (개똥지빠귀 코로나바이러스) - 31.7 kb (흰 돌고래 코로나바이러스)]를 가지고 있음 (Lai et al., 2007; Woo et al., 2007, 2009).
- 코로나바이러스 유전체의 구조는 5'-leader sequence - untranslated region - ORF1ab - spike gene - envelope gene- membrane gene - nucleocapsid gene-untranslated region - 3' 순서로 구성되어 있음.
- 이러한 각 유전자 사이에는 다양한 수의 부수적인 유전자가 있음(Woo et al., 2010).
- 특히 유전체 3' 말단에 있는 200-500개 핵산으로 구성된 untranslated region에는 전사 조절 염기서열(transcription regulatory sequence) 부위가 있어 RNA 복제 시 copy-choice 기전을 통해 유전체 가닥을 교환하여 바이러스 재조합이 일어나게 함 (Lai et al., 1985).

##### ■ 바이러스 주요 단백질의 기능

- **ORF1ab:** 코로나바이러스의 ORF1ab는 전체 유전체의 2/3를 차지하며, 바이러스 증식에 관련된 비구조단백질인 바이러스 효소를 가지고 있음(Lai et al., 2007).
- **Spike 단백질:** 코로나바이러스 spike 단백질은 세포수용체와 결합, 세포 내 이동, 세포와 세포 간 전파에 중요함. 특히 중화항원으로 작용하기 때문에, spike 단백질에 변이가 발생한 바이러스는 기존 백신에 의해 방어가 되지 않을 수 있음(Weiss and Navas-Martin, 2005; Woo et al., 2010).
- **혈구응집-에스테라아제 단백질:** BCoV를 포함한 베타코로나바이러스속의 많은 바이러스는 혈구응집-에스테라아제 단백질 유전자를 가지고 있음. 하지만 이 단백질은 바이러스의 생활환에 필수적이지 않을 것이라는 것이 일반적임(Woo et al., 2010).
- **막 단백질:** 막 단백질은 바이러스 외막의 형성뿐만 아니라 바이러스와 숙주의 상호작용에 중요하다고 함. 예를 들어 TGEV와 쥐 간염 바이러스의 막 단백질의 당화(glycosylation)는 인터페론을 유도하며, 막 단백질에서 당기를 제거하면 이러한 반응이 없어짐(de Haan et al., 2003; Laude et al., 1992)
- **Nucleocapsid(N) 단백질:** N 단백질은 바이러스의 구조단백질로서 바이러스 유전체의 전사 및 기병론에 중요한 역할을 함(Ding et al., 1997; Ning et al., 1999; Schelle et al., 2005; Weiss and Navas-Martin, 2010). 특히 N 단백질은 감염 세포에서 세포성 면역을 유도한다고 함.



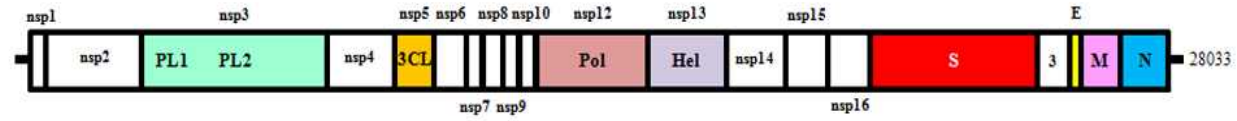


Genera

Species

*Alphacoronavirus*

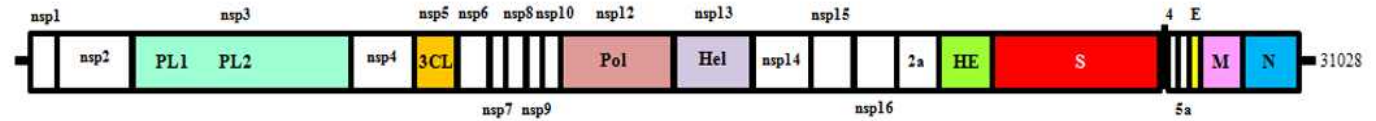
PEDV



*Betacoronavirus*

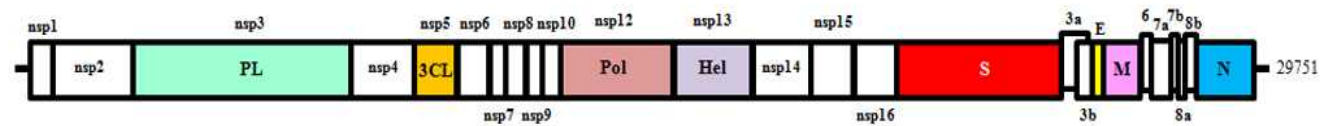
Subgroup A

BCoV



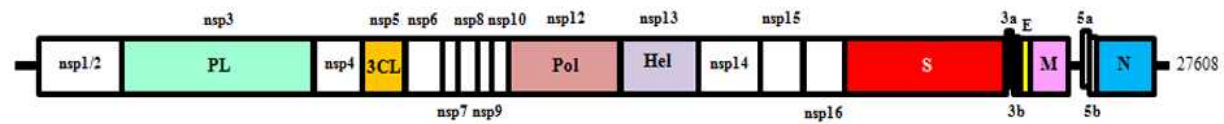
Subgroup B

SARSr-CoV



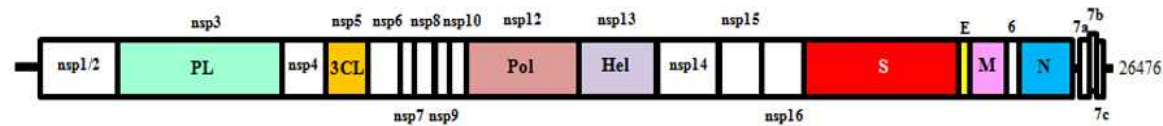
*Gammacoronavirus*

IBV



*Deltacoronavirus*

BuCoV

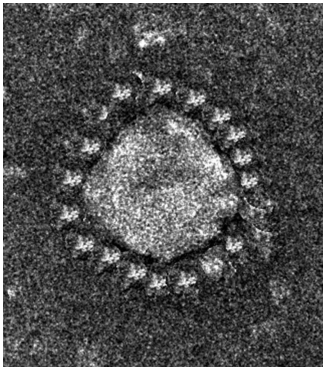




[그림 1-2] 코로나바이러스아과 내의 4개 속(알파-, 베타-, 감마- 및 델타코로나바이러스) 바이러스들의 유전체 구조. 돼지 유행성 설사 바이러스(PEDV, NC\_003436), 소 코로나바이러스(BCoV, NC\_003045), 사스 코로나바이러스(SARS-CoV, NC\_004718), 닭 전염성 기관지염 바이러스(IBV, NC\_001451) 및 불불새 코로나바이러스(BuCoV, FJ376620)는 각 바이러스속의 대표주로 보여주고 있음. PL1, 파파인 유사 단백분해효소1; PL2, 파파인 유사 단백분해효소2; PL, 파파인 유사 단백분해효소; 3CL, 키모트립신 유사 단백분해효소; Pol, RNA 의존성 RNA 중합효소; Hel, 헬리카제; HE, 혈구응집-에스테라아제; S, spike; E, 외막; M, 막; N, 뉴클레오캡시드.

## 나. PED 백신의 문제점

돼지 유행성 설사 바이러스(PEDV)는 포유자돈에서 모돈에 이르기까지 전 연령에 걸쳐 심한 설사를 일으키며, 특히 포유자돈은 50%~100%에 이르는 폐사율을 일으키는 악성의 바이러스성 전염병 원인체임. 최근 기존의 백신에 의해 방어율이 매우 낮은 변이형 PEDV가 국내는 물론 아시아, 북남미의 많은 나라에서 창궐하여 막대한 경제적 피해가 발생하고 있음. 따라서 이 질병으로 인한 양돈산업의 경제적 피해를 막을 수 있는 효과적인 백신개발이 시급히 개발되어야 함.

### 1) PEDV 원인체, 임상증상 및 주요한 병리소견[그림 1-3]

돼지 유행성 설사 바이러스 감염증		
병원체	임상증상	육안소견
 <ul style="list-style-type: none"> <li>알파코로나바이러스</li> <li>Spike가 있는 80 -220 nm 바이러스</li> </ul>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>전 돈군에 걸쳐 수양성 설사</li> <li>포유자돈 50%-100% 폐사율</li> </ul>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>소장 점막의 위축</li> <li>대장 내 설사분변</li> <li>항문 주위 설사분변 오염</li> </ul>
조직학적 소견		
 <ul style="list-style-type: none"> <li>소장 용모 상피세포 탈락을 동반한 용모의 심한 위축 및 융합</li> <li>대장 점막 상피세포의 경미한 탈락</li> </ul>		

[그림 1-3] 돼지 유행성 설사 바이러스 원인체, 임상증상 및 병리소견.

## ■ PEDV 원인체

- PEDV는 알파코로나바이러스속의 바이러스로서 오직 한 개의 혈청형만 존재함.

## ■ PEDV 임상증상

- 백신을 하지 않은 돈군에서는 포유자돈에서 모돈에 이르기까지 전 연령에 걸쳐 심한 설사가 발생하며, 특히 포유자돈에서는 50%-100%에 이르는 폐사가 발생함.
- 감염된 돼지는 설사, 구토, 식욕부진 등의 임상증상을 보임.

## ■ PED 병리소견

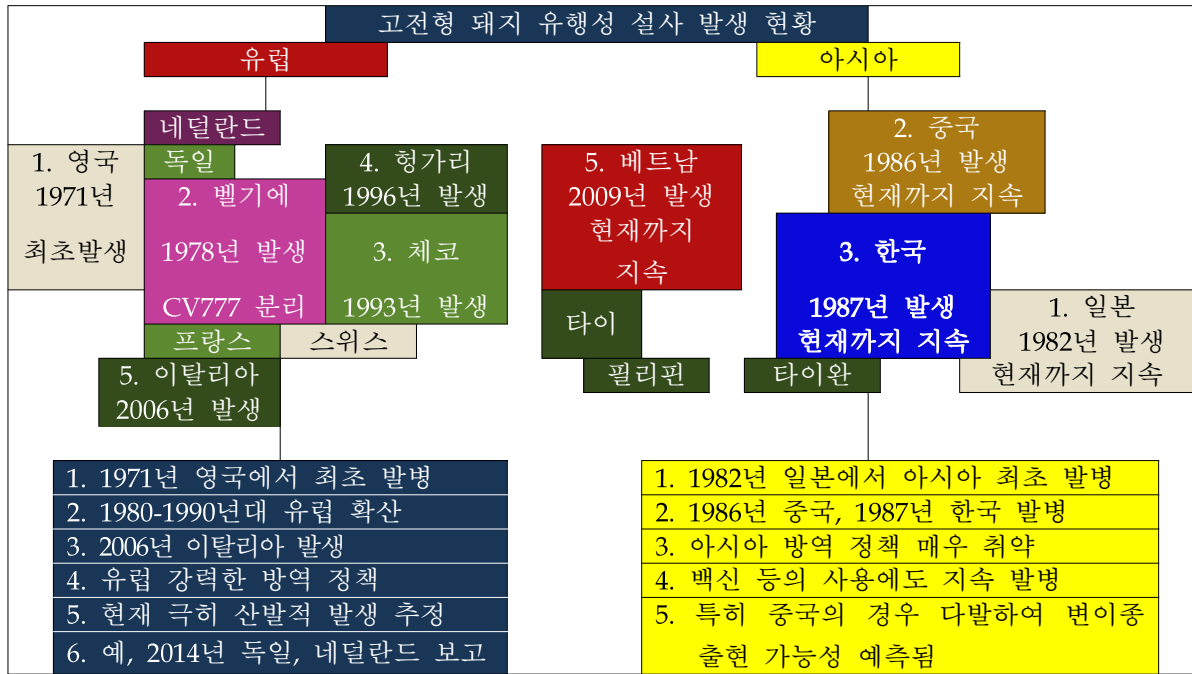
- 육안적으로 감염된 자돈의 소장 점막은 심하게 얇아져 있음.
- 수양성 장 내용물로 채워져 있으며, 항문 주위는 설사분변으로 오염되어 있음.
- 병리조직학적으로, 소장 용모 상피세포는 탈락을 보이고 이로 인해 용모의 심한 위축 및 융합, 음와 상피세포의 심한 증식이 관찰됨. 또한 감염 초기에는 용모 상피세포의 융합에 의한 합포체 세포(syncytium)가 발생함. 대장 점막의 상피세포 탈락이 있음.
- 이러한 소장 및 대장 점막상피세포에서 PEDV 항원이 검출됨.

## 2) PEDV 발생경향

### ■ 고전형 PED 발생경향[그림 1-4]

#### -유럽 대륙-

- 1971년 영국의 육성돈과 비육돈에서 PED가 처음 확인된 후(Wood, 1977), 1978년 벨기에에서도 검출되었고, PEDV CV777가 분리됨(Pensaert and de Bouck, 1978).
- 이 후 1980년대 및 1990년대에는 벨기에, 영국, 독일, 프랑스, 네덜란드, 스위스, 체코, 헝가리 등 유럽의 많은 나라에서 유행하였지만, 경제적 손실은 그리 크지 않았음 (Nagy et al., 1996; Song and Park, 2012; Van Reeth and Pensaert, 1994).
- 이탈리아에서는 2005년 5월부터 2006년 6월까지 전 돈군에 걸쳐 발생한 PED가 보고 되었음(Martelli et al., 2008).
- 현재 아메리카 대륙 및 아시아 대륙에서 변이형 PED 강독주가 창궐하여 유럽, 오세아니아 대륙 등에서는 변이형 PEDV 유입을 차단하려고 하고 있음.
- 이러한 차원에서 독일 및 네덜란드에서 PED의 발생을 역학조사한 결과 육성돈 및 비육돈에서 고전형 PEDV만 최근 검출되었음(Ter Beek, 2015a).
- 유럽의 축산선진국은 각종 질병에 대한 강력한 방역정책을 수행한 결과, PED를 비롯하여 많은 전염병의 발생이 억제되고 있는 것으로 추정됨.
- PED는 TGE와 달리 국제수역사무국에 보고의무가 없어, 유럽의 발병보고는 없지만, 아마도 독일, 네덜란드처럼 고전형 PED는 산발적으로 발생하고 있을 것으로 추정됨.



[그림 1-4] 고전형 돼지 유행성 설사 전 세계 발생 현황(Song and Park, 2012).

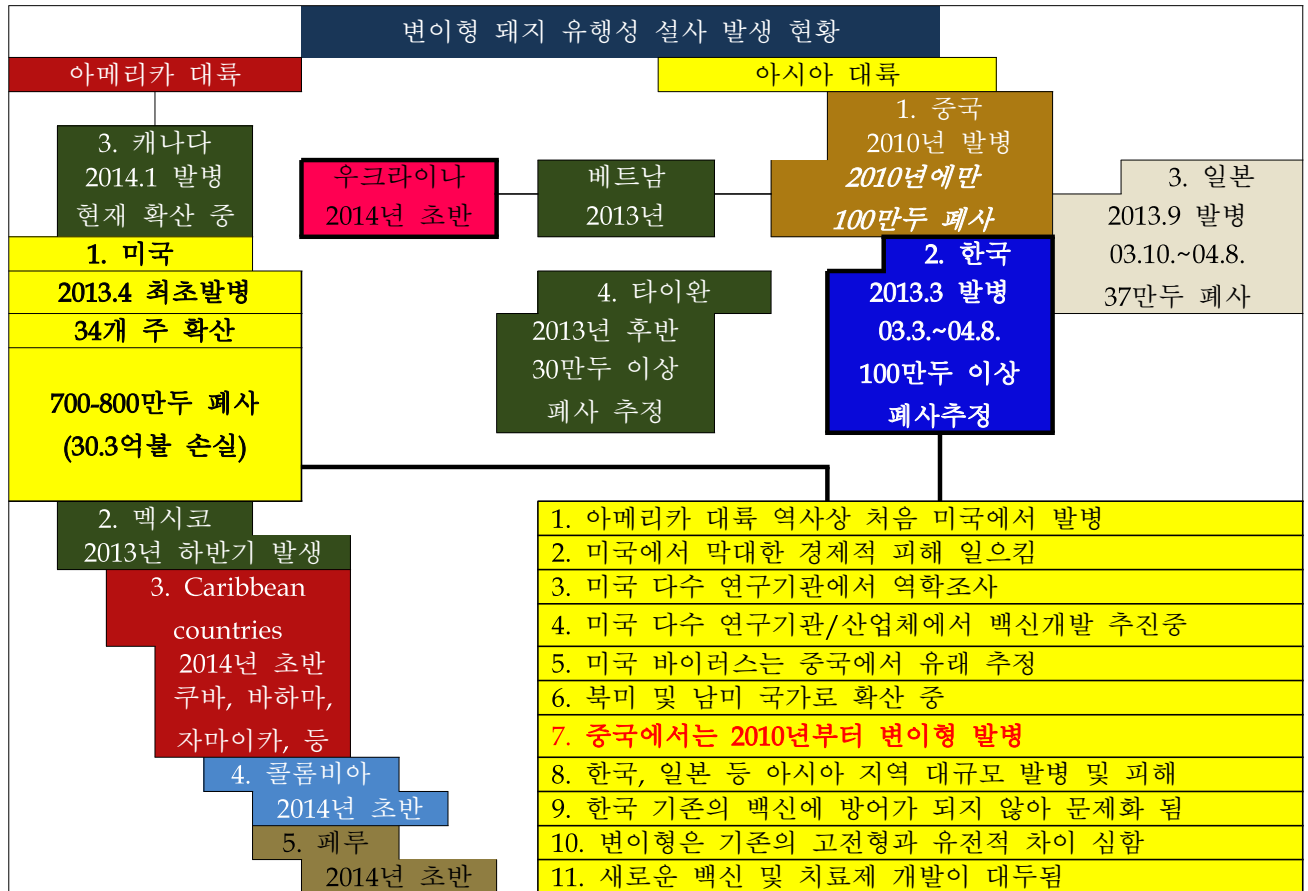
**-아시아 대륙-**

- 1982년 일본(Takahashi et al., 1983), 1986년 중국(Chen et al., 2011), 1993년 한국(Kwon et al., 1993; Park et al., 1993)에서 보고되었음.
- 국내에서 후향적 연구를 수행한 결과 1987년부터 발생이 확인됨(Park and Lee, 1997).
- 이후 아시아에서는 돼지를 사육하고 있는 모든 나라에서 PED가 지역 유행형으로 자리 잡아 지속적인 경제적 피해를 유발하고 있음(Chen et al., 2010; Jinghui and Yijing, 2005; Lee et al., 2010; Park et al., 2013; Song and Park, 2012).

**▣ 변이형 PED 발생경향[그림 1-5]**

**-아메리카 대륙-**

- 아메리카 대륙에서는 2013년 4월 29일 미국 아이오와주의 양돈장에서 PED가 처음 발병보고 된 후(Stevenson et al., 2013), 현재 양돈산업이 발달한 34개 주 이상에서 PED가 발병되었음(Yoon, 2014).
- 변이형 PED에 의해 미국 전체 돼지의 13%인 800만 두의 폐사와 32.5억불의 경제적 피해가 발생하였음(Yoon, 2014).
- 2013년 말에는 멕시코를 시작으로 2014년 초에는 캐나다를 포함하여 카리브 해 지역(쿠바, 바하마 등), 페루 등 북남미 지역 모두에서 확산 중에 있음(Yoon, 2014).



[그림 1-5] 변이형 돼지 유행성 설사의 세계 발생 현황.

-아시아 대륙-

- 아시아 지역에서는 2010년 10월부터 중국의 주요 양돈생산 지역에서 60%-100%의 발병률과 80%-100%의 자돈 폐사율을 보이는 변이형 PED가 발생하여, 2010년에만 약 100만 두가 폐사하였음(Sun et al., 2012; Wang et al., 2013).
- 국내에서도 2013년 하반기부터 PED가 전국적인 규모로 발병하여, 2014년 1월부터 10월까지 약 3만두가 발병되었다는 보고로 부터 100만두 이상의 자돈들이 폐사하였다는 발표까지 다양한 추정 피해들이 나오고 있음.
- 본 연구자들의 조사 결과, 국내 변이주는 2013년 5월에도 변이주가 국내에서 검출되어, 국내 변이주 유입은 미국이 아닌 중국 등으로 의심됨(Lee and Lee, 2014).
- 국내에서 변이형 PED의 폭발적 발생의 원인 분석(추론)
  - 국내에서는 2011년 하반기부터 2012년 상반기에 걸쳐 구제역이 전국적인 규모로 발생하여 약 300만 두 이상의 돼지를 살처분하였음(Lee and Lee, 2014).
  - 이에 적정 돈수를 유지하기 위해 미국 등 PEDV에 대한 항체 음성의 돼지가 수입되어 국내에서는 PEDV에 대한 저항성이 저하되어, 국내에 유입된 변이형 PEDV

의 전국적인 발병으로 높은 폐사율이 발생한 것으로 추정됨(Lee and Lee, 2014).

- **일본의 경우** 1996년 이후 7년 만에 PEDV가 2013년 9월에 발생하여, 2013.10.-2014.8 사이에 약 373천 두의 자돈이 폐사하였음(Ohashi et al., 2014).
- **대만의 경우** 2013년 10월부터 변이형 PEDV가 폭발적으로 발생하여 50만두 이상의 자돈이 폐사하였으며(Yang and Huang, 2014), 베트남에서도 변이형 PEDV가 보고되었음(Vui et al., 2014).
- **우크라이나는** 2014년 중반부터 변이형 PEDV가 발생하는 것으로 British Animal & Plant Health Agency가 최종 발표하였음(Ter Beek V, 2015b)

### 3) 국내 변이형 PEDV 유전자 특징[그림 1-6]

▣ **염기서열 및 계통학적 비교**(Cho et al, 2014; Choi et al., 2014; Lee and Lee, 2014; Lee et al., 2014).

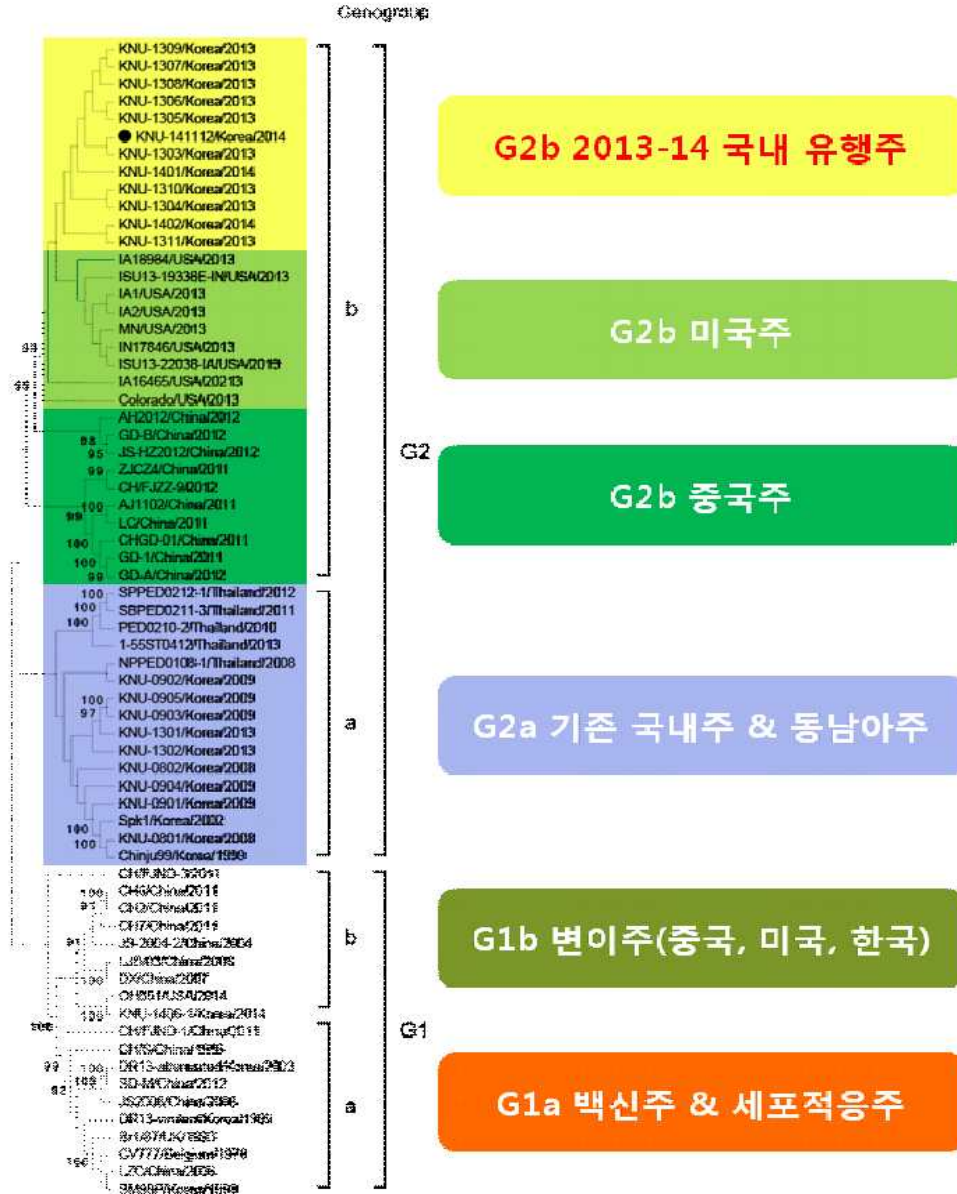
- **본 연구팀에 의해 검출된 국내 변이형 PEDV의 특징**(Lee and Lee, 2014).
  - 국내 변이형 PEDV의 spike 유전자 염기서열은 국내 고전형 PEDV인 KNU-0801 주와 94.3%-94.7%의 비교적 낮은 상동성을 보였음.
  - 하지만, **미국의 변이주와는 99.2%-99.9%의 높은 상동성**을 보였음.
  - 또한 국내 변이주 전체 유전체 핵산 염기서열도 미국 변이형 PEDV와 96.3%-99.9%의 높은 상동성을 보였음.
- **국내 변이주 3개 PEDV의 전체 유전체 핵산 염기서열 비교**(Choi et al., 2014)
  - **국내 변이주는 미국 및 중국의 변이주와 99.1%-99.4%의 높은 상동성**을 보였음.
  - 하지만, 기존의 국내 백신주 및 유럽 주(CV777)와는 96.3%-97.6%의 비교적 낮은 상동성을 보였음.
- 미국의 변이형 PEDV는 계통학적으로 중국의 변이형 PEDV인 AH2012주와 모두 유사하여, 미국 PEDV는 모두 중국에서 유입된 것으로 추정되고 있음(Chen et al., 2014; Huang et al., 2013; Marthaler et al., 2013).
- 일본, 대만, 베트남의 변이형 PEDV도 모두 미국 및 중국의 변이주와 유사하였음(Lin et al., 2014; Ohashi et al., 2014; Vui et al., 2014).
- 미국에서는 spike 유전자에 다수의 핵산이 결손 및 삽입된(insertions and deletions in the spike gene; S INDELS) PEDV들이 검출되었음(Vlasova et al., 2014).
- 이러한 INDELS 변이주는 미국 외에도 한국, 베트남 등 여러 나라에서 발생하였음(Lee et al., 2010; Marthaler et al., 2014; Vlasova et al., 2014; Vui et al., 2014).
- 최근 콜로라도 변이형 PEDV 강독주와 유사하지만 spike 유전자 S1 부분에 2개의



아미노산이 결손 된 S2aa-del 변이주가 검출되었음(Marthaler et al., 2014).

• **Spike 단백질 유전자 및 전체 유전체 염기서열의 계통학적 비교**

- 국내 변이형 PEDV는 미국, 중국 등의 변이형 PEDV와 함께 genogroup 2(G2)에 속해 있지만, 기존의 고전형 PEDV인 DR13, SM98-1주들은 고전형 유럽주(CV777) 및 기존의 중국주들과 함께 genogroup 1(G1)에 속해 있음[그림 1-6].



[그림 1-6] 돼지 유행성 설사 바이러스 전체 spike 단백질 유전자 염기서열을 이용한 계통학적 분석. 바이러스 명 앞의 검은 원은 국내 변이형 분리주 의미함. 국내의 변이형 PEDV 강독주는 genogroup 2(G2)에 있으며, 국내의 고전형 PEDV 및 백신주는 모두 G1에 속해 있음. 이는 고전형 PED 백신에 의해 변이형 PEDV 강독주가 방어되지 않는 근거가 될 수 있음.



- 요약:

- 국내외 변이형 PEDV들은 기존의 고전형 PEDV와 유전자 염기서열뿐만 아니라 계통학적으로 차이가 심함.
- 특히 중화항원인 spike 단백질 유전자가 변이형과 고전형 PEDV 간에 차이가 심해 고전형 PED 백신이 변이형 PEDV를 방어할 수 없음을 설명할 수 있음.

#### 4) 국내의 PED 백신판매 현황 및 문제점

##### ▣ 고전형 PED 백신

- 국내 고전형 PED 백신 개발 및 판매 현황

- 농림축산검역본부 : 국내 분리주인 KPEDV-9를 약독화 시킨 백신주(Kweon et al., 1999)와 SM98 약독주(Song et al., 2003 and Park, 2012)를 각각 단독 혹은 TGEV와 돼지 로타바이러스와 함께 불활화 혹은 약독화 생균 백신 형태로 중앙백신연구소, 코미팜, 대성미생물연구소, 고려비엔피, 녹십자수의약품 등에서 판매하고 있음.
- 서울대 및 녹십자수의약품: 국내 분리 DR13주를 약독화 시킨 백신주(Song et al., 2007)를 녹십자수의약품에서 판매하고 있음.
- 수입백신의 판매는 오창무역 및 바이엘코리아에서 P-5V 약독화 생독 백신을 일본 Nisseiken 회사로부터 수입하여 판매하고 있음.

- 일본 백신 판매 현황

- 일본의 경우 야외 증례(Kuwahara et al., 1988)에서 분리 계대한 약독화 P-5V (Kusanagi et al., 1992) 백신을 Nisseiken에서 판매하고 있음(Kadoi et al., 2002).

- 중국은 벨기에에서 분리한 CV777을 약독화 후 백신으로 사용하고 있음(Song and Park, 2012).

##### ▣ 고전형 PED 백신의 문제점

- 국내 양돈농가에서는 고전형 PEDV 백신을 투여하였음에도 불구하고 PED가 지속적으로 발생하여, 양돈농가에서는 오히려 기피의 대상이었음.

- 이러한 기피의 원인은 국내 판매중인 백신이 야외 고전형 PEDV도 충분히 방어하지 못하기 때문으로 판단됨.

- 본 연구팀의 연구 결과에 따르면, 국내 고전형 PEDV 분리주의 spike 유전자 염기서열이 국내 백신주와 상이함(Lee et al., 2010).

- 2002년-2007년에 발생한 국내 PEDV의 막 단백질(membrane protein) 및 ORF3

- 유전자를 국내 백신주 및 유럽의 CV777주와 비교한 결과 유전적으로 상이하였고, 오히려 중국에서 발생한 고전형 PEDV와 밀접하였음(Park et al., 2011).
- 더욱이 2010년 및 2011년에 발생한 PEDV의 외막 단백질(envelope protein) 유전자도 국내 백신주 및 유럽의 CV777주와 달리 중국주와 밀접하였음(Park et al., 2013).

▣ 변이형 PED 및 기존 백신의 문제점

- **한국**
  - 국내에서 2013년 하반기부터 발생한 변이형 PED는 기존의 시판 백신을 투여와 상관없이 모든 양돈농가에서 발생하였음.
  - 국내 발생 변이형 PEDV는 미국, 중국 등에서 발생한 변이주와 매우 유사하였으며, 고전형 PEDV와는 계통학적으로나 유전자 염기서열에서 상이하였음(Cho et al, 2014; Choi et al., 2014; Lee and Lee, 2014; Lee et al., 2014).
  - 이는 현재 한국, 미국, 중국 등 변이형 PED가 기존의 고전형 PEDV를 이용한 백신에 의해 방어가 되지 않는다는 것을 시사함(Oh et al., 2014; Lee, 2015).
  - 고전형 백신에 의해 변이주가 방어가 되지 않는다는 것은 미국 변이주와 국내 고전형 SM98-1주를 이용한 중화항체반응 결과에서 알 수 있음(Oh et al., 2014; Lee, 2015).

[표 1-2] 국내 변이형 돼지 유행성 설사 바이러스와 국내 고전형 백신주 간의 중화항체 반응

바이러스	항체 <sup>1</sup>		
	국내 변이주	국내 SM98-1주	TGEV <sup>2</sup> Miller주
국내 변이주	1:256	1:64	None
국내 SM98-1주	1:32	1:256	None
TGEV Miller주	None	None	High

<sup>1</sup>미국 변이주, 국내 SM98-1주, 돼지 전염성 위장염 바이러스 각각에 대한 항체.

<sup>2</sup>TGEV: transmissible gastroenteritis virus, 돼지 전염성 위장염 바이러스.

- 즉, 표 1-2에서 보이는 바와 같이 미국 변이주에 대한 항체는 미국 변이주 및 국내 고전주인 SM98-1주 모두를 충분히 교차방어함.

- 하지만 국내 고전형 PED 백신주인 SM98-1은 미국 변이주에 대한 교차 방어능이 매우 낮았음.
- 이상의 결과가 의미하는 것은 현재 국내에서 시판되고 있는 SM98-1 백신은 변이형 PED를 교차 방어할 수 없거나 매우 낮다는 것을 의미함(Oh et al., 2014; Lee, 2015).
- 따라서 현재 국내에서 발생하고 있는 변이형뿐만 아니라 고전형 PED를 동시에 예방할 수 있는 백신은 국내에서 발생하고 있는 변이형 PEDV를 분리하여 사용하여야 한다는 것임(Oh et al., 2014; Lee, 2015).

• 중국

- 2010년부터 변이형 PEDV 강독주의 발생으로 막대한 경제적 피해가 발생하였음 (Sun et al., 2012; Wang et al., 2013).
- 중국의 변이형 PEDV의 spike 유전자는 중국에서 사용 중인 유럽주인 CV777와 계통학적으로 멀리 떨어져 있음(Sun et al., 2012).
- 2010년 이후 중국에서 보고된 변이형 PEDV는 모두 미국, 한국, 태국, 베트남에서 발생한 변이형 PEDV와 유사하여 본 과제로 백신 개발 시 이들 발생국가로의 수출가능성을 높일 수 있음.
- 또한, 중국의 변이형 PED도 고전형 유럽 백신주인 CV777에 의해 방어되지 않음을 시사 함(Sun et al., 2012).

5) PED 백신개발 필요성에 대한 기술적 측면 요약

- 국내는 물론 전 세계적으로 **고병원성의 변이형 PED**가 발생하고 있음.
- 국내외 시판 백신은 고전형 PED를 완벽하게 예방할 수 없을 뿐만 아니라 현재 세계적으로 창궐하고 있는 변이형 PED를 예방하지 못함.
- 중화항체반응 검사결과, 변이형 PEDV에 대한 항체는 변이형 PEDV 뿐만 아니라 고전형 PEDV에도 방어를 하였음.
- 따라서 국내에서 발생하고 있는 **변이형 PEDV 분리주를 이용한 약독 및 불활화 백신을 개발하여 변이형 PEDV와 고전형 PEDV를 제어하여야 할 것임.**

## 다. 소 코로나바이러스 백신의 문제점

소 코로나바이러스(BCoV) 감염증은 송아지 설사형, 비육우 호흡기형 및 성우의 동절기 적리형으로 구분되며, 국내는 물론 전 세계적으로 다발하고 있어, 경제적으로 막대한 피해를 일으키고 있음. 특히 BCoV는 RNA 바이러스의 특성상 변이가 쉽게 발생하여, 기존의 백신에 의해 방어가 되지 않는 경우가 많음. 따라서 국내 축우산업의 이들 질병의 피해를 최소화하기 위한 효과적인 BCoV 맞춤형 백신의 개발이 요구됨.

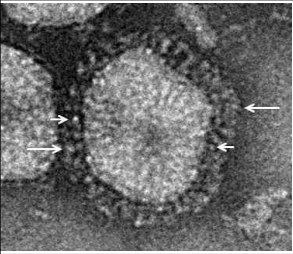


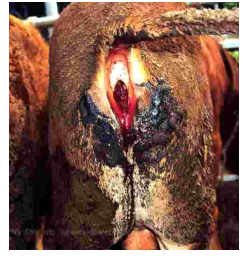
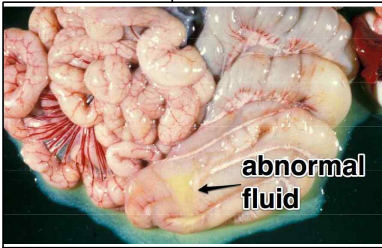






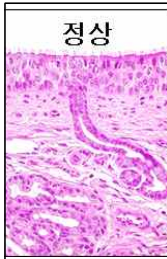
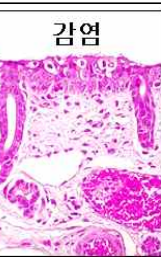
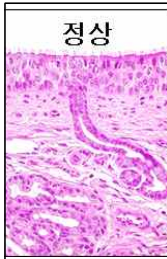
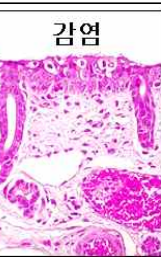
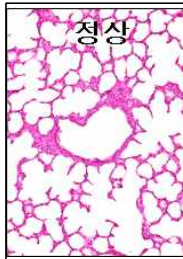
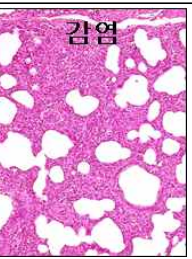
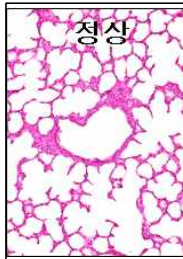
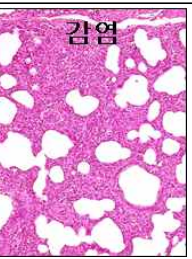


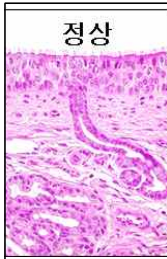
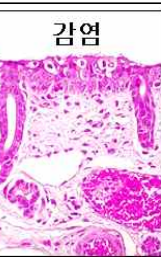
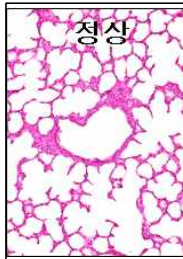
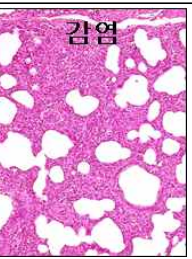
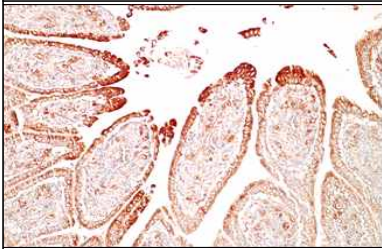
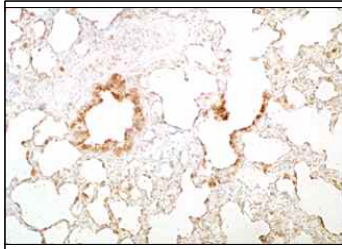
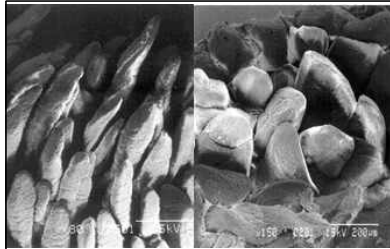
### 1) BCoV 원인체, 임상증상, 병리소견[그림 1-7]

#### ▣ BCoV 원인체

- BCoV는 베타코로나바이러스속의 바이러스로서 오직 한 개의 혈청형만 존재함.

#### ▣ BCoV 임상증상에 따른 바이러스 분류

- BCoV는 임상증상에 따라 크게 3가지 임상형으로 분류됨(Boileau and Kapil, 2010; Saif, 2010).
- **송아지 설사형 BCoV(Calf diarrhea BCoV)**
  - 송아지에 급성설사, 식욕부진 등의 임상증상을 일으킴(Boileau and Kapil, 2010; Mebus et al., 1973; Park et al., 2007b).
  - 일반적으로 로타바이러스 감염증에 비해 설사의 정도가 심하고 폐사율이 높음.
- **비육우 호흡기형 BCoV(Feedlot cattle BCoV)**
  - 비육우가 스트레스(예, 수송 등)를 받을 때 BCoV가 상부 및 하부 호흡기에 증식한 결과 호흡기계 염증을 일으킴. 수송열의 한 원인으로 작용(Cho et al., 2001a).
  - 특히 상부 및 하부 호흡기에 염증을 일으켜 2차성의 세균성 감염증을 유도함.
  - 이로 인해 비육우에서 가장 문제가 되고 있는 소 호흡기 복합 증후군(bovine respiratory disease complex; BRDC)을 일으킬 수 있음(Boileau and Kapil, 2010).
- **성우 동절기 적리형 BCoV(Winter dysentery BCoV)**
  - 겨울철에 다 자란 성우에서 집단적으로 수양성에서 혈액양 설사에 이르는 급성의 심한 설사가 발생함(Jeong et al., 2005).
  - 특히 젖소에서는 현격한 유량감소(50%~90%)로 심각한 경제적 손실이 발생함.
  - BCoV는 동절기 적리와 동일한 증상을 따뜻한 봄-가을사이에도 유발함.
  - 이를 온난기 적리(warmer dysentery)라고도 함(Park et al., 2006).

BCoV 감염증														
원인체		연령 및 증상에 따른 BCoV 감염증(임상형)												
 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 베타코로나바이러스</li> <li>• 80-220 nm 바이러스 입자(두 종류의 외막 spike가 있음)</li> </ul>	<b>송아지 설사형</b>  <ul style="list-style-type: none"> <li>• 수양성 설사</li> <li>• 쇠약, 폐사</li> </ul>	<b>비육우 호흡기형</b>  <ul style="list-style-type: none"> <li>• 비루, 2차 감염</li> <li>• 폐렴으로 폐사</li> </ul>	<b>동절기 적리형</b>  <ul style="list-style-type: none"> <li>• 성우 집단 설사</li> <li>• 젖소 유량 감소</li> </ul>											
	<b>각 임상형 별 육안소견</b>													
 <p>송아지형: 결장 내 설사분변</p>	 <p>호흡기형: 기관지 폐렴</p>	 <p>동절기 적리형: 대장 내 혈변</p>												
<b>형태학적 소견</b>														
<table border="1"> <tr> <th>정상</th> <th>감염</th> </tr> <tr> <td></td> <td></td> </tr> </table> <p>소장: 정상에 비해 감염 송아지 소장 용모 상피세포 탈락 및 용모의 위축과 융합</p>	정상	감염			<table border="1"> <tr> <th>정상</th> <th>감염</th> </tr> <tr> <td></td> <td></td> </tr> </table> <p>비강: 정상에 비해 감염 송아지는 비강 점막 섬모 탈락 및 상피세포 괴사</p>	정상	감염			<table border="1"> <tr> <th>정상</th> <th>감염</th> </tr> <tr> <td></td> <td></td> </tr> </table> <p>폐: 정상에 비해 감염 송아지 폐포는 심하게 증식된 간질성 폐렴 소견</p>	정상	감염		
정상	감염													
														
정상	감염													
														
정상	감염													
														
 <p>소장: 용모 상피세포 내 BCoV 양성반응</p>	 <p>폐: 기관지 및 폐포 상피세포 내 BCoV 양성 반응</p>	 <p>소장: 정상(왼쪽)에 비해 감염 용모는 위축되고 융합됨</p>												

[그림 1-7] BCoV 원인체, 임상증상 및 병리소견.



## ■ BCoV 감염증의 병리소견

- 부검 시 발생한 송아지의 소장 점막의 두께가 얇아져 있음.
- 장은 다양한 설사분변으로 채워져 있으며, 항문주위는 설사로 인하여 오염되어 있음.
- 특히 성우에서 발생한 동절기 적리의 경우 대장 내 혈변 및 점막출혈이 관찰됨.
- 병리조직학적으로, 감염된 송아지와 성우는 소장 용모 상피세포의 탈락으로 소장 용모의 심한 위축 및 융합이 관찰됨. 상피세포의 탈락에 의해 음와상피세포의 심한 증식이 나타남.
- 대장 점막의 상피세포 탈락이 송아지 및 성우에서 공통적으로 관찰되며, 특히 성우의 경우 대장 점막의 출혈이 다발하고, 이들 소장 및 대장 점막상피세포에서 BCoV 항원이 검출됨.
- 특히 상부 호흡기 점막 상피세포, 폐의 기관지 및 폐포 상피세포 내에서 BCoV 항원이 다수 분포됨.
- 주사전자현미경으로 관찰하면, 정상의 손가락 모양의 정상 용모에 비해 감염된 용모는 길이가 짧아져 있고(위축) 서로 융합되어 있으며, 미세용모는 탈락되어 있음.
- 또한 비강 및 기관 내 상피세포의 변성 및 괴사에 의해 섬모의 심한 탈락이 관찰됨.

## 2) BCoV 발생경향

### ■ 국내외 BCoV 발생경향

- BCoV에 의해 발생하는 송아지 설사형, 비육우 호흡기형, 성우의 동절기 적리형 임상형은 소를 키우는 모든 나라에서 발생하는 것으로 추정됨(Boileau and Kapil, 2010).
  - 독일은 3.4%(Gillhuber et al., 2014), 알제리는 20.7%(Ammar et al., 2014), 뉴질랜드는 31%(Al Mawly et al., 2014), 브라질은 68.6%(Coura et al., 2015), 일본 야마카타현은 유우에서 57.7% 및 육우에서 62.5%(Mawatari et al., 2014)이었음.
- 본 연구팀의 연구결과 송아지 및 성우에서 BCoV 감염증이 설사의 주요 원인체였음.
  - 국내 송아지 설사분변에서 BCoV 감염률이 34.7%로 소 로타바이러스 다음으로 다발하고 있음(Lim et al., 2005; Park et al., 2007c).
  - 국내 32개 축우농가의 동절기에 집단적으로 수양성에서 혈변을 보이는 97개 설사분변에서 BCoV를 검사한 결과 모두 양성이었음(Jeong et al., 2005).
  - 더욱이 봄에서 가을의 기온이 비교적 높은 온절기에 집단적으로 수양성에서 혈변을 보이는 75개 축우농가 184개 설사분변 중 47개 농가 107개 설사분변에서 온절기 적리형 BCoV가 분리되었음(Park et al., 2006).

- 본 연구팀의 연구결과 국내 도축우에서 BCoV 혈청가는 매우 높았음.
  - 국내 도축우(3-5세령) 384두에서 채취한 혈청을 계절별로 채취하여 BCoV 항체가를 검사한 결과 계절에 상관없이 매우 높았음(Kim et al., 2007).
- **요약**
  - 국내 축우농가에서는 약독화 BCoV 및 소 로타바이러스 혼합백신을 사용하고 있음에도 불구하고 BCoV 감염증이 재발하여 백신효과의 제고가 요구되고 있음.
  - 본 연구팀의 선행 연구에서도 BCoV에 의해 일어나는 송아지 설사형, 동절기 적리형, 온절기 적리형의 다발이 확인된 바 있음.
  - 따라서 국내 양축 현장에 효과적인 맞춤형 BCoV 백신의 개발이 요구됨.

### 3) 국내외 BCoV 백신의 문제점

#### ▣ 국내 시판 BCoV 백신의 문제점

- 국내 시판 BCoV 백신
  - 농림축산검역본부에서 1994년에 분리한 BC94주 및 소 로타바이러스 678주(G6P[11])와 P4주(G6P[x])가 혼합된 3가 약독화 생건조백신을 중앙백신연구소, 코미팜, 대성미생물연구소, 고려비엔피, 녹십자수의약품등에서 판매하고 있음.
  - 이 외에 불활화백신 형태로 상술한 바이러스 외에 대장균이 포함된 것도 있음.
- 외국계 다국적 회사에서 국내에 시판 중인 BCoV 백신
  - 한국화이자동물약품: 소 코로나바이러스, 소 로타바이러스(G6 및 G10 혼합), 대장균이 혼합된 불활화백신.
  - 이화팜텍: 일본 교토바이켄에서 수입한 BCoV, 소 로타바이러스(G6, G8, G10 혼합백신), 대장균을 혼합시킨 사균 백신을 수입판매하고 있음.
- 하지만 국내에서 BCoV 백신을 접종하고 있음에도 불구하고 BCoV가 재발하거나 지속적인 발생을 보이고 있는 실정임(Lim et al., 2005; Park et al., 2007c).

#### ▣ 일본 시판 BCoV 백신의 문제점

- 일본에서 시판 중인 BCoV는 1977년 송아지 설사분변에서 분리한 66/H 주를 계대한 약독화 백신주(Takamura et al., 2002)가 판매중임.
- 일본의 경우 BCoV 백신을 사용하고 있음에도 불구하고 BCoV가 재발하는 실정임(Kanno et al., 2007, 2009, 2013; Takamura et al., 2000a,b).

#### ▣ 미국 시판 BCoV 백신

- 미국에서 시판 중인 BCoV 백신은 네브래스카대학교의 Charles A Mebus 교수팀에서 1972년에 송아지 설사분변에서 분리한 Mebus 주를 계대하여 약독화 시킨 것으로 약독주 명을 Vaccine 주로 하여 Norden Laboratories에서 판매되고 있음(Zhang et al., 1991).
- 하지만 미국의 경우에도 BCoV 백신을 투여하고 있음에도 BCoV 감염증이 여전히 문제가 되고 있음(Boileau and Kapil, 2010; Cho 2001b; Saif, 2010).

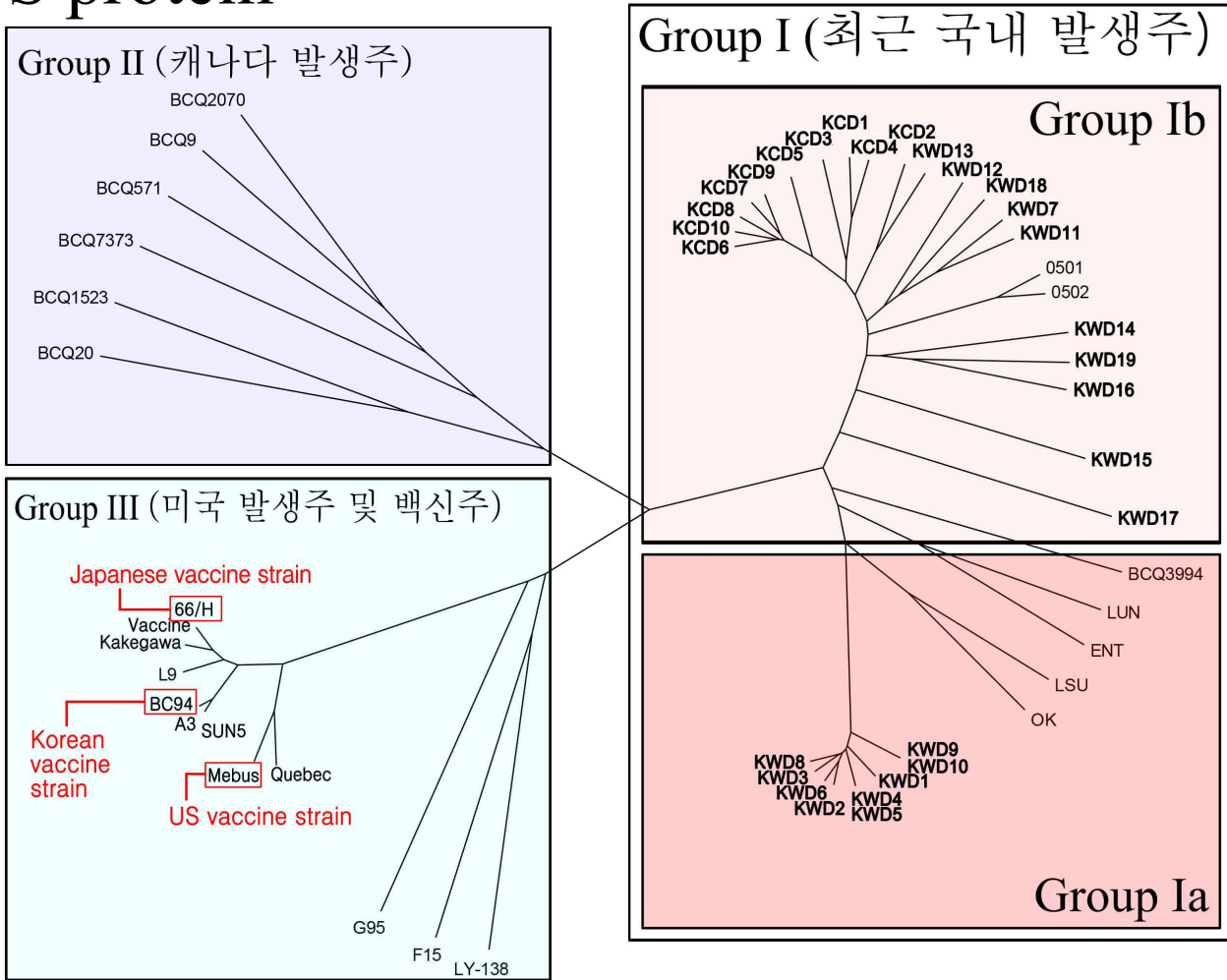
#### 4) BCoV 유전자 특징

##### ▣ 국내 BCoV 염기서열 및 계통학적 비교[그림 1-8]

- 본 연구팀이 최근 분리한 국내 송아지 설사형 BCoV 분리주들의 spike 유전자는 99.5% 이상의 높은 상동성과 계통학적으로 근연관계에 있었음(Jeong et al., 2005, Park et al., 2006, Park et al., 2007c).
- 하지만 국내 송아지 설사형 BCoV는 미국 및 캐나다 BCoV와는 96% 이하였으며, 계통학적으로 거리가 떨어져 있었음(Park et al., 2007c).
- 또한 국내 분리 동절기 적리형 BCoV의 경우에도 미국의 송아지 설사형 Mebus strain과는 93.4%의 낮은 상동성과 계통학적으로도 미국 및 캐나다 바이러스와는 떨어져 있었음(Jeong et al., 2005).
- 국내 분리 온절기 적리형 BCoV 분리주들도 캐나다 송아지 설사형 BCQ20주와는 94.7%의 낮은 상동성을 보였으며, 계통학적으로도 미국 및 캐나다 바이러스들과는 떨어져 있었음(Park et al., 2006).
- 특히 본 연구팀이 최근에 분리한 송아지 설사형, 동절기 적리형 및 온절기 적리형 BCoV들은 국내에서 시판 중인 BC94 백신주뿐만 아니라 미국 백신주인 Vaccine 주와 일본의 백신주인 66/H 주와도 유전자분석 결과, 계통학적으로 매우 떨어져 있음을 확인하였음[그림 1-8].
- 이는 국내 자체 개발 BC94주 백신과 미국의 Vaccine주 백신이 국내 송아지 및 성우에서 발생하고 있는 송아지 설사형, 동절기 적리형 및 온절기 적리형 BCoV를 예방하는데 한계가 있음을 설명할 수 있음.



# S protein



[그림 1-8] BCoV spike protein 유전자 아미노산 염기서열을 이용한 계통학적 분석. BCoV는 groups I-III까지 분류되며, 이 중 group I은 대부분 국내 분리주임. Group Ia는 주로 국내 분리 동절기(KWD1-KWD10) 및 온절기 적리형 코로나바이러스(KWD11-KWD20)로, group Ib는 주로 국내 분리 송아지 설사형(KCD1-KCD10) 및 온절기 적리형 코로나바이러스로 구성되어 있음. Group II는 캐나다에서 발생한 BCoV로 구성되었으며, Group III은 주로 미국 발생주 및 국내외 백신주들이 포함되어 있음. (참조, Jeong et al., 2005; Ko et al., 2006; Park et al., 2006, 2007c)

## ▣ 일본 BCoV 백신주와 야외주간의 계통학적 및 항원성 비교[그림 1-8 및 표 1-3]

- 일본에서는 1999년부터 2006년 사이에 분리한 BCoV의 spike 유전자에 대한 계통학적 분석을 수행하였음(Kanno et al., 2007, 2009, 2013).
- 그 결과 본 연구팀이 선행 보고한 내용과 유사하게, 일본에서 발생하고 있는 BCoV 들은 일본의 백신주 및 미국의 백신주와는 계통학적으로 떨어져 있었음.
- 이는 일본에서 BCoV 백신을 투여하고 있음에도 BCoV 감염증이 재발하는 이유가

될 수 있음.

- 일본의 야외 축우농가의 BCoV와 백신주인 66/H 간의 교차방어능이 매우 낮았음 (Kanno et al., 2013).
  - 일본에서 사용 중인 BCoV 백신주인 66/H와 그동안 연도별로 일본에서 분리한 BCoV 분리주와의 교차방어능을 중화항체 반응검사를 통해 검사하였음.
  - 그 결과 충격적으로 백신주와 현재 일본에서 발생하고 있는 BCoV의 항원 관련성이 시간이 지날수록 매우 낮아졌음[표 1-3].
  - 이는 일본에서 판매중인 BCoV 백신이 현재 일본 축우농가에서 발생하고 있는 BCoV를 완벽히 방어할 수 없다는 것을 의미함(Kanno et al., 2013).

#### ▣ 미국 BCoV 계통학적 비교[그림 1-8]

- 미국의 BCoV의 경우에도 미국에서 개발한 백신주 원형인 Mebus 주와는 계통학적으로 거리가 있음.
- 이는 앞서 한국 및 일본의 경우와 같이 미국의 BCoV 백신의 한계성을 보여주는 것이라 할 수 있음.

#### ▣ 요약:

- 국내는 물론 일본 및 미국에서 개발한 백신은 현재 발생하고 있는 BCoV와 계통학적으로 상이함.
- 특히 일본에서 보고한 바와 같이 기존의 백신주는 현재 발생하고 있는 BCoV와 항원 관련성이 매우 낮았음.
- 이러한 원인에 의해 국내는 물론 전 세계적으로 BCoV 백신을 투여하였음에도 불구하고 BCoV 감염증이 재발하고 있음.
- 따라서 국내는 물론 전 세계적으로 현재 발생하고 있는 BCoV를 예방하기 위해서는 현장 맞춤형의 새로운 백신의 개발이 필요함.

#### 5) BCoV 백신개발 필요성 기술적 측면 요약

- 국내는 물론 전 세계적으로 BCoV 감염증이 다발하고 있음.
- 국내외 시판 백신은 항원성 및 계통학적 차이에 의해 현재 발생하고 있는 BCoV 감염증을 완벽히 예방하고 있지 못함.
- 따라서 국내에서 현재 문제가 되고 있는 BCoV 분리주를 이용한 약독 및 불활화 백신을 개발하여 BCoV 감염증을 예방하여야 할 것임.

[표 1-3] 일본 소 코로나바이러스 분리주의 중화 항체가 결과를 바탕으로 한 항원 관련성(Kanno et al., 2009)

		항원 관련성 <sup>1</sup>							
Group	바이러스 <sup>2</sup>	Group 1		Group 2	Group 3	Group 4			
		Takegawa /76	66/H /77	Ishikawa/2 /99	Hokkaido/12/ 03	Kumamoto/1 /07	Hokkaido/25 /05	Hokkaido/40 /08	Hokkaido/45 /08
1	Takegawa/76	100							
1	66/H/77	84	100						
2	Ishikawa/2/99	50	50	100					
3	Hokkaido/12/03	59	59	59	100				
4	Kumamoto/1/07	50	35	71	59	100			
4	Hokkaido/25/05	50	35	84	84	84	100		
4	Hokkaido/40/08	30	21	42	35	35	35	100	
4	Hokkaido/45/08	18	11	35	59	25	50	84	100

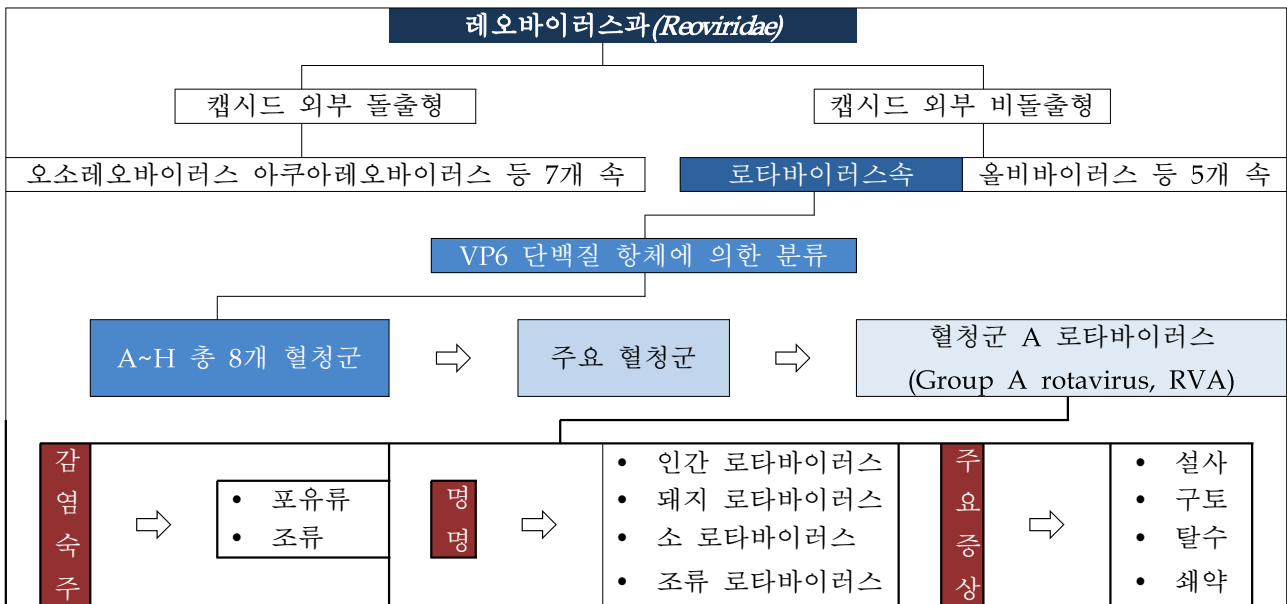
<sup>1</sup>항원 관련성 검사: Archetti and Horsfall, 1950; El-Ghorr et al., 1989의 방법.

<sup>2</sup>각 바이러스의 뒷 번호는 분리 연도.

## 라. 로타바이러스의 중요성

로타바이러스는 어린 영유아 및 가축에 심한 장염을 일으키는 바이러스성 전염병으로 세계적으로 발생하고 있음. 가축 로타바이러스는 인간으로 전파될 수 있는 인수공통전염병의 병원체임. 따라서, 가축 로타바이러스에 대한 효과적인 백신개발은 가축생산의 경제적 손실을 줄이는 것뿐 아니라 공중보건학적으로 매우 중요함.

### 1) 로타바이러스 분류[표 1-4]



▣ 로타바이러스가 포함되어 있는 레오바이러스과(*Reoviridae*)의 바이러스들은 캡시드 내측의 fivefold axes에서 탑 모양의 단백질 돌출물(turret-like protein projecting)의 유무에 따라 다시 세분됨(Schiff et al., 2007).

- 돌출물이 있는 바이러스: *Orthoreovirus*, *Aquareovirus*, *Cypovirus*, *Idnoreovirus*, *Fijivirus*, *Oryzavirus*, *Mycoreovirus*.
- 돌출물이 없는 바이러스: ***Rotavirus***, *Orbivirus*, *Coltivirus*, *Phytoreovirus*, *Seadornavirus*.

### ▣ 로타바이러스의 분류[표 1-5]

- 로타바이러스의 3개 캡시드층 중 내부의 VP6 캡시드 단백질에 대한 항체의 반응성에 따라 A-H까지 8개의 혈청군(serogroup)으로 분류됨(Estes and Kapikian, 2007).
- 8개의 로타바이러스 혈청군 중에서 **인간과 동물에 심각한 질병을 일으키는 것은 혈청군 A 로타바이러스**임(Estes and Kapikian, 2007).

[표 1-5] 로타바이러스 분류

혈청군	숙주	주요 임상 증상
혈청군 A 로타바이러스 (Group A rotavirus, RVA)	인간, 포유류, 조류	심한 설사
혈청군 B 로타바이러스 (Group B rotavirus, RVB)	인간, 포유류, 조류	설사
혈청군 C 로타바이러스 (Group C rotavirus, RVC)	인간, 포유류, 조류	심한 설사
혈청군 D 로타바이러스 (Group D rotavirus, RVD)	조류	설사
혈청군 E 로타바이러스 (Group E rotavirus, RVE)	돼지	설사
혈청군 F 로타바이러스 (Group F rotavirus, RVF)	조류	설사
혈청군 G 로타바이러스 (Group G rotavirus, RVG)	조류	설사
혈청군 H 로타바이러스 (Group H rotavirus, RVE)	인간, 돼지	설사

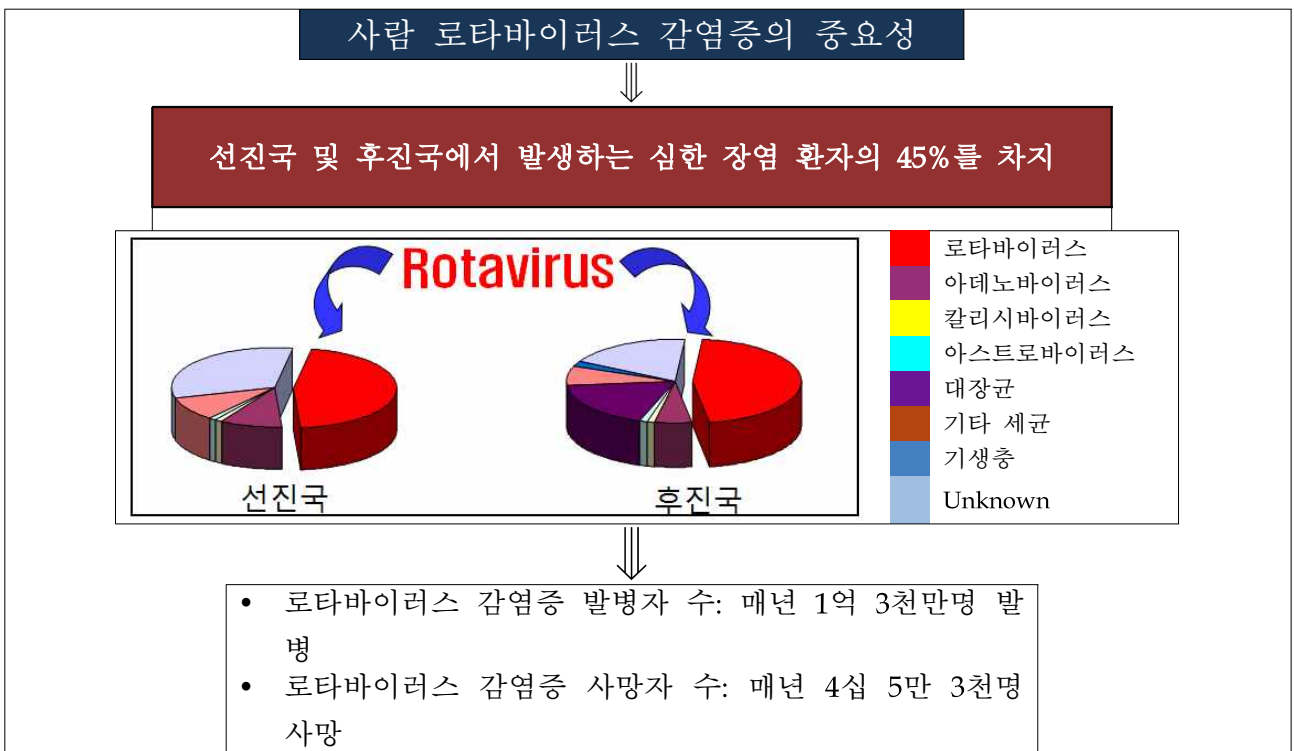
- 혈청군 A 로타바이러스는 3층의 캡시드층(코아, 내부, 외부 캡시드층) 내에 **11개의 분절화된 이중쇄 RNA 유전체**들을 가지고 있음(Estes and Kapikian, 2007).
- 11개의 지놈은 **7개의 바이러스 구조단백질** 및 4(5)개의 비구조단백질을 암호화 하고 있음(Estes and Kapikian, 2007).
- 최근 혈청군 A 로타바이러스의 11개 유전체에 대한 유전형이 확립되었음 (Matthijnssens et al., 2008).
  - 각 유전체의 핵산염기서열 cut-off value와 pairwise identity frequency graph에 의해 11개 유전형으로 분류됨[표 1-6].
  - 로타바이러스 11개 유전체의 VP7, VP4, VP6, VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP3, NSP4, NSAP5의 유전형은 G<sub>x</sub>-P<sub>[x]</sub>-I<sub>x</sub>-R<sub>x</sub>-C<sub>x</sub>-M<sub>x</sub>-A<sub>x</sub>-N<sub>x</sub>-T<sub>x</sub>-E<sub>x</sub>-E<sub>x</sub>-H<sub>x</sub>로 배열되며, 이 중에서 x는 각 유전체의 유전형 수임.
  - 현재 G 유전형은 27개, P 유전형은 37개, I 유전형은 11개, R 유전형은 4개, C 유전형은 5개, M 유전형은 6개, A 유전형은 14개, N 유전형은 5개, T 유전형은 7개, E 유전형은 11개, H 유전형은 6개가 알려져 있음(Collins et al., 2010; Matthijnssens et al., 2008; Trojnar et al., 2013).

[표 1-6] 혈청군 A 로타바이러스 11개 유전체의 유전형(genotype) 분류

유전체명	핵산염기서열 percent cut-off value	유전형 명칭	유전형 수	유전형 명칭 유래
VP7	80%	G	27 G	<b>G</b> lycosylated
VP4	80%	P	37 P	<b>P</b> rotease-sensitive
VP6	85%	I	11 I	<b>I</b> nter capsid
VP1	83%	R	4 R	<b>R</b> NNA-dependent RNA polymerase
VP2	84%	C	5 C	<b>C</b> ore protein
VP3	81%	M	6 M	<b>M</b> ethyltransferase
NSP1	79%	A	14 A	Interferon <b>A</b> ntagonist
NSP2	85%	N	5 N	<b>N</b> TPase
NSP3	85%	T	7 T	<b>T</b> ranslation enhancer
NSP4	85%	E	11 E	<b>E</b> nterotoxin
NSP5	91%	H	6 H	<b>pH</b> osphoprotein

2) 로타바이러스에 의해 발생하는 주요 질병 요약

▣ 사람 로타바이러스 감염증[그림 1-9]



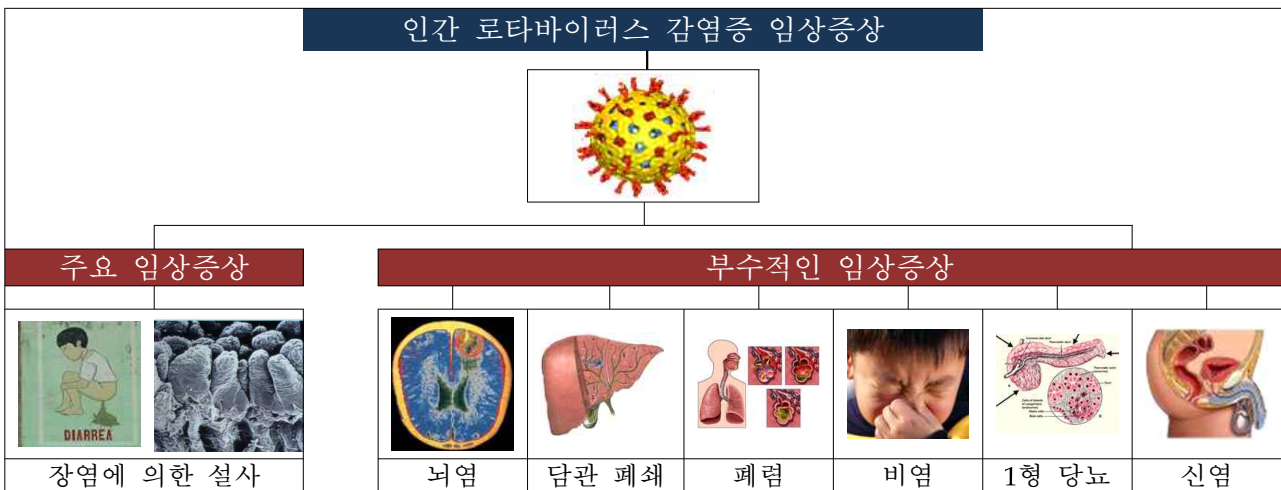
[그림 1-9] 사람 로타바이러스 감염증의 발병현황.

- 사람에서는 다양한 혈청군 중 혈청군 A 로타바이러스가 가장 심각한 문제를 일으키고 있음(Estes and Kapikian, 2007).
- 혈청군 A 로타바이러스(이하 로타바이러스로 칭함)는 영유아의 설사를 주 증상으로 국내는 물론 전 세계적으로 발생되고 있음(Estes and Kapikian, 2007).

- 특히 로타바이러스 감염증은 선진국이든 후진국이든 상관없이 영유아의 심한 설사 환자의 45%를 차지함(Estes and Kapikian, 2007).
- 로타바이러스 감염증 환자는 매년 1억 3천만명이 발생되고, 이 중 4십5만3천명이 사망하는 인간 사회에서 악성의 바이러스성 전염병 중 하나임(Tate et al., 2012).

■ 사람 로타바이러스 감염증 임상증상[그림 1-10]

- 사람 로타바이러스는 주로 장염을 유발함(Estes and Kapikian, 2007).
- 하지만 로타바이러스에 감염 된 영유아에서 드물게 상부호흡기 감염, 담관 폐쇄, 두통을 동반한 뇌염, 폐렴 등 다양한 임상증상이 발현됨(Blutt and Conner, 2007).



[그림 1-10] 인간 로타바이러스 감염증의 소화기 및 소화기 외 임상증상.

■ 소 및 돼지 로타바이러스 원인체[그림 1-11]

- 혈청군 A 로타바이러스에 속하는 바이러스가 주요한 병원체임(Papp et al., 2014).

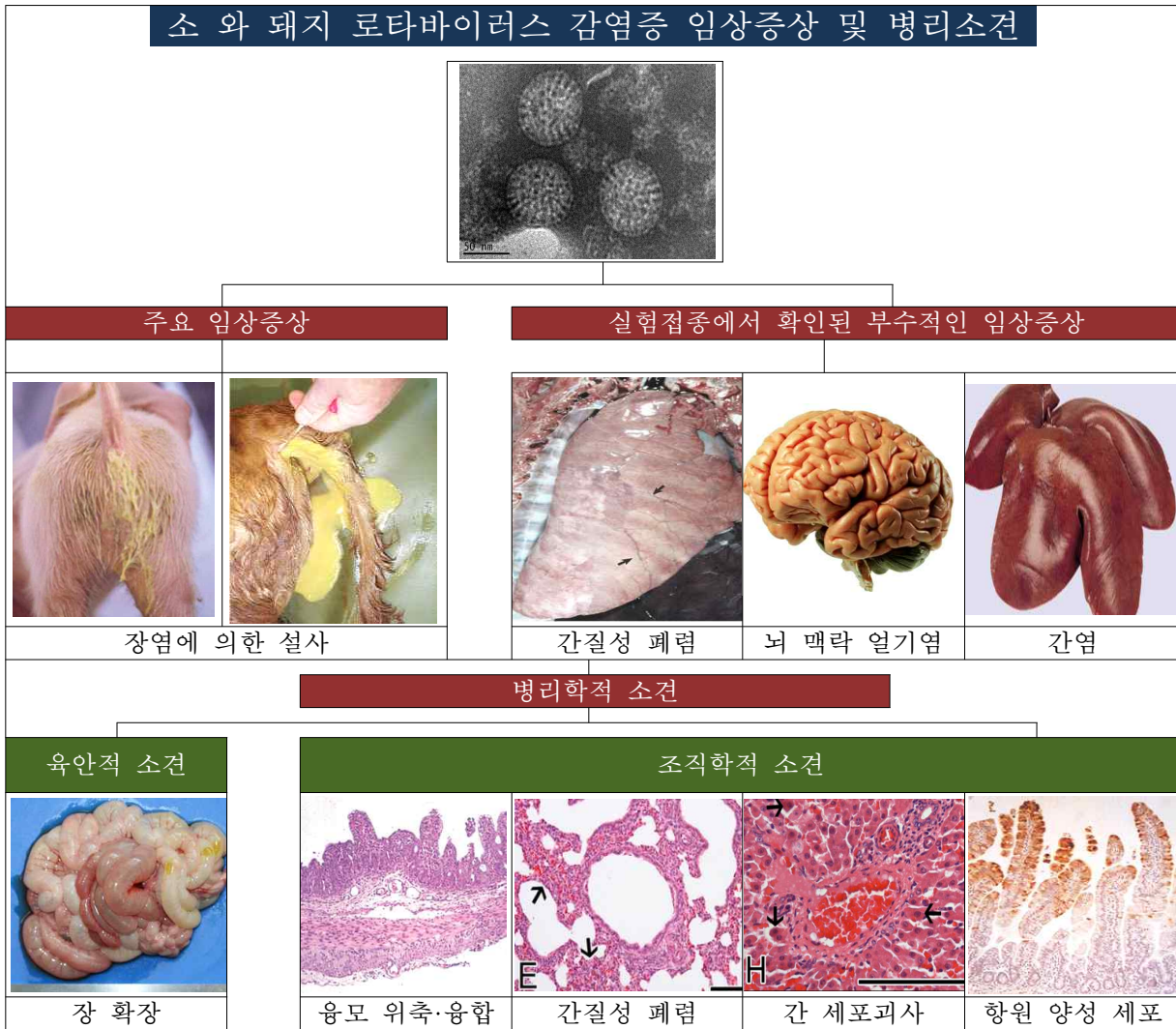
■ 소 및 돼지 로타바이러스 임상증상[그림 1-11]

- 로타바이러스에 감염 시 식욕저하, 설사, 구토가 발생하여, 위축과 폐사가 발생함.
- 회복된 동물은 면역기능이 약화되고 이로 인해 이유시기에 바이러스성 폐렴에 쉽게 노출되어 육성기에는 2차성의 세균성 폐렴이 병발하여 소 호흡기 복합증군 및 돼지 호흡기 복합 증후군에 쉽게 이환됨.

■ 소 및 돼지 로타바이러스 병리소견[그림 1-11]

- 부검 시 소장은 가스에 의해 확장되어 있고, 점막은 얇아져 있음.
- 다양한 수양성 장 내용물로 장은 채워져 있으며 설사변이 보임.
- 병리조직학적으로 소장 융모 상피세포의 탈락으로 융모의 위축 및 융합이 나타나며, 장상피세포의 탈락으로 음와상피세포의 다양한 증식이 관찰됨.
- 소화기 병변 외에 간질성 폐렴, 맥락 열기염, 간염 등을 일으킴.





[그림 1-11] 소와 돼지의 로타바이러스 감염증의 소화기 및 소화기 외 임상증상.

### 3) 로타바이러스 입자 및 유전체 구조 [그림 1-12]

#### ▣ 바이러스 입자 구조(Estes and Kapikian, 2007)

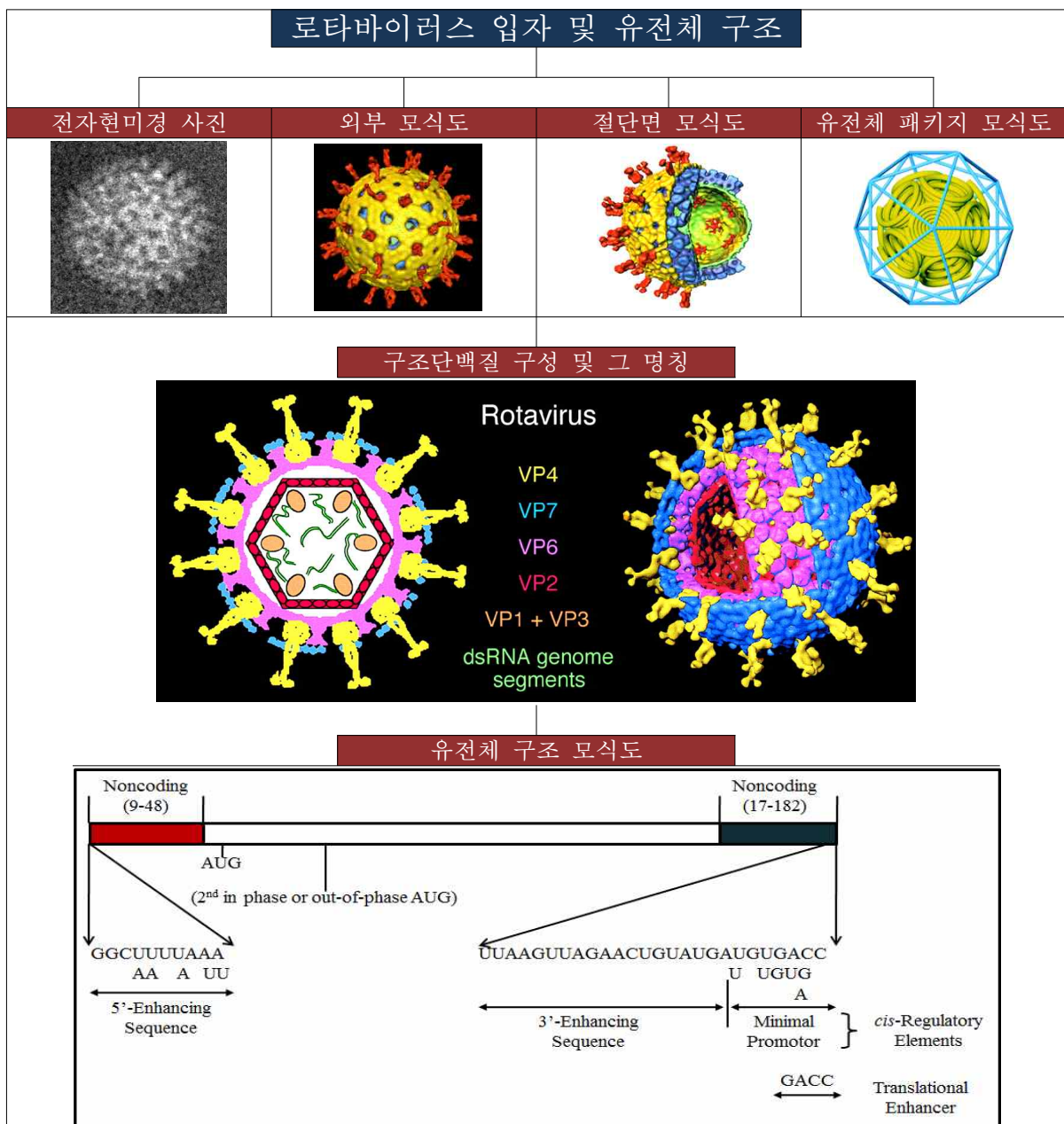
- 로타바이러스는 75 nm(VP4 spike 포함 시 100 nm) 크기의 정이십면체 바이러스임.
- 로타바이러스 입자는 3층의 캡시드층으로 구성되어 있음.
  - Core 캡시드 층 구성 단백질: VP2 단백질
  - 내부 캡시드 층 구성 단백질: VP6 단백질
  - 외부 캡시드 층 구성 단백질: VP7 단백질 및 VP4 단백질

#### ▣ 바이러스 유전체 구조(Estes and Kapikian, 2007)

- 로타바이러스는 3층의 캡시드 내에 11개의 분절화된 이중쇄 RNA 유전체 단편들을 가지고 있음(Estes and Kapikian, 2007).
- 로타바이러스 11개 유전체의 5' 및 3' 말단은 공통적인 특성을 가지고 있음



- 5' 말단 및 3' 말단은 9-48개와 17-182개의 핵산으로 구성된 비암호화 부분 (noncoding region)으로 구성되어 있음.
- 3' 말단의 5'-UGUGACC-3'은 유전체 발현 및 복제에 중요함. 특히 나머지 4개의 핵산은 단백질 번역을 촉진함(Chizhikov and Patton, 2000).
- 3' 말단은 일반적인 바이러스 유전체 구조와 달리 polyadenylation tail이 없음.
- 로타바이러스 mRNA 5' 말단 및 3' 말단은 상보적으로 단백질 합성 시 프라이팬 손잡이(panhandle structure) 모양으로 결합하여 단백질 합성이 일어남.
- 로타바이러스 10개의 유전자는 단일 단백질만 암호화 하며, 단지 11번째인 NSP5 유전체만이 2개의 단백질을 암호화 하고 있음.



[그림 1-12] 로타바이러스 입자 및 유전체 구조.

## 마. 돼지 로타바이러스 백신의 문제점

돼지 로타바이러스는 어린 자돈에 설사, 구토, 성장장애 및 폐사를 일으키는 바이러스성 전염병으로서 국내는 물론 전 세계적으로 발생하여 양돈산업에 막대한 경제적 피해를 일으키고 있음. 현재 국내 돼지 로타바이러스 백신은 야외 양돈농가에서 발생하고 있는 야외주의유전형과 일치하지 않아 불완전한 방어를 나타내고 있음. 따라서 백신을 투여함에도 재발하는 경향이 많음. 이에 국내 현장에 적합한 맞춤형 백신을 개발하여 그 피해를 최소화하여야 함.

### 1) 돼지 로타바이러스 발생경향

#### ▣ 국내외 돼지 로타바이러스 발생경향

- 돼지 로타바이러스 감염증은 돼지를 사육하고 있는 거의 모든 나라에서 발생하고 있음(Papp et al., 2014).
- 본 연구팀의 연구결과 국내 양돈농가의 포유자돈 설사의 주요 원인체는 돼지 로타바이러스였음(Kim et al., 2010).
  - 즉, 국내 자돈 설사분변에서 돼지 로타바이러스 감염률이 **38.3%**로 가장 높았음.
- 외국의 경우 나라별로 돼지 로타바이러스 감염증 발생비율은 차이가 있음.
  - 브라질 35.3%(Rácz et al., 2000), 태국 22.3%(Khamrin et al., 2007), 캐나다 9.2%(Morin et al., 1983), 독일 4%(Wieler et al., 2001), 아르헨티나는 3.3%(Parra et al., 2008)의 발생비율을 보였음.
- 요약
  - 국내 양돈농가에서 돼지 로타바이러스 백신을 투여하고 있음에도 불구하고 돼지 로타바이러스 감염증이 재발 중임.
  - 본 연구팀의 연구결과에서도 돼지 로타바이러스 감염증이 브라질의 발생률과 비슷한 38.3%의 높은 비율로 발생하여 만성적인 경제적 피해가 발생하고 있음.
  - 이는 국내 양돈농가에서 발생하고 있는 돼지 로타바이러스를 이용한 현장 맞춤형 돼지 로타바이러스 백신의 개발이 필요함을 의미함.

### 2) 국내 돼지 로타바이러스 백신판매 현황 및 문제점

#### ▣ 국내 시판 돼지 로타바이러스 백신주

- 국내 동물약품 회사에서 시판중인 돼지 로타바이러스는 농림축산검역본부에서 개발되고 기술이전 된 것임.
  - 농림축산검역본부에서 기술이전 받아 판매중인 회사: 중앙백신연구소, 코미팜, 대성

미생물연구소, 고려비엔피, 녹십자수의약품.

- 백신의 근간은 돼지 로타바이러스 A1주(G5P[7] 유전형 조합) 및 10주(G9P[7]유전형 조합) 바이러스의 불활화 혹은 약독화 백신임.
- 돼지 로타바이러스 백신은 TGEV와 혼합, 혹은 TGEV와 PEDV와 불활화 혹은 약독화 혼합 백신의 형태로 판매되고 있음.
- 회사별로 대장균 혹은 클로스트리디움 퍼프리전스를 포함한 제품도 있음.
- 외국계 다국적 회사에서 국내에 시판 중인 돼지 로타바이러스 백신
  - 외국계 다국적 회사에서 개발한 백신의 근간은 1990년대 미국에서 유행하였던 G5, G4, P[7], P[6] 유전형 조합을 보이는 바이러스들을 포함하고 있음.
  - 인터베트코리아: 약독화 생독 돼지 로타바이러스 및 돼지 전염성 위장염 바이러스 약독화 생독 혼합백신. 여기에 대장균, 클로스트리디움 퍼프리전스, 위축성 비염, 혹은 돼지 단독 불활화백신이 혼합된 제품도 판매 중.
  - 바이엘코리아: 돼지 로타바이러스 및 TGEV 약독화 생독 혼합 백신.
  - 한국화이자동물약품: 돼지 로타바이러스, TGEV, 클로스트리디움 퍼프리전스, 대장균 불활화 혼합백신.

#### ▣ 국의 돼지 로타바이러스 유전형 분포[그림 1-13]

- 로타바이러스 VP7 및 VP4 단백질은 바이러스 중화항원으로 작용하여, 백신 개발 시 VP7 및 VP4 유전형 조합이 중요함.
- VP7 단백질은 세포질 내에서 합성 중 당화(Glycosylation)되어 있어, 이에 대한 유전형을 G 유전형이라고 함.
- VP4 단백질은 단백질 분해 효소에 민감(Protease sensitive)하다고 하여, 이에 대한 유전형을 P 유전형이라고 함.
- 돼지 로타바이러스 G 유전형 분포(Papp et al., 2013)
  - 최소 11개의 G 유전형이 보고되었음(G1-G6, G8-G12).
  - 세계적으로 G5(45.8%), G3(11.2%), G4(9.6%) 순서로 다발하고 있음.
  - 하지만 지역별, 대륙별 호발 G 유전형은 상이함. 예를 들어 미국 및 캐나다는 G5(71.43%), G4(8.19%), G3(8.19%) 순서로 다발하고 있었음.
- 돼지 로타바이러스 P 유전형 분포(Papp et al., 2013)
  - 최소 19개의 P 유전형이 보고되었음(P1-P13, P19, P22, P23, P26, P27, P32).
  - 세계적으로 P[7](47.4%), P[6](15.9%), P[13](3.2%) 순서로 다발하고 있음.
  - 하지만 G 유전형과 마찬가지로 지역별, 대륙별 P 유전형 발생 비율은 상이함.
  - 즉, 미국과 캐나다는 P[7]이 77.2%로 압도적으로 많지만, 유럽의 경우에는 P[6] 유

전형이 P[7] 유전형보다 다수를 차지함.

- 현재 다국적 회사에서 판매 중인 돼지 로타바이러스 백신의 G 및 P 유전형 조합
  - 미국과 캐나다에서 호발하고 있는 G5, G4, P[7], P[6], P[1]을 보이는 바이러스 중에서 2개의 로타바이러스 주를 사용하고 있음.

#### ■ 돼지 로타바이러스의 시대별 주요 G 및 P 유전형 변화[그림 1-13]

- 돼지 로타바이러스 G 및 P 유전형은 시대별로 변화하고 있음
  - 특정 국가의 특정 시점의 주요 G 및 P 유전형은 해당 돈군에 질병을 일으키지만, 역으로 이에 대한 항체가 돈군에서 생성됨.
  - 이로 인해 특정 시점의 주요 G 및 P 유전형은 돈군에 형성된 항체에 의해 점점 그 발생빈도가 낮아짐.
  - 반면에 주요 G 및 P 유전형에 방어가 되지 않은 소수의 G 및 P 유전형이 증가하여, 어느 시점에서는 주요 G 및 P 유전형이 됨.
  - 혹은 특정 시점의 주요 G 및 P 유전형에 맞는 백신의 투여는 주요 G 및 P 유전형의 발생빈도를 낮추고, 소수의 G 및 P 유전형이 증가하여 주요 G 및 P 유전형이 되게 함.
  - 또한 주요 G 및 P 유전형을 보이는 바이러스의 돌연변이에 의해 주요 G 및 P 유전형에 방어가 되지 않은 G 및 P 유전형이 증가할 수 있음.
- 캐나다 돼지 로타바이러스 G 및 P 유전형 변화[그림 1-14]
  - 1982년-1984년에는 G 및 P 유전형으로 오직 G5와 P[7]만 유행하였음.
  - 하지만 2005년-2006년에는 G 유전형으로 G4, G5, G2, G9 순으로, P 유전형으로는 P[6], P[13], P[27] 순으로 G 및 P 유전형이 변화되었음.
- 태국 돼지 로타바이러스 G 및 P 유전형 변화[그림 1-14]
  - 2000년-2001년에는 G 유전형으로 G4와 G3 유전형과 P 유전형으로는 오직 P[6]와 P[19] 유전형이 압도적으로 점유하고 있었음.
  - 하지만 2006년-2008년에는 G 유전형으로 G9, G3 순으로, P 유전형으로는 P[23] 유전형이 우세한 것으로 변화되었음.
- **요약**
  - 전 세계적으로 보고된 대표적인 돼지 로타바이러스 G 및 P 유전형은 보고되었지만, 이는 지역별, 시대별 G 및 P 유전형의 변화를 대변하지 못함.
  - 특히, 캐나다, 스페인, 태국의 시대별 G 및 P 유전형을 조사한 결과, 지금까지의 G 및 P 유전형 누계치와는 달리 시대별로 G 및 P 유전형이 극적으로 변화하고 있음.

- 이는 현재 발생하고 있는 돼지 로타바이러스를 효과적으로 예방하기 위해서는 현재 시점에서 가장 다발하는 돼지 로타바이러스를 이용한 맞춤형 백신이 개발되어야 하는 것을 의미함.

▣ 국내 돼지 로타바이러스 유전형 분포

- 본 연구팀은 국내 단일 기관으로서 유일하게 전 세계적으로 가장 많은 150주의 돼지 로타바이러스를 분리하여 선행연구를 수행한 바 있음.
- 이 중 98주에 대한 G 및 P 유전형 조합을 검사하였음(Kim et al., 2010).
  - 그 결과 가장 호발하는 G 유전형은 G5(67.3%), G8(17.3%), G9(9.2%) 순이었음.
  - P 유전형은 P[7]이 92.9%로 가장 호발하였고, 그 다음으로 P[23]과 P[1]이 2.0%씩 차지하고 있었음[표 1-7].

[표 1-7] 국내 분리 돼지 로타바이러스 G 및 P 유전형 조합(Kim et al., 2010)

유전형	G5	G8	G9	Unknown
P[1]	0	1	0	1
P[7]	63	16	7	5
P[23]	0	0	2	0
Unknown	3	0	0	0

- 이를 G 및 P 유전형 조합으로 보면, G5P[7] 조합이 64.3%로 가장 많았고, G8P[7]이 16.3%, G9P[7]이 7.1%, GxP[7]이 5.1%, G5P[x]가 3.1%, G9P[23]이 2.0%, G8P[1] 및 GxP[1]이 각각 1.0% 이었음[표 1-8].

[표 1-8] 국내 분리 돼지 로타바이러스 G 및 P 유전형 조합 분포

G & P 조합	바이러스 수(%)	G & P 조합	바이러스 수(%)
G5P[7]	63 (64.3%)	G5P[x]	3 (3.1%)
G8P[7]	16 (16.3%)	G9P[23]	2 (2.0%)
G9P[7]	7 (7.1%)	G8P[1]	1 (1.0%)
GxP[7]	5 (5.1%)	GxP[1]	1 (1.0%)

- 즉, 국내에서 가장 많이 분포하는 G 및 P 유전형은 G5 및 P[7] 유전형이었음.
- 국내 돼지 로타바이러스에서 2번째로 많이 발생하고 있는 G 유전형은 소의 G 유전형인 G[8]이었으며, 이 외에도 소의 P 유전형인 P[1]도 발생한다는 것임.
- 즉, 국내 돼지 로타바이러스는 소 로타바이러스와 혼합감염에 의해 국내 돼지 로타바이러스와 소 로타바이러스 11개 유전체가 서로 교환되어 발생하는 재배열 (reassortment) 로타바이러스가 많은 부분을 차지하고 있다는 것임.

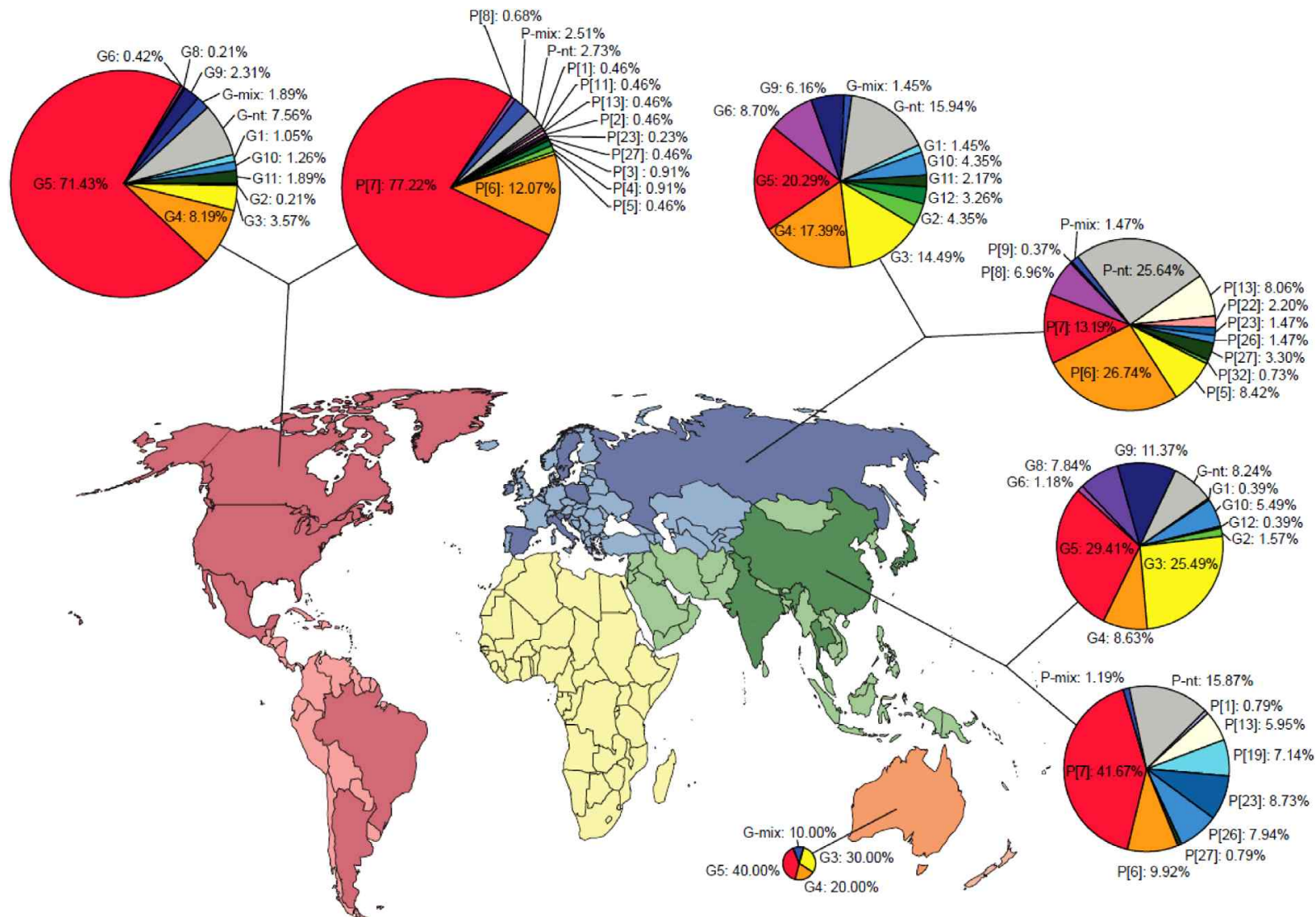
• 국내 백신의 문제점 요약

- 본 연구팀이 선행연구로 얻어진 결과에 따르면, 현재 국내에서 발생하고 있는 주요 G 유전형은 G5, G8, G9이며, 주요 P 유전형은 P[7], P[1], P[23] 이었음.
- 국내에서 시판중인 돼지 로타바이러스 혼합 백신은 G5P[7] 및 G9P[7] 유전형 조합으로서, 국내에서 발생하고 있는 G8, P[23], P[1] 유전형을 보이는 돼지 로타바이러스는 예방효과가 낮을 수 밖에 없음.
- 또한 외국계 수입백신의 경우에도 G5, G4, P[7], P[6] 유전형 조합으로서 국내에서 발생하는 G8, G9, P[1], P[23]을 보이는 돼지 로타바이러스를 방어하는데 한계가 있을 수밖에 없음.
- 결론적으로 현재 기존백신이 접종되고 있음에도 불구하고 야외 사육현장에서 다발하고 있는 이유는, 국내에서 시판중인 돼지 로타바이러스 백신주가 양돈농가에 서 발생하고 있는 바이러스들과 그 G 및 P 유전형이 불일치하기 때문임.

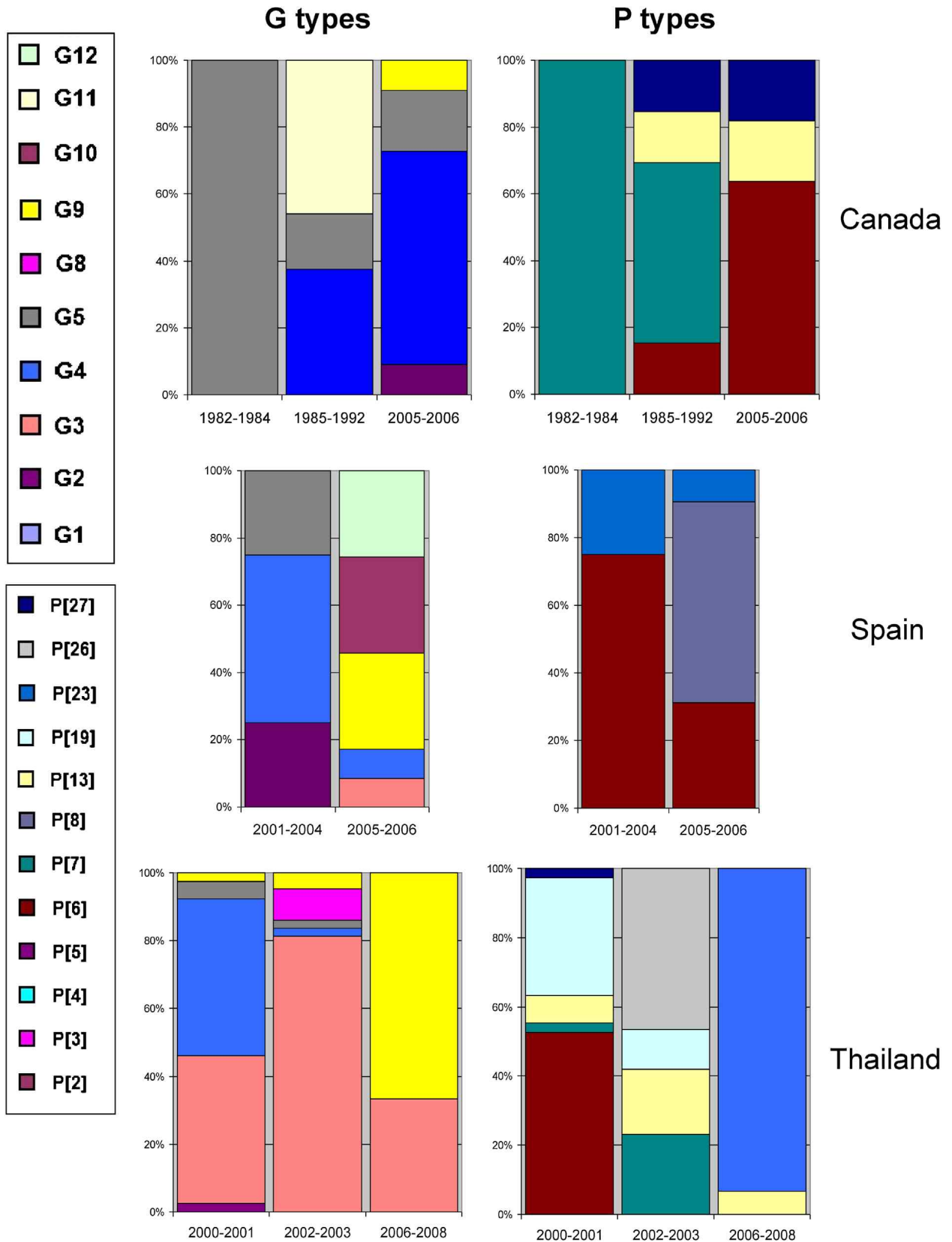
5) 돼지 로타바이러스 백신개발 필요성 기술적 측면 요약

- 국내는 물론 전 세계적으로 돼지 로타바이러스 감염증이 양돈현장에서 다발하고 있음.
- 현재 국내외 시판 백신은 국내 양돈 농가에서 발생하고 있는 돼지 로타바이러스 G 및 P 유전형과 완벽히 일치하지 않아, 백신을 투여하였음에도 재발하고 있음.
- 따라서 국내 양돈농가에서 발생하고 있는 돼지 로타바이러스 G 및 P 유전형과 일치하는 맞춤형 백신을 개발하여 돼지 로타바이러스 감염증을 제어하여야 함.





[그림 1-13] 전 세계 돼지 로타바이러스 VP7 단백질에 대한 G 유전형 및 VP4 단백질에 대한 P 유전형 분포. 대륙별 및 각 지역별 G 및 P 유전형 발생경향은 상이함. (Papp et al., 2013)



[그림 1-14] 캐나다, 스페인, 태국의 돼지 로타바이러스 VP7-G 유전형 및 VP4-P 유전형의 시대별 변화. 시대별로 주요 G 및 P 유전형은 변화함. 이에 돼지 로타바이러스 백신은 현재 발생중인 유전형 바이러스를 사용하여 개발되어야 함(Papp et al., 2013).



## 바. 소 로타바이러스 백신의 문제점

소 로타바이러스는 송아지에 설사, 구토, 성장장애 및 폐사를 일으키는 바이러스성 전염병으로서 국내는 물론 전 세계적으로 발생하여 축우산업에 막대한 경제적 피해를 일으키고 있음. 국내 시판 소 로타바이러스 백신은 현장에서 발생하고 있는 바이러스 유전형과 일치하지 않아 불완전한 방어를 함. 따라서 백신을 투여함에도 재발하는 경향이 있어 축우농가에서는 백신의 사용을 기피하고 있음. 이에 국내 현장에 적합한 맞춤형 백신을 개발하여 국내 축우농가의 보호 및 해외 수출을 통해 축산업의 창조경제 달성에 기여하여야 할 것임.

### 1) 소 로타바이러스 발생동향

#### ▣ 국내외 소 로타바이러스 발생동향

- 소 로타바이러스 감염증은 소를 사육하고 있는 모든 나라에서 발생하는 것으로 보임 (Papp et al., 2014).
- 본 연구팀에 의한 연구결과 송아지 설사의 주요 원인체는 소 로타바이러스였음
  - 즉, 국내 송아지 설사분변에서 소 로타바이러스 감염률이 64.3%로 가장 높았음 (Lim et al., 2005).
- 외국의 경우, 나라별로 소 로타바이러스 감염증 발생비율은 차이가 있음.
  - 뉴질랜드는 57%(Al Mawly et al., 2014), 브라질 49.2%(Coura et al., 2015), 중국 42.1%(Wei et al., 2013), 독일 37.8%(Gillhuber et al., 2014), 아일랜드 33.1%(Collins et al., 2014), 아르헨티나 30%(Badaracco et al., 2012), 튀니지 15.4%(Hassine-Zaafraane et al., 2014), 알제리 14.6%(Ammar et al., 2014), 미국 오하이오 주는 9.4%(Amimo et al., 2013)의 발생비율을 보였음.
- 요약
  - 국내 축우농가에서 소 로타바이러스 백신을 투여하고 있음에도 불구하고 소 로타바이러스 감염증이 지속적으로 발생하고 있음.
  - 본 연구팀의 선행 연구를 통해 소 로타바이러스 감염증이 뉴질랜드 발생률과 비슷한 64.3%의 높은 비율로 발생하여 경제적 피해가 큼을 확인하였음.
  - 이는 국내에서 사용 중인 소 로타바이러스 백신의 방어력에 한계가 있음을 의미함.
  - 따라서 소 로타바이러스감염증의 피해를 효과적으로 예방할 국내 현장에 유행 중인 바이러스를 사용한 맞춤형 백신의 개발이 절실함.

### 3) 국내 소 로타바이러스 백신판매 현황

#### ■ 국내 시판 소 로타바이러스 백신주

- 국내 동물약품 회사에서 시판중인 소 로타바이러스는 농림축산검역본부에서 개발되고 기술이전 된 것임.
  - 현재 국내에서 사용되고 있는 소 로타바이러스 백신은 678 백신주(G10P[11] 유전형 조합)와 P44 백신주(P유전형은 규명되지 않은 G6P[x] 유전형 조합)가 혼합된 불활화 혹은 약독화 생건조혼합백신임.
  - 국내 백신주 선발 근거의 명확한 보고는 없지만, 아마도 백신주 선발 당시 미국의 발생경향과 다국적 회사의 제품이 모두 G10 및 G6 유전형을 보이는 백신주를 사용하였기 때문으로 추정됨.
  - 현재, 농림축산검역본부에서 기술이전 받아 판매중인 회사: 중앙백신연구소, 코미팜, 대성미생물연구소, 고려비엔피, 녹십자수의약품.
  - 소 로타바이러스 백신은 상술한 소 로타바이러스 백신주 2개 외에 BCoV BC94주가 섞여 있는 생혼합건조백신(일명 로코백신)의 형태로 판매되고 있음.
  - 이화팜텍: 일본 교토바이켄에서 수입한 소 로타바이러스(G6, G8, G10 혼합 백신), BCoV, 대장균을 혼합시킨 사균 백신을 판매하고 있음.
- 외국계 다국적 회사에서 국내에 시판 중인 소 로타바이러스 백신
  - 외국계 다국적 회사에서 개발한 백신의 근간은 1990년대 미국에서 유행하였던 G6, G10, P[5], P[11] 유전형 조합을 보이는 백신주들을 주로 포함하고 있음.
  - 한국화이자동물약품: 소 로타바이러스(G6+G10 혼합 백신주) 및 BCoV 약독화 생독 혼합 백신 혹은 소 로타바이러스(G6 단독 혹은 G6+G10 혼합 백신주), BCoV, 대장균 혼합 불활화 백신.

#### ■ 국외 소 로타바이러스 유전형 분포[그림 1-15]

- 소 로타바이러스 G 유전형 분포(Papp et al., 2014)
  - 최소 12개의 G 유전형이 보고되었음(G1-G6, G8, G10-G12, G15, G21).
  - 세계적으로 G6(56.7%), G10(20.6%), G8(3.5%) 순서로 다발하고 있음.
  - 하지만 지역별, 대륙별 호발 G 유전형은 상이함. 예를 들어 미국 및 캐나다에서는 G6(55.39%) 및 G10(14.22%)이 압도적으로 많은 반면에 일본의 경우에는 G6 및 G10 외에 G8도 상당히 많은 부분을 차지함.
- 소 로타바이러스 P 유전형 분포(Papp et al., 2014)
  - 최소 10개의 P 유전형이 보고되었음(P[1], P[3], P[5], P[7], P[10], P[11], P[14], P[21], P[29], P[33]).

- 세계적으로 P[5](25.9%), P[11](21.5%), P[1](2.15%) 순서로 다발하고 있음. 나머지 43.6%의 소 로타바이러스는 P 유전형이 규명되지 않았음.
- P 유전형 발생 비율은 지역별 및 대륙별호 상이함. 예를 들어 미국과 캐나다는 P[5]와 P[11]가 우세하지만, 유럽과 아시아는 P[5], P[11] 외에 P[1]이 상당수 있음.

#### ▣ 소 로타바이러스 시대별 주요 G 및 P 유전형 변화[그림 1-15]

- 소 로타바이러스 G 및 P 유전형은 시대별로 변화하고 있음
  - 앞서 돼지 로타바이러스 시대별 주요 G 및 P 유전형에서 기술한 바와 같이 특정 시점의 주요 G 및 P 유전형의 감염, 혹은 이에 대한 맞춤형 백신의 투여는 특정 시점의 G 및 P 유전형이 감소하게 함.
  - 반면에 주요 G 및 P 유전형의 항체에 의해 방어가 되지 않는 소수의 G 및 P 유전형이 증가하여, 주요 G 및 P 유전형이 됨.
- **브라질** 소 로타바이러스 G 및 P 유전형 변화[그림 1-16]
  - 브라질은 1994-1995년도에 G6, G10, P[1], P[11]이 우세하였음.
  - 하지만, 2000-2001년도에는 G10은 사라지고 G8 유전형이 신규 출현하여 G6와 G8 이 우세 유전형으로, P 유전형에서는 P[1]과 P[11] 외에 P[5] 유전형이 우세 유전형으로 출현하였음.
- **이탈리아** 소 로타바이러스 G 및 P 유전형 변화[그림 1-16]
  - 이탈리아는 1994-1998년에는 G 유전형으로는 G6, G10, G8 순서로, P 유전형으로는 P[11], P[5] 순서로 우세하였음.
  - 하지만, 2003-2005년에는 G6가 증가하고 G10이 감소하였으며, P 유전형으로는 P[11]과 P[5]는 대폭 감소하였지만 P[1] 유전형이 대거 신규 출현하였음.
- **일본**의 G 및 P 유전형 변화[그림 1-16]
  - 일본의 경우에는 1983-1991년에는 G 유전형으로 G6 및 G10과 P 유전형으로 P[5], P[11], P[1] 순서로 우세하였음.
  - 하지만, 1995-2000년에는 G6 다음으로 G8 유전형이 우세주로 출현하고 P 유전형으로는 P[5], P[11] 다음으로 P[29] 유전형이 우세주로 출현하였음.
- **요약**
  - 전 세계적으로 보고된 대표적인 소 로타바이러스 G 및 P 유전형은 보고되었지만, 이는 지역별, 시대별 G 및 P 유전형의 변화를 대변하지 못함.
  - 외국(브라질, 이탈리아, 일본)의 경우와 같이 시대별 G 및 P 유전형을 조사한 결과, 지금까지의 G 및 P 유전형 누계치와는 달리 시대별로 G 및 P 유전형이 크게 변화한다는 것임.

- 이는 현재 발생하고 있는 소 로타바이러스를 효과적으로 예방하기 위해서는 현재 시점에서 가장 다발하는 소 로타바이러스를 이용한 맞춤형 백신이 개발되어야 하는 것을 의미함.

▣ 국내 소 로타바이러스 유전형 분포

- 본 연구팀은 국내 단일 기관으로서는 유일하게 전 세계적으로 가장 많은 200주의 소 로타바이러스를 분리하였음.
- 이 중 113주에 대한 G 및 P 유전형 조합을 분석하였음[표 1-9, 1-10](Ha et al., 2009; Kim et al., 2011, 2012; Park et al., 2006, 2011, 2013, 2014c,d)
  - 가장 호발 하는 G 유전형은 G8(49.6%), G6(26.5%), G5(23.9%) 순이었음[표1-10].
  - P 유전형은 P[7]이 82.3%로 가장 많았고, 그 다음으로 P[5]가 15.10%, P[1]이 2.7%씩 차지하고 있었음[표 1-9].

[표 1-9] 국내 분리 소 로타바이러스 G 및 P 유전형 분포

유전형	G5	G6	G8
P[1]	3	0	0
P[5]	1	13	3
P[7]	23	17	53

- 이를 G 및 P 유전형 조합으로 보면, G5P[7] 조합이 64.3%로 가장 많았고, G8P[7]이 16.3%, G9P[7]이 7.1%, GxP[7]이 5.1%, G5P[x]가 3.1%, G9P[23]이 2.0%, G8P[1] 및 GxP[1]이 각각 1.0%이었음[표 1-10].

[표 1-10] 국내 분리 소 로타바이러스 G 및 P 유전형 조합 분포

G & P 조합	바이러스 수(%)	G & P 조합	바이러스 수(%)
G8P[7]	53 (46.9%)	G5P[1]	3 (2.7%)
G5P[7]	23 (20.4%)	G8P[5]	3 (2.7%)
G6P[7]	17 (15.0%)	G5P[5]	1 (0.9%)
G6P[5]	13 (11.5%)	Total	113 분리주

- 즉, 국내에서 가장 많이 발생하고 있는 G 유전형은 G8, G6, G5 순이며, P 유전형은 P[7], P[5], P[1] 순이었음.
- 따라서, 국내 소 로타바이러스 G 유전형에서 돼지의 G 유전형인 G5가 세 번째로 호발하고, 소 로타바이러스 P 유전형에서 돼지의 P 유전형인 P[7]이 다수였음.

- 이는 앞서 돼지 로타바이러스와 유사하게 국내 소 로타바이러스들도 소와 돼지의 로타바이러스의 혼합감염에 의한 재배열 바이러스가 우세하다는 것임.
- 또한 국내 발생 재배열 소 로타바이러스 11개 유전체에 대한 유전형을 조사한 결과, 표 1-11에서 보이는 바와 같이 116개의 소 로타바이러스 분리주 중에서 30주의 소 로타바이러스는 소와 돼지의 로타바이러스 유전체를 서로 교환한 재배열 로타바이러스였음(Park et al., 2011).

[표 1-11] 국내 소 재배열 로타바이러스 11개 유전형의 조합(Park et al., 2011)

분리주 이름	분리주 수	숙주	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
OSU		돼지	G5	P[7]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
KJ25-1	27 <sup>a</sup>	소	G8	P[7]	I5	R1	C1	M2	A1	N1	T1	E1	H1
KJ9-1	1 <sup>b</sup>	소	G6	P[7]	I2	R2	C1	M2	A1	N2	T1	E2	H1
KJ19-2	2 <sup>c</sup>	소	G6	P[7]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
RF		소	G6	P[1]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3

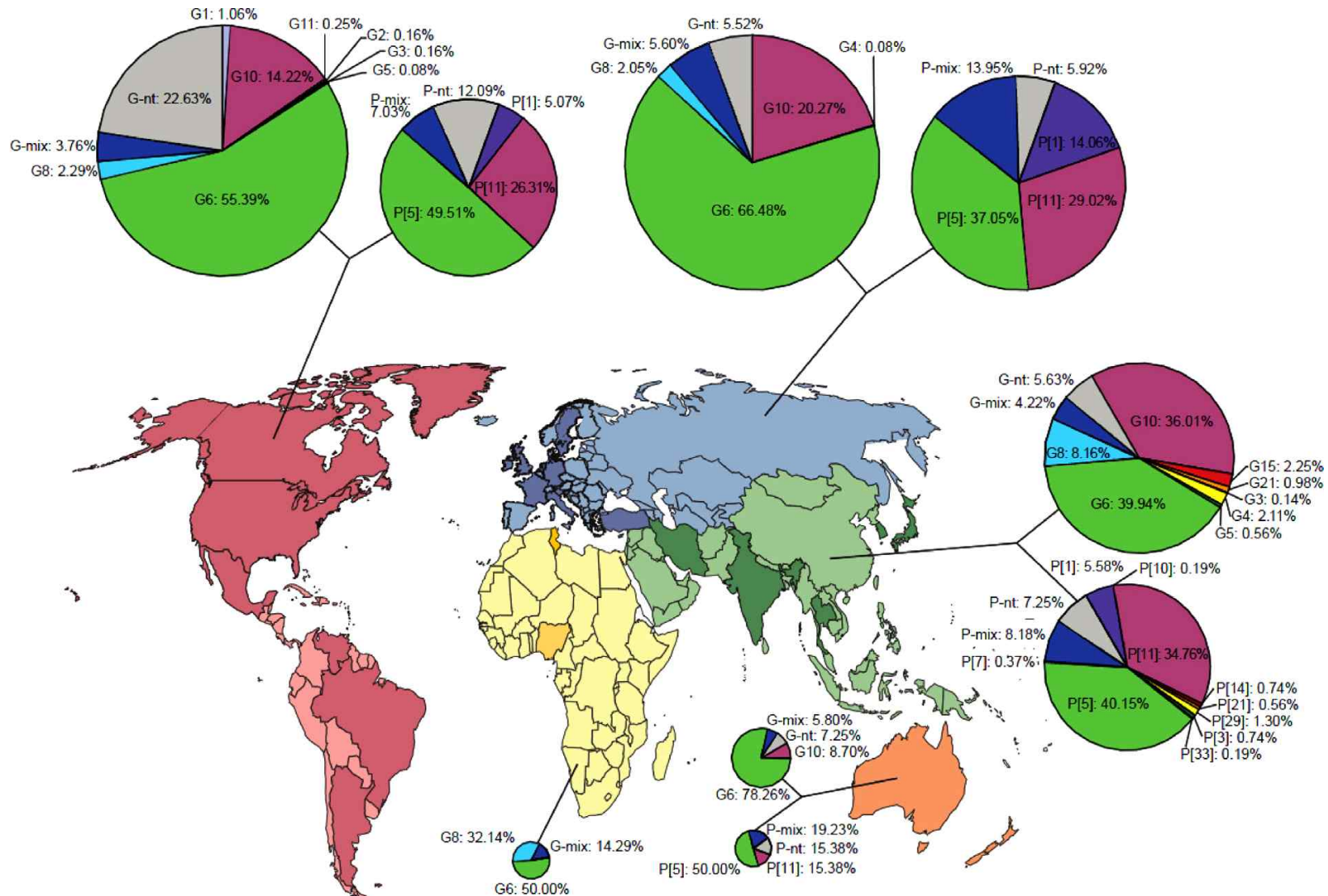
<sup>a</sup>KJ25-1 주와 똑같은 유전체 배열을 보이는 분리주 수. <sup>b</sup>KJ9-1 주와 똑같은 유전체 배열을 보이는 분리주 수. <sup>c</sup>KJ19-2 주와 똑같은 유전체 배열을 보이는 분리주 수.

• 요약

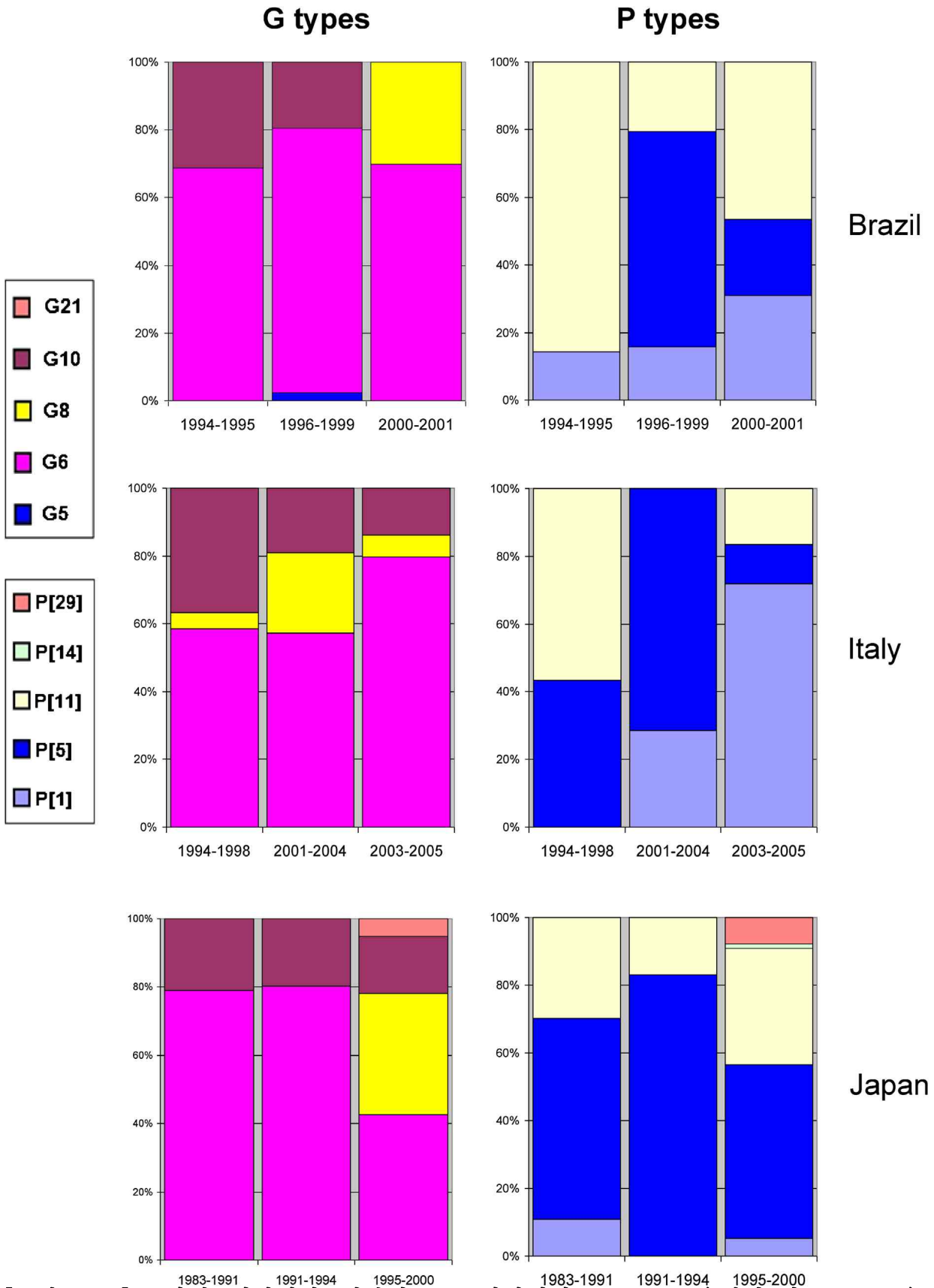
- 국내 판매중인 소 로타바이러스 백신주는 G10P[11] 및 G6P[x] 유전형 조합으로, 국내 발생하고 있는 G8, G5, P[7], P[1], P[5]인 소 로타바이러스의 재발을 지속적으로 막는데 한계가 있음.
- 또한 외국계 수입백신도 G6, G8, G10, P[11], P[5], P[1] 유전형 조합으로서 국내에서 발생하는 G5, P[7]를 갖는 소 로타바이러스에는 효과가 제한적일 수 있음.
- 결국 국내에서 소 로타바이러스 백신접종 후에도 재발하는 이유는 현재 국내에서 사용중인 백신주가 현장에서 발생하고 있는 바이러스유전형이 불일치하기 때문임.

4) 소 로타바이러스 백신개발 필요성 기술적 측면 요약

- 국내를 포함하여 전 세계적으로 축우농가에서 소 로타바이러스 감염증이 다발하고 있음.
- 국내외 시판 백신은 현재 국내 축우 농가에서 발생하고 있는 소 로타바이러스 G 및 P 유전형과 완벽히 일치하지 않아, 해당질병의 재발과 지속의 원인이 되고 있음.
- 따라서 국내 축우농가에서 발생하고 있는 소 로타바이러스 G 및 P 유전형과 일치하는 맞춤형 백신을 개발하여 소 로타바이러스 감염증을 제어하여야 함.



[그림 1-15] 전 세계 소 로타바이러스 VP7 단백질에 대한 G 유전형 및 VP4 단백질에 대한 P 유전형 분포. 대륙별 및 각 지역별 G 및 P 유전형 발생경향이 상이함(Papp et al., 2013).



[그림 1-16] 브라질, 이탈리아, 일본의 소 로타바이러스 VP7-G 유전형 및 VP4-P 유전형의 시대별 변화. 시대별로 주요 G 및 P 유전형은 변화함. 이에 소 로타바이러스 백신은 현재 발생하는 주요 유전형을 보이는 바이러스를 사용하여 개발되어야 함(Papp et al., 2013).



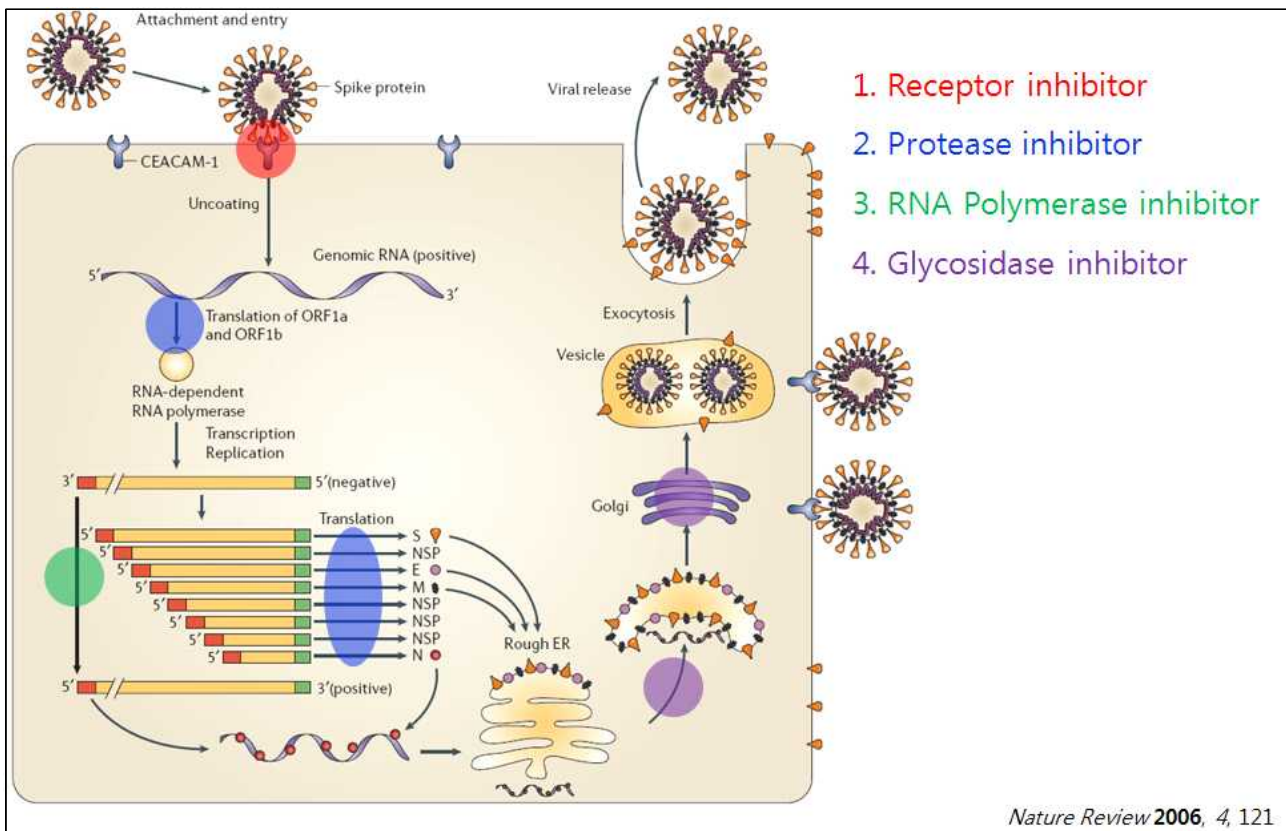
## 사. PED 치료제 개발의 필요성

최근 국내외에 변이형 돼지 유행성 설사(PED)의 폭발적인 발병으로 막대한 경제적 피해가 발생하고 있음. 변이형 PED를 효과적으로 제어하기 위한 수단으로는 백신 및 치료제 개발이라 할 수 있음. 변이형 PED의 치료제는 세계적으로 현재까지 전무하여 이에 대한 치료제의 개발은 양돈산업 생산성과 부가가치측면에서 매우 중요한 과제임.

### 1) 항코로나바이러스 치료제 개발 동향

#### ▣ 항바이러스 치료제 개발

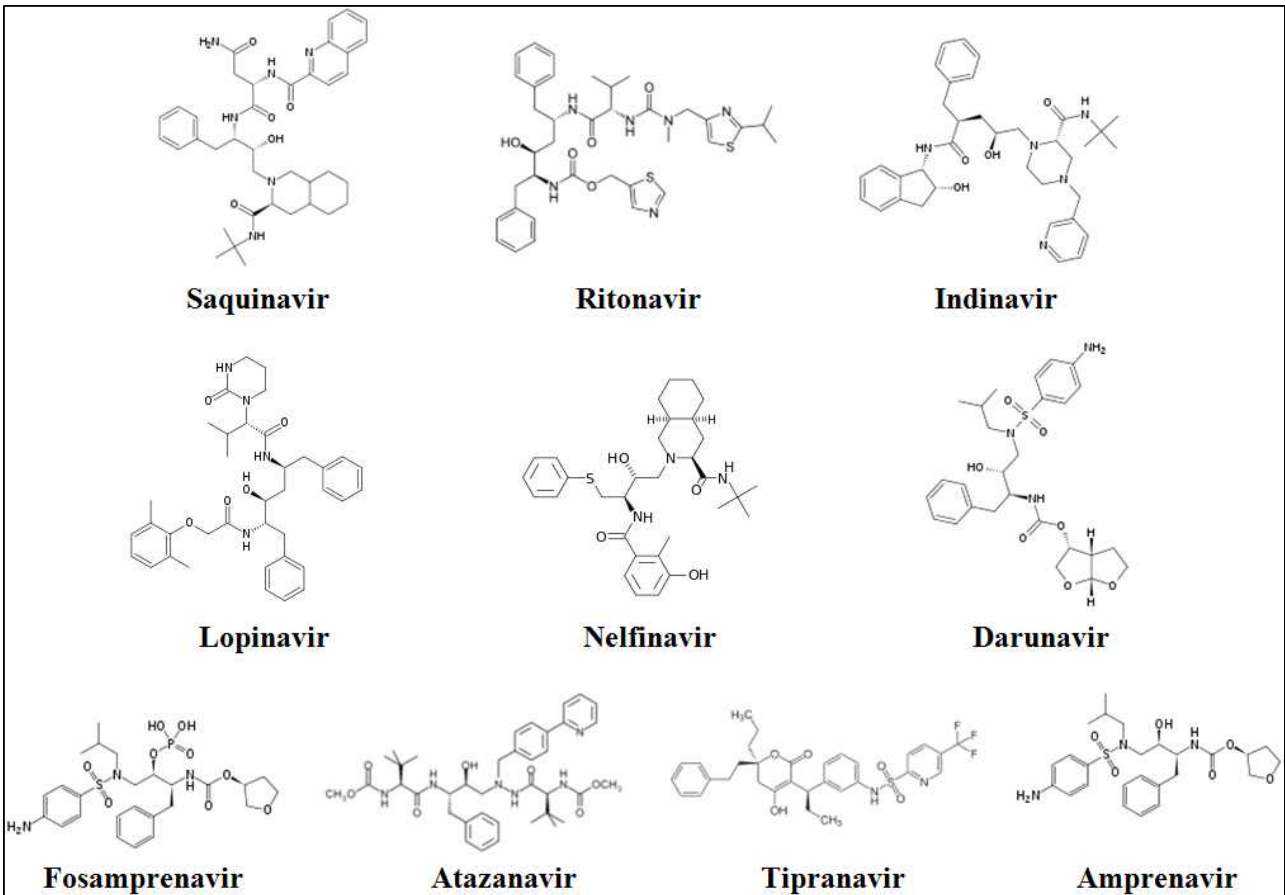
- 항바이러스제는 바이러스 복제 과정을 억제하는 기전을 타깃으로 함[그림 1-17].



[그림 1-17] 코로나바이러스의 복제과정(Cornelia et al., 2006).

- 바이러스의 세포 흡착저해 (attachment 저해) 및 세포 내 이동저해제(entry 저해)
  - HIV의 gp120 단백질과 수용체 CD4와의 결합 저해제 (Jacobson et al., 2009): TNX-335 (Labaizumab)-monoclonal antibody (임상3상)
  - HIV의 숙주 내 수용체 CCR5 저해제 (Pugach et al., 2008): Vicriviroc, Cenicriviroc, PRO 140 - monoclonal antibody (임상3상)

- 바이러스 단백질 분해효소 저해제 (viral protease 저해) [그림 1-18] (Flexner, 2007; Smith and Simon, 2005; Luber et al., 2007)
  - HIV의 protease inhibitor (FDA 승인) : peptidomimetic hydroxyethylamine 유도체 (Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Lopinavir), non-peptidic inhibitors (Nelfinavir, Amprenavir, Fosamprenavir, Atazanavir, Tipranavir, Darunavir)
  - Picornavirus의 3C protease inhibitor (Binford et al., 2005): Ruintrivir (Pfizer)



[그림 1-18] FDA 승인받은 protease 저해제기반 항바이러스제들

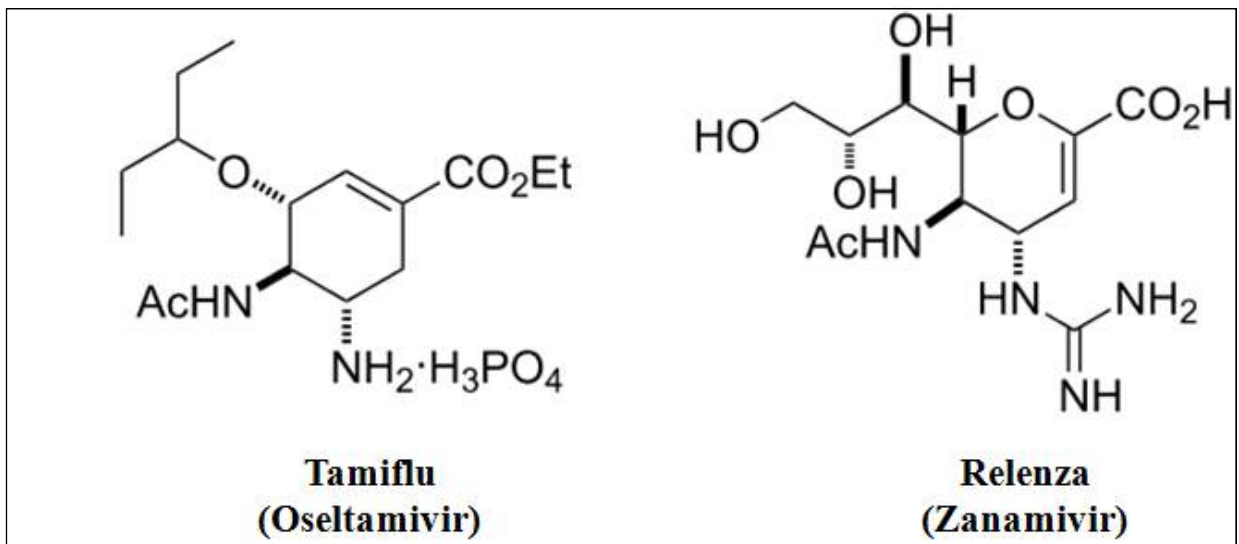
- 유전자의 전사 및 복제저해제(Polymerase 저해)[표 1-12]
  - 바이러스는 유전자를 복제하기 위해 DNA 또는 RNA polymerase을 이용하는데, 이러한 바이러스 polymerase 억제제는 크게 3가지 그룹으로 나누어짐
  - Nucleoside 및 nucleotide analog : HIV, HBV, HSV등의 치료제로 개발
  - Pyrophosphate analogy
  - Allosteric inhibitor (또는 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NNRTIs)

[표 1-12]. 바이러스의 polymerase 억제제(Bo, 2006)

Type of inhibitor			Virus
Nucleoside and nucleotide analog	Pyrophosphate analog	Allosteric inhibitors	
Acyclovir			HSV, VZV
Penciclovir			HSV
Ganciclovir			HCMV
Brivudine			VZV
Cidofovir			HCMV
	Foscarnet		H C M V , HSV
Zidovudine			HIV
Didanosine			HIV
Zalcitabine			HIV
Lamivudine			HIV, HBV
Stavudine			HIV
Abacavir			HIV
Tenofovir			HIV
Emtricitabine			HIV
		Nevirapine	HIV
		Delavirkine	HIV
		Efavirenz	HIV
Adfovir			HBV

• 세포로부터 방출억제제(release 저해)[그림 1-19]

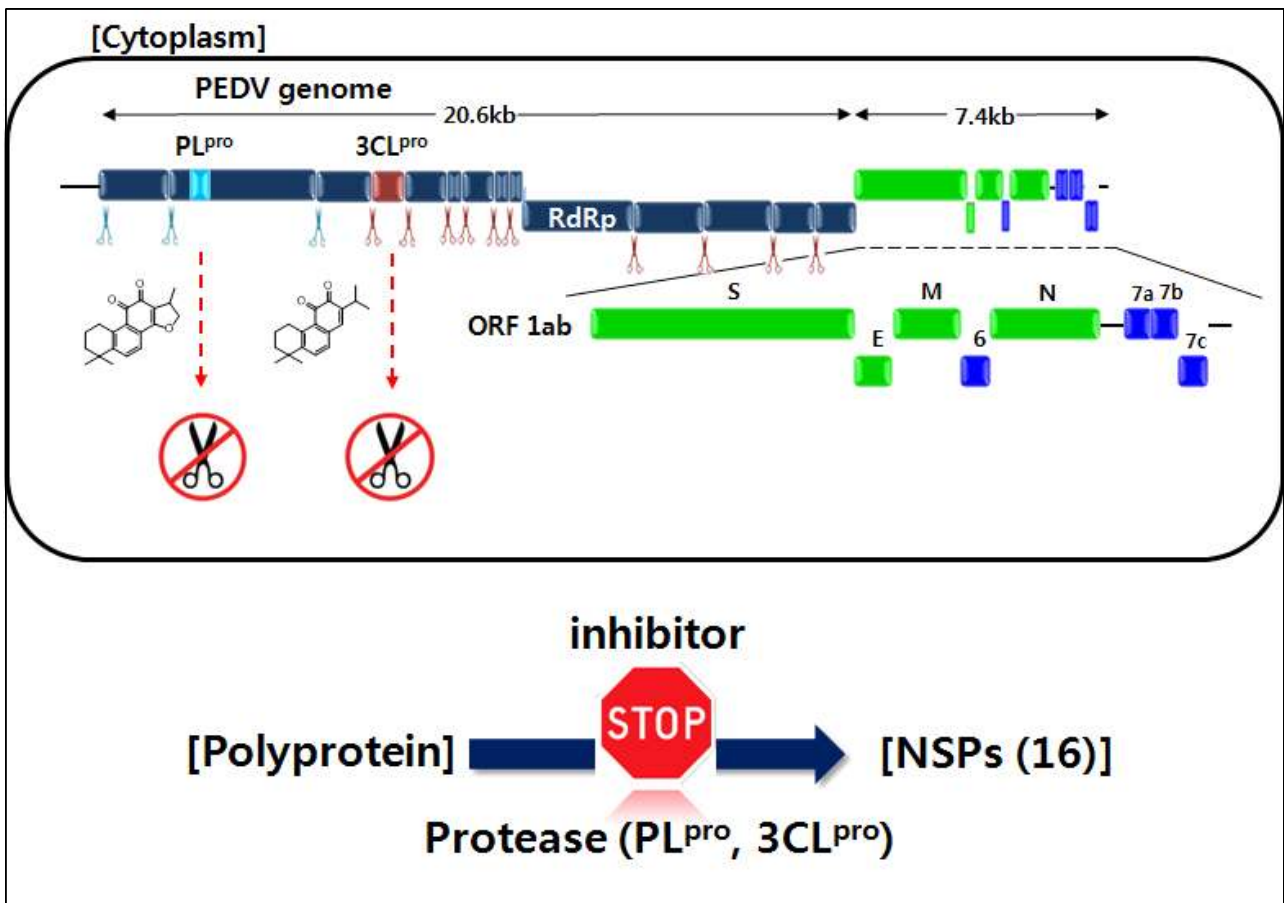
- Neuraminidase inhibitor : 자나미비르 (Zanamivir, 리렌자), 오셀타미비르 (Oseltamivir, 타미플루)는 인플루엔자 바이러스 치료제



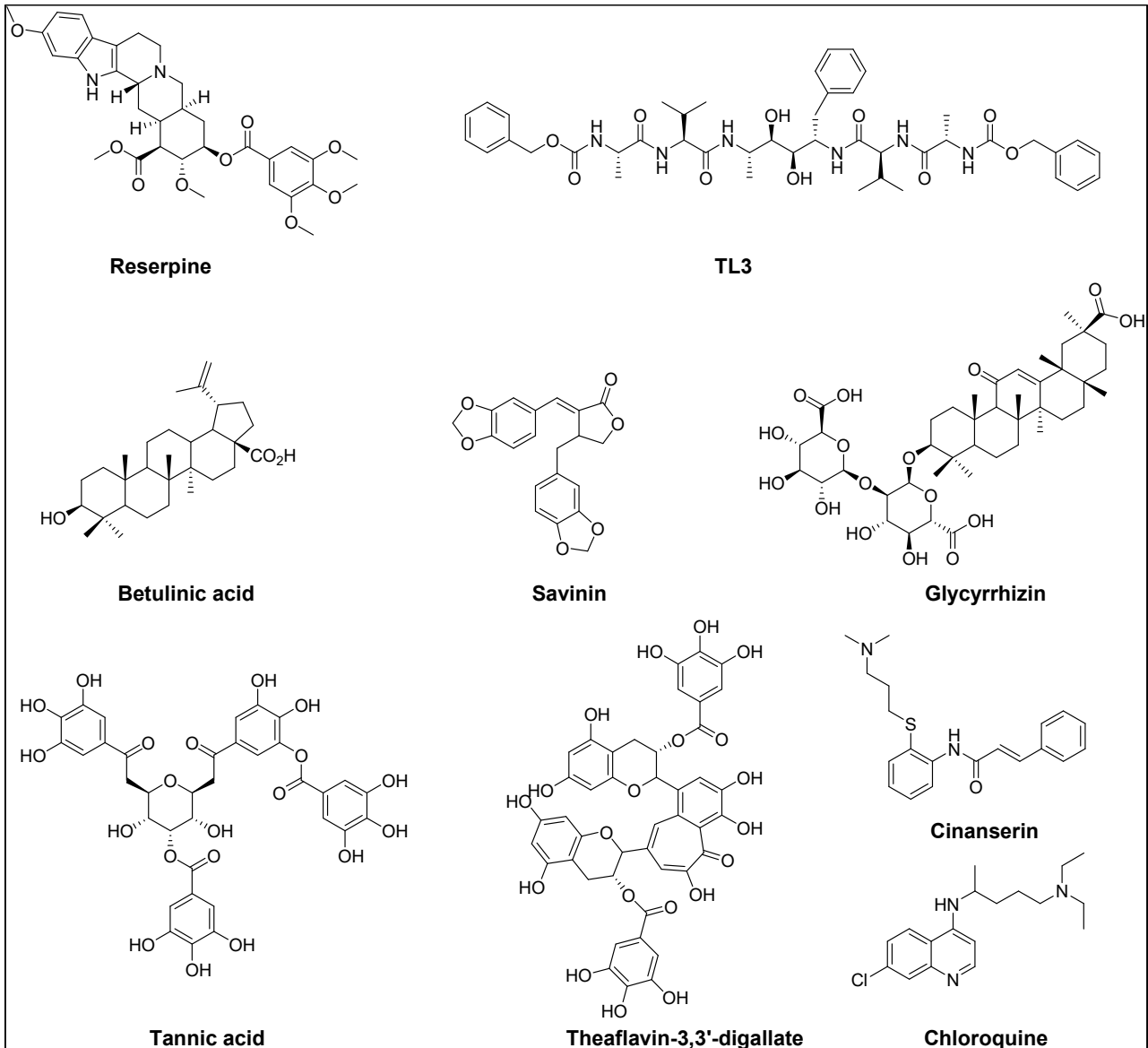
[그림 1-19] 대표적인 바이러스 Neuraminidase inhibitor.

▣ 항코로나바이러스 신약 개발 target

- 현재 코로나바이러스 제어용 target으로 가장 연구가 활발히 진행되는 것은 코로나바이러스 단백분해효소[그림 1-20]
  - 3C-like protease (3CL<sup>pro</sup> and main protease M<sup>pro</sup>): NSP4-16 단백질 절단
  - Papain-like protease (PL<sup>pro</sup>): NSP1-3 단백질 절단
- 코로나바이러스는 숙주 세포 내에서 하나의 바이러스 다단백질체 (polyprotein)를 생산한 후 바이러스 자체 protease에 의해서 바이러스 다단백질체가 각각의 단백질로 분할됨.
- 따라서 바이러스 복제에 관여하며 숙주에는 영향이 없이 바이러스에만 선택적으로 작용하는 virus-encoded protease가 새로운 항바이러스제 개발의 target으로 대두되었으며, 다양한 저해제가 개발되었음[그림 1-21]
- 특히, 코로나바이러스의 protease는 변이가 적고 구조가 밝혀져 있어 PEDV뿐만 아니라 사스 및 메르스 코로나바이러스에도 적용할 수 있는 target임.
- 본 연구에서는 protease 및 PED 바이러스를 활용하여 선도소재를 도출하고 PED 감염 동물모델 구축을 통하여 효능을 평가하고 후보소재를 개발하고자 함.

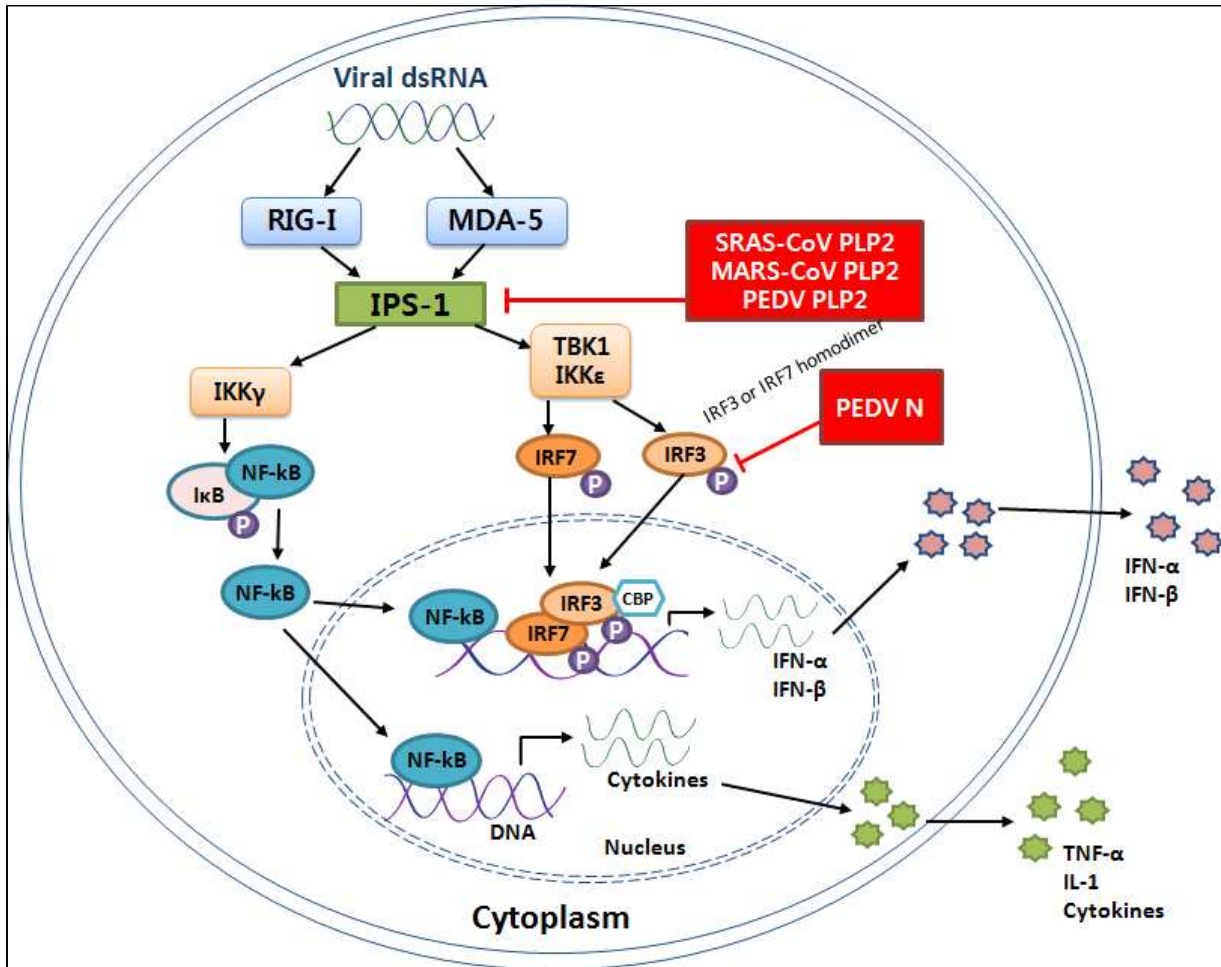


[그림 1-20] 바이러스 증식·복제에 중요한 역할을 하는 코로나바이러스 protease의 역할



[그림 1-21] 현재까지 연구되어진 대표적인 코로나바이러스 질환 타깃인 3CL<sup>pro</sup> 저해제

- 또한, 코로나바이러스 감염 시 바이러스 단백질이 숙주세포의 면역반응을 억제하여 바이러스 복제를 유도하게 됨[그림 1-22].
  - 최근 연구에 따르면 PEDV가 감염된 숙주 세포에서 IRF3의 인산화 및 전사활성이 차단되어 항바이러스 기전에 중요한 역할을 하는 type 1 interferon (IFN- $\alpha$ /IFN- $\beta$ )의 생성이 저해된다고 보고되었음 (Charley et al., 2006; Laude et al., 1993).
  - 특히, PEDV의 N과 PLP2 단백질은 RIG-1 signaling의 중요 인자인 IRF-3의 인산화를 억제하여 인터페론 생성을 억제하는 것으로 보고됨 (Devaraj et al., 2007; Narayanan et al., 2008; Zust et al., 2007; Xing et al., 2013).
  - 따라서, 인터페론의 감소를 유도하는 바이러스 단백질을 억제함으로써 숙주의 방어 기전을 활성화 하는 것은 항바이러스 작용의 중요한 target이라 할 수 있음.



[그림 1-22] PEDV 단백질에 의한 type I IFN 생성의 저해 기전.

- 본 연구팀은 PEDV 감염 시 숙주 세포내 인터페론 생성을 억제하는 바이러스 단백질을 특이적으로 억제하는 천연물질을 개발 할 계획임.

## 2) 국내외 바이러스 치료제 개발현황 및 문제점

### ▣ 항바이러스제 기술 및 제품 개발 동향

- 항바이러스제는 일반적으로 바이러스 중에 따라 각기 다른 치료제를 사용하기도 하나 적용되는 범위가 겹치는 바이러스 질환도 있음.
  - Polymerase inhibitor는 HIV, HBV, CMV 등 질환 증세가 다른 바이러스질환에도 적용되는 반면, neruaminidase inhibitor는 인플루엔자 바이러스에만 적용됨
- 미국 등 선진국에서는 복합물질이면서 뛰어난 효과를 가진 약의 가능성을 인지하기 시작함.
  - 각종 논문에서 복합물질에 대한 가능성을 소개하였지만, 복합조성물에 포함 되어있는 물질이 단일로 존재하는 경우는 매우 낮음.



- 현재 주로 쓰이는 항바이러스제로는 acyclovir(피부연고), ribavirin & interferon(간염), zidobudine(에이즈) 그리고 전 세계적으로 보유하고 있는 타미플루(인플루엔자)가 있음.
- HIV 치료제 단독 연구 분야는 2006년 동안 168건의 제품이 개발되고 있으며, 전체 신약개발 제품순위에서 25위를 차지함..
- 미국의 Cangene(캔진)사에서 개발한 수두 치료제, 미국 Abbott(애보트)사에서 개발한 호흡기 질환 치료제, 그리고 한국의 녹십자에서 개발한 HCV 치료제는 현재 국내는 물론 전 세계에서 시판중임.
- 한국의 녹십자에서 개발한 HBV 치료제, 프랑스 Sanofi-aventis (사노피아벤티스)에서 개발한 광견병 치료제, 그리고 영국의 Genmap(젠맵)에서 개발한 HCV 치료제 또한 시판을 위해, 임상시험 중임.
- 국내에서는 은행나무 추출물로부터 분리한 polysaccharide의 PED 바이러스의 세포내 이동 억제연구, 삼지구엽초 추출물의 PED 세포내 복제를 억제 연구 등이 있음 (Cho et al., 2012; Lee et al., 2015).
- 본 연구팀은 감태에서 추출한 화합물(phlorotannin)에서 PED 복제 억제 기전 연구를 수행하여 특허 출원 및 SCI논문에 게재하는 등 천연자원을 활용한 항바이러스제 개발에서는 국내외에서 선두 연구그룹 중 하나임(Kwon. et al., 2013).

#### ■ 시판되는 항바이러스제의 문제점

- 현재 사용되고 있는 바이러스 치료제로는 각종 화학약품들과 인터페론이 있으나 임상에서 많은 한계점들을 가지고 있음
  - 화학제품은 내성증가와 부작용으로 국지적 사용만 가능함
  - 인터페론의 경우, 낮은 효능에도 불구하고, 11조원 정도의 시장을 가지고 있음
- 기존의 항바이러스 제품은 간염 바이러스, 에이즈, 인플루엔자 등 일부 바이러스 질환에만 국한되어 있음

### 3) PED 치료제 개발의 필요성 기술적 측면 요약

- 국내외에서 고병원성의 변이형 PED가 다발하여 그 피해가 누적되어 가고 있어, 변이형 PED 제어를 위한 효과적인 치료제 개발이 절실함.
- 현재까지 개발된 항바이러스 치료제들은 바이러스 내성 및 비특이적 반응으로 다양한 부작용을 나타내어 천연물 기반의 항바이러스제 개발이 반드시 필요함.
- 이러한 치료제 개발의 성공은 PED 바이러스는 물론 유사 코로나바이러스인 소 코로나 바이러스, 인간의 사스 및 메르스와 같은 악성 코로나바이러스 전염병 치료제로 응용 확대 할 수 있을 것임.



## 2. 경제적 측면

### 가. 축산업과 전염병의 상관성

국내 축산업의 비약적인 발전으로 축산업이 국내 농업을 선도하고 있지만, 재난성 및 고질적 전염병이 축산업의 경쟁력 확보에 걸림돌이 되고 있음. 이러한 전염병을 제어할 수 있는 백신 및 치료제 산업화는 축산업의 선진화를 이루는 필수적인 대책임.

#### 1) 축산업이 농업성장 선도[그림 2-1]

- ▣ 국내 축산업 생산액은 1990년 4조원에서 **2013년 16조원으로 괄목한 성장**을 하고 있음 (2014년 농림축산식품부 연보).
- ▣ 특히 국내 농업생산액 내 축산업의 비중이 1990년 21.7%에서 2013년 36%로 높아졌고, 2010년 이후 축산업이 농업 성장을 선도하고 있음(2014년 농림축산식품부 연보).
- ▣ 2013년 농업 생산액 상위 10대 품목 중에서 양돈, 한육우, 닭, 우유, 달걀, 오리 품목 등 6개 축산물이 상위 10위권 내에 들어 있음(2014년 농림축산식품부 연보).



[그림 2-1] 국내 축산업 현황.

## 2) 축산업 발전의 걸림돌은 전염병[그림 2-2]

▣ 가축전염병은 크게 만성의 고질적 전염병 및 재난성 전염병으로 나눌 수 있음[그림 2]

- 고질적 전염병은 그동안 지속적으로 가축에 문제를 일으키고 있는 질병으로서 대표적인 것이 소와 돼지의 로타바이러스 감염증, 돼지 생식기 호흡기 증후군 등이 있음.
- 반면에 재난성 전염병은 고병원성 조류 인플루엔자, 구제역, 변이형 돼지 유행성 설사(PED) 등이 있음.



[그림 2-2] 국내 축산업의 문제점인 고질적 및 재난성 전염병.

▣ 산업동물의 고질성 전염병은 경제적 피해를 지속적으로 일으키고 있음[그림 2-3]

- 2011년 국내 축산 총생산액은 15조원 이었으며, 이 중 고질적 전염병에 의한 손실액을 최소한 약 20%로 가정 시 약 3조원의 손실액이 발생한 것으로 추산됨.
- 특히 인간에 감염될 수 있는 로타바이러스를 비롯, 식중독의 주요 원인체인 살모넬라 및 크립토스포리디움 감염증의 발생은 국가이미지 하락, 수출 및, 관광수입 급감 등을 일으킴.
- 이에 산업동물 고질적 전염병에 대한 백신과 치료제 개발 및 산업화가 성취될 경우

질병발생에 따른 전체 피해예상액의 최소 20%인 약 6천억원을 절감할 수 있음.

- 이와 함께 국내 축산업의 생산성 및 경쟁력 강화는 물론 생물산업 및 제약산업의 활성화를 통해 국가 경제에 긍정적 영향을 줄 수 있음.



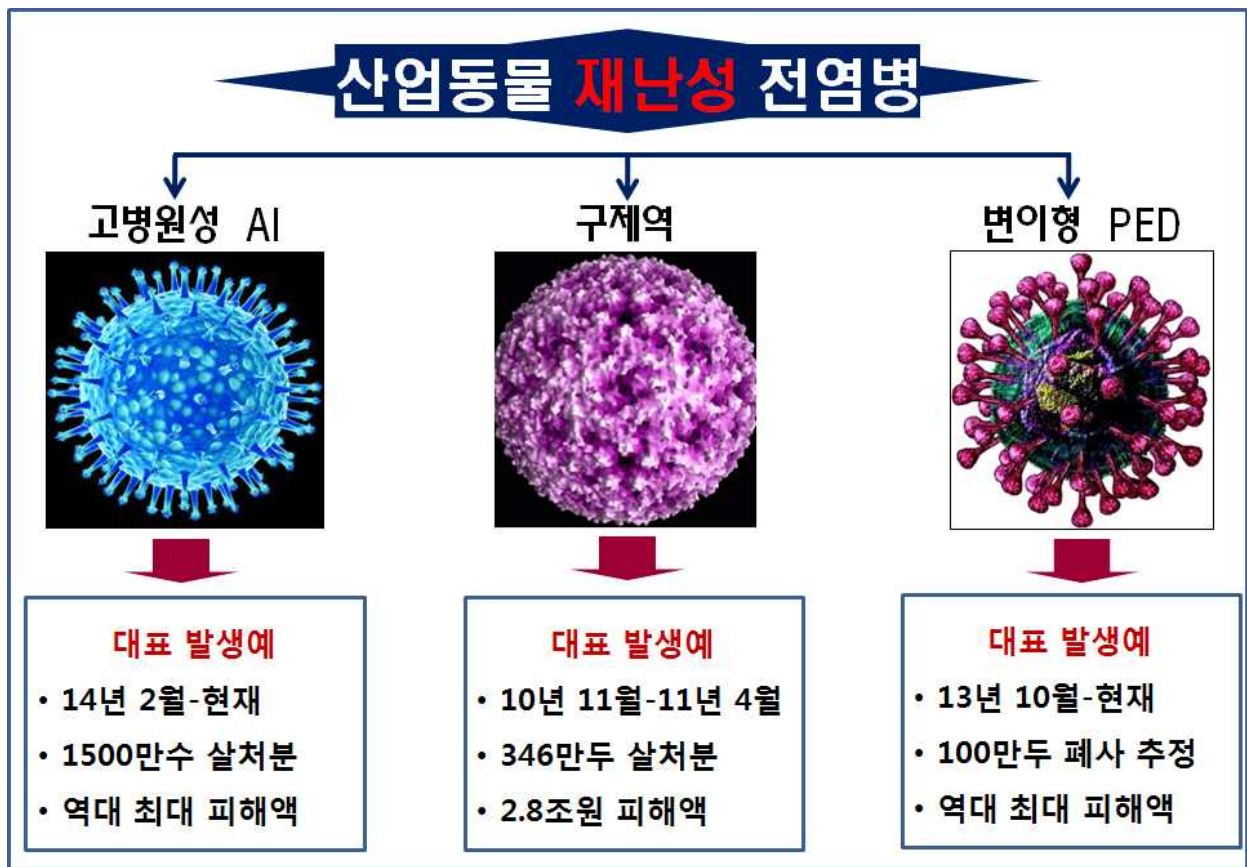
[그림 2-3] 국내 축산업내 고질성 전염병 발생에 따른 피해와 대책.

▣ 산업동물 재난성 전염병은 국내 축산업의 경쟁력을 약화시키고 있음[그림 2-4]

- 국내에서는 주기적으로 산업동물 재난성 전염병이 지속적으로 발생하여 국내 축산업에 심각한 경제적 손실을 주고 있음.
- 대표적인 예가 지금까지 5번 발생하였던 고병원성 조류 인플루엔자(HPAI)로서, 작년 부터 현재까지 발생하고 있는 이번에도 현재 닭과 오리를 1500만수 이상을 살처분고 있어 역대 최대 피해액이 발생할 예정임(농림축산검역본부).
- 구제역의 경우도 국내에 5회 발생하였으며, 2010년 11월~2011년 4월까지 발생한 경우를 보면 총 346만두의 소와 돼지를 살처분함으로써 직접적인 피해액만 2.8조원에 달했으며, 간접적인 피해액까지 합산 시 10조원 가량의 천문학적인 피해가 발생하였음(농림축산검역본부).
- 그동안 국내 고질적인 PED 바이러스의 병원성이 증가한 변이형 PED가 2014년 10월 부터 지금까지 국내 거의 모든 양돈장에 발생하여 100만두 이상이 폐사가 추정되고

있고 그에 따른 막대한 경제적 피해가 발생한 것으로 판단됨(Lee and Lee, 2014).

- 이러한 고질성 혹은 재난성 전염병을 제어하기 위한 가장 효과적인 과학적 수단은 백신 및 치료제라 할 수 있음.
- 국가 재난성 전염병을 퇴치하기 위한 백신과 치료제 개발 후 산업화는 해당 산업의 생산성 기반이 강화되고, 이와 관련한 생물소재산업과 동물약품산업의 활성화로 경제적 측면의 극대화로 이어질 수 있을 것임.



[그림 2-4] 국내 축산업의 주요한 국가 재난성 수준의 전염병 발생 예들

### 3) 국내 축산업의 주요 전염병 발생 상황 요약

- 현재, 국내는 물론 세계적으로 재난성 및 고질적 전염병의 발생으로 막대한 경제적 피해가 발생하고 있음.
- 가축의 재난성 및 고질적 전염병을 퇴치하기 위한 근본적인 수단은 백신 및 치료제의 확보라 할 수 있음.
- 따라서, 국내에서 발생하고 있는 이들 전염병에 대한 백신 및 치료제를 산업화할 경우 축산농가의 소득증대는 물론 수입 대체 및 수출까지 확장된 경제적 파급효과가 기대됨.



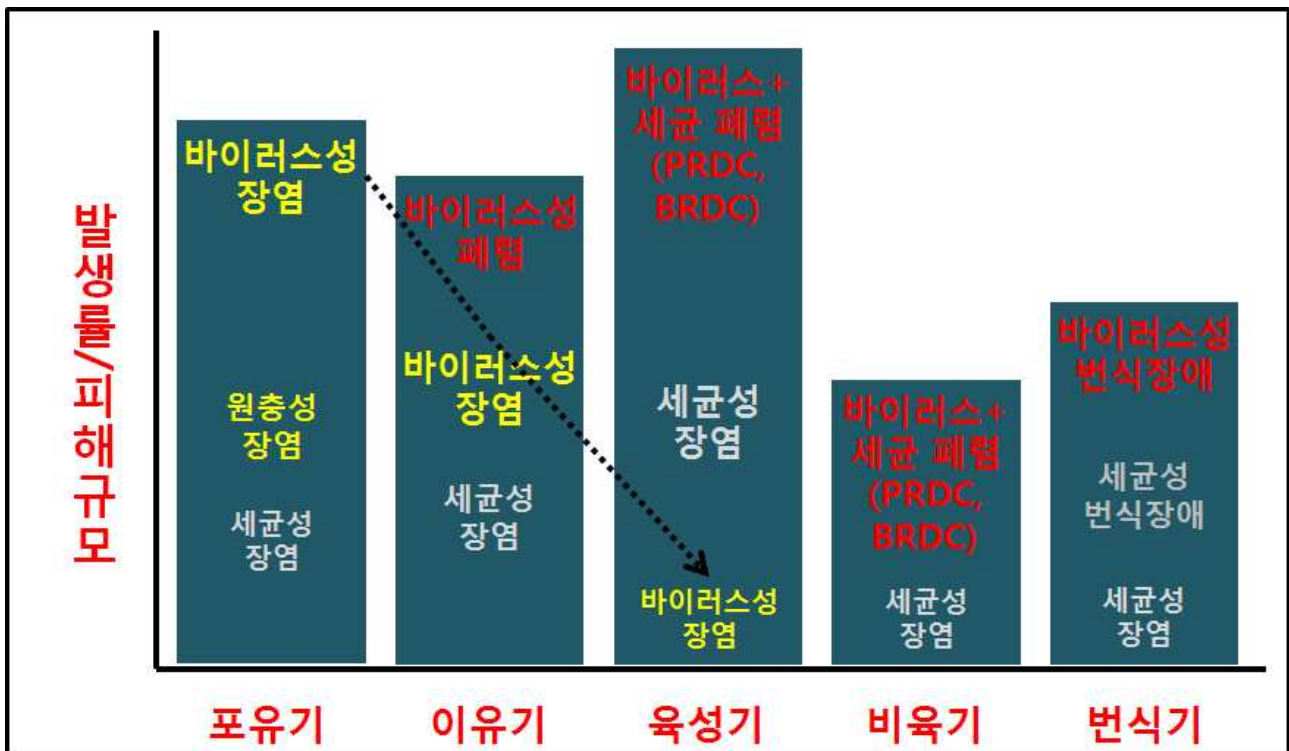
## 나) 산업동물 바이러스성 장염에 의한 경제적 손실

산업동물의 생산성을 저하시키는 대표적인 원인 중 하나가 바이러스성 장염임. 바이러스성 장염은 자돈 및 송아지 사육기간 동안 1번 이상은 반드시 발생되어, 증체율 저하와 폐사를 일으켜 지속적인 경제적 피해를 주고 있음. 이에 산업동물 바이러스성 장염을 효과적으로 제어할 수 있는 백신 및 치료제 개발은 필수적인 대안으로 대두됨.

### 1) 연령별 산업동물 바이러스성 장염 발병양상[그림 2-5]

□ 일반적으로 해당 가축의 보유기간에 다발하여 막대한 피해를 유발함[그림 2-5]

- 산업동물의 장염은 주로 보유기에서 주로 발생하며, 그 원인은 주로 **바이러스성**임.
- 바이러스성 장염은 송아지 및 포유자돈의 사육기간 동안 최소 한 번 이상 발생함.
- 발생한 동물은 수양성 설사, 구토, 체온상승, 식욕부진, 기립불능 증상 등을 보임.
- 이러한 바이러스성 장염은 **송아지 및 포유자돈 폐사의 주요 원인**이기도 함.



[그림 2-5] 연령별 소와 돼지의 전염병 발생경향

### 2) 돼지 바이러스성 장염 발병형태 별 경제적 손실

□ 국내 자돈 장염의 주요 병원체는 바이러스성임

- 포유자돈에 장염을 일으키는 원인으로는 바이러스성, 세균성, 원충성 등이 있음.
- 이 중 바이러스성 원인체가 포유 자돈 장염의 주요 원인으로 밝혀지고 있음.

- 현재 국내에 알려져 있는 바이러스성 장염의 원인으로는 PEDV, TGEV, 로타바이러스, 사포바이러스, 토로바이러스 등이 있음.

[표 2-1] 원인체 및 백신접종에 따른 돼지 바이러스성 장염의 발병양상

구분 요인	전격성(fulminating)		산발성(sporadic)	
병원체	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지 유행성 설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus; PEDV)</li> <li>• 돼지 전염성 위장염 바이러스(transmissible gastroenteritis virus; TGEV)</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 혈청형 A 로타바이러스</li> <li>• 돼지 사펠로바이러스</li> <li>• 혈청형 C 로타바이러스</li> <li>• 돼지 레오바이러스 등</li> </ul>	
백신 판매	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지 유행성 설사 바이러스(PEDV)</li> <li>• 돼지 전염성 위장염 바이러스(TGEV)</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 혈청형 A 로타바이러스 백신만 오직 판매 중</li> </ul>	
백신 문제점	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기존 PED 백신: - 기존 PED에 대한 불완전한 방어능 - 최근 발생(미국, 중국, 한국 등) 변이형 PED에 매우 낮은 방어능</li> <li>• TGE 백신: - 완벽한 방어능 - TGEV S 유전자 부분 결손형 변이형인 저병원성의 돼지 호흡기 코로나바이러스 (porcine respiratory coronavirus; PRCV) 국내외 높은 자연 감염 - PRCV는 TGEV와 교차 방어능이 있어, 국내외 TGE 발생 억제</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 혈청형 A 로타바이러스: - 백신주와 야외주의 혈청형이 상이하어 백신 효능이 매우 낮음</li> </ul>	
발병 양상	전격성	산발성	산발성	
모체이행 항체의 영향	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 모체이행항체 없음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 불충분한 모체 이행항체</li> <li>• 불충분 교차방어 항체</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 불충분한 모체 이행항체</li> <li>• 불충분 교차방어 항체</li> </ul>	
원인	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 백신접종 무</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 부적절한 백신 (백신 접종 회수, 방법, 보관 상 문제)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 백신접종 유무와 상관없음</li> </ul>	
임상증상	모체 이행항체 양에 의해 결정			
	매우 낮음	낮음	불충분	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 신생 자돈부터 설사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 포유 중기부터 설사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 이유자돈부터 설사</li> </ul>	

▣ 자돈 바이러스 장염의 발병양상에 따른 경제적 손실[표 2-1]

- 자돈의 바이러스성 장염은 발병형태에 따라 전격성과 산발성으로 구분할 수 있음.
- 전격성 장염(fulminating enteritis)은 PEDV 및 TGEV에 의해 발생함.
- 산발성 장염(sporadic enteritis)은 로타바이러스, 사펠로바이러스, 사포바이러스, 토로바이러스 등에 의해 발생함.
- 전격성 장염의 특징은 전 돈군에 걸쳐 심한 설사가 일시에 폭발적으로 발생하며, 특히 포유자돈에서 50%-100%의 폐사율이 발생함.

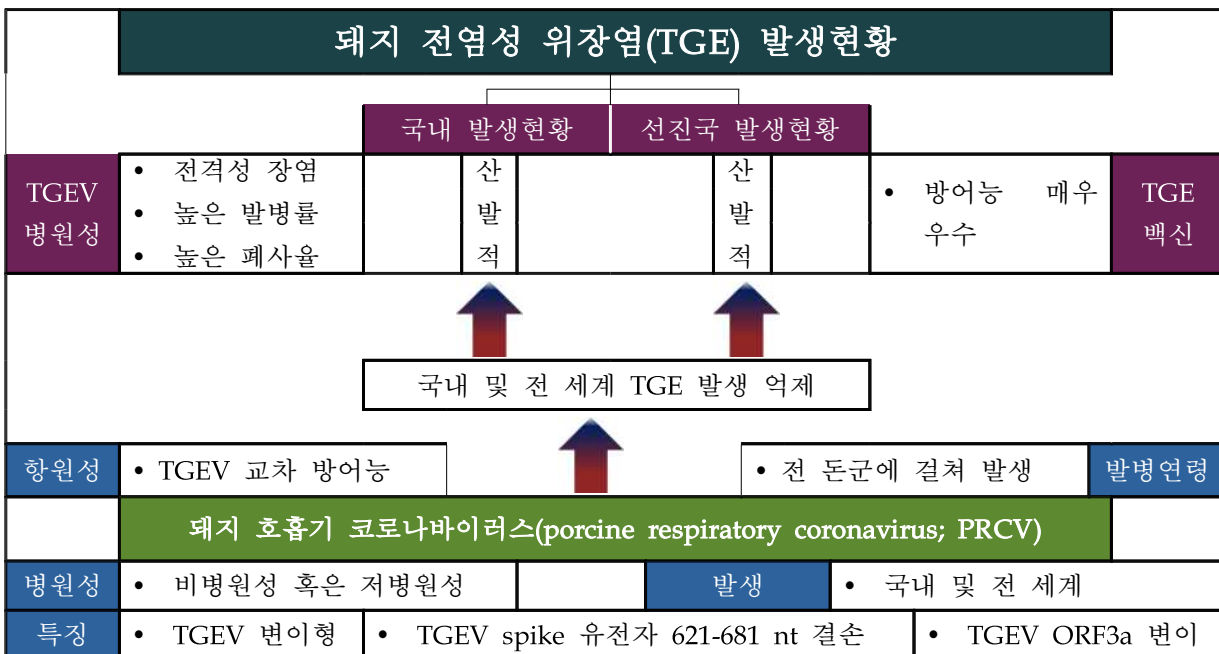
- 반면에 산발성 설사는 모돈의 복 단위별로 포유자돈 및 일부 이유자돈에서 발생하지만, 폐사율은 10% 미만으로, 발생농가는 전격성에 비해 그 피해정도가 낮음.
- 하지만 로타바이러스에 의해 일어나는 산발성 설사는 다른 장염바이러스와 혼합감염으로 결국 폐사율을 높일 뿐아니라 국내 모든 양돈농가에서 발생하기 때문에, 지금의 변이형 PED 다음으로 매우 높은 경제적 피해를 주고 있는 것으로 추정됨.

### 3) 돼지 전염성 위장염(TGE)에 의한 경제적 손실

□ 국내는 물론 전 세계적으로 TGE에 의한 발생 및 그 피해가 급감하는 추세임.

- TGE는 1946년 미국에서 최초 보고(Doyle and Hutchings, 1946), 국내에서는 1950년 발병이 추정 보고된 이후, 국내는 물론 전 세계적으로 돼지를 사육하고 있는 모든 나라에서 발생하고 있음(Saif et al., 2012).
- TGE는 백신을 하지 않거나 TGEV에 대한 항체가 형성되지 않는 돈군에서는 전 연령에 걸쳐 심한 설사가 발생하며, 특히 2주령 미만의 포유자돈에서는 100%에 이르는 높은 폐사율이 발생함(Garwes, 1988; Saif et al., 2012).
- 현재 TGE는 그 백신의 효능이 우수하여 국내는 물론 전 세계적으로 백신을 투여하고 있는 나라에서는 거의 발생하지 않고 있음[표 2-2].

[표 2-2] TGE 발생현황과 돼지 호흡기성 코로나바이러스 감염과의 연관성



- 이렇게 TGE의 발생률이 급격히 떨어진 이유 중 하나는 국내는 물론 전 세계적으로 돼지 호흡기 코로나바이러스(porcine respiratory coronavirus; PRCV)가 전 돈군에



걸쳐 감염되었기 때문에 보임(Laude et al., 1993; Oh et al., 2010).

- PRCV는 TGEV spike 유전자의 5' 말단에서 621-681 핵산 염기서열 결손 및 ORF3a 유전자가 돌연변이 된 것임(Laude et al., 1993).
- TGEV와 PRCV는 중화 항원기를 공유하여 교차방어가 됨(Kim et al., 2000).
- 즉, 비병원성의 PRCV의 감염에 의해 형성된 항체가 TGEV의 감염을 예방함으로써 국내는 물론 전 세계적으로 TGE의 발병이 급속히 떨어짐(Brown and Carwright 1986; Laude et al., 1993; Pensaert 1989; Pensaert et al., 1986, 1993).
- 결론적으로 TGE에 의한 경제적 피해는 국내외에서 낮은 것으로 평가됨.

#### 4) 돼지 유행성 설사(PED)에 의한 경제적 손실

▣ PED 발병현황, 백신의 종류 및 문제 등에 관한 자세한 사항은 전술한 '기술적 측면'을 참조 요망

#### ▣ PED의 분류[표 2-3]

- PED는 기존에 알려진 **고전형 PED**와 최근 한국, 중국, 미국 등에서 폭발적으로 발병한 **변이형 PED**로 구분됨.

[표 2-3] 국내외 PED에 의한 경제적 피해 상황

		돼지 유행성 설사(PED)											
		고전형	변이형										
분류		유럽 및 아시아	북남미 및 아시아										
발병국		유럽 및 아시아	북남미 및 아시아										
발병시기		1971년~현재	2010년~현재										
피해현황		<ul style="list-style-type: none"> <li>• TGE와 달리 PED는 OIE 보고 질병 아님</li> <li>• 이에 국내외 PED 공식적인 발병 집계 없음</li> <li>• 국내에서는 1992년 폭발적인 발병으로 막대한 경제적 피해 발생</li> <li>• 이 후 국내에서 지속적으로 발병하여 국내 고질적 전염병인 3P 질환의 하나로 취급됨</li> </ul>	<table border="1"> <tr> <td>미국</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2013.4~2014.7. 1년3개월간</li> <li>• 34개주 발생</li> <li>• 8백만 두 폐사(미국 돼지의 13%) 및 32.5억불 피해</li> </ul> </td> </tr> <tr> <td>중국</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2010.10~2011.9. 1년간</li> <li>• 1백만 두 폐사</li> </ul> </td> </tr> <tr> <td>일본</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2013.10~2014.8. 11개월간</li> <li>• 3십7만3천 두 폐사</li> </ul> </td> </tr> <tr> <td>대만</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2013.10~2014.10. 13개월간</li> <li>• 약 50만 두 폐사</li> </ul> </td> </tr> <tr> <td>한국</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2014.1~2014.10. 10개월간</li> <li>• 공식적으로 약 3만두 폐사</li> <li>• 비공식적으로는 약 1백만 두 폐사 추정</li> </ul> </td> </tr> </table>	미국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2013.4~2014.7. 1년3개월간</li> <li>• 34개주 발생</li> <li>• 8백만 두 폐사(미국 돼지의 13%) 및 32.5억불 피해</li> </ul>	중국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2010.10~2011.9. 1년간</li> <li>• 1백만 두 폐사</li> </ul>	일본	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2013.10~2014.8. 11개월간</li> <li>• 3십7만3천 두 폐사</li> </ul>	대만	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2013.10~2014.10. 13개월간</li> <li>• 약 50만 두 폐사</li> </ul>	한국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2014.1~2014.10. 10개월간</li> <li>• 공식적으로 약 3만두 폐사</li> <li>• 비공식적으로는 약 1백만 두 폐사 추정</li> </ul>
미국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2013.4~2014.7. 1년3개월간</li> <li>• 34개주 발생</li> <li>• 8백만 두 폐사(미국 돼지의 13%) 및 32.5억불 피해</li> </ul>												
중국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2010.10~2011.9. 1년간</li> <li>• 1백만 두 폐사</li> </ul>												
일본	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2013.10~2014.8. 11개월간</li> <li>• 3십7만3천 두 폐사</li> </ul>												
대만	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2013.10~2014.10. 13개월간</li> <li>• 약 50만 두 폐사</li> </ul>												
한국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2014.1~2014.10. 10개월간</li> <li>• 공식적으로 약 3만두 폐사</li> <li>• 비공식적으로는 약 1백만 두 폐사 추정</li> </ul>												
백신현황		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 아시아권 시판 중</li> <li>• 고전형에 불완전한 방어능</li> <li>• 변이형에 매우 낮은 방어능</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 변이형 특이적인 시판 백신 없음</li> </ul>										

■ 고전형 PED에 의한 경제적 피해

- 국내에서는 1992년 고전형 PED가 폭발적으로 발병하여 많은 경제적 피해가 발생한 것으로 추정되며, 이후 PED의 지속적인 감염 및 백신접종에 의한 농장 내 돈군의 면역상태 형성으로 중국이나 일본의 경우와 같이 산발성으로 전환되었음(Chen et al., 2010; Jinghui and Yijing, 2005; Song and Park, 2012).
- 고전형 PED가 국내 많은 농가에서 산발성으로 발생함
  - 표 2-1 및 표 2-3에서 제시한 바와 같이 기존 PED 백신의 접종 후에도 PED가 국내 많은 농가에서 산발성으로 발생하고 있음.
  - 실례로 대한양돈협회(2006)의 ‘2005년도 전국 양돈장 질병 실태 조사’에 의하면 PED가 1992년과 같은 폭발적인 발병은 확인되지 않았지만, 고전형 PED의 복단위의 산발성 발생이 조사대상 60개 농가 중 59개 농가(98.3%)에서 확인되었음.
  - 이와 같이 PED는 국내에서는 3P[porcine reproductive and respiratory syndrome(PRRS), postweaning multisystem wasting syndrome(PMWS), porcine epidemic diarrhea(PED)]라는 3대 고질적 전염병의 하나로 자리 잡았음.
- 국내 시판 고전형 PED 백신의 문제점
  - 국내에서 고전형 PED가 다발하는 이유는 국내외 사용 중인 백신이 실제 야외 양돈장의 고전형 PEDV와 유전적인 차이에 의해 야외 고전형 PEDV를 완벽히 예방하지 못하기 때문임(‘기술적 측면’ 참조요망).
- 고전형 PED에 의한 경제적 피해[표 2-4].
  - 2005년 국내 PED의 발병을 0.45%로 계산 시 53억 3,300만원의 피해가 발생하였다고 함(가축질병의 경제적 영향 분석, 2006년, 한국농촌경제연구원).

[표 2-4] 국내 고전형 돼지 유행성 설사에 의한 경제적 피해 현황(2005년)

구분	돼지 유행성 설사	돼지열병	돼지 호흡기 생식기 증후군
가축두수	936만 9천 두	936만 9천 두	936만 9천 두
질병 발생률	0.45%	0.07%	0.04%
질병 유병률	100%	100%	100%
피해 발생 수준	50%	100%	100%
직접 피해액	53억 3,300만원	16억 5,925만원	9억 4,814만원

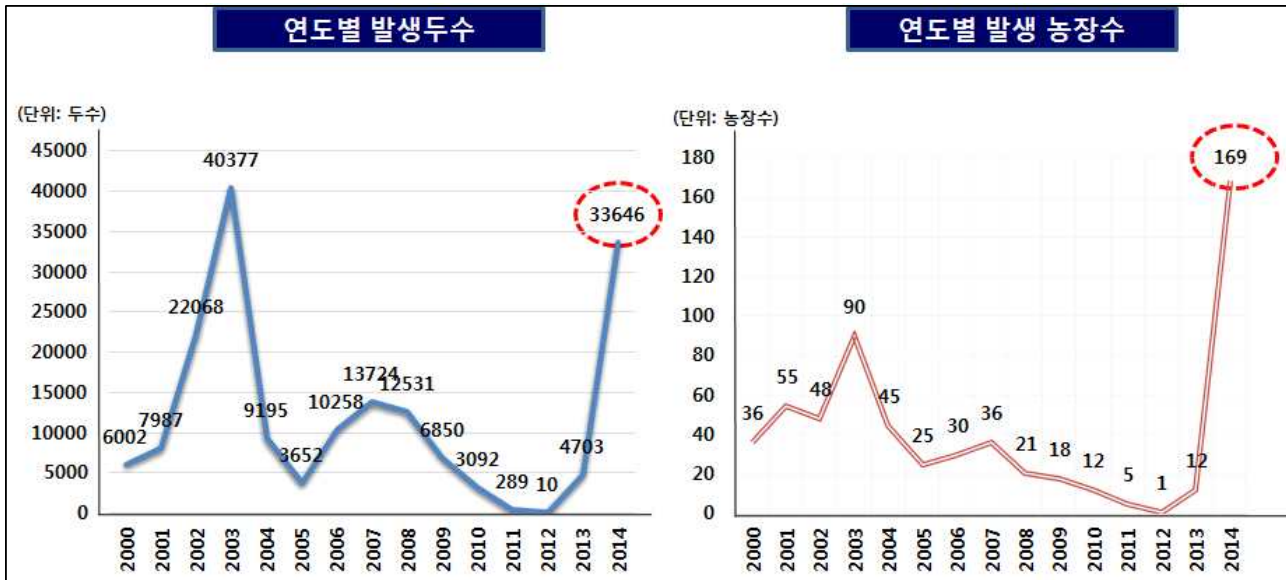
[자료: 가축질병의 경제적 영향 분석, 2006년, 한국농촌경제연구원]

- PED는 국내에서 **가축전염병예방법상 제2종법정전염병**으로 지정되어 있어, PED 발생 농가에서는 돼지의 출하제한 등의 제약을 받게 됨.
- 이로 인해 국내 양돈농가에서는 PED 발생 시 방역당국에 신고를 하지 않는 경향이 있어 농림축산검역본부에 집계된 발병 건수에 비해 실제 발생건수는 월등히 높을 것으로 추정되고 있음(위 대한양돈협회 양돈장 질병 실태 조사 참조).
- 즉, 대한양돈협회(2006)의 ‘2005년도 전국 양돈장 질병 실태 조사’에서 보고된 바와 같이 그동안 국내 고전형 PED의 발병에 의한 피해액은 표 4의 피해액보다 훨씬 높을 것으로 추정됨

#### ■ 변이형 PED에 의한 경제적 피해[표 2-3]

- 2010년 10월 중국에서 발병이 보고된 후, 북남미 대륙, 한국을 비롯한 아시아 지역에서 폭발적으로 발병 중에 있음.
- **중국의 피해현황**
  - 변이형 PED가 발병한 2010년 10월-2011년 9월까지 1년간 약 100만두 이상이 폐사되었다고 함.
  - 중국에서 최초 발병이후 현재까지 누적합산 피해액은 보고되지 않았지만, 천문학적 인 경제적 피해가 발생되었을 것으로 추정됨.
- **미국의 피해현황**
  - 아메리카 대륙에서는 2013년 4월 29일 미국 아이오와주의 양돈장에서 PED가 처음 발병보고 된 후(Stevenson et al., 2013), 2014년 7월까지 양돈산업이 발달한 34개 주 이상에서 PED가 발병되었음(Yoon, 2014).
  - 변이형 PED에 의해 미국 전체 돼지의 13%인 800만 두의 폐사와 32.5억불의 직접적인 경제적 피해가 발생하였음(Yoon, 2014).
  - PED 발병에 의한 돈가 상승에 의한 기대 수입까지 포함 시 PED 피해농가의 손실액은 79.1억불에 달한다고 함(Yoon, 2014).
- **국내 피해현황**
  - 국내에서도 2013년 하반기부터 변이형 PED가 폭발적으로 전국에 걸쳐 발생하였지만, 본 연구팀의 연구에 의하면 최소 2013년 5월부터 발생되었음(Lee and Lee, 2014).
  - 농림축산검역본부에 의하면, PED 발병이 2013년도 12개 농장의 4703두에서 2014년도 169개 농장의 33646두로 폭발적인 증가를 하였음[그림 2-6].
  - 당시 양축농가 및 양돈수의사들의 소견에 따르면 국내 대다수 양돈장에서 PED가 발병되었을 것으로 추정함

- 양돈수의사회 등의 의견을 종합해 보면 국내에서도 PED의 발병에 의해 다발했던 지난 2년 동안 최소 100만두 이상이 자돈이 폐사되었을 것으로 추정되고 있음.
- 이를 미국 PED 발병(800만두)에 의한 피해액(32.5억불)의 1/8로 추정 시 약 4억불(4,875억원)의 직접적인 피해가 발생한 것으로 추산됨.



[그림 2-6] 국내 돼지 유행성 설사 발생경향. 2013년 하반기 변이형 PEDV의 폭발적인 발병에 의해 2014년 1월부터-12월까지 변이형 PED의 발생두수가 급격히 증가함. (자료: 농림축산검역본부 국가동물방역통합시스템)

• **변이형 PED 백신개발 필요성**

- 현재 시판 중에 있는 고전형 PED 백신은 고전형 PED를 불완전하게 방어하며, 변이형 PED에 대해서는 완벽한 방어를 하지 못하고 있음
- 현재 변이형 PED 백신은 시판되고 있지 않지만, 국내는 물론 전 세계적으로 변이형 PED 백신개발에 박차를 가하고 있음.
- 따라서 국내에서도 변이형 PED 백신(불활화 및 약독화 백신 등)을 개발하여 국내 양돈농가의 피해를 최소화시켜 경제적 이익을 극대화시킬 수 있을 것임.

5) 돼지 로타바이러스 감염증에 의한 경제적 손실

▣ 돼지 로타바이러스 발병현황, 백신의 종류 및 문제 등에 관한 자세한 사항은 기술적 측면 참조요망

▣ **돼지 로타바이러스 감염증에 의한 경제적 피해**

- 국내는 물론 전 세계적으로 돼지 로타바이러스 감염증에 의해 지속적인 경제적 피해

가 발생하고 있음

- 돼지 로타바이러스 감염증은 국내 모든 양돈농가에서 발생
  - 돼지 로타바이러스 감염증은 국내 모든 양돈농가 보유자돈의 보유기간 동안에 1번 이상 감염되어 설사 및 구토를 통한 성장장애 및 폐사를 일으킴.
- 국내 시판 돼지 로타바이러스 백신의 문제점
  - 국내에서 돼지 로타바이러스 감염증이 다발하는 이유는 국내외 시판 백신이 실제 야외 양돈장의 돼지 로타바이러스와 그 유전형이 상이하여, 야외 돼지 로타바이러스 감염증을 예방하지 못하기 때문임(기술적 측면 참조 요망).
- 돼지 로타바이러스 감염증에 의한 경제적 피해[표 2-5]
  - 한국농촌경제연구원에서 2006년 보고한 “가축질병의 경제적 영향 분석”에서 제시한 방식에 의해 돼지 로타바이러스 감염증에 따른 경제적 피해를 계산 방식에 의하면, 돼지 로타바이러스 감염증에 의한 피해액은 2005년 발병한 PED 피해액의 2배인 약 106억원에 달함[표 2-5].

[표 2-5] 국내 돼지 로타바이러스 감염증에 의한 경제적 피해

구분	돼지 로타바이러스	돼지 유행성 설사	돼지 호흡기 생식기 증후군
가축두수	936만 9천 두	936만 9천 두	936만 9천 두
질병 발생률	4.5%	0.45%	0.04%
질병 유병률	100%	100%	100%
피해 발생 수준	10%	50%	100%
직접 피해액	106억 6,600만원	53억 3,300만원	9억 4,814만원

[자료: 가축질병의 경제적 영향 분석, 2006년, 한국농촌경제연구원]

- 상술한 바와 같이 돼지 로타바이러스 감염증은 국내 대부분 양돈농가에서 발생 (<100% 질병발생률)하고 있는 것으로 보고, 위 계산 방식에서는 단지 유행성 설사(PED) 발생의 약 10배인 4.5%로만 상향조정하였음.
- 또한 피해 발생 수준은 역학적 조사결과를 감안하여 PED가 약 50%인 반면에 돼지 로타바이러스 감염증은 약 10%로 낮추어 추산하였음.
- 따라서 돼지 로타바이러스 감염증에 의한 실제피해액은 추산액보다 더 높을 것임.
- 현재 국내는 물론 전 세계적으로 돼지 바이러스성 장염, 특히 돼지 로타바이러스에

의한 경제적 피해를 조사한 역학조사는 찾지 못함.

- 따라서 송아지 바이러스성 장염에 의한 피해액을 참고로 보면, 호주의 경우 소 바이러스성 장염에 의해 연간 5천2백만 불의 피해가 발생한다고 함(Coopers Animal health, 2013).

- 효과적인 돼지 로타바이러스 백신개발을 위한 경제적 필요성

- 현재 시판 중에 있는 돼지 로타바이러스 백신은 국내 야외 양돈장에서 발생하고 있는 돼지 로타바이러스와 유전형이 차이를 보여, 야외 바이러스를 완벽하게 방어하지 못함(연구개발의 필요성 중 기술적 측면 참조요망)
- 따라서 국내 양돈장에서 발생하는 해당 바이러스의 유전형에 맞는 돼지 로타바이러스 백신을 개발 및 판매하여 양돈농가의 생산성을 높여야 할 것임.

## 6) 소 로타바이러스 및 코로나바이러스 감염증에 의한 경제적 손실

▣ 국내 송아지 장염의 주요 원인은 바이러스성임(기술적 측면 참조요망)

- 국내 송아지 장염의 주요 원인은 소 로타바이러스(64.3%)와 소 코로나바이러스(34.7%)라 할 수 있음(Lim et al., 2005; Park et al., 2007c).
- 이러한 바이러스성 장염은 송아지 사육기간 동안 최소 한 번 이상 발생하여 설사와 폐사등을 일으켜 경제적 피해를 유발함.

▣ 송아지 장염에 의한 경제적 피해

- 영국(UK National Animal Disease Information Services, 2010)
  - 영국에서 송아지 장염은 40.3% 농가에서 관찰되었으며, 이 중 폐사율은 5.289%로, 연간 10만두가 폐사하였음.
  - 송아지 장염의 원인체로 소 로타바이러스(29%), 크립토스포리디움(20%), 콕시디움(11%), 코로나바이러스(6%), 대장균(4%), 살모넬라(3%) 순으로 검출되었음.
  - 조사에 의하면 병든 송아지 1두당 약 20만원(123 파운드), 장염이 전체 송아지에 미치는 피해액은 송아지 1두당 약 6만원(36.91 파운드)에 달함.
  - 주목할 보고사항은 로타바이러스, 코로나바이러스, 대장균의 경우 백신이 시판되고 있지만, 29%의 영국 농가에서만 적절한 치료를 하고, 이중 15%만 로타바이러스와 대장균에 대한 백신을 접종하고 있음.
  - 이러한 결과가 의미하는 것은 영국의 축우농가에서는 송아지 장염에 대한 치료가 적절히 수행되지 않고, 또한 백신을 투여한 농가에서도 로타바이러스가 재발한다는 것임.
- 호주(Gunn, 2003)

- 호주에서 송아지 장염은 20%의 농가에서 발생하며, 폐사율은 2% 이상이었음.
- 송아지 장염의 원인체로 콕시듐(11%), 크립토스포리디움(11%), 로타바이러스(8%), 살모넬라(1%), 다수 원인체에 의한 복합감염(16%), 원인체가 검출되지 않은 것은 52%에 달함.
- 조사에 의하면 송아지 장염이 전체 송아지에 미치는 피해액은 송아지 1두당 73불 (6만 4천원)이라고 함.
- 현재 호주에서 송아지 장염에 의한 피해액은 연간 5천2백만 불의 피해가 발생한다고 함(Coopers Animal Health, 2013).
- 이에 호주 정부는 백신에 의해 예방이 될 수 있는 송아지 장염의 주요 원인체인 로타바이러스 및 코로나바이러스의 혼합백신 생산을 장려했음.
- 그 결과 로타바이러스, 대장균, 살모넬라, 코로나바이러스 혼합백신인 ROTAVEC CORONA가 2013년 출시되었음(Coopers Animal Health, 2013).

• **한국[표 2-6 및 표 2-7]**

- 농촌경제연구원에서 발표한 바에 의하면, 송아지 설사 발생률 10% 및 이에 따른 폐사율 20%로 가정할 경우, 100두를 사육하는 한우비육 농가의 연간 소득 감소액은 약 2천8백만 원으로 계측되었음(가축질병의 경제적 영향 분석, 2006).

[표 2-6] 송아지 설사병과 관련된 한우농가 피해액 추정을 위한 주요 외부변수 가정치

변수명	적용치		근거
	발생전(정상축)	발생후(이환축)	
규모(S)	100두	100두	전업농 규모
질병발생율(Ro)	0%	10%	임의가정
육성률(Rg)	90%	72%	임의가정
폐사율(Rd)	0%	20%	임의가정
비육기간	25개월	26개월	1개월 연장
비육우 경영비(Cb)	371만6,288원/600kg	계산치	농림부, 2005년 축산물 생산비조사보고, 2006
비육우 가격(Pb)	553만원/1두(1두=632kg)		2006.1~6월 평균가격
폐사축 매몰비용	-	50만원/회	농가조사

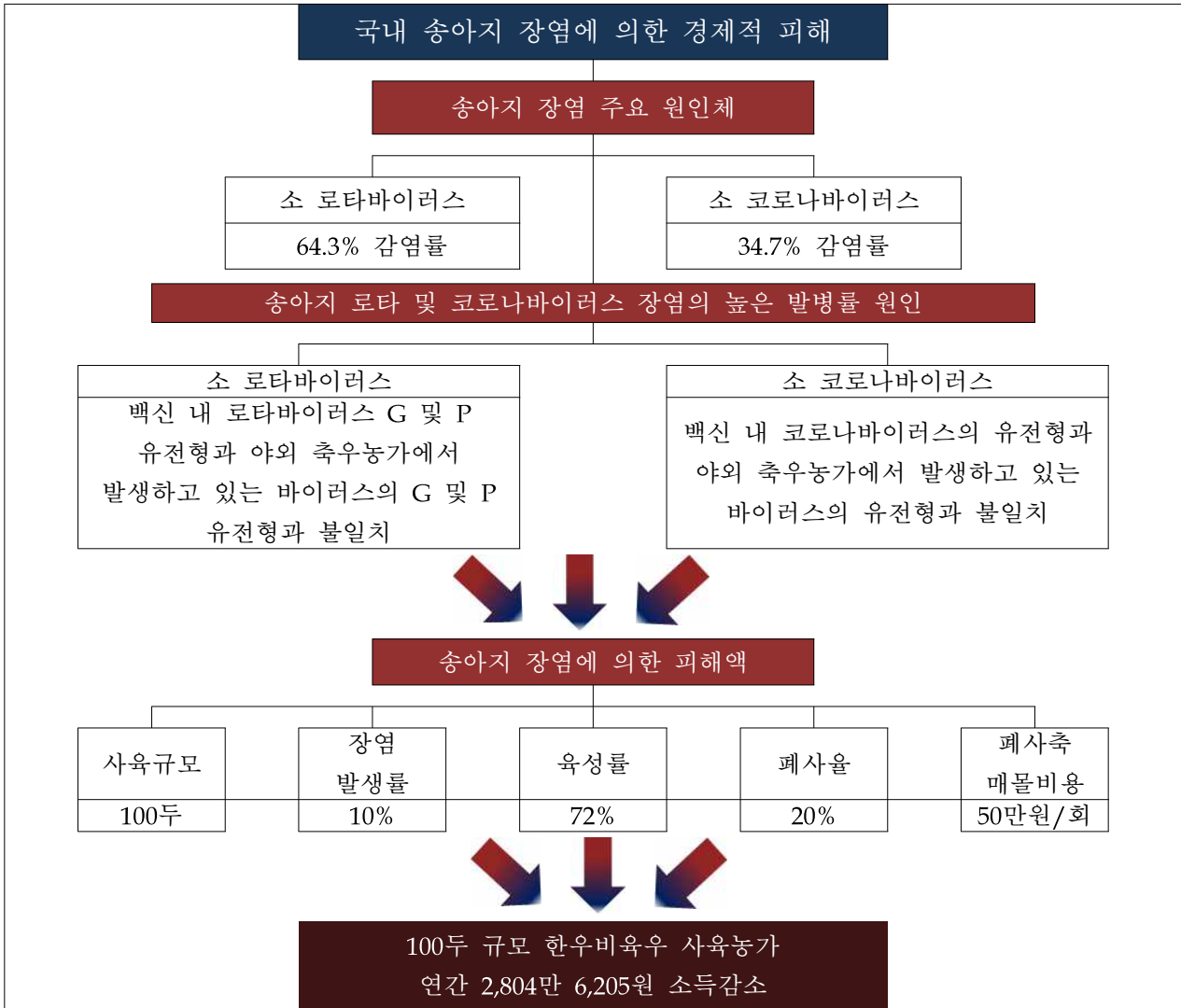
[자료: 가축질병의 경제적 영향 분석, 2006년, 한국농촌경제연구원]

- 하지만 국내 축우농가의 모든 송아지는 사육기간 중 장염에 걸려 설사 및 체중저하를 보이며, 심한 경우 폐사에 이르기도 함.
- 따라서 위의 질병발생률을 50%로만 반영할 경우, 100두를 사육하는 한우비육 농가



의 연간 소득 감소액은 연간 1억4천만 원이 됨(기술적 측면에서 소 로타바이러스 및 소 코로나바이러스 국내 발병률 참조 요망).

**[표 2-7] 국내 소 로타바이러스 및 소 코로나바이러스 백신의 개선 필요성을 반영한 경제성 관련 흐름도**



[자료: 가축질병의 경제적 영향 분석, 2006년, 한국농촌경제연구원]

• **소 로타바이러스 및 소 코로나바이러스 백신개발에 대한 필요성**

- 국내에서는 소 로타바이러스 및 소 코로나바이러스 혼합백신이 사용 중인데도 불구하고, 소 로타바이러스(64.3%)와 소 코로나바이러스(34.7%) 감염증 발생률이 매우 높아, 국내 축우농가에 막대한 경제적 피해를 일으키고 있음.
- 이렇게 높은 발병에 의한 경제적 피해는 현재 국내에서 활용 중에 있는 백신의 방어효과에 한계와 관련이 있다고 판단됨.
- 현재 시판 중인 소 로타바이러스 및 소 코로나바이러스 혼합백신은 국내 야외 축

우농가에서 발생하고 있는 소 로타바이러스와 소 코로나바이러스 유전형과 차이가 있어, 야외 바이러스를 완벽히 예방하지 못한 것으로 판단됨(기술적 측면 참조요망)

- 따라서 국내 유전자형과 맞는 소 로타바이러스 및 소 코로나바이러스 백신(불활화 및 약독화)을 산업화시켜 국내 축우농가의 생산성을 높이도록 하려고 함.

#### 7) 산업동물 바이러스성 장염 제어용 백신 및 치료제 개발을 위한 경제적 측면 요약

- 우리나라를 포함 전 세계적으로 산업동물 바이러스성 장염이 다발하여 막대한 경제적 피해가 발생하고 있음.
- 국내에서 활용되고 있는 대상 바이러스성 장염에 대한 백신들이 야외 축산농가에서 발생하고 있는 바이러스와 그 유전형이 달라 완벽한 방어를 할 수 없음.
- 특히 이들 바이러스성 장염의 발생에 따른 경제적 피해가 발생하고 있지만, 효율적인 치료제가 개발되어 있지 않음.
- 이에 국내 축산농가에서 발생하고 있는 바이러스성 장염의 주요한 병원체를 이용한 백신을 비롯 치료제를 개발하여 축산농가의 소득증대 및 수출을 통해 생산성 향상에 기여하여야 할 것임.

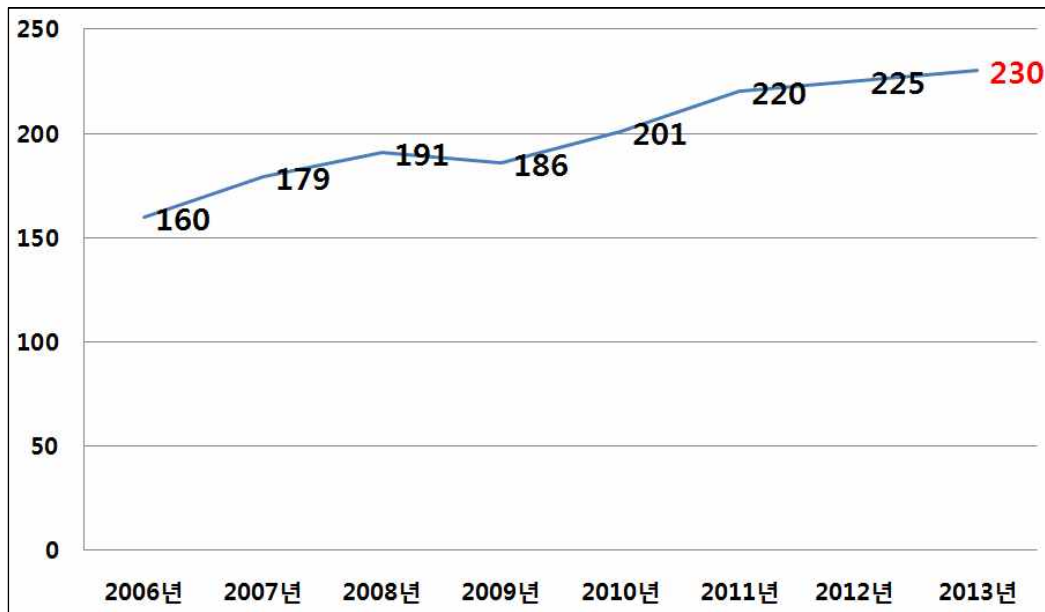
## 다) 산업동물 바이러스장염 백신 개발의 필요성

전 세계 산업동물 바이러스성 장염에 대한 백신 및 치료제 시장은 그동안 고도성장을 하여 왔음. 국내에서도 전체 동물용 백신 시장에서 산업동물 바이러스성 장염에 대한 백신이 차지하는 규모가 매우 높음. 하지만 수입백신의 비율도 높은 편임. 이에 효능과 안전성이 향상된 산업동물 바이러스성 장염 백신을 자체적으로 개발하여 축산농가의 소득증대, 수입대체 및 수출 등을 축산업의 창조경제 달성에 공헌하여야 할 것임.

### 1) 전 세계 동물용 의약품, 생물학적 제제 및 사료첨가제 시장의 발전가능성[그림 2-7]

▣ 전 세계 동물용 의약품, 생물학적 제제 및 사료첨가제의 구성 및 시장 점유율

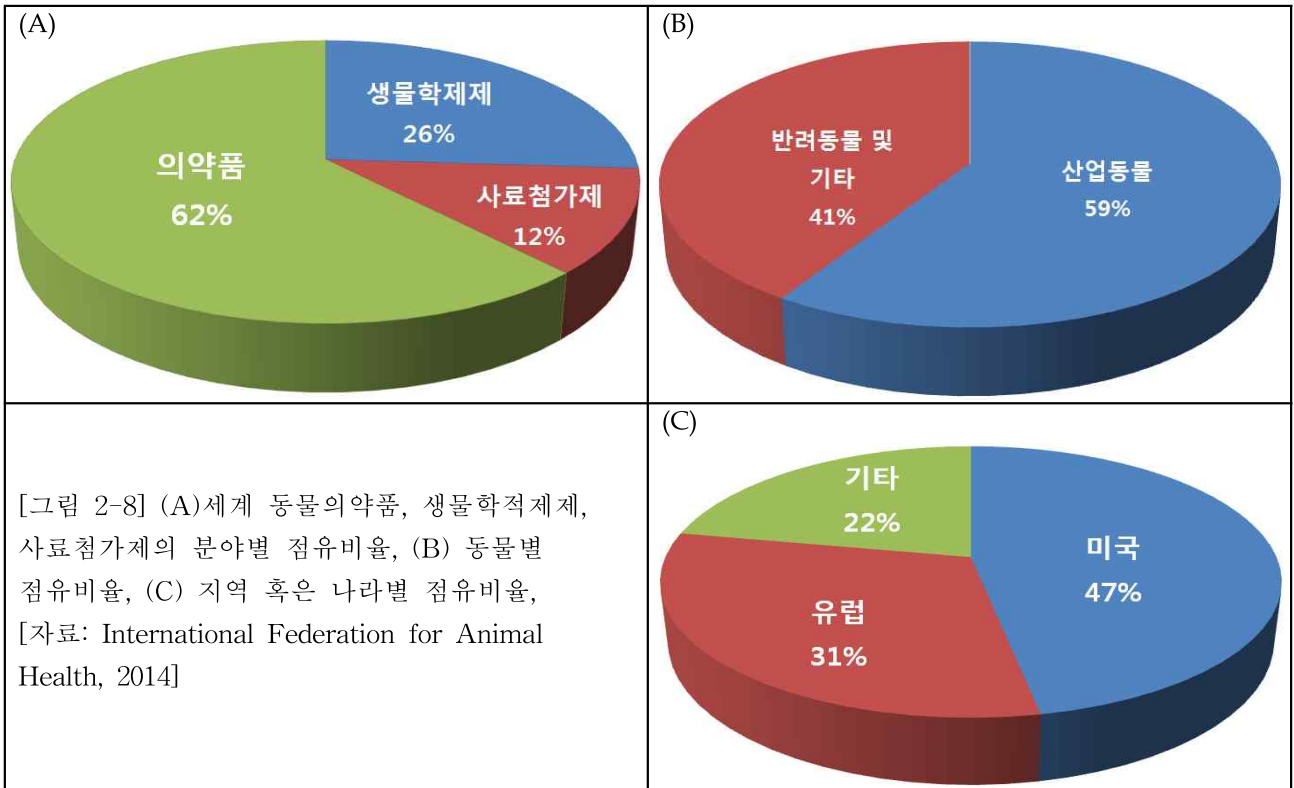
- 동물용 제제는 주로 동물용 의약품, 생물학적 제제, 사료 첨가제로 구성되어 있음.
- 전 세계 동물용 제제 시장규모는 2006년 160억불에서 2013년 230억불로 급성장하였음.



[그림 2-7] 세계 동물용 의약품, 생물학적 제제, 사료첨가제 등 전체 시장규모(단위: 억불).

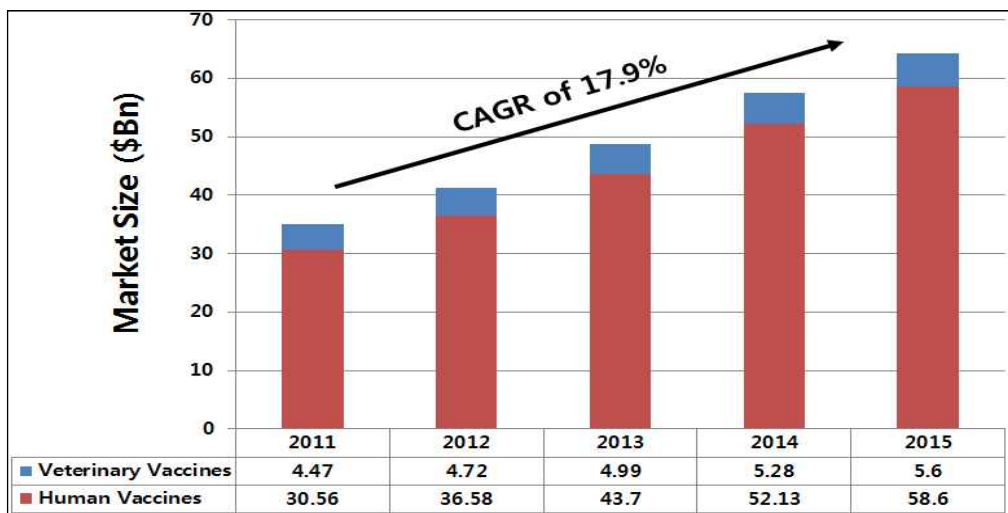
(자료: International Federation for Animal Health, 2014).

- 2014년 전 세계 동물용 제제는 의약품 62%(약 142억불), 생물학적 제제 26%(약 59.8억불), 사료 첨가제 12%(약 27.6억불)로 구성되어 있음[그림 2-8].
- 이 중 산업동물이 59%를 차지하고, 나머지 41%는 반려동물 및 기타 동물이 점유하고 있음.
- 이러한 전 세계 동물용 제제 시장별 점유 비율을 보면 미국이 압도적으로 높은 47%를 차지하며, 유럽연합이 31% 그 외 22%를 차지하고 있음.



- 우리나라 동물용 의약품 시장 규모는 전 세계시장 규모에 비해 매우 낮은 3%인 4억 3천만불(5,187억원)을 차지하고 있음.
- 이는 현재 국내 동물용 의약품 회사의 성장에 근본적인 한계가 되고 있고, 따라서 바람직한 관련산업의 발전을 위해서는 경쟁력이 있는 외국시장으로의 수출시장 확보가 절실하며, 이에 대한 정부나 자체의 R&D 투자가 필요하다는 것을 시사함.

▣ 전 세계 동물용 백신시장 규모 및 시장 점유율[그림 2-9]



[그림 2-9] 2011년-2015년 세계 동물백신 시장규모 전망, [자료: Dolcera Analysis]

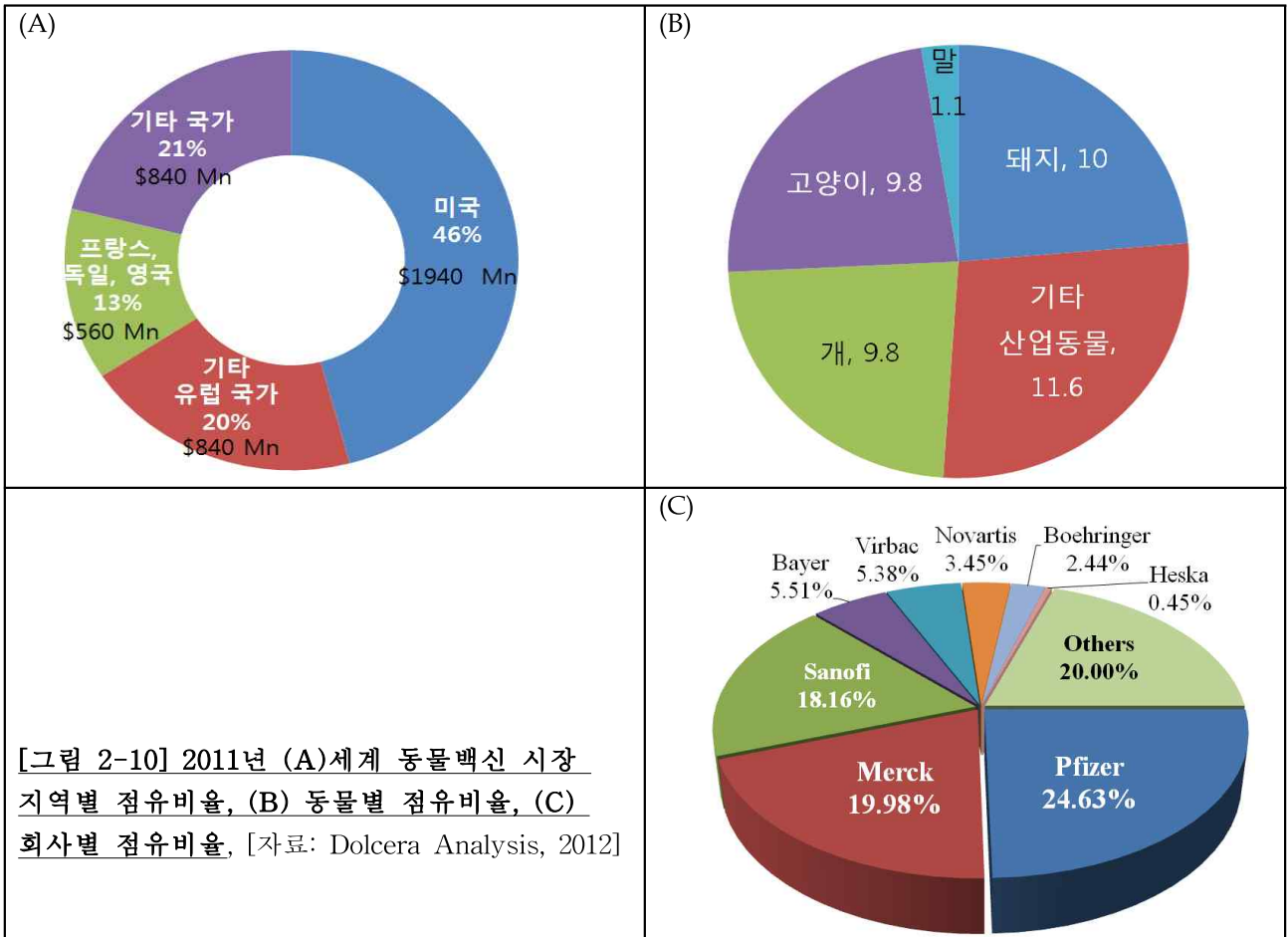
- 전 세계 동물용 백신시장 규모는 2011년 44억 7천만 불에서 2015년 56억불로 연평균 성장률이 17.9%에 이를 정도로 고도성장이 예상됨[표 2-8].

[표 2-8] 사람 및 동물백신 세계 시장규모(단위: 1억불)

구분 \ 연도	2011	2012	2013	2014	2015
동물백신	44.7	47.2	499.9	52.8	56.0
인의백신	305.6	365.8	437.0	521.3	586.0

[자료:Dolcera Analysis, 2012]

- 시장별 점유 비율로 보면 미국이 압도적으로 많은 19억 4천만 불이며, 프랑스, 독일, 영국의 합산이 5억 6천만 불, 기타 유럽국가가 8억 4천만 불, 기타 국가가 8억 9천만 불을 차지하고 있음[그림 2-10].
- 축종별 시장규모를 보면 돼지가 단일 품종으로는 제일 많은 10억불, 소, 닭 등 기타 산업동물이 11.6억불, 개 9.8억불, 고양이 9.8억불, 말이 1.1억불을 차지함[그림 2-10].

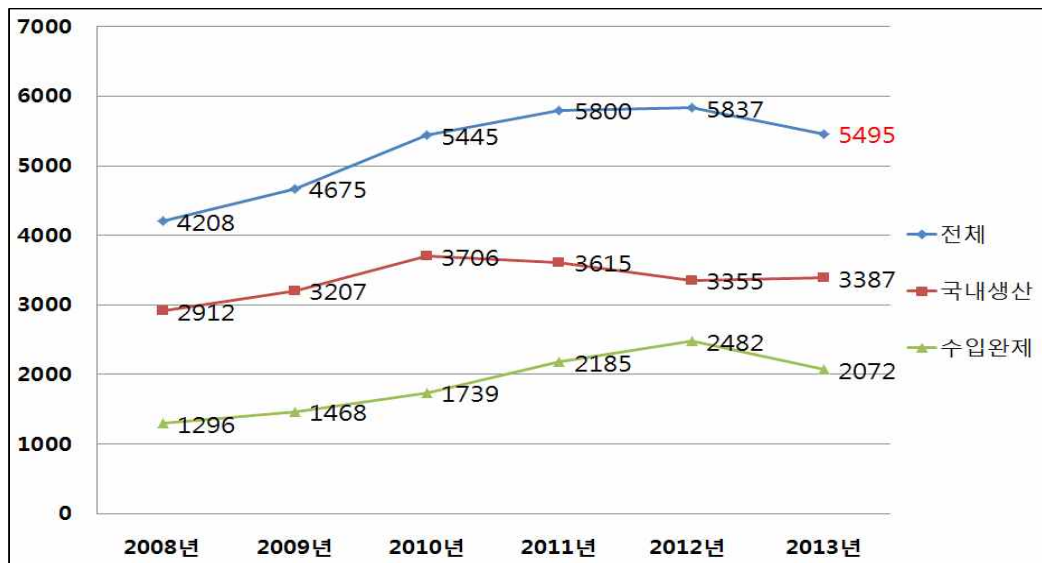


- 하지만 세계 동물용 백신은 다국적 회사들이 독점하고 있음[그림 2-10]
  - 화이자 24.63%, 머크 19.98%, 사노피 18.16%, 바이엘 5.51%, 버락 5.38%, 노바티스 3.45%, 베링거 2.44%, 헤스카 0.45%.
  - 즉, 상술한 8개의 다국적 회사가 전 세계 시장의 80%를 독식하고 있음.
- 이는 국내 동물용 의약품 회사뿐만 아니라 정부의 R&D 투자 및 지원이 있으면 국내에서도 세계적인 브랜드가 창출되어 세계 시장을 석권할 수 있을 것임.

## 2) 국내 동물용 백신 시장 전망 및 발전가능성

### ▣ 국내 동물용 의약품 시장규모 및 시장 점유율

- 국내 동물용 의약품 내수시장은 그동안 비약적인 발전을 하였음[그림 2-11]
  - 즉, 2008년 4208억 원 규모였던 것이 2013년 5495억 원으로 5년간 급성장하였음.



[그림 2-11] 국내 동물용 의약품 내수시장 현황(단위: 억원)

(자료: International Federation for Animal Health, 2014).

- 2013년 국내 동물약품 총 시장규모는 수출입을 포함하여 7,165억 원이었음[표 2-9].
  - 국내 동물약품 판매 시장규모(5,187억 원)를 보였음.
  - 이 중 국내 판매는 3,387억 원(68%)이었으며, 동남아, 남미 국가에 수출한 금액이 1,670억 원(153백만불)으로 국내 생산의 32%를 차지하였음.
  - 국내 동물약품 내수시장 중, 베링거, 인터베트, 메리알, 바이엘, 화이자 등 다국적 회사들의 수입규모는 1,978억 원이었음.

[표 2-9] 국내 동물약품 시장현황(생산·수입, 2013년) (단위: 억원)

구분		생산(수입)	국내 판매	수출	비고
국내 생산	일반약품	3,302	2,631	671	수출(항생제, 영양제)
	백신	886	756	130	수출(닭 오일 백신, IBD, NDL, PCV2)
	원료	999	130	869	Lysine
	기타	-	-	-	
소계		5,187	3,517 (원료제외; 3,387)	1,670	
수입	일반약품	694	694	-	애완견 구충제, 주사제 등
	백신	1,148	1,148	-	PCV2, MH, FMD, IBDL, NDL, DHPPL
	기타	136	136	-	의약품
	소계	1,978	2,108	-	
<b>계</b>		<b>7,165</b>	<b>5,495</b> (원료제외: 5,365)	<b>1,670</b>	

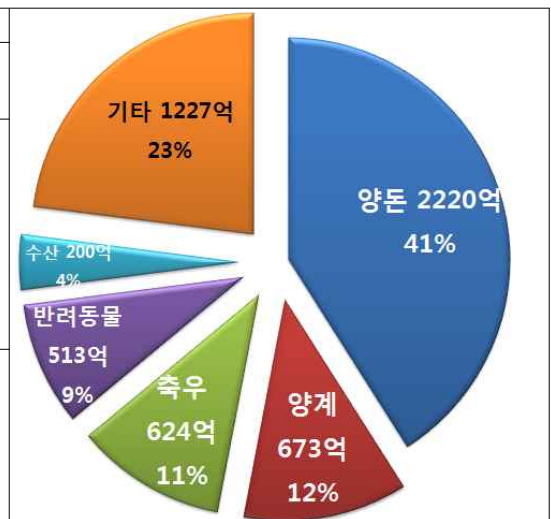
[자료: 동물약품협회, 2014]

▣ 국내 동물용 의약품 시장의 축종별 점유 현황[그림 2-12]

- 2013년 국내 동물용 의약품 시장규모는 원료를 제외하면 5,365억 원이었음.
- 세계 시장과 달리 국내 축종별 판매현황은 산업동물 분야가 압도적이었음.
  - 2013년 국내 판매 동물용 의약품 시장 규모는 5,495억 원이었음.
  - 이 중 양돈이 41%로 2,220억 원, 양계가 12%인 673억 원, 축우가 11%인 624억 원, 반려동물이 9%인 513억 원 등의 순이었음.

구분	축종별 판매액 (단위 억원)			계(구성비)
	일반약품	백신 (국내외 비중)	기타	
국내생산	2,631	756 (39.7%)	-	3,387억 원
수입	694	1,148 (60.3%)	136	1,978억 원
계(구성비)	3,325 (62%)	1,904 (35.5%)	136 (2.5%)	5,365 (100%)

[그림 2-12] 국내 동물약품 시장 규모 및 축종별 분포. [자료: 동물약품협회, 2014]



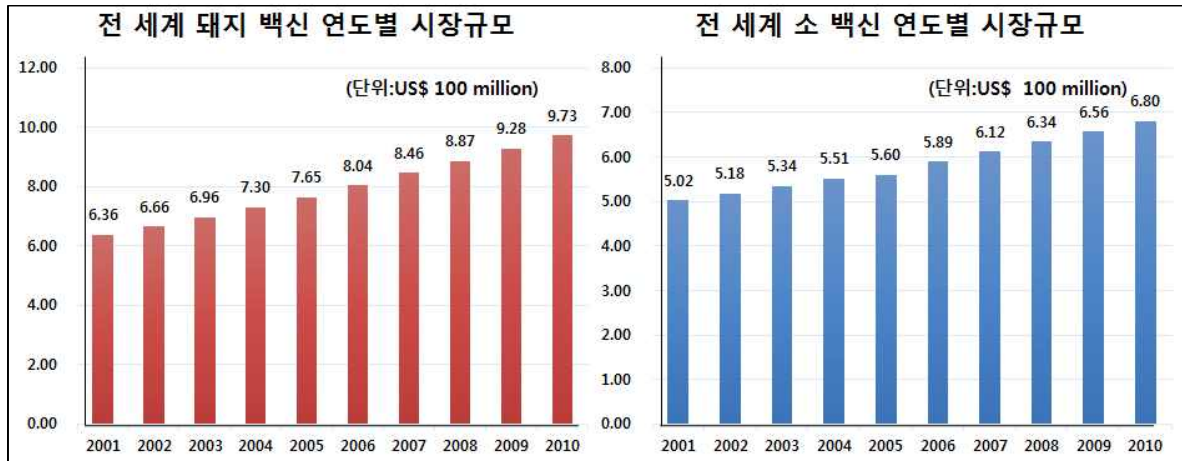
2) 국내 돼지 및 소 백신 시장 전망 및 발전가능성

▣ 전 세계 돼지 및 소 백신시장 규모[그림 2-13]

- 2010년 세계 돼지 및 소 백신 시장 규모
  - 전 세계 돼지 백신시장은 2001년 6억3천6백만 불에서 2010년 9억7천3백만 불로 급속히 성장하였음.



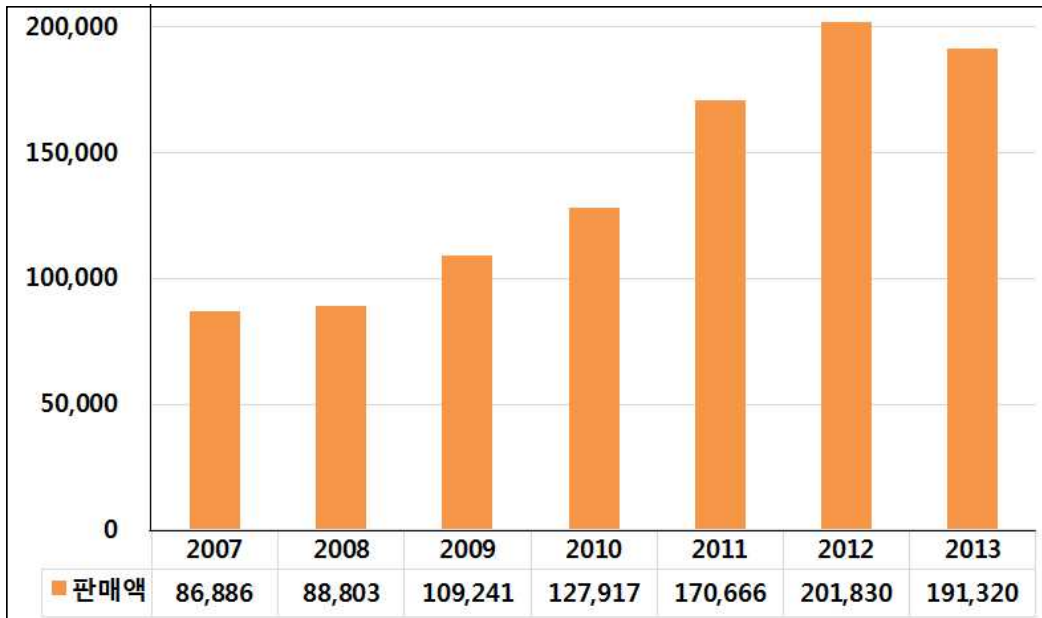
- 소 백신시장규모도 2001년 5억2천만 불에서 2010년 6억8천만 불로 고도성장하였음.
- 또한 기후온난화 등에 의해 신변종 전염병의 창궐이 예상되어, 전 세계 돼지 및 소 백신 시장은 더욱 더 발전할 것으로 기대되고 있음.



[그림 2-13] 전 세계 돼지 및 소 백신 연도별 시장규모. [자료: Veterinary Vaccine 시장보고서, 2010]

▣ 국내 동물용 백신시장 규모[그림 2-14]

- 국내 동물용 백신 시장의 비약적인 발전
  - 국내 동물용 백신시장은 2007년 약 869억 원 규모에서 2013년 1,913억 원 규모로 비약적인 발전을 하였음.



[그림 2-14] 국내 동물용 백신 시장 연도별 규모. (단위 백만원). [자료: 동물약품협회, 2014]

- 국내 동물용 백신 시장의 회사별 점유비율[표 2-10]

- 2011년도 국내 동물용 백신 판매현황을 보면 1위부터 5위까지 모두 다국적 회사가 66.3%를 점유하고 있으며, 나머지는 국내 업체가 차지하고 있음.

[표 2-10] 국내 동물용 백신시장 국내외 업체별 판매 현황

업체명	2010년 누계	순 위	점유율	2011년 누계	순 위	점유율	전년비
(주)베링거인겔하임동물약품	386	1	17.3%	432	1	16.0%	11.9%
(주)인터베트코리아	188	8	8.5%	428	2	15.8%	127.2%
(주)메리알코리아	210	4	9.4%	375	3	13.9%	78.7%
(주)바이엘코리아	296	2	13.3%	304	4	11.2%	2.4%
(주)한국화이자동물약품	244	3	11.0%	255	5	9.4%	4.6%
<b>다국적 회사 점유율</b>	<b>1,324</b>		<b>59.5%</b>	<b>1,794</b>		<b>66.3%</b>	
(주)엘지생명과학	200	5	9.0%	197	6	7.3%	-2.0%
(주)코미팜	189	7	8.5%	192	7	7.1%	1.2%
(주)대성미생물연구소	190	6	8.6%	187	8	6.9%	-2.3%
(주)고려비엔피	161	9	7.2%	181	9	6.7%	12.4%
(주)중앙백신연구소	161	10	7.2%	156	10	5.8%	-3.1%
<b>국내 회사 점유율</b>	<b>901</b>		<b>40.5%</b>	<b>913</b>		<b>33.8%</b>	

[자료: 동물약품협회, 2012년]

▣ 국내 동물용 백신시장 문제점 및 개선방안

• 다국적 회사의 높은 비율 점유

- 국내 동물용 백신시장은 그동안 비약적인 발전을 하였음.
- 하지만 그만큼 5개 다국적 회사의 비율이 높아져 2011년 66.3% 점유율 차지함.

• 개선책

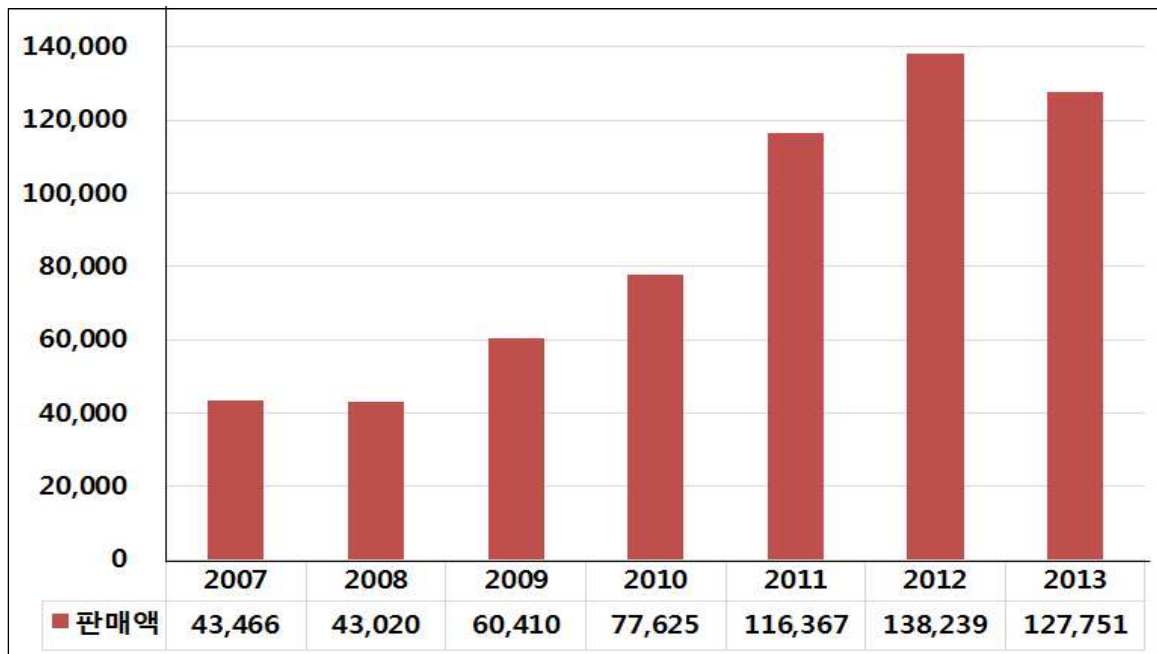
- 현재 국내 동물약품 회사, 대학 및 연구소의 백신생산 연구/개발/생산 능력은 예전에 비해 월등히 향상되었음.
- 이에 산학연 컨소시움을 통해 수입 제품을 능가하는 국제 경쟁력을 지닌 백신 개발이 필수적임.

3) 국내 돼지 바이러스 장염 백신 시장 전망 및 발전가능성

▣ 국내 돼지 바이러스성 장염 백신시장 규모

• 국내 돼지 백신시장 현황[그림 2-15]

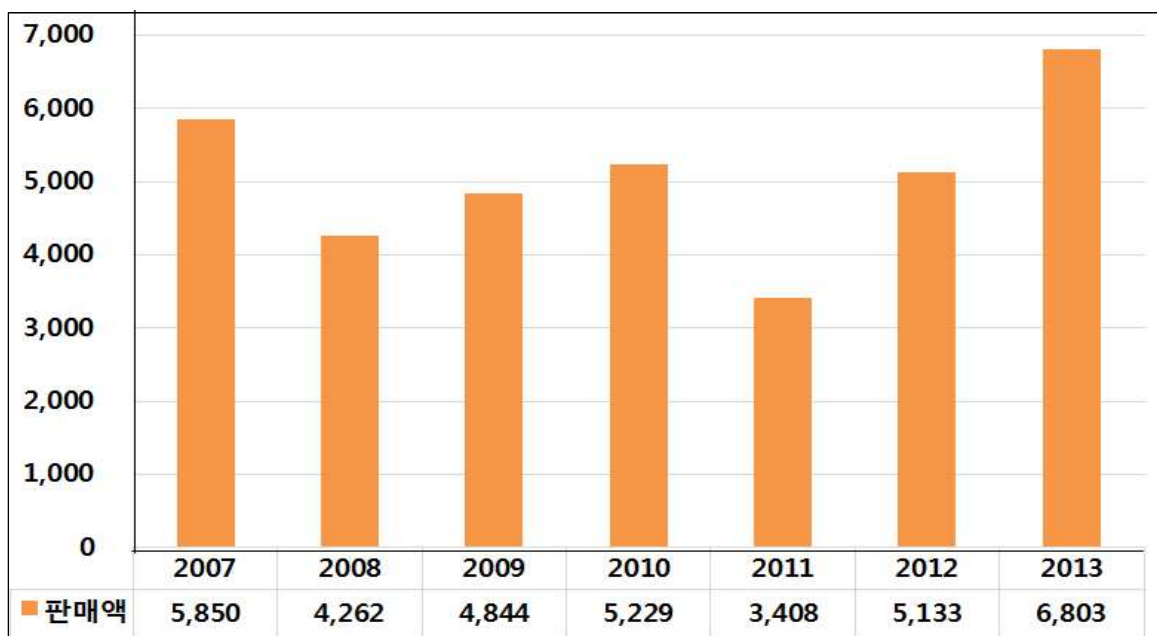
- 국내 돼지 백신시장 규모는 2007년 약 434억 원에서 2013년 약 1,227억 원으로 가파른 증가세를 보임.



[그림 2-15] 국내 돼지 백신 시장 연도별 규모. (단위: 백만 원) [자료: 동물약품협회, 2014]

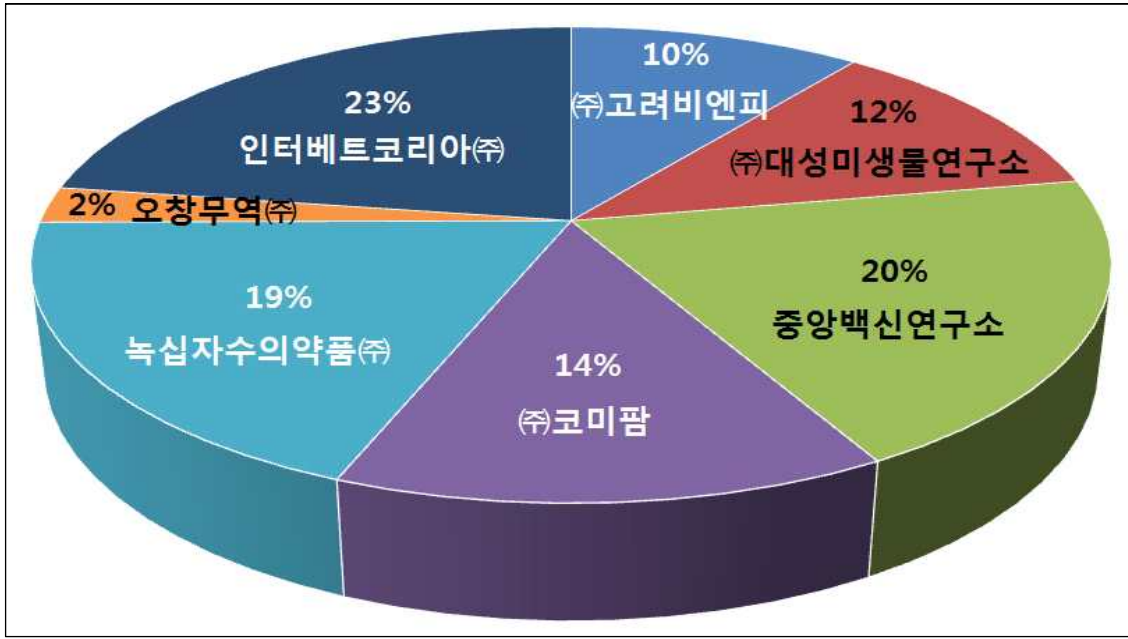
• 국내 돼지 바이러스성 장염 백신시장 현황[그림 2-16]

- 국내 돼지 바이러스성 장염 백신시장 규모는 2007년 약 59억 원에서 2013년 약 68억 원으로 증가하였음.
- 2013년 매출액이 증가한 주된 이유는 2013년 하반기에 PED가 국내 대다수 양돈장에서 폭발적으로 발생하였기 때문임.

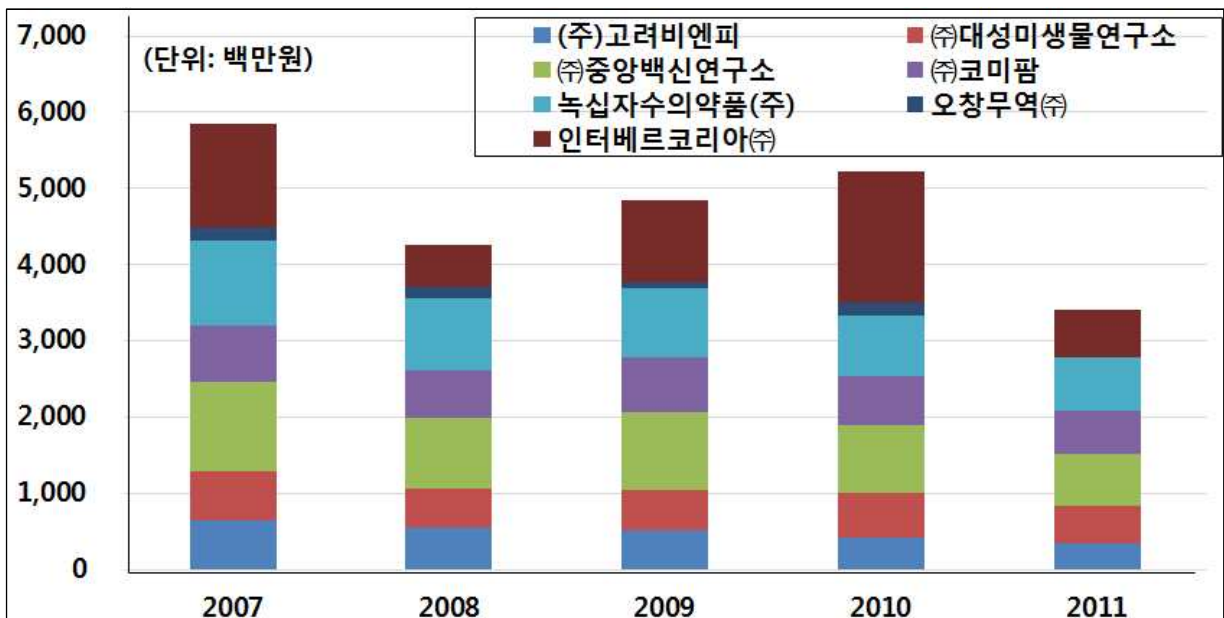


[그림 2-16] 국내 돼지 바이러스성 장염 백신시장 규모. (단위: 백만 원) [자료: 동물약품협회, 2014]

- 국내 돼지 바이러스성 장염 백신 시장 업체별 점유율 현황[그림 2-17]
  - 2007년-2011년 5년간 국내 돼지 바이러스성 장염 백신 시장에서 1위를 점유한 회사는 외국계 다국적 회사인 인터베트이 23%로 1위를 차지하였음.
  - 그 다음으로 중앙백신연구소 20%, 녹십자수의약품 19%, 코미팜 14%, 고려비엔피 10%, 일본 백신 수입업체인 오창무역이 2%를 점유하고 있음.



[그림 2-17] 국내 돼지 바이러스성 장염 백신 시장 회사별 점유 비율(2007-2011년).  
[자료: 동물약품협회, 2014]



[그림 2-18] 국내 돼지 바이러스성 장염 백신 시장 회사별/연도별 판매 비율 (2007-2011년). [자료: 동물약품협회, 2014]

- 국내 돼지 바이러스성 장염 백신 시장 업체별 판매 현황[그림 2-18 및 표 2-11]
  - 2007년-2011년 5년간 국내 돼지 바이러스성 장염 백신 시장 연간평균 판매 규모는 약 47억 2천만 원이었음.
  - 이 중 외국계 다국적 회사로서 연간평균 인터베트가 10.6억 원, 오창무역이 수입품으로 약 1.2억 원을 판매하여, 외국계로는 총 11억 8천 3백 6십만 원임.
  - 국내 회사는 5년간 연평균은 총 35억 3천 3백 6십만 원임.

[표 2-11] 국내 돼지 바이러스성 장염 국내의 업체별 판매 현황

회사	연도	2007	2008	2009	2010	2011	평균 (단위: 백만원)
고려비엔피		640	554	514	421	337	493.20
대성미생물연구소		647	509	523	590	490	551.80
중앙백신연구소		1,171	916	1,027	873	690	935.40
코미팜		736	623	725	655	556	659.00
녹십자수의약품		1,126	947	894	793	711	894.20
오창무역		162	161	82	176	0	116.20
인터베트코리아		1,363	552	1,079	1,720	623	1,067.40
총 판매액		5,845	4,262	4,844	5,228	3,407	4,717.2

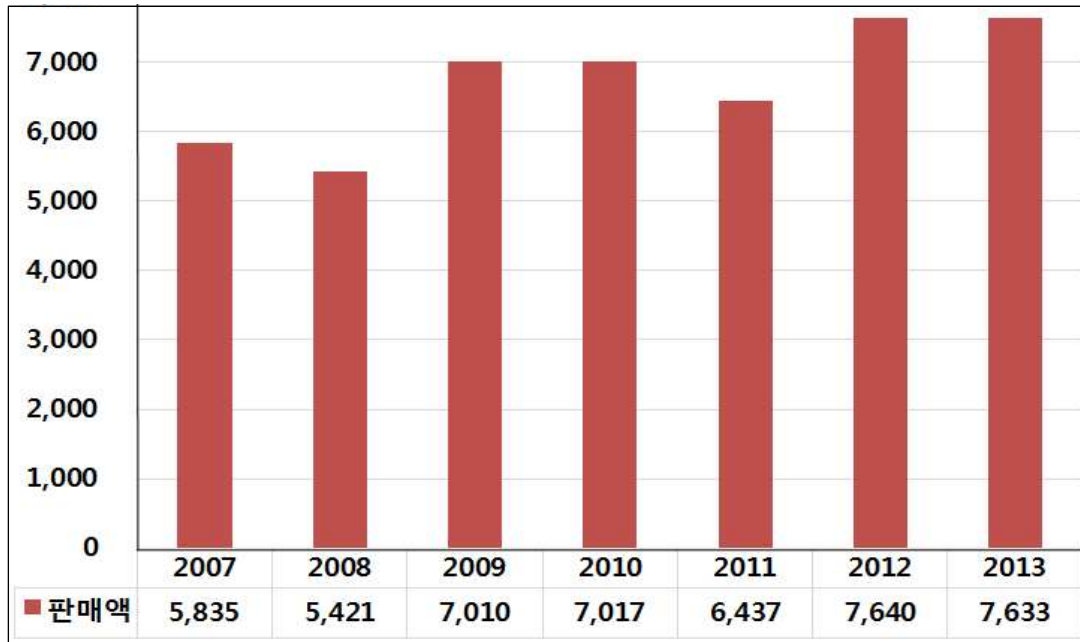
[자료: 동물약품협회, 2014]

▣ 국내 돼지 바이러스성 장염 백신시장 현황 및 개선 방안

- 다국적 회사의 높은 비율로 점유하고 있음.
  - 국내 돼지 바이러스성 장염 백신시장 중 수입백신은 인터베트와 오창무역을 통해 총 25%인 11.8억 원으로 국내 시장에서 높은 비율을 차지하고 있음.
- 수입 및 국내 생산된 내수용 돼지 바이러스성 장염 백신의 낮은 방어능.
  - 연구의 필요성 중 기술적 측면에서 기술한 바와 같이 변이형 PEDV는 고전형 PEDV와 유전적 차이가 심해 고전형 PEDV 백신으로 방어가 낮은 편임.
  - 국내 회사 및 다국적 회사에서 생산한 돼지 로타바이러스 백신은 야외양돈장의 바이러스와 유전형의 차이로 현재 발생하고 있는 바이러스를 완벽히 예방하기 힘들..
  - 이로 인해 고전형 PED 백신을 한 농장에서 변이형 PED가, 기존의 돼지 로타바이러스 백신을 투여한 한 농장에서도 돼지 로타바이러스가 재발하고 있는 실정임.
- 개선책
  - 국내 현실에 적합한 PED 및 돼지 로타바이러스 맞춤형 백신은 변이형 PEDV 분리주 및 현재 발생하고 있는 로타바이러스를 이용하여 개발하여야 함.
  - 이를 통한 수입백신과 차별화된 백신의 개발로 해당 백신의 국내 시장 확보와 수출로 이어질 수 있음.

#### 4) 국내 소 바이러스 장염 백신 시장 전망 및 발전가능성

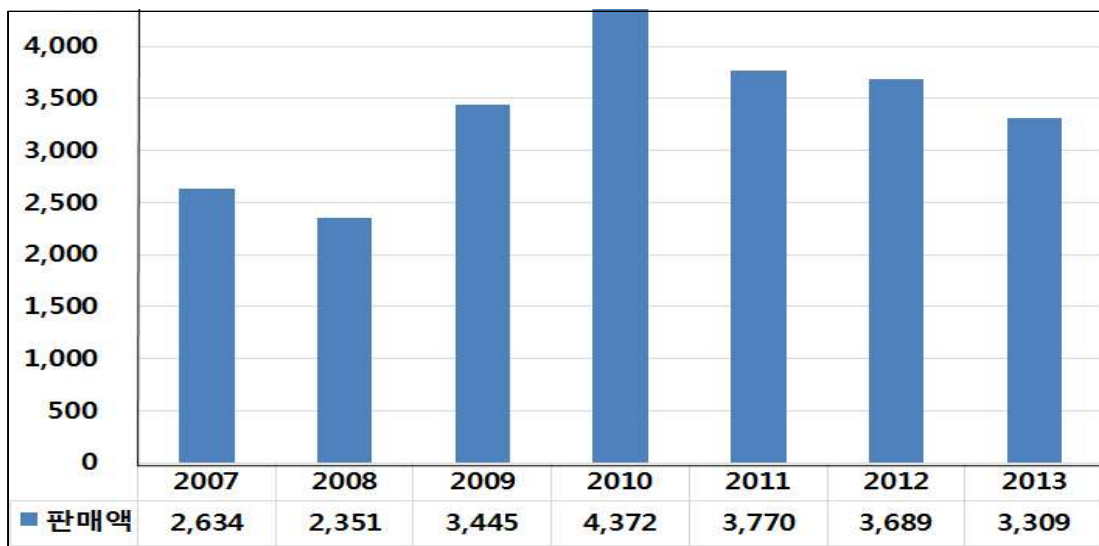
##### ▣ 국내 소 바이러스성 장염 백신시장 규모



[그림 2-19] 국내 소 백신 시장 연도별 규모. (단위: 백만 원) [자료: 동물약품협회, 2014]

##### • 국내 소 백신시장 현황[그림 2-19]

- 국내 소 백신시장 규모는 2007년 약 58억 원에서 2013년 약 76억 원으로 점진적인 성장을 하였음.



[그림 2-20] 국내 소 바이러스성 장염 백신 시장 연도별 규모. (단위: 백만 원) [자료: 동물약품협회, 2014]

##### • 국내 소 바이러스성 장염 백신시장 현황[그림 2-20]



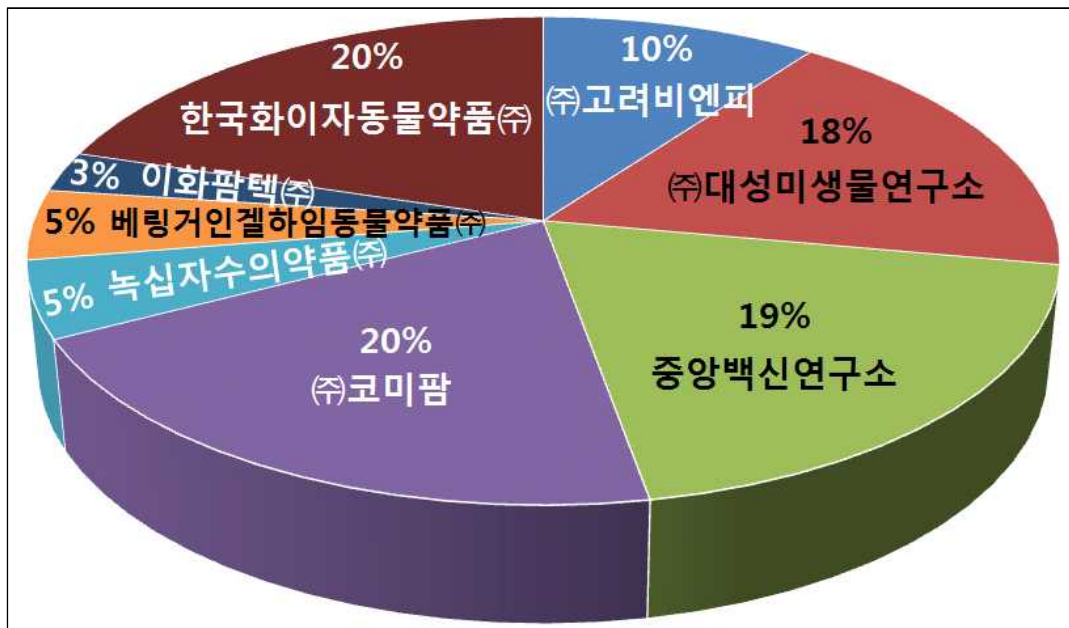
- 국내 소 바이러스성 장염 백신시장 규모는 2007년 약 26억 원에서 2013년 약 33억 원으로 증가하였음.

• 국내 소 바이러스성 장염 백신 시장 업체별 점유율 현황[그림 2-21].

- 2007년-2011년 5년간 국내 소 바이러스성 장염 백신 시장에서 1위를 점유한 회사는 외국계 다국적 회사인 한국화이자동물약품이 20%이며, 국내업체로는 코미팜이 20%를 점유하고 있음.

- 그 다음으로 중앙백신연구소 19%, 대성미생물연구소 18%, 고려비엔피 10%, 녹십자수의약품 및 베링거인겔하임이 각각 5%, 이화팜텍이 3%를 점유하고 있음.

- 국내 소 바이러스성 장염 백신시장 중에서 다국적 및 국내 수입 대행업체의 점유율은 총 28%인.



[그림 2-21] 국내 소 바이러스성 장염 백신 시장 회사별 점유 비율(2007-2011년)

[자료: 동물약품협회, 2014]

• 국내 소 바이러스성 장염 백신 시장 업체별 판매 현황[표 2-12 및 그림 2-22]

- 2007년-2011년 5년간 국내 소 바이러스성 장염 백신 시장 연간평균 판매 규모는 약 29억 원이었음.

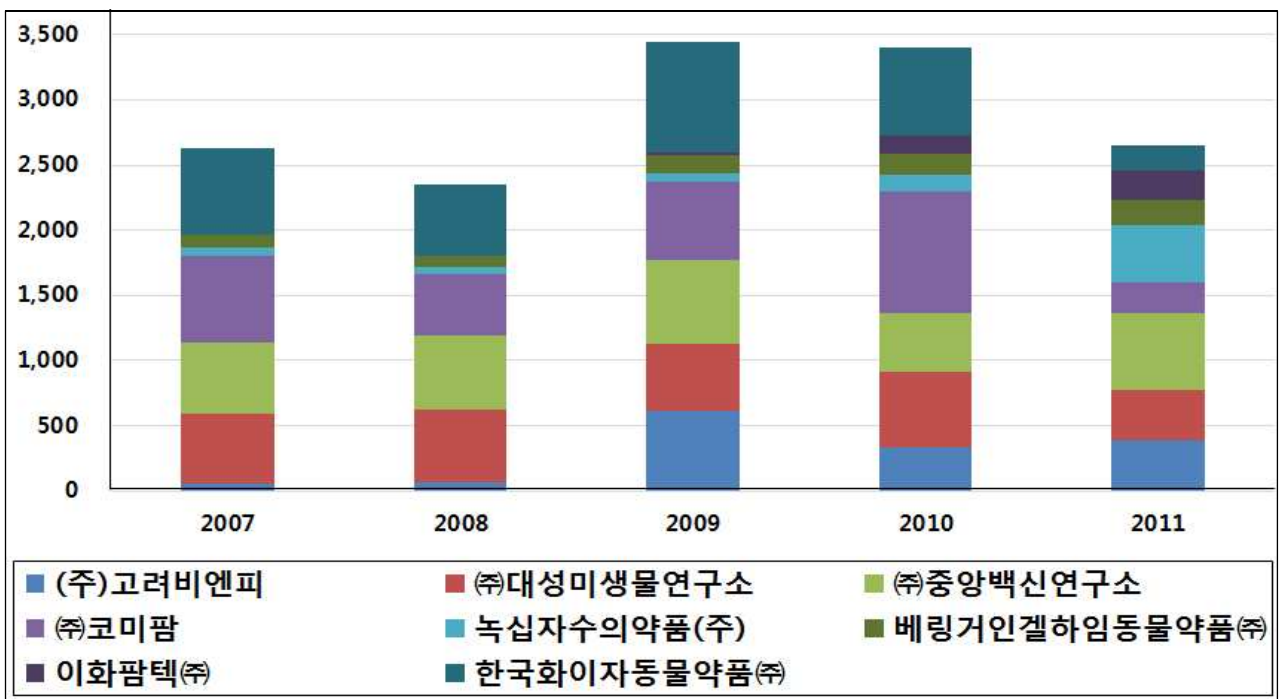
- 이 중 외국계 다국적 회사로서 한국화이자가 연간평균 5.9억 원, 베링거인겔하임이 1.4억 원, 이화팜텍이 수입품으로 약 0.78억 원을 판매하여, 외국계로는 총 7억 9천 8백 8십만 원임.

- 국내 회사는 5년간 연평균 총 20억 9천 7백 6십만 원을 판매하였음.



[표 2-12] 국내 소 바이러스성 장염 국내의 업체별 판매 현황

회사	연도	2007	2008	2009	2010	2011	평균 (단위: 백만원)
고려비엔피		61	61	618	335	389	292.80
대성미생물연구소		532	561	513	583	383	514.40
중앙백신연구소		550	572	640	443	593	559.60
코미팜		667	475	603	934	240	583.80
녹십자수의약품		59	51	60	129	436	147.00
베링거인겔하임		100	80	140	166	189	135.00
한국화이자		666	551	848	672	190	585.40
이화팜텍		0	0	23	139	230	78.40
총 판매액		2,635	2,351	3,445	3,401	2,650	2,896.4



[그림 2-22] 국내 소 바이러스성 장염 백신 시장 회사별/연도별 점유 비율(2007-2011년).  
(단위: 백만 원) [자료: 동물약품협회, 2014]

▣ 국내 소 바이러스성 장염 백신시장 문제점 및 개선 방향

- 국내 시장은 다국적 회사의 수입 백신이 높은 비율로 점유 중임
  - 국내 소 바이러스성 장염 백신시장 중 수입백신은 한국화이자, 베링거, 이화팜텍을 통해 총 28%인 약 8억 원으로 국내 시장에서 높은 비율을 차지하고 있음.
- 수입과 국내 생산된 내수용 소 바이러스성 장염 백신들은 현재 방어능이 충분하지 않음
  - 연구의 필요성 중 기술적 측면에서 기술한 바와 같이 국내에서 판매되고 있는 국내 자체 혹은 수입제품의 소 로타바이러스 및 소 코로나바이러스 백신은 야외 축우농가에서 발생하고 있는 바이러스와 유전형이 상이하여 완벽한 예방을 할 수 없음.
  - 이로 인해 백신한 농장에서 소 로타바이러스 및 소 코로나바이러스가 재발하고 있어, 현장의 축우농가에서는 그 방어능력의 개선이 요구되고 있음.
- 개선책
  - 소 로타바이러스 및 소 코로나바이러스에 대한 백신은 국내 현실에 적합한 맞춤형 혼합 백신으로 개발하여야 함.
  - 국내 현장의 축우농가에 적합한 맞춤형 백신의 개발은 외국에서 수입한 백신과 차별화가 검증되어야 함.

5) 산업동물 바이러스성 장염 백신개발의 경제적 필요성 요약

- 소와 돼지의 바이러스성 장염은 세계적인 발생을 보이고 있고, 그로 인한 다대한 경제적 피해가 지속되고 있음
- 특히 국내에서 생산되거나 수입된 과제 연구 대상 바이러스들에 대한 현행 백신은 국내 소와 돼지 사육현장에서 발생하는 바이러스들과 유전형이 맞지 않아 효율적인 방어능력의 개선이 필요함.
- 산업동물 바이러스성 장염의 백신시장 규모는 국내는 물론 전 세계적으로 고도성장을 하고 있음.
- 하지만 국내 관련 시장은 돼지백신의 경우 인터베트 등 외국 제품이 25%, 소백신의 경우에는 한국화이자 등 외국 제품이 28%를 차지하고 있음.
- 이에 국내 산업동물 바이러스성 장염에 대한 백신은 국내 발생중인 바이러스와 일치하고, 외국에서 수입한 백신과 차별화 될 수 있는 백신이 필요함.

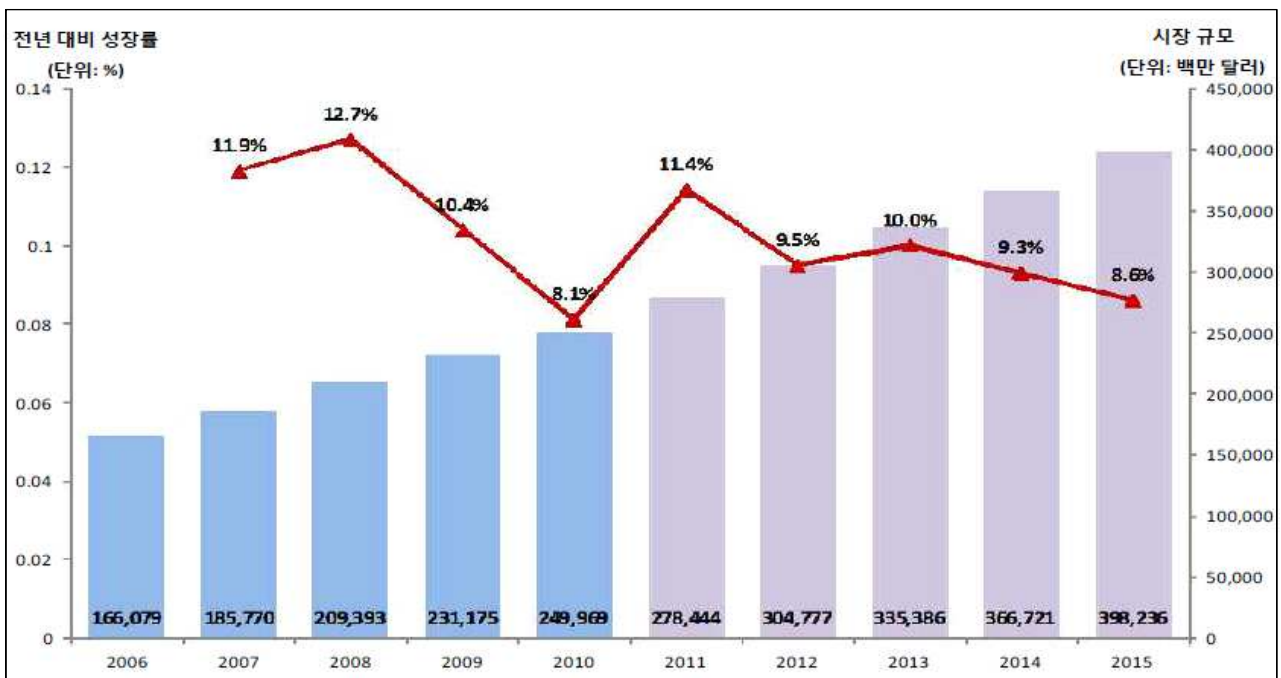
## 라) 천연물 유래 PED 치료제 개발의 필요성

○ 국내는 물론 전 세계적으로 변이형 PED가 창궐하여 천문학적인 피해가 발생하고 있지만 이에 대한 특이적인 치료제가 국내는 물론 세계적으로도 개발되어 있지 않음. 이에 변이형 PED를 특이적으로 치료할 수 있는 천연물유래 치료제의 개발이 절실함.

### 1) 세계 바이오의약산업 및 항바이러스 치료제 시장규모

#### ▣ 세계 바이오의약산업 시장 현황 및 전망[그림 2-23]

- 2010년 세계 바이오산업 시장규모는 약 2,500억 달러 규모이며, 연평균 성장률('06-'10년 기준)이 10.8%로 고성장세를 보이고 있음(출처:DataMonitor, 2011a).
- 2015년 세계 바이오산업 시장규모는 2010년 대비 약 59.3% 성장한 약 3,980억 달러 규모로 전망.
- 세계의약품 시장은 2008년 7,731억 달러로 2003년 이후 연평균 9.1%의 높은 성장세를 유지하고 있으며, 지속적 성장으로 2020년에는 1.3조 달러의 시장이 형성 될 것으로 전망되고 있음(보건산업백서, 2010).
- 기존 합성의약품에서 항체, 백신, 단백질 의약품, 항바이러스제 등의 바이오의약품으로 빠르게 전환되고 있으며, 유전체에 기반의 맞춤형 신약개발이 활성화 될 것으로 전망되고 있음.



[그림 2-23] 세계 바이오산업 시장규모 현황 및 전망 (보건산업백서, 2010).

• **세계 10대 Specialty drugs 현황[표 2-13]**

- 대표 specialty drugs의 의약품군에 항암제, **항바이러스제** 및 HIV/AIDS약, 면역억제제, 자가면역질환 생물약품치료제, 면역촉진제, 혈액응고제 등으로 대부분 세계 시장 상위 20개 치료군에 속함.
- 이와 같이 항바이러스제는 현재는 물론 앞으로도 고도성장이 예상되는 부분으로서, 우리 정부와 업계에서 이에 대한 R&D에 대한 우선적 지원이 필요함.

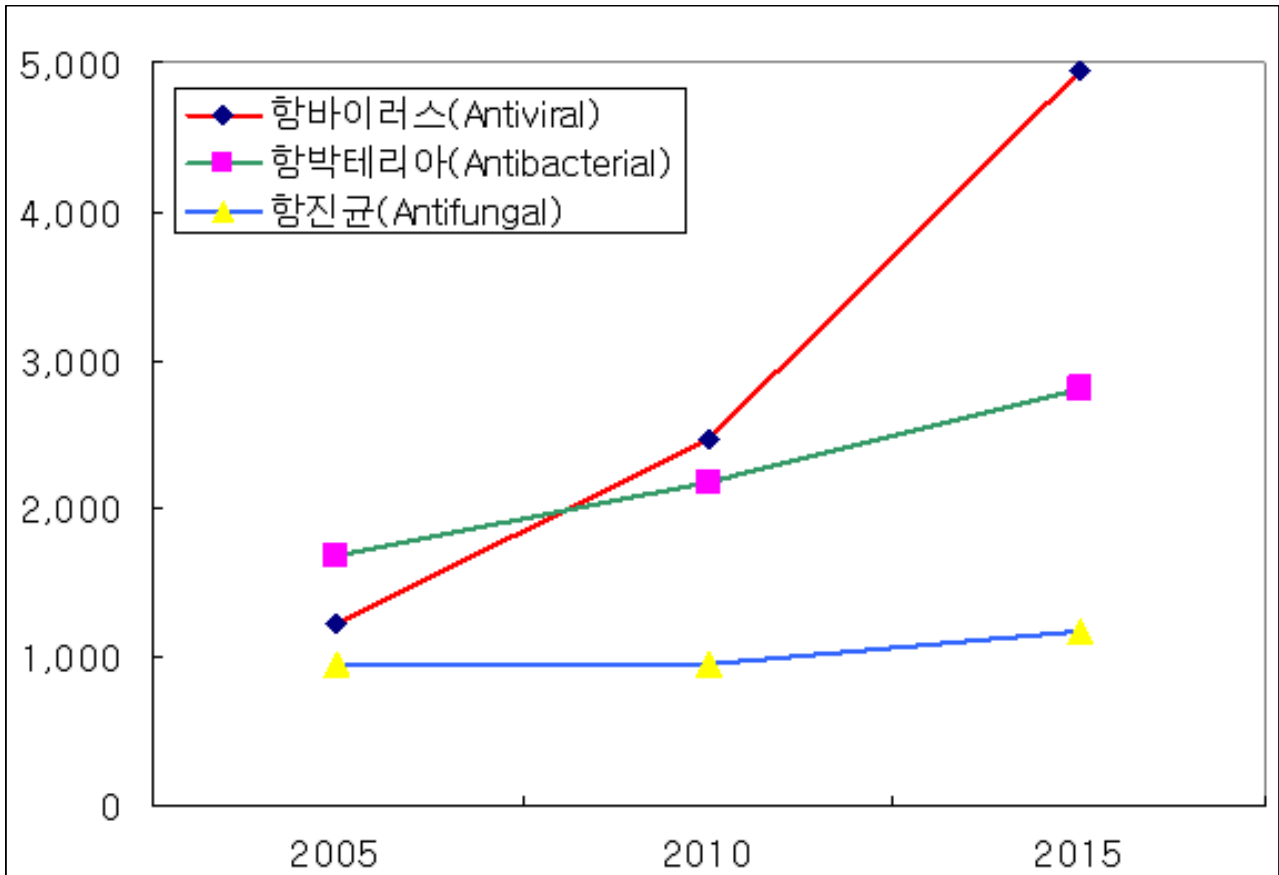
**[표 2-13] 세계 10대 Specialty drug 시장**

구분	전체 Specialty drugs 시장 중 비중(%)
항암제	35.7
<b>항바이러스제 및 HIV/AIDS약</b>	<b>9.1</b>
면역억제제	9.1
에리스로포이에탄	8.5
자가면역질환 생물약품 치료제	8.2
면역촉진제	6.6
자가면역 조절제	4.2
이뮤노글로불린	3.7
혈액응고제	3.0
C형 간염 치료제 인터페론	2.9

[자료: IMS Health, 2011]

■ **국내·외 항바이러스 치료제 시장 규모[그림 2-24]**

- 국내 항바이러스 치료제 시장은 2005년 1,255억 원에서 연평균 15%씩 지속적인 성장
  - 항박테리아 치료제는 연평균 5.2% 상승, 항진균 치료제는 연평균 1.9%감소하여, 2015년에는 각각 2,804억 원과 1,168억 원의 시장을 형성할 것으로 전망함.
- 시장 전망분석을 통해 3개의 바이오 신약 제품군에서 항바이러스 치료제 분야의 시장이 가장 높은 성장률을 보일 것으로 전망.



[그림 2-24] 항바이러스 치료제 국내시장 추이 [자료: IMS Health, 2011]

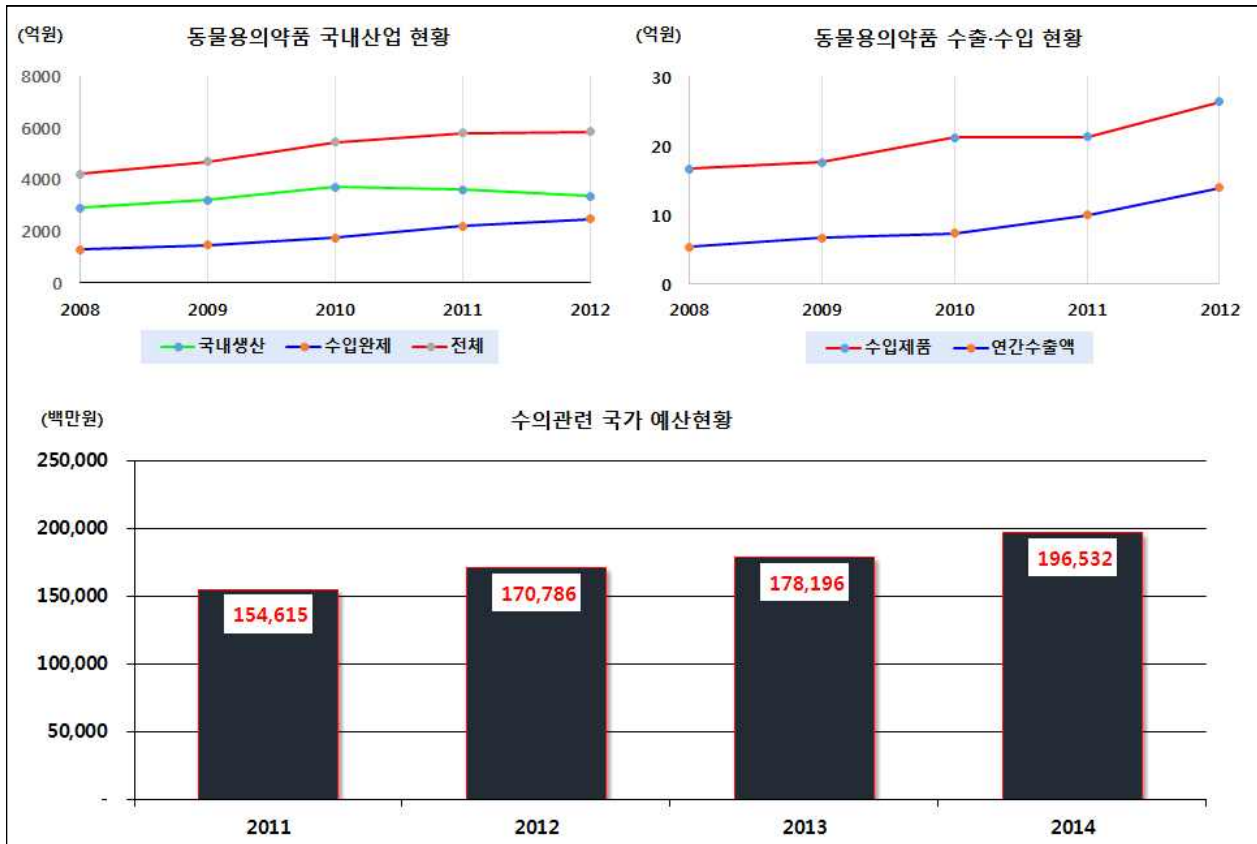
- 세계 항바이러스 치료제 시장은 의약품 시장에서 높은 성장률을 차지함
  - 세계 항바이러스 시장은 환자수 증가에 따른 시장 성장과 질병에 대한 자각 증가, 뛰어난 효과가 있는 신약개발에 의해 높은 성장률을 보일 것으로 전망.
  - 수스티바(Sustiva), 타미플루(Tamiflu), 리렌자(Relenza) 등의 특허만료가 2017년 이내로 예상.
  - 항바이러스제 시장의 제네릭 의약품으로 릴피비린(Rilpivirine), 비크리비록(Vicriviroc), 엘비테그라비어(Elvitegravir), 이나비어(Inavir)등이 출시로 인해 의약품 시장에 영향을 미칠 것으로 전망.
  - 2010년 세계항바이러스 시장규모는 221억 달러로 추정, 2010-2017년 까지 4.5% 성장으로 2017년 약 301억으로 달할 전망(Global information 2012).

## 2) 국내 동물의약품 산업 규모 및 감염증 치료제 시장규모

### ▣ 국내동물의약품 산업현황 및 수출·수입 현황과 전망[그림 2-25]

- 국내 동물의약품 산업은 지속적인 성장추세를 보이고 있으며, 내수시장 규모가 2007년 4,076억원에서 2011년 6,000억원으로 연평균 10% 성장을 보임.

- 2012년 이후 6,600억원 이상으로 성장 할 것으로 전망됨.
- 특히, 수출 규모는 내수 규모보다 더 빠른 성장세를 보이고 있으며, 2007년 4,900만 달러에서 2011년 1억 달러까지 연평균 30% 이상의 성장세를 시현.
- 미국의 동물용의약품 시장 규모(67억 달러)에 달하는 등 전 세계의 동물용의약품 시장이 지속적으로 성장해 나가는 추세여서 우리나라 동물용의약품의 수출에도 긍정적인 영향을 미칠 것으로 전망됨.



[그림 2-25] 동물용의약품산업 현황. [자료:농림축산식품부 가축방역 동물약품 정책방향 2014]

■ 국내동물의약품 산업시장의 성장요인

- 2000년대 구제역, 돼지콜레라, 조류인플루엔자 등 악성 가축전염병 창궐로 인한 축산업의 침체 (농림수산식품부, 2012)
  - 2010년 말 기준으로 국내 동물용의약품 품목허가 현황을 보면 11,060 품목으로 2009년에 비해 358품목, 3.3%가 증가함.
  - 2000년대 항생제 국가검정 폐지, KGMP의무화, 제조물책임법 시행 등을 통해 축산식품의 안전성 강화하는데 정책의 초점을 두었음.
  - 최근에는 우리나라 동물용의약품 산업의 성장 동력은 해외 시장 수출에 있음을 인



지하고, 의약품 개발에 집중이 되고 있음.

### 3) 국내외 천연물 신약 시장 현황 및 발전가능성

#### ▣ 천연물 신약개발의 발전가능성[그림 2-26]

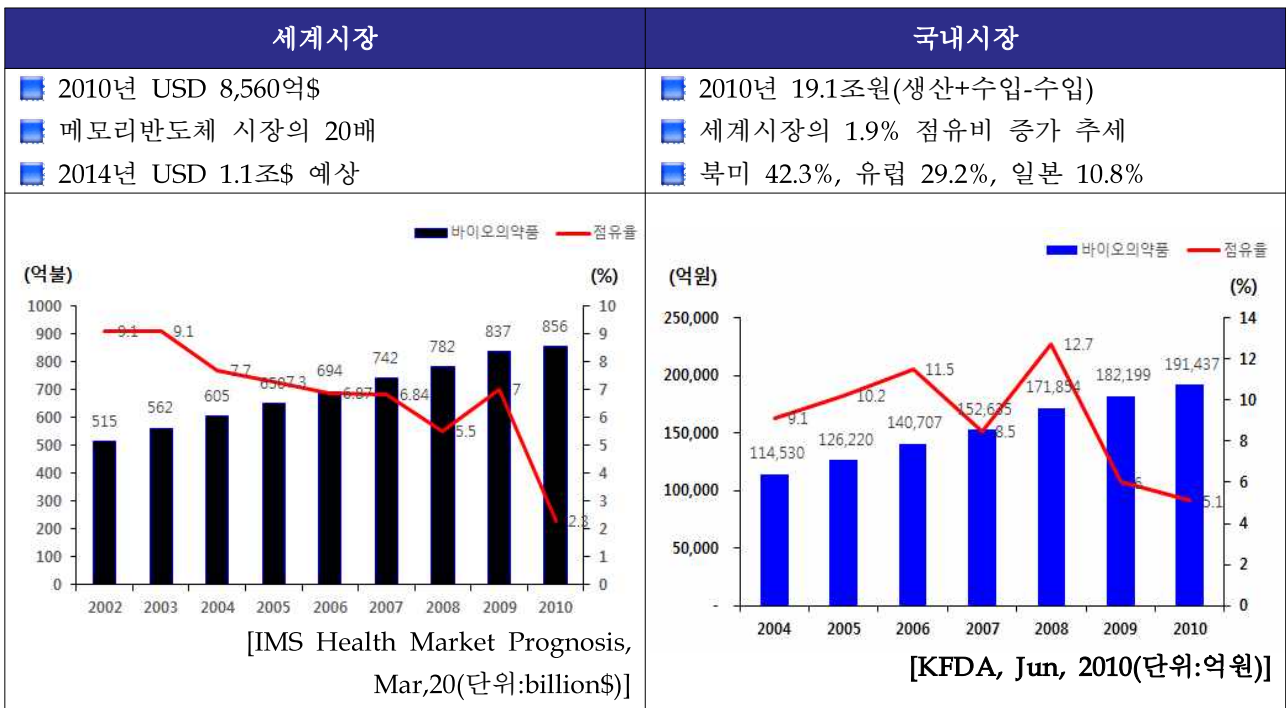
- 천연물신약의 연구개발 영역은 기존의약품과 개발영역이 유사하지만, 기존에 사용되어지던 천연물의 효과를 검증하면서 약효를 입증하여 신약으로 개발과정에서 차이남.
  - 천연물신약은 일반적인 합성신약의 연구개발 과정보다 개발비용과 기간을 단축시킬 수 있는 장점이 있음.
  - 합성신약은 새로운 특정성분을 추출하거나 가공하여 약물을 만드는 반면, 천연물신약은 안전성 및 유효성이 입증된 생약을 사용해서 부작용이 적어 개발비용과 기간을 절감 할 수 있음.
- 세계적인 혁신신약 1개를 개발 시 임상까지 소요비용은 2008년 8.8억 달러로 추산됨.
  - 천연물 신약은 전통적으로 축적된 자료를 바탕으로 개발과정에서 비용의 절감이 가능함.
  - 독성, 부작용과 관련된 경험지식을 활용하여 시험 전 단계에서부터 예측이 가능함.



[그림 2-26] 신약연구개발사용시 예상 수익 구조. [자료:한국신약개발연구조합, 2014]

■ 천연물 신약시장의 경제적 가치[그림 2-27]

- 천연물신약 1개 개발 시 세계적으로 연간 1조원~2조원 규모의 매출과 매출의 20~50%의 순이익이 창출이 가능함(한국바이오협회, 2010).
  - 세계에서 판매되고 있는 상위 25개의 제품 중 42%가 생물학제제·천연물 의약품 또는 천연물 유래 단일물질로 경제성, 유용성의 가치가 높음을 시사함.
  - Bristol-Myers Squib(BMS)사의 경우 Taxus속 식물(주목)로부터 개발된 항암제인 “Taxol”로 연간 12억 달러(약 1조 4천억 원) 이상의 매출을 올림.
  - 브라질산 백독 성분인 Teprotide를 기초로 하여 개발된 고혈압 치료제인 “ACE 억제제(Captopril)”은 연간 20억 달러(약 2조 4천억 원) 이상의 매출을 올림.
  - 일본 Sankyo사는 미생물로부터 혈중콜레스테롤저하제 “Compactin(mevastain)”을 개발하여 연간 1,000억 엔(약 1조 원) 이상 수출을 함.
  - 독일의 경우 은행잎으로부터 혈액순환 장애 치료제를 개발하여 연간 20억 달러(약 2조 4천억 원)이상의 매출액을 올림(천연물신약 시장 및 연구개발 동향, 2012).



[그림 2-27] 국내외 천연물 시약시장 규모 (자료: 한국바이오협회, 2010)

■ 세계 천연물 의약품 시장 규모

- 세계 천연물의약품 시장은 약 1,000조원 수준에 있고 연간 8~10%의 성장세를 나타냄.

- 전세계 천연물의약품 시장은 연평균 30% 이상의 가파른 성장률을 보이고 있음.
- 전체 천연물의약품 시장규모는 23조원 이상으로 이중 전문의약품이 18조원 규모를 가짐.
- 지역별 시장규모로는 북미와 유럽이 전체의 약 74%를 차지하고 있으며, 한국은 전세계시장의 약 2% 규모로 적은 시장을 형성하고 있음.
- 최근 중국, 브라질, 터키 등이 높은 성장률을 보이고 있음.

#### ▣ 국내의 천연물 신약 시장 현황

##### • 국내 천연물신약 현황[표 2-14]

- 천연물소재신약은 정부 연구개발(R&D)사업 중 '대한민국 핵심연구 사업 5대 기술'에 선정되었으며 2020년 글로벌 선도천연물 소재 신약은 10조원의 매출을 올릴 수 있을 것으로 예상.(지식경제부 R&D기획, 2010)
- 국내 최초 개발된 천연물신약은 조인스정이며, 2012년까지 총 8개의 천연물신약이 국내에서 개발 되었고, 전체 신약개발의 약 24%를 차지함.
- 국내에서 개발된 천연물신약은 SK케미칼의 조인스정이 1589억원, 스티렌정이 3158억원, 시네츄라시럽이 100억원의 매출을 보임.
- 천연물신약이 국내개발 합성신약보다 두배 이상 많은 매출액을 발생함.

[표 2-14] 국내 천연물의약품 개발사례

기업명	제품명	적용증	주요성분	허가연도	매출액(억)	비고
안국약품	푸로스판	진해거담	아이비잎	'00	300	
SK케미칼	조인스정	관절염	위령성, 팔루근, 하고초	'01	160	연골파괴억제, 관절분해효소 억제
동아제약	스티렌정	위염	애엽	'02	700	PG생성 촉진, 위점액분비 촉진
휴온스	살사라진	복부비만	당귀, 작약, 천궁, 연교, 박하, 등 18종	'03/'07	100	동의보감 처방

[자료: IMS Health 2008, 한국보건산업진흥원, 국내외 천연물의약품 시장동향, 2007]

##### • 해외 천연물신약 현황[표 2-15]

- 천연물기반 세계 제약산업의 블록버스터 신약 R&D는 상대적으로 경제적이고 안정성과 유효성을 확보할 수 있는 천연물로부터의 연구전략이 증가추세임.
- 천연물 신약은 합성의약품에 비해 연구개발기간과 연구개발비를 줄일 수 있는 장

- 점과 잠재된 우수한 약효와 부작용이 적은 고부가가치의 신약개발이 가능함.
- 세계적으로 천연물을 이용한 의약품으로는 아스피린, 탁솔, 은행잎엑스, 차전자엑스 등이 개발 및 시판 중이며 큰 매출을 올리고 있음.(천연물신약의 미래, 2013)
  - 특히, 인플루엔자 치료제인 타미플루는 팔각회향에서 추출한 shikimic acid에서 출발한 천연물 신약임.

[표 2-15] 해외 천연물 의약품 개발사례

기업명	제품명	적응증	주요성분	허가연도	매출액 (백만불)	비고
Bayer	아스피린	해열/진통	버드나무껍질 추출물	1899	300 (국내, '8년)	Prostaglandin inhibitor
Schwabe	테보닌	혈액순환 개선	은행잎 내 Ginkgo flavonoids	'65	2000	혈소판 응집저해 등
Bristol-Myers Squibb	Taxol	항암제	주목에서 추출한 paclitaxel	'95	1200	유사분열 억제
Bristol-Myers Squibb	Capoten	고혈압	뱀독의 teprotide	'96	2000	ACE inhibitor
Roche	Tamiflu	독감치료	팔각회향의 shikimic acid	'99	700	NA inhibitor
GSK	Relenza	독감치료	합성물질	'99/'00	42('06년)	NA inhibitor

[자료: IMS Health 2008, 한국보건산업진흥원, 국내외 천연물 의약품 시장동향, 2007]

▣ 합성신약의 문제점 및 천연물신약 개발의 중요성

• 합성신약개발의 문제점

- 유효성과 안전성을 가진 새로운 합성신약을 발견하기 어려움.
- 부작용으로 인해 임상 의약품 및 시판중인 의약품 허가 취소사례가 많음.
- 높은 경쟁 강도로 인한 글로벌 합성 신약 개발 기술의 일반화되어 있음.
- High risk로 개발까지 막대한 비용과 시간이 소요되는 반면 경제적 효과 보장이 어려움(천연물신약 시장 및 연구개발 동향, 2011).

• 천연물 신약개발의 기회

- 현재 천연물신약 시장은 초기시장 형성단계로서 선진국과 연구 격차가 작음.
- 합성신약과 비교 시 세계 제약시장에서 천연물 신약분야는 비교적 진입장벽이 낮음.

- 한국형 신약개발 경쟁력은 오랜 시간 축적된 전통의약 지식분야에서 상대적으로 확보.
- 합성의약품과 차별화로서 만성, 난치성 질환 치료제, 독성 및 부작용에 대한 안전성을 확보하고 있음(천연물신약 시장 및 연구개발 동향, 2011).

#### ▣ PED 치료제 개발의 문제점 및 개선 방안

- 항바이러스 시장이 항감염제 중에서 가장 비약적으로 발전하고 있음에도 불구하고 HIV, influenza, HBV등의 몇몇 바이러스 질환에만 국한되어 개발되는 실정임.
- 모든 항바이러스제는 다국적 기업이 모두 점유하고 있음.
- 개선 방향
  - 국내 다양한 천연자원을 활용하여 PED를 제어할 수 있는 항바이러스제를 개발함으로써 국내 양돈산업 및 국내 천연물 신약 분야의 발전을 통한 국가 경제에 긍정적인 영향을 끼칠 수 있음.

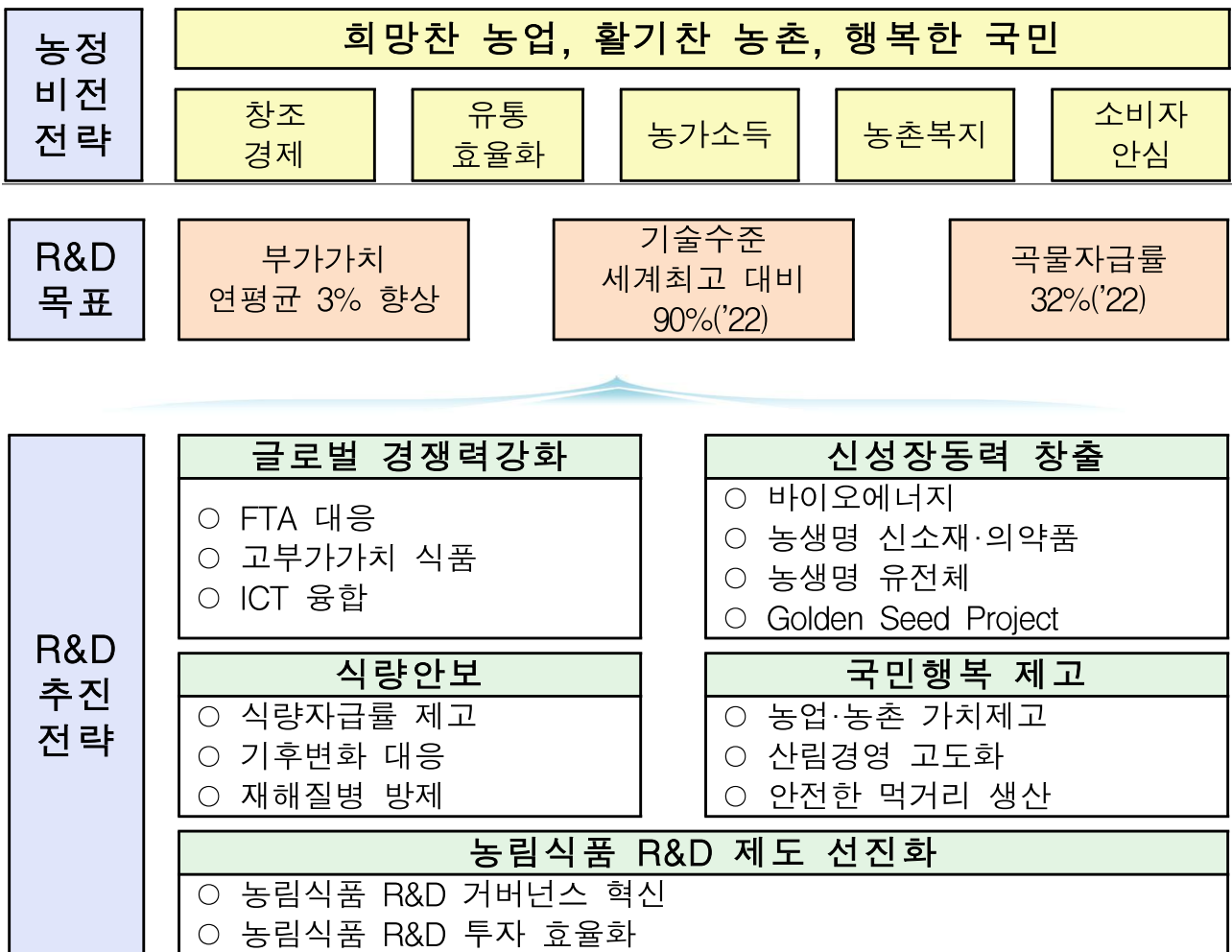
#### 3) 천연물 유래 PED치료제 개발의 경제적 필요성 요약

- 최근 변이형 PED의 발생으로 우리나라를 비롯한 미국, 중국등 전세계 양돈산업의 경제적 손실은 막대한 수준임.
- 따라서 변이형 PED 백신 개발과 더불어 비교우위에 있는 천연물 신약 개발을 통해 국내 축산업의 생산성을 높일 수 있는 기회를 제공할 수 있음.
- 개발 예정인 천연물 항바이러스제 개발은 PED 바이러스와 유사한 코로나바이러스인 인간의 사스 및 메르스 치료제로서의 활용을 추후 검토할 수 있는 기반이 될 것임.

### 3. 정책적 측면

#### 가. 중점 농업정책과의 부합

FTA 등 시장개방 확대 및 농림축산업 저성장은 농업의 새로운 성장동력 확충이 필요하게 되었음. 박근혜 정부는 글로벌 시장개방, 기후변화 등 R&D 환경과 창조경제, 국민행복 등 국정·농정철학을 반영하여 4대 중점연구분야인, 1)글로벌 경쟁력강화, 2)신성장동력 창출, 3)안정적 식량공급, 4)국민행복 제고 분야를 선정하였음. 이러한 4대 중점분야를 아우르는 농림축산분야 핵심 문제가 바로 “산업동물 바이러스성 전염병”임. 즉, 산업동물 바이러스성 전염병은 재난형 및 고질적 전염병 형태로 국내 축산업 발전에 걸림돌이었지만, 이에 대한 백신은 현장의 축산농가에 적합하지 못해 기피의 대상이 되어 왔으며, 치료제는 전무한 실정임. 따라서 “산업동물 바이러스성 전염병에 대한 백신 및 치료제 개발”은 우리 축산농가의 보호(국민행복 제고), 안정적인 축산물 생산(식량안보), 농생명 의약품개발(신성장동력 창출), 국외 수출(글로벌 경쟁력강화)이라는 박근혜 정부의 4대 중점분야와 부합되는 사업임.



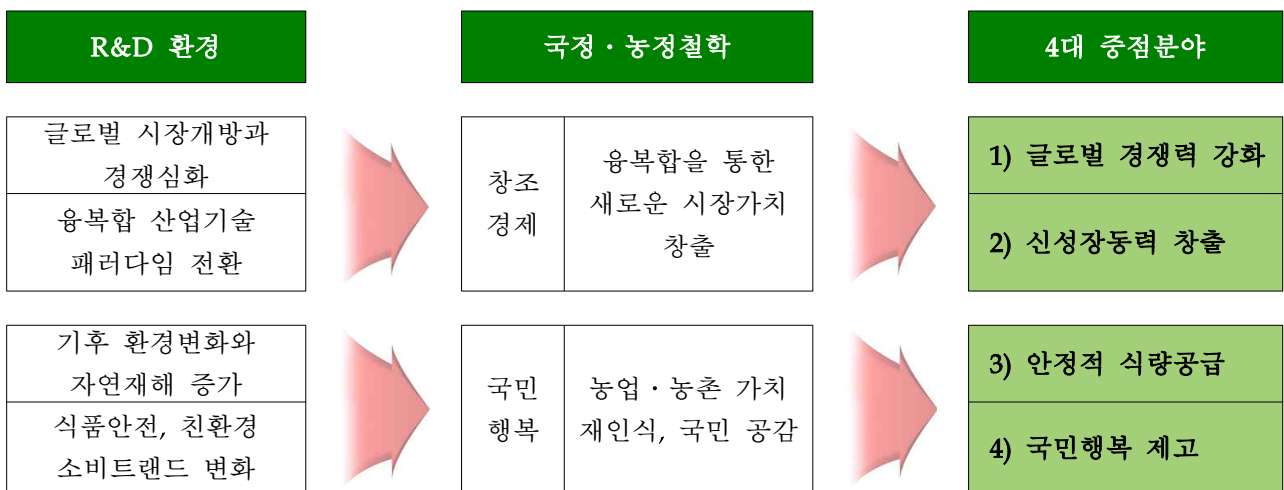
[그림 3-1] 현 정부 농림식품과학기술육성 중장기계획(2013~2022) 비전 및 정책방향.



1) 현 정부 농림정책 4대 중점분야

▣ 4대 중점분야 선정 배경[그림 3-2]

- 우리나라는 2013년 현재 FTA를 45개 국가들과 체결, 25개 국가와 진행, 5개 국가에 대해 준비하는 등 전 세계 국가들과 FTA를 체결 혹은 체결하려고 하고 있음.
- 우리나라는 IT를 포함한 첨단 산업에 감정이 있지만, 반면에 FTA를 체결 혹은 체결하려고 하는 나라는 농업에 감점을 두고 있어, FTA 체결 시 우리나라 농업은 불을 보듯이 타격을 받게 될.
- 박근혜 정부는 글로벌 시장개발, 기후변화 등 R&D 환경과 창조경제, 국민행복 등 국정-농정철학을 반영하여 4대 중점분야를 선정하였음.
  - 글로벌 경쟁력 강화, 신성장동력 창출, 안정적 식량공급, 국민행복 제고
- 하지만 4대 중점분야를 선정한 숨은 주된 배경에는 다자간 FTA에서 우리나라 농축산업을 보호하려고 하는 숨은 뜻이 있음.



[그림 3-2] 현 정부 농림식품과학기술육성 중장기계획(2013~2022) 비전 및 정책방향.

2) 본 과제와 농림정책 4대 중점분야와의 적합성 분석

▣ 글로벌 경쟁력 강화 목표와의 부합성[표 3-1]

- 정부 글로벌 경쟁력 강화 추진 목표
  - 우리나라의 다자간 FTA 체결에 따른 피해예상 품목의 산업경쟁력 제고 및 수출 확대추진이 목표임.
  - 이를 위해 기술집약형 농식품 산업육성을 통한 글로벌 경쟁력 강화하고, ICT 융복합 등 첨단기술 접목을 통한 고부가가치 산업화를 추진하고 있음.
- 본 사업의 목표 및 글로벌 경쟁력 강화 추진 목표와의 부합성
  - 글로벌 경쟁력 강화 중점분야에서 본 과제가 지향하는 세부 분야는 FTA 대응 세

부분야 중에서 축산물 품질 고급화 및 생산성 향상기술임.

- 본 사업을 통해 가격 경쟁력이 있는 글로벌 수준의 ‘산업동물 바이러스성 장염에 대한 백신 및 치료제 산업화’를 하려고 함.
- 이를 통해, 국내 산업동물 바이러스성 장염을 퇴치함으로써 축산물 품질 고급화 및 생산성 향상시킬 뿐만 아니라 FTA를 통해 경쟁력이 강화된 다국적 회사의 백신 수입을 저지하는 것이어서 “글로벌 경쟁력 강화의 목표”와 부합.

**[표 3-1] 글로벌 경쟁력 제고를 위한 핵심기술**

세부 분야	관련기술
<b>FTA 대응</b>	• 친환경 통합 분뇨 처리 기술
	• 첨단 친환경 동물복지형 축사 개발
	• <b>축산물 품질 고급화 및 생산성 향상 기술</b>
	• 신선 농축산물 수확 후 관리 및 선도유지 저장유통기술
	• 로열티 대응 및 수출용 고품질 원예특용작물 신품종 육성
	• 원예용 첨단 고성능 기자재 산업화 기술
	• 시설원예 경영비 절감 및 생산성 향상 기술
고부가가치 식품	• 질환경 개선 고부가가치 기능성 식품개발 기술
	• 고품질/고소득 발효식품 소재화 및 실용화 기술
	• 농식품 신선도 유지 및 장기저장을 위한 냉해동 기술
	• 식품기공공정 효율성 향상 통합 생산관리 시스템
ICT 융합	• 농림축산 활용 로봇 기반 기술
	• 첨단 지능형 정밀농업 구현 기술
	• 스마트(완전제어형) 친환경 식물공장 상용화 기술
	• 지능형 농업용수 통합제어 시스템

[자료: 농림식품 과학기술 육성 중장기 계획(안), 농림축산식품부, 2013]

**■ 신성장동력 창출 목표와의 부합성[표 3-2]**

- 정부 신성장동력 창출 추진목표
  - 농생명산업 원천기술 확보 및 국가 전략 대응기술개발이 추진목표임.
  - 이를 위해 고품질·친환경 농생명 신소재 산업육성으로 새로운 시장을 창출하고, 농업·농촌 에너지 개발 및 산업화를 통한 에너지 강국을 실현하는 것임.
- 본 사업의 목표 및 신성장동력 창출 추진 목표와의 부합성
  - 신성장동력 창출 분야에서 본 과제가 지향하는 분야는 식·의약소재 내 천연물 자원을 이용한 의약 소재 개발, 산업용 신소재 내 천연물 유래 신소재 원천기술 개발 및 산업화, 식품 신소재 내 질병예방을 위한 식품바이오 신소재 개발이 해당됨.
  - 본 사업을 통해 산업동물 바이러스성 장염 백신 및 치료제 분야의 원천기술을 확보하는 것이어서 “신성장동력 창출의 목표”와 부합.

[표 3-2] 신성장 동력 창출 분야 중 신소재/바이오 식의약/농생명 유전체 분야 주요 기술

분야	관련 기술
농생명자원 유전체 해독	• 국가 유용 유전자원의 유전체 해독과 표준화된 정보 생산체계 구축 및 활용 • 오믹스 기반 유전자 개발 기술
유전체 정보 고도화	• 생물정보 통합관리 시스템 구축 • 범부처 유전체 정보 인프라 협력 연계 구축을 통해 종합서비스 제공
바이오장기	• 이종간 면역제어 유전자 분석 기술 • 장기 이식용 형질전환 무균 돼지 생산 • 의료용 동물 사육시스템 개발
식·의약소재	• 바이오신약 생산용 형질전환 동물 개발 • 천연물 자원을 활용한 인공 뼈·치아·피부 등 의약 소재 개발
산업용 신소재	• 바이오 플라스틱 • 천연 항생제 대체제 등 천연물 유래 신소재 원천기술 개발 및 산업화
식품 신소재	• 건강증진 • 질병예방을 위한 식품바이오 신소재 개발 • 천연조미료·방부제 등 화합물 대체 소재 개발 기술

[자료: 농림식품 과학기술 육성 중장기 계획(안), 농림축산식품부, 2013]

▣ 안정적 식량공급 목표와의 부합성[표 3-3]

- 정부 안정적 식량공급 추진목표
  - 국제 곡물가 급등, 기후변화, 신변종 가축질병 등으로 인한 미래 농식품 생산·공급 위기를 선제적으로 대처하는 것이 목표임.
  - 이를 위해 기후변화 대응역량 강화를 통한 지속가능한 농산업 구현 및 완벽한 가축질병 방역체계 구축으로 축산물 안전생산 기반확립을 추진하고 있음.
- 본 사업의 목표 및 안정적 식량공급 추진 목표와의 부합성[표 3-3]
  - 안정적 식량공급 중점분야에서 본 과제가 지향하는 분야는 재배 질병 방제 분야 내 가축질병(인수공통감염병 포함) 예방 및 치료 기술임.

[표 3-3] 안정적 식량공급을 위한 핵심기술분야 및 기술명

분야	기술명
안정적 식량공급	고품질·고생산성 주곡 신품종 개발 및 안정성 향상기술
	발작물 생산성 증대기술
	기능성·생산성 향상 조사료 대량재배 기술
기후변화 대응	기후변화 적응 품종 개발 및 생산기술 개발
	농림축산 실시간 첨단 기상재해 예측경보 시스템
	농림축산 기후변화 영향평가 및 예측 기반구축 기술
재해질병 방제	BIT 융복합 병해충·질병 신속진단 기술
	농림축산 질병 역학특성 규명 기술
	가축질병(인수공통감염병 포함) 예방 및 치료 기술
	국내외 통합 질병 방역체계 구축

[자료: 농림식품 과학기술 육성 중장기 계획(안), 농림축산식품부, 2013]

- 이러한 재해질병 방제에서 본 사업은 동물의약품 개발분야임[표 3-4].

- 즉, 가축질병 및 인수공통감염병의 근절에 필요한 동물 의약품의 국산화 기술에 해당 됨.
- 결론적으로 본 사업을 통해 산업동물의 바이러스성 장염 백신 및 치료제를 개발하여, 산업동물 생산성을 증대하는 것이어서 “안정적 식량공급의 목표”와 부합.

**[표 3-4] 안정적 식량공급 중점분야 내 재해질병 방제를 위한 핵심기술분야 및 기술명**

분야	관련 기술
진단·예방 기술	• 가축질병의 위해요소 감지 및 조기경보시스템 개발 • 위해요소별 위험 평가 모델개발 • 첨단 센서 기반 질병 통합 진단키트 개발 등
방역체계 구축	• 국내외 전염병 역학적 특성 연구 • 해외 병해충 유입감시 및 방제 시스 템 구축 • 국가간 인수공통감염병 모니터링 감시 및 공동 대응체계 구축
동물의약품 개발	• 가축질병 통합치료용 백신개발 • 가축전염병 제어용 신소재 개발

[자료: 농림식품 과학기술 육성 중장기 계획(안), 농림축산식품부, 2013]

■ **국민행복 제고 목표와의 부합성[표 3-5]**

- 정부 국민행복 제고 추진목표
  - 농산촌 가치 증진을 트오한 활력 있는 일터, 쉼터, 삶터로 재창조, 동식물-인간-환경이 공존하는 도시농업 활성화, G7 수준의 안전한 농식품 생산 관리 기반을 구축하는 것이 목표임.
  - 이를 위해 국민 삶의 질 향상 및 농산촌의 활력도 제고를 위한 농산촌 경영 고도화, 국민의 안전한 먹거리 생산체계 확립을 위한 기술개발을 추진 중.
- 본 사업의 목표 및 국민행복 제고 추진 목표와의 부합성[표 3-5]
  - 국민행복 제고 분야에는 농업·농촌 가치제고, 산림경영 고도화, 안전한 먹거리 생산이 있으며, 이 중 본 과제가 지향하는 관련분야는 안전한 먹거리 생산임.
  - 안전한 먹거리 생산에는 농산물 안전생산 및 위해요소 안전관리기술, 전주기 축산식품 안전관리 체계구축 기술, 농산물(농식품) 생산단계 안전성 조사 및 품질관리 기술이 있는데, 본 사업은 위 3항목 모두와 관련성이 있음.

[표 3-5] 국민행복 제고를 위한 세부분야 및 핵심기술

분야	기술명
농업·농촌 가치제고	농산촌경관·전통자원 보전 및 문화콘텐츠화 기술
	농업인 안전재해 보호 및 관리 기술 구축
	도시녹화 기반기술 활용 그린타운 조성 기술
	귀농 인력 농업 정착 지원 기술
산림경영 고도화	산림복지 서비스 R&D 기술
	고부가가치 산림자원 조성 및 육성기술
	임산소득자원 신제품 개발 및 재배기술
안전한 먹거리 생산	농산물 안전생산 및 위해요소 안전관리기술
	전주기 축산식품 안전관리 체계구축 기술
	농산물(농식품) 생산단계 안전성 조사 및 품질관리 기술

[자료: 농림식품 과학기술 육성 중장기 계획(안), 농림축산식품부, 2013]

- 즉, 농산물 안전관리분야에서는 친환경 안전농산물 생산기술, 축산물 안전관리 분야에서는 천연 사료첨가제 개발, 식품품질·유통관리 분야에서는 식품품질 유지·관리 유통기술이 “국민행복 제고를 위한 목표”와 연관성이 있음[표 3-6].

[표 3-6] 국민행복 제고 분야 내 안전한 먹거리 생산을 위한 핵심기술분야 및 관련기술

분야	관련 기술
농산물 안전관리	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 농식품 유해물질의 과학적 위해평가</li> <li>• 진단·분석 및 환경오염 저감기술</li> <li>• 농약 및 친환경 유기농자재 안전성 제고 기술 중점개발</li> <li>• <b>친환경 안전농산물 생산기술</b></li> </ul>
축산물 안전관리	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 도축전 축산물 안전성 신속진단기술</li> <li>• 항생제 대체 <b>천연 사료첨가제 개발</b></li> <li>• 도축·포장·유통 단계 HACCP 적용·관리기술</li> </ul>
식품품질·유통관리	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 농산물(농식품) 위해요소 분석 및 검출기술</li> <li>• <b>식품품질 유지·관리 유통기술</b></li> <li>• U-IT기반 전주기 식품 품질관리시스템 구축 등</li> </ul>

[자료: 농림식품 과학기술 육성 중장기 계획(안), 농림축산식품부, 2013]

### 3) 본 사업의 목표와 4대 중점 농림정책과의 관련성 요약

#### ○ 글로벌 경쟁력 강화

- 본 사업의 목표인 글로벌 수준의 “산업동물 바이러스성 장염에 대한 백신 및 치료제 산업화”는 글로벌 경쟁력 강화 내 FTA 대응 세부분야의 “축산물 품질 고급화 및 생산성 향상기술”과 해당함.

#### ○ 신성장 동력 창출

- 본 사업은 신성장 동력 창출 분야 중 “식의약소재, 산업용 신소재, 식품 신소재의 목표”와 관련됨.

#### ○ 안정적 식량공급

- 본 사업은 안정적 식량공급 분야 중 재해 질병 방제의 “가축질병(인수공통감염병 포함) 예방 및 치료 기술의 목표”에 부합함.

#### ○ 국민행복 제고

- 본 사업은 국민행복 제고 분야 중 “안전한 먹거리 생산의 목표”와 연관됨.



## 4. 사회적 측면

산업동물 바이러스성 장염의 창궐로 국내 축산농가에서 막대한 경제적 손실이 연중 발생하여 축산농가의 사육의지 격감 및 포기가 사회경제적 문제로 대두되고 있음. 또한 본 사업의 대상 질병들에 대한 현장 대응 수단인 백신의 개선여지와 치료수단의 전무로 양축가들의 사회심리학적 불안요소가 가중되고 있음. 한편 본 사업의 병원체중에는 인수공통전염병이 될 수 있는 병원체들이 있어 최종 소비자들인 국민에게도 막대한 불안감을 조장할 수 있음. 따라서 이들 질병발생의 최소화과 방제에 의한 안전한 축산물 생산은 양축가들의 의욕을 높이면서 축산물을 먹는 국민들의 건강을 증진시킬 수 있을 것임.

### 가. 산업동물 바이러스성 장염 발생에 따른 축산농가를 비롯 축산물 최종수요자인 국민의 사회경제적 피해 해결

- ▣ 축산농가와 국민들의 사회경제적 손실은 본 사업의 결과물인 백신과 치료제 개발로 직종의 안전성 확보와 국민신뢰도 제고로 이끌 수 있음.
  - PED는 발생 시 양돈장내 감수성 축군 전체에 걸쳐 폭발적으로 발생하는데, 특히 포유자돈에서는 50%-100%에 이르는 높은 폐사를 일으켜 양축가의 경제적 피해외에 사육의지를 꺾고 있음.
  - 또한, 돼지 및 소 로타바이러스, 소 코로나바이러스 감염증 역시 국내 모든 사육농가에서 발생하고 있어 경제적 피해가 발생하여 만성적 생산성의 악화를 초래하는 중임.
  - 그럼에도 이들 산업동물 바이러스성 장염의 지속적 발생은 사육농가들의 양축의지를 약화시키거나 심할 경우 폐업으로 이끌 수 있음.
  - 이러한 양축현장의 경제적 피해뿐만 아니라 종사하는 직업의 심리적 불안전성은 사육기반의 취약으로 드러날 수 있음.
  - 결국, 본 사업은 대상 병원체들의 직접적인 양축현장의 생산성 하락과 발생 시 사람에게 바로 관련된 공중보건학적 병원체를 사육현장에서 사전에 방어할 수 있다는 강점을 지니고 있음.

### 나. 본 사업의 대상 질병들에 의한 양축가들의 축산실패의 원인 제거

- ▣ 대상 가축의 바이러스성 장염에 의한 경제적 피해로 현행 양축가는 물론 귀농 신규 양축가들에게 양축현장을 떠나는 원인이 될 수 있음
  - 국내 사회적 문제의 가장 큰 문제인 높은 실업률을 감안해 볼 때 기존 산업현장의 일터를 지켜내고 귀농형태의 신규 양축가들의 진입은 긍정적인 사회적 안전망 확보

가 될 수 있음.

-젊은 후속 세대의 축산업 진출이 낮은 가운데, 가족 형태의 축산을 시작하는 경우가 증가하고 있어 이들에 대한 본 사업의 결과를 통해 경제적 피해를 줄여 안전한 정착을 이룰 수 있는데 사회적 기여를 할 수 있을 것임.

- 가축의 만성 전염병 창궐에 의한 축산농가의 이직률 감소

- 양축현장에서 PED를 비롯하여 돼지 로타바이러스, 소의 로타바이러스 및 코로나바이러스 감염증은 근본적으로 수익을 내어야 하는 적정 생산성의 유지를 위협하여 결과적으로 축산농가의 파산과 이로 인한 축산농가의 이직률을 증가시킨.

- 따라서 본 사업의 결과물을 통해 약화 내지 감소시킬 수 있을 것임.

- 적극적인 시각으로 보면, 본 사업을 통해 기존 축산농가의 소득을 증대시켜 사육의지를 북돋아 주고, 실업 상태의 유휴 노동인구를 신규 축산농가로 유인하여 일자리를 창출할 수 있을 것임.

#### **다. 본 사업 결과에 따른 국내 생산 축산물의 국민 신뢰도 향상**

##### ▣ 국민의 급격한 안전 먹거리 인식 향상에 의한 고품질 축산물 및 유제품 추구

- 국민의 소득증대에 의해 안전한 먹거리에 대한 관심이 높아져, 비위생적이거나 안전성에 문제가 있는 육류 및 유제품에 대해서는 시장에 진입할 수 없음.
- 대표적인 예가 사람에게 매우 낮은 감염을 일으키는 구제역이나 고병원성 조류 인플루엔자가 국내에서 발생할 때마다 관련 축산물의 소비가 급감하고 있음.

##### ▣ 본 사업의 소와 돼지 로타바이러스는 인수공통감염병의 원인체임[그림 4-1]

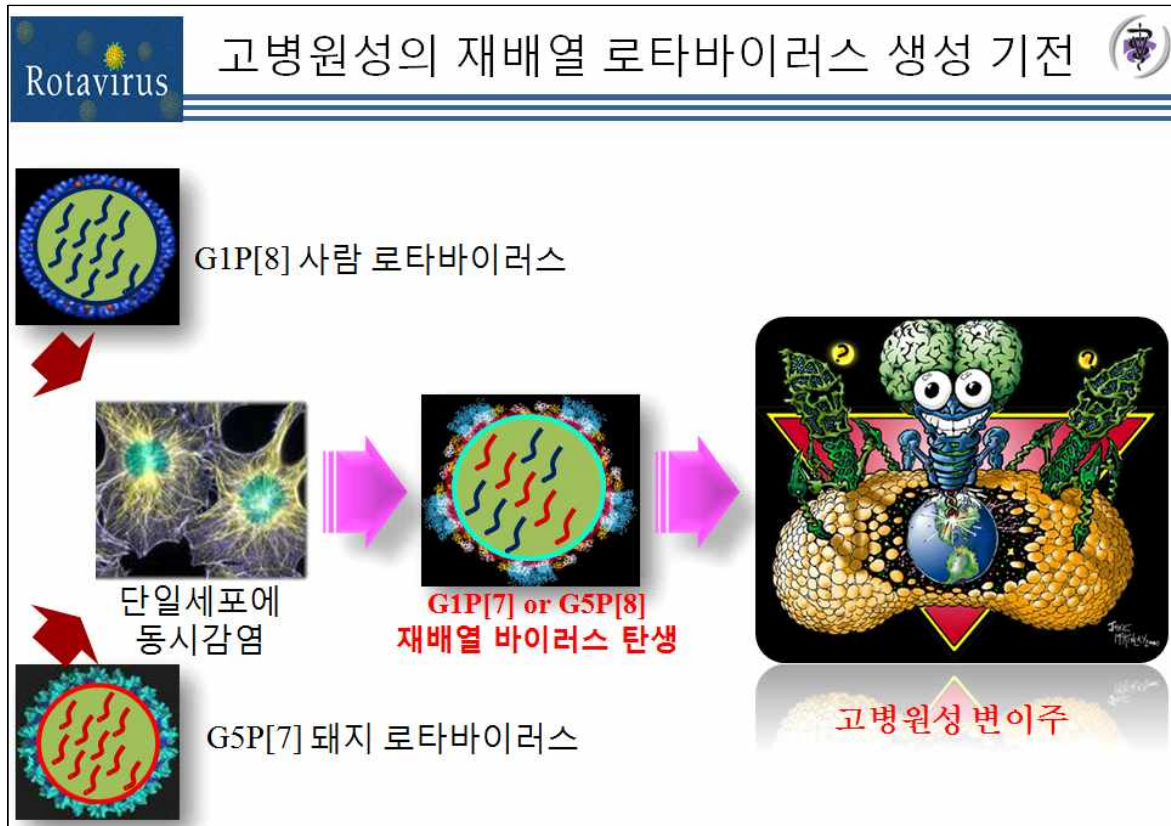
- 소와 돼지 로타바이러스는 어린아이에 설사를 일으킴
  - 예를 들어서 돼지의 주요 G 유전형인 G5, 소의 주요 G 유전형인 G6, G8, G10 유전형 바이러스들이 어린아이 설사분변에서 검출되었음(Adah et al., 2001; Banyai et al., 2003; Beards et al., 1992; Cunliffe et al., 1999; Griffin et al., 2002; Palombo et al., 2000).
  - 소와 돼지의 로타바이러스는 선진국의 어린아이에서도 검출이 되지만, 특히 사람과 가축의 접촉이 빈번한 나라에서도 빈발하고 있음.
- 축산물의 최종소비자인 국민들이 높은 수준의 안전성을 요구하는 우리나라의 현실아래 양축 현장의 재난형 혹은 고질성 대상 질병들의 다발은 품질면에서 축산물의 신뢰하락과 심리적 소비기피 현상을 일으킬 수 있는데 본 사업의 성공적 결과물들은 이를 미연에 막을 수 있을 것임.



[그림 4-1] 로타바이러스는 인수공통감염병의 원인체로서 특히 가축과 빈번한 신체적 접촉이 있는 개발도상국에서 빈번히 일어남.

- 인간에 쉽게 감염될 수 있는 재배열 로타바이러스의 근원[그림 4-2]
  - 로타바이러스 유전체는 11개의 분절화된 2중의 RNA로 구성되어 있음.
  - 이러한 특성에 의해 서로 다른 로타바이러스가 한 숙주에 감염되면, 바이러스 복제 과정 중에 서로 다른 분절화된 유전체가 혼합된 재배열 로타바이러스가 생성됨.
  - 이러한 로타바이러스는 새로운 숙주에 더욱 더 전염성과 병원성이 높아진 신종의 바이러스가 될 수 있음.
  - 어린이 설사분변에서 검출된 가축의 로타바이러스는 거의 대부분 가축과 인간의 로타바이러스 유전체가 서로 교환된 재배열 로타바이러스라고 함.
  - 대표적인 예가 1992년 브라질 어린이 장염의 26%가 돼지 G5 로타바이러스와 인간 로타바이러스가 재배열 된 바이러스임(Gentsch et al., 1996; Gouvea et al., 1994).
- 소와 돼지의 로타바이러스의 근절은 인간으로 전파를 차단
  - 국내에서 소 및 돼지 로타바이러스 감염증 다발로 막대한 경제적 피해가 발생함.
  - 소 및 돼지 로타바이러스는 인간으로 전파될 수 있는 인수공통감염병의 원인체임.

- 이에 국내 축산농가의 현실에 적합한 소 및 돼지 로타바이러스 맞춤형 백신개발은 국내 축산농가의 보호뿐만 아니라 우리 국민으로 전파를 차단할 수 있어, 경제적으로나 공중보건적으로 매우 중요하다 할 수 있음.



[그림 4-2] 재배열 로타바이러스 생성기전. 로타바이러스는 11개의 분절화된 유전체를 가지고 있어, 서로 다른 로타바이러스가 한 세포에 감염될 경우, 바이러스 복제 과정 중에 서로 다른 바이러스의 유전체가 혼합된 재배열 로타바이러스가 생성됨. 재배열 로타바이러스 변이주는 새로운 숙주에 전파성 및 병원성이 높아질 수 있음.

▣ 사스 코로나바이러스와 관련성으로 산업동물 코로나바이러스는 국민에 불안감 조성

- 야생동물에서 유래된 사스 및 메르스 코로나바이러스
  - 기술적 측면에서 기술한 바와 같이 야생동물에서 유래한 사스 및 메르스 코로나바이러스 감염증에 의해 우리 국민은 물론 인류를 공포에 몰아넣었음.
- 산업동물에서 코로나바이러스 감염증의 중요성
  - 산업동물에서 코로나바이러스 감염증은 악성의 바이러스성 전염병임.
  - 문제는 PEDV나 BCoV가 사스나 메르스 코로나바이러스와 같이 인간으로의 전파는 없지만, 마치 “자라보고 놀란 가슴 솥뚜껑 보고 놀란다”라는 것과 같이, 인간으로 전파가 우려되어 소비자들이 육류 및 유제품을 외면할 수 있음.

- 따라서 산업동물 바이러스성 장염에 대한 백신 및 치료제를 개발하여 건강한 육류 및 유제품을 생산을 통해 높아진 국민 보건 의식에 발맞추어 나가야 할 것임.

#### 라. 본 연구의 사회적 필요성 요약

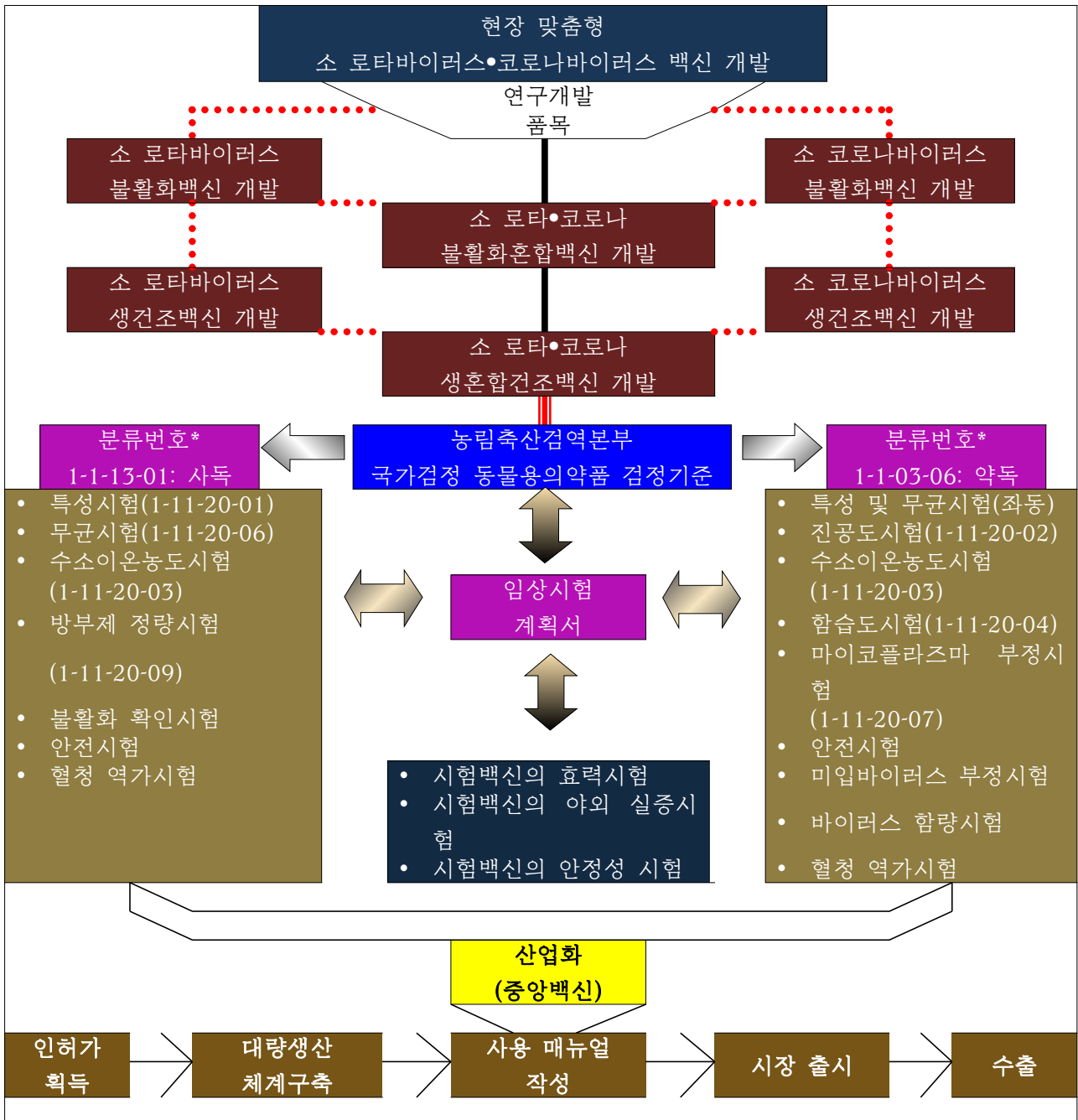
- 본 사업의 대상인 산업동물 바이러스성 장염이 국내 축산농가에서 다발하고 있어 양축가들은 경제적으로나 정신적으로 고통을 받고 있으며 이로 인한 생산성 악화가 이직으로 이어질 수 있음.
- 본 사업의 대상 병원체 중, 소와 돼지의 로타바이러스는 사람으로 인수공통전염성 병원체로 이들로 인한 안전한 먹거리 생산과 국민의 축산물 신뢰에 부정적 영향을 끼쳐 결국 소비 감소로 이어질 경우 축산소비의 악순환 고리가 형성될 수 있음.
- 따라서 본 사업에서 얻어질 대상 산업동물의 바이러스성 장염의 새로운 백신 및 치료제는 양축현장의 생산성 향상을 기반을 확대시키고 최종 소비자인 국민의 건강 보호와 사회경제적 안정수단의 확보라는 선순환 구조를 이루는데 중요하게 기여를 할 것임.

### 1-3. 연구개발 범위

#### 가. 제1세부과제(전남대 조경오교수) 연구개발 범위

○ 소 로타·코로나 불활화(사독) 및 생건조(약독화) 단독 혹은 혼합 백신 개발

- 본 세부과제는 제1협동과제 수행기관(중앙백신연구소)과 함께 국내 축우농가에 막대한 경제적 피해를 일으키고 있는 소 로타바이러스 및 소 코로나바이러스에 대한 불활화 및 생건조 단독 혹은 혼합백신을 개발하고, 이 중 소 로타·코로나 불활화혼합백신 혹은 생혼합건조백신을 산업화 시키는 것이 최종목표임.

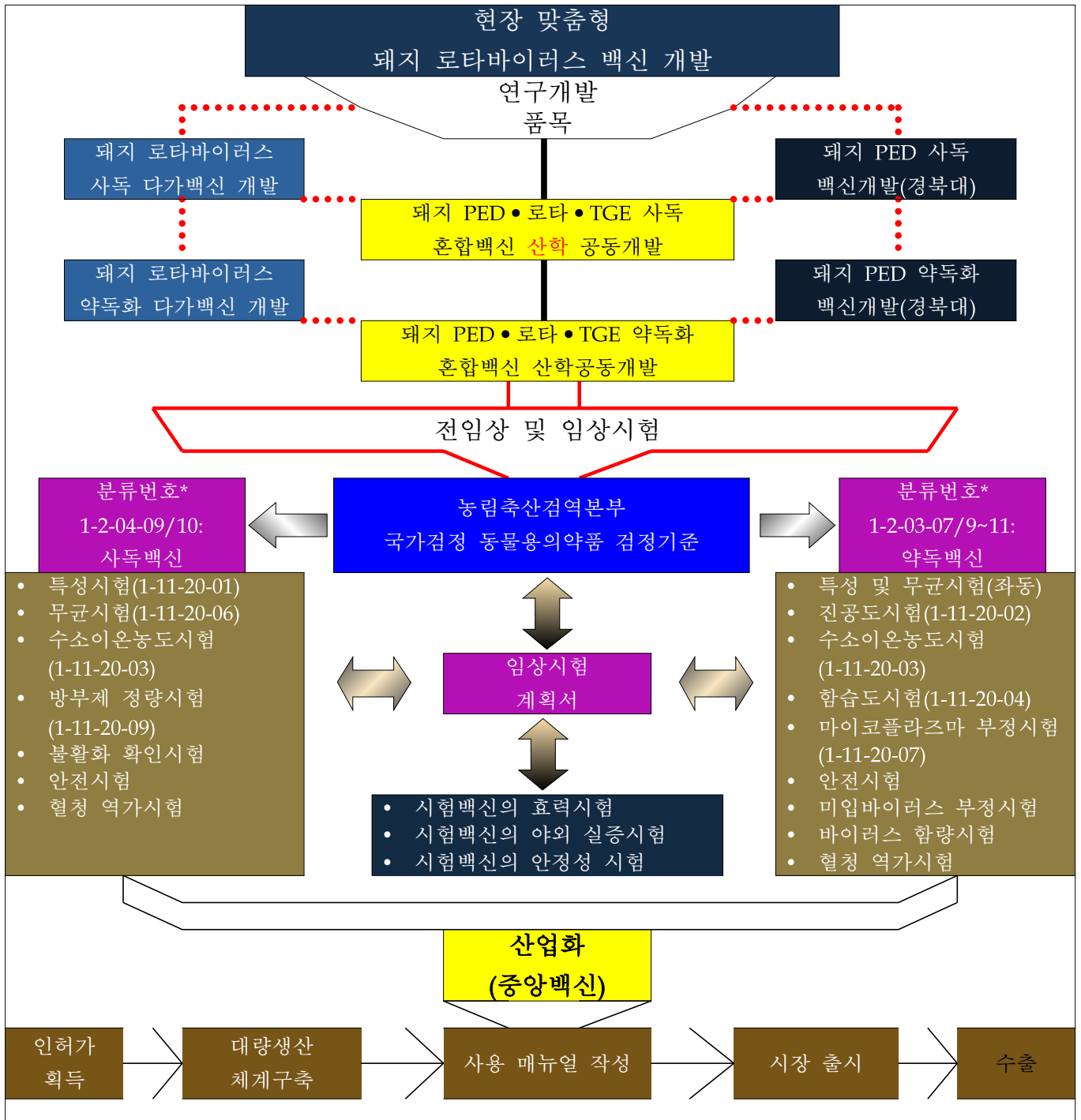




나. 제2세부과제(전남대 강문일교수) 연구개발 범위

○ 돼지 로타바이러스 불활화(사독) 및 생건조(약독) 단독 혹은 혼합 백신 개발

- 본 세부과제는 제1협동과제 수행기관(중앙백신연구소)과 함께 국내 양돈농가에 막대한 경제적 피해를 일으키고 있는 돼지 로타바이러스 불활화 및 생건조 단독 백신을 개발하고, 제1협동 및 제2협동과제와 함께 PEDV, 로타+TGEV 불활화혼합백신 혹은 생혼합 건조백신을 산업화 시키는 것이 최종목표임.

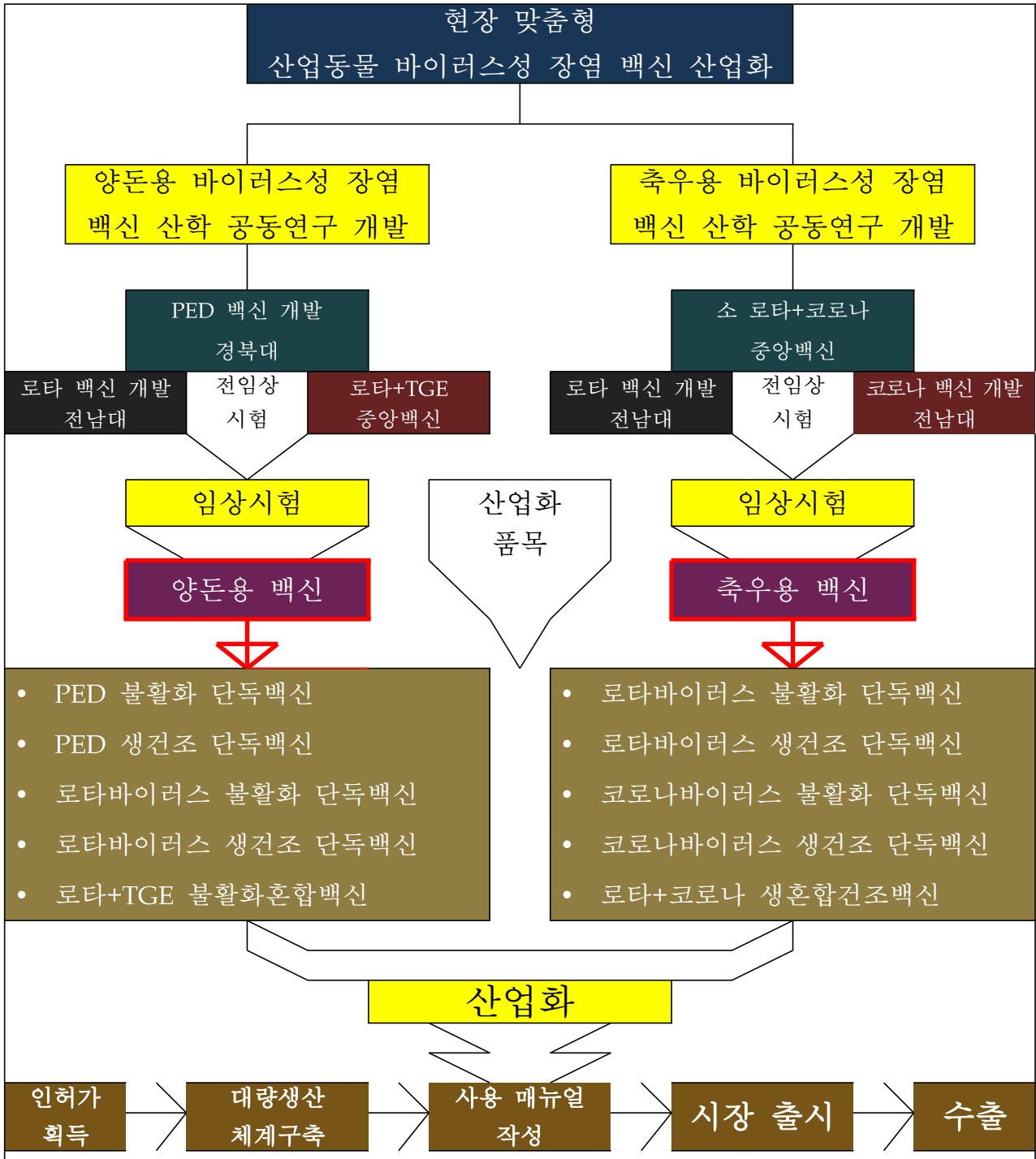




다. 제1협동과제(중양백신 김은희 박사) 연구개발 범위

○ 산업동물 바이러스성 장염 백신의 산업화

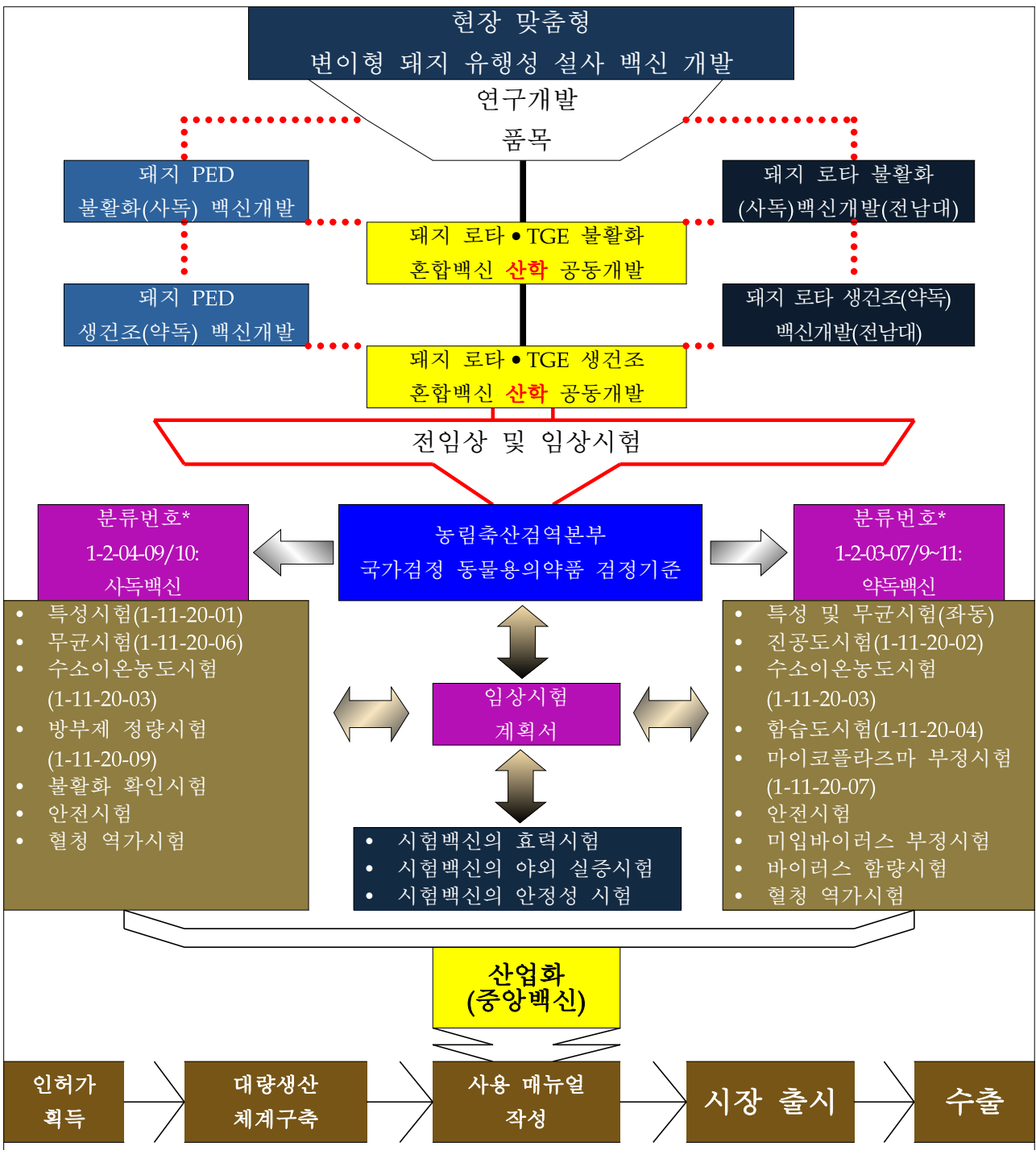
- 본 협동과제는 제1세부과제, 제2세부과제 및 제2협동과제와 공동으로 국내 축산업에 막대한 경제적 피해를 유발하는 변이형 돼지 유행성 설사 바이러스, 돼지 로타바이러스, 소 코로나바이러스 및 소 로타바이러스 감염증을 예방할 수 있는 양돈 및 축우용 바이러스성 장염 불활화혼합백신 혹은 생혼합건조백신을 산업화 시키는 것이 최종목표임.



라. 제2협동과제(경북대 이창희 교수) 연구개발의 범위

○ 변이형 돼지 유행성 설사(PED) 백신 개발

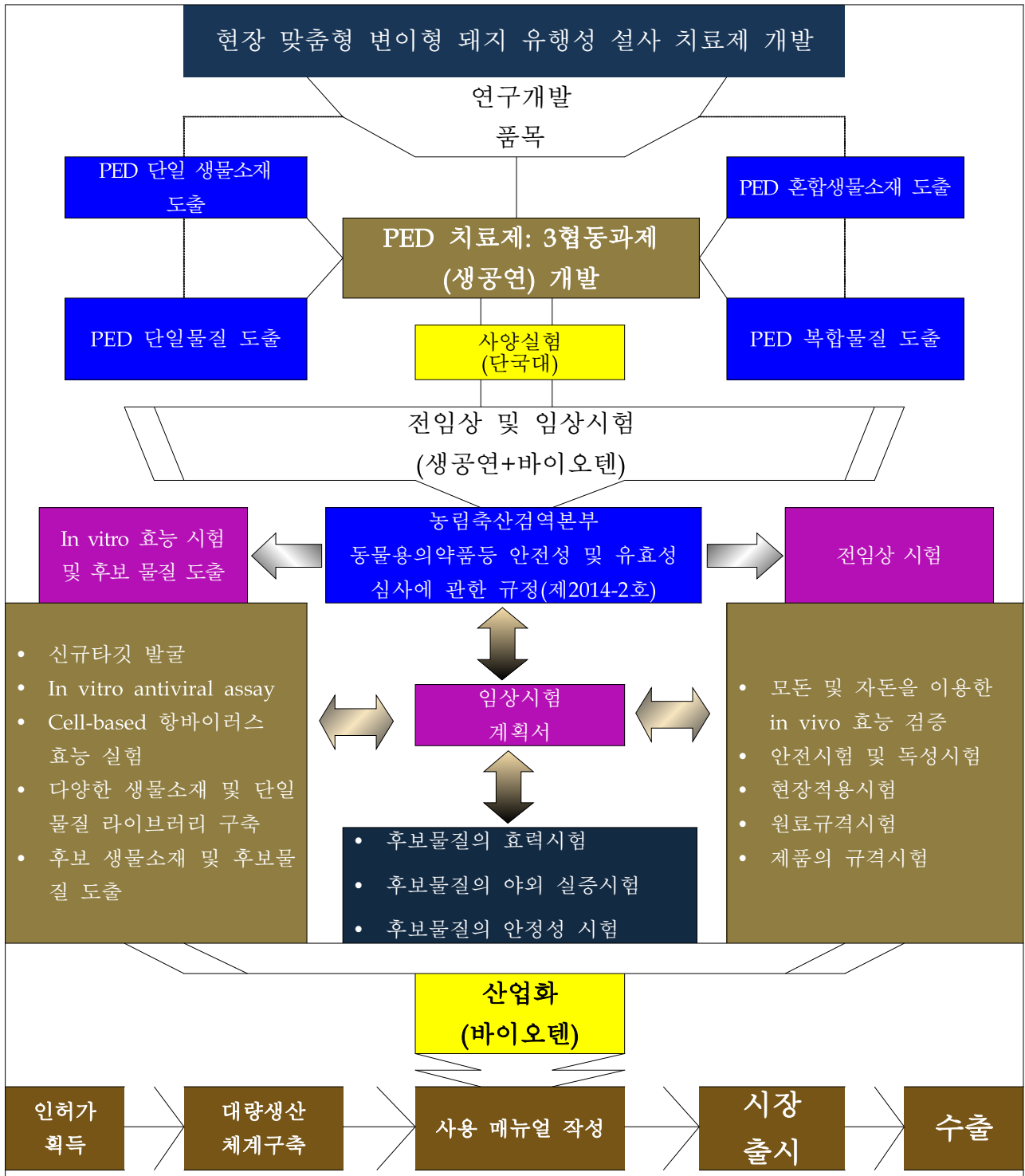
- 본 협동과제는 제1협동과제 수행기관(중앙백신연구소)과 함께 국내는 물론 전 세계 양돈 산업을 위협하고 있는 변이형 돼지 유행성 설사 감염증을 예방할 수 있는 PED 불활화(사독) 및 생건조(약독) 백신을 개발하며, 제1협동 및 제1세부과제와 함께 PEDV 및 로타 +TGEV 생혼합건조백신을 산업화 시키는 것이 최종목표임.



마. 제3협동과제(생공연 박수진 박사) 연구개발의 범위

○ 변이형 돼지 유행성 설사(PED) 치료제 개발

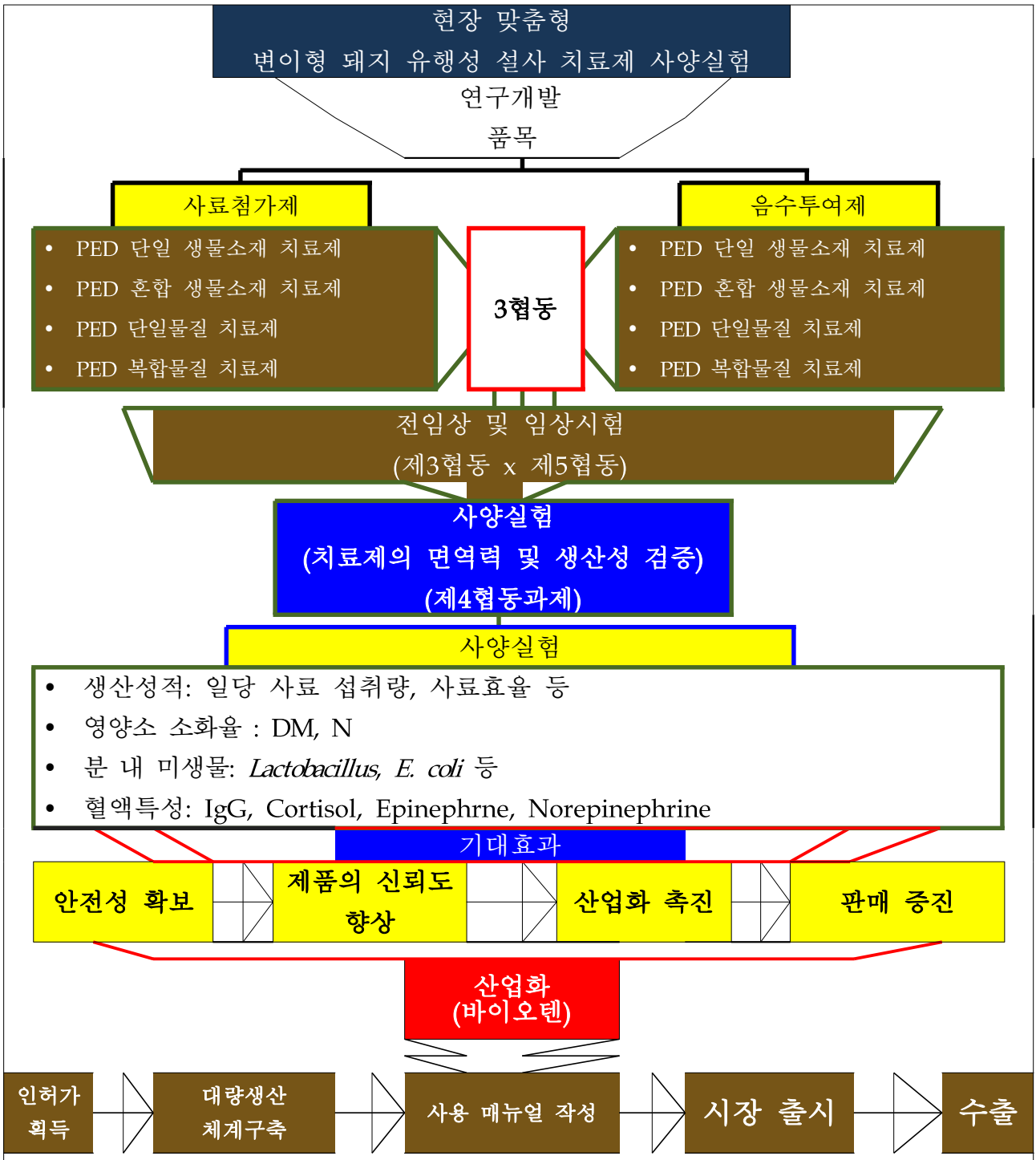
- 제3협동과제는 국내에서 대량 생산되고 있는 천연물에서 PED 치료용 생물소재로부터 단일물질은 도출한 후, 이를 단독 혹은 혼합제제의 형태로 개발하여 이에 대한 전임상 및 임상시험을 수행한 후, 제4 및 제5협동과제 수행기관인 단국대 및 바이오텐(주)와 함께 산학연 공동으로 제품화 하여 산업화하는 것이 최종목표임.



바. 제4협동과제(단국대 이상인교수) 연구개발의 범위

○ 돼지 유행성 설사증(PED) 예방 및 치료제 사양실험

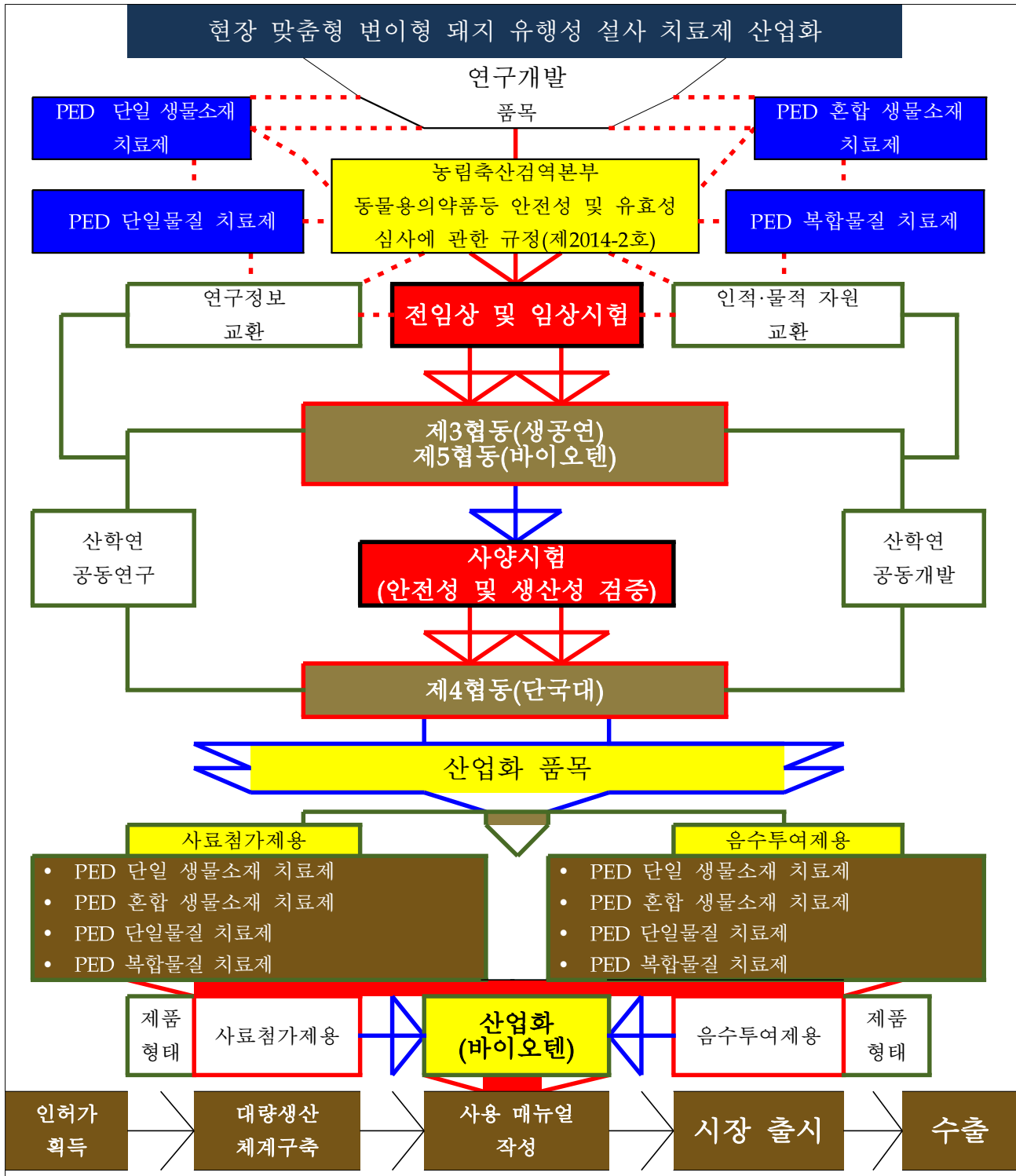
- 제4협동과제는 제3협동과제(생명공학연구원)와 제5협동과제[바이오텐(주)]가 개발한 PED 치료제를 사료첨가제 및 음수투여제 형태로 투여한 후, 생산성적, 번식성적, 영양소 소화율, 혈액특성, 분내 미생물 영향과 같은 사양실험을 통해 제품의 안전성과 생산성을 검증하는 것이 최종목표임.



사. 제5협동과제(바이오텐 윤태영 박사) 연구개발의 범위

○ 변이형 돼지 유행성 설사(PED) 치료제 산업화

- 본 협동과제는 제3협동과제인 한국생명공학연구원에서 개발하고, 제4협동과제인 단국대에서 사양시험을 통해 개발된 PED 치료제를 제3협동과제와 전임상 및 임상시험을 수행한 후, 효능 및 안전성이 확보된 물질에 대하여 다양한 제형연구를 통해 시제품 생산 및 산업화하는 것이 최종목표임.



## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 1절. 소 로타바이러스 특성 분석 및 백신 전임상 시험

#### 1. 소 로타바이러스 백신주 특성 분석

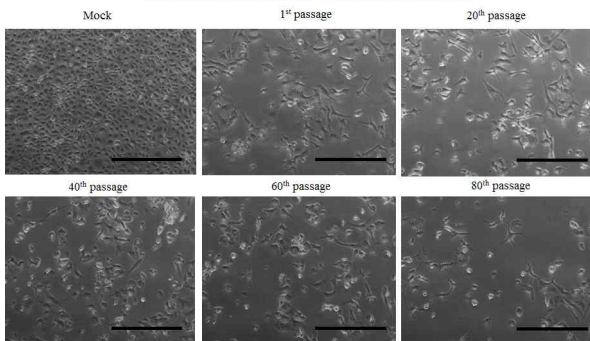
##### 가. 백신주 계대별 역가 분석

Strain Name	Species	Genotype	Passage numbers				
			1 <sup>st</sup>	20 <sup>th</sup>	40 <sup>th</sup>	60 <sup>th</sup>	80 <sup>th</sup>
KJ11	Bovine	G8P[7]	2.0 X 10 <sup>6</sup>	5.4 x 10 <sup>10</sup>	2.3 x 10 <sup>11</sup>	6.2 x 10 <sup>12</sup>	2.5 x 10 <sup>13</sup>
KJ19-2		G6P[7]	1.2 X 10 <sup>6</sup>	3.0 x 10 <sup>9</sup>	6.2 x 10 <sup>11</sup>	1.1 x 10 <sup>12</sup>	1.12 x 10 <sup>13</sup>
KJ44		G5P[1]	1.4 X 10 <sup>6</sup>	4.3 x 10 <sup>9</sup>	2.2 x 10 <sup>10</sup>	8.6 x 10 <sup>11</sup>	4.7 x 10 <sup>12</sup>

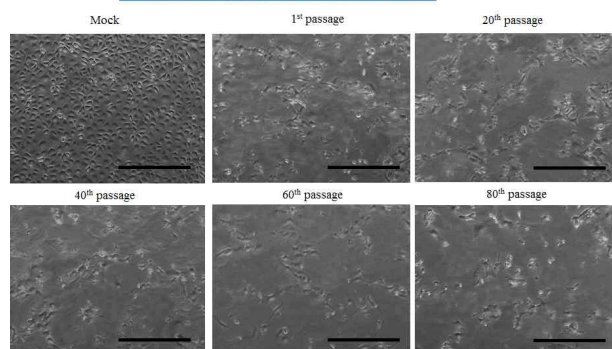
- 국내 분리 KJ11, KJ19-2 및 KJ44 주를 MA104 세포에서 80대까지 계대배양 후 바이러스 역가를 측정된 결과 상술한 테이블에서와 같이 계대 횟수가 높아질수록 바이러스 역가도 높아졌음. 즉, 불활화 및 약독화 백신주로 개발에 문제가 없음을 확인하였음.

##### 나. 백신주 계대별 CPE 및 항원성 분석

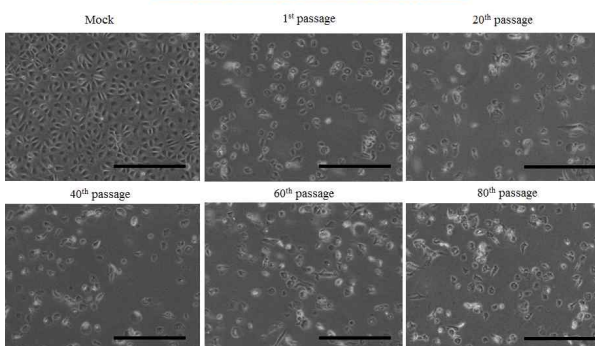
#### Bovine rotavirus KJ19-2 strain



#### Bovine rotavirus KJ11 strain

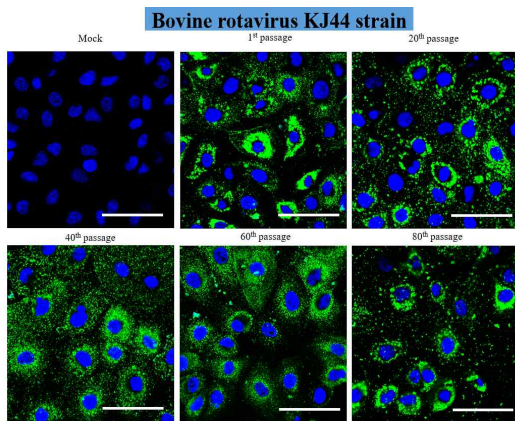
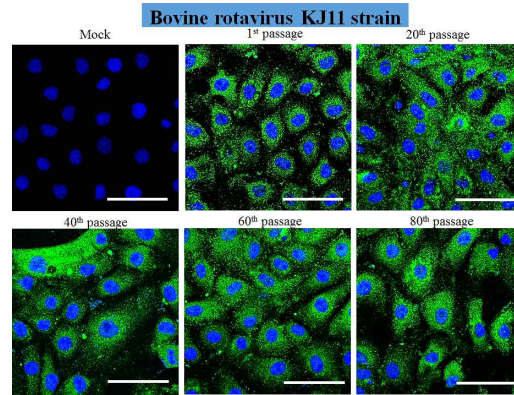
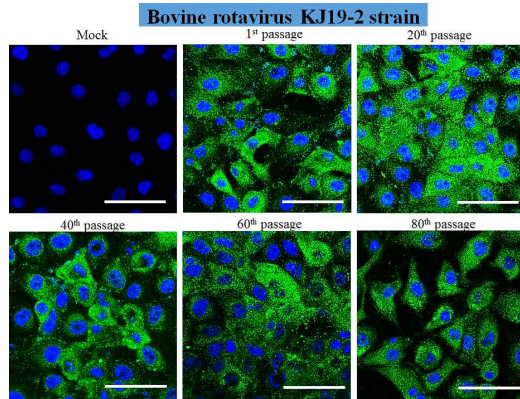


#### Bovine rotavirus KJ44 strain



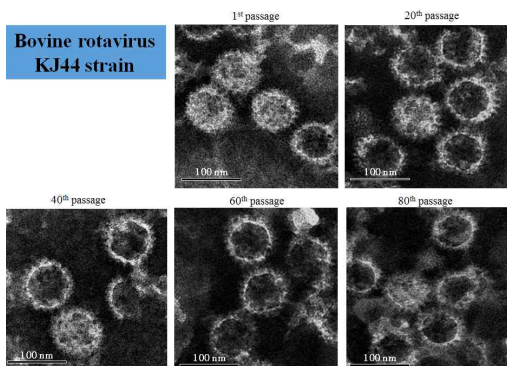
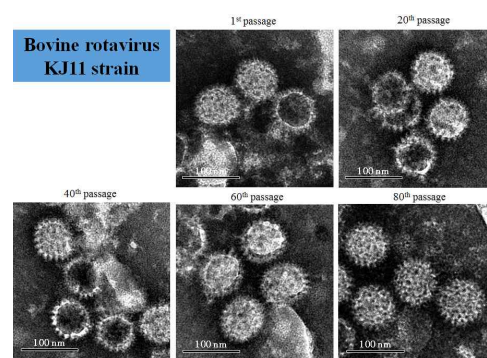
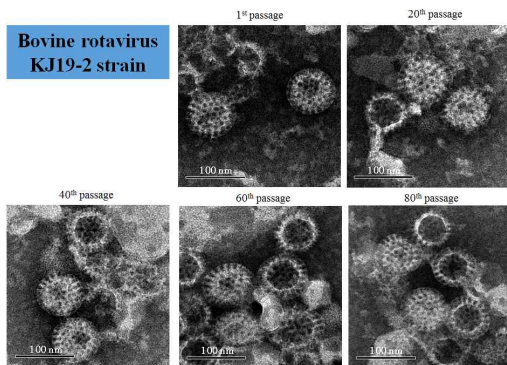
- 상술한 국내 분리주 및 계대주에 대하여 CPE를 확인한 결과 세포의 원형화와 위축 및 탈락과 같은 전형적인 CPE 소견이 분리주뿐만 아니라 계대주 전체에 걸쳐서 확인되었음. 즉, 백신주의 계대화에 따른 바이러스 특성의 변화는 없었음.





- 상술한 국내 분리주 및 계대주에 대하여 로타 바이러스 VP6에 대한 단클론항체를 이용하여 면역형광염색을 수행한 후 Confocal microscope로 검사한 결과, 분리주 및 계대주 전체에 걸쳐 강한 양성 반응이 세포질 내에서 확인되었음. 즉, 백신주의 계대화에 따른 바이러스 특성의 변화는 없었음.

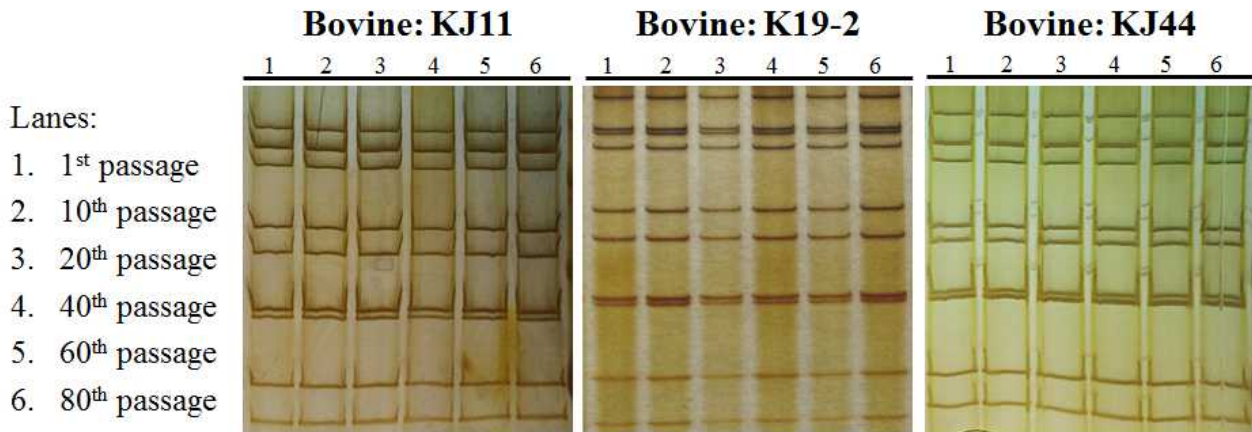
#### 다. 백신주 계대별 바이러스 구조 분석



- 상술한 국내 분리주 및 계대주를 초고속원심분리 후, 침전물에 대하여 Postassium tungstic acid 염색을 수행하여 전자현미경으로 관찰한 결과, 분리주 및 계대주 전체에 걸쳐 60-80 nm 크기의 로타바이러스가 확인되었음. 즉, 백신주의 계대화에 따른 바이러스 특성의 변화는 없었음.

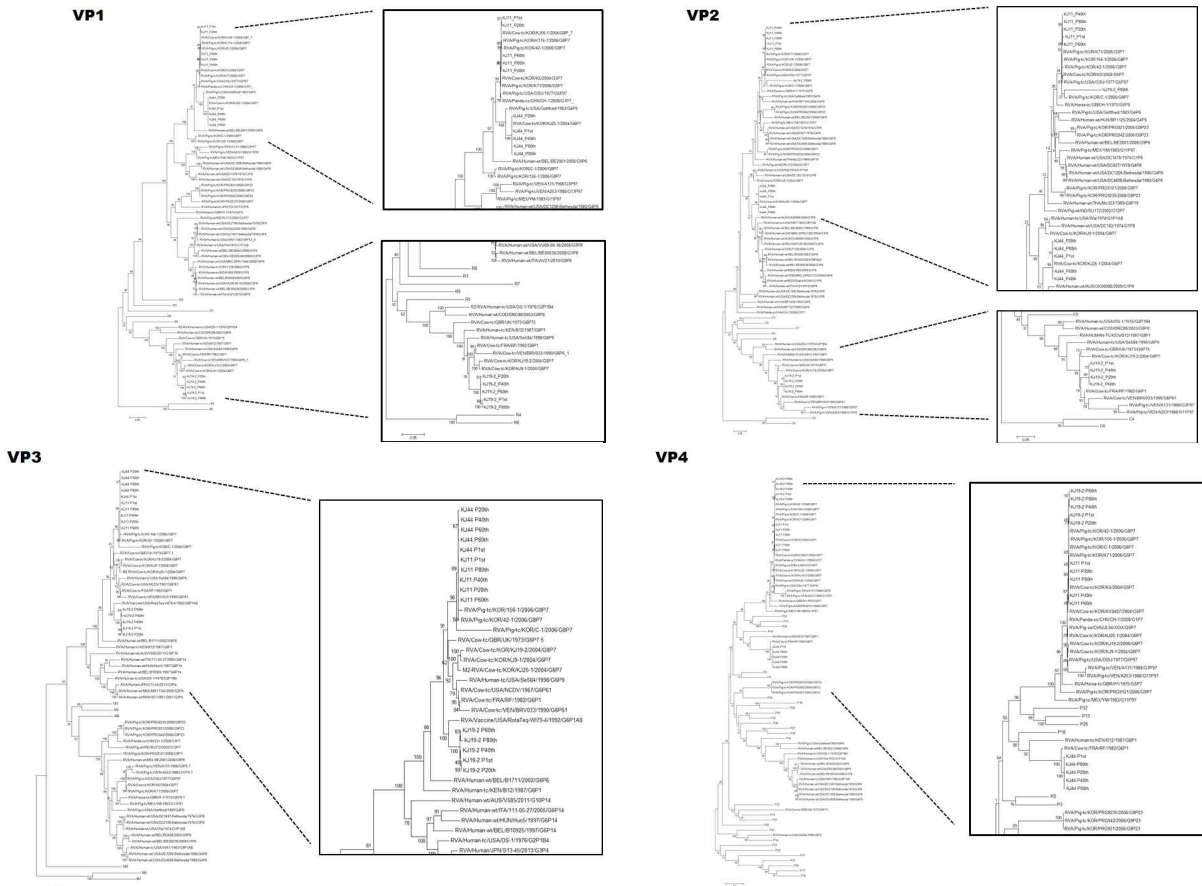


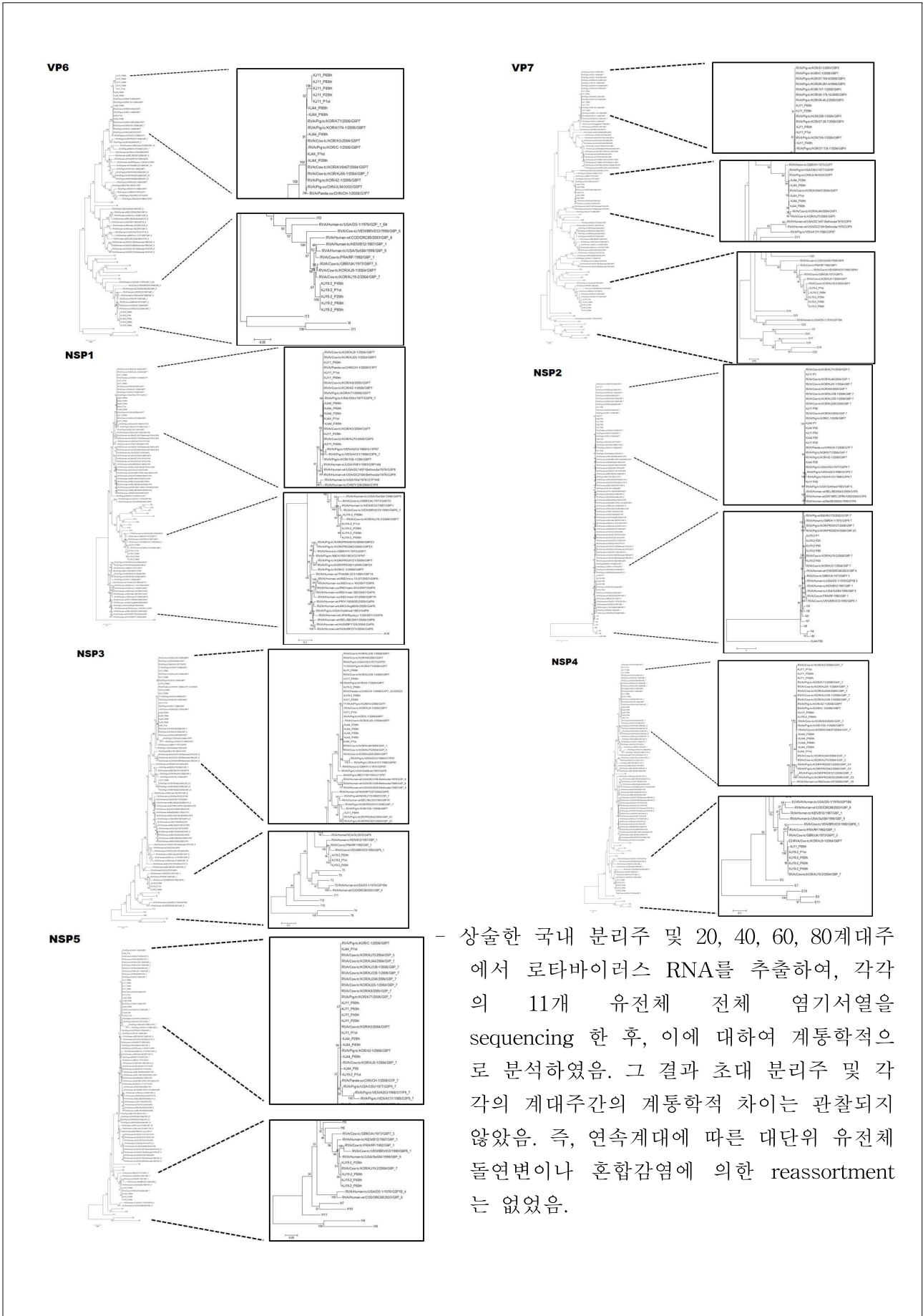
라. 백신주 계대별 PAGE-pattern 분석



- 상술한 국내 분리주 및 계대주에서 로타바이러스 RNA를 추출하여 PAGE-pattern을 분석한 결과 혈청형 A 로타바이러스의 전형적인 PAGE-pattern인 4-2-3-2 pattern이 분리주 및 계대주 전체에 걸쳐서 확인되었음. 즉, 연속계대에 따른 유전체 rearrangement는 없었음.

마. 백신주 계대별 유전형 분석





- 상술한 국내 분리주 및 20, 40, 60, 80계대주에서 로타바이러스 RNA를 추출하여, 각각의 11개 유전체 전체 염기서열을 sequencing 한 후, 이에 대하여 계통학적으로 분석하였음. 그 결과 초대 분리주 및 각각의 계대주간의 계통학적 차이는 관찰되지 않았음. 즉, 연속계대에 따른 대단위 유전체 돌연변이나 혼합감염에 의한 reassortment는 없었음.

바. 백신주 계대별 유전자 염기서열 및 상동성 분석

**Bovine: KJ11 (G8[P7]) strain**

VP1	Amino acid position				VP2	Amino acid position												
	88	311	336	784		75	135	163	176	199	318	326	433	459	488	576	731	835
P1st	K	V	E	I	P1st	E	K	P	S	K	S	W	P	K	R	R	V	E
P20th	K	V	E	I	P20th	G	E	L	N	K	L	W	Q	N	R	Q	V	V
P40th	R	V	K	I	P40th	E	K	L	N	R	L	W	Q	N	R	Q	V	V
P60th	K	A	K	T	P60th	E	E	L	N	K	L	W	Q	N	R	Q	A	V
P80th	K	A	K	I	P80th	E	E	L	N	K	L	G	Q	N	S	Q	V	V

VP3	Amino acid position								VP4	Amino acid position				VP6	Amino acid position					
	11	112	167	168	249	549	579	708	802		265	363	536	575		34	117	206	244	285
P1st	A	I	N	F	E	F	P	I	F	P1st	R	R	S	I	P1st	L	Y	R	C	M
P20th	A	I	N	F	K	F	S	I	F	P20th	R	R	S	I	P20th	L	Y	C	C	M
P40th	A	I	N	F	K	F	S	I	F	P40th	Q	R	S	I	P40th	L	C	C	C	T
P60th	A	M	S	F	K	L	S	I	F	P60th	Q	R	S	I	P60th	P	Y	C	C	M
P80th	V	I	F	L	K	F	S	M	S	P80th	Q	G	N	T	P80th	L	Y	C	R	M

VP7	Amino acid position					NSP1	Amino acid position				NSP2	Amino acid position
	34	117	206	244	285		93	132	165	307		132
P1st	L	Y	R	C	M	P1st	F	C	L	K	P1st	L
P20th	L	Y	C	C	M	P20th	F	C	F	K	P20th	F
P40th	L	C	C	C	T	P40th	F	R	F	K	P40th	L
P60th	P	Y	C	C	M	P60th	F	C	F	R	P60th	L
P80th	L	Y	C	R	M	P80th	L	C	F	K	P80th	L

Red letters indicate amino acid change compared with the first passage.

**Bovine: KJ11 (G8[P7])**

NSP3	Amino acid position															
	12	40	49	68	81	83	107	172	189	200	202	235	236	268	310	311
P1st	S	H	K	A	T	R	I	A	N	K	R	Q	S	S	C	T
P20th	S	N	R	A	T	G	I	A	N	K	R	Q	S	S	C	T
P40th	S	N	K	A	T	R	I	A	N	K	R	R	S	S	C	T
P60th	S	N	K	A	T	R	I	A	N	K	R	Q	S	S	C	T
P80th	G	N	K	M	V	R	M	S	S	E	S	Q	N	P	Y	A

NSP4	Amino acid position																	
	5	19	23	25	59	76	89	93	97	108	131	135	138	141	154	157	161	
P1st	A	D	S	I	R	I	V	D	Q	C	H	V	P	A	R	D	S	
P20th	A	D	S	I	R	I	V	D	Q	C	H	V	P	A	R	D	S	
P40th	T	S	T	L	K	F	I	D	R	R	Y	M	T	E	K	K	N	
P60th	A	D	S	I	R	I	A	G	Q	C	H	V	P	A	R	D	S	
P80th	A	D	S	I	R	I	V	D	Q	C	H	V	P	A	R	D	S	

Red letters indicate amino acid change compared with the first passage.



## Bovine: KJ19-2 (G6[P7]) strain

VP1	Amino acid position										VP2	Amino acid position						
	9	88	208	213	530	610	830	834	922	925		420	449	468	470	501	506	519
P1st	S	R	S	M	S	T	G	T	E	G	P1st	I	K	G	A	S	L	L
P20th	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>N</b>	<b>I</b>	<b>N</b>	T	G	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	P20th	I	K	G	A	S	L	L
P40th	S	<b>K</b>	<b>N</b>	M	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>E</b>	T	E	G	P40th	I	K	G	A	S	L	L
P60th	S	<b>K</b>	<b>N</b>	M	<b>N</b>	T	G	T	E	G	P60th	I	K	G	A	S	L	L
P80th	S	R	S	M	S	T	G	T	E	G	P80th	<b>L</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>Q</b>

VP3	Amino acid position							VP4	Amino acid position						
	42	266	307	325	473	493	615		31	34	302	343	369	677	723
P1st	N	L	R	I	G	P	S	P1st	R	T	Q	E	Q	N	G
P20th	N	L	R	I	G	P	S	P20th	<b>Q</b>	<b>A</b>	Q	E	Q	N	G
P40th	N	L	<b>W</b>	I	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	P40th	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>D</b>
P60th	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>W</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	P60th	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>D</b>
P80th	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>W</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	P80th	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>D</b>

VP7	Amino acid position						NSP1	Amino acid position			NSP2	Amino acid position		
	65	66	176	262	302	316		61	118	342		34	134	199
P1st	T	V	Q	Q	Y	S	P1st	H	N	K	P1st	K	K	E
P20th	T	A	Q	Q	Y	<b>L</b>	P20th	H	N	K	P20th	K	K	E
P40th	T	A	Q	Q	Y	S	P40th	H	N	K	P40th	K	K	E
P60th	T	A	Q	Q	Y	S	P60th	H	N	K	P60th	<b>R</b>	K	<b>G</b>
P80th	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>C</b>	S	P80th	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>M</b>	P80th	K	<b>R</b>	E

Red letters indicate amino acid change compared with the first passage.

## Bovine: KJ19-2 (G6[P7]) strain

NSP3	Amino acid position																
	11	81	82	89	91	92	94	96	107	144	172	193	218	226	232	236	250
P1st	A	A	A	V	T	R	T	R	M	R	S	T	S	Y	V	N	K
P20th	A	A	A	V	T	R	T	R	M	R	S	T	S	Y	V	N	K
P40th	A	A	A	V	T	R	T	R	M	R	S	T	S	Y	V	N	K
P60th	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>I</b>	<b>K</b>	<b>A</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	Y	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>R</b>
P80th	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>I</b>	<b>K</b>	<b>A</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	H	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>R</b>

NSP4	Amino acid position					NSP5	Amino acid position												
	5	19	23	25	59		41	45	49	112	113	117	118	125	132	139	149	170	178
P1st	T	S	T	L	K	P1st	T	V	N	L	N	V	S	C	N	K	R	K	K
P20th	T	S	T	L	K	P20th	<b>I</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>K</b>	<b>M</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>R</b>
P40th	T	S	T	L	K	P40th	<b>I</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>K</b>	<b>M</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>R</b>
P60th	T	S	T	L	K	P60th	<b>I</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>K</b>	<b>M</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>R</b>
P80th	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>	P80th	<b>I</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>K</b>	<b>M</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>E</b>	<b>R</b>

Red letters indicate amino acid change compared with the first passage.

## Bovine: KJ44 (G5[P1]) strain

VP1	Amino acid position										
	223	259	384	526	602	605	726	788	805	1008	1046
P1st	D	G	H	S	I	L	F	F	S	D	I
P20th	H	G	Q	S	I	I	F	F	S	D	I
P40th	D	A	H	S	I	L	F	I	S	D	I
P60th	D	G	H	S	T	L	F	F	T	V	I
P80th	D	G	H	P	I	L	C	F	S	D	N

VP2	Amino acid position													
	220	241	260	343	345	364	408	443	526	688	723	765	783	792
P1st	A	Q	H	V	D	V	F	I	S	R	Q	N	V	A
P20th	P	Q	H	V	D	D	F	K	S	T	Q	N	V	A
P40th	A	H	H	V	D	D	L	I	S	R	Q	N	D	A
P60th	A	Q	H	V	H	D	F	I	S	R	Q	Y	V	A
P80th	A	Q	O	L	D	D	F	I	C	R	L	N	V	S

VP3	Amino acid position																
	90	108	129	130	253	273	353	355	451	478	496	515	538	597	655	732	739
P1st	Y	W	Y	N	Q	Y	W	K	R	V	D	F	L	N	L	P	K
P20th	Y	W	S	N	Q	S	W	K	S	V	D	F	F	N	L	P	M
P40th	Y	W	Y	I	Q	Y	S	K	R	L	D	F	L	I	L	S	K
P60th	V	W	Y	N	L	Y	W	N	R	V	H	F	L	N	L	P	K
P80th	Y	S	Y	N	Q	Y	W	K	R	V	D	L	L	N	F	P	K

Red letters indicate amino acid change compared with the first passage.

## Bovine: KJ44 (G5[P1]) strain

VP4	Amino acid position								
	4	30	56	69	109	113	134	148	170
P1st	A	N	K	S	S	S	K	N	N
P20th	A	N	K	G	C	F	K	N	H
P40th	A	N	K	G	S	F	K	K	N
P60th	A	N	T	G	S	F	K	N	N
P80th	P	Y	K	G	S	F	I	N	N

VP6	Amino acid position										
	55	61	62	63	160	204	345	366	368	378	385
P1st	P	F	D	F	Y	N	N	N	N	N	V
P20th	P	F	D	L	Y	I	N	N	N	N	G
P40th	P	F	H	F	Y	N	Y	T	T	T	V
P60th	P	S	D	F	Y	N	N	N	N	N	V
P80th	A	F	D	F	H	N	N	N	N	N	V

VP7	Amino acid position									
	46	57	76	79	141	175	199	213	235	248
P1st	P	F	F	S	L	Q	Y	N	H	Y
P20th	A	L	F	S	L	Q	N	N	P	N
P40th	P	L	F	S	V	Q	N	Y	H	N
P60th	P	L	V	W	L	L	N	N	H	N
P80th	P	L	F	S	L	Q	N	N	H	N

NSP2	Amino acid position								
	28	48	89	113	134	172	202	219	254
P1st	N	V	N	N	K	L	V	I	V
P20th	K	L	N	N	K	L	V	I	V
P40th	K	V	N	K	K	L	V	I	V
P60th	K	V	K	N	K	V	V	T	V
P80th	K	V	N	N	T	L	F	I	D

NSP1	Amino acid position											
	139	189	162	224	243	262	265	342	344	425	428	466
P1st	M	G	D	S	M	L	D	Y	N	G	P	L
P20th	M	R	D	S	M	R	D	N	N	G	P	L
P40th	M	G	H	C	K	L	D	Y	K	R	Q	L
P60th	M	G	D	S	M	L	D	Y	N	G	P	L
P80th	I	G	D	S	M	L	V	Y	N	G	P	Q

Red letters indicate amino acid change compared with the first passage.

## Bovine: KJ44 (G5[P1]) strain

	NSP3														
	Amino acid position														
	86	88	108	169	192	231	254	255	169	192	232	254	255	271	291
P1st	N	M	L	D	Y	A	L	S	D	Y	A	L	S	A	D
P20th	N	M	I	D	Y	A	F	S	D	Y	A	F	S	P	D
P40th	N	M	I	D	Y	A	F	S	D	Y	A	F	S	P	D
P60th	N	M	L	D	N	P	L	S	D	N	P	L	S	A	D
P80th	K	I	L	V	Y	A	L	P	V	Y	A	L	P	A	H

	NSP4									
	Amino acid position									
	54	58	76	99	101	141	146	165	167	
P1st	M	L	I	M	R	A	K	P	E	
P20th	M	L	I	K	S	P	K	S	E	
P40th	M	L	I	M	R	A	Q	P	E	
P60th	M	L	F	M	T	A	K	P	E	
P80th	K	W	I	M	R	A	K	P	V	

	NSP5							
	Amino acid position							
	118	84	101	103	125	143	165	189
P1st	F	N	N	G	C	R	S	V
P20th	F	N	N	G	C	R	S	V
P40th	F	N	N	R	C	R	R	V
P60th	F	I	N	G	C	R	S	D
P80th	L	N	K	G	S	T	S	V

Red letters indicate amino acid change compared with the first passage.

- 백신주의 계대를 통해 아미노산 서열의 치환이 증가하는 경향이 있으며, 이러한 아미노산 서열의 치환이 백신주의 약독화와 관련성이 있는 것으로 추정됨. 이에 대해서는 현재 자세한 연구를 계획하고 있음.

사. 소 로타바이러스 반수유효량(50% Effective Dose; ED<sub>50</sub>) 결정 시험

(1) 소 로타바이러스 KJ11 주의 공격바이러스 설사 유발 반수유효량

Challenge dosage	No. per group	No. (%) of piglets showed diarrhea	No. (%) of piglets did not showed diarrhea	Median diarrhea dose
10 <sup>2</sup> FFU	2	0 (0%)	2 (100%)	10 <sup>3.5</sup> (3.2 x 10 <sup>3</sup> FFU)
10 <sup>3</sup> FFU	2	0 (0%)	2 (100%)	
10 <sup>4</sup> FFU	2	2 (100%)	0 (0%)	

- 국내 송아지 설사분변에서 분리한 KJ11 분리 원주를 이용하여 공격바이러스 설사 유발 반수유효량 결정시험을 수행하였음. 그 결과, 설사 유발 반수유효량은 3.2 x 10<sup>3</sup> FFU이었음.

(2) 소 로타바이러스 KJ19-2 주의 공격바이러스 설사 유발 반수유효량

Challenge dosage	No. per group	No. (%) of piglets showed diarrhea	No. (%) of piglets did not showed diarrhea	Median diarrhea dose
10 <sup>2</sup> FFU	3	0 (0%)	3 (100%)	10 <sup>2.3</sup> (1.8x 10 <sup>2</sup> FFU)
10 <sup>3</sup> FFU	3	3 (100%)	0 (0%)	

- 국내 송아지 설사분변에서 분리한 KJ19-2 분리 원주의 공격바이러스 설사 유발



반수유효량은  $1.8 \times 10^2$  FFU이었음.

(3) 소 로타바이러스 KJ44 주의 공격바이러스 설사 유발 반수유효량

Challenge dosage	No. per group	No. (%) of piglets showed diarrhea	No. (%) of piglets did not showed diarrhea	Median diarrhea dose
$10^2$ FFU	3	1 (33%)	2 (67%)	$10^{2.3}$ ( $1.8 \times 10^2$ FFU)
$10^3$ FFU	3	3 (100%)	0 (0%)	

- 국내 송아지 설사분변에서 분리한 KJ44 분리 원주를 이용하여 공격바이러스 설사 유발 반수유효량 결정시험을 수행하였음. 그 결과, 설사 유발 반수유효량은  $1.8 \times 10^2$  FFU이었음.

## 2. 소 로타바이러스 불활화 혼합백신 전임상 시험

### 가. Seed 및 배양세포 확립

- (1) 전남대학교에서 분리한 소 로타바이러스 3개의 strain 별로 각각 표 1과 같이 백신 seed의 제조번호를 부여하고 master, working, production seed를 확립하였음.
- (2) 소 로타바이러스 발생농장 소에서 분리되어 MA104 세포에서 80계대 한 바이러스로서 세포내 병원성을 유지하고 있었음.
- (3) MA104 세포에 접종 2일 후부터 특이적인 CPE를 형성하였으며, 바이러스 증식성은  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml 이상이었음.

[표 1] 소 로타바이러스 백신 seed 및 배양세포 확립

Strain 명	Seed 제조번호	Cell (제조번호)	Master seed	생산용 종독	Production seed
KJ11	RD-B-V-006	TF (SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th
KJ19-2	RD-B-V-012	TF (SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th
KJ44	RD-B-V-018	TF (SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th

### 나. Seed 제조단위 시스템

- (1) 세포증식용 배양액( $\alpha$ -MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml) 0.1%)에 ml당 15~30만개의 MA104 세포를 분산시켜 37°C에서 4~5일간 배양한 다음 배양액을 제거한 후 소 로타바이러스를 0.1 M.O.I 접종하여 37°C에서 1시간 배양한 후 바이러스 증식용 배양액( $\alpha$ -MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml) 0.1%, trypsin 1 $\mu$ g/ml)을 가한 다음 3일간 회전 배양하면서 세포변성효과가 약 80% 이상 일어날 때까지 배양하였음.

### 다. Master seed

- (1) 80대 계대 된 소 로타바이러스를 단층이 형성된 MA104세포에 접종하여 37°C에서 3~4일간 배양한 후, 접종 바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채득하여 -80°C의 냉동고에 동결보존 및 동결건조하여 원종독으로 사용하였음.

라. Production seed

- (1) Master seed와 같은 계대방법으로 2대 계대한 소 로타바이러스를 단층이 형성된 MA104세포에 접종하여 37℃에서 3~4일간 배양한 후, 접종바이러스에 의한 세포 변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채독하여 -80℃의 냉동고에 동결건조하여 생산용 종독으로 사용하였음.

마. 배양조건 확립

(1) 바이러스 접종

- (가) MA104 세포를 세포증식용 배양액에 ml당 15~30만개의세포를 분산시킨 후, 37℃에서 4~5일간 배양한 다음 배양 세포가 단층을 형성하였을 때 배양액을 제거한 후 소 로타바이러스를 0.1 M.O.I 접종하고 37℃에서 1시간 흡착배양한 후 바이러스 증식용 배양액을 넣었음.

(2) 바이러스 배양

- (가) 세포에 바이러스를 접종한 후 37℃에서 3~4일간 배양하였음.

(3) 채독 및 불활화

- (가) 37℃에서 3~4일간 배양한 후 소 로타바이러스에 의한 세포변성 효과가 약 80%이상 일어났을 때 배양감염액을 채독하였음.
- (나) 채독한 배양감염액에 formalin을 최종농도 0.3%되게 첨가하여 37℃에서 3일간 교반하면서 불활화 한 후 4℃에 보관하였음.

바. Adjuvant 확립

(1) Adjuvant 결정 시험

- (가) 표 2와 같이 백신보조제 5종류에 따른 시험백신 5종을 제조하여 emulsion type에 따른 특성시험 (pH 측정, 점도측정, 성상관찰)과 동물 실험을 실시하였음.

[표 2] 소 로타바이러스 백신보조제 종류에 따른 시험백신 (5종)

Group	항원량(TCID <sub>50</sub> /dose)	Adjuvant	Emulsion type	비고
Group 1	10 <sup>5.0</sup> ,50%	Type 1	50%	W/O/W
Group 2	10 <sup>5.0</sup> ,80%	Type 2	20%	O/W
Group 3	10 <sup>5.0</sup> ,80%	Type 3	20%	O/W
Group 4	10 <sup>5.0</sup> ,80%	Type 4	20%	O/W
Group 5	10 <sup>5.0</sup> ,80%	Type 5	20%	O/W
Group 6	-	-	-	음성대조군

- (나) 시험결과 소 로타바이러스 시험백신의 pH는 7.57~7.89로 나타났으며 emulsion type에 따른 차이 없이 검정기준 내의 값으로 측정되었음.

- (다) 점도의 경우, emulsion type에 따라 차이가 W/O type인 경우, 가장 높은 57cP, 그 다음으로는 W/O/W type, O/W인 경우에는 1~2cP 수준의 낮은 값으로 측정되었음. 즉 emulsion type에 따른 점도의 차이가 있고, 백신보조제에 따른 큰 차이는 없었음(표 3).

[표 3] Emulsion type에 따른 시험 백신의 pH 및 점도

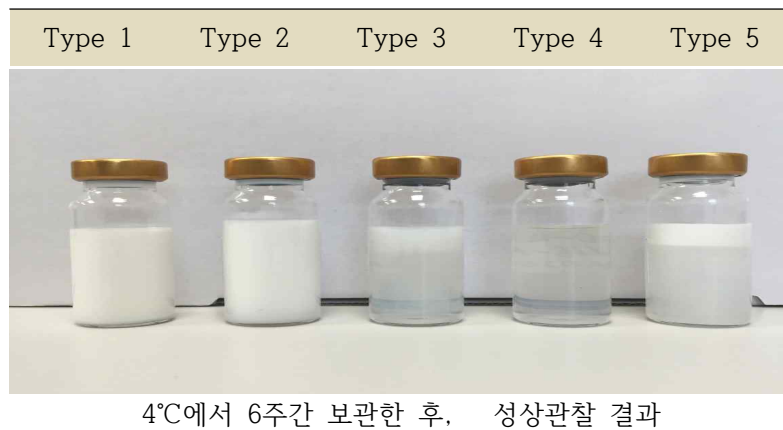
시험백신 조성	Emulsion type	pH	점도(cP)
---------	---------------	----	--------

1	Type 1	W/O/W	7.89	14.3
2	Type 2	O/W	7.66	2.8
3	Type 3	O/W	7.65	1.5
4	Type 4	O/W	7.57	1.5
5	Type 5	W/O	7.80	57.0

(2) Emulsion type에 따른 시험백신의 성상관찰

(가) Type 1, type 2, type 4 백신보조제로 제조한 시험백신은 균질한 성상을 보였고, type 3과 type 5 백신보조제로 제조한 시험백신은 불균질한 상태로 관찰되었음. Type 3과 type 5를 각각 손으로 흔들면 균질해졌음(표 4).

[표 4] Emulsrion type에 따른 시험백신의 성상



사. 실험동물 안전시험

- (1) 시험 그룹 중에 group 2 (type 2)를 접종한 8마리 중에서 2마리는 폐사, 나머지 6마리는 접종부위에서 괴사가 발생하여 소 로타바이러스 백신보조제로 사용하기에는 안전상의 문제가 있었음.
- (2) 나머지 group은 접종한 기니픽 모두 생존하였으며 접종부위 이상 증상이 관찰되지 않았음(그림 1).



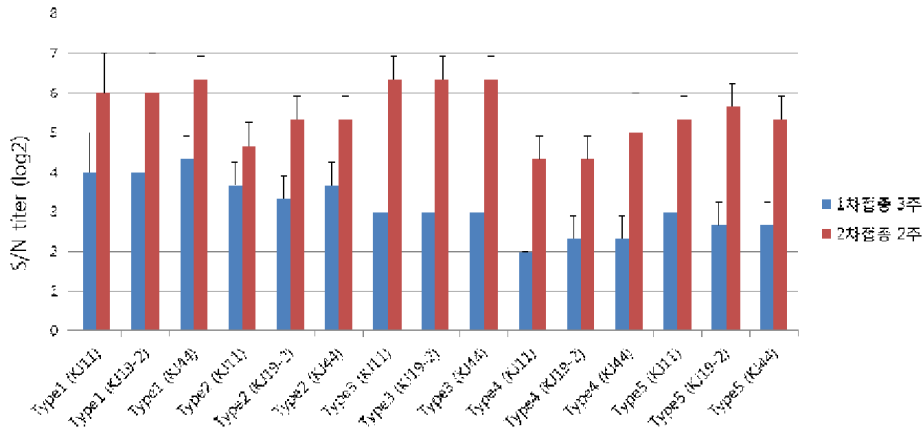
[그림 1] Group 2(type 2 adjuvant) 시험백신을 접종한 부위 사진.

아. 소 로타바이러스 불활화 혼합백신 실험동물 혈청역가시험

(1) 중화항체가 시험결과

(가) 마우스에 그룹별 1차 접종 3주후, 2차 접종 2주후의 혈청 역가시험을 한 결과, 1차 접종 3주후에는 4~32배 수준의 낮은 항체가가 형성되었으며, 2차 접종 2주후에는 32~82배의 항체가가 형성되었음.

(나) Turkey HSD 및 Duncan 통계학적 분석 시 virus strain에 따른 혼합백신 항체가는 adjuvant type에 따른 유의적인 차이가 없었음.



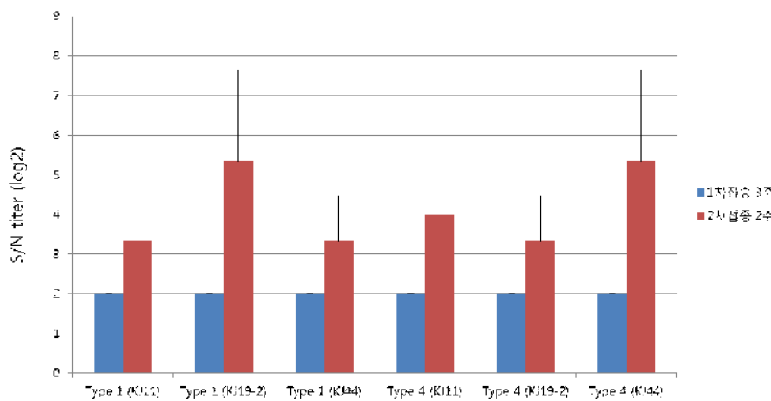
[그림 2] 소 로타바이러스 시험백신 마우스 혈청역가 시험.

자. 소 로타바이러스 불활화 혼합백신 목적동물 혈청역가시험

(1) 중화항체가 시험결과

(가) Emulsion 성상으로 type 1,2,4 가능하며, 실험동물의 안전실험으로 type 2에서 부작용으로 인해 최종 type 1, 4로 목적동물 실험을 실시하였음.

(나) 실험결과, 혼합 백신에 각각 virus strain을 다르게 처리하여 결과를 도출하였음. 검사 결과 두 시험백신 모두 virus strain에 따른 유의적인 차이는 발생하지 않았으며, type 1과 4 시험백신은 1차 접종 3주와 2차 접종 2주에서 각각 2배, 2~8배의 결과를 보였음(그림 3).



[그림 3]. 소 로타바이러스 시험백신 소 혈청역가 시험.

차. 백신보조제 생산단가 비교 및 결정

(1) 생산단가 비교

(가) Table 5.는 수입 백신보조제의 단가와 사용량에 따른 단가를 비교한 자료임.

(나) Type 1의 경우 판매단가는 type 4에 비하여 낮지만 사용량이 백신 최종혼합약의 50%로 많은 양을 사용해야 하는 만큼 사용량 대비 단가가 증가하는 것을 알 수 있음(표 5).

[표 5] 시험 백신 단가 비교

백신보조제명	판매단가	사용량	사용량 대비 단가 (10두분, 10,000 생산기준)
Type 1	38.66 유로/kg	50%	5,025,800원
Type 4	68.00 유로/kg	20%	2,652,000원

(2) Adjuvant 결정

(가) 위 결과와 생산, 단가 등을 종합적으로 정리해보면, W/O/W의 type 1 백신보조제를 사용하는 경우 항체가 형성과 백신 안정성에서 우수한 반면, 제조시 항원과 백신보조제를 30℃로 가운을 해야 하고, 백신 보조제의 사용량이 높음.

(나) O/W type에서는 type 4 백신보조제가 항체가 형성과 백신 제조, 단가 측면에서 유리한 것으로 판단되. 따라서 최종적 소 로타바이러스 adjuvant는 type 4로 결정하였음.

카. 일반시험

(1) 중화 항체가 검정 기준 미달에 의해 3 lot를 생산하지 않고 1 lot만 생산하여 일반 시험을 진행하였음.

표 6. 일반시험 결과

Lot No.	Date of production	Contents (per 1 dose)	Production quantity (1,000doses /bottle)
T315RO01	2015. 11. 16.	소 로타바이러스 (KJ11 주) ..... $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상 소 로타바이러스 (KJ19-2 주) .. $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상 소 로타바이러스 (KJ44 주) ..... $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상 Adjuvant ..... 20% 보존제 ..... 0.3% 이하	508

타. 특성 시험

(1) 시험방법

(가) Type 4 adjuvant 소 로타바이러스 시험백신을 동물용의약품 생물학적 제제의

국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-01에 따라 색, 혼탁도, 이물 또는 이취에 대하여 검사하였으며, 현탁 상태를 검사할 때는 지정된 용기에 지정된 희석액을 가하여 가볍게 흔들어서 혼탁도, 색조를 검사하였음.

(2) 시험결과

(가) 백색의 유탁주사액으로 이물, 이취가 없고 내용물의 성상이 균일하였음(표 7).

[표 7] 시험 백신 특성시험 결과

Lot. No.	Tests				
	Color	Turbidity	Sediment	Foreign substance	Foreign odor
T315RO01	-*	-	-	-	-

\*Normal or negative.

과. 무균 시험

(1) 시험방법

(가) 시험백신을 nutrient agar(NA), nutrient broth(NB), fluid thioglycollate medium(Thio)에 2개의 시험관에 접종하여 22℃와 37℃에서 7일간 배양하면서 잡균의 존재 여부를 관찰하였음.

(2) 시험결과

(가) 어떠한 세균의 발육도 관찰할 수 없었음(표 8).

[표 8] 시험 백신 무균시험 결과

Lot. No.	22℃			37℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
T315RO01	-*	-	-	-	-	-

\* Normal or negative.

하. 수소이온농도시험

(1) 시험방법

(가) 시험백신을 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-03 에 따라 시험백신 각 Lot별로 백신의 수소이온농도를 측정하였음.

(2) 시험결과

(가) 수소이온농도는 pH 6.0~8.0 이내임을 확인하였음(표 9).

[표 9] 시험백신 수소 이온 농도 시험 결과

Lot. No.	pH
----------	----



### 가. 방부제 정량시험

#### (1) 시험방법

(가) 시험백신을 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-09 에 의하여 동물약품공정서의 일반시험법 중 Schiff 시약을 첨가하여 spectrophotometer를 이용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였음.

#### (2) 시험결과

(가) 포르말린 함량은 0.3% 이하로 확인되었음(표 10).

[표 10] 시험 백신 방부제 정량시험 결과

Lot. No.	Formalin content(%)
T315RO01	0.11

### 나. 불활화 확인시험

#### (1) 시험방법

(가) 불활화 된 바이러스 감염배양액을 원심 한 다음 그 상층액을 투석하여 시험품을 MA104 세포에 0.1ml씩 각각 접종하고, 대조 세포와 함께 37℃에서 7일간 배양한 후 소 로타바이러스 및 기타 바이러스에 의한 특유의 세포변성 (CPE)가 나타나는지 확인하였음.

#### (2) 시험결과

(가) 불활화 확인시험 결과 시험백신에서 세포변성효과가 나타나지 않았음(표 11).

[표 11]. 시험 백신 불활화 확인 시험 결과

Lot. No.	Cell	Inoculation volumne(ml)	Results
			CPE
T315RO01	MA104	0.1	-
Control		-	-

### 결론

- 목적동물과 실험동물에서 중화 항체가가 미흡한 것으로 판단됨.
- 불활화 백신의 효율을 올리기 위해 adjuvant 재선정 방법과 바이러스 역가를 올리는 방안이 있지만 현재 소 로타바이러스 백신 시장은 생건조 백신에 혼합 백신이 주임.
- 또한 소 로타바이러스의 불활화 백신 시험 결과 면역원성은 있는 것으로 확인되었

으므로 생독백신의 가능성은 높은 것으로 판단됨.

- 따라서 불활화 백신의 추가실험은 배제하고 생독백신의 개발을 하였음.

### 3. 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 전임상 시험

#### 가. Seed 및 배양세포 확립

(1) 불활화 백신 개발을 위한 소 로타바이러스 SEED 및 배양세포를 확립 방법과 동일하게 생건조 백신 seed 및 배양세포를 확립하였음(표 12).

[표 12] 소 로타바이러스 백신 Seed 및 배양세포 확립

Strain	Seed 제조번호	Cell (제조번호)	Master seed	생산용 종독	Production seed
KJ11 (G8P[7])	RD-B-V-006	TF(SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th
KJ19-2 (G6P[7])	RD-B-V-012	TF(SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th
KJ44 (G5P[1])	RD-B-V-018	TF(SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th

#### 나. Seed 제조단위 시스템

(1) 세포증식용 배양액( $\alpha$ -MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml) 0.1%)에 ml당 15~30만개의 MA104 세포를 분산시켜 37 $^{\circ}$ C에서 4~5일간 배양한 다음 배양액을 제거한 후 소 로타바이러스를 0.1 MOI 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한 후 바이러스 증식용 배양액( $\alpha$ -MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml) 0.1%, trypsin 1 $\mu$ g/ml)을 가한 다음 3일간 회전 배양하면서 세포변성효과가 약 80% 이상 일어날 때까지 배양하였음.

#### 다. Master seed

(1) 80대 계대 된 소 로타바이러스를 단층이 형성된 MA104 세포에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 3~4일간 배양한 후, 접종 바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채득하여 -80 $^{\circ}$ C의 냉동고에 동결보존 및 동결건조하여 원종독으로 사용하였음.

#### 라. Production seed

(1) Master seed와 같은 계대방법으로 2대 계대한 소 로타바이러스를 단층이 형성된 MA104 세포에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 3~4일간 배양한 후, 접종 바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채득하여 -80 $^{\circ}$ C의 냉동고에 동결건조하여 생산용 종독으로 사용하였음.

#### 마. 배양조건 확립

(1) MA104 세포를 세포증식용 배양액에 ml당 15~30만개의 세포를 분산시킨 후, 37 $^{\circ}$ C에서 4~5일간 배양한 다음 배양 세포가 단층을 형성하였을 때 배양액을 제거한 후 소 로타바이러스를 0.1 MOI 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 흡착배양한 후 바이러스 증

식용 배양액을 가한 후, MA104 세포에 바이러스를 접종한 후 37°C에서 3~4일간 배양하였으며, 소 로타바이러스에 의한 세포변성 효과가 약 80%이상 일어났을 때 배양감염액을 채독하였음.

바. 보호제 조성 결정

- (1) 기존 ROCO 백신에서 안정성 및 효능이 입증된 보호제 성분을 사용하여 보호제를 결정하였음(표 13).

[표 13] 보호제의 성분

구성 성분	합량
Lactose	74.62g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.517g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

사. 시험 백신 생산

- (1) 동결 건조 형태로 아래와 같이 20병씩 3 lot의 시험백신을 제조하였음.  
 (2) 바이러스 함량은 기존 ROCO제품의 10<sup>5.0</sup> TCID<sub>50</sub>/1 dose 이상 기준으로 제조하였음(표 14).

[표 14] 소 로타바이러스 약독화 생건조 시험백신 정보

Lot. No.	MFD*	Contents (per 1 dose)	Quantity (5 doses/vial)
T316Rota-KJ11-Lot1	2016.10.03.	소 로타 바이러스 KJ11 주 ..... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	20 vials
T316Rota-KJ11-Lot2	2016.10.05.	소 로타 바이러스 KJ11 주 ..... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	20 vials
T316Rota-KJ11-Lot3	2016.10.07.	소 로타 바이러스 KJ11 주 ..... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	20 vials
T316Rota-KJ19-2-Lot1	2016.10.10.	소 로타 바이러스 KJ19-2 주 ..... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	20 vials
T316Rota-KJ19-2-Lot2	2016.10.12.	소 로타 바이러스 KJ19-2 주 ..... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	20 vials
T316Rota-KJ19-2-Lot3	2016.10.14.	소 로타 바이러스 KJ19-2 주 ..... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	20 vials
T316Rota-KJ44-Lot1	2016.10.17.	소 로타 바이러스 KJ44 주 ..... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	20 vials
T316Rota-KJ44-Lot2	2016.10.19.	소 로타 로타 바이러스 KJ44 주 ... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	20 vials
T316Rota-KJ44-Lot3	2016.10.21.	소 로타 로타 바이러스 KJ44 주 ... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	20 vials

T3163Rota-L ot1	2016.10.24.	소 로타 바이러스 KJ11 주 ..... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상	20 vials
		소 로타 바이러스 KJ19-2 주 ..... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상	
		소 로타 로타 바이러스 KJ44 주 ... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	
T3163Rota-L ot2	2016.10.26.	소 로타 바이러스 KJ11 주 ..... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상	20 vials
		소 로타 바이러스 KJ19-2 주 ..... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상	
		소 로타 로타 바이러스 KJ44 주 ... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	
T3163Rota-L ot3	2016.10.28.	소 로타 바이러스 KJ11 주 ..... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상	20 vials
		소 로타 바이러스 KJ19-2 주 ..... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상	
		소 로타 로타 바이러스 KJ44 주 ... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	

자. 단일백신과 혼합백신의 간섭반응 확인 시험

- (1) 단일 백신으로 접종 시 다른 항원에 대한 항체가가 일정수준으로 오르지만 동일 항원보다는 낮은 항체가를 보였음(낮은 교차 면역 반응).
- (2) 3종의 로타바이러스 혼합 백신의 경우 단일로 접종한 결과와 비슷하거나 높은 결과를 얻었음. 이는 3종의 혼합 백신이 단일 백신 보다 더 우수한 백신이 될 수 있음을 시사함.

차. 기존 백신과의 비교시험

- (1) 신규 3종의 혼합 백신은 기존 ROCO백신의 항원에 대해 높은 수준의 방어능을 보이는 것으로 확인되었음(표 15).

[표 15] 소 로타바이러스 단독 및 혼합 3종백신의 기니픽에서 혈청 항체가가 (기존 백신 항원 추가 비교, 각각 1차 생산된 lot01 백신으로 실험)

구분	항체역가 (log2)						
	항원				ROCO (기존백신)		
	3ROCO		ROCO (기존백신)				
	KJ11 G8P[7]	KJ19-2 G6P[7]	KJ44 G5P[1]	44	678		
혈청	KJ11	1	8	4	4	7	5
	2	8	5	3	8	3	
	3	7	5	5	6	4	
	4	8	4	4	7	5	
	5	8	3	5	5	4	
	6	7	6	4	7	4	
	7	8	3	4	7	5	
	8	8	5	4	7	4	
	평균	7.75	4.375	4.125	6.75	4.25	
	표준편차	0.46291	1.06066	0.64087	0.886405	0.707107	
KJ19-2	1	5	7	5	7	3	
	2	6	7	4	6	3	
	3	5	8	5	7	4	

	4	4	9	4	6	5	
	5	5	7	5	5	3	
	6	6	7	6	6	3	
	7	5	8	5	7	4	
	8	5	8	5	7	3	
	평균	5.125	7.625	4.875	6.375	3.5	
	표준편차	0.64087	0.744024	0.64087	0.744024	0.755929	
KJ44	1	5	4	8	5	4	
	2	5	5	8	4	4	
	3	5	4	8	5	3	
	4	6	5	9	4	4	
	5	6	5	8	5	4	
	6	5	4	8	5	5	
	7	5	5	9	6	4	
	8	6	4	8	5	3	
		평균	5.375	4.5	8.25	4.875	3.875
		표준편차	0.517549	0.534522	0.46291	0.64087	0.64087
Mix (3strains)	1	8	8	8	7	4	
	2	7	7	7	7	7	
	3	8	8	8	7	5	
	4	9	9	8	6	6	
	5	8	7	9	8	4	
	6	8	7	8	7	5	
	7	8	8	8	8	6	
	8	7	8	8	7	5	
		평균	7.875	7.75	8	7.125	5.25
		표준편차	0.64087	0.707107	0.534522	0.64087	1.035098
음성 대조	1	2	2	2	3	2	
	SPF1	2	2	2	2	2	

카. 소 로타바이러스 약독화 생독백신 특성 시험

(1) 시험 방법

(가) 2개 이상의 백신에 대하여 무색 투명한 용기의 백신은 백신 희석액으로 용해하고, 불투명한 용기의 백신은 직경 18~22mm의 무색 투명한 유리용기에 옮겨서 자연광 또는 1,000룩스 이상의 백색 광원하에서 실시하였음.

(2) 시험 결과

(가) 이물, 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하는 등, 시험 결과 모든 시험백신에서 적합 판정을 받았음(표 16).

[표 16] 소 로타바이러스 약독화 생독백신 특성 시험 결과

Lot	시험	시험방법 및 시험 결과	판정
T316Rota-KJ11-		백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰	
Lot1	색조시험	성상 : 노란백색 용해후 색조 : 밝은회분홍색	적합
T316Rota-KJ11-Lot2	투명도(혼탁도) 시험	투명도 또는 혼탁도 관찰 성상 : 투명함	적합

T316Rota-KJ11-Lot3	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 성상 : 이물없음	적합
	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 성상 : 이취없음	적합
	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 성상 : 균일함	적합
T316Rota-KJ19-2-Lot1	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰 성상 : 노란백색 용해후 색조 : 밝은회분홍색	적합
	투명도(혼탁도) 시험	투명도 또는 혼탁도 관찰 성상 : 투명함	적합
T316Rota-KJ19-2-Lot2	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 성상 : 이물없음	적합
T316Rota-KJ19-2-Lot3	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 성상 : 이취없음	적합
	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 성상 : 균일함	적합
	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰 성상 : 노란백색 용해후 색조 : 밝은회분홍색	적합
T316Rota-KJ44-Lot1	투명도(혼탁도) 시험	투명도 또는 혼탁도 관찰 성상 : 투명함	적합
T316Rota-KJ44-Lot2	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 성상 : 이물없음	적합
T316Rota-KJ44-Lot3	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 성상 : 이취없음	적합
	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 성상 : 균일함	적합
	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰 성상 : 노란백색 용해후 색조 : 밝은회분홍색	적합
T3163Rota-Lot1	투명도(혼탁도) 시험	투명도 또는 혼탁도 관찰 성상 : 투명함	적합
T3163Rota-Lot2	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 성상 : 이물없음	적합
T3163Rota-Lot3	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 성상 : 이취없음	적합
	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 성상 : 균일함	적합

타. 소 로타바이러스 약독화 생건조 백신 진공도 시험



(1) 시험 방법

(가) 암실에서 백신으로부터 5~10mm 떨어진 위치에 테스트코일을 놓고 방전의 유무를 관찰하며, 방전 인정 시 적합함.

(2) 시험 결과

(가) 모든 백신에서 방전이 인정되었음(표 17).

[표 17] 소 로타바이러스 약독화 생독백신 진공도 시험검사 결과

Lot	시험	시험방법	판정
T316Rota- KJ11-Lot1	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
T316Rota- KJ11-Lot2	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합
T316Rota- KJ11-Lot3	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot1	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot2	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot3	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
T316Rota- KJ44-Lot1	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
T316Rota- KJ44-Lot2	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합
T316Rota-KJ44-Lot3	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
T3163Rota-Lot1	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합
T3163Rota-Lot2	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
T3163Rota-Lot3	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합

파. 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 수소이온농도 시험

(1) 시험 방법

(가) 각 lot 별 2개의 백신에 대하여 각각 pH측정기를 이용하여 측정하였음.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 판정 기준내의 pH값을 보였음(표 18).

[표 18] 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 수소이온농도 시험결과

Lot	백신	시험방법	시험결과	판정기준	판정
T316Rota- KJ11-Lot1	백신 1	측정기 (pH/conductivity meter : METTLER TOLEDO)	7.07	6.0~8.0	적합
	백신 2		7.10		적합
T316Rota- KJ11-Lot2	백신 1		7.08		적합
	백신 2		7.07		적합
T316Rota- KJ11-Lot3	백신 1		7.1		적합
	백신 2		7.08		적합
T316Rota- KJ19-2-Lot1	백신 1		7.09		적합
	백신 2		7.08		적합
T316Rota-	백신 1		7.08		적합

KJ19-2-Lot2	백신 2	7.1	적합
T316Rota-	백신 1	7.06	적합
KJ19-2-Lot3	백신 2	7.04	적합
T316Rota-	백신 1	7.07	적합
KJ44-Lot1	백신 2	7.06	적합
T316Rota-	백신 1	7.05	적합
KJ44-Lot2	백신 2	7.08	적합
T316Rota-	백신 1	7.05	적합
KJ44-Lot3	백신 2	7.10	적합
T3163Rota-Lo	백신 1	7.12	적합
t1	백신 2	7.08	적합
T3163Rota-Lo	백신 1	7.05	적합
t2	백신 2	7.05	적합
T3163Rota-Lo	백신 1	7.08	적합
t3	백신 2	7.02	적합

타. 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 함습도 시험

(1) 시험 방법

- (가) 표준용액으로 함습도 측정하며 1회 측정시 샘플링을 1g 미만으로 측정함.
- (나) 3개의 백신에 대하여 내용물을 신속히 분쇄하여 입자의 직경을 2mm 이하로 하여 10~20mg을 시험에 사용함.
- (다) Karl-Fischer방법을 사용하여 함습도를 측정하며, 3개 중 최고치를 함습도로 인정함(표 19).

[표 19] 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 함습도 시험 방법

Water standard	표준용액 제조번호	허용오차범위	시험결과	시험평균	판정
1	Lot SZBE1320V	water standard	1.00	1.00	적합
2		10.0*	1.00		
3		(0.97%~1.03%)	1.01		

\*Fluka #34849 HYBRANAL Water Standard 10.0. 1.0g 미만으로 측정.

(2) 시험 결과

- (가) 모든 시험 백신에서 최고치가 6%이하로 검출되었음(표 20).

[표 20] 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 함습도 시험 결과

백신 Lot	시험결과	판정기준	판정	
T316Rota- KJ11-Lot1	백신1	4.89	적합	
	백신2	4.03	최고치가 6.0% 이하이어야 함.	적합
	백신3	3.51		적합
T316Rota- KJ11-Lot2	백신1	4.72		적합
	백신2	4.39	적합	
	백신3	3.90	적합	

T316Rota- KJ11-Lot3	백신1	3.94	적합
	백신2	4.12	적합
	백신3	4.33	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot1	백신1	3.69	적합
	백신2	4.02	적합
	백신3	4.10	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot2	백신1	4.10	적합
	백신2	4.23	적합
	백신3	3.80	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot3	백신1	3.92	적합
	백신2	4.13	적합
	백신3	4.38	적합
T316Rota- KJ44-Lot1	백신1	3.78	적합
	백신2	3.95	적합
	백신3	4.00	적합
T316Rota- KJ44-Lot2	백신1	4.13	적합
	백신2	4.62	적합
	백신3	4.33	적합
T316Rota- KJ44-Lot3	백신1	3.67	적합
	백신2	3.86	적합
	백신3	3.61	적합
T3163Rota-Lot1	백신1	4.21	적합
	백신2	4.05	적합
	백신3	4.04	적합
T3163Rota-Lot2	백신1	3.85	적합
	백신2	3.76	적합
	백신3	3.91	적합
T3163Rota-Lot3	백신1	4.03	적합
	백신2	4.31	적합
	백신3	3.89	적합

과. 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 무균 시험

(1) 시험 방법

(가) 시험품의 액상 제제는 그대로, 건조제제는 전용 희석액으로, 전용 희석액이 없는 제제는 멸균된 일반 희석액으로 용해한 후 접종함.

(나) 사용 배지는 tryptic soy agar (TSA), tryptic soy broth (TSB), 0.5% beefextract 첨가된 thioglycollate medium (Thio)를 사용함.

(다) 22℃ 및 32℃ incubator에서 각각 14일간 배양하며 관찰하고 시험 결과 어떠한 세균 및 진균의 발육도 인정되어서는 안됨.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 세균 및 진균 발육이 인정되지 않음(표 21-22).

[표 21] 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 무균 시험 결과

백신 종류	22℃			32℃			결과	판정
	TSA	TSB	Thio	TSA	TSB	Thio		
							세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합

T316Rota-KJ11-Lot1	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Rota-KJ11-Lot2	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Rota-KJ11-Lot3	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Rota-KJ19-2-Lot1	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Rota-KJ19-2-Lot2	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Rota-KJ19-2-Lot3	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Rota-KJ44-Lot1	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Rota-KJ44-Lot2	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Rota-KJ44-Lot3	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T3163Rota-Lot 1	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T3163Rota-Lot 2	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T3163Rota-Lot 3	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합

양성은 “+”, 음성은 ”-“로 표기.

[표 22] 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 무균 시험 실험 중 환경 모니터링 결과 (실험 종료 후 배양기에 배지를 배양시킴)

관찰 일자	TSA		R-TAS		SDA		R-SDA		판정
	낙하균		표면균		낙하균		표면균		
	1	2	1	2	1	2	1	2	
1일차	-	-	-	-	-	-	-	-	적합
2일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
3일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
4일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
5일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
6일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
7일차	-	-	-	-	-	-	-	-	

양성은 “+”, 음성은 ”-“로 표기.

#### 하. 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 마이코플라즈마 부정시험

##### (1) 시험 방법

(가) PCR 방법을 이용한 마이코플라즈마 검출 방법을 사용하였으며 PCR산물을 전기영동하여 양성대조군에서는 464bp의 증폭 산물이 관찰되고, 음성대조군에서는

증폭산물이 관찰되지 않으면 이 시험은 적합한 것으로 판정함.

(나) 만약 시험품에서 464bp의 증폭 산물이 관찰되면 직접배양법을 이용하여 마이코플라즈마 분리시험을 실시하여 최종 확인함.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 마이코플라즈마 음성이었음(표 23 & 그림 4).

[표 23] 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 마이코플라즈마 부정시험 결과

백신종류	시험방법	시험결과	판정
T316Rota- KJ11-Lot1	PCR방법	음성	적합
T316Rota- KJ11-Lot2		음성	적합
T316Rota- KJ11-Lot3		음성	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot1		음성	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot2		음성	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot3		음성	적합
T316Rota- KJ44-Lot1		음성	적합
T316Rota- KJ44-Lot2		음성	적합
T316Rota- KJ44-Lot3		음성	적합
T3163Rota-Lot1		음성	적합
T3163Rota-Lot2		음성	적합
T3163Rota-Lot3		음성	적합



1 : 양성 대소균 -; 음성대소균 1 : T316Rota-KJ11-Lot1, 2 : T316Rota-KJ11-Lot2, 3 : T316Rota-KJ11-Lot3, 4 : T316Rota-KJ19-2-Lot1, 5 : T316Rota-KJ19-2-Lot2, 6 : T316Rota-KJ19-2-Lot3, 7 : T316Rota-KJ44-Lot1, 8 : T316Rota-KJ44-Lot2, 9 : T316Rota-KJ44-Lot3, 10 : T316Rota-Lot1, 11 : T316Rota-Lot2, 12 : T316Rota-Lot3

[그림 4] 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 시험백신의 마이코 플라즈마 부정 시험결과.

가. 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 시험백신 미립바이러스 부정시험 (BVDV, CPIV 오염검사)

(1) 시험 방법

(가) 건조 백신을 일반 희석액 1ml로 희석 후 RNA를 추출하여 PCR 검사방법을

사용하여 미입바이러스 부정시험을 실시하였음.

(2) 시험 결과

(가) 모든 백신에서 미입바이러스가 발견되지 않았음(표 24).

[표 24] 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 미입바이러스 부정시험 결과

백신종류	시험방법	검출항원	시험결과	판정
T316Rota- KJ11-Lot1	PCR방법	BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Rota- KJ11-Lot2		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Rota- KJ11-Lot3		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot1		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot2		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot3		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Rota- KJ44-Lot1		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Rota- KJ44-Lot2		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Rota- KJ44-Lot3	BVDV	음성	적합	
	CPIV	음성	적합	
T3163Rota-Lot1	BVDV	음성	적합	
	CPIV	음성	적합	
T3163Rota-Lot2	BVDV	음성	적합	
	CPIV	음성	적합	
T3163Rota-Lot3	BVDV	음성	적합	
	CPIV	음성	적합	

나. 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 시험백신 함량 시험

(1) 시험 방법

(가) 백신을 혼합하여 최종 1두분 (2ml/두)으로 되게 한 후 10진 희석한다. 각 희석액 0.1ml을 TF cell에 접종한 후 37℃에서 4~7일간 배양함.

(2) 시험 결과

(가) 시험 결과 모든 시험 백신이 판정기준 이상의 바이러스 함량임을 확인하였음 (표 25).

[표 25] 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 시험백신 함량 시험 결과

백신종류	Virus 함량 (10 <sup>x</sup> TCID <sub>50</sub> /두당)	판정기준	판정
T316Rota- KJ11-Lot1	6.9	국검 : ≥10 <sup>5.0</sup>	적합
T316Rota- KJ11-Lot2	7.3	자검 : ≥10 <sup>5.5</sup>	적합
T316Rota- KJ11-Lot3	6.5	TCID <sub>50</sub> /dose	적합



T316Rota- KJ19-2-Lot1	6.5	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot2	6.9	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot3	6.9	적합
T316Rota- KJ44-Lot1	7.3	적합
T316Rota- KJ44-Lot2	6.9	적합
T316Rota- KJ44-Lot3	6.9	적합
T3163Rota-Lot1	7.3	적합
T3163Rota-Lot2	7.0	적합
T3163Rota-Lot3	7.0	적합

다. 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 안전시험

(1) 시험방법

- (가) 소 로타바이러스 백신주에 따라 3개의 시험백신 및 3종 혼합 백신을 각각 20 병씩 3lot 제작하였음.
- (나) 동결 건조 시험백신의 바이러스 함량은 기존에 판매되고 있는 ROCO제품의  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub> 이상 기준으로 제조하였음(Table 14).
- (다) 각각의 백신주를 마우스, 기니픽, 소의 복강, 극육에 각각 접종하였음.

[표 26] 각각의 로타바이러스 백신주 정보

Lot. No.	Date manufactured	Contents (per 1 dose)	Quantity (25 doses/vial)
T316Rota-KJ11-Lot1	2016.10.03.	Bovine rotavirus KJ11 strain ..... Over $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Rota-KJ11-Lot2	2016.10.05.	Bovine rotavirus KJ11 strain ..... Over $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Rota-KJ11-Lot3	2016.10.07.	Bovine rotavirus KJ11 strain ..... Over $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Rota-KJ19-2-Lot1	2016.10.10.	Bovine rotavirus KJ19-2 strain ..... Over $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Rota-KJ19-2-Lot2	2016.10.12.	Bovine rotavirus KJ19-2 strain ..... Over $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Rota-KJ19-2-Lot3	2016.10.14.	Bovine rotavirus KJ19-2 strain ..... Over $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Rota-KJ44-Lot1	2016.10.17.	Bovine rotavirus KJ44 strain ..... Over $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Rota-KJ44-Lot2	2016.10.19.	Bovine rotavirus KJ44 strain ..... Over $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Rota-KJ44-Lot3	2016.10.21.	Bovine rotavirus KJ44 strain ..... Over $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T3163Rota-Lot1	2016.010.24.	Bovine rotavirus KJ11 strain ..... Over $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> Bovine rotavirus KJ44 strain ..... Over $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T3163Rota-Lot2	2016.10.26.	Bovine rotavirus KJ11 strain ..... Over $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> Bovine rotavirus KJ19-2 strain ..... Over $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> Bovine rotavirus KJ44 strain ..... Over $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub>	20 vials

		Stabilizer .....	Suitable amount	
T3163Rota-L ot3	2016.10.28.	Bovine rotavirus KJ11 strain .....	Over 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub>	20 vials
		Bovine rotavirus KJ19-2 strain .....	Over 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
		Bovine rotavirus KJ44 strain .....	Over 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
		Stabilizer .....	Suitable amount	

(2) 시험결과

(가) 안전성 검사에 사용한 마우스, 기니픽, 소에 각각의 백신주 혹은 혼합백신주를 복강, 근육 등의 경로를 통해 접종한 결과 접종부위 이상 증상 등 어떠한 임상증상 없이 생존하여 안전성이 확인되었음(표 27-30).

[표 27] 소 로타바이러스 약독화 백신주 KJ11의 안전성 검사결과

Species	Lot No.	Route of administration	No. of animals	Amount of vaccine	Clinical signs
Mice	T316Rota-KJ11-Lot1	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316Rota-KJ11-Lot2	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316Rota-KJ11-Lot3	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
Guinea pigs	T316Rota-KJ11-Lot1	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ11-Lot2	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ11-Lot3	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ11-Lot1	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ11-Lot2	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ11-Lot3	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
Cows	T316Rota-KJ11-Lot1	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316Rota-KJ11-Lot2	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316Rota-KJ11-Lot3	Intra-muscle	2	10 ml	None

[표 28] 소 로타바이러스 약독화 백신주 KJ19-2의 안전성 검사결과

Species	Lot No.	Route of administration	No. of animals	Amount of vaccine	Clinical signs
Mice	T316Rota-KJ19-2-Lot1	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316Rota-KJ19-2-Lot2	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316Rota-KJ19-2-Lot3	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
Guinea pigs	T316Rota-KJ19-2-Lot1	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ19-2-Lot2	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ19-2-Lot3	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ19-2-Lot1	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ19-2-Lot2	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ19-2-Lot3	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
Cows	T316Rota-KJ19-2-Lot1	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316Rota-KJ19-2-Lot2	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316Rota-KJ19-2-Lot3	Intra-muscle	2	10 ml	None

[표 29] 소 로타바이러스 약독화 백신주 KJ44의 안전성 검사결과

Species	Lot No.	Route of	No. of	Amount of	Clinical signs
---------	---------	----------	--------	-----------	----------------

		administration	animals	vaccine	
Mice	T316Rota-KJ44-Lot1	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316Rota-KJ44-Lot2	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316Rota-KJ44-Lot3	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
Guinea pigs	T316Rota-KJ44-Lot1	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ44-Lot2	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ44-Lot3	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ44-Lot1	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ44-Lot2	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ44-Lot3	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
Cows	T316Rota-KJ44-Lot1	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316Rota-KJ44-Lot2	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316Rota-KJ44-Lot3	Intra-muscle	2	10 ml	None

[표 30] 소 로타바이러스 약독화 혼합백신주(KJ11, KJ19-2 & KJ44 strains)의 안전성 검사결과

Species	Lot No.	Route of administration	No. of animals	Amount of vaccine	Clinical signs
Mice	T3163Rota-Lot1	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T3163Rota-Lot2	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T3163Rota-Lot3	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
Guinea pigs	T3163Rota-Lot1	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T3163Rota-Lot2	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T3163Rota-Lot3	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T3163Rota-Lot1	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T3163Rota-Lot2	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T3163Rota-Lot3	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
Cows	T3163Rota-Lot1	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T3163Rota-Lot2	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T3163Rota-Lot3	Intra-muscle	2	10 ml	None

라. 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 혈청 역가 시험

(1) 시험방법

(가) 기니픽 10마리 중 8마리는 접종군, 2마리는 대조군으로 하였음.

(나) 각각의 백신주 및 혼합백신주를 접종군에 투여하였음.

(2) 시험결과

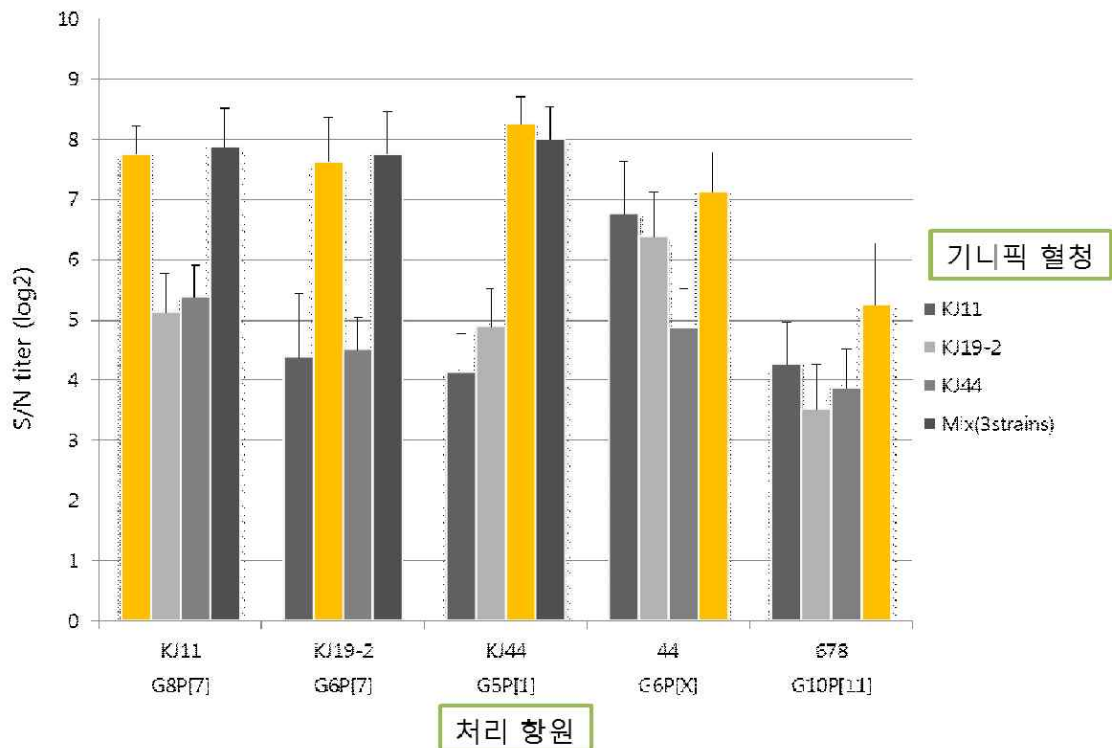
(가) KJ11 단독으로 접종 시  $2^{7.75 \pm 0.46}$ 배, KJ19-2 단독으로 접종 시  $2^{7.6 \pm 0.744}$ 배, KJ44 단독 접종 시  $2^{8.25 \pm 0.46}$ 배, 3종 혼합 백신 접종 시  $2^{7.13 \pm 0.64}$ 배의 혈청 중화 항체 역가를 보였음.

(나) 이는 농림축산검역본부의 검정기준인  $2^3$ 배를 모두 넘어 각각의 백신주는 생독 백신 균주로서 적합함을 시사함(표 31 & 그림 5).

[표 31] 시판 백신주, 본 연구에서 개발한 각각의 백신주 혹은 혼합백신주를 투여한 기니픽의 로타바이러스에 대한 혈청 중화항체가

Strain name used	Animal	Serum neutralizing antibody titer (log2) to
------------------	--------	---------------------------------------------

for immunization	No.	Current vaccine strains			Commercialized vaccine strains	
		KJ11 (G8P[7])	KJ19-2 (G6P[7])	KJ44 (G5P[1])	44 (G10P[11])	678 (G6P[x])
KJ11 (G8P[7])	1	8	4	4	7	5
	2	8	5	3	8	3
	3	7	5	5	6	4
	4	8	4	4	7	5
	5	8	3	5	5	4
	6	7	6	4	7	4
	7	8	3	4	7	5
	8	8	5	4	7	4
	Average Standard deviation	7.75 0.46291	4.375 1.06066	4.125 0.64087	6.75 0.886405	4.25 0.707107
KJ19-2 (G6P[7])	1	5	7	5	7	3
	2	6	7	4	6	3
	3	5	8	5	7	4
	4	4	9	4	6	5
	5	5	7	5	5	3
	6	6	7	6	6	3
	7	5	8	5	7	4
	8	5	8	5	7	3
	Average Standard deviation	5.125 0.64087	7.625 0.744024	4.875 0.64087	6.375 0.744024	3.5 0.755929
KJ44 (G5P[1])	1	5	4	8	5	4
	2	5	5	8	4	4
	3	5	4	8	5	3
	4	6	5	9	4	4
	5	6	5	8	5	4
	6	5	4	8	5	5
	7	5	5	9	6	4
	8	6	4	8	5	3
	Average Standard deviation	5.375 0.517549	4.5 0.534522	8.25 0.46291	4.875 0.64087	3.875 0.64087
Trivalent vaccine mixed with KJ11, KJ19-2 and KJ44 strains	1	8	8	8	7	4
	2	7	7	7	7	7
	3	8	8	8	7	5
	4	9	9	8	6	6
	5	8	7	9	8	4
	6	8	7	8	7	5
	7	8	8	8	8	6
	8	7	8	8	7	5
	Average Standard deviation	7.875 0.64087	7.75 0.707107	8 0.534522	7.125 0.64087	5.25 1.035098
Serum from non-immunized animals	1	2	2	2	3	2
	SPF1	2	2	2	2	2



[그림 5] 각각의 백신주 혹은 혼합백신주를 투여한 기니픽의 로타바이러스에 대한 혈 중 중화항체가.

마. 소 로타바이러스 생건조 백신 전임상 시험 종합

- (1) 3종류의 바이러스 단독과 3개의 항원이 포함된 1종류의 소 로타바이러스 혼합백신의 시험 결과 모든 시험백신의 안정성이 확보되었으며 항체 역가가 우수하게 확인되었음.
- (2) 하지만 현재 로타 단독으로 제품이 출시되었을 경우 시판되고 있는 ROCO백신과 경쟁성을 갖기가 어려울 것으로 판단됨.
- (3) 3종류의 로타바이러스 생건조 혼합백신에서 안전성과 항체 역가 측면에서 우수한 결과를 보였으므로, 다음에 기술한 바와 같이 소 코로나바이러스와 혼합 백신을 생산하여 4종의 혼합 생 백신과 비교하여 최종적인 백신을 개발하였음.

## 2절. 소 코로나바이러스 특성 분석 및 백신 전임상 시험

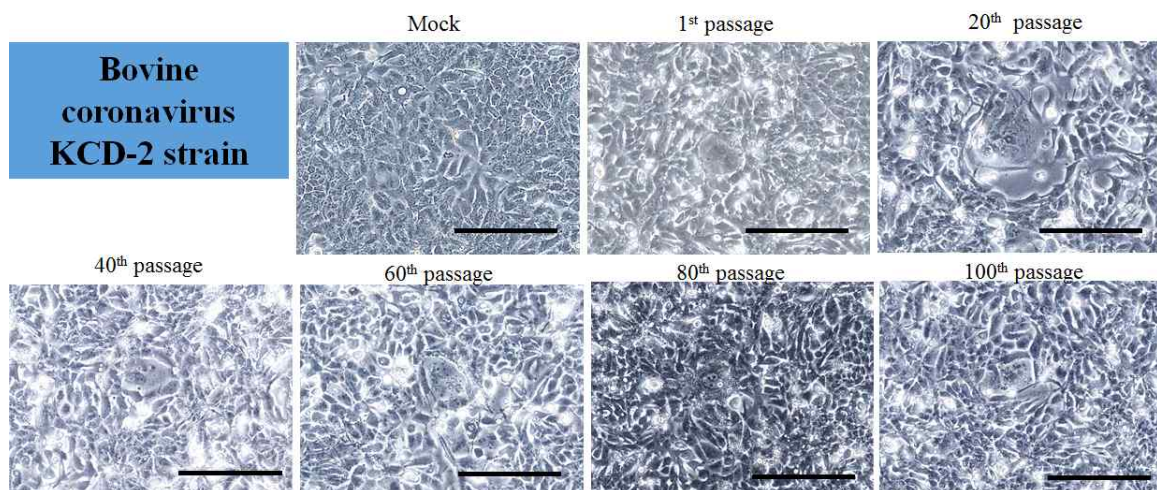
### 1. 소 코로나바이러스 백신주 특성 분석

#### 가. 백신주 계대별 역가 분석

Strain Name	Passage numbers					
	1 <sup>st</sup>	20 <sup>th</sup>	40 <sup>th</sup>	60 <sup>th</sup>	80 <sup>th</sup>	100 <sup>th</sup>
KCD-2 (2-35)	$2.3 \times 10^6$	$5.5 \times 10^7$	$3.0 \times 10^8$	$2.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^{10}$	$5.6 \times 10^{11}$
KWD-20 (20-2)	$3.2 \times 10^5$	$6.0 \times 10^6$	$3.2 \times 10^7$	$3.0 \times 10^9$	$5.0 \times 10^{10}$	$3.6 \times 10^{11}$
KWD-1 (585-1)	$1.0 \times 10^5$	$5.0 \times 10^6$	$1.2 \times 10^7$	$2.0 \times 10^8$	$3.0 \times 10^{10}$	$4.5 \times 10^{11}$

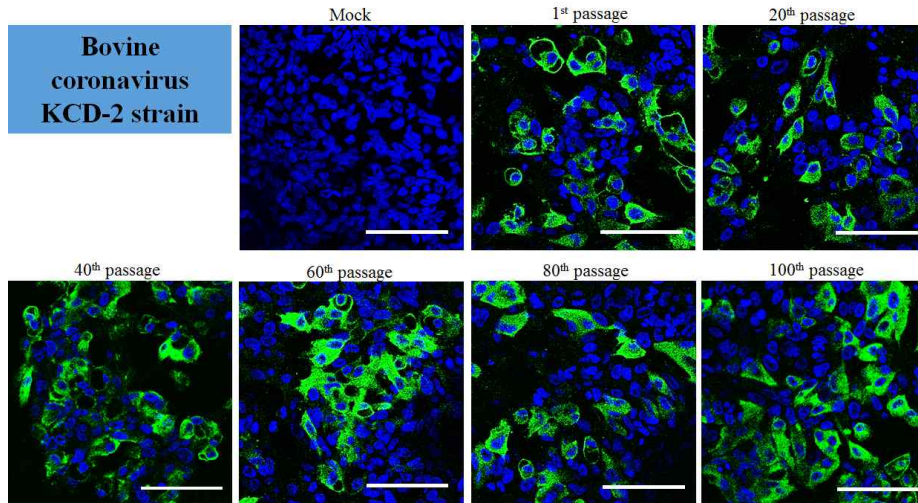
- 국내 송아지 설사분변에서 분리한 백신 후보주인 KCD-2주뿐만 아니라 온절기 적리 분리주 KWD-20과 동절기 적리 분리주 KWD-1분리주를 HRT-18 세포에서 100대까지 계대배양 후 바이러스 역가를 측정한 결과 상술한 테이블에서와 같이 계대 횟수가 높아질수록 바이러스 역가도 높아졌음. 즉, 불활화 및 약독화 백신주로 개발에 문제가 없음을 확인하였음.

#### 나. 백신주 계대별 CPE 및 항원성 분석



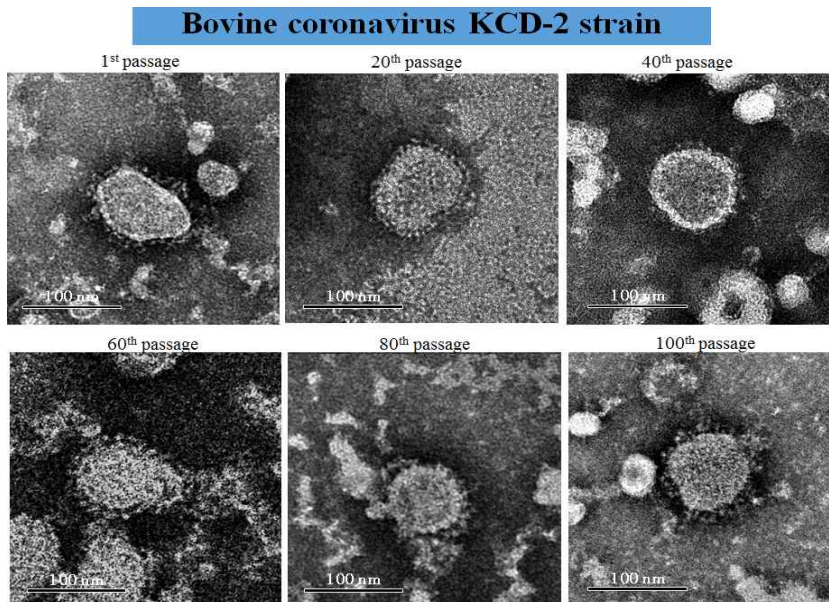
- 소 코로나바이러스 불활화 및 약독화 백신주로 사용할 국내 송아지 설사분변에서 분리한 KCD-2 분리주 및 계대주에 대하여 CPE를 확인한 결과 세포의 원형화와 위축 및 탈락과 같은 전형적인 CPE 소견이 분리주뿐만 아니라 계대주 전체에 걸쳐서 확인되었음. 즉, 백신주의 계대화에 따른 바이러스 특성의 변화는 없었음.





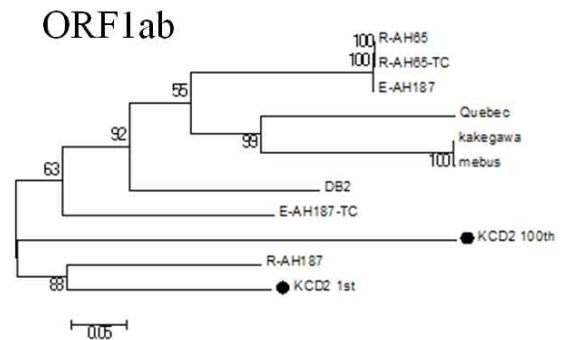
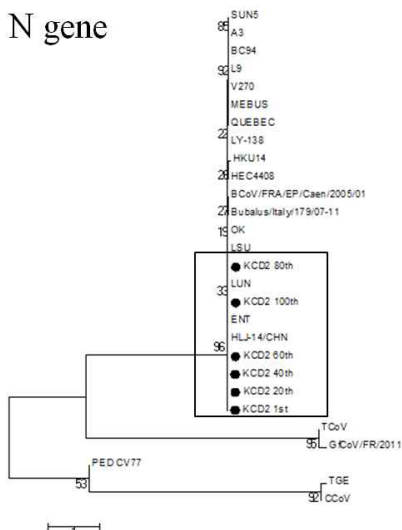
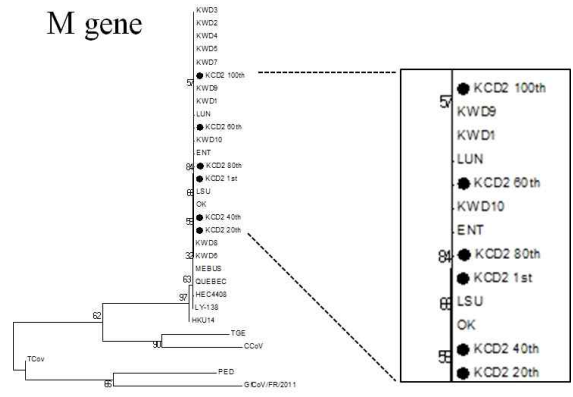
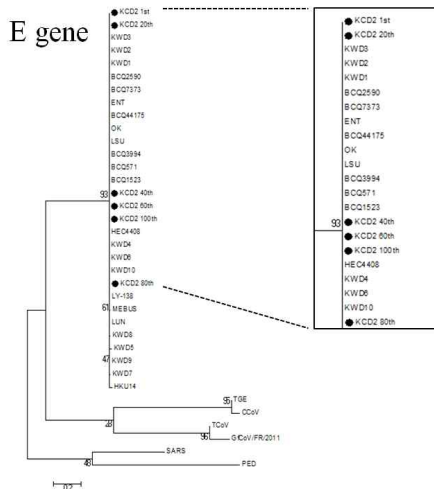
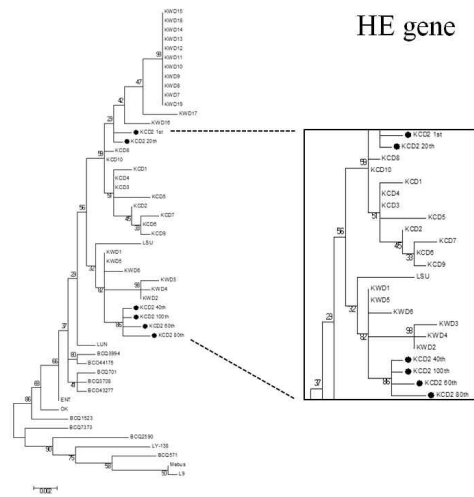
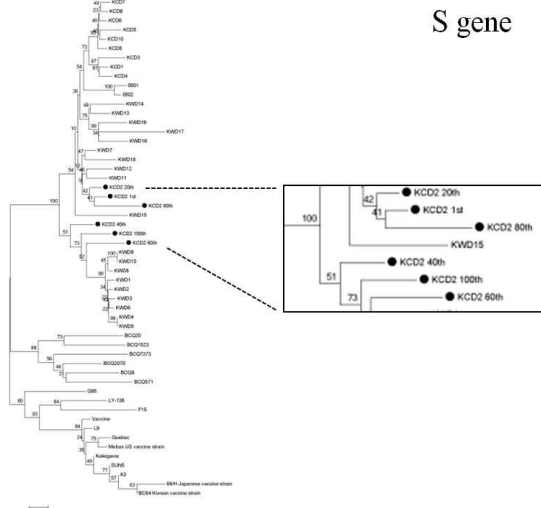
- 상술한 KCD-2 분리주 및 계대주에 대하여 소 코로나바이러스 스파이크 단백질에 대한 단클론항체를 이용하여 면역형광염색을 수행한 후 confocal microscope로 검사한 결과, 분리주 및 계대주 전체에 걸쳐 강한 양성 반응이 세포질 내에서 확인되었음. 즉, 백신주의 계대화에 따른 바이러스 특성의 변화는 없었음.

#### 다. 백신주 계대별 바이러스 구조 분석



- 상술한 국내 분리주 및 계대주를 초고속원심분리 후, 침전물에 대하여 Postassium tungstic acid 염색을 수행하여 전자현미경으로 관찰한 결과, 분리주 및 계대주 전체에 걸쳐 두 개 종류의 spike가 외막에 있는 100-160 nm 크기의 코로나바이러스가 확인되었음. 즉, 백신주의 계대화에 따른 바이러스 특성의 변화는 없었음.

라. 백신주 계대별 유전형 분석



- 상술한 국내 분리주 및 20, 40, 60, 80, 100대 계대주에서 소 코로나바이러스 RNA를 추출하여, 각각의 구조단백질 유전자에 대한 전체 염기서열을 sequencing 한 후, 이에 대하여 계통학적으로 분석하였음. 또한 비구조단백질에 대해서는 분리주

및 100대 계대주에 대한 계통학적 분석을 하였음. 그 결과 초대 분리주 및 각각의 계대주간의 계통학적 차이는 관찰되지 않았음. 즉, 연속계대에 따른 대단위 유전체 돌연변이나 혼합감염에 의한 recombination은 없었음.

마. 백신주 계대별 유전자 염기서열 및 상동성 분석

## BCoV KCD-2 strain: S gene

S	Amino acid position																									
	173	179	218	231	244	252	378	526	537	590	617	640	716	769	841	905	942	943	975	1113	1122	1162	1176	1256	1259	133
P1 <sup>st</sup>	N	R	T	K	Y	C	D	N	D	D	T	I	T	S	L	S	A	E	A	K	K	V	C	L	P	C
P20 <sup>th</sup>	N	K	T	K	Y	C	D	N	D	D	T	I	T	S	L	G	A	E	A	K	K	V	R	L	P	C
P40 <sup>th</sup>	N	K	T	K	Y	C	D	N	D	D	I	T	I	S	L	S	A	E	A	K	K	V	C	R	L	R
P60 <sup>th</sup>	S	R	T	R	H	C	D	N	G	A	I	T	I	P	S	S	A	G	A	K	K	V	C	R	L	C
P80 <sup>th</sup>	N	R	A	K	H	C	D	N	D	D	T	I	T	P	L	S	A	G	V	K	K	D	C	L	P	C
P100 <sup>th</sup>	N	R	T	K	H	R	G	Y	D	A	I	T	I	P	L	S	G	E	A	R	E	V	C	R	L	C

▶ Red letters indicate amino acid change compared with the first passage.

## BCoV KCD-2 strain

### HE gene

HE	Amino acid position						
	37	173	245	297	345	415	419
P1 <sup>st</sup>	S	A	F	S	S	V	T
P20 <sup>th</sup>	F	A	F	S	S	V	T
P40 <sup>th</sup>	F	V	F	R	S	-	T
P60 <sup>th</sup>	F	V	S	R	S	-	T
P80 <sup>th</sup>	F	V	F	R	P	-	N
P100 <sup>th</sup>	F	V	F	R	S	-	T

### E gene

E	Amino acid position
	57
P1 <sup>st</sup>	S
P20 <sup>th</sup>	S
P40 <sup>th</sup>	S
P60 <sup>th</sup>	S
P80 <sup>th</sup>	T
P100 <sup>th</sup>	S

### M gene

M	Amino acid position				
	52	82	115	154	219
P1 <sup>st</sup>	Y	Y	W	L	S
P20 <sup>th</sup>	Y	Y	R	L	S
P40 <sup>th</sup>	Y	Y	W	L	F
P60 <sup>th</sup>	Y	V	W	P	S
P80 <sup>th</sup>	C	H	W	L	S
P100 <sup>th</sup>	Y	Y	W	L	S

### N gene

N	Amino acid position			
	45	163	213	386
P1 <sup>st</sup>	P	G	S	M
P20 <sup>th</sup>	P	D	L	M
P40 <sup>th</sup>	H	D	S	M
P60 <sup>th</sup>	P	D	L	M
P80 <sup>th</sup>	P	D	S	T
P100 <sup>th</sup>	P	D	L	T

▶ Red letters indicate amino acid change compared with the first passage.

- 백신주의 계대를 통해 아미노산 서열의 치환이 증가하는 경향이 있으며, 이러한 아미노산 서열의 치환이 백신주의 약독화와 관련성이 있는 것으로 추정됨.

바. 소 코로나바이러스 반수유효량(50% Effective Dose; ED<sub>50</sub>) 결정 시험

Challenge dosage	No. per group	No. (%) of piglets showed diarrhea	No. (%) of piglets did not showed diarrhea	Median diarrhea dose
10 <sup>2</sup> FFU	3	1 (33%)	2 (67%)	10 <sup>2.3</sup> (1.8x 10 <sup>2</sup> FFU)
10 <sup>3</sup> FFU	3	3 (100%)	0 (0%)	

- 국내 송아지 설사분변에서 분리한 소 코로나바이러스 KCD-2 분리 원주를 이용하여 공격바이러스 설사 유발 반수유효량 결정시험을 수행하였음. 그 결과, 설사 유발 반수유효량은 1.8 x 10<sup>2</sup> FFU이었음.

2. 소 코로나바이러스 불활화 백신 전임상 시험

가. Seed 및 배양세포 확립

- (1) 전남대학교에서 분리한 소 코로나바이러스를 표 1과 같이 백신 Seed의 제조번호를 부여하고 Master, Working, Production seed를 확립하였음.
- (2) 소 코로나바이러스 발생농장 소에서 분리되어 HRT-18G 세포에서 100계대하고, MDBK 세포에서 추가 계대한 것으로 세포내 병원성을 유지하고 있었음.
- (3) MDBK 세포에 접종 2일 후부터 특이적인 CPE를 형성하였으며, 바이러스 증식성은 10<sup>5.0</sup>TCID<sub>50</sub>/ml 이상이었음.

[표 1] 소 코로나바이러스 백신 Seed 및 배양세포 확립

Strain 명	Seed 제조번호	Cell (제조번호)	Master seed	생산용 종독	Production seed
KWD-20	RD-B-V-030	MDBK (SOP-CM-C07-01)	100th	2계대	102th

나. Seed 제조단위 시스템

- (1) 세포증식용 배양액(α-MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100μg/ml) 0.1%)에 ml당 15~30만개의 MDBK 세포를 분산시켜 37℃에서 4~5일간 배양한 다음 배양액을 제거한 후 소 코로나바이러스를 0.1 M.O.I 접종하여 37℃에서 1시간 배양한 후 바이러스 증식용 배양액(α-MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100μg/ml) 0.1%, trypsin 1μg/ml)을 가한 다음 3일간 회전 배양하면서 세포변성효과가 약 80% 이상 일어날 때까지 배양하였음.

다. Master seed



- (1) 106대 계대 된 소 코로나바이러스를 단층이 형성된 MDBK세포에 접종하여 37℃에서 3~4일간 배양한 후, 접종 바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채독하여 -80℃의 냉동고에 동결보존 및 동결건조하여 원종독으로 사용하였음.

라. Production seed

- (1) Master seed와 같은 계대방법으로 2대 계대된 소 코로나바이러스를 단층이 형성된 MDBK세포에 접종하여 37℃에서 3~4일간 배양한 후, 접종바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채독하여 -80℃의 냉동고에 동결건조하여 생산용 종독으로 사용하였음.

마. 배양조건 확립

(1) 바이러스 접종

- (가) MDBK 세포를 세포증식용 배양액에 ml당 15~30만개의세포를 분산시킨 후, 37℃에서 4~5일간 배양한 다음 배양 세포가 단층을 형성하였을 때 배양액을 제거한 후 소 코로나바이러스를 0.1 M.O.I 접종하고 37℃에서 1시간 흡착배양한 후 바이러스 증식용 배양액을 넣었음.

(2) 바이러스 배양

- (가) 세포에 바이러스를 접종한 후 37℃에서 3~4일간 배양하였음.

(3) 채독 및 불활화

- (가) 37℃에서 3~4일간 배양한 후 소 코로나바이러스에 의한 세포변성 효과가 약 80%이상 일어났을 때 배양감염액을 채독하였음.

- (나) 채독한 배양감염액에 formalin을 최종농도 0.3%되게 첨가하여 37℃에서 3일간 교반하면서 불활화 한 후 4℃에 보관하였음.

(4) Adjuvant 확립

(가) Adjuvant 결정 시험

- ① 표 2와 같이 백신보조제 2종류에 따른 시험백신 2종을 제조하여 emulsion type에 따른 특성시험 (pH 측정, 점도측정, 성장관찰) 및 동물 실험을 실시하였음.

[표 2] 소 코로나바이러스 백신보조제 종류에 따른 시험백신 (2종)

	항원량(TCID <sub>50</sub> /dose)	Adjuvant		Emulsion type	비고
Group 1	10 <sup>5.0</sup> ,50%	Type 1	50%	W/O/W	
Group 2	10 <sup>5.0</sup> ,80%	Type 2	20%	O/W	
Group 3	-	-	-	-	음성대조군

- ② 시험결과 소 로타바이러스 시험백신의 pH는 7.67~7.87로 나타났으며

emulsion type에 따른 차이 없이 검정기준 내의 값으로 측정되었음.

- ③ 점도의 경우, emulsion type에 따라 차이가 W/O/W type인 경우 14.4, O/W type인 경우 1~2cP 수준의 낮은 값으로 측정되었음. 즉 emulsion type에 따른 점도의 차이가 있었음(표 3).

[표 3] Emulsion type에 따른 시험 백신의 pH 및 점도

시험백신 조성	Emulsion type	pH	점도(cP)
1 Type 1	W/O/W	7.87	14.4
2 Type 2	O/W	7.67	1.6

(나) Emulsion type에 따른 시험백신의 정상관찰

- ① Type 1과 type 2 백신보조제로 제조한 시험백신 모두 균질한 성상을 보였음.

(다) 실험동물 안전시험

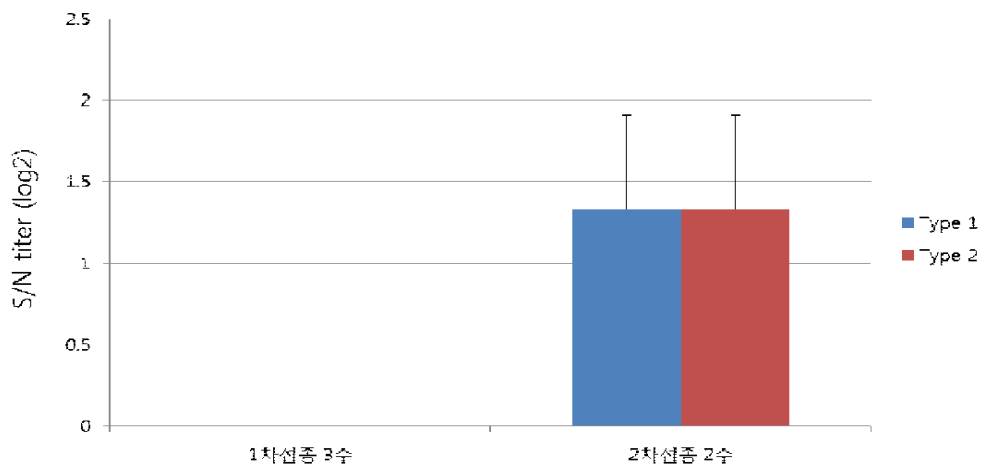
- ① 시험 그룹 모두 접종한 기니픽 모두 생존하였으며 접종부위 이상 증상이 관찰되지 않았음.

바. 소 코로나바이러스 백신 목적동물 혈청역가시험

(1) 중화항체가 시험결과

- (가) 소에 그룹별 1차 접종 3주후, 2차 접종 2주후의 혈청 역가시험을 한 결과, 1차 접종 3주후에는 1배 수준으로 항체가가 형성되지 않았으나, 2차 접종 2주 후에는 모든 그룹에서 2~4배의 항체가가 형성되었음.

(나) Turkey HSD 및 Duncan 통계학적 분석을 통해 시험백신 그룹별 항체가를 비교한 결과, 2그룹간의 유의적 차이가 없는 것으로 판정됨(그림 1).



[그림 1] 소 코로나바이러스 시험백신 소 혈청역가 시험 결과

사. 백신보조제 결정



(1) 위 결과와 생산, 단가 등을 종합적으로 정리해 최종적으로 소 코로나바이러스 백신보조제(adjuvant)는 소 로타바이러스와 동일한 type2로 결정하였음.

아. 일반시험

(1) 소 코로나바이러스 불활화 백신 역시 충분한 충분한 역가를 형성하지 못하는 것으로 판명되었으며, 일반시험은 1 lot만 생산하여 일반 시험을 진행하였음.

[표 4] 일반시험 결과

Lot No.	Date of production	Contents (per 1 dose)	Production quantity (1,000doses /bottle)
T315CO01	2015. 11. 14.	소 코로나바이러스 (KWD-20 주) $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상 Adjuvant ..... 20% 보존제 ..... 0.3% 이하	498

자. 특성 시험

(1) 시험방법

(가) Type 2 adjuvant 소 코로나바이러스 시험백신을 동물용의약품 생물학적 제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-01에 따라 색, 혼탁도, 이물 또는 이취에 대하여 검사하였으며, 현탁 상태를 검사할 때는 지정된 용기에 지정된 희석액을 가하여 가볍게 흔들어서 혼탁도, 색조를 검사하였음.

(2) 시험결과

(가) 백색의 유타주사액으로 이물, 이취 등이 없고 내용물의 성상이 균일하였음(표 5).

[표 5] 시험 백신 특성시험 결과

Lot. No.	Tests				
	Color	Turbidity	Sediment	Foreign substance	Foreign odor
T315CO01	-*	-	-	-	-

\* Normal or negative.

차. 무균 시험

(1) 시험방법

(가) 시험백신을 nutrient agar(NA), nutrient broth(NB), fluid thioglycollate medium(Thio)에 2개의 시험관에 접종하여 22℃와 37℃에서 7일간 배양하면서 잡균의 존재 여부를 관찰하였음.

(2) 시험결과

(가) 어떠한 세균의 발육도 관찰할 수 없었음(표 6).

[표 6] 시험 백신 무균시험 결과

Lot. No.	22℃			37℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
T315CO01	-*	-	-	-	-	-

카. 수소이온농도시험

(1) 시험방법

(가) 시험백신을 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-03 에 따라 시험백신 각 Lot별로 백신의 수소이온농도를 측정하였음.

(2) 시험결과

(가) 수소이온농도는 pH 6.0~8.0 이내임을 확인하였음(표 7).

[표 7] 시험백신 수소 이온 농도 시험 결과

Lot. No.	pH
T315CO01	7.5

타. 방부제 정량시험

(1) 시험방법

(가) 시험백신을 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-09 에 의하여 동물약품공정서의 일반시험법 중 Schiff 시약을 첨가하여 Spectrophotometer를 이용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였음.

(2) 시험결과

(가) 포르말린 함량은 0.3% 이하로 확인되었음(표 8).

[표 8] 시험 백신 방부제 정량시험 결과

Lot. No.	Formalin content(%)
T315CO01	0.11

파. 불활화 확인시험

(1) 시험방법

(가) 불활화 된 바이러스 감염배양액을 원심 한 다음 그 상층액을 투석하여 시험품을 MDBK 세포에 0.1ml씩 각각 접종하고, 대조 세포와 함께 37℃에서 7일간 배양한 후 소 로타바이러스 및 기타 바이러스에 의한 특유의 세포변성 (CPE)가 나타나는지 확인하였음.

(2) 시험결과

(가) 불활화 확인시험 결과 시험백신에서 세포변성효과가 나타나지 않았음(표 9).

[표 9] 시험 백신 불활화 확인 시험 결과

Lot. No.	Cell	Inoculation volumne(ml)	Results
			CPE
T315CO01	MDBK	0.1	-
Control		-	-

### 결론

- 목적동물과 실험동물에서 소 로타바이러스 불활화 백신과 마찬가지로 중화 항체가 미흡한 것으로 판단됨.
- 현재 소 코로나바이러스 백신 시장 역시 생건조 백신에 혼합 백신이 주임.
- 또한 소 코로나바이러스의 불활화 백신 시험 결과 면역원성은 있는 것으로 확인되었으므로 생독백신의 가능성은 높은 것으로 판단됨.
- 따라서 불활화 백신의 추가실험은 배제하고 생독백신의 개발을 하였음.

### 3. 소 코로나바이러스 생건조 백신 전임상 시험

#### 가. Seed 및 배양세포 확립

- (1) 소 코로나바이러스 불활화 백신 개발에서 확립된 배양 방법과 동일함.
- (2) 전남대학교에서 분리한 소 코로나바이러스를 표 1과 같이 백신 Seed의 제조번호를 부여하고 Master, Working, Production seed를 확립하였음.
- (3) 소 코로나바이러스 발생농장 소에서 분리되어 HRT-18G 세포에서 100계대하고, MDBK 세포에서 추가 계대한 것으로 세포내 병원성을 유지하고 있었음.
- (3) MDBK 세포에 접종 2일 후부터 특이적인 CPE를 형성하였으며, 바이러스 증식성은  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml 이상이었음.

[표 10] 소 코로나바이러스 백신 seed 및 배양세포 확립

Strain 명	Seed 제조번호	Cell (제조번호)	Master seed	생산용 종독	Production seed
KWD-20	RD-B-V-030	MDBK (SOP-CM-C07-01)	100th	2계대	102th

#### 나. Seed 제조단위 시스템

- (1) 세포증식용 배양액( $\alpha$ -MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml) 0.1%)에 ml당 15~30만개의 MDBK 세포를 분산시켜 37℃에서 4~5일간 배양한 다음 배양액을 제거한 후 소 코로나바이러스를 0.1 M.O.I 접종하여 37℃에서 1시간 배양한 후 바이러스 증식용 배양액( $\alpha$ -MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml) 0.1%, trypsin 1 $\mu$ g/ml)을 가한 다음 3일간 회전 배양하면서 세포변성효과가 약 80% 이상 일어날 때까지 배양하였음.

다. Master seed

- (1) 106대 계대 된 소 코로나바이러스를 단층이 형성된 MDBK세포에 접종하여 37℃에서 3~4일간 배양한 후, 접종 바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채독하여 -80℃의 냉동고에 동결보존 및 동결건조하여 원종독으로 사용하였음.

라. Production seed

- (1) Master seed와 같은 계대방법으로 2대 계대한 소 코로나바이러스를 단층이 형성된 MDBK세포에 접종하여 37℃에서 3~4일간 배양한 후, 접종바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채독하여 -80℃의 냉동고에 동결건조하여 생산용 종독으로 사용하였음.

마. 배양조건 확립

(1) 바이러스 접종

- (가) MDBK 세포를 세포증식용 배양액에  $\text{ml}$ 당 15~30만개의세포를 분산시킨 후, 37℃에서 4~5일간 배양한 다음 배양 세포가 단층을 형성하였을 때 배양액을 제거한 후 소 코로나바이러스를 0.1 M.O.I 접종하고 37℃에서 1시간 흡착배양한 후 바이러스 증식용 배양액을 넣었음.

(2) 바이러스 배양

- (가) 세포에 바이러스를 접종한 후 37℃에서 3~4일간 배양하였음.

(3) 채독

- (가) 37℃에서 3~4일간 배양한 후 소 코로나바이러스에 의한 세포변성 효과가 약 80%이상 일어났을 때 배양감염액을 채독하였음.

사. 보호제 조성 결정

- (1) 기존 ROCO 백신에서 안정성 및 효능이 입증된 보호제 성분으로 결정하였음(표 11).

[표 11] 소 코로나바이러스 백신 보호제

구성 성분	합량
Lactose	74.62g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.517g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

아. 시험백신 생산

- (1) 동결 건조 형태로 아래와 같이 20병씩 3 lot의 시험백신을 제조하였음.

(2) 바이러스 함량은 기존 ROCO제품의  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub>/1 dose 이상 기준으로 제조하였음(표 12).

[표 12] 소 코로나바이러스 약독화 생건조 시험백신 정보

Lot. No.	MFD*	Contents (per 1 dose)	Quantity (5 doses/vial)
T316Coro-KWD20-Lot1	2016.10.03.	소 코로나 바이러스 KWD20 주 · $10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	20 vials
T316Coro-KWD20-Lot2	2016.10.05.	소 코로나 바이러스 KWD20 주 · $10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	20 vials
T316Coro-KWD20-Lot3	2016.10.07.	소 코로나 바이러스 KWD20 주 · $10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	20 vials

\*MFD: 제조일.

자. 소 코로나바이러스 약독화 시험백신 특성 시험

(1) 시험 방법

(가) 2개 이상의 백신에 대하여 무색 투명한 용기의 백신은 백신 희석액으로 용해하고, 불투명한 용기의 백신은 직경 18~22mm의 무색 투명한 유리용기에 옮겨서 자연광 또는 1,000룩스 이상의 백색 광원하에서 실시하였음.

(2) 시험 결과

(가) 이물, 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하는 등, 시험 결과 모든 시험백신에서 적합 판정을 받았음(표 13).

[표 13] 소 코로나바이러스 약독화 생독백신 특성 시험 결과

Lot	시험	시험방법 및 시험 결과	판정
T316Coro-KWD20-Lot 1	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰	적합
		성상 : 노란백색 용해 후 색조 : 밝은 회분홍색	
	투명도(혼탁도) 시험	투명도 또는 혼탁도 관찰	적합
		성상 : 투명함	
	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰	적합
		성상 : 이물없음 후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부	
이취시험	부 관찰	적합	
	성상 : 이취없음		
내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰	적합	
	성상 : 균일함		
T316Coro-KWD20-Lot 2	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰	적합
		성상 : 노란백색 용해 후 색조 : 밝은 회분홍색	
	투명도(혼탁도) 시험	투명도 또는 혼탁도 관찰	적합
성상 : 투명함			

T316Coro- KWD20-Lot 3	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 정상 : 이물없음	적합
	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 정상 : 이취없음	적합
	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 정상 : 균일함	적합
	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰 정상 : 노란백색 용해 후 색조 : 밝은 회분홍색	적합
	투명도(혼탁도) 시험	투명도 또는 혼탁도 관찰 정상 : 투명함	적합
	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 정상 : 이물없음	적합
	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 정상 : 이취없음	적합
	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 정상 : 균일함	적합

차. 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 진공도 시험

(1) 시험 방법

(가) 암실에서 백신으로부터 5~10mm 떨어진 위치에 테스터코일을 놓고 방전의 유무를 관찰하며, 방전 인정 시 적합함.

(2) 시험 결과

(가) 모든 백신에서 방전이 인정되었음(표 14).

[표 14] 소 로타바이러스 약독화 생독백신 진공도 시험검사 결과

Lot	시험	시험방법	판정
T316Coro- KWD20-Lot1	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합
T316Coro- KWD20-Lot2	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합
T316Coro- KWD20-Lot3	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합

카. 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 수소이온농도 시험

(1) 시험 방법

(가) 각 lot 별 2개의 백신에 대하여 각각 pH측정기를 이용하여 측정하였음.

(2) 시험 결과



(가) 모든 시험 백신에서 판정 기준내의 pH값을 보였음(표 15).

[표 15] 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 수소이온농도 시험결과

Lot	백신	시험방법	시험결과	판정기준	판정
T316Coro-	백신 1	측정기	7.06	6.0~8.0	적합
KWD20-Lot1	백신 2		7.03		적합
T316Coro-	백신 1	(pH/conducti vity meter :	7.12		적합
KWD20-Lot2	백신 2		7.02		적합
T316Coro-	백신 1	METTLER TOLEDO)	7.03		적합
KWD20-Lot3	백신 2		7.08		적합

타. 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 함습도 시험

(1) 시험 방법

- (가) 표준용액으로 함습도 측정하며 1회 측정시 샘플링을 1g 미만으로 측정함.
- (나) 3개의 백신에 대하여 내용물을 신속히 분쇄하여 입자의 직경을 2mm 이하로 하여 10~20mg을 시험에 사용함.
- (다) Karl-Fischer방법을 사용하여 함습도를 측정하며, 3개 중 최고치를 함습도로 인정함(표 16).

[표 16] 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 함습도 시험 방법

Water standard	표준용액 제조번호	허용오차범위	시험결과	시험평균	판정
1	Lot SZBE1320V	water standard	1.00	1.00	적합
2		10.0*	1.00		
3		(0.97%~1.03%)	1.01		

\*Fluka #34849 HYBRANAL Water Standard 10.0. 1.0g 미만으로 측정.

(2) 시험 결과

- (가) 모든 시험 백신에서 최고치가 6%이하로 검출되었음(표 17).

[표 17] 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 함습도 시험 결과

백신 Lot	시험결과	판정기준	판정	
T316Coro- KWD20-Lot1	백신1 백신2 백신3	4.32 4.04 3.97	최고치가 6.0% 이하이어야 함.	적합 적합 적합
T316Coro- KWD20-Lot2	백신1 백신2 백신3	4.31 4.62 3.75		적합 적합 적합
T316Coro- KWD20-Lot3	백신1 백신2 백신3	3.70 4.52 4.17		적합 적합 적합

과. 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 무균 시험

(1) 시험 방법

(가) 시험품의 액상 제제는 그대로, 건조제제는 전용 희석액으로, 전용 희석액이 없는 제제는 멸균된 일반 희석액으로 용해한 후 접종함.

(나) 사용 배지는 tryptic soy agar (TSA), tryptic soy broth (TSB), 0.5% beefextract 첨가된 thioglycollate medium (Thio)를 사용함.

(다) 22℃ 및 32℃ incubator에서 각각 14일간 배양하며 관찰하고 시험 결과 어떠한 세균 및 진균의 발육도 인정되어서는 안됨.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 세균 및 진균 발육이 인정되지 않음(표 18 & 19).

[표 18] 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 무균 시험 결과

백신 종류	22℃			32℃			결과 세균 및 진균 발육 인정 안됨	판정 적합
	TSA	TSB	Thio	TSA	TSB	Thio		
T316Coro-KWD20-Lot1	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Coro-KWD20-Lot2	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Coro-KWD20-Lot3	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합

양성은 “+”, 음성은 “-”로 표기.

[표 19] 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 무균 시험 실험 중 환경 모니터링 결과 (실험 종료 후 배양기에 배지를 배양시킴)

관찰 일자	TSA		R-TAS		SDA		R-SDA		판정
	낙하균		표면균		낙하균		표면균		
	1	2	1	2	1	2	1	2	
1일차	-	-	-	-	-	-	-	-	적합
2일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
3일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
4일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
5일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
6일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
7일차	-	-	-	-	-	-	-	-	

양성은 “+”, 음성은 “-”로 표기.

하. 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 마이코플라즈마 부정시험

(1) 시험 방법

(가) PCR 방법을 이용한 마이코플라즈마 검출 방법을 사용하였으며 PCR산물을 전기영동하여 양성대조군에서는 464bp의 증폭 산물이 관찰되고, 음성대조군에서는 증폭산물이 관찰되지 않으면 이 시험은 적합한 것으로 판정함.

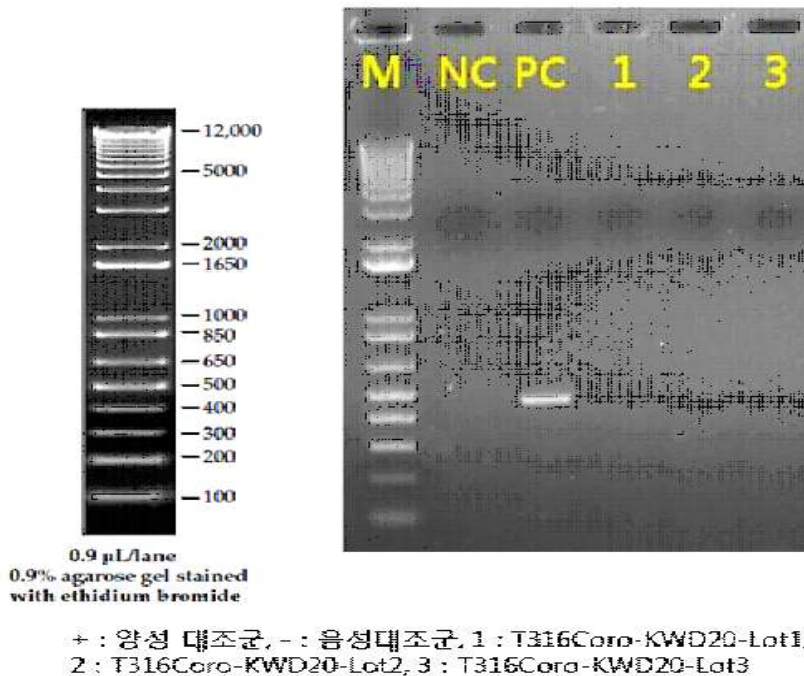
(나) 만약 시험품에서 464bp의 증폭 산물이 관찰되면 직접배양법을 이용하여 마이코플라즈마 분리시험을 실시하여 최종 확인함.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 마이코플라즈마 음성이었음(표 20 & 그림 6).

[표 20] 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 마이코플라즈마 부정시험 결과

백신종류	시험방법	시험결과	판정
T316Coro- KWD20-Lot1	PCR방법	음성	적합
T316Coro- KWD20-Lot2		음성	적합
T316Coro- KWD20-Lot3		음성	적합



[그림 6] 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 시험백신의 마이코 플라즈마 부정 시험 결과.

가. 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 시험백신 미입바이러스 부정시험 (BVDV, CPIV 오염검사)

(1) 시험 방법

(가) 건조 백신을 일반 희석액 1ml로 희석 후 RNA를 추출하여 PCR 검사방법을 사용하여 미입바이러스 부정시험을 실시하였음.

(2) 시험 결과

(가) 모든 백신에서 미입바이러스가 발견되지 않았음(표 21).

[표 21] 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 미입바이러스 부정시험 결과

백신종류	시험방법	검출항원	시험결과	판정
------	------	------	------	----

T316Coro- KWD20-Lot1		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Coro- KWD20-Lot2	PCR방법	BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Coro- KWD20-Lot3		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합

나. 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 시험백신 함량 시험

(1) 시험 방법

(가) 백신을 혼합하여 최종 1두분 (2ml/두)으로 되게 한 후 10진 희석한다. 각 희석액 0.1ml을 MDBK cell에 접종한 후 37℃에서 4~7일간 배양함.

(2) 시험 결과

(가) 시험 결과 모든 시험 백신이 판정기준 이상의 바이러스 함량임을 확인하였음 (표 22).

[표 22] 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 시험백신 함량 시험 결과

백신종류	Virus 함량 (10 <sup>x</sup> TCID <sub>50</sub> /1dose)	판정기준	판정
T316Coro- KWD20-Lot1	5.7	국검 : ≥10 <sup>5.0</sup>	적합
T316Coro- KWD20-Lot2	6.0	자검 : ≥10 <sup>5.5</sup>	적합
T316Coro- KWD20-Lot3	6.0	TCID <sub>50</sub> /dose	적합

다. 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 안전시험

(1) 시험방법

(가) 소 코로나바이러스 백신주를 각각 20병씩 3lot 제작하였음.

(나) 동결 건조 시험백신의 바이러스 함량은 기존에 판매되고 있는 ROCO제품의 10<sup>5.0</sup> TCID<sub>50</sub> 이상 기준으로 제조하였음(표 23).

(다) 각각의 백신주를 마우스, 기니픽, 소의 복강, 극육에 각각 접종하였음.

[표 23] 소 코로나바이러스 백신주 정보

Lot. No.	Date manufactured	Contents (per 1 dose)	Quantity (25 doses/vial)
T316Coro- KWD20-Lot1	2016.10.03.	Bovine coronavirus KWD20 strain ..... Over 10 <sup>4.0</sup> TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Coro- KWD20-Lot2	2016.10.05.	Bovine coronavirus KWD20 strain ..... Over 10 <sup>4.0</sup> TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Coro- KWD20-Lot3	2016.10.07.	Bovine coronavirus KWD20 strain ..... Over 10 <sup>4.0</sup> TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials

(2) 시험결과

(가) 안전성 검사에 사용한 마우스, 기니픽, 소에 각각의 백신주 혹은 혼합백신주를 복강, 근육 등의 경로를 통해 접종한 결과 접종부위 이상 증상 등 어떠한 임상증상 없이 생존하여 안전성이 확인되었음(표 24).

[표 24] 소 코로나바이러스 약독화 백신주의 안전성 검사결과

Species	Lot No.	Route of administration	No. of animals	Amount of vaccine	Clinical signs
Mice	T316Coro-KWD20-Lot1	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316Coro-KWD20-Lot1	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316Coro-KWD20-Lot1	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
Guinea pigs	T316Coro-KWD20-Lot1	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Coro-KWD20-Lot1	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Coro-KWD20-Lot1	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Coro-KWD20-Lot1	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Coro-KWD20-Lot1	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Coro-KWD20-Lot1	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Coro-KWD20-Lot1	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
Cows	T316Coro-KWD20-Lot1	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316Coro-KWD20-Lot1	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316Coro-KWD20-Lot1	Intra-muscle	2	10 ml	None

라. 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 혈청 역가 시험

(1) 시험방법

(가) 기니픽 10마리 중 8마리는 접종군, 2마리는 대조군으로 하였음.  
 (나) 백신주를 접종군에 투여하였음.

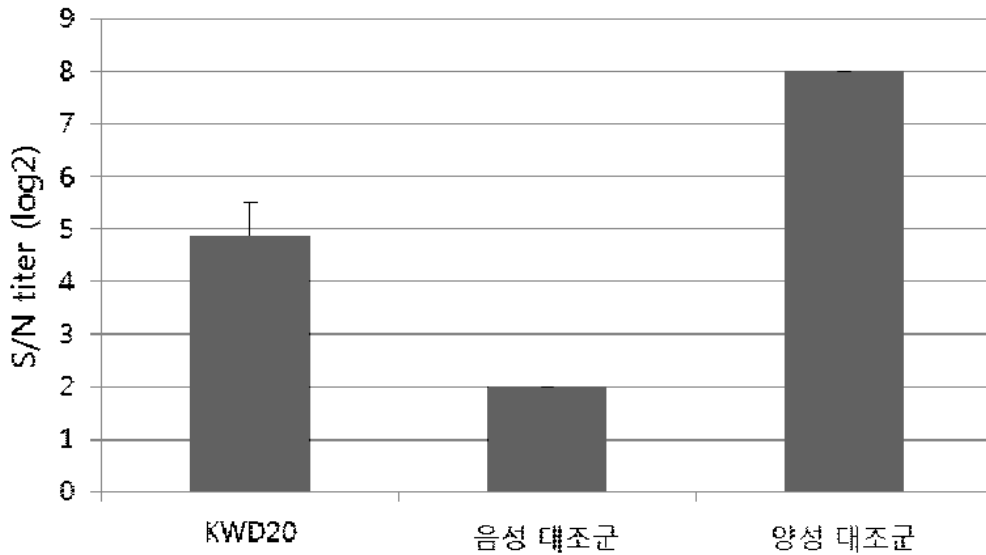
(2) 시험결과

(가) 백신주를 단독으로 접종 시  $2^{4.879 \pm 0.64}$ 배의 혈청 중화 항체 역가를 보였음.  
 (나) 이는 농림축산검역본부의 검정기준인  $2^3$ 배를 모두 넘어 각각의 백신주는 생독 백신 균주로서 적합함을 시사함(표 25 & 그림 6).

[표 25] 시판 백신주, 본 연구에서 개발한 각각의 백신주 혹은 혼합백신주를 투여한 기니픽의 로타바이러스에 대한 혈청 중화항체가

Strain name used for immunization	Animal No.	Serum neutralizing antibody titer (log2) to
		KWD20 strain
KWD20	1	5
	2	5
	3	4
	4	5
	5	5
	6	4
	7	6
	8	5
	Average	4.875
	Standard deviation	0.64

Serum from non-immunized animals	1	2
	2	2
Serum from animals immunized with commercialized vaccine strain	1	8
	2	8



[그림 6] 백신주를 투여한 기니픽의 소 코로나바이러스에 대한 혈중 중화항체가.

마. 소 코로나바이러스 생건조 백신 전임상 시험 종합

- (1) 소 코로나바이러스 생건조 백신의 시험 결과 모든 시험백신의 안정성이 확보되었으며 항체 역가가 우수하게 확인되었음.
- (2) 하지만 현재 소 코로나바이러스 단독으로 제품이 출시되었을 경우 시판되고 있는 ROCO백신과 경쟁성을 갖기가 어려울 것으로 판단됨.
- (3) 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신이 안전성과 항체 역가 측면에서 우수한 결과를 보였으므로, 다음에 기술한 바와 같이 소 로타바이러스와 혼합 백신을 생산하여 4종의 혼합 생건조 백신과 비교하여 최종적인 백신을 개발하였음.



### 3절. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 전임상 시험

#### 1. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 전임상 시험

##### 가. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신 seed 및 배양세포 확립

- (1) 앞선 실험 결과 소 로타바이러스 3개 약독주 혼합백신과 소 코로나바이러스 단독 시험 결과 검정 기준 이상의 혈청 역가를 보였고, 안전 시험에서 모두 좋은 결과를 얻어 4개 약독화 바이러스를 혼합한 4종의 생건조 혼합 백신을 제조하였음.
- (2) 백신 seed 및 배양 세포 확립은 앞의 내용과 동일함(표 1).

[표 1] 소 로타바이러스, 코로나바이러스 백신 seed 및 배양세포 확립

Strain	Seed 제조번호	Cell (제조번호)	Master seed	생산용 종독	Production seed
KJ11	RD-B-V-006	TF(SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th
KJ19-2	RD-B-V-012	TF(SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th
KJ44	RD-B-V-018	TF(SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th
KWD20	RD-B-V-030	MDBK (SOP-CM-C07-01)	100th	2계대	102th

##### 나. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신 보호제 조성 결정

- (1) 기존 ROCO 백신에서 안정성 및 효능이 입증된 보호제 성분을 사용하였음(표 2).

[표 2] 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신 보호제

구성 성분	합량
Lactose	74.62g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.517g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

##### 다. 시험백신 생산

- (1) 동결 건조 형태로 아래와 같이 3 lot의 시험백신을 제조하였음.
- (2) 바이러스 함량은 기존 ROCO제품과 같이 로타바이러스는 10<sup>5.0</sup> TCID<sub>50</sub>/1 dose 이상, 코로나바이러스는 10<sup>4.0</sup> TCID<sub>50</sub>/1 dose 이상 기준으로 제조하였음(표 3).

[표 3] 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신 시험백신 정보

Lot. No.	MFD*	Contents (per 1 dose)	Quantity (5 doses/vial)
T3163ROCO -Lot1	2016.12.26	소 로타 바이러스 KJ11 주 ..... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상	100 vials
		소 로타 바이러스 KJ19-2 주 ..... 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상	
		소 로타 로타 바이러스 KJ44 주 · 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> 이상	

T3163ROCO -Lot2	2016.12.27	소 코로나 바이러스 KWD20 주	$10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상	200 vials
		보호제	적량	
		소 로타 바이러스 KJ11 주	$10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상	
		소 로타 바이러스 KJ19-2 주	$10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상	
		소 로타 로타 바이러스 KJ44 주	$10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상	
		소 코로나 바이러스 KWD20 주	$10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상	
		보호제	적량	
T3163ROCO -Lot3	2016.12.28	소 로타 바이러스 KJ11 주	$10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상	200 vials
		소 로타 바이러스 KJ19-2 주	$10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상	
		소 로타 로타 바이러스 KJ44 주	$10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상	
		소 코로나 바이러스 KWD20 주	$10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상	
		보호제	적량	

\*MFD: 제조일.

라. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 시험백신 특성 시험

(1) 시험 방법

(가) 2개 이상의 백신에 대하여 무색 투명한 용기의 백신은 백신 희석액으로 용해하고, 불투명한 용기의 백신은 직경 18~22mm의 무색 투명한 유리용기에 옮겨서 자연광 또는 1,000룩스 이상의 백색 광원하에서 실시하였음.

(2) 시험 결과

(가) 이물, 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하는 등, 시험 결과 모든 시험백신에서 적합 판정을 받았음(표 4).

[표 4] 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 4종 혼합백신 특성 시험 결과

Lot	시험	시험방법 및 시험 결과	판정
T3163ROCO -Lot1	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰	적합
		성상 : 노란백색 용해 후 색조 : 밝은 회분홍색	
	투명도(혼탁도) 시험	투명도 또는 혼탁도 관찰	적합
		성상 : 투명함	
	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰	적합
T3163ROCO -Lot2	이취시험	성상 : 이물없음 후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰	적합
		성상 : 이취없음	
	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰	적합
		성상 : 균일함	
T3163ROCO -Lot2	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰	적합
		성상 : 노란백색	

		용해 후 색조 : 밝은 회분홍색	
	투명도(혼탁도) 시험	투명도 또는 혼탁도 관찰 정상 : 투명함	적합
	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 정상 : 이물없음	적합
	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 정상 : 이취없음	적합
	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 정상 : 균일함	적합
	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰 정상 : 노란백색	적합
	투명도(혼탁도) 시험	용해 후 색조 : 밝은 회분홍색 투명도 또는 혼탁도 관찰 정상 : 투명함	적합
T3163ROCO-Lot3	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 정상 : 이물없음	적합
	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 정상 : 이취없음	적합
	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 정상 : 균일함	적합

마. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 진공도 시험

(1) 시험 방법

(가) 암실에서 백신으로부터 5~10mm 떨어진 위치에 테스트코일을 놓고 방전의 유무를 관찰하며, 방전 인정 시 적합함.

(2) 시험 결과

(가) 모든 백신에서 방전이 인정되었음(표 5).

[표 5] 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 4종 혼백신 진공도 시험검사 결과

Lot	시험	시험방법	판정
T3163ROCO-Lot1	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합
T3163ROCO-Lot2	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합
T3163ROCO-Lot3	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합

바. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 수소이온농도 시험

(1) 시험 방법

(가) 각 lot 별 2개의 백신에 대하여 각각 pH측정기를 이용하여 측정하였음.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 판정 기준내의 pH값을 보였음(표 6).

[표 6] 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 수소이온농도 시험결과

Lot	백신	시험방법	시험결과	판정기준	판정		
T3163ROCO-Lot1	백신 1	측정기 (pH/condu ctivity meter :	7.00	6.0~8.0	적합		
	백신 2		7.07		적합		
T3163ROCO-Lot2	백신 1	METTLER TOLEDO)	7.02		6.0~8.0	적합	
	백신 2		7.15			적합	
T3163ROCO-Lot3	백신 1		7.07			6.0~8.0	적합
	백신 2		7.03				적합

사. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 함습도 시험

(1) 시험 방법

(가) 표준용액으로 함습도 측정하며 1회 측정시 샘플링을 1g 미만으로 측정함.

(나) 3개의 백신에 대하여 내용물을 신속히 분쇄하여 입자의 직경을 2mm 이하로 하여 10~20mg을 시험에 사용함.

(다) Karl-Fischer방법을 사용하여 함습도를 측정하며, 3개 중 최고치를 함습도로 인정함(표 7).

[표 7] 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 함습도 시험 방법

Water standard	표준용액 제조번호	허용오차범위	시험결과	시험평균	판정
1	Lot SZBE1320V	water standard	1.00	1.00	적합
2		10.0*	1.00		
3		(0.97%~1.03%)	1.01		

\*Fluka #34849 HYBRANAL Water Standard 10.0. 1.0g 미만으로 측정.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 최고치가 6%이하로 검출되었음(표 8).

[표 8] 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 함습도 시험 결과

백신 Lot	시험결과	판정기준	판정
T3163ROCO-Lot 1	백신1 4.22	최고치가 6.0%	적합
	백신2 4.72	이하이어야 함.	적합

	백신3	3.94	적합
T3163ROCO-Lot 2	백신1	3.71	적합
	백신2	3.89	적합
	백신3	4.13	적합
T3163ROCO-Lot 3	백신1	4.15	적합
	백신2	4.03	적합
	백신3	4.07	적합

아. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 무균 시험

(1) 시험 방법

(가) 시험품의 액상 제제는 그대로, 건조제제는 전용 희석액으로, 전용 희석액이 없는 제제는 멸균된 일반 희석액으로 용해한 후 접종함.

(나) 사용 배지는 tryptic soy agar (TSA), tryptic soy broth (TSB), 0.5% beefextract 첨가된 thioglycollate medium (Thio)를 사용함.

(다) 22℃ 및 32℃ incubator에서 각각 14일간 배양하며 관찰하고 시험 결과 어떠한 세균 및 진균의 발육도 인정되어서는 안됨.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 세균 및 진균 발육이 인정되지 않음(표 9 & 10).

[표 9] 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 무균 시험 결과

백신 종류	22℃			32℃			결과 세균 및 진균 발육 인정 안 됨	판정 적합
	TSA	TSB	Thio	TSA	TSB	Thio		
T3163ROCO-Lot1	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안 됨	적합
T3163ROCO-Lot2	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안 됨	적합
T3163ROCO-Lot3	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안 됨	적합

양성은 “+”, 음성은 “-”로 표기.

[표 10] 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 무균 시험 실험 중 환경 모니터링 결과 (실험 종료 후 배양기에 배지를 배양시킴)

관찰 일자	TSA		R-TAS		SDA		R-SDA		판정
	낙하균		표면균		낙하균		표면균		
	1	2	1	2	1	2	1	2	
1일차	-	-	-	-	-	-	-	-	적합
2일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
3일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
4일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
5일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
6일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
7일차	-	-	-	-	-	-	-	-	

양성은 “+”, 음성은 “-”로 표기.

자. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 마이코플라즈마 부정 시험

(1) 시험 방법

(가) PCR 방법을 이용한 마이코플라즈마 검출 방법을 사용하였으며 PCR산물을 전기영동하여 양성대조군에서는 464bp의 증폭 산물이 관찰되고, 음성대조군에서는 증폭산물이 관찰되지 않으면 이 시험은 적합한 것으로 판정함.

(나) 만약 시험품에서 464bp의 증폭 산물이 관찰되면 직접배양법을 이용하여 마이코플라즈마 분리시험을 실시하여 최종 확인함.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 마이코플라즈마 음성이었음(표 11).

[표 11] 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 마이코플라즈마 부정시험 결과

백신종류	시험방법	시험결과	판정
T3163ROCO-Lot1	PCR방법	음성	적합
T3163ROCO-Lot2		음성	적합
T3163ROCO-Lot3		음성	적합

차. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 시험백신 미입바이러스 부정시험 (BVDV, CPIV 오염검사)

(1) 시험 방법

(가) 건조 백신을 일반 희석액 1ml로 희석 후 RNA를 추출하여 PCR 검사방법을 사용하여 미입바이러스 부정시험을 실시하였음.

(2) 시험 결과

(가) 모든 백신에서 미입바이러스가 발견되지 않았음(표 12).

[표 12] 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 미입바이러스 부정시험 결과

백신종류	시험방법	검출항원	시험결과	판정
T3163ROCO-Lot1	PCR방법	BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T3163ROCO-Lot2		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T3163ROCO-Lot3		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합



카. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 시험백신 함량 시험

(1) 시험 방법

(가) 백신을 혼합하여 최종 1두분 (2ml/두)으로 되게 한 후 10진 희석한다. 각 희석액 0.1ml을 MA104 cell과 MDBK cell에 각각 접종한 후 37℃에서 4~7일간 배양함.

(2) 시험 결과

(가) 시험 결과 모든 시험 백신이 판정기준 이상의 바이러스 함량임을 확인하였음 (표 13).

[표 13] 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 시험백신 함량 시험 결과

백신종류	Virus 함량 (10 <sup>x</sup> TCID <sub>50</sub> /dose)		판정기준	판정
T3163ROCO-Lo t1	Rotavirus	6.9	국검 : ≥105.0 자검 : ≥105.5 TCID <sub>50</sub> /dose	적합
	Coronavirus	6.0		
T3163ROCO-Lo t2	Rotavirus	7.0	TCID <sub>50</sub> /dose	적합
	Coronavirus	5.7		
T3163ROCO-Lo t3	Rotavirus	7.3		적합
	Coronavirus	6.0		

타. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 안전시험

(1) 시험방법

(가) 소 로타바이러스, 코로나바이러스 4종 혼합백신을 500병씩 3lot 제작하였음.

(나) 동결 건조 시험백신의 바이러스 함량은 기존에 판매되고 있는 ROCO제품과 같이 로타바이러스는 10<sup>5.0</sup> TCID<sub>50</sub>/1 dose 이상, 코로나바이러스는 10<sup>4.0</sup> TCID<sub>50</sub>/1 dose 이상 기준으로 제조하였음(표 14).

(다) 각각의 백신주를 마우스, 기니픽, 소의 복강, 극육에 각각 접종하였음.

[표 14] 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 정보

Lot. No.	Date manufactured	Contents (per 1 dose)	Quantity (25 doses/vial)
T3163ROCO- Lot1	2016.12.01.	Bovine rotavirus KJ11 strain	Over 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub>
		Bovine rotavirus KJ19-2 strain	Over 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub>
		Bovine rotavirus KJ44 strain	Over 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub>
		Bovine coronavirus KWD20 strain	Over 10 <sup>4.0</sup> TCID <sub>50</sub>
		Stabilizer	Suitable amount
T3163ROCO- Lot2	2016.12.05.	Bovine rotavirus KJ11 strain	Over 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub>
		Bovine rotavirus KJ19-2 strain	Over 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub>
		Bovine rotavirus KJ44 strain	Over 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub>
		Bovine coronavirus KWD20 strain	Over 10 <sup>4.0</sup> TCID <sub>50</sub>

		Stabilizer .....	Suitable amount	
		Bovine rotavirus KJ11 strain .....	Over 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
		Bovine rotavirus KJ19-2 strain .....	Over 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
T3163ROCO-Lot3	2016.12.07.	Bovine rotavirus KJ44 strain .....	Over 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub>	500 vials
		Bovine coronavirus KWD20 strain .....	Over 10 <sup>4.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
		Stabilizer .....	Suitable amount	

(2) 시험결과

(가) 안전성 검사에 사용한 마우스, 기니픽, 소에 혼합백신을 복강, 근육 등의 경로를 통해 접종한 결과 접종부위 이상 증상 등 어떠한 임상증상 없이 생존하여 안전성이 확인되었음(표 15).

[표 15] 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신주의 안전성 검사결과

Species	Lot No.	Route of administration	No. of animals	Amount of vaccine	Clinical signs
Mouse	T3163ROCO-Lot1	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T3163ROCO-Lot2	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T3163ROCO-Lot3	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
Guinea pig	T3163ROCO-Lot1	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T3163ROCO-Lot2	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T3163ROCO-Lot3	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T3163ROCO-Lot1	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T3163ROCO-Lot2	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T3163ROCO-Lot3	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
Cow	T3163ROCO-Lot1	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T3163ROCO-Lot2	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T3163ROCO-Lot3	Intra-muscle	2	10 ml	None

파. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 혈청 역가 시험

(1) 시험방법

(가) 기니픽 10마리 중 8마리는 접종군, 2마리는 대조군으로 하였음.

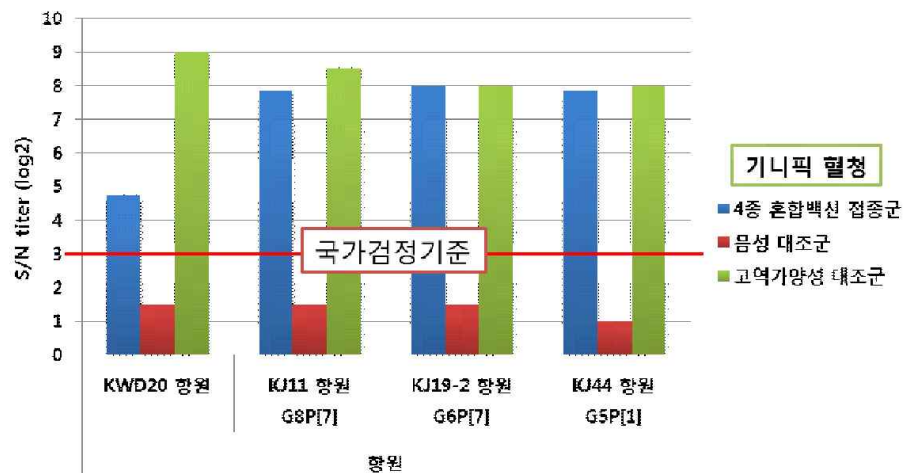
(나) 백신주를 접종군에 투여하였음.

(2) 시험결과

(가) 혼합백신주를 접종 시 소 코로나바이러스 KWD20에 대한 항체 역가는 2<sup>4.75±0.71</sup>배, KJ19-2 로타바이러스에 대한 항체 역가는 2<sup>6±0.76</sup>배, KJ44 로타바이러스에 대한 항체 역가는 2<sup>7.88±0.83</sup>배, KJ11 로타바이러스에 대한 항체 역가는 2<sup>7.88±0.83</sup>배의 혈청 중화 항체 역가를 보여 4종의 생독 혼합 백신은 모든 항원에 대한 농립축 산검역본부의 검정기준인 2<sup>3</sup>배를 모두 넘어 각각의 백신주는 생독 혼합백신 균주로서 적합함을 시사함(표 16 & 그림 1).

[표 16] 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신주를 투여한 기니픽의 로타바이러스에 대한 혈중 중화항체가

Strain name used for immunization	Animal No.	Serum neutralizing antibody titer (log2) to			
		KWD20	KJ11 (G8P[7])	KJ19-2 (G6P[7])	KJ44 (G5P[1])
Tetravalent vaccine mixed with KWD20, KJ11, KJ19-2 and KJ44 strains	1	4	8	8	7
	2	5	7	7	7
	3	5	8	8	8
	4	6	7	9	7
	5	4	7	8	9
	6	5	9	7	9
	7	5	8	8	8
	8	4	9	9	8
	Average	4.75	7.875	8	7.875
	Standard deviation	0.707	0.835	0.756	0.835
Serum from non-immunized animals	1	1	2	2	1
	2	2	1	1	1
	Average	1.5	1.5	1.5	1
	Standard deviation	0.71	0.71	0.71	0
Serum from animals immunized with high doses of commercialized vaccine strain	1	9	8	8	8
	2	9	9	8	8
	Average	9	8.5	8	8
	Standard deviation	0	0.707	0	0



[그림 1] 혼합백신주를 투여한 기니픽의 소 코로나바이러스 및 3종의 로타바이러스에 대한 혈중 중화항체가.

하. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 주의 송아지에서 안전성 및 효능 평가 시험

- (1) 송아지에서 로타바이러스 백신주의 안전성 및 공격접종에 의한 설사 예방 평가
  - (가) 앞서 기술한 바와 같이 각각의 백신주의 초대 분리주를 초유를 급여하지 않은 신생 송아지를 이용하여 설사 유발 반수유효량 (ED<sub>50</sub>)을 결정되었음.
  - (나) 초유를 급여하지 않은 신생 송아지에 각각의 초대 병원성 분리주의 ED<sub>50</sub>의

100에 해당하는 백신주 역가를 각각 3두씩에 구강으로 접종하여 2주간 임상증상을 확인하였지만, 설사를 비롯한 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았음.

(다) 백신주를 투여한 송아지에서는 백신주 투여 후 6-7일 정도 분변을 통해 바이러스가 배출이 RT-PCR 기법을 통해 확인되었음.

(라) 이상의 결과를 요약하면, 비록 백신주에 의해 바이러스가 배출은 관찰되었지만 설사 등 임상증상이 관찰되지 않아 안전성이 있다고 결론지을 수 있음.

[표 17] 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 내 각 로타바이러스 백신주 접종 및 이에 대한 공격접종에 의한 임상증상, 분변을 통한 바이러스 배출 검사 결과

Vaccine strain	Calf No.	Vaccination (inoculated at 2-day-old)		Challenge (inoculated at 14 days post-vaccination)	
		Occurrence of diarrhea	RT-PCR onset (duration)	Occurrence of diarrhea	RT-PCR onset (duration)
G8P[7] KJ11	1	None	1(6)	None	14(3)
	2	None	1(7)	None	14(3)
	3	None	1(7)	None	14(5)
G6P[7] KJ19-2	4	None	1(7)	None	14(3)
	5	None	1(6)	None	14(4)
	6	None	1(6)	None	14(3)
G5P[1] KJ44	7	None	1(6)	None	14(3)
	8	None	1(7)	None	14(5)
	9	None	1(7)	None	14(4)
Mock-inoculated	10	None	None	None	None
	11	None	None	None	None
	12	None	None	None	None

(라) 또한 각각의 백신주를 접종 후 2주 뒤 각 분리주의 분리 원주인 병원성 분리주의 ED<sub>50</sub> 100배 역가에 해당되는 바이러스를 각각 공격접종하였지만, 설사를 비롯한 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았음. 하지만 백신 접종 후 공격접종한 바이러스가 정상 분변에서 3~5일 정도 검출되었음.

(라) 이상의 결과를 요약하면, 각각의 약독화 생독 백신주는 병원성 원주에 대한 공격접종에 대해 설사를 성공적으로 방어하는 등 그 효능이 입증되었다고 결론지을 수 있음.

(2) 송아지에서 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신주의 안전성 및 공격접종에 의한 설사 예방 평가

(가) 앞서 기술한 바와 같이 각각의 백신주의 초대 분리주를 초유를 급여하지 않은 신생 송아지를 이용하여 설사 유발 반수유효량 (ED<sub>50</sub>)을 결정되었음.

(나) 초유를 급여하지 않은 신생 송아지에 소 코로나바이러스 초대 병원성 분리주의 ED<sub>50</sub>의 100에 해당하는 백신주를 각각 3두씩에 구강으로 접종하여 2주간 임상증상을 확인하였지만, 설사를 비롯한 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았음.

(다) 이상의 결과를 요약하면, 백신주에 의한 설사 등 임상증상이 관찰되지 않아 안전성이 있다고 결론지을 수 있음.

(라) 또한 백신주 접종 후 백신원주의 공격접종에 의한 설사가 발생하지 않아, 백신의 효능이 있음을 확인할 수 있었음.

[표 18] 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 내 소 코로나바이러스 백신주 접종 및 이에 대한 공격접종에 의한 임상증상, 분변을 통한 바이러스 배출 검사 결과

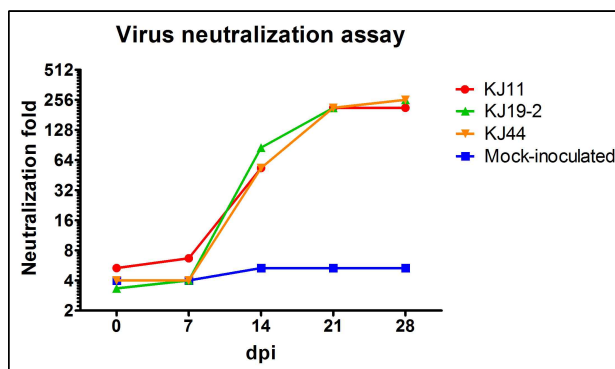
Vaccine strain	Calf No.	Vaccination (inoculated at 2-day-old)		Challenge (inoculated at 14 days post-vaccination)	
		Occurrence of diarrhea	RT-PCR onset (duration)	Occurrence of diarrhea	RT-PCR onset (duration)
KWD20V-102	1	None	1(3)	None	14(2)
	2	None	1(3)	None	14(3)
	3	None	1(4)	None	14(3)
Mock-inoculated	4	None	None	None	None
	5	None	None	None	None
	6	None	None	None	None

(3) 송아지에서 소 로타바이러스 및 코로나바이러스 약독화 생건조 백신주 및 공격주에 의해 유발된 항체가 검사 결과

(가) 소 로타바이러스 백신주에 의해 유발된 혈청 중화항체가 검사결과

- ① 각각의 백신주를 접종 및 공격바이러스를 접종 후 1주 간격으로 혈청을 채취하여 혈청 중화항체를 검사하였음.
- ② 백신 후보주 KJ11, KJ19-2 및 KJ44를 접종 후 1주까지는 음성대조군과 비교하여  $2^{2-3}$  배의 낮은 수준의 항체를 유지하였으나 2주 후부터는 모든 동물에서  $2^{5-8}$  배 이상의 중화혈청 배수를 보여주었음.
- ③ 즉, 각각의 백신주에 의해 중화항체가 유발된 후, 바이러스의 공격접종에 의해 그 역가가 증가(boosting) 되었음을 보여준 것임.

(나) 소 코로나바이러스 백신주에 의해 유발된 혈청 중화항체가 검사결과



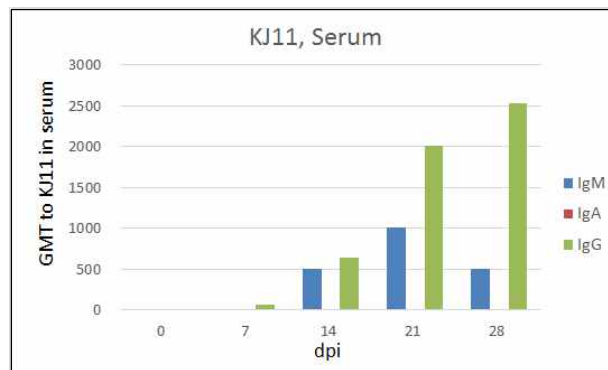
[그림 2] 혼합백신주 내 각 로타바이러스 백신주 및 공격접종에 의해 유발된 송아지 혈청 중화항체가.

- ① 백신주를 접종 및 공격바이러스를 접종 후 1주 간격으로 혈청을 채취하여 혈청 중화항체를 검사하였음.

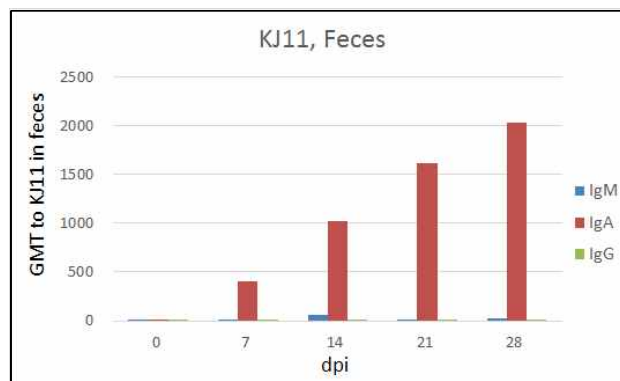
- ② 백신 후보주 KWD20V-102를 접종 후 1주까지는 음성대조군과 비교하여  $2^{2\sim3}$  배의 낮은 수준의 항체가를 유지하였으나 2주 후부터는 모든 동물에서  $2^{5\sim8}$ 배 이상의 중화혈청 배수를 보여주었음.
- ③ 즉, 백신주에 의해 중화항체가가 유발된 후, 바이러스의 공격접종에 의해 그 역가가 증가(boosting) 되었음을 보여준 것임.

(다) ELISA를 통한 혈중 및 분변 내 항체가 검사결과

- ① 소 로타바이러스 KJ11 백신주 및 공격접종에 의해 유발된 혈중 및 분변의 항체가



[그림 3] 혼합백신주 내 로타바이러스 백신주 KJ11 주 및 공격접종에 의해 유발된 송아지 혈청 항체가.



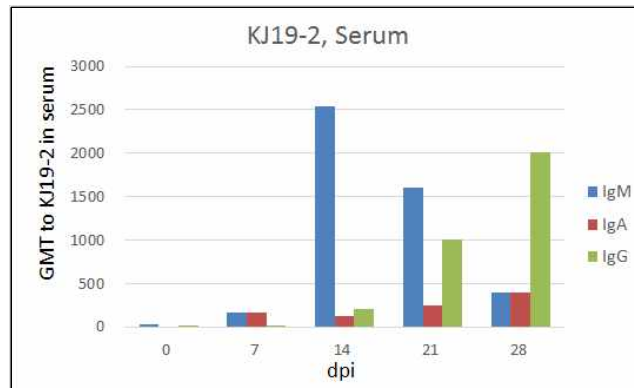
[그림 4] 혼합백신주 내 로타바이러스 백신주 KJ11 주 및 공격접종에 의해 유발된 송아지 분변 내 항체가.

- 소 로타바이러스 KJ11 백신주 접종 후 혈중 내 IgM, IgG 및 IgA 항체가 중 IgM은 백신접종 후 2주경부터 관찰된 후 3주후까지 증가된 후 감소하는 경향을 보였음.
- 반면에 IgG 항체가는 백신 접종 후 7일경부터 관찰된 후 지속적으로 증가하였음.
- 하지만 혈중 IgA 항체가는 관찰되지 않았음.

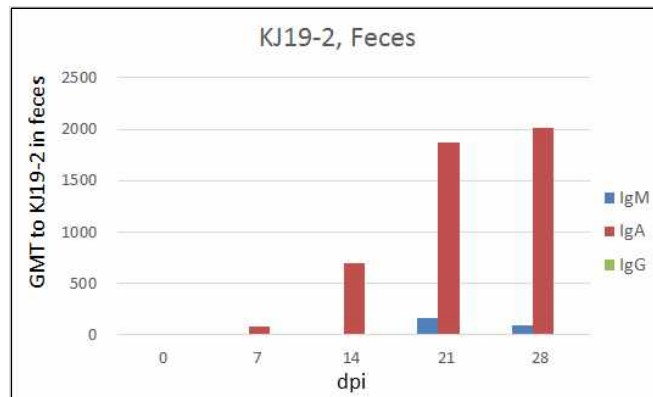


- 분변에서의 소 로타바이러스 KJ11주에 특이적인 항체를 검사한 결과 IgA가 백신 접종 후 1주부터 관찰된 후 지속적으로 증가되었음.
- 하지만 IgM 및 IgG의 항체는 분변 내에서 거의 관찰되지 않았음.

② 소 로타바이러스 KJ19-2 백신주 및 공격접종에 의해 유발된 혈중 및 분변의 항체가



[그림 5] 혼합백신주 내 로타바이러스 백신주 KJ19-2 주 및 공격접종에 의해 유발된 송아지 혈청 항체가.

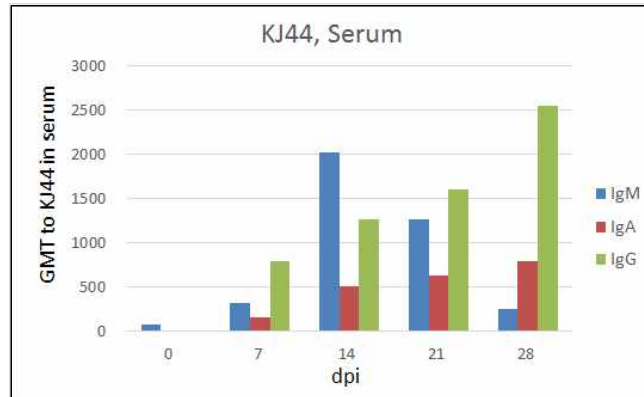


[그림 6] 혼합백신주 내 로타바이러스 백신주 KJ19-2 주 및 공격접종에 의해 유발된 송아지 분변 내 항체가.

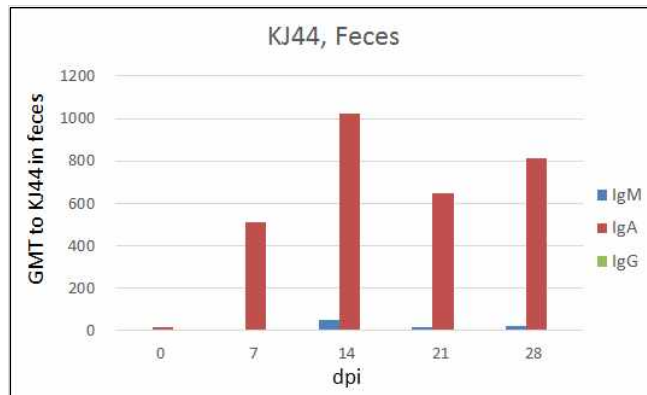
- 소 로타바이러스 KJ19-2 백신주 접종 후 혈중 내 IgM, IgG 및 IgA 항체가 중 IgM은 백신접종 후 1주경부터 관찰된 후 2주후까지 증가된 후 이 후 감소하는 경향을 보였음.
- 반면에 IgG 항체는 백신 접종 후 2주경부터 관찰된 후 지속적으로 증가하였음.
- 하지만 혈중 IgA 항체는 백신 접종 후 1주부터 관찰되어 4주까지 약간 증가되었음.
- 분변에서의 소 로타바이러스 KJ19-2주에 특이적인 항체를 검사한 결과 IgA가 백신 접종 후 1주부터 관찰된 후 지속적으로 증가되었음.

- 하지만 IgG의 항체가는 분변 내에서 관찰되지 않았고, IgM은 3주 및 4주에서 약간 관찰되었음.

③ 소 로타바이러스 KJ44 백신주 및 공격접종에 의해 유발된 혈중 및 분변의 항체가



[그림 7] 혼합백신주 내 로타바이러스 백신주 KJ44 주 및 공격접종에 의해 유발된 송아지 혈청 항체가.



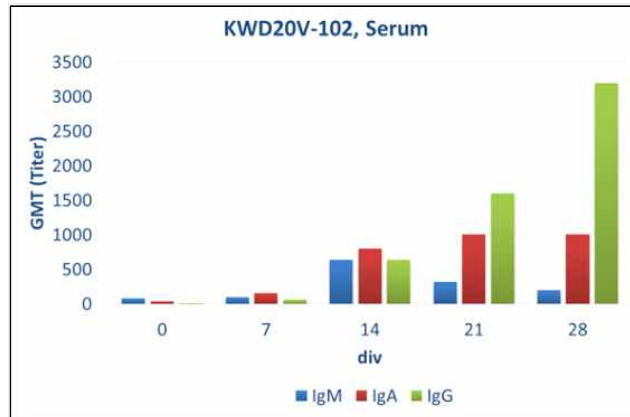
[그림 8] 혼합백신주 내 로타바이러스 백신주 KJ44 주 및 공격접종에 의해 유발된 송아지 분변 내 항체가.

- 소 로타바이러스 KJ44 백신주 접종 후 혈중 내 IgM, IgG 및 IgA 항체가 중 IgM은 백신접종 후 1주경부터 관찰된 후 2주후까지 증가된 후 감소하는 경향을 보였음.
- 반면에 IgG 항체가는 백신 접종 후 1주 짜부터 관찰된 후 지속적으로 증가하였음.
- 하지만 혈중 IgA 항체가는 백신 접종 후 1주째부터 관찰되어 4주째까지 증가하는 경향을 보였지만, IgG 및 IgM 항체가에 비해서 상대적으로 낮았음.
- 분변에서의 소 로타바이러스 KJ44주에 특이적인 항체가를 검사한 결과 IgA가 백신 접종 후 1주부터 관찰된 후 4주째까지 높은 항체가를 유지하였음.
- 하지만 IgM 및 IgG의 항체가는 분변 내에서 거의 관찰되지 않았음.
- 이상의 결과를 요약하면, 백신주 및 공격접종에 의해 혈중 내 IgM 및 IgG 항

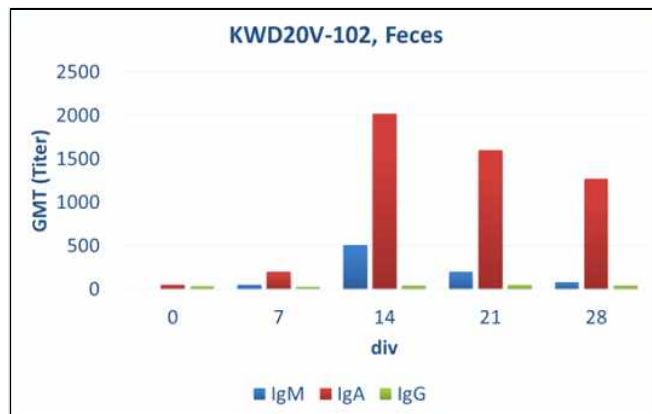
체가가 높게 형성되었으며, 이는 로타바이러스의 혈액을 통한 전파를 차단할 수 있다는 것을 암시하였음.

- 뿐만 아니라 장관 내 로타바이러스 증화에 중심적인 역할을 하는 분비형 IgA는 각각의 소 로타바이러스 백신주의 구강 접종에 의해 7일경부터 높게 관찰되어, 공격주를 효과적으로 방어할 수 있게 함을 알 수 있었음.

④ 소 코로나바이러스 KWD20 백신주 및 공격접종에 의해 유발된 혈중 및 분변의 항체가



[그림 9] 혼합백신주 내 코로나바이러스 백신주 KWD20 주 및 공격접종에 의해 유발된 송아지 혈청 항체가.



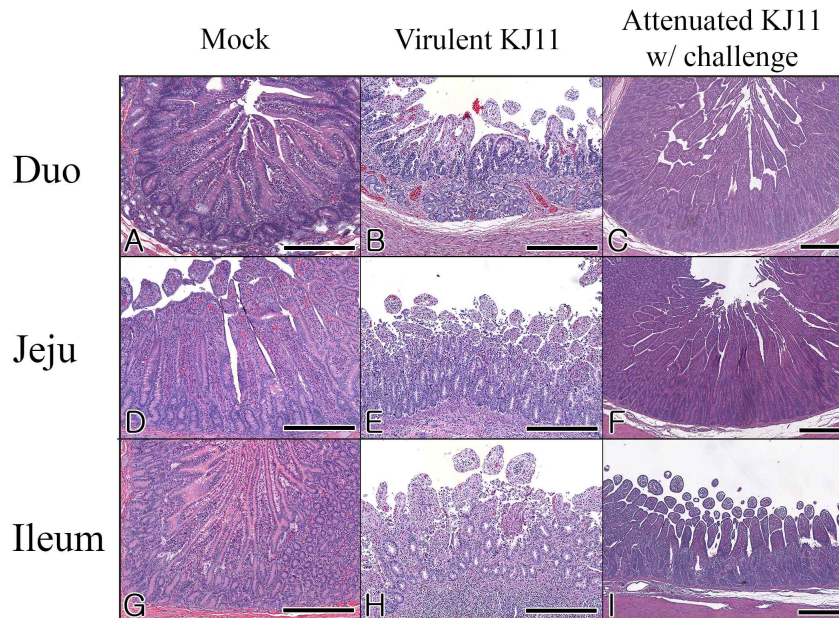
[그림 10] 혼합백신주 내 코로나바이러스 백신주 KWD20 주 및 공격접종에 의해 유발된 송아지 분변 내 항체가.

- 소 코로나바이러스 KWD20V-102 백신주 접종 후 초대 병원성주의 공격접종에 의해 유발된 혈중 및 분변 내의 소 코로나바이러스 항체가를 ELISA 기법을 통해 검사하였음.
- 소 코로나바이러스 KWD20V-102 백신주 접종 후 혈중 내 IgM, IgG 및 IgA 항체가 중 IgM은 백신접종 후 1주경부터 관찰된 후 2까지는 증가하다 3주경부터 감소하였음.
- 소 코로나바이러스에 대한 혈중 IgA 항체가가도 백신접종 후 1주부터 관찰되

어 실험 종료시까지 증가하는 경향이 있었음.

- 반면에 IgG 항체가는 백신 접종 후 14일경부터 관찰된 후 지속적으로 증가하였음.
- 분변에서의 소 코로나바이러스 KWD20주에 특이적인 항체를 검사한 결과 IgM이 백신 접종 후 2주에 증가 후 점차 감소하였으며, IgG의 항체가는 분변 내에서 거의 관찰되지 않았음.
- 하지만 IgA는 백신 접종 후 1주부터 관찰되어 2주경에는 급격히 상승 후, 실험종료때까지 높게 형성되어 있었음.
- 이상의 결과를 요약하면, 백신주 및 공격접종에 의해 혈중 내 IgM 및 IgG 항체가가 높게 형성되었으며, 이는 코로나바이러스의 혈액을 통한 전파를 차단할 수 있다는 것을 암시하였음.
- 뿐만 아니라 장관 내 코로나바이러스 중화에 중심적인 역할을 하는 분비형 IgA는 각각의 소 코로나바이러스 백신주의 구강 접종에 의해 7일경부터 높게 관찰되어, 공격주를 효과적으로 방어할 수 있게 함을 알 수 있었음.

(4) 송아지에서 소 로타바이러스 및 코로나바이러스 약독화 생건조 백신주 및 공격주에 의해 유발된 소장 병변 완화효과



[그림 11] 송아지에서 소 로타바이러스 KJ11주 약독화 생건조 백신주 및 공격주 공격접종에 의해 유발된 소장 병변 완화효과.

(가) KJ11 백신주 접종 후 동일 백신원주의 공격접종에 의한 소장 병변 지수

- ① 백신주인 KJ11주를 송아지에 접종 후 2주 후에 백신원주를 공격접종한 후 소장의 병변을 병리조직학적으로 검사하였음.
- ② 그 결과 백신 및 백신원주를 접종하지 않은 경우 소장에서는 어떠한 병변도

관찰되지 않았음.

- ③ 하지만 소장 병원성이 있는 백신원주를 접종하여 접종 후 7일 경에 부검을 통하여 병리조직학적 검사를 수행한 결과 십이지장, 공장 및 회장의 용모는 심하게 위축되고 융합되었으며, 음와는 심하게 증식되어 있었음.
- ④ KJ11 백신주를 접종 후 2주 경에 병원성 백신원주를 공격접종한 경우, 십이지장, 공장 및 회장에서 용모의 위축 및 융합과 음와의 증식은 현저히 감소되었음.
- ⑤ 즉, 약독화 생독 백신인 소 로타바이러스 K11 백신주는 같은 병원성 원주의 공격접종에 의한 소장의 병변을 예방하는 효과가 있음을 알 수 있었음.

[표 19] 송아지에서 소 로타바이러스 KJ11주 약독화 생건조 백신주 및 공격주 공격접종에 의해 유발된 소장 병변 완화효과

Strain	Calf No.	DPI <sup>b</sup> at euthanasia	Duodenum	Jejunum	Ileum
			Lesion score <sup>c</sup>	Lesion score <sup>c</sup>	Lesion score <sup>c</sup>
Mock-inoculated <sup>a</sup>	1	28	0.2	0	0.2
	2	28	0.2	0.2	0.4
	3	28	0	0	0.4
Virulent KJ11	4	7	3.2	3.0	3.8
	5	7	3.4	3.6	3.8
	6	7	3.4	3.6	3.6
Vaccination orally with attenuated	7	28	1.8	1.2	2.0
	8	28	1.2	1.4	1.8
KJ11 vaccine and challenge	9	28	1.4	1.4	1.8

<sup>a</sup>Inoculated with serum-free α-MEM.

<sup>b</sup>DPI: Days post-inoculation.

<sup>c</sup>The small intestinal changes were scored according to the average villi/crypt (V/C) ratio plus the grade of epithelial cell desquamation, which was measured as follows: V/C ratio, 0 = normal (V/C ≥ 6:1), 1 = mild (V/C = 5.0 to 5.9:1), 2 = moderate (V/C = 4.0 to 4.9:1), 3 = marked (V/C = 3.0 to 3.9:1), 4 = severe (V/C ≤ 3.0:1) and desquamation grade, 0 = normal (no desquamation), 1 = mild (cuboidal attenuation of tip villous epithelium), 2 = moderate (desquamation of upper villous epithelium), 3 = marked (desquamation of lower villous epithelium), 4 = severe (desquamation of crypt epithelium).

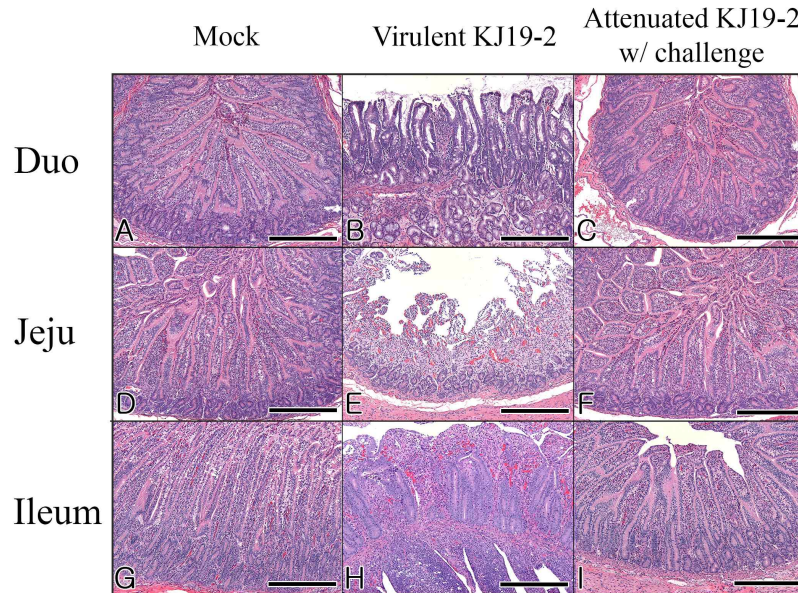
(나) KJ19-2 백신주 접종 후 동일 백신원주의 공격접종에 의한 소장 병변 지수

- ① 백신주인 KJ19-2를 송아지에 접종 후 2주 후에 백신원주를 공격접종한 후 소장의 병변을 병리조직학적으로 검사하였음.
- ② 그 결과 백신 및 백신원주를 접종하지 않은 경우 소장에서는 어떠한 병변도 관찰되지 않았음.
- ③ 하지만 소장 병원성이 있는 백신원주를 접종하여 접종 후 7일 경에 부검을 통하여 병리조직학적 검사를 수행한 결과 십이지장, 공장 및 회장의 용모는



심하게 위축되고 융합되었으며, 음와는 심하게 증식되어 있었음.

- ④ KJ19-2 백신주를 접종 후 2주 경에 병원성 백신원주를 공격접종한 경우, 십이지장, 공장 및 회장에서 용모의 위축 및 융합과 음와의 증식은 현저히 감소되었음.
- ⑤ 즉, 약독화 생독 백신인 소 로타바이러스 K19-2 백신주는 같은 병원성 원주의 공격접종에 의한 소장의 병변을 예방하는 효과가 있음을 알 수 있었음.



[그림 12] 송아지에서 소 로타바이러스 KJ19-2주 약독화 생건조 백신주 및 공격주 공격접종에 의해 유발된 소장 병변 완화효과.

[표 20] 송아지에서 소 로타바이러스 KJ19-2주 약독화 생건조 백신주 및 공격주 공격접종에 의해 유발된 소장 병변 완화효과

Strain	Calf No.	DPI <sup>b</sup> at euthanasia	Duodenum	Jejunum	Ileum
			Lesion score <sup>c</sup>	Lesion score <sup>c</sup>	Lesion score <sup>c</sup>
Mock-inoculated <sup>a</sup>	1	28	0.2	0	0.4
	2	28	0.4	0.4	0.4
	3	28	0	0.2	0.2
Virulent KJ19-2	4	7	3.4	3.4	3.6
	5	7	3.6	3.8	3.8
Attenuated KJ19-2 strain and Challenge of its virulent strain	6	7	3.4	3.4	3.8
	7	28	1.2	1.2	1.6
	8	28	1.4	1.2	2.0
	9	28	1.4	1.6	1.8

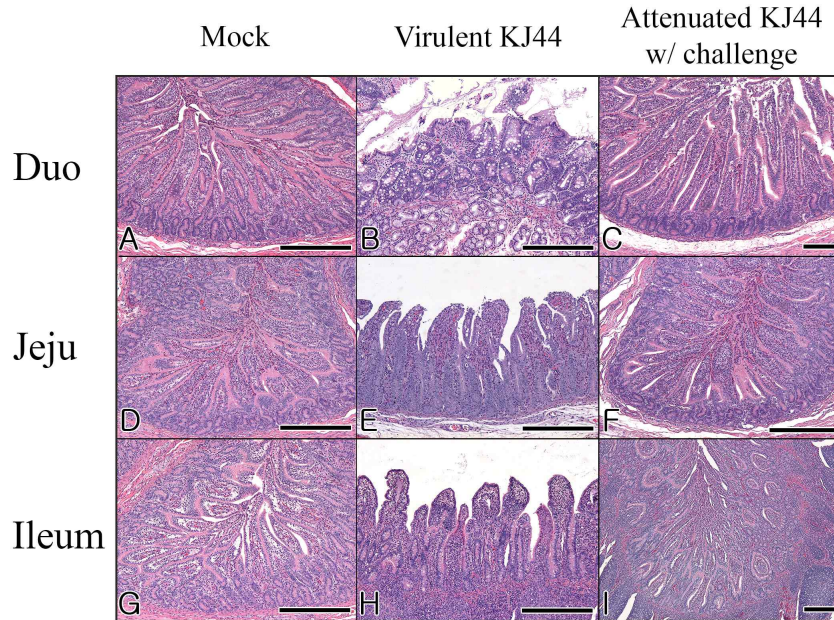
<sup>a</sup>Inoculated with serum-free α-MEM.

<sup>b</sup>DPI: Days post-inoculation.

<sup>c</sup>The small intestinal changes were scored according to the average villi/crypt (V/C) ratio plus the grade of epithelial cell desquamation, which was measured as follows: V/C ratio, 0 = normal (V/C ≥ 6:1), 1 = mild (V/C = 5.0 to 5.9:1), 2 = moderate (V/C = 4.0 to 4.9:1), 3 = marked (V/C = 3.0 to 3.9:1), 4 = severe (V/C ≤ 3.0:1) and desquamation grade, 0 = normal (no desquamation), 1 = mild (cuboidal attenuation of tip villous epithelium), 2 = moderate (desquamation of upper villous epithelium), 3 =

marked (desquamation of lower villous epithelium), 4 = severe (desquamation of crypt epithelium).

(다) KJ44 백신주 접종 후 동일 백신원주의 공격접종에 의한 소장 병변 지수



[그림 13] 송아지에서 소 로타바이러스 KJ44주 약독화 생건조 백신주 및 공격주 공격접종에 의해 유발된 소장 병변 완화효과.

- ① 백신주인 KJ44를 송아지에 접종 후 2주 후에 백신원주를 공격접종한 후 소장의 병변을 병리조직학적으로 검사하였음.
- ② 그 결과 백신 및 백신원주를 접종하지 않은 경우 소장에서는 어떠한 병변도 관찰되지 않았음.
- ③ 하지만 소장 병원성이 있는 백신원주를 접종하여 접종 후 7일 경에 부검을 통하여 병리조직학적 검사를 수행한 결과 십이지장, 공장 및 회장의 용모는 심하게 위축되고 융합되었으며, 음와는 심하게 증식되어 있었음.
- ④ KJ44 백신주를 접종 후 2주 경에 병원성 백신원주를 공격접종한 경우, 십이지장, 공장 및 회장에서 용모의 위축 및 융합과 음와의 증식은 현저히 감소되었음.
- ⑤ 즉, 약독화 생독 백신인 소 로타바이러스 KJ44 백신주는 같은 병원성 원주의 공격접종에 의한 소장의 병변을 예방하는 효과가 있음을 알 수 있었음.

[표 21] 송아지에서 소 로타바이러스 KJ44주 약독화 생건조 백신주 및 공격주 공격접종에 의해 유발된 소장 병변 완화효과

Strain	Calf No.	DPI <sup>b</sup> at euthanasia	Duodenum	Jejunum	Ileum
			Lesion score <sup>c</sup>	Lesion score <sup>c</sup>	Lesion score <sup>c</sup>
Mock-	1	28	0	0.2	0.2



inoculated <sup>a</sup>	2	28	0.2	0	0.2
	3	28	0.2	0.4	0.4
	4	7	3.4	3.4	3.6
Virulent KJ44	5	7	3.6	3.8	3.8
	6	7	3.4	3.4	3.8
	7	28	1.2	1.2	1.6
Attenuated KJ44 strain and then Challenge of its virulent strain	8	28	1.4	1.2	2.0
	9	28	1.4	1.6	1.8

<sup>a</sup>Inoculated with serum-free α-MEM.

<sup>b</sup>DPI: Days post-inoculation.

<sup>b</sup> The small intestinal changes were scored according to the average villi/crypt (V/C) ratio plus the grade of epithelial cell desquamation, which was measured as follows: V/C ratio, 0 = normal (V/C ≥ 6:1), 1 = mild (V/C = 5.0 to 5.9:1), 2 = moderate (V/C = 4.0 to 4.9:1), 3 = marked (V/C = 3.0 to 3.9:1), 4 = severe (V/C ≤ 3.0:1) and desquamation grade, 0 = normal (no desquamation), 1 = mild (cuboidal attenuation of tip villous epithelium), 2 = moderate (desquamation of upper villous epithelium), 3 = marked (desquamation of lower villous epithelium), 4 = severe (desquamation of crypt epithelium).

(마) 소 코로나바이러스 KWD20 백신주 접종 후 동일 백신원주의 공격접종에 의한 소장 병변 지수

- ① 백신주인 KWD20을 송아지에 접종 후 2주 후에 백신원주를 공격접종한 후 소장의 병변을 병리조직학적으로 검사하였음.
- ② 그 결과 백신 및 백신원주를 접종하지 않은 경우 소장에서는 어떠한 병변도 관찰되지 않았음.
- ③ 하지만 소장 병원성이 있는 백신원주를 접종하여 접종 후 7일 경에 부검을 통하여 병리조직학적 검사를 수행한 결과 십이지장, 공장 및 회장의 용모는 심하게 위축되고 융합되었으며, 음와는 심하게 증식되어 있었음.
- ④ KWD20 백신주를 접종 후 2주 경에 병원성 백신원주를 공격접종한 경우, 십이지장, 공장 및 회장에서 용모의 위축 및 융합과 음와의 증식은 현저히 감소되었음.
- ⑤ 즉, 약독화 생독 백신인 소 로타바이러스 KWD20 백신주는 같은 병원성 원주의 공격접종에 의한 소장의 병변을 예방하는 효과가 있음을 알 수 있었음.

[표 22] 송아지에서 소 코로나바이러스 KWD20주 약독화 생건조 백신주 및 공격주 공격접종에 의해 유발된 소장 병변 완화효과

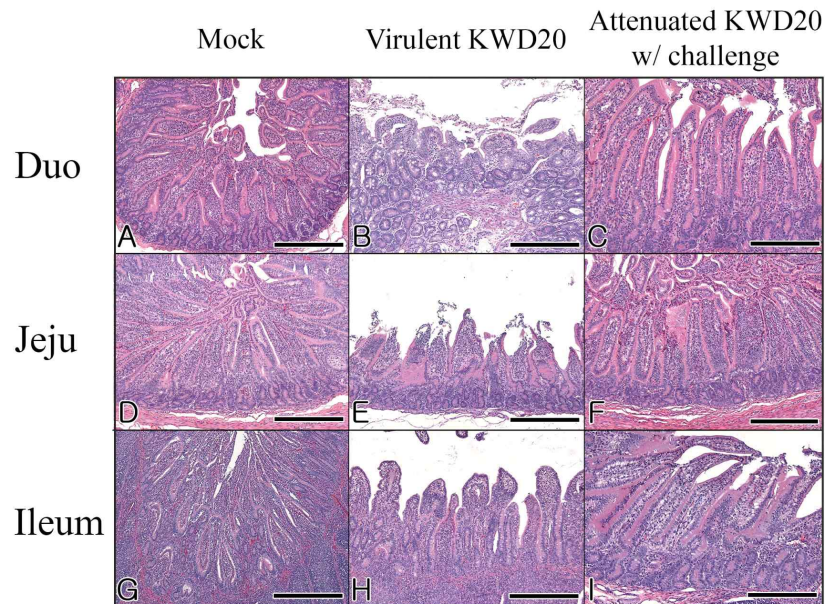
Strain	Calf No.	DPI <sup>b</sup> at euthanasia	Duodenum	Jejunum	Ileum
			Lesion score <sup>c</sup>	Lesion score <sup>c</sup>	Lesion score <sup>c</sup>
Mock-inoculated <sup>a</sup>	1	28	0	0	0.2
	2	28	0	0.2	0.4
	3	28	0	0.2	0.2
Virulent KWD20	4	7	3.5	3.6	3.6
	5	7	3.1	3.2	3.8
	6	7	3.3	3.4	3.8

Vaccination with	7	28	1.2	1.2	1.4
KWD20V-102 and	8	28	1.4	1.4	1.6
challenge exposure	9	28	1.2	1.4	2.0
with KWD20					

<sup>a</sup>Inoculated with serum-free  $\alpha$ -MEM.

<sup>b</sup>DPI: Days post-inoculation.

<sup>b</sup> The small intestinal changes were scored according to the average villi/crypt (V/C) ratio plus the grade of epithelial cell desquamation, which was measured as follows: V/C ratio, 0 = normal ( $V/C \geq 6:1$ ), 1 = mild ( $V/C = 5.0$  to  $5.9:1$ ), 2 = moderate ( $V/C = 4.0$  to  $4.9:1$ ), 3 = marked ( $V/C = 3.0$  to  $3.9:1$ ), 4 = severe ( $V/C \leq 3.0:1$ ) and desquamation grade, 0 = normal (no desquamation), 1 = mild (cuboidal attenuation of tip villous epithelium), 2 = moderate (desquamation of upper villous epithelium), 3 = marked (desquamation of lower villous epithelium), 4 = severe (desquamation of crypt epithelium).



[그림 14] 송아지에서 소 코로나바이러스 KWD20주 약독화 생건조 백신주 및 공격주 공격접종에 의해 유발된 소장 병변 완화효과.

(5) 송아지에서 소 로타바이러스 및 코로나바이러스 약독화 생건조 백신주 병원성 복귀 시험

(가) 소 로타바이러스 약독화 생건조 백신의 병원성 복귀 시험

- ① 소 로타바이러스 백신주인 KJ11, KJ19-2, KJ44 백신주가 혼합된 3가 백신주를 생후 3일령의 무균자우에 총 다섯 번의 in vivo 계대를 수행하였음.
- ② 첫 번째 접종에서는 3가 약독화 생혼합 백신주를  $1 \times 10^{6.0}$  FFU/1 ml 역가로 조정하여, 각각의 백신주별로 무균자우 1마리에 구강을 통하여 접종하였음.
- ③ 접종 5일 후에 안락사를 실시하여 부검을 통해 소장 및 분변을 채취하고 채취된 소장 및 분변시료는 1% 겐타마이신이 포함된 PBS에 섞은 후 (10%, w/v) 소장은 곱게 갈고 분변은 진탕을 하여 잘 섞어주었음.
- ④ 이 후 소장 및 분변은 1000 g에서 10분간 원심분리를 통하여 상층액을 수거 후, 소장 및 분변 상층액을 동량 섞은 다음 여과 ( $0.2 \mu\text{m}$ )하여 cell cultured

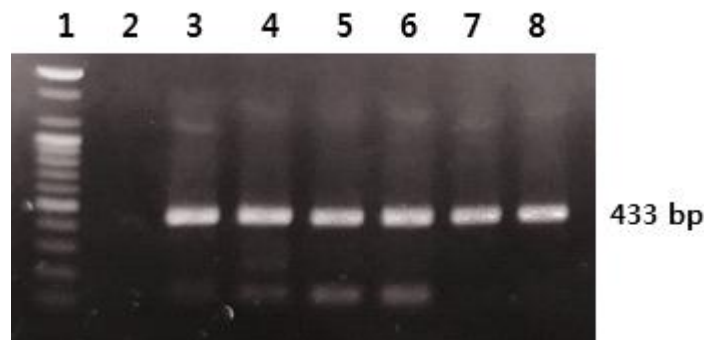
immunofluorescence (CCIF) assay를 통해 바이러스 역가를 측정하였음.

- ⑤ 이 후 상술한 소장 및 분변 상층 혼합액 내의 로타바이러스 역가를 초대 백신주 접종 역가와 동일하게  $10^{6.0}$  FFU/1 ml로 조정하여  $1 \times 10^{6.0}$  FFU/1 ml의 로타바이러스가 포함된 소장 및 분변 상층 혼합액 ( $1 \times 10^{6.0}$  FFU/1 ml)을 무균자우 1두에 구강 접종한 후, 접종 5일 후에 안락사를 실시하여 부검을 통해 소장 및 분변을 채취하였음.
- ⑥ 위 과정을 상술한 바와 같이 총 5회 반복하였음.
- ⑦ 총 5회 반복 투여 시 설사를 포함한 어떤 임상증상도 관찰되지 않았음.

[표 23] 소 로타바이러스 약독화 생건조 3종 혼합백신의 송아지에서 병원성 복귀 검사 결과(임상증상)

Strains	Route	No. of animals (each passages)	Clinical signs				
			(No. of diarrhetic animals/No. of passaged animals)				
			1st passage	2nd passage	3rd passage	4th passage	5th passage
KJ11V-80, KJ19-2V-80, KJ44V-80	Oral route	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

- ⑦ 총 5회 반복 투여 시 5일 째의 분변을 채취하여 RT-PCR을 통해 바이러스 유전자 검사를 수행한 결과, 첫 번째계대부터 다섯 번째 계대까지 지속적으로 바이러스 RNA가 검출되었음.



[그림 16] 소 로타바이러스 약독화 생건조 3종 혼합백신의 송아지에서 병원성 복귀 검사결과(분변을 통한 바이러스 배출)

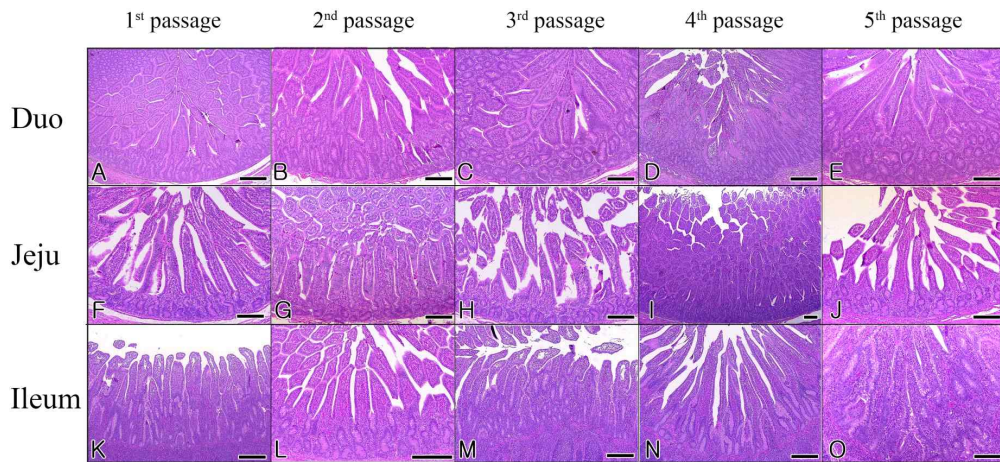
- ⑧ 총 5회 반복 투여 시 5일 째의 분변 및 소장을 섞어, 바이러스 역가를 CCIF 검사를 통해 측정한 결과, 계대를 거치면서 분변을 통한 백신주의 배출이 관찰되었음.

[표 24] 소 로타바이러스 약독화 생건조 3종 혼합백신의 송아지에서 병원성 복귀 검사

결과(분변을 통한 바이러스 배출)

Strains	Type of Samples	Titer (FFU/ml)				
		1st passage	2nd passage	3rd passage	4th passage	5th passage
KJ11V-80,	Small intestine and	2.5 *	3.7 *	3.2 *	2.6 *	1.8 *
KJ19-2V-80,	Feces	106	106	106	106	106
KJ44V-80						

⑨ 총 5회 반복 투여 후 각 계대별로 송아지를 안락사 시킨 후, 소장의 병리조직학적 소견을 관찰하였음. 다섯 번의 계대기간동안 소장에서는 경도의 음와의 증식 및 융모의 위축만이 관찰되었음.



[그림 17] 소 로타바이러스 약독화 생건조 3종 혼합백신의 송아지에서 병원성 복귀 검사결과(소장 병변 조직 검사)

[표 25] 소 로타바이러스 약독화 생건조 3종 혼합백신의 송아지에서 병원성 복귀 검사결과(소장 조직 검사결과)

Strains	Calf No.	DPI <sup>b</sup> at euthanasia	Duodenum	Jejunum	Ileum
			Lesion score <sup>c</sup>	Lesion score <sup>c</sup>	Lesion score <sup>c</sup>
1st passage of a trivalent vaccine	1	5	0	0.2	0.5
2nd passage of a trivalent vaccine	2	5	0.3	0.3	0.6
3rd passage of a trivalent vaccine	3	5	0	3.8	0.3
4th passage of a trivalent vaccine	4	5	0.4	0.4	0.2
5th passage of a trivalent vaccine	5	5	0.2	0.4	0.6

<sup>a</sup>Inoculated with serum-free α-MEM.

<sup>b</sup>DPI: Days post-inoculation.

<sup>c</sup>The small intestinal changes were scored according to the average villi/crypt (V/C)

ratio plus the grade of epithelial cell desquamation, which was measured as follows: V/C ratio, 0 = normal (V/C $\geq$ 6:1), 1 = mild (V/C = 5.0 to 5.9:1), 2 = moderate (V/C = 4.0 to 4.9:1), 3 = marked (V/C = 3.0 to 3.9:1), 4 = severe (V/C  $\leq$ 3.0:1) and desquamation grade, 0 = normal (no desquamation), 1 = mild (cuboidal attenuation of tip villous epithelium), 2 = moderate (desquamation of upper villous epithelium), 3 = marked (desquamation of lower villous epithelium), 4 = severe (desquamation of crypt epithelium).

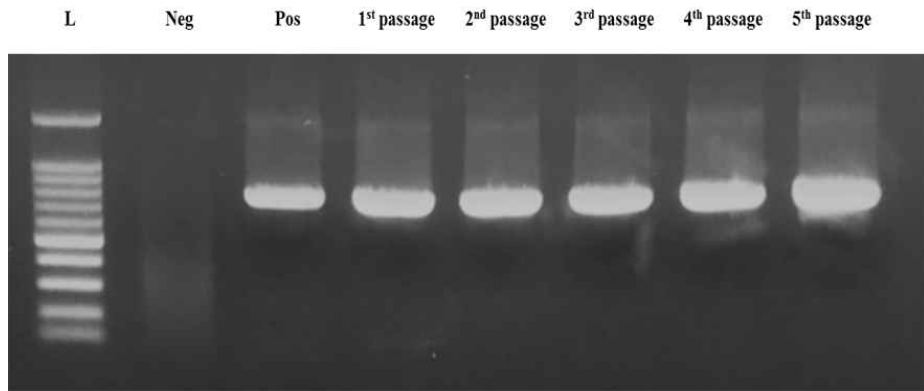
(나) 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신의 병원성 복귀 시험

- ① 소 코로나바이러스 백신주인 KWD20V-102 백신주를 생후 3일령의 신생송아지에 총 다섯 번의 in vivo 계대를 수행하였음.
- ② 첫 번째 접종에서는 약독화 생백신주를 1 x 10<sup>5.0</sup> FFU/1 ml 역가로 조정하여, 각각의 백신주별로 무균자우 1마리에 구강을 통하여 접종하였음.
- ③ 접종 5일 후에 안락사를 실시하여 부검을 통해 소장 및 분변을 채취하고 채취된 소장 및 분변시료는 1% 겐타마이신이 포함된 PBS에 섞은 후 (10%, w/v) 소장은 곱게 갈고 분변은 진탕을 하여 잘 섞어주었음.
- ④ 이 후 소장 및 분변은 1000 g에서 10분간 원심분리를 통하여 상층액을 수거 후, 소장 및 분변 상층액을 동량 섞은 다음 여과 (0.2  $\mu$ m)하여 cell cultured immunofluorescence (CCIF) assay를 통해 바이러스 역가를 측정하였음.
- ⑤ 이 후 상술한 소장 및 분변 상층 혼합액 내의 코로나바이러스 역가를 초대 백신주 접종 역가와 유사하게 3.3 x 10<sup>4</sup> FFU/ ml로 조정하여 10<sup>5.0</sup> FFU의 코로나바이러스가 포함된 소장 및 분변 상층 혼합액 (1 x 10<sup>5.0</sup> FFU/3 ml)을 신생송아지 1두에 구강 접종한 후, 접종 5일 후에 안락사를 실시하여 부검을 통해 소장 및 분변을 채취하였음.
- ⑥ 위 과정을 상술한 바와 같이 총 5회 반복하였음.
- ⑦ 총 5회 반복 투여 시 설사를 포함한 어떤 임상증상도 관찰되지 않았음.

[표 26] 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신(KWD20V-102)의 송아지에서 병원성 복귀 검사결과(소장 조직 검사결과)

Strains	Route of administration	No. of animals (each passages)	Clinical signs (No. of diarrheic animals/No. of passaged animals)				
			1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	4 <sup>th</sup>	5 <sup>th</sup>
			passage	passage	passage	passage	passage
KWD20V-102	Oral route	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

- ⑧ 총 5회 반복 투여 시 5일 째의 분변을 채취하여 RT-PCR을 통해 바이러스 유전자 검사를 수행한 결과, 첫 번째 계대부터 다섯 번째 계대까지 지속적으로 바이러스 RNA가 검출되었음.



L: Ladder  
 Neg; Negative control  
 Pos: Positive control (KWD20V-102)

[그림 18] 소 코로나바이러스 약독화 생건조 3종 혼합백신의 송아지에서 병원성 복귀 검사결과(분변을 통한 바이러스 배출)

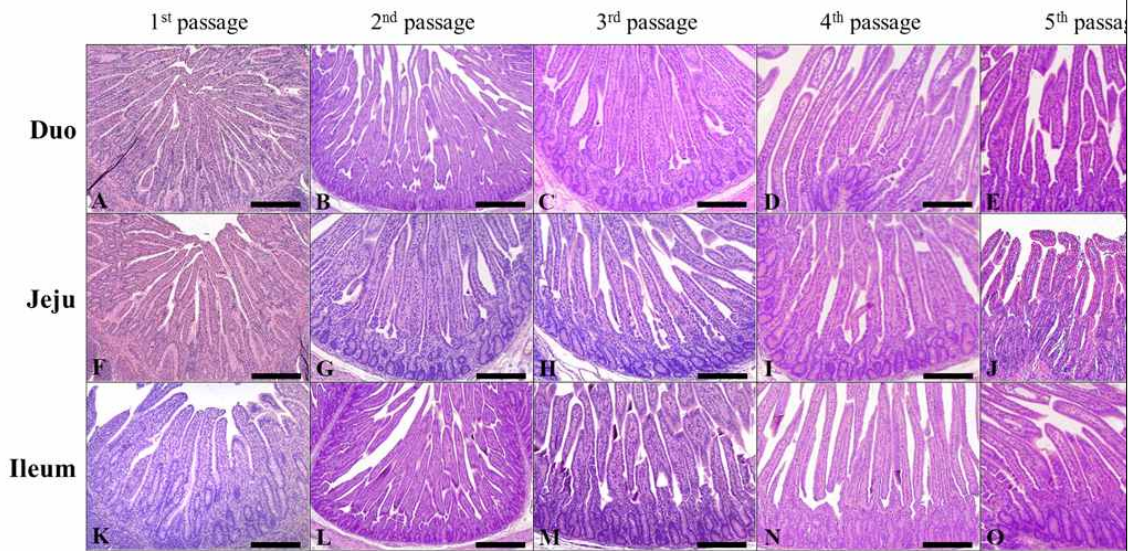
⑨ 총 5회 반복 투여 시 5일 쯤의 분변 및 소장을 섞어, 바이러스 역가를 CCIF 검사를 통해 측정한 결과, 계대를 거치면서 분변을 통한 백신주의 배출이 관찰되었음.

[표 27] 소 코로나바이러스 약독화 생건조 3종 혼합백신의 송아지에서 병원성 복귀 검사결과(분변을 통한 바이러스 배출)

Strains	Type of Samples	Titer (FFU/ml)				
		1 <sup>st</sup> passage	2 <sup>nd</sup> passage	3 <sup>rd</sup> passage	4 <sup>th</sup> passage	5 <sup>th</sup> passage
KWD20V-102	Small intestine and Feces	1.2 * 10 <sup>5</sup>	9.2 * 10 <sup>4</sup>	8.7 * 10 <sup>4</sup>	7.5 * 10 <sup>4</sup>	5.5 * 10 <sup>4</sup>

⑩ 세 분리주 모두에서 다섯 번의 계대기간동안 소장에서 경도(mild)의 음와의 증식 및 용모의 위축만이 관찰되었으며 용모의 융합, 고유관에서의 림프구의 침윤, 용모상피세포의 탈락, 용모상피세포의 과증식 등의 소견은 관찰되지 않았음





[그림 19] 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신의 송아지에서 병원성 복귀 검사결과 (소장 병변 조직 검사)

[표 28] 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신의 송아지에서 병원성 복귀 검사결과 (소장 조직 검사결과)

Strains	Calf No.	DPI <sup>b</sup> at euthanasia	Duodenum	Jejunum	Ileum
			Lesion score <sup>c</sup>	Lesion score <sup>c</sup>	Lesion score <sup>c</sup>
1 <sup>st</sup> passage					
of a trivalent vaccine	1	5	0.2	0.2	1.2
2 <sup>nd</sup> passage					
of a trivalent vaccine	2	5	0	0	0
3 <sup>rd</sup> passage					
of a trivalent vaccine	3	5	0	0	0
4 <sup>th</sup> passage					
of a trivalent vaccine	4	5	0	0	0.4
5 <sup>th</sup> passage					
of a trivalent vaccine	5	5	0	0.8	0.2

<sup>a</sup>Inoculated with serum-free DMEM.

<sup>b</sup>DPI: Days post-inoculation.

<sup>c</sup>The small intestinal changes were scored according to the average villi/crypt (V/C) ratio plus the grade of epithelial cell desquamation, which was measured as follows: V/C ratio, 0 = normal (V/C ≥ 6:1), 1 = mild (V/C = 5.0 to 5.9:1), 2 = moderate (V/C = 4.0 to 4.9:1), 3 = marked (V/C = 3.0 to 3.9:1), 4 = severe (V/C ≤ 3.0:1) and

desquamation grade, 0 = normal (no desquamation), 1 = mild (cuboidal attenuation of tip villous epithelium), 2 = moderate (desquamation of upper villous epithelium), 3 = marked (desquamation of lower villous epithelium), 4 = severe (desquamation of crypt epithelium).

**결론:** 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 전임상 시험 종합

- 1) 4종류의 바이러스를 혼합한 생독 백신이 단일로 접종하였을 경우와 비교시 안정성 및 항체 역가가 비슷한 수준으로 보이는 것으로 확인되었음.
- (2) 현재 시판되고 있는 ROCO백신의 3종 백신과 비교하여 기니픽 역가 시험 결과 품질면에서 우수한 것으로 확인되었음.
- (3) 소 로타바이러스의 경우 4종 생건조 백신은 다른 genotype의 3개의 균주가 포함되어 있기 때문에 야외 로타바이러스 방어능 측면이나 경제성 측면에서 단일백신과 기존백신보다 효능이 좋을 것으로 예상되므로 최종적인 백신 형태는 4종 혼합 백신으로 개발하였음.

## 4절. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 임상 시험

### 1. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 임상시험용 3 Lots 시험백신 생산

- (1) 2016년도 소 로타바이러스(3개 백신주), 코로나 바이러스(1개백신주)에 대한 4종 혼합백신을 3 Lots(T3163ROCO-Lot01, 02, 03)의 대량화 시험백신을 제작하였음.
- (2) 생산된 백신은 소 로타바이러스 KJ11주  $10^{5.0}$  TCID 이상, 소 로타바이러스 KJ19-2 주  $10^{5.0}$  TCID 이상, 소 로타바이러스 KJ44 주  $10^{5.0}$  TCID 이상, 소 코로나바이러스 KWD20 주  $10^{4.0}$  TCID 이상 포함하며 안정제가 포함된 동결건조 백신이었음
- (3) 대량 생산한 3Lots에 대하여 2~8C에 보관하면서, 제조직후에 대량 생산하고 특성시험, 진공도시험, 수소이온농도시험, 함습도시험, 무균시험, 마이코플라즈마 부정시험, 미입바이러스 부정시험, 바이러스함량시험을 실시하여 농림축산검역본부 검정기준(고시 2017-46호, 1-1-03-06 소 로타바이러스, 코로나바이러스 생혼합건조백신 검정기준)에 적합한 결과를 확인하였음.

### 2. 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 임상시험

- (1) 생산된 시험백신{소 로타바이러스 KJ11백신주 (G8P[7] 유전형 조합), 소 로타바이러스 KJ19-2 백신주(G6P[7] 유전형조합), 소 로타바이러스 KJ44 백신주 (G5P[1] 유전형 조합), 소 코로나바이러스 KWD20 약독주} 3Lot에 대하여 목적 동물에서의 효력을 확인하기 위한 실험을 하였음.
- (2) 시험백신의 목적동물 적용을 위해 경기도 소재의 4개 농장을 섭외하였으며, 정보는 다음과 같다(표 1).

[표 1] 실험농장 정보

농장명	주소지	사육 두수 세부 내역					소계
		자유	육성우	초임우	착유우	건유우	
A	경기도 김포시	3	25	8	40	8	84
B	경기도 김포시	-	-	-	27	3	30
C	경기도 김포시	5	20	10	44	8	87
D	경기도 김포시	5	35	21	66	10	137

- (3) 농장의 초임우 29마리 중, 로타바이러스와 코로나바이러스의 항체가가 상대적으로 낮은 10마리의 소를 선정하였음.
- (4) 선정된 소들에서 분만 6주 전의 임신 우를 채혈 후, 생산된 백신을 분만 6주, 4주 전에 2 ml 씩 근육으로 접종하였음 (그림 1).



[그림 1] 시험백신 백신접종 프로그램 모식도.

(5) 분만 후에 초유를 채취하고, 모우와 자우로부터 채혈을 진행하였음.

(가) 모우의 초유에서 real-time PCR을 통해 병원체(로타바이러스, 코로나바이러스, 소 바이러스성 설사병 바이러스, 구제역 바이러스)를 검사하였으며, 모두 음성으로 확인되었음.

(나) 모우, 자우의 혈청 및 초유에서 바이러스 중화시험을 통해 백신의 효능을 확인하였음.

(다) BRV KJ11에 대한 중화항체의 경우, 백신군의 초유와 송아지의 혈청에서 대조군에 비해 유의적으로 높은 중화항체를 나타내었음( $p < 0.05$ , Table 2).

(라) BRV KJ11에 대한 중화항체의 경우, 백신군의 어미의 혈청의 경우 중화항체가 증가한 반면, 대조군의 어미의 혈청에서는 중화항체가 감소하는 것을 확인하였음( $p < 0.05$ , 표 2).

[표 2] 소 로타바이러스 백신주 KJ11주를 투여한 모우 초유 및 면역된 모우에서 태어난 자우의 혈청 내 중화 항체가

BRV KJ11	Average±standard error (SE) of neutralization test					
	Colostrum		Maternal serum		Calf serum	
	1st	2nd	Before vaccination	After parturition	1 week old	2 weeks old
Vaccinated group	1750±5 12.34	641.67±22 8.92	26.67±4.22	56.67±10.85	466.67±1 80.57	433.33±18 9.43
Control group	200±70. 71	62.5±12.5	25±5.00	17.5±2.50	40±14.14	35±5.00

(마) BRV KJ19-2에 대한 중화항체의 경우, 백신군의 초유와 송아지의 혈청에서 대조군에 비해 유의적으로 높은 중화항체를 나타내었다( $p < 0.05$ , Table 3).

(바) BRV KJ19-2에 대한 중화항체의 경우, 백신군의 어미의 혈청의 경우 중화항체가 증가한 반면, 대조군의 어미의 혈청에서는 중화항체가 감소하는 것을 확인하였다( $p < 0.05$ , 표 3).

[표 3] 소 로타바이러스 백신주 KJ19-2주를 투여한 모우 초유 및 면역된 모우에서 태

BRV KJ19-2	Average±standard error (SE) of neutralization test					
	Colostrum		Maternal serum		Calf serum	
	1st	2nd	Before vaccination	After parturition	1 week old	2 weeks old
Vaccinated group	1375±469 .71	558.33±23 5.38	28.33±5.43	56.67±10.85	380±201.7 9	270±118.41
Control group	225±62.9 2	87.5±12.50	30±5.77	25±5.00	80±28.28	65±32.02

어난 자우의 혈청 내 중화 항체가

(사) BRV KJ44에 대한 중화항체의 경우, 백신군의 초유와 송아지의 혈청에서 대조군에 비해 유의적으로 높은 중화항체를 나타내었다(p<0.05, Table 4).

(아) BRV KJ44에 대한 중화항체의 경우, 백신군의 어미의 혈청의 경우 중화항체가 증가한 반면, 대조군의 어미의 혈청에서는 중화항체가 감소하는 것을 확인하였다(p<0.05, 표 4).

[표 4] 소 로타바이러스 백신주 KJ11주를 투여한 모우 초유 및 면역된 모우에서 태어난 자우의 혈청 내 중화 항체가

BRV KJ44	Average±standard error (SE) of neutralization test					
	Colostrum		Maternal serum		Calf serum	
	1st	2nd	Before vaccination	After parturition	1 week old	2 weeks old
Vaccinated group	1500±412 .31	750±206.1 6	23.33±3.33	60±8.95	353.33±10 0.35	270±87.29
Control group	150±28.8 7	62.5±12.50	25±5.00	12.5±2.50	22.5±6.29	17.5±2.50

(자) BCV KWD20에 대한 중화항체의 경우, 백신군의 초유와 송아지의 혈청에서 대조군에 비해 유의적으로 높은 중화항체를 나타내었다(p<0.05, Table 5).

(차) BCV KWD20에 대한 중화항체의 경우, 백신군의 어미의 혈청의 경우 중화항체가 증가한 반면, 대조군의 어미의 혈청에서는 중화항체가 감소하는 것을 확인하였다.(p<0.05, 표 5).

[표 5] 소 코로나바이러스 백신주 KJ11주를 투여한 모우 초유 및 면역된 모우에서 태어난 자우의 혈청 내 중화 항체가

BCV KWD20	Average±standard error (SE) of neutralization test					
	Colostrum		Maternal serum		Calf serum	
	1st	2nd	Before vaccination	After parturition	1 week old	2 weeks old
Vaccinated group	766.67±1 96.07	342.67±10 4.60	13.33±2.11	103.33±26.54	226.67±43. 41	242.67±41.4 0
Control group	56±26.53	28±18.33	20±7.07	12.5±2.50	15±2.89	12.5±2.50

(6) 시험백신의 안전성 확인

(가) 신생 송아지 안전성 시험

- ① 신생 송아지의 안전성 시험은 초유를 섭취하지 않은 신생송아지에 권장 접종량의 10배를 구강접종하여, 3주 동안 설사, 활력저하, 식욕, 탈수 등을 관찰하였음.
- ② 그 결과 설사, 활력저하, 식욕저하, 탈수 등이 관찰되지 않았음(표 6).

[표 6] 신생 송아지 안전성 시험 결과

No. of calf	Dose/Route	Clinical signs			
		Diarrhea	Lethargy	Loss of appetite	Dehydration
1	10 doses / Oral inoculation	-	-	-	-
2	10 doses / Oral inoculation	-	-	-	-
3	10 doses / Oral inoculation	-	-	-	-
4	10 doses / Oral inoculation	-	-	-	-
5	10 doses / Oral inoculation	-	-	-	-

(나) 임신우 안전성 시험

- ① 임신우에서의 안전성을 확인하기 위해 백신의 10두분을 백신 접종 이력이 없는 1산차의 모우에 분만 6주, 4주 전 근육접종 후, 과민반응, 화농, 괴사, 유산, 활력변화 등을 관찰하였으며, 분만 후 사산 혹은 유약송아지를 분만하였는지 검사하였음.
- ② 그 결과, 모든 모우에서 1, 2차 접종 후 정상 체온이 유지되었고, 과민반응, 접종 부위의 화농 및 괴사, 활력상태 변화, 유산 등의 부작용 또한 확인되지 않았으며, 분만된 송아지에서도 사산이나 유약송아지 등의 이상증후가 관찰되지 않았음(표 7).

[표 7] 임신우에서 안전성 시험 결과

No. of cattle	Dose/Route	Maternal cow							Calf	
		*BT in 1st vaccinati on(°C)	BT in 2nd vaccinati on(°C)	Hyper sensitivity	Pyode rma	Necro sis	Aborti on	Lethar gy	Death	Weak calf
1	10 doses / IM/ 2 shots	38.7	38.8	-	-	-	-	-	-	-
2		38.9	38.5	-	-	-	-	-	-	-
3		38.2	38.3	-	-	-	-	-	-	-
4		38.3	38.6	-	-	-	-	-	-	-



5	38.4	38.7	-	-	-	-	-	-	-
6	38.3	38.5	-	-	-	-	-	-	-
7	38.7	38.6	-	-	-	-	-	-	-
8	38.8	38.5	-	-	-	-	-	-	-

\*BT : 체온.

(7) 신생 송아지에서 바이러스 접종 시험

(가) 실험방법

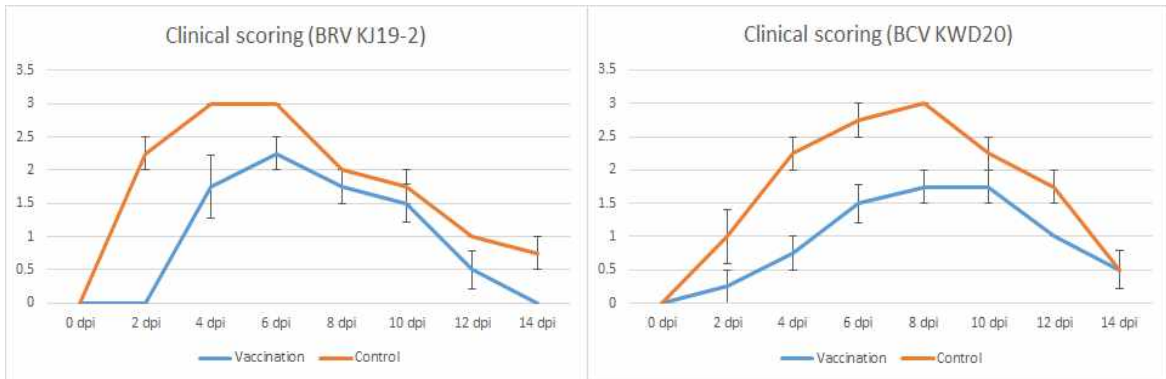
- ① 모우 8마리를 선정하여 시험백신을 분만 6주 전, 4주 전 2번 접종하였음
- ② 면역된 어미로부터 태어난 송아지에 어미 초유를 섭취시킨 뒤, 바이러스 균주(BRV KJ19-2와 BCV KWD20)를 각각 4마리에 10 ml씩 공격접종하고 방어능 여부를 평가하였음.
- ③ 또한 다른 8마리를 대조군으로 선정하여, 백신을 접종하지 않은 어미 초유를 섭취시킨 뒤, 바이러스 균주(BRV KJ19-2와 BCV KWD20)를 각각 4마리에 10 ml씩 공격접종하였음.

[표] 면역된 모우에서 태어난 신생 송아지에서 바이러스 접종 시험 결과

Group	No. of calves	Challenge strain/route	Challenge virus titer (TCID <sub>50</sub> /ml)
Vaccination	4	BRV KJ19-2/PO	10 <sup>4.0</sup>
	4	BCV KWD20/PO	10 <sup>4.0</sup>
Control	4	BRV KJ19-2/PO	10 <sup>4.0</sup>
	4	BCV KWD20/PO	10 <sup>4.0</sup>

(나) 임상증상 관찰 결과

- ① 임상증상은 공격접종 후, 14일 동안 2일 간격으로 분변을 확인하여 점수로 기록하였음 (0: 정상, 1: 반고형, 2: 비정형, 3: 수양성). 2점 이상을 설사로 간주하였음.
- ② BRV KJ19-2와 BCV을 공격접종한 실험에서 모두 백신을 접종한 그룹이 접종하지 않은 그룹보다 유의적으로 임상증상이 낮게 형성됨을 확인하였음 (p < 0.05, Fig. 2).
- ③ BRV KJ19-2 접종 실험의 경우, 백신 접종군에서는 임상증상이 6 dpi에 2.25점으로 가장 높았으나, 대조군에서는 4~6 dpi에 모두 최대 점수인 3점의 임상증상을 나타내었음(Fig. 2).
- ④ BCV KWD20 접종 실험의 경우, 백신 접종군에서는 임상증상이 8 dpi ~ 10 pi에 1.75점으로 가장 높았으나, 대조군에서는 8 dpi에 최대 3점을 나타내었음(그림 2).



[그림 2] 면역된 모우에서 태어난 신생 송아지에서 바이러스 접종 시험 결과.

(다) 바이러스 배출 관찰 결과

- ① 2일 간격으로 채취한 분변에서 바이러스의 배출 여부를 확인하였음.
- ② 백신을 접종하지 않은 경우, 접종 후 2일 후에 모두 바이러스 배출이 확인된 반면, 백신을 접종한 군에서는 4 dpi부터 관찰되었고, 또한 백신 미접종 군보다 빠르게 감소하는 것을 확인하였음(표 9).

[표 9] 면역된 모우에서 태어난 신생 송아지에서 바이러스 접종 후 분변을 통한 바이러스 배출 시험 결과

Challenge virus	Group	No. of calves positive for each virus in feces							
		0 dpi	2 dpi	4 dpi	6 dpi	8 dpi	10 dpi	12 dpi	14 dpi
BRV KJ19-2	Vaccination	0/4	0/4	2/4	4/4	3/4	1/4	0/4	0/4
	Control	0/4	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	0/4	0/4
BCV KWD20	Vaccination	0/4	0/4	2/4	3/4	3/4	1/4	0/4	0/4
	Control	0/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	2/4	0/4

(다) 혈중 중화항체가 검사 결과

- ① 혈중 중화항체가 검사를 공격접종 전, 1주 후, 2주 후 진행하여 체내의 면역반응을 확인하였음.
- ① BRV KJ19-2의 경우, 백신군은 공격접종 후에도 혈중 중화항체가 공격접종 전과 비슷하게 평균 280배를 유지하다가 일부 감소하는 경향을 보인 반면, 백신을 접종하지 않은 초유를 섭취한 송아지의 경우, 공격접종 전에는 평균 17.5배를 유지하다가 높아지는 것을 확인하였음(Table 10).
- ① BCV KWD20의 경우, 백신군은 공격접종 후에도 혈중 중화항체가 공격접종 전과 비슷하게 평균 160배를 유지하다가 일부 감소하는 경향을 보인 반면, 백신을 접종하지 않은 초유를 섭취한 송아지의 경우, 평균 15배에서 점점 높아지는 것을 확인하였음(표 10).

[표 10] 면역된 모우에서 태어난 신생 송아지에서 바이러스 접종 후 혈중 중화항체가 시험 결과

Challenge virus	Group	S/N result (GMT)		
		0 WPC	1 WPC	2 WPC
BRV KJ19-2	Vaccination (n = 4)	280±40	280±40	160±0
	Control (n = 4)	17.5±2.5	25±5	60±11.55
BCV KWD20	Vaccination (n = 4)	160±0	160±0	120±23.09
	Control (n = 4)	15±2.89	17.5±2.5	45±12.58

(라) 농림축산검역본부의 임상시험 승인 절차

- ① “농림축산검역본부 고시 제2015-69호, 동물용의약품등 임상시험 관리지침 “에 따라, 안전성, 효능성이 인정된 시험백신에 대한 시험결과 및 야외임상 계획서를 2019년 8월 말에 제출할 예정임.

## 5절. 돼지 로타바이러스 백신주 특성 분석 및 불활화 백신 전임상 시험

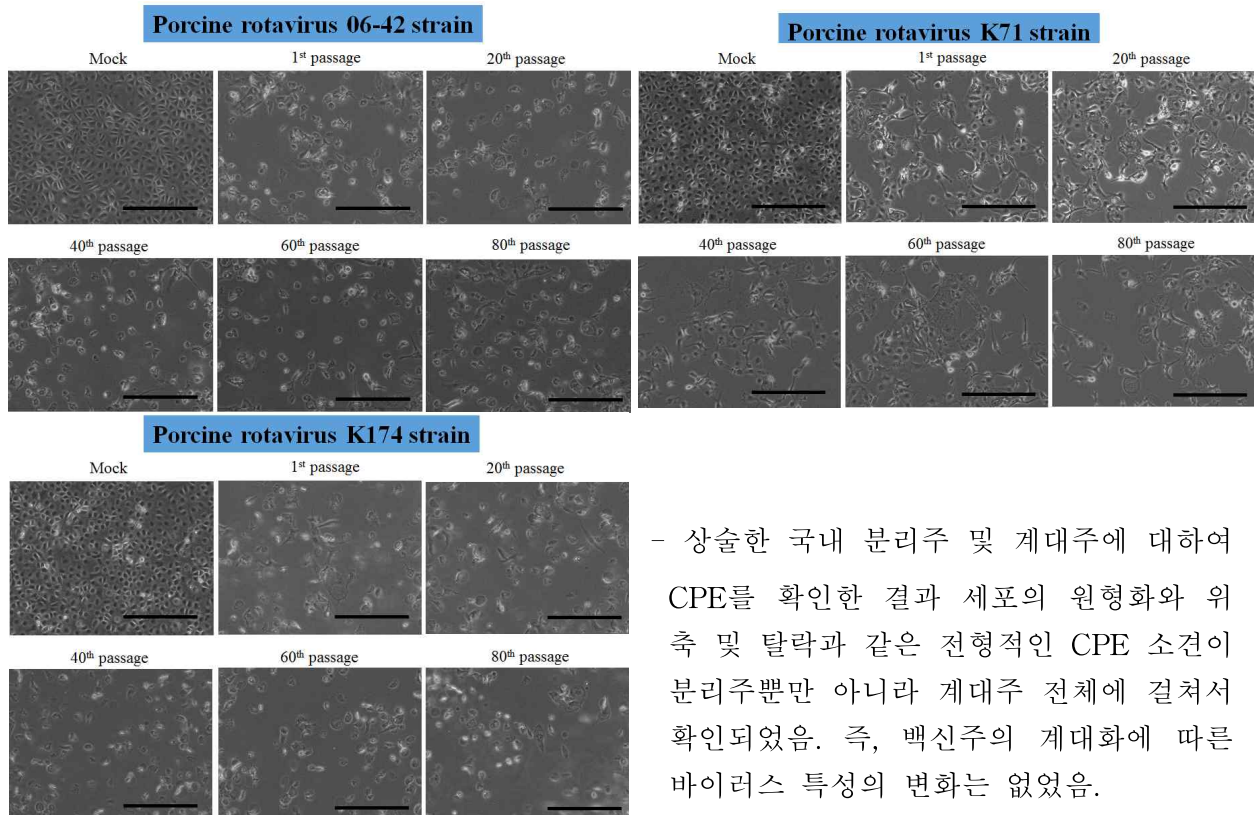
### 1. 돼지 로타바이러스 백신주 특성 분석

#### 가. 백신주 계대별 역가 분석

Strain Name	Species	Genotype	Passage numbers				
			1 <sup>st</sup>	20 <sup>th</sup>	40 <sup>th</sup>	60 <sup>th</sup>	80 <sup>th</sup>
K174	Porcine	G8P[7]	5.9 X 10 <sup>6</sup>	6.6 x 10 <sup>10</sup>	7.8x 10 <sup>11</sup>	1.4 x 10 <sup>12</sup>	1.5 x 10 <sup>13</sup>
K71		G5P[7]	3.6 X 10 <sup>9</sup>	8.8 x 10 <sup>10</sup>	9.9 x 10 <sup>12</sup>	1.15 x 10 <sup>13</sup>	2.5 x 10 <sup>13</sup>
06-42		G9P[23]	3.1 X 10 <sup>6</sup>	3.3 x 10 <sup>10</sup>	1.4 x 10 <sup>11</sup>	8.4 x 10 <sup>11</sup>	5.5 x 10 <sup>12</sup>

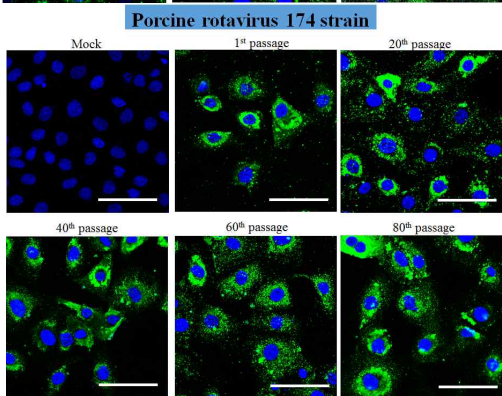
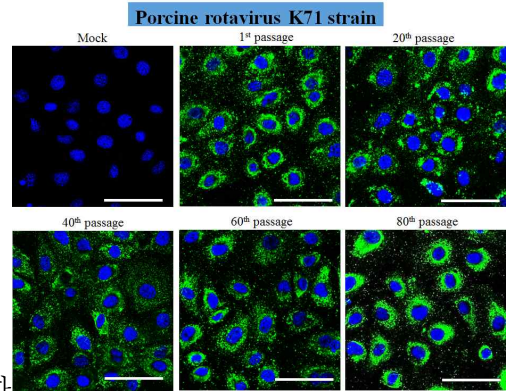
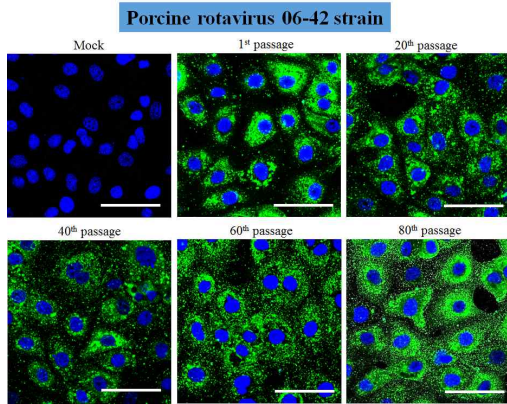
- 국내 자돈 설사분변에서 분리한 K174, K71 및 06-42 주를 MA104 세포에서 80 대까지 계대배양 후 바이러스 역가를 측정된 결과 상술한 테이블에서와 같이 계대 횟수가 높아질수록 바이러스 역가도 높아졌음.

#### 나. 백신주 계대별 CPE 및 항원성 분석



- 상술한 국내 분리주 및 계대주에 대하여 CPE를 확인한 결과 세포의 원형화와 위축 및 탈락과 같은 전형적인 CPE 소견이 분리주뿐만 아니라 계대주 전체에 걸쳐서 확인되었음. 즉, 백신주의 계대화에 따른 바이러스 특성의 변화는 없었음.

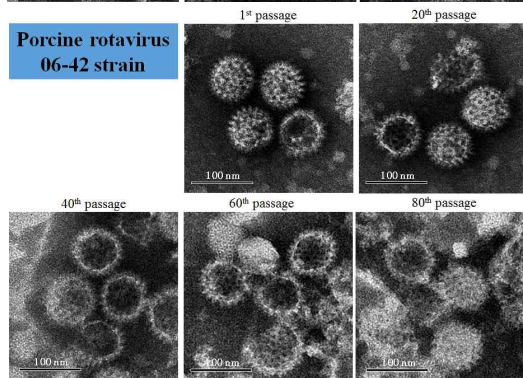
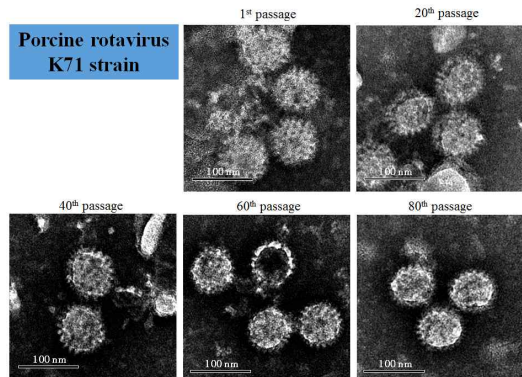
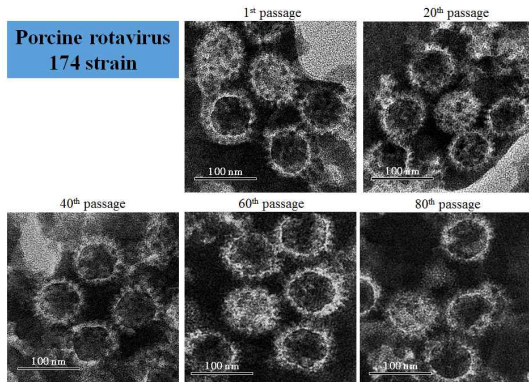




- 상술한

국내 분리주 및 계대주에 대하여 로타바이러스 VP6에 대한 단클론항체를 이용하여 면역형광염색을 수행한 후 Confocal microscope로 검사한 결과, 분리주 및 계대주 전체에 걸쳐 강한 양성 반응이 세포질 내에서 확인되었음. 즉, 백신주의 계대화에 따른 바이러스 특성의 변화는 없었음.

다. 백신주 계대별 바이러스 구조 분석



- 상술한 국내 분리주 및 계대주를 초고속 원심분리 후, 침전물에 대하여 Postassium tungstic acid 염색을 수행하여 전자현미경으로 관찰한 결과, 분리주 및 계대주 전체에 걸쳐 60-80 nm 크기의 로타바이러스가 확인되었음. 즉, 백신주의 계대화에 따른 바이러스 특성의 변화는 없었음.

라. 백신주 계대별 PAGE-pattern 분석

**Porcine: K174**

**Porcine: K71**

**Porcine: 06-42**

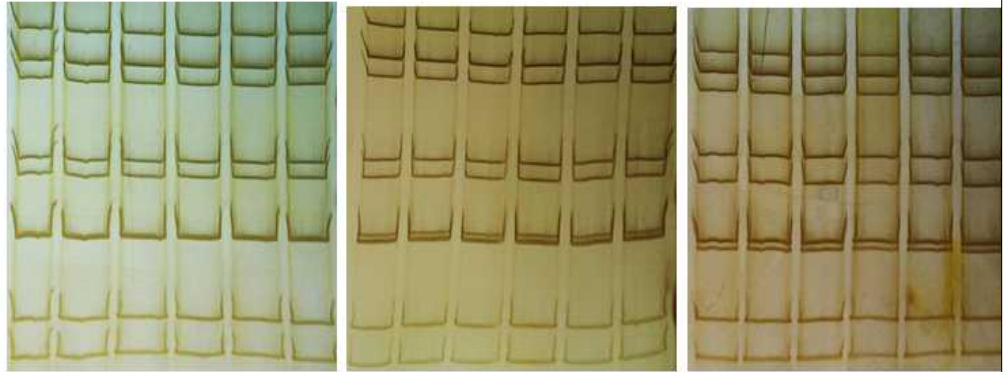
1 2 3 4 5 6

1 2 3 4 5 6

1 2 3 4 5 6

Lanes:

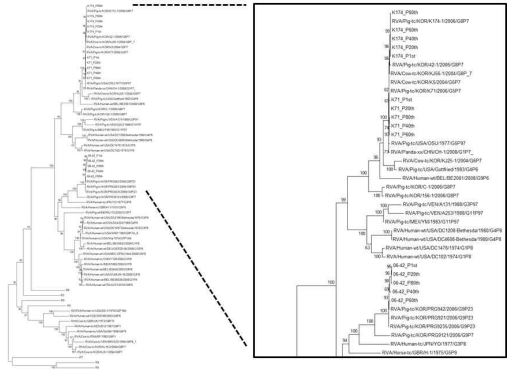
1. 1<sup>st</sup> passage
2. 10<sup>th</sup> passage
3. 20<sup>th</sup> passage
4. 40<sup>th</sup> passage
5. 60<sup>th</sup> passage
6. 80<sup>th</sup> passage



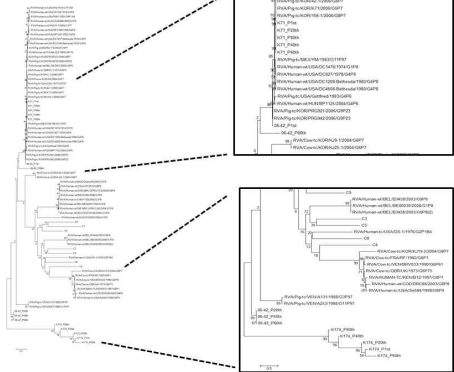
- 상술한 국내 분리주 및 계대주에서 바이러스 RNA를 추출하여 page-pattern을 분석한 결과 혈청형 A 로타바이러스의 전형적인 page-pattern인 4-2-3-2 pattern이 분리주 및 계대주 전체에 걸쳐서 확인되었음. 즉, 연속계대에 따른 유전체 rearrangement는 없었음.

**마. 백신주 계대별 유전형 분석**

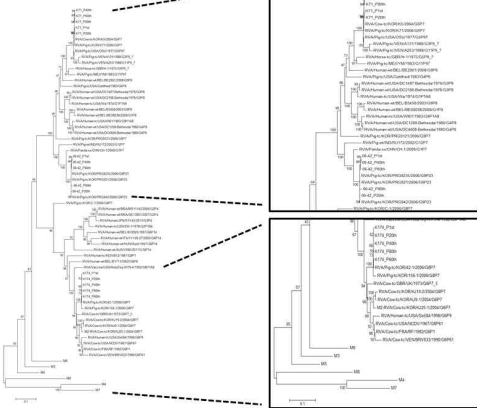
**VP1**



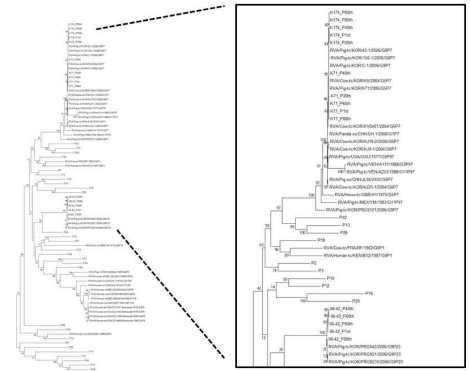
**VP2**



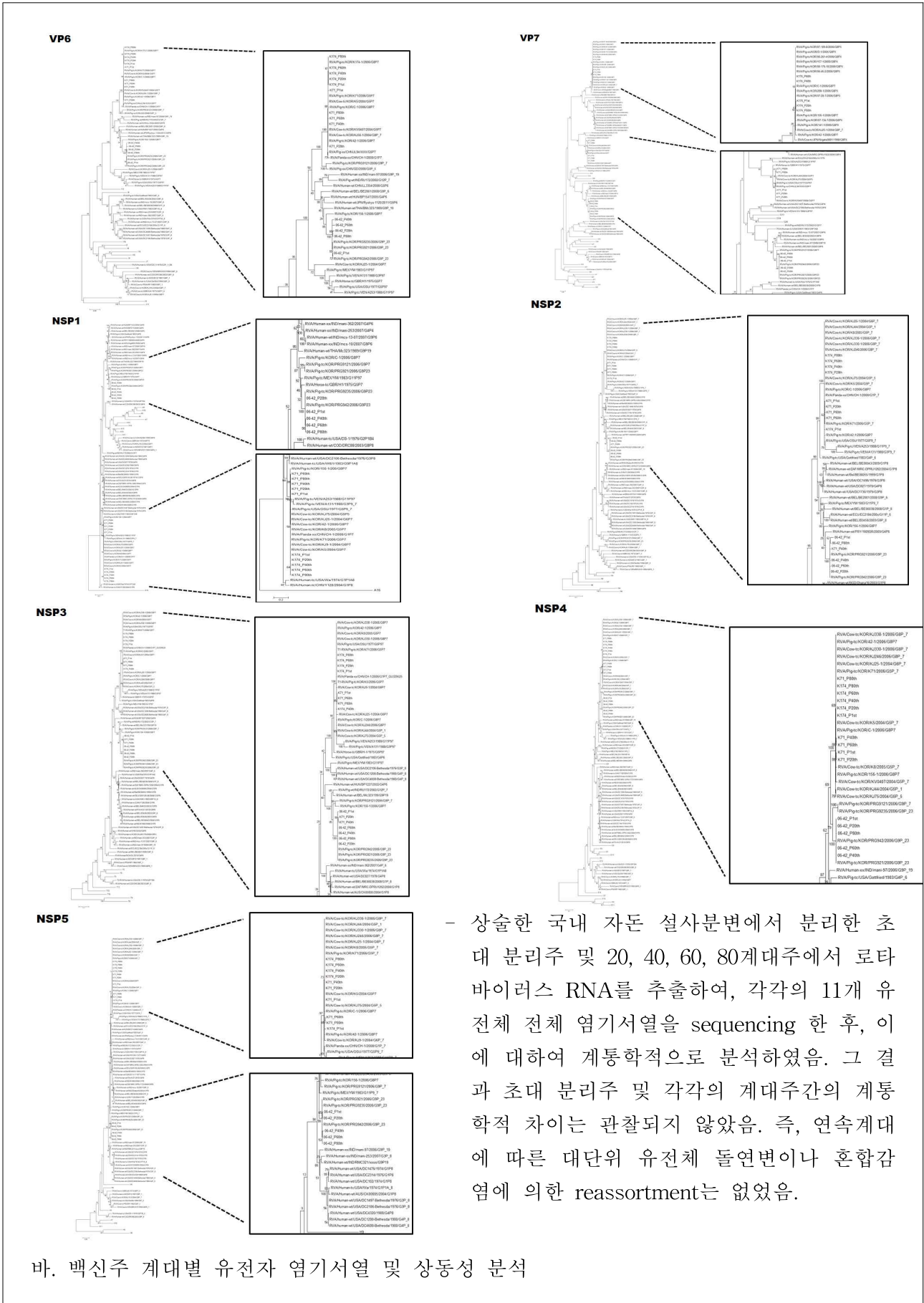
**VP3**



**VP4**







## Porcine: 06-42 (G9[P23]) strain

VP1	Amino acid position						VP2	Amino acid position								
	76	135	202	228	238	277	308		36	39	110	210	216	251	324	330
P1st	L	L	Y	E	S	K	Q	P1st	K	I	E	S	C	S	S	T
P20th	L	L	Y	E	S	K	Q	P20th	K	I	E	S	C	S	S	T
P40th	L	L	Y	E	P	K	P	P40th	N	N	E	S	R	L	S	T
P60th	S	P	Y	E	S	K	Q	P60th	K	I	G	P	R	S	Q	R
P80th	L	L	H	Y	S	Q	Q	P80th	K	I	G	P	R	S	Q	R

VP3	Amino acid position								VP4	Amino acid position											
	33	210	212	237	254	285	286	531	557	571	654	807		80	83	163	194	212	247	301	302
P1st	L	G	R	H	F	V	G	I	Y	R	E	T	P1st	Y	F	K	Y	E	R	Y	Q
P20th	F	D	G	H	L	L	X	I	Y	R	E	T	P20th	Y	L	K	Y	G	R	Y	Q
P40th	L	G	R	H	F	V	G	I	Y	R	E	T	P40th	Y	L	K	Y	E	R	Y	Q
P60th	L	G	R	H	F	V	G	I	Y	R	G	A	P60th	C	L	R	C	E	G	Y	R
P80th	F	G	R	R	F	L	G	M	C	G	G	A	P80th	Y	L	K	Y	E	R	W	Q

VP7	Amino acid position						NSP1	Amino acid position				
	7	69	97	106	115	180		46	57	126	146	229
P1st	T	N	E	F	A	E	P1st	C	C	R	S	S
P20th	Y	N	E	F	V	E	P20th	C	C	R	L	P
P40th	T	N	G	F	V	G	P40th	R	W	S	L	S
P60th	T	N	E	L	V	E	P60th	R	W	S	L	S
P80th	T	I	V	F	V	E	P80th	R	W	S	L	S

Red letters indicate amino acid change compared with the first passage.

## Porcine: K71 (G5P[7]) strain

VP1	Amino acid position							VP2	Amino acid position									
	329	432	361	370	432	712	818		240	255	260	278	324	466	523	568	801	862
P1st	S	R	N	E	R	M	Q	P1st	V	S	F	I	S	S	P	M	K	S
P20th	P	R	N	E	R	I	Q	P20th	V	P	F	T	S	S	L	T	N	P
P40th	S	G	N	E	G	I	R	P40th	A	P	F	I	S	F	L	T	N	P
P60th	S	R	S	G	R	I	R	P60th	V	S	F	I	S	F	P	M	K	S
P80th	S	R	S	G	R	I	R	P80th	V	P	S	I	P	F	L	T	N	P

VP3	Amino acid position							VP4	Amino acid position						VP6	Amino acid position		
	28	49	175	347	532	590	724		98	230	315	404	559	687		8	120	248
P1st	E	S	E	S	F	F	Q	P1st	S	T	H	P	A	D	P1st	P	T	Y
P20th	E	C	G	S	F	F	Q	P20th	S	T	L	L	A	D	P20th	S	S	Y
P40th	G	S	E	N	L	L	L	P40th	N	T	H	L	A	D	P40th	S	S	Y
P60th	G	S	E	N	L	L	L	P60th	S	T	H	L	A	D	P60th	S	S	C
P80th	E	S	E	N	L	L	L	P80th	S	A	H	L	V	G	P80th	S	S	Y

VP7	Amino acid position		NSP1	Amino acid position		NSP2	Amino acid position									
	24	201		3			24	59	75	153	161	177	200	207	271	314
P1st	R	Q	P1st	G		P1st	S	K	P	E	T	M	A	A	A	H
P20th	K	Q	P20th	G		P20th	S	K	S	K	N	M	A	A	A	H
P40th	K	Q	P40th	S		P40th	N	K	S	E	N	M	V	A	A	H
P60th	K	R	P60th	S		P60th	S	K	S	E	N	M	A	A	T	R
P80th	K	R	P80th	S		P80th	S	R	S	E	N	T	A	T	A	H

Red letters indicate amino acid change compared with the first passage.

## Porcine: K174 (G8P[7]) strain

VP1	Amino acid position				VP2	Amino acid position						VP3	Amino acid position			
	328	630	820	986		10	67	403	438	814	815		19	153	279	300
P1st	W	G	L	Y	P1st	Q	I	V	E	R	A	P1st	I	X	K	P
P20th	W	G	L	Y	P20th	Q	I	V	E	R	A	P20th	R	X	K	P
P40th	W	G	L	Y	P40th	P	I	V	E	R	A	P40th	I	X	N	P
P60th	W	G	L	Y	P60th	Q	L	V	K	R	A	P60th	I	X	K	S
P80th	A	T	N	W	P80th	Q	I	N	E	L	E	P80th	I	A	N	P

VP4	Amino acid position					VP6	Amino acid position			VP7	Amino acid position	NSP1	Amino acid position			
	123	323	325	589	711		137	201	325		73		61	240	301	360
P1st	G	V	N	S	L	P1st	E	A	R	P1st	R	P1st	H	S	L	G
P20th	G	V	N	S	L	P20th	E	A	R	P20th	R	P20th	H	S	L	G
P40th	R	V	N	S	L	P40th	E	A	R	P40th	P	P40th	H	S	L	G
P60th	G	D	N	S	I	P60th	E	A	R	P60th	P	P60th	W	T	I	I
P80th	G	V	I	C	L	P80th	K	G	P	P80th	R	P80th	W	T	I	I

NSP2	Amino acid position	NSP3	Amino acid position		NSP4	Amino acid position	
	178		88	240		83	114
P1st	A	P1st	M	S	P1st	A	D
P20th	P	P20th	M	S	P20th	A	D
P40th	P	P40th	M	S	P40th	A	D
P60th	P	P60th	X	K	P60th	T	G
P80th	P	P80th	X	K	P80th	T	G

Red letters indicate amino acid change compared with the first passage.

## Porcine: K71 (G5P[7]) strain

NSP3	Amino acid position										
	12	68	81	107	146	236	266	268	296	310	311
P1st	G	M	V	M	K	N	L	P	S	Y	A
P20th	G	M	V	M	K	N	L	P	S	Y	A
P40th	S	A	T	I	R	S	S	S	F	C	T
P60th	S	A	T	I	R	S	S	S	F	C	T
P80th	S	A	T	I	R	S	S	S	F	C	T

NSP4	Amino acid position			NSP5	Amino acid position		
	123	146	160		4	124	166
P1st	Q	K	G	P1st	S	S	V
P20th	Q	K	G	P20th	S	S	D
P40th	Q	K	E	P40th	S	S	D
P60th	L	R	E	P60th	G	P	D
P80th	L	R	E	P80th	G	P	D

Red letters indicate amino acid change compared with the first passage.



## Porcine: 06-42 (G9[P23]) strain

NSP2	Amino acid position								
	12	13	38	61	66	113	125	277	292
P1st	L	E	R	Y	S	N	P	K	R
P20th	L	E	K	Y	N	N	L	K	K
P40th	L	E	K	Y	N	N	L	K	K
P60th	W	R	K	Y	N	N	L	K	K
P80th	L	E	K	C	N	S	L	R	K

NSP3	Amino acid position					NSP4	Amino acid position	NSP5	Amino acid position			
	28	144	188	220	301				20	94	176	
P1st	G	A	S	Q	S		88		P1	N	L	K
P20th	V	T	L	Q	L	P1	Q		P20	N	L	K
P40th	V	T	L	R	L	P40	Q		P40	S	S	R
P60th	V	T	L	R	L	P60	Q		P60	S	S	K
P80th	V	T	L	Q	L	P80	R		P80	S	S	K

Red letters indicate amino acid change compared with the first passage.

- 백신주의 계대를 통해 아미노산 서열의 치환이 증가하는 경향이 있으며, 이러한 아미노산 서열의 치환이 백신주의 약독화와 관련성이 있는 것으로 추정됨.

사. 돼지 로타바이러스 반수유효량(50% Effective Dose; ED<sub>50</sub>) 결정 시험

(1) 돼지 로타바이러스 K174 주의 공격바이러스 설사 유발 반수유효량

Challenge dosage	No. per group	No. (%) of piglets showed diarrhea	No. (%) of piglets did not showed diarrhea	Median diarrhea dose
10 <sup>1</sup> FFU	3	0 (0%)	3 (100%)	10 <sup>1.75</sup> (5.6 x 10 <sup>1</sup> FFU)
10 <sup>2</sup> FFU	3	2 (67%)	1 (33%)	
10 <sup>3</sup> FFU	3	3 (100%)	0 (0%)	

- 국내 자돈 설사분변에서 분리한 K174 분리 원주를 이용하여 공격바이러스 설사 유발 반수유효량 결정시험을 수행하였음. 그 결과, 설사 유발 반수유효량은 5.6 x 10<sup>1</sup> FFU이었음.

(2) 돼지 로타바이러스 K71 주의 공격바이러스 설사 유발 반수유효량

Challenge dosage	No. per group	No. (%) of piglets showed diarrhea	No. (%) of piglets did not showed diarrhea	Median diarrhea dose
10 <sup>1</sup> FFU	3	0 (0%)	100 (100%)	10 <sup>1.5</sup> (3.1 x 10 <sup>1</sup> FFU)
10 <sup>2</sup> FFU	3	3 (100%)	0 (0%)	
10 <sup>3</sup> FFU	3	3 (100%)	0 (0%)	
10 <sup>4</sup> FFU	3	3 (100%)	0 (0%)	

- 국내 자돈 설사분변에서 분리한 K71 분리 원주를 이용하여 공격바이러스 설사 유발 반수유효량 결정시험을 수행하였음. 그 결과, 설사 유발 반수유효량은 3.1 x 10<sup>1</sup>

FFU이었음.

(3) 돼지 로타바이러스 06-42 주의 공격바이러스 설사 유발 반수유효량

Challenge dosage	No. per group	No. (%) of piglets showed diarrhea	No. (%) of piglets did not showed diarrhea	Median diarrhea dose
10 <sup>1</sup> FFU	3	1 (33%)	2 (67%)	10 <sup>2.5</sup> (3.1 x 10 <sup>2</sup> FFU)
10 <sup>2</sup> FFU	3	1 (33%)	2 (67%)	
10 <sup>3</sup> FFU	3	3 (100%)	0 (0%)	

- 국내 자돈 설사분변에서 분리한 06-42 분리 원주를 이용하여 공격바이러스 설사 유발 반수유효량 결정시험을 수행하였음. 그 결과, 설사 유발 반수유효량은 3.1 x 10<sup>2</sup> FFU이었음.

2. 돼지 로타바이러스 불활화 혼합백신 전임상 시험

가. Seed 및 배양세포 확립

- (1) 전남대학교에서 분리한 돼지 로타바이러스 3개 주 별로 각각 표 1과 같이 백신 seed의 제조번호를 부여하고 master, working, production seed를 확립하였음.
- (2) 돼지 로타바이러스 발생농장 자돈에서 분리되어 MA104 세포에서 80계대 한 바이러스로서 세포내 병원성을 유지하고 있었음.
- (3) MA104 세포에 접종 2일 후부터 특이적인 CPE를 형성하였으며, 바이러스 증식성은 10<sup>6.0</sup>TCID<sub>50</sub>/ml 이상이었음.

[표 1] 돼지 로타바이러스 백신 seed 및 배양세포 확립

Strain	Seed 제조번호	Cell (제조번호)	Master seed	생산용 종독	Production seed
K174	RD-P-V-006	TF(SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th
K71	RD-P-V-012	TF(SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th
06-42	RD-P-V-018	TF(SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th

나. Seed 제조단위 시스템

- (1) 세포증식용 배양액(α-MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100μg/ml) 0.1%)에 ml당 15~30만개의 MA104 세포를 분산시켜 37℃에서 4~5일간 배양한 다음 배양액을 제거한 후 돼지 로타바이러스를 0.1 M.O.I 접종하여 37℃에서 1시간 배양한 후 바이러스 증식용 배양액(α-MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100μg/ml) 0.1%, trypsin 1μg/ml)을 가한 다음 3일간 회전 배양하면서 세포변성효과가 약 80% 이상 일어날 때까지 배양하였음.

다. Master seed

- (1) 80대 계대 된 돼지 로타바이러스를 단층이 형성된 MA104세포에 접종하여 37℃에서 3~4일간 배양한 후, 접종 바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채독하여 -80℃의 냉동고에 동결보존 및 동결건조하여 원

종독으로 사용하였음.

라. Production seed

- (1) Master seed와 같은 계대방법으로 2대 계대한 돼지 로타바이러스를 단층이 형성된 MA104세포에 접종하여 37℃에서 3~4일간 배양한 후, 접종바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채독하여 -80℃의 냉동고에 동결건조하여 생산용 종독으로 사용하였음.

마. 배양조건 확립

(1) 바이러스 접종

- (가) MA104 세포를 세포증식용 배양액에 ml당 15~30만개의세포를 분산시킨 후, 37℃에서 4~5일간 배양한 다음 배양 세포가 단층을 형성하였을 때 배양액을 제거한 후 돼지 로타바이러스를 0.1 M.O.I 접종하고 37℃에서 1시간 흡착배양한 후 바이러스 증식용 배양액을 넣었음.

(2) 바이러스 배양

- (가) 세포에 바이러스를 접종한 후 37℃에서 3~4일간 배양하였음.

(3) 채독 및 불활화

- (가) 37℃에서 3~4일간 배양한 후 돼지 로타바이러스에 의한 세포변성 효과가 약 80%이상 일어났을 때 배양감염액을 채독하였음.
- (나) 채독한 배양감염액에 formalin을 최종농도 0.3%되게 첨가하여 37℃에서 3일간 교반하면서 불활화 한 후 4℃에 보관하였음.

바. Adjuvant 확립

(1) Adjuvant 결정 시험

- (가) 표 2. 와 같이 백신보조제 5종류에 따른 시험백신 3종을 제조하여 emulsion type에 따른 특성시험 (pH 측정, 점도측정, 성장관찰) 및 동물 실험을 실시하였음.

[표 2] 돼지 로타바이러스 백신보조제 종류에 따른 시험백신 (3종)

Group	항원량 (TCID <sub>50</sub> /dose)	Adjuvant		Emulsion type	비고
Group 1	10 <sup>6.0</sup> ,50%	Type 1	50%	W/O/W	
Group 2	10 <sup>6.0</sup> ,80%	Type 2	20%	O/W	
Group 3	10 <sup>6.0</sup> ,80%	Type 3	10%	-	
Group 4	-	-	-	-	음성대조군

- (나) 시험결과 돼지 로타바이러스 시험백신의 pH는 7.57~7.79로 나타났으며 emulsion type에 따른 차이 없이 검정기준 내의 값으로 측정되었음.

- (다) 점도의 경우, emulsion type에 따라 차이가 W/O/W type인 경우, 가장 높은 14.4cP로 나타났지만, O/W type인 경우에는 1.6pC수준으로 가장 낮은 값으로 측정되었음(표 3).



[표 3] Emulsion type에 따른 시험 백신의 pH 및 점도

시험백신 조성	Emulsion type	pH	점도(cP)
1 Type 1	W/O/W	7.79	14.4
2 Type 2	O/W	7.65	1.6
3 Type 3	Gel type	7.57	3.4

(2) Emulsion type에 따른 시험백신의 성상관찰

(가) Type 1 백신보조제로 제조한 시험백신은 균질한 성상을 보였고, type2와 type3 백신보조제로 제조한 시험백신은 불균질한 상태로 관찰되었음. 하지만 각각 손으로 흔들면 균질해졌음.

사. 실험동물 안전시험

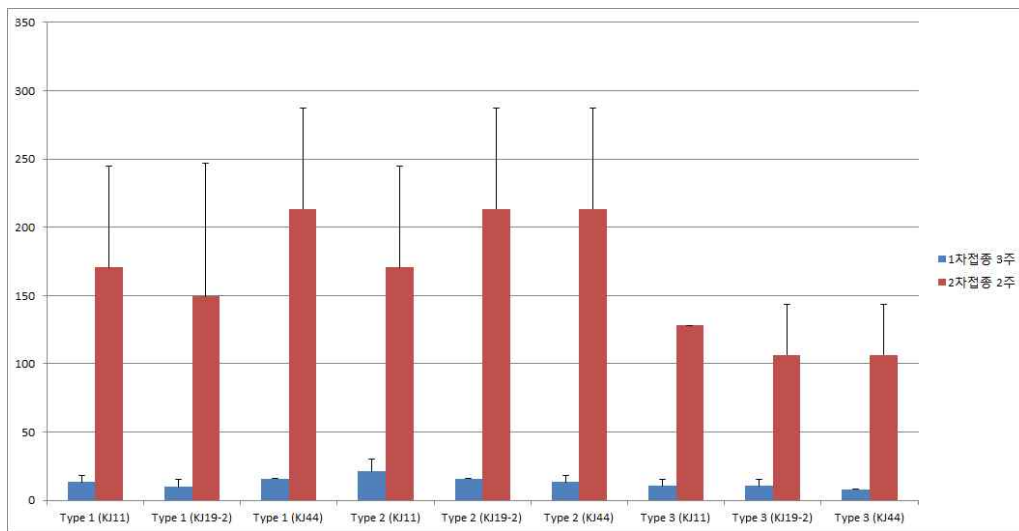
(1) 시험 그룹에 사용한 기니픽에 접종한 결과 모두 생존하였으며, 접종부위 이상 증상이 관찰되지 않았음.

아. 돼지 로타바이러스 불활화 혼합백신 실험동물 혈청역가시험

(1) 중화항체가 시험결과

(가) 기니픽에 그룹별 1차 접종 3주후, 2차 접종 2주후의 혈청 역가시험을 한 결과, 1차 접종 3주후에는 8~21배 수준의 낮은 항체가가 형성되었으며, 2차 접종 2주후에는 모든 그룹에서 64배 이상의 항체가가 형성되었음.

(나) 시험백신 그룹별 항체가 비료를 위하여 Turkey HSD 및 Duncan 통계학적 분석한 결과 3 그룹 간 및 중화검사 항원 간 유의적 차이가 없는 것으로 판정됨 (그림 1).



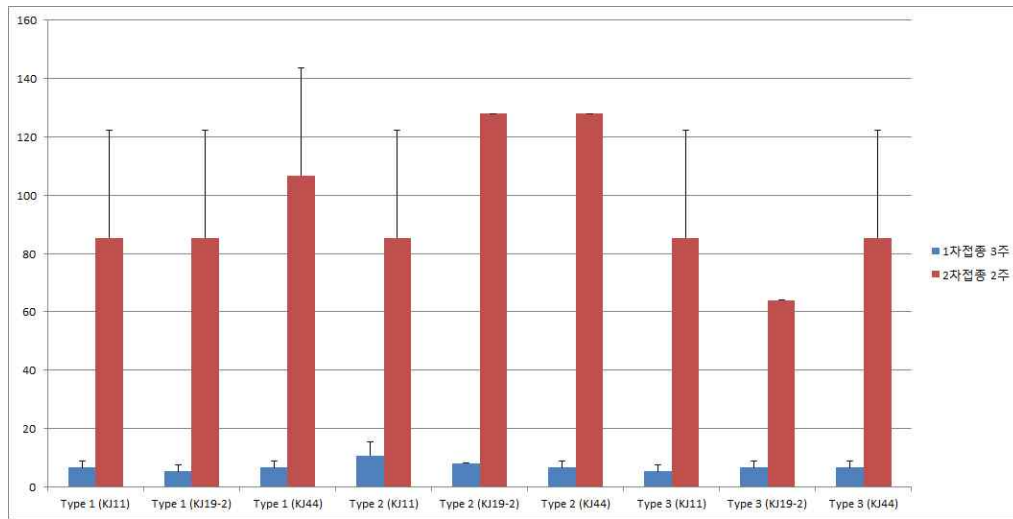
[그림 1] 돼지 로타바이러스 시험백신 기니픽 혈청역가 시험.

자. 돼지 로타바이러스 불활화 혼합백신 목적동물 혈청역가시험

(1) 중화항체가 시험결과

(가) 돼지에서 그룹별 혈청 역가 시험을 진행한 결과, 1차 접종 3주차에는 4~16배 수

준의 항체가가 형성된 반면, 2차 접종 2주 후에는 모든 그룹이 64~128배의 결과를 보였음(그림 2).



[그림 2] 돼지 로타바이러스 시험백신 돼지 혈청역가 시험.

#### 차. 백신보조제 결정

- (1) 위 결과와 생산단가 등을 종합적으로 정리 및 추후 혼합 백신 생산을 위해 type 2를 백신보조제로 결정하였음.

#### 카. 특성 시험

##### (1) 시험방법

(가) Type 2 adjuvant 사용한 3 Lots의 돼지 로타바이러스 시험백신을 동물용의약품 생물학적 제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-01에 따라 색, 혼탁도, 이물 또는 이취에 대하여 검사하였으며, 현탁 상태를 검사할 때는 지정된 용기에 지정된 희석액을 가하여 가볍게 흔들어서 혼탁도, 색조를 검사하였음.

##### (2) 시험결과

(가) 백색의 유탁주사액으로 이물, 이취 등이 없고 내용물 성상이 균일하였음(표 4).

[표 4] 시험 백신 특성시험 결과

Lot. No.	Tests				
	Color	Turbidity	Sediment	Foreign substance	Foreign odor
T315PR301	- *	-	-	-	-
T315PR302	-	-	-	-	-
T315PR303	-	-	-	-	-

\*Normal or negative.

타. 무균 시험

(1) 시험방법

(가) 시험백신을 nutrient agar(NA), nutrient broth(NB), fluid thioglycollate medium(Thio)에 2개의 시험관에 접종하여 22℃와 37℃에서 7일간 배양하면서 잡균의 존재 여부를 관찰하였음.

(2) 시험결과

(가) 어떠한 세균의 발육도 관찰할 수 없었음(표 5).

[표 5] 시험 백신 무균시험 결과

Lot. No.	22℃			37℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
T315PR301	-*	-	-	-	-	-
T315PR302	-	-	-	-	-	-
T315PR303	-	-	-	-	-	-

파. 수소이온농도시험

(1) 시험방법

(가) 시험백신을 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-03 에 따라 시험백신 각 Lot별로 백신의 수소이온농도를 측정하였음.

(2) 시험결과

(가) 수소이온농도는 pH 6.0~8.0 이내임을 확인하였음(표 6).

[표 6] 시험백신 수소 이온 농도 시험 결과

Lot. No.	pH
T315PR301	7.6
T315PR302	7.7
T315PR303	7.6

하. 방부제 정량시험

(1) 시험방법

(가) 시험백신을 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-09에 의하여 동물약품공정서의 일반시험법 중 Schiff 시약을 첨가하여 spectrophotometer를 이용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였음.

(2) 시험결과

(가) 포르말린 함량은 0.3% 이하로 확인되었음(표 7).

[표 7] 시험 백신 방부제 정량시험 결과

Lot. No.	Formalin content(%)
----------	---------------------

T315PR301	0.11
T315PR302	0.12
T315PR303	0.10

가. 불활화 확인시험

(1) 시험방법

(가) 불활화 된 바이러스 감염배양액을 원심 한 다음 그 상층액을 투석하여 시험품을 MA104 세포에 0.1ml씩 각각 접종하고, 대조 세포와 함께 37℃에서 7일간 배양한 후 돼지 로타바이러스 및 기타 바이러스에 의한 특유의 세포변성 (CPE)가 나타나는지 확인하였음.

(2) 시험결과

(가) 불활화 확인시험 결과 시험백신에서 세포변성효과가 나타나지 않았음(표 8).

[표 8] 시험 백신 불활화 확인 시험 결과

Lot. No.	Cell	Inoculation volumne(ml)	Results
			CPE
T315PR301	MA104	0.1	-
T315PR302		0.1	-
T315PR303		0.1	-
Control		-	-

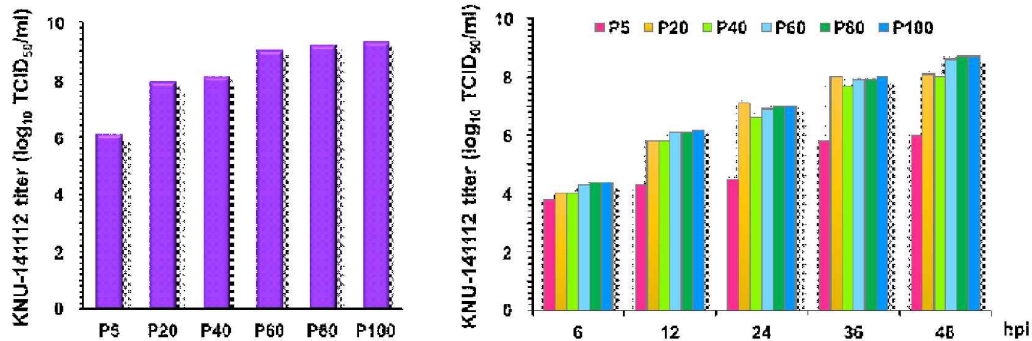
**결론**

- 목적동물과 실험동물에서 중화 항체가가 미흡한 것으로 판단됨.
- 불활화 백신의 효율을 올리기 위해 adjuvant 개선정 방법과 바이러스 역가를 올리는 방안이 있지만 현재 돼지 로타바이러스 백신 시장은 생건조 백신에 혼합 백신이 주임.
- 또한 돼지 로타바이러스의 불활화 백신 시험 결과 면역원성은 있는 것으로 확인되었으므로 생독백신의 가능성은 높은 것으로 판단됨.
- 따라서 불활화 백신의 추가실험은 배제하고 생독백신의 개발을 하였음.

## 6절. 돼지 PEDV 백신주 특성 분석 및 불활화 백신 전임상 시험

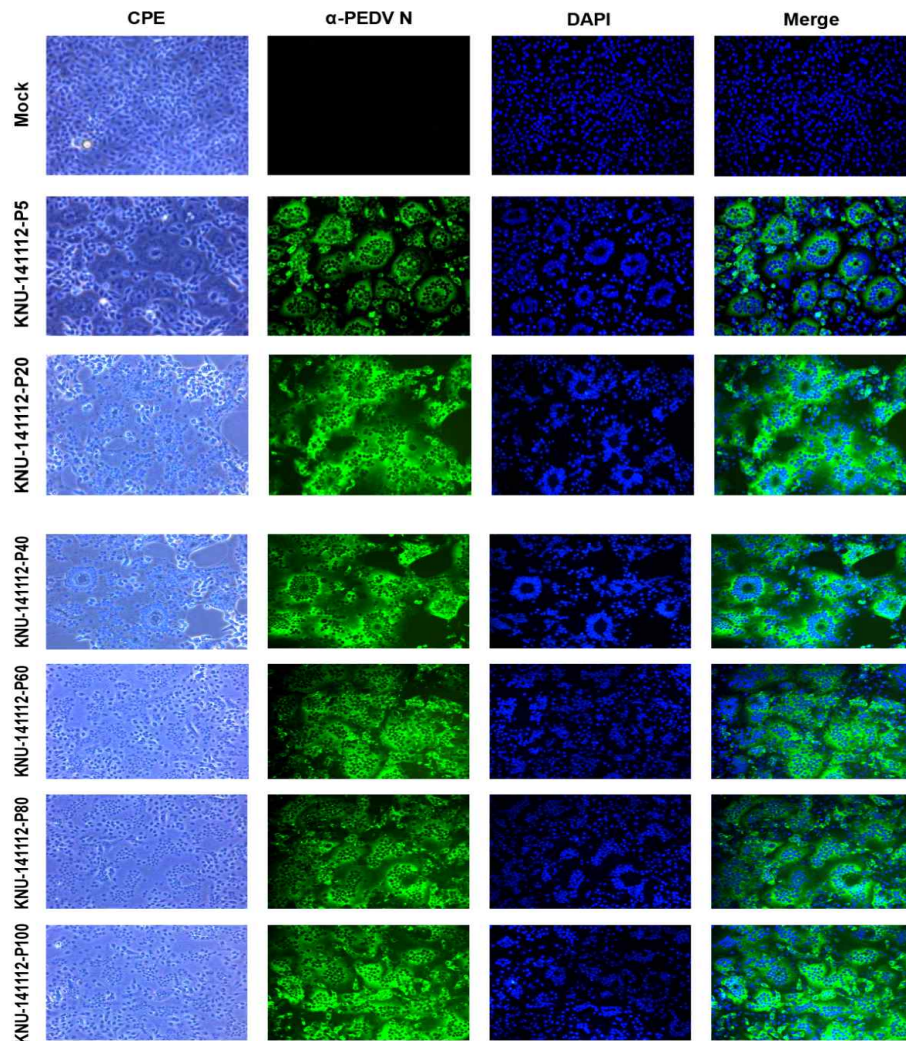
### 1. 돼지 PEDV 백신주 특성 분석

#### 가. 백신주 계대별 역가 분석



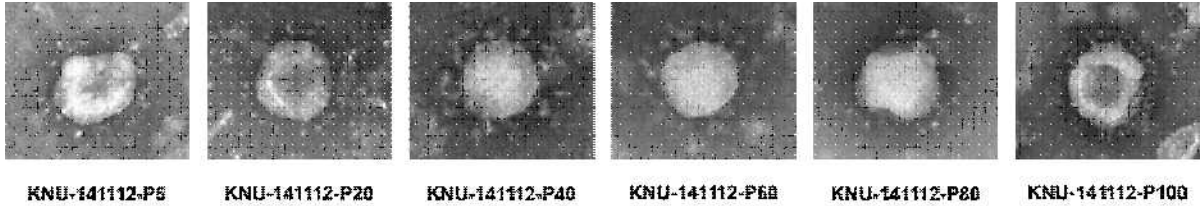
- 국내 분리주 KNU-141112를 Vero 세포에서 100대까지 계대한 결과 백신원주의 바이러스 역가는 10<sup>6.1</sup> TCID<sub>50</sub>/ml이었으며 세포에서 계대를 할수록 바이러스 역가가 점차 높아지는 것을 확인하였음.

#### 나. 백신주 계대별 CPE 및 항원성 분석



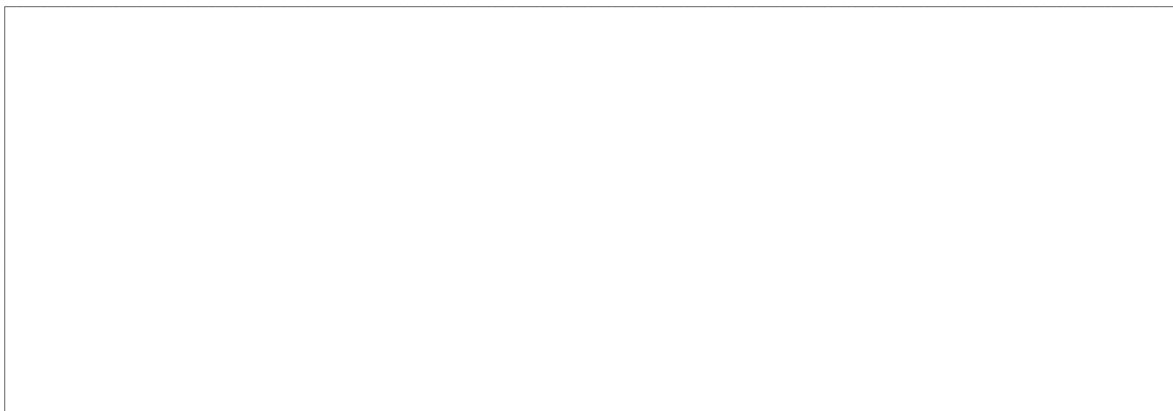
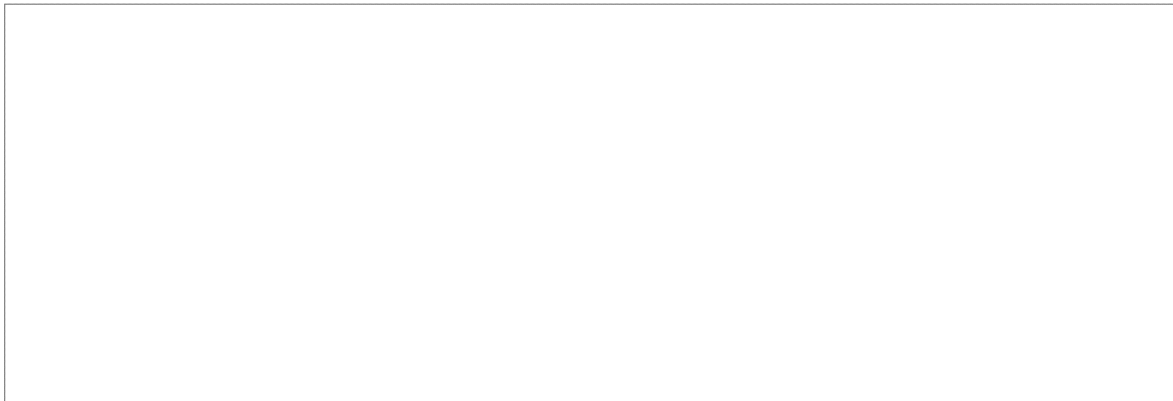
- KNU-141112 백신원주, 20대, 40대, 60대, 80대, 100대 각 계대별 바이러스에 대한 CPE 확인 및 바이러스 뉴클레오캡시드 단백질에 대한 단클론항체를 이용한 형광항체법을 통하여 바이러스에 양성반응을 보이는 세포를 confocal microscope에서 확인하였음. 합포체 형성 등의 바이러스 특이 세포변성효과를 확인할 수 있었고, 바이러스 접종에 따른 강한 양성반응을 확인하였음.

다. 백신주 계대별 바이러스 구조 분석



- KNU-141112 백신원주, 20대, 40대, 60대, 80대, 100대 각 계대별 바이러스를 배양한 상층액을 sucrose gradient로 농도구배 원심분리로 바이러스를 정제 후 침전물에 PTA로 혼합하는 negative staining을 수행하여 전자현미경으로 관찰한 결과, 백신원주 및 계대주에서 약 100nm 직경의 바이러스 입자를 확인하여, 계대배양에 따른 바이러스의 특성의 변화는 없었음.

라. 백신원주 유전체 전체 염기서열 분석 및 상동성 분석



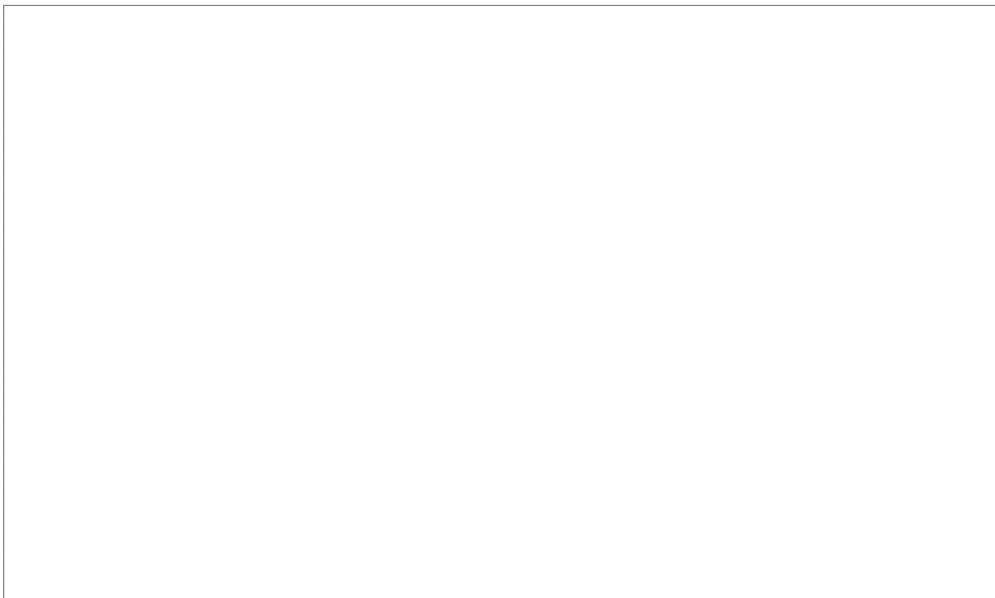


- KNU-141112 백신원주 바이러스(●)에서 돼지 유행성 설사 바이러스의 RNA를 추출하여 sequencing하여 각 6개의 유전체 염기서열 및 전체염기서열을 바탕으로 계통학적 분석을 하였음. 백신원주는 국내 유행주가 속하는 G2 그룹에 속하는 것을 확인하였음.

Strain	Nucleotide identity (%) (No. of nucleotide differences)													
	KNU-141112-feces	KNU-141112-P5	KNU-141112-P10	KNU-1305-Korea/2013	Co-3/USA/2013	IA1/USA/2013	MFN/USA/2013	IN17816/USA/2013	AH2012/China/2012	GD-R/China/2012	JS-HZ2012/China/2012	CV777-Belgium/1978	SM98-1/Korea/1998	DR-13/Korea/1999
KNU-141112-feces		99.9 (1)	95.9 (3)	99.5 (8)	99.8 (38)	99.8 (43)	99.9 (12)	99.9 (13)	99.5 (117)	99.2 (206)	99.3 (180)	96.7 (305)	95.3 ( 34)	96.8 (582)
KNU-141112-P5			99.9 (2)	99.5 (9)	99.8 (39)	99.8 (44)	99.9 (13)	99.9 (14)	99.5 (118)	99.2 (201)	99.3 (181)	96.7 (306)	95.3 ( 35)	96.8 (583)
KNU-141112-P10				99.5 (11)	99.8 (41)	99.8 (46)	99.9 (15)	99.9 (16)	99.5 (120)	99.2 (203)	99.3 (183)	96.7 (308)	95.3 ( 37)	96.8 (585)
KNU-1305-Korea/2013					99.8 (44)	99.8 (49)	99.9 (18)	99.9 (19)	99.5 (119)	99.2 (202)	99.3 (182)	96.7 (305)	95.3 ( 34)	96.8 (584)
Co-3/USA/2013						99.9 (11)	99.8 (40)	99.8 (43)	99.5 (119)	99.2 (192)	99.3 (172)	96.7 (308)	95.3 ( 37)	96.8 (590)
IA1/USA/2013							99.8 (45)	99.8 (48)	99.5 (114)	99.2 (197)	99.3 (177)	96.7 (313)	95.3 ( 42)	96.8 (595)
MFN/USA/2013								99.9 (13)	99.5 (119)	99.2 (202)	99.3 (182)	96.7 (306)	95.3 ( 35)	96.8 (585)
IN17816/USA/2013									99.5 (118)	99.2 (205)	99.3 (185)	96.7 (310)	95.3 ( 39)	96.8 (587)
AH2012/China/2012										99.4 (164)	99.4 (147)	96.8 (306)	95.3 ( 42)	96.8 (580)
GD-R/China/2012											99.8 (22)	96.8 (307)	95.3 ( 42)	96.8 (575)
JS-HZ2012/China/2012												96.8 (309)	95.4 ( 40)	96.8 (577)
CV777-Belgium/1978													97.2 (651)	97.2 (651)
SM98-1/Korea/1998														97.6 (581)
DR-13/Korea/1999														97.6 (582)

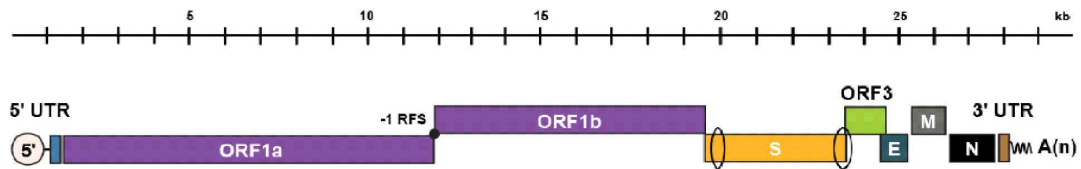
- KNU-141112 백신원주 바이러스 전체염기서열을 바탕으로 백신원주 및 다른 돼지 유행성 설사 바이러스간의 상동성을 확인하였음.

마. 백신주 계대별 유전자 유전형 분석



- KNU-141112 백신원주, 20대, 40대, 60대, 80대, 100대 각 계대별 바이러스(●)에서 RNA를 추출하여 스파이크 유전자의 염기서열을 sequencing 하여 확인하였다. 염기서열을 바탕으로 계통학적 분석하였다. 백신주 및 각 계대 바이러스는 국내 유행주를 포함하는 G2b 그룹에 속하는 것을 확인하였으며 계대 간의 계통학적 차이는 관찰되지 않았음.

Strain	Nucleotide identity (%)																				
	KNU-141112-feces	KNU-141112-P5	KNU-141112-P10	KNU-141112-P20	KNU-141112-P40	KNU-141112-P60	KNU-141112-P80	KNU-141112-P100	KNU-1305-Korea/2013	Co-3/USA/2013	IA1/USA/2013	MFN/USA/2013	IN17816/USA/2013	AH2012/China/2012	GD-R/China/2012	JS-HZ2012/China/2012	CV777-Belgium/1978	SM98-1/Korea/1998	DR-13/Korea/1999		
KNU-141112-feces		99.9	94.9	99.5	99.9	99.9	99.1	99.1	99.9	99.8	99.9	99.9	99.9	99.2	99.2	99.3	95.3	92.0	93.2	93.2	
KNU-141112-P5			99.9	99.9	99.9	99.9	99.7	99.1	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.5	99.5	99.6	95.6	92.0	93.2	93.2	
KNU-141112-P10				100	100	100	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.1	99.1	99.2	95.6	92.0	93.2	93.2	
KNU-141112-P20					100	100	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.1	99.1	99.2	95.6	92.0	93.2	93.2	
KNU-141112-P40						100	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.6	99.6	99.7	95.6	92.0	93.2	93.2	
KNU-141112-P60							99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.1	99.1	99.2	95.6	92.0	93.2	93.2	
KNU-141112-P80								99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.1	99.1	99.2	95.6	92.0	93.2	93.2	
KNU-141112-P100									99.1	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.1	95.6	92.0	93.2	93.2	
KNU-141112-P200										99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.1	95.6	92.0	93.2	93.2	
Co-3/USA/2013											99.8	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	95.6	92.0	93.2	93.2	
IA1/USA/2013												99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	95.6	92.0	93.2	93.2	
MFN/USA/2013													99.9	99.9	99.9	99.9	95.6	92.0	93.2	93.2	
IN17816/USA/2013														99.9	99.9	99.9	95.6	92.0	93.2	93.2	
AH2012/China/2012															99.9	99.9	95.6	92.0	93.2	93.2	
GD-R/China/2012																99.8	95.6	92.0	93.2	93.2	
JS-HZ2012/China/2012																	95.6	92.0	93.2	93.2	
CV777-Belgium/1978																		97.2	97.2	97.2	97.2
SM98-1/Korea/1998																			97.6	97.6	97.6
DR-13/Korea/1999																				97.6	97.6



```

P5   156 TCTACCTATTGGTGA AAAACCAG 177   4130 ACGAAGTTTTGAAAAGGTCACCGTGCAGTGA TGTTCCTGGACTTTTCAATACAGGATGACACAGTTGTC 4202
P20  156 TCTACCTATTGGTGA AAAACCAG 177   4130 ACGAAGTTTTGAAAAGGTCACCGTGCAGTGA TGTTCCTGGACTTTTCAATACAGGATGACACAGTTGTC 4202
P40  156 TCTACCTATTGGTGA AAAACCAG 177   4130 ACGAAGTTTTGAAAAGGTCACCGTGCAGTGA TGTTCCTGGACTTTTCAATACAGGATGACACAGTTGTC 4202
P60  156 TCTACCTA-----AAAACCAG 171   4124 ACGAAGTTC-----ACGATGACACAGTTGTC 4150
P80  156 TCTACCTA-----AAAACCAG 171   4124 ACGAAGTTC-----ACGATGACACAGTTGTC 4150
P100 156 TCTACCTA-----AAAACCAG 171   4124 ACGAAGTTC-----ACGATGACACAGTTGTC 4144
  
```

- KNU-141112 백신원주, 20대, 40대, 60대, 80대, 100대 각 계대별 바이러스의 스파이크 유전자의 염기서열을 토대로 상동성을 확인하였다. 연속 계대배양으로 염기서열의 치환과 결실이 발생하였음. 60대부터 스파이크 유전자 C-terminus 부근에서 6개의 뉴클레오타이드 결실이 확인되었으며 N-terminus에서 60대와 80대는 46개, 100대에서는 52개의 뉴클레오타이드 결실을 확인하였음.

바. 돼지 PEDV 반수유효량(50% Effective Dose; ED<sub>50</sub>) 결정 시험

(1) 돼지 PEDV 공격바이러스 설사 유발 반수유효량

--	--

<sup>a</sup> -, no diarrhea; +, mild to moderate diarrhea; ++, severe diarrhea  
<sup>b</sup> Mortality attributed to PEDV infection confirmed by RT-PCR and necropsy diagnosis  
<sup>c</sup> Not determined due to the death of this piglet

- 국내 분리주인 KNU-141112를 이용하여 공격바이러스 설사 유발 반수유효량 결정시험을 하였음. 그 결과, 설사 유발 반수유효량은  $4.5 \log_{10} \text{ED}_{50}/\text{ml}$  ( $10^{0.5} \text{TCID}_{50}$ )였음.

## 2. 돼지 PED 불활화 백신 전임상 시험

### 가. Seed 및 배양세포 확립

- (1) 자체 분리한 돼지 PEDV 1개의 strain을 Table 1과 같이 백신 seed의 제조번호를 부여하고 master, working, production seed를 확립하였음.
- (2) 돼지 PEDV 발생농장 자돈에서 분리되어 Vero 세포에서 30계대 한 바이러스로서 세포내 병원성을 유지하고 있었음.
- (3) Vero 세포에 접종 2일 후부터 특이적인 CPE를 형성하였으며, 바이러스 증식성은  $10^{6.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$  이상이었음.

[표 1] 돼지 PEDV백신 seed 및 배양세포 확립

Strain	Seed 제조번호	Cell (제조번호)	Master seed	생산용 종독	Production seed
PED-XX (미정)	RD-B-V-024	Vero (SOP-CM-C02-01)	30th	2계대	32th

### 나. Seed 제조단위 시스템

- (1) 세포증식용 배양액( $\alpha$ -MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 0.1%)에 ml당 15~30만개의 Vero 세포를 분산시켜 37°C에서 4~5일간 배양한 다음 배양액을 제거한 후 돼지 PEDV를 0.1 M.O.I 접종하여 37°C에서 1시간 배양한 후 바이러스 증식용 배양액( $\alpha$ -MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 0.1%, trypsin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 가한 다음 3일간 회전 배양하면서 세포변성효과가 약 80% 이상 일어날 때까지 배양하였음.

### 다. Master seed

- (1) 80대 계대 된 돼지 PEDV를 단층이 형성된 Vero 세포에 접종하여 37°C에서 3~4일간 배양한 후, 접종 바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채득하여 -80°C의 냉동고에 동결보존 및 동결건조하여 원종독으로 사용하였음.

### 라. Production seed

- (1) Master seed와 같은 계대방법으로 2대 계대한 돼지 PEDV를 단층이 형성된 Vero 세포에 접종하여 37°C에서 3~4일간 배양한 후, 접종바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채득하여 -80°C의 냉동고에 동결건조하여 생산용 종독으로 사용하였음.

### 마. 배양조건 확립

- (1) 바이러스 접종

(가) Vero 세포를 세포증식용 배양액에 ml당 15~30만개의세포를 분산시킨 후, 37℃에서 4~5일간 배양한 다음 배양 세포가 단층을 형성하였을 때 배양액을 제거한 후 돼지 PEDV를 0.1 M.O.I 접종하고 37℃에서 1시간 흡착배양한 후 바이러스 증식용 배양액을 넣었음.

(2) 바이러스 배양

(가) Vero 세포에 바이러스를 접종한 후 37℃에서 3~4일간 배양하였음.

(3) 채독 및 불활화

(가) 37℃에서 3~4일간 배양한 후 돼지 PEDV에 의한 세포변성 효과가 약 80%이상 일어났을 때 배양감염액을 채독하였음.

(나) 채독한 배양감염액에 0.1M BEI를 최종농도 1mM 되게 첨가함. 이 후, 37℃에서 24시간 동안 교반하며 불활화 시킨 다음, 1M sodium thiosulfate를 최종 농도 1mM 되게 첨가함. 4℃에서 24시간 교반하면서 중화함.

바. Adjuvant 확립

(1) Adjuvant 결정 시험

(가) 표 2와 같이 백신보조제 3종에 따른 시험백신 3종을 제조하여 emulsion type에 따른 특성시험 (pH 측정, 점도측정, 정상관찰) 및 동물 실험을 실시하였음.

[표 2] 돼지 로타바이러스 백신보조제 종류에 따른 시험백신 (3종)

	항원량(TCID <sub>50</sub> /dose)	Adjuvant		Emulsion type	비고
Group 1	10 <sup>6.0</sup> ,50%	Type 1	50%	W/O/W	
Group 2	10 <sup>6.0</sup> ,80%	Type 2	20%	O/W	
Group 3	10 <sup>6.0</sup> ,80%	Type 3	60%	W/O	
Group 4	315PEDX17	CAWIO	60%	W/O	Emulsion type 대조군
Group 5	-	-	-	-	음성대조군

(나) 시험결과 돼지 PEDV 시험백신의 pH는 7.66~7.86로 나타났으며 emulsion type에 따른 차이 없이 검정기준 내의 값으로 측정되었음.

(다) 점도의 경우, emulsion type에 따라 차이가 W/O type인 경우, 가장 높은 156.2cP이었음(표 3).

[표 3] Emulsion type에 따른 시험 백신의 pH 및 점도

	시험백신 조성	Emulsion type	pH	점도(cP)
1	Type 1	W/O/W	7.85	14.2
2	Type 2	O/W	7.66	1.5
3	Type 3	W/O	7.80	55.9

## (2) Emulsion type에 따른 시험백신의 성장관찰

(가) Type 1 백신보조제로 제조한 시험 백신은 균질한 성상을 보였음.

(나) Type 2 백신보조제로 제조한 시험백신은 불균질한 상태로 관찰되었음. 하지만 type 2는 손으로 흔들면 균질해졌음.

## 사. 실험동물 안전시험

(1) 시험 그룹에 사용한 기니픽에 접종한 결과 모두 생존하였으며, 접종부위 이상 증상이 관찰되지 않았음.

## 아. 돼지 PEDV 불활화 백신 실험동물 혈청역가시험

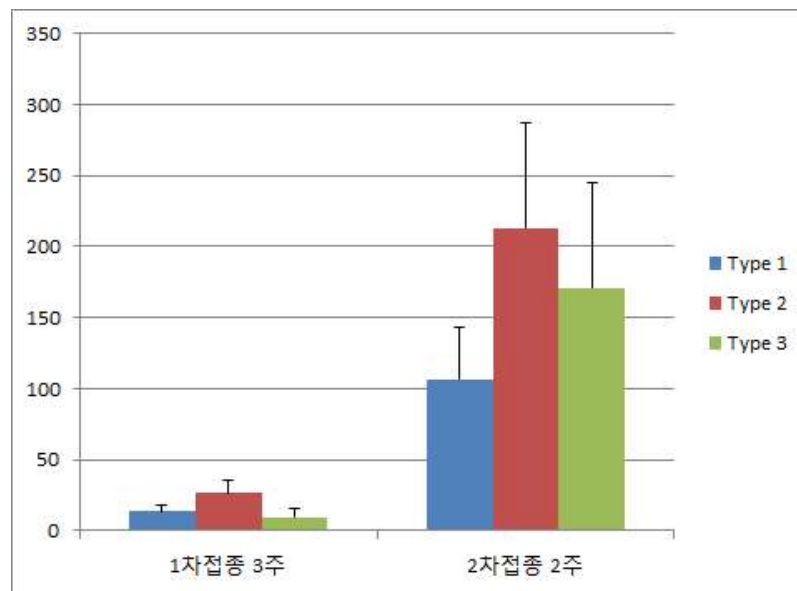
## (1) 중화항체가 시험결과

(가) 기니픽과 자돈에 그룹별 1차 접종 3주후, 2차 접종 2주후의 혈청 역가시험을 한 결과, 기니픽에서는 1차 접종 3주후에는 4~32배 수준의 낮은 항체가가 형성되었으나. 2차 접종 2주후에는 type 1 그룹은 128배 이하, 나머지 2 그룹은 128배를 상회하는 결과를 나타냈음.

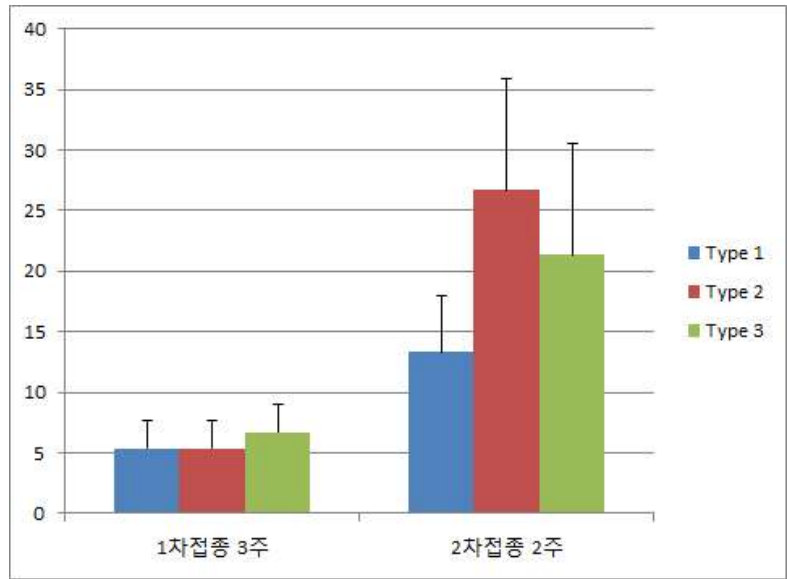
(나) 자돈에서는 1차 접종 3주후부터 4~8배 수준의 낮은 항체가가 형성되었으나. 2차 접종 2주후에는 type 1 그룹은 13배, 나머지 2 그룹은 16배를 상회하는 결과를 나타냈음.

(다) 시험백신 그룹별 항체가 비교를 위하여 통계 처리한 결과, 기니픽과 자돈 그룹 모두에서 turkey HSD 분석시 그룹간의 차이가 없는 것으로 평가되었음.

(라) Duncan 분석 시 두 동물 그룹 모두 Figs. 1 & 2와 같이 type 2 > type 3 > type 1 순으로 평가되었음.



[그림 1] 돼지 PEDV 시험백신 기니픽 혈청역가 시험결과.



[그림 2] 돼지 PEDV 시험백신 돼지 혈청역가 시험결과.

자. 백신보조제 결정

- (1) 위 결과와 생산단가 등을 종합적으로 정리 및 추후 혼합 백신 생산을 위해 type 2 를 백신보조제로 결정하였음.

차. 특성 시험

(1) 시험방법

- (가) Type 2 adjuvant 사용한 3 Lots의 돼지 PEDV 시험백신을 동물용의약품 생물학적 제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-01에 따라 색, 혼탁도, 이물 또는 이취에 대하여 검사하였으며, 현탁 상태를 검사할 때는 지정된 용기에 지정된 희석액을 가하여 가볍게 흔들어서 혼탁도, 색조를 검사하였음.

(2) 시험결과

- (가) 백색의 유탁주사액으로 이물, 이취 등이 없고 내용물 성상이 균일하였음(표 4).

[표 4] 시험 백신 특성시험 결과

Lot. No.	Tests				
	Color	Turbidity	Sediment	Foreign substance	Foreign odor
T315PEDAX01	- *	-	-	-	-
T315PEDAX02	-	-	-	-	-
T315PEDAX03	-	-	-	-	-

\*Normal or negative.

카. 무균 시험

(1) 시험방법

- (가) 시험백신을 nutrient agar(NA), nutrient broth(NB), fluid thioglycollate medium(Thio)에 2개의 시험관에 접종하여 22℃와 37℃에서 7일간 배양하면서 잡균의 존재 여부를 관찰하였음.



(2) 시험결과

(가) 어떠한 세균의 발육도 관찰할 수 없었음(표 5).

[표 5] 시험 백신 무균시험 결과

Lot. No.	22°C			37°C		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
T315PEDAX01	-*	-	-	-	-	-
T315PEDAX02	-	-	-	-	-	-
T315PEDAX03	-	-	-	-	-	-

다. 수소이온농도시험

(1) 시험방법

(가) 시험백신을 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-03 에 따라 시험백신 각 Lot별로 백신의 수소이온농도를 측정하였음.

(2) 시험결과

(가) 수소이온농도는 pH 6.0~8.0 이내임을 확인하였음(표 6).

[표 6] 시험백신 수소 이온 농도 시험 결과

Lot. No.	pH
T315PEDAX01	7.5
T315PEDAX02	7.6
T315PEDAX03	7.5

파. 방부제 정량시험

(1) 시험방법

(가) 시험백신을 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-09에 의하여 동물약품공정서의 일반시험법 중 ICP 발광분석분법에 따라 시험하여 Timerosal을 정량하였음.

(2) 시험결과

(가) Timerosal 함량은 0.3% 이하로 확인되었음(표 7).

[표 7] 시험 백신 방부제 정량시험 결과

Lot. No.	Thimerosal contents							
	0 MPM*	3 MPM	6 MPM	9 MPM	12 MPM	18 MPM	24 MPM	27 MPM
T315PEDAX01	0.0085	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
T315PEDAX02	0.0095	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
T315PEDAX03	0.0085	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

하. 불활화 확인시험

(1) 시험방법

(가) 불활화 된 바이러스 감염배양액을 원심 한 다음 그 상층액을 투석하여 시험품을 Vero 세포에 0.1ml씩 각각 접종하고, 대조 세포와 함께 37°C에서 7일간 배양한 후 돼지 PEDV 및 기타 바이러스에 의한 특유의 세포변성 (CPE)가 나타나는지 확인하였음.

(2) 시험결과

(가) 불활화 확인시험 결과 시험백신에서 세포변성효과가 나타나지 않았음(표 8).

[표 8] 시험 백신 불활화 확인 시험 결과

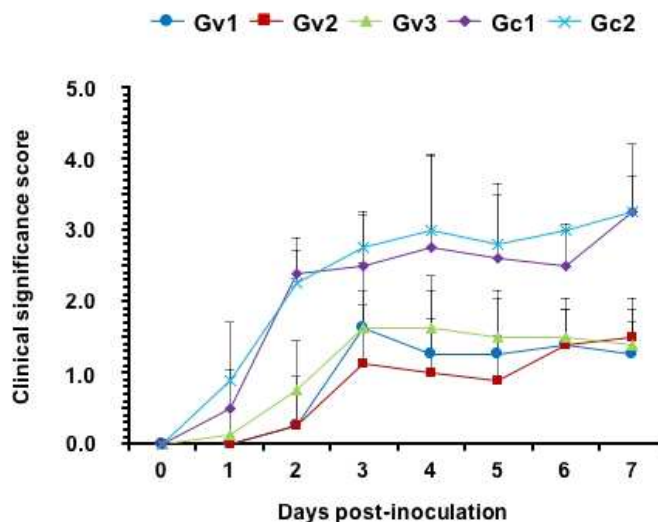
Lot. No.	Cell	Inoculation volumne(ml)	Results
			CPE
T315PEDAX01	Vero	0.1	-
T315PEDAX02		0.1	-
T315PEDAX03		0.1	-
Control		-	-

가. 돼지 PED 불활화백신 방어능 검사

(1) 설사예방 효능

(가) 백신접종 모돈과 백신미접종 모돈 각각의 자돈에서의 공격접종 시 분변을 통한 바이러스 배출을 확인하였음.

(나) 설사 스코어링은 분변 상태가 정상일 때(평균 Ct값이 45보다 높을 경우) 0, 가벼운 설사의 경우 1, 보통의 수양성 설사의 경우 2, 심각한 설사 및 projectile diarrhea의 경우 (평균 Ct값이 20 미만일 경우) 3, 폐사를 4로 하였음. 이의 기준에 따르면, 백신접종 모돈의 자돈에서 설사가 심하지 않으며 바이러스 배출이 적은 것을 확인하였음(그림 3).



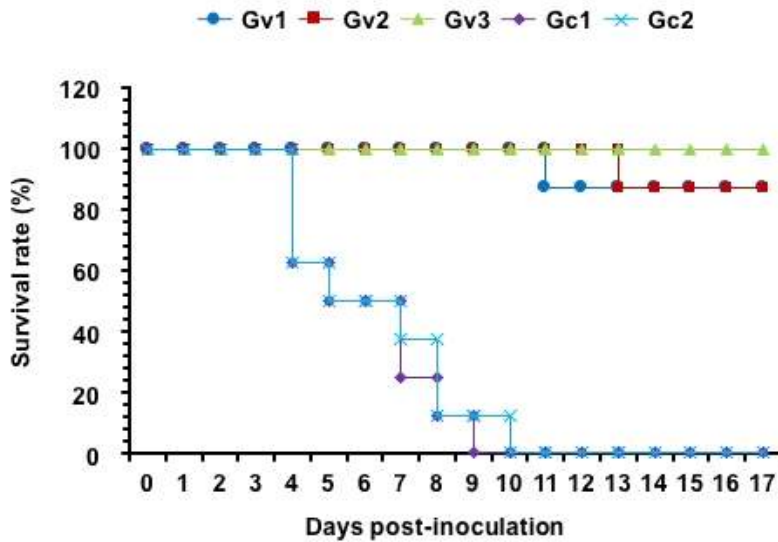
[그림 3] 돼지 PEDV 불활화 백신 미투여 및 투여 모돈에서 분만한 자돈에 공격접종

시 설사 예방 효능 시험결과.

(2) 폐사율 저감 효능

(가) 백신접종 모돈과 백신미접종 모돈에서 분만한 각각의 자돈에서의 공격접종 시 생존률을 확인하였음.

(나) 그 결과, 접종 4일차에 백신미접종 모돈에서 분만한 자돈의 37.5%가 폐사하였으며 접종 9일차 모두 폐사한 것을 확인하였음. 이와는 달리 백신접종 모돈의 자돈들에서는 2마리만이 폐사하여 불활화 백신의 효능을 확인하였음(그림 4).



[그림 4] 돼지 PEDV 불활화 백신 미투여 및 투여 모돈에서 분만한 자돈에 공격접종 시 폐사율 저감.

3) 혈청역가 시험

(가) 백신접종 및 백신미접종 모돈 그리고 각각의 자돈에서 혈청을 이용한 중화시험을 실시하였음.

(나) 그 결과, 백신미접종 모돈 및 자돈들과 달리 백신접종 모돈과 자돈에서 높은 중화항체가가 확인되었음. 따라서 불활화 백신접종에 따른 모돈의 중화 항체가 자돈으로 이행되어 공격접종에 대한 방어를 형성하여 자돈들이 생존할 수 있었으며 이를 통해 불활화 백신의 효능이 입증되었음(표 9).

Table 9. 돼지 PEDV 불활화 백신 미투여 및 투여 모돈과 분만 자돈에서의 혈청 역가 검사 결과

Sow	VN	Piglet	VN
V1	64	Gv1-1	654
		Gv1-2	>256
		Gv1-3	>256
V2	>256	Gv2-1	128

V3	128	Gv2-2	64
		Gv2-3	>256
		Gv3-1	128
		Gv3-2	128
C1	<4	Gv3-3	>256
		Gc1-1	<4
		Gc1-2	<4
C2	<4	Gc1-3	<4
		Gc2-1	<4
		Gc2-2	<4
		Gc2-3	<4

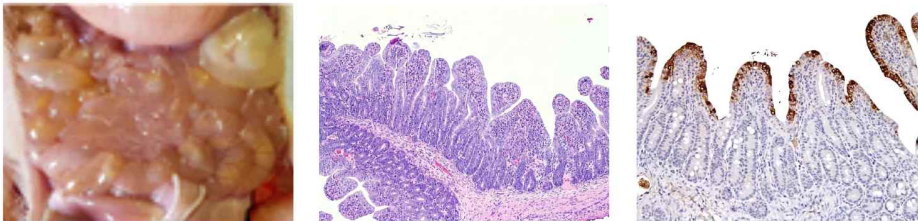
#### 4) 병변 완화 효과

(가) 병리조직 검사 결과 불활화백신 미접종 모돈의 자돈들은 부검 후 육안으로 관찰한 결과 PED 바이러스 감염의 전형적인 증상인 소장벽이 얇아지고 투명해지는 것을 확인하였음.

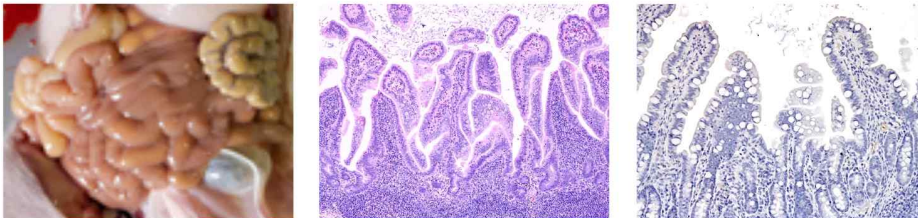
(나) 병리조직학적으로 돼지의 소장 용모상피세포의 위축, 탈락 및 공포화를 확인하였으며 또한 면역조직화학 염색을 통해 백신미접종 모돈의 자돈(Gc) 그룹에서 소장 용모상피세포에서 뚜렷한 PED 바이러스 검출을 확인하였음.

(다) 이에 반해 백신접종 모돈의 자돈 그룹(Gv)은 육안 및 조직병리학적 검사 결과 정상으로 확인되었음(그림 6).

#### 백신미접종돈 (Gc)



#### 백신접종돈 (Gv)



[그림 6] 돼지 PEDV 불활화 백신 미투여 및 투여 모돈에서 분만한 자돈에 공격접종 시 백신 투여에 의한 소장의 육안적 및 병리조직학적 병변 저감 및 면역조직화학적 항원 감소 결과.

## 결론

- 불활화 백신을 투여한 목적 동물에서 유효성이 있는 설사 예방효과, 병변 감소효과, 혈청 항체가가 확인되었음.
- 현재 돼지 PEDV 백신 시장은 생건조 백신이 주임.
- 또한 돼지 PEDV 불활화 백신 시험 결과 면역원성은 있는 것으로 확인되었으므로 생독백신의 가능성은 높은 것으로 판단됨.
- 따라서 불활화 백신의 추가실험은 배제하고 생독백신의 개발을 하였음.

## 7절. 돼지 로타바이러스 생건조 혼합백신 전임상 시험

### 1. 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 확립

#### 가. Seed 및 배양세포 확립

- (1) 돼지 로타바이러스 불활화 백신 개발을 위한 돼지 로타바이러스 seed 및 배양세포를 확립 방법과 동일하게 생건조 백신 seed 및 배양세포를 확립하였음(표 1).
- (2) 다만 K71 strain의 경우 G type과 P type이 동일한 기존의 TR2백신의 A1 균주와 비교실험을 통하여 결과에 따라 최종 백신 구성 strain을 결정하기로 하였음.

[표 1] 돼지 로타바이러스 백신 seed 및 배양세포 확립

Strain	Seed 제조번호	Cell (제조번호)	Master seed	생산용 종독	Production seed
K174 (G8P[7])	RD-P-V-006	TF(SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th
06-42 (G9P[23])	RD-P-V-018	TF(SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th
A1 (G5P[7])	RD-P-V-043	TF(SOP-CM-C08-01)	1st	2계대	3rd
K71 (G5P[7])	RD-P-V-012	TF(SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th

#### 나. Seed 제조단위 시스템

- (1) 세포증식용 배양액( $\alpha$ -MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml) 0.1%)에 ml당 15~30만개의 MA104 세포를 분산시켜 37℃에서 4~5일간 배양한 다음 배양액을 제거한 후 돼지 로타바이러스를 0.1 M.O.I 접종하여 37℃에서 1시간 배양한 후 바이러스 증식용 배양액( $\alpha$ -MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml) 0.1%, trypsin 1 $\mu$ g/ml)을 가한 다음 3일간 회전 배양하면서 세포변성효과가 약 80% 이상 일어날 때까지 배양하였음.

#### 다. Master seed

- (1) 80대 계대 된 돼지 로타바이러스를 단층이 형성된 MA104세포에 접종하여 37℃에서 3~4일간 배양한 후, 접종 바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채독하여 -80℃의 냉동고에 동결보존 및 동결건조하여 원종독으로 사용하였음.

#### 라. Production seed

- (1) Master seed와 같은 계대방법으로 2대 계대한 돼지 로타바이러스를 단층이 형성된 MA104세포에 접종하여 37℃에서 3~4일간 배양한 후, 접종 바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채독하여 -80℃의 냉동고에 동결건조하여 생산용 종독으로 사용하였음.

#### 마. 배양조건 확립

- (1) 바이러스 접종



(가) MA104 세포를 세포증식용 배양액에 ml당 15~30만개의세포를 분산시킨 후, 37℃에서 4~5일간 배양한 다음 배양 세포가 단층을 형성하였을 때 배양액을 제거한 후 돼지 로타바이러스를 0.1 M.O.I 접종하고 37℃에서 1시간 흡착배양한 후 바이러스 증식용 배양액을 넣었음.

(2) 바이러스 배양

(가) 세포에 바이러스를 접종한 후 37℃에서 3~4일간 배양하였음.

(3) 채독

(가) 37℃에서 3~4일간 배양한 후 돼지 로타바이러스에 의한 세포변성 효과가 약 80%이상 일어났을 때 배양감염액을 채독하였음.

바. 보호제 조성 결정

(1) 기존 TR2 백신에서 안전성 및 효능이 입증된 보호제 성분으로 결정하였음(표 2).

[표 2] 돼지 로타바이러스 보호제

구성 성분	합량
Trehalose	100g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.517g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

사. 시험 백신 생산

(1) 동결 건조 형태로 아래와 같이 20병씩 3 lot의 시험백신을 제조하였음.

(2) 바이러스 함량은 기존 TR2제품의 10<sup>6.0</sup> TCID<sub>50</sub>/1 dose 이상 기준으로 제조하였음 (표 3).

[표 3] 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 시험백신 정보

Lot. No.	Date manufactured	Contents (per 1 dose)	Quantity (5 doses/vial)
T316Rota-K174-Lot1	2016.11.01.	Porcine rotavirus KJ174 strain ..... Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Rota-K174-Lot2	2016.11.03.	Porcine rotavirus KJ174 strain ..... Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Rota-KJ174-Lot3	2016.11.04.	Porcine rotavirus KJ174 strain ..... Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Rota-06-42-Lot1	2016.11.07.	Porcine rotavirus 06-42 strain ..... Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Rota-06-42-Lot2	2016.11.09.	Porcine rotavirus 06-42 strain ..... Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Rota-06-42-Lot3	2016.11.11.	Porcine rotavirus 06-42 strain ..... Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Rota- A1-Lot1	2016.11.14.	Porcine rotavirus A1 strain ..... Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub> Stabilizer ..... Suitable amount	20 vials
T316Rota- A1-Lot2	2016.11.16.	Porcine rotavirus A1 strain ..... Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	20 vials

		Stabilizer .....	Suitable amount	
T316Rota- A1-Lot3	2016.11.18.	Porcine rotavirus A1 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	20 vials
		Stabilizer .....	Suitable amount	
T316Rota- K71-Lot1	2016.11.14.	Porcine rotavirus K71 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	20 vials
		Stabilizer .....	Suitable amount	
T316Rota- K71-Lot2	2016.11.16.	Porcine rotavirus K71 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	20 vials
		Stabilizer .....	Suitable amount	
T316Rota- K71-Lot3	2016.11.18.	Porcine rotavirus K71 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	20 vials
		Stabilizer .....	Suitable amount	
T316R3A1-Lot1	2016.11.21.	Porcine rotavirus KJ174 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	20 vials
		Porcine rotavirus 06-42 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
		Porcine rotavirus A1 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
		Stabilizer .....	Suitable amount	
T316R3A1-Lot2	2016.11.23.	Porcine rotavirus KJ174 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	20 vials
		Porcine rotavirus 06-42 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
		Porcine rotavirus A1 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
		Stabilizer .....	Suitable amount	
T316R3A1-Lot3	2016.11.25.	Porcine rotavirus KJ174 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	20 vials
		Porcine rotavirus 06-42 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
		Porcine rotavirus A1 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
		Stabilizer .....	Suitable amount	
T316R3K71-Lot1	2016.11.28.	Porcine rotavirus KJ174 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	20 vials
		Porcine rotavirus 06-42 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
		Porcine rotavirus K71 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
		Stabilizer .....	Suitable amount	
T316R3K71-Lot2	2016.11.29.	Porcine rotavirus KJ174 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	20 vials
		Porcine rotavirus 06-42 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
		Porcine rotavirus K71 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
		Stabilizer .....	Suitable amount	
T316R3K71-Lot3	2016.11.30.	Porcine rotavirus KJ174 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	20 vials
		Porcine rotavirus 06-42 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
		Porcine rotavirus K71 strain .....	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
		Stabilizer .....	Suitable amount	

\*MFD: 제조일.

아. 안전시험

(1) 단일 돼지 로타바이러스 후보주 및 3종 혼합 로타바이러스 생건조 혼합백신의 안전 시험 결과, 마우스, 기니픽, 돼지에소 모두 안전성이 확인되었음(표 4-9).

[표 4] 돼지 로타바이러스 174주 단일 생건조 백신의 안전시험 결과

Species	Lot No.	Route of administration	No. of animals	Amount of vaccine	Clinical signs
Mice	T316Rota-K174-Lot1	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316Rota-K174-Lot2	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316Rota-KJ174-Lot3	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None

Guinea pigs	T316Rota-K174-Lot1	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota-K174-Lot2	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ174-Lot3	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota-K174-Lot1	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Rota-K174-Lot2	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Rota-KJ174-Lot3	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
Pigs	T316Rota-K174-Lot1	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316Rota-K174-Lot2	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316Rota-KJ174-Lot3	Intra-muscle	2	10 ml	None

[표 5] 돼지 로타바이러스 06-42주 단일 생건조 백신의 안전시험 결과

Species	Lot No.	Route of administration	No. of animals	Amount of vaccine	Clinical signs
Mice	T316Rota-06-42-Lot1	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316Rota-06-42-Lot2	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316Rota-06-42-Lot3	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
Guinea pigs	T316Rota-06-42-Lot1	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota-06-42-Lot2	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota-06-42-Lot3	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota-06-42-Lot1	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Rota-06-42-Lot2	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Rota-06-42-Lot3	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
Pigs	T316Rota-06-42-Lot1	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316Rota-06-42-Lot2	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316Rota-06-42-Lot3	Intra-muscle	2	10 ml	None

[표 6] 돼지 로타바이러스 A1주 단일 생건조 백신의 안전시험 결과

Species	Lot No.	Route of administration	No. of animals	Amount of vaccine	Clinical signs
Mice	T316Rota- A1-Lot1	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316Rota- A1-Lot2	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316Rota- A1-Lot3	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
Guinea pigs	T316Rota- A1-Lot1	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota- A1-Lot2	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota- A1-Lot3	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota- A1-Lot1	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Rota- A1-Lot2	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Rota- A1-Lot3	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
Pigs	T316Rota- A1-Lot1	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316Rota- A1-Lot2	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316Rota- A1-Lot3	Intra-muscle	2	10 ml	None

[표 7] 돼지 로타바이러스 K71주 단일 생건조 백신의 안전시험 결과

Species	Lot No.	Route of administration	No. of animals	Amount of vaccine	Clinical signs
Mice	T316Rota- K71-Lot1	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None

	T316Rota- K71-Lot2	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316Rota- K71-Lot3	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
Guinea pigs	T316Rota- K71-Lot1	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota- K71-Lot2	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota- K71-Lot3	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316Rota- K71-Lot1	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Rota- K71-Lot2	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316Rota- K71-Lot3	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
Pigs	T316Rota- K71-Lot1	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316Rota- K71-Lot2	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316Rota- K71-Lot3	Intra-muscle	2	10 ml	None

[표 8] 돼지 로타바이러스 K174, 06-42, A1주 혼합 3종 시험 백신의 안전시험 결과

Species	Lot No.	Route of administration	No. of animals	Amount of vaccine	Clinical signs
Mice	T316R3A1-Lot1	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316R3A1-Lot2	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316R3A1-Lot3	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
Guinea pigs	T316R3A1-Lot1	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316R3A1-Lot2	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316R3A1-Lot3	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316R3A1-Lot1	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316R3A1-Lot2	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316R3A1-Lot3	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
Pigs	T316R3A1-Lot1	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316R3A1-Lot2	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316R3A1-Lot3	Intra-muscle	2	10 ml	None

[표 9] 돼지 로타바이러스 K174, 06-42, K71주 혼합 3종 시험 백신의 안전시험 결과

Species	Lot No.	Route of administration	No. of animals	Amount of vaccine	Clinical signs
Mice	T316R3K71-Lot1	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316R3K71-Lot2	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T316R3K71-Lot3	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
Guinea pigs	T316R3K71-Lot1	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316R3K71-Lot2	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316R3K71-Lot3	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T316R3K71-Lot1	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316R3K71-Lot2	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T316R3K71-Lot3	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
Pigs	T316R3K71-Lot1	Intra-muscle	2	10 ml	None
	T316R3K71-Lot2	Intra-muscle	2	10 ml	None

T316R3K71-Lot3	Intra-muscle	2	10 ml	None
----------------	--------------	---	-------	------

자. 혈청 역가시험

- (1) 돼지 4마리를 선정하여 2마리는 접종군으로 2마리는 대조군으로 실험 한 결과 KJ174 단독으로 접종 시  $28.5 \pm 0.71$ 배의 혈청 중화 항체 배수를 보였으며 06-42 단독으로 접종 시  $28.5 \pm 0.71$ 배, A1 단독 접종 시 29배, K71 단독 접종 시  $27.5 \pm 0.71$ 배의 중화 항체 역가를 보였음.
- (2) KJ174+06-42+A1 항원이 포함된 3종 혼합 백신 접종시 최소  $28.0.13 \pm 0.64$ 배의 중화 항체 역가를 보였으며 KJ174+06-42+K71 항원이 포함된 3종 혼합 백신 접종시 최소 27배의 항체 역가를 보였음.
- (3) 두 혼합 백신 모두 검정기준인 27배를 넘는 수치이지만 KJ174+06-42+A1 혼합 백신이 좀 더 높은 항체가를 보이는 것을 확인하였음(표 10).

[표 10] 돼지 로타바이러스 단독 및 혼합 3종 백신의 돼지에서 혈청 중화 항체가

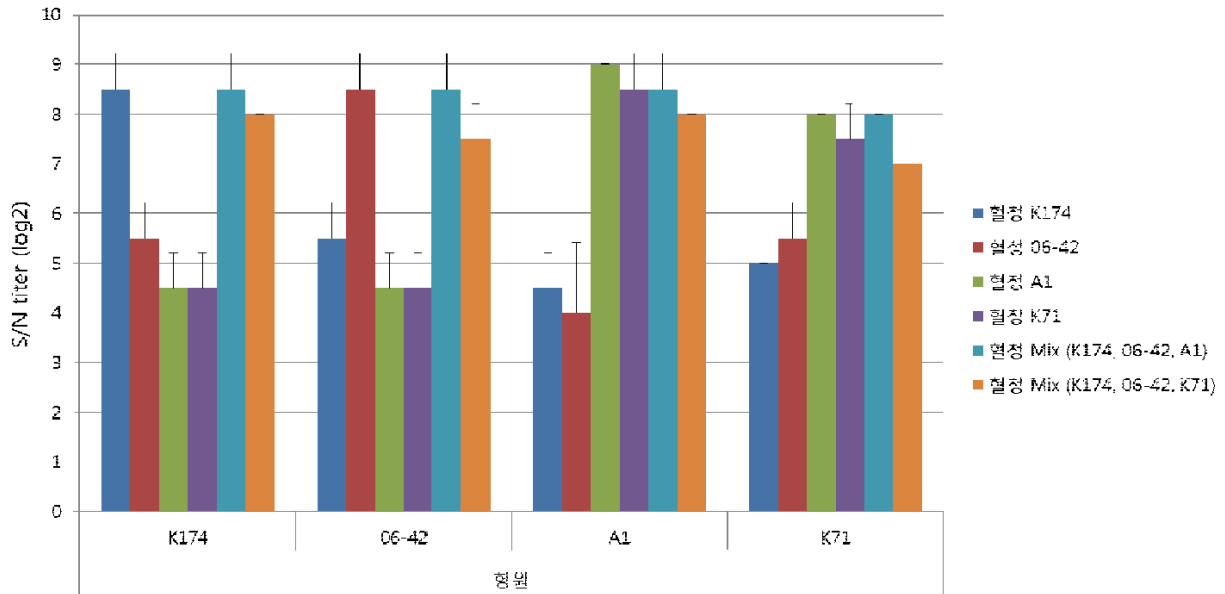
Strain name used for immunization	Animal No.	Serum neutralizing antibody titer (log2) to			
		K174	06-42	A1	K71
K174	1	8	5	4	5
	2	9	6	5	5
	Average	8.5	5.5	4.5	5
	Standard deviation	0.707107	0.707107	0.707107	0
06-42	1	6	9	5	5
	2	5	8	3	6
	Average	5.5	8.5	4	5.5
	Standard deviation	0.707107	0.707107	1.414214	0.707107
A1	1	4	5	9	8
	2	5	4	9	8
	Average	4.5	4.5	9	8
	Standard deviation	0.707107	0.707107	0	0
K71	1	4	5	9	8
	2	5	4	8	7
	Average	4.5	4.5	8.5	7.5
	Standard deviation	0.707107	0.707107	0.707107	0.707107
Trivalent vaccine mixed with K174, 06-42 and A1 strains	1	9	8	9	8
	2	8	9	8	8
	Average	8.5	8.5	8.5	8
	Standard deviation	0.707107	0.707107	0.707107	0
Trivalent vaccine mixed with K174, 06-42 and K71 strains	1	8	8	8	7
	2	8	7	8	7
	Average	8	7.5	8	7
	Standard deviation	0	0.707107	0	0
Mock-vaccinated negative control	SPF1	2	2	2	2
	SPF2	2	2	2	2

차. 단일백신과 혼합백신의 간섭반응 확인시험

- (1) 단일 백신으로 접종시 다른 항원에 대한 일정수준의 면역 항체가가 오르지만 동일

항원과 동일하거나 약간 낮은 항체가를 보였음.

(2) 3종의 로타바이러스 혼합 백신의 경우 단일로 접종한 결과와 비슷하거나 높은 결과를 얻었음. 이는 3종의 혼합 백신이 단일 백신 보다 더 우수한 백신이 될 수 있음을 시사 함.



[그림 1] 돼지 로타바이러스 단독 및 혼합 3종 백신의 기니픽에서 혈청 항체가.

#### 카. 돼지 로타바이러스 약독화 생독백신 특성 시험

##### (1) 시험 방법

(가) 2개 이상의 백신에 대하여 무색 투명한 용기의 백신은 백신 희석액으로 용해하고, 불투명한 용기의 백신은 직경 18~22mm의 무색 투명한 유리용기에 옮겨서 자연광 또는 1,000룩스 이상의 백색 광원하에서 실시하였음.

##### (2) 시험 결과

(가) 이물, 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하는 등, 시험 결과 모든 시험백신에서 적합 판정을 받았음(표 11).

[표 11] 돼지 로타바이러스 약독화 생독백신 특성 시험 결과

Lot	시험	시험방법 및 시험 결과	판정
T316Rota -	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰	적합
K174-Lot 1		성상 : 노란백색 용해 후 색조 : 밝은 회분홍색	
	투명도(혼탁도)시험	투명도 또는 혼탁도 관찰 성상 : 투명함	적합
T316Rota -	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰	적합
K174-Lot		성상 : 이물없음	



2	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 정상 : 이취없음	적합
T316Rota - K174-Lot 3	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 정상 : 균일함	적합
T316Rota - 06-42-Lo t1	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰 정상 : 노란백색 용해후 색조 : 밝은회분홍색	적합
	투명도(혼탁도)시험	투명도 또는 혼탁도 관찰 정상 : 투명함	적합
T316Rota - 06-42-Lo t2	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 정상 : 이물없음	적합
	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 정상 : 이취없음	적합
T316Rota - 06-42-Lo t3	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 정상 : 균일함	적합
T316Rota - A1-Lot1	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰 정상 : 노란백색 용해후 색조 : 밝은회분홍색	적합
	투명도(혼탁도)시험	투명도 또는 혼탁도 관찰 정상 : 투명함	적합
T316Rota - A1-Lot2	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 정상 : 이물없음	적합
	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 정상 : 이취없음	적합
T316Rota - A1-Lot3	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 정상 : 균일함	적합
T316R3A 1-Lot1	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰 정상 : 노란백색 용해후 색조 : 밝은회분홍색	적합
	투명도(혼탁도)시험	투명도 또는 혼탁도 관찰 정상 : 투명함	적합
T316R3A 1-Lot2	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 정상 : 이물없음	적합
	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 정상 : 이취없음	적합
T316R3A 1-Lot3	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 정상 : 균일함	적합
T316R3K7	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰	적합

1-Lot1		성상 : 노란백색 용해후 색조 : 밝은회분홍색	
	투명도(흔탁도)시험	투명도 또는 흔탁도 관찰	적합
T316R3K7	1-Lot2	이물시험 성상 : 투명함 백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰	적합
T316R3K7	이취시험	성상 : 이물없음 후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰	적합
1-Lot3	내용물의 균일성 시험	성상 : 이취없음 투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 성상 : 균일함	적합

타. 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 백신 진공도 시험

(1) 시험 방법

(가) 암실에서 백신으로부터 5~10mm 떨어진 위치에 테스터코일을 놓고 방전의 유무를 관찰하며, 방전 인정 시 적합함.

(2) 시험 결과

(가) 모든 백신에서 방전이 인정되었음(표 12).

[표 12] 돼지 로타바이러스 약독화 생독백신 진공도 시험검사 결과

Lot	시험	시험방법	판정
T316Rota-K174-Lot1	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
T316Rota-K174-Lot2	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합
T316Rota-K174-Lot3			
T316Rota-06-42-Lot1	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
T316Rota-06-42-Lot2	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합
T316Rota-06-42-Lot3			
T316Rota-A1-Lot1	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
T316Rota-	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합

A1-Lot2			
T316Rota-A1-Lot3			
T316R3A1-Lot1	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
T316R3A1-Lot2	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합
T316R3A1-Lot3			
T316R3K71-Lot1	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
T316R3K71-Lot2	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합
T316R3K71-Lot3			

파. 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 수소이온농도 시험

(1) 시험 방법

(가) 각 lot 별 2개의 백신에 대하여 각각 pH측정기를 이용하여 측정하였음.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 판정 기준내의 pH값을 보였음(표 13).

[표 13] 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 수소이온농도 시험결과

Lot	백신	시험방법	시험결과	판정기준	판정
T316Rota-K174-Lot1	백신 1	측정기 (pH/conductivity meter : METTLER TOLEDO)	7.02	6.0~8.0	적합
	백신 2		7.05		적합
T316Rota-K174-Lot2	백신 1		7.02		적합
	백신 2		7.04		적합
T316Rota-K174-Lot3	백신 1		7.08		적합
	백신 2		7.12		적합
T316Rota-06-42-Lot1	백신 1		7.04		적합
	백신 2		7.05		적합
T316Rota-06-42-Lot2	백신 1		7.06		적합
	백신 2		7.04		적합
T316Rota-	백신 1		7.01		적합

06-42-Lot3	백신 2		7.02		적합
T316Rota-A1-Lot1	백신 1		7.12		적합
	백신 2		7.15		적합
T316Rota-A1-Lot2	백신 1		7.08		적합
	백신 2		7.06		적합
T316Rota-A1-Lot3	백신 1		7.05		적합
	백신 2		7.05		적합
T316R3A1-Lo t1	백신 1		7.07		적합
	백신 2		7.03		적합
T316R3A1-Lo t2	백신 1		7.06		적합
	백신 2		7.07		적합
T316R3A1-Lo t3	백신 1		7.09		적합
	백신 2		7.05		적합
T316R3K71-L ot1	백신 1		7.02		적합
	백신 2		7.03		적합
T316R3K71-L ot2	백신 1		7.01		적합
	백신 2		7.04		적합
T316R3K71-L ot3	백신 1		7.08		적합
	백신 2		7.06		적합

하. 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 함습도 시험

(1) 시험 방법

- (가) 표준용액으로 함습도 측정하며 1회 측정시 샘플링을 1g 미만으로 측정함.
- (나) 3개의 백신에 대하여 내용물을 신속히 분쇄하여 입자의 직경을 2mm 이하로 하여 10~20mg을 시험에 사용함.
- (다) Karl-Fischer방법을 사용하여 함습도를 측정하며, 3개 중 최고치를 함습도로 인정함(표 14).

[표 14] 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 함습도 시험 방법

Water standard	표준용액 제조번호	허용오차범위	시험결과	시험평균	판전
1	Lot	water standard	1.00	1.00	적합
2	SZBE1320V	10.0* (0.97%~1.03%)	1.00		

\*Fluka #34849 HYBRANAL Water Standard 10.0. 1.0g 미만으로 측정.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 최고치가 6%이하로 검출되었음(표 15).

[표 15] 돼지 로타바이러스 약독화 생진조 혼합백신 함습도 시험 결과

백신 Lot		시험결과	판정기준	판정
T316Rota - K174-Lot 1	백신1	4.02	최고치가 6.0% 이하이어야 한다.	적합
	백신2	4.34		적합
	백신3	4.13		적합
T316Rota - K174-Lot 2	백신1	3.98		적합
	백신2	3.72		적합
	백신3	4.07		적합
T316Rota - K174-Lot 3	백신1	4.23		적합
	백신2	4.52		적합
	백신3	4.01		적합
T316Rota - 06-42-Lo t1	백신1	3.99		적합
	백신2	3.67		적합
	백신3	3.80		적합
T316Rota - 06-42-Lo t2	백신1	4.01		적합
	백신2	4.35		적합
	백신3	4.55		적합
T316Rota - 06-42-Lo t3	백신1	3.90		적합
	백신2	4.16		적합
	백신3	4.42		적합
T316Rota - A1-Lot1	백신1	4.72	적합	
	백신2	4.23	적합	
	백신3	4.11	적합	
T316Rota - A1-Lot2	백신1	3.89	적합	
	백신2	3.92	적합	
	백신3	3.85	적합	
T316Rota - A1-Lot3	백신1	3.80	적합	
	백신2	4.10	적합	
	백신3	4.12	적합	

T316R3A 1-Lot1	백신1	4.22		적합
	백신2	4.38		적합
	백신3	4.62		적합
T316R3A 1-Lot2	백신1	4.11		적합
	백신2	4.36		적합
	백신3	3.90		적합
T316R3A 1-Lot3	백신1	3.85		적합
	백신2	4.06		적합
	백신3	4.59		적합
T316R3K 71-Lot1	백신1	3.79		적합
	백신2	3.98		적합
	백신3	4.03		적합
T316R3K 71-Lot2	백신1	4.23	적합	
	백신2	4.51	적합	
	백신3	4.22	적합	
T316R3K 71-Lot3	백신1	4.32	적합	
	백신2	4.11	적합	
	백신3	4.03	적합	

가. 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 무균 시험

(1) 시험 방법

(가) 시험품의 액상 제제는 그대로, 건조제제는 전용 희석액으로, 전용 희석액이 없는 제제는 멸균된 일반 희석액으로 용해한 후 접종함.

(나) 사용 배지는 tryptic soy agar (TSA), tryptic soy broth (TSB), 0.5% beefextract 첨가된 thioglycollate medium (Thio)를 사용함.

(다) 22℃ 및 32℃ incubator에서 각각 14일간 배양하며 관찰하고 시험 결과 어떠한 세균 및 진균의 발육도 인정되어서는 안됨.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 세균 및 진균 발육이 인정되지 않음(표 16 & 17).

[표 16] 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 무균 시험 결과

백신 종류	22℃			32℃			결과	판정
	TSA	TSB	Thio	TSA	TSB	Thio		
T316Rota-K174-Lot1	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Rota-K174-Lot2	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Rota-K174-Lot3	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Rota-06-42-Lot1	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Rota-	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합



06-42-Lot2								안됨	
T316Rota-06-42-Lot3	-	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Rota-A1-Lot1	-	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Rota-A1-Lot2	-	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316Rota-A1-Lot3	-	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316R3A1-Lot1	-	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316R3A1-Lot2	-	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316R3A1-Lot3	-	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316R3K71-Lot1	-	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316R3K71-Lot2	-	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T316R3K71-Lot3	-	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합

양성은 “+”, 음성은 “-”로 표기.

[표 17] 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 무균 시험 실험 중 환경 모니터링 결과 (실험 종료 후 배양기에 배지를 배양시킴)

관찰 일자	TSA		R-TAS		SDA		R-SDA		판정
	낙하균		표면균		낙하균		표면균		
	1	2	1	2	1	2	1	2	
1일차	-	-	-	-	-	-	-	-	적합
2일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
3일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
4일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
5일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
6일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
7일차	-	-	-	-	-	-	-	-	

양성은 “+”, 음성은 “-”로 표기.

나. 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 마이코플라즈마 부정시험

(1) 시험 방법

(가) PCR 방법을 이용한 마이코플라즈마 검출 방법을 사용하였으며 PCR산물을 전기영동하여 양성대조군에서는 464bp의 증폭 산물이 관찰되고, 음성대조군에서는 증폭산물이 관찰되지 않으면 이 시험은 적합한 것으로 판정함.

(나) 만약 시험품에서 464bp의 증폭 산물이 관찰되면 직접배양법을 이용하여 마이코플라즈마 분리시험을 실시하여 최종 확인함.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 마이코플라즈마 음성이었음(표 18).

[표 18] 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 마이코플라즈마 부정시험 결과

백신종류	시험방법	시험결과	판정
T316Rota-K174-Lot1	PCR방법	음성	적합
T316Rota-K174-Lot2		음성	적합
T316Rota-K174-Lot3		음성	적합
T316Rota-06-42-Lot1		음성	적합
T316Rota-06-42-Lot2		음성	적합
T316Rota-06-42-Lot3		음성	적합
T316Rota- A1-Lot1		음성	적합
T316Rota- A1-Lot2		음성	적합
T316Rota- A1-Lot3		음성	적합
T316R3A1-Lot1		음성	적합
T316R3A1-Lot2		음성	적합
T316R3A1-Lot3		음성	적합
T316R3K71-Lot1		음성	적합
T316R3K71-Lot2		음성	적합
T316R3K71-Lot3		음성	적합

다. 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 시험백신 미입바이러스 부정시험

(BVDV, CPIV 오염검사)

(1) 시험 방법

(가) 건조 백신을 일반 희석액 1ml로 희석 후 RNA를 추출하여 PCR 검사방법을 사용하여 미입바이러스 부정시험을 실시하였음.

(2) 시험 결과

(가) 모든 백신에서 미입바이러스가 발견되지 않았음(표 19).

[표 19] 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 미입바이러스 부정시험 결과

백신종류	시험방법	검출항원	시험결과	판정
T316Rota- KJ11-Lot1	PCR방법	BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Rota- KJ11-Lot2		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Rota- KJ11-Lot3		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot1		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot2		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Rota- KJ19-2-Lot3		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Rota- KJ44-Lot1		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Rota- KJ44-Lot2		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316Rota- KJ44-Lot3		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T3163Rota-Lot1		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T3163Rota-Lot2	BVDV	음성	적합	
	CPIV	음성	적합	
T3163Rota-Lot3	BVDV	음성	적합	

		CPIV	음성	적합
T316R3K71-Lot1		CPIV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316R3K71-Lot2		CPIV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T316R3K71-Lot3		CPIV	음성	적합
		CPIV	음성	적합

라. 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 시험백신 함량 시험

(1) 시험 방법

(가) 백신을 혼합하여 최종 1두분 (2ml/두)으로 되게 한 후 10진 희석한다. 각 희석액 0.1ml을 MA104 cell에 접종한 후 37℃에서 4~7일간 배양함.

(2) 시험 결과

(가) 시험 결과 모든 시험 백신이 판정기준 이상의 바이러스 함량임을 확인하였음 (표 20).

[표 20] 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 시험백신 함량 시험 결과

백신종류	Virus 함량 (10 <sup>x</sup> TCID <sub>50</sub> /dose)	판정기준	판정
T316Rota-KJ11-Lot1	6.7	국검 : ≥10 <sup>6.0</sup> 자검 : ≥10 <sup>6.5</sup> TCID <sub>50</sub> /dose	적합
T316Rota-KJ11-Lot2	7.0		적합
T316Rota-KJ11-Lot3	7.0		적합
T316Rota-KJ19-2-Lot1	7.2		적합
T316Rota-KJ19-2-Lot2	7.2		적합
T316Rota-KJ19-2-Lot3	7.0		적합
T316Rota-KJ44-Lot1	7.2		적합
T316Rota-KJ44-Lot2	7.0		적합
T316Rota-KJ44-Lot3	7.0		적합
T3163Rota-Lot1	6.7		적합

T3163Rota-Lot2	7.0		적합
T3163Rota-Lot3	7.0		적합
T316R3K71-Lot1	7.2		적합
T316R3K71-Lot2	7.2		적합
T316R3K71-Lot3	7.0		적합

### 결론

- 3종류의 바이러스 단독과 2종류의 로타바이러스 혼합백신의 시험 결과 모든 시험백신의 안정성이 확보되었으며 항체 역가가 우수하게 확인되었음.
- 하지만 현재 로타 단독으로 제품이 출시되었을 경우 시판되고 있는 PTR이나 TR2 백신과 경쟁성을 갖기가 어려운 것으로 판단됨.
- 대신 3종류의 로타바이러스 생 혼합백신에서 안전성이나 면역원성에서 우수한 결과를 보였으므로 아래 TGE 바이러스와 혼합 백신을 생산하여 시험결과를 비교분석 최종 백신의 구성성분을 결정하였음.

## 8절. 돼지 로타바이러스, TGEV 생건조 4종 혼합백신 전임상 시험

### 1. 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 혼합백신 확립

#### 가. Seed 및 배양세포 확립

- (1) 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 개발을 위한 돼지 로타바이러스 seed 및 배양세포를 확립 방법과 동일하게 사용하였음.
- (2) 이에 여기에서는 TGEV 175주에 대한 정보만 작성하였음.

[표 1] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생독백신 seed 및 배양세포 확립

Strain	Seed 제조번호	Cell (제조번호)	Master seed	생산용 종독	Production seed
K174 (Rotav)	RD-P-V-006	TF(SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th
06-42 (Rotav)	RD-P-V-018	TF(SOP-CM-C08-01)	80th	2계대	82th
A1 (Rotav)	RD-P-V-043	TF(SOP-CM-C08-01)	1st	2계대	3rd
175L (TGEV)	RD-P-V-024	ST(SOP-CM-C01-01)	2nd	2계대	4th

#### 나. Seed 제조단위 시스템

- (1) 세포증식용 배양액( $\alpha$ -MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml) 0.1%)에 ml당 15~30만개의 ST 세포를 분산시켜 37°C에서 4~5일간 배양한 다음 배양액을 제거한 후 돼지 TGEV 175주를 0.1 M.O.I 접종하여 37°C에서 1시간 배양한 후 바이러스 증식용 배양액( $\alpha$ -MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml) 0.1%, trypsin 1 $\mu$ g/ml)을 가한 다음 3일간 회전 배양하면서 세포변성효과가 약 80% 이상 일어날 때까지 배양하였음.

#### 다. Master seed

- (1) 169대 계대 된 TGEV 175주를 단층이 형성된 ST세포에 접종하여 37°C에서 3~4일간 배양한 후, 접종 바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채득하여 -80°C의 냉동고에 동결보존 및 동결건조하여 원종독으로 사용하였음.

#### 라. Production seed

- (1) Master seed와 같은 계대방법으로 2대 계대한 돼지 TGEV 175주를 단층이 형성된 ST세포에 접종하여 37°C에서 3~4일간 배양한 후, 접종바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채득하여 -80°C의 냉동고에 동결건조하여 생산용 종독으로 사용하였음.



마. 배양조건 확립

(1) 바이러스 접종

(가) ST세포를 세포증식용 배양액에 ml당 15~30만개의세포를 분산시킨 후, 37℃에서 4~5일간 배양한 다음 배양 세포가 단층을 형성하였을 때 배양액을 제거한 후 돼지 TGEV 175주를 0.1 M.O.I 접종하고 37℃에서 1시간 흡착배양한 후 바이러스 증식용 배양액을 넣었음.

(2) 바이러스 배양

(가) 세포에 바이러스를 접종한 후 37℃에서 3~4일간 배양하였음.

(3) 채독

(가) 37℃에서 3~4일간 배양한 후 돼지 TGEV 175주에 의한 세포변성 효과가 약 80%이상 일어났을 때 배양감염액을 채독하였음.

바. 보호제 조성 결정

(1) 기존 TR2 백신에서 안전성 및 효능이 입증된 보호제 성분으로 결정하였음(표 2).

[표 2] 돼지 로타바이러스 보호제

구성 성분	함량
Trehalose	100g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.517g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

사. 시험 백신 생산

(1) 동결 건조 형태로 아래와 같이 200병씩 3 lot의 시험백신을 제조하였음.

(2) 바이러스 함량은 기존 TR2제품의 로타바이러스 10<sup>6.0</sup> TCID<sub>50</sub>/1 dose 이상, TGEV는 10<sup>4.0</sup> TCID<sub>50</sub>/1 dose 이상 기준으로 제조하였음(표 3).

[표 3] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 혼합백신 시험백신 정보

Lot. No.	Date manufactured	Contents (per 1 dose)	Quantity (5 doses/vial)
T317TR3-Lot1	2017.02.02.	Porcine rotavirus K174 strain	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>
		Porcine rotavirus 06-42 strain	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>
		Porcine rotavirus A1 strain	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>
		Porcine coronavirus 175L strain	Over 10 <sup>4.0</sup> TCID <sub>50</sub>
		Stabilizer	Suitable amount
T317TR3-	2017.02.03.	Porcine rotavirus K174 strain	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub> 200 vials

Lot2	Porcine rotavirus 06-42 strain	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
	Porcine rotavirus A1 strain	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
	Porcine coronavirus 175L strain	Over 10 <sup>4.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
	Stabilizer	Suitable amount	
T317TR3-Lot3	2017.02.06.		200 vials
	Porcine rotavirus K174 strain	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
	Porcine rotavirus 06-42 strain	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
	Porcine rotavirus A1 strain	Over 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
	Porcine coronavirus 175L strain	Over 10 <sup>4.0</sup> TCID <sub>50</sub>	
	Stabilizer	Suitable amount	

아. 안전시험

- (1) 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 4종 혼합백신의 안전 시험 결과, 마우스, 기니픽, 돼지에소 모두 안전성이 확인되었음(표 4).

[표 4] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 4종 혼합백신의 안전시험 결과

Species	Lot No.	Route of administration	No. of animals	Amount of vaccine	Clinical signs
Mice	T317TR3-Lot1	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T317TR3-Lot2	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
	T317TR3-Lot3	Intra-peritoneum	8	0.5 ml	None
Guinea pigs	T317TR3-Lot1	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T317TR3-Lot2	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T317TR3-Lot3	Intra-muscle	2	2 ml	None
	T317TR3-Lot1	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T317TR3-Lot2	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
	T317TR3-Lot3	Intra-peritoneum	2	2 ml	None
Pigs	T317TR3-Lot1	Intra-muscle	2	20 ml	None
	T317TR3-Lot2	Intra-muscle	2	20 ml	None
	T317TR3-Lot3	Intra-muscle	2	20 ml	None

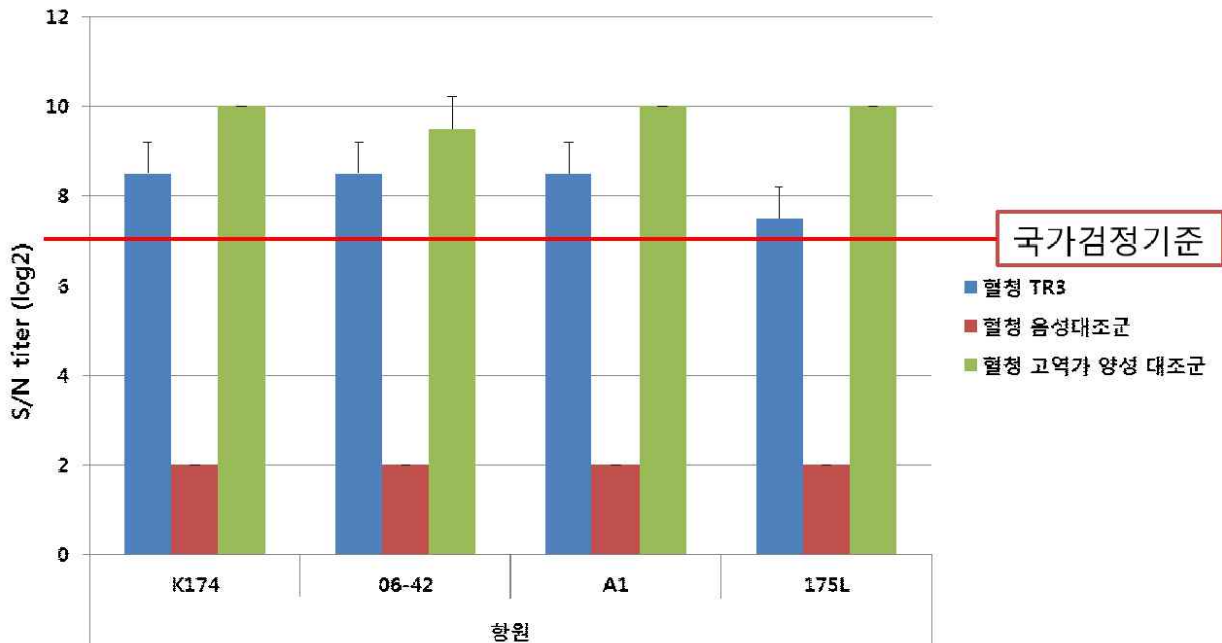
자. 혈청 역가시험

- (1) 돼지 6마리를 선정하여 4마리는 접종군으로 2마리는 음성 대조군으로 실험 한 결과 4종의 생건조 혼합 백신으로 접종 시 돼지 TGEV 175L에 대한 항체 역가는 2<sup>7.5±0.71</sup>배의 혈청 중화 항체 배수를 보였으며 KJ174에 대한 항체 역가는 2<sup>8.5±0.71</sup>배, 06-42는 2<sup>8.5±0.71</sup>배, A1항원에 대한 항체 역가는 2<sup>8.5±0.71</sup>배의 중화 항체 역가를 보여 4종의 생독 혼합 백신은 모든 항원에 대한 검정기준인 2<sup>7</sup>배를 넘었음.
- (2) 즉, 본 연구에 사용된 약독화 생독 혼합 백신은 모두 농림축산검역본부의 검정기준을 넘어 생독 백신 균주로서 적합함을 시사 함.

[표 5] 돼지 로타바이러스 단독 및 혼합 3종 백신의 돼지에서 혈청 중화 항체가

Strain name used for immunization	Animal No.	Serum neutralizing antibody titer (log2) to			
		K174	06-42	A1	175L
Tetravalent vaccine	1	9	8	9	7

mixed with K174, K71, 06-42 and 175L strains	2	8	9	8	8
	3	8	8	8	8
	4	9	8	8	8
	Average	8.5	7.5	7.5	7.5
	Standard deviation	0.707	0.707	0.707	0.707
Serum from non-immunized animals	1	2	2	2	2
	2	2	2	2	2
	Average	2	2	2	2
	Standard deviation	0	0	0	0
Serum from animals immunized with high doses of commercialized vaccine strain	1	10	9	10	10
	2	10	10	10	10
	Average	10	9.5	10	10
	Standard deviation	0	0.707	0	0



[그림 1] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신의 기니피에서 혈청 항체가.

#### 차. 특성 시험

##### (1) 시험 방법

(가) 2개 이상의 백신에 대하여 무색 투명한 용기의 백신은 백신 희석액으로 용해하고, 불투명한 용기의 백신은 직경 18~22mm의 무색 투명한 유리용기에 옮겨서 자연광 또는 1,000룩스 이상의 백색 광원하에서 실시하였음.

##### (2) 시험 결과

(가) 이물, 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하는 등, 시험 결과 모든 시험백신에서 적합 판정을 받았음(표 6).

[표 6] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신 특성 시험 결과

Lot	시험	시험방법 및 시험 결과	판정
T317TR3-Lot1	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰 정상 : 노란백색 용해 후 색조 : 밝은 회분홍색	적합
	투명도(혼탁도)시험	투명도 또는 혼탁도 관찰 정상 : 투명함	적합
	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 정상 : 이물없음	적합
	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 정상 : 이취없음	적합
	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 정상 : 균일함	적합
T317TR3-Lot2	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰 정상 : 노란백색 용해 후 색조 : 밝은 회분홍색	적합
	투명도(혼탁도)시험	투명도 또는 혼탁도 관찰 정상 : 투명함	적합
	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 정상 : 이물없음	적합
	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 정상 : 이취없음	적합
	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 정상 : 균일함	적합
T317TR3-Lot3	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰 정상 : 노란백색 용해 후 색조 : 밝은 회분홍색	적합
	투명도(혼탁도)시험	투명도 또는 혼탁도 관찰 정상 : 투명함	적합
	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 정상 : 이물없음	적합
	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 정상 : 이취없음	적합
	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 정상 : 균일함	적합

카. 진공도 시험

(1) 시험 방법

(가) 암실에서 백신으로부터 5~10mm 떨어진 위치에 테스터코일을 놓고 방전의 유무를 관찰하며, 방전 인정 시 적합함.

(2) 시험 결과

(가) 모든 백신에서 방전이 인정되었음(표 7).

[표 7] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신 진공도 시험검사 결과

Lot	시험	시험방법	판정
T317TR3-Lot1	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합
T317TR3-Lot2	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합
T317TR3-Lot3	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여부(음압) 관찰	적합

타. 수소이온농도 시험

(1) 시험 방법

(가) 각 lot 별 2개의 백신에 대하여 각각 pH측정기를 이용하여 측정하였음.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 판정 기준내의 pH값을 보였음(표 8).

[표 8] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신 수소이온농도 시험결과

Lot	백신	시험방법	시험결과	판정기준	판정
T317TR3-Lot1	백신 1	측정기 (pH/conduct)	7.07	6.0~8.0	적합

	백신 2	ivity meter : METTLER TOLEDO)	7.04		적합
T317TR3-Lot2	백신 1		7.08		적합
	백신 2		7.02		적합
T317TR3-Lot3	백신 1		7.07		적합
	백신 2		7.04		적합

과. 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 함습도 시험

(1) 시험 방법

- (가) 표준용액으로 함습도 측정하며 1회 측정시 샘플링을 1g 미만으로 측정함.
- (나) 3개의 백신에 대하여 내용물을 신속히 분쇄하여 입자의 직경을 2mm 이하로 하여 10~20mg을 시험에 사용함.
- (다) Karl-Fischer방법을 사용하여 함습도를 측정하며, 3개 중 최고치를 함습도로 인정함(표 9).

[표 9] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신 함습도 시험 방법

Water standard	표준용액 제조번호	허용오차범위	시험결과	시험평균	판전
1	Lot SZBE1320V	water standard 10.0* (0.97%~1.03%)	1.00	1.00	적합
2			1.00		
3			1.01		

\*Fluka #34849 HYBRANAL Water Standard 10.0. 1.0g 미만으로 측정.

(2) 시험 결과

- (가) 모든 시험 백신에서 최고치가 6%이하로 검출되었음(표 10).

[표 10] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신 함습도 시험 결과

백신 Lot		시험결과	판정기준	판정
T317TR3-Lot1	백신1	4.02	최고치가 6.0% 이하이어야 한다.	적합
	백신2	4.45		적합
	백신3	4.03		적합
T317TR3-Lot2	백신1	3.89		적합
	백신2	3.91		적합



	백신3	4.05		적합
T317TR3-Lot3	백신1	4.21		적합
	백신2	4.41		적합
	백신3	4.06		적합

하. 무균 시험

(1) 시험 방법

- (가) 시험품의 액상 제제는 그대로, 건조제제는 전용 희석액으로, 전용 희석액이 없는 제제는 멸균된 일반 희석액으로 용해한 후 접종함.
- (나) 사용 배지는 tryptic soy agar (TSA), tryptic soy broth (TSB), 0.5% beefextract 첨가된 thioglycollate medium (Thio)를 사용함.
- (다) 22℃ 및 32℃ incubator에서 각각 14일간 배양하며 관찰하고 시험 결과 어떠한 세균 및 진균의 발육도 인정되어서는 안됨.

(2) 시험 결과

- (가) 모든 시험 백신에서 세균 및 진균 발육이 인정되지 않음(표 11 & 12).

[표 11] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신 무균 시험 결과

백신 종류	22℃			32℃			결과	판정
	TSA	TSB	Thio	TSA	TSB	Thio		
T317TR3-Lot1	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T317TR3-Lot2	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T317TR3-Lot3	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합

양성은 “+”, 음성은 “-”로 표기.

[표 12] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신 무균 시험 실험 중 환경 모니터링 결과 (실험 종료 후 배양기에 배지를 배양시킴)

관찰 일자	TSA		R-TAS		SDA		R-SDA		판정
	낙하균		표면균		낙하균		표면균		
	1	2	1	2	1	2	1	2	
1일차	-	-	-	-	-	-	-	-	적합
2일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
3일차	-	-	-	-	-	-	-	-	

4일차	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5일차	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6일차	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7일차	-	-	-	-	-	-	-	-	-

양성은 “+”, 음성은 “-”로 표기.

#### 가. 마이코플라즈마 부정시험

##### (1) 시험 방법

(가) PCR 방법을 이용한 마이코플라즈마 검출 방법을 사용하였으며 PCR산물을 전기영동하여 양성대조군에서는 464bp의 증폭 산물이 관찰되고, 음성대조군에서는 증폭산물이 관찰되지 않으면 이 시험은 적합한 것으로 판정함.

(나) 만약 시험품에서 464bp의 증폭 산물이 관찰되면 직접배양법을 이용하여 마이코플라즈마 분리시험을 실시하여 최종 확인함.

##### (2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 마이코플라즈마 음성이었음(표 13).

[표 13] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신 마이코플라즈마 부정시험 결과

백신종류	시험방법	시험결과	판정
T317TR3-Lot1	PCR방법	음성	적합
T317TR3-Lot2		음성	적합
T317TR3-Lot3		음성	적합

#### 나. 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 시험백신 미입바이러스 부정시험 (BVDV, CPIV 오염검사)

##### (1) 시험 방법

(가) 건조 백신을 일반 희석액 1ml로 희석 후 RNA를 추출하여 PCR 검사방법을 사용하여 미입바이러스 부정시험을 실시하였음.

##### (2) 시험 결과

(가) 모든 백신에서 미입바이러스가 발견되지 않았음(표 14).

[표 14] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신 미입바이러스 부정시험 결과

백신종류	시험방법	검출항원	시험결과	판정
T317TR3-Lot1	PCR방법	BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합

T317TR3-Lot2		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T317TR3-Lot3		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합

다. 시험백신 함량 시험

(1) 시험 방법

(가) 백신을 혼합하여 최종 1두분 (2ml/두)으로 되게 한 후 10진 희석한다. 각 희석액 0.1ml을 MA104 cell과 ST cell에 접종한 후 37℃에서 4~7일간 배양함.

(2) 시험 결과

(가) 시험 결과 모든 시험 백신이 판정기준 이상의 바이러스 함량임을 확인하였음 (표 15).

[표 15] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신 시험백신 함량 시험 결과

백신종류	Virus 함량 (10*TCID50/dose)		판정기준	판정
	Rotavirus	Coronavirus		
T317TR3-Lot1	Rotavirus	7.0	TGE 국검 : $\geq 10^{4.0}$ 자검 : $\geq 10^{4.5}$ TCID <sub>50</sub> /dose	적합
	Coronavirus	5.0		
T317TR3-Lot2	Rotavirus	7.3	Rota 국검 : $\geq 10^{6.0}$ 자검 : $\geq 10^{6.5}$ TCID <sub>50</sub> /dose	적합
	Coronavirus	5.0		
T317TR3-Lot3	Rotavirus	7.0		적합
	Coronavirus	4.75		

**결론**

- 4종류의 바이러스를 혼합한 생독 백신이 단일로 접종하였을 경우와 비교시 안정성 및 항체 역가가 비슷한 수준으로 보이는 것으로 확인되었음.
- 현재 시판되고 있는 PTR백신과 비교하여 돼지 역가 시험 결과 품질면에서 우수한 것으로 판단되었음.
- 4종 혼합백신의 경우 단일 백신보다 여러 genotype에 대한 바이러스 방어 능력이 더 뛰어나며 실제 시장에서 다른 백신과 비교 시 경쟁력을 가질 것으로 예상됨.

## 9절. 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 4종 혼합백신 임상 시험

### 1. 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 4종 혼합백신 임상시험용 3 Lots 시험백신 생산

- (1) 2017년도 돼지 로타바이러스(3개 백신주), 전염성 위장염 바이러스(1개 백신주)에 대한 4종 혼합백신을 3 Lots(T317TR3-Lot01, 02, 03)의 대량화 시험백신을 제작하였음.
- (2) 백신은 돼지 로타바이러스 K174주, 06-42주, A1주  $10^{6.0}$  TCID 이상, TGEV 175L주  $10^{4.0}$  TCID 이상 포함하며 안정제가 포함된 동결건조백신임(표 1).
- (3) 대량 생산한 3Lot에 대하여 2~8도에 보관하면서, 제조직후에 대량 생산하고 특성시험, 진공도시험, 수소이온농도시험, 함습도시험, 무균시험, 마이코플라즈마 부정시험, 미입바이러스 부정시험, 바이러스함량시험을 실시하여 농림축산검역본부 검정기준(고시 2017-46호, 1-2-03-10 돼지 로타바이러스, 전염성위장염 생혼합건조백신 검정기준)에 적합한 결과를 확인하였음.

[표 1] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신 정보

Lot. No.	Date manufactured	Contents (per 1 dose)	Quantity (5 doses/vial)
T317TR3 -Lot1	2017.02.02.	Porcine rotavirus K174 strain	Over $10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub>
		Porcine rotavirus 06-42 strain	Over $10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub>
		Porcine rotavirus A1 strain	Over $10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub>
		TGEV 175L strain	Over $10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub>
		Stabilizer	Suitable amount
T317TR3 -Lot2	2017.02.03.	Porcine rotavirus K174 strain	Over $10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub>
		Porcine rotavirus 06-42 strain	Over $10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub>
		Porcine rotavirus A1 strain	Over $10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub>
		TGEV 175L strain	Over $10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub>
		Stabilizer	Suitable amount
T317TR3 -Lot3	2017.02.06.	Porcine rotavirus K174 strain	Over $10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub>
		Porcine rotavirus 06-42 strain	Over $10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub>
		Porcine rotavirus A1 strain	Over $10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub>
		TGEV 175L strain	Over $10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub>
		Stabilizer	Suitable amount

### 2. 안전성 및 역가 시험

#### (1) 시험방법

- (가) 돼지 로타바이러스 및 TGEV 약독화 4종 혼합백신의 효능을 평가하기 위하여 대량 생산한 3Lot중에서 1개를 랫트를 선정하여, 모든실험을 진행하였음.
- (나) 분만 6주전 임신돈를 사용하여 실험 전 혈청과 분변 검사를 하여 중화 항체가

와 PCR 결과에서 항체가 및 바이러스가 검출 되지 않음을 확인하였음.  
 (다) 아래 표처럼 모돈에 백신 2차 접종 이후 태어난 자돈에 대한 안전성 및 면역 원성을 평가하였음.

[표 2] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신의 안전성 및 면역원성

백신 종류	백신접종 방법	접종 개체	시험방법
T317T R3-Lo t1	분만 5주전, 분만 3주전, 총 2차 접종	분만 6주전 모돈 4마리	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 안전성 평가                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 모돈: 백신 접종 후 분만까지 안전성 평가 (폐사, 소화기 증상, 유사산 등)</li> <li>- 자돈: 분만 후 2주간 안전성 평가 (폐사, 소화기 증상 등)</li> </ul> </li> <li>● 면역원성 평가                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 모돈: 백신접종 전, 1차 접종 2주 후, 2차 접종 2주 후에 채혈한 혈청 및 초유를 이용하여 각 백신주에 대한 중화항체가 평가</li> <li>- 자돈: 분만 후 각 모돈 당 5두 선정 후 1주일 간격으로 채혈하여 2주령까지의 중화항체가 평가</li> </ul> </li> </ul>
음성대 조	무접종	분만 6주전 모돈 4마리	

(2) 안전성 시험결과

- (가) 임신 모돈에서의 안전성 평가: 백신 접종 후 분만까지 모돈에서의 어떠한 임상 증상도 관찰되지 않은 채 생존하였으며 유사산 등의 부작용이 관찰되지 않았음.  
 (나) 분만된 자돈에서의 안전성 평가: 백신을 접종한 모돈에서 분만된 자돈의 경우 어떠한 임상증상도 관찰되지 않은 채 생존하였음.

(3) 면역원성 시험결과

- (가) 모돈에서 2차 접종 2주 후 모든 바이러스에 대해 검정기준 (128배) 이상의 항체를 보였으며 초유에서도 매우 높은 항체가를 유지하였음.  
 (나) 초유를 섭취한 자돈 또한 높은 항체가를 유지하다가 감소하는 양상을 보였음.

[표 3] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신의 면역원성

Group	Virus strains	모돈			자돈		
		분만 5주 전	분만 3주 전	분만 1주 전	초유	1주령	2주령
T317TR3 -Lot1	175L	<2	53.82±2.60	304.44±1.65	512.00±2.26	97.01±2.26	18.38±3.64
	K174	<2	64.00±4.11	181.02±1.78	724.08±1.78	128.00±3.17	21.11±4.48
	06-42	<2	26.91±4.11	215.27±1.65	608.87±2.60	73.52±2.26	21.11±3.64

	A1	<2	32.00±2.26	181.02±1.78	861.92±2.61	73.52±1.78	24.25±1.65
음성대조	175L	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	K174	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	06-42	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	A1	<2	<2	<2	<2	<2	<2

### 3. 포유자돈에서 효능평가

#### (1) 시험방법

- (가) 돼지 로타바이러스 및 전염성 위장염바이러스에 대한 4종 혼합 백신의 효능을 평가하기 위하여 대량 생산한 3 랫트 중에서 1개를 랫트를 선정하였음.
- (나) 해당 백신을 모돈에 접종 후 태어난 자돈에 대하여 면역자돈과 비면역자돈으로 그룹을 나눠서 공격접종하고 방어능을 확인하였음.
- (다) 시험군 및 공격접종: 아래 표처럼 백신 2차 접종한 모돈 또는 무접종한 모돈에서 태어난 자돈에 초유를 1주일 동안 충분히 섭취시킨 뒤 각 그룹 당 4두씩 대용유를 급이하면서 분리사육 함.
- (라) 각 그룹의 해당 공격균주를 1ml씩 경구 접종하고 방어능 여부를 평가하였음.

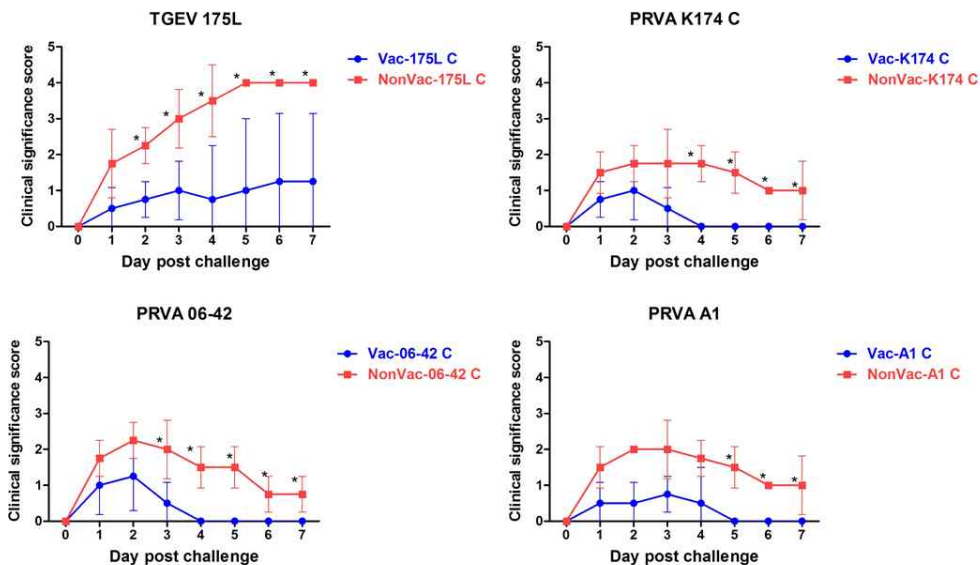
[표 4] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신의 자돈에서 방어능 검사

그룹	모든 백신접종 방법	모든 자돈 수	자돈 공격 접종 균주	공격접종 역가	공격접종 방법	
접종군 (T317TR3-Lot1)	분만 5주전, 분만 3주전, 총 2차 접종	4	4	175L	$10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml	1ml, PO
			4	K174	$3.1 \times 10^{4.0}$ FFU/ml (100 ED <sub>50</sub> /ml)	
			4	06-42	$5.6 \times 10^{3.0}$ FFU/ml (100 ED <sub>50</sub> /ml)	
			4	A1	$10^{4.0}$ FFU/ml	
공격접종 대조	무접종	4	4	175L	$10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml	
			4	K174	$3.1 \times 10^{4.0}$ FFU/ml (100 ED <sub>50</sub> /ml)	
			4	06-42	$5.6 \times 10^{3.0}$ FFU/ml (100 ED <sub>50</sub> /ml)	
			4	A1	$10^{4.0}$ FFU/ml	

- (마) 임상증상 평가: 공격접종 한 후 7일간 임상증상 점수를 확인하였음 (정상: 0, 가벼운 설사: 1, 중등도의 점액~수양성 설사: 2, 심각한 수양성 설사: 3, 폐사: 4).
- (바) 바이러스 배출평가: 공격접종 후 1, 3, 5, 7일의 분변을 채취하여 바이러스 배출 여부를 확인하였음.
- (사) 소화기 장기 병변 확인: 공격접종에 의한 소화기 장기의 병변 발생 유무를 확인하기 위해 실험종료 시 시험동물을 안락사 후 소화기 장기의 현미경학적 병변을 검사하였음.

(2) 임상증상 개선 효과

- (가) 자돈에 공격접종 후 임상증상을 확인한 결과 TGE 공격접종 자돈의 경우 공격접종 2일 차부터 백신 접종군이 공격접종 대조군에 비해 유의적으로 낮은 임상증상을 보였으며 백신 접종군의 경우 1두만 폐사한 반면 공격접종 대조군의 경우 공격접종 5일차에 모두 폐사하였음.
- (나) 돼지 로타바이러스 K174주를 공격접종한 돼지들 중 백신 접종군은 접종 4일차부터 임상증상을 보이지 않으며 공격접종 대조군에 비해 유의적으로 낮은 임상증상 지수를 보였음.
- (다) 돼지 로타바이러스 06-42주를 공격접종한 돼지들 중 백신 접종군은 접종 3일차부터 유의적으로 낮은 임상증상을 보였으며 4일차부터 임상증상을 보이지 않았음.
- (라) 돼지 로타바이러스 A1주를 접종한 그룹의 백신 접종군의 경우 대조군에 비해 낮은 임상증상 지수를 보였고 접종 후 5일차부터 임상증상을 보이지 않으며 유의적으로 낮은 임상증상 지수를 보였음.

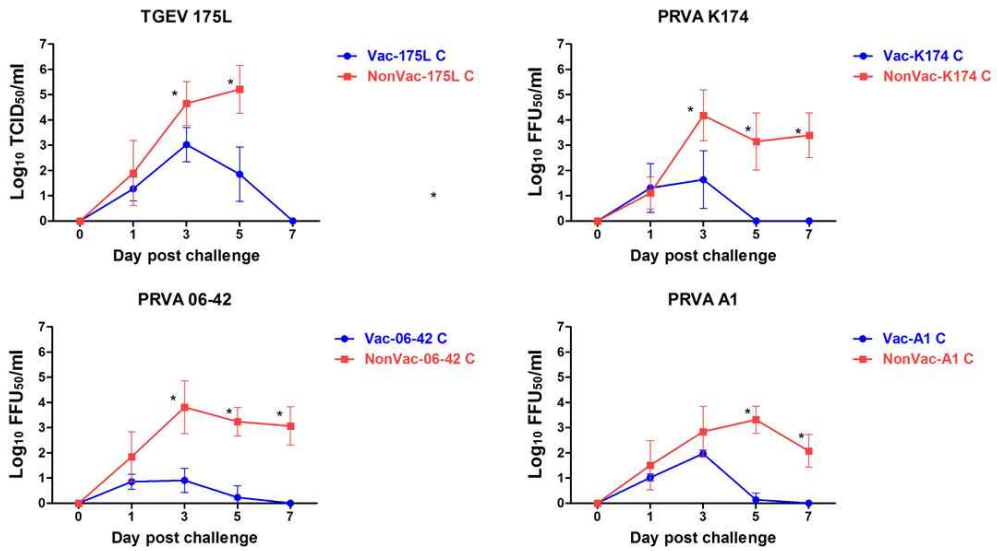


[그림 1] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신 미투여 혹은 투여 모돈에서 분만한 자돈에 각각의 바이러스에 대한 공격접종 후 임상증상 감소 효과 비교.

(3) 분변을 통한 바이러스 배출 개선 효과

- (가) 공격접종 후 1, 3, 5, 7일의 분변을 채취하여 바이러스 배출 여부를 확인한 결과 TGEV 공격접종 자돈의 경우 공격접종 후 3일차부터 백신접종군이 공격접종군에 비해 유의적으로 낮은 바이러스 배출을 보였음.
- (나) 돼지 로타바이러스 K174주 공격접종 자돈의 백신접종군 및 06-42주 공격접종 자돈의 백신접종군은 모두 공격접종 3일차 이후부터 공격접종 대조군에 비해 유의적으로 낮은 바이러스 배출을 보였음.
- (다) 돼지 로타바이러스 A1주 공격접종 자돈의 백신접종군의 경우 공격접종 5일차부터 유의적으로 낮은 배출을 보였음.

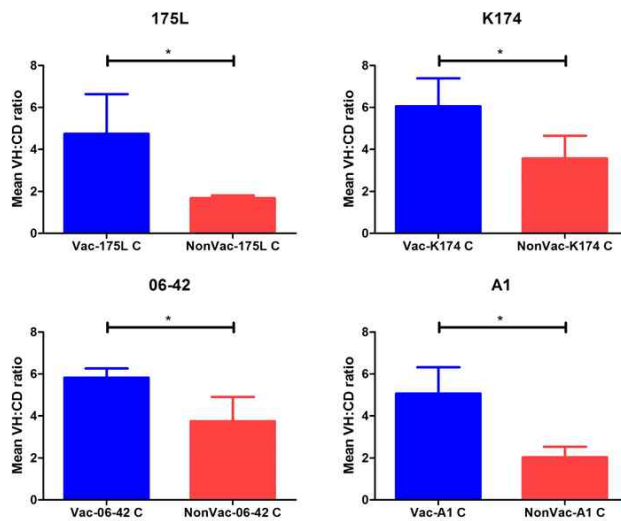




[그림 2] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신 미투여 혹은 투여한 모돈에서 분만한 자돈에 각각의 바이러스에 대한 공격접종 후 분변을 통한 저감 효과.

(4) 소장병변 개선 효과

(가) 공격접종 후 7일차 및 폐사 시기에 부검하여 소화기 장기 병변을 villous atrophy 점수로 확인한 결과 백신을 접종한 모든 그룹의 VH:CD ratio가 백신을 접종하지 않은 그룹에 비해 유의적으로 높았음.



[그림 3] 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 4종 혼합백신 미투여 혹은 투여한 모돈에서 분만한 자돈에 각각의 바이러스에 대한 공격접종 후 소장 병변 개선 효과.

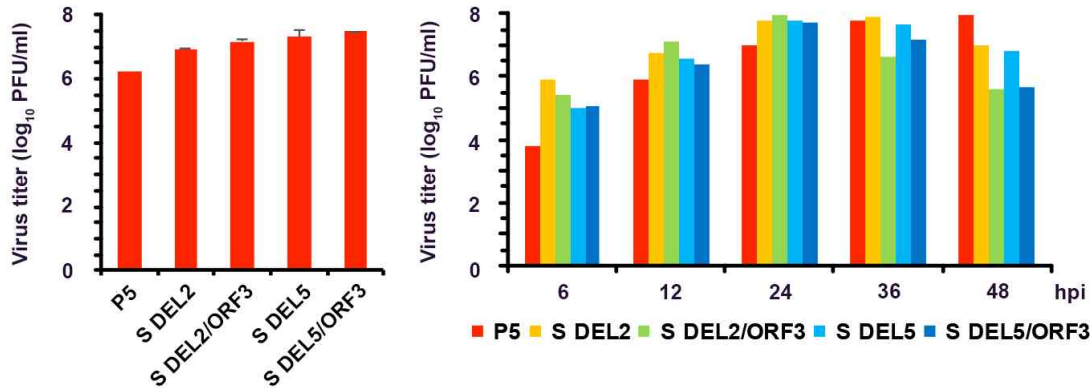
(5) 농림축산검역본부 허가승인

(가) “농림축산검역본부 고시 제2018-15호, 동물용의약품등 제조업 및 품목허가 등 지침”에 따라 다음과 같은 절차로 수이샷 티알3 (수출용, 허가번호 제13-218호) 의 수출용 제조품목 허가승인을 2018.11.26.일자로 득하였음.

## 10절. 돼지 PEDV 약독화 생건조 백신주 특성 분석 및 전임상 시험

### 1. 돼지 PEDV 생건조백신주 특성 분석

#### 가. 백신주 계대별 역가 분석



- 국내 분리주 KNU-141112 백신원주를 Vero 세포에서 100대까지 계대하여 plaque picking 과정을 거쳐 KNU-141112-S DEL2, KNU-141112-S DEL2/ORF3, KNU-141112-S DEL5, KNU-141112-S DEL5/ORF3 각 네 개의 백신후보주를 선별하였다. 백신후보주의 바이러스 역가는 10<sup>6</sup> PFU/ml에서 10<sup>7</sup> PFU/ml 사이에 분포하였으며 백신원주에 비해 빠른 시간대인 접종 후 24시간에 바이러스 역가가 가장 높게 나타나는 것을 확인하였음.

#### 나. 백신 후보주 plaque assay 사진

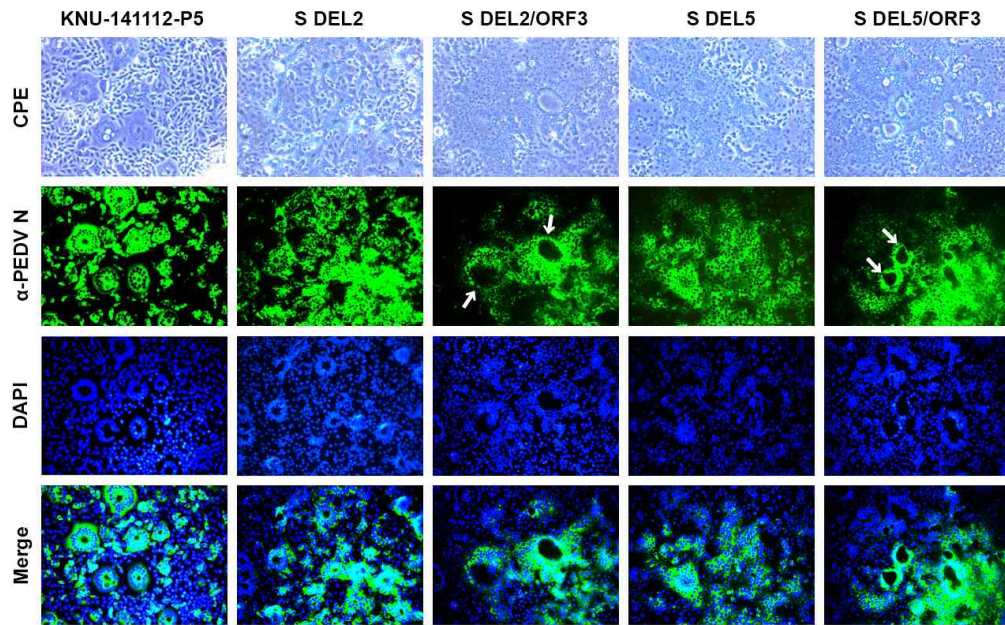


- 국내 분리주 KNU-141112 백신원주와 백신후보주 S DEL2, S DEL2/ORF3, S DEL5, S DEL5/ORF3를 Vero 세포에서 plaque assay 실험을 진행한 결과, 분리주에 비해 백신후보주에서 큰 plaque 크기를 보였으며 S DEL2/ORF3, S DEL5/ORF3 후보주의 plaque 크기가 가장 큰 것으로 확인하였음.

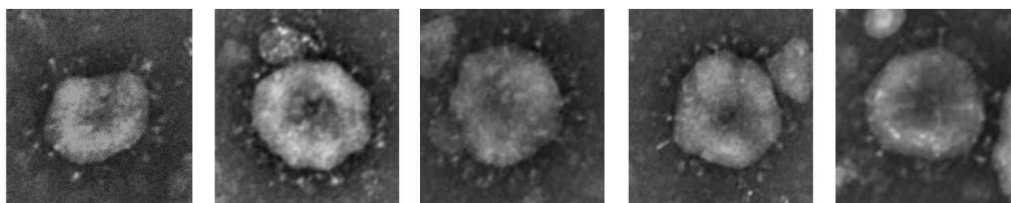
#### 다. 백신 후보주 계대별 CPE 및 항원성 분석

- 국내 분리주 KNU-141112 백신원주, 백신후보주인 S DEL2, S DEL2/ORF3, S DEL5, S DEL5/ORF3 바이러스에 대한 CPE 확인 및 바이러스 뉴클레오펙시드 단백질에 대한 단클론항체를 이용한 형광항체법을 통하여 바이러스에 양성반응을 보이는 세포를 confocal microscope에서 확인하였으며 바이러스 접종에 따른 강한 바이러스 형광 양성반응을 보였음. 바이러스 감염에 따른 공포화와 합포체 형성 및 바이러스 특이 세포변성효과를 확인할 수 있었음. 특히, S DEL2/ORF3,

S DEL5/ORF3 바이러스에서 더욱 더 큰 합포체를 형성하는 것을 확인하였음. 아래 사진 확인 요망.



라. 백신 후보주 바이러스 구조 분석

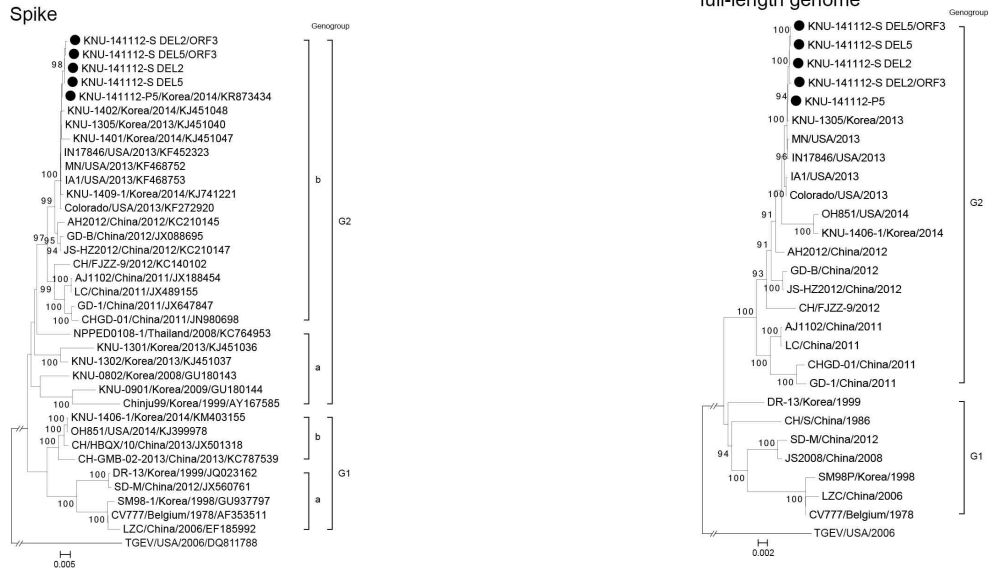


KNU-141112-P5      KNU-141112-S DEL2      KNU-141112-S DEL2/ORF3      KNU-141112-S DEL5      KNU-141112-S DEL5/ORF3

- KNU-141112 백신원주, S DEL2, S DEL2/ORF3, S DEL5, S DEL5/ORF3 각 바이러스를 배양한 상층액을 sucrose gradient로 농도구배 원심분리로 바이러스를 정제 후 침전물에 PTA로 혼합하는 negative staining을 수행하여 전자현미경으로 관찰한 결과, 백신원주 및 백신후보주에서 약 100nm 직경의 바이러스 입자를 확인하였음. 따라서 백신후보주에서의 바이러스 외형 변화는 없는 것을 확인하였음.

마. 백신 후보주별 유전체 전체 염기서열 분석 및 상동성 분석

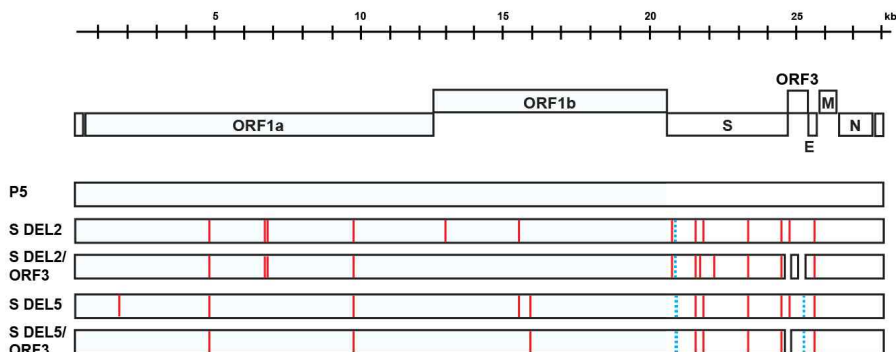
- KNU-141112 백신원주, 백신후보주 바이러스(●)에서 돼지 유행성 설사 바이러스의 RNA를 추출하여 sequencing하여 스파이크 염기서열 및 전체염기서열을 바탕으로 계통학적 분석을 하였음. 백신주 및 각 후보주 바이러스는 국내 유행주를 포함하는 G2b 그룹에 속하는 것을 확인하였으며 계대 간의 계통학적 차이는 관찰되지 않았음. 아래 계통도 확인



- KNU-141112 백신원주, 백신후보주 바이러스 전체염기서열을 바탕으로 백신원주와 후보주 및 다른 돼지 유행성 설사 바이러스간의 상동성을 확인하였음. 아래 상동성 분석 결과 참조 요망.

Strain	Nucleotide identity (%) (No. of nucleotide differences)																	
	KNU-1411112-S DEL2	KNU-1411112-S DEL2/ORF3	KNU-1411112-S DEL5	KNU-1411112-S DEL5/ORF3	KNU-1411112-46ces	KNU-1411112-P5	KNU-1411112-P10	KNU-1305/Korea/2013	Co/13/USA/2013	IA1/USA/2013	MN/USA/2013	IN17846/USA/2013	AH2012/China/2012	GD-B/China/2012	JS-HZ2012/China/2012	CV777/Belgium/1978	SM98-1/Korea/1998	DR-13/Korea/1999
KNU-1411112-S DEL2		99.7 (17)	99.9 (15)	99.7 (15)	99.9 (15)	99.9 (14)	99.9 (12)	99.8 (23)	99.7(53)	99.7(58)	99.8 (27)	99.8 (27)	99.5 (131)	99.2 (215)	99.2 (194)	96.7 (895)	96.2 (965)	97.6 (649)
KNU-1411112-S DEL2/ORF3			99.7 (26)	99.8 (26)	99.7 (22)	99.7 (21)	99.7 (19)	99.7 (50)	99.6 (60)	99.5 (65)	99.6 (34)	99.6 (34)	99.3 (138)	99.0 (222)	99.0 (201)	96.5 (962)	96.4 (974)	97.4 (656)
KNU-1411112-S DEL5				99.8 (2)		99.8 (17)	99.8 (15)	99.8 (26)	99.7 (56)	99.7 (61)	99.8 (30)	99.8 (30)	99.4 (134)	99.1 (218)	99.2 (197)	96.7 (893)	96.2 (969)	97.6 (652)
KNU-1411112-S DEL5/ORF3					99.7 (18)	99.7 (17)	99.7 (15)	99.6 (26)	99.5 (56)	99.5 (61)	99.6 (30)	99.6 (30)	99.2 (134)	98.9 (218)	99.0 (197)	96.5 (893)	96.4 (965)	97.4 (652)
KNU-141112-ces/Korea/2004						99.9 (3)	99.9 (3)	99.8 (38)	99.8 (38)	99.8 (63)	99.9 (12)	99.9 (13)	99.5 (117)	99.2 (200)	99.3 (180)	96.7 (884)	96.3 (951)	96.8 (655)
KNU-141112-P5/Korea/2014							99.9 (2)	99.9 (9)	99.8 (39)	99.8 (44)	99.9 (13)	99.9 (14)	99.5 (118)	99.2 (201)	99.3 (181)	96.7 (885)	96.3 (952)	96.8 (636)
KNU-141112-P10/Korea/2014								99.8 (41)	99.8 (46)	99.9 (15)	99.9 (16)	99.9 (16)	99.5 (120)	99.2 (203)	99.3 (183)	96.7 (887)	96.3 (954)	96.8 (636)
KNU-1305/Korea/2013									99.9 (11)	99.8 (49)	99.9 (18)	99.9 (19)	99.5 (119)	99.2(202)	99.3 (182)	96.7 (890)	96.3 (951)	96.8 (637)
Co/13/USA/2013										99.9 (11)	99.8 (43)	99.5 (139)	99.3 (192)	99.3 (172)	96.7 (893)	96.3 (954)	96.8 (643)	
IA1/USA/2013											99.8 (45)	99.8 (48)	99.4 (144)	99.2 (197)	99.3 (177)	96.7 (892)	96.2 (959)	96.8 (640)
MN/USA/2013												99.9 (13)	99.5 (119)	99.2 (202)	99.3 (182)	96.7 (885)	96.3 (952)	96.8 (638)
IN17846/USA/2013													99.5 (120)	99.2 (205)	99.3 (185)	96.7 (888)	96.2 (955)	96.8 (639)
AH2012/China/2012														99.4 (164)	99.4 (147)	96.8 (874)	96.3 (944)	96.8 (622)
GD-B/China/2012															99.8 (32)	96.8 (882)	96.3 (944)	96.8 (636)
JS-HZ2012/China/2012																96.8 (863)	96.4 (925)	96.9 (599)
CV777/Belgium/1978																	99.4 (148)	97.2 (651)
SM98-1/Korea/1998																		97.6 (782)
DR-13/Korea/1999																		

바. 백신 후보주별 유전자 유전형 분석





- KNU-141112 백신원주, 백신후보주의 각 바이러스 전체염기서열을 토대로 상동성을 확인하였음. 백신원주를 이용한 연속 계대배양으로 염기서열의 치환과 결실이 발생하였음. 스파이크 유전자 C-terminus 부근에서 6개, 15개의 뉴클레오타이드 결실이 확인되었으며 N-terminus에서 46개의 뉴클레오타이드 결실을 확인하였음. 또한 백신원주와 비교하여 S DEL2, S DEL2/ORF3, S DEL5, S DEL5/ORF3는 각각 14개, 14개, 12개, 12개의 아미노산 치환을 확인하였음. 위 및 아래 그림 참조 요망.

UIRs/ORFs	Encoding protein	No. of nucleotide/amino acid changes					
		p5	S DEL2	S DEL2/ORF3	S DEL5	S DEL5/ORF3	
5'-UTR		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	
ORF1a	nsp1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	
	nsp2	0/0	1/0	1/0	1/1	0/0	
	nsp3	0/0	4/3	3/3	1/1	1/1	
	nsp4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	
	nsp5	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	
	nsp6	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0	
	nsp7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	
	nsp8	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	
	nsp9	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0	
	nsp10	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	
	nsp11	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	
	ORF1b	nsp12	0/0	1/1	0/0	0/0	1/0
		nsp13	0/0	1/1	0/0	2/2	2/2
		nsp14	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		nsp15	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		nsp16	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
ORF2	S	0/0	7/5	8/8	4/4	4/6	
ORF3	ORF3	0/0	6/2	12/1	5/2	5/1	
ORF4	E	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	
ORF5	M	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0	
ORF6	N	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	
3'-UTR		0/0	0/0	2/0	1/0	1/0	
Total number			22/14	28/14	19/12	19/12	

ORF	Encoding protein	aa position <sup>a</sup>	Mutation at indicated no. of passages				
			p5	S DEL2	S DEL2/ORF3	S DEL5	S DEL5/ORF3
ORF1a	nsp2	192	T	T	T	I	T
	nsp3	1564	S	F	F	F	F
		2178	I	L	L	I	I
		2182	C	F	F	C	C
	nsp5	3186	T	I	I	I	I
ORF1b	nsp12	142	K	N	K	K	K
	nsp13	1025	T	I	T	I	I
ORF2		1165	A	A	A	S	S
	S	272	K	T	T	T	T
		381	N	N	K	N	N
		383	T	N	T	N	N
		516	T	T	I	T	T
		888	G	R	R	R	R
		1287	E	Q	Q	Q	Q
		1380	F	F	H	F	H
	1381	E	E	D	E	D	
ORF3	ORF3	26	D	Y	-	Y	-
		135	K	K	S	K	K
		166	N	S	-	S	S
ORF4	E	70	P	S	S	S	S

## 2. 돼지 PED 생건조 백신 전임상 시험

### 가. Seed 및 배양세포 확립

- (1) 1차년도 사독 백신 개발에서 확립된 돼지 PEDV 배양 방법과 동일함.
- (2) 경북대학교에서 분리한 돼지 PEDV를 백신 seed의 제조번호를 부여하고 master, working, production seed를 확립하였음.
- (3) 돼지 PED 발생농장 돼지에서 분리되어 Vero 세포에서 93계대 한 바이러스로서 세포내 병원성을 유지하고 있었음.
- (4) Vero 세포에 접종 1일 후부터 특이적인 CPE를 형성하였고, 바이러스 역가는 10<sup>6.0</sup>

TCID<sub>50</sub>/ml 이상이었음.

[표 1] 돼지 PEDV 백신 seed 및 배양세포 확립

Strain	Seed 제조번호	Cell	Master seed	생산용 종독	Production seed
KNU-141112-S (Del5/ORF3)	RD-P-V-036	Vero	93th	2계대	95th

나. Seed 제조단위 시스템

- (1) 세포증식용 배양액( $\alpha$ -MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml) 0.1%)에 ml당 15~30만개의 Vero 세포를 분산시켜 37°C에서 4~5일간 배양한 다음 배양액을 제거한 후 돼지 PEDV를 0.1 M.O.I 접종하여 37°C에서 1시간 배양한 후 바이러스 증식용 배양액( $\alpha$ -MEM, 5% FBS, penicillin G-Na(100unit/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml) 0.1%, trypsin 1 $\mu$ g/ml)을 가한 다음 3일간 회전 배양하면서 세포변성효과가 약 80% 이상 일어날 때까지 배양하였음.

다. Master seed

- (1) 80대 계대 된 돼지 PEDV를 단층이 형성된 Vero 세포에 접종하여 37°C에서 3~4일간 배양한 후, 접종 바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채득하여 -80°C의 냉동고에 동결보존 및 동결건조하여 원종독으로 사용하였음.

라. Production seed

- (1) Master seed와 같은 계대방법으로 2대 계대한 돼지 PEDV를 단층이 형성된 Vero 세포에 접종하여 37°C에서 3~4일간 배양한 후, 접종바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 감염 배양액을 채득하여 -80°C의 냉동고에 동결건조하여 생산용 종독으로 사용하였음.

마. 배양조건 확립

- (1) 바이러스 접종
  - (가) Vero 세포를 세포증식용 배양액에 ml당 15~30만개의세포를 분산시킨 후, 37°C에서 4~5일간 배양한 다음 배양 세포가 단층을 형성하였을 때 배양액을 제거한 후 돼지 PEDV를 0.1 M.O.I 접종하고 37°C에서 1시간 흡착배양한 후 바이러스 증식용 배양액을 넣었음.
- (2) 바이러스 배양
  - (가) Vero 세포에 바이러스를 접종한 후 37°C에서 3~4일간 배양하였음.
- (3) 채득
  - (가) 37°C에서 3~4일간 배양한 후 돼지 PEDV에 의한 세포변성 효과가 약 80%이상 일어났을 때 배양감염액을 채득하였음.

바. Master seed에 대한 병원성 복귀시험

- (1) 시험방법

(가) 감수성이 높은 생후 5일령 자돈에 구강 접종 이후 균주 접종 5일차에 분변과 장 조직을 채취하여 자돈에  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml 용량으로 1ml 접종하였음.

(2) 시험결과

(가) 시험은 3차까지 진행되었으며 3차까지 병원성 복귀가 없고 면역원성이 있음을 확인하였음.

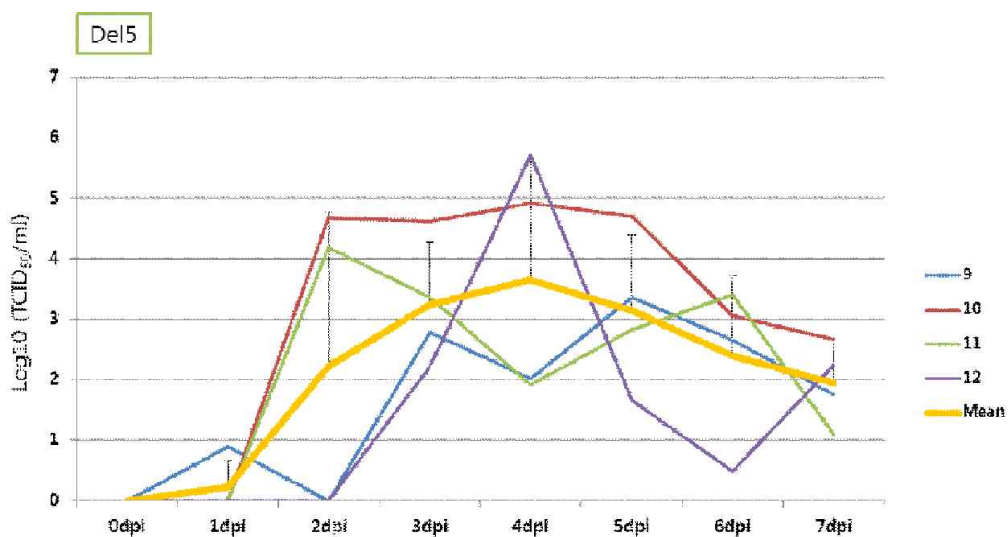
(3) PEDV Del5/ORF3 주의 1차 병원성 회귀 시험결과

(가) 1차 병원성 복귀 시험을 하여 부검 결과 4마리 개체 모두 특이 병변이 관찰되지 않았음(그림 1).



[그림 1] PEDV Del5/ORF3 약독주 1차 접종 후 부검소견.

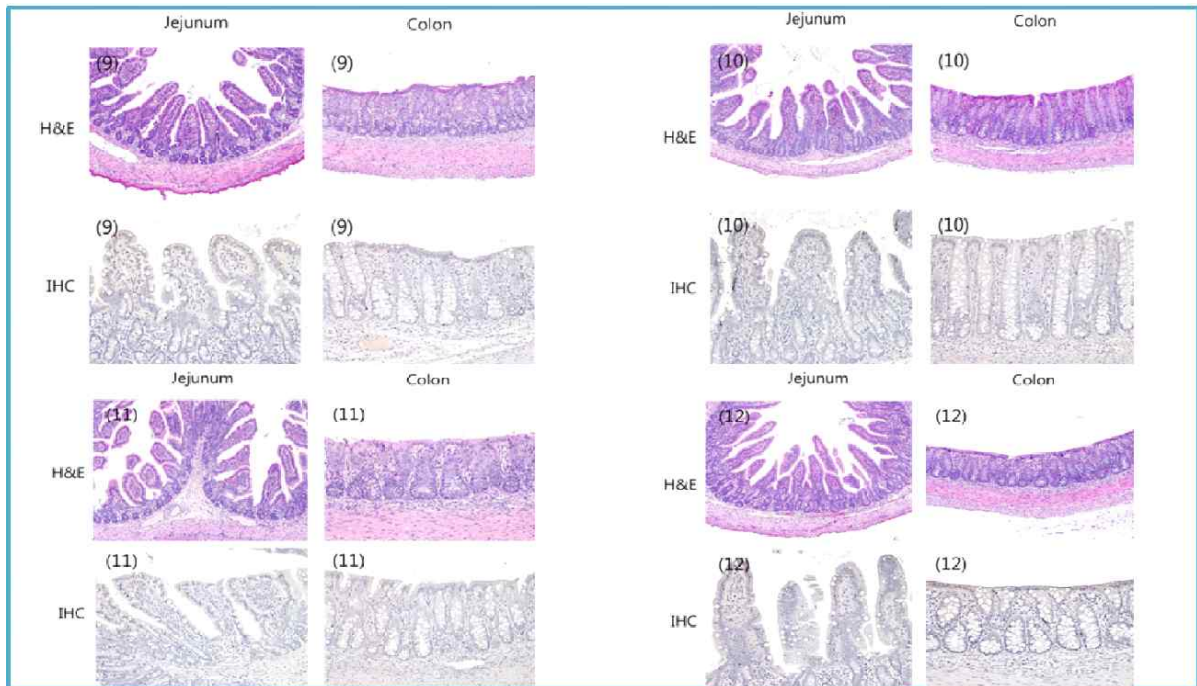
(나) 1차 병원성 복귀 시험 시 매일 분변을 채취하여 바이러스 함량을 측정 한 결과 바이러스 접종 4일차에 가장 많은 바이러스가 배출된 후, 점차 감소하였음.



[그림 2] PEDV Del5/ORF3 약독주 접종 후 분변을 통한 바이러스 배출량.

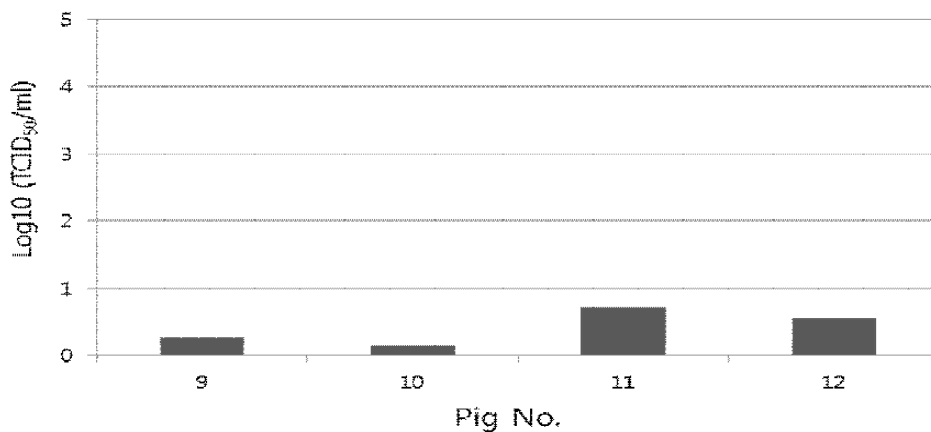


(다) 약독주 접종 후 7일차에 부검 후 병리조직 병변을 검사한 결과 용모의 위축 및 융합이 관찰되지 않았으며, 면역조직화학염색법에 의해서도 바이러스 항원이 검출되지 않았음(그림 3).



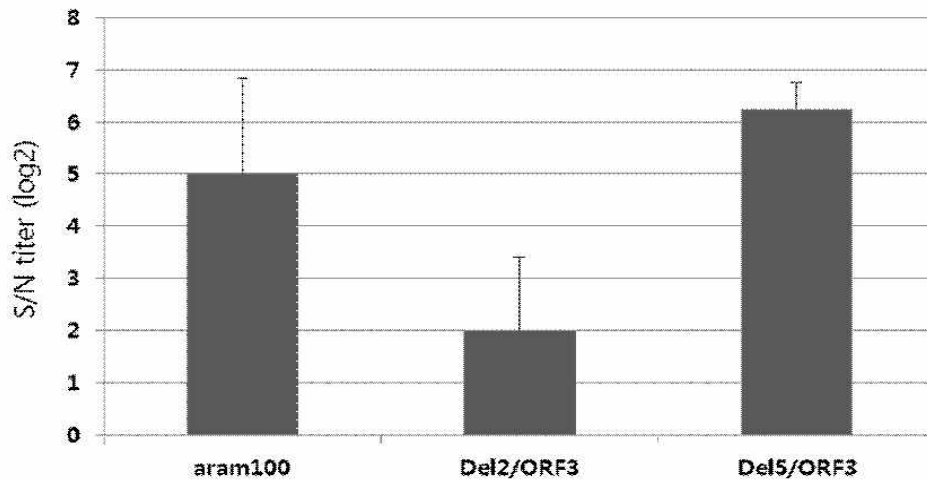
[그림 3] PEDV Del5/ORF3 약독주 접종 자돈의 소장 병변 및 항원 양성세포 분포.

(라) 약독주 접종 후 7일차에 부검 후 회장에서 바이러스를 검출한 결과 매우 낮은 바이러스가 검출되었음(그림 4).



[그림 4] PEDV Del5/ORF3 약독주 접종 자돈의 회장 내 바이러스 검출량.

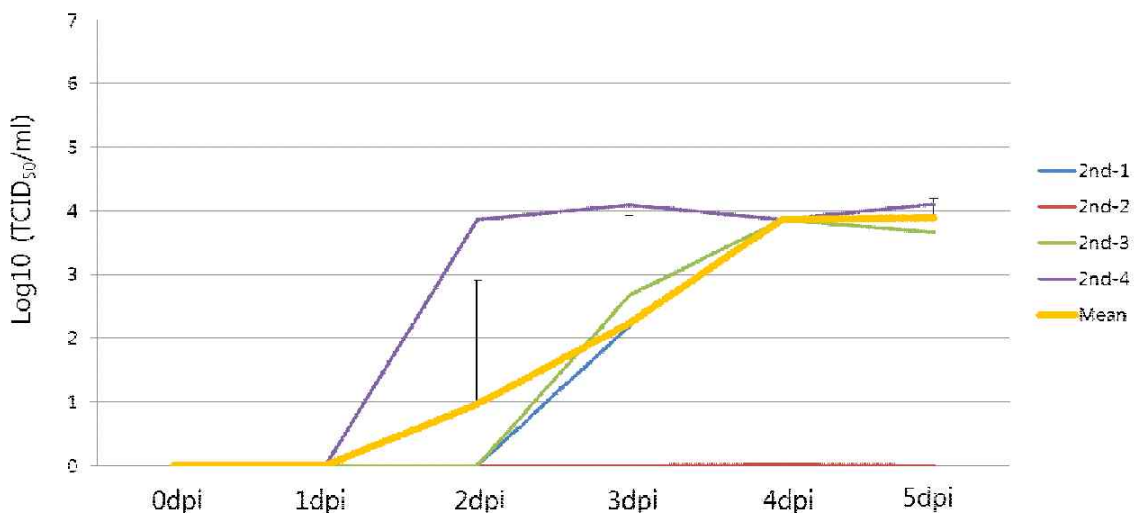
(마) 약독주 접종 후 7일차 자돈의 혈청 내 중화항체를 검사한 결과 26 회석배수의 중화 항체를 보였음(그림 5).



[그림 5] PEDV Del5/ORF3 약독주 접종 자돈의 혈청 내 중화항체가.

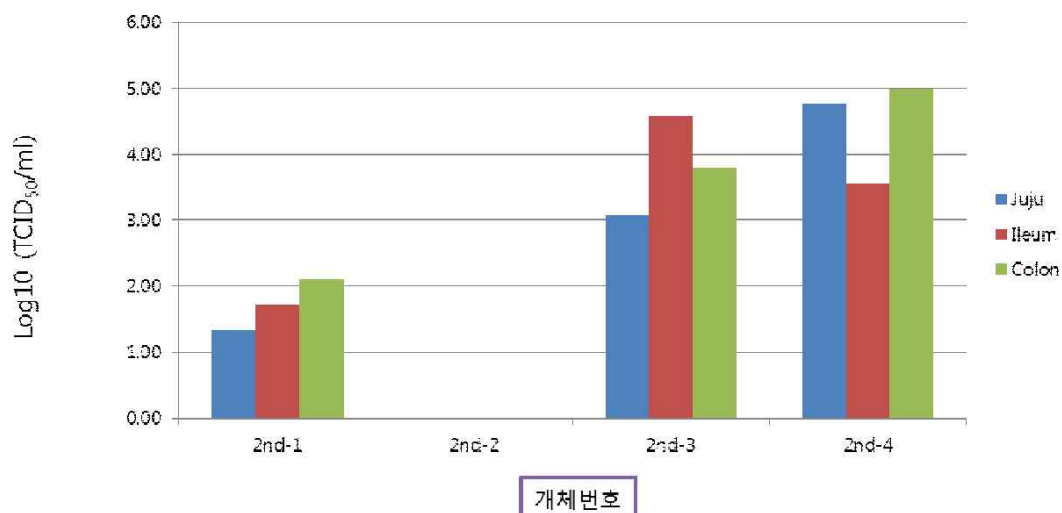
(4) PEDV Del5/ORF3 주의 2차 병원성 회귀 시험결과

- (가) 2차 병원성 복귀 시험을 하여 부검 결과 4마리 개체 모두 특이 병변이 관찰되지 않았음.
- (나) 2차 시험에서 1번 개체는 균주 접종 3일차에 부검하여 Del5/ORF3균주의 균주 감염 초기 병원성을 관찰 한 결과 감염 3일차에도 병원이 보이지 않는 것을 확인하였음.
- (다) 2차 병원성 복귀 시험에서 실험 기간 매일 분변을 채취하여 바이러스 함량을 측정 한 결과 균주 접종 4일차에 가장 많은 바이러스가 배출되며 이는 1차 실험 결과와 유사하고 바이러스 함량도 1차와 비슷한 수준으로 검출되었음. 1차 실험에서 4~5일차에 분변 함량이 최고치를 보였으므로 2차 실험부터는 5일차에 부검하여 병원성을 관찰하고 다음 계대로 접종 시험을 실시하였음. 특이하게 2번 개체의 경우 바이러스 검출이 되지 않았음(그림 6).



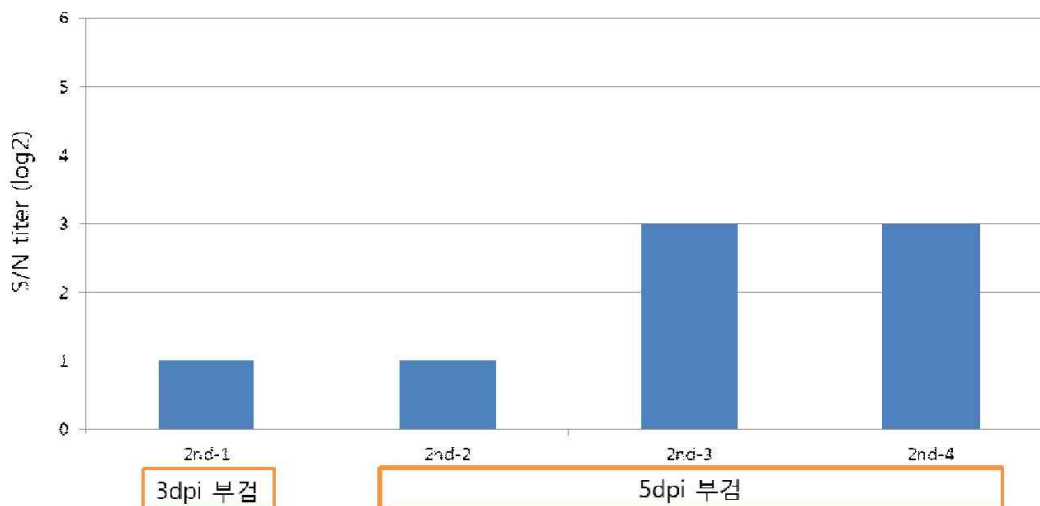
[그림 6] PEDV Del5/ORF3 약독주 접종 후 분변을 통한 바이러스 배출량.

(라) 약독주 접종 후 5일차에 부검 후 소화장에서 바이러스를 검출한 결과 매우 낮은 바이러스가 검출되었음(그림 7).



[그림 7] PEDV Del5/ORF3 약독주 접종 자돈의 소장 내 바이러스 검출량.

(마) 약독주 접종 후 3, 5일차 자돈의 혈청 내 중화항체를 검사한 결과, 3일차에 부검한 개체와 바이러스 배출이 되지 않았던 개체는 낮은 항체를 보였으며 5일차에 부검한 개체는 8배의 희석배수 항체를 보였음. 이는 1차 병원성 복귀 실험의 7일차 부검 자돈보다 낮은 수치임. 바이러스 감염 초기에는 항체가 낮게 형성됨을 확인 할 수 있었음(그림 8).



[그림 8] PEDV Del5/ORF3 약독주 2차 병원 회귀 시험 3, 5일차 혈청 내 중화항체가.

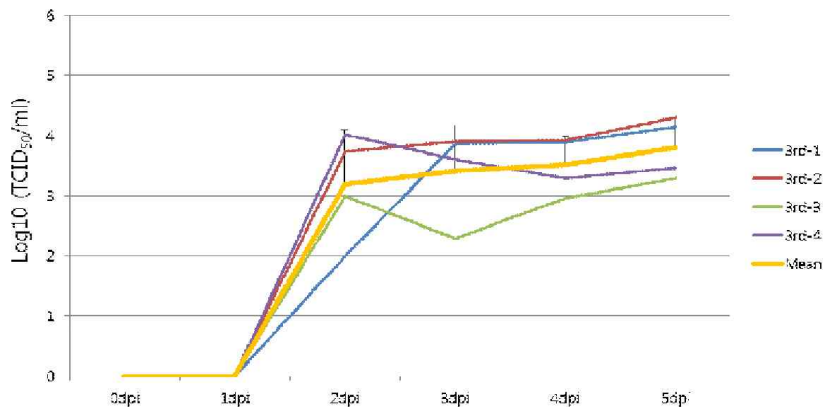
(5) PEDV Del5/ORF3 주의 3차 병원성 회귀 시험결과

(가) 3차 병원성 복귀 시험 부검 결과 4마리 개체 모두 특이 병변요소를 보이지 않았음(그림 9).



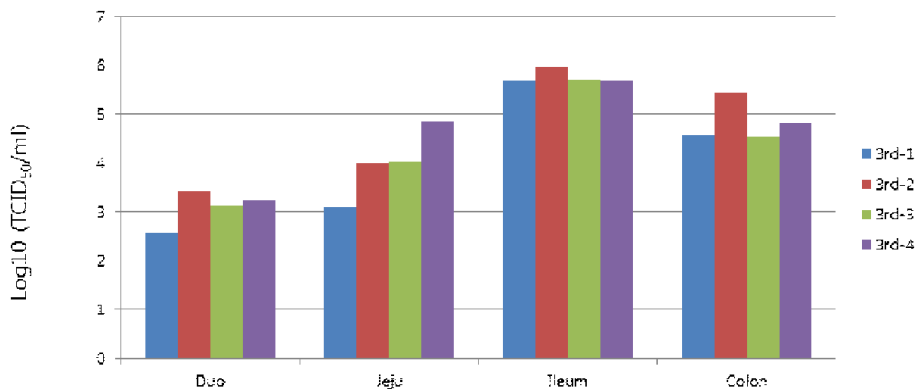
[그림 9] PEDV Del5/ORF3 약독주 3차 접종 후 부검소견.

(나) 3차 병원성 복귀 시험에서 실험 기간 매일 분변을 채취하여 바이러스 함량을 측정된 결과 균주 접종 5일차에 가장 많은 바이러스가 배출되며 이는 1차, 2차 실험 결과와 유사하고 바이러스 함량도 1차, 2차와 비슷한 수준으로 검출되었음 (그림 10).



[그림 10] PEDV Del5/ORF3 약독주 접종 후 분변을 통한 바이러스 배출량.

(다) 3차 병원성 복귀 시험 부검 이후 장기에서 바이러스 함량을 측정된 결과 앞선 일차별 분변에서 바이러스 배출량과 비슷한 양상을 보였음(그림 11).



[그림 11] PEDV Del5/ORF3 약독주 3 접종 자돈의 소장 내 바이러스 검출량.

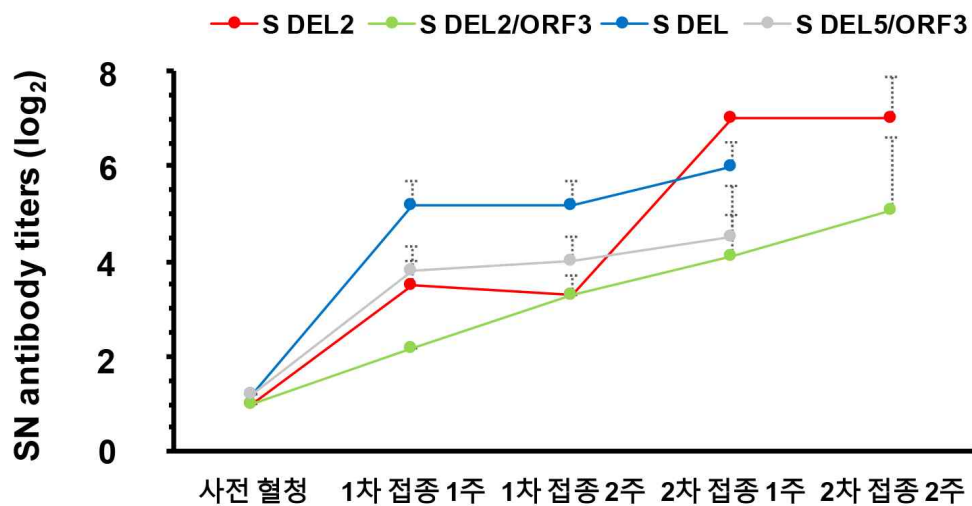
사. 백신 후보주별 혈청 역가 시험

(1) 시험방법

(가) 백신후보주 S DEL2, S DEL2/ORF3, S DEL5, S DEL5/ORF3 바이러스를 각 3주령의 돼지에 2회에 걸쳐 구강 접종한 후 면역원성을 확인하기 위하여 감염된 돼지의 혈청을 이용하여 중화시험을 실시하였음.

(2) 시험결과

(가) 2차 접종 결과 각 백신후보주 접종 돼지 혈청에서 높은 중화항체가 형성을 확인하였음.



[그림 12] PEDV 백신 후보주별 혈청 역가 시험 결과.

아. 보호제 조성 결정

(1) 보호제 구성

(가) 기존 G1a type PED 생독 백신에서 안정성 및 효능이 입증된 보호제 성분을 사용하여 보호제를 결정하였음(표 2).

[표 2] 돼지 PEDV 생건조백신 보호제 구성

구성 성분	함량
Trehalose	74.62g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.517g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

자. 시험백신 생산

- (1) 균주를 동결건조하여 아래와 같이 400병씩 3lot의 시험백신을 제조하였음.
- (2) 바이러스 함량은 기존 PED 생독 백신 제품의  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub>/dose 이상 기준으로 제조하였음.
- (3) 바이러스 균주명은 KNU-141112-S Del5/ORF3 균주이지만 편의상 Del5/ORF3로 기술하였음.

[표 3] 돼지 PEDV 생건조백신 시험백신

Lot. No.	MFD*	Contents (per 1 dose)	Quantity (5 doses/vial)
T317PEDel-Lot1	2016.10.03.	돼지 유행성 설사 바이러스 Del5/ORF3 주 ..... $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	400 vials
T317PEDel-Lot2	2016.10.05.	돼지 유행성 설사 바이러스 Del5/ORF3 주 ..... $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	400 vials
T317PEDel-Lot3	2016.10.07.	돼지 유행성 설사 바이러스 Del5/ORF3 주 ..... $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> 이상 보호제 ..... 적량	400 vials

차. 안전시험

- (1) 단일 돼지 유행성 설사바이러스 생건조 백신의 안전 시험 결과 마우스, 기니픽, 돼지에서 모두 안전성이 확인되었음(표 4).

[표 4] 돼지 PEDV 생건조백신 안전시험 결과

개체	마우스	기니픽		돼지
접종 경로	복강	근육	복강	근육
접종 용량	0.5ml	2ml	2ml	20ml
그룹	접종군	접종군	접종군	접종군
접종 수량	8	2	2	2
T317PEDel-Lot1	모든 개체에서 이상없이 생존하였음.			
T317PEDel-Lot2	모든 개체에서 이상없이 생존하였음.			
T317PEDel-Lot3	모든 개체에서 이상없이 생존하였음.			

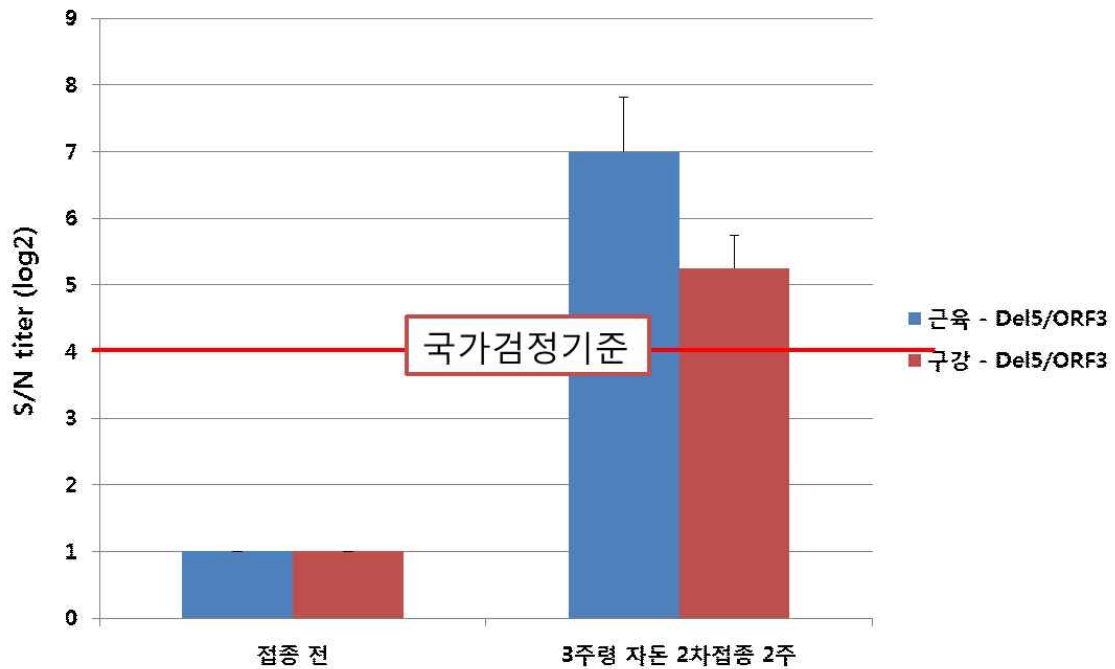
카. 혈청 역가시험

- (1) 안전시험에서 안전함을 확인한 3랏트 중에 1랏트(T317PEDel-Lot1)를 선정하여 돼지 8마리를 선정하여 백신을 구강과 근육으로 4마리씩 2차 접종 한 결과 경구 접종군은  $25.25 \pm 0.5$ 배의 혈청 중화 항체 배수를, 근육 접종군은  $27 \pm 0.82$ 배의 혈청 중화 항체 배수를 보였음.

(2) 이는 경구용과 근육용 돼지 유행성 설사바이러스 검정 기준인 16배를 넘는 값이며 생독 백신 균주에 적합함을 시사 함.

[표 5] 돼지 PEDV 생건조백신에 의한 혈청 중화 항체가

구분		개체번호	중화항체역가 (log2, 2차 접종 2주)	
			경구용	근육용
혈청	Del5/ORF3	1	6	7
		2	5	8
		3	5	7
		4	5	6
		평균	5.25	7
		표준편차	0.5	0.82
	음성 대조	1	2	
		2	2	
	양성 대조	1	8	
		2	8	



[그림 13] 돼지 PEDV Del5/ORF3 strain 단독의 돼지 혈청 역가 실험.

타. 특성 시험

(1) 시험 방법



(가) 2개 이상의 백신에 대하여 무색 투명한 용기의 백신은 백신 회색액으로 용해하고, 불투명한 용기의 백신은 직경 18~22mm의 무색 투명한 유리용기에 옮겨서 자연광 또는 1,000룩스 이상의 백색 광원하에서 실시하였음.

(2) 시험 결과

(가) 이물, 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하는 등, 시험 결과 모든 시험백신에서 적합 판정을 받았음(표 6).

[표 6] 돼지 PEDV 생건조백신 특성 시험 결과

Lot	시험	시험방법 및 시험 결과	판정
T317PEDel-Lot1	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰 성상 : 노란백색 용해 후 색조 : 밝은 회백색	적합
	투명도(혼탁도)시험	투명도 또는 혼탁도 관찰 성상 : 투명함	적합
	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 성상 : 이물없음	적합
	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 성상 : 이취없음	적합
	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 성상 : 균일함	적합
T317PEDel-Lot2	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰 성상 : 노란백색 용해 후 색조 : 밝은 회백색	적합
	투명도(혼탁도)시험	투명도 또는 혼탁도 관찰 성상 : 투명함	적합
	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 성상 : 이물없음	적합
	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 성상 : 이취없음	적합
	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 성상 : 균일함	적합
T317PEDel-Lot3	색조시험	백색 배경을 바탕으로 백신의 색조 관찰 성상 : 노란백색 용해 후 색조 : 밝은 회백색	적합
	투명도(혼탁도)시험	투명도 또는 혼탁도 관찰 성상 : 투명함	적합
	이물시험	백색 또는 흑색의 배경을 이용해 육안 관찰 성상 : 이물없음	적합
	이취시험	후각으로 개봉된 백신에 대해 이취 발생 여부 관찰 성상 : 이취없음	적합

	내용물의 균일성 시험	투명한 유리용기에 옮겨 내용물의 균일성 관찰 성상 : 균일함	적합
--	-------------	--------------------------------------	----

과. 진공도 시험

(1) 시험 방법

(가) 암실에서 백신으로부터 5~10mm 떨어진 위치에 테스터코일을 놓고 방전의 유무를 관찰하며, 방전 인정 시 적합함.

(2) 시험 결과

(가) 모든 백신에서 방전이 인정되었음(표 7).

[표 7] 돼지 PEDV 생건조백신 진공도 시험검사 결과

Lot	시험	시험방법	판정
T317PEDel-Lot1	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여무(음압) 관찰	적합
T317PEDel-Lot2	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여무(음압) 관찰	적합
T317PEDel-Lot3	발취시 검사	테스터코일로 방전유무 관찰	적합
	일반시험시 검사	백신용기의 개봉시 진공여무(음압) 관찰	적합

하. 수소이온농도 시험

(1) 시험 방법

(가) 각 lot 별 2개의 백신에 대하여 각각 pH측정기를 이용하여 측정하였음.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 판정 기준내의 pH값을 보였음(표 8).

[표 8] 돼지 PEDV 생건조 백신 수소이온농도 시험결과

Lot	백신	시험방법	시험결과	판정기준	판정
-----	----	------	------	------	----

T317PEDel -Lot1	백신 1	측정기 (pH/conductivity meter : METTLER TOLEDO)	7.03	6.0~8.0	적합
	백신 2		7.06		적합
T317PEDel -Lot2	백신 1		7.02		적합
	백신 2		7.07		적합
T317PEDel -Lot3	백신 1		7.10		적합
	백신 2		7.05		적합

가. 돼지 PEDV 생건조 백신 함습도 시험

(1) 시험 방법

- (가) 표준용액으로 함습도 측정하며 1회 측정시 샘플링을 1g 미만으로 측정함.
- (나) 3개의 백신에 대하여 내용물을 신속히 분쇄하여 입자의 직경을 2mm 이하로 하여 10~20mg을 시험에 사용함.
- (다) Karl-Fischer방법을 사용하여 함습도를 측정하며, 3개 중 최고치를 함습도로 인정함(표 9).

[표 9] 돼지 PEDV 생건조 백신 함습도 시험 방법

백신 Lot		시험결과	판정기준	판정
T317PEDel-L ot1	백신1	4.45	최고치가 6.0% 아하이어야 한다.	적합
	백신2	3.85		적합
	백신3	4.12		적합
T317PEDel-L ot2	백신1	4.05		적합
	백신2	3.97		적합
	백신3	3.83		적합
T317PEDel-L ot3	백신1	4.06		적합
	백신2	4.38		적합
	백신3	4.41		적합

\*Fluka #34849 HYBRANAL Water Standard 10.0. 1.0g 미만으로 측정.

나. 무균 시험

(1) 시험 방법

- (가) 시험품의 액상 제제는 그대로, 건조제제는 전용 희석액으로, 전용 희석액이 없

는 제제는 멸균된 일반 회석액으로 용해한 후 접종함.

(나) 사용 배지는 tryptic soy agar (TSA), tryptic soy broth (TSB), 0.5% beefextract 첨가된 thioglycollate medium (Thio)를 사용함.

(다) 22°C 및 32°C incubator에서 각각 14일간 배양하며 관찰하고 시험 결과 어떠한 세균 및 진균의 발육도 인정되어서는 안됨.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 세균 및 진균 발육이 인정되지 않음(표 10 & 11).

[표 10] 돼지 PEDV 생건조 백신 무균 시험 결과

백신 종류	22°C			32°C			결과	판정
	TSA	TSB	Thio	TSA	TSB	Thio	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T317PEDel-Lot1	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T317PEDel-Lot2	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합
T317PEDel-Lot3	-	-	-	-	-	-	세균 및 진균 발육 인정 안됨	적합

양성은 “+”, 음성은 “-”로 표기.

[표 11] 돼지 PEDV 생건조 백신 무균 시험 실험 중 환경 모니터링 결과 (실험 종료 후 배양기에 배지를 배양시킴)

관찰 일자	TSA		R-TAS		SDA		R-SDA		판정
	낙하균		표면균		낙하균		표면균		
	1	2	1	2	1	2	1	2	
1일차	-	-	-	-	-	-	-	-	적합
2일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
3일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
4일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
5일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
6일차	-	-	-	-	-	-	-	-	
7일차	-	-	-	-	-	-	-	-	

양성은 “+”, 음성은 “-”로 표기.

다. 마이코플라즈마 부정시험

(1) 시험 방법

(가) PCR 방법을 이용한 마이코플라즈마 검출 방법을 사용하였으며 PCR산물을 전기영동하여 양성대조군에서는 464bp의 증폭 산물이 관찰되고, 음성대조군에서는 증폭산물이 관찰되지 않으면 이 시험은 적합한 것으로 판정함.

(나) 만약 시험품에서 464bp의 증폭 산물이 관찰되면 직접배양법을 이용하여 마이코플라즈마 분리시험을 실시하여 최종 확인함.

(2) 시험 결과

(가) 모든 시험 백신에서 마이코플라즈마 음성이었음(표 12).

[표 12] 돼지 PEDV 생건조 백신 마이코플라즈마 부정시험 결과

백신종류	시험방법	시험결과	판정
T317PEDel-Lot1	PCR방법	음성	적합
T317PEDel-Lot2		음성	적합
T317PEDel-Lot3		음성	적합

라. 돼지 PEDV 생건조 백신 시험백신 미입바이러스 부정시험 (BVDV, CPIV 오염검사)

(1) 시험 방법

(가) 건조 백신을 일반 희석액 1ml로 희석 후 RNA를 추출하여 PCR 검사방법을 사용하여 미입바이러스 부정시험을 실시하였음.

(2) 시험 결과

(가) 모든 백신에서 미입바이러스가 발견되지 않았음(표 13).

[표 13] 돼지 PEDV 생건조 백신 미입바이러스 부정시험 결과

백신종류	시험방법	검출항원	시험결과	판정
T317PEDel-Lot1	PCR방법	BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T317PEDel-Lot2		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합
T317PEDel-Lot3		BVDV	음성	적합
		CPIV	음성	적합

마. 시험백신 함량 시험

(1) 시험 방법

(가) 백신을 혼합하여 최종 1두분 (2ml/두)으로 되게 한 후 10진 희석한다. 각 희석액 0.1ml을 MA104 cell과 ST cell에 접종한 후 37°C에서 4~7일간 배양함.

(2) 시험 결과

(가) 시험 결과 모든 시험 백신이 판정기준 이상의 바이러스 함량임을 확인하였음 (표 14).

[표 14] 돼지 PEDV 생건조 백신 시험백신 함량 시험 결과

백신종류	Virus 함량 (10 <sup>x</sup> TCID <sub>50</sub> /dose)	판정기준	판정
T317PEDel-Lot1	6.0	국검 : ≥10 <sup>5.0</sup> 자검 : ≥10 <sup>5.5</sup> TCID <sub>50</sub> /dose	적합
T317PEDel-Lot2	6.0		적합
T317PEDel-Lot3	6.0		적합

**결론**

- 돼지 PEDV 단독백신의 시험 결과 백신의 안정성이 확보되었으며 항체 역가가 우수하게 확인되었음.
- 현재 이미 최신 유행 균주인 G2b type의 사독 백신이 개발되어 있는 상태이지만 생독 백신 개발은 아직 이루어지지 않았음.
- PED의 경우 질병이 발병하였을 시 농가 피해가 크고 사독 백신만으로는 완전한 방어를 할 수 없다고 알려져 있음.
- 따라서 이 후에 기술된 바와 같이 PEDV 생건조 백신의 임상 시험을 통하여 생독 백신을 개발하였음.

## 11절. 돼지 PEDV 약독화 생건조 백신 임상 시험

### 1. 농림축산검역본부 임상시험 승인

- (1) “농림축산검역본부 고시 제2015-69호, 동물용의약품등 임상시험 관리지침“에 따라 돼지 유행성설사병 바이러스 생건조백신의 안전성, 효능성에 대한 시험결과와 야외임상시험 계획에 대해 2018년 12월 24일자로 승인을 득함(표 1).
- (2) 승인된 야외임상 계획에 따라 지정된 3개 농장에 대한 야외임상시험을 진행하였으며 이에 대한 결과를 바탕으로 제조품목 허가신청을 위한 허가서류를 제출함(2019.05.28.).

[표 1] 돼지 PED 생건조 백신 임상 시험 진행절차 및 시행날짜

진행절차		시행날짜
1	임상시험계획서 작성	2017.05.01.~2017.08.10.
2	임상시험계획서 제출	2017.08.11.
3	농림축산검역본부의 추가요청	2017.09.26.
4	요청사항에 따른 추가실험	2017.09.27.~ 2018.09.13.
5	2차 임상시험계획서 제출	2018.09.14.
7	농림축산검역본부 검토	2018.09.14.~2018.12.23.
8	야외임상승인	2018.12.24.
9	야외임상시험	2018.12.25.~2019.05.27.
10	허가서류 제출	2019.05.28.

### 2. 돼지 PED 생건조 백신의 임상시험

#### 가. 야외 임상시험 개요

- (1) 동물약품관리과 - 14659 (2018.12.24.)에 승인받은 내용에 따라 실제 야외농장에서의 광범위한 안전성 및 효능 평가를 위하여 임상시험을 수행하였음.
- (2) 야외임상시험을 수행하기 위하여 기존 다른 PEDV 생독백신을 접종하지 않는 시험농장 3군대를 선정하였음.
- (3) 각 시험 농장은 백신 효능에 영향을 미칠 수 있는 질병에 대한 모니터링을 실시한 후 선정하였으며, 지정된 용법 및 용량 (분만 및 종부 2주전까지 2주 간격으로 2회 접종)으로 시험백신을 접종하여 안전성 및 면역원성을 평가하였음.

#### 나. 제1시험농장

##### (1) 안전성 시험

##### (가) 시험방법

- ① 임신 모돈 12두(시험군 6두, 대조군 6두)를 선정하여 시험군 6두에 분만 4주 전에 시험 백신 10두분을 우유와 함께 혼합(용해 백신 2ml : 우유 3ml)하여 각각 경구접종하고 분만 2주전에 시험백신 10두분을 동일한 방법으로 추가



접종하였음.

- ② 대조군은 무처치 대조군으로 6마리씩 배정하고 접종군과 함께 14일동안 접종 부작용(발열, 과민반응, 유산, 설사)을 관찰하였으며, 분만 후 분만성적(분만두수, 포유개시두수, 사산수, 허약자돈수)을 관찰 비교하였음.

(나) 시험결과

- ① 모든의 안전성 시험 결과 백신을 접종한 모든 그룹에서 1차 접종 및 2차 접종 후 14일 동안 어떠한 임상증상도 관찰할 수 없었음.
- ② 또한 그룹 별 분만성적 비교 결과 백신을 접종한 시험군 및 대조군 모두 유산/사산 등의 번식장애를 관찰할 수 없었으며 정상적인 분만두수 및 포유개시 자돈수를 보였음(표 2).

[표 2] 돼지 PED 생건조 백신의 안전성

Group		Sow no.	Abortion	No. of total piglets born	No. of piglets born alive	No. of stillbirth	No. of weak piglets
Vaccinated group	Live-Live	1	0	14	12	0	2
		2	0	13	13	0	0
		3	0	14	11	1	2
		4	0	12	10	2	0
		5	0	11	9	1	1
		6	0	14	12	0	2
		Avg.*	0	13.0	11.2	0.7	1.2
		S.D**	0	1.3	1.5	0.8	1.0
Control group	Non-treated	7	0	13	11	0	2
		8	0	15	12	1	2
		9	0	17	13	2	2
		10	0	11	10	1	0
		11	0	14	12	2	0
		12	0	13	11	1	1
		Avg.*	0	13.8	11.5	1.2	1.2
		S.D**	0	2.0	1.0	0.8	1.0

\*: Average, \*\*: Standard deviation

(다) 음성 후보돈에서의 효능 확인시험

① 시험방법

- PEDV 항원, 항체 음성인 후보돈 20두(시험군 10두, 대조군 10두)를 선정하여 후보돈 도입 후 10두에 시험 백신 1두분을 우유와 함께 혼합(용해 백신 2ml : 우유 3ml)하여 각각 경구접종하고 2주 후에 1두분을 동일한 방법으로 추가 접종하였음.
- 접종 전, 1차 접종 2주 후, 2차 접종 2주 후에 채혈하여 중화항체를 측정하였고, 추가적으로 생독백신 접종 후 2, 3, 4일차의 모든 분변을 채취하여

바이러스의 배출, 유전자 변이여부(spike 및 ORF3 유전자)를 검사하였음.

② 시험결과

- 후보돈 항체가 검사 결과 2차 접종 2주 후부터 평균 137.19 (GMT)의 중화 항체가가 관찰되었으며 음성대조군의 경우 음성으로 유지되었음.
- 백신접종 후 2, 3, 4일차의 후보돈의 분변 검사 결과 모든 그룹에서 PED 바이러스가 검출되지 않았음.

[표 3] 돼지 PED 생건조 백신의 면역원성

Vaccine	Gilt no.	Before vaccination	SN titer		
			2 weeks after 1 <sup>st</sup> vaccination	2 weeks after 2 <sup>nd</sup> vaccination	
Vaccinated group	Live-Live	1	<2	64	256
		2	<2	32	256≤
		3	<2	64	256≤
		4	<2	16	32
		5	<2	8	64
		6	<2	16	256≤
		7	<2	32	256
		8	<2	32	128
		9	<2	16	64
		10	<2	32	128
		<b>GMT</b>	<b>&lt;2</b>	<b>25.99*</b>	<b>137.19*</b>
Control group	Non-treated	11	<2	<2	<2
		12	<2	<2	<2
		13	<2	<2	<2
		14	<2	<2	<2
		15	<2	<2	<2
		16	<2	<2	<2
		17	<2	<2	<2
		18	<2	<2	<2
		19	<2	<2	<2
		20	<2	<2	<2
		<b>GMT</b>	<b>&lt;2</b>	<b>&lt;2</b>	<b>&lt;2</b>

(라) 임신 모돈에서의 효능 확인시험

① 시험방법

- 임신 모돈 20두(시험군 10두, 대조군 10두)를 선정하여 분만 4주전의 시험군 10두에 시험 백신 1두분을 우유와 함께 혼합(용해 백신 2ml : 우유 3 ml)하여 각각 경구접종하고 분만 2주전에 1두분을 동일한 방법으로 추가 접종하였음.
- 모돈의 경우 분만 4주전, 분만 2주전, 분만 직후에 채혈, 분만 시의 초유를 채취하였으며, 생독백신 접종 후 2, 3, 4일차의 모돈 분변을 채취하였음.
- 모돈의 혈청을 이용하여 중화항체 및 IgG ELISA 검사를, 분만 시의 초유

를 이용하여 중화항체 및 IgA ELISA 검사를 실시하였다. 모든의 분변을 이용하여 바이러스의 배출 및 유전자 변이여부 (Spike 및 ORF3 유전자)를 검사하였음.

- 태어난 자돈에 대하여 자돈의 임상증상(설사여부 및 폐사율 등)을 확인하였으며 폐사돈이 발생 시 부검하여 폐사의 원인을 규명하였음.
- 태어난 자돈 중 복당 6마리씩 선정하여 생후 1, 2, 3, 4주령 및 5주령에 채혈하며 매주 체중을 측정하였음.
- 또한, 복당 6마리 자돈의 혈청을 이용하여 중화항체 및 IgG ELISA 검사를 실시하였음.

② 시험결과

- 모든의 혈청 중화항체가 검사 결과 백신 접종 전에는 접종군 및 대조군 모두 기존의 사독백신 접종 이력으로 인해 항체가가 관찰되었으며 유의적인 차이는 관찰되지 않았음.
- 백신 접종군의 경우 생독백신 접종 후 항체가가 상승하여 분만시점인 2차 접종 2주후에 238.9 (GMT)의 높은 항체가를 보였고 1차 접종 2주 후 및 2차 접종 2주후에 대조군에 비해 유의적으로 높은 항체가를 보였음.
- 대조군의 경우 항체가 감소하는 양상을 보여 분만시인 2차 접종 2주 후에는 68.6 (GMT)의 항체가를 보였음.
- 상용화 PEDV IgG ELISA를 이용한 ELISA검사 결과 모든 샘플에서 항체 양성으로 확인되었고 백신 접종을 통한 O.D. 값의 유의적인 상승은 관찰되지 않았음.

[표 4] 돼지 PED 생건조 백신의 모돈에서 면역원성

Vaccine	Sow. no.	SN titer			Serum IgG antibody for ELISA						
		Before vaccination	2 weeks after 1 <sup>st</sup> vaccination	2 weeks after 2 <sup>nd</sup> vaccination	Before vaccination		2 weeks after 1 <sup>st</sup> vaccination		2 weeks after 2 <sup>nd</sup> vaccination		
					O.D	+/-	O.D	+/-	O.D	+/-	
Vaccinated group	Live-Live	1	128	256≤	256≤	0.866	+	0.768	+	1.439	+
		2	32	256≤	256≤	1.179	+	1.354	+	1.693	+
		3	256	256≤	256≤	1.186	+	1.018	+	1.496	+
		4	128	128	256≤	1.274	+	1.155	+	1.105	+
		5	64	128	256≤	1.273	+	0.865	+	0.933	+
		6	16	128	128	1.312	+	1.42	+	1.407	+
		7	128	128	256≤	1.049	+	1.045	+	0.973	+
		8	32	256	256≤	1.122	+	1.052	+	1.004	+
		9	64	256≤	256≤	0.845	+	0.821	+	0.691	+
		10	64	128	256≤	0.764	+	0.925	+	1.205	+
		<b>GMT</b>		<b>84.4</b>	<b>174.2*</b>	<b>238.9*</b>					
<b>Average ±SD</b>					<b>1.09±0.20</b>		<b>1.04±0.22</b>		<b>1.19±0.31</b>		
Control group	Non-treated	11	64	128	64	1.240	+	1.014	+	0.802	+
		12	128	128	32	0.999	+	1.086	+	0.870	+
		13	128	64	128	1.439	+	1.597	+	0.833	+
		14	256	64	256	1.129	+	0.845	+	0.930	+

15	128	32	64	0.899	+	0.862	+	0.970	+
16	32	64	32	0.910	+	0.868	+	1.532	+
17	64	128	32	1.532	+	1.424	+	0.948	+
18	256	128	256	0.673	+	1.324	+	0.829	+
19	256	64	64	1.256	+	1.674	+	0.974	+
20	64	64	32	1.352	+	1.242	+	1.012	+
<b>GMT</b>	<b>111.4</b>	<b>78.8</b>	<b>68.6</b>						
<b>Average</b>						<b>1.14±0.27</b>		<b>1.19±0.31</b>	<b>0.97±0.21</b>
<b>±SD</b>									

GMT: Geometric mean titer, \*: The star signal indicates significant difference.  $p < 0.05$

The number exceeding 256 ( $256 \leq$ ) was calculated as 256. +: O.D. value  $> 0.38$ , -: O.D. value  $< 0.2$ .

- 모든의 초유 중화항체가 검사 결과 백신 접종군의 경우 모든 개체에서 256 배 이상의 높은 항체가를 보였으며 대조군의 경우 이전에 접종된 사독백신 기초접종으로 인해 59.7 (GMT) 정도의 항체가를 보였음.
- 두 그룹 간에는 유의적인 차이가 관찰된 반면에 상용화 PED IgA ELISA 을 이용한 초유 IgA의 경우 모든 개체가 양성으로 검출되었으며 S/P ratio 또한 백신 접종 여부 및 중화항체가와 상관 없이 대조군이 높은 수치를 보였고 통계적 유의성은 관찰되지 않았음.
- 백신접종 후 2, 3, 4일차의 임신모돈의 분변 검사 결과 모든 그룹에서 PED 바이러스가 검출되지 않았음.

[표 5] 돼지 PED 생진조 백신의 모든의 초유 항체가

Vaccine	Sow no.	Colostrum VN titer	Colostrum IgA antibody for ELISA		
			S/P ratio	Result (cut off value 0.385)	
Vaccinated group	Live-Live	1	256 ≤	2.65	+
		2	256 ≤	1.11	+
		3	256 ≤	1.24	+
		4	256 ≤	0.66	+
		5	256 ≤	1.75	+
		6	256 ≤	3.25	+
		7	256 ≤	2.37	+
		8	256 ≤	3.46	+
		9	256 ≤	1.78	+
		10	256 ≤	0.90	+
		<b>GMT</b>	<b>256* ≤</b>		
		<b>Average ± SD</b>		<b>1.92 ± 0.98</b>	
Control group	Non-treated	11	64	0.78	+
		12	64	3.56	+
		13	128	2.56	+
		14	64	1.89	+
		15	128	3.56	+
		16	64	2.67	+
		17	32	3.68	+
		18	64	2.68	+
		19	64	0.87	+
		20	16	2.22	+

	GMT	59.7
	Average±SD	2.45±1.04

- 자돈의 혈청 중화항체가 검사 결과, 백신 접종군의 경우 분만 후 1주차에는 196.27(GMT)의 중화항체를 보이다가 감소하여 5주차에는 16배 이하의 항체를 보였으며 대조군의 경우 분만 1주차에도 23.16(GMT)의 중화항체를 보이다가 2주차 이후부터 16배 이하의 항체를 보였음.
- 모든 구간에서 백신 접종군이 대조군에 비해 유의적으로 높은 항체를 보였음.

[표 6] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 모돈에서 분만한 자돈의 면역원성

Vaccine	Piglet no.	Geomean SN titer of piglet				
		1 weeks of ages	2 weeks of ages	3 weeks of ages	4 weeks of ages	5 weeks of ages
Vaccinated group Live-Live	60	196.27*	80.63*	44.22*	20.87*	12.55*
Control group Non-treated	60	23.16	14.76	5.79	3.56	2.00

\*: The star signal indicates significant difference.  $p < 0.05$ .

- 상용화 PEDV IgG ELISA를 이용한 자돈의 혈청 IgG를 검사한 결과 백신 접종군과 대조군 간에 유의적인 차이가 관찰되지 않았고 항체가의 변화 양상 또한 관찰되지 않은 채 높은 O.D. 값을 유지하였음.

[표 7] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 모돈에서 분만한 자돈의 면역원성

Vaccine	Piglet no.	Serum IgG antibody titer for ELISA titer of piglet (Mean O.D. value±standard deviation)				
		1 weeks of ages	2 weeks of ages	3 weeks of ages	4 weeks of ages	5 weeks of ages
Vaccinated group Live-Live	60	1.14±0.23	1.08±0.20	0.95±0.11	1.15±0.19	1.17±0.21
Control group Non-treated	60	1.00±0.13	1.10±0.24	1.14±0.20	1.01±0.19	1.14±0.23

+: O.D. value>0.38, -: O.D. value<0.2.

- 자돈의 체중측정 결과 백신 접종군 및 대조군의 경우 두 그룹 간의 유의적인 차이가 관찰되지 않았으며 5주령까지 일반적인 자돈의 주령 별 체중과 유사하게 정상적으로 성장하였음.

[표 8] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 모돈에서 분만한 자돈의 체중변화

Vaccine	Sow	Average body weight of piglets per litters (kg)
---------	-----	-------------------------------------------------

	no.	After farrowing	1 weeks of ages	2 weeks of ages	3 weeks of ages	4 weeks of ages	5 weeks of ages
Vaccinated group	1	1.45	2.02	3.13	4.60	6.65	9.40
	2	1.50	1.97	2.97	4.68	6.67	9.28
	3	1.47	1.97	3.15	4.62	6.68	9.28
	4	1.43	1.98	3.22	4.58	6.67	9.30
	5	1.55	1.95	3.12	4.82	6.63	9.45
	6	1.35	1.93	3.10	4.75	6.57	9.13
	7	1.37	1.93	3.08	4.85	6.78	9.28
	8	1.38	1.92	3.08	4.73	6.58	9.32
	9	1.33	1.98	3.07	4.78	6.75	9.38
	10	1.38	2.03	3.17	4.77	6.62	9.45
		<b>Avg.*</b>	1.42	1.97	3.11	4.72	6.66
	<b>S.D.**</b>	0.07	0.04	0.07	0.09	0.07	0.10
Control group	11	1.48	2.05	3.15	4.72	6.63	9.47
	12	1.45	2.02	3.03	4.78	6.62	9.40
	13	1.42	2.03	3.07	4.82	6.45	9.38
	14	1.50	1.95	3.10	4.75	6.70	9.45
	15	1.37	1.97	3.12	4.78	6.70	9.47
	16	1.33	1.98	3.13	4.83	6.45	9.45
	17	1.32	1.98	3.10	4.73	6.57	9.23
	18	1.38	1.93	3.00	4.75	6.58	9.25
	19	1.43	1.92	2.98	4.78	6.60	9.25
	20	1.40	1.95	3.08	4.62	6.60	9.22
		<b>Avg.*</b>	1.41	1.98	3.08	4.76	6.59
	<b>S.D.**</b>	0.06	0.04	0.06	0.06	0.09	0.11

\*: Average, \*\*: Standard deviation.

- 백신군의 경우 3마리의 모돈에서 각각 1두씩 폐사하여 8.3~11.1%의 폐사율을 보였으나 모두 압사 및 식자증에 의한 폐사였고 대조군의 경우 3마리의 모돈에서 압사로 인해 각각 1두가 폐사하여 8.3~9.1%의 폐사율을 보였으며 다른 한 마리의 모돈의 경우 2두가 쇠약 등의 임상증상을 보이면서 폐사하였음.
- 이는 모돈의 무유증으로 인해 저혈당증으로 폐사한 것으로 추정됨.
- 모든 개체에서 PED 바이러스에 의한 설사, 구토, 탈수 등의 증상은 관찰되지 않았음.

[표 9] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 모돈에서 분만한 자돈의 임상증상

Vaccine	Sow no.	Clinical signs*	Mortality rate	Cause of death
Vaccinated group	1	-	8.3	Death from pressure
	2	-	0.0	-
	3	-	0.0	-
	4	-	10.0	Death from pressure
	5	-	11.1	Canibalism
	6	-	0.0	-
	7	-	0.0	-

		8	-	0.0	-
		9	-	0.0	-
		10	-	0.0	-
Control group	Non-treated	11	-	9.1	Death from pressure
		12	-	8.3	-
		13	-	0.0	-
		14	lethargy	20.0	Weakness (caused by agalactia),
		15	-	0.0	-
		16	-	0.0	-
		17	-	0.0	-
		18	-	8.3	Death from pressure
		19	-	0.0	-
		20	-	0.0	-

\*: Average, \*\*: Standard deviation.

## 나. 제2시험농장

### (1) 안전성 시험

#### (가) 시험방법

- ① 임신 모든 12두(시험군 6두, 대조군 6두)를 선정하여 시험군 6두에 분만 4주 전에 시험 백신 10두분을 우유와 함께 혼합(용해 백신 2ml : 우유 3ml)하여 각각 경구접종하고 분만 2주전에 시험백신 10두분을 동일한 방법으로 추가 접종하였음.
- ② 대조군은 무처치 대조군으로 6마리씩 배정하고 접종군과 함께 14일동안 접종 부작용(발열, 과민반응, 유산, 설사)을 관찰하였으며, 분만 후 분만성적(분만두수, 포유개시두수, 사산수, 허약자돈수)을 관찰 비교하였음.

#### (나) 시험결과

- ① 모든의 안전성 시험 결과 백신을 접종한 모든 그룹에서 1차 접종 및 2차 접종 후 14일 동안 어떠한 임상증상도 관찰할 수 없었음.
- ② 또한 그룹 별 분만성적 비교 결과 백신을 접종한 시험군 및 대조군 모두 유산/사산 등의 번식장애를 관찰할 수 없었으며 정상적인 분만두수 및 포유개시 자돈수를 보였음.

[표 10] 돼지 PED 생건조 백신의 안전성

Group	Sow no.	Abortion	No. of total piglets born	No. of piglets born alive	No. of stillbirth	No. of weak piglets	
Vaccinated group	Live-Live	1	0	13	12	0	1
		2	0	11	11	0	0
		3	0	12	11	1	0
		4	0	12	11	1	0
		5	0	11	9	1	1



		6	0	14	12	0	2
		Avg.*	0	12.2	11.0	0.5	0.7
		S.D**	0	1.2	1.1	0.5	0.8
Control group	Non-treated	7	0	13	12	0	1
		8	0	14	12	0	2
		9	0	15	13	0	2
		10	0	11	10	1	0
		11	0	13	12	1	0
		12	0	13	10	1	2
		Avg.*	0	13.2	11.5	0.5	1.2
		S.D**	0	1.3	1.2	0.5	1.0

\*: Average, \*\*: Standard deviation.

(다) 음성 후보돈에서의 효능 확인시험

① 시험방법

- PEDV 항원, 항체 음성인 후보돈 20두(시험군 10두, 대조군 10두)를 선정하여 후보돈 도입 후 10두에 시험 백신 1두분을 우유와 함께 혼합(용해 백신 2ml : 우유 3ml)하여 각각 경구접종하고 2주 후에 1두분을 동일한 방법으로 추가 접종하였음.
- 접종 전, 1차 접종 2주 후, 2차 접종 2주 후에 채혈하여 중화항체를 측정하였음.
- 추가적으로 생독백신 접종 후 2, 3, 4일차의 모든 분변을 채취하여 바이러스의 배출 및 유전자 변이여부 (Spike 및 ORF3 유전자)를 검사하였음.

② 시험결과

- 후보돈 항체가 검사 결과 2차 접종 2주 후부터 평균 157.59 (GMT)의 중화항체가 관찰되었으며 음성대조군의 경우 음성으로 유지되었음.
- 백신접종 후 2, 3, 4일차의 후보돈의 분변 검사 결과 모든 그룹에서 PED 바이러스가 검출되지 않았음.

[표 11] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 음성 후보돈에서 면역원성

Vaccine	Gilt no.	Before vaccination	SN titer		
			2 weeks after 1 <sup>st</sup> vaccination	2 weeks after 2 <sup>nd</sup> vaccination	
Vaccinated group	Live-Live	1	<2	64	256≤
		2	<2	64	256
		3	<2	64	256
		4	<2	16	256≤
		5	<2	16	64
		6	<2	16	256
		7	<2	8	64
		8	<2	16	128
		9	<2	16	128
		10	<2	32	128
		<b>GMT</b>	<b>&lt;2</b>	<b>24.25*</b>	<b>157.59*</b>
Control	Non-treated	11	<2	<2	<2

group	12	<2	<2	<2
	13	<2	<2	<2
	14	<2	<2	<2
	15	<2	<2	<2
	16	<2	<2	<2
	17	<2	<2	<2
	18	<2	<2	<2
	19	<2	<2	<2
	20	<2	<2	<2
	<b>GMT</b>	<b>&lt;2</b>	<b>&lt;2</b>	<b>&lt;2</b>

GMT: Geometric mean titer, \*: The star signal indicates significant difference.  $p < 0.05$ .

(라) 임신 모돈에서의 효능 확인시험

① 시험방법

- 임신 모돈 20두(시험군 10두, 대조군 10두)를 선정하여 분만 4주전의 시험군 10두에 시험 백신 1두분을 우유와 함께 혼합(용해 백신 2ml : 우유 3 ml)하여 각각 경구접종하고 분만 2주전에 1두분을 동일한 방법으로 추가 접종하였음.
- 모돈의 경우 분만 4주전, 분만 2주전, 분만 직후에 채혈하였고, 분만 시의 초유를 채취하였으며, 생독백신 접종 후 2, 3, 4일차의 모돈 분변을 채취하였음.
- 모돈의 혈청을 이용하여 중화항체 및 IgG ELISA 검사를, 분만 시의 초유를 이용하여 중화항체 및 IgA ELISA 검사를 실시하였음.
- 모돈의 분변을 이용하여 바이러스의 배출 및 유전자 변이여부 (Spike 및 ORF3 유전자)를 검사하였음.
- 태어난 자돈에 대하여 자돈의 임상증상(설사여부 및 폐사율 등)을 확인하였으며 폐사돈이 발생 시 부검하여 폐사의 원인을 규명하였음.
- 태어난 자돈 중 복당 6마리씩 선정하여 생후 1, 2, 3, 4주령 및 5주령에 채혈하며 매주 체중을 측정하였음.
- 또한, 복당 6마리 자돈의 혈청을 이용하여 중화항체 및 IgG ELISA 검사를 실시하였음.

① 시험결과

- 모돈의 혈청 중화항체가 검사 결과 백신 접종군의 경우 생독백신 접종 후 항체가가 상승하여 분만시인 2차 접종 2주 후에 222.9 (GMT)의 높은 중화항체가를 보였음.
- 대조군의 경우 시험기간 동안 중화항체가가 음성으로 확인되었음.
- 상용화 PEDV IgG ELISA를 이용한 ELISA검사 결과 접종군 및 대조군을 포함한 모든 샘플에서 항체 양성으로 확인되었고 백신 접종을 통한 O.D. 값의 유의적인 상승은 관찰되지 않았음.

[표 12] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 임신 모돈에서 면역원성

Vaccine	Sow no.	Before vaccination	SN titer		Serum IgG antibody for ELISA						
			2 weeks after 1 <sup>st</sup> vaccination	2 weeks after 2 <sup>nd</sup> vaccination	Before vaccination		2 weeks after 1 <sup>st</sup> vaccination		2 weeks after 2 <sup>nd</sup> vaccination		
			on	on	O.D	+/-	O.D	+/-	O.D	+/-	
Vaccinated group	Live-Live	1	<2	64	256≤	1.352	+	1.332	+	1.214	+
		2	<2	32	256	0.888	+	1.002	+	1.401	+
		3	<2	64	128	1.219	+	0.895	+	0.646	+
		4	<2	64	256	1.458	+	0.914	+	1.067	+
		5	<2	16	256≤	1.277	+	0.991	+	0.735	+
		6	<2	8	256≤	1.131	+	1.358	+	0.908	+
		7	<2	16	256≤	0.986	+	0.776	+	0.516	+
		8	<2	32	128	0.926	+	1.068	+	1.175	+
		9	<2	16	256	0.955	+	1.155	+	0.859	+
		10	<2	32	256	1.123	+	1.055	+	0.569	+
		<b>GMT</b>	<2	<b>27.9*</b>	<b>222.9*</b>						
<b>Average ±SD</b>				<b>1.13±0.19</b>		<b>1.05±0.19</b>		<b>0.91±0.30</b>			
Control group	Non-treated	11	<2	<2	<2	1.028	+	0.964	+	0.863	+
		12	<2	<2	<2	1.375	+	0.975	+	0.755	+
		13	<2	<2	<2	0.687	+	0.934	+	0.654	+
		14	<2	<2	<2	1.309	+	0.743	+	0.816	+
		15	<2	<2	<2	0.710	+	1.100	+	1.021	+
		16	<2	<2	<2	1.245	+	0.630	+	0.764	+
		17	<2	<2	<2	1.053	+	0.854	+	0.733	+
		18	<2	<2	<2	0.961	+	0.944	+	1.280	+
		19	<2	<2	<2	1.059	+	0.733	+	0.936	+
		20	<2	<2	<2	1.273	+	0.994	+	0.906	+
		<b>GMT</b>	<2	<2	<2						
<b>Average ±SD</b>				<b>1.07±0.24</b>		<b>0.89±0.14</b>		<b>0.87±0.18</b>			

GMT: Geometric mean titer, \*: The star signal indicates significant difference.  $p < 0.05$

The number exceeding 256 ( $256 \leq$ ) was calculated as 256., +positive: O.D. value  $> 0.38$ , -negative: O.D. value  $< 0.2$ .

- 모든의 초유 중화항체가 검사 결과 백신 접종군의 경우 238.9 (GMT)의 높은 항체가를 보였고 대조군의 경우 음성을 유지하였으며 두 그룹 간에는 유의적인 차이가 관찰되었음.
- 반면에 상용화 PED IgA ELISA 을 이용한 초유 IgA의 경우 모든 개체가 양성으로 검출되었으며 S/P ratio 또한 백신 접종 여부 및 중화항체가와 상관 없이 대조군이 높은 수치를 보였으나 통계적 유의성은 관찰되지 않았음.
- 백신접종 후 2, 3, 4일차의 임신모돈의 분변 검사 결과 모든 그룹에서 PED 바이러스가 검출되지 않았음.

[표 13] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 임신 모돈의 초유 항체가

Vaccine	Sow no.	Colostrum VN titer	Colostrum IgA antibody for ELISA	
			S/P ratio	Result (cut off value)

		0.385)			
Vaccinated group	Live-Live	1	256 ≤	2.67	+
		2	256	2.34	+
		3	256 ≤	1.034	+
		4	256	1.192	+
		5	256 ≤	2.23	+
		6	256 ≤	1.298	+
		7	256	1.78	+
		8	256 ≤	0.65	+
		9	256	2.04	+
		10	128	0.65	+
		<b>GMT</b>	<b>238.9*</b>		
		<b>Average±SD</b>	<b>1.59±0.72</b>		
Control group	Non-treated	11	<2	2.34	+
		12	<2	2.34	+
		13	<2	1.346	+
		14	<2	2.34	+
		15	<2	1.471	+
		16	<2	1.106	+
		17	<2	1.059	+
		18	<2	1.377	+
		19	<2	2.34	+
		20	<2	1.346	+
		<b>GMT</b>	<b>&lt;2</b>		
		<b>Average±SD</b>	<b>1.71±0.56</b>		

GMT: Geometric mean titer, \*: The star signal indicates significant difference.  $p < 0.05$   
The number exceeding 256 ( $256 \leq$ ) was calculated as 256., +: Positive;  $> 0.385$ .

- 자돈의 혈청 중화항체가 검사 결과, 백신 접종군의 경우 분만 후 1주차에는 143.68(GMT)의 중화항체를 보이다가 감소하여 5주차에는 16배 이하의 항체를 보였으며 대조군의 경우 음성으로 유지되었음.
- 모든 구간에서 백신 접종군이 대조군에 비해 유의적으로 높은 항체를 보였음.

[표 14] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 임신 모돈에서 분만한 자돈의 항체가

Vaccine	Piglet no.	Geomean SN titer of piglet				
		1 weeks of ages	2 weeks of ages	3 weeks of ages	4 weeks of ages	5 weeks of ages
Vaccinated group Live-Live	60	143.68*	85.43*	36.34*	16.95*	12.13*
Control group Non-treated	60	<2	<2	<2	<2	<2

\*: The star signal indicates significant difference.  $p < 0.05$ .

- 상용화 PEDV IgG ELISA를 이용한 자돈의 혈청 IgG를 검사한 결과 백신 접종군과 대조군 간에 유의적인 차이가 관찰되지 않았고 항체가의 변화 양상 또한 관찰되지 않은 채 높은 O.D. 값을 유지하였음.

[표 15] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 임신 모돈에서 분만한 자돈의 항체가

Vaccine	Piglet	Serum IgG antibody titer for ELISA titer of piglet
---------	--------	----------------------------------------------------

		no.	(Mean O.D. value±standard deviation)				
			1 weeks of ages	2 weeks of ages	3 weeks of ages	4 weeks of ages	5 weeks of ages
Vaccinated group	Live-Live	60	1.25±0.33	1.03±0.21	1.08±0.22	1.28±0.25	1.21±0.24
Control group	Non-treated	60	1.24±0.19	1.09±0.26	1.01±0.26	1.23±0.21	1.14±0.22

+positive: O.D. value>0.38, -negative: O.D. value<0.2.

- 자돈의 체중 측정 결과 백신 접종군 및 대조군의 경우 두 그룹 간의 유의적인 차이가 관찰되지 않았으며 5주령까지 일반적인 자돈의 주령 별 체중과 유사하게 정상적으로 성장하였음.

[표 16] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 임신 모돈에서 분만한 자돈의 체중 변화

Vaccine	Sow no.	Average body weight of piglets per litters (kg)						
		After farrowing	1 weeks of ages	2 weeks of ages	3 weeks of ages	4 weeks of ages	5 weeks of ages	
Vaccinated group	Live-Live	1	1.52	2.02	3.35	4.90	6.67	9.75
		2	1.48	2.03	3.37	4.80	6.73	9.78
		3	1.52	2.05	3.30	4.78	6.60	9.78
		4	1.48	2.00	3.33	4.80	6.75	9.77
		5	1.50	1.95	3.53	4.75	6.45	9.80
		6	1.50	1.97	3.33	4.77	6.67	9.88
		7	1.43	2.00	3.40	4.80	6.57	9.73
		8	1.50	2.02	3.33	4.82	6.53	9.78
		9	1.50	2.00	3.37	4.80	6.67	9.87
		10	1.52	2.02	3.38	4.77	6.68	9.85
			<b>Avg.*</b>	<b>1.50</b>	<b>2.01</b>	<b>3.37</b>	<b>4.80</b>	<b>6.63</b>
	<b>S.D**</b>	<b>0.02</b>	<b>0.03</b>	<b>0.06</b>	<b>0.04</b>	<b>0.09</b>	<b>0.05</b>	
Control group	Non-treated	11	1.50	1.97	3.38	4.80	6.72	9.78
		12	1.55	2.00	3.40	4.82	6.28	9.73
		13	1.52	2.00	3.25	4.80	6.68	9.67
		14	1.53	2.02	3.37	4.82	6.63	9.77
		15	1.48	1.98	3.37	4.85	6.70	9.62
		16	1.45	1.95	3.28	4.77	6.63	9.75
		17	1.50	1.98	3.37	4.65	6.65	9.83
		18	1.53	1.98	3.32	4.77	6.73	9.88
		19	1.52	1.98	3.30	4.65	6.75	9.77
		20	1.52	2.02	3.32	4.88	6.68	9.77
			<b>Avg.*</b>	<b>1.51</b>	<b>1.99</b>	<b>3.34</b>	<b>4.78</b>	<b>6.65</b>
	<b>S.D**</b>	<b>0.03</b>	<b>0.02</b>	<b>0.05</b>	<b>0.08</b>	<b>0.13</b>	<b>0.08</b>	

\*: Average, \*\*: Standard deviation.

- 백신군의 경우 6마리의 모돈에서 각각 1두씩 폐사하여 8.3~16.7%의 폐사율을 보였으나 압사, 식자증 및 포유 부족으로 인한 쇠약에 의한 폐사였고 대조군의 경우 4마리의 모돈에서 압사 및 포유 부족으로 인한 쇠약으로 인해 각각 1두가 폐사하여 7.7~10.0%의 폐사율을 보였음.
- 모든 개체에서 PED 바이러스에 의한 설사, 구토, 탈수 등의 증상은 관찰되지

지 않았음.

[표 17] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 임신 모돈에서 분만한 자돈의 임상증상

Vaccine	Sow no.	Clinical signs*	Mortality rate	Cause of death	
Vaccinated group	Live-Live	1	-	8.3	Death from pressure
		2	-	9.1	Canibalism
		3	-	0.0	
		4	-	0.0	
		5	lethargy	8.3	Weakness
		6	-	0.0	
		7	-	0.0	
		8	-	8.3	Death from pressure
		9	-	11.1	Death from pressure
		10	lethargy	16.7	Weakness
		11		0.0	
		12		0.0	
		13		7.7	Weakness
		14		10.0	Death from pressure
Control group	Non-treated	15		8.3	Death from pressure
		16		0.0	
		17		0.0	
		18	lethargy	10.0	Weakness
		19		0.0	
		20		0.0	

\*: Diarrhea, Vomiting, dehydration, anorexia, and lethargy.

#### 라. 제3시험농장

##### (1) 안전성 시험

###### (가) 시험방법

- ① 임신 모돈 12두(시험군 6두, 대조군 6두)를 선정하여 시험군 6두에 분만 4주 전에 시험 백신 10두분을 우유와 함께 혼합(용해 백신 2ml : 우유 3ml)하여 각각 경구접종하고 분만 2주전에 시험백신 10두분을 동일한 방법으로 추가 접종하였음.
- ② 대조군은 무처치 대조군으로 6마리씩 배정하고 접종군과 함께 14일동안 접종 부작용(발열, 과민반응, 유산, 설사)을 관찰하였으며, 분만 후 분만성적(분만두수, 포유개시두수, 사산수, 허약자돈수)을 관찰 비교하였음.

###### (나) 시험결과

- ① 모돈의 안전성 시험 결과 백신을 접종한 모든 그룹에서 1차 접종 및 2차 접종 후 14일 동안 어떠한 임상증상도 관찰할 수 없었음.
- ② 또한 그룹 별 분만성적 비교 결과 백신을 접종한 시험군 및 대조군 모두 유산/사산 등의 번식장애를 관찰할 수 없었으며 정상적인 분만두수 및 포유개

시 자돈수를 보였음.

[표 18] 돼지 PED 생건조 백신의 안전성

Group	Sow no.	Abortion	No. of total piglets born	No. of piglets born alive	No. of stillbirth	No. of weak piglets	
Vaccinated group	Live-Live	1	0	11	10	1	0
		2	0	11	10	0	1
		3	0	12	12	0	0
		4	0	12	11	1	0
		5	0	11	10	1	0
		6	0	14	12	1	1
		Avg.*	0	11.8	10.8	0.7	0.3
		S.D**	0	1.2	1.0	0.5	0.5
Control group	Non-treated	7	0	13	12	0	1
		8	0	13	12	0	1
		9	0	15	14	0	1
		10	0	12	11	1	0
		11	0	13	12	1	0
		12	0	12	10	1	1
		Avg.*	0	13.0	11.8	0.5	0.7
		S.D**	0	1.1	1.3	0.5	0.5

(다) 음성 후보돈에서의 효능 확인시험

① 시험방법

- PEDV 항원, 항체 음성인 후보돈 20두(시험군 10두, 대조군 10두)를 선정하여 후보돈 도입 후 10두에 시험 백신 1두분을 우유와 함께 혼합(용해 백신 2ml : 우유 3ml)하여 각각 경구접종하고 2주 후에 1두분을 동일한 방법으로 추가 접종하였음.
- 접종 전, 1차 접종 2주 후, 2차 접종 2주 후에 채혈하여 중화항체를 측정하였음.
- 추가적으로 생독백신 접종 후 2, 3, 4일차의 모든 분변을 채취하여 바이러스의 배출 및 유전자 변이여부 (Spike 및 ORF3 유전자)를 검사하였음.

② 시험결과

- 후보돈 항체가 검사 결과 2차 접종 2주 후부터 평균 119.43 (GMT)의 중화항체가 관찰되었으며 음성대조군의 경우 음성으로 유지되었음.
- 백신접종 후 2, 3, 4일차의 후보돈의 분변 검사 결과 모든 그룹에서 PED 바이러스가 검출되지 않았음.

[표 19] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 음성 후보돈에서 면역원성



Vaccine	Gilt no.	Before vaccination	SN titer		
			2 weeks after 1 <sup>st</sup> vaccination	2 weeks after 2 <sup>nd</sup> vaccination	
Vaccinated group	Live-Live	1	<2	32	256
		2	<2	16	256
		3	<2	64	256
		4	<2	32	256
		5	<2	16	64
		6	<2	32	32
		7	<2	16	256
		8	<2	32	64
		9	<2	64	32
		10	<2	32	128
		<b>GMT</b>	<b>&lt;2</b>	<b>29.86*</b>	<b>119.43*</b>
Control group	Non-treated	11	<2	<2	<2
		12	<2	<2	<2
		13	<2	<2	<2
		14	<2	<2	<2
		15	<2	<2	<2
		16	<2	<2	<2
		17	<2	<2	<2
		18	<2	<2	<2
		19	<2	<2	<2
		20	<2	<2	<2
		<b>GMT</b>	<b>&lt;2</b>	<b>&lt;2</b>	<b>&lt;2</b>

GMT: Geometric mean titer.

\*: The star signal indicates significant difference.  $p < 0.05$ .

(라) 임신 모돈에서의 효능 확인시험

① 시험방법

- 임신 모돈 20두(시험군 10두, 대조군 10두)를 선정하여 분만 4주전의 시험군 10두에 시험 백신 1두분을 우유와 함께 혼합(용해 백신 2ml : 우유 3ml)하여 각각 경구접종하고 분만 2주전에 1두분을 동일한 방법으로 추가 접종하였음.
- 모돈의 경우 분만 4주전, 분만 2주전, 분만 직후에 채혈하였고, 분만 시의 초유를 채취하였으며, 생독백신 접종 후 2, 3, 4일차의 모돈 분변을 채취하였음.
- 모돈의 혈청을 이용하여 중화항체 및 IgG ELISA 검사를, 분만 시의 초유를 이용하여 중화항체 및 IgA ELISA 검사를 실시하였음.
- 모돈의 분변을 이용하여 바이러스의 배출 및 유전자 변이여부 (Spike 및 ORF3 유전자)를 검사하였음.
- 분만 자돈에 대하여 자돈의 임상증상(설사여부 및 폐사율 등)을 확인 하였으며 폐사돈이 발생 시 부검하여 폐사의 원인을 규명하였음.

- 분만 자돈 중 복당 6마리씩 선정하여 생후 1, 2, 3, 4주령 및 5주령에 채혈하며 매주 체중을 측정하였다. 또한, 복당 6마리 자돈의 혈청을 이용하여 중화항체 및 IgG ELISA 검사를 실시하였음.

② 시험결과

- 모든의 혈청 중화항체가 검사 결과 백신 접종 전에는 접종군 및 대조군 모두 기존의 사독백신 접종 이력으로 인해 항체가가 관찰되었으며 유의적인 차이는 관찰되지 않았음.
- 백신 접종군의 경우 생독백신 접종 후 항체가가 상승하여 분만 시인 2차 접종 2주후에 222.9 (GMT)의 높은 항체가를 보였고 1차 접종 2주 후 및 2차 접종 2주후에 대조군에 비해 유의적으로 높은 항체가를 보였음.
- 대조군의 경우 항체가 감소하는 양상을 보여 분만시인 2차 접종 2주 후에는 42.2 (GMT)의 항체가를 보였다. 상용화 PEDV IgG ELISA를 이용한 ELISA검사 결과 모든 샘플에서 항체 양성으로 확인되었고 백신 접종을 통한 O.D. 값의 유의적인 상승은 관찰되지 않았음.

[표 20] 돼지 PED 생건조 백신의 임신모돈에서 면역원성

Vaccine	Sow. no.	SN titer			Serum IgG antibody for ELISA							
		Before vaccination	2 weeks after 1 <sup>st</sup> vaccination on	2 weeks after 2 <sup>nd</sup> vaccination on	Before vaccination		2 weeks after 1 <sup>st</sup> vaccination		2 weeks after 2 <sup>nd</sup> vaccination			
					O.D	+/-	O.D	+/-	O.D	+/-		
					n		n		n			
Vaccinated group	Live-Live	1	128	256	256≤	1.223	+	1.523	+	0.967	+	
		2	64	128	256≤	1.32	+	1.35	+	1.437	+	
		3	256	256	256≤	1.497	+	0.867	+	0.922	+	
		4	64	128	256≤	1.501	+	1.26	+	1.279	+	
		5	128	128	256	256≤	0.819	+	1.109	+	1.292	+
		6	32	64	128	256≤	1.332	+	0.903	+	0.964	+
		7	16	64	128	256≤	1.51	+	1.522	+	1.112	+
		8	32	128	256≤	256≤	1.375	+	0.793	+	1.045	+
		9	64	256	256	256≤	1.271	+	1.53	+	1.107	+
		10	128	256	256≤	256≤	1.425	+	1.186	+	1.185	+
		<b>GMT</b>		<b>68.6</b>	<b>147.0*</b>	<b>222.9*</b>						
<b>Average±SD</b>					<b>1.33±0.20</b>		<b>1.20±0.28</b>		<b>1.13±0.17</b>			
Control group	Non-treated	11	64	32	32	1.191	+	1.567	+	1.223	+	
		12	64	64	32	1.476	+	0.858	+	1.115	+	
		13	32	32	64	64	1.412	+	1.138	+	1.35	+
		14	128	64	128	128	1.142	+	1.567	+	1.125	+
		15	16	16	8	8	0.979	+	1.079	+	1.127	+
		16	128	64	32	32	0.618	+	1.378	+	1.064	+
		17	256	32	64	64	1.314	+	1.479	+	1.163	+
		18	256	256	128	128	1.417	+	1.16	+	1.364	+
		19	64	128	64	64	1.444	+	1.005	+	1.516	+
		20	32	32	16	16	1.5	+	1.434	+	1.284	+
		<b>GMT</b>		<b>73.5</b>	<b>52.0</b>	<b>42.2</b>						
<b>Average±SD</b>					<b>1.25±0.28</b>		<b>1.27±0.25</b>		<b>1.23±0.14</b>			

SD

GMT: Geometric mean titer, \*: The star signal indicates significant difference.  $p < 0.05$   
 The number exceeding 256 ( $256 \leq$ ) was calculated as 256., +: O.D. value  $> 0.38$ , -: O.D. value  $< 0.2$ .

- 모든의 초유 중화항체가 검사 결과 백신 접종군의 경우 222.9 (GMT)의 높은 항체가를 보였으며 대조군의 경우 이전에 접종된 사독백신 기초접종으로 인해 45.3 (GMT) 정도의 항체가를 보였음.
- 두 그룹 간에는 유의적인 차이가 관찰된 반면에 상용화 PED IgA ELISA를 이용한 초유 IgA의 경우 모든 개체가 양성으로 검출되었으며 S/P ratio 또한 백신 접종 여부 및 중화항체가와 상관 없이 대조군이 높은 수치를 보였고 통계적 유의성은 관찰되지 않았음.
- 백신접종 후 2, 3, 4일차의 임신모돈의 분변 검사 결과 모든 그룹에서 PED 바이러스가 검출되지 않았음.

[표 21] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 임신모돈의 초유 항체가

Vaccine	Sow no.	Colostrum VN titer	Colostrum IgA antibody for ELISA		
			S/P ratio	Result (cut off value 0.385)	
Vaccinated group	Live-Live	1	256 $\leq$	1.372	+
		2	256	2.153	+
		3	256 $\leq$	1.943	+
		4	128	1.29	+
		5	256 $\leq$	1.28	+
		6	128	1.62	+
		7	256 $\leq$	1.555	+
		8	256 $\leq$	1.497	+
		9	256 $\leq$	1.735	+
		10	256	1.99	+
				<b>GMT</b>	<b>222.9*</b>
		<b>Average<math>\pm</math></b>	<b>1.64<math>\pm</math>0.31</b>		
		<b>SD</b>			
Control group	Non-treated	11	32	1.554	+
		12	32	1.744	+
		13	32	1.754	+
		14	64	1.061	+
		15	64	1.309	+
		16	64	1.53	+
		17	16	2.152	+
		18	64	1.409	+
		19	128	1.868	+
		20	32	1.356	+
				<b>GMT</b>	<b>45.3</b>
		<b>Average<math>\pm</math></b>	<b>1.57<math>\pm</math>0.31</b>		
		<b>SD</b>			

GMT: Geometric mean titer, \*: The star signal indicates significant difference.  $p < 0.05$

The number exceeding 256 ( $256 \leq$ ) was calculated as 256., +: Positive.

- 자돈의 혈청 중화항체가 검사 결과, 백신 접종군의 경우 분만 후 1주차에는 196.27(GMT)의 중화항체를 보이다가 감소하여 5주차에는 16.95 (GMT)의 항체를 보였으며 대조군의 경우 분만 1주차에도 30.20(GMT)의 중화항체를 보이다가 2주차 이후부터 16배 이하의 항체를 보였음.
- 모든 구간에서 백신 접종군이 대조군에 비해 유의적으로 높은 항체를 보였음.

[표 22] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 모돈에서 분만한 자돈의 면역원성

Vaccine	Piglet no.	Geomean SN titer of piglet				
		1 weeks of ages	2 weeks of ages	3 weeks of ages	4 weeks of ages	5 weeks of ages
Vaccinated group Live-Live	60	166.96*	85.43*	63.26*	47.40*	16.95*
Control group Non-treated	60	30.20	12.85	8.77	8.67	4.98

\*: The star signal indicates significant difference.

- 상용화 PEDV IgG ELISA를 이용한 자돈의 혈청 IgG를 검사한 결과 백신 접종군과 대조군 간에 유의적인 차이가 관찰되지 않았고 항체가의 변화 양상 또한 관찰되지 않은 채 높은 O.D. 값을 유지하였음.

[표 23] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 모돈에서 분만한 자돈의 면역원성

Vaccine	Piglet no.	Serum IgG antibody titer for ELISA titer of piglet (Mean O.D. value±standard deviation)				
		1 weeks of ages	2 weeks of ages	3 weeks of ages	4 weeks of ages	5 weeks of ages
Vaccinated group Live-Live	60	1.30±0.25	1.06±0.23	1.03±0.26	1.24±0.21	1.04±0.23
Control group Non-treated	60	1.27±0.22	1.09±0.21	1.06±0.22	1.19±0.28	1.05±0.26

+: O.D. value>0.38, -: O.D. value<0.2.

- 자돈의 체중 측정 결과 백신 접종군 및 대조군의 경우 두 그룹 간의 유의적인 차이가 관찰되지 않았으며 5주령까지 일반적인 자돈의 주령 별 체중과 유사하게 정상적으로 성장하였음.

[표 24] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 모돈에서 분만한 자돈의 체중변화

Vaccine	Sow no.	Average body weight of piglets per litters (kg)						
		After farrowin g	1 weeks of ages	2 weeks of ages	3 weeks of ages	4 weeks of ages	5 weeks of ages	
Vaccinated group	Live-Live	1	1.51	1.98	3.57	4.81	6.72	9.17
		2	1.60	2.00	3.45	4.76	6.90	9.52
		3	1.60	1.98	3.44	4.61	6.73	9.49
		4	1.59	2.13	3.49	4.73	6.65	9.46
		5	1.65	1.99	3.33	4.75	6.58	9.70
		6	1.55	1.93	3.62	4.77	6.46	9.72
		7	1.66	1.94	3.40	4.78	6.58	9.17
		8	1.71	1.94	3.44	4.78	6.77	9.65
		9	1.59	2.01	3.47	4.97	6.83	9.36
		10	1.46	2.09	3.37	4.68	6.77	9.68
				<b>Avg.*</b>	1.59	2.00	3.46	4.76
		<b>S.D**</b>	0.07	0.07	0.09	0.09	0.13	0.21
Control group	Non-treated	11	1.58	2.01	3.58	4.85	6.74	9.51
		12	1.67	2.05	3.43	4.78	6.65	9.31
		13	1.54	2.01	3.45	4.92	6.58	9.61
		14	1.62	2.11	3.41	4.60	6.61	9.53
		15	1.52	2.21	3.42	4.71	6.73	9.82
		16	1.50	1.95	3.38	4.77	6.52	9.51
		17	1.46	2.27	3.54	4.65	6.84	9.62
		18	1.59	1.89	3.46	4.82	6.52	9.48
		19	1.56	2.00	3.47	4.65	6.86	9.46
		20	1.59	2.03	3.51	4.78	6.63	9.66
				<b>Avg.*</b>	1.56	2.05	3.47	4.75
		<b>S.D**</b>	0.06	0.11	0.06	0.10	0.12	0.14

\*: Average, \*\*: Standard deviation.

- 백신군의 경우 4마리의 모돈에서 각각 1두씩, 1마리의 모돈(7번)에서 2두 폐사하여 8.3~16.7%의 폐사율을 보였으나 모두 압사, 식자증, 초유 섭취 부전에 의한 쇠약으로 폐사하였음.
- 대조군의 경우 4마리의 모돈에서 압사, 식자증, 초유 섭취 부전에 의한 쇠약으로 인해 각각 1두가 폐사하였고 한 마리의 모돈(19번)에서 식자증과 쇠약으로 인해 2두 폐사하여 총 7.1~20.0%의 폐사율을 보였음.
- 모든 개체에서 PED 바이러스에 의한 설사, 구토, 탈수 등의 증상은 관찰되지 않았음.

[표 25] 돼지 PED 생건조 백신을 투여한 모돈에서 분만한 자돈의 임상증상

Vaccine	Sow no.	Clinical signs*	Mortality rate	Cause of death		
Vaccinated group	Live-Live		1	0.0		
			2	0.0		
			3		8.3	Death from pressure
			4		0.0	
			5		10.0	Canibalism
			6	Lethargy	8.3	Weakness
			7		16.7	Death from

			pressure
			Canibalism
		8	0.0
		9	7.1
		10	0.0
		11	0.0
		12	0.0
		13	7.1
		14	Lethargy
			9.1
			Weakness
		15	8.3
			Death from
			pressure
		16	10.0
			Weakness
		17	0.0
		18	0.0
		19	20.0
			Canibalism
			Weakness
		20	0.0

\*: Diarrhea, Vomiting, dehydration, anorexia, and lethargy.

### 결론

- 돼지 PEDV 단독백신의 야외 임상시험 결과 백신의 안정성이 확보되었으며 항체 역가가 우수하게 확인되었음.
- 이러한 결과를 바탕으로 농림축산검역본부에 승인을 받아 시판에 들어가려고 함.

## 12절. 돼지 유행성 설사 치료제 개발

### 1. PEDV 타깃 단백질 (3CL<sup>pro</sup>) *in vitro* assay 시스템을 이용한 효능평가

- (1) 본 연구의 3CL<sup>pro</sup>는 코로나바이러스의 main protease로서 감염된 숙주세포에서 RNA 복제, 분화 및 단백질 trafficking에 관여하는 바이러스 생육에 중요한 인자로 알려져 있다. 본 연구에서는 이러한 코로나바이러스 주요인자를 타깃으로 이를 활용한 활성 검증 시스템을 통해 유효 생물 소재를 도출하고자 PEDV 코로나바이러스 3CL<sup>pro</sup>를 발현 및 정제하여 생리활성 검증시스템에 사용하였음.
- (2) 기존에 PEDV virus로부터 프라이머쌍 (PEDV3CL-F; 5'-GCTGGCTTGCGTAAGATGGC-3', PEDV3CL-R; 5'-CTGAAGATTAACGCCATACA-3')을 이용하여 얻어진 PEDV 3CL<sup>pro</sup> 유전자를 *E. coli* expression system에 transformation 하여 재조합 유전자를 확보하였음.

**PEDV 3CL<sup>pro</sup>-pET23d(+)**

```

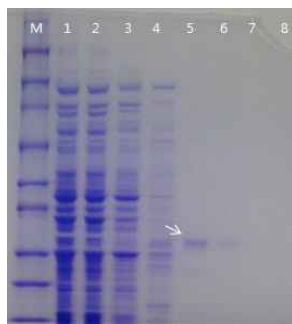
CCATGGTACAGGCTGGCTTGCGTAAGATGGCACAACCTTCTGGTGTGTTGAGAAGTGCATAGCCGTGTTTGTATGGTAATATGGC
TCTTAATGGCCTATGGCTTGGCGATATGTTATGTGCCACGCCAATGTTATAGCGTCTAGTACTACTAGCACTATAGATTAIGATTATGCC
TTTCTGTTTACGCCTCCACAACCTTCTCCATTTTCATCTGGGAATGTTTCTAGGTGTTGTGAGTGCACACTATGCGAGGTGCTTGTGCA
GATAAAGGTTAATCAAAGCAATGTCCACACGCCCTAAGTACACCTATCGCACAGTTAGACCGGGTGAATCTTTAATATTTGGCGTGCT
ATGATGGTGTGTCAGCTGGTGTGTACGGCGTTAGCATGCGCTCTAATTACACTATTAGAGGCTCGTTCATTAATGGCGCTTGTGGTTTAC
CTGGTTATAATATTAACAATGGTACCGTTGAGTTTGTCTATTTACACCAGCTTGAACCTGGTTCAGGCTGTCATGTTGGTAGCGACTTAG
ATGGTGTATGATGGTGGTTATGAGGACCAACCTACTTTGCAAGTTGAAGGCGCTAGTAGTCTGTTTACAGAGAATGTGTTGGCATTTC
TTTATGCAGCACTCATTAAATGGTTCTACCTGGTGGCTTAGTCTTCTAGGATCGCTGTAGACAGGTTTAAATGAGTGGGCTGTTTATAATG
GTATGACAACAGTGGGCAATACTGATTGCTTTTCTATTTCTGTGCTAAGACTGGAGTTGATGTACAACGTTTGTGGCCCTCAATCCAGT
CTCTGCATAAGAATTTGGTGGAAAGCAAATCTTGGCCATACCTCGTTGACAGATGAGTTTACTACAGGTGAAGTTGATCGTCAAATG
TATGGCGTTAATCTTCAGGTTGGCTCGAGCACCACCACCACCACCTGA
    
```

MVQAGLRKMAQPSGVVEKIVRVCYGNMALNGLWLGDIVMCPRHVIASSTTSTIDVDYALSVLRLHNFSSISGNVFLGVVSATMRGAL  
 LQIKVNSNVHTPKYTYRTPGSEFNILACYDGAAGVYGVSMRSNYTIRGSFINGACGSPGYNNINGTVEFCYLHQLELGSCHVGS  
 DLDGVMYGGYEDQPTLQVEGASSLFTENVLAFLYAALINGSTWWLSSSRIAVDRFNEWAVHNGMTTVGNITDCFSILAAKTGVDVQRL  
 ASIQLSHKNFNGGKQILGHTSLTDEFTTGEVVRQMYGVNLQGGLEHHHHHHH&

**MW = 34.2 kDa**

[그림 1] 돼지 코로나바이러스(PEDV) 3CL<sup>pro</sup> 유전정보.

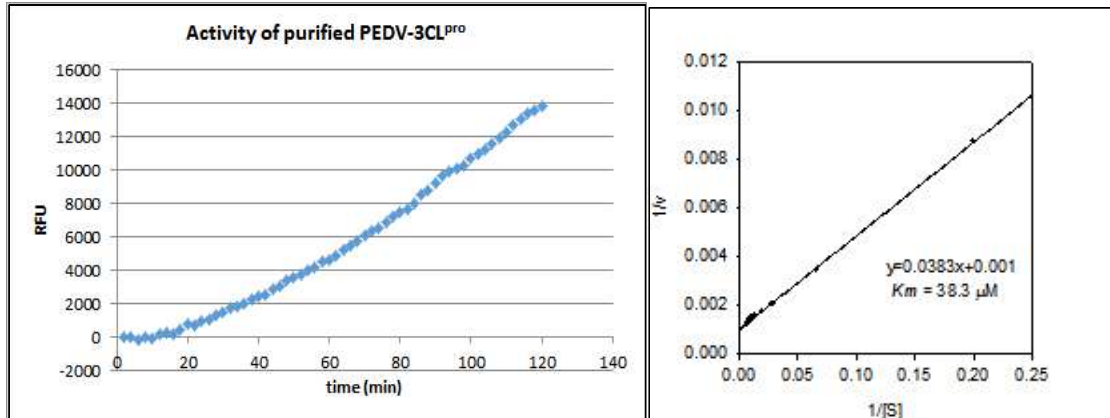
- (3) PEDV-3CL<sup>pro</sup>로 형질전환된 *E. coli*는 IPTG inducer를 이용하여 발현을 유도하였고, 발현된 단백질은 Ni-NTA resin을 이용하여 정제하였음.



[그림 2] Ni-NTA를 이용한 PEDV-3CL<sup>pro</sup> 정제 SDS-PAGE.



(4) 정제된 효소는 합성 peptide substrate (Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans)를 이용하여 FRET assay로 수행하였고, PEDV-3CL<sup>pro</sup>의  $K_m$  값은 38  $\mu\text{M}$ 로 확인되었음.



[그림 3] 정제된 PEDV-3CLpro의 활성 확인 및 Lineweaver-Bulk plot.

(5) 구축된 assay system을 이용하여 보유한 식물의 에탄올 추출물을 이용하여 효소에 대한 저해활성을 확인하였음.

[표 1] *S. pneumoniae*의 sialidase (NanA, NanB 및 NanC)에 대한 식물 추출물의 저해활성

추출물	저해활성(%)	추출물	저해활성(%)	추출물	저해활성(%)
흑후주	100	복령	0	황기	13.0
감태 dry	0	감초	0	인동	0
강황	99.9	인삼	0	천문동	8.2
울금	0	마치현	0	고분	0
영경귀	0	백삼곡삼	6.5	목향	52.4
센나엽	0	숙지황	0	황정	0
현호색	0	고삼	0	작약	0
죽엽	0	송화분	0	감초	0
단삼	0	건강	0	팔루근	0
계피	0	후박	0	지황(건지황)	0
초두구	0	자초	0	맥문동	0
갈화	0	신선초	35.3	지모	0
길경	0	백단향	0	세신	0
야관문	0	소목	55.8	천궁	0
산두근	0	노박덩굴	22.9	산사	0

고려감초	57.5	승마	0	석창포	0
위령선	0	반하	0	오미자	0
건지황	0	백출	73.5	창출	0
호장근	21.6	식방풍	0	시라자	0
음양곽	0	국화	0	부자	0
가자	0	귀판	0	마가목	0
감수	0	굴피	7.25	마황	0
검인	0	금은화	0	맥아	0
건울	0	내복자	0	목과	0
결명자	0	노근	0	목통	0
견우자	0	누로(뿌리)	0	마인	0
계병	0	누로(절굿대)	0	만형자	0
계지	0	당삼	0	모근	0
곡기생	0	대복피	0	목단피	0
골쇄보	0	대황	0	미후도	0
곽향	0	도인	0	박하.엽	0
관동화	0	독활	0	방기	0
광곽향	0	동과자	0	방풍	0
괄루인	0	두충	0	백강잠	0
괴화	0	대추	0	백과	0
구기자	18.4	대황주증	0	백반	0
구맥	0	도인	0	백두구	0
구자	0	두시	0	백렴	0
구절초	0	비해	0	백부근	86.8
백선피	0	비파엽	0	백부자	0
백수오	0	빈랑자	0	산사[육]	0
백자인	0	오가피	0	산수유	0
백지	86.0	사간	0	산약	0
백합	0	사군자	0	산초	0
보골지	100	사삼	0	삼릉	0
복분자	0	사상자	100	상기생	0
부소맥	0	사인	0	상심자	0
비자	0	석곡	0	상엽	0
부평	0	선모	0	유백피	100

(6) 보유중인 약 150여 종의 식물 추출물을 이용하여 PEDV-3CL<sup>PRO</sup>에 대한 저해활성을 확인한 결과, 14 종의 식물 추출물이 30 µg/ml의 농도에서 저해활성을 보였고 특히, 흑후추, 강황, 백지, 보골지, 백출, 사상자, 백부근과 유백피에서 80% 이

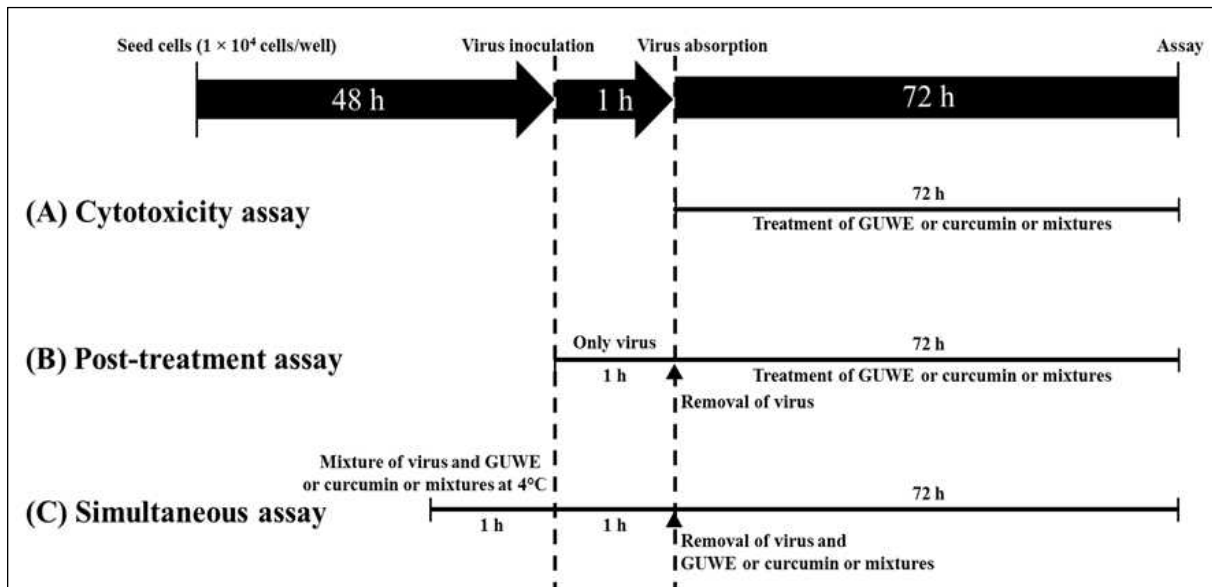
상의 저해활성을 확인하였음.

- (7) 1, 2차년도 연구 결과를 통해 약 150종의 식물 추출물 중 PEDV-3CL<sup>pro</sup>에 대해 저해활성이 있는 소재 14종을 확인하였음. 특히, 30 µg/mL의 농도에서 50% 이상의 저해활성을 지닌 흑후추, 강황, 감초, 백지, 보골지, 소목, 백출, 목향, 백부근, 유백피, 사상자의 활성이 높은 것을 확인함.

[표 2] PEDV 3CL<sup>pro</sup> 대한 식물 추출물의 저해활성(%)

추출물	저해활성(%)	추출물	저해활성(%)	추출물	저해활성(%)
흑후추	100	백삼곡삼	6.5	황기	13.0
강황	99.9	신선초	35.3	천문동	8.2
감초	57.5	소목	55.8	목향	52.4
호장근	21.6	노박덩굴	22.9	백부근	86.8
구기자	18.4	백출	73.5	유백피	100
백지	86.0	굴피	7.2	사상자	100
보골지	100				

## 2. 후보생물소재의 Cell-based assay 이용한 항바이러스 소재탐색



[그림 4] Cell-based assay를 이용한 항바이러스 후보 생물소재 탐색.

- (1) 숙주세포인 Vero 세포를 이용하여 구축된 항바이러스 assay 시스템을 이용하여 항바이러스 활성 생물소재를 스크리닝 하였음. 후보소재 총 90여종을 50, 100 µg/mL로 assay를 수행하였음.
- (2) 항바이러스 활성은 바이러스 억제효과를 50%이상 갖는 생물소재만을 선발하였음. 또한 독성이 있는 물질은 활성이 있다하더라도 선발에서 제외하였음.

(3) 후보소재 90여종에 대해 항바이러스 활성 스크리닝을 수행한 결과, 바이러스 억제 효과를 50%이상 갖는 소재를 17종 도출하였음.

[표 3] PEDV의 항바이러스 효능을 보이는 생물소재(%)

	Dose Samples(µg/mL)	Cell viability (%)	CPE reduction	Samples	Dose (µg/mL)	Cell viability (%)	CPE reduction	Samples	Dose (µg/mL)	Cell viability (%)	CPE reduction
1	100	2.9 ± 0.0	-15.9 ± 0.1	11	100	2.5 ± 0.1	-8.9 ± 0.0	21	100	62.8 ± 1.2	62.0 ± 5.8
	50	2.8 ± 0.1	-15.8 ± 0.1		50	6.5 ± 4.0	-8.8 ± 0.2		50	69.2 ± 2.3	9.7 ± 0.6
2	100	73.3 ± 5.2	22.2 ± 2.0	12	100	3.3 ± 0.1	-8.4 ± 0.1	22	100	49.2 ± 2.7	48.2 ± 3.6
	50	93.9 ± 1.0	-9.4 ± 3.6		50	50.0 ± 3.8	14.3 ± 4.0		50	59.3 ± 3.6	1.3 ± 1.3
3	100	83.0 ± 2.1	48.0 ± 1.8	13	100	4.4 ± 0.1	-7.0 ± 0.2	23	100	81.8 ± 2.9	87.2 ± 1.1
	50	89.1 ± 3.3	46.5 ± 1.8		50	22.6 ± 1.8	7.0 ± 3.6		50	83.1 ± 2.1	5.4 ± 4.0
4	100	3.2 ± 0.2	-15.4 ± 0.3	14	100	94.0 ± 3.2	-4.1 ± 2.3	24	100	10.7 ± 0.6	2.8 ± 1.1
	50	76.1 ± 1.5	51.5 ± 5.6		50	95.0 ± 4.4	-5.9 ± 0.8		50	46.4 ± 6.1	38.0 ± 3.5
5	100	4.7 ± 1.0	-14.8 ± 0.2	15	100	84.6 ± 5.7	78.9 ± 4.3	25	100	76.3 ± 2.1	67.6 ± 2.4
	50	13.5 ± 2.8	-11.1 ± 1.9		50	90.4 ± 4.1	96.3 ± 4.3		50	101.0 ± 3.5	2.6 ± 1.0
6	100	3.2 ± 0.3	-15.8 ± 0.1	16	100	117.4 ± 1.3	93.0 ± 3.5	26	100	95.5 ± 0.8	1.4 ± 0.2
	50	63.6 ± 0.6	33.5 ± 2.1		50	102.3 ± 4.5	95.1 ± 4.9		50	102.8 ± 6.2	-1.0 ± 0.4
7	100	4.0 ± 0.8	-15.7 ± 0.1	17	100	8.1 ± 1.3	7.0 ± 2.2	27	100	102.3 ± 5.1	-0.9 ± 0.3
	50	54.5 ± 1.6	21.5 ± 2.8		50	78.9 ± 3.2	44.7 ± 4.9		50	101.7 ± 0.5	-0.9 ± 0.7
8	100	3.1 ± 0.0	-15.9 ± 0.0	18	100	12.6 ± 0.4	-2.7 ± 0.2	28	100	82.4 ± 2.1	0.6 ± 0.8
	50	88.5 ± 3.7	54.7 ± 3.5		50	4.9 ± 0.5	4.1 ± 4.9		50	86.6 ± 4.1	-1.0 ± 0.4
9	100	3.6 ± 0.2	-15.2 ± 0.1	19	100	3.3 ± 0.3	-6.4 ± 1.8	29	100	60.9 ± 1.7	10.3 ± 4.4
	50	5.0 ± 0.9	-14.3 ± 0.6		50	2.7 ± 0.1	-7.5 ± 1.0		50	71.7 ± 2.0	-0.1 ± 0.4
10	100	76.5 ± 6.0	41.2 ± 4.5	20	100	68.2 ± 1.7	-5.6 ± 2.4	30	100	88.0 ± 1.4	-1.7 ± 0.2
	50	113.0 ± 1.6	77.6 ± 4.0		50	80.6 ± 5.8	5.1 ± 3.2		50	89.0 ± 1.6	0.2 ± 1.7

[표 4] PEDV의 항바이러스 효능을 보이는 생물소재(%)

Samples	Dose (µg/mL)	Cell viability (%)	CPE reduction	Samples	Dose (µg/mL)	Cell viability (%)	CPE reduction
31	100	26.1 ± 0.8	23.9 ± 2.0	41	100	53.0 ± 1.3	38.8 ± 1.7
	50	12.4 ± 0.6	9.1 ± 0.6		50	63.7 ± 0.4	0.6 ± 0.2
32	100	71.2 ± 4.9	65.0 ± 5.6	42	100	74.1 ± 1.9	-0.8 ± 0.1
	50	73.9 ± 1.6	10.8 ± 10.7		50	82.3 ± 0.9	-1.2 ± 0.3
33	100	5.6 ± 0.3	-0.8 ± 0.1	43	100	5.6 ± 0.1	-2.4 ± 0.2
	50	53.1 ± 2.8	44.1 ± 3.7		50	21.6 ± 4.9	42.6 ± 3.9
34	100	68.8 ± 4.4	3.7 ± 2.6	44	100	11.3 ± 0.6	9.9 ± 0.9
	50	75.9 ± 0.8	0.0 ± 0.3		50	34.8 ± 2.9	44.3 ± 1.7
35	100	83.2 ± 1.4	80.0 ± 1.8	45	100	83.2 ± 7.5	89.8 ± 2.7
	50	92.2 ± 5.1	27.8 ± 2.4		50	91.9 ± 6.7	28.8 ± 4.4
36	100	7.2 ± 0.3	-0.6 ± 0.2	46	100	85.3 ± 1.0	1.0 ± 0.3
	50	5.4 ± 0.1	-1.5 ± 0.1		50	82.9 ± 6.0	-1.0 ± 0.5
37	100	73.1 ± 2.3	23.9 ± 4.0	47	100	100.3 ± 0.4	0.3 ± 1.5
	50	89.6 ± 3.8	59.1 ± 0.8		50	103.7 ± 2.5	-0.7 ± 0.7
38	100	31.1 ± 3.6	27.6 ± 2.8	48	100	81.7 ± 1.6	37.2 ± 3.1
	50	93.8 ± 1.2	56.9 ± 2.5		50	84.1 ± 2.0	-0.1 ± 0.4
39	100	29.3 ± 1.8	13.3 ± 1.0	49	100	11.5 ± 0.7	0.8 ± 0.5
	50	74.7 ± 0.6	24.0 ± 2.0		50	5.3 ± 0.1	-2.6 ± 0.1
40	100	69.9 ± 2.8	66.1 ± 1.0	50	100	73.5 ± 2.9	31.3 ± 3.9
	50	79.9 ± 1.4	37.1 ± 0.0		50	80.2 ± 3.5	-0.2 ± 0.4



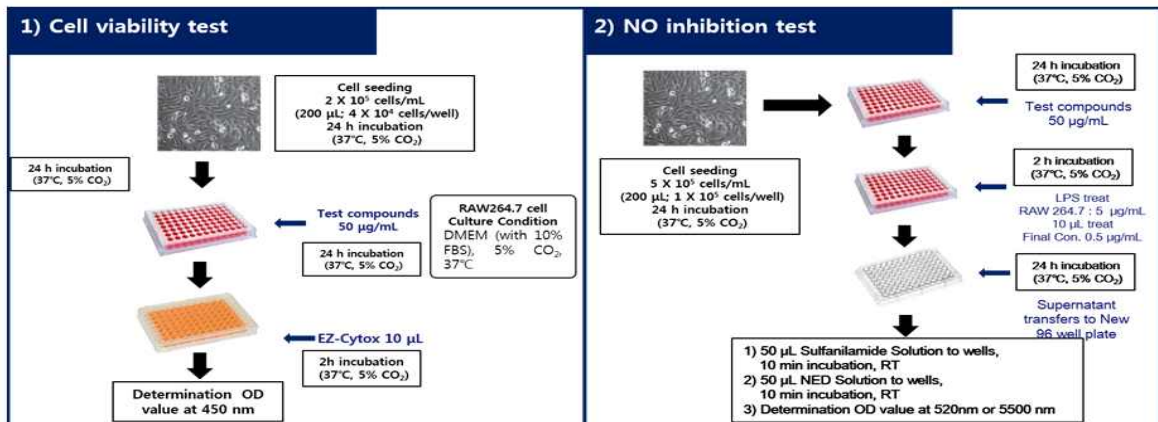
[표 5] PEDV의 항바이러스 효능을 보이는 생물소재(%)

Samples	Dose (µg/mL)	Cell viability (%)		CPE reduction		Samples	Dose (µg/mL)	Cell viability (%)		CPE reduction	
		1	2	1	2			1	2	1	2
61	100	19.0±0.2	17.7±0.8	15.6±1.8	6.8±0.5	81	100	62.2±1.3	62.8±1.6	33.8±6.4	33.7±3.0
	50	31.0±3.4	40.6±5.2	32.7±2.3	12.2±0.9		50	64.3±0.7	63.0±2.0	19.2±11.1	19.3±0.7
63	100	39.7±1.2	5.0±0.1	37.0±1.2	-4.6±0.1	83	100	5.2±0.4	5.3±0.1	-3.7±0.1	-2.6±0.1
	50	44.7±0.9	38.8±0.3	34.6±1.7	24.6±2.9		50	42.0±4.0	43.4±1.3	24.6±1.1	15.8±0.9
64	100	69.2±2.3	64.1±1.2	35.5±3.3	36.4±3.5	84	100	64.7±2.2	64.7±0.6	-0.6±0.2	0.8±0.6
	50	83.5±1.1	64.0±0.9	26.5±8.5	26.9±8.9		50	62.9±1.2	68.1±0.7	-0.7±0.7	-0.2±0.2
65	100	55.8±0.9	51.4±0.2	20.7±6.1	26.7±2.0	85	100	64.0±1.3	59.6±1.6	46.0±1.3	43.1±2.1
	50	61.2±3.0	57.3±2.3	0.7±1.0	3.0±0.4		50	65.6±0.5	64.3±1.2	26.0±10.7	29.3±3.3
66	100	15.7±1.7	16.5±1.9	15.2±0.5	6.4±1.5	86	100	65.2±1.2	67.1±2.9	23.3±2.9	35.6±7.5
	50	38.2±1.9	42.9±2.0	5.2±0.7	14.1±1.4		50	69.1±1.9	66.9±2.6	2.0±2.2	7.1±3.0
70	100	58.8±3.1	53.0±1.2	45.4±3.1	33.0±1.1	87	100	69.3±2.8	62.0±1.2	-0.1±0.5	0.4±0.6
	50	71.6±3.1	64.1±2.1	41.0±1.0	34.5±4.0		50	71.4±1.5	67.5±2.8	-1.0±0.3	-0.6±0.3
71	100	73.1±1.6	66.3±2.7	47.3±1.3	43.4±1.4	88	100	23.0±1.4	15.5±1.0	4.5±1.1	4.2±0.6
	50	71.2±1.9	70.3±3.6	13.9±1.4	26.7±1.8		50	64.3±2.4	59.8±0.2	44.3±2.8	54.7±1.7
73	100	5.4±0.1	5.5±0.1	-2.6±0.0	-3.9±0.1	91	100	62.9±2.8	66.6±4.2	45.1±3.4	48.8±1.4
	50	9.3±0.4	8.8±0.2	0.2±0.7	-0.4±1.0		50	69.1±1.6	64.8±2.5	8.1±6.4	19.8±4.5
74	100	57.0±1.1	52.6±1.7	42.4±0.6	34.4±1.6	93	100	63.3±1.0	62.0±4.2	-0.6±0.7	4.8±0.5
	50	59.1±1.0	54.2±1.3	12.3±1.9	12.9±4.7		50	65.2±1.9	60.3±1.4	1.0±2.3	5.3±0.9
75	100	49.5±0.5	42.5±2.2	42.4±1.1	31.7±1.4	94	100	4.8±0.1	5.8±0.4	-1.7±2.3	-2.0±0.1
	50	64.0±1.0	55.2±2.1	51.4±0.3	41.7±1.7		50	30.7±1.5	36.1±2.3	20.0±1.6	11.7±4.3
76	100	82.5±0.6	81.8±1.7	54.6±2.2	46.6±2.7	95	100	73.2±1.9	67.6±0.3	33.1±7.0	46.9±2.6
	50	77.8±1.3	71.5±1.6	5.2±1.6	10.6±4.4		50	70.7±1.5	68.4±1.4	5.2±8.8	4.3±2.3
77	100	74.8±1.4	74.2±2.0	-0.6±0.3	0.3±0.9	96	100	69.2±3.8	57.3±2.5	34.7±2.2	30.5±1.6
	50	91.3±2.3	75.4±1.5	-0.7±0.5	-0.3±0.2		50	69.6±1.8	68.2±0.9	25.8±4.2	29.4±2.6
78	100	67.3±4.7	61.9±1.1	41.5±4.4	41.7±8.0	97	100	5.2±0.1	5.1±0.1	-2.5±0.3	-1.0±0.2
	50	65.6±2.8	65.8±1.3	12.8±9.8	6.8±3.1		50	5.2±0.2	5.4±0.7	-2.8±0.1	-2.2±0.1
79	100	60.8±3.4	56.6±0.3	37.4±8.3	27.5±1.2	99	100	61.1±2.8	58.2±1.8	0.3±0.8	0.1±0.6
	50	63.0±1.1	64.6±1.4	7.4±4.4	12.4±7.0		50	64.7±3.0	61.9±1.9	-0.3±0.3	-1.1±0.1
80	100	70.5±1.8	65.7±0.9	55.7±0.8	43.8±0.2	100	100	58.0±0.8	56.2±2.8	20.7±2.4	23.4±1.5
	50	72.7±1.7	68.4±3.8	5.8±1.5	17.6±0.5		50	65.7±3.7	60.6±2.7	0.7±0.6	3.2±0.4

- 그 결과, 17종의 후보소재 중 바이러스 복제를 억제하는 CPE reduction assay에서 독성이 낮고 효능이 있는 소재 중 경제성 및 산업화 분석을 통해 **항바이러스 소재로 최종 감초 열수 추출물을 선정하였음.**

3. 후보생물소재의 Cell-based assay 이용한 항염증(NO 생성 저해활성) 소재탐색

(1) RAW264.7 세포를 이용하여 nitric oxide 생성 저해활성 검증 시스템을 이용하여 항염 활성 생물소재를 스크리닝 하였음. 후보소재 총 219 종을 15 µg/mL로 assay를 수행하였음.



[그림 5] RAW 264.9 세포를 이용한 viability test 및 NO assay 모식도.

[표 6] 생물소재의 항염증 반응(NO 생성 저해)

Sample	Viability (%)	NO production inhibition (%)	Sample	Viability (%)	NO production inhibition (%)
No.1	92.7 ± 0.7	67.7 ± 3.7	No.31	101.7 ± 8.4	12.7 ± 2.1
No.2	92.2 ± 2.5	13.9 ± 6.1	No.32	107.8 ± 11.7	31.6 ± 1.7
No.3	92.9 ± 4.4	47.5 ± 4.2	No.33	93.6 ± 0.1	20.8 ± 0.2
No.4	88.3 ± 0.1	69.5 ± 4.6	No.34	97.9 ± 3.7	47.8 ± 1.1
No.5	89.1 ± 11.4	24.0 ± 6.4	No.35	95.8 ± 0.3	25.1 ± 1.3
No.6	82.5 ± 5.2	53.1 ± 3.3	No.36	85.7 ± 6.7	16.0 ± 12.1
No.7	73.5 ± 0.6	27.4 ± 5.2	No.37	91.3 ± 0.9	23.6 ± 7.9
No.8	100.8 ± 10.4	26.5 ± 3.6	No.38	100.6 ± 13.8	1.9 ± 9.3
No.9	97.3 ± 0.2	33.2 ± 2.6	No.39	96.1 ± 1.8	60.5 ± 5.3
No.10	103.7 ± 3.7	24.8 ± 2.2	No.40	82.5 ± 4.5	42.1 ± 5.5
No.11	106.8 ± 2.9	43.1 ± 1.0	No.41	80.1 ± 1.9	15.6 ± 7.9
No.12	97.8 ± 9.3	31.7 ± 1.2	No.42	73.2 ± 18.0	-5.6 ± 11.8
No.13	89.4 ± 0.9	18.4 ± 2.2	No.43	72.1 ± 19.8	10.4 ± 0.8
No.14	94.7 ± 16.4	27.8 ± 1.7	No.44	78.5 ± 15.6	9.8 ± 1.3
No.15	95.8 ± 1.2	29.7 ± 2.8	No.45	22.4 ± 2.9	77.2 ± 4.3
No.16	111.9 ± 6.3	46.3 ± 3.1	No.46	77.3 ± 23.7	10.3 ± 8.6
No.17	109.1 ± 0.5	20.7 ± 0.7	No.47	66.3 ± 4.9	8.3 ± 4.8
No.18	101.4 ± 5.8	21.1 ± 2.4	No.48	68.3 ± 17.0	8.8 ± 5.3
No.19	104.1 ± 5.5	22.7 ± 2.0	No.49	43.8 ± 6.0	7.7 ± 4.1
No.20	88.1 ± 8.4	36.6 ± 2.5	No.50	79.0 ± 4.8	13.7 ± 1.3
No.21	93.6 ± 10.1	22.4 ± 0.8	No.51	81.2 ± 1.0	13.6 ± 3.4
No.22	119.2 ± 11.4	48.0 ± 0.7	No.52	89.2 ± 7.9	11.6 ± 3.4
No.23	104.0 ± 0.5	23.9 ± 1.5	No.53	84.5 ± 9.1	21.1 ± 3.1
No.24	104.2 ± 6.6	25.4 ± 0.9	No.54	84.8 ± 6.8	28.2 ± 1.1
No.25	101.5 ± 13.5	3.2 ± 0.4	No.55	77.5 ± 9.5	11.4 ± 0.9
No.26	101.1 ± 6.8	18.9 ± 0.9	No.56	44.1 ± 5.0	5.0 ± 1.0
No.27	90.2 ± 0.5	45.0 ± 1.9	No.57	88.9 ± 1.2	10.5 ± 3.8
No.28	96.6 ± 8.7	28.2 ± 0.0	No.58	91.9 ± 2.5	57.0 ± 0.5
No.29	69.0 ± 4.3	72.8 ± 1.0	No.59	105.5 ± 2.7	47.6 ± 3.4
No.30	105.2 ± 11.0	41.1 ± 0.1	No.60	108.3 ± 2.8	7.8 ± 3.8

[표 7] 생물소재의 항염증 반응(NO 생성 저해)

Sample	Viability (%)	NO production inhibition (%)	Sample	Viability (%)	NO production inhibition (%)
No.61	99.1 ± 4.3	13.6 ± 2.0	No.91	68.4 ± 2.1	0.1 ± 3.0
No.62	87.8 ± 1.0	30.0 ± 1.1	No.92	86.9 ± 6.8	23.7 ± 6.3
No.63	41.6 ± 2.2	67.0 ± 1.1	No.93	110.2 ± 18.1	15.6 ± 7.0
No.64	89.9 ± 7.3	8.8 ± 5.2	No.94	110.6 ± 5.8	23.7 ± 6.7
No.65	106.6 ± 0.8	1.6 ± 3.3	No.95	117.3 ± 1.9	4.0 ± 5.4
No.66	117.5 ± 0.9	23.0 ± 1.5	No.96	126.9 ± 2.9	37.5 ± 4.7
No.67	114.2 ± 4.9	75.3 ± 0.7	No.97	127.7 ± 35.5	14.7 ± 4.4
No.68	95.3 ± 2.6	-6.0 ± 4.1	No.98	75.8 ± 1.6	8.0 ± 0.6
No.69	92.4 ± 4.1	46.4 ± 2.1	No.99	88.3 ± 0.2	10.9 ± 2.5
No.70	49.2 ± 5.5	19.1 ± 2.1	No.100	143.0 ± 6.5	9.4 ± 2.0
No.71	80.8 ± 10.0	18.2 ± 1.6	No.101	139.2 ± 8.0	26.6 ± 3.3
No.72	101.3 ± 4.3	20.9 ± 0.5	No.102	108.6 ± 7.9	22.1 ± 8.3
No.73	136.8 ± 11.2	75.5 ± 0.6	No.103	145.9 ± 35.3	14.7 ± 1.2
No.74	118.2 ± 21.8	25.2 ± 0.2	No.104	151.1 ± 7.7	16.0 ± 1.7
No.75	108.9 ± 4.8	21.2 ± 2.1	No.105	74.5 ± 6.6	4.1 ± 0.8
No.76	93.3 ± 0.6	9.9 ± 0.7	No.106	94.2 ± 2.8	45.0 ± 1.6
No.77	56.7 ± 4.4	1.3 ± 3.8	No.107	120.0 ± 7.7	24.2 ± 2.4
No.78	74.1 ± 7.8	13.3 ± 5.5	No.108	117.1 ± 8.7	8.7 ± 0.5
No.79	84.5 ± 29.6	14.9 ± 4.0	No.109	123.1 ± 6.4	9.0 ± 2.0
No.80	94.6 ± 26.3	21.0 ± 7.4	No.110	114.9 ± 6.0	13.2 ± 2.3
No.81	73.1 ± 21.8	23.1 ± 6.4	No.111	137.6 ± 28.5	21.8 ± 3.7
No.82	66.7 ± 27.3	-10.0 ± 5.0	No.112	73.5 ± 1.9	11.1 ± 0.8
No.83	71.4 ± 26.1	8.5 ± 5.2	No.113	88.6 ± 0.0	16.8 ± 2.9
No.84	56.9 ± 0.6	-3.4 ± 3.9	No.114	108.1 ± 2.0	34.7 ± 4.2
No.85	94.9 ± 30.8	6.7 ± 5.2	No.115	111.7 ± 4.0	18.2 ± 0.7
No.86	98.2 ± 39.1	-0.2 ± 5.5	No.116	115.0 ± 28.6	11.6 ± 0.8
No.87	108.4 ± 51.2	14.3 ± 0.4	No.117	132.0 ± 20.0	9.5 ± 1.3
No.88	113.7 ± 55.5	25.0 ± 1.6	No.118	140.6 ± 1.4	13.5 ± 3.2
No.89	91.9 ± 41.1	6.0 ± 1.9	No.119	72.3 ± 3.8	5.1 ± 4.6
No.90	102.5 ± 31.9	0.6 ± 5.4	No.120	79.6 ± 13.5	5.5 ± 6.5



[표 8] 생물소재의 항염증 반응(NO 생성 저해)

Sample	Viability (%)	NO production inhibition (%)	Sample	Viability (%)	NO production inhibition (%)
No.181	101.2 ± 9.3	41.2 ± 0.3	No.201	163.8 ± 16.0	41.4 ± 2.4
No.182	88.8 ± 0.3	37.1 ± 0.6	No.202	113.1 ± 8.0	21.9 ± 5.0
No.183	137.0 ± 11.6	28.3 ± 0.1	No.203	103.9 ± 9.9	22.7 ± 2.9
No.184	103.1 ± 20.6	23.7 ± 1.8	No.204	103.0 ± 40.4	9.5 ± 10.8
No.185	174.7 ± 8.7	24.6 ± 2.2	No.205	102.4 ± 33.3	5.8 ± 5.9
No.186	168.8 ± 29.7	14.8 ± 3.7	No.206	110.8 ± 20.4	9.0 ± 4.0
No.187	188.9 ± 31.0	15.5 ± 2.1	No.207	90.6 ± 20.0	43.7 ± 4.9
No.188	103.1 ± 15.2	22.9 ± 0.2	No.208	90.5 ± 12.6	28.4 ± 3.1
No.189	71.7 ± 0.9	39.6 ± 1.5	No.209	101.4 ± 11.1	56.5 ± 1.5
No.190	132.6 ± 3.3	12.2 ± 3.5	No.210	93.8 ± 9.5	7.3 ± 9.2
No.191	116.6 ± 3.7	41.0 ± 2.8	No.211	80.2 ± 11.8	34.2 ± 0.6
No.192	156.7 ± 28.7	28.0 ± 0.3	No.212	118.8 ± 56.4	-4.7 ± 5.7
No.193	177.3 ± 22.5	40.6 ± 1.1	No.213	111.6 ± 35.9	21.0 ± 5.6
No.194	163.9 ± 10.5	15.6 ± 4.0	No.214	99.0 ± 40.6	-1.5 ± 2.4
No.195	105.6 ± 10.3	10.9 ± 3.7	No.215	94.4 ± 18.6	22.6 ± 1.9
No.196	118.3 ± 32.2	39.4 ± 2.0	No.216	60.7 ± 15.7	28.9 ± 1.6
No.197	121.2 ± 6.0	42.9 ± 1.5	No.217	81.8 ± 15.4	28.1 ± 4.0
No.198	116.4 ± 12.6	11.2 ± 3.3	No.218	171.3 ± 2.1	47.6 ± 2.0
No.199	150.8 ± 26.6	10.8 ± 2.2	No.219	86.3 ± 11.1	32.2 ± 1.9
No.200	180.6 ± 65.4	50.2 ± 0.2			

- (2) 항염 활성은 NO 생성 저해 효과를 40%이상 갖는 생물소재만을 선발하였음. 또한 독성이 있는 물질은 활성이 있다하더라도 선발에서 제외하였음.
- (3) 후보소재 219 중에 대해 15 µg/mL의 농도에서 항염 활성 스크리닝을 수행한 결과, 세포생존률 90% 이상, NO 생성 저해 활성 40%이상을 충족하는 항염소재를 30종 도출하였음.
- (4) 그 결과, 17종의 후보소재 중 NO 생성을 억제하고 독성이 낮고 효능이 있는 소재 중 경제성 및 산업화 분석을 통해 **항염활성 소재로 최종 강황 추출물을 선정하였음.**

#### 4. 후보생물소재의 항바이러스 활성평가를 위한 소재 확보

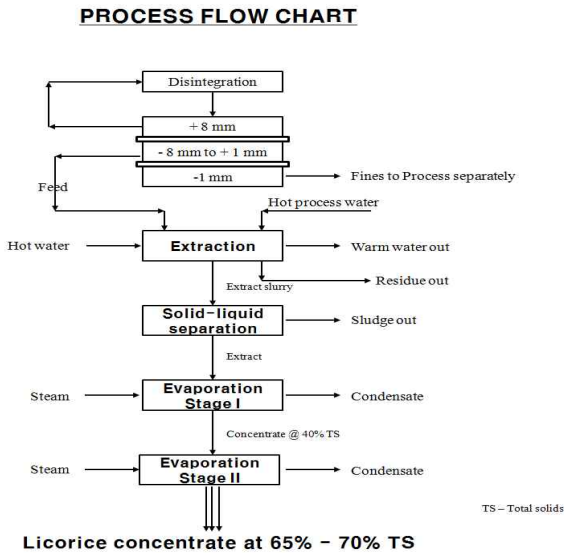
- (1) 항바이러스 소재(감초)의 대량생산공정 확립: 본 연구의 성공적인 수행을 위하여 카자흐스탄과 중국의 국경지역에서 품종과 야생분포 등에 대하여 조사하여 해당 국가의 국영기업과 MOU를 체결한 품질이 우수한 감초를 확보하였음.



[그림 6] 카자흐스탄 현지 생물소재 감초의 재배, 수확 및 자연건조.



- (2) 또한 대량으로 재배 및 수확된 카자흐스탄 동북 감초를 세척과 건조과정을 거쳐 일관된 제조공정 과정을 거쳐 본 연구에서 사용할 생물소재 **엑스**로 제조하였음.
- (3) 제조과정에 사용된 제조공정도는 카자흐스탄의 Licorice Kazakhstan 社の 인증된 공정과정



[그림 7] 카자흐스탄 현지 대량생산공정도 및 감초추출물.

- (가) 감초를 활용하여 난용성 소재인 커큐민을 함유하는 각테일 제제의 제조: 추출장비, 농축장비 및 동결건조 장비를 활용하여 대량 생산 체계를 구축하여 시제품 제작을 통한 효능검증 및 현장적용 시험을 수행하였음.



[그림 8] 시제품의 대량생산체계의 확립.

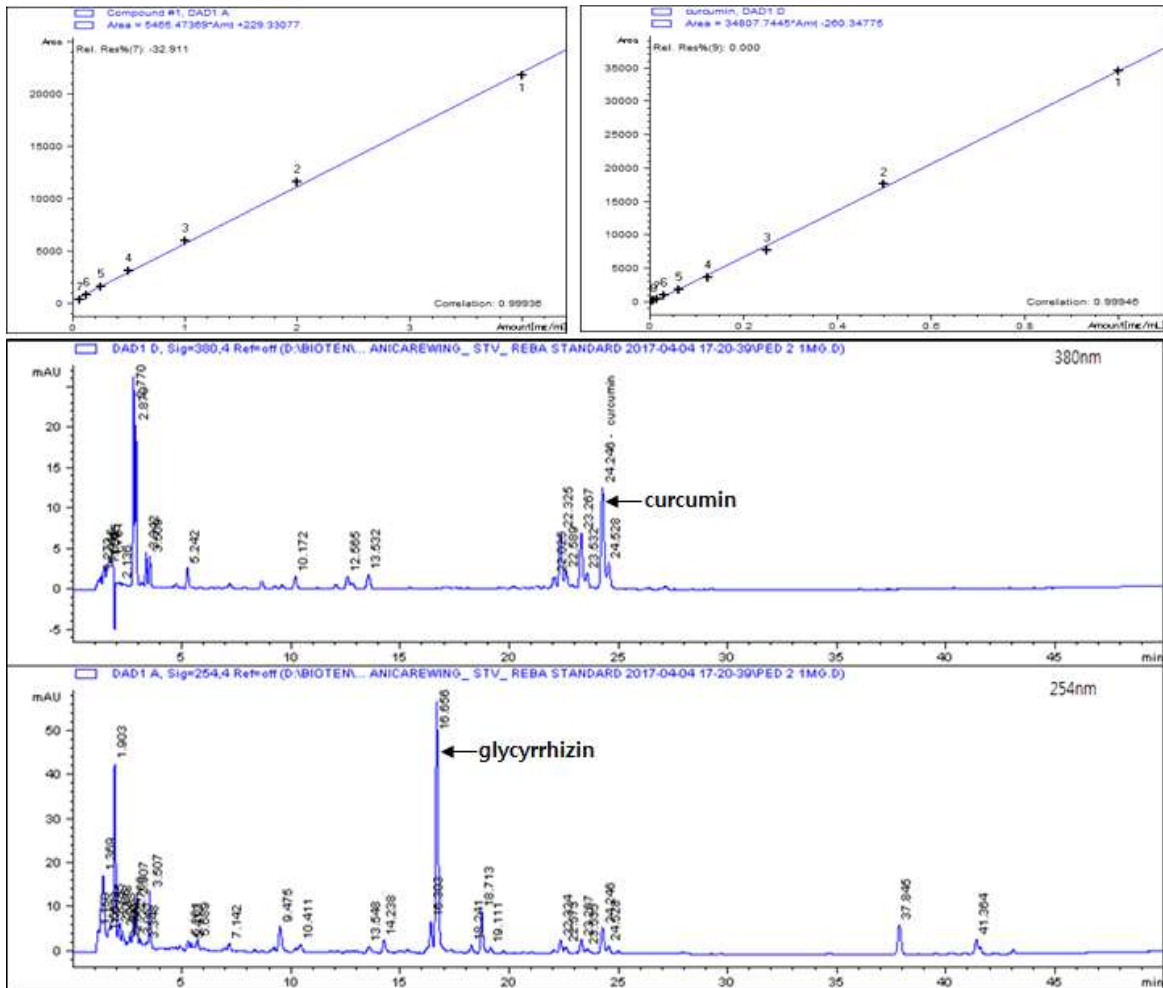
- (나) 대량생산 시제품에 포함되어 있는 커큐민 및 글리진산의 함량 분석: HPLC 는 agilent technology 1200 series를 사용하여 분석하였으며 pump system은 quaternary pump를 사용하였으며 컬럼은 agilent사의 ZORBAX SB-C18 (5 $\mu$  m, 4.6 X 150mm)을 사용함. 이동상은 물 (A, 0.1% trifluoroacetic acid)과 아

세토니트릴(B, 0.1% trifluoroacetic acid)을 사용하였고, 기울기 용리를 이용하여 분석하였음.

[표 9] HPLC 조건 및 기울기 용리 조건

▶ HPLC Apparatus: Agilent technology 1200 series ▶ Pumping system: quaternary pumps ▶ Detector: VWD( 260 nm) ▶ Flow rate: 1.0 ml/min ▶ Sample injection volume: 10 µl ▶ Column: ZORBAX SB-18, 5µm, 4.6 X 150mm ▶ Column oven : 30 °C ▶ Concentration: 10 mg/ml ▶ Flow solvent A: 0.1% TFA in water ▶ Flow solvent B: 0.1% TFA in Acetonitrile	▶ Solvent gradient condition		
	Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
	0	80	20
	10	75	25
	20	65	35
	30	50	50
	40	40	60
	50	30	70
60	0	100	

(다) 시제품의 분석결과 글리진산은 9.0%, 커큐민은 1.0%가 포함되어 있었음. 특히 2분대의 당성분 물질(증육량 증대)과 글리진산(감염제어용 소재) 때문에 돼지의 증육 및 감염예방에 매우 효과적일 것으로 판단하였음.



[그림 10] 대량생산을 통해 얻어진 시제품의 정량 분석.

## 5. PED 치료용 *in vivo* 효능평가 감염동물모델 구축(감염모델, 전과감염모델)

- (1) 숙주세포를 이용한 국내분리 변이형 유행성 설사 바이러스(Aram strain) 대량배양
  - (가) 국내 분리 변이형 유행성 설사 바이러스를 중앙백신으로부터 얻었음.
  - (나) PEDV를 대량 배양하기 위해 T-150 flask 30개에 Vero 세포를 동일한 조건으로 배양하고 약 80~90% 정도의 단층이 형성되었음을 확인 후 바이러스를 접종하였음.
  - (다) Seed 바이러스를 alpha-MEM(trypsin 10 µg/mL) 배지에 희석하여 1시간동안 감작시킨 후 1 MOI가 되도록 flask에 5 ml씩 접종 후 2시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 감염 후 alpha-MEM(trypsin 5 µg/ml) 배지를 20 ml씩 첨가하였음.
  - (라) 48시간 배양 후 최종적으로 1×10<sup>1</sup> TCID<sub>50</sub>/mL의 역가를 갖는 600 mL의 바이러스를 확보하였음.
- (2) 감염모델을 위한 무균돼지 생산 및 자돈사 환경조건
  - (가) 구제역 및 돼지열병 예방접종을 한 임신말기 모돈을 농가에서 구입하여, 3일간 순치기간 동안 설사를 포함한 질병의 유무와 특히 임상증상이 없음을 확인 후 실험동물로 사용하였음.
  - (나) 임신말기의 모돈을 제왕절개한 후 초유를 먹이지 않은 (cesarean-derived colostrum-deprived: CDCD) 무균자돈을 생산하였음.
  - (다) 실험동물시설은 SPF동물 대상의 청정시설(BS: Barrier system)로서 자돈사 온도는 32°C, 습도는 40%, 조도는 150~300 lux, 배기는 14~18회/시간 환경에서 무균자돈은 4시간 간격으로 대용유를 급이 하였음.



[그림 11] 임신모돈의 자궁적출술을 통한 무균돼지 생산과정.



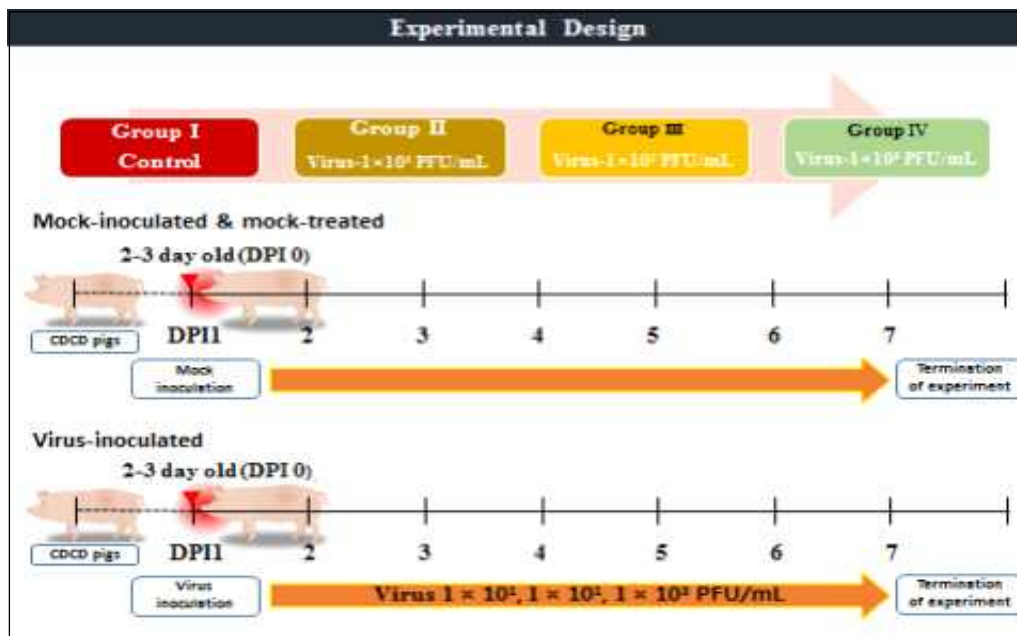
[그림 12] PEDV 저해 활성 검사를 위한 동물실험 모식도.

(라) 실험에 사용 될 신생자돈 각 그룹 5마리에 대하여 분변을 채취 후 RT-PCR 검사를 수행하여 음성자돈임을 확인 후 실험에 사용하였음.

(마) 바이러스 감염 동물모델 실험설계, 임상증상 및 육안소견

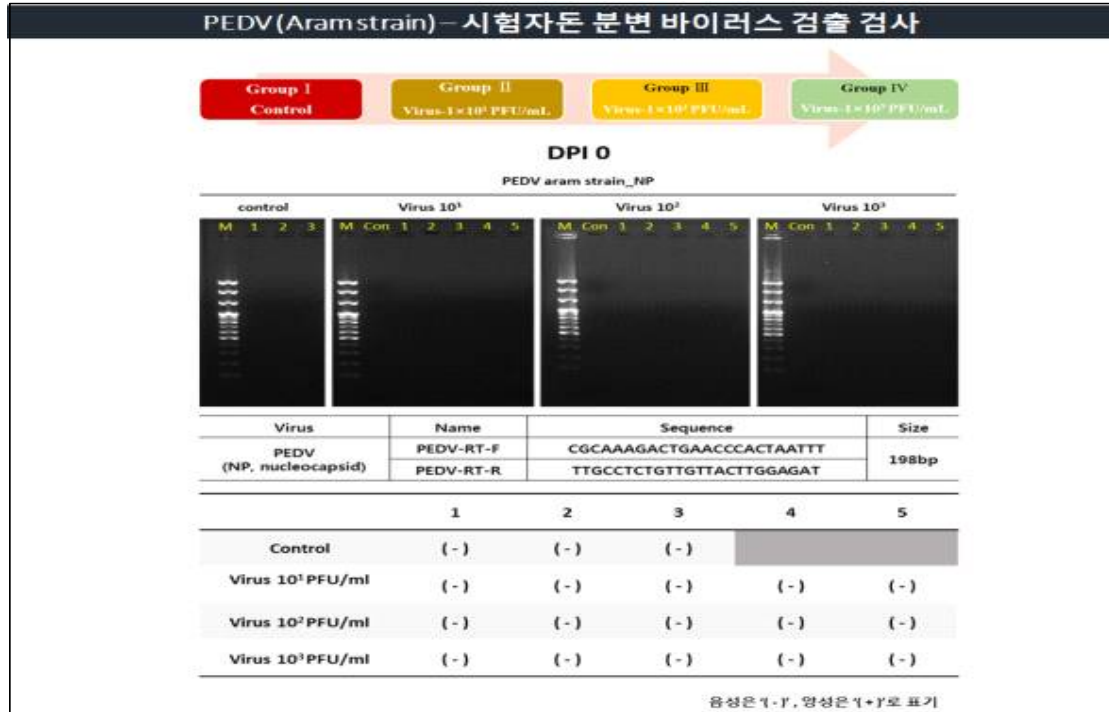
① Mock (3n) : 비접종    ② Titer  $1 \times 10^1$  (5n) : 바이러스 접종군

③ Titer  $1 \times 10^2$  (5n) : 바이러스 접종군    ④ Titer  $1 \times 10^3$  (5n) : 바이러스 접종군.



[그림 13] 자돈을 이용한 PEDV 치료 효능 검사를 위한 모식도.





[그림 14] 분변 내 PEDV 검출 모식도.

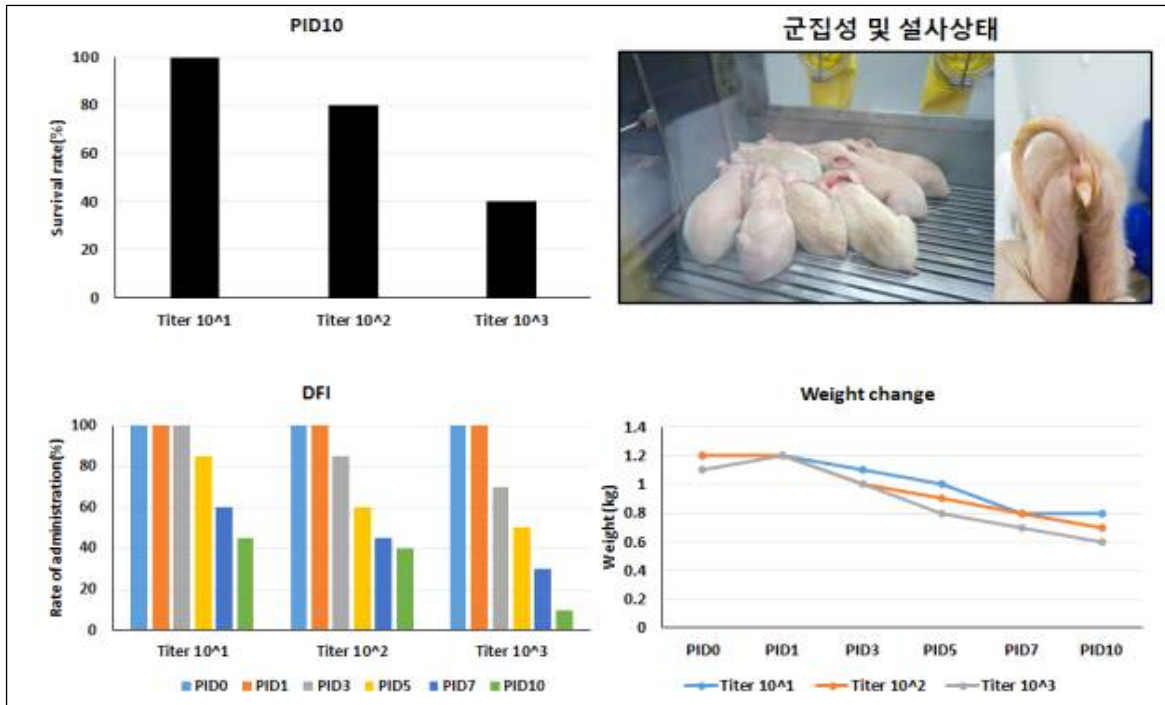
(바) 바이러스 동물모델 실험설계 및 세부 임상증상과 육안조건

- 실험수행 중 각 그룹에서의 설사유무, 구토, 섭취율, 균집성, 원기손실 및 폐사율을 확인하였으며, 부검 시 위내에 대용유 유무와 육안적 소견 시 소장(십이지장, 공장, 회장)에서 장벽(수양성 설사 시 용모의 위축과 탈락으로 장벽이 얇아져 내용물이 보임) 상태를 확인하였음.
- 동물실험 수행 시 아이솔레이터의 온도(30℃) 및 습도(50%)를 유지하였음.

[표 10] PEDV 접종 자돈에서의 임상증상

Category of clinical sign	Symptom	Score
PED virus inoculation	Diarrhea, vomit	Pasty(+), Semi-liquid(++), Liquid(+++)
	Daily feed intake (DFI)	Rate of administration(%)
	Weight change	kg
	Survival rate	%
	Small intestine anatomy	Slight(1), Mild(2), Moderate(3), Severe(4)

- (사) 시험자돈을 이용한 소재효능평가 전 바이러스 경구접종량 결정을 위하여 동물실험그룹 ① Mock (3n) : 비접종    ② Titer 1×10<sup>1</sup> (5n) : 바이러스 접종군  
 ③ Titer 1×10<sup>2</sup> (5n) : 바이러스 접종군    ④ Titer 1×10<sup>3</sup> (5n) : 바이러스 접종군 그룹으로 실험을 수행하였음.



[그림 15] PEDV 감염 자돈의 임상증상.

(아) 임상증상 결과, Titer  $1 \times 10^1$  접종 그룹에서는 개체전체 생존하였고 Titer  $1 \times 10^2$  접종 그룹에서는 80%, Titer  $1 \times 10^3$  접종 그룹에서는 40%의 생존율을 확인하였음. 또한 PID1부터 종료시점인 PID10 까지 분변에 대해 바이러스 검출 검사를 수행한 결과 전 그룹 모두에서 PED 바이러스가 검출됨을 확인하였음.

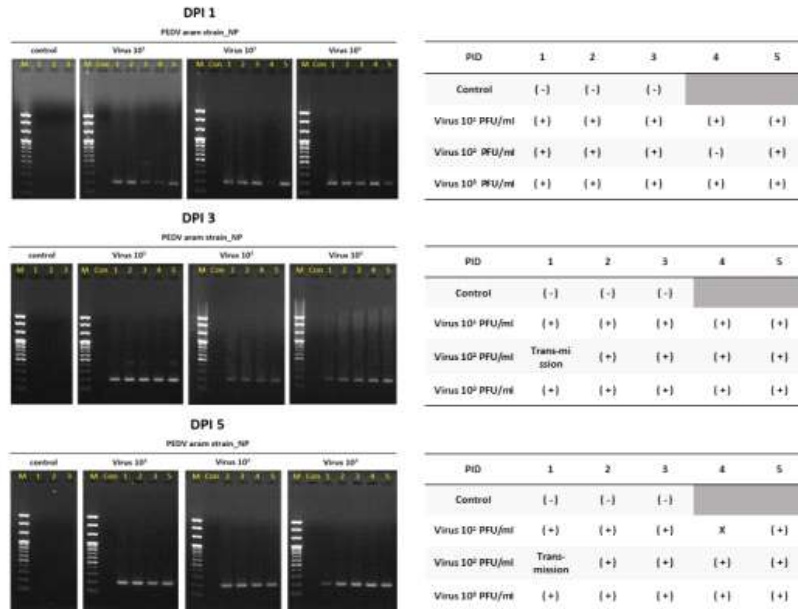
(자) PID7에 접종 및 시험그룹의 자돈에서 특징적인 증상은 침울, 설사 직전/후 식욕부진, 구토를 보였으며 심한 수양성 설사가 관찰됐으며, 부검소견은 소장 내 액체가 차있고, 장막이 얇아져 내용물이 육안적으로 보임을 관찰되었음.

(차) 비접종 그룹을 제외한 나머지 실험그룹 모두에서 군집성과 수양성 설사가 정도의 차이를 나타내며 발생하였고(Titer  $1 \times 10^1$ /Semi-liquid > Titer  $1 \times 10^2$ /Semi-liquid > Titer  $1 \times 10^3$ /liquid), 대용유 섭취율은 각 그룹에서 PID5 부터 섭취율이 현저히 떨어졌으며, 각 그룹 간에 있어 Titer  $1 \times 10^1$  > Titer  $1 \times 10^2$  > Titer  $1 \times 10^3$  순으로 섭취율을 나타내었음. 본 결과는 체중감소 변화 시점과 비슷한 양상을 나타냄을 확인하였음.

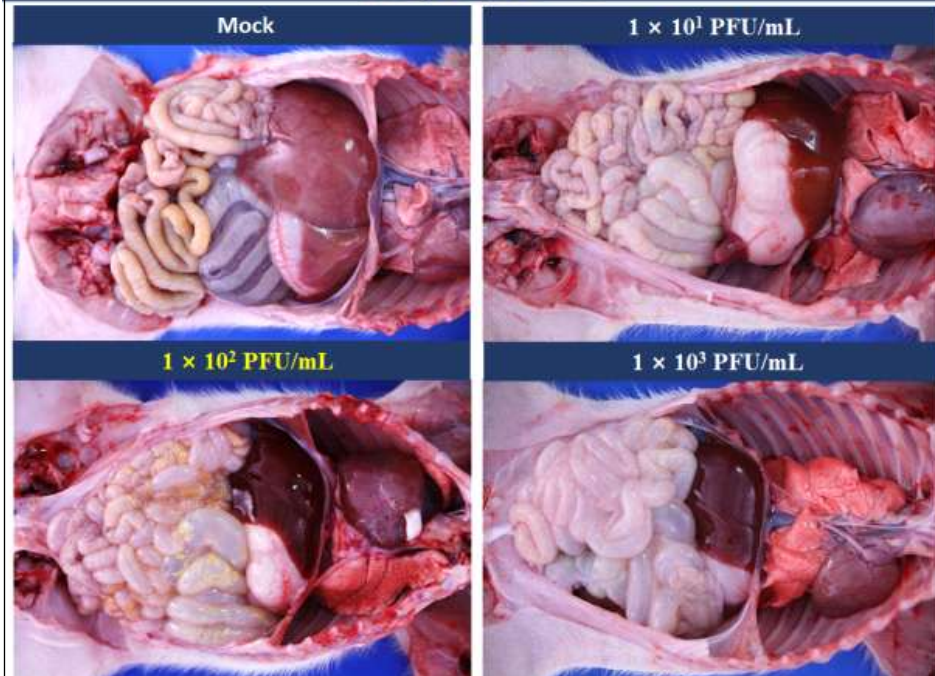
(카) 실험수행 기간동안 각 시험그룹에 대한 체중변화는 PID3일부터 체중감소가 나타났으며, Titer  $1 \times 10^3$  > Titer  $1 \times 10^2$  > Titer  $1 \times 10^1$  시험종료일까지 지속적인 체중감소를 나타내었음.

- 자돈에 바이러스 경구 접종량 결정을 위해 실험을 수행한 결과 생존율 및 대용유 섭취율, 체중변화와 바이러스 배출검사를 통해 최종 Titer  $1 \times 10^2$  PFU/mL의 virus titer로 선정하여 효능평가 감염 동물모델에 적용하였음.

## PEDV(Aramstrain) – 시험자돈 분변 바이러스 검출 검사



## 동물부검사진 [PID7]



[그림 16] PEDV 감염 자돈의 분변 내 바이러스 배출 및 육안검사 소견.

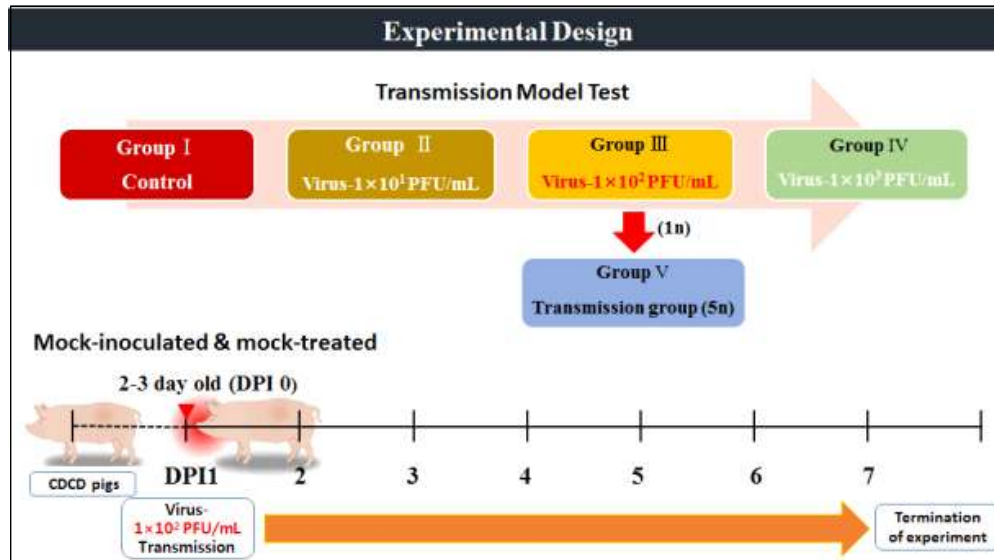
(3) 감염모델을 위한 무균돼지 생산 및 자돈사 환경조건

- ① Mock (5n) : 비접종      ② 전파모델 그룹 : 비접종 자돈(4n)+접종자돈(1n)
- (가) 실험수행 중 각 그룹에서의 설사유무, 구토, 섭취율, 군집성, 원기손실 및 폐사율을 확인하였으며, 부검 시 위내에 대용유 유무와 육안적 소견 시 소장(십



이지장, 공장, 회장)에서 장벽(수양성 설사 시 용모의 위축과 탈락으로 장벽이 얇아져 내용물이 보임) 상태를 확인하였음.

(나) 동물실험 수행 시 아이슬레이터의 온도(30℃) 및 습도(50%)를 유지하였음.



[그림 17] PEDV 전파모델 모식도.

(4) 바이러스 감염전파모델 구축

(가) 실험에 사용 될 신생자돈 각 그룹 5마리에 대하여 분변을 채취 후 RT-PCR 검사를 수행하여 음성자돈임을 확인 후 실험에 사용하였음.

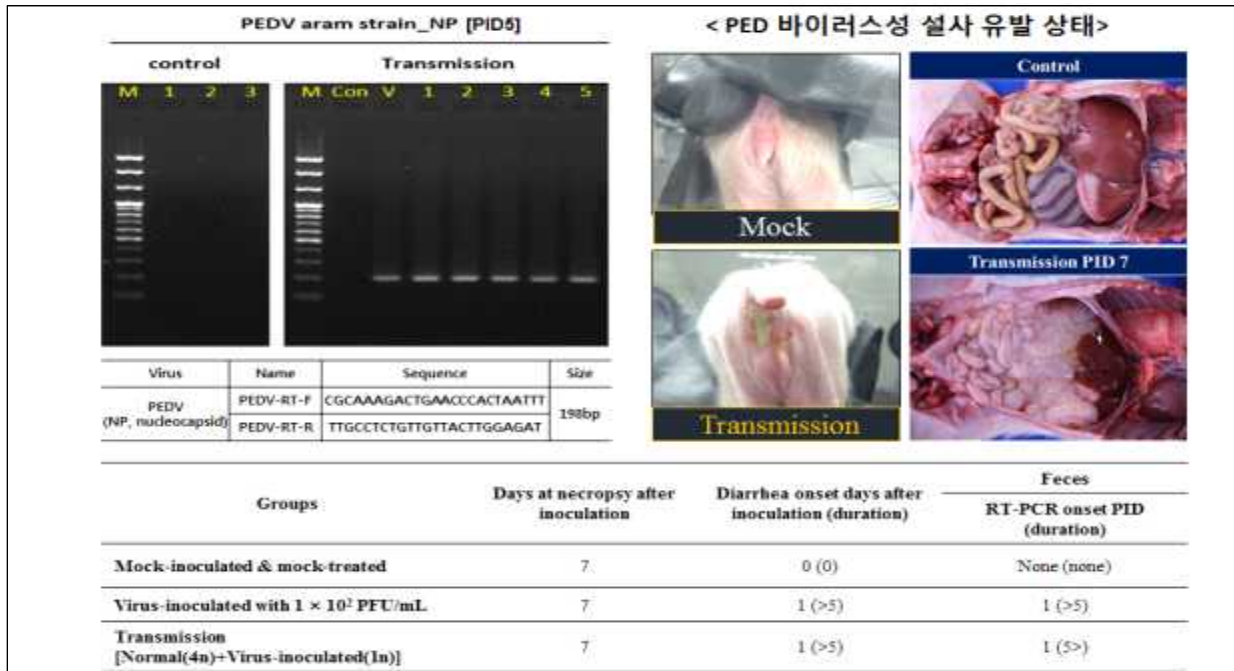
(나) 3일령 포유자돈(1n)에 1x10<sup>2</sup> PFU/mL titer로 경구접종 2일 후 비접종 그룹(4n)에 합사를 시킨 후 접종 후 7일간 정상자돈에서 바이러스 전파감염 유무를 분변을 채취하여 RT-PCR을 이용하여 검출유무를 확인하였음.

(다) 그 결과, 바이러스를 접종한 자돈을 정상그룹에 합사시킨 후 PID5에 분변을 채취하여 바이러스 검출검사를 수행한 결과 비접종 그룹을 제외한 감염전파 모델 전체개체에서 바이러스가 검출됨을 확인함으로써 감염전파가 성공적으로 이루어짐을 확인하였음.

(라) PID7에 감염전파그룹에서의 설사지표는 semi-liquid 정도로 묽은 정도의 설사를 나타냈으며, 특징적인 증상은 침울, 설사직전/후 식욕부진, 구토를 보였으며 수양성 설사로 인한 탈수로 인해 체중감소가 나타났음.

(마) 감염전파 그룹의 특징적 부검소견은 소장내 액체가 차있고, 장막이 얇아져 내용물이 육안적으로 관찰되었음.

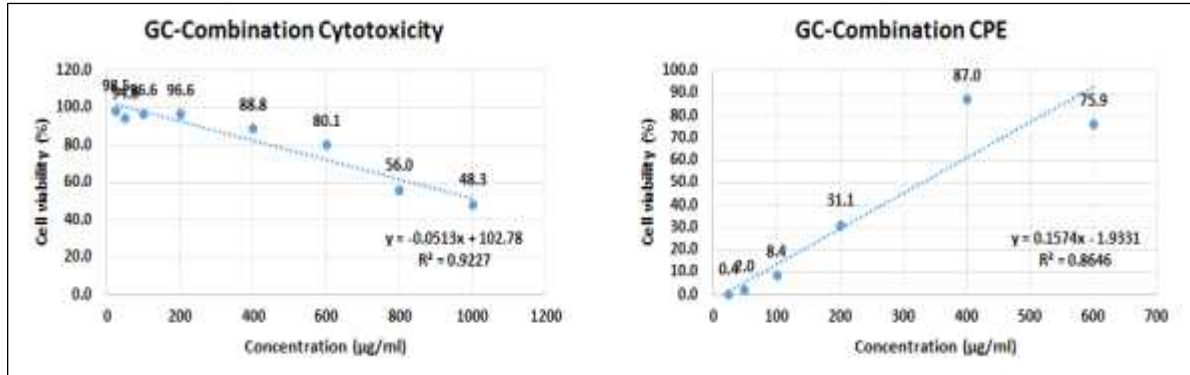
- 종합결과, 3일령 포유자돈(1n)에 1x10<sup>2</sup> PFU/mL titer로 접종 2일 후 비접종 그룹(4n)에 합사를 시킴으로서 비접종 정상그룹 내 바이러스가 전파됨을 확인하여 바이러스 감염전파 동물모델을 성공적으로 구축을 하였음. 구축된 바이러스 전파모델을 이용하여 소재효능평가를 수행하였음.



[그림 18] 바이러스 전파 모델에서의 분변 내 바이러스 검출 및 육안적 검사.

6. PED 치료용 복합소재(combination) 제품의 Cell-based assay 이용한 항바이러스 효능검증

- (1) 90종의 항바이러스 스크리닝을 통해 도출된 단일소재(감초 추출물)와 219종의 항염활성 스크리닝을 통해 도출된 단일소재(강화추출물, 감초추출물)에 대해 항바이러스 소재(감초추출물)+항염활성소재(커큐민)를 합제하여 항바이러스 효능을 cell-based assay를 수행하였음.
  - (2) 그 결과, 감초추출물 단독으로 세포에 처리하였을 때 세포독성은 800  $\mu\text{g/mL}$  이상인 반면, 복합제를 처리하였을 때의 세포독성은 1028  $\mu\text{g/mL}$ 으로 세포독성이 1.28배 낮아졌음.
  - (3) 세포병변억제 효능인  $EC_{50}$ 은 단독으로 처리하였을 때 493.8  $\mu\text{g/mL}$ 인 반면, 복합제를 하여 처리하였을 때 329.9  $\mu\text{g/mL}$ 로 1.5배 높아졌음을 확인 하였고 SI 값도 1.62에서 3.11로 1.9배 상승함을 확인하였음.
  - (4) 감초추출물 단독으로 바이러스 처리시 항바이러스 및 항염활성으로 효능을 나타내지만, 항염활성이 매우 높은 커큐민 화합물과 합제하여 처리 시 항바이러스 및 항염활성이 증강되어 단독처리보다 복합제가 항바이러스 활성이 증강되는 것으로 사료됨.
- 종합적인 결과, 감초추출물+커큐민화합물의 복합제에 대하여 추후 항바이러스 및 항염효능 작용기전 연구를 수행 할 예정이며, 동물모델을 이용하여 복합제의 효능평가를 수행 하였음.



[그림 19] 감초열수추출물-커큐민 복합제에 의한 세포 독성 및 세포변성효과.

[표 11] 감초열수추출물-커큐민 복합제에 대한 세포병변 억제효과

Samples	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	PEDV-CPE reduction assay	
		EC <sub>50</sub> (µg/mL)	SI
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (Hot-water extract)	> 800	493.8	1.62
<b>GC-Combination</b>	<b>1028.85</b>	<b>329.9</b>	<b>3.11</b>

CC<sub>50</sub>: mean (50%) value of cytotoxic concentration.  
 EC<sub>50</sub>: mean (50%) value of effective concentration.  
 SI: selective index, CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>.

7. PED 치료용 단일 및 복합소재 제품의 감염전파 동물모델에서의 항바이러스 효능평가
  - (1) 숙주세포를 이용한 국내분리 변이형 유행성 설사 바이러스(Aram strain) 대량배양하였음.
  - (2) 국내 분리 변이형 유행성 설사 바이러스를 중앙백신으로부터 얻었음.
  - (3) PEDV를 대량 배양하기 위해 T-150 flask 30개에 Vero 세포를 동일한 조건으로 배양하고 약 80~90% 정도의 단층이 형성되었을 때 바이러스를 접종하였음.
  - (4) Seed 바이러스를 alpha-MEM(trypsin 10 µg/mL) 배지에 희석하여 1시간동안 감각시킨 후 1 MOI가 되도록 flask에 5 ml씩 접종 후 2시간 동안 37°C CO2 incubator에서 감염 후 alpha-MEM(trypsin 5 µg/ml) 배지를 20 ml씩 첨가하였음.
  - (5) 48시간 배양 후 최종적으로 1×10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/mL의 역가를 갖는 800 mL의 바이러스를 확보하였음.
8. PED 치료용 단일소재(감초추출물) 및 복합제(감초추출물+커큐민) 제품의 감염전파 동물모델에서 항바이러스 효능평가

- (1) 항바이러스 활성 단일소재(감초추출물)와 항염활성 단일소재인 강황추출물의 단일물질인 커큐민 복합제의 전과동물모델을 이용하여 효능을 평가하였음.
- (2) 구제역 및 돼지열병 예방접종(모돈)을 한 신생자돈(3일령)을 농가에서 구입하여, 3일간 순치기간 동안 설사를 포함한 질병의 유무와 특이 임상증상이 없음을 확인 후 실험동물로 사용하였음.
- (3) 동물실험 수행 시 아이슬레이터의 온도(30℃) 및 습도(50%)를 유지하였음
- (4) 실험에 사용 될 신생자돈 각 그룹 5마리에 대하여 분변을 채취 후 RT-PCR 검사를 수행하여 음성자돈임을 확인 후 실험에 사용하였음.
- (5) 바이러스 감염전과 동물모델 실험설계, 임상증상 및 육안조건
  - ① Mock (5n) : 비접종 그룹      ② Titer  $1 \times 10^2$  PFU/mL (5n) : 바이러스 접종군
  - ③ GC-200 mg/kg/day (5n)      ④ GC-100 mg/kg/day (5n)      ⑤ Gu-200 mg/kg/day (5n)
- (6) 소재효능 시험군에 5일간 시험소재를 경구투여 후 3일령 포유자돈(5n)에  $1 \times 10^2$  PFU/mL titer로 경구접종 후 설사유발이 발생한(PID2) 접종군 자돈(1n)을 비접종 시험그룹(5n)에 합사를 시킨 후 10일간 소재를 투여한 정상자돈에서 바이러스에 대한 전과방어 및 치료효능을 평가 수행하였음.
- (7) 바이러스 접종 후 4시간 간격으로 시험자돈의 임상증상을 관찰하였고, 정기적으로 분변채취 및 분변점도를 확인하였음.
- (8) 실험수행 중 각 그룹에서의 설사유무, 구토, 섭취율, 균집성, 원기손실 및 폐사율을 확인하였으며, 안락사 및 사망한 시험자돈을 대상으로 부검을 하여 혈액, 소장(십이지장, 공장, 회장)에서 장벽(수양성 설사 시 용모의 위축과 탈락으로 장벽이 얇아져 내용물이 보임) 상태를 확인하였고, 장간막 림프절 등 특정 대상장기를 채취 후 시험분석을 수행하였음.

## 9. 바이러스 감염전과 동물모델계를 이용한 복합제(combination) 제품의 효능평가

### (1) 육안적 임상증상

- (가) 바이러스 비접종 및 무투여 군의 자돈은 실험기간 내 설사를 포함하여 어떠한 임상증상도 나타나지 않았으며, 바이러스 접종 및 무투여 군의 자돈들은 바이러스 접종 2일부터 실험종료시점 혹은 폐사시점까지 지속적으로 설사를 보였음.
- (나) 임상증상 결과, 비접종 그룹에서는 개체전체 생존하였고 바이러스 접종그룹 그룹에서는 80%, GC-100/GC-200/Gu-200 소재투여 그룹에서는 100%의 생존율을 확인하였음.
- (다) 실험기간 동안 섭취율은 비접종 그룹을 제외한 나머지 실험그룹 모두 접종 후 기간이 지남에 따라 전체적으로 섭취율이 낮아졌으며, 특히 바이러스 접종

그룹은 PID3일 이후부터 급격히 낮아짐을 확인하였음. 그러나 투여그룹은 바이러스 접종그룹과 비교시 약 30%이상 섭취율이 높은 상태를 유지함으로써 소재 투여 시 바이러스 감염에 의한 식욕부진 및 체력저하 향상에 효능을 나타냄을 확인하였음.



[그림 20] 바이러스 전파 동물모델을 이용한 소재효능평가.

(라) 비접종 그룹을 제외한 나머지 실험그룹 모두에서 균집성과 수양성 설사가 정도의 차이를 나타내며 발생하였고 (GC-200/Semi-liquid  $\geq$  GC-100, Gu-200/Semi-liquid  $>$  Virus/liquid), 대용유 비섭취율은 각 그룹에서 PID3부터 섭취율이 떨어졌으며, 각 그룹 간에 있어 (GC-200  $\geq$  GC-100, Gu-200  $>$  Virus) 순으로 섭취율을 나타내었음.

10. PED 치료용 복합소재(combination) 제품기반의 최적화 비율 선정을 위한 Cell-based assay 이용한 항바이러스 효능검증

(1) 90종의 항바이러스 스크리닝을 통해 도출된 단일소재(감초 추출물)와 219종의 항염활성 스크리닝을 통해 도출된 단일소재(강화추출물, 감초추출물)에 대해 항바이러스 소재(감초추출물)+항염활성소재(커큐민)를 합제하여 항바이러스 효능을 cell-based assay를 수행하였음.

(2) 그 결과, 감초추출물 단독으로 세포에 처리하였을 때 세포독성은 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상인 반면, 복합제를 처리하였을 때의 세포독성은 1028  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 세포독성이 1.28배 낮아졌음.

(3) 세포병변억제 효능인  $\text{EC}_{50}$ 은 단독으로 처리하였을 때 493.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 반면, 복합



제를 하여 처리하였을 때 329.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 1.5배 높아졌음을 확인 하였고 SI 값도 1.62에서 3.11로 1.9배 상승함을 확인하였음.

(5) 감초추출물 단독으로 바이러스 처리시 항바이러스 및 항염활성으로 효능을 나타내지만, 항염활성이 매우 높은 커큐민 화합물과 합제하여 처리 시 항바이러스 및 항염활성이 증강되어 단독처리보다 복합제가 항바이러스 활성이 증강되는 것으로 사료됨.

- 종합적인 결과, 감초추출물+커큐민화합물의 복합제에 대하여 추후 항바이러스 및 항염효능 작용기전 연구를 수행 할 예정이며, 동물모델을 이용하여 복합제의 효능평가를 수행 할 예정임.

[표 12] 감초추출물, 커큐민 및 이의 복합제에 의한 항바이러스 효과.

Extract or compound	Cytotoxicity assay	Post-treatment assay		Simultaneous assay	
	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	EC <sub>50</sub> <sup>b</sup> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	SI <sup>c</sup>	EC <sub>50</sub> <sup>b</sup> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	SI <sup>c</sup>
GUWE	> 400	310.5 $\pm$ 4.3	> 1.3	353.1 $\pm$ 2.5	> 2.3
Cur (curcumin)	31.7 $\pm$ 5.6	-	-	17.1 $\pm$ 2.6	1.8
GUWE(9) + Cur (1)	108.7 $\pm$ 2.9	37.1 $\pm$ 8.3	2.9	72.8 $\pm$ 10.0	1.5
GUWE(8) + Cur (2)	46.3 $\pm$ 6.8	34.7 $\pm$ 1.8	1.3	66.1 $\pm$ 12.1	0.7
GUWE(7) + Cur (3)	43.9 $\pm$ 9.9	-	-	-	-
6-Azauridine <sup>d</sup>	13.4 $\pm$ 4.1	0.9 $\pm$ 0.7	14.8	-	-

<sup>a</sup>CC<sub>50</sub> : half maximal cytotoxic concentration

<sup>b</sup>EC<sub>50</sub> : half maximal effective concentration

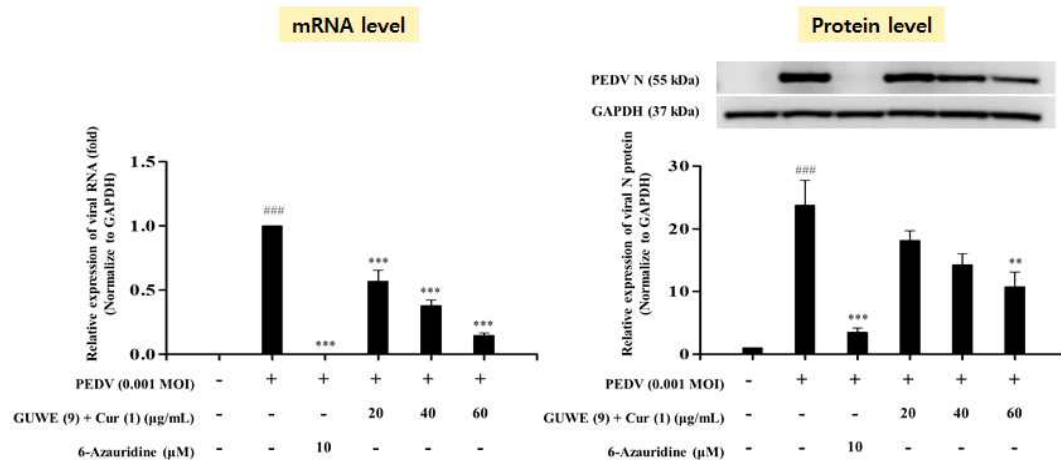
<sup>c</sup>SI : selective index, CC<sub>50</sub> / EC<sub>50</sub>

(가) 최종 검증된 단일소재(감초 추출물)와 단일화합물(커큐민)에 대해 항바이러스 소재(감초추출물)+항염활성소재(커큐민)를 비율 별로 합제하여 최적의 항바이러스 효능을 cell-based assay를 통해 수행하였음.

(나) 소재를 전처리 결과, 감초추출물 단독으로 세포에 처리하였을 때 세포독성은 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상인 반면, 복합제를 비율 별로 처리하였을 때의 세포독성은 108.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (9:1), 46.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (8:2), 43.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (7:3)으로 커큐민 함량이 증가할수록 세포독성도 증가됨을 나타내었다.

(다) 세포병변억제 효능인 EC50은 단독으로 처리하였을 때의 SI 값은 1.3 이상인 반면, 복합제를 비율 별로 처리하였을 때 2.9 (9:1) > 1.3 (8:2) > 독성 (7:3)으로 효능을 나타내었음.

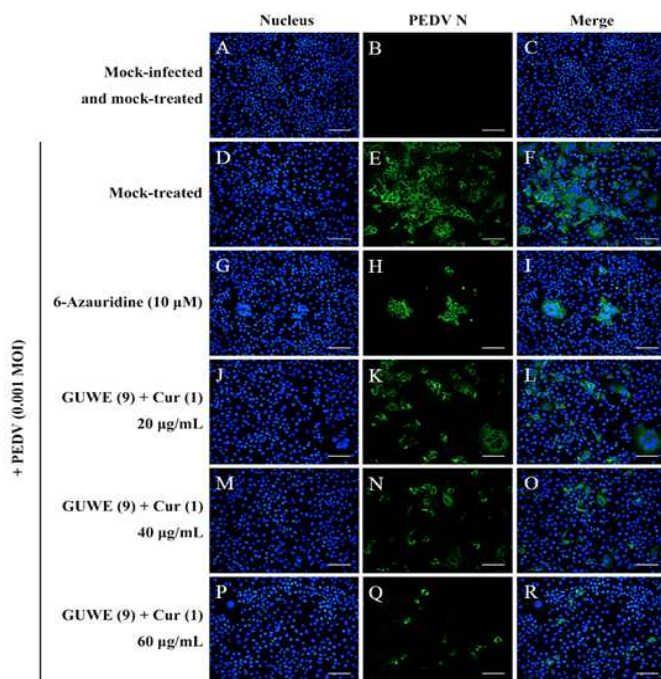
(라) 감초추출물 단독으로 바이러스 처리시 항바이러스 및 항염활성으로 효능을 나타내지만, 항염활성이 매우 높은 커큐민 화합물과 비율별로 합제하여 처리시 감초추출물과 커큐민 비율이 9:1 일때, 항바이러스 및 항염활성이 증강되어 타비율의 복합제를 처리할 때 보다 9:1 비율의 복합제가 가장 높은 항바이러스 활성을 나타냄을 확인하였음.



[그림 21] 감초추출물, 커큐민의 9:1 복합제에 의한 항바이러스 효과.

(마) 항바이러스 효능소재인 감초추출물 및 커큐민 복합제를 비율 별 효능평가를 통해 도출된 9:1 비율의 최적화 복합제에 대한 항바이러스 작용기전 연구를 수행한 결과, 타깃 바이러스 mRNA 및 PEDV N protein에 대해 농도의존적으로 저해함을 확인하였음.

(바) 감초추출물 및 커큐민 9:1 비율의 복합제에 대하여 PED 바이러스 N protein 타깃으로 면역형광염색법을 이용하여 항바이러스 효능을 육안적으로 확인한 결과, 양성대조군은 정상적으로 숙주세포에서 다수의 바이러스 감염이 됨을 확인하였고, 감초추출물 및 커큐민 9:1 비율의 복합제를 20 μg/mL, 40 μg/mL, 60 μg/mL로 처리하였을 때 농도 의존적으로 감염을 억제하는 것을 확인하였음.

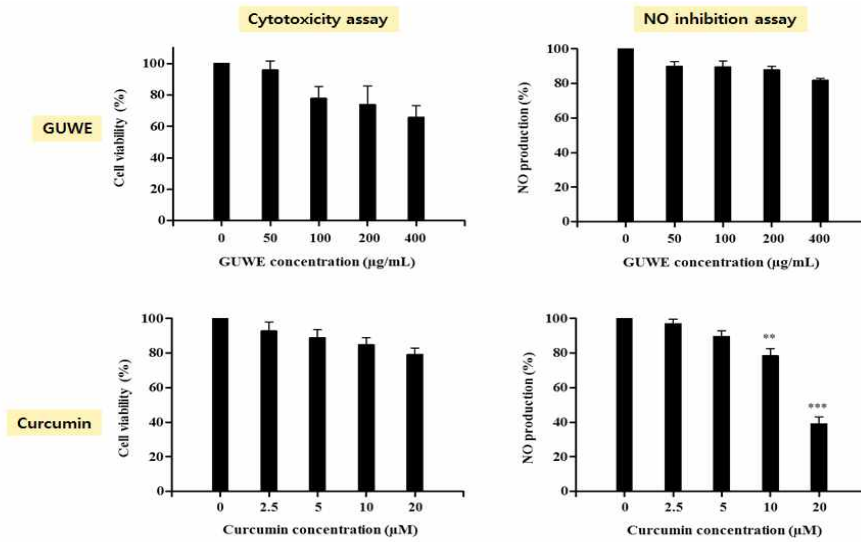


[그림 22] 감초추출물, 커큐민의 9:1 복합제에 의한 항바이러스 효과.

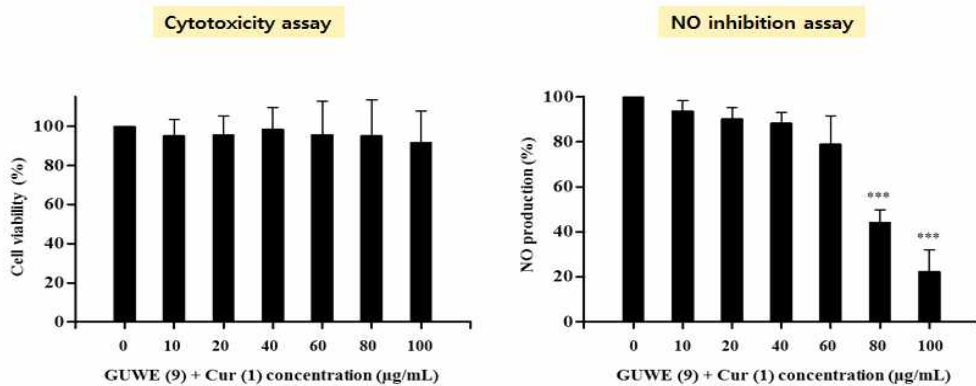
- 종합적인 결과, 독성을 나타내지 않는 감초추출물+커큐민화합물 9:1 비율의 복합제가 가장 높은 항바이러스 및 항염 활성을 나타내었으며, 작용기전 연구를 수행할 예정이며, 동물모델을 이용하여 복합제의 효능평가를 수행하였음.



11. PED 치료용 복합소재(combination) 제품기반의 Cell-based assay 이용한 항염활성 효능검증

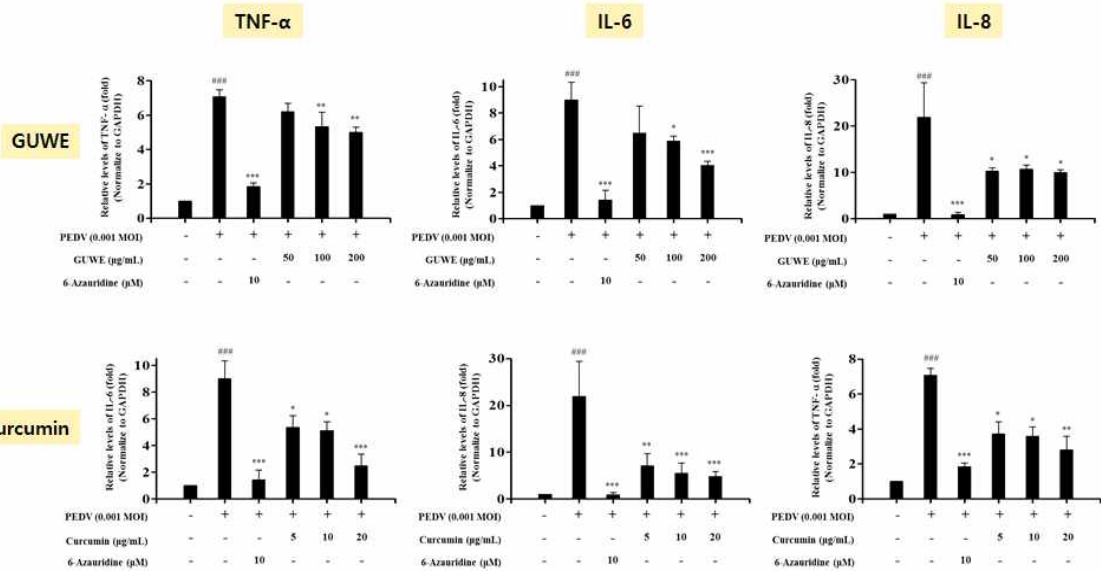


[그림 23] 감초추출물(GUWE), 커큐민 (curcumin)에 의한 세포 독성 및 NO 억제 효과.

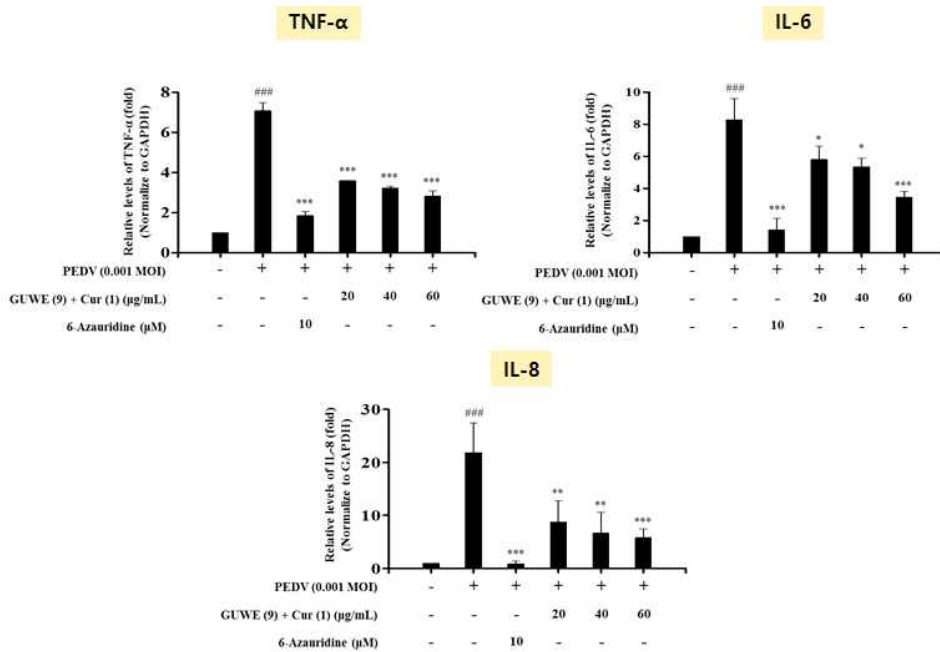


[그림 24] 감초추출물(GUWE) 및 커큐민 (curcumin) 9:1 복합제에 의한 세포 독성 및 NO 억제 효과.

- (1) 세포독성을 통해 영향이 없는 수준의 농도에서 RAW264.7 세포에서 LPS를 처리하여 NO 생성을 유도시킨 후 감초열수추출물, 커큐민, 감초추출물(9):커큐민(1) 복합제를 농도 별로 처리 시 감초추출물 단독 처리 시 400 µg/mL에서도 항염활성을 나타내지 않았고, 커큐민 20 µM에서 60%의 NO생성 저해능을 나타내었다.
- (2) 반면, 감초추출물 및 커큐민 9:1 비율의 복합제를 처리했을 때 100 µg/mL에서 약 80%의 NO생성을 저해 하였고, 농도 의존적으로 NO생성 저해능을 나타냄을 확인하였음.



[그림 25] 감초추출물(GUWE) 및 커큐민 (curcumin)에 의한 pro-inflammatory cytokine 억제 효과.



[그림 26] 감초추출물(GUWE) 및 커큐민 (curcumin) 9:1 복합제에 의한 pro-inflammatory cytokine 억제 효과.

(3) 세포독성을 통해 영향이 없는 수준의 농도에서 Vero 세포에서 PEDV를 접종하여 감염시킨 후 감초추출물, 커큐민, 감초추출물(9):커큐민(1) 복합제를 농도별로 처리 후 pro-inflammatory cytokine (TNF-α, IL-6, IL-8) 억제능을 평가한 결과, 감초추출물 단독 처리 시 200 μg/mL에서 TNF-α를 제외한 IL-6, IL-8을

저해시킴을 확인 할 수 있었고, 커큐민 20  $\mu$ M 단독 처리 시 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 모두 높은 저해율을 나타내었음.

(4) 반면, 감초추출물 및 커큐민 9:1 비율의 복합제와 감초추출물 단독 처리했을 때와 비교 시 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8을 약 30% 염증성 사이토카인을 저해함을 확인하여, 단독소재 처리보다 항염증 소재를 포함한 복합제에서 항염증 효과가 증감됨을 확인하였음.

## 12. PED 치료용 최적화 비율의 복합제(감초추출물(9)+커큐민(1))의 감염 및 감염전파 동물모델에서 항바이러스 효능평가

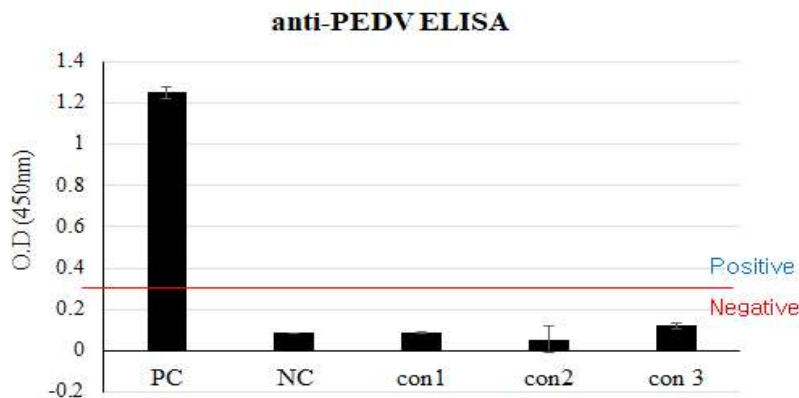
(1) 항바이러스 활성 단일소재(감초추출물)와 항염활성 단일소재인 강황추출물의 단일물질인 커큐민 복합제의 전파동물모델을 이용한 효능평가

(2) 바이러스(Aram strain) 및 신생자돈

(가) 구제역 및 돼지열병 예방접종(모돈)을 한 신생자돈(3일령)을 농가에서 구입하여, 3일간 순치기간 동안 설사를 포함한 질병의 유무와 특히 임상증상이 없음을 확인 후 실험동물로 사용하였음.

(나) 동물실험 수행 시 아이슬레이터의 온도(30 $^{\circ}$ C) 및 습도(50%)를 유지하였음

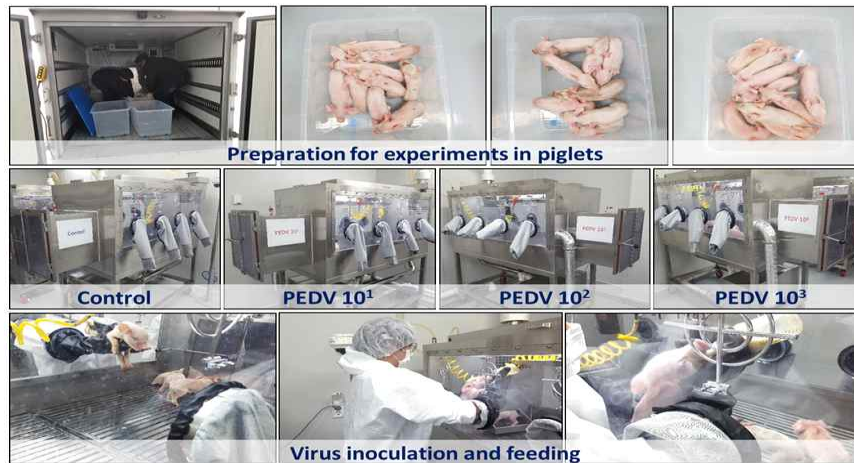
(다) 실험에 사용 될 신생자돈 각 그룹 5마리에 대하여 분변을 채취 후 RT-PCR 검사 및 혈액 내 항체가 검사를 수행하여 음성자돈임을 확인 후 실험에 사용하였음.



[그림 27] 감초추출물(GUWE) 및 커큐민 (curcumin) 9:1 복합제에 항 PEDV 항체 저해 효과를 검사하기 위한 ELISA를 이용한 혈청 내 항체 검사. 빨강 선은 항 PEDV 혈청 유무 최소선.

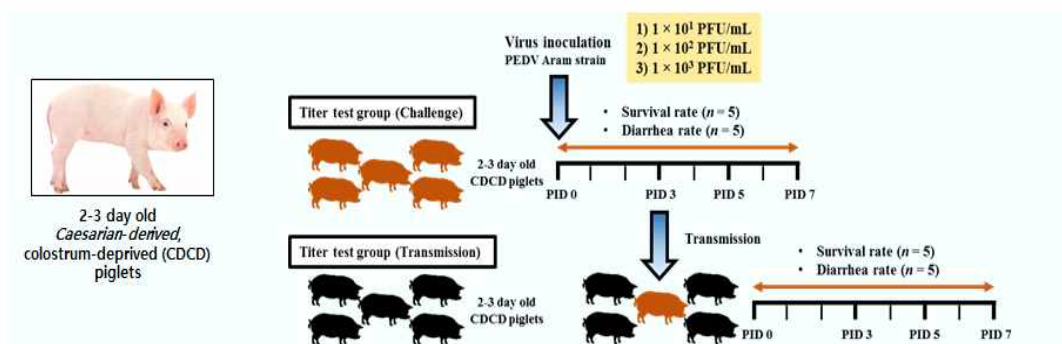
(3) 바이러스 감염동물모델 실험설계, 임상증상 및 육안소견

1) Mock (5n) : 비접종 그룹    2) Titer  $1 \times 10^1$  PFU/mL (5n)    3) Titer  $1 \times 10^2$  PFU/mL (5n)    4) Titer  $1 \times 10^3$  (5n)



[그림 28] 전과모델 준비 및 적정 바이러스량 검사 모식도.

- 기 구축된 바이러스 감염동물모델을 기반으로 소재 최종평가 전 포유자돈을 대상으로 바이러스 접종량 테스트를 수행하였음.



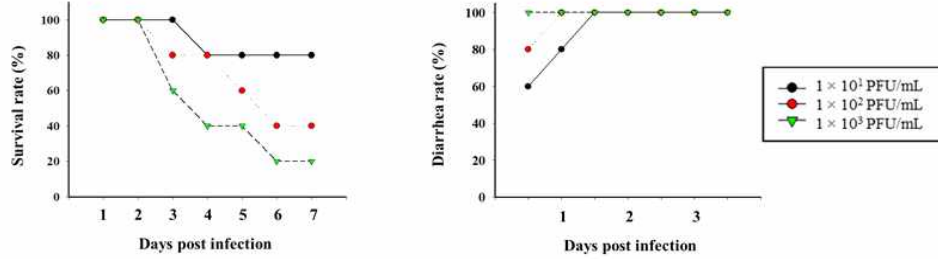
[그림 29] 전과모델을 이용한 적정 바이러스량 검사 모식도.

- (가) 기 구축된 바이러스 감염동물모델을 기반으로 PED 바이러스는 구강 접종 방법으로 수행하였고, 감염 후 설사 개시일과 종료일을 매일 확인 및 설사 정도는 스코어 1~4까지로 육안으로 확인 후 기록하였음.

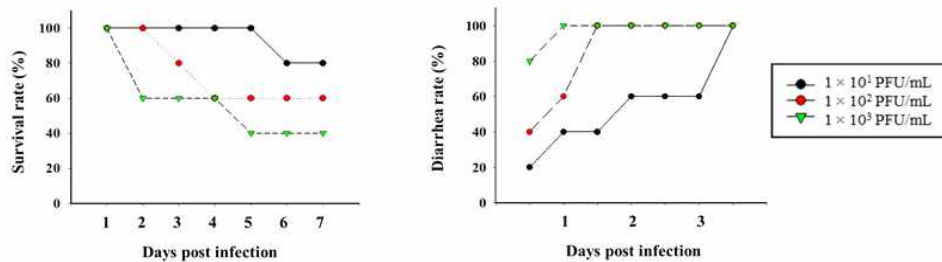


[그림 29] PEDV 전과모델을 이용한 항바이러스제 효능 검사 모식도.

➤ Challenge model



➤ Transmission model

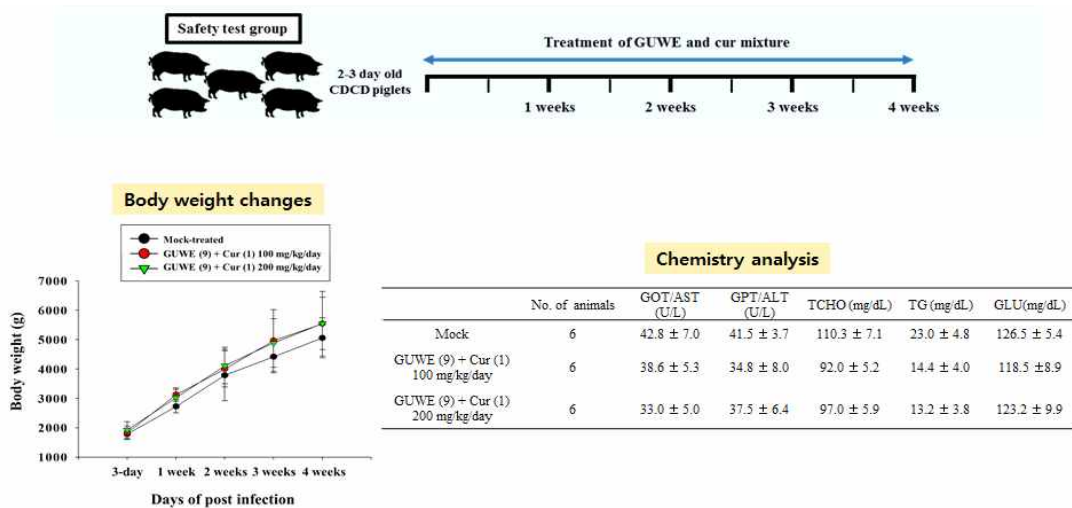


[그림 30] PEDV 감염 및 전파모델에서 바이러스 역가에 따른 임상증상 차이.

(나) 바이러스 접종량 테스트를 수행 한 결과, LD<sub>50</sub> 및 바이러스 접종 후 설사정도를 확인 후 바이러스 접종모델은 Titer 1×10<sup>1</sup> PFU/mL 및 바이러스 전파감염모델은 Titer 1×10<sup>2</sup> PFU/mL로 최종 선정하였음.

(4) 감초열수추출물 및 커큐민 혼합제(9:1)의 안전성 평가수행

- 1) 혈액화학분석 (5항목)
- 2) 장기무게 변화 (8종 장기)



[그림 31] PEDV 전파모델에서 감초열수추출물(GUWE) 및 커큐민(curcumin) 9:1 혼합제에 의한 따른 임상증상 개선 효과.



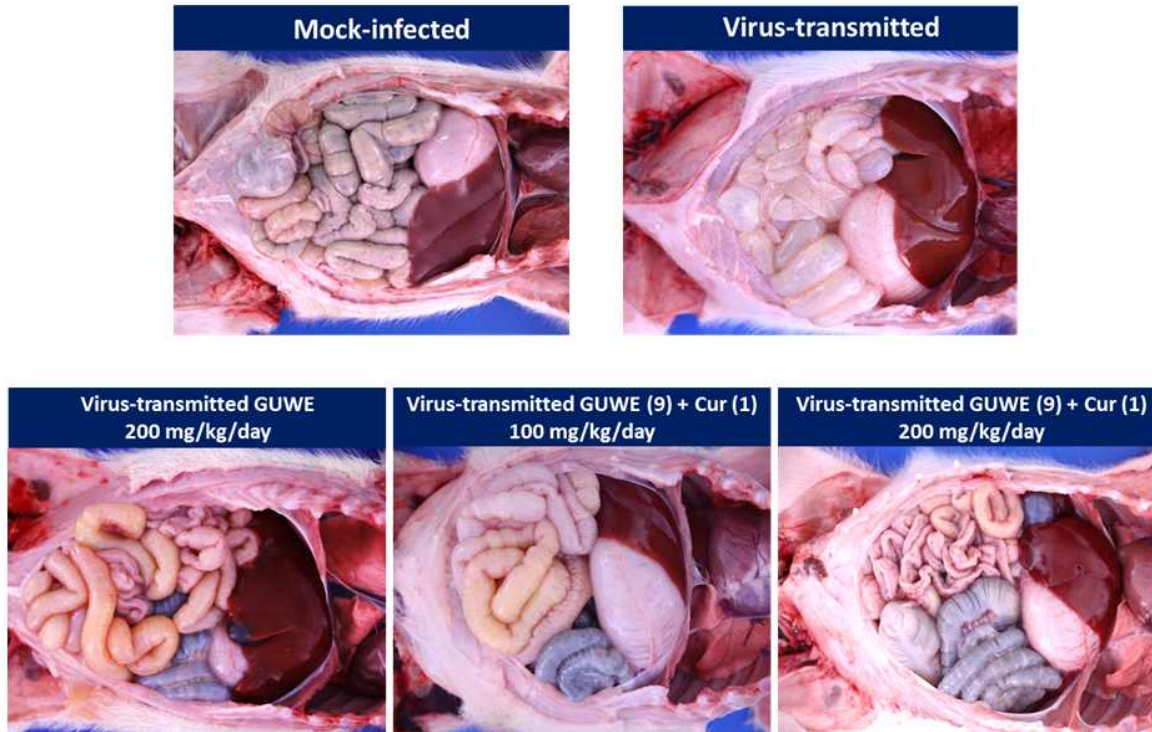
- (가) 감초열수추출물 및 커큐민 혼합제(9:1)를 4주간 경구투여 후 체중변화 및 혈액을 채취 후 혈액화학분석을 수행하였음.
- (나) 수행결과, 음성대조군과 비교 시 100 mg/kg/day 및 200 mg/kg/day 소재를 4주가 투여한 그룹에서의 체중변화는 농도 의존적으로 약 400 g의 증체율을 나타내었고, 소재 투여 그룹간의 체중변화는 없었음.
- (다) 소재를 4주간 투여한 각 그룹에서 혈액을 채취하여 5항목(GOT/AST, GPT/ALT, TCHO, TG, GLU)에 대하여 혈액분석 결과 정상범위 내 수치가 나타내어 소재에 대한 예비 안전성을 확인하였음.

[표 13] 감초추출물, 커큐민 9:1 복합제에 의한 안전성 평가 결과

Sex	GUWE (9)+ Cur (1)	No. of animals	Relative organ-to-body weight (mean ± standard deviation)								
			Liver (%)	Kidney-left (%)	Kidney-right (%)	Lung (%)	Spleen (%)	Heart (%)	Adrenal gland (%)	Testis (%)	Ovary (%)
Male	Mock	3	3.36 ± 0.44	0.31 ± 0.04	0.29 ± 0.05	1.25 ± 0.25	0.20 ± 0.01	0.74 ± 0.09	0.01 ± 0.02	0.10 ± 0.03	-
	100 mg/kg/day	3	2.90 ± 0.36	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.02	1.34 ± 0.15	0.20 ± 0.02	0.64 ± 0.04	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02	-
	200 mg/kg/day	3	2.66 ± 0.34	0.29 ± 0.02	0.28 ± 0.03	1.26 ± 0.13	0.18 ± 0.02	0.63 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	-
Female	Mock	3	3.34 ± 0.23	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.03	1.29 ± 0.03	0.28 ± 0.07	0.70 ± 0.10	0.01 ± 0.00	-	0.002 ± 0.00
	100 mg/kg/day	3	2.61 ± 0.35	0.41 ± 0.09	0.41 ± 0.08	1.36 ± 0.20	0.19 ± 0.03	0.69 ± 0.06	0.01 ± 0.00	-	0.001 ± 0.00
	200 mg/kg/day	3	2.86 ± 0.43	0.33 ± 0.01	0.35 ± 0.04	1.25 ± 0.04	0.16 ± 0.03	0.71 ± 0.04	0.01 ± 0.00	-	0.002 ± 0.00

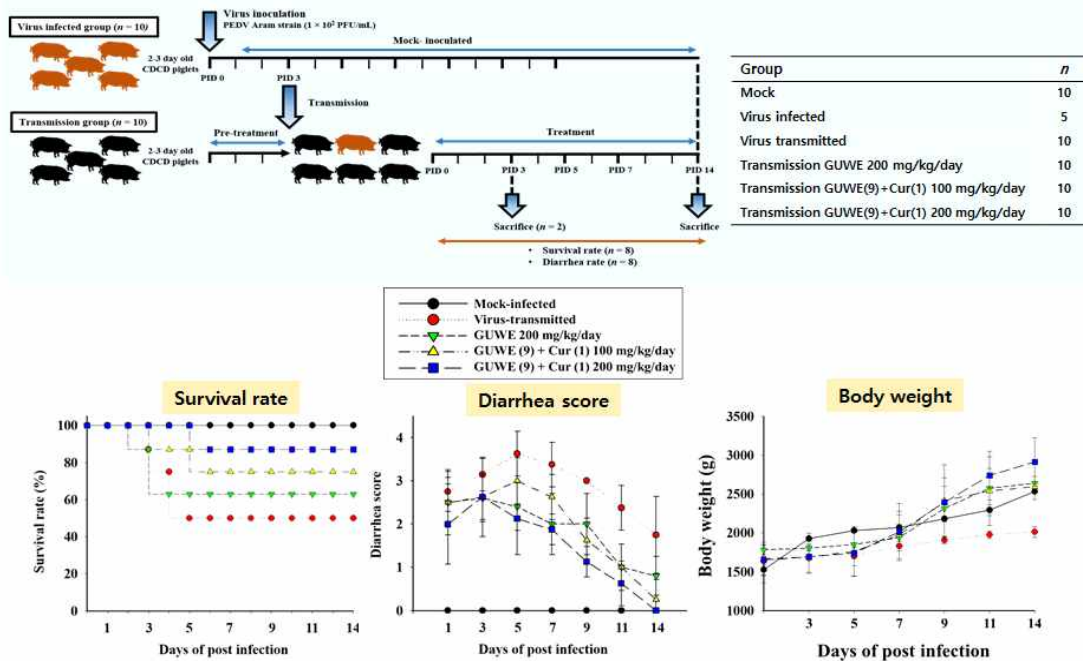
- (라) 감초열수추출물 및 커큐민 혼합제(9:1)를 4주간 경구투여 후 부검을 통해 채취한 8종 장기(liver, lung, kidney, spleen, heart, adrenal gland, testis, ovary)에 대해 육안적 검사 및 무게를 측정된 결과, 음성대조군과 비교 시 100 mg/kg/day 및 200 mg/kg/day 소재를 투여한 그룹에서의 장기무게 변화 및 육안적 특이소견은 발견되지 않아 소재에 대한 예비 안전성을 확인하였음.
- (5) 항바이러스 활성 단일소재(감초추출물)와 항염활성 단일소재인 강황추출물의 단일물질인 커큐민 복합제의 전파동물모델을 이용한 효능평가
  - (가) 소재효능 시험군에 5일간 시험소재를 경구투여 후 3일령 포유자돈(5n)에  $1 \times 10^2$  PFU/mL titer로 경구접종 후 설사유발이 발생한(PID2) 접종군 자돈(1n)을 비접종 시험그룹(5n)에 합사를 시킨 후 14일간 소재를 투여한 정상자돈에서 바이러스에 대한 전파방어 및 치료효능을 평가 수행하였음.
  - (나) 바이러스 접종 후 4시간 간격으로 시험자돈의 임상증상을 관찰하였고, 정기적으로 분변채취 및 분변점도를 확인하였음.
  - (다) 실험수행 중 각 그룹에서의 설사유무, 구토, 섭취율, 군집성, 원기손실 및 폐사율을 확인하였으며, 안락사 및 사망한 시험자돈을 대상으로 부검을 하여 혈액, 소장(십이지장, 공장, 회장)에서 장벽(수양성 설사 시 용모의 위축과 탈락으로 장벽이 얇아져 내용물이 보임) 상태를 확인하였고, 장간막 림프절 등 특정 대상장기를 채취 후 시험분석을 수행하였음.





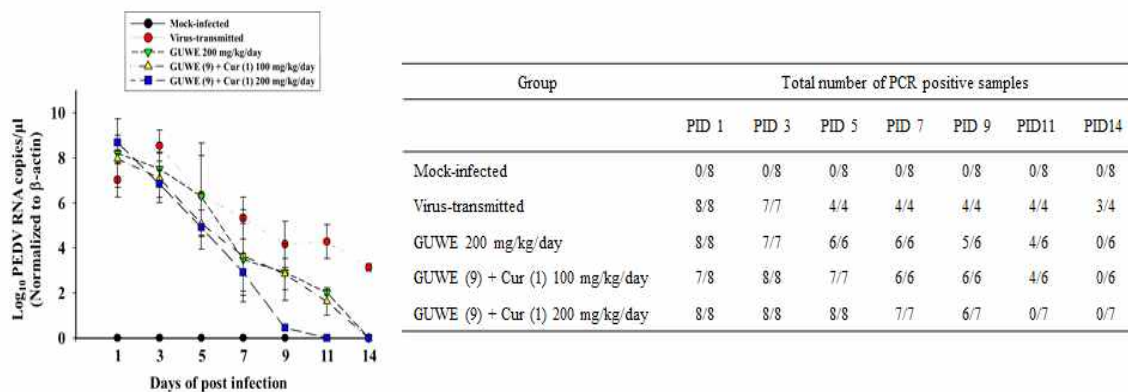
[그림 32] PEDV 전과모델에서 감초열수추출물(GUWE) 및 커큐민(curcumin) 9:1 혼합제에 의한 육안적 소장병변 개선 효과.

- (라) 육안적 임상증상 : 바이러스 비접종 및 무투여 군의 자돈은 실험기간 내 설사를 포함하여 어떠한 임상증상도 나타나지 않았으며, 바이러스 접종 및 무투여 군의 자돈들은 바이러스 접종 1일부터 실험종료시점 혹은 폐사시점까지 지속적으로 설사를 보였음.
- (마) 실험기간 동안 섭취율은 비접종 그룹을 제외한 나머지 실험그룹 모두 접종 후 기간이 지남에 따라 전체적으로 섭취율이 낮아졌으며, 특히 바이러스 접종 그룹은 PID3일 이후부터 급격히 낮아짐을 확인하였음. 그러나 투여그룹은 바이러스 접종그룹과 비교 시 약 30%이상 섭취율이 높은 상태를 유지함으로써 소재투여 시 바이러스 감염에 의한 식욕부진 및 체력저하 향상에 효능을 나타냄을 확인하였음.
- (바) 비접종 그룹을 제외한 나머지 실험그룹 모두에서 군집성과 수양성 설사가 정도의 차이를 나타내며 발생하였고 (복합제 200 mg/kg/day/Semi-liquid  $\geq$  복합제 100 mg/kg/day, 감초열수추출물 200 mg/kg/day/Semi-liquid > Virus/liquid), 대용유 비섭취율은 각 그룹에서 PID3부터 섭취율이 떨어졌으며, 각 그룹 간에 있어 복합제 고용량 그룹 > 복합제 저용량 그룹 > 감초열수추출물 > 바이러스 대조군 순으로 섭취율을 나타내었음.



[그림 33] PEDV 전파모델을 이용한 감초열수추출물(GUWE) 및 커큐민(curcumin) 9:1 혼합제에 의한 임상소견 개선 효과.

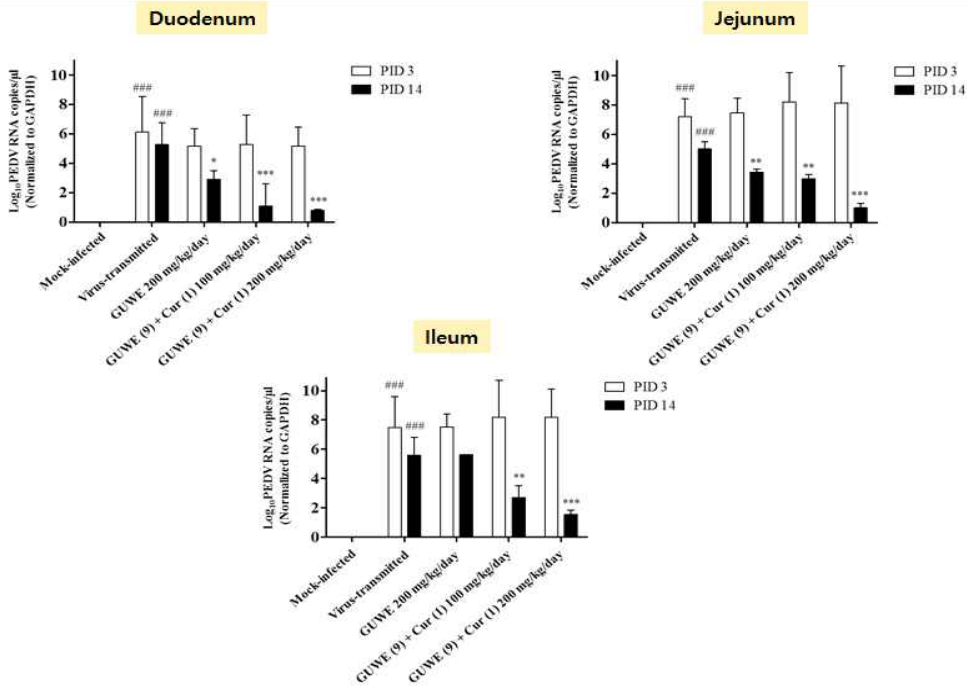
(사) 바이러스 대조군과 비교 시 100 mg/kg/day 및 200 mg/kg/day 소재를 투여한 그룹의 생존율은 복합제 고용량 그룹 > 복합제 저용량 그룹 > 감초열수추출물 > 바이러스 대조군 순으로 생존율이 나타났으며, 설사정도 및 체중 변화도 생존율 그룹과 같게 나타났음.



[그림 34] PEDV 전파모델을 이용한 감초열수추출물(GUWE) 및 커큐민(curcumin) 9:1 혼합제에 의한 분변을 통한 바이러스 배출 개선 효과.

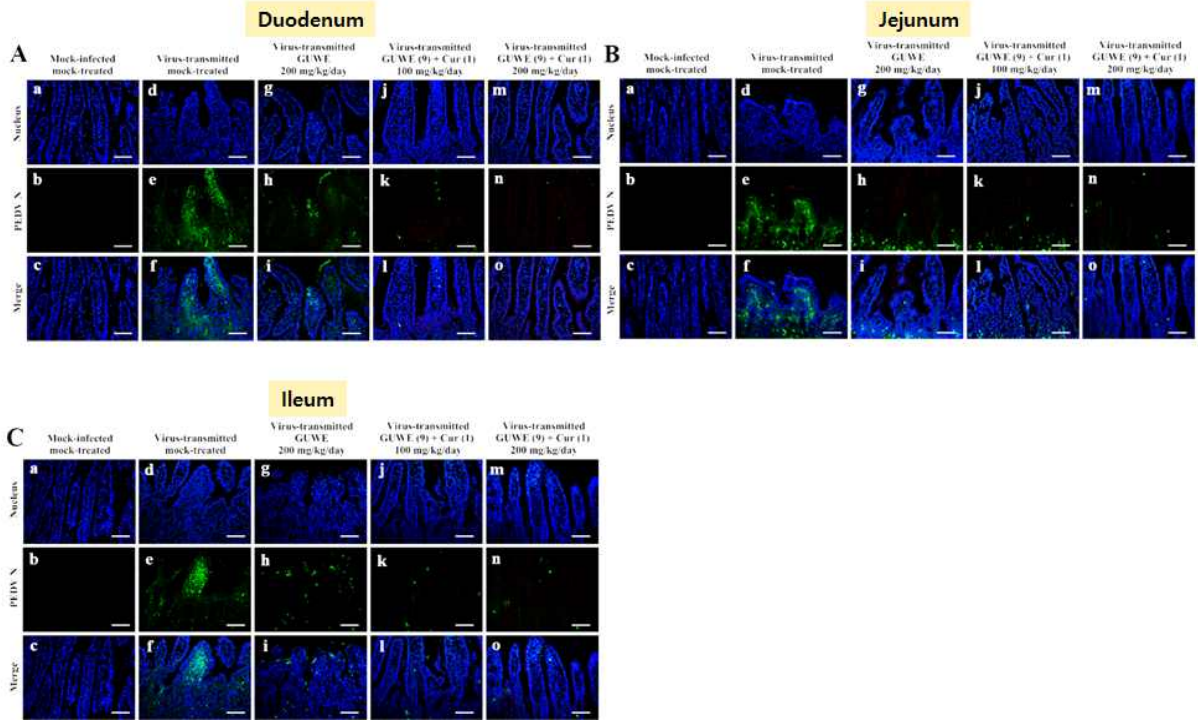
(아) 수행기간 내 정기적으로 분변을 채취하여 q-PCR을 이용하여 PEDV RNA를 타깃으로 바이러스 정량 및 정성검사를 수행한 결과, PID1부터 바이러스가 검출되었고, 종료시점인 PID14에는 복합제 고용량 그룹 > 복합제 저용량

그룹 > 감초열수추출물 > 바이러스 대조군 순으로 바이러스 검출량이 현저히 감소함을 확인하였음.



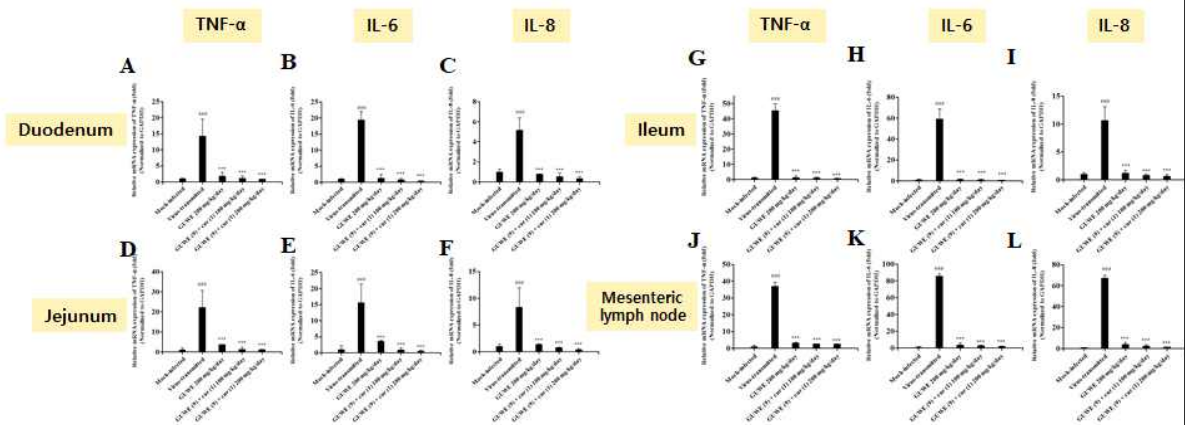
[그림 35] PEDV 전파모델을 이용한 감초열수추출물(GUWE) 및 커큐민(curcumin) 9:1 혼합제에 의한 소장 내 바이러스 개선 효과.

- (자) 수행기간 PID3 및 PID14에 부검을 통해 소장부위(십이지장, 공장, 회장)을 채취하여 조직 내 바이러스를 q-PCR을 이용하여 바이러스 정량검사 및 면역형광염색법을 이용하여 장기 바이러스 검출검사를 수행한 결과, 전 그룹에서 소장 조직 내 바이러스 검출량이 PID3에서 PID14까지 줄어들었고, 특히 감초열수추출물 및 커큐민을 9:1 비율의 고용량 그룹에서 바이러스 검출량이 현저히 줄어들었고, 면역형광염색법으로 분석 시 소장부위(십이지장, 공장, 회장) 모두 바이러스 그룹에 비해 소재투여 그룹에서 현저히 바이러스가 감소됨을 확인하였음.
- (차) 또한 소장조직 및 림프조직 내 pro-inflammatory cytokine(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8)도 바이러스 대조군과 비교 시 소재투여 그룹 모두에서 현저히 억제됨을 확인하였음.
- (카) 소장 조직 내 바이러스 검출량, 면역형광염색법 및 염증성 사이토카인을 분석 시 복합제 고용량 그룹 > 복합제 저용량 그룹 > 감초열수추출물 > 바이러스 대조군 순으로 바이러스 검출량이 현저히 감소함을 확인하였음.



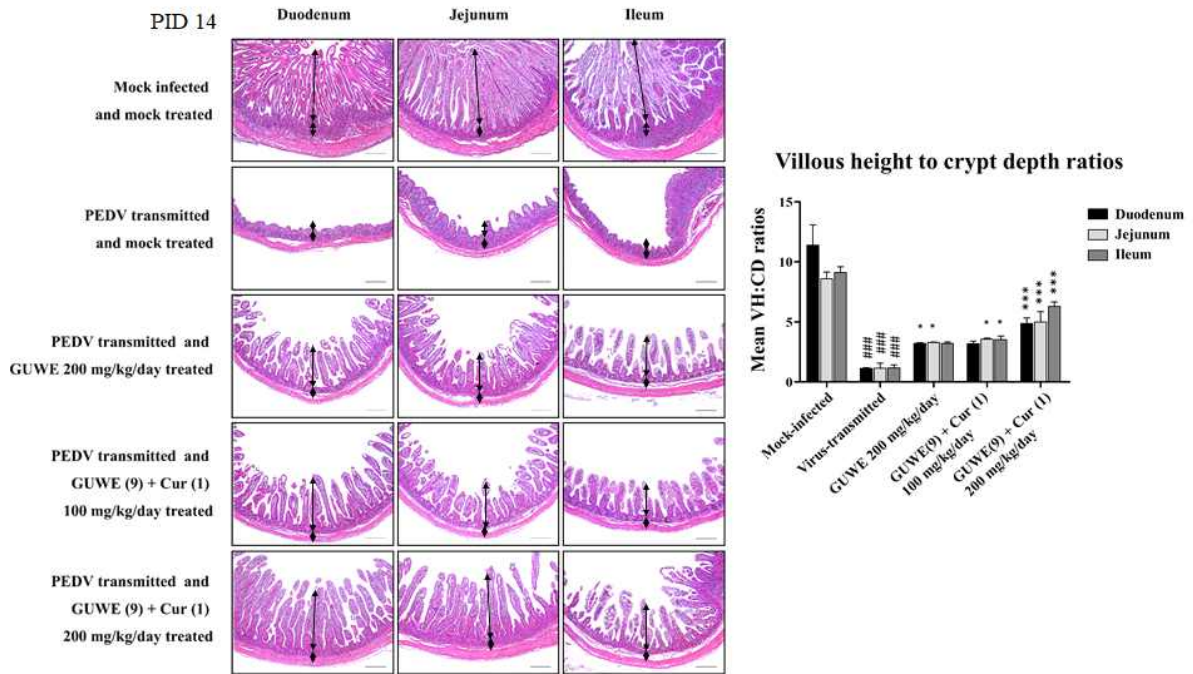
[그림 36] PEDV 전파모델을 이용한 감초열수추출물(GUWE) 및 커큐민(curcumin) 9:1 혼합제에 의한 소장 내 바이러스 개선 효과.

(6) 항바이러스 활성 단일소재(감초추출물)와 항염활성 단일소재인 강황추출물의 단일물질인 커큐민 복합제의 전파동물모델에서의 소장병변 개선효과



[그림 37] PEDV 전파모델을 이용한 감초열수추출물(GUWE) 및 커큐민(curcumin) 9:1 혼합제에 의한 소장 및 장간막 림프절 내 pro-inflammatory cytokine 개선 효과.





[그림 38] PEDV 전파모델을 이용한 감초열수추출물(GUWE) 및 커큐민(curcumin) 9:1 혼합제에 의한 소장 내 조직학적 병변 개선 효과.

- (가) 감초열수추출물 및 커큐민 혼합제(9:1)에 의한 PED 바이러스 소장병변 개선 효과는,
- (나) 바이러스 비접종 및 무투여 그룹을 제외한 시험 전 그룹의 자돈에서 특징적 증상은 침울, 설사 직전/후 식욕부진, 구토를 보였으며 심한 수양성 설사로 인한 탈수로 인해 체중감소 및 빠른 사망률을 나타냈으며 사망한 시험자돈의 특징적 부검소견은 소장내 액체가 차있고, 장막이 얇아져 내용물이 육안적으로 보임을 관찰되었음.
- (다) 실험종료 시 전체 실험군 자돈을 부검을 통하여 소장(십이지장, 공장, 회장)의 각 부위를 채취한 후 중성 포르말린에 고정 후 파라핀에 포매하여 4  $\mu$ m의 절편을 제작하여, Hematoxylin & eosin 염색 후 광학현미경으로 병변정도를 분석하였음.
- (라) 바이러스 비접종 및 무투여 그룹의 소장은 용모가 정상의 손가락 모양으로 길쭉길쭉하였으며, 음와는 정상의 크기를 보였음.
- (마) 이와 반면에 바이러스 접종 및 무투여 군의 자돈에서는 바이러스가 소장 용모상피세포에 증식하여 용모상피세포를 탈락시킴으로서 결과적으로 용모의 길이가 위축되고 융합되며, 탈락된 용모를 대체하기 위하여 음와의 증식이 저명하게 관찰되었음. 또한 점막 고유내에 충혈 및 출현이 관찰되었고 단핵세포의 침윤이 관찰되었음.
- (바) PED 바이러스 접종 후 감초열수추출물 200 mg/kg/day, 감초열수추출물 및

커큐민 혼합제(9:1)를 100 mg/kg/day, 200 mg/kg/day로 투여한 실험군에서는 바이러스 접종 및 무투여군에 비해 용모의 길이가 전체적으로 증가했으며, 특히 복합제 고농도 투여군에서 용모가 정상 손가락 모양으로 증가됨을 확인하였으며, 음와의 크기도 정상의 크기로 보임을 확인하였음.

### 13. PED 치료용 최적화 비율의 복합제(감초추출물(9)+커큐민(1))의 감염 동물모델에서 항바이러스 효능평가

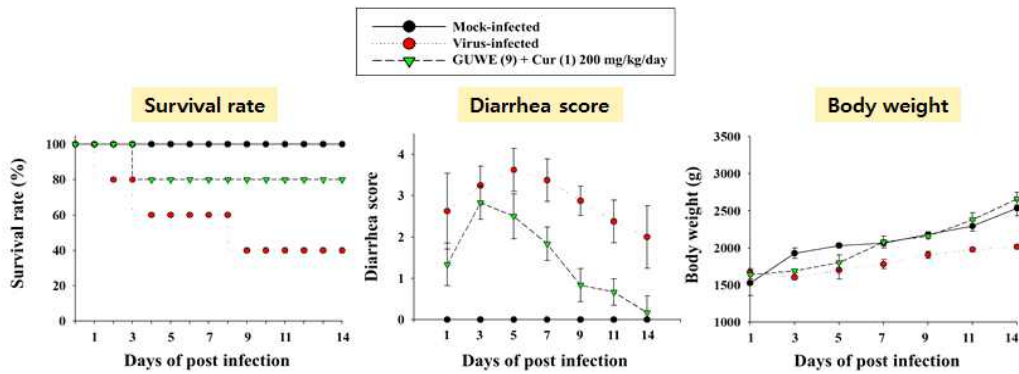
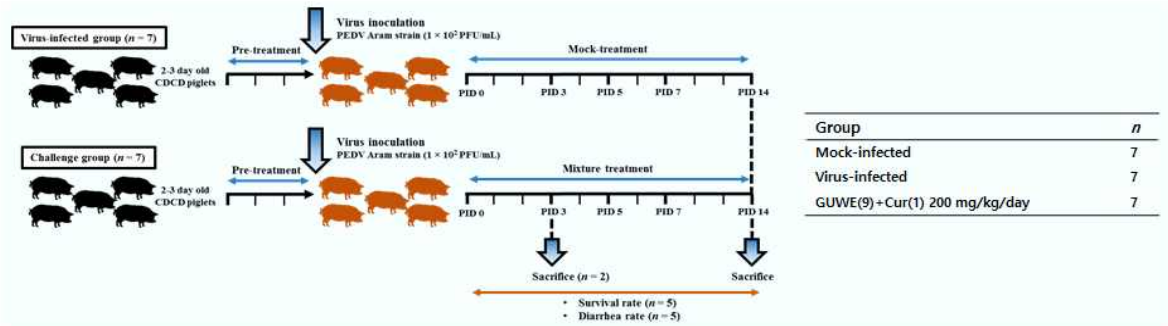
(1) 동물실험은 기 구축된 방법으로 동일조건으로 수행하였음.



[그림 39] PEDV 감염모델을 이용한 항바이러스 개선효과 검사 모식도.

- (가) 기 구축된 바이러스 감염동물모델을 기반으로 PED 바이러스는 구강 접종 방법으로 수행하였고, 감염 후 설사 개시일과 종료일을 매일 확인 및 설사 정도는 스코어 1~4까지로 육안으로 확인 후 기록하였음.
- (나) 바이러스 접종 후 4시간 간격으로 시험자돈의 임상증상을 관찰하였고, 정기적으로 분변채취 및 분변점도를 확인하였음.
- (다) 실험수행 중 각 그룹에서의 설사유무, 구토, 섭취율, 군집성, 원기손실 및 폐사율을 확인하였으며, 안락사 및 사망한 시험자돈을 대상으로 부검을 하여 혈액, 소장(십이지장, 공장, 회장)에서 장벽(수양성 설사 시 용모의 위축과 탈락으로 장벽이 얇아져 내용물이 보임) 상태를 확인하였고, 장간막 림프절 등 특정 대상장기를 채취 후 시험분석을 수행하였음.





[그림 39] PEDV 감염모델을 이용한 감초열수추출물(GUWE) 및 커큐민(curcumin) 9:1 혼합제에 의한 임상증상 개선 효과.

(라) 바이러스 대조군과 비교 시 100 mg/kg/day 및 200 mg/kg/day 소재를 투여한 그룹의 생존율은 복합제 고용량 그룹 > 복합제 저용량 그룹 > 감초열수추출물 > 바이러스 대조군 순으로 생존율이 나타났으며, 설사정도 및 체중 변화도 생존율 그룹과 같게 나타났음.



[그림 40] PEDV 감염모델을 이용한 감초열수추출물(GUWE) 및 커큐민(curcumin) 9:1 혼합제에 의한 소장 병변 개선 효과.

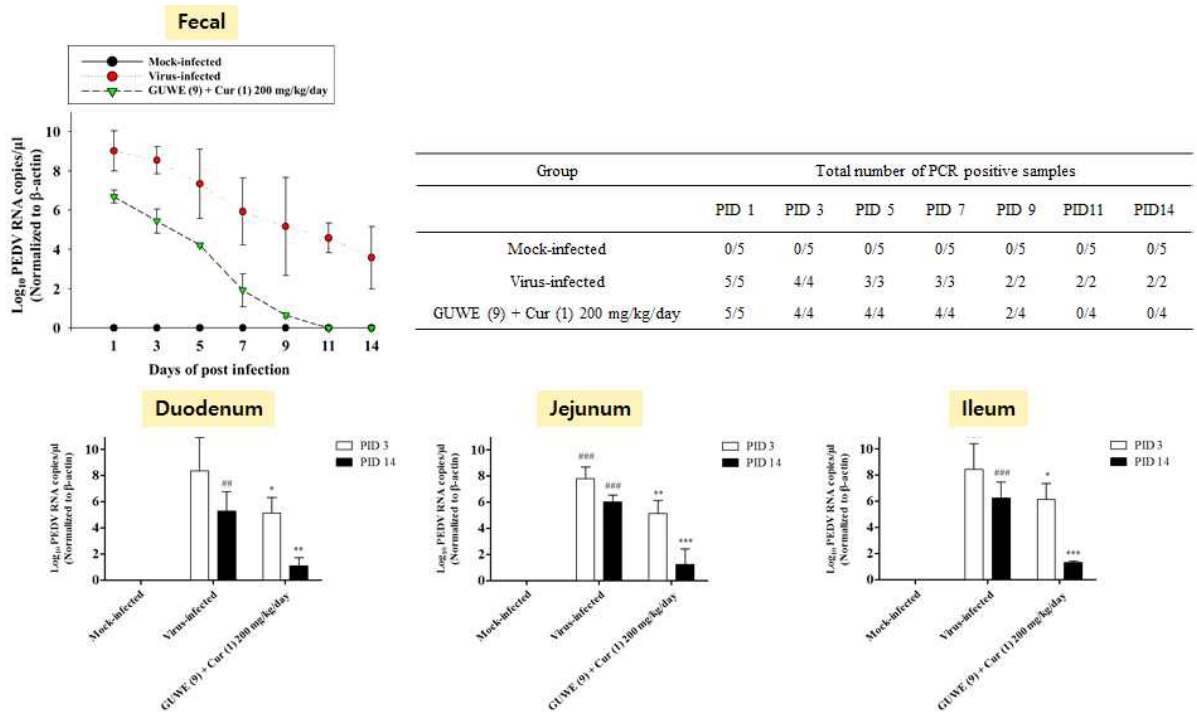
(2) 육안적 임상증상

(가) 바이러스 비접종 및 무투여 군의 자돈은 실험기간 내 설사를 포함하여 어떠한 임상증상도 나타나지 않았으며, 바이러스 접종 및 무투여 군의 자돈들은

바이러스 접종 1일부터 실험종료시점 혹은 폐사시점까지 지속적으로 설사를 보였음.

(나) 실험기간 동안 설취율은 비접종 그룹을 제외한 나머지 실험그룹 모두 접종 후 기간이 지남에 따라 전체적으로 설취율이 낮아졌으며, 특히 바이러스 접종 그룹은 PID3일 이후부터 급격히 낮아짐을 확인하였음. 그러나 투여그룹은 바이러스 접종그룹과 비교 시 약 30%이상 설취율이 높은 상태를 유지함으로서 소재투여 시 바이러스 감염에 의한 식욕부진 및 체력저하 향상에 효능을 나타냄을 확인하였음.

(다) 비접종 그룹을 제외한 실험그룹에서 균집성과 수양성 설사가 정도의 차이를 나타내며 발생하였고 (복합제 200 mg/kg/day/Semi-liquid > Virus/liquid), 대용유 비설취율은 각 그룹에서 PID3부터 설취율이 떨어졌으며, 각 그룹 간에 있어 복합제 200 mg/kg/day 투여그룹 > 바이러스 대조군 순으로 설취율을 나타내었음.

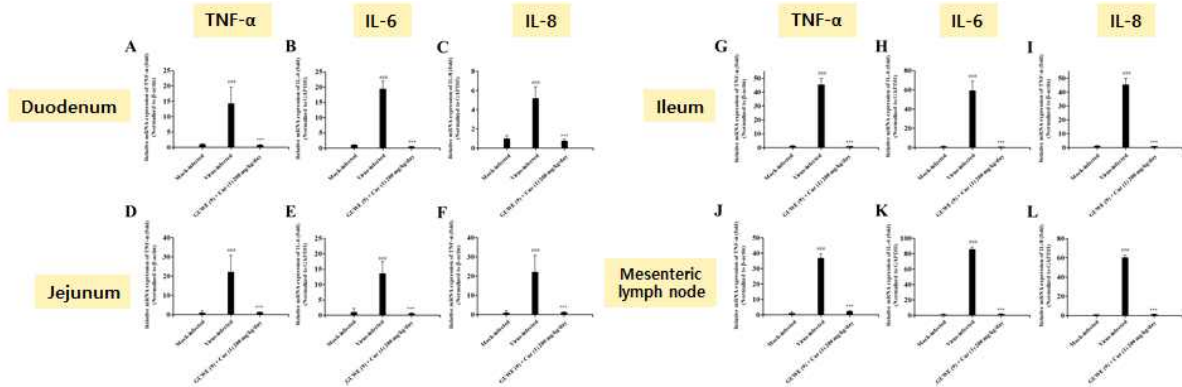


[그림 41] PEDV 감염모델을 이용한 감초열수추출물(GUWE) 및 커큐민(curcumin) 9:1 혼합제에 의한 분변 및 소장 조직에서 바이러스 배출 및 증식 개선 효과.

(라) 수행기간 내 정기적으로 분변을 채취하여 q-PCR을 이용하여 PEDV RNA를 타겟으로 바이러스 정량 및 정성검사를 수행한 결과, PID1부터 바이러스가 검출되었고, 종료시점인 PID14에는 복합제 200 mg/kg/day 그룹 > 바이러스 대조군 순으로 바이러스 검출량이 현저히 감소함을 확인하였음.

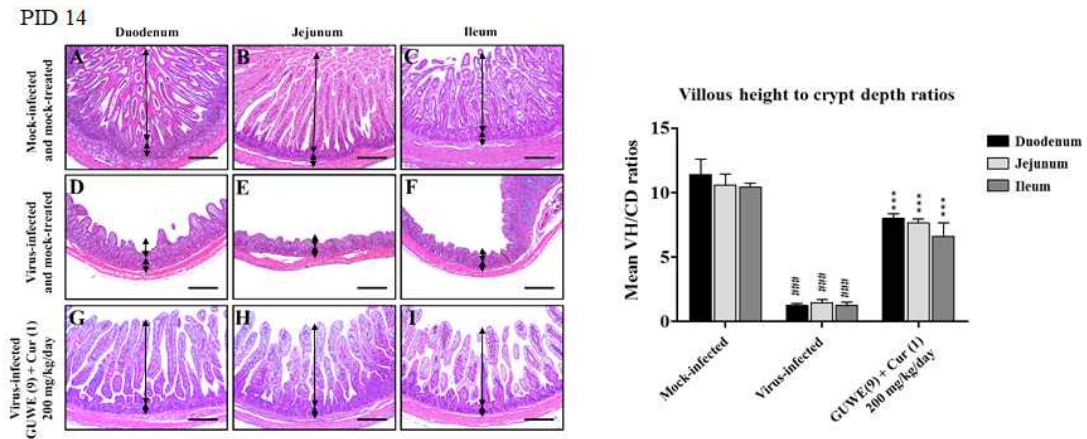
(마) 수행기간 PID3 및 PID14에 부검을 통해 소장부위(십이지장, 공장, 회장)을

채취하여 조직 내 바이러스를 q-PCR을 이용하여 바이러스 정량검사를 수행한 결과, 전 그룹에서 소장 조직 내 바이러스 검출량이 PID3에서 PID14까지 줄어들었고, 특히 감초열수추출물 및 커큐민을 9:1 비율의 200 mg/kg/day 그룹에서 바이러스 검출량이 현저히 감소함을 확인하였음.



[그림 42] PEDV 감염모델을 이용한 감초열수추출물(GUWE) 및 커큐민(curcumin) 9:1 혼합제에 의한 소장 및 장간막 림프절에서 pro-inflammatory cytokine 개선 효과.

(바) 또한 소장조직 및 림프조직 내 pro-inflammatory cytokine(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8)도 바이러스 대조군과 비교 시 소재투여 그룹 모두에서 현저히 억제됨을 확인하였음.



[그림 43] PEDV 감염모델을 이용한 감초열수추출물(GUWE) 및 커큐민(curcumin) 9:1 혼합제에 의한 소장 조직병변 개선 효과.

(3) 감초열수추출물 및 커큐민 혼합제(9:1)에 의한 PED 바이러스 소장병변 개선효과  
 (가) 바이러스 비접종 및 무투여 그룹을 제외한 시험 전 그룹의 자돈에서 특징적 증상은 침울, 설사 직전/후 식욕부진, 구토를 보였으며 심한 수양성 설사로 인한 탈수로 인해 체중감소 및 빠른 사망률을 나타냈으며 사망한 시험자돈의 특징적 부검소견은 소장내 액체가 차있고, 장막이 얇아져 내용물이 육안적으

로 보임을 관찰되었음.

- (나) 실험종료 시 전체 실험군 자돈을 부검을 통하여 소장(십이지장, 공장, 회장)의 각 부위를 채취한 후 중성 포르말린에 고정 후 파라핀에 포매하여 4 μm의 절편을 제작하여, Hematoxylin & eosin 염색 후 광학현미경으로 병변정도를 분석하였음.
- (다) 바이러스 비접종 및 무투여 그룹의 소장은 용모가 정상의 손가락 모양으로 길쭉길쭉하였으며, 음와는 정상의 크기를 보였음.
- (라) 이와 반면에 바이러스 접종 및 무투여 군의 자돈에서는 바이러스가 소장 용모상피세포에 증식하여 용모상피세포를 탈락시킴으로서 결과적으로 용모의 길이가 위축되고 융합되며, 탈락된 용모를 대체하기 위하여 음와의 증식이 저명하게 관찰되었음. 또한 점막 고유내에 충혈 및 출현이 관찰되었고 단핵세포의 침윤이 관찰되었음.
- (마) PED 바이러스 접종 후 감초열수추출물 및 커큐민 혼합제(9:1)를 200 mg/kg/day로 투여한 실험군에서는 바이러스 접종 및 무투여군에 비해 용모의 길이가 전체적으로 증가했으며, 용모가 정상 손가락 모양으로 증가됨을 확인 하였으며, 음와의 크기도 정상의 크기로 보임을 확인하였음.

**이상의 결과, PED 바이러스에 대한 치료 및 예방제로서 감초추출물의 다당체 및 폴리페놀 성분은 면역증강 및 항바이러스 효능을 나타낸다고 보고되어 있으며, 특히 커큐민은 항염활성이 매우 높은 것으로 보고가 되어있음. 따라서 단독소재가 아닌 감초추출물과 커큐민의 복합제(combination)를 사용하여 수행한 결과 PED바이러스 억제효능이 있음을 확인하였음.**

#### 14. PED 치료용 혼합생물소재 [KW-100(감초추출물) + KW-200(커큐민)]의 안전성 평가

Test no. 1602

Single oral dose toxicity study of Extracted curcumin using Glycyrrhiza uralensis

감초를 이용한 강황추출물의 단회투여독성시험

##### (1) 실험목적

(가) 감초를 이용한 Curcumin 추출액 [GC-Combination]의 단회경구투여 후 개략의 치사량, 임상증상, 체중 변화, 육안적 부검소견을 통해 독성영향을 평가하고, 반복독성시험에 대한 독성정보를 제공하고자 함.

##### (2) 실험계획 및 실험군 구성

###### (가) 시험물질

- ① 중량 : 120 g (8월 26일 수령)
- ② 성상 : 노란색 고형
- ③ 보관 : 상온(20℃)
- ④ 부형제 : DW

⑤ 조제방법 : DW를 첨가하여 진탕 교반하여 조제하며, 각 용량에 해당하는 시험물질은 계단희석법을 이용하여 조제하였음.

(3) 실험동물

- ① 실험동물 : ICR mouse
- ② 주령 : 7주령
- ③ 성별 및 수량 : 수컷 25, 암컷 25 마리 (총 50마리)

(4) 투여방법 및 실험군

- ① 투여경로 : 경구투여
- ② 투여방법 : 시험동물은 투여전일 절식(6시간이상)한 후 투여당일(Day 0) 경구용 소식자(sonde)와 26G 1cc syringe를 이용하여 경배부 보정법을 이용하여 투여하였음.
- ③ 투여시간 : 오전9시-오후2시
- ④ 투여횟수 : 1일 1회 투여하되 난용성인 경우에는 24시간이내 2회에 나누어 투여하였음.
- ⑤ 한계용량시험(Limited dose test)

[표 14] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200) 안전성 평가 실험군 구성

Group	Gender	ID No.	No. of Animal	Dose (mg/kg)	Volume (mL/kg)
T1	Male	1	1	0	10
T2	Male	2	1	2000	10
T3	Female	3	1	0	10
T4	Female	4	1	2000	10

[표 15] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200) 단회투여독성시험 실험군 구성

Group	Gender	ID No.	No. of Animal	Dose (mg/kg)	Volume (mg/mL)
G1	Male	1-5	5	0	10
G2		6-10	5	250	10
G3		11-15	5	500	10
G4		16-20	5	1000	10
G5		21-25	5	2000	10
G6	Female	31-35	5	0	10
G7		36-40	5	250	10
G8		41-45	5	500	10
G9		46-50	5	1000	10
G10		51-55	5	2000	10

(5) 관찰방법

(가) 임상증상 및 사망률: 1일 1회 이상 관찰하여 임상증상 및 사망유무를 기록하였음. 투여당일에는 시험물질 투여 후 1시간동안 지속적으로 관찰하고, 이후 2,



4, 6시간에 관찰하였음. 투여의일부부터는 1회 이상 관찰하도록 하고, 사망률을 계산하여 개략의 반수치사량을 산출하였음. 시험물질투여로 인해 빈사상태 또는 군당 3마리이상에서 체중의 30%이상 감소 시 시험의뢰자와 상의하여 빈사 개체 또는 군전체 안락사를 결정하였음. 투여 중 사망개체는 발견즉시 부검하는 것을 원칙으로 하며, 부검소견에서 관찰된 이상장기는 조직병리학적 평가를 시행하였음.

(나) 체중: 투여 전, 투여 후 1일, 3일, 7일, 14일에 체중을 측정하였음.

(다) 육안적 부검소견: 부검당일 전체 조직 및 장기에 대한 육안적 이상소견유무를 기록하였음.

(라) 장 기중량: 간, 신장, 비장, 심장, 폐에 대한 장기중량을 측정하였음.

(마) 조직병리학적 소견: 육안적 이상소견이 관찰된 장기에 대해 조직병리학적 평가를 진행하였음.

(6) 관시험결과

(가) 한계용량시험: GC-Combination의 한계용량시험결과, 최고용량 2000 mg/kg에서 사망 및 투여와 관련한 임상증상을 나타내지 않았음. 3일간의 관찰기간 동안 체중 변화에 있어서도 대조군과 비교하여 체중의 감소가 현저하게 나타나지 않았음. 본 실험결과를 바탕으로 급성단회투여시험의 최고용량을 2000 mg/kg으로 산정하였으며, 공비를 2로 하여 1000, 500, 250 mg/kg을 각각 중간 및 저용량으로 산정하였음.

[표 16] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200) 단회투여독성시험에 의한 임상증상

CLINICAL SIGNS, MORTALITY, (Limited dose test)					
STUDY No.: T1802		G1 (2000 mg/kg, 10 mL/kg)		Sex : Male, Female	
Animal ID	OBSERVATIONS		OBSERVATION ON (3 Days)		
Male	1 (2000)	None		DAY	
	2 (0)	None		DAY	
Female	3 (2000)	None		DAY	
	4 (0)	None		DAY	
BODY WEIGHTS (g)					
Animal ID (mg/kg)	DAY 0	DAY 1	DAY 3	Gains (D3-D0)	
Male	1 (2000)	32.31	32.82	34.09	1.78
	2 (0)	31.56	32.46	33.51	1.95
Female	3 (2000)	27.27	27.37	28.02	0.75
	4 (0)	26.62	26.91	27.56	0.94

(나) 급성단회투여시험: 감초열수추출물과 curcumin의 합제(상품명: GC-Combination)의 단회투여시험결과, 최고용량 2000 mg/kg에서 2주 시험기간 동안 암, 수컷 모두에서 사망 및 투여와 관련한 임상증상은 관찰되지 않았음. 체중 변화의 결과에서도 암, 수컷 모두에서 유의성 있는 체중 및 증체량 감소는 관찰되지 않았으며, 부검 시 육안적 장기 관찰결과에서도 뚜렷한 육안적 이상 소견이 관찰되지 않았음. 장기중량 측정결과, 대조군과 2000 mg/kg



투여군의 절대 및 상대증량 결과에서 유의성 있는 증가 또는 감소가 관찰되지 않았음. 본 시험결과를 바탕으로, 감초열수추출물과 curcumin의 단회투여 시험결과 대략의 치사량은 2000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단되며, 시험물질에 의한 명확한 독성영향을 평가하기 위해서는 반복투여독성을 통한 혈액 생화학적 분석 및 조직학적 평가가 필요할 것으로 판단됨.

[표 16] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200) 한계용량 시험에서의 암컷, 수컷 마우스의 체중변화

BODY WEIGHTS (g)							
STUDY No.: 1702		L1 ( 0 mg/kg)				Sex : Male	
Animal ID	DAY 1	DAY 2	DAY 3	DAY 7	Day10	DAY 14	Gains
1	31.15	30.89	32.60	33.00	33.45	35.18	4.030
2	29.66	30.68	31.18	34.04	35.34	37.20	7.540
3	27.96	29.59	30.05	33.14	34.42	37.09	9.130
4	30.27	31.47	31.80	33.56	35.83	38.23	7.960
5	30.75	31.42	32.30	34.87	36.09	37.36	6.610
MEAN	29.96	30.81	31.59	33.72	35.03	37.01	7.05
SD	1.248	0.761	1.013	0.759	1.087	1.118	1.918

[표 17] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200) 한계용량 시험에서의 암컷, 수컷 마우스의 체중변화

BODY WEIGHTS (g)							
STUDY No.: 1702		L2 ( 5000 mg/kg)				Sex : Male	
Animal ID	DAY 1	DAY 2	DAY 3	DAY 7	Day10	DAY 14	Gains
6	28.32	29.76	30.29	33.55	34.88	37.34	9.020
7	31.06	32.00	32.59	35.95	37.32	39.60	8.540
8	32.20	33.14	33.19	33.41	34.01	36.39	4.190
9	30.22	31.86	32.04	35.06	35.45	37.11	6.890
10	30.17	31.40	31.49	33.75	35.02	37.40	7.230
MEAN	30.39	31.63	31.92	34.34	35.34	37.57	7.17
SD	1.422	1.227	1.109	1.112	1.226	1.205	1.888

[표 18] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200) 한계용량 시험에서의 암컷, 수컷 마우스의 체중변화

BODY WEIGHTS (g)							
STUDY No.: 1702		L3 ( 0 mg/kg)				Sex : Female	
Animal ID	DAY 1	DAY 2	DAY 3	DAY 7	Day10	DAY 14	Gains
11	23.90	24.42	24.57	26.72	27.70	28.13	4.230
12	24.14	24.66	23.70	24.90	25.48	27.38	3.240
13	23.87	24.32	24.58	26.08	26.30	27.21	3.340
14	24.58	25.42	26.03	26.93	27.31	29.68	5.100
15	24.33	25.05	25.77	26.23	26.64	28.66	4.330
MEAN	24.16	24.77	24.93	26.17	26.69	28.21	4.05
SD	0.299	0.458	0.959	0.791	0.869	1.007	0.770

STUDY No.: 1702		L4 ( 5000 mg/kg)				Sex : Female	
Animal ID	DAY 1	DAY 2	DAY 3	DAY 7	Day10	DAY 14	Gains
16	25.65	26.31	26.99	28.61	28.98	32.09	6.440
17	21.83	22.31	23.06	25.67	25.96	27.93	6.100
18	24.22	24.81	25.74	26.41	26.20	27.54	3.320
19	24.33	24.36	24.87	26.01	26.14	28.00	3.670
20	24.26	25.20	24.09	26.48	26.39	28.23	3.970
MEAN	24.06	24.60	24.95	26.64	26.73	28.76	4.70
SD	1.382	1.469	1.509	1.151	1.265	1.879	1.457

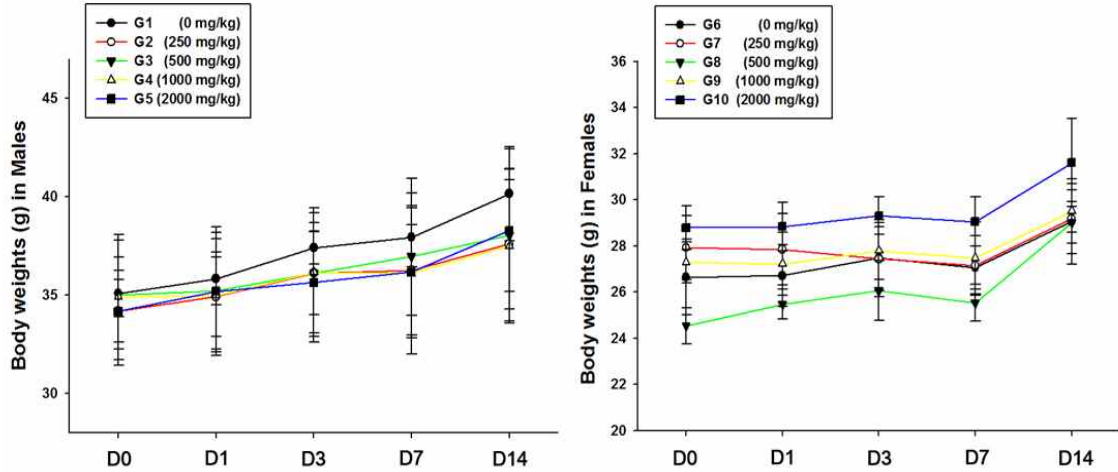
[표 19] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200) 단회투여독성시험의 시험군 구성

Group	Gender	ID No.	No. of Animal	Dose (mg/kg)	Volume (mg/mL)
G1	Male	1-5	5	0	10
G2		6-10	5	250	10
G3		11-15	5	500	10
G4		16-20	5	1000	10
G5		21-25	5	2000	10
G6	Female	31-35	5	0	10
G7		36-40	5	250	10
G8		41-45	5	500	10
G9		46-50	5	1000	10
G10		51-55	5	2000	10

(다) 혼합생물소재 KW-100(감초추출물) + KW-200(커큐민)의 단회투여독성시험

- 2000 mg/kg을 최고용량으로 하여 1000, 500, 250 mg/kg과 대조군을 포함한 5군으로 구성하였으며, 각 용량에 대하여 암컷, 수컷 5마리 ICR mouse를 이용하여 단회투여독성시험을 수행하였음.
- 단회투여독성시험에서의 평가항목은 임상증상, 사망률, 체중(투여전, 투여후 1, 3, 7, 14일), 육안적 부검소견, 장기중량, 육안적으로 이상소견이 관찰된 장기에서의 조직병리학적 소견이며, 사망률을 바탕으로 대략의 치사량을 산출하였음.
- 단회투여독성시험결과, 최고용량 2000 mg/kg에서 2주 시험기간 동안 암, 수컷 모두에서 사망 및 투여와 관련한 임상증상은 관찰되지 않았으며, 체중 변화의 결과에서도 암, 수컷 모두에서 유의성 있는 체중 및 증체량 감소는 관찰되지 않았음.
- 부검 시 육안적 장기 관찰결과에서도 뚜렷한 육안적 이상 소견이 관찰되지 않았으며, 장기중량을 측정된 결과에서도 대조군과 2000 mg/kg 투여군의 절대 및 상대중량 결과에서 유의성 있는 증가 또는 감소가 관찰되지 않았음.

- 본 시험결과를 바탕으로, 혼합생물소재(KW-100 + KW-200)의 단회투여시험결과 대략의 치사량은 2000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단되며, 시험물질에 의한 명확한 독성영향을 평가하기 위해서는 반복투여독성시험을 통한 혈액생화학적 분석 및 조직학적 평가가 필요할 것으로 판단됨.



[그림 44] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200)을 투여한 마우스 체중변화.

[표 19] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200) 단회투여독성시험에서의 수컷 마우스 대조군 및 최고용량군 장기중량

ABSOLUTE & RELATIVE ORGAN WEIGHTS (g)							
STUDY No.: 1702	G1 ( 0 mg/kg)			Sex : Male			
ANIMAL ID	1	2	3	4	5	Mean	SD
BODY WEIGHT	38.01	38.99	35.95	41.6	35.28		
SPLEEN	0.151	0.095	0.123	0.137	0.098	0.121	0.024
per BODY WEIGHT	0.397	0.244	0.342	0.329	0.278	0.318	0.059
KIDNEY-LEFT	0.204	0.265	0.240	0.273	0.276	0.252	0.030
per BODY WEIGHT	0.537	0.680	0.668	0.656	0.782	0.665	0.087
KIDNEY-RIGHT	0.248	0.248	0.231	0.294	0.264	0.257	0.024
per BODY WEIGHT	0.652	0.636	0.643	0.707	0.748	0.677	0.049
HEART	0.152	0.165	0.144	0.192	0.163	0.163	0.018
per BODY WEIGHT	0.400	0.423	0.401	0.462	0.462	0.429	0.031
LUNG	0.198	0.191	0.184	0.198	0.181	0.190	0.008
per BODY WEIGHT	0.521	0.490	0.512	0.476	0.513	0.502	0.019
LIVER	1.899	2.254	1.684	2.561	1.920	2.064	0.345
per BODY WEIGHT	4.996	5.781	4.684	6.156	5.442	5.412	0.590

[표 20] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200) 단회투여독성시험에서의 수컷 마우스 대조군 및 최고용량군 장기중량

ABSOLUTE & RELATIVE ORGAN WEIGHTS (g)			
STUDY No.: 1702	G5 ( 2000 mg/kg)	Sex : Male	

ANIMAL ID	21	22	23	24	25	Mean	SD
BODY WEIGHT	40.56	37.6	37.84	38.09	37.64		
SPLEEN	0.117	0.118	0.102	0.116	0.102	0.111	0.008
per BODY WEIGHT	0.288	0.314	0.270	0.305	0.271	0.289	0.020
KIDNEY-LEFT	0.296	0.287	0.280	0.246	0.279	0.278	0.019
per BODY WEIGHT	0.730	0.763	0.740	0.646	0.741	0.724	0.045
KIDNEY-RIGHT	0.263	0.279	0.251	0.242	0.278	0.263	0.016
per BODY WEIGHT	0.648	0.742	0.663	0.635	0.739	0.686	0.051
HEART	0.173	0.169	0.145	0.164	0.167	0.164	0.011
per BODY WEIGHT	0.427	0.449	0.383	0.431	0.444	0.427	0.026
LUNG	0.199	0.193	0.192	0.195	0.209	0.198	0.007
per BODY WEIGHT	0.491	0.513	0.507	0.512	0.555	0.516	0.024
LIVER	2.145	1.774	1.961	2.020	2.108	2.002	0.146
per BODY WEIGHT	5.288	4.718	5.182	5.303	5.600	5.219	0.320

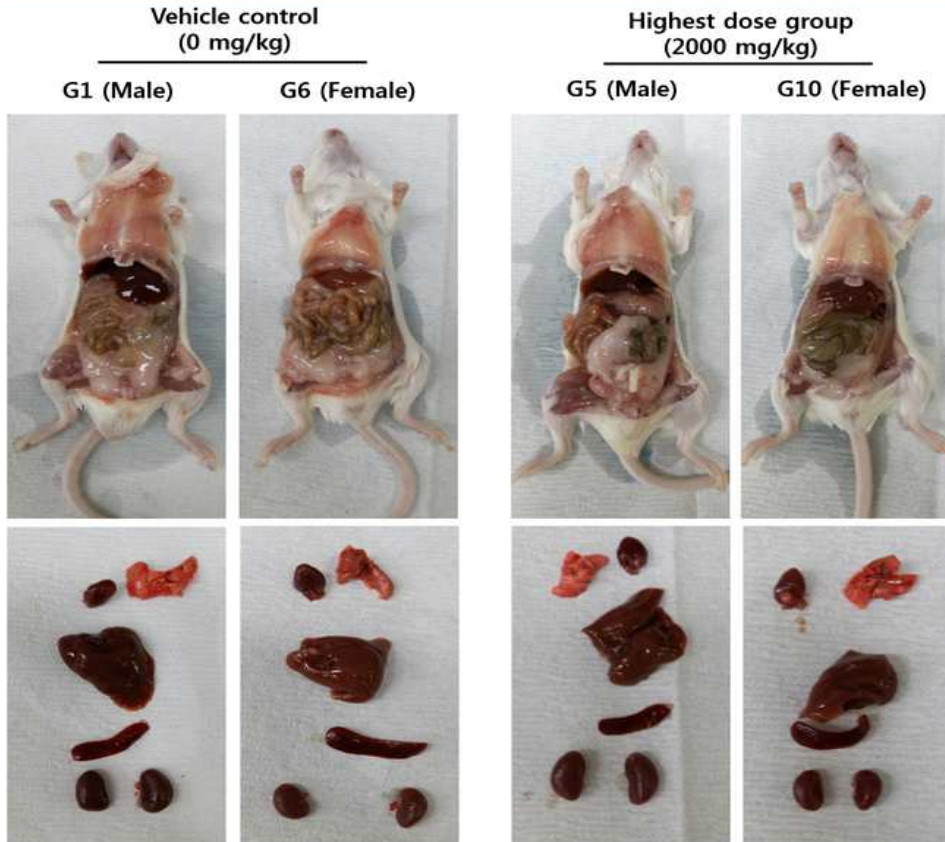
[표 20] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200) 단회투여독성시험에서의 암컷 마우스 대조군 및 최고용량군 장기중량

ABSOLUTE & RELATIVE ORGAN WEIGHTS (g)							
STUDY No.: 1702	G6 ( 0 mg/kg)			Sex : Female		Mean	SD
ANIMAL ID	31	32	33	34	35		
BODY WEIGHT	29.58	30.65	26.77	30.34	29.02		
SPLEEN	0.167	0.155	0.116	0.149	0.100	0.137	0.028
per BODY WEIGHT	0.565	0.506	0.433	0.491	0.345	0.468	0.083
KIDNEY-LEFT	0.138	0.144	0.137	0.162	0.161	0.148	0.012
per BODY WEIGHT	0.467	0.470	0.512	0.534	0.555	0.507	0.039
KIDNEY-RIGHT	0.116	0.148	0.141	0.150	0.152	0.141	0.015
per BODY WEIGHT	0.392	0.483	0.527	0.494	0.524	0.484	0.055
HEART	0.121	0.139	0.127	0.124	0.130	0.128	0.007
per BODY WEIGHT	0.409	0.454	0.474	0.409	0.448	0.439	0.029
LUNG	0.178	0.163	0.141	0.179	0.176	0.167	0.016
per BODY WEIGHT	0.602	0.532	0.527	0.590	0.606	0.571	0.039
LIVER	1.278	1.502	1.407	1.270	1.514	1.394	0.117
per BODY WEIGHT	4.320	4.900	5.256	4.186	5.217	4.776	0.499

[표 21] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200) 단회투여독성시험에서의 암컷 마우스 대조군 및 최고용량군 장기중량

ABSOLUTE & RELATIVE ORGAN WEIGHTS (g)							
STUDY No.: 1702	G10 ( 2000 mg/kg)			Sex : Female		Mean	SD
ANIMAL ID	51	52	53	54	55		
BODY WEIGHT	32.97	26.38	31.73	27.02	26.47		
SPLEEN	0.147	0.134	0.126	0.129	0.143	0.136	0.009
per BODY WEIGHT	0.446	0.508	0.397	0.477	0.540	0.474	0.055
KIDNEY-LEFT	0.180	0.139	0.164	0.136	0.133	0.150	0.021
per BODY WEIGHT	0.546	0.527	0.517	0.503	0.492	0.517	0.021
KIDNEY-RIGHT	0.167	0.128	0.147	0.137	0.125	0.141	0.017
per BODY WEIGHT	0.507	0.485	0.463	0.507	0.472	0.487	0.020
HEART	0.130	0.121	0.144	0.118	0.109	0.124	0.013
per BODY WEIGHT	0.394	0.459	0.454	0.437	0.412	0.431	0.028
LUNG	0.169	0.151	0.182	0.173	0.156	0.166	0.013

per BODY WEIGHT	0.513	0.572	0.574	0.640	0.589	0.578	0.046
LIVER	1.733	1.163	1.470	1.208	1.170	1.349	0.249
per BODY WEIGHT	5.256	4.409	4.633	4.471	4.420	4.638	0.357



[그림 45] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200)을 투여한 마우스 육안소견.

- (라) 혼합생물소재 [KW-100(감초추출물) + KW-200(커큐민)] 반복투여독성시험
- 단회투여독성시험결과를 바탕으로, 2000 mg/kg을 단회투여한 경우 독성 영향이 나타나지 않아 반복투여독성시험의 최고설정용량인 2000 mg/kg/day를 최고용량으로 하여 1000, 500, 250 mg/kg/day와 대조군을 포함한 5군으로 실험군을 구성하였으며, 각 용량에 대하여 암컷, 수컷 5마리 ICR mouse를 이용하여 2주반복투여독성시험을 수행하였음.

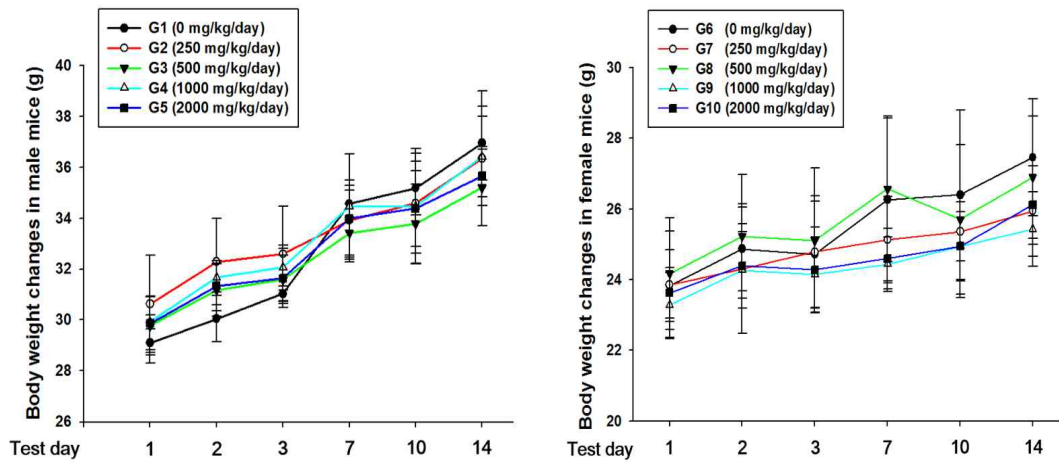
[표 21] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200) 반복투여독성시험의 시험군 구성

Group	Gender	ID No.	No. of Animal	Dose (mg/kg)	Volume (mg/mL)
T1	Male	1-5	5	0	5
T2		6-10	5	250	5
T3		11-15	5	500	5
T4		16-20	5	1000	5
T5		21-25	5	2000	5

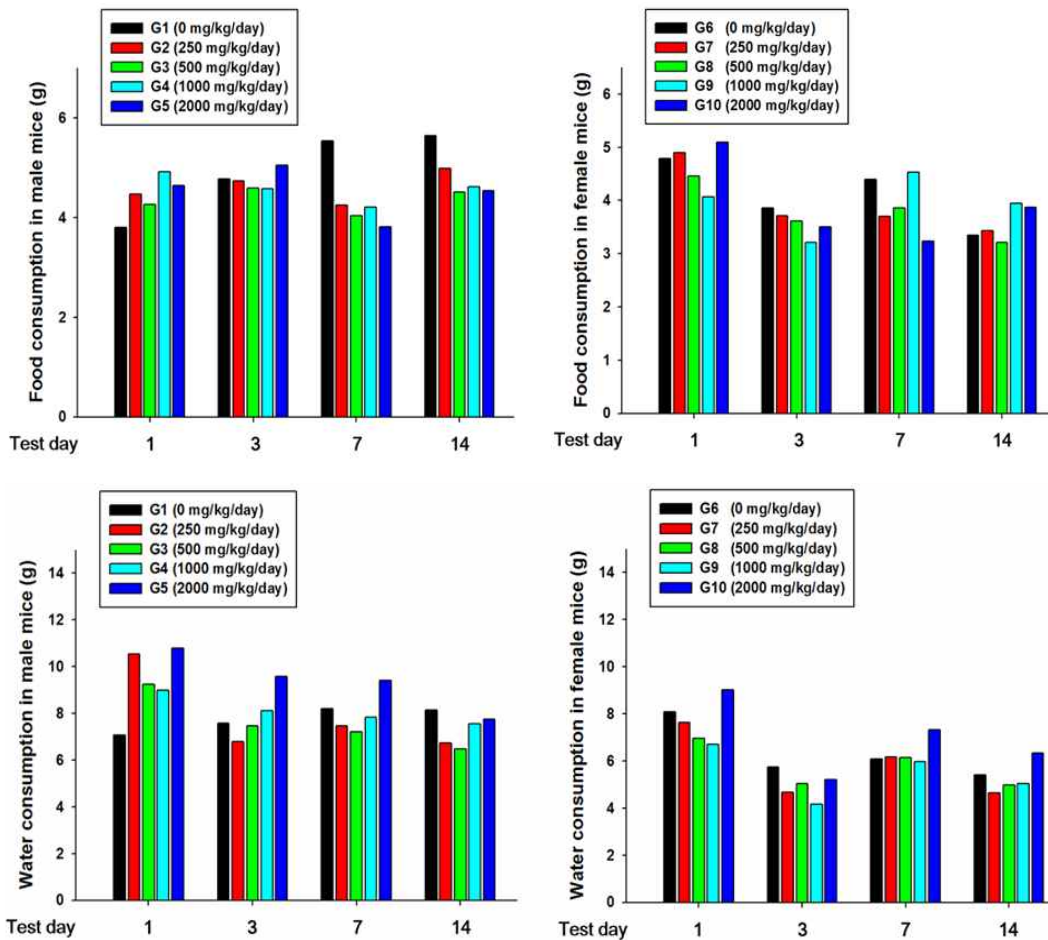
T6	Female	31-35	5	0	5
T7		36-40	5	250	5
T8		41-45	5	500	5
T9		46-50	5	1000	5
T10		51-55	5	2000	5

- 2주반복투여독성시험에서의 평가항목은 임상증상, 사망률, 체중(투여전, 투여 후 1, 3, 7, 14일), 사료 및 음수섭취량(투여후 1, 3, 7, 13일), 육안적 부검소견, 장기중량(간, 신장, 비장, 심장, 폐), 혈액생화학적 검사, 조직병리학적 소견이며, 이러한 평가항목을 통해 잠재적인 표적장기를 확인하고 개략의 무해용량(No-Observed-Adverse-Effect Level; NOAEL)을 산출하였음.
- 임상증상 및 사망률관찰 결과, 최고용량 2000 mg/kg/day 투여한 최고용량군을 포함한 시험물질투여군에서는 암컷 및 수컷 모두에서 시험물질투여에 따른 사망 및 임상증상을 나타내지 않았으며, 시험물질의 높은 단미도로 인한 자극성으로 인해 구토, 설사, 식욕감퇴 등의 임상증상을 예상하였으나, 시험결과에서는 관찰되지 않았음.
- 체중 측정결과, 2주 반복투여기간동안 암컷 및 수컷 모두에서 증체량 감소 경향을 나타내었으나, 명확한 용량의존성 및 통계학적으로 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았으며, 사료 및 음수섭취량에서도 현저한 차이를 나타내지 않아 시험물질투여에 의한 감소로 판단하기 어려움.
- 사료섭취량 및 음수섭취량 측정결과, 시험물질투여군의 사료섭취량 및 음수섭취량에서 통계학적으로 유의성 있는 감소가 관찰되지 않았으며, 높은 단미도에 따른 음수섭취량의 증가 및 이에 따른 다뇨 등의 임상증상이 예상되었으나 관찰되지 않았음.
- 육안적 부검소견 관찰결과, 시험물질투여에 따른 육안적 이상소견은 관찰되지 않았음.
- 장기중량 측정결과, 부검소견 관찰 후 측정된 간, 신장, 비장, 심장, 폐에 대한 절대 및 상대중량을 측정하였으며 수컷 2000 mg/kg/day 투여군에서 간의 상대중량의 현저한 증가가 관찰되었으나, 암컷 2000 mg/kg/day 투여군은 대조군과 비교하여 유의성 있는 간 상대중량의 증가를 나타내지 않아 시험물질에 의한 소견으로 판단되지 않으며, 이외의 시험물질투여군에서는 신장, 비장, 심장, 폐의 중량에서 대조군과 비교하여 어떠한 변화도 관찰되지 않았음.
- 혈청생화학적 분석결과, 시험물질 투여군의 ALB, BUN, CRE, GOT, GPT, TCHO, TG, TP, GLU 수치는 대조군과 비교하여 유의적인 증가 또는 감소를 나타내지 않았음.

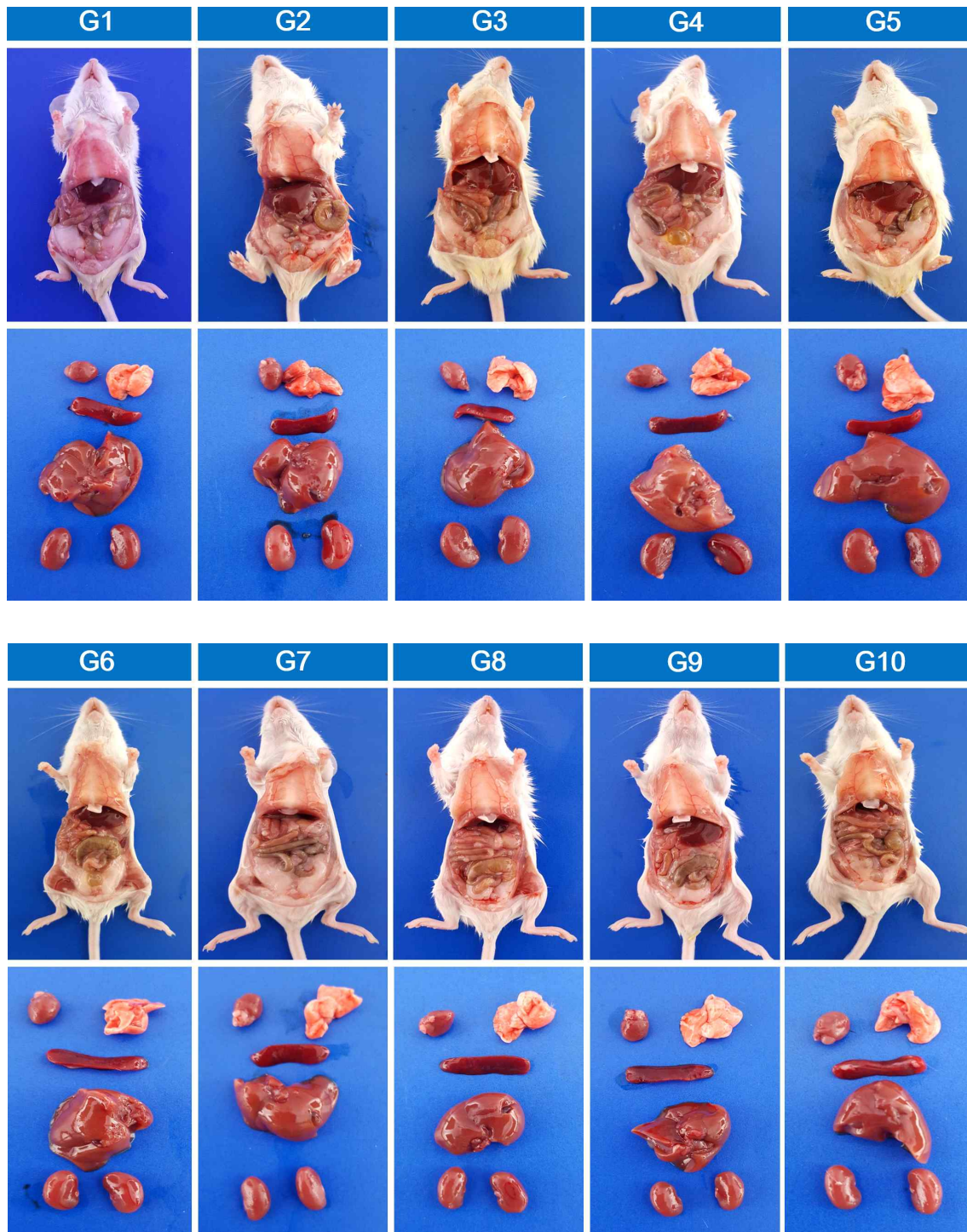




[그림 46] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200)을 각각 혹은 혼합 투여한 마우스 체중변화.



[그림 47] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200)을 각각 혹은 혼합 투여한 마우스 음수량 변화.



[그림 48] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200)을 각각 혹은 혼합 투여한 마우스 육안적 소견.

[표 22] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200) 반복투여독성시험에서의 수컷 마우스 장기중량(1)

ABSOLUTE & RELATIVE ORGAN WEIGHTS (g)

STUDY No.: 1702							
G1 ( 0 mg/kg/day)				Sex : Male			
ANIMAL ID	1	2	3	4	5	MEAN	SD
SPLEEN	0.141	0.154	0.126	0.174	0.164	0.152	0.0189
per BODY WEIGHT	0.366	0.407	0.333	0.459	0.433	0.399	0.0509
KIDNEY-LEFT	0.265	0.227	0.282	0.312	0.214	0.260	0.0401
per BODY WEIGHT	0.687	0.599	0.783	0.800	0.590	0.692	0.0987
KIDNEY-RIGHT	0.258	0.244	0.256	0.319	0.217	0.259	0.0374
per BODY WEIGHT	0.669	0.644	0.711	0.818	0.599	0.688	0.0833
HEART	0.143	0.147	0.143	0.158	0.148	0.148	0.0061
per BODY WEIGHT	0.371	0.388	0.397	0.405	0.408	0.394	0.0151
LUNG	0.207	0.201	0.195	0.201	0.183	0.197	0.0091
per BODY WEIGHT	0.537	0.531	0.541	0.516	0.505	0.526	0.0152
LIVER	1.954	1.840	2.033	2.155	1.786	1.954	0.1482
per BODY WEIGHT	5.066	4.857	5.644	5.527	4.927	5.204	0.3584
STUDY No.: 1702							
G2 ( 250 mg/kg/day)				Sex : Male			
ANIMAL ID	6	7	8	9	10	MEAN	SD
SPLEEN	0.193	0.142	0.125	0.102	0.127	0.138	0.0340
per BODY WEIGHT	0.483	0.370	0.365	0.296	0.367	0.376	0.0675
KIDNEY-LEFT	0.294	0.329	0.271	0.227	0.256	0.275	0.0386
per BODY WEIGHT	0.736	0.856	0.791	0.658	0.741	0.756	0.0734
KIDNEY-RIGHT	0.300	0.343	0.263	0.247	0.274	0.285	0.0375
per BODY WEIGHT	0.751	0.893	0.768	0.716	0.793	0.784	0.0669
HEART	0.149	0.160	0.150	0.138	0.142	0.148	0.0084
per BODY WEIGHT	0.373	0.416	0.438	0.400	0.411	0.408	0.0237
LUNG	0.219	0.201	0.224	0.167	0.201	0.202	0.0224
per BODY WEIGHT	0.548	0.523	0.654	0.484	0.581	0.558	0.0643
LIVER	2.175	2.285	1.948	1.820	1.853	2.016	0.2045
per BODY WEIGHT	5.446	5.947	5.686	5.274	5.360	5.543	0.2736
STUDY No.: 1702							
G3 ( 500 mg/kg/day)				Sex : Male			
ANIMAL ID	11	12	13	14	15	MEAN	SD
SPLEEN	0.129	0.108	0.113	0.097	0.126	0.115	0.0132
per BODY WEIGHT	0.396	0.314	0.318	0.267	0.348	0.329	0.0472
KIDNEY-LEFT	0.231	0.241	0.254	0.268	0.235	0.246	0.0152
per BODY WEIGHT	0.709	0.701	0.716	0.739	0.649	0.702	0.0333
KIDNEY-RIGHT	0.235	0.219	0.265	0.258	0.236	0.243	0.0187
per BODY WEIGHT	0.721	0.637	0.747	0.711	0.651	0.693	0.0472
HEART	0.134	0.150	0.146	0.144	0.134	0.142	0.0073
per BODY WEIGHT	0.411	0.436	0.411	0.397	0.370	0.405	0.0242
LUNG	0.182	0.199	0.225	0.211	0.178	0.199	0.0197
per BODY WEIGHT	0.558	0.578	0.634	0.582	0.491	0.569	0.0515
LIVER	1.664	1.829	1.825	2.227	1.852	1.879	0.2083
per BODY WEIGHT	5.104	5.317	5.142	6.140	5.112	5.363	0.4429

[표 22] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200) 반복투여독성시험에서의 수컷 마우스 장기중량(2)

ABSOLUTE & RELATIVE ORGAN WEIGHTS (g)							
STUDY No.: 1702				Sex : Male			
G4 ( 1000 mg/kg/day)				Sex : Male			
ANIMAL ID	16	17	18	19	20	MEAN	SD
SPLEEN	0.119	0.144	0.172	0.133	0.128	0.139	0.0204
per BODY WEIGHT	0.308	0.398	0.482	0.398	0.344	0.386	0.0659

KIDNEY-LEFT	0.204	0.256	0.238	0.240	0.245	0.237	0.0195
per BODY WEIGHT	0.529	0.708	0.667	0.718	0.658	0.656	0.0757
KIDNEY-RIGHT	0.196	0.243	0.253	0.241	0.238	0.234	0.0221
per BODY WEIGHT	0.508	0.672	0.709	0.721	0.639	0.650	0.0857
HEART	0.138	0.147	0.143	0.131	0.140	0.140	0.0060
per BODY WEIGHT	0.358	0.407	0.401	0.367	0.393	0.385	0.0215
LUNG	0.190	0.188	0.207	0.171	0.186	0.188	0.0128
per BODY WEIGHT	0.492	0.520	0.580	0.512	0.500	0.521	0.0350
LIVER	2.144	2.533	1.912	1.829	1.996	2.083	0.2773
per BODY WEIGHT	5.557	7.009	5.362	5.474	5.361	5.753	0.7070
STUDY No.: 1702	G5 ( 2000 mg/kg/day)				Sex : Male		
ANIMAL ID	21	22	23	24	25	MEAN	SD
SPLEEN	0.131	0.114	0.139	0.119	0.091	0.119	0.0184
per BODY WEIGHT	0.373	0.307	0.380	0.346	0.276	0.336	0.0446
KIDNEY-LEFT	0.224	0.226	0.221	0.249	0.210	0.226	0.0143
per BODY WEIGHT	0.638	0.608	0.605	0.723	0.636	0.642	0.0479
KIDNEY-RIGHT	0.218	0.240	0.227	0.245	0.203	0.227	0.0169
per BODY WEIGHT	0.621	0.646	0.621	0.712	0.615	0.643	0.0402
HEART	0.134	0.149	0.147	0.141	0.141	0.142	0.0059
per BODY WEIGHT	0.382	0.401	0.402	0.410	0.427	0.404	0.0164
LUNG	0.186	0.176	0.204	0.209	0.166	0.188	0.0182
per BODY WEIGHT	0.530	0.473	0.558	0.607	0.503	0.534	0.0514
LIVER	2.076	2.160	2.506	1.955	1.993	2.138	0.2204
per BODY WEIGHT	5.915	5.810	6.858	5.678	6.038	6.060	0.4657

[표 23] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200) 반복투여독성시험에서의 암컷 마우스 장기중량(1)

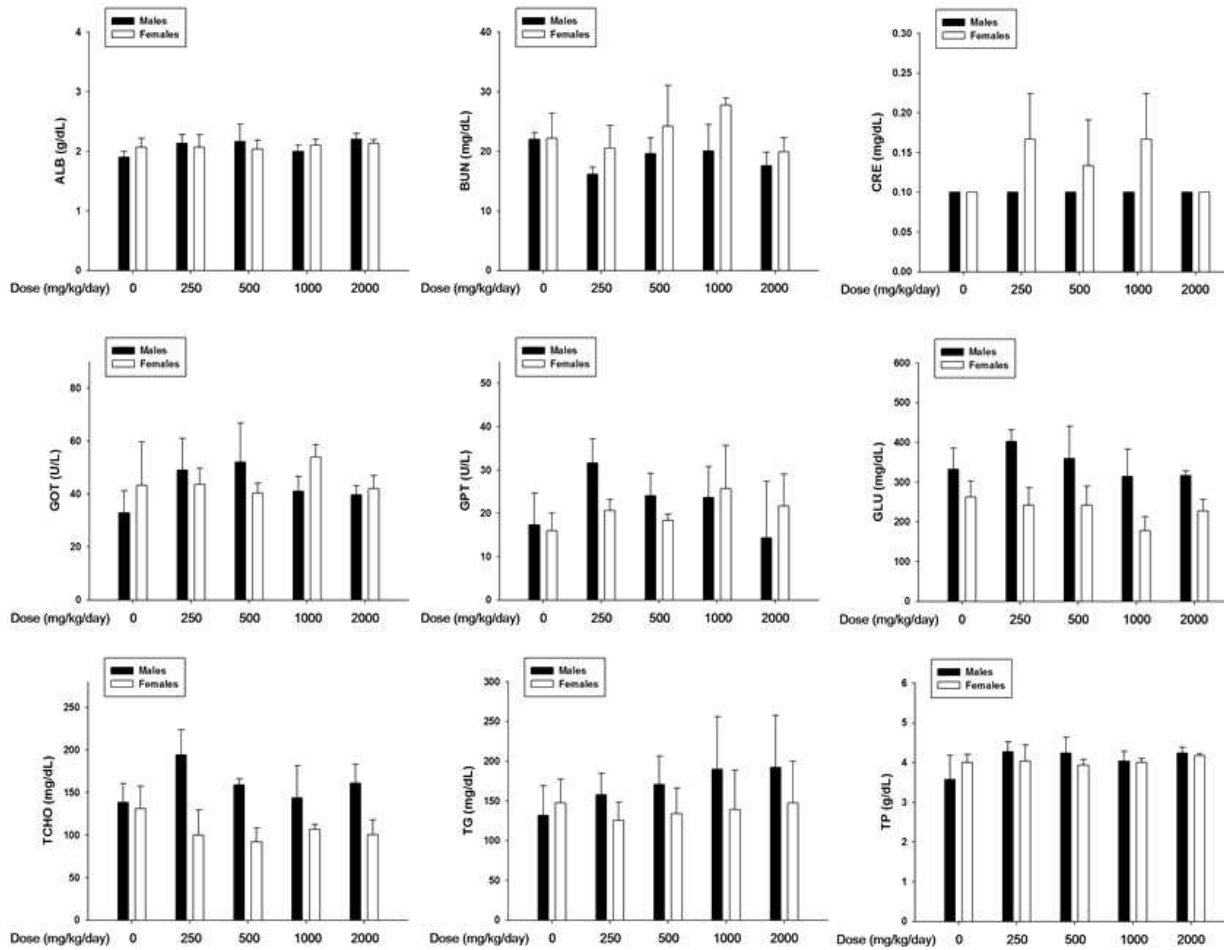
ABSOLUTE & RELATIVE ORGAN WEIGHTS (g)							
STUDY No.: 1702	G6 ( 0 mg/kg/day)				Sex : Female		
ANIMAL ID	31	32	33	34	35	MEAN	SD
SPLEEN	0.131	0.133	0.176	0.101	0.124	0.133	0.0272
per BODY WEIGHT	0.459	0.522	0.580	0.390	0.416	0.473	0.0778
KIDNEY-LEFT	0.153	0.127	0.185	0.149	0.169	0.157	0.0218
per BODY WEIGHT	0.536	0.499	0.610	0.576	0.567	0.557	0.0420
KIDNEY-RIGHT	0.151	0.122	0.176	0.137	0.171	0.151	0.0227
per BODY WEIGHT	0.529	0.479	0.580	0.529	0.573	0.538	0.0407
HEART	0.124	0.114	0.145	0.113	0.144	0.128	0.0157
per BODY WEIGHT	0.434	0.448	0.478	0.437	0.483	0.456	0.0230
LUNG	0.182	0.143	0.239	0.168	0.240	0.194	0.0435
per BODY WEIGHT	0.637	0.562	0.787	0.649	0.805	0.688	0.1043
LIVER	1.268	1.072	1.508	1.060	1.476	1.277	0.2134
per BODY WEIGHT	4.438	4.211	4.969	4.096	4.948	4.532	0.4081
STUDY No.: 1702	G7 ( 250 mg/kg/day)				Sex : Female		
ANIMAL ID	36	37	38	39	40	MEAN	SD
SPLEEN	0.098	0.091	0.119	0.108	0.101	0.103	0.0106
per BODY WEIGHT	0.410	0.362	0.434	0.419	0.396	0.404	0.0274
KIDNEY-LEFT	0.132	0.147	0.159	0.165	0.151	0.151	0.0126
per BODY WEIGHT	0.552	0.585	0.580	0.640	0.593	0.590	0.0319
KIDNEY-RIGHT	0.159	0.140	0.155	0.151	0.150	0.151	0.0071
per BODY WEIGHT	0.665	0.557	0.566	0.586	0.589	0.593	0.0428
HEART	0.103	0.115	0.131	0.115	0.110	0.115	0.0103



per BODY WEIGHT	0.431	0.458	0.478	0.446	0.432	0.449	0.0197
LUNG	0.162	0.174	0.170	0.202	0.175	0.177	0.0151
per BODY WEIGHT	0.678	0.692	0.620	0.784	0.687	0.692	0.0587
LIVER	1.019	1.073	1.150	1.071	1.103	1.083	0.0480
per BODY WEIGHT	4.264	4.270	4.197	4.156	4.329	4.243	0.0674
STUDY No.: 1702	G8 ( 500 mg/kg/day)				Sex : Female		
ANIMAL ID	41	42	43	44	45	MEAN	SD
SPLEEN	0.102	0.124	0.084	0.079	0.093	0.096	0.0178
per BODY WEIGHT	0.383	0.432	0.320	0.326	0.336	0.359	0.0475
KIDNEY-LEFT	0.147	0.142	0.163	0.157	0.134	0.149	0.0116
per BODY WEIGHT	0.553	0.495	0.622	0.648	0.484	0.560	0.0735
KIDNEY-RIGHT	0.143	0.133	0.157	0.143	0.141	0.143	0.0086
per BODY WEIGHT	0.538	0.463	0.599	0.590	0.509	0.540	0.0566
HEART	0.136	0.108	0.143	0.121	0.113	0.124	0.0149
per BODY WEIGHT	0.511	0.376	0.545	0.499	0.408	0.468	0.0722
LUNG	0.166	0.166	0.228	0.163	0.172	0.179	0.0276
per BODY WEIGHT	0.624	0.578	0.870	0.672	0.621	0.673	0.1148
LIVER	1.203	1.017	1.257	1.010	1.188	1.135	0.1139
per BODY WEIGHT	4.523	3.542	4.794	4.167	4.289	4.263	0.4687

[표 24] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200) 반복투여독성시험에서의 암컷 마우스 장기중량(2)

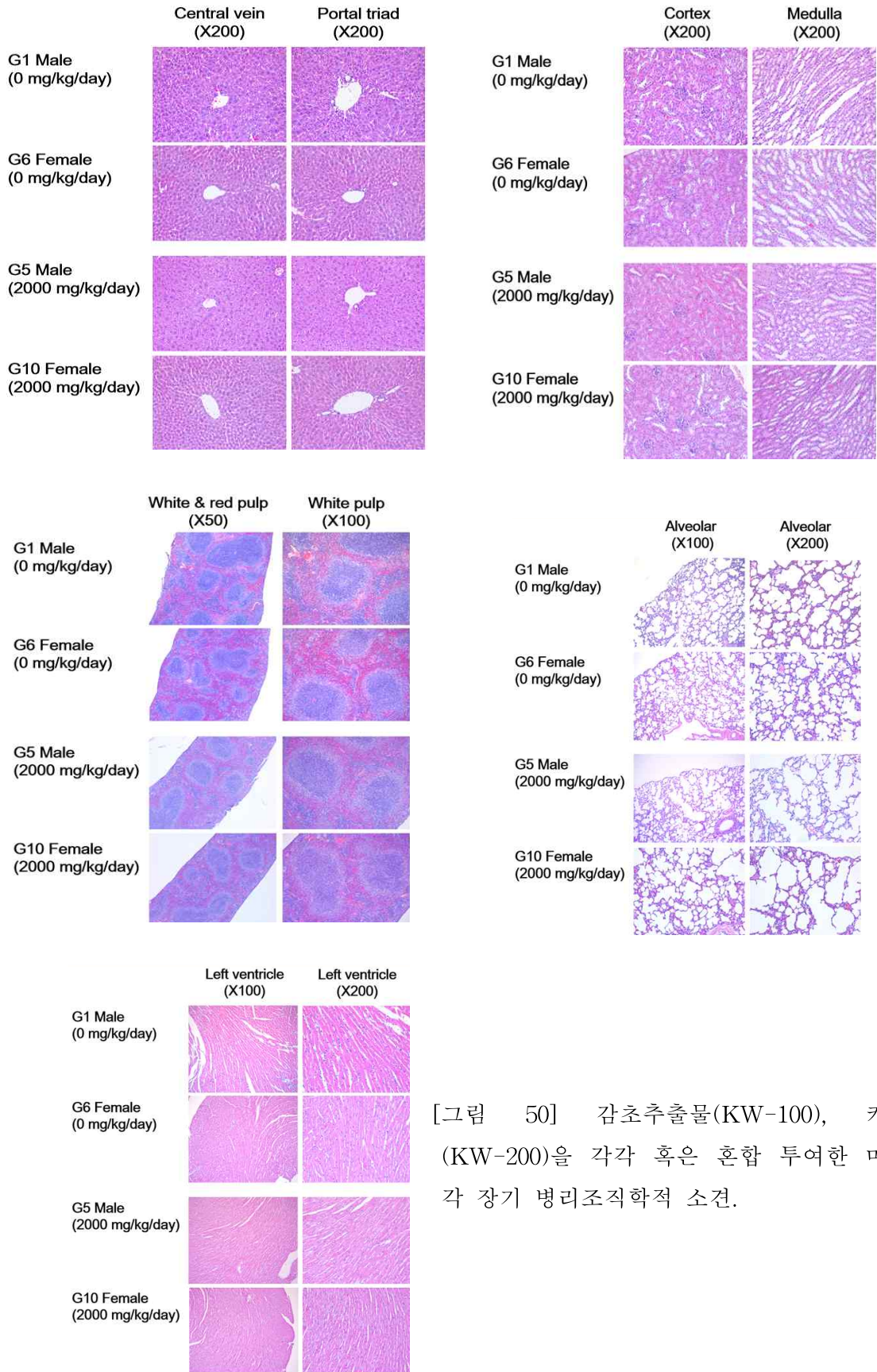
ABSOLUTE & RELATIVE ORGAN WEIGHTS (g)							
STUDY No.: 1702	G9 ( 1000 mg/kg/day)				Sex : Female		
ANIMAL ID	46	47	48	49	50	MEAN	SD
SPLEEN	0.145	0.120	0.082	0.092	0.100	0.108	0.0250
% per BODY WEIGHT	0.579	0.458	0.345	0.353	0.398	0.427	0.0962
KIDNEY-LEFT	0.124	0.170	0.135	0.164	0.190	0.157	0.0268
% per BODY WEIGHT	0.495	0.649	0.568	0.630	0.757	0.620	0.0973
KIDNEY-RIGHT	0.120	0.170	0.143	0.165	0.181	0.156	0.0243
% per BODY WEIGHT	0.479	0.649	0.602	0.633	0.721	0.617	0.0885
HEART	0.114	0.137	0.113	0.120	0.145	0.126	0.0144
% per BODY WEIGHT	0.455	0.523	0.476	0.461	0.578	0.498	0.0517
LUNG	0.158	0.172	0.191	0.158	0.191	0.174	0.0165
% per BODY WEIGHT	0.631	0.656	0.804	0.607	0.761	0.692	0.0861
LIVER	1.075	1.176	1.053	1.192	1.176	1.134	0.0651
% per BODY WEIGHT	4.293	4.487	4.434	4.576	4.685	4.495	0.1477
STUDY No.: 1702	G10 ( 2000 mg/kg/day)				Sex : Female		
ANIMAL ID	51	52	53	54	55	MEAN	SD
SPLEEN	0.108	0.117	0.119	0.094	0.121	0.112	0.0111
% per BODY WEIGHT	0.411	0.476	0.439	0.365	0.469	0.432	0.0455
KIDNEY-LEFT	0.133	0.135	0.160	0.149	0.129	0.141	0.0129
% per BODY WEIGHT	0.506	0.549	0.590	0.578	0.500	0.545	0.0410
KIDNEY-RIGHT	0.134	0.142	0.157	0.152	0.138	0.145	0.0096
% per BODY WEIGHT	0.510	0.577	0.579	0.590	0.535	0.558	0.0344
HEART	0.116	0.118	0.128	0.120	0.110	0.118	0.0065
% per BODY WEIGHT	0.441	0.480	0.472	0.466	0.426	0.457	0.0225
LUNG	0.171	0.151	0.171	0.200	0.166	0.172	0.0178
% per BODY WEIGHT	0.650	0.614	0.631	0.776	0.643	0.663	0.0649
LIVER	1.257	1.143	1.372	1.236	1.125	1.227	0.0993
% per BODY WEIGHT	4.781	4.648	5.059	4.798	4.367	4.731	0.2519



[그림 49] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200)을 각각 혹은 혼합 투여한 마우스 혈청 생화학적 결과.

- 조직병리학적 평가결과, 2000 mg/kg/day 최고용량군을 포함한 시험물질투여군의 신장, 심장, 폐, 비장, 간에서 시험물질 투여로 인한 조직병리학적 이상병변은 관찰되지 않았음.
- 2주 반복투여독성시험결과, 시험기간 동안 시험물질투여로 인한 임상증상 또는 사망은 관찰되지 않았으며, 암컷 및 수컷에서 증체량감소소견이 관찰되었으나 뚜렷한 용량상관성이 관찰되지 않아 독성학적으로 의미 있는 결과로 판단되지 않았으며, 사료 및 음수섭취량 측정결과, 육안적 부검소견 및 혈청생화학적 분석결과, 조직병리학적 소견에서도 대조군과 비교하여 뚜렷한 변화가 관찰되지 않아, 본 시험조건 하에서 혼합생물소재 (KW-100+KW-200)의 잠재적인 표적 장기는 관찰되지 않았으며, 무해용량 (No-observed-adverse-effect level, NOAEL)은 2000 mg/kg/day로 판단하였음.





[그림 50] 감초추출물(KW-100), 커큐민(KW-200)을 각각 혹은 혼합 투여한 마우스 각 장기 병리조직학적 소견.

## 13절. 돼지 유행성 설사 치료제 사양시험

### 1. PED치료용 생물소재가 생산성에 미치는 영향평가

(1) 공시동물 : 3원 교잡종 [(Landrace x Yorkshire) x Duroc] 이유자돈

(2) 처리내용 :

- ① Commercial diet 급여 처리구
- ② Commercial diet + PED 치료용 첨가제 수준 1
- ③ Commercial diet + PED 치료용 첨가제 수준 2
- ④ Commercial diet + PED 치료용 첨가제 수준 3

(3) 조사항목

- ① 생산성적
- ② 영양소 소화율
- ③ 혈액특성 : WBC, Lymphocyte, IgA, IgM, IgG, Il-6
- ④ 분내 미생물

(4) 조사방법

(가) 생산성적: 일당증체량은 각 개체별로 체중을 측정함. 일당사료섭취량은 체중 측정시 사료급여량에서 잔량을 제하여 계산하였고, 사료요구율은 일당사료섭취량을 일당증체량으로 나누어 산출함.

(나) 영양소 소화율: 영양소 소화율은 종료시 7일 전에 산화크롬 ( $Cr_2O_3$ )을 표시물로서 사료 내 0.2% 첨가하여 7일간 급여 후 분을 채취함. 채취한 분은 60°C의 건조기에서 72시간 건조시킨 후 Willey mill로 분쇄하여 분석에 이용함. 사료의 일반성분과 표시물로 혼합된 Cr은 AOAC (2000)의 방법에 준하여 분석함.

(다) 혈액특성: 혈액 분석은 경정맥(Jugular vein)에서 Vacuum tube (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ)를 이용하여 혈액 5 mL 채취 후 4°C에서 3,000rpm으로 15분간 원심분리하여 얻은 혈청을 자동생화학 분석기 (HITACHI 747, Japan)를 이용하여 혈액 내 성분을 측정함.

(라) 분내 미생물: 분내 미생물 조성은 처리구별로 항문 마사지법을 이용하여 분을 채취한 뒤, 실험시까지 -20°C에서 냉동보관 하였으며, 이후 멸균된 생리식염수에 현탁하여 균질화 시킨 다음  $10^{-4}$ 에서  $10^{-6}$ 까지 단계 희석하여 생균 수 측정용 시료로 사용함. 실험처리에 의한 분변 내의 *Lactobacillus* 및 *E. coli*의 균수를 측정하기 위해 *Lactobacillus*에는 MRS agar, *E. coli*에는 MacConkey agar (Difco, USA)를 사용하였고, 37°C에서 38시간 배양 후 균수를 측정함.

### 2. PED치료용 단일 생물소재가 생산성에 미치는 영향평가 결과

(1) 생산 성적 분석 (일당 증체량, 일당 사료 섭취량, 사료 효율 분석)

[표 1] 이유자돈에서 PED 치료용 단일 생물소재가 생산성에 미치는 영향

Items	TRT1	TRT2	TRT3	TRT4	SEM <sup>2</sup>
Body weight, kg					
Initial	8.23	8.23	8.23	8.22	0.01
Week 3	15.82 <sup>bc</sup>	16.73 <sup>a</sup>	16.12 <sup>b</sup>	15.61 <sup>c</sup>	0.10
Week 6	28.77 <sup>c</sup>	30.04 <sup>a</sup>	29.34 <sup>b</sup>	28.44 <sup>c</sup>	0.13
Week3 (0-21 d)					
ADG, g	362 <sup>bc</sup>	404 <sup>a</sup>	376 <sup>b</sup>	352 <sup>c</sup>	5
ADFI, g	488 <sup>b</sup>	544 <sup>a</sup>	506 <sup>b</sup>	495 <sup>b</sup>	7
GF	0.741	0.743	0.743	0.711	0.011
Week6 (21-42 d)					
ADG, g	617 <sup>ab</sup>	634 <sup>a</sup>	630 <sup>ab</sup>	611 <sup>b</sup>	6
ADFI, g	921 <sup>b</sup>	967 <sup>a</sup>	940 <sup>b</sup>	927 <sup>b</sup>	8
GF	0.670	0.656	0.670	0.659	0.008
Overall (0-42 d)					
ADG, g	489 <sup>c</sup>	519 <sup>a</sup>	503 <sup>b</sup>	481 <sup>c</sup>	3
ADFI, g	704 <sup>b</sup>	756 <sup>a</sup>	723 <sup>b</sup>	711 <sup>b</sup>	6
GF	0.695	0.687	0.696	0.677	0.006

<sup>1</sup>Abbreviation: TRT1, basal diet; TRT2, basal diet + 0.01% 단일 생물 소재; TRT3, basal diet + 0.02% 단일 생물 소재; TRT4, basal diet + 0.03% 단일 생물 소재.

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>abc</sup>Means in the same row with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

(가) 시험 3주차 체중에 있어서는 0.01% 단일 생물 소재 처리구가 무처리구 및 0.02% 단일 생물 소재 처리구보다 유의적으로 높게 나타났고 ( $P < 0.05$ ), 0.03% 단일 생물 소재 처리구가 가장 낮게 나타났음 ( $P < 0.05$ ). 6주차 체중에 있어서는 0.01% 단일 생물 소재 처리구가 0.02% 단일 생물 소재 처리구보다 유의적으로 높게 나타났고 ( $P < 0.05$ ), 무처리구 및 0.03% 단일 생물 소재 처리구가 가장 낮게 나타났음 ( $P < 0.05$ ). 3주차 일당증체량에 있어서는 0.01% 단일 생물 소재 처리구가 무처리구 및 0.02% 단일 생물 소재 처리구보다 유의적으로 높게 나타났고 ( $P < 0.05$ ), 0.03% 단일 생물 소재 처리구가 가장 낮게 나타났음 ( $P < 0.05$ ). 일당사료섭취량에 있어서는 0.01% 단일 생물 소재 처리구가 무처리구, 0.02% 단일 생물 소재 및 0.03% 단일 생물 소재 처리구보다 유의적으로 높게 나타났음 ( $P < 0.05$ ).

(나) 6주차 일당증체량에 있어서는 0.01% 단일 생물 소재 처리구가 0.03% 단일 생물 소재 처리구보다 유의적으로 높게 나타났고 ( $P < 0.05$ ), 일당사료섭취량에 있어서는 0.01% 단일 생물 소재 처리구가 무처리구, 0.02% 단일 생물 소재 및 0.03% 단일 생물 소재 처리구보다 유의적으로 높게 나타났음 ( $P < 0.05$ ). 전체 시험기간동안 일당증체량에 있어서는 0.01% 단일 생물 소재 처리구가 0.02% 단일 생물 소재 처리구보다 유의적으로 높게 나타났고 ( $P < 0.05$ ), 무처리구 및 0.03% 단일 생물 소재 처리구가 가장 낮게 나타났으며 ( $P < 0.05$ ), 일당사료섭취량에 있어서는 0.01% 단일 생물 소재 처리구가 무처리구, 0.02% 단일 생물 소재 및 0.03% 단일 생물 소재 처리구보다 유의적으로 높게 나타났음 ( $P < 0.05$ ).

(2) 영양소 소화율 분석 (건물 및 질소 분석)

[표 2] 이유자돈에서 PED 치료용 단일 생물소재가 영양소 소화율에 미치는 영향

Items, %	TRT1	TRT2	TRT3	TRT4	SEM <sup>2</sup>
Week 6					
Dry matter	79.32	80.19	79.06	79.08	0.51
Nitrogen	79.83	80.41	79.62	80.20	0.60

<sup>1</sup>Abbreviation: TRT1, basal diet; TRT2, basal diet + 0.01% 단일 생물 소재; TRT3, basal diet + 0.02% 단일 생물 소재; TRT4, basal diet + 0.03% 단일 생물 소재.

<sup>2</sup>Standard error of means.

(가) 이유자돈 사료 내 PED 치료제의 첨가가 이유자돈의 영양소 소화율에 미치는 영향은 Table 2에 나타내었다. 종료시 (6주) 건물 및 질소 소화율에 있어서는 처리구간 유의적인 차이가 나타나지 않았다 ( $P > 0.05$ ).

(3) 혈액 특성 분석 (IgG, Cortisol, Epinephrine, Norepinephrine 분석)

[표 3] 이유자돈에서 PED 치료용 단일 생물소재에 의한 혈액 특성

Items	TRT1	TRT2	TRT3	TRT4	SEM <sup>2</sup>
Week 6					
IgG, mg/dL	236	207.8	215.8	205.5	13.8
Cortisol, ug/dL	4.1	3.6	3.9	3.9	0.5
Epinephrine, pg/mL	300.2	372	354.7	311.5	58.6
Norepinephrine, pg/mL	670.5	626.1	652.0	663.6	41.3

<sup>1</sup>Abbreviation: TRT1, basal diet; TRT2, basal diet + 0.01% 단일 생물 소재; TRT3, basal diet + 0.02% 단일 생물 소재; TRT4, basal diet + 0.03% 단일 생물 소재.

<sup>2</sup>Standard error of means.

(가) 이유자돈 사료 내 PED 치료제의 첨가가 이유자돈의 혈액특성에 미치는 영향은 Table 3에 나타내었다. 종료시 (6주) IgG, Cortisol, Epinephrine 및 Norepinephrine 에 있어서는 처리구간 유의적인 차이가 나타나지 않았다 ( $P > 0.05$ ).

(4) 분변내 미생물 조성 (*Lactobacillus*, *E.Coli* 분석)

[표 3] 이유자돈에서 PED 치료용 단일 생물소재에 의한 분변 내 미생물 조성 특성

Items, log <sub>10</sub> cfu/g	TRT1	TRT2	TRT3	TRT4	SEM <sup>2</sup>
Week 6					
<i>Lactobacillus</i>	7.55 <sup>b</sup>	7.65 <sup>a</sup>	7.68 <sup>a</sup>	7.66 <sup>a</sup>	0.03
<i>E.coli</i>	5.77	5.66	5.64	5.61	0.06

<sup>1</sup>Abbreviation: TRT1, basal diet; TRT2, basal diet + 0.01% 단일 생물 소재; TRT3, basal diet + 0.02% 단일 생물 소재; TRT4, basal diet + 0.03% 단일 생물 소재.

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>a,b</sup>Means in the same row with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).



(가) 이유자돈 사료 내 PED 치료제의 첨가가 이유자돈의 분내 미생물 수에 미치는 영향은 Table 4에 나타내었다. 종료시 (6주) *Lactobacillus* 수에 있어서는 0.01% 단일 생물 소재, 0.02% 단일 생물 소재 및 0.03% 단일 생물 소재 처리구가 무처리구 처리구보다 유의적으로 높게 나타났지만 ( $P < 0.05$ ), *Escherichia coli* 수에 있어서는 처리구간 유의적인 차이가 나타나지 않았다 ( $P > 0.05$ ).

### 3. PED치료용 생물소재의 면역력에 미치는 영향평가 결과

(1) 생산 성적 분석 (일당 증체량, 일당 사료 섭취량, 사료 효율 분석)

[표 4] 이유자돈에서 PED 치료용 혼합생물소재가 생산성에 미치는 영향

Items	TRT 1	TRT 2	TRT 3	TRT 4	SEM
<b>Body weight, kg</b>					
Initial	7.28	7.28	7.27	7.25	0.02
Week 1	8.75 <sup>b</sup>	8.82 <sup>ab</sup>	8.84 <sup>ab</sup>	8.88 <sup>a</sup>	0.07
Week 2	11.32	11.39	11.42	11.58	0.12
Week 6	28.45	28.45	28.68	28.85	0.49
<b>Week 0-1</b>					
ADG, g	210.00 <sup>b</sup>	220.00 <sup>ab</sup>	224.29 <sup>ab</sup>	232.86 <sup>a</sup>	10.00
ADFI, g	250.00	255.00	254.00	257.00	4.00
GF	0.840 <sup>a</sup>	0.863 <sup>ab</sup>	0.883 <sup>ab</sup>	0.962 <sup>b</sup>	0.03
<b>Week 1-2</b>					
ADG, g	367.14	367.14	368.57	385.71	11.00
ADFI, g	491.00	498.00	501.00	490.00	9.00
GF	0.748	0.737	0.736	0.758	0.02
<b>Week 2-6</b>					
ADG, g	611.79	609.29	616.43	616.79	16.00
ADFI, g	902.00	910.00	909.00	900.00	8.00
GF	0.678	0.670	0.678	0.685	0.02
<b>Overall</b>					
TADG, g	504.05	504.05	509.76	514.29	12.00
TADFI, g	725.00	732.00	732.00	725.00	5.00
TGF	0.695	0.689	0.696	0.709	0.02

<sup>1</sup>Abbreviation: TRT1, Basal diet; TRT2, Basal diet + 0.01% 혼합 생물소재; TRT3, Basal diet + 0.02% 혼합 생물소재; TRT4, Basal diet + 0.03% 혼합 생물소재.

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>abc</sup>Means in the same row with different superscripts differ ( $P < 0.05$ )

(가) 시험 1주차 체중에 있어 0.03% 혼합 생물 소재 처리구가 무처리구 처리구보다 유의적으로 높게 나타났음 ( $P < 0.05$ ).

(나) 시험 1주차 일당증체량에 있어 0.03% 혼합 생물 소재 처리구가 무처리구 처리구보다 유의적으로 높게 나타났음 ( $P < 0.05$ ).

(다) 시험 1주차 사료효율에 있어 0.03% 혼합 생물 소재 처리구가 무처리구 처리구보다 유의적으로 높게 나타났음 ( $P < 0.05$ ).

(라) 일당 사료 섭취량에 있어 처리구간 유의적인 차이는 없었다. ( $P > 0.05$ ).

(2) 영양소 소화율 분석 (건물 및 질소 분석)

[표 5] 이유자돈에서 PED 치료용 혼합생물소재가 영양소 소화율에 미치는 영향

Items	TRT 1	TRT 2	TRT 3	TRT 4	SEM <sup>2</sup>
Dry matter	78.5	78.8	79.1	79.5	0.72
Nitrogen	77.3	77.3	77.9	78.3	1.3
Energy	79	79.2	79.3	79.9	0.74

<sup>1</sup>Abbreviation: TRT1, Basal diet; TRT2, Basal diet + 0.01% 혼합 생물소재; TRT3, Basal diet + 0.02% 혼합 생물소재; TRT4, Basal diet + 0.03% 혼합 생물소재.

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>abc</sup>Means in the same row with different superscripts differ (P<0.05)

(가) 종료시 (6주) 건물, 질소, 에너지 소화율에 있어서는 처리구간 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (P>0.05).

(3) 혈액 특성 분석 (IgG, IgM, IgA, Cortisol, Epinephrine, Norepinephrine, WBC, Lymphocyte, IL-6 분석)

[표 6] 이유자돈에서 PED 치료용 혼합생물소재에 의한 혈액 특성

Items	TRT 1	TRT 2	TRT 3	TRT 4	SEM <sup>2</sup>
Epinephrine, pg/mL	301.87	361.13	403.11	253.02	114.49
Norepinephrine, pg/mL	3282.08	2346.51	2514.91	1236.68	853.74
WBC, 10 <sup>3</sup> /ul	15.44	17.34	19.16	19.62	3.21
IL-6, pg/ml	2.93	2.83	2.8	2.78	0.17
Lymphocyte, %	50.1	42.9	55.1	49.0	3.9
Cortisol, ug/dL	2.05 <sup>ab</sup>	1.57 <sup>b</sup>	1.94 <sup>ab</sup>	2.96 <sup>a</sup>	0.33
IgG, mg/dL	214.4	214.6	228.3	222.4	10.45
IgA, mg/dL	42.6	43.7	45.6	47.7	1.80
IgM, mg/dL	39.2	39.4	38.4	40.2	1.32

<sup>1</sup>Abbreviation: TRT1, Basal diet; TRT2, Basal diet + 0.01% 혼합 생물소재; TRT3, Basal diet + 0.02% 혼합 생물소재; TRT4, Basal diet + 0.03% 혼합 생물소재.

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>abc</sup>Means in the same row with different superscripts differ (P<0.05)

(가) 종료시 (6주) Cortisol에 있어 0.03% 혼합 생물 소재 처리구가 0.01% 처리구보다 유의적으로 높게 나타났음 (P<0.05).

(나) 종료시 (6주) IgG, IgM, IgA, Epinephrine, Norepinephrine, WBC, Lymphocyte, IL-6 에 있어서는 처리구간 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (P>0.05).

(4) 분변내 미생물 조성 (*Lactobacillus*, *E.Coli* 분석)

[표 7] 이유자돈에서 PED 치료용 혼합생물소재에 의한 분변 내 미생물 조성 특성

Items, log <sub>10</sub> cfu/g	TRT 1	TRT 2	TRT 3	TRT 4	SEM <sup>2</sup>
<i>Lactobacillus</i>	7.15	7.19	7.17	7.22	0.05
<i>E.coli</i>	6.15	6.19	6.18	6.15	0.03

<sup>1</sup>Abbreviation: TRT1, Basal diet; TRT2, Basal diet + 0.01% 혼합 생물소재; TRT3, Basal diet + 0.02% 혼합 생물소재; TRT4, Basal diet + 0.03% 혼합 생물소재.

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>abc</sup>Means in the same row with different superscripts differ (P<0.05)

(가) 종료 시 (6주) *Lactobacillus*, *Escherichia coli* 수에 있어서는 처리구간 유



의적인 차이가 나타나지 않았다 ( $P>0.05$ ).

#### 4. PED치료용 복합생물소재의 면역력에 미치는 영향평가 결과

##### (1) 생산 성적 분석 (일당 증체량, 일당 사료 섭취량, 사료 효율 분석)

[표 8] 이유자돈에서 PED 치료용 혼합생물소재가 생산성에 미치는 영향

Items	CON	TRT1	TRT2	TRT3	SEM <sup>2</sup>
<b>Body weight, kg</b>					
Initial	7.77	7.76	7.76	7.77	0.01
Week 1	8.79	8.85	8.82	8.82	0.03
Week 2	10.27	10.45	10.42	10.35	0.06
Week 6	24.36 <sup>b</sup>	25.22 <sup>ab</sup>	25.62 <sup>a</sup>	24.90 <sup>ab</sup>	0.33
<b>Week 1</b>					
ADG, g	146	155	151	150	4
ADFI, g	164	172	170	170	6
G/F	0.895	0.902	0.894	0.881	0.017
<b>Week 2</b>					
ADG, g	212	229	228	218	7
ADFI, g	269	288	285	276	14
G/F	0.798	0.799	0.804	0.795	0.026
<b>Week 6</b>					
ADG, g	503 <sup>b</sup>	527 <sup>ab</sup>	543 <sup>a</sup>	520 <sup>ab</sup>	11
ADFI, g	750	762	777	761	9
G/F	0.671	0.691	0.699	0.683	0.009
<b>Overall</b>					
ADG, g	395 <sup>b</sup>	416 <sup>ab</sup>	425 <sup>a</sup>	408 <sup>ab</sup>	8
ADFI, g	572	585	594	581	7
G/F	0.690 <sup>b</sup>	0.710 <sup>ab</sup>	0.716 <sup>a</sup>	0.701 <sup>ab</sup>	0.007

<sup>1</sup>Abbreviation: CON, Basal diet; TRT1, CON + 0.01% PED 치료용 생물소재; TRT2, CON + 0.02% PED 치료용 생물소재; TRT3, CON + 0.03% PED 치료용 생물소재.

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>a,b</sup>Means in the same row with different superscript differ significantly ( $P<0.05$ ).

- (가) 시험 6주차 체중에 있어 0.02% PED 치료용 생물 소재 처리구가 무처리구 처리구보다 유의적으로 높게 나타났음 ( $P<0.05$ ).
- (나) 시험 6주차 일당증체량에 있어 0.02% PED 치료용 생물 소재 처리구가 무처리구 처리구보다 유의적으로 높게 나타났음 ( $P<0.05$ ).
- (다) 전체 시험구간의 일당증체량에 있어 0.02% PED 치료용 생물 소재 처리구가 무처리구 처리구보다 유의적으로 높게 나타났음 ( $P<0.05$ ).
- (라) 전체 시험구간의 사료 효율에 있어 0.02% PED 치료용 생물 소재 처리구가 무처리구 처리구보다 유의적으로 높게 나타났음 ( $P<0.05$ ).
- (마) 일당 사료 섭취량에 있어 처리구간 유의적인 차이는 없었다. ( $P>0.05$ ).

##### (2) 영양소 소화율 분석 (건물 및 질소 분석)

[표 9] 이유자돈에서 PED 치료용 혼합생물소재가 영양소 소화율에 미치는 영향

Items	CON	TRT1	TRT2	TRT3	SEM <sup>2</sup>
<b>Finish</b>					
Dry matter	76.49 <sup>b</sup>	77.33 <sup>ab</sup>	78.38 <sup>ab</sup>	78.92 <sup>a</sup>	0.74
Nitrogen	75.97	76.81	77.23	78.25	0.88
Energy	76.97	77.64	78.57	79.47	0.85

<sup>1</sup>Abbreviation: CON, Basal diet; TRT1, CON + 0.01% PED 치료용 생물소재; TRT2, CON + 0.02% PED 치료용 생물소재; TRT3, CON + 0.03% PED 치료용 생물소재.

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>a,b</sup>Means in the same row with different superscript differ significantly ( $P<0.05$ ).

- (가) 종료 시 (6주) 건물에 있어 0.03% PED 치료용 생물 소재 처리구가 무처리

구 처리구보다 유의적으로 높게 나타났음 (P<0.05).

(나) 종료 시 (6주) 질소, 에너지 소화율에 있어서는 처리구간 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (P>0.05).

(3) 혈액 특성 분석 (IgG, IgM, IgA, RBC, WBC, Lymphocyte, IL-6 분석)

[표 10] 이유자돈에서 PED 치료용 혼합생물소재에 의한 혈액 특성

Items	CON	TRT1	TRT2	TRT3	SEM <sup>2</sup>
<b>Finish</b>					
WBC, 10 <sup>3</sup> /μl	15.44	17.75	17.51	16.76	1.88
RBC, 10 <sup>6</sup> /μl	2.45	2.52	2.44	2.45	0.19
Lymphocyte, %	38.66	39.68	40.81	42.66	1.47
IgG, mg/dL	189.0	207.5	211.5	223.8	24.6
IgA, mg/dL	39.5	38.0	39.0	46.8	4.4
IgM, mg/dL	94.0	96.8	106.8	103.0	14.3
IL-6	12.520	13.21	12.25	11.99	3.250

<sup>1</sup>Abbreviation: CON, Basal diet; TRT1, CON + 0.01% PED 치료용 생물소재; TRT2, CON + 0.02% PED 치료용 생물소재; TRT3, CON + 0.03% PED 치료용 생물소재.

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>a,b</sup>Means in the same row with different superscript differ significantly (P<0.05).

(가) 종료시 (6주) IgG, IgM, IgA, RBC, WBC, Lymphocyte, IL-6 에 있어서는 처리구간 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (P>0.05).

#### 5. PED치료용 복합생물소재의 면역력에 미치는 재현성 사양평가 결과

(1) 생산 성적 분석 (일당 증체량, 일당 사료 섭취량, 사료 효율 분석)

(1) 생산 성적 분석 (일당 증체량, 일당 사료 섭취량, 사료 효율 분석)

[표 11] 이유자돈에서 PED 치료용 혼합생물소재가 생산성에 미치는 영향

Items	CON	TRT1	TRT2	TRT3	SEM <sup>2</sup>
<b>Body weight, kg</b>					
Initial	7.84	7.86	7.83	7.82	0.01
Week 1	8.82	8.82	8.81	8.83	0.05
Week 2	10.32	10.41	10.44	10.38	0.06
Week 6	24.38 <sup>b</sup>	25.26 <sup>ab</sup>	25.69 <sup>a</sup>	24.96 <sup>ab</sup>	0.35
<b>Week 1</b>					
ADG, g	145	155	153	149	4
ADFI, g	168	173	171	169	5
G/F	0.885	0.91	0.901	0.891	0.022
<b>Week 2</b>					
ADG, g	213	228	225	219	8
ADFI, g	273	287	289	279	15
G/F	0.799	0.789	0.802	0.801	0.041
<b>Week 6</b>					
ADG, g	503 <sup>b</sup>	527 <sup>ab</sup>	543 <sup>a</sup>	520 <sup>ab</sup>	11
ADFI, g	750	762	777	761	9
G/F	0.671	0.691	0.699	0.683	0.009
<b>Overall</b>					
ADG, g	385 <sup>b</sup>	413 <sup>ab</sup>	427 <sup>a</sup>	413 <sup>ab</sup>	9
ADFI, g	582	582	599	583	7
G/F	0.689 <sup>b</sup>	0.706 <sup>ab</sup>	0.719 <sup>a</sup>	0.703 <sup>ab</sup>	0.009

<sup>1</sup>Abbreviation: CON, Basal diet; TRT1, CON + PED치료용 복합생물소재0.1%; TRT2, CON + 치료용 복합생물소재 0.2%; TRT3, CON + 치료용 복합생물소재 0.3%.

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>a,b</sup>Means in the same row with different superscript differ significantly (P<0.05).

(가) 시험 6주차 체중에 있어 0.02% PED 치료용 복합생물소재 처리구가 무처리구 보다 유의적으로 높게 나타났으며 (P<0.05), 일당증체량 또한 0.02% PED

치료용 복합생물소재 처리구가 무처리구 보다 유의적으로 높게 나타났음 (P<0.05).

(나) 전체 시험구간 (6주사양평가)의 일당증체량에 있어 0.02% PED 치료용 생물 소재 처리구가 무처리구 처리구보다 유의적으로 높게 나타났으며 (P<0.05), 사료효율에 있어도 0.02% PED 치료용 생물 소재 처리구가 무처리구 처리구보다 유의적으로 높게 나타났음 (P<0.05).

(다) 일당 사료 섭취량에 있어 처리구간 유의적인 차이는 없었다. (P>0.05).

(2) 영양소 소화율 분석 (건물 및 질소 분석)

[표 12] 이유자돈에서 PED 치료용 혼합생물소재가 영양소 소화율에 미치는 영향

Items	CON	TRT1	TRT2	TRT3	SEM <sup>2</sup>
Finish					
Dry matter	76.39 <sup>b</sup>	77.64 <sup>ab</sup>	79.03 <sup>ab</sup>	78.99 <sup>a</sup>	0.91
Nitrogen	76.49	76.83	77.05	77.24	0.91
Energy	76.99	77.22	78.01	77.93	0.95

<sup>1</sup>Abbreviation: CON, Basal diet; TRT1, CON +PED치료용 복합생물소재0.1%; TRT2, CON + 치료용 복합생물소재 0.2%; TRT 3, CON +치료용 복합생물소재 0.3%.

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>a,b</sup>Means in the same row with different superscript differ significantly (P<0.05).

(가) 종료 시 (6주) 건물 (Dry matter)에 있어 0.03% PED 치료용 복합생물소재 처리구 무처리구 보다 유의적으로 높게 나타났으나 (P<0.05), 질소 및 에너지 소화율에 있어서는 처리구간 유의적인 차이가 나타나지 않았다. (P>0.05).

(3) 혈액 특성 분석 (IgG, IgM, IgA, RBC, WBC, Lymphocyte, IL-6 분석)

[표 13] 이유자돈에서 PED 치료용 혼합생물소재에 의한 혈액 특성

Items	CON	TRT1	TRT2	TRT3	SEM <sup>2</sup>
Finish					
WBC, 10 <sup>3</sup> /μl	15.52	16.23	17.01	16.95	2.05
RBC, 10 <sup>6</sup> /μl	2.34	2.61	2.34	2.51	0.23
Lymphocyte, %	39.04	39.24	40.63	41.34	1.89
IgG, mg/dL	188.2	201.4	203.5	107.3	18.1
IgA, mg/dL	39.4	37.3	38.0	39.8	1.7
IgM, mg/dL	94.3	97.2	99.3	100.2	8.2
IL-6	12.350	13.01	12.21	13.53	0.980

<sup>1</sup>Abbreviation: CON, Basal diet; TRT1, CON +PED치료용 복합생물소재0.1%; TRT2, CON + 치료용 복합생물소재 0.2%; TRT 3, CON +치료용 복합생물소재 0.3%.

<sup>2</sup>Standard error of means.

(가) 종료시 (6주) IgG, IgM, IgA, RBC, WBC, Lymphocyte, IL-6 에 있어서는 처리구간 유의적인 차이가 나타나지 않았음 (P>0.05).

## 14절. 돼지 유행성 설사 치료제 산업화

### 1. PED치료용 단일생물소재 안정성 수립 및 현장적용 실험

#### (1) 단일 생물소재의 배합비율을 위한 농도 선정 및 제조

			
<p>1. 감태분말 20kg을 식품용 에탄올(발효주정 95%)에 담근다.</p>	<p>2. 감태분말을 2주 동안 추출을 한다.</p>	<p>3. 2주 후 대용량농축기를 이용하여 추출한 감태를 농축시킨다.</p>	<p>4. 필요시 원하는 추출물의 양을 확보하기 위해 2차 추출을 한다.</p>

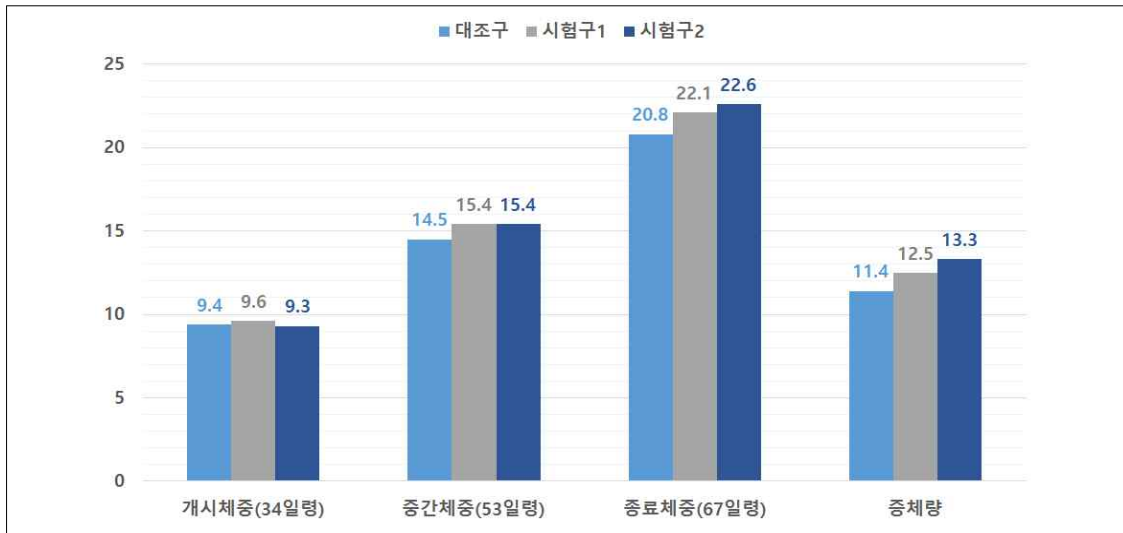
[그림 1] 단일 생물소재 감태 추출 과정.

#### (가) 단일 생물소재 GT-100(감태분말) 및 GT-200(감태추출물)의 최적 비율을 위한 시험

- 34일령의 건강한 이유자돈 120두를 대조구에 40두, 시험구I에 40두, 시험구II에 40두씩 무작위로 분류함.
- 대조군에는 어떠한 물질도 혼합되지 않은 사료를, 시험구I는 34일령부터 GT-100과 GT-200이 9:1로 섞여있는 제제가 0.1%가 들어가도록 혼합한 사료를, 시험구II에는 34일령부터 GT-100과 GT-200이 8:2으로 섞여 있는 제제가 0.1%가 들어가도록 혼합한 사료를 실험기간 동안 제공함.

#### ① 시험결과 및 고찰

- 시험기간: 2016. 01. 28 ~ 02. 29 (33일간)
- 시험장소: GM축산
- 무처리한 대조구와 시험구의 이유자돈에 대하여 33일간 설사, 기침, 위축돈을 포함한 비정상적인 임상증상이 관찰되지 않았으며, 시험기간 동안 폐사한 자돈은 없는 것으로 확인됨.
- 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율을 확인한 결과, 시험구II인 GT-100 : GT200=8:2 각테일 제제 처리구가 이유 자돈의 체중증가에 가장 우수한 것으로 나타남.



[그림 2] GT-100 및 GT-200 각테일 체제 급여가 이유자돈의 성장에 미치는 영향.

## (2) 단일 생물소재의 제형 안정성 연구 및 성분 검정

### (가) GT-100의 제형 안정성 시험

- GT-100의 장기보관시험과 가속시험으로 제형의 안정성 여부를 규명하였음.

#### ① 시험계획

- 본 GT-100의 제형의 안정성을 위하여 시료를 35℃, 45℃에서 6개월간 보관하면서 미생물시험, 이화학시험, 관능검사를 통하여 세균수, 대장균군 검사, 수분함량, pH, 색상관찰(이미, 이취, 형태변화) 등을 1개월 마다 실시하여 검사하였음.
- 저장조건은 온도 45℃±2℃, 35℃±2℃, 상대습도 75%± 5%, 저장기간 6개월

#### ② 시험결과 및 고찰

- 35℃ 저장의 경우 6개월, 45℃ 저장의 경우 6개월까지 제품의 세균과 대장균군이 음성이었고, 수분함량과 pH 수치는 규격에 적합하였으며, 색상도 이미, 이취, 색, 외관 등 변화가 없이 양호하였음.
- 즉 GT-200의 원료조건 및 보관방법으로 인하여 보존성은 확보될 수 있으며 유통과정 중의 품질변화나 규격 부적합사유가 발생되지 않을 것으로 판단되어 GT-200의 안정성과 품질에 별다른 문제점이 없을 것으로 규명되었음.

### (나) 단일 생물소재 GT-100과 GT-200의 성분 분석

- ① 일반 조성분 중 감태분말보다 높게 검출된 성분은 조지방으로 31.56%가 나왔으며, 칼로리는 5600 cal/g로 감태분말보다 높게 나타났음. 무기물 분석 결과 마그네슘은 1843.56 mg/kg이 검출되었으며 세포막 구성물질인 NDF, ADF, 셀룰로스, 실리카, 리그닌은 검출되지 않았음.

- ② 유해성분을 검사한 결과 카드뮴, 수은, 납에서 기준치 이하로 검출되어 추후 다른 활성소재로 변경 예정임.
- ③ 즉 GT-200(감태추출물)의 성분을 분석한 결과 GT-100(감태분말)보다 분석성분에 대해서 대부분 낮게 나왔으며, 추출방법에 따라 차이는 있겠지만 추후에 유효성분에 대한 추출방법에 따른 추출실험을 할 필요가 있음. GT-100과 GT-200을 혼합한 각테일 제제를 활용한다면 사료 및 첨가제로서 가치 있는 것으로 판단되었음.

(3) PED 치료용 단일 생물소재의 임상시험

(가) 단일 생물소재의 자돈 현장적용 시험을 통한 안전성 시험

- 과제명 [돼지 유행성 설사 치료제 산업화]에 의거하여 단일 생물소재인 GT-200의 안전성 여부를 규명하고자 함.

① 시험계획

- 31일령의 건강한 이유 자돈을 3일간 순치함.
- 순치기간 동안 설사를 포함한 질병의 유무를 확인한 후, 특히 임상증상이 없는 경우 실험동물로 사용하였음.
- 상술한 34일령의 건강한 자돈 120두를 각각 40두씩 대조구, 시험구 I (0.01%) 과 시험구 II (0.1%)로 무작위로 분류한 후, 대조구는 어떠한 물질도 투여하지 않으며, 시험구 I은 34일령부터 0.01%의 GT-200과 시험구 II는 0.1%의 GT-200을 사료에 혼합 한 후, 급이를 통해 33일 동안 투여하였음.

② 시험구 배치

[표 1] PED 치료용 단일 생물소재 시험군

구 분	대조구	시험구 I	시험구 II
공시두수	40	40	40

② 시험결과 및 고찰

- 무처리한 대조구, 시험구 I 및 시험구 II의 이유 자돈들에 대하여 33일간 설사, 기침을 포함한 비정상적인 임상증상의 발현을 체크한 결과 대조구, 시험구 I 및 시험구 II의 자돈들에서는 전혀 관찰되지 않았음.
- 즉 GT-200의 용량은 이유 자돈에 임상적으로 안전하다는 것이 규명되었음.
- 시험동물의 부검 및 육안검사에서도 장기 및 조직에서 어떠한 병변도 관찰되지 않았음.
- 체중변화를 확인한 결과, 각테일 제제의 용량은 이유 자돈의 체중증가에 변화를 주는 것으로 확인하였음.



(나) 단일 생물소재의 자돈 현장적용 시험을 통한 효능 시험

- 과제명 [돼지 유행성 설사 치료제 산업화]에 의거하여 돼지 유행성 설사 (PED) 치료효과 여부 검증과 증체효과를 규명하고자 함.

① 시험계획

- 24일령의 건강한 자돈 120두를 각각 40두씩 대조구, 시험구I 및 시험구II로 무작위로 분류한 후, 대조구는 어떠한 물질도 투여하지 않으며, 시험구I은 24일령부터 0.1%의 각테일 제제(KW-100/ST-100)와 시험구II는 0.1%의 각테일제제(GT-100:GT-200 =9:1)을 사료에 혼합 한 후, 급이를 통해 20일 동안 투여하였음.
- 효능 시험 시 돼지 유행성 설사(PED)를 유발시키는 바이러스가 발생되지 않은 경우 기본적인 항목인 증체, 폐사율 및 사료섭취량을 측정하였음.

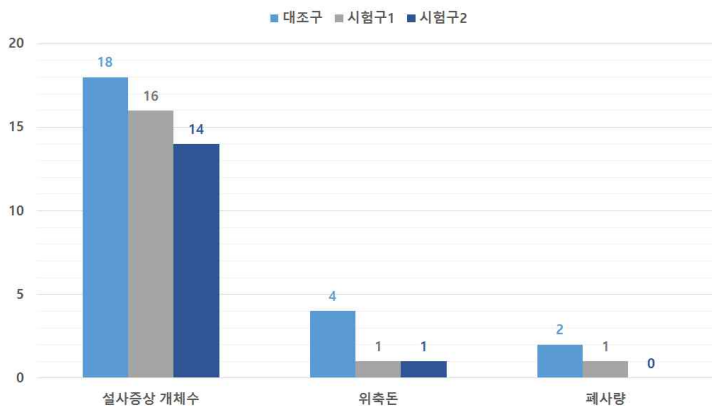
[표 2] PED 치료용 단일소재 GT-200에 대한 효능평가

Group	No. of animals	Age of animals (days)	Treatment	Dosage	Route	Experimental period
Control	40	24	None	0	Oral	20 days
I	40	24	KW-100/ST-100	0.1%	Oral	20 days
II	40	24	GT-100:GT-200=9:1	0.1%	Oral	20 days

- 효능 검사에 사용된 이유자돈에는 매일 사료와 음수를 무제한 공급하였으며, 체중 측정은 개시체중, 중간 체중, 종료체중으로 나누어서 측정하였음.
- 20일간의 실험기간 동안 설사, 기침과 같은 특이 임상증상의 발현 유무를 매일 검사하였음.
- 현장규모/도출된 생물소재 투약구 및 비투약 대조구간의 위축돈, 폐사율 및 유효율을 조사하였음.

② 시험결과 및 고찰

- 20일간의 효능평가 결과, 설사증상에 대한 차이는 유의적이지 않는 반면, 시험구 I 과 시험구II에서 위축돈 및 폐사율이 낮은 것을 확인하였음.



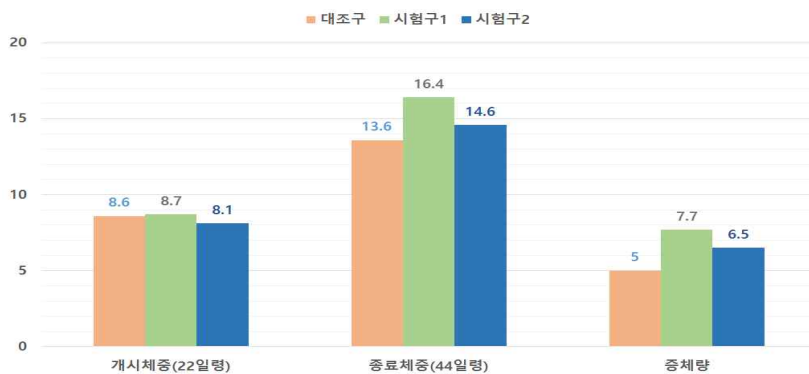
[그림 3] GT-100 및 GT-200 각테일 제제 급여가 이유자돈의 설사, 위축돈 및 폐사에 미치는 영향.

- 사료첨가제로써의 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율을 평가한 결과, 시험구 II는 이유 자돈의 체중증가, 위축돈 발생, 설사감소, 폐사율 감소에 우수한 것으로 나타남을 확인하였음.

[표 3] PED 치료용 단일소재 급여가 이유자돈의 성장에 미치는 영향

구 분	개시체중 (24일령) (kg)	종료체중 (44일령) (kg)	증체량 (kg)	사료섭취량 (kg)	사료요구율 <sup>1)</sup>
대조구	8.6±1.4	13.6±2.1	5.0	500	100
I	8.7±1.2	16.4±1.6	7.7	530	68.8
II	8.1±1.4	14.6±1.5	6.5	530	81.5

주) 평균±표준오차, <sup>1)</sup>배합사료 섭취량에 대한 사료요구율(사료섭취량/증체량)임.



[그림 4] GT-100 및 GT-200 각테일 제제 급여가 이유자돈의 성장에 미치는 영향.

## 2. PED치료용 혼합생물소재의 최적화 연구

### (1) PED 치료용 혼합생물소재의 최적화 수립

#### (가) 혼합생물소재 제조

- 혼합생물소재 추출 시험



5. 소재를 동결건조 판에 넣어 4일 동안 동결건조

6. 동결건조 된 혼합생물소재를 회수함

[그림 5] 혼합생물소재 추출 과정 모식도.

(나) 혼합생물소재 농도 선정

① 혼합생물소재 농도 선정 기준

- 농가에서 사료 급이를 위하여 사료첨가제를 투입할 당시, 사료첨가제의 비율이 확대되었을 경우, 가격 경쟁력이 낮아진다는 단점을 가지고 있음.
- 위의 내용을 토대로 하여, 0.1%와 0.3%를 설정하여 시험을 진행하고, 혼합생물소재에 대한 평가를 진행하였음.

② 시험결과

- 혼합생물소재 급여가 이유 자돈의 체중 증가에 도움을 주는 것을 확인 할 수 있었으며, 이 중 0.1% 투여구인 시험구 I 이 가장 우수한 것을 확인 할 수 있었음.
- 또한 시험구에서 대조구에 비하여 폐사율이 감소되는 것을 확인 할 수 있었고, 이는 혼합생물소재 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였음.

[표 4] 혼합생물소재 제제 급여가 이유자돈 성장에 미치는 영향

구 분	개시체중 (kg) (31일령)	중간체중 (kg) (45일령)	종료체중 (kg) (66일령)	증체량 (kg)	폐사율 (%)
대조구	9.4	15.3	20.2	10.7	33.3
I (0.1%)	7.4	15.1	19.8	12.5	25
II (0.2%)	8.0	15.1	19.4	11.4	9

(다) 혼합생물소재의 제형 안정성 연구

- 과제명 [돼지 유행성 설사 치료제 산업화]에 의거하여 혼합생물소재의 장기 보관시험을 통하여 제형의 안정성 여부를 규명하고자 하였음.

① 시험계획


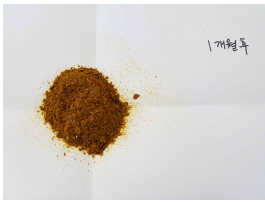
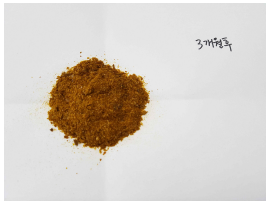
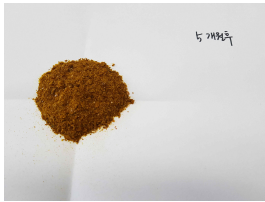
- 본 혼합생물소재의 제형 안정성 평가를 위하여, 시료를 실온, 상온(25℃)에서 5개월간 보관하면서 미생물실험 혼입, 이화학실험, 관능검사를 통하여 세균수, 대장균군검사, 수분함량, pH, 색상관찰(이미, 이취, 형태변화) 등을 1개월 마다 실시하여 검사하였음.
- 저장조건은 온도 실온, 상온, 상대습도 65%± 5%, 저장기간 5개월

① 시험결과 및 고찰

- 상온과 실온 모두 5개월까지 제품의 세균과 대장균군이 음성이었고, 수분함량과 pH 수치는 규격에 적합하였으며, 색상도 이미, 이취, 색, 외관 등 변화가

없이 양호하였음.

- 따라서, 혼합생물소재가 유통과정 중의 품질변화나 규격 부적합사유가 발생되지 않을 것으로 판단되어 안정성과 품질에 문제점이 없을 것으로 규명되었음.

			
1. 혼합소재의 성상	2. 저장 1개월 후 혼합소재의 제형 변화 없음	3. 저장 3개월 후 혼합소재의 제형 변화 없음	4. 저장 5개월 후 혼합소재의 제형 변화 없음

[그림 6] 혼합생물소재 안정성 평가.

(2) PED 치료용 혼합생물소재의 안전성 평가

- 과제명 [돼지 유행성 설사 치료제 산업화]에 의거하여 혼합생물소재의 안전성을 규명하고자 하였음.

① 안전성 평가 시험 계획

- 31령의 건강한 자돈 30두를 각각 10두씩 대조구, 시험구 I (0.1%)과 시험구 II (0.3%)로 무작위로 분류한 후, 대조구는 어떠한 물질도 투여하지 않으며, 시험구 I 과 시험구 II는 혼합생물소재를 각각 0.1%, 0.3% 사료에 혼합 한 후 35일 동안 급이하였음.

② 안전성 평가 결과

- 혼합생물소재를 처리하지 않은 대조구, 시험구 I 및 시험구 II의 이유 자돈들에 대하여 35일간 설사, 기침, 위축돈을 포함한 비정상적인 임상증상이 전혀 관찰되지 않았으며, 시험기간 동안 혼합생물소재에 의한 폐사는 없는 것으로 관찰되었음.
- 즉, 혼합생물소재 급여는 이유 자돈에 임상적으로 안전하였음.
- 체중변화를 확인 한 결과, 혼합생물소재의 첨가는 이유 자돈의 체중을 증가시키는 것을 확인하였음.

[표 5] 혼합 생물소재 제제 급여가 이유자돈의 성장에 미치는 영향

구 분	개시체중(kg) (31일령)	중간체중(kg) (45일령)	종료체중(kg) (66일령)	증체량(kg)	폐사율 (%)
대조구	7.6	12.0	18.4	10.9	30
I	7.6	12.8	19.6	12.0	10

## (3) 혼합생물소재의 임상 효능 평가

## (가) 실용화 및 상품화를 위한 혼합생물소재의 효능 평가

- 과제명 [돼지 유행성 설사 치료제 산업화]에 의거하여 돼지 유행성 설사 (PED) 치료효과를 검증하고 증체효과를 규명하고자 하였음.

## ① 시험 계획

- 31령의 건강한 자돈 60두를 각각 20두씩 대조구, 시험구 I (0.1%)과 시험구 2(0.3%)로 무작위로 분류한 후, 대조구는 어떠한 물질도 투여하지 않으며, 시험구 I 은 31일령부터 0.1%, 시험구 II는 0.3%의 혼합소재를 사료에 혼합 한 후, 급이를 통해 35일 동안 투여하였음.
- 효능 시험 시 돼지 유행성 설사(PED)를 유발시키는 바이러스가 발생되지 않은 경우 기본적인 항목인 증체, 폐사율을 측정하였음.

## ② 시험결과 및 고찰

- 무처리한 대조구, 시험구 I 및 시험구 II의 이유 자돈들에 대하여 35일간 설사, 기침, 위축돈을 포함한 비정상적인 임상증상의 발현을 체크한 결과, 모든 그룹에서 설사 증상이 크게 보이지 않음을 확인하였음.
- 정확한 진단을 위하여 처리구별로 분변을 채취하여 바이러스 및 세균을 진단 하였음.
- 분변으로부터 설사성 바이러스 및 세균이 모두 검출 되지 않았음. 즉, 혼합 생물소재 급이를 통한 PED 치료 효과를 입증하기 어려움.

[표 6] 현장시험 돼지 바이러스 검사 결과

자돈 소화기 항원 검사 결과서				
		접수번호 :		17-0143
접수일자	2017. 05. 12	의뢰정보	바이오텐(주)	
시료내역	분변swab 9점	농장정보		
순번	검체번호	PEDV	TGEV	Rotavirus
1	Con-1	N	N	N
2	Con-2	N	N	N
3	Con-3	N	N	N
4	T1-1	N	N	N
5	T1-2	N	N	N
6	T1-3	N	N	N
7	T2-1	N	N	N
8	T2-2	N	N	N
9	T2-3	N	N	N

Con: 대조구; T1: 0.1%; T2: 0.3%. N: Negative; P: Positive.

[표 7] 현장시험 돼지 세균 검사 결과

자돈 소화기 항원 검사 결과서				
			접수번호 :	17-0174
접수일자	2017. 05. 24	의뢰정보		바이오텐(주)
시료내역	분변swab 9점	농장정보		
순번	검체번호	<i>Lawsonia intracellularis</i>	Swine dysentery	<i>Salmonella</i>
1	Con-1	N	N	N
2	Con-2	N	N	N
3	Con-3	N	N	N
4	T1-1	N	N	N
5	T1-2	N	N	N
6	T1-3	N	N	N
7	T2-1	N	N	N
8	T2-2	N	N	N
9	T2-3	N	N	N

Con: 대조구; T1: 0.1%; T2: 0.3%. N: Negative; P: Positive.

- 체중변화를 확인 한 결과, 0.1% 급이 조건인 시험구 I 이 가장 높은 증체효과를 보이는 것을 확인 할 수 있었음.
- PED 발병이 일어나지 않아서 혼합생물소재를 이용한 PED 치료 효과를 평가하기 어려움.
- 따라서, 일반적인 사료첨가제로서의 활용가치를 평가함으로써 소재의 가능성을 평가함. 결론적으로, 혼합생물소재의 급이는 이유 자돈의 체중 증가에 우수한 것으로 나타났음.

[표 8] 혼합 생물소재 급여가 이유자돈의 성장에 미치는 영향

구 분	개시체중 (kg) (31일령)	중간체중 (kg) (45일령)	종료체중 (kg) (66일령)	증체량 (kg)
대조구	7.5	10.6	19.9	12.4
I	7.4	11.4	21.3	13.9
II	7.0	10.9	20.5	13.5

(4) 혼합생물소재를 활용한 시제품 생산

- (가) 본 기업에서 판매하고 있는 사료첨가제 형태의 포장에 혼합생물소재를 이용한 시제품을 적용하여 시제품을 생산하였음.
- (나) 농가에게 사용 방법 및 배합비를 제품설명 부분에 첨부하여 설명하였음.



[그림 7] 시제품 생산과정.



### 3. PED치료용 혼합생물소재의 생산화 연구

#### (1) PED 치료용 혼합생물소재의 생산화 수립

##### (가) 후보생물소재의 생산을 위한 공정 시스템 구축 및 제조

##### - 후보생물소재 추출



[그림 8] PED 치료용 후보생물소재 추출 과정.

- 다양한 추출 기법을 기반으로 추출효율을 평가한 결과, 마이크로웨이브를 활용한 추출이 가장 높은 효율을 보였고, 소요 시간과 추출상에 발생하는 시설 비용을 크게 절감시킬 수 있었음.
- 후보생물소재 추출을 위한 원료의 배합비는 소재의 추출율과 경제성을 기반으로 결정하여 가장 효율적인 배합비를 결정하였음.

##### (나) 후보생물소재 농도 선정을 위한 연구

- 과제명 [돼지 유행성 설사 치료제 산업화]에 의거하여 후보 생물소재의 배합 비율을 통한 최적화 연구.

##### ① 시험 계획

- 31일령의 건강한 이유자돈을 대조구, 시험구에 무작위로 분류하였음.
- 대조구에는 혼합되지 않은 사료를, 시험구는 31령부터 후보생물소재 0.1%와 0.3% 섞여 있는 혼합 사료를 시험기간 동안 제공하였음.

##### ② 농도선정 시험 결과

- 임상증상의 발현을 체크한 결과, 설사, 기침, 위축돈을 포함한 비정상적인 임

상증상의 발현이 대조구에 비하여 시험구에서 감소하는 것을 확인하였고, 소재 투입량에 따라 폐사율이 감소하는 경향을 확인함.

[표 9] 후보 생물소재 급여가 이유자돈에 미치는 영향

구 분	개시체중 (31일령) (kg)	중간체중 (45일령) (kg)	종료체중 (66일령) (kg)	증체량 (kg)	폐사율 (%)
대조구	7.5	12.4	19.4	11.9	20
I	7.4	12.9	20.3	12.9	10
II	7.5	12.6	19.8	12.3	9.1

- 후보 생물소재 급여가 이유 자돈의 체중 증가에 효과적인 것을 확인 할 수 있었으며, 0.1% 후보생물소재의 급여가 가장 우수한 것을 확인 할 수 있었음.



1. 시험 자돈의 사육 모습

2. 후보생물소재가 배합된 사료를 섭취하는 자돈의 모습



3. 대조구, 시험구 I, 시험구 II 자돈 모습

6. 위축돈 발생여부 확인 모습

[그림 9] 시험농장 및 이유자돈의 모습.

(다) 후보생물소재의 제형 안정성 연구


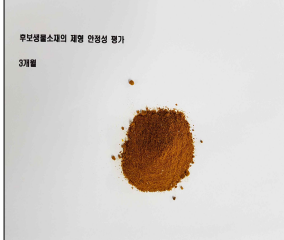
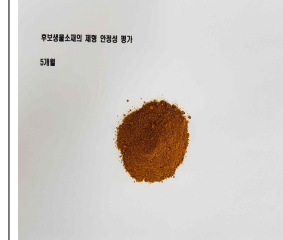
- 과제명 [돼지 유행성 설사 치료제 산업화]에 의거하여 후보 생물소재의 장기 보관시험 및 가속시험을 통하여 제형의 안정성 여부를 규명하였음.

① 제형 안정성 평가 계획

- 후보생물소재의 제형 안정성 평가를 위하여 시료를 25°C±2°C(장기보관시험), 40°C±2°C(가속시험) 에서 5개월간 보관하면서 미생물시험, 이화학시험, 관능검사를 통하여 세균수, 대장균군검사, 수분함량, pH, 정상관찰(이미, 이취, 형태변화) 등을 1개월 마다 실시하여 검사하였음.
- 상대습도는 60%±5%(장기보관시험), 75%±5%(가속시험)로 진행하였음.

② 평가 결과 및 고찰

- 장기보관시험 및 가속시험에서 모두 5개월까지 시료의 세균과 대장균군이 음성이었으며, 수분함량과 pH 수치는 규격에 적합하였으며, 색상도 이미, 이취, 색, 외관 등 변화가 없이 양호하였음.
- 즉, 후보생물소재의 원료조건 및 보관방법으로 인하여 보존성은 확보될 수 있으며, 유통과정 중의 품질변화나 규격 부적합사유가 발생되지 않을 것으로 판단되어 안정성과 품질에 문제점이 없을 것으로 사료됨.

 <p>후보생물소재의 제형 안정성 평가 0개월</p>	 <p>후보생물소재의 제형 안정성 평가 1개월</p>	 <p>후보생물소재의 제형 안정성 평가 3개월</p>	 <p>후보생물소재의 제형 안정성 평가 5개월</p>
1. 후보생물소재의 성상	2. 저장 1개월 후 혼합 소재의 제형 변화 없음	3. 저장 3개월 후 혼합 소재의 제형 변화 없음	4. 저장 5개월 후 혼합 소재의 제형 변화 없음

[그림 10] 장기보관/가속시험에 따른 제형의 변화 모습.

(2) PED 치료용 후보생물소재의 현장적용 시험

(가) 이유자돈 구간에서의 후보생물소재의 효능 검증

- 과제명 [돼지 유행성 설사 치료제 산업화]에 의거하여 돼지 유행성 설사 (PED) 치료효과 및 안정성을 검증하고 증체효과를 규명하고자 함.

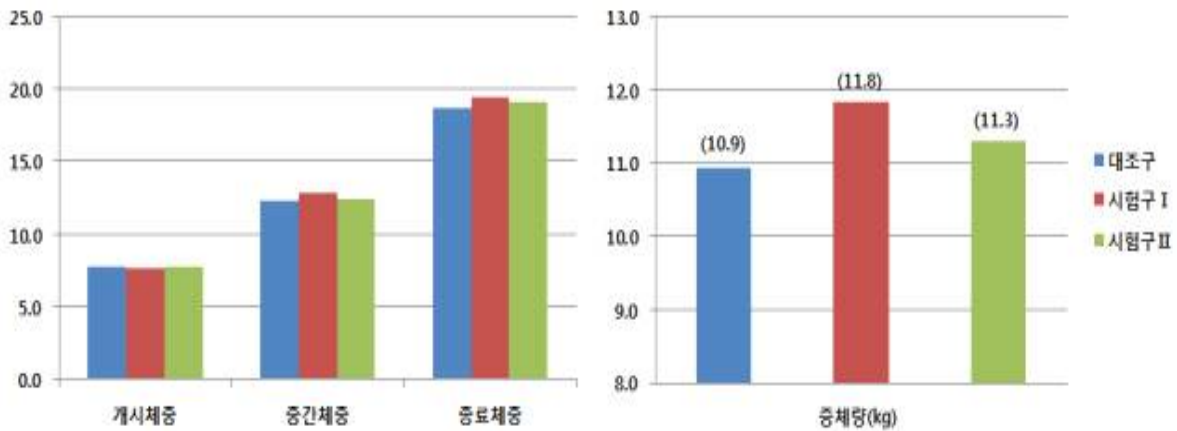
① 현장적용평가를 위한 시험 계획

- 31령의 건강한 자돈 30두를 각각 10두씩 대조구, 시험구(0.1%)과 시험구II (0.3%)로 무작위로 분류한 후, 대조구는 어떠한 물질도 투여하지 않고, 시험구 I 은 31일령부터 0.1%, 시험구II는 0.3%의 후보생물소재를 사료에 혼합 한 후 35일 동안 투여하였음.
- 35일간의 시험기간 동안 설사, 기침과 같은 특이 임상증상의 발현 유무를 매일 검사하였음.

- 현장규모/도출된 생물소재 투약구 및 비투약 대조구간의 위축돈, 폐사율 및 유효율을 조사하였음.

② 현장적용평가 결과

- 효능평가 시 돼지 유행성 설사(PED)를 유발시키는 바이러스가 발생되지 않아 기본적인 항목인 증체 및 폐사율을 측정하였음.
- 무처리한 대조구, 시험구 I 및 시험구 II의 이유 자돈들에 대하여 35일간 설사, 기침, 위축돈을 포함한 비정상적인 임상증상의 발현을 체크한 결과, 대조구와 실험구간의 큰 차이를 확인 할 수 없었음.
- 폐사를 관찰한 결과, 시험구에서는 폐사가 발생되지 않는 반면에, 대조구에서는 폐사가 발생하는 것을 확인하였음.
- 시험구 I 및 시험구 II 이유 자돈의 체중을 검사한 결과, 대조구에 비하여 체중이 증가되었으며, 이 중 시험구 I 은 대조구보다 1.5kg 증체량을 보였고, 시험구 II는 1.1kg의 증체량을 보였음.
- 즉, 후보생물소재의 급이는 이유 자돈의 체중 증가에 우수하였음.



[그림 11] 후보생물소재 급이에 따른 이유자돈의 체중변화 및 증체량.

(3) PED 치료용 후보생물소재의 안전성 평가

(가) 실용화 및 상품화를 위한 후보생물소재의 안전성 평가

- 과제명 [돼지 유행성 설사 치료제 산업화]에 의거하여 후보생물소재의 안전성을 규명하고자 함.

① 안전성 평가를 위한 시험 계획

- 양돈의 사육에서 가장 높은 폐사율을 보이는 구간은 자돈시기임으로써 자돈의 폐사를 예방하기 위하여 많은 첨가제와 치료제 등이 개발되고 있음.
- 따라서, 후보생물소재의 실용화 및 상품화를 위한 안전성 평가를 이유자돈에



서 실시하였음.

- 31령의 건강한 자돈 33두를 각각 11두씩 대조구, 시험구 I (0.1%)과 시험구 II (0.3%)로 무작위로 분류한 후, 대조구는 어떠한 물질도 투여하지 않으며, 시험구 I 과 시험구 II는 후보생물소재를 각각 0.1%, 0.3% 사료에 혼합 한 후 35 일 동안 급이 하였음.

② 시험결과 및 고찰

- 대조구, 시험구 I 및 시험구 II의 이유 자돈들에 대하여 35일간 후보생물소재 급이를 통한 설사, 기침, 위축돈을 포함한 비정상적인 임상증상을 측정한 결과, 특히 이상 증상이 전혀 관찰되지 않았으며, 후보생물소재에 의한 폐사는 없는 것으로 관찰되었음.
- 시험구 I 과 시험구 II의 자돈에서 후보생물소재 급이 농도에 따른 이상 증상이 관찰되지 않았으며, 사료 섭취량에도 차이를 보이지 않았음.
- 즉, 후보생물소재는 이유자돈에 임상적으로 안전하다는 것이 확인됨.
- 체중변화를 확인한 결과, 시험구 I 은 대조구에 비하여 0.9kg 더 높게 증체 되었고, 시험구 II는 0.5kg 높은 증체율을 보이는 것을 확인 할 수 있었음.
- 폐사율의 경우 대조구는 18.2%의 폐사율을 보이는 반면에, 시험구 I 및 시험구 II에서는 각각 9.1%의 폐사율을 보여 후보생물소재 투여 시 폐사율이 감소 됨을 확인할 수 있었음.
- 즉, 후보생물소재의 첨가는 이유 자돈의 체중증가에 변화를 주는 것으로 규명되었음.

[표 10] 후보생물소재 급이에 따른 이유자돈의 성장 변화

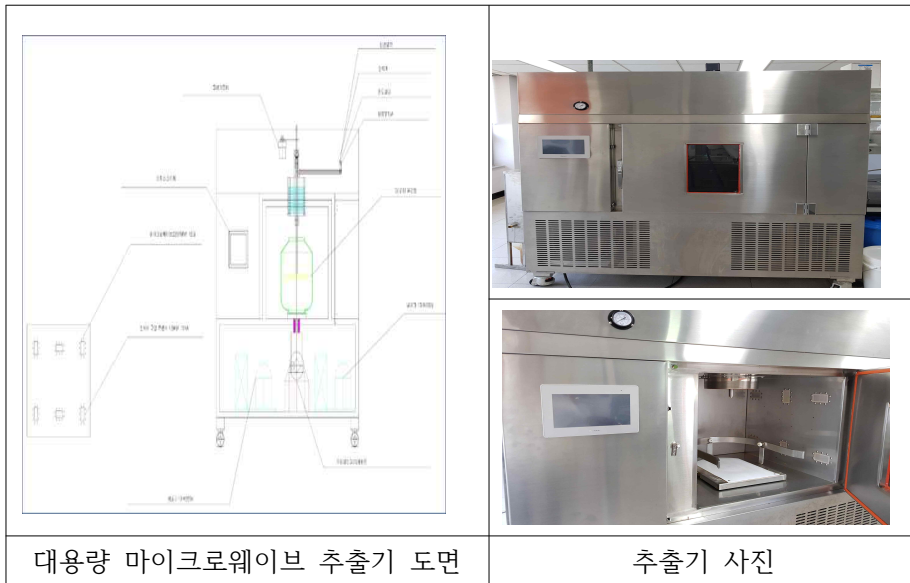
구 분	개시체중 (31일령) (kg)	중간체중 (45일령) (kg)	종료체중 (66일령) (kg)	증체량 (kg)	폐사율 (%)
대조구	7.5	12.1	19.1	11.6	18.2
I	7.6	12.5	20.1	12.5	9.1
II	7.5	12.4	19.6	12.1	9.1

(4) PED 치료용 후보생물소재의 시제품 제작

(가) 후보생물소재의 대량생산을 위한 공정 시스템 구축

① 후보생물소재의 대량생산 설비 구축

- 후보생물소재의 대량생산을 위하여 대용량 마이크로웨이브 추출기를 자체 제작하였음.



[그림 12] 대용량 마이크로웨이브 추출기.

- 대용량 마이크로웨이브의 개발을 통해 후보생물소재의 높은 추출 함량과 추출시간 단축을 일궈냄.

② 대량공정시스템을 통한 시제품 생산

- 개발된 대용량 마이크로웨이브 장비를 활용하여 후보생물소재를 추출.



[그림 13] 대용량 마이크로웨이브를 활용한 시제품 생산과정.

- 사료첨가제 형태의 포장으로 후보생물소재를 활용한 시제품을 생산함.





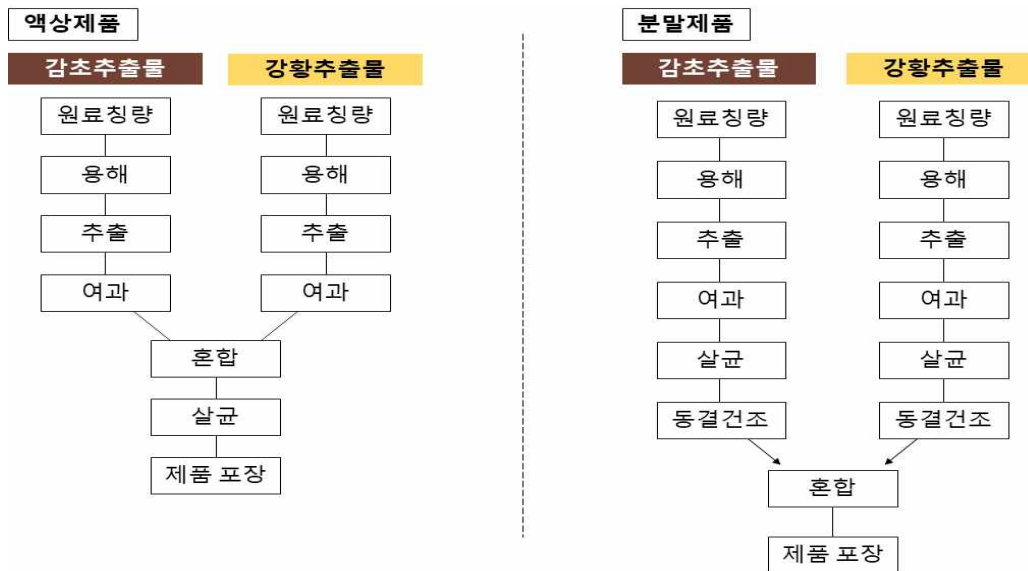
5kg 단위 포장

박스 포장

[그림 14] 대용량 마이크로웨이브를 활용한 시제품 생산과정.

#### 4. PED치료용 혼합생물소재의 대량 생산화 연구

(1) PED 치료용 후보생물소재로 개발된 제품의 대량생산공정 구축 및 성분분석




[그림 15] PED 치료용 활용 시제품 생산공정 모식도.

(가) PED 후보생물소재 활용 시제품 생산 평가

- ① 과제명에 의거 3차년도 연구과제에서 도출된 PED 치료용 후보소재를 활용하여 액상과 분말 형태의 시제품을 생산하였음.
- ② 시제품의 유효성분에 함량은 3차년도에 수행하였던 후보생물소재를 활용한 효력시험의 결과를 기반으로 설정하였으며, 평가된 후보소재와의 유효성분 함

량에 맞추어 배합하였음.

- ③ 시제품의 생산은 다양한 추출법을 기반으로 추출효율 및 생산성을 평가한 결과, 3차년도 연구에서 대량생산을 위한 공정으로 구축된 대용량 마이크로웨이브 추출기를 활용한 제조공정이 높은 추출 효율과 생산성으로 생산비용을 절감시킬 수 있었음.
- ④ 또한, 추출의 효율을 높이기 위한 부형제로 스테비올배당체(Steviol glycoside)를 활용하여 추출효율 및 생산 제품에 대한 감미를 향상시켰음.
- ⑤ 시제품의 생산 공정은 마이크로웨이브를 활용한 추출공정을 기반으로, 감초 및 강황 추출물을 생산하고 이후 필터프레스를 활용한 정제과정과 온열살균을 통해 2개의 반제품을 생산함. 최종적으로 2종류의 반제품을 혼합하여 시제품을 생산하였음.
- ⑥ 분말 제품의 경우, 액상 제품의 공정과정에 동결건조(Freeze/Dry) 공정을 추가하여 생산함.

		
1. 원재료 칭량	2. 추출가공을 위한 원재료 준비	3. 마이크로웨이브를 이용한 추출
		
4. 필터프레스를 활용한 정제	5. 80°C 이상에서 온열살균	6. 동결건조 (분말 제품)
		
감초추출액 액상 / 분말 제품	강황 추출물 액상 / 분말 제품	혼합 액상 및 분말

[그림 16] PED 치료용 후보생물소재 활용 싯품 생산과정 및 액상/분말 제품 이미지.

- ⑦ 상기 생산 공정을 통한 시제품의 일일 생산량은 대용량 마이크로웨이브 추출기 당 약 100L 생산 할 수 있음.

(나) 시제품의 HPLC 장비를 사용한 제품의 유효성분 정량 분석방법 수립

- ① 시제품 2종은 돼지 유행성 설사 치료 후보소재인 감초 추출물과 강황 추출물을 기반으로 혼합하여 사용하였으며, 유효성분으로 글리시리진산(Glycyrrhizic acid)과 커큐민(Curcumin)를 함유하였음.
- ② 부형제로 활용된 스테비올배당체(Steviol glycoside)의 함량은 스테비오사이드(Stevioside)와 레바우디오사이드(Rebaudioside)의 함량을 합하여 측정하였음.
- ③ HPLC 분석 장비를 활용하여 생산된 시제품의 유효성분에 대한 자체적인 함량 분석을 위해 분석설비와 시험공정 과정을 수립하였음.
- ④ 시제품의 유효성분에 대한 HPLC 분석에서 성분별 유효 파장의 값, Retention time, Standard 등의 기준 값을 확립하여 분석하였음.
- ⑤ 생산된 모든 시제품에 대하여 3회 반복하여 유효성분 함량을 분석하였으며, 기준 함량범위 이하의 시제품이 생산되지 않도록 하였음.
- ⑥ 또한, 분석된 유효성분의 수치는 시제품 생산 공정 구축 및 자체 안정성 평가 그리고 기준 및 시험방법 등의 자료로 활용하였음.

#### HPLC 분석방법

##### ○ 분석 시료제작

- 시제품의 분석시료제작은 시제품 2종을 MeOH로 10배 희석하여 vortexing 한다. 그 다음 시제품과 MeOH의 혼합액의 상층액 1mL를 취하여 0.2 $\mu$ m membrane filter로 filtration 한 후 HPLC 분석한다.

##### ○ HPLC조작 조건

- HPLC Apparatus: Agilent technology 1200 series
- Pumping system: Binary pumps
- Detector: Glycyrrhizic acid;DAD(254 nm), Curcumin;DAD(210nm), Stevioside;DAD(210 nm), Rebaudioside(210 nm).
- Flow rate: 1 ml/min
- Sample injection volume: 10  $\mu$ l
- Column: phenomenex, Gemini-NX C18 110A, 3 $\mu$ m, 150x4.6mm
- Column oven: 20 °C (Curcumin) / 40°C ( Glycyrrhizic acid, Steviol glucoside, Rebaudioside)
- Flow solvent A: 0.1% TFA in Water
- Flow solvent B: 0.1% TFA in Acetonitrile
- Solvent condition: Gradient (Glycyrrhizic acid, Steviol glycoside)

시간	A(%)	B(%)	Flow rate(mL/min)
0	65	35	1.0
10	65	35	1.0
20	50	50	1.0

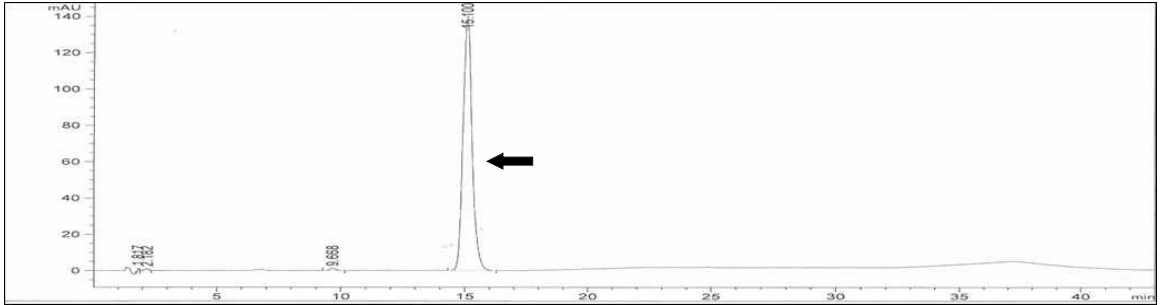
30	50	50	1.0
40	35	65	1.0
50	60	40	1.0

- Solvent condition: Isocratic (Curcumin)

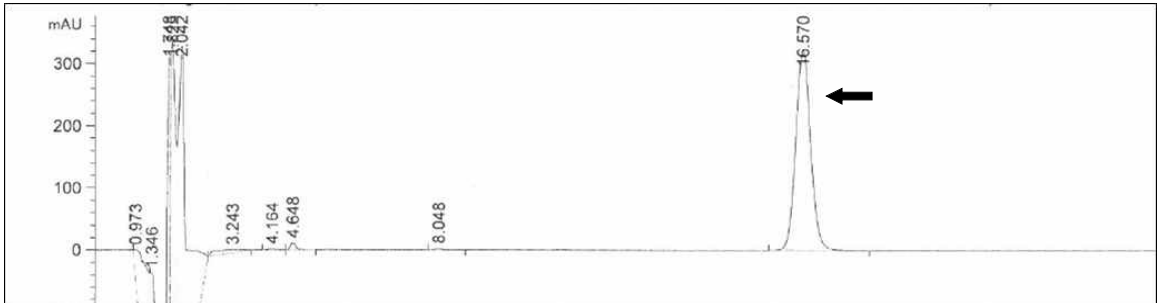
Time(min)	A(Water)	B(ACN)
0	55	45
25	55	45

○ 유효성분의 시험 용액에 대표 크로마토그램

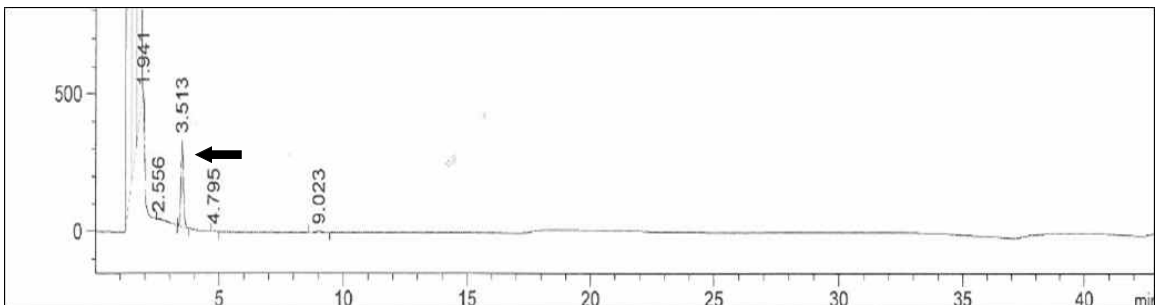
▶ Glycyrrhizic acid



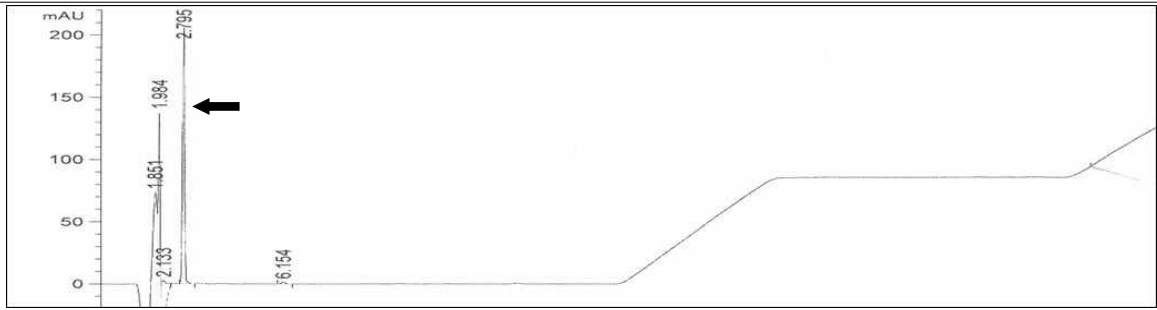
▶ Curcumin



▶ Stevioside



▶ Rebaudioside



구성 요소	정체 시간(분)
Glycyrrhizic acid	15.1
Curcumin	16.5
Stevioside	3.5
Rebaudioside	2.7

[그림 17] HPLC장비를 활용한 시제품의 유효성분 함량 분석방법.

(다) 후보생물소재 활용 시제품에 대한 유효성분 함량 검정

- ① 확립된 HPLC 조건으로 시제품의 유효성분 함량을 검증하였음.
- ② 그 결과, 대용량 마이크로웨이브 추출기를 활용한 공정으로 생산된 2종의 시제품은 기준함량에 허용수치(기준 함량의 90~110%)의 유효성분을 함유한 것을 확인하였음.

[표 11] 시제품의 유효성분 함량 분석

함량(mg/kg)	액상 제형의 시제품			분말 제형의 시제품		
	1 batch	2 batch	3 batch	1 batch	2 batch	3 batch
Glycyrrhizic acid	12,542	12,730	12,815	102,329	102,052	101,785
Curcumin	955	964	953	4,851	4,822	4,816
Steviol glycoside	12,433	12,528	12,118	80,270	80,752	80,525

(라) 후보생물소재 활용 시제품의 산업화를 위한 공정 평가

- ① 마이크로웨이브 추출 장비를 활용한 시제품의 생산은 8시간 기준 4회 사용이 가능하며, 1회 가동 시 25~30L 생산됨에 따라 일일 생산량은 추출기당 100~120L 정도 추출됨.
- ② 대용량 마이크로웨이브를 이용한 추출공정은 기존의 추출법에 비하여 유효성분의 추출이 증대됨에 따라서 추출효율이 인정되나, 차후 제품의 산업화에 대해서는 용량의 제한점이 있음.
- ③ 그에 따라, 산업화를 위한 새로운 대량공정을 구상하였으며, 추출물의 함량 및 생산비 등을 고려하여 일일 생산량의 목표치를 액상 제품은 1,000L 이상,

분말 제품은 200kg 이상으로 설정하였음.

- ④ 표2와 같은 추출공정을 기반으로, 각각의 공정으로 생산된 시제품들에 대하여 유효성분의 함량 수치와 일일 생산량을 평가함으로써 적합한 공정을 수립하고 그에 준하는 작업표준서를 작성하였음.

[표 12] 제품의 산업화를 위한 대량생산 추출공정 비교

구분	공정 A	공정 B	공정 C	공정 D	
추출방법	마이크로웨이브	대용량 추출기	대용량 가압 추출기	마이크로웨이브 + 대용량 가압 추출기	
내용	기존의 공정과정	대용량 추출기를 사용하여 추출	고온, 고압의 추출기로 추출	마이크로웨이브로 추출물(고농도)과 대용량 가압 추출물을 혼합	
온도	100~110°C	100°C	100°C	100~110°C	100°C
압력	0.4bar 이하	-	0.2bar	0.4bar	0.2bar
시간	30분	1시간	1시간	30분	1시간



1. 마이크로웨이브 추출



2. 대용량 추출기



3. 고온&고압 추출기를 활용한 추출

[그림 18] 시제품의 대량생산을 위한 추출공정 비교.

(마) 정별 함량 분석

- ① 기존의 대량생산공정보다 일일 생산량을 증대시킬 수 있는 공정을 수립하기 위하여, 공정별로 3회 시제품을 생산하고 유효성분의 함량 수치와 일일 생산



량을 비교하였음.

- ② 각각의 공정으로 생산한 시제품들의 유효성분 함량을 분석한 결과, 글리시리진산의 함량은 모두 기준함량에 적합하였으나, 커큐민의 함량은 공정D 만이 적합한 수치로 확인됨.
- ③ 일일 생산량은 공정A를 제외한 모든 공정으로 1,000L 이상 생산할 수 있음.
- ④ 따라서, 각각의 공정으로 생산한 시제품들에 대한 유효성분 함량 및 일일 생산량을 평가한 결과, 대용량 마이크로웨이브 추출기에서 추출된 고농도 추출물과 가압 추출기로 추출된 추출물을 혼합하여 생산하는 공정이 시제품의 산업화를 위한 대량생산체계로 확립됨.

[표 13] 공정별 액상 시제품의 유효성분 함량

구분	글리시리진산	커큐민	스테비올배당체
허용범위(mg/kg)	11,134 ~ 13,860	864 ~ 1,056	10,800 ~ 13,200
공정 A	11,860	1,141	11,457
	12,670	1,095	11,680
	12,310	1,126	12,767
공정 B	13,878	682	12,357
	12,417	703	11,825
	12,558	675	11,985
공정 C	12,730	721	11,551
	12,940	735	11,753
	12,560	746	11,570
공정 D	12,050	953	12,616
	12,507	977	12,274
	13,736	950	11,597

[표 14] 공정별 분말 시제품의 유효성분 함량

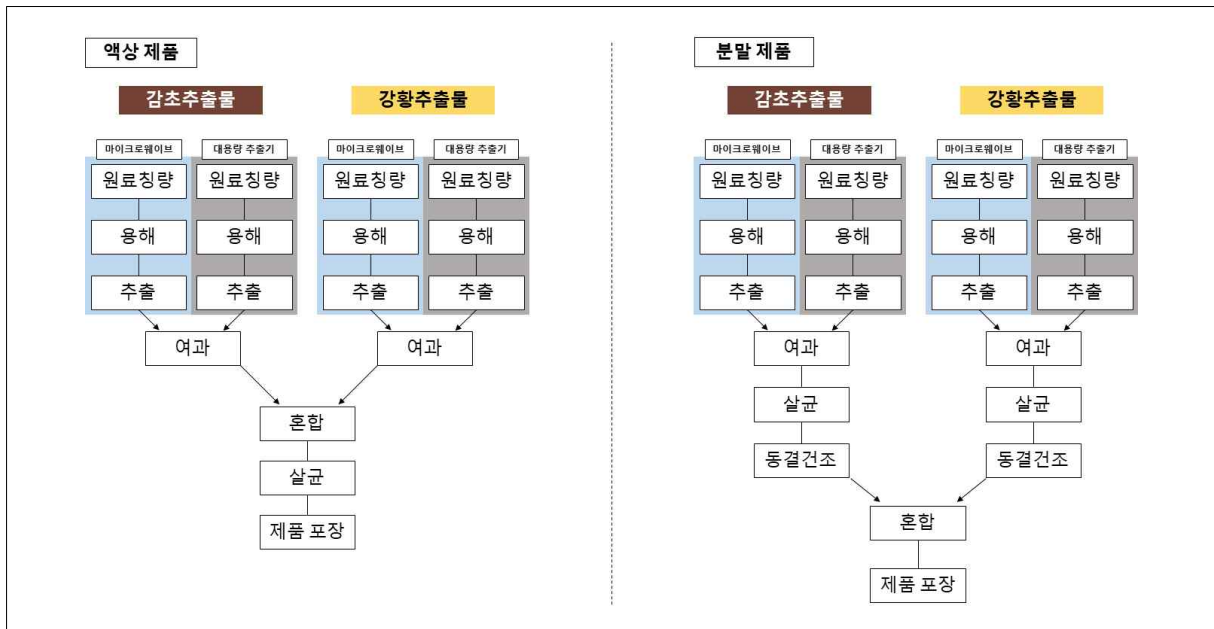
구분	글리시리진산	커큐민	스테비올배당체
허용범위(mg/kg)	82,800 ~ 101,200	4,320 ~ 5,280	72,000 ~ 88,000
공정 A	100,347	5,254	83,031
	109,079	5,115	80,821
	117,144	5,173	79,496
공정 B	108,777	3,078	81,506
	125,008	3,176	81,146
	112,159	3,157	80,926
공정 C	117,551	3,748	80,190
	115,706	3,870	78,707
	116,804	3,694	81,856
공정 D	117,378	4,876	81,040
	119,774	4,921	80,276
	117,795	4,698	82,155

[표 15] 공정별 시제품의 유효성분 및 일일 생산량 비교분석

구분	공정 A	공정 B	공정 C	공정 D
Glycyrrhizic acid	적합	적합	적합	적합
Curcumin	적합	허용치 미달	허용치 미달	적합
Stevioside	적합	적합	적합	적합
일일 최대 생산량	100L	1,000L	1,000L	1,000L

(바) 후보생물소재활용 제품의 대량생산 공정 확립

- ① 유효성분의 함량과 일일생산량을 기준으로 대량생산을 위한 공정방법을 결정하였고, 새로운 공정에 대한 공정서를 작성하려 하였음.
  - ② 새로 정립한 공정 과정은 원료를 칭량 후 혼합하여 추출하며, 추출공정은 마이크로웨이브로 추출한 고농도의 추출액과 대용량 추출기로 추출한 추출액을 혼합하여 반제품으로 감초 추출물과 강황 추출물을 생산하고 이후 2개의 반제품을 혼합하여 시제품을 생산하였음.
  - ③ 분말 제품의 경우, 액상 제품의 공정과정에 동결건조(Freeze/Dry) 공정을 추가하여 생산하였음.
  - ④ 포장은 생산제품의 제형에 따라 포장을 달리하며, 액상 제형은 PE 용기에 분말 제형은 파우치 팩에 담아 포장하였음.
- 액상, 분말 제형에 따라 각각의 시제품에 대한 공정도를 작성하였음.



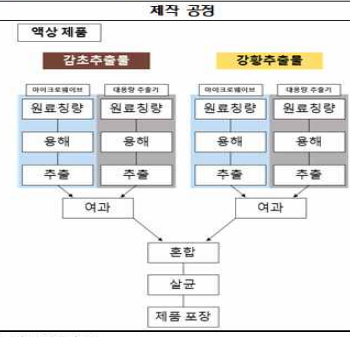
[그림 19] 시제품 2종에 대한 공정 모식도.

(사) 후보생물소재 활용 시제품의 작업 표준서 작성

① 실질적인 생산 공정을 반영하여 작성된 공정도를 토대로 작업 표준서를 작성함으로써, 시제품의 작업 표준화를 실시하였음.

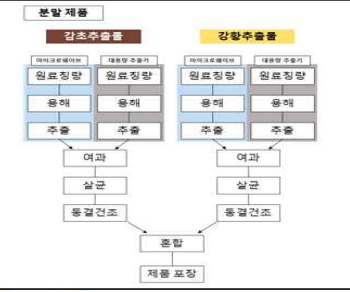
액상 제품

BIOTEN		작업 표준서				결	작성자	담당	연구소장	대표	문서분류	제 조	
						원재료	감초, 강황, 스테비올배당체, 증류수					페이지번호	1
작업명		PED 후보생물소재 액상 제품 케어솔루션				부재료	PE 보관용기, 스티커, 박스					작 성 자	
												작성일자	2019.04.04
반제품 .1		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 마이크로웨이브 용기에 감초와 강황을 칭량하여 넣는다.</li> <li>2. 증류수 투입하여 잘 섞어준다.</li> <li>3. 마이크로웨이브 추출기에 넣고 100℃ 이상에서 10분 동안 가열하여 고농도 추출액을 만든다.</li> <li>4. 대용량 가압추출기에 감초와 강황을 칭량하여 넣는다.</li> <li>5. 증류수 투입하여 잘 섞어준다.</li> <li>6. 120분 동안 100℃ 이상으로 가열 및 가압하여 추출액을 만든다.</li> <li>7. 마이크로웨이브로 추출한 고농도 추출액과 대용량 추출기로 추출한 액상을 혼합한다.</li> <li>8. 정제기로 혼합액을 정제한다.</li> <li>9. 정제된 혼합액을 보관용기에 투입하여 보관한다.</li> </ol>											
반제품 .2		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 마이크로웨이브 용기에 스테비올배당체와 강황을 칭량하여 넣는다.</li> <li>2. 증류수 투입하여 잘 섞어준다.</li> <li>3. 마이크로웨이브 추출기에 넣고 100℃ 이상에서 10분 동안 가열하여 고농도 추출액을 만든다.</li> <li>4. 대용량 가압추출기에 스테비올배당체, 강황을 칭량하여 넣는다.</li> <li>5. 증류수 투입하여 잘 섞어준다.</li> <li>6. 120분 동안 110℃ 이상으로 가열 및 가압하여 추출액을 대용량으로 만든다.</li> <li>7. 마이크로웨이브로 추출한 고농도 추출액과 대용량 추출기로 추출한 액상을 혼합한다.</li> <li>8. 정제기로 혼합액을 정제한다.</li> <li>9. 정제된 혼합액을 보관용기에 투입하여 보관한다.</li> </ol>											
관리 및 점검항목		<p>장비 가동 전 위생상태 및 가동상태 확인 원료 상태 확인(이물질 혼합, 변질) 보관용기 확인(보관, 위생상태)</p>											
		<p>작업 시 주의 및 유의사항</p> <p>작업내용과 점검항목을 숙지 후 작업을 실시한다. 문제점 발생 시 기계가동을 중단하고 담당자에게 보고한다.</p>											



분말 제품

BIOTEN		작업 표준서				결	작성자	담당	연구소장	대표	문서분류	제 조	
						원재료	감초, 강황, 스테비올배당체, 증류수					페이지번호	1
작업명		PED 후보생물소재 분말 제품 에니-디펜더				부재료	PE 보관용기, 파우치, 스티커, 박스					작 성 자	
												작성일자	2019.04.04
반제품 .1		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 마이크로웨이브 용기에 감초와 강황을 칭량하여 넣는다.</li> <li>2. 증류수 투입하여 잘 섞어준다.</li> <li>3. 마이크로웨이브 추출기에 넣고 100℃ 이상에서 10분 동안 가열하여 고농도 추출액을 만든다.</li> <li>4. 대용량 가압추출기에 감초와 강황을 칭량하여 넣는다.</li> <li>5. 증류수 투입하여 잘 섞어준다.</li> <li>6. 120분 동안 100℃ 이상으로 가열 및 가압하여 추출액을 만든다.</li> <li>7. 마이크로웨이브로 추출한 고농도 추출액과 대용량 추출기로 추출한 액상을 혼합한다.</li> <li>8. 정제기로 혼합액을 정제한다.</li> <li>9. 정제된 혼합액을 80℃의 온도에서 은열 살균한다.</li> <li>10. 동결건조 트레이에 3.5L 씩 넣어 동결건조 한다.</li> <li>11. 분말을 1kg씩 나누어 파우치 팩에 담아 박스에 보관.</li> </ol>											
반제품 .2		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 마이크로웨이브 용기에 스테비올배당체, 강황을 칭량하여 넣는다.</li> <li>2. 증류수 투입하여 잘 섞어준다.</li> <li>3. 마이크로웨이브 추출기에 넣고 100℃ 이상에서 10분 동안 가열하여 고농도 추출액을 만든다.</li> <li>4. 대용량 가압추출기에 스테비올배당체, 강황을 칭량하여 넣는다.</li> <li>5. 증류수 투입하여 잘 섞어준다.</li> <li>6. 120분 동안 110℃ 이상으로 가열 및 가압하여 추출액을 대용량으로 만든다.</li> <li>7. 마이크로웨이브로 추출한 고농도 추출액과 대용량 추출기로 추출한 액상을 혼합한다.</li> <li>8. 정제기로 혼합액을 정제한다.</li> <li>9. 정제된 혼합액을 80℃의 온도에서 은열 살균한다.</li> <li>10. 동결건조 트레이에 3.5L 씩 넣어 동결건조 한다.</li> <li>11. 분말을 1kg씩 나누어 파우치 팩에 담아 박스에 보관.</li> </ol>											
관리 및 점검항목		<p>장비 가동 전 위생상태 및 가동상태 확인 원료 상태 확인(이물질 혼합, 변질) 보관용기 확인(보관, 위생상태)</p>											
		<p>작업 시 주의 및 유의사항</p> <p>작업내용과 점검항목을 숙지 후 작업을 실시한다. 문제점 발생 시 기계가동을 중단하고 담당자에게 보고한다.</p>											



[그림 20] 시제품 2종에 대한 작업 표준서.

(2) 후보생물소재 활용 시제품 안정성 평가

(가) 안정성 평가

- ① 과제명 [돼지 유행성 설사 치료제 산업화]에 의거하여 후보생물소재 활용 시제품의 장기보관시험 및 가속시험을 통하여 제형의 안정성 여부를 규명하고자 하였음.
- ② 안정성 평가는 제품등록 후 수행하고자 하였지만, 6개월간의 시험기간이 소요됨으로 시제품에 대한 안정성을 진행하고 이후 등록 진행하였음.

(나) 안정성 평가 수행

- ① 액상 및 분말 제형의 시제품에 대하여 장기보관시험과 가속시험 조건에 부합하는 환경에서 평가를 수행하였음.
- ② 장기보관시험과 가속시험의 조건은 ‘동물의약품 일반시험법’에 따라 설정하였으며, 장기보존시험은 25±2℃/상대습도 60±5%, 가속시험은 45±2℃/상대습도 75±5%의 조건에 맞추어 진행하였음.
- ③ 안정성 평가 항목으로는 정상 외 10개의 항목을 평가하며 대하여 각 항목별 허용기준을 설정하여 평가를 수행하였음.
- ④ 평가는 장기보관시험, 가속시험 6개월간 총 4회 실시하였으며, 시험개시 당일, 개시 이후 2, 4, 6개월에 진행하였음.
- ⑤ 시제품 2종에 대하여 각 3개 배치를 사용하여 장기보존시험과 가속시험을 수행하였음.

[표 16] 액상 시제품 장기보관시험 평가결과

저장기간 (month)	성상	PH	함량시험	확인시험	잔류용매	무균시험
규격	황갈색의 액체	5~6	규정량의 90.0~110.0%	피크 유지시간 일치	잔류초산 0.5% 이하	세균, 대장균 음성
시험개시일	양호(이미, 이취, 성상 변화없음)	적합	적합	일치	음성	음성
2	양호(이미, 이취, 성상 변화없음)	적합	적합	일치	음성	음성
4	양호(이미, 이취, 성상 변화없음)	적합	적합	일치	음성	음성
6	양호(이미, 이취, 성상 변화없음)	적합	적합	일치	음성	음성

[표 17] 액상 시제품 가속시험 평가결과

저장기간	성상	PH	함량시험	확인시험	잔류용매	무균시험
------	----	----	------	------	------	------









(month)						
규격	황갈색의 액체	5~6	규정량의 90.0~110.0 %	피크 유지시간 일치	잔류초산 0.5% 이하	세균, 대장균 음성
시험개시 일	양호(이미, 이취, 정상 변화없음)	적합	적합	일치	음성	음성
2	양호(이미, 이취, 정상 변화없음)	적합	적합	일치	음성	음성
4	양호(이미, 이취, 정상 변화없음)	적합	적합	일치	음성	음성
6	양호(이미, 이취, 정상 변화없음)	적합	적합	일치	음성	음성

[표 18] 분말 시제품 장기보관시험 평가결과

저장기간 (month)	성상	PH	함량시험	확인시험	잔류용매	무균시험
규격	황갈색의 분말	5~6	규정량의 90.0~110.0 %	피크 유지시간 일치	잔류초산 0.5% 이하	세균, 대장균 음성
시험개시 일	양호(이미, 이취, 정상 변화없음)	적합	적합	일치	음성	음성
2	양호(이미, 이취, 정상 변화없음)	적합	적합	일치	음성	음성
4	양호(이미, 이취, 정상 변화없음)	적합	적합	일치	음성	음성
6	양호(이미, 이취, 정상 변화없음)	적합	적합	일치	음성	음성

[표 19] 분말 시제품 가속시험 평가결과

저장기간 (month)	성상	PH	함량시험	확인시험	잔류용매	무균시험
규격	황갈색의 분말	5~6	규정량의 90.0~110.0 %	피크 유지시간 일치	잔류초산 0.5% 이하	세균, 대장균 음성
시험개시 일	양호(이미, 이취, 정상 변화없음)	적합	적합	일치	음성	음성
2	양호(이미, 이취, 정상 변화없음)	적합	적합	일치	음성	음성
4	양호(이미, 이취, 정상 변화없음)	적합	적합	일치	음성	음성
6	양호(이미, 이취, 정상 변화없음)	적합	적합	일치	음성	음성

케 어 솔 루 션				
	시험개시일	2개월 후	4개월 후	6개월 후
에 니 - 디 펜 더				
	시험개시일	2개월 후	4개월 후	6개월 후

[그림 21] 장기보관 시험 정상.

케 어 솔 루 션				
	시험개시일	2개월 후	4개월 후	6개월 후
에 니 - 디 펜 더				
	시험개시일	2개월 후	4개월 후	6개월 후

[그림 22] 가속시험 정상.

(다) 안정성 평가 결과 및 고찰

- ① 6개월간의 장기보관 및 가속시험 결과, 세균 및 대장균은 검출되지 않았고, PH, 잔류용매 수치는 규격에 적합 하였으며, 유효성분, 성상(이미, 이취, 색, 외관 등)에 변화 없이 양호하였음.
- ② 즉, 후보생물소재 활용 시제품의 원료조건 및 보관방법에 대한 보존성이 확보



될 수 있으며, 유통과정 중의 품질변화나 규격 부적합 사유가 발생되지 않을 것으로 판단되어 안정성에 문제점이 없을 것으로 사료됨.

(3) PED치료용 후보생물소재로 개발된 시제품의 등록 및 인허가

(가) 제품화를 위한 도청 성분등록 및 인허가

- ① 평가된 후보생물소재 기반 제품의 등록 및 인허가를 목적으로 도청에서의 성분등록을 진행하였음.
- ② 성분 등록을 위한 서류로 성분등록 신청서, 유효성분, 중금속, 영양분 성분에 대한 성적서, 원료에 대한 자료, 제품 공정서를 작성하여 제출하였음.
- ③ 성분등록을 위한 성적서는 외부 분석기관에 의뢰하여 유효성분 함량, 중금속, 미생물, 영양성분, 칼로리 등을 평가하고 성적서를 발급받았음.
- ④ 제품명은 액상 제품은 ‘케어솔루션’, 분말 제품은 ‘에니-디펜더’라는 명칭으로 사료성분 등록을 신청하였음.

[표 20] 제품 2종(케어솔루션, 에니-디펜더) 분석기관 발급 성적서 결과표

구분	케어솔루션 성적서 결과	에니-디펜더
<b>유효성분 (mg/kg)</b>		
글리시리진산	14,316	107,458
커큐민	934	4,193
스테비올 배당체	10,868	83,268
<b>중금속</b>		
납	0.01 ppm	0.01 ppm 이하
비소	0.01 ppm 이하	0.01 ppm 이하
수은	불검출	불검출
카드뮴	0.01 ppm 이하	불검출
<b>살모넬라</b>	불검출	불검출
<b>수분</b>	-(액상제형)	9.59%
<b>영양성분</b>		
조단백질	1.15%	7.90%
조지방	0.41	1.07%
조섬유	불검출	0.07%
조회분	0.67	4.77%
요소	0.20	0.36%
<b>칼로리 (cal/g)</b>	775	4736

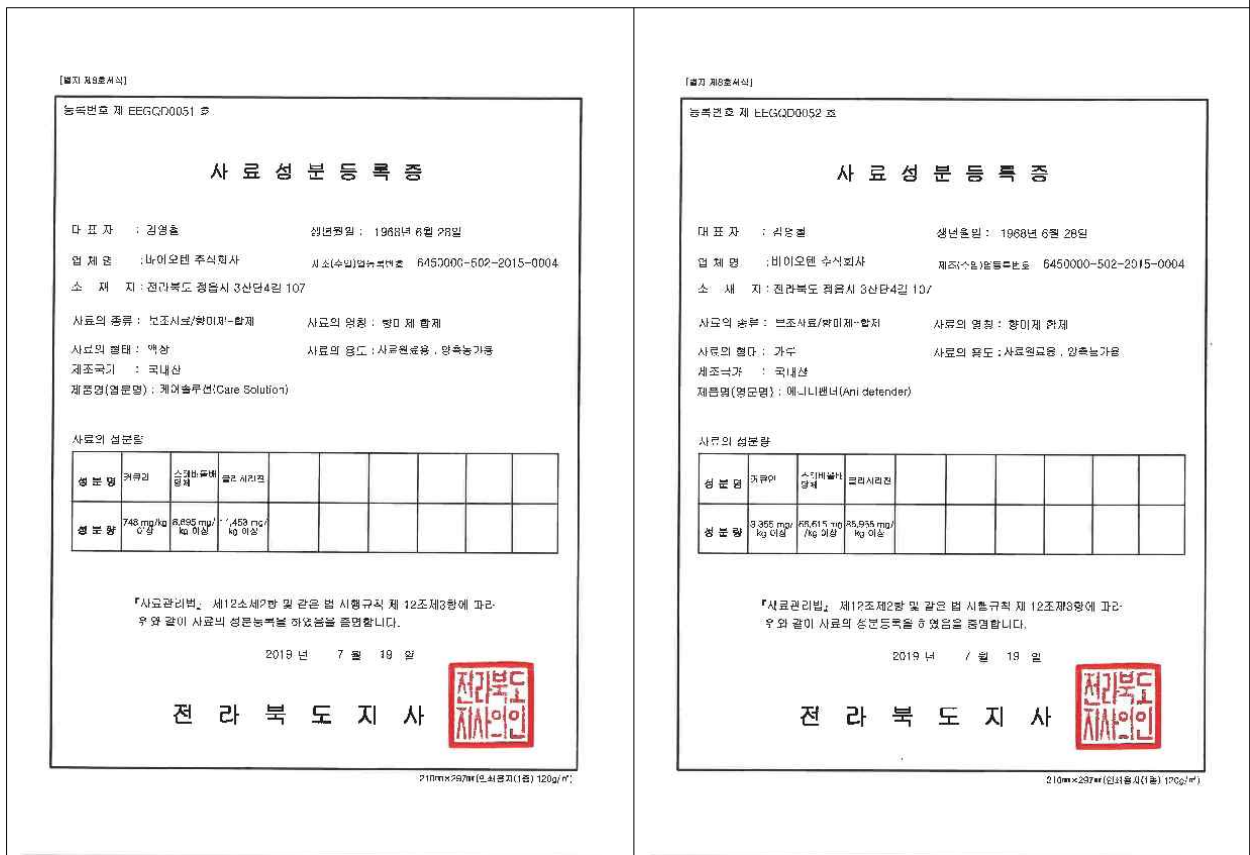
- ⑤ 성분분석결과 제품 2종 모두 유효성분의 함량은 자체평가 된 함량과 유사한 수치임을 확인하였음.

- ⑥ 또한, 살모넬라균은 불검출 되었으며, 중금속(납, 비소, 수은)은 불검출 또는 매우 낮게 측정되어 유해물질의 범위 및 허용기준에 적합하였음.
- ⑦ 영양성분의 함량과 칼로리는 첨가제로서의 적정 수준임을 확인하였음.
- ⑧ 따라서 제품 2종 모두 동물용 첨가제로서 성분등록이 가능한 수준의 함량과 품질을 가진 제품임을 확인하였음.



[그림 23] 제품 2종(케어솔루션, 에니-디펜더)의 성분 분석 성적서.

- ⑨ 도청에 사료성분등록을 위한 서류를 구비하여 신청서류를 제출하였으며 최종 저금로 성분등록 심사를 통과하여 등록됨.



[그림 24] 사료성분 등록 도청 허가증.

(4) PED 치료용 후보생물소재로 개발된 제품의 안전성 및 효능 평가

(가) 안전성 평가

① 안전성 평가 목적

- 이유자돈에서 생산된 제품을 사료에 혼합하거나 또는 음수투여하여 위축돈, 폐사돈의 발생과 체중의 변화를 측정함으로써 안전성을 평가하고자 하였음.

② 안전성 평가 계획

- 안전성 평가는 건강한 이유자돈(26일령) 171두를 각각 42두씩(시험군Ⅲ은 41두) 대조군, 시험군(0.1%), 시험군Ⅱ(0.2%), 시험군Ⅲ(0.3%)로 무작위로 분류한 후, 대조군은 어떠한 첨가물질도 투여하지 않고, 시험군Ⅰ은 0.1%, 시험군Ⅱ는 0.2%, 시험군Ⅲ는 0.3%의 제품을 26일령부터 38일 동안 투여.
- 투여 용량은 제품의 유효성과 경제성을 기반으로 0.1~0.3% 가 투입되도록 제조하여 안전성 평가를 진행하였음

[표 21] 제품을 혼합하여 급이 한 일반사료 영양성분 함량

성분명	성분량	성분명	성분량
조단백질	23% 이하	인	1% 이하
조지방	5% 이하	라이신	1.55% 이하
조섬유	4% 이하	가소화 조단백질(DCP)	17% 이하
조회분	8% 이하	가소화 에너지(DE)	3.7Mcal/kg 이상
칼슘	0.5% 이하		

③ 시험동물

- 시험동물은 23일령 이유자돈을 3일간 순치한 후 시험에 이용하였으며, 순치기간 동안 설사를 포함한 질병의 유무를 확인한 후 특이 임상증상이 없는 시험동물만을 선별하여 사용하였음.
- 안전성 평가는 약 5주간 진행하여 평가기간 동안 대조군과 섭취군의 평균 체중과 증체량, 폐사 두수를 기록하여 평가.

[표 22] 제품의 안전성 평가를 위한 시험군 분류>

Group	No. of animals	Age of animals (days)	Treatment	Dose	Route	평가 기간 (days)
대조군	43	26	None	0	Oral	38
시험군Ⅰ	43	26	후보소재	0.1%	Oral	38
시험군Ⅱ	43	26	후보소재	0.2%	Oral	38
시험군Ⅲ	42	26	후보소재	0.3%	Oral	38

④ 안전성 평가 수행

- 5주간(38일)의 평가 기간 동안 시험군과 대조군에서 위축돈 및 폐사의 발생율과 체중의 변화를 확인하여 안전성 검증을 수행하였음.
- 제품의 안전성을 평가하기 위해 사용된 이유자돈에게는 매일 사료와 음수를 무제한 공급하며, 체중 측정은 개시체중, 중간 체중, 종료체중으로 나누어서 총 3회 측정하였음.
- 이유자돈의 체중 측정은 분류군에 해당하는 모든 이유자돈의 체중을 측정한 후 평균을 내어 기록하였음.
- 38일간의 시험기간 동안 설사, 기침과 같은 특이 임상증상, 위축돈 및 폐사의 유무를 매일 검사하였음.



[그림 25] 이유자돈에서 제품의 안전성 평가.

⑤ 이유자돈에서의 제품의 안전성 평가 결과

- 시험기간 : 2018. 10. 21. ~ 11. 27 (38일간)
- 시험장소 : 신광축산(전남 함평군 신광면 덕일길 301)
- 공시동물 : 이유자돈 총 171두, 분류군 별 42두씩 (시험군Ⅲ은 41두)

⑥ 평가 결과 및 고찰

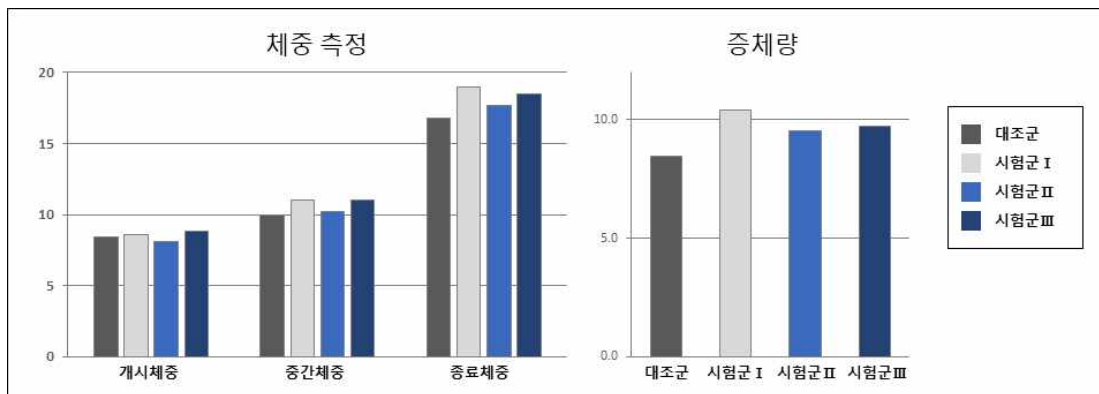
- 안전성 시험기간 동안 설사, 기침과 같은 특이 임상 증상의 발생과 폐사 및 위축돈의 발생율은 대조군과 시험군에서 차이를 보이지 않음.
- 폐사두수는 시험군Ⅱ를 제외하고 모든 분류군에서 각 1마리씩 폐사하였음.

- 평가에서 확인한 시험군에서 체중의 변화는 병리적 특성을 보이지 않았으며, 오히려 증체량이 대조군보다 높았음.
- 시험군의 이유자돈들은 대조군보다 증체량이 12~22% 높았음.
- (종료체중 : 대조군 - 8.5kg, 시험군 I - 10.4kg, 시험군 II - 9.5kg, 시험군 III - 9.7kg)

[표 23] 제품 급이에 따른 이유자돈의 체중 변화 및 폐사두수

Group	개시체중	중간체중	종료체중	증체량	폐사두수
대조군	8.4	10	16.8	8.5	1
시험군 I	8.6	11	19	10.4	1
시험군 II	8.1	10.2	17.7	9.5	0
시험군 III	8.8	11	18.5	9.7	1

- 약 5주간 171마리의 이유자돈을 활용한 안전성 평가 결과 체중의 변화와 폐사 및 위축돈의 발생, 설사, 기침과 같은 특이 임상증상의 발생이 보이지 않음으로 제품의 독성은 없는 것을 확인 할 수 있었으며 이유자돈의 성장을 촉진하여 대조군 대비 증체량을 12~22% 증가시키는 것을 확인할 수 있었음.
- 따라서, 후보생물소재로 생산한 제품은 독성, 유해성을 가지지 않고 안전성이 높은 것으로 확인됨.



[그림 26] 제품 급이에 따른 이유자돈의 증체량.

(나) 효력 평가

- PED 발생 야외농장에서 제품에 대한 효과를 평가하는 것이 타당하나, 질병 발생 시 확산의 우려로 농장 출입이 불가할 뿐 아니라, 실제로 시험농장에서 PED가 발생되지 않음. 따라서, 첨가제로서의 현장적용평가를 수행하였

음.

- 첨가제로써의 평가는 일령에 비해 체중이 현저히 낮은 이유자돈을 선별하여 제품을 투여하고, 그에 따른 성장촉진 및 증체를 평가하였음.

① 성장 및 증체 효력평가

- 일령의 평균보다 체중이 현저히 낮은 이유자돈을 선별하여 첨가제로써 성장 및 증체 향상에 대한 평가를 진행하였음.
- 일령에 비하여 체중이 적은 이유자돈을 총 4개의 군(대조군, 시험군 I~III)로 분류하고 37일 동안 제품을 급여하면서 일주일 단위로 체중을 측정.
- 제품의 급여 농도는 시험군 I 0.1%, 시험군 II 0.2%, 시험군 III 0.3%의 투여하고, 대조군은 어떠한 첨가물질도 투여하지 않음.
- 투여용량은 제품의 효과 및 경제성을 기반으로 0.1~0.3% 가 투입되도록 제조하여 효력 평가를 진행하였음.

[표 24] 제품을 혼합하여 급여한 일반사료 영양성분 함량

성분명	성분량	성분명	성분량
조단백질	23% 이하	인	1% 이하
조지방	5% 이하	라이신	1.55% 이하
조섬유	4% 이하	가소화 조단백질(DCP)	17% 이하
조회분	8% 이하	가소화 에너지(DE)	3.7Mcal/kg 이상
칼슘	0.5% 이하		

② 시험동물

- 시험동물은 23일령 이유자돈 중 평균 체중보다 현저히 낮은 이유자돈을 선별한 후 3일간 순치하고 시험에 이용하였으며, 순치기간 동안 설사를 포함한 질병의 유무를 확인한 후 특이 임상 증상이 없는 경우 시험동물로 사용하였음.

[표 25] 제품의 현장평가를 위한 시험군 분류

Group	No. of animals	Age of animals (days)	Treatment	Dose	Route	평가 기간 (days)
대조군	37	26	None	0	Oral	38
시험군 I	37	26	개발제품	0.1%	Oral	38
시험군 II	37	26	개발제품	0.2%	Oral	38
시험군 III	37	26	개발제품	0.3%	Oral	38

③ 효력평가 수행

- 시험기간 : 2018. 10. 28. ~ 12. 05 (38일간)
- 시험장소 : 신광축산(전남 함평군 신광면 덕일길 301)
- 공시동물 : 이유자돈 총 148두, 분류군 별 37두씩



- 평가에 사용된 이유자돈에게 매일 사료와 음수를 무제한 공급하며, 체중 측정은 개시 체중, 중간 체중, 종료 체중으로 나누어서 총 3회 측정하였음.
- 이유자돈에 무게 측정은 분류군에 해당하는 모든 이유자돈의 무게를 측정한 후 평균을 내어 기록하였음.
- 38일간의 시험기간 동안 설사, 기침과 같은 특이 임상 증상, 위축돈 및 폐사의 발현 유무를 매일 검사하였음.

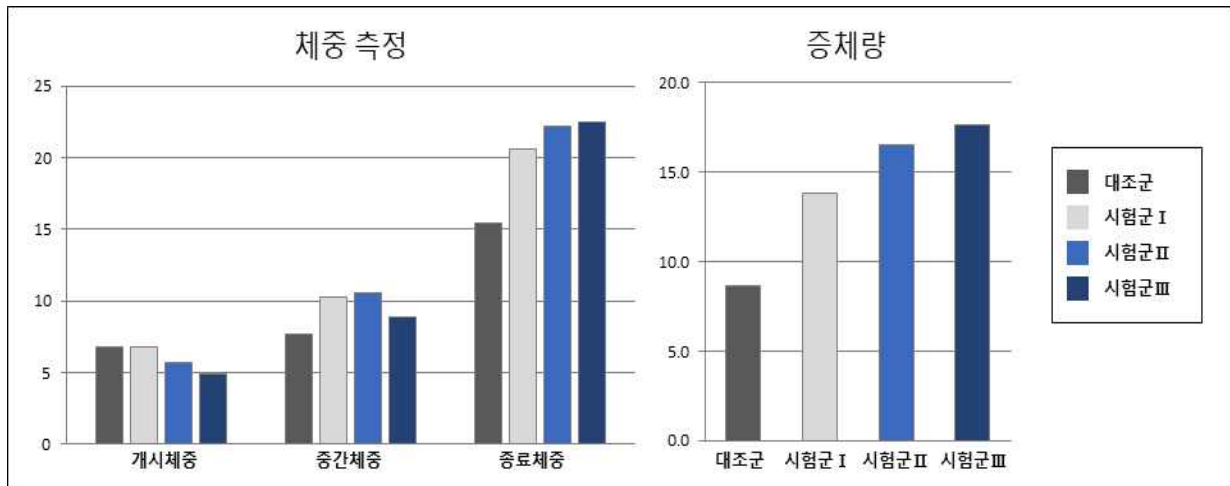
		
이유자돈 축사	제품을 첨가하여 제조된 사료	시험을 시행한 이유자돈
		
위축돈 및 폐사 등 확인 모습	무게측정을 위한 이동 모습	무게 측정

[그림 27] 제품 대한 효력평가 수행 및 이유자돈 모습.

#### ④ 평가 결과 및 고찰

- 약 5주간의 효력평가에서 시험군의 증체량이 향상되었으며, 제품 투입량에 따라 증체량이 증가함을 확인하였음.
- 증체량은 같은 기간 동안 대조군보다 시험군 I 59%, 시험군 II 90%, 시험군 III 103% 더 높은 것을 확인하였음.
- (그룹별 증체량 : 대조군 - 8.7kg, 시험군 I - 13.8kg, 시험군 II - 16.5kg, 시험군 III - 17.6kg)
- 제품을 섭취한 시험군에서 평가기간 동안 설사, 기침과 같은 특이 임상 증상의 발생과 폐사 및 위축돈의 발생율은 대조군보다 적음.
- 폐사 두수는 대조군 2마리(5.4%) 시험군은 모든 분류군에서 각 1마리씩 (2.7%) 폐사하였음.
- 약 5주간 148마리의 이유자돈을 활용한 효력평가 결과, 이유자돈의 성장을 촉진 시키며 급이 농도에 따라 증체량이 대조군 대비 59~103% 증가된 것을 확인할 수 있었음.

- 또한, 동일한 일령(26일령)에 비하여 현저히 낮은 시험동물의 체중이 제품의 투여를 통하여 평균체중(9주령의 자돈 평균체중: 20kg) 이상으로 증가되었음.
- 폐사 및 위축돈의 발생 또한 대조군보다 시험군에서 감소하였음.
- 따라서 후보생물소재 활용 제품은 이유자돈에 성장과 증체량을 촉진시키며 폐사 및 위축돈의 발생을 낮춰주는 것이 확인됨.



[그림 28] 제품의 급이에 따른 이유자돈의 체중의 변화.

[표 26] 제품 급이에 따른 이유자돈의 체중 변화 및 폐사두수

Group	개시체중	중간체중	종료체중	증체량	폐사두수
대조군	6.8	7.7	15.4	8.7	2
시험군 I	6.8	10.3	20.6	13.8	1
시험군 II	5.7	10.6	22.2	16.5	1
시험군 III	4.9	8.9	22.5	17.6	1

(다) 면역력 평가

① 임신한 모돈 10마리를 5마리씩 대조군과 시험군으로 분류한 후 시험군에게는 21일 동안 제품을 급이하여 혈액 내 항체(IgG, IgM)량을 분석함으로써 면역력의 변화를 확인하였음.

② 시험동물

- 시험동물은 비슷한 시기에 임신한 모돈을 선별한 후 3일간 순치하여 시험에 이용하였으며, 순치기간 동안 설사를 포함한 질병의 유무를 확인한 후 특이 임상 증상이 없는 6마리를 시험동물로 사용하였음.

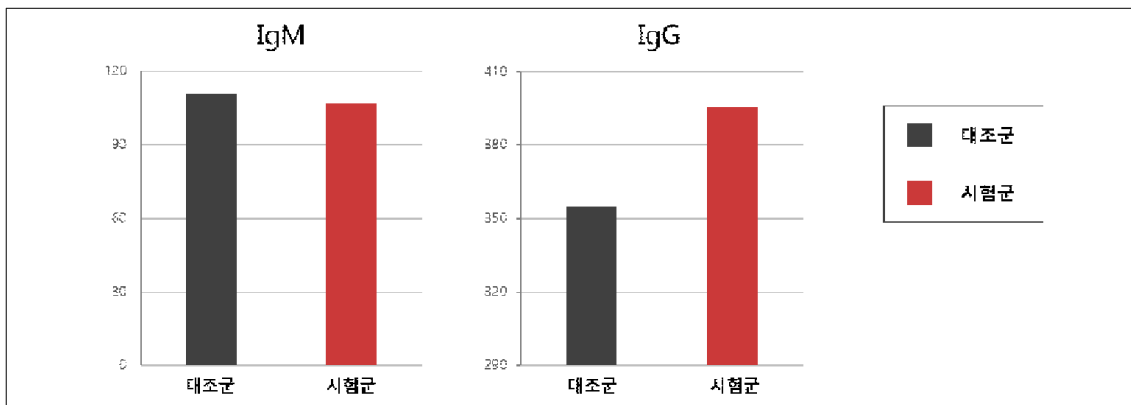
③ 효력평가 수행

- 시험기간 : 2019. 04. 25. ~ 05. 16 (21일간)

- 시험장소 : 송원농장(전북 진안군 진안읍 연장리 1114-5)
- 공시동물 : 모든 총 10두, 대조구, 시험구 각 5두씩
- 시험동물은 매일 사료와 음수를 무제한 공급하며, 혈액내의 항체의 측정 은 시험시작 3주후 1회 측정하였음.
- 21일간의 시험기간 동안 설사, 기침과 같은 특이 임상 증상, 위축 및 폐 사 발생을 매일 검사하였음.
- 모든의 혈액의 양돈 전문 수의사가 직접 채취하였음.
- 채취한 혈액은 10ml씩 SST tube에 담아 1시간 응고 후 원심분리기를 사용하여(3,000 rpm으로 10분) 혈장과 혈구를 분리하였음.  
\*SST tube : 혈구와 혈장 사이에 비중을 가진 특수한 겔이 들어있어 원 심분리를 통해 분리시킬 수 있는 tube.
- 분리한 혈청으로부터 IgG, IgM 항체의 양을 분석하였음.
- 평가는 모든 10마리를 대조군과 시험군으로 5마리씩 분류하여 진행하였 으나, 채취한 시료의 문제로 6마리(그룹별 각 3마리)의 샘플만을 2회 반 복분석 의뢰하였음.

④ 평가 결과 및 고찰

- 6마리의 모든에서 혈액내 항체량을 검사하였으나, 분석결과 모든 2마리는 시료의 문제로 분석되지 않아 평가에서 제외하였음.
- 모든 4마리의 혈액내 항체의 양을 분석한 결과 IgM은 큰 차이를 보이지 않는 반면에 IgG의 양은 11% 증가하였음.



[그림 28] 제품의 면역증강 효과 평가를 위한 모든의 항체가 분석.

[표 27] 제품의 면역증강 효과 평가를 위한 모든의 항체량 분석수치

Group	IgM 수치	IgM 평균	IgG	IgG 평균
대조군 I	108.5	110.8	349	358.3

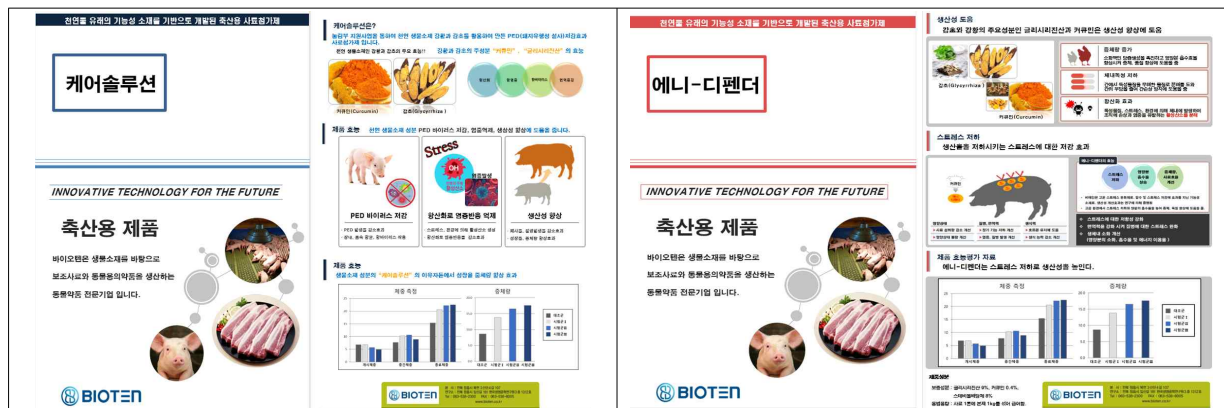
대조군 II	113		367.5	
시험군 I	95		412.5	
시험군 II	119.3	107.15	375.5	394

- IgG는 혈액과 세포외액에 있는 주요항체로, 병원체에 결합하여 신체조직이 감염되지 않도록 하고 이차적인 항체반응(Memory B cell)에 참여하는 항체 중 가장 큰 비율을 차지하는 항체로 알려져 있음.
- 또한, 모돈의 IgG는 태반을 통해 자돈에게 전달되며, 이는 자돈의 면역체계가 발달하기 전 체액성 면역력을 부여함으로써 자돈의 면역력을 증강시킬 수 있음.
- 따라서, 제품을 급이 한 시험구의 면역력이 향상된 것으로 사료됨.
- 모돈의 두수가 적어 평가 결과가 유효성을 가진다고 평가하기엔 무리가 있어 제품의 효력에 대한 보조 자료로 활용하고자 함.

(5) 제품의 시장진출을 위한 사용매뉴얼 및 홍보자료 제작

(가) 효능평가를 통하여 도출된 결과를 토대로 사용매뉴얼 및 리플렛 제작

- ① 과제명 [돼지 유행성 설사 치료제 산업화]를 의거하여 산업화를 위한 사용 매뉴얼과 홍보자료용 리플렛 제작하였음.
- ② 제품사용에 대한 매뉴얼은 홍보자료에 포함하여 제작하였음.
- ③ 제품 2종에 대한 홍보물을 각각 제작하였으며, 향후 제품 홍보 및 판매를 위해 사용하고자 함.



[그림 29] 후보생물소재 기반 개발 제품의 홍보물.

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

○ 산업동물 바이러스성 장염 백신 산업화

- 돼지(변이형 PEDV+로타바이러스) 및 소(코로나바이러스+로타바이러스) 바이러스성 장염을 예방할 수 있는 백신(불활화혼합백신 혹은 생혼합건조백신)을 개발하여 산업화 시키는데 있음.

○ 돼지 유행성 설사(PED) 치료제 산업화

- 국내 천연물 자원 유래 생물소재 및 이의 단일·복합물질을 이용한 변이형 돼지 PED 치료제를 개발하여 산업화 시키는데 있음.



### 3-2. 목표 달성여부

목표	평가 착안점	달성여부
• 소 로타바이러스 특성 분석	• 백신주 계대별 역가 분석, 항원성, PAGE patter, 전제 염기서열, 유전형 등 분석.	달성
• 소 로타바이러스 불활화 혼합백신 개발	• Seed 및 배양세포 확립, adjuvant 확립, 실험동물 및 목적동물 혈청역가시험, 안전성 시험, 일반시험, 특성 시험, 무균 시험, 수소이온농도시험, 방부제 정량시험, 불활화 확인시험 등 분석.	달성
• 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 개발	• Seed 및 배양세포 확립, 보호제 조성 결정, 실험동물 및 목적동물 혈청역가시험, 안전성 시험, 특성 시험, 진공도 시험, 수소이온농도시험, 함습도 시험, 무균 시험, 마이코플라즈마 부정시험, 미입바이러스 부정시험, 함량 시험 등 분석.	달성
• 소 코로나바이러스 특성 분석	• 백신주 계대별 역가 분석, 항원성, 전제 염기서열, 유전형 등 분석.	달성
• 소 코로나바이러스 불활화 백신 개발	• Seed 및 배양세포 확립, adjuvant 확립, 실험동물 및 목적동물 혈청역가시험, 안전성 시험, 일반시험, 특성 시험, 무균 시험, 수소이온농도시험, 방부제 정량시험, 불활화 확인시험 등 분석.	달성
• 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 개발	• Seed 및 배양세포 확립, 보호제 조성 결정, 실험동물 및 목적동물 혈청역가시험, 안전성 시험, 특성 시험, 진공도 시험, 수소이온농도시험, 함습도 시험, 무균 시험, 마이코플라즈마 부정시험, 미입바이러스 부정시험, 함량 시험 등 분석.	달성
• 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신 개발	• Seed 및 배양세포 확립, 보호제 조성 결정, 실험동물 및 목적동물 혈청역가시험, 효능 시험, 안전성 시험, 특성 시험, 진공도 시험, 수소이온농도시험, 함습도 시험, 무균 시험, 마이코플라즈마 부정시험, 미입바이러스 부정시험, 함량 시험, 야외 축우 농가에서 효능 및 안전성 시험이 포함된 임상시험 등.	달성
• 돼지 로타바이러스 특성 분석	• 백신주 계대별 역가 분석, 항원성, PAGE patter, 전제 염기서열, 유전형 등 분석.	달성
• 돼지 로타바이러스 불활화 혼합백신 개발	• Seed 및 배양세포 확립, adjuvant 확립, 실험동물 및 목적동물 혈청역가시험, 안전성	달성



	시험, 일반시험, 특성 시험, 무균 시험, 수소 이온농도시험, 방부제 정량시험, 불활화 확인시험 등 분석.	
• 돼지 PEDV 특성 분석	• 백신주 계대별 역가 분석, 항원성, 전체 염기서열, 유전형 등 분석.	달성
• 돼지 PEDV 불활화 백신 개발	• Seed 및 배양세포 확립, adjuvant 확립, 실험동물 및 목적동물 혈청역가시험, 안전성 시험, 일반시험, 특성 시험, 무균 시험, 수소 이온농도시험, 방부제 정량시험, 불활화 확인시험 등 분석.	달성
• 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 개발	• Seed 및 배양세포 확립, 보호제 조성 결정, 실험동물 및 목적동물 혈청역가시험, 안전성 시험, 특성 시험, 진공도 시험, 수소이온 농도시험, 함습도 시험, 무균 시험, 마이코플라즈마 부정시험, 미입바이러스 부정시험, 함량 시험 등 분석.	달성
• 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 4종 혼합백신 개발	• Seed 및 배양세포 확립, 보호제 조성 결정, 실험동물 및 목적동물 혈청역가시험, 안전성 시험, 특성 시험, 진공도 시험, 수소이온 농도시험, 함습도 시험, 무균 시험, 마이코플라즈마 부정시험, 미입바이러스 부정시험, 함량 시험, 야외 양돈 농가에서 효능 및 안전성 시험이 포함된 임상시험 등 분석.	달성
• 돼지 PEDV 약독화 생건조 백신 개발	• Seed 및 배양세포 확립, 보호제 조성 결정, 실험동물 및 목적동물 혈청역가시험, 안전성 시험, 특성 시험, 진공도 시험, 수소이온 농도시험, 함습도 시험, 무균 시험, 마이코플라즈마 부정시험, 미입바이러스 부정시험, 함량 시험, 야외 양돈 농가에서 효능 및 안전성 시험이 포함된 임상시험 등 분석.	달성
• 돼지 PED 액상 치료제	• 돼지 유행성 설사 치료제 개발을 위해 단일소재(감초, 강황) 및 복합생물소재(감초추출물/키큐민) 대한 항바이러스 및 항염 효능검증과 예비 안전성 검사를 수행 후, 치료제에 대한 유효성 실험과 생산성적, 번식성적, 영양소 소화율, 혈액특성, 분내 미생물 영향 등 농장 사양실험을 통해 동물의약품 승인준비를 위한 임상시험 효능결과를 확보하였음. 경제성 분석을 통해 최종적으로 각각의 치료 및 개선효능을 갖는 액상 사료첨가제로서 품목허가 취	• 달성

	<p>득 후 제품으로 출시하였음.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 유행성 설사 치료제 개발을 위해 단일소재(감초, 강황) 및 복합생물소재(감초추출물/커큐민) 대한 항바이러스 및 항염 효능검증과 예비 안전성 검사를 수행 후, 치료제에 대한 유효성 실험과 생산성적, 번식성적, 영양소 소화율, 혈액특성, 분내 미생물 영향 등 농장 사양실험을 통해 동물의약품 승인준비를 위한 임상시험 효능결과를 확보하였음. 경제성 분석을 통해 최종적으로 각각의 치료 및 개선효능을 갖는 분말 사료첨가제로서 품목허가 취득 후 제품으로 출시하였음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>달성</li> </ul>
--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------

### 3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

안전	목표	미달성 원인	차후대책
<b>재산권(특허출원)</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>소 로타바이러스 백신</li> <li>(약독화 생건조 3종 혼합백신 형태로 1건 특허출원된 상태)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>소 로타바이러스 세 개 분리주에 대하여 각각 불활화 백신주 및 약독화 백신주로 6개 특허를 출원하려고 하였음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>국내에는 물론 전 세계적으로 불활화 백신 대신 약독화 백신이 대세임.</li> <li>또한 로타바이러스 백신은 3개의 백신주가 들어가 있음.</li> <li>이러한 이유로 3개의 백신주가 들어 있는 약독화 3종 혼합백신의 형태로 특허를 출원하였음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>현재 출원 및 등록이 완료되었음.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>소 코로나바이러스 백신</li> <li>(약독화 생건조 백신 형태로 1건 특허출원된 상태)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>소 코로나바이러스 한 개 분리주에 대하여 각각 불활화 백신주 및 약독화 백신주로 2개 특허를 출원하려고 하였음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>국내에는 물론 전 세계적으로 불활화 백신 대신 약독화 백신이 대세임.</li> <li>이러한 이유로 약독화 백신의 형태로 특허를 출원하였음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>현재 출원 중이며 조만간 등록 될 것으로 예상됨.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 로타바이러스 백신</li> <li>(약독화 생건조 3종 혼합백신 형태)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 로타바이러스 세 개 분리주에 대하여 각각 불활화 백신주 및 약독화 백신</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>국내에는 물론 전 세계적으로 불활화 백신 대신 약독화 백신이 대세임.</li> <li>또한 로타바이러스 백신은 3개의 백신주가 들어가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>현재 출원 중이며 조만간 등록 될 것으로 예상됨.</li> </ul>

로 1건 특허 출원된 상태)	주로 6개 특허를 출원하려고 하였음.	있음. • 이러한 이유로 3개의 백신주가 들어 있는 약독화 3종 혼합백신의 형태로 특허를 출원하였음.	
• 돼지 유행성 설사 바이러스 백신 및 치료제 (1건 특허 등록된 상태)	• 돼지 유행성설사 바이러스에 대하여 특허를 출원하려고 하였음.	• 현재 국내 분리주 및 그의 이용 형태로 출원하였음. • 현재 국내 분리주를 포함하든 백신 조성물로 출원하였음.	• 4건 출원된 특허가 현재 1건 등록되었음. • 조만간 나머지 것 3건도 등록될 것으로 예상됨.
• 칼리시 바이러스 감염증 예방용 치료제	• 가축과 인간에 설사 등 다양한 질병을 유발하는 칼리시 바이러스 치료제에 대하여 특허를 출원하려고 함.	• 칼리시바이러스 치료제와 관련 특허를 출원하였음.	• 출원된 특허가 현재 1건 등록되었음.
결론	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 특허 출원 최종 목표는 12개였음.</li> <li>• 하지만 상술한 이유와 같이 소 로타바이러스 백신의 경우 약독화 3종 혼합백신으로 1건만 특허 출원하였음(6건 목표-&gt;1건으로 축소).</li> <li>• 또한 상술한 이유와 같이 소 코로나바이러스 백신의 경우도 약독화 백신으로 1건만 특허 출원하였음(2건 목표-&gt;1건으로 축소).</li> <li>• 상술한 이유와 같이 돼지 로타바이러스 백신의 경우 약독화 3종 혼합백신으로 1건만 특허 출원하였음(6건 목표-&gt;1건으로 축소).</li> <li>• 이에 소 로타바이러스 약독화 3종 혼합백신 1건, 소 코로나바이러스 약독화 백신 1건, 돼지 로타바이러스 약독화 혼합백신 1건, 돼지 유행성 설사 바이러스 및 그의 이용 1건, 신규한 약독화 PEDV 균주 및 그의 백신 조성물 1건, 칼리시바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물 1건 등 총 7건을 특허 출원하였음.</li> </ul>		
<b>재산권(특허등록)</b>			
• 소 로타바이러스 백신	• 6건 특허 등록 목표.	• 위 원인 참조 요망. • 1건 특허출원 되었음.	• 특허등록 완료
• 소 코로나바이러스 백신 • (약독화 생건조 백신 형태로 1건 특허 출원된 상태)	• 2건 특허 등록 목표.	• 위 원인 참조 요망. • 1건 특허출원 되었음.	• 조만간 특허등록 예상됨.

<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 로타바이러스 백신</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>6건 특허 등록 목표.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>위 원인 참조 요망.</li> <li>1건 특허출원 되었음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>조만간 특허등록 예상됨.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 유행성 설사 바이러스 백신</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2건 특허 등록 목표.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>위 원인 참조 요망.</li> <li>4건 특허 출원, 1건 특허등록 되었음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>조만간 나머지 3건도 특허등록 예상됨.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>칼리시 바이러스 감염증 예방용 치료제</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1건 특허 등록 목표.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1건 특허 출원 후 최종 등록 되었음.</li> </ul>	
<b>결론</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>특허 등록 최종 목표는 12개였음.</li> <li>하지만 상술한 이유와 같이 불활화 백신 대신 약독화 백신이 국내외적으로 대세이며, 단일 백신보다 혼합백신이 대세임.</li> <li>이에 불활화 백신의 특허출원과 각각의 백신주에 대한 특허출원 대신에 약독화 혼합백신의 형태로 특허를 출원하였음.</li> <li>이러한 이유로 특허 출원이 감소하였음.</li> <li>현재 3건의 특허가 등록되었으며, 조만간 5건의 특허 출원도 등록될 것으로 예상되어, 총 8건의 특허가 등록될 것으로 기대됨.</li> </ul>		
<b>특허자원기탁(기타 연구 활용)</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 로타바이러스 백신주</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>등록 목표 없었음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>3건 기탁하였음.</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>소 로타바이러스 백신주</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>등록 목표 없었음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>3건 기탁하였음.</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>소 코로나바이러스 백신주</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>등록 목표 없었음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1건 기탁하였음.</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 유행성 설사 바이러스 백신주</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>등록 목표 없었음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1건 기탁하였음.</li> </ul>	
<b>결론</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>위에서 기술된 바와 같이 특허자원으로 총 8건을 기탁하였음.</li> </ul>		
<b>기술실시</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>소 로타바이러스 백신</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>6건 기술실시 목표.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>위에서 설명한 바와 같이 약독화 혼합백신 1건에 대하여 기술실시 준비 중.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>특허가 등록되면 기술실시하려고 함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>소 코로나바이러스 백신</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2건 기술실시 목표.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>위에서 설명한 바와 같이 약독화 백신 1건에 대하여 기술실시 준비 중.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>특허가 등록되면 기술실시하려고 함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 로타바이러스 백신</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>6건 기술실시 목표.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>위에서 설명한 바와 같이 약독화 혼합백신 1건에 대하여 기술실시 준비 중.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>특허가 등록되면 기술실시하려고 함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 유행성 설사 바이러스 백신</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2건 기술실시 목표.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>위에서 설명한 바와 같이 약독화 혼합백신 1건에 대하여 기술실시 하였고, 기술료를 받은 상태임.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>특허가 등록되면 기술실시하려고 함.</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>칼리시바이러스 감염증 예방용 치료제</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1건 기술실시 목표.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>기술실시를 준비중에 있음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>기술실시를 조만간 하려고 함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 유행성 설사 치료제</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1건 기술실시 목표.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>현재 2개 제품이 상품화 되어 있어, 이에 대한 기술실시를 준비 중에 있음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>기술실시를 조만간 하려고 함.</li> </ul>
<b>결론</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>기술실시 최종 목표는 13건이었음.</li> <li>하지만 상술한 이유와 같이 불활화 백신 대신 약독화 백신이 국내외적으로 대세이며, 단일 백신보다 혼합백신이 대세임.</li> <li>이에 불활화 백신의 특허출원과 각각의 백신주에 대한 특허출원 대신에 약독화 혼합백신의 형태로 특허를 출원하였음.</li> <li>현재 1건의 기술이전 및 1건의 기술료를 받은 상태임.</li> <li>향후 소 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신 특허, 소 코로나바이러스 약독화 생건조 백신 특허, 돼지 로타바이러스 약독화 생건조 혼합백신에 대한 특허가 등록되면, 이에 대하여 기술이전 및 기술료를 받으려고 함.</li> <li>또한 돼지 유행성 설사 치료제는 2개가 제품화 된 후 판매되고 있어, 이에 대하여 2개의 기술실시를 조만간 한 후 기술료를 받으려고 함.</li> </ul>		
<b>사업화</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>소 로타바이러스 백신</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1건 제품화 목표.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>위에서 설명한 바와 같이 약독화 혼합백신 1건에 대하여 제품화를 목표로 하였음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>국내는 물론 전 세계적으로 판매되고 있는 바와 같이 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신으로 임상시험 후 제품화 계획.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>소 코로나바이러스 백신</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1건 제품화 목표.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>위에서 설명한 바와 같이 약독화 백신 1건에 대하여 제품화를 목표로 하였음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>위에서 설명한 바와 같이 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신으로 임상시험 후 제품화 계획.</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 로타바이러스 백신</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1건 제품화 목표.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>위에서 설명한 바와 같이 약독화 혼합백신 1건에 대하여 제품화를 목표로 하였음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>현재 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 혼합백신으로 임상시험 후 제품화 하려고 함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 유행성 설사 바이러스 백신</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1건 제품화 목표.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>위에서 설명한 바와 같이 약독화 백신 1건에 대하여 제품화를 목표로 하였음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>현재 PEDV 생건조 백신으로 임상시험 후 제품화 하려고 함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>칼리시 바이러스 감염증 예방용 치료제</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1건 제품화 목표.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1건에 대하여 제품화를 목표로 하였음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>특히 기술이전 후, 제품화를 하려고 함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 유행성 설사 치료제</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1건 제품화 목표.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>현재 2개 제품을 상품화 하여 판매하기 시작하였음.</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>고용창출</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>10명 목표.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>10명 고용</li> <li>백신 및 치료제 판매가 활성화 되면 더 많은 신규 고용창출이 예상됨.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>목표 달성</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>투자유치</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>4건.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>20건 (20,000 천원)</li> <li>백신 및 치료제가 제품화 될 경우 더 많은 투자 유치가 예상됨.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>초과달성 (목표대비 500%)</li> </ul>
<b>결론</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>사업화 지표 중 제품화 5건, 매출액 3건, 고용창출 10명, 투자유치 4건이 목표였음.</li> <li>제품화의 경우 현재 백신의 경우 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신의 임상시험 후 내년 경에 제품화가 예상됨.</li> <li>돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 혼합 백신은 임상시험 후 내년 경에 제품화가 예상됨.</li> <li>돼지 유행성설사 바이러스 약독화 백신은 임상시험 후 내년 경에 제품화가 예상됨.</li> <li>돼지 유행성 설사 치료제는 현재 2개의 제품이 제품화 되어 판매되고 있음.</li> <li>이에 제품화 목표 5건에서 3개는 제품화 되어 있고, 2개는 내년 하반기에 계획되어 있어, 충분히 달성할 수 있을 것으로 기대됨.</li> </ul>		



연구기반지표			
SCI 논문	• 10편 목표.	• 14편 게재.	• 초과달성. (목표대비 140%)
학술발표	• 8건 목표.	• 16편 발표.	• 초과달성. (목표대비 200%)
교육지도	• 9건 목표.	• 9건 달성.	• 목표달성.
인력양성	• 14명 목표.	• 14명 달성.	• 목표달성.
정책활용	• 3건 목표.	• 0건 달성.	• 내년 제품화 시 백신 및 치료제 사용에 대한 정책활용 목표를 충분히 달성할 것으로 기대됨.
홍보전시	• 8건 목표.	• 5건 달성.	• 내년 백신 제품화 시 이에 대한 판매증진을 위한 홍보전시가 활성화 되어, 홍보전시 목표를 충분히 달성할 것으로 기대됨.
기타(타 연구 활용 등)	• 6건 목표.	• 8건 달성(특허자원기탁)	• 초과달성. (목표대비 133%)
결론	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 학술성과는 초과달성하였음.</li> <li>• 교육지도는 9건 목표 중 9건 달성하였으며, 내년 제품화 시 더 많은 교육지도 성과가 예상됨.</li> <li>• 인력양성은 14명 목표 중 14명 달성하였음.</li> <li>• 정책활용은 3건 목표 중 0건 달성하였지만, 내년 제품화 시 백신 및 치료제 정책활용을 건의하면, 충분히 달성할 것으로 기대됨.</li> <li>• 홍보전시는 8건 목표 중 5건 달성하였지만, 내년 백신 및 치료제 제품화가 활성화 되면 충분히 달성할 것으로 기대됨.</li> <li>• 기타 타 연구로의 활용을 위해 본 과제에서 수행한 8개의 백신주를 특허자원으로 기탁하여, 기타 6건 목표 중 총 8건 달성하였음.</li> </ul>		

#### 4. 연구결과의 활용 계획 등

연구결과	활용계획
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 소 로타바이러스 백신</li> <li>• 소 코로나바이러스 백신</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신을 (주)중앙백신에 기술 이전하여 내년도에 제품화 하고, 전 세계에 수출을 하려고 함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지 로타바이러스 백신</li> <li>• 돼지 전염성 위장염 바이러스 백신</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 혼합백신을 (주)중앙백신에 기술 이전하여 내년도에 제품화 하고, 전 세계에 수출을 하려고 함.</li> <li>• <u>현재 동남아시아 등 수출을 위해 수출승인을 받아놓은 상태임.</u></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지 유행성 설사 바이러스 백신</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지 유행성 설사 약독화 생건조 백신을 (주)중앙백신에 기술이전 하였으며, 내년도에 제품화 하고, 전 세계에 수출을 하려고 함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 칼리시 바이러스 감염증 예방용 치료제</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지 사포바이러스, 소 노로바이러스, 소 네보바이러스 치료제로서 (주)중앙백신에 기술이전하여 내년도에 제품화 하고, 전 세계에 수출을 하려고 함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지 유행성 설사 치료제</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 현재 2개의 제품을 상품화 하여 판매 중에 있으며, 향후 전 세계를 대상으로 수출을 추진하려고 계획하고 있음.</li> </ul>

## 붙임. 참고문헌

- Adah MI, Wade A, Taniguchi K. 2001. Molecular epidemiology of rotaviruses in Nigeria: detection of unusual strains with G2P[6] and G8P[1] specificities. *J. Clin. Microbiol.* 39:3969 - 7395.
- Adams MJ, Carstens EB. 2012. Ratification vote on taxonomic proposals to the international committee on taxonomy of viruses (2012). *Arch. Virol.* 157:1411-1422.
- Adams NR, Hofstad MS. 1971. Isolation of transmissible enteritis agent of turkeys in avian embryos. *Avian Dis.* 15:426-433.
- Al Mawly J, Grinberg A, Prattley D, Moffat J, French N. 2014. Prevalence of endemic enteropathogens of calves in New Zealand dairy farms. *N. Z. Vet. J.* 19:1-18.
- Al-Tawfiq JA, Memish ZA. 2014. Middle East respiratory syndrome coronavirus: epidemiology and disease control measures. *Infect. Drug Resist.* 7:281-287.
- Amimo JO, Vlasova AN, Saif LJ. 2013. Detection and genetic diversity of porcine group A rotaviruses in historic (2004) and recent (2011 and 2012) swine fecal samples in Ohio: predominance of the G9P[13] genotype in nursing piglets. *J. Clin. Microbiol.* 51:1142-1151.
- Ammar SS, Mokhtaria K, Tahar BB, Amar AA, Redha BA, Yuva B, Mohamed HS, Abdellatif N, Laid B. 2014. Prevalence of rotavirus (GARV) and coronavirus (BCoV) associated with neonatal diarrhea in calves in western Algeria. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4(Suppl 1):S318-S322.
- An S, Chen CJ, Yu X, Leibowitz JL, Makino S. 1999. Induction of apoptosis in murine coronavirus-infected cultured cells and demonstration of E protein as an apoptosis inducer. *J. Virol.* 73:7853-7859.
- Arden KE, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. 2005. New human coronavirus, HCoV-NL63, associated with severe lower respiratory tract disease in Australia. *J. Med. Virol.* 75:455-462.
- Badaracco A, Garaicoechea L, Rodriguez D, Uriarte EL, Odeon A, Bilbao G, Galarza R, Abdala A, Fernandez F, Parreno V. 2012. Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. *Vet. Microbiol.* 158:394-399.
- Bailey OT, Pappenhheimer AM, Sargent F, Cheever MD, Daniels JB. 1949. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. II. Pathology. *J. Exp. Med.* 90:195-212.
- Banyai K, Gentsch JR, Griffin DD, Holmes JL, Glass RI, Szucs G. 2003. Genetic variability among serotype G6 human rotaviruses: identification of a novel lineage isolated in Hungary. *J. Med. Virol.* 71:124 - 134.
- Basler CF, Wang X, Muhlberger E, Volchkov V, Paragas J, Klenk HD, Garcia-Sastre A, Palese P. 2000. The Ebola virus VP30 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:12289-12294.
- Bastien NK, Anderson K, Hart L, Van Caesele P, Brandt K, Milley D, Hachette T, Weiss EC, Li Y. 2005. Human coronavirus NL63 infection in Canada. *J. Infect. Dis.* 191:503-506.
- Beard CW. 1967. Infectious bronchitis virus interference with Newcastle disease virus in monolayers of chicken kidney cells. *Avian Dis.* 11:399-406.
- Beards G, Xu L, Ballard A, Desselberger U, McRae MA. 1992. A serotype 10 human rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 30:1432-1435.
- Beaudette FR, Hudson CB. 1937. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 90:51-58.
- Benfield DA, Saif LJ. 1990. Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. *J. Clin. Microbiol.* 28:1454-1457.
- Bermingham A, Chand MA, Brown CS, Aarons E, Tong C, Langrish C, Hoschler K, Brown K, Galiano M, Myers R, Pebody RG, Green HK, Boddington NL, Gopal R, Price N, Newsholme W, Drosten C, Fouchier RA, Zambon M. 2012. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Euro. Surveill.* 17:20290.
- Bi J, Zeng S, Xiao S, Chen H, Fang L. 2012. Complete genome sequence of porcine epidemic diarrhea virus strain AJ1102 isolated from a suckling piglet with acute diarrhea in China. *J. Virol.* 86:10910-10911.
- Binford SL, Maldonado F, Brothers MA, Weady PT, Zalman LS, Meador JW 3rd, Matthews DA, Patick AK. 2005. Conservation of amino acids in human rhinovirus 3C protease correlates with broad-spectrum antiviral activity of rupintrivir, a novel human rhinovirus 3C protease inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:619-626.
- Blutt SE, Conner ME. 2007. Rotavirus: to the gut and beyond! *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23:39-43.
- Boileau MJ, Kapil S. 2010. Bovine coronavirus associated syndromes. *Vet. Clin. Food Anim.* 26:123-146.
- Booth CM, Matukas LM, Tomlinson GA, Rachlis AR, Rose DB, Dwosh HA, Walmsley SL, Mazzulli T, Avendano M, Derkach PZ, Eptimios IE, Kitai I, Mederski BD, Shadowitz SB, Gold WL, Hawryluck LA, Rea E, Chenkin JS, Cescon DW, Poutanen SM, Detsky AS. 2003. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *JAMA* 289:2801-2809.

- Brian DA, Hogue BG, Kienzle TG. 1995. the coronavirus hemagglutinin esterase glycoprotein. In: Sidel SG (ed.), The Coronaviridae. pp. 165-179. Pleum Press, New York, NY.
- Bridger JC, Woode GN, Meyling A. 1978. Isolation of coronaviruses from neonatal calf diarrhoea in Great Britain and Denmark. *Vet. Microbiol.* 3:101 - 113.
- Brown I, Cartwright S. 1986. New porcine coronavirus? *Vet. Rec.* 119:282-283.
- Charley, B., Riffault, S. & Van Reeth, K. 2006. Porcine innate and adaptative immune responses to influenza and coronavirus infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1081:130-136.
- Cartwright SF, Lucas M, Cavill JP, Gush AF, Blandford TB. 1969. Vomiting and wasting disease of piglets. *Vet. Rec.* 84:175-176.
- Chasey D, Cartwright SF. 1978. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea. *Res. Vet. Sci.* 25:255-256.
- Cheever FS, Baniels JB, Pappenheimer AM, Baily OT. 1949. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. I. Isolation and biological properties of the virus. *J. Exp. Med.* 90:181-194.
- Chen Q, Li G, Stasko J, Thomas JT, Stensland WR, Pillatzki AE, Gauger PH, Schwartz KJ, Madson D, Yoon KH, Stevenson GW, Burrough ER, KHarmoon KM, Main RG, Zh an g J. 2014. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhoea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 52:234-243.
- Chen F, Pan Y, Zhang X, Tian X, Wang D, Zhou Q, Song Y, Bi Y. 2012. Complete genome sequence of a variant porcine epidemic diarrhoea virus strain isolated in China. *J. Virol.* 86:12448.
- Chen J, Liu Z, Shi D, Shi H, Zhang X, Feng L. 2012. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhoea virus variant. *J. Virol.* 86:3408.
- Chen J, Wang C, Shi H, Qiu H, Liu S, Shi D, Zhang X, Feng L. 2011. Complete genome sequence of a Chinese virulent porcine epidemic diarrhoea virus strain. *J. Virol.* 85:11538-11539.
- Chen J, Wang C, Shi H, Qiu H, Liu S, Chen X, Zhang Z, Feng L. 2010. Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhoea virus in China. *Arch. Virol.* 155:1471-1476.
- Chiu SS, Chan KH, Chu KW, Kwan SW, Guan Y, Poon LL, Peiris JS. 2005. Human coronavirus NL63 infection and other coronaviruses infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China. *Clin. Infect. Dis.* 40:1721-1729.
- Chizhikov V, Patton JT. 2000. A four-nucleotide translation enhancer in the 3'-terminal consensus sequence of the nonpolyadenylated mRNAs of rotavirus. *RNA* 6:814-825.
- Cho WK, Kim H, Choi YJ, Yim NH, Yang HJ, Ma JY. 2012. *Epimedium koreanum* Nakai Water Extract Exhibits Antiviral Activity against Porcine Epidemic Diarrhoea Virus *In Vitro* and *In Vivo*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012:985151.
- Cho YY, Lim SI, Kim YK, Song JY, Lee JB, An DJ. 2014. Complete genome sequence of K14JB01, a novel variant strain of porcine epidemic diarrhoea virus in South Korea. *Genome Announc.* 2:e00505.14.
- Cho KO, Hoet AE, Loerch SC, Wittum TE, Saif LJ. 2001a. Evaluation of concurrent shedding of bovine coronavirus via the respiratory tract and enteric route in feedlot cattle. *Am. J. Vet. Res.* 62:1436-1441.
- Cho KO, Hasoksuz M, Nielsen PR, Chang KO, Lathrop S, Saif LJ. 2001b. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhoea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Arch. Virol.* 146:2401-2419.
- Cho KO, Halbur PG, Bruna JD, sorden SD, Yoon KJ, Janke BH, Chang KO< Saif LJ. 2000. Detection and isolation of coronavirus from feces of three herds of feedlot cattle during outbreaks of winter dysentery-like disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217:1191-1194.
- Choi JC, Lee KK, Pi JH, Park SY, Song CS, Choi IS, Lee JB, Lee DH, Lee SW. 2014. Comparative genome analysis and molecular epidemiology of the reemerging porcine epidemic diarrhoea virus strains isolated in Korea. *Infect. Genet. Evol.* 26:348-351.
- Chouljenko VN, Kousoulas KG, Lin X, Storz J. 1998. Nucleotide and predicted amino acid sequences of all genes encoded by the 3' genomic portion (9.5 kb) of respiratory bovine coronaviruses and comparisons among respiratory and enteric coronaviruses. *Virus Genes* 17:33-42.
- Clark MA. 1993. Bovine coronavirus. *Br. Vet. J.* 149:51 - 70.
- Collins P, Mulherin E, Cashman O, Lennon G, Gunn L, O'Shea H, Fanning S. 2014. Detection and characterisation of bovine rotavirus in Ireland from 2006-2008. *Ir. Vet. J.* 67:13.
- Collins PJ, Martella V, Sleator RD, Fanning S, O'Shea H. 2010. Detection and characterization of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland. *Arch. Virol.* 155:1247-1259.
- Coopers Animal Health, 2013. New dairy vaccine targets rotavirus. *Stock J.* (available at [www.stockjournal.com.au](http://www.stockjournal.com.au))
- Cornelia C. Bergmann, Thomas E. Lane & Stephen A. Stohlman. 2006. Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:121-132.

- Coura FM, Freitas MD, Ribeiro J, de Leme RA, de Souza C, Alfieri AA, Facury Filho EJ, de Carvalho AU, Silva MX, Lage AP, Heinemann M. 2015. Longitudinal study of Salmonella spp., diarrheagenic Escherichia coli, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. *Trop. Anim. Health. Prod.* 47:3-11.
- Cunliffe NA, Gondwe JS, Broadhead RL, Molyneux ME, Woods PA, Bresee JS, Glass RI, Gentsch JR, Hart CA. 1999. Rotavirus G and P types in children with acute diarrhea in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1998: predominance of novel P[6]G8 strains. *J. Med. Virol.* 57:308-312.
- Curtis KM, Yount B, Baric RS. 2002. Heterologous gene expression from transmissible gastroenteritis virus replicon particles. *J. Virol.* 76:1422-1434.
- Debouck P, Pensaert M. 1980. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV777. *Am. J. Vet. Res.* 41:219-223.
- Decaro N, Mari V, Desario C, Campolo M, Elia G, Martella V, Greco G, Cirone F, Colaianni ML, Cordioli P, Buonavoglia C. 2008. Severe outbreak of bovine coronavirus infection in dairy cattle during the warmer season. *Vet. Microbiol.* 126:30-39.
- de Groot RJ. 2006. Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses. *Glyconj. J.* 23:59-72.
- de Groot RJ, Baker SC, Baric RS. 2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.* 87:7790-7792.
- de Haan CA, de Wit M, Kuo L, Montalto-Morrison C, Haagmans BL, Weiss SR, Masters PS, Rottier PJ. 2003. The glycosylation status of the murine hepatitis coronavirus M protein affects the interferogenic capacity of the virus in vitro and its ability to replicate in the liver but not the brain. *Virology* 312:395-406.
- Delaplane JP, Sturur HO. 1941. The modification of infectious bronchitis virus of chickens as the result of propagation in embryonated chicken eggs. *Rhod Island Agricultural Experiment Station, RI Bulletin* 284.
- Devaraj SG, Wang N, Chen Z, Tseng M, Barretto N, Lin R, Peters CJ, Tseng CT, Baker SC, Li K. 2007. Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Biol. Chem.* 282:32208-32221.
- Ding JW, Ning Q, Liu MF, Lai A, Leibowitz J, Peltekian KM, Cole EH, Fung LS, Holloway C, Marsden PA, Yeger H, Phillips MJ, Levy GA. 1997. Fulminant hepatic failure in murine hepatitis virus strain 3 infection: tissue-specific expression of a novel fgl2 prothrombinase.
- Doyle L, Hutchings LM. 1946. A transmissible gastroenteritis in pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 108:257-259.
- Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguiere AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Muller S, Rickerts V, Sturmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW. 2003a. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348:1967-1976.
- Drosten C, Preiser W, Gunther S, Schmitz H, Doerr HW. 2003b. Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. *Trends Mol. Med.* 9:325-327.
- Dveksler GS, Dieffenbach CW, Cardellichio CB, McCuaig K, Pensiero MN, Jiang GS, Beauchemin N, Holmes KV. 1993. Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59. *J. Virol.* 67:1-8.
- Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, Kikuta H. 2005. Detection of human coronavirus NL63 in young children with bronchiolitis. *J. Med. Virol.* 75:463-465.
- El-Kanawati ZR, Tsunemitsu H, Smith DR, Saif LJ. 1996. Infection and cross-protection studies of winter dysentery and calf diarrhea bovine coronavirus strains in colostrum-deprived and gnotobiotic calves. *Am. J. Vet. Res.* 57:48-53.
- Estes MK, Kapikian AZ. 2007. Rotaviruses. In: Knipe DM, Griffin DE, Lamb RA, Straus SE, Howley PM, Martin MA, Roizman B (Eds.). *Fields Virology*, Fifth edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp.1917-1974.
- Fan H, Zhang J, Ye Y, Tong T, Xie K, Liao M. 2012. Complete genome sequence of a novel porcine epidemic diarrhea virus in South China. *J. Virol.* 86:10248-10249.
- Fischer F, Peng D, Hingley ST, Weiss SR, Masters PS. 1997. The internal open reading frame within the nucleocapsid gene of mouse hepatitis virus encodes a structural protein that is not essential for viral replication. *J. virol.* 71:996-1003.
- Flexner, C. 2007. HIV drug development: the next 25 years. *Nature Reviews Drug Discovery.* 6:959-966.
- Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH, Osterhaus AD. 2004. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:6212-6216.
- Fouchier RA, HKuiken T, Schutten M, Van Amerongen G, Van Doornum GJ, Van Den Hoogen BG, Peiris M, Lim W, Stohr K, Osterhaus AD. 2003. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 423:240.

- Garwes DJ. 1988. Transmissible gastroenteritis. *Vet. Rec.* 122:462-463.
- Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A, Kumar R, Bhan MK, Glass RI. 1996. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J. Infect. Dis.* 174:S30-S36.
- Gillhuber J, Rügamer D, Pfister K, Scheuerle MC. 2014. Giardiasis and other enteropathogenic infections: a study on diarrhoeic calves in Southern Germany. *BMC Res. Notes* 7:112.
- Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, Snijder EJ. 2006. Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res.* 117:17-37.
- Gouvea V, de Castro L, Timenetsky MC, Greenberg H, Santos N. 1994. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J. Clin. Microbiol.* 32:1408 - 1409.
- Greig AS, Johnson CM, Bouillant AM. 1971. encephalomyelitis of swine caused by a haemagglutinating virus. VI. Morphology of the virus. *Res. Vet. Sci.* 12:305-307.
- Greig AS, Mitchell D, Corner AH, Bannister GL, Meads EB, Julian RJ. 1962. A hemagglutinating virus producing encephalomyelitis in baby pigs. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 26:49-56.
- Griffin DD, Nakagomi T, Hoshino Y, Nakagomi O, Kirkwood CD, Parashar UD, Glass RI, Gentsch JR. 2002. Characterization of nontypeable rotavirus strains from the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6], G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. *Virology* 294:256 - 269.
- Grove J, Marsh M. 2011. The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J. Cell Biol.* 195:1071-1082.
- Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, Luo SW, Li PH, Zhang LJ, Guan YJ, Butt KM, Wong KL, Chan KW, Lim W, Shortridge FK, Yuen KY, Peiris JS, Poon LL. 2003. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 302:276-278.
- Gunn A. 2003. Calf scours in Southern Australia. Meat and Livestock Australia Ltd. Australia.
- Guy JS. 2013. Turkey Coronavirus Enteritis. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V, eds. *Diseases of Poultry*. pp.376-407. John Wiley & Sons, Inc. Ames, Iowa.
- Haagmans BL, Al Dhahiry SH, Reusken CB, Raj VS, Galiano M, Myers R, Godeke GJ, Jonges M, Farag E, Diab A, Ghobashy H, Alhajri F, Al-Thani M, Al-Marri SA, Al Romaihi HE, Al Khal A, Bermingham A, Osterhaus AD, AlHajri MM, Koopmans MP. 2014; Middle East respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: an outbreak investigation. *Lancet Infect. Dis.* 14:140-145.
- Hasoksuz M, Sreevatsan S, Cho KO, Hoet AE, Saif LJ. 2002. Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. *Virus Res.* 84:101-109.
- Hasoksuz M, Lathrop S, Al-dubaib MA, Lewis P, Saif LJ. 1999. Antigenic variation among bovine enteric coronaviruses (BECV) and bovine respiratory coronaviruses (BRCV) detected using monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 144:2441-2447.
- Ha TPM, Kim HJ, Saif LJ, Jeong YJ, Kim HH, Kwon HJ, Park SJ, Cho KO. 2009. Sequence analysis of unusual P[7]G5 bovine rotavirus strains reveals evidence of interspecies transmission. *J. Virol.* 83:3329-3332.
- Hassine-Zafrane M, Ben Salem I, Sdiri-Loulizi K, Kaplon J, Bouslama L, Aouni Z, Sakly N, Pothier P, Aouni M, Ambert-Balay K. 2014. Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Tunisian calves with diarrhoea. *J. Appl. Microbiol.* 116:1387-1395.
- Hijawi B, Abdallat M, Sayaydeh A. 2012. Novel coronavirus infections in Jordan, April 2013: epidemiological findings from a retrospective investigation. *East Mediterr. Health J.* 19:S12-S18.
- Hofmann H, Pyrc K, van der Hoek L, Geier M, Berkhout B, Pohlmann S. 2005. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:7988-7993.
- Hohdatsu T, Eiguchi Y, Tsuchimoto M, Ide S, Yamagishi H, Matumot M. 1987. Antigenic variation of porcine transmissible gastroenteritis virus detected by monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 14:115-124.
- Jackwood MW, de Wit S. 2013. Infectious Bronchitis. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V, eds. *Diseases of Poultry*. pp.139-159. John Wiley & Sons, Inc. Ames, Iowa.
- Jacobson JM, Kuritzkes DR, Godofsky E. 2009. Safety, Pharmacokinetics, and Antiretroviral Activity of Multiple Doses of Ibalizumab (formerly TNX-355), an Anti-CD4 Monoclonal Antibody, in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:450 - 457.
- Jeong JH, Kim GY, Yoon SS, Park SJ, Kim YJ, Sung CM, Shin SS, Lee BJ, Kang MI, Park NY, Koh HB, Cho KO. 2005. Molecular analysis of S gene of spike glycoprotein of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2003.
- Jia A, feng X, Liu Q, Zhou R, Wang G. 2014. Complete genome sequence of CHYJ130330, a highly virulent strain of porcine epidemic diarrhea virus in South China. *Genome Announc.* 2:e00165-14.
- Jinghui F, Yijing L. 2005. Cloning and sequence analysis of the M gene of porcine epidemic diarrhea virus LJB/03. *Virus Genes* 30:69-73.
- Jungherr EI, Chomiak TW, Luginbuhl RE. 1956. Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus.



- Proc. 60th Annual Meeting U.S. Livestock Sanitary Associatin. pp. 203-209.
- Kadoi K, Sugioka H, Satoh T, Kadoi BK. 2002. The propagation of a porcine epidemic diarrhea virus in swine cell lines. *New Microbiol.* 25:285-290.
- Kang TJ, Seo JE, Kim DH, Kim TG, Jang YS, Yang MS. 2005. Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants. *Protein Expr. Purif.* 41:378-383.
- Kanno T, Kamiyoshi T, Ishihara R, Hatama S, Uchida I. 2009. Phylogenetic studies of bovine coronaviruses isolated in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 71:83-86.
- Kanno T, Ishihara R, Hatama S, Uchida I. 2013. Antigenic variation among recent Japanese isolates of bovine coronaviruses belonging to phylogenetically distinct genetic groups. *Arch. Virol.* 158:1047-1053.
- Kanno T, Hatama S, Ishihara R, Uchida I. 2007. Molecular analysis of the S glycoprotein gene of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. *J. Gen. Virol.* 88:1218-1224.
- Kapil S, goyal SM. 1995. Bovine coronavirus-associated respiratory disease. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 17:1179-1181.
- Kapil S, Lamm CG, McVey DS. 2008. Detection of bovine respiratory coronavirus in beef cattle. In: *Proceedings of the 27th annual meeting of the American Society of Virologists.* pp. 9-1. Cornell University, Itaca, NY.
- Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Chan-it W, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. 2007. Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. *Virology* 361:243-252.
- Kienzle TG, Abraham S, Hogue BG, Brian DA. 1990. Structure and orientation of expressed bovine coronavirus hemagglutinin-esterase protein. *J. Virol.* 64:1834-1838.
- Kim HJ, Park JG, Alfajaro MM, Kim DS, Hosmillo M, Son KY, Lee JH, Bae YC, Park SI, Kang MI, Cho KO. 2012. Pathogenicity characterization of a bovine triple reassortant rotavirus in calves and piglets. *Vet. Microbiol.* 159:11-22.
- Kim HJ, Park JG, Mthijnsens J, Lee JH, Bae YC, Alfajaro MM, Park SI, Kang MI, Cho KO. 2011. Intestinal and extra-intestinal pathogenicity of a bovine reassortant rotavirus in calves and piglets. *Vet. Microbiol.* 152:291-303.
- Kim HJ, Park SI, Ha TPM, Jeong YJ, Kim HH, Kwon HJ, Kang MI, Cho KO, Park SJ. 2010. Detection and genotyping of Korean porcine rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 144:274-286.
- Kim HH, Park ES, Sung CM, Kim GY, Park SJ, Park SI, Park SH, Jeong C, Kim YJ, Cho KO. 2007. Seroprevalence of bovine coronavirus in adult dairy and beef cattle in Korea. *Lab. Ani. Res.* 23:187-190.
- Kim SJ, Han JH, Kwon HM. 2003. partial sequence of the spike glycoprotein gene of transmissible gastroenteritis viruses isolated in Korea. *Vet. Microbiol.* 94:195-206.
- Kim L, Hayes J, Lewis P, Parwani AV, Chang KO, Saif LJ. 2000. Molecular characterization and pathogenesis of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) field isolates co-circulating in a swine herd. *Arch. Virol.* 145:1133-1147.
- Ko CK, Kang MI, Lim GK, Kim GY, Yoon SS, Park JT, Jeong C, Park SH, Park SJ, Kim YJ, Jeong JH, Kim SK, Park SI, Kim HH, Kim KY, Cho KO. 2006. Molecular characterization of HE, M, and E genes of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2003. *Virus Genes* 32:129-136.
- Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AG, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, anderson LJ, SARS Working Group. 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348:1953-1966.
- Kuo L, Masters PS. 2003. The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *J. Virol.* 77:4597-4608.
- Kusanagi K, Kuwahara H, Katoh T, Nunoya T, Ishikawa Y, Samejima T, Tajima M. 1992. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *J. Vet. Med. Sci.* 54:313-318.
- Kuwahara H, Nunoya T, Samejima T, Tajima M. 1988. Passage in piglets of a coronavirus associated with porcine epidemic diarrhea. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 41:169-173.
- Kweon CH, Kwon BJ, Jung TS, Kee YJ, Hur DH, Hwang EK, Rhee JC, An SH. 1993. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Korea. *Kor. J. Vet. Res.* 33:249-254.
- Kweon CH, Kwon BJ, Kang YB, An SH. 1994. Cell adaptation of KPEDV-9 and serological survey on porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection in Korea. *Kor. J. Vet. Res.* 34:321-326.
- Kweon CH, Kwon BJ, Lee JG, Kwon GO, Kang YB. 1999. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Vaccine* 17:2546-2553.
- Kwon HJ, Ryu YB, Kim YM, Song N, Kim CY, Rho MC, Jeong JH, Cho KO, Lee WS, Park SJ. 2013. In vitro antiviral activity of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* against porcine epidemic diarrhea coronavirus infection and hemagglutination. *Bioorg. Med. Chem.* 21:4706-4713.

- Lai MM, Perman S, Anderson LJ. 2007. Coronaviridae. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. *Fields Virology*, 5th ed. Vol. 1, pp. 1305-1335. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Lai MM, Baric RS, Makino S, Keck JG, Egbert J, Leibowitz JL, Stohlman SA. 1985. Recombination between nonsegmented RNA genomes of murine coronaviruses. *J. Virol.* 56:449-456.
- Langpap TJ, Bergeland ME, Reed DE. 1979. Coronaviral enteritis of young calves: virologic and pathologic findings in naturally occurring infections. *Am. J. Vet. Res.* 34:145 - 150.
- Lathrop SL, Wittum TG, Brock KV, Loerch SC, Perino LJ, Bingham HR, McCollum FT, Saif LJ. 2000. Association between infection of the respiratory tract attributable to bovine coronavirus and health and growth performance of cattle in feedlots. *Am. J. Vet. Res.* 61:1062-1066.
- Laude H, Gelfi J, Lavenant L, Charley B. 1992. Single amino acid changes in the viral glycoprotein M affect induction of alpha interferon by the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* 66:743-749.
- Laude H, Van Reeth K, Pensaert M. 1993. Porcine respiratory coronavirus; molecular features and virus-host interactions. *Vet. Res.* 24:125-150.
- Laude H, Gelfi JD, Aynaud JM. 1981. In vitro properties of low- and high-passaged strains of transmissible gastroenteritis coronavirus of swine. *Am. J. Vet. Res.* 42:447-449.
- Lee S, Lee C. 2014. Outbreak-related porcine epidemic diarrhea virus strains similar to US strains, South Korea, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 20:1223-1226.
- Lee S, Park GS, Shin JH, Lee C. 2014. Full-genome sequence analysis of a variant strain of porcine epidemic diarrhea virus in South Korea. *Genome Announc.* 2:e01116-14.
- Lee DK, Park CK, Kim SH, Lee C. 2010. Heterogeneity in spike protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Res.* 149:175-182.
- Lee N, Hui D, Wu A, Chan ZP, Cameron P, Joynt GM, Ahuja A, Yung MY, Leung CB, To KF, Lui SF, Szeto CC, Chung S, Sung JJ. 2003. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.* 348:1986-1994.
- Lee JH, Park JS, Lee SW, Hwang SY, Young BE, Choi HJ. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: inhibition by polysaccharide from *Ginkgo biloba* exocarp and mode of its action. *Virus Res.* 195:148-152.
- Leung WK, To KF, Chan PK, Chan HL, Wu AK, Lee N, Yuen KY, Sung JJ. 2003. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *Gastroenterology* 125:1011-1017.
- Li B, Liu H, He K, Guo R, Ni Y, Du L, Wen L, Zhang X, Yu Z, Zhou J, Mao A, Lv L, Hu Y, Yu Y, Zhu H, Wang X. 2013. Complete genome sequence of a recombinant porcine epidemic diarrhea virus strains from Eastern China. *Genome Announc.* 1:e00105-13.
- Li BX, Ge JW, Li YJ. 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology* 365:166-172.
- Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426:450-454.
- Lim GK, Kang MI, Lee BJ, Park SJ, Jeong C, Park SH, Kim YJ, Jeong JH, Sung CM, Ko CK, Cho KO. 2005. Detection of viral diseases causing calf diarrhea in Korea. *Kor. J. Buiatrics* 10:115-126.
- Lin CN, Chung WB, Chang SW, Wen CC, Liu H, Chien CH, Chiou MT. US-like strain of porcine epidemic diarrhea virus outbreaks in Taiwan, 2013-2014. *J. Vet. Med. Sci.* 76:1297-1299.
- Lin XQ, O' Eilly KL, Storz J, Purdy CW, Loan RW. 2000. Antibody responses to respiratory coronavirus infections of cattle during shipping fever pathogenesis. *Arch. Virol.* 145:2335-2349.
- Lu X, Pan J, Tao J, Guo D. 2011. SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN-beta response by targeting initial step of IFN-beta induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism. *Virus Genes* 42:37-45.
- Luber AD, Brower R, Kim D, Silverman R, Peloquin CA, Frank I. 2007. Steady-state pharmacokinetics of once-daily fosamprenavir/ritonavir and atazanavir/ritonavir alone and in combination with 20mg omeprazole in healthy volunteers. *HIV medicine.* 8:457-464
- Luo Y, Zhang J, Deng X, Ye Y, Liao M, Fan H. 2012. Complete genome sequence of a highly prevalent isolate of porcine epidemic diarrhea virus in South China. *J. Virol.* 86:9551.
- Martelli P, Lavazza A, Nigrilli AD, Merialdi G, Alborali Lg, Pensaert MB. 2008. Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. *Vet. Rec.* 162:307-310.
- Marthaler D, Bruner L, Collins J, Rossow K. 2014. Third strain of porcine epidemic diarrhea virus, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 20:2162-2163.
- Marthaler D, Jiang Y, Otterson T, Goyal S, Rossow K, Collins J. 2013. Complete genome sequence of porcine epidemic diarrhea virus strains USA/Colorado/2013 from the United States. *Genome Announc.* 1:e00555-13.
- Martin SW, Nagy E, Shewen PE, Harland RJ. 1998. The association of titers to bovine coronavirus with treatment for bovine respiratory disease and weight gain in feedlot calves. *Can. J. Vet. Res.* 62:257-261.

- Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F. 2005. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:12543-12547.
- Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Patton JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger U, Van Ranst M. 2008b. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 153:621-1629.
- Mawatari T, Hirano K, Ikeda H, Tsunemitsu H, Suzuki T. 2014. Surveillance of diarrhea-causing pathogens in dairy and beef cown in Yamagata Prefecture, Japan from 2002-to 2011. *Microbiol. Immunol.* 58:530-535.
- McIntosh K. 1974. Coronaviruses: a comparative review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 63:85-129.
- McNulty MS, Bryson DG, Allan Gm, Logan EF. 1984. Coronavirus infection of the bovine respiratory tract. *Vet. Microbiol.* 9:425-434.
- Mebus CA, Stair EL, Rhodes MB, Twiehaus MJ. 1973. Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a coronavirus-like agent. *Vet. Pathol.* 10:45-64.
- Memish ZA, Mishra N, Olival KJ, Fagbo SF, Kapoor V, Epstein JH, Alhakeem R, Durosinloun A, Al Asmari M, Islam A, Kapoor A, Briese T, Daszak AP, Al Rabeeah AA, Lipkin Wi. 2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus in bats, Saudi Arabia. *Emerg. Infect. Dis.* 19:18189-1823.
- Mercer J, Schelhaas M, Helenius A. 2010. virus entry by endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 79:803-833.
- Miyazaki A, Fukuda M, Kuga K, Takagi M, Tsunemitsu H. 2010. Prevalence of antibodies against transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus among pigs in six regions in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 72:943-946.
- Moes E, Vijgen L, Keyaerts E, Zlateva K, Li S, Maes P, Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L, Van Ranst M. 2005. A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus LN63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC Infect. Dis.* 5:6.
- Morin M, Turgeon D, Jollette J, Robinson Y, Phaneuf JB, Sauvageau R, Beauregard M, Teuscher E, Higgins R, Larivière S. 1983. Neonatal diarrhea of pigs in Quebec: infectious causes of significant outbreaks. *Can. J. Comp. Med.* 47:11-17.
- Murphy FA, Gibbs EP, Horzinek MC, Studdert MJ. 1999. Coronaviridae. In: *Veterinary Virology*, 3rd edition, pp.495-508. Academic Press. San Diego, USA.
- Nagaraja KV, Pomeroy BS. 1997. Coronaviral enteritis of turkeys (bluecomb disease). In: Calnek BW, Barnes JH, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, eds. *Disease of poultry*, 10th ed. pp. 686-692. Iowa state University Press, Ames, Iowa.
- Nagy B, Nagy GY, Meder M, Mocsári E. 1996. Enterotoxigenic *Escherichia coli*, rotavirus, porcine epidemic diarrhoea virus, adenovirus and calici-like virus in porcine postweaning diarrhoea in hungary. *Acta Vet. Hung.* 44:9-19.
- Narayanan K, Huang C, Lokugamage K, Kamitani W, Ikegami T, Tseng CT, Makino S. 2008. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 suppresses host gene expression, including that of type I interferon, in infected cells. *J. Virol.* 82:4471-4479.
- Nasr F, Filipowicz W. 2000. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclic nucleotide phosphodiesterase involved in the metabolism of ADP-ribose<sup>1</sup>,<sup>2</sup>-cyclic phosphate. *Nucleic Acids Res.* 28:1676-1683.
- Nga PT, Parquet MDC, Lauber C, Parida M, Nabeshima T, Yu F, Thuy NT, Inoue S, Ito T, Okamoto K, Ichinose A, Snijder EJ, Morita K, Gorbalenya AE. 2011. Discovery of the first insect nidovirus, a missing evolutionary link in the emergence of the largest RNA virus genomes. *PLoS Pathogens* 7:e1002215.
- Nie QH, Luo XD, Zhang JZ, Su Q. 2003. Current status of severe acute respiratory syndrome in China. *World J. Gastroenterol.* 9:1635-1645.
- Ning Q, Liu M, Kongkhan P, Lai MM, Marsden PA, Tseng J, pereira B, Belyavskiy M, Leibowitz J, Phillips MJ, Levy G. 1999. the nucleocapsid protein of murine hepatitis virus type 3 inuces transcription of the novel fgl2 prothrombinase gene. *J. Biol. Chem.* 274:9930-9936.
- Nomura R, Kiyota A, 념마 E, Kataoka K, Ohe Y, Miyamoto K, Senda T, Fujimoto T. 2004. Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *J. Virol.* 78:8701-8708.
- Oberg B. 2006. Rational design of polymerase inhibitors as antiviral drugs. *Antiviral Res.* 71:90-95.
- Oh J, Lee K-W, choi H-W, Lee C. 2014. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Arch. Virol.* 159:2977-2987.
- Oh YI, Cho SD, Kang HK, Choi SK, Kim YJ, Hyun BH, Song JY, Yang DK. 2010. Surveillance of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) in South Korea. *Korean J. Vet. Res.* 50(S1):S103-S104.
- Ohashi S, Suzuki T, Miyazaki A, Goto Y, Itoh S, Yamakawa M, Tsutsui T, Tsuda T. 2014. Isolation and genetic characterization of a novel porcine epidemic diarrhea virus obtained from an outbreak in 2013-2014 in Japan. *Swine Enteric Coronavirus Diseases International Meeting, Chicago, IL, September 25, 2014.*

- Ortego J, Escors D, Laude H, Enjuanes L. 2002. Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *J. Virol.* 76:11518-11529.
- Palombo E, Clark R, Bishop RF. 2000. Characterization of a "European-like" serotype G8 human rotavirus isolated in Australia. *J. Med. Virol.* 60:56 - 62.
- Panigrahy B, Naqi SA, Hall CF. 1973. Isolation and characterization of viruses associated with transmissible enteritis(bluecomb) of turkeys. *Avian Dis.* 17:430-438.
- Papp H., László B, Jakab F, Ganesh B, De Grazia S, Matthijssens J, Ciarlet M, Martella V, Bányai K. 2013. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet. Microbiol.* 165:190-199.
- Parisien JP, Lee JF, Rodriguez JJ, Sullivan BM, Moscona A, Parks GD, Lamb RA, Horvath CM. 2001. The V protein of human parainfluenza virus 2 antagonizes type I interferon responses by destabilizing signal transducer and activator of transcription 2. *Virology* 283:230-239.
- Park JG, Kim HJ, Matthijssens J, Alfajaro MM, Kim DS, Son KY, Kwon HJ, Hosmillo M, Ryu EH, Kim JY, Cena RB, Lee JH, Kang MI, Park SI, Cho KO. 2013. Different virulence of porcine and porcine-like bovine rotavirus strains with genetically nearly identical genomes in piglets and calves. *Vet. Res.* 44:88.
- Park SI, Matthijssens J, Saif LJ, Kim HJ, Park JG, Alfajaro MM, Kim DS, Son KY, Yang DK, Hyun BH, Kang MI, Cho KO. 2011. Reassortment among bovine, porcine and human rotavirus strains results in G8P[7] and G6P[7] strains isolated from cattle in South Korea. *Vet. Microbiol.* 152:55-66.
- Park SH, Saif LJ, Jeong C, Lim GK, Park SI, Kim HH, Park SJ, Kim YJ, Jeong JH, Kang MI, Cho KO. 2006. Molecular characterization of novel G5 bovine rotavirus strains. *J. Clin. Microbiol.* 44:4101-4112.
- Park S, Kim S, Song D, Park B. 2014a. Novel porcine epidemic diarrhea virus variant with large genomic deletion, South Korea. *Emerg. Infect. Dis.* 20:2089-2092.
- Park JE, Cruz DJM, Shin HJ. 2014b. Clathrin- and serine proteases-dependent uptake of porcine epidemic diarrhea virus into Vero cells. *Virus Res.* 191:21-29.
- Park JG, Kim DS, Matthijssens J, Kwon HJ, Zeller M, Alfajaro MM, Son KY, Hosmillo M, Ryu EH, Kim JY, Lee JH, Park SJ, Kang MI, Kwon J, Choi JS, Cho KO. 2014c. Comparison of pathogenicities and nucleotide changes between porcine and bovine reassortant rotavirus strains possessing the same genotype constellation in piglets and calves. *Vet. Microbiol.* 172:51-62.
- Park JG, Kim HJ, Matthijssens J, Alfajaro MM, Kim DS, Son KY, Kwon HJ, Hosmillo M, Ryu EH, Kim JY, Cena RB, Lee JH, Kang MI, Park SI, Cho KO. 2014d. Different virulence of porcine and porcine-like bovine rotavirus strains with genetically nearly identical genomes in piglets and calves. *Vet. Res.* 44:88.
- Park SJ, Song DS, Park BK. 2013. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field isolates in Korea. *Arch. Virol.* 158:1533-1541.
- Park SJ, Kim HK, Song DS, Moon HJ, Park BK. 2011. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field isolates in Korea. *Arch. Virol.* 156:577-585.
- Park SJ, Moon HJ, Yang JS, Lee CS, Song DS, Kang BK, Park BK. 2007a. Sequence analysis of the partial spike glycoprotein gene of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Genes* 35:321-332.
- Park SJ, Kim GY, Cho HE, Hong YJ, Saif LJ, Jeong JH, Park SI, Kim HH, Kim SK, Shin SS, Kang MI, Cho KO. 2007b. Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronaviruses in calves. *Arch. Virol.* 152:1885-1900j.
- Park SJ, Lim GK, Park SI, Kim HH, Koh HB, Cho KO. 2007c. Detection and molecular characterization of calf diarrhoea bovine coronaviruses circulating in south Korea during 2004-2005. *Zoonoses Public health* 54:223-230.
- Park SJ, Jeong C, Yoon SS, Choy HE, Saif LJ, Park SH, Kim YJ, Jeong JH, Park SI, Kim HH, Lee BJ, Cho HS, Kim SK, Kang MI, Cho KO. 2006. Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal samples of adult cattle with diarrhea during the warmer seasons. *J. Clin. Microbiol.* 44:3178-3188.
- Park NY, Cho KO, Cho SS, Ha YK. 1993. Isolation and identification of porcine epidemic diarrhea virus. *J. Kor. Vet. Med. Assoc.* 29:360-365.
- Park NY, Lee SY. 1997. Retrospective study of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Korea by in situ hybridization. *Korean J. Vet. Res.* 37:809-816.
- Parra GI, Vidales G, Gomez JA, Fernandez FM, Parreño V, Bok K. 2008. Phylogenetic analysis of porcine rotavirus in Argentina: increasing diversity of G4 strains and evidence of interspecies transmission. *Vet. Microbiol.* 126:243-250. *Pig Progress.* 2014. PEDv outbreak in Taiwan, reported new cases. *PIGPROGRESS.* Aug 27, 2014.
- Parry J. 2003. WHO investigates China's fall in SARS cases. *Br. Med. J.* 326:1285.
- Paul PS, Zhu XL, Vaughn EM. 1988. Current strategies for the development of efficacious vaccines for transmissible gastroenteritis in swine. *Proc. U.S. Anim. Hlth. Assoc.* 92:429-443.
- Perlman S, Netland J. 2009. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev.*

Microbiol. 7:439-450.

- Pensaert M. 1989. Transmissible gastroenteritis virus (respiratory variant). In: Pensaert M, ed. *Virus Infections of Porcines*, VI. 2. PP. 154-165. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Pensaert M, Callebaut P, Vergote J. 1986. Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Vet. Q.* 8:257-261.
- Pensaert M, Cox E, van Deun K, Callebaut P. 1993. A sero-epizootiological study of porcine respiratory coronavirus in Belgian swine. *Vet. Q.* 15:16-20.
- Pensaert MB, de Bouck P. 1978. A new coronavirus-like particles associated with diarrhea in swine. *Arch. Virol.* 58:243-247.
- Perera RA, Wang P, Gomaa MR, El-Shesheny R, Kandeil A, Bagato O, Siu LY, Shehata MM, Kayed AS, Moatasim Y, Li M, Poon LL, Guan Y, Webby RJ, Ali MA, Peiris JS, Kayali G. 2013. Seroepidemiology for MERS coronavirus using microneutralisation and pseudoparticle virus neutralisation assays reveal a high prevalence of antibody in dromedary camels in Egypt, June 2013. *Euro. Surveill.* 18:pii=20574.
- Peterson EH, Hymas TA. 1951. Antibiotics in the treatment of unfamiliar turkey disease. *Poult Sci.* 30:466-468.
- Poon LL, Chu DK, Chan KH, Wong OK, Ellis TM, Leung YH, Lau SK, Woo PC, Suen KY, Yuen KY, Guan Y, Peiris JS. 2005. Identification of a novel coronavirus in bats. *J. Virol.* 79:2001-2009.
- Poon LL, Guan Y, Nicholls JM, Yuen KY, Peiris JS. 2004. The aetiology, origins, and diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Lancet Infect. Dis.* 4:663-671.
- Popova R, Zhang X. 2002. The spike but not the hemagglutinin/esterase protein of bovine coronavirus is necessary and sufficient for viral infection. *Virology* 294:222-236.
- Pugach P, Ketas TJ, Michael E, Moore JP. 2008. Neutralizing antibody and anti-retroviral drug sensitivities of HIV-1 isolates resistant to small molecule CCR5 inhibitors. *Virology* 377:401-407.
- Quiroga MA, Cappuccio J, Piñeyro P, Basso W, Moré G, Kienast M, Schonfeld S, Cáncer JL, Arauz S, Pintos ME, Nanni M, Machuca M, Hirano N, Perfumo CJ. 2008. Hemagglutinating encephalomyelitis coronavirus infection in pigs, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 14:484-486.
- Rácz ML, Kroeff SS, Munford V, Caruzo TA, Durigon EL, Hayashi Y, Gouvea V, Palombo EA. 2000. Molecular characterization of porcine rotaviruses from the southern region of Brazil: characterization of an atypical genotype G[9] strain. *J. Clin. Microbiol.* 38:2443-2446.
- Raggi LG, Lee GG. 1963. Infectious bronchitis virus interference with growth of Newcastle disease virus. I. Study of interference in chicken embryos. *Avian Dis.* 7:106-122.
- Register KB, Wesley RD. 1994. Molecular characterization of attenuated vaccine strains of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Virology* 190:92-105.
- Regl G, Kaser A, Iwersen M, Schmid H, Kohla G, Strobl B, Vilas U, Schauer R, Vlasak R. 1999. The hemagglutinin-esterase of mouse hepatitis virus strain S is a sialate-4-O-acetylerase. *J. Virol.* 73:4721-4727.
- Reusken CB, Messadi L, Feyisa A, Ularanu H, Godeke GJ, Danmarwa A, Dawo F, Jemli M, Melaku S, Shamaki D, Woma Y, Wungak Y, Gebremedhin EZ, Zutt I, Bosch BJ, Haagmans BL, Koopmans MP. 2014. Geographic distribution of MERS coronavirus among dromedary camels, Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 20:1370-1374.
- Reusken C, Farag E, Jonges M. 2014. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) RNA and neutralising antibodies in milk collected according to local customs from dromedary camels, Qatar, Apr 2014. *Euro Surveill.* 19:pii=20829.
- Reusken CB, Haagmans BL, Müller MA, Gutierrez C, Godeke GJ, Meyer B, Muth D, Raj VS, Smits-De Vries L, Corman VM, Drexler JF, Smits LS, El Tahir YE, De Sousa R, van Beek J, Nowotny N, van Mannen K, Kidalgo-Hermoso E, Bosch BJ, Rottier P, Osterhaus A, Gortázar-Schmidt C, Drosten C, Koopmans MP. 2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *Lancet Infect. Dis.* 13:859-866.
- Reynolds DJ, Debney TG, Hall GA. 1985. Studies on the relationship between coronaviruses from the intestinal and respiratory tracts in calves. *Arch. Virol.* 85:71-83.
- Rho S, Moon HJ, Park SJ, Kim HK, Keum HO, Han JY, Nguyen GV, Park BK. 2011. Detection and genetic analysis of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus in South Korea. *Virus Genes* 42:90-96.
- Ritchie AE, Deshmukh DR, Larsen CT, Pomeroy BS. 1973. Electron microscopy of coronavirus-like particles characteristic of turkey bluecomb disease. *Avian Dis.* 17:546-558.
- Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, Penaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen MH, Tong S, Tamin A, Lowe L, Frace M, DeRisi JL, Chen Q, Wang D, Drdman DD, Peret TC, Burns C, Ksiazek TG, Rollin PE, Sanchez A, Liffick S, Holloway B, Limor J, McCaustland K, Olsen-Rasmussen M, Fouchier R, Gunther S, Osterhaus AD, Drosten C, Pallansch MA, Anderson LJ, Bellini WJ. 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 300:1394-1399.
- Saif LJ. 2010. Bovine respiratory coronavirus. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 26:349-364.
- Saif LJ, Pensaert MB, Sestak K, Yeo SG, Jung K. 2012. Coronaviruses. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez

- A, Schwartz KJ, Stevenson GW (Eds), Disease of Swine. 10th edition. pp. 501-554. Wiley-Blackwell, West Sussex, UK.
- Saif LJ, Heckert R. 1990. Enteropathogenic coronaviruses. In: Saif LJ, Theil KW, eds. *Viral diarrheas of man and animals*. pp. 185 - 252. Boca Raton, Fla: CRC Press.
- Saif LJ, Redman DR, Moorhead PD, Theil KW. 1986. Experimentally induced coronavirus infections in calves: viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *Am. J. Vet. Res.* 47:1426-1432.
- Sánchez CM, Gebauer F, Suñé C, Mendez A, Dopazo J, Enjuanes L. 1992. Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Virology* 190:92-105.
- Schalk AF, Hawn MC. 1931. An apparent new respiratory disease of baby chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 78:413-422.
- Schelle B, Karl N, Ludewig B, Siddell SG, Thiel V. 2005. Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J. Virol.* 79:6620-6630.
- Schiff LA, Libert ML, Tyler KL. 2007. Orthoreoviruses and Their Replication. In: Knipe DM, Griffin DE, Lamb RA, Straus SE, Howley PM, Martin MA, Roizman B (Eds.). *Fields Virology*, Fifth edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp.1853-1915.
- Schultze B, Herrler G. 1992. Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells. *J. Gen. Virol.* 73:901-906.
- Schultze B, Gross HJ, Brossmer R, Klenk HD, Herrler G. 1990. Hemagglutinating encephalomyelitis virus attaches to N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid-containing receptors on erythrocytes; comparison with bovine coronavirus and influenza C virus. *Virus Res.* 16:185-194.
- Schultze B, Gross HJ, Brossmer R, Herrler G. 1991. The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant. *J. Virol.* 65:6232-6237.
- Sharpee RL, Mebus CA, Bass EP. 1976. Characterization of a calf diarrhea coronavirus. *Am. J. Vet. Res.* 37:1031 - 1041.
- Simkins RA, Weillnau PA, Bias J, Saif LJ. 1992. Antigenic variation among transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus strains detected with monoclonal antibodies to the S protein of TGEV. *Am. J. Vet. Res.* 53:1253-1258.
- Siu KL, Kok KH, Ng MH, Poon VK, Yuen KY, Zheng BJ, Jin DY. 2009. Severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein inhibits type I interferon production by impeding the formation of TRAF3.TANK.TBK1/IKKepsilon complex. *J. Biol. Chem.* 284:16202-16209.
- Smith, H.J. and Simons, C. 2005. *Enzymes and Their Inhibition: Drug Development* (6th edition). United State of America: CRC press.
- Smith DR, Fedorka-Cray PJ, Mohan R, Brock KV, Wittum TE, Morley PS, Hoblet KH, Saif LJ. 1998a. Epidemiologic herd-level assessment of causative agents and risk factors for winter dysentery in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 59:994-1001.
- Smith DR, Fedorka-Cray PJ, Mohan R, Brock KV, Wittum TE, Morley PS, Hoblet KH, Saif LJ. 1998b. Evaluation of cow-level risk factors for the development of winter dysentery in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 59:986-993.
- Smits SL, Gerwig GJ, van Vliet AL, Lissenberg A, Briza P, Kamerling JP, Vlasak R, de Groot RJ. 2005. Nidovirus sialate-O-acetylsterases: evolution and substrate specificity of corona- and toroviral receptor-destroying enzymes. *J. Biol. Chem.* 280:6933-6941.
- Simmons G, Reeves JD, Rennekamp AJ, Amberg SM, Piefer AJ, Bates P. 2004. Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:4240-4245.
- Snijder EJ, Kikkert M, Fang Y. 2013. Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *J. Gen. virol.* 94:2141-2163.
- Snijder EJ, Bredenbeek PJ, Dobbe JC, Thiel V, Ziebuhr J, Poon LL, Guan Y, Rozanov M, Spa an WJ, Gorbalenya AE. 2003. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* 331:991-1004.
- Song D, Park B. 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus; a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 44:167-175.
- Song DS, Oh JS, Kang BK, Yang JS, Moon HJ, Yoo HS, Jang YS, Park BK. 2007. Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain. *Res. Vet. Sci.* 82:134-140.
- Spann KM, Tran KC, Chi B, Rabin RL, Collins PL. 2004. suppression of the induction of alpha, beta, and gamma interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages. *J. Virol.* 78:4363-4369.
- Stair EL, Rhodes MB, White RG, Mebus CA. 1972. Neonatal calf diarrhea: purification and electron microscopy of a coronavirus-like agent. *Am. J. Vet. Res.* 33:1147 - 1156.
- Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, Burrough ER, Sun D, Madson D, Cooper VL, Pillatzki A, Gauger P, Schmitt BJ, Koster LG, Killian ML, Yoon KJ. 2013. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25:649-654.



- Storz J, Purdy CW, Lin X, Burrell M, Truax RE, Briggs RE, Frank GH, Loan RW. 2000a. Isolation of respiratory coronaviruses, other cytotidal viruses and *Pasteurella* spp. from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. *J. Am. vet. Med. Assoc.* 216:1599-1606.
- Storz J, Lin X, Purdy CW, Chouljenko VN, Kousoulas KG, Enright FM, Gilmore WC, Briggs RE, Loan RW. 2000b. Coronavirus and *Pasteurella* infections in bovine shipping fever pneumonia and Evans' criteria for causation. *J. Clin. Microbiol.* 38:3291-3298.
- Storz J, Stine L, Liem A, Anderson GA. 1996. Coronavirus isolations from nasal swabs samples in cattle with signs of respiratory tract disease after shipping. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208:1452-1455.
- Sun RQ, Cai RJ, Chen YQ, Liang PS, Chen DK, Song CX. 2012. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. *Emerg. Infect. Dis.* 18:161-163.
- Takahashi K, Okada K, Ohshima K. 1983. An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.* 45:829-832.
- Takamura K, Okada N, Ui S, Hirahara T, Shimizu Y. 2000a. Protection studies on winter dysentery caused by bovine coronavirus in cattle using antigens prepared from infected cell lysates. *Can. J. Vet. Res.* 64:138-140.
- Takamura K, Matsumoto Y, Shimizu Y. 2002b. Field study of bovine coronavirus vaccine enriched with hemagglutinin antigen for winter dysentery in dairy cows. *Can. J. Vet. Res.* 66:278-281.
- Takano T, Katada Y, Moritoh S, Ogasawara M, Satoh K, Satoh R, Tanabe M, Hohdatsu T. 2008. Analysis of the mechanism of antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection: aminopeptidase N is not important and a process of acidification of the endosome is necessary. *J. Gen. Virol.* 89:1025-1029.
- Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD, WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. 2012. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 12:136 - 141.
- Temeeyasen G, Srijangwad A, Tripipat T, Tipsombatboon P, Piriyaopansa J, Phoolcharoen W, Chuanasa T, Tantituvanont A, Nilubol D. 2014. Genetic diversity of ORF3 and spike genes of porcine epidemic diarrhea virus in Thailand. *Infect. Genetic. Evol.* 21A:205-213.
- Ter Beek V. 2015a. Mild strain of PEDv found in farms West Europe. *PIGPROGRESS*. Jan 8, 2015.
- Ter Beek V. 2015b. UKlab confirms PEDv outbreaks in Ukraine. *PIGPROGRESS*. Jan 9, 2015.
- Tian Y, Su D, Zhang H, Chen R, He D. 2013. complete genome sequence of a very virulent porcine epidemic diarrhea virus strain, CH/GDGZ/2012, isolated in Southern China. *Genome Announc.* 1:e00645-13.
- Trojnar E, Sachsenröder J, Twardziok S, Reetz J, Otto PH, Johne R. 2013. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 94:136-142.
- Tsui PT, Kwok ML, Yuen H, Lai ST. 2003. Severe acute respiratory syndrome: clinical outcome and prognostic correlates. *Emerg. Infect. Dis.* 9:1064-1069.
- Tsunemitsu H, Saif LJ. 1995. Antigenic and biological comparisons of bovine coronaviruses derived from neonatal calf diarrhea and winter dysentery of adult cattle. *Arch. Virol.* 140:1303-1311.
- Tyrrel DAJ, Almedia JD, Berry DM, Cunningham CH, Hamre D, Hfstad MS, Malluci L, McIntosh K. 1968. Coronavirus. *Nature* 220:650.
- UK National Animal disease Information Services. 2010. Calf enteritis survey.
- Valarcher JF, Furze J, Wyld S, Cook R, Conzelmann KK, Taylor G. 2004. role of alpha/beta interferons in the attenuation and immunogenicity of recombinant bovine respiratory syncytial viruses lacking NS proteins. *J. Virol.* 77:8426-8439.
- van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PM, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B. 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* 10:368-373.
- van der Hoek L, Sure K, Ihorst G, Stang A, Pyrc K, Jebbink MF, Petersen G, Forster J, Berkhout B, Uberla K. 2005. Croup is associated the novel coronavirus NL63. *PLoS Med.* 2:e240.
- Van Hamme E, Dewerchin HL, Cornelissen E, Verhasselt B, Nauwynck HJ. 2008. Clathrin- and caveolae-independent entry of feline infectious peritonitis virus in monocytes depends on dynamin. *J. Gen. Virol.* 89:247-2156.
- Van Reeth K, Pensaert M. 1994. Prevalence of infections with enzootic respiratory and enteric viruses in feeder pigs entering fattening herds. *Vet. Rec.* 135:594-597.
- van Roeckel H, Bullis KL, Flint OS, Clarke MK. 1942. Poultry disease control service. Massachusetts Agricultural Experiment Station, MA, Annual Report. Bulletin 388:99-103.
- Vaughn EM, Paul PS. 1993. Antigenic and biological diversity among transmissible gastroenteritis virus isolates of swine. *Vet. Microbiol.* 36:333-347.
- Vennema H, Godeke GJ, Rossen JW, Voorhout WF, Horzinek MC, Opstelten DJ, Rottier PJ. 1996. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein

- genes. *EMBO J.* 15:2020-2028.
- Vlasak R, Luytjes W, Spaan W, Palese P. 1988a. Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4526-4529.
- Vlasak R, Luytjes W, Leider J, Spaan W, Palese P. 1988b. The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylsterase activity. *J. Virol.* 62:4686-4690.
- Vlasova AN, Marthaler D, Wang Q, Culhane MR, Rossow KD, Rovira A, Collins J, Saif LJ. 2014. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 20:1620-1628.
- Vui DT, Tung N, Inui K, Slater S, Nilubol D. 2014. Complete genome sequence of porcine epidemic diarrhea virus in Vietnam. *Genome Announc.* 2:e00753-14.
- Wang L, Byrum B, Zhang Y. 2014. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 20:917-919
- Wang XM, Liu BB, Yan H, Gao DS, Yang X, Chen L, Chang HT, Zhao J, Wang CQ. 2013a. Genetic properties of endemic Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains isolated since 2010. *Arch. Virol.* 158:2487-2494.
- Wang XM, Niu BB, Yan H, Gao DS, Huo JY, Chen L, Chang HT, Wang C, Zhao J. 2013b. Complete genome sequence of a variant porcine epidemic diarrhea virus strain isolated in Central China. *Genome Announc.* 1:e00243-12.
- Wei S, Gong Z, Che T, Guli A, Tian F. 2013. Genotyping of calves rotavirus in China by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 189:36-40.
- Wei ZY, Lu WH, Li ZL, Mo JY, Zeng XD, Zeng XD, Zeng ZL, Sun BL, Chen F, Xie QM, Bee YZ, Ma JY. 2012. Complete genome sequence of novel porcine epidemic diarrhea virus strain GD-1 in China. *J. Virol.* 86:13824-13825.
- Weiss SR, Navas-Martin S. 2005. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:635-664.
- Wesley RD, Woods RD, Cheung AK. 1990. Genetic bias for the pathogenesis of transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* 64:4761-4766.
- Wieler LH, Ilieff A, Herbst W, Bauer C, Vieler E, Bauerfeind R, Failing K, Klös H, Wengert D, Baljer G, Zahner H. 2001. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in Southern Germany. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 48:151-159.
- Wilson L, McKinlay C, Gage P, Ewart G. 2004. SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology* 330:322-331.
- Winterfield RW, Hitchner SB. 1962. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am. J. Vet. Res.* 23:1273-1278.
- Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen KY. 2010. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses* 2:1804-1820.
- Woo PC, Lau SK, Lam CS, Lai KK, Huang Y, Lee P, Luk GS, Dyrting KC, Chan KH, Yuen KY. 2009. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. *J. Virol.* 83:908-917.
- Woo PC, Wang M, Lau SK, Xu H, Poon RW, Guo R, Wong BH, Gao K, Tsoi HW, Huang Y, Li KS, Lam CS, Chan KH, Zheng BJ, Yuen K Y. 2007. Comparative analysis of twelve genomes of three novel group 2c and group 2d coronaviruses reveals unique group and subgroup features. *J. Virol.* 81:1574-1585.
- Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY. 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.* 79:884-895.
- Wood EN, 1977. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. *Vet. Rec.* 100:243-244.
- Woods RD. 1978. Small plaque variant transmissible gastroenteritis virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173:643-647.
- World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)-update. Geneva: World Health Organization; 2014.
- Wurm T, Chen H, Hodgson T, Britton P, Brooks G, Hicox JA. 2001. Localizatin to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins, and the protein may disrupt host cell division. *J. Virol.* 75:9345-9456.
- Wurzer WJ, Obojes K, Vlasak R. 2002. The sialate-4-O-acetylsterases of coronaviruses related to mouse hepatitis virus: a proposal to reorganize group 2 Coronaviridae. *J. Gen. Virol.* 83:395-402.
- Xing Y, Chen J, Tu J, Zhang B, Chen X, Shi H, Baker SC, Feng L, Chen Z. 2013. The papain-like protease of porcine epidemic diarrhea virus negatively regulates type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase. *J. Gen. Virol.* 94:1554-1567.
- Yaeger M, Funk N, Hoffman L. 2002. A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14:281-287.
- Yang L, Wu Z, Ren X, Yang F, Zhang J, He G, Dong J, Sun L, Zhu Y, Zhang S, Jin Q. 2014. MERS-related

- betacoronavirus in *Vespertilio superans* bats, China. *Emerg. Infect. Dis.* 20:1260-1262.
- Yang S, Huang M. 2014. Focus Taiwan News, Porcine epidemic diarrhea, Taiwan. Central News Agency report. (<http://focustaiwan.tw/news/aeco/201402280029.aspx>)
- Yang Y, Xiong Z, Zhang S, Yan Y, Nguyen J, Ng B, Lu H, Brendese J, Yang F, Wang H, Yang XF. 2005. Bcl-xL inhibits T cell apoptosis induced by expression of SARS coronavirus E protein in the absence of growth factors. *Biochem. J.* 392:135-143.
- Yang ZY, Huang Y, Ganesh L, Leung K, Kong WP, Schwartz O, Subbarao K, Nabel GJ. 2004. pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN. *J. Virol.* 78:5642-5650.
- Yoon K. 2014. Porcine epidemic diarrhea: US experience under experimental and field conditions. 2014 Korean Association of Swine Veterinarians pp. 138-141.
- Yount B, Curtis KM, Fritz EA, Hensley LE, Jahrling PB, Prentice E, Denison MR, Geisbert TW, Baric RS. 2003. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:12995-1300.
- Yount B, Denison MR, Weiss SR, Baric RS. 2002. Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J. Virol.* 76:11065-11078.
- Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. 2013. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* 367:1814-1820.
- Zhang X, Hasoksuz M, Spiro D, Halpin R, Wang S, Vlasova A, Janies D, Jones LR, Ghedin E, Saif LJ. 2007. Quasispecies of bovine enteric and respiratory coronaviruses based on complete genome sequences and genetic changes after tissue culture adaptation. *Virology* 363:1-10.
- Zhang X, Kousoulas KG, Storz J. 1991. Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the S genes specified by virulent and avirulent strains of bovine coronaviruses. *Virology* 183:397-404.
- Zhao M, Sun Z, Zhang Y, Wang G, Wang H, Yang F, Tian F, Jiang S. 2012. Complete genome sequence of a Vero cell-adapted isolate of porcine epidemic diarrhea virus in Eastern China. *J. Virol.* 86:13858-13859.
- Zhou YJ, Wu YL, Zhu JP, tong W, Yu H, Jiang YF, Tong GZ. 2012. Complete genome sequence of a virulent porcine epidemic diarrhea virus strain. *J. Virol.* 86:13862.
- Zhong NS, Zheng BzJ, Li YM, Poon YM, Xie ZH, Chan ZKH, Li PH, Tan SY, Chang Q, Xie JP, Liu XQ, Xu J, Li DX, Yuen KY, Peiris JS, Guan Y. 2003. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, In February, 2003. *Lancet* 362:1353-1358.
- Zirkel F, Kurth A, Quan PL, Briese T, Ellerbrok H, Pauli G, Leendertz FH, Lipkin WI, Ziebuhr J, Drosten C, Junglen S. 2011. An insect nidovirus emerging from a primary tropical rainforest. *mBio* 2:e00077-11.
- Zust R, Cervantes-Barragan L, Kuri T, Blakqori G, Weber F, Ludewig B, Thiel V. 2007. Coronavirus non-structural protein 1 is a major pathogenicity factor: implications for the rational design of coronavirus vaccines. *PLoS. Pathog.* 3:e109.
- 권창희, 권병준, 정태성, 기영진, 허동호, 황의경, 이재진, 안수환. 1993. 돼지 유행성 설사 바이러스의 국내 분리주 작성에 관한 연구. *대한수의학회지* 33:249-254.
- 권혁무. 1996. PCR과 RFLP분석을 이용한 transmissible gastroenteritis virus의 spike glycoprotein gene과 nonstructural protein gene의 분석. *대한수의학회지* 36:627-635.
- 권혁무, 피재호. 1998. 돼지 전염성 위장염 바이러스(국내분리주)의 분자생물학적 특성규명. *대한수의학회지* 38:304-313.
- 권혁무, 피재호, 성환우. 1998. 국내분리 돼지 전염성 위장염 바이러스의 antigenic site A와 D를 포함하는 spike gene의 염기서열 분석. *대한수의학회지* 38:319-327.
- 권혁준, 이동우, 안영기, 윤종용, 김선중. 2001. 1986년 이전 국내 전염성 기관지염 바이러스의 확인. *대한수의학회지* 41:59-65.
- 국가생명연구자원 통계자료집, 2012.
- 국내외 천연물의약품 시장동향 2007.
- 김순재, 이영옥, 김선중, 전우상, 박근식. 1980. 특정 전염성 병원체에 대한 국내종계의 항체 보유상황. *대한수의학회지*. 20:59-64.
- 농림축산식품부 가축방역 동물약품 정책방향 2014.
- 대한양돈협회. 2006. 2005년도 전국 양돈장 질병 실태 조사 보고서.
- 미국 농무성(USDA) 2014. Technical note.
- 박동권. 1997. 돈 주요질병의 예방과 진단 및 치료. *대한수의사회지* 13:169-184.
- 박남용, 조경오, 조성수. 1993. 돼지 유행성 설사 바이러스의 분리동정. *대한수의사회지* 29:360-365.
- 보건산업백서, 2010
- 유태석. 1968. 닭의 전염성 기관지염 바이러스에 관한 연구: 전염성 기관지염 바이러스에 대한 항체분포조사. *대한수의학회지* 8:24-29.
- 이영옥, 김재홍, 김재학, 모인필, 윤희정, 최상호, 남궁선. 1986. 전염성 기관지염의 국내발생. *대한수의학회지*. 26:277-282.

장영은, 조선희, 김병한, 안재문, 강신영. 1998. 돼지 전염성 위장염 바이러스에 대한 단크론항체 생산 및 특성. 대한 수의학회지 38:336-344.

천연물신약 시장 및 연구개발 동향, 2011.

천연물신약 시장 및 연구개발 동향, 2012.

[별첨 1]

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 산업동물 바이러스성 장염 백신 및 치료제 산업화				
	(영문) Industrialization of vaccines and drugs against livestock viral enteritis				
주관연구기관	전남대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 전남대학교	
참 여 기 업	(주)중앙백신 바이오텐(주)			(성명) 조 경 오	
총연구개발비 (4,000,002천원)	계	4,000,002	총 연 구 기 간	2015 . 08.~2019 . 08 .( 4년 0월)	
	정부출연 연구개발비	3,000,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	223
	기업부담금	1,000,002		내부인원	115
	연구기관부담금	0		외부인원	108
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>본 연구과제의 개발 목표는 돼지(변이형 돼지 유행성 설사 바이러스와 돼지 로타바이러스) 및 소(소 코로나바이러스와 소 로타바이러스) 바이러스성 장염을 예방할 수 있는 백신(불활화혼합백신 혹은 생 혼합건조백신)과 변이형 돼지 유행성 설사 치료제를 개발하여 산업화 시키는데 있다.</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>산업동물 바이러스성 장염 백신개발을 위해 백신주 (변이형 PEDV, 돼지 로타, 소 코로나 및 소 로타의 계대별 역가, 유전형, 병원성(ED50 포함)의 특성을 분석하였다. PEDV 불활화, 돼지 로타 불활화, 로타+TGEV 불활화혼합백신 및 생건조혼합백신 개발을 위해 농림축산검역본부(검역본부) 국가검정 기준에 따라 안전시험, 효력시험을 수행하였다. 소 코로나 불활화, 소 로타 불활화, 소 코로나+로타 불활화혼합백신 및 생건조혼합백신 개발을 위해 검역본부 국가검정 기준에 따라 안전시험, 효력시험 등을 수행하였다. 현재 소 로타바이러스 및 소 코로나바이러스 각각의 불활화 백신에 대한 전임상 시험이 완료되었다. 하지만, 국내는 물론 전 세계적으로 불활화 백신보다 생건조 혼합백신의 사용이 우세하여 소 로타바이러스 및 코로나바이러스 약독화 생건조 4종 혼합백신에 대한 예비 임상시험을 성공적으로 완수되어, 이러한 결과를 바탕으로 농림축산검역본부에 야외 임상시험계획서를 제출하여, 2020년 하반기에 제품으로 출시하려고 한다. 돼지 바이러스성 장염 백신도 현재 돼지 로타바이러스, PEDV에 대한 각각의 불활화 백신에 대한 전임상 시험이 완료되었지만, 국내는 물론 전 세계적으로 생건조 혼합백신의 사용이 우세하다. 이에 돼지 로타바이러스 및 TGEV 생건조 4종 혼합백신과 PEDV 생건조 혼합백신에 대한 예비 임상시험을 성공적으로 완수되어, 이러한 결과를 바탕으로 농림축산검역본부에 야외 임상시험계획서를 제출하여, 2020년 하반기에 제품으로 출시하려고 한다. 돼지 유행성 설사 치료제 개발을 위해 천연물 라이브러리를 확보하고 항PEDV 타겟을 도출하였다. 보유한 라이브러리에서 선별한 단일소재(감초, 강황) 및 복합생물소재(감초추출물/커큐민) 대한 항바이러스 및 항염 효능검증과 예비 안전성 검사를 수행 후, 치료제에 대한 유효성 실험과 생산성적, 번식성적, 영양소 소화율, 혈액특성, 분내 미생물 영향 등</p>					

농장 사양실험을 통해 동물약품 승인준비를 위한 임상시험 효능결과를 확보하였다. 경제성 분석을 통해 최종적으로 각각의 치료 및 개선효능을 갖는 액상 및 분말 타입의 사료첨가제 제품에 대한 사용매뉴얼 작성하고, 2개 제품에 대하여, 품목허가 취득 후 제품으로 출시하였다.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

본 연구를 통해 얻어진 산업동물 바이러스성 장염에 대한 백신 및 치료제에 대한 특허를 산업체에 기술이전 함으로써 매출창출 및 고용창출에 의한 수의동물약품 산업의 활성화가 기대된다. 또한 국내 축산업 발전에 걸림돌이 되고 있는 이러한 바이러스성 장염을 제어할 수 있어 농가소득 증대를 통한 국가 경제에 기여가 기대된다.



## 자체평가의견서

1.

		과제번호	310521-04		
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농생명산업기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	산업동물 바이러스성 장염 백신 및 치료제 산업화			과제유형	(개발)
연구기관	전남대학교 산학협력단			연구책임자	조 경 오
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2015.08.14.~2016.08.13	500,000	166,667	666,667
	2차연도	2016.08.14.~2017.08.13	1,000,000	333,334	1,333,334
	3차연도	2017.08.14.~2018.08.13	833,000	277,667	1,110,667
	4차연도	2018.08.14~2019.08.13	667,000	222,334	889,334
	계	4년	3,000,000	1,000,002	4,000,002
참여기업	(주)중앙백신연구소, 바이오텐(주)				
상대국			상대국연구기관		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2019. 11. 18

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
전남대학교	교수	조 경 오

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	---------------------------------------------------------------------------------------

## I. 연구개발실적

다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

- 본 연구개발과제는 국내에서 발생하고 있는 소 및 돼지의 바이러스성 장염에 대한 백신 및 돼지 유행성 설사 치료제를 개발하는데 있음.
- 소 및 돼지 바이러스성 장염의 원인체인 로타바이러스, 코로나바이러스는 RNA 바이러스로서, 돌연변이가 쉽게 발생함.
- 국내 역학 연구를 수행한 결과, 현재 국내에서 발생하고 있는 원인체들은 기존의 백신에 사용되고 있는 백신주들과 유전형이 상이하여, 기존 백신에 의해 예방이 되지 않거나 낮은 가능성이 높음.
- 이에 본 연구에서는 현재 국내에서 발생하고 있는 대표 유전형을 백신주로 사용하였기 때문에, 기존 백신에 비해 효능이 월등할 수 있음.
- 또한 최근 발생한 고병원성 돼지 유행성 설사증을 치료할 수 있는 치료제의 개발이 되어 있지 않아, 이의 연구개발 및 산업화가 시급한 실정임.
- 본 연구에서 개발한 소 및 돼지의 바이러스성 장염에 대한 백신은 기존 백신과 달리 현장 맞춤형 백신으로서 예방 효과가 좋음.
- 또한 본 연구에서 개발한 고병원성 돼지 유행성 설사증 치료제는 이러한 고병원성 병원체에 치료 효과가 높음.
- 결론적으로 본 연구개발결과는 매우 우수하며 창의성이 있다 할 수 있음.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

- 본 연구에서 개발한 소 및 돼지의 바이러스성 장염 예방용 백신 및 돼지 유행성 설사 치료제는 국내에 적용 시, 이러한 질병들을 예방 및 치료할 수 있어 농가소득 향상에 기여할 수 있음.
- 본 연구에서 개발한 이러한 백신 및 치료제를 국내 수의계약업계에 기술이전하면, 국내 수의계약업계의 발전에 기여할 수 있음.
- 본 연구에서 개발 및 산업화된 이러한 백신 및 치료제를 세계에 수출 시, 국가 경제 발전에 기여할 수 있음.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

- 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신을 (주)중앙백신에 기술 이전하여 내년도에 제품화 하고, 전 세계에 수출을 하려고 함.
- 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 혼합백신을 (주)중앙백신에 기술 이전하여 내년도에 제품화 하고, 전 세계에 수출을 하려고 함.
- 현재 동남아시아 등에 수출을 위해 수출승인을 받아놓은 상태임.
- 돼지 유행성 설사 약독화 생건조 백신을 (주)중앙백신에 기술이전 하였으며, 내년도에 제품화 하고, 전 세계에 수출을 하려고 함.
- 돼지 사포바이러스, 소 노로바이러스, 소 네보바이러스 치료제로서 (주)중앙백신에 기술 이전하여 내

년도에 제품화 하고, 전 세계에 수출을 하려고 함.

- 돼지 유행성 설사 치료제로서 현재 2개의 제품을 상품화하여 국내에서 판매를 시작하였으며, 향후 전 세계에 수출을 계획하고 있음.

#### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

##### ■ 등급 : (아주우수)

- 본 연구는 소 및 돼지의 바이러스성 장염 예방용 백신 및 돼지 유행성 설사 치료제 개발을 위해, 총 7개의 과제로 구성되어 있음.
- 즉, 소 및 돼지의 바이러스성 장염 예방용 백신을 개발하기 위해, 전남대학교 2 세부과제(조경오교수, 강문일교수)과 경북대학교 1개 협동과제(이창희교수)가 백신주의 개발 및 특성에 관해 연구하였고, 이러한 백신주들을 이용하여 (주)중앙백신(김은희 박사)가 전임상 및 임상시험을 하는 등 서로간의 공동연구를 수행하여, 백신을 성공적으로 개발하였음.
- 또한 돼지 유행성 설사 치료제 개발을 위해 한국생명공학연구원 1개 협동과제(권형준 박사)가 치료제를 개발하였고, 이에 대한 사양시험은 단국대학교 1개 협동과제(이상인 교수)에서 수행하였고, 임상시험을 포함한 제품화는 바이오텐(주) 협동과제(김영민 소장)에서 성공적으로 수행하였음.
- 이와 같이 소 및 돼지의 바이러스성 장염 예방용 백신 및 돼지 유행성 설사 치료제의 성공적인 개발을 위해 각 세부 및 협동 과제팀 간에 고유 업무뿐만 아니라 상호간에 공동연구도 활발히 진행하는 등 연구개발 수행에 있어 최선의 노력을 다하였음.

#### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

##### ■ 등급 : (아주우수)

- 본 연구를 통해 국제유수학술지(SCI)에 18편을 게재, 학술발표 19편 발표, 교육지도 6건을 하였음. 정책활용 및 홍보전시는 현재 없지만, 내년 하반기에 4종 이상의 백신 및 2종 이상의 치료제가 제품화 되어 출시되면, 소기의 목적 이상의 결과를 달성할 것으로 기대됨.
- 지적소유권으로서 현재 2건의 특허가 등록되었으며, 조만간 5건의 특허 출원도 등록될 것으로 예상되고 있음.
- 이와 같이 본 연구를 통해 공개발표된 연구개발성과는 아주우수하다고 할 수 있음.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신	25	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신에 대한 전임상 및 예비 임상시험을 완료하였음.</li> <li>그 결과 백신의 효능이 매우 우수하고 안전함을 입증하였음.</li> <li>현재 농림축산검역본부의 임상시험 승인을 받아 임상시험을 수행할 예정이며, 내년 하반기에 제품화 할 것으로 기대됨.</li> </ul>
돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 4종 혼합백신	25	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 혼합백신에 대한 전임상 및 예비 임상시험을 완료하였음.</li> <li>그 결과 백신의 효능이 매우 우수하고 안전함을 입증하였음.</li> <li>현재 농림축산검역본부의 임상시험 승인을 받아 임상시험을 수행할 예정이며, 내년 하반기에 제품화 할 것으로 기대됨.</li> </ul>
돼지 유행성 설사 약독화 생건조 백신	20	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 유행성 설사 약독화 생건조 백신에 대한 전임상 및 예비 임상시험을 완료하였음.</li> <li>그 결과 백신의 효능이 매우 우수하고 안전함을 입증하였음.</li> <li>현재 농림축산검역본부의 임상시험 승인을 받아 임상시험을 수행할 예정이며, 내년 하반기에 제품화 할 것으로 기대됨.</li> </ul>
돼지 유행성 설사 치료제	30	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>돼지 유행성 설사 치료제로서 현재 2개의 제품을 상품화하여 판매 중에 있으며, 향후 전 세계에 수출을 계획하고 있음.</li> </ul>
합계	100점		

## III. 종합의견

### 1. 대한 종합의견

- 본 연구과제의 개발 목표는 돼지(변이형 돼지 유행성 설사 바이러스와 돼지 로타바이러스) 및 소(소 코로나바이러스와 소 로타바이러스) 바이러스성 감염을 예방할 수 있는 백신(불활화혼합백신 혹은 생혼합건조백신)과 변이형 돼지 유행성 설사 치료제를 개발하여 산업화 시키는데 있음.

- 이러한 최종 목표를 달성하기 위해 주관책임자, 세부 및 협동과제 책임자 및 참여 연구원들은 혼신의 힘을 다하여 연구/개발에 최선을 다하였음.
- 이러한 노력의 결과, 국내는 물론 전 세계적인 백신 제품의 형태인 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신, 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 혼합백신, 돼지 유행성 설사 생건조 백신, 돼지 유행성 설사 치료제를 개발하였음.
- 이 중 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신 및 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 혼합백신은 전임상 및 예비 임상시험 결과 효능 및 안전성이 우수하여, 농림축산검역본부의 임상시험을 요청 혹은 요청하려고 하며, 이러한 임상시험을 거치면 내년 하반기에 제품화 할 수 있을 것으로 예측됨.
- 국내는 물론 전 세계적으로 문제되고 있는 고병원성 변이형 돼지 유행성 설사 치료제는 현재 2개 제품이 제품화 되어, 판매를 시작하고 있음.
- 이와 같이 본 과제의 책임자 및 연구원들의 최선을 다한 노력의 결과, 본 연구가 지향하는 목표를 충분히 달성하였다고 생각됨.

## 2. 고려할 사항 또는 요구사항

- 본 연구과제가 추구하는 산업동물 바이러스성 전염병에 대한 백신의 개발정도.
- 본 연구과제가 추구하는 돼지 유행성 설사 치료제의 개발정도.

## 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신은 현재 전임상 및 예비 임상시험 결과 효능 및 안전성이 우수하였음. 현재 농림축산검역본부의 임상시험을 요청하려고 하며, 이러한 임상시험을 거치면 내년 하반기에 제품화 할 수 있을 것으로 예측됨.
- 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 혼합백신은 전임상 및 예비 임상시험 결과 효능 및 안전성이 우수하였음. 현재 농림축산검역본부의 임상시험을 요청 중이며, 이러한 임상시험을 거치면 내년 하반기에 제품화 할 수 있을 것으로 예측됨.
- 고병원성 변이형 돼지 유행성 설사 치료제는 현재 2개 제품이 제품화 되어, 판매를 시작하고 있음.
- 향후 산업동물 바이러스성 장염 백신 및 치료제에 관해 출원된 특허를 등록하게 하며, 기술이전을 통해, 참여기업으로부터 기술료를 징수하여, 참여업체의 제품화 및 판매 증진 촉진에 활용할 것임.
- 현재 제품화 되어 판매 중인 돼지 유행성 설사 치료제 2개 제품뿐만 아니라, 내년 하반기에 출시가 예측되고 있는 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신 및 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 혼합백신 제품들에 대하여 정책활용을 건의하고 활발한 홍보전시를 통해 제품의 판매를 증진시키려고 함.

#### IV. 보안성 검토

○ 해당사항 없음

※ 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과



[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	산업동물 바이러스성 장염 백신 및 치료제 산업화			
주관연구기관	전남대학교 산학협력단	주관연구책임자	조 경 오	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	3,000,000,000	1,000,002,000	0	4,000,002,000
연구개발기간	2015. 08. 14. ~ 2019. 08. 13.			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(            ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:            )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기존 제품의 구성 바이러스와 달리, 국내에서 유행하고 있는 대표 바이러스주를 이용하여, 효과와 안전성이 우수한 약독화 생건조 혼합백신을 개발하였음.</li> </ul>
② 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 혼합백신 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기존 제품의 구성 바이러스와 달리, 국내에서 유행하고 있는 대표 바이러스주를 이용하여, 효과와 안전성이 우수한 약독화 생건조 혼합백신을 개발하였음.</li> </ul>
③ 돼지 유행성 설사 약독화 생건조 백신 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기존 제품의 구성 바이러스와 달리, 국내에서 유행하고 있는 고병원성 변이형 대표 바이러스주를 이용하여, 효과와 안전성이 우수한 약독화 생건조 혼합백신을 개발하였음.</li> </ul>
④ 돼지 유행성 설사 치료제	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지 유행성 설사 치료제로서 케어솔루션과 에니디펜더 2개 제품을 제품화 후 판매 중에 있음.</li> </ul>

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표				연구기반지표				
	지식	기술	사업화	기	학술성과	교	인	정책	기

	재산권			실시 (이전)							술 인 증	논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표	육 지 도	력 양 성	활용·홍보		타 (타 연 구 활 용 등)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		SC I	비 SC I					정 책 활 용	홍 보 전 시		
단위	건	건	건	건	원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	명	명	건	건		
가중치																					
최종목표	12	12	0	13	0	5	3	0	10	4	5	10	0	0	8	9	14	3	8	6	
연구기간내 달성실적	8	3	0	1	10	3	0	0	10	20	0	14	0	0	16	9	14	0	5	8	
달성율(%)	67	25	-	8	1000	60	0	-	100	500	0	140	-	-	200	100	100	0	63	100	

#### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신
②	돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 혼합백신
③	돼지 유행성 설사 약독화 생건조 백신
④	돼지 유행성 설사 치료제: 케어솔루션
⑤	돼지 유행성 설사 치료제: 에니디팬더

#### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술	V					V	V	V	V	
②의 기술	V					V	V	V	V	
③의 기술	V					V	V	V	V	
④의 기술		V					V	V	V	
⑤의 기술		V					V	V	V	

\* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	• 소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신은 (주)중앙백신에 기술 이전하여, 2020년 후반부에 제품화 하여, 국내 축우농가에 판매함으로써 국내 질병발생 감소를 통한 축우농가의 농가소득을 높이고, 전 세계에 수출함으로써 국가 경제에 기여하려고 함.
②의 기술	• 돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 혼합백신은 (주)중앙백신에 기술 이전하여, 2020년 후반부에 제품화 하여, 국내 양돈농가에 판매함으로써 국내 질병발생 감소를 통한 양돈농가의 농가소득을 높이고, 전 세계에 수출함으로써 국가 경제에 기여하려고 함.
③의 기술	• 돼지 유행성 설사 약독화 생건조 백신은 (주)중앙백신에 기술 이전하여, 2020년 후반부에 제품화 하여, 국내 양돈농가에 판매함으로써 국내 질병발생 감소를 통한 양돈농가의 농가소득을 높이고, 전 세계에 수출함으로써 국가 경제에 기여하려고 함.
④의 기술	• 돼지 유행성 설사 치료제인 케어솔루션은 현재 제품화 되어 판매되고 있어, 돼지 유행성 설사 발병에 의한 양돈농가의 피해를 경감시킬 수 있어, 양돈농가의 소득 향상에 기여할 것으로 예상됨. 또한 이 제품을 향후 전 세계에 수출함으로써 국가 경제에 기여할 것으로 기대됨.
⑤의 기술	• 돼지 유행성 설사 치료제인 에니디펜더는 현재 제품화 되어 판매되고 있어, 돼지 유행성 설사 발병에 의한 양돈농가의 피해를 경감시킬 수 있어, 양돈농가의 소득 향상에 기여할 것으로 예상됨. 또한 이 제품을 향후 전 세계에 수출함으로써 국가 경제에 기여할 것으로 기대됨.

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	정책활용			홍보전시		
												SCI	비SCI						논문평균IF	
단위	건	건	건	건	만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치																				
최종목표	12	12	0	13	0	5	3	0	10	4	5	10	0	0	8	9	14	3	8	6
연구기간내 달성실적	8	3	0	1	10	3	0	0	10	20	0	14	0	0	16	9	14	0	5	8
연구종료후 성과창출 계획	8	8	-	7	50	5	50	50	10	30	5	14	-	-	16	9	14	3	8	8

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	소 로타바이러스, 코로나바이러스 약독화 생건조 혼합백신		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	50,000천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	연구과제 종료 후 1년 이내	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2020년 후반기
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	백신제조 설비 및 장비 구비		

핵심기술명 <sup>1)</sup>	돼지 로타바이러스, TGEV 약독화 생건조 혼합백신		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	30,000천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	연구과제 종료 후 1년 이내	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2020년 후반기
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	백신제조 설비 및 장비 구비		

핵심기술명 <sup>1)</sup>	돼지 유행성 설사 약독화 생건조 백신		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	30,000천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	연구과제 종료 후 1년 이내	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2020년 후반기
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	백신제조 설비 및 장비 구비		

핵심기술명 <sup>1)</sup>	돼지 유행성 설사 치료제: 케어솔루션		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	30,000천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	연구과제 종료 후 1년 이내	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	기 실용화되었음
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	해당 제품 제조 설비 및 장비 구비		

핵심기술명 <sup>1)</sup>	돼지 유행성 설사 치료제: 에니디팬더		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	30,000천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	연구과제 종료 후 1년 이내	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	기 실용화되었음
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	해당 제품 설비 및 장비 구비		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리  
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

## <뒷면지>

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.