

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “동물(가금 및 양돈)질병제어 연구사업단” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 9 월 25 일

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 송 창 선

세부연구책임자 : 박 승 용

세부연구책임자 : 이 윤 정

세부연구책임자 : 김 재 홍

세부연구책임자 : 이 중 복

세부연구책임자 : 최 인 수

세부연구책임자 : 한 장 혁

요 약 문

I. 제 목

동물(가금 및 양돈)질병제어 연구사업단

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 본 사업단의 첫 번째 목표는 가금산업에서 최근 변이 바이러스 출현으로 문제시 되고 있는 H9형-LPAI, VII형-ND, 신장형-IB를 동시에 진단하고 예방하는 3중 복합 질병제어기술을 개발하고 산업화하는데 있다.
- 두 번째 목표는 H5N1형-HPAI의 지속적 발생으로 백신정책을 사용하고 있는 중국, 인도, 인도네시아, 파키스탄 시장을 1차 목표로 하고, HPAI 변이주의 출현 및 유행을 대비한 전세계 시장을 2차 목표로 하여 이들 변이형 AI를 감별진단하고, H5형-HPAI, VI형-ND, 신장형-IB를 동시에 예방하는 3중 복합 질병제어기술을 개발하고 산업화하는데 있다.
- 세 번째 목표는 양돈산업에서 효과적 백신부재로 문제시 되고 있는 PRRS, PPE의 예방기술과 동물복지와 수태지 육질 개선을 위한 CTLA-4 / GM-CSF-GnRH 재조합 단백질 이용 기술을 개발하고 산업화하는데 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 동물(가금 및 양돈)질병제어 연구사업단은 총 2개 핵심과제를 수행하는 2개의 핵심과제연구팀으로 구성하였으며, 제 1 핵심과제연구팀은 4개의 세부과제연구팀으로 구성되어있으며, 제 2 핵심과제연구팀은 3개의 세부과제연구팀으로 구성하였다.
- 각 핵심과제연구팀의 핵심과제책임자와 세부과제책임자 그리고 핵심과제별 참여기업이 소유한 핵심 신기술을 선행시험 연구결과와 융합하여 개발된 질병제어기술을 산업화 하고자 한다.
- 제 1핵심과제연구팀은 연구팀 소유 선행연구기술인 신장형 IBV를 이용한 약독화 생백신주의 개발 및 제조기술'과 '역유전학 시스템을 이용한 AI(H5) 재조합 백신 제조' '육내 철새 유래 NDV K148주를 이용한 생백신주 개발 및 제조기술' 'NDV(VI형) 재조합 백신 제조기술'을 융합하여 내수 및 수출을 위한 육계용 K2+K148 생독백신 산란계용 K2+LaSota

생독백신, K2+L7 생독백신, AI(H9)+ND+IB(신장형) 사독백신, AI(H5)+ND+IB(신장형) 사독백신, IB(신장형) 항원진단 Rapid 키트, IB(신장형) 항체진단 ELISA 키트, AI+ND+IB(신장형) 항체진단 ELISA 키트, AIV 백신항체 감별진단 ELISA 키트 9종의 상품으로 대표되는 신기술융합 가금질병 제어기술을 (주)고려비엔피, (주)녹십자수의약품, (주)대성미생물연구소, (주)중앙백신, (주)바이오노트, (주)메디안디노스틱 등 국내 6개 기업체와 연계하여 산업화하고자 한다.

- 제 2핵심과제연구팀은 연구팀 소유 3종의 선행연구기술인 '역유전학 시스템을 이용한 PRRS 재조합 백신 제조기술', 'CTLA-4 / GM-CSF-GnRH 재조합 단백질 제조기술', '돼지 증식성 회장염 생독 백신주 제조기술'을 융합하여 중국, EU 시장 수출을 위한 PRRS 사독백신, GnRH 면역거세 백신과 GnRH 항체진단 ELISA 키트, 돼지 증식성 회장염 백신 등 4종의 상품으로 대표되는 돼지질병 제어기술을 (주)고려비엔피, (주)대성미생물연구소, (주)중앙백신, (주)메디안디노스틱 등 국내 4개 기업체와 연계하여 산업화하고자 한다.

IV. 연구개발결과

- 신장형 IB 백신주 (K2) 를 이용한 IB-ND 혼합 생독백신의 개발을 완료 하였으며 , 이를 국내 2개 백신회사에 기술이전 및 산업화를 완료하였다.
- 신규 IB 백신주 (K40/09) 및 약독화 H5N1 조류인플루엔자 백신주를 개발하여 이를 사용한 AI(H9)-ND-IB 및 AI(H5)-ND-IB 혼합백신의 개발을 완료하였으며 , 이를 국내 4개 백신회사에 기술이전을 완료하여 야외 임상 시험을 진행 중이다.
- 본 연구사업에서 개발된 AI(H5)-ND-IB 혼합백신의 국내 발생 고병원성 조류인플루엔자 분리주 (clade 2.5, clade 2.2) 에 대한 방어능 시험은 완료하였으며 , 해외시장 진출을 위하여 최근 동남아 유행 고병원성 조류인플루엔자 분리주 (clade 2.3.2.1, clade 1)에 대한 방어능 평가는 진행 중이다.
- 기존 키트로로는 진단이 어려웠던 국내 신장형 IBV 항원 및 항체를 효과적으로 검출 할 수 있는 진단 키트의 개발을 목표로 하여 IBV 항원진단키트, 항체진단키트 및 AIV-NDV-IBV 항체 동시진단 키트를 개발하여 산업화를 완료하였으며 현재 12개국에 수출 중이다.
- 백신접종 후 높은 중화항체를 유도하기 어려웠던 기존 기술의 단점을 보완할 수 있는 재조합 PRRSV 백신주를 개발 하였으며, 이를 이용하여 목적동물인 돼지에서 높은 중화항체를 유도 할 수 있는 PRRSV 백신생산 기법을 국내 3개 백신회사에 기술이전을 완료하였고 산업화를 진행 중이다.
- 면역을 통하여 GnRH 에 대한 항체를 유도함으로써 돼지에서 화학적 거세를 실시할 수 있

는 면역거세백신을 개발하여 이를 국내 백신회사에 기술이전을 완료하고 산업화를 진행 중이다.

- L. intracellularis를 세포에 접종하는 배양시스템을 구축하여 국내분리 L. intracellularis균주의 연속계대 배양을 통하여 약독화 백신균주를 확보하였고, 현재 산업화를 위한 대량생산 공정 개발을 진행 중이다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 본 사업단 연구과제 수행을 통하여 특허 출원 12건, 특허 등록 5건, 제품 등록 허가신청 10건, 유전자원 등록 367건, 논문게재 20건, 학술발표 30건의 성과를 창출하였다.
- 참여기업으로의 기술이전을 통해 4종의 백신 및 2종의 진단키트를 산업화하여 총 2,864,398원의 매출액을 달성하였다. 진단키트의 경우 연구사업기간 내에 12개국에 수출 판매를 달성하였다.
- 본 사업단이 추진하고자 하는 '신기술융합 가금 및 돼지질병 제어기술 산업화'를 통하여 생산된 가금 및 돼지용 백신과 진단 키트는 국내 수입백신 대체를 유도하고, 전 세계 축산업의 25-50%를 차지하는 중국, 인도, 인도네시아, 파키스탄 등의 아시아 시장에서 시장점유율을 높이는데 결정적인 기여를 할 것으로 예상된다.
- 아시아, 중동, 유럽을 포함한 유라시아대륙 전역으로 전파되고 있는 신장형 IB 및 뉴캐슬 병 바이러스에 대한 세계최초의 혼합 생 사독백신 및 진단키트 개발을 통해 질병의 예방 및 진단 효율을 증진시키고, 산업화를 통하여 새로운 국내 및 해외 가금백신시장을 개척할 수 있을 것으로 기대한다.
- 또한 본 사업단에서 생산되는 조류독감 백신 및 진단키트는 향후 아시아 지역을 중심으로 인체감염과 대유행의 조짐을 보이는 고병원성 조류인플루엔자의 방역과 예방에 효과적으로 사용되어 향후 차세대 국가 대표 브랜드로 거듭 날 수 있을 것으로 기대한다.
- 현재까지는 다국적기업의 생독백신이 국내 PRRS 백신 시장을 독주하고 있었지만, 국내에서 유행하는 유전자형 바이러스에 대하여 방어능이 우수하고 안전성이 인정되는 사독백신 개발의 필요성 점차 대두되고 있다. 본 사업단에서 신융합기술을 이용하여 개발될 PRRS 사독백신은 국내 및 해외의 PRRS 백신 시장에서 충분한 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 기대한다.
- 본 사업단에서 생산되는 면역 거세 백신은 옹취제거를 위한 수태지의 외과적 거세술을 대체할 수 있는 백신으로 돼지 뿐 아니라 다른 동물에도 적용 가능하기 때문에 개를 비롯한 반려 동물의 백신으로도 개발 가능하다.

○ 2011년 7월부터 사료 내 항생제 첨가 금지 법안이 시행되면서 향후 돼지 증식성 회장염의 발생 빈도가 높아질 것으로 전망된다. 따라서 돼지 증식성 회장염 예방 백신의 수요가 증가될 것으로 보이며, 본 사업단에서 개발할 회장염 백신은 이러한 필요성을 충족시킬 수 있을 것으로 기대한다.

SUMMARY

The vision for this project is to provide effective solutions to prevent and control animal diseases that impact agriculture and public health in poultry and swine industries. The objective is to develop and commercialize the vaccines and diagnostics of poultry and swine pathogens, including avian influenza virus (AIV), avian infectious bronchitis virus (IBV), avian Newcastle disease virus (NDV), porcine respiratory and reproductive syndrome virus (PRRSV), and *Lawsonia intracellularis* (*L. intracellularis*). In addition, we also conducted research and development to improve GnRH vaccine and diagnostic for immunocastration of swine.

Specific objectives of the project are as follows. Objective 1: Develop and commercialize vaccines and diagnostic kits for poultry viral diseases. Subobjective 1.1: Develop and commercialize IBV-NDV bivalent live-vaccine by using Korean IBV isolate K2 strain. Subobjective 1.2: Develop and commercialize inactivated HPAI(H5)-ND-IB and LPAI(H9)-ND-IB vaccines. Subobjective 1.3: Perform in vivo evaluation of inactivated HPAI(H5)-ND-IB vaccine. Subobjective 1.4: Develop and commercialize diagnostic kits for poultry viral diseases. Objective 2: Develop and commercialize vaccines and diagnostic kits for swine pathogens and GnRH. Subobjective 2.1: Develop and commercialize PRRSV vaccine. Subobjective 2.2: Develop and commercialize GnRH immunocastration vaccine and antibody detection kit. Subobjective 2.3: Develop and commercialize *L. intracellularis* vaccine.

This research project resulted in the development and commercialization of methods to prevent and identify animal pathogens described above, a critical need of the poultry and swine industries. During research period, this project accomplished 12 patent applications, 5 patent registrations, 10 products commercialization, 20 journal publications, and 30 presentations in scientific meetings. We transferred technologies developed in this project to collaborative companies and commercialized 4 vaccines and 2 diagnostic kits which had reached a total amount of 2,864,398,000 KRW. Recently, we successfully export vaccines and diagnostics developed in this study to 12 countries. Our accomplishments and outcomes can be utilized in national and international strategies for the control of animal diseases and improvement of animal welfare.

CONTENTS

I. INTRODUCTION	10
1. Scope and background of the project	10
2. Background and purpose of the study.....	15
II. INFORMATION OF RELATED RESEARCH AND DEVELOPMENT TRENDS	21
1. Research trends in Korea and other countries	21
2. Market condition in Korea and other countries	26
3. Current status in related field in Korea and other countries	30
III. METHODOLOGY AND RESULTS	31
1. Research methodology and approach	31
2. Results	64
[1-1] Development of IBV-NDV bivalent live-vaccine by using Korea isolate K2 strain	
[1-2] Development of inactivated AI-ND-IB vaccine by fusion technology	
[1-3] <i>in vivo</i> evaluation of inactivated AI(H5)-ND-IB vaccine	
[1-4] Development of diagnostic kits for poultry disease by fusion technology	
[2-1] Development for PRRSV vaccine by fusion technology	
[2-2] Industrialization of immunocastration vaccine and antibody detection kit	
[2-3] Industrialization of the ileitis attenuated live vaccine using korean isolate	
IV. RESEARCH ACHIEVEMENTS AND IMPACT ON THE RELATED FIELDS	293
1. Research objective and evaluation criteria	293
2. Qualitative research achievements	296
3. Impact on the related fields	305
V. ACCOMPLISHMENTS AND FUTURE AIMS	306
1. Accomplishments of the project	306
2. Future aims	315
VI. CURRENT KNOWLEDGE ON THE FOREIGN RESEARCH INFORMATION	320
1. Avian influenza virus	320
2. Avian infectious bronchitis virus	323
3. Avian Newcastle disease virus	325
4. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	326
5. Immunocastration	328
VII. FACILITY AND EQUIPMENT	329
VIII. REFERENCES	330

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	10
1.	연구사업단의 연구목적, 필요성 및 범위	10
2.	핵심과제별 연구목적, 필요성 및 범위	15
제 2 장	국내외 기술개발 현황	21
1.	국내·외 관련 분야 기술 개발 현황	21
2.	국내·외 관련 분야 시장 현황	26
3.	국내·외 기술 개발 현황에서 차지하는 위치	30
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	31
1.	연구개발 접근 방법 및 내용.....	31
2.	연구개발 수행 결과	64
가.	[1핵심 1세부] 신장형 IB K2주 이용 IB-ND 혼합 생독백신 개발 및 산업화 연구	
나.	[1핵심 2세부] 신기술 융합 AI-ND-IB 혼합 사독백신 산업화 연구	
다.	[1핵심 3세부] 신기술 융합 AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 임상 시험 연구	
라.	[1핵심 4세부] 신기술 융합 가금질병 진단키트 개발 및 산업화 연구	
마.	[2핵심 1세부] 신기술 융합 PRRS 사독백신의 시제품 제작 및 국내 임상시험	
바.	[2핵심 2세부] 신기술 융합 면역거세백신 및 진단키트 산업화 연구	
사.	[2핵심 3세부] 국내 분리주 이용 돼지 증식성 회장염 생독백신 개발 및 산업화 연구	
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	293
1.	연도별 연구목표 및 평가의 착안점	293
2.	연구개발목표의 달성도	296
3.	관련분야 기술발전 기여도	305
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	306
1.	연구개발결과의 성과	306
2.	성과 활용 계획	315
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	320
1.	조류인플루엔자 바이러스 해외과학기술정보	320
2.	전염성 기관지염 해외과학기술정보	323
3.	뉴캐슬병 해외과학기술정보	325
4.	PRRS 해외과학기술정보	326
5.	면역거세 관련 해외과학기술정보	328
제 7 장	연구시설·장비 현황	329
제 8 장	참고문헌	330

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구사업단의 연구목적, 필요성 및 범위

가. 최종 및 연차별 목표

■ 제 1 핵심 과제 : 신기술융합 가금질병 제어기술 개발

구분	연구 목표
제 1 세부과제 신장형 IB K2주 이용 IB-ND 혼합 생독백신 산업화 연구	
최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> - 신장형 IB K2주와 내열성 ND K148주를 혼합한 생독백신 개발 및 산업화 - 신장형 IB K2주와 저병원성 LaSota주를 혼합한 생독백신 개발 및 산업화 - 신장형 IB K2주와 재조합 NDV(VII형) L7주를 혼합한 생독백신 개발 및 산업화
1년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ K2+K148 혼합 생독 백신의 개발 및 실험실 내 효능 시험 ○ K2+LaSota 혼합 생독 백신의 개발 및 실험실 내 효능 시험 ○ K2+L7 혼합 생독 백신의 개발 및 실험실 내 효능 시험
2년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ K2+K148 혼합 생독 백신의 시제품 제작 및 국내 임상 시험 ○ K2+LaSota 혼합 생독 백신의 시제품 제작 및 국내 임상 시험 ○ K2+L7 혼합 생독 백신의 시제품 제작 및 국내 임상 시험
3년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ K2+K148 혼합 생독 백신의 해외 임상 시험 ○ K2+LaSota 혼합 생독 백신의 해외 임상 시험 ○ K2+L7 혼합 생독 백신의 해외 임상 시험
제 2 세부과제 신기술 융합 AI-ND-IB 혼합 사독백신 산업화 연구	
최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> - AI(H9)+ND+IB 사독백신의 개발 및 산업화 - AI(H5)+ND+IB 사독백신의 개발 및 산업화
1년차	○ AI(H9)+ND+IB 및 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 개발 및 실험실 내 효능시험
2년차	○ AI(H9)+ND+IB 및 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 시제품 제작 및 국내 임상 시험
3년차	○ AI(H9)+ND+IB 및 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 해외 임상 시험
제 3 세부과제 신기술 융합 AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 산업화 연구	
최종 목표	- AI(H5), ND, 신장형 IB를 혼합한 사독백신 수출대상국 유행 HPAI 방어효능 확인
1년차	○ H5N1 HPAI의 닭 공격접종 모델 개발
2년차	○ 개발된 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 Clade 2.2 H5N1 바이러스 방어효능 시험
3년차	○ 개발된 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 Clade 2.3.2 H5N1 바이러스 방어효능 시험
제 4 세부과제 신기술 융합 가금질병 진단키트 개발 및 산업화 연구	
최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> - 신장형 IB 항원진단 Rapid 키트의 개발 및 산업화 - 신장형 IB 항체진단 ELISA 키트의 개발 및 산업화 - AI-ND-신장형 IB 항체진단 ELISA 키트의 개발 및 산업화 - AIV 백신 항체 감별진단 키트의 개발 및 산업화
1년차	○ 신기술 융합 가금질병 진단키트 개발 및 실험실내 효능시험
2년차	○ 신기술 융합 가금질병 진단키트 시제품 제작 및 국내 임상시험
3년차	○ 신기술 융합 가금질병 진단키트 해외 임상시험

■ 제 2 핵심 과제 : 신기술융합 돼지질병 제어기술 개발

구분	연구 목표
제 1 세부과제 신기술 융합 PRRS 사독백신의 시제품 제작 및 국내 임상시험	
최종 목표	- 다양한 제형(유전자 백신, VLP, 수용성/활성형 단백질 사독백신 시제품 제작 및 국내 임상시험 - 유전자 재조합 PRRS 사독백신의 시제품 제작 및 국내 임상 시험
1년차	○ PRRS 사독백신 개발 및 실험실내 효능시험
2년차	○ PRRS 사독백신의 시제품 제작 및 국내 임상시험
3년차	○ PRRS 사독백신의 해외 임상시험
제 2 세부과제 신기술 융합 면역거세백신 및 진단키트 산업화 연구	
최종 목표	- 면역증강 단백질 융합 GnRH 면역거세 백신 및 GnRH 항체진단 키트 개발
1년차	○ GnRH 면역 거세 백신 개발 및 실험실내 효능시험 ○ GnRH 항체진단 ELISA 키트 개발 및 실험실내 효능시험
2년차	○ GnRH 면역 거세 백신 시제품 제작 및 국내 임상시험 ○ GnRH 항체진단 ELISA 키트 시제품 제작 및 국내 임상시험
3년차	○ GnRH 면역 거세 백신의 해외 임상시험 ○ GnRH 항체진단 ELISA 키트의 해외 임상시험
제 3 세부과제 국내 분리주 이용 돼지 증식성회장염 생독백신 개발 및 산업화 연구	
최종 목표	- 돼지 증식성회장염 생독백신의 개발 및 산업화
1년차	○ 돼지 증식성회장염 생독백신 개발 및 실험실내 효능시험
2년차	○ 돼지 증식성회장염 생독백신 시제품 제작 및 국내 임상시험
3년차	○ 돼지 증식성회장염 생독백신의 해외 임상시험

나. 목표설정의 배경

(1) 관련산업의 기술수준 및 애로기술

○ 최근 국내 양계, 오리 등 가금시장과 양돈시장은 바이오에너지 관련 사료가격 상승, 한미 FTA 체결, 사육단계 HACCP 지침 적용 등 삼중고를 겪고 있는 실정이다. 또한 전 세계 축산 시장의 흐름은 rich market을 겨냥한 명품브랜드육 및 무항생제 유기농 축산물 생산하는 방향으로 빠르게 변화되고 있다.

○ 1996년 이후 한국, 중국, 파키스탄에서 H9N2 저병원성 조류인플루엔자 (LPAI) 감염으로 인한 양계 생산성 감소 피해 유발과 더불어 최근 중국과 한국에서 바이러스 변이로 인한 인체 감염의 위험성이 보고되고 있다.

○ 2000년 이후 한국, 중국, 유럽에서 현 백신주로 사용되고 있는 혈청형 (I 형)과 항원적 차이가 보고된 VII형 뉴캐슬병 (ND) 감염으로 인한 산란계 산란저하 피해가 증가되고 있음이 보고되어 야외 강독주를 이용한 백신생산 및 바이러스 배출 억제 효능을 보이는 백신 출시가 요구되고 있다.

○ 1990년 이후 한국, 중국, 대만에서 신장염 닭전염성기관지염 (IB) 감염으로 인한 육계의 폐사피해와 양계산업의 생산성에 가장 큰 영향을 미치는 대장균증 감염, 항생제 사용으로 이어지는 피해예방을 위한 생독백신의 생산이 요구되고 있다.

○ 2003년 한국을 위시하여 중국, 인도네시아, 태국, 베트남에서 H5N1 고병원성 조류인플루엔자 (HPAI)가 지속적으로 발생하여 전 세계의 이목을 집중시키고 있으며, 인체감염으로 인한 피해가 한국, 일본을 제외한 동남아시아 전역에서 확산되어 현재 중국, 홍콩, 인도네시아에서는 양계농장에서 바이러스 확산방지와 인체감염을 차단하기 위하여 정부차원에서 정책적으로 백신접종을 실시하고 있으나 바이러스 변이로 인한 기존 백신에 저항성을 보이는 바이러스의 출현을 포함하여 고병원성 조류 인플루엔자 대유행을 대비하기 위하여 한국을 포함한 G7국가들이 백신, 치료제 및 진단키트 개발에 많은 R&D 자금을 투자하고 있다.

○ 1994년 한국, 중국, 미국, 유럽에서 돼지 생식기호흡기증후군 (PRRS)의 순환감염으로 인한 양돈산업의 피해는 돼지 서코바이러스 또는 마이코플라즈마와 동시감염 될 경우 더욱 가중된다고 보고되고 있으나 기존의 생독백신은 백신주의 병원성 문제가 완벽히 해결되지 못한 문제점이 대두되고 있으며, 사독백신은 중화항체 생산능이 떨어지는 문제점이 보고되고 있어 새로운 고효율 생독 및 사독 백신개발 요구가 이어지고 있다.

○ 2001년 EU에서 사료 내 항생제 첨가를 금지하면서 돼지농장에서 증식성회장염(II)의 발생율이 증가되고 있는 추세이나 피해 예방을 위한 생균백신은 한국과 EU에서 허가절차를 받고 있는 단계이다. 증식성회장염의 원인체인 로소니아균은 2000년 미국에서 최초 분리되었으며, 한국에서 전 세계 두 번째로 균 분리에 성공하여 약독화 안전성 시험을 거쳐 시험백신 생산연구가 현재 국내에서 진행되고 있다.

○ 1999년 EU에서 최초로 동물보호법이 시행되면서 비육돈에서 응취제거를 위한 수태지의 외과적 거세술이 논란이 되면서 비외과적 거세법 도입에 대한 관심이 일기 시작 하였으며, 2008년 응성호르몬 억제제를 위한 GnRH 단백을 이용한 면역거세백신이 개발되어 한국을 비롯한 중국, 미국, EU등 전 세계적으로 새로운 개념의 백신시장이 개발되고 있다.

(2) 국내외시장의 미래전망 및 연구배경

○ 신기술융합 가금질병 제어기술은 본 연구사업단의 제 1핵심과제팀이 선행기술로 확보하고 있는 결과물과 본 연구사업단 보유 신기술을 융합하여 전 세계 양계산업에 가장 큰 경제적 손실을 주고 있는 3대 호흡기 질병인 IB, ND, AI를 동시에 예방하고 진단하는 질병제어 기술이다.

○ 1990년 국내 발생을 기점으로 확산된 신장형 IB는 최근 중국, 대만 등 아시아 지역과 EU 지역으로 확산되고 있는 추세이므로 향후 신장형 IB K2주를 이용한 백신과 진단법 제조기술은 한국을 포함한 전 세계 양계시장에서 요구하는 핵심기술로서의 역할을 충분히 할 수 있을 것으로 예상된다. 또한 신장형 IB 제어기술은 전 세계적으로 현재 대안이 없는 실정이므로 신장형 IB K2주를 아용한 백신과 진단키트를 본 사업단이 목적하는데로 IB, ND, AI를 동시에 예방하고 진단하는 시스템으로 발전시킨다면 국내외 시장점유율 제고와 아울러 전 세계 양계 백신 시장의 연평균 성장률 4.19%를 상회하는 높은 성장율을 유지에 크게 기여 할 수 있을 것으로 전망된다.

○ 또한 신기술융합 가금질병 제어기술은 전 세계 양계산업과 인류의 안녕을 크게 위협하고 있는 H5N1 HPAI를 효과적으로 방제하는 신개념의 백신과 인체감염을 위협하는 변이형 인플루엔자를 신속, 감별 진단하는 최첨단 진단키트를 제조하고 산업화 할 수 있는 질병제어 기술이다. 2005년 중국 칭하이 호수를 기점으로 전 세계로 확산된 clade 2 H5N1 HPAI는 최근 중국, 홍콩, 인도네시아, 인도, 파키스탄 등 아시아 지역과 유럽, 아프리카 지역으로 확산되고 있는 추세이므로 향후 본 사업단 보유 신기술은 신종 H5N1 HPAI 발생을 포함한 신종 인플루엔자 대유행에 대비하고 전 세계 조류인플루엔자 백신 및 진단키트 시장에서 요구하는 핵심기술로서의 역할을 충분히 할 수 있을 것으로 예상된다. 또한 사육오리에 효과적인 AI 백신이 없는 현실을 감안해 보면 역유전자 시스템을 이용한 AI(H5) 백신 제조기술은 향후 오리를 매개로 하는 AI(H5)의 전파를 최소화 하고, 궁극적으로는 전 세계에서 문제시 되고 있는 H5N1 HPAI의 확산 방지와 변이형 신종인플루엔자 대유행에 대비하여 국가가 요구하는 백신항원뱅크 구축 등 효과적 질병제어기술 개발에 크게 기여 할 수 있을 것으로 전망된다.

○ 신기술융합 양돈질병 제어기술은 본 연구사업단의 제 2핵심과제팀이 선행기술로 확보하고 있는 결과물과 본 연구사업단 보유 신기술을 융합하여 전 세계 양돈산업에 가장 큰 경제적 손실을 주고 있는 돼지 PRRS 피해를 최소화 하고, 최근 전 세계 양돈산업에서 초미의 관심의 대상이 되고 있는 GnRH 면역거세 백신과 돼지 증식성 회장염 백신을 제조하고 이들 백신의 효능을 진단하는 진단키트를 산업화하는 기술이다. 현존하는 PRRS 백신은 효능에 많은 문제점이 있어 효과적인 백신만 개발된다면 개발된 PRRS 백신은 어떠한 형태의 백신이라도 단시간 내에 전 세계 양돈 시장을 장악 할 수 있는 베스트 셀러로 거듭날 수 있다. 또한 GnRH 면

역거세 백신은 백신 접종 시 응취제거, 육질개선 외 조기 폐사방지 등 부가적인 효과가 있어 상용화시 전 세계 양돈 시장에 미칠 파급 효과는 기존의 전 세계 양돈백신 시장규모를 수배 늘리는 효과를 가져올 것으로 전망된다. 돼지 증식성회장염 백신의 경우도 사업단에서 개발된 백신은 전 세계 2번째 개발된 백신으로 무항생제 돼지고기 생산과 생산단계 HACCP 실현을 위한 필수 백신으로 거듭날 수 있는 제품으로 상품화 후 경제적 가치는 매우 높다고 예상되며, 아울러 전 세계 양돈백신 시장의 연평균 성장률 5.15%를 상회하는 높은 성장율을 유지에 크게 기여 할 수 있을 것으로 전망된다.

2. 핵심과제별 연구목적, 필요성 및 범위

가. 제 1 핵심 과제 : 신기술융합 가금질병 제어기술 개발 연구배경 및 필요성

(1) 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

본 핵심 과제는 가금 산업에 큰 피해를 입히고 있는 3대 질병인 뉴캐슬병(Newcastle disease, ND), 전염성기관지염(infectious bronchitis, IB), 조류인플루엔자(Avian influenza, AI)를 효과적으로 제어하기 위하여 신기술융합 예방백신 및 진단 키트를 개발하고 산업화하는 것을 목표로 삼고 있다. 첫째로, 신장형 IB K2주를 이용한 생독백신을 기반으로 한 IB-ND 혼합백신을 개발하여 양계 산업의 주요 호흡기 질병을 제어하고자 하고, 둘째로 산란계 및 종계의 장기적인 면역 지속 효과를 위한 개량형 사독백신을 AI, ND, IB에 대하여 개발하고자 한다. 마지막으로 상기 질병의 효과적인 통제를 위하여 다양한 종류의 감별진단 키트를 개발하여 양계 임상에 활용하고자 한다.

<제 1 세부과제: 신장형 IB K2주 이용 IB-ND 혼합 생독백신 산업화 연구>

전염성기관지염 (Infectious bronchitis: IB)은 IB 바이러스 (IBV)에 의해서 발생하는 전파력이 매우 빠른 닭의 급성 전염병이다. IB는 감염 시 폐사율은 높지 않으나 이환율이 높고 기침, 콧물, 증체율 저하, 외부 및 내부 난질저하를 동반하는 산란율 저하를 유발 할 뿐만 아니라 호흡기 후유증으로 대장균증이 수반되어 만성 폐사가 지속되는 등 매우 다양한 생산성 저하를 유발하여 전세계적으로 양계산업에 막대한 경제적 피해를 입히고 있다. IBV는 RNA 바이러스로서 바이러스 입자를 구성하는 유전자가 인플루엔자 바이러스와 유사하게 쉽게 변이 되는 특성이 있다. 따라서 현재 전 세계적으로 매우 다양한 혈청형의 IBV들이 분리 보고되고 있으며, 이들 각 혈청형에서 변이된 변이형 바이러스까지 포함하면 그 종류는 수십 종에 이를 것으로 추정되고 있다. 또한 이들 혈청형들 간에는 상호 교차반응이나 교차 면역이 잘되지 않으며, 야외 감염 시 나타나는 임상증상들도 고병원성 조류인플루엔자나 뉴캐슬병과 같이 뚜렷한 질병의 경과를 취하는 것이 아니기 때문에 그만큼 질병의 진단과 예방에 많은 어려움이 수반되고 있다.

국내의 IB 발생은 1986년에 보고된 것이 최초이며, 국내에서 유행하는 IBV들은 다른 나라에 유행하는 바이러스들과 유전적으로 동떨어져 독립된 특징을 나타내고 있으며, 크게 호흡기형의 Korean group I 과 신장형의 Korean group II로 구분되고 있다. 특히, Korean group II에 속하는 신장형 IBV를 국내 IBV 유행주의 대표적인 주 유행주로 추정하고 있으며 실험을 통해 1일령 SPF (특정병원체부재) 병아리에 감염 시 심한 신장의 요산 침착뿐 만 아니라 50%의 폐사율을 유발하는 특징을 지니고 있음이 확인된 바 있다.

현재 국내에서 사용되고 있는 생독백신은 메사추세스형(Mass) IB 생독 백신이 유일하며, 동일한 호흡기 혈청형의 바이러스에 대해서는 뛰어난 면역원성을 나타내지만 국내 유행 신장형 바이러스에 대해서는 교차면역능이 떨어지기 때문에, 국내 분리주를 사용한 생독 백신의 개발 필요성은 오래전부터 강조되어왔다. 그러나 IB 생독 백신의 경우 약독화에 장시간이 소요될 뿐만 아니라 약독화 이후답에서 병원성이 회복될 수 있는 가능성도 지니고 있어서 쉽게 개발할 수 없는 어려움이 있다. 따라서 지금까지 국내 분리 신장형 바이러스인 KM91주를 불활화한 사독 백신으로 산란계와 종계의 산란저하 피해를 예방해 왔다. 그러나 국내 육계 농장은 짧은

사육기간과 생산원가 절감 차원에서 사독백신을 사용할 수 없을 뿐 만 아니라 IBV 감염의 후유증으로 발생하는 속발성 대장균성 복막염 피해를 원발성 대장균증으로 오인하여 IB 예방백신을 사용하기보다 항생제를 남용하기 쉽다. 설사 IB 예방을 위해 생독백신을 하더라도 호흡기형 Mass 타입의 생독백신만을 사용하기 때문에 신장형 IBV의 감염을 효과적으로 방어하지 못하여 피해를 입게 된다. 또한, 산란계와 종계의 경우에도 사독백신으로 산란저하의 피해는 감소시킬 수 있지만 Mass 타입 생독 백신만으로는 신장형 IBV 감염으로 인한 직접적인 호흡기도 손상 및 복막염 피해는 예방하기 힘들다. 따라서 국내 육계농장에 적용 가능한 효과적인 생독백신의 개발이 절실하고, 산란계나 종계 역시 사독백신 접종만으로 부족한 호흡기 방어능을 보완하기 위해 국내 유행주를 이용한 생독백신이 필요한 실정이다.

뉴캐슬병 (Newcastle disease)은 가금에서 치명적이고 전염성이 강한 제1종 가축전염병 및 OIE 지정 notifiable disease로 백신을 접종하지 않은 닭에 감염될 때는 100% 폐사율을 초래하며, 적절한 백신을 하지 않는 경우 호흡기 및 소화기 증상과 산란계에서 산란을 저하로 경제적인 피해를 일으키는 치명적인 질병이다. 뉴캐슬병 예방 백신은 생독백신과 사독백신으로 구분되어 다양하게 사용되고 있으며 생독백신은 백신주로 사용하는 바이러스의 잔여독력에 따라 크게 중간독주 (mesogenic strain), 약독주 (lentogenic strain), 비병원성주 (apathogenic strain) 등으로 분류할 수 있다. 약독주중 B1주와 LaSota주 (Clone30주 포함)는 국내뿐만 아니라 전세계적으로 가장 널리 사용되어 온 대표적인 뉴캐슬병 생백신주이며 접종 시 주로 닭의 호흡기도에서 증식되는 특성 때문에 백신접종 후 어느 정도의 백신접종반응을 유발하는 것으로 알려져 있다. 반면, 소화기 점막에서 주로 증식되는 호흡기 비병원성 (장친화성) 백신주인 V4주, Ulster 2c(NDW)주 및 VG/GA주(에비뉴) 등을 이용한 각종 생독백신들은 접종 시 백신접종반응이 거의 없어 1일령 병아리에게 분무 백신으로 적용할 수 있다. 그러나 상대적으로 B1주 등 약독주들에 비하여 백신접종효능이 다소 떨어지는 단점이 있는 것으로 평가되고 있다. 특히 한국에서 유행하고 있는 유전자형 VII형에 속하는 내장친화성 강독 뉴캐슬병 바이러스는 보편적으로 사용되던 유전자형 I 형에 속하는 백신주 (LaSota) 및 유전자 II형의 백신주 (V4, VG/GA) 기반의 사독백신으로 완벽한 방어가 되지 않아 뉴캐슬병이 전국에서 빈번하게 발생하고 있는 실정이며 이에 대한 대책마련이 시급하다.

<제 2 세부과제: 신기술 융합 AI-ND-IB 혼합 사독백신 산업화 연구>

조류인플루엔자(Avian influenza, AI) 바이러스는 병원성에 따라 닭에 감염 시 가벼운 호흡기 증상을 유발하는 비병원성 조류인플루엔자, 1-30% 내외의 폐사와 산란저하를 유발하는 저병원성 조류인플루엔자 (Low pathogenic Avian influenza, LPAI) 그리고 95% 이상의 높은 치사성을 보이는 고병원성 조류인플루엔자 (Highly Pathogenic Avian Influenza : HPAI) 등 크게 3가지 병형으로 구분할 수 있다. 국내에서는 1996년 최초로 H9N2 LPAI가 발생한 이후 현재까지 산란계와 종계에서 심한 산란저하를 동반한 폐사유발로 심각한 경제적인 피해를 유발하고 있으며, 파키스탄, 중국을 비롯한 아시아 여러 지역에서도 LPAI로 인한 산란저하와 폐사 피해가 날로 커져가고 있다. 또한 H9N2 AIV의 인체 감염 사례도 보고되어 있어 비록 LPAI라 할지라도 H9N2 형의 일부 변종 바이러스의 위험성을 간과해서는 안 된다. 이에 국내에서도 2007년부터 국내 분리주를 이용한 사독백신을 사용하고 있으나, 농장 적용 시 높은 수준의 항체 역가가 형성되지 않는 것이 단점으로 지적되고 있어 개선책 마련이 시급하다.

2000년 초반부터 동남아시아 지역에서 일어나고 있는 H5N1 HPAI의 지속적 발생과 인체

감염사례는 가금류의 HPAI 사독백신 접종 정책의 실시를 가져왔다. 그러나 현재까지 개발 및 사용되는 백신은 HPAI의 감염을 완전히 예방할 수 없고 감염 시 나타나는 임상증상의 발현을 감소시키는 수준의 방어능만을 나타내어 해당 백신의 효능 개선 노력이 활발히 이어지고 있다.

<제 3 세부과제: 신기술 융합 AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 임상 시험 연구>

FAO, OIE 및 WHO에서 정한 HPAI clade 명명법에 따르면 국내에 3회에 걸쳐 유행한 HPAI 바이러스는 각각 clade 2.5 (2003년), clade 2.2 (2006년), clade 2.3.2 (2008년)로 밝혀졌다. 반면, 캄보디아, 태국, 베트남 등지의 가금류에 유행중인 바이러스는 clade 1, 인도네시아에서 인체감염을 일으키는 바이러스는 clade 2.1, 그리고 동남아시아와 유럽에 걸쳐 가장 광범위하게 발병하는 바이러스는 clade 2.2로 알려져 있다. 또한, clade 2.3.2와 2.3.4 에 속하는 바이러스도 아시아지역에서 유행중이며 중국, 라오스, 미얀마, 베트남에서 인체감염을 일으켜 문제시되고 있다.

따라서 제 3 세부과제에서 개발되는 신기술 융합 AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신을 해외에 수출할 경우 해당 지역에 유행하는 바이러스에 대한 방어효능이 필수적이다. 본 세부과제에서는 도입과 취급이 제한적인 해외 유행 HPAI 바이러스를 이용한 닭 감염 모델을 확립하고, 이를 이용한 개발 백신의 효능시험을 수행하고자 한다.

<제 4 세부과제: 신기술 융합 가금질병 진단키트 개발 및 산업화 연구>

국내 가금 산업에서 문제시되는 주요 질병인 H9N2 LPAI, 강독형 ND, 신장형 IB를 진단하기 위해서는 많은 시간과 노력이 소모되어 빠른 시간 내에 주요 질병을 감별 진단하는 기술의 개발이 요구되고 있다.

혈청형 간 교차 항원이 인정되지 않는 IB의 경우 Mass type 바이러스를 이용해 만든 기존의 항체검출 ELISA 키트로 국내의 신장형 IB 감염 항체를 검출하는 데 어려움이 있고 백신 접종 항체와 감염 항체를 구분하기 위하여 신장형 IB에 대해 특이적인 ELISA 키트의 개발이 필요하다.

또한, 닭의 경우 백신접종이 이루어지지 않은 경우 HPAI 바이러스에 노출되면 뚜렷한 임상증상과 함께 100%에 이르는 치사율을 나타내어 쉽게 진단이 가능하다. 그러나 백신접종으로 면역이 형성된 닭은 HPAI 바이러스 감염 시 임상증상 발현 정도가 감소하기 때문에 조기 진단이 어려워지므로 바이러스의 전파를 가속화하는 요인이 될 수 있다. 따라서, 항체검사시 백신 또는 감염 여부를 감별할 수 있는 진단법의 개발이 반드시 필요하다. 또한, HPAI 예방 백신 접종을 실시하는 경우 반드시 백신접종 개체와 감염 개체를 감별할 수 있는 시스템이 뒷받침되어야 성공적인 방제전략을 펼칠 수 있다.

나. 제 2 핵심 과제 : 신기술융합 돼지질병 제어기술 개발 연구배경 및 필요성

(1) 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

본 연구과제는 총 3 세부과제로 구성되어 있으며 연구의 내용은 돼지, 소, 개 및 고양이의 면역거세 백신 (Immunocastration vaccine), 돼지의 회장염 예방백신 (*Lawsonia intracellularis* vaccine) 및 돼지의 생식기호흡기증후군 예방백신 (Porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine)을 개발하여 산업화하는 것을 주요 목표로 삼고 있다.

<제 1 세부과제: 역유전학 시스템을 이용한 PRRS 백신 및 진단키트 산업화 연구>

바이러스학적인 측면에서 PRRSV는 lactate dehydrogenase-elevating virus 및 equine arteritis virus, simian hemorrhagic fever virus와 함께 Arteriviridae family에 속하는 단일가닥의 양성극성 RNA 바이러스이다. 바이러스의 RNA 게놈은 5'-말단 방향에 바이러스의 자가복제에 관여하는 자가복제효소 (replicase)들을 인코딩하고 있는 두 개의 open reading frame ORF1a와 1b가 자리잡고 있으며, 3'-말단 방향에는 감염성이 있는 바이러스 입자를 형성하는데 필요한 7 개의 구조단백질들을 인코딩하고 있는 7개의 유전자 (ORF2a, 2b, 3, 4, 5, 6, 7)가 위치하고 있다. PRRSV가 돼지의 생식기호흡기증후군을 일으키는 원인체라는 것이 밝혀진 이후, 많은 연구자들이 이 바이러스의 전파를 막기 위한 노력의 일환으로 백신개발을 위한 기초 연구를 꾸준히 해 왔다. 그러나 이 바이러스에 대한 분자생물학적인 기초연구는 바이러스의 RNA 게놈을 유전학적으로 조작하는데 필요한 infectious cDNA의 결핍으로 인해서 큰 진전을 이루지 못 하였다. 또한, PRRSV가 분리된 이후 외국에서 개발되어 현재까지 전 세계적으로 사용되고 있는 PRRSV MLV 약독화 백신은 백신주의 유전학적 안정성 문제가 최근 큰 문제로 대두되고 있는 실정이다. 많은 나라에서 최근에 발표된 연구결과에 의하면, PRRSV 백신주는 돼지에 접종한 이후 돼지에서 증폭되는 과정에 병원성을 가진 독성주로 변화될 수 있으며, 이러한 전이는 빈번히 일어나는 것으로 보고되었다. 이렇게 변화된 독성주는 돼지에서 돼지로, 농장에서 농장으로 전파됨으로써 많은 지역이 새롭게 감염되는 악순환을 초래하고 있다. 따라서 전세계적인 PRRSV의 감염과 전파를 막기 위해서는 현재 사용되고 있는 백신을 대체할 수 있는 유전학적으로 안정되며 효능이 뛰어난 새로운 재조합 백신주의 개발이 무엇보다도 시급한 과제이다.

<제 2세부과제: 신기술 융합 면역거세백신 및 진단키트 산업화 연구>

돼지, 소, 개 및 고양이를 포함한 동물에서의 거세는 통상적으로 수컷을 대상으로 외과적 수술을 통한 물리적 거세 방법이 사용되고 있다. 개 및 고양이등과 같은 반려동물의 경우 수컷의 성적욕구를 제거하기 위한 목적으로 동물병원에 내원하여 수의사의 집도하에 거세를 실시하게 되며 수술 후 입원 및 통원치료를 통해 회복하게 된다. 그러나 돼지 및 소와 같은 산업동물의 경우 생산성 향상, 육질의 개선, 고기에서의 응취 제거 및 수컷 특유의 공격성 저하 등의 여러 목적 하에서 거세가 실시되고 있으나 거세를 실시하는 과정에서 대두되는 가장 큰 문제점은 거세 후 동물이 매우 심각한 고통 및 스트레스를 받게 된다는 것이다. 생산성이 중요한 목적이 아닌 반려동물의 경우 이러한 문제점으로 인한 경제적 손실이 크게 부각되지 않을 수 있으나, 돼지 및 소 등과 같은 산업동물은 거세 후 중 장기적인 증체율의 저하, 사료효율 감소

및 세균감염으로 인한 2차적 질병의 발생 등과 같은 부작용으로 인한 경제적 손실이 매우 큰 것이 주지의 사실이다. 우리나라 및 대부분의 국가에서 실시되는 돼지 및 소에서의 거세는 특별한 마취과정 없이 위생시설이 미비한 축사에서 실시되고 있다.

선진국의 경우 이러한 거세방법이 비인간적인 동물학대로 인식되면서 점차 물리적 거세를 금지하는 법을 제정하여 거세를 실시하지 못하도록 강제하고 있는 실정이다. 스위스의 경우 2009년도부터 돼지에서 거세는 반드시 마취제를 투여한 후 실시하여야 한다는 법을 2005년도에 제정하였으며, 노르웨이의 경우 2009년도부터 모든 물리적 거세를 금지하고 있다. 또한 벨기에 및 네덜란드 등의 국가들도 물리적 거세를 금지하는 법안을 제정할 계획을 세우고 있다. 우리나라 또한 동물 학대행위 방지 조항의 실효성을 높이는 내용을 근간으로 하는 동물보호법 전면개정을 추진하여 2008년 1월 27일 이후부터 시행하고 있다. 이와 같은 동물보호, 동물학대 방지 및 동물의 권리 증진 등을 강조하는 사회적 여건의 성숙을 바탕으로 전 세계적으로 동물 보호법령을 제정하여 실시하고 있는 추세이다. 따라서 향후 우리나라를 비롯한 거의 모든 국가에서 물리적 거세방법은 전면적으로 금지될 가능성이 매우 높기 때문에 물리적 거세방법을 대신할 인도적 거세법의 개발이 절실히 요구되는 상황이다. 이와 같은 요구에 가장 부응할 수 있는 것이 면역거세 방법이다. 면역거세란 백신의 투여를 통해 수컷의 성 성숙을 촉진하는 호르몬인 gonadotropin releasing hormone (GnRH)을 제거할 수 있는 항체를 형성시켜 줌으로써 고통 및 부작용이 없는 상태로 수컷의 성 성숙을 억제하여 주는 기법이다. 이에 본 연구팀에서는 향후 미국 및 EU와의 FTA 협상 후 동물복지에 근간을 둔 면역거세 백신의 사용을 요구받게 될 상황에 대비하여 신개념의 면역거세백신을 개발하여 돼지 및 소와 같은 산업동물 및 개 및 고양이와 같은 반려동물에 적용하고자 한다. 또한 면역거세백신 투여 후 형성되는 GnRH 항체를 측정하기 위한 ELISA 키트를 개발하여 백신을 접종한 동물에서의 항체형성을 바탕으로 백신의 효율성을 측정하는 지표로 삼고자 한다.

<제 3세부과제: 국내 분리주 이용 회장염 생독백신 및 진단키트 산업화 연구>

돼지의 회장염은 장세포 내에서만 증식하는 *Lawsonia intracellularis* 세균에 의해 유도되는 질병으로써 육성돈 및 비육돈에서의 만성설사, 증체율 저하, 및 폐사를 유발하는 질병이다. 가장 왕성한 성장시기인 육성/비육돈에서 발생하는 회장염에 의한 경제적 손실은 실로 매우 막대하다. 일례로 영국에서 매년 약 1,000-2,500만 파운드 (한화 약 180-450억원)에 해당하는 손실이 회장염에 의해 유발되는 것으로 보고되어 있다. 또한 미국, 영국, 캐나다, 덴마크 및 대만의 양돈 농가 중 95-100%에 해당하는 농장이 회장염 균에 감염되어 있는 것으로 보고되고 있다. 우리나라의 경우에도 약 53%의 돼지가 회장염에 감염되어 항체를 보유하고 있는 것으로 판명되었다. 따라서 회장염으로 인한 경제적 손실은 향후 사료를 통해 제공되던 항생제 사용이 전면적으로 금지될 경우 지금보다도 더욱 막대할 것으로 추정되고 있다.

따라서 우리나라를 포함한 대부분의 국가가 회장염을 예방할 수 있는 백신의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 현재 전 세계적으로 사용되고 있는 회장염 백신은 (주)베링거인겔하임에서 출시되어 있다. 그러나 회장염균의 분리가 매우 어려운 이유로 인하여 미국 및 유럽을 제외한 어떠한 국가에서도 회장염 균을 분리하지 못하였으며 백신의 제조도 불가능한 상황이었다. 이에 본 연구진은 회장염의 중요성을 수년전에 파악하여 회장염의 원인균인 *L. intracellularis*를 2006년도에 세계에서 3번째 및 아시아에서 최초로 순수 분리 증식시키는데 성공하여 현재 회장염균을 확보한 상태이다. 우리나라에서 분리된 세균을 이용하여 백신을 제조

할 경우 strain이 다른 수입 백신에 비하여 국내에서 발생하는 회장염의 방어효과가 우수할 것으로 판단되며, 특히 중국을 포함한 아시아 지역에 판매가 용이할 것으로 예상된다. 이에 본 연구진은 국내에서 순수 분리된 회장염 균을 이용한 효과적인 생독백신을 개발하여 양돈산업에 적용하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내·외 관련 분야 기술 개발 현황

▶ 신장형 IB K2주 이용 IB-ND 혼합 생독백신 산업화 연구

(1) 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계	O	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

○ 주요 다국적 기업에서 생산된 Mass type 생독백신이 전 세계에 유통되고 있음.

○ 미국, 대만, 중국 등지에서 자국 내 변이주의 약독화 생독백신이 지역적 및 실험적으로 사용됨.

(2) 국내수준

○ IBV 약독화 생독백신 개발: 본 사업단의 개발 제품 및 기술이 유일함.

(3) 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Georgia University (USA)	-미국 남동부 지역에서 유행하는 GA98형의 야외분리주를 이용한 약독화 생독백신 개발	- 미국 내 시판 중
National Taiwan University (Taiwan)	-대만 지역에서 유행하는 Taiwan group I의 야외분리주를 이용한 약독화 생독백신 개발	

▶ 신기술 융합 AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 산업화 연구

(1) 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계	O	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

○ 국가별 목적에 따라 H9N2형 influenza 사독백신 사용 중.

○ AI VLP 제조 기술: 대학을 중심으로 VLP 생산 효율 증진 중.

(2) 국내수준

○ 국내 유행 influenza virus 이용 사독백신 제조: 5대 동물약품회사에서 생산 중.

○ AI VLP 제조 기술: 대학 연구기관 중심으로 선진국 대비 50% 수준

(3) 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
연세대학교 (대한민국)	-RNA-binding protein을 이용한 수용성 및 활성형 단백질의 대량 생산 기술 연구	- 특히 출원 및 인플루엔자 재조합 단백질 백신제조 기술 이전 (출원번호:02-48929, 출원연도:2002, 출원국:대한민국)
Emory University (USA)	-Influenza VLP 백신 개발 연구	- Induction of long-term protective immune responses by influenza H5N1 virus-like particles. PLoS ONE 4(3), e4667.

▶ 신기술 융합 AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 산업화 연구

(1) 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계	O	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

- 국가별 목적에 따라 H5N1형 influenza 사독백신 사용 중.
- AI VLP 제조 기술: 대학을 중심으로 VLP 생산 효율 증진 중.

(2) 국내수준

- 국내 유행 influenza virus 이용 사독백신 제조: 5대 동물약품회사에서 생산 중.
- AI VLP 제조 기술: 대학 연구기관 중심으로 선진국 대비 50% 수준

(3) 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
연세대학교 (대한민국)	-RNA-binding protein을 이용한 수용성 및 활성형 단백질의 대량 생산 기술 연구	- 특허 출원 및 인플루엔자 재조합 단백질 백신제조 기술 이전 (출원번호:02-48929, 출원연도2002, 출원국:대한민국)
Emory University (USA)	-Influenza VLP 백신 개발 연구	- Induction of long-term protective immune responses by influenza H5N1 virus-like particles. PLoS ONE 4(3), e4667.

▶ 신기술 융합 AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 임상 시험 연구

(1) 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계		기술 안정화 단계	O
---------	--	--------	--	-----------	---

- HPAI형 influenza 병원성 검정 시험은 OIE 국제 기준에 따라 수행함.
- H5N1 예방백신의 방어효능 시험을 위한 HPAI 공격접종 모델 개발이 활발함.

(2) 국내수준

- 국내 유행 HPAI 바이러스 병원성 시험: 국가 기관인 국립수의과학검역원에서 단독 수행하며 선진국 대비 기술수준은 거의 100%임.

▶ 신기술 융합 가금질병 진단키트 개발 및 산업화 연구

(1) 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계	O	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

- 상용화 키트는 IDEXX사에서 판매중인 IB 항체검출 ELISA 키트가 전세계에서 유일함.
- 대장균 혹은 효모에서 생산한 재조합 N 단백질을 이용한 ELISA 키트 개발이 활발히

진행 중.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
국립수의과학검역원	-국내 유행 HPAI 바이러스의 닭 및 오리에서의 병원성 비교 시험	- Experimental infection of chickens, ducks, and quails with the highly pathogenic H5N1 avian influenza virus (J Vet Sci. 2009 Mar;10(1): 53-60)
University of Georgia (USA)	- 감염 경로별 HPAI 바이러스의 병원성 비교	- Experimental infections of herring gulls with H5N1 highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses by intranasal inoculation of virus and ingestion of virus-infected meat. (Avian Pathol 2008 Aug;37(4):393-397)

- 다양한 AI 감염 축종에 적용 가능한 ELISA 개발 노력이 활발히 진행 중.
- 활성형의 단백질을 생산하는 기법으로 단백질 폴딩을 유도하는 molecular chaperone을 사용하는 기술: 대학을 중심으로 새로운 molecular chaperone 발굴 중.
- AI 혈청형 특이 ELISA 개발 노력은 미미함.

(2) 국내수준

- 신장형 IBV 특이 항체진단용 ELISA 개발: 선진국 대비 20% 수준

(3) 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Hangzhou Bureau of Agriculture (중국)	An ELISA for antibodies to infectious bronchitis virus based on nucleocapsid protein produced in <i>Escherichia coli</i>	-

▶ 재조합 PRRS 백신 개발 및 산업화 연구

(1) 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계	○	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

- 최근 5년 동안에 본 연구실을 포함해서 약 3-4개의 독립된 역상유전자 시스템 구축
- 역상유전자 시스템을 이용한 PRRSV 병원성 기전연구: 초기 단계
- 역상유전자 시스템을 이용한 PRRSV 자가복제 기전연구: 초기 단계
- 현재 전 세계적으로 사용되고 있는 생백신 PRRSV MLV: 유전학적으로 불안정
- 최근의 경향: 유전학적으로 안정된 PRRSV 백신 개발에 주력

(2) 국내수준

- 국내에서 독자적으로 PRRSV에 대한 역상유전자 시스템 개발 성공: 선진국과 동일한 수준
- 구축된 PRRSV 역상유전자 시스템의 백신개발에의 활용도: 초기 단계
- 구축된 PRRSV 역상유전자 시스템을 이용한 기초연구: 초기 단계

○ 구축된 PRRSV 역상유전자 시스템을 이용한 응용연구: 초기 단계

(3) 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
충북대학교 (대한민국)	-PRRSV의 국내분리주를 사용하여 독자적으로 역상유전자 시스템 개발 성공 -역상유전자 시스템을 이용하여 바이러스의 자가복제와 관련된 기초연구 확립 -역상유전자 시스템을 활용하여 바이러스의 병원성 유발인자 규명을 위한 응용연구 진행중 -유전학적, 생화학적, 및 분자생물학적 실험기법을 통한 PRRSV 백신개발의 가능성 확인	-특허출원 및 향후 면역적 거세 백신의 산업화 연구에 활용
University of Minnesota (미국)	-PRRSV의 미국 분리주를 사용하여 하나의 역상유전자 시스템을 개발하였으나, 개발된 시스템의 재현성에 문제가 발견됨. -PRRSV의 유전자 변이에 대해서 연구중	
Danish Research Group (네덜란드)	-PRRSV의 유럽 분리주를 사용하여 하나의 역상유전자 시스템을 개발하였음. -미국에서 개발한 것과 같이, 개발된 시스템의 유전학적 불안정성 때문에 재현성에 문제가 발견됨.	

▶ 신기술 융합 면역거세백신 및 진단키트 산업화 연구

(1) 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계	○	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

- GnRH 단백질을 멀티머의 형태로 발현시킬 수 있는 시스템 구축
- GnRH 단백질에 대한 면역 증강 효과를 위해 viral 단백 또는 Cytokine 단백질과 GnRH 단백질의 재조합 폴리펩타이드를 발현시킬 수 있는 시스템 구축
- 현재 GnRH와 캐리어 단백질이 결합되어 있는 형태의 면역 거세 백신이 시판 중에 있음.

(2) 국내수준

- GnRH 단백질을 멀티머의 형태로 발현시킬 수 있는 시스템 및 캐리어 단백질과 GnRH 단백질을 동시에 발현시킬 기술 구축 : 선진국 대비 100% 수준

(3) 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
건국대학교 (대한민국)	-다중 GnRH 멀티머 형태의 단백을 사용한 면역적 거세 백신 개발 -Viral 단백질과 GnRH 단백을 동시에 발현시키는 백 신 제조 기술	-특허출원 및 향후 면역적 거세 백신의 산업화 연구에 활용
Akzo Nobel (네덜란드)	-E.coli의 P-fimbrial filament와 GnRH 단백을 폴리 펩타이드 형태로 발현시키는 백신 제조 기술	

▶ 국내 분리주 이용 회장염 생독백신 산업화 연구

(1) 세계적 수준

개념정립 단계	기업화 단계	○	기술 안정화 단계

- 회장염 원인체인 *Lawsonia intracellularis*는 그 배양 조건이 매우 까다로워 전 세계적으로 균을 배양할 수 있는 연구팀이 극히 드문 상태임.
- 배양조건의 까다로움으로 인해 연구가 거의 진행되지 않은 질병으로 균의 병원성에 대한 기전이나 감염 기전 등이 전혀 연구되어 있지 않은 상태임.
- 1999년도에 유럽에서 분리된 회장염 균을 사용한 생독백신이 개발되어 현재 시판되고 있다.
- 자국을 포함하여 필리핀, 일본 등 아시아 지역에서 생독백신에 대한 백신효능 및 안전성 검사가 실시되고 있다.

(2) 국내수준

- 본 연구팀에 의해 2006년도에 세계에서 3번째로 회장염 균을 샘플에서 분리, 배양하여 국내 분리주를 확보.
- *Lawsonia intracellularis*의 최초 분리자인 과학자의 조언에 의해 균의 분리 및 배양법 확립 : 선진국 대비 100% 수준
- 백신의 생산을 위한 대량 배양 system의 구축 : 50% 수준

(3) 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
건국대학교 (대한민국)	- <i>Lawsonia intracellularis</i> 국내 야외주의 분리 및 배양 -회장염 균의 약독화를 위해 지속적인 균의 계대 배양을 실시	-특허 등록 및 국내 야외 분리주를 사용한 생독 백신의 제조
베링거 잉겔하임 (독일)	-유럽분리주를 고도 계대 배양하여 약독화 생독백 신주를 개발 -백신생산을 위한 대량 배양 시스템 구축	-특허 등록 및 최초로 세 계 여러 나라에 회장염 생독백신을 시판

2. 국내·외 관련 분야 시장 현황 (자료출처: 동물약품협회)

(1) 국내 양계 및 양돈백신 시장규모

- 국내 동물약품 전체의 시장규모는 총 4,000억원이며, 그중 동물백신의 시장규모는 총 900억원으로 집계되어 전체 동물약품시장 규모 대비 약 22.5%대의 시장을 형성하고 있는 것으로 조사되었다.
- 국내 양계백신의 경우 시장규모는 2009년 기준 총 256억원으로 집계되어 전체 동물백신 시장규모 대비 약 28.4%대의 시장을 형성하고 있는 것으로 조사되었다.
- 또한 양계백신 시장 중 생독백신이 차지하고 있는 비율은 약 67.6%로 조사되어 사독백신에 비하여 생독백신의 사용비율이 높은 것으로 조사되었다.
- 국내 양돈백신의 경우 시장규모는 2009년 기준 총 424억원으로 집계되어 전체 동물백신 시장규모 대비 약 47.1%대의 시장을 형성하고 있는 것으로 조사되었으며, 2008년 대비 약 3% 정도 시장규모가 성장하였다.
- 또한 양돈백신 시장 중 사독(사균)백신이 차지하고 있는 비율은 약 53%로 조사되어 생독(생균)백신에 비하여 사독(사균)백신의 사용비율이 높은 것으로 조사되었다.

(2) 해외 양계 및 양돈백신 시장규모

- 해외 동물백신 시장규모는 2007년 기준 총 2조 3,081억원 (26억7천7백2십8만불)이며, 그중 해외 양계백신의 시장규모는 6,924억원 (6억 7만불)으로 집계되어 전체 해외 동물백신 시장규모 대비 약 29.9%대의 시장을 형성하고 있는 것으로 조사되었으며, 연평균 성장율은 4.19%대로 조사되었다.
- 해외 양돈백신의 시장규모는 1조 91억원 (9억4천6백4십3만불)으로 집계되어 전체 해외 동물백신 시장규모 대비 약 47.2%대의 시장을 형성하고 있는 것으로 조사되었으며, 연평균성장율은 5.15%대로 조사되었다.
- 아시아 지역 양계백신 시장규모는 아시아 닭 사육두수 조사현황 자료를 근거로 하여 볼 때 전 세계 닭 사육두수의 50.6%를 점유하므로 아시아 지역 양계백신의 시장규모는 6924억원의 50%로 환산할 경우 약 3,462억원으로 추정되었다.
- 또한 아시아 지역 양돈백신 시장규모는 아시아 돼지 사육두수 조사현황 자료를 근거로 하여 볼 때 전 세계 돼지 사육두수의 60.7%를 점유하므로 아시아 지역 양돈백신의 시장규모는 1조 91억원의 60%로 환산할 경우 약 6,054억원으로 추정되었다.

(3) 소비패턴

■ 양계백신 및 진단키트 소비패턴

- 국내 양계백신 시장은 뉴캐슬병 (Newcastle disease: ND) 단미 생독백신과 IB(M41)-IB(KM91)-ND-EDS (BBNE) 3가 혼합 오일 백신시장이 단일백신으로는 가장 큰 규모의 백신시장을 형성하고 있으며, AI, ND, IB 등 3종 닭 호흡기 질병의 항체진단은 현재 혈구응집억제반응 (HI test)에 의존하고 있다.

▶ND 및 IB 생독백신 소비패턴

- 국내 ND 단미 생독백신 시장의 경우 1990년부터 농림부에서 ‘국내 뉴캐슬병 피해 최소화 정책’의 일환으로 전국 부화장에 뉴캐슬병 생독백신을 무상으로 공급하고 있어 단일백신으로는 47억원이라는 비교적 큰 양계백신 시장규모를 형성하고 있다. 그러나 뉴캐슬병 생독백신 시장은 현재 2개의 다국적 기업 소유 제품이 80%대의 시장점유율을 보이고 있다. 예를 들어 메리알코리아의 에비뉴 뉴캐슬병 생독백신은 국내 전체 양계백신매출의 약 12.1%, 단독 뉴캐슬병 생독백신 시장의 65.8%를 점유하고 있다.
- 2000년 이후 국내는 물론 중국, 대만 등 화교권 아시아 지역에서 변이형 신장형 IB 발생보고가 이어지고 있으며, 특히 육계산업에서 30%대의 폐사, 2등급 계육생산으로 인한 경제적 손실, 대장균증 유발로 인한 항생제 남용 유도 등 신장형 IB감염으로 인한 피해 증가로 이를 효과적으로 예방할 수 있는 신장형 IB 생독백신의 수요가 폭발적으로 늘어나 새로운 생독백신 시장이 형성되고 있다.

▶BBNE 사독백신 소비패턴

- IB-ND-EDS (BNE) 3가 혼합 사독백신 시장점유율은 국산백신과 수입백신의 시장점유율이 20:80 정도로 수입백신 선호도가 매우 높았으나 1997년 국립수의과학검역원에서 변이형 신장형 닭전염성기관지염 (Infectious bronchitis: IB) KM91주가 포함된 BBNE 3가 혼합오일백신제조기술을 국내 5개 백신제조사에 기술이전하면서 국산백신과 수입백신의 시장점유율이 80:20로 역전되어 현재에 이르고 있으며, 2009년 현재 국내 백신 회사에서 BBNE의 경우 국내기업의 시장점유율은 77% 정도를 차지하고 있으며 시장규모는 약 9억원 정도로 조사되고 있다.
- 국내 H9N2 저병원성 조류인플루엔자 (Low pathogenic avian influenza: LPAI)에 의한 피해 만연으로 농림부 주관으로 LPAI 사독오일백신이 개발되어 2007년부터 국내에 시판되고 있으나, 수당 접종단가가 고가(80원)이고, 단미 오일백신이라 백신접종 비용 부담된다는 이유로 2009년 현재까지의 국내 시장점유율은 아직 미미한 실정이다.
- 2003년 이후 변이형 H9N2 LPAI가 중국과 화교권 아시아 지역으로 확산되어 변이형 H9N2 LPAI 백신과 기존의 BBNE 백신을 융합한 AI(H9N2)-IB(신장형)-ND (ABN) 3가 혼합 사독오일 백신의 개발이 요구되고 있어 국내 및 아시아 지역에 ABN 3가 혼합

사독오일 시장이 새로이 형성되고 있다.

▶ AI, ND, IB 등 3종 닭 호흡기 질병의 항체진단키트 소비패턴

- 한국을 포함하여 전 세계적으로 사용되고 있는 AI, ND, IB용 혈구응집억제반응 (Hemeagglutinin Inhibition : HI test) 방법은 Mass형 IBV 항체진단에는 적합하나 현재 아시아에서 유행하고 있는 신장형 IBV 항체진단에는 적용할 수가 없어 신장형 IBV 항체진단용 진단키트의 개발이 요구되고 있다. 따라서 국내 및 아시아 지역에 IBV K2 주를 이용한 항체진단 ELISA 키트 시장이 새로이 형성되고 있다.

■ 조류인플루엔자 백신 및 진단키트 소비패턴

- H5N1 고병원성 조류인플루엔자 (Highly pathogenic avian influenza: HPAI) 사독 오일 백신은 현재 중국, 홍콩, 인도네시아에서 닭과 종오리를 대상으로 국가 방역차원에서 사용되고 있으며, 국내에서 생산된 AIV 항원진단 Rapid 키트는 인플루엔자 현장진단을 위하여 조류인플루엔자 전문 실험실이 없는 인도네시아나 중국 변방지역 등을 중심으로 아시아 국가에서 6억원 규모의 시장을 형성하고 있다.

▶ H5N1 HPAI 백신 소비패턴

- 현재 중국은 2006년 이후 ND 백신 바이러스에 H5N1 HPAI 바이러스의 HA 유전자를 발현하는 ND-AI(H5) 혼합 생독 재조합 백신을 인체감염 방지와 질병확산을 방지할 목적으로 국가 방역 차원에서 사용하고 있으며, 2003년 이후 인도네시아는 H5N3 사독오일백신을 정책적으로 사용하고 있다. 기존의 H5N3 AI 사독오일백신은 백신접종계의 폐사방지에는 유효하나 감염 시 바이러스의 체외배출을 완벽히 차단 할 수 없고 오리 등 특수 가금류에 접종 시 방어 효능이 저하되는 문제점이 지적되어 이러한 단점이 개선된 새로운 개념의 AI (H5) 사독백신이 요구되고 있어 인플루엔자 대유행을 대비하여 국내 및 아시아 지역에 적용 가능한 신개념의 AI (H5) 생독 및 사독오일백신 시장이 새로이 형성되고 있다. 인플루엔자 대유행대비 AI(H5) 백신은 지역별, 국가별 HPAI 유행주를 이용하여 단 시간내에 백신을 제조하여야 하므로 본 사업단이 목적하는 역 유전학 시스템을 이용한 백신이나 신기술이 융합된 백신제조 기술은 인플루엔자 대유행을 대비한 국가별 HPAI 백신항원뱅크 구축 등 기존 백신시장과는 차별화되는 새로운 시장을 개척할 것이다.

■ 양돈백신 및 진단키트 소비패턴

- 양돈백신 시장은 현재 전 세계 양돈업계에 막대한 경제적 손실을 유발하고 있는 돼지 PRRS 방제, 수태지의 외과적 거세를 대체할 수 있는 새로운 방법, 사료 내 항생제 첨가 금지조치에 따른 돼지 증식성 회장염 방역대책 등 이들 질병을 제어할 수 있는 신기술의 개발과 산업화를 절실히 요구하고 있는 실정이다.

▶ PRRS 백신 소비패턴

- 기존 PRRS 생독백신은 국내 시장규모만 40억원 정도로 추산되나 백신의 안전성 문제가 지속적으로 문제시 되고 있으며, PRRS 사독오일백신은 중화항체 형성능이 낮아 보

다 효과적인 백신개발이 요구되고 있으나, 이들 기존의 PRRS 백신들을 대체 할 수 있는 후보백신이 없어 신개념의 백신 개발이 전 세계 양돈시장에서 현안과제로 대두되고 있는 실정이다.

▶ GnRH 면역거세 백신 소비패턴

- 2001년 EU에서 동물애호·복지법이 시행되면서 비육돈에서 응취제거를 위한 수태지의 외과적 거세술 시술이 논란의 대상이 되고 있어, 면역거세와 같은 비외과적 거세법 도입에 대한 관심이 고조되고 있어 국내를 비롯하여 돼지 밀집사육지역인 아시아 지역에 기존에 없던 비외과적 거세법인 GnRH 면역거세 백신과 GnRH 항체진단 키트 시장이 새로이 형성되고 있다.

▶ 돼지 증식성회장염 생균백신 소비패턴

- 1999년 EU에서 사료 내 항생제 첨가를 전면적으로 금지하면서 돼지 증식성회장염 (PPE) 발생율이 급증하고 있는 추세이며, 최근 EU를 중심으로 이를 예방하고 진단 할 수 있는 생균백신에 대한 개발이 요구되고 있다.

3. 국내·외 기술 개발 현황에서 차지하는 위치

개발 상품명	핵심기술 수준				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량
신장형IB K2주와 내열성 ND K148주를 혼합한 생독백신	○				
신장형IB K2주와 저병원성 LaSota주를 혼합한 생독백신	○				
신장형IB K2주와 재조합 NDV L7주를 혼합한 생독백신	○				
AI(H9), ND, 신장형IB를 혼합한 사독백신	○				
AI(H5), ND, 신장형IB를 혼합한 사독백신	○				
신장형IB 항원진단 Rapid 키트	○				
신장형IB 항체진단 ELISA 키트	○				
AI-ND-신장형IB 항체진단 ELISA 키트	○				
AIV 백신 항체 감별진단 키트		○			○
PRRSV 사독백신		○			○
GnRH면역 거세 백신		○			○
GnRH항체진단 ELISA 키트	○				
돼지 증식성회장염 생독 백신		○			○

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 연구개발 접근 방법 및 내용

가. [1핵심 1세부] 신장형 IB K2주 이용 IB-ND 혼합 생독백신 개발 및 산업화 연구

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
IB K2주의 안전성 및 방어효능시험	IB K2의 종란 계대 및 증식시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ K2 백신주를 SPF 종란에 증식시켜 생산량을 최대화함. - K2 백신주 Seed 바이러스를 종란의 장요막강 내에 0.1ml 접종함. - 접종 후 72시간에 장요막강액을 채취하여 증식된 바이러스의 역가(EID₅₀/ml)를 종란에서 측정함.
	IB K2주의 안전성 및 방어효능시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ IB K2 백신주의 안전성을 확인하기 위하여 실험을 실시함. - IB K2백신주를 1일령의 SPF 병아리에 점안접종한 후 2주간 임상증상 및 폐사율을 관찰함. - 7일째 되는 날 장기에 대한 조직 침투능을 관찰하고, 기도와 폐의 조직학적 병변을 관찰함. - IB K2백신주를 1일령 육계 병아리에 분무접종한 후 증체율, 임상증상, 기관지상피 섬모의 운동성 그리고 기관과 폐의 조직학적 병변을 관찰함. ■ IB K2 백신주의 방어효능을 확인하기 위하여 실험을 실시함 - 3주령의 SPF 병아리에 점안으로 IB K2 생독 백신을 접종함. - 백신접종 3주 후, 국내 유행하고 있는 IBV 야외분리주를 공격접종하고 5일 후 기도와 신장으로부터 공격접종 바이러스 재분리를 실시하여 방어효능을 평가함. - 또한 국내에서 새롭게 유행하는 IBV 야외분리주에 대해서도 교차방어효능을 확인하기 위하여 상기에 표시된 방법으로 실험을 실시함.
K2-K148 혼합 생독백신 개발 및 산업화	NDV K148주의 종란계대 및 증식시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ NDV K148 백신주를 SPF 종란에 증식시켜 생산량을 최대화함. - NDV K148 백신주 Seed 바이러스를 종란의 장요막강 내에 0.1 ml 접종함. - 접종 후 72시간에 장요막강액을 채취하여 증식된 바이러스의 역가(EID₅₀/ml)를 종란에서 측정함.
	NDV K148주의 안전성 및 효능 시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ NDV K148 백신주의 안전성을 확인하기 위하여 실험을 실시함. - NDV K148 백신주를 SPF 계태아란에 접종한 후 평균치사시간 (Mean death time, MDT)과 1일령 SPF 초생추에 접종하여 대뇌 병원성 지수(Intracerebral

		<p>pathogenic index, ICPI)를 측정함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - NDV K148 백신주를 10수분을 6주령 SPF 병아리에 점안접종한 후 임상증상 및 폐사율을 확인한 후 안전성을 평가함 <p>■ NDV K148 백신주의 방어효능을 확인하기 위하여 실험을 실시함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - NDV K148 백신주를 6주령 SPF병아리에 접종하고 2주 후 NDV강독주(Kr-005/00 주)를 공격접종하여 임상증상 및 폐사율을 관찰하여 방어효능을 산출함.
<p>IB K2주와 NDV K148주간의 간접현상을 최소화하는 농도 측정</p>	<p>■ IB K2주와 ND 백신주간의 간접현상을 최소화하는 혼합비율을 설정하기 위하여 실시함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - IB K2주와 ND 백신주를 각기 다른 농도로 혼합한 백신을 제조한 후 그룹당 10마리의 3주령 SPF병아리에 1수분의 백신을 점안으로 접종함. - 백신 접종 3주 후 백신접종한 병아리로부터 혈액을 채취하여 혈구응집억제반응을 통해 NDV 항체를 측정하였고, IBV의 경우 중화항체형성여부 확인을 위한 중화시험을 실시함. - NDV 강독형주 (Kr-005/00 주)를 공격접종한 후 2주간 임상증상 및 폐사율을 관찰하여 NDV에 대한 방어능을 산출함. 	<p>■ IB K2주와 ND 백신주간의 간접현상을 최소화하는 혼합비율을 설정하기 위하여 실시함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - IB K2주와 ND 백신주를 각기 다른 농도로 혼합한 백신을 제조한 후 그룹당 10마리의 3주령 SPF병아리에 1수분의 백신을 점안으로 접종함. - 백신 접종 3주 후 백신접종한 병아리로부터 혈액을 채취하여 혈구응집억제반응을 통해 NDV 항체를 측정하였고, IBV의 경우 중화항체형성여부 확인을 위한 중화시험을 실시함. - NDV 강독형주 (Kr-005/00 주)를 공격접종한 후 2주간 임상증상 및 폐사율을 관찰하여 NDV에 대한 방어능을 산출함.
	<p>■ 제작된 IB-ND 혼합 생독백신에서 IB 바이러스에 대한 역가를 확인하기 위한 실험을 실시함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스를 증식시킨 장요막강액을 채취하여 IB 중화항체와 1:1비로 상온에서 한시간 반응함. - 반응 실시 후 10진법으로 단계 희석함. - 10일령 SPF 종란에 종란당 0.1 ml씩 장요막강 내에 접종함. - 접종 후 72시간에 장요막강액을 채취하여 Dot-Immunoblotting assay를 실시함. - 바이러스 함유량은 케버 방법 (Karber method)을 이용하여 EID₅₀/ml 값으로 계산함. 	<p>■ 제작된 IB-ND 혼합 생독백신에서 IB 바이러스에 대한 역가를 확인하기 위한 실험을 실시함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스를 증식시킨 장요막강액을 채취하여 IB 중화항체와 1:1비로 상온에서 한시간 반응함. - 반응 실시 후 10진법으로 단계 희석함. - 10일령 SPF 종란에 종란당 0.1
	<p>■ 제작된 IB-ND 혼합 생독백신에서 ND 바이러스에 대한 역가를 확인하기 위한 실험을 실시함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스를 증식시킨 장요막강액을 채취하여 IB 중화항체와 1:1비로 상온에서 한시간 반응함. - 반응 실시 후 10진법으로 단계 희석함. - 10일령 SPF 종란에 종란당 0.1 	<p>■ 제작된 IB-ND 혼합 생독백신에서 ND 바이러스에 대한 역가를 확인하기 위한 실험을 실시함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스를 증식시킨 장요막강액을 채취하여 IB 중화항체와 1:1비로 상온에서 한시간 반응함. - 반응 실시 후 10진법으로 단계 희석함. - 10일령 SPF 종란에 종란당 0.1

		<p>ml씩 장요막강 내에 접종함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 접종 후 72시간에 장요막강액을 채취하여 10% 닭 적혈구를 이용한 혈구응집반응을 통하여 바이러스 역가를 산출함. - 바이러스 함유량은 캐버 방법 (Karber method)을 이용하여 EID₅₀/ml 값으로 계산함.
	<p>K2+K148 혼합 생독백신의 실험실 내 안전성 및 효능시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 백신의 안전성여부를 확인하기 위하여 SPF닭에 시험백신을 접종한 후 국립수의과학검역원 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거 안전시험을 실시함. - 각 바이러스에 감수성있는 3주령 닭 10수에 시험바이러스 10수씩을 접종함. - 14일동안 임상증상을 관찰함. - 90%이상의 닭이 건강하면 안전성이 확보된 것으로 판정함. ■ SPF닭에 시험백신을 접종한 후 항체생성능을 확인함. - 시험백신 1수분을 3주령 SPF 닭에 접종함. - 3주 후 혈액을 채취한 후 IBV에 대해 중화항체형성여부 확인을 위한 중화시험을 실시하고, NDV에 대해 혈구응집억제시험을 실시하여 면역원성을 평가함. ■ 백신의 효능을 확인하기 위하여 시험백신을 접종한 후 국립수의과학검역원 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거 효력 시험을 실시함. - 뉴캐슬 바이러스에 감수성이 있는 3주령의 닭에 IB-ND 혼합백신을 접종함. - 백신접종 2주 후, 공격접종용 바이러스를 마리당 105.0ELD₅₀을 근육으로 공격접종함. - 공격접종 후 14일간 이상유무를 관찰함. - 무접종 대조군은 100% 폐사하고 시험군은 80%이상 건강할 경우 방어능이 확보된 것으로 판정함.
	<p>K2+K148 혼합생독백신 시제품 제작</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ K2+K148 혼합 생독백신의 국가검정 기준 시험에 대한 ND 바이러스 함량조절 ■ K2+K148 혼합 생독백신의 국가검정 기준 시험에 대한 IB 바이러스 함량조절 ■ K2+K148 혼합 생독백신 시제품 제작 혼합비율 설정 ■ K2+K148 혼합 생독백신의 시제품 제작 및 역가확인시험
	<p>K2+K148 혼합 생독백신 시제품의 안전성 시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 국가검정기준에 의한 시제품의 안전성 시험

		<ul style="list-style-type: none"> - 각 바이러스에 감수성이 있는 1주령 닭에 백신 시제품을 10수분을 음수 접종함 - 14일동안 임상증상을 관찰함 <p>■ 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 안전성 시험</p> <ul style="list-style-type: none"> - 각 바이러스에 감수성이 있는 1일령 닭에 백신 시제품을 1수분을 분무 접종함 - 14일동안 임상증상을 관찰함
	K2+K148 혼합 생독백신 시제품의 면역원성 시험 및 방어효능 시험	<p>■ IB 바이러스에 대한 국가검정기준에 의한 시제품의 면역원성 및 방어능의 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 3주령의 닭에서의 음수 접종 시험 <p>■ ND 바이러스에 대한 국가검정기준에 의한 시제품의 면역원성 및 방어능의 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 6주령의 닭에서의 음수 접종 시험 <p>■ 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 IB 바이러스에 대한 면역원성 및 방어능의 평가</p> <p>■ 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 ND 바이러스에 대한 면역원성 및 방어능의 평가</p>
	K2+K148 혼합 생독백신 시제품의 품목 허가 신청	<p>■ 국가 검정기준에 의거한 평가시험 및 1일령 닭에서의 확대 적용에 대한 평가결과를 바탕으로 농림축산검역본부에 제품 등록 신청</p>
	K2+K148 혼합 생독백신 시제품의 야외임상시험 신청	<p>■ 백신의 안전성 및 면역원성을 확인하기 위하여 3개 농장에서 1일령에 시험백신을 분무 및 음수 투여하는 야외임상시험을 농림축산검역본부에 신청</p>
	K2+K148 혼합 생독백신의 해외 임상 시험	<p>■ K2+K148 혼합 생독백신의 1일령에서의 면역원성 시험</p> <p>■ K2+K148 혼합 생독백신의 수출국 유행 IB주에 대한 방어효능 시험</p>
K2-LaSota 혼합 생독백신 개발 및 산업화	NDV LaSota주의 종란계대 및 증식시험	<p>■ NDV LaSota 백신주를 SPF 종란에 증식시켜 생산량을 최대화함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - NDV LaSota 백신주 Seed 바이러스를 종란의 장요막강 내에 0.1ml 접종함. - 접종 후 72시간에 장요막강액을 채취하여 증식된 바이러스의 역가(EID50/ml)를 종란에서 측정

	<p>NDV LaSota주의 안전성 및 효능 시험</p>	<p>합.</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ NDV LaSota 백신주의 안전성을 확인하기 위하여 실험을 실시함. <ul style="list-style-type: none"> - NDV LaSota 백신주를 SPF 계 태아란에 접종한 후 평균치사시간 (Mean death time, MDT)과 1일령 SPF 초생추에 접종하여 대뇌 병원성 지수(Intracerebral pathogenic index, ICPI)를 측정함. - NDV LaSota 백신주를 10수분을 6주령 SPF 병아리에 점안 접종한 후 임상증상 및 폐사율을 확인한 후 안전성을 평가함. ■ NDV LaSota 백신주의 방어효능을 확인하기 위하여 실험을 실시함. <ul style="list-style-type: none"> - NDV LaSota 백신주를 6주령 SPF 병아리에 접종하고 2주 후 NDV강독주(Kr-005/00 주)를 공격접종하여 임상증상 및 폐사율을 관찰하여 방어효능을 산출함.
	<p>IB K2주와 NDV LaSota주간의 간섭현상을 최소화하는 농도 측정</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ IB K2주와 ND 백신주간의 간섭현상을 최소화하는 혼합비율을 설정하기 위하여 실시함. <ul style="list-style-type: none"> - IB K2주와 ND 백신주를 각기 다른 농도로 혼합한 백신을 제조한 후 그룹당 10마리의 3주령 SPF 병아리에 1수분의 백신을 점안으로 접종함. - 백신 접종 3주 후 백신접종한 병아리로부터 혈액을 채취하여 혈구응집억제반응을 통해 NDV 항체를 측정하였고, IBV의 경우 중화항체형성여부 확인을 위한 중화시험을 실시함. - NDV 강독형주 (Kr-005/00 주)를 공격접종한 후 2주간 임상증상 및 폐사율을 관찰하여 NDV에 대한 방어능을 산출함. ■ 제작된 IB-ND 혼합 생독백신에서 IB 바이러스에 대한 역가를 확인하기 위한 실험을 실시함. <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스를 증식시킨 장요막강액을 채취하여 IB 중화항체와 1:1비로 상온에서 한시간 반응함. - 반응 실시 후 10진법으로 단계 희석함. - 10일령 SPF 종란에 종란당 0.1 ml씩 장요막강 내에 접종함. - 접종 후 72시간에 장요막강액을 채취하여 Dot-Imunoblottin g assay를 실시함. - 바이러스 함유량은 캐버 방법 (Karber method)을 이용하여 EID50/ml 값으로 계산함. ■ 제작된 IB-ND 혼합 생독백신에

		<p>서 ND 바이러스에 대한 역가를 확인하기 위한 실험을 실시함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스를 증식시킨 장요막강액을 채취하여 IB 중화항체와 1:1비로 상온에서 한시간 반응함. - 반응 실시 후 10진법으로 단계 희석함. - 10일령 SPF 종란에 종란당 0.1 ml씩 장요막강 내에 접종함. - 접종 후 72시간에 장요막강액을 채취하여 10% 닭 적혈구를 이용한 혈구응집반응을 통하여 바이러스 역가를 산출함. - 바이러스 함유량은 캐버 방법 (Karber method)을 이용하여 EID50/ml 값으로 계산함.
	<p>K2+LaSota 혼합 생독백신의 실험실 내 안전성 및 효능시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 백신의 안전성여부를 확인하기 위하여 SPF닭에 시험백신을 접종한 후 국립수의과학검역원 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거 안전시험을 실시함. - 각 바이러스에 감수성있는 3주령 닭 10수에 시험바이러스 10수씩을 접종함. - 14일동안 임상증상을 관찰함. - 90%이상의 닭이 건강하면 안전성이 확보된 것으로 판정함. ■ SPF닭에 시험백신을 접종한 후 항체생성능을 확인함. - 시험백신 1수분을 3주령 SPF 닭에 접종함. - 3주 후 혈액을 채취한 후 IBV에 대해 중화항체형성여부 확인을 위한 중화시험을 실시하고, NDV에 대해 혈구응집억제시험을 실시하여 면역원성을 평가함. ■ 백신의 효능을 확인하기 위하여 시험백신을 접종한 후 국립수의과학검역원 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거 효력 시험을 실시함. - 뉴캐슬 바이러스에 감수성이 있는 3주령의 닭에 IB-ND 혼합백신을 접종함. - 백신접종 2주 후, 공격접종용 바이러스를 마리당 105.0ELD50을 근육으로 공격접종함. - 공격접종 후 14일간 이상유무를 관찰함. - 무접종 대조군은 100% 폐사하고 시험군은 80%이상 건강할 경우 방어능이 확보된 것으로 판정함.
	<p>K2+LaSota 혼합생독백신 시제품 제작</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ K2+LaSota 혼합 생독백신의 국가검정 기준 시험에 대한 ND 바이러스 함량조절 ■ K2+LaSota 혼합 생독백신의 국가검정 기준 시험에 대한 IB

		<p>바이러스 함량조절</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ K2+LaSota 혼합 생독백신 시제품 제작 혼합비율 설정 ■ K2+LaSota 혼합 생독백신의 시제품 제작 및 역가확인시험
	K2+LaSota 혼합 생독백신 시제품의 안전성 시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ 국가검정기준에 의한 시제품의 안전성 시험 <ul style="list-style-type: none"> - 각 바이러스에 감수성이 있는 1주령 닭에 백신 시제품을 10수분을 음수 접종함 - 14일동안 임상증상을 관찰함 ■ 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 안전성 시험 <ul style="list-style-type: none"> - 각 바이러스에 감수성이 있는 1일령 닭에 백신 시제품을 1수분을 분무 접종함 - 14일동안 임상증상을 관찰함
	K2+LaSota 혼합 생독백신 시제품의 면역원성 시험 및 방어효능 시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ IB 바이러스에 대한 국가검정기준에 의한 시제품의 면역원성 및 방어능의 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 3주령의 닭에서의 음수 접종 시험 ■ ND 바이러스에 대한 국가검정기준에 의한 시제품의 면역원성 및 방어능의 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 6주령의 닭에서의 음수 접종 시험 ■ 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 IB 바이러스에 대한 면역원성 및 방어능의 평가 ■ 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 ND 바이러스에 대한 면역원성 및 방어능의 평가
	K2+LaSota 혼합 생독백신 시제품의 품목 허가 신청	<ul style="list-style-type: none"> ■ 국가 검정기준에 의거한 평가시험 및 1일령 닭에서의 확대 적용에 대한 평가결과를 바탕으로 농림축산검역본부에 제품 등록 신청
	K2+LaSota 혼합 생독백신 시제품의 야외임상시험 신청	<ul style="list-style-type: none"> ■ 백신의 안전성 및 면역원성을 확인하기 위하여 3개 농장에서 1일령에 시험백신을 분무 및 음수 투여하는 야외임상시험을 농림축산검역본부에 신청
	K2+LaSota 혼합 생독백신의 해외 임상 시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ K2+LaSota 혼합 생독백신의 1일령에서의 면역원성 시험 ■ K2+LaSota 혼합 생독백신의 수출국 유행 IB주에 대한 방어효능 시험
K2-L7 혼합 생독백신 개발 및 산업화	NDV L7주의 종란계대 및 증식시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ NDV L7 백신주를 SPF 종란에 증식시켜 생산량을 최대화함. <ul style="list-style-type: none"> - NDV L7 백신주 Seed 바이러스를 종란의 장요막강 내에 0.1ml

		<p>접종함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 접종 후 72시간에 장요막강액을 채취하여 증식된 바이러스의 역가(EID50/ml)를 종란에서 측정함.
	<p>NDV L7주의 안전성 및 효능 시험</p>	<p>■ NDV L7 백신주의 안전성을 확인하기 위하여 실험을 실시함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - NDV LaSota 백신주를 SPF 계 태아란에 접종한 후 평균치사시간 (Mean death time, MDT)과 1일령 SPF 초생추에 접종하여 대뇌 병원성 지수(Intracerebral pathogenic index, ICPI)를 측정함. - NDV L7 백신주를 10수분을 6주령 SPF 병아리에 점안접종한 후 임상증상 및 폐사율을 확인한 후 안전성을 평가함 <p>■ NDV L7 백신주의 방어효능을 확인하기 위하여 실험을 실시함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - NDV L7 백신주를 6주령 SPF 병아리에 접종하고 2주 후 NDV 강독주(Kr-005/00 주)를 공격접종하여 임상증상 및 폐사율을 관찰하여 방어효능을 산출함.
	<p>IB K2주와 NDV L7주간의 간섭현상을 최소화하는 농도 측정</p>	<p>■ IB K2주와 ND 백신주간의 간섭현상을 최소화하는 혼합비율을 설정하기 위하여 실시함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - IB K2주와 ND 백신주를 각기 다른 농도로 혼합한 백신을 제조한 후 그룹당 10마리의 3주령 SPF 병아리에 1수분의 백신을 점안으로 접종함. - 백신 접종 3주 후 백신접종한 병아리로부터 혈액을 채취하여 혈구응집억제반응을 통해 NDV 항체를 측정하였고, IBV의 경우 중화항체형성여부 확인을 위한 중화시험을 실시함. - NDV 강독형주 (Kr-005/00 주)를 공격접종한 후 2주간 임상증상 및 폐사율을 관찰하여 NDV에 대한 방어능을 산출함. <p>■ 제작된 IB-ND 혼합 생독백신에서 IB 바이러스에 대한 역가를 확인하기 위한 실험을 실시함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스를 증식시킨 장요막강액을 채취하여 IB 중화항체와 1:1비로 상온에서 한시간 반응함. - 반응 실시 후 10진법으로 단계 희석함. - 10일령 SPF 종란에 종란당 0.1 ml씩 장요막강 내에 접종함. - 접종 후 72시간에 장요막강액을 채취하여 Dot-Immunoblotting assay를 실시함. - 바이러스 함유량은 캐버 방법 (Karber method)을 이용하여

		<p>EID50/ml 값으로 계산함.</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 제작된 IB-ND 혼합 생독백신에서 ND 바이러스에 대한 역가를 확인하기 위한 실험을 실시함. <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스를 증식시킨 장요막강액을 채취하여 IB 중화항체와 1:1비로 상온에서 한시간 반응함. - 반응 실시 후 10진법으로 단계 희석함. - 10일령 SPF 종란에 종란당 0.1 ml씩 장요막강 내에 접종함. - 접종 후 72시간에 장요막강액을 채취하여 10% 닭 적혈구를 이용한 혈구응집반응을 통하여 바이러스 역가를 산출함. - 바이러스 함유량은 캐버 방법 (Karber method)을 이용하여 EID50/ml 값으로 계산함.
	<p>K2+L7 혼합 생독백신의 실험실 내 안전성 및 효능시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 백신의 안전성여부를 확인하기 위하여 SPF닭에 시험백신을 접종한 후 국립수의과학검역원 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거 안전시험을 실시함. <ul style="list-style-type: none"> - 각 바이러스에 감수성있는 3주령 닭 10수에 시험바이러스 10수씩을 접종함. - 14일동안 임상증상을 관찰함. - 90%이상의 닭이 건강하면 안전성이 확보된 것으로 판정함. ■ SPF닭에 시험백신을 접종한 후 항체생성능을 확인함. <ul style="list-style-type: none"> - 시험백신 1수분을 3주령 SPF 닭에 접종함. - 3주 후 혈액을 채취한 후 IBV에 대해 중화항체형성여부 확인을 위한 중화시험을 실시하고, NDV에 대해 혈구응집억제시험을 실시하여 면역원성을 평가함. ■ 백신의 효능을 확인하기 위하여 시험백신을 접종한 후 국립수의과학검역원 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거 효력 시험을 실시함. <ul style="list-style-type: none"> - 뉴캐슬 바이러스에 감수성이 있는 3주령의 닭에 IB-ND 혼합백신을 접종함. - 백신접종 2주 후, 공격접종용 바이러스를 마리당 105.0ELD50을 근육으로 공격접종함. - 공격접종 후 14일간 이상유무를 관찰함. - 무접종 대조군은 100% 폐사하고 시험군은 80%이상 건강할 경우 방어능이 확보된 것으로 판정함.
	<p>K2+L7 혼합생독백신 시제품 제작</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ K2+L7 혼합 생독백신의 국가검정 기준 시험에 대한 ND 바이러스 함량조절

		<ul style="list-style-type: none"> ■ K2+L7 혼합 생독백신의 국가검정 기준 시험에 대한 IB 바이러스 함량조절 ■ K2+L7 혼합 생독백신 시제품 제작 혼합비율 설정 ■ K2+L7 혼합 생독백신의 시제품 제작 및 역가확인시험
	K2+L7 혼합 생독백신 시제품의 안전성 시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ 국가검정기준에 의한 시제품의 안전성 시험 <ul style="list-style-type: none"> - 각 바이러스에 감수성이 있는 1주령 닭에 백신 시제품을 10수분을 음수 접종함 - 14일동안 임상증상을 관찰함 ■ 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 안전성 시험 <ul style="list-style-type: none"> - 각 바이러스에 감수성이 있는 1일령 닭에 백신 시제품을 1수분을 분무 접종함 - 14일동안 임상증상을 관찰함
	K2+L7 혼합 생독백신 시제품의 면역원성 시험 및 방어효능 시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ IB 바이러스에 대한 국가검정기준에 의한 시제품의 면역원성 및 방어능의 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 3주령의 닭에서의 음수 접종 시험 ■ ND 바이러스에 대한 국가검정기준에 의한 시제품의 면역원성 및 방어능의 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 6주령의 닭에서의 음수 접종 시험 ■ 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 IB 바이러스에 대한 면역원성 및 방어능의 평가 ■ 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 ND 바이러스에 대한 면역원성 및 방어능의 평가
	K2+L7 혼합 생독백신 시제품의 품목 허가 신청	<ul style="list-style-type: none"> ■ 국가 검정기준에 의거한 평가시험 및 1일령 닭에서의 확대 적용에 대한 평가결과를 바탕으로 농림축산검역본부에 제품 등록 신청
	K2+L7 혼합 생독백신 시제품의 야외농장 안전성 시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ 백신의 안전성시험을 3개 농장에서 1일령 병아리에 시험 백신을 분무 및 음수 투여함. <ul style="list-style-type: none"> - 임상 증상 관찰 - 증체를 측정
	K2+L7 혼합 생독백신 시제품의 야외농장 효능 시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ 백신의 면역원성을 시험하기 위하여 3개의 농장에서 1일령에 시험백신을 분무 및 음수 투여함. <ul style="list-style-type: none"> - 혈구응집억제반응을 통한 ND 바이러스의 항체검사 - 중화시험을 통한 IB 바이러스의 면역원성 검사 - 시험기간 중의 타질병으로 인한

		<p>간접여부 판별을 위한 질병 모니터링</p> <ul style="list-style-type: none"> - 혼합 생독백신의 바이러스 간 간접현상 조사 - 생산지수 산출
	K2+L7 혼합 생독백신의 제품등록 및 산업화	<ul style="list-style-type: none"> ■ K2+L7 혼합 생독백신의 제품 등록 완료 및 제품 판매 중
	K2+L7 혼합 생독백신의 해외 임상 시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ K2+L7 혼합 생독백신의 1일령에서의 면역원성 시험 ■ K2+L7 혼합 생독백신의 수출국 유행 IB주에 대한 방어효능 시험 ■ K2+L7 혼합 생독백신의 접종 경로에 따른 면역원성 시험 및 수출국 유행 IB에 대한 방어효능 시험 <ul style="list-style-type: none"> - 1일령에 분무 백신 후 2주령에 분무 또는 음수 경로로 백신 접종 후 면역원성 확인 - 2차 백신 접종 2주 후 수출국 유행 IB 공격접종 후 방어효능 확인 ■ K2+L7 혼합 생독백신의 접종 횟수에 따른 면역원성 시험 및 수출국 유행 IB에 대한 방어효능 시험 <ul style="list-style-type: none"> - 1일령에 분무 백신 후 2주령에 백신 접종의 유무에 따른 면역원성 차이 확인 - 4주령 닭에 수출국 유행 IB 공격접종 후 방어효능 확인

나. [1핵심 2세부] 신기술 융합 AI-ND-IB 혼합 사독백신 산업화 연구

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
신기술 융합 AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 산업화 연구		
<p>H9N2조류인플루엔자 Virus-like particle (VLP) 를 이용한 백신의 제작 및 면역원성, 안전성 및 방어능 시험</p>	<p>H9N2 VLP 단백질의 제작 및 검정</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 저병원성 H9N2형 조류인플루엔자 바이러스의 표면단백질을 발현하는 VLP 단백질 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 곤충세포 기반의 baculovirus 발현 system을 이용함 - HA단백질 과 M1단백질을 동시 발현하는 VLP 생산 ■ 생산된 VLP의 역가 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 생산한 VLP를 PBS에 2진법으로 단계 희석함. - Western blotting 을 통해 단백질 생성여부 확인 - 1% 닭 적혈구를 이용하여 혈구응집반응을 실시하여 HAU 역가 측정 - MW 컬럼으로 정제 후 단백질 함량 측정으로 VLP 역가 측정
	<p>H9N2 VLP 백신 제작 및 닭에서의 면역원성 및 방어능 시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 검정된 VLP를 이용한 오일백신 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 생산된 VLP를 농도별로 희석하여 ISA70 water-in-oil adjuvant 와 혼합함 - 혼합 후 점적법 등을 통해 emulsion 생성여부 확인 ■ SPF닭에 시험백신 실시 후 항체 생성능 확인 및 방어율 산정 <ul style="list-style-type: none"> - 시험백신 용량별로 SPF 닭에 접종하여 최소면역원성 시험을 실시함 - 3주 후 혈액을 채취한 후 혈구응집억제시험을 실시함 - 백신 3주 후 야외바이러스 공격 접종시험을 통해 방어율 산정
<p>H9N2 조류인플루엔자 수용성 활성형 단백질을 이용한 백신의 제작 및 면역원성평가 시험</p>	<p>H9 수용성 활성형 단백질의 제작 및 검정</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 수용성 활성형 AI(H9) 백신 생산 <ul style="list-style-type: none"> - Hemagglutinin 의 Globulin domain 중 면역원성이 높은 위치 선정 - RNA-binding protein fusion system을 이용하여 수용성 활성형 H9단백질을 생산 - 발현된 단백질을 Nickel affinity chromatography법을 이용해 정제

		<p>합</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 생산된 수용성 활성형 단백질의 확인 - Western blotting 을 통해 단백질 생성여부 확인
	H9 수용성 활성형 단백질 백신의 면역원성 평가시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ 검정된 수용성 활성형 단백질을 이용한 백신 제작 - 생산된 수용성 활성형 단백질을 농도별로 희석하여 polymer adjuvant와 혼합함 ■ 마우스에 시험백신 실시 후 항체 생성능 확인 및 안전성 평가 - 시험백신 용량별로 마우스에 3주간격으로 priming 과 boosting 을 실시하고 boosting 3주 후 혈청을 채취하여 ELISA 를 통해 생성된 항체가를 평가함
Adjuvant system 최적화 연구	최적의 혼합백신 제조를 위한 백신 제조방법 연구	<ul style="list-style-type: none"> ■ 최적의 adjuvant 선정 - Gel adjuvant를 이용한 면역보강 효과 검정 - Oil adjuvant를 이용한 면역보강 효과 검정 - 접종횟수별 면역보강효과 검정 - 최적의 adjuvant 사용 형태 판정
AI(H9 VLP)-ND-IB 혼합 사독백신 제작, 면역원성 및 방어능 평가	VLP 포함 AI(H9 VLP)+ND+IB 혼합 사독백신의 제작	<ul style="list-style-type: none"> ■ AI(H9)-ND-IB 백신의 제조 - 최소면역원성 시험에서 선정된 농도의 VLP (H9) 와 불활화된 ND, IB 항원을 ISA70 water-in-oil 면역보강제와 혼합함 - 혼합 후 점적법 등을 통해 emulsion 생성여부 확인
	VLP 포함 AI(H9 VLP)+ND+IB 혼합 사독백신의 면역원성 및 방어능 평가시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ SPF닭에 시험백신 실시 후 항체 생성능 확인 및 방어율 산정 - 백신 3주 후 혈액을 채취한 후 항체 역가를 평가함 - 백신 3주 후 야외바이러스 공격 접종시험을 통해 방어율을 산정함
저병원성 조류인플루엔자 (H9N2형) 불활화백신 백신주 교체 실험	기존백신주 A/chicken/Korea/01310/01 균주를 사용한 오일 사독백신의 교차 방어능 검정	<ul style="list-style-type: none"> ■ AI(H9) 백신의 제조 - 기존 백신주를 불활화 후 ISA70 water-in-oil 면역보강제와 혼합하여 백신을 제조함. ■ AI(H9) 백신의 교차방어능 평가 - 제작된 백신을 6주령 SPF 닭에 근육접종 한 후 최신분리주인 A/Korean native

		chicken/Korea/040110/10 (H9N2)를 사용한 방어능 평가시험을 진행함.
	AI(H9 VLP)를 포함하는 사독백신의 교차 방어능 검정	<ul style="list-style-type: none"> ■ AI(H9 VLP) 백신의 제조 <ul style="list-style-type: none"> - 기존 백신주 A/chicken/Korea/01310/01 의 HA 단백질을 발현시킨 H9 VLP 항원을 ISA70 water-in-oil 면역보강제와 혼합하여 백신을 제조함. ■ AI(H9) 백신의 교차방어능 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 제작된 백신을 6주령 SPF 닭에 근육접종 한 후 최신펠리주인 A/Korean native chicken/Korea/040110/10 (H9N2)를 사용한 방어능 평가시험을 진행함.
	AI(H9) 신규 백신주의 특성분석 및 교차 방어능 검정시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ 신규 백신균주의 특성분석 <ul style="list-style-type: none"> - 신규백신균주의 유전자증폭 및 국내 분리주들과의 상동성 분석 ■ 신규 백신균주를 사용한 불활화 백신제작 <ul style="list-style-type: none"> - 신규 백신주를 불활화하고 $10^{8.6}$EID₅₀/dose 의 항원양을 갖는 사독백신을 제작함 ■ 신규 백신균주를 사용한 불활화 백신의 교차면역원성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 제작된 백신을 6주령 SPF 닭에 근육접종 한 후 기존백신주 및 신규 백신주에 대한 교차방어능을 평가함
	저병원성 조류인플루엔자 불활화백신 백신주 교체 검토요청	<ul style="list-style-type: none"> ■ 본 사업단의 실험 결과를 바탕으로 농림수산검역본부로 저병원성 조류인플루엔자 불활화백신 백신주 교체 검토를 요청함
IB 신규 백신주 선발 실험	IB 신규 백신주 K40/09주의 유전자 분석을 통한 특성파악	<ul style="list-style-type: none"> ■ 신규백신주 S1 유전자의 recombination pattern 분석을 통한 특성파악
	IB 신규 백신주 K40/09주의 닭에서의 병원성 측정	<ul style="list-style-type: none"> ■ 1일령 및 6주령 SPF 닭을 사용한 IBV K40/09주의 병원성 및 조직침투성 평가
	IB 신규 백신주 K40/09주의 종란에서의 growth kinetics 측정 시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ 접종 역가별, 배양 기간별 바이러스 역가측정을 통한 growth kinetics 분석

	IB 신규 백신주 K40/09주의 교차 방어능 평가	<ul style="list-style-type: none"> ■ 국내,외 유행 IB 균주를 사용한 신규 백신주의 교차방어능 평가
	IB 신규 백신주 K40/09주를 이용하여 제작한 사독 오일백신의 최소면역원성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ■ IB 신규백신주를 사용한 사독백신의 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 신규백신주를 불활화 후 $10^{4.5}$, $10^{5.5}$, $10^{6.5}$, $10^{7.5}$EID50/dose 의 항원양을 갖는 사독백신을 제작함 ■ IB 신규백신주를 사용한 사독백신의 최소면역원성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 6주령 SPF 닭에 근육접종 후 혈청 내 중화항체를 평가함.
	DES투여 IBV 공격접종 모델을 이용한 K40/09 백신주의 교차방어능 평가	<ul style="list-style-type: none"> ■ DES투여 모델을 사용한 산란장기 발달유도 모델 개발 ■ 개발된 DES투여 모델을 사용한 산란장기에서의 IBV 교차방어능 평가
AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품 제작 및 실험실 내 효능 시험	AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> ■ 신규 IBV 백신주인 K40/09 주를 포함하는 AI(H9)-ND-IB 사독백신 시제품의 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 참여기업인 (주) 고려비엔피, (주) 대성미생물연구소, (주) 녹십자수의약품에서 시제품을 제작함
	AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 안전성 평가시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ 동물용의약품 국가검정기준을 통한 안전성 시험을 실시함
	AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 면역원성 및 방어능 평가시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ AI(H9)-ND-IB 사독백신 시제품의 NDV 공격접종에 대한 방어능 평가 ■ AI(H9)-ND-IB 사독백신 시제품의 IBV 에 대한 면역원성 평가 ■ AI(H9)-ND-IB 사독백신 시제품의 AIV에 대한 면역원성 및 방어능 평가
AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 국내 야외임상시험	AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 야외임상시험 승인	<ul style="list-style-type: none"> ■ 농림축산검역본부에 야외임상시험계획서 제출 ■ 보완요구사항 충족을 통한 야외임상시험 승인획득

	AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 야외임상시험 실시	<ul style="list-style-type: none"> ■ 산란계 농장 2곳, 육용종계농장 1곳에서 AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신의 야외임상시험을 실시함 (2013년 9월 예정)
신기술 융합 AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 산업화 연구		
고병원성 H5N1 조류인플루엔자 Virus-like particle (VLP) 를 이용한 백신의 제작 및 면역원성 및 방어능 시험	H5N1 VLP의 제작 및 검정	<ul style="list-style-type: none"> ■ 고병원성 H5N1형 조류인플루엔자 바이러스의 표면단백질을 발현하는 VLP 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 곤충세포 기반의 baculovirus 발현 system을 이용함 - HA, NA, M1 단백질을 동시 발현하는 VLP 생산 - 생산된 VLP의 역가 확인 - Western blotting 방법을 통해 단백질 생성여부 확인 - 생산한 VLP를 PBS에 2진법으로 단계 희석 후 1% 닭 적혈구를 이용하여 혈구응집반응을 실시하여 HAU 역가측정
	H5N1 VLP 백신 제작 및 SPF 닭에서의 면역원성 및 방어능 평가시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ 검정된 VLP를 이용한 오일백신 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 생산된 VLP를 농도별로 희석하여 ISA70 water-in-oil adjuvant 와 혼합함 - 혼합 후 점적법 등을 통해 emulsion 생성여부 확인 ■ SPF닭에 시험백신 실시 후 항체 생성능 확인 및 방어율 산정 <ul style="list-style-type: none"> - 시험백신 용량별로 SPF 닭에 접종하여 최소면역원성 시험을 실시함 - 2, 3주 후 혈액을 채취한 후 혈구응집억제시험을 실시함 - 백신 3주 후 고병원성 야외바이러스 공격접종시험을 통해 방어율 산정
고병원성 H5N1 조류인플루엔자 수용성 활성형 단백질을 이용한 백신의 제작, 면역원성 및 방어능 평가시험	H5 수용성 활성형 단백질의 제작 및 검정	<ul style="list-style-type: none"> ■ 수용성 활성형 AI(H5) 단백질 생산 <ul style="list-style-type: none"> - Hemagglutinin 의 Globulin domain 중 면역원성이 높은 위치 선정 - RNA-binding protein fusion system을 이용하여 수용성 및 활성형 H5 단백질을 생산 - 발현된 단백질을 Nickel affinity chromatography법을 이용해 정제함

		<ul style="list-style-type: none"> - 생산된 수용성 활성형 단백질의 확인 - Western blotting 을 통해 단백질 생성여부 확인 ■ 검정된 수용성 활성형 단백질을 이용한 백신 제작 - 생산된 수용성 활성형 단백질을 농도별로 희석하여 polymer adjuvant와 혼합함
	<p>H5 수용성 활성형 단백질 백신의 면역원성 및 방어능 평가시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 마우스에 시험백신 실시 후 항체 생성능 확인 및 안전성 평가 - 시험백신 용량별로 마우스에 3주간격으로 priming 과 boosting 을 실시하고 boosting 3주 후 혈청을 채취하여 ELISA 를 통해 생성된 항체가를 평가함 마우스에서 높은 병원성을 보이는 A/aquaticbird/Korea/W81/06 (H5N2) 균주의 공격접종을 통한 방어능의 평가
<p>역유전학 시스템을 이용하여 제작한 고병원성 H5N1 백신균주를 backbone 으로 한 불활화 백신의 제작 및 면역원성, 안전성 및 방어능 시험</p>	<p>저온 적응 생독 백신균주를 backbone 으로 한 H5N1 HPAI 재조합 바이러스 제작 및 검정</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 역 유전학 시스템을 이용하여 안전하게 증폭하여 백신 균주로 사용할 수 있는 재조합 인플루엔자 바이러스의 제작 - RNA Pol I -Pol II driven vector(pHW2000) 시스템을 사용하여 고병원성 인플루엔자의 특성을 없앤 재조합 바이러스를 제작함.
	<p>H5N1 HPAI 재조합 백신균주의 특성분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ H5N1 백신주의 종란 및 닭에서의 병원성 평가 ■ H5N1 백신주의 growth kinetics 측정 ■ H5N1 백신주를 사용하여 제작한 사독 오일백신의 최소면역원성 시험 ■ H5N1 백신주의 cross-clade HI 항체 형성능 평가
	<p>H5N1 HPAI 재조합 바이러스 사독백신의 제작 및 SPF닭에서의 면역원성 및 방어능 평가시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ AI(H5) 불활화 백신의 제조 - 불활화 한 H5N1 백신균주를 ISA70 water-in-oil 면역보강제와 혼합하여 백신을 제조함 ■ SPF닭에 시험백신 실시 후 항체 생성능 확인 및 방어율 산정 - 백신 3주 후 혈액을 채취한 후 혈구응집억제시험을 실시함

		- 백신 3주 후 야외바이러스 공격 접종시험을 통해 방어율 산정
AI(H5N1 VLP)+ND+IB 혼합 사독백신 제작, 면역원성 및 방어능 평가	AI(H5N1 VLP)+ND+IB 혼합 사독백신의 제작	<ul style="list-style-type: none"> ■ AI(H5N1 VLP)+ND+IB 혼합 사독백신의 제작 - 최소면역원성 시험에서 선정된 농도의 H5N1 VLP 와 불활화된 ND, IB 항원을 ISA70 water-in-oil 면역보강제와 혼합 - 혼합 후 점적법 등을 통해 emulsion 생성여부 확인
	AI(H5N1 VLP)+ND+IB 혼합 사독백신의 면역원성 및 방어능 평가시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ SPF닭에 시험백신 실시 후 항체 생성능 확인 및 방어율 산정 - 백신 3주 후 혈액을 채취한 후 혈청 내 항체역가를 평가함. - 백신 3주 후 야외바이러스 공격 접종시험을 통해 방어율을 산정함
역유전학 AI(H5N1)+ND+IB 혼합 사독백신 제작, 면역원성 및 방어능 평가	역유전학AI(H5N1)+ND+IB 혼합 사독백신의 제작	<ul style="list-style-type: none"> ■ AI(H5N1)+ND+IB 혼합 사독백신의 제작 - 최소면역원성 시험에서 선정된 농도의 불활화된 재조합 H5N1 바이러스, ND, IB 항원을 ISA70 water-in-oil 면역보강제와 혼합 - 혼합 후 점적법 등을 통해 emulsion 생성여부 확인
	역유전학AI(H5N1)+ND+IB 혼합 사독백신의 면역원성 및 방어능 평가시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ SPF닭에 시험백신 실시 후 항체 생성능 확인 및 방어율 산정 - 백신 3주 후 혈액을 채취한 후 혈청내 항체역가를 측정함 - 백신 3주 후 야외바이러스 공격 접종시험을 통해 방어율을 산정함
AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품 제작 및 실험실 내 효능시험	AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> ■ AI(H5)-ND-IB(K40/09) 사독백신의 시제품 제작 - 참여기업인 (주) 고려비엔피, (주)농심자수의약품, (주)대성미생물연구소, (주)중앙백신연구소에서 시제품을 제작함.
	AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 안전성 평가시험	■ 동물용의약품 국가검정기준을 통한 안전성 시험을 실시함
	AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 면역원성 및 방어효능 평가시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ AI(H5)-ND-IB 사독백신 시제품의 NDV 공격접종에 대한 방어능 평가 ■ AI(H5)-ND-IB 사독백신 시제품

		<p>의 IBV 에 대한 면역원성 평가</p> <p>■ AI(H5)-ND-IB 사독백신 시제품의 AIV에 대한 면역원성 및 방어능 평가</p>
AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 수출품목 허가 신청	농림축산검역본부 수출품목 허가신청	<p>■ 개발된 AI(H5)-ND-IB 사독백신의 수출품목 허가신청</p>

다. [1핵심 3세부] 신기술 융합 AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 임상 시험 연구

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
H5N1 HPAI의 닭 공격접종 모델 개발	SPF 닭을 이용한 Clade 2.2 바이러스 감염모델 개발을 위한 표준실험법 확립	<ul style="list-style-type: none"> ■ 접종경로별 감염모델 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 비강(intranasal) 경로를 통한 공격접종 모델확립 - 정맥(intravenous) 경로를 통한 공격접종 모델 확립 ■ 바이러스 배출경로별 감염모델 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 구강(oropharynx) 경로를 통한 공격접종 모델확립 - 총배설강(cloaca) 경로를 통한 공격접종 모델 확립
	SPF 닭을 이용한 Clade 2.3.2 바이러스 감염모델 개발을 위한 표준실험법 확립	<ul style="list-style-type: none"> ■ 접종경로별 감염모델 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 비강(intranasal) 경로를 통한 공격접종 모델확립 - 정맥(intravenous) 경로를 통한 공격접종 모델 확립 ■ 바이러스 배출경로별 감염모델 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 구강(oropharynx) 경로를 통한 공격접종 모델확립 - 총배설강(cloaca) 경로를 통한 공격접종 모델 확립
개발된 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 Clade 2.2 H5N1 바이러스 방어효능 시험	H5N1 HPAI clade 2.2 바이러스 감염모델 개발을 위한 표준실험법 확립	<ul style="list-style-type: none"> ■ 실험동물별 감염모델 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 오리 공격접종 모델확립 - 마우스 공격접종 모델확립 - 페렛 공격접종 모델확립
	개발된 AI(H5)+ND+IB 사독백신 시제품의 HPAI H5N1 clade 2.2 바이러스 방어효능 시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ Clade 2.2 바이러스 방어효능 시험 <ul style="list-style-type: none"> - 제조된 사독백신을 SPF 닭에 접종함 - 바이러스 감염 모델 시험법에 따라 바이러스를 공격접종함 - 공격접종 후 임상 증상 발현, 폐사율, 분변 및 구강 내 바이러스 배출 역가를 측정하여 백신의 방어 효능을 산정함
AI(H5)+ND+IB 사독백신의 Clade 2.3.2 H5N1 바이러스 방어효능 시험	H5N1 HPAI clade 2.3.2.1 바이러스 감염모델 개발을 위한 표준실험법 확립	<ul style="list-style-type: none"> ■ 실험동물별 감염모델 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 닭 공격접종 모델확립 - 오리 공격접종 모델확립 - 마우스 공격접종 모델확립

	<p>개발된 AI(H5)+ND+IB 사독백신 시제품의 HPAI H5N1 clade 2.3.2.1 바이러스 방어효능 시험</p>	<p>■ Clade 2.3.2.1 바이러스 방어효능 시험</p> <ul style="list-style-type: none"> - 제조된 사독백신을 SPF 닭에 접 종함 - 바이러스 감염 모델 시험법에 따 라 바이러스를 공격접종함 - 공격접종 후 임상 증상 발현, 폐 사육, 분변 및 구강 내 바이러스 배출 역가를 측정하여 백신의 방 어 효능을 산정함
--	--	---

라. [1핵심 4세부] 신기술 융합 가금질병 진단키트 개발 및 산업화 연구

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
가금질병 진단키트의 개발 및 실험실 내 효능 시험	IB 항원진단 Rapid 키트의 개발 및 실험실내 효능시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ IBV의 Nucleo protein recombinant 및 단클론 항체 생산 ■ 고감도의 IB 특이 항체를 선별하여 항원진단 Rapid kit를 개발 ■ IB 항원을 포함하는 양성 샘플을 확보하여 Rapid kit의 민감도 및 특이도를 평가
	IB 항체진단 ELISA 키트의 개발 및 실험실내 효능시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ IBV의 Nucleo protein recombinant 및 단클론 항체 생산 ■ 단클론 항체를 ELISA plate에 코팅 후 바이러스 배양액을 반응시켜 capture로 사용하고 anti-chicken IgY를 detector로 사용하여 ELISA kit를 개발 ■ IB 항체를 포함하는 양성 샘플을 확보 후 ELISA kit의 민감도 및 특이도 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 특이도 시험 실시 - 신장형 및 호흡기형 IBV 항혈청에 대한 검출 시험 실시 - 동일목적 비교시약(IDEXX)과 비교 평가
	AI-ND-IBV 항체진단 ELISA 키트의 개발 및 실험실내 효능시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ AIV, NDV, IBV 항원 생산 및 유효성 시험 <ul style="list-style-type: none"> - AIV NP 재조합단백질은 곤충세포에서 발현 및 정제하고, NDV, IBV 바이러스는 SPF 종란에 증식시켜 생산 조건을 설정함 - 표준혈청, 백신접종혈청을 사용하여 항체 검출능 및 항원 유효성을 확인함 ■ AI-ND-IBV 항체진단 ELISA 키트의 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 혈청희석배수, 희석용액, 반응시간, HRP conjugate 농도 등의 최적화 조건 설정 실험 실시 ■ 백신면역혈청을 이용하여 각 바이러스의 항체반전시기 및 HI역가와와의 상관관계 확인 실험 실시
	AIV 백신 항체 감별진단 키트의 개발 및 실험실내 효능 시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ AIV의 NS1 단백질의 cDNA 확보 후, 수용성 및 활성형 단백질 제조 기술을 이용하여 재조합 단백질 생산 ■ 개발된 NS1 재조합 단백질을 면역하여 단클론 항체 생산 ■ ELISA plate에 NS1 단백질을 코팅하여 capture로 사용하고 anti-chicken IgY를 detector로 사용하여 ELISA kit 개발 ■ 야외 바이러스 감염개체의 검체와 백신접종 개체의 검체 확보하여 감별진단 성능 평가

	<p>IB 항원진단 Rapid 키트의 시제품 제작 및 야외 임상시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ IB 항원진단 Rapid 키트의 시제품 제작하고 임상평가 및 국내등록에 활용 ■ 외부기관(바이엘임상병리실)에 의뢰하여 성능평가 실시 <ul style="list-style-type: none"> - 유사질병감별 특이도 시험 실시 - 개체별 민감도 시험 실시 - 기관, 신장, 분변에서 검체별 민감도 측정 - 개체별 특이도 시험 실시 - 기관, 신장, 분변에서 검체별 특이도 측정
	<p>IB 항체진단 ELISA 키트의 시제품 제작 및 야외 임상시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ IB 항체진단 ELISA 키트의 시제품 제작을 완료하고 임상평가 및 국내등록에 활용 ■ 외부 평가기관(삼화)에 의뢰하여 야외 임상시험 실시 <ul style="list-style-type: none"> - 두 농장 5계군 대상 신장형 백신 개체에 대한 평가 실시
<p>가금질병 진단키트의 시제품 제작 및 국내 임상 시험</p>	<p>AI-ND-IBV IB 항체진단 ELISA 키트의 시제품 제작 및 야외 임상시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ AI-ND-IBV 항체진단 ELISA 키트의 시제품을 제작하고 임상평가 및 국내등록에 활용 ■ 야외임상시험을 통한 민감도 측정 <ul style="list-style-type: none"> - 상용백신 접종 계군에서 민감도 평가 - 야외 저병원성 인플루엔자 백신 접종 종계군의 초생추 그룹에서 민감도 평가 - 야외 산란계 항체 양성 계군 혈청에서의 민감도 검사 ■ 야외임상시험을 통한 특이도 측정 <ul style="list-style-type: none"> - 야외 항체음성 초생추 계군에서 특이도 검사 - 야외 항체음성 육계 계군에서 특이도 검사 - 야외 항체음성 산란계 계군에서 특이도 검사 - 판정기준 설정시험(TG-ROC) - 안정성 시험: 가혹조건(37℃)에서의 안정성을 조사하여 유효기간 설정 ■ 재현성 시험 ■ 신장형 IBV 보완실험 (제조합 NP (nucleoprotein) 이용 및 평가)
	<p>AIV 백신 항체 감별진단 키트의 시제품 제작 및 야외 임상시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ AIV NS1 antibody에 대한 AIV 백신 항체 감별진단 키트의 시제품을 제작하여 임상평가에 활용함 ■ AIV NS1 Ab ELISA 키트의 국내 임상시험 <ul style="list-style-type: none"> - AIV 백신 접종 전/후의 특이도 시험 - 무작위 검체의 특이도 시험 - 주령별 닭혈청의 특이도 시험 - SPF 닭의 주령별 challenge 후 혈청을 이용한 키트 성능 시험
<p>가금질병 진단키트 시제품의 품목 허가 신청 및 산업화 연구</p>	<p>IB 항원진단 Rapid 키트 시제품의 품목 허가 신청 및 산업화</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 키트 개발, 시제품 제작 및 국내 임상 시험 완료 ■ 국내 품목 허가 완료 (농림축산검역본부 허가번호: 133-46) ■ 키트 산업화 완료 및 국내외 매출 발생 (한국, 멕시코, 요르단, 이라크, 인도 등)

	<p>IB 항체진단 ELISA 키트 시제품의 품목 허가 신청 및 산업화</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 키트 개발, 시제품 제작 및 국내 임상 시험 완료 ■ 국내 품목 허가 완료 (농림축산검역본부 허가번호: 133-47) ■ 키트 산업화 완료 및 국내외 매출 발생 (한국, 두바이)
	<p>AI-ND-IBV 항체진단 ELISA 키트 시제품의 품목 허가 신청 및 산업화</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 키트 개발, 시제품 제작 및 국내 임상 시험 완료 ■ 국내 품목 허가 완료 (농림축산검역본부 허가번호 : 107-020) ■ 키트 산업화 완료 ■ 수출국 선정 및 바이어 발굴하여 해외 인허가 신청·접수 진행 중 - 인도네시아의 품목허가 관련 서류에 대한 공증을 완료하고, 현지의 PT-Blue-Sky사를 통해 해당국에 신청·접수를 진행하고 있음

마. [2핵심 1세부] 신기술 융합 PRRS 사독백신의 시제품 제작 및 국내 임상시험

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
PRRS 사독백신의 시제품 제작	수용성/활성형 GP5 단백질 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> ■ 수용성 GP5 단백질의 발현. - 대장균에서 외부단백질을 수용성/활성형 단백질 형태로 발현시킬 수 있는 RNA-binding protein fusion system을 이용하여 PRRSV의 GP5 단백질을 수용성 형태로 생산. - Western blot을 이용하여 수용성 GP5 단백질을 확인한 후 칼럼을 사용하여 정제. - adjuvant IMS1313과 혼합하여 시제품으로 제작.
	DNA 백신 시제품의 제작	<ul style="list-style-type: none"> ■ GP5를 포함하는 벡터의 제작 - 유전자 백신 시스템 (pFB-HERV-GP5)에 PRRSV의 GP5단백질을 코딩하는 ORF5유전자를 삽입시켜 유전자 백신 플라스미드를 제작. - GP5를 돼지세포에서 발현시킬 수 있는 재조합 baculovirus system인 AcHERV-GP5를 제작. - 돼지 세포에 제작된 플라스미드를 transfection시킨 후 GP5의 발현을 형광항체법으로 확인. - 1×10^8 PFU/ml의 플라스미드를 백신 시제품으로 제작.
	PRRSV의 GP5와 M단백질을 발현하는 VLP 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> ■ VLP-GP5-M의 제작. - baculovirus system을 이용하여 PRRSV의 GP5와 M 단백질을 동시에 발현시키는 VLP를 제작. - VLP-GP5-M을 곤충세포에서 대량생산 후, sucrose gradient에서 초원심분리하여 정제. - PRRSV의 GP5-M 단백질 발현을 western blot으로 확인. - adjuvant IMS 1313과 혼합하여 시제품으로 제작.
	PRRSV의 infectious clone system을 이용하여, ORF5 유전자가 조작된 변형바이러스의 제작 및 그 바이러스를 이용한 사독백신 시제품의 제작	<ul style="list-style-type: none"> ■ 미국 공동연구자(University of Nebraska-Lincoln)로부터 제공 받은 PRRSV infectious clone (pFL12)를 이용하여 wild-type virus를 작출. - 중화 항체 형성 epitope이 위치하고 있는 GP5 단백질 부위의 N-glycosylation site를 site-direct mutagenesis법으로 deglycosylation하여 mutant plasmid를 제작함. - 제작된 mutant plasmid를 in

		<p>in vitro transcription을 통해 RNA로 변환한 후 MARC145 cell에 transfection하여 mutant virus를 작출.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 작출된 바이러스는 농축한 후 BEI법으로 불활화시켜 변형바이러스 사독백신 시제품으로 제작. - adjuvant IMS 1313과 혼합하여 시제품으로 제작.
	<p>국내분리주의 중화항체 형성 epitope을 포함한 chimeric virus를 제작 및 그 바이러스를 이용한 사독백신 시제품의 제작</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 한국에서 분리한 PRRSV의 ORF5의 변이성 분석과 infectious clone에서 ORF5 유전자의 치환. - 국내분리주 중 우위를 차지하는 LMY strain의 구조단백질 부분 (ORF2-ORF7)을 pFL12 infectious clone에 치환하여 chimeric infectious clone 제작 - ORF5 유전자를 site-direct mutagenesis법으로 mutant infectious clone 제작 - MARC145 cell에서 LMY chimeric wild type virus 및 mutant virus의 작출 - 작출된 바이러스는 농축한 후, BEI법으로 불활화시켜 사독백신 시제품으로 제작. - adjuvant IMS 1313과 혼합하여 시제품으로 제작.
PRRS 사독백신 시제품의 효능 평가 시험	<p>수용성/활성형 GP5 단백질 효능 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 수용성 GP5 단백질의 면역원성 확인. - 9마리의 마우스를 2개의 시험군으로 설정하고, 각 시험군에 수용성 단백질을 오일 adjuvant에 섞은 후 100ug씩 복강에 접종. - 2주 후에 동일한 항원양을 피하경로로 추가접종을 실시함. - 4주 후에 채혈하여 PRRSV에 대한 중화항체를 측정.
	<p>DNA 백신 시제품 효능 평가 시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ DNA 백신의 면역원성 시험 - DNA 백신용 플라스미드 1×10^8 PFU/ml함량을 자돈의 근육에 접종. - 2주, 4주 후에 동일한 방법으로 백신을 추가 접종. - 5주 후에 채혈하여 혈중 PRRSV에 대한 중화항체를 측정.
	<p>PRRSV의 GP5와 M단백질을 포함하는 VLP 시제품 효능 평가 시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ VLP-GP5-M 백신의 면역원성 확인. - 12마리의 마우스를 2개 시험군으로 선정하고, VLP는 adjuvant에 혼합한 후 10^8PFU를 복강에 접종. - 2주, 4주 후에 추가 접종하여, 총 3차 면역을 실시.. - 6주 후에 채혈하여 PRRSV에 대한 중화항체를 측정.

	<p>Infectious clone을 이용한 mutant virus (FL12) 사독백신의 효능 평가 시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ PRRSV infectious clone (pFL12)으로부터 작출된 wild type virus와 mutant virus의 면역원성 시험. - 4주령의 자돈에 제작한 사독백신을 근육으로 접종. - 3주 후에 동일한 방법으로 추가 접종을 실시. - 6주, 7주 후에 채혈하여 혈중 PRRSV에 대한 중화항체를 측정.
	<p>국내분리주의 중화항체 형성 epitope을 포함한 chimeric virus를 이용한 사독백신 효능 평가 시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Chimeric PRRSV의 병원성 측정 평가. - 4주령의 자돈에 제작한 chimeric PRRSV를 근육에 접종. - 7일간 임상 증상 및 혈청 내 viremia를 측정. ■ Chimeric PRRSV 사독백신의 안전성 측정 평가. - 8마리의 마우스 복강에 0.5ml을 접종한 후 7일간 임상증상 관찰. - 2마리의 기니피크에 근육으로, 2마리의 기니피크에 복강으로 2ml씩 접종한 후 7일간 임상증상 관찰. - 4주령 자돈에 근육 접종한 후 임상 증상 및 백신의 부작용 관찰. ■ Chimeric PRRSV 사독백신의 최소면역원성 시험. - 4주령의 자돈에 제작한 chimeric virus 사독백신을 각각 10^8, 10^7, 10^6 TCID₅₀/ml씩 근육에 접종. - 3주 후에 동일한 방법으로 추가 접종을 실시. - 6주, 7주 후에 채혈하여 혈중 PRRSV에 대한 중화항체를 측정.
	<p>PRRS 백신의 효능을 증진시키는 신규 adjuvant 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 신규 adjuvant의 효능 분석시험. - 4주령의 자돈에 시판되는 PRRSV 생독백신 및 사독백신을 신규 adjuvant와 혼합하여 근육에 접종. - 매주 채혈하여 혈중 PRRSV에 대한 중화항체를 측정.
<p>야외 임상시험 및 시제품의 품목 허가 신청</p>	<p>시제품의 품목 허가 신청</p>	<p>- 시제품의 품목 허가 신청</p>
	<p>야외 임상시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 야외 임상시험. - 국내 농장 상황에 따라 크게 세 가지로 나누어 PRRSV가 없는 곳, 안정화된 곳, 생독백신을 시행하는 곳의 세 농장을 선정. - 4주령의 자돈에 제작한 백신 중 효과가 입증된 chimeric PRRSV 사독백신을 근육에 접종. - 3주 후에 동일한 방법으로 추가 접종을 실시. - 국가 검정기준일에 채혈하여 혈

		중 PRRSV에 대한 중화항체가를 측정.
--	--	------------------------

바. [2핵심 2세부] 신기술 융합 면역거세백신 및 진단키트 산업화 연구

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
GnRH 면역 거세 백신 시제품 제작	면역거세 백신의 대량배양 방법 확립	<ul style="list-style-type: none"> ■ STF2-GnRH recombinant protein을 E.coli 에서 발현하여 Ni-NTA resin을 이용하여 정제함. - 정제한 단백질 2mg/ml과 수산화 알루미늄 겔을 10mg/ml 로 넣어서 교반하였음. - 멸균된 소분용기에 무균실에서 분주한 후 캡핑 하였음.
GnRH 면역 거세 백신 시제품의 실험실내 효능 시험	면역 거세 백신 시제품을 랫트 에 적용 후 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> ■ 랫트에서 면역거세 백신 시제품의 최소 농도 확인을 위하여 실험을 실시함. - 총 24마리의 6주령 male Spraque Dawley (SD) rat 으로 6 마리씩 4개의 그룹으로 구성함. - 그룹 1은 아무것도 접종하지 않은 control 그룹이고 그룹 2는 면역 거세 백신 시제품 10ug을 접종한 그룹, 그룹 3은 50ug을 접종한 그룹, 그룹 4는 100ug을 접종한 그룹임. - 백신의 접종은 7주령의 랫트에 1차 접종을 실시하고 2주 간격으로 세 번의 추가 접종을 실시함. - 모든 그룹의 랫트는 접종 전에 미정맥에서 채혈을 하고 마지막 백신접종 2주 후 안락사 하기 전에 복대정맥에서 채혈을 실시함. - 채혈한 혈액은 혈청 분리를 실시하여 추후 ELISA를 이용한 GnRH 항체 검사에 사용함. - 안락사를 실시한 후 고환 및 부고환을 절제하여 무게와 크기를 측정하고 포르말린에 조직을 고정하여 조직 검사를 실시함.
	면역 거세 백신 시제품을 돼지에 적용 후 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> ■ 돼지에서의 면역 거세 백신의 효능을 확인하기 위한 실험을 실시함. 1. 총 21마리의 돼지로 7마리씩 3그룹으로 구성함. 그룹 1은 외과적 거세 그룹이고 그룹 2는 아무것도 접종하지 않고

		<p>백신도 하지 않은 control 그룹이며 그룹 3은 면역거세 백신 시제품을 주사한 그룹임.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 백신 접종은 도축 8주전 1차 접종을 실시하고 도축 4주전 2차접종을 실시함. - 모든 그룹의 돼지에서 접종전 도축전 채혈을 실시하고 testosterone 수치를 측정함. - 고환 및 부고환의 무게를 측정하고 포르말린에 고환조직을 고정하여 조직검사를 실시함. <p>2. 총 105마리의 돼지로 35마리씩 3그룹으로 나누었으며 한 그룹당 거세그룹 5마리, 비거세 그룹 5마리, 비거세 및 백신 그룹 25마리로 구성됨.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 돼지의 성성숙과 anti-GnRH 항체생성을 위한 백신 접종은 시기가 중요하다. - 따라서 다음 개체의 수를 늘리고 기간을 앞당겨 3주령의 돼지에 앞서 실험한 GnRH 면역 백신을 접종함. - 3주령에 1차접종을 하고 4주후에 2차접종을 함 - 모든 그룹의 돼지에서 접종전 도축전 채혈을 실시하고, anti-GnRH에 대한 항체와 testosterone 수치를 측정함 - 고환 및 부고환의 무게를 측정하여 성성숙의 정도를 평가함.
	<p>실험동물 및 돼지에서의 STF2-GnRH 백신 시제품의 안전성 확인 실험</p>	<ul style="list-style-type: none"> - STF2-GnRH vaccine 의 안전성 시험을 위해서 마우스, 기니픽, 자돈에서 안전성 시험 및 토끼에서 파이로젠 시험을 실시한 결과 이상 없음이 확인 되어 안전성을 확인 할 수 있었음.
<p>GnRH 면역 거세 백신 시제품의 품목 허가 신청</p>	<p>STF2-GnRH 백신 시제품의 품목 허가 신청</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 시제품의 품목 허가를 위하여 농림축산검역본부에 야외임상시험 계획서 제출

<p>GnRH 항체 검사 ELISA 키트 시제품 제작 및 국내 임상시험</p>	<p>GnRH 항체진단 ELISA 시제품의 용법 및 용량에 따라 시험하여 성능을 평가</p>	<p>■ GnRH 항체진단 ELISA 시제품의 용법 및 용량에 따라</p> <ul style="list-style-type: none"> - 민감도 시험 - 특이도 시험 - 판정기준설정 시험(TG-ROC) - 재현성 시험 - 안정성 시험 등을 수행
<p>GnRH 항체 검사 ELISA 키트 시제품의 품목 허가 신청</p>	<p>GnRH 항체진단 ELISA 키트의 국내인허가자료 작성 및 신청</p>	<p>■ GnRH 항체진단 ELISA 키트의 성능평가자료를 바탕으로 농림축산검역본부의 인허가 규격에 따라 인허가 자료를 작성</p>

사. [2핵심 3세부] 국내 분리주 이용 돼지 증식성 회장염 생독백신 개발 및 산업화 연구

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
회장염 약독화 생독백신 시제품의 제작	Lawsonia intracellularis의 백신주 확립	<ul style="list-style-type: none"> ■ 돼지 증식성 회장염 원인균 (<i>Lawsonia intracellularis</i>) 를 McCoy 세포에서 증식시키는 기법 확립. - <i>L. intracellularis</i> 종균을 세포에 1:3의 비율로 접종. - 접종 후 5일째에 세포를 수거하여 세포내에서 증식한 <i>L. intracellularis</i>를 세포로부터 분리하여 세균 수거. ■ <i>L. intracellularis</i>의 약독화. - 100번의 연속 계대배양을 통하여 약독화 시킨 후 백신후보주로 선발.
회장염 약독화 생독백신 시제품의 효능 평가	닭에서의 효능 평가 시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ SPF 닭을 이용한 면역원성 시험 - 약독화된 백신주를 SPF 닭에 접종한 후 항체생성능 측정.
	마우스에서의 효능 평가 시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ IFN-γ knockout 마우스를 이용한 면역원성 시험. - 야외분리주와 약독화 생독백신주를 IFN-γ knockout 마우스에 접종하고 분변으로 배출여부를 PCR로 확인.
	햄스터에서의 효능 평가 시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ Golden syrian hamster를 이용한 면역원성 시험. - 3주령의 golden syrian hamster에 야외분리주와 약독화 생독백신주를 구강으로 접종하고 체중 측정 및 분변에서 세균의 shedding을 PCR법으로 분석. - 시험 종료 시 부검을 실시하여 회장 부위의 병변 확인.
	목적동물 (돼지)에서의 백신 효능 평가 시험	<ul style="list-style-type: none"> ■ 목적동물(돼지)을 이용한 면역원성 및 안전성 평가 시험. - 회장염에 감염되지 않은 5주령 돼지를 이용하여 약독화 생독백신주를 경구접종. - 백신접종 후 임상증상(설사, 피모조강, 위축, 활력) 관찰 및 분변 채취. - 기간별로 분변 PCR 및 항체가 측정을 위한 ELISA 실시. - 백신접종 후 생성된 항체 중 중화항체를 측정하기 위한 중화시험 실시. ■ 방어능 시험을 위한 질병 모델

		<p>확립 평가.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 회장염에 감염되지 않은 5주령 돼지를 이용하여 야외분리주를 세균수에 따라 $10^8/ml$과 $10^6/ml$로 시험군을 나누어 경구접종. - 백신접종 후 임상증상(설사, 피모조강, 위축, 활력) 관찰 및 체중 변화 측정. - 분변 상태에 따른 분변 지수 측정 및 기간별로 분변에서 세균의 shedding을 PCR법으로 분석. - 부검을 통하여 회장부위의 병변 유무 확인 및 조직학적 분석.
산업화 및 시제품의 품목 허가 신청	산업화 공정 최적화	■ 대량 배양 조건 확립
	시제품의 품목 허가 신청	■ 시제품의 품목 허가 신청

2. 연구개발수행 결과

가. [1핵심 1세부] 신장형 IB K2주 이용 IB-ND 혼합 생독백신 개발 및 산업화 연구

< 1핵심 1세부과제 : 신장형 IB K2주 이용 IB-ND 혼합 생독백신 개발 및 산업화 연구 >

개발 배경

전염성기관지염 (Infectious bronchitis; IB)은 IB 바이러스 (IBV)에 의해서 발생하는 전파력이 매우 빠른 닭의 급성 전염병이다. IB는 감염 시 폐사율은 높지 않으나 이환율이 높고 기침, 콧물, 증체율 저하, 외부 및 내부 난질저하를 동반하는 산란율 저하를 유발 할 뿐만 아니라 호흡기 후유증으로 대장균증이 수반되어 만성 폐사가 지속되는 등 매우 다양한 생산성 저하를 유발하여 전세계적으로 양계산업에 막대한 경제적 피해를 입히고 있다. 현재 전 세계적으로 매우 다양한 혈청형의 IBV들이 분리 보고되고 있으며, 이들 각 혈청형에서 변이된 변이형 바이러스까지 포함하면 그 종류는 수십 종에 이를 것으로 추정되고 있다. 다양한 혈청형만큼이나 바이러스의 감수성 장기 및 병원성이 다양하며 지역별 및 국가별로 유행하는 혈청형이 서로 다른 것 또한 특징이다. 그리고 이들 혈청형들 간에는 상호 교차 반응이나 교차 면역이 잘되지 않아 질병의 예방과 통제에 많은 어려움을 초래하고 있다. 따라서 각 국가별로 그 나라에서 가장 유행하거나 피해가 큰 IB 바이러스 혈청형을 이용하여 백신주를 개발하여 사용할 수 밖에 없으며, 국내의 경우 호흡기형 Massachusettes (Mass)타입의 생독백신과 국내에서 유행하는 바이러스 중 가장 병원성이 강하고 방어력과 방어범위가 높은 바이러스를 선발하여 사독백신주를 사용해 왔으나, 사독백신으로 산란저하의 피해는 감소시킬 수 있지만 Mass 타입 생독 백신만으로는 신장형 IBV 감염으로 인한 직접적인 호흡기도 손상 및 복막염 피해는 예방하기 힘들다. 따라서 국내 육계농장에 적용 가능한 효과적인 생독백신의 개발이 절하고, 산란계나 종계 역시 사독백신 접종만으로 부족한 호흡기 방어능을 보완하기 위해 국내 유행주를 이용한 생독백신이 필요한 실정이다.

뉴캐슬병 (Newcastle disease; ND)은 가금에서 치명적이고 전염성이 강한 제 1종 가축전염병 및 OIE 지정 notifiable disease로 백신을 접종하지 않은 닭에 감염될 때는 100% 폐사율을 초래하며, 적절한 백신을 하지 않는 경우 호흡기 및 소화기 증상과 산란계에서 산란율 저하로 경제적인 피해를 일으키는 치명적인 질병이다. 뉴캐슬병 예방 백신은 생독백신과 사독백신으로 구분되어 다양하게 사용되고 있으며 생독백신은 백신주로 사용하는 바이러스의 잔여독력에 따라 크게 중간독주 (mesogenic strain), 약독주 (lentogenic strain), 비병원성주 (apathogenic strain) 등으로 분류할 수 있다. 약독주중 B1주와 LaSota주 (Clone30주 포함)는 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 가장 널리 사용되어 온 대표적인 뉴캐슬병 생백신주이며 접종 시 주로 닭의 호흡기도에서 증식되는 특성 때문에 백신접종 후 어느 정도의 백신접종반응을 유발하는 것으로 알려져 있다. 반면, 소화기 점막에서 주로 증식되는 호흡기 비병원성 (장친화성) 백신주인 V4주, Ulster 2c(NDW)주 및 VG/GA주 (예비뉴) 등을 이용한 각종 생독백신들은 접종 시 백신접종반응이 거의 없어 1일령 병아리에게 분무 백신으로 적용할 수 있다. 그러나 상대적으로 B1주 등 약독주들에 비하여 백신접종효능이 다소 떨어지는 단점이 있는 것으로 평가되고 있다. 특히 한국에서 유행하고 있는 유전자형 VII형에 속하는 내장친화성 강독 뉴캐슬병 바이러스는 보편적으로 사용되던 유전자형 I형에 속하는 백신주 (LaSota) 및 유전자 II형의 백신주 (V4, VG/GA)기반의 사독백신으로 완벽한 방어가 되지 않아 뉴캐슬병이 전국에서 빈번하게 발생하고 있는 실정이며 이에 대한 대책마련이 시급하다.

현재 전 세계에서 다양한 종류의 IB 생독백신이 널리 사용되며 백신의 종류에 따라 다르지만 주로 음수 혹은 분무 접종을 통해 이루어진다. 특히, 분무접종의 경우 대량 접종의 용이성 때문에 널리 이용되며 접종의 편리성 때문에 1일령 병아리에게 분무접종 하는 것도 일반적이다. 이 때, 뉴캐슬병 바이러스 (Newcastle disease virus, NDV) 생독백신과 동시에 접종한다면 백신 접종 횟수를 최소화 하게 되어 여러 가지 측면에서 효과적이다. 그러나 IBV와 NDV 사이에는 서로 간에 면역형성을 방해하는 '간섭현상'이 존재하여 호흡기 상피세포에서 경쟁적으로 감염될 경우 증식속도가 빠른 IBV가 우선

적으로 증식한다고 알려져 있다. 따라서 이 두 바이러스의 간접현상을 최소화하는 농도로 제조된 합제 백신을 사용하는 것이 바람직하며 합제 백신의 사용이 불가능할 경우 두 바이러스의 접종 일자에 차이를 두는 것이 권장된다.

전년도 연구결과에 따르면 IBV K2백신주와 ND K148주, LaSota주와 L주는 실험실 내 안전성 및 효능시험 결과에서 안전하고, 방어효능이 뛰어난 것을 확인하였다. 그리고 IBV K2 백신주 $10^{3.3}$ EID₅₀ 농도와 NDV 백신주는 $10^{5.5}$ EID₅₀ 농도에서 서로간의 간접현상 없이 면역원성 및 방어효능이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

가. IB K2주의 안전성 및 방어효능시험

1. IB K2의 종란 계대 및 증식시험

- ▶ IB K2 백신주의 종란에서의 생산량을 확인하기 위하여 SPF 종란의 장요막강 내에 0.1ml 접종하고, 접종 후 72시간에 장요막강액을 채취하여 SPF 종란 50%를 감염시킬 수 있는 (EID₅₀/ml) 바이러스 역가를 Dot-Immunoblotting assay를 통해 확인하였다. 이를 3회 반복 실험하여 증식된 IBV K2주의 평균역가를 측정하였다. 실험결과 IBV K2 백신주는 SPF 종란에서 평균 $10^{7.5}$ EID₅₀/ml 역가로 증식됨을 확인하였다.



[그림-1] 증식된 IBV K2백신주의 Dot-Immunoblotting assay를 통한 역가 확인 시험

2. IB K2주의 안전성 및 방어효능시험

(1) IB K2 백신주의 SPF 병아리에서의 안전성 시험

- ▶ IB K2 백신주를 1일령의 SPF 병아리에 점안접종하여 (104.5 EID₅₀/수) 호흡기형 국내 분리주 (K71/01) 및 국내에서 상용하고 있는 생독 백신주 (H120 및 Ma5)와 안전성을 비교하였다. 시험 방법은 총 120수의 1일령 SPF 병아리를 20수씩 6개의 그룹으로 구분한 다음 K2 백신주 및 비교 바이러스 4종(기원주 K2/01 CE7, 호흡기 친화성 야외 분리주 K71/01 그리고 상용화 백신 H120 및 Ma5)을 각각 점안으로 104.5 EID₅₀/수의 농도로 접종하였다. 접종 후 14일간 호흡기 증상, 폐사율 등의 임상증상을 관찰하고 7일째 되는 날 그룹별 10수씩의 닭으로부터 기도, 폐, 맹장편도, 신장 그리고 F낭을 적출하여 접종한 바이러스의 조직 내 증식 여부를 판정하였다. 또한 바이러스 접종 14일 후, 남아있는 그룹별 10수씩의 닭으로부터 기도와 신장을 적출하여 10% 중성 포르말린에 고정하고 Hematoxylin & Eosin 염색 후 조직병변을 관찰하였다.

① 임상증상 발현

- ▶ 실험결과 K2 백신주의 기원주(K2/01 CE7)는 30% 가량의 병아리에서 호흡곤란, 기침과 같은

호흡기 증상과 신장염 및 요산침착을 유발하였고, 30%의 폐사율을 나타내었다. 반면, K2백신주 (K2/01 CE170)는 기침과 폐사와 같은 임상증상을 유발하지 않아 완전히 약독화 되었음을 알 수 있었다.

표-1. 1일령 SPF 병아리에서 K2 백신 접종에 의한 임상증상 및 부검소견

바이러스 ^A	수수	폐사율 (%)	호흡기 증상	신장염 및 요산 침착
K2/01 CE7	10	30	++ ^B	++ ^C
K2/01 CE170	10	0	-	-
비접종 대조	10	0	-	-

^A 1일령 SPF 닭에 10^{4.5}EID₅₀ 농도의 바이러스를 점안으로 접종함.

^B ++: 호흡곤란은 없으나 30% 이상의 닭에서 기침 증상이 관찰되는 경우, -: 기침 증상이 관찰되지 않음

^C 폐사한 병아리에서 관찰되는 부검 소견으로써 ++는 중증도의 신장염을 의미함.

② 조직 침투능

▶ K2 백신주의 기원주는 (K2/01 CE7) 병아리의 기관, 폐, 신장 외에도 맹장편도와 F낭과 같은 면역장기에서 높은 수준으로 재분리되어 30%에 이르는 폐사율과 더불어 국내 신장형 바이러스의 높은 병원성을 증명하였다. 그러나 약독화된 K2 백신주는 기관과 폐를 제외한 나머지 장기에서의 증식이 확인되지 않았고 국내에 유행하는 호흡기형 바이러스 (K71/01)의 제한적인 호흡기내 증식 결과와도 일치하였다. 따라서 K2/01 기원주는 170회의 순화과정을 통하여 신장형 바이러스의 병원성을 상실하였음을 알 수 있었다.

표-2. 1일령 SPF 닭에서 K2 백신의 장기별 조직 침투능 관찰 결과

바이러스 ^A	바이러스 재분리 결과 ^B				
	기도	폐	맹장편도	신장	F 낭
K2/01 CE7	10/10	9/10	8/10	8/10	10/10
K2/01 CE170	8/10	3/10	1/10	0/10	0/10
K71/01 CE6	6/10	0/10	1/10	0/10	1/10
비접종 대조	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

^A 1일령 SPF 닭에 10^{4.5}EID₅₀ 농도의 바이러스를 점안으로 접종함.

^B 공격접종 7일 후, 그룹별 10수의 닭을 안락사하여 기도, 폐, 맹장편도, 신장, F낭을 채취하고 각 장기 유제액을 9-10일령의 계 대아란에 접종하는 방법으로 공격접종 바이러스를 재분리함. 표현된 수치는 '바이러스 양성 병아리의 수/바이러스 접종 병아리 수'를 의미함.

③ 조직학적 병변

▶ K2 백신주의 기원주(K2/01 CE7)는 닭 기도에서 중증도의 점막 소실과 변성을 유도하고 신장의 실질 조직 내 림프구 침윤과 세뇨관 신증을 유발하여 기도와 신장 모두에서 비접종 대조군 (0.2 및 0.45)에 비하여 높은 수준의 (1.32 및 1.25) 조직 병변 지수를 나타내었다. 그러나 약독화된 K2 백신주의 조직 병변 지수는 안전성이 입증된 2종의 상용화 백신이 나타내는 병변 지수와 유의성 있는 차이를 나타내지 않아 조직 침투능 결과와 마찬가지로 K2 백신주의 안전성을 입증하였다.

표-3. 1일령 SPF 병아리에서 K2 백신 접종에 의한 기도 및 신장의 조직학적 병변비교

바이러스 ^A	평균 조직학적 병변 지수 ^B	
	기도	신장
K2/01 CE7	1.32 ^C	1.25
K2/01 CE170	0.72	0.4
Ma5	0.56	0.35
H120	0.52	0.65
비접종 대조	0.2	0.45

^A 1일령 SPF 닭에 10^{4.5}EID₅₀ 농도의 바이러스를 점안으로 접종함.

^B 공격접종 2주 후, 그룹별 10수의 닭을 안락사하여 조직 병변 관찰을 위하여 기도와 신장을 채취함.

^C 조직 병변 지수는 정상 조직의 경우 0점, 조직별 특징적 병변이 국소적으로 관찰되면 1점, 다수의 부위에서 관찰되면 2점, 관찰 부위 전체에서 고르게 관찰되면 3점으로 간주함.

(2) 1일령 육계 병아리에 IBV K2백신 분무접종에 따른 안전성 시험

▶ 개발된 백신을 양계 농가에 적용할 경우 나타날 수 있는 백신 반응의 정도를 파악하기 위하여 실제 1일령 육계 병아리에 대표적인 야외 접종 방법인 분무 접종법으로 K2 백신주를 접종한 뒤 나타나는 백신 반응을 상용 생독 백신 (H120)의 백신 반응과 비교하였다. 실험을 위하여 1일령 육계 병아리 120수를 3개 그룹으로 나눈 뒤 2개 그룹은 각각 상용백신인 H120과 K2 백신주를 Desvac 분무기 (거친 입자 분무기, 입자 사이즈 115 um)를 이용하여 마리당 103.0EID₅₀의 용량으로 투여하고, 나머지 1개 그룹은 백신 비접종 대조군으로 두었다. 백신 접종 후 2주간 임상증상을 관찰하여 백신접종 4, 8, 11 그리고 14일에 그룹별로 5수의 병아리로부터 랫셀음을 청취한 뒤 기도를 채취하여 기관지섬모운동을 관찰하였으며 기도, 폐, 신장의 포르말린 고정을 통하여 조직학적 병변을 관찰하였다. 나머지 병아리 (그룹별 20수는 1주일마다 체중을 측정하여 백신접종이 체중 증가에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

① 임상증상 발현

▶ 아래 표-4에 나타난 바와 같이 K2 백신주를 접종한 육계 병아리에서 랫셀음이 약 1일 간 청취되었다. 그러나 상용백신인 H120 접종군에서도 동일한 빈도로 11 일 간 랫셀음이 관찰되어 K2 백신주의 백신 반응은 상용 백신 수준으로 안전함을 확인하였다.

표-4. 1일령 육계 병아리에 K2 백신 분무 접종 후 랫셀음의 관찰

백신접종 후 일자	랫셀음 ^B		
	대조군	백신접종군	
		H120	K2
4	0/5	3/5	3/5
8	0/5	3/5	3/5
11	0/5	1/5	1/5
14	0/5	0/5	0/5

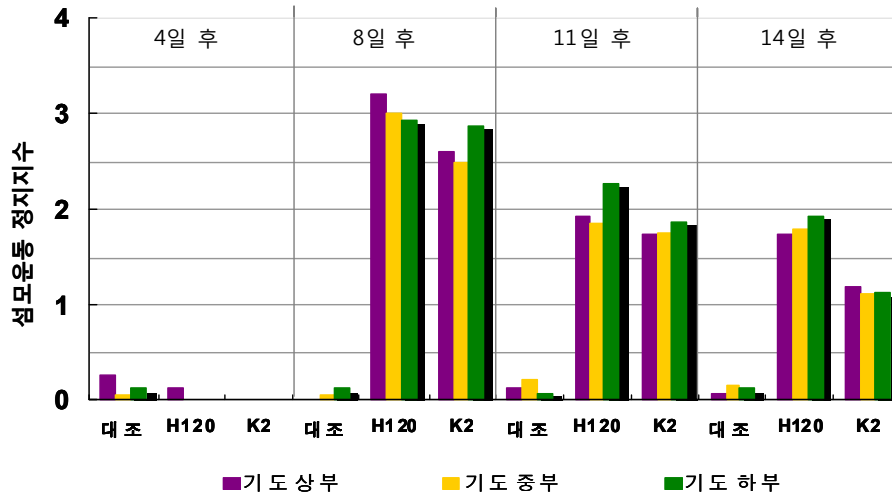
^A 1일령 SPF 닭에 10^{4.5}EID₅₀ 농도의 바이러스를 거친 입자 분무로 접종함.

^B 백신 접종 4, 8, 11 그리고 14일 후, 그룹별 5수씩의 병아리를 선발하여 랫셀음을 청취함.

② 기관지상피 섬모의 운동성 감소

▶ 기관지 상피의 섬모운동을 백신접종 4, 8, 11 그리고 14일 후에 그룹별로 각 5수씩 상부, 중부, 하부 기도를 채취한 후 기도 절편을 만들어 아래의 평가기준에 따라 기록하고 유럽약전 (European pharmacopedia, 2005)에서 제시한 호흡기 바이러스 백신의 섬모운동소실 지수를 기준

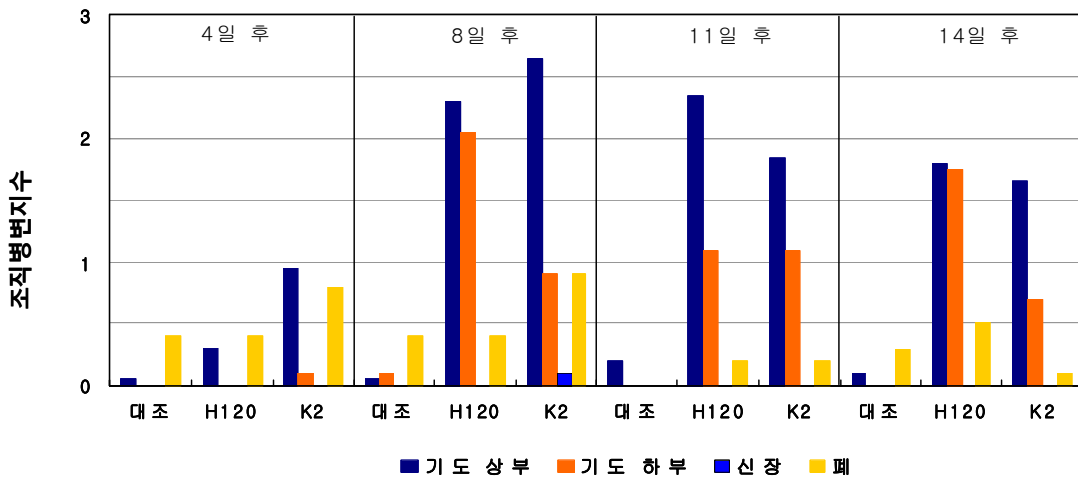
으로 평가하였다. 섬모운동 소실지수는 기관류 단면 전체에서 섬모운동이 활발하면 10점, 25%의 섬모가 정지되면 1점, 50%의 섬모가 정지되면 2점, 75%의 섬모가 정지되면 3점, 마지막으로 기관류 전체의 섬모운동이 정지되었으면 4점으로 간주하였다. 그룹별 및 부위별 운동정지지수의 평균을 산출하여 비교한 결과, 그림 3에 나타난 것처럼 K2 백신주를 접종한 뒤 8일째부터 14일까지 기관지 섬모운동의 감소가 뚜렷이 나타났다. 그러나 감소 정도는 상용백신인 H120과 비교하여 유사하거나 오히려 더 낮은 것으로 나타났고 11일 후부터는 유럽약전 제시 기준보다 낮은 수치로 관찰되어 K2 백신주의 안전성은 1일령의 육계에 분무 접종 시에도 유지됨을 알 수 있었다.



[그림-2] 1일령 육계에 K2 백신주를 분무접종 한 뒤 기도에서 관찰된 섬모운동감소 효과

③ 조직학적 병변

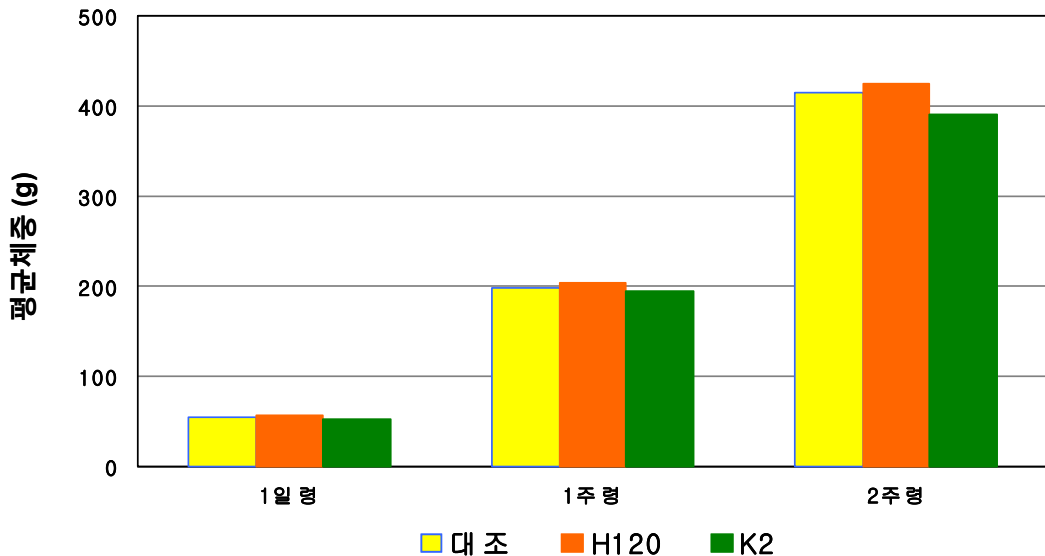
▶ 백신접종 2주 후 기관, 폐, 신장의 조직 병변을 관찰하였고 사용한 병변지수는 SPF 닭에서의 안전성 시험 방법과 동일하였다. 시험 결과, K2 백신을 접종한 병아리의 기관과 폐에서 백신접종 4일후부터 중증도의 조직학적 손상이 나타나 14일까지 유지되었으며 주요 소견으로는 기도의 섬모 손상, 상피세포 탈락 후 회복 및 변성 등이었다. 그러나 그림 4에서 나타나듯이 손상지수의 정도가 상용백신 H120의 수치와 유사하거나 낮아 앞선 결과와 마찬가지로 1일령 육계에서의 안전성을 확인하였다.



[그림-3] 1일령 육계에 K2 백신주 분무접종으로 인한 기도, 신장, 폐의 조직병변지수 비교

④ 체중에 미치는 영향

▶ 생독 백신의 분무 접종은 호흡기계의 심부까지 백신바이러스를 도달하게 하여 효과적인 면역 유도하는 반면 백신 바이러스의 과도한 증식으로 인하여 부작용이 나타나기 쉬우며 특히 육계의 경우 호흡기 손상으로 인한 직접적인 피해 외에도 체중 증가를 둔화시키는 소모성 증상으로 발전하기 쉽다. 따라서 K2 백신주의 육계 적용 시 이러한 피해가 발생하는 지 여부도 임상 시험에 앞서 안전성 평가차원에서 측정해야 할 요소이다. 백신 접종 후 1주 간격으로 그룹의 평균 체중을 측정하였고, 시험 결과 K2 백신주의 분무 접종군의 체중은 백신 비접종 대조군 및 상용 백신 H120 접종군의 체중과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 K2 백신주는 1일령 육계에 분무 접종하여도 안전함을 확인하였다.



[그림-4] 1일령 육계에 K2 백신주 분무접종 후 주령별 평균 체중 비교

(3) IBV K2 백신주의 국내 유행하는 야외주에 대한 실험실내 방어효능 시험

▶ K2 백신주가 보유한 방어능을 평가하기 위하여 동종의 바이러스에 대한 방어능 외에 이종의

바이러스에 대한 교차 방어능을 함께 관찰하였다. 3주령의 SPF 병아리 180수를 준비하여 크게 K2 백신주 접종군, H120 상용 백신 접종군, 비접종 대조군의 3개 그룹으로 분류 한 뒤 백신 접종군에 한하여 점안으로 생독 백신을 $10^{3.0}EID_{50}$ 농도로 투여하였다. 백신접종 3주 후, 국내에 유행하는 IBV 대표주 6주를 선발하여 그룹 별 10수씩의 병아리에게 $10^{4.5}EID_{50}$ 농도로 점안으로 공격 접종하였다. 공격접종 5일 후, 모든 병아리의 기도와 신장을 무균적으로 채취하여 조직 유체 상층액을 9~11일령의 SPF 계태아란에 접종하는 방법으로 공격접종 바이러스 재분리에 사용하였다. 공격접종 결과, 아래 표-5에 나타나듯이 기존의 메사츄세츠형 백신 (H120은 동종의 Mass41주에 대해 완벽하게 방어한 것 외에는 국내 유행 호흡기형 IBV의 기도 재분리율과 신장형 IBV의 기도 및 신장 재분리율을 대조군에 비해 50% 이하로 낮추지 못하였다. 반면, K2 백신주를 접종한 병아리의 경우 국내 유행 호흡기형 IBV의 기도 재분리율이 대조군에 비하여 50% 이상 감소하였고 신장형 IBV의 경우에도 기도와 신장 모두에서 공격접종 바이러스의 재분리율이 대조군에 비하여 50% 이상 높게는 100% 감소하였다. 특히, 개발된 백신주의 기원주는 KM9을 대표로 하는 기존의 Korean group II-1에 속함에도 불구하고, 2003년 이후 유행하는 Korean group II-2에 속하는 신장형 바이러스인 K1277/03주의 신장 재분리율을 대조군에 비해 100%감소시켰다. 따라서 개발된 K2 백신주는 동종의 신장형 IBV 외에도 이종의 최신 유행 신장형 IBV, 호흡기형 IBV 모두에 대해 뛰어난 방어능을 나타내어 광범위한 교차 방어능을 보유한 백신주로 확인되었다.

표-5. 3주령 SPF 닭에서 H120 백신 및 K2 백신주의 국내 유행 IBV 공격접종에 대한 방어 효능

백신 ^A	공격접종 바이러스 ^B		공격접종 바이러스 분리수수/공격접종 수수 ^C			
	유전형	분리주	기도		신장	
			대조군	백신접종군	대조군	백신접종군
H120	Korean group I	Mass 41	10/10	0/10 ^{***}	10/10	0/10 ^{***}
		K71/01	9/10	5/10	1/10	0/10
		K107/04	7/10	4/9	0/10	0/9
	Korean group II	K2/01 CE 7	10/10	3/10 ^{**}	10/10	7/10
		KM91	10/10	5/10	8/10	4/10
		K1277/03	10/10	8/10	9/10	8/10
K2	Korean group I	Mass 41	10/10	2/10 ^{***}	10/10	0/10 ^{***}
		K71/01	9/10	0/10 ^{***†}	1/10	1/10
		K107/04	7/10	2/10	0/10	0/10
	Korean group II	K2/01 CE 7	10/10	1/10 ^{***}	10/10	1/10 ^{***†}
		KM91	10/10	4/10 [*]	8/10	0/10 ^{***}
		K1277/03	10/10	3/8 ^{**}	9/10	0/8 ^{***††}

^A 3주령의 SPF 닭에 $10^{3.0}EID_{50}$ 용량의 백신을 점안으로 접종함.

^B 백신 접종 3주 후, 6종의 한국형 IBV 분리주를 $10^{4.5}EID_{50}$ 의 용량으로 점안으로 공격 접종함.

^C 공격 접종 5일 후, 접종계의 기도와 신장으로부터 공격접종 바이러스를 재분리함.

^{*} $P < 0.01$, ^{**} $p < 0.005$, ^{***} $p < 0.001$ 대조군의 결과와 비교하여 Student's t-test로 유의성 분석시 P값

[†] $P < 0.01$, ^{††} $p < 0.005$ 대조군의 결과와 비교하여 One tailed Fisher's exact test로 유의성 분석시 P값

(4) IBV K2 백신주의 국내 새롭게 유행하는 변이주에 대한 실험실내 방어효능 시험

▶ IBV K2 백신주에 대해 2005년 이래로 국내에서 문제가 되고 있는 새로운 변이형 IBV에 대한 방어능을 함께 관찰하였다. 3주령의 SPF 병아리 120수를 준비하여 크게 K2 백신주 접종군 H120

상용 백신 접종군, 비접종 대조군의 3개 그룹으로 분류 한 뒤 백신 접종군에 한하여 점안으로 생독 백신을 수당 103.0EID₅₀ 농도로 투여하였다. 백신접종 3주 후, 국내 새롭게 유행하는 IBV 주4주를 선발하여 그룹 별 10수씩의 병아리에게 10^{4.5}EID₅₀ 농도로 점안으로 공격접종하였다. 공격접종 5일 후, 모든 병아리의 기도와 신장을 무균적으로 채취하여 조직 유체 상층액을 9~11일령의 SPF 계태아란에 접종하는 방법으로 공격접종 바이러스 재분리를 확인하고 방어능을 평가하였다. 공격접종 결과, 아래 표 -5에 나타나듯이 기존의 메사츄세스형 백신 (H120)은 국내 새롭게 유행 변이형 IBV에 대해 방어율이 낮게 나옴을 확인한 반면, K2 백신주는 기존 백신주에 비해 유의적으로 높은 교차방어능을 나타냄을 확인하였다. 본 연구와 관련된 국내 유행하는 새로운 바이러스의 분리 및 특성분석에 관한 내용은 2011년 국제 학술지인 'Infection, Genetics and Evolution'에 게재 되었으며, 이 분리주들에 대한 K2 백신주의 방어효능과 관련된 논문 또한 국제 학술지인 'Infection, Genetics and Evolution'에 투고한 상태이다.

표-6. 3주령 SPF 닭에서 H120 백신 및 K2 백신주의 국내 유행 IBV 공격접종에 대한 방어 효능

백신 ^A	공격접종 바이러스 ^B		공격접종 바이러스 분리수수/공격접종 수수 ^C			
	유전형	분리주	기도		신장	
			대조군	백신접종군	대조군	백신접종군
H120	Korean group II	K245/09	10/10	10/10	10/10	8/10
		K40/09	10/10	10/10	10/10	9/10
		K716/05	10/10	9/10	10/10	5/10
		K26/10	9/10	7/10	3/10	1/10
K2	Korean group II	K245/09	10/10	1/10 ^{***,†††}	10/10	0/10 ^{***,†††}
		K40/09	10/10	5/10 ^{*,†}	10/10	1/10 ^{***,††}
		K716/05	10/10	3/10 ^{**,†}	10/10	0/10 ^{***,†}
		K26/10	9/10	0/10 ^{***,††}	3/10	1/10

^A 3주령의 SPF 닭에 10^{3.0}EID₅₀ 용량의 백신을 점안으로 접종함.

^B 백신 접종 3주 후, 6종의 한국형 IBV 분리주를 10^{4.5}EID₅₀ 의 용량으로 점안으로 공격 접종함.

^C 공격 접종 5일 후, 접종계의 기도와 신장으로부터 공격접종 바이러스를 재분리함.

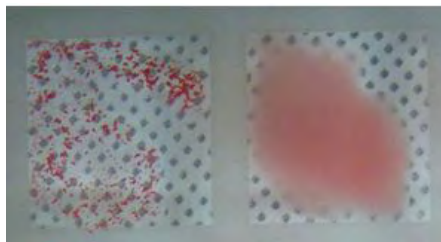
* P < 0.01, ** p < 0.005, *** p < 0.001 대조군의 결과와 비교하여 Student's t-test로 유의성 분석시 P값

† P < 0.01, †† p < 0.005 대조군의 결과와 비교하여 One tailed Fisher's exact test로 유의성 분석시 P값

나. K2-K148 혼합 생독백신 개발 및 산업화

1. NDV K148주의 종란계대 및 증식시험

- ▶ NDV K148주의 종란에서의 생산량을 확인하기 위하여 SPI종란의 장요막강 내에 0.1ml 접종하고, 접종 후 72시간에 장요막강액을 채취하여 SPF 종란 50%를 감염시킬 수 있는 (EID₅₀/ml) 바이러스 역가는 혈구응집반응을 통하여 확인하였다. 이를 3회 반복 실험하여 증식된 K148의 평균 역가를 측정하였다. 실험결과 K148주는 평균 10^{8.0}EID₅₀/ml 역가로 증식됨을 확인하였다 (그림 5).



[그림-5] 증식된 NDV 백신주의 혈구응집반응을 통한 증식확인

2. NDV K148주의 안전성 및 효능 시험

(1) 10일령 SPF 계태아란과 1일령 SPF 초생추에서의 안전성 시험

▶ NDV 병원성을 측정하는 방법은 SPF 계태아란을 이용하는 평균치사시간 (Mean death time, MDT) 측정과 1일령 SPF 초생추를 이용하는 대뇌병원성지수 (Intracerebral pathogenic index, ICPI) 측정이 있다. NDV 강독주의 경우 ICPI 1~2점, MDT 60시간 이내로 나타나고, NDV 약독주는 ICPI 1점 이하, MDT 90시간 이상으로 나타나는 것이 특징이다. 10일령 SPF 초생추의 대뇌에 NDV K148주를 10배 희석하여 접종한 뒤 8일간 임상증상과 폐사를 관찰하며 정상일 경우 0점, 임상증상이 나타나는 경우 1점, 폐사하는 경우 2점으로 간주하여 합산한 후 총 접종 초생추수로 나누는 방법으로 대뇌병원성지수를 산출하였다. 시험결과 NDV K148주의 대뇌병원성지수는 0.1로 측정되었다.

또한 K148주 원액을 10⁻⁶에서 10⁻⁹까지 10진 희석한 후 10일령 SPF 계태아란에 접종하여 7일간 관찰하며 접종한 모든 계태아란에서 폐사를 유발하는 최대 희석배수의 폐사 유발시간을 측정하여 평균치사시간을 시험하였다. 시험결과 NDV K148주의 평균치사시간은 각각 144시간으로 측정되었다. 대뇌병원성지수와 평균 치사시간을 바탕으로 NDV K148주는 약독주임을 확인하였다 (표-7).

표-7. SPF 계태아란 및 SPF 초생추를 이용한 ND K148주, LaSota주와 L7주 병원성 동정 결과

NDV 백신주	병원성 지수	
	평균 치사 시간	대뇌병원지수
K148	144시간	0.0

(2) NDV K148주를 백신접종한 6주령 SPF 병아리에서의 안전성 및 방어능 시험

▶ ND K148주를 뉴캐슬병 바이러스에 감수성이 있는 6주령 닭 10마리에 10⁶분을 점안으로 접종한 후 14일간 임상증상 및 폐사율을 관찰한다. 백신접종 3주후 백신접종한 병아리로부터 채혈을 하여 혈구응집억제반응 (Hemagglutination inhibition, HI)을 통해 NDV 항체가를 측정하였다. 또한 강독형 (Kr-005/00 주)를 공격접종한 후 임상증상 및 폐사율을 관찰하여 방어능을 산출하였다. 시험결과 백신을 접종한 그룹에서 모두 임상증상 및 폐사율을 관찰할 수 없었으며, NDV에 대한 항체도 모두 높게 나타남을 통해 면역원성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 또한 NDV 공격접종에 대해서도 검정기준인 80% 이상이 됨을 통해 NDV K148주의 안전성과 효능이 입증되었다 (표-8).

표-8. NDV 백신주의 강독형 NDV에 대한 6주령 SPF 닭에서의 안전성 및 방어효능 시험

NDV 백신주 ^A	강독형 NDV 공격접종시 임상증상 및 폐사율 ^B		
	임상증상 (%)	폐사율 (%)	HI titer
K148	0/20 (0%)	0/20 (0%)	4.4
음성대조군	20/20(100%)	20/20(100%)	-

^A 1일령 SPF 병아리에 각 NDV 백신주를 수당 10^{5.0}EID₅₀의 바이러스 역가로 분무백신접종

^B 백신접종 2주 후에 NDV강독주 (Kr-005/00주)를 수당 10^{5.0}EID₅₀ 로 근육으로 공격접종함

3. IB K2주와 NDV K148주간의 간섭현상을 최소화하는 농도 측정

(1) IB K2주와 ND 백신주간의 간섭현상을 최소화하는 농도 측정

▶ IB K2주와 ND 백신주간의 간섭현상을 최소화하는 농도를 측정하기 위하여 IB K2 주와NDV 백신주를 각기 다른 농도로 혼합하여 백신을 제조한 후 그룹당 10마리의 병아리에 1/50의 백신을 점안으로 접종한 후 3주후 백신접종한 병아리로부터 채혈을 하여 혈구응집억제반응 (Hemagglutination inhibition, HI)을 통해 NDV 항체가를 측정하였고, IBV의 경우 중화항체형성 여부 확인을 위한 중화시험을 실시하였다. 또한 강독형 (Kr-005/00 주)를 공격접종한 후 임상증상 및 폐사율을 관찰하여 방어능을 산출하였다. 시험결과 IBV와 NDV 백신주간의 간섭현상이 있음을 확인할 수 있었으나, IBV K2 백신주 10^{3.5}EID₅₀농도와 NDV 백신주는 10^{5.7}EID₅₀ 농도에서 서로간의 간섭현상 없이 면역원성 및 방어효능이 뛰어난을 확인할 수 있었다 (표-9).

표-9. IB K2주와 ND 백신주간의 간섭현상을 최소화하는 농도측정 시험결과

농도		효능		
K2	NDV	NDV		IBV
		HI titer(Log ₂)	방어능(%)	중화시험
10 ^{3.0} EID ₅₀	10 ^{6.0} EID ₅₀	3.7	40	2.2
10 ^{3.0} EID ₅₀	10 ^{7.0} EID ₅₀	4.3	60	2.4
10 ^{3.0} EID ₅₀	10 ^{8.0} EID ₅₀	5.4	80	2.0
10 ^{4.0} EID ₅₀	10 ^{6.0} EID ₅₀	4.2	50	3.0
10 ^{5.0} EID ₅₀	10 ^{6.0} EID ₅₀	5.2	30	3.2
10 ^{6.0} EID ₅₀	10 ^{6.0} EID ₅₀	3.0	20	3.4

(2) K2-K148 혼합백신 IBV와 NDV 각각에 대한 개별 역가 확인시험

▶ IB-ND 혼합백신의 경우 동결건조된 상태로 농가에서 적용된다. 그러나 동결건조 후 백신주의 역가가 떨어지기 때문에 혼합백신에서의 개별 바이러스의 동결건조 전과 동결건조 후의 역가를 측정하였다. 동결건조된 혼합백신의 역가측정 방법은 IB의 경우 바이러스를 증식시킨 장요막강액을 채취하여 NDV 중화항체와 1:1비로 상온에서 한 시간 반응 시킨 후 10배법으로 단계 희석하여 10일령 SPF 종란에 종란당 0.1ml씩 장요막강 내에 접종하였다. 접종 후 48시간에 장요막강액을 채취하여 Dot-Immunoblotting assay를 실시하여 역가 (EID₅₀/ml)를 측정하였다. NDV의 경우 IBV 중화항체와 반응시킨다는 것을 제외하고 같은 방법으로 혈구응집반응을 통해 역가를 측정하였다. 시험결과 동결건조 전후 개별 바이러스의 역가는 검역원 기준인 NDV 5이상 IBV 2.5이상의 기준에 부합함을 확인하였다 (표-10).

표-10. IB-ND 혼합백신의 동결건조 전후의 개별 역가 확인시험

IB-ND 혼합백신		동결건조 전		동결건조 후	
IB	NDV	IB	NDV	IB	NDV

K2	K148	3.5	5.7	3	5.83
----	------	-----	-----	---	------

4. K2-K148 혼합 생독백신의 실험실 내 안전성 및 효능시험

▶ 제작된 K2-K148 혼합백신을 뉴캐슬병 바이러스 및 닭 전염성 기관지염 바이러스에 감수성이 있는 3주령 닭 10마리에 10수분을 점안으로 접종한 후 14일간 임상증상 및 폐사율을 관찰한다. 백신접종 3주후 백신접종한 병아리로부터 채혈을 하여 혈구응집억제반응 (Hemagglutination inhibition, HI)을 통해 NDV 항체가를 측정하였고, IBV의 경우 중화항체형성여부 확인을 위한 중화시험을 실시하였다. 또한 강독형 (Kr-005/00 주)를 공격접종한 후 임상증상 및 폐사율을 관찰하여 방어능을 산출하였다. 시험결과 백신을 접종한 그룹에서 모두 임상증상 및 폐사율을 관찰할 수 없었으며, NDV와 IBV에 대한 항체도 모두 높게 나타남을 통해 면역원성이 뛰어난을 확인할 수 있었다. 또한 NDV 공격접종에 대해서도 검정기준인 80%이상이 됨을 통해 제작된 IB-ND 혼합 생독백신의 안전성과 효능이 입증되었다 (표-11).

표-11. IB-ND 혼합백신의 실험실내 효능시험

IB-ND 혼합백신		효능		
		NDV		IBV
IBV	NDV	HI titer(Log ₂)	방어능 (%)	중화시험
K2	K148	4.3	95	2.4
음성 대조군		-	0	-

5. K2+K148 혼합생독백신 시제품 제작

(1) K2+K148 혼합 생독백신의 함량 조절

① K2+K148 혼합 생독백신의 국가검정 기준 시험에 대한 ND 바이러스 함량조절

▶ 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 백신의 바이러스 함량시험에 의하면 ND 바이러스의 경우 37℃에서 5일간 보존한 뒤에 역가를 측정하는 가혹실험이 있기에 ND 바이러스의 함량의 조절이 필요하다. 실험실에서 검정기준에 따라 가혹실험을 한 결과 ND 바이러스의 역가가 평균적으로 10배 정도 떨어지는 것으로 확인되었다. 그에 따라 검정기준의 최소 함량기준인 1수분당 ND 바이러스 10^{5.0} EID₅₀ 이상을 통과하기 위하여 ND 바이러스의 함량을 10배 상승시켜 시제품을 제작하는 것이 적합하다고 판단하였다.

② K2+K148 혼합 생독백신의 국가검정 기준 시험에 대한 IB 바이러스 함량조절

▶ 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 백신의 바이러스 함량시험에 의하면 ND 바이러스의 경우 37℃에서 5일간 보존한 뒤에 역가를 측정하는 가혹실험이 있기에 ND 바이러스의 함량을 10배 상승시켜 시제품을 제작하기로 하였다. 이에 간섭현상을 최소화하는 혼합비율을 맞추기 위하여 ND 바이러스와 동일하게 IB 바이러스의 함량을 10배 상승시켜 시제품을 제작하였다. 그리고 IB-ND 혼합백신의 경우 동결건조된 상태로 시제품을 제작하여 농가에서 적용하게 된다. 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 합습도시험 기준에 따라 동결건조하였을 때 동결건조 전후의 개별 바이러스 함량을 비교하면, IB 바이러스는 함량이 평균 10^{0.5} EID₅₀ 정도 떨어지는 것이 확인되어 함량을 그에 맞추어 상승시켜 시제품을 제작하는 것이 적합하다고 판단하였다.

③ K2+K148 혼합 생독백신 시제품 제작 혼합비율 설정

- ▶ 위의 두 시험의 결과에 따라 IB-ND 혼합 생독백신 시제품 제작의 최종 혼합비율을 1 수분당 ND 바이러스는 $10^{6.5}$ EID₅₀로, IB 바이러스는 $10^{4.8}$ EID₅₀로 최종 설정하였다.

(2) K2+K148 혼합 생독백신의 시제품 제작 및 역가확인시험

- ▶ (주)대성미생물연구소에서는 국내에서 분리하여 안전하게 약독화한 IB K2주와 청둥오리에서 분리한 비병원성 ND K148주와 혼합하여 육계 및 1일령 병아리에 적용 가능한 2가 IB-ND 생독 혼합백신을 제작하였다.
- ▶ 제작된 IB-ND 혼합 생독백신 시제품의 IB 바이러스 백신주의 함량을 확인하기 위하여 개별역가 확인시험을 실시하였다. 각 백신 시제품의 IB 바이러스 백신주의 함량을 확인하기 위하여 백신을 ND 바이러스의 고도 면역혈청으로 중화한 후 인산완충용액으로 1:100의 희석액으로 10-1부터 10-6까지 10배 희석한다. 10-1부터 10-6까지의 희석액을 5개의 10일령 발육계란의 장노막강내에 0.1ml 씩 접종한 후 37°C에서 3일간 배양한다. 접종 후 24시간 이내에 폐사한 것은 제외하고 24시간 이후에 폐사한 것은 IB 바이러스에 의한 폐사임을 확인하고 3일 후에 생존한 것에 대하여는 장노막강액을 채취하여 Dot-immunoblotting assay를 실시하여 EID₅₀을 산출한다. 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준은 1수분당 IB 바이러스 $10^{2.5}$ EID₅₀ 이상이다.
- ▶ 제작된 IB-ND 혼합 생독백신 시제품의 ND 바이러스 백신주의 함량을 확인하기 위하여 개별역가 확인시험을 실시하였다. 각 백신 시제품의 ND 바이러스 백신주의 함량을 확인하기 위하여 백신을 IB 바이러스의 고도 면역혈청으로 중화한 후 인산완충용액으로 1:100의 희석액으로 10-3부터 10-8까지 10배 희석한다. 10-3부터 10-8까지의 희석액을 5개의 10일령 발육계란의 장노막강내에 0.1ml 씩 접종한 후 37°C에서 3일간 배양한다. 접종 후 24시간 이내에 폐사한 것은 제외하고 24시간 이후에 폐사한 것은 ND 바이러스에 의한 폐사임을 확인하고 3일 후에 생존한 것에 대하여는 장노막강액의 닭 적혈구 응집성을 조사한다. 적혈구를 응집하는 것을 양성으로 인정하여 EID₅₀을 산출한다. 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준은 1수분당 ND 바이러스 $10^{5.0}$ EID₅₀ 이상이다.

표-12. K2+K148 생독백신 동결건조 후 역가검정 결과

Batch	동결건조 전 (logEID ₅₀ /1 dose)		동결건조 후 (logEID ₅₀ /1 dose)	
	NDV	IBV	NDV	IBV
1	6.6	4.8	6.6	4.4
2	6.6	4.8	6.5	4.3
3	6.7	4.9	6.7	4.5

6. K2+K148 혼합 생독백신 시제품의 안전성 시험

(1) 국가검정기준에 의한 시제품의 안전성 시험

- ▶ 시험 방법: K2+K148 백신의 안전성 여부를 확인하기 위하여 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 안전시험을 실시한다. 각 백신 당 3개의 batch에 대하여 100씩 1주령 SPF 병아리에 각 백신 시제품을 10수분씩 음수로 접종한다. 백신 접종 후 14일간 호흡기 증상, 폐사율 등의 임상증상을 관찰한다.
- ▶ 시험 결과: K2+K148 백신들은 표-13과 같이 임상증상, 폐사율 및 증체율 시험에서 높은 안전성을 확인하였다. K2+K148 백신은 모두 백신 접종으로 인한 임상증상 및 폐사가 발생하지 않았으

며, 접종 2주 후의 체중 측정에서도 백신을 접종하지 않은 대조군과 비교하였을 때 차이가 없어 백신 접종으로 인한 증체 저하는 없는 것으로 확인되었다.

표-13. K2+K148 생독 백신 음수 접종 후 1주일 SPF 시험계의 임상 증상, 폐사율 및 증체율

Batch	시험계 수	임상증상	폐사	체중 (Mean ± SD)	
				접종 전	접종 2주 후
1	10	0/10	0/10	64.3 ± 1.2	188.6 ± 7.8
2	10	0/10	0/10	65.4 ± 2.3	187.9 ± 9.9
3	10	0/10	0/10	64.7 ± 2.8	188.3 ± 10.6
대조군	10	0/10	0/10	64.7 ± 2.3	185.2 ± 7.5

(2) 초생추 분무 접종을 통한 K2+K148 시제품의 안전성 시험

① 시험 방법

▶ K2+K148 시제품 초생추에 분무 접종을 하였을 때의 안전성 여부를 확인하기 위하여 안전시험을 실시한다. 1일령 SPF 병아리를 40수, 그리고 20수의 대조군으로 구분한 다음 각 백신 시제품을 1수분씩 국내에서 사용되는 50 μ m 분무입자 크기의 케비넷형 분무기 (SK-MO-Auto-3000, 쓰리샤인, 한국)를 이용하여 고운분부로 접종하고, 병아리의 체중을 측정한다. 백신 접종 후 14일간 호흡기 증상, 폐사율 등의 임상증상을 관찰하고 체중을 측정한다. 그리고 1일령 SPF 병아리를 12수씩, 그리고 12수의 대조군으로 구분한 다음 K2+K148 백신 시제품을 1수분씩 분무로 접종하고 백신접종 4, 7, 11, 그리고 14일 후에 기도, 폐, 신장의 포르말린 고정을 통하여 조직학적 병변을 관찰한다.

② 시험 결과

▶ K2+K148 백신은 분무 접종으로 임상증상이나 폐사 및 증체저하가 거의 나타나지 않았으며 표-14), 기관염증소견과 기관섬모소실소견도 거의 나타나지 않았으며 미약한 신장염증소견을 보였다(표-15, 16, 17). 그러므로, K2+K148 백신은 초생추에 적용하였을 때 높은 안전성을 가지는 것으로 사료된다.

표-14. 시험백신 분무 접종 후 1일령 SPF 시험계의 임상 증상, 폐사율 및 증체율의 관찰결과

백신	시험계 수	임상증상	폐사	체중 (g, Mean ± SD)	
				접종 전	접종 2주 후
K2+ K148	40	0/40	0/40	35.3 ± 1.2	130.3 ± 11.3
대조군	20	0/20	0/20	34.7 ± 2.3	126.6 ± 7.5

표-15. 시험백신 접종 4, 7, 11 그리고 14일 후 1일령 SPF 시험계의 기관염증소견

백신	접종 후 경과일자에 따른 기관염증소견 ^A (Mean ± SD)			
	접종 4일 후	접종 7일 후	접종 11일 후	접종 14일 후
K2+ K148	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
대조군	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

^A기관염증소견에 따른 조직병변지수 (normal=0, focal=1, multifocal=2, diffuse=3)

표-16. 시험백신 접종 4, 7, 11 그리고 14일 후 1일령 SPF 시험계의 기관섬모소실조건

백신	접종 후 경과일자에 따른 기관섬모소실조건 ^A (Mean ± SD)			
	접종 4일 후	접종 7일 후	접종 11일 후	접종 14일 후
K2+K148	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
대조군	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

^A기관섬모소실정도에 따른 조직병변지수 (0=normal cilia, 1=<25% cilia damaged, 2=<50%, 3=<75%, 4=>75%.)

표-17. 시험백신 접종 4, 7, 11 그리고 14일 후 1일령 SPF 시험계의 신장염증조건

백신	접종 후 경과일자에 따른 신장염증조건 ^A (Mean ± SD)			
	접종 4일 후	접종 7일 후	접종 11일 후	접종 14일 후
K2+K148	0.00 ± 0.00	0.67 ± 1.15	0.67 ± 1.15	0.33 ± 0.58
대조군	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

^A신장염증조건에 따른 조직병변지수 (normal=0, focal=1, multifocal=2, diffuse=3)

7. K2+K148 혼합 생독백신 시제품의 면역원성 시험 및 방어효능 시험

(1) 국가검정기준에 의한 시제품의 면역원성 및 방어능의 평가

① IB 바이러스에 대한 국가검정기준의 면역원성 시험 및 방어효능 시험

- ▶ 시험 방법: K2+K148 시제품의 IB 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 혈청 역가시험을 실시한다. 총 20%의 4령 SPF 병아리를 10수씩 2개의 그룹으로 구분한 다음 백신 시제품을 1수분씩 점안으로 접종한다. 백신 접종 후 3주 후 채혈하여 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화한 후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화한다. 중화 후 바이러스 함량 시험법에 따라 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 계란의 장노막 강액을 채취하여 Dot immunoblotting assay를 통해 중화지수를 산출한다. 그리고 백신의 방어효능을 확인하기 위해 백신접종 3주 후, 공격접종용 바이러스(KM91)를 마리당 10^{4.5} EID₅₀을 점안으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장에서 바이러스 재분리율을 확인한다.
- ▶ 시험 결과: K2+K148 백신은 표-18과 같이 중화시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였으며 공격접종 시험에서도 뛰어난 방어능을 보였다. 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 고시된 바에 의하면 대조군의 혈청으로 한 중화지수와 백신군의 혈청으로 한 중화지수가 2.0 이상이 차이가 나와야하는데, 모든 백신 시험군에서 2.0 이상 차이가 남이 확인되었다. IBV ELISA kit으로 항체 역가를 직접 확인한 실험에서도 모두 우수한 항체형성능을 보임이 확인되었다. 추가적으로 진행된 병원성 바이러스의 공격접종 시험에서도 우수한 방어능을 보여 이 실험에 사용한 IB-ND 혼합 생독백신을 야외농장에 적용한다면 IB 바이러스로 인한 피해를 완벽히 차단할 수 있을 것으로 사료된다.

표-18. 백신 21일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 IB 바이러스에 대한 중화시험 결과 및 공격접종 5일 후 시험계의 기관과 신장으로부터의 공격접종바이러스 재분리율

백신	시험계 수수	중화시험 ^A		ELISA 결과 ^C	공격접종 바이러스의 재분리율	
		중화 후 역가 ^B	중화지수		기관	신장
K2+K148	10	2.1	5.0	10/10	0/10	0/10
대조군(SPF)	10	7.1	0	0/10	10/10	8/10
대조군(PBS)	10	7.8	-	-	-	-

^AIBV K2 strain(10^{7.8} EID₅₀)에 대한 중화시험

^B면역혈청을 중화한 후의 바이러스 역가 (logEID₅₀/ml)

^CBionote사의 IBV ELISA kit을 사용하여 시험혈청을 검사하였을 때 양성으로 확인된 혈청수/검사한 혈청수

② ND 바이러스에 대한 국가검정기준의 면역원성 시험 및 방어효능 시험

- ▶ 시험 방법: K2+K148 백신 시제품의 ND 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 효력시험을 실시하고 또한 면역원성을 확인하기 위하여 항체형성능을 확인한다. 총 20수의 7주령 SPF 병아리를 10수씩 2개의 그룹으로 구분한 다음 각 백신의 시제품을 1수분씩 점안으로 접종한다. 백신 접종 2주 후 혈액을 채취한 후 ND 바이러스에 대한 중화항체형성여부 확인을 위하여 혈구응집억제시험을 실시한다. 백신 접종 2주 후 실험군 및 대조군에 공격용 바이러스(Kr-005주)를 마리당 10^{5.5} EID₅₀을 근육으로 공격접종하고 14일간 이상유무를 관찰한다.
- ▶ 시험 결과: 표-19와 같이 혈구응집억제시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였으며, 공격접종 시험에서도 뛰어난 방어능을 보였다. 혈구응집억제시험에서 모든 백신이 백신 접종 14일 후에 충분한 항체형성능을 보였으며, 방어효능 시험에서도 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준인 80% 이상의 시험군이 임상증상 및 폐사를 보이지 않는 조건에 부합하는 것으로 확인되었다. 그러므로 이 실험에 사용한 IB-ND 혼합 생독백신을 야외농장에 적용한다면 ND바이러스로 인한 피해를 완벽히 차단할 수 있을 것으로 사료된다.

표-19. 백신 14일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 ND 바이러스에 대한 혈구응집억제시험결과 및 공격접종 후 14일간 시험계의 임상 증상, 폐사율의 관찰결과

백신	HI test ^A	시험계 수수	임상증상 ^B	폐사
K2+K148	4.14 ± 1.51	10	0/10	0/10
대조군	0±0	10	10/10	10/10

^A혈구응집억제지수 (Mean ± SD, log₂)

^B뉴캐슬병과 관련한 임상증상을 나타낸 닭의 수로 폐사를 포함한 임상증상

(2) 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 면역원성 및 방어능의 평가

① 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 IB 바이러스에 대한 면역원성 및 방어효능 시험

- ▶ 시험 방법: K2+K148 백신 시제품의 IB 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 혈청 역가시험을 실시한다. 총 20수의 1일령 SPF 병아리를 10수씩 2개의 그룹으로 구분한 다음 각 백신 시제품을 1수분씩 국내에서 사용되는 50μm 분무입자 크기의 케비넷형 분무기 (SK-MO-Auto-3000, 쓰리샤인 한국)를 이용하여 고운분무로 접종한다. 백신 접종 후 3주 후 채혈하여 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화한 후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화한다. 중화 후 바이러스 함량 시험법에 따라 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 계란의 장노막강액을 채취하여 Dot immunoblotting assay를 통해 중화지수를 산출한다. 그리고 백신의 방어효능을 확인하기 위해 백신접종 3주 후, 공격접종용 바이러스

(KM91)를 마리당 $10^{4.5}$ EID₅₀을 접종으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장에서의 바이러스 재분리율을 확인한다.

- ▶ 시험 결과: K2+K148 백신은 표-20과 같이 중화시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였으며 공격접종 시험에서도 뛰어난 방어능을 보였다. 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 고시된 바에 의하면 대조군의 혈청으로 한 중화지수와 백신군의 혈청으로 한 중화지수가 2.0 이상이 차이가 나와야하는데, 모든 백신 시험군에서 2.0 이상 차이가 많이 확인되었다 IBV ELISA kit으로 항체 역가를 직접 확인한 실험에서도 모두 우수한 항체형성능을 보임이 확인되었다. 추가적으로 진행된 병원성 바이러스의 공격접종 시험에서도 우수한 방어능을 보임이 확인되었다. 그러므로 이 백신을 초생추에 적용하였을 때 IB 바이러스로 인한 피해를 완벽히 차단할 수 있을 것으로 사료된다.

표-20. 백신 21일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 IB 바이러스에 대한 중화시험 결과 및 공격접종 5일 후 시험계의 기관과 신장으로부터의 공격접종바이러스 재분리율

백신	시험계 수	중화시험 ^A		ELISA 결과 ^C	공격접종 바이러스의 재분리율	
		중화 후 역가 ^B	중화지수		기관	신장
K2+K148	10	2.3	5.2	10/10	0/10	0/10
대조군(SPF)	10	7.5	0	0/10	10/10	8/10
대조군(PBS)	10	8.0	-	-	-	-

^AIBV K2 strain($10^{8.0}$ EID₅₀)에 대한 중화시험

^B면역혈청을 중화한 후의 바이러스 역가 (logEID₅₀/ml)

^CBionote사의 IBV ELISA kit을 사용하여 시험혈청을 검사하였을 때 양성으로 확인된 혈청수/검사한 혈청수

② 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 ND바이러스에 대한 면역원성 및 방어효능 시험

- ▶ 시험 방법: K2+K148 백신 시제품의 ND 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 효력시험을 실시하고 또한 면역원성을 확인하기 위하여 항체형성능을 확인한다. 총 40수의 1일령 SPF 병아리를 30수의 시험군과 10수의 대조군으로 구분한 다음 각 백신의 시제품을 1수분씩 국내에서 사용되는 50 μ m 분무입자 크기의 케비넷형 분무기 (SK-MO-Auto-3000, 쓰리샤인, 한국)를 이용하여 고운분무로 접종한다. 백신 접종 2주 후 혈액을 채취한 후 ND 바이러스에 대한 중화항체형성여부 확인을 위하여 혈구응집억제시험을 실시한다. 백신 접종 2주 후 실험군 및 대조군에 공격용 바이러스 (Kr-005주)를 마리당 $10^{5.5}$ EID₅₀을 근육으로 공격접종하고 14일간 이상유무를 관찰한다.
- ▶ 시험 결과: 표-21와 같이 혈구응집억제시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였으며, 공격접종 시험에서도 뛰어난 방어능을 보였다. 혈구응집억제시험에서 모든 백신이 백신 접종 14일 후에 충분한 항체형성능을 보였으며, 방어효능 시험에서도 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준인 80% 이상의 시험군이 임상증상 및 폐사를 보이지 않는 조건에 부합하는 것으로 확인되었다. 그러므로 이 백신을 초생추에게 야외농장에서 적용한다면 ND 바이러스로 인한 피해를 크게 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

표-21. 백신 14일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 ND 바이러스에 대한 혈구응집억제시험결과 및 공격접종 후 14일간 시험계의 임상 증상, 폐사율의 관찰결과

백신	HI test ^A	시험계 수	임상증상 ^B	폐사
K2+K148	3.85 \pm 0.95	30	0/30	0/30
대조군	0 \pm 0	10	10/10	10/10

^A혈구응집억제지수 (Mean ± SD, log₂)

^B뉴캐슬병과 관련한 임상증상을 나타낸 닭의 수로 폐사를 포함한 임상증상

8. K2+K148 혼합 생독백신 시제품의 품목 허가 신청

▶ K2-K148 생독 혼합백신의 시제품을 제작하여 국가 검정기준에 의거한 국내 실험실내 임상시험을 완료하고 농림축산검역본부에 품목 허가신청을 위한 임상시험계획서 제출을 완료하였다.

9. K2+K148 혼합 생독백신 시제품의 야외임상시험 신청

▶ K2-K148 생독 혼합백신의 시제품을 제작하여 국가 검정기준에 의거한 국내 실험실내 임상시험을 완료하고 농림축산검역본부에 제품 등록을 위한 야외임상시험계획서 제출을 완료하였다.

10. K2+K148 혼합 생독백신의 해외 임상 시험

(1) K2+K148 혼합 생독백신 시제품의 면역원성 및 해외 유행 IB에 대한 방어효능 시험

① 초생추 점안 접종을 통한 시제품의 IB 및 ND 바이러스에 대한 면역원성 시험

▶ 시험 방법: K2+K148 백신 시제품의 IB 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 혈청 역가시험을 실시한다. 총 20수의 4주령 SPF 병아리를 10수씩 2개의 그룹으로 구분한 다음 각 백신 시제품을 1수분씩 점안으로 접종한다. 백신 접종 후 3주 후 채혈하여 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화한 후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화한다. 중화 후 바이러스 함량 시험법에 따라 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 계란의 장노막강액을 채취하여 Dot immunoblotting assay를 통해 중화지수를 산출한다. 또한 ND에 대한 면역원성을 확인하기 위하여 백신 접종 2주 후 혈액을 채취한 후 ND 바이러스에 대한 혈구응집억제시험을 실시한다.

▶ 시험 결과: K2+K148 백신은 표-22와 같이 중화시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였다. 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 고시된 바에 의하면 대조군의 혈청으로 한 중화지수와 백신군의 혈청으로 한 중화지수가 2.0 이상이 차이가 나와하는데, 모든 백신 시험군에서 2.0 이상 차이나는 것을 확인되었다. IBV ELISA kit으로 항체 역가를 직접 확인한 실험에서도 모두 우수한 항체형성능을 보임이 확인되었다. 또한 ND 바이러스에 대한 혈구응집억제반응 결과 ND에 대한 면역원성도 높게 나타나 IB로 인한 간접현상은 나타나지 않은 것으로 확인되었다. 그러므로 이 백신을 초생추에 적용하였을 때 IB 및 ND에 대한 충분한 면역이 형성된다고 보인다.

표-22. 백신 21일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 IB 바이러스에 대한 중화시험 결과

백신	시험계 수	IB 중화지수 ^A	IB ELISA 결과 ^B	ND HI test ^C
K2+ K148	10	2.20	8/8	4.87±3.2
대조군(SPF)	10	0	0/10	0

^AIBV K2 strain(10⁷·8.0 EID₅₀)에 대한 중화시험

^BMedian diagnostics의 IBV ELISA kit을 사용하여 시험혈청을 검사하였을 때 양성으로 확인된 혈청수/검사한 혈청수

^CND 바이러스에 대한 혈구응집억제지수 (Mean ± SD, log₂)

② 초생추 점안 접종을 통한 시제품의 수출국 유행 IB에 대한 방어효능 시험

▶ 시험 방법: K2+K148 백신 시제품의 수출국 유행 IB 바이러스에 대한 방어효능을 확인하기 위하여 공격접종 실험을 실시하였다. 총 30수의 1일령 SPF 병아리를 10수씩 3개의 그룹으로 구분한 다음 각 백신 시제품을 1수분씩 점안경로로 접종한다. 백신 접종 후 3주 후 공격접종용 바이러스

(QX-like)를 마리당 $10^{4.5}$ EID₅₀을 점안으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장을 채취하였다. 채취한 기관과 신장을 유제하여 인산완충용액과 10:1의 비율로 희석하여 발육계란에 접종하고 37°C에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 계란의 장노막강액을 채취하여 Dot immunoblotting assay를 통해 공격접종 바이러스의 재분리율을 확인하였다.

- ▶ 시험 결과: K2+K148 백신은 표-23과 같이 수출국 유행 IB 바이러스 공격접종에 대하여 신장에서 우수한 방어효능을 나타내었다. 또한 백신을 접종하지 않은 시험군과 비교하였을 때 통계적으로 유의성 있는 결과를 확인할 수 있었다. 각각의 시험백신을 제조한 고려와 대성의 K2단미 백신을 접종한 후 공격접종을 실시한 시험군과 IB-ND 혼합생독백신을 접종한 시험군을 비교하였을 때 방어율이 차이가 없는 것으로 보아 두 가지 바이러스의 혼합으로 인한 IB에 대한 방어 효능에는 영향이 없는 것으로 확인되었다. 그러므로 이 백신을 초생추에 적용하였을 때 IB바이러스로 인한 피해를 완벽히 차단할 수 있을 것으로 사료된다.

표-23. 21일령 시험계에 공격접종 후 시험계의 기관과 신장으로부터의 공격접종바이러스 재분리율

백신	시험계 수	재분리 결과	
		기관	신장
대성 K2	10	10/10	3/10
대성 K2+K148	8	8/8	0/8
대조군(SPF)	10	10/10	9/10

다. K2-LaSota 혼합 생독백신 개발 및 산업화

1. NDV LaSota주의 종란계대 및 증식시험

- ▶ NDV LaSota주의 종란에서의 생산량을 확인하기 위하여 SPF종란의 장요막강 내에 0.1ml 접종하고, 접종 후 72시간에 장요막강액을 채취하여 SPF 종란 50%를 감염시킬 수 있는 (EID₅₀/ml) 바이러스 역가는 혈구응집반응을 통하여 확인하였다. 이를 3회 반복 실험하여 증식된 LaSota의 평균역가를 측정하였다. 실험결과 LaSota주는 평균 $10^{8.0}$ EID₅₀/ml 역가로 증식됨을 확인하였다.

2. NDV LaSota주의 안전성 및 효능 시험

(1) 10일령 SPF 계태아란과 1일령 SPF 초생추에서의 안전성 시험

- ▶ NDV 병원성을 측정하는 방법은 SPF 계태아란을 이용하는 평균치사시간 (Mean death time, MDT) 측정과 1일령 SPF 초생추를 이용하는 대뇌병원성지수 (Intracerebral pathogenic index, ICPI) 측정이 있다. NDV 강독주의 경우 ICPI 1~2점, MDT 60시간 이내로 나타나고, NDV 약독주는 ICPI 1점 이하, MDT 90시간 이상으로 나타나는 것이 특징이다. 10일령 SPF 초생추의 대뇌에 NDV LaSota주를 10배 희석하여 접종한 뒤 8일간 임상증상과 폐사를 관찰하며 정상일 경우 0점, 임상증상이 나타나는 경우 1점, 폐사하는 경우 2점으로 간주하여 합산한 후 총 접종 초생추수로 나누는 방법으로 대뇌병원성지수를 산출하였다. 시험결과 NDV LaSota주의 대뇌병원성지수는 0.4로 측정되었다.

또한 LaSota주 원액을 10⁻⁶에서 10⁻⁹까지 10진 희석한 후 10일령 SPF 계태아란에 접종하여 7일간 관찰하며 접종한 모든 계태아란에서 폐사를 유발하는 최대 희석배수의 폐사 유발시간을 측정하여 평균치사시간을 시험하였다. 시험결과 NDV LaSota주의 평균치사시간은 각각 103시간으로 측정되었다. 대뇌병원성지수와 평균 치사시간을 바탕으로 NDV LaSota주는 약독주임을 확인하였다 (표-24).

표-24. SPF 계태아란 및 SPF 초생추를 이용한 NDV LaSota주 병원성 동정 결과

NDV 백신주	병원성 지수	
	평균 치사 시간	대뇌병원지수
LaSota	103시간	0.4

(2) NDV LaSota를 백신접종한 6주령 SPF 병아리에서의 안전성 및 방어능 시험

▶ NDV LaSota주를 뉴캐슬병 바이러스에 감수성이 있는 6주령 닭 10마리에 10^{5.0}를 점안으로 접종한 후 14일간 임상증상 및 폐사율을 관찰한다. 백신접종 3주후 백신접종한 병아리로부터 채혈을 하여 혈구응집억제반응 (Hemagglutination inhibition, HI)을 통해 NDV 항체를 측정하였다 또한 강독형 (Kr-005/00 주)를 공격접종한 후 임상증상 및 폐사율을 관찰하여 방어능을 산출하였다. 시험결과 백신을 접종한 그룹에서 모두 임상증상 및 폐사율을 관찰할 수 없었으며, NDV에 대한 항체도 모두 높게 나타남을 통해 면역원성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 또한 NDV 공격접종에 대해서도 검정기준인 80%이상 이 됨을 통해 NDV LaSota주의 안전성과 효능이 입증되었다 (표-25).

표-25. NDV 백신주의 강독형 NDV에 대한 6주령 SPF 닭에서의 안전성 및 방어효능 시험

NDV 백신주 ^A	강독형 NDV 공격접종시 임상증상 및 폐사율 ^B		
	임상증상 (%)	폐사율 (%)	HI titer
LaSota	0/20 (0%)	0/20 (0%)	4.2
음성대조군	20/20(100%)	20/20(100%)	-

^A 1일령 SPF 병아리에 각 NDV 백신주를 수당 10^{5.0}EID₅₀의 바이러스 역가로 분무백신접종

^B 백신접종 2주 후에 NDV강독주 (Kr-005/00주)를 수당 10^{5.0}EID₅₀ 로 근육으로 공격접종함

3. IB K2주와 NDV LaSota주간의 간섭현상을 최소화하는 농도 측정

(1) IB K2주와 ND 백신주간의 간섭현상을 최소화하는 농도 측정

▶ IB K2주와 ND 백신주간의 간섭현상을 최소화하는 농도를 측정하기 위하여 IB K2주와 NDV백신주를 각기 다른 농도로 혼합하여 백신을 제조한 후 그룹당 10마리의 병아리에 10^{5.0}의 백신을 점안으로 접종한 후 3주후 백신접종한 병아리로부터 채혈을 하여 혈구응집억제반응 (Hemagglutination inhibition, HI)을 통해 NDV 항체를 측정하였고, IBV의 경우 중화항체형성 여부 확인을 위한 중화시험을 실시하였다. 또한 강독형 (Kr-005/00 주)를 공격접종한 후 임상증상 및 폐사율을 관찰하여 방어능을 산출하였다. 시험결과 IBV와 NDV 백신주간의 간섭현상이 있음을 확인할 수 있었으나, IBV K2 백신주 10^{3.5}EID₅₀농도와 NDV 백신주는 10^{5.7}EID₅₀ 농도에서 서로간의 간섭현상 없이 면역원성 및 방어효능이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다 (표-26).

표-26. IB K2주와 ND 백신주간의 간섭현상을 최소화하는 농도측정 시험결과

농도		효능		
K2	NDV	NDV		IBV
		HI titer(Log ₂)	방어능(%)	중화시험
10 ^{3.0} EID ₅₀	10 ^{6.0} EID ₅₀	3.7	40	2.2

10 ^{3.0} EID ₅₀	10 ^{7.0} EID ₅₀	4.3	60	2.4
10 ^{3.0} EID ₅₀	10 ^{8.0} EID ₅₀	5.4	80	2.0
10 ^{4.0} EID ₅₀	10 ^{6.0} EID ₅₀	4.2	50	3.0
10 ^{5.0} EID ₅₀	10 ^{6.0} EID ₅₀	5.2	30	3.2
10 ^{6.0} EID ₅₀	10 ^{6.0} EID ₅₀	3.0	20	3.4

(2) K2-LaSota 혼합백신 IBV와 NDV 각각에 대한 개별 역가 확인시험

▶ IB-ND 혼합백신의 경우 동결건조된 상태로 농가에서 적용된다. 그러나 동결건조 후 백신주의 역가가 떨어지기 때문에 혼합백신에서의 개별 바이러스의 동결건조 전과 동결건조 후의 역가를 측정하였다. 동결건조된 혼합백신의 역가측정 방법은 IB의 경우 바이러스를 증식시킨 장요막강액을 채취하여 NDV 중화항체와 1:1비로 상온에서 한 시간 반응 시킨 후 10배 희석하여 10일령 SPF 종란에 종란당 0.1ml씩 장요막강 내에 접종하였다. 접종 후 48시간에 장요막강액을 채취하여 Dot-Immunoblotting assay를 실시하여 역가 (EID₅₀/ml)를 측정하였다. NDV의 경우 IBV 중화항체와 반응시킨다는 것을 제외하고 같은 방법으로 혈구응집반응을 통해 역가를 측정하였다. 시험결과 동결건조 전후 개별 바이러스의 역가는 검역원 기준인 NDV 5이상 IBV 2.5이상의 기준에 부합함을 확인하였다 (표-27).

표-27. IB-ND 혼합백신의 동결건조 전후의 개별 역가 확인시험

IB-ND 혼합백신		동결건조 전		동결건조 후	
IB	NDV	IB	NDV	IB	NDV
K2	LaSota	3.5	5.7	3.3	5.5

4. K2-LaSota 혼합 생독백신의 실험실 내 안전성 및 효능시험

▶ 제작된 K2-LaSota 혼합백신을 뉴캐슬병 바이러스 및 닭 전염성 기관지염 바이러스에 감수성이 있는 3주령 닭 10마리에 10수분을 점안으로 접종한 후 14일간 임상증상 및 폐사율을 관찰한다. 백신접종 3주후 백신접종한 병아리로부터 채혈을 하여 혈구응집억제반응 (Hemagglutination inhibition, HI)을 통해 NDV 항체를 측정하였고, IBV의 경우 중화항체형성여부 확인을 위한 중화시험을 실시하였다. 또한 강독형 (Kr-005/00 주)를 공격접종한 후 임상증상 및 폐사율을 관찰하여 방어능을 산출하였다. 시험결과 백신을 접종한 그룹에서 모두 임상증상 및 폐사율을 관찰할 수 없었으며, NDV와 IBV에 대한 항체도 모두 높게 나타남을 통해 면역원성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 또한 NDV 공격접종에 대해서도 검정기준인 80% 이상이 됨을 통해 제작된 IB-ND 혼합 생독백신의 안전성과 효능이 입증되었다(표-28).

표-28. IB-ND 혼합백신의 실험실내 효능시험

IB-ND 혼합백신		효능		
		NDV		IBV
IBV	NDV	HI titer(Log ₂)	방어능 (%)	중화시험
K2	LaSota	4.5	90	2.2
음성 대조군		-	0	-

5. K2+LaSota 혼합생독백신 시제품 제작

(1) K2+LaSota 혼합 생독백신의 함량 조절

① K2+LaSota 혼합 생독백신의 국가검정 기준 시험에 대한 ND 바이러스 함량조절

- ▶ 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 백신의 바이러스 함량시험에 의하면 ND 바이러스의 경우 37℃에서 5일간 보존한 뒤에 역가를 측정하는 가혹실험이 있기에 ND 바이러스의 함량의 조절이 필요하다. 실험실에서 검정기준에 따라 가혹실험을 한 결과 ND 바이러스의 역가가 평균적으로 10배 정도 떨어지는 것으로 확인되었다. 그에 따라 검정기준의 최소 함량기준인 1수분당 ND 바이러스 $10^{5.0}$ EID₅₀ 이상을 통과하기 위하여 ND 바이러스의 함량을 10배 상승시켜 시제품을 제작하는 것이 적합하다고 판단하였다.

② K2+LaSota 혼합 생독백신의 국가검정 기준 시험에 대한 IB 바이러스 함량조절

- ▶ 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 백신의 바이러스 함량시험에 의하면 ND 바이러스의 경우 37℃에서 5일간 보존한 뒤에 역가를 측정하는 가혹실험이 있기에 ND 바이러스의 함량을 10배 상승시켜 시제품을 제작하기로 하였다. 이에 간섭현상을 최소화하는 혼합비율을 맞추기 위하여 ND 바이러스와 동일하게 IB 바이러스의 함량을 10배 상승시켜 시제품을 제작하였다. 그리고 IB-ND 혼합백신의 경우 동결건조된 상태로 시제품을 제작하여 농가에서 적용하게 된다. 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 합습도시험 기준에 따라 동결건조하였을 때 동결건조 전후의 개별 바이러스 함량을 비교하면, IB 바이러스는 함량이 평균 $10^{0.5}$ EID₅₀ 정도 떨어지는 것이 확인되어 함량을 그에 맞추어 상승시켜 시제품을 제작하는 것이 적합하다고 판단하였다.

③ K2+LaSota 혼합 생독백신 시제품 제작 혼합비율 설정

- ▶ 위의 두 시험의 결과에 따라 IB-ND 혼합 생독백신 시제품 제작의 최종 혼합비율을 1 수분당 ND 바이러스는 $10^{6.5}$ EID₅₀로, IB 바이러스는 $10^{4.8}$ EID₅₀로 최종 설정하였다.

(2) K2+LaSota 혼합 생독백신의 시제품 제작 및 역가확인시험

- ▶ (주)대성미생물연구소에서는 국내에서 분리하여 안전하게 약독화한 IB K2주와 약병원성 ND LaSota주를 혼합하여 산란계 및 종계에 적용 가능한 2가 IB-ND 생독 혼합백신을 제작하였다.
- ▶ 제작된 IB-ND 혼합 생독백신 시제품의 IB 바이러스 백신주의 함량을 확인하기 위하여 개별역가 확인시험을 실시하였다. 각 백신 시제품의 IB 바이러스 백신주의 함량을 확인하기 위하여 백신을 ND 바이러스의 고도 면역혈청으로 중화한 후 인산완충용액으로 1수분의 10^{-6} 까지 10진 희석한다. 10^{-1} 부터 10^{-6} 까지의 희석액을 5개의 10일령 발육계란의 장노막강내에 0.1ml씩 접종한 후 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 후 24시간 이내에 폐사한 것은 제외하고 24시간 이후에 폐사한 것은 IB 바이러스에 의한 폐사임을 확인하고 3일 후에 생존한 것에 대하여는 장노막강액을 채취하여 Dot-immunoblotting assay를 실시하여 EID₅₀을 산출한다. 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준은 1수분당 IB 바이러스 $10^{2.5}$ EID₅₀ 이상이다.
- ▶ 제작된 IB-ND 혼합 생독백신 시제품의 ND 바이러스 백신주의 함량을 확인하기 위하여 개별역가 확인시험을 실시하였다. K2+LaSota 백신 시제품의 ND 바이러스 백신주의 함량을 확인하기 위하여 백신을 IB 바이러스의 고도 면역혈청으로 중화한 후 인산완충용액으로 1수분의 10^{-8} 까지 10진 희석한다. 10^{-3} 부터 10^{-8} 까지의 희석액을 5개의 10일령 발육계란의 장노막강내에 0.1ml씩 접종한 후 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 후 24시간 이내에 폐사한 것은 제외하고 24시간 이후에 폐사한 것은 ND 바이러스에 의한 폐사임을 확인하고 3일 후에 생존한 것에 대하여는 장노막강액

의 닭 적혈구 응집성을 조사한다. 적혈구를 응집하는 것을 양성으로 인정하여 EID₅₀을 산출한다. 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준은 1수분당 ND 바이러스 10^{5.0} EID₅₀이상이다.

표-29. K2+LaSota 생독백신 동결건조 후 역가검정 결과

Batch	동결건조 전 (logEID ₅₀ /1 dose)		동결건조 후 (logEID ₅₀ /1 dose)	
	NDV	IBV	NDV	IBV
1	6.5	4.8	6.5	4.2
2	6.5	4.8	6.5	4.3
3	6.6	4.9	6.6	4.3

6. K2+LaSota 혼합 생독백신 시제품의 안전성 시험

(1) 국가검정기준에 의한 시제품의 안전성 시험

- ▶ 시험 방법: K2+LaSota 백신 시제품의 안전성 여부를 확인하기 위하여 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 안전시험을 실시한다. 각 백신 당 3개의 batch에 대하여 10수씩 1주령 SPF 병아리에 각 백신 시제품을 10수분씩 음수로 접종한다. 백신 접종 후 14일간 호흡기 증상, 폐사율 등의 임상증상을 관찰한다.
- ▶ 시험 결과: K2+LaSota 백신은 표-30과 같이 임상증상, 폐사율 및 증체율 시험에서 높은 안전성을 확인하였다. K2+LaSota 백신은 백신 접종으로 인한 임상증상 및 폐사가 발생하지 않았으며, 접종 2주 후의 체중 측정에서도 백신을 접종하지 않은 대조군과 비교하였을 때 차이가 없어 백신 접종으로 인한 증체 저하는 없는 것으로 확인되었다.

표-30. K2+LaSota 생독 백신 음수 접종 후 1주령 SPF 시험계의 임상 증상, 폐사율 및 증체율

Batch	시험계 수	임상증상	폐사	체중 (Mean ± SD)	
				접종 전	접종 2주 후
1	10	0/10	0/10	63.4 ± 2.3	183.6 ± 9.5
2	10	0/10	0/10	64.8 ± 3.0	184.2 ± 7.6
3	10	0/10	0/10	65.0 ± 2.5	182.7 ± 11.3
대조군	10	0/10	0/10	64.7 ± 2.3	185.2 ± 7.5

(2) 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 안전성 시험

① 시험 방법

- ▶ K2+LaSota 백신 시제품 초생추에 분무 접종을 하였을 때의 안전성 여부를 확인하기 위하여 안전시험을 실시한다. 각 백신당 1일령 SPF 병아리를 40수씩, 그리고 20수의 대조군으로 구분한 다음 각 백신 시제품을 1수분씩 국내에서 사용되는 50μm 분무입자 크기의 케비넷형 분무기 (SK-MO-Auto-3000, 쓰리샤인, 한국)를 이용하여 고운분무로 접종하고, 이 때의 병아리의 체중을 측정한다. 백신 접종 후 14일간 호흡기 증상, 폐사율 등의 임상증상을 관찰하고, 이 때의 체중을 측정한다. 그리고 각 백신당 1일령 SPF 병아리를 12수씩, 그리고 12수의 대조군으로 구분한 다음 K2+LaSota 백신 시제품을 1수분씩 분무로 접종하고, 백신접종 4, 7, 11, 그리고 14일 후에 기도

폐, 신장의 포르말린 고정을 통하여 조직학적 병변을 관찰한다.

② 시험 결과

▶ K2+LaSota 백신은 분무 접종으로 임상증상이나 폐사가 나타나지 않았지만 대조군에 비해 증체 저하가 관찰되었다(표-31). 그리고 심한 기관염증소견과 기관섬모소실소견을 나타내었다 표32, 33). 미약한 신장염증소견을 보였다(표 -34). K2+LaSota 백신의 접종으로 인하여 조직염증소견을 보이며 증체에 영향을 미치는 것으로 확인되어, K2+LaSota 백신은 초생후에 적용하였을 때, 위험성이 있는 것으로 사료된다.

표-31. 시험백신 분무 접종 후 1일령 SPF 시험계의 임상 증상, 폐사율 및 증체율의 관찰결과

백신	시험계 수	임상증상	폐사	체중 (g, Mean ± SD)	
				접종 전	접종 2주 후
K2+ LaSota	40	0/40	0/40	35.4 ± 2.3	121.5 ± 14.9
대조군	20	0/20	0/20	34.7 ± 2.3	126.6 ± 7.5

표-32. 시험백신 접종 4, 7, 11 그리고 14일 후 1일령 SPF 시험계의 기관염증소견

백신	접종 후 경과일자에 따른 기관염증소견 ^A (Mean ± SD)			
	접종 4일 후	접종 7일 후	접종 11일 후	접종 14일 후
K2+ LaSota	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.67 ± 0.58
대조군	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

^A기관염증소견에 따른 조직병변지수 (normal=0, focal=1, multifocal=2, diffuse=3)

표-33. 시험백신 접종 4, 7, 11 그리고 14일 후 1일령 SPF 시험계의 기관섬모소실소견

백신	접종 후 경과일자에 따른 기관섬모소실소견 ^A (Mean ± SD)			
	접종 4일 후	접종 7일 후	접종 11일 후	접종 14일 후
K2+ LaSota	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	0.33 ± 0.58	1.67 ± 0.58
대조군	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

^A기관섬모소실정도에 따른 조직병변지수 (0=normal cilia, 1=<25% cilia damaged, 2=<50%, 3=<75%, 4=>75%.)

표-34. 시험백신 접종 4, 7, 11 그리고 14일 후 1일령 SPF 시험계의 신장염증소견

백신	접종 후 경과일자에 따른 신장염증소견 ^A (Mean ± SD)			
	접종 4일 후	접종 7일 후	접종 11일 후	접종 14일 후
K2+ LaSota	0.00 ± 0.00	0.67 ± 0.58	1.67 ± 1.15	1.00 ± 1.00
대조군	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

^A신장염증소견에 따른 조직병변지수 (normal=0, focal=1, multifocal=2, diffuse=3)

7. K2+LaSota 혼합 생독백신 시제품의 면역원성 시험 및 방어효능 시험

(1) 국가검정기준에 의한 시제품의 면역원성 및 방어능의 평가

① IB 바이러스에 대한 국가검정기준의 면역원성 시험 및 방어효능 시험

- ▶ 시험 방법: K2+LaSota 백신 시제품의 IB 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 혈청 역가시험을 실시한다. 총 20수의 4주령 SPF 병아리를 10수씩 2개의 그룹으로 구분한 다음 K2+LaSota 백신 시제품을 1수분씩 점안으로 접종한다. 백신 접종 후 3주 후 채혈하여 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화한 후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화한다. 중화 후 바이러스 함량 시험법에 따라 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 계란의 장노막강액을 채취하여 Dot immunoblotting assay를 통해 중화지수를 산출한다. 그리고 백신의 방어효능을 확인하기 위해 백신접종 3주 후, 공격접종용 바이러스(KM91)를 마리당 10^{4.5} EID₅₀을 점안으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장에서의 바이러스 재분리율을 확인한다.
- ▶ 시험 결과: K2+LaSota 백신은 표-35와 같이 중화시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였으며 공격접종 시험에서도 뛰어난 방어능을 보였다. 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 고시된 바에 의하면 대조군의 혈청으로 한 중화지수와 백신군의 혈청으로 한 중화지수가 2.0 이상이 차이가 나와야하는데, 시험 백신 시험군에서 2.0 이상 차이가 남이 확인되었다 IBV ELISA kit으로 항체 역가를 직접 확인한 실험에서도 모두 우수한 항체형성능을 보임이 확인되었다. 추가적으로 진행된 병원성 바이러스의 공격접종 시험에서도 우수한 방어능을 보여 이 실험에 사용한 IB-ND 혼합 생독백신을 야외농장에 적용한다면 IB 바이러스로 인한 피해를 완벽히 차단할 수 있을 것으로 사료된다.

표-35. 백신 21일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 IB 바이러스에 대한 중화시험 결과 및 공격접종 5일 후 시험계의 기관과 신장으로부터의 공격접종바이러스 재분리율

백신	시험계 수	중화시험 ^A		ELISA 결과 ^C	공격접종 바이러스의 재분리율	
		중화 후 역가 ^B	중화지수		기관	신장
K2+ LaSota	10	2.4	4.6	10/10	0/10	0/10
대조군(SPF)	10	7.1	0	0/10	10/10	8/10
대조군(PBS)	10	7.8	-	-	-	-

^AIBV K2 strain(10^{7.8} EID₅₀)에 대한 중화시험

^B면역혈청을 중화한 후의 바이러스 역가 (logEID₅₀/ml)

^CBionote사의 IBV ELISA kit을 사용하여 시험혈청을 검사하였을 때 양성으로 확인된 혈청수/검사한 혈청수

② ND 바이러스에 대한 국가검정기준의 면역원성 시험 및 방어효능 시험

- ▶ 시험 방법: K2+LaSota 백신 시제품의 ND 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 효력시험을 실시하고 또한 면역원성을 확인하기 위하여 항체형성능을 확인한다. 총 20수의 7주령 SPF 병아리를 10수씩 2개의 그룹으로 구분한 다음 K2+LaSota 백신의 시제품을 1수분씩 점안으로 접종한다. 백신 접종 2주 후 혈액을 채취한 후 ND 바이러스에 대한 중화항체형성여부 확인을 위하여 혈구응집억제시험을 실시한다. 백신 접종 2주 후 실험군 및 대조군에 공격용 바이러스(Kr-005주)를 마리당 10^{5.5} EID₅₀을 근육으로 공격접종하고 14일간 이상유무를 관찰한다.
- ▶ 시험 결과: 표-36와 같이 혈구응집억제시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였으며, 공격접종 시험에서도 뛰어난 방어능을 보였다. 혈구응집억제시험에서 모든 백신이 백신 접종 14일 후에 충분한 항체형성능을 보였으며, 방어효능 시험에서도 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준인 80% 이상의 시험군이 임상증상 및 폐사를 보이지 않는 조건에 부합하는 것으로 확인되었다. 그러므로 이 실험에 사용한 IB-ND 혼합 생독백신을 야외농장에 적용한다면 ND바

이러므로 인한 피해를 완벽히 차단할 수 있을 것으로 사료된다.

표-36. 백신 14일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 ND 바이러스에 대한 혈구응집억제시험결과 및 공격 접종 후 14일간 시험계의 임상 증상, 폐사율의 관찰결과

백신	HI test ^A	시험계 수	임상증상 ^B	폐사
K2+LaSota	5.00 ± 1.89	10	0/10	0/10
대조군	0±0	10	10/10	10/10

^A혈구응집억제지수 (Mean ± SD, log₂)

^B뉴캐슬병과 관련된 임상증상을 나타낸 닭의 수로 폐사를 포함한 임상증상

8. K2+LaSota 혼합 생독백신 시제품의 품목 허가 신청

▶ K2-LaSota 생독 혼합백신의 시제품을 제작하여 국가 검정기준에 의거한 국내 실험실내 임상시험을 완료하고 농림축산검역본부에 품목 허가신청을 위한 임상시험계획서 제출을 완료하였다.

9. K2+LaSota 혼합 생독백신 시제품의 야외임상시험 신청

▶ K2-LaSota 생독 혼합백신의 시제품을 제작하여 국가 검정기준에 의거한 국내 실험실내 임상시험을 완료하고 농림축산검역본부에 제품 등록을 위한 야외임상시험계획서 제출을 완료하였다.

10. K2+LaSota 혼합 생독백신의 해외 임상 시험

(1) K2+LaSota 혼합 생독백신 시제품의 면역원성 및 수출국 유행 IB에 대한 방어효능 시험

① 초생추 점안 접종을 통한 시제품의 IB 및 ND 바이러스에 대한 면역원성 시험

▶ 시험 방법: K2+LaSota 백신 시제품의 IB 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 혈청 역가시험을 실시한다. 총 20수의 4주령 SPF 병아리를 10수씩 2개의 그룹으로 구분한 다음 각 백신 시제품을 1수분씩 점안으로 접종한다. 백신 접종 후 3주 후 채혈하여 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화한 후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화한다. 중화 후 바이러스 함량 시험법에 따라 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 계란의 장노막강액을 채취하여 Dot immunoblotting assay를 통해 중화지수를 산출한다. 또한 ND에 대한 면역원성을 확인하기 위하여 백신 접종 2주 후 혈액을 채취한 후 ND 바이러스에 대한 혈구응집억제시험을 실시한다.

▶ 시험 결과: K2+LaSota 백신은 표-37과 같이 중화시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였다. 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 고시된 바에 의하면 대조군의 혈청으로 한 중화지수와 백신군의 혈청으로 한 중화지수가 2.0 이상이 차이가 나와야하는데, 모든 백신 시험군에서 2.0 이상 차이나는 것을 확인되었다. IBV ELISA kit으로 항체 역가를 직접 확인한 실험에서도 모두 우수한 항체형성능을 보임이 확인되었다. 또한 ND 바이러스에 대한 혈구응집억제 반응 결과 ND에 대한 면역원성도 높게 나타나 IB로 인한 간접현상은 나타나지 않은 것으로 확인되었다. 그러므로 이 백신을 초생추에 적용하였을 때 IB 및 ND에 대한 충분한 면역이 형성된다고 보인다.

표-37. 백신 21일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 IB 바이러스에 대한 중화시험 결과

백신	시험계 수	IB 중화지수 ^A	IB ELISA 결과 ^B	ND HI test ^C
K2+LaSota	10	3.20	9/10	4±2.8

대조군(SPF)	10	0	0/10	0
----------	----	---	------	---

^AIBV K2 strain($10^{8.0}$ EID₅₀)에 대한 중화시험

^BMedian diagnostics의 IBV ELISA kit을 사용하여 시험혈청을 검사하였을 때 양성으로 확인된 혈청수/검사한 혈청수

^CND 바이러스에 대한 혈구응집억제지수 (Mean \pm SD, log₂)

(2) 초생추 접종을 통한 시제품의 수출국 유행 IB에 대한 방어효능 시험

- ▶ 시험 방법: K2+LaSota 백신 시제품의 수출국 유행 IB 바이러스에 대한 방어효능을 확인하기 위하여 공격접종 실험을 실시하였다. 총 30수의 1일령 SPF 병아리를 10수씩 3개의 그룹으로 구분한 다음 각 백신 시제품을 1수분씩 접종경로로 접종한다. 백신 접종 후 3주 후 공격접종용 바이러스(QX-like)를 마리당 $10^{4.5}$ EID₅₀을 접종으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장을 채취하였다. 채취한 기관과 신장을 유제하여 인산완충용액과 10:1의 비율로 희석하여 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 계란의 장노막강액을 채취하여 Dot immunoblotting assay를 통해 공격접종 바이러스의 재분리율을 확인하였다.
- ▶ 시험 결과: K2+LaSota 백신은 표-38와 같이 수출국 유행 IB 바이러스 공격접종에 대하여 신장에서 우수한 방어효능을 나타내었다. 또한 백신을 접종하지 않은 시험군과 비교하였을 때 통계적으로 유의성 있는 결과를 확인할 수 있었다. 각각의 시험백신을 제조한 고려와 대성의 K2단미 백신을 접종한 후 공격접종을 실시한 시험군과 IB-ND 혼합생독백신을 접종한 시험군을 비교하였을 때 방어율이 차이가 없는 것으로 보아 두 가지 바이러스의 혼합으로 인한 IB에 대한 방어효능에는 영향이 없는 것으로 확인되었다. 그러므로 이 백신을 초생추에 적용하였을 때 IB바이러스로 인한 피해를 완벽히 차단할 수 있을 것으로 사료된다.

표-38. 21일령 시험계에 공격접종 후 시험계의 기관과 신장으로부터의 공격접종바이러스 재분리율

백신	시험계 수	재분리 결과	
		기관	신장
대성 K2	10	10/10	3/10
대성 K2+ LaSota	10	7/10	2/10
대조군(SPF)	10	10/10	9/10

라. K2-L7 혼합 생독백신 개발 및 산업화

1. NDV L7주의 종란계대 및 증식시험

- ▶ NDV L7주의 종란에서의 생산량을 확인하기 위하여 SPF종란의 장요막강 내에 0.1 ml 접종하고, 접종 후 72시간에 장요막강액을 채취하여 SPF 종란 50%를 감염시킬 수 있는 (EID₅₀/ml) 바이러스 역가는 혈구응집반응을 통하여 확인하였다. 이를 3회 반복 실험하여 증식된 L7의 평균역가를 측정하였다. 실험결과 L7주는 평균 $10^{8.0}$ EID₅₀/ml 역가로 증식됨을 확인하였다.

2. NDV L7주의 안전성 및 효능 시험

(1) 10일령 SPF 계태아란과 1일령 SPF 초생추에서의 안전성 시험

- ▶ NDV 병원성을 측정하는 방법은 SPF 계태아란을 이용하는 평균치사시간 (Mean death time, MDT) 측정과 1일령 SPF 초생추를 이용하는 대뇌병원성지수 (Intracerebral pathogenic index, ICPI) 측정이 있다. NDV 강독주의 경우 ICPI 1~2점, MDT 60시간 이내로 나타나고, NDV 약독

주는 ICPI 1점 이하, MDT 90시간 이상으로 나타나는 것이 특징이다. 1일령 SPF 초생추의 대뇌에 NDV L7주를 10배 희석하여 접종한 뒤 8일간 임상증상과 폐사를 관찰하며 정상일 경우 0점, 임상증상이 나타나는 경우 1점, 폐사하는 경우 2점으로 간주하여 합산한 후 총 접종 초생추수로 나누는 방법으로 대뇌병원성지수를 산출하였다. 시험결과 NDV L7주의 대뇌병원성지수는 0.1로 측정되었다.

또한 L7주 원액을 10-6에서 10-9까지 10진 희석한 후 10일령 SPF 계태아란에 접종하여 7일간 관찰하며 접종한 모든 계태아란에서 폐사를 유발하는 최대 희석배수의 폐사 유발시간을 측정하여 평균치사시간을 시험하였다. 시험결과 NDV L7주의 평균치사시간은 각각 150시간으로 측정되었다. 대뇌병원성지수와 평균 치사시간을 바탕으로 NDV L7주는 약독주임을 확인하였다 (표-39).

표-39. SPF 계태아란 및 SPF 초생추를 이용한 NDV L7주 병원성 동정 결과

NDV 백신주	병원성 지수	
	평균 치사 시간	대뇌병원지수
L7주	150시간	0.1

(2) NDV L7를 백신접종한 6주령 SPF 병아리에서의 안전성 및 방어능 시험

▶ NDV L7주를 뉴캐슬병 바이러스에 감수성이 있는 6주령 닭 10마리에 10^{5.0}분을 점안으로 접종한 후 14일간 임상증상 및 폐사율을 관찰한다. 백신접종 3주후 백신접종한 병아리로부터 채혈을 하여 혈구응집억제반응 (Hemagglutination inhibition, HI)을 통해 NDV 항체가를 측정하였다. 또한 강독형 (Kr-005/00 주)를 공격접종한 후 임상증상 및 폐사율을 관찰하여 방어능을 산출하였다. 시험결과 백신을 접종한 그룹에서 모두 임상증상 및 폐사율을 관찰할 수 없었으며, NDV에 대한 항체도 모두 높게 나타남을 통해 면역원성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 또한 NDV 공격접종에 대해서도 검정기준인 80%이상이 됨을 통해 NDV LaSota주의 안전성과 효능이 입증되었다 (표-40).

표-40. NDV 백신주의 강독형 NDV에 대한 6주령 SPF 닭에서의 안전성 및 방어효능 시험

NDV 백신주 ^A	강독형 NDV 공격접종시 임상증상 및 폐사율 ^B		
	임상증상 (%)	폐사율 (%)	HI titer
L7주	0/20 (0%)	0/20 (0%)	4.1
음성대조군	20/20(100%)	20/20(100%)	-

^A 1일령 SPF 병아리에 각 NDV 백신주를 수당 10^{5.0}EID₅₀의 바이러스 역가로 분무백신접종

^B 백신접종 2주 후에 NDV강독주 (Kr-005/00주)를 수당 10^{5.0}EID₅₀ 로 근육으로 공격접종함

3. IB K2주와 NDV L7주간의 간섭현상을 최소화하는 농도 측정

(1) IB K2주와 ND 백신주간의 간섭현상을 최소화하는 농도 측정

▶ IB K2주와 ND 백신주간의 간섭현상을 최소화하는 농도를 측정하기 위하여 IB K2주와 NDV 백신주를 각기 다른 농도로 혼합하여 백신을 제조한 후 그룹당 10마리의 병아리에 1/100의 백신을 점안으로 접종한 후 3주후 백신접종한 병아리로부터 채혈을 하여 혈구응집억제반응 (Hemagglutination inhibition, HI)을 통해 NDV 항체가를 측정하였고, IBV의 경우 중화항체형성 여부 확인을 위한 중화시험을 실시하였다. 또한 강독형 (Kr-005/00 주)를 공격접종한 후 임상증상 및 폐사율을 관찰하여 방어능을 산출하였다. 시험결과 IBV와 NDV 백신주간의 간섭현상이 있

음을 확인할 수 있었으나, IBV K2 백신주 $10^{3.5}EID_{50}$ 농도와 NDV 백신주는 $10^{5.7}EID_{50}$ 농도에서 서로간의 간섭현상 없이 면역원성 및 방어효능이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다 (표-41).

표-41. IB K2주와 ND 백신주간의 간섭현상을 최소화하는 농도측정 시험결과

농도		효능		
K2	NDV	NDV		IBV
		HI titer(Log ₂)	방어능(%)	중화시험
$10^{3.0}EID_{50}$	$10^{6.0}EID_{50}$	3.7	40	2.2
$10^{3.0}EID_{50}$	$10^{7.0}EID_{50}$	4.3	60	2.4
$10^{3.0}EID_{50}$	$10^{8.0}EID_{50}$	5.4	80	2.0
$10^{4.0}EID_{50}$	$10^{6.0}EID_{50}$	4.2	50	3.0
$10^{5.0}EID_{50}$	$10^{6.0}EID_{50}$	5.2	30	3.2
$10^{6.0}EID_{50}$	$10^{6.0}EID_{50}$	3.0	20	3.4

(2) K2-L7 혼합백신 IBV와 NDV 각각에 대한 개별 역가 확인시험

▶ IB-ND 혼합백신의 경우 동결건조된 상태로 농가에서 적용된다. 그러나 동결건조 후 백신주의 역가가 떨어지기 때문에 혼합백신에서의 개별 바이러스의 동결건조 전과 동결건조 후의 역가를 측정하였다. 동결건조된 혼합백신의 역가측정 방법은 IB의 경우 바이러스를 증식시킨 장요막강액을 채취하여 NDV 중화항체와 1:1비로 상온에서 한 시간 반응 시킨 후 10인법으로 단계희석하여 10일령 SPF 종란에 종란당 0.1ml씩 장요막강 내에 접종하였다. 접종 후 48시간에 장요막강액을 채취하여 Dot-Immunoblotting assay를 실시하여 역가 (EID_{50}/ml)를 측정하였다. NDV의 경우 IBV 중화항체와 반응시킨다는 것을 제외하고 같은 방법으로 혈구응집반응을 통해 역가를 측정하였다. 시험결과 동결건조 전후 개별 바이러스의 역가는 검역원 기준인 NDV 5이상 IBV 2.5이상의 기준에 부합함을 확인하였다 (표-42).

표-42. IB-ND 혼합백신의 동결건조 전후의 개별 역가 확인시험

IB-ND 혼합백신		동결건조 전		동결건조 후	
IB	NDV	IB	NDV	IB	NDV
K2	L7	3.5	5.7	3.5	5.7

4. K2-L7 혼합 생독백신의 실험실 내 안전성 및 효능시험

▶ 제작된 K2-L7 혼합백신을 뉴캐슬병 바이러스 및 닭 전염성 기관지염 바이러스에 감수성이 있는 3주령 닭 10마리에 10수분을 점안으로 접종한 후 14일간 임상증상 및 폐사율을 관찰한다. 백신접종 3주후 백신접종한 병아리로부터 채혈을 하여 혈구응집억제반응 (Hemagglutination inhibition, HI)을 통해 NDV 항체가를 측정하였고, IBV의 경우 중화항체형성여부 확인을 위한 중화시험을 실시하였다. 또한 강독형 (Kr-005/00 주)를 공격접종한 후 임상증상 및 폐사율을 관찰하여 방어능을 산출하였다. 시험결과 백신을 접종한 그룹에서 모두 임상증상 및 폐사율을 관찰할 수 없었

으며, NDV와 IBV에 대한 항체도 모두 높게 나타남을 통해 면역원성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 또한 NDV 공격접종에 대해서도 검정기준인 80% 이상이 됨을 통해 제작된 IB-ND 혼합 생독 백신의 안전성과 효능이 입증되었다(표-43).

표-43. IB-ND 혼합백신의 실험실내 효능시험

IB-ND 혼합백신		효능		
		NDV		IBV
IBV	NDV	HI titer(Log ₂)	방어능 (%)	중화시험
K2	L7	4.2	95	2.5
음성 대조군		-	0	-

5. K2+L7 혼합생독백신 시제품 제작

(1) K2+L7 혼합 생독백신의 함량 조절

① K2+L7 혼합 생독백신의 국가검정 기준 시험에 대한 ND 바이러스 함량조절

▶ 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 백신의 바이러스 함량시험에 의하면 ND 바이러스의 경우 37℃에서 5일간 보존한 뒤에 역가를 측정하는 가혹실험이 있기에 ND 바이러스의 함량의 조절이 필요하다. 실험실에서 검정기준에 따라 가혹실험을 한 결과 ND 바이러스의 역가가 평균적으로 10배 정도 떨어지는 것으로 확인되었다. 그에 따라 검정기준의 최소 함량기준인 1수분당 ND 바이러스 10^{5.0} EID₅₀ 이상을 통과하기 위하여 ND 바이러스의 함량을 10배 상승시켜 시제품을 제작하는 것이 적합하다고 판단하였다.

② K2+L7 혼합 생독백신의 국가검정 기준 시험에 대한 IB 바이러스 함량조절

▶ 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 백신의 바이러스 함량시험에 의하면 ND 바이러스의 경우 37℃에서 5일간 보존한 뒤에 역가를 측정하는 가혹실험이 있기에 ND 바이러스의 함량을 10배 상승시켜 시제품을 제작하기로 하였다. 이에 간섭현상을 최소화하는 혼합비율을 맞추기 위하여 ND 바이러스와 동일하게 IB 바이러스의 함량을 10배 상승시켜 시제품을 제작하였다. 그리고 IB-ND 혼합백신의 경우 동결건조된 상태로 시제품을 제작하여 농가에서 적용하게 된다. 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 합숙도시험 기준에 따라 동결건조하였을 때 동결건조 전후의 개별 바이러스 함량을 비교하면, IB 바이러스는 함량이 평균 10^{0.5} EID₅₀ 정도 떨어지는 것이 확인되어 함량을 그에 맞추어 상승시켜 시제품을 제작하는 것이 적합하다고 판단하였다.

③ K2+L7 혼합 생독백신 시제품 제작 혼합비율 설정

▶ 위의 두 시험의 결과에 따라 IB-ND 혼합 생독백신 시제품 제작의 최종 혼합비율을 1 수분당 ND 바이러스는 10^{6.5} EID₅₀로, IB 바이러스는 10^{4.8} EID₅₀로 최종 설정하였다.

(2) K2+L7 혼합 생독백신의 시제품 제작 및 역가확인시험

▶ (주)고려비엔피에서는 국내에서 분리하여 안전하게 약독화한 IB K주와 재조합 ND L주를 혼합하여 육계와 산란계 모두에 적용 가능한 2가 IB-ND 생독 혼합백신을 제작하였다.

▶ 제작된 IB-ND 혼합 생독백신 시제품의 IB 바이러스 백신주의 함량을 확인하기 위하여 개별역가 확인시험을 실시하였다. K2+L7 백신 시제품의 IB 바이러스 백신주의 함량을 확인하기 위하여 백신을 ND 바이러스의 고도 면역혈청으로 중화한 후 인산완충용액으로 1수분의 10⁻⁶까지 10진 희석한다. 10⁻¹부터 10⁻⁶까지의 희석액을 5개의 10일령 발육계란의 장노막강내에 0.1ml씩 접종한 후

37℃에서 3일간 배양한다. 접종 후 24시간 이내에 폐사한 것은 제외하고 24시간 이후에 폐사한 것은 IB 바이러스에 의한 폐사임을 확인하고 3일 후에 생존한 것에 대하여는 장노막강액을 채취하여 Dot-immunoblotting assay를 실시하여 EID₅₀을 산출한다. 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준은 1수분당 IB 바이러스 10^{2.5} EID₅₀이상이다.

- ▶ 제작된 IB-ND 혼합 생독백신 시제품의 ND 바이러스 백신주의 함량을 확인하기 위하여 개별역가 확인시험을 실시하였다. K2+L7 백신 시제품의 ND 바이러스 백신주의 함량을 확인하기 위하여 백신을 IB 바이러스의 고도 면역혈청으로 중화한 후 인산완충용액으로 1수분의 10⁻⁸까지 10배 희석한다. 10⁻³부터 10⁻⁸까지의 희석액을 5개의 10일령 발육계란의 장노막강내에 0.1mℓ씩 접종한 후 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 후 24시간 이내에 폐사한 것은 제외하고 24시간 이후에 폐사한 것은 ND 바이러스에 의한 폐사임을 확인하고 3일 후에 생존한 것에 대하여는 장노막강액의 닭 적혈구 응집성을 조사한다. 적혈구를 응집하는 것을 양성으로 인정하여 EID₅₀을 산출한다. 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준은 1수분당 ND 바이러스 10^{5.0} EID₅₀이상이다.

표-44. K2+L7 생독백신 동결건조 후 역가검정 결과

Batch	동결건조 전 (logEID ₅₀ /1 dose)		동결건조 후 (logEID ₅₀ /1 dose)	
	NDV	IBV	NDV	IBV
1	6.6	4.8	6.6	4.3
2	6.5	4.8	6.5	4.3
3	6.5	4.8	6.5	4.3

6. IB-ND 혼합 생독백신 시제품의 안전성 시험

(1) 국가검정기준에 의한 시제품의 안전성 시험

- ▶ 시험 방법: K2+L7 백신 시제품의 안전성 여부를 확인하기 위하여 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 안전시험을 실시한다. 각 백신 당 3개의 batch에 대하여 10수씩 1주령 SPF 병아리에 각 백신 시제품을 10수분씩 음수로 접종한다. 백신 접종 후 1주일간 호흡기 증상, 폐사율 등의 임상증상을 관찰한다.
- ▶ 시험 결과: 각 백신들은 표-45와 같이 임상증상, 폐사율 및 증체율 시험에서 높은 안전성을 확인하였다. 각 백신들은 모두 백신 접종으로 인한 임상증상 및 폐사가 발생하지 않았으며, 접종 2주 후의 체중 측정에서도 백신을 접종하지 않은 대조군과 비교하였을 때 차이가 없어 백신 접종으로 인한 증체 저하는 없는 것으로 확인되었다.

표-45. K2+L7 생독 백신 음수 접종 후 1주령 SPF 시험계의 임상 증상, 폐사율 및 증체율

Batch	시험계 수	임상증상	폐사	체중 (Mean ± SD)	
				접종 전	접종 2주 후
1	10	0/10	0/10	65.5 ± 2.8	184.5 ± 8.2
2	10	0/10	0/10	64.8 ± 1.8	183.7 ± 10.4
3	10	0/10	0/10	63.6 ± 1.9	182.6 ± 10.8
대조군	10	0/10	0/10	64.7 ± 2.3	185.2 ± 7.5

(2) 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 안전성 시험

① 시험 방법

▶ K2+L7 백신 시제품 초생추에 분무 접종을 하였을 때의 안전성 여부를 확인하기 위하여 안전시험을 실시한다. K2+L7 백신 그룹에 1일령 SPF 병아리를 40수, 그리고 20수의 대조군으로 구분한 다음 각 백신 시제품을 1수분씩 국내에서 사용되는 50 μ m 분무입자 크기의 캐비넷형 분무기 (SK-MO-Auto-3000, 쓰리사인, 한국)를 이용하여 고운분무로 접종하고, 병아리의 체중을 측정한다. 백신 접종 후 14일간 호흡기 증상, 폐사율 등의 임상증상을 관찰하고 체중을 측정한다. 그리고 K2+L7 백신을 1일령 SPF 병아리 12수, 그리고 12수의 대조군으로 구분한 다음 각 백신 시제품을 1수분씩 분무로 접종하고, 백신접종 4, 7, 11, 그리고 14일 후에 기도, 폐, 신장의 포르말린 고정을 통하여 조직학적 병변을 관찰한다.

② 시험 결과

▶ K2+L7 백신은 분무 접종으로 임상증상이나 폐사 및 증체저하가 거의 나타나지 않았으며 (표46), 미약한 기관염증소견과 기관섬모소실소견 그리고 신장염증소견을 보였다 (표 47, 48, 49). 백신의 접종으로 인하여 미약한 조직염증소견을 보이거나 증체에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 그러므로, K2+L7 백신은 초생추에 적용하였을 때, 안전성을 가지는 것으로 사료된다.

표-46. 시험백신 분무 접종 후 1일령 SPF 시험계의 임상 증상, 폐사율 및 증체율의 관찰결과

백신	시험계 수수	임상증상	폐사	체중 (g, Mean \pm SD)	
				접종 전	접종 2주 후
K2+L7	40	0/40	0/40	34.7 \pm 2.8	131.5 \pm 5.6
대조군	20	0/20	0/20	34.7 \pm 2.3	126.6 \pm 7.5

표-47. 시험백신 접종 4, 7, 11 그리고 14일 후 1일령 SPF 시험계의 기관염증소견

백신	접종 후 경과일자에 따른 기관염증소견 ^A (Mean \pm SD)			
	접종 4일 후	접종 7일 후	접종 11일 후	접종 14일 후
K2+L7	1.00 \pm 1.00	2.33 \pm 0.58	0.67 \pm 0.58	1.33 \pm 0.58
대조군	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00

^A기관염증소견에 따른 조직병변지수 (normal=0, focal=1, multifocal=2, diffuse=3)

표-48. 시험백신 접종 4, 7, 11 그리고 14일 후 1일령 SPF 시험계의 기관섬모소실소견

백신	접종 후 경과일자에 따른 기관섬모소실소견 ^A (Mean \pm SD)			
	접종 4일 후	접종 7일 후	접종 11일 후	접종 14일 후
K2+L7	1.67 \pm 1.15	3.33 \pm 0.58	1.00 \pm 0.00	1.67 \pm 0.58
대조군	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00

^A기관섬모소실정도에 따른 조직병변지수 (0=normal cilia, 1=<25% cilia damaged, 2=<50%, 3=<75%, 4=>75%.)

표-49. 시험백신 접종 4, 7, 11 그리고 14일 후 1일령 SPF 시험계의 신장염증소견

백신	접종 후 경과일자에 따른 신장염증소견 ^A (Mean ± SD)			
	접종 4일 후	접종 7일 후	접종 11일 후	접종 14일 후
K2+L7	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.33 ± 0.58	0.33 ± 0.58
대조군	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

^A신장염증소견에 따른 조직병변지수 (normal=0, focal=1, multifocal=2, diffuse=3)

7. K2+L7 혼합 생독백신 시제품의 면역원성 시험 및 방어효능 시험

(1) 국가검정기준에 의한 시제품의 면역원성 및 방어능의 평가

① IB 바이러스에 대한 국가검정기준의 면역원성 시험 및 방어효능 시험

- ▶ 시험 방법: K2+L7 백신 시제품의 IB 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 혈청 역가시험을 실시한다. 총 20수의 7주령 SPF 병아리를 10수씩 2개의 그룹으로 구분한 다음 K2+L7 백신 시제품을 1수분씩 점안으로 접종한다. 백신 접종 후 3주 후 채혈하여 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화한 후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화한다. 중화 후 바이러스 함량 시험법에 따라 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 계란의 장노막강액을 채취하여 Dot immunoblotting assay를 통해 중화지수를 산출한다. 그리고 백신의 방어효능을 확인하기 위해 백신접종 3주 후, 공격접종용 바이러스 (KM91) 를 마리당 10^{4.5} EID₅₀ 을 점안으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장에서 바이러스 재분리율을 확인한다.
- ▶ 시험 결과: K2+L7 백신은 표-50과 같이 중화시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였으며, 공격접종 시험에서도 뛰어난 방어능을 보였다. 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 고시된 바에 의하면 대조군의 혈청으로 한 중화지수와 백신군의 혈청으로 한 중화지수가 2.0 이상이 차이가 나야하는데, 백신 시험군에서 2.0 이상 차이가 남아 확인되었다 IBV ELISA kit으로 항체 역가를 직접 확인한 실험에서도 모두 우수한 항체형성능을 보임이 확인되었다. 추가적으로 진행된 병원성 바이러스의 공격접종 시험에서도 우수한 방어능을 보여 이 실험에 사용한 IB-ND 혼합 생독백신을 야외농장에 적용한다면 IB 바이러스로 인한 피해를 완벽히 차단할 수 있을 것으로 사료된다.

표-50. 백신 21일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 IB 바이러스에 대한 중화시험 결과 및 공격접종 5일 후 시험계의 기관과 신장으로부터의 공격접종바이러스 재분리율

백신	시험계 수	중화시험 ^A		ELISA 결과 ^C	공격접종 바이러스의 재분리율	
		중화 후 역가 ^B	중화지수		기관	신장
K2+L7	10	2.1	5.0	10/10	0/10	0/10
대조군(SPF)	10	7.1	0	0/10	10/10	8/10
대조군(PBS)	10	7.8	-	-	-	-

^AIBV K2 strain(10^{8.0} EID₅₀)에 대한 중화시험

^B면역혈청을 중화한 후의 바이러스 역가 (logEID₅₀/ml)

^CBionote사의 IBV ELISA kit을 사용하여 시험혈청을 검사하였을 때 양성으로 확인된 혈청수/검사한 혈청수

② ND 바이러스에 대한 국가검정기준의 면역원성 시험 및 방어효능 시험

- ▶ 시험 방법: K2+L7 백신 시제품의 ND 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 효력시험을 실시하고 또한 면역원성을 확인하기 위하여 항체형성능을 확인한다. 총 20수의 7주령 SPF 병아리를 10수씩 2개의 그룹으로 구분

한 다음 백신 시제품을 1수분씩 점안으로 접종한다. 백신 접종 2주 후 혈액을 채취한 후 ND바이러스에 대한 중화항체형성여부 확인을 위하여 혈구응집억제시험을 실시한다. 백신 접종 2주 후 실험군 및 대조군에 공격용 바이러스(Kr-005주)를 마리당 $10^{5.5}$ EID₅₀을 근육으로 공격접종하고 14일간 이상유무를 관찰한다.

- ▶ 시험 결과: 표-51과 같이 혈구응집억제시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였으며, 공격접종 시험에서도 뛰어난 방어능을 보였다. 혈구응집억제시험에서 백신 접종 14일 후에 충분한 항체형성능을 보였으며, 방어효능 시험에서도 농립축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준인 80% 이상의 시험군이 임상증상 및 폐사를 보이지 않는 조건에 부합하는 것으로 확인되었다. 그러므로 이 실험에 사용한 IB-ND 혼합 생독백신을 야외농장에 적용한다면 ND바이러스로 인한 피해를 완벽히 차단할 수 있을 것으로 사료된다.

표-51. 백신 14일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 ND 바이러스에 대한 혈구응집억제시험결과 및 공격접종 후 14일간 시험계의 임상 증상, 폐사율의 관찰결과

백신	HI test ^A	시험계 수	임상증상 ^B	폐사
K2+L7	4.65 ± 1.86	10	0/10	0/10
대조군	0±0	10	10/10	10/10

^A혈구응집억제지수 (Mean ± SD, log₂)

^B뉴캐슬병과 관련된 임상증상을 나타낸 닭의 수로 폐사를 포함한 임상증상

(2) 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 면역원성 및 방어능의 평가

① 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 IB 바이러스에 대한 면역원성 및 방어효능 시험

- ▶ 시험 방법: K2+L7 백신 시제품의 IB 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 혈청 역가시험을 실시한다. 총 20수의 1일령 SPF 병아리를 10수씩 2개의 그룹으로 구분한 다음 K2+L7 백신 시제품을 1수분씩 국내에서 사용되는 50µm 분무입자 크기의 케비넷형 분무기 (SK-MO-Auto-3000, 쓰리샤인 한국)를 이용하여 고온분무로 접종한다. 백신 접종 후 3주 후 채혈하여 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화한 후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화한다. 중화 후 바이러스 함량 시험법에 따라 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 계란의 장노막강액을 채취하여 Dot immunoblotting assay를 통해 중화지수를 산출한다. 그리고 백신의 방어효능을 확인하기 위해 백신접종 3주 후, 공격접종용 바이러스 (KM91)를 마리당 $10^{4.5}$ EID₅₀을 점안으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장에서의 바이러스 재분리율을 확인한다.
- ▶ 시험 결과: K2+L7 백신은 표-52와 같이 중화시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였으며, 공격접종 시험에서도 뛰어난 방어능을 보였다. 농립축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 고시된 바에 의하면 대조군의 혈청으로 한 중화지수와 백신군의 혈청으로 한 중화지수가 2.0 이상이 차이가 나와야하는데, 시험군에서 2.0 이상 차이가 남아 확인되었다. IBV ELISA 키트로 항체 역가를 직접 확인한 실험에서도 우수한 항체형성능을 보임이 확인되었다. 추가적으로 진행된 병원성 바이러스의 공격접종 시험에서도 우수한 방어능을 보임이 확인되었다. 그러므로 이 백신을 초생추에 적용하였을 때 IB 바이러스로 인한 피해를 완벽히 차단할 수 있을 것으로 사료된다.

표-52. 백신 21일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 IB 바이러스에 대한 중화시험 결과 및 공격접종 5일 후 시험계의 기관과 신장으로부터의 공격접종바이러스 재분리율

백신	시험계 수수	중화시험 ^A		ELISA 결과 ^C	공격접종 바이러스의 재분리율	
		중화 후 역가 ^B	중화지수		기관	신장
K2+L7	10	2.5	5.0	10/10	0/10	0/10
대조군(SPF)	10	7.5	0	0/10	10/10	8/10
대조군(PBS)	10	8.0	-	-	-	-

^AIBV K2 strain(10^{8.0} EID₅₀)에 대한 중화시험

^B면역혈청을 중화한 후의 바이러스 역가 (logEID₅₀/ml)

^CBionote사의 IBV ELISA kit을 사용하여 시험혈청을 검사하였을 때 양성으로 확인된 혈청수/검사한 혈청수

② 초생추 분무 접종을 통한 시제품의 ND바이러스에 대한 면역원성 및 방어효능 시험

- ▶ 시험 방법: K2+L7 백신 시제품의 ND 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 효력시험을 실시하고 또한 면역원성을 확인하기 위하여 항체형성능을 확인한다. 총 40수의 1령 SPF병아리를 30수의 시험군과 10수의 대조군으로 구분한 다음 각 백신의 시제품을 1수분씩 국내에서 사용되는 50 μ m 분무입자 크기의 케비넷형 분무기 (SK-MO-Auto-3000, 쓰리샤인, 한국)를 이용하여 고운분무로 접종한다. 백신 접종 2주 후 혈액을 채취한 후 ND 바이러스에 대한 중화항체형성여부 확인을 위하여 혈구응집억제시험을 실시한다. 백신 접종 2주 후 실험군 및 대조군에 공격용 바이러스 (Kr-005주)를 마리당 10^{5.5} EID₅₀을 근육으로 공격접종하고 14일간 이상유무를 관찰한다.
- ▶ 시험 결과: 표-53와 같이 혈구응집억제시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였으며, 공격접종 시험에서도 뛰어난 방어능을 보였다. 혈구응집억제시험에서 백신 접종 14일 후에 충분한 항체형성능을 보였으며, 방어효능 시험에서도 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준인 80% 이상의 시험군이 임상증상 및 폐사를 보이지 않는 조건에 부합하는 것으로 확인되었다. 그러므로 이 백신을 초생추에게 야외농장에서 적용한다면 ND 바이러스로 인한 피해를 크게 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

표-53. 백신 14일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 ND 바이러스에 대한 혈구응집억제시험결과 및 공격접종 후 14일간 시험계의 임상 증상, 폐사율의 관찰결과

백신	HI test ^A	시험계 수수	임상증상 ^B	폐사
K2+L7	4.34 \pm 1.22	30	0/30	0/30
대조군	0 \pm 0	10	10/10	10/10

^A혈구응집억제지수 (Mean \pm SD, log₂)

^B뉴캐슬병과 관련된 임상증상을 나타낸 닭의 수로 폐사를 포함한 임상증상

8. K2+L7 혼합 생독백신 시제품의 품목 허가 신청

- ▶ K2-L7 생독 혼합백신의 시제품을 제작하여 국가 검정기준에 의거한 국내 실험실내 임상시험을 완료하고 농림축산검역본부에 품목 허가신청을 위한 기술검토서류 제출을 완료하였다.

9. K2+L7 혼합 생독백신 시제품의 야외농장 안전성 시험

- ▶ 부화장에서 K2+L7 혼합 생독백신을 1회 분무접종 한 시험군 (G1), 1령에 분무접종하고 14일령에 음수접종 한 시험군 (G2)과 ND백신만 분무접종한 대조군 (G3)으로 구분하여 시험하였다. 기타 사양관리는 각 농장의 방법에 따르고, 출하시까지 임상관찰 (사료섭취 상태, 폐사, 호흡기증상, 설사)하면서, 접종전, 접종후 14일, 접종후 28일, 출하시에 체중을 측정 하여 증체율을 조사하였다. 체중은 20수를 측정하여 평균치로 환산하고 시험결과의 유의성은 Student's t-test 로 분석하였다.

백신의 안전성시험을 3개 농장에서 시험군 간의 임상증상을 비교, 관찰하고 14일령, 28일령, 출하시 일령별 체중을 측정하였다(표-54, 55, 56). 시험 결과 금성농장에서 14일령에 야외감염에 의한 호흡기 반응과 K2+L7 혼합 생독백신을 접종한 계립농장에서 시험군 (G2와 대조군에서 14일령을 전후하여 경미한 호흡기 반응이 나타난 점을 제외하면 뚜렷한 임상증상을 보이지 않았으며, 체중 측정 결과 K2+L7 혼합 생독백신을 접종한 시험군의 체중이 접종하지 않은 대조군과 비교하였을 때 차이를 보이지 않았다(표-57, 58, 59).

표-54. 장현농장 시험군과 대조군의 임상증상 비교

구 분	시험군	일령별 임상증상			
		접종 전	14일령	28일령	출하시(32일령)
시험군	1일령 분무접종	이상없음	이상없음	이상없음	이상없음
	1일령 분무접종 14일령 음수접종	이상없음	이상없음	이상없음	이상없음
대조군	1일령 ND 분무접종	이상없음	이상없음	이상없음	이상없음

표-55. 금성 농장 시험군과 대조군의 임상증상 비교

구 분	시험군	일령별 임상증상			
		접종 전	14일령	28일령	출하시(32일령)
시험군	1일령 분무접종	이상없음	이상없음	이상없음	이상없음
	1일령 분무접종 14일령 음수접종	이상없음	호흡기반응 ^A	이상없음	이상없음
대조군	1일령 ND 분무접종	이상없음	호흡기반응 ^A	이상없음	이상없음

^A18일령 대장균 감염

표-56. 계립 농장 시험군과 대조군의 임상증상 비교

구 분	시험군	일령별 임상증상			
		접종 전	14일령	28일령	출하시(33일령)
시험군	1일령 분무접종	이상없음	이상없음	이상없음	이상없음
	1일령 분무접종 14일령 음수접종	이상없음	이상없음	이상없음	이상없음
대조군	1일령 분무접종 14일령 음수접종	이상없음	이상없음	이상없음	이상없음

표-57. 장현 농장 증체량 비교시험 결과

구 분	시험군	접종 후 일령별 체중(g)			
		접종 전	14일령	28일령	32일령
시험군	1일령 분무접종	41.21	382	1,297	1,683
	1일령 분무접종 14일령 음수접종	43.15	387	1,319	1,729
대조군	1일령 ND 분무접종	42.49	381	1281	1,642

표-58. 금성 농장 증체량 비교시험 결과

구 분	시험군	접종 후 일령별 체중(g)			
		접종 전	14일령	28일령	32일령
시험군	1일령 분무접종	41.25	390	1,234	1,578
	1일령 분무접종 14일령 음수접종	42.12	399	1,265	1,681
대조군	1일령 ND 분무접종	41.98	398	1,224	1,521

표-59. 계림 농장 증체량 비교시험 결과

구 분	시험군	접종 후 일령별 체중(g)			
		접종 전	14일령	28일령	33일령
시험군	1일령 분무접종	39.87	371	1,260	1,657
	1일령 분무접종 14일령 음수접종	40.52	379	1,289	1,701
대조군	1일령 분무접종 14일령 음수접종	40.31	375	1,161	1,611

10. K2+L7 혼합 생독백신 시제품의 야외농장 효능 시험

(1) 야외농장에서의 ND 바이러스에 대한 면역원성 시험

▶ 백신의 면역원성을 시험하기 위하여 3개의 농장에서 1일령에 K2+L7 혼합 생독백신 접종 시험군과 1일령(분무) 과 14일령(음수)에 K2+L7 혼합 생독백신 접종 시험군 그리고 1일령 ND 생백신 접종 대조군의 항체가를 14일령, 28일령, 출하 시에 비교하였다(표-60, 61, 62). LaSota 항원과 L7 항원을 이용한 혈구응집억제 반응(HI test)으로 ND 바이러스에 대한 항체가를 측정 한 결과 1일령에 1회 접종한 시험군보다 1일령과 14일령에 2회 접종한 시험군에서 높은 항체가를 보였다. 백신을 실시하지 않은 조류 인플루엔자(AI)에 대해서는 3개 시험농장 모두 항체형성을 보이지 않아서 야외감염이 없었음을 확인하였다.

표-60. 장현 농장 항체가 비교시험 결과

구분	접종방법	중화용 항원	항체역가			
			접종 전	14일령	28일령	32일령
시험군	1일령 분무접종	IB K2 ^A	0.4	3.7	3.7	3.9
		ND LaSota ^B	9.8±0.8	6.8±0.8	3.1±0.8	1.3±0.7
		ND L7 ^B	10±0.9	6.1±0.8	2.7±1.1	1.5±1.1
	1일령 분무접종 14일령 음수접종	IB K2 ^A	0.5	3.4	4.5	4.9
		ND LaSota ^B	9.6±0.5	6.3±1.1	3.1±1.0	1.5±1.0
		ND L7 ^B	9.8±0.6	6.0±1.1	4.2±1.6	3.7±1.2
대조군	1일령 ND 분무접종	IB K2 ^A	0.4	0.6	0.4	0.5
		ND LaSota ^B	9.6±0.5	5.3±1.3	2.4±1.2	0.9±0.7
		ND L7 ^B	10±0.8	6.0±1.1	2.7±0.9	1.4±1.1

^A중화시험지수

^BHI 역가 (Mean±S.D, log2)

표-61. 금성 농장 항체가 비교시험 결과

구분	접종방법	중화용 항원	항체역가(Mean±S.D, log2)			
			접종 전	14일령	28일령	32일령
시험군	1일령 분무접종	IB K2 ^A	0.5	3.2	3.3	3.5
		ND LaSota ^B	7.8±0.8	4.8±0.6	2.1±0.7	0.9±0.7
		ND L7 ^B	7.5±0.7	4.1±0.7	2.2±0.8	1.0±1.1
	1일령 분무접종 14일령 음수접종	IB K2 ^A	0.5	3.1	4.2	4.5
		ND LaSota ^B	7.6±0.8	4.2±0.7	3.4±0.7	1.9±1.0
		ND L7 ^B	7.8±0.5	4.1±0.6	4.8±0.8	4.1±0.5
대조군	1일령 ND 분무접종	IB K2 ^A	0.5	0.7	0.6	0.6
		ND LaSota ^B	7.6±0.6	4.8±0.7	1.9±1.2	0.8±0.7
		ND L7 ^B	7.2±0.8	4.7±0.6	1.4±0.9	0.6±1.1

^A중화시험지수

^BHI 역가 (Mean±S.D, log2)

표-62. 계림 농장 항체가 비교시험 결과

구분	접종방법	중화용 항원	항체역가(Mean±S.D, log2)			
			접종 전	14일령	28일령	33일령
시험군	1일령 분무접종	IB K2 ^A	0.6	3.3	3.4	3.3
		ND LaSota ^B	6.7±0.6	3.9±0.7	1.9±1.0	0.9±0.6
		ND L7 ^B	6.4±0.6	3.7±0.5	1.6±0.9	0.8±0.8
	1일령 분무접종 14일령 음수접종	IB K2 ^A	0.5	3.2	4.5	4.7
		ND LaSota ^B	6.6±0.8	3.8±0.7	2.2±0.6	1.3±1.0
		ND L7 ^B	6.7±0.6	3.7±0.7	3.1±0.8	2.9±0.8
대조군	1일령 분무접종 14일령 음수접종	IB K2 ^A	0.5	0.7	0.5	0.4
		ND LaSota ^B	6.6±0.7	3.3±0.6	2.4±0.6	1.2±0.9
		ND L7 ^B	6.4±0.8	3.1±0.8	2.2±0.8	1.1±0.6

^A중화시험지수

^BHI 역가 (Mean±S.D, log2)

(2) 야외 농장에서의 IB 바이러스에 대한 면역원성 시험

▶ 시험 농장의 시험기간 중 IB 중화항체 형성여부를 확인하기 위하여 14일령, 28일령, 출하 시 각 시험군 별로 채혈하여 분리된 혈청을 이용하여 중화시험을 하였다 (표 -60, 61, 62). 출하 시 그룹별 중화지수를 산출, 비교한 결과 K2+L7 혼합 생독백신을 접종한 시험군들은 접종하지 않은 대조군보다 유의성 있게 높은 IB 중화지수를 보였다.

(3) K2+L7 혼합 생독백신 시제품의 야외 농장에서의 간섭현상 확인 시험

▶ 시험 농장의 시험기간 중 IBV에 의한 NDV의 간섭여부를 확인하기 위하여 14일령과 28일령에 ND 강독주를 공격접종하고 14일간 관찰하여 폐사를 근거로 방어율을 산출하였다 (표63, 64, 65). 시험결과 ND 모체이행항체가 높은 장현농장에서는 14일령, 28일령에 공격접종한 결과 시험군과 대조군 모두 100% 생존하였다. 금성농장과 계림농장에서는 1일령에 K2+L7 혼합 생독백신을 접종한 시험군(G1)은 Avinew 생백신을 접종한 대조군과 비슷한 ND 방어율을 보였지만, 1일령과 14일령에 2회 K2+L7 혼합 생독백신을 접종한 시험군 (G2)에서는 1일령에만 접종한 시험군 (G1)과 대조군보다 높은 ND 방어율을 확인하였다.

표-63. 장현 농장 방어능 비교시험 결과

구 분	접종방법	공격접종 일령	폐사수/ 접종수	방어율(%)
시험군	1일령 분무접종	14일령	0/15	100
		28일령	0/15	100
	1일령 분무접종 14일령 음수접종	14일령	0/15	100
		28일령	0/15	100
대조군	1일령 ND 분무접종	14일령	0/15	100
		28일령	0/15	100

표-64. 금성농장 방어능 비교시험 결과

구 분	접종방법	공격접종 일령	폐사수/ 접종수	방어율(%)
시험군	1일령 분무접종	14일령	0/15	100
		28일령	4/15	73
	1일령 분무접종 14일령 음수접종	14일령	0/15	100
		28일령	2/15	100
대조군	1일령 ND 분무접종	14일령	2/15	87
		28일령	5/15	67

표-65. 계림농장 방어능 비교시험 결과

구 분	접종방법	공격접종 일령	폐사수/ 접종수	방어율(%)
시험군	1일령 분무접종	14일령	0/15	100
		28일령	4/15	73
	1일령 분무접종 14일령 음수접종	14일령	0/15	100
		28일령	1/15	93
대조군	1일령 분무접종 14일령 음수접종	14일령	0/15	100
		28일령	2/15	87

(4) K2+L7 혼합 생독백신의 야외농장 적용 시의 생산성에 미치는 영향 조사

▶ K2+L7 혼합 생독백신이 생산성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 출하체중, 입추수수, 출하일령 사료효율을 근거로 생산지수를 비교하였다(표-66, 67, 68). CAV 감염에 의한 생산성 저하를 보인 장현농장을 제외한 2개의 시험농장에서 K2+L7 혼합 생독백신을 접종한 시험군들의 생산지수가 K2+L7 혼합 생독백신을 접종하지 않은 대조군과 비슷하게 나타나, K2+L7 혼합 생독백신이 육계 생산성에 저해를 가져오지 않는 것으로 확인되었다.

▶ 시험농장의 시험기간 중 타 질병으로 인한 간섭여부 판별과 백신주의 바이러스 혈증 시기를 측

정하기 위하여 주 2회 구강 Swab 후 바이러스 검출 시험을 실시하였다. 시험결과 시험백신을 접종한 모든 군에서 백신주가 분리되어 백신접종이 잘되었음을 확인하였고, 백신 접종 후 2주에서 3주에 걸쳐 백신주 바이러스가 분리되었다. 또한, 입추와 출하시 혈청을 대상으로 생산성에 영향을 미칠 수 있는 세망내피증 (RE, Reticuloendotheliosis), 닭 전염성 빈혈증 (CA, Chicken anemia), 레오바이러스 감염증 (Reo)은 ELISA 검사를 실시하였다. 혈청 모니터링 결과 장현농장에서 CAV가 야외감염이 확인되었다. 장현농장에서는 생산지수를 산출한 결과 다른 2개 시험농장에 비하여 대조의 생산지수가 낮게 산출되어 CAV로 인한 생산성 저하가 나타났음을 확인하였다

표-66. 장현 농장 생산지수 결과

구 분	시험군	출하체중(g)	입추수	출하일령	사료효율	생산지수
시험군	1일령 분무접종	1,683	1,2500	32일령	1.69	297
	1일령 분무접종 14일령 음수접종	1,729	1,1500	32일령	1.61	298
대조군	1일령 ND 분무접종	1,642	10,100	32일령	1.81	273

표-67. 금성 농장 생산지수 결과

구 분	시험군	출하체중(g)	입추수	출하일령	사료효율	생산지수
시험군	1일령 분무접종	1,578	1,4500	32일령	1.70	287
	1일령 분무접종 14일령 음수접종	1,681	1,3800	32일령	1.68	290
대조군	1일령 ND 분무접종	1,521	1,3500	32일령	1.71	285

표-68. 계립 농장 생산지수 결과

구분	시험군	출하체중(g)	입추수	출하일령	사료효율	생산지수
시험군	1일령 분무접종	1,657	1,2800	33일령	1.89	291
	1일령 분무접종 14일령 음수접종	1,701	1,1700	33일령	1.78	297
대조군	1일령 분무접종 14일령 음수접종	1,611	1,2800	33일령	1.80	296

▶ 이상의 시험결과 공시된 K2+L7 혼합 생독백신은 뉴캐슬병과 닭 전염성 기관지염에 대한 항체 형성능과 안전성이 뛰어나고 증체율에 영향을 미치지 않는 백신임을 확인하였다. NDV와 IBV에 대한 간섭 영향을 살펴본 결과 1일령에 K2+L7 혼합 생독백신 접종 시 간섭현상 없이 항체형성이 우수함을 확인하였다. 이상의 결과로 K2+L7 혼합 생독백신은 1일령 병아리에 접종할 경우 생산성 향상에 기여하며 뉴캐슬병과 신장형 닭 전염성 기관지염 예방에 적합한 백신으로 판단된다.

11. K2+L7 혼합 생독백신의 산업화 완료

▶ 국가 검정기준에 의거하여 3개의 국내 육계 농장을 대상으로 하는 야외임상시험을 완료하였으

며 IB와 ND에 대한 안전성과 면역원성을 확인받아 제품 등록을 완료하였으며 현재 국내에서 판매 중에 있다.



그림-8. 제품등록이 완료되어 현재 판매 중인 K2+L7 혼합 생독백신(고려BNP 달구방 BN++)

12. K2+L7 혼합 생독백신의 해외 임상 시험

(1) K2+L7 혼합 생독백신 시제품의 면역원성 및 수출국 유행 IB에 대한 방어효능 시험

① 초생추 점안 접종을 통한 시제품의 IB 및 ND 바이러스에 대한 면역원성 시험

▶ 시험 방법: K2+L7 백신 시제품의 IB 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 혈청 역가시험을 실시한다. 총 20수의 4주령 SPF 병아리를 10수씩 2개의 그룹으로 구분한 다음 각 백신 시제품을 1수분씩 점안으로 접종한다. 백신 접종 후 3주 후 채혈하여 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화한 후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화한다. 중화 후 바이러스 함량 시험법에 따라 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 계란의 장노막강액을 채취하여 Dot immunoblotting assay를 통해 중화지수를 산출한다. 또한 ND에 대한 면역원성을 확인하기 위하여 백신 접종 2주 후 혈액을 채취한 후 ND 바이러스에 대한 혈구응집억제시험을 실시한다.

▶ 시험 결과: K2+L7 백신은 표-69과 같이 중화시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였다. 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 고시된 바에 의하면 대조군의 혈청으로 한 중화지수와 백신군의 혈청으로 한 중화지수가 2.0 이상이 차이가 나야하는데, 백신 시험군에서 2.0 이상 차이나는 것을 확인되었다. IBV ELISA kit으로 항체 역가를 직접 확인한 실험에서도 모두 우수한 항체형성능을 보임이 확인되었다. 또한 ND 바이러스에 대한 혈구응집억제반응 결과 ND에 대한 면역원성도 높게 나타나 IB로 인한 간섭현상은 나타나지 않은 것으로 확인되었다. 그러므로 이 백신을 초생추에 적용하였을 때 IB 및 ND에 대한 충분한 면역이 형성된다고 보인다.

표-69. 백신 21일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 IB 바이러스에 대한 중화시험 결과

백신	시험계 수	IB 중화지수 ^A	IB ELISA 결과 ^B	ND HI test ^C
K2+L7	10	2.15	8/9	4.55±2.0
대조군(SPF)	10	0	0/10	0

^AIBV K2 strain(10⁷8.0 EID₅₀)에 대한 중화시험

^BMedian diagnostics의 IBV ELISA kit을 사용하여 시험혈청을 검사하였을 때 양성으로 확인된 혈청수/검사한 혈청수

^CND 바이러스에 대한 혈구응집억제지수 (Mean ± SD, log₂)

② 초생추 접안 접종을 통한 시제품의 수출국 유행 IB에 대한 방어효능 시험

- ▶ 시험 방법: K2+L7 백신 시제품의 수출국 유행 IB 바이러스에 대한 방어효능을 확인하기 위하여 공격접종 실험을 실시하였다. 총 30수의 1일령 SPF 병아리를 10수씩 3개의 그룹으로 구분한 다음 각 백신 시제품을 1수분씩 접안경로로 접종한다. 백신 접종 후 3주 후 공격접종용 바이러스(QX-like)를 마리당 $10^{4.5}$ EID₅₀을 접안으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장을 채취하였다. 채취한 기관과 신장을 유제하여 인산완충용액과 10:1의 비율로 희석하여 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 계란의 장노막강액을 채취하여 Dot immunoblotting assay를 통해 공격접종 바이러스의 재분리율을 확인하였다.
- ▶ 시험 결과: K2+L7 백신은 표-70과 같이 수출국 유행 IB 바이러스 공격접종에 대하여 신장에서 우수한 방어효능을 나타내었다. 또한 백신을 접종하지 않은 시험군과 비교하였을 때 통계적으로 유의성 있는 결과를 확인할 수 있었다. 각각의 시험백신을 제조한 고려와 대성의 K2단미 백신을 접종한 후 공격접종을 실시한 시험군과 IB-ND 혼합생독백신을 접종한 시험군을 비교하였을 때 방어율이 차이가 없는 것으로 보아 두 가지 바이러스의 혼합으로 인한 IB에 대한 방어 효능에는 영향이 없는 것으로 확인되었다. 그러므로 이 백신을 초생추에 적용하였을 때 IB바이러스로 인한 피해를 완벽히 차단할 수 있을 것으로 사료된다.

표-70. 21일령 시험계에 공격접종 후 시험계의 기관과 신장으로부터의 공격접종바이러스 재분리율

백신	시험계 수	재분리 결과	
		기관	신장
고려 K2	10	9/10	6/10
고려 K2+L7	9	9/9	3/9
대조군(SPF)	10	10/10	9/10

(2) K2+L7 혼합 생독백신의 백신 접종 경로 및 횟수에 따른 면역원성 및 방어효능 시험

① K2+L7 혼합 생독백신 및 다국적기업의 대조백신의 접종 횟수에 따른 면역원성 시험 및 수출국 유행 IB에 대한 방어효능 시험

- ▶ 시험 방법: K2+L7 혼합 생독백신의 접종 횟수에 따른 면역원성 형성능과 그에 따른 수출국 유행 IB 바이러스에 대한 방어효능을 확인하기 위하여 공격접종 실험을 실시하였다. 총 50 수의 1일령 SPF 병아리를 10수씩 5개의 그룹으로 구분한 다음 시중에서 판매중인 K2+L7 백신과 메리알사의 Avinew와 Bioral HI20을 1수분씩 국내에서 사용되는 50 μ m 분무입자 크기의 케비넷형 분무기 (SK-MO-Auto-3000, 쓰리샤인, 한국)를 이용하여 고운분무로 접종한다. 백신접종 2주 후 2개의 그룹에 추가로 115 μ m 분무입자 크기의 Desvac kit2분무기 (Ceva를 이용하여 거친 분무로 접종한다. 시험군의 구분은 표-71과 같다. 2차 백신 접종 2주 후 (4주령)에 채혈하여 분리한 혈청을 56℃에서 30분간 비동화한 후 각각 Median diagnostics의 IBV ELISA Kit를 사용하여 항체 형성 여부를 확인하였다. 또한 ND에 대한 면역원성을 확인하기 위하여 1차 백신 접종 2주 후 (2주령)와 2차 백신 접종 2주 후 (4주령)에 혈액을 채취한 후 ND 바이러스에 대한 혈구응집억제시험을 실시한다. 실험계가 4주령이 될 때 공격접종용 IB 바이러스(QX-like)를 마리당 $10^{4.5}$ EID₅₀을 접안으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장을 채취하였다. 채취한 기관과 신장을 유제하여 인산완충용액과 10:1의 비율로 희석하여 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 계란의 장노막강액을 채취하여 Dot immunoblotting assay를 통해 공격접

중 바이러스의 재분리율을 확인하였다.

- ▶ 시험 결과: K2+L7 혼합 생독백신은 표-72와 같이 백신을 1회 혹은 2회 접종하였을 때 모두 IB와 ND에 대하여 충분한 면역형성능을 나타내는 것으로 확인되었다. 수출국 유행 IB 바이러스 공격접종 실험에서도 1회 혹은 2회 백신을 실시하였을 때 모두 신장에서 IB에 대한 높은 방어능을 나타내었다. 그에 반해 메리알사의 Avinew와 Bioral 백신을 접종하였을 때 ND와 IB에 대한 면역형성능은 높게 형성되었으나, 공격접종 시험 결과 1회 혹은 2회 백신을 접종하여도 수출국에서 유행하고 있는 IB 바이러스에 대하여 낮은 방어효능을 나타내는 것으로 나타났다. 그러므로 K2+L7 혼합 생독백신을 초생추에 적용하였을 때 수출국의 유행 IB 바이러스로 인한 피해를 완벽히 차단할 수 있을 것으로 사료되며 수출국에서 다국적 기업의 백신과 경쟁력도 충분히 갖출 수 있을 것으로 사료된다.

표-71. K2+L7 혼합 생독백신의 접종 횟수에 따른 방어능 실험의 실험군 설정

구분	공시 수수	1차 백신		2차 백신	
		백신종류	경로	백신종류	경로
Group 1	10	BN2+	분무	BN2+	분무
Group 2	10	Avinew/ Bioral H120	분무	Ma5/clone30	분무
Group 3	10	BN2+	분무	-	-
Group 4	10	Avinew/ Bioral H120	분무	-	-
Group 5	10	-	-	-	-

표-72. 1일령 초생추에서 K2+L7 혼합 생독백신의 접종 횟수에 따른 면역형성능과 방어효능 시험

구분	IB ELISA 결과 ^A		ND HI test ^B		재분리 결과	
	2주령	4주령	2주령	4주령	기관	신장
Group 1	0/11	1/11	4.45±0.8	4.18±1.3	10/11	6/11
Group 2	4/12	2/12	4.8±0.8	4.3±2.0	12/12	8/12
Group 3	4/11	11/11	5.81±1.1	5±1.0	11/11	0/11
Group 4	2/11	11/11	3.27±1.6	4.64±1.6	11/11	7/11
Group 5	0/9	0/9	0	0	9/9	9/9

^AMedian diagnostics의 IBV ELISA kit을 사용하여 시험혈청을 검사하였을 때 양성으로 확인된 혈청수/검사한 혈청수

^BND 바이러스에 대한 혈구응집억제지수 (Mean ± SD, log₂)

② K2+L7 혼합 생독백신 및 다국적기업의 대조백신의 접종 경로에 따른 면역원성 시험 및 수출국 유행 IB에 대한 방어효능 시험

- ▶ 시험 방법: K2+L7 혼합 생독백신의 접종 경로에 따른 면역원성 형성능과 그에 따른 수출국 유

행 IB 바이러스에 대한 방어효능을 확인하기 위하여 공격접종 실험을 실시하였다. 총 50주의 일령 SPF 병아리를 10수씩 5개의 그룹으로 구분한 다음 시중에서 판매중인 K2+L7 백신과 메리알사의 Avinew와 Bioral H120을 1수분씩 국내에서 사용되는 50 μ m 분무입자 크기의 케비넷형 분무기 (SK-MO-Auto-3000, 쓰리샤인, 한국)를 이용하여 고운분무로 접종한다. 백신접종 2주 후 백신의 종류 별로 음수 또는 115 μ m 분무입자 크기의 Desvac kit 분무기 (Ceva)를 이용하여 거친 분무로 접종한다. 시험군의 구분은 표-73과 같다. 2차 백신 접종 2주 후 (4주령)에 채혈하여 분리한 혈청을 56 $^{\circ}$ C에서 30분간 비동화한 후 각각 Median diagnostics의 IBV ELISA Ki를 사용하여 항체 형성 여부를 확인하였다. 또한 ND에 대한 면역원성을 확인하기 위하여 1차 백신 접종 2주 후 (2주령)와 2차 백신 접종 2주 후 (4주령)에 혈액을 채취한 후 ND 바이러스에 대한 혈구응집억제시험을 실시한다. 실험계가 4주령이 될 때 공격접종용 IB 바이러스(QX-like)를 마리당 10^{4.5} EID₅₀을 점안으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장을 채취하였다. 채취한 기관과 신장을 유제하여 인산완충용액과 10:1의 비율로 희석하여 발육계란에 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 계란의 장노막강액을 채취하여 Dot immunoblotting assay를 통해 공격접종 바이러스의 재분리율을 확인하였다.

- ▶ 시험 결과: K2+L7 혼합 생독백신은 표-74와 같이 백신을 분무 2회 혹은 분무 후 음수 접종하였을 때 모두 IB와 ND에 대하여 충분한 면역형성능을 나타내는 것으로 확인되었다. 수출국 유행 IB 바이러스 공격접종 실험에서도 분무 2회 혹은 분무 후 음수 접종 실시하였을 때 모두 IB에 대한 높은 방어능을 나타내었다. 그에 반해 메리알사의 Avinew와 Bioral 백신을 접종하였을 때 ND와 IB에 대한 면역형성능은 형성되었으나, 공격접종 시험 결과 분무 2회 혹은 분무 후 음수 백신을 접종하여도 수출국에서 유행하고 있는 IB 바이러스에 대하여 낮은 방어효능을 나타내는 것으로 나타났다. 그러므로 K2+L7 혼합 생독백신을 초생추에 적용하였을 때 수출국의 유행 IB 바이러스로 인한 피해를 완벽히 차단할 수 있을 것으로 사료되며 수출국에서 다국적 기업의 백신과 경쟁력도 충분히 갖출 수 있을 것으로 사료된다.

표-73. K2+L7 혼합 생독백신의 접종 경로에 따른 방어능 실험의 실험군 설정

구분	공시 수수	1차 백신		2차 백신	
		백신종류	경로	백신종류	경로
Group 1	10	BN2+	분무	BN2+	분무
Group 2	10	BN2+	분무	BN2+	음수
Group 3	10	Avinew/ Bioral H120	분무	Ma5/clone30	분무
Group 4	10	Avinew/ Bioral H120	분무	Ma5/clone30	음수
Group 5	10	-	-	-	-

표-74. 1일령 초생추에서 K2+L7 혼합 생독백신의 접종 횟수에 따른 면역형성능과 방어효능 시험

구분	IB ELISA 결과 ^A		ND HI test ^B		재분리 결과	
	2주령	4주령	2주령	4주령	기관	신장
Group 1	0/11	1/11	4.45±0.8	4.18±1.3	10/11	6/11
Group 2	0/10	0/10	4.0±2.6	4.5±1.1	9/10	2/10
Group 3	4/12	2/12	4.8±0.8	4.3±2.0	12/12	8/12
Group 4	2/11	2/11	3.8±2.1	3.81±0.9	11/11	11/11
Group 5	0/9	0/9	0	0	9/9	9/9

^AMedian diagnostics의 IBV ELISA kit을 사용하여 시험혈청을 검사하였을 때 양성으로 확인된 혈청수/검사한 혈청수

^BND 바이러스에 대한 혈구응집억제지수 (Mean ± SD, log₂)

1. 신기술융합 AI(H9)+ND+IB 사독백신 개발

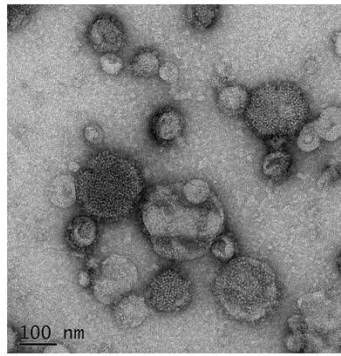
개발배경

국내 및 중동을 포함한 아시아 지역에서는 유행중인 H9형 저병원성 조류인플루엔자 바이러스를 예방하기 위하여 불활화 항원을 사용한 사독백신을 실시하고 있다. 이러한 사독백신은 종란에 백신균주를 접종하여 생산하고 있으나, 생산과정에서 항원 생산용 종란의 폐사가 발생하며 생산된 바이러스의 역가가 높지 않아 불활화 후 항원을 농축해야 하므로 백신의 단가가 올라간다는 단점이 있다. 또한 조류 인플루엔자는 Orthomyxoviridae의 RNA 바이러스로 매우 빠르게 진화하므로 백신주의 교체도 빠르게 이루어져야만 질병 방어에 효과적이라고 할 수 있다. Virus-like particle (VLP) 및 수용성 활성형 단백질을 항원으로 사용한 백신은 유전자 염기서열과 같은 제한적인 정보만으로도 빠르고 면역원성이 높은 백신을 생산할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서는 Virus-like particle 및 수용성 활성형 단백질 제조기술을 활용한 백신제조를 통하여 국내 및 수출 대상국에 적합한 최근 유행하고 있는 저병원성 H9N2형 조류인플루엔자 바이러스의 단백질을 포함하며 면역원성 및 생산역가가 높은 조류인플루엔자 VLP 단백질과 수용성 활성형 단백질을 생산하였으며, 이를 불활화 ND, IB 바이러스 항원과 혼합한 신기술 융합 AI(H9)+ND+IB 사독백신을 개발하였다. 또한 전염성기관지염의 경우 국내에서 새로운 변이형 IBV 발생 보고가 지속적으로 증가하고 있으나, 서로 다른 혈청형들 간에는 상호 교차반응이나 교차 면역이 잘되지 않으므로, 질병의 예방과 통제에 많은 어려움을 초래하고 있다. 최근에는 기존 QX주와 KM91주의 재조합주가 국내에 등장하여 유행하고 있으며, 기존 백신주와 교차 면역원성 시험 결과 면역원성이 충분하지 않은 것으로 판단되어 IB 백신주의 교체가 요구되는 시점이다. 본 연구에서는 최신 분리주를 이용하여 전염성기관지염 백신주 교체를 위한 교차방어능 시험을 수행하고 이를 사용한 AI+ND+IB 사독백신을 개발하고 산업화 하였다.

가. H9N2조류인플루엔자 Virus-like particle (VLP) 를 이용한 백신의 제작 및 면역원성, 안전성 및 방어능 시험

(1) H9N2 VLP 단백질의 제작 및 검정

▶ 국내에서 유행하는 저병원성 조류 인플루엔자 H9N2 형의 Virus-like particle (VLP) 를 제작하기 위하여 현재 백신주로 사용되고 있는 A/chicken/Korea/01310/2001 조류 인플루엔자 바이러스의 HA 단백질과 M1 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 선택적으로 증폭하였다. 증폭된 유전자를 배플로 바이러스의 DNA 에 삽입하여, 곤충세포에 감염 시 A/chicken/Korea/01310/2001 조류 인플루엔자 바이러스의 HA 단백질과 M1 단백질을 동시에 발현 시킬 수 있는 재조합 배플로 바이러스를 제작하였다. 재조합 바이러스를 곤충세포인 Sf9 세포에 감염시킨 후 배양 상층액에서 H9 VLP 를 수거하며, 이를 초원심 농축 및 sucrose 밀도구배 정제 과정을 거쳐 백신으로 사용할 VLP 항원을 제작하였으며, 제작된 VLP 항원을 혈구 응집반응, western blotting 및 전자현미경을 사용하여 확인하였다. Western blotting 및 전자현미경으로 확인 결과 influenza HA, M1 단백질을 함유하는 VLP 항원의 존재를 확인 할 수 있었으며, 8000HAU의 혈구 응집능을 갖는 것으로 확인 되었다.



[그림-1] VLP 항원의 검정

▶ 제작된 VLP 항원을 전자현미경으로 관찰한 결과 제작된 VLP가 influenza virus 와 유사한 형태를 보임을 알 수 있었다..

(2) H9N2 VLP 백신의 제작 및 SPF 닭에서의 면역원성 및 방어능 시험

▶ SPF 닭에서의 항원 농도별 면역원성 및 방어능을 확인하기 위하여 제작된 VLP 항원을 가급류 전용 adjuvant 인 ISA70 (SEPPIC, France) 과 무게비 30:70 으로 혼합하여 각기 다른 VLP 항원농도 (2ug, 5ug, 10ug, 20ug/dose) 를 갖는 백신을 제조 하였다. 제조된 VLP 백신을 그룹당 10수씩의 6주령 SPF 닭에 근육주사 경로를 통하여 투여 하였으며, 대조군에는 현재 시판되고 있는 H9N2 백신을 사용 하였다. 백신 1, 2, 3주 후 혈구응집억제반응을 통하여 조류인플루엔자 특이 항체의 생성 여부를 확인 하였으며, 백신 3주 후 VLP 백신의 방어능을 확인하기 위하여 10^7 EID₅₀/ml 의 A/chicken/Korea/01310/2001 바이러스를 1수당 0.1ml씩 비강경로로 공격 접종하였다. 공격접종 5일 후 trachea 와 cecal tonsil 을 채취하여 유제 후 중란접종을 통하여 공격접종 바이러스의 재분리 여부를 관찰 하였다. 항체검사 결과를 ANOVA with Tukey - Kramer post-test 로 통계처리 시 음성 대조군에 비하여 VLP 백신을 투여한 그룹의 H9 influenza 특이 항체가 유의성 있게 증가함을 알 수 있었으며, 공격접종 바이러스의 재분리 결과 10ug 이상의 VLP를 포함한 백신을 투여한 그룹에서는 바이러스의 재분리가 되지 않음을 확인하였다.

표-1. VLP 백신 접종 후 H9 인플루엔자 특이 항체가의 변화

Group	HI titer (mean ± SD, log ₂)		
	1week post vaccination	2weeks post vaccination	3weeks post vaccination
1 VLP 2ug + ISA 70	1.60 ± 0.89	6.20 ± 0.84	7.10 ± 0.57
2 VLP 5ug + ISA 70	2.40 ± 1.14	6.60 ± 1.14	7.89 ± 0.78
3 VLP 10ug + ISA 70	2.80 ± 0.84	7.40 ± 0.89	8.70 ± 0.48
4 VLP 20ug + ISA 70	2.80 ± 0.45	6.60 ± 1.67	8.20 ± 1.32
5 commercial vaccine	2.80 ± 1.79	8.40 ± 0.89	8.80 ± 0.79
6 control	0	0	0

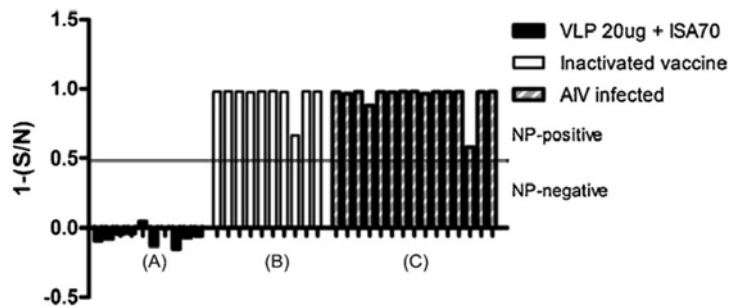
▶ VLP 백신을 접종 한 후 3주간 혈청 분석을 통하여 H9 influenza 특이 항체를 확인하였다. 백신 후 H9 influenza 특이항체가 형성되는 것을 확인 할 수 있었으며, Dose 당 10ug 이상의 VLP 항원을 함유한 백신을 접종한 그룹에서는 시판되고 있는 사독백신을 접종 한 그룹과 비슷한 수준의 항체가를 보임을 확인 할 수 있었다.

표-2. VLP 백신 접종 그룹에서의 공격접종 바이러스 재분리 결과

Group	Virus isolation/total	
	Trachea	Cecal tonsil
1 VLP 2ug + ISA 70	1/10 **	2/10*
2 VLP 5ug + ISA 70	2/10 **	2/10*
3 VLP 10ug + ISA 70	0/10 ***	0/10 ***
4 VLP 20ug + ISA 70	0/10 ***	0/10 ***
5 commercial vaccine	0/10 ***	0/10 ***
6 control	9/10	8/10

▶ VLP 백신 접종 3주 후 공격접종을 실시하였으며, 공격접종 5일 후 trachea 와 cecal tonsil 을 채취하여 종란접종을 통하여 공격접종 바이러스의 배출을 확인 하였다. Dose 당 10ug 이상의 VLP를 함유한 백신을 접종한 그룹에서는 공격접종 바이러스의 배출이 이루어 지지 않는 것을 확인 하였다. (***)Tukey - Kramer post-test 를 이용한 ANOVA 통계분석시의 p value < 0.001)

▶ 본 연구에서 사용된 VLP 항원에는 influenza 의 NP 항원이 발현 되어있지 않으므로 이러한 특성을 이용하여 백신 개체와 감염개체를 구분 (differentiating infected from vaccinated animals, DIVA) 하기 위하여 인플루엔자 바이러스의 NP 단백질을 코팅한 ELISA를 사용하여 혈청 검사를 실시하였다. 검사 결과 시판중인 whole virus 백신과는 달리 VLP 백신을 사용할 경우 NP 단백질에 대한 항체가 형성 되지 않아 백신개체와 감염 개체의 구분이 가능하였다.



[그림-2] VLP 백신접종 그룹, 사독백신 접종 그룹, 감염 그룹의 항 NP 단백질 항체가

▶ VLP 백신 혹은 시판 사독백신을 투여한 그룹과 실제 감염된 SPF 닭의 혈청을 인플루엔자 NP 단백질을 코팅한 ELISA 를 이용하여 검사하였다. 사독백신 (B) 과 비교시 VLP 백신을 투여한 SPF 닭의 혈청 (A) 에서는 항 NP 항체가 검출 되지 않아 실제 감염이 일어난 개체 (C) 와의 구분이 가능 하였다.

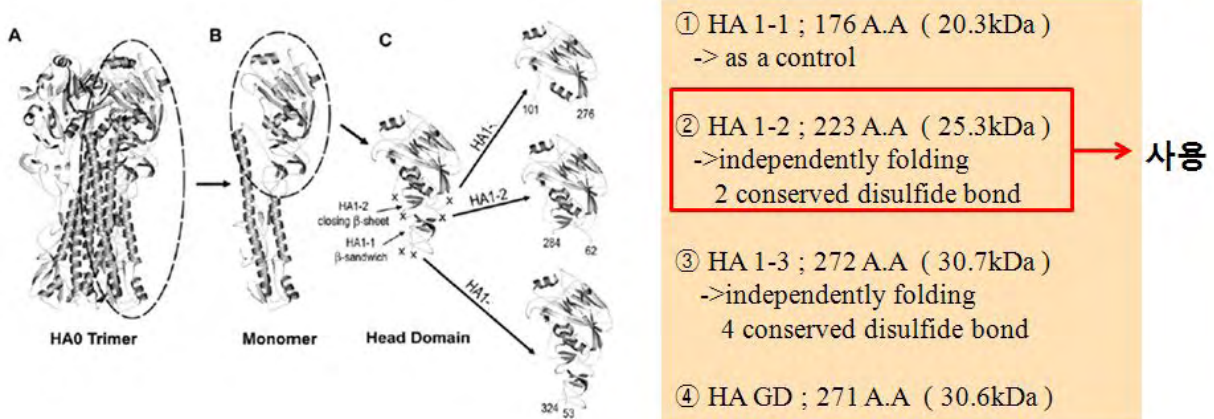
▶ 본 연구에서는 시험제작된 VLP 사독백신과 기존 백신의 효능을 효과적으로 비교하기 위하여 공격접종용 H9N2형 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 감염 동물 모델을 개발하였으며 실험을 통하여 공격접종 후 분변 및 구강내 바이러스 배출양상을 확인 할 수 있었다. 본 실험수행 결과는 본 세부과제를 수행하는데 있어 중요한 지표가 되는 정보일 뿐 아니라 H9형 저병원성 인플루엔자에 대한 백신개발 전반에 걸쳐 응용될 수 있는 자료로 사용 될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 제작된

VLP백신과 현재 시판되고 있는 불활화백신을 비교하여 항체형성능, 방어능을 평가 하였으며, 이를 통하여 항체형성능과 방어능을 최대화 하는 적정 VLP 항원량을 결정 하였다. 실험 결과 본 연구에서 제작된 VLP 백신은 SPF 닭에서 높은 면역원성을 갖는 것으로 확인 되었으며, 시판되고 있는 불활화 백신과 동등한 수준의 방어능을 갖는 것으로 확인되었다. 더욱이 기존 사독백신의 경우 백신 개체와 야의 주 감염개체간의 혈청학적 구분이 불가능 하여 백신을 실시한 지역에서의 역학 조사가 어렵다는 단점을 가지고 있었으나, VLP 백신을 적용할 경우 혈청 내 항 인플루엔자 NP 단백질 항체의 존재 여부를 평가함으로써 실제 감염이 일어난 그룹과 구별 (differentiating infected from vaccinated animals, DIVA) 이 가능하여 이러한 단점을 극복할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 VLP 백신은 효능 면에서 기존의 상용화된 불활화백신을 효과적으로 대체할 수 있을 것으로 기대될 뿐만 아니라 혈청 검사를 통한 백신개체와 감염개체의 구분을 가능하게 함으로써 국가방역차원에서 의 활용도 역시 높을 것으로 기대된다.

나. H9N2 조류인플루엔자 수용성 활성형 단백질을 이용한 백신의 제작 및 면역원성 시험

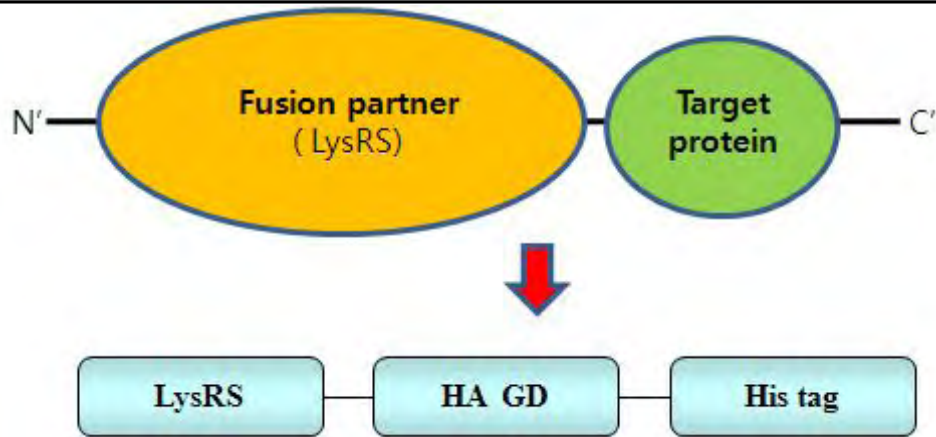
(1) H9 수용성 활성형 단백질의 제작 및 검증

▶ 국내분리 저병원성 조류인플루엔인 A/Chicken/Korea/MS96/96 (H9N2) 의 Hemagglutinin을 선정 한다.



[그림-3] 목적 단백질의 선정; HA의 Globulin domain 중 면역원성이 높은 HA 1-2 선정

▶ 선행 연구를 통해 확립된 RNA-binding protein fusion system을 이용하여 수용성 및 활성형으로 H9단백질을 생산한다. 각 expression vector를 E.coli expression host인 BL21star(DE3)pLysS에 transformation한다. Transformants의 single colony를 50µg/ml ampicillin과 34µg/ml chloramphenicol 이 포함된 3ml LB media에 접종한 뒤, cell을 37°C에서 culture한다. 그 후 15ml fresh LB에 dilution 하여 A600 =0.5의 cell density로 culture한 뒤, recombinant proteins는 1mM의 IPTG 첨가 후 27°C에서 5시간 동안 expression된다. Culture된 cell은 3,000rpm에서 15분 centrifugation하여 harvest한 뒤 300µl PBS에 resuspension하여 sonication한다. 50µl의 total lysates는 같은 volume의 2x SDS gel loading buffer와 mix하고, residual cell lysates를 12,000rpm에서 15분 동안 centrifugation한 뒤 soluble fraction을 얻는다. Insoluble fraction은 suspension하고, soluble과 insoluble fraction 각각을 같은 volume의 2x SDS gel loading buffer와 mix한다. 2분 동안 100°C에서 boiling 후, 각 sample을 loading하여 SDS-PAGE로 running하고 Coomassie Brilliant Blue로 staining하여 확인한다.



[그림-4] 수용성 및 활성형 단백질의 모식도

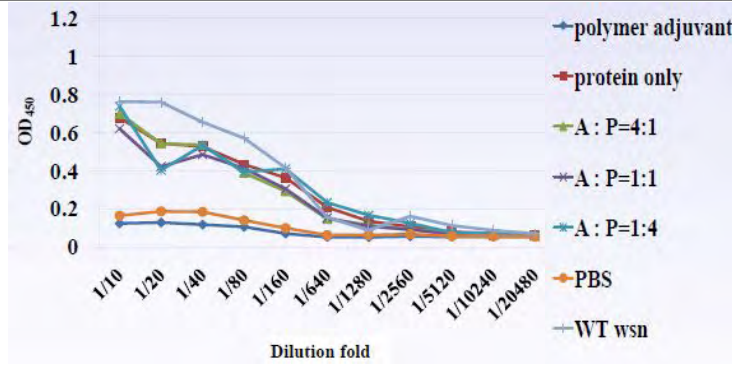
▶ H9 단백질을 수용성 및 활성형으로 발현하기 위해 N'에 RNA fusion partner와 C'에 정제를 위한 His tag이 연결되어 있다.

▶ 수용성 및 활성형 H9 단백질의 정제

Fusion protein의 purification을 위해 AKTAPrime을 사용하여 nickel affinity chromatography를 한다. Transformants의 induced cultures(500ml~2L)를 7,000rpm에서 15분 동안 centrifugation 하고 cell을 nickel column buffer A에 용해시킨다. Soluble protein의 분리를 위해서, protein은 buffer A에서 equilibration 된 뒤 HiTrap™ chelating HP를 사용한다. Buffer A로 충분히 washing 한 후, protein은 buffer A와 B의 mixing에 의한 10mM에서 300mM imidazole의 gradient를 이용하여 elution된다. Fusion protein을 포함하는 fraction은 storage buffer로 dialysis한다. 분리된 protein은 gel densitometry를 이용하여 정량한다. 농도를 아는 Bovine serum albumin(BSA)를 기준으로 사용한다. Protein sample과 BSA standard의 SDS-PAGE에 따라, gel을 coomasie blue로 staining하고 band의 density를 분석한다.

(2) 제작된 H9 수용성 활성형 단백질의 면역원성 평가시험

▶ 제작된 수용성 활성형 단백질의 면역원성을 알아보기 위하여 마우스의 복강경로를 통하여 제작된 단백질을 주사하였으며, 3주후 같은 단백질을 이용하여 피하 경로로 부스팅을 실시하였다. 부스팅 3주 후 ELISA assay를 통해 항체가의 생성을 확인 하였다. 본 연구에서 개발된 H9 수용성 및 활성형 단백질은 조류인플루엔자 특이 항체를 생성하는 것으로 확인되었으며, 세균 배양을 통한 대량 생산을 통해 저렴하면서도 면역원성을 보유한 단백질을 생산하여 기존의 사독백신을 보강하여 항원량을 낮춰 줄 수 있는 첨가항원으로 사용 가능 할 것으로 기대된다.



[그림-5] 수용성 활성형 단백질에 의해 생성된 항체의 측정

다. Adjuvant system 최적화 연구

(1) 최적의 혼합백신 제조를 위한 백신 제조방법 연구

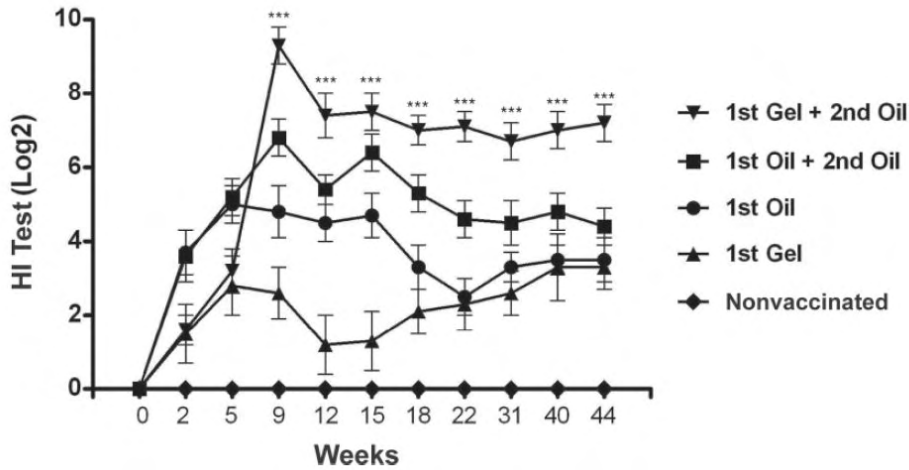
▶ 개발된 백신의 면역원성을 극대화하기 위한 adjuvant 선정을 위해 adjuvant 종류 및 접종 횟수별로 SPF닭을 이용한 실험실내 실험과 육용종계를 이용한 야외실험을 실시하였다. A/chicken/Korea/01310/2001 (10^6 50% egg infected dose/mL) 조류 인플루엔자 바이러스를 불활화하고 oil 백신을 제작하기 위하여 가금류 전용 water-in-oil adjuvant 인 ISA70 (SEPPIC, France) 과 무게비 30:70 으로 혼합하였고, Gel백신 제작을 위하여 aluminum hydroxide를 최종 20%의 부피가 될 수 있도록 혼합하였다. 실험실내 실험에서는 제조된 백신을 표-1에 따라 그룹 당 10수씩의 6주령 SPF 닭에 근육주사 경로를 통하여 투여 하였으며, 백신 2, 3주 후 혈구응집억제반응을 통하여 조류인플루엔자 특이 항체의 생성 여부를 확인 하였다. 야외적용 실험에서는 제조된 백신을 그룹 당 15수씩의 14-20주령 육용종계에 근육주사 경로를 통하여 투여 하였으며, 백신 44주 후까지 혈구응집억제반응을 통하여 조류인플루엔자 특이 항체형성능 및 지속성을 확인하였다.

표-3. SPF닭에서의 adjuvant 종류별, 접종 횟수별 특이 항체가의 변화

Adjuvant type		Mean HI titer ($\log_2 \pm$ SD)		
First vaccination	Second vaccination	2 wk after first vaccination	3 wk after first vaccination	3wk after second vaccination
Oil adjuvant	ND	6.1 ± 0.8	6.6 ± 0.6	7.0 ± 0.6
Oil adjuvant	Oil adjuvant	5.8 ± 0.7	6.7 ± 0.6	7.9 ± 0.6
Gel adjuvant	ND	5.1 ± 1.0	5.0 ± 0.7	3.1 ± 0.5
Gel adjuvant	Oil adjuvant	4.9 ± 0.9	4.9 ± 0.8	8.3 ± 0.5
ND	ND	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

▶ SPF닭을 이용하여 adjuvant 종류별, 접종 횟수별 특이 항체가의 변화를 조사한 결과 gel백신에 비하여 oil백신의 면역형성유도능이 높고 빠르며 그 지속성이 긴 것을 확인 하였다. 그러나 백신 2회 접종 시에는 1차 oil-2차 oil 보다 1차 gel-2차 oil 백신을 실시하는 것이 높은 항체가를 유도하는 것으로 확인 되었다.

[그림-6] 육용종계에서의 adjuvant 종류별, 접종 횟수별 특이 항체가의 변화



▶ 육용종계를 이용한 adjuvant 종류별, 접종 횟수별 특이 항체가의 변화를 조사한 결과 gel백신에 비하여 oil백신의 면역형성유도능이 높고 빠르며 그 지속성이 긴 것을 확인 하였다. 그러나 백신 2회 접종 시에는 1차 oil-2차 oil 보다 1차 gel-2차 oil 백신을 실시하는 것이 높은 항체가를 유도하며 그 지속성이 44주 이상 지속되는 것으로 확인 되었다.

▶ SPF닭을 이용한 실험실내 실험과 육용종계를 이용한 야외농장 적용시험을 통해 확인 된 것과 같이 백신을 1회만 실시할 경우 gel백신에 비하여 oil백신의 면역형성유도능이 높고 빠르며 그 지속성이 긴 것을 확인 하였다. 그러나 백신 2회 접종 시에는 1차 oil-2차 oil 보다 1차 gel-2차 oil 백신을 실시하는 것이 보다 높은 항체 형성을 유도하며 그 지속성이 44주 이상 지속되는 것으로 확인 되었다. 단회 접종의 경우 adjuvant 선택시 빠르고 탁월한 oil adjuvant를 선택하는 것이 유리할 것으로 판단되며, 2회 접종의 경우 1차는 gel백신을 실시하고 2차는 oil백신을 접종하여 높은 항체가를 오래 지속하는 것이 유리할 것으로 판단된다. 본 현상은 1차에 접종한 aluminum hydroxide gel adjuvant의 뛰어난 memory B cell 형성능에 기인되는 것으로 사료되며, 2차 추가 접종시 memory B cell로부터 많은 항체형성이 유도되는 것으로 예상된다. 본 연구는 AI-ND-IB 합제백신을 제작하기 위한 기반기술로써 향후연구과제수행에 있어 필수적인 단계이며, 본 연구와 관련한 내용은 2011년 국제학술지인 'Poultry Science'지에 게재하였다.

라. AI(H9 VLP)-ND-IB 혼합 사독백신 제작 및 안전성, 면역원성, 방어능 평가

(1) VLP 포함 AI(H9 VLP)+ND+IB 혼합 사독백신의 제작

▶ 제작된 VLP 항원 (10ug/dose)과 ND 불활화 항원, IB 불활화 항원을 가금류 전용 adjuvant 인 ISA70 (SEPPIC, France) 과 무게비 30:70 으로 혼합하여 백신을 제조함

(2) VLP 포함 AI(H9 VLP)+ND+IB 혼합 사독백신의 면역원성, 안전성 및 방어능 평가시험

▶ 제조된 혼합 사독백신을 국립수의과학검역원 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거하여 면역원성 및 방어능을 평가하였다. 제조된 백신을 표-4 및 표-5와 같이 6주령 SPF 닭에 근육주사 경로를 통하여 투여 하였다. 백신 3주 후 채혈을 통하여 H9 인플루엔자, ND, IB에 대한 특이 항체의 생성 여부를 확인 하였으며, 백신 3주 후 백신의 방어능을 확인하기 위하여 ND바이러스를 공격 접종하여 대조군과의 비교를 통하여 방어능을 평가하였다. 표-3과 같이 AI(H9)+ND+IB 사독백신은 세 가지 바이러스에 대하여 모두 높은 항체 형성능을 보였으며, 표-4와 같이 공격접종에 대하여 탁월한 방어능을 보였다.

표-4. AI(H9)+ND+IB 사독백신의 면역원성

시험백신	접종수수	AI 항체가	ND 항체가	IB바이러스 혈청 중화지수
AI(H9)+ ND+ IB 사독백신	10	8.5	9.2	2.8
대조군	10	0	0	0

표-5. AI(H9)+ND+IB 혼합 사독백신의 NDV 공격접종 방어능

시험백신	접종수수	ND 생존 수수/ 총 수수
VLP 포함 AI(H9)+ ND+ IB 사독백신	15	15/15
대조군	15	0/15

마. 저병원성 조류인플루엔자 (H9N2형) 불활화백신 백신주 교체 실험

(1) 기존백신주 A/chicken/Korea/01310/01 균주를 사용한 오일 사독백신의 교차 방어능 검정

▶ 국내에서는 저병원성 조류인플루엔자 H9N2 형을 방어하기 위한 목적으로 2007년부터 사독백신의 사용하는 정책을 펼치고 있다. 사독백신에 사용되는 균주는 2001 년에 분리된 A/chicken/Korea/01310/01 균주를 백신주로 선발하여 사용하고 있으며 이를 단일주로 통일하여 사용하고 있다. 최근에는 2007 년부터 사용되어온 A/chicken/Korea/01310/01 주로 효율적인 방어가 힘든 야의 분리주가 출현하고 있으며, 이러한 최근 야의 분리주에 대한 A/chicken/Korea/01310/01 의 방어 효율을 평가하기 위하여 교차 방어능 검정을 실시하였다.

▶ 현재 사용중인 저병원성 H9N2형 조류인플루엔자 백신균주 A/chicken/korea/01310/01를 SPF 발육란의 요막강 내에서 배양한 후 0.2% 포르말린으로 불활화한 후 양계용 Oil adjuvant 와 혼합하여 $10^{8.5}EID_{50}/dose$ 의 항원양을 갖는 사독백신을 제작하였다..

▶ 제작된 백신을 0.5ml/dose 의 투여량으로 6주령 SPF 닭의 가슴근육에 근육 내 주사법으로 주사를 실시하고 3주 후 최근 야의 분리주로 공격접종을 실시하였다. A/Korean native chicken/Korea/040110/10 (H9N2) 주를 비강경로를 통하여 $10^{6.5}EID_{50}/100ul/chicken$ 의 역가로 접종하고 설사, 부종 등의 임상증상을 관찰하였으며, 공격접종 3, 5, 7일 후에 구강인두와 총배설강에서 swab 을 실시하여 바이러스의 배출양을 측정하였다. 바이러스 배출양은 인플루엔자 M gene 에 대한 real-time RT-PCR 실시한 후 Ct 값을 calibration curve 에 대입하여 EID_{50}/ml 로 환산 하였다. calibration curve 는 백신을 실시하지 않은 공격접종 대조군의 swab sample 내 바이러스의 역가 (EID_{50}/ml)를 측정 하고 이를 10배수로 단계 희석 후 인플루엔자 M gene real-time RT-PCR 을 실시하여 그 Ct 값과 해당되는 역가를 이용하여 작성하였다.

표-6. 최근 야의 분리주에 대한 현재 사용중인 사독백신의 방어율

		바이러스 배출 (EID_{50}/ml)	

시험군	Swab	3 d.p.c	5 d.p.c	7 d.p.c	임상증상
H9N2 백신	구강인두	3/10 (5.5)	8/10 (5.4)	2/10 (2.6)	3/10
	총배설장	1/10 (0.6)	1/10 (0.8)	0/10 (-)	
control	구강인두	9/10 (5.8)	8/10 (6.4)	7/10 (5.6)	7/10
	총배설장	4/10 (7.2)	7/10 (7.4)	10/10 (7.2)	

▶ 현재 사용 중인 백신균주인 A/chicken/Korea/01310/01 (H9N2) 주를 사용하여 제작된 백신은 신규분리주인 A/Korean native chicken/Korea/040110/10 (H9N2) 의 공격 접종으로부터 임상증상 및 바이러스 배출을 줄여주는 하지만 그 방어율은 현저하게 떨어지는 것으로 나타났다.

(2) 기존백신주 A/chicken/Korea/01310/01 균주를 사용한 오일 사독백신의 교차 방어능 검증

▶ 사업단에서 1차년도에 개발된 A/chicken/Korea/01310/01 주의 HA 단백질을 표면 발현시킨 H9 VLP 항원 항원을 ISA70 오일 어쥬번트와 혼합하여 10ug VLP/0.5ml/dose 의 농도로 VLP 백신을 제조하였으며 제조 후 점적법을 통하여 적절한 제조가 이루어 졌는지 확인하였다.

▶ 시험백신 실시 후 항체생성능 및 방어율을 산정하기 위하여 제작된 백신을 6주령 SPF 닭의 가슴 근육에 근육 내로 수당 0.5ml 을 접종하고 3주 후 최근 야의 분리주인 A/Korean native chicken/Korea/040110/10 (H9N2) 공격접종을 실시하였다. 공격접종은 비강경로를 통하여 $10^{6.5}$ EID₅₀/100ul/chicken 의 역가로 진행되었으며 실험기간동안 설사, 부종 등의 임상증상을 관찰하고, 공격접종 3, 5, 7일 후에 구강인두와 총배설장에서 swab 을 실시하여 바이러스의 배출량을 측정하였다. 바이러스 배출량은 인플루엔자 M gene 에 대한 real-time RT-PCR 실시한 후 Ct 값을 calibration curve 에 대입하여 EID₅₀/ml 로 환산 하였다. calibration curve 는 백신을 실시하지 않은 공격접종 대조군의 swab sample 내 바이러스의 역가(EID₅₀/ml)를 측정 하고 이를 10배수로 단계 희석 후 인플루엔자 M gene real-time RT-PCR 을 실시하여 그 Ct 값과 해당되는 역가를 이용하여 작성하였다.

표-7. 최근 야의 분리주에 대한 H9 VLP 백신의 방어율

시험군	Swab	바이러스 배출 (EID ₅₀ /ml)			임상증상
		3 d.p.c	5 d.p.c	7 d.p.c	
H9 VLP 백신	구강인두	4/10 (5.3)	8/10 (5.7)	2/10 (2.3)	4/10
	총배설장	2/10 (0.8)	2/10 (1.0)	1/10 (0.5)	
control	구강인두	9/10 (5.8)	8/10 (6.4)	7/10 (5.6)	7/10
	총배설장	4/10 (7.2)	7/10 (7.4)	10/10 (7.2)	

▶ 현재 사용 중인 백신균주인 A/chicken/Korea/01310/01 (H9N2) 주의 HA 단백질을 발현시킨 VLP 항원을 이용하여 제작된 백신은 시판중인 사독백신과 비슷한 수준으로 신규분리주인 A/Korean native chicken/ Korea/040110/10 (H9N2)의 공격 접종으로부터 임상증상 및 바이러스 배출을 줄여주

기는 하지만 그 방어율은 시판중인 사독백신과 마찬가지로 다소 저조한 것으로 나타났다.

(3) AI(H9) 신규 백신주의 특성분석 및 교차 방어능 검정시험

▶ 2007년부터 사용되고 있는 사독백신 균주의 경우 최근 야외 분리주에 대하여 방어능이 다소 저조한 것으로 나타났다. 따라서 사업단에서는 보다 효과적인 백신개발을 위하여 최근 분리주를 선발하여 신규 백신주로 선발하기 위한 실험을 진행하였다.

▶ A/Korean native chicken/Korea/040110/10 균주의 전체 유전자를 분석함으로써 최근 국내 유행 분리주들과의 상동성을 비교하였다. 9-11 일령의 종란에서 증폭한 A/Korean native chicken/korea/040110/10 균주의 RNA 를 RNeasy kit (Qiagen) 를 이용하여 추출 하였다. 추출된 RNA 로부터 PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS 유전자를 Hoffmann 등이 서술한 방법에 따라 증폭시킨 후 염기서열 분석을 실시하였다. 분석된 각각의 염기서열을 이용하여 GenBank 에 등록된 국내 최근 분리주 들과의 상동성을 비교하였다.

표-8. 국내 최근 분리주 들과의 상동성 비교

유전자	가장 높은 상동성을 갖는 야외분리주 (상동성 %)
PB2	A/chicken/Korea/SH0902/2009 (H9N2; 99.3)
PB1	A/chicken/Korea/A146/2009 (H9N2; 98.9)
PA	A/chicken/Korea/HC0410/2009 (H9N2; 99.1)
HA	A/chicken/Korea/HC0410/2009 (H9N2; 99.2)
NP	A/chicken/Korea/HC0410/2009 (H9N2; 98.8)
NA	A/duck/Korea/A14/2008 (H5N2; 99.3)
M	A/duck/Korea/A14/2008 (H5N2; 99.9)
NS	A/duck/Korea/A14/2008 (H5N2; 99.0)

▶ 국내 최근 분리주 들과의 상동성 비교결과 A/Korean native chicken/korea/040110/10 균주는 국내에서 2008년, 2009년부터 새롭게 분리보고가 되고 있는 저병원성 조류인플루엔자와 높은 상동성을 갖는 것으로 나타났다.

▶ A/Korean native chicken/korea/040110/10 균주를 SPF egg 의 요막강 내에서 배양한 후 0.2% 포르말린으로 불활화한 후 양계용 Oil adjuvant 와 혼합하여 $10^{8.6}$ EID₅₀/dose 의 항원양을 갖는 사독백신을 제작하고 SPF닭에 백신 실시 후 항체생성능을 확인하고 방어율을 산정하였다.

▶ 제작된 백신을 6주령 SPF 닭의 가슴근육에 근육 내로 수당 0.5ml 을 접종하고 3주 후 항체가를 측정 하였다. 공격접종은 최근 야외 분리주인 A/Korean native chicken/Korea/040110/10 및 기존 백신 균주인 A/chicken/Korea/01310/01 바이러스를 각각 $10^{6.5}$ 및 $10^{6.0}$ EID₅₀/100ul/chicken 의 역가로 비강경로를 통하여 실시하였으며, 공격접종 5일 후 기관과 맹장편도에서 공격접종 바이러스의 재분리를 실시하였다.

표-9. 백신 접종 1, 2, 3주 후 혈청의 HI titer

시험군	공격접종 virus	7 d.p.v.	14 d.p.v.	21 d.p.v.	
G1	Homologous challenge	AIV K040110	0.6 ± 1.07	6.1 ± 0.99	7.1 ± 0.99
G2	Heterologous challenge	AIV K01310	0 ± 0	6.8 ± 1.14	7.4 ± 0.70
G3	Positive control	AIV K040110	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
G4	Positive control	AIV K01310	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

▶ 신규 분리주 (A/Korean native chicken/Korea/K040110/10)를 사용하여 생산한 불활화 백신은 백신 3주 후에 HI titer 2⁷ 이상의 높은 H9 특이적 항체가를 유도하였다.

표-10. 공격접종 5일 후 기관과 맹장 편도에서의 바이러스 재분리율

시험군	공격접종 virus	기관	맹장편도
G1	Homologous challenge	AIV K040110	0/10
G2	Heterologous challenge	AIV K01310	0/10
G3	Positive control	AIV K040110	10/10
G4	Positive control	AIV K01310	8/10

▶ 신규 분리주 (A/Korean native chicken/Korea/K040110/10)를 사용하여 생산한 불활화 백신은 homologous strain 뿐만 아니라 현재 사용중인 백신주 (A/chicken/Korea/01310/01) 에 대해서도 기관과 맹장편도에서 높은 방어능을 보여 기존 시판백신에 사용되는 백신주보다 교차방어능이 우수함을 확인 할 수 있었다.

(4) 저병원성 조류인플루엔자 불활화백신 백신주 교체 검토요청

▶ 2011년도 전략기술 기획단 회의 (2011.9.30)에서 최신 유행 H9형 조류인플루엔자에 대한 방어율을 높이기 위하여 현재 백신주(01310주)를 교차면역원성이 뛰어난 신규 분리주(K040110주)로 교체하는 방안이 제시되어 위와 같이 백신주 교체 검토를 위한 교차방어실험을 실시하여 신규분리주의 탁월한 교차면역원성을 입증하고, 농림축산검역본부에 저병원성 조류인플루엔자(H9N2형) 불활화백신 백신주 교체 검토를 (공문: 건국대학교 동물질병제어사업단 제11-07호) 공식적으로 요청하였으나, 아래와 같은 사유로 백신주 교체 허가가 반려됨 (공문: 농림축산검역본부 조류질병과 - 315호).

< 반려사유 >

- 우리나라에서 설정한 저병원성 조류인플루엔자 불활화백신의 효능평가 기준은 맹장편도에서의 바이러스 증식이 대조군에 비해 80% 이상 억제되면 효능이 있는 것으로 평가하도록 되어 있으며, 기존 백신도 이와 같은 조건에는 여전히 부합되어 효능이 있는 것으로 평가되기 때문이며,

- 둘째, 제시된 자료와 같이 특정 바이러스를 이용한 제한적인 실험결과만으로 백신주를 교체하기에는 무리가 있어, 향후 지속적인 모니터링과 광범위한 교차방어능 시험이 실시된 후 백신주 교체를 할 예정입니다.

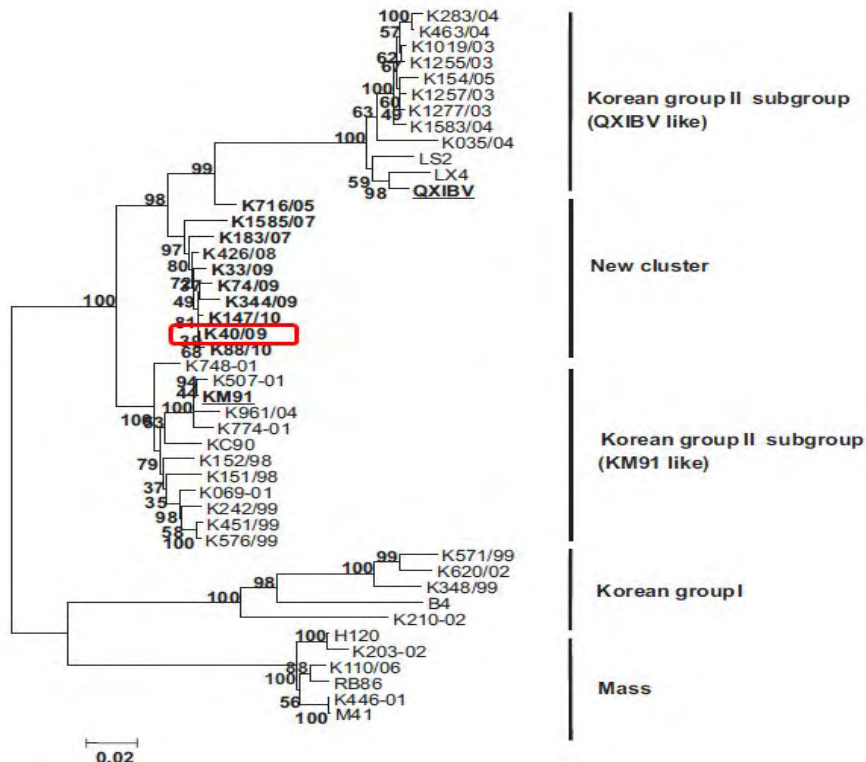
- 또한 조류인플루엔자 백신주 교체는 특정 업체만 참여하는 민간사업단에서 추진될 사항이 아니라, 정부기관에서 백신주를 선정·교체하여 국내 모든 업체에 동시에 적용함으로써 우리나라 조류인플루엔자 방역정책의 효율성을 기하여야 할 사안으로 판단됩니다.

▶ 농림축산검역본부의 백신주 교체 요청 반례에 따라, 본 사업단에서 연구개발한 신규 H9형 조류인플루엔자 백신주의 사용이 제한되어 교차면역원성이 뛰어난 백신제형 개발을 위해 신규 adjuvant를 이용한 교차방어능 상승 연구를 진행함.

바. IB 신규 백신주 선발 실험

(1) IB 신규 백신주 K40/09주의 유전자 분석을 통한 특성과약

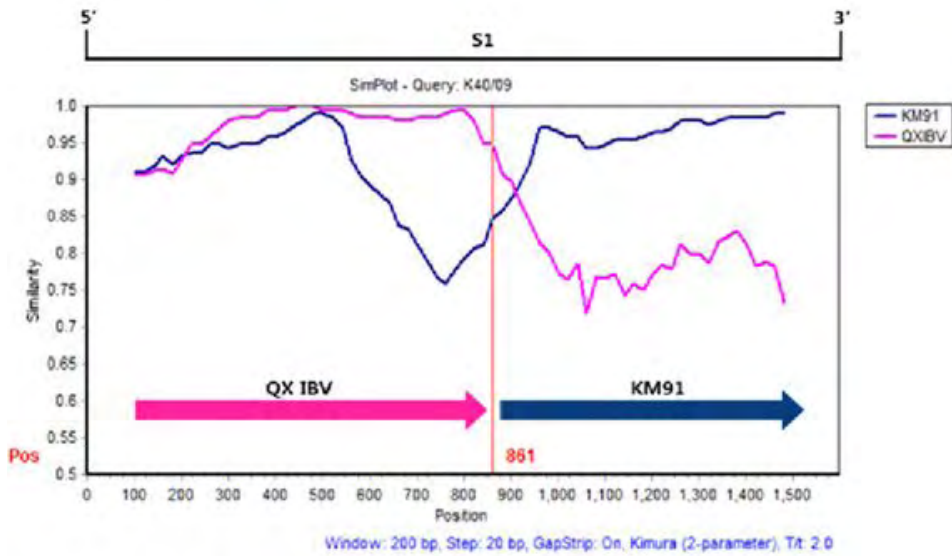
▶ 종란에서 증폭한 K40/09 주를 10일령 SPF 종란에 접종한 후 37C에서 48시간 동안 배양한 후 장요막강액을 채취 하였다. 채취된 장요막강액 으로부터 RNeasy mini kit (qiagen) 를 사용하여 viral RNA 를 확보하고 S1 reverse primer (5-GTT TGT ATG TAC TCA TCT GTA AC-3) 와 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) 를 사용하여 reverse transcription 을 실시 하여 S1 cDNA 를 확보 하였다. 확보된 S1 gene 의 염기서열은 S1 cDNA 를 S1 forward primer (5-TAG TGA CCC TTT TGT GTG CAC TAT-3) 와 S1 reverse primer 를 사용하여 Ex-taq polymerase (Takara) 로 PCR 을 수행함으로써 증폭하였다. 확보된 K40/09 S1 gene 염기서열은 10개의 실험실내 분리주 및 미국, 네덜란드, 중국, 한국에서 보고된 35개 IBV 주의 S1 유전자 정보와 함께 계통수 분석에 사용되었다. 또한 K40/09 주 S1 gene 의 recombination 분석을 위하여 Simplot (version 3.5.1) 프로그램이 사용되었으며, 이를 통하여 recombination pattern 을 분석 하였다.



[그림-7] K40/09 균주의 계통수 분석

▶ IBV 의 S1 gene 을 사용하여 phylogenetic tree 를 작성 하였으며, K40/09 균주 (네모로 표시)

의 S1 gene은 QX-like group 과 KM91-like group 의 사이에 위치함을 알 수 있다.



[그림-8] K40/09 균주의 recombination pattern 분석

▶ Simplot 을 이용한 recombination 분석결과 K40/09 주는 QX IBV 와 KM91 IBV 의 S1 gene 이 재조합 되어 생성된 chimeric S1 gene을 가지고 있는 재조합 균주임을 알 수 있다.

(2) IB 신규 백신주 K40/09주의 닭에서의 병원성 측정

▶ 1일령 및 6주령 SPF 닭에서 IBV K40/09주의 병원성 및 조직침투성을 평가 하였다. 1일령 및 6주령의 닭을 20수씩 사용하였으며, 접종군 10수 및 대조군 10수로 하여 실험을 실시하였다. 실험군은 닭 1수당 $10^{4.5}$ EID₅₀의 바이러스를 점안 접종법(eye drop)으로 공격접종 하였으며 대조군 10수의 경우 멸균 PBS 용액을 동일한 방법으로 접종 하였다. 신규백신주의 병원성 평가를 위하여 1일령 병아리는 14일간 폐사율 및 호흡기 증상을 관찰하였으며 공격접종 14일 후 부검을 통하여 신장염 및 요산 침착 증상을 관찰 하였다. 신규 백신주의 병원성 평가를 위하여 6주령 닭을 공격접종 5일 후 부검하여 기관과 신장에서 바이러스를 재분리 하였다.

표-11. 공격접종 14일 후 1일령 병아리에서의 임상증상 및 폐사율 관찰결과

공격접종 바이러스	접종수수	폐사율(%)	호흡기 증상	신장염/ 요산 침착
K40/09	10	30%(3/10)	+++ (10/10)	+++ (10/10)
대조군	10	0%(0/10)	-	-

표-12. 공격접종 5일 후 6주령 SPF 닭에서 기관과 신장에서의 바이러스 재분리율

공격접종 바이러스	접종수수	폐사율(%)	바이러스 재분리	
			기관	신장
K40/09	10	0%(0/10)	10/10	10/10
대조군	10	0%(0/10)	0/10	0/10

▶ 병원성 및 조직침투성 실험 결과, IBV K40/09주 감염계에서는 심한 호흡기 증상 및 신장염 증상, 신장 내 요산 침착 소견이 관찰되었다. IBV K40/09주 공격접종 5일 후 부검을 통하여 기관과 신장을 채취하고 이들 장기로부터 공격접종 바이러스의 재분리를 실시한 결과 모든 감염계의 기관과 신장에서 바이러스가 재분리됨을 확인 할 수 있었다.

(3) IB 신규 백신주 K40/09주의 종란에서의 growth kinetics 측정 시험

▶ 백신 생산 시 높은 역가의 바이러스를 회수하기 위한 조건을 설정하기 위하여 K40/09 주의 종란 접종 농도별 및 증폭 시간대별 growth pattern 을 측정하였다. 역가를 알고있는 K40/09 균주를 10배수로 희석하고 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 EID₅₀/100ul/egg로 접종역가를 달리하여 각각 10개씩의 9-11일령의 SPF 발육란의 장요막강에 접종 하였다. 접종 후 48시간, 72시간에 5개씩의 발육란의 장요막강액을 회수한 후 real-time RT PCR 을 통하여 바이러스의 증폭량을 측정하였다.

표-13. 접종 농도별, 배양시간대별 회수된 바이러스 역가

접종량 (log EID ₅₀ /egg)	증폭 시간별 Ct 값	
	48시간	72시간
5	16.5 ± 1.7	19.8 ± 2.7
4	16.8 ± 1.2	19.9 ± 3.8
3	18.2 ± 3.3	18.3 ± 0.6
2	16.9 ± 3.1	18.8 ± 0.5

▶ 측정결과 모든 접종 역가에서 72시간 보다는 48시간에 바이러스의 증폭 역가가 더 높은 것으로 확인되어 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 EID₅₀/100ul/egg 의 역가로 각 10개씩의 9-11일령 SPF 발육란의 장요막강에 접종 한 후 48시간 후 바이러스의 증폭 역가를 측정 하였다.

표-14. 접종 48시간 후 접종 농도별 회수된 바이러스 역가

접종량 (log EID ₅₀ /egg)	바이러스 Titer (log EID ₅₀ /ml)
5	8.5
4	8.37
3	8
2	8

▶ 측정결과 10^4 또는 10^5 EID₅₀/100ul/egg 의 역가로 접종 후 48시간 동안 배양 하였을 때 각각 $10^{8.5}$, $10^{8.37}$ EID₅₀/ml 의 바이러스를 회수하여 증폭효율이 가장 좋은 것으로 나타났으며 이를 바탕으로 백신균주의 계대배양을 실시하였다.

(4) IB 신규 백신주 K40/09주의 교차방어능 평가

▶ 신규백신주의 국내-외 유행 IBV 에대한 교차방어능을 평가하기 위하여 3주령 SPF 닭에 점안경로로 $10^{3.5}$ EID₅₀/chicken 의 K40/09 균주를 접종하였다. 접종 3주 후 7종의 IBV 균주로 공격접종을 실시하였으며, 공격접종 5일 후 trachea 와 kidney 에서의 공격접종 바이러스분리를 통하여 K40/09 주의 교차방어능을 평가하였다.

표-15. 7종의 IBV 에 대한 K04/09 균주의 교차방어능

Challenge virus genotype	Challenge IBV strain	No. of challenge virus isolated/no. of birds challenged ^A			
		Trachea		Kidney	
		Control	Immunized	Control	Immunized
Mass	M41	10/10	3/10**	10/10	0/10***
Korean I (B4-like)	K107/04	10/10	0/10***	10/10	1/10***
Korean II subgroup 1	KM91	10/10	1/10***	10/10	0/10***
Korean II subgroup 2 (QX-like)	K1277/03	10/10	0/10***	10/10	1/10***
Korean new genetic cluster 1	K40/09	10/10	1/10***	10/10	1/10***
Korean new genetic cluster 2	K26/10	10/10	0/10***	7/10	1/10*
4/91	4/91	10/10	3/10**	4/10	2/10

^AFive days after challenge protection was evaluated by the absence of challenge virus in the kidney and trachea.

* $P < 0.01$, by Fisher exact test, compared to nonvaccinated control group.

** $P < 0.005$, by Fisher exact test, compared to nonvaccinated control group.

*** $P < 0.001$, by Fisher exact test, compared to nonvaccinated control group.

▶ 대조군에 비하여 유의적으로 줄어든 공격접종 바이러스 재분리율을 보였으며 이를 통하여 신규 IBV 백신주인 K40/09 균주의 우수한 교차방어능을 확인하였다.

(5) IB 신규 백신주 K40/09주를 이용하여 제작한 사독 오일백신의 최소면역원성 평가

▶ K40/09 균주를 9-11 일령 SPF 종란의 장요막강 내로 접종 한 후 37C에서 72시간 배양한 후 장요막강액을 회수하여 바이러스의 역가를 측정 한 후 0.2% 포르말린으로 불활화하여 K40/09 불활화 항원을 제작 하였다. 불활화된 항원을 농축 및 희석하여 ISA70 오일 adjuvant와 혼합 하였으며, 불활화 전의 바이러스 역가를 기준으로 각각 $10^{4.5}$, $10^{5.5}$, $10^{6.5}$, $10^{7.5}$ EID₅₀/dose 의 항원양을 갖는 사독백신을 제작하였다.

▶ 제작된 백신을 6주령의 SPF 닭에 마리당 0.5ml씩 가슴근육에 접종하였으며, 백신접종 1, 2, 3주 후에 혈청 내 IBV 특이항체의 역가를 농립축산검역본부의 닭 전염성 기관지염 불활화백신 검정기준에 따른 중화시험을 실시하여 평가하였다.

표-16. K40/09 백신주로 제작한 사독오일백신의 최소면역원성

IBV K40/09 항원량 (logEID ₅₀ /dose)	혈청중화지수
7.7	2.9
6.7	2.1
5.7	1.3
4.7	0.4
대조군	-

▶ 백신 접종 3주 후에 시험군과 대조군에서 혈청을 채취한 후 중화지수를 산출하였다. 최소면역원성 시험결과 IB7.V K40/09 백신주로 제작한 사독백신은 $10^{6.7}$ EID₅₀/dose 이상의 항원농도에서 면역원성이 형성되는 것을 확인할 수 있었다.

(6) DES투여 IBV 공격접종 모델을 이용한 K40/09 백신주의 교차방어능 평가

▶ IBV 감염 시 발생하는 산란율의 저하 및 난질의 저하는 산란중인 닭의 산란장기가 손상을 입을

으로써 발생하게 되는데 이러한 산란장기에 관련된 연구를 진행하려면 닭의 수란관이 발달하는 14주령 이후에나 실험이 가능하다. 하지만 높은 주령의 닭을 이용한 실험은 현실적인 문제점을 갖고 있으며, 어린 주령의 닭에서 이 실험을 진행하기에는 산란장기의 발달이 미약하여 실험을 수행할 수 없다. 따라서 인위적으로 산란장기의 발달이 유도된 어린 일령의 병아리에서 IBV 공격접종 후 산란장기에서 바이러스를 재분리할 수 있는 IBV 공격접종 모델을 개발한다면 사업단에서 개발된 백신의 산란장기에서의 방어능을 평가하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

▶ Diethylstilbestrol (DES) 는 비 스테로이드성 에스트로겐 유사체로써 과거에는 인체에서 임신 유지목적으로 사용되어져 왔다. 사업단에서는 어린 일령의 병아리에서 산란장기의 발달을 유도하기 위한 DES 투여 방법을 개발하기 위하여 7일령 병아리에 7.5mg, 15mg, 22.5mg씩의 DES를 복부 피하에 투여하였고, 투여 10일 후, 30일 후에 부검하여 수란관의 발달 정도를 대조군과 비교 하였다.

표-17. DES 투여량에 따른 수란관의 발달

DES 투여량 (mg)	수란관의 무게 (g)		수란관의 길이 (cm)	
	10 days	30 days	10 days	30 days
7.5	0.86 ± 0.37	0.30 ± 0.23	9.19 ± 1.70	7.05 ± 2.22
15	1.35 ± 0.38**	1.25 ± 1.03*	11.30 ± 1.35*	12.75 ± 5.91*
22.5	1.48 ± 0.16***	2.82 ± 0.91***§§§	12.55 ± 1.82***	17.08 ± 3.14***
(-)	-	-	-	-

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 by One-way Analysis of Variance (ANOVA), compared to 7.5 mg of DES treatment group at a same age

§§§ P<0.001 by One-way Analysis of Variance (ANOVA), compared to 15 mg of DES treatment group at a same age

▶ 투여량에 따른 수란관의 발달 정도를 측정된 결과 수란관의 채취가 불가능한 대조군과 비교 시 15mg 이상의 DES를 투여한 실험군에서 수란관이 유의적으로 발달한 것으로 확인되었다.

(A)

(B)



[그림-9] DES 투여군 (A) 과 대조군 (B) 의 수란관 발달정도 비교

▶ (A) DES 를 투여한 병아리의 경우 (B) 대조군과 수란관의 발달 정도를 비교 시 조직 채취 및 바이러스의 재분리가 가능할 정도로 수란관이 발달한 것을 확인 할 수 있다.

▶ 개발된 DES 투여모델을 이용하여 수란관에서의 IBV 공격접종 시험시 바이러스 재분리율을 검정

하기 위하여 DES 처리로 수란장기를 발달시킨 어린일령 병아리에서의 IBV 공격접종 시험을 실시하였다. 개발된 모델에 따라서 7일령 암컷 병아리의 복부피하로 DES를 15mg 을 투여하고, 35일령에 IB 백신주인 K2와 IB 야외주인 KM91을 점안경로로 접종 하였다. 접종 5일 후 부검을 실시하여, 기관과 신장, 수란관에서 바이러스의 재분리를 실시하였다.

표-18. DES 모델을 이용한 산란장기 에서의 IBV 재분리 결과

공격접종 바이러스	DES 처리	재분리 장기		
		기관	신장	수란관
K2	15mg	9/10	0/10	0/10
	-	10/10	0/10	-
KM91	15mg	10/10	8/10	6/10
	-	11/11	10/11	-

▶ 개발된 IBV 공격접종 모델을 이용할 경우 수란관에서도 접종한 바이러스의 재분리가 가능했던 반면에 DES 비 처리군의 경우 산란장기의 발달 미약으로 수란관을 채취할 수 없었다. 산란저하를 일으키지 않는 K2 백신주의 경우 기관에서만 재분리 되었으며, 산란저하는 일으키는 KM91 야외 분 리주의 경우 수란관에서도 바이러스가 재분리 되었다. 따라서 DES-IBV 공격접종 모델을 이용하여 수란관에서 바이러스의 재분리를 가능하게 할 경우 백신의 산란 장기에서의 방어능을 평가하기에 좋은 지표가 될 수 있음을 확인하였다.

▶ K40/09주를 포함한 사독백신의 교차면역원성을 검증하기 위하여 K40/09 혹은 KM91 균주를 포 함한 사독백신을 제작한 후 사독백신 단독 혹은 K2 생독백신 투여 2주 후 boosting 의 목적으로 SPF 닭에 가슴근육에 접종하였다. 백신접종 3주 후 homologous 및 heterologous challenge에 대한 방어능을 평가하기 위하여 K40/09 및 KM91 을 1수당 $10^{5.5}$ EID₅₀ 의 역가로 점안 경로를 통하여 공 격접종을 실시하였다. 공격접종 5일 후 부검을 통하여 기관, 신장 및 수란관을 채취하고 이들 장기로 부터 공격접종 바이러스를 재분리 함으로써 백신의 교차방어능을 평가 하였다.

표-19. K40/09 및 KM91 균주를 포함한 사독백신의 (A) K40/09 주 공격접종 및 (B) KM91 주 공격접종에 대한 방어 효능

(A) 시험군	DES 처리	백신		재분리 장기		
		생백신	사독백신	기관	신장	수란관
G1	15 mg	K2	K40/09	4/12	0/12	1/10
G2	15 mg	K2	KM91	4/12	0/12	0/10
G3	15 mg	-	K40/09	10/10	7/10	9/10
G4	15 mg	-	KM91	12/12	12/12	10/10
G5	15 mg	K2	-	7/12	1/12	2/10
G6	15 mg	-	-	12/12	12/12	9/10
G7	-	-	-	12/12	12/12	-

(B)	DES	백신	재분리 장기
-----	-----	----	--------

시험군	처리	생백신	사독백신	기관	신장	수관관
G1	15 mg	K2	K40/09	3/14	0/14	0/12
G2	15 mg	K2	KM91	3/14	0/14	2/12
G3	15 mg	-	K40/09	13/13	4/13	5/11
G4	15 mg	-	KM91	11/11	10/11	9/10
G5	15 mg	K2	-	1/13	1/13	1/11
G6	15 mg	-	-	13/13	12/13	10/11
G7	-	-	-	11/11	10/11	-

▶ DES 모델을 이용한 공격접종 시험에서 K40/09 주는 사독백신의 형태로 이용될 시 KM91 주보다 (A) homologous challenge 뿐만 아니라 (B) heterologous challenge 에 대해서도 유의적으로 높은 수준의 방어능을 갖는 것으로 나타났다. 특히 표 (B) 의 G3 와 G4 의 바이러스 분리 결과를 비교 시 K2 생독백신의 priming 없이 K40/09 사독백신의 단독접종 만으로도 heterologous strain 인 KM41 주의 공격접종에 대하여 높은 교차 방어율을 보인 것을 확인할 수 있었다.

사. AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품 제작 및 실험실 내 효능 시험

(1) AI(H9)-ND-IB 사독백신의 시제품 제작

▶ 신규분리주인 K40/09 균주를 포함한 AI-ND-IB 혼합사독백신의 시제품을 참여기업인 (주) 고려비엔피, (주) 녹십자수의약품, (주) 대성미생물연구소에서 제작하였다. 혼합사독백신에 사용된 불활화 항원은 AI; A/chicken/Korea/01310/01, ND; LaSota, IB; M41 균주를 사용하였으며 추가로 기존에 포함된 KM91 항원 대신 교차방어능이 보다 우수한 것으로 나타난 K40/09 주를 불활화 항원으로 포함하였다.

(2) AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 안전성 평가시험

▶ 6-8주령의 SPF 닭 5수를 시험군으로 하여 AI(H9)-ND-IB(K40/09) 혼합 사독백신시제품의 안전성 시험을 진행 하였다. 제작된 시제품 2수분을 근육내로 접종하고 14일간 관찰하였다. 시험기간 동안 안전성 시험에 사용된 닭들은 특이사항 없이 건강하게 생존하였으며 비정상적인 육아종 역시 형성되지 않아 국가검정 동물수의약품 검정기준에 부합한 것으로 나타났다.

(3) AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 면역원성 및 방어효능 평가시험

(1) AI(H9)-ND-IB(K40/09) 혼합 사독백신 시제품의 면역원성 및 방어능의 평가

▶ 농림축산검역본부 국가검정 동물수의약품 검정기준에 따라 6-8주령의 SPF 닭을 이용하여 제작된 시제품의 면역원성 및 방어능을 평가하였다.

▶ 시제품의 NDV에 대한 방어능을 시험하기 위하여 6-8주령의 SPF 닭 15수를 1개 시험군으로 하여 NDV 에 대한 방어능 평가 시험을 진행 하였다. 백신 3주 후 강독형 뉴캐슬 바이러스인 Kr-005 균주를 수당 5.0-6.0 EID₅₀ 의 역가로 근육 내 투여를 통하여 공격접종을 실시하였다. 공격접종 2주간 생존율 및 임상증상을 관찰하여 방어능을 평가하였다.

표-20. 3개 제조사에서 생산된 AI(H9)-ND-IB 사독백신의 NDV 공격접종에 대한 방어능 평가

시험백신	제조사	폐사율	임상증상
AI(H9)+ ND+ IB사독백신	(주) 고려비엔피	0/15	0/15
	(주) 녹십자 수의약품	0/15	0/15
	(주) 대성미생물연구소	0/15	0/15
대조군	-	15/15	-

▶ 모든 시험군은 강독형 NDV의 공격접종 후 2주 간 건강하게 생존하였다. 3개 제조사에서 제조한 백신은 모두 NDV 공격접종에 대하여 효과적인 방어능을 제공하는 것으로 나타났다.

▶ 시제품의 IBV 에 대한 면역원성을 시험하기 위하여 6-8주령의 SPF 닭 15수를 1개 시험군으로 하여 IBV 에 대한 면역원성 평가 시험을 진행 하였다. 제작된 시제품을 6-8주령의 SPF 닭에 근육 내로 접종하고 3주 후 혈청을 채취하여 IBV 에 대한 중화시험을 실시하였다. 중화지수는 시제품에 포함된 백신 균주인 K40/09 및 M41 strain 에 대하여 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의하여 산정하였다.

표-21. 3개 제조사에서 생산된 AI(H9)-ND-IB 사독백신의 IBV 에 대한 면역원성 평가

시험백신	제조사	접종수수	IBV중화지수	
			K40/09	M41
AI(H9)+ ND+ IB사독백신	(주) 고려비엔피	15	2.2	2.9
	(주) 녹십자 수의약품	15	2.1	2.9
	(주) 대성미생물연구소	15	2.2	2.7
대조군	-	10	0	0

▶ 시제품의 IBV에 대한 면역원성을 평가한 결과 모든 제품의 IBV 중화지수가 2.0 이상을 보임으로써 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 부합한 것으로 나타났다.

▶ 시제품의 AIV에 대한 면역원성 및 방어능을 시험하기 위하여 6-8주령의 SPF 닭 15수를 1개 시험군으로 하여 AIV 에 대한 면역원성 및 방어능 시험을 진행 하였다. 제작된 시제품을 6-8주령의 SPF 닭에 근육 내로 접종하고 3주 후 H9N2 조류인플루엔자 항원에 대한 혈청의 HI titer 를 평가하였다. 공격접종으로 현재 백신균주인 A/chickenKorea/01310/01 (H9N2) 바이러스를 수당 $10^{6.0}$ EID₅₀의 농도로 접종한 후 5일 후 기관과 맹장편도에서 재분리를 실시하여 AI 에 대한 방어능을 평가하였다.

표-22. 3개 제조사에서 생산된 AI(H9)-ND-IB 사독백신의 AIV에 대한 면역원성 및 방어능 평가

시험백신	제조사	HI 역가 (log2)	재분리 장기	
			기관	맹장편도
AI(H9)+ ND+ IB사독백신	(주) 고려비엔피	7.6±0.7	0/10	1/10
	(주) 녹십자 수의약품	7.9±0.7	0/10	0/10
	(주) 대성미생물연구소	7.2±0.9	1/10	0/10
대조군	-	0	8/10	6/10

▶ 각 제조사에서 제작한 시제품들은 AIV, NDV, IBV 에 대하여 우수한 면역원성 및 방어능을 보였다. 특히 K40/09 백신주의 경우는 현재 산란계에서 산란저하 등을 일으키는 농장에서 많이 분리되고 있는 new cluster에 속하는 IBV 이며 본 사업단의 시험내용대로 보다 광범위한 교차면역원성을 보이므로 야외에 적용할 경우 현재 사용되고 있는 KM91 을 포함한 사독 백신보다 우수한 방어능을 보일 것으로 기대된다.

아. AI-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 국내야외임상시험

(1) AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 야외임상시험 승인

▶ 제작된 AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품을 제작하여 국가 검정기준에 의거한 국내 실험실내 임상시험을 완료하고 농림축산검역본부에 품목 허가신청을 위한 임상시험계획서 제출 후 보완요구사항 충족을 통하여 국내 야외임상시험 승인을 획득하였다.

(2) AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 야외임상시험 실시

▶ 국내 산란계 농장 2곳, 육용 종계 농장 1곳에서 AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신의 야외임상시험을 실시할 예정이다. (2013년 9월 예정)

2. 신기술융합 AI(H5)+ND+IB 사독백신 개발

개발배경

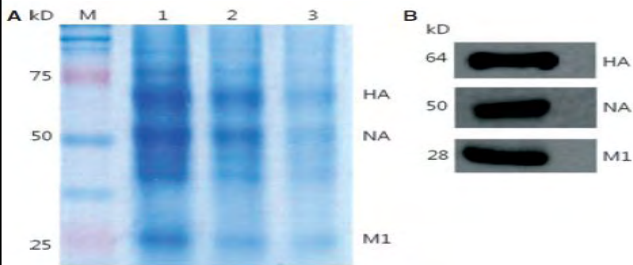
베트남, 인도네시아 등을 포함한 동남아시아에 상재하며, 국내에서도 9년간 4번의 가금류에 발생했던 H5N1 형 고병원성 조류인플루엔자 바이러스는 병원성의 제거 없이 백신을 생산하기에는 종란의 폐사율이 너무 높아 제조가 까다로울 뿐만 아니라 제조시 높은 등급의 생물안전시설이 필요하다는 단점이 있다. 또한 조류 인플루엔자는 Orthomyxoviridae의 RNA 바이러스로 매우 빠르게 진화하므로 백신주의 교체도 빠르게 이루어져야만 질병 방어에 효과적이다. Virus-like particle (VLP) 및 수용성 활성형 단백질을 항원으로 사용한 백신은 유전자 염기서열과 같은 제한적인 정보만으로도 빠르고 면역원성이 높은 백신을 생산할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서는 VLP 및 수용성 활성형 단백질 제조기술을 이용한 백신제조 방법을 이용하여 국내 및 수출 대상국에 적합한 최근 유행하고 있는 고병원성 H5N1형 조류인플루엔자 바이러스의 단백질을 포함하며 면역원성 및 생산역가가 높은 고병원성 H5N1 조류인플루엔자 VLP 와 수용성 활성형 단백질을 제작 하였으며, 역유전학 시스템을 이용하여 병원성을 제거한 백신균주를 제작하여 이들을 불활화 ND, IB 바이러스 항원과 혼합한 신기술 융합 AI(H5)+ND+IB 사독백신을 개발하였다.

가. 고병원성 H5N1 조류인플루엔자 Virus-like particle (VLP) 를 이용한 백신의 제작 및 면역원성, 안전성 및 방어능 시험

(1) H5N1 VLP의 제작 및 검정

▶ 고병원성 조류 인플루엔자 H5N1 형의 Virus-like particle (VLP) 를 제작하기 위하여 국내에서 처음 발생한 고병원성 H5N1 조류인플루엔자인 A/chicken/Korea/Es/03 의 HA, NA, M1 단백질을 코딩하는 유전자 서열을 선택적으로 증폭하였다. 증폭된 유전자를 배컬로 바이러스의 DNA 에 삽입하여, 곤충세포에 감염 시 A/chicken/Korea/Es/03 (H5N1) 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 HA, NA, M1 단백질을 동시에 발현 시킬 수 있는 재조합 배컬로 바이러스를 제작하였다. 재조합 바이러

스를 곤충세포인 Sf9 세포에 감염시킨 후 배양 상층액에서 H5N1 VLP 를 수거하였으며, 0.2% 포르말린을 이용하여 배탈로 바이러스를 불활화 시킨 후 농축하여 추가 정제과정 없이 백신으로 사용할 VLP 항원을 제작하였으며, 제작된 VLP 항원을 혈구 응집반응 및 western blotting 을 사용하여 확인하였다. 확인 결과 influenza HA, NA, M1 단백질을 함유하는 VLP 항원의 존재를 확인 할 수 있었으며, 2¹⁰ HAU의 혈구 응집능을 갖는 것으로 확인 되었다.



[그림-10] 제작된 VLP 항원의 확인

▶ 제작된 VLP 항원을 Western blotting 으로 확인한 결과 인플루엔자 HA, NA, M1 단백질을 발현하고 있음을 알 수 있었다.

(2) VLP 백신의 제작 및 SPF 닭에서의 면역원성 및 방어능 시험

▶ SPF 닭에서의 항원 농도별 면역원성 및 방어능을 확인하기 위하여 제작된 VLP 항원을 농도별로 (2⁸, 2⁹, 2¹⁰ HAU) 가급류 전용 adjuvant 인 ISA70 (SEPPIC, France) 과 무게비 30:70 으로 혼합하여 각기 다른 VLP 항원농도를 갖는 백신을 제조 하였다. 제조된 VLP 백신을 그룹당 8수씩의 5주령 SPF 닭에 근육주사 경로를 통하여 투여 하였으며, 대조군에는 VLP가 함유된 배양상층액 대신 곤충세포의 배양에 사용되는 배양배지를 ISA70 (SEPPIC, France) 과 무게비 30:70 으로 혼합하여 실험군과 같은 방식으로 투여하였다. 백신 2, 3주 후 채혈을 통하여 H5 인플루엔자 특이 항체의 생성 여부를 확인 하였으며, 백신 3주 후 VLP 백신의 방어능을 확인하기 위하여 10⁶ EID50/ml 의 A/chicken/Korea/ES/03 (H5N1) 바이러스를 1수당 0.1ml씩 비강경로로 공격 접종하였다. 공격접종 후 2, 3, 5, 7일에 oropharynx 와 cloaca 의 swab 후 rRT-PCR 을 통하여 공격접종 바이러스의 배출 정도를 평가 하였다. 항체검사 결과를 ANOVA with Tukey -Kramer post-test 로 통계처리 시 음성 대조군에 비하여 VLP 백신을 투여한 그룹의 H5 influenza 특이 항체가 유의성 있게 증가함을 알 수 있었으며, 공격접종 후 100% 방어율을 보였다. 공격접종 바이러스의 배출역가 역시 큰 폭으로 감소한 것을 확인 하였다.

표-1. VLP 백신 접종 후 H5 인플루엔자 특이 항체가의 변화

Group	HI titer (mean ± SD, log2)		
	2weeks post vaccination	3weeks post vaccination	
1	VLP 2 ⁸ + ISA 70	4.87 ± 0.83	6.63 ± 1.19
2	VLP 2 ⁹ + ISA 70	5.00 ± 1.32	7.11 ± 1.36
3	VLP 2 ¹⁰ + ISA 70	5.13 ± 2.03	6.88 ± 2.35
4	control	0	0

▶ VLP 백신을 접종 한 후 3주간 혈청 분석을 통하여 H5 influenza 특이 항체를 확인하였다. 백신

후 H5 influenza 특이항체가 형성되는 것을 확인 할 수 있었으며, 2⁹ HAU 를 갖는 항원을 이용하여 제작한 백신을 투여한 그룹에서 가장 높은 항체가가 유도됨을 알 수 있었다.

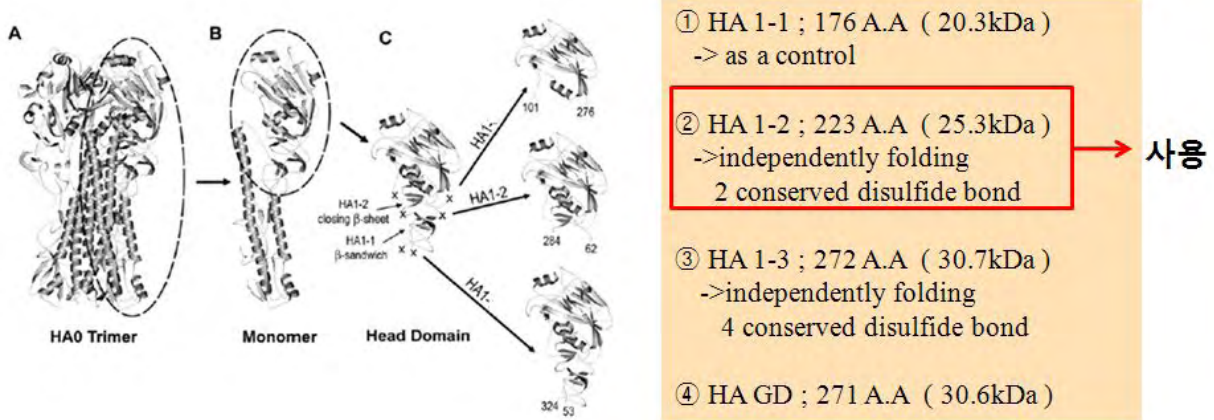
표-23. VLP 백신 접종 그룹에서의 공격접종 후 생존률

Group ^A	Mortality:		Morbidity	
	[number	dead/total	(number	ill/total)
	(MDT ^B)]			
2 ⁸ VLP		0/8		1/8
2 ⁹ VLP		0/8		1/8
2 ¹⁰ VLP		0/7		0/7
Mock		8/8 (2.4)		6/8

나. 고병원성 H5N1 조류인플루엔자 수용성 활성형 단백질을 이용한 백신의 제작 및 면역원성 및 방어능 평가시험

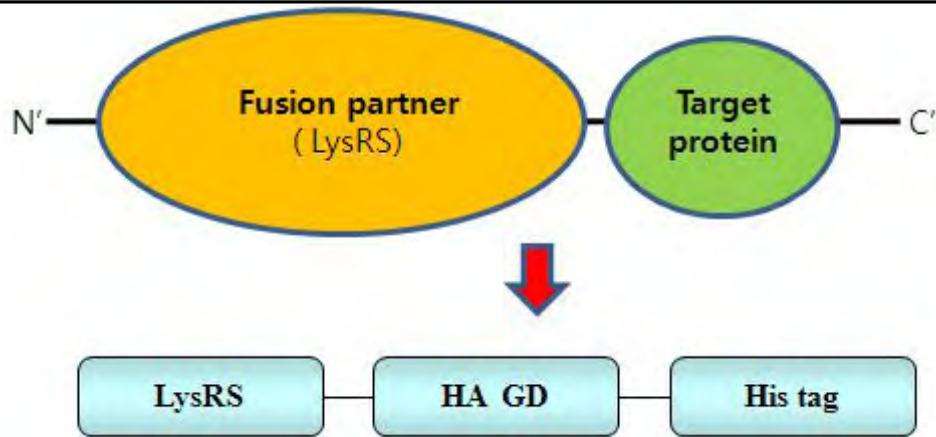
(1) H5 수용성 활성형 단백질의 제작 및 검정

▶ 선행 연구를 통해 확립된 RNA-binding protein fusion system을 이용하여 수용성 및 활성형으로 H5단백질을 생산하기 위하여 고병원성 조류인플루엔자 H5N1 형인 A/Indonesia/5/05 바이러스의 Hemagglutinin 단백질을 선정 하였다.



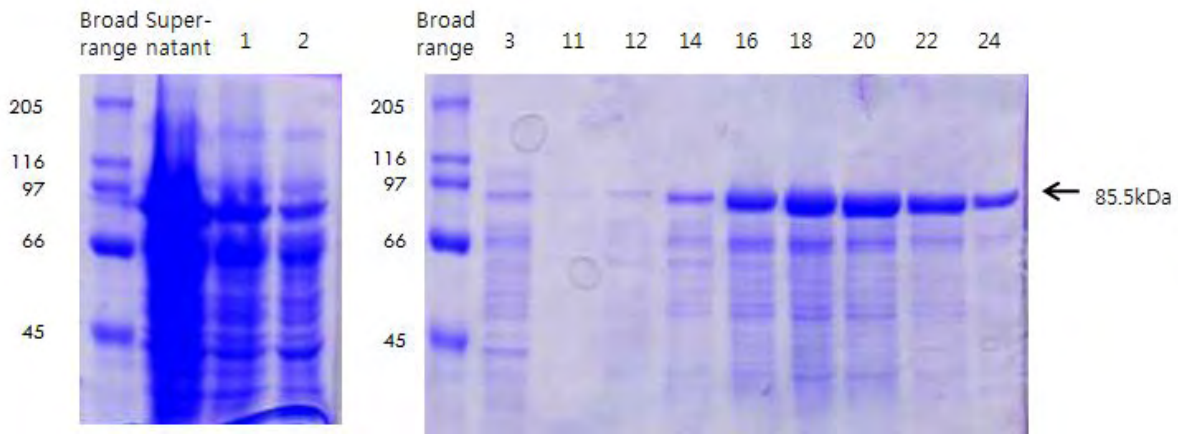
[그림-11] 수용성 활성형 단백질을 생산하기 위한 목적 단백질의 선정

▶ Hemagglutinin의 Globulin domain 중 면역원성이 높은 HA 1-2 선정



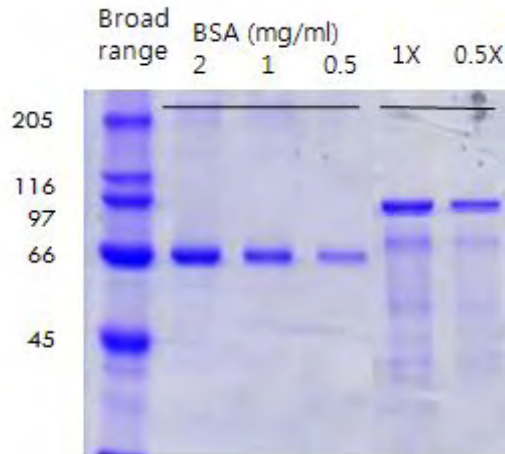
[그림-12] 수용성 및 활성형 단백질의 모식도

- ▶ H5 단백질을 수용성 및 활성형으로 발현하기 위해 N'에 RNA fusion partner와 C'에 정제를 위한 His tag이 연결되어 있다.
- ▶ HA 단백질의 중화항체가 생성 될 것으로 예상되는 globular domain (GD) 을 수용성 활성형으로 발현 하는 HA GD 단백질과 면역원성 및 교차방어능을 늘리기 위하여 인플루엔자 NP 단백질을 함께 발현하는 NP-HA GD 단백질을 제작 하였다.
- ▶ 발현된 단백질 (NP-HA GD, 85kDa; HA GD, 30.6kDa) 을 Nickel affinity chromatography를 이용하여 분리한 후, storage buffer (50mM Tris-Cl(pH7.5), 200mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT)로 dialysis하였다.



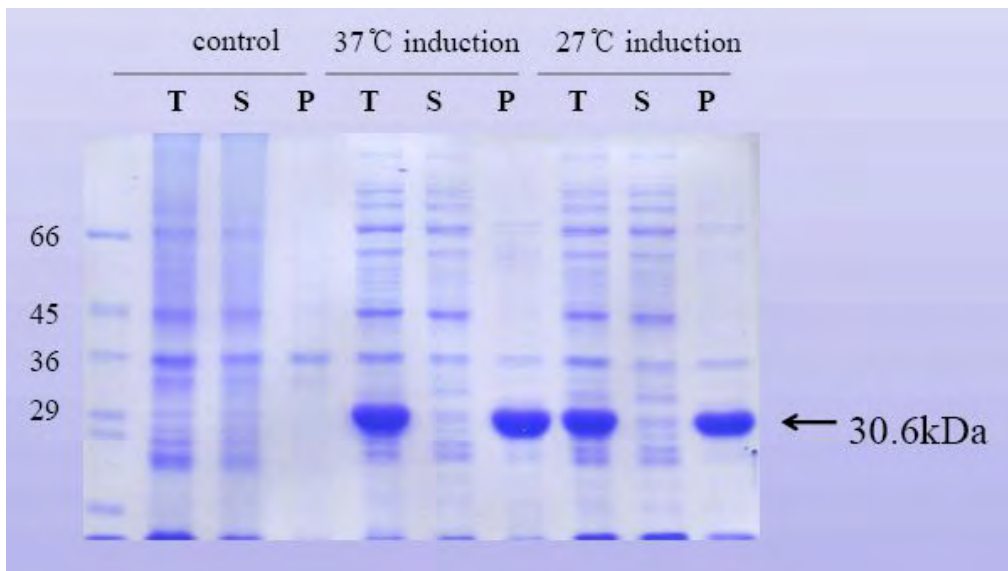
[그림-13] NP-HA GD 단백질(85kDa)의 정제

- ▶ 발현된 NP-HA GD 수용성 활성형 단백을 Nickel affinity chromatography에 의해 정제한 후 PAGE gel 상에서 쿠마시 염색을 통하여 확인 하였다 (lane 14~24).



[그림-14]. Dialysis된 H5 단백질의 정량

▶ 정제된 단백질을 reference protein 인 BSA 를 이용하여 정량한 결과 1.7 mg/ml 의 농도를 갖는 것으로 확인 되었다.

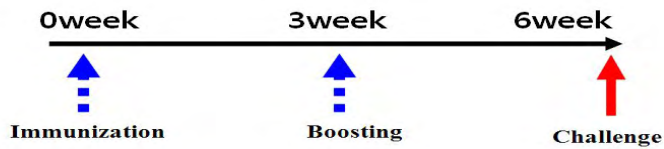


[그림-15] HA GD 단백질 (30.6kDa) 의 정제

▶ 발현된 H5 HA GD 수용성 활성형 단백을 Nickel affinity chromatography에 의해 정제한 후 PAGE gel 상에서 쿠마시 염색을 통하여 확인 하였다.

(2) H5 수용성 활성형 단백질 백신의 면역원성 및 방어능 평가시험

▶ 제작된 수용성 활성형 단백질의 면역원성 및 공격접종에 대한 방어능을 알아보기 위하여 마우스의 복강경로를 통하여 제작된 단백질을 주사하였으며, 3주후 같은 단백질을 이용하여 피하 경로로 부스팅을 실시 하였다. 부스팅 3주 후 항체가의 생성을 확인 하였으며, 마우스에서 높은 병원성을 보이는 A/aquaticbird/Korea/W81/06 (H5N2) 균주를 5LD50 의 농도로 비강경로를 통한 공격 접종을 실시하여 방어능을 평가 하였다.

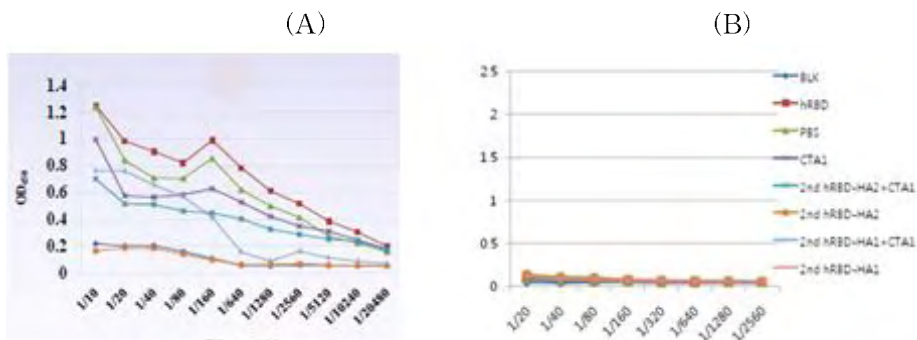


Immunization group	Inoculation route	Challenge
PBS	IN	A/aquaticbird/Korea
hRBD	IN	a/W81/06
CTA1	IN	(H5N2)
hRBD-HA 1-1 (indonesia)	IN	5 LD ₅₀
hRBD-HA 1-1 (indonesia)+CTA1	IN	
hRBD-HA 1-1 (indonesia)+CTA1	IN	
hRBD-HA 1-2(indonesia)	IN	
hRBD-HA 1-2(indonesia)+CTA1	IN	

[그림-16] 수용성 활성형 단백질을 이용한 면역원성 및 방어능의 평가

▶ 각 그룹별로 2회에 걸쳐 복강투여와 피하투여를 실시하고, 6주후에 A/aquaticbird/Korea/W81/06 (H5N2) 균주로 Challenge를 실시 하였다.

▶ 제작된 수용성 활성형 단백질은 마우스에서 면역원성이 높지 않은 것으로 나타났다. VLP 및 재조합 바이러스 항원을 이용하여 제작한 백신에 비하여 면역원성이 떨어지는 것으로 나타났다.

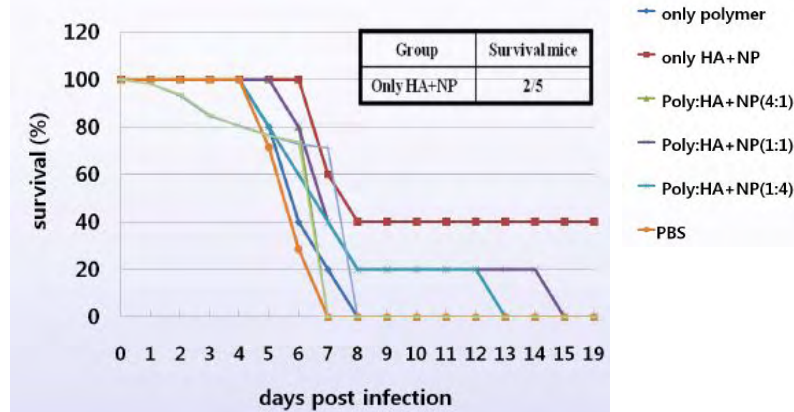


[그림-17] 수용성 활성형으로 백신한 마우스에서의 항체가 측정

▶ 수용성 활성형으로 2회 백신 후 혈청내의 항체를 측정 하였다. NP-HA GD 단백질을 이용하여 백신을 한 그룹에서는 인플루엔자에 대한 항체가 형성 되었으나 (A), HA GD 단백질을 이용하여 백신을 한 그룹에서는 인플루엔자 특이항체가 형성 되지 않았다 (B).

▶ 부스팅 3주 후 A/aquaticbird/Korea/W81/06 (H5N2) 균주로 Challenge를 실시 한 결과 수용성 활성형 단백질은 최대 40%의 생존율을 보여 VLP 및 재조합 바이러스 항원을 이용하여 제작한 백신에 비하여 방어능이 떨어지는 것으로 나타났다.

[그림-18] 수용성 활성형으로 백신의 방어능 평가



▶ 마우스에 수용성 활성형 단백질을 이용하여 백신을 실시 한 후 공격 접종으로 방어능을 평가하였다. 5LD50 의 역가로 접종 시 40% 의 생존률을 보이는 것으로 나타났다.

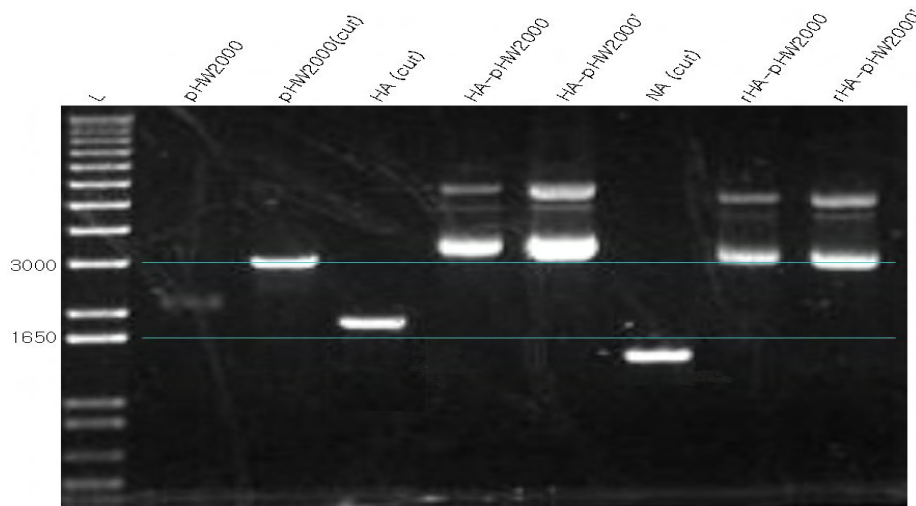
▶ 면역원성 및 공격접종에 대한 방어능이 있는 것으로 확인된 수용성 활성형 단백질은 VLP 에 비하여 생산 단가가 저렴하다는 장점을 가지고 있는 특성을 고려하여 불 때 기존의 백신에 첨가 형태로 사용 시 양계용 백신으로써 활용가치가 높을 것으로 생각된다.

다. 역유전자 시스템을 이용하여 제작한 H5N1 백신균주를 사용한 불활화 백신의 제작, 면역원성 및 방어능 시험

(1) 저온 적응 생독 백신균주를 backbone 으로 한 H5N1 HPAI 재조합 바이러스 제작 및 검정

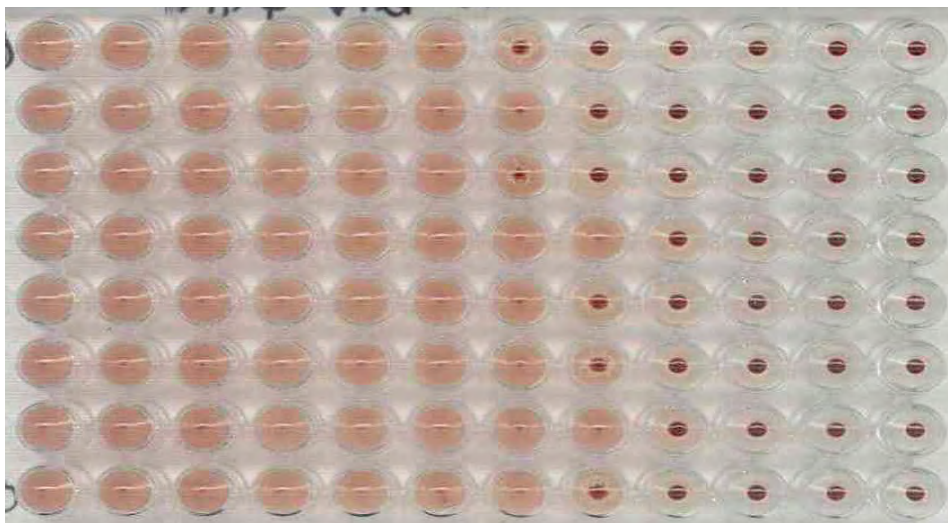
▶ 고병원성 조류인플루엔자 H5N1 바이러스 중 2003년 국내에서 최초로 발생했던 A/chicken/Korea/Es/03 균주를 선정하였다.

▶ 고병원성 조류인플루엔자 H5N1 바이러스 A/chicken/korea/ES/03 의 면역원성을 나타내는 표면 단백질인 Hemagglutinin(HA)과 Neuraminidase(NA)의 RNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 cDNA를 확보하고, 두 cDNA 중 고병원성을 나타내는 HA의 polybasic cleavage site의 polybasic amino acid 를 제거하였다. 증폭된 각 cDNA는 RNA Pol I-Pol II driven vector(pHW2000)에 cloning 한 뒤, sequencing을 통해 mutation이 일어나지 않았음을 확인한다.



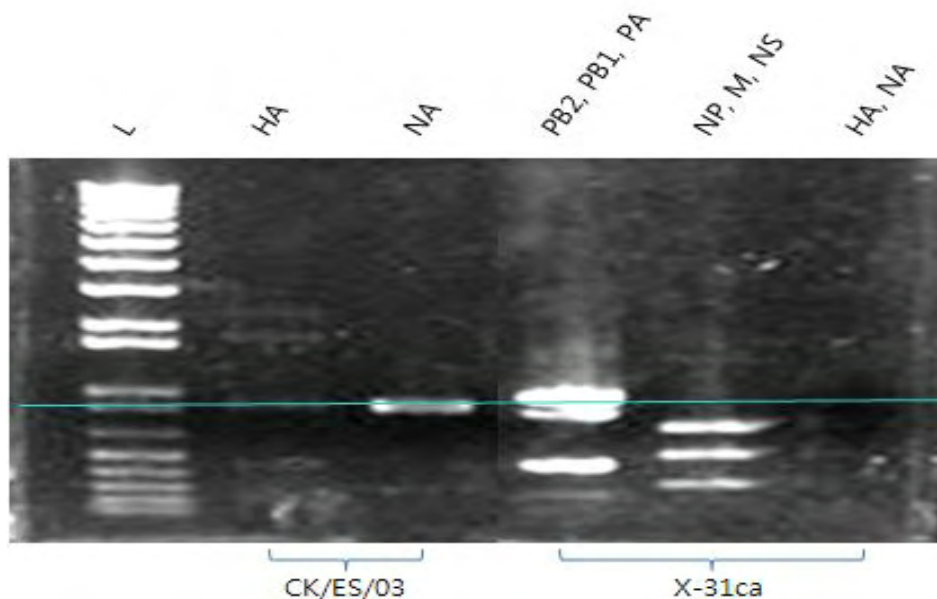
[그림-19] HA와 NA의 cloning

- ▶ Vector(pHW2000)와 Insert(HA, NA)는 Restriction enzyme(BsmB I) 처리 후, ligation되었다.
- ▶ 293T cell이 80%정도 찬 6well-plate에 cold adapted X-31의 internal gene plasmid 6개(PB2, PB1, PA, NP, NS, M)과 cloning된 H5N1의 HA, NA plasmid를 well 당 300ng씩 총2,400ng이 되도록 혼합한 뒤, lipofectamin과 plus reagent를 혼합한다. serum-free media를 사용하여 transfection을 하고 3시간 뒤 새로운 serum-free media로 교체하고, 37℃에서 5% CO2로 배양한다. 48시간 뒤, trypsin(1μg/ml)을 처리하고, 24시간 뒤 상층액을 거둔다.
- ▶ 거둬들인 상층액을 100μl씩 11일된 수정란에 접종하여 30℃에서 배양한다. 72시간 뒤, allantoic fluid를 거둬 HA assay를 통해 제조함 바이러스의 생성여부를 확인하고, 생성된 바이러스로부터 vRNA를 추출하여 Mutiplex PCR을 통해 제대로 된 6:2 제조함바이러스 여부를 확인한다



[그림-20] 혈구응집 반응을 통한 증폭된 바이러스의 확인

- ▶ 제조된 바이러스를 HA assay를 통해 확인하였다.



[그림-21] Mutiplex PCR 을 통한 재조합 바이러스의 확인

▶ CK/ES/03의 HA, NA와 X-31ca의 PB2/PB1/PA, NP/M/NS, HA/NA에 특이적인 Primer를 이용하여 6:2 재조합 바이러스를 확인하였다.

(2) H5N1 HPAI 재조합 백신균주의 특성분석

① H5N1 백신주의 종란 및 닭에서의 병원성 평가

▶ H5N1 백신주의 고병원성 제거여부를 평가하기 위하여 종란 및 SPF 닭에서의 병원성을 평가 하였다. H5N1 백신주 원액을 10^{-3} 에서 10^{-6} 까지 희석하여 접종한 뒤 10일령 SPF 계태아란에 접종하여 7일간 관찰한 결과, 야외분리주의 특성과 달리 계태아의 병변을 관찰할 수 없었으며, 폐사 또한 일어나지 않았다. SPF 닭에서의 병원성을 시험하기 위하여 6주령 SPF 닭 10마리에 비강 경로로 $10^{6.0}$ EID₅₀의 역가로 RG H5N1 백신주를 접종하여 14일간 관찰 하였다. 시험기간 동안 모든 개체가 생존하였으며, 안면부종, 호흡기증상 등의 저병원성 조류인플루엔자 감염증상을 유발하지 않았다.

표-24. RG H5N1 백신주의 닭에서의 병원성

그룹	RG H5N1 접종역가 (log EID ₅₀ /chicken)	폐사율	임상증상
실험군	6.0	0/10	0/10
대조군	-	0/5	0/5

② H5N1 백신주의 growth kinetics 측정

▶ H5N1 백신주의 종란에서의 growth kinetics 측정 시험을 실시하였다. 백신 생산 시 높은 역가의 바이러스를 회수하기 위한 조건을 설정하기 위하여 RG H5N1 주의 종란접종 농도별 및 증폭 시간대별 growth kinetics 를 측정하였다. 접종량에 따른 바이러스의 증식특성을 확인하기 위하여 CE2 에 해당하는 RG H5N1 바이러스의 역가를 50 Percent Embryo Infective Dose (EID₅₀) 로 측정 후 이를 10배수로 희석하여 각각 30개씩의 SPF 발육란의 장요막강에 $10^{1.3}$, $10^{2.3}$, $10^{3.3}$, $10^{4.4}$ EID₅₀/100ul/egg 역가로 접종 하였다. 배양은 37C에서 이루어 졌으며, 증폭 시간에 따른 증폭 특성을 확인하기 위하여 접종 후 24시간, 48시간, 72시간에 장요막강액을 회수하여 회수된 바이러스의 역가를 EID₅₀ 및 HAU 으로 측정하였다.

표-25. 약독화 reverse genetics (RG) H5N1 백신주의 growth kinetics.

(A) HAU 으로 측정한 접종역가별, 증폭 시간대별 증폭특성.

(A) 접종역가 (logEID ₅₀ /egg)	시간별 증폭역가 (HAU)		
	24 시간	48 시간	72 시간
6.3	5.6 ± 0.5	6.4 ± 0.5	6.3 ± 0.5
5.3	4.7 ± 0.7	6.9 ± 0.3	6.6 ± 0.5
4.3	4.6 ± 0.8	6.9 ± 0.6	7.2 ± 0.6
3.3	1.6 ± 1.7	7.3 ± 0.5	7.5 ± 0.5
2.3	0 ± 0.0	7.6 ± 0.5	7.8 ± 0.6

(B) 접종 72시간 후에 EID₅₀ 로 측정한 접종역가별 증폭특성

(B) 접종역가 (logEID50/egg)	바이러스 증폭역가 (log EID50/ml)
4.3	7.8
3.3	7.2
2.3	8.3
1.3	8.5

▶ 접종역가별, 증폭 시간대별 증폭특성을 측정한 결과 $10^{2.3}$, $10^{3.3}$ EID₅₀/egg 의 접종양으로 72시간 동안 배양하였을 경우 회수된 장요막강액은 각각 7.8 및 7.5 HAU 의 역가를 보임으로써 증폭 효율이 가장 좋은 것으로 나타났다. $10^{1.3}$, $10^{2.3}$ EID₅₀/egg 의 접종양으로 72시간 동안 배양하였을 경우 회수된 장요막강액은 각각 $10^{8.5}$, $10^{8.3}$ EID₅₀/ml 의 역가를 보임으로써 증폭 효율이 가장 좋은 것으로 나타났으며 이 결과를 바탕으로 계대배양을 실시하였다.

③ H5N1 백신주를 사용하여 제작한 사독 오일백신의 최소면역원성 시험

▶ 시제품 제작을 위한 백신 내 항원의 함량을 결정하기 위하여 RG H5N1 백신주를 사용한 사독 오일 백신의 접종 dose 별 항체 생성능을 평가하였다. RG H5N1 바이러스를 불활화 후 항원 용량별로 사독 오일 백신을 제작하여 SPF 닭에 근육 경로로 접종 후 경과 시간별 (2주,3주) 항체 생성능을 평가하였다. 1수분의 백신에 포함된 항원의 양은 항원을 불활화 하기전의 역가를 기준으로 설정 하였으며 불활화된 항원은 가금류 전용 adjuvant 인 ISA70 (SEPPIC, France) 과 30:70 (w/w) 의 비율로 혼합하여 제작되었다.

표-16. RG H5N1 사독항원을 포함하는 백신의 최소면역원성 시험

1수분당 사독백신 항원량 (log EID50/dose)	HI titer (log2)	
	백신접종 2주 후	백신접종 3주 후
8.0	8.1 ± 0.6	8.5 ± 0.5
7.0	6.6 ± 0.8	8.1 ± 0.9
6.0	2.2 ± 1.1	1.3 ± 1.8
5.0	1.9 ± 1.8	0.6 ± 1.3
대조군	0	0

▶ 사독백신의 최소면역원성 시험결과 $10^{7.0}$ EID₅₀/dose 이상의 항원양에서 최소면역원성이 형성 되는 것을 확인하였다.

④ 약독화 reverse genetics (RG) H5N1 백신주의 cross-clade HI 항체 형성능 평가

▶ 수출을 목표로하는 동남아시아 지역에는 다양한 clade 의 H5N1 이 존재하므로 이들 clade 에 대한 교차 면역원성을 평가하기 위하여 Clade 1 에 속하는 A/VietNam/1194/2004 균주 및 Clade 2.1 에 속하는 A/Indonesia/2005 (H5N1) 균주에 대한 cross-clade HI test 를 실시하였다.

표-26. heterologous 항원에 대한 cross-HI test

개체번호	Cross-clade HI 역가		
	homo	hetero	
	ES03 (clade 2.5)	Indonesia (clade 2.1)	Vietnam (clade 1)
1	8	5	4
2	8	7	4
3	8	6	5
4	6	4	2
5	8	6	4
6	7	4	2
7	8	7	4
8	7	5	2
평균±SD	7.5±0.8	5.5±1.2	3.4±1.1

▶ Cross-HI test 결과 서로 다른 지역의 분리주에 대해서도 교차면역원성을 나타내었다. 특히 clade 2 에 속해있는 Indonesia 분리주의 경우 높은 수준의 cross HI titer 를 보여 해당 수출국에서 시판 이 이루어 질 경우 효율적인 교차방어가 이루어 질 수 있을 것으로 생각된다.

(3) H5N1 HPAI 재조합 바이러스 사독백신의 제작 및 SPF닭에서의 면역원성 및 방어능 평가시험

▶ 재조합 인플루엔자 바이러스를 이용하여 제작 한 사독백신의 면역원성 및 방어능을 확인하기 위하여 2⁹ HAU 의 불활화된 항원을 가금류 전용 adjuvant 인 ISA70 (SEPPIC, France) 과 무게비 30:70 으로 혼합하여 불활화 백신을 제조 하였다. 제조된 백신을 8주의 5주령 SPF 닭에 근육주사 경로를 통하여 투여 하였으며, 대조군에는 증류수를 ISA70 (SEPPIC, France) 과 무게비 30:70 으로 혼합하여 실험군과 같은 방식으로 투여하였다. 백신 2, 3주 후 채혈을 통하여 H5 인플루엔자 특이 항체의 생성 여부를 확인 하였으며, 사독백신의 방어능을 확인하기 위하여 10⁶ EID₅₀/ml 의 A/chicken/Korea/ES/03 (H5N1) 바이러스를 1수당 0.1ml씩 비강경로로 공격 접종하였다. 공격접종 후 2, 3, 5, 7일에 oropharynx 와 cloaca 의 swab 후 종란접종을 통하여 공격접종 바이러스의 재분리 여부를 관찰 하였다. 항체검사 결과를 ANOVA with Tukey -Kramer post-test 로 통계처리 시 음성 대조군에 비하여 사독백신을 투여한 그룹의 H5 influenza 특이 항체가 유의성 있게 증가함을 알 수 있었으며, 공격접종 바이러스의 재분리 결과 사독백신을 투여한 그룹에서는 바이러스의 재분리가 되지 않음을 확인하였다.

표-27. 사독백신 접종 후 H5 인플루엔자 특이 항체가의 변화

Group	HI titer (mean ± SD, log ₂)	
	2weeks post vaccination	3weeks post vaccination
inactivated vaccine	6.00 ± 1.2	8.13 ± 1.13
control	0	0

▶ 재조합 조류인플루엔자 바이러스 사독백신을 접종 한 후 3주간 혈청 분석을 통하여 H5 influenza 특이 항체를 확인하였다. 백신 후 H5 influenza 특이항체가 형성되는 것을 확인 할 수 있었다

표-28. 사독 백신 접종 그룹에서의 공격접종 바이러스 재분리 결과

Group	Virus reisolation							
	2dpc		3dpc		5dpc		7dpc	
	Oropharynx	Cloaca	Oropharynx	Cloaca	Oropharynx	Cloaca	Oropharynx	Cloaca
inactivated vaccine	0/8	0/8	2/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
control	8/8	8/8	3/3	3/3	-	-	-	-

▶ 재조합 조류인플루엔자 바이러스 사독백신 접종 3주 후 공격접종을 실시하였으며, 공격접종 5일 후 공격접종 후 2, 3, 5, 7일에 oropharynx 와 cloaca 의 swab 후 종란접종을 통하여 공격접종 바이러스의 재분리 여부를 관찰 하였으며, 사독백신을 접종한 실험군에서는 바이러스의 재분리가 되지 않음을 확인하였다. 또한 공격접종 후 전 개체가 폐사한 대조군과 달리 백신 군에서는 100%의 생존율을 확인 할 수 있었다.

라. AI(H5N1 VLP)+ND+IB 혼합 사독백신 제작, 면역원성 및 방어능 평가

(1) AI(H5N1 VLP)+ND+IB 혼합 사독백신의 제작

▶ SPF 닭에서의 VLP 포함 AI(H5)+ND+IB 3종 혼합 사독백신의 면역원성 및 방어능을 확인하기 위하여 제작된 VLP 항원 (2*10 HAU) 과 ND 불활화 항원, IB 불활화 항원을 가금류 전용 adjuvant 인 ISA70 (SEPPIC, France) 과 무게비 30:70 으로 혼합하여 백신을 제조 하였다.

(2) AI(H5N1 VLP)+ND+IB 혼합 사독백신의 면역원성 및 방어능 평가시험

▶ 제조된 혼합백신을 그룹당 10수씩의 6주령 SPF 닭에 근육주사 경로를 통하여 투여 하였다. 백신 3주 후 채혈을 통하여 H5 인플루엔자, ND, IB에 대한 특이 항체의 생성 여부를 확인 하였으며, 백신 3주 후 혼합백신의 방어능을 확인하기 위하여 각각 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 [A/chicken/Korea/Es/03], ND바이러스, IB바이러스를 공격 접종하였다. 조류인플루엔자 공격접종군과 IB공격접종군은 5일 후 trachea 와 cecal tonsil 을 채취하여 유제 후 종란접종을 통하여 공격접종 바이러스의 재분리 여부를 관찰 하였으며, ND공격접종군의 폐사율을 관찰하였다. 표-3과 같이 VLP 포함 AI(H5)+ND+IB 사독백신은 세가지 질병에 대하여 모두 높은 항체형성능을 보였으며, 표-4와 같이 공격접종에 대하여 탁월한 방어능을 보였다.

표-29. VLP 포함 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 면역원성

시험백신	접종수수	AI 항체가	ND 항체가	IB 항체가
AI(H5)+ND+IB 사독백신	10	6.9	9.0	2.2
대조군	10	0	0	0

표-30. VLP 포함 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 공격접종 방어능

시험백신	접종수수	AI 생존 수수/ 총 수수	ND 생존 수수/ 총 수수
AI(H5)+ND+IB 사독백신	10	10/10	10/10
대조군	10	0/10	0/10

마. 역유전학 AI(H5N1)+ND+IB 혼합 사독백신 제작, 면역원성 및 방어능 평가

(1) 역유전학AI(H5N1)+ND+IB 혼합 사독백신의 제작

▶ SPF 닭에서의 재조합 조류 인플루엔자 불활화 항원 포함 AI(H5)+ND+IB 3종 혼합 사독백신의 면역원성 및 방어능을 확인하기 위하여 제작된 재조합 조류 인플루엔자 바이러스 불활화 항원 (2*9 HAU) 과 ND 불활화 항원, IB 불활화 항원을 가금류 전용 adjuvant 인 ISA70 (SEPPIC, France) 과 무게비 30:70 으로 혼합하여 백신을 제조 하였다.

(2) 역유전학AI(H5N1)+ND+IB 혼합 사독백신의 면역원성 및 방어능 평가시험

▶ 제조된 혼합백신을 그룹당 10수씩의 6주령 SPF 닭에 근육주사 경로를 통하여 투여 하였다. 백신 3주 후 채혈을 통하여 H5 인플루엔자, ND, IB에 대한 특이 항체의 생성 여부를 확인 하였으며, 백신 3주 후 혼합백신의 방어능을 확인하기 위하여 각각 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 [A/chicken/Korea/Es/03], ND바이러스, IB바이러스를 공격 접종하였다. 조류인플루엔자 공격접종군 과 IB공격접종군은 5일 후 trachea 와 cecal tonsil 을 채취하여 유제 후 종란접종을 통하여 공격접종 바이러스의 재분리 여부를 관찰 하였으며, ND공격접종군의 폐사율을 관찰하였다. 표-7과 같이 재조합 조류 인플루엔자 바이러스 포함 AI(H5)+ND+IB 사독백신은 세가지 질병에 대하여 모두 높은 항체형성능을 보였으며, 표-4와 같이 공격접종에 대하여 탁월한 방어능을 보였다.

표-31. 재조합 조류인플루엔자 바이러스 포함 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 면역원성

시험백신	접종수수	AI 항체가	ND 항체가	IB 항체가
AI(H5)+ND+IB 사독백신	10	8.2	9.2	2.3
대조군	10	0	0	0

▶ 재조합 조류 인플루엔자 바이러스 불활화 항원 포함 AI(H5)+ND+IB 사독백신은 세가지 질병에 대하여 모두 높은 항체형성능을 보였다.

표-32. 재조합 조류인플루엔자 바이러스 포함 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 공격접종 방어능

시험백신	접종수수	AI 생존 수수/ 총 수수	ND 생존 수수/ 총 수수
AI(H5)+ND+IB 사독백신	10	10/10	10/10
대조군	10	0/10	0/10

▶ 재조합 조류 인플루엔자 바이러스 불활화 항원 포함 AI(H5)+ND+IB 사독백신은 세가지 질병에 대하여 모두 탁월한 방어능을 보였다.

마. AI(H5)-ND-신규IB 혼합 사독백신 시제품 제작 및 실험실내 효능실험

(1) AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품 제작

▶ 신규분리주인 K40/09 균주를 포함한 AI(H5)-ND-IB 혼합사독백신의 시제품을 참여기업인 (주) 고려비엔피, (주) 녹십자수의약품, (주) 대성미생물연구소, (주) 중앙백신연구소에서 제작하였다. 혼합사독백신에 사용된 불활화 항원은 AI; RG H5N1, ND; LaSota, IB; M41 균주를 사용하였으며 (주) 중앙백신연구소를 제외한 참여기업에서는 추가로 기존에 포함된 KM91 사독항원 대신 교차방어능이 보다 우수한 것으로 나타난 K40/09 주를 불활화 항원으로 포함하였다. (주) 중앙백신연구소에서는 K40/09 주 대신에 기존 백신 균주인 KM91 주를 사독 항원으로 사용하였다.

(2) AI(H5)-ND-IB 혼합사독백신 시제품의 안전성 평가시험

▶ 6-8주령의 SPF 닭 5수를 시험군으로 하여 AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신시제품의 안전성 시험을 진행 하였다. 제작된 시제품 2수분을 근육내로 접종하고 14일간 관찰하였다. 시험기간 동안 안전성 시험에 사용된 닭들은 특이사항 없이 건강하게 생존하였으며 비정상적인 육아종 역시 형성되지 않아 국가검정 동물약품 검정기준에 부합한 것으로 나타났다.

(3) AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 면역원성 및 방어효능 평가시험

▶ 시제품의 NDV 에 대한 방어능을 시험하기 위하여 6-8주령의 SPF 닭 15수를 1개 시험군으로 하여 NDV 에 대한 방어능 평가 시험을 진행 하였다. 백신 3주 후 강독형 뉴캐슬 바이러스인 Kr-005 균주를 수당 5.0-6.0 EID₅₀ 의 역가로 근육 내 투여를 통하여 공격접종을 실시하였다. 공격접종 2주간 생존을 및 임상증상을 관찰하여 방어능을 평가하였다

표-33. 4개 제조사에서 생산된 AI(H5)-ND-IB 사독백신의 NDV 공격접종에 대한 방어능 평가

시험백신	제조사	폐사율	임상증상
AI(H5)+ ND+ IB사독백신	(주) 고려비엔피	0/15	0/15
	(주) 녹십자 수의약품	0/15	0/15
	(주) 대성미생물연구소	0/15	0/15
	(주) 중앙백신연구소	0/15	0/15
대조군	-	15/15	-

▶ 모든 시험군은 강독형 NDV의 공격접종 후 2주간 건강하게 생존하였다. 4개 제조사에서 제조한 백신은 모두 NDV 공격접종에 대하여 효과적인 방어능을 제공하는 것으로 나타났다.

▶ 시제품의 IBV 에 대한 방어능을 시험하기 위하여 6-8주령의 SPF 닭 15수를 1개 시험군으로 하여 IBV 에 대한 면역원성 평가 시험을 진행 하였다. 제작된 시제품을 6-8주령의 SPF 닭에 근육 내로 접종하고 3주 후 혈청을 채취하여 IBV 에 대한 중화시험을 실시하였다. 중화지수는 시제품에 포함된 백신 균주인 M41 strain 및 K40/09 또는 KM91에 대하여 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의하여 산정하였다.

표-34. 3개 제조사에서 생산된 AI(H5)-ND-IB 사독백신의 IBV 에 대한 면역원성 평가

시험백신	제조사	접종수	IBV중화지수	
			K40/09	M41
AI(H5)+ ND+ IB사독백신	(주) 고려비엔피	15	2.2	2.8
	(주) 녹십자 수의약품	15	2.2	2.9

	(주) 대성미생물연구소	15	2.3	2.6
대조군	-	10	0	0

표-35 1개 제조사에서 생산된 AI(H5)-ND-IB 사독백신의 IBV 에 대한 면역원성 평가

시험백신	제조사	접종수	IBV중화지수	
			KM91	M41
AI(H5)+ ND+ IB사독백신	(주) 중앙백신연구소	15	2.1	2.8
대조군	-	10	0	0

▶ 시제품의 IBV에 대한 면역원성을 평가한 결과 모든 제품의 IBV 중화지수가 2.0 이상을 보임으로써 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 부합한 것으로 나타났다.

▶ 시제품의 AIV 에 대한 방어능을 시험하기 위하여 6-8주령의 SPF 닭 10수를 1개 시험군으로 하여 AIV 에 대한 면역원성 및 방어능 시험을 진행 하였다. 제작된 시제품을 6-8주령의 SPF 닭에 근육 내로 접종하고 3주 후 시제품에 포함된 H5N1 조류인플루엔자 항원에 대한 혈청의 HI titer 를 평가하였다. 백신접종 3주 후 고병원성 야외분리주인 A/chicken/Korea/ES/03 (H5N1) 바이러스를 비강 경로를 통하여 수당 $10^{5.0}$ EID₅₀ 의 역가로 공격접종 하였다. 접종 5일 후 구강인두와 총배설강의 swab을 실시하여 바이러스의 배출여부를 측정하였다. 바이러스 배출여부는 인플루엔자 M gene 에 대한 real-time RT-PCR 을 통하여 판정하였다. 역가를 알고있는 바이러스 원액을 단계 희석 후 RNA 를 추출하여 M gene real-time PCR 을 통한 calibration curve 를 작성하였으며, 바이러스 배출 역가는 각 샘플의 Ct 값을 calibration curve 에 대입하여 산출 하였다.

표-36. 4개 제조사에서 생산된 AI(H5)-ND-IB 사독백신의 AIV 에대한 면역원성, 방어능 평가

시험백신	제조사	HI 역가 (log2)	폐사율	재분리 장기	
				구강인두 (EID ₅₀ /ml)	총배설강 (EID ₅₀ /ml)
AI(H5)+ ND+ IB 사독백신	(주) 고려비엔피	7.2±1.1	0/10	3/10 (0.56)	2/10 (0.66)
	(주) 녹십자 수의약품	9.0±0.7	0/10	1/10 (0.19)	1/10 (0.12)
	(주) 대성미생물연구소	8.0±0.8	0/10	2/10 (0.12)	2/10 (0.12)
	(주) 중앙백신연구소	7.4±0.8	0/10	2/10 (0.73)	3/10 (0.14)
대조군	-	0	10/10	-	-

▶ 항체검사 결과를 ANOVA with Tukey - Kramer post-test 로 통계처리 시 음성 대조군에 비하여 사독백신을 투여한 그룹의 H5 influenza 특이 항체가 유의성 있게 증가함을 알 수 있었다

▶ 대조군은 평균 2.8일에 모두 폐사하였으나 모든 백신 그룹은 임상 증상 없이 건강하게 생존 하였다. 특히 공격접종 5일째에 구강인두와 총 배설강의 스왑을 통하여 바이러스의 배출여부를 측정한 결과 모든 그룹에서 매우 낮은 역가의 바이러스가 배출됨을 확인함으로써 제작된 시제품들의 높은 방어능을 확인 할 수 있었다.

▶ 각 제조사에서 제작한 시제품들은 모두 AI(H5)-ND-IB 에 대하여 우수한 면역원성 및 방어능을 보였다. 특히 K40/09 백신주의 경우는 현재 산란계에서 산란저하 등을 일으키는 농장에서 많이 분리

가 되고 있는 new cluster에 속하는 IBV 이며 본 사업단의 시험내용대로 보다 광범위한 교차면역원성을 보이므로 해외로 수출할 경우 RG H5N1 바이러스와 함께 현지에서 유행하는 균주들에 대하여 우수한 방어능을 보일 것으로 기대된다.

사. AI-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 품목 허가 신청

(1) 수출 지정국으로의 품목등록을 위한 농림수산검역본부에의 수출품목 허가신청

▶ 제작된 AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품을 제작하여 국가 검정기준에 의거한 국내 실험실내 임상시험을 완료하였고 농림수산검역본부에 수출품목 허가신청 서류를 준비 중이다.

가. H5N1 HPAI의 닭 공격접종 모델 개발

1. SPF 닭을 이용한 Clade 2.2 바이러스 감염모델 개발을 위한 표준실험법 확립

▶ 1) 실험장소 및 실험장비

- 국립수의과학검역원 BL3 시설 내 chicken 실험용 isolator 사용

2) 실험동물

- SPF 닭 (6주령), 접종그룹 당 8수 사용

3) 접종경로

- 정맥(IV) 및 비강(IN) 접종

4) 모델 개발에 사용된 바이러스

- 접종용량

- 정맥경로: 원액바이러스(Ck/IS/06 $10^{8.8}$ EID₅₀ /0.1ml, Ck/Gimje/08 $10^{8.4}$ EID₅₀ /0.1ml)를 10배 희석하여 정맥내로 0.2ml 접종 (OIE 병원성 실험 기준)

- 비강경로: 각 바이러스를 $10^{6.5}$ EID₅₀ /0.1ml 역가로 희석하여 0.1ml씩 개체별로 접종

- 바이러스 종류

가. Clade 2.2 분리주: A/chicken/Korea/IS/06 (H5N1)

나. Clade 2.3.2 분리주: A/chicken/Korea/Gimje/08 (H5N1)

* A/chicken/Korea/IS/06 (H5N1)주는 2006/2007년 국내 두 번째 발생 index case의 분리주로서 우리나라뿐만 아니라 중국, 몽골, 유럽, 아프리카 등지까지 야생조류를 통해 광범위하게 확산되었던 바이러스임.

* A/chicken/Korea/Gimje/08 (H5N1)주는 2008년 국내 세 번째 발생 index case의 분리주로서 중국, 동남아의 가금류에 발생이 많고, 2009년 이후 몽골, 우리나라, 일본의 야생조류에서 많이 분리된 바이러스임.

5) 관찰 및 시료처리 방법

- 공격접종 후 14일간 임상증상 발현 유무 및 정도, 폐사율 관찰

- 구강 및 총배설장으로의 바이러스 배출 정도 측정(일)

- 시료처리방법: 구강(OP) 및 총배설장(CL) 시료는 채취 후 1-2일 이내에 처리(처리 전 4C 보관)한다.

- OP, CL은 CEF 배지(항생제 포함) 1ml 넣고 vortex, 3000rpm에 10분간 원심 후 상층액 채취하며 다시 gentamicin을 최종 1%되도록 첨가하여 사용한다.

- 전처리된 OP, CL 시료 상층액을 96 well plate에서 CEF 배지를 이용하여 10^{-1} 에서 10^{-8} 까지 10진 희석한 후 희석배율이 높은 것에서부터 CEF 세포에 100ul씩 5반복하여 접종한다.

* CEF 세포는 시료처리 전날 96 well plate에 미리 primary cell culture하여 준비

- 37°C CO₂ incubator에서 5일간 배양하며 도립현미경으로 세포변성효과(CPE) 유무를 관찰하고, 각 시료별로 5반복 접종한 바이러스의 평균역가를 바이러스 배출 역가로 산정한다.

6) 실험결과

표-1. 임상증상 및 폐사

바이러스	Ck/IS/06 (clade 2.2)	
접종경로	정맥	비강
1DPI	8수 폐사	1수 증상
2DPI	-	3수 증상
3DPI	-	8수 폐사
4DPI	-	-
총계(폐사수/접종수)	8/8 (100%)	8/8 (100%)
평균치사시간	24시간	72시간

표-2. 바이러스 배출 (구강 및 총배설량)

- Clade 2.2 바이러스 감염시킨 경우의 바이러스 배출

바이러스	Ck/IS/06 (Clade 2.2)			
접종경로	정맥 (1DPI)		비강 (3DPI)	
배출경로	OP	CL	OP	CL
배출역가	1.1±1.6*	2.9±0.6	3.6±1.8	1.4±1.3
양성개체/접종수	3/8	8/8	8/8	8/8

* Mean ± S.D. (10진 희석 기준), TCID₅₀/0.1ml

2. SPF 닭을 이용한 Clade 2.3.2 바이러스 감염모델 개발을 위한 표준실험법 확립

▶ 1) 실험장소 및 실험장비

- 국립수의과학검역원 BL3 시설 내 chicken 실험용 isolator 사용

2) 실험동물

- SPF 닭 (6주령), 접종그룹 당 8수 사용

3) 접종경로

- 정맥(IV) 및 비강(IN) 접종

4) 모델 개발에 사용된 바이러스

- 접종용량

- 정맥경로: 원액바이러스(Ck/IS/06 $10^{8.8}$ EID₅₀ /0.1ml, Ck/Gimje/08 $10^{8.4}$ EID₅₀ /0.1ml)를 10배 희석하여 정맥내로 0.2ml 접종 (OIE 병원성 실험 기준)

- 비강경로: 각 바이러스를 $10^{6.5}$ EID₅₀ /0.1ml 역가로 희석하여 0.1ml씩 개체별로 접종

- 바이러스 종류

가. Clade 2.2 분리주: A/chicken/Korea/IS/06 (H5N1)

나. Clade 2.3.2 분리주: A/chicken/Korea/Gimje/08 (H5N1)

* A/chicken/Korea/IS/06 (H5N1)주는 2006/2007년 국내 두 번째 발생 index case의 분리주로서 우리나라뿐만 아니라 중국, 몽골, 유럽, 아프리카 등지까지 야생조류를 통해 광범위하게 확산되었던 바이러스임.

* A/chicken/Korea/Gimje/08 (H5N1)주는 2008년 국내 세 번째 발생 index case의 분리주로서 중국, 동남아의 가금류에 발생이 많고, 2009년 이후 몽골, 우리나라, 일본의 야생조류에서 많이 분리된 바이러스임.

5) 관찰 및 시료처리 방법

- 공격접종 후 14일간 임상증상 발현 유무 및 정도, 폐사율 관찰
- 구강 및 총배설장으로의 바이러스 배출 정도 측정(일)
 - 시료처리방법: 구강(OP) 및 총배설장(CL) 시료는 채취 후 1-2일 이내에 처리(처리 전 4C 보관)한다.
 - OP, CL은 CEF 배지(항생제 포함) 1ml 넣고 vortex, 3000rpm에 10분간 원심 후 상층액 채취하며 다시 gentamicin을 최종 1%되도록 첨가하여 사용한다.
 - 전처리된 OP, CL 시료 상층액을 96 well plate에서 CEF 배지를 이용하여 10^{-1} 에서 10^{-8} 까지 10진 희석한 후 희석배율이 높은 것에서부터 CEF 세포에 100ul씩 5반복하여 접종한다.
 - * CEF 세포는 시료처리 전날 96 well plate에 미리 primary cell culture하여 준비
 - 37°C CO2 incubator에서 5일간 배양하며 도립현미경으로 세포변성효과(CPE) 유무를 관찰하고, 각 시료별로 5반복 접종한 바이러스의 평균역가를 바이러스 배출 역가로 산정한다.

6) 실험결과

표-1. 임상증상 및 폐사

바이러스	Ck/Gimje/08 (clade 2.3.2)	
	정맥	비강
접종경로		
1DPI	8수 폐사	-
2DPI	-	8수 폐사
3DPI	-	-
4DPI	-	-
총계(폐사수/접종수)	8/8 (100%)	8/8 (100%)
평균치사시간	24시간	48시간

- Clade 2.3.2 바이러스 감염시킨 경우의 바이러스 배출

바이러스	Ck/Gimje/08 (Clade 2.3.2)			
	정맥 (1DPI)		비강 (2DPI)	
배출경로	OP	CL	OP ¹⁾	CL ²⁾
배출역가	ND*	ND	4.6±0.7	3.5±0.8
양성개체/접종수	ND	ND	8/8	8/8

* ND: Not done

1) 기관(trachea)에서의 바이러스 역가로 대치

2) 맹장편도(cecal tonsil)에서의 바이러스 역가로 대치

7) 실험결과 고찰

○ SPF 닭을 이용한 감염모델 개발을 위해 세계동물보건기구(OIE) 권장 병원성 확인 방법인 정맥접종방법과 실제 야외에서 병원체가 주로 감염되는 경로인 비강접종방법을 비교하였다. 정맥접종의 경우 바이러스 종류에 관계없이 접종 후 24시간에 모두 폐사하였고, 급격히 폐사하여 바이러스의 배출 역가도 개체간의 변이가 심하였으며 배출역가도 낮았다. 반면 자연감염 경로인 비강접종의 경우 Ck/IS/06의 경우 3일째에, Ck/Gimje/08의 경우 2일째에 폐사가 일어났으며, 바이러스의 배출은 전 개체에서 비교적 높은 역가로 고르게 되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 사독백신 접종 후 백신의 방어능 평가를 위한 지표로 삼기 위해서는 비강접종경로로 바이러스를 공격접종하는 것이 타당한 것으로 보인다.

나. H5N1 HPAI의 오리, 마우스, 페렛 공격접종 모델 개발

1. 오리, 마우스, 페렛을 이용한 감염모델 개발을 위한 표준실험법 확립

(1) HPAI 사독백신 시제품 평가를 위한 감염실험동물 모델 확립

① 실험장소 및 실험장비

▶ 농림축산검역본부 BL3 시설 내 chicken/duck, mouse, ferret 실험용 isolator 사용

② 실험동물

▶ 오리 (2주령), 마우스 (5-6주령), 페렛 사용

③ 접종경로

▶ 비강(IN) 접종

④ 모델 개발에 사용된 바이러스

▶ 접종용량 및 경로

- 비강경로: 각 바이러스를 $10^{6.5}$ EID₅₀ /0.1ml 역가로 희석하여 0.1ml씩 개체별로 접종

▶ 바이러스 종류

가. Clade 2.2 분리주: A/chicken/Korea/IS/06 (H5N1)

나. Clade 2.3.2 분리주: A/chicken/Korea/Gimje/08 (H5N1)

⑤ 관찰 및 시료처리 방법

▶ 오리 병원성 측정: 공격접종 후 14일간 임상증상 발현 유무 및 정도, 폐사율 관찰

▶ 마우스 및 족제비에서의 병원성 측정

- 마우스 및 족제비 폐, 뇌에서의 역가 측정 : $10^{6.0}$ EID₅₀ 접종 그룹에서 역가 측정
- 체중변화 및 체온변화 : $10^{6.0}$ EID₅₀ 접종 그룹에서 역가 측정
- MID₅₀ 측정: 각 역가별 바이러스 접종 그룹의 폐에서 바이러스 분리 후 산정
- LD₅₀ 측정: 각 역가별 바이러스 접종 그룹의 폐사율 측정 후 산정

⑥ 실험결과

▶오리 병원성 실험결과

Species	Virus			
	Ck/Iksan/06 (Clade 2.2)		Ck/Gimje/08 (Clade 2.3.2)	
	Mortality (%)	MDT (day)	Mortality (%)	MDT (day)

Duck	0	-	100	4.6
------	---	---	-----	-----

▶마우스 병원성 실험결과

Virus	Lung titers (Log ₁₀ EID ₅₀ /ml)	MID ₅₀	LD ₅₀	Virus in brain	Pathogenecity
Ck/Iksan/06 (Clade 2.2)	10 ^{7.9}	10 ^{0.5}	10 ^{0.5}	Yes(10 ^{2.8})	high
Ck/Gimje/08 (Clade 2.3.2)	10 ^{7.5}	10 ^{1.5}	10 ^{3.2}	Yes(10 ^{3.2})	high

▶족제비 병원성 실험결과

Virus	Rise of body temperature (°C)	Lung titers (Log ₁₀ EID ₅₀ /ml)	Weight loss (%)	Lethality	Virus in brain	Pathogene ncity
Ck/Iksan/06 (Clade 2.2)	2.4	10 ^{4.5}	9.4	0/3	Yes	high
Ck/Gimje/08 (Clade 2.3.2)	0.8	10 ^{6.3}	17.2	1/3	Yes	high

⑦ 실험결과 고찰

▶ 제조된 백신에 방어효과를 평가하기 위해 오리, 마우스, 페렛(족제비) 축종별 병원성 실험을 실시하였다. 오리의 경우 clade 2.2에 속하는 Ck/IS/06 바이러스를 접종했을 때 임상증상이나 폐사가 전혀 일어나지 않아 백신의 효능을 평가하기 위해서는 구강이나 총배설강으로의 바이러스 배출을 측정해야만 한다는 결론을 얻었다. 반면 clade 2.3.2에 속하는 Ck/Gimje/08의 경우 어린 오리에서는 100%의 폐사율을 보여 임상증상 관찰 및 폐사율 측정을 통해서도 백신 효능 평가가 가능할 것으로 추정되었다. 하지만, 오리의 일령에 따른 평가는 이루어지지 않아 어린 일령의 오리를 사용하여 백신효능 평가를 하는 것이 바람직할 것으로 판단되었다.

▶ 마우스와 족제비를 이용한 병원성 시험 경우 clade 2.2에 속하는 Ck/IS/06 바이러스를 접종했을 때나 clade 2.3.2에 속하는 Ck/Gimje/08 바이러스를 접종했을 때 모두에서 병원성이 높은 것으로 나타나, 백신효능 평가는 마우스에서 폐에서의 바이러스 역가, MID₅₀ 측정, LD₅₀ 측정, 뇌에서의 바이러스 역가 등을 통해서, 족제비에서는 체온상승, 폐에서의 바이러스 역가, 체중변화, 뇌에서의 바이러스 역가 등 특정 지표를 측정함으로써 가능할 것으로 판단되었다.

다. H5N1 HPAI clade 2.3.2.1 바이러스 감염모델 개발을 위한 표준실험법 확립

(1) HPAI 사독백신 시제품 평가를 위한 감염실험동물 모델 확립

① 실험장소 및 실험장비

▶ 농림축산검역본부 BL3 시설 내 실험용 isolator 사용

② 실험동물

▶ SPF닭 (6주령), 오리 (2주령), 마우스 (6주령) 사용

③ 집중경로

▶ 비강(IN) 접종

④ 모델 개발에 사용된 바이러스

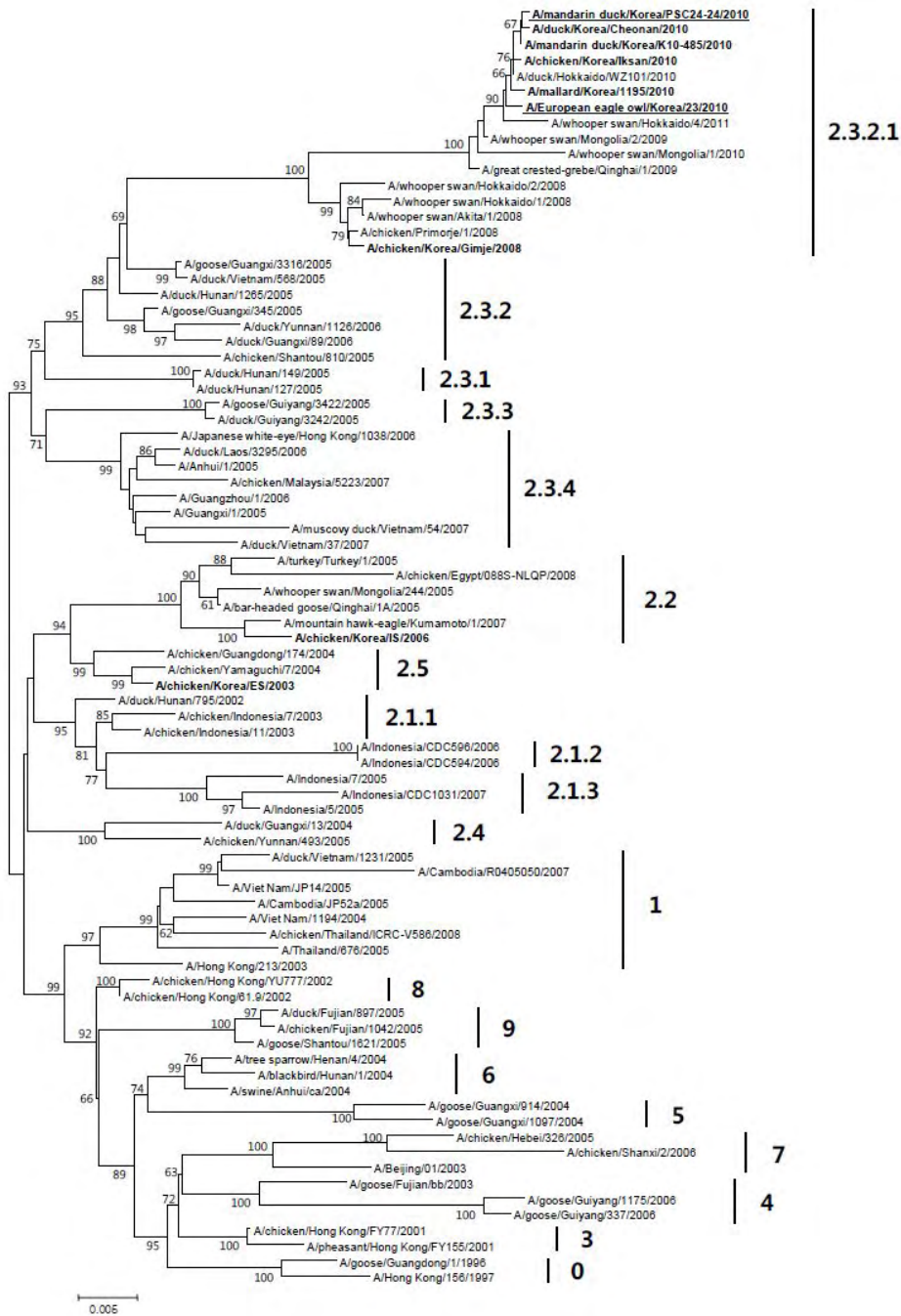
▶ 접종용량 및 경로

- 비강경로: 각 바이러스를 $10^{6.5}$ EID₅₀ /0.1ml 역가로 희석하여 0.1ml씩 개체별로 접종

▶ 바이러스 종류

가. Clade 2.3.2.1 분리주: A/Mandarin duck/Korea/PSC24-24/2010 (PSC24-24)

나. Clade 2.3.2.1 분리주: A/Eurasian eagle owl/Korea/23/2010 (EEO/23)



⑤ 실험결과

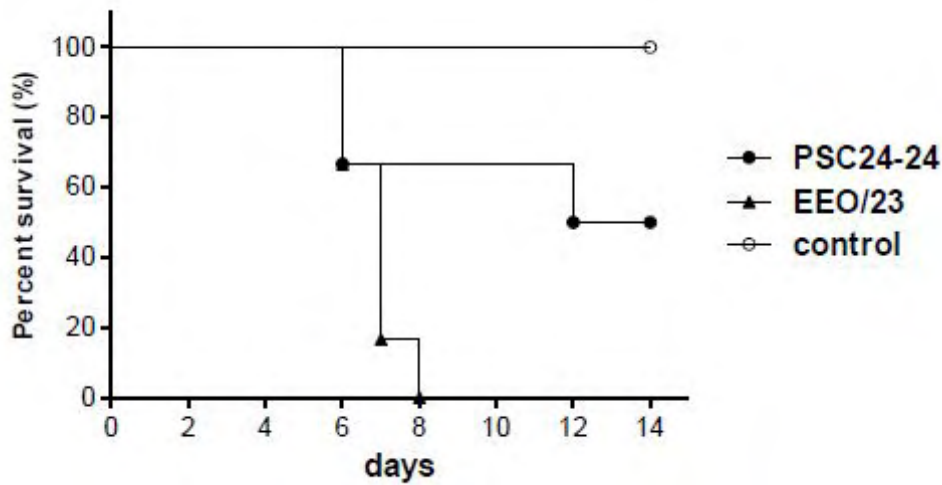
▶ 닭 병원성 실험결과

- PSC24-24 및 EEO/23 바이러스 모두 감염 후 전수 폐사를 일으키는 고병원성의 특성을 나타내었으며 각각 58.2, 44.1의 평균치사시간을 나타내었다.

Virus	Inoculation route	Virus titer (log ₁₀ TCID ₅₀ /0.1 ml. mean ± standard deviation)								MDT ^a (hours)	IVPT ^b
		Brain	Trachea	Lung	Spleen	Kidney	Heart	Muscle	Cecal tonsil		
PSC24-24	Intravenous	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	58.2	2.74
	Intravenous	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	44.1	2.86
EEO/23	Intranasal	5.1 ± 0.5	5.2 ± 0.5	5.8 ± 0.7	5.0 ± 0.7	5.2 ± 0.8	5.6 ± 0.7	4.7 ± 0.8	4.9 ± 0.9	75	na

▶ 오리 병원성 실험결과

- EEO/23 바이러스는 감염 후 6일부터 폐사가 시작되어 8일째 전수 폐사 (6/6) 하였다. PSC24-24 바이러스는 감염 후 6일부터 폐사가 시작되어 14일째 50% 폐사율 (3/6) 을 나타내었다.



- EEO/23 및 PSC24-24 바이러스 모두 감염 후 구강 및 충배설강에서 증식이 일어나는 것으로 확인되었다. 감염 후 3-5일째에 바이러스 배출역가가 가장 높았으며, 접촉 전파군에서도 바이러스 배출 및 항체역가 반전이 확인되었다.

Virus	Group	Sample	virus titer (log ₁₀ TCID ₅₀ /0.1 ml. mean±standard deviation)						HI titer ^c
			1dpi	3dpi	5dpi	7dpi	10dpi	14dpi	
PSC24-24	Inoculated	OP	1.6±0.1 (4/8) ^a	2.8±0.7 (8/8)	2.6±0.8 (6/6)	+ (2/4)	- (0/4)	- (0/3)	5.3±0.6
		CL	- (0/8)	1.9±1.1 (6/8)	1.8±0.9 (4/6)	2.4±1.0 (3/4)	0.9 (1/4)	- (0/3)	
	Contact	OP	- (0/3)	2.2±0.6 (2/3)	2.1±0.4 (3/3)	2.0±1.4 (3/3)	- (0/2)	- (0/2)	5.0±0.0
		CL	- (0/3)	- (0/3)	1.4±0.1 (2/3)	1.1±0.8 (3/3)	0.6 (1/2)	- (0/2)	
EEO/23	Inoculated	OP	+ (2/8)	2.6±0.6 (8/8)	2.6±1.7 (5/6)	1.9±1.0 (4/4)	nt	nt	nt
		CL	+ (3/8)	1.2±0.8 (5/8)	1.4±0.7 (6/6)	- (0/4)	nt	nt	
	Contact ^b	OP	- (0/3)	2.5 (1/2)	1.6 (2/2)	0.8 (2/2)	+ (1/1)	- (0/1)	7.0
		CL	- (0/3)	- (0/2)	+ (2/2)	2.5 (1/2)	- (0/1)	- (0/1)	

^a Number of virus isolation / number of tested samples

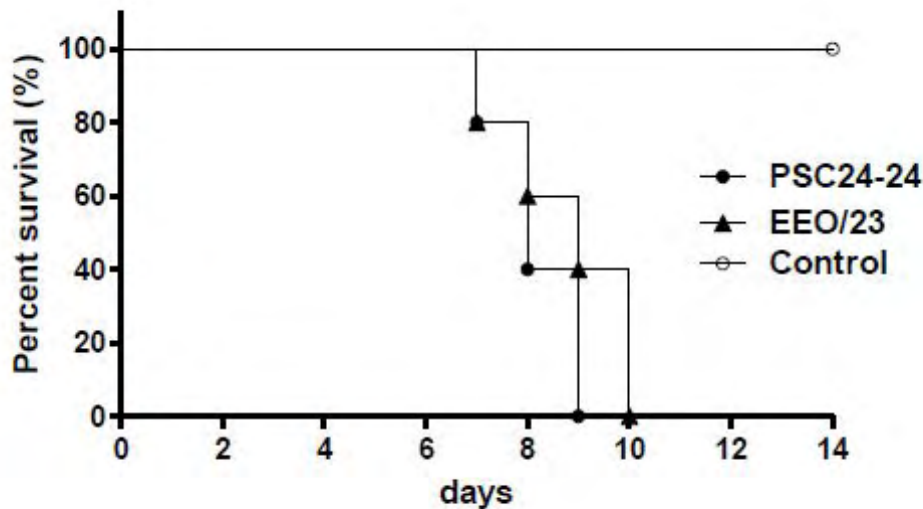
^b One of the three ducks accidentally died at 2 dpi, but its data are not presented in the table.

^c HI (log₂) titer of serum samples collected from the survived ducks at 14 dpi.

OP: oropharyngeal swab sample; CL: cloacal swab sample; -: virus was not detected; +: virus was detected but the titer was not calculable; nt: not tested.

▶ 오리 병원성 실험결과

- EEO/23 및 PSC24-24 바이러스 모두 감염 후 7일부터 폐사가 시작되어 9-10일째 전수 폐사 (5/5) 하였다.



라. 개발된 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 clade 2.2 바이러스 방어효능 시험

- ▶ 제조된 사독백신을 SPF 닭에 접종하고, 개발된 clade 2.2 바이러스 감염 모델 시험법에 따라 바이러스를 공격접종 한다. 공격접종 후 임상 증상 발현, 폐사율, 분변 및 구강 내 바이러스 배출 역가를 측정하여 백신의 방어 효능을 산정한다.

① 시험장소

- ▶ 농림축산검역본부 BL3 시설 내 chicken 실험용 isolator 사용

② 실험동물

- ▶ 6주령 SPF 닭 40마리를 사용하며, 8마리는 대조군으로 32마리는 8마리씩 4개 시험군으로 사

용한다. [동물실험 승인번호: 농림축산검역본부 승인번호 2012-123]

③ 시험백신

▶ 제조회사별 시험백신 4종

- (주) 고려비엔피 - AI(H5)-ND(LaSota)-IB(K40/09, M41)
- (주) 녹십자 수의약품 - AI(H5)-ND(LaSota)-IB(K40/09, M41)
- (주) 대성 미생물연구소 - AI(H5)-ND(LaSota)-IB(K40/09, M41)
- (주) 중앙 백신연구소 - AI(H5)-ND(LaSota)-IB(KM91, M41)

④ 처리내용

▶ 시험군에 백신 시제품 1수분을 사용법(근육)에 따라 접종하고 매주(1,2,3주) 시험군과 대조군으로부터 채혈 후 혈청을 분리하고 8HA unit의 인플루엔자 항원을 사용하여 혈구응집억제반응을 실시한다. 단, 항원으로 쓰이는 바이러스 주(strain)는 백신 주(strain)와 동일한 균주인 A/chicken/Korea/ES/03 (H5N1) 을 사용한다.

▶ 시험군에 백신 시제품 1수분을 사용법(근육)에 따라 접종하고 3주 후 동물질병제어 연구사업단 1년차 1핵심 4세부과제에서 확립된 표준실험법을 바탕으로 효력시험을 실시한다. 시험군과 대조군에 공격용 고병원성 조류인플루엔자 H5N1형 clade 2.2 에 속하는 A/chicken/Korea/IS/06 (H5N1) 바이러스를 비강으로 공격접종 하고 ($10^{6.5}EID_{50}/0.1ml/마리$), 공격접종 1, 3, 5, 7, 10일 후 구강 및 총배설강 에서의 공격접종 바이러스 배출 정도를 측정한다. 배출 정도를 측정하기 위하여 시험군 및 대조군의 구강 및 총배설강을 면봉으로 도말하고 이를 1ml 의 CEF 배지가 들어있는 15ml tube 에 넣는다. Vortex 및 원심분리 (3000rpm, 10분) 후 채취된 시료 상층액을 CEF 배지를 이용하여 10^{-1} 에서 10^{-8} 까지 10진 희석 한 후 96 well plate 에 배양된 CEF 세포에 100ul씩 5반복하여 접종한다. 접종 후 CO2 배양기 (37℃) 에 5일간 배양하며 CPE 유무를 관찰하고, 각 시료별로 5반복 접종 한 바이러스의 평균 역가를 바이러스 배출 역가로 산정한다.

▶ 공격접종 후 14일간 임상증상 발현 유무 및 정도, 폐사율을 관찰한다.

⑥ 실험결과

▶ 사용 백신 내역 및 접종

	A. 고려	B. 녹수	C. 대성	D. 중앙	E. 대조군
AI (rg ES03)	7.5	7.7	8.5	4.3	-
IB (K40/09)	8.0	5.1	6.6	4.7 #	-
IB (M41)	7.5	4.7	6.6	4.4	-
ND (LaSota)	9.3	5.9	9.0	6.8	-

단위 : $\log_{10}EID_{50}/ml$

: KM91

▶ 바이러스 공격접종 (9/10/2012)

- challenge virus : A/Chicken/Kr/IS2/2006, Tra, CE1, ($10^{8.5}$ EID₅₀/0.1ml)
- challenge route and dose : intranasal, $10^{6.0}$ EID₅₀/0.1ml, 100ul/chicken

Group	chicken no.	remarks
A	7	BL3 isolator에 사육
B	6	BL3 isolator에 사육
C	7	BL3 isolator에 사육
D	6	BL3 isolator에 사육
E (control)	8	각 백신그룹에 2마리씩 분사

Swab, plate tube label

1 = A group

2 = B group

3 = C group

4 = D group

C = E group (control)

▶ 임상증상, 폐사율 및 바이러스 배출결과

Group	chicken no.	Clinical signs	Mortality	date	dpi	OP	CL
A (고려)	7	1/7 (14.3%)	1/7 (14.3%)	8d	1	0/7	0/7
					3	0/7	0/7
					5	0/7	0/7
					7	1/7 (1.2)	0/7
					10	0/6	0/6
B (녹수)	6	1/6 (16.7%)	1/6 (16.7%)	7d	1	0/6	0/6
					3	3/6 (1.4±1.0)	1/6 (1.2)
					5	2/6 (3.4±0.1)	1/6 (0.8)
					7	1/6 (2.5)	0/6
					10	0/5	0/5
C (대성)	7	0/7 (0%)	0/7 (0%)	-	1	0/7	0/7
					3	2/7 (1.2±0.5)	0/7
					5	1/7 (1.5)	0/7
					7	0/7	0/7
					10	0/7	0/7
D (중양)	6	2/6 (33.3%)	1/6 (16.7%)	5d	1	1/6 (1.0)	0/6
					3	3/6 (3.2±1.2)	2/6 (1.1±0.6)
					5	3/6 (3.9±0.6)	1/6 (1.4)
					7	0/5	0/5
					10	0/5	0/5
E (대조)	8	8/8 (100%)	8/8 (100%)	3d(5),	1	1/8 (0.8)	0/8
				5d,	3	6/8 (4.0±1.2)	3/8 (3.1±0.4)
				6d,	5	2/3 (4.4±0.2)	1/3 (1.2)
				7d	7	1/1 (5.6)	0/1
				10	-	-	

마. 개발된 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 clade 2.3.2.1 바이러스 방어효능 시험

▶ 제조된 사독백신을 SPF 닭에 접종하고, 개발된 clade 2.3.2.1 바이러스 감염 모델 시험법에 따라 바이러스를 공격접종 한다. 공격접종 후 임상 증상 발현, 폐사율, 분변 및 구강 내 바이러스 배출 역가를 측정하여 백신의 방어 효능을 산정한다.

[사독백신 접종 및 방어효능 시험]

- 제조된 사독백신 시제품의 SPF 닭 접종
- 백신접종군 공격접종 (9월 중 건국대학교 내 BL3에서 실시 예정)

개발 배경

뉴캐슬병 (Newcastle disease: ND)은 가금에서 치명적이고 전염성이 강한 제 1종 가축전염병 및 OIE 지정 notifiable disease로 백신을 접종하지 않은 닭에 감염될 때는 100%폐사율을 초래하며, 적절한 백신을 하지 않는 경우 호흡기 및 소화기 증상과 산란계에서 산란율 저하로 경제적인 피해를 일으키는 치명적인 질병이다. 한국에서는 유전자형 I형에 속하는 백신주 (LaSota) 및 유전자 II형의 백신주 (V4, VG/GA) 기반의 백신이 주로 사용되지만, 한국에서는 유전자형 VII형에 속하는 강독이 전국에서 발생하고 있다.

전염성기관지염 (Infectious bronchitis: IB)은 IB 바이러스 (IBV)에 의해서 발생하는 전파력이 매우 빠른 닭의 급성 전염병이다. IB는 감염 시 폐사율은 높지 않으나 이환율이 높고 기침, 콧물, 증체율 저하, 외부 및 내부 난질저하를 동반하는 산란율 저하를 유발 할 뿐만 아니라 호흡기 후유증으로 대장균증이 수반되어 만성 폐사가 지속되는 등 매우 다양한 생산성 저하를 유발하여 전세계적으로 양계산업에 막대한 경제적 피해를 입히고 있다. 국내의 경우 호흡기형 IBV 뿐만 아니라 신장형 IBV감염으로 인한 직접적인 호흡기도 손상 및 복막염 피해도 발생하고 있다.

조류 인플루엔자 (Avian Influenza: AI)는 AI 바이러스에 의해 발생하는 바이러스이다. 국내에서는 저병원성의 H9N2 subtype의 AIV가 주로 발생하고, 폐사율은 높지 않으나 호흡기 증상과 산란율 저하 등의 경제적 피해를 일으키고, 고병원성 H5N1 AIV도 2003년에 처음 발생한 이후 2011년까지 세차례 추가로 발생하여 직접적인 폐사 뿐만 아니라, 살처분과 예방을 위한 방역경비 소모와 농장·유통·요식업체 등에 막대한 경제적 피해를 일으켰으며 인수공통전염병에 대한 공포심까지 증가시켰다.

본 과제에서는 앞서 언급한 세 가지 질병과 관련하여, IB(신장형) 항원진단 Rapid 키트 IB(신장형) 항체진단 ELISA 키트, AI+ND+IB(신장형) 항체진단 ELISA 키트, AIV백신항체 감별진단 ELISA 키트를 국내 업체인 (주)바이오노트, (주)메디안디노스틱과 연계하여 산업화하고자 한다. 이를 통해 질병의 예방 및 진단 효율을 증진시키고 산업화를 통해 국내 및 해외 시장을 개척하고자 한다.

1. IB 항원진단 Rapid 키트

가. IB 항원진단 Rapid 키트의 시제품 제작

(1) 원료 제조 방법

▶ 항원의 제조 방법

항원은 IBV Nucleo protein recombinant TC1, TC2, TC3항원을 사용하였다. 제조과정은 다음과 같이 수행하였다.

1) Template DNA 추출

IBV virus로부터 RNA isolation 하여 template RNA 를 입수하였다.

2) PCR 및 발현백터 제조

NP TC1,TC2,TC3 항원을 encoding 하는 유전자는 IBV RNA 을 주형으로 하여 RT-PCR을 수행하여 획득하였다.

PCR을 수행하기 위해 다음의 Oligonucleotide primer 는 유전자은행Accession No.

DQ472166, FJ888351)에서 정보를 얻어 작성하였다 (표1).

표 1. Oligonucleotide primers used in this study

GGA TCC GCA TCT AGT AGA GCA CCA	IBV N TC1 F
GTC GAC TTA CAC TTG ATC AAC CTT ATA	IBV N TC1 R
GGA TCC GAT CCG CAG TTT GAT AAT	IBV N TC2 F
GTC GAC TTA ATC CTG CTT CTT TGG CTT	IBV N TC2 R
GGA TCC CCT AAG AAG GAG AAA	IBV N TC3 F
GTC GAC TCA AAG TTC ATT CTC TCC	IBV N TC3 R

NP TC1,TC2,TC3 항원의 증폭 thermocycle (mycycler ; BioRad) 은 (42°C 30 분 x 1 cycle, (94°C, 5분) x 1 cycle, (94°C, 1분, 45°C, 1분, 72°C, 1분 x 28 cycles, (94°C, 1분, 60°C, 1분, 72°C, 10분) x 1 cycle, 4°C, 16시간으로 사용하였다 . PCR 반응이 완전히 끝난 후, 1.5%의 agarose gel을 만들어 PCR product 1u를 전기 영동하여 항원의 size를 확인하고 Gene clean Kit (MP biochemical, #1101-400, France)를 사용하여 증폭된 DNA를 추출하였다(그림1).

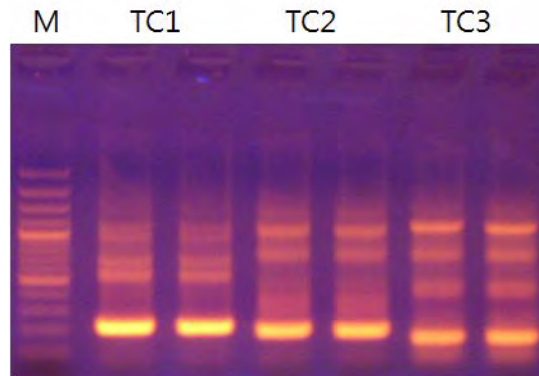


그림1. PCR products of IBV NP TC1, TC2, TC3 from PRRS RNA. M: marker

DNA의 확인은 작업의 효율과 정확성을 기하기 위하여 전문업체 (Jenotech, Korea)에 DNA sequencing을 의뢰하였고, 추출한 DNA가 IBV NP TC1, TC2, TC3 유전자임을 확인하였다(그림 2).

Translation Map(A)

```

1 A S S R A P S R E G L R G R R S G S E D
1 GCATCTAGTAGAGCACCATCGCGTGAAGGCTTGC GTGGTCGTAGAAAGTGGTTCTGAAGAT
21 D L I A R A A K I I Q D Q Q K K G S R I
61 GATCTTATTGCTCGTGCAGCAAAGATAATCCAGGATCAGCAGAAGAAGGGTTCTCGCATT
41 T K A K A D E M A H R R Y C K R T V P P
121 ACTAAGGCTAAGGCTGATGAAATGGCTCATCGCCGGTATTGCAAGCGCACTGTTCCACCT
    
```

```
61 G Y K V D Q V *
181 GGCTATAAGGTTGATCAAGTGTA
```

Translation Map(B)

```
1 D P Q F D N Y V K I C D Q C V D G V G T
1 GATCCGCAGTTTGATAATTATGTGAAAATTTGTGATCAGTGTGTTCGATGGTGTAGGAACA
21 R P K D D E T R P K S R T N S R P A T R
61 CGTCCAAAAGACGATGAAACGAGACCAAAGTCACGCACAAATTCAAGACCTGCAACGAGG
41 A N S P A P R Q Q R P K R E K K P K K Q
121 GCTAATTCTCCGGCGCCAAGACAACAGCGCCCAAAGAGGGAGAAAAAGCCAAAGAAGCAG
61 D *
181 GATTAA
```

Translation Map(C)

```
1 P K K E K K P K K Q D D E V D K A L T S
1 CCTAAGAAGGAGAAAAAGCCAAAGAAGCAGGATGATGAAGTGGATAAAGCATTAACTCA
21 D E E R N N A Q L E F D D E P K V I N W
61 GATGAGGAGAGGAACAATGCACAGCTGGAGTTTGATGATGAACCTAAAGTGATTAATTGG
41 G D S V L G E N E L *
121 GGTGATTTCAGTACTTGGAGAGAATGAACTTTGA
```

그림2. Nucleotide sequence of cloned IBV NP TC1, TC2, TC3 gene. The deduced amino acid sequence is given next to the nucleotide sequence for the cloned (A): NP TC, (B): NP TC2, (C): NP TC3

IBV NP TC1, TC2, TC3을 위하여 대장균 발현 벡터인 pQE30, pGEX도 primer의 linker site인 BamH I(NEB, #R0136S, USA), SalI(NEB, #R0138S, USA) 으로 절단하고 BamH agarose gel에 전기 영동하여 Gene Clean Kit (MP biochemical, #1101-400, France)를 이용해 추출해 놓았다.

T4 DNA ligase(Roche, 10481220001, Germany)를 이용해 증폭해서 추출한 insert와 벡터를 16°C O/N ligation 시키고 competent cell (Top10F')에 형질전환 시켰다. 형질전환은 heat-shock법을 이용하였으며, -70°C에 보관된 competent cell을 꺼내 ice위에서 해동 시킨 후 ligate 5ul를 넣고 약 3초간 조심스럽게 혼합한 후 얼음에서 30분간 정치 시켰다. 반응물이 혼합된 competent cell의 tube를 42°C의 항온수조에 90초간 정치시킨 후 heat shock을 주고 즉시 얼음에 넣어 주었다. LB 액체 배지를 1 ml 넣어주어 37°C, 1시간 incubation을 시킨 후 selection marker 로 항생제 암피실린이 포함된 LB agar plate에 100 ul의 균액을 도말하고 O/N, 37°C 조건으로 배양하였다.

LB agar plate에 자란 colony를 액체 LB 배지에 접종하여 cell이 자랐을 때 Wizard Plus SV Minipreps Kit (Promega, #A1460, USA)를 이용해서 DNA를 추출하고, 추출한 DNA를 BamHI(NEB, #R0136S, USA), Sal I(NEB, #R0138S, USA)으로 절단하고 전기 영동하여 vector에 각 항원 insert가 ligation 되었는지를 확인하였다.

3) SDS-PAGE & western blot

IBV NP TC1, TC2, TC3 유전자가 ligation 된 cell에서 추출한 DNA를 대장균 발현용 균주인 M15, BL21 에 형질 전환시켜서 IBV NP TC1, TC2, TC3 항원을 발현하는 대장균을 얻었다.

유전자 재조합 IBV NP TC1, TC2, TC3 항원을 발현하는 대장균 균주를 삼각 플라스크에 넣어 18시간 이상 진탕 배양하였다. 배양된 균주를 발효기에 접종하여 37°C에서 약 2시간 배양하고 균주가 증식하여 600 nm에서 흡광도 값이 약 1.0에외가 될 때까지 배양하였다. 균주가 흡광도 1.0 내외로 증식하였을 경우 IPTC를 2.5mM 되도록 첨가하여 추가로 약 5시간을 배양한 후 배양된 균주액을 회수하여 원심방적으로 균체를 회수하여 SDS-PAGE와 western blot 을 수행하여 발현된 유전자 재조합 항원 IBV NP TC1: 22kDa, TC2: 22.5kDa, TC3: 21 kDa)을 확인하였다(그림3).

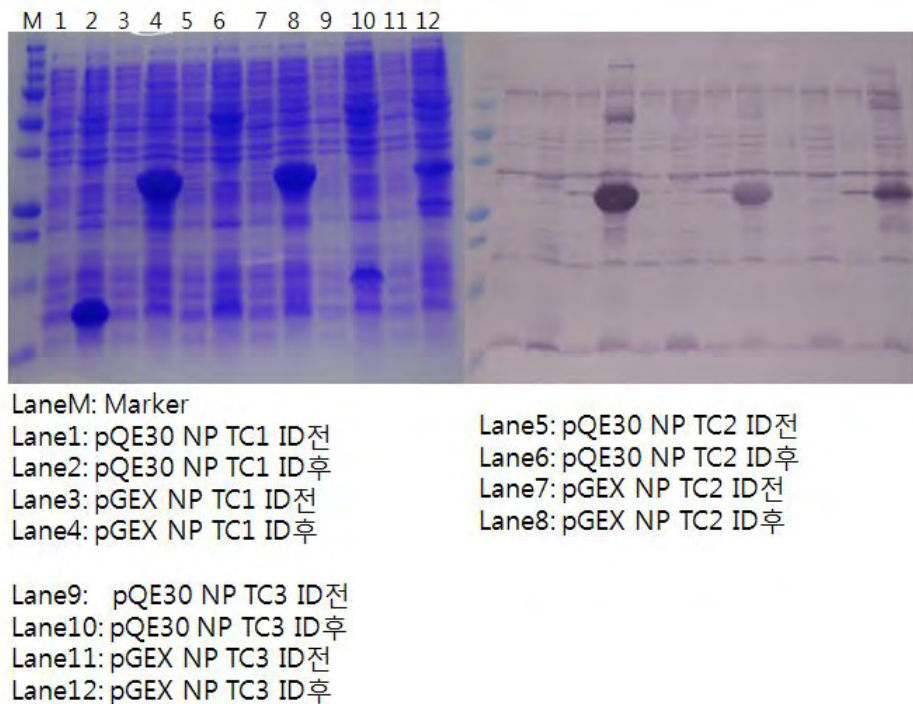


그림3. Western blotting analysis of cells expressing IBV NP TC1, TC2, TC3

4) 유전자 재조합 항원의 정제

유전자 재조합 IBV NP TC1, TC2, TC3 항원을 발현하는 대장균 균주를 배양하여 회수한 균체를 초음파 파쇄기 (VCX750 ; Sonics&materials)로 처리하여 파쇄하고 8,000rpm, 20분, 4°C로 원심분리(VS24SMTi ; vision science)하여 침전을 회수하였다. 항원이 함유된 침전을 6M guanidine 용액으로 용해하였다. DEAE-sepharose 겔을 이용하여 Ion exchange chromatography 방법으로 항원을 정제하였다. 즉 용해된 Inclusion body 용액을 6M guanidine 용액으로 평형된 겔에 반응시키고 NaCl gradient를 실시하여 각 fraction들을 SDS-PAGE 방법으로 분석하여 유전자 재조합 IBV NP TC1, TC2, TC3 항원이 함유된 fraction만을 선별하였다. 선별한 항원은 BCA법 (Pierce, USA)으로 정량하여 사용하였다.

▶ 항체의 제조 방법

1) 면역원의 제조

상기의 방법으로 정제된 항원을 사용하여 다음과 같이 면역원을 제작하였다. 1차 면역시에 사용하는 면역원은 Complete Freud's Ajuvant(Sigma사)를 1:1로 emulsion 하여 제조하였고, 2차~4차 면역시에 사용하는 면역원은 Incomplete Freud's Ajuvant(Sigma사)를 1:1로 emulsion 하여 제조하였다.

2) 면역

상기의 방법으로 제조된 면역원을 BALB/C 마우스, 6주령, 암컷에 다음과 같이 면역하였다. 200ml/마리의 양으로 1주 간격으로 4회 복강 주사하고 일주일 후에 항원을 인산염 완충 용액(Phospho bufferd saline, 이하 - PBS) 에 20% 농도(v/v)로 희석하여 1일 간격으로 3회 꼬리 정맥에 50ml/회 주사하였다. 3차 면역 후에는 꼬리 정맥에서 얻어낸 혈청으로 중간 역가 검사를 실시하였다.

3) 하이브리도마 세포주 제작

면역 후에 마우스의 비장 세포를 떼어내어 45mm 세포 strainer(BD falcon사)를 통해 걸러내었다. 걸러진 비장세포를 원심분리하여 침전물로 획득하고 적혈구 용해 버퍼(Red blood cell lysis buffer, Sigma사)를 5ml 섞어준 뒤 4분간 방치하여 적혈구를 제거하였다. 적혈구가 제거된 비장세포는 둘째코 이글배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 이하 - DMEM, Gibco사)를 넣어 3회 세척하고 세포 카운팅을 실시하였다. 비장세포와 융합시킬 세포는 마우스 유래 골수종 세포인 SP2/0-Ag 14(ATCC CRL-1581)세포주이며, 혼합비율은 1:5 (비장세포 : SP2/0)가 되게 섞어주었다. 혼합된 세포액은 DMEM으로 2회 세척 후 PEG1500(Roche사)를 사용하여 융합하였다. 융합은 PEG1500을 1분간 1.7ml 점적하고, 30초간 정치 후 DMEM을 1분간 1ml 점적하고, 30초간 정치 후 DEME을 1분간 2ml 점적하고 30초간 6ml 점적하고, 30초간 정치 후 DMEM을 30초간 10ml 점적하였다. 융합이 완료된 세포액은 원심분리하여 침전물로 획득하고 HAT(PAA사)와 항생제(Gibco사), 소태아혈청(Fetal bovine serum, Hyclone사)이 10% 첨가된 DMEM(이하 - HAT배지)과 잘 섞어준 뒤 200ml/웰의 용량으로 96 well 플레이트에 분주한 뒤 3일간 배양기에서 성장시켰다..

4) 세포 배양

융합이 완료된 세포주는 37도, 5%의 CO₂,가습 조건이 유지되는 세포배양기에서 성장시켰으며, 2일 간격으로 일주일 간 HAT 배지를 교체하였다.

5) 양성 클론 세포주 검색

HAT배지로 선별이 완료된 세포주는 효소연결면역흡광도분석법(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)으로 양성 클론을 검색하였다. 구체적으로, 세포주가 자라고 있는 각각의 배양액을 요막 강액(음성 대조군)과 1:1로 섞어주어 37도에서 한 시간 동안 반응시켜 비특이적인 항체를 중화시킨 뒤, 96 well 흡착 플레이트에(Costar사) IBV 항원이 1/500 농도로 코팅된 플레이트에 100m/웰의 용량으로 분주하고 37도에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 반응 후 5회 세척하고 항 마우스 IgG 항체와 항 마우스 IgM 항체를 100m/웰의 용량으로 분주하고 37도에서 30분간 반응시켰다. 30분 반응 후 5회 세척하고 기질액(TMB-one)을 100m/웰의 용량으로 분주하여 15분간 발색시켰다. 발색이 완료 후 반응정지액을 100m/웰의 용량을 분주하고, 450nm 파장에서 흡광도를 측정하여 높은 수치를 나타내는 클론을 선별하였다. 선별된 양성클론은 24-웰 플레이트로 옮긴 뒤 3일간 배양하고 위와 동일한 방법으로 2차 검색하여 최종 양성 클론 후보군을 선별해내었다.

6) 마우스 복수액 채취

최종 선별된 양성클론은 T75 (NUNC사) 배양접시로 옮긴 뒤 3일간 배양하여 1 X 10⁶cell/ml세포 밀도로 0.5ml 씩 마우스의 복강에 주사한 뒤, 일주일 뒤 채취하였다.

7) 항체 정제

얻어낸 마우스 복수액은 원심분리 (3000rpm, 10분, 4도)를 통해 찌꺼기를 제거하고 걸

합버퍼(Binding buffer, Thermo scientific사)와 1:1 비율로 섞어준 뒤 상온에서 1시간 동안 반응하였다. 1시간 후 원심분리(3000rpm, 10분, 4도)를 통해 찌꺼기를 침전물로 가라앉히고, 1.12mm 구멍크기를 가지는 필터를 사용하여 가라앉지 않은 찌꺼기를 재차 걸러내었다. 찌꺼기가 제거된 복수액은 Protein G 레진 (Pierce사)이 들어있는 컬럼에 넣어주어, 항체와 Protein G 간의 결합을 유도하였다. 복수액이 컬럼을 모두 통과한 후 인산염완충용액으로 3회 세척한 뒤 용출버퍼(Elution buffer, Thermo scientific사)를 사용하여 용출시켰다. 용출된 항체는 다시 PD-10 컬럼(GE heathcar사)에 적용하고 인산염완충용액으로 용출시켜 최종 정제하였다.

(2) Matching test

ELISA screening으로 선별된 10종의 monoclonal antibody를 사용, capture 및 detect용 최적 조합의 항체를 찾기 위하여, 각각의 항체들을 membran에 coating(capture용)하거나 gold particle에 conjugation (detector용)하여 cross check 하여 시험하였다. 그 결과 1종의 mAb에서 반응성이 있음을 확인하였다. 이 때 검체는 신장형 virus(9106 strain, 서울대)와 호흡기형 virus(8067 strain, 서울대), 그리고 음성 control로는 NDV를 사용하였다 (그림4)

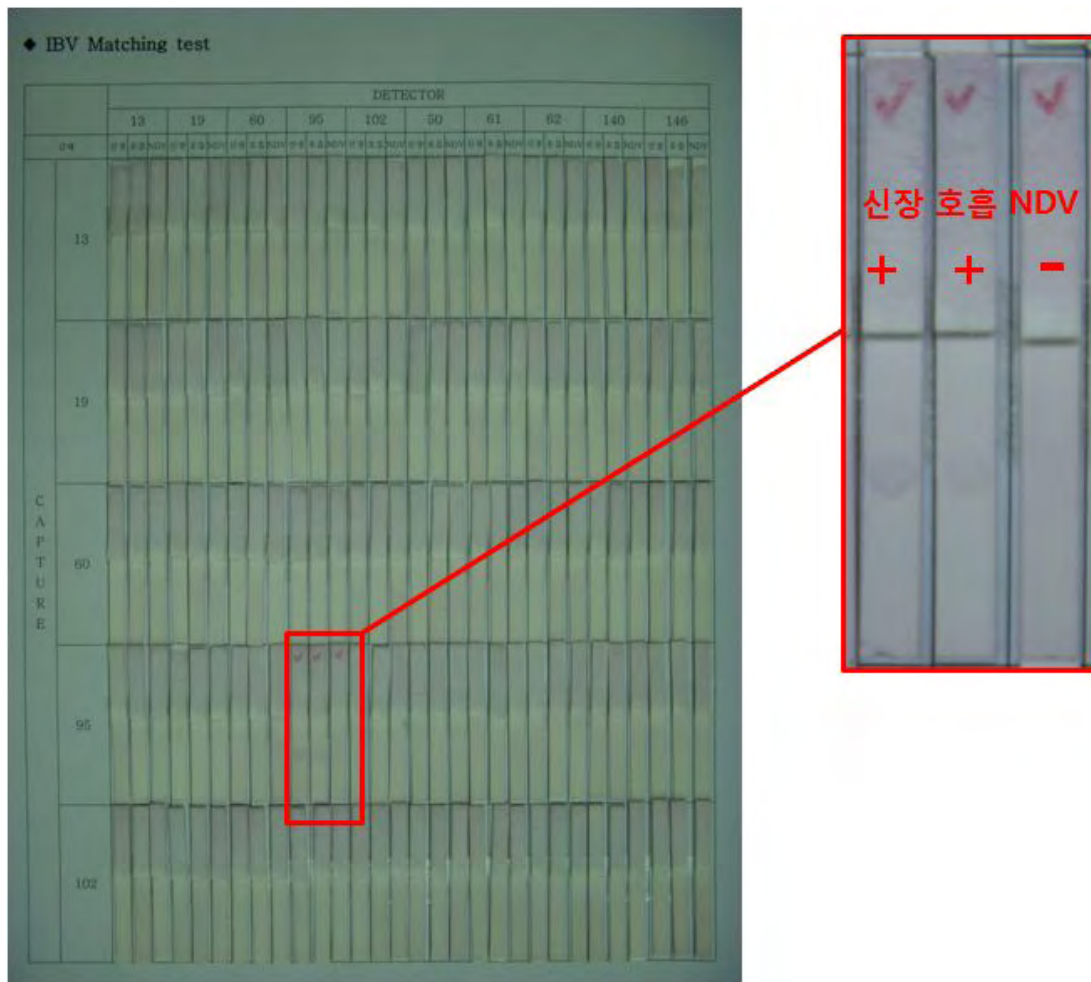
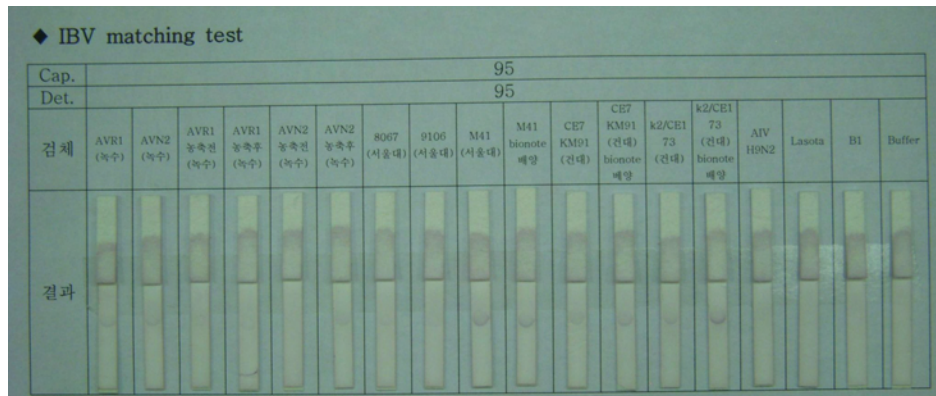


그림 4. Cross matching test

(3) 액상시험

Matching test를 통해 선별된 mAb(95)를 capture & detector로 사용하여 보유하고 있는 모든 종류의 IBV와 음성 control 검체를 test한 결과, IBV는 모두 detection하고 음성 검체는 detection하지 않음을 확인하였다.(그림 5)



- | | | |
|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 1. AVR1(호흡기형)-녹십자수의약품 | 7. 8067 strain-서울대 | 13. k2 strain-건국대 |
| 2. AVN2(신장형)-녹십자수의약품 | 8. 9106 strain-서울대 | 14. k2 strain- 바이오노트 배양 |
| 3. AVR1(호흡기형)-바이오노트 배양 | 9. M41 strain-서울대 | 15. AIV H9N2 |
| 4. AVR1(호흡기형)-바이오노트 배양 후 ultra 농축 | 10. M41 strain-바이오노트 배양 | 16. NDV Lasota |
| 5. AVN2(신장형)-바이오노트배양 | 11. KM91 strain-건국대 | 17. NDV B1 |
| 6. AVN2(신장형)-바이오노트배양 후 ultra 농축 | 12. KM91 strain-바이오노트 배양 | |

그림 5. Virus strain별 액상시험

(4) Kit 제제화 시험

Matching test를 통하여 음양성 변별력이 가장 좋은 capture-mAb anti-IBV 95와 detector-mAb anti-IBV 95로 실제 kit 제작을 실시하였다. Capture 항체의 N/C membrane coating 농도와 conjugation 농도를 최적화하여 IBV Ag detection kit를 제작하였다. 이 때 control line으로는 Goat anti-mouse IgG를 사용하였다.

▶ Gold colloid의 제조

Gold colloid는 HAuCl₄를 sodium citrate로 환원시켜 제조하였다. 즉, 400mL 증류수에 Gold chloride를 0.04ml 첨가하여 끓인 후 10% sodium citrate용액을 첨가하여 교반하고, 약 10분간 가열한 후 냉각하여 사용하였다.

▶ Gold colloid와 monoclonal anti-IBV conjugate의 제조

입자의 크기 40nm 내외의 Gold colloid를 사용하였다. Gold colloid를 0.25M K₂CO₃용액으로 pH를 8.9로 보정한 후 10분 이내에 conjugation에 이용하였다. pH가 보정된 Gold colloid에 monoclonal anti-IBV를 10μg/ml로 첨가한 후, 실온에서 10분간 교반하였다. 그 후, 10% bovine serum albumin 용액을 최종농도가 3% 되게 첨가한 후 10분간 교반하여

Gold colloid를 안정화 시킨 후, 10,000g에서 30분간 원심하여 침전을 만들었다. 침전을 PBS에 용해하고 0.45 μ m 여과기로 여하여 540nm에서 흡광도가 10이 되도록 희석하였다.

▶ Assay Strip의 제조

Pore size 10 μ m의 Nitrocellulose Membrane(milipore사, USA)에 자동분주기를 이용하여 monoclonal anti-IBV를 1mg/ml의 농도로 분주하고 37 $^{\circ}$ C 항온건조기에서 1시간 건조하였다. 대조선에는 산양 항 mouse IgG 항체를 사용하였다 Gold conjugate 는 5mM Tris (pH7.2)완충액에 희석 후 polyester pad(milipore사, USA)에 흡착시키고 37 $^{\circ}$ C 항온건조기에서 Over night 건조하여 사용하였다.

(5) IB 항원진단 Rapid 키트 시제품의 구성품



- device(4mm 단일 device) : 10test/kit
- Rapid용 알루미늄 파우치 : 10ea
- 0.5g 실리카겔 : 10ea
- 1.5ml bottle : 10ea(검체 희석용 assay diluent-1ml)
- 면봉 : 10ea
- dropper : 10ea

나. IBV 항원진단 Rapid 키트의 실험실 내 효능 시험

(1) 실험실 내 효능 시험

7종의 IBV strain 모두 양성(단, 양성 band의 density는 strain별로 차이 있음)으로 detection하였으며, NDV, AIV, IBDV와는 Cross reactivity가 없음을 확인하였다.

검출한계시험 (D/L) 의 경우 M41 strain 바이러스 원액 (10⁷EID₅₀/ml) 을 2⁷까지 단계 희석한 샘플까지 양성으로 판정되어 본 시제품의 검출 한계는 10^{4.8}EID₅₀/ml 로 확인되었다. SPF 닭분변을 이용한 특이도 시험결과 9건 모두 음성으로 판정 되었다. (그림 22)

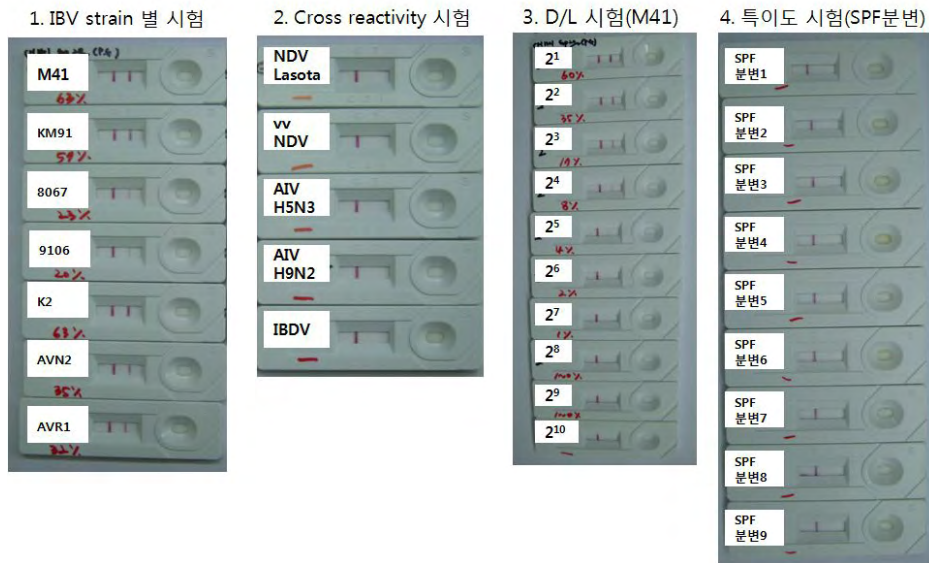


그림 22. Rapid kit 제제화 완료 후 실험실 내 효능시험 결과

(2) 안정성 시험

유효 기간 설정 근거로써 장기 보존 시험을 통한 안정성을 평가하였다.

▶ 시 료

1) 양성 표준검체

IB H-120 Stratin을 요막강액에 접종 5일 동안 배양하여 원액을 회수 하였다. 원액을 불활화 하여 단백 안정제가 들어간 희석액으로 다음과 같이 희석하여 양성 표준검체를 제조하였다.

- 저역가 표준검체 (RP151301) : IB H-120 Strain 불활화 배양액을 희석액으로 30배 희석하여 제조하였다.
- 중역가 표준검체 (RP151302) : IB H-120 Strain 불활화 배양액을 희석액으로 10배 희석하여 제조하였다.
- 고역가 표준검체 (RP151303) : IB H-120 Strain 불활화 배양액을 희석액으로 3배 희석하여 제조하였다.

2) 음성 표준검체 (RP1513004)

아무것도 접종하지 않은 정상 요막강액과 단백 안정제가 들어간 희석액을 1:1로 혼합하여 제조 하였다.

▶ 시험 방법

장기보존 안정성 시험 : 본 제제 3로트의 시약을 실온에 보관하면서 각각 제조 직후 부터 3, 6, 9, 12, 18개월 경과 후 까지 시기별로 본 제제의 용법 용량에 따라 음, 양성 표준 검체를 시험하였다.

▶ 시험 기준

매회 시험 결과는 다음과 일치하여야 한다.(그림 23)

- 1) 고역가 표준 검체 : 매회 3+(CS≥35%)로 판정되어야 한다.

- 2) 중역가 표준 검체 : 매회 2+(CS≥14%)로 판정되어야 한다.
- 3) 저역가 표준 검체 : 매회 1+(CS<14%)로 판정되어야 한다.
- 4) 음성 표준 검체 : 매회 음성 - (CS<1%)으로 판정되어야 한다.

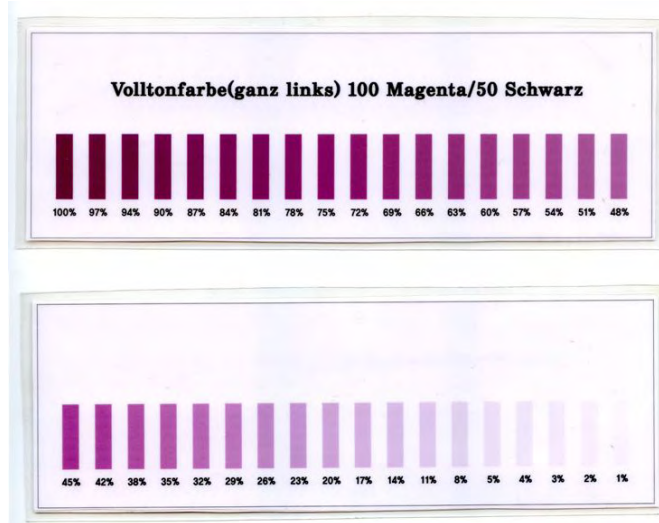


그림23. Color Scale

▶ 결과

T151301G, T151302G, T151303G 3로트를 사용하여 제조 직후부터 실온에서 제조 후 18개월까지 안정성시험을 실시한 결과, 모든 기간동안 정도관리용 양성 및 음성 표준검체의 판정을 정확하게 하여 시험기준에 적합하여 본 제제는 최소 18개월간 안정함을 확인할 수 있었다.(표5)

표5. 장기보존 안정성 시험

제 조 번 호	제 조 일 자	표준 검체	초기	제조후 3개월 경과	제조후 6개월 경과	제조후 12개월 경과	제조후 18개월 경과
T1513001G	2010.11. 03	저-RP151301	1+(8%)	1+(6%)	1+(8%)	1+(11%)	1+(11%)
		중-RP151302	2+(26%)	2+(26%)	2+(23%)	2+(26%)	2+(23%)
		고-RP151303	3+(42%)	3+(42%)	3+(38%)	3+(45%)	3+(42%)
		음성-RP151304	음성(0%)	음성(0%)	음성	음성(0%)	음성(0%)
T1513002G	2010.11. 08	저-RP151301	1+(8%)	1+(11%)	1+(8~6%)	1+(8%)	1+(11%)
		중-RP151302	2+(26%)	2+(26%)	2+(23%)	2+(23%)	2+(26%)
		고-RP151303	3+(42%)	3+(42%)	3+(42%)	3+(42%)	3+(42%)
		음성-RP151304	음성(0%)	음성(0%)	음성(0%)	음성(0%)	음성(0%)
T1513003G	2010.11. 17	저-RP151301	1+(8%)	1+(11%)	1+(8%)	1+(8%)	1+(8%)
		중-RP151302	2+(26%)	2+(26%)	2+(23%)	2+(26%)	2+(23%)
		고-RP151303	3+(42%)	3+(42%)	3+(42%)	3+(38%)	3+(42%)
		음성-RP151304	음성(0%)	음성(0%)	음성(0%)	음성(0%)	음성(0%)

다. IBV 항원진단 Rapid 키트의 야외 임상시험

(1) IBV 항원진단 Rapid 키트의 민감도 및 특이도 시험

▶ 시제품의 민감도 및 특이도를 평가하기 위하여 외부기관 (바이엘임상병리실 예 의뢰하

여 IBV, APV, ILT, FAV 등의 감염체를 대상으로 성능평가를 실시하였다. 그 결과 개체별로는 100%의 민감도와 95%의 특이도를 나타내었고, 검체별 (기관, 신장, 분변)로는 95-100%의 특이도를 나타내었다. 또한 신장형 IB virus와 호흡기형 IB virus를 구분하지 않고 모두 검출하고 있음을 확인하였다. (표 6) 따라서 본 제제는 Flockcheck 개념의 키트로서 개체별로 IBV 진단시, 민감도는 종란 배양 대비 100%, PCR 대비해서도 100%를 보였다.

표6. IB 감염체에 대한 민감도 및 특이도 검사 결과

구분	Sensitivity			Specificity		
	No. of Samples	No. of Positive	% Positive	No. of Samples	No. of Positive	% Positive
개체별	17	17	100	21	20	95
검체별	Trachea	16	11	69	22	100
	Kidney	16	9	56	19	95
	Feces	17	12	71	18	100

▶ Raw data

IBV 임상시험 결과(바이엘 임상병리실)

계군	개체명	Trachea			Kidney			Feces		
		RRT-PCR		Rapid	RRT-PCR		Rapid	RRT-PCR		Rapid
		Ct value	Result	Result	Ct value	Result	Result	Ct value	Result	Result
신장형 IBV 감염체	IBV 감염체1	14.257	+	+	15.351	+	+	16.513	+	+
	IBV 감염체2	20.1372	+	-	15.4592	+	+	15.000	+	+
	IBV 감염체3	20.9801	+	-	15.6353	+	+	17.7138	+	+
	IBV 감염체4	17.6015	+	+	15.5225	+	+	15.5178	+	+
	IBV 감염체5	17.3282	+	+	16.2909	+	+	14.2962	+	+
	IBV 감염체6	18.8593	+	+	14.67	+	+	12.1013	+	+
FAV에 의한 심낭수종증 5수	11-387-1	22.2791	+	+	19.6642	+	-	19.5698	+	-
	11-387-2	17.5358	+	+	20.8049	+	+	23.1455	+	-
	11-387-3	23.4586	+	+	24.2362	+	-	23.1884	+	-
	11-387-4	21.1468	+	+	24.5551	+	+	19.3263	+	+
	11-387-5	25.4958	+	-	24.3264	+	-	28.3546	+	+
육계 30일령 IB(호흡기형)+대장균	11-382-1	20.2347	+	+	25.7929	+	-	23.2004	+	-
	11-382-2	19.6816	+	-	18.8489	+	+	19.5672	+	+
	11-382-3	19.5672	+	+	18.851	+	-	19.0004	+	-
	11-382-4	19.1558	+	+	25.2407	+	-	19.0612	+	+
	11-382-5	25.0976	+	-	22.2514	+	-	17.5873	+	+
육계 14일령 APV 감염 의심	11-383-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11-383-2	-	-	-	-	-	-	38.701	+	+
	11-383-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11-383-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11-383-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11-383-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11-383-7	-	-	-	-	-	+	-	-	-
산란계 ILT 의심 기관 3수분	11-384-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11-384-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11-384-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
저혈당증 개체	110609-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	110609-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	110609-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	110609-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	110609-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	110609-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	110609-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	110609-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	110609-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	110609-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	110609-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	110609-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-

▶ 또한 추가적인 특이도 시험을 위해 3개의 산란계 농장에서 임상증상이 없는 건강한 닭 304개체를 직접 구입 및 부검하여 기관, 신장, 분변을 시험하였다. 본 제제는 비교할

만한 유사 목적의 제품이 존재하지 않아, 양성으로 판정되는 검체에 대해서만 PCR로 비교시험 실시하였고, 그 결과 각 검체별 시험시 특이도는 각각 기관에서 신장에서 분변에서이며, 검사개체수로 계산한 본제제의 특이도는 98.4%로 확인되었다.(표 7)

표7. 산란계 농장 건강한 닭에서의 특이도 검사 결과

농장명	주 소	품종	주령	검사수
진실양계	경북 칠곡군 왜관읍	로만라이트	32주	102
해동양계	경북 군위군 군위읍	하이라인	22주	97
창인농장	경남 거창군 거창읍	이사브라운	40주	105
합계				304
구 분	기 관	신 장	분 변	
Negative	303/304	302/304	302/304	
Specificity	99.7%	99.3%	99.3%	
검사개체수 대비 Specificity	98.4%			

라. IBV 항원진단 Rapid 키트 시제품의 수출용 허가 신청

IBV 항원진단 Rapid 키트 시제품의 품목 허가 및 수출용 허가를 위해 농림축산검역본부의 규정에 맞게 기술검토서를 준비하여 제출, 허가를 승인받음.

부 표

- 업체명 : 유한회사 바이오노트 허가일자 : 2012. 08. 30.
 ■ 제품명 : 바이오노트 래피드 IBV 항원 진단 키트 - 수출용
 (Anigen Rapid IBV Ag Test Kit)
 ■ 허가번호 : 제 133- 46 호

1. 원료약품 및 분량

*1회 검사용 디바이스 중

가. 골드 마우스 단클론 IBV 항체 접합 골드 콜로이드 (OD 10:540nm)---	8.3± 1.6 μl
나. 검사 선 마우스 단클론 IBV 항체	0.75± 0.15 μg
다. 대조 선 토끼항마우스 항체	0.75± 0.15 μg
라. 나이트로셀룰로스 막	25± 5 x 4.5± 0.9 mm
마. 콘쥬게이트 패드	7± 1.4 x 4.5± 0.9 mm
바. 검체 패드	20± 4 x 4.5± 0.9 mm
사. 흡습 패드	20± 5 x 4.5± 0.9 mm
아. 플라스틱 카세트	1개
자. 방습제(1개/디바이스) 실리카겔	0.5g/개
차. 샘플병 : 검체 회석액 1ml	10개
카. 검액 점적용 1회용 드롭퍼	10개
타. 검체 채취용 면봉	30개

2. 성상

가. 검사용 디바이스 : 플라스틱 카세트 외부에 타원형의 점적부위가 있고, 직사각형의 표시창에는 대조선(C)과 검사선(T) 위치가 표시되어 있으며, 내부의 검사용 스트립에는 검체패드, 보라색의 콘쥬게이트 패드, 백색 나이트로 셀룰로스 멤브레인, 흡습패드가 차례대로 중첩하여 부착되어 있다.

나. 검체 회석액 : 무색 내지 미황색 액상 제제

3. 제조방법 (별첨 1)

4. 효능 및 효과

닭의 신장, 기관 그리고 직장 내 분변에서 IBV에 대한 항원 검사

5. 용법 및 용량

가. 반응 원리

나이트로셀룰로스 멤브레인을 solid phase로 하여 검사선 위치에 마우스 단클론 IBV 항체를 흡착시켜 놓고, 콘쥬게이트 패드에는 또 다른 마우스 단클론 IBV 항체를 골드와 결합시켜 놓았다. 따라서 검액을 점적부위에 첨가하면, 이 검체중의 IBV 항원이 콘쥬게이트 패드의 마우스 단클론 IBV 항체 골드와 결합하여 IBV 항원-항체 복합체가 immunochromatography 원리에 의해 멤브레인을 따라 이동하면서 이미 검사선 위치에 흡착되어있는 마우스 단클론 IBV 항체와 2차적으로 결합 하게되어, indirect법에 의해 양성일 경우 보라색으로 발색하게 된다.

(1) 부표 작성 사항

① 원료약품의 분량

*1회 검사용 디바이스 중	
가. 골드 마우스 단클론 항 IBV항체 -----	8.3± 1.6 μl
마우스 IgG -----	8.3± 1.6 μl
나. 검사 선 마우스 단클론 항 IBV항체-----	0.58± 0.15 μg
다. 대조선 산양 항 마우스 항체 -----	0.75± 0.09 μg
라. 나이트로셀룰로스 막 -----	25± 5 x 5.0± 1.0 mm
마. 콘쥬게이트 패드 -----	7± 1.4 x 5.0± 1.0 mm
바. 검체 패드 (개 파보바이러스 항원) -----	20± 4 x 5.0± 1.0 mm
사. 흡습 패드 -----	18± 3.6 x 5.0± 1.0 mm
아. 플라스틱 카세트 -----	1개
자. 방습제(1개/디바이스) 실리카겔 -----	1g/개

② 성상

▶ 검사용 디바이스 : 플라스틱 카세트 외부에 사각형의 검체 점적 부위와 타원형의 전개

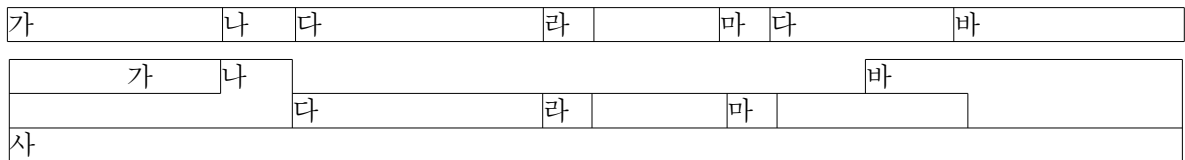
액 점적 부위가 있고, 직사각형의 표시창에는 대조선 (C)과 검사선 (T) 위치가 표시되어 있으며, 내부의 검사 용 스트립에는 검체패드, 보라색의 콘쥬게이트 패드, 백색 나이트로 헬롤로스 멤브레인, 흡습패드가 차례대로 중첩하여 부착 되어 있다.

- ▶ 전혈용 검체희석액 : 무색 내지 미황색 액상 제제
- ▶ 전개액 : 무색 내지 미황색 액상 제제

③ 제조방법

▶ 검사용 디바이스의 구조

- 1) 검체 패드
- 2) 골드 패드
- 3) 멤브레인
- 4) 검사선
- 5) 대조선
- 6) 흡습 패드
- 7) 플라스틱 카드



▶ 검사용 디바이스의 공정별 제조 방법

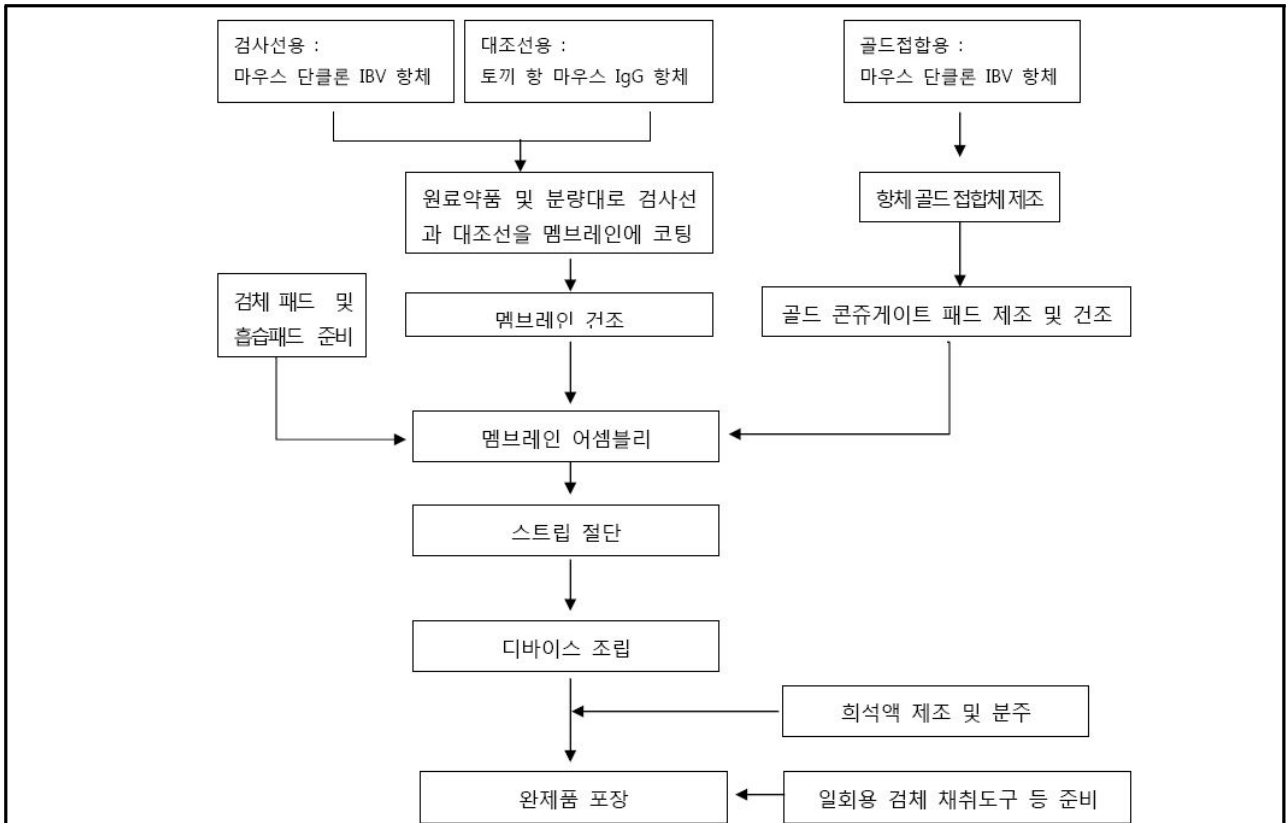


그림. 바이오노트 래피드 IBV 항원진단키트 공정도

1) 멤브레인 코팅 공정

- 나이트로셀룰로스 멤브레인의 검사선에는 마우스 단클론 항체 IgG(항체를 대조선에는 산양 항 마우스 항체를 각각 코팅한다.

테이블 라미네이터기를 이용하여 멤브레인 라미네이션
 ↓
 분주기를 이용하여 검사선, 대조선 위치 부위에 용액 분주
 ↓
 항은 및 건조
 ↓
 멤브레인을 데시케이터에 보관 (습도 10% 이하)

2) 골드 콘쥬게이트 패드 제조 공정

- E.canis gp19항원과 마우스 IgG 항체를 각각 금 콜로이드 (gold colloid)와 결합시킨 후 혼합 하여 패드에 분주하고, 건조한 후 절단하여 콘쥬게이트 패드를 제조한다.

골드 패드 전처리 용액으로 전처리
 ↓
 전처리된 골드 패드를 건조

↓
절삭기를 사용하여 패드 절단

↓
항체가 접합된 골드액을 패드에 분주 후 건조

↓
데시케이터에 골드 패드 보관 (습도 10% 이하)

3) 검체 패드 제조

- 검체 패드를 검액이 잘 흡수될 수 있는 용액으로 전처리하여 건조한다.

검체 패드 전처리 용액으로 패드 전처리

↓
전처리된 검체 패드를 건조

↓
절삭기를 사용하여 패드 절단

↓
데시케이터에 검체 패드 보관 (습도 10% 이하)

4) 흡습 패드 제조

- 반응 용액이 잘 흡수될 수 있도록 건조하여 제조한다.

흡습 패드를 건조

↓
절삭기를 사용하여 패드 절단

↓
데시케이터에 흡습 패드 보관 (습도 10% 이하)

5) 멤브레인 어셈블리

- 라미네이터를 이용하여 제조된 각종 재료를 플라스틱 카드를 중심으로 조립하는 과정을 칭한다. 먼저 플라스틱 카드의 이중 테이프 부분을 떼어내어 라미네이터에 올려놓고 정해진 위치에 상기 가, 나, 다, 라에서 준비된 흡습 패드, 검체 패드, 골드 패드를 차례대로 놓고 라미네이션을 진행한다. 어셈블리된 카드를 다시 손으로 차분히 눌러 주어 빈틈이 없게 한다. 완료된 카드는 다음 공정으로 진행하기 전까지 제습된 데시케이터에 보관한다.

6) 스트립 절단

- 라미네이션된 카드를 절삭기로 절단한다. 단, 절단 시작 지점과 끝 지점의 일부는 폐기하고 중간에도 불량으로 표기된 스트립은 선별하여 폐기한다. 선별된 스트립은 조립 전까지 제습된 데시케이터에 보관한다.

7) 플라스틱 디바이스에 조립 및 포장

- 플라스틱 디바이스에 샘플패드가 시료홀 쪽으로 가게 디바이스를 조립한다.

▶ 검체 희석액의 제조 방법

- 1) 원료 약품의 분량대로 조제하여 대한 약전 제제 총칙 액제의 제법에 따라 제조한다.

④ 효능, 효과

닭의 장기(기관, 신장) 및 분변에서의 IBV 항원진단

⑤ 용법, 용량

▶ 반응 원리

나이트로셀룰로스 멤브레인을 solid phase로 하여 검사선 위치에 마우스 단클론 항IBV 항체를 흡착시켜 놓고, 콘쥬게이트 패드에는 마우스 단클론 항 IBV항체를 흡착시켜 놓았다. 따라서 검체를 검체 점적부위에 첨가하면, 이 검체중의 IBV항원이 콘쥬게이트 패드의 IBV항체와 결합하게 된다. 이후 전개액 점적부위에 전개액을 첨가하면 IBV항원 항체 복합체가 immunochromatography원리에 의해 멤브레인을 따라 이동하면서 이미 검사선 위치에 흡착되어있는 마우스 단클론 항 IBV항체와 2차적으로 결합하게되어, indirec법에 의해 양성일 경우 보라색으로 발색하게 된다.

▶ 검체

닭의 장기(기관, 신장) 및 분변을 검체로 사용한다.

▶ 검사 방법

- 1) 면봉을 이용하여 직장내 분변 및 장기(기관, 신장)를 swab하여 assay diluent bottle에 넣고 잘 희석한다.
- 2) Assay diluent bottle을 1분정도 정치시켜 분변 찌꺼기등이 침전되도록 한다.
- 3) Dropper를 이용하여 상층액만을 취하여 kit의 sample 점적부(S)에 4방울 점적
- 4) 10분 후 결과 판정 → 1줄이면 음성, 2줄이면 양성

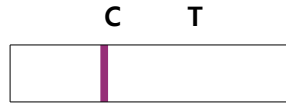
▶ 정도 관리

- 1) 모든 검사 결과는 대조선(C)에 보라색 선이 나타나야 한다.

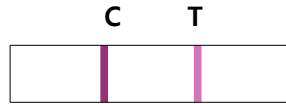


▶ 결과의 판정

- 1) 음성 : 대조선(C) 위치에 한 밴드만 나타나는 경우



2) 양성 : 대조선(C)과 검사선 (T) 위치에 두 밴드가 나타나는 경우



3) 재시험 : 어떠한 밴드도 나타나지 않는 경우 혹은 검사선에만 밴드가 나온 경우



- 대조선에 밴드가 나타나지 않으면 검사가 잘못된 경우 또는 시약의 품질에 문제가 있을 가능성이 있으므로 이 검사는 무효화시키고, 새로운 시약으로 재시험한다.
- 대조선에 밴드가 나타나지 않는 경우는 검체량 부족 등의 조작상 미숙일 수 있으므로 재시험 한다.

⑥ 포장단위

포장 단위 원료 약품	5Tests/Kit	10Tests/Kit	30 Tests/Kit	100 Tests/Kit
검사용 디바이스	1 device/포 x5포	1 device/포 x10포	10 multi-device device/포 x3	10 multi-device device/포 x10

⑦ 저장방법 및 유효기간

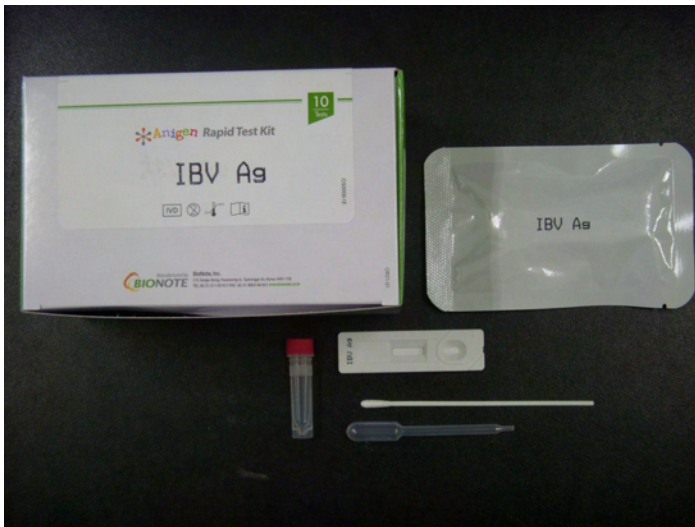
냉장 혹은 실온에서 보관(2 ~ 30℃)하며 사용 기간은 제조일로부터 2개월간임 (단, 검체와 검사용 디바이스 냉장 보관시 실험 시작 15 ~ 30분전에 실온에 둬). 검사 키트는 냉동 보관하지 않도록 주의.

⑧ 사용상의 주의사항

- ▶ 닭의 체외 진단용으로만 사용한다.
- ▶ 보관 중인 디바이스가 습기에 노출되면 제품의 성능이 저하될 수 있으므로 사용 직전에 개봉하고, 개봉 후 10분 이내에 사용한다.
- ▶ 반드시 각 검체마다 별개의 1회용 드롭퍼를 사용한다.
- ▶ 유효기간이 경과한 시약은 사용하지 않는다.

- ▶ 검체는 미지의 바이러스나 세균 감염원으로서의 위험성을 내포하고 있으므로 취급에 주의하며, 감염 가능한 물질의 취급 시에는 일회용 장갑을 사용하고 취급 후 손을 깨끗이 씻는다.
- ▶ 실험에 사용한 고형 폐기물은 121℃에서 15분 이상 고압 증기 멸균하여 폐기한다.
- ▶ 본 제제는 IBV 항원검출에 관한 1차적인 스크리닝 목적으로 고안된 진단시약으로서 간편하고 신속한 방법으로 결과를 얻을 수 있으나, 보다 정밀하게 고안된 원리의 검사법과는 검출 감도면에서 차이를 보일 수 있다.

⑨ 제품 사진



⑩ 제품설명서

One step Infectious Bronchitis Virus antigen test

Anigen Rapid IBV Ag Test Kit

■ Principles

Anigen Rapid IBV Antigen Test Kit is a chromatographic immunoassay for the qualitative detection of Infectious Bronchitis Virus antigen in avian trachea, kidney or feces sample.

Anigen Rapid IBV Antigen Test Kit has a letter of "T" as test line and "C" as control line on the surface of the device. The test line and control line in result window are not visible before applying any samples. The control line is used for procedural control. The control line should be always appeared if the test procedure is performed properly and the test reagents of control line are working. A purple test line respectively will be visible in the result window if there is enough avian influenza virus antigens in the sample.

The specially selected avian influenza virus antibodies are used in test band as both capture and detector materials. These enable Anigen Rapid IBV Antigen Test Kit to identify Infectious Bronchitis Virus antigen in avian trachea, kidney, or feces sample with a high degree of accuracy.

■ Materials provided (10 Tests/Kit)

- 1) Anigen Rapid IBV Antigen Test Devices x 10
- 2) Sample collection tubes containing assay diluent x 10
- 3) Sample collection swabs x 10
- 4) Disposable droppers x 10
- 5) Instruction for use x 1

■ Precautions

- 1) For veterinary use only.
- 2) For best results, strict adherence to these instructions is required.
- 3) All Samples should be handled as being potentially infectious.
- 4) Do not open or remove test kit from their individually sealed pouches until immediately before their use.
- 5) Do not use the test kit if the pouch is damaged or the seal is broken.
- 6) Do not reuse test kit.
- 7) All reagents must be at room temperature before running the assay.
- 8) Do not use reagents beyond the stated expiration date marked on the package label.
- 9) Do not mix components from different lot numbers because the components in this kit have been quality control tested as standard batch unit.

■ Storage and Stability

The kit can be stored at room temperature (2~30°C) or refrigerated. The test kit is stable through the expiration date marked on the package label. **DO NOT FREEZE.** Do not store the test kit in direct sunlight.

■ Sample Collection and Preparation

- 1) Trachea, kidney, or cloaca (feces) sample should be used with this test
- 2) If the samples are not immediately tested, they should be refrigerated at 2~8°C. For storage not less than 48 hours, freeze the Sample at -20°C or below.

■ Procedure of the test

- 1) Take a swab sample from a cloaca (feces), trachea or kidney with the sample collection swab. Or take scattered wet feces with the sample collection.
- 2) Insert the swab into the sample collection tube containing assay diluent.
- 3) Mix the swab until the sample has been dissolved into the assay diluent.
- 4) Leave the tube until the large particles have settled down to the bottom of the tube (Approximately 1 minute).
- 5) Remove the test device from the foil pouch, and place it on a flat and dry surface.
- 6) Using a disposable dropper provided, take an aliquot from the extracted and mixed sample in the tube.
- 7) Add 4(four) drops into the sample hole with the disposable dropper.
- 8) As the test begins to work, you will see purple color move across the result window in the center of the test device. If the migration has not appeared after 1 minute, add one more drop of the mixed assay diluent to the sample well.
- 9) Interpret test results at 10 minutes.

■ Interpretation of the test

1) Negative result

The presence of only one band within the result window indicates a negative result.



2) Positive result

The presence of two color bands ("T" and "C") within the result window, no matter which band appears first indicates a positive result.



3) Invalid Result

If the purple color band is not visible within the result window after performing the test, the result is considered invalid. The directions may not have been followed correctly or the test may have deteriorated. It is recommended that the Sample be re-tested.



■ Limitations of the test

This kit can detect Infectious Bronchitis Virus antigen. Although the Anigen Rapid IBV Ag Test Kit is very accurate in detecting Infectious Bronchitis Virus antigen, a low incidence of false results can be occurred. This kit is for screening purpose. Other clinically available tests are required if questionable results are obtained. As with all diagnostic tests, a definitive clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should only be made by the veterinarian after all clinical and laboratory findings have been evaluated.

Doc. No. : I 1513-0E
Issued date : Aug. 18, 2011



Manufactured by **BioNote, Inc.**
2-9, Seogu-dong, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, Korea
TEL:82-31-211-0516 FAX:82-31-8003-0618
<http://www.bionote.co.kr>

마. IBV 항원진단 Rapid 키트의 해외 수출

▶ IBV 항원진단 Rapid 키트의 해외 수출 판매를 시작함 (11개국).

제품명	국가	금액(원)
IB 항원진단 Rapid kit	멕시코	2,787,904
	요르단	9,506,102
	이라크	3,181,402
	인도	217,372
	중국	295,828
	쿠웨이트	304,911
	그루지아	112,020
	이집트	33,543
	코스타리카	63,487
	예멘	107
	태국	28,205
합계		16,530,881

2. IB 항체진단 ELISA 키트

가. IB 항체진단 ELISA 키트의 시제품 제작

(1) IB 항체진단 ELISA 키트의 시제품 제작

① 교정용 기준 물질(표준 검체)의 설정 근거

표준검체 구성	[양성표준검체] RP01 RP02 : 고역가 , RP03 RP04 : 중역가, RP05 RP06 : 저역가 [음성표준검체] RN01, RN02
제조일자	2011. 08. 24
제조량	각 검체별로 3 ml

▶ 양성 표준 검체

백신된 필드 농장 개체를 채혈한 후 동일목적시약 (IDEXX) 키트로 IBV Ab양성임이 확인된 혈청을 사용하였다.

- 1) 고역가 표준 검체 (RP01, RP02): IBV Ab 양성으로 확인된 혈청중 IDEXX 키트로 S/P 로 2.0 이상 되는 혈청 2개를 선정하였다.
- 2) 중역가 표준 검체 (RP03, RP04): IBV Ab 양성으로 확인된 혈청중 IDEXX 키트로 S/P 로 1.0 이상 되는 혈청 2개를 선정하였다.
- 3) 저역가 표준 검체 (RP05, RP06): IBV Ab 양성으로 확인된 혈청중 IDEXX 키트 로 S/P 로 0.2 이상 되는 혈청 2개를 선정하였다.

▶ 음성 표준 검체 (RN01, RN02)

SPF 닭 혈청 중 IDEXX 키트로 S/P 로 0.2 미만인 혈청 2개를 선정하였다.

② 용법, 용량 설정 근거

▶ 항원 coating 농도 조건 시험

1) 시험방법 및 조건선정 기준

표준음성 혈청(RN440101)의 흡광도 값은 0.3를 넘지 않고, 표준양성과 표준음성 혈청의 흡광도의 차이(P/N Value)가 가장 큰 조건을 선정하였다.

항원 코팅 조건	Viral Ag을 농도별 희석후 coating, 37°C, 1시간 coating
Washing	5회, 350 μ l/well
Blocking	3% BSA, 실온, 2시간
검체첨가	100배 희석검체 100 μ l/well, 실온(15~25°C), 30분
Washing	5회, 350 μ l/well
Conjugate 첨가	접합체 용액(0.5 μ g/ml) 100 μ l/well, 실온(15~25°C), 30분
Washing	5회, 350 μ l/well
Substrate 첨가	TMB 100 μ l/well첨가, 실온(15~25°C),15분후 stop
판정 (450nm, 620nm Ref.)	
표준양성 혈청	RP01/RP02
표준음성 혈청	RN01/RN02

2) 결과

항원 코팅 농도 설정 실험 결과 항원의 coating 희석배율이 2x이었을 때, 조건선정 기준에 부합하였다.(표 2)

표2. 항원 코팅 희석비율에 따른 P/N Value

검 체	항원 코팅 희석비율				
	1x	2x	4x	8x	16x
표준양성혈청RP01	2.495	2.245	1.701	1.264	0.987
표준양성혈청RP02	1.804	1.674	1.531	0.948	0.531
표준음성혈청RN01	0.321	0.217	0.184	0.112	0.100
표준음성혈청RN02	0.282	0.181	0.151	0.155	0.061
표준양성혈청 평균	2.150	1.960	1.616	1.106	0.759
표준음성혈청 평균	0.3015	0.199	0.1675	0.1335	0.0805
P/N Value	7.1	9.8	9.6	8.3	9.4

* P/N Value = 표준양성혈청 평균/표준음성혈청 평균

▶ 검체 희석배수 설정 시험

1) 시험 방법 및 조건선정 기준

다음과 같은 step으로 실시하여 표준음성 혈청의 흡광도 값은 0.3를 넘지 않고, 표준양성과 표준음성 혈청의 흡광도의 차이가 가장 큰 조건을 검체의 희석배수로 결정하였다.

검체첨가	100배 희석검체 100 μ l/well, 실온(15~25°C), 30분 200배 희석검체 100 μ l/well, 실온(15~25°C), 30분 500배 희석검체 100 μ l/well, 실온(15~25°C), 30분 800배 희석검체 100 μ l/well, 실온(15~25°C), 30분
Washing	5회, 350 μ l/well
Conjugate 첨가	접합체 용액(0.5 μ g/ml) 100 μ l/well, 실온(15~25°C), 30분
Washing	5회, 350 μ l/well
Substrate 첨가	TMB 100 μ l/well첨가, 실온(15~25°C),15분후 stop
판정 (450nm, 620nm Ref.)	
표준양성 혈청	RP01/RP02
표준음성 혈청	RN01/RN02

2) 결과

검체 희석배수는 500배 희석하였을 때 조건선정 기준에 부합하였다.(그림 6)

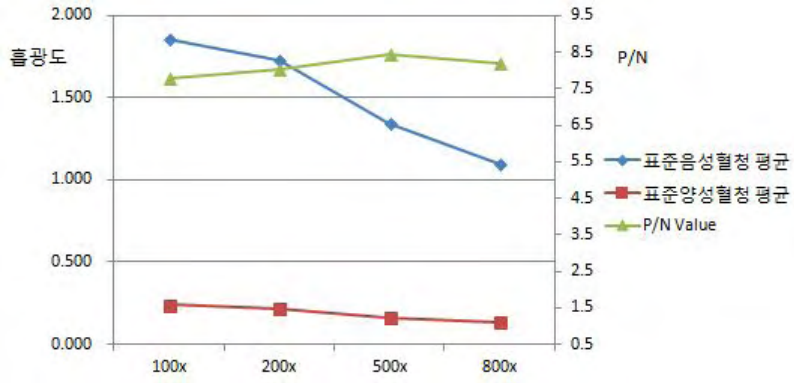


그림 6. 검체 희석배수에 따른 P/N value

▶ 검체 반응시간 설정

1) 시험 방법 및 조건선정 기준

다음과 같은 step으로 실시하여 표준음성 혈청의 흡광도 값은 0.3를 넘지 않고, 표준양성과 표준음성 혈청의 흡광도의 차이가 가장 큰 조건을 검체의 희석배수를 결정하였다.

검체첨가	500배 희석검체 100 μ l/well, 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 15분 500배 희석검체 100 μ l/well, 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 30분 500배 희석검체 100 μ l/well, 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 60분 500배 희석검체 100 μ l/well, 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 90분
Washing	5회, 350 μ l/well
Conjugate 첨가	접합체 용액(0.5 μ g/ml) 100 μ l/well, 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 30분
Washing	5회, 350 μ l/well
Substrate 첨가	TMB 100 μ l/well첨가, 실온(15~25 $^{\circ}$ C),15분후 stop
판정 (450nm, 620nm Ref.)	
표준양성 혈청	RP01/RP02
표준음성 혈청	RN01/RN02

2) 결과

검체 반응시간은 30분으로 사용하였을 때 조건선정 기준에 부합하였다.(표 4-3)

표3. 검체 반응시간에 따른 P/N Value

검 체	검체반응시간			
	15분	30분	60분	90분
표준양성혈청RP01	0.875	1.474	1.788	2.271
표준양성혈청RP02	0.614	1.142	1.312	1.967
표준음성혈청RN01	0.134	0.167	0.214	0.282
표준음성혈청RN02	0.171	0.151	0.174	0.265
표준양성혈청 평균	0.745	1.308	1.550	2.119
표준음성혈청 평균	0.153	0.159	0.194	0.274
P/N Value	4.9	8.2	8.0	7.7

▶ Conjugate(접합체) 농도 설정

1) 시험 방법 및 조건선정 기준

다음과 같은 step으로 실시하여 표준음성 혈청의 흡광도 값은 0.3를 넘지 않고, 표준양성과 표준음성 혈청의 흡광도의 차이가 가장 큰 조건을 검체의 희석배수로 결정하였다.

검체첨가	500배 희석검체 100 μ l/well, 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 30분		
Washing	5회, 350 μ l/well		
Conjugate 첨가	접합체 용액(0.25 μ g/ml) 100 μ l/well, 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 30분		
	접합체 용액(0.5 μ g/ml) 100 μ l/well, 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 30분		
	접합체 용액(1.0 μ g/ml) 100 μ l/well, 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 30분		
	접합체 용액(2.0 μ g/ml) 100 μ l/well, 실온(15~25 $^{\circ}$ C), 30분		
Washing	5회, 350 μ l/well		
Substrate 첨가	TMB 100 μ l/well첨가, 실온(15~25 $^{\circ}$ C),15분후 stop		
판정 (450nm, 620nm Ref.)			
표준양성 혈청	RP01/RP02/		
표준음성 혈청	RN01/RN02		

2) 결과

접합체 농도를 1.0ug/ml로 사용하였을 때 조건선정 기준에 부합하였다.(그림 7)

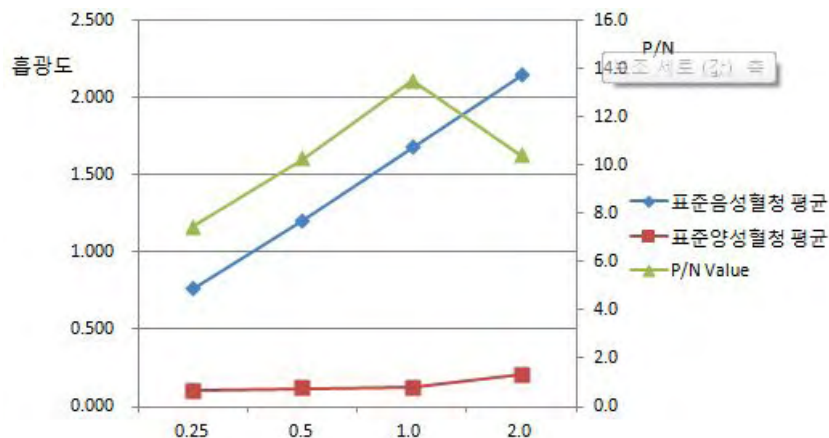


그림 7. 접합체 농도에 따른 P/N value

▶ 시험단계 및 단계별 시험 최종 조건

상기의 시험결과로 용법 용량을 다음과 같이 설정하여 시제품을 제작 하였다.

시험단계 및 단계별 시험 최종 조건		
	단 계	최 종 조 건
1	항원 coating	IBV Antigen을 2배 희석 코팅 하여 37 °C 에서 1시간 동안 coating하는 것이 최적의 상태임
2	Washing	5회, 350 μ l/well(특별한 시험은 하지 않음)
3	Blocking	3% BSA, 실온, 2시간동안 실시 (특별한 시험은 하지 않음)
4	검체첨가	검체를 검체희석액으로 500배희석하는 것이 가장 최적의 상태임
5	Conjugate첨가	conjugate 를 최종농도가 1.0 μ g/ml되게 제조된 접합체를 첨가하는 것이 최적의 상태임
6	Substrate첨가	TMB solution을 100 μ l/well 첨가하고 실온에서 15분간 반응 (특별한 시험은 하지 않음)
7	Stop Solution 첨가	0.1N H ₂ SO ₄ 를 100 μ l/well 첨가하고 반응 정지 (특별한 시험은 하지 않음)
8	결과 판정	620nm를 reference로 하여 450nm에서 측정

(2) IB 항체진단 ELISA 키트 시제품의 구성품



- 시제품의 규격 : 96Test/Kit, 480Test/Kit
- 시제품의 원료 및 용량(480Test/Kit 기준)
- IB 항원 흡착 플레이트 : 5장 (8 wells x 12 스트립/장)
주성분 : IB Viral Antigen
- 음성대조액 : 1병(0.2ml/병)
주성분 : 정상 닭혈청, 방부제(프로클린),
- 양성대조액 : 1병(0.2ml/병)
주성분 : IB 항체가 포함된 양성 항혈청, 방부제(프로클린)
- 검체희석액 : 2병(250ml/병)
주성분 : 보라색 색소가 함유된 인산염 완충액
- 20배 농축세척액 : 1병(250ml/병)
주성분 : 폴리소르베이트 20, 방부제(프로클린), 농축 인산염생리식염 완충액
- 접합체액: 1병(60ml/병)

주성분 : Rabbit anti-chicken IgY-HRP, 방부제 (프로클린), 청록색 색소가 함유된 인산염, 단백안정제(소 혈청 알부민)

- 기질액 : 1병(60ml/병) 중

주성분 : 테트라메틸벤지딘

- 반응정지액 : 1병(60ml/병) 중

주성분 : 1.6N 황산

나. IB 항체진단 ELISA 키트 시제품의 실험실 내 효능 시험 및 야외 임상시험

(1) IB 항체진단 ELISA 키트 시제품의 실험실 내 효능 시험

① 판정기준 설정시험

비교 제품으로써, 기존에 상업화되어 국내에서 사용되고 있는 IDEXX IBV Ab TEST KIT로, 4곳으로 부터 입수한 음성 및 양성 혼재 닭 혈청을 사용하여 검사하고, 동시에 본사에서 개발한 본 제제를 용법용량대로, 동일한 닭 혈청에 대해 시험하였다. 비교 제품으로 시험하여 나온 결과를 기준으로 본제제와 비교하여, S/P ratio 조건별 판정 일치율을 비교 평가하였다

IDEXX IBV Ab TEST KIT로 검사 한 결과 180개 검체로 판정하여 이를 기준으로 본제제의 검사결과를 비교해본 결과 다음과 같았다. 본 제품의 판정 기준값이 S/P ratio 0.2 일때, 동일목적 비교시약과 판정일치율이 가장 높게 측정되어, cut of를 0.2로 선정하였다.(표4-8)

표8. 판정기준 값 설정 및 동일목적 시약 비교 결과

기준 S/P ratio	IDEXX KIT와 일치검체	일치율(%)
0.6	97/180	53.8%
0.4	176/180	97.8%
0.2	179/180	99.4%
0.1	97/180	53.8%

② 안정성시험

본 제제를 2~8℃에 보관하면서 각각 제조 직후부터 제조직후, 3개월, 6개월 경과 후까지 시기별로 각 2회씩 본 제제의 용법 용량에 따라 음, 양성 표준 검체를 시험하였다. 본 과제에서 제조한 제제를 사용하여 제조 직후부터 6개월 까지 안정성시험을 실시한 결과, 모든 기간 동안 정도관리용 양성 및 음성 표준검체의 판정을 정확하게 하여 시험기준에 적합하여 본 제제는 최소 6개월간 안정함을 확인할 수 있었다.(표 9)

표 9. IB 항체진단 ELISA 키트 시제품의 실험실 내 효능 시험 안정성 시험결과

제조번호	제조일자	표준 검체	제조직후	3개월경과	6개월경과
T1101	2011. 9. 2	RP01	양성	양성	양성
		RP02	양성	양성	양성
		RP03	양성	양성	양성
		RP04	양성	양성	양성
		RP05	양성	양성	양성
		RP06	양성	양성	양성
		RN01	음성	음성	음성
		RN02	음성	음성	음성

③ 재현성 및 정확성 시험

각 표준 검체를 본 제제의 용법 용량 검사 방법 항에 따라 동일인이 3회 검사하여 사람내(intra) 재현성, 서로 다른 3인이 1회 검사하여 사람간 (inter)재현성, 동일인이 콧트를 1회 시험하여 콧트간 재현성을 검사하였다. 그 결과 100%의 재현성을 나타내었고, 본 과제에서 제조하고자 하는 제품의 검사 재현성이 기준에 적합한 것으로 판단되었다. (표 10, 표 11)

표10. 사람내 재현성 실험 결과

구 분	교정검체	1회	2회	3회	
사람내 (intra)	시험자 1	RP01	양성	양성	양성
		RP02	양성	양성	양성
		RP03	양성	양성	양성
		RP04	양성	양성	양성
		RP05	양성	양성	양성
		RP06	양성	양성	양성
		RN01	음성	음성	음성
		RN02	음성	음성	음성

표11. 사람간 재현성 실험 결과

구 분	교정검체	시험자 1	시험자 2	시험자 3
사람간 (inter)	RP01	양성	양성	양성
	RP02	양성	양성	양성
	RP03	양성	양성	양성
	RP04	양성	양성	양성
	RP05	양성	양성	양성
	RP06	양성	양성	양성
	RN01	음성	음성	음성
	RN02	음성	음성	음성

각 표준 검체를 본 제제의 용법 용량 검사 방법 항에 따라 3콧트의 시약으로 6개의 양성 표준 검체와 2개의 음성 표준 검체에 대해 시험하였다. 그 결과, 콧트 모두에서 모든 양성표준혈청검체를 양성으로, 음성표준 혈청검체를 음성으로 판정하였다. 따라서 본 과제에서 제조하고자 하는 제품의 제조 재현성과 감도, 특이도가 기준에 적합한 것으로 판단되었다.(표 4-4)

표 12. 기준 및 시험 방법에 따른 3회 시험 결과

제조 번호	검사 결과		
	혈청		판정
	양성	음성	
시제품-1 (T1101)	6	2	적합
시제품-2	6	2	적합
시제품-3	6	2	적합

④ 동일목적 시약비교

173개 필드 백신 혈청 및 SPF 음성 혈청을 동일 목적 비교 시약인 IDEXX IBV Ab ELISA 제품과 함께 시험하여, 비교시약 대비 일치율, 민감도, 특이도를 비교 평가하였다.

표13. 동일목적 비교시약과 비교 평가 결과

IDEXX	BIONOTE			
		positive	negative	
	positive	92	3	95
negative	4	74	78	
	96	77	173	

- ▶ IDEXX와 판정일치율: 173개 샘플 중 166개 샘플이 판정 일치하여, 일치율 96.0%로 확인되었다.
- ▶ 민감도: IDEXX 제품으로 양성 확인된 95개 샘플 중 92개 샘플을 동일하게 양성판정하여, 민감도 96.8%로 확인되었다.
- ▶ 특이도: IDEXX 제품으로 음성 확인된 78개 샘플 중 74개 샘플을 동일하게 음성판정하여, 특이도 94.9%로 확인되었다.

(2) IB 항체진단 ELISA 키트 시제품의 야외임상시험

① IB 항체진단 ELISA 키트 시제품의 민감도 및 특이도 시험

▶ 신장형 IBV 백신 개체에 대한 평가를 위해 외부평가기관인 삼화육종에 의뢰하여 신장형 IBV백신 접종 후 주령별 항체가 측정을 실시하였다. 비교 시약으로는 BioCheckK 제품을 사용하였으며, ‘하만농장’, ‘천일농장’ 2곳에서 총 5개 계군을 채혈하여 S/P ratio 값으로 항체 수준 변화 양상을 그래프로 비교하였다.

- 1) 실험기관: 삼화육종
- 2) 적용 대상계군: 하만(110107/11계군), 천일(110128/30계군)
- 3) 적용 백신: 하만 K2+Lasota 2번($10^{4.0}EID_{50}$) / 천일 K2+Lasota3번($10^{3.5}EID_{50}$)
- 4) 백신 접종내역

일령	하만	천일	비고
1 일령	DSB+K2	DSB+K2	
15 일령	K2 Lasota 분무 (2번)	K2 Lasota 분무 (3번)	하만 20일령
30 일령	K2 Lasota 분무 (2번)	K2 Lasota 분무 (3번)	
55 일령	K2 Lasota 분무 (2번)	K2 Lasota 분무 (3번)	
70 일령	AI oil 단미 주사	ABBN oil주사	
100 일령	K2 Lasota 분무 (2번)	K2 Lasota 분무 (3번)	
127 일령	ABEN oil 주사		
135 일령	K2 Lasota 분무 (2번)	K2 Lasota 분무 (3번)	천일 140일령

표 14. 하만 110107/11계군의 IBV ELISA 키트 검사 결과 비교

구분	주령	1	3	5	7	10	14	18	22
바이오노트	S/P	0.971	0.124	1.254	1.700	1.539	2.300	1.547	3.189
	양성률	11/15	5/14	15/15	14/15	15/15	15/15	14/15	15/15
BioChek	S/P	0.264	0.059	0.226	0.285	0.420	0.710	0.589	1.058
	양성률	15/15	1/14	2/15	8/15	11/15	14/15	14/15	15/15
HI test	IB	5.8	3.9	4.1	3.2	5.9	6.7	6.7	6.9
	ND	6.5	2.6	4	5.1	7.2	9.4	8.3	10.1

표15. 천일 110128/30계군의 IBV ELISA 키트 검사 결과 비교

구분	주령	1	3	5	7	10	14	18	22
바이오노트	S/P	1.656	0.144	0.300	1.338	0.783	1.964	4.671	3.193
	양성률	14/15	3/15	5/15	13/13	11/14	14/14	15/15	15/15
BioChek	S/P	0.982	0.061	0.069	0.481	0.570	0.927	2.116	1.690
	양성률	15/15	0/15	1/15	8/10	14/14	13/14	15/15	15/15
HI test	IB	6.4	5.1	3.4	5.2	5.1	7.6	7.6	7.6
	ND	8.2	2.1	4.4	5.6	7.1	10.1	9.3	10.4

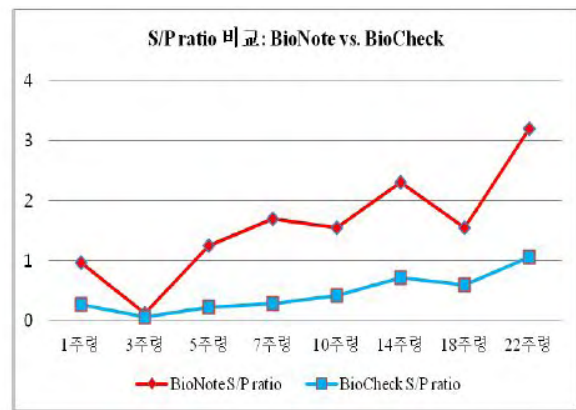
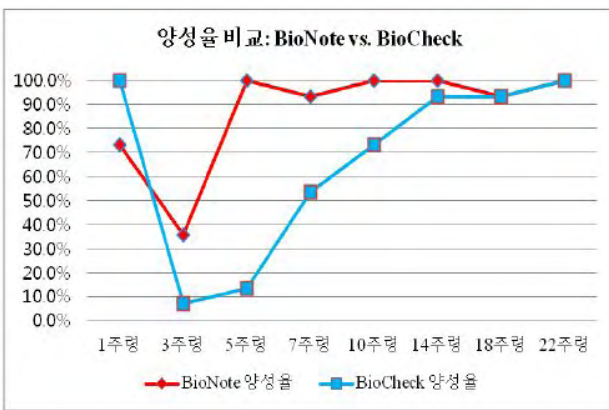


그림 24. 바이오노트와 BioChek ELISA 키트의 양성율 및 S/P ratio 비교 그래프

▶ 바이오노트, BioChek 검사에서 3주령까지 모체 이행 항체 감소를 나타낸 후 5주령부터 S/P ratio와 양성율이 증가하는 추세를 나타내었다. 한편, S/P ratio와 양성율에 있어서 그 값은 바이오노트에서 우세하게 높은 결과를 볼 수 있었다. H검사에서 천일의 경우 5주령까지 감소하는 추세를 나타내었으나 하만의 경우 3주령 감소 후 5주령 상승, 5주령 감소 이후 증가하는 추세를 나타내어 전반적인 추세를 고려하였을 때 5주령 이후 역가 상승을 나타내었다. 신장형의 K2(IB)백신 역가는 기존의 사용되던 제품(BioCheck IB ELISA Kit)보다 바이오노트의 IBV ELISA 키에서의 민감도가 더 높은 것으로 판단된다.

다. IB 항체진단 ELISA 키트 시제품의 품목 허가 신청

IB 항체진단 ELISA 키트 시제품의 야외임상시험 및 품목 허가 신청

: 농림축산검역본부에 상기의 성능시험자료 등을 바탕으로 농림축산검역본부의 규격에 맞춰 IB 항체진단 ELISA 키트의 국내 인허가를 신청, 허가를 승인받음.

부 표

- ▣ 업체명 : 유한회사 바이오노트 ▣ 허가일자 : 2012. 12. 10
- ▣ 제품명 : 바이오노트 닭 전염성 기관지염 항체 엘리자
[AniGen IBV Ab ELISA]
- ▣ 허가번호 : 제 133 - 47 호

1. 원료 약품의 분량

*96 테스트/키트, 480 테스트/키트 중

원료 약품	표시용량	
	96테스트	480테스트
가. IBV 항원 흡착 플레이트 : 8wells x 12스트립/장 주성분 : 유전자 제조합 IBV 항원 : 2µg/ml	1장	5장
나. 음성대조액(혈청) 주성분 : SPF 닭 혈청 방부제 : 프로클린 : 0.05%	1ml	4ml
다. 양성대조액(혈청) 주성분 : 닭 IBV 양성혈청 방부제 : 프로클린 : 0.05%	1ml	4ml
라. 검체희석액 주성분 : 인산염생리식염 완충액 방부제 : 프로클린 : 0.01%	100ml	250ml*2
마. 농축 세척액(20배 농축액) 주성분 : 폴리스트베이트 20 : 2% 희석액 : 농축 인산염생리식염 완충액 방부제 : 프로클린 : 0.05%	50ml	250ml
바. 집합제액 주성분 : 토끼 항 닭 IgY 항체-과산화효소 집합액 : 1.0µg/ml 단백안정제: 소혈청알부민 : 적 량 방부제 : 프로클린 : 0.05%	15ml	80ml
사. 기질액 주성분 : 과산화수소수 : 적 량 주성분 : 테트라메틸벤지딘 : 적 량	12ml	60ml
아. 반응정지액 주성분 : 1N 황산 : 20µl/ml	15ml	80ml

2. 성 상

- 가. IBV 항원 흡착 플레이트 : 무색 평면 바닥 형태의 폴리스티렌 플레이트
- 나. 음성대조액 (혈청) : 붉은색 내지 옅은 붉은색의 액상 제제
- 다. 양성대조액 (혈청) : 파란색 내지 옅은 파란색의 액상 제제

(1) 부표 작성 사항

① 원료 약품의 분량

*96 테스트/키트, 480 테스트/키트 중

원료 약품	표시용량	
	96테스트	480테스트
가. IBV 항원 흡착 플레이트 : 8wells x 12스트립/장 주성분 : IBV Viral Ag : 2X	1장	5장
나. 음성대조액(혈청) 주성분 : SPF 닭 혈청 방부제 : 프로클린 : 0.05%	0.1mℓ	0.2mℓ
다. 양성대조액(혈청) 주성분 : 닭 IBV 양성혈청 방부제 : 프로클린 : 0.05%	0.1mℓ	0.2mℓ
라. 검체희석액 주성분 : 인산염생리식염 완충액 방부제 : 프로클린 : 0.01%	100mℓ	250mℓ*2
마. 농축 세척액(20배 농축액) 주성분 : 폴리소르베이트 20 : 2% 희석액 : 농축 인산염생리식염 완충액 방부제 : 프로클린 : 0.05%	50mℓ	250mℓ
바. 접합체액 주성분 : 토끼 항 닭 IgY 항체-과산화효소 접합액 : 2μg/mℓ 단백안정제: 소혈청알부민 : 적 량 방부제 : 프로클린 : 0.05%	15mℓ	80mℓ
사. 기질액 주성분 : 과산화수소수 : 적 량 주성분 : 테트라메칠벤지딘 : 적 량	12mℓ	60mℓ
아. 반응정지액 주성분 : 1N 황산 : 20μℓ/mℓ	15mℓ	80mℓ

② 성 상

- ▶ IBV 항원 흡착 플레이트 : 무색 평면 바닥 형태의 폴리스틸렌 플레이트
- ▶ 음성대조액 (혈청) : 붉은색 내지 옅은 붉은색의 액상 제제
- ▶ 양성대조액 (혈청) : 파란색 내지 옅은 파란색의 액상 제제
- ▶ 검체희석액 : 연한 보라 내지 청색의 액상제제
- ▶ 농축 세척액 (20배 농축액) : 무색 내지 옅은 담황색의 액상 제제
- ▶ 접합체액 : 초록내지 진한초록색의 액상제제
- ▶ 기질액 : 무색 내지 미황색의 액상 제제
- ▶ 반응 정지액 : 무색의 액상 제제
- ▶ 플레이트 밀봉 테이프 : 무색 투명한 폴리에스테르 접착 테이프

③ 제조방법

▶ 개별 구성물의 제조방법

1) 마이크로 웰 흡착용 항원: 본 제제에 사용된 항원은 불활화 IBV Virus 항원을 사용하였다.

- 배양된 8067 IB virus를 BEI 불활화와 TritonX detergent 불활화를 거친 후 고속원심기를 사용하여, 농축된 항원을 사용하였다.

2) 접합체 : 토끼 항 닭 IgY-과산화 효소 접합액을 2±0.2μg/mℓ의 농도로 단백 안정제와 방부제가 포함된 희석액으로 희석하여 제조 하였다.

▶ 각 구성물의 제조공정도

1) IBV 항원흡착 플레이트 제조

IBV 항원 및 용액준비 (코팅액, 봉쇄액, 안정제)



IBV 항원 희석 및 분주, 항온, 흡입



봉쇄액 분주, 항온, 흡입



안정제 분주, 항온, 흡입



건조



실리카겔 포 준비, 포장

2) 기타 용액 : 용액 조성에 따라 조제

④ 효능 및 효과

- ▶ 본 키트는 ELISA를 이용한 항체검사법으로 IBV 항원 흡착 플레이트는 닭 전염성 기관지염 바이러스에 대한 항체 유무를 검출한다.
- ▶ 본 키트는 닭 전염성 기관지염 바이러스 항체 양성 및 음성 판정 시에 사용한다.

⑤ 용법 및 용량

▶ 검체 준비

- 1) 닭의 혈청을 검체로 사용할 수 있으나 심하게 용혈 되었거나 상한 검체는 쓸 수 없다. 혈구나 혈액응고 성분 등의 고형물이 있는 검체는 비특이 반응을 유발하므로 가능한 한 사용하지 않는다.
- 2) 혈청은 2~8℃에서 보관할 경우 15일까지 본 시약을 이용한 검사에 사용 가능하며 3일 이상 보관 시에는 -20℃에 보관한다.
- 3) 용혈이 심하거나 미생물에 오염된 검체의 경우는 부정확한 결과를 나타낼 수 있으므로 주의한다.
- 4) 혈청 검체의 경우 비동화 (56℃ 30분)유무가 판정결과에 영향을 미치지 않는다.

▶ 시액제조

1) 주의사항

- 시약을 약 30분 전에 실온(18~25℃)에 꺼내어 둔다 (실온에 충분히 적응되었는지 확인한 후 사용하도록 한다)
- 시험 후 남은 항원흡착플레이트는 자체 은박포에 실리카겔 포와 함께 잘 밀봉하여 2~8℃에서 냉장 보관한다.
- 검체는 사용 전에 충분히 혼합하여 사용한다.

2) 시액의 조제

- 세척액의 준비: 농축세척액(20배)을 정제수 (탈이온수나 증류수)로 20 배 희석한다.

(예, 증류수 950ml 농축 세척액 50ml을 첨가하여 세척액을 조제한다).

3) 조제한 시액의 보관조건 및 보존 기간

조제시액	보관조건	보존기간
세척액	실온, 2 ~ 8°C	1주일

▶ 검사방법

- 1) 검사를 시작하기 전에 시약 구성물들을 상온에 꺼내두고 (실온에 적응될 때까지), 가볍게 흔든 후 사용한다.
- 2) 검사에 필요한 well 수를 결정하고 사용하고 남은 well 은 자체 은박포에 실리카겔과 함께 밀봉하여 2 ~ 8°C에 보관한다.
- 3) 시험에 필요한 양 만큼의 스트립을 꺼내어 프레임에 고정시킨다.
- 4) 음, 양성 대조액 및 검체를 검체 희석액으로 500배 희석한다. (예 검체 2 μ l +검체 희석액 1000 μ l)
- 5) 준비된 플레이트 well에 500배 희석된 음, 양성 대조액 및 검체를 100 μ l를 분주 한다.
- 6) 5)의 플레이트를 실온 (18~25°C)에서 30분간 반응 시킨다.
- 7) 6)의 반응이 끝나면 각 well의 내용물을 흡입 해 내고 세척액으로 3회 세척한다. (회 : 350 μ l이상/well).
- 8) 세척된 플레이트를 흡습지에 뒤집어 강하게 쳐서 남아있는 세척액을 완전히 제거한 다음, 접합체액을 플레이트 각 well에 100 μ l씩 넣고 실온 (18~25°C)에서 30분간 반응 시킨다.
- 9) 8)의 반응이 끝난 다음 각 well의 내용물을 흡입해 내고 세척액으로5 회 세척한다 (1 회 : 350 μ l이상/well)
- 10) 기질액을 모든 well에 100 μ l씩 넣고 빛을 차단한 후 15분간 실온 (18~25°C)에서 반응 시킨다.
- 11) 10)의 반응이 끝난 Plate에 반응정지액을 well당 100 μ l씩 반응정지액을 넣고 잘 혼합 하여 청색이 노란색으로 완전히 변하도록 한다.
- 12) 공기를 맹검으로 하여 (Air blank) 음성대조액 , 양성대조액 그리고 각 검체의 흡광도를 측정한다. 이때 흡광도의 측정 파장은 450 nm로 하고 , 이중 파장흡광도측정기 (dual wavelength reader) 를 사용할 경우 참조파장은 620 nm로 하며 반응 정지액을 넣고 30분 이내에 흡광도 값을 측정한다.

▶ 결과 판정

1) 정도관리

- 양성대조액은 2well을 이용하여 시험하며, 평균 흡광도 값은0.4 이상이어야 하며 2개의 값의 평균값으로 산출한다 만약 2개중 1개의 값이 위의 범위를 벗어났을 경우 재 시험을 하여야 한다.
- 음성대조액은 2well을 이용하여 시험하며, 평균 흡광도 값은0.1 이하 이어야 하며 2개의 값의 평균값으로 산출한다. 만약 2개중 1개의 값이 위의 범위를 벗어났을 경우 재 시험을 하여야 한다.

- Corrected Positive Control(CPC)은 0.3이상 이어야 한다.

$$*CPC = \text{양성대조액 평균 흡광도} - \text{음성대조액 평균 흡광도}$$

- 평균 흡광도값이 위의 범위를 벗어난 경우에는 검사과정이나 시약에 문제가 있는 것이므로 그 원인을 확인한 후 재검사 하여야 한다.

2) 결과의 판정

- 결과의 판정은 Sample to positive ratio(S/P) value로 한다.

$$S/P \text{ value} = \frac{\text{검체의 흡광도} - \text{음성대조액의 평균 흡광도}}{\text{양성대조액의 평균 흡광도} - \text{음성대조액의 평균 흡광도}}$$

- 판정 기준값(S/P value) 및 본 제제의 민감도, 특이도는 다음과 같다..

양성 S/P 값	0.2 이상
음성 S/P 값	0.2 미만
근거 검체수	379
민감도	99.0%
특이도	98.8%

- 음성 : 판정 기준값 미만의 S/P 값을 나타내는 검체는 음성으로 판정한다.
- 양성 : 판정 기준값 이상의 S/P 값을 나타내는 검체는 양성으로 판정한다.
- 양성 판정된 검체는 다른 임상결과나 실험결과를 함께 이용하여 전문 수의사가 종합적으로 최종 진단을 내려야 한다.

3) 판정 기준값 (Sample to positive ratio : S/P) 계산

- 양성대조액 평균값 계산: 상기 검사방법에 따라 양성 대조액의 흡광도를 얻은 다음 그 두 값의 평균값을 산출한다.

예)

양성 대조액 번호	흡광도 (450 nm, 참조파장 620 nm)
1	0.452
2	0.395
합계	0.847

$$*양성대조액의 평균 흡광도 : PCx = 0.847/2 = 0.424$$

- 음성대조액 평균값 계산: 상기 검사방법에 따라 음성대조액의 흡광도를 얻은 다음 그 두 값의 평균값을 산출한다.

예)

음성 대조액 번호	흡광도 (450 nm, 참조파장 620 nm)
1	0.054
2	0.036
합계	0.09

$$*음성대조액(혈청)의 평균 흡광도 : NCx = 0.09/2 = 0.045$$

- S/P값 계산

$$S/P \text{ value} = \frac{\text{검체의 흡광도} - \text{음성대조액의 평균 흡광도}}{\text{양성대조액의 평균 흡광도} - \text{음성대조액의 평균 흡광도}}$$

예) 양성 대조액의 평균 흡광도 = 0.424, 음성대조액의 평균 흡광도 : 0.045

검체의 흡광도 = 0.8340

$$S/P \text{ value} = \frac{0.8340 - 0.045}{0.424 - 0.045} = 2.09 \text{ (S/P 0.2 이상 양성 : 양성)}$$

- 역가(Log titer)의 계산

1/500으로 희석된 가검 혈청 역가와 S/P 와의 관계식

$$*Log_{10} \text{ Titer} = 1.074(Log_{10} S/P) + 3.29$$

⑥ 포장 단위

원료약품	포장단위	96 tests/kit (8wells x 12스트립/장)	480 tests/kit (8wells x 12스트립/장)	960 tests/kit (8wells x 12스트립/장)
항원흡착플레이트		1장	5장	10장
음성대조액(혈청)		1병(0.1ml/병)	1병(0.2ml/병)	1병(0.5ml/병)
양성대조액(혈청)		1병(0.1ml/병)	1병(0.2ml/병)	1병(0.5ml/병)
농축세척액(20배)		1병(50ml/병)	1병(250ml/병)	2병(250 ml/병)
검체희석액		1병(100ml/병)	2병(250ml/병)	4병(250ml/병)
접합체액		1병(15ml/병)	1병(80ml/병)	1병(200ml/병)
기질액		1병(12ml/병)	1병(60ml/병)	1병(120ml/병)
반응정지액		1병(15ml/병)	1병(80ml/병)	1병(200ml/병)
플레이트 밀봉테이프		2장	10장	20장

⑦ 저장 방법 및 유효 기간

플레이트는 기밀 파우치에 실리카겔과 함께 포장하고, 각종 용액들은 기밀용기에 분주하여 냉장에서 보관(2~8℃)한다. 사용 기간은 제조일로부터 12개월간이다.

⑧ 사용상의 주의사항

- ▶ 닭의 체외진단용 시약으로만 사용한다.
- ▶ 제품의 사용 후 남은 구성물은 즉시 냉암소에 다시 보관한다.
- ▶ 서로 다른 로트의 구성물과 혼합하여 사용하지 않도록 주의한다.
- ▶ 유효기간이 지난 제품은 사용하지 않는다.
- ▶ 제품 내 시약이 다른 시약이나 검체에 오염되지 않도록 주의 한다.
- ▶ 검체는 전염성 기관지염 바이러스 등의 감염 가능성이 있는 것이므로 취급에 주의 한다.
- ▶ 용혈이 심하거나 미생물이 심하게 오염된 검체는 부정확한 결과를 나타낼 수 있으므로 신선한 검체를 시료로 사용한다.
- ▶ 검체내의 혈구 찌꺼기, 혈액 응고성분 등의 고형물은 세척할 때 완전히 제거되지 않으면 well의 한 부분으로부터 시작되는 비특이 반응을 유발하므로 특히 주의해야 한다.
- ▶ 만약의 경우 well의 한 부분에서부터 발색반응이 나오기 시작하면 양성으로 간주하지 않는다.
- ▶ 감염 가능물질을 취급할 때는 1회용 비닐장갑 등을 착용하고 취급 후에는 손을 세정제로 깨끗이 닦는다.
- ▶ 기질액과 반응정지액은 피부에 닿지 않도록 주의한다.

- ▶ 실험에 사용한 고형폐기물은 121℃에서 15분 이상 고압 증기 멸균하여 폐기한다.
- ▶ 실험에 사용되었던 액체 폐기물은 차아염소산나트륨용액을 1% 이상 되도록 첨가하여 12시간 이상 담가 감염성을 완전히 제거한 후에 폐기한다.

라. IB 항체진단 ELISA 키트의 해외 수출

- ① IB 항체진단 ELISA 키트 시제품의 야외임상시험 및 품목 허가 신청
 - ▶ IB 항체진단 ELISA 키트의 해외 수출 판매를 시작함.

제품명	수출지역	금액(원)
IB 항체진단 ELISA kit	두바이	501,116

3. AIV-NDV-IBV triple Ab ELISA 키트

가. AIV-NDV-IBV triple Ab ELISA 키트의 시제품 제작

(1) AIV-NDV-IBV triple Ab ELISA의 구성 및 개발전략

AIV-NDV-IBV Ab triple ELISA는 AIV, NDV, IBV의 각각 또는 동시에 감염되었을 경우 면역반응에 의해 유발되는 각각의 항체를 한번의 시료채취와 한번의 시료회석, 한번의 ELISA 시험을 통해 각각의 항체를 동시에 또는 단독으로 측정할 수 있는 진단키트임 이를 위하여 아래 Fig. 3-1-1 과 같은 immunoassay를 design하였으며 요구사항은 아래와 같음.

- ① Plate : AIV, NDV, IBV 항원이 각 8-well strip 에 최적의 조건으로 각각 coating 되어야 함.
- ② conjugate-항체 (HRP conjugated) : AIV, NDV, IBV 항원에 의해 감지된 각각의 질병 특이항체들이 conjugate 항체에 의해 모두 인지될 수 있어야 하며 최적의 HRP conjugate 항체의 회석배수는 3중 (AIV, NDV, IBV) 모두 동일해야함.
- ③ 기타 시료의 회석배수, 회석된 시료의 plate 반응시간, washing solution type, 기질액 반응시간, 등등 에 대한 용법의 일원화가 요구됨

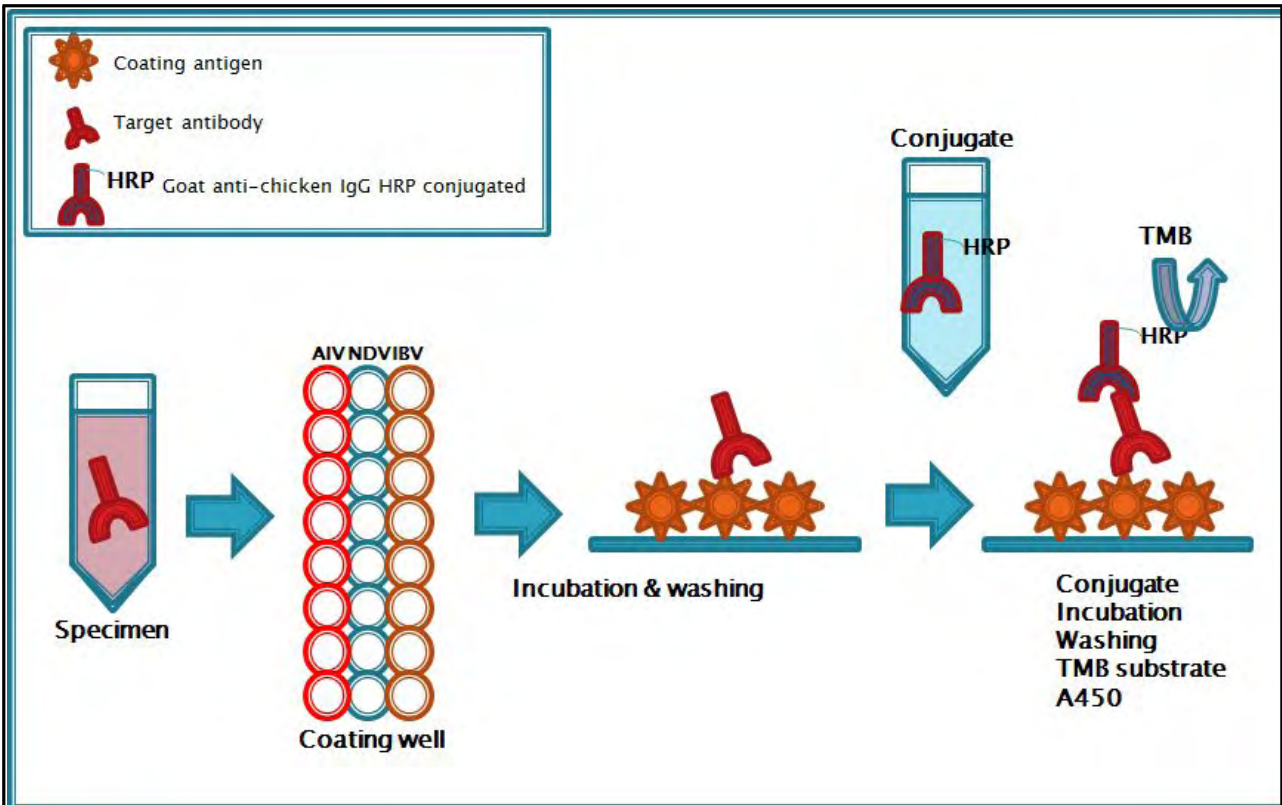


Fig.3-1-1 AIV-NDV-IBV Ab triple ELISA의 immunoassay design

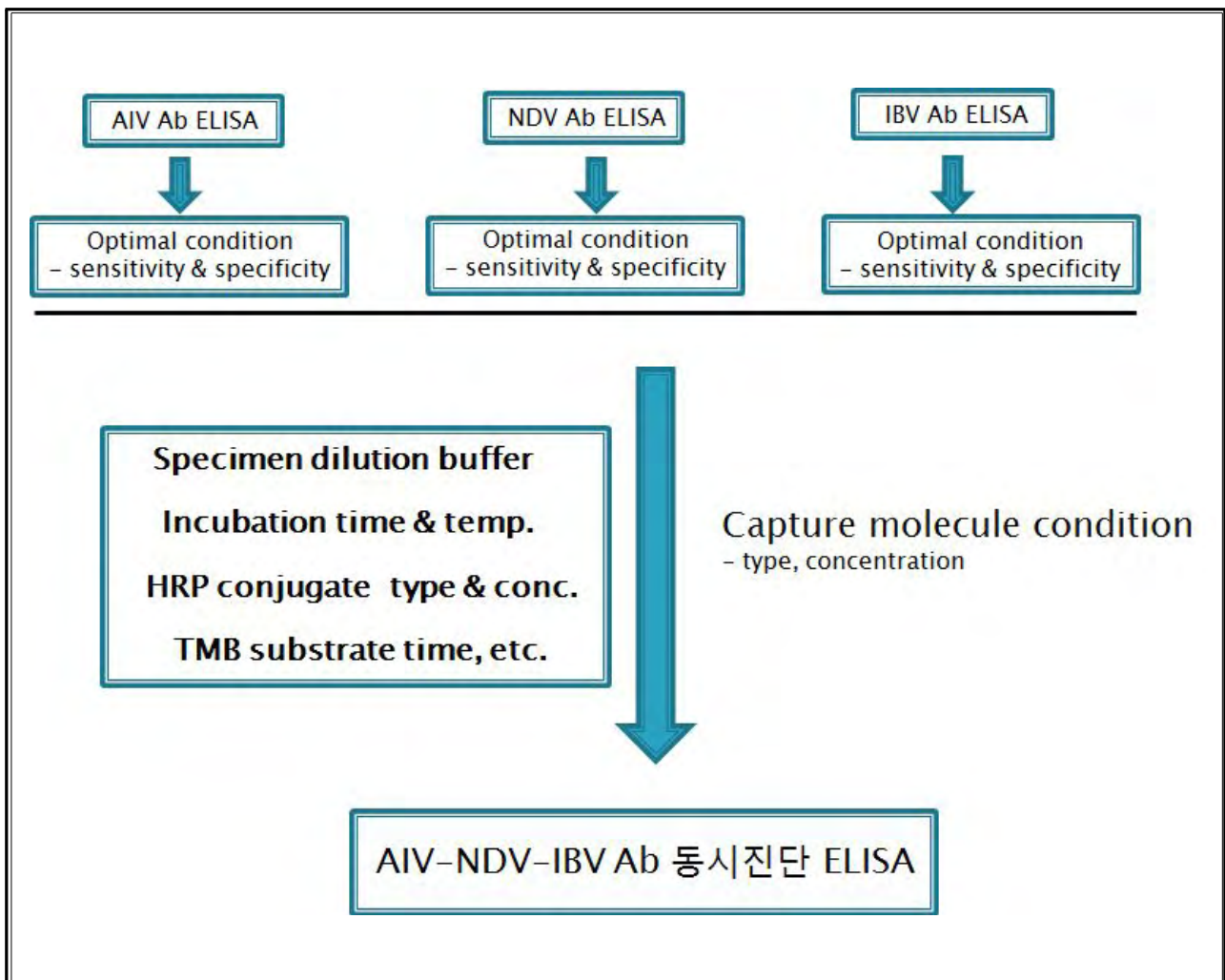


Fig.3-1-2 AIV-NDV-IBV Triple Ab ELISA의 개발전략 및 요구사항

(2) AIV-NDV-IBV Triple Ab ELISA의 plate coating용 항원개발 및 최적반응조건 설정

① plate coating 용 항원개발

AIV의 경우 AIV H9N2 Nucleoprotein(NP) 재조합단백질을 Baculovirus Expression vector system(BEVS)을 이용하여 발현 정제하여 진단항원으로 사용하였음.

NDV와 IBV의 경우 각각 LaSota 및 M41 바이러스 strain을 SPF 종란에 접종하여 수확하고 초고속원심 등의 방법으로 바이러스를 정제한 후 진단항원으로 사용하였음.

항원은 표준혈청과 백신면역혈청을 사용하여 유효성을 확인하였으며 항원고정화농도, HRP-conjugate농도, 희석배율, 반응시간 등을 조정하여 ELISA 반응 최적화를 진행하였음.

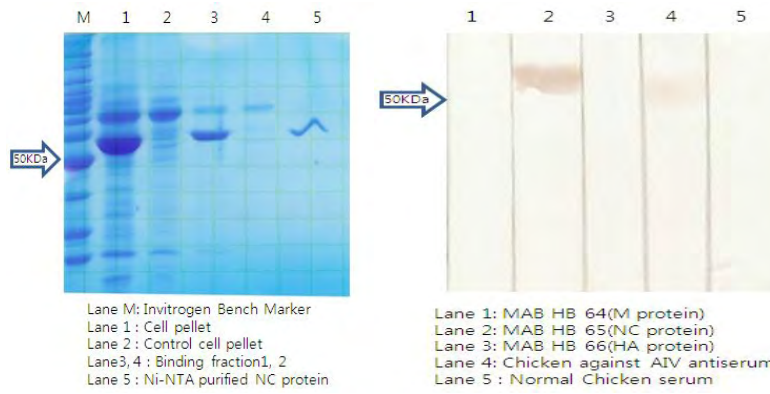


Fig.3-2-1 H9N2 rNP 재조합단백질의 SDS-PAGE 및 western blot을 통한 반응성 확인

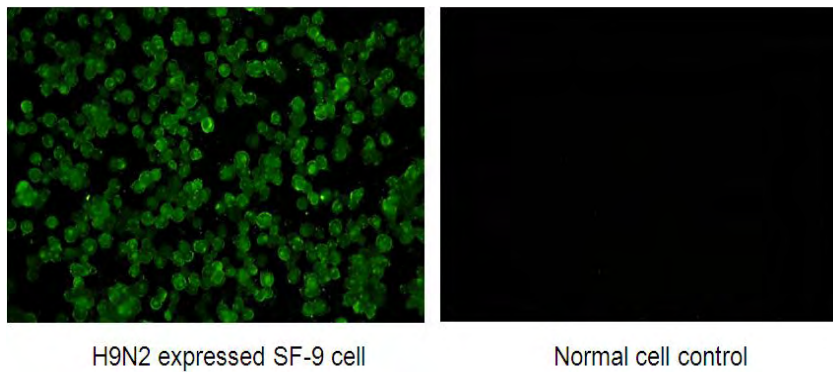


Fig.3-2-2 H9N2 rNP의 단클론항체(HB65) FA 반응성

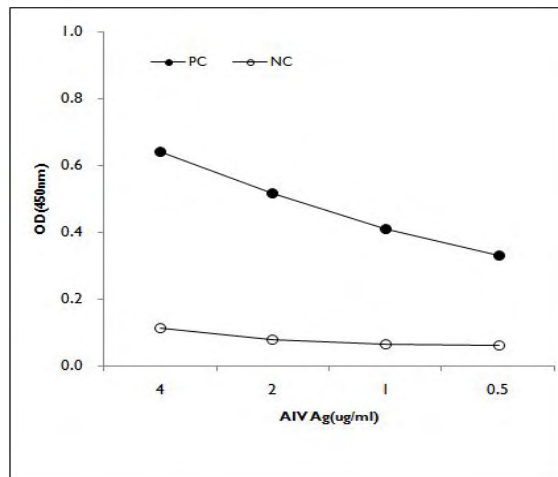


Fig.3-2-3 H9N2 rNP 재조합단백질의 표준혈청과의 ELISA 반응성

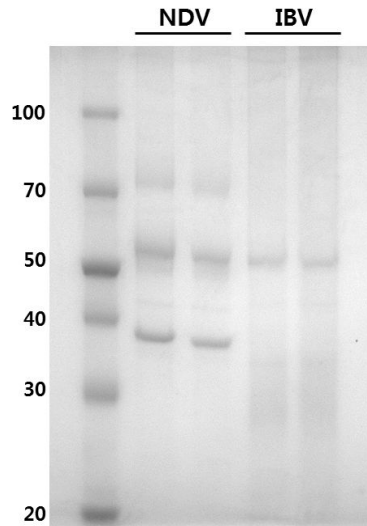


Fig.3-2-4 NDV, IBV 바이러스 항원의 SDS-PAGE 결과

② AIV-NDV-IBV Triple Ab ELISA 최적화

조류 3종 질병의 항체를 검출하기 위하여 간접 ELISA를 사용하였다. 각 항원의 최적 고정화 농도는 Checker-board titration method를 사용하여 결정하였고, 양성대조와 음성대조 혈청을 사용하여 양성혈청의 반응성에 영향을 주지 않고 음성대조혈청에서 비특이 반응이 가장 낮은 조건을 나타내는 희석완충액 및 세척완충액의 성분을 결정하였다. 혈청희석배수는 항체양을 정량적으로 분석하기 위하여 1:500 희석으로 결정하고 최적 HRP conjugate 농도는 25~50ng/ml로 결정하였다. 혈청과 HRP conjugate의 반응조건은 실온에서 각각 30분씩 반응시키고 TMB기질을 15분 반응하고 정지한 후 OD₄₅₀에서 결과를 판독하였다.

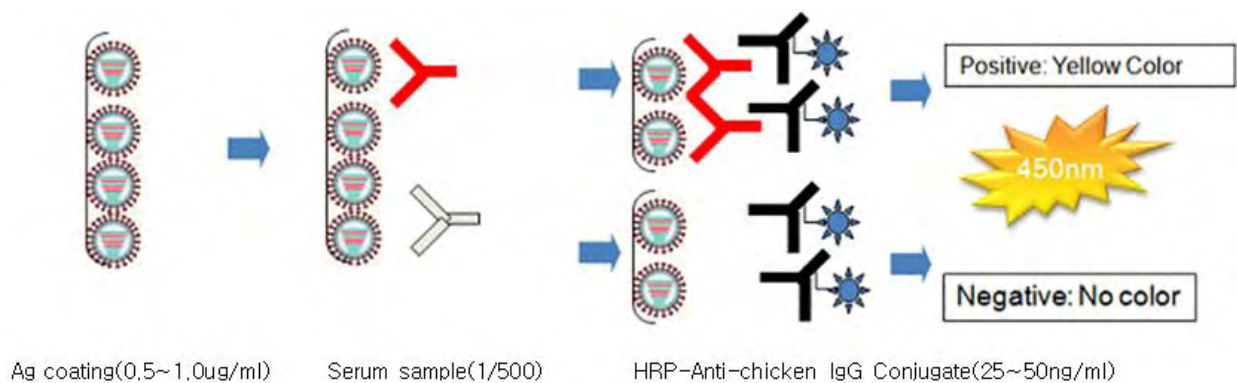


Fig.3-2-5 AIV-NDV-IBV Triple Ab ELISA 최적화

ELISA protocol (Quick Guide)

AIV, NDV, IBV 항원 흡착플레이트 준비

↓
혈청 희석(1:500)

↓
희석 혈청 첨가 100 μ l 첨가

↓
실온에서 30분 반응

↓
3회 세척

↓
HRPO Anti-Chicken IgG conjugate
100 μ l 분주

↓
실온에서 30분 반응

↓
3회 세척

↓
발색제 100 μ l 분주
15분간 반응

↓
정지액 50 μ l 분주

↓
판독(450nm) 및 결과해석

Fig.3-2-6 AIV-NDV-IBV Ab Triple Ab ELISA protocol

<AIV-NDV-IBV Triple Ab ELISA 시제품 규격>



구성	용량
AIV-NDV-IBV 항원흡착플레이트	160 테스트
10X 세척액 (10X washing solution)	200ml 이상
검체희석액 (Sample dilution buffer)	200ml 이상
HRPO anti-chicken IgG conjugate	50ml 이상
AIV, NDV, IBV 양성대조액 (Positive control)	각각 1ml 이상
AIV, NDV, IBV 음성대조액 (Negative control)	각각 1ml 이상
발색제 (TMB substrate)	60ml 이상
정지액 (Stop solution)	30ml 이상
사용 설명서	1부

나. AI-ND-IBV Ab triple ELISA 키트 시제품에 대한 실험실 내 효능 시험 및 야외 임상시험

최적조건이 설정된 AIV-NDV-IBV Ab triple ELISA의 유효성 평가를 위하여 아래와 같이 성능을 평가하였음.

(1) AI 항체진단용 ELISA coating plate의 성능평가

야외임상시료를 시제품의 용법 및 용량에 따라 시험하여 민감도, 특이도를 산출하였으며, 판정기준 설정, 안정성, 재현성 및 정확성 시험 등을 통해 성능을 평가하였음. 상용백신 접종계군에서는 100%(n=487), 야외 저병원성 인플루엔자 백신 접종 종계군의 초생추 그룹에서는 80%(n=175), 야외 산란계 항체 양성 계군에서는 100% (n=35)의 민감도를 보였다. 야외 항체 음성계군 초생추의 경우 100% (n=115), 육계의 경우 99.6%(n=250), 산란계의 경우 99.2%(n=119)의 특이도를 보였다.

① 민감도시험

▶ 상용백신 접종 계군에서 민감도 평가

시제품의 AIV 상용백신 접종 혈청에 대한 검출민감도를 측정하기 위하여 백신을 접종한 계군의 혈청을 검사하여 sero-conversion을 확인하였다. 3주령의 SPF 닭에 AIV 상용백신 2종을 각각 1ml씩, 근육으로 접종한 닭 혈청 487개를 이용하여 시제품으로 검사하였다. 그 결과 AIV 단독백신 접종계군에서는 접종 3주 후 모두 항체 양성으로 반전되었으며, 접종 후 24주까지 항체가 지속적으로 유지되었고, AIV-NDV 혼합백신 접종계군에서도 동일한 결과가 확인되었음.

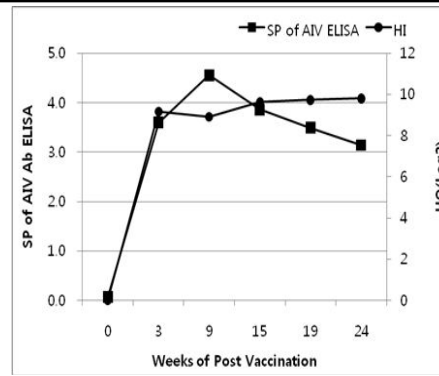
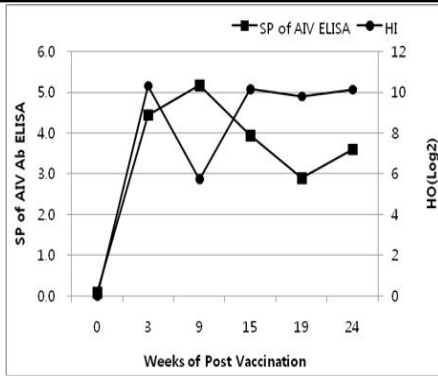


Fig.1 AIV 단독백신 계군 sero-conversion

Fig.2 AIV 혼합백신 계군 sero-conversion

▶ 야외 저병원성 인플루엔자 백신 접종 종계군의 초생추 그룹에서 민감도평가

저병원성 인플루엔자 시험백신을 접종한 종계장의 1일령 초생추에서 모체이행항체를 평가하여 시제품의 검출민감도를 측정하였다. 국내 저병원성 인플루엔자 시험백신을 접종한 경기도 지역의 종계장에서 1일령 병아리를 구입하여 채취한 17주의 혈청을 사용하였으며, AIV H9N2를 이용하여 HI검사하여 HI10배를 기준으로 양성과 음성으로 판정하였고 시제품으로 검사하였음. 그 결과 양성 140두, 음성 80두로 HI검사와 비교할 때 보다 높은 검출 감도를 나타내었음.

Herd	No.Sample	AIV (H9N2) HI test			AIV Ab ELISA		
		Result	No.Sample	% Positive	Positive	Negative	% Positive
YJ	54	Positive	53	98.1	53	0	98.1
		Negative	1		1	0	
		Sub-total			54	0	
GN1	44	Positive	20	45.5	20	0	59.1
		Negative	24		6	18	
		Sub-total			26	0	
HHG2	18	Positive	5	27.8	4	1	72.2
		Negative	13		9	4	
		Sub-total			13	0	
JJD2	19	Positive	4	21.1	4	0	36.8
		Negative	15		3	12	
		Sub-total			7	0	
JJD4	20	Positive	19	95.0	19	0	100.0
		Negative	1		1	0	
		Sub-total			20	0	
GJG4	20	Positive	20	100.0	20	0	100.0
		Negative	0		0	0	
		Sub-total			20	0	
Grand Total	175	Positive	121	64.6	120	1	80.0

Table.1 야외 초생추 계군에서 모체이행항체 검사결과

▶ 야외 산란계 항체 양성 계군 혈청에서의 민감도 검사

AIV 시험백신을 접종한 산란계 혈청을 검사하여 시제품의 검출 민감도를 측정하였다. 강원도 지역과 경기도 지역의 농장에서 채혈한 2개 계군 혈청 35수를 HI 검사(AIV H9N2)

하여 HI16배를 기준으로 양성과 음성을 확인하였고 시제품으로 검사한 결과 ,모두 양성으로 확인되었음

Herd	No. Sample	HI test			AIV Ab ELISA		
		Result	No. Sample	% Positive	Positive	Negative	% Positive
MS	16	Positive	16	100.0	16	0	100.0
		Negative	0		0	0	
SYK	19	Positive	19	100.0	19	0	100.0
		Negative	0		0	0	
Total	35	Positive	35	100.0	35	0	100.0

Table 2. 야외산란계 혈청 (2개 계군, 35수)의 Herd 별 검사결과

② 특이도 시험

▶ 야외 항체 음성 계군에서 특이도 검사1 : 초생추 계군

AIV항체 음성인 부화장의 1일령 병아리의 혈청을 이용하여 시제품의 특이도를 평가하였다. 국내 부화장에서 구입한 1일령 병아리에서 채취한 혈청 (4 계군 115 수)을 HI(AIV H9N2) 검사하여 HI16배를 기준으로 양성과 음성을 확인하였고 시제품으로 검사한 결과 모두 음성으로 확인되었음

Herd	No of samples	Result			
		No. of Positive	%Positive	Mean O.D	Mean S/P
GN2	57	0	0	0.147	0.08
KDH2	19	0	0	0.144	0.04
KDH4	21	0	0	0.105	-0.03
GJG2	18	0	0	0.127	0.01
Total	115	0	0	0.136	0.04

Table3. 야외 농장 초생추 음성계군 혈청(4개 계군, 115수)에서 시제품의 특이도 검사결과

▶ 야외 항체음성 계군에서 특이도 검사2 : 육계 계군

AIV 항체 음성으로 확인된 야외 육계 혈청을 검사하여 시제품의 특이도를 평가하였다. 경기, 강원 및 충북에서 채혈된 야외 육계 혈청 (11계군, 250수)을 AIV H9N2를 이용하여 HI 검사하여 HI 16배를 기준으로 양성과 음성을 확인하였고 시제품으로 검사하였다. 그 결과 250수중 249수가 음성으로 확인되어 99.6%의 특이도를 나타내었음

Herd	No of samples	Result			
		No. of Positive	%Positive	Mean O.D	Mean S/P
KDH	20	0	0	0.138	0.05
KDH3	20	0	0	0.112	0.03
KJG3	20	0	0	0.153	0.16
JJD3	20	0	0	0.152	0.15
HHG	20	0	0	0.130	0.04
HHG3	20	0	0	0.143	0.09
PCH	30	0	0	0.120	0.03
SBG	29	0	0	0.140	0.08
GCK	31	1	3.2	0.139	0.07
YD farm1	19	0	0	0.136	0.05
YD farm2	21	0	0	0.103	-0.00
Total	250	1	0.4	0.133	0.07

Table4. 야외 육계혈청(11개 계군, 250수)의 Herd별 검사결과

▶ 야외 항체 음성 계군에서 특이도 검사 3 : 산란계 계군

AIV 항체 음성으로 확인된 야외 산란계 혈청을 검사하여 시제품의 특이도를 평가하였다. 경기, 강원 및 충북에서 채혈된 야외 산란계 농장의 혈청 (6 계군 119 두 을 AIV H9N2를 이용하여 HI 검사하여 HI 16배를 기준으로 양성과 음성을 확인하였고 시제품으로 검사한 결과 1개 계군 1수에서 양성이 판정되어 특이도는 99.2%로 측정되었음.

Herd	Age	No of samples	Result			Herd data		
			No. of positive	%Positive	Mean OD	Mean SP	CV%	Mean Titer
SY	59	20	0	0	0.175	0.12	73.3	58
ABJ 1	59	22	0	0	0.207	0.17	56.1	90
ABJ 2	490	22	0	0	0.190	0.16	64.5	90
IJ 2	270	20	0	0	0.201	0.19	59.9	107
IJ 3	195	19	1	5	0.204	0.16	33.9	80
PJ	442	16	0	0	0.205	0.16	78.9	94
Total/Mean		119	1	0.8	0.196	0.16	63.3	84

Table5. 야외 산란계 음성 계군(6개 계군, 119수)혈청에서 시제품의 특이도 검사

③ 판정기준 설정시험

HI시험으로 확인된 HI역가 16이상의 양성혈청 520개와 16미만의 음성혈청 390개를 시제품으로 검사하여 S/P(sample to positive control) 값을 계산하고 TG-ROC(Two-graph Receiver Operative Curve)분석으로 판정기준을 설정하였음. 그 결과 S/P값 0.9에서 민감도는 97.7%, 특이도는 97.7%를 나타내어 가장 우수한 결과를 보였음 선정된 혈청패널의 S/P 분포는 HI음성혈청 390개중 323개 혈청이 S/P 값 0.3미만에 분포하였고, 양성 혈청

520개중 501개 혈청의 S/P값은 0.80이상에 분포하였음

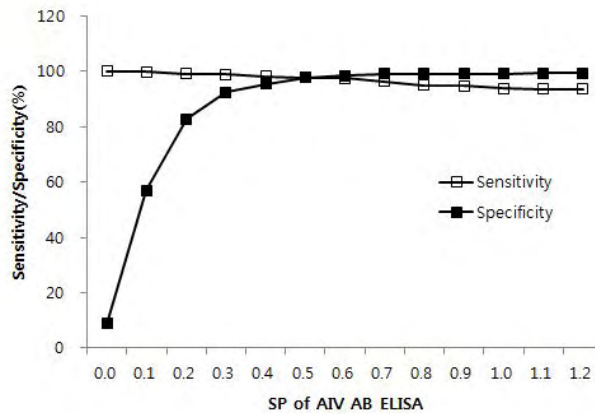


Fig3. Two-graph Receiver operative curve (TG-ROC)에 의한 판정기준 분석

④ 안정성시험

시제품의 주요 구성품인 AIV 항원 흡착플레이트, HRP conjugate, 양성 및 음성대조를 가혹조건(37℃)에서의 안정성을 조사하여 제품의 유효기간을 설정하였다. 제조 후 4℃에서 보관한 각 부품을 대조군으로 하여 가혹조건에서 보관한 각 부품을 비교검사하고 S/P값의 변화를 확인하였다. 양성 및 음성대조 시약은 보존 후 14일까지 흡광도 값이 92%이상의 회수율을 보여 안정하였으며, 항원 흡착 플레이트는 14일까지 판정값에 변화가 없으며 S/P값의 회수율이 82% 이상으로 안정하였다 HRPO anti-chicken IgG conjugate를 검사한 결과 14일까지 판정값에 변화가 없었으며 항체가 있는 시료에 대한 S/P값의 회수율이 평균 70%이상으로 안정하였다. 결론적으로 시제품은 가혹조건에서 S/P값은 평균 80%이상의 회수율을 보이고 판정값에는 영향을 주지 않아 각 부품은 37℃ 보관 후 14일까지는 안정하며 4℃에서는 12개월 이상 유효할 것으로 예측된다.

⑤ 재현성 및 정확성 시험

시제품을 사용하여 AIV 내부표준시료를 8개의 well에서, 양성대조와 음성대조는 각각 6개 well에서 검사하고 흡광도와 S/P의 변이계수(cv%)를 확인하였다. 그 결과 well-to-well 흡광도의 cv%는 3.1, S/P의 cv%는 4.1%를 나타내었고, 양성대조 및 음성대조의 well-to-well 흡광도의 변이계수도 각각 3.1%, 2.0%로 측정되었다. 또한 표준혈청패널을 사용하여 다른 검사자가 각각 다른 검사일에 2종의 시제품을 검사하고 판정값과 lot 간 S/P값의 상관계수를 분석하였다. 그 결과 lot 간 상관계수(r^2)는 0.998로 높은 상관성을 보였으며 판정값의 차이가 없었다.

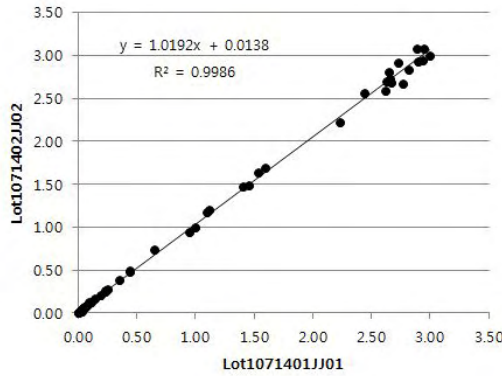


Fig4. Lot-to-lot의 S/P값 상관성 분석결과

(2) ND 항체진단용 coating plate의 성능평가

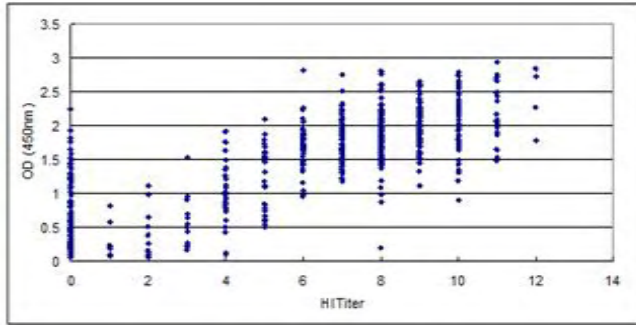
야외임상시료를 시제품의 용법 및 용량에 따라 시험하여 민감도, 특이도를 산출하였으며, 판정기준 설정, 안정성, 재현성 및 정확성 시험등을 통해 성능을 평가하였다. 백신접종 계군에서 94.9%(n=137)의 민감도를 보였으며, NDV 항체 음성으로 확인된 야외 혈청 20건을 검사한 결과 97.5%의 특이도를 보였다.

① 민감도 시험

백신접종이 실시된 강원도 가축위생시험소 및 도계장 계군에서 채취된 혈청을 사용하여 시제품의 용법 및 용량에 따라 검사하여 시제품의 민감도를 확인하였다. 채취된 혈청은 혈구응집억제반응(HI) 시약(대성미생물)을 사용하여 양성음성을 확인하였다. 또한 시제품과 HI역가간의 상관성 분석을 위하여 야외에서 채취된 가검혈청(745개)의 NDV에 대한 HI 역가를 측정하고 시제품을 이용하여 동일한 혈청을 검사하였으며, 그 결과 HI역가와 높은 상관성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

Herd	No. Sample	HI test			NDV Ab ELISA		
		Result	No. Sample	% Positive	Positive	Negative	% Positive
Group 2	20	Positive	20	100%	20	0	100%
		Negative	0		0	0	
Group 5	117	Positive	117	100%	110	7	94%
		Negative	0		0	0	
Total	137	Negative	137	100%	130	7	94.9%

Table6. 야외 양성 계군(2개 계군, 137수)혈청에서 시제품의 민감도 검사



MEAN O.D	NO. Sample	HI
2.4115	4	12
2.2137	22	11
2.1018	61	10
2.037	88	9
1.8613	138	8
1.7408	95	7
1.4862	58	6
1.1234	47	5
0.9453	41	4
0.7141	21	3
0.4712	17	2
0.4596	21	1
0.2008	132	0

Table7. 닭 뉴캐슬병 HI역가별 흡광도 분포

② 특이도 시험

조류질병 중 뉴캐슬 바이러스 항체 이외의 바이러스에 대한 교차반응을 확인하였다.

대상질병	ELISA	S/P	TITER	비 고
Fowl pox	0.0874	-0.152	1	
Infectious Bronchitis	0.135	-0.127	1	
Infectious Bursal Disease (Standard)	0.100	-0.145	1	
Infectious Bursal Disease (Variant)	0.133	-0.1281	1	
Infectious Laryngotracheitis	0.151	-0.118	1	
Avian Encephalomyelitis	0.143	-0.122	1	
Salmonella garillarum	0.127	-0.131	1	
Newcastle Disease virus	0.682	0.56	582	
Control	0.087	-0.14	1	

Table8. 질병별 시제품의 반응성 및 S/P값비교

NDV 항체 음성으로 확인된 야외혈청 200건을 검사하여 시제품의 특이도를 평가하였다. HI 검사하여 양성 음성을 확인하였고 시제품으로 검사한 결과 GroupX 계군에서는 95.4%, Group 1-3-4계군에서는 100%의 특이도를 보였다.

Herd	No. Sample	HI test			NDV Ab ELISA		
		Result	No. Sample	% Positive	Positive	Negative	% Positive
Group X	109	Positive	0	0%	0	0	4.6%
		Negative	109		5	104	
Group1-3-4	91	Positive	0	0%	0	0	0%
		Negative	91		0	91	
Total	200	Negative	200	0%	0	200	2.5%

Table9. 야외 음성 계군(4개 계군, 200수)혈청에서 시제품의 특이도 검사

③ 판정기준 설정시험

백신접종이 실시된 야외 양성계군(2계군) 137검체(HI 양성)와 혈구응집억제반응(HI)에서 음성으로 판정된 야외 음성계군(4개 계군) 200개의 혈청을 시제품으로 검사하여 S/P값을 계산하고 TG-ROC(Two-graph Receiver Operative Curve)분석으로 판정기준을 설정하였다. 그 결과 S/P값 0.2에서 민감도는 95%, 특이도는 99.5%를 나타내어 가장 우수한 결과를 보였다.

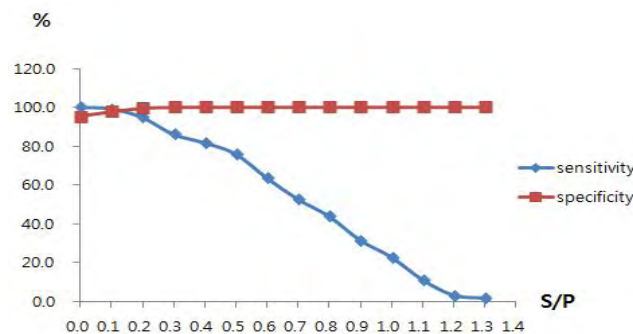


Fig5. Two-graph Receiver operative curve (TG-ROC)에 의한 NDV ELISA 판정기준 분석

④ 안정성시험

시제품의 주요 구성품인 NDV 항원 흡착플레이트, HRP conjugate, 양성 및 음성대조를 가혹조건(37°C)에서의 안정성을 조사하여 제품의 유효기간을 설정하였다. 제조 후 4°C에서 보관한 각 부품을 대조군으로 하여 가혹조건에서 보관한 각 부품을 비교검사하고 S/P값의 변화를 확인하였다. 양성 및 음성대조 시약은 보존 후 1달까지 흡광도 값이 95% 이상의 회수율을 보여 안정하였으며, 항원 흡착플레이트는 1달까지 판정값에 변화가 없으며 S/P값의 회수율이 85%이상으로 안정하였다. HRPO anti-chicken IgG conjugate를 검사한 결과 14일까지 판정값에 변화가 없었으며 항체가 있는 시료에 대한 S/P값의 회수율이 평균 70%이상으로 안정하였다. 결론적으로 시제품은 가혹조건에서 S/P 값은 평균 80% 이상의 회수율을 보이고 판정값에는 영향을 주지 않아 각 부품은 37°C 보관 후 1달까지는 안정하며 4°C에서는 12개월 이상 유효할 것으로 예측된다.

⑤ 재현성 및 정확성 시험

시제품의 반응 재현성을 확인하기 위하여 양성대조 및 음성대조 혈청으로 용법 및 용량에 따라 시험 후 well간, lot간 변이계수를 계산하여 재현성을 확인하였다.

Lot	평균 흡광도(OD 450nm)		시험 well 수		CV (%)	
	양성	음성	양성	음성	양성	음성
Lot. 1	2.13	0.07	24	24	4.1	3.6
Lot. 2	2.21	0.07	24	24	6.9	6.1

Table10. NDV Ab ELISA의 well-to-well 변이계수(CV%)

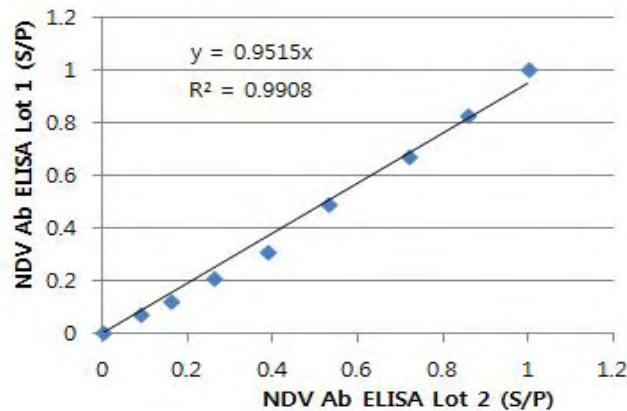


Fig6. NDV Ab ELISA Lot-to-lot의 S/P값 상관성 분석결과

(3) IBV 항체진단용 coating plate의 성능평가

야외임상시료를 시제품의 용법 및 용량에 따라 시험하여 민감도, 특이도를 산출하였으며, 판정기준 설정, 안정성, 재현성 및 정확성 시험 등을 통해 성능을 평가하였다.

야외 산란계, 초생추 혈청 106건(HI 양성)을 시험한 결과 100% 민감도를 보였으며 SPF 검체 88건을 검사한 결과 100% 특이도를 보였음.

① 민감도 시험

시제품의 민감도를 평가하기 위하여 표준 시험법인 HI 양성혈청을 이용하여 검출율을 측정하였다. 강원도 지역의 도계장에서 채취한 산란계 혈청과 초생추 (One day chicken) 혈청을 농림축산검역본부 IBV 표준검사 매뉴얼에 따라 HI를 검사하여 HI 양성패널로 구축하고 시제품으로 검사하였다.

그 결과 panel 1과 panel2의 혈청을 모두 양성으로 판정하였다.

② 특이도 시험

시제품의 특이도를 확인하기 위하여 IBV항체 음성으로 판정된 Specific Pathogen Free(특정 병원체 부재, SPF) 닭 혈청을 검사하여 평가하였다. 60일령의 SPF닭 88羽를 구입하여(양성 애니멀 바이오, 한국) 혈청을 채취하여 상용화 키트를 사용하여 음성으로

확인하였고 시제품으로 검사하여 특이도를 평가하였다. 시제품은 SPF닭 88종을 모두 음성으로 판정하였다.

Table11. HI 양성 혈청 시료에서 시제품 검사결과

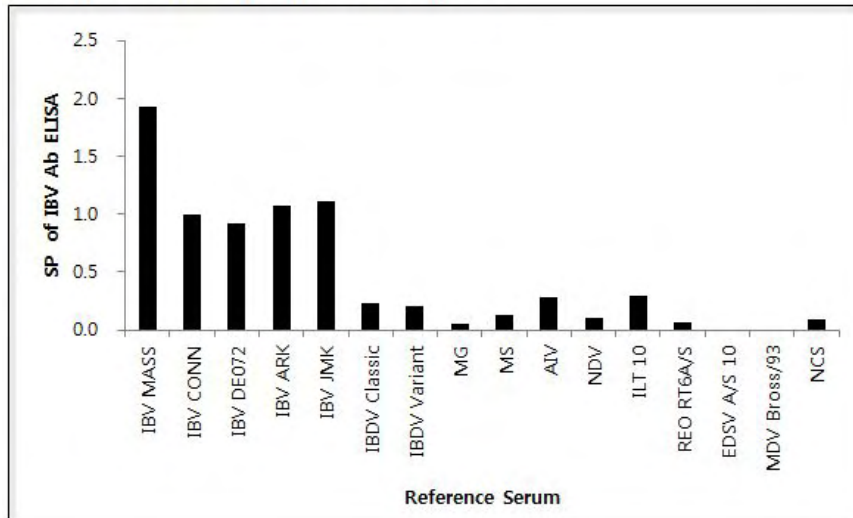
Farm	No.	Mean HI (Log2)	IBV AB ELISA				Sensitivity (%)
			No. Positive	Mean S/P	Min S/P	Max S/P	
L1	20	11.4	20	1.58	1.05	2.62	100
L2	20	11.2	20	1.41	1.13	1.74	100
Sub-total	40	11.3	40	1.49			100
A	17	9.2	17	0.74	0.38	1.22	100
B	15	7.6	15	0.92	0.54	1.72	100
C	16	9.1	16	0.83	0.45	1.21	100
D	18	8.5	18	0.91	0.45	1.90	100
Sub-total	66	8.5	66	0.85			100
Total	106	9.47	106	1.09			100

Table12. SPF 닭 혈청 패널에서 특이도 검사 결과

No. of samples	IBV AB ELISA					Specificity (%)
	No. Positive	No. Negative	Mean S/P	Min S/P	Max S/P	
88	0	88	-0.20	-0.24	0.09	100.0

또한 시제품의 IBV 이외의 혈청 교차반응성을 평가하기 위하여 유사항원에 대한 표준 항혈청을 이용하여 특이도를 측정하였다. IBV 표준혈청 5종과 닭의 유사질병에 대한 고도 면역 혈청 표준항혈청 9종을 SPAFAS(CT, USA)와 VLA(UK)에서 구입하였고 AIV 양성혈청은 국내에서 사용하는 AGID 양성대조 혈청을 도입하여 15종의 혈청패널을 구성하고 시제품으로 검사하였다. 그 결과 양성혈청패널에서 IBV 5종 항혈청에 대해서는 S/P 0.92이상으로 측정되어 모두 양성으로 판정되었고, 다른 유사질병 항원에 대한 1종의 표준 항혈청에서는 S/P값이 0.30미만으로 나타내어 모두 음성으로 확인되었다.

Fig.7 유사 질병 항혈청 패널에서 시제품의 특이도 분석



③ 판정기준(Cut-off) 설정시험

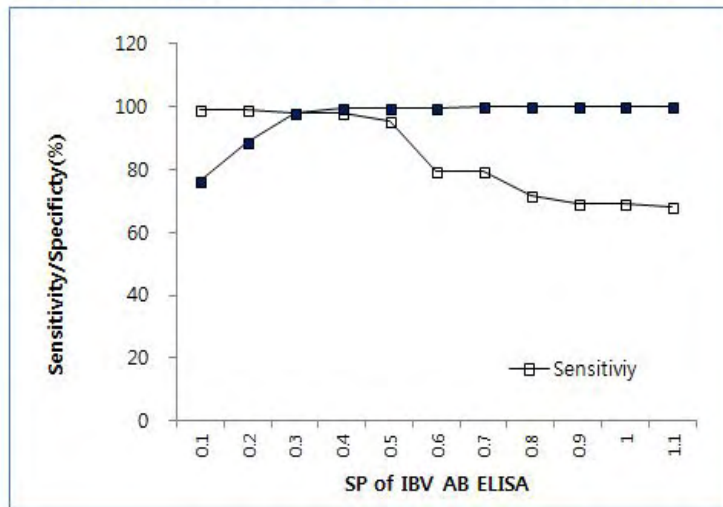
HI검사에서 양성으로 판정된 혈청 88개와 음성으로 판정된 혈청 143개를 다양한 계군에서 선별하여

231개를 시제품으로 검사하여 S/P (Sample to Positive Control) 값을 계산하고 TG-ROC(Two-graph Receiver operative curve) 분석으로 판정기준을 설정하였다.

$$S/P = \frac{\text{Sample OD} - \text{Negative Control OD}}{\text{Mean OD of Positive Control} - \text{Mean OD of Negative Control}}$$

TG-ROC 분석결과 S/P 값 0.30에서 민감도는 97.7%, 특이도는 97.9%를 나타내어 가장 우수한 결과를 보였다. 선정된 혈청패널의 S/P 분포는 HI음성 혈청 143개중 109혈청의 S/P값 0.2미만이었고 양성 혈청 88개중 84개 혈청의 S/P값이 0.50이상에 분포하였다.

Fig. 8 Two-graph Receiver operative curve (TG-ROC)에 의한 판정기준 분석



④ 안정성 시험

시제품의 주요 구성품인 IBV 항원 흡착플레이트, HRP Conjugate, 양성 및 음성대조를 가혹조건에서의 안정성을 조사하여 제품의 유효기간을 설정하였다. 시제품의 IBV 항원 흡착 플레이트, HRP Conjugate, 양성 및 음성대조를 무작위로 발취하고 37°C가혹조건하에 보관하였다. 제조 후 4°C에 보관한 각 부품을 대조군으로 하여 가혹조건에서 보관한 각 부품을 비교검사하고 S/P값의 변화를 확인하였다. 가혹조건에서 보관된 부품은 보관 후 1, 7, 14일에 각각 회수하여 검사하고 흡광도의 회수율 (Recovery, %을 아래의 공식에 따라 측정하였다.

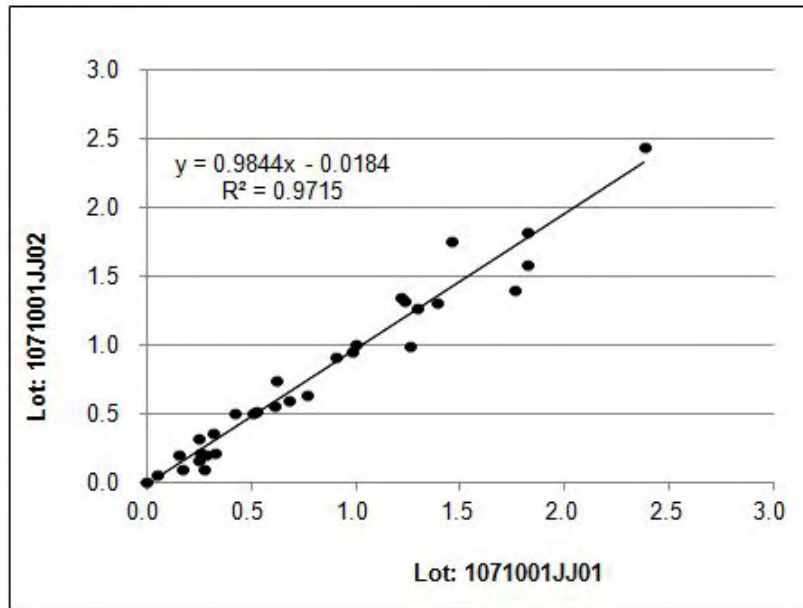
$$\text{Recovery (\%)} = \text{Sample OD} / \text{Control OD} * 100$$

시제품은 가혹조건에서 흡광도는 평균 80%이상의 회수율을 보이고 판정값에는 영향을 주지 않아 각 부품은 37°C보관 후 14일 까지는 안정하며 4°C에서는 12개월 이상 유효할 것으로 예상된다.

⑤ 재현성 및 정확성 시험

시제품의 재현성에 대한 시험기준 및 방법을 확인하기 위하여 well간 검사재현성과 정확성을 검사하였다. IBV 내부표준시료 (Internal Standard Serum-PC/150, HI 128를 8개의 well에서, 양성대조와 음성대조는 각각 6개 well에서 검사하고 변이계수 (CV%)를 확인하였다. Well-to-well 흡광도의 CV%는 5.63, S/P의 CV%는 8.02를 나타내었고, 양성대조 및 음성대조의 Well-to-well 흡광도의 변이계수도 각각 2.22%, 3.50%로 측정되었다. 또한 시제품을 사용하여 표준혈청 패널을 사용하여 다른 검사자가 각각 다른 검사일에 쯤의 시제품을 검사하고 판정값과 로트 간 S/P값의 상관계수를 분석하였다. 37개 시료패널을 사용하여 2개의 시제품 Lot를 검사한 결과 Lot 간 상관계수 (r2)은 0.97로 높은 상관성을 보였으며 판정 값의 차이가 없었다.

Fig. 9 Lot-to-lot의 S/P값 상관성 분석 결과



※ AIV-NDV-IBV 항체를 동시에 진단하기 위해, 각각 개별 항원 coating plate를 제외하고, 공통적으로 필요한 검체희석배수, conjugate 농도, 반응시간 등은 한가지로 설정되었다.

※ 신장형 IBV K2 strain의 반응성 보완실험

IBV 진단항원을 선정하는 과정에서 최근 국내에서 주로 문제시되는 신장형 IBV에 대한 반응성을 확인하는 것이 매우 중요하여, M41 strain을 이용한 ELISA coating plate에 추가적인 보완실험을 진행하였다. ELISA plating 항원을 M41 strain, K2 strain, recombinant nucleocapsid protein을 각각 coating하여, M41 항혈청과 신장형 IBV K2항혈청에 대한 반응성을 비교하였으며, 그 결과 IBV M41 strain coating plate에서 M41 항혈청과 신장형 IBV K2 항혈청 모두 높은 반응성을 보이는 것을 확인하였고 negative control (S/N 1.0) 대비 2배 이상의 signal을 나타냄을 확인하였다.

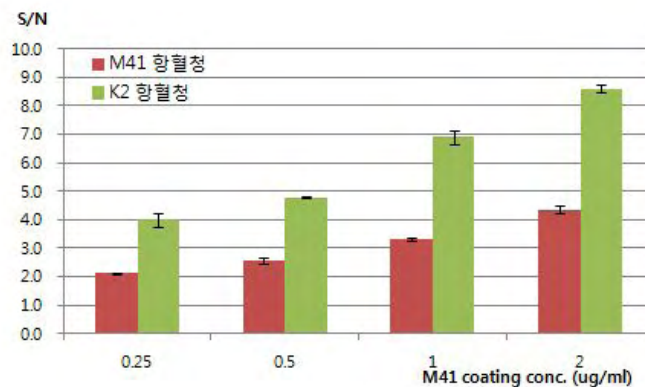


Fig.10 IBV M41 coating plate에서 M41 항혈청과 K2 항혈청의 반응성 비교

IBV K2 strain coating plate에서 또한 negative control(S/N 1.0) 대비 높은 signal을 보였으나 M41 strain coating plate 및 rec.NCP coating plate 보다 낮은 반응성을 확인하였다.

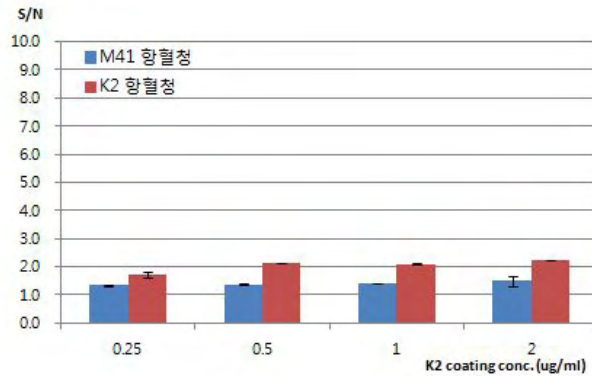


Fig.11 신장형 IBV K2 coating plate에서 M41 항혈청과 K2 항혈청의 반응성 비교

IB virus의 구조단백질의 일종인 nucleocapsid protein으로 coating한 plate의 경우 negative control(SN 1.0) 대비 높은 signal을 보였으며 M41 strain을 coating한 plate와 유사한 반응 pattern을 나타내었다.

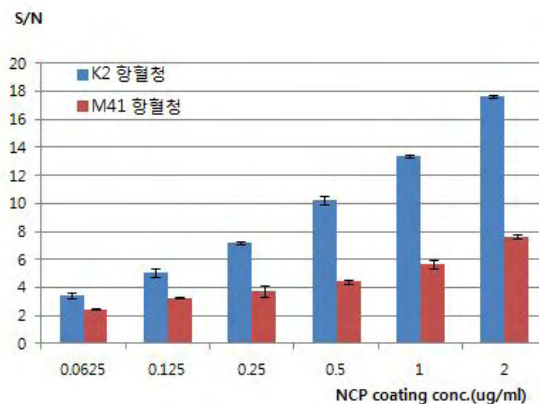


Fig.12 IBV recombinant nucleocapsid protein (rec. NCP) coating plate에서 M41 항혈청과 K2 항혈청의 반응성 비교

M41, K2, rec.NCP coating plate에서 M41항혈청보다 K2항혈청이 높게 나타난 것은 각 항혈청의 항체역가가 보정되지 않아서 나타나는 결과로 사료되고, 정성적인 관점에서 M41 strain 또는 rec.NCP(recombinant nucleocapsid protein) 으로 coating 할 경우 M41 strain에 의한 항혈청뿐만 아니라 신장형 IBV K2 strain에 의한 항혈청도 안정적으로 감지할 수 있을 것으로 판단되지만, 추가적인 확인을 위해 더 다양한 혈청을 확보하여 시험 분석할 예정이다.

다. AIV-NDV-IBV triple Ab ELISA 키트 시제품의 품목 허가 신청

: 농림축산검역본부에 상기의 성능시험자료 등을 바탕으로 농림축산검역본부의 규격에 맞춰 키트의 국내 인허가를 신청, 허가를 승인받음.



제 107 - 020 호

동물용의약품 제조 품목 허가(신고)증

업 체 명 : (주)메디안디노스틱

업 종 : 동물용의약품등 제조업

제 품 명 : VDPro 조류인플루엔자-닭뉴캐슬병-닭전염성기관지염 바
이러스 항체 Triple ELISA(VDPro AIV-NDV-IBV AB Triple
FI ISA)

구 분 : 동물용의약품

허 가 조 건 : -


허가(신고수리)번호 : 제 107 - 020 호

최 초 허 가 년 월 일 : 2013.01.29

부 표 : 별 첨

동물용의약품등취급규칙 제 5 조 · 제 9 조 제 4 항 · 제 11 조 및 제 16 조
제 3 항 규정에 의하여 위와 같이 허가합니다.

2013 년 01 월 29 일

농림수산검역검사본부장 



(1) 부표 작성 사항

① 첨부 1

시험기준 및 시험방법

1. 원료의 시험기준 및 방법

원료명	기준 및 시험방법
AIV rec. NP NDV whole antigen IBV antigen	정량검사: BCA Protein assay 순도검사: SDS PAGE, 단백질 프로파일 확인 활성검사: ELISA Unit 측정 동등성검사: 직전배취와 ELISA 반응성 비교
HRPO Anti-Chicken IgG Conjugate	동등성 검사: 직전 배취와 ELISA 반응성 검사
AIV, NDV, IBV 양성대조 혈청	ELISA 역가 검사 동등성 검사: 직전 배취와 ELISA 반응성 검사
AIV, NDV, IBV 음성대조 혈청	ELISA 역가 검사: 동등성 검사: 직전 배취와 ELISA 반응성 검사

2. 완제품의 시험기준 및 방법

가. 시험기준

검사항목	기준	비고
Well-to-well 변이계수	평균 CV% 10 이하	
Plate-to-plate 변이계수	CV% 25이상의 상승이 없을 것	
양성대조 평균 흡광도	각 플레이트에서 0.35이상	
음성대조 평균 흡광도	각 플레이트에서 0.20이하	
표준물질에서 판정 값	모든 시료에서 100 일치	

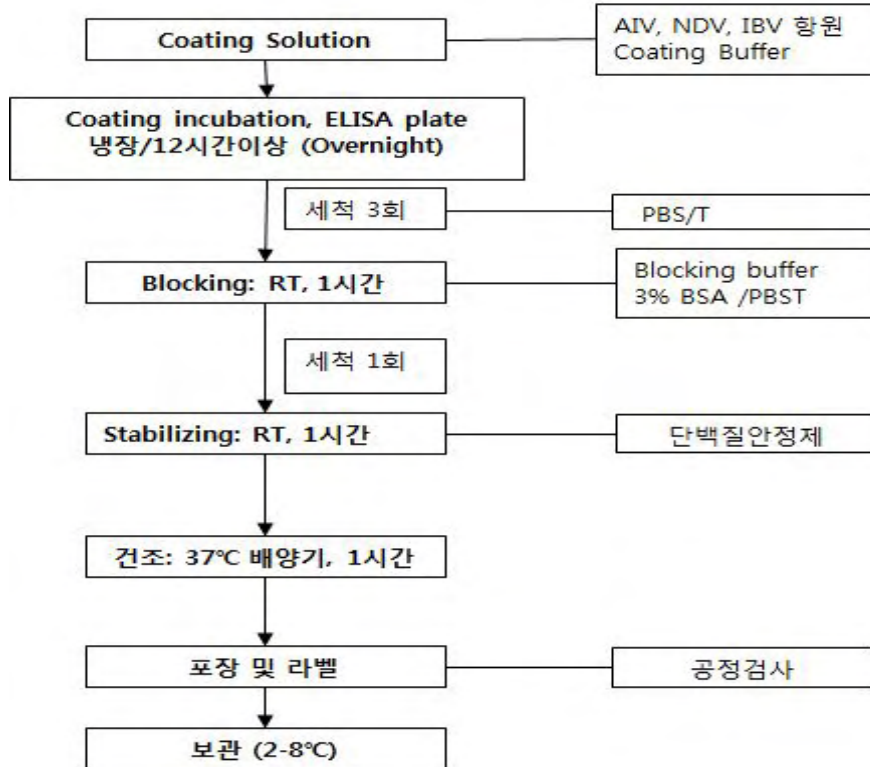
나. 시험방법

- (1) 제품을 무작위 발취하여 사용설명서의 따라 품질관리책임자의 지시에 따라 검사한다.
- (2) Well-to-well 변이계수의 측정은 84 well 이상 검사한다.
- (3) Plate-to-plate 변이계수는 2장 이상의 plate를 검사한다.
- (4) 변이계수(CV%)는 S/P 표준 편차 / S/P 평균 X 100으로 계산한다.

② 첨부 2

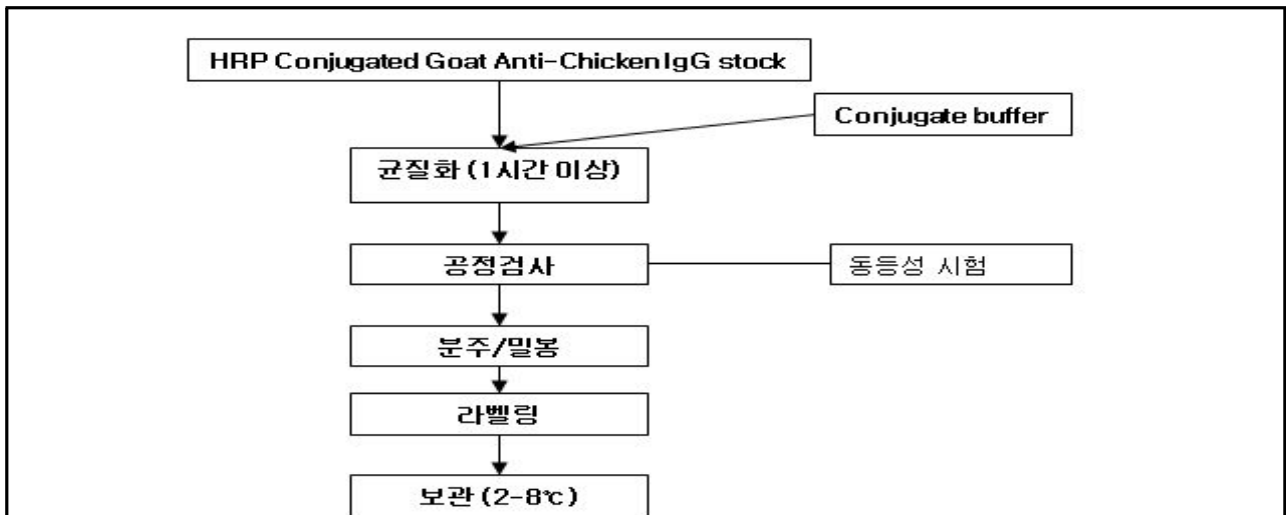
제 조 방 법

1. 항원흡착 플레이트 제조



2. HRPO anti-chicken IgG conjugate 제조

- 1) HRP conjugate stock은 원료 검사 후 승인된 것을 냉동 보관하면서 사용한다.
- 2) HRP conjugated goat anti-chicken IgG를 HRP 희석액에 적정농도로 희석하여 제조한다.



3. 양성대조 (Positive Cotrol, PC)

AIV, NDV, IBV 백신이 각각 접종되거나 감염된 닭 혈청을 희석한 후 보존제를 첨가하고 플라스틱 용기에 분주하고 밀봉하여 제조한다.

4. 음성대조 (Negative control)

AIV, NDV, IBV 각각 항체 음성인 SPF 닭 혈청에 보존제를 첨가하고 플라스틱 용기에 주입하고 밀봉하여 제조한다.

5. 혈청 희석액 제조 (Dilution Buffer)

Tris 완충액에 detergent, 안정제, 보존제 등을 첨가하고 균질화 한 후 플라스틱 용기에 주입하고 밀봉하여 제조한다.

6. 세척액 제조(10X Washing Solution)

멸균 3차 증류수에 detergent, 보존제를 첨가하고 균질화 한 후 플라스틱 용기에 주입하고 밀봉하여 제조한다.

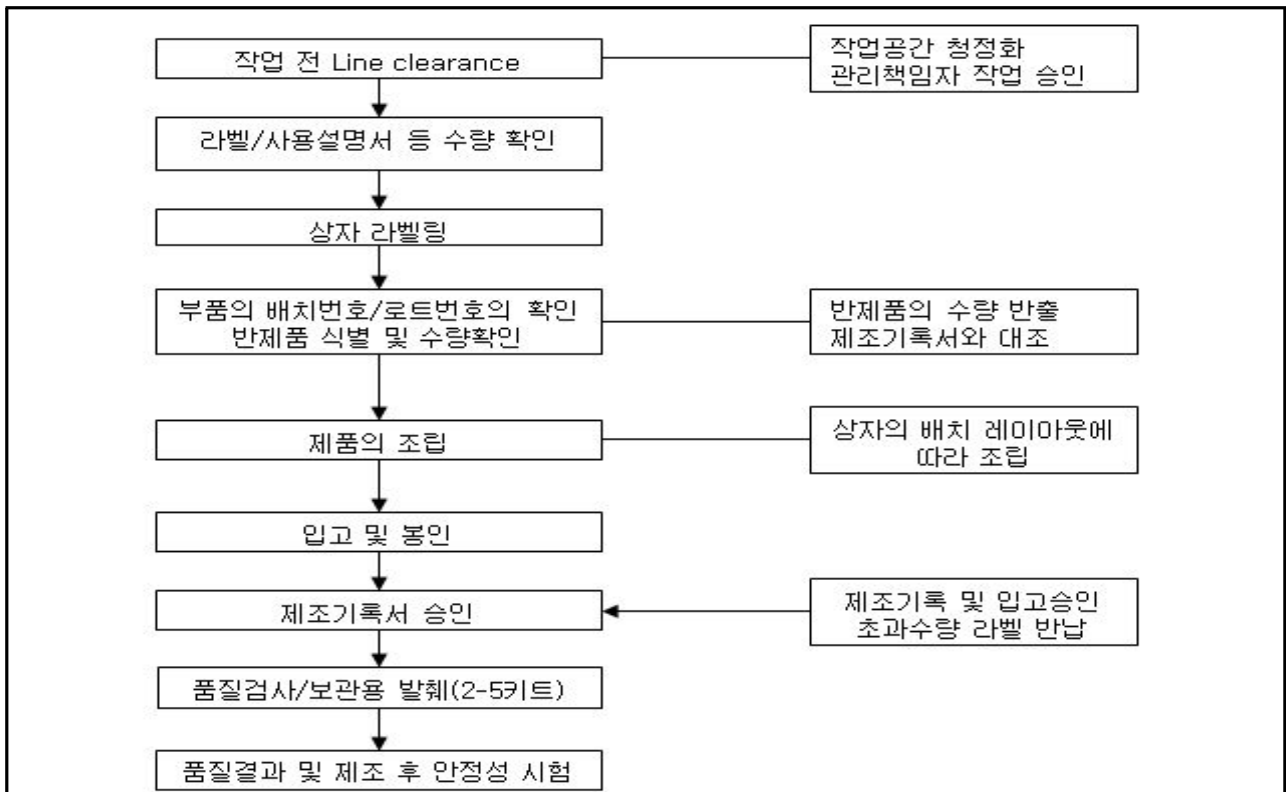
7. 발색제 (TMB Substrate)

제조사로부터 구입하여 플라스틱 용기에 주입하고 밀봉하여 제조한다.

8. 반응정지액 제조(Stop Solution)

0.5M H₂SO₄을 제조하여 플라스틱 용기에 주입하고 밀봉하여 제조한다.

9. 제품의 조립 (Packaging)



③ 첨부 3

1. 시약의 준비

1) 1X 세척액 (1X Washing solution)

20ml의 10X 세척액을 180ml의 증류수와 혼합하여 사용합니다.

2) 발색제(TMB)

발색제는 사용 전 실내온도 적응시킨 후 사용하십시오.

2. 시료(Sample)의 준비

1) 시료는 비동화 또는 비동화 하지 않은 혈청을 사용 하며 ,검사 전 까지 -20℃ 냉동고에 서 시료를 보관 하십시오.

2) 검사기록지에 아래의 예시와 같이 시료내역을 기록하십시오.

3) 혈청희석용 Deep-well-plate (1ml DWP)의 각 well에 희석액을 1ml씩 분주합니다.

4) 혈청희석용 DWP의 well에 가검혈청을 1 μ l씩 분주 하십시오.

3. 검사 순서

1) AIV, NDV, IBV 항원흡착 Plate를 실온에 적응시킨 후 포장백에서 꺼내 준비된 혈청희석용 DWP와 동일하게 표시 하십시오.

2) 500배 희석된 가검혈청과 원액의 양성대조, 음성 대조를 각각 100 μ l씩 AIV, NDV,

IBV Antigen Coated Plate에 분주하십시오.

- 3) 실온(22°C-27°C)에서 30분 반응시키십시오.
- 4) 플레이트를 털어버리고 1X세척액 300 μ l를 모든 well에 분주한 후 바로 털어 버리는 방법으로 세척을 실시하되 이 과정을 3회 반복합니다.
- 5) 마지막으로 세척액을 제거한 뒤 plate를 거꾸로 들고 paper towel에 수 차례 쳐서 남아 있는 용액을 제거하십시오.
- 6) HRPO anti-Chicken IgG conjugate를 100 μ l씩 분주하고 실온 (22°C-27°C)에서 30분 반응시킵니다.
- 7) 반응이 끝난 Plate는 위의 4-5)의 방법과 동일하게 세척하십시오.
- 8) 발색제(TMB)을 100 μ l씩 분주하십시오.
- 9) 15분 후 정지액을 50 μ l씩 첨가하여 반응을 중지시킵니다.
- 10) ELISA Reader 450nm에서 흡광도(OD₄₅₀)를 측정 하십시오.

4. 결과해석

4-1. AIV Ab

1) 유효성 평가 (validation)

양성대조 (PC)의 평균 O.D는 0.35이상

음성대조 (NC)의 평균 O.D는 0.20이하

2) 결과판정 (Interpretation)

SP ratio 산출 (S/P)

$$S/P = \frac{\text{시료평균OD} - \text{음성대조 평균OD}}{\text{양성대조 평균OD} - \text{음성대조 평균OD}}$$

결과 판정.

S/P	< 0.50	≥ 0.50
결과 판정	음성	양 성

4-2. NDV Ab

1) 유효성 평가 (validation)

양성대조 (PC)의 평균 O.D는 0.4이상

음성대조 (NC)의 평균 O.D는 0.2이하

2) 결과판정 (Interpretation)

SP ratio 산출 (S/P)

$$S/P = \frac{\text{시료평균OD} - \text{음성대조 평균OD}}{\text{양성대조 평균OD} - \text{음성대조 평균OD}}$$

결과 판정.

S/P	< 0.20	≥ 0.20
-----	--------	--------

결과 판정

음성

양성

4-3. IBV Ab

1) 유효성 평가 (validation)

양성대조 (PC)의 평균 O.D는 0.35이상

음성대조 (NC)의 평균 O.D는 0.2이하

2) 결과판정 (Interpretation)

SP ratio 산출 (S/P)

$$S/P = \frac{\text{시료평균OD} - \text{음성대조 평균OD}}{\text{양성대조 평균OD} - \text{음성대조 평균OD}}$$

결과 판정.

S/P	< 0.30	≥ 0.30
결과 판정	음성	양성

첨부3. 사용자 설명서

VDPPro[®] 닭인플루엔자-뉴캐슬-전염성기관지염 바이러스 항체 Triple ELISA (VDPPro[®] AIV-NDV-IBV Ab Triple ELISA) Cat. No. AIV-NDV-IBV-AB

- 1. 재품의 구성**

	96T	192T	
1) AIV 항원흡착 플레이트 (AIV Antigen coated plate)	1plate	2plate	
2) NDV 항원흡착 플레이트 (NDV Antigen coated plate)	1plate	2plate	
3) IBV 항원흡착 플레이트 (IBV Antigen coated plate)	1plate	2plate	
4) 반응 플레이트 (Reaction Plate)	1plate	1plate	
5) 희석액 (Dilution Buffer)	200ml x 1	200ml x 2	
6) 10X 세척액 (10X Washing Buffer)	100ml x 1	100ml x 2	
7) 양성대조(Positive control)			
A. AIV용	1ml x 1	2ml x 1	
B. NDV용	1ml x 1	2ml x 1	
C. IBV용	1ml x 1	2ml x 1	
8) 음성대조(Negative control)			
A. AIV용	1ml x 1	2ml x 1	
B. NDV용	1ml x 1	2ml x 1	
C. IBV용	1ml x 1	2ml x 1	
9) HRPO Anti-Chicken IgG Conjugate	50ml x 1	50ml x 2	
10) 발색제 (TMB Substrate)	60ml x 1	60ml x 2	
11) 정지액 (Stop Solution)	30ml x 1	30ml x 2	
- 2. 사용 전 실온에 적응시킨 후 사용하십시오.**
 - 사용 후 남은 플레이트는 지퍼백에 다시 밀봉하여 보관하면서 사용 할 수 있으나 가급적 빠른 시간 내에 사용하십시오.
 - 제조번호가 다른 제품은 서로 혼합하여 사용하지 않습니다.
 - 시약은 피부, 점막에 닿지 않도록 유의하십시오.
- 3. 시약의 준비**
 - 1X 세척액(1X Washing Buffer)
20ml의 10X 세척액을 180ml의 증류수와 혼합하여 사용합니다.(Plate 1정당 약 200ml이 소요됨)
 - 발색제(TMB)
발색제는 사용 전 실온에 적응시킨 후 사용하십시오.(Plate 1정당 약 10ml이 소요됨)
- 4. 시료의 준비**
 - 시료는 비동화 또는 비동화 하지 않은 열정물 사용하며, 검사 전 까지 -20℃ 냉동고에서 시료를 보관하십시오.
- 5. Plate의 준비**
 - 반응 플레이트 위에 감출하고자 하는 항원 플레이트 well을 고정하여 사용한다.
(예시)

※ 유의사항
양성대조(Positive control, PC)와 음성대조 (Negative control, NC)는 희석하지 마십시오.

	AIV	NDV	IBV	AIV	NDV	IBV	AIV	NDV	IBV	AIV	NDV	IBV
A	1	1	1	2	2	2	17	17	17	26	26	26
B	2	2	2	10	10	10	18	18	18	27	27	27
C	3	3	3	11	11	11	19	19	19	27	27	27
D	4	4	4	12	12	12	20	20	20	26	26	26
E	5	5	5	13	13	13	21	21	21	PC	PC	PC
F	6	6	6	14	14	14	22	22	22	PC	PC	PC
G	7	7	7	15	15	15	23	23	23	NC	NC	NC
H	8	8	8	16	16	16	24	24	24	NC	NC	NC

※ Well 8번(단독)은 blank가 가능합니다.

- 3. 키트 사용시 주의사항**
 - 제품은 4℃ 냉장소에서 보관하십시오.

7. 검사 순서

- 1) AV, NDV, IBV 항원 흡착 플레이트에서 well 단위로 꺼내어 반응 플레이트에 고정된 후 각 well 위에 코팅 항원을 표시 하고(역시 참조) 실온에 적응 시킵니다.
- 2) 500배 희석된 가검물과 원액의 양성대조, 음성대조를 각각 100 µl씩 AV, NDV, IBV Antigen Coated Plate에 동시에 각각 분주하십시오(1-well 혹은 2-well 검사를 할 수 있습니다).
- 3) 실온(22°C-27°C)에서 30분 반응시키십시오.
- 4) 플레이트를 털어버리고 1X 세척액 300µl을 모든 well에 분주한 후 비록 털어 버리는 방법으로 세척을 실시하되 이 과정을 3회 반복합니다.
- 5) 마지막으로 세척액을 제거한 뒤 plate를 기구로 들고 paper towel에 수 차례 쳐서 남아 있는 용액을 제거하십시오.
- 6) HRPO anti-Chicken IgG conjugate를 300µl씩 분주하고 실온(22°C-27°C)에서 30분 반응시키십시오.
- 7) 반응이 끝난 plate는 위의 4-5)의 방법과 동일하게 세척하십시오.
- 8) 발색제(TMB)를 100µl씩 분주하십시오.
- 9) 15분 후 정지액을 50µl씩 첨가하여 반응을 중지시킵니다.
- 10) ELISA Reader 450nm에서 흡광도(OD₄₅₀)를 측정하십시오.

▶ 검사 시 유의사항

- 가검물용 시료마다 반드시 Tip을 교환하여 사용하여 교차오염을 방지할 수 있습니다.
- 발색제 첨가 후 15분 이내로 판독하여야 하며 발색이 없는 경우 30분까지 반응시간을 연장할 수 있습니다.



8. 결과 해석

8-1. AV

- 1) 유효성 평가(Validation)
 - 양성대조(PC)의 평균 OD 는 0.350이상
 - 음성대조(NC)의 평균 OD 는 0.20이하
- 2) 결과판정(Interpretation)
 - SP ratio 산출 (S/P)

$$S/P = \frac{\text{시료평균OD} - \text{음성대조 평균OD}}{\text{양성대조 평균OD} - \text{음성대조 평균OD}}$$

결과 판정

S/P	<0.50	≥0.50
결과 판정	음성	양성

ELISA 역가(ELISA titer)계산
1/500으로 희석된 시료의 역가 계산식(Log titer)
 $\text{Log titer} = 1/50 \times \text{Log}(S/P) + 3.07$

Log titer는 AV에 대한 ELISA 항체역가를 말하며 비의 높은 상관관계를 나타내지만 동일한 역가를 나타내는 것은 아님.

8-2. NDV

- 1) 유효성 평가(Validation)
 - 양성대조(PC)의 평균 OD 는 0.4이상
 - 음성대조(NC)의 평균 OD 는 0.2이하
- 2) 결과판정(Interpretation)
 - SP ratio 산출 (S/P)

$$S/P = \frac{\text{시료평균OD} - \text{음성대조 평균OD}}{\text{양성대조 평균OD} - \text{음성대조 평균OD}}$$

결과 판정

S/P	<0.20	≥0.20
결과 판정	음성	양성

ELISA 역가(ELISA titer)계산
1/500으로 희석된 시료의 역가 계산식(Log titer)
 $\text{Log titer} = 1/50 \times \text{Log}(S/P) + 3.56$

Log titer는 NDV에 대한 ELISA 항체역가를 말하며 열구충집적제반응(비)과 높은 상관관계를 나타내지만 동일한 역가를 나타내는 것은 아님.

8-3. IBV

- 1) 유효성 평가(Validation)
 - 양성대조(PC)의 평균 OD 는 0.350이상
 - 음성대조(NC)의 평균 OD 는 0.20이하

2) 결과판정(Interpretation)

SP ratio 산출 (S/P)

$$S/P = \frac{\text{시료평균OD} - \text{음성대조 평균OD}}{\text{양성대조 평균OD} - \text{음성대조 평균OD}}$$

결과 판정

S/P	<0.30	≥0.30
결과 판정	음성	양성

ELISA 역가(ELISA titer)계산
1/500으로 희석된 시료의 역가 계산식(Log titer)
 $\text{Log titer} = 1.00 \times \text{Log}(S/P) + 3.46$
Log titer는 IBV에 대한 ELISA 항체역가를 말하며 비의 높은 상관관계를 나타내지만 동일한 역가를 나타내는 것은 아님.

기술지원 및 문의

유료기간 내 정품은 고객센터를 통하여
질문해주시거나 기술자원을 요청하실 수 있습니다.

문의처: (주) 메디안 디노스틱스 유통관리
200-583 경희도 춘천시 거두동 1길 41
전화 033 244 0100, 팩스 033 244 4634
median@mediansdiagnostics.com

4. AIV 백신 항체 감별진단 키트

가. AIV 백신 항체 감별진단 키트의 시제품 제작

(1) AIV NS1 Ab ELISA 키트의 시제품 제작

① AIV 항원 개발

▶ AIV NS-1 recombinant 항원 개발

마이크로 웰에 흡착할 항원을 선별하기 위해 AIV NS-1 TC1,TC2,TC3,TC4,TC5,TC6,TC7 항원을 사용하였다. NS-1 gene을 33a.a 단위로 truncation 하여서 항원을 제조 하였고 제조과정은 다음과 같이 수행하였다.

1) Template DNA 추출

AIV 감염 혈청으로부터 RNA isolation 하여 template RNA 를 입수하였다.

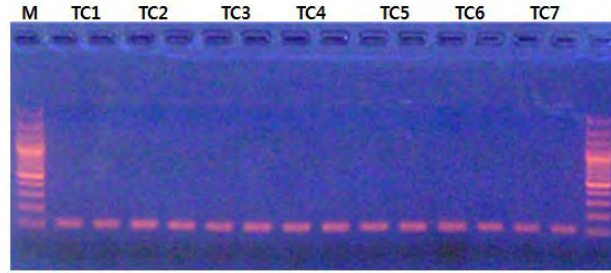
2) PCR 및 발현벡터 제조

AIV NS-1 항원을 encoding 하는 유전자는 NS-1 을 주형으로 하여 RT- PCR을 수행하여 획득하였다. PCR을 수행하기위해 다음의 Oligonucleotide primer는 유전자은행 (Accession No: HM212771, GU186527, GU051524)에서 정보를 얻어 작성하였다. (표 4-11)

표4. Oligonucleotide primers used in this study

GGA TCC ATG GAT TCC AAC ACT GTG	AIV NS-1 TC1 F
GTC GAC TTA AAG GAA TGG GGC ATC ACC	AIV NS-1 TC1 R
GGA TCC GAC CGG CTT CGC CGA GAT	AIV NS-1 TC2 F
GTC GAC TTA CTC CAC TAT CTG CTT TCC	AIV NS-1 TC2 R
GGA TCC CGG ATT CTG GAG GAA GAA	AIV NS-1 TC3 F
GTC GAC TTA TGA CAT TTC TTC GAG AGT	AIV NS-1 TC3 R
GGA TCC AGG GAC TGG TTC ATG CTC	AIV NS-1 TC4 F
GTC GAC TTA TGC TTT CAA TAT GAT GTT	AIV NS-1 TC4 R
GGA TCC AAC TTC AGT GTG ATT TTC	AIV NS-1 TC5 F
GTC GAC TTA AGA AGG TAA CGG TGA GAT	AIV NS-1 TC5 R
GGA TCC CTT CCA GGA CAT ACT GAT	AIV NS-1 TC6 F
GTC GAC TTA TAG AGT TTC AGA GAC TCG	AIV NS-1 TC6 R
GGA TCC CAG AGA TTC GCT TGG AGA	AIV NS-1 TC7 F
GTC GAC TTA AAC TTC TGA CTC AAT TGT	AIV NS-1 TC7 R

항원의 증폭 thermocycle (mycycler ; BioRad) 은 (42°C 30 분)x 1 cycle,(94°C, 5 분 x 1 cycle, (94°C, 1분, 45°C, 1분, 72°C, 1분) x 28 cycles, (94°C, 1분 60°C, 1분 72°C, 10 분) x 1 cycle, 4°C, 16시간으로 사용하였다. PCR반응이 완전히 끝난 후 , 1.5%의 agarose gel을 만들어 PCR product 1ul를 전기 영동하여 항원의 size 를 확인하고 Gene clean Kit (MP biochemical, #1101-400, France) 를 사용하여 증폭된 DNA NS-1 TC1,2,3,4,5,6,7 를 추출하였다.



Lane M: Marker Lane TC3: 102bp Lane TC6: 102bp
 Lane TC1: 102bp Lane TC4: 102bp Lane TC7: 99bp
 Lane TC2: 102bp Lane TC5: 102bp

그림 19. PCR products of NS-1 TC1,2,3,4,5,6,7 from AIV NS-1 gene

DNA의 확인은 작업의 효율과 정확성을 기하기 위하여 전문업체 (Jenotech, Korea)에 DNA sequencing을 의뢰하였고, 추출한 DNA가 NS 유전자임을 확인하였다(그림 20).

<p>Translation Map NS-1 TC1</p> <p>1 M D S N T V S S F Q V D C F L W H V R K</p> <p>1 ATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGACTGCTTCTTTGGCATGTCCGCAAA</p> <p>21 R F A D Q E L G D A P F L *</p> <p>61 CGATTTGCAGACCAAGAAGCTGGGTGATGCCCATTCCTTTAA</p>
<p>Translation Map NS-1 TC2</p> <p>1 D R L R R D Q K S L R G R G S T L G L D</p> <p>1 gaccggcttcgccgagatcagaaatcttaagaggaagaggcagcactcttggtctggac</p> <p>21 I E T A T R A G K Q I V E *</p> <p>61 atcgaacagccactcgtgctggaaagcagatagtgaggtaa</p>
<p>Translation Map NS-1 TC3</p> <p>1 R I L E E E S D E A L K M T I A S V P A</p> <p>1 CGGATTCTGGAGGAAGAATCCGATGAGGCACCTAAAATGACTATTGCTTCTGTGCCTGCT</p> <p>21 S R Y L T G M T L E E M S *</p> <p>61 TCACGCTACTTAAGTGGCATGACTCTCGAAGAAATGTCATAA</p>
<p>Translation Map NS-1 TC4</p> <p>1 R D W F M L M P K Q K V A G S L C I R M</p> <p>1 AGGGACTGGTTCATGCTCATGCCAAGCAGAAAAGTGGCAGGTTCCCTTTGTATCAGAATG</p> <p>21 D Q A I M D K N I I L K A *</p> <p>61 GACCAGGCAATAATGGATAAAAACATCATATTGAAAGCATAA</p>
<p>Translation Map NS-1 TC5</p> <p>1 N F S V I F D R L E T L I L L R A F T E</p> <p>1 AACTTCAGTGTGATTTTCGACCGGCTGGAAACCCTAATACTACTCAGAGCTTTCACAGAA</p> <p>21 E G A I V G E I S P L P S *</p> <p>61 GAAGGAGCAATTGTGGGCGAAATCTCACCGTTACCTTCTTAA</p>
<p>Translation Map NS-1 TC6</p> <p>1 L P G H T D E D V K N A I G V L I G G L</p> <p>1 CTTCCAGGACATACTGATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTCCCTCATCGGAGGACTT</p> <p>21 E W N D N T V R V S E T L *</p> <p>61 GAATGGAATGATAACACAGTTCGAGTCTTGAAACTCTATAA</p>
<p>Translation Map NS-1 TC7</p> <p>1 Q R F A W R S S N E D G R P P L P P K Q</p> <p>1 CAGAGATTCGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGGATGGGAGACCTCCACTCCCTCCAAAGCAG</p> <p>21 K R K M A R T I E S E V *</p> <p>61 AAACGGAAAATGGCGAGAACAATTGAGTCAGAAGTTTAA</p>

그림 20. Nucleotide sequence of cloned NS-1 TC1,2,3,4,5,6,7 gene. The deduced amino acid sequence is given next to the nucleotide sequence for the cloned NS-1

TC1,2,3,4,5,6,7

NS-1 TC1,2,3,4,5,6,7을 위하여 대장균 발현 벡터인 pGS vector(BIONOTE Inc., Korea)도 primer 의 linker site인 BamH I(NEB, #R0136S, USA), SalI(NEB, #R0138S, USA)으로 절단하고, BamH agarose gel에 전기 영동하여 Gene Clean Kit (MP biochemical, #1101-400, France)를 이용해 추출해 놓았다.

T4 DNA ligase(Roche, 10481220001, Germany)를 이용해 증폭해서 추출한 insert와 벡터를 16°C O/N ligation 시키고 competent cell (Top10F')에 형질전환 시켰다. 형질전환은 heat-shock법을 이용하였으며, -70°C에 보관된 competent cell을 꺼내 ice위에서 해동시킨 후 ligate 5ul를 넣고 약 3초간 조심스럽게 혼합한 후 얼음에서 30분간 정치시켰다. 반응물이 혼합된 competent cell의 tube를 42°C의 항온수조에 90 초간 정치시킨 후 heat shock을 주고 즉시 얼음에 넣어 주었다. LB 액체 배지를 1 ml 넣어주어 37°C, 2시간 incubation을 시킨 후 selection marker로 항생제 암피실린이 포함된 LB agar plate에 100 ul의 균액을 도말하고 O/N, 37°C 조건으로 배양하였다.

LB agar plate에 자란 colony를 액체 LB 배지에 접종하여 cell이 자랐을 때 Wizard Plus SV Minipreps Kit (Promega, #A1460, USA)를 이용해서 DNA를 추출하고, 추출한 DNA를 BamHI(NEB, #R0136S, USA), Sal I(NEB, #R0138S, USA)으로 절단하고 전기 영동하여 vector에 각 항원 insert가 ligation 되었는지를 확인하였다.

3) Transformation

NS-1 TC1,2,3,4,5,6,7 유전자가 ligation 된 cell에서 추출한 DNA를 대장균 발현용 균주인 BL21에 형질 전환시켜서 NS-1 TC1,2,3,4,5,6,7 항원을 발현하는 대장균을 얻었다.

유전자 재조합 NS-1 TC1,2,3,4,5,6,7 항원을 발현하는 대장균 균주를 삼각 플라스크에 넣어 18시간이상 진탕 배양하였다. 배양된 균주를 발효기에 접종하여 37°C에서 약 2시간 배양하고 균주가 증식하여 600 nm에서 흡광도 값이 약 1.0내외가 될 때까지 배양하였다. 균주가 흡광도 1.0 내외로 증식하였을 경우 IPTG를 2.5mM 되도록 첨가하여 추가로 약 5시간을 배양한 후 배양된 균주액을 회수하여 원심방법으로 균체를 회수하여 SDS-PAGE와 western blot을 수행하여 발현된 유전자재조합항원 (NS-1 TC1,2,3,4,5,6,7 : 19kDa)을 확인하였다(그림21).

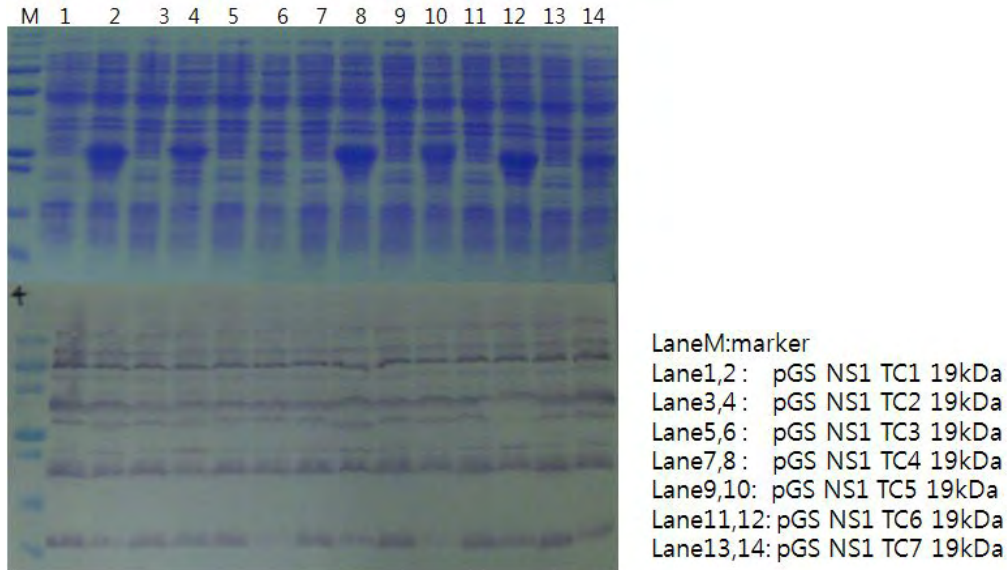


그림 21. Western blotting analysis of cells expressing NS-1 TC1,2,3,4,5,6,7

4) 유전자재조합 항원의 정제

유전자 재조합 NS-1 TC1,2,3,4,5,6,7항원을 발현하는 대장균 균주를 배양하여 회수한 균체를 초음파 파쇄기(VCX750 ; Sonics&materials)로 처리하여 파쇄하고 8,000rpm, 20분 4°C로 원심분리(VS24SMTi ; vision science)하여 침전을 회수하였다. 항원이 함유된 침전을 6M guanidine용액으로 용해하였다. DEAE-sepharose gel을 이용하여 Ion exchange chromatography 방법으로 항원을 정제하였다. 즉 용해된 Inclusion body 용액을 6M guanidine용액으로 평형된 gel에 반응시키고 NaCl gradient를 실시하여 각 fraction들을 SDS-PAGE방법으로 분석하여 유전자 재조합 NS-1 TC1,2,3,4,5,6,7 항원이 함유된 fraction만을 선별하였다. 선별한 항원은 BCA법 (Pierce, USA)으로 정량하여 사용하였다.

5) 항원의 선별

후보군 유전자 재조합 NS-1 TC1,2,3,4,5,6,7을 플레이트에 각각 2µg/mL로 코팅시킨 후, AIV NS1 양성 혈청 (Positive control)과 SPF chicken serum(Negative control)을 이용한 ELISA를 수행하였다. 그 결과 같은 조건에서 AIV NS1 양성혈청에 대한 흡광도값과 SPF chicken serum에 대한 흡광도값 차이가 가장 뚜렷하게 구분되는 항원 NS-1 TC를 선별하였다.

▶ Raw data

검체	검체 희석배율	coating Ag (AIV NS1)						
		TC1	TC2	TC3	TC4	TC5	TC6	TC7
PC (AIV NS1 양성혈청)	125X	0.431	0.363	0.806	0.160	1.457	0.286	0.206
	250X	0.285	0.227	0.560	0.095	0.935	0.181	0.136
	500X	0.264	0.151	0.374	0.105	0.667	0.105	0.093
NC (Chicken serum)	125X	0.052	0.027	0.083	0.038	0.172	0.029	0.027
	250X	0.030	0.017	0.047	0.030	0.101	0.021	0.025
	500X	0.033	0.015	0.031	0.157	0.055	0.016	0.015

② AIV NS1 Ab ELISA 키트의 최적화

플레이트의 종류와 재조합항원의 코팅농도 및 용액들의 반응 온도 및 반응시간이 최적화 실험을 위해 아래와 같이 채택되었다.

플레이트에 재조합항원 AIV NS1 TC5을 2 μ g/mL로 코팅시킨 후, 검사하고자 하는 혈청(검체)을 희석액으로 1/100배로 희석하여 well에 100 μ L씩 주입하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시킨다. well 안의 용액을 모두 제거한 후 세척액으로 세척과정을 거쳐 well에 흡착된 항원과 반응하지 않은 희석된 혈청의 잔여를 제거한다. Horseradish-peroxidase를 접합된 이차항체인 goat anti-Chicken IgY-HRP conjugate를 0.1 μ g/mL의 농도로 100 μ L씩 주입하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시킨다. 앞의 세척과정을 반복하여 well표면의 반응하지 않고 남아있는 goat anti-Chicken IgY-HRP conjugate를 제거시킨다. 기질액 (substrate; TMB)를 주입하여 실온에서 15분 동안 반응시킨 후 2M의 황산용액을 주입하여 효소반응을 정지한다.

(2) AIV 백신 항체 감별진단 키트 시제품의 구성품



- 유전자재조합 AIV NS1 항원흡착 플레이트 5장
- 검체희석액 1병 (250 mL)
- 20배 농축세척액 1병 (250 mL)
- 음성 대조액 1병 (1.5 mL)
- 양성 대조액 1병 (1.5 mL)
- 접합체액 1병 (60 mL)
- 기질액 1병 (60 mL)
- 반응정지액 1병 (60 mL)

나. AIV 백신 항체 감별진단 키트시제품에 대한 실험실 내 효능 시험 및 야외 임상시험

(1) AIV NS1 Ab ELISA 키트 시제품의 실험실 내 효능 시험

① 민감도 및 특이도 시험

▶ AIV 백신 접종 전과 접종 2주 후, 접종 4주 후의 SPF 닭혈청의 AIV NS1 Ab ELISA 키트의 검사 결과와 HI test의 결과의 비교를 통해 개발한 키트의 효능을 확인하고자 하였고 그 결과 AIV 백신 접종 전/후 모든 검체에서 AIV NS1 Ab ELISA와 HI결과 모두 음성임을 확인하였다.

	sample	HI	AIV NS1 Ab ELISA		Results
			O.D	S/P	
접종 전	접종전-1	0	0.116	0.14	-
	접종전-2	0	0.075	0.05	-
	접종전-3	0	0.130	0.17	-
	접종전-4	0	0.057	0.01	-
	접종전-5	0	0.057	0.01	-
	접종전-6	0	0.073	0.05	-
	접종전-7	0	0.070	0.04	-
	접종전-8	0	0.087	0.08	-
	접종전-9	0	0.083	0.07	-
	접종전-10	0	0.072	0.05	-
	접종전-11	0	0.069	0.04	-
	접종전-12	0	0.084	0.07	-
	접종전-13	0	0.032	-0.04	-
	접종전-14	0	0.074	0.05	-
	접종전-15	0	0.114	0.14	-
	접종전-16	0	0.086	0.08	-
	접종전-17	0	0.047	-0.01	-
	접종전-18	0	0.061	0.02	-
	접종전-19	0	0.062	0.03	-
	접종전-20	0	0.030	-0.04	-
	접종전-21	0	0.049	0.00	-
	접종전-22	0	0.112	0.13	-
	접종전-23	0	0.062	0.03	-
	접종전-24	0	0.031	-0.04	-
접종 2주후	1mL접종-1	7	0.100	0.11	-
	1mL접종-2	1	0.099	0.10	-
	1mL접종-3	7	0.135	0.28	-
	1mL접종-4	9	0.136	0.28	-
	1mL접종-5	7	0.125	0.16	-
	1mL접종-6	9	0.128	0.17	-
	1mL접종-7	7	0.116	0.14	-
	1mL접종-9	6	0.073	0.05	-
	1mL접종-10	5	0.065	0.03	-
	1mL접종-11	8	0.195	0.31	-
	1mL접종-12	8	0.123	0.16	-
	0.5mL접종-1	7	0.096	0.10	-
	0.5mL접종-2	7	0.109	0.13	-
	0.5mL접종-3	nt	0.083	0.07	-
0.5mL접종-4	9	0.103	0.11	-	
접종 4주후	1mL접종-1	10	0.113	0.13	-
	1mL접종-2	10	0.089	0.08	-
	1mL접종-3	10	0.101	0.11	-
	1mL접종-4	9	0.121	0.15	-
	1mL접종-5	10	0.099	0.10	-
	1mL접종-6	10	0.081	0.07	-
	1mL접종-7	10	0.079	0.06	-
	1mL접종-8	9	0.129	0.17	-
	1mL접종-9	10	0.115	0.14	-
	1mL접종-10	9	0.073	0.05	-
	1mL접종-11	9	0.068	0.04	-
	1mL접종-12	9	0.072	0.05	-
	1mL접종-13	10	0.081	0.07	-
	1mL접종-14	10	0.086	0.08	-
	1mL접종-15	10	0.091	0.09	-
	1mL접종-16	9	0.104	0.11	-
	1mL접종-17	9	0.066	0.03	-
	1mL접종-18	10	0.108	0.12	-
	1mL접종-19	9	0.062	0.03	-
	1mL접종-20	8	0.080	0.06	-
	1mL접종-21	11	0.115	0.14	-
	1mL접종-22	11	0.100	0.11	-
	1mL접종-23	9	0.133	0.18	-
	1mL접종-24	9	0.126	0.16	-
0.5mL접종-1	9	0.093	0.09	-	
0.5mL접종-2	10	0.081	0.07	-	
0.5mL접종-3	9	0.126	0.16	-	
0.5mL접종-4	10	0.065	0.03	-	

0.5mL접종-5	9	0.091	0.09	-
0.5mL접종-6	11	0.111	0.13	-
0.5mL접종-7	12	0.092	0.09	-
0.5mL접종-8	10	0.135	0.18	-
0.5mL접종-9	9	0.080	0.06	-
0.5mL접종-10	9	0.093	0.09	-

② SPF 닭의 주령별 항혈청에 대한 민감도 및 특이도 시험

▶ AIV NS1 Ab ELISA 키트의 성능을 판단하고자 SPF닭의 주령별 challenge 실험을 진행하였다.

▶ 그룹 1 군은 6주령 닭에 AIV 오일 백신을 접종 후 2주 후에 AIV 공격접종을 하였고 공격접종 5일 후 채혈을 진행하였다.

▶ 그룹 2 군은 6주령 닭에 AIV 오일백신을 접종 후 4주 후에 AIV 공격접종을 하였고 공격접종 1주 후와 2주 후에 채혈을 진행 하였다.

▶ 그룹 3 군은 3주령 닭에 AIV 공격접종 후 3주 후 채혈을 진행하였다.

▶ 그 결과 그룹1, 2에서는 이는 SPF 닭의 AIV 감염개체에서는 NS1 에 대한 항체 titer 가 아직 충분하지 않아 AIV NS1 Ab ELISA 키트로 검출이 되지 않은 것으로 사료된다. 따라서 공격 접종 후 3주 이상의 전 연령개체에 대한 민감도 비교 및 8주령 이상의 고 연령 개체의 특이도 평가가 추가로 필요할 것으로 판단된다.

그룹	구분	검체	AIV Ab ELISA			AIV NS1 Ab ELISA			HI test (2 ⁿ)
			O.D	PI	result	O.D	S/P	result	
그룹 1	AIV오일백신 접종 2주후	1	0.0470	98.08	+	0.0200	0.03	-	6 : 4ea 7 : 5ea
		2	0.0840	96.57	+	0.0090	0.01	-	
		3	0.1630	93.34	+	0.0260	0.04	-	
		4	0.0630	97.43	+	0.0250	0.04	-	
		5	0.1350	94.48	+	0.0120	0.01	-	
		6	0.0190	99.22	+	0.0120	0.01	-	
		7	0.0060	99.75	+	0.0130	0.02	-	
		8	0.0930	96.20	+	0.0100	0.01	-	
		9	0.0250	98.98	+	0.0060	0.00	-	
	AIV오일백신 접종 2주후 에 대한 control (백신접종 및 공격접종 안함)	1	2.3700	3.15	-	0.0420	0.07	-	0 : 6ea 1 : 3ea
		2	2.5390	-3.76	-	0.0120	0.01	-	
		3	2.4860	-1.59	-	0.0160	0.02	-	
		4	2.6790	-9.48	-	0.0300	0.05	-	
		5	2.5530	-4.33	-	0.0120	0.01	-	
		6	2.3370	4.50	-	0.0240	0.04	-	
		7	1.4950	38.90	-	0.0200	0.03	-	
		8	2.5630	-4.74	-	0.0460	0.07	-	
		9	2.6090	-6.62	-	0.0160	0.02	-	
	AIV오일백신 접종 2주후 AIV 공격 5일 후	1	0.0020	99.92	+	0.0120	0.01	-	6 : 3ea 7 : 6ea
		2	0.0140	99.43	+	0.0110	0.01	-	
		3	0.0890	96.36	+	0.0320	0.05	-	
		4	0.1240	94.93	+	0.0100	0.01	-	
		5	0.0430	98.24	+	0.0120	0.01	-	
		6	0.0080	99.67	+	0.0230	0.03	-	
		7	0.0030	99.88	+	0.0140	0.02	-	
		8	0.0100	99.59	+	0.0320	0.05	-	
		9	0.0040	99.84	+	0.0080	0.01	-	
control AIV 공격접종 5일후	1	2.3150	5.39	-	0.0190	0.03	-	0 : 6ea 1 : 2ea 2 : 1ea	
	2	0.9590	60.81	+	0.0380	0.06	-		
	3	2.5450	-4.00	-	0.0260	0.04	-		
	4	2.4370	0.41	-	0.0180	0.02	-		
	5	2.5020	-2.25	-	0.0250	0.04	-		
	6	1.6870	31.06	-	0.0210	0.03	-		
	7	2.1040	14.02	-	0.0530	0.09	-		
	8	2.4720	-1.02	-	0.0150	0.02	-		
	9	1.4080	42.46	-	0.0170	0.02	-		
그룹 2	AIV오일백신	1	0.0110	99.55	+	0.0180	0.02	-	

	접종 4주후	2	0.0550	97.75	+	0.0120	0.01	-	7 : 2ea
		3	0.0050	99.80	+	0.0200	0.03	-	8 : 3ea
		4	0.0060	99.75	+	0.0300	0.05	-	9 : 4ea
		5	0.0060	99.75	+	0.0370	0.06	-	11 : 1ea
		6	0.0060	99.75	+	0.0290	0.04	-	
		7	0.0150	99.39	+	0.0270	0.04	-	
		8	0.0070	99.71	+	0.0260	0.04	-	
		9	0.0110	99.55	+	0.0260	0.04	-	
		10	0.0080	99.67	+	0.0790	0.13	-	
	AIV오일백신 접종 4주후 에 대한 control (백신접종 및 공격접종 안함)	1	2.6470	-8.17	-	0.0900	0.15	-	
		2	2.5400	-3.80	-	0.0570	0.09	-	0 : 8ea
		3	2.5330	-3.51	-	0.0150	0.02	-	1 : 2ea
		4	2.5300	-3.39	-	0.0220	0.03	-	
		6	2.5550	-4.41	-	0.1150	0.20	-	
		7	2.6190	-7.03	-	0.0410	0.07	-	
		8	2.6450	-8.09	-	0.0340	0.05	-	
		9	2.6740	-3.48	-	0.0320	0.04	-	
		10	2.7100	-4.88	-	0.0530	0.07	-	
	AIV오일백신 접종 4주후 AIV 공격 7일 후	1	0.0070	99.73	+	0.0410	0.05	-	
		2	0.0270	98.96	+	0.0110	0.01	-	7 : 1ea
		3	0.0070	99.73	+	0.0420	0.05	-	8 : 1ea
		4	0.0040	99.85	+	0.0380	0.05	-	9 : 3ea
		5	0.0300	98.84	+	0.0350	0.04	-	10 : 3ea
		6	0.0030	99.88	+	0.0270	0.03	-	11 : 2ea
		7	0.0270	98.96	+	0.0250	0.03	-	
		8	0.0070	99.73	+	0.0460	0.06	-	
		9	0.0060	99.77	+	0.0290	0.03	-	
		10	0.0080	99.69	+	0.0670	0.09	-	
	control AIV 공격 7일 후	2	0.1110	95.70	+	0.0800	0.11	-	
		3	0.2180	91.56	+	0.0150	0.01	-	3 : 1ea
		4	0.0800	96.90	+	0.0540	0.07	-	4 : 4ea
		5	0.0570	97.79	+	0.0750	0.11	-	5 : 3ea
		6	0.0670	97.41	+	0.0820	0.12	-	6 : 1ea
		7	0.0560	97.83	+	0.0490	0.07	-	7 : 1ea
		8	0.1310	94.93	+	0.0460	0.06	-	
		9	0.0250	99.03	+	0.0310	0.04	-	
		10	0.2350	90.91	+	0.0600	0.08	-	
	AIV오일백신 접종 4주후 AIV 공격 14일 후	1	0.0040	99.85	+	0.0350	0.04	-	
		2	0.0060	99.77	+	0.0690	0.10	-	7 : 1ea
		3	0.0050	99.81	+	0.0300	0.04	-	8 : 1ea
		4	0.0150	99.42	+	0.0730	0.10	-	9 : 2ea
		5	0.0930	96.40	+	0.0210	0.02	-	10 : 4ea
		6	0.0070	99.73	+	0.0350	0.04	-	11 : 1ea
		7	0.0250	99.03	+	0.0300	0.04	-	12 : 1ea
		8	0.0110	99.57	+	0.0460	0.06	-	
		9	0.0060	99.77	+	0.0450	0.06	-	
		10	0.0060	99.77	+	0.0880	0.13	-	
	control AIV 공격 14일 후	1	0.0830	96.79	+	0.0910	0.13	-	
		2	0.0530	97.95	+	0.1040	0.15	-	6 : 3ea
		3	0.4120	84.06	+	0.0210	0.02	-	8 : 4ea
		4	0.0760	97.06	+	0.0410	0.05	-	9 : 2ea
		5	0.0240	99.07	+	0.0940	0.14	-	
		6	0.0070	99.73	+	0.1080	0.16	-	
		7	0.0570	97.79	+	0.0450	0.06	-	
		9	0.0210	99.19	+	0.0260	0.03	-	
		10	0.0220	99.15	+	0.0370	0.05	-	
그룹 3	3주령 SPF닭에 공격접종한 후 3주후 혈청	1	0.0250	99.03	+	0.0160	0.01	-	
		2	0.0660	97.45	+	0.0150	0.01	-	
		3	0.0200	99.23	+	0.0320	0.04	-	
		4	0.4170	83.86	+	0.0210	0.02	-	
		5	0.0320	98.76	+	0.0240	0.03	-	
		6	0.0600	97.68	+	0.0270	0.03	-	
		7	0.0410	98.41	+	0.0500	0.07	-	
		8	0.0150	99.42	+	0.0340	0.04	-	
		9	0.0310	98.80	+	0.0180	0.02	-	
		10	0.0130	99.50	+	0.0200	0.02	-	

(2) AIV NS1 Ab ELISA 키트 시제품의 야외임상시험

① AIV NS1 Ab ELISA 키트 시제품의 민감도 및 특이도 조사

▶ 무작위 검체에 대한 특이도 시험

:무작위 농장에서 채혈한 주령 및 백신접종 여부를 확인할 수 없는 무작위 닭혈청의 AIV NS1 Ab ELISA의 검사결과와 HI test 결과를 비교하여 특이도 시험을 진행하였다. 그 결과 앞선 실험에서 SPF 닭혈청의 특이도 결과와는 다르게 HI역가와 연관관계가 성립하지 않는 비특이로 추정되는 결과가 나타남을 확인하였고 그 결과에 대한 원인을 확인하고자 주령별 닭 혈청의 검사를 실시하여 비교하고자 하였다.

	sample	HI	AIV NS1 Ab ELISA		Results
			O.D	S/P	
무작위	1695-2-2	0	1.018	2.06	+
	1695-2-3	0	0.881	1.77	+
	1695-2-4	0	0.999	2.02	+
	1695-2-6	0	0.873	1.75	+
	1695-2-7	0	0.674	1.33	+
	1695-3-1	0	0.423	0.79	+
	1695-3-2	0	0.326	0.59	+
	1695-3-3	0	0.942	1.90	+
	1695-3-4	0	0.405	0.76	+
	1689-1	0	0.921	1.85	+
	1689-5	0	0.462	0.88	+
	1695-3-5	0	0.995	2.01	+
	1695-3-6	0	1.087	2.21	+
	1695-3-7	0	1.000	2.02	+
	1695-3-8	0	1.191	2.43	+
	1695-3-9	0	1.126	2.29	+
	1700-1	0	1.276	2.61	+
	1700-2	0	1.490	3.06	+
	1700-3	0	1.814	3.75	+
	1700-4	0	1.935	4.01	+
	1700-5	0	1.519	3.13	+
	1700-6	0	1.982	4.11	+
	1700-7	0	1.985	4.12	+
	1700-8	0	1.894	3.92	+
	1700-9	0	1.824	3.77	+
	1702-1-1	0	0.742	1.47	+
	1702-1-2	0	0.599	1.17	+
	1702-1-3	0	0.832	1.66	+
	1702-1-4	0	0.733	1.45	+
	1702-1-5	0	1.336	2.74	+
1702-1-6	0	1.034	2.09	+	
1702-1-7	0	1.210	2.47	+	
1702-1-8	0	1.748	3.61	+	
1702-1-9	0	0.803	1.60	+	
무작위	1702-2-1	0	0.803	1.60	+
	1702-2-2	0	0.849	1.70	+
	1702-2-3	0	1.053	2.13	+
	1702-2-4	0	0.939	1.89	+
	1702-2-5	0	0.922	1.86	+
	1702-2-6	0	1.118	2.27	+
	1702-2-7	0	0.966	1.95	+
	1703-1	0	1.760	3.64	+
	1703-3	0	1.562	3.22	+
	1703-4	0	1.820	3.77	+
	1703-5	0	1.901	3.94	+
	1703-6	0	1.700	3.51	+
	1703-7	0	1.462	3.00	+
	1703-8	0	1.795	3.71	+
	1703-9	0	1.926	3.99	+
	1703-10	0	1.845	3.82	+
1704-1-1	0	2.239	4.66	+	

		1704-1-2	0	2.266	4.71	+
		1704-1-3	0	2.542	5.30	+
		1704-1-4	0	2.495	5.20	+
		1704-2-1	0	2.316	4.82	+
		1707-B-6	0	2.872	6.00	+
		1707-B-7	0	1.331	2.73	+
		1707-B-8	0	1.825	3.78	+
		1708-1-1	0	2.712	5.66	+
		1708-1-8	0	1.810	3.74	+
		1708-1-4	0	1.064	2.16	+
		1708-1-5	0	1.468	3.02	+
		1708-1-6	0	1.296	2.65	+
		1708-1-7	0	1.596	3.29	+
		1716-3-1	0	1.641	3.39	+
		1716-3-2	0	1.492	3.07	+
		1716-3-3	0	2.748	5.74	+
		1716-3-4	0	1.812	3.75	+
		1716-3-6	0	1.484	3.05	+
	무작위	1708-2-3	3	1.420	2.91	+
		1708-2-4	4	2.429	5.06	+
		1708-2-5	5	1.993	4.13	+
		1708-2-6	3	2.173	4.52	+
		1708-2-7	3	2.043	4.24	+
		1708-2-8	3	1.450	2.98	+
		1708-3-1	2	1.298	2.66	+
		1708-3-2	5	2.465	5.14	+
		1708-3-5	2	1.964	4.07	+
		1708-3-7	2	1.778	3.68	+
		1708-4-1	4	1.401	2.87	+
		1709-5	0	0.984	1.99	+
		1709-6	0	1.669	3.44	+
		1715-1-8	0	2.302	4.79	+
		1715-2-2	4	2.581	5.39	+
		1715-1-1	0	2.177	4.53	+
		1715-12-1	nt	1.969	4.08	+
		1716-1-7	0	2.204	4.58	+
		1716-1-1	0	2.375	4.95	+
		1716-1-3	0	2.746	5.74	+
		1716-1-6	0	2.852	5.96	+
		1716-2-1	0	2.350	4.89	+
		1716-2-2	0	1.385	2.84	+
		1716-2-3	0	2.815	5.88	+
		1716-2-4	0	1.251	2.56	+
		1716-2-5	0	1.998	4.14	+
		1716-2-6	0	1.714	3.54	+
		1716-2-7	0	1.485	3.05	+
		1716-2-8	0	2.302	4.79	+
		1716-2-9	0	1.453	2.99	+
		H5 DPI 10-S	0	0.376	0.69	+
		H5 DPI 10-M	0	0.279	0.49	+
		H5 DPI 10-L	0	0.621	1.21	+

▶ 주령별 닭혈청의 특이도 시험

:앞의 무작위 닭혈청에서 나타난 비특이의 원인이 닭의 주령과 관계가 있는지 비교 확인하고자 1일령부터 34주령 이상의 종계까지의 혈청의 검사를 진행하였다 .이 실험에 사용된 항혈청은 control을 제외하고 HI test에서 모두 음성을 나타낸 검체였다 .검사 결과에서는 아래의 표와 같이 8주령 이상의 닭 혈청에서는 특이도가 감소하는 것을 확인할 수 있었고 이는 AIV NS1 Ab ELISA키트는 8주령 이하의 닭에서만 유의성을 보일 것으로 예상된다.

	Sample	O.D	S/P	Results
control	1801-5(양성)	0.638	1.25	+

	백신접종4주후45	0.015	-0.07	-
	코코-1(NS1음성)	0.074	0.05	-
	코코-2(NS1음성)	0.087	0.08	-
1일령	1600-1	-0.018	-0.14	-
	1600-2	-0.025	-0.16	-
	1600-3	-0.014	-0.14	-
	1600-4	-0.024	-0.16	-
	1600-5	-0.012	-0.13	-
3일령	1605-1	0.02	-0.06	-
	1605-2	0.015	-0.07	-
	1605-3	0.024	-0.06	-
	1605-4	0.068	0.04	-
	1605-5	0.018	-0.07	-
7주령 (토종)	1610-1	0.005	-0.10	-
	1610-2	0.022	-0.06	-
	1610-3	0.034	-0.03	-
	1610-4	0.046	-0.01	-
	1610-5	0.07	0.04	-
8주령 (산란계)	1516-1-2	0.084	0.07	-
	1516-1-4	0.082	0.07	-
	1516-1-5	0.14	0.19	-
8주령 (육계)	1523-1	-0.014	-0.14	-
	1523-2	0.16	0.23	-
	1523-3	0.036	-0.03	-
	1523-4	0.021	-0.06	-
	1523-5	0.015	-0.07	-
10주령	1506-2	0.383	0.71	+
	1506-3	0.496	0.95	+
	1506-4	0.476	0.91	+
	1506-6	0.411	0.77	+
	1506-7	0.493	0.94	+
14주령 (산란계)	1507-1	0.624	1.22	+
	1507-2	0.662	1.30	+
	1507-4	0.282	0.49	+
중추계	1525-1	0.019	-0.07	-
	1525-2	0.077	0.06	-
	1525-3	-0.017	-0.14	-
	1525-4	-0.028	-0.17	-
	1525-5	-0.018	-0.14	-
15주령 (산란계)	1521-1	0.143	0.20	-
	1521-2	0.064	0.03	-
	1521-3	0.129	0.17	-
	1521-4	0.747	1.48	+
	1521-5	0.107	0.12	-
19주령	1608-1	0.369	0.68	+
	1608-2	0.476	0.91	+
	1608-3	0.276	0.48	+
	1608-4	0.498	0.95	+
	1608-5	0.453	0.86	+
21주령	1601-1	0.517	0.99	+
	1601-2	0.799	1.59	+
	1601-3	0.862	1.73	+
	1601-4	0.484	0.92	+
	1601-5	0.296	0.52	+
28주령	1606-1	0.273	0.47	+
	1606-2	0.301	0.53	+
	1606-3	0.656	1.29	+
	1606-4	0.587	1.14	+
	1606-5	0.352	0.64	+
28주령	1611-1-1	0.752	1.49	+
	1611-1-2	0.417	0.78	+
	1611-1-3	0.293	0.52	+
	1611-1-4	0.146	0.20	-
34주령 (종계)	1512-1	0.258	0.44	+
	1512-2	0.371	0.68	+
	1512-3	0.463	0.88	+
	1512-4	1.361	2.79	+
	1512-5	0.377	0.70	+
중계	1704-1-1	0.564	1.09	+
	1704-1-2	0.829	1.66	+

	1704-1-3	1.157	2.36	+
	1704-1-4	0.95	1.91	+
총계	1702-2-1	0.114	0.14	-
	1702-2-2	0.26	0.45	+
	1702-2-3	0.39	0.72	+
	1702-2-4	0.327	0.59	+
	1702-2-7	0.265	0.46	+

다. AIV NS1 Ab ELISA 키트 시제품의 품목 허가 신청

AIV 백신 항체 감별진단 kit 시제품을 제작하여 국가 검정기준에 의거한 임상시험을 진행 중이며 농림축산검역본부에 품목 허가신청을 위한 기술검토서류를 제출예정이다.

(1) 부표 작성 사항

제품명 : 바이오노트 조류인플루엔자 NS1 항체 엘리자 [AniGen AIV NS1 Ab ELISA]

① 원료 약품

*96 테스트/키트, 480 테스트/키트 중

원료 약품	표시용량	
	96테스트	480테스트
가. AIV NS1 항원 흡착 플레이트 : 8wells x 12스트립/장 주성분 : Recombinant AIV NS1 : 2ug/mL	1장	5장
나. 음성대조액(혈청) 주성분 : SPF 닭 혈청 방부제 : 프로클린 : 0.05%	0.1ml	0.2ml
다. 양성대조액(혈청) 주성분 : 불활화 닭 AIV NS1 양성혈청 방부제 : 프로클린 : 0.05%	0.1ml	0.2ml
라. 검체희석액 주성분 : 인산염생리식염 완충액 방부제 : 프로클린 : 0.01%	100ml	250ml*2
마. 농축 세척액(20배 농축액) 주성분 : 폴리소르베이트 20 : 2% 희석액 : 농축 인산염생리식염 완충액 방부제 : 프로클린 : 0.05%	50ml	250ml
바. 접합체액 주성분 : 토끼 항 닭 IgY 항체-과산화효소 접합액 : 2μg/ml 단백안정제: 소혈청알부민 : 적 량 방부제 : 프로클린 : 0.05%	15ml	80ml
사. 기질액 주성분 : 과산화수소수 : 적 량 주성분 : 테트라메칠벤지딘 : 적 량	12ml	60ml
아. 반응정지액 주성분 : 1N 황산 : 20μl/ml	15ml	80ml

② 성 상

- ▶ AIV NS1 항원 흡착 플레이트 : 무색 평면 바닥 형태의 폴리스틸렌 플레이트
- ▶ 음성대조액 (혈청) : 붉은색 내지 옅은 붉은색의 액상 제제
- ▶ 양성대조액 (혈청) : 파란색 내지 옅은 파란색의 액상 제제
- ▶ 검체희석액 : 연한 보라 내지 청색의 액상제제

- ▶ 농축 세척액 (20배 농축액) : 무색 내지 옅은 담황색의 액상 제제
- ▶ 접합체액 : 초록내지 진한초록색의 액상제제
- ▶ 기질액 : 무색 내지 미황색의 액상 제제
- ▶ 반응 정지액 : 무색의 액상 제제
- ▶ 플레이트 밀봉 테이프 : 무색 투명한 폴리에스테르 접착 테이프

③ 제조방법

▶ 개별 구성물의 제조방법

1) 마이크로 웰 흡착용 항원

본 제제에 사용된 항원은 유전자재조합 AIV NS1 항원을 사용하였다.

NS-1 gene을 33a.a 단위로 truncation 하여 항원을 제조 하였고 제조과정은 다음과 같이 수행하였다.

Translation Map NS-1 Truncation5 (이하 TC5)

1 N F S V I F D R L E T L I L L R A F T E

1

AACTTCAGTGTGATTTTCGACCGGCTGGAAACCCTAATACTACTCAGAGCTTTC
ACAGAA

21 E G A I V G E I S P L P S *

61 GAAGGAGCAATTGTGGGCGAAATCTCACCGTTACCTTCTTAA

Nucleotide sequence of cloned NS-1 TC5 gene.

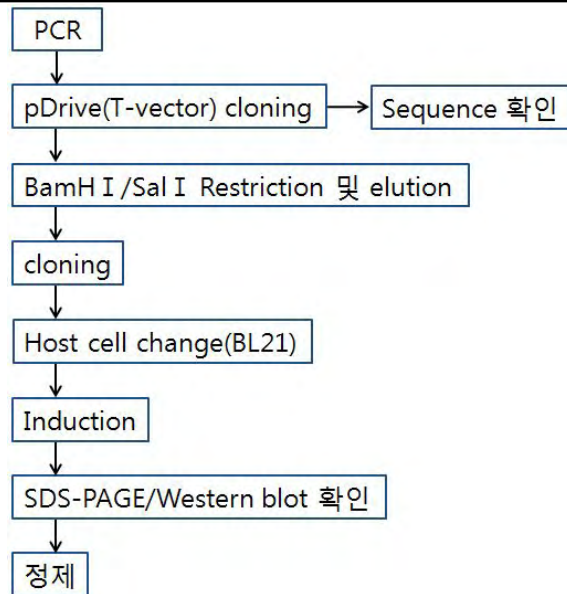
AIV 감염 혈청으로부터 RNA isolation 하여 template RNA 를 입수하고 AIV NS-1 항원을 encoding 하는 유전자는 NS-1 을 주형으로 하여 RT- PCR을 수행하여 획득하였다.

PCR을 수행하기위해 다음의 Oligonucleotide primer 는 유전자은행(Accession No: HM212771, GU186527, GU051524)에서 정보를 얻어 작성하였다.

Oligonucleotide primers used in this study

GGA TCC AAC TTC AGT GTG ATT TTC	AIV NS-1 TC5 F
GTC GAC TTA AGA AGG TAA CGG TGA GAT	AIV NS-1 TC5 R

상기의 primer를 이용하여 항원 AIV NS1 TC5를 증폭하였으며 발현 벡터에 삽입한 후 E.Coli BL21에 형질전환하여 배양 1mM의 IPTG를 첨가하여 단백질 과발현을 유도시킨 다음, DEAE-sepharose gel을 이용하여 Ion exchange chromatography법으로 항원을 정제하였다. 정제 항원은 BCA법 (Pierce, USA)으로 정량하여 사용하였다.



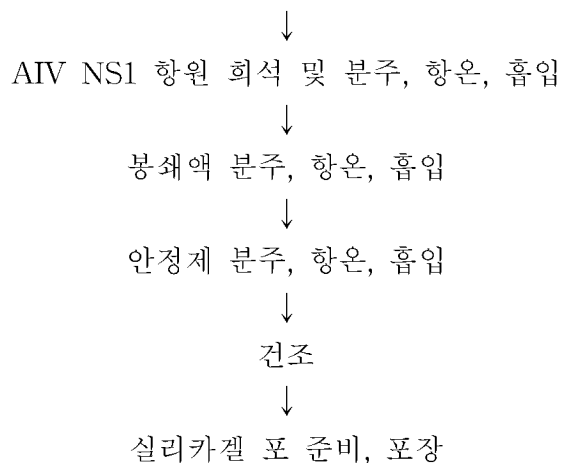
유전자 재조합 AIV NS1 제조 Flow chart

2) 접합체 : 토끼 항 닭 IgY-과산화 효소 접합액
 시그마 알드리치 코리아로부터 구매 (제품번호 A9046 : MSDS 와 Product information
 첨부)하여 $2\pm 0.2\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 단백 안정제와 방부제가 포함된 희석액으로 희석하여 제
 조 하였다.

▶ 각 구성물의 제조공정도

1) AIV NS1 항원흡착 플레이트 제조

AIV NS1 항원 및 용액준비 (코팅액, 봉쇄액, 안정제)



2) 기타 용액 : 용액 조성에 따라 조제

④ 효능 및 효과

▶ 본 키트는 ELISA를 이용한 항체검사법으로 AIV NS1 항원 흡착 플레이트는 AIV
 NS1에 대한 항체 유무를 검출한다.

▶ 본 키트는 조류인플루엔자 자연감염에 대한 양성 및 음성 판정 시에 사용한다.

⑤ 용법 및 용량

▶ 검체 준비

1) 닭의 혈청을 검체로 사용할 수 있으나 심하게 용혈 되었거나 상한 검체는 쓸 수 없다. 혈구나 혈액응고 성분 등의 고형물이 있는 검체는 비특이 반응을 유발하므로 가능한 사용하지 않는다.

2) 혈청은 2~8℃에서 보관할 경우 15일까지 본 시약을 이용한 검사에 사용 가능하며 3일 이상 보관 시에는 -20℃에 보관한다.

3) 용혈이 심하거나 미생물에 오염된 검체의 경우는 부정확한 결과를 나타낼 수 있으므로 주의한다.

4) 혈청 검체의 경우 비동화 (56℃ 30분)유무가 판정결과에 영향을 미치지 않는다.

▶ 시액제조

1) 주의사항

- 시약을 약 30분 전에 실온(18~25℃)에 꺼내어 둔다 (실온에 충분히 적응되었는지 확인한 후 사용하도록 한다)

- 시험 후 남은 항원흡착플레이트는 자체 은박포에 실리카겔 포와 함께 잘 밀봉하여 2~8℃에서 냉장 보관한다.

- 검체는 사용 전에 충분히 혼합하여 사용한다.

2) 시액의 조제

- 세척액의 준비

농축세척액(20배)을 정제수 (탈이온수나 증류수)로 20 배 희석한다 (예 증류수950ml 농축 세척액 50ml을 첨가하여 세척액을 조제한다).

3) 조제한 시액의 보관조건 및 보존 기간

조제시액	보관조건	보존기간
세척액	실온, 2 ~ 8℃	1주일

▶ 검사방법

1) 검사를 시작하기 전에 시약 구성물들을 상온에 꺼내두고 (실온에 적응될 때까지),가볍게 흔든 후 사용한다.

2) 검사에 필요한 well 수를 결정하고 사용하고 남은 well 은 자체 은박포에 실리카겔과 함께 밀봉하여 2 ~ 8℃에 보관한다.

3) 시험에 필요한 양 만큼의 스트립을 꺼내어 프레임에 고정시킨다.

4) 음, 양성 대조액 및 검체를 검체 희석액으로 500배 희석한다 . (예 검체 2 μ l +검체 희석액 1000 μ l)

5) 준비된 플레이트 well에 500배 희석된 음, 양성 대조액 및 검체를 100 μ l를 분주 한다.

6) 5)의 플레이트를 실온 (37℃)에서 60분간 반응 시킨다.

7) 6)의 반응이 끝나면 각 well의 내용물을 흡입해 내고 세척액으로 5회 세척한다(1회 : 350 μ l 이상/well).

8) 세척된 플레이트를 흡습지에 뒤집어 강하게 쳐서 남아있는 세척액을 완전히 제거한 다음, 접합체액을 플레이트 각 well에 100 μ l씩 넣고 실온 (37 $^{\circ}$ C)에서 30분간 반응시킨다.

9) 8)의 반응이 끝난 다음 각 well의 내용물을 흡입해 내고 세척액으로 5회 세척한다(1회 : 350 μ l 이상/well)

10) 기질액을 모든 well에 100 μ l씩 넣고 빛을 차단한 후 15분간 실온 (18~25 $^{\circ}$ C)에서 반응시킨다.

11) 10)의 반응이 끝난 Plate에 반응정지액을 well당 100 μ l씩 반응정지액을 넣고 잘 혼합하여 청색이 노란색으로 완전히 변화도록 한다.

12) 공기를 맹검으로 하여 (Air blank) 음성대조액, 양성대조액 그리고 각 검체의 흡광도를 측정한다. 이때 흡광도의 측정 파장은 450 nm로 하고, 이중 파장흡광도측정기 (dual wavelength reader) 를 사용할 경우 참조파장은 620 nm로 하며 반응 정지액을 넣고 30분 이내에 흡광도 값을 측정한다.

▶ 결과 판정

1) 정도관리

- 양성대조액은 2well을 이용하여 시험하며, 평균 흡광도 값은 0.4 이상이어야 하며 2개의 값의 평균값으로 산출한다 만약 2개중 1개의 값이 위의 범위를 벗어났을 경우 재 시험을 하여야 한다.

- 음성대조액은 2well을 이용하여 시험하며, 평균 흡광도 값은 0.1 이하 이어야 하며 2개의 값의 평균값으로 산출한다. 만약 2개중 1개의 값이 위의 범위를 벗어났을 경우 재 시험을 하여야 한다.

- Corrected Positive Control(CPC)은 0.3이상 이어야 한다.

$$*CPC = \text{양성대조액 평균 흡광도} - \text{음성대조액 평균 흡광도}$$

- 평균 흡광도값이 위의 범위를 벗어난 경우에는 검사과정이나 시약에 문제가 있는 것이므로 그 원인을 확인한 후 재검사 하여야 한다.

2) 결과의 판정

- 결과의 판정은 Sample to positive ratio(S/P) value로 한다.

$$S/P \text{ value} = \frac{\text{검체의 흡광도} - \text{음성대조액의 평균 흡광도}}{\text{양성대조액의 평균 흡광도} - \text{음성대조액의 평균 흡광도}}$$

- 판정 기준값(S/P value) 및 본 제제의 민감도, 특이도는 다음과 같다.

양성 S/P 값	0.2 이상
음성 S/P 값	0.2 미만
근거 검체수	357
민감도	30.0%
특이도	62.1%

- 음성 : 판정 기준값 미만의 S/P 값을 나타내는 검체는 음성으로 판정한다.

- 양성 : 판정 기준값 이상의 S/P 값을 나타내는 검체는 양성으로 판정한다.
- 양성 판정된 검체는 다른 임상결과나 실험결과를 함께 이용하여 전문 수의사가 종합적으로 최종 진단을 내려야 한다.

3) 판정 기준값 (Sample to positive ratio : S/P) 계산

- 양성대조액 평균값 계산

상기 검사방법에 따라 양성 대조액의 흡광도를 얻은 다음 그 두 값의 평균값을 산출한다.

예)

양성 대조액 번호	흡광도 (450 nm, 참조파장 620 nm)
1	0.435
2	0.452
합계	0.887

*양성대조액의 평균 흡광도 : $PC_x = 0.887/2 = 0.4435$

- 음성대조액 평균값 계산

상기 검사방법에 따라 음성대조액의 흡광도를 얻은 다음 그 두 값의 평균값을 산출한다.

예)

음성 대조액 번호	흡광도 (450 nm, 참조파장 620 nm)
1	0.047
2	0.040
합계	0.087

*음성대조액(혈청)의 평균 흡광도 : $NC_x = 0.087/2 = 0.0435$

- S/P값 계산

$$S/P \text{ value} = \frac{\text{검체의 흡광도} - \text{음성대조액의 평균 흡광도}}{\text{양성대조액의 평균 흡광도} - \text{음성대조액의 평균 흡광도}}$$

예) 양성 대조액의 평균 흡광도 = 0.4435, 음성대조액의 평균 흡광도 : 0.0435

검체의 흡광도 = 0.847

$$S/P \text{ value} = \frac{0.847 - 0.0435}{0.4435 - 0.0435} = 2.00 \text{ (S/P } 0.2 \text{ 이상 양성 : 양성)}$$

⑥ 포장 단위

원료약품 \ 포장단위	96 tests/kit (8wells x 12스트립/장)	480 tests/kit (8wells x 12스트립/장)	960 tests/kit (8wells x 12스트립/장)
항원흡착플레이트	1장	5장	10장
음성대조액(혈청)	1병(0.1ml/병)	1병(0.2ml/병)	1병(0.5ml/병)
양성대조액(혈청)	1병(0.1ml/병)	1병(0.2ml/병)	1병(0.5ml/병)
농축세척액(20배)	1병(50ml/병)	1병(250ml/병)	2병(250 ml/병)
검체희석액	1병(100ml/병)	2병(250ml/병)	4병(250ml/병)
접합체액	1병(15ml/병)	1병(80ml/병)	1병(200ml/병)
기질액	1병(12ml/병)	1병(60ml/병)	1병(120ml/병)
반응정지액	1병(15ml/병)	1병(80ml/병)	1병(200ml/병)
플레이트 밀봉테이프	2장	10장	20장

⑦ 저장 방법 및 유효 기간

플레이트는 기밀 파우치에 실리카겔과 함께 포장하고, 각종 용액들은 기밀용기에 분주하여 냉장에서 보관(2~8℃)한다. 사용 기간은 제조일로부터 12개월간이다.

⑧ 사용상의 주의사항

- ▶ 닭의 체외진단용 시약으로만 사용한다.
- ▶ 제품의 사용 후 남은 구성물은 즉시 냉암소에 다시 보관한다.
- ▶ 서로 다른 로트의 구성물과 혼합하여 사용하지 않도록 주의한다.
- ▶ 유효기간이 지난 제품은 사용하지 않는다.
- ▶ 제품 내 시약이 다른 시약이나 검체에 오염되지 않도록 주의한다.
- ▶ 검체는 조류인플루엔자 바이러스 등의 감염 가능성이 있는 것이므로 취급에 주의한다.
- ▶ 용혈이 심하거나 미생물이 심하게 오염된 검체는 부정확한 결과를 나타낼 수 있으므로 신선한 검체를 시료로 사용한다.
- ▶ 검체내의 혈구 찌꺼기, 혈액 응고성분 등의 고형물은 세척할 때 완전히 제거되지 않으면 well의 한 부분으로부터 시작되는 비특이 반응을 유발하므로 특히 주의해야 한다.
- ▶ 만약의 경우 well의 한 부분에서부터 발색반응이 나오기 시작하면 양성으로 간주하지 않는다.
- ▶ 감염 가능물질을 취급할 때는 1회용 비닐장갑 등을 착용하고 취급 후에는 손을 세정제로 깨끗이 닦는다.
- ▶ 기질액과 반응정지액은 피부에 닿지 않도록 주의한다.
- ▶ 실험에 사용한 고형폐기물은 121℃에서 15분 이상 고압 증기 멸균하여 폐기한다.
- ▶ 실험에 사용되었던 액체 폐기물은 차아염소산나트륨용액을 1% 이상 되도록 첨가하여 12시간 이상 닭가 감염성을 완전히 제거한 후에 폐기한다.

⑨ 시험 기준 및 시험 방법

- ▶ 정상

시험기준 및 방법 : 본 제제의 내용물을 육안으로 관찰하였을 경우 다음의 성상을 나타내야 한다.

- 1) AIV NS1항원 흡착 플레이트 : 무색 평면 바닥 형태의 폴리스틸렌 플레이트
- 2) 음성대조액 (혈청) : 파란색 내지 옅은 파란색의 액상제제
- 3) 양성대조액 (혈청) : 빨간색 내지 옅은 빨간색의 액상제제
- 4) 검체희석액 : 연한 보라색 내지 청색의 액상제제
- 5) 농축 세척액 (20배 농축액) : 무색 내지 옅은 담황색의 액상 제제
- 6) 접합체액 : 초록내지 진한초록색의 액상제제
- 7) 기질액 : 무색 내지 미황색의 액상 제제
- 8) 반응 정지액 : 무색의 액상 제제
- 9) 플레이트 밀봉 테이프 : 무색투명한 폴리에스테르 접착테이프

▶ 효능시험

다음의 음, 양성 표준검체를 본 제제의 용법 용량에 따라 각각 3well씩 검사하였을 때 판정기준에 적합하여야 한다.

1) 표준검체의 구성

- 양성 표준검체 6개 : RP450701, RP450702, RP450703, RP450704, RP450705, RP450706

- 음성 표준검체 2개 : RN450701, RN450702

2) 판정기준

- 음성 표준검체의 흡광도는 판정 기준값 (Cut-off : S/P Value 0.2) 미만이어야 한다
- 양성 표준검체의 판정 기준값 (Cut-off : S/P Value 0.2) 이상이면서 다음의 조건을 만족 하여야 한다.

◦ RP450701, RP450702 S/P Value는 1.0 이상 이어야 한다.

◦ RP450703, RP450704 S/P Value는 0.5 이상 이어야 한다.

◦ RP450705, RP450706 S/P Value는 0.2 이상 이어야 한다.

(흡광도가 -0.002처럼 마이너스 가 나오면 0.0으로 간주한다.)

- 각 표준검체의 S/P Value의 크기는 다음과 같아야 한다.

: RP450701,RP450702 > RP450703,RP450704 > RP450705,RP450706 > 음성표준체

마. [2핵심 1세부] 신기술 융합 PRRS 사독백신의 시제품 제작 및 국내 임상시험

개발 배경

돼지에서 호흡기 질병을 일으키는 원인체인 PRRSV (Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus)는 Arterivirus에 속하며 15kb의 단일(+) RNA 바이러스이다. 총 9개의 해독틀(open reading frame:ORF)을 가지며 ORF1 (ORF1a, 1b)은 비구조 단백질, ORF2-7 (GP2, GP3, GP4, GP5, M, N)은 구조 단백질로서 존재한다. 구조단백질 중 GP2, GP3, GP4는 바이러스가 숙주 세포 내로 침입하여 들어갈 때 작용하는 minor 구조단백질이고, GP5, M은 서로 이합체(dimer)를 형성하여 major 구조단백질로 작용하며 바이러스의 감염력을 높여주는 역할을 한다고 알려져 있다. 특히, PRRSV에 대한 중화능을 가지는 항체는 GP5에 대한 항체로서 이 중화항체가 만들어지기 시작하는 시기는 이미 바이러스가 전신적으로 감염된 후이다. 이 때문에 PRRSV에 대한 중화항체를 빠르게 만들어낼 수 있는지가 바이러스의 감염 및 증식 억제의 가장 중요한 요인이 된다. PRRSV는 유전자형에 따라 크게 북미 타입과 유럽 타입, 두 가지로 나눌 수 있고, 서로 최대 40% 정도의 상이한 유전자형을 가지며, 특징적으로 유전적 돌연변이의 확률이 높게 나타나는 매우 불안정한 RNA 바이러스이다. 따라서 각기 다른 타입별로 백신은 생산되었지만, 서로 교차 방어가 안되는 등의 미약한 효과 때문에 백신에 대한 연구가 더 필요한 실정이다. 현재 국내/외에서 상품화된 PRRS 백신은 크게 약독화 생독백신과 사독백신 두 가지로 대별된다. 생독백신은 PRRSV에 대한 중화항체를 형성하여 방어력 면에서는 효과적인 백신으로 작용하지만, 유전자 변이율이 높은 PRRS 바이러스의 특성상 상동성(homogenous) 바이러스에 대한 방어력은 있어도 이형(heterogenous) 바이러스에 대해서는 방어력이 없어서 백신으로서의 작용을 하지 못하는 것으로 보고되었다. 또한 PRRS 바이러스는 낮은 수의 바이러스 입자의 감염만으로도 질병을 유발시킬 수 있을 정도로 높은 감염력을 가지고 있다고 알려졌다. 이러한 특성 때문에 생독백신을 사용할 경우 약독백신주의 병원성 회복으로 인하여, 백신을 접종한 농장에서 PRRSV와 관련된 경제적인 손실을 입을 가능성을 배제할 수 없다. 이에 반해 사독백신은 백신주 바이러스로 인한 감염력이 없기 때문에 안전하지만, 백신으로서의 충분한 방어효과를 기대할 수 없다. PRRS 바이러스의 특성으로 미루어 보아 백신 개발전략에 있어서 가장 중요시 되는 것은 바이러스의 감염을 막을 수 있는 중화항체의 형성 시기와 항체가 수준이다. 특히 이 바이러스의 감염시에 특징적으로 나타나는 현상은 다른 바이러스 감염의 경우와 다르게 지연되고 그리고 상당히 낮은 수준의 중화항체가 형성된다는 것이다. 따라서 보다 효과적인 PRRS 백신을 개발하기 위해서는 상당한 수준의 중화항체가 (1:8 이상) 형성을 빠르게 유도할 수 있는 백신을 개발하는 것이 최선이다. 이러한 실정 때문에 다양한 방법으로 안전성, 면역원성, 및 방어능을 효과적으로 갖춘 백신을 제작하기 위한 시도가 이루어지고 있다. 본 연구에서는 다양한 분자생물학적 접근방법으로 PRRSV에 대하여 높은 중화항체를 생산할 수 있는 사독백신의 개발에 초점을 맞추고 있다. 예를 들면, 대장균에서 수용성 및 활성형의 GP5 생산, GP5와 M 단백질을 발현시킬 수 있는 VLP(virus-like particle)의 생산, GP5와 M 단백질을 동물 세포내에서 발현시킬 수 있는 유전자 백신, 그리고 역유전자 조작에 의한 중화항체 생성능이 강화된 변형 바이러스의 생산 등이다.

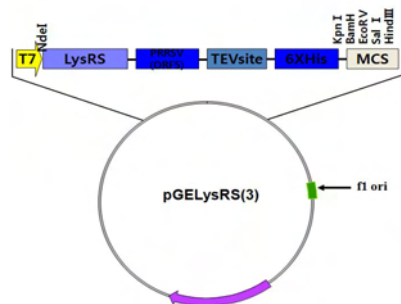
본 연구에서는 1차년도에 높은 중화항체를 생산할 수 있을 것으로 예상되는 다양한 유형의 백신 제형을 개발하였고, 2년차에 실험실 내 효능시험을 통하여 가장 효과가 좋은 백신 제형을 선발하였으며 3년차에 선별 제작한 사독백신 시제품으로 야의 임상 시험을 통하여 국내 농장상황에 적합한 PRRS 백신으로서의 효능을 검증하였다.

가. PRRSV 사독백신의 시제품 제작

1. PRRSV의 수용성/활성형 단백질 시제품

- ▶ PRRSV의 구조단백질 중에서 숙주의 감수성 세포에 바이러스가 부착, 침입하는 과정에 중요한

역할을 하는 GP5을 백신 후보단백질로 선택하였다. 선행연구를 통해 확립한 RNA-binding protein fusion system을 이용하여 수용성 및 활성형으로 GP5 단백질을 생산하였다. 간단히 설명하면, 단백발현 벡터에 PRRSV의 ORF5의 유전자를 삽입한(그림-1) 후 *E. coli* star(DE3)pLysS에 형질전환을 시켰다. 이 대장균을 LB배지에서 배양시키면서 대수증식기(흡광도 0.5 at OD₆₀₀)에 도달하면 1mM IPTG를 첨가하여 27°C에서 5시간 동안 재조합단백질을 과발현시켰다. 대장균에서 발현된 재조합 단백질 정제는 AKTAprime 사용하여 nickel chromatography로 실시하였다. 수용성 단백질의 분리를 위하여 HiTrapTm chelating HP를 사용하여 정제한 후, imimidazole 구배 (10mM ~ 300mM)를 이용하여 단백질을 칼럼에서 유리시켰다. 이렇게 생산된 수용성 재조합 단백질의 농도를 1 mg/ml으로 조정하여 -80°C에 보관하였다.

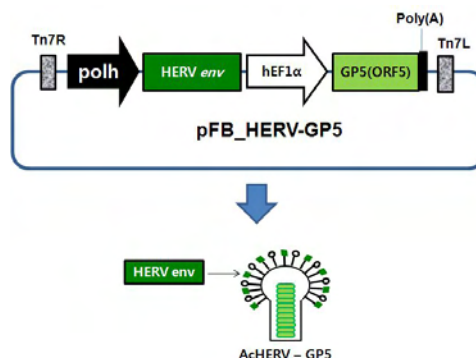


[그림-1] 수용성 및 활성형 단백질 발현 플라스미드의 모식도.

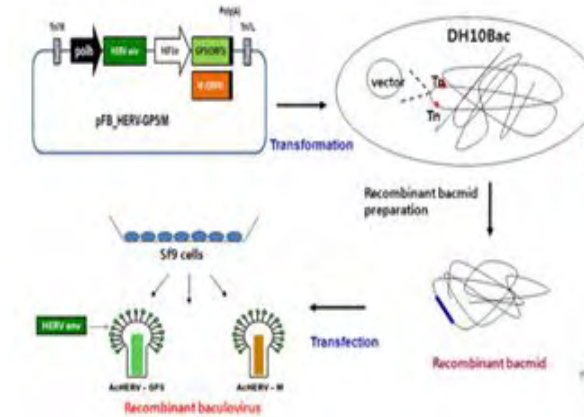
PRRSV ORF5 단백질을 수용성 및 활성형으로 발현하기 위한 아미노말단의 RNA fusion partner와 카르복실말단에 정제를 위한 His tag이 연결되어 있다.

2. PRRSV의 유전자 백신 시제품

- ▶ PRRSV가 숙주세포에 감염되는 동안 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 GP5 단백질을 유전자 백신의 표적항원으로 설정하였다. GP5 단백질을 코딩하고 있는 PRRSV의 ORF5 유전자를 PCR로 증폭하여, FastBac1 플라스미드에 클로닝하였다. Porcine Endogenous Retrovirus (PERV) envelopment 단백질을 발현하는 polyhedrin 프로모터와 GP5 유전자를 조절하는 Human elongation factor(hEF)1a 프로모터를 이용하여 아래 그림-2와 같이 재조합 baculovirus 벡터 (pFB_PERV-GP5)를 제작하였다. pFB_PERV-GP5 플라스미드는 Bacmid를 제작하고 Bac-to Bac system을 이용하여 재조합 baculovirus를 제작하였으며, 다음 (그림-3과 같은 과정을 거쳐 AcPERV-GP5을 완성하였다. Sf9 세포를 이용하여 AcPERV-GP5를 대량으로 생산한 다음, sucrose gradient cushion을 이용하여 초원심분리하여 정제하였다. 정제된 재조합 baculovirus를 돼지 유래의 세포주에 감염시켜 단백질의 발현을 western blot과 PCR로 확인하였다. 이렇게 생산된 유전자 백신을 면역원성 시험에 사용하였다.



[그림-2] PRRSV의 ORF5를 포함하는 벡터의 구조도

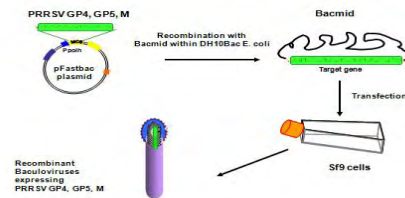


[그림-3] PRRSV 유전자 백신 제조를 위한 재조합 baculovirus 제작 과정

3. PRRSV의 VLP백신 시제품

▶ PRRSV의 virus-like particle (VLP)를 제작하기 위하여 현재 국내에서 널리 분포하는 LMY strain의 GP5, M 단백질을 코딩하는 유전자 ORF5와 ORF6를 PCR을 이용하여 증폭 하였다. 증폭된 각각의 유전자를 baculovirus 유전자에 삽입하여, PRRSV의 GP5, M 단백질을 동시에 발현시킬 수 있는 재조합 baculovirus를 제작하였다(그림 -4). 재조합 baculovirus를 곤충세포인 Sf9세포를 이용하여 VLP를 대량생산하였고, sucrose gradient상에서 초원심분리하여 VLP를 순수 정제하였다. PRRSV의 유전자가 순수정제된 VLP에서 정상적으로 발현되었는지를 확인하기 위하여 western blotting을 실시하여 확인한 결과 그림 -5에서 보이는 것처럼 PRRSV의 GP5, M 단백질이 발현되었음이 확인되었다. 이렇게 생산된 VLP를 면역원성 시험에 사용하였다.

Generation of recombinant baculoviruses (rBV)



[그림-4] 재조합 baculovirus의 제작과정 흐름도

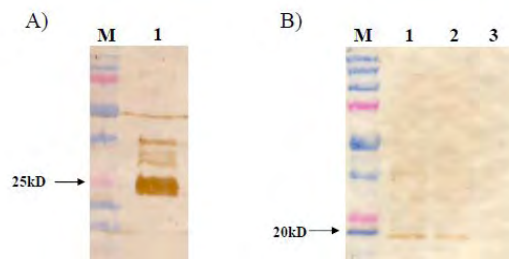
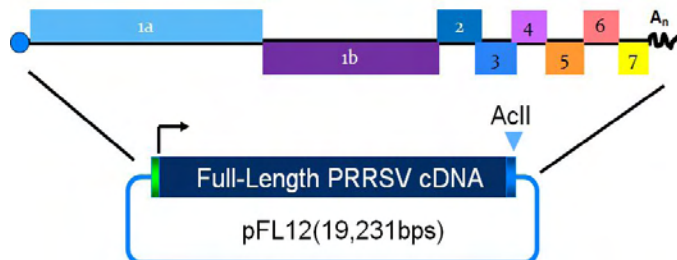


Figure. Western blotting of GP5 and M VLPs. A) 1ug of GP5 and M VLP and B) lane 1: 2.5ug of GP5 and M VLP, lane 2: 1ug of GP5 and M VLP, lane 3: negative

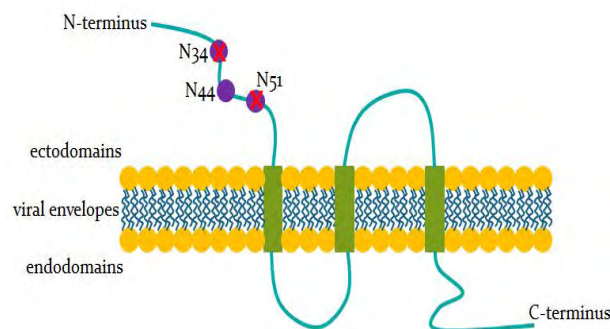
[그림-5] VLP에서 PRRSV의 GP5와 M 단백질 발현을 western blotting으로 확인

4. 역유전자법에 의한 변형 PRRSV 사독백신 시제품

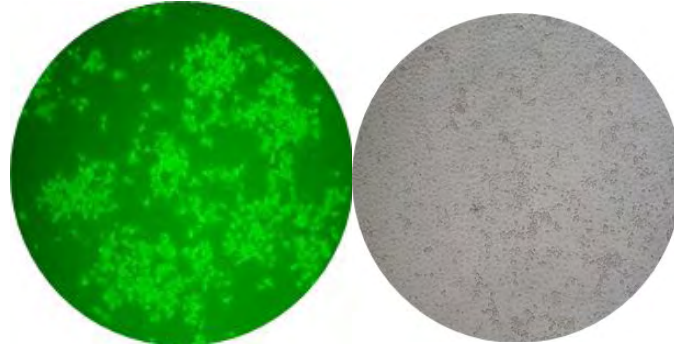
▶ 15kb의 PRRSV 모든 유전자가 삽입된 infectious clone(그림-6)을 미국의 공동연구자 (University of Nebraska-Lincoln)으로부터 제공받은 후, 중화항체 epitope이 존재하는 GP5부위 (그림-7)를 site-directed mutagenesis법으로 유전자 변형시켰다. GP5가 변형된 플라스미드를 PRRSV에 감수성이 있는 MARC145 cell에 transfection한 후 N protein에 대한 항체를 이용하여 FA(immunofluorescence assay)로 확인하였고, 약 10일 후에 CPE가 형성됨을 확인하였다(그림-8). 유전자가 변형된 변형바이러스는 wild type바이러스보다 생산수율이 낮은 수준이었고, 사독백신을 제작하기 위하여 생산된 바이러스 액은 농축과정을 거쳐 1×10^8 TCID₅₀/ml의 농도까지 조정하였다. 농축된 바이러스를 사독백신으로 제작하기 위하여 1 mM 의 BEI (binary ethylenimine)로 37°C에서 24시간 처리하여 불활화시켰고, BEI를 중화시키기 위하여 0.1mM Na-thiosulphate를 37°C에서 2시간 처리하였다. 바이러스의 불활화는 MARC145 cell에 접종한 후 3일 후에 FA로 확인하였고, 5일 후에 CPE가 형성되지 않음을 확인하였다. 이러한 과정을 거쳐 변형바이러스의 사독백신 시제품을 제작하였으며, 이렇게 생산된 변형바이러스 사독백신을 면역원성 시험에 사용하였다.



[그림-6] PRRSV infectious clone의 모식도



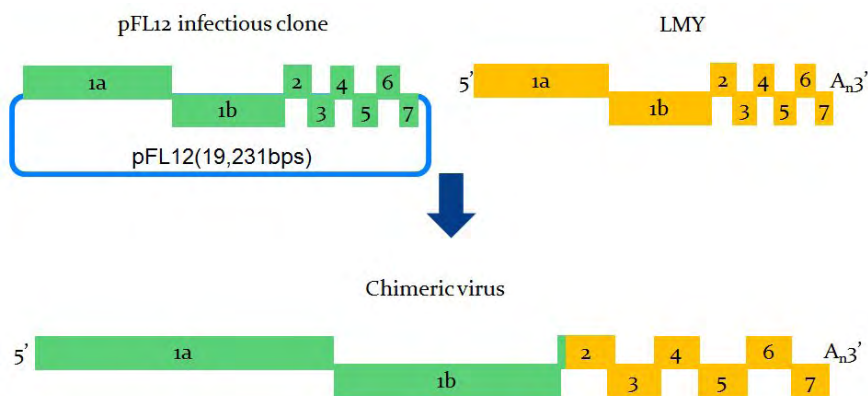
[그림-7] 변형바이러스 제작을 위한 GP5의 변형 위치 모식도



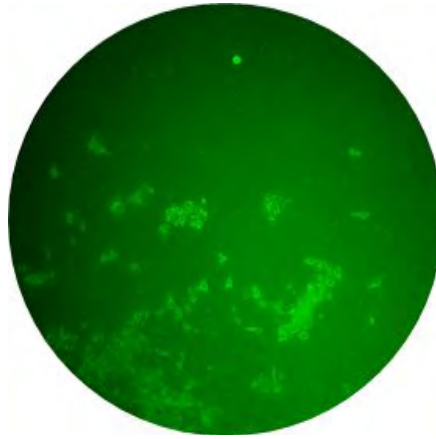
[그림-8] GP5가 변형된 유전자를 MARC145 cell 내에 transfection시켜 바이러스가 rescue되는지 확인하기 위한 FA 실험 결과, 변형바이러스가 제대로 증식 되고 있음을 보여주는 사진 (왼쪽), 그리고 바이러스의 증식에 의한 CPE 현상을 보여주는 사진(오른쪽)

5. 국내분리주 이용 chimeric PRRSV 사독백신 시제품

▶ PRRSV는 변이율이 높은 특성 때문에 지역, 동일한 농장의 각 돈군간에서도 바이러스의 유전자 염기서열 상 차이를 보인다. 이러한 특성으로 인하여 국내 농장에 효과적으로 적용시킬 수 있는 국내형 사독백신을 제작하고자, 백신주로 국내에서 유행하는 PRRSV 중 우위를 차지하고 있는 LMY strain을 선발하였다. 위에서 사용한 FL12 infectious clone에 LMY의 구조단백질 유전자를 치환하여 chimeric 바이러스를 제작하였다. PCR을 이용하여 LMY의 ORF2부터 ORF7까지의 일부분을 증폭한 후 infectious clone의 같은 부위에 치환하여 chimeric infectious clone을 제작하였다(그림-9). 이 플라스미드를 MARC145 cell에 transfection시켜 chimeric 바이러스를 작출하였다. 이 chimeric 바이러스에서 중화항체 생성능과 관련된 GP5 유전자상에 필요한 부분을 위에서 기술한 방법에 의하여 변형시켰다. 이렇게 선발된 변형바이러스는 같은 방법을 이용하여 rescue되었고 (그림-10), 불활화하였으며, 이를 한국형 사독백신주로 선정하여 국내 농장에서 적용가능한지 면역원성 시험을 통해 검증하였다. 특히 중요한 것은, 본 연구과제에서 기술한 chimeric virus 구축기법은 향후 다수의 국내 분리주를 대상으로 바이러스 백신주를 작출하는 데 유용하게 사용될 수 있는 상당히 의미 있는 기술적인 진보이다.



[그림-9] 국내의 대표적인 PRRSV인 LMY(노란색)의 구조 단백질 부분을 infectious clone FL12(녹색)의 동일한 부분에 치환시켜 chimeric PRRSV를 제작하는 모식도



[그림-10] chimeric PRRSV를 MARC145 cell에서 rescue되는지 확인한 FA 실험 결과

나. PRRSV 백신 시제품의 실험실 내 효능 시험

1. 수용성/활성형 단백질 백신 시제품의 실험실내 효능 시험

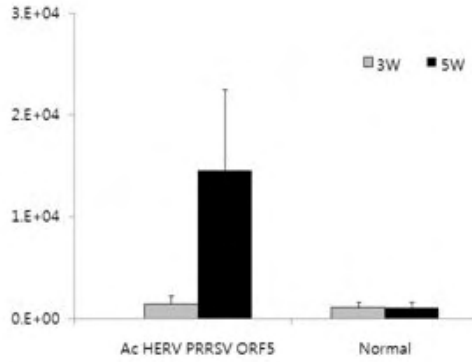
▶ 제작된 활성형 PRRSV의 GP5 단백질 100 μ g을 마우스 복강에 주사하여 초기면역을 실시하고 2주 후에 피하경로로 추가면역을 실시하였다. 추가면역 2주 후에 마우스의 혈액을 취하여 항체의 생성여부를 ELISA법으로 측정하였다. 또한 바이러스 감염을 방어하는데 가장 중요한 중화항체 형성을 측정하였다. 본 연구에서 시도한 수용성 재조합단백질 발현 기법으로 생산된 PRRSV의 GP5 단백질은 PRRSV에 대한 특이적인 항체를 생성하는 것으로 확인되었지만, 중화항체 형성을 유도하지는 못했다(표-1). 따라서 이 결과로 세균에서 PRRSV의 면역원성을 가진 항원인 외막단백질 GP5의 대량생산이 가능함을 확인하였지만, 중화항체 생성능이 미약하였기 때문에 수용성 단백질 GP5는 추가적인 진행을 보류하였다.

[표-1] 수용성/활성형 단백질 백신을 접종한 마우스에서 PRRSV에 대한 항체가 및 중화항체 역가

	항체가 (OD value)		중화항체가	
	2주	4주	2주	4주
GP5 단백질 접종군	0.23	0.58	0	<2
음성대조군	0	0	0	0

2. DNA 백신 시제품의 실험실내 효능 시험

▶ PRRSV 유전자 백신의 면역원성을 평가하기 위하여, 자돈에 재조합 baculovirus를 10^8 PFU 로 3회 근육 주사한 후 채혈하여 ELISA법을 이용하여 항체역가를 측정하였다. 본 연구에서 제작된 PRRSV 유전자 백신을 접종한 돼지의 혈중 항체가는 그림 -1과 같다. 즉, 백신접종군 돼지의 항체가는 3주까지는 음성대조군과 차이가 없지만, 5주에는 상당히 의미 있는 차이를 보였다. 바이러스의 감염 방어에 중요한 역할을 하는 중화 항체가는 백신을 접종한 돼지에서만 유의성 있는 결과를 보였다(표-2). 결론적으로 GP5를 세포내에서 발현시킬 수 있도록 제작된 유전자 백신은 효과적인 PRRSV 백신으로서의 충분한 가능성을 보였다. 하지만, 유전자 백신을 3회 반복 접종하여 도출된 중화항체가 1:4 - 1:8의 경우는 현실적으로 농장에 적용하기 어려운 결과이다. 또한 유전자 백신은 현재까지 상품화시키는 데 제도적으로 많은 제약이 따르는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로 PRRSV 유전자 백신은 추가적인 진행을 보류하였다.



[그림-11] PRRSV 유전자 백신 (AcHERV-GP5) 면역 후 PRRSV에 대한 IgG titer 비교

[표-2] 유전자 백신을 접종한 돼지에서 PRRSV에 대한 중화항체 역가

실험군	실험두수	중화항체 형성 여부	개체 중 최고 중화항체가
AcHERV-PRRSV-ORF5 접종군	5	+ (3/5)	8
음성대조군	5	- (0/5)	0

3. VLP 시제품의 실험실내 효능 시험

▶ 제작된 VLP백신의 면역원성을 확인하기 위하여, 제조된 VLP백신 (10^8 PFU)을 마우스의 복강에 1차로 접종한 후, 2주 간격으로 3차 면역까지 실시하였다. 백신 2주 후에 마우스의 혈액을 취한 후, 혈청에서 PRRSV에 대한 항체가를 ELISA법으로 측정했다. 백신접종군에서 PRRSV의 단백질에 대한 항체가가 음성대조군과 비교하여 상당히 유의성 있게 증가하였다. 또한 중화항체 형성은 2차 면역까지는 낮은 수준 (<1:4)이었지만, 3차 면역 후에는 1:8 수준의 중화항체가를 형성하였다 (표-3). 따라서 기술적으로 VLP의 제작이 PRRS 백신으로서의 가능성은 확인되었지만, 목적동물인 돼지를 면역시키기 위해서는 3차의 접종과 많은 양의 항원을 필요로 하기 때문에 현실적으로 국내 농장 상황에 적용할 수 없다는 결론을 내렸으며, 이에 따라 추가적인 진행을 보류하였다.

[표-3] VLP 백신을 접종한 마우스에서 PRRSV에 대한 항체가 및 중화항체 역가

	항체가 (OD value)			중화항체가		
	2주	4주	6주	2주	4주	6주
VLP백신접종군	0.37	0.72	0.96	0	<4	8
음성대조군	0	0	0	0	0	0

4. 역유전자법에 의한 PRRSV 사독백신 시제품의 실험실내 효능 시험

▶ PRRSV FL12 strain을 site-direct mutagenesis를 통해 GP5의 유전자를 변형시킨 mutant type의 바이러스를 제작한 후, BEI로 불활화시켜 사독백신의 면역원성을 평가하기 위하여 표 5와 같이 총 10마리의 4주령 자돈에 접종하였다. 변형바이러스 백신접종군과 음성대조군으로 나누어 총 7주간 일반항체 그리고 중화항체 생성여부에 대하여 분석하였다. 일반 항체검사는 Herdcheck PRRSV ELISA kit (IDEXX)를 이용하였고, 중화항체검사는 MARC145 cell에 혈청과 바이러스를 감염시켜 혈청 내에 중화항체 존재 여부에 따른 FA 검사법으로 수행하였다. 그 결과로 백신접종군에서는 음성대조군에 비해 높은 중화항체가를 나타냈으며, 이는 국가검정기준에 준수함을 확인

하였다 (표-4). 따라서 역유전자법에 의한 백신주 제작이 기술적으로 작용함과 동시에, 중화항체 형성에 주요 역할을 하는 GP5 유전자를 변형시킨 mutant type 바이러스 작출을 통해 면역원성을 확인하였으며, 이 기술을 활용하여 국내 농장 상황에 적합한 백신주 제작의 가능성을 확보하였다

[표-4] PRRS 사독백신을 접종한 자돈에서의 혈중 항체가 및 중화항체가 측정

	항체가 (OD value)			중화항체가 (개체 중 최고중화항체가)		
	0주	6주	7주	0주	6주	7주
변형바이러스 백신접종군	0.32	0.83	0.91	0	16 (64)	8 (16)
음성대조군	0	0	0	0	0	0

5. chimeric PRRSV 사독백신의 실험실내 효능 시험

(1) chimeric PRRSV의 병원성 측정 평가

▶ Chimeric PRRSV 유래의 wild type 및 mutant type 바이러스를 제작한 후 4령의 PRRS 바이러스에 대한 항체가 음성인 돼지에 대한 변종 바이러스의 병원성 조사를 수행했다. 8마리의 자돈에 $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml의 wild type 및 mutant type 바이러스를 근육 주사하여 공격 접종한 후 일주일 간 임상증상과 혈청 내 viremia를 측정하였다. 공격접종군은 8마리 모두 발열 및 호흡기 증상을 동반한 임상증상이 나타났으나, 음성대조군에서는 임상증상이 나타나지 않았다. 공격접종 후 기간 별로 채혈하여 혈청 분리 후 MARC145 cell에 접종하여 2일 후에 FA를 실시함으로써 혈청 내 viremia를 측정한 결과, 음성대조군의 혈청에서는 바이러스가 측정되지 않았지만, 공격접종군의 혈청에서는 바이러스가 $10^{3.4}$ TCID₅₀/ml로 측정되었다. 공격접종군 내에서도 wild type 바이러스 접종군이 mutant type 바이러스 접종군에 비해 임상증상 및 혈청 내 viremia가 더 높게 나타났다 (표-5).

[표-5] PRRS 변종 바이러스의 병원성 실험 결과

실험군	시험두수	폐사율 (%)	임상증상	viremia
wild type 공격접종군	4	0 (0/4)	+++ (4/4)	+++ (4/4)
mutant type 공격접종군	4	0 (0/4)	++ (4/4)	++ (4/4)
음성대조군	4	0 (0/4)	- (0/4)	- (0/4)

(2) chimeric PRRSV 사독백신 시제품의 안전성 측정 평가

1) 마우스에서 chimeric PRRSV 사독백신 시제품의 안전성 측정 평가

▶ 실험동물인 마우스에서 사독백신에 대한 안전성 시험을 수행하기 위해 체중 약 20g인 마우스 8마리의 복강에 0.5ml을 접종한 후 7일간 관찰했다. 백신접종 후 7일간 이상 증상 없이 모두 생존하는 것을 확인하였다 (표-6).

[표-6] 마우스에서 PRRSV 사독백신 안전성 실험 결과

실험군	시험두수	임상증상	폐사	조직 괴사
사독백신접종군	8	0/8	0/8	0/8

2) 기니픽에서 chimeric PRRSV 사독백신 시제품의 안전성 측정 평가

▶ 사독백신 시제품의 안전성 시험을 수행하기 위해 체중 약 300g의 기니픽 2마리에 2m씩 근육으로 접종하고, 다른 2마리에 복강으로 접종하여 7일간 관찰했다. 백신접종 후 7일간 이상 증상 없이 모두 생존하는 것을 확인하였다 (표-7).

[표-7] 기니픽에서 PRRSV 사독백신 안전성 실험 결과

실험군	백신접종 경로	시험두수	임상증상	폐사	조직 괴사
사독백신접종군	근육	2	0/2	0/2	0/2
사독백신접종군	복강	2	0/2	0/2	0/2

3) 자돈에서 chimeric PRRSV 사독백신 시제품의 안전성 측정 평가

▶ 목적동물인 돼지에서 사독백신에 대한 안전성 시험을 수행했다 (표 -8). PRRS 바이러스 항체 음성인 건강한 4주령 자돈에 백신을 근육 접종한 후 1~2시간 내에 과민반응이 없는 것을 확인하였으며, 시험 기간 동안 백신 주사 부위의 괴사, 발열 증상 및 호흡기 질환 증상 등의 부작용이 없었음을 확인하였다 (표-9).

[표-8] 자돈에서 PRRSV 사독백신 시험 공시축

실험군		시험두수	백신접종 여부
G1	사독백신접종군	6	mutant type 백신 접종
G2	음성대조군	3	무처리

[표-9] 자돈에서 PRRSV 사독백신의 안전성 실험 결과

실험군	실험 두수	임상증상		폐사	조직 괴사
		발열	호흡기 증상		
G1	사독백신접종군	6	0/6	0/6	0/6
G2	음성대조군	3	0/3	0/3	0/3

(3) chimeric PRRSV 사독백신 시제품의 최소면역원성 측정 평가

▶ chimeric PRRSV 유래의 mutant type의 바이러스를 제작한 후, BE로 불활화시켜 사독백신의 면역원성을 평가하기 위하여 표-10과 같이 총 12마리의 4주령 자돈에 접종하였다 mutant type 바이러스의 항원량에 따라 백신접종군이 세 군으로 나뉘었으며, 음성대조군을 포함하여 모든 실험군을 총 7주간 중화항체 생성여부에 대하여 분석하였다. 중화항체검사는 MARC145 cell에 혈청과 바이러스를 감염시켜 혈청 내에 중화항체 존재 여부에 따른 FA 검사법으로 수행하였다. 그

결과로 표-11과 같이 10^8 TCID₅₀/ml의 항원이 함유된 사독백신접종군에서 다른 실험군에 비해 높은 중화항체가 생성되는 것이 확인되었다. 특히 개체 중 최고 중화항체가가 1:32로 측정되었으며 이는 PRRS 바이러스의 감염에 충분히 방어할 수 있는 수준이다. 하지만 10^8 TCID₅₀/ml의 항원량을 제작하기 위해선 바이러스를 대량으로 배양 후 100배 이상의 농축과정이 필요하며, 이는 백신 제조업체의 경제적인 측면에서 비효율적이기 때문에 산업적으로 제작 불가능한 것으로 판단되었다. 10^7 TCID₅₀/ml의 사독백신접종군에서도 평균 1:4의 중화항체가가 확인되었고, 최고 중화항체가는 1:8로 측정되어, 이는 바이러스 감염의 부분적 방어능 뿐만 아니라 국가검정기준에도 적합한 수치이다. 따라서 10^7 TCID₅₀/ml의 항원이 함유된 사독백신으로도 충분히 PRRSV 사독백신으로서 가능성이 확인되었다.

[표-10] 자돈에서 PRRSV 사독백신 시험 공시축

실험군		실험두수	백신접종 여부	항원량 (TCID ₅₀ /ml)
G1	사독백신접종군	3	mutant type 백신 접종	10^8
G2		3		10^7
G3		3		10^6
G4	음성대조군	3	무처리	-

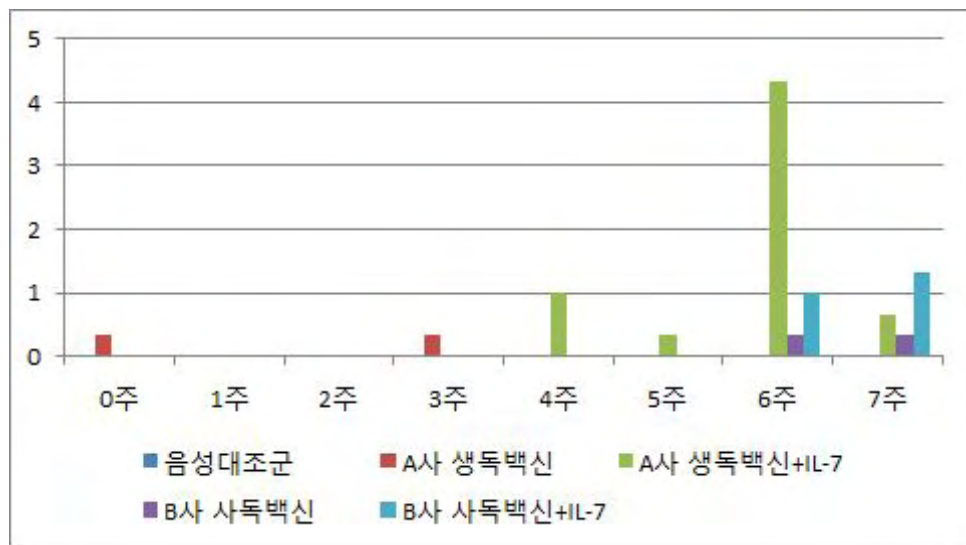
[표-11] PRRS 사독백신을 접종한 자돈에서의 혈중 항체가 및 중화항체가 측정

			항체가 (OD value)			중화항체가 (개체 중 최고중화항체가)		
			0주	6주	7주	0주	6주	7주
G1	사독백신접종군	10^8	0.06	1.99	1.30	0	8 (32)	8 (16)
G2		10^7	0.22	0.59	0.40	0	<4 (8)	4 (4)
G3		10^6	0.05	0.07	0.07	0	0	0
G4	음성대조군		0	0	0	0	0	0

6. 신규 adjuvant의 발굴과 PRRSV 백신에의 적용 효과

▶ 현재 시판되고 있는 PRRS 백신은 바이러스의 감염을 억제할 수 있는 정도의 중화항체 생성능이 없는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 과제에서는 보다 효과적으로 백신의 면역원성을 증진시키는 신규 adjuvant를 발굴하기 위하여, 현재 시판중인 생독백신 (A) 과 사독백신 (B) 을 대상으로 IL-7을 적용하여 그 효과를 평가하였다. 신규 adjuvant인 IL-7은 포항공대의 연구진에 의하여 개발되어 사람을 대상으로 하는 백신의 adjuvant로 사용되는 초기 단계의 제품이며, 산업동물에서의 적용 가능성을 타진하기 위하여 본 시험을 수행하였다. 본 실험을 위하여 4주령 자돈 29마리를 5개 시험군을 나누고, 각 시험군을 생독백신만 접종, 생독백신과 adjuvant 동시 접종, 사독백신만 접종, 사독백신과 adjuvant 동시 접종, 그리고 비접종 음성대조군으로 설정하였다. 백신 접종 후 매주 채혈하여 조직배양법에 의해 중화항체가의 수준을 평가하였다. 그 결과로 생독백신만 접종한 시험군에서는 음성대조군의 경우와 유사한 정도의 중화항체가를 보였다 (그림 -12). 하지만 백신 접종 6주 후에 IL-7을 부형제로 사용한 생독백신시험군에서는 1:4 이상의 중화항체가를 보였다. 이 항체가 수준은 바이러스의 감염을 부분적으로 방어할 수 있는 수준으로, 백신의 효과를 어느정도 기대할 수 있을 것이다. 본 실험에서 가장 흥미로운 것은, 백신 접종 6주 후에 신

규 부형제 IL-7을 접종한 시험군에서 PRRSV의 감염을 억제할 수 있다고 알려진 1:8 이상의 중화항체를 6마리 중에서 3마리에서 보여준 것이다(표 -12). 이 실험결과로 효과적인 PRRSV백신의 개발을 위해서 우수한 바이러스 백신주 개발과 더불어 중화항체를 높일 수 있는 적합한 adjuvant 개발의 중요성을 확인하였으며, 향후 성공적인 PRRS 백신을 개발하는 데 필수적인 요소가 될 것임이 확인되었다. 이 결과로 PRRSV 생독백신과 함께 새로운 부형제인 IL-7을 사용하였을 경우 기대되는 특징인 보다 신속하고 보다 높은 면역반응 유도를 할 수 있다는 가능성을 보였다. 하지만 사독백신의 경우는 생독백신에서의 결과와 크게 다른 양상을 보였다. IL-7을 부형제로 사용한 사독백신시험군에서는 음성대조군 및 사독백신 접종군의 중화항체와 큰 차이가 없었으며, 이로 인해 새로운 부형제인 IL-7은 PRRSV 사독백신과 함께 사용하였을 경우 면역보강제로서의 역할을 충분히 하지 못함을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 선정된 사독백신 시스템에 적용 불가능한 것으로 판단되었다.



[그림-12] PRRSV 백신 접종 후 측정된 중화항체

[표-12] PRRSV 백신 접종 후 중화항체와 부형제의 효과

시험군	자돈번호	백신 접종 후 경과시간 (주)							
		0	1	2	3*	4	5	6	7
음성 대조군	61	0	0	0	0	0	0	0	0
	62	0	0	0	0	0	0	0	0
	63	0	0	0	0	0	0	0	0
	65	0	0	0	0	0	0	0	0
	66	0	0	0	0	0	0	0	0
A사 생독백신만 접종	82	0	0	0	0	0	0	0	0
	83	2	0	0	0	0	0	0	0
	84	0	0	0	0	0	0	0	0
	85	0	0	0	0	0	0	0	0
	86	0	0	0	2	0	0	0	0
	87	0	0	0	0	0	0	0	0
A사 생독백신+IL-7 동시접종	126	0	0	0	0	0	0	4	4
	127	0	0	0	0	0	0	8	0
	128	0	0	0	0	2	0	0	0

	129	0	0	0	0	0	0	2	0
	130	0	0	0	0	0	0	8	0
	131	0	0	0	0	4	2	4	0
B사 사독백신만 접종	25	0	0	0	0	0	0	0	0
	26	0	0	0	0	0	0	0	0
	27	0	0	0	0	0	0	0	0
	28	0	0	0	0	0	0	0	2
	29	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	2	0
B사 사독백신 + IL-7 동시접종	37	0	0	0	0	0	0	2	2
	38	0	0	0	0	0	0	0	0
	39	0	0	0	0	0	0	2	2
	40	0	0	0	0	0	0	0	2
	41	0	0	0	0	0	0	2	0
	42	0	0	0	0	0	0	0	2
* : 사독백신 2차접종일									

7. 효과적인 PRRSV 백신 선정

▶ 현재 시판되는 PRRS 백신의 취약점은 백신을 접종하여도 바이러스의 감염을 방어할 수 있을 정도의 중화항체가 생성되지 않는다는 것이다. 이러한 현상은 PRRSV가 숙주의 면역세포에 침입하여 증식함으로써 면역반응 유도를 억제하여 발생하는 것으로 알려졌다. PRRS 백신의 효능 평가에서 중화항체 생성능은 중요시 되는 부분 중 하나이며, 기출된 논문에 의하면 중화항체의 수준이 1:32이상이면 돼지에서 PRRSV의 감염을 억제할 수 있고, 최소 1:8 이상이면 바이러스의 감염을 부분적으로 억제할 수 있다고 보고되었다. 따라서 효과적인 PRRSV 백신은 신속하고 높은 중화항체가 생성 여부가 관건이다. 본 연구과제에서는 PRRSV 백신 개발을 위해서 국내외적으로 사용되고 있는 다양한 발현 시스템을 이용하여 5종류의 PRRSV 백신 제형을 제작하였으며, 면역원성 시험을 통해 중화항체 생성능을 측정하였다. 그 결과에 따라 chimeric PRRSV 사독백신을 가장 효과적인 백신 제형으로 선정하였으며, 이를 가지고 PRRSV 백신 야외 임상 시험을 수행하였다.

다. PRRSV 사독백신 시제품의 품목 허가

PRRSV 사독백신 시제품을 제작하여 국가 검정기준에 의거한 임상시험은 완료되었으며, 농림축산검역본부에 품목 허가를 통한 산업화를 완료할 예정이다.

라. PRRSV 사독백신의 야외 임상 시험

▶ chimeric PRRSV 사독백신을 제작한 후, 국내 농장에서의 적용 가능성을 평가하기 위하여 표13과 같이 총 3개의 농장에서 효능 평가를 수행하였다. 국내 양돈 농가를 PRRSV를 기준으로 크게 세 가지로 나누어보면, PRRSV가 감염되지 않은 농장(A), PRRSV야외주(LMY와의 상동성 약 96%)가 상재하고 있지만 안정화된 농장(B), 그리고 PRRSV 생독백신을 사용하는 농장(C)으로 분류되며, 야외 임상 시험을 하기 위해 각 농장을 선정하였다. 각 농장별로 총 60마리의 쫄령 자돈에 chimeric 사독백신을 접종하였고, 음성대조군을 포함하여 모든 실험군을 쫄간 중화항체 생성 여부에 대하여 분석하였다. 중화항체검사는 MARC145 cell에 혈청과 바이러스를 감염시켜 혈청 내에 중화항체 존재 여부에 따른 FA 검사법으로 수행하였다. 그 결과는 표 14와 같이 A농장에서는 중화항체 양성율이 약 38%였으며, B농장에서는 약 94%, C농장에서는 약 72%로 농장 상황에 따른 큰 차이를 확인하였다. PRRSV가 감염되지 않은 A농장에서의 비교적 낮은 항체 양성율은

개체 차이에 따른 것으로, 실험군의 개체수를 늘린 후 진행한다면 통계적으로 더욱 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다. B농장은 대부분의 실험돈에서 높은 중화항체를 확인하였다. 이 결과로 B농장에서 상재하고 있는 야외주 PRRSV에 면역이 된 실험돈에서 사독백신에 의한 면역원성 증가를 확인하였다. 그 원인으로 예상되는 PRRSV의 면역원성에 기여하는 바이러스 구조단백질 간의 상동성을 확인해본 결과, B농장의 야외주 바이러스와 사독백신주의 상동성이 약 96%로 높았기 때문에 homogenous strain에 대한 백신 효과임을 확인할 수 있었다. 또한 시판되는 PRRSV 생독백신과 사독백신주의 상동성은 약 91%이며, 생독백신 사용 농장인 C농장에서도 약 72%의 비교적 높은 중화항체 양성율이 확인되었다. 국내 양돈 농가는 전체적으로 PRRSV 바이러스에 감염되었던 이력이 있거나 현재 감염된 상태이거나 또는 생독백신을 사용하여 약독화 생독백신주가 상재해 있는 상태가 대부분이며, 이에 따라 본 야외 임상 시험 결과는 국내 대부분의 양돈 농가에 PRRSV 사독백신의 가능성을 확보한 중요한 결과가 될 것이다.

[표-13] chimeric PRRSV 사독백신 야외 임상 시험 공시축

실험군		실험농장	실험두수	백신접종 여부
A1	mutant type 백신접종군	A	18	mutant type 백신 접종
A2	음성대조군		4	무처치
B1	mutant type 백신접종군	B	18	mutant type 백신 접종
B2	음성대조군		4	무처치
C1	mutant type 백신접종군	C	18	mutant type 백신 접종
C2	음성대조군		4	무처치

[표-14] chimeric PRRS 사독백신을 접종한 자돈에서의 중화항체가 측정

실험군		실험농장	자돈번호	중화항체가	
				0주	7주
A1	mutant type 백신접종군	A	21	2	<2
			23	<2	4
			24	<2	<2
			25	<2	4
			26	<2	2
			27	<2	2
			28	2	16
			29	2	2
			30	<2	<2
			31	8	<2
			32	2	<2
			33	<2	4

			34	<2	4
			35	<2	4
			36	16	<2
			37	8	<2
			38	<2	2
			40	<2	8
A2	음성대조군		42	<2	<2
			43	<2	<2
			44	<2	2
			45	<2	2
B1	mutant type 백신접종군	B	66	2	256
			67	<2	32
			69	<2	32
			70	<2	2048
			71	<2	8
			72	<2	2
			73	<2	4
			74	<2	32
			75	2	32
			76	<2	16
			77	<2	4
			79	4	4
			80	<2	1024
			81	<2	256
			82	<2	32
			83	<2	8
			84	<2	128
			85	<2	16
B2	음성대조군		86	<2	<2
			87	<2	2
			88	<2	16
			89	<2	8
C1	mutant type 백신접종군	C	41	<2	2
			42	<2	8
			43	<2	8

			45	<2	4
			46	<2	8
			05	2	32
			47	<2	8
			48	<2	8
			49	2	8
			04	<2	2
			06	<2	2
			07	<2	64
			01	2	4
			08	<2	8
			27	<2	256
			30	<2	2
			31	<2	16
			32	<2	2
C2	음성대조군		33	<2	2
			34	<2	<2
			35	<2	4
			36	<2	<2

1. 개발배경

면역거세(immunocastration)란 면역 반응을 유도하여 동물의 생식 기능을 없애는 것으로 경제적인 이유와 동물학대 방지 측면에서 외과적 거세에 대한 대안으로 제안되어 왔다. 동물의 거세는 성적 충동으로 야기되는 배회, 땅파기, 성적 행동, 난폭한 행동 등을 감소시키고, 고환암, 전립선암 및 직장암 등을 방지하기 위한 건강상의 목적과, 동물의 과도한 개체 증가를 방지하고 그 이용가치를 높이기 위한 목적으로 행해진다. 외과적 거세는 간단하고 쉬운 방법이지만 동물에게 매우 심각한 고통 및 스트레스를 발생시키기 때문에 동물복지 차원에서 문제가 되므로, 최근 스위스, 노르웨이, 벨기에, 네덜란드 등의 유럽국가의 경우 동물의 물리적 거세를 금지하기로 결정하였으며, 오스트레일리아는 외과적으로 응돈을 거세하는 대신에 면역거세를 시행하는 최초의 국가가 되었고, 우리나라에서도 이와 유사한 조치를 검토하고 있다. 면역거세 방법은 대부분 성선자극호르몬 분비호르몬 (GnRH)에 대한 면역반응을 유도할 수 있는 백신을 이용하여 실시되고 있다. GnRH는 10개의 아미노산으로 이루어진 호르몬으로, 모든 동물에서 거의 동일한 아미노산으로 구성되어 있는 것으로 알려져 있다. GnRH는 시상하부에서 생성되어 뇌하수체에 작용함으로써 성 호르몬인 FSH(follicle stimulating hormone) 및 LH(luteinizing hormone)의 생성을 촉진시키기 때문에, 시상하부에서 GnRH의 생성을 원천적으로 차단할 경우 거세효과가 발생한다는 연구 결과가 보고되고 있다. GnRH를 항원으로 이용하여 동물에 접종하면 백신을 접종 받은 동물에서는 GnRH를 인식하는 항체가 형성되는데, GnRH를 인식하는 항체가 체내에서 생성되는 GnRH를 제거하여 수컷 및 암컷 동물의 성 성숙을 차단함으로써 거세효과를 발휘한다는 것이다. 그러나 GnRH는 동물에서 생성되는 자체 단백질이기 때문에 정상적인 동물의 면역체계에서는 GnRH를 자가항원으로 인식하여 GnRH에 대한 항체를 형성하지 않는다. 따라서 GnRH를 인식하는 항체를 형성시키기 위해서 인위적으로 과량의 GnRH를 투여하거나, GnRH의 항원성을 향상시키기 위해서 캐리어(carrier) 단백질과 융합시켜 투여하는 방법이 시도되고 있다. 최근에 호주에 있는 CSI이라는 회사에서는 캐리어 단백질로서 KLH를 사용하여 거세 백신을 개발한 바 있다. 이 외에도, Pfizer 사가 면역거세 백신으로 Improvac를 개발한 바 있으나, 강력한 면역반응을 유도하지 못하는 단점을 갖고 있다. 또한, WO92/19746은 GnRH 또는 그의 유사체 및 T세포 에피토프(T-cell epitope)를 포함하는 재조합 폴리펩타이드를 이용한 동물의 면역거세 방법을 개시하고 있고, WO02/22659는 GnRH-I 및 GnRH-II 를 이용한 돼지의 면역거세방법을 개시하고 있고, US5837268는 류코톡신(leukotoxin) 및 GnRH 를 포함하는 키메라 단백질(chimeric protein)을 이용하여 GnRH에 대한 면역원성을 개선하는 방법을 개시하고 있으나, 동물에게서 보다 강력한 면역반응을 유도하여 거세 효과를 달성할 수 있는 백신에 대한 요구가 현재까지 계속되고 있다. 한편, STF2(Salmonella typhimurium flagellin fljB)는 TLR 5(Toll-like receptor 5)의 리간드로 작용하는 물질로서 후천성 면역 반응(adaptive immune response)의 활성화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

본 연구에서는 GnRH의 항원성을 향상시키고 모든 동물에게 적용 가능한 면역거세백신을 개발하기 위하여 노력한 결과, STF2와 GnRH를 융합시킨 융합 재조합 단백질을 제조하여 면역거세 백신 시제품을 제작하고 효능을 평가하였다.

2. 면역거세백신 시제품 제작

가. 면역거세 백신의 시제품 제작

(1) 면역거세 백신의 대량 배양법 확립

(가) Sequencing 을 통해 확인된 STF2-GnRH가 들어있는 stock을 overnight culture 한 후 Overnight culture product 200ml를 LB broth Amp(+), Kana(+) 10L 에 접종해서 OD 600값이 0.5에 도달 할 때까지 배양 후 IPTG 1mM을 넣고 induction 실시하여 4-5시간 동안 배양하였음. 8M urea 버퍼와 Ni-NTA resin 을 이용하여 lysis 및 purification 을 실시한 후 SDS-PAGE 를 이용하여 발현 및 정제를 확인한 결과 약 62KD의 밴드가 확인 되었음 (그림 1).

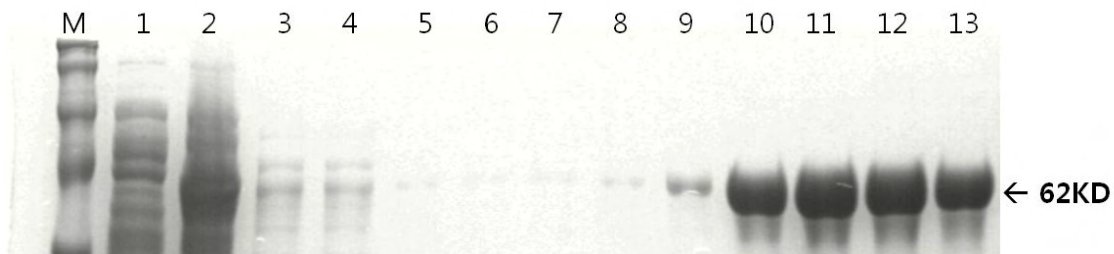


그림 1. M은 standard protein marker를 나타내고 1은 IPTG 를 넣기 전 , 2는 IPTG를 넣은 후, 3은 Ni-NTA, 4 - 5는 washing 단계인 W 1 - 2를 6 - 9 는 elution 단계인 D1 - D4 를 10 - 13은 elution 단계인 E1- E4 를 나타냄.

(나)또한 정제된 STF2-GnRH 단백질을 확인하기 위하여 GnRH 에 대한 항체를 이용하여 western blot을 실시한 결과 약 62kD 의 밴드가 확인되었음 (그림 2).

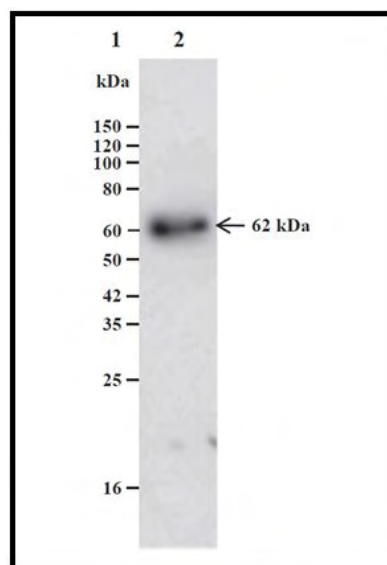


그림 2. western blotting을 이용하여 STF2-GnRH를 확인함 lane 1은 standard protein marker를 나타내고 lane 2는 STF2-GnRH protein을 나타냄.

(2) 면역 거세백신 시제품 제작

(가) 정제한 단백질 2 mg 과 수산화알루미늄겔 0.2 mg 을 혼합하여 시제품을 제작하였음 (그림 3).

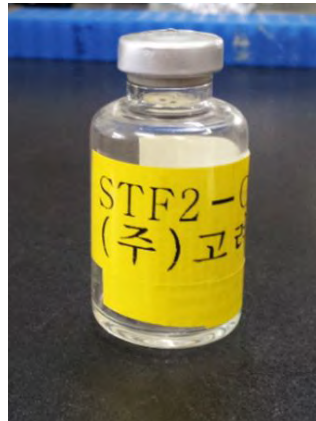


그림 3. 면역거세백신 시제품

3. STF2-GnRH 면역거세 백신 시제품의 실험실내 효능 시험

가. 랫트에서의 STF2-GnRH 백신 시제품의 최소 면역원성 확인 실험

(1) 총 24마리의 6주령 male Spraque Dawley (SD) rat으로 6마리씩 4개의 그룹으로 구성하였음; 그룹 1; control, 그룹 2; STF2-GnRH 10 ug, 그룹 3; STF2-GnRH 50 ug, 그룹 4; STF2-GnRH 100 ug

(2) 그룹 1, 2 그리고 3은 STF2-GnRH 백신을 농도 별로 차이를 두었고 그룹 4는 대조군으로 아무것도 접종하지 않았음. 백신의 접종은 7 주령의 랫트에 1차 접종을 실시하고 2주 간격으로 세 번의 추가 접종을 실시하였음. 모든 그룹의 랫트는 접종 전에 미정맥에서 채혈을 하였고 마지막 백신접종 2주 후 안락사 하기 전에 복대정맥에서 채혈을 실시하였음. 채혈한 혈액은 혈청 분리를 실시하여 추후 ELISA를 이용한 GnRH 항체 검사에 사용하였음. 안락사를 실시한 후 고환 및 부고환을 절제하여 무게와 크기를 측정하고 Bouin's solution 에 조직을 고정하여 조직 검사를 실시하였음.

(3) STF2-6xGnRH 백신을 접종한 그룹인 그룹 1, 2 및 3의 랫트와 비접종 그룹인 그룹 4의 랫트의 고환크기를 비교한 결과 백신을 접종한 그룹의 랫트 고환이 매우 작아져 있음을 육안적으로 확인할 수 있었음 (그림 4).

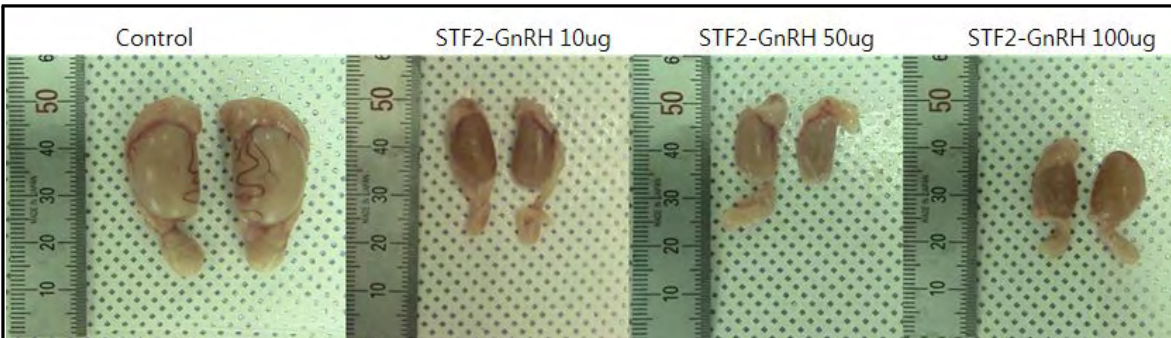


그림 4. STF2-GnRH 백신을 용량별 접종한 그룹별 고환 사진임 .Control은 아무것도 접종하지 않은 그룹을 나타냄.

(4) 각 그룹의 랫트 고환 및 부고환의 무게를 잰 결과는 다음 표와 같고 접종을 하지 않은 그룹의 랫트에 비해 접종을 한 그룹의 랫트 고환무게가 약 40% 이상 적은 것이 확인되었음 (표 1).

표 1. 그룹별 고환 및 부고환의 무게

그룹	백신	고환 및 부고환의 무게(쌍) (g)
I	Control	5.09 (± 0.21)
II	STF2-6xGnRH 10ug	2.23 (± 0.58)***
III	STF2-6xGnRH 50ug	1.04 (± 0.06)***
IV	STF2-6xGnRH 100ug	1.81 (± 0.57)***

*** p<0.001 vs control group

(5) 각각의 접종 전과 안락사 전에 채혈한 혈액에 존재하는 GnRH 에 대한 항체를 측정 한 결과 다음 그림과 같이 접종을 하지 않은 그룹은 항체가 형성되지 않은 것에 반해 접종 그룹의 랫트는 2차 접종 이후부터 항체가 증가하였음 .그러나 백신의 농도에 따른 항체형성의 증가현상은 관찰되지 않았음 (그림 5).

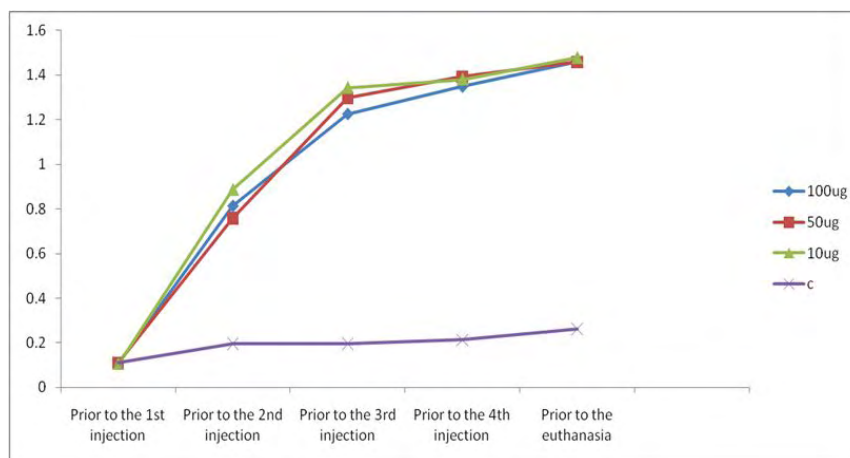


그림 5. GnRH 에 대한 항체를 나타내는 그래프. 세로축은 OD 값을 나타내고 가로축은 접종 후 시간을 나타낸 것임.

(6) 각 그룹의 고환의 조직 검사를 실시한 결과 다음 그림에서와 같이 대조군인 그룹 1의 고환조직은 정세관 (seminiferous tubule, ST) 가장 바깥층에 존재하는 정모세포 (spermatogonia)와 그 안쪽으로 순차적으로 일차 이차 정모세포 (primary, secondary spermatocyte), 정자세포, (spermatid), tail을 가지고 있는 정자가 배열되어 있고 정상적인 크기의 정세관으로 이루어져 있으며 정세관 사이의 간극이 치밀하며 결합 조직에는 leydig cell이 존재하며 혈관이 발달되어 있는 것에 반해 백신 접종군인 2, 3, 4그룹의 고환조직은 대부분의 정세관이 심하게 위축 되어있고 정세관 (seminiferous tubule, ST)을 구성하는 정모세포 (spermatogonia)의 괴사로 인해 일차 이차 정모세포 (primary, secondary spermatocyte), 정자세포, (spermatid)로의 발달이 이루어지지 않아서 형태학적으로 정모세포 이후의 단계가 관찰되지 않고 ST 사이의 결합조직을 이루는 간질세포인 leydig cell의 수가 적으며, 상당히 심한 고환 조직의 손상을 관찰할 수 있음. (그림 6)

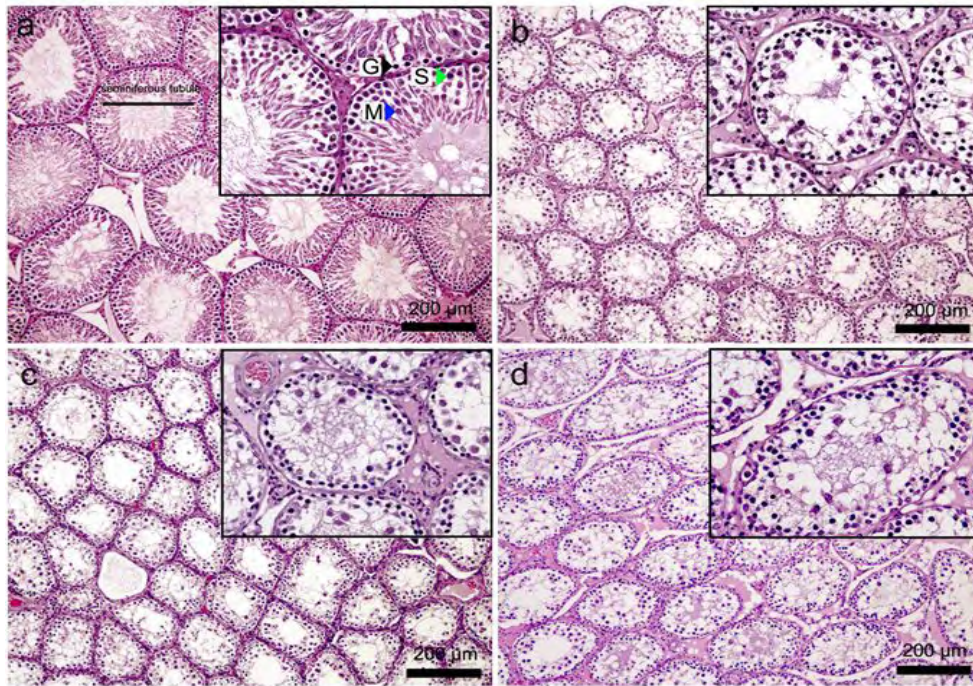


그림 6. 고환 조직 검사 결과 사진. a 는 대조군으로 아무것도 접종하지 않은 그룹의 고환 조직 사진이고 b 는 STF2-GnRH 10ug을 c 는 STF2-GnRH 50ug을 접종한 그룹이며 d는 STF2-GnRH 100ug을 접종한 그룹의 고환 조직사진 이며 a, b, c, d 는 100x 로 각각 안쪽에 있는 박스안의 사진은 400x 로 찍은 고환 조직 사진을 나타냄.

나-1. 돼지에서의 STF2-GnRH 백신 시제품의 면역원성 확인 실험

- 총 21마리의 돼지로 7마리씩 3그룹으로 구성하였음

그룹 1; 거세 그룹

그룹 2; 비거세 그룹

그룹 3; STF2-GnRH 백신그룹

- (1) 백신 접종은 도축 8주전 1차 접종을 실시하였고 도축 4주전 2차 접종을 실시하였음 .모든 그룹의 돼지에서 접종 전 및 도축 전에 채혈을 실시하였고 혈청을 분리하여 GnRH항체 검사 및 testosterone 수치를 측정하였음 . 또한 도축 전에 고환 및 부고환을 절제하여 고환 및 부고환의 무게를 측정하였고 포르말린에 고환조직을 고정하여 조직검사를 실시하였음.
- (2) 각 그룹별로 고환 및 부고환 무게를 측정한 결과는 다음과 같고 control에 비해 백신 접종 그룹에서 고환 및 부고환의 무게가 감소하였음 (표 2).

표 2. 그룹별 고환 및 부고환의 무게

그룹	백신	고환 및 부고환의 무게(쌍) (g)
I	거세	-
II	비거세	706.85 (± 92)
III	STF2-GnRH 백신	523.85 (± 93)*

* p<0.05 vs intact group

- (3) 각 그룹의 돼지에서 도축 전에 채혈한 혈액으로 testosterone 수치를 측정한 결과 접종 그룹이 control 그룹에 비해 월등히 낮은 것으로 나타남 (표 3).

표3. 그룹별 testosterone 농도

그룹	백신	테스토스테론 (ng/ml)
I	거세	0.04 (± 0.012)***
II	비거세	2.132 (± 0.943)
III	STF2-GnRH 백신	0.528 (± 0.255)***

*** p<0.001 vs intact group

- (4) 각각의 백신 4주 후에 채혈한 혈액에 존재하는 GnRH에 대한 항체를 측정한 결과 다음 그림과 같이 접종을 하지 않은 그룹은 항체가 형성되지 않은 것에 반해 접종 그룹의 돼지는 항체가 증가하였음 (그림 7).

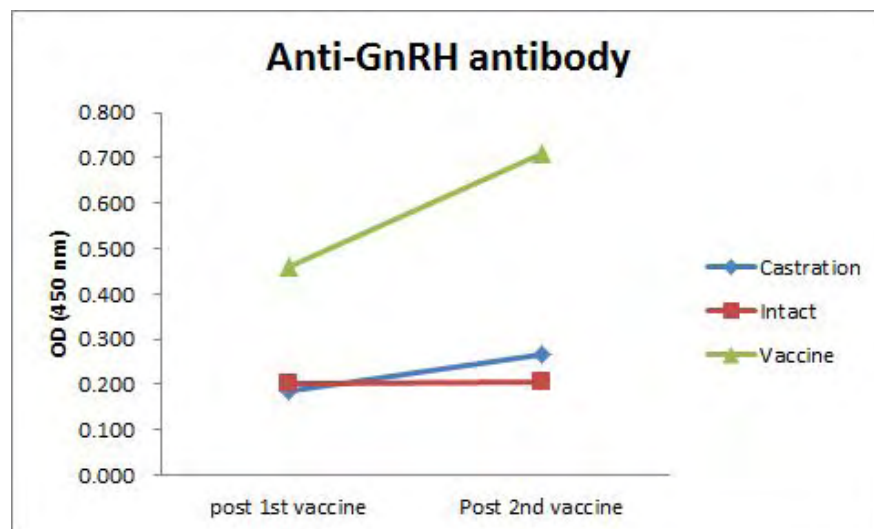
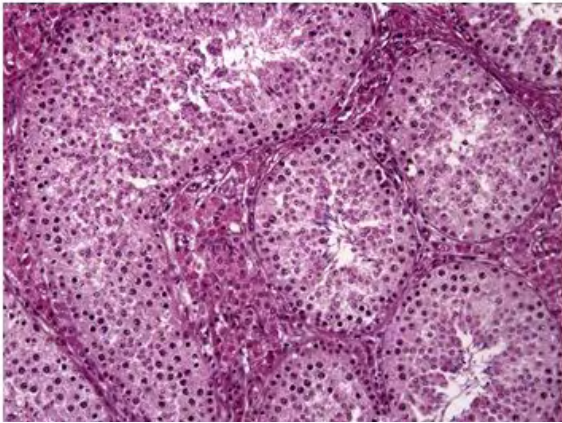


그림 7. GnRH 에 대한 항체가를 나타내는 그래프. 세로축은 OD 값을 나타내고 가로축은 채혈시기를 나타낸 것임.

(5) 각 그룹의 고환의 조직 검사를 실시한 결과 다음 그림에서와 같이 대조군인 Intact 그룹의 고환조직은 성숙 곡정세관 (seminiferous tubule)이 잘 발달되어 있으며 곡정세관 사이 간질세포 (interstitial cell) 또한 정상적인 구조를 관찰할 수 있음. 곡정세관 기저막을 기점으로 지주세포 (supporting cells of Sertoli), 정모세포 (Spermatogonia), 정모세포 (Spermatocyte), 정자세포 (Spermatid), 및 정자 (Spermatozoa)로 발달된 정상적인 곡정세관과 발달중에 있는 곡정세관이 고루 관찰되는 정상적인 고환의 조직조건이 관찰되는 것에 반해 백신 접종그룹의 고환조직은 전체적으로 곡정세관 (seminiferous tubule)이 위축되고, 부분적으로 곡정세관의 기저막에 분포하는 Sertoli cell만 관찰되는 저형성 고환 (testicular hypoplasia)이 관찰됨. 정세관내에 구조물인 정모세포, 정모세포 및 정자의 정상적인 구조가 미약함.

Intact



Vaccine

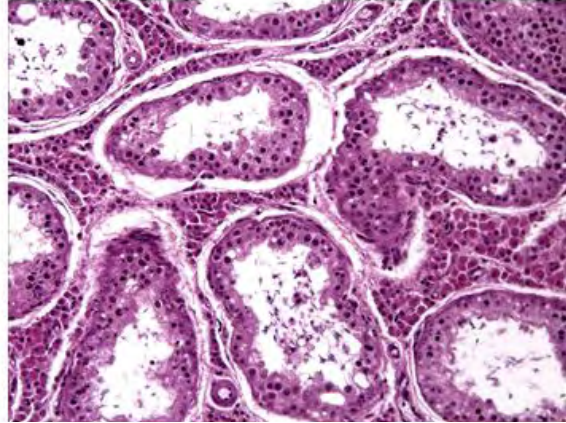


그림 8. 돼지의 고환 조직 검사 사진. Intact는 거세를 하지 않은 돼지의 고환 조직을 나타내며 Vaccine 은 면역거세 백신을 투여한 돼지의 고환조직을 나타냄.

나-2 돼지에서의 STF2-GnRH 백신 시제품의 면역원성 확인 실험

- 35두 돼지를 이용하여 3그룹으로 구성하였고 3반복 실험하여 총 105두 돼지를 이용하였음.

그룹 1; 거세 그룹 : 5마리

그룹 2; 비거세 그룹 : 5마리

그룹 3; STF2-GnRH 백신그룹 : 25마리

백신 접종은 3주령 수컷 돼지에게 1차 접종을 실시하였고, 4주 후 2차 접종을 실시하였음. 모든 그룹의 돼지에서 접종 전 및 도축 전에 채혈을 실시하였고, 혈청을 분리하여 GnRH항체 검사 및 testosterone 수치를 측정할 예정임. 또한 도축 전에 고환 및 부고환

을 절제하여 고환 및 부고환의 무게를 측정하여 고환의 발달 저지 정도를 확인 할 예정이다. 실험은 현재 진행중에 있으며 결과는 도출되는 기간인 8~10월 사이에 나올 예정이다.

다. 실험동물 및 돼지에서의 STF2-GnRH 백신 시제품의 안전성 확인 실험

(1) STF2-GnRH vaccine 의 안전성 시험을 위해서 마우스, 기니픽, 자돈에서 안전성 시험 및 토끼에서 파이로젠 시험을 실시한 결과 이상 없음이 확인 되어 안전성을 확인 할 수 있었음.

마우스 안전 시험 결과

시험백신	품 종	공시수	접종량	접종부위	관찰기간	결 과
STF2-GnRH (1mg/ml)	ICR	5마리	0.5ml	복강	10일	이상 없음

기니픽 안전 시험 결과

시험백신	품 종	공시수	접종량	접종부위	관찰기간	결 과
STF2-GnRH (1mg/ml)	Hartley	2	1.0ml	근육	7일	이상 없음
		2	1.0ml	피하	7일	이상 없음
		2	0.1ml	피내	7일	이상 없음

자돈 안전시험 결과

시험백신	공시수	접종량	접종부위	관찰기간	결 과
STF2-GnRH (1mg/ml)	3	4.0ml	근육	21일	이상 없음

자돈 체온 측정 결과

시험백신	자 돈	접종부위	체 온 측 정			결 과
			접종 전 체온	접종 1시간 후 체온	접종 1일 후 체온	
STF2-GnRH (1mg/ml)	1	이근부 근육 4.0ml 접종	38.7 °C	38.9 °C	39.0 °C	정상
	2		38.9 °C	39.1 °C	39.1 °C	정상
	3		39.0 °C	39.0 °C	39.2 °C	정상

토끼 파이로젠 시험 결과

시험 백신	접종 전	1시간 후	2시간 후	3시간 후	4시간 후
STF2-GnRH (1mg/ml)	37.74	38.29	38.34	38.07	37.78
대조군	37.64	37.63	38.15	37.96	38.30

4. 면역거세 백신 시제품의 품목 허가 신청

가. STF2-GnRH 면역거세 백신 시제품의 품목 허가 신청

- ▶ 제작된 면역거세 백신 시제품 효능 평가자료를 바탕으로 시제품의 야외임상시험 및 품목 허가를 위하여 농림축산검역본부에 기술검토서류 제출을 완료하였음.

5. GnRH Ab ELISA의 구성 및 개발전략

VDPro[®]GnRH Ab ELISA는 indirect ELISA를 사용한 제품으로 GnRH 항원이 고정화된 플레이트에 돼지혈청을 첨가한 후 rGnRH Ag HRP conjugate를 반응시키고 연속하여 발색제를 첨가한다. 혈청 내에 GnRH 특이 항체가 존재하면 항체의 양에 의존적으로 Conjugate가 반응하여 발색제 첨가 후 발색 반응이 증가하게 된다. 반응결과는 양성대조에 대한 혈청의 흡광도 비(S/P, Sample to Positive ratio)를 사용하여 판정하고 ELISA 역가를 산출할 수 있도록 하였다.

이를 위하여 아래 Fig. 3-1-1 과 같은 immunoassay를 design하였으며 요구사항은 아래와 같음.

- Plate : GnRH 항원이 각 8-well strip에 최적의 조건으로 각각 coating 되어야 함.
- conjugate-항체 (HRP conjugated) : GnRH 항원에 의해 감지된 GnRH 특이항체들이 conjugate항체에 의해 모두 인지될 수 있어야 하며 최적의 HRP conjugate 항체의 희석배수가 설정되어야함.
- 기타 시료: 희석배수, 희석된 시료의 plate 반응시간, washing solution type, 기질액 반응시간, 등등에 대한 용법의 확립이 요구됨



Fig.3-1-1 GnRH Ab ELISA의 immunoassay design

6. GnRH Ab ELISA의 plate coating용 항원개발 및 최적반응조건 설정

가. plate coating 용 항원개발

GnRH 재조합단백질을 합성하여 진단항원으로 사용하였음.

항원은 표준혈청과 백신면역혈청을 사용하여 유효성을 확인하였으며 항원고정화농도, HRP-conjugate 농도, 희석비, 반응시간 등을 조정하여 ELISA 반응 최적화를 진행하였음.

Positive control	Commercial items
GnRH mAb	(Santa cruz, sc-33675
GnRH pAb	Thermo scientific, PA1-120
GnRH mAb	Ab frontier, YF-MA13282

Ab coating	Santa	Thermo	Young-in	Santa	Thermo	Young-in
	1 µg/ml					
Ag-HRP	GnRH C-HRP			GnRH N-HRP		
	2 µg/ml					
Ag-HRP	Santa	Thermo	Young-in	Santa	Thermo	Young-in
2	0.961	1.752	1.852	0.892	1.393	1.852
1	0.894	1.513	1.870	0.581	1.514	1.743
0.5	0.441	0.669	0.811	0.318	0.584	0.816
0.25	0.173	0.258	0.288	0.157	0.295	0.304
0.125	0.095	0.126	0.129	0.094	0.124	0.133
0.0625	0.067	0.067	0.081	0.063	0.074	0.079
0.03125	0.057	0.056	0.060	0.052	0.060	0.060
0.015625	0.052	0.050	0.053	0.048	0.050	0.053

Fig.3-2-1 anti Gn RH antibodies 표준시료와 이를 통한 Gn RH 항원의 반응성 확인

나. GnRH Ab ELISA 최적화

GnRH 항체를 검출하기 위하여 간접 ELISA를 사용하였다. 각 항원의 최적 고정화 농도는 Checker-board titration method를 사용하여 결정하였고, 양성대조와 음성대조 혈청을 사용하여 양성혈청의 반응성에 영향을 주지 않고 음성대조혈청에서 비특이 반응이 가장 낮은 조건을 나타내는 희석완충액 및 세척완충액의 성분을 결정하였다. 혈청희석배수는 항체양을 정량적으로 분석하기 위하여 1:100 희석으로 결정하고, 최적 HRP conjugate 농도는 25~50ng/ml로 결정하였다. 혈청과 HRP conjugate의 반응조건은 실온에서 각각 30분씩 반응시키고 TMB기질을 15분 반응하고 정지한 후 OD₄₅₀에서 결과를 판독하였다.

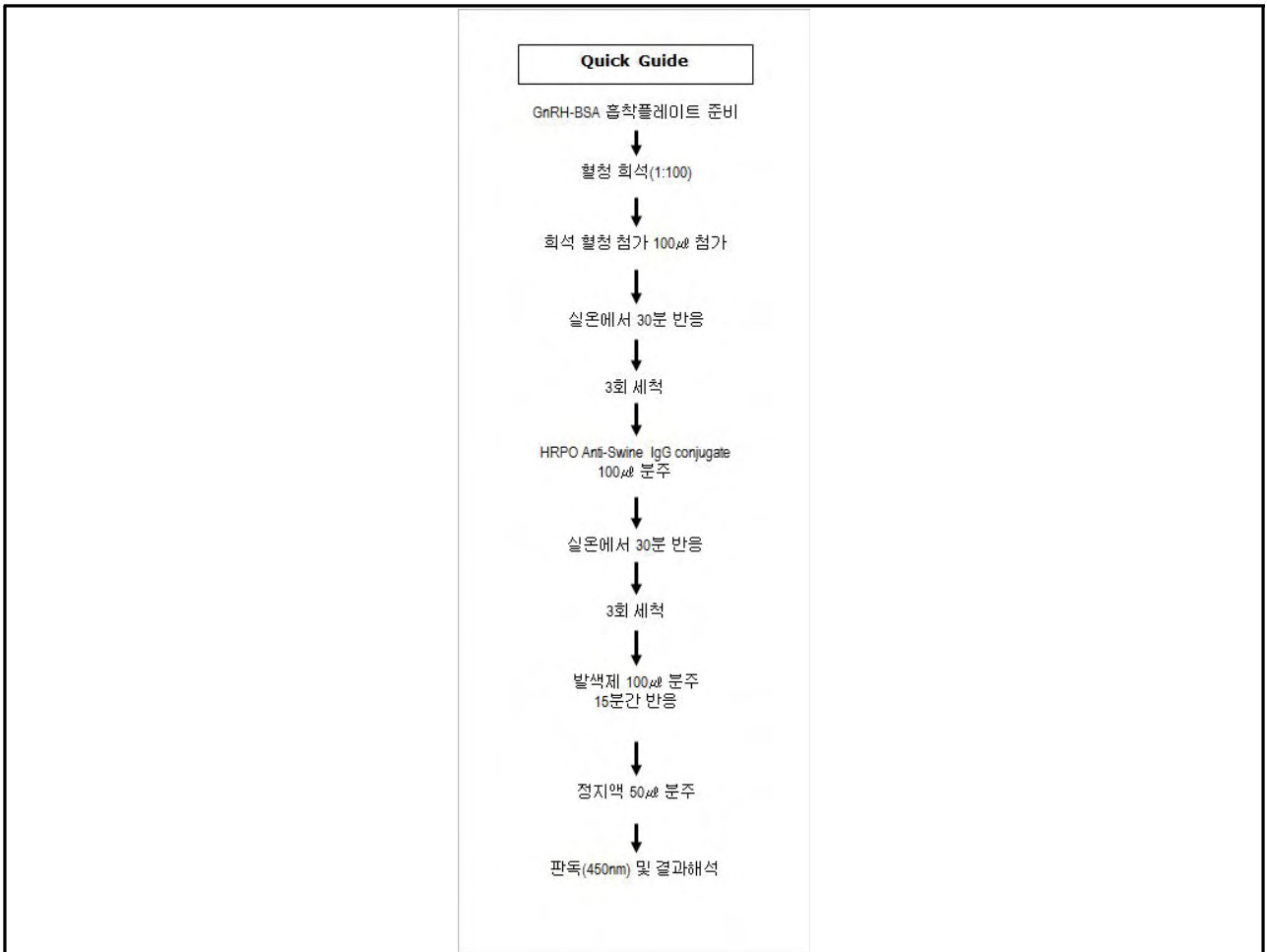


Fig.3-2-2 GnRH Ab ELISA protocol

7. GnRH Ab ELISA의 유효성 평가 및 인허가 등록

가. GnRH Ab ELISA의 유효성 평가

최적조건이 설정된 GnRH Ab ELISA의 유효성 평가를 위하여 아래와 같이 성능을 평가하였고 GnRH 항체진단 ELISA 시제품의 민감도/특이도 시험을 수행하였다.

(1) GnRH 항체 진단 ELISA키트의 민감도/특이도 시험

백신접종 된 돼지혈청 11 건과 백신접종 되지 않은 돼지혈청 52건을 이용하여 GnRH 항체진단 ELISA 시제품의 민감도/특이도 시험을 수행하였다. 백신접종 전과 후를 각 돼지 개체별로 추적 비교하였으며 또한 백신접종 전 그룹과 백신접종 후 그룹을 비교하였다. 각 개체별 백신접종 전/후 결과를 보면 백신접종 전에 비해서 백신접종 후의 S/N 값이 증가함을 알 수 있었으며, 또한 백신접종하지 않은 돈군에 비해 접종한 돈군에서 높은 S/N 값을 보였다. TG-ROC 분석 후 cut-off 농도를 S/N 값 1.1로 설정

경우 GnRH 항체진단 ELISA 시제품의 민감도는 81.8%, 특이도는 84.6%로 측정되었다.

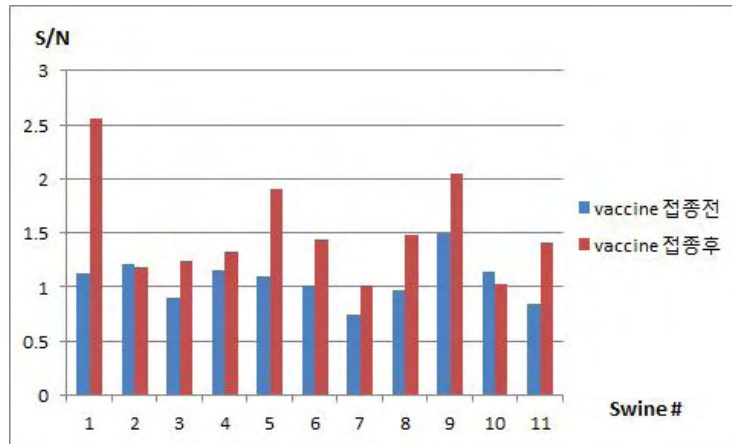


Fig.3-3-1 각 돼지 개체별 백신접종 전과 백신접종 후의 S/N 값 비교

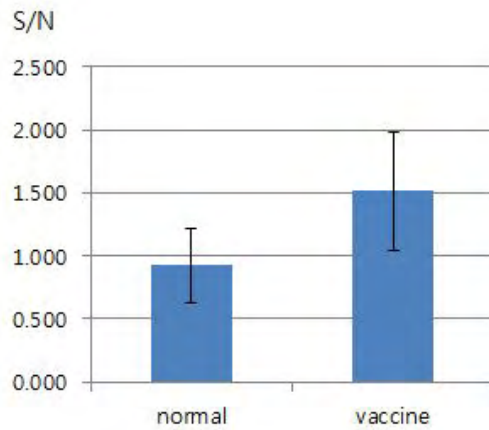


Fig.3-3-2 백신접종하지 않은 정상 돼지혈청(normal, n=52)과 백신 접종한 돼지혈청(vaccine, n=11)의 S/N값 비교

No. of sample	GnRH Ab ELISA					Sensitivity (%)
	No. of Positive	No. of Negative	Mean S/N	Min S/N	Max S/N	
11	9	2	1.436	1.018	2.562	81.8 %

Table.3-3-1. GnRH 항체진단 ELISA의 민감도

No. of sample	GnRH Ab ELISA					Specificity (%)
	No. of Positive	No. of Negative	Mean S/N	Min S/N	Max S/N	
52	8	44	0.92	0.546	1.493	84.6 %

Table.3-3-2. GnRH 항체진단 ELISA의 특이도

(2) GnRH 항체 진단 ELISA키트의 판정기준설정시험

백신접종 돼지혈청 11건과 백신접종하지 않은 돼지혈청 52건을 시제품으로 검사하여 S/N(Sample to Negative control)값을 계산하고 TG-ROC(Two-graph Receiver Operative Curve)분석으로 판정기준을 설정하였다. 그 결과 S/N값 1.1에서 민감도는 81.8%, 특이도는 84.6%를 나타내어 상대적으로 좋은 결과를 보였다.

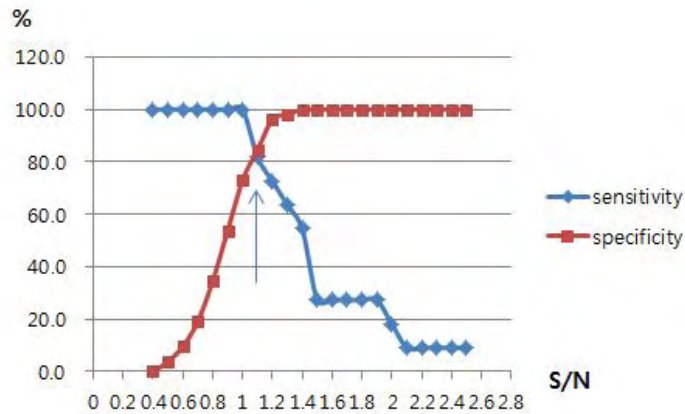


Fig.3-3-3. Two-Graph Receiver Operative Curve (TG-ROC)에 의한 판정기준 분석

(3) 백신접종 Rat 혈청에서의 역가실험

백신이 접종되지 않은 Rat혈청 4종과 백신이 접종된 Rat혈청 12종을 이용하여 GnRH 항체진단ELISA 시제품의 민감도/특이도 시험을 수행하였다. 백신접종 전과 후를 각 Rat 개체별로 추적 비교하였으며 또한 백신접종 전 그룹과 백신접종 후 그룹을 비교하였다. 각 개체별 백신접종 전/후 결과를 보면 백신접종 전에 비해서 백신접종 후의 S/P 값이 증가함을 알 수 있었으며, 또한 백신접종하지 않은 돈군에 비해 접종한 돈군에서 높은 S/P 값을 보였다.

sample	OD	S/P
C-1	0.073	-0.34925
C-2	0.068	-0.36418
C-3	0.075	-0.34328
C-4	0.068	-0.36418
1-1	0.776	1.749254
1-2	0.988	2.38209
1-3	2.383	6.546269
2-1	1.69	4.477612
2-2	2.186	5.958209
3-1	3.047	8.528358
3-2	3.614	10.2209
4-1	1.543	4.038806
4-2	1.304	3.325373
4-3	2.298	6.292537
PC	0.523	
NC	0.188	

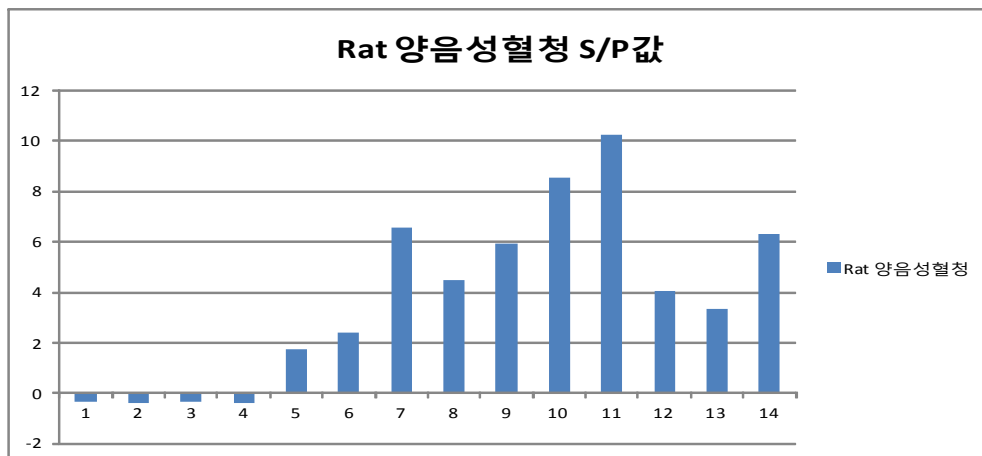


Fig.3-3-4 각 Rat 개체별 백신접종 전 (1~4 개체)과 백신접종 후(5~14) 의 S/P 값 비교

(4) 판정기준 설정(Cut-off) 설정

시제품의 시험기준 및 방법을 설정하기 위하여 판정기준(Cut-off)을 다음과 같이 설정했다.

백신된 돼지혈청 40개와 백신하지않은 돼지 혈청 88개를 선발하여 검체 128개를 시제품으로 검사하여 S/P (Sample to Positive Control)값을 계산하고 TG-ROC(Two-graph Receiver operative curve) 분석으로 판정기준을 설정하였다.

$$S/P = \frac{\text{Sample OD} - \text{Negative Control OD}}{\text{Mean OD of Positive Control} - \text{Mean OD of Negative Control}}$$

판정기준 설정을 위한 혈청패널 구축내역 (n=128)

*백신 시험군: GnRH 단독 백신을 면역한 시험계군

TG-ROC 분석결과 S/P 값 1.0에서 민감도는 80.0%, 특이도는 89.0%를 나타내어 가장 우수한 결과를 보였다. 선정된 혈청패널의 S/P 분포는 백신 음성 혈청 88개중 78 혈청의 S/P값 1.0미만이었고 양성 혈청 40개중32개 혈청의 S/P값이 1.0이상에 분포하였다. 따라서 TG-ROC분석에 의하여 판정기준을 다음과 같이 설정하였다.

양성: S/P ≥ 1.00

음성: S/P < 1.00

S/P	No.of Samples	vaccination		T/F positive		sen.	spe.
		P	N	TP	FP		
0.00	4	0	4	40	4	100	5
0.05	30	1	29	40	33	100	38
0.10	16	0	16	39	49	98	56
0.15	11	4	7	39	56	98	64
0.20	0	0	0	35	56	88	64
0.25	1	0	1	35	57	88	65
0.30	2	0	2	35	59	88	67
0.35	1	0	1	35	60	88	68
0.40	0	0	0	35	60	88	68
0.45	2	0	2	35	62	88	70
0.50	0	0	0	35	62	88	70
0.55	1	0	1	35	63	88	72
0.60	2	0	2	35	65	88	74
0.65	1	1	0	35	65	88	74
0.70	3	0	3	34	68	85	77
0.75	2	2	0	34	68	85	77
0.80	0	0	0	32	68	80	77
0.85	1	0	1	32	69	80	78
0.90	2	0	2	32	71	80	81
0.95	3	0	3	32	74	80	84
1.00	6	2	4	32	78	80	89
1.05	1	0	1	30	79	75	90
1.10	3	0	3	30	82	75	93
1.15	2	2	0	30	82	75	93
1.20	0	0	0	28	82	70	93
1.25	3	2	1	28	83	70	94
1.30	0	0	0	26	83	65	94
1.35	0	0	0	26	83	65	94
1.40	3	2	1	26	84	65	95
1.45	0	0	0	24	84	60	95
1.50	0	0	0	24	84	60	95
1.55	1	1	0	24	84	60	95
1.60	0	0	0	23	84	58	95
1.65	1	1	0	23	84	58	95
1.70	2	2	0	22	84	55	95
1.75	1	1	0	20	84	50	95
1.80	2	2	0	19	84	48	95
1.85	0	0	0	17	84	43	95
1.90	2	2	0	17	84	43	95
1.95	3	1	2	15	86	38	98
2.00	1	1	0	14	86	35	98
2.05	0	0	0	13	86	33	98
2.10	0	0	0	13	86	33	98
2.15	0	0	0	13	86	33	98
2.20	0	0	0	13	86	33	98
2.25	1	1	0	13	86	33	98
2.30	1	0	1	12	87	30	99
2.35	2	2	0	12	87	30	99
2.40	0	0	0	10	87	25	99
2.45	1	1	0	10	87	25	99
2.50	2	2	0	9	87	23	99
2.55	0	0	0	7	87	18	99
2.60	0	0	0	7	87	18	99

Table.3-3-3 TG-ROC분석을 이용한 판정기준 설정

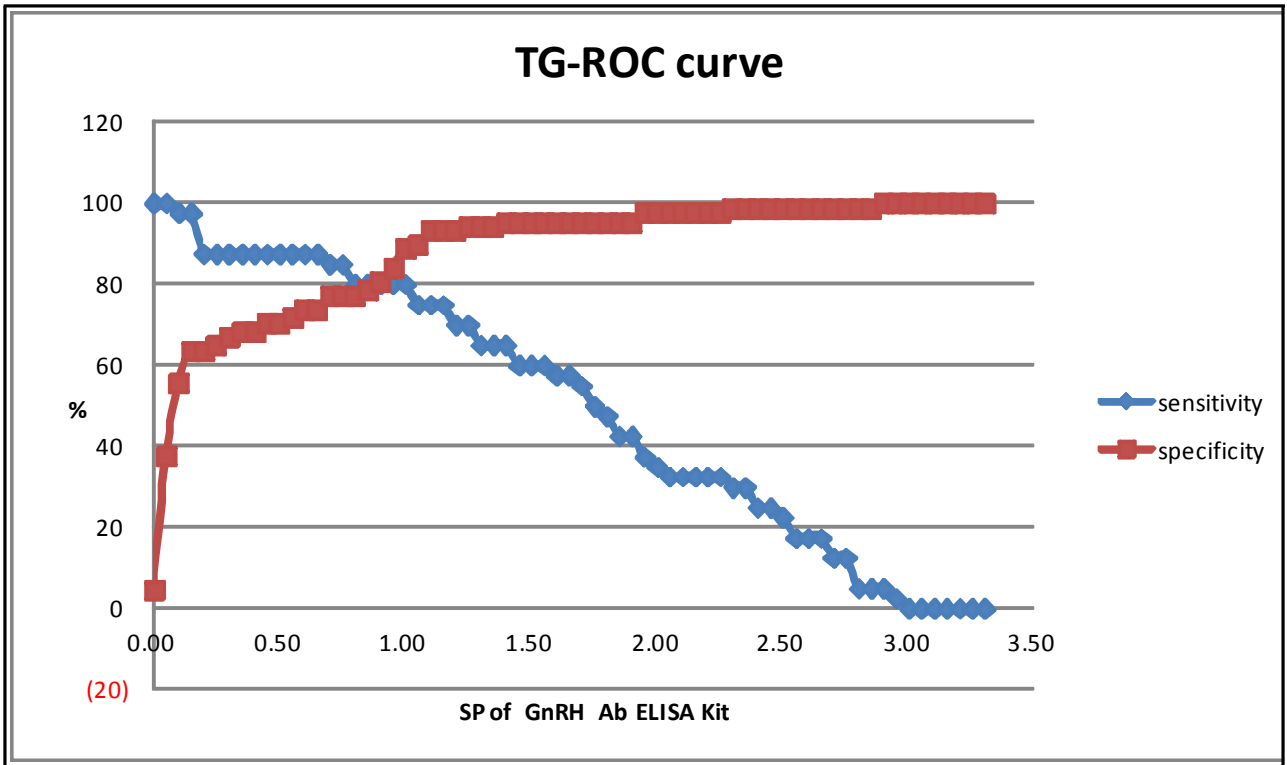


Fig. 3-3-5 Two-graph Receiver operative curve (TG-ROC)에 의한 판정기준 분석

(5) 양성 대조 기준 설정 시험

시제품의 양성대조 대한 시험기준 및 방법을 설정하고 검사 후 Validation을 위한 양성대조의 기준 값을 설정하였다. 양성대조는 구매한 anti GnRH mAb를 희석하여 사용하였다. 양성대조를 포함한 표준회석패널을 사용하여 시제품으로 검사하고 기질반응 후 발색시간을 5분부터 60분까지 반응시킨 후 판독하여 양성 및 음성대조의 흡광도 변화에 따른 판정결과의 변화여부를 확인하고 양성대조의 유효 범위를 설정하였다. 양성대조는 발색 5분 후 최저흡광도 0.215에서 60분 후 최고 흡광도 0.530를 나타내었다. 발색 10분 후에 흡광도인 0.309에서 60분까지 Calibrate에서는 판정결과의 변화가 없었다. 양성대조의 유효성 판정기준은 판정결과가 변하지 않는 최저흡광도인 0.309를 기준하여 이상을 0.35이상으로 설정 하였다.

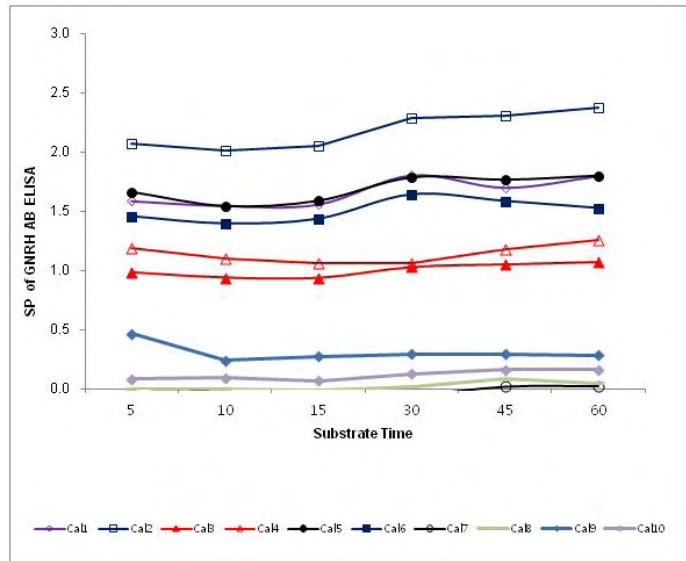


Fig.3-3-6 발색시간에 따른 표준시료의 S/P값 변화

Calibrate	5 min			10 min		
	Mean	S/P	Result	Mean	S/P	Result
cal1	0.292	1.59	P	0.418	1.55	P
cal2	0.356	2.08	P	0.511	2.02	P
cal3	0.213	0.98	P	0.297	0.94	P
cal4	0.240	1.19	P	0.330	1.11	P
cal5	0.302	1.66	P	0.417	1.54	P
cal6	0.275	1.46	P	0.388	1.40	P
cal7	0.081	-0.02	N	0.106	-0.02	N
cal8	0.084	0.00	N	0.110	0.00	N
cal9	0.145	0.47	P	0.158	0.24	N
Cal10	0.095	0.08	N	0.129	0.10	N
PC	0.215	1.00	P	0.309	1.00	P
NC	0.084	0.00	N	0.110	0.00	N

Calibrate	15 min			30 min		
	Mean	S/P	Result	Mean	S/P	Result
cal1	0.494	1.56	P	0.718	1.81	P
cal2	0.612	2.05	P	0.868	2.29	P
cal3	0.346	0.94	P	0.476	1.03	P
cal4	0.377	1.07	P	0.486	1.06	P
cal5	0.501	1.59	P	0.712	1.79	P
cal6	0.465	1.44	P	0.667	1.64	P
cal7	0.111	-0.05	N	0.140	-0.05	N
cal8	0.120	-0.01	N	0.162	0.02	N
cal9	0.189	0.28	N	0.247	0.29	N
Cal10	0.139	0.07	N	0.196	0.13	N
PC	0.361	1.00	P	0.467	1.00	P
NC	0.123	0.00	N	0.156	0.00	N

Calibrate	45 min			60 min		
	Mean	S/P	Result	Mean	S/P	Result
cal1	0.494	1.56	P	0.718	1.81	P
cal2	0.612	2.05	P	0.868	2.29	P
cal3	0.346	0.94	P	0.476	1.03	P
cal4	0.377	1.07	P	0.486	1.06	P
cal5	0.501	1.59	P	0.712	1.79	P
cal6	0.465	1.44	P	0.667	1.64	P
cal7	0.111	-0.05	N	0.140	-0.05	N
cal8	0.120	-0.01	N	0.162	0.02	N
cal9	0.189	0.28	N	0.247	0.29	N
Cal10	0.139	0.07	N	0.196	0.13	N
PC	0.361	1.00	P	0.467	1.00	P
NC	0.123	0.00	N	0.156	0.00	N

Table.3-3-4 발색시간 별 양성대조 흡광도와 Calibrate에서의 결과판정

(6) 음성 대조 기준 설정

시제품의 음성대조에 대한 시험기준 및 방법을 설정하고 검사 후 validation을 위한 음성대조의 기준값을 설정하였다. 음성대조는 GnRH 백신 음성인 돼지 혈청을 사용하여 기준으로 설정하였다. 설정된 음성대조와 양성대조를 포함하여 표준패널(Calibrate, n=8)를 구성하고 시제품으로 검사하였다. 각 Calibrate를 8회 반복검사하여 음성대조의 범위를 설정하였다. 음성대조의 흡광도는 평균 0.130, 표준편차 0.014로 평균흡광도 범위를 아래의 공식에 따라 추정한 결과 최대 0.200까지 변화하는 것으로 측정되었다. 따라서 음성대조의 유효성 판정기준은 평균 흡광도 0.20이하로 결정하였다.

Calibrate	Mean OD	SD	S/P	Range of OD	
				OD+5SD (Max)	OD-5SD (Min)
Cal 1	0.626	0.03	1.70	0.791	0.460
Cal 2	0.438	0.02	1.06	0.515	0.361
Cal 3	0.343	0.01	0.73	0.393	0.292
Cal 4	0.291	0.01	0.56	0.365	0.218
Cal 5	0.105	0.00	-0.08	0.128	0.081
Cal 6	0.118	0.01	-0.04	0.163	0.072
PC	0.422	0.02	1.00	0.527	0.317
NC	0.130	0.014	0.00	0.200	0.060

Table.3-3-5 발색시간 별 음성 대조 흡광도와 Calibrate에서의 결과판정

(6) 시제품의 부품별 가혹 조건에서 안정성 시험

시제품의 주요 구성품인 GNRH 항원 흡착플레이트, HRP Conjugate, 양성 및 음성대조를 가혹조건에서의 안정성을 조사하여 제품의 유효기간을 설정하였다. 시제품 (1071001JJ01)의 GNRH 항원 흡착 플레이트, HRP Conjugate, 양성 및 음성대조를 무작위로 발취하고 37°C 가혹조건하에 보관하였다. 제조 후 4°C에 보관한 각 부품을 대조군으로 하여 가혹조건에서 보관한 각 부품을 비교검사하고 S/P값의 변화를 확인하였다. 가혹조건에서 보관된 부품은 보관 후 1, 7, 14일에 각각 회수하여 검사하고 흡광도의 회수율(Recovery, %)을 아래의 공식에 따라 측정하였다.

$$\text{Recovery (\%)} = \text{Sample OD} / \text{Control OD} * 100$$

양성 및 음성대조 시약은 보존 후 14일 까지 흡광도 값이 90%이상의 회수율을 보여 안정하였다. 항원 흡착 플레이트는 14일까지 판정값에 변화가 없으며 S/P값의 회수율이 89.5% 이상으로 안정하였다. HRPO Protein G conjugate를 검사한 결과 14일까지 판정값에 변화가 없으며 항체가 있는 시료에 대한 S/P값의 회수율이 평균 84.8%이상으로 안정하였다. 시제품은 가혹조건에서 흡광도는 평균 80%이상의 회수율을 보이고 판정값에는 영향을 주지 않아 각 부품은 보관 후 14일까지는 안정하며 12개월 이상 유효한 것으로 판정된다.

양성대조 (Positive control, PC)

Day	Mean OD	Recovery (%)
0	0.429	100.0
1	0.431	100.5
7	0.414	96.5
14	0.409	95.3

음성대조 (Negative control, NC)

Day	Mean OD	Recovery (%)
0	0.107	100.0
1	0.110	102.8
7	0.099	92.5
14	0.097	90.7

Table.3-3-6 양성 및 음성대조의 가혹조건에서 보존기간별 흡광도 및 회수율

Sample	대조군(보관 0 일)				보관 후 1 일			
	OD	S/P	Result	Recovery (%)	OD	S/P	Result	Recovery (%)
cal1	0.657	1.72	P	100	0.672	1.69	P	102.3
cal2	0.466	1.12	P	100	0.462	1.07	P	99.0
cal3	0.361	0.79	P	100	0.346	0.72	P	95.8
cal4	0.294	0.58	P	100	0.327	0.67	P	111.1
cal5	0.090	-0.05	N	100	0.108	0.02	N	120.1
cal6	0.097	-0.03	N	100	0.114	0.04	N	117.3
PC	0.427	1.00		100	0.439	1.00		102.9
NC	0.107	0.00		100	0.101	0.00		94.1

Sample	보관 후 7 일				보관 후 14 일			
	OD	S/P	Result	Recovery (%)	OD	S/P	Result	Recovery (%)
cal1	0.659	1.68	P	100.3	0.626	1.65	P	95.3
cal2	0.439	1.02	P	94.2	0.417	0.98	P	89.5
cal3	0.381	0.85	P	105.4	0.362	0.81	P	100.1
cal4	0.310	0.64	P	105.6	0.301	0.62	P	102.4
cal5	0.095	-0.01	N	105.7	0.106	-0.01	N	117.3
cal6	0.104	0.02	N	106.7	0.102	-0.02	N	105.7
PC	0.431	1.00		100.9	0.422	1.00		98.8
NC	0.098	0.00		91.2	0.107	0.00		100.4

Table.3-3-7 플레이트의 가혹조건에서 보존기간별 흡광도와 S/P값의 변화

Sample	대조군(보관 0 일)				보관 후 1 일			
	OD	S/P	Result	Recovery (%)	OD	S/P	Result	Recovery (%)
cal1	0.654	1.82	P	100	0.687	1.55	P	105.0
cal2	0.448	1.13	P	100	0.537	1.14	P	120.0
cal3	0.346	0.79	P	100	0.387	0.72	P	112.0
cal4	0.291	0.60	P	100	0.288	0.45	P	99.0
cal5	0.104	-0.02	N	100	0.102	-0.06	N	98.0
cal6	0.112	0.00	N	100	0.123	0.00	N	110.0
PC	0.410	1.00			0.488	1.00		119.0
NC	0.111	0.00			0.123	0.00		111.1

Sample	보관 후 7 일				보관 후 14 일			
	OD	S/P	Result	Recovery (%)	OD	S/P	Result	Recovery (%)
cal1	0.653	1.98	P	99.8	0.555	1.54	P	84.8
cal2	0.516	1.49	P	115.2	0.444	1.16	P	99.1
cal3	0.376	0.98	P	108.6	0.337	0.80	P	97.5
cal4	0.280	0.64	P	96.1	0.251	0.50	P	86.2
cal5	0.112	0.03	N	107.8	0.101	-0.01	N	97.0
cal6	0.117	0.05	N	104.5	0.104	0.00	N	93.5
PC	0.381	1.00		92.8	0.396	1.00		96.5
NC	0.104	0.00		93.3	0.105	0.00		94.3

Table.3-3-8 HRPO Protein G conjugate의 안정성

(7) 재현성 및 정확성 시험

양성대조와 음성대조를 이용하여 시제품의 well-to-well 변이계수를 측정하였으며, lot-to-lot variation은 상관계수를 이용하여 측정하였다. 양성대조와 음성대조의 well-to-well 흡광도의 cv%는 각각 3.5%, 4.9%로 나타났으며 다른 검사자가 각각 다른 검사일에 2종의 시제품을 검사하고 판정값과 lot간 S/N값의 상관계수를 분석하였다. 그 결과 lot간 상관계수 (r^2)는 0.988로 높은 상관성을 보였으며 판정값의 차이가 없었다.

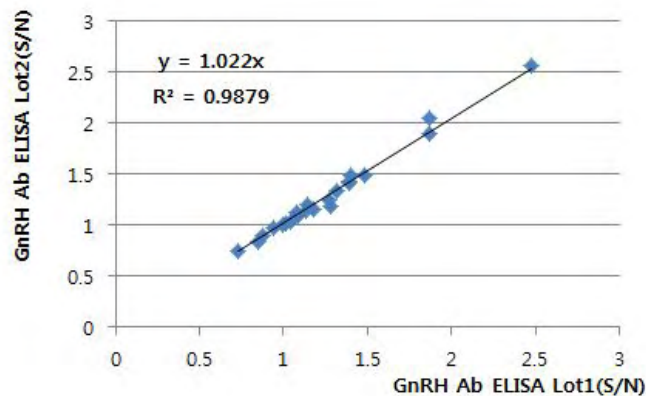


Fig.3-3-6. GnRH 항체진단 ELISA의 제조 Lot간 재현성

본 2핵심 2세부과제 연구에서는 GnRH 항체진단용 ELISA의 성능을 확인하기 위해 임상시료를 시제품의 기설정된 용법 및 용량에 따라 시험하여 민감도, 특이도를 산출하였으며, TG-ROC 분석에 의한 판정기준설정, 재현성 및 정확성 시험 등을 수행하였다. 백신 접종돈군 (n=40)과 백신접종하지 않은 돈군(n=88)의 혈청을 이용해 시험 분석한 결과 민감도는 80.0%, 특이도는 89.0%로 나타났으며, 백신접종혈청을 더욱더 많이 확보하기 위한 노력과 함께 민감도 특이도를 한단계 더 높이기 위한 보완실험 및 안정성 시험 등을 수행하고 있는 중이다. 한편 양성대조와 음성대조를 이용한 well-to-well 홉광도 변이계수(c.v%)는 3.5%, 4.9%, 제조 lot간 상관성(r^2)은 0.988 로 나타나 본 시제품의 재현성 및 정밀성은 매우 양호한것으로 사료된다.

나. GnRH Ab ELISA 국내 인허가 접수 및 등록

GnRH Ab ELISA kit의 국내 인허가 등록 신청을 위해 상기 성능평가 시험자료를 바탕으로 농림축산검역본부의 규격에 따라 인허가 자료를 작성하여 접수 및 등록을 진행 중이다.

<GnRH Ab ELISA 시제품 규격>

Reagents		Volume
1	GnRH Antigen Coated Plates	5
2	Positive Control	1ml
3	Negative Control	1ml
4	(Protein G HRPO) Conjugate	60ml
5	Sample Diluent	45ml
A	TMB substrate	60ml
B	Stop solution	60ml
C	Wash concentrate (10X)	480ml



<첨부 1>

시험기준 및 시험방법

1. 원료의 시험기준 및 방법

원료명	기준 및 시험방법
GnRH-BSA conjugate	정량검사: BCA Protein assay 순도검사: SDS PAGE, 단백질 프로파일 확인 활성검사: ELISA Unit측정 동등성검사: 직전배취와 ELISA 반응성 비교

HRPO protein G Ag Conjugate	동등성 검사: 직전 배취와 ELISA 반응성 검사
양성대조 혈청	ELISA 역가 검사 동등성 검사: 직전 배취와 ELISA 반응성 검사
음성대조 혈청	ELISA 역가 검사: 동등성 검사: 직전 배취와 ELISA 반응성 검사

2. 완제품의 시험기준 및 방법

가. 시험기준

검사항목	기준	비고
Well-to-well 변이계수	평균 CV% 10 이하	
Plate-to-plate 변이계수	CV% 25이상의 상승이 없을 것	
양성대조 평균 흡광도	각 플레이트에서 0.35이상	
음성대조 평균 흡광도	각 플레이트에서 0.20이하	
표준물질에서 판정 값	모든 시료에서 100 일치	

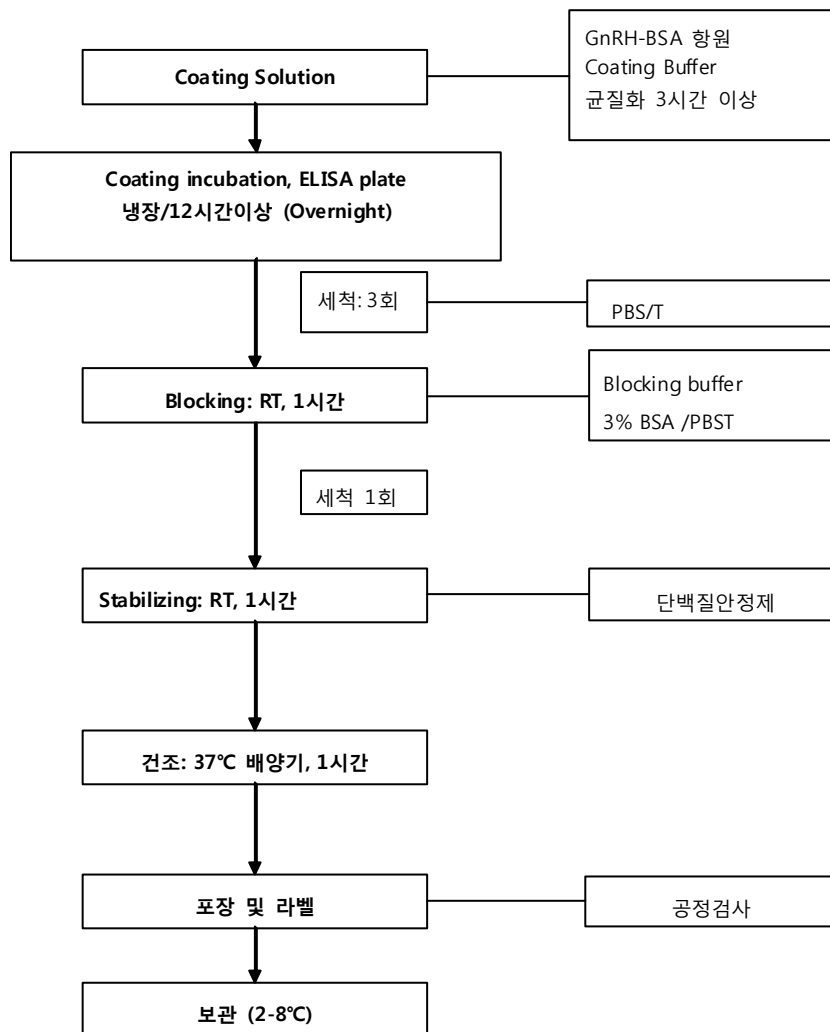
나. 시험방법

- (1) 제품을 무작위 발취하여 사용설명서의 따라 품질관리책임자의 지시에 따라 검사한다.
- (2) Well-to-well 변이계수의 측정은 84 well 이상 검사한다.
- (3) Plate-to-plate 변이계수는 2장 이상의 plate를 검사한다.
- (4) 변이계수(CV%)는 S/N 표준 편차 / S/N 평균 X 100으로 계산한다.

<첨부 2>

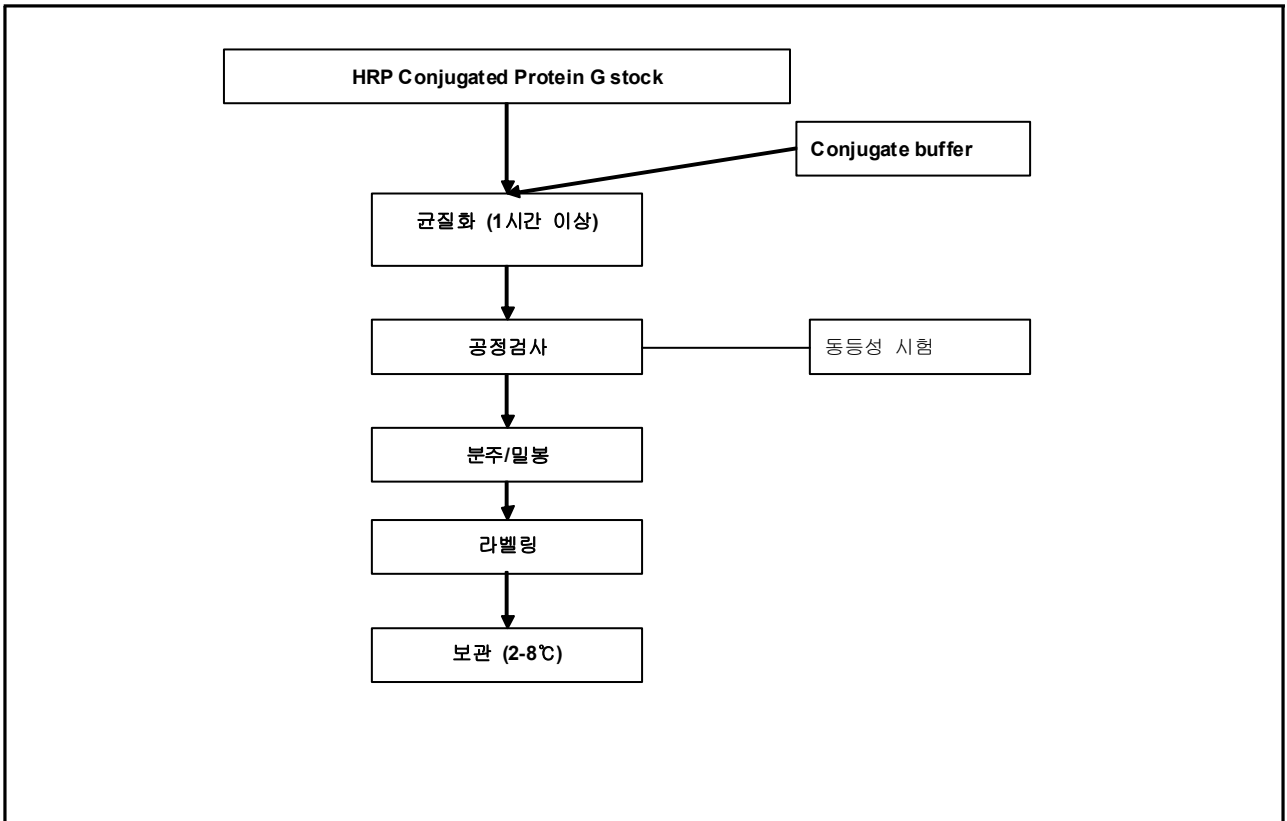
제조 방법

1. 항원흡착 플레이트 제조



2. HRPO protein G conjugate 제조

- 1) HRP conjugate stock은 원료 검사 후 승인된 것을 냉동 보관하면서 사용한다.
- 2) HRP conjugated protein G를 HRP 희석액에 적정농도로 희석하여 제조한다.



3. 양성대조 (Positive Control, PC)

anti GnRH mAb를 돼지혈청에 희석한 후 보존제를 첨가하고 플라스틱 용기에 분주하고 밀봉하여 제조한다.

4. 음성대조 (Negative control)

GnRH 항체 음성인 돼지혈청에 보존제를 첨가하고 플라스틱 용기에 주입하고 밀봉하여 제조한다.

5. 혈청 희석액 제조 (Dilution Buffer)

Tris 완충액에 detergent, 안정제, 보존제 등을 첨가하고 균질화 한 후 플라스틱 용기에 주입하고 밀봉하여 제조한다.

6. 세척액 제조(10X Washing Solution)

멸균 3차 증류수에 detergent, 보존제를 첨가하고 균질화 한 후 플라스틱 용기에 주입하고 밀봉하여 제조한다.

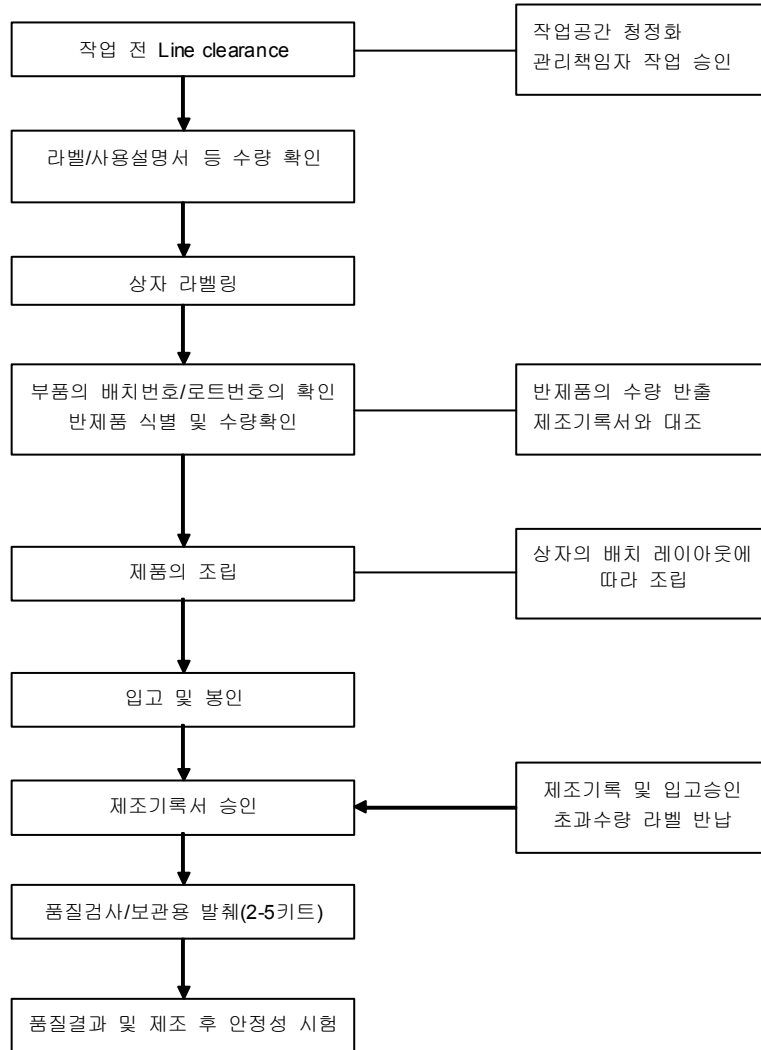
7. 발색제 (TMB Substrate)

제조사로부터 구입하여 플라스틱 용기에 주입하고 밀봉하여 제조한다.

8. 반응정지액 제조(Stop Solution)

0.5M H₂SO₄을 제조하여 플라스틱 용기에 주입하고 밀봉하여 제조한다.

9. 제품의 조립 (Packaging)



첨부 3

1. 시약의 준비

1) 1X 세척액 (1X Washing solution)

20ml의 10X 세척액을 180ml의 증류수와 혼합하여 사용합니다.

2) 발색제(TMB)

발색제는 사용 전 실내온도 적응시킨 후 사용하십시오.

2. 시료(Sample)의 준비

시료는 비동화 또는 비동화 하지 않은 혈청을 사용 하며, 검사 전 까지 -20℃ 냉동고에서 시료를 보관 하십시오.

검사기록지에 아래의 예시와 같이 시료내역을 기록하십시오.

혈청희석용 Deep-well-plate (1ml DWP)의 각 well에 희석액을 1ml씩 분주합니다.

혈청희석용 DWP의 well에 가검혈청을 1 μ l씩 분주 하십시오.

3. 검사 순서

GnRH 항원흡착 Plate를 실온에 적응시킨 후 포장백에서 꺼내 준비된 혈청희석용 DWP와 동일하게 표시 하십시오.

500배 희석된 가검혈청과 원액의 양성대조, 음성 대조를 각각 100 μ l씩 GnRH Antigen Coated Plate에 분주하십시오.

실온(22 $^{\circ}$ C -27 $^{\circ}$ C)에서 30분 반응시키십시오.

플레이트를 털어버리고 1X 세척액 300 μ l를 모든 well에 분주한 후 바로 털어 버리는 방법으로 세척을 실시하되 이 과정을 3회 반복합니다.

마지막으로 세척액을 제거한 뒤 plate를 거꾸로 들고 paper towel에 수 차례 쳐서 남아있는 용액을 제거하십시오.

HRPO protein G conjugate를 100 μ l씩 분주하고 실온(22 $^{\circ}$ C -27 $^{\circ}$ C)에서 30분 반응시킵니다.

반응이 끝난 Plate는 위의 4-5)의 방법과 동일하게 세척하십시오.

발색제(TMB)을 100 μ l씩 분주하십시오.

15분 후 정지액을 50 μ l씩 첨가하여 반응을 중지시킵니다.

ELISA Reader 450nm에서 흡광도(OD₄₅₀)를 측정 하십시오.

4. 결과해석

1) 유효성 평가 (validation)

양성대조 (PC)의 평균 O.D는 0.50이상

음성대조 (NC)의 평균 O.D는 0.20이하

2) 결과판정 (Interpretation)

SP ratio 산출 (S/P)

S/P = $\frac{\text{시료OD}-\text{음성대조평균OD}}{\text{양성대조평균OD}}$

양성대조평균OD-음성대조 평균OD

결과 판정.

S/P	< 1.00	≥ 1.00
결과 판정	음성	양 성

3. GnRH Ab ELISA 해외 수출 계획

가. 수출국 및 바이어 선정

수출관련사항

Contents	Progress	Remarks
KOTRA 해외시장 사전조사서비스 중국	Pfizer사의 IMPROVAC정보에 대해 조사한 결과, 2010년 이미 중국판매 허가 획득(IMPROVAC 수태지의 응취 억제 백신, 중국시장에서의 농업부 비준), 단 실제 판매와 관련된 정보가 없으며, 또한 사용 후 검사결과나 수요상황에 대한 정보가 나타나지 않고 있음.	중국청두무역관 진단시약의 수요에 한계가 예상됨 GnRH 항체진단키트의 수요없음
북미	2011 美 FDA 승인 승인58번째국가	GnRH 항체진단키트의 수요없음
유럽	23개국 런칭	GnRH 항체진단키트의 수요없음
인도네시아	판매여부 정보없음	자사대리점문의
필리핀	판매여부 정보없음	자사대리점문의

개발 배경

돼지증식성회장염은 *L. intracellularis*라는 그람 음성의 세포내 기생세균에 의하여 발생한다. 이 세균의 감염은 감염된 숙주의 만성 설사 등의 소화기 질병을 유발하여 사료효율의 저하, 도태율의 증가 등으로 인하여 양돈 산업에 경제적으로 막대한 피해를 끼치는 질병이다. 이 질병은 사양관리가 우수한 종돈장 및 양돈장에서 발생하는 특징이 있으며, 주로 8주령 이상의 육성돈, 비육돈, 모돈에서 발병된다. 우리나라를 비롯한 유럽, 아시아, 북미 등 전 세계적으로 양돈농장의 약 25-50%가 회장염균에 감염된 것으로 보고되었고, 혈청학적 검사에서는 약 90% 이상이 양성반응을 보이고 있다. 이 질병의 전파는 감염 모돈이나 다른 감염돈이 분변을 통하여 수직, 수평으로 감염되는 특성을 가지고 있다. 이러한 감염경로의 특성으로 인하여, 이 세균은 양돈 농장에 상재하면서 양돈 산업에 경제적으로 큰 피해를 끼치고 있다. 따라서 회장염을 쉽게 제어할 수 있는 가장 효과적인 방법은 사양 환경의 개선, 감염 개체의 조기 발견을 통해 도태시키는 것이다. 회장염은 크게 만성형과 급성형이 존재한다. 대부분 농장에서 회장염에 대한 정상적인 모체이행항체를 가지는 돼지는 만성과 무증상 형태의 회장염으로 발생한다. 많은 농장에서 포유자돈을 이유자돈사로 옮긴 직후나 초기 육성기에 돼지가 회장염균에 노출되며, 잠복기 이후 몇몇 돼지에서 질병이 발생하고 세균이 배출되면서 다른 돼지에 질병이 퍼지기 시작한다. 급성 회장염의 경우는 돼지가 이전에 회장염에 걸리지 않은 상태에서 상대적으로 많은 양의 회장염균에 노출되었을 때 발생한다. 이 병원체는 항생제의 처방으로 쉽게 제어할 수 있지만, 항생제의 사용을 중단한 후 쉽게 재발하는 경향이 있다. 그 예로 18주령까지 항생제를 투여한 실험군에서 항생제 치료를 중단한 후 *L. intracellularis*를 접종하였을 때, 급성의 심각한 출혈성 회장염이 발생한 연구 결과가 있다. 유럽의 일부 국가에서는 1990년대 초에 사료 내 항생제 첨가를 금지한 이후로 회장염 진단율이 증가하였다. 항생제의 사료첨가 금지 이전에도 많은 농가에서 회장염이 진단되었지만 현저한 임상증상을 보이지 않아 심각한 질병으로 고려되지 않았었다. 하지만 사료첨가제의 사용이 금지된 후 회장염 및 세균성 질병의 발생이 급격히 증가하였고, 이로 인한 일당중체량의 감소가 50%에 달했다. 이러한 현상은 항생제의 사료첨가 금지 조치에 따라 그동안 항생제 사용으로 억제되었던 병원성 세균이 새로운 감염을 유발하여 심각한 질병으로 발전할 수 있는 가능성을 확인한 사례로 볼 수 있다. 따라서 많은 국가에서 사료첨가 항생제의 사용금지로 인하여 예측되는 주요 세균성 질병의 폭발적인 발생에 미리 대비할 필요가 있다고 인식되어져 많은 연구가 진행되는 상황이다. 국내에서도 돼지 회장염은 거의 모든 농장에서 항체 양성으로 조사되었으나 뚜렷한 증상이 나타나지 않는 경우가 대부분이었다. 하지만 현재 정부에서 사료 첨가용 항생제 사용을 금지하는 법안이 시행됨에 따라 유럽의 사례를 바탕으로 앞으로 더욱 빈번히 발생될 회장염을 예방할 수 있는 회장염 백신 개발의 필요성이 대두되고 있다. 그러나 회장염의 원인균인 *L. intracellularis*는 세포에 균을 접종하여 배양하는 시스템을 사용하기 때문에 일반 세균 배양법에 비해 배양이 어려워 전세계적으로 본 세균에 대한 연구가 미진한 상태이다. 따라서 질병의 효과적인 제어를 위하여 백신 및 진단법의 개발이 요구되는 바이다.

본 연구진은 증식성회장염 증상을 보이는 돼지에서 *L. intracellularis*를 분리 배양하여 KK42 균을 보유하고 있으며, 이를 세포에 접종하는 배양 시스템을 확립한 후 높은 횟수로 연속 계대 배양하여 백신 주로 사용할 수 있도록 약독화시켰다. 약독화된 돼지증식성회장염 백신으로 실험동물 및 목적동물에서의 실험실 내 효능시험을 수행하였다.

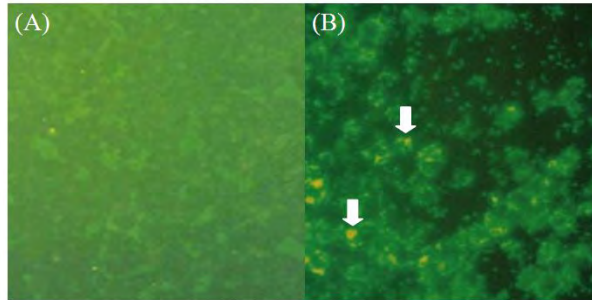
가. 돼지증식성회장염 백신 시제품의 제작

1. *L. intracellularis* 생독백신 시제품 제작

▶ *L. intracellularis* 생독백신의 제작

*L. intracellularis*균의 계대 배양을 통한 약독화 생백신 제조를 위하여, 본 연구사업단에 의하여 국

내에서 분리된 *L. intracellularis* KK421 주(KCTC 10686)를 마우스 유래의 McCoy 세포(ATCC CRL 1696)에 접종하여 계대 배양하였다. 5% FBS (Fetal Bovine Serum)가 첨가된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)배지에 세포는 1ml당 5×10^5 의 농도가 되도록 계대 배양하였다. 배양시 가스 조성은 8.0%의 수소, 8.8%의 이산화탄소, 83.2%의 질소로 구성된 혼합 가스를 사용하였고, 37°C에서 5일 동안 배양하였다. 감염 5일 후, 세포 단층 표면에 0.1%의 염화칼륨을 적용시키고 10분간 반응 후 5% FBS가 첨가된 SPG용액을 첨가하여 중화한 후 부착된 세포를 수거하였다. 수거된 세포는 20G의 syringe needle을 통해 물리적인 힘을 가하여 파열시킨 후 원심분리 한 후, 상층액에서 *L. intracellularis*만을 분리하여 McCoy 세포에 계대 배양을 하였다. 세균 배양 확인은 면역형광 염색법(그림1)과 Real-time PCR을 이용하여 확인하였다.



[그림-1] *L. intracellularis* 의 면역형광 염색법. (A) 음성, (B) 양성. *L. intracellularis* (화살표).

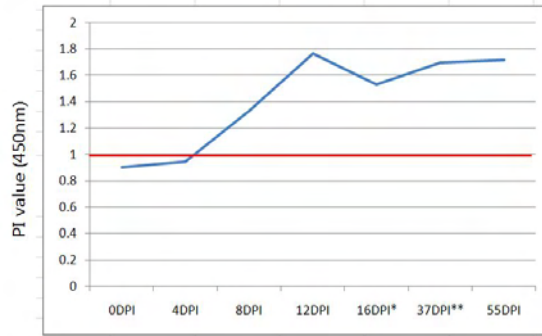
나. 돼지증식성회장염 생독백신 시제품의 실험실 내 효능 평가 시험

1. SPF 닭을 이용한 돼지증식성회장염 생독백신 시제품의 면역원성 시험

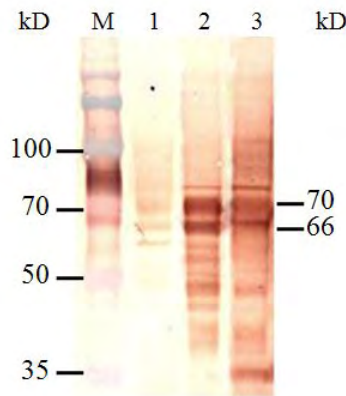
▶ 계대배양을 통해 약독화된 생독백신 균주의 면역원성을 검정하기 위하여 SPF 닭에 약독화된 *L. intracellularis* 접종 후 항체생성여부를 검정하였다. 표-1과 같이 백신접종군과 음성대조군으로 나누어 총 20마리의 SPF 닭을 이용하여 8주간 항체생성여부를 ELISA를 통해 검정하였다. ELISA는 *L. intracellularis* 백신주를 96well plate에 코팅하여 사용하였으며, 항체로는 HRP가 conjugat된 anti-chicken IgG를 사용하였고, TMB substrate로 발색하였다. 그림-2에서와 같이 백신접종 4일 후부터 항체가 확인되기 시작하여 12일 후에 최고치에 도달한 후 감소하는 경향을 보였다. 그 후 16일 차에 2차 추가접종을 진행하고 37일차에 3차 추가접종을 진행한 결과 항체생성의 증가를 확인할 수 있었으며 western blotting(그림-3)을 통해 검증하였다. 본 실험에서는 약독화된 생독백신균주의 면역원성을 확인하였으며, 이에 따라 *L. intracellularis*에 감수성이 있다고 알려진 실험동물 및 목적 동물에서의 효능 평가를 수행하였다.

[표-1] SPF 닭에서 *L. intracellularis* 약독화 생독백신주 접종 시험 공시축

실험군		실험두수	백신접종 여부
G1	약독화 생독백신접종군	10	<i>L. intracellularis</i> 생독백신 접종
G2	음성대조군	10	무치치



[그림-2] SPF 닭에서의 *L. intracellularis* 백신접종군 항체가 측정 결과
*: 1차 부스팅, **: 2차 부스팅



[그림-3] SPF 닭에서의 *L. intracellularis* 백신접종군 혈청을 이용한 western blotting 결과
M : 단백질 마커; 1 : 백신접종일; 2 : 1차 부스팅; 3 : 2차 부스팅

2. IFN- γ knockout 마우스를 이용한 돼지증식성회장염 생독백신 시제품의 안전성 시험

- ▶ 연속 계대 배양하여 약독화시킨 백신주의 안전성을 검정하기 위하여 *L. intracellularis*에 감수성 있다고 알려진 IFN- γ knockout 마우스에 접종하고 분변 shedding 여부를 PCR법으로 확인하였다. 표-2와 같이 분변에서의 백신주 shedding은 백신접종군에서는 검출되지 않았으며, 양성대조군에서만 접종 후 4일-16일까지 검출되었다. 본 실험에서는 IFN- γ knockout 마우스 접종실험을 통해 계대배양된 균주의 약독화 여부를 확인하였고, 약독화된 생독백신균주를 사용하여 마찬가지로 감수성을 보유하는 햄스터에서의 효능 시험을 수행하였다.

[표-2] *L. intracellularis* 백신주 접종 후 IFN- γ knockout 마우스 분변에서의 균 검출 결과

실험군		분변에서의 <i>L. intracellularis</i> 검출 결과						
		접종일	4일	8일	12일	16일	20일	24일
G1	야외분리주 공격접종군	-	+	+	+	+	-	-
G2	약독화 생독백신접종군	-	-	-	-	-	-	-
G3	음성대조군	-	-	-	-	-	-	-

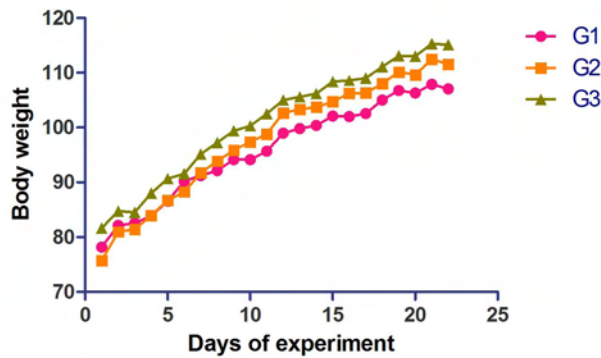
2. 햄스터를 이용한 돼지증식성회장염 생독백신 시제품의 효능 평가 시험

- ▶ 연속계대 배양으로 약독화시킨 백신주를 *L. intracellularis*에 감수성이 있다고 알려진 실험동물인

햄스터에 접종하여 효능시험을 수행하였다. 표-3과 같이 총 15마리의 3주령 햄스터를 사용하여 약독화 생독백신접종군과 야외분리주 접종군과 음성 대조군으로 나누어 그룹당 5마리씩 경구로 접종하였다. 세균 접종량은 1×10^8 이상의 생균수를 가지는 세균배양액을 투여하였다. 백신 접종 후 매일 임상증상 관찰과 체중을 측정하였다. 또한 분변 가검물을 매일 채취하여 분변으로 균의 배출여부를 PCR법을 통해 분석하였다. 백신 접종 3주 후에는 부검을 통하여 회장 부위의 병변 유무를 확인하였다. 백신 접종 기간 동안 회장염에 의한 특별한 임상증상은 관찰되지 않았으며 체중 변화는 그림-4와 같이 모든 실험군에서 비슷한 일별 체중 증가 양상을 확인하였다. 실험군 중 백신접종군의 체중 변화가 음성대조군의 체중 변화와 큰 차이 없이 증가되는 것에 비해 분리주 접종군은 상대적으로 낮은 체중 변화를 보였다. PCR을 통한 분변에서의 균검출 결과는 야외 분리주의 접종하였을 경우에는 접종 후 6일부터 시험이 종료되는 2일까지 세균의 배출이 검출되었지만, 백신접종군에서는 분변에서의 세균 검출이 간헐적으로 검출됨이 확인되었다 (표-4). 시험 종료시 수행된 부검소견에 따르면, 백신접종군 및 음성대조군의 회장에 특이적인 병변이 나타나지 않았지만, 분리주 접종군에서는 회장 부위의 비후 및 출혈 증상을 보였다 (그림-5). 이 결과에 따르면 세포에서 연속 계대배양으로 야외분리주는 병원성이 소실되었고, 접종된 햄스터에서 병원성이 없음이 확인되었다.

[표-3] 햄스터에서 *L. intracellularis* 약독화 생독백신주 접종 시험 공시축

실험군		실험두수	접종 여부
G1	야외분리주 공격접종군	5	<i>L. intracellularis</i> 공격접종
G2	약독화 생독백신접종군	5	약독화 <i>L. intracellularis</i> 생독백신 접종
G3	음성 대조군	5	무처리



[그림-4] 햄스터에서 백신 접종 기간 동안의 체중 변화

[표-4] 약독화 생독백신접종 후 햄스터 분변에서의 균 검출 결과

	분변에서의 <i>L. intracellularis</i> 검출 결과																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
G1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-

G3

G1 (*L. intracellularis* challenge)

G2 (cell-attenuated vaccine)

[그림-5] 백신 접종 후 부검을 통한 회장에서의 병변(화살표) 확인

3. 목적동물(돼지)을 이용한 돼지증식성회장염 생독백신 시제품의 면역원성 및 안전성 평가 시험

▶ 앞서 SPF 닭과 IFN- γ knockout 마우스, 햄스터를 이용하여 검증된 백신주를 목적 동물인 돼지에서의 면역원성 및 안전성시험을 진행하였다. 회장염에 감염되지 않은 5주령의 돼지 50마리를 개발된 백신을 접종하고 10주간 분변에서의 균 검출을 위한 PCR과 혈중 항체 측정을 위한 항체검사를 진행하였다. 백신접종 후 10주간 모든 돼지에서 회장염으로 의심되는 임상증상을 관찰할 수 없었으며, 분변 PCR의 결과에서는 시험기간 내 분변을 통해 *L. intracellularis*가 배출되지 않았으므로 개발된 생백신주의 안전성이 확인되었다 (표-6). 항체검사를 통해서도 항체가 음성이었던 백신접종 전에 비해 백신접종 4주 후에는 항체가 증가가 확인되었으며 10주 이상 유지되었다 (그림-6). *L. intracellularis*에 대한 중화항체 시험에서는 백신접종 후의 혈청과 *L. intracellularis*를 반응시킨 후 McCoy 세포에 접종하여 4일 후에 수거한 후 RNA를 분리하여 16s rDNA에 대한 Real-time PCR로 측정하였다. 중화항체는 그림-7과 같이 양성대조군 (Red line, McCoy 세포에 *L. intracellularis*만을 접종시킨 결과)에 비하여 경시적으로 증가되는 경향을 보였다. 이와 같이 목적동물에서의 면역원성과 안정성을 확인하였다.

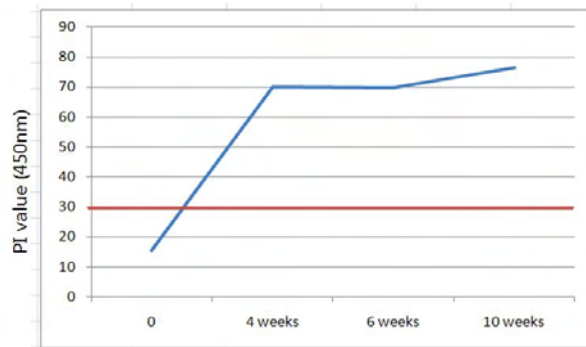
[표-5] 돼지에서 *L. intracellularis* 백신주 시험의 공시축

실험군	실험두수	회장염균 접종 여부
G1	5	약독화 생독백신 접종
G2	5	무처리

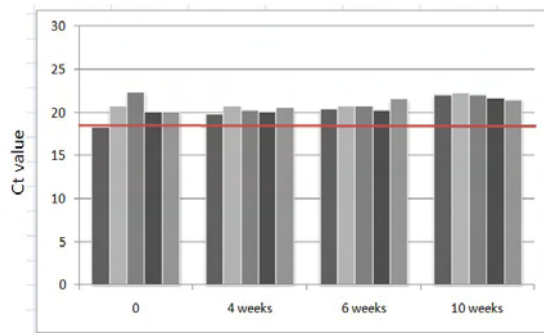
[표-6] *L. intracellularis* 백신주 접종 후 돼지 분변에서의 균 검출 결과

실험군	분변에서의 <i>L. intracellularis</i> 검출 결과			
	접종일	4주	6주	10주

G1	약독화 생독백신접종군	-	-	-	-
G2	음성대조군	-	-	-	-



[그림-6] 돼지에서의 *L. intracellularis* 백신접종군 항체가 측정 결과



[그림-7] 돼지에서의 *L. intracellularis* 백신접종군 중화 항체 측정 결과

4. *L. intracellularis* 방어능 시험을 위한 회장염 질병 모델 확립 평가

▶ 이 결과를 바탕으로 백신주의 공격접종에 대한 방어능 시험을 수행할 목적으로 회장염 질병 모델을 확립하기 위하여 5주령의 자돈 15마리를 한 시험군당 5마리씩 3개의 시험군을 설정하여, 각각의 시험군 1 (G1)에는 1×10^8 /ml, 시험군 2 (G2)에는 1×10^6 /ml 의 세균수를 포함하는 SPG용액을 구강으로 접종하였다 (표-6). 음성대조군에는 SPG 용액만을 동일한 방법으로 투여하였다. 공격접종 후 3주간 임상증상 (행동이상, 발열, 호흡곤란, 기침, 보행이상, 설사, 폐사)을 관찰하였으며 (표-7), 각 시험군의 체중 및 분변지수를 측정하였다 (표-8). 3주 후에 부검을 실시하여 회장에서의 병변을 관찰하였다. 전체적으로 모든 시험군에서 비슷한 임상증상이 관찰되었으며, 실험군당 개체 간 동일한 정도의 결과를 얻을 수 없었다 (표-9). 시험 기간동안 각 시험군의 체중 변화에서도 시험군 간의 유의성을 확인할 수 없었으며, 편차가 크게 측정되었다 (표-10). 이러한 현상은 특히 분변 지수 및 분변으로의 세균 배출 검사에서 두드러지게 나타났다. 각 시험군 간의 분변 지수는 시험일에 따라 일정하지 않게 나타났으며, 심지어 시험 기간 동안 개체별로 서로 다른 시험일에 자연히 설사 증상이 회복되는 것을 확인하였고 (표-11), 이러한 분변을 채취하여 항원 검사를 하였을 때 1×10^8 /ml의 세균수를 접종한 G1에서 부검일에만 20%의 비율로 세균이 배출됨을 확인하였다 (표-12). 시험이 종료되는 시점에 부검을 통하여 회장염 병변을 관찰하였으나, 공격접종한 시험군에서 일정한 병변을 확인하는 것에 실패하였다 (그림-8). 공격접종한 시험군의 조직학적 소견에서도 세균수에 따라 *L. intracellularis*를 접종함에도 불구하고 시험군 간에 특이적인 차이를 발견할 수 없었으며, 개체별로 일정한 증상 및 소견이 일치하지 않음이 확인되었다 (그림-9). 국내 양돈농장 상태에서 회장염의 유발은 환경적인 요인이나 스트레스가 복합적으로

작용하는 상태에서 비육돈의 말기, 또는 산차수가 높은 임신모돈에서 빈발하는 것으로 보고되었으나, 자돈의 경우는 경미한 설사증상을 동반하다가 자연치유 되는 것으로 보고되었다. 따라서 본 연구과제에서 수행하고자 하는 약독화 생독백신 접종 후 공격접종 방어능 시험은 회장염이 시간에 따라 자연히 치유되는 자돈을 이용하여 수행하기엔 확립된 질병 모델이 없으며, 임신모돈을 이용하여 백신 및 공격접종 시험을 수행하기엔 기술적인 어려움이 있기 때문에 현실적으로 가능한 실험 모델을 확립하지 않으면 현재로서는 어려운 상태이다. 이는 돼지증식성회장염의 선행연구가 전세계적으로 미진한 상태이기 때문에 앞으로 많은 연구를 통해 회장염 극복을 위한 길을 하나씩 밝혀나가야 할 것이다.

[표-6] 돼지증식성회장염 질병 모델 확립을 위한 *L. intracellularis* 공격접종 시험의 공시축

실험군		실험두수	공격접종 여부
G1	공격접종군 (1x10 ⁸ /ml)	5	공격접종 (1x10 ⁸ /ml)
G2	공격접종군 (1x10 ⁶ /ml)	5	공격접종 (1x10 ⁶ /ml)
G3	음성대조군	5	무처치

[표-7] 돼지증식성회장염 공격접종 후 임상증상 관찰 항목

임상증상		임상증상지수
행동이상	정상	0
	침울	1
	횡와자세	2
발열	정상	0
	가벼운 발열	1
	오한/청색증	2
호흡곤란	정상	0
	호흡증가	1
	개구호흡	2
기침	정상	0
	간헐 기침	1
	심한 기침	2
보행이상	정상	0
	가벼운 파행/관절종창	1
	심한 파행/관절종창	2
설사	정상	0
	연변	1
	수양성 설사	2
폐사	폐사	20

[표-8] 돼지증식성회장염 공격접종 후 분변 지수 기준

분변 상태에 따른 지수	설사 양상	지수
	정상변	0
	연변	1
	설사변	2
	혈변	3
	냄새나는 설사 및 혈변	4

[표-9] 임상증상 종합 지수

시험일	각 시험군의 임상증상 지수		
	G1	G2	G3
-3	2	2	2
0	1	4	0
3	1	2	2
6	0	3	4
9	2	2	1
12	8	4	2
15	1	3	1
18	1	2	2
21	2	2	2

[표-10] 돼지증식성회장염 공격집중 후 체중 변화

시험일	각 시험군의 체중 (Kg)		
	G1	G2	G3
-3	15.84±4.52	16.00±3.54	15.56±3.78
0	16.76±4.64	16.36±3.22	16.72±3.99
3	19.20±5.91	19.04±4.56	18.48±5.12
6	21.56±6.38	21.24±5.04	19.08±5.95
9	19.12±5.51	22.60±5.22	18.64±8.12
15	27.08±7.29	27.84±5.44	15.60±8.17
18	40.60±9.69	42.00±7.48	35.60±9.74
21	47.92±14.31	45.24±8.64	36.60±10.78

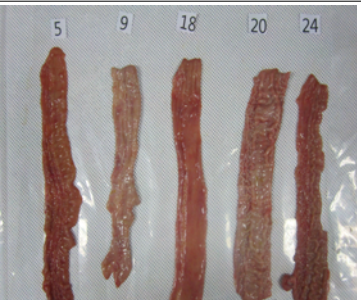

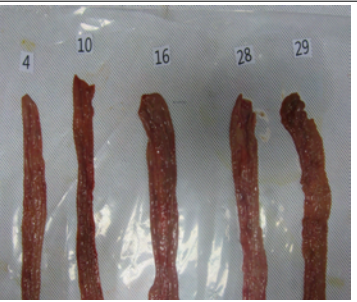
[표-11] 각 시험군의 분변 지수

시험일	각 시험군의 분변지수		
	G1	G2	G3

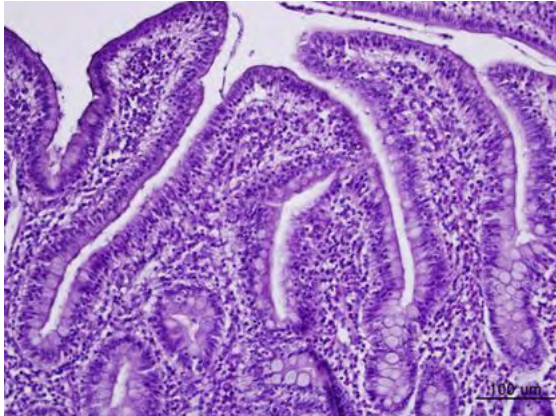
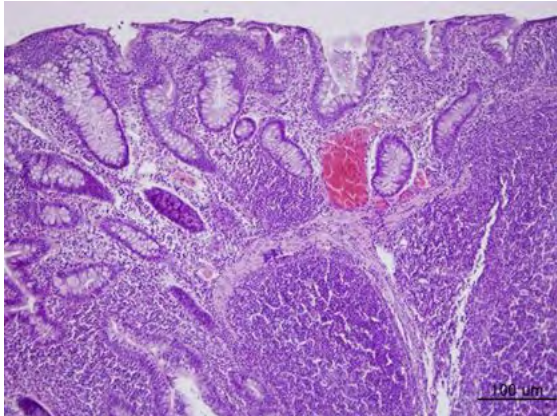
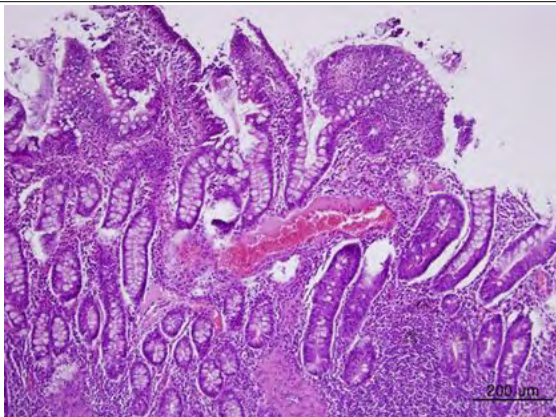
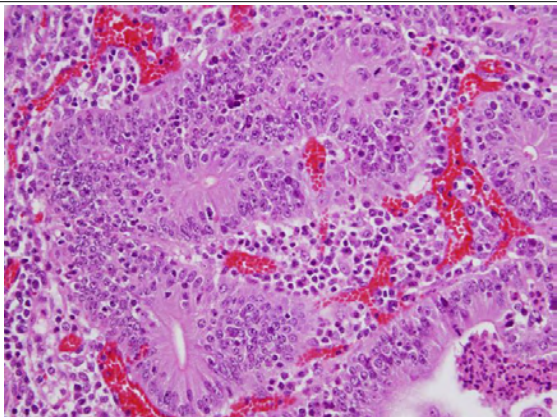
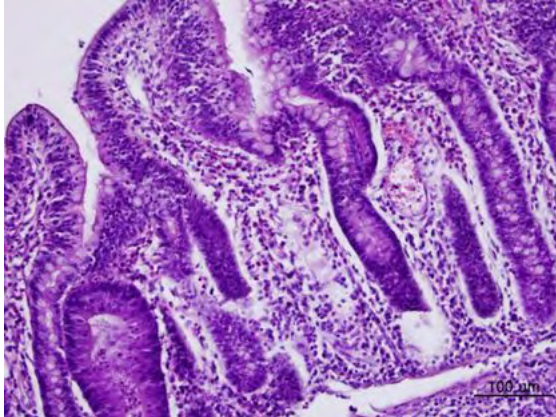
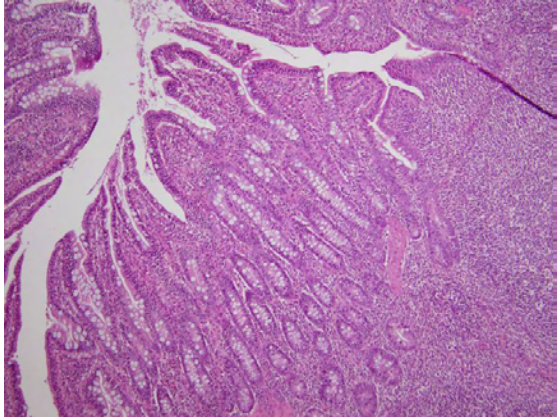
-3	0	0	0
0	0	0.8	0
3	0	0	0.4
6	0	0	0
9	0.4	0.4	0
12	0.8	0.4	0.4
15	0	0	0
18	0.2	0	0
21	0.2	0	0

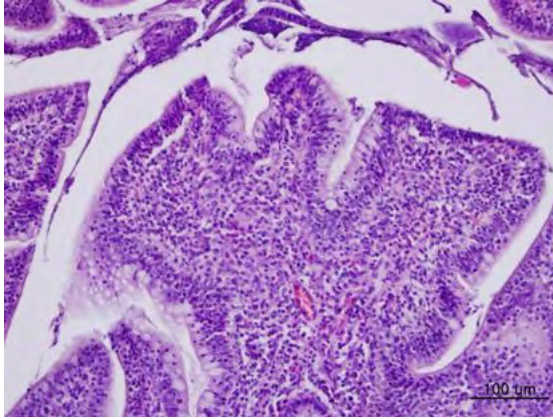
[표-12] 각 시험군 분변에서의 균 검출 결과

시험일	각 시험군의 항원검사 양성율 (%)		
	G1	G2	G3
-3	0	0	0
0	0	0	0
3	0	0	0
6	0	0	0
9	0	0	0
12	0	0	0
15	0	0	0
18	0	0	0
21	20	0	0

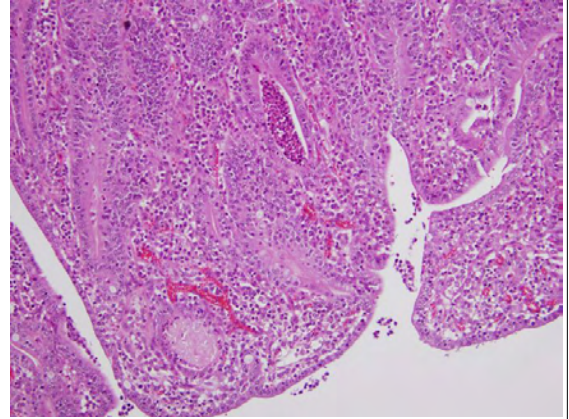
	G1	G2	G3
부검 사진			
부검 소견	회장에 현저한 출혈병변은 없었지만 장벽에 경미한 비후 현상이 보임	G3 (음성대조)와 비교하여 유의성있는 차이가 없음	특이적인 병변이 관찰되지 않음

[그림-8] 돼지증식성회장염 공격접종 후 부검 소견

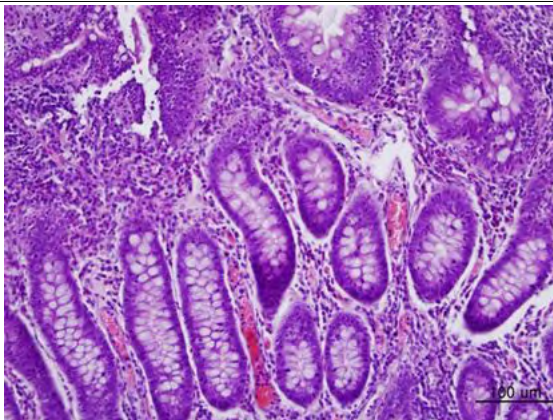
	G1	G2
조직 사진 및 조직 소견		
	정상적인 villi의 모습	mucosa 내에 염증세포 침윤이 관찰되었으나, 전체적인 구조는 유지됨
		
	mucosa 내에 심한 출혈 및 출혈 소견 관찰됨	장점막의 비후 및 염증세포와 피사세포가 관찰됨
		
	회장염으로 인한 mucosa 내의 염증세포 침윤이 관찰됨	장상피세포의 미약한 비후가 관찰되지만 특이적인 염증소견은 관찰되지 않음



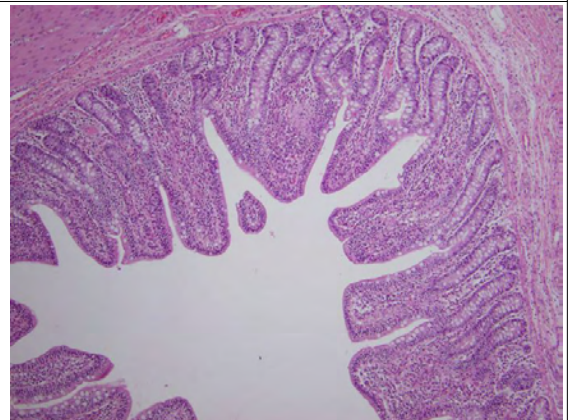
미약한 점막상피세포의 탈락이 관찰되었으나, 전체적인 구조는 유지됨



미약한 염증소견이 관찰됨



mucosa villi에 충혈과 더불어 염증세포의 침윤이 관찰됨



회장의 payer's patch의 미약한 비후 및 임파소절 내 심한 피사가 관찰됨

[그림-9] 돼지증식성회장염 공격접종 시험군의 개체별 조직병리학적 소견

다. 돼지 증식성 회장염 생독백신의 산업화

돼지 증식성 회장염 생독백신의 대량 생산 조건 확립을 통해 생산 공정을 최적화 중이며, 국가 검정기준에 의거한 임상시험을 진행하여 산업화를 진행할 예정이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연도별 연구목표 및 평가의 착안점

■ 제 1 핵심 과제 : 신기술융합 가금질병 제어기술 개발

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
제 1세부과제 신장형 IB K2주 이용 IB-ND 혼합 생독백신 개발 및 산업화 연구				
1차 연도	2010	K2+K148 혼합 생독백신의 개발 및 실험실 내 효능 시험 K2+LaSota 혼합 생독백신의 개발 및 실험실 내 효능 시험 K2+L7 혼합 생독백신의 개발 및 실험실 내 효능 시험	40 %	백신 개발 완료
2차 연도	2011	K2+K148 혼합 생독백신의 시제품 제작 및 국내 임상 시험 K2+LaSota 혼합 생독백신의 시제품 제작 및 국내 임상 시험 K2+L7 혼합 생독백신의 시제품 제작 및 국내 임상 시험	30 %	시제품 제작 및 국내 등록 신청 완료
3차 연도	2012	K2+K148 혼합 생독백신의 해외 임상 시험 K2+LaSota 혼합 생독백신의 해외 임상 시험 K2+L7 혼합 생독백신의 해외 임상 시험	30 %	수출국 등록 신청 완료
최종 평가		신장형 IB K2주 이용 IB-ND 혼합 생독백신 산업화 연구	100 %	백신 제작 및 산업화
제 2 세부 과제: 신기술 융합 AI-ND-IB 혼합 사독백신 산업화 연구				
1차 연도	2010	AI(H9)+ND+IB 및 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 개발 및 실험실 내 효능시험	40 %	백신 개발 완료
2차 연도	2011	AI(H9)+ND+IB 및 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 시제품 제작 및 국내 임상 시험	30 %	시제품 제작 및 국내 등록 신청 완료
3차 연도	2012	AI(H9)+ND+IB 및 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 해외 임상 시험	30 %	수출국 등록 신청 완료
최종 평가		AI(H9)+ND+IB 및 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 개발 및 산업화	100 %	백신 제작 및 산업화
제 3 세부 과제: 신기술 융합 AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 임상 시험 연구				
1차 연도	2010	H5N1 HPAI의 닭 공격접종 모델 개발	40 %	감염모델 확립

2차 연도	2011	개발된 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 Clade 2.2 H5N1 바이러스 방어효능 시험	30 %	방어효능 평가
3차 연도	2012	개발된 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 Clade 2.3.2 H5N1 바이러스 방어효능 시험	30 %	방어효능 평가
최종 평가		AI(H5), ND, 신장형 IB를 혼합한 사독백신 수출대상국 유행 HPAI 방어효능 확인	100 %	방어효능 평가
제 4 세부 과제: 신기술 융합 가금질병 진단키트 개발 및 산업화 연구				
1차 연도	2010	신기술 융합 가금질병 진단키트 개발 및 실험실내 효능시험	40 %	키트 개발 완료
2차 연도	2011	신기술 융합 가금질병 진단키트 시제품 제작 및 국내 임상시험	30 %	시제품 제작 및 국내 임상 시험 완료
3차 연도	2012	신기술 융합 가금질병 진단키트 해외 임상시험	30 %	수출국 등록 신청 완료
최종 평가		신기술 융합 가금질병 진단키트 개발 및 산업화 연구	100 %	키트 제작 및 산업화

■ 제 2 핵심 과제: 신기술 융합 돼지질병 제어기술 개발

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
제 1 세부 과제: 신기술 융합 PRRS 백신 산업화 연구				
1차 연도	2010	PRRS 사독백신 개발 및 실험실내 효능시험	40 %	개발 및 실험실내 효능시험
2차 연도	2011	PRRS 사독백신의 시제품 제작 및 국내 임상시험	30 %	시제품 제작 및 국내 임상 시험
3차 연도	2012	PRRS 사독백신의 해외 임상시험	30 %	해외 임상 시험
최종 평가		PRRS 백신 개발 및 산업화	100 %	백신 개발의 산업화 항원진단 키트의 산업화
제 2 세부 과제: 신기술 융합 면역거세백신 및 진단키트 산업화 연구				
1차 연도	2010	신기술 융합 면역거세백신 및 진단키트 개발 및 실험실내 효능시험	40 %	개발 및 실험실내 효능시험
2차 연도	2011	신기술 융합 면역거세백신 및 진단키트 시제품 제작 및 국내 임상시험	30 %	시제품 제작 및 국내 임상 시험
3차 연도	2012	신기술 융합 면역거세백신 및 진단키트 해외 임상시험	30 %	해외 임상 시험
최종 평가		신기술 융합 면역거세백신 및 진단키트 산업화 연구	100 %	백신 개발의 산업화 진단 키트의 산업화
제 3 세부 과제: 국내 분리주 이용 돼지 증식성 회장염 생독백신 개발 및 산업화 연구				
1차 연도	2010	돼지 증식성 회장염 생독백신 개발 및 실험실내 효능시험	40 %	개발 및 실험실내 효능시험
2차 연도	2011	돼지 증식성 회장염 생독백신 시제품 제작 및 국내 임상시험	30 %	시제품 제작 및 국내 임상 시험
3차 연도	2012	돼지 증식성 회장염 생독백신의 해외 임상시험	30 %	해외 임상 시험
최종 평가		돼지 증식성 회장염 생독백신의 개발 및 산업화	100 %	백신 개발의 산업화

2. 연구개발목표의 달성도

■ 제 1 핵심 과제 : 신기술융합 가금질병 제어기술 개발

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
제 1세부과제: 신장형 IB K2주 이용 IB-ND 혼합 생독백신 개발 및 산업화 연구		
IB 와 ND 개별 백신주의 안전성평가	- 혼합백신 제조 전, 개별 백신주의 안전성여부를 평가하기 위하여 국립수의과학검역원 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거 안전성평가를 수행.	100
IB 와 ND 개별 백신주의 효능평가	- 혼합백신 제조 전, 개별 백신주의 안전성여부를 평가하기 위하여 국립수의과학검역원 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거 효능평가를 수행.	100
간섭현상을 최소화하는 IB백신주와 ND 백신주의 혼합비율 설정	- IB와 ND 백신주간의 간섭현상을 최소화하는 혼합비율을 설정함.	100
IB-ND 백신주 혼합 후 개별 백신주의 역가확인시험	- IB-ND 백신주 혼합 후 개별 백신주의 동결건조 전과 후의 역가를 확인함	100
제작된 IB-ND 혼합 생독백신 실험실 내 효능 시험	- 제작된 IB-ND 혼합 생독백신의 안전성 및 효능을 국립수의과학검역원 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거하여 평가함	100
IB-ND 혼합 생독백신의 시제품 제작	- 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 백신의 바이러스 함량시험의 ND 바이러스에 대한 가혹시험과 동결건조 전 후의 역가 차이를 극복하기 위한 혼합비율을 재설정하고, 각 백신업체별 시제품을 제작하여 전년도에 설정하고 당년도에 재설정된 혼합비율에 맞게 제작되었는가를 확인함	100
IB-ND 혼합 생독백신 시제품의 실험실 내 효능 시험	- 제작된 IB-ND 혼합 생독백신 시제품의 국내 등록신청을 위한 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 안전시험, 혈청 역가시험 및 효력시험과 1일령 닭에서의 안전성 및 효능을 확인하기 위한 안전시험, 혈청 역가시험 및 효력시험을 실시함	100
IB-ND 혼합 생독백신 시제품의 품목 허가 신청	- K2-K148 혼합 생독백신의 품목 허가신청을 위한 임상시험계획서 제출을 완료함 - K2-LaSota 혼합 생독백신의 품목 허가신청을 위한 임상시험계획서 제출을 완료함 - K2-L7 혼합 생독백신의 품목 허가신청을 위한 기술검토서류 제출을 완료함	100
신장형 IB K2주 이용 IB-ND 혼합 생독백신 산업화	- 신장형 IB K2주 이용 IB-ND 혼합 생독백신 제품 등록을 완료하였으며 현재 국내에서 판매 중에 있음	100
IB-ND 혼합 생독백신의 해외	- K2-K148 혼합 생독백신의 초생추에서의 면역원성을 확인하였으며 수출국에서 유행중인 QX-like	100

<p>입상 시험</p>	<p>IBV에 대한 방어효능 시험을 완료함</p> <ul style="list-style-type: none"> - K2-LaSota 혼합 생독백신의 초생추에서의 면역원성을 확인하였으며 수출국에서 유행중인 QX-like IBV에 대한 방어효능 시험을 완료함 - K2-L7 혼합 생독백신의 초생추에서의 면역원성을 확인하였으며 수출국에서 유행중인 QX-like IBV에 대한 방어효능 시험을 완료함 - K2-L7 혼합 생독백신의 접종 횟수 및 접종 경로에 따른 면역원성 및 수출국에서 유행중인 QX-like IBV에 대한 방어효능 시험을 완료함 	
--------------	---	--

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
제 2 세부 과제: 신기술 융합 AI-ND-IB 혼합 사독백신 산업화 연구		
H9N2 및 H5N1 VLP 제작	- Baculovirus 발현 system을 이용해 VLP 백신 제작	100
H9N2 및 H5N1 VLP를 이용한 백신의 제작 및 효능 시험	- 생산된 VLP의 생물학적 활성도 평가 후 면역보강제와 혼합하여 사독백신 제작하여 면역원성, 방어능을 평가함.	100
AI(H9VLP)-ND-IB 사독백신의 실험실 내 시험	- 국립수의과학검역원 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거하여 SPF닭을 이용한 안전성, 면역원성 및 방어율 평가	100
H9N2 LPAI 국내분리주의 재조합 HA 단백질 생산, 백신 제작 및 면역원성 평가	- RNA-binding protein fusion system을 이용하여 수용성 및 활성형 H9단백질을 생산 및 면역원성 평가	100
AI(H5N1 VLP)+ND+IB 사독백신의 실험실 내 시험	- AI(H5N1 VLP)+ND+IB 사독백신을 제작 후 SPF 닭을 이용하여 면역원성 및 방어능을 평가함	100
H5 수용성 활성형 단백질의 제작 및 면역원성, 안전성, 방어능 시험	- RNA-binding protein fusion system을 이용하여 수용성 활성형 H5 단백질을 생산	100
H5 수용성 활성형 단백질 백신의 면역원성, 방어능 평가시험	- 생산된 H5 수용성 활성형 단백질을 면역보강제와 혼합하여 백신 제작 후 면역원성 및 방어능을 평가함	100
H5N1 HPAI 재조합 바이러스의 제작	- 고병원성 인플루엔자의 특성을 제거하여 안전하게 항원을 생산 할 수 있게 변형시킨 재조합 바이러스의 제작	100
H5N1 HPAI 재조합 바이러스를 포함하는 사독백신의 제작 및 효능 시험	- 제작된 재조합 바이러스를 종란에서 증폭하여 불활화 한 후 면역보강제와 혼합하여 사독백신을 제작하여 면역원성, 방어능을 평가함.	100
AI(H5N1 VLP)+ND+IB 사독백신의 실험실 내 시험	- AI(H5N1)+ND+IB 사독백신을 제작 후 SPF닭을 이용하여 면역원성 및 방어능을 평가함	100
AI-ND-IB 혼합 사독백신의 시제품 제작	- 교차면역원성을 갖는 IBV 신규 백신주를 선정하였으며 IBV 신규백신주 및 RG H5N1 주의 특성을 파악하여 백신업체에 분양하였음. 각 백신업체에서는 이 결과를 바탕으로 AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 및 AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품을 제작하였음	100
AI-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 실험실 내 효능 시험	- 제작된 AI-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 국내 등록신청을 위한 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 안전시험, 혈청 역가시험 및 효력시험을 실시함	100
AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신 시제품의 국내 품목 허가 신청	- AI(H9)-ND-IB 혼합 사독백신의 품목 허가신청을 위한 임상시험계획서 제출을 완료함	100
AI-ND-IB 혼합 사독백신	- 국내 산란계농장 2곳, 육용종계농장 1곳에서 개발	90

시제품의 야외임상시험	된 AI(H9)-ND-IB 혼합백신의 야외임상시험 예정 (2013년 9월)	
수출대상국 유행바이러스 특성조사	- 수출대상국 AI 특성조사 - 수출대상국 ND 특성조사 - 수출대상국 IB 특성조사	100
AI(H5)+ND+IB 사독백신의 해외 야외 임상 시험	- 동남아 수출 대상국 유행 AI(H5) clade에 대한 실험실내 방어능 실험으로 대체 - 건국대학교 생물안전위원회, 동물실험 윤리 위원회 승인완료 - 1핵심 3세부과제 clade 2.3.2.1 방어율 자료를 바탕으로 수출 품목 허가 신청 준비 중 (2013년 9월 예정)	50

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
제 3 세부 과제: 신기술 융합 AI(H5)-ND-IB 혼합 사독백신 임상 시험 연구		
H5N1 HPAI의 닭 공격접종 모델 개발	- SPF 닭을 이용한 감염모델 개발을 위한 표준실험법 확립	100
개발된 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 Clade 2.2 H5N1 바이러스 방어효능 시험	- H5N1 HPAI clade 2.2 바이러스 감염모델 개발을 위한 표준실험법 확립 - 개발된 AI(H5)+ND+IB 사독백신 시제품의 HPAI H5N1 clade 2.2 바이러스 방어효능 시험 완료	100
개발된 AI(H5)+ND+IB 사독백신의 Clade 2.3.2.1 및 Clade 1 H5N1 바이러스 방어효능 시험	- H5N1 HPAI clade 2.3.2.1 바이러스 감염모델 개발을 위한 표준실험법 확립 - 개발된 AI(H5)+ND+IB 사독백신 시제품의 HPAI H5N1 clade 2.3.2.1 및 clade 1 바이러스 방어효능 시험 (2013년 9월 예정) - 기관 생물안전 위원회, 동물실험 윤리 위원회 승인완료	60

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
제 4 세부 과제: 신기술 융합 가금질병 진단키트 개발 및 산업화 연구		
IB 항원진단 Rapid kit 개발	- 개발 및 실험실내 효능시험 완료	100
IB 항체진단 ELISA kit 개발	- 개발 및 실험실내 효능시험 완료	100
AI-ND-신장형 IB 항체진단 ELISA 키트의 개발 및 실험실내 효능시험	- 개발 및 개별 진단키트의 실험실내 효능시험 완료	100
AIV 백신 항체 감별진단 kit 개발	- 개발 및 실험실내 효능시험 완료	100
IB 항원진단 Rapid kit 산업화	- 시제품 제작 및 국내 임상 시험 완료 - 국내 품목 허가 완료 (농림축산검역본부 허가번호: 133-46) - 키트 산업화 완료 및 국내외 매출 발생 (한국, 멕시코, 요르단, 이라크, 인도 등)	100
IB 항체진단 ELISA kit 산업화	- 시제품 제작 및 국내 임상 시험 완료 - 국내 품목 허가 완료 (농림축산검역본부 허가번호: 133-47) - 키트 산업화 완료 및 국내외 매출 발생 (한국, 두바이)	100
AI-ND-신장형 IB 항체진단 ELISA kit 산업화	- 시제품 제작 및 국내 임상 시험 완료 - 국내 품목 허가 완료 (농림축산검역본부 허가번호: 107-020) - 키트 산업화 완료 - 해외 인허가 신청·접수 중 (PT-Blue-Sky사를 통해 인도네시아에 품목허가 신청·접수 및 공증완료)	100
AIV 백신 항체 감별진단 kit 산업화	- 시제품 제작 완료 - 국내 인허가 신청접수 중	50

■ 제 2 핵심 과제: 신기술 융합 돼지질병 제어기술 개발

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
제 1 세부 과제: 신기술 융합 PRRS 백신 산업화 연구		
PRRSV 수용성/활성형 백신 제작 및 효능시험	- 선행연구에서 얻어진 수용성 단백 발현시스템을 이용하여 PRRSV의 GP5를 대장균에서 활성형의 단백질로 발현시켰고, 이의 항원성을 평가하였음.	100
PRRSV VLP 백신의 제작 및 효능시험	- PRRSV의 ORF5, ORF6 유전자를 baculovirus에 삽입하여 VLP-GP5-M을 제작하였고, 이 VLP-GP5-M을 곤충세포에서 생산, 정제한 후, 그의 면역원성을 평가하였음.	100
PRRSV 유전자 백신 및 효능시험	- PRRSV의 GP5를 동물세포에서 발현시킬 수 있는 유전자 백신을 제작하였고, 돼지세포에서 GP5 단백질이 발현되는 것을 확인하였으며, 이 유전자 백신이 접종된 자돈에서 IgG, 중화항체가 생성되는 것을 확인하였음.	100
PRRSV 역유전자 백신 및 효능시험	- 역유전학을 이용하여 국내분리주의 ORF5 유전자 서열상에 point mutation시킨 바이러스를 제작하였고, 현재 동물실험을 통하여 면역원성을 확인할 예정이다.	100
PRRS 사독백신의 시제품 제작	- GP5 수용성/활성형 단백질 백신 시제품 제작 완료 - PRRSV의 GP5유전자를 발현하는 DNA 백신 시제품의 제작 완료 - PRRSV의 GP5와 M단백질을 포함하는 VLP 시제품 제작 완료 - 역유전자 재조합 기법으로 PRRSV 사독백신의 제작 완료 - 역유전자 재조합 기법으로 국내에서 유행하는 PRRSV LMY strain 유전자를 포함하는 chimeric virus의 제작 및 사독백신 시제품 제작 완료	100
PRRS 사독백신의 효능 평가 시험	- 수용성/활성형 단백질 시제품의 효능 평가 시험 완료 - DNA백신 시제품으로 돼지에서 효능 평가 시험 완료 - VLP 시제품으로 마우스에서 효능 평가 시험 완료 - 역유전자 기법에 의한 PRRSV 사독백신 시제품에 대한 효능평가 시험완료	100
PRRS 사독백신의 야외 임상시험 및 시제품의 품목 허가 신청	- 실험실내 시제품 방어 효능 확인 및 기술이전 완료 - 품목 허가신청을 위한 임상시험계획서 작성 완료 (2013년 8월 제출 예정)	70

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
제 2 세부 과제: 신기술 융합 면역거세백신 및 진단키트 산업화 연구		
면역거세백신 제작	- GM-CSF 와 conjugation 한 GnRH 6copy 와 12 copy 의 면역거세 백신 제작 및 STF2와 GnRH 6copy 의 면역 거세 백신 개발	100
실험실내 효능 시험	- GM-CSF-GnRH 면역거세 백신을 돼지에게 투여 하여 백신의 효능시험을 실시함 - STF2-GnRH 면역거세 백신을 rat 에게 투여하여 백신의 효능 시험을 실시함	100
GnRH 진단용 항원 유효성 평가	- DHFR-GnRH 유전자재조합 항원에 대하여 indirect ELISA에서 유효성 평가	100
GnRH 항체진단 ELISA의 최적화	- Indirect ELISA에서 항체정량검사를 위하여 Checker-board titration 실시 - ELISA 반응 최적화	100
GnRH 항체진단 ELISA 키트의 실험실내 효능시험	- 돼지 혈청에서 백신 후 주기별 혈청을 사용하여 정량반응성 평가 - 최적화 결과를 사용하여 시제품을 제작함	100
면역거세백신 시제품 제작	- STF2 와 GnRH를 conjugation 한 면역거세 백신 시제품을 제작함.	100
면역거세백신 시제품의 실험실내 효능 시험	- 면역거세 백신 시제품을 랫트 및 돼지에 적용하여 효능 시험 실시	100
제작된 면역거세 백신 시제품의 국내등록신청	- 품목 허가신청을 위한 임상시험계획서 작성 완료 - 면역거세백신의 의약품 분류 여부를 농림축산검역본부에서 검토 중인 관계로 제출 대기 중	100
GnRH 항체진단 ELISA 키트의 시제품제작 및 성능시험	- GnRH 항체진단 ELISA 시제품의 효능평가지험 완료	100
GnRH 항체진단 ELISA 키트의 국내 인허가 자료 작성 및 신청	- GnRH 항체진단 ELISA 키트의 국내 인허가 자료 작성 완료 (2013년 8월 제출 예정)	70
수출국 선정 및 바이어발굴	- 문헌 조사 및 자사 마케팅 조사자료를 통해 수출국 선정 및 바이어 발굴함	80

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
제 3 세부 과제: 국내 분리주 이용 돼지 증식성 회장염 생독백신 개발 및 산업화 연구		
약독화시킨 <i>L. intracellularis</i> 를 이용한 생독백신의 효능시험	<ul style="list-style-type: none"> - 연속적인 세포배양을 통하여 약화시킨 - <i>L. intracellularis</i>를 백신주로서 적합성을 IFN-γ knockout 마우스, SPF 닭, 그리고 목적 동물인 돼지에서 효능시험을 수행함. 	100
회장염 생독백신의 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> - 연속적인 세포배양을 통하여 약독화시킨 <i>L. intracellularis</i>를 이용한 백신 시제품을 제작 완료 	100
회장염 생독백신의 효능평가 시험	<ul style="list-style-type: none"> - 햄스터를 이용한 회장염 생독백신의 효능평가 완료 - 자돈을 이용한 생독백신의 효능평가 완료. - 자돈을 사용한 질병유발 모델 확립에 어려움이 있어, 회장염 백신 검증을 위한 기타의 방법을 고려할 필요가 있음. 	90
회장염 생독백신의 품목 허가 신청	<ul style="list-style-type: none"> - 시제품의 품목 허가 신청 서류 준비 중 	80

3. 관련분야 기술발전 기여도

가. 가금 및 양돈 산업의 지식산업화

- 가금산업과 양돈산업은 국내 산업동물 중 가장 중요한 비중을 차지하고 있기 때문에, 구제역, 고병원성 조류인플루엔자, 돼지 콜레라 등의 급성 전염병 발생 예방과 통제에 막대한 예산을 투자하고 있다. 그러나 전염병의 예방 및 치료 기술 방면의 전문가 및 우수 인적자원들은 대학·정부연구소 등에 산재되어 효율적인 산업화 연구 개발에 어려움을 겪고 있다. 본 사업단을 통해서 가금 및 양돈 산업 발전과 국제 경쟁력 확보에 활용할 수 있는 다양한 분야의 지식, 기술, 정보를 지닌 석·박사 급 전문 인력을 배출하였다.
- 지구촌사회의 무한경쟁에서 경쟁력 우위를 차지하기 위해서는 기존의 가격 및 제품 경쟁보다는 지식 경쟁 및 문화경쟁으로 세계적인 기업으로 육성하는 것이 바람직하며 이를 위한 사고의 전환이 필요하다. 이를 위해서는 현재 우리나라 가금 및 양돈산업을 지식산업으로 전환해야하며 각 대학, 연구소, 정부 및 산업계에 흩어져 시간의 흐름 속에 묻혀 지내는 전문가들이 본 사업단에 모여 각자가 지닌 각 방면의 지식을 산업화에 활용함으로써 일차 및 단순 가공산업으로 치부되어온 가금 및 양돈 산업을 지식산업, 첨단기술산업으로 이끄는 데 본 사업단이 지식활용 Network의 구심점이 된다. 따라서 국내 가금 및 양돈 산업 발전을 위해 관련된 지식과 정보 및 기술을 통합하고 산업화 하는데 거대한 R&D 구축보다는 network를 통한 효율적이고, 효과적인 R&D를 수행할 수 있도록 시스템을 구축하는 것이 본 사업단의 역할이 된다. 본 사업단에서는 본 연구 과제 수행을 통하여 산-학-연 network를 구성하여 개발된 기술이 효율적인 산업화로 이어질 수 있는 기반에 대한 모델을 제시하였다.

나. 국내 산업동물 관련 시장의 선진화

- 본 연구사업단은 핵심연구팀의 선행연구에서 이미 개발 완료된 선행기술과 핵심연구팀 보유 신기술들을 상호 융합하여 동물의 질병예방 및 진단을 목적으로 하는 제품을 신속히 개발 및 산업화를 추진하여 신기술을 산업체에 전수시킴으로써 백신 및 진단제품을 개발하는 동물백신 및 진단키트 국내 제조 산업체의 기술력을 향상시켰다. 연구수행 기간 동안 총 12건의 특허출원 및 5건의 특허를 등록하여 국내 및 해외산업화의 기반을 마련하였다.

다. 수의 백신 및 진단 분야의 기술 고도화

- 본 연구사업단은 수의 전염성 질병을 진단하고 예방할 수 있는 진단법 및 백신을 개발하고 관련 내용을 저명 학회에 발표하고 해외 SCI급 저널에 게재 하였다. 3년간의 연구수행 기간 동안 총 30건의 학술발표 및 20편의 논문을 게재하여 개발된 우수 기술들을 국내 및 해외의 연구자들에게 보급하였다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발결과의 성과

가. 연차별 연구성과 목표 및 달성

(단위 : 건수)

구분		특허		신제품				유전자원 등록	논문		기타 (학술 발표)
		출원	등록	제품 허가	등록 신청	품종 수	생산 판매 업권 신고		품종보호		
									출원	등록	
1차년도	목표	8	2					2	2	1	0
	달성	11	1					212	5		6
2차년도	목표		4	10				2	7	1	10
	달성	1	2	10				15	5		12
3차년도	목표		2	7				2	4	1	
	달성		2					140	7	3	12
3년차 계	목표	8	8	17				6	13	3	10
	달성	12	5	10				367	17	3	30

나. 연구종료 후 연구결과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	17	17				
달성	49*	6**			9***	

*기술실시 세부내역

세부과제	기술실시 품목	기술실시 대상	건수	계
1-1	K2 생백신주	고려, 대상	2	3
	K148 생백신주	대상	1	
1-2	AI H9형 신규분리주	고려, 대상, 중앙, 녹수	4	12
	AI H9형 VLP 백신	고려, 대상, 중앙, 녹수	4	
	AI H9 수용성활성 단백질	고려, 대상, 중앙, 녹수	4	
	AI H5형 역유전자 백신	고려, 대상, 중앙, 녹수	4	12
	AI H5형 VLP 백신	고려, 대상, 중앙, 녹수	4	
	AI H5형 수용성활성 단백질	고려, 대상, 중앙, 녹수	4	
1-4	IB 항원진단 Rapid kit	바이오노트	1	4
	IB 항체 진단 ELISA kit	바이오노트	1	
	AI-ND-IB 항체진단키트	제노바이오텍	1	
	AIV 백신 항체 감별진단 kit	바이오노트	1	
2-1	PRRS 역유전자 백신	고려, 대상, 중앙	3	13
	PRRS 유전자 백신	고려, 대상, 중앙	3	
	PRRS VLP 백신	고려, 대상, 중앙	3	
	PRRS 수용성 활성형 단백질	고려, 대상, 중앙	3	
	PRRS 항원진단 Rapid kit	베트올	1	
2-2	GMCSF-GnRH 백신	고려	1	3
	STF2-GnRH 백신	고려	1	
	GnRH 항체진단키트	제노바이오텍	1	
2-3	증식성 회장염 생독백신	고려	1	2
	증식성 회장염 rapid kit	베트올	1	

총 계				49
-----	--	--	--	----

** 상품화 세부내역 (“바. 사업화 현황” 항 참조)

** 언론홍보 세부내역

1. 국내 동물백신 산업의 성장 동력 마련/ 대한뉴스 2010.09.30.
2. 건국대 연구팀, 조류 뉴캐슬병-기관지염 동시 예방 백신개발/ 아시아투데이 2012.06.24
3. 건국대 연구팀, 조류 뉴캐슬병-기관지염 동시 예방 백신개발/ 연합뉴스 2012.06.24
4. 건국대 연구팀, 조류 뉴캐슬병-기관지염 동시 예방 백신개발/ 뉴시스 2012.06.24
5. [건국대] 연구팀, 조류 뉴캐슬병-기관지염 동시 예방 백신개발/ 경향신문 2012.06.25
6. 건국대 송창선 교수팀, 뉴캐슬병-전염성기관지염 예방 백신 개발/ 뉴스1 2012.06.22
7. 조류 뉴캐슬병-기관지염 동시 예방 백신개발/ 헬스코리아뉴스 2012.06.24
8. 조류에 발생하는 뉴캐슬병-전염성기관지염 예방 백신 개발/ 메디컬투데이 2012.06.23.
9. 건대 교수팀, 뉴캐슬병-전염성기관지염 예방 백신 개발/ 한국대학신문 2012.06.24

다. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010 (1-1) <1차년도>	Characterization of a novel live attenuated infectious bronchitis virus vaccine candidate derived from a Korean nephropathogenic strain	이현정	송창선	윤하나, 권지선 이윤정, 김재홍 이중복, 박승용 최인수	Vaccine	28(16)	국외	SCI
2011 (1-1) <1차년도>	An emerging recombinant cluster of nephropathogenic strains of avian infectious bronchitis virus in Korea	임태현	송창선	이현정, 이동훈 이유나, 박재근 윤하나, 김명섭 이중복, 박승용 최인수	Infection, Genetics and evolution	11(3)	국외	SCIE
2011 (1-2) <1차년도>	H9N2 avian influenza virus-like particle vaccine provides protective immunity and a strategy for the differentiation of infected from vaccinated animals	이동훈	송창선	박재근, 이유나, 송재민, 강상무, 이중복, 박승용, 최인수	Vaccine	29(23)	국외	SCI
2011 (1-2) <1차년도>	Inactivated H9N2 avian influenza virus vaccine with gel-primed and mineral oil-boostered regimen could produce improved immune response in broiler breeders	이동훈	송창선	권지선, 이현정, 이유나, 허 원, 홍영호, 이중복, 박승용, 최인수	Poultry Science	90(5)	국외	SCI
2010 (2-3) <1차년도>	Microarray analysis of differential expression of cell cycle and cell differentiation genes in cells infected with <i>Lawsonia intracellulris</i>	오유식	이중복	McOrist S	Veterinary journal	184(3)	국외	SCI
2012 (1-1) <2차년도>	Live attenuated nephropathogenic infectious bronchitis virus vaccine provides broad cross protection against new variant strains	임태현	송창선	장준혁, 김명섭, 이동훈, 박재근, 윤하나	Poultry science	91	국외	SCI
2012 (1-1) <2차년도>	Exchange of Newcastle disease viruses in Korea: the relatedness of isolates between wild birds, live bird markets, poultry farms and neighboring countries.	김병윤	송창선	이동훈, 김명섭, 장준혁, 이유나, 박재근, 육성수, 이중복, 박승용, 최인수	Infection, Genetics, and Evolution	12(2)	국외	SCIE
2012	Protective efficacy of crude	박재근	송창선	이동훈,	Influenza and	in	국외	SCIE

(1-2) <2차년도>	virus-like particle vaccine against HPAI H5N1 in chickens and its application on DIVA strategy			이유나, 육성수, 김명섭, 윤하나, 이중복, 박승용, 최인수	other Respiratory Viruses	press		
2011 (2-2) <2차년도>	Evaluation of the Efficacy of Immunocastration Vaccine Composed of Gonadotrophin-releasing Hormone Conjugated with Salmonella typhimurium Flagellin in Rats	송영조	최인수	김도근, 남해미, 이중복, 박승용, 송창선, 서건호, 김형문	Reproduction in domestic animals		국외	SCI
2011 (2-3) <2차년도>	Antimicrobial Susceptibility Testing of Two Lawsonia intracellularis Isolates Associated with Proliferative Hemorrhagic Enteropathy and Porcine Intestinal Adenomatosis in South Korea	예정용	예정용	이지혜, 예혜란, 김애란, 이지윤, 황정민, 강보규, 김종만, 최인수, 이중복	Antimicrobial Agents Chemotherapy	55(9)	국외	SCI
2013 (1-1) <3차년도>	Cross-protective immune responses elicited by a Korean variant of infectious bronchitis virus	김병윤	송창선	이동훈, 장준혁, 임태현, 최수원, 윤하나, 박재근, 이중복, 박승용, 최인수	Avian Diseases	In press	국외	SCI
2013 (1-2) <3차년도>	H9N2 avian influenza virus in Korea: evolution and vaccination	이동훈	송창선	-	Clin Exp Vaccine Res.	2(1)	국내	비SCI
2013 (1-2) <3차년도>	Efficacy of single dose of a bivalent vaccine containing inactivated Newcastle disease virus and reassortant highly pathogenic avian influenza H5N1 virus against lethal HPAI and NDV infection in chickens	이동훈	송창선	박재근, 권정훈, 육성수, 에르텐어치르, 장요한, 성백린, 이중복, 박승용, 최인수	PLoS One	8(3)	국외	SCI
2013 (1-2) <3차년도>	Characterization of low-pathogenicity H5 and H7 Korean avian influenza viruses in chickens	이동훈	송창선	권정훈, 박재근, 이유나, 육성수, 이중복, 박승용, 최인수	Poultry science	91(12)	국외	SCI
2012 (1-4) <3차년도>	Comparative Genomics of Korean Infectious Bronchitis Viruses (IBVs) and an Animal Model to Evaluate	홍승민, 권혁준	김재홍	김일환, Mo Meilan	Viruses	4	국외	SCI

	Pathogenicity of IBVs to the Reproductive Organs							
2013 (1-4) <3차년도>	Genetic Diversity of Spike, 3a, 3b and E Genes of Infectious Bronchitis Viruses and Emergence of New Recombinants in Korea	Mo Meilan, 홍승민	김재홍	권혁준, 김일환, 송창선	Viruses	5	국외	SCI
2013 (2-1) <3차년도>	Immune responses in mice vaccinated with virus-like particles composed of the GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus	남해미	최인수	채경실, 송영조, 이낙형, 이중복, 박승용, 송창선, 서건호, 강상무, 김민철	Archives of Virology	158(6)	국외	SCI
2013 (2-1) <3차년도>	A review of vaccine development and research for industry animals in Korea	이낙형	이중복	이정아, 박승용, 송창선, 최인수	Clinical and experimental vaccine research	1(1)	국내	비SCI
2013 (2-1) <3차년도>	The signal sequence of typeII Porcine reproductive ans respiratory syndrome virus glycoprotein 3 is sufficient for endoplasmic reticulum retention	김도근	이상수	송창선, 최인수, 박승용, 이중복	Journal of veterinary science		국내	SCI
2013 (2-3) <3차년도>	Efficacy of a commercial live attenuated Lawsonia intracellularis vaccine in a large scale field trial in Korea	박상신	이상원	이중복, 김경진, 오유식, 김만옥, 오유리, 황민야, 이정아	Clinical and experimental vaccine research	2(2)	국내	비SCI

라. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도 (핵심 및 세부)	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2009 (1-1) <1차년도>	신규한 뉴캐슬병 바이러스 K148/08주, 및 그 바이러스를 함유하는 뉴캐슬병 백신	건국대학 교 산학협력 단	대한민국	10-2009- 0102246	2009 (2-1) <1차년도>	배콜로바이러 스-기반 백신	건국대학교 산학협력단	한국	10-2009-0 076852
2011 (1-1) <1차년도>	전염성기관지염 바이러스 K40/09주 및 이를 이용한 전염성 기관지염 백신	건국대학 교 산학협력 단	대한민국	10-2011- 0051522	2011 (1-1) <2차년도>	신규한 뉴캐슬병 바이러스 K148/08주, 및 그 바이러스를 함유하는 뉴캐슬병 백신	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-109962 9
2011 (1-2) <1차년도>	공기전파가 가능한 신규한 H9N2형 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 균주 및 그로부터 유래된 백신	건국대학 교 산학협력 단	대한민국	10-2011- 0051518	2011 (2-2) <2차년도>	CTLA-4-GnR H 또는 GM-CSF-Gn RH 재조합 단백질을 유효성분으로 함유하는 동물의 면역거세용 백신	주식회사 고려비엔피 (164211- 0*****) 충청남도 예산군 신암면 두곡리 254-18	대한민국	제 10-108001 5 호
2011 (1-2) <1차년도>	고병원성 조류인플루엔자 A(H5N1) 바이러스 유사입자 및 이를 이용한 가금용 백신	건국대학 교 산학협력 단	대한민국	10-2011- 0050097	2013 (1-4) <3차년도>	신장형 및 호흡기형 감염성 기관지염 바이러스를 인식하는 항체 및 그의 용도	유한회사 바이오노트	대한민국	제 10-128760 2-0000 호
2011 (1-2) <2차년도>	H9 조류 인플루엔자 바이러스 유사입자 백신 및 그 응용	건국대학 교 산학협력 단	대한민국	10-2011- 0096858	2013 (1-2) <3차년도>	H9 조류 인플루엔자 바이러스 유사입자 백신 및 그 응용	건국대학교 산학협력단	대한민국	제 10-126741 60000 호
2011 (1-4) <1차년도>	신장형 및 호흡기형 감염성 기관지염 바이러스를 인식하는 항체 및 그의 용도	유한회사 바이오노 트	대한민국	10-2011- 0051672					
2011 (2-1)	돼지 생식기 호흡기 증후군	건국대학 교	대한민국	10-2011- 0049757					

<1차년도>	바이러스를 진단하기 위한 랩타이드 및 그 응용	산학협력 단							
2011 (2-1) <1차년도>	면역원성이 증강된 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 제작과 그 응용	건국대학 교 산학협력 단	대한민국	10-2011- 0049760					
2011 (2-1) <1차년도>	돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 유사입자 및 이를 이용한 백신	건국대학 교 산학협력 단	대한민국	10-2011- 0051078					
2011 (2-2) <1차년도>	S T F 2 - G n R H 융합 제조합 단백질을 포함하는 면역 거세용 백신 조성물 및 이를 이용한 동물의 면역 거세 방법	주식회사 고려비엔 피(1-200 2-01280 4-0) 외 1명	대한민국	10-2011- 0014670					
2011 (2-2) <1차년도>	S T F 2 - G n R H 융합 제조합 단백질, 이를 코딩하는 유전자, 이 유전자를 포함하는 제조합 벡터, 이 벡터로 형질전 환된 형질전환체 및 이를 이용한 융합 제조합 단백질의 제조 방법	주식회사 고려비엔 피(1-200 2-01280 4-0) 외 1명	대한민국	10-2011- 0014669					
2011 (2-3) <1차년도>	돼지 증식성 회장염을 진단하기 위한 단백질 및 그 응용	건국대학 교 산학협력 단	대한민국	10-2011- 0049758					

마. 기술료 징수 현황

기 징수액(2010~2012)	당해연도 징수액(2013)	합계
168,916	66,796	235,712

바. 사업화 현황

(단위: 천원)

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해년도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			
(주)고려비엔피 신장형 IB 생독백신 사업화	신장형 IB K2주 이용 전염성 기관지염 감염 예방백신	(주)고려비엔피	송기연	85명	중소기업	839,454	468,848	1,308,302
(주)고려비엔피 신장형 IB-ND 생혼합백신 사업화	신장형 IB K2주-ND 생혼합백신	(주)고려비엔피	송기연	85명	중소기업	-	49,442	49,442
(주)대성미생물연구소 신장형 IB생독백신 사업화	신장형 IB K2주 이용 전염성 기관지염 감염 예방백신	(주)대성미생물연구소	조항원	127명	중소기업	554,497	78,640	633,137
(주)대성미생물연구소 신장형 IB-ND 생혼합백신 사업화	신장형 IB K2주-ND 생혼합백신	(주)대성미생물연구소	조항원	127명	중소기업	661,103	191,471	852,574
(유) 바이오노트 IB 항원진단 Rapid kit 사업화	IB 항원진단 Rapid kit	(유) 바이오 노트	하건우	50명	유한회사	12,927	4,203	17,130
(유) 바이오노트 IB 항체진단 ELISA kit	IB 항체진단 ELISA kit	(유) 바이오 노트	하건우	50명	유한회사	3,312	501	3,813
총 계								2,864,398

사. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원년도	지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
		박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지 역
1차년도	9	2	6		1	4	5	9		
2차년도	6		2	4		4	2	6		
3차년도	7	2	2	3		6	1	7		
총 계	22	4	10	7	1	14	8	22		

(2) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
전염성 기관지염 진단 및 정량법 교육	IBV dot immunoassay의 원리 및 수행방법 교육	건국대학교 수의과대학 조류질병학 실험실	2회	4일	8명
조류 인플루엔자 VLP 생산 기법 교육	곤충세포 부유 배양기법을 이용한 VLP 항원 생산 기법 교육	건국대학교 수의과대학 조류질병학 실험실	3회	6일	4명
IB 바이러스 항체 검사법 교육	ELISA 및 혈구응집억제반 응을 통한 항체 검사법 교육	건국대학교 수의과대학 조류질병학 실험실	5회	10일	5명
PRRSV 고역가 바이러스 생산 기법 교육	MARC 145 세포를 이용한 고역가 바이러스 생산 기법 전수	건국대학교 수의과대학 전염병학 실험실	5회	7일	3명
면역거세 백신 생산 방법 교육	재조합 단백질의 발현 및 정제 방법 및 정제된 단백질의 확인 방법 교육	건국대학교 수의과대학 전염병학 실험실	1회	3일	1명
회장염 생독백신 대량 생산 방법 교육	연속 계대 배양을 통한 L. intracellularis의 대량 생산 방법 교육	건국대학교 수의과대학 전염병학 실험실	2회	4일	1명

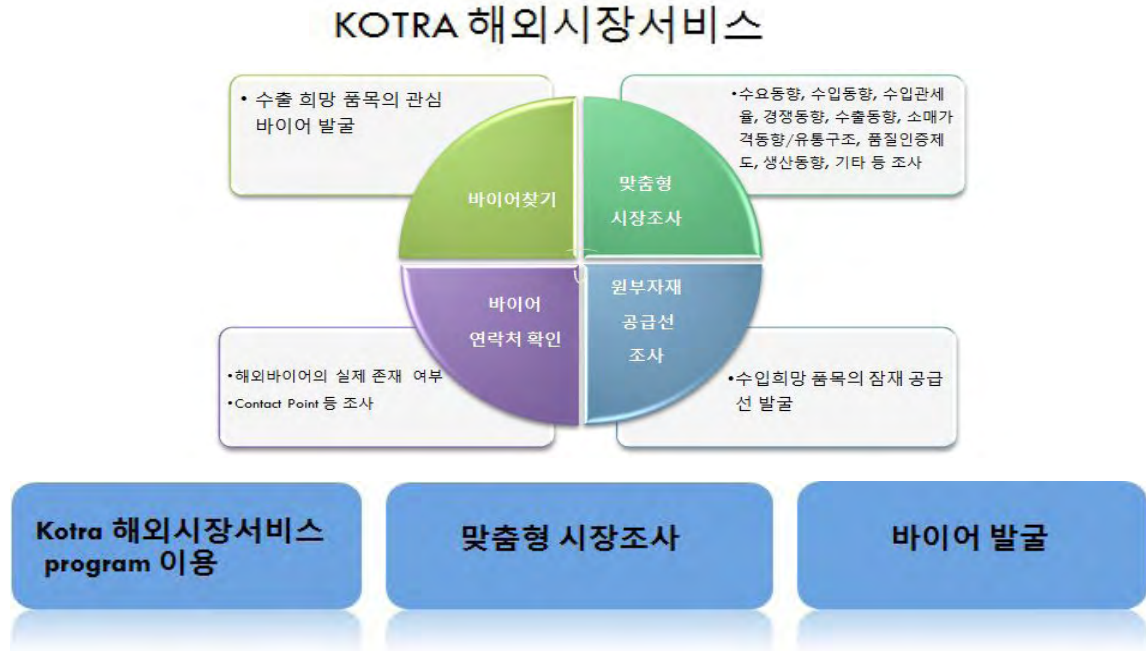
2. 성과 활용 계획

가. 산업화 계획

상품명	산업화 계획
신장형IB K2주와 내열성 ND K148주를 혼합한 생독백신	개발균주 및 기술의 기업체 이전이 완료되어 시제품 제작 및 실험실 내 효능평가가 완료되었으며, 야외임상실험을 건국대와 (주)대성미생물연구소가 공동으로 진행하여 국내 산업화를 완료 할 계획임.
신장형IB K2주와 저병원성 LaSota주를 혼합한 생독백신	개발균주 및 기술의 기업체 이전이 완료되어 시제품 제작 및 실험실 내 효능평가가 완료되었으며, 야외임상실험을 건국대와 (주)대성미생물연구소가 공동으로 진행하여 국내 산업화를 완료 할 계획임.
신장형IB K2주와 재조합 NDV L7주를 혼합한 생독백신	(주)고려비엔피에서 국내 산업화를 완료하였으며, 기존 수출망을 통한 동남아시아 시장 진출을 진행중임.
AI(H9), ND, 신장형IB를 혼합한 사독백신	개발균주 및 기술의 기업체 이전이 완료되어 시제품 제작 및 실험실 내 효능평가가 완료되었으며, 야외임상실험을 건국대, (주)고려비엔피, (주)농심자수의약품, (주)대성미생물연구소가 공동으로 진행하여 국내 산업화를 완료 할 계획임.
AI(H5), ND, 신장형IB를 혼합한 사독백신	개발균주 및 기술의 (주)고려비엔피, (주)농심자수의약품, (주)대성미생물연구소, (주)중앙백신연구소의 이전이 완료되어 시제품 제작 및 실험실 내 효능평가가 완료되었으며, 수출국 유행균주를 이용한 백신의 평가를 건국대, 농림축산검역본부가 공동으로 진행중임. 효능평가 결과를 동남아시아 등의 해외 시장 진출에 활용할 계획임.
신장형IB 항원진단 Rapid 키트	(주)바이오노트와 공동으로 산업화를 완료하여 12개국에 수출판매를 개시하였으며 국제박람회 출품 등의 적극적 홍보를 통해 판매를 극대화할 예정임.
신장형IB 항체진단 ELISA 키트	(주)바이오노트와 공동으로 산업화를 완료하여 해외에 수출판매를 개시하였으며 국제박람회 출품 등의 적극적 홍보를 통해 판매를 극대화할 예정임.
AI-ND-신장형IB 항체진단 ELISA 키트	(주)메디안디노스틱과 공동으로 산업화를 진행하고 국제박람회 출품 등의 적극적 홍보를 통해 판매를 극대화할 예정임.
PRRSV 사독백신	개발균주 및 기술의 기업체 이전이 완료되어 시제품 제작 및 실험실 내 효능평가가 완료되었으며, 야외임상실험을 건국대, (주)고려비엔피, (주)대성미생물연구소, (주)중앙백신연구소가 공동으로 진행하여 국내 산업화를 완료 할 계획임.
GnRH면역 거세 백신	개발균주 및 기술의 기업체 이전이 완료되어 시제품 제작 및 실험실 내 효능평가가 완료되었으며, 야외임상실험을 건국대와 (주)고려비엔피가 공동으로 진행하여 국내 산업화를 완료 할 계획임.
GnRH항체진단 ELISA 키트	키트의 시제품 제작 및 실험실 내 효능평가가 완료되었으며, 야외임상실험을 건국대와 (주)고려비엔피가 공동으로 진행하여 국내 산업화를 완료 할 계획임.
돼지 증식성회장염 생독 백신	개발균주 및 기술의 기업체 이전이 완료되어 시제품 제작 및 실험실 내 효능평가가 완료되었으며, 야외임상실험을 건국대와 (주)고려비엔피가 공동으로 진행하여 국내 산업화를 완료 할 계획임.

나. 기술확산 계획

- 동남아 시장 뿐만 아니라 KOTRA 해외시장서비스를 이용하여 중국을 포함한 동남아시아 및 유럽 등에 관심 바이어를 지속적으로 발굴하여 수출을 확대해나갈 예정이다.



- 세계농축산박람회(VIV) 등 국제박람회에 참가하여 전시 및 홍보활동 예정임

	SPACE	VIV	EuroTier
			
출품규모	1,400 여 업체 출품	500여 업체 출품	1500여 업체 출품
방문규모	120,000여명 방문	60,000여 축산업 전문인 방문	120,000여명 방문
주최기관	SPACE 전시사무국	VNU Exhibitions Europe	DLG 독일농축산업 소사이어티
개최주기	1년	1년	2년

- 수출국의 vaccine program 분석을 통해 항체 profiling 제품군을 지속적으로 개발하여 poultry antibody profiling 사업을 추진할 계획임.

다. 지식재산권 확보계획

(1) 특허 확보계획

- ‘신장형 IBV를 이용한 약독화 생백신주의 개발 및 제조기술’과 ‘철새분리 NDV 이용 생백신주의 개발 및 제조기술’에 대한 특허의 출원 및 등록을 완료하였다. ‘신규한 H9N2형 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 균주 및 그로부터 유래된 백신’에 대한 특허 출원을 완료한 상태로 차년도 특허 등록이 완료될 것으로 예상된다.
- ‘신장형 및 호흡기형 감염성 기관지염 바이러스를 인식하는 항체 및 그의 용도’에 대한 특허 출원 및 등록을 완료하였다. 추후 개발된 다양한 진단제품에 대한 특허 출원 및 등록을 완료할 예정이다.
- ‘돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 진단하기 위한 펩타이드 및 그 응용’, ‘면역원성이 증강된 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 제작과 그 응용’ 및 ‘돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 유사입자 및 이를 이용한 백신’에 대한 특허 출원을 완료한 상태로 차년도 특허 등록이 완료될 것으로 예상된다.
- ‘CTLA-4-GnRH 또는 GM-CSF-GnRH 재조합 단백질을 유효성분으로 함유하는 동물의 면역거세용 백신’에 대한 특허의 출원 및 등록을 완료하였다. ‘STF2-GnRH 융합 재조합 단백질을 포함하는 면역 거세용 백신 조성물 및 이를 이용한 동물의 면역 거세 방법’에 대한 특허 출원을 완료한 상태로 차년도 특허 등록이 완료될 것으로 예상된다.

(2) 논문 확보계획

- ‘신장형 IBV를 이용한 약독화 생백신주의 개발 및 제조기술’과 관련된 논문 검색 결과, 지역적으로 유행하는 변이주를 이용한 약독화 생독백신 개발을 내용으로 하는 논문이 수편 존재하였다. 그러나 이들 변이주는 국내에서 유행하는 신장형 IBV와 근연관계가 먼 바이러스로서 본 기술과 관련성이 낮다. 현재 본 기술을 포함하는 생백신주 개발 논문을 SCI급 학술지인 Vaccine에 게재하였으며 뉴캐슬병 및 조류인플루엔자 백신과의 혼합 백신 생산 등을 추후 연구하여 SCI급 학술지 Avian disease에 투고할 계획 예정이다.
- ‘VLP를 이용한 백신 제조 기술’과 관련된 특허 검색 결과, 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 백신 개발에 관련된 논문 및 면역기전 분석에 관련된 논문이 주로 검색되었으며, 관련 논문은 VLP생산 기술 개발, 설치류 및 폐렛을 이용한 실험실내 효능 시험에 제한되어 있다. 본 사업단의 VLP생산기술은 양계용 백신을 대상으로 하며 생산 효율을 월등하게 개선하였으므로 가금산업현장에 적용이 가능할 것으로 예상되므로, 본 과제 수행을 통해 개선된 AI-ND-IB 3종 혼합백신을 적용한 결과를 SCI급 학술지 Vaccine에 투고할 계획이다.
- 제조한 다양한 키트의 개발방법 및 야외 적용 시험 내용을 기존 상품화된 해외 키트와

비교하여 그 결과를 SCI급 학술지인 Vaccine지에 게재할 예정이다.

- ‘철새분리 NDV 이용 생백신주의 개발 및 제조기술’과 관련된 논문 검색 결과, B1 및 La Sota 주 등의 백신주를 이용한 면역원성 실험이 대부분이다. 본 연구팀이 철새에서 분리한 NDV는 안전성 및 효능이 기존의 백신보다 높으므로 부화장용 백신으로의 접종 경로에 관한 연구, 혼합백신 비율 산정에 관한 연구 등을 수행하여 이에 관한 결과 등을 Avian disease, Vaccine지 등의 SCI급 학술지에 게재할 예정이다.
- ‘NDV(VII형) 재조합 백신 생산기술’과 관련한 논문 검색 결과, NDV 재조합 백신 생산에 관련된 논문이 수편 존재하였다. 검색된 논문은 NDV를 벡터로 사용하여 기타 질병을 치유 하거나 NDV 단백질을 포함하는 subunit vaccine이 대부분이다. 현재 본 기술을 포함하는 백신 개발 논문을 SCI급 학술지인 Clin Vaccine Immunol에 게재하였으며 전염성기관지염 백신과의 혼합 백신 생산 및 접종경로별 면역원성 연구 등을 추후 진행하여 SCI급 학술지 Vaccine지에 투고할 계획 예정이다.
- PRRSV의 역상유전자 시스템을 활용하여 PRRSV의 바이러스학적 및 면역학적 기초자료를 통해서 바이러스의 자가복제능력과 병원성을 제어할 수 있는 방향으로 연구를 추진함으로써 효과적인 백신을 개발할 계획이며 그와 같은 연구결과물을 Journal of Virology, Virology 등의 저명한 국외전문학술지에 논문을 게재하고자 한다.
- GnRH 단백질을 사용한 면역거세 백신 연구의 경우 GnRH 단백 자체의 형태와 구조 및 융합 단백질로서 어떤 것을 사용하였는가에 따라 다양한 연구 결과의 논문들이 게재하였다. 본 연구에서는 기존의 백신보다 효과적이며 강한 면역반응을 일으킬 수 있는 재조합 GnRH 단백질 백신을 개발하여 이들의 야외 임상실험을 진행함으로써 연구결과물을 Vaccine 등의 국외전문학술지에 논문을 게재하고자 한다.

라. 추가연구, 타연구에 활용 계획

(1) 추가연구의 필요성

- IBV K2주의 최근 유행주에 대한 교차 방어능이 저하되고 있어 IBV 40/09주를 이용한 신규 생독백신주의 개발이 요구됨.
- AI(H9)-ND-IB 3종 혼합 오일백신의 최신 유행 H9에 대한 호흡기 방어효능 개선이 요구됨.
- PRRSV 사독 오일백신의 효율을 극대화하기 위하여 PRRS 생독 백신의 개발이 요구됨.
- IB의 실험실적 확진을 위한 간편 검사법과 양성판정 기준의 재확립이 필요함.

(2) 타 연구에의 응용

- 본 연구에서 개발된 RG 및 VLP 백신의 제조기법은 다른 바이러스의 백신 제조를 위하여 사용이 가능하다고 판단됨.
- AIV의 HA와 NA gene의 전체 유전자 염기서열은 GenBank에 등록하여 고유의 ID를

부여받았으며 이는 다양한 AIV 연구에 활용이 가능

- 새로운 변이형 IBV 및 PRRSV 출현시 관련 백신 제조 기술을 이용한 신형 백신 제조 가능

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 조류인플루엔자 바이러스 해외과학기술정보

가. 조류인플루엔자 바이러스 확산 및 진화

○ H9N2형 저병원성 조류인플루엔자 확산 (Okamatsu et al., 2013; Slomka et al., 2013)

- H9N2형 저병원성 조류인플루엔자 바이러스는 유전형에 따라 G1-like, Y280-like, Y439-like 등으로 구분된다. 국내의 경우 1996년 H9N2형 바이러스 발생 이후 현재까지 Y439-like과 유사한 H9N2형 바이러스가 유행중이다. 최근 중동지역에는 G1-like 바이러스가 유행하고 있으며, 아일랜드, 네덜란드, 영국, 이탈리아, 독일, 헝가리를 포함한 유럽 지역에서는 Y439형의 H9형 바이러스가 유행하고 있는 것으로 조사되었다.

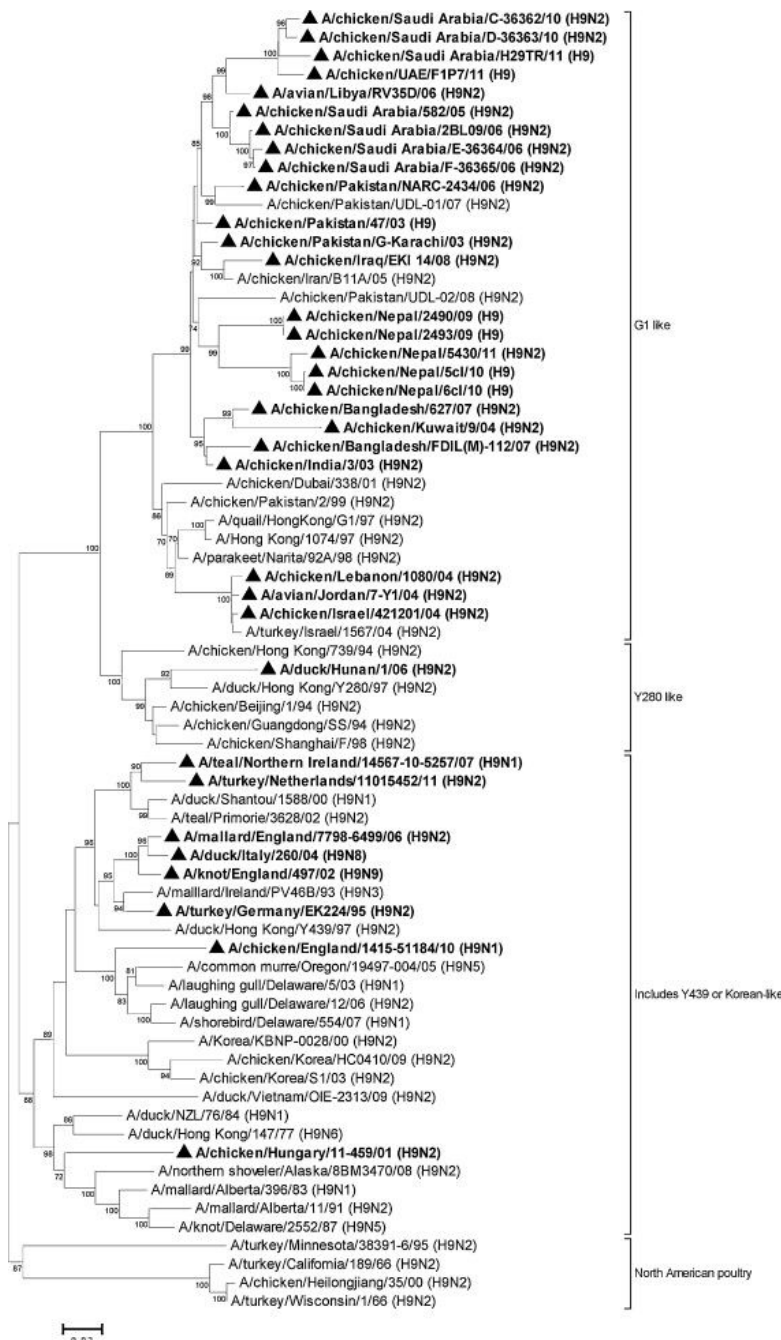


그림. 중동 및 유럽지역으로 H9형 LPAI 확산

- 베트남의 H9N2형 저병원성 조류인플루엔자 바이러스는 2009년-2010년에는 G1-like 및 Y439-like과 유사한 H9N2형 바이러스가 유행중이었으나 최근에는 Y280-like 바이러스가 유행하고 있는 것으로 분석되었다.

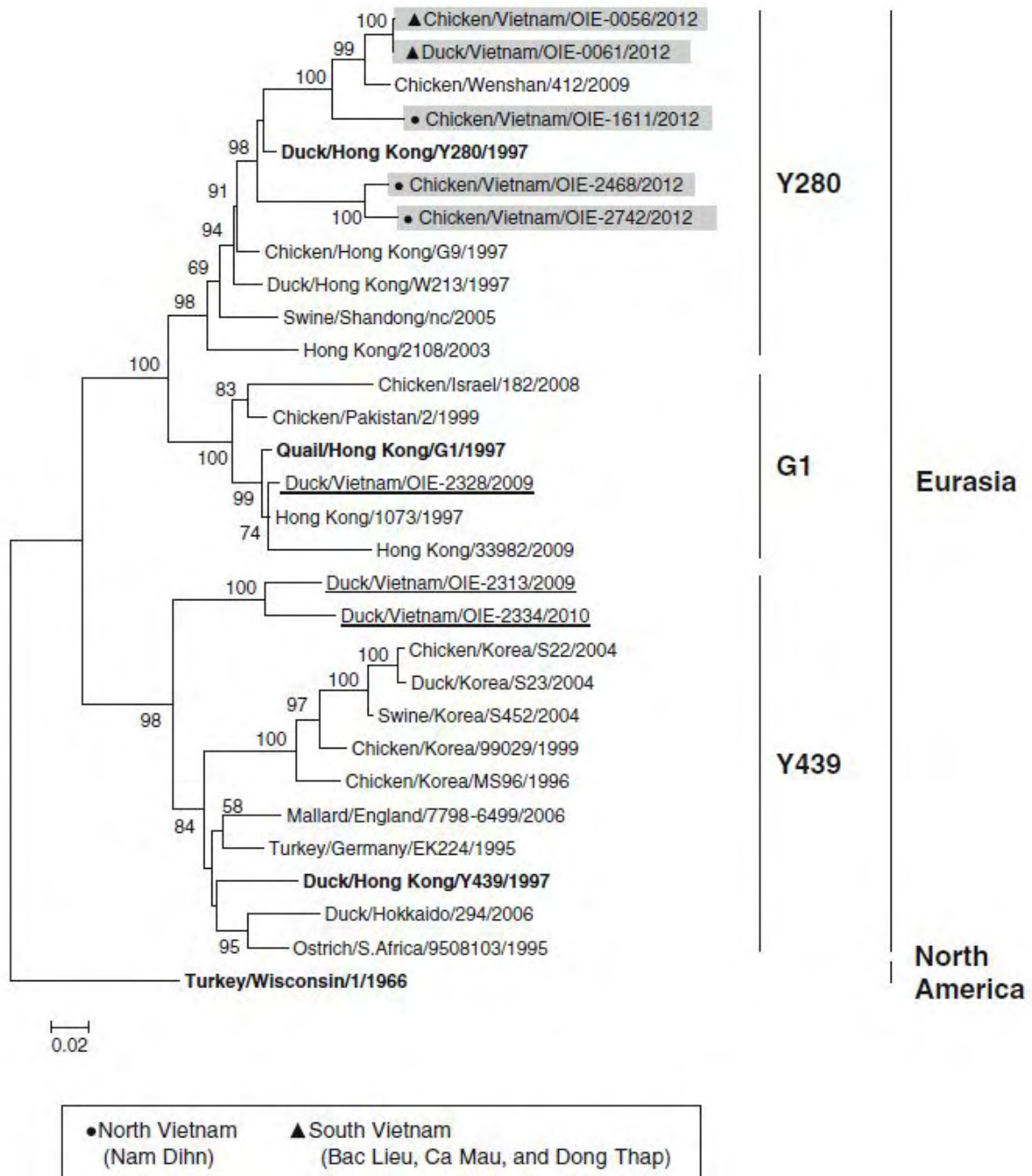


그림. 베트남의 유행 H9N2형 바이러스 변화양상

○ 2.3.2.1 H5N1형 고병원성 조류인플루엔자 확산 및 진화 (Creanga et al., 2013; Reid et al., 2011)

- 2000년대 중반에는 H5N1형 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 clade 2.2 바이러스가

유라시아 대륙에서 유행을 하였으나 2009년 중반 이후 clade 2.3.2.1 바이러스가 유행을 하기 시작하여 현재 대부분의 아시아 지역에 널리 분포되어 있다. 특히 베트남에서는 clade 2.3.2 바이러스가 H5N1 바이러스간 유전자 교환을 통하여 빠르게 진화하고 있는 것으로 조사되었다.

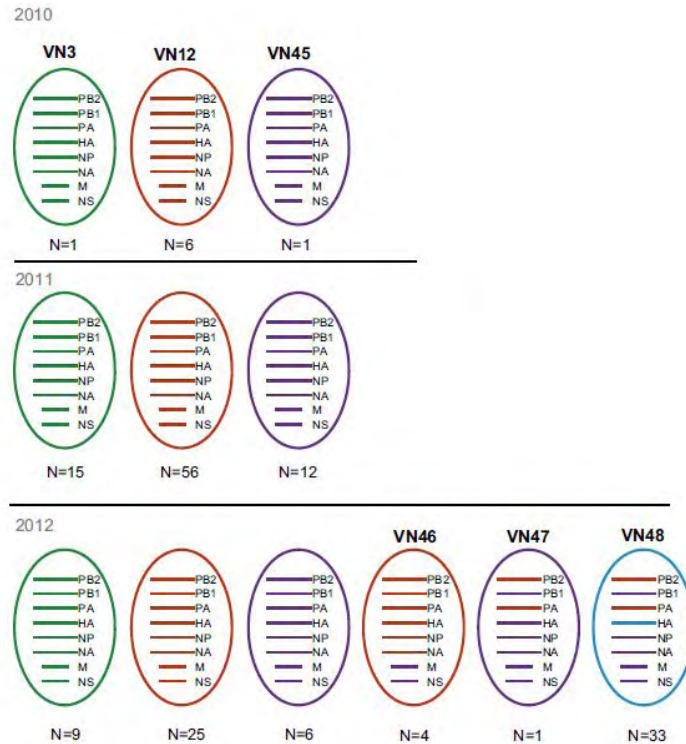


그림. 베트남 H5N1 Clade 2.3.2.1 바이러스의 진화양상

나. 조류인플루엔자 진단방법 개발 동향

○ Influenza 감별진단 nano-microarray 기법 (Zhao et al. 2012)

- gold-nanoparticle을 이용한 macroarray 기법으로 인플루엔자의 신속한 진단이 가능하며, 다양한 probe의 이용을 통하여 2009년 유행한 신종플루와 기타 유행중인 influenza 타입 구분이 가능하였다. 이 기술을 통하여 다양한 subtype의 인플루엔자 바이러스를 동시진단 가능할 것으로 기대된다.

○ LAMP법을 이용한 고병원성 H5N1의 진단 (Dinh et al. 2011)

- Loop-Mediated Isothermal Amplification(LAMP)법은 기존 PCR 방법에 필요한 Thermocycler 필요 없이 유전자를 증폭하여 진단 가능한 방법이다. 최근 RT-LAMP법을 이용하여 다양한 clade의 고병원성 H5N1이 모두 진단 가능한 기법이 개발되었다.

Virus strain (Accession no.)	Year of isolation	Clade/ Subclade	RT - LAMP		RT - PCR WHO primers
			NIID primers	Nagasaki primers	
HN 3040 (HM 114481.1)	2004	1	0.01	0.01	0.01
HN 30408 (HM 114529.1)	2005	1	0.01	0.001	0.001
BM 196	2005	2/2.3	1	0.01	0.01
HN 30850 (HM 114537.1)	2005	2/2.3	0.001	0.001	0.001
HN 31203 (HM 114545.1)	2007	2/2.3	1	1	0.1
HN 31242	2007	2/2.3	1	1	1
HN 31244 (HM 114561.1)	2007	2/2.3	1	0.1	0.1
HN 31312 (HM 114577.1)	2007	2/2.3	1	0.1	0.01
HN 31323	2007	2/2.3	1	1	1

표. RT-LAMP 및 기존 RT-PCR의 측정 한계

2. 전염성 기관지염 해외과학기술정보

가. 전염성 기관지염 바이러스 확산 및 진화

- QX형 전염성 기관지염의 확산 (Jackwood et al., 2012; Abro et al., 2011; Valastro et al., 2010)
 - 국내의 경우 2000년도 초반 QX형 바이러스 발생 이후 현재까지 중국에서 1996년도 최초 발생 보고된 QX형 바이러스와 유사한 LX4-type의 바이러스가 유행중이다. 일본 및 말레이시아에서도 LX4-type의 바이러스가 유행하는 것으로 조사되었다.
 - 유럽의 경우 2011년 스웨덴에서 육계 농장 및 산란계 농장에서 산발적인 QX형 전염성 기관지염 바이러스의 감염증이 확인되었으며, 또한 영국에서도 2010년부터 QX형 전염성 기관지염 바이러스가 확인되어서 유럽 전역에 유행하고 있는 것으로 조사되었다.
- 아메리카 대륙에서의 새로운 전염성 기관지염 바이러스 변이주의 출현 (Jackwood et al., 2012; Villarreal et al., 2010)
 - 미국에서 주로 분리되던 전염성 기관지염 바이러스는 대부분이 Arkansas 형 바이러스였으나, 1990년대 캘리포니아 변이형이 최초로 발생한 이후 지속적으로 유행하면서 변이가 계속되고 있음이 확인되었다. 또한 2007년도에 Georgia 주 및 남부 Carolina 주에서 GA07형 바이러스가 분리 보고되었으며 이들은 기존에 사용하던 백신주로는 방어가 되지 않음이 확인되었다. 또한 멕시코 및 남아메리카 주에도 2012년에 Arkansas형 바이러스가 분리됨이 확인되었으며 브라질에서는 다른 곳에서는 분리된 적이 없는 새로운 혈청형의 분리가 보고된 바 있다.



그림. 유럽지역으로 QX형 IBV 확산

○ 아메리카 대륙에서의 새로운 전염성 기관지염 바이러스 변이주의 출현 (Jackwood et al., 2012; Villarreal et al., 2010)

- 미국에서 주로 분리되던 전염성 기관지염 바이러스는 대부분이 Arkansas 형 바이러스였으나, 1990년대 캘리포니아 변이형이 최초로 발생한 이후 지속적으로 유행하면서 변이가 계속되고 있음이 확인되었다. 또한 2007년도에 Georgia 주 및 남부 Carolina 주에서 GA07형 바이러스가 분리 보고되었으며 이들은 기존에 사용하던 백신주로는 방어가 되지 않음이 확인되었다. 또한 멕시코 및 남아메리카 주에도 2012년에 Arkansas형 바이러스가 분리됨이 확인되었으며 브라질에서는 다른 곳에서는 분리된 적이 없는 새로운 혈청형의 분리가 보고된 바 있다.

3. 뉴캐슬병 해외과학기술정보

가. 전염성 기관지염 바이러스 확산 및 진화

○ 멕시코 뉴캐슬병 genotype V형의 진화 및 확산 (Garcia et al. 2013)

- 뉴캐슬병 바이러스(NDV)의 경우 2개의 class로 나뉘며 class II의 경우 16개의 genotype으로 구분된다. 베트남의 경우 genotype V형의 NDV가 1988년부터 현재까지 지속되고 있으며 최근 분리주들은 과거 분리주들과 phylogenetic tree에서 구분되는 특징을 나타낸다. 2002년부터 집중적인 백신접종으로 인해 새로운 바이러스가 출현한 것으로 추정되어진다. 또한 이러한 바이러스가 야생조류 및 동물원의 조류에서도 발견되어지고 있다.

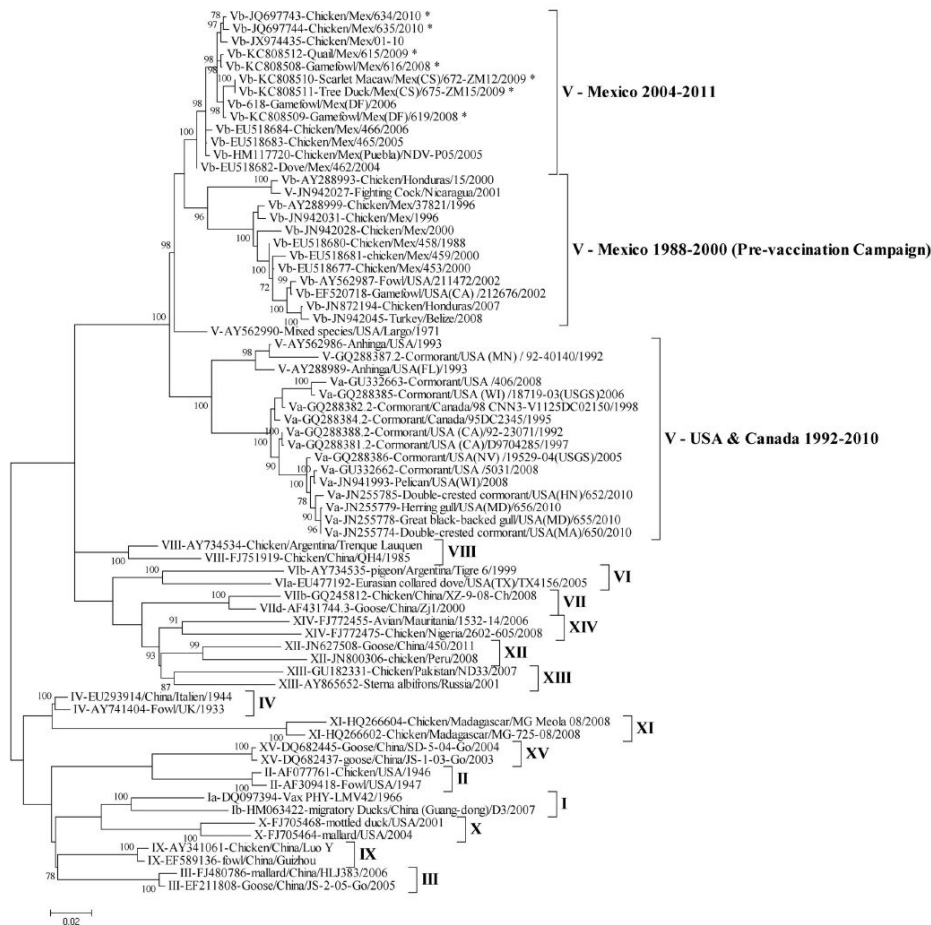


그림. 멕시코의 새로운 genotype V의 출현

○ 이집트에서의 NDV genotype VII형의 출현 (Radwan et al. 2013)

- 이집트의 경우 class II에 속하는 genotype II 및 genotype VI 형이 기존에 존재하였으나 새로이 genotype VIId형이 출현하게 되었다. genotype VIId형은 중국 및 중동지역에서 유행하는 NDV로 가금류의 수입 및 야생조류가 바이러스 전파에 기여한 것으로 추정된다.

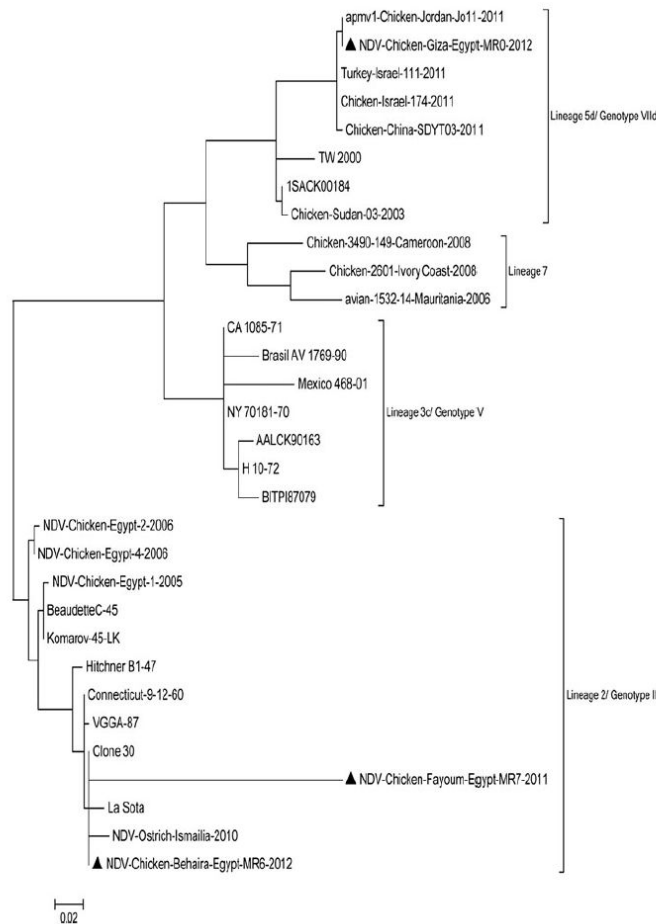


그림. 이집트의 genotype VII d형 발생

○ 중국에서 새로운 genotype VII형의 발생 - (Liu et al. 2013, Wang et al. 2013, Sun et al. 2013)

- 최근 중국에서 원래 발견되지 않던 genotype VIIb형을 포함한 새로운 형태의 VII형의 출현이 계속되어 보고되고 있다. 이 바이러스들은 닭 및 거위에서 분리되었으며 모두 velogenic한 것으로 알려졌다. 이 새로운 바이러스의 전파 및 기존 백신의 방어가능 여부에 대해 주목할 필요가 있다.

4. PRRS 해외과학기술정보

가. PRRS 바이러스의 확산과 진화

○ 중국 PRRS 유행 현황 (Bin Li et al., 2010)

- 1995년 처음 PRRS 발병 이후 중국내 각 지역에서 다양한 균주의 PRRS 바이러스가 분리 되었다. 특히 2006년 고병원성의 PRRS 바이러스가 분리 되었고 많은 피해를 주었으며, ORF5 유전자 염기서열을 분석한 결과 1996년에서 부터 2009년 사이 중국에서 분리된 모든 바이러스는 4개의 subgenotype으로 구분되는 North American 유전형에 속하는 것이며 그림과 같이 분류된다. 바이러스 계통 다양성과 점진적인 진화는 중국의 지역 내 여러 바이러스에 의한 PRRS 바이러스의 여러가지 유전자의 변형에 의한 것이라고 분석되었다.

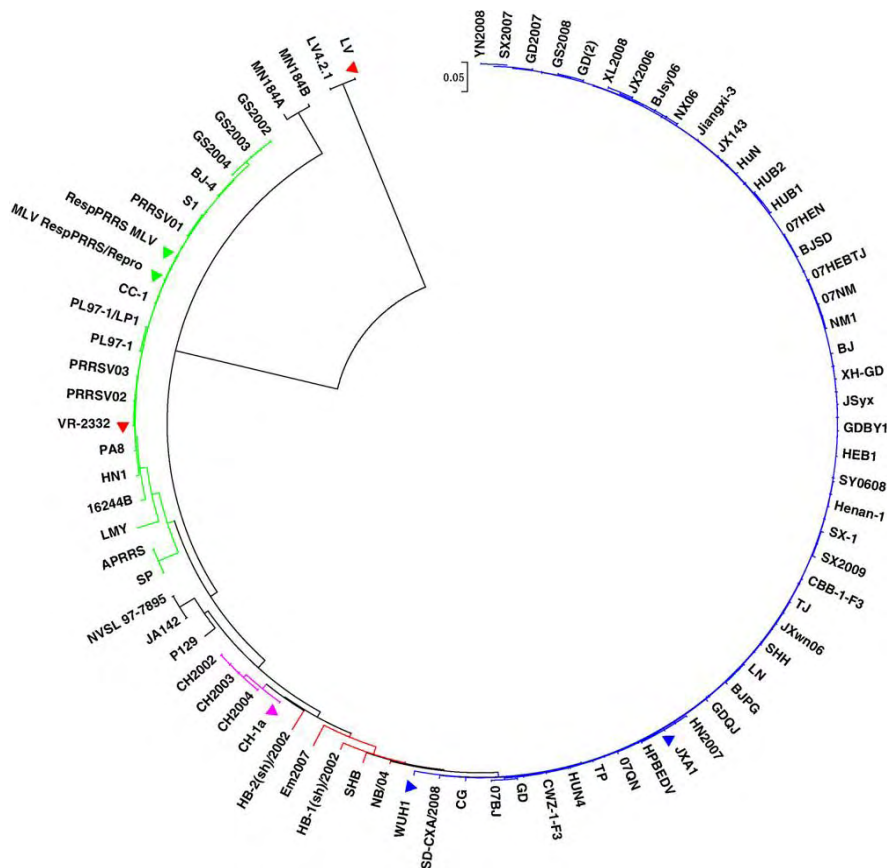


그림. 중국 PRRS 바이러스의 진화 모식도

○ 2009년 중국에서 고병원성 PRRS의 발생 (Zhou et al., 2011)

- 2009년 중국의 10개 지역에서 14종의 고병원성 PRRS 바이러스가 분리 되었고 염기서열 분석 결과 14종의 바이러스 중 12종은 2009년 이전에 분리된 North American형 PRRS와 유전자적으로 밀접한 관련성이 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 고병원성 PRRS바이러스가 중국 뿐 만 아니라 세계 여러 지역에서 진화를 통한 병원성 획득을 통하여 나타날 수 있다는 것을 시사한다.

○ Europe에서의 PRRS 발병 현황 (Tomasz Stadejek a., et al, 2013)

- 유럽에서 발생한 PRRS는 유럽 내 돼지 산업에 큰 타격을 주고 있다. 이는 그 지역에서 분리된 바이러스가 유전적으로 변형을 일으키고 중국 등 다른 지역에서 발생한 고병원성 균주가 전파되면서 가속화 되고 있다. 최근 유럽에서 분리된 PRRSV는 이미 유럽에서 분리된 바이러스의 변형 균주이며 Type 2 (North American 유전형) 분리주도 다양한 유전적인 계통이 존재하는 것으로 보고 되었다. Type2 PRRS의 경우 기존에 백신 균주만 분

리되었으나 최근 독립적으로 병원성을 띄는 균주가 발견 되고 있으며, Type 1 PRRS는 중부 및 서부 유럽에서는 subtype 1 균주가 분리되고 동유럽에서는 모든 subtype의 PRRS 바이러스가 분리되는 것으로 알려졌다. 결과적으로 유럽 내에서도 지역마다 서로 다른 균주가 발견되고 있어 더욱더 광범위하고 체계적인 PRRS 진단 및 예방이 필요한 실정이다.

Sequence	*Type	Name	Subtype	Country	Year
1		Lelystad virus	1	Netherlands	1991
2		BH 95 10 12	1	Germany	2006
3		rom22	1	Romania	2012
4	1	28M	1	Slovakia	2009
5		Vas	2	Belarus	2005
6		Ili	2	Russia	2009
7		Bor-54	2	Belarus	2004
8		Zap	3	Belarus	2004
9		Soz	3	Belarus	2009
10		VL	Subtyping pending	Russia	2006
11	2	29D1		Mexico	2002
12		91-27712 (US7)	Not applicable	USA	1991
13		VR-2332		USA	1990

*Type 1: EU genotype PRRSV. Type 2: North American genotype PRRSV.

그림. 유럽 각 지역 내 분리된 PRRS ‘바이러스 균주

5. 면역거세 관련 해외과학기술정보

- 면역거세 백신의 축종별 적용시험 (Donovan et al., 2012; Dunshea et al., 2001; Janett et al., 2012)
 - GnRH 면역 거세 백신인 Improbac의 실제 수퇘지에서의 효능을 시험한 결과, 수퇘지의 androstenone과 skatole의 수치를 낮추고 응취를 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 백신을 주사한 돼지의 증체량과 사료 섭취량이 증가하였고 공격적인 성향 역시 감소된 것으로 나타났다.
 - Cattle-specific protein conjugated 거세백신인 Bopriva를 접종한 우군에서 적어도 12주 동안 고환의 발달과 testosterone의 분비가 억제되었다. 또한 숫소의 동성간의 마운팅과 초지를 망쳐놓는 행동들 역시 줄어든 것으로 나타났다.
 - 시중에 팔고 있는 GnRH 백신은 수캐에게 접종하였을 때에 일시적이거나 가역적인 체액면역을 일으켜서, testosterone의 농도와 고환의 크기가 감소하였다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

제 8 장 참고문헌

- Abro, S. H., L. H. Renstrom, K. Ullman, M. Isaksson, S. Zohari, D. S. Jansson, S. Belak, and C. Baule. , 2013. Emergence of novel strains of avian infectious bronchitis virus in Sweden, 2011. *Veterinary microbiology*.
- Creanga, A., Thi Nguyen, D., Gerloff, N., Thi Do, H., Balish, A., Dang Nguyen, H., Jang, Y., Thi Dam, V., Thor, S., Jones, J., Simpson, N., Shu, B., Emery, S., Berman, L., Nguyen, H.T., Bryant, J.E., Lindstrom, S., Klimov, A., Donis, R.O., Davis, C.T., Nguyen, T., 2013. Emergence of multiple clade 2.3.2.1 influenza A (H5N1) virus subgroups in Vietnam and detection of novel reassortants. *Virology*.
- Dinh D.T., Quynh Le M.T., Vuong C.D., Hasebe F., Morita K., 2011, An Updated Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of H5N1 Avian Influenza Viruses, *Tropical Medicine and Health*.
- Donovan, C.E., Greer, M., Kutzler, M.A., 2012. Physiologic responses following gonadotropin-releasing hormone immunization in intact male dogs. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 47 Suppl 6, 403-405.
- Dunshea, F.R., Colantoni, C., Howard, K., McCauley, I., Jackson, P., Long, K.A., Lopaticki, S., Nugent, E.A., Simons, J.A., Walker, J., Hennessy, D.P., 2001. Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. *Journal of animal science* 79, 2524-2535.
- Garcia S.C., Lopezb R.N., Moralesc R., Olverab M.A., Marquezd M.A., Merinoe R., Millera P.J., Afonsoa C.L., 2013, Molecular Epidemiology of Newcastle Disease in Mexico: Potential Spillover of Viruses from 2 Poultry into Wild Bird Species, *Applied and Environmental Microbiology*.
- Janett, F., Gerig, T., Tschuor, A.C., Amatayakul-Chantler, S., Walker, J., Howard, R., Bollwein, H., Thun, R., 2012. Vaccination against gonadotropin-releasing factor (GnRF) with Bopriva significantly decreases testicular development, serum testosterone levels and physical activity in pubertal bulls. *Theriogenology* 78, 182-188.
- L. Y. B. Villarreal T. L. Sandri, S. P. Souza, L. J. Richtzenhain, J. J. de Wit, P. E. Brandao., 2010. Molecular epidemiology of Avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in Breeders, Broilers, and Layers. *Avian disease*.

- Li, B., Fang, L., Liu, S., Zhao, F., Jiang, Y., He, K., Chen, H., Xiao, S., 2010. The genomic diversity of Chinese porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from 1996 to 2009. *Veterinary microbiology* 146, 226-237.
- Mark W. Jackwood, 2012. Review of infectious bronchitis around the world. *Avian disease*.
- Okamatsu, M., Nishi, T., Nomura, N., Yamamoto, N., Sakoda, Y., Sakurai, K., Chu, H.D., Thanh, L.P., Van Nguyen, L., Van Hoang, N., Tien, T.N., Yoshida, R., Takada, A., Kida, H., 2013. The genetic and antigenic diversity of avian influenza viruses isolated from domestic ducks, muscovy ducks, and chickens in northern and southern Vietnam, 2010-2012. *Virus genes*.
- Radwan M.M., Darwish S.F., El-Sabagh I.M., El-Sanousi A.A., Shalaby M.A., 2013, Isolation and molecular characterization of Newcastle disease virus genotypes II and VIIId in Egypt between 2011 and 2012, *Virus Genes*.
- Reid, S.M., Shell, W.M., Barboi, G., Onita, I., Turcitu, M., Cioranu, R., Marinova-Petkova, A., Goujgoulova, G., Webby, R.J., Webster, R.G., Russell, C., Slomka, M.J., Hanna, A., Banks, J., Alton, B., Barrass, L., Irvine, R.M., Brown, I.H., 2011. First reported incursion of highly pathogenic notifiable avian influenza A H5N1 viruses from clade 2.3.2 into European poultry. *Transboundary and emerging diseases* 58, 76-78.
- Slomka, M.J., Hanna, A., Mahmood, S., Govil, J., Krill, D., Manvell, R.J., Shell, W., Arnold, M.E., Banks, J., Brown, I.H., 2013. Phylogenetic and molecular characteristics of Eurasian H9 avian influenza viruses and their detection by two different H9-specific RealTime reverse transcriptase polymerase chain reaction tests. *Veterinary microbiology* 162, 530-542.
- Stadejek, T., Stankevicius, A., Murtaugh, M.P., Oleksiewicz, M.B., 2013. Molecular evolution of PRRSV in Europe: Current state of play. *Veterinary microbiology* 165, 21-28.
- Valastro, V., I. Monne, M. Fasolato, K. Cecchetti, D. Parker, C. Terregino, and G. Cattoli., 2010. L X-type infectious bronchitis virus in commercial flocks in the UK. *Veterinary record*

Wang J.Y., Liu W.H., Ren J.J., Tang P., Wu N., Liu H.J., 2013, Complete Genome Sequence of a Newly Emerging Newcastle Disease Virus, genome announcements.

Zhao J., Wang X., Ragupathy V., Zhang P., Tang W., Ye Z., Eichelberger M., Hewlett I., 2012, Rapid Detection and Differentiation of Swine-Origin Influenza A Virus (H1N1/2009) from Other Seasonal Influenza A Viruses, *Viruses*.

Zhou, Z., Ni, J., Cao, Z., Han, X., Xia, Y., Zi, Z., Ning, K., Liu, Q., Cai, L., Qiu, P., Deng, X., Hu, D., Zhang, Q., Fan, Y., Wu, J., Wang, L., Zhang, M., Yu, X., Zhai, X., Tian, K., 2011. The epidemic status and genetic diversity of 14 highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) isolates from China in 2009. *Veterinary microbiology* 150, 257-269.