

318032
-03

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)

가축질병대응기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003468-01

AI 항원뱅크 구축용 백신주의
오리(육용오리, 종오리)에서의 효능(방어능) 평가 및
오리에 효과있는 백신 개발

2021. 04. 09.

주관연구기관 / 주식회사 카브
협동연구기관 / 건국대학교

2021

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

A - 1
농림식품기술기획평가원
가축질병대응기술개발사업
2021년도 최종보고서
AI 항원뱅크 구축용 백신주의
오리(육용오리, 종오리)에서의 효능(방어능) 평가 및
오리에 효과있는 백신 개발

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “AI 항원뱅크 구축용 백신주의 오리(육용오리, 종오리)에서의 효능(방어능) 평가 및 오리에 효과있는 백신 개발”(개발기간 : 2018. 04. 26. ~ 2020. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021 . 04 . 09 .

주관연구기관명 : 주식회사 카브

(대표자) 송 창 선



협동연구기관명 : 건국대학교 산학협력단

(대표자) 송 창 선



주관연구책임자 : 송 창 선

협동연구책임자 : 박 승 용

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	318032-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2018-04-26 ~ 2020-12-31	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	AI 항원뱅크 구축용 백신주의 오리(육용오리, 종오리)에서의 효능(방어능) 평가 및 오리에 효과있는 백신 개발			
연구책임자	송 창 선	해당단계 참여연구원 수	총: 25 명 내부: 25 명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부:880,000천원 민간:586,668천원 계:1,466,668천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 25 명 내부: 25 명 외부: 0 명	총 연구개발비	정부:880,000천원 민간:586,668천원 계:1,466,668천원
연구기관명 및 소속부서명	주식회사 카브 건국대학교 산학협력단			참여기업명 주식회사 카브 주식회사 씨티씨백	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

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

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 2주령 육용오리에서의 면역원성 및 방어능 평가 ○ AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 종오리에서의 면역원성 및 방어능 평가 ○ 오리에 효과적인 벡터백신 개발 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 2주령 육용오리에서의 면역원성 및 방어능 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 불활화 백신으로 제조하여 2주령 육용오리에 dose별(1, 1/10, 1/100)로 접종 후 항체가(HI test)를 통한 면역원성 확인 - 또한, 면역원성이 확인된 육용오리에 dose별로 공격접종하여 PD50, 일자별 바이러스 배출량(OP/CL)등을 통한 방어능 평가 ○ AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 종오리에서의 면역원성 및 방어능 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 불활화 백신으로 제조하여 종오리에 dose별(1, 1/10, 1/100)로 접종후 항체가 (HI test)를 통한 면역원성 확인 - 또한, 면역원성이 확인된 종오리에 dose별로 공격접종하여 PD50, 일자별 바이러스 배출량(OP/CL)등을 통한 방어능 평가 ○ 오리에 효과적인 벡터백신 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 항원뱅크를 통한 사독백신 뿐만 아니라 ND 또는 APMV 바이러스를 이용하여 생독백신으로서 적용이 가능한 벡터백신을 이용한 AI 백신 개발 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 구축예정 항원뱅크용 백신주의 실용오리(육용오리, 종오리)에 대한 실질적인 방어능 평가결과 확보 ○ 신규 발생주의 실용오리(육용오리, 종오리)에 대한 실질적인 방어능 평가결과 확보 ○ 오리에 효과 있는 AI용 불활화 백신 및 생독 백신 확보 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	조류인플루엔자	백신	육용오리	종오리	항원뱅크
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Avian influenza	Vaccine	Broiler Duck	Breeder Duck	Antigen Bank

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구수행 내용 및 결과	19
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	56
4. 연구결과의 활용 계획 등	62
붙임. 참고 문헌	63

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발 목적

1. 최종 목표

- (1) AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 2주령 육용오리에서의 면역원성 (HI test) 및 방어능 (생존율) 평가
- (2) AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 중오리에서의 면역원성 (HI test) 및 방어능 (생존율) 평가
- (3) 오리에 효과적인 벡터백신 개발

2. 세부 목표

- (1) AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 2주령 육용오리에서의 면역원성 (HI test) 및 방어능 (생존율) 평가
 - 불활화 백신으로 제조하여 2주령 육용오리에 dose별(1, 1/10, 1/100)로 접종후 항체가(HI test)를 통한 면역원성 확인
 - 또한, 면역원성이 확인된 육용오리에 dose별로 공격접종하여 PD50, 일자별 바이러스 배출량(OP/CL)등을 통한 방어능 평가
- (2) AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 중오리에서의 면역원성 (HI test) 및 방어능 (생존율) 평가
 - 불활화 백신으로 제조하여 중오리에 dose별(1, 1/10, 1/100)로 접종후 항체가(HI test)를 통한 면역원성 확인
 - 또한, 면역원성이 확인된 중오리에 dose별로 공격접종하여 PD50, 일자별 바이러스 배출량(OP/CL)등을 통한 방어능 평가
- (3) 오리에 효과적인 벡터백신 개발
 - 항원뱅크를 통한 사독백신 뿐만 아니라 ND 또는 APMV 바이러스를 이용하여 생독백신으로서 적용이 가능한 벡터백신을 이용한 AI 백신 개발

제 2 절. 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 개요

(1) 국내 오리 산업 현황

- 오리 고기 소비량은 2007년도부터 2012년까지 5년간 쇠고기, 돼지고기, 닭고기에 비해 가파른 증가추세를 보였으나(222%), 2013년도부터 고병원성 조류인플루엔자의 발생 등으로 인해 소비량이 일부 위축되어(70%) 2014년도부터 유지추세에 있음.
- 하지만 소비자들로부터 웰빙 음식으로 꾸준히 인식되고 있으며 사업이 성장할 가능성이 높아 조류인플루엔자를 막을 수 있는 지속적인 계획이 필요함.
- 오리는 국내 축산업의 주요 식품원 중 하나로서 자리 잡고 있지만, 그 사육 특성에 의하여 바이러스성 및 세균성 인수공통 전염병의 매개체로써 그 위험성이 높음.
- 오리 시장의 양적 성장에 비해 사육환경에 대한 질적인 성장은 이루어지지 않고 있는 것으로 평가되며, 닭에 비해 소규모 농장으로 운영하여 아직까지 체계적인 사육환경 및 위생시설이 미비한 실정임.
- 오리의 경우 상대적으로 다른 가금류에 비해 면역 능력이 좋고 감염 질병의 수가 적어 위생관리가 미비한 경우가 많으며 특히 수생생활을 선호하는 습성으로 인해 다른 가금류에 비해 사육환경의 관리가 어려워 외부로부터 유입되는 질병에 대한 노출이 쉬움.

(2) 오리에 대한 고병원성 조류인플루엔자 백신 연구의 필요성

- 조류인플루엔자는 오리에서 사람으로 직접적, 간접적 전파가 가능하여 질병의 효율적인 방제가 이루어져야 함.

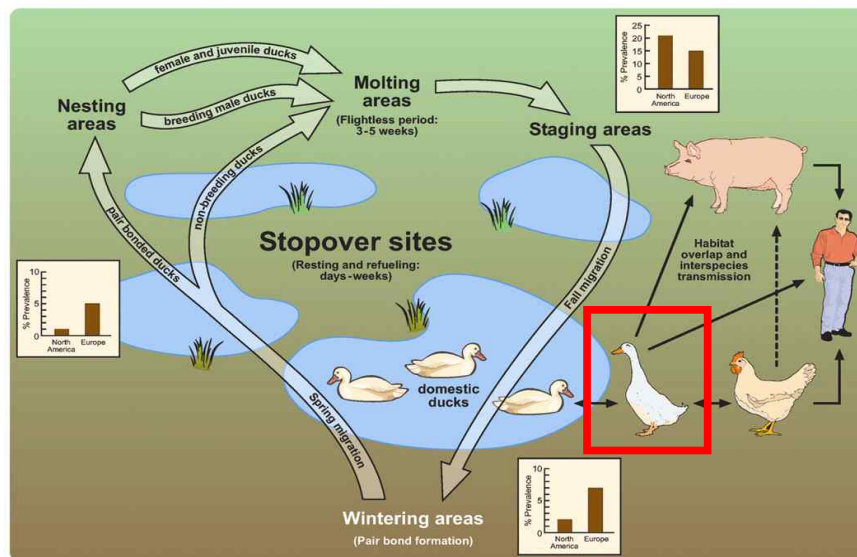


그림 1. 야생오리의 패턴과 사육오리의 조류인플루엔자 전파관계

(출처 : Influenza other respi viruses, 2009)

- 오리의 사육밀도와 고병원성 조류인플루엔자 발생에 대한 연관 보고가 있음.

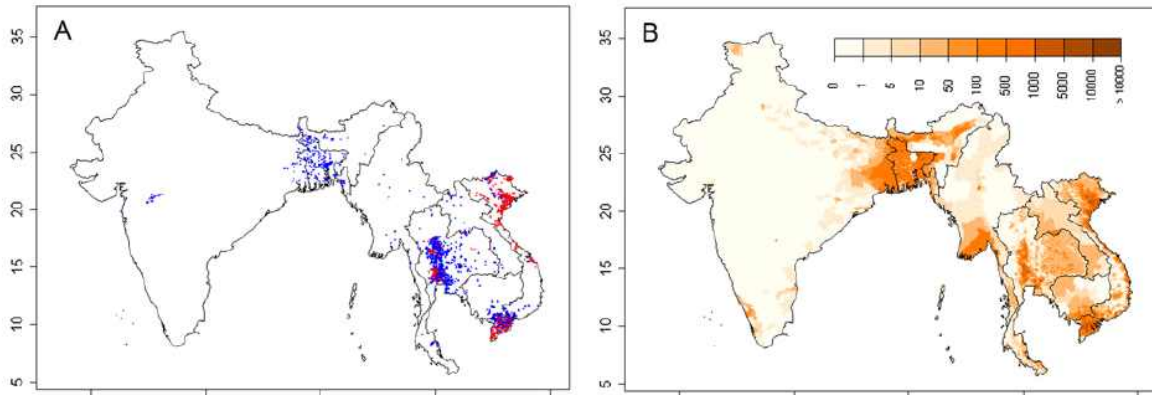


그림 3. (A) 고병원성 조류 인플루엔자 발생 지역과 (B) 오리의 사육 밀도
(Eco Health, 2010)

- 또한 야생 조류에서 유행하는 고병원성 조류인플루엔자가 사육 오리에 유입된 후 전국적으로 전파되어 국내 가금 산업에 막대한 피해를 주고 공중보건학적 우려를 낳은 예가 있음.

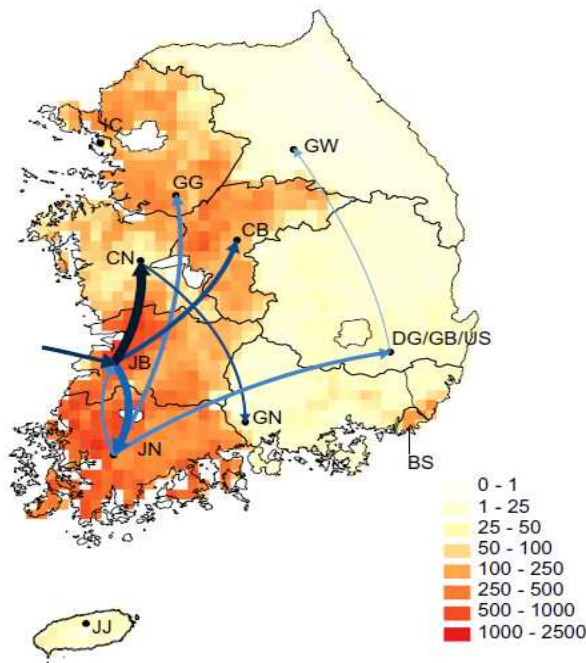


그림 4. 국내 유입 사례 및 전파 경로- 2014년
(Infection, Genetics and Evolution, 2015)

- 오리에서 고병원성 조류인플루엔자가 높은 빈도로 발생하고 있으며(2003년 47%, 2006년 53%, 2008년 38%, 2010/2011년 61.5%, 2014/2016년 82%, 2016/2017년 41%), 2017/2018년 국내 고병원성 조류인플루엔자 양성판정 18개 농장 중 13개 농장은 종오리 및 육용오리에서 검사된 것이며, 이것은 양성농장 중 반 이상(72.2%)을 차지함.

- 고병원성 인플루엔자가 상재하는 동남아에서는 고병원성 인플루엔자 백신을 실시하고 있지만 높은 항체를 얻기 어렵고, 개체마다 면역원성 형성 정도의 차이가 큰 단점이 있음.
- 2010년 이후 중국 남부에서 clade 2.3.4.4 의 바이러스가 발생되어 H5Nx형의 다양한 형태로 진화하였으며 사육 오리에서 많은 보고가 있고, 이곳을 지나가는 철새의 국내 유입을 통해 H5Nx형 HPAI가 한국으로 유입되어 큰 피해를 준 적이 있으며 추후 유입 가능성이 상재하여 대비책을 세우는 것이 필수적임.

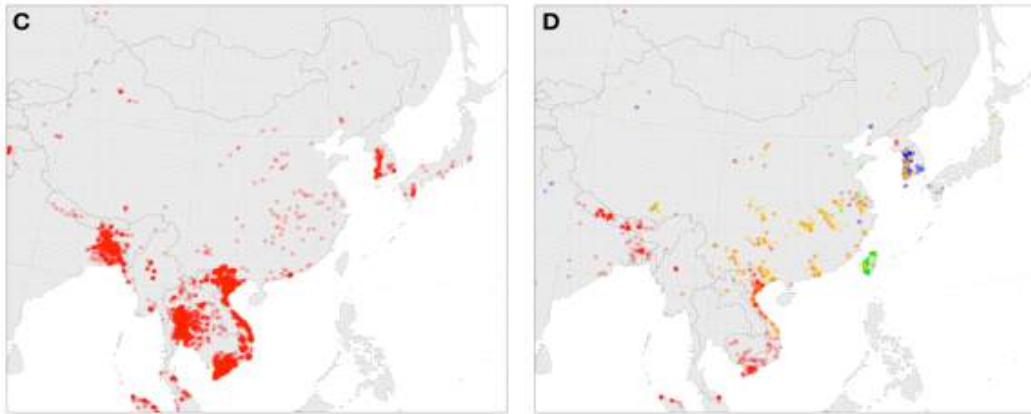


그림 5. (C) 2012년 이전 HPAI 발생 사례, (D) 2012년 이후 HPAI 발생 사례
 (붉은 점: H5N1, 녹색 점: H5N2, 파란 점: H5N8, 주황 점: H5N6)
 (Front Vet Sci, 2017)

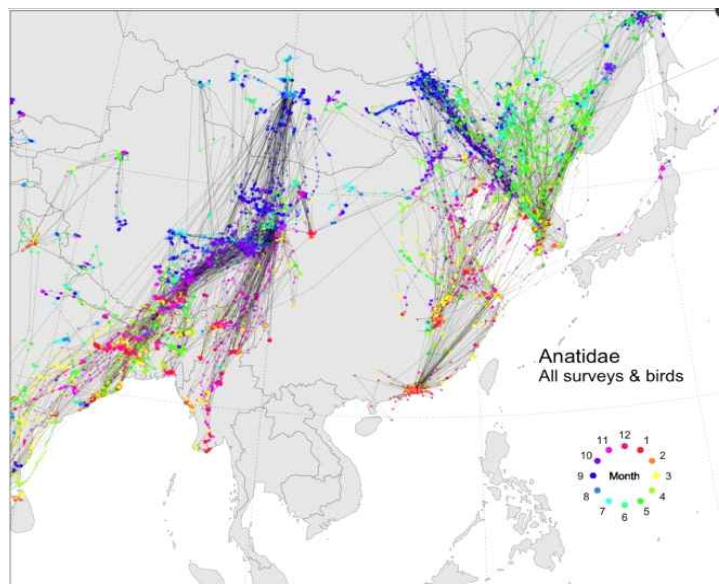


그림 6. 기러기목 오리과 철새(Anatidae) 이동 경로
 (Front Vet Sci, 2017)

- 현재 국내에는 가금류에서의 HPAI 백신이 사용되고 있지 않지만, 국내에 들어올 가능성이 있는 다양한 HPAI에 대한 유사시 긴급용 방역백신 사용을 위한 항원뱅크가 준비되고 있으며, 항원뱅크 보유주에 대한 가금 종별 백신 효능의 평가가 필요한 상황임.

- 닭(SPF, 산란계, 종계)에서의 축종별 효능평가는 검역본부 자체 과제로 수행예정이나, 질병의 유입 및 전파를 막기 위해서는 실용오리(종오리, 육용오리)에 대한 축종별 효능평가가 필수적으로 이루어져야 함.

(3) 고병원성 조류인플루엔자 백신 연구의 필요성

- 고병원성 조류인플루엔자의 특성상 항원을 증폭시키는 수단인 종란에서의 병원성으로 인해 많은 항원을 얻지 못하는 단점이 있으며, 분절부위 염기서열 변이를 이용한 저병원성 재조합 백신주의 경우 종란에서의 증식능과 항원성을 확보하였으나 항원 변이의 가능성이 존재하여 생독백신으로 사용할 수 없고 개체별 백신이 필요하다는 단점이 있음.
- 뉴캐슬병 바이러스 (NDV)의 경우 APMV(Avian Paramyxovirus) type I에 속하는 바이러스로 250종 이상의 조류에 대하여 감수성이 있으며, 호흡기성 바이러스로서 조류간의 전파가 쉬워 집단 백신 접종(mass vaccination)이 가능한 생독백신으로서 높은 가치를 지니고 있음.
- NDV의 경우 유래된 종에 따라 분리주의 종별 감수성이 다른 것으로 보고됨. 현재 백신용으로 사용되고 있는 바이러스는 대부분 닭에서 분리된 ND 바이러스로, 닭에 대해서는 감수성 및 전파능이 좋지만 오리에 대해서는 상대적으로 감염이 잘 이루어지지 않는 특징이 있음.

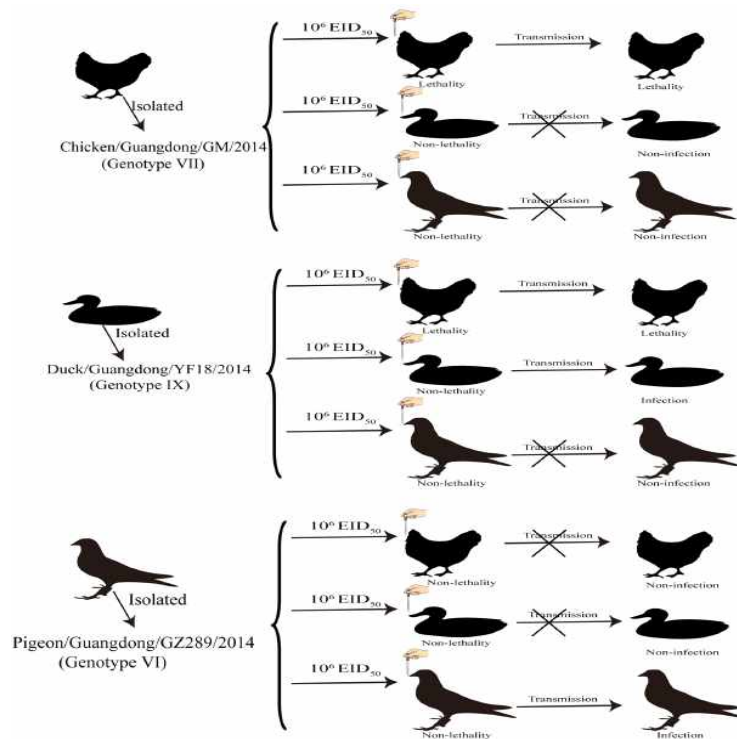


그림 7. 유래 종에 따른 NDV 분리주의 감수성 차이 (Front Microbiol. 2016)

- 오리에서 분리된 NDV의 경우 오리 및 닭에 모두 감염 및 항체가 형성이 가능하여 백신주로서 높은 가능성을 가지고 있어, 오리 유래 NDV를 이용하여 생독 백신을 개발할 경우 백신으로서의 효용성을 높일 수 있을 것으로 기대됨.
- NDV 및 다른 형의 APMV의 경우 역유전학 기술을 통해 타 바이러스의 항원을 삽입하여 이종의 병원체에 대하여 벡터 백신으로서 사용이 가능하며, 고병원성 조류인플루엔자의 HA 유전자를 삽입할 경우 고병원성 조류인플루엔자에 대한 백신으로 사용이 가능함.
- 벡터 백신의 경우 고병원성 조류인플루엔자 백신의 HA 단백질만을 발현하여 항원 변이의 가능성이 없으며, 인플루엔자 바이러스의 다른 단백질에 대한 항체 검사를 통하여 백신 개체/백신 후 감염 개체의 구별이 가능하여 발생이 종료된 후 출구전략을 사용하기 용이함.

제 3 절. 연구개발 범위

1. 1차년도

(1) 연구개발 목표

○ 주관연구기관(주KCAV) :

- ◆ AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주 (Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 불활화 백신 제조
- ◆ AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 2주령 육용오리에서의 면역원성 (HI test) 및 방어능 (PD₅₀, 바이러스 배출량, 생존율) 평가

○ 협동연구기관(건국대학교) :

- ◆ 오리 유래 ND 분리주 역유전학 바이러스 제작 1종 이상
- ◆ AI HA 유전자 삽입 ND 바이러스 (ND+AI 벡터 백신주) 제작 1종 이상

(2) 개발 내용 및 범위

○ 주관연구기관(주KCAV) :

◆ 고병원성 조류인플루엔자 백신 제조

- 항원뱅크에 확보되어 있는, 고병원성 조류인플루엔자 H5N1 형 유행주 (Clade 2.3.2.1C - 2010/2011 년 국내 발생을 포함하여, 현재 아시아, 유럽 및 다양한 지역에 유행 중)를 이용하여 백신을 제조함
- 항원뱅크에 확보되어 있는, 고병원성 조류인플루엔자 H5Nx형 유행주 (Clade 2.3.4.4 - 2014/2016년, 2016/2017년, 2017/2018년 국내 발생을 포함하여, 현재, 아시아, 유럽, 아메리카 등 다양한 지역에 유행 중)를 이용하여 백신을 제조함
 - ◆ 국내 발생주에 대입할 경우 Clade 2.3.4.4C는 2016/2017년에 발생한 H5N6 주에 해당하며, 2016/2017년에 발생한 H5N8 주는 Clade 2.3.4.4B, 2014/2016년도 주는 H5N8 Clade 2.3.4.4A, 2017/2018년 발생 H5N6주는 Clade 2.3.4.4B에 해당함

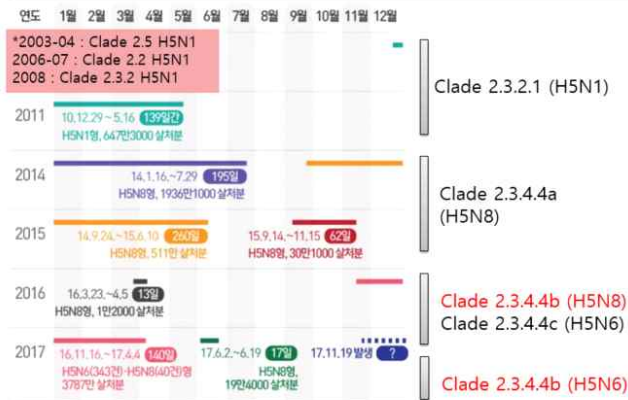


그림 8. 주관연구기관 선행 조사 자료

- ◆ Clade 2.3.4.4A-C의 경우 항원성과 관련된 HA 단백질의 차이가 크지 않아 하나의 Clade에 대한 백신주로 다른 Clade에 대해 비슷한 수준의 교차 면역원성이 예상됨. 본 연구과제에서는 Clade 2.3.4.4C 주를 사용하여 백신으로서의 효과를 판별할 예정임

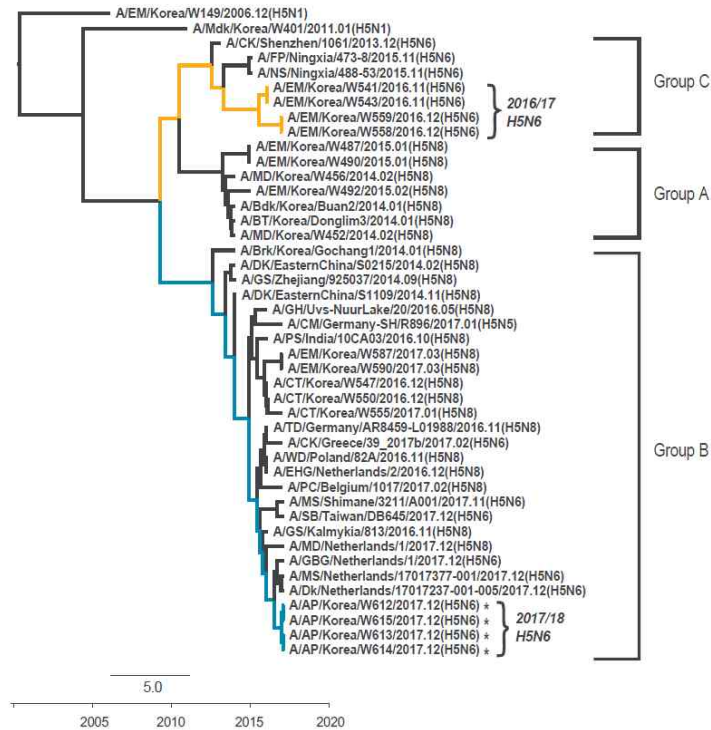


그림 9. H5Nx Clade 2.3.4.4 바이러스의 분화
(Eurosurveillance, 2018)

- 오리에 최적화된 백신을 개발하기 위해 항원량 조절, 부형제 교체 등 다양한 방법으로 백신을 제조하여 평가할 예정임
- 고병원성 조류인플루엔자 신규 발생시, 신규 발생주에 대해 같은 방법으로 백신을 제조 및 평가함
- ◆ 2주령 육용오리에서의 고병원성 조류인플루엔자 백신 면역원성 평가
 - 제조된 고병원성 조류인플루엔자 백신에 대해 2주령 오리에서의 면역원성을 평가함.
 - 백신 실시 전 NP cELISA를 통해 항체 형성을 파악하여 인플루엔자에 대한 감염 여부를 확인하고 감염이 확인되지 않은 개체에 대해 백신을 실시함.
 - dose별(1, 1/10, 1/00)로 백신을 실시하고 1주, 2주, 3주 후에 혈청을 채취하여 혈구 응집억제반응 (HI test)을 통해 면역원성을 평가하며, 증체량 등의 평가를 통해 백신의 안전성을 평가할 예정임.
 - 항체 역가가 충분히 올라오지 않을 경우, 백신접종 루트 변경, 백신 추가접종, 부형제 교체 등의 다양한 방법을 통해 백신의 면역원성 증가 방법을 평가할 예정임.

◆ 2주령 육용오리에서의 고병원성 조류인플루엔자 백신 방어능 평가

- 본 연구팀은 선행연구를 통해 H5N1 (Clade 2.3.2.1C) 바이러스를 6주령 오리에 농도 별로 공격접종 하여 반수치사량(LD₅₀ ; 50% Lethal Dose) 및 감염 3, 7일째의 바이러스 배출 역가를 확인하였음.
- 항원뱅크 H5Nx (Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C)에 대하여 선행연구와 같은 방법을 토대로 바이러스의 접종이 예상되는 5주령의 육용오리에 바이러스의 반수치사 용량을 측정 후 전수가 폐사할 것으로 예상되는 100 LD₅₀의 용량으로 공격 접종 예정임. (단, 제일 높은 농도에서도 폐사가 나타나지 않거나, 바이러스의 역가가 100LD₅₀의 농도로 접종이 불가능할 경우 가능한 한 높은 농도를 사용할 예정임)
- dose별(1, 1/10, 1/100)로 백신이 실시된 육용오리에 대해 100 LD₅₀의 용량으로 공격 접종하여 3, 5, 7, 10일에 바이러스 배출량(OP/CL)을 확인하고 14일동안 임상증상 관찰 및 PD₅₀를 계산하여 백신의 효능 및 지속능에 대해 평가할 예정임.

○ 협동연구기관(건국대학교) :

◆ 오리 유래 ND 분리주 역유전학 바이러스 제작 1종 이상

- 역유전학 ND 바이러스를 제작하기 위하여는 ND의 전장(full-length) 유전체, 보조 플라스미드 3종 및 보조 바이러스가 필요함.

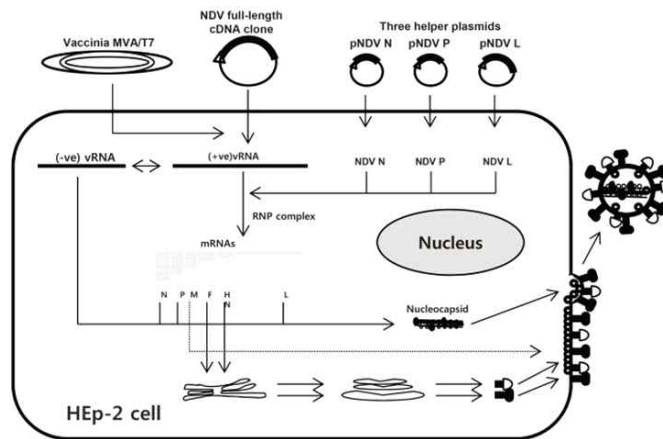


그림 10. 역유전학 ND 바이러스 제작 과정
(Clin Exp Vaccine Res, 2017)

- 위의 4개의 플라스미드와 1개의 바이러스를 세포에 동시 삽입하여 배양 후, 종란에의 배양 과정을 거쳐 혈구응집능을 통해 역유전학 제작 바이러스 확보 여부를 판단할 수 있음.

◆ AI HA 유전자 삽입 ND 바이러스 (ND+AI 벡터 백신주) 제작 1종 이상

- 역유전학 ND 바이러스가 제작되면 ND 바이러스의 전장 유전체 특정 위치에 타 항원을 삽입하여 여러 질병에 대해 동시에 방어할 수 있는 벡터 백신 형태로의

개발이 가능함.

- 본 연구팀에서는 ND 또는 오리에서 증식성 및 효능이 좋은 APMV를 선발하여 본 과정을 거쳐 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 HA 항원을 넣음으로써 고병원성 조류인플루엔자 및 벡터 바이러스에 대해 방어가 가능한 벡터 백신을 개발할 예정임

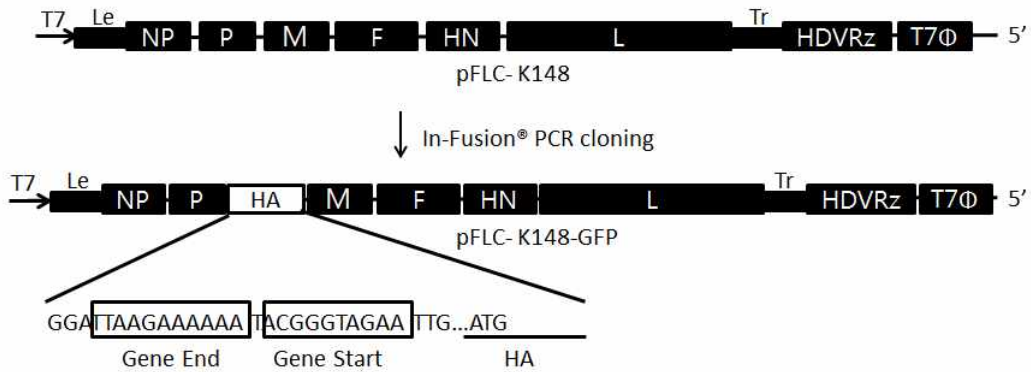


그림 11. ND+AI 벡터 백신주 제작 과정

2. 2차년도

(1) 연구개발 목표

○ 주관연구기관(주KCAV) :

- ◆ 신규 발생주에 대한 불활화 백신 제조
- ◆ AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 종오리에서의 면역원성 (HI test) 및 방어능 (PD50, 바이러스 배출량, 생존율) 평가
- ◆ 신규 발생주 백신에 대한 면역원성, 방어능 평가

○ 협동연구기관(건국대학교) :

- ◆ 오리 유래 ND 분리 바이러스주와 역유전자 제작 바이러스, ND+AI 벡터 백신주의 닭 및 오리에서의 증식성 비교평가
- ◆ 오리 유래 ND 분리 바이러스주와 역유전자 제작 바이러스, ND+AI 벡터 백신주의 종란 내 병원성, 병아리 병원성 비교

(2) 개발 내용 및 범위

○ 주관연구기관(주KCAV) :

- ◆ 신규 발생주에 대한 백신 제조
 - 고병원성 조류인플루엔자 신규 발생시, 신규 발생주에 대해 백신을 제조함
 - 오리에 최적화된 백신을 개발하기 위해 항원량 조절, 부형제 교체 등 다양한 방법으로 백신을 제조하여 평가할 예정임
- ◆ 종오리에서의 고병원성 조류인플루엔자 백신 면역원성 평가

- 제조된 고병원성 조류인플루엔자 백신에 대해 종오리에서의 면역원성을 평가함.
- 백신 실시 전 NP cELISA를 통해 항체 형성을 파악하여 인플루엔자에 대한 감염 여부를 확인하고 감염이 확인되지 않은 개체에 대해 백신을 실시함.
- dose별(1, 1/10, 1/00)로 백신을 실시하고 1주, 2주, 3주 후에 혈청을 채취하여 혈구 응집억제반응 (HI test)을 통해 면역원성을 평가하며, 증체량 등의 평가를 통해 백신의 안전성을 평가할 예정임.
- 항체 역가가 충분히 올라오지 않을 경우, 백신접종 루트 변경, 백신 추가접종, 부형제 교체 등의 다양한 방법을 통해 백신의 면역원성 증가 방법을 평가할 예정임.

◆ 종오리에서의 고병원성 조류인플루엔자 백신 방어능 평가

- 항원뱅크 H5Nx (Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C)에 대하여 선행연구와 같은 방법을 토대로 종오리에 바이러스의 반수치사 용량을 측정 후 전수가 폐사할 것으로 예상되는 100 LD₅₀의 용량으로 공격 접종 예정임. (단, 제일 높은 농도에서도 폐사가 나타나지 않거나, 바이러스의 역가가 100LD₅₀의 농도로 접종이 불가능할 경우 가능한 한 높은 농도를 사용할 예정임)
- dose별(1, 1/10, 1/00)로 백신이 실시된 종오리에 대해 100 LD₅₀의 용량으로 공격접종하여 3, 5, 7, 10일에 바이러스 배출량(OP/CL)을 확인하고 14일동안 임상증상 관찰 및 PD₅₀를 계산하여 백신의 효능 및 지속능에 대해 평가할 예정임.

◆ 신규 발생주 백신에 대한 면역원성, 방어능 평가

- 참여기업에서 제조된 신규 발생주 고병원성 조류인플루엔자 백신에 대해 2주령 오리에서의 면역원성을 평가함.
- 백신 실시 전 NP cELISA를 통해 항체 형성을 파악하여 인플루엔자에 대한 감염 여부를 확인하고 감염이 확인되지 않은 개체에 대해 백신을 실시함.
- dose별(1, 1/10, 1/00)로 백신을 실시하고 1주, 2주, 3주 후에 혈청을 채취하여 혈구 응집억제반응 (HI test)을 통해 면역원성을 평가함.
- dose별(1, 1/10, 1/00)로 백신이 실시된 육용오리에 대해 100 LD₅₀의 용량으로 공격 접종하여 3, 5, 7, 10일에 바이러스 배출량(OP/CL)을 확인하고 14일동안 임상증상 관찰 및 PD₅₀를 계산하여 백신의 효능 및 지속능에 대해 판별할 예정임.

○ 협동연구기관(건국대학교) :

- ◆ 오리 유래 ND 분리 바이러스주와 역유전학 제작 바이러스, ND+AI 벡터 백신주의 종란에서의 증식성 비교평가
 - 생독백신으로서 백신 가치가 높기 위해서는 종란 내에서의 증식성이 높아야함. 역유전학을 통해 제작된 백신 후보주가 기존 바이러스와 유사하게 백신으로서의 가치가 높은지 판단하기 위해 12시간별로 종란 요막강액을 채취하여 growth kinetics를 측정함.
- ◆ 오리 유래 ND 분리 바이러스주와 역유전학 제작 바이러스, ND+AI 벡터 백신주의 종란 내 병원성, 1일령 병아리 뇌내접종 병원성 비교

- 역유전학을 통해 제작된 백신 후보주가 기존 바이러스와 유사하게 백신으로서의 사용이 가능한지 판단하기 위해 종란 내 병원성(MDT; Mean death time) 및 1일령 병아리 뇌내접종 평가(ICPI; Intracerebral Pathogenic Index)를 실시함.
- 개발된 역유전학 백신주는 최초의 오리 유래 NDV 벡터주으로써 특허 출원을 진행할 예정임

3. 3차년도

(1) 연구개발 목표

○ 주관연구기관(주KCAV) :

- ◆ 신규 발생주에 대한 불활화 백신 제조
- ◆ 신규 발생주에 대한 육용오리에서의 면역원성 (HI test) 및 방어능 (PD₅₀, 바이러스 배출량, 생존율) 평가
- ◆ 협동기관 제작 ND+AI 벡터 백신 1종의 2주령 오리에서의 면역원성 (HI test) 및 방어능 (최소면역원성, 바이러스 배출량, 생존율) 평가

○ 협동연구기관(건국대학교) :

- ◆ cytokine, IRES 시스템 등을 이용한 ND+AI 벡터 백신 개량주 개발 1종
- ◆ ND+AI 벡터 백신 개량주 1종 면역원성 (HI test) 평가

(2) 개발 내용 및 범위

○ 주관연구기관(주KCAV) :

- ◆ 신규 발생주에 대한 백신 제조
 - 고병원성 조류인플루엔자 신규 발생시, 신규 발생주에 대해 백신을 제조함
 - 오리에 최적화된 백신을 개발하기 위해 항원량 조절, 부형제 교체 등 다양한 방법으로 백신을 제조하여 평가할 예정임
- ◆ 신규 발생주 백신에 대한 면역원성, 방어능 평가
 - 제조된 신규 발생주 고병원성 조류인플루엔자 백신에 대해 2주령 오리에서의 면역원성을 평가함.
 - 백신 실시 전 NP cELISA를 통해 항체 형성을 파악하여 인플루엔자에 대한 감염 여부를 확인하고 감염이 확인되지 않은 개체에 대해 백신을 실시함.
 - dose별(1, 1/10, 1/100)로 백신을 실시하고 1주, 2주, 3주 후에 혈청을 채취하여 혈구 응집억제반응 (HI test)을 통해 면역원성을 평가하며, 증체량 등의 평가를 통해 백신의 안전성을 평가할 예정임.
 - 항체 역가가 충분히 올라오지 않을 경우, 백신접종 루트 변경, 백신 추가접종, 부형제 교체 등의 다양한 방법을 통해 백신의 면역원성 증가 방법을 평가할 예정임.
 - dose별(1, 1/10, 1/100)로 백신이 실시된 육용오리에 대해 100 LD₅₀의 용량으로 공격 접종하여 3, 5, 7, 10일에 바이러스 배출량(OP/CL)을 확인하고 14일동안 임상증상

관찰 및 PD₅₀를 계산하여 백신의 효능 및 지속능에 대해 판별할 예정임.

◆ 역유전학 제작 ND+AI 벡터 백신의 2주령 오리에서의 면역원성 및 방어능 평가

- 협동연구기관(건국대학교)에서 제조된 ND+AI 벡터백신에 대하여 접종 경로별로 백신의 효능을 평가함. 점안, 분무 등의 경로를 평가해볼 예정임.
- 설정된 백신 경로에 대해 dose별로 2주령 오리에 백신을 실시하여 최소면역원성을 평가함.
- 면역능이 확인된 농도/경로의 백신이 실시된 육용오리에 대해 100 LD₅₀의 용량으로 공격접종하여 3, 5, 7, 10일에 바이러스 배출량(OP/CL)을 확인하고 14일동안 임상증상 관찰을 통해 백신의 방어능을 평가할 예정임
- 생독 백신의 개발을 통하여 오리에 대하여 생독 + 사독 백신 프로그램을 제작하여 오리에서 효율적으로 고병원성 조류인플루엔자에 대한 방어능을 유도할 수 있을 것으로 판단되며 오리뿐 아니라 닭 등 기타 가금류에 대해서도 사용해볼 수 있을 것으로 사료됨

○ 협동연구기관(건국대학교) :

◆ cytokine, IRES 시스템 등을 이용한 ND+AI 벡터 백신 개량주 개발 1종

- ND+AI 벡터 백신 개량을 위해 면역보조제로서 기능이 가능한 cytokine이 포함된 벡터 백신 개량주를 개발함.
- ND 벡터 백신은 바이러스의 특성상 유전자의 위치에 따라 단백질의 발현량이 달라지는 특성이 있어, 원하는 항원의 단백질 발현량을 증가시키기 위해 독립적인 전사 단위(ITU; Independent transcription unit)를 삽입할 수 있는 IRES(Internal ribosom entry site) 등의 방법을 사용하여 벡터 백신 개량주를 개발함.

◆ ND+AI 벡터 백신 개량주 1종 면역원성 (HI test) 평가

- 신규 개발된 벡터 백신 개량주를 이용하여 동일 경로/동일 대비 기존 벡터백신주에 비해 면역원성의 개선 여부가 나타나는지 확인함.
- 개발된 역유전학 백신 개량주는 최초의 오리 유래 NDV 벡터 개량주로서 특허 출원을 진행할 예정임


제 2 장. 연구수행 내용 및 결과


제 1 절. AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 육용오리 및 종오리에서의 면역원성 (HI test) 및 방어능 (생존율) 평가

1. 1차년도 연구수행 내용 및 결과

○ 연구성과 및 결과

- 고병원성 조류인플루엔자 AI 항원뱅크 구축용 백신 시제품 수령
 - 육용오리 및 종오리에 대한 AI 항원뱅크 구축용 백신의 면역원성 및 방어능 평가를 위하여 농림축산검역본부로부터 2종의 오일백신 시제품(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C)을 수령함
- 고병원성 조류인플루엔자 AI 공격접종주 수령
 - 육용오리 및 종오리에 대한 AI 항원뱅크 구축용 백신의 면역원성 및 방어능 평가를 위하여 농림축산검역본부로부터 오일백신 관련 바이러스 공격접종주(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C)를 수령함(그림 1, 2)

수의유전자원 분양신청서							분양신청번호	
<input checked="" type="checkbox"/> 특별관리병원체 <input type="checkbox"/> 일반관리병원체 <input type="checkbox"/> 기타병원체 <input type="checkbox"/> 세보주 <input type="checkbox"/> 융합물질 <input checked="" type="checkbox"/> 분양신청 <input type="checkbox"/> 제3자 분양신청								
분양신청자	성명	송장선	소속	㈜카브	직위	대표이사		
	E-mail	songcs3712@gmail.com	전화	02-6461-0085	FAX	-		
	주소	서울특별시 광진구 능동로 120 건국대학교 미래에너지관 202호			사업자등록번호	2068703682		
연구책임자/수의유전자원 취급-관리자	성명	송장선	소속	㈜카브	직위	대표이사		
	E-mail	songcs3712@gmail.com	전화	02-6461-0085	FAX	-		
	주소	서울특별시 광진구 능동로 120 건국대학교 미래에너지관 202호						
연구과제명 (해당시)	AI 항원뱅크 구축용 백신주의 오리(육용오리, 종오리)에서의 효능(방어능) 평가 및 오리에 효과있는 백신 개발							
연구기간/사용기간	바이러스 수령일 ~ 2020.12.31							
연구목적/사용목적	AI 항원뱅크 구축용 백신주의 오리에서의 효능평가							
유전자원 사용기간	바이러스 수령일 ~ 2020.12.31							
연구실 및 보존장소	건국대학교 서울캠퍼스 의생명과학연구소 524호, 810호 BL3 실험실 (제KCDC-09-3-01호, 제KCDC-10-3-06호)							
시설점검 유무	<input checked="" type="checkbox"/> 유 (점검일: 2018년 7월 30일) <input type="checkbox"/> 무							
폐기방법	건국대학교 생물안전관리 규정에 따라 처리							
수의유전자원 항목(바이러스, 세균, 곰팡이, 기생충, 세보주, 융합물질, 표준형질)								
순번	수의유전자원 번호	수의유전자원 항목	수의유전자원명			수량	비고	
1	KVCC-VR130-0047	바이러스	A/chicken/Vietnam/NCVD-KA435/2013(H5N1)			1		
본인은 위 수의유전자원을 분양 신청함에 있어서 상기의 목적으로만 사용할 것이며 제3자에게 임의로 제공, 분양하지 않을 것임을 서약합니다. 2018년 8월 3일 송 장 선 서명 								
농림축산검역본부장 귀하								

수의유전자원 분양신청서							분양신청번호	
<input checked="" type="checkbox"/> 특별관리병원체 <input type="checkbox"/> 일반관리병원체 <input type="checkbox"/> 기타병원체 <input type="checkbox"/> 세보주 <input type="checkbox"/> 융합물질 <input checked="" type="checkbox"/> 분양신청 <input type="checkbox"/> 제3자 분양신청								
분양신청자	성명	송장선	소속	㈜카브	직위	대표이사		
	E-mail	songcs3712@gmail.com	전화	02-6461-0085	FAX	-		
	주소	서울특별시 광진구 능동로 120 건국대학교 미래에너지관 202호			사업자등록번호	2068703682		
연구책임자/수의유전자원 취급-관리자	성명	송장선	소속	㈜카브	직위	대표이사		
	E-mail	songcs3712@gmail.com	전화	02-6461-0085	FAX	-		
	주소	서울특별시 광진구 능동로 120 건국대학교 미래에너지관 202호						
연구과제명 (해당시)	AI 항원뱅크 구축용 백신주의 오리(육용오리, 종오리)에서의 효능(방어능) 평가 및 오리에 효과있는 백신 개발							
연구기간/사용기간	바이러스 수령일 ~ 2020.12.31							
연구목적/사용목적	AI 항원뱅크 구축용 백신주의 오리에서의 효능평가							
유전자원 사용기간	바이러스 수령일 ~ 2020.12.31							
연구실 및 보존장소	건국대학교 서울캠퍼스 의생명과학연구소 524호, 810호 BL3 실험실 (제KCDC-09-3-01호, 제KCDC-10-3-06호)							
시설점검 유무	<input checked="" type="checkbox"/> 유 (점검일: 2018년 7월 30일) <input type="checkbox"/> 무							
폐기방법	건국대학교 생물안전관리 규정에 따라 처리							
수의유전자원 항목(바이러스, 세균, 곰팡이, 기생충, 세보주, 융합물질, 표준형질)								
순번	수의유전자원 번호	수의유전자원 항목	수의유전자원명			수량	비고	
1	KVCC-VR160-0038	바이러스	A/duck/Korea/ES2/2016(H5N6)			1		
본인은 위 수의유전자원을 분양 신청함에 있어서 상기의 목적으로만 사용할 것이며 제3자에게 임의로 제공, 분양하지 않을 것임을 서약합니다. 2018년 8월 3일 송 장 선 서명 								
농림축산검역본부장 귀하								

<그림 11. 유전자원 분양 신청서>



32	(주)카브 (승정선)	고병원성 A1 바이러스 -A/chicken/Vietnam/NOV0- KA435/2013(H5N1)- KVCC VR1300047	1vial	승인
----	----------------	---	-------	----

수신 수신자 참조
(경유)

제목 2018년 제7차 수의유전자원 심사위원회 심사결과 알림((주)카브)

1. 관련 : 「가축전염병 예방법 등 수의유전자원 관리규정(검역본부 고시 제2016-13호), 접수번호 2018-3183, -3184 및 연구기획과-3506(2018.8.3.) -3537(2018.8.7.) , -3642(2018.8.13.)
2. 위와 관련하여, (주)카브에서 연구과제(과제명: A1 항원백그라운드 구축용 백신주의 오리(육용오리, 증오리)에서의 효능(방어능)평가 및 오리에 효과있는 백신 개발) 수행을 위해 신청하신 유전자원(특별관리병원체)의 분양이 아래와 같이 승인되었음을 알려드립니다.
3. 분양 받으신 수의유전자원은 공문수령일로부터 3일 이후 수령 가능하며, 유전자원 수령 담당자(054-912-0789)와 연락하시어 수령일, 이송용기 등 관련 사항을 안내 받으시기 바랍니다.
4. 분양 받으신 수의유전자원은 분양신청서 상의 목적외로만 사용 가능하므로 「가축전염병 예방법」 및 「가축전염병 예방법 등 수의유전자원 관리규정」에 따라 관리하여 주시고 매년 1월 15일까지 국가동물방역통합시스템(www.kahis.go.kr)으로 보유현황을 신고하여 주시기 바랍니다.
5. 분양 받으신 수의유전자원을 사용하여 발표하는 논문은 수의유전자원번호(예: KVCC-BA1100113)를 재료, 방법 또는 사서에 명기하고 활용결과에 따른 학회초록, 논문 별세봉 및 특허출원번호 등을 한국수의유전자원은행으로 제출하여 주시기 바랍니다.
6. 분양 받으신 수의유전자원은 A1 항원백그라운드 항원으로서 실용오리에서의 공격접종용으로 적합하여 사용 가능하니 유의하여 주시기 바랍니다.
7. 고병원성 A1 바이러스는 “화학무기·생물무기의 금지와 특정화학물질·생물작용제 등의 제조·수출입 규제 등에 관한 법률” 상의 생물작용제에 해당되나 산업통상자원부 바이오나노과(044-203-4398)로 연락하시어 관련 절차에 대해 안내 받으시기 바랍니다. 바이오나노과에서는 업무에 참고하시기 바랍니다.

연번	신청기관 (신청자)	병원체명 및 수량	수량	심사결과
31	(주)카브 (승정선)	고병원성 A1 바이러스 -A/duck/Korea/ES2/2016(H5N6)- KVCC VR1600038	총 1vial	승인

붙.

농림축산검역본부장

수신자: 바이러스예방과장, (주)카브 대표, 산업통상자원부장(바이오나노과장)

주요관: 박주선 수의연구관, 생사 연구기획과장, 신원2018.8.13.
 연구자: #K000500000/양종근 수의연구관, 이우대리, 축분
 시험: 연구기획과-3709, 접수
 주: 39680 경상북도 김천시 혁신로 177, 3층 연구기획과 (물리동) / http://www.dva.go.kr
 연락처: 054-912-0719 팩스번호: 054-912-0721 / pws3063@korea.kr / 비공개(T)

<그림 12. 유전자원 분양 승인 공문>

- 5주령 육용오리에서의 고병원성 조류인플루엔자 Clade 2.3.4.4C 바이러스 LD₅₀(lethal dose 50%) 측정 - 1차 시험

- 2주령 육용 오리에 백신 시행 후 공격접종이 예상되는 5주령 육용오리에 대하여 Clade 2.3.4.4C 공격접종주(A/duck/Korea/ES2/2016(H5N6))를 농도 별로 나누어 접종함
- 공격접종 전 인플루엔자에 대한 감염 여부를 확인하기 위하여 NP-cELISA를 통한 항체 검사 및 swab 후 M gene에 대한 real-time PCR을 통한 항원 검사를 실시하였으며, 두 검사에서 모두 음성인 개체에 대해 BL3 이동 후 접종을 실시함.
- 기존 본 연구팀에서 선행 연구를 통해 본 실험에 사용할 Clade 2.3.4.4C, C4 subtype (A/duck/Korea/ES2/2016(H5N6)) 바이러스를 2주령의 육용오리에 공격접종 해본 결과, BID₅₀(Bird infectious dose of 50%)의 경우 10^{3.0}EID₅₀, BLD₅₀(Bird lethal dose of 50%)의 경우 10^{4.0}EID₅₀로 확인됨 (표 1)

Group	Challenge dose (logEID ₅₀)	Morbidity	Mortality (MDT)	Serology (HI titer)	BID ₅₀	*BLD ₅₀
C1	2.0	0/5	0/5	0/5	10 ^{3.0} EID ₅₀	≥10 ^{6.3} EID ₅₀
	4.0	5/5	0/5	5/5 (6.60)		
	6.0	7/7	2/5 (3.5d)	3/3 (6.67)		
	Contact	3/3	0/3	3/3 (5.33)		
C4	2.0	0/5	0/5	0/5	10 ^{3.0} EID ₅₀	10 ^{4.0} EID ₅₀
	4.0	5/5	3/5 (7.3d)	2/2 (6.5)		
	6.0	7/7	4/5 (7.5d)	1/1 (9.0)		
	Contact	3/3	3/3 (6.7d)	-		

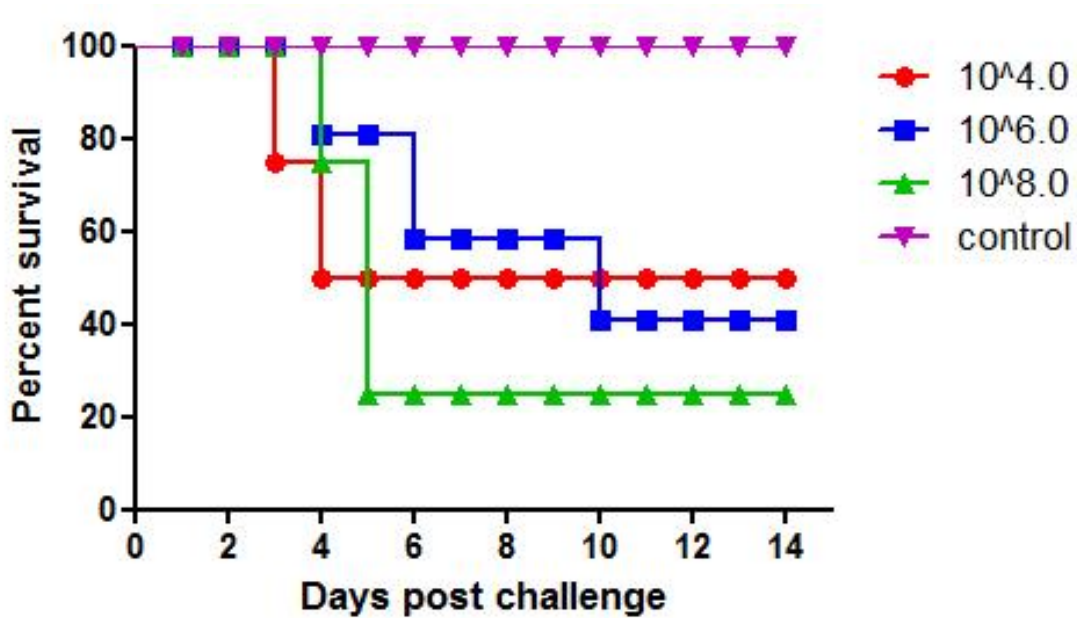
<표 1. 2주령 육용오리에서의 C1 및 C4 subtype 공격접종 실험 결과>

- 5주령 육용오리의 경우 2주령에 비해 높은 농도의 BID₅₀ 및 BLD₅₀를 나타낼 것으로 예상되어 공격접종 용량을 기존 2주령에 비해 10^{2.0}EID₅₀씩 높여 접종을 실시함
- 10^{2.0}EID₅₀ 접종 개체 중 1개체를 제외한 모든 개체에서 바이러스 감염이 확인되어 BID₅₀의 경우 10^{4.0}EID₅₀ 이하로 나타났으며, BLD₅₀의 경우 전반적으로 폐사가 나타났으나 농도가 높아질수록 더 높은 폐사율이 나타나 최종적으로 10^{4.74}EID₅₀로 확인됨(표 2)

Group	Challenge dose (logEID ₅₀)	Morbidity	Mortality (MDT)	Serology (HI titer)	BID ₅₀	*BLD ₅₀
5-week-old ducks	4.0	3/4	2/4 (3.5d)	1/2 (10.0)	<10 ^{4.0} EID ₅₀	10 ^{4.74} EID ₅₀
	6.0	5/5	3/5 (6.7d)	2/2 (9.5)		
	8.0	4/4	3/4 (4.7d)	1/1 (9.0)		
	Control	0/2	0/2	0/2		

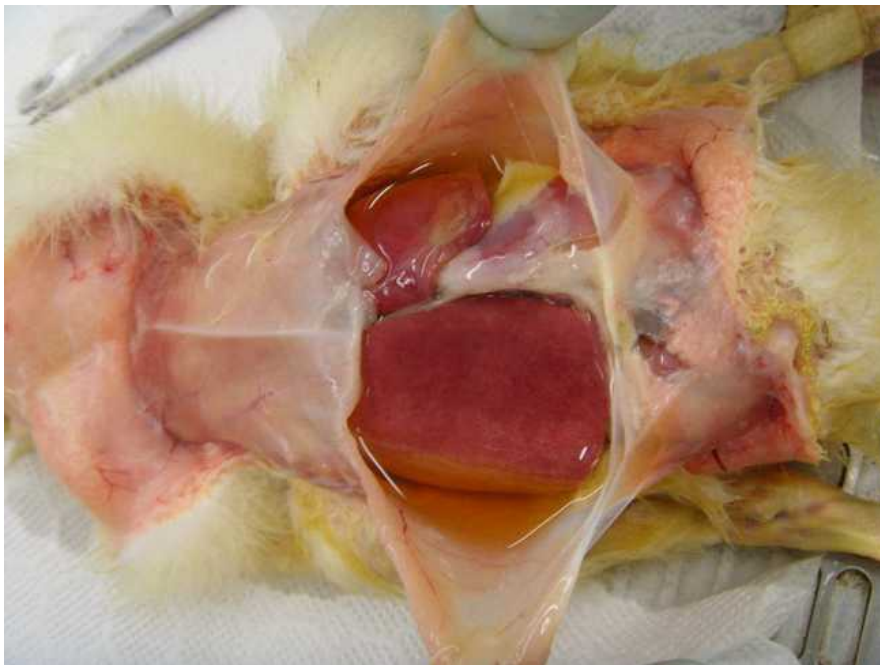
<표 2. Clade 2.3.4.4C 바이러스의 5주령 오리 LD₅₀ 실험 결과>

- 평균 폐사일(mean death time; MDT)의 경우 폐사 개체에 대하여 유의적인 차이를 나타내지 않았음 (그림 13)



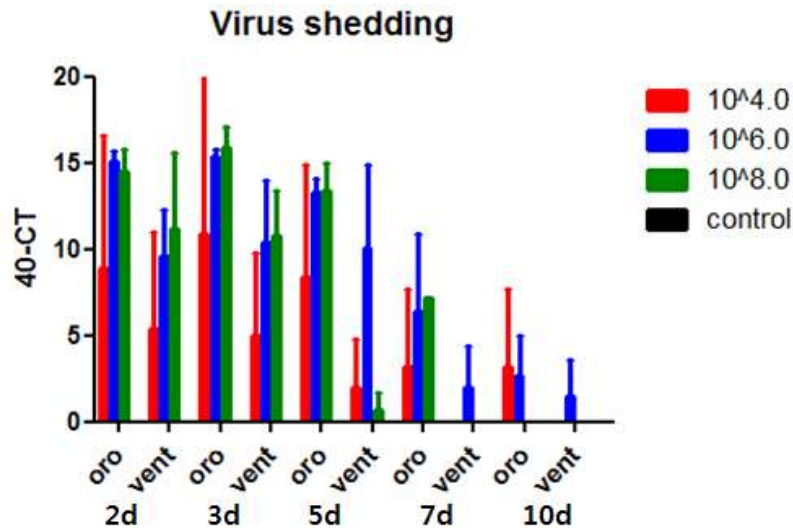
<그림 13. Clade 2.3.4.4C 바이러스의 5주령 오리 LD₅₀ 실험 결과 - survival curve>

- 대표적인 임상증상으로는 기존 고병원성 조류인플루엔자의 대표적 소견으로 알려진 췌장 괴사와 함께, 노란 복수 및 심낭수가 확인되었으며 일부는 젤리형으로 단단한 소견을 나타냄 (그림 14)



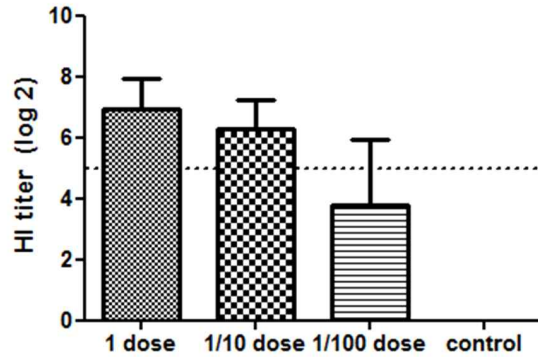
<그림 14. Clade 2.3.4.4C 바이러스의 5주령 오리 LD₅₀ 실험 결과 - 부검 사진>

- 구강인두 및 총배설강 바이러스 배출량의 경우 공격접종량에 따라 dose-dependent 하게 나타남 (그림 15)



<그림 15. Clade 2.3.4.4C 바이러스의 5주령 오리 LD₅₀ 실험 결과 - Viral shedding>

- 이후 백신 면역원성 및 방어능 평가는 본 실험에 바탕을 두고 이루어질 예정으로, 오리의 공격접종에 사용될 100LD₅₀의 바이러스는 10^{6.74}EID₅₀로 계산됨
- 2주령 육용오리에서의 고병원성 조류인플루엔자 Clade 2.3.4.4C 바이러스 PD₅₀ (protective dose 50%) 측정 - 1차 시험
- 백신 후 충분한 항체 역가를 생성하기 위해서는, OIE 기준 50PD₅₀ 이상 또는 3ug 이상의 HA 함량이 포함된 백신을 시행하도록 되어 있어 백신의 PD₅₀를 확인하는 것이 중요함
 - 이에 따라 2주령의 육용오리를 수령하여 근육접종을 통해 백신을 실시함
 - 백신 전 인플루엔자에 대한 감염 여부를 확인하기 위하여 NP-cELISA를 통한 항체 검사 및 swab 후 M gene에 대한 real-time PCR을 통한 항원 검사를 실시하였으며, 두 검사에서 모두 음성인 개체에 대해 dose 별로 백신을 실시함
 - 백신의 PD₅₀를 측정하기 위하여 백신을 dose별(1, 1/10, 1/100)로 나눠 실시하며(dose 별 10수), 1, 2, 3주 후에 혈청을 채취하여 혈구응집억제반응 (HI test)를 통해 면역원성을 평가함 (그림 16)



<그림 16. 백신 면역원성 평가 결과>

- 1, 2주차의 경우 혈청에서 HI 역가가 확인이 되지 않았으나, 3주차에는 1 dose 및 1/10 dose 그룹에서 OIE 기준 조류 인플루엔자로부터 생존에 필요한 5log₂ 이상의 항체가 검출되는 것이 확인됨
- 백신 접종 3주차인 5주령의 육용오리를 BL3 시설로 이동하여, LD₅₀ 실험을 통해 100LD₅₀ 로 확인된 10^{6.74}EID₅₀의 Clade 2.3.4.4C 바이러스를 공격접종함
- PD₅₀를 측정하기 위하여는 대조군에서 폐사가 발생하여야 하지만, 육용오리의 획득 경로에 대한 차이 등의 요인으로 인하여 1/100 dose 백신군에서만 7마리 중 2마리의 폐사가 나타났으며 대조군에서는 폐사가 나타나지 않음 (표 3)
- 이로 인해 향후 정확한 PD₅₀를 측정하기 위하여 2차 실험을 진행하기로 판단한 후, 우선 현재까지 나온 1차 시험 데이터에 대한 분석을 진행함 (표 3)

Group (vaccine dose)	Challenge dose (logEID ₅₀)	Morbidity	Mortality (MDT)	Serology (HI titer)	PD ₅₀
1 dose	6.74	8/8	0/8	8/8 (9.50±0.71)	측정불가
1/10 dose		8/8	0/8	8/8 (8.88±2.15)	
1/100 dose		7/7	2/7 (6d)	5/5 (9.80±1.47)	
control		4/4	0/4	4/4 (10.50±0.50)	

<표 3. Clade 2.3.4.4C 바이러스의 5주령 오리 PD₅₀ 실험 결과>

- 구강인두 바이러스 배출량 분석 결과 대조군의 경우 3일차부터 10일차까지 바이러스 배출이 확인되었으며 3일차와 5일차에 높은 바이러스 배출을 보인 후 7일차부터 점차 감소되는 경향을 보임. 반면 1/100 dose의 백신군은 3일차의 바이러스 배출은 막지 못했으나 5~10일차까지 바이러스 배출이 보이지 않다가 14일차에 소량 다시 검출

됨. 1/10 dose의 경우 7일차까지는 바이러스 배출이 확인되지 않았으나 10일차부터 바이러스 배출이 확인되었으며, 1 dose의 백신은 바이러스의 배출이 전혀 확인되지 않음. 이에 따라 구강인두를 통한 바이러스 배출은 백신 양에 따라 초기의 바이러스 배출은 억제하지만 감염 일정 시간 후에 소량의 바이러스가 배출되는 것으로 보임 (표 4)

Group (vaccine dose)	Number of ducks	3d	5d	7d	10d	14d
1 dose	8	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)
1/10 dose	8	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)	5.73±3.35 (6/8)	2.12±3.72 (2/8)
1/100 dose	7	6.65±5.97 (4/7)	0.00±0.00 (0/7)	0.00±0.00 (0/7)	0.00±0.00 (0/7)	3.27±2.68 (3/7)
control	4	9.79±0.83 (4/4)	11.18±1.37 (4/4)	3.98±4.06 (2/4)	1.63±2.82 (1/4)	0.00±0.00 (0/4)
PD ₅₀ of viral shedding in each day		75PD ₅₀	>100PD ₅₀	>100PD ₅₀	측정불가	측정불가

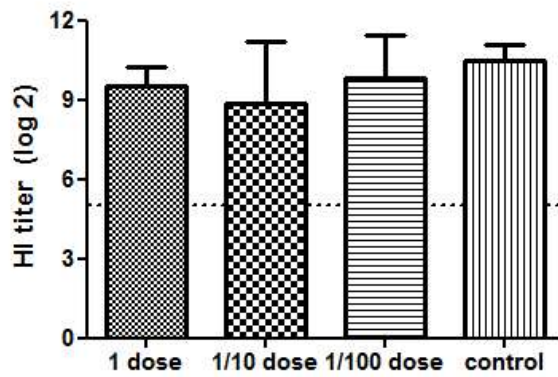
<표 4. Clade 2.3.4.4C 바이러스의 5주령 오리 PD₅₀ 실험 결과 - oropharyngeal shedding>

- 총배설량 바이러스 배출량 분석 결과 대조군의 경우 구강인두 바이러스 배출량에 비해 적은 바이러스 배출을 보였으나 3일차 및 5일차에는 50% 이상 개체에서 바이러스 배출이 확인됨. 구강인두 배출과 마찬가지로 백신군에서는 초기 3일차와 5일차에서는 바이러스 배출이 확인되지 않았으나 7일차부터 배출이 확인되었으며, 구강인두와 달리 백신 dose가 높을수록 이른 시기부터 바이러스 배출이 확인되는 특징을 보임

Group (vaccine dose)	Number of ducks	3d	5d	7d	10d	14d
1 dose	8	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)	3.26±3.31 (4/8)	3.97±2.55 (6/8)	0.00±0.00 (0/8)
1/10 dose	8	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)	4.43±2.43 (8/8)
1/100 dose	7	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)
control	4	5.42±3.33 (3/4)	4.14±4.14 (2/4)	0.00±0.00 (0/4)	2.02±3.50 (1/4)	0.00±0.00 (0/4)
PD ₅₀ of viral shedding in each day		>100PD ₅₀	>100PD ₅₀	측정불가	측정불가	측정불가

<표 5. Clade 2.3.4.4C 바이러스의 5주령 오리 PD₅₀ 실험 결과 - oropharyngeal shedding>

- 바이러스 공격접종 2주 후 생존 개체의 혈청을 채취하여 혈구응집억제반응을 시행한 결과, 생존한 모든 개체에서 HI 역가가 나타나 감염이 이루어졌음을 확인할 수 있었음. 또한 1 dose 및 1/10 dose에서는 HI 역가가 $3\log_2$ 이상 증가하지 않은 반면, 1/100 dose 및 대조군에서는 $3\log_2$ 이상의 항체 역가 증가가 확인되어 바이러스가 면역반응을 유도하기에 충분한 양의 증식이 일어났음을 확인할 수 있음 (그림 17)



<그림 17. 바이러스 공격접종 후 HI 항체 역가>

2. 2차년도 연구수행 내용 및 결과

○ 연구성과 및 결과

- 5주령 육용오리에서의 고병원성 조류인플루엔자 Clade 2.3.4.4C 바이러스 LD₅₀ (lethal dose 50%) 측정 2차 시험
- 2018년도에 이루어진 5주령 육용 오리의 Clade 2.3.4.4C 바이러스 LD₅₀ 및 PD₅₀ 실험(1차 시험)에서 LD₅₀ 가 10^{4.74} EID₅₀로 확인되어, PD₅₀ 실험에서는 백신의 효능을 평가하기 위해 100LD₅₀의 농도인 10^{6.74} EID₅₀로 바이러스의 접종이 이루어짐.

Group	Challenge dose (logEID ₅₀)	Morbidity	Mortality (MDT)	Serology (HI titer)	BID ₅₀	BLD ₅₀
5-week-old ducks	4.0	3/4	2/4 (3.5d)	1/2 (10.0)	<10 ^{4.0} EID ₅₀	10 ^{4.74} EID ₅₀
	6.0	5/5	3/5 (6.7d)	2/2 (9.5)		
	8.0	4/4	3/4 (4.7d)	1/1 (9.0)		
	Control	0/2	0/2	0/2		

그림 18. 1차 시험 당시 Clade 2.3.4.4C 바이러스의 5주령 오리 LD₅₀ 실험 결과

- 하지만 10^{6.74} EID₅₀의 농도에서 구강 및 총배설강에서의 바이러스 배출량 검사 결과 (real-time PCR; 40-CT값 표현), 대조군에서 가장 많은 양의 바이러스 배출이 발견되었으나 전수 생존하였으며, 오히려 백신 1/100 dose 그룹에서 일부 바이러스 배출과 함께 2마리가 폐사하여 오리 상태로 인해 LD₅₀ 실험에서 오차가 발생한 것으로 판단하고 LD₅₀ 재설정을 위한 2차 시험을 진행하기로 결정함

Group (vaccine dose)	Challenge dose (logEID ₅₀)	Morbidity	Mortality (MDT)	Serology (HI titer)	PD ₅₀
1 dose	6.74	8/8	0/8	8/8 (9.50±0.71)	측정불가
1/10 dose		8/8	0/8	8/8 (8.88±2.15)	
1/100 dose		7/7	2/7 (6d)	5/5 (9.80±1.47)	
control		4/4	0/4	4/4 (10.50±0.50)	

그림 19. 1차 시험 당시 Clade 2.3.4.4C 바이러스의 5주령 오리 PD₅₀ 실험 결과

- 2차 시험에서는 1차 시험과 마찬가지로 2.3.4.4C LD₅₀ 실험에서 그룹별로 10⁸ EID₅₀/bird, 10⁶ EID₅₀/bird, 10⁴ EID₅₀/bird, 및 대조군으로 그룹을 나누고 14일간 임상증상, 폐사율 및 바이러스 배출량을 관찰함
- 1차 실험에서 BID₅₀ 의 경우 10⁴ EID₅₀/bird보다 낮게 나타났으며 BLD₅₀는 10^{4.74} EID₅₀로 나타난 데 비해, 2차 실험에서는 10⁸ EID₅₀ 및 10⁶ EID₅₀ 그룹에서만 각각 6마리 중 2마리씩의 폐사가 일어나는 데 그쳐, BID₅₀ 는 10⁴ EID₅₀ 이하로 기존 1차 실험과 마찬가지로 같은 값이 나타났지만 BLD는 10⁸ EID₅₀ 이상으로 계산할 수 없는 상태의 결과를 도출함

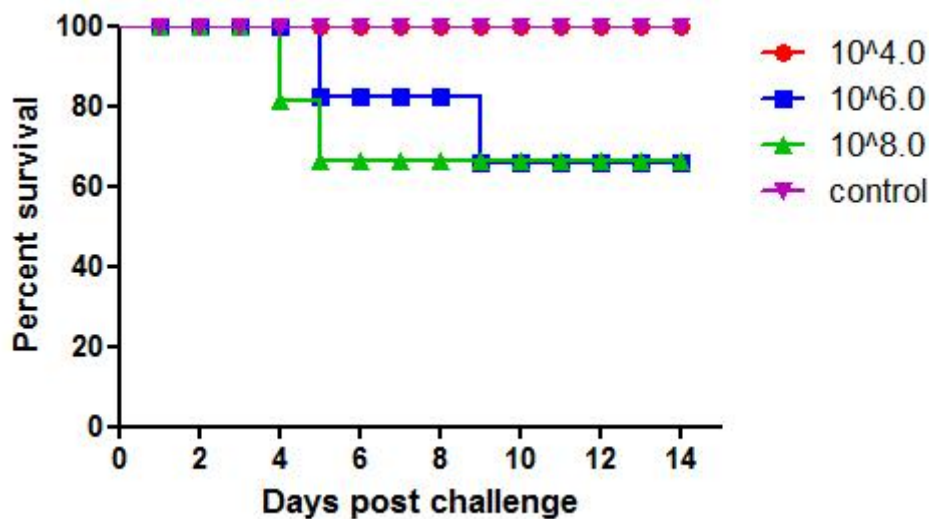


그림 20 2.3.4.4C LD₅₀ 2차 시험 공격접종 바이러스 농도별 폐사율

Group	Challenge dose (log EID ₅₀)	Morbidity	Oro	Vent	Mortality (MDT)	BID ₅₀	BLD ₅₀
5-week-old ducks	8.0	6/6	6/6	5/6	2/6 (4.5d)	<10 ⁴ EID ₅₀	>10 ⁸ EID ₅₀
	6.0	6/6	6/6	3/6	2/6 (7d)		
	4.0	4/6	4/6	0/6	0/6		
	Control	0/4	0/4	0/4	0/4		

그림 21. 2.3.4.4C LD₅₀ 2차 시험 공격접종 바이러스 농도별 감염율 및 BID₅₀, BLD₅₀ 측정값

- 2차 실험 바이러스 폐사율 및 바이러스 배출량 분석 결과, 폐사한 개체는 10^{8.0}EID₅₀ 그룹에서 가장 빠른 날짜인 평균 4.5일차에 2마리의 폐사가 나타났으며, 10^{6.0}EID₅₀ 그룹에서 그 뒤를 이어 평균 7일차에 2마리의 폐사가 관찰됨
- 이에 따라 PD₅₀ 실험을 위해서는 최고 농도로 바이러스를 접종한다 하더라도 폐사율을 바탕으로 한 백신의 방어율을 계산할 수 없어, 최종적으로 최고 농도의 바이러스를 접

중했을 때 바이러스 배출량을 얼마나 줄일 수 있는지를 백신의 효용성 평가에 대한 지표로 삼는 것으로 결정함

Challenge dose (log EID ₅₀)	Number of ducks	3d	5d	7d	10d	14d
8.0	6	11.18±1.30 (6/6)	10.78±1.37 (5/6)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)
6.0	6	10.16±2.96 (6/6)	11.93±1.27 (4/6)	6.45±0.00 (1/5)	0.00±0.00 (0/5)	0.00±0.00 (0/4)
4.0	6	9.48±2.01 (4/6)	9.52±0.00 (1/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
Control	4	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)

그림 22. 2.3.4.4C 바이러스 LD₅₀ 2차 시험 5주령 오리 실험 결과
- oropharyngeal shedding, real-time PCR; 40-CT값 표현

Challenge dose (log EID ₅₀)	Number of ducks	3d	5d	7d	10d	14d
8.0	6	8.27±1.03 (5/6)	8.87±3.27 (2/6)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)
6.0	6	12.62±3.93 (2/6)	8.96±1.12 (2/6)	0.00±0.00 (0/5)	0.00±0.00 (0/5)	0.00±0.00 (0/4)
4.0	6	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
Control	4	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)

그림 23. 2.3.4.4C 바이러스 LD₅₀ 2차 시험 5주령 오리 실험 결과
- cloacal shedding, real-time PCR; 40-CT값 표현

- 바이러스 배출량을 비교 분석한 결과 구강인두 샘플링이 총배설장 샘플링에 비해서 훨씬 높은 바이러스 배출량을 나타내었음
- 구강인두 샘플링의 경우 공격접종 양이 많은 10^{8.0}EID₅₀, 10^{6.0}EID₅₀, 10⁴ EID₅₀ 그룹순으로 바이러스 배출량이 많은 것이 확인되었으며, 10^{6.0}EID₅₀ 그룹 내 1개체를 제외하고는 모든 개체의 바이러스 배출이 5일차에 끝나는 것이 확인됨
- 총배설장 샘플링의 경우에도 공격접종 양이 많은 10^{8.0}EID₅₀, 10^{6.0}EID₅₀ 그룹에서 바이러스 배출이 확인되었으며 높은 농도일수록 바이러스 배출 개체가 많은 것이 확인됨. 하지만 바이러스 접종량이 적은 10^{4.0}EID₅₀ 그룹의 경우 바이러스를 접종했음에도 불구하고 총배설장으로의 바이러스 배출은 확인되지 않음. 모든 개체의 바이러스 배출은 5일차까지 관찰됨

- 5주령 육용오리에서의 고병원성 조류인플루엔자 Clade 2.3.4.4C 바이러스 PD₅₀ (lethal dose 50%) 측정 2차 시험
- 1차 실험 당시 바이러스의 공격접종 농도는 10^{6.74} EID₅₀ 였던 데 비해, 2차 실험에서는 최고 농도인 10^{8.0}EID₅₀의 바이러스를 공격접종하여 기존보다 약 20배 높은 양을 투여하고 백신을 실시했을 때의 생존율을 확인함

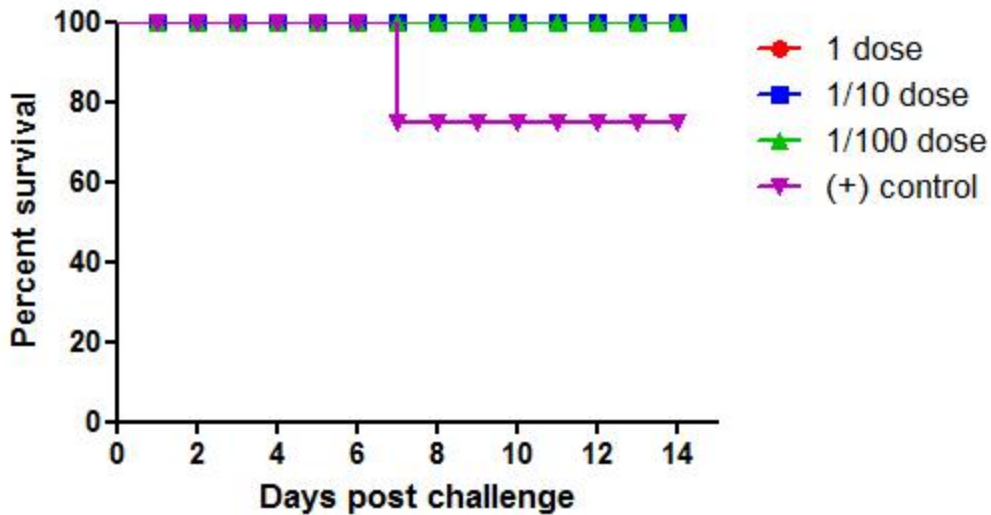


그림 24. 2.3.4.4C PD₅₀ 2차 시험 백신 용량별 폐사율

- 백신 군에서는 폐사 개체가 발생하지 않았으며, 백신을 실시하지 않은 대조군에서만 4마리 중 1마리의 개체 (25%)가 폐사함. 이는 LD₅₀ 실험에서 10^{8.0}EID₅₀을 공격접종했을 때 폐사율이 2/6 (33%)였던 것과 유사함

Group	Vaccine dose	Morbidity	Oro	Vent	Mortality (MDT)
5-week-old ducks	1 dose	0/6	0/6	0/6	0/6
	1/10 dose	2/6	2/6	0/6	0/6
	1/100 dose	3/6	4/6	0/6	0/6
	(+) Control	4/4	4/4	1/4	1/4 (7d)

그림 25. 2.3.4.4C PD₅₀ 2차 시험 백신 용량별 감염율 및 바이러스 배출 부위

- 구강인두 샘플링 결과, 1 dose의 백신을 투여받은 그룹에서는 전혀 바이러스 배출이 관찰되지 않았지만 1/10 dose, 1/100 dose를 투여받은 그룹에서는 일부 바이러스 배출이 관찰됨. 바이러스 배출량 자체는 크게 줄지 않았지만 바이러스 배출 개체 수는 크게 감소하는 경향을 나타내었음. 대조군의 경우 LD₅₀ 실험 때와 마찬가지로 대부분 5일차에 바이러스 배출이 종료되었으며, 일부 개체에 한해 7일차까지 바이러스의 배출이 확인됨

Vaccine dose (log EID ₅₀)	Number of ducks	3d	5d	7d	10d	14d
1 dose	6	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
1/10 dose	6	9.57±0.01 (2/6)	8.03±0.00 (1/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
1/100 dose	6	7.19±1.45 (3/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
(+) Control	4	10.38±1.48 (4/4)	8.04±1.53 (4/4)	6.89±0.00 (1/3)	0.00±0.00 (0/3)	0.00±0.00 (0/3)

그림 26. 2.3.4.4C 바이러스 PD₅₀ 2차 시험 5주령 오리 실험 결과

- oropharyngeal shedding, real-time PCR; 40-CT값 표현

Vaccine dose (log EID ₅₀)	Number of ducks	3d	5d	7d	10d	14d
1 dose	6	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
1/10 dose	6	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
1/100 dose	6	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
(+) Control	4	6.66±0.00 (1/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/3)	0.00±0.00 (0/3)	0.00±0.00 (0/3)

그림 27. 2.3.4.4C 바이러스 PD₅₀ 2차 시험 5주령 오리 실험 결과

- cloacal shedding, real-time PCR; 40-CT값 표현

- 총배설장 샘플링의 경우, 백신을 접종하지 않은 대조군 1마리에서만 3일차에 바이러스 배출이 관찰됨. 이에 따라 백신 접종 실험에서도 병원성 실험에서와 마찬가지로 구강인 두 샘플링에서 총배설장 샘플링에 비해 높은 바이러스 배출량이 확인됨.

- 5주령 육용오리에서의 고병원성 조류인플루엔자 Clade 2.3.2.1C 바이러스 LD₅₀(lethal dose 50%) 측정
 - 2주령 육용 오리에 백신 시행 후 공격접종이 예상되는 5주령 육용오리에 대하여 Clade 2.3.2.1C 공격접종주(A/chicken/Vietnam/NCVD-KA435/2013(H5N1))를 농도 별로 나누어 10^{8.0}EID₅₀/bird, 10^{6.0}EID₅₀/bird, 10^{4.0}EID₅₀/bird 로 접종함
 - 공격접종 전 인플루엔자에 대한 감염 여부를 확인하기 위하여 NP-cELISA를 통한 항체 검사 및 swab 후 M gene에 대한 real-time PCR을 통한 항원 검사를 실시하였으며, 두 검사에서 모두 음성인 개체에 대해 BL3 이동 후 접종을 실시함.
 - 2.3.2.1C LD₅₀ 실험에서는 2.3.4.4C LD₅₀ 실험과 마찬가지로 그룹별로 10⁸ EID₅₀/bird, 10⁶ EID₅₀/bird, 10⁴ EID₅₀/bird, 및 대조군으로 그룹을 나누고 14일간 임상증상, 폐사율 및 바이러스 배출량을 관찰함

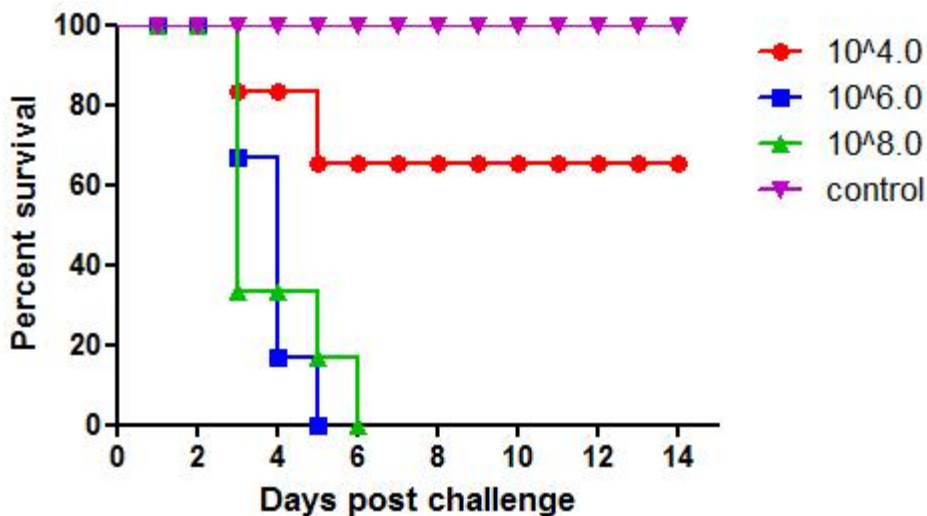


그림 28. 2.3.2.1C LD₅₀ 시험 공격접종 바이러스 농도별 폐사율

- 2.3.2.1C 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 용량별 폐사율 및 바이러스 배출량 분석 결과, 10^{8.0}EID₅₀ 그룹 및 10^{6.0}EID₅₀ 그룹에서 전수 폐사가 일어났으며, 상대적으로 용량이 낮은 10^{4.0}EID₅₀ 그룹에서도 6마리 중 2마리가 폐사하여 2.3.4.4C 바이러스에 비해 5주령 오리에서 훨씬 높은 폐사율을 나타냄. 10^{8.0}EID₅₀ 그룹 및 10^{6.0}EID₅₀ 그룹 모두 평균 3.8 일차에 전수 폐사가 나타났으며, 10^{4.0}EID₅₀ 그룹에서는 2마리가 평균 4일차에 폐사함
- 이에 따라 Clade 2.3.2.1C 공격접종주(A/chicken/Vietnam/NCVD-KA435/2013(H5N1))는 5주령 육용오리에 대하여 기존에 실험을 진행한 Clade 2.3.4.4C 공격접종주에 비해 병원성이 훨씬 높은 것으로 분석됨.
- 또한 특이적으로, 10^{8.0}EID₅₀ 그룹 및 10^{6.0}EID₅₀ 그룹에서는 모든 개체에서 구강인두와 총배설장에서 바이러스의 배출이 발견되었으며, 10^{4.0}EID₅₀ 그룹에서는 바이러스를 배출한 2마리에서 모두 폐사가 관찰되어 BID₅₀와 BLD₅₀가 동일하게 10^{4.5}EID₅₀로 확인됨.

Group	Challenge dose (log EID ₅₀)	Morbidity	Oro	Vent	Mortality (MDT)	BID ₅₀	BLD ₅₀
5-week-old ducks	8.0	6/6	6/6	6/6	6/6 (3.8d)	10 ^{4.5} EID ₅₀	10 ^{4.5} EID ₅₀
	6.0	6/6	6/6	6/6	6/6 (3.8d)		
	4.0	2/6	2/6	2/6	2/6 (4d)		
	Control	0/4	0/4	0/4	0/4		

그림 29. 2.3.2.1C LD₅₀ 공격접종 바이러스 농도별 감염율 및 BID₅₀, BLD₅₀ 측정값

Challenge dose (log EID ₅₀)	Number of ducks	3d	5d	7d	10d	14d
8.0	6	16.27±0.94 (6/6)	13.50±2.14 (2/2)	n.p.	n.p.	n.p.
6.0	6	15.69±2.45 (6/6)	13.91±0.00 (1/1)	n.p.	n.p.	n.p.
4.0	6	14.71±0.68 (2/6)	14.43±0.00 (1/5)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)
Control	4	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)

그림 30. 2.3.2.1C 바이러스 LD₅₀ 시험 5주령 오리 실험 결과
- oropharyngeal shedding, real-time PCR; 40-CT값 표현
(n.p. : not possible)

- 구강인두로의 바이러스 배출량의 경우, Real-time PCR 40-Ct 환산값에 대해 2.3.4.4C 바이러스에 비해 훨씬 높은 바이러스 배출량을 보였으며, 폐사 직전까지도 바이러스 배출량이 유지되는 것이 확인됨.

Challenge dose (log EID ₅₀)	Number of ducks	3d	5d	7d	10d	14d
8.0	6	7.91±1.82 (6/6)	0.00±0.00 (0/2)	n.p.	n.p.	n.p.
6.0	6	10.75±2.96 (6/6)	12.47±0.00 (1/1)	n.p.	n.p.	n.p.
4.0	6	10.89±7.88 (2/6)	0.00±0.00 (0/5)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)
Control	4	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)

그림 31. 2.3.2.1C 바이러스 LD₅₀ 시험 5주령 오리 실험 결과
- cloacal shedding, real-time PCR; 40-CT값 표현
(n.p. : not possible)

- 총배설강으로의 바이러스 배출량의 경우, Real-time PCR 40-Ct 환산값에 대해 2.3.4.4C 바이러스와 마찬가지로 구강인두 바이러스 배출량보다는 적은 배출량을 보였으나, 2.3.4.4C 바이러스보다 높은 바이러스 배출량을 나타내어 2.3.2.1C 공격접종주가 5주령 육용오리에 대해 2.3.4.4C 공격접종주보다 병원성 및 바이러스 배출량이 모두 많은 것으로 확인됨
 - 따라서 PD₅₀ 실험을 위한 최종 2.3.2.1C 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 접종 농도는 100LD₅₀ 인 10^{6.5}EID₅₀의 용량으로 최종 결정함.
- 5주령 육용오리에서의 고병원성 조류인플루엔자 Clade 2.3.2.1C 바이러스 PD₅₀ (protective dose 50%) 측정
- 2주령 육용오리에 1 dose, 1/10 dose, 1/100 dose로 나눠서 백신을 실시한 후, 3주 후인 5주령에 100LD₅₀ 인 10^{6.5}EID₅₀의 용량으로 Clade 2.3.2.1C 바이러스를 공격접종하여 폐사율 및 바이러스 배출량을 확인함
 - 백신 전 인플루엔자에 대한 감염 여부를 확인하기 위하여 NP-cELISA를 통한 항체 검사 및 swab 후 M gene에 대한 real-time PCR을 통한 항원 검사를 실시하였으며, 두 검사에서 모두 음성인 개체에 대해 dose 별로 백신을 실시함

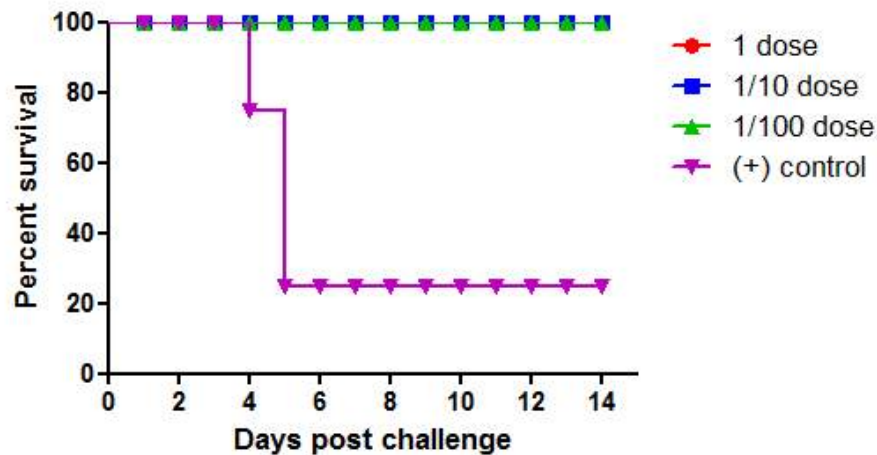


그림 32. 2.3.2.1C PD₅₀ 시험 공격접종 바이러스 농도별 폐사율

Group	Vaccine dose	Morbidity	Oro	Vent	Mortality (MDT)
5-week-old ducks	1 dose	0/6	0/6	0/6	0/6
	1/10 dose	4/6	2/6	2/6	0/6
	1/100 dose	4/6	3/6	1/6	0/6
	(+) Control	4/4	4/4	0/4	3/4 (4.7d)

그림 33. 2.3.2.1C PD₅₀ 공격접종 바이러스 농도별 감염율 및 BID₅₀, BLD₅₀ 측정값

- 백신 실시 후 바이러스 공격 접종 결과, 백신을 실시한 그룹에서는 전혀 폐사가 나타나지 않았음. 바이러스 배출량을 확인해보면, 1 dose의 백신을 실시한 그룹에서는 바이러스의 배출이 전혀 관찰되지 않았지만, 1/10 dose 및 1/100 dose를 실시한 그룹에서는 6마리 중 4마리의 바이러스 배출이 각각 구강인두 또는 총배설장 중 1개의 경로를 통해서 하루의 날짜에만 확인되었음. 대조군의 경우 4마리 중 3마리가 평균 4.7일 차에 폐사하였으며, 모두 구강인두에서 높은 바이러스 배출량을 나타내었지만 총배설장으로의 바이러스 배출은 확인되지 않음.

Vaccine dose (log EID ₅₀)	Number of ducks	3d	5d	7d	10d	14d
1 dose	6	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
1/10 dose	6	12.53±0.00 (1/6)	9.05±0.00 (1/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
1/100 dose	6	0.00±0.00 (0/6)	7.79±1.11 (3/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
(+) Control	4	12.56±2.42 (4/4)	10.70±2.58 (3/3)	n.p.	n.p.	n.p.

그림 34. 2.3.2.1C 바이러스 PD₅₀ 시험 5주령 오리 실험 결과

- oropharyngeal shedding, real-time PCR; 40-CT값 표현

(n.p. : not possible)

- 구강인두로의 바이러스 배출의 경우 1/10 dose에서는 각각 다른 2마리의 개체에서 바이러스의 배출이 확인되었으며, 1/100 dose에서는 3일차에는 바이러스 배출이 관찰되지 않았지만 5일차에 6마리 중 3마리의 개체에서 바이러스 배출이 관찰되어, 1 dose의 백신을 실시한 것만큼 바이러스의 배출을 완벽하게 억제하지 못하는 것이 확인됨.
- 대조군의 경우 전수에서 높은 바이러스 배출량이 확인되었으며, 죽기 전까지도 높은 바이러스 배출량이 확인되어 LD₅₀ 실험에서와 같은 결과를 나타냄.

Vaccine dose (log EID ₅₀)	Number of ducks	3d	5d	7d	10d	14d
1 dose	6	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
1/10 dose	6	0.00±0.00 (0/6)	9.05±1.32 (2/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
1/100 dose	6	0.00±0.00 (0/6)	8.49±0.00 (1/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
(+) Control	4	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/3)	n.p.	n.p.	n.p.

그림 35. 2.3.2.1C 바이러스 PD₅₀ 시험 5주령 오리 실험 결과

- cloacal shedding, real-time PCR; 40-CT값 표현

(n.p. : not possible)

- 반면 총배설강에서의 바이러스 배출을 확인해 보면, 5일차에 1/10 dose 2마리 및 1/100 dose 1마리에서만 바이러스 배출이 확인되었으며, 양성대조군에서 바이러스 배출이 확인되지 않음. 상대적으로 구강인두에 비해 바이러스 배출 개체가 적지만 백신의 효능 평가를 위해서는 지속적인 검사가 필요할 것으로 판단됨.

3. 3차년도 연구수행 내용 및 결과

- 종오리에서의 고병원성 조류인플루엔자 Clade 2.3.4.4C 바이러스 병원성 평가

- 백신 실시 전 NP cELISA를 통해 항체 형성 여부를 파악하여 인플루엔자에 대한 감염 여부를 확인하고 감염이 확인되지 않은 개체에 대해 농도 별로 공격접종을 실시함.

Group	Challenge dose (log EID ₅₀)	Morbidity	Oro	Vent	Mortality (MDT)	BID ₅₀	BLD ₅₀
25-week-old ducks	8.0	5/5	5/5	2/5	0/5	<10 ⁴ EID ₅₀	>10 ⁸ EID ₅₀
	6.0	4/5	4/5	4/5	0/5		
	4.0	4/4	4/4	3/4	0/4		
	Control	0/4	0/4	0/4	0/4		

그림 36 2.3.4.4C LD₅₀ 공격접종 바이러스 농도별 감염율 및 BID₅₀, BLD₅₀ 측정값

- 종오리에서도 육용오리와 마찬가지로 2.3.4.4C LD₅₀ 실험에서 그룹별로 10⁸ EID₅₀/bird, 10⁶ EID₅₀/bird, 10⁴ EID₅₀/bird, 및 대조군으로 그룹을 나누고 14일간 임상증상, 폐사율 및 바이러스 배출량을 관찰함

Challenge dose (log EID ₅₀)	Number of ducks	3d	5d	7d	10d	14d
8.0	5	11.29±1.45 (5/5)	8.53±1.47 (5/5)	5.89±1.03 (3/5)	0.00±0.00 (0/5)	0.00±0.00 (0/5)
6.0	5	10.19±1.16 (4/5)	8.98±1.48 (4/5)	5.07±0.00 (2/5)	0.00±0.00 (0/5)	0.00±0.00 (0/5)
4.0	4	10.58±1.29 (4/4)	8.08±1.35 (4/4)	6.14±0.00 (1/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)
Control	4	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)

Challenge dose (log EID ₅₀)	Number of ducks	3d	5d	7d	10d	14d
8.0	5	6.71±0.37 (2/5)	7.12±0.87 (2/5)	0.00±0.00 (0/5)	0.00±0.00 (0/5)	0.00±0.00 (0/5)
6.0	5	8.79±2.62 (2/5)	0.00±0.00 (0/5)	0.00±0.00 (0/5)	0.00±0.00 (0/5)	0.00±0.00 (0/5)
4.0	4	6.41±0.74 (4/4)	7.93±1.28 (4/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)
Control	4	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)	0.00±0.00 (0/4)

그림 37. 2.3.4.4C 바이러스 LD₅₀ 시험 종오리 실험 결과

- 상 : oro shedding, 하 : cloacal shedding, real-time PCR; 40-CT값 표현

- 육용오리 시험에서는 10⁸ EID₅₀ 및 10⁶ EID₅₀ 그룹에서 각각 6마리 중 2마리씩의 폐사가 일어났었지만, 종오리 시험에서는 전체 시험군에서 폐사가 발생하지 않았음. 따라서 BID₅₀ 는 10⁴ EID₅₀ 이하, BLD는 10⁸ EID₅₀ 이상으로 계산할 수 없는 상태의 결과를 도출함

- 이에 따라 PD₅₀ 실험을 위해서는 최고 농도로 바이러스를 접종한다 하더라도 폐사율을 바탕으로 한 백신의 방어율을 계산할 수 없어, 최종적으로 최고 농도의 바이러스를 접종했을 때 바이러스 배출량을 얼마나 줄일 수 있는지를 백신의 효용성 평가에 대한 지표로 삼는 것으로 결정함.

- 종오리에서의 고병원성 조류인플루엔자 Clade 2.3.2.1C 바이러스 병원성 평가

- 백신 실시 전 NP cELISA를 통해 항체 형성 여부를 파악하여 인플루엔자에 대한 감염 여부를 확인하고 감염이 확인되지 않은 개체에 대해 농도 별로 공격접종을 실시함.

Group	Challenge dose (log EID ₅₀)	Morbidity	Oro	Vent	Mortality (MDT)	BID ₅₀	BLD ₅₀
25-week-old ducks	8.0	6/6	6/6	1/6	0/6	<10 ⁴ EID ₅₀	>10 ⁸ EID ₅₀
	6.0	4/6	4/6	0/6	0/6		
	4.0	1/6	1/6	0/6	0/6		
	Control	0/4	0/4	0/3	0/3		

그림 38. 2.3.2.1C LD₅₀ 공격접종 바이러스 농도별 감염을 및 BID₅₀, BLD₅₀ 측정값

- 종오리에서도 육용오리와 마찬가지로 2.3.2.1C LD₅₀ 실험에서 그룹별로 10⁸ EID₅₀/bird, 10⁶ EID₅₀/bird, 10⁴ EID₅₀/bird, 및 대조군으로 그룹을 나누고 14일간 임상증상, 폐사율 및 바이러스 배출량을 관찰함

Challenge dose (log EID ₅₀)	Number of ducks	3d	5d	7d	10d	14d
8.0	6	8.39±1.70 (6/6)	7.57±1.87 (6/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
6.0	6	9.23±0.65 (4/6)	9.19±1.84 (4/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
4.0	6	6.30±0.00 (1/6)	8.96±0.00 (1/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
Control	3	0.00±0.00 (0/3)	0.00±0.00 (0/3)	0.00±0.00 (0/3)	0.00±0.00 (0/3)	0.00±0.00 (0/3)

Challenge dose (log EID ₅₀)	Number of ducks	3d	5d	7d	10d	14d
8.0	6	3.80±0.00 (6/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
6.0	6	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
4.0	6	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)	0.00±0.00 (0/6)
Control	3	0.00±0.00 (0/3)	0.00±0.00 (0/3)	0.00±0.00 (0/3)	0.00±0.00 (0/3)	0.00±0.00 (0/3)

그림 39. 2.3.2.1C 바이러스 LD₅₀ 시험 종오리 실험 결과

- 상 : oro shedding, 하 : cloacal shedding, real-time PCR; 40-CT값 표현

- 육용오리에서는 2.3.2.1C 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 용량별 폐사율 및 바이러스 배출량 분석 결과, $10^{8.0}EID_{50}$ 그룹 및 $10^{6.0}EID_{50}$ 그룹에서 전수 폐사가 일어났으며, 상대적으로 용량이 낮은 $10^{4.0}EID_{50}$ 그룹에서도 6마리 중 2마리가 폐사하여 2.3.4.4C 바이러스에 비해 5주령 오리에서 훨씬 높은 폐사율을 나타냈었지만, 종오리 시험에서는 2.3.4.4C 바이러스와 마찬가지로 전체 시험군에서 폐사가 발생하지 않았음. 따라서 BID_{50} 는 $10^4 EID_{50}$ 이하, BLD 는 $10^8 EID_{50}$ 이상으로 계산할 수 없는 상태의 결과를 도출함.
 - 이에 따라 2.3.4.4C 바이러스와 마찬가지로 PD_{50} 실험을 위해서는 최고 농도로 바이러스를 접종한다 하더라도 폐사율을 바탕으로 한 백신의 방어율을 계산할 수 없어, 최종적으로 최고 농도의 바이러스를 접종했을 때 바이러스 배출량을 얼마나 줄일 수 있는지를 백신의 효용성 평가에 대한 지표로 삼는 것으로 결정함.
- 종오리에서의 고병원성 조류인플루엔자 Clade 2.3.2.1C / Clade 2.3.4.4C 바이러스 PD_{50} (protective dose 50%) 측정
- 25주령 종오리에 1 dose, 1/10 dose, 1/50 dose로 나눠서 각 clade의 바이러스로 제조한 백신을 실시한 후, 3주 뒤에 $10^{8.0}EID_{50}$ 의 용량으로 각각 homologous challenge를 실시하여 폐사율 및 바이러스 배출량을 확인함.
 - 백신 전 인플루엔자에 대한 감염 여부를 확인하기 위하여 NP-cELISA를 통한 항체 검사 및 swab 후 M gene에 대한 real-time PCR을 통한 항원 검사를 실시하였으며, 두 검사에서 모두 음성인 개체에 대해 dose 별로 백신을 실시함.

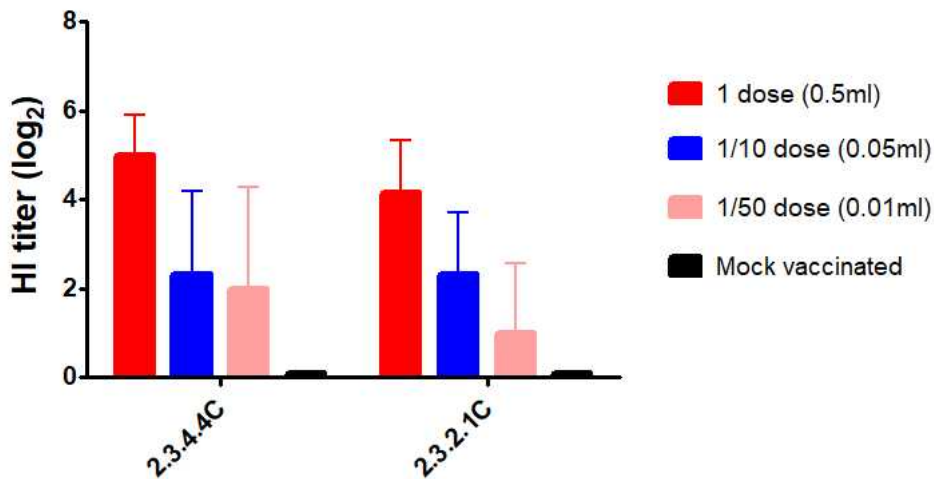


그림 40. 종오리 PD_{50} 시험 백신 3주 후 HI 결과

- 백신 실시 후 3주차에 혈청을 채취하여 동종 항원에 대한 혈구응집억제역가 (Haemagglutinin inhibition titer)를 확인한 결과, 항원량의 감소에 따른 항체 역가의 감소 경향이 확인되었음.
- 바이러스 공격 접종 결과, 백신을 실시한 그룹에서는 접종 용량에 관계 없이 전혀 폐사가 나타나지 않았으며, 비백신 대조군에서는 각각 1마리씩의 폐사가 발생하였음. 바

이러스 배출량을 확인해보면, 2.3.4.4C 바이러스에 대한 백신을 접종한 군에서는 접종량에 관계없이 바이러스 배출이 확인되지 않았으며, 비접종 대조군에서는 공격접종 후 5일까지 바이러스의 배출이 확인되었음.

반면, 2.3.2.1C 바이러스 백신을 접종한 군에서는 가장 낮은 백신 농도인 1/50 dose를 접종한 군의 일부 개체에서 구강 인두로부터의 바이러스 배출이 확인되었으며, 비접종 대조군에서는 공격접종 후 5~7일 정도 까지 바이러스의 배출이 확인되었음.

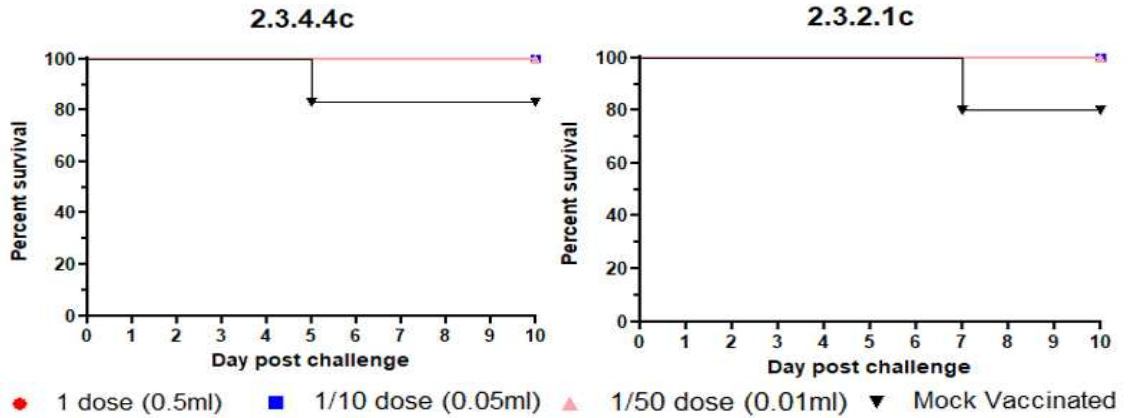


그림 41. 종오리 PD₅₀ 시험 공격접종 바이러스 농도별 폐사율

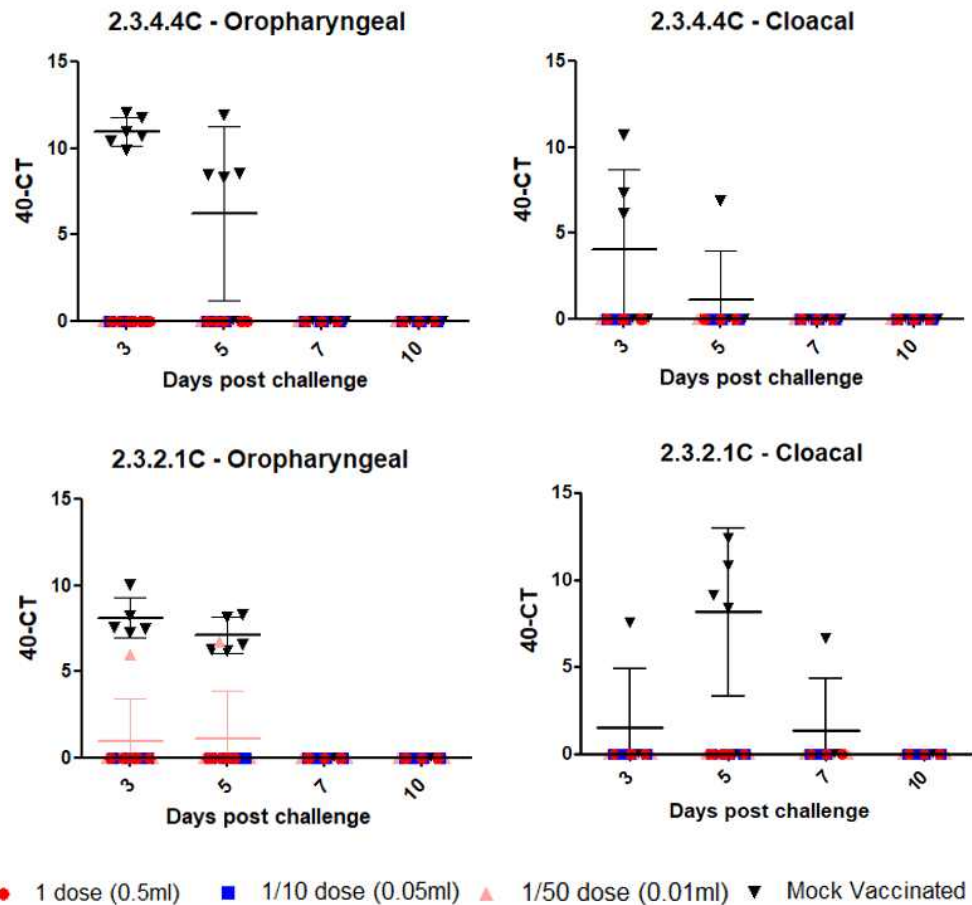


그림 42. 종오리 PD₅₀ 시험 바이러스 배출량 평가 결과

- real-time PCR; 40-CT값 표현

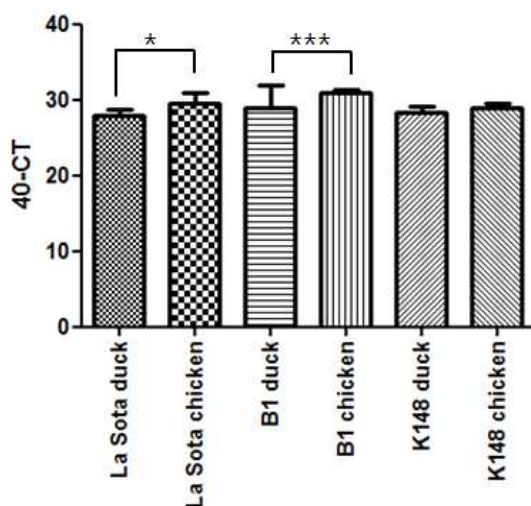
제 2 절. 오리에 효과적인 벡터백신 개발

1. 1차년도 연구수행 내용 및 결과

○ 연구성과 및 결과

- K148 및 현재 사용 백신주의 계란 및 오리알에서의 증식성 비교

- 오리 유래에서 분리된 NDV인 K148/08 주와 닭에서 분리되어 백신주로 사용되고 있는 La Sota 및 B1 분리주에 대하여 계란 및 오리알에서 증식성 분석을 실시함
- 2차에 걸친 시험 결과 La Sota 및 B1 분리주의 경우 동일 바이러스 역가에 대하여 계란 및 오리알에 접종 시 계란에서 약 $10^{0.3}EID_{50}/ml$ 정도의 역가가 높게 나타났지만 차이가 유의적이지 않았음. 단, K148 분리주의 경우 계란과 오리알에서의 역가의 차이가 관찰되지 않음
- 증식성 평가를 위하여 3종의 바이러스를 20개의 계란 및 오리알에 접종하여 바이러스의 증식 역가를 비교한 결과 La Sota 및 B1 분리주의 경우 계란에 비해 오리알에서 유의적으로 낮은 증식성을 보였지만 K148 분리주의 경우 오리알에서도 계란과 마찬가지로 바이러스가 잘 자라는 것이 확인됨



<그림 43. 각 백신 후보주의 계란 및 오리알에서의 증식성 비교>

- 현재 사용 백신주 및 오리 유래 APMV-4 벡터 제작

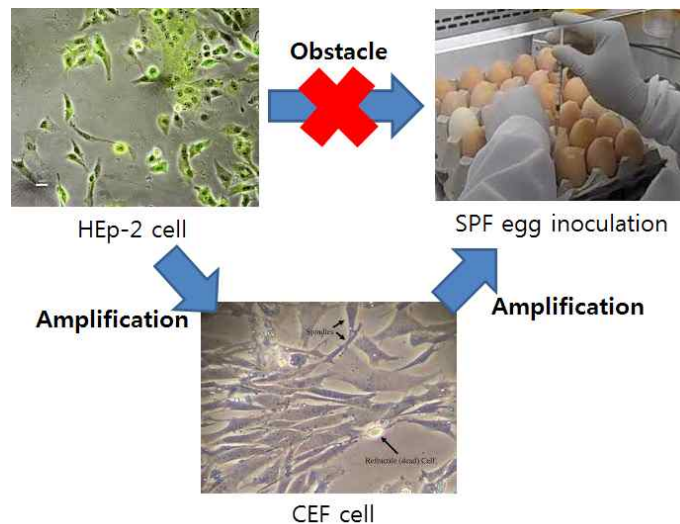
- 벡터 백신을 통한 prime-boost 백신을 시행하게 될 경우, homologous strain을 2회 접종하는 것보다 각기 다른 vector를 사용하여 백신을 수행하는 것이 더 효과적으로 면역반응을 이끌어낼 수 있음. 이에 따라 선행연구를 통해 완성된 K148 vector와 함께 사용될 수 있는 heterologous vector를 만들기 위해 APMV-4 (N12-019 strain) 1종, La Sota, B1 strain에 대한 vector 제조가 진행 중임
- 현재 APMV-4 N12-019 strain에 대하여는 full length clone (FLC)이 만들어졌으며, 보다 높은 효율의 virus rescue를 위하여 N12-019로 이루어진 supporting plasmid 3종

(NP, P, L)을 제작 중임

- La Sota strain에 대하여는 유전자 전체를 총 5개의 절편으로 나누어 절편은 완성되었으며 이를 이어붙이는 단계를 진행하고 있음
- B1 strain의 경우 5개의 절편 중 3개의 절편이 완성되었으며, 이를 바탕으로 완성된 절편을 이으며, 나머지 2개의 절편에 대해서도 제작 작업을 진행 중임

- NDV rescue 고도화

- NDV 역유전학 바이러스의 경우, 동일한 clone으로 진행한다고 하더라도 매번 efficiency 효율이 다른 경우가 발생하며, 이에 따라 K148 바이러스의 rescue 효율을 증가시키기 위한 전략을 수립하였음
- HEp-2 세포에 MVA-T7 바이러스 감염 및 K148-FLC 및 K148-N, P, L 플라스미드를 transfection하여 역유전학 ND 바이러스를 생성한 후 이를 바로 종란에 감염시키지 않고 CEF 세포에 1회 계대를 넘긴 후 종란에 바이러스를 감염시킴
- 이를 통하여 transfection 이후 생성된 낮은 역가의 NDV를 세포에 충분한 MOI (multiplicity of infection)로 감염시켜 EID 역가가 계산이 가능할 수준으로 바이러스를 증식시킴. 이를 다시 종란에 접종함으로써 혈구 응집 반응(HA test)을 통해 검출이 가능한 양의 NDV를 확보할 수 있음

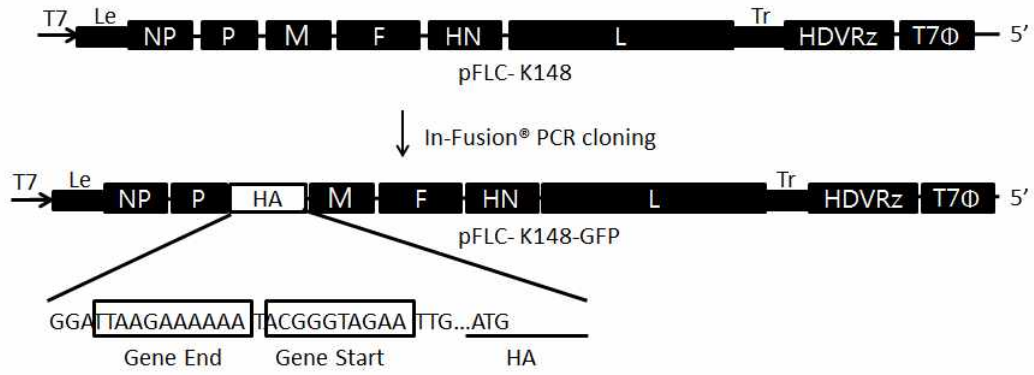


<그림 44. CEF 접종을 통한 rescue 효율 향상>

- 이를 통해 기존에 비해 rK148 바이러스를 보다 높은 효율로 rescue에 성공할 수 있게 되었음

- AI HA 유전자 삽입 ND 바이러스 제작

- 전장유전체가 완성된 K148 strain에 대해 Clade 2.3.4.4C 형의 HA를 삽입함. HA 유전자는 계란에서 증식성을 높이기 위하여 codon optimization을 진행하였으며 cleavage site를 polybasic에서 monobasic으로 전환하여 병원성이 나타나지 않도록 함



<그림 45. ND+AI 백터 백신주 제작 과정>

- rK148 바이러스와 같은 방법을 통해 virus의 rescue를 확인하였으며 이에 대해 추가적으로 K148 parent virus, rK148 바이러스 및 rK148+AI HA 바이러스의 종란 내 병원성, 병아리에서의 병원성 확인 및 닭 및 오리에서의 증식성 비교 평가가 이루어질 예정입니다

2. 2차년도 연구수행 내용 및 결과

○ 연구성과 및 결과

- APMV-4 및 APMV-3의 1일령 오리에서의 안전성 및 배출량 실험
 - NDV 이외에 야생조류 및 생가금류유통시장에서 분리된 APMV들에 대한 오리에서의 안전성 및 배출량에 대한 평가를 실시함

1일령 오리 APMV-4 shedding 분석 및 항체 생성능 평가 시험

공격접종 바이러스: APMV-4 7종 및 APMV-3 1종

- G1 - APMV-4/Mallard/LBM/Korea/019/2012, $10^{8.5}$ EID₅₀/ml
- G2 - APMV-4/Korea/097/2016, $10^{6.3}$ EID₅₀/ml
- G3 - APMV-4/Korea/372-1/2017, $10^{8.2}$ EID₅₀/ml
- G4 - APMV-4/Korea/534-5/2017, $10^{9.5}$ EID₅₀/ml
- G5 - APMV-4/Korea/1131/2017, $10^{8.5}$ EID₅₀/ml
- G6 - APMV-4/Korea/1909/2017, $10^{7.8}$ EID₅₀/ml
- G7 - APMV-4/Mongolia/3/2017, $10^{8.5}$ EID₅₀/ml
- G8 - APMV-3/Korea/004/2017, $10^{8.8}$ EID₅₀/ml

- 1일령 오리에 대해 호흡기에서의 바이러스 배출량 및 안전성을 평가하기 위해, 비강 경로를 통해 50ul씩의 바이러스를 접종하였으며, 각 바이러스당 8마리를 이용함
- virus는 증식된 최고 농도의 바이러스를 사용함
- 바이러스 공격 접종 후 2, 3, 5, 7일 차에 구강인두 샘플링을 실시한 후 real-time PCR을 통해 바이러스 shedding을 검사하였으며 총배설강의 경우 샘플링으로 인한 탈장 위험성이 높아 실시하지 않음
- 모든 실험 그룹에서 폐사 및 기타 임상증상이 확인되지 않아, 실험에 사용한 8종의 APMV 모두 1일령 오리에서 병원성을 나타내지 않음이 확인됨.
- 8종의 APMV 중 G2 및 G4, 2종의 바이러스의 경우 오리에서 원활하게 증식이 확인되지 않았으나, 기타 6종의 바이러스의 경우 증식능이 확인되었으며, G3, G5의 경우 7일차까지도 각각 8마리 중 5마리, 3마리에서의 바이러스 배출이 확인되어 바이러스가 면역반응을 일으키기에 충분한 역가의 증식 및 배출이 이루어짐을 확인함.
- 충분한 증식이 일어나는 APMV G3 및 G5번 사용 바이러스에 대해 유전자 절편을 6개로 나누어 벡터 제작을 진행하고 있음.

Group	Number of ducks	2d	3d	5d	7d
G1	8	10.44±0.82 (6/8)	13.03±3.93 (6/8)	13.17±2.17 (6/8)	0.00±0.00 (0/8)
G2		14.11±0.00 (1/8)	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)
G3		13.12±2.51 (8/8)	12.65±3.36 (7/8)	11.28±4.28 (5/8)	7.33±1.62 (5/8)
G4		0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)	0.00±0.00 (0/8)
G5		12.24±0.99 (8/8)	11.91±1.76 (8/8)	8.30±1.33 (8/8)	7.60±0.77 (3/8)
G6		11.57±1.60 (7/8)	11.23±1.44 (8/8)	8.61±1.57 (6/8)	6.64±0.00 (1/8)
G7		10.33±2.05 (8/8)	11.61±1.58 (8/8)	9.53±0.07 (2/8)	0.00±0.00 (0/8)
G8		11.82±1.30 (8/8)	11.19±2.27 (8/8)	6.35±1.49 (8/8)	0.00±0.00 (0/8)

그림 46. APMV 8종의 1일령 오리에서의 배출량 확인

- HIV-1 벡터백신 기능 평가 (in vitro)

- NDV 및 APMV-4 벡터와 마찬가지로 HIV-1 벡터에 대하여 벡터 백신으로서의 효능 평가를 진행하기 위해 숙명여대 임광일 교수 연구팀과 협동으로 HIV-1 벡터 제작에 대해 논의함
- HIV-1 벡터의 경우 최초 1회에 대해서만 감염이 일어나며 이후 삽입된 유전자를 통해 지속적으로 단백질의 생산을 유도할 수 있는 효율적인 벡터로, 지속적인 연구를 통해 삽입 위치를 조절함으로써 돌연변이로 인한 암의 발생이 억제될 수 있도록 개발되어 옴.
- HIV-1 벡터에 대하여 외부 단백질 발현용 promoter를 결정하기 위해 닭, 개, 사람, 돼지 유래 세포에 해당하는 CEF, MDCK, HEp-2, PK-15 세포를 선발하여 CMV promoter 및 Human ubiquitin promoter를 이용하여 GFP 또는 luciferase 단백질을 발현하는 3종 벡터를 제작함

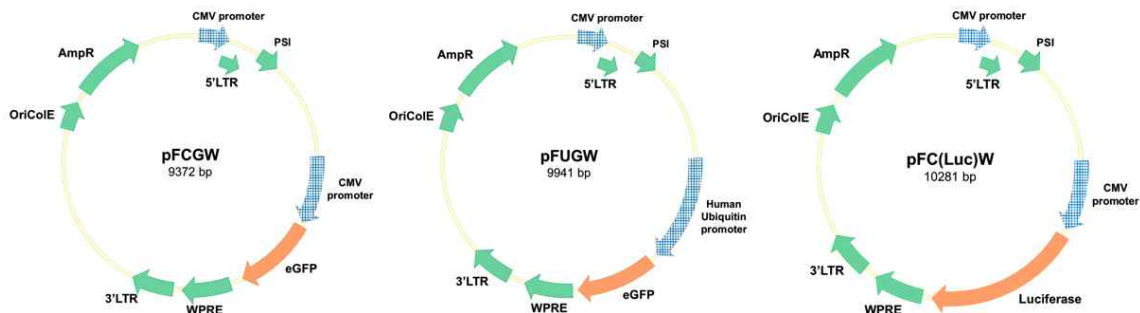


그림 47. CMV promoter-GFP 발현 벡터(좌), Human ubiquitin promoter-GFP 발현 벡터(중) 및 CMV-promoter-luciferase 발현 벡터(우) 제작

- CMV promoter 및 Human ubiquitin promoter를 비교해보면 사람 유래 세포를 포함한 4종류의 세포에서 모두 CMV promoter의 발현량이 높아 벡터 백신으로의 promoter는 CMV promoter가 효율적일 것으로 판단함

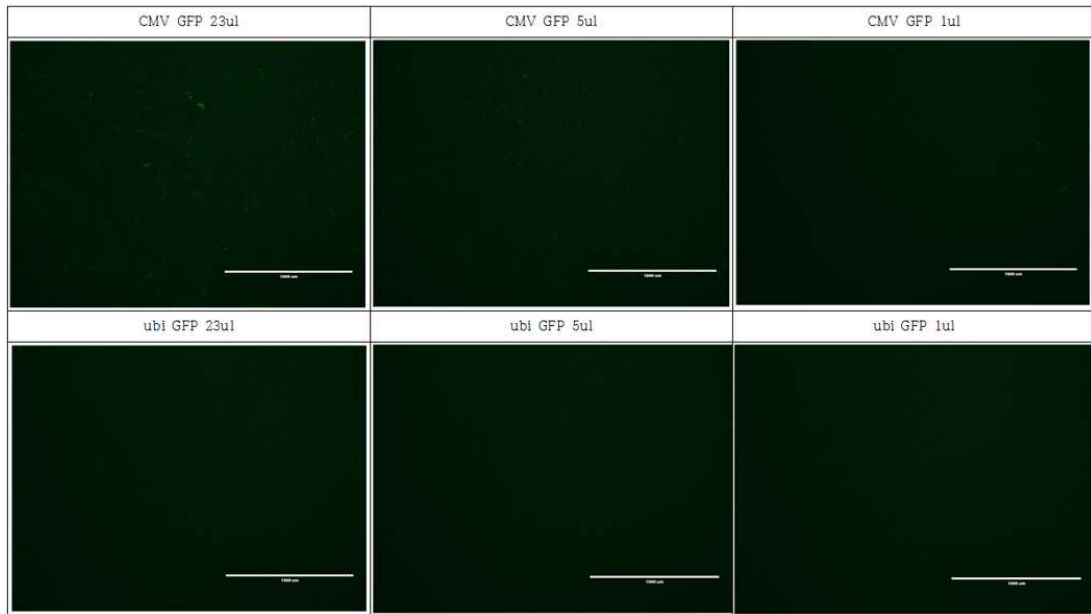


그림 48. CEF 세포에서의 CMV promoter 및 Human ubiquitin promoter의 GFP 발현

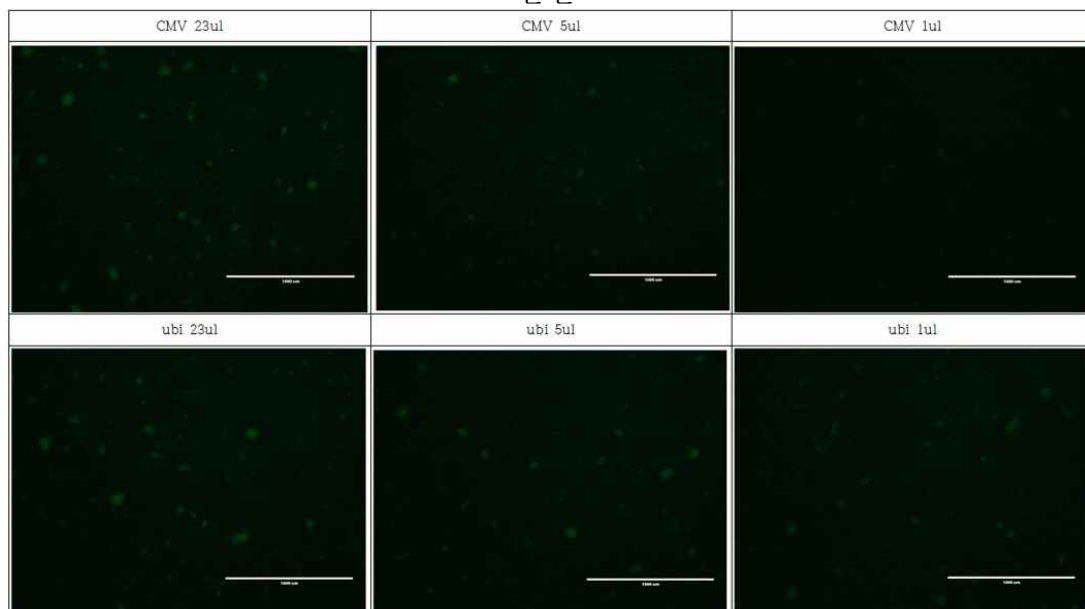


그림 49. MDCK 세포에서의 CMV promoter 및 Human ubiquitin promoter의 GFP 발현

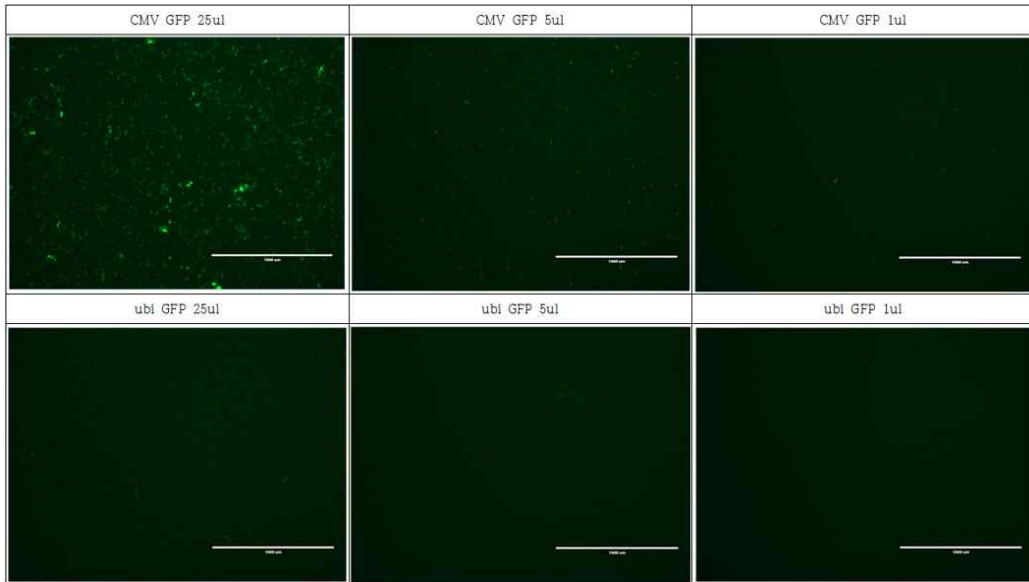


그림 50. HEp-2 세포에서의 CMV promoter 및 Human ubiquitin promoter의 GFP 발현

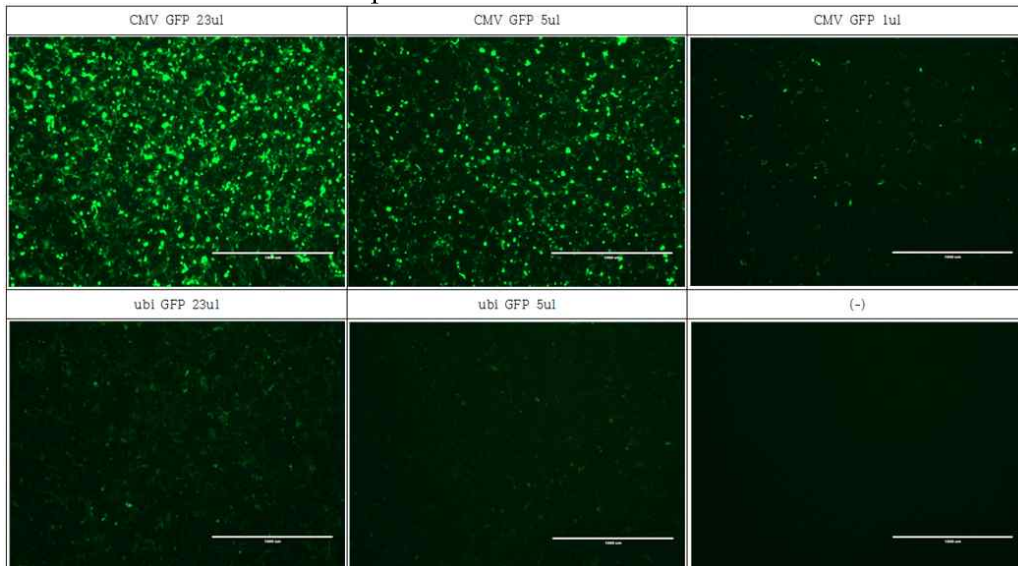


그림 51. PK-15 세포에서의 CMV promoter 및 Human ubiquitin promoter의 GFP 발현

- 세포순으로 비교해보면 PK15 - HEp-2 - MDCK - CEF 순으로 GFP 발현량이 차이가 나는 것이 확인되었으며, 상대적으로 CEF에서 GFP의 발현량이 적은 이유는 line cell 이 아닌 primary cell을 이용했기 때문일 것으로 추측됨
- GFP 발현 확인 후, luciferase에 대한 CEF, MDCK, HEp-2 세포에 대한 실험 결과 luciferase의 발현량은 CEF - HEp-2 - MDCK 순으로 높게 나타나는 것이 확인되어 벡터백신으로서의 사용 가능성을 재확인할 수 있었음

세포종류	접종량	측정값	세포종류	접종량	측정값	세포종류	접종량	측정값
CEF	23ul	181050	MDCK	23ul	4284	Hep-2	23ul	11121
	5ul	40413		5ul	920		5ul	1662
	1ul	6785		1ul	99		1ul	165
	N.C.	4		N.C.	4		N.C.	4

그림 52. 각 세포의 In vitro 실험상에서의 luciferase의 발현량 확인

- HIV-1 벡터백신 기능 평가 (in vivo)

- luciferase 발현 HIV-1에 대하여 2주령의 SPF 닭에 I.V., I.M. 2가지의 경로로 바이러스를 접종하여 luciferase의 발현량을 확인함.
- 1차 실험은 전실험으로 소규모로 이루어졌으며, 벡터 백신의 접종량은 마우스에 대한 접종 기준보다 1/5 정도의 소량으로 접종이 이루어짐.

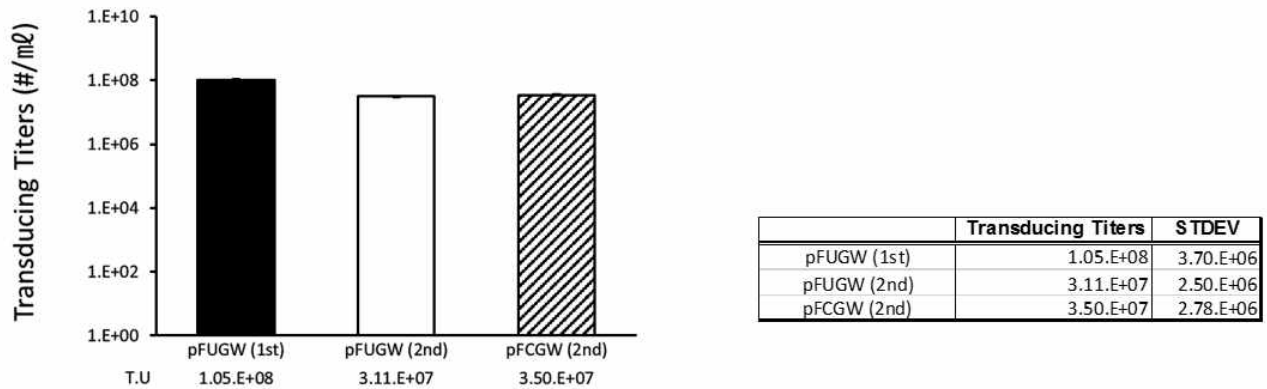


그림 53. HIV-1 벡터의 역가 확인

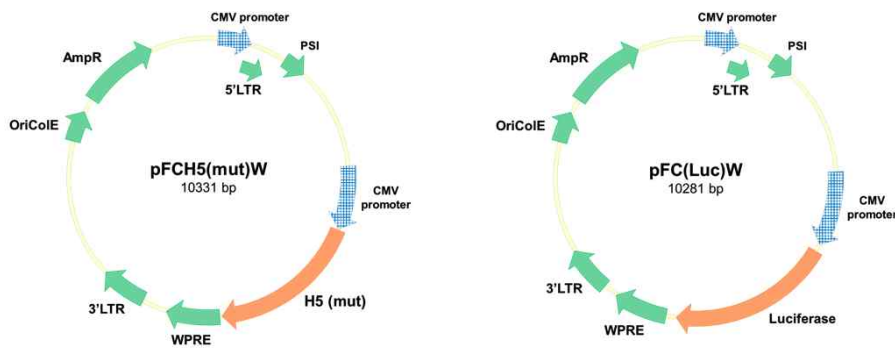
접종루트	장기	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
		Trachea	Heart	Pectoral m.	Lung	Kidney	S.I.	Brain	Liver	Bursa	C.T.	Spleen
I.V.	개체번호											
	1-1	3	3	3	3	4	3	4	3	4	6	42
	1-2	3	2	2	3	6	7	4	3	6	4	5
I.M.	1-3	2	4	5	4	5	5	4	5	3	3	4
	2-1	175	8	2076	258	5	3	23	6	27	3	4
Negative Control	2-2	230	5	654	418	12	3	20	4	3	7	3
	3-1	4	4	5	5	3	2	4	4	3	4	2
	3-2	5	4	4	3	6	3	4	4	3	6	5

그림 54. HIV-1 벡터의 접종 루트별 luciferase 발현량 확인

- I.V., I.M. 2가지의 경로를 분석한 결과 I.M. 접종법의 경우 바이러스를 직접 접종한 Pectoral m. 부위 이외에도 trachea와 lung에서 luciferase의 발현량이 높아 호흡기 바이러스의 항원 단백질을 발현시킬 경우 국소적인 면역을 높게 이끌어낼 수 있을 것으로 예상됨
- I.V 경로의 경우 바이러스의 양이 적어 전신적으로 소량의 바이러스가 감염되어 충분한 luciferase의 발현이 이루어지지 않은 것으로 판단되어, 추후 바이러스 양을 증량하여 재실험을 계획하고 있음

- 고병원성 조류인플루엔자에 대한 HIV-1 벡터백신 기능 평가 (in vivo)

- HIV-1 벡터가 조류의 호흡기에서 단백질 발현량이 높은 것이 확인됨에 따라 cleavage site를 제거한 고병원성 조류인플루엔자 HA 단백질을 발현하는 HIV-1 벡터를 제작함
- 본 벡터는 역가검정이 완료되어 2주령 닭에 접종이 들어가 있는 상태로 HI 및 local IgA의 분석 등을 통해 HA 단백질에 대한 항체 생성 여부를 분석할 예정임



• pFCH5(mut)W

- Promoter : CMV promoter
- Gene expressions : H5(mut)

• pFC(Luc)W

- Promoter : CMV promoter
- Gene expressions : Luciferase

그림 55. CMV promoter를 이용한 고병원성 조류인플루엔자 H5 HA 단백질 발현 HIV-1 벡터

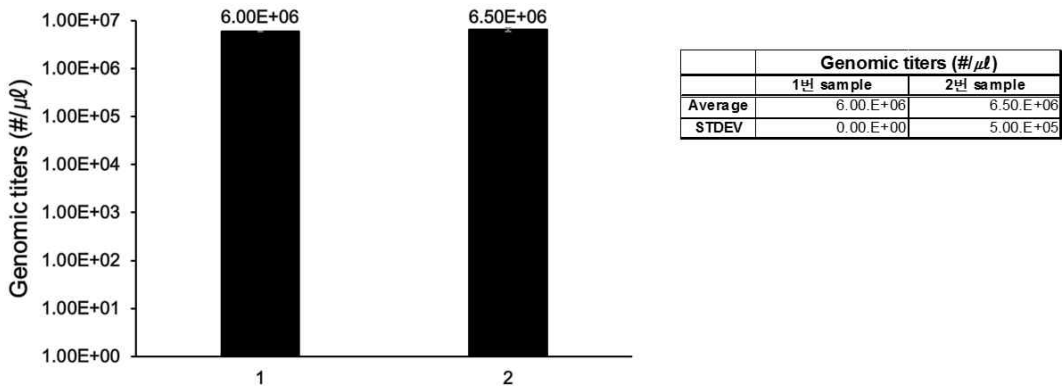


그림 56. 고병원성 조류인플루엔자 H5 HA 단백질 발현 HIV-1 벡터 정량

3. 3차년도 연구수행 내용 및 결과

○ 연구성과 및 결과

- Newcastle disease virus K148/08 분리주를 이용한 벡터 백신 개발
- 야생오리에서 분리된 바이러스인 NDV K148/08 주를 종란에 접종하여 propagation 후 유전자를 추출하여 reverse transcript를 통해 cDNA를 제작함
- cDNA를 6개의 절편으로 나누어 PCR을 진행 한 후 각각의 절편을 TA cloning을 통해서 유전자 클로닝을 진행함. 각 유전자 절편은 약 3kb에 달하고 인접한 유전자와 300bp 정도로 겹치는 부분이 생기게 디자인 함. 각 유전자 절편의 cloning에 사용된 프라이머는 표 3. 과 같음

번호	서열	프라이머
1	5'-ACCAAACAGAGAATCTGTAAGG-3'	F1_F
2	5'-TCAGTACCCCCAGTCGG-3'	F1_R
3	5'-GTGACCAGATGAGCTTTGC-3'	F2_F
4	5'-TTAGCCATTCAGTGCAAGG-3'	F2_R
5	5'-GTGCATTGATCATGTACAG-3'	F3_F
6	5'-GTCAGTTTGACATTGACCTTG-3'	F3_R
7	5'-GATAGAAGAAGCTTGACACCTC-3'	F4_F
8	5'-GAGCCATGCAAAGCTTGGCTG-3'	F4_R
9	5'-ATGGCGRGCTCCGGTCC-3'	F5_F
10	5'-AACAGCATTGCATGCATGC-3'	F5_R
11	5'-GACTAACCTTCAATACTCAAG-3'	F6_F
12	5'-ACCAAACAAAGATTTGGTGAATG-3'	F6_R
13	5'-ATGTCTTCTGTATTCGATGAG-3'	NP_F
14	5'-TCAGTACCCCCAGTCGG-3'	NP_R
15	5'-ATGGCCACCTTYACAGATG-3'	P_F
16	5'-TTAGCCATTCAGTGCAAGG-3'	P_R
17	5'-ATGGCGRGCTCCGGTCC-3'	L_F
18	5'-TTAAGAGTCACAGTTACTRTRTAATATC-3'	L_R

표 3. K148 cDNA 6개의 절편과 NP,P,L 유전자의 PCR에 사용된 프라이머

- 각각의 인접한 절편과 겹쳐지는 부분 (overlapping region)내에 위치한 infusion 프라이머를 제작하여 in-fusion 반응을 통해 각각의 절편을 이어 붙임. infusion primer는 표4.와 같음.

번호	서열	프라이머
1	5'-ACCAAACAGAGAATCTGTAAGGTACG-3'	F1-F
2	5'-gatttggatgaatgacCTCTCATCAAATCCAAAAATTG-3'	F1-up-trailer
3	5'-TGGATTTGATGAGAGCGGTGGCAAATAGC-3'	F2-F
4	5'-gatttggatgaatgacTTAGCCATTCAAGTATTTTCTTCC-3'	F2-up-trailer
5	5'-TGTCACGCCCTATGCATCCGAGCTCC-3'	F3-F
6	5'-gatttggatgaatgacGAGATATCGAGATTGCCTGTC-3'	F3-up-trailer
7	5'-CAATCTCGATATCTCGACTGAGCTTGG-3'	F4-F
8	5'-gatttggatgaatgacAGCCGATTCAAGTATTTTCTTCC-3'	F4-up-trailer
9	5'-ATACTTGAATCGGCTTCTCCTGACAC-3'	F5-F
10	5'-gatttggatgaatgacCTTCCTCCTACCTACGGAGCTTG-3'	F5-up-trailer
11	5'-GTAGGTAGGAGGAAGCAGATTCAGG-3'	F6-F
12	5'-gatttggatgaatgacAGAACTACACTCAAGAACAATTAC-3'	F6-up-trailer
13	5'-GATTCTCTGTTTGGTccctatagtgagtcgtattagc-3'	F1-up
14	5'-CTCTCATCAAATCCAAAattgggtctc-3'	F2-up
15	5'-GCATAGGGCGTGACAtgatcaatgcac-3'	F3-up
16	5'-GAGATATCGAGATTGcctgtcacgattac-3'	F4-up
17	5'-AGCCGATTCAAGTATtttcttcattgtcg-3'	F5-up
18	5'-CTTCCTCCTACCTACggagcttgcttc-3'	F6-up
19	5'-gtcattcaccaaatctttgtttg-3'	Trailer-down

표 4 각 절편들을 infusion하기 위해 사용된 프라이머.

- Infusion이 완료된 K148 cDNA는 T7 promoter, HDV ribozyme, terminator sequence가 포함된 pBlueScript 플라스미드로 삽입하여 pK148를 제작함.
- 같은 방법을 사용하여 expression vector plasmid 내에 RNP complex를 구성할 수 있는 pNP, pP, pL supporting plasmid를 제작함
- pK148 및 supporting plasmid를 E.coli에 Transformation 하고 PureLink HiPure midiprep Plasmid Kits (Introgen)을 사용하여 순도 높은 플라스미드를 얻어냄
- 위에서 얻어낸 플라스미드를 T7 polymerase를 encoding 하고 있는 MVA-T7 바이러스가 감염된 Hep-2 cell에 Transfection함. MVA-T7 polymerase는 미국 NIH의 Bernard Moss 박사 연구팀에게서 분양받음.
- Transfection 3일 후 Freezing & Thawing을 진행하고 10일령 SPF 종란에 접종을 하여 바이러스를 증폭시킴.
- 증폭된 바이러스는 Micro Hemagglutination Assay를 통해 확인함. Micro HA 양성으로 판단된 샘플은 이후 종란에서의 계대를 통해 증폭되었고 NDV realtime PCR을 통하여 바이러스 존재 여부를 확인함

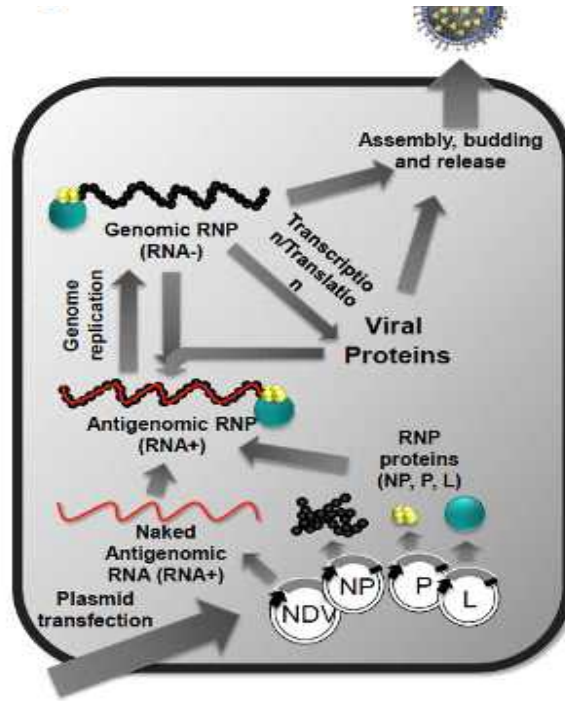


그림 57 NDV vector rescue 원리

- 고병원성 조류인플루엔자의 HA단백질을 발현하는 K148 벡터 백신 개발.
- 위의 실험에서 성공적으로 rescue가 된 벡터의 plasmid 내에 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스 A/Duck/Korea/ES2/16의 HA 유전자를 삽입하였음

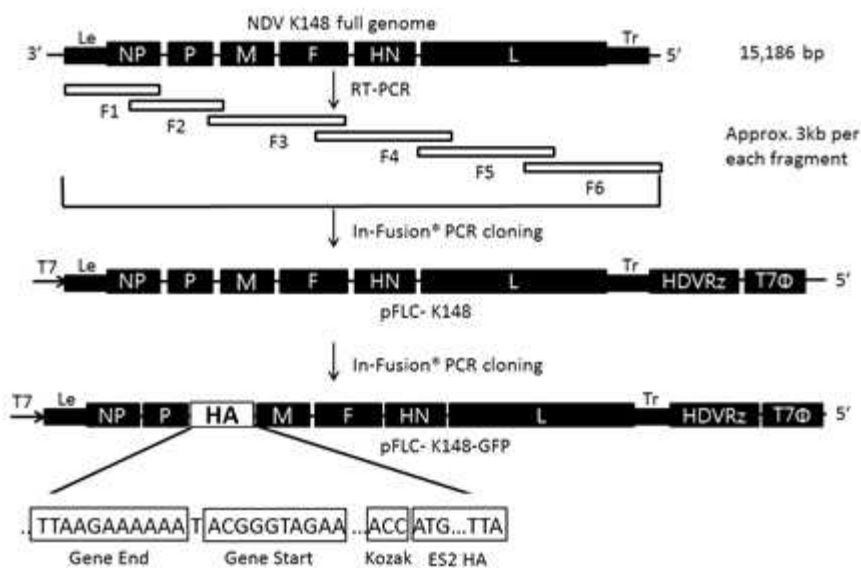


그림 58 NDV 유전자 내에 HA유전자 삽입

- 위에 기술된 infusion을 통한 방법을 통해 HA 유전자를 삽입하였으며, Transfection의 성공여부를 육안적으로 확인하기 위해 GFP유전자가 삽입된 plasmid를 제작함. NDV의 P유전자와 M유전자 사이에 삽입을 진행하였음.

- HA유전자의 upstream에 Gene end(GE), Gene start(GS), IGS(intergenic sequence)를 포함하는 Noncoding region(NCR) region를 추가로 삽입하였음.
- Paramyxovirus의 “Rule of Six” 에 맞게 NCR region의 유전자 개수를 맞추어 삽입하였음.
- 위에서 기술된 방법을 이용하여 제작된 Plasmid(pK148/ES2-HA, pK148/GFP)들을 Transfection하고 바이러스를 성공적으로 얻어내었음.
- Rescue 된 바이러스는 종란 접종을 통하여 증폭되었고 Microneutralization을 통하여 HA titer를 측정하였음. 측정결과 1회 종란 계대 후 rK148/ES2-HA 바이러스의 HA titer는 256 HA unit으로 확인됨.
- 바이러스 rescue의 추가적인 확인은 PCR, Western blot 및 면역형광염색법(IFA)을 통하여 확인하였음.
- 세 번의 종란 계대를 통해 얻어진 rK148/ES2-HA 바이러스의 유전자를 추출 후 HA유전자의 upstream에서 Forward Primer를 제작하고 HA의 down stream에서 유전자를 제작 후 PCR을 통해 HA 유전자의 존재 여부를 확인함.

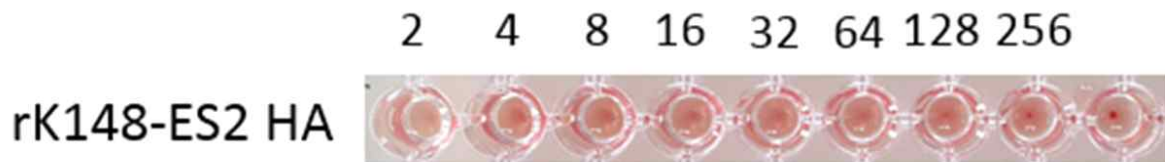


그림 59 Microhemagglutination Assay를 통한 HA titer 확인

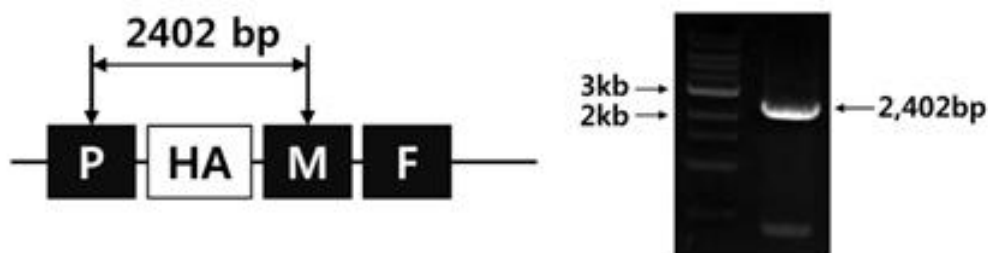


그림 60. rK148/ES2-HA 바이러스의 유전자 PCR을 통한 HA 유전자 존재 여부 확인

- PCR결과 타겟 사이즈와 일치하는 2402bp에 해당되는 band를 확인할 수 있었음.
- Western blot과 면역형광염색법(IFA)의 1차 항체는 오리의 ES2 바이러스에 대한 항혈청을 사용하였고, 2차 항체는 HRP/IFA conjugated Goat anti-duck IgG antibody를 사용하였음.
- Western blot에서 HA 단백질의 사이즈에 해당하는 약 70Kda 부근에서 밴드를 확인할 수 있었고 rK148/ES2-HA를 감염시킨 DF-1 cell에서 형광현미경으로 관찰 시 CPE가 나타난 부분에 대해 형광 반응을 확인할 수 있었음

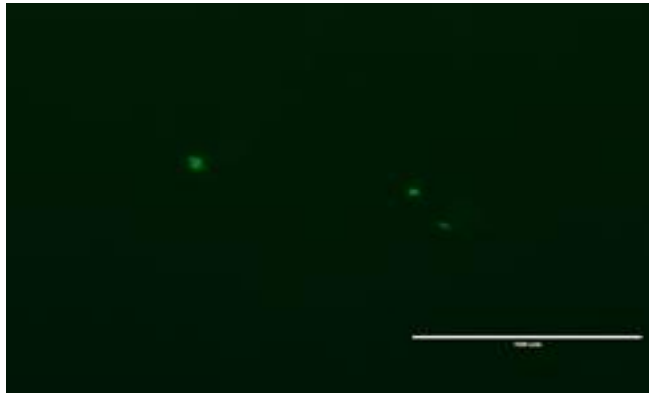


그림 61 pK148/GFP Transfection 이후 형광현미경에서의 GFP 발현 확인

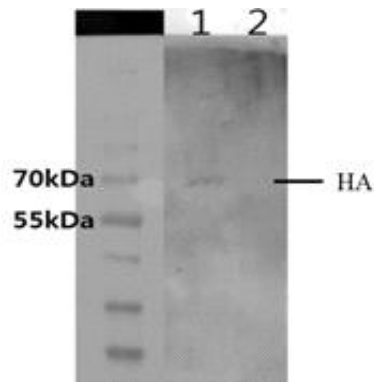


그림 62 Westernblotting을 통한 rK148/ES2-HA 바이러스의 HA 유전자 발현 확인

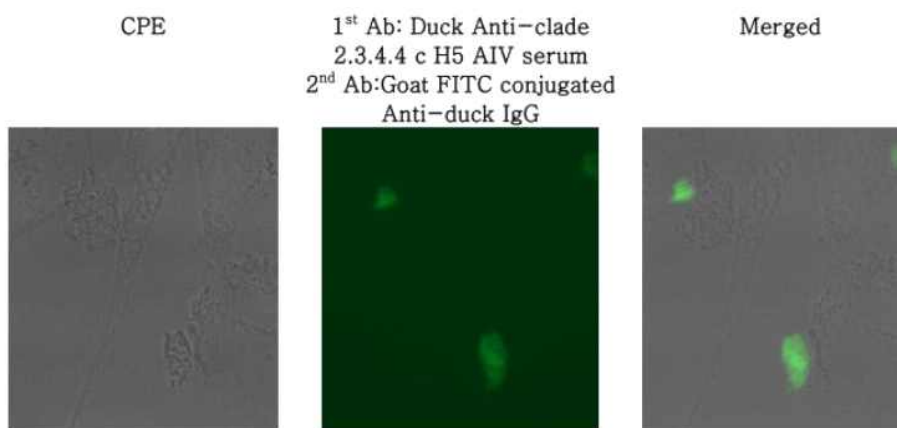


그림 63 면역형광염색법을 통한 rK148/ES2-HA 바이러스의 HA 발현 확인

- 위 방법들을 통해 rK148/ES2-HA에 의한 HA발현이 성공적으로 이루어졌고 종란 계대를 통해서도 유전자 및 단백질이 유지되는 것을 확인할 수 있었음.

- rK148/ES2-HA 벡터 백신 개량주 개발

- 삽입된 HA 유전자의 앞부분에 Kozak sequence 삽입을 통한 외부 유전자의 발현 증가는 여러 연구에서 증명된 바 있음. 따라서 HA 유전자의 앞부분에 KOZAK sequence의 삽입을 통하여 HA 유전자가 더 효율적으로 발현될 수 있게 조절하였음.

- rK148/ES2-HA의 면역원성 (HI test) 평가 - 닭

- 5 마리의 4주령 SPF 닭에 106EID50 (Egg infectious dose 50)의 rK148/ES2-HA를 비강 (intranasal)접종하였음.. 접종한 닭의 임상증상은 매일 관찰하였음.
- 백신 접종 1, 2, 3주(weeks post vaccination; wpv) 이후 백신 접종된 5마리의 닭과 접종하지 않은 3마리 닭의 혈액을 채취하여 혈청 검사에 사용하였음.
- rK148/ES2-HA 백신을 접종한 닭에서의 면역반응은 혈구응집억제반응(Hemagglutination inhibition; HI) 시험을 통해 확인하였음.
- 백신을 접종한 닭에서의 K148 바이러스에 대한 HI 역가의 GMT(Geometrical Mean)는 1주차에 1.32(SD:1.46)에서 2주차에 18.38(SD: 2.47)로 증가하였음. 백신 3주차 K148 바이러스에 대한 HI 역가의 GMT는 약간 감소하여 16.0(SD:2.34)로 측정되었음. 백신을 접종한 닭에서의 clade 2.3.4.4 H5 AIV에 대한 HI 역가의 GMT는 백신 1주차에 1.52 (SD:1.86)에서 2주차에 6.96(SD:2.47)로 증가하였으며 3주차에는 5.27 (SD:1.86)로 감소하였음.
- 위 실험을 통하여 rK148/ES2-HA 벡터 백신 바이러스가 효율적으로 혈청을 생성 할 수 있음을 확인하였음.

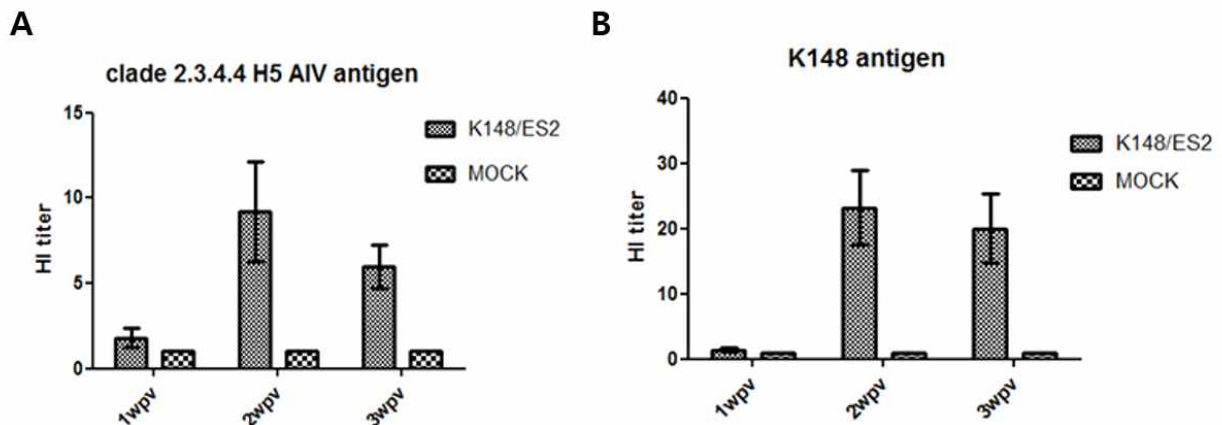
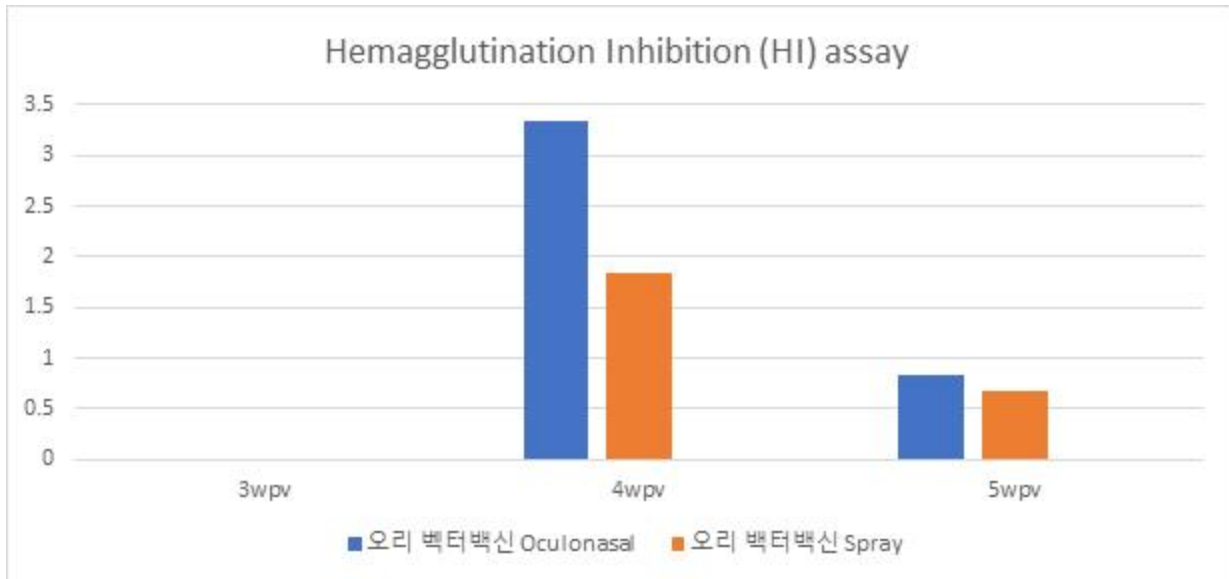


그림 64. rK148/ES2-HA 백신 이후 clade 2.3.4.4 H5 AIV antigen에 대한 HI 검사 결과(A)와 K148 NDV antigen에 대한 HI 검사 결과

- rK148/ES2-HA의 면역원성 (HI test) 평가 - 오리

- 1일령 Domestic duck에 10⁶ EID 50 (Egg infectious dose 50)의 rK148/ES2-HA를 Oculonasal 및 Spray route로 백신하였음. 접종한 오리의 임상증상은 매일 관찰하였음.
- 백신 접종 2주차에 한차례 동일 경로로 부스팅을 진행한 후 백신 접종 3주(weeks post vaccination; wpv) 차부터 오리의 혈액을 채취하여 혈청 검사에 사용하였음.

- rK148/ES2-HA 백신을 접종한 오리에서의 면역반응은 혈구응집억제반응(Hemagglutination inhibition; HI) 시험을 통해 확인하였음.



- 백신을 접종한 오리에서의 clade 2.3.4.4 H5 AIV에 대한 HI 역가는 백신 4주차에 Oculonasal route 3.33, Spray route 1.83으로 측정되었으며, 백신 5주차에는 감소하는 것을 확인할 수 있었음.
- 위 실험을 통하여 rK148/ES2-HA 벡터 백신 바이러스가 오리에서도 효율적으로 항혈청을 생성할 수 있음을 확인하였으며, 향후 추가 공격접종 시험을 통해 실증할 계획임.

제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절. 목표

1. 연차별 목표

구분	1년차	2년차	3년차
주관연구기관	<ul style="list-style-type: none"> ◆ AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주 (Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 백신 제조 ◆ AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주 (Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 2주령 육용오리에서의 면역원성 (HI test) 및 방어능 (PD₅₀, 바이러스 배출량, 생존율) 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 신규 발생주에 대한 백신 제조 ◆ AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주 (Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 종오리에서의 면역원성 (HI test) 및 방어능 (PD₅₀, 바이러스 배출량, 생존율) 평가 ◆ 신규 발생주 백신에 대한 면역원성 및 방어능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 신규 발생주에 대한 백신 제조 ◆ 신규 발생주에 대한 육용오리에서의 면역원성 및 방어능 평가 ◆ 협동기관 제작 ND+AI 벡터 백신의 2주령 오리에서의 면역원성 (HI test) 및 방어능 (최소면역원성, 바이러스 배출량, 생존율) 평가
제1협동과제	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 오리 유래 ND 분리주 역유전학 바이러스 제작 ◆ AI HA 유전자 삽입 ND 바이러스 (ND+AI 벡터 백신주) 제작 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 오리 유래 ND 분리 바이러스주와 역유전학 제작 바이러스, ND+AI 벡터 백신주의 닭 및 오리에서의 증식성 비교평가 ◆ 오리 유래 ND 분리 바이러스주와 역유전학 제작 바이러스, ND+AI 벡터 백신주의 종란 내 병원성, 병아리 병원성 비교 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ cytokine, IRES 시스템 등을 이용한 ND+AI 벡터 백신 개량주 개발 ◆ ND+AI 벡터 백신 개량주 면역원성 (HI test) 평가

2. 성과 목표

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료 백만원	제품화	매출액 백만원	수출액 백만원	고용창출	투자유치 백만원		논문		학술발표	정책활용			홍보전시		
												SCI	비SCI						논문평균 IF	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건				
가중치	20	20		20	20								10			10				
최종목표																				
1차년도													1							
2차년도	1										1		2	2	1					
3차년도	1	1		2	100						1	1	2		1					
소 계	2	1		2	100						2	1	5	2	2					
종료 1차년도		1				1	100	100												
종료 2차년도																				
종료 3차년도																				
종료 4차년도																				
종료 5차년도																				
소 계		1				1	100	100												
합 계	2	2		2	100	1	100	100			2	1	5	5	2	2				

* 단계별 연구성과 목표는 향후 중간/최종/추적평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨
 ** 연구성과는 연구개발계획에 맞춰 도출하고 예시와 같이 작성
 *** 가중치 총합 100을 기준으로 성과목표지표별 중요도, 난이도에 따라 배분하되 가중치 총합이 100이 되도록 배분(산업화과제의 경우 사업화지표에 70 이상 배분)

제 2 절. 목표 달성여부

1. 연구과제 목표 달성도

1차년도														
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												목표 달성도 (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	2주령 육용오리에서 의 면역원성 평가				■	■	■	■	■					100
2	2주령 육용오리에서 의 방어능 평가									■	■	■	■	100
3	오리 유래 ND 분리 주 역유전자 바이러스 제작				■	■	■	■	■	■				100
4	AI HA 유전자 삽입 ND 바이러스 (ND+AI HA 벡터백신주) 제작						■	■	■	■	■	■	■	100
2차년도														
1	중오리에서의 면역원성 평가	■	■	■	■	■	■							100
2	중오리에서의 방어능 평가							■	■	■	■	■	■	100
3	오리 유래 ND 분리 바이러스 주와 역유 전자 제작 바이러스, ND+AI 벡터 백신주의 종란에서의 증식성 비교평가	■	■	■	■									100
4	오리 유래 ND 분리 바이러스 주와 역유 전자 제작 바이러스, ND+AI 벡터 백신주의 종란 내 병원성, 병아 리 병원성 비교					■	■	■	■	■	■	■	■	100

3차년도												
1	신규 발생주에 대한 육용오리에서의 면역원성 및 방어능 평가											0
2	역유전학 제작 ND+AI 백터 백신의 2주령 오리에서의 면역원성 및 방어능 평가											50
3	cytokine, IRES 시스템 등을 이용한 ND+AI 백터 백신 개량주 개발											100
4	ND+AI 백터 백신 개량주 면역원성 (HI test) 평가											100

2. 성과 목표 달성도

성과지표	계획(A)	실적(B)	목표달성률 (C:B/A)	지표달성률 (C'=C)	가중치	점수(D)
특허 출원	2	2	100.0%	100.0%	0.200	20.00
특허 등록	1	0	0.0%	0.0%	0.200	0.00
품종 등록			-	-	-	-
기술이전(건)	2	2	100.0%	100.0%	0.200	20.00
기술료(백만원)	100	100	100.0%	100.0%	0.200	20.00
제품화(건)			-	-		-
매출액(백만원)			-	-		-
수출액(백만원)			-	-		-
고용창출(명)			-	-		-
투자유치(백만원)			-	-		-

기술인증			-	-		-
논문(SCI)	2	0	-	-		-
논문(비SCI)	1	0	-	-		-
논문평균 IF	2	0	0.0%	0.0%		0.00
학술발표	5	5	100.0%	100.0%	0.100	10.00
교육지도			-	-		-
인력양성	2	2	100.0%	100.0%		0.00
정책활용	2	2	100.0%	100.0%	0.100	10.00
홍보전시			-	-		-
영농활용			-	-		-
계	119	113				80.00점

제 3 절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구 필요성)

1. 연구과제 목표 중 미달성 사유

(1) 신규 발생주에 대한 육용오리에서의 면역원성 및 방어능 평가

- 본 과제 수행 기간 내 국내 HPAI 신규 발생은 과제 종료 한달 전인 지난 2020년 11월 26일 정읍의 한 오리농장에서 최초로 확인된 바 있음.
- 해당 발생 이후 본 연구팀은 야생조류 분변으로부터 이번 신규 발생주인 HPAI H5N8 clade 2.3.4.4b 바이러스를 분리, 해당 바이러스의 유전자 분석 결과를 국제 학술지에 보고한 바 있음. (Viruses. 2020 Dec 4;12(12):1389. doi: 10.3390/v12121389.)
- 따라서 현재 신규 발생주는 확보가 되어 있는 상황이지만, 해당 분리주를 이용한 오리에서의 백신 면역원성 및 방어능 평가가 이루어질 건국대학교 내 ABL3 시설은 작년 중순 이후 코로나19 관련 시험 일정으로 인해 2월 현재까지 인플루엔자 시험이 불가능한 상황임.
- 이에 따라 향후 연구팀간 일정 조정을 통해 올해 3월 중에 신규 발생주를 이용한 면역원성 및 방어능 평가를 수행할 예정임.

(2) 역유전학 제작 ND+AI 벡터 백신의 2주령 오리에서의 면역원성 및 방어능 평가

- 현재 벡터 백신의 면역원성 관련 시험은 완료하였으나, 방어능 시험은 상기한 ABL3 시

설의 일정 조정 문제로 3월 중 진행될 예정임.

2. 성과 목표 중 미달성 사유

(1) 특허 등록

- 현재 ND 벡터 백신의 출원은 완료된 상태이나 이번 연구기간 내에 등록까지는 완수하지 못하였음. 해당 특허의 진행 상황을 지속 체크하여 등록 완료시 성과 업로드 계획 중임.

(2) 논문

- 오리용 ND 벡터 백신의 개발과 그 평가에 관한 논문을 현재 작성 중이며, 공격접종 시험 완료 후 결과 정리 및 논문화 진행 예정

3. 후속 연구의 필요성

- (1) 현재 본 연구진의 연구결과에 따르면 국내 항원뱅크 구축용 백신주는 오리에서의 Homologous Challenge Test에서 효과적으로 질병을 예방할 수 있음이 확인되었으나, 해당 백신주의 사용 시 오리에서의 안전성 지표(육용오리 : 증체량, 종오리 : 산란율 등)에 대한 추가적인 연구 역시 필요한 상황임.
- (2) 또한 ND 벡터백신 플랫폼의 생독백신 적용 시(주로 분무백신) 오리의 상하부 호흡기에서의 안전성 역시 중요한 고려 요인이 될 수 있음.
- (3) 향후 실험실적 조건에서의 안전성 확보 시험 및 대규모 야외 임상 시험 결과를 통한 추가적 검증이 이루어질 필요가 있음

제 4 절. 연구결과의 활용 계획 등

1. 연구개발 결과의 활용방안

- 국내 방역정책 유연성 확보를 위한 오리용 고병원성 조류인플루엔자 백신의 긴급방역 백신으로의 활용
- 항원뱅크의 수립 및 효능이 입증된 백신을 이용하여 국내 유입주에 대응되는 백신의 활용 가능
- 개체별 백신 접종이 필요한 사독백신뿐만 아니라 집단 백신 접종이 가능한 벡터백신을 개발하여 백신의 효율성 증가
- 항원뱅크 보유를 위한 불활화백신용 항원 및 백신 생산을 통한 실용화 및 벡터 백신의 기술이전을 통한 백신시장 성장
- 과제 종료 후 본 연구개발 사업을 통하여 고도화된 백신 평가 기술을 이용한 추가연구 기반으로의 활용
- 특히, 본 연구에서 도출한 ND 벡터 백신 플랫폼은 자체 백신 개발 경쟁력이 부족한 중동, 동남아 등과 같은 개발도상국을 대상으로 다양한 현지 유행 질병주(QX-IB, ND genotype VII 등) 대응 백신으로 사업화가 이루어지고 있으며, 추가적인 기술이전을 통해 국내 동물용 백신 제조사의 수출 다각화에 기여할 예정임.

2. 기대성과 및 파급효과

- 기술적 측면
 - 과제 수행으로 인한 연구팀의 기술 고도화 및 이를 통한 경쟁력 향상
 - 과제 수행을 통하여 발생한 결과의 연구논문 발표를 통한 학술자료 확보
 - 과제 수행을 통하여 발생한 결과의 특허 출원을 통한 지적재산권 확보
 - 기술 이전을 통한 백신 기업의 기술 고도화
- 경제·산업적 측면
 - 백신 기술이전을 통한 기술료 수입 발생
 - 생독 백신의 수출을 통한 국내 기업의 수익 창출
 - 오리의 질병 발생 차단을 통한 오리 산업 경쟁력 향상 및 국민 안전성 확보
 - 유사기술을 사용한 신규 상품의 개발 및 산업화

붙임. 참고문헌

1. Ayllon, J., García-Sastre, A., Martínez-Sobrido, L. Rescue of Recombinant Newcastle Disease Virus from cDNA. *J. Vis. Exp.* (0), e50830,doi:10.3791/50830 (2013)
2. Witko SE, Kotash CS, Nowak RM, Johnson JE, Boutilier LA, Melville KJ, Heron SG, Clarke DK, Abramovitz AS, Hendry RM, Sidhu MS, Udem SA, Parks CL (2006) An efficient helper-virus-free method for rescue of recombinant paramyxoviruses and rhabdoviruses from a cell line suitable for vaccine development. *J Virol Methods* 135:91-101
3. Jeong, S.H., et al., Immunization with a thermostable newcastle disease virus K148/08 strain originated from wild mallard duck confers protection against lethal viscerotropic velogenic newcastle disease virus infection in chickens. *PLoS One*, 2013. 8(12): p. e83161.
4. Yuk, S.S., et al., Optimization of inactivated H5N9 highly pathogenic avian influenza vaccine and inactivated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine with antigen dose and prime-boost regimen in domestic ducks. *Poult Sci*, 2017. 96(9): p. 3079-3085.
5. Lee, C.W., D.A. Senne, and D.L. Suarez, Generation of reassortant influenza vaccines by reverse genetics that allows utilization of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy for the control of avian influenza. *Vaccine*, 2004. 22(23-24): p. 3175-81.
6. Spackman, E., et al., Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol*, 2002. 40(9): p. 3256-60.
7. Kolakofsky, D., et al., Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J Virol*, 1998. 72(2): p. 891-9.
8. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness. 2014
9. Kang, Y.M., et al., Protection of layers and breeders against homologous or heterologous HPAIv by vaccines from Korean national antigen bank. *Scientific Reports* volume 10, Article number: 9436 (2020)
10. Kang, Y. M. et al. Protective efficacy of vaccines of the Korea national antigen bank against the homologous H5Nx clade 2.3.2.1 and clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza viruses. *Vaccine*. 38(3), 663-672 (2020).

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) AI 항원뱅크 구축용 백신주의 오리(육용오리, 종오리)에서의 효능(방어능) 평가 및 오리에 효과있는 백신 개발					
	(영문) Evaluation of vaccine efficacy (protective ability) of AI strains for the construction of AI antigen banks in ducks (broiler ducks, breeder ducks) and development of effective vaccines for ducks					
주관연구기관	주식회사 카브		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 주식회사 카브		
참 여 기 업	씨티씨백			(성명) 송 창 선		
총연구개발비 (1,466,668천원)	계	1.466.668	총 연 구 기 간	2018. 04. ~ 2020. 12. (2년 9월)		
	정부출연 연구개발비	880.000		총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	25
	기업부담금	586.668			내부인원	25
	연구기관부담금	0			외부인원	0
○ 연구개발 목표 및 성과						
<ul style="list-style-type: none"> - AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 2주령 육용오리에서의 면역원성 및 방어능 평가 - AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 종오리에서의 면역원성 및 방어능 평가 - 오리에 효과있는 벡터백신 개발 						
○ 연구내용 및 결과						
<ul style="list-style-type: none"> - AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 2주령 육용오리에서의 면역원성 및 방어능 평가 * 불활화 백신으로 제조하여 2주령 육용오리에 dose별(1, 1/10, 1/100)로 접종후 항체가(HI test)를 통한 면역원성 확인 * 또한, 면역원성이 확인된 육용오리에 dose별로 공격접종하여 PD50, 일자별 바이러스 배출량(OP/CL) 등을 통한 방어능 평가 - AI 항원뱅크 구축용 2종의 백신주(Clade 2.3.2.1C, Clade 2.3.4.4C) 및 신규 발생주에 대한 종오리에서의 면역원성 및 방어능 평가 * 불활화 백신으로 제조하여 종오리에 dose별(1, 1/10, 1/100)로 접종후 항체가(HI test)를 통한 면역원성 확인 * 또한, 면역원성이 확인된 종오리에 dose별로 공격접종하여 PD50, 일자별 바이러스 배출량(OP/CL) 등을 통한 방어능 평가 - 오리에 효과있는 벡터백신 개발 * 항원뱅크를 통한 사독백신 뿐만 아니라 ND 또는 APMV 바이러스를 이용하여 생독백신으로서 적용이 가능한 벡터백신을 이용한 AI 백신 개발 						
○ 연구성과 활용실적 및 계획						
<ul style="list-style-type: none"> - 구축예정 항원뱅크용 백신주의 실용오리(육용오리, 종오리)에 대한 실질적인 방어능 평가결과 확보 - 신규 발생주의 실용오리(육용오리, 종오리)에 대한 실질적인 방어능 평가결과 확보 - 오리에 효과 있는 AI용 불활화 백신 및 생독 백신 확보 						

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	318032-3		
사업구분	가축질병대응기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	AI 항원뱅크 구축용 백신주의 오리(육용오리, 종오리)에서의 효능(방어능) 평가 및 오리에 효과있는 백신 개발			과제유형	(개발)
연구기관	주식회사 카브			연구책임자	송 창 선
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2018.04~2018.12	240,000	160,000	400,000
	2차연도	2019.01~2019.12	320,000	213,334	533,334
	3차연도	2020.01~2020.12	320,000	213,334	533,334
	4차연도				
	5차연도				
	계		880,000	586,668	1,466,668
참여기업	씨티씨백				
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021.02.15

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
주식회사 카브	대표이사	송 창 선

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	---

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제를 통해 수행된 항원뱅크 백신주의 오리에서의 효능 평가는 국내 AI 방역 정책 수립에 필수적인 정보를 제공하며, 개발된 백터 백신은 기존 사독 백신 플랫폼이 아닌 집단 백신 접종이 가능한 새로운 형태의 백신 플랫폼을 제공한다는 점에서 우수성과 창의성을 가진다고 판단됨.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제를 통해 얻어진 효능평가 결과와 백터 백신의 개발은 다양한 형태의 학술자료와 지적재산권 확보로 이어질 것이며, 이러한 결과를 바탕으로 한 국내외 기업으로의 기술이전을 통해 국내 백신 산업 기술의 고도화를 이룰 수 있을 것임.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

국내 방역 정책의 유연성 확보를 위한 오리용 고병원성 조류인플루엔자 항원뱅크주 확립에 기여할 수 있으며, 향후 지속적으로 유입될 신규 발생주에 대한 신속한 대응이 가능해짐. 개발된 백터 백신 기술은 고병원성 조류인플루엔자 뿐만이 아니라 다양한 가금 질병에 대한 백신 개발에도 적용될 수 있어 활용 가능성이 높음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

코로나 19로 인해 일부 연구활동에 제약이 존재하였으나, 본 과제의 목표를 달성하기 위해 성실히 노력하고 수행해 왔다고 사료됨.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지식소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제의 수행을 통해 현재까지 특허 출원 1건 및 기술이전 2건(1억원) 성과를 달성하였으며, 국내외 학술대회를 통해 연구성과를 발표하였음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
특허 출원 (2건)	20	100	달성 완료
특허 등록 (1건)	20	0	진행 중
기술 이전 (2건)	20	100	달성 완료
기술료 (100백만원)	20	100	달성 완료
학술 발표 (5건)	10	100	달성 완료
인력양성 (2건)	0	100	달성 완료
정책활용 (2건)	10	100	달성 완료
합계	80점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 과제의 수행을 통해 확보된 항원뱅크 백신주의 오리에서의 효능 평가 결과는 향후 국내 AI 방역 정책 수립 시 주요 근거로 활용될 수 있을 것으로 기대되며, 본 과제에서 개발한 오리 유래 ND 바이러스 이용 벡터 백신은 국내 가금 산업에 새로운 생독 백신 플랫폼을 제공한다는 점에서 의의가 있음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

특허 등록 및 논문 등 일부 미진한 연구성과의 경우, 현재 계획 중인 실험 종료 후 사업 종료 1차년도 내에 완료할 예정이며, 정책활용 건은 현재 소관부처로부터 건의에 대한 결과를 기다리고 있음을 고려해주실 것을 요청드립니다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 과제를 통해 확보된 연구 성과는 국내 방역정책 유연성 확보를 위한 오리용 고병원성 조류인플루엔자 백신의 긴급방역 백신으로의 활용 가능성을 제시하고 있으며, 이를 통해 국내 유입이 예상되는 발생주를 미리 상비한다는 항원뱅크 구축 정책의 근거자료로 사용될 수 있음.

또한 본 과제를 통해 개발된 벡터 백신의 경우 개체별 백신 접종이 필요한 사독백신의 단점을 극복한 mass vaccination이 가능한 생독 백신이라는 점에서 의의를 가지며, 향후 다양한 가금 질병에 대한 백신으로 확장 가능한 플랫폼이라는 이점을 가짐.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	가축질병대응기술개발	
연구과제명	AI 항원뱅크 구축용 백신주의 오리(육용오리, 종오리)에서의 효능(방어능) 평가 및 오리에 효과있는 백신 개발			
주관연구기관	주식회사 카브	주관연구책임자	송 창 선	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	880,000	586,668		1,466,668
연구개발기간	2018.04 ~ 2020.12			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input checked="" type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
2주령 육용오리에서의 면역원성 평가	연구 목표 달성
2주령 육용오리에서의 방어능 평가	연구 목표 달성
오리 유래 ND 분리주 역유전학 바이러스 제작	연구 목표 달성
AI HA 유전자 삽입 ND 바이러스 (ND+AI HA 벡터백신주) 제작	연구 목표 달성
종오리에서의 면역원성 평가	연구 목표 달성
종오리에서의 방어능 평가	연구 목표 달성
오리 유래 ND 분리 바이러스 주와 역유전학 제작 바이러스, ND+AI 벡터 백신주의 종란에서의 증식성 비교평가	연구 목표 달성
오리 유래 ND 분리 바이러스 주와 역유전학 제작 바이러스, ND+AI 벡터 백신주의 종란 내 병원성, 병아리 병원성 비교	연구 목표 달성
신규 발생주에 대한 육용오리에서의 면역원성 및 방어능 평가	과제 종료 1달 전 신규 발생주 확인으로 현재 시험 진행 예정
역유전학 제작 ND+AI 벡터 백신의 2주령 오리에서의 면역원성 및 방어능 평가	BL3 시설 일정 관계로 방어능 평가 미비
cytokine, IRES 시스템 등을 이용한 ND+AI 벡터 백신 개량주 개발	연구 목표 달성
ND+AI 벡터 백신 개량주 면역원성 (HI test) 평가	연구 목표 달성

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	20	20		20	20									10			10			
최종목표	2	1		2	10 0									5		2	2			
연구기간내 달성실적	2	0		2	10 0									5		2	2			
달성율(%)	10 0	0		10 0	10 0									10 0		10 0	10 0			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	오리에서 고병원성 인플루엔자 백신의 효능 평가법 확립
②	오리 유래 뉴캐슬병 바이러스를 이용한 백신 제조 방법 확립
③	
·	
·	
·	

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		V							V	
②의 기술	V					V				
③의 기술										
·										
·										

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	본 과제를 통해 확보된 연구 성과는 국내 방역정책 유연성 확보를 위한 오리용 고병원성 조류인플루엔자 백신의 긴급방역 백신으로의 활용 가능성을 제시하고 있으며, 이를 통해 국내 유입이 예상되는 발생주를 미리 상비한다는 항원뱅크 구축 정책의 근거자료로 사용될 수 있음.
②의 기술	또한 본 과제를 통해 개발된 벡터 백신의 경우 개체별 백신 접종이 필요한 사독백신의 단점을 극복한 mass vaccination이 가능한 생독 백신이라는 점에서 의의를 가지며, 향후 다양한 가금 질병에 대한 백신으로 확장 가능한 플랫폼이라는 이점을 가짐.
③의 기술	
:	

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	2	2		2	10/0	1	10/0	10/0			2	1	5	5	2	2			
연구기간내 달성실적	2			2	10/0									5	2	2			
연구종료후 성과창출 계획		2				1	10/0	10/0			2	1	5						

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	신규한 재조합 뉴캐슬바이러스벡터를 포함하는 백신 조성물		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	100,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(노하우 기술이전)		
이전소요기간	2021.2.22- 2021.03.22	실용화예상시기 ³⁾	미정
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	없음		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술 개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.