

최 종 보 고 서

<p>(뒷면)</p> <div style="border: 1px solid black; width: fit-content; margin: 10px auto; padding: 2px 5px;"> <p style="text-align: center;">주 의 (편집순서 8)</p> </div> <p style="text-align: center; margin-top: 20px;">(15 포인트 고딕체열)</p> <div style="text-align: center;"> <p>↑ 6cm ↓</p> </div>	<p>1 1 1 1 0 4 / 1</p> <p>면역증강물질 (SoltoB)</p> <p>의</p> <p>구제역에</p> <p>대한</p> <p>임상실험</p> <p>검증</p> <p>농림수산식품부</p>	<p style="text-align: right;">(앞면)</p> <p>보안과제(), 일반과제(O) 과제번호 111104-1</p> <div style="border: 1px solid black; width: fit-content; margin: 10px auto; padding: 5px;"> <p style="text-align: center; margin-bottom: 5px;">발 간 등 록 번 호</p> <p style="text-align: center;">11-1541000-001598-01</p> </div> <p style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.2em;">면역증강물질 (SoltoB) 의 구제역에 대한 임상실험 검증</p> <p style="text-align: center;">(Field and clinical evaluation of an immunostimulator (SoltoB) to foot-and-mouth disease)</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.2em; margin-top: 20px;">서 울 대 학 교</p> <div style="text-align: center; margin: 10px 0;"> <p>↑ 9cm ↓</p> </div> <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">농 립 수 산 식 품 부</p> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> <p>↑ 4cm ↓</p> </div>
---	---	--

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “면역증강물질 (SoltoB) 의 구제역에 대한 임상실험 검증” 과제의 보고서로 제출합니다.

제 1 세부과제 : 소에서 구제역 예방을 위한 SoltoB 의 야외 검증 실험

제 1 협동과제 : 돼지에서 SoltoB 급여가 FMDV 백신의 효과에 미치는 영향

2012 년 10 월 24 일

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 유한상

연구원 : 정명환

연구원 : 차승빈

연구원 : 신승원

연구원 : 신민경

농림수산검역검사본부 : 김병한

제 1 협동연구기관명 : 전남대학교

제 1 협동연구책임자 : 이봉주

연구원 : 정복기

연구원 : 이진아

연구원 : 조우진

연구원 : 문성규

참여기업 : 서봉바이오베스텍

대표이사 : 정연권

연구원 : 이창기

요 약 문

I. 제 목

면역증강물질 (SoltoB) 의 구제역에 대한 임상실험 검증

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 사료 첨가제로 사용되고 있는 SoltoB는 다양한 실험을 통하여 면역증강기능들이 밝혀졌고, 또한 국내 구제역 발생 시 SoltoB를 급여한 농가에서 그 효과에 대하여 사례를 밝히고 있으나, 소와 돼지에서 이 물질의 면역계, 즉 자연 면역 및 획득 면역에 작용하는 기전에 대하여 과학적인 연구가 없어서 이 물질의 사용 확대 및 수출 확대 등에 걸림돌이 되어 왔다. 특히 이번 구제역 사태로 이러한 문제점을 해결하여야 하는 필요성이 강력하게 대두되었다. 이에 본 연구에서는 SoltoB 급여가 소와 돼지의 면역계에 미치는 영향 즉, 자연 면역 증강, 백신 접종 효과 증대 등에 대한 실험적 결과와 문헌고찰을 바탕으로 구제역 바이러스에 대한 방어 가능성, 구제역 백신 접종에 따른 항체 형성능 등에 대한 과학적 검토 및 구제역 발생 시 효과를 증명한 농가들의 역학적 연구를 통하여 이 비특이 면역증강물질, SoltoB 의 구제역에 대한 효능을 과학적으로 증명하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 소에서 SoltoB 급여에 따른 구제역 예방백신의 효과 분석

- 가. 항체 생성 초기 반응 비교 (백신 접종 후 항체가 출현 시기 비교)
- 나. 항체 class switching 시기 비교 (IgM, IgG)
- 다. 항체 유지 기간 및 항체 생성능 측정
- 라. 점막 면역 반응 측정
- 마. 2010-2011 안동주에 대한 중화항체가 측정

2. 소에서 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 특성 및 면역 세포의 분포변화분석

- 가. SoltoB 급여에 따른 말초 혈액 내 림프구의 비율 분석
- 나. SoltoB 급여에 따른 소의 혈액조성 변화 분석
- 다. SoltoB 급여에 따른 상대적 cytokines 발현 정도 분석
- 라. SoltoB 급여에 따른 림프구 증식능 분석
- 마. SoltoB 급여에 따른 혈청 대식세포 활성화도 분석

3. 2010-2011 구제역 발생 시 SoltoB 급여에 따른 소 농장의 경험 사례 분석

- 가. 구제역 발생 지역에서의 SoltoB 급여에 따른 구제역 방어 효과 사례 발굴
- 나. 발굴 사례의 역학적 분석
- 다. 야외 농장에서의 SoltoB 효과의 종합적 분석

4. 돼지에서 구제역 백신 항체 형성에 SoltoB의 효과

- 가. 구제역 백신 접종 후 항체가 출현 시기 비교 (IgM, IgG, IgA)
- 나. 야외 농장에서 구제역 백신 접종 후 항체 출현을 비교
- 다. 백신 접종 후 항체가 수준 비교 (IgM, IgG, IgA)
- 라. 백신 접종 후 항체 class switching 시기 비교

5. 돼지에서 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 및 면역 세포의 영향분석

- 가. 구제역 백신 접종 및 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 변화 비교
- 나. SoltoB 급여에 따른 면역 세포의 변화 비교
- 다. SoltoB 급여에 따른 면역 세포의 cytokine 생성능 비교
- 라. SoltoB 급여에 따른 면역 세포의 활성화도 비교

6. 2010-2011 구제역 발생 시 돼지 농장에서 SoltoB 급여에 따른 예방 사례 분석

- 가. 구제역 발생 지역에서의 SoltoB 급여에 따른 구제역 방어 효과 사례 발굴
- 나. 발굴 사례의 역학적 분석

다. 야외 농장에서의 SoltoB 효과의 종합적 분석

7. 구제역 바이러스 공격 접종을 통한 SoltoB 급여에 따른 구제역 예방백신 효과 분석 (미니돼지)

가. 공격 접종 후 임상증상 분석

나. 공격 접종 후 혈중 항체가 변화 및 cytokines 분석

다. 공격 접종 후 면역 세포의 활성화도 비교 분석

IV. 연구개발결과

1. 소에서 SoltoB 급여에 따른 구제역 예방백신의 효과 분석

SoltoB 급여군에서 비급여군에 비해 빠른 IgM과 IgA의 출현을 확인하였으며, 항체 class switching 시기에 높은 IgM과 IgG 항체가를 확인하였다. 또한 추가 백신 접종이 필요한 2차 백신 접종 후 6개월째 때에는 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 높은 항체가를 유지함을 확인하였다. 또한 1차 백신 접종 후 20주 및 30주에 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 높은 수준의 안동주에 대한 중화항체가를 보임을 확인하였다.

2. 소에서 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 특성 및 면역 세포의 분포변화분석

SoltoB 급여군에서 비급여군에 비해 높은 CD8+, MHC II lymphocytes의 발현이 확인되었으며, 비급여군에 비해 증가된 대식세포의 활성화도, B lymphocytes 증식능, T lymphocytes 증식능이 확인되었다. 또한 SoltoB 급여군의 말초 혈액 면역 세포에서 비급여군에 비해 높은 cytokines (IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β)의 발현을 확인하였다.

3. 2010-2011 구제역 발생 시 SoltoB 급여에 따른 소 농장의 경험 사례 분석

전국의 소 농장을 대상으로 한 설문 조사를 통해 2010년 11월의 구제역 파동 때, SoltoB 급여 농장에서 구제역 발병 사례가 적었고, 이러한 사례가 통계적으로도 유의성이 있음을 확인하였다 ($p < 0.05$).

4. 돼지에서 구제역 백신 항체형성에 SoltoB의 효과

SoltoB 급여군에서 IgG 항체 생성능 및 IgG 항체 생성율의 증가를 확인하였으며, SoltoB 급여군에서 면역 초기 반응인 IgM 항체의 생성능이 증가하였음을 확인하였다. 또한 농장 단위에서 SoltoB 급여 적용 실험에서도 SoltoB 급여군에서의 IgG 항체가 및 IgG 항체 생성율의 증가를 확인하였다.

5. 돼지에서 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 및 면역 세포의 영향분석

SoltoB 급여군에서의 혈중 IFN- γ level의 증가를 확인하였다.

6. 2010-2011 구제역 발생 시 돼지 농장에서 SoltoB 급여에 따른 예방 사례 분석

SoltoB 급여 농장이 비급여 농장에 비해 낮은 구제역 발생률을 보임을 확인하였다.

7. 구제역 바이러스 공격 접종을 통한 SoltoB 급여에 따른 구제역 예방백신 효과 분석 (미니돼지)

미니돼지를 이용한 구제역 공격 접종 실험에서 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 낮은 구제역 비구조 단백질 (non-structure protein, NSP) 에 대한 항체가를 보였으며, 높은 혈중 IL-8 농도를 보였다. 또한 공격 접종을 실시한 미니돼지의 말초 면역 세포에서 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 높은 IL-8의 생성능과 증식능을 보였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 비특이 면역증강물질 (SoltoB)의 숙주동물 면역계에 작용기전을 밝힘으로써, 구제역 등 악성 가축전염병에 대한 효과의 과학적 근거를 확립.
2. 비특이 면역증강물질의 평가기법 확립을 통한 다양한 물질의 면역학적 평가 기준 및 효과의 과학적 분석 기법 확립.
3. 구제역 예방백신 접종에 대한 SoltoB 급여 효과 규명을 바탕으로 한 구제역 발생 차단으로 국내 축산업의 안정화를 추구할 수 있음.
4. 구제역 등 악성 가축전염병의 발생 차단으로 국내 축산 농가에게 경제적 이익 증대
5. SoltoB 에 대한 구제역 예방에 대한 과학적 근거를 확립하여 더 많은 국가에 더 많은 양을 수출하여 국가 경제 공헌 할 수 있음.

SUMMARY

I. Title

Field and clinical evaluation of an immunostimulator (SoltoB) to foot-and-mouth disease

II. Objectives and Requirements of Research and Development

It has been well known that SoltoB has a immunostimulating effect, and also reported that many local farm using SoltoB could endure against foot-and-mouth disease (FMD) in Korea. Therefore, feeding with SoltoB as a supplement could possibly enhance the protective ability against FMD virus (FMDV). However, the effects of SoltoB on adaptive immunity against FMDV has not been explored yet. Thus, the aim of this study was to investigate the effects of SoltoB on the possibility of its protective ability against FMDV and boosting effect of antibody production after FMDV vaccination.

III. Research coverage and scopes

1. Effects of SoltoB on antibody production in cows after FMDV vaccination

- A. Comparison of antibody production point after FMDV vaccination (IgM, IgG, IgA)
- B. Comparison of antibody class switching point after FMDV vaccination
- C. Comparison of antibody productive level and duration of immunity
- D. Comparison of mucosal immunity
- E. Comparison of neutralizing antibody titer against Andong strain

2. Effects of SoltoB on hematological and immunological changes in cows

- A. Effects of SoltoB on lymphocytes subpopulation

- B. Effects of SoltoB on hematological changes
- C. Effects of SoltoB on relative cytokines expression level
- D. Effects of SoltoB on lymphocytes proliferation level
- E. Effects of SoltoB on macrophage activity

3. Analysis of prevention cases of FMDV in local cow farms using SoltoB

- A. Analysis of prevention cases at outbreak of FMDV in local cow farms using SoltoB
- B. Epidemiological analysis of prevention cases of FMDV
- C. Analysis of effects of SoltoB in field

4. Effects of SoltoB on antibody production in pigs after FMDV vaccination

- A. Comparison of antibody production point after FMDV vaccination (IgM, IgG, IgA)
- B. Comparison of antibody production rate after FMDV vaccination in field
- C. Comparison of antibody level after FMDV vaccination (IgM, IgG, IgA)
- D. Comparison of antibody class switching point after FMDV vaccination

5. Effects of SoltoB on hematological and immunological changes in pigs

- A. Effects of SoltoB on hematological changes after FMDV vaccination
- B. Effects of SoltoB on lymphocytes subpopulation
- C. Effects of SoltoB on relative cytokine expression level
- D. Effects of SoltoB on lymphocytes proliferation level

6. Analysis of prevention cases of FMDV in local pig farms using SoltoB

- A. Analysis of prevention case at outbreak of FMDV in local pig farms using SoltoB
- B. Epidemiological analysis of prevention cases of FMDV
- C. Analysis of effects of SoltoB in field

7. Analysis of effects of SoltoB on FMD vaccine using mini pig FMD challenge

- A. Analysis of clinical signs after FMD challenge
- B. Analysis of changes of immunoglobulins and cytokines in serum after FMD challenge
- C. Analysis of activities of immune cells after FMD challenge

IV. Results of Research and Development

1. Effects of SoltoB on antibody production in cows after FMDV vaccination

SoltoB supplemented group showed rapid IgM and IgA productive responses to FMD vaccine. The higher IgM and IgG titers than control group were observed in the SoltoB supplemented. The SoltoB supplemented group also has high level of antibody titer compared with the control in six months later after boosting vaccination, when the second boosting vaccination was required. In addition, the high level of neutralizing antibody titers against Andong strain were observed in SoltoB supplemented group compared the control at 20 and 30 weeks later after 1st vaccination.

2. Effects of SoltoB on hematological and immunological changes in cows

The SoltoB supplemented group showed high expression of CD8+ and MHC II on lymphocytes compared with the control. The higher level of macrophage, B lymphocytes proliferation, and T lymphocytes proliferation activities than the control group were observed in the SoltoB supplemented. The high cytokines (IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β) expression level was also observed in the SoltoB supplemented group compared with the control.

3. Analysis of prevention cases of FMDV in local cow farms using SoltoB

In a survey of cow farms located in Korea, low frequency of FMD onset was

observed in farms that use SoltoB as feed supplement, showing significant difference ($p < 0.05$).

4. Effects of SoltoB on antibody production in pigs after FMDV vaccination

The IgG antibody production level and rate increased significantly in the SoltoB supplemented group compared with the control and the same results were confirmed in local pig farms. The IgM antibody, the first reaction of antibody production of immune system, increased significantly in SoltoB supplemented group compared with control.

5. Effects of SoltoB on hematological and immunological changes in pigs

IFN- γ level increase significantly in SoltoB supplemented group compared with control.

6. Analysis of prevention case of FMDV in local pig farm using SoltoB

Outbreak of FMD decrease in local pig farm using SoltoB as feed supplement

7. Analysis of effects of SoltoB on FMD vaccine using mini pig FMD challenge

The low antibody titers against non-structure protein (NSP) of FMDV and high serum cytokine of IL-8 concentration were observed in the SoltoB supplemented group compared with the control. The peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultured from SoltoB supplemented group showed higher proliferation and IL-8 production activities than the control.

V. Application of Developed Techniques

1. Establishment of scientific basis of the effects of SoltoB on domestic animal infectious diseases such as FMD by measurement of the mechanisms of SoltoB supplement on host immune system.
2. Establishment of immunological valuation basis by development of potential tool for assessment of non-specific immunostimulators effects
3. Achievement of stability of livestock industry by establishment of effects of SoltoB on FMD vaccination
4. Increasement of profit of domestic stock farmer by prevention of domestic animal infectious diseases such as FMD
5. Increasement of SoltoB exportation induced by scientific establishment of effects of SoltoB on FMD vaccination

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	16
Part 1. Objective and requirements of research and development	16
Part 2. Research coverage and scopes	21
1. Effects of SoltoB on antibody production in cows after FMDV vaccination....	21
2. Effects of SoltoB on hematological and immunological changes in cows	21
3. Analysis of prevention cases of FMDV in local cow farms using SoltoB	21
4. Effects of SoltoB on antibody production in pigs after FMDV vaccination ...	21
5. Effects of SoltoB on hematological and immunological changes in pigs	22
6. Analysis of prevention cases of FMDV in local pig farms using SoltoB	22
7. Analysis of effects of SoltoB on FMD vaccine using mini pig FMDV challenge.	22
Chapter 2. Present status of the technical development	23
Part 1. Status of the technical development abroad	23
Part 2. Status of the technical development in Korea	23
Chapter 3. Materials, methods, and results	25
Part 1. Field and clinical evaluation of SoltoB to FMD in cows	25
1. Purposes of study	25
2. Effects of SoltoB on antibody production in cows after FMDV vaccination	25
3. Effects of SoltoB on hematological and immunological changes in cows	30
4. Analysis of prevention cases of FMDV in local cow farms using SoltoB	36
Part 2. Effects of SoltoB on FMDV vaccination in pigs	64
1. Purposes of study	64
2. Effects of SoltoB on antibody production in pigs after FMDV vaccination ...	64
3. Effects of SoltoB on antibody production ability and rate in field pig farms after FMDV vaccination	66
4. Comparison of early antibody production response after FMDV vaccination ...	67
5. Effects of SoltoB on hematological and immunological changes in pigs	68

6. Analysis of prevention cases of FMDV in local pig farms using SoltoB	70
Part 3. Analysis of effects of SoltoB on FMD vaccine using mini pig FMDV challenge	94
1. Purposes of study	94
2. Experiment design	94
3. Comparison of clinical signs after FMDV challenge	96
4. Comparison of immunological differences in serum after FMDV challenge	97
5. Comparison of responses of immune cells cultured from peripheral blood after FMDV challenge	99
Part 4. Discussion	113
1. Effects of SoltoB administration on FMDV vaccine and scientific demonstration of immunostimulating effects of SoltoB in cows	114
2. Effects of SoltoB administration on FMDV vaccine and scientific demonstration of immunostimulating effects of SoltoB in pigs	116
3. Effects of SoltoB on FMDV vaccine protection against FMDV challenge	118
4. Conclusions	119
Chapter 4. Achievements and contributions of research and development	121
Chapter 5. Application of research and development	122
Part 1. Products of research and development	122
Part 2. Application plans of research and development	122
1. Academic views	122
2. Social and economical views	123
Chapter 6. International scientific and technical reference materials	125
Part 1. Immunity induced by FMD virus and FMD vaccine	125
Part 2. Methods of FMD challenge	125
Chapter 7. List of registered research equipments	126
Chapter 8. References	127

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	16
제 1 절 연구개발의 필요성과 목적	16
제 2 절 연구 개발의 범위	21
1. 소에서 SoltoB 급여에 따른 구제역 예방백신의 효과 분석	21
2. 소에서 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 특성 및 면역세포의 분포변화분석 ...	21
3. 2010-2011 구제역 발생시 SoltoB 급여에 따른 소 농장의 경험 사례 분석....	21
4. 돼지에서 구제역 백신 항체형성에 SoltoB의 효과	21
5. 돼지에서 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 및 면역 세포의 영향분석	22
6. 2010-2011 구제역 발생 시 돼지 농장에서 SoltoB 급여에 따른 예방 사례 분석	22
7. 구제역 바이러스 공격접종을 통한 SoltoB 급여에 따른 구제역 예방백신 효과 분석(미니돼지)	22
제 2 장 국내외 기술개발 현황	23
제 1 절 국외 기술개발 현황	23
제 2 절 국내 기술개발 현황	23
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	25
제 1 절 소에서 구제역 예방을 위한 SoltoB의 야외 검증 실험	25
1. 연구 목표	25
2. 소에서 구제역 백신 항체 형성에 SoltoB의 효과	25
3. 소에서 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 및 면역세포의 영향 분석	30
4. 2010-2011 구제역 발생지역에서 SoltoB 급여에 의한 방어효과 분석	36
제 2 절 돼지에서 SoltoB 급여가 FMDV 백신의 효과에 미치는 영향	64
1. 연구 목표	64
2. 돼지에서 구제역 백신 항체형성에 SoltoB의 효과	64
3. 야외 농장에서의 항체 생성능 및 항체 생성을 비교	66
4. 항체 생성 초기 반응 비교	67
5. 돼지에서 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 및 면역 세포의 영향분석	68

6. 2010-2011 구제역 발생 시 돼지 농장에서 SoltoB 급여에 따른 예방 사례 분석	70
제 3 절 SoltoB 급여가 FMDV 백신의 효과에 미치는 영향 평가 (공격접종)	94
1. 연구목표	94
2. 실험 설계	94
3. 공격접종 후 임상증상 비교 분석	96
4. 공격접종 후 혈청 내 면역학적 변화	97
5. 공격접종 후 말초혈액 면역세포의 면역반응 비교 분석	99
제 4 절 고찰	113
1. 소에서 구제역 백신에 SoltoB 급여가 미치는 영향과 면역증강의 과학적 입증....	114
2. 돼지에서 구제역 백신에 SoltoB 급여가 미치는 영향과 면역증강의 과학적 입증....	116
3. SoltoB 급여가 구제역 백신의 방어능에 미치는 영향 (미니돼지 구제역 공격접종 실험)	118
4. 결론	119
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	121
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	122
제 1 절 연구개발 성과	122
제 2 절 성과활용 계획	122
1. 학술적 측면	122
2. 사회, 경제적 측면	123
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	125
제 1 절 FMD 감염과 FMD vaccine에 의한 FMD 면역 획득	125
제 2 절 구제역 공격접종 방법	125
제 7 장 연구시설·장비 현황	126
제 8 장 참고문헌	127

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성과 목적

구제역 (Foot-and-mouth disease, 口蹄疫)은 우제류 동물에 Picornaviridae 과 Aphthovirus 속에 속하는 구제역 바이러스 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV)가 감염되어 발생하는 질병이다. FMDV는 넓은 숙주영역, 높은 전염력, 매우 빠른 복제효율을 특징으로 하며, 직·간접 접촉전파, 공기전파 등의 다양한 경로로 전파된다. 특히 반추동물에서는 무증상으로 지속감염의 원인이 될 수 있어서 근절이 매우 어려운 질병이다. 구제역은 다른 국가 등 먼 거리로 확산될만한 충분한 요소를 갖추고 있어, 이러한 특성으로 인해 가축과 축산 가공품의 국제무역에서 가장 큰 걸림돌이 되어 왔다. 이러한 구제역의 근절을 위해 전 세계적으로 많은 노력을 하였음에도 불구하고 우리나라를 포함한 세계 여러 나라에서 많은 문제를 유발하고 있다. 우리나라의 경우 지난 2010-2011년에 구제역이 전국을 휩쓸면서 약 6,000여 농가에서 우제류 약 340만 두를 살처분 매몰하였다. 이를 위해 공무원, 민간인, 군인 등 연 인원 약 160만 명이 동원되었으며, 직접적인 경제적 피해만 약 5조원에 이르고 간접적인 경제적 피해를 포함하면, 직접적 피해에 약 10배 정도 될 것으로 추정된다. 또한 살처분 가축의 매몰에 따른 매몰지의 환경오염 문제는 이보다 더 심각할 것으로 추정된다.

구제역의 근절을 위한 노력은 국가 또는 지역에 따라서 구제역의 발생상황 (Endemic, Semi-endemic, Disease-free), 구제역 발생 동물 등 다양한 요소를 반영하여 그 정책을 시행하여야 왔다. 즉, 발생 상황에 따라서, 예방적인 백신 접종, 긴급 백신 접종, 살처분 등의 정책 중 가장 적절한 방법을 선택하여 적용하여왔다. 우리나라도 2010-2011년 구제역 파동 이후 살처분 매몰과 함께 전국적인 긴급 백신 접종을 실시하여 구제역 발생 기간 동안 소는 약 340만 두, 돼지는 약 830만 두에 대하여 2차 백신 접종을 실시하였고, 2012년 현재까지 백신 접종을 의무적으로 실시하고 있다. 그러나 백신 접종을 실시하더라도 많은 구제역 방역에 많은 문제점이 남아 있어 이를 해결할 필요성이 대두되고 있다. 첫째, 현재까지 개발된 가장 좋은 백신의 경우도 접종 4-5 일후, 일반적으로는 2 주일 후에 백신에 대한 항체가 형성된다. 그러나 구제역은 질병의 경과 및 전파의 속도가 매우 빠르게 진행됨으로 지난 2010-2011 구제역 발생 사례와 같이 구제역에 대한 방어항체가 형성되기 전에 질병이 계속적으로 전파되

고 발생할 수 있다. 둘째, 백신 접종 후 항체 형성기간에 구제역바이러스에 감염된 개체들은 carrier 상태로 되어 다른 개체에 바이러스를 전파할 수 있는 감염원이 될 수 있기 때문에 이를 차단할 수 있는 자연 면역의 증강이 절실히 요구된다. 셋째, 구제역바이러스는 7종의 혈청형과 80여종의 혈청아형을 가지고 있어서, 현재 백신으로는 매우 적은 범위의 혈청형만을 방어할 수 있어 백신 접종 후 다른 혈청형이 침입하게 되면 방어할 수 없다. 넷째, 현재 개발되어 사용되고 있는 구제역 백신의 최고 효능이 소에 약 80%, 돼지에서는 65-70% 수준임을 감안하면 백신 접종 후에도 구제역 발생에 대한 위험성은 상재한다고 볼 수 있다. 즉 현재 실시하고 있는 구제역 백신 정책만으로는 구제역에 대한 완벽한 차단방역을 이루기 어렵고, 이러한 문제점을 극복하기 위한 방법 중 하나로 비특이면역 (자연 면역)을 증강시켜 구제역에 대한 저항성 증가와 구제역 백신의 효율 증대를 유도하는 것이다. 이러한 자연 면역은 다양한 종류의 비특이 면역증강제로 증강시킬 수 있을 뿐만 아니라, 구제역에 특이적인 획득면역 (specific adaptive immunity) 을 효율적으로 유도하는데도 매우 중요한 작용을 한다.

구제역 바이러스의 감염 또는 구제역 예방백신 접종에 따른 숙주동물의 면역반응은 선천성면역 (innate immunity), 체액성면역 (humoral immunity) 및 세포성 면역 (cellular immunity) 으로 구분할 수 있다 (그림 1). 선천성면역에 관여하는 면역 세포들은 다양하며 macrophage, dendritic cells, lymphocytes, 특히 자연살해 세포 [natural killer (NK) cells], Lymphokine-Activated Killer (LAK) cells 들이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 면역 세포들은 IFN- γ , type I IFN 등 cytokine 의 생성을 통해서 T-lymphocytes와 B-lymphocytes의 활성화를 유도하고, 이를 통해 specific adaptive immune response를 유도하게 된다. 이러한 면역은 proinflammatory cytokines의 생성과 이동성 (migratory) 및 주화성 (chemotactic activity)의 증가에 의하여 유도되고, IFN- α , 와 IFN- γ 들도 innate immunity의 증진에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 cytokines는 항바이러스효과와 함께 NK cell, macrophages 의 활성도를 증가시킴으로써 구제역 바이러스가 숙주동물의 체내에서 증식 (replication) 이나 전이 (spread) 되는 것을 억제하여, 감염초기에 구제역의 방제에 매우 중요한 역할을 한다. 무엇보다도 구제역은 전파속도가 매우 빠른 질병이므로 구제역 발생 시 긴급 백신을 접종하더라도 방어항체가 형성되는 기간 동안에 방어를 할 수 있는 면역능, 특히 자연 면역 (innate immunity)의 증진이 필요하다. 구제역에 대한 체액성 면역 (humoral immunity)은 monocytes, macrophages, dendritic cells들이 antigen presenting cells (APCs)의 활성화로부터 형성되며, 특히 dendritic cell 이 B 세포에 항원을 제시하여 줌으로써 시작된다. 구제역에 대한 체액성 면역은 숙주에서 재감염에 대한 효과적인 방어를 유도할 수 있고, 백신 접종에 의한 주요 방어능은 체액성 면역을 통해서 이루어진다.

체액성 면역에서 항체의 중요한 역할 중 하나는 항원 및 항체의 면역복합체를 탐식작용에 의하여 구제역 바이러스의 감염력을 떨어뜨리게 하는 것이다. Macrophages는 감염 또는 긴급 백신 접종 시 4 일 이내 탐식세포의 활성화가 이루어지며 초기 면역반응에 중요하며 특이한 항체 없이 작용한다. 특히 항체가 형성되면 상호작용에 의하여 더욱 탐식작용이 활성화 된다. 바이러스 감염 또는 백신 접종 후에 3-4 일후 IgM이 생성되고 1-14일에 최대가 되며 그 이후 감소한다. 주요 중화항체인 IgG는 면역 4-7일에 형성되어 2주후에 최대로 생성된다. 일반적으로 IgG1은 IgG2 보다 그 역가가 더 높게 나타난다. B 세포의 면역의 활성화는 세포표면의 Ig like receptor와 T helper (Th) 세포에 대한 표면 사이토카인 수용체 (cytokine receptor)의 상호작용과, B 및 Th 세포의 물리적인 결합으로 작용되며, T-B 세포의 상호작용으로 IgM 이 IgG 로 변환된다. 구제역의 세포성 면역은 감염이나 백신 접종 시에 나타난다. 숙주동물이 같은 항원에 대하여 같은 항체역가를 가진 동물에서 MHC 분자의 다형성으로 동물간의 저항성이 다를 수 있으며, 이는 세포성 면역이 매우 중요한 역할을 한다. 소와 돼지에서 B 세포의 활성화와 항체생산은 주로 T 세포 (대부분 CD4+)와 관련이 있다. Th 세포는 주로 외피단백과 비구조 단백질을 인식하여 바이러스에 대한 방어면역과 항체생산에 중요한 역할을 한다. Th 세포는 항체생산을 위하여 항원에 의해 자극된 B 세포와 effector 세포로 cytotoxic T 세포의 작업의 진행과정에서 필수적인 요소이다. Effector 세포의 면역은 항체/바이러스 복합체를 제거하기 위하여 탐식작용에 관여, 항체 친화성 및 항체 농도들과 관련이 있다.

상기에 언급한 구제역에 대한 면역반응 중, 비특이 면역증강물질은 숙주의 자연 면역을 활성화하여 외부로부터 침입하는 다양한 병원균을 방어할 수 있도록 해 줄 뿐만 아니라 숙주에서의 체액성 및 세포성 면역을 증강 시켜주는 역할을 해 면역반응에서 매우 중요한 역할을 차지하고 있다. 이러한 이유로 비특이 즉 자연 면역력을 증강시키는 면역증강제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 면역증강물질중 하나로 SoltoB [Aluminosilicates (Al_2SiO_5)]가 비특이 면역 유도, 촉매제, ion exchangers, 흡착력 등의 효과로 인해 다양한 분야에서 연구되고 적용되어 왔다. SoltoB는 주성분인 aluminosilicate 외에 칼륨 (potassium), 마그네슘 (magnesium), 알루미늄 (aluminum), 규산염 (silicate)로 이루어진 격자 규산염 (phyllosilicate) 물질로, 돼지와 송아지에서 호흡기 및 소화기질병의 발생감소, 비육돈에서의 소화분해능 증가, 면역반응의 증진 등에 대하여 다양한 연구 보고가 있다. 또한 SoltoB는 superantigen과 유사한 비특이 면역증강물질로 알려져 있어, 세포성면역에 가장 중요한 역할을 하는 T 세포 의 활성화, 구조적적합성 물질 class II (Major histocompatibility complex class II molecules) 에 매우 높은 친화력을 가질 뿐만 아니라, reactive oxygen 생성에 의

한 탐식작용의 증진, interleukin IL-1 α , IL-6, TNF- α 와 같은 proinflammatory cytokines 생성 유도로 숙주동물의 면역체계를 활성화는 물질임이 많은 연구를 통해서 밝혀졌다.

하지만 다양한 실험을 통해 면역증강 기능이 연구되어온 사료 첨가제로 사용되는 SoltoB에 대한 소와 돼지에서의 면역 획득 및 증강 기전에 대해서는 과학적인 연구가 전무한 상태이다. 또한 국내구제역 발생시 SoltoB를 급여한 농가에서 그 효과에 대한 사례를 밝히고 있으나 SoltoB가 구제역 방어와 백신의 면역작용에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서 과학적 근거가 연구되지 않고 있어 이 물질의 사용 확대 및 수출 확대 등에 걸림돌이 되어 왔다. 이에 본 연구에서는 SoltoB 급여가 소와 돼지의 면역계에 미치는 영향 즉, 자연 면역 증강, 백신 접종 효과 증대 등에 대한 실험적 결과와 문헌고찰을 바탕으로 구제역 바이러스에 대한 방어 가능성, 구제역 백신 접종에 따른 항체 형성능 등에 대한 과학적 검토 및 구제역 발생 시 효과를 증명한 농가들의 역학적 연구를 통하여 이 비특이 면역증강물질, SoltoB 의 구제역에 대한 효능을 과학적으로 증명하고자 한다.

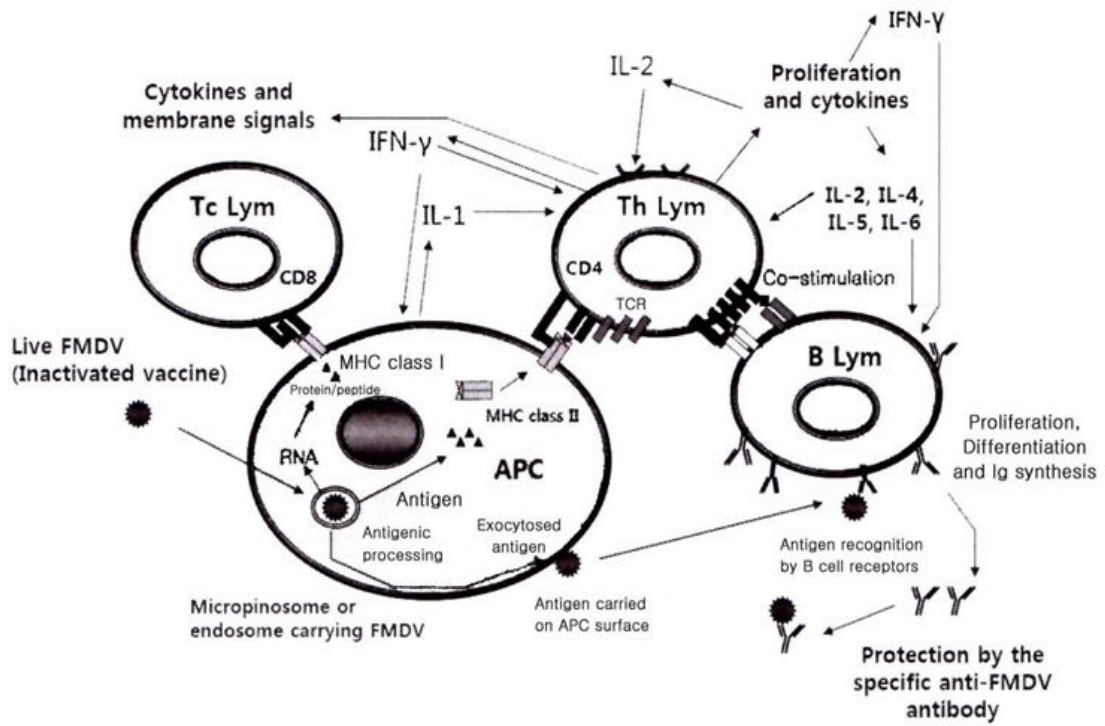


그림 1. 구제역 바이러스 감염 또는 구제역 백신 접종에 따른 숙주의 면역 반응

제 2 절 연구 개발의 범위

1. 소에서 SoltoB 급여에 따른 구제역 예방백신의 효과 분석

- 가. 항체 생성 초기 반응 비교 (백신 접종 후 항체가 출현 시기 비교)
- 나. 항체 class switching 시기 비교 (IgM, IgG)
- 다. 항체 유지 기간 및 항체 생성능 측정
- 라. 점막 면역 반응 측정
- 마. 2010-2011 안동주에 대한 중화항체가 측정

2. 소에서 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 특성 및 면역 세포의 분포변화분석

- 가. SoltoB 급여에 따른 말초 혈액 내 림프구의 비율 분석
- 나. SoltoB 급여에 따른 소의 혈액조성 변화 분석
- 다. SoltoB 급여에 따른 상대적 cytokines 발현 정도 분석
- 라. SoltoB 급여에 따른 림프구 증식능 분석
- 마. SoltoB 급여에 따른 혈청 대식세포 활성화도 분석

3. 2010-2011 구제역 발생시 SoltoB 급여에 따른 소 농장의 경험 사례 분석

- 가. 구제역 발생지역에서의 SoltoB 급여에 따른 구제역 방어 효과 사례 발굴
- 나. 발굴 사례의 역학적 분석
- 다. 야외농장에서의 SoltoB 효과의 종합적 분석

4. 돼지에서 구제역 백신 항체형성에 SoltoB의 효과

- 가. 구제역 백신 접종 후 항체가 출현 시기 비교 (IgM, IgG, IgA)
- 나. 야외 농장에서 구제역 백신 접종 후 항체 출현을 비교
- 다. 백신 접종 후 항체가 수준 비교 (IgM, IgG, IgA)
- 라. 백신 접종 후 항체 class switching 시기 비교

5. 돼지에서 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 및 면역 세포의 영향분석

- 가. 구제역 백신 접종 및 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 변화 비교
- 나. SoltoB 급여에 따른 면역 세포의 변화 비교
- 다. SoltoB 급여에 따른 면역 세포의 cytokines 생성능 비교
- 라. SoltoB 급여에 따른 면역 세포의 활성화도 비교

6. 2010-2011 구제역 발생 시 돼지 농장에서 SoltoB 급여에 따른 예방 사례 분석

- 가. 구제역 발생지역에서의 SoltoB 급여에 따른 구제역 방어 효과 사례 발굴
- 나. 발굴 사례의 역학적 분석
- 다. 야외 농장에서의 SoltoB 효과의 종합적 분석

7. 구제역 바이러스 공격 접종을 통한 SoltoB 급여에 따른 구제역 예방백신 효과 분석 (미니돼지)

- 가. 공격 접종 후 임상증상 분석
- 나. 공격 접종 후 혈중 항체가 변화 및 cytokines 분석
- 다. 공격 접종 후 면역 세포의 활성화도 비교 분석

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 기술개발 현황

국외의 축산업에서 천연 미네랄의 이용에 대한 관심은 주로 zeolite의 연구를 통해서 이루어졌으며, Mumpton과 Fishman (1977)이 zeolite를 사료 첨가로 이용하였을 경우 돼지에서 성장이 촉진된다는 보고 이후 많은 연구가 진행되었다. Zeolite는 SoltoB과 같이 알루미늄규산염 (aluminosilicates)로 이루어진 물질로 격자무늬의 구조에 기인한 광범위 흡착력에 의해 가축 분뇨에서 발생하는 암모늄의 발생을 감소시킨다는 Airolidi 등 (1993)과 Ma 등 (1979)의 보고와 함께 이러한 흡착력에 기인하여 장내의 독소 물질을 흡착하여 사료의 효율을 증진시키고 가축의 성장을 촉진할 수 있음이 Castro 등 (1989)에 의해 보고 되었다. 또한 성장 촉진과 더불어 돼지에서 육질의 효과가 있음이 Coffey 등 (1989)에 의해 학계에 보고되기도 하였다. 이 후 Ramos 등 (1996)과 Piva 등 (2000)에 의해 이러한 독성 흡착성은 성장뿐만 아니라 수태율을 증가시킬 수 있음이 연구되었고, Cole과 Hutcheson (1990)에 의해 미량 미네랄과 함께 면역증강효과가 유발되어 소에서 수송열에 의한 피해가 감소될 수 있음이 밝혀졌다. 산란계에서의 효과는 Elliot와 Edwards (1991)에 의해 보고되기 시작하였다. 2000년대에는 Stanton (2000)에 의해 다른 미량 미네랄과 함께 연구되어 사료 내 공급을 통해 소에서 증체율이 증가되고 Papaioannou (2002a, 2002b)에 의해 모돈에서 산자수가 증가됨이 보고되었다. 또한 1990년대 이후에도 농장 내 암모늄의 농도를 조절하는 목적으로 연구가 계속되어 Ndegwa 등 (2008)의해 농장 내 암모늄 농도를 낮추는 효과가 보고되었다. 이후 지속적인 연구가 진행되고 있으나 zeolite를 포함한 알루미늄규산염이 소화기에서 macrophage에 탐식되고, 이를 통해 macrophage가 활성화되어 면역을 유발한다는 Holian 등 (1997) 연구를 제외하고 가축에서 사료를 통한 급여 이후 면역계의 변화와 이로 인한 백신 접종에 미치는 영향은 아직 연구되고 있지 않은 실정이다.

제 2 절 국내 기술개발 현황

국내 축산업에서 천연 미네랄의 이용에 대한 관심은 알루미늄규산염이 주성분으로 된 천연 광물질인 게르마늄 흑운모 (SoltoB)에 대한 연구를 통해 이루어졌다. Kwon 등 (2003)은

SoltoB를 사료 첨가제로 사용했을 때 돼지에서 성장률이 증가함을 보고하였다. Chen 등 (2005)은 SoltoB가 사료 첨가용 항생제 대체제로 사용되어 돼지에서 lymphocytes와 monocytes의 증식능을 증가시킬 수 있음을 보고 하였고, 이어 돼지에서 고단백 영양소의 흡수율이 증가하고 분변 내 butyric acid, acetic acid, propionic acid의 량이 감소함을 보고하였다. 산란계에서는 SoltoB의 급여에 의해 암모늄의 발생이 감소되었음이 Lee 등 (2003)과 Sarker 등 (2010)에 의해 보고되었다. 최근에는 Jung 등 (2010)에 의해 SoltoB의 급여가 실험동물인 마우스에서 면역 반응을 증강시키고, 돼지에서 바이러스성 질병에 대한 방어력을 증가시킴을 보고하였으며, Jung 등 (2012b)은 SoltoB 급여에 의한 소의 호흡기 질병에 대한 방어력 증가를 연구하여 보고하였다. 또한 Jung 등 (2012a)은 SoltoB가 세균성 소화기 질병의 대표적인 원인체인 Enterotoxin *E. coli* 와 *Salmonella* spp.의 성장을 억제함을 보고 하였다. 이러한 많은 연구 함께 2010 구제역 파동 때의 SoltoB의 효과 사례 등에 의해 사료 첨가제인 SoltoB에 대한 관심이 높아지고 있으나 현재까지는 소와 돼지에서 SoltoB의 면역 증강 기전이 연구되지 못했으며, 면역 증강에 의한 백신 효율에 미치는 영향에 대해서도 과학적인 연구가 진행되지 못하였으나, 본 “면역증강물질 (SoltoB)의 구제역에 대한 임상실험 검증” 과제를 통해 SoltoB에 대한 과학적인 근거를 제시할 수 있을 것으로 판단된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 소에서 구제역 예방을 위한 SoltoB의 야외 검증 실험

(동물실험 승인 : 서울대학교 동물실험윤리위원회 SNU-11120-1)

1. 연구 목표

- 가. 소에서 SoltoB 급여에 따른 구제역 예방백신의 효과 분석
- 나. 소에서 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 특성 및 면역 세포의 분포 변화 분석
- 다. 구제역발생시 SoltoB 급여에 따른 소 농장의 경험 사례 분석

2. 소에서 구제역 백신 항체 형성에 SoltoB의 효과

가. 야외 농장 및 실험 동물 선정

야외 실험농장을 선정 (경북 칠곡 ○○농장, 충남 공주 □□농장, 충북 음성 △△농장) 하여 신생 송아지를 중심으로 이유 항체에 의한 간섭을 배제하기 위해 구제역 항체 존재 여부를 확인한 후 구제역 항체가 없는 개체들을 선발하여 각각 SoltoB 급여군 (n=45; 섭취 사료 내 SoltoB 0.5% w/w 혼합 급여)과 비급여군 (n=44)으로 구분한 하였다. 백신 접종 전 구제역 항체 존재 여부는 PrioCHECK[®] FMDV type O ELISA kit (Prionics)를 이용하였다 (그림 2).

나. FMDV vaccination 및 샘플링

국내 관납되고 있는 백신인 Decivac FMD DOE trivalent vaccine (Intervet)을 두 당 2 mL 근육주사 하였고, 1차 접종을 한지 4주째에 boosting 접종 (2차 접종)을 실시하였다. 백신 접종 전 샘플링을 실시 한 뒤 이후 2차 백신 접종 후 6개월째까지 주기적으로 혈액, 분변 및 타액을 샘플링 하였다 (그림 3). 채취된 혈액은 1500 ×g, 15분, 4 °C 조건으로 원심 처리하여 혈청을 분리하고, 56 °C에서 30분간 비동화한 뒤 -20 °C에 보관하였다. 면봉 swab으로 샘플링 된 분변 및 타액은 1 mL PBS에 1시간 동안 4°C 조건으로 침지시킨 후 1500 ×g, 15분, 4 °C 로 원심 처리하여 상층액을 수거 하였다.

다. 구제역 백신 항체 유지 기간

현재 사용 중인 구제역 백신은 소에서 1차 접종을 한 뒤 boosting vaccination이 필요하여 1차 백신 접종 후 3-4주 시기에 2차 접종을 실시하고 이후 6개월마다 보강 접종을 실시하여야 한다. 이는 구제역 백신 접종으로 영구적으로 면역이 형성되지 않기 때문이다. 이상적인 백신은 백신 접종 후 빠른 면역 형성, 한 번의 접종으로 영구 면역 또는 오랜 기간의 면역 형성 유지 및 야외 감염과 백신 접종 간의 구분성으로 정의할 수 있는데 (Cox, 2009), SoltoB 급여에 의해 구제역 백신의 유지 기간이 얼마나 달라지는 지는 백신의 효율이 얼마나 증가했는지의 지표가 될 수 있다.

이에 본 실험에서는 추가적인 보강접종이 필요한 시기인 2차 접종 후 6개월 때 까지 샘플링을 실시하여 보강 접종 전 소에서 항체가가 얼마나 높게 유지 되는지로 항체 유지 기간을 비교 판단하였다. PrioCHECK[®] FMDV type O ELISA kit (Prionics)를 이용하여 샘플링 하여 수집된 혈청의 inhibition percentage (PI)를 항체가의 지표로 삼고, 높은 PI 수치는 높은 항체의 역가로 산정하였다.

Prionics 社の PrioCHECK[®] FMDV type O ELISA kit

- PrioCHECK[®] FMDV type O ELISA kit는 96well 플레이트에 FMDV type O structure protein 항원이 코팅되어 있어서 혈청 내 FMDV structure protein에 대한 항체를 확인하는 kit이다.
- Kit의 sample dilution buffer에 가검 혈청 및 kit의 대조군 혈청을 10배 희석하여 항원이 코팅된 플레이트에 100 μ l 씩 분주하여 22 \pm 3 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 incubation 한 후 kit의 washing buffer로 6번 플레이트를 세척한다.
- Kit의 dilution buffer로 kit의 horseradish peroxidase conjugated mouse anti-FMDV structure protein 2차 항체를 30배 희석하여 각 well에 100 μ l 분주하고 22 \pm 3 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 incubation 한 후 kit의 washing buffer로 6번 플레이트를 세척한다.
- Kit의 TMB substrate를 각 well에 100 μ l 씩 분주하고 22 \pm 3 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨다.
- Kit의 stop solution 100 μ l로 TMB의 반응을 정지 시키고 450 nm에서 OD를 측정한다.
- Kit의 positive control 혈청 값을 최고값으로, kit의 negative control 혈청 값을 최소값으로 하여 inhibition percentage (PI)를 산출한다. PI 값이 50 이상이면 양성, 50 미만

일 경우 음성으로 판정한다.

$$PI = 100 - \frac{\text{가검 혈청 OD} - \text{negative control 혈청 OD}}{\text{positive control 혈청 OD}} \times 100$$

- 본 실험에서는 PI 값이 높을수록 혈청 내 항체의 역가가 높은 것으로 산정하였다.

1차 백신을 접종한 후 SoltoB 급여군과 비급여군은 모두 같은 수준의 PI 상승을 보였다 (그림 4). 이 후 1차 백신 접종 후 2주에서 boosting vaccination이 필요한 4주 시점까지 완만한 PI의 증가를 보이다가 boosting vaccination을 실시한 4주 이후부터 다시 급격하게 PI 값이 증가하기 시작하고, 10주 시점에서 가장 높은 PI 값을 보였다. 이후 PI 값은 완만한 곡선을 보이며 그 값이 감소하다 보강 접종이 요구되는 시점에서는 다시 PI 값이 감소하기 시작하는 전체적인 경향을 나타내었다. 백신 접종 후 27주까지는 SoltoB 급여군과 비급여군 사이에 큰 차이가 없었으나 보강 접종 시기인 30주에서는 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 높은 PI를 나타내었다 ($p < 0.05$).

라. 항체 생성 초기 반응 비교

항체 생성 초기 반응의 비교는 보다 높은 역가의 항체가 얼마나 빠르게 출현하느냐와 IgM과 IgG의 class switching의 시기로 판단할 수 있다. 초기 체액성 면역 반응의 지표로 사용되는 IgM은 백신 접종 후 3-4일 이내에 빠르게 혈청 내에 출현하지만 항원과의 결합력이 약하고 항원 중화능이 낮아서 이 후 항원과의 결합력이 강하고 항원 중화능이 강한 IgG로 class switching 된다. 이에 본 실험에서는 초기 IgM의 출현 시기와 역가, IgG와의 class switching 시기를 비교하여 항체 생성 초기 반응을 비교하였다.

이를 위해 1차 백신 접종 전 혈청과 1차 백신 접종 후 1, 2, 3, 7일 혈청 및 1차 백신 접종 후 2주, 3주, 4주차의 혈청을 샘플로 하여 각각의 항체 역가를 변화를 확인하였다. 구체역 구조 단백질에 대한 특이 IgM과 IgG를 측정하기 위해 PrioCHECK[®] FMDV type O ELISA kit (Prionics), horseradish peroxidase conjugated rabbit anti-bovine IgM (Bethyl), horseradish peroxidase conjugated sheep anti-bovine IgG (Bethyl)를 이용하였으며 아래의 실험 방법으로 각각의 항체 역가를 측정하였다.

- PrioCHECK[®] FMDV type O ELISA kit 항원 플레이트에 혈청 샘플을 kit의 dilution buffer로 1/40 희석하여 각 well에 100 μ l 분주한다.
- 22 \pm 3 °C에서 1시간 동안 incubation 한 후 kit의 washing buffer로 6번 플레이트를 세척한다.
- Kit의 dilution buffer로 horseradish peroxidase conjugated 2차 항체를 1/3000 희석하여 각 well에 100 μ l 분주한다.
- 22 \pm 3 °C에서 1시간 동안 incubation 한 후 kit의 washing buffer로 6번 플레이트를 세척한다.
- Substrate TMB 100 μ l를 각 well에 분주한 뒤 22 \pm 3 °C에서 10분간 반응시킨다.
- Kit의 stop solution으로 TMB의 반응을 정지 시키고 450 nm에서 OD를 측정한다.
- OD 값이 높을수록 각각의 항체 역가가 높은 것으로 판단하였다.

그 결과 SoltoB 급여군에서 백신 접종 후 1일째에 IgM의 출현이 확인되었으나 비급여군에서는 3일 이후 7일째부터 IgM의 출현을 확인할 수 있었고, ($p < 0.05$) 백신 접종 후 4주째 까지 SoltoB 급여군은 비급여군보다 높은 역가의 IgM을 유지하였다 (그림 5a). IgG의 경우 1차 백신 접종 후 역가가 증가하는 경향을 보이다가, 3주 이후로 역가가 떨어지는 경향을 보였는데 (그림 5b), 이는 백신 접종 후 일반적으로 보이는 경향으로 이로 인해 소에 구제역 백신을 할 경우 4주째에 boosting 백신 (2차 백신 접종)을 실시해야 한다. SoltoB 급여군과 비급여군은 백신 접종 후 2주일까지 큰 차이를 보이지 않다가 2차 백신 접종 시기인 1차 백신 접종 후 4주째에는 SoltoB 급여군이 비급여군보다 유의적으로 높은 항체가를 보였다 ($p < 0.05$). Class switching 시기는 SoltoB 급여군과 비급여군 모두 1차 백신 접종 후 1주에서 2주 사이로 판단되었으며, 이 시기에 SoltoB 급여군이 비급여군 보다 상대적으로 높은 수준의 IgM과 IgG의 역가를 보였다.

마. 점막 면역 반응 비교

점막은 숙주가 FMDV를 처음 접하게 되는 곳으로 점막 면역의 형성은 초기 FMD의 감염을 차단하는데 매우 중요하지만 주사 형태의 백신으로는 점막 면역 반응이 효과적으로 유도되지 않음이 선행 논문에 의해 보고되었다. (Cox, 2009) 점막 면역은 IgA의 immunoglobulin이 주로 담당하는데, 구제역 백신 접종 후 SoltoB 급여군과 비급여군 사

이의 점막 면역 형성의 차이를 확인하기 위해 1/3000배로 희석된 horseradish peroxidase conjugated sheep anti-bovine IgA (Bethyl)와 원액의 분변 및 타액 샘플을 이용하여 IgM과 IgG의 역가를 확인한 실험방법과 동일하게 ELISA를 수행하였다.

그 결과 분변 내에서는 IgA의 발현을 확인하기 어려웠으나 타액에서는 1차 백신 접종 후 2주째에 SoltoB 급여군에서 비급여군 보다 높은 역가의 IgA가 확인되었다 (그림 6, $p < 0.05$). 추가적인 boosting vaccination이 필요한 2차 백신 접종 후 6개월째인 1차 백신 후 30주째 때에는 SoltoB 급여군이 비급여군보다 높은 IgA의 역가를 보였다 ($p < 0.05$).

분변에서 IgA의 발현을 확인하지 못한 것은 주사제 백신이 점막 면역을 강하게 유도하지는 못한 것도 있지만 샘플링이 swab을 통해서 이루어 졌기 때문에 variation이 증가하고 swab을 통한 분변의 양이 IgA를 측정할 수 있을 만큼의 양이 되지 못했기 때문인 것으로 판단된다. 타액의 경우도 1차 백신 접종 후 10주째와 28주째에 높은 variation과 더불어 전체적인 IgA의 경향성을 벗어난 측정값이 나왔는데, 이 또한 샘플링이 swab을 통해서 이루어 질 수밖에 없었기 때문에 variation이 크게 측정된 것으로 판단된다.

타액의 IgA 결과를 통해서 보면, boosting vaccination을 실시한지 3-6주 사이, 즉 1차 백신 접종 후 7-10주 사이에 IgA가 가장 높게 측정되고 이후에는 추가적인 boosting vaccination이 필요한 시기까지 IgA가 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 SoltoB 급여군은 비급여군에 비해서 빠른 시기에 IgA의 상승이 확인되었고, 그 역가 또한 높음을 확인할 수 있었다.

바. 2010-2011 안동주에 대한 중화항체가 측정

2010-2011년 국내 구제역 발생 시 긴급 백신 접종에 사용된 백신은 국내 분리주인 안동주가 아닌 O-Manisa 유래 백신으로 현재까지도 전국적으로 사용되고 있는 백신주이다. 이로 인해 O-Manisa주 백신에 의해 형성된 항체는 안동주에 대한 직접적인 방어능을 가지기에는 부족하며, 안동주에 대한 방어능은 O-Manisa주에 의해 형성된 항체가 안동주에 대한 교차방어 (cross protection)를 할 수 있어야 형성된다. 이에 본 실험에서는 SoltoB 급여에 따라, 백신에 의해 형성된 항체의 교차방어능이 어떠한 차이를 보이는지 확인하기 위해 안동주를 이용하여 중화항체를 측정해 비교 분석하였다. 야외 농장에서 샘플링 된 백신 접종 후 20주 및 30주의 혈청을 무작위로 선별하여 (각각 SoltoB 급여군 8개 혈청, 비급여군 7개 혈청) 농림수산검역검사본부 해외전염병과의 차폐 실험실에서 안동주에 대한 중화항체가 측정을 실시하였다.

선발된 혈청은 56 °C에서 30분간 비동화한 뒤 DMEM 배지 (Difco, USA)로 8배 희석

하여 96 well plate에서 2진 단계 희석하였으며, 희석된 혈청 50 μ l에 안동주 바이러스 100 TCID₅₀ 50 μ l를 첨가해 37 °C에서 1시간동안 반응 시켰다. 이후 LFBK cell 1×10^4 cell을 50 μ l complete DMEM 배지 (5% FBS,)로 부유하여 각 well에 분주하고 37 °C에서 48시간 배양한 뒤 형성된 CPE를 확인하여 안동주에 대한 중화항체가를 측정하였다.

그 결과 SoltoB 비급여군은 백신 접종 후 20주 및 30주의 각각의 7개 혈청이 모두 중화항체가 역가가 16배 이하로 측정이 되었으나 SoltoB 급여군은 20주 혈청에서 8개 중 5개가 16배의 중화항체가를 나타내었고, 30주 혈청에서 8개 중 5개가 16배 이상의 중화항체가를 나타내었다 (표 1).

3. 소에서 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 및 면역 세포의 영향 분석

가. SoltoB 급여에 따른 말초 혈액 내 림프구의 비율 분석

면역능의 변화는 면역에 관여하는 면역 세포의 변화에 기인한다 (그림 1). 감염이나 백신 접종 등으로 인해 면역계에 변화가 생기게 되면 가장 먼저 나타나는 현상은 관련된 면역 세포의 비율의 변화나 그 절대 수치의 증감이다. 면역 세포인 monocytes, T helper cells, macrophages, dendritic cell 등에 발현되는 CD4+ 수용체는 lymphocytes의 활성을 나타내는 중요한 glycoprotein이다. CD4+ 수용체는 면역 반응 시작에 매우 중요한 항원 제시 세포 (antigen presenting cells, APCs)의 T cell receptor와 작용하여 면역을 강하게 유발 시키며, major histocompatibility complex class II (MHC class II)와 결합하여 specific한 면역을 유발하는 중요한 인자이다. CD8+ 수용체 역시 CD4+ 수용체와 같이 T cell receptor에 작용하여 면역을 유발시키고 specific한 면역을 유발시키는 역할을 하는 glycoprotein이다. 특히 CD8+의 경우 MHC class I와 결합하여 면역을 유발하며, cytotoxic T cells에 작용하여 감염된 세포를 처리하는 중요한 역할을 한다. 면역에 중요한 역할을 하고 면역능의 지표로 사용되는 CD4+, CD8+ 수용체와 더불어 이들과 결합하는 MHC molecules도 면역능을 나타내는 좋은 지표이다. 모든 척추동물의 세포 표면에 분포되어 있는 MHC molecules은 면역 세포에 항원을 제시하는 역할을 한다. 숙주에 침투한 항원은 항원제시 세포에 의해 탐식 처리된 후 면역을 유발할 수 있는 epitopes로 분해되어 MHC molecules에 의해 면역을 유발하는 세포에 제시되어 면역반응이 유발된다. MHC I은 CD8+와 결합하여 intracellular 감염이나 바이러스 감염에 대한 면역을 나타낸다. MHC II는 모든 세포의 표면에 발현이 될 수 있으나 주로 면역 세포인 항원제시 세포 (APCs)에 많이 분포되어 있으며, 특히 항원제시능이 가장 크고 native T cells

의 활성을 유도하는 dendritic cells에 많이 분포하는 면역에 중요한 molecules이다. 또한 MHC II는 native T cells와 더불어 B cells를 활성화 하여 항체의 생성을 유도하는데 중요한 역할을 한다. 항체 생성과 관련하여 MHC II와 더불어 중요한 B cell의 경우 intracellular molecules인 CD79a를 indicator로 가지고 있는데, 상기에 언급한 것과 같이 항체의 생성에 매우 중요한 역할을 한다. 또한 CD3 역시 T cells에 모두 분포하고 있는 molecules로서 면역에 중요한 작용을 하는 T cells의 분포를 확인할 수 있는 indicator로 알려져 있다. 이에 SoltoB 급여가 소의 면역능에 미치는 영향을 세포 수준에서 확인하기 위하여 소의 말초혈액에서 면역 세포를 분리하여 각각의 면역 세포의 분포를 확인하였다 (그림 7, 8).

소의 말초혈액에서 면역 세포를 분리하기 위해 SoltoB 급여군 (n=5)과 비급여군 (n=5)을 설정하여 경정맥에서 50 cc 이상의 혈액을 채취한 후 헤파린 처리된 RPMI 1640 배지에 6배 희석하였다. 희석된 혈액 30 mL를 Histopaque-1077 (Sigma) 20 mL에 조심스럽게 loading하여 400 ×g, 30분, 20 °C (원심 조건 accel 0, brake 0) 조건으로 원심 처리하여 말초혈액 면역 세포 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)를 분리하였다. 분리된 PBMC는 RPMI 1640 배지로 3번 세척 (원심조건 300 ×g, 10분, 8 °C)하여 최종적으로 5×10^6 cells/mL 의 cell 수로 배양하였다. 배양된 cell은 8 시간동안 안정화 시킨 후 DPBS, concanavalin A (ConA, Sigma) 5 ug/mL, lipopolysaccharide (LPS, Sigma) 5 ug/mL로 자극하고 이후 96 시간 동안 배양하였다. 96 시간 동안 배양된 세포들을 수거하여 2% FBS (Difco)가 첨가된 DPBS (Difco)로 2차례 세척한 뒤 3% formaldehyde solution 200 μ l에 부유하여 22±3 °C에서 20분간 반응시켜 세포를 고정하였다. 고정된 세포는 2% FBS가 첨가된 DPBS로 2차례 세척한 뒤 Tween-20 (Sigma)이 0.2% 함유된 DPBS (permeabilization solution, PS) 200 μ l에 부유하여 37 °C에서 15분간 incubation 시켜 세포의 인지질 막을 용해 시켰다. 고정된 상태에서 인지질 막이 용해된 세포는 2% FBS가 첨가된 DPBS로 2차례 세척한 뒤, 100 μ l의 2% FBS가 첨가된 DPBS에 부유하여 비특이 반응을 막기 위해 Fc receptor를 사용할 항체의 host의 normal IgG로 blocking 하였다. Fc receptor를 blocking한 상태에서 형광 물질이 conjugate 된 각각의 indicator에 대한 항체로 반응시켰다. 각각의 indicator에 대한 항체와 결합된 세포들은 유세포 측정기 (FACS, BD)로 결합된 형광물질을 측정하여 분리된 PBMC의 subpopulation을 조사하였다 (표 2).

(1) CD3+ lymphocytes

SoltoB 급여 전 모든 송아지의 혈액을 채취하여 CD3+ lymphocytes의 비 subpopulation을 조사한 결과 PBMC 내에 CD3 positive의 lymphocytes는 평균 65.4% 이었고 두 개의 실험군 사이에는 차이를 보이지 않았다 (그림 9). 이 후 SoltoB 를 급여한지 23 주 후에는 SoltoB 급여군의 비율은 93.8%, 비급여군은 94.3%로 각각 두군 사이에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. SoltoB를 급여하기 전보다 각각 두 개의 군 모두에서 CD3+ lymphocytes의 비율이 증가한 것은 SoltoB 급여 시험 동안 실험동물인 송아지가 성장해했기 때문인 것으로 판단된다.

(2) CD4+ lymphocytes

SoltoB 급여 전 급여군과 비급여군 사이에는 유의적인 차이를 보이지 않았다 (그림 10). SoltoB 급여 시험을 실시 한 이 후 SoltoB 급여군의 subpopulation는 13.9%로 비 급여군의 subpopulation 19.2%에 비해 낮은 CD4+ subpopulation을 보였으나 높은 variation으로 인해 통계 유의성은 확인하지 못했다.

(3) CD8+ lymphocytes

SoltoB 급여 전 급여군과 비급여군 사이에는 유의적인 차이를 보이지 않았다 (그림 11). SoltoB 급여 시험을 실시 한 이 후 SoltoB 급여군의 subpopulation는 12.0%로 비 급여군의 subpopulation 14.9%에 비해 낮은 CD8+ subpopulation을 보였다.

(4) CD79a+ PBMC

SoltoB 급여 전 급여군과 비급여군 사이에는 유의적인 차이를 보이지 않았다 (그림 12). SoltoB 급여 시험을 시작한지 23주 후에 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 CD79a+ PBMC의 subpopulation이 감소한 것이 확인되었다. SoltoB 급여군의 CD79a+ PBMC subpopulation은 4.7%, SoltoB 비급여군의 CD79a+ PBMC subpopulation은 6.7%로 확인되었다.

(5) MHC I 과 MHC II lymphocytes

SoltoB 급여 전 급여군과 비급여군 사이에 각각의 subpopulation이 차이를 보이는 것을 확인할 수 있다 (그림 13). 이는 실험에 사용된 송아지의 개체차로 보인다. SoltoB 급여군에 SoltoB를 급여한지 23주 후에는 SoltoB 비급여군 사이에 MHC I 발현의 차이는 확인되지 않았다. 이에 비해 MHC II의 subpopulation은 SoltoB 비급여군에 비해 SoltoB

급여군에서 유의적으로 증가한 것이 확인되었다 ($p < 0.05$).

SoltoB 급여에 따른 소에서 말초혈액 면역 세포의 비율을 조사한 결과, SoltoB 급여군에서는 비급여군에 비해 CD 79a, CD4, CD8의 subpopulation이 감소하였고, 전체적인 lymphocytes의 subpopulation와 MHC I의 발현은 차이를 보이지 않았으며, MHC II의 발현은 유의적으로 증가되었다 (그림 14). CD79a와 CD4의 경우 variation의 차이로 통계적 유의성을 확보하지 못했다. 반면 MHC II의 경우 유의적으로 그 발현 subpopulation이 증가하였는데, 이는 SoltoB의 주성분인 알루미늄노규산염이 macrophage에 탐식되어 IFN- γ 분비 증가와 함께 면역 증강의 효과를 보인다는 Holian 등 (1997)과 Mollick 등 (1989)의 선행 연구와 일치하는 결과이다. 선행 연구 결과와 본 연구 결과를 토대로 보면, SoltoB를 급여할 경우 MHC II의 발현이 증가하고 이로 인해 면역 증강 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

나. SoltoB 급여에 따른 소의 말초혈액 조성의 변화

SoltoB 급여에 따른 소에서의 말초혈액 조성의 변화를 확인하기 위해, 백신 접종 후 0, 1, 3, 8, 11, 23 주차에 소의 경정맥에서 말초혈액을 채취하여 EDTA 처리를 한 후 자동혈구계산기 (Compteur Analyseur d'Hematologie MS 9-5, MELET SCHLOESING Laboratoires, France)를 이용하여 면역 및 방어에 관련된 WBC, lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils, basophils의 조성을 확인하였다. (그림 15.)

SoltoB 급여 실험을 시작하기 전인 0주차에는 두 군 사이에 WBC, lymphocytes, neutrophils 및 basophils에서 유의적인 차이가 확인되었는데, 이는 실험을 시작하기 위해 송아지를 수송하고 그에 따라 사육환경이 달라지게 되어 발생된 스트레스에 의한 개체차로 인해 발생한 실험 외적인 요소에 의한 결과로 판단된다. 이후 SoltoB 급여 실험을 시작한 뒤 채취된 샘플에서 두 군 사이의 유의적인 차이는 확인되지 못하였다.

다. SoltoB 급여에 따른 상대적 cytokines 발현의 변화

Cytokines는 면역계에서 면역 세포의 신호전달 및 면역반응을 유도하는 물질로 면역 형성에 매우 중요한 역할을 한다. IFN- γ 는 주로 바이러스성 질병이나 intracellular bacteria 감염 등에 대한 면역 작용 시 두드러지게 확인되는 cytokine으로 주로 세포성 면역과 획득면역에 중요한 역할을 한다. IL-1의 경우 주로 macrophage, monocytes, dendritic cell 등의 면역 세포에서 분비되는 cytokine으로 주로 염증 반응과 관련하여 작용을 한다. IL-4는 분화 성숙하지 못한 native T cell의 분화를 유도하고 B cells과 T

cells의 proliferation을 유도하는 것으로 알려진 cytokine이다. 분화 증식된 B cells은 plasma cells로 분화하여 항체 생성에 중요한 역할을 하게 된다. IL-6는 미생물의 항원 인자 (pathogen associated molecular pattern, PAMP)에 의해 자극된 macrophage에 의해 주로 생성되며 발열과 급성 면역에 주로 관여하는 cytokine이다.

SoltoB 급여가 소에서의 cytokines 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 샘플링 된 혈액에서 PBMC를 분리한 후 RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 다시 Reverse Transcription kit (Qiagen)을 이용하여 cDNA로 합성한 뒤 이 cDNA를 template로 하여 IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6의 상대적인 cytokines 발현정도를 Roto-Gene SYBR[®] Green PCR kit (Qiagen)와 Rotor-Gene Q (Qiagen)를 이용하여 비교 분석하였다 (표 3).

RNeasy mini kit

- Cell을 300 ×g, 8 °C, 10분의 원심 조건으로 수거한다.
- 수거된 cell을 β -mercaptoethanol (Sigma)이 1/100으로 희석된 kit의 Buffer RLT 350 μ l로 부유하여 2분간 vortexing하여 lysate시킨다.
- 상온에서 8,000 ×g, 15초간 원심하여 상층액을 채취한다.
- 채취된 상층액에 350 μ l의 70% 에탄올을 첨가한 뒤 고르게 섞어 준다.
- Kit의 column에 상기의 혼합물을 700 μ l 넣고 상온에서 8,000 ×g, 15초간 원심한다.
- 이 후 column에 kit의 RW1 buffer 700 μ l 넣고 상온에서 8,000 ×g, 15초간 원심한다.
- Column에 kit의 RPE 500 μ l 넣고 상온에서 8,000 ×g, 15초간 원심한다. (2 반복)
- 빈 column을 상온에서 8,000 ×g, 1분간 원심하여 말린다.
- 상온에서 빈 column을 말린 후 RNase free 멸균 증류수 30 μ l을 column에 넣고 8,000 ×g, 15초간 원심하여 column의 통과액을 수거한다.
- 수거된 RNase free 멸균 증류수에 RNA의 농도를 Nano drop spectrometer (Thermo)를 이용하여 농도를 측정 후 200 ng의 RNA로 부터 Reverse Transcription kit로 cDNA를 합성한다.

Real-time PCR의 조건은 Initialization step : 95°C/1min, Denaturation step :

94°C/1s, Annealing step : optimal anealing temperature/5s, Extension step : 72°C/10s, Denaturation-Extension : 50 cycles로 실시하였다.

IFN- γ 의 경우 SoltoB 급여군에서 비급여군에 비해 높은 발현량이 급여 후 3, 8주차에 유의적으로 관찰되었으며 (그림 16, $p < 0.05$), IL-1 family의 경우 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 높은 발현량을 나타내었다 ($p < 0.05$). 이는 알루미늄노규산염의 급여가 macrophage에 탐식되어 면역 반응이 유발되면서 IFN- γ 의 생성을 촉진한다는 Albina 등 (1991)과 Jung 등 (2010)의 결과와 일치하는 결과이다. 사료 첨가제로 급여된 SoltoB는 소의 체내에서 macrophages에 탐식되어 macrophages를 활성화하여 IL-1 family cytokines의 발현을 증가시키고, 바이러스성 질병과 획득면역에 중요한 역할을 하는 IFN- γ 의 생성을 촉진했을 것으로 보인다. 또한 IL-4와 IL-6의 경우 대체로 SoltoB 급여군이 비급여군 보다 높은 발현량을 나타내는 경향을 확인하였다.

라. SoltoB 급여에 따른 림프구 증식능 평가

면역이 증강된 개체의 림프구의 경우 일정한 mitogen의 자극에 빠르게 반응하여 proliferation이 유발되는데, SoltoB의 급여에 따른 림프구의 증식능을 평가하기 위해 소의 말초혈액에서 분리된 PBMC를 각각의 mitogen이나 DPBS로 자극을 주어 비교 분석하였다.

SoltoB 급여군과 비급여군에서 분리된 말초혈액의 면역 세포인 PBMC를 5×10^6 cells/mL의 농도로 96well 플레이트에 90 μ l씩 배양한 후 T-lymphocytes mitogen인 ConA와 B-lymphocytes mitogen인 LPS로 각각 5 ug/mL의 농도로 96시간동안 37 °C, 5% CO₂의 배양조건으로 자극하였다. 이 후 cell viability reagent인 10×Prestoblue[®] (Life technologiesTM)를 10 μ l 넣어준 뒤 2시간동안 배양하고 560 nm에서 흡광도를 측정하여 증식능을 평가하였다.

그 결과 그림 17 와 같이 SoltoB를 급여한 실험군에서 분리한 말초혈액의 림프구가 비급여군에서 분리한 말초혈액의 림프구보다 같은 자극에 대해 더 높은 증식능을 보임이 확인되었다 ($p < 0.05$).

마. SoltoB 급여에 따른 혈청 중 lysozyme 활성 평가

Lysozyme은 주로 macrophage와 같은 탐식세포에서 주로 분비되는 물질로 탐식세포의 활성을 평가하는데 주로 이용되는 방법이다. SoltoB 급여에 따른 혈청 중 lysozyme의 활성을 평가하기 위해 샘플링 한 혈청의 *M. lysodeikticus* (Sigma)에 대한 분해능을 조사하였다. *M. lysodeikticus*에 대한 분해능을 평가하기 위한 Standard curve와 혈청 샘플

은 Kreukniet 등 (1994)의 방법에 따라 준비되어 실시되었다. Crystalline lysozyme을 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 ug/mL의 농도로 녹여서 standard로 준비하였다. 96-well plate의 각 well에 200 μ l씩 0.6 ug/mL 농도의 *M. lysodeikticus* 용액을 넣었고, 미리 준비한 standard lysozyme 또는 혈청 20 μ l씩 첨가하였다. 41°C에서 1시간 동안 배양하며 15분 간격으로 흡광도를 측정하였다 (540nm). 시료의 lysozyme 활성 측정은 standard curve에 시료의 시간에 따른 흡광도의 변화를 대입하여 구하였다.

그림 18 과 같이 SoltoB 급여군의 혈청에서 비급여군의 혈청보다 더 높은 lysozyme 분해능이 8주와 20주차에 확인이 되었다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 macrophages와 관련하여 SoltoB 급여군이 비급여군보다 높은 IL-1 family의 cytokine 발현과 IFN- γ 의 발현을 보이는 결과와 부합되는 결과이며, IFN- γ 가 macrophage의 활성을 유도한다는 Albina 등 (1991)의 선행논문과 일치하는 결과이다.

4. 2010-2011 구제역 발생지역에서 SoltoB 급여에 의한 방어효과 분석

지난 2010-2011 구제역 파동 때 SoltoB를 급여하는 농장에서 구제역의 발생이 실제로 다른 농장에 비해서 낮았는지를 확인하기 위해 SoltoB를 급여하거나 급여하지 않은 농장을 총 99개를 선정하여 설문조사를 실시하였고 각각의 설문 내용은 교차분석 (카이제곱 검정)의 방법으로 SPSS version 19.0 (SPSS, USA) 프로그램을 이용하여 통계적 유의성을 조사하였다. 강원 지역 36개, 경기 지역 7개, 영남 지역 29개, 충청 지역 27개를 대상으로 설문조사를 실시하였으며, 구제역이 발생하지 않은 호남지역은 설문조사에서 제외되었다 (표 4). 조사된 주요 사항은 설문조사를 통해 확인된 구제역 발생 건수에서 각 지역이 차지하는 비율 (그림 19a), 농장 운영 경력에 따른 구제역 발생 비율 (그림 19b), 농장과 주도로와의 거리에 따른 발생 비율 (그림 19c), 사용되는 사료 첨가제에 따른 구제역 발생의 상관관계 (그림 19d)를 중점적으로 조사하였다. 또한 답변에 농장주의 주관이 매우 크게 작용할 수 있는 농장에 방역시설의 유무 (대체로 설치하였으나 사용하지 않는 경우에도 농장주의 답변은 설치하여 사용했다고 나올 수 있음.)와 구제역 발생의 상관관계, 겨울철 농장 소득 횡수 (농장주의 주관에 개입될 소지가 높음)와 구제역 발생의 상관관계를 조사하였다.

그 결과 농장 운영 경력에 따라 구제역 발생의 상관관계는 유의성이 없었으나 운영 경력이 증가할수록 구제역 발생의 비율이 감소하였고, 발생이 보고된 농장의 75.3%가 2차선 이상의 주도로와 400 m 내에 위치하고 있음 (유의성은 확인할 수 없었음)을 알 수 있었다. 사료 첨가제의 사용과 구제역 발생과의 관계 역시 통계적 유의성을 확인할 수 없었으

나, 조사 변수를 SoltoB 급여, 타제품 급여, 급여하지 않음으로 분석하였을 경우 카이제곱 검정의 점근 유의확률이 0.023으로 매우 유의적인 것으로 확인되었다. 이는 지난 구제역 파동 때 SoltoB를 급여한 농장이 다른 농장에 비해 구제역이 발생할 위험도가 낮았음을 보여준다.

2010-2011 구제역 파동 시

농장 현장에서의 차단 방역 사례 분석을 위한 설문 (牛)

안녕하십니까? 저희 서울대학교 수의과대학 전염병학실에서는 2010-2011년 전국적인 구제역 파동으로 많은 가축들이 매몰될 당시 농장 현장에서 구제역 차단 방역을 위한 경험적 사례를 분석하고자 본 설문 조사를 시행하고 있습니다.

응답하신 내용은 조사 목적 이외에는 사용하지 않을 것이며, 개인적인 사항 및 농장 제반 사항에 대한 조사 내용은 철저히 비밀이 보장됨을 약속드립니다. 또한 각 농장의 여러 제반사정에 따른 차단 방역 경험 사례가 다를 수 있으며, 이러한 경험적 사례를 분석하고자 하오니 여러분의 의견을 솔직하게 답해 주시길 바랍니다.

본 설문지 작성에 귀중한 시간을 내어 주시는 점 감사드리며, 답변해 주신 귀한 경험적 사례를 바탕으로 구제역 차단 방역 사례를 분석하여, 구제역 발생을 사전에 막아 축산업 발전에 이바지하고자 합니다. 감사합니다.

2012년 9월 서울대학교 수의과대학 전염병학실

I. 일반사항

1. 귀하의 농장 소재지는 어느 지역입니까?

- ① 경기 (인천) ② 강원 ③ 영남 (부산, 대구) ④ 호남 (광주) ⑤ 제주 및 도서
⑥ 충청

2. 귀하의 농장의 주된 사육 가축은 무엇입니까?

- ① 한우 ② 홀스타인 (젖소) ③ 기타 (_____)

3. 귀하의 농장의 주된 사육 방식은 무엇입니까?

- ① 어린 송아지 구입 후 성우 되기 전 판매 (젖소 포함)
② 어린 송아지 구입 후 성우로 출하 (젖소 포함)
③ 수정 및 분만에서 비육 후 성우까지 (젖소 포함)
④ 성우 착유소 구입 후 착유
⑤ 기타 (_____)

4. 귀하의 목장 규모는 어떻게 되십니까? (송아지 및 성우 모두 포함 총 마릿수)

- ① 10두 미만 ② 10-30두 ③ 30-50두 ④ 50-100두 ⑤ 100-200두 이상
⑥ 200-300두 ⑦ 300두 이상

5. 귀하의 농장 운영 경력은 어떻게 되십니까?

- ① 5년 미만 ② 5-10년 ③ 10-20년 ④ 20년 이상

II. 차단 방역관련

1. 지난 구제역 파동 시 (2010-2011) 귀하의 농장에서도 구제역이 발병하였습니까?

- ① 예 ② 아니오

2. 지난 구제역 파동 시 (2010-2011) 귀하의 농장에서도 매물 처분이 있었습니까?

- ① 백신 접종 전 구제역 발병으로 인한 모든 가축에 대한 매물 처분
② 백신 접종 전 인근 농가의 발병으로 인한 예방적 차원의 매물 처분
③ 백신 접종 후 구제역 발병 가축에만 해당하는 부분 매물 처분
④ 매물 처분 없었음

3. 귀하의 농장 입구와 주도로 (왕복 2차선 이상의 도로)와는 얼마나 떨어져 있습니까?

- ① 200m 이하 ② 200-400m ③ 400-600m ④ 600-1000m ⑤ 1km-2km
⑥ 2-3km ⑦ 3-5km ⑧ 5km 이상

4. 올해 (2012) 1월부터 8월 사이 외부 농장 (이웃 농장 포함)에서 가축을 도입한 적이 있으십니까?

- ① 예 ② 아니오

5. 외부 농장에서 가축을 도입을 했다면, 가장 많은 수의 가축을 도입해 온 지역은 어느 지역입니까?

[II-4번 문항에 '예'를 선택하셨을 경우만 답변해 주십시오]

- ① 경기 (인천) ② 강원 ③ 영남 (부산, 대구) ④ 호남 (광주) ⑤ 제주 및 도서
⑥ 인근 지역

6. 귀하 농장의 입구에는 차단 방역 시설이 있습니까? (자동 차량 소독기 또는 차량 바퀴 소독조 등)

- ① 있다 ② 없다

7. 설치된 차단 방역 시설은 어떠한 것입니까? (만약 차단 방역시설이 없다면 이를 대체하기 위하여 어떠한 조치를 취하시고 계시는지 아래 칸에 적어 주십시오)

(_____)

8. 귀하는 올해 (2012) **2월**에 총 몇 번의 농장 소독을 실시하였습니까? (약제 소독 및 화염 소독 포함)

- ① 1회 이하 ② 2-3회 ③ 4-6회 ④ 7-8회 ⑤ 9-12회 ⑥ 13회 이상

9. 귀하는 올해 (2012) **8월**에 총 몇 번의 농장 소독을 실시하였습니까? (약제 소독 및 화염 소독 포

합)

- ① 1회 이하 ② 2-3회 ③ 4-6회 ④ 7-8회 ⑤ 9-12회 ⑥ 13회 이상

10. 귀하 농장에서 주로 사용하는 소독 방법은 무엇이며, 주로 사용하는 소독제는 무엇입니까?

[화염 소독일 경우 화염이라고 기재해 주십시오. 물청소만을 실시할 경우 물청소라고 기재해 주십시오]

[소독 방법이 두 가지 이상일 경우 두 가지만 기재해 주십시오]

(_____)

Ⅲ. 사육 관리 관련

1. 귀하의 농장에서는 사료 첨가제를 사용하십니까? (면역증강제 또는 비타민 제제 등)

- ① 예 ② 아니오

2. 귀하의 농장에서 주로 사용하는 사료 첨가제의 종류와 제조 업체명은 무엇입니까?

[Ⅲ-1 문항에 '예'라고 답한 경우만 아래 칸에 적어주십시오 / 두 종류 이상일 경우 두 개만 기재해 주십시오.]

(첨가제 종류 : _____ 제조 업체명 : _____)

3. 귀하 농장의 송아지에 주로 급여되는 사료의 종류와 제조 업체명은 무엇입니까?

[귀하 농장에 송아지가 있을 경우만 답해 주십시오. / 두 종류 이상일 경우 두 개만 기재해 주십시오.]

(사료 종류 : _____ 제조 업체명 : _____)

4. 귀하 농장의 비육우에 주로 급여되는 사료의 종류와 제조 업체명은 무엇입니까?

[귀하 농장에 비육우가 있을 경우만 답해 주십시오. / 두 종류 이상일 경우 두 개만 기재해 주십시오.]

(사료 종류 : _____ 제조 업체명 : _____)

5. 귀하 농장의 성우 또는 착유소에 주로 급여되는 사료의 종류와 제조 업체명은 무엇입니까?

[귀하 농장에 성우 또는 착유소가 있을 경우만 답해 주십시오. / 두 종류 이상일 경우 두 개만 기재해 주십시오.]

(사료 종류 : _____ 제조 업체명 : _____)

문항은 여기까지입니다. 성실한 답변에 깊은 감사말씀 전하며,
귀하의 무궁한 번창을 기원합니다.

감사합니다.

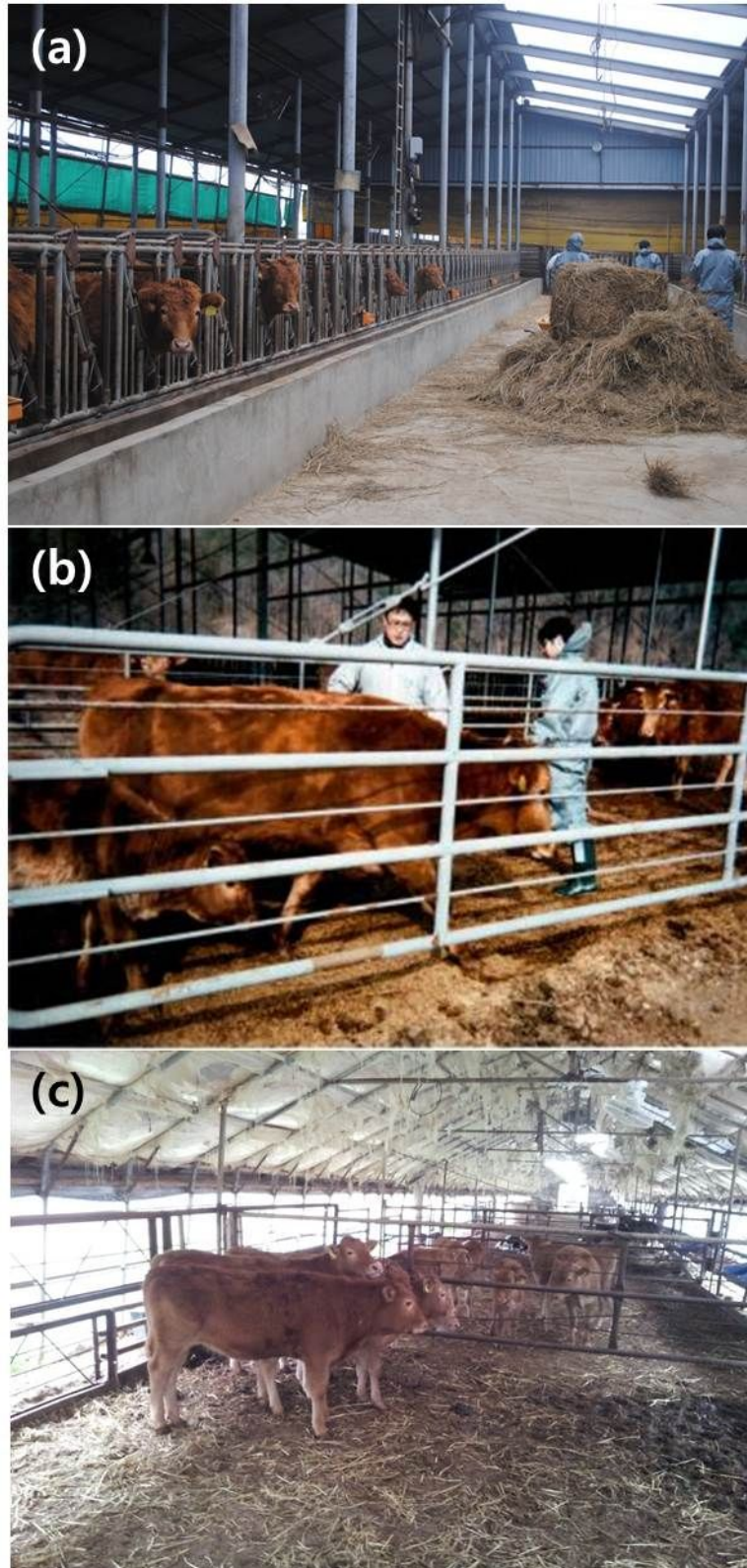


그림 2. 소에서 구제역 백신 항체 형성에 SoltoB의 효과를 검증하기 위해 선정된 농장. (a) 경북 칠곡 ○○농장, (b) 충남 공주 □□농장, (c) 충북 음성 △△농장



그림 3. SoltoB 급여가 구제역 백신 의한 항체 형성에 미치는 효과를 확인하기 위한 야외 농장에서 SoltoB 급여 및 샘플링 모습. (a) 사료 내 SoltoB 급여, (b) 혈액 샘플링, (c) 타액 샘플링, (d) 분변 샘플링

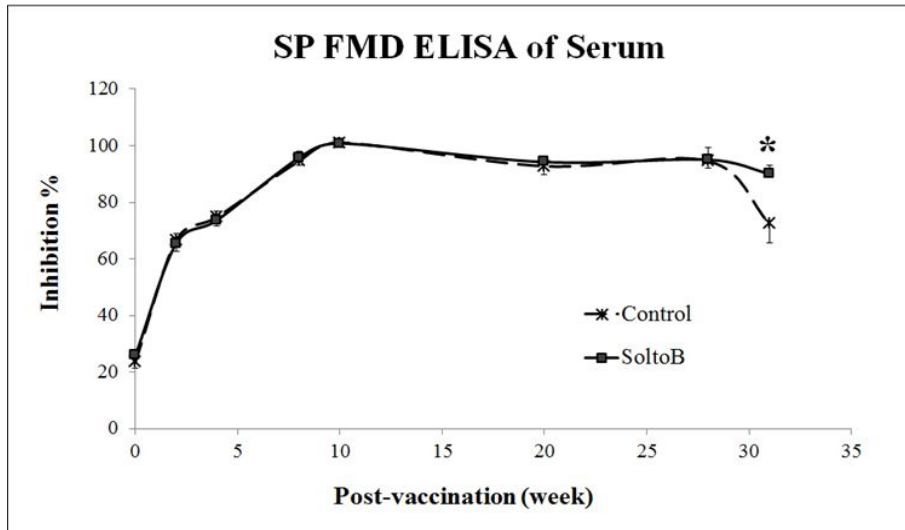


그림 4. PrioCHECK[®] FMDV type O ELISA kit를 이용한 소 혈청 내의 PI 변화. 백신 접종 후 SoltoB 급여군과 비급여군의 차이는 발견되지 않으나, 보강 접종이 필요한 시기인 30주 시점에서 SoltoB 급여군이 비급여군보다 높은 항체 역가를 보인다.

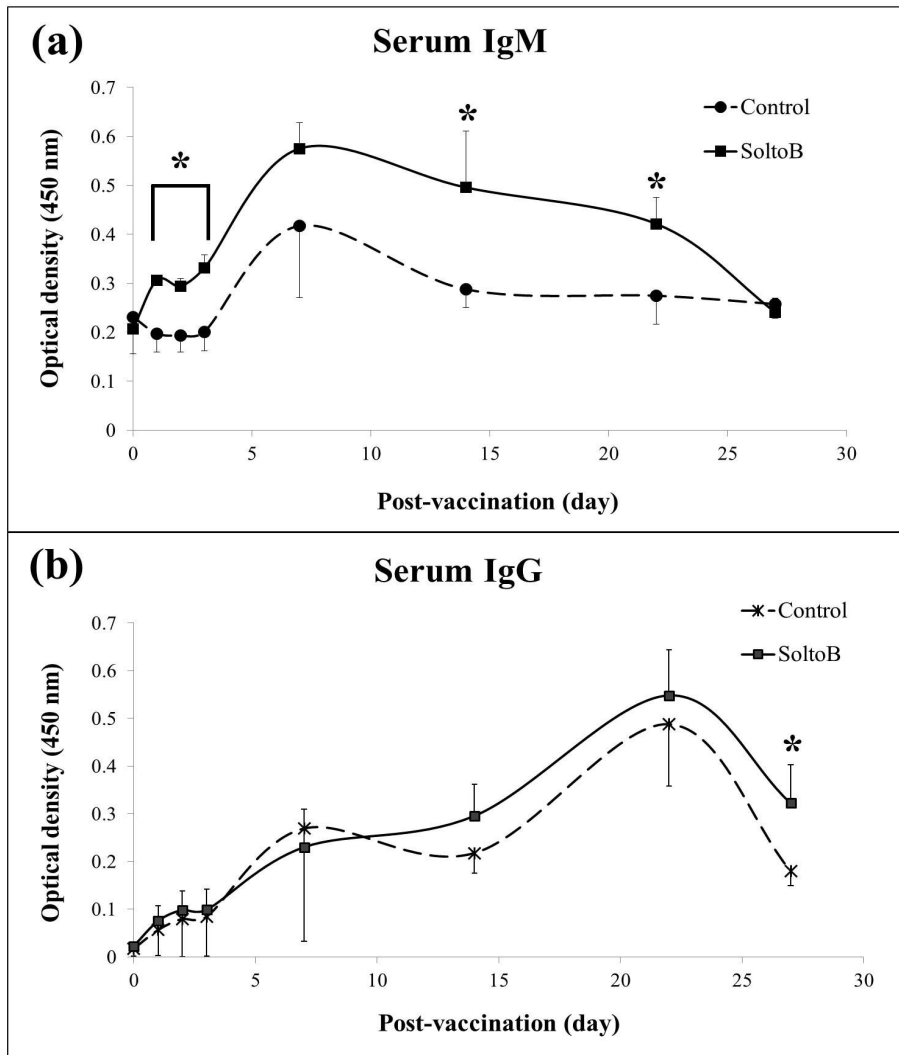


그림 5. 1차 백신 접종 후 혈청내의 IgM과 IgG의 변화 양상. (a) 백신 접종 후 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 빠르고 높은 IgM의 역가를 보이고 있으며 ($p < 0.05$) 3주째 까지 유의적으로 높은 IgM의 역가를 보이고 있다 ($p < 0.05$). (b) SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 대체로 높은 IgG 역가를 보이며, 4주째에는 유의적으로 높은 역가를 확인할 수 있다 ($p < 0.05$).

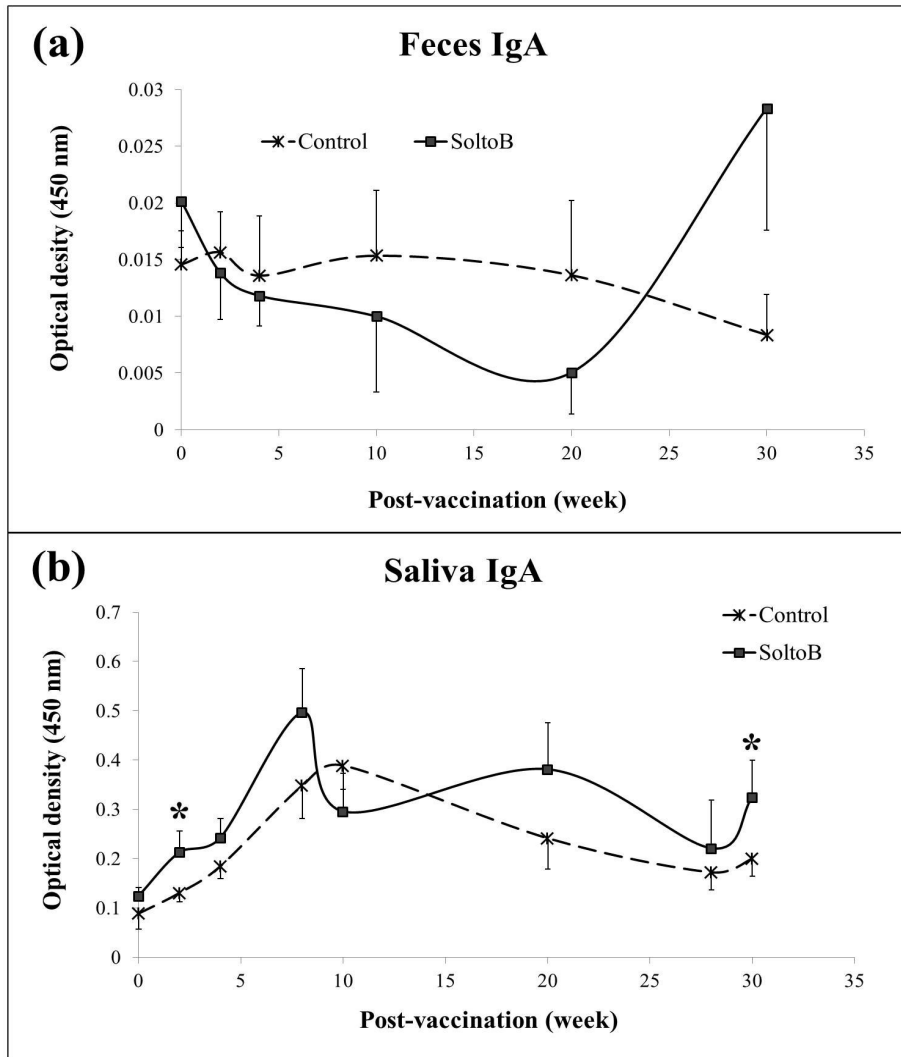


그림 6. 백신 접종 후 분변 및 타액 내 IgA의 변화 양상. (a) 분변 내 FMD SP에 대한 IgA 역가의 변화. (B) 타액 내 FMD SP에 대한 IgA 역가의 변화.



그림 7. 소에서의 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 및 면역학적 영향을 분석하기 위한 샘플링 모습

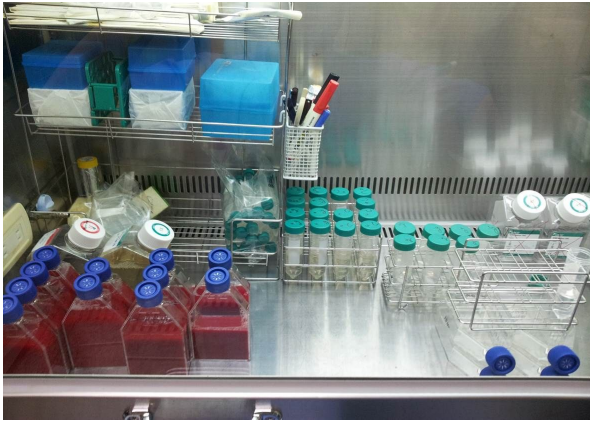


그림 8. 소에서 PBMC를 분리하는 모습

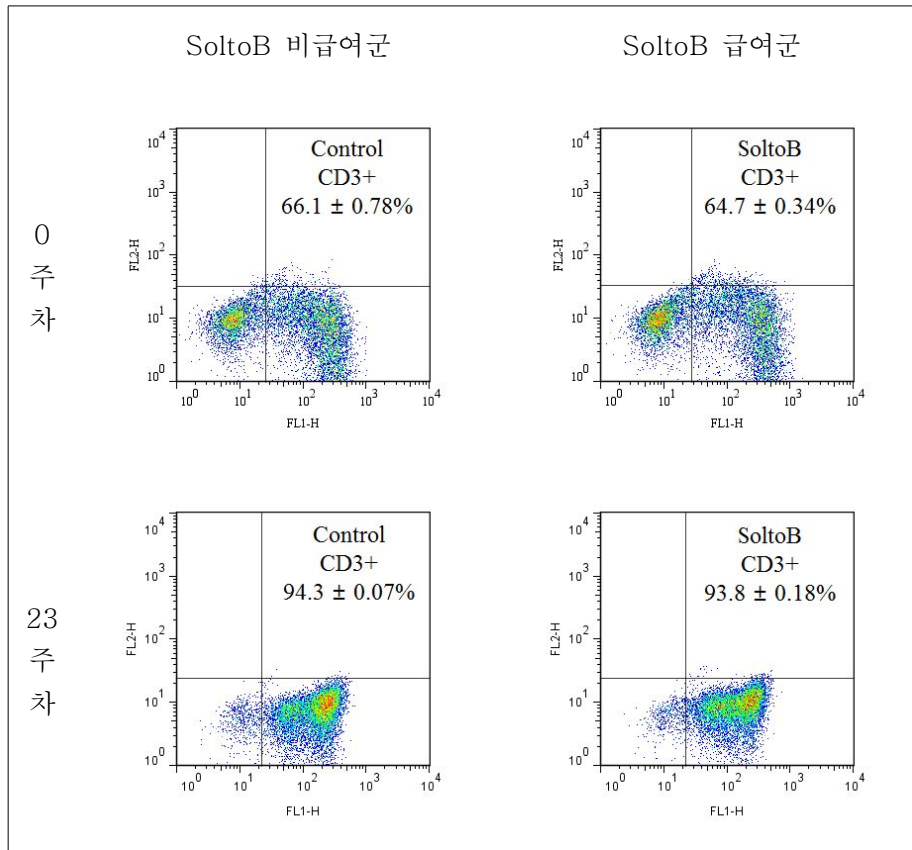


그림 9. SoltoB 급여 전 CD3+ lymphocytes의 subpopulation과 23주의 급여 후 변화. SoltoB 급여 전 급여군과 비급여군 사이에는 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 급여 전 후 subpopulation의 변화는 급여 시험 동안 실험동물인 송아지가 성장했기 때문으로 판단된다. CD3+ lymphocytes는 각 그래프의 4 사분면에 위치한 cell subpopulation 이다.

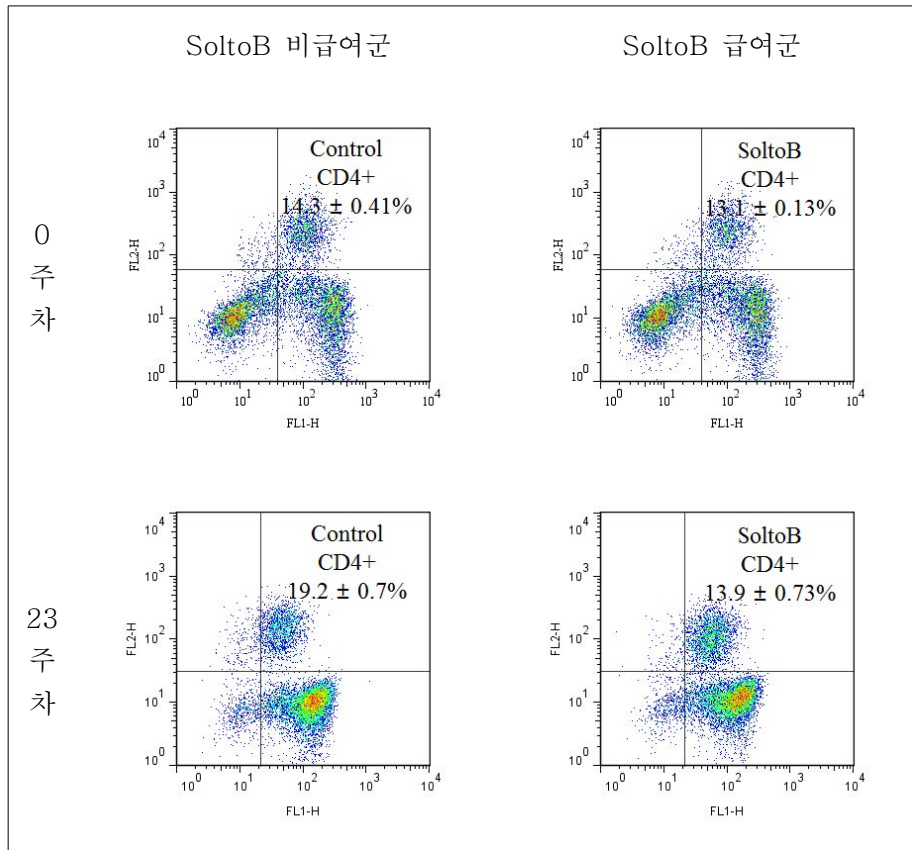


그림 10. SoltoB 급여 전 CD4+ lymphocytes의 subpopulation과 23주의 급여 후 변화. SoltoB 급여 전 급여군과 비급여군 사이에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. SoltoB 급여 시험을 실시 한 이 후 SoltoB 급여군에서 비급여군에 비해 낮은 CD4+ subpopulation을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. T cell marker인 CD3+와 함께 CD4+ lymphocytes를 확인하였다. 1 사분면은 CD3+4+, 2 사분면은 CD3-4+, 3 사분면은 CD3-4-, 4 사분면은 CD 3+4- lymphocytes의 subpopulation 이다

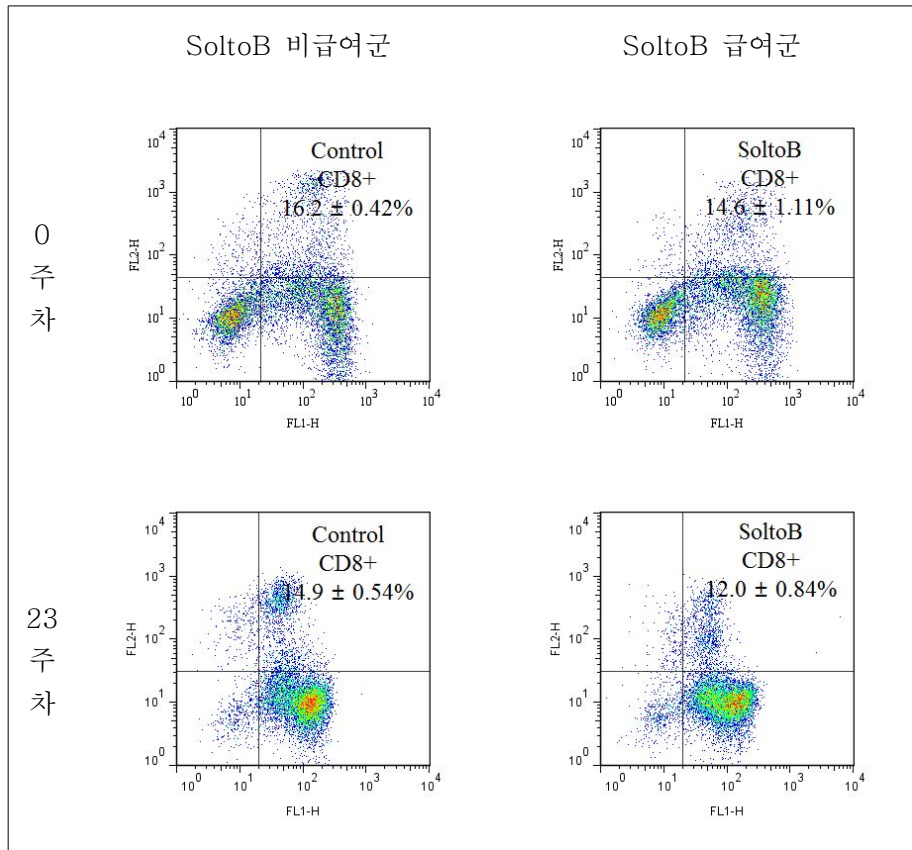


그림 11. SoltoB 급여 전 CD8+ lymphocytes의 subpopulation과 23주의 급여 후 변화. SoltoB 급여 전 급여군과 비급여군 사이에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. SoltoB 급여 시험을 실시 한 이 후 SoltoB 급여군에서 비급여군에 비해 낮은 CD8+ subpopulation을 보였다. T cell marker인 CD3+와 함께 CD8+ lymphocytes를 확인하였다. 1 사분면은 CD3+8+, 2 사분면은 CD3-8+, 3 사분면은 CD3-8-, 4 사분면은 CD 3+8- lymphocytes의 subpopulation 이다.

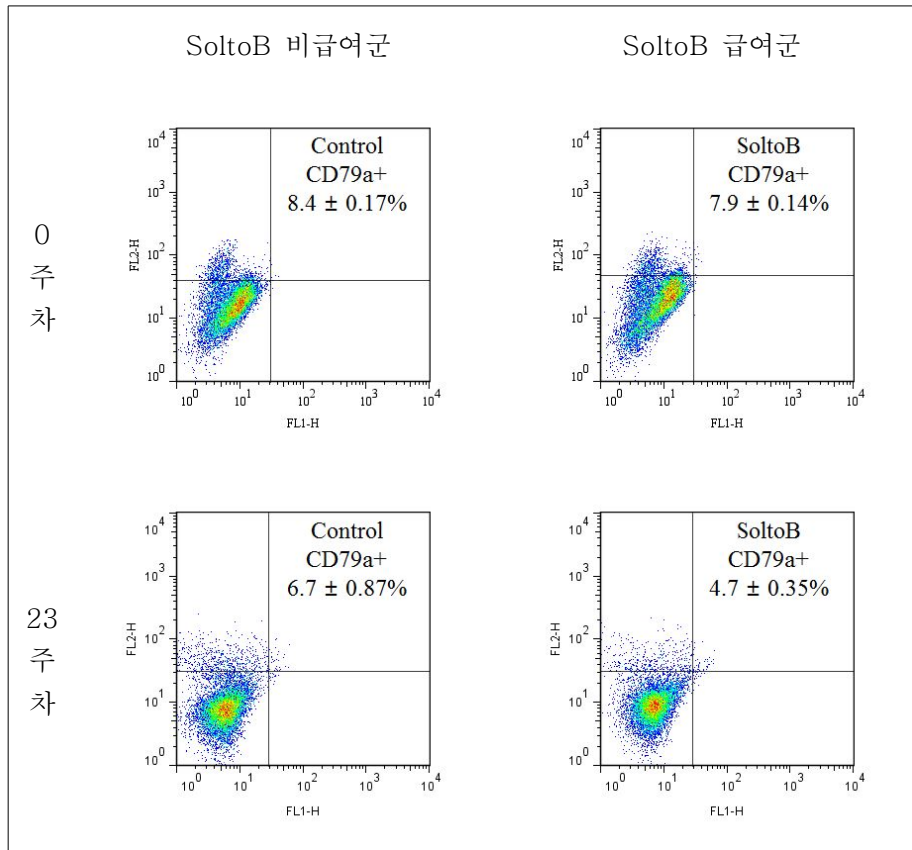


그림 12. SoltoB 급여 전 CD79a+ PBMC의 subpopulation과 23주의 급여 후 변화. SoltoB 급여 전 급여군과 비급여군 사이에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. SoltoB 급여 시험을 시작한지 23주 후에 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 CD79a+ PBMC의 subpopulation이 감소한 것이 확인되었다. CD79a+ PBMC는 각 그래프의 2 사분면에 위치한 cell subpopulation 이다.

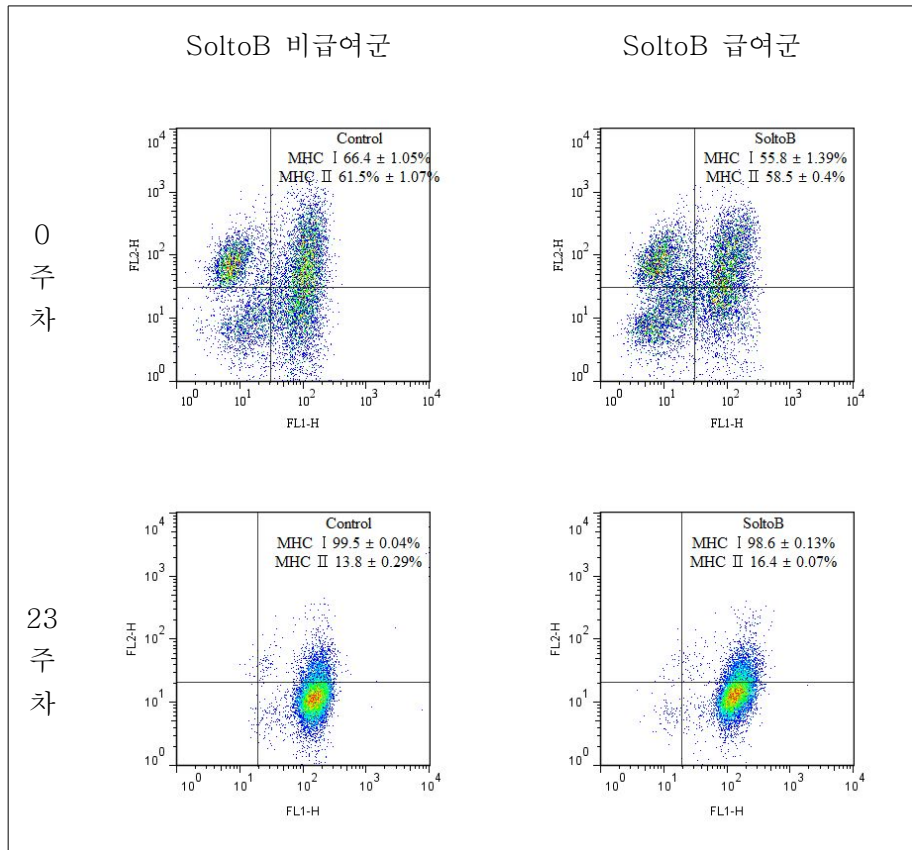


그림 13. SoltoB 급여 전 MHC I 및 II lymphocytes의 subpopulation과 23주의 급여 후 변화. SoltoB 급여 전 급여군과 비급여군 사이에 각각의 subpopulation이 차이를 보이는 것을 확인할 수 있다. 이는 실험에 사용된 송아지의 개체차로 보인다. SoltoB 급여군에 SoltoB를 급여한지 23주 후에는 SoltoB 비급여군에 비해 MHC II의 subpopulation이 유의적으로 증가한 것이 확인되었다 ($p < 0.05$). 1 사분면은 MHC I + II+, 2 사분면은 MHC I - II+, 3 사분면은 MHC I - II-, 4 사분면은 MHC I + II- lymphocytes의 subpopulation 이다.

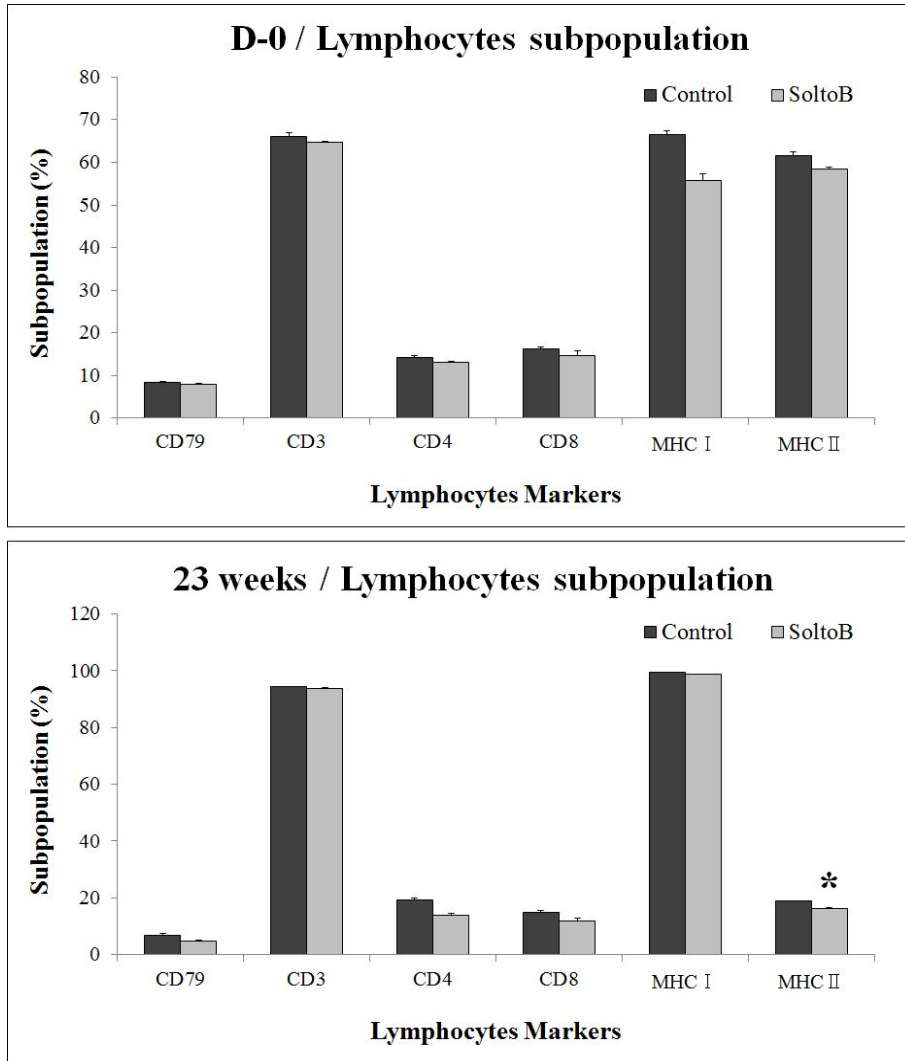


그림 14. SoltoB 급여에 따른 소에서 말초혈액 면역 세포의 비율 변화.

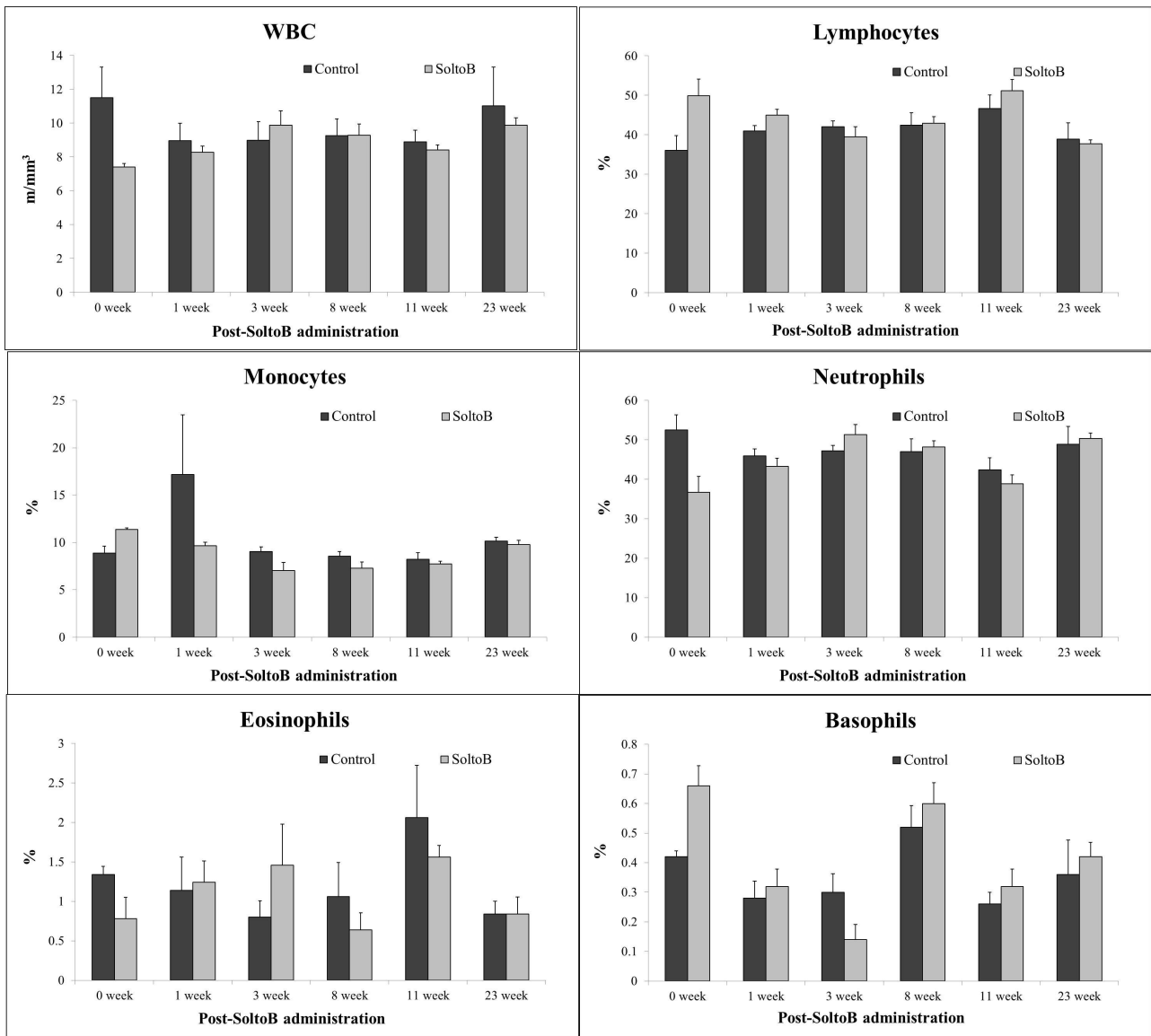


그림 15. SoltoB 급여에 따른 말초혈액 조성의 변화. 말초혈액 세포의 조성의 변화를 질병 감염이나, 백신 접종, 외상 등에 의해 크게 좌우되는데, SoltoB 급여 실험과정 중 질병 감염이나 외상 등이 없었고, SoltoB 급여군과 비급여군 모두 구제역 백신을 접종하였기 때문에 두 군 사이에서는 유의적인 차이를 얻을 수 없었다. SoltoB 급여 전인 0 주차의 두 실험군 사이의 차이는 실험을 시작하는 시기에 송아지의 사육환경이 바뀌게 되어 스트레스로 인한 실험 외적인 요소에 의한 것으로 판단된다.

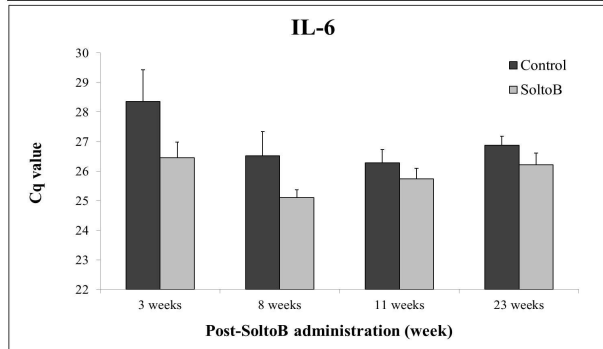
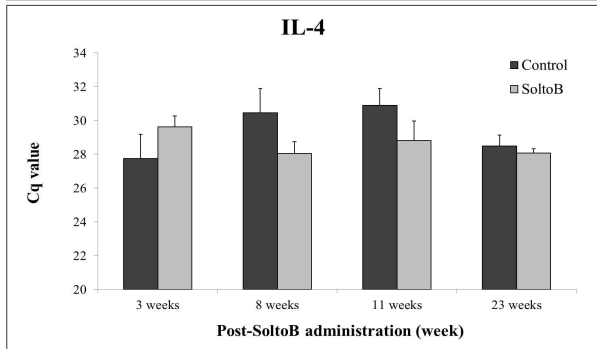
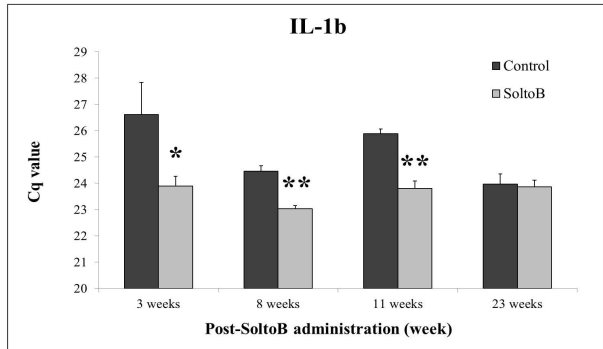
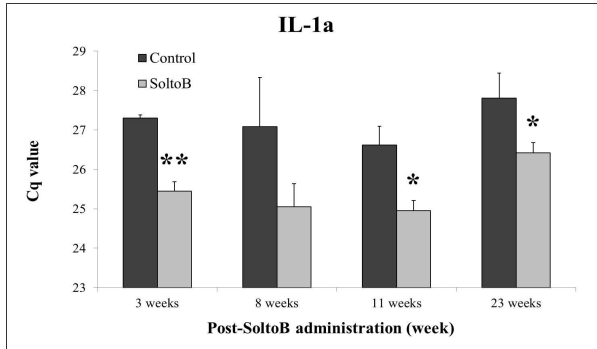
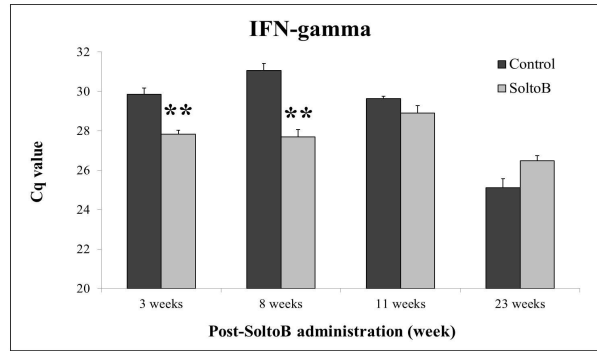


그림 16. 소에서의 SoltoB 급여에 따른 상대적 cytokines의 변화. 각각 상대적인 발현을 나타내며, 발현과 관련된 mRNA의 양이 많을수록 Cq 값이 낮게 측정된다.

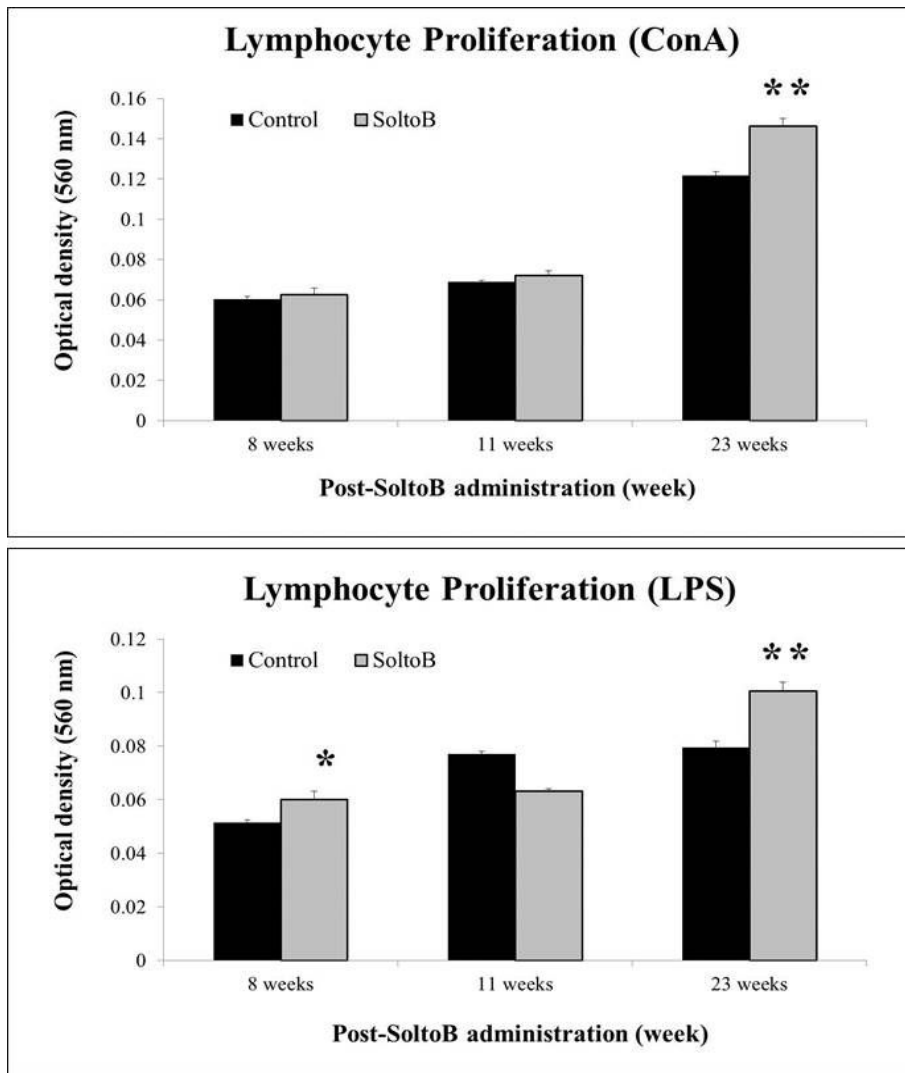


그림 17. SoltoB 급여에 따른 림프구 증식능 평가. SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 높은 증식능을 보임이 확인되었다.

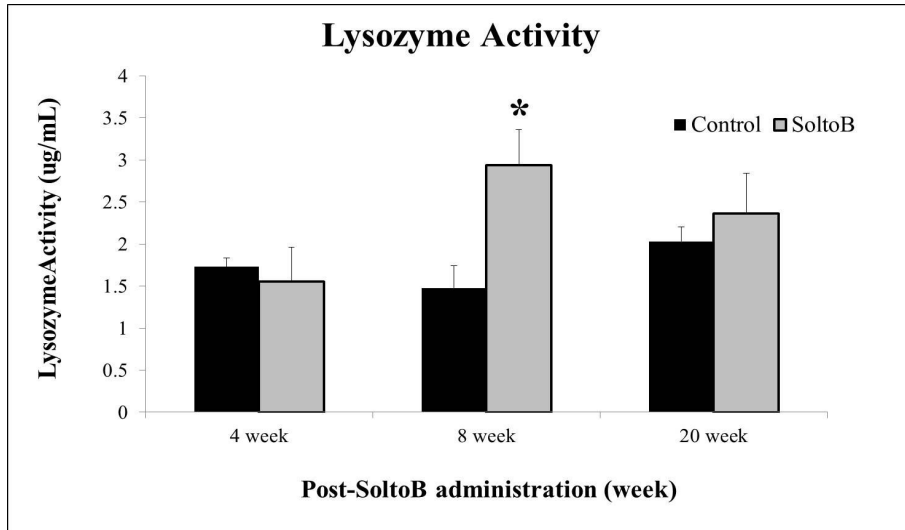


그림 18. SoltoB 급여에 따른 혈청 중 lysozyme 활성도 변화. SoltoB 급여군에서 비급여군보다 높은 활성이 확인되었다 ($p < 0.05$).

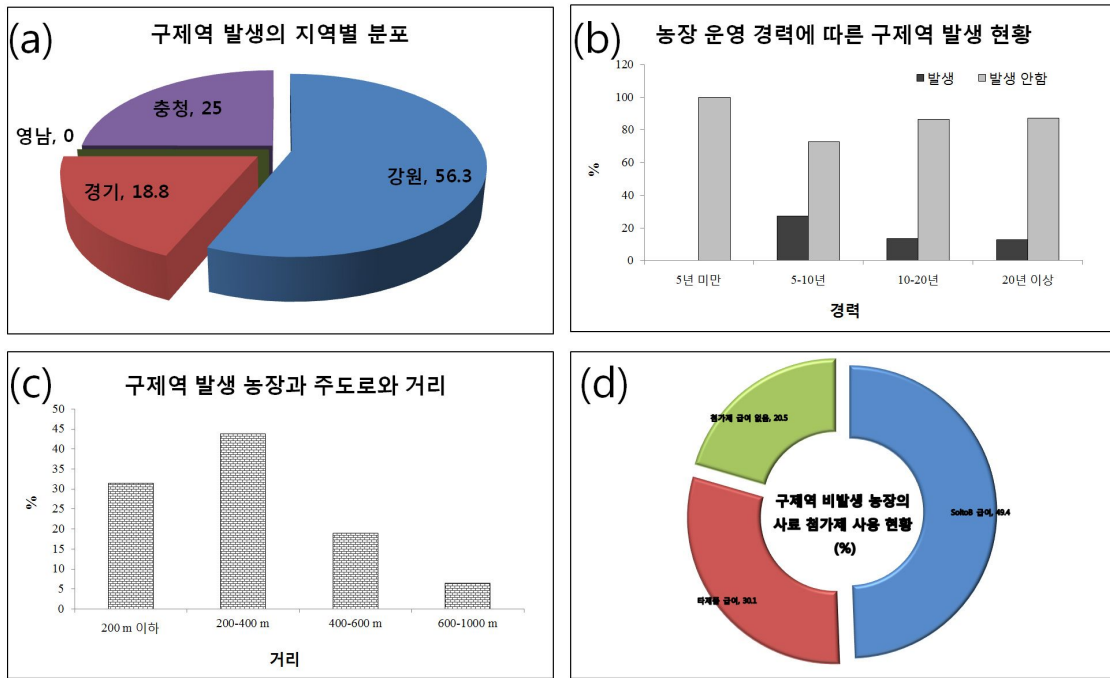


그림 19. 2010-2011 구제역 발생과 농장 사양 간의 설문조사 결과. (a) 구제역 발생에 각 지역이 차지하는 비율. (b) 농장 운영 경력에 따른 구제역 발생 현황. (c) 구제역 발생 농장과 주도로와 거리 관계. (d) SoltoB 급여, 타제품 급여, 및 비급여 농장들의 구제역 발생 현황.

표 1. 1차 백신 접종 후 20주 및 30주째 샘플링 된 송아지 혈청의 국내 발생 분리주인 안동주에 대한 중화항체가.

Groups	Samples	20 weeks	30 weeks
SoltoB 비급여군	1	< 16	< 16
	2	< 16	< 16
	3	< 16	< 16
	4	< 16	< 16
	5	< 16	< 16
	6	< 16	< 16
	7	< 16	< 16
SoltoB 급여군	1	< 16	16
	2	16	< 16
	3	16	32
	4	16	26
	5	16	< 16
	6	16	< 16
	7	< 16	26
	8	< 16	32

표 2. 소 PBMC에서 subpopulation을 조사하기 위해 선정된 indicators와 사용된 형광물질이 결합된 항체

Target	기능	Antibody	형광 물질	회사
CD3	T cell 수용체로서 항원제시 및 면역 유도	Hamster anti-bovine CD3	FITC	abcam
CD4	Th1 활성화로 면역 유도	Mouse anti-bovine CD4	PE	US Biological
CD8	바이러스 청소율과 관련 세포성 면역 활성화	Mouse anti-bovine CD8	PE	LS Bioscience
CD79a	항체를 생성하는 B cell 의 활성화	Mouse anti-bovine CD79a	PE	abcam
MHC I	CD8 수용체와 결합 면역 유발	Mouse anti-bovine MHC I	FITC	Novus Biological
MHC II	CD4 수용체와 결합 면역 유발	Mouse anti-bovine MHC II	PE	abcam

표 3. 소의 cytokines의 발현을 확인하기 위한 primer와 그 염기서열

Gene name	Forward	Reverse	Annealing Temp.	Accession No
IFN- γ	ATAACCAGGTCATTCAAAGG	ATTCTGACTTCTCTTCCGCT	52 °C	M29867
IL-1 α	GATGCCTGAGACACCCAA	GAAAGTCAGTGATCGAGGG	53 °C	M37210
IL-1 β	CAAGGAGAGGAAAGAGACA	TGAGAAGTGCTGATGTACCA	53 °C	M37211
IL-4	CAAAGAACACAACCTGAGAAG	AGGTCTTTCAGCGTACTTGT	54 °C	M77120
IL-6	TCCAGAACGAGTATGAGG	CATCCGAATAGCTCTCAG	52 °C	X57317

[Konnai et al. Vet Microbiol. (2003)]

표 4. 설문조사 실시 지역 분포 및 각 지역별 발생 여부 현황.

		지역				전체	
		강원	경기	영남	충청		
발병여부	발병	빈도	9	3	0	4	16
		기대빈도	5.8	1.1	4.7	4.4	16.0
		발병여부 중 %	56.3%	18.8%	.0%	25.0%	100.0%
발병 안함	발병 안함	빈도	27	4	29	23	83
		기대빈도	30.2	5.9	24.3	22.6	83.0
		발병여부 중 %	32.5%	4.8%	34.9%	27.7%	100.0%
전체	전체	빈도	36	7	29	27	99
		기대빈도	36.0	7.0	29.0	27.0	99.0
		발병여부 중 %	36.4%	7.1%	29.3%	27.3%	100.0%

제 2 절 돼지에서 SoltoB 급여가 FMDV 백신의 효과에 미치는 영향

(동물실험 승인 : 전남대학교 동물실험윤리위원회 CNUACUC-YB-2010-1)

1. 연구 목표

- 가. 돼지에서 SoltoB 급여에 따른 구제역 예방백신의 효과 분석
- 나. 돼지에서 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 특성 및 면역 세포 분포변화분석
- 다. 구제역 발생시 SoltoB 급여에 따른 돼지 농장의 경험 사례 분석

2. 돼지에서 구제역 백신 항체형성에 SoltoB의 효과

가. 실험동물 설계

사육사는 입사 일주일 전 포르말린으로 완전 훈증 소독 후, 후드를 이용하여 완전 환기를 실시하였다. 구제역이 발생한 적이 없는 농장으로부터 8주령의 이유자돈 (평균 22kg)을 전남대학교 수의과대학 실험동물 사육사로 입식하였다 (그림 20). 사육사에 입사시킨 15마리의 자돈을 완전 임의로 구성된 3개의 군으로 나누어 실험을 실시하였다. 비급여군 (Control)은 일반 돼지 사료를 공급하였으며, 1% SoltoB 급여군은 일반 돼지 사료에 1% (w/w) SoltoB를 혼합하여 공급하였고, 3% SoltoB 급여군은 일반 돼지 사료에 3% (w/w) SoltoB를 혼합하여 공급하였다. 사육장 내 온도와 습도는 각각 19-22°C와 45-55%의 조건으로 유지시켰으며, Specific pathogen-free (SPF) 시설 내에서 실험을 실시하였다. 사료의 급여는 무제한 급여를 실시하였으며, 음수는 일반 수도수를 자율 급여하였다. 사료는 백신 주사 2주일 전부터 미리 급여를 실시하였다.

군 분리 (각 군당 5수)

- 비급여군 (control) : 일반 사료 급여 및 백신 주사
- 1% SoltoB 급여군 : 사료 내 1% (w/w) SoltoB 첨가 급여 및 백신 주사
- 3% SoltoB 급여군 : 사료 내 3% (w/w) SoltoB 첨가 급여 및 백신 주사

나. FMDV Vaccination

돼지 입사 2주 후 현재 국내에 보급되어 있는 불활화 정제 구제역 백신인 아토포퍼 (Aftopor[®], Merial)를 돼지 목 부위에 2 mL씩 근육주사로 접종하였다. SoltoB 급여가

구제역 바이러스 백신의 효과에 미치는 영향을 검증하기 위하여 백신 접종 전 2주부터 백신 접종 후 5주에 걸쳐 자돈의 경정맥에서 매주 채혈을 실시하였다.

다. 항체 생성능의 확인

IgG는 백신 접종 후 형성되는 주요 중화항체로서 체내의 IgG의 수치가 증가할수록 질병에 대한 면역력이 더 향상되는 것으로 생각할 수 있다. 따라서 백신 접종 후 IgG 항체를 측정함으로써 특정 질병에 대한 면역반응이 증가되었는지 여부를 확인할 수 있다. 본 실험에서는 이러한 IgG 항체 생성능의 확인을 위하여 자돈으로부터 백신 접종 2주일 전부터 백신 접종 5주일 후까지 1주 간격으로 채혈을 실시하여 혈청을 분리한 후, Prionics사의 PrioCHECK[®] FMDV type O ELISA kit를 사용하여 혈청 내 IgG 항체를 측정하였다 (그림 21). 항체가 측정을 위해 Kit의 사용설명서에 따라 실험을 진행하였으며 실험의 마지막 단계에서 흡광도를 측정하여 (450nm) kit의 사용설명서를 준수하여 percentage inhibition (PI)으로 환산하였으며 PI 값이 50%가 넘는 개체를 FMDV 항체가 양성으로 판단하여 FMDV에 대한 항체가 형성된 것으로 판단하였다. 또한 이렇게 항체가 형성된 개체들 중에서 PI값이 높을수록 항체가 높은 것으로 판단하였다.

FMDV 백신 접종 전 각 군의 PI값은 비급여군 29.17, 1% SoltoB 급여군 22.44, 3% SoltoB 급여군 25.86%으로 FMDV 항체가 음성을 나타내었다. 하지만 FMDV 백신 접종 1주후에는 비급여군 42.99, 1% SoltoB 급여군 45.15, 3% SoltoB 급여군 55.73으로 증가하였으며, 접종 2주후에는 비급여군 54.40, 1% SoltoB 급여군 57.67, 특히 3% SoltoB 급여군에서는 76.06의 항체를 나타내어 비급여군에 비해 항체가 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$). 백신 접종 후 3주차와 4주차에도 3% SoltoB 급여군의 항체가 비급여군에 지속적으로 높게 유지되는 것을 확인할 수 있었는데, 3주차에서는 비급여군의 항체는 60.00인데 비해 3% SoltoB 급여군의 항체는 77.37로 유의적인 증가를 나타냈으며 ($p < 0.05$), 4주차에서도 비급여군의 항체는 65.05인데 비해 3% SoltoB 급여군은 81.28로 항체가 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$).

이를 통해 3% SoltoB를 급여한 군이 비급여군에 비해 FMDV에 대한 IgG항체가 높음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 이전에 ginseng stem-leaf saponin과 mineral oil을 적용 시 FMDV에 대한 IgG 항체가 증가했다는 Song 등 (2009)의 보고나 Cliptox에 의해 FMDV에 특이적인 IgG 항체가 증가했다는 Batista 등 (2010)의 보고와 상이한 결과이다. 또한 이는 SoltoB급여가 돼지의 PCV2 virus에 대한 항체를 증가시킨다는 Jung 등 (2010)의 보고와도 연관성이 있는 결과로 사료된다.

라. 항체 생성율의 확인

구제역 백신의 경우 기존에 개발된 가장 좋은 백신 접종을 실시하더라도, 일반적으로 돼지에서 백신의 최고 효능은 65-70% 수준에 불과하다. 따라서 백신 접종 후에 항체가 형성될 수 있다면 백신효율을 증진시킬 수 있을 것이다. 따라서 본 실험에서는 SoltoB 급여 후 항체 생성이 촉진되는지 여부를 확인하기 위해 항체 생성율을 비교해 보았다 (그림 22). 항체 생성율의 확인은 앞의 항체 생성능 확인을 위한 실험과 동일한 방식으로 진행하였다. 다만 마지막에 전체 마리 수 당 항체 양성가를 나타낸 마리수를 나누어 준 후 100을 곱해주는 방식을 사용하여 항체생성율을 계산하였다.

그 결과, 접종 1주차에서 비급여군 20%, 1% SoltoB 급여군 40%, 3% SoltoB 급여군 60%의 항체 생성율을 나타내었다. 2주차에는 3% SoltoB 급여군의 경우 항체 생성율이 100%에 도달하였으나, 비급여군의 항체 생성율은 60%에 불과하였다. 또한 4주차에는 1% SoltoB 급여군과 3% SoltoB 급여군 모두 항체 생성율이 100%였으나 비급여군은 80%에 머물렀으며, 5주차가 돼서야 비급여군의 항체 생성율이 100%에 도달함을 확인할 수 있었다. 따라서 비급여군에 비해 SoltoB 급여군이 백신 접종 후 항체가 더 빠른 시기에 생성되는 것으로 보아 SoltoB의 급여가 구제역 바이러스 백신에 의한 항체 생성을 촉진시키는 것을 확인할 수 있었다.

3. 야외 농장에서의 항체 생성능 및 항체 생성율 비교

가. 농장 단위에서의 항체 생성능 측정을 위한 실험 설계

실험실 단위뿐만 아니라 실제 야외 농장 단위에서 SoltoB 급여가 FMDV 백신에 대한 항체 생성능에 미치는 영향을 확인하기 위해 순천의 돼지농장을 선정하여 농장에서 SoltoB를 급여하며 사육되고 있는 이유자돈과 급여하지 않고 사육되는 이유자돈 30마리로부터 각각 백신 접종 1개월 전과 백신 접종 1개월 후의 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액의 전처리는 앞의 방식과 동일하게 실시하였으며, 측정 시까지 -20°C에 보관하였다.

나. 항체 생성능 측정 및 항체 생성율의 확인

혈청 내 FMDV에 대한 IgG 항체 생성능을 확인하기 위하여 앞의 실험실적 항체능 측정 실험에서 항체 생성능을 확인하기 위해 사용하였던 방법을 동일하게 사용하였다. 그 결과 (그림 23), FMDV 백신 접종전의 비급여군의 항체가는 21.68, SoltoB 급여군은 17.23으로 FMDV 항체가 음성을 나타내었다. 하지만 FMDV백신 접종 1개월 후에는 두 군 모

두 항체가 증가하여 항체가 양성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 특히 비급여군의 항체가인 64.04에 비해 SoltoB 급여군의 경우 72.77의 항체를 나타내었으며, 이를 통해 SoltoB 급여군의 항체 생성능이 비급여군에 비해 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다 ($p < 0.01$). 이는 앞서 실험실 단위에서 실시한 항체능 증가 실험과 유사한 결과이며, 따라서 SoltoB의 급여가 실험실적 단위에서 뿐만 아니라 일반 야외 농장 단위에서도 구제역 바이러스에 대한 항체를 증가시키는데 도움을 준다고 할 수 있겠다.

다. 농장단위에서의 항체 생성을 비교 분석 결과

항체 생성율은 앞의 실험실 단위 실험과 같은 방식을 사용하여 나타내주었다. 그 결과 백신 접종 4주차에 비급여군의 경우 86.67%, SoltoB 급여군의 경우 90%의 항체 생성율을 나타내었다 (그림 24). 따라서 비급여군에 비해 SoltoB 급여군의 항체 생성율이 더 높음을 확인할 수 있었다. 이는 실험실 단위 실험과 유사한 결과이며, 따라서 SoltoB 급여가 야외 농장에서의 구제역 바이러스 백신에 대한 항체 생성율을 증가시켜 백신 효율을 증진시킨다고 할 수 있겠다.

4. 항체 생성 초기 반응 비교

IgM은 백신 접종 후 3-4일 이내에 가장 먼저 형성되는 항체로, 항체 생성 초기 반응을 나타내어주는 지표로 사용되고 있다. IgM은 나중에 T-B세포의 상호작용에 의해 주요 중화항체인 IgG로 변화되어 면역 반응을 나타내기 백신에 의한 면역 형성에 중요한 역할을 담당하고 있다. 이에 본 실험에는 이러한 IgM 항체가 측정을 통해 항체 생성 초기 반응을 비교해 보고자 하였다. 이를 위해 각 군의 자돈의 경정맥에서 백신 접종 전, 백신 접종 후 1주차, 2주차에 3 mL씩 말초혈액을 채취하였으며, 채취한 혈액으로부터 혈청을 분리하여 본 실험에 사용하였다. 혈청내의 IgM을 측정하기 위하여 Prionics사의 PrioCHECK[®] FMDV type O ELISA kit와 horseradish peroxidase conjugated goat anti-pig IgM secondary antibody(AbD serotec)를 사용하였으며, 실험의 마지막 단계에서 흡광도를 측정하여 (405nm) IgM 항체의 발현 정도를 확인하였다. IgM 항체의 비교는 흡광도가 높을수록 항체가 높을 것으로 간주하였다.

그 결과 FMDV 백신 접종 전에는 비급여군 0.66, 1% SoltoB 급여군 0.73, 3% SoltoB 급여군 0.69 였으나, 백신 접종 1주 후에는 비급여군 1.11, 1% SoltoB 급여군 1.25, 3% SoltoB 급여군 1.33으로 증가하였다 (그림 25). 3% SoltoB 급여군의 경우 control에 비해 유의적으로 IgM 항체가 증가함을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$). 이는 FMDV 백신

적용 시 replication이 결여된 adenovirus 5에 FMDV의 capsid와 3C proteinase coding regions을 construct로 적용 시 IgM 항체가와 IgG 항체가 증가의 결과를 나타낸 Mayr 등 (2001)의 논문과 유사한 결과이다. 따라서 IgM 항체가가 증가하는 경우 IgG 항체가의 증가에도 영향을 미쳐 FMDV에 대한 방어능을 높일 수 있는 것으로 생각된다.

5. 돼지에서 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 및 면역 세포의 영향분석

가. SoltoB 급여에 따른 말초혈액 내 림프구의 비율분석

CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포의 비율은 면역의 기능과 반응을 측정하는데 일반적으로 이용되어지는 지표이다. CD4⁺:CD8⁺ 비율이 낮은 상태는 면역 억압성 질병이나 급성 바이러스성 질병에 걸린 개체에서 많이 나타나는 반면, CD4⁺:CD8⁺ 비율이 높은 상태는 육계의 면역이 증강된 경우 많이 보여진다.

본 연구에서는, SoltoB 급여에 따른 말초혈액에서의 림프구의 비율을 비교 분석하기 위해 백신 접종 후 1~5주차에 돼지의 경정맥에서 말초혈액 3 mL를 수거하여 동일한 양의 PBS로 희석해 주었다. 희석된 말초혈액을 3 mL의 Lymphoprep (Axis-shield)위에 조심히 올리고 800 ×g, 20분의 조건으로 원심분리 후, 림프구만을 분리하였다. 혈액으로부터 림프구들의 분리는 LymphoprepTM (Axis-shield, Oslo, Norway)을 이용하였다. 분리된 림프구는 아래 표시되어 있는 항체들과 30분간 반응 시킨 후, cold PBS로 3회 세척하여 측정을 실시한다. 림프구의 수를 5.0×10⁶cell/ml의 농도로 희석하였다. FITC anti-pig CD4a (help T cell)와 PE anti-pig CD8 (cytotoxic T cell)의 항체로 암실에서 30분간 반응시켜 염색하였다. 반응 후에 2회 원심 세척하고 PBS 1 mL를 분주하여 유세포분석기 (FACSCalibur FACS, BD Biosciences, USA)를 이용하여 말초혈액 내 림프구의 비율을 측정하였다.

그 결과 CD4⁺ T cell (그림 26), CD8⁺ T cell (그림 27)의 비율은 각 군에서 유의적인 변화가 없었으며, CD4⁺/CD8⁺ ratio (그림 28, 29)역시 각 군에서 유의적인 변화는 관찰되지 않았다.

나. SoltoB 급여에 따른 돼지의 혈액조성 변화

SoltoB 급여에 따른 돼지의 혈액 조성 변화를 확인하기 위해, 백신 접종 후 1주차, 4주차 및 5주차에 돼지의 경정맥에서 말초혈액을 채취한 후, 자동혈구계산기 (ForcyteTM, Oxford science Inc., UK)를 이용하여 Neutrophils, Lymphocytes, Monocytes, Eosinophils, Basophils을 포함하는 백혈구의 절대적 수치 변화를 검사하였다. 그 결과 말

초 혈액 내 백혈구 감별계산의 결과 각 군별 유의적인 차이를 확인 할 수 없었다 (그림 30, 31, 32).

다. SoltoB 급여에 따른 상대적 cytokines 발현 정도 조사

SoltoB 급여가 구제역 백신 접종 이후 돼지의 cytokines 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 백신 접종 후 1~5주차에 돼지의 경정맥에서 채혈을 실시한 후, 혈액에서 림프구를 분리하고 RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 다시 Reverse Transcription kit (Qiagen)을 이용하여 cDNA로 합성하여 template로 사용하였으며, TNF- α , IL-1 β 그리고 IFN- γ 의 상대적인 발현정도를 MyiQ™ real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 측정하였다 (표 5).

Real-time PCR의 조건은 Initialization step: 95°C/5min, Denaturation step: 94°C/30s, Annealing step: 57°C/30s, Extension step: 72°C/45s, Denaturation-Extension: 35 cycles로 실시하였다.

그 결과 백신 접종 1주 후에 SoltoB 급여군의 IFN- γ level이 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다 (그림 33, $p < 0.05$). 반면 TNF- α 와 IL-1 β level의 경우 각 군에서 유의적인 변화를 확인할 수 없었다 (그림 34, 35). 이는 SoltoB급여가 마우스에서 IFN- γ 사이토카인의 발현량을 증가시킨다는 Jung 등 (2010)의 보고와 유사한 결과로, IFN- γ 와 같은 대표적인 면역증강효과를 가진 사이토카인의 발현 증가는 구제역 바이러스 백신 접종 후 획득면역이 형성되는 과정을 촉진시킬 수 있을 것으로 생각된다.

라. SoltoB 급여에 따른 림프구 증식능 평가

SoltoB 급여에 따른 돼지의 림프구 증식능을 비교 분석하기 위해 백신 접종 후 1~5주차에 돼지의 경정맥에서 말초혈액을 수거하여 림프구를 분리하여 본 실험을 수행하였다. 분리한 림프구를 trypan blue로 염색 후, 현미경하에서 측정 및 그 수를 계산하였다. 최종적으로 1×10^6 cells/mL의 농도로 RPMI-1640 배지에 희석하였다. 96-well cell culture plate의 각 well에 100ul씩 희석된 세포를 분주 후, ConA (5ug/mL) 또는 LPS (50ug/mL)가 첨가된 RPMI-1640 배지를 100ul씩 추가로 넣어주거나 또는 mitogen이 무(無)첨가된 배지를 100ul씩 첨가하여 41°C, 5% CO₂의 조건으로 48시간 동안 배양하였다. 48시간 동안 배양된 세포의 각 well에 MTT (5mg/mL)용액 20ul씩을 첨가한 후, 다시 41°C, 5% CO₂의 조건으로 4시간을 더 배양하였다. 배양 종료 후, 상층액을 모두 제거하고 각 well당 200ul씩의 DMSO를 넣어 모든 세포가 녹을 때까지 충분한 시간을 주었다 (최소 10분 이상). 모든

세포가 녹은 후, 540nm에서 흡광도를 측정하여 림프구의 증식능을 비교하였다.

그 결과, mitogen 무첨가시, 각 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았으며, LPS (B cell mitogen)와 ConA (T cell mitogen)로 자극 시에도 각 군별로 유의적인 차이를 보이지 않았다 (그림 36, 37, 38).

마. SoltoB 급여에 따른 혈청 중 lysozyme 활성 평가

라이소자임은 대식세포나 다형핵 백혈구와 같은 탐식구들에서 주로 분비되며 세균의 벽을 녹이는 항균물질이다. SoltoB 급여가 돼지에 구제역 바이러스 접종 시에 lysozyme 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 접종 1-5주차 돼지의 혈청에서 lysozyme의 활성을 측정하였다. Lysozyme의 측정은 crystal lysozyme의 세균에 대한 분해 정도를 Standard curve로 사용하여 Kreukniet *et al.* (1994)의 방법에 따라 실시하였다 (그림 39). Crystalline lysozyme을 0.5, 1, 2, 3, 4, 5ug/mL의 농도로 녹여서 standard로 준비하였다. 96-well plate의 각 well에 200ul씩의 *M. lysodeikticus*-용액을 넣었고, 미리 준비한 standard lysozyme 또는 혈청 20ul씩 첨가하였다. 41°C에서 1시간 동안 배양하며 15분 간격으로 흡광도를 측정하였다 (540nm). 시료의 lysozyme 활성 측정은 standard curve에 시료의 시간에 따른 흡광도의 변화를 대입하여 구하였다. 그 결과, 각 군마다 유의적인 차이를 나타내지 않음을 확인할 수 있었다.

6. 2010-2011 구제역 발생 시 돼지 농장에서 SoltoB 급여에 따른 예방 사례 분석

SoltoB를 급여한 돼지 농장에서 구제역 발생 시 예방 사례에 대한 분석을 위하여 전국의 돼지 농장 9개를 대상 (경기 3, 영남5, 충청1)으로 설문을 실시하였다. 설문은 직접 농장을 방문하여 설문지를 배부하는 방식으로 진행하였다. 설문지는 총 7개의 문항으로 작성되었으며 문항 내용은 다음과 같다.

- 농장이 속해있는 지역 (시.도)
- 농장 운영 경력 (년)
- 농장이 주도로와 떨어진 정도
- 농장 내 방역 시설 유무
- 농장에서 평소에 실시하는 횟수
- 돼지 사육 시 사료 첨가제 사용 유무
- 사료 첨가제로서의 SoltoB 사용 여부

설문 조사 종료 후, 각 설문 조사 항목과 구제역 발생 여부와의 상관관계를 조사하기 위해 설문 조사 항목을 명목변수로 처리한 후 다시 이 명목 변수를 바탕으로 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 카이제곱 검정을 실시하였다. 카이제곱 검정 후에는 검정 값이 $p < 0.05$ 를 나타내는 경우를 통계적 유의성을 나타내는 것으로 판단하였다. 그 결과 설문조사를 실시한 농장 9곳 모두 SoltoB를 사료첨가제로 급여하고 있었으며 이 중 구제역이 발생한 농장은 1곳 (경기)에 불과했다 (표 6).

동일한 설문지를 사용하여 전국의 소 농장을 대상으로 설문을 실시한 결과 SoltoB를 급여한 농장의 경우 구제역 발생률이 12.5%였으나, 다른 사료첨가제를 급여한 농장의 경우 56.3%, 첨가제를 급여하지 않은 농장의 경우 31.3%의 발생률을 나타내어, SoltoB급여 시 구제역 발생률이 유의성 있게 감소함을 확인할 수 있었다 (그림 19). 돼지 농장을 대상으로 한 설문 조사의 경우, 전국에 SoltoB를 사료 첨가제로 사용하고 있는 농가의 수가 적어 상대적으로 충분한 양의 자료를 수집하는데 어려움을 겪은 관계로 정확한 통계 처리를 하는데 있어 다소 부족한 점이 있으나 소 농장을 대상으로 한 설문 조사 결과와 위의 돼지 농장 설문조사 결과값으로 미루어볼 때, SoltoB를 사료첨가제로 급여 시 구제역 발생률이 감소할 것으로 사료된다.

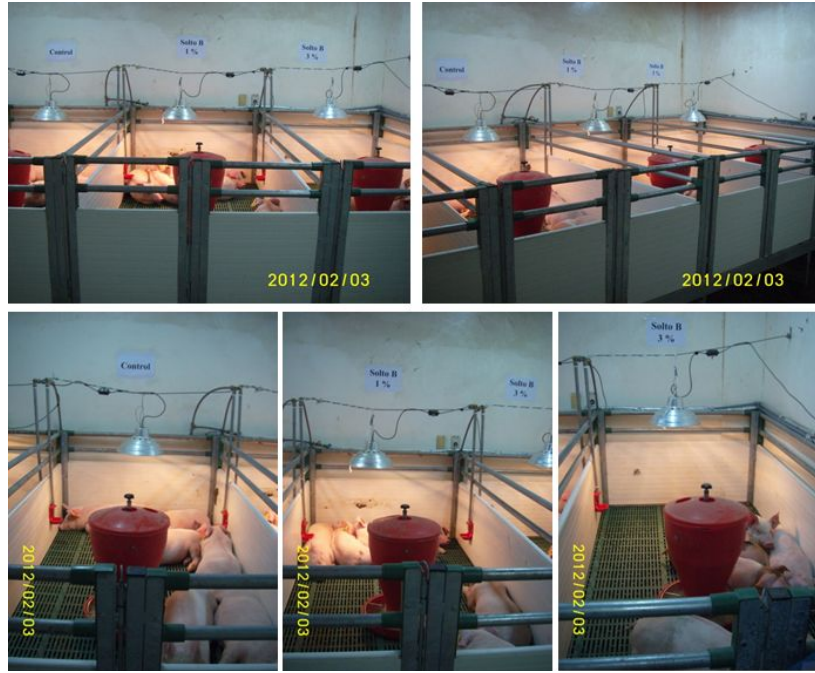


그림 20. 돼지에서 SoltoB 급여가 구제역 바이러스 백신의 효과에 미치는 영향을 평가하기 위한 돼지의 군 분리 및 사육장의 모습

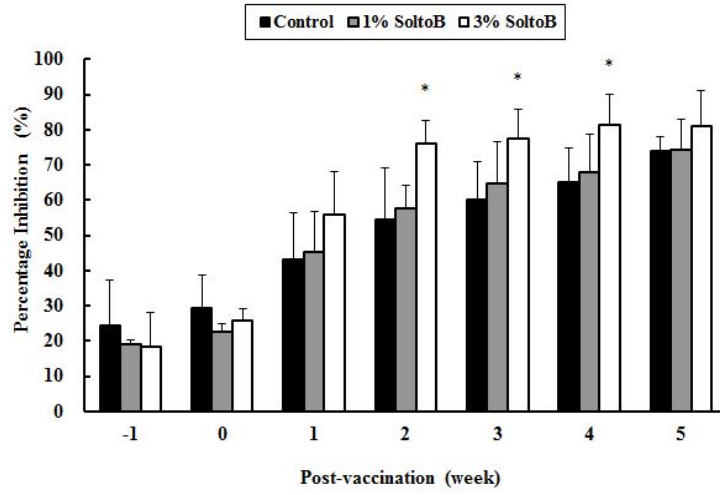


그림 21. 실험실 단위에서 구제역 바이러스 백신 접종 전과 접종후의 혈중 IgG 항체가

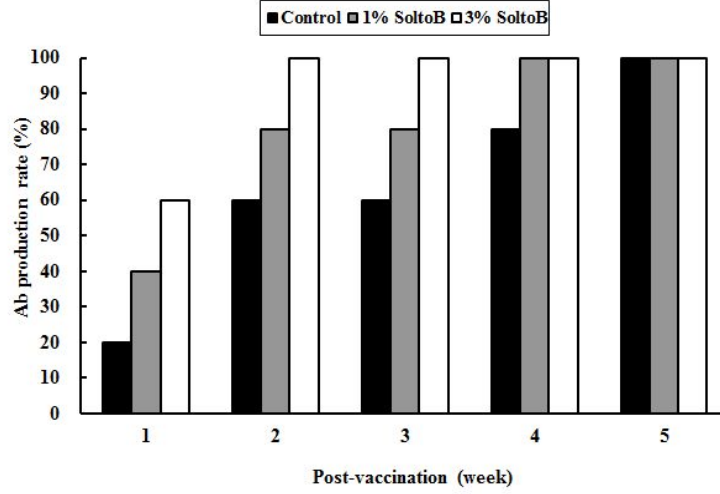


그림 22. 실험실 단위에서 구제역 바이러스 백신 접종후의 혈중 IgG 항체 생성율

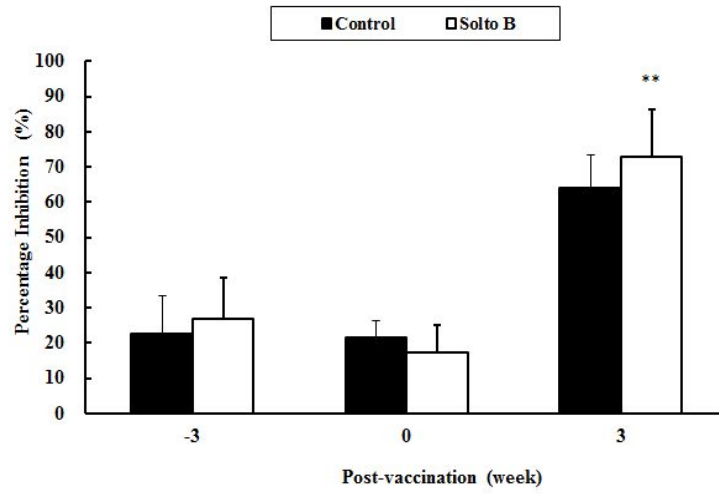


그림 23. 야외 농장 단위에서 구제역 백신 접종 전과 접종후의 혈중 IgG 항체가

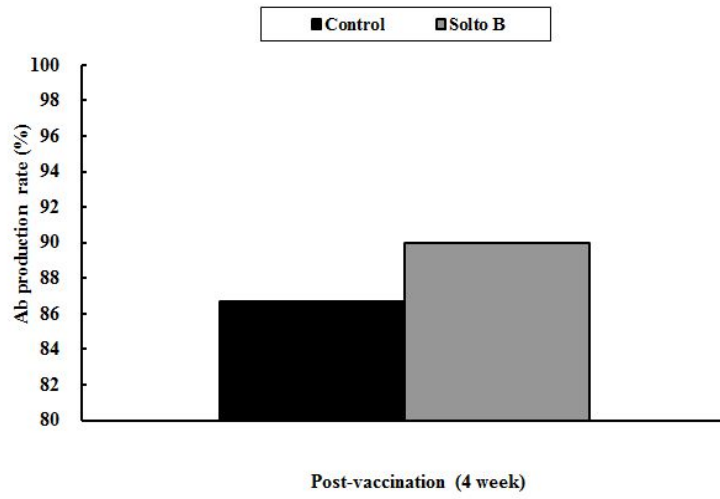


그림 24. 야외 농장 단위에서 SoltoB 급여 후 구제역 백신 접종 후 혈중 IgG 항체 생성율

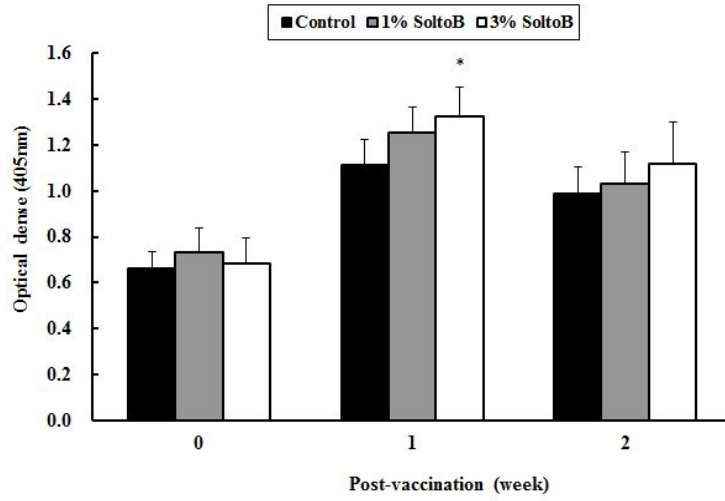


그림 25. 구제역 백신 접종 전과 접종후의 혈중 IgM 항체가

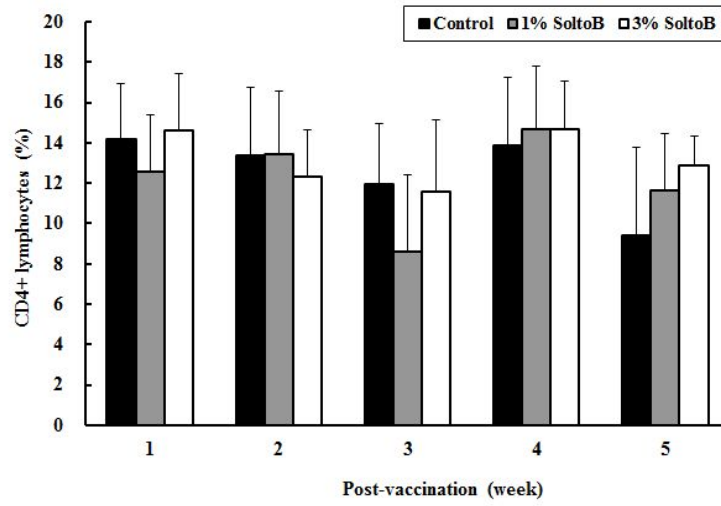


그림 26. 구제역 백신 접종 이후 돼지 혈액 내 CD4+ T Lymphocyte 수치

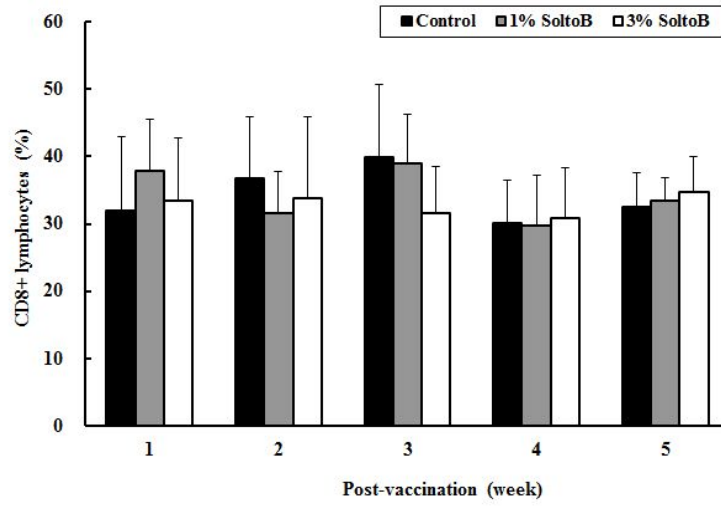


그림 27. 구제역 백신 접종 이후 돼지 혈액 내 CD8+ T Lymphocyte 수치

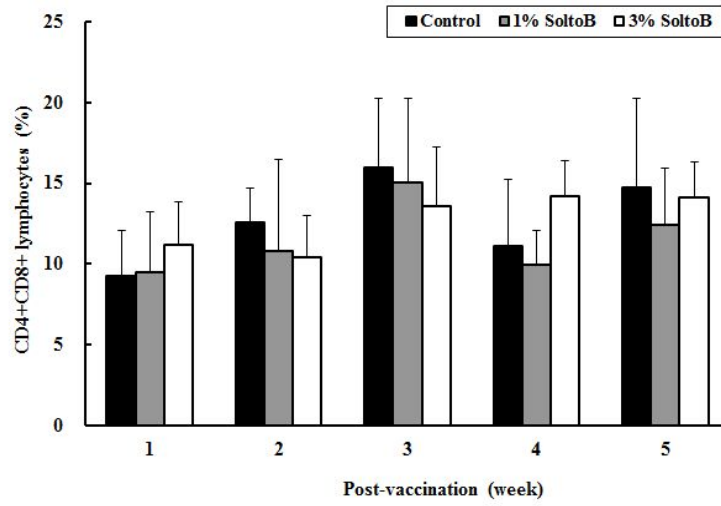


그림 28. 구제역 백신 접종 이후 돼지 혈액 내 CD4+/CD8+ T Lymphocyte 수치

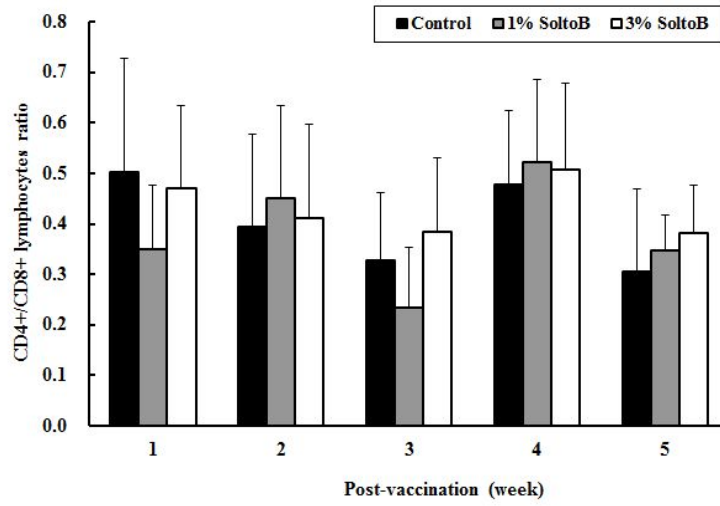


그림 29. 구제역 백신 접종 이후 돼지 혈액 내 CD4+/CD8+ T Lymphocyte 비율

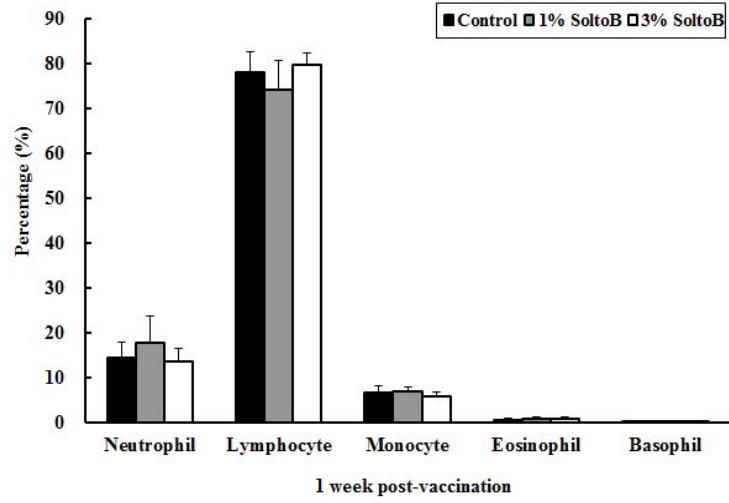


그림 30. 구제역 바이러스 백신 접종 1주일 후 혈액 조성 변화

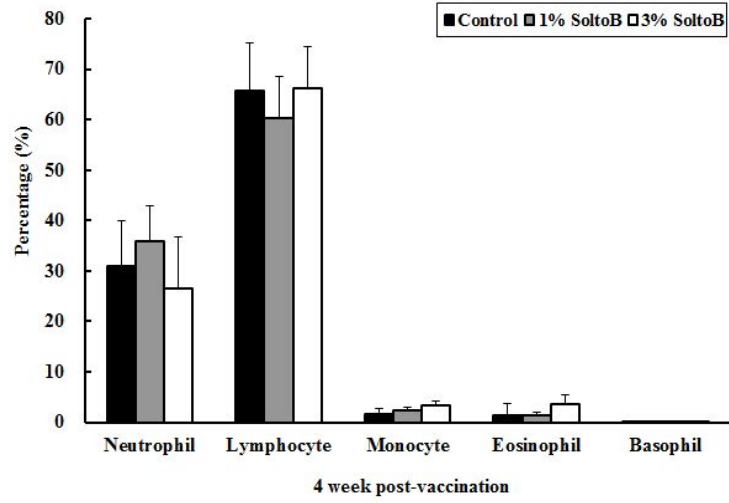


그림 31. 구제역 바이러스 백신 접종 4주일 후 혈액 조성 변화

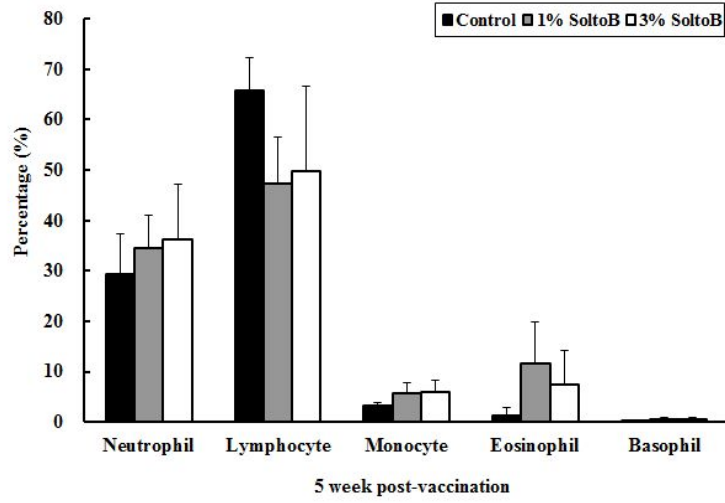


그림 32. 구제역 바이러스 백신 접종 5주일 후 혈액 조성 변화

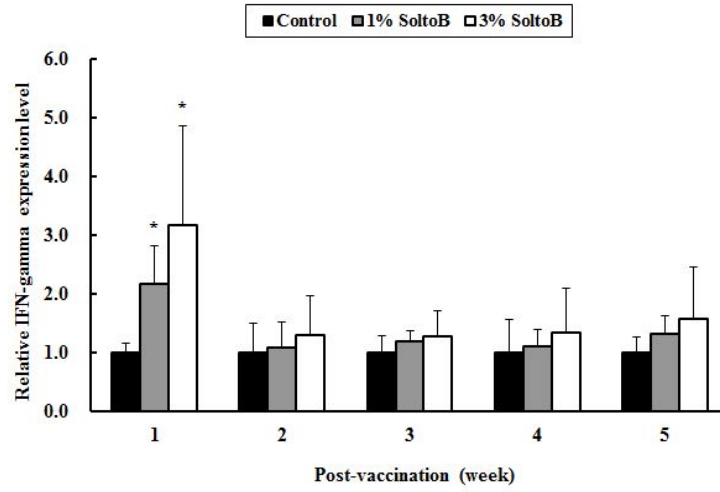


그림 33. 구제역 바이러스 백신 접종 후 IFN- γ cytokine의 상대적인 발현정도

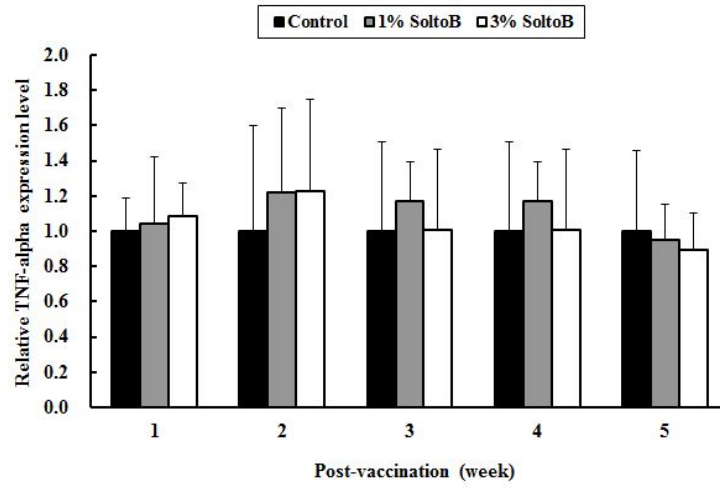


그림 34. 구제역 바이러스 백신 접종 후 TNF- α cytokine의 상대적인 발현정도

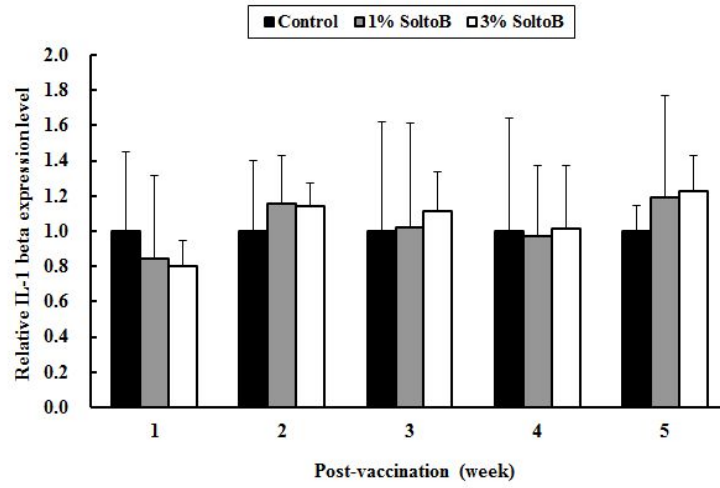


그림 35. 구제역 바이러스 백신 접종 후 IL-1 beta 사이토카인의 상대적인 발현정도

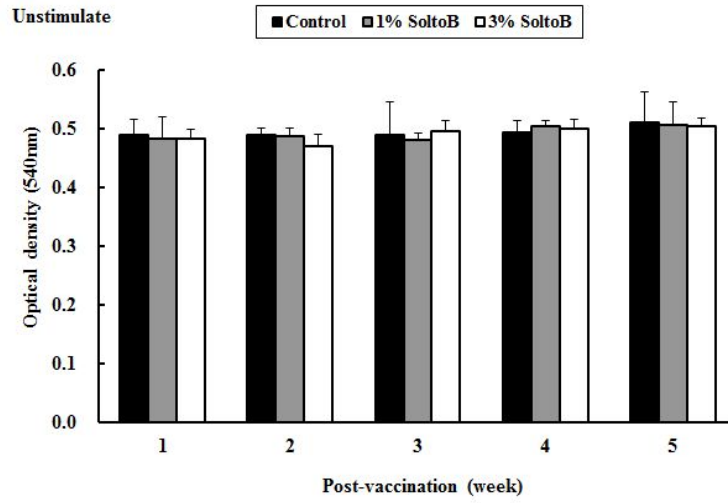


그림 36. 구제역 바이러스 백신 접종 후 림프구 증식능 비교 (unstimulated)

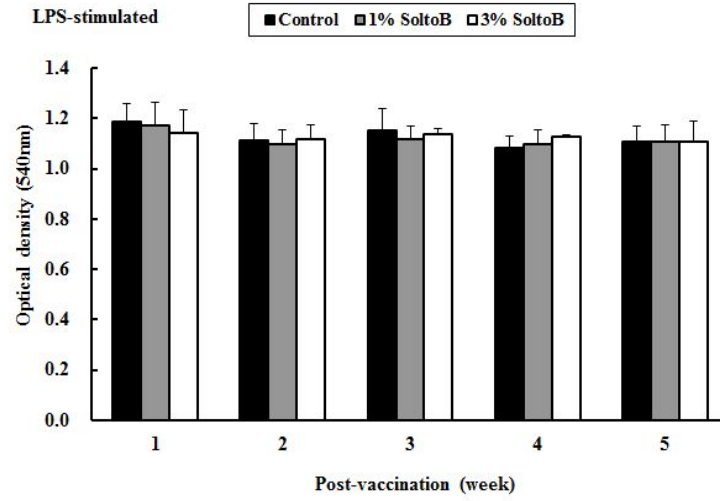


그림 37. 구제역 바이러스 백신 접종 후 림프구 증식능 비교 (LPS-stimulated)

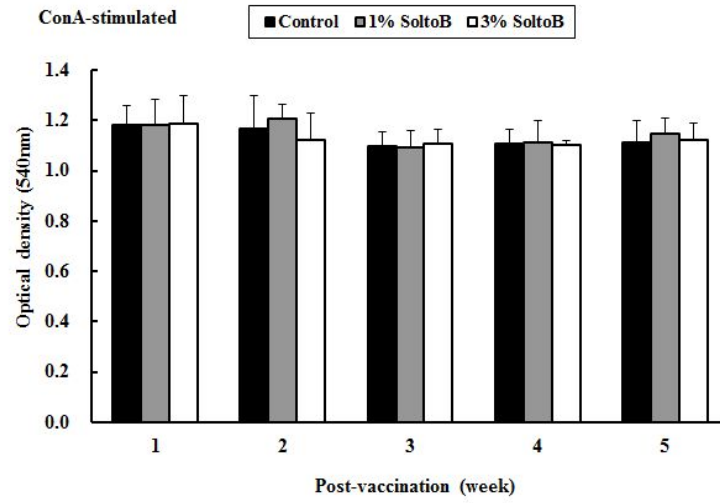


그림 38. 구제역 바이러스 백신 접종 후 림프구 증식능 비교 (ConA-stimulated)

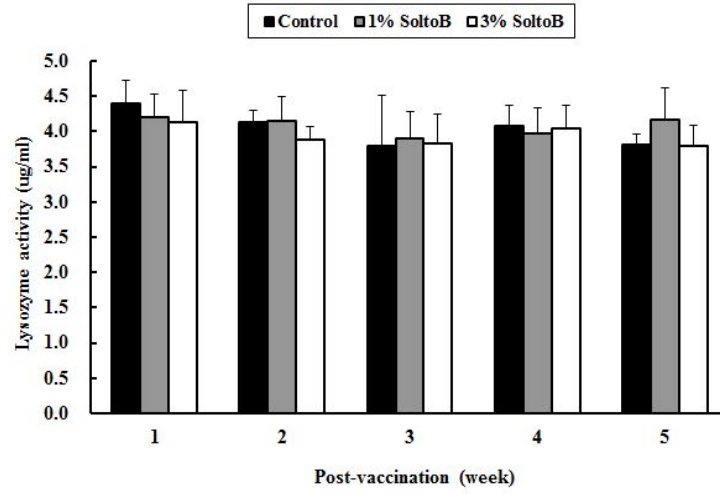


그림 39. 구제역 바이러스 백신 접종 이후의 돼지 혈청에서 lysozyme의 활성 변화

Table 5. Primer sequences for porcine cytokines

Gene name	Forward	Reverse	Accession No
Beta-actin	CAGGTCATCACCATCGGCAACG	GACAGCACCGTGTTGGCGTAGAGGT	U07786
TNF- α	CCTCTTCTCCTTCCTCCTG	CCTCGGCTTTGACATTGG	NM_214022
IL-1 β	GGCCGCCAAGATATAACTGA	GGACCTCTGGGTATGGCTTTC	NM_214055
IFN- γ	CAAAGCCATCAGTGAACATCATGA	TCTCTGGCCTTGGAACATAGTCT	X53085

[Collado-Romero et al. Vet Res. (2010)]

표 6. SoltoB를 급여한 농장 중 구제역 발병 및 미발병 농장 수

발병여부	SoltoB 급여 농장수 (%)
구제역 발병	1 (11.1%)
구제역 미발병	8 (88.9%)
전체	9 (100%)

제 3 절 SoltoB 급여가 FMDV 백신의 효과에 미치는 영향 평가 (공격 접종)

1. 연구목표

FMD 바이러스 공격 접종을 통한 SoltoB 급여에 따른 구제역 예방백신 효과 분석

2. 실험 설계

가. 실험 개요

- (1) 공시동물 : 구제역 항체가 없는 5주령의 미니돼지 (옵티팜 솔루션)
- (2) 실험군 : SoltoB 급여 백신 접종군 (5두, SoltoB+vaccination), SoltoB 비급여 백신 접종군 (5두, Vaccination), SoltoB 비급여 백신 미접종군 (5두, Control)
- (3) 공격균주 : 2010년 안동 분리주 (농림수산검역검사본부 제공)
- (4) 실험장소 : 옵티팜 솔루션 무균 사육장, 농림수산검역검사본부 해외전염병과 차폐 연구실
- (5) 실험승인 관련
 - (가) 구제역 공격 접종 생물안전위원회 승인
 - ① 서울대학교 생물안전위원회
 - ② 승인 번호 : SNU-P120220-1
 - (나) 구제역 공격 접종 동물실험 승인
 - ① 서울대학교 동물실험윤리위원회
 - ② SNU-120223-8
 - (다) 농림수산검역검사본부 해외전염병과 차폐 연구실 이용 승인
 - ① 협조 요청 : 2011년도 농림기술개발사업 관련 차폐 실험실 사용에 대한 협조 (유한상 교수) / 서울대학교 산학협력단 160970 (2012. 07. 17)
 - ② 이용 승인 : 해외전염병연구동 차폐 연구시설 출입 및 사용 승인 통보 / 농림수산검역검사본부 구제역진단과-2943 (2012. 07. 20)
 - ③ 농림수산검역검사본부의 구제역 공격 접종 동물실험 승인의 경우 서울대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 확인하는 것으로 진행됨.
- (6) 사료 및 음수 제공 : 자유급식

나. 미니돼지의 백신 접종, SoltoB 급여, 공격 접종

(1) 미니돼지 백신 접종과 SoltoB 급여

공격 접종에 이용된 미니돼지는 옵티팜 솔루션 (오송)의 무균 사육시설에서 생산된 것으로 이유 후 (5주령) 7일 간의 SoltoB (사료 내 0.5% w/w) 급여 후 아토퍼 (Aftopor[®], Merial) 구제역 백신을 접종하였다. 이후 SoltoB 급여군은 실험 종료일까지 지속적으로 SoltoB를 급여하였다.

(2) 공격 접종

백신 접종 후 5주차에 옵티팜 솔루션의 미니돼지를 농림수산검역검사본부 (이하 검사본부) 해외전염병과 차폐 연구실 (이하 차폐실)로 옮긴 후 1일 계류 후 control 군에서 한 마리를 선발하여 donor로 선택하고 이 donor를 마취시킨 뒤 구제역 바이러스를 발굽에 직접 주사하여 감염 시켰다 (그림 40). 감염 시킨 donor는 차폐실 내의 isolator cage에 옮겨 다른 실험군의 개체에 감염이 되는 것을 차단하였다. 이후 48시간 뒤 donor의 구제역 임상증상을 확인한 후 이 donor를 SoltoB+vaccination군, vaccination군, control군과 16 시간 동안 합사하여 구제역에 감염된 donor와 다른 실험군의 미니돼지가 직접 접촉하여 전 실험군에 구제역을 공격 접종 하였다 (그림 41). Donor와 실험군의 미니돼지를 접촉시키기 위해 합사하는 16 시간 동안에는 SoltoB의 급여를 중지하고 이후 16시간의 공격 접종이 끝난 후에 실험군을 분리한 뒤 SoltoB 급여군에 다시 SoltoB를 급여하였다. 공격 접종에 이용된 donor는 윤리적 차원에서 공격접종이 끝난 뒤 안락사 시켰다.

(가) Donor 공격 접종

- ① FMDV : 2010 안동 분리주
- ② 마취 후 발바닥 제엽부 4곳에 1×10^5 TCID₅₀/mL의 바이러스를 200 μ l 씩 피내 주사
- ③ 48 시간동안 isolator 분리 사육

(나) SoltoB 급여군 및 비급여군 공격 접종

- ① Donor 임상증상 확인
- ② 임상증상을 통해 구제역 감염이 확인된 Donor를 전 실험군과 16 시간 합사하여 접촉 감염 시킴.

다. 공격 접종 후 사육 관리 및 샘플링

공격 접종 후 구제역에 감염된 돼지에서 다량의 구제역 바이러스가 배출되어 Donor에

의한 공격 접종 이후 같이 사육되는 돼지에 의해 지속적으로 감염이 이루어져 실험의 오차가 발행하므로 이를 예방하기 위해 공격 접종 후 임상증상으로 감염이 확인된 개체는 isolator cage에 옮겨서 사육하였다. 또한 배출되어 사육 시설에 잔류된 바이러스에 의한 지속 감염을 막기 위해 1일 1회 베크스 (바이엘)로 전 사육장을 소독하였다. 샘플링은 1일 1회 실시하였으며, 혈청, 타액, 콧물을 채취하였다. 또한 1일 1회 임상증상을 확인하고 체온을 측정하였다 (그림 42).

3. 공격 접종 후 임상증상 비교 분석

공격 접종 이후 control군 (백신 미접종군)의 경우 2일째부터 침울 증상 (사람이 다가가도 움직임이 없으며, 케이지를 흔들어도 거부나 기피의 움직임이 둔한 상태, depression)을 보이기 시작하였고, 3일째에 구제역의 전형적인 임상증상인 수포 형성이 제엽부 및 구강부에서 확인되었으며, 4일째부터 체온 상승이 관찰되었다 (그림 43). 수포 발생 및 발열 등의 임상증상과 더불어 같은 시기에 채혈한 혈청에서 구제역 진단 real time PCR (AccuPower[®] FMD real time PCR kit, Bioneer) 양성의 결과를 확인하여 혈중 바이러스 (viremia)를 확진하였고, 이로써 공격 접종이 모든 실험군의 미니돼지에 적절히 진행되었음을 확인하였다. 이후 control군은 8일째에 거의 정상 체온을 회복하였으며, 발생한 수포 역시는 가피를 형성하는 경과를 보였다.

SoltoB 급여군과 비급여군 역시 공격 접종 D+2에 침울 증상을 보이기 시작하였고 이때 SoltoB 급여군이 경우 5마리 중 4마리의 침울 증상을 보인 반면 비급여군의 경우 5마리 전체에서 침울 증상을 보였다 (그림 44). 체온의 경우 공격 접종을 한지 4일 후 증가하였으며, D+6일차에 정상 체온을 회복하는 것을 확인하였으나, SoltoB 급여군과 비급여군의 유의적인 차이는 확인할 수 없었다 (그림 45). 또한 공격 접종 D+2에 비급여군에서 수포 의심 병변이 5마리 중 3마리에서 관찰되었으나, SoltoB 급여군에서는 관찰되지 않았고, 공격 접종 D+3에 SoltoB 급여군에서 5마리 중 2마리에서 수포 의심 병변이 발생하였다. 같은 시기 비급여군에서는 5마리 중 1마리만 수포 의심 병변을 보였다. D+3에 수포 의심 병변을 보인 SoltoB 급여군의 2마리 중 1마리는 D+5에 제엽부 및 구강부에 수포 임상증상을 보임으로서 감염이 확인되었고, 이후 발병 및 회복이 빠르게 진행되어 control군과 같은 경과를 보였다.

공격 접종을 실시 후 혈중에 존재하는 바이러스의 양 (D+3, D+4)과 비액 (D+4)과 타액 (D+4)에서 분비되는 바이러스의 양을 측정하기 위해 bovine kidney cell을 이용하여 plaque assay를 실시하였는데, 백신을 접종한 SoltoB 급여군과 비급여군의 경우 상기의 샘플에서 live virus를 확인하지 못하였다. 반면 백신을 접종하지 않은 control군의 경우

D+3, D+4 때에 혈중에서 4마리중 3마리에서 live virus를 확인하였고 D+4 때에 1 마리의 비액 및 3 마리의 타액에서 각각 live virus를 확인하였다 (그림 46).

4. 공격 접종 후 혈청 내 면역학적 변화

가. 혈청 내 구제역 바이러스에 대한 항체 변화

구제역 야외 감염에 의한 항체 형성과 구제역 백신 접종에 의한 항체 형성을 구분하기 위해 구제역 백신에 의한 항체는 구제역 바이러스의 structure protein (SP)에 대한 항체만 형성되고 non-structure protein (NSP)에 대한 항체는 형성되지 않는다 (Cox, 2008). 또한 구제역 백신에 의해 항체가 충분히 생성되어 방어력이 충분히 갖추어졌을 경우, 실제 구제역 바이러스에 감염이 되어도 NSP에 대한 항체는 백신을 접종하지 않은 개체보다 낮게 형성되는데, 이는 NSP에 대한 항체가 생기기 전 SP에 대한 항체에 의해 바이러스가 충분히 중화되기 때문이다. 이에 본 실험에서는 SoltoB 급여군과 비급여군의 SP와 NSP에 대한 항체역가를 분석하여 SoltoB의 급여가 구제역 백신에 의한 면역 형성에 어떠한 효과를 주는 지 조사하였다. 또한 공격주인 안동주에 대한 중화항체가를 측정하여 직접적인 방어능 형성의 차이를 비교 분석하였다.

(1) 구제역 SP 항원에 대한 항체 변화

구제역 바이러스 공격 접종 직전 샘플링 한 혈청에 존재하는 SP에 대한 항체의 역가를 확인하기 위해 PrioCHECK[®] FMDV type O ELISA kit를 이용하여 PI를 측정하였다. PI의 값이 높을수록 항체의 역가가 높은 것으로 산정하였다. 그 결과 그림 47a 와 같이 SoltoB 급여군과 비급여군 사이에서는 차이를 보이지 않았으며, 공격 접종 이후에도 두 실험군 사이에서 유의적인 차이를 확인하지 못하였다. 백신을 접종하지 않은 control군의 경우 공격 접종 전에는 PI 값이 음성으로 매우 낮았으며, 공격 접종 이후 4일째부터 PI 값이 증가하기 시작하였지만 실험이 종료된 8일째까지 음성과 양성의 판정 기준인 PI 값 50 까지 올라오지는 못하였다. 반면 백신을 접종한 SoltoB+vaccination군과, vaccination군은 공격 접종 실험 전 기간에 걸쳐 PI 값이 70-80 을 유지하였다.

(2) 구제역 NSP 항원에 대한 항체 변화

구제역 공격 접종 후 NSP에 대한 항체의 생성 정도를 확인하기 위해 BioNote FMD NSP Antibody ELISA (BioNote) kit를 이용하여 혈청 내 NSP에 대한 항체의 역가를 PI로 산출하여 측정하였다. 구제역 백신은 야외 감염과 백신에 의한 항체를 구분하기 위해

접종후에도 NSP에 대한 항체가 형성되지 않는다. 하지만 **그림 47b** 와 같이 구제역 공격 접종 전 혈청에서도 NSP에 대한 양성의 기준인 PI 값 50 이상의 역가를 확인할 수 있었는데, 이는 kit의 비특이적인 반응에 의한 것으로 판단된다. 비특이적인 반응을 고려하더라도 공격 접종 이후 SoltoB 급여군이 비급여군보다 NSP ELISA의 PI 값이 낮게 측정되었으며, 공격 접종 2일 및 3일째에는 유의적으로 SoltoB 급여군의 PI 값이 비급여군의 PI 값보다 낮게 확인되었다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 SoltoB 급여군이 비급여군보다 중화항체에 관련된 항체의 역가가 높아 SP에 대한 항체에 의해 바이러스가 중화되었기 때문인 것으로 판단된다.

(3) 안동주에 대한 중화항체가 변화

SoltoB 급여군과 비급여군의 공격 접종 전 D-10차와 공격 접종 후 D+4 및 D+8차의 혈청 내에 있는 공격균주인 안동주에 대한 중화항체를 측정하여 공격 접종에 대한 각 실험군의 방어능을 비교하였다. 그 결과 SoltoB 급여군에서는 공격 접종 전 안동주에 대한 중화항체가 한 두의 개체 (중화항체가 16배 이하)를 제외하고 비교적 고르게 형성되었음이 확인되었으나 비급여군은 5두 중 3두가 16배 이하로 측정이 되었고 나머지 2두에서만 32배로 측정되었다 (**표 7**). 공격 접종 이후 SoltoB 급여군에서는 **표 7**과 같이 D+4일 차에 한 두 (중화항체가 16배)를 제외한 4 두에서 모두 중화항체가가 16배 이하로 관찰되었고, 비급여군에서는 같은 시기에 SoltoB 급여군에 비해 높은 항체가를 보였다. D+8일 차에서는 SoltoB 급여군 중 한 두를 제외하고 비급여군에 비해 낮은 중화항체가를 보였다. 이는 공격 접종 전 백신 접종에 의한 교차 방어능이 SoltoB 급여군에서 비급여군에 비해 높게 형성되었고, 공격 접종이 이루어진 이 후에는 SoltoB 급여군의 초기 높은 교차 방어능에 의해서 공격 접종 후 직접적인 바이러스 감염에 의한 중화항체를 생성하기 전에 바이러스가 충분히 중화되었기 때문이라고 판단된다.

나. 혈청 내 cytokines의 변화

Cytokines는 면역을 형성하고 방어하는데 매우 중요하다. IFN- γ 와 IL-8은 바이러스성 감염이나 intracellular bacteria 등의 감염에 매우 중요하며, 두 종류 모두 선천성 면역과 획득 면역을 형성하는데, 매우 중요한 역할을 한다. IL-8의 경우 주로 항원을 탐식한 macrophage에 의해서 분비된다. CCL-2의 경우 주로 염증반응에 매개하는 cytokines으로 주로 상처나 염증 부위에 T cells이나 monocytes를 유도하는 역할을 한다. SoltoB의 급여가 백신에 의한 면역 형성과 공격 접종에 대한 방어에 미치는 영향을 확인하기 위해 IFN- γ (R&D system, USA), IL-8 (R&D system, USA), CCL-2 (MyBioSource,

USA)의 혈청 내 생성량을 측정하였다. 공격 접종을 실시한 이 후 미니돼지의 혈청의 cytokine의 변화는 **그림 48** 과 같다. SoltoB 급여군은 IFN- γ 와 IL-8의 생성이 비급여군에 비해 높고, CCL-2의 경우는 비급여군 보다 낮게 확인 되었다. 이는 SoltoB 급여가 macrophage의 활성을 촉진 시키고 IFN- γ 의 생성을 높인다는 선행 연구 결과와 일치하는 결과이다. 반면 CCL-2가 낮게 발현된 것은 CCL-2가 염증에 관여하는 cytokine으로 구제역 공격 접종을 SoltoB 급여군이 비급여군 보다 효과적으로 방어하여 염증 반응이 비급여군보다 낮은 수준에서 이루어 졌기 때문이라고 판단된다.

5. 공격 접종 후 말초혈액 면역 세포의 면역반응 비교 분석

공격 접종 후 말초혈액 면역 세포의 구제역 항원 자극에 대한 반응 분석을 통해 SoltoB 급여가 백신에 의한 방어능 형성에 미치는 영향을 분석하였다. 공격 접종 후 8일째의 미니돼지 혈액에서 PBMC를 분리하여 5×10^6 cells/mL의 cell 수로 배양하고, 이후 FMD Ag 2.5 ug/mL로 96 시간동안 자극하였다. 자극된 cell은 $300 \times g$, $4^\circ C$, 10분으로 원심하여 cell 상층액을 수거하여 cytokines의 생성량을 측정하였다. 또한 96 well 플레이트에 5×10^6 cells/mL의 cell 수로 $90 \mu l$ 배양하고, 여기에 FMD Ag 2.5 ug/mL로 96 시간동안 자극한 뒤, cell viability reagent인 10 \times Prestoblu[®] (Life technologiesTM) $10 \mu l$ 를 넣고 2시간 더 배양하여 560 nm의 흡광도로 cell 의 proliferation을 확인하였다.

가. 말초혈액 면역 세포의 구제역 항원에 대한 cytokines 생성능 비교 분석

말초혈액 면역 세포의 구제역 항원에 대한 반응으로 구제역 공격 접종을 실시한 미니돼지의 혈청에서 분석한 항목과 동일한 항목인 IFN- γ (Kingfisher biotech Inc, USA), IL-8 (Kingfisher biotech Inc, USA), CCL-2 (Kingfisher biotech Inc, USA) 항목을 분석하였다. 그 결과 **그림 49** 과 같이 FMD Ag로 PBMC를 자극하였을 때 SoltoB 급여군에서 IFN- γ 및 IL-8의 생성량이 비급여군보다 높았으며, CCL-2는 비급여군보다도 낮게 생성됨이 확인되었다. 이는 공격 접종을 실시한 미니돼지의 혈청에서 직접 실시한 cytokines의 생성량 실험과 동일한 결과로 IFN- γ 와 IL-8이 주로 관여하는 innate immune system과 세포성 면역 반응이 SoltoB 급여에 의해 향상되었기 때문인 것으로 판단된다. 또한 염증과 관련된 면역에 작용하는 CCL-2의 생성이 SoltoB 급여군에서 비급여군보다 낮게 확인된 점은 SoltoB 급여에 의한 면역 증강으로 백신에 의한 구제역 감염에 대한 저항성이 더 증가했기 때문인 것으로 판단된다.

나. 말초혈액 면역 세포의 구제역 항원에 대한 proliferation 비교 분석

말초혈액 면역 세포의 구제역 항원에 대한 proliferation을 비교 분석하여 SoltoB 급여가 백신의 의해 생성된 공격 접종에 대한 방어능에 미치는 영향을 평가하였다. 그 결과 **그림 50** 과 같이 SoltoB 급여군이 비급여군과 비교하였을 때 유의적으로 구제역 항원에 대한 proliferation이 증가하였음을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$). 이는 SoltoB의 급여가 면역 세포 수준에서 백신에 의한 방어능을 증가시켜 세포 수준에서 구제역 항원에 대한 증식능이 증가되었기 때문일 것으로 판단된다. 또한 상기의 IL-8의 SoltoB 급여군에서의 상승 결과는 말초혈액 면역 세포의 구제역 항원에 대한 SoltoB 급여군의 높은 proliferation의 결과와 부합되는데, cell의 proliferation을 IL-8이 촉진한다는 것은 Li 등 (2003)에 의해 선행 연구되어 보고되었다. 반면 백신을 접종하지 않은 실험군에서 SoltoB 급여군 및 비급여군 보다 높은 proliferation 의 수준을 보였는데, 이는 구제역의 직접적인 감염 및 viremia가 유발된 control군에서 구제역 항원에 대한 감각이 다른 군에 비해 cell을 분리하기 전인 전혈상태에서도 지속적으로 이루어 졌기 때문인 것으로 보인다.

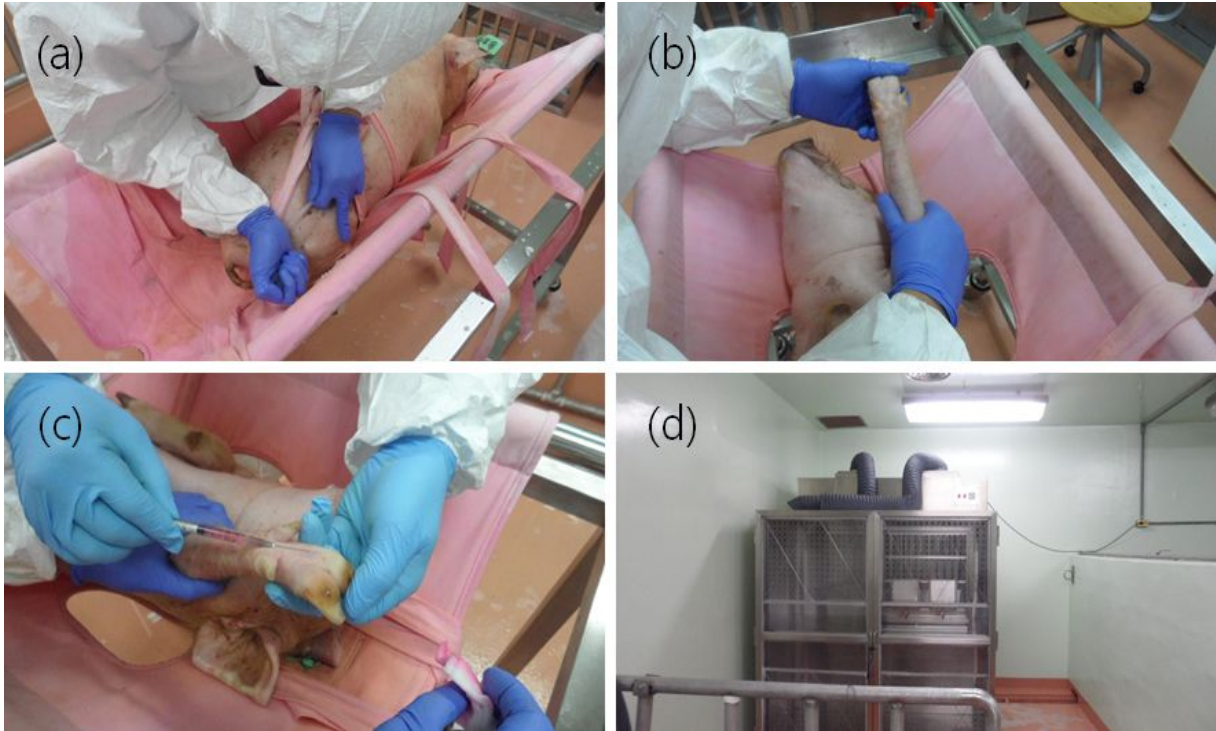


그림 40. (a) donor를 마취하는 모습. (b) 공격정접 전 donor의 발굽을 확인하는 모습 (c) 직접 주사의 방식으로 공격 접종 하는 모습 (d) 공격 접종 후 donor, 공격 접종 후 구제역 임상증상이 확인된 실험군의 미니돼지를 사육하는 isolator cage.



그림 41. Donor의 임상 증상 확인. 전형적인 구제역의 임상증상은 붉은 원으로 표시하였다. 발굽부위의 부종과 수포, 혀에 발생한 수포, 코 주둥이와 잇몸에 발생한 수포가 구제역의 전형적인 임상증상이다.



그림 42. 샘플링 모습. 1일 1회 채혈 (혈청), 체온, 타액, 콧물을 샘플링 하였다.

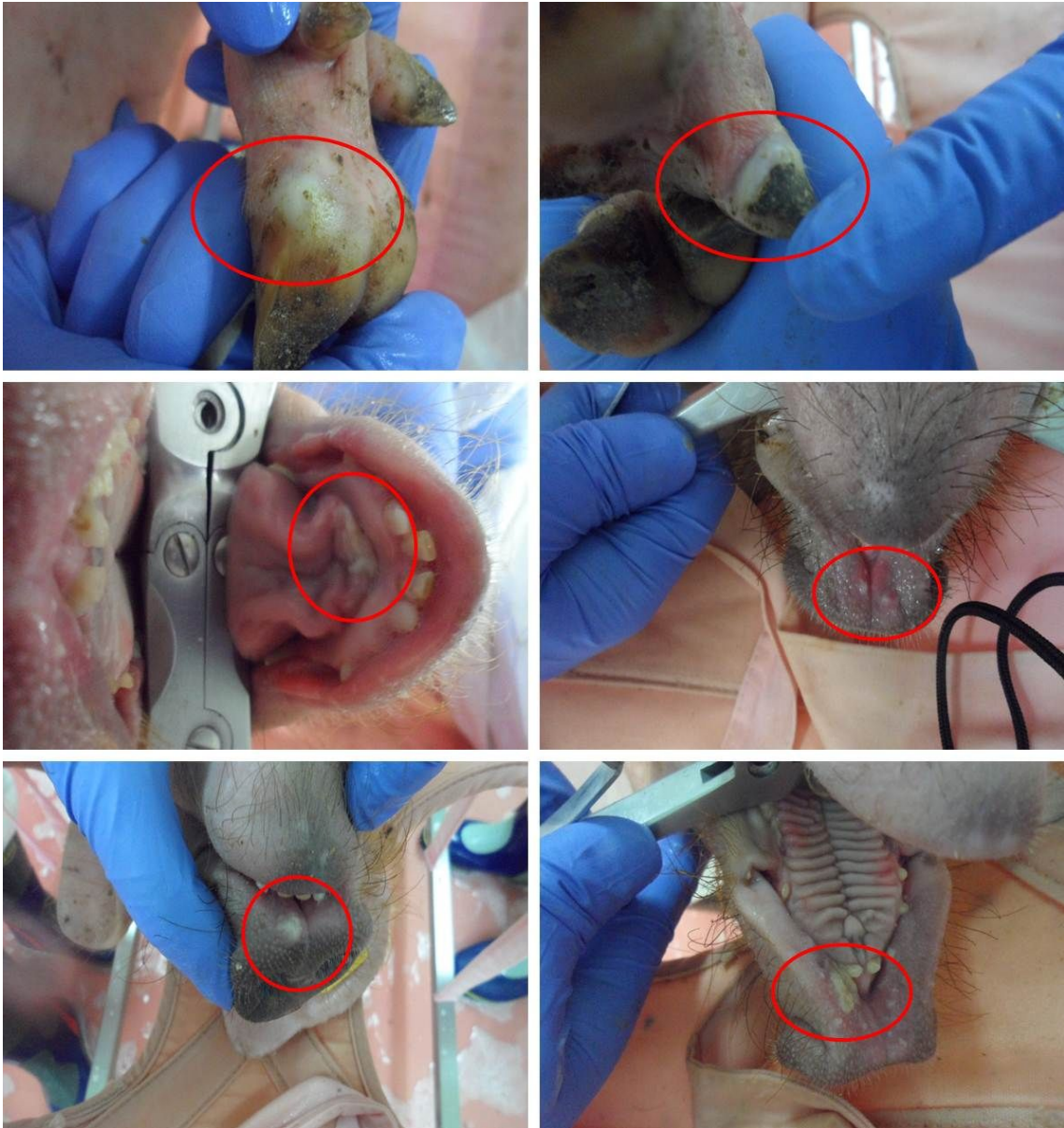


그림 43. 공격 접종을 실시한지 3일째에 Control (백신 미접종)군의 임상 증상 확인. 전형적인 구제역의 임상증상은 붉은 원으로 표시하였다. 발굽부위의 부종과 수포, 혀에 발생한 수포, 코 주둥이 주변부와 잇몸에 발생한 수포가 구제역의 전형적인 임상증상이다. 같은 시기의 혈청 샘플에서 FMD real time PCR을 통해 viremia를 확인하였다.



그림 44. 공격 접종 이후 2일째 SoltoB 급여군과 비급여군의 침울 증상 확인 (a) SoltoB 급여군의 경우 사람이 다가가면 일시적으로 뒤로 물러섰다가 다시 다가오는 일반 돼지의 움직임을 보이나 공격 접종 전보다 둔해졌고 5마리 중 4마리에서 침울 증상을 확인하였다. (b) 비급여군의 경우 사람의 움직임에 따른 반응이 공격 접종 전보다 둔해졌고 5마리 전체에서 침울 증상이 관찰되었다.

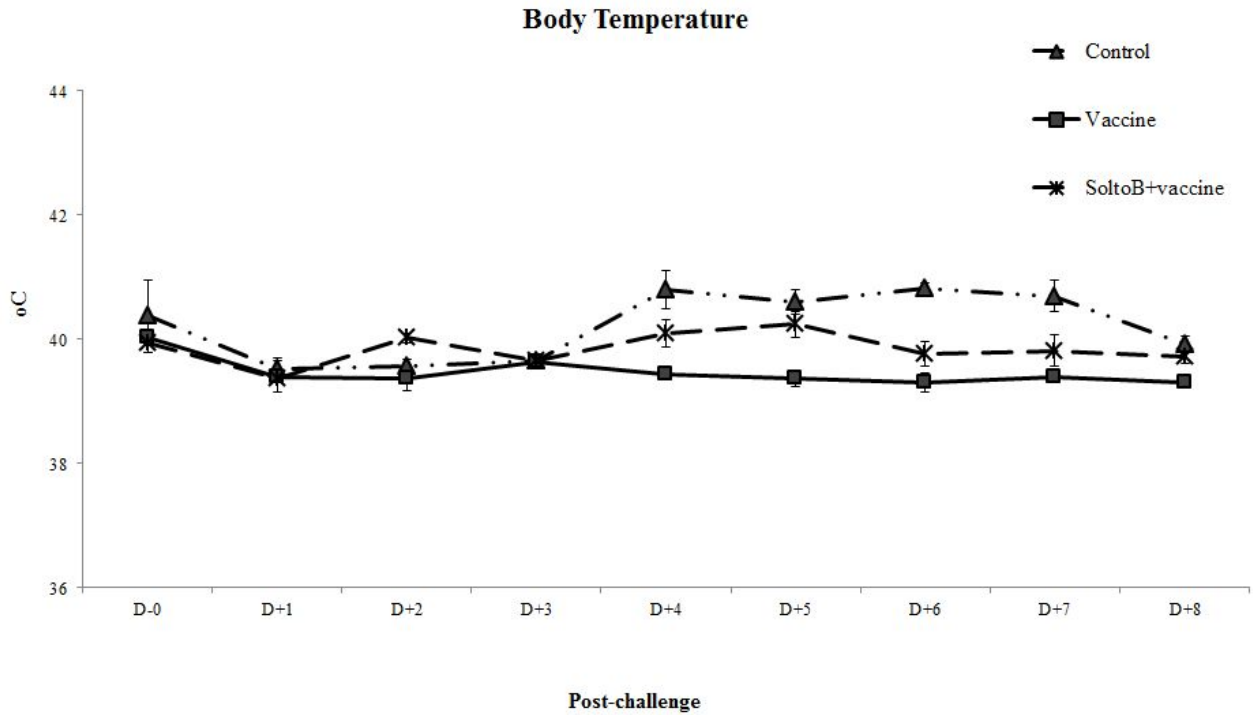


그림 45. 공격 접종 이후 각 실험군의 체온 변화. Control의 경우 체온이 4일째에 증가하기 시작하여 8일째에는 정상체온을 회복하였다. SoltoB 급여군과 비급여군 사이에서는 유의적인 차이를 확인하지 못하였다.

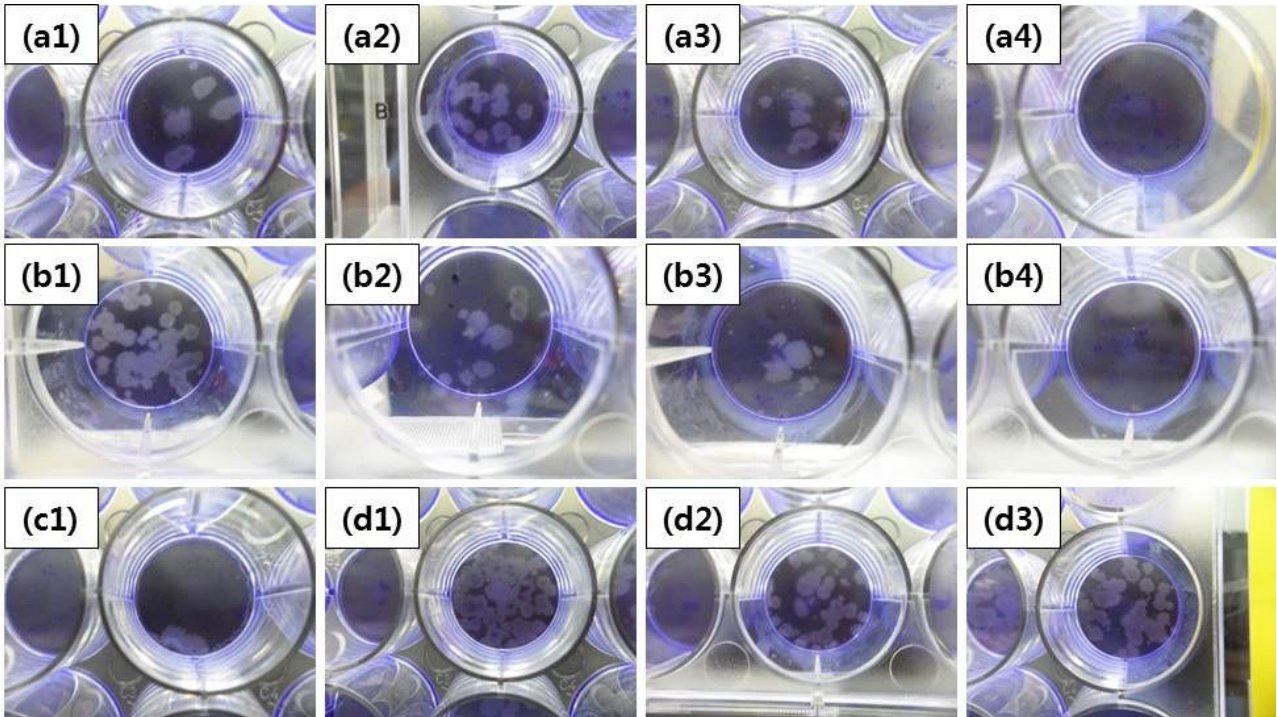


그림 46. Control (백신 미접종) 균의 혈청, 비액 및 타액 plaque assay. (a) 4마리 중 3마리에서 확인된 공격 접종 3일째 10^{-2} 으로 희석한 혈청 내에 확인된 live virus, (b) 4마리 중 3마리에서 확인된 공격 접종 4일째 10^{-3} 으로 희석한 혈청 내에 확인된 live virus, (c) 4마리 중 1마리에서 확인된 공격 접종 4일째 비액 내에 확인된 live virus, (d) 4마리중 3마리에서 확인된 공격 접종 4일째 타액 내에 확인된 live virus, 혈청 결과의 경우 D+3에서 D+4로 경과가 진행됨에 따라 plaque의 수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 같은 시기 SoltoB 급여균 및 비급여균에서는 live virus가 분리되지 않았다.

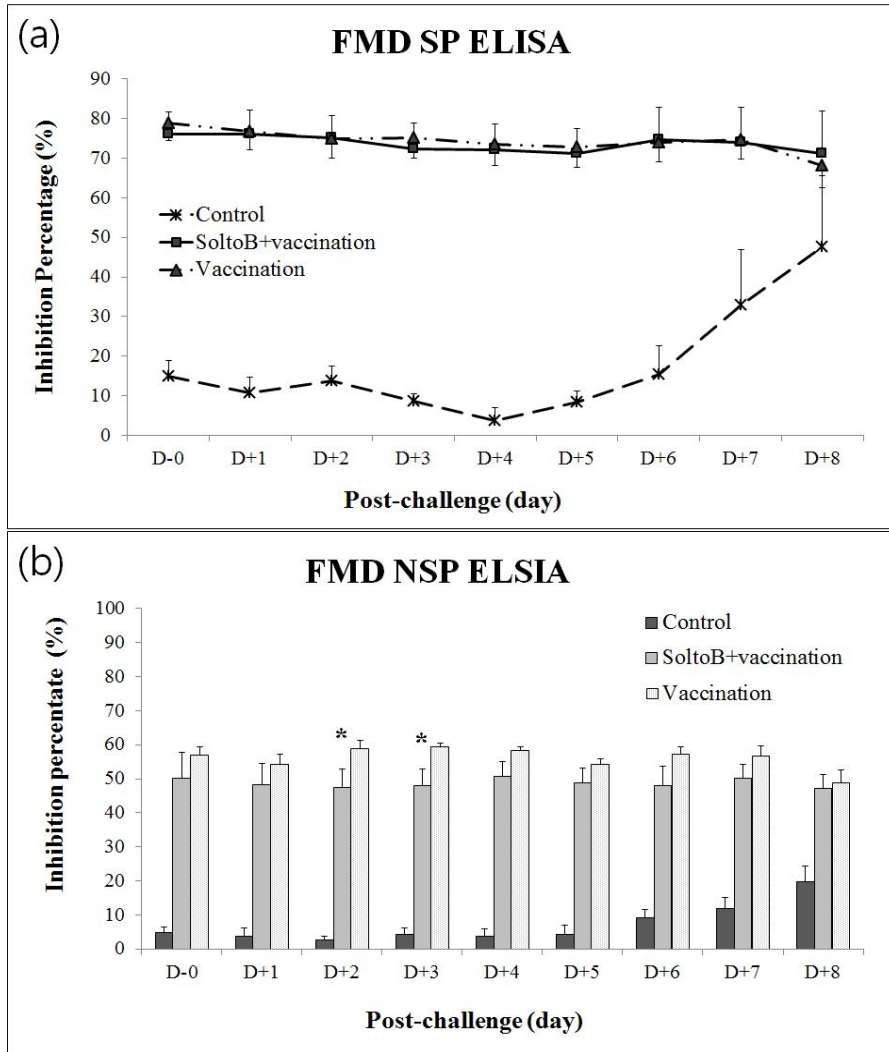


그림 47. 구제역 공격 접종 실험 기간의 구제역 바이러스 structural protein (SP)과 non-structural protein (NSP)에 대한 미니돼지의 항체가 변화. SoltoB 급여군과 비급여군 사이에 SP에 대한 항체는 차이가 없으나 NSP에 대한 항체는 SoltoB 급여군이 비급여군 보다 낮은 inhibition percentage를 보인다.

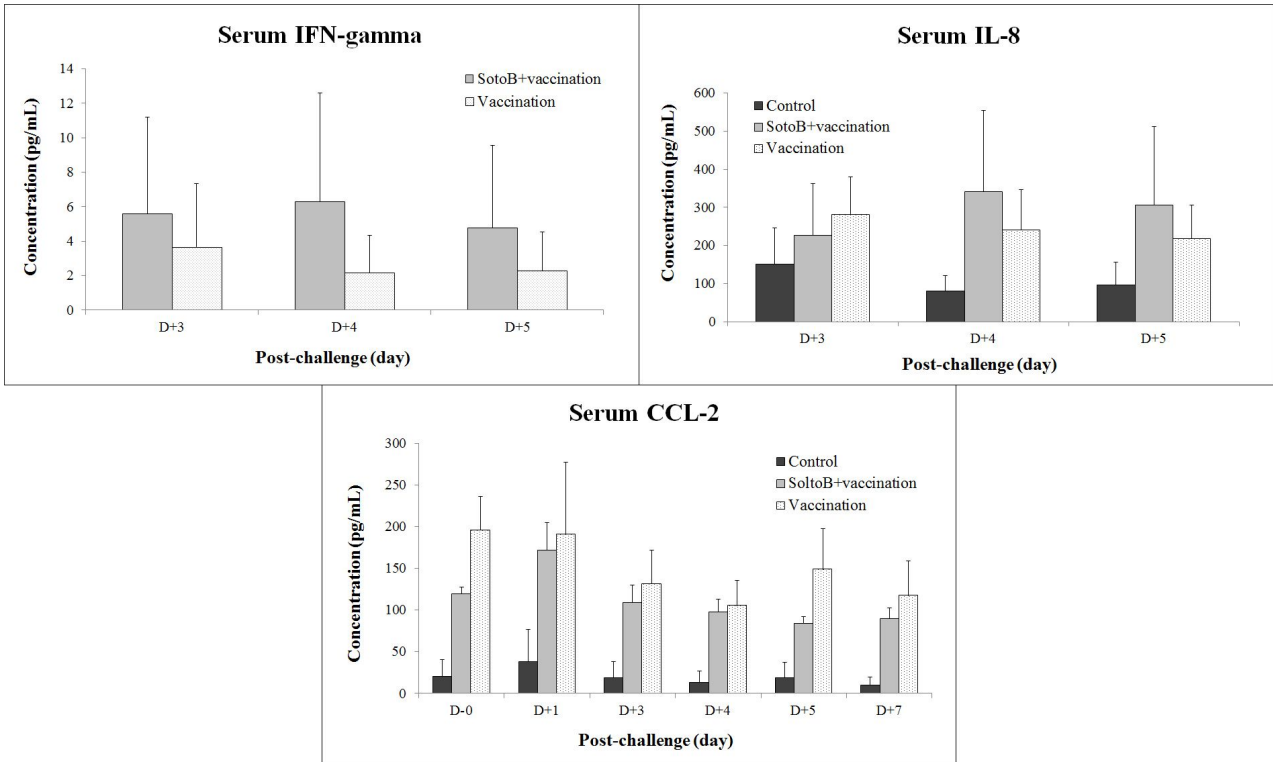


그림 48. 공격 접종 후 미니돼지 혈청내의 cytokine 생성량. SoltoB 급여군은 비급여군에 비해 높은 IFN- γ 와 IL-8의 생성을 보였고, 낮은 CCL-2의 생성을 보였다. IFN- γ 의 경우 control군에서는 ELISA 측정범위 이하의 수치를 보여 측정되지 않았다.

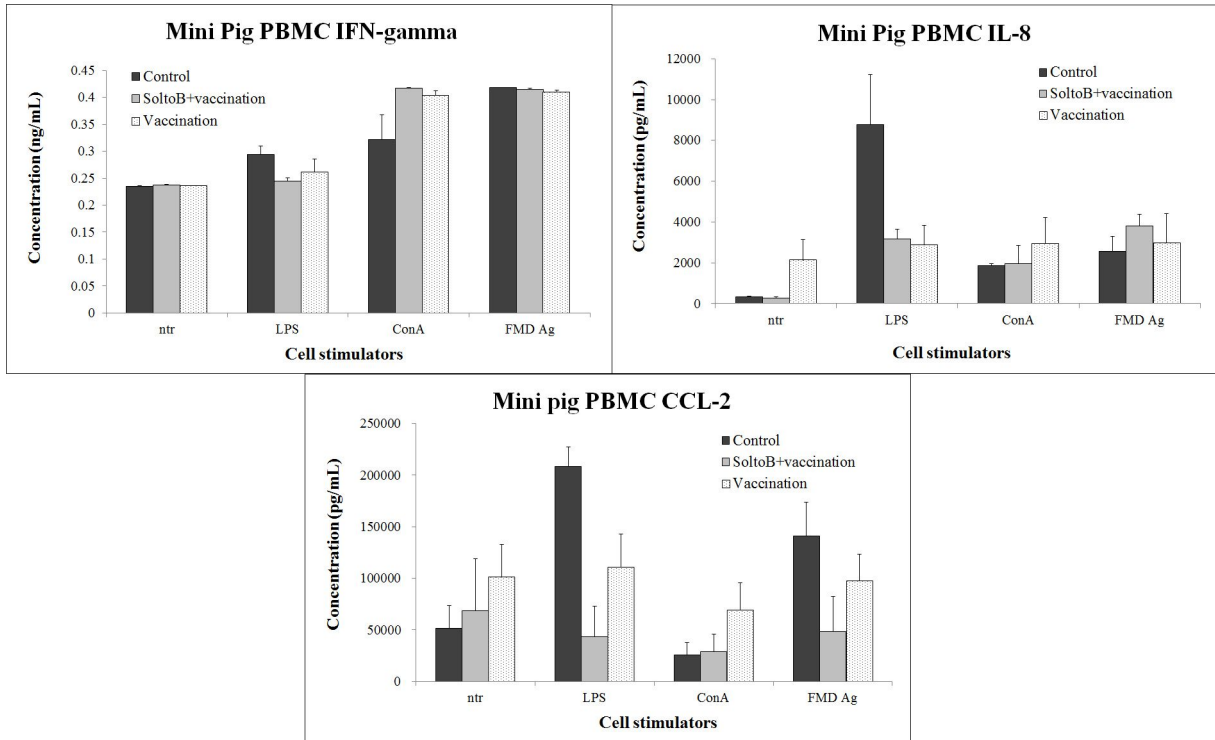


그림 49. 공격 접종을 실시한 미니돼지 말초혈액의 면역 세포 PBMC를 구제역 항원으로 자극한지 96 시간째 cytokines 생성량. SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 높은 IFN- γ 와 IL-8의 생성량을 보이고 더 낮은 수준의 CCL-2의 생성량을 보임이 확인되었다.

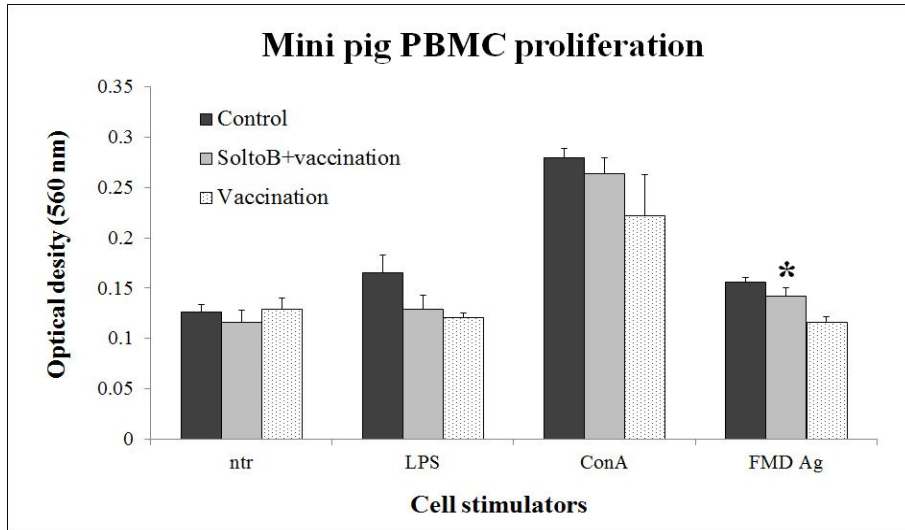


그림 50. 공격 접종을 실시한 미니돼지의 말초혈액 면역 세포 PBMC의 구제역 항원에 대한 증식능 결과. SoltoB 급여군이 비급여군과 비교하였을 때 유의적으로 구제역 항원에 대한 proliferation이 증가하였음을 확인할 수 있다 ($p < 0.05$).

표 7. 미니페지 혈청 내의 공격 접종 전·후 안동주에 대한 중화항체가 변화

Groups	No.	D-10	D+4	D+8
	1	32	90	32
SoltoB 비급여	2	< 16	16	16
+	3	< 16	< 16	< 16
vaccination	4	32	16	32
	5	< 16	< 16	< 16
	1	22	16	< 16
SoltoB 급여	2	16	< 16	1,024
+	3	22	< 16	16
vaccination	4	16	< 16	16
	5	< 16	< 16	< 16

제 4 절 고찰

본 과제는 면역증강물질 (SoltoB)의 구제역에 대한 임상실험 검증을 위한 실험으로 면역증강제로 사료 첨가제로써 쓰이고 있는 SoltoB가 구제역 백신 효과에 미치는 영향을 과학적으로 분석하기 위해 진행되었다.

구제역 (Foot and mouth disease, 口蹄疫)은 우제류 동물에 *Picornaviridae* 과 *Aphthovirus* 속에 속하는 구제역 바이러스 (Foot and mouth disease virus, FMDV)가 감염되어 발생하는 질병으로 넓은 숙주영역, 높은 전염력, 매우 빠른 복제효율을 특징으로 하는 질병이다. 직, 간접 접촉전파, 공기전파 등의 다양한 경로로 전파되며 발생 시 축산업에 막대한 피해를 주고, 다른 국가 등 먼 걸로 확산될 가능성이 매우 크기 때문에 가축과 축산 가공품의 국제무역에서 가장 큰 걸림돌이 되어 왔다.

이러한 이유로 구제역의 근절을 위해 전 세계적으로 많은 노력을 기울이고 있고 각 나라의 실정에 맞게 방역정책을 실시하고 있다. 대부분의 구제역 청정국가들은 발생 시 살처분 정책 또는 긴급 백신 접종 후 살처분 정책을 실시하고 있으나 최근에 들어서 윤리적 측면과 경제적 측면의 문제가 부각되면서 살처분 정책에서 백신 접종 후 관리 정책 (vaccination-live)으로 그 중요성이 옮겨지고 있다. 우리나라의 경우도 마찬가지로 지난 2010년 11월에 안동에서 시작한 구제역이 전국으로 전파되면서 6,000 여 농가의 우제류 약 340만 두가 살처분 매몰되었고, 이를 위해 공무원, 민간인, 군인 등 연 인원 약 160만 명이 동원되었으나 구제역의 전국적인 전파를 우려해 백신 정책을 실시하게 되었다. 전국적인 소와 돼지에 대한 백신 접종으로 소는 약 340만 두, 돼지는 830만 두에 대해 백신을 접종하게 되었다. 하지만 백신 접종을 실시하더라도 많은 문제점이 야외 농장에서 대두되어 백신의 효과를 증진 시킬 수 있는 방안에 대한 연구가 필요하게 되었다. 특히 백신 접종에 의해서도 접종 4-5 일 후, 일반적으로는 2 주일 후에 백신에 의한 항체가 형성되어 구제역에 대한 방어능이 없는 기간이 발생하며, 백신의 효과가 일반적으로 boosting 백신 후 6 개월까지여서 이 후 추가적인 보강접종이 지속적으로 필요해 이를 보완해줄 새로운 방안이 필요하게 되었다. 또한 백신 접종으로는 다양한 혈청형의 구제역 백신에 대한 방어능을 형성할 수 없고, 현재 시판 사용되고 있는 구제역 백신의 효능이 소에서 약 80%, 돼지에서 65-70% 수준임을 감안할 때 구제역 백신의 효능을 증진 시킬 수 있는 새로운 방안이 요구되고 있다.

구제역 백신의 효능을 증진 시킬 수 있는 방안 중 하나가 자연 면역을 증강시켜 질병에 대한 저항성을 높이고 백신 접종에 대한 면역반응을 증강시켜, 구제역 백신 접종 후 빠른 항체 생성과 높은 항체가 유지, 오랜 면역기간을 구현하는 것이다. 이에 본 실험은 이러한 백신에 대한 면역반응의 활성을 촉진하기 위한 하나의 방법으로 면역증강제로 알려진 사료첨가제인 SoltoB 급여와 백신 접종을 함께 실시하였고,

그 효과를 과학적으로 증명하고자 진행하게 되었다. 또한 면역증강제인 SoltoB가 소와 돼지에서 어떠한 면역기전으로 면역이 증강되는지도 함께 연구 진행하였다.

SoltoB 급여의 면역증강 효과와 구제역 백신 효과에 미치는 영향을 확인하기 위해, 소와 돼지에서 각각 SoltoB 급여군과 비급여군으로 실험군을 설정하고 각 실험군의 면역학적 차이와 백신 접종 후 백신의 효과차이를 분석하였다.

구제역 백신의 면역계 작용에 SoltoB 급여가 미치는 영향을 분석하기 위해 백신 접종 후 항체 유지 기간 및 항체가, 초기 체액성 면역의 class switching의 시점 비교와 점막면역의 형성 정도를 시험하였으며, 지난 2010-2011 구제역 파동 때 실 사례를 설문 조사 분석하여 SoltoB 급여와 구제역 방어능과의 상관관계를 분석하였다. 또한 SoltoB의 급여가 숙주 면역계에 미치는 영향을 분석하기 위해 SoltoB 급여 후 소와 돼지에서 혈액학적 변화와 말초혈액 면역 세포의 변화 및 분화능을 분석하였으며, 말초혈액 면역 세포의 cytokines의 발현 정도를 비교 분석하였다. 더불어 구제역 백신에 의해 생성된 구제역 감염에 대한 방어능을 직접적으로 확인하기 위해 농림수산검역검사본부 해외전염병과 차폐 연구실에서 2010-2011 구제역 발생 때 분리된 안동주 구제역 바이러스를 이용하여 미니돼지에 공격 접종 후 그 결과를 비교 분석하였다.

1. 소에서 구제역 백신에 SoltoB 급여가 미치는 영향과 면역증강의 과학적 입증

현재 사용 중인 구제역 백신은 소에서 1차 접종을 한 뒤 boosting vaccination이 필요하며, 그 시기는 1차 백신 접종 후 약 3-4 주 사이로 알려져 있다. 또한 백신 접종에 의해 영구면역되는 것이 아니므로 2차 백신 접종 후 6 개월 시점에 보강접종이 필요하며, 이후 6개월 마다 지속적으로 보강 접종을 실시해야 한다. 이에 SoltoB 급여가 백신 접종 후 항체 유지 기간에 미치는 영향을 분석한 결과 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 보강접종이 필요한 6개월 시점에 높은 항체가를 나타냄을 확인하였다 ($p < 0.05$). 백신의 증대된 효과는 항체가가 보다 빠르고 높게 올라가는 것인데, SoltoB 급여가 구제역 백신의 초기 효과에 미치는 영향을 분석하기 위해 초기 체액성 면역 반응의 지표로 사용되는 IgM과 이후 중화항체와 관련하여 중요한 역할을 하는 IgG의 생성 시기를 비교하고 이 두 종류의 체액성 면역글로불린이 어느 시점에서 전환되는지를 확인하였다. 그 결과 SoltoB 급여군은 비급여군에 비해 IgM의 생성이 빠르게 관찰되었고 그 역가 또한 높게 관찰되었다 ($p < 0.05$). 초기 IgG의 출현은 두 실험군 사이에서 차이를 보이지 않았으나, boosting vaccination이 필요한 4 주차에는 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 높은 IgG의 역가를 보였다 ($p < 0.05$). IgM과 IgG의 class switching에

는 두 군 사이에 차이가 없었다. 주사 백신은 점막면역을 강하게 유도하지는 못한 것으로 알려져 있지만 구제역 바이러스가 숙주에 최초로 접하는 곳이 점막이므로 질병의 방어에 점막면역은 매우 중요하다. 이에 SoltoB 급여가 백신의 효과에 미치는 영향을 분석하고자, 타액 및 분변에서 점막면역의 글로블린인 IgA의 역가를 비교분석하였다. 분변내의 IgA의 경우 분변 샘플의 특성상 IgA의 측정이 어려웠으며, 그 결과 역시 경향성이나 두 실험군의 차이를 확인할 수 없었다. 반면 타액의 IgA의 경우 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 빠르게 IgA가 확인되었으며 ($p < 0.05$), 그 역가 역시 비급여군에 비해 높았다. 또한 보강접종이 필요한 시점에서 SoltoB 급여군은 비급여군에 비해 높은 IgA의 역가를 보였다 ($p < 0.05$). 이러한 결과들은 SoltoB 급여가 기존의 백신의 효과를 좀 더 빠르고 높은 역가로 보다 오래 지속해 줄 수 있음을 확인시켜주는 결과라고 하겠다. 또한 2010-2011 국내에서 발생 분리된 안동주에 대한 직접적인 중화항체능을 비교 분석한 결과 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 높고 고른 중화항체형성능을 보였다 (표 1). 이는 SoltoB 급여에 의해 O-Manisa 백신주에 의해 생성된 항체가 국내 분리주에 대한 교차 방어능이 상승한 것으로 판단된다.

SoltoB 급여가 백신의 효과를 증진시키는 요인일 것으로 보이는 면역증강효과를 과학적으로 증명하기 위해 SoltoB 급여 후 혈액학적 및 면역 세포의 양상 변화와 대식세포 활성을 실험하였다. 이를 위해 SoltoB 급여군과 비급여군을 설정하고 혈액을 채취하여 말초혈액의 면역 세포를 분석하였는데, SoltoB 급여 23 주가 지난 시점에서 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 MHC II의 subpopulation이 증가한 것이 확인되었다 ($p < 0.05$). MHC II는 주로 면역 반응의 시작에서 중요한 역할을 하는 항원 제시세포 (Antigen presenting cells, APCs)에 많이 분포되어 있는 molecule로서 특히 항원 제시능이 가장 크고 native T cells의 유일한 분화 유도체인 dendritic cells에 많이 분포한다. 또한 MHC II는 native T cells와 더불어 B cells를 활성화 하여 항체의 생성을 유도하는데 중요한 역할을 한다. 이러한 결과는 SoltoB의 주성분인 알루미늄노규산염이 MHC II의 활성을 유도한다는 Holian 등 (1997)과 Mollick 등 (1989)의 선행 연구와 일치하는 결과이다. MHC II 이외에 SoltoB 급여에 따른 소에서 말초혈액 면역 세포의 비율을 조사한 결과는 그림 14와 같다. SoltoB 급여군에서는 비급여군에 비해 CD79a, CD4, CD8의 subpopulation이 감소하였고, 전체적인 lymphocytes의 subpopulation와 MHC I의 발현은 차이를 보이지 않았다. CD79a와 CD4의 경우 variation의 차이로 통계적 유의성을 확보하지 못했다. 하지만 면역반응의 시작에 중요한 역할을 하는 MHC II가 SoltoB 급여에 의해 증가된 점은 SoltoB 급여가 면역계의 빠른 작용을 유도할 수 있음을 확인시켜 주었다. 말초혈액의 면역 세포의 subpopulation이외에 면역 세포의 분화능과 cytokines의 발현량을 비교한 결과 SoltoB 급여군에서 비급여군에 비해 면역 세포의 분화능이 유의적으로 증가했음을 확인하였다 ($p < 0.05$). 또한 말초혈액 면역 세포의 cytokines의 mRNA의 발현량을

분석한 결과 SoltoB 급여군에서 IFN- γ 와 IL-1 family의 발현이 유의적으로 증가됐음을 확인하였다 ($p < 0.05$). 이러한 결과 역시 알루미늄노균산염이 macrophage에 탐식되어 면역 반응이 유발되면서 IFN- γ 의 생성을 촉진한다는 Albina 등 (1991)과 Jung 등 (2010)의 결과 일치하는 결과로 세포성 면역과 획득면역 형성에 중요한 역할을 하는 IFN- γ 와 IL-1이 SoltoB 급여에 의해 증가된 결과는 SoltoB 급여가 세포성 면역반응을 증가시킬 수 있음을 나타낸다고 하겠다. 또한 CD4+/MHC II/IFN- γ /T cell의 subset은 APCs의 항원제시능을 더욱 활성화 하여 Th1 반응을 촉진 시켜 항체 형성을 촉진한다는 선행 연구 (Parida 2009)를 토대로 본 과제를 수행하면서 얻어진 실험 결과가 SoltoB 급여로 인해 증가한 백신의 효과를 과학적으로 입증할 수 있음을 확인하였다. IFN- γ , IL-1과 더불어 SoltoB 급여군의 말초혈액 면역 세포에서 IL-4와 IL-6 mRNA의 증가를 확인하였으나 통계적 유의성은 확인하기 어려웠다. 면역 세포에 대한 분석과 더불어 말초혈액의 조성의 차이를 분석하였는데, 두 실험군 사이의 유의적인 결과는 확인하기 어려웠다. 이는 단순 혈액의 조성은 면역 증강에 의해 변하기보다는 질병의 감염이나 백신 접종, 외상 등의 직접적인 항원에 의한 체내의 반응에 의해 크게 변하기 때문인 것으로 보인다. 대식세포 활성도의 시험은 lysozyme의 활성화도 평가를 통해서 이루어졌는데, SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 높은 활성화도를 가지고 있음을 혈청 수준에서 확인하였다. 이 역시 상기의 선행 논문과 일치하는 내용으로 SoltoB 급여가 macrophages의 활성을 촉진했기 때문인 것으로 판단된다. 상기의 결과를 토대로 SoltoB 급여의 면역증강의 효과는 주로 세포성면역과 관련하여, macrophages의 활성화와 dendritic cells 항원 제시능력이 증가하고 이로 인해 면역이 빠르게 형성되고 그 반응의 증가로 인해 나타나는 효과로 추측할 수 있다.

SoltoB 급여가 구제역 발생 시 방어 효과가 있었는지를 야외농장 수준에서 사례를 분석하기 위해 총 99개의 구제역 발생 지역의 농장을 대상으로 설문조사를 실시하였다. 설문조사의 분석 결과 구제역 발생의 75.3%는 주로 2차선 주도로에서 400 m 이내의 농장에서 발생 하였고, 농장 운영 경력이 오래될수록 발생할 수 있는 위험도가 감소하는 것으로 나왔다. 또한 SoltoB 급여에 따라 농장의 구제역에 대한 위험도가 감소하는 것을 유의적으로 확인하였다 ($p < 0.05$).

소에서 구제역 백신에 SoltoB 급여가 미치는 영향과 면역증강의 분석을 통해서 확인한 결과를 통해 SoltoB 급여로 인해 세포성 면역이 증가하고, 이로 인해 구제역 백신의 효과가 증가하여 구제역에 대한 방어능이 증가하고 위험도가 감소하였다고 판단할 수 있었다.

2. 돼지에서 구제역 백신에 SoltoB 급여가 미치는 영향과 면역증강의 과학적 입증

실험실 단위에서 항체 생성능의 경우 FMDV 백신 접종 후 지속적으로 비급여에 비해 SoltoB

급여군의 IgG항체가가 높게 유지됨을 확인할 수 있었는데, 특히 3% SoltoB 급여군에서 그러한 경향이 뚜렷하게 나타나는 것 확인할 수 있었다. 특히 백신 접종 후 2주-4주차에는 비급여군에 비해 3% SoltoB 급여군의 IgG항체가가 통계적으로 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 SoltoB 급여가 돼지에서 FMDV 백신 접종 시 FMDV에 대한 항체 생성을 촉진시키는 능력과 관련이 있는 것으로 사료된다. 또한 항체 생성율의 경우 3% SoltoB 급여군에서 백신 접종 1주차부터 60%의 항체 생성율을 나타내었으며, 2주차에는 모든 개체에서 항체가 형성되어 5주차까지 항체 생성율이 100%로 유지되었다. 반면에 비급여군의 경우 1주차의 항체 생성율은 20%에 불과하였고, 2주차에서도 항체 생성율은 60%로 100%에 도달하지 못하였으며, 5주차가 되어서야 모든 개체에서 항체가 형성됨을 확인할 수 있었다. 따라서 SoltoB 급여가 돼지에 있어 FMDV 백신에 의한 항체 생성이 좀 더 빠르게 될 수 있도록 촉진하는 작용을 하는 것으로 사료된다. 이와 마찬가지로, 농장 단위에서 SoltoB를 돼지에 급여하였을 때, FMDV에 대한 IgG 항체 생성능 및 항체 생성율을 비교한 결과 FMDV 백신 접종 후 비급여군에 비해 SoltoB를 급여한 군에서 유의적으로 IgG 항체가가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 항체 생성율 역시 비급여군에 비해 SoltoB를 급여한 군에서 더 높은 수치를 나타내었다. 이러한 결과들은 이전에 ginseng stem-leaf saponin과 mineral oil을 적용 시 FMDV에 대한 IgG 항체가가 증가했다는 Song 등 (2009)의 보고나 Cliptox에 의해 FMDV에 특이적인 IgG 항체가가 증가했다는 Batista 등 (2010)의 보고와 상이한 결과이다. 또한 이는 SoltoB급여가 돼지의 PCV2 virus에 대한 항체가를 증가시킨다는 Jung 등 (2010)의 보고와도 연관성이 있는 결과로 사료된다. 또한 돼지에서 SoltoB 급여 후 FMDV 백신 접종 시 항체 생성 초기 반응이 촉진되는지 확인하기 위하여 혈중 IgM 항체가를 측정하였다. 그 결과, 실험실 단위에서 비급여군에 비해 SoltoB 급여군에서 IgM 항체가가 높게 유지됨을 확인할 수 있었는데, 특히 3% SoltoB 급여군에서 IgM 항체가가 통계학적으로 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 FMDV 백신 적용 시 replication이 결여된 adenovirus 5에 FMDV의 capsid와 3C proteinase coding regions을 construct로 적용 시 IgM 항체가와 IgG 항체가 증가의 결과를 나타낸 Mayr 등 (2001)의 논문과 유사한 결과이다. 따라서 IgM 항체가가 증가하는 경우 IgG항체가의 증가에도 영향을 미쳐 FMDV에 대한 방어능을 높일 수 있는 것으로 생각된다.

또한 돼지에 SoltoB 급여 후 FMDV 백신 접종 시 항체능의 변화 이외에 체내의 면역반응에 미치는 영향을 확인하기 위해 real time PCR을 이용하여 상대적 cytokines 발현 정도를 확인하였다. 그 결과, 백신 접종 1주 후에 1%와 3% SoltoB 급여군의 IFN- γ level이 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 ginseng stem-leaf saponin과 mineral oil을 적용한 후 FMDV를 공격 접종 시 IFN- γ level이 증가했다는 Song 등 (2009)의 보고와 유사한 것이

다. 따라서 SoltoB를 돼지에 급여 후 FMDV vaccine 접종 시 항체가 증가뿐만 아니라 IFN- γ 증가에 의한 면역 증강 효과도 기대할 수 있는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해 보면 SoltoB를 돼지에 급여 후 FMDV백신 접종 시 항체 생성 초기 반응에 나타나는 IgM의 생성이 촉진되며, 이에 이어 IgG 항체의 생성 역시 촉진됨을 확인할 수 있었다. 또한 체내의 IFN- γ 의 생성 역시 촉진시키는 것을 확인할 수 있었는데, IFN- γ 는 B cell에서 IgG2a와 IgG3로의 switching을 유발하는 cytokine이므로 (Roitt 등, 2001) SoltoB 급여에 의한 항체 생산능 증진 효과 이외에도 IFN- γ 의 작용에 의한 항체 생산능 촉진 효과 역시 기대할 수 있는 것으로 사료된다.

3. SoltoB 급여가 구제역 백신의 방어능에 미치는 영향 (미니돼지 구제역 공격 접종 실험)

SoltoB 급여가 구제역 백신의 방어능에 형성에 미치는 영향을 분석하기 위해 미니돼지에 2010-2011 안동주 구제역 바이러스를 이용한 공격 접종 실험을 진행하였다. 공격 접종의 분석을 위해 임상증상의 발현, FMD SP 항원에 대한 항체 변화, FMD NSP 항원에 대한 항체 변화, 혈청내의 cytokines의 변화 및 말초혈액 면역 세포의 구제역 항원에 대한 활성화와 cytokines의 생성량을 분석하였다. 공격 접종이 적절히 진행되었는지 확인하기 위한 백신 미접종 control군에서는 공격 접종 후 전 두수에서 임상증상 및 viremia가 확인되었다. 공격 접종 후 SoltoB 급여군과 비급여군은 모두 D+2에 침울 증상을 보였으나 SoltoB 급여군의 경우 총 5마리중 4마리가 비급여군에 비해 좀 더 완화된 침울 증상을 보였으며, 이때 비급여군의 경우 5마리 전체가 침울 증상을 보였다. 또한 SoltoB 급여군은 비급여군에 비해 낮은 NSP 항체 ($p < 0.05$)와 CCL-2의 발현을 보였고 비급여군에 비해 높은 IFN- γ , IL-8의 생성을 보였다 ($p < 0.05$). 안동주에 대한 중화항체는 공격 접종 전에는 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 높고 고른 중화항체를 보였으나, 공격 접종이 실시된 이후에는 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 낮은 수준의 중화항체를 보였다. 이는 SoltoB 급여에 따라 공격 접종 전 높은 중화항체에 의해 공격 접종 이후 직접적인 노출된 바이러스를 SoltoB 급여군이 비급여군에 비해 빠르게 중화시켰기 때문인 것으로 판단된다. 말초혈액 면역 세포에서는 SoltoB 급여군의 말초혈액 면역 세포가 비급여군에 비해 높은 IFN- γ 과 IL-8의 생성과 증식능 ($p < 0.05$)을 보였고, 낮은 CCL-2의 생성을 보였다. 이러한 결과는 혈청 수준의 결과와 세포 수준의 결과가 일치하며, 또한 앞서 밝힌 선행논문의 결과와도 부합된다. 이는 SoltoB 급여군의 증강된 세포성 면역으로 인해 구제역에 대한 면역반응이 진행되어 세포성 면역의 지표인 IFN- γ 와 IL-8의 생성이 증가되고 말초혈액 세포의 증식성이 증가되었음을 확인할 수 있었다. 반면 감염에 의한 염증과 관련된 CCL-2의 생성이 SoltoB 급여군에서 낮게 형성된 것은 SoltoB 급여군의 구제역에 대한 감염 저항성 증가로 인해 부가적으로 발생하는 염증성 반응이

비급여군에 비해 감소했기 때문인 것으로 판단된다.

4. 결론

소와 돼지에서의 SoltoB 급여에 따른 면역증강 효과 분석과 구제역 백신 효과에 미치는 영향, 구제역 바이러스 공격 접종 실험 결과를 통해 우리는 SoltoB 급여가 세포성 면역을 주로 유발하고 (IFN- γ , IL-1, IL-8, subset of MHC II, macrophage, lymphocytes proliferation)이로 인해 구제역 백신의 효과가 보다 빠르고 높은 역가로 오래 지속될 수 있음을 확인하였다. 이는 SoltoB의 급여로 인해 macrophage의 활성이 증가하고 (lysozyme activity 증가, $p < 0.05$), 이로 인해 MHC II의 발현이 증가되어 ($p < 0.05$) cytokines (IFN- γ , IL-1, IL-8, $p < 0.05$, $p < 0.01$)의 발현이 유도되 B cell이 활성화를 통해 면역 증강의 효과를 나타내는 것으로 생각되며, 구제역 백신에 대한 면역반응의 증가와 예방 효과는 이러한 면역 증강의 효과에서 기인한 것으로 판단된다 (그림 51).

Macrophage 활성화 증가

Cytokines 생성 증가

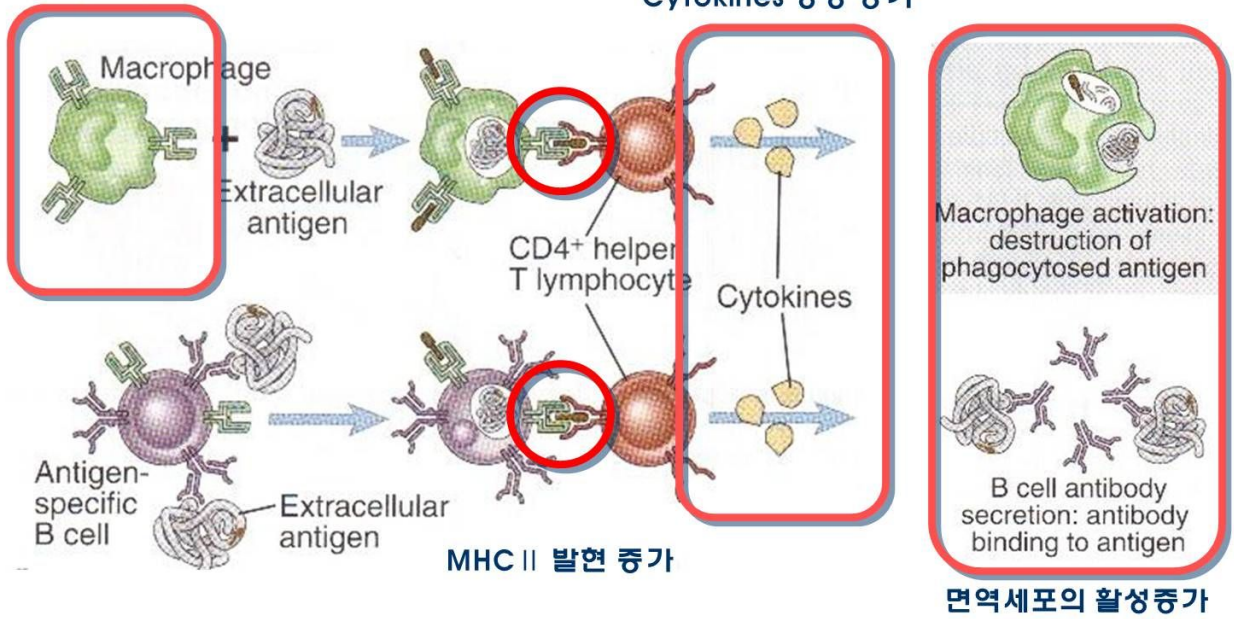


그림 51. SoltoB 급여로 인한 면역 증강 효과. SoltoB의 급여는 macrophage의 활성을 유도하고 이어 MHC II의 발현이 증가되어 cytokines의 발현과 면역 세포의 활성이 증가하여 면역 증강효과를 나타내는 것으로 생각된다. 구제역 백신에 대한 면역반응 증가와 구제역에 대한 예방효과의 증가는 이러한 면역 세포의 활성화증가로 인한 면역증강 효과에서 기인하는 것으로 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

세부 연구개발 목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전예의 기여
○ 소와 돼지에서 구제역 백신 항체 형성에 SoltoB 의 효과	100	<ul style="list-style-type: none"> - 현재 국내에서 사용 중인 구제역 백신에 대한 접종 후 과학적인 구제역 항체가 출현 시기, 점막면역 형성 시기, 항체 유지 기간 등의 근거를 마련함. - 야외 농장에서 구제역 백신 접종 후 항체 출현율 및 항체가 수준 비교 - 백신 접종 후 항체 class switching 분석
○ 소와 돼지에서 SoltoB 급여에 따른 혈액학적 및 면역 세포의 영향 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> - SoltoB 급여에 따른 혈액학적 변화 비교 - SoltoB 급여에 따른 면역 세포의 변화 분석 - SoltoB 급여에 따른 비특이면역 증강분석 (cytokine 생성능, 면역 세포활성도등)
○ SoltoB의 구제역 예방 현장 사례 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> - 구제역 발생지역에서 SoltoB 급여에 구제역 방어효과 사례 분석 - 구제역 발생과 사례의 역학적 분석 - SoltoB 급여에 따른 구제역 위험도 감소정도 조사
○ SoltoB 급여가 구제역 백신 방어능에 미치는 영향	100	<ul style="list-style-type: none"> - 공격 접종 후 측정 지표 확립 - 현재 국내에서 사용 중인 구제역 백신의 안동 분리주 (국내 발생주)에 대한 방어능 평가
○ SoltoB의 구제역 예방의 종합적 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> - 실험적 결과 및 역학적 사례 분석을 바탕으로 한 SoltoB의 구제역 방어에 대한 종합적 분석

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

- 특허출원 (목표: 국내 1건)
- 논문 (목표: SCI 2편/ 비SCI 1편)
 - The mechanisms of germanium biotite in immune system and effects of germanium biotite supplement on immune responses to foot-and-mouth disease vaccine in cows (투고 예정)
- 학술발표
 - The effects of germanium biotite supplement on humoral immune responses to foot-and-mouth disease vaccine in cows (추계대한수의학회, 서울, 2012)
 - The effects of germanium biotite supplement on humoral immune response induced by foot-and-mouth disease vaccine in cows (FAVA, Taipei, Taiwan, 2013)
- SoltoB 판매 실적
 - 과제 수행 기간 동안 약 2788.2 ton의 SoltoB 판매량을 기록하였으며, 지난 구제역 과동 전후를 기점으로 판매량과 사용 농가수가 계속 증가하고 있다 (그림 52).
- SoltoB 홍보 실적
 - [축산신문] FMD 예방 정부 연구과제 선정 (2011. 10. 31)
 - [축산신문] 항생제 없어도 면역력 쑥... 안전 축산물 생산 문제없다. (2012. 04. 16)
 - [축산신문] 솔투바이오 판매 10주년... 경품 ‘와르르’ (2012. 07. 11)
 - [축산신문] 고급육 생산 도우미로... ‘가치의 재발견’ (2012. 08. 20)
 - 본 과제의 총 연구기간은 1년으로 본 과제의 결과를 홍보자료로 이용한 실적은 아직 없으나, 현재 본 연구과제에서 확인된 SoltoB의 효과 (면역증강효과로 인한 구제역 질병 예방 효과)를 매스컴을 통해 홍보 할 준비 중에 있음.

제 2 절 성과활용 계획

1. 학술적 측면

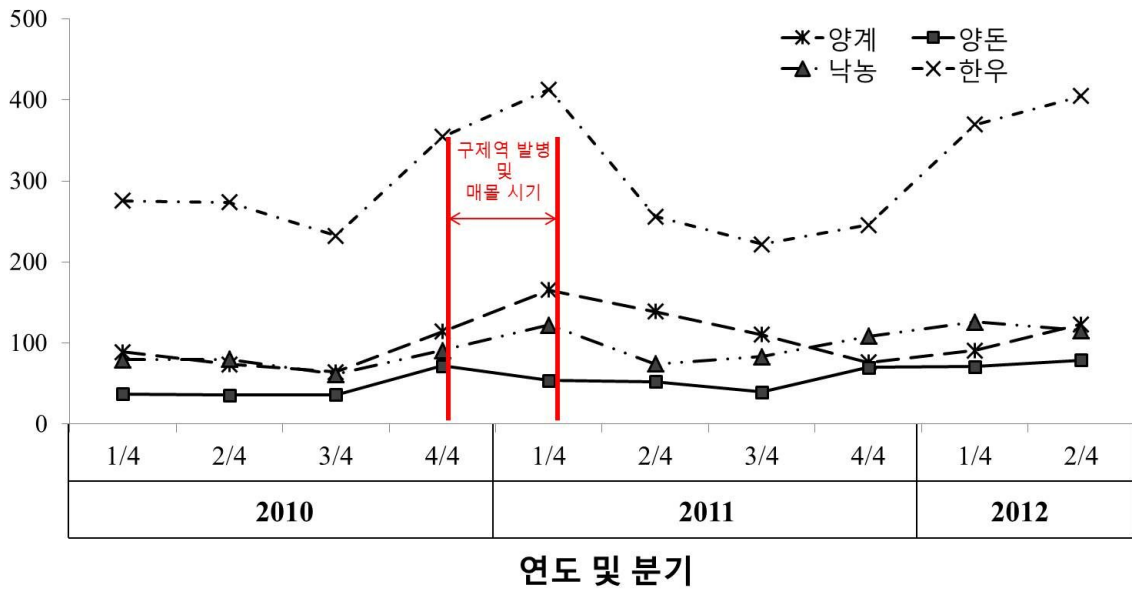
- o 비특이 면역증강물질 (SoltoB)의 숙주동물 면역계에 작용기전을 밝힘으로써, 구제역등 악성가축전염병에 대한 이 물질의 효과에 대한 과학적 근거 확립.
- o SoltoB 급여에 따른 숙주동물의 면역체계 변화를 규명함으로써 구제역 방역효과 및 박멸 정책 추진을 위한 과학적 근거 확립
- o 비특이 면역증강물질의 구제역에 대한 단편적인 이해로 인한 사회적인 혼란을 극복하

- 고, 과학적 근거를 바탕으로한 국가 방역정책의 수립에 큰 공헌을 할 것으로 기대함.
- 비특이 면역증강물질의 평가기법 확립을 통한 다양한 물질의 면역학적 평가 기준 및 효과의 과학적 분석기법 확립

2. 사회, 경제적 측면

- 구제역 예방백신 접종에 대한 SoltoB 급여 효과 규명으로 구제역 발생 차단으로 국내 축산업의 안정화를 추구할 수 있음.
- 기존의 SoltoB의 특허는 사료 첨가제를 사용한 육질 개선이나 증체율 분야에 치중하였으나, 본 연구과제를 통해 확인된 SoltoB의 면역증강효과에 대한 기전과 구제역 질병에 대한 예방 효과 증진에 대한 과학적 분석을 바탕으로 질병예방 특히 구제역에 대한 예방 방향으로 특허를 획득하여 홍보 및 판매할 예정임.
- 구제역등 악성 가축전염병의 발생차단으로 국내 축산 농가에게 경제적 이익이 극대화 되면 날로 위축되어 가는 국내 축산업의 경쟁력이 제고되고 농민의 축산의욕이 고취 될 것으로 기대함.
- SoltoB 가 현재도 세계 여러 나라로 수출하고 있지만 구제역예방에 대한 과학적 근거가 확립되면 더 많은 국가에 더 많은 양을 수출하여 국가경제에 공헌할 것으로 기대함.
- SoltoB 급여 확대로 구제역등 악성 가축전염병의 발생을 억제함으로써 악성 가축전염병 발생으로 인한 각종 사회, 경제적인 문제를 최소화하여 국가 경제 및 사회에 공헌할 것으로 기대함.
- SoltoB 의 구제역등 악성가축전염병의 차단효과와 항생제 대체효과로 천연영농을 이룰 수 있는 가능성이 높아져, 한.EU FTA 대응 및 향후 우리나라 축산업의 발전방향인 친환경축산의 기반을 구축하는데 크게 기여할 것으로 기대함.

SoltoB 사용량 (톤)



SoltoB 사용 농가수

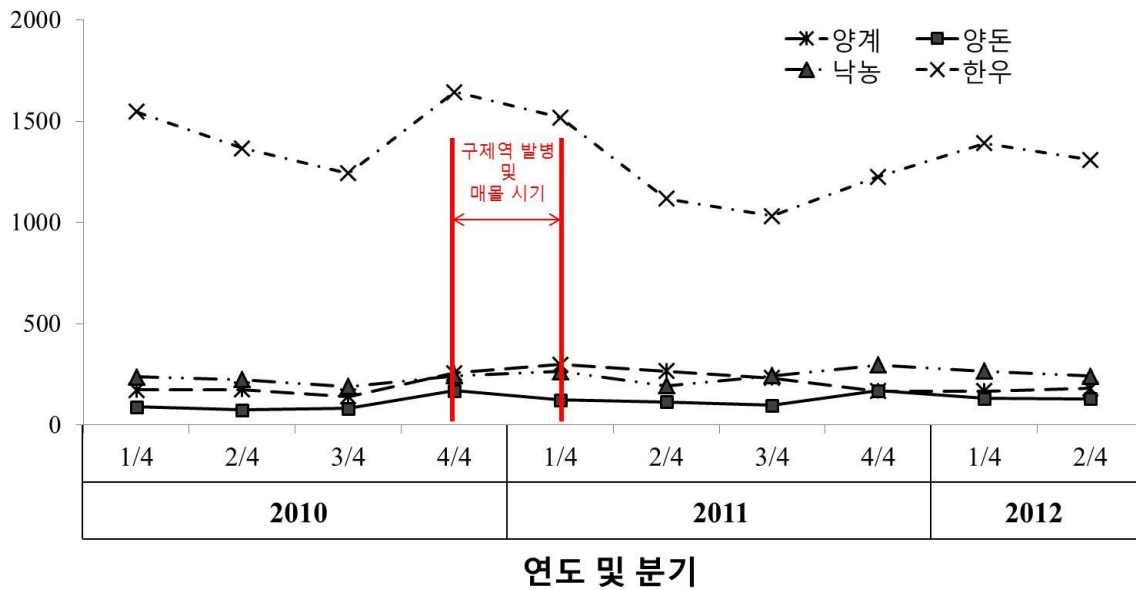


그림 52. SoltoB 판매 실적 (판매량 및 농가수). 지난 2010-2011 구제역 발생 시 살처분 및 매몰 처분으로 판매량이 감소하였다가, 이 후 판매량 및 사용 농가수가 증가하고 있다. 특히 한우에서의 실적은 구제역 이후 계속 증가하고 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 FMD 감염과 FMD vaccine에 의한 FMD 면역 획득

구제역 바이러스나 백신에 의해 최초 항체 출현은 3-4일 사이에 IgM으로 확인이 되며, 이후 4-7 일 후에는 IgG가 출현하고 직접적인 중화능을 가지는 항체는 2 주 후에 출현한다는 선행 연구 결과 (Batista, 2010; Cox, 2009; Liao 2003; Song, 2009)를 토대로 각 시기별로 출현할 것으로 예상되는 항체를 추적하였으며, 이를 바탕으로 공격 접종을 진행하였다.

제 2 절 구제역 공격 접종 방법

구제역 공격接种의 경로를 탐색함에 있어 직접적인 항원 주입 방식과 직접 접촉을 통한 방식, 간접적인 접촉을 통한 방식에서 선택함에 있어 직접 주입 방식은 공격 접종 한 dose의 정확한 양을 확인할 수 있으나 병원성이 오히려 잘 나타나지 않는다는 선행 연구 결과 (Mayr, 2001; Orsel, 2007; Parida, 2009)을 참고로 하여 Donor를 이용한 직접 접촉 방식의 공격 접종을 실시하였다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당 사항 없음

제 8 장 참고문헌

- Airoldi, G., Balsari, P., Chiabrando, R., 1993. Odor control in swine houses by the use of natural zeolites: First approach to the problem. *Livestock environment* 4th, 701–708, Univ. of warwick, Conrenty, UK
- Albina, J.E., Abate, J.A., Henry Jr, W., 1991. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen–stimulated T cell proliferation. Role of IFN–gamma in the induction of the nitric oxide–synthesizing pathway. *The JI* 147, 144–148.
- Batista, A., Quattrocchi, V., Olivera, V., Langellotti, C., Pappalardo, J., Di Giacomo, S., Mongini, C., Portuondo, D., Zamorano, P., 2010. Adjuvant effect of Cliptox™ on the protective immune response induced by an inactivated vaccine against foot and mouth disease virus in mice. *Vaccine* 28, 6361–6366.
- Castro, M., Iglesias, M., 1989. Effect of zeolite on traditional diets for fattening pigs. *Revista Cubana de Ciencia Agricola* 23.
- Chen, Y., Kwon, O., Min, B., Shon, K., Cho, J., Kim, I., 2005a. The effects of dietary biotite V supplementation on growth performance, nutrients digestibility and fecal noxious gas content in finishing pigs. *Asian Australas J Anim* 18, 1147–1152.
- Chen, Y., Kwon, O., Min, B., Son, K., Cho, J., Hong, J., Kim, I., 2005b. The effects of dietary Biotite V supplementation as an alternative substance to antibiotics in growing pigs. *Asian Australas J Anim* 18, 1642–1645.
- Coffey, M., Pilkington, D., 1989. Effect of feeding zeolite–A on the performance and carcass quality of swine. *J Anim Sci* 67(suppl.), 36(abstr.).
- Cole, N., Hutcheson, D., 1990. Influence of dietary protein concentrations on performance and nitrogen repletion in stressed calves. *J Anim Sci* 68, 3488–3497.
- Collado–Romero, M., Arce, C., Ramírez–Boo, M., Carvajal, A., Garrido, J.J., 2009. Quantitative analysis of the immune response upon *Salmonella typhimurium* infection along the porcine intestinal gut. *Vet Res* 41, 23–34.
- Cox, S.J., Barnett, P.V., 2009. Experimental evaluation of foot–and–mouth disease

- vaccines for emergency use in ruminants and pigs: a review. *Vet Res* 40, 13–42.
- Elliot, M.A., Edwards, H.M., 1991. Comparison of the effects of synthetic and natural zeolite on laying hen and broiler chicken performance. *Poult Sci* 70, 2115–2130.
- Holian, A., Uthman, M.O., Goltsova, T., Brown, S.D., Hamilton Jr, R.F., 1997. Asbestos and silica-induced changes in human alveolar macrophage phenotype. *Environ Health Perspect* 105, 1139–1142.
- Roitt I., Brostoff J., Male D., 2001, Immunology. 6th ed. London: Mosby Publications
- Jung, B.G., Toan, N.T., Cho, S.J., Ko, J., Jung, Y.K., Lee, B.J., 2010. Dietary aluminosilicate supplement enhances immune activity in mice and reinforces clearance of porcine circovirus type 2 in experimentally infected pigs. *Vet Microbiol* 143, 117–125.
- Jung, M., Cha, S.B., Shin, S.W., Lee, W.J., Shin, M.K., Yoo, A., Yoo, H.S., 2012a. The effects of Germanium biotite on the adsorptive and inhibition of growth abilities against *E. coli* and *Salmonella* spp. in vitro. *Korean J Vet Res* 52, 33–38.
- Jung, M., Jung, B.G., Cha, S.B., Shin, M.K., Lee, W.J., Shin, S.W., Lee, J.A., Jung, Y.K., Lee, B.J., Yoo, H.S., 2012b. The Effects of Germanium Biotite Supplement as a Prophylactic Agent against Respiratory Infection in Calves. *Pak Vet J* 32, 319–324.
- Konnai, S., Usui, T., Ohashi, K., Onuma, M., 2003. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. *Vet Microbiol* 94, 283–294.
- Kreukniet, M.B., Nieuwland, M.G.B., van der Zijpp, A.J., 1994, Phagocytic activity of two lines of chickens divergently selected for antibody production. *Vet Immunol immunopathol* 44, 377–387.
- Kwon, O., Kim, I., Hong, J., Lee, S., Min, B., Lee, W., Shon, K., Jung, Y., 2003. Effects of dietary germanium biotite in weaned, growing and finishing pigs. *J Anim Sci Tech* 45, 335–368.
- Lee, W., Kim, I., Hong, J., Kwon, O., Min, B., Shon, K., Jung, Y., 2003. Effect of Protein Level and Dietary Germanium Biotite on Egg Production, Egg Quality and Fecal Volatile Fatty Acid in Laying Hens. *Korean J Poult Sci* 30,

275–280.

- Li, A., Dubey, S., Varney, M.L., Dave, B.J., Singh, R.K., 2003. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *The JI* 170, 3369–3376.
- Liao, P., Lin, Y., Jong, M., Chung, W., 2003. Efficacy of foot-and-mouth disease vaccine in pigs with single dose immunization. *Vaccine* 21, 1807–1810.
- Ma, C., Tzeng, C., Lai, M., Tsai, A., 1979. The feeding of zeolite on the litter size at birth of swine. *Sot: Agric* 27, 189–193.
- Mayr, G.A., O'Donnell, V., Chinsangaram, J., Mason, P.W., Grubman, M.J., 2001. Immune responses and protection against foot-and-mouth disease virus (FMDV) challenge in swine vaccinated with adenovirus-FMDV constructs. *Vaccine* 19, 2152–2162.
- Mollick, J.A., Cook, R.G., Rich, R.R., 1989. Class II MHC molecules are specific receptors for staphylococcus enterotoxin A. *Science* 244, 817–820.
- Mumpton, F., Fishman, P., 1977. The application of natural zeolites in animal science and aquaculture. *J Anim Sci* 45, 1188–1203.
- Ndegwa, P., Hristov, A., Arogo, J., Sheffield, R., 2008. A review of ammonia emission mitigation techniques for concentrated animal feeding operations. *Biosyst Eng* 100, 453–469.
- Orsel, K., De Jong, M., Bouma, A., Stegeman, J., Dekker, A., 2007. Foot and mouth disease virus transmission among vaccinated pigs after exposure to virus shedding pigs. *Vaccine* 25, 6381–6391.
- Papaioannou, D., Kyriakis, S., Papasteriadis, A., Roumbies, N., Yannakopoulos, A., Alexopoulos, C., 2002a. Effect of in-feed inclusion of a natural zeolite (clinoptilolite) on certain vitamin, macro and trace element concentrations in the blood, liver and kidney tissues of sows. *Res Vet Sci* 72, 61–68.
- Papaioannou, D., Kyriakis, S., Papasteriadis, A., Roumbies, N., Yannakopoulos, A., Alexopoulos, C., 2002b. A field study on the effect of in-feed inclusion of a natural zeolite (clinoptilolite) on health status and performance of sows/gilts and their litters. *Res Vet Sci* 72, 51–59.
- Parida, S., 2009. Vaccination against foot-and-mouth disease virus: strategies and effectiveness. *Expert Review of Vaccines* 8, 347–365.

- Piva, G., Galvano, F., Pietri, A., Piva, A., 2000. Detoxification methods of aflatoxins. *Zootec Intern* 23(abstr), 689–715.
- Ramos, A., Hernandez, E., Pla–Delfina, J., Merino, M., 1996. Intestinal absorption of zearalenone and in vitro study of non–nutritive sorbent materials. *Int J Pharm* 128, 129–137.
- Sarker, M., Kim, G., Yang, C., 2010. Effect of green tea and biotite on performance, meat quality and organ development in Ross broiler. *Egypt Poult Sci* 30, 77–88.
- Song, X., Bao, S., Wu, L., Hu, S., 2009. Ginseng stem-leaf saponins (GSLs) and mineral oil act synergistically to enhance the immune responses to vaccination against foot–and–mouth disease in mice. *Vaccine* 27, 51–55.
- Stanton, T., Whittier, J., Geary, T., Kimberling, C., Johnson, A., 2000. Effects of trace mineral supplementation on cow–calf performance, reproduction, and immune function. *Prof Anim Sci* 16, 121–127.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 가축질병대응사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 가축질병대응사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.