

발간등록번호

11-1541000-001360-01

돼지 초대배양세포주를 이용한 돼지 유행성설사병  
바이러스 (PEDV)에 대한 백신주 개발 및  
효율적인 백신 개발 (생명산업기술개발사업)

(Development of Efficient Vaccine strains for Porcine  
Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) using  
Swine Primary Cell Lines)

충남대학교

농림수산식품자료실



0021039

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “돼지 초대배양세포주를 이용한 돼지 유행성설사병 바이러스(PEDV)에 대한 백신주 개발 및 효율적인 백신 개발 (생명산업기술개발사업)” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 6 월 15 일

주관연구기관명 : 충남대학교

주관연구책임자 : 신현진

연 구 원 : 박정은

연 구 원 : 최지민

연 구 원 : 강재익

협동연구기관명 : 제주대학교

협동연구책임자 : 황규계

협동연구기관명 : (주)중앙백신연구소

협동연구책임자 : 최환원

# 요 약 문

I. 제 목: 돼지 초대배양세포주를 이용한 돼지 유행성설사병 바이러스(PEDV)에 대한 백신주 개발 및 효율적인 백신 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

돼지 유행성 설사병(Porcine Epidemic Diarrhea, PED)은 현재 우리나라를 비롯한 아시아 국가의 양돈 산업에 막대한 피해를 끼치는 중요한 바이러스성 질병중 하나이다. 이 질병은 특히나 겨울철에 이유기 이전의 자돈 등에 특이적으로 발생하여 설사를 동반한 탈수로 인하여 많은 자돈들이 폐사하는 질병으로 계절적 특성을 가지고 있었다. 그렇지만 이 질병은 현재 겨울철 이외의 다른 계절에도 발병하고 있으며, 발병 양상도 훨씬 다양해져 가고 있는 중이다.

이러한 유전적인 상이성은 항원성의 상이성을 유발하여 백신의 효율성에 문제점을 유발할 가능성이 매우 높은 현실이다. 이러한 맥락에서 현재 질병을 유발하고 있는 야외주와 유전자형과 항원성이 비슷한 새로운 야외주의 분리 및 확보가 절실히 요구되는 현실이며 또한 이를 이용한 새로운 백신의 개발도 절대적으로 요구되는 현실이다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구진들은 새로이 야외주를 이용하기 위하여 전문가 pool을 이용하여 돼지 초대배양세포를 불멸화를 통하여 구축하고 이를 이용하여 새로운 야외주를 분리하여 이를 이용한 새로운 효율적인 백신의 개발을 추구하고자 한다. 우선적으로 가장 중요한 급선무인 새로운 야외주의 분리 및 이를 이용한 새로운 효율적인 백신의 개발이다. 이제까지 이 바이러스를 분리 시도는 대부분 이 바이러스가 유일하게 자란다고 보고되고 있는 Vero cell을 이용한 분리 시도만 행해져 왔다. 그렇지만 Vero cell은 원숭이 유래 세포로써 이 바이러스의 숙주인 돼지 세포와는 단백질 구성이나 기타 생물학적 특성이 다를 것으로 예측된다. 그렇지만 다른 대책이 없었기 때문에 Vero cell만을 이용할 수밖에 없었고 이러한 이유 때문에 야외주의 분리가 어려웠을 것으로 판단된다. 이에 본 연구진들은 돼지 장세포 등 다양한 장기 유래 세포를 개발하고 이를 이용하여 이 바이러스에 대한 분리율을 높이고자 한다. 이러한 이유로 본 연구는 PEDV 감염 억제에 매우 중요한 neutralizing epitope를 보다 체계적이고 과학적인 방법을 이용하여 추적하고 이들의 PEDV에 대한 방어 능력, 즉 PEDV에 대한 neutralization assay를 시험해 봄으로써 이들의 중요성을 인식하고, 중화항체 유도부위를 이용한 PEDV에 대한 백신 개발 가능성 연구를 수행하고자 한다. PEDV 백신의 효율성을 검사할 수 있는 효율성 검사 kit를 개발하고자 한다.

## IV. 연구개발결과

새로운 PEDV주를 분리하고자 하는 노력의 일환으로 돼지조직으로부터 초대배양세포의 구축을 실시하였고, telomerase의 과발현을 통한 세포의 불멸화 유도를 통하여 여러 가지 초대배양세포의 구축을 실시하였다. 이들 세포주들의 안정화를 실시하여 몇몇 후보 세포주 구축에 성공

하였고, 이들 세포주들의 PEDV에 대한 감수성 증대 방안을 모색하였다.

또한 보다 효율적인 PEDV 백신을 위하여, 새로운 야외주의 분리 성과를 이루었고, 다양한 형태의 효율적인 백신 개발 가능성 모색을 위한 연구 결과로써, PEDV의 중화항체 유도부위 (neutralizing epitope) 부위를 확정 하였으며, 이를 이용한 in vivo 실험을 실시하였다. 특히나 PEDV의 중화항체 유도 부위에 대한 여러나라의 연구 결과가 있었지만, 본 연구진들이 발견한 부위는 기존의 연구 결과와 매우 상이한 결과로써, 고무적이라고 할 수 있을 것이라 평가된다. 또한 PEDV의 감염에 가장 절대적으로 작용하는 것으로 알려진 수용체 단백질 (receptor protein)에 대한 연구 결과도 불확실하였었던 것들을 본 연구진들의 연구 결과, 더욱 분명하여졌으며, 이러한 과학적 접근 방법을 통한 PEDV 수용체 단백질 증명은, 향후 이 바이러스 질환에 대한 많은 추가 연구가 이루어질 수 있는 기초 자료로 매우 소중하게 이용될 것으로 판단되며, 이를 이용한 효율적인 백신 개발 및 효율성 검사 또한 이루어 질 것으로 기대된다.

또한 본 연구진들에 의해 이루어진 추가적인 연구 결과로써, 이 바이러스성 질환의 질병이 수양성 설사를 동반하는 소화기성 질환으로만 알려져 있지만, 본 연구진들의 연구 결과 이 바이러스가 alveolar macrophage와도 매우 밀접한 관계가 있다는 매우 이례적이고 매우 새로운 연구 결과를 얻을 수 있었으며, 이러한 연구 결과 또한 추후 추가적인 다양한 연구 결과의 기초 자료로 이용될 것으로 기대된다.

또한 PEDV에 대한 보다 정확한 진단 시스템 구축을 위한 노력의 일환으로 보다 효율적으로 이 질병을 진단할 수 있는 진단 kit 개발에 노력하였다. 이를 위하여 이 바이러스에 대한 monoclonal antibody를 구축하고 이를 coating antigen으로 이용하는 효율적인 진단 kit 개발을 이루어 상품화에 성공하였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구진들에 의해 추진된 연구결과는 기존의 방식인 Vero cell을 사용하지 않고 이제까지의 오랜 경험과 전문성을 살려서 아직까지 시도되지 않았던 새로운 방식인 돼지 초대배양 세포주를 이용한 분리법을 확립하고 이를 이용하여 야외주 분리를 시도하여 유전자형과 항원성이 비슷한 구조를 가진 새로운 백신주를 이용한 효율성이 높은 백신은 기술적인 측면에서 여러 가지 기대성과를 가지게 된다. 첫째로 이제까지 확립되지 않은 새로운 PEDV 분리법의 확립이다. 이는 거의 불가능하거나 매우 어렵다고 여겨지던 PEDV 분리 방법에 새로운 기술적 제안이 될 것이다. 선행 연구에서 보다시피 이 바이러스의 유전자는 매우 빠르고 다양하게 변화하고 있다. 이러한 이 바이러스의 특성상 유전자형이 변화함에 따라서 새로운 백신주의 개발이 꾸준히 요구될 것으로 생각된다. 이러한 문제점을 해결할 수 있는 새로운 분리법의 확립은 효율적인 PED 백신 개발 기술의 확립이라고 할 수 있을 것이다. 둘째로 본 연구진들이 확립하고자 하는 돼지 초대배양 세포주를 이용하면 단순한 PEDV 분리 뿐 아니라 다른 돼지에서의 전염성 질환 원인체 등을 분리한다거나 백신을 개발하거나, 과학적인 연구를 수행함에 있어서 기본적인 매체로 작용할 것이라고 확신하며 이러한 기술의 발전으로 수의학 분야 연구에 이바지 할 것으로 기대된다.

본 연구진들이 추진하고자 하는 PED에 대한 다양한 접근법으로 인한 백신 개발 연구, 즉 돼지 초대배양 세포주의 확보 및 이를 이용한 새로운 PEDV 분리법 확립, 중화항체 유도부위와

receptor protein을 이용한 유전자 백신 개발, PEDV 백신의 효율성 검사 kit 개발, 이 모든 것을 포함하는 효율적인 백신의 개발 등을 이용하여 지금 시판 되는 백신의 문제점을 해결하는 새로운 백신의 개발로 아직까지 많은 양돈 농가에 경제적 피해를 입히고 있는 제2종 법정 전염병인 돼지 유행성 설사병의 정확한 진단과 효율적인 예방법을 확립함으로써 양돈 농가의 피해를 최소화 할 것으로 기대되며, 또한 이러한 효율적인 백신의 산업화를 통하여 백신 회사의 매출 증대에 적극 활용될 것으로 기대된다.

최우선적으로 새로이 분리된 야외주를 이용한 효율적인 백신의 사업화이다. 협력과제 책임자 이면서 참여기업인 (주)중앙백신 연구소는 우리나라 동물 백신 업계의 선두 주자중 하나로써 이제까지 많은 동물 백신에 대한 꾸준한 연구 개발로 우리나라 축산 및 수의 업계에 많은 공헌을 해 오는 회사로서 이번에 새로이 분리될 PEDV 야외주를 이용한 효율적인 백신의 개발로 사업화를 추진하고 기존의 국내 및 해외 영업망을 이용하여 효율적인 PED 백신의 매출을 극대화 할 것이다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

Porcine epidemic diarrhea (Porcine Epidemic Diarrhea, PED) is one of the most important viral disease in swine industry in asian countries, including South Korea. This disease occurred specifically piglets prior to weaning with severe diarrhea and dehydration, especially in the winter. However, this disease is currently endemic in the winter than other seasons, and disease patterns are also much more likely to be encountered. Discrepancy of vaccine effectiveness might be came from genetic difference in PEDV and antigenicity difference are more likely to cause problems. Because of these reasons, development of new vaccines using wild type PEDV is absolutely required, we have been tried to do our best to solve these issues.

With groups of experts in this field, we established couple of immortalized cell lines using primary swine tissues. Those cell lines were stabilized and tested for susceptibility for PEDV. PEDV was successfully propagated on these new cell lines and we tried to isolate wild type PEDV using these cell lines.

We also tried to prove specific neutralizing epitope on PEDV which could be useful for development of effective vaccines. We found specific neutralizing epitope is located on tail domain on spike protein. This is very new and interesting findings because it is the first finding on this region as the neutraling epitope. We also proved that this region is quite promising neutralizing in vivo experiments. This results might be useful for new generation of PEDV vaccine for the future as recombinant vaccine.

We also tried to prove receptor protein of PEDV using many other experiments. This is one of the most important issues on PEDV and we used different, different approaches for this study. We found CD13 might be very promising receptor protein for PEDV infection and this results are also one of our great finding from this study. In pathogenesis studies, we found PEDV also successfully infect alveolar macrophages and this is quite surprising results as well. We found PEDV infection seems like on going on alveolar macrophages in infected piglets. Although we don't know yet clearly what this means, but at least we know, this might be very new finding and should have special meaning on understanding of pathogenesis.

We also developed couple of monoclonal antibodies on PEDV, and successfully developed detection kit for PEDV using those. We already commercialized this kit for the market.

All our results and performance was quite useful and efficient expecially on understanding of PEDV. We successfully isolated new PEDV strains using primary swine cell lines and tried to develop new vaccines. We also developed new efficient detection kit for PEDV. Those development might useful for efficient detection and protection for PEDV in piglets and this might be very useful for swine industry.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

Chapter 1 Introduction

Chapter 2 Current Status on related areas

Chapter 3 Research Contents and Results

Chapter 4 Accomplishment and contribution

Chapter 5 Plan for the usage on results

Chapter 6 Recently updated information from overseas

Chapter 7 References

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절. 연구개발의 목적

돼지 유행성 설사병(Porcine Epidemic Diarrhea, PED)은 현재 우리나라를 비롯한 아시아 국가의 양돈 산업에 막대한 피해를 끼치는 중요한 바이러스성 질병중 하나이다. 이 질병은 특히나 겨울철에 이유기 이전의 자돈 등에 특이적으로 발생하여 설사를 동반한 탈수로 인하여 많은 자돈들이 폐사하는 질병으로 계절적 특성을 가지고 있었다. 그렇지만 이 질병은 현재 겨울철 이외의 다른 계절에도 발병하고 있으며, 발병 양상도 훨씬 다양해져 가고 있는 중이다. 우리나라가 미국이나 유럽 국가에서 많은 종돈을 검역, 수입하고 있지만 흥미롭게도 미국을 비롯한 북미 국가들이나 남미 국가들에서는 발병 보고가 없으며, 유럽에서는 발병 후, 양돈 산업에 피해를 끼쳤지만, 현재는 발병 보고가 거의 없어져 가고 있는 추세이다. 그러나 아시아 국가들 특히나 겨울철에 추운, 한국, 일본, 중국에서 많은 발병 보고가 이루어지는 특징이 있다. 이러한 이유들에 대해서는 아직까지 전혀 밝혀지지 않고 있는 실정이다. 또한 현재 우리나라에서 개발된 생독 백신들이 만들어져 농가에 보급되어 이용되고 있지만, 이 질병의 발생 보고는 별로 줄어들고 있지 않는 실정이다. 또 하나의 가장 큰 문제점은 세계 여러 나라 여러 기관들에서 이 바이러스의 분리를 시도하였지만, 현재까지 이 바이러스의 분리는 거의 이루어진 바가 없고, 매우 극소수의 분리주들만이 보고되었고, 또한 이를 이용한 백신이 개발되어 이용되고 있다.

하지만 이 질병의 원인체인 돼지유행성설사병바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)는 coronaviridae에 속하는 RNA virus로서 RNA virus의 특성상 mutation이 매우 빠르게 이루어지고 있는데, 현재 국내 농장에서 질병을 일으키는 wild type과 vaccine strain간의 유전자적 변이가 매우 많이 이루어진 것을 본 연구진이 밝혀낸바 있다. 이러한 맥락에서도 새로운 vaccine strain의 개발은 절대적으로 필요한 현실이지만 이 바이러스의 분리가 거의 불가능한 것으로 알려져 있는 바, 현재 유행하고 있는 wild type과 유전적으로 matching이 되는 새로운 vaccine strain의 개발이 절대적으로 요구됨에도 불구하고 이러한 문제점을 해결하기가 그리 쉽지만은 않은 실정이다. 이러한 새로운 type의 vaccine strain의 개발은 이 질병의 예방차원에서 필수적인 요소라고 할 수 있을 것이다.

이 질병에 대한 예방법으로는 PED는 바이러스성 질병이라 항생제나 항균제로 근본적인 치료는 할 수 없으나 2차 세균감염을 방지하고, 대증요법으로 설사와 구토로 인한 탈수를 완화시켜주기 위해 포도당이나 전해질을 충분히 공급해주고 항상 물을 먹을 수 있도록 하고 보온은 물론 쾌적한 환경을 유지시켜 자돈의 폐사를 줄이도록 하고 있다. 포유자돈에서 유행성자돈설사를 예방하기 위해 백신을 임신 모돈에 매 분만 5~6주전에 1차 예방접종하고 다시 분만 2~3주전에 2차 예방접종하여 분만 후 초유를 통하여 자돈에 모체이행항체를 이행시켜 줌으로써 포유자돈의 설사를 예방하도록 유도하고 있다. 하지만 현재의 PED 발생 현실을 고려하면 이러한 백신의 노력에도 PED의 발생 보고는 매년 이루어지고 있으며, 또한 위에서 언급한대로 야외주와 백신주와의 유전적 상이성이 매우 높은 현실이다. 이러한 유전적인 상이성은 항원성의

상이성을 유발하여 백신의 효율성에 문제점을 유발할 가능성이 매우 높은 현실이다. 이러한 맥락에서 현재 질병을 유발하고 있는 야외주와 유전자형과 항원성이 비슷한 새로운 야외주의 분리 및 확보가 절실히 요구되는 현실이며 또한 이를 이용한 새로운 백신의 개발도 절대적으로 요구되는 현실이다.

## 제2절. 연구개발의 필요성

### (1) 돼지 유행성 설사병 바이러스에 대한 기존의 연구 발표 내용

- ① PEDV에 의한 돼지 유행성 설사병은 한국, 일본, 중국 등 아시아 국가 및 돼지를 키우는 유럽 국가에서 주로 많은 문제가 되어 오고 있음에도 불구하고 현재까지 PEDV에 대한 우리나라뿐 아니라 국제적인 연구 결과는 주로 ELISA, RT-PCR, Immunohistochemistry, in situ hybridization과 같은 진단 방법 개발 연구나 이 질병의 임상 증상에 대한 case report에 국한되어 오고 있었던 것이 사실이다. 그것은 아직까지 PEDV를 분리하는 cell culture system이 미흡한 이유도 있을 것이지만, 실제로는 이에 대한 연구 투자가 미흡했던 이유도 있을 것이다.
- ② 이 바이러스에 대한 백신 개발 연구의 일환으로 국내에서 가장 최근에 PEDV의 neutralizing epitope에 대한 연구 결과가 있었으나, TGEV의 neutralizing epitope에 기초를 하여 연구 결과를 얻었지만, TGEV와 PEDV는 매우 유사한 임상 증상을 나타내는 바이러스이지만, 그들이 밝힌 부위는 사실 두 바이러스의 sequence 비교에서도 나타나듯이 매우 낮은 유사성을 가지고 있는바, 이 부위가 PEDV의 실제 neutralizing epitope이라고 설명하기는 어렵다고 할 수 있으므로 보다 체계적인 연구 결과가 요구된다.
- ③ 현재까지의 PEDV에 대한 연구들은 연구 분야가 이 질병의 임상 증상, 원인체의 유전자형 분석 등에 매우 한정적으로 이루어져 왔었으며, 또한 이 바이러스에 대한 직접적인 분자 생물학적 접근 노력은 별로 이루어져 있지 않았고, 이 바이러스의 감염 기전, receptor protein, PEDV 감염 시에 일어나는 분자 생물학적 변화 및 면역 반응 등 보다 체계적이고 과학적인 접근법이 요구되는 현실이다.
- ④ 우리나라에서 이제까지 행해진 PEDV에 대한 연구는 epidemiology 측면에서의 접근법이 대부분이었으며, 야외 발생 strain의 유전자 분석을 통한 다양성에 대한 연구 결과가 대부분이었다. 이러한 연구 결과에 의하여 현재 우리나라에서 유행하고 있는 PEDV는 유전적으로 매우 빠르고 다양하게 변화하고 있으며, 특히나 유일한 표면 단백질로 알려진 spike protein gene의 유전자가 매우 다양하고 심각하게 변화됨을 알려주고 있어서, 유전자형이 비슷한 바이러스를 이용한 새로운 백신 개발의 필요성을 요구하고 있는 현실이다. 이러한 새로운 백신의 필요성이 간절히 요구되는 현실에도 불구하고 이 바이러스의 분리가 매우 어렵다고

알려져 있어서 어려움을 겪고 있다. 우리나라에서 돼지 유행성 설사병에 대한 효율적인 예방책으로 새로운 야외주를 이용한 백신의 개발이 절대적으로 요구되고 있다.

## (2) 기존의 PEDV에 대한 연구와 본 연구의 차별성

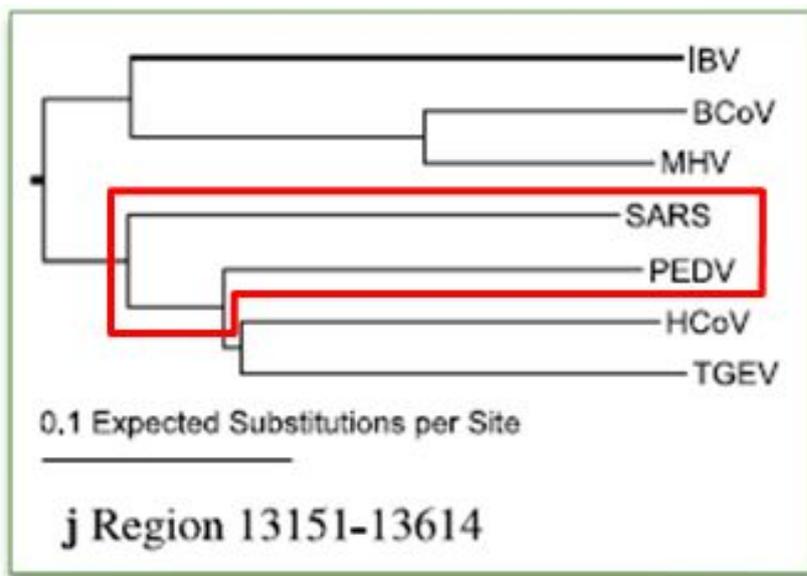
현재 우리나라 행해지고 있는 PEDV에 대한 백신 프로그램은 일반적으로 모든으로 부터의 모체 항체를 유도하는 방법을 사용하고 있다. 종부 전 및 분만 전에 백신을 접종하여 항체의 형성을 유발하고 이렇게 유발된 모체 항체가 어린 포유자돈으로 이행되는 시스템을 택하고 있다. PED의 질병 특성상 백신 항체가 유발되기 전의 어린 포유 자돈에서 일반적으로 이 질병이 발생하기 때문에 모체 항체에 의존하는 방법을 사용하고 있다. 그러므로 모든 항체의 항체량 및 성상이 매우 중요하다고 할 수 있다. 앞에서 언급한데로 꾸준한 백신의 노력에도 불구하고 PED는 아직까지 우리나라 양돈 농가에서 매년 피해를 입히고 있는 제2종 법정 전염병이다. 실제로 양돈 수의사 및 양돈 관련자들과 상의해 보면, 아직까지 이 바이러스성 질병에 대한 두려움은 줄어들고 있지 않음을 쉽사리 느낄 수 있다. 국내 여러 동물 백신 회사에서 다양한 상품명 PEDV 백신이 시판되고 있으며 거의 모든 양돈 농가에서 백신을 꾸준히 하고 있지만, 본 연구진들의 선행 연구 결과에 따르면 백신주와 현재 질병을 유발하고 있는 야외주 사이에 상당한 유전자적 상이성이 발견되고 있다. 이러한 문제점을 해결하는 가장 효율적인 방법은 현재 질병을 유발하고 있는 야외주와 유전자형과 항원서이 비슷한 새로운 야외주를 분리하여 백신주를 확보하는 방법일 것이지만, 이 바이러스의 분리가 매우 어렵다고 알려져 있어서 어려움을 겪고 있다. 또한 야외주의 부재로 인해 질병 유발 challenge strain이 없기 때문에, 현재 시판되고 있는 백신들의 효율성을 검증할 방법이 없는 현실이다.

현재까지 알려진 이 바이러스의 분리법은 PEDV가 유일하게 증식할 수 있는 것으로 알려진 Vero cell을 이용하는 방법이다. 물론 일본 연구자들은 MA104, CPK, ESK cell line 등에서 증식했다는 보고가 있지만, 실제로 효율성이 떨어지기 때문에 Vero cell을 이용한 방법이 적용되고 있다. 그렇지만 Vero cell은 원숭이 유래 세포이어서 그런지는 모르겠지만 실제로 이 바이러스의 분리 보고는 매우 희박하며 분리율도 매우 낮은 현실이다. 이러한 어려움을 해결하고자 본 연구진들은 기존의 방식인 Vero cell을 사용하지 않고 이제까지의 오랜 경험과 전문성을 살려서 아직까지 시도되지 않았던 새로운 방식인 돼지 초대배양 세포주를 이용한 분리법을 확립하고 이를 이용하여 야외주 분리를 시도하고자 한다. 이렇게 새롭게 분리된 야외주를 이용하여 유전자형과 항원성이 비슷한 구조를 가진 새로운 백신주를 이용한 효율서이 높은 백신을 개발하고자 하며, 이러한 연구는 이제까지 발표되지 않은 PEDV에 대한 많은 새로운 정보를 제공할 것으로 기대된다.

## (3) 돼지 유행성 설사병 연구의 중요성

- ① 2005년도에 Zhang등이 발표한 내용에 의하면 SARS virus와 다른 Coronavirus에 속하는 다른 6개의 바이러스, 즉 PEDV, transmissible gastroenteritis virus (TGEV), bovine coronavirus (BCoV), human coronavirus 229E (HCoV-229E), murine hepatitis virus

(MHV), avian infectious bronchitis virus (IBV)에 존재하는 replicase 1b와 spike protein 사이에 7개의 recombination region이 있다고 보고하였다. 또한 유전자 분석상으로 볼 때, 위에서 언급한 6개의 Coronavirus group에 속하는 바이러스 중, 아마도 PEDV와 MHV가 SARS Coronavirus의 조상이 아닐까라는 가설을 보고하였다. 아직까지 이 바이러스에 대한 연구 결과는 대단히 미미한 상태일지라도 이 바이러스가 지니는 의미는 상당히 크다고 할 수 있을 것이다. 그 자체가 지니는 중요한 의미에도 불구하고 이 바이러스는 단순한 돼지의 질병으로만 치부되는 경향이 있으며 별다른 과학적인 연구가 진행이 되지 않고 있는 중이다. 그렇지만 여러 가지 중요한 이유로 이 바이러스에 대한 보다 체계적이고 과학적인 연구가 수행되어야 한다고 생각된다.



- ② 돼지 유행성 설사병은 구토와 수양성 설사를 주증으로 하는 돼지의 소화기 질병으로 우리나라의 양돈 사업에 매우 심각한 경제적 피해를 끼치는 중요한 질병으로 또 하나의 다른 돼지의 소화기 질병인 Transmissible Gastric Enteritis (TGE)와 임상적으로 매우 유사하나 2주령 미만의 어린 자돈의 폐사율이 TGE보다 훨씬 높으며, 일반적으로 전염성이 매우 높고 어린 자돈에 매우 치명적인 이 바이러스 질병은 원래 겨울철에만 주로 발생하고 있는 질병으로 알려져 있었으나, 현재는 예전의 기존의 이 질병에 대한 기본 개념과 달리 연중 발병하고 있어서 우리나라 축산업에 미치는 영향은 점점 더 커져가고 있는 중이다.
- ③ 현재는 유럽을 비롯한 특히나 아시아 국가에서 발병율이 매우 높고 발병을 또한 증가하고 있는 중이다. 1992년 국내에서 처음으로 PED바이러스가 분리 보고된 이후, 많은 피해를 입히는데 1차 발생시 적절한 방어전략을 수립하지 못한 농장은 지속적으로 만성화되어 피해를 입는 농장이 늘어나고 있다. 백신 등과 같은 현재의 의학적 기술로는 돈군에 PED나 TGE를 완벽히 방어할 수 있는 방법은 없다고 평가된다.
- ④ 현재 이용되고 있는 돼지 유행성 설사병에 대한 예방 대책은 PEDV를 약독화시킨 바이러스와 LPGG 보호제를 혼합하여 만든 돼지 유행성설사(PED)예방 생독 백신이 주로 쓰이고 있으며, 이는 분만 4~5주전에 1차 접종하고, 분만 2~3주 전에 2차 접종한다. 또한 우리나라

라에서는 인공 감염 및 생독 백신이 현재 농가에서 사용되고 있으나, 매년 PED에 의한 피해는 계속되고 있다. 이는 이들 예방 대책의 한계를 들어 내고 있다고 할 수 있다. 인공 감염의 경우, PEDV에 대한 항체 역가가 상대적으로 낮고, 준비 과정이 번거로울 뿐 아니라, 오히려 활성화된 강독 PEDV에 의한 질병을 초래할 수 있다는 위험성이 있다. 또한 농가에서 현재 일반적으로 사용되고 있는 생독 백신의 경우에도, 병원성이 강한 PEDV를 약독화하여 사용하는 백신이므로, 부적절한 보관 및 사용 방법에 의하여 위험성을 항상 내포하고 있다. 이러한 여러 가지 문제점을 가지고 있기 때문에, 보다 효율적이고 안전한 PED 백신의 필요성이 절실히 요구되는 현실이다.

⑤ 그렇지만 이러한 범국가적인 백신의 노력에도 불구하고 이 질병의 발생률은 낮아지지 않고 있으며 오히려 증가 추세로 돌아서서 국가적인 대책이 시급한 질병으로 알려져 있다. 이러한 이유에서 이 바이러스에 대한 보다 구체적이고 과학적인 접근 방법을 통하여 이 바이러스에 대한 보다 많은 정보가 시급한 상황이다.

#### (4) 돼지 유행성 설사병 바이러스의 유전자적 분석

① 이 질병의 원인체는 Coronaviridae Coronavirus로서 PEDV는 (60-)120-160(-200) nm 정도 크기의 envelope이 있는 다양한 형태를 가지고 있다. 유전자의 구성은 스파이크 단백질 유전자, 표면 단백질을 전사하는 유전자 등으로 구성되어 약 20-30Kb 정도의 유전자로 구성되어 있다고 알려져 있지만 아직까지 이 바이러스에 대한 체계적이고 분자생물학적 접근은 아직까지 매우 미흡한 상태이다.

② 또한 PEDV는 약 5개의 구조 단백질로 구성되어 있다. 즉, 바이러스의 숙주 세포와의 접촉 및 hemagglutination and membrane fusion에 관여하는 surface glycoprotein (or spike, S)이 있고, 바이러스 표면을 세 번 정도 교차하는 50-60 kDa 정도의 integral membrane protein (M)이 있다. 또한 65kDa 정도의 4번째로 큰 Hemagglutinine-Esterase protein (HE)이 있는데 이는 표면에 돌출되어 있으며 receptor binding, hemagglutination과 같은 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그 외에도 핵단백질 (nucleocapsid protein)과 기능이 알려져 있지 않은 작은 또 하나의 단백질이 있다. 이 바이러스는 세포질에서 증식하는 것으로 알려져 있다.

③ PEDV의 항원성은 spike에서 결정되는 것으로 알려져 있다. 항원 특이성은 S를 이용한 중화 항체 실험(neutralization test), 또는 M을 이용한 보체 중합 반응(Complement Fixation Test)을 통하여 검사한다.

#### (5) 중화 항체 유도 부위 (Nuetralizing epitope)의 중요성

① 실제로 바이러스가 동물에 감염되었을 때, 일련의 많은 종류의 바이러스에 대한 항체가 형성된다. 이들 중 몇몇은 실제로 바이러스 파티클 (virus particles)에 접촉하여 그들의 감염

력을 중화한다. 이것을 증명하는 실험을 virus neutralization assay라고 하는데, 이것은 일반적으로 혈청 또는 단클론성 항체 (monoclonal antibody)를 연속적인 희석하여 바이러스와 반응시킨 후, 감염력이 있는 세포, 부화 계란, 동물로의 감염력 여부를 가지고 실험한다.

- ② 바이러스의 항원성 구조에 대한 정보는 바이러스에 대한 면역 반응을 이해하는데 매우 중요하며 또한 이것은 새로운 백신 개발 연구에도 중요하다. 중화 실험에 있어서 단클론성 항체의 사용은 바이러스의 중화 부위의 인식 및 중화 항체를 만드는 중요한 아미노산 부위를 인식하는데 매우 중요한 역할을 한다. 각각의 단클론성 항체는 각각 약 8-12 개의 아미노산과 특이적으로 반응하며 이들 아미노산 부위를 각각 에피토프 (epitope)이라고 한다.
- ③ 중화 항원 부위를 인식하고자 하는 방법들은 단클론성 항체와 바이러스와의 결합력 그리고, 어떤 단백질이 항체의 목표가 되는 어떤 특이 단백질 결정, 또한 단클론성 항체의 바이러스 단백질과 같은 합성 단백질과의 결합력 등에 대한 실험 등을 포함한다. 단클론성 항체가 epitope을 인식할 때, 이들은 Westernblot analysis, Immunoprecipitation과 같은 실험시 그 단백질과 반응하여 항원 부위를 나타내는 바이러스 단백질 인식하도록 한다.

### 제 3 절. 연구개발의 범위

본 연구진들은 많은 백신의 노력에도 불구하고 아직까지 양돈 농가에 많은 경제적 피해를 유발하는 돼지 유행성 설사병에 대한 새로운 백신의 개발에 노력하고자 한다. 이 질병에 대한 백신의 효율성에 대한 많은 의문점 내지는 문제점이 제시되었다. 본 연구진들의 선행 연구 결과에 의하면 현재 양돈 농가에서 질병을 유발하고 있는 야외주와 백신주에는 유전적으로 상당히 높은 상이성을 가지는데, 이러한 유전적인 상이성은 항원성에도 차이점을 가질 것으로 여겨지며 이로 인한 백신의 효율성에 의문점을 가지고 있다. 그렇기 때문에 새로운 야외주의 분리 및 이를 이용한 효율적인 백신의 개발이 요구되고 있는 현실이지만, 이러한 문제점에도 불구하고 이 바이러스에 대한 분리가 매우 어렵기 때문에 문제점 해결이 상당히 어렵다고 여겨지고 있다. 이러한 문제점을 해결하고자 본 연구진들은 새로이 야외주를 이용하기 위하여 전문가 pool을 이용하여 돼지 초대배양세포를 불멸화를 통하여 구축하고 이를 이용하여 새로운 야외주를 분리하여 이를 이용한 새로운 효율적인 백신의 개발을 추구하고자 한다. 우선적으로 가장 중요한 급선무인 새로운 야외주의 분리 및 이를 이용한 새로운 효율적인 백신의 개발이다. 이는 효율적인 백신 개발에 가장 중요한 요소로서 현재 농장에서 질병을 일으키는 야외주 바이러스의 분리확보를 통한 새로운 백신주의 개발이다. 이제까지 이 바이러스를 분리 시도는 대부분 이 바이러스가 유일하게 자란다고 보고되고 있는 Vero cell을 이용한 분리 시도만 행해져왔다. 그렇지만 Vero cell은 원숭이 유래 세포로써 이 바이러스의 숙주인 돼지 세포와는 단백질 구성이나 기타 생물학적 특성이 다를 것으로 예측된다. 그렇지만 다른 대책이 없었기 때문에 Vero cell만을 이용할 수밖에 없었고 이러한 이유 때문에 야외주의 분리가 어려웠을 것으로 판단된다. 이에 본 연구진들은 돼지 장세포 등 다양한 장기 유래 세포를 개발하고 이를 이

용하여 이 바이러스에 대한 분리율을 높이고자 한다. 이러한 새로운 방법을 통하여 이제까지 분리가 매우 어렵다고 여겨지고 있는 PEDV에 대한 효율적인 분리 방법을 확립하고 새로운 야외주를 분리하고 이를 이용한 효율적인 백신의 개발에 노력하고자 한다.

또한 이 질병 차단에 대한 여러 가지 방안을 모색하고자 이 바이러스에 대한 여러 가지 체계적이고 과학적인 접근 방법을 모색하고자 한다. 바이러스의 중화항체 유도 부위 (neutralizing epitope)를 밝히는 연구는 그 바이러스성 질병의 예방 대책 수립 및 백신 개발에 있어서 필수적이 요소라고 할 수 있는 만큼 매우 중요한 연구 분야라고 할 수 있다. 이러한 이유로 본 연구는 PEDV 감염 억제에 매우 중요한 neutralizing epitope를 보다 체계적이고 과학적인 방법을 이용하여 추적하고 이들의 PEDV에 대한 방어 능력, 즉 PEDV에 대한 neutralization assay를 시험해 봄으로써 이들의 중요성을 인식하고, 중화항체 유도부위를 이용한 PEDV에 대한 백신 개발 가능성 연구를 수행하고자 한다. 또한 단순한 백신의 개발에 그치지 않고 백신이 효율적으로 방어를 하는지를 평가할 수 있는 백신의 효율성을 검증할 수 있는 백신 효율성 검증 시스템 또한 절대적으로 필요하다고 할 수 있다. 이러한 이유에서 본 연구진들은 새로운 백신의 개발뿐 아니라 백신의 PEDV 백신의 효율성을 검사할 수 있는 효율성 검사 kit를 개발하고자 한다.

또한, 병인기작에 관한 연구로서 PEDV에 의한 apoptosis의 유발 여부를 알아보하고자 한다. Apoptosis는 바이러스에 대한 생체의 방어기작에 매우 중요한 역할을 한다. 즉, 바이러스에 감염된 세포는 apoptosis를 통하여 스스로 사멸하여 바이러스가 복제할 장소를 제거함으로써 바이러스의 감염을 완화시킨다. PEDV와 감염된 세포 내의 apoptosis에 관한 연구는 현재까지 전무한 상태이다. 따라서 PEDV에 의한 apoptosis의 유발 또는 억제여부를 알아보고 apoptosis와 관련이 있다면 이의 역할과 의의 및 p53, Fas/FasL, caspase, bcl-2/bax 등과 같은 apoptosis와 관련된 신호전달체계에 관하여도 면역조직화학적 및 immunoblot법을 이용하여 알아보하고자 한다. 특히 위장관 세포는 자연적으로도 지속적으로 사멸과 재생을 반복하기 때문에 apoptosis와 매우 밀접하게 관련되어 있다. 따라서 세포질내의 세포사멸 신호전달체계뿐 아니라 미토콘드리아 유래의 세포사멸 신호전달 체계에서 caspase의 활성화 기전, 미토콘드리아로 부터 분비되는 cytochrome c에 의해 조절 및 caspase pathway이외에 여러 다른 종류의 protease 예를 들어 calpain, granzyme B, chymotrypsin, proteinase K 및 trypsin등 PEDV 감염과 apoptosis와 연관되어 있는 신호전달체계에 대하여 체계적으로 연구하고자 한다.

앞에서 언급했듯이 우리나라에서는 인공 감염 및 생독 백신이 현재 농가에서 사용되고 있으나, 매년 PED에 의한 피해는 계속되고 있다. 이는 이들 예방 대책의 한계를 드러내고 있다고 할 수 있다. 인공 감염의 경우, PEDV에 대한 항체 역가가 상대적으로 낮고, 준비 과정이 번거로울 뿐 아니라, 오히려 활성화된 강독 PEDV에 의한 질병을 초래할 수 있다는 위험성이 있다. 또한 농가에서 현재 일반적으로 사용되고 있는 생독 백신의 경우에도, 병원성이 강한 PEDV를 약독화 하여 사용하는 백신이므로, 부적절한 보관 및 사용 방법에 의하여 위험성을 항상 내포하고 있다. 이러한 여러 가지 문제점을 가지고 있기 때문에, 보다 효율적이고 안전한 PED 백신의 필요성이 절실히 요구되는 현실이다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여,

(1) 본 연구에서는 발병 농가로부터 새로운 바이러스를 분리 안정화 하여 현재 질병을 일으키고 있는 wild type과 유전적으로 비슷한 새로운 백신주의 확보하고자 한다. 이는 효율적인 PED에 대한 백신 개발에 절대적으로 필요한 요소라고 할 수 있을 것이다. 이렇게 새로운

야외주의 분리가 절대적으로 필요한 상황에서 분리율을 높이기 위하여 돼지의 장세포 등 초대배양 세포를 이용하여 새로운 야외주의 분리하고 이를 이용한 새로운 효율적인 백신을 개발하고자 한다.

- (2) 본 연구진들에 의해서 이미 예비 실험으로 밝혀낸 PEDV에 대한 중화 항체(neutralizing antibody)를 생성할 수 있는 중요한 neutralizing epitope로 밝혀진 spike protein의 3'end cytoplasmic domain에 위치한 7-mer amino acid들의 각각에 대해서 point mutation 방법을 이용한 좀 더 체계적이고 심도 있는 연구를 진행하여 PEDV에 대한 중요한 중화 항체 유도 부위를 확립하고자 한다.
- (3) 또한 이 바이러스 감염에 절대적으로 중요한 요소인 receptor protein에 대한 연구를 수행하고자 한다. 바이러스의 receptor protein은 감염의 시작과 질병 유발에 절대적인 요소이며 이를 이용한 백신의 개발에 대한 연구도 많이 수행되고 있지만 PEDV에 대한 receptor protein에 대한 연구는 매우 미미하다. 이를 위해 보다 과학적이고 체계적인 방법을 이용하여 PEDV에 대한 Vero cell 및 불멸화된 돼지 초대배양세포에서의 receptor protein을 연구하고 이를 이용한 백신 개발에 노력하고자 한다.
- (4) 현재까지 알려진 바로는 spike protein만이 PEDV의 표면에 발현되는 유일한 표면 단백질로 알려져 있으며, 이 단백질이 가장 중요한 면역원성을 가지는 단백질로 알려져 있다. 또한 이 단백질은 중요한 중화 항체 유도 부위를 포함하고 있기 때문에 이 단백질을 이용한 백신 개발 노력도 필요하다고 평가된다. 이를 위하여 이 단백질을 항원성을 그대로 유지하면서 과량으로 발현하여 이를 이용한 백신 개발에도 노력하고자 한다.
- (5) 단순한 백신의 개발뿐 아니라 백신의 효율성을 검증할 수 있는 백신 효율성 검사 시스템을 개발하고자 한다.
- (6) 병인기작에 관한 연구로서 PEDV에 의한 apoptosis의 유발 여부를 알아보고자 한다. PEDV에 의한 apoptosis의 유발 또는 억제여부를 알아보고 apoptosis와 관련이 있다면 이의 역할과 의의 및 p53, Fas/FasL, caspase, bcl-2/bax 등과 같은 apoptosis와 관련된 신호 전달체제에 관하여도 면역조직화학적 및 immunoblot법을 이용하여 알아보고자 한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재 많은 발병 보고가 있음에도 불구하고 이 바이러스 자체에 대한 연구는 생각보다 많이 이루어지지 않았다고 할 수 있다. 이는 사실 미국을 비롯한 북미 국가들이나 유럽 국가들에서 발병이 이루어지지 않고 있다는 이유가 가장 크다고 여겨진다. 그렇지만 아직까지 한국을 비롯한 아시아 국가들에서는 문제가 많이 일어나고 있지만 관심도가 많이 떨어진 것 같다고 평가된다. 하지만 이 바이러스 이외에 다른 Coronaviridae에 속하는 바

이러스에 대한 연구 또한 상대적으로 매우 미미하다. 이는 좋은 animal model이 별로 없고 이 바이러스의 유전자 자체가 너무나 큰 이유도 있을 것으로 생각된다.

PEDV에 의한 돼지 유행성 설사병은 한국, 일본, 중국 등 아시아 국가 및 돼지를 키우는 유럽 국가에서 주로 많은 문제가 되어 오고 있음에도 불구하고 현재까지 PEDV에 대한 우리나라뿐만 아니라 국제적인 연구 결과는 주로 ELISA, RT-PCR, immunohistochemistry, in situ hybridization과 같은 진단 방법 개발 연구나 이 질병의 임상 증상에 대한 case report에 국한되어 오고 있었던 것이 사실이다. 그것은 아직까지 PEDV를 분리하는 cell culture system이 미흡한 이유도 있을 것이지만, 실제로는 이에 대한 연구 투자가 미흡했던 이유도 있을 것이다.

이 바이러스에 대한 백신 개발 연구의 일환으로 국내에서 가장 최근에 PEDV의 neutralizing epitope에 대한 연구 결과가 있었으며, 이를 이용한 경구 백신 개발 연구가 진행되고 있는 것으로 알고 있다. 그렇지만 본 연구진이 밝힌 중화 항체 유도 부위와 다른 연구진들이 밝힌 부위에는 상당한 차이가 있으므로, 두 epitope들의 중화 능력 비교 실험이라든지 다른 추가적인 연구를 통하여 확정할 수 있을 것으로 기대된다. 이 PEDV에 대한 감염 기전은 아직까지 전혀 밝혀져 있지 않았고, 또한 apoptosis와 관련된 자료는 전무한 현실이다.

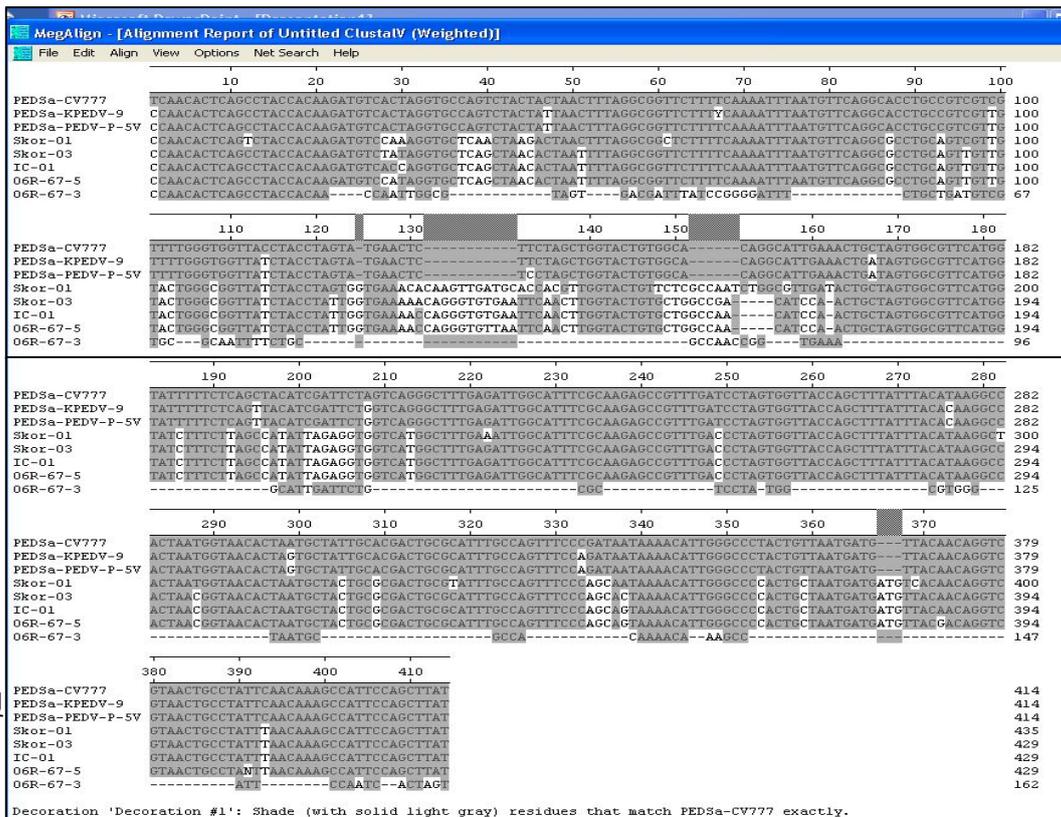
연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
전북대학교	COE라는 부위를 이용한 중화항체 유도 부위에 대한 연구	COE와 식물세포를 이용한 경구 백신 개발에 대한 연구 수행 중
Northeast Agriculture University	중국내 strain의 분리	현재 sequencing을 통한 유전자 비교 연구 수행 중

본 연구진들은 양돈 농가에 많은 경제적 피해를 입히는 PEDV에 대한 다양한 연구를 수행해 오고 있는 중이다. 본 연구진들의 선행 연구 결과에 의하면 PEDV는 다른 RNA 바이러스와 같이 RNA 바이러스의 특성상 유전자 변이가 매우 빠르고 많이 변한다는 특성을 똑같이 지니고 있음을 알고 있다.

- (1) 그림 1과 같이 현재 양돈 농가에서 질병을 유발하고 있는 야외주 (Skor-1, Skor-2, IC-01, O6R-67-5, O6R-67-3)들은 현재 상업적으로 개발되어 농가에 보급되어진 백신주(CV777, P5V, KPED-9)들과 유전적으로 매우 높은 상이성을 지니고 있다. 이러한 유전적인 상이성은 항원성에도 다양성을 유발할 것으로 예상되면 이러한 아미노산에서 연속적인 addition 및 deletion에 의한 변이는 이제까지 백신으로 사용되고 있는 백신주에 의한 항체를 피해갈 가능성이 매우 높을 것으로 예상된다. 이러한 이유로 현재 유행하고 있는 야외주의 분리와 이를 이용한 새로운 백신의 필요성이 절대적으로 요구된다.

		Percent Identity						
		1	2	3	4	5	6	7
Divergence	1	97.5	81.4	81.8	82.3	81.6	81.6	1
	2	2.5	99.5	80.7	81.1	81.6	80.9	2
	3	2.7	0.2	81.1	81.1	81.6	80.9	3
	4	16.3	16.9	16.6	81.3	91.0	91.3	4
	5	14.7	15.3	15.6	7.9	98.6	98.4	5
	6	14.2	14.8	15.0	8.1	1.4	98.6	6
	7	14.8	15.4	15.7	7.6	1.4	1.2	7

PEDSa-CV777  
 PEDSa-KPEDV-9  
 PEDSa-PEDV-P-5V  
 Skor-01  
 Skor-03  
 IC-01  
 06R-67-5



(2) 예  
 용  
 5년  
 서  
 대  
 가  
 의

비연구내  
 으로 약  
 에 걸쳐  
 PEDV에  
 한 여러  
 지 연구  
 결과로

그림 1 PEDV 분리주의 유전자형 검사

현재까지 3개의 SCI 논문 및 국제 학술 행사에 참가하여 연구 결과를 발표하고 있다. 본 연구진들이 그동안 수행해온 결과는 첫째로 PEDV의 중화 항체 유도부위의 증명이었다. 또한 이를 보다 과학적이고 효율적으로 규명하기 위한 여러 가지 연구를 수행해 오고 있는 중이다. 현재까지, 7-mer random peptide phage를 이용하여 PEDV의 spike protein의 마지막 뒷 부분인 transplasmic domain 쪽에 neutralizing epitope가 있을 가능성이 많다는 것을 이미 밝혔다. 이 방법은  $2 \times 10^{11}$  개의 여러 가지 다른 조합으로 구성된 7개짜리 아미노산으로 구성되어있는 bacteriophage를 이용하여 규명하였다. 아래에 기술한 증명과 같이 PEDV의 중화 항체 유도 부위는 spike protein의 마지막 3' end쪽에 위치한 부위에 존재함을 증명하였다.

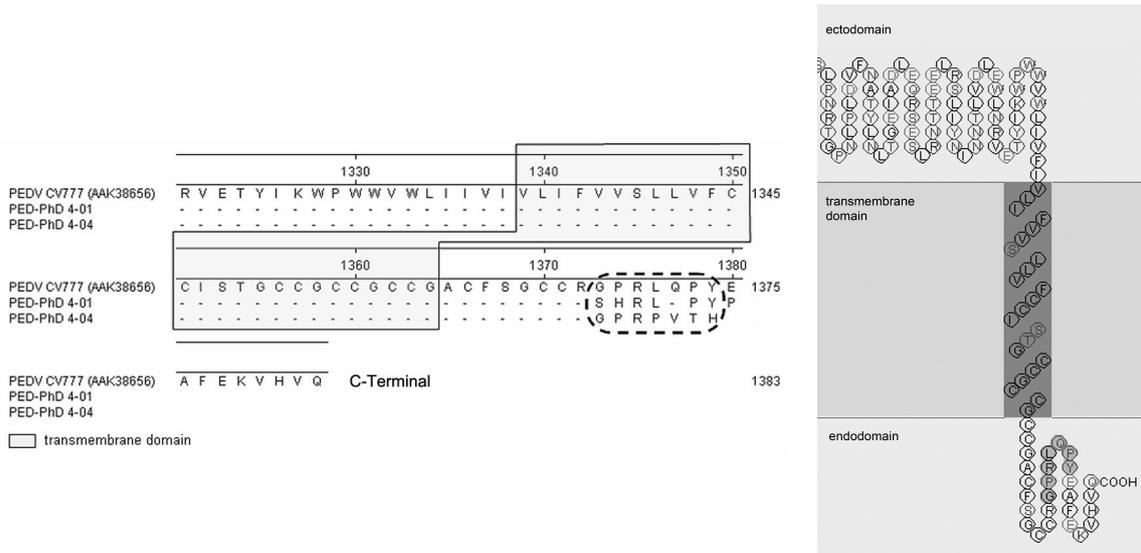


그림 2 PEDV의 putative neutralizing epitope

(3) 또한 PEDV의 배양을 위하여 배양 배지에 trypsin의 첨가가 절대적으로 필요하며 trypsin의 첨가 없이는 PEDV의 배양이 불가능하다고 알려져 있지만 본 연구진들의 연구 결과에 의하면 trypsin이 없이도 PEDV가 효율적으로 배양이 가능함을 알게 되었다 (그림 3).

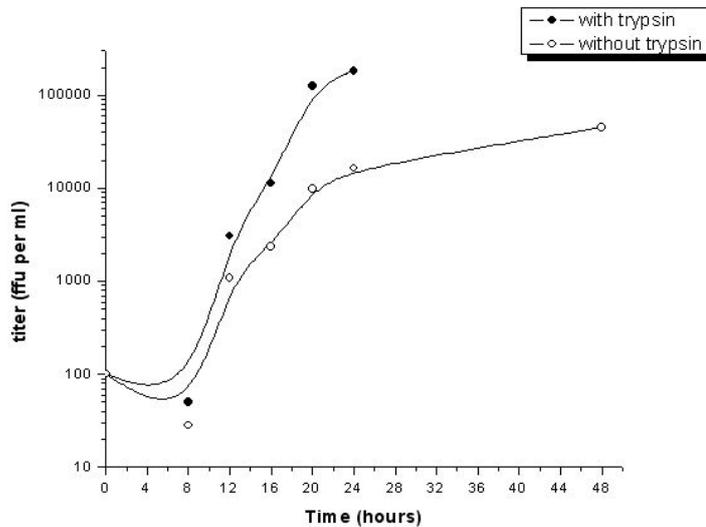


그림 3. PEDV의 바이러스 증식곡선

(4) 국립수의과학검역원의 용역과제로 소 태아를 이용하여 구제역바이러스에 감수성이 있는 소 유래 세포주를 작성한바 있다. 소 태아의 신장, 갑상선, 인후두강 조직을 무균적으로 적출하고 효소처리를 통하여 단일세포로 분리 한 후 초대배양을 하였다. Na<sub>2</sub>EDDA를 사용하여 초대배양한 세포에서 섬유아세포를 제거하고 상피세포만을 클로닝하여 레트로바이러스 벡터를 이용한 telomerase의 세포내 과발현 방법을 이용하여 초대상피세포의 불멸화 하였다. 제작된 세포주의 telomerase 발현양상조사, 세포모양 관찰, 세포배양 유효 계대수 측정, 염색체 검사, 마이코플라즈마등 잡균 감염검사와 바이러스 감염검사를 통하여 후보 세포주를

선정하고 선정된 후보 세포주에 대한 FMDV 감수성 검사를 통하여 최종 후보주를 선택하였다. 제작된 세포주의 telomerase 발현양상을 Real-Time PCR을 통하여 조사한 결과 신장 T2 세포주와 신장 T3 세포주에서 높은 fluorescence 값이 나왔으며 25세대까지 지속적으로 telomerase가 발현되는 것을 볼 수 있었고, 세포 유효 계대수를 측정한 결과 25세대까지 비교적 일정한 분열속도를 보였으며 염색체의 변화도 거의 보이지 않았다. 실험 동안 오염이나 소 태아 자체의 오염 여부를 알아보기 위한 잠균 감염 실험과 바이러스 감염 실험에서 제작된 세포주 모두 음성이었다. FMDV 감수성이 있을 것이라고 생각되는 유력한 세포주인 신장 T2 세포주와 신장 T3 세포주, 불멸화를 하지 않은 일반 세포, 그리고 일반적으로 FMDV에 감수성이 있다고 알려진 IBRS-2 세포주에 FMDV(AS/SKR/2002, 4passaged in IBRS-2)를 접종하여 감수성 검사를 실시한 결과 바이러스 접종 24시간 후 신장 T2 세포주와 T3 세포주 그리고 일반신장 세포에서 IBRS-2 세포주 보다 100~1000배 정도 높은 TCID<sub>50</sub>/ml를 보였다. 이는 제작된 신장 T2 세포주와 신장 T3 세포주가 불멸화가 되면서 일반세포가 가지고 있는 생물학적 특성을 그대로 유지하였음을 보여준다. 위와 같은 연구 성과를 바탕으로 돼지 조직을 이용한 상피세포의 불멸화 예비 실험에서도 소에서와 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

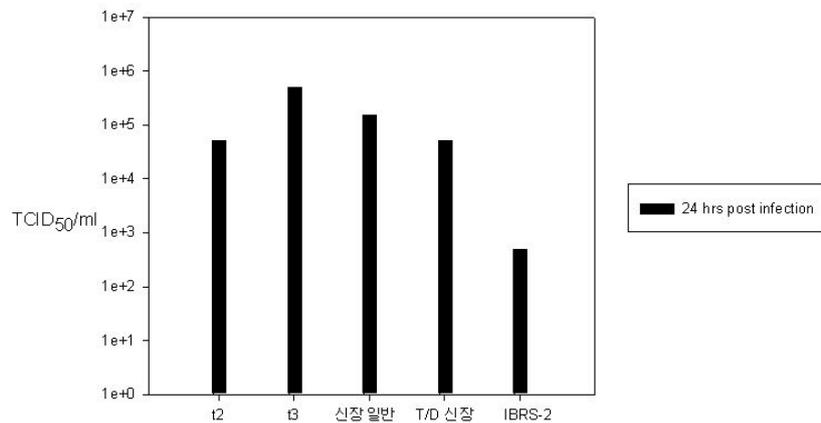


그림 4. 구제역바이러스(AS/SKR/2002, 4passaged in IBRS-2)에 대한 세포의 감수성테스트 결과

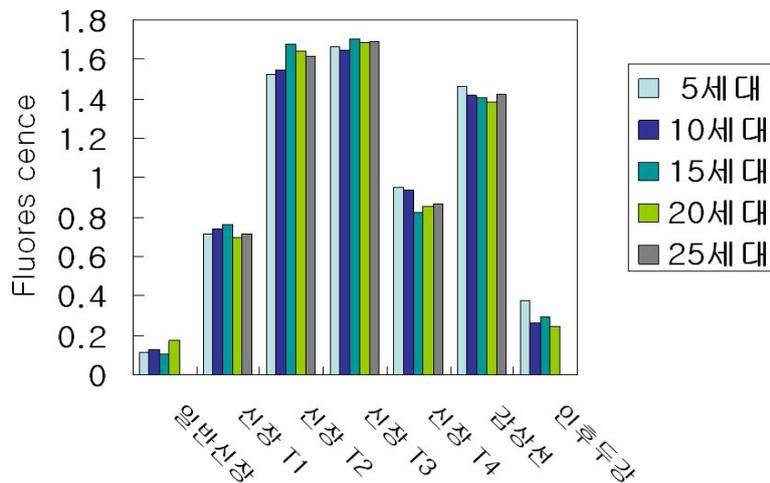


그림 5. 제작 세포주의 35 Cycle에서의 Fluorescence 비교. (Real-Time PCR)

(5) 앞에서 언급한대로 우리나라에서의 PEDV 백신 전략은 종부 전 및 분만 전에 모든에 백신 접종하여 모체 항체의 이행을 유발하는 시스템이다. 그렇지만 본 연구진들의 선행 연구 결과와 이 연구 과제를 제안하게 만든 가장 큰 이유로 국내 양돈 농가의 모든에서의 PEDV 항체 검사를 실시한 결과 백신 횟수에 비해서 많은 모든 들에서의 PEDV에 대한 항체 수준이 낮다는 것을 발견하였다. 아래표는 각 농장들로부터 수집한 혈청 샘플들에 대한 ELISA 결과로 OD value를 의미한다. A 농장의 경우, PEDV 발병 2주 후 살아남은 자돈 들에서의 항체가이다. 비교적 높은 수준의 항체를 유지하고 있다. 이는 아마도 발병 이전 부터 높은 항체를 유지 했다가 보다는 감염 후 살아남는 과정에서 높은 항체를 확보할 수 있지 않았나 생각된다. B 농장의 경우, PEDV의 발병은 보고되지 않았지만 상대적으로 낮은 항체를 유지함을 알 수 있다. C 농장의 경우, 약 3-5산 정도의 비교적 높은 항체가 가 기대되는 모든 들에서의 항체를 보면 이미 많은 횟수의 PEDV 백신 경험에도 불구하고 상대적으로 항체가가 낮음을 알 수 있다. 아직까지 이 농장에서 PEDV의 발생은 보고 되지 않았지만, 모체 항체가가 낮기 때문에, 이들 모든 으로부터 분만된 자돈에서의 항체를 기대하기가 어려울 것으로 판단된다.

(6)

농장 A (PEDV발생, 자돈)	농장 B (PEDV 비발생, 자돈)	농장 C (PEDV비발생, 모든)
0.592	0.393	0.787
0.848	0.311	1.182
1.081	0.259	0.273
1.638	0.307	0.123
1.635	0.221	0.209
0.840	0.585	
1.536	0.201	
	0.339	
	0.251	

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 중화항체 유도부위를 이용한 효율적인 PEDV 백신 개발

#### 1. 새로운 야외주의 분리 및 면역성 검사를 통한 새로운 백신주 확보

야외주 PEDV를 분리하기 위해 설사와 탈수를 임상증상으로 보이는 의심자돈으로부터 검체를 채취하였다. 설사를 임상증상으로 하는 자돈의 장내 내용물 및 분변을 이용하여 reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 법을 통해 PEDV 양성돈을 감별

하였다. 설사증을 보이다 폐사한 자돈의 소장을 무균적으로 적출하고 이를 항생제 및 항진균제를 포함한 phosphate buffered saline (PBS) 에 넣은 후 잘게 파쇄하였다. 파쇄된 조직은 강한 vortexing과 freeze-thawing 을 실시하여 조직 내의 바이러스가 상층액으로 나올 수 있도록 하였다. 12000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분리한 뒤 viral RNA 분리에 사용하였다. 0.3 ml 의 상층액에 0.5 ml 의 virus lysis buffer 을 가한 후 강한 vortexing 을 하고 10 분간 상온에서 incubation 하였다. 10 분 후 RNA binding buffer 0.7 ml 을 pipetting으로 섞어주고 column 에 0.75 ml 씩 transfer 하였다. 12000 rpm에서 약 1분간 원심분리하여 남은 용액을 제거하였다. washing buffer 을 이용하여 2번의 washing을 시행한 후 RNase-free DW을 이용하여 elution 하였다. 최종산물을 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. 가장 conserve 하다고 알려져 있는 Nucleocapsid protien 중 950부터 1251 번 염기서열 해당하는 specific primer (forward primer 5' CAGGCTATGCTCAGATCGCCAG 3' and reverse primer 5' CAGATTGGCATGGGTCACATCA 3') 를 PEDV 진단을 위해 RT-PCR 에 사용하였으며 RT-PCR에 사용된 PCR 조건은 다음과 같다.

- 45 도 30분
- 94 도 5분
- 94 도 20초
- 60 도 20초
- 72 도 50초 (X40)
- 72 도 5분

TGEV 와 swine rotavirus 에 대한 RT-PCR 을 추가로 수행하여 유사한 임상증상을 보이는 다른 바이러스성 질병으로부터 감별진단하였다. PEDV 의 발병 특성상, 겨울철에 주로 질병이 발생되므로 12월부터 3월 사이에 설사를 임상증상으로 하는 농가로부터 자돈을 얻어 RT-PCR 을 수행하고자 하였으며, 충남 및 충북지역의 양돈농가로부터 2009년 겨울에는 총 10건 (2009년 3월 19일, 자돈 5마리; 2009년 4월 16일, 자돈 5마리), 2010년 겨울에는 총 6 건 (2009년 12월 23일, 자돈 4마리; 2010년 1월 13일, 자돈 2마리) 의 자돈 샘플을 채취하여 RT-PCR 및 야외주 바이러스 분리에 사용하였다. 그러나, 2011년에는 구제역으로 인해 농가로부터의 샘플링이 어려워 새로운 샘플링이 이루어지지 못하여 이전에 실험을 수행 중이던 총 16 건의 자돈 샘플을 이용하여 지속적인 실험을 수행하였으며 이들 분변 샘플의 RT-PCR의 결과는 다음과 같았다 (표 1). 양성돈의 경우, 장 및 장내 내용물을 파쇄한 상층액을 0.2 $\mu$ m sterile filter로 필터링하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하고 야외주 바이러스의 분리를 위해 사용하였다.

	PEDV	TGEV	Rotavirus
090319-01	-	-	-
090319-02	-	-	-
090319-03	+	-	-
090319-04	+	-	-
090319-05	-	-	-
090416-01	+	-	-

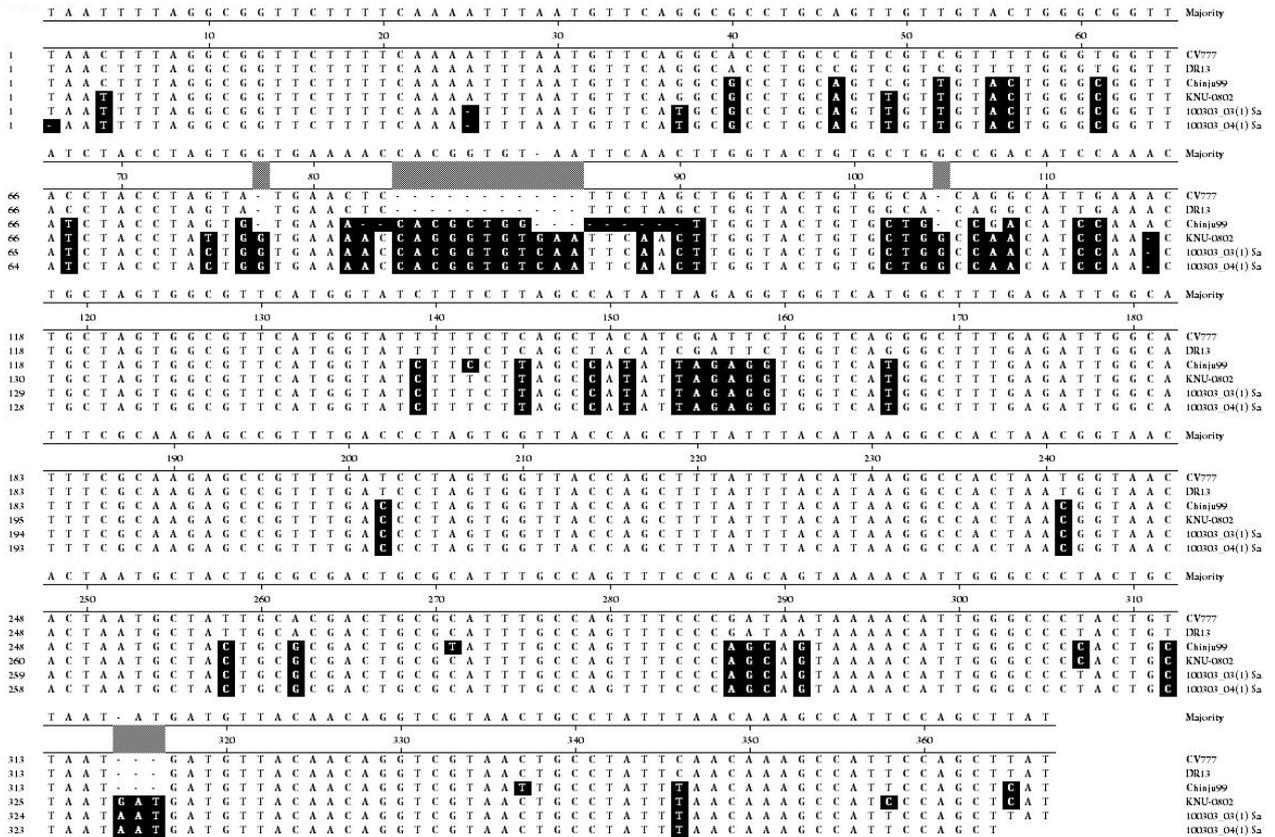
090416-02	+	-	-
090416-03	-	-	-
090416-04	+	-	-
090416-05	+	-	-
091223-01	+	-	-
091223-02	+	-	-
091223-03	+	-	-
091223-04	+	-	-
100113-01	+	-	-
100113-02	-	-	-

표 1. PEDV 감염의심돈의 RT-PCR 결과

PEDV Nucleocapsid protein 에 대한 PCR 결과 양성반응을 보이는 자돈에 대해 Spike protein 에 대한 RT-PCR을 추가로 수행하였다. spike protein 은 PEDV 의 가장 dominant 한 structural protein 의 하나로 바이러스의 감염과 중화항체를 유도 하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 특히, spike protein 의 N terminal 부분은 바이러스 감염시 세포와 interaction 하는 receptor protein 과 binding 하는 receptor binding domain 이 있는 것으로 믿어지고 있으며 중화항체 유도에도 매우 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다. 실제로 야외주 바이러스의 spike protein sequencing 결과, spike protein 의 N terminal 부분에서 큰 variation 이 있는 것으로 보고 되어 있으며 야외주 바이러스와 백신주 바이러스와의 감별을 위해 가장 variable 하다고 알려져 있는 spike region 에 대한 RT-PCR 및 sequencing 을 수행하였다. spike variable region 의 RT-PCR 에 사용된 primers 는 다음과 같다 (forward primer 5' CCA ACA CTC AGC CTA CCA CAA 3'; reverse primer 5' ATA AGC TGG AAT GGC TTT GTT 3'). RT-PCR에 사용된 PCR 조건은 다음과 같다.

45 도 30분  
 94 도 5분  
 94 도 20초  
 53 도 20초  
 72 도 50초 (X40)  
 72 도 5분

PCR product 는 1 % agarose gel에서 확인한후, PCR purification kit 을 이용하여 PCR product 만을 purification 하였다. purified PCR product 의 염기서열분석을 실시한 결과, 이전에 보고된 바와 같이 spike variable region 에 상당히 큰 variation 을 보였으며 이를 바탕으로 야외주 PEDV 의 감염을 확인 할 수 있었다 (그림 1). 감염된 돼지로부터 얻은 spike protein 과 백신주 바이러스로부터 얻은 spike protein 의 상동성은 78.2 ~ 79.3 % 정도로 나타났다.



Decoration \* Decoration #: Shaded (with solid black) residues that differ from CV777.

그림 1. 야외 분리주 PEDV의 염기서열 분석 및 상동성 검사

양성 샘플을 이용하여 야외주 바이러스 분리를 수행하였다. 우선 현재 PEDV propagation에 가장 널리 이용되고 있는 Vero cell을 사용하여 야외주 바이러스 분리를 수행하였다. 그러나 본 과제에서 언급했듯이, 원숭이 유래 세포주인 Vero cell을 이용한 돼지 바이러스의 분리는 성공적이지 못했으므로 새로운 돼지 유래 세포주의 개발에 앞서 Vero cell에 PEDV의 receptor protein으로 알려져 있는 돼지 APN 단백질을 과발현시킨 Vero-pAPN을 추가적으로 야외주 바이러스 분리에 사용하고자 하였다. 이를 위해, 우선 돼지의 장조직으로부터 돼지 APN에 특이적인 primer를 이용하여 pAPN gene을 증폭해내고 이를 pcDNA3.1-Hygro(+) vector에 클로닝하였다 (그림 2). pcDNA3-pAPN을 Vero cell에 transfection한 뒤, G418을 이용하여 transfected Vero cell만 selection하였다. pAPN의 발현을 확인하기 위해 FACS와 면역염색을 수행하였으며 non-permeable condition에서 세포 표면에 pAPN이 잘 발현되고 있음을 확인하였다 (그림 3). Vero cell에서 pAPN이 지속적으로 발현되도록 하기 위해 50 ug/ml G418로 계속해서 selection을 수행하였다. Vero cell과 Vero-pAPN을 이용해 백신주인 KPEDV-9을 감염시켜 본 결과, 두 세포 모두 PEDV에 잘 감염하는 것을 확인하였다.

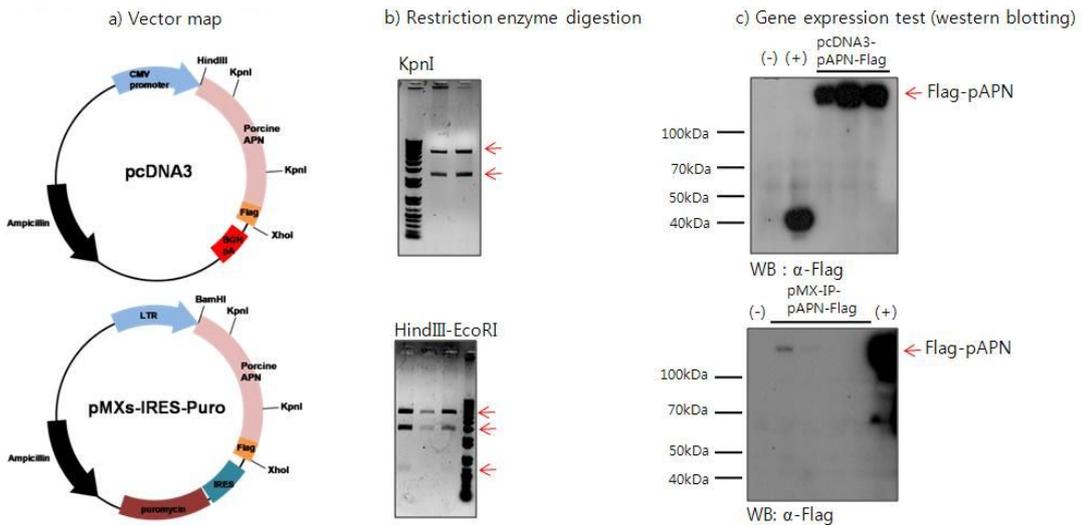


그림. 2. pcDNA3-pAPN-Flag expression 을 위한 cloning strategy

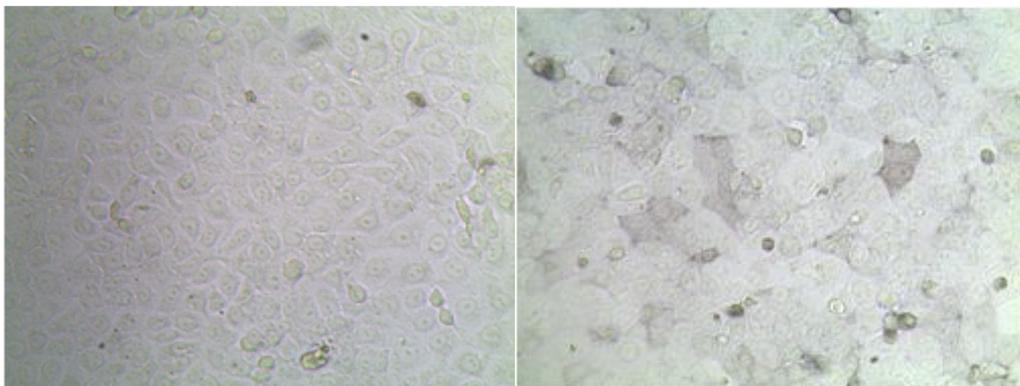


그림. 3. Vero-pAPN 의 발현확인

양성돈으로부터 얻은 유제를 1:5로 희석한 뒤 우선, Vero cell 에 inoculation 하였다. 하루 동안 incubation한 후에 inoculum 을 제거하고 새로운 media로 교체한 후 4일 동안 incubation 하면서 세포를 관찰하였다. 세포가 90~100 % 정도의 confluency 를 보이면 약 20 %의 세포만 남기고 80 %의 세포는 freeze-thawing 후 상층액만 다시 넣어주었다. RT-PCR을 통해 바이러스의 유무를 확인하였으며 sequencing을 실시하여 이미 보고된 백신주와의 유전자적 상동성을 비교하였다. 세 그룹으로부터 16 가지 sample을 이용하여 위에 기술한 방법으로 10번의 계대 배양을 실시하였으며 RT-PCR을 사용하여 바이러스의 존재여부를 확인하였다. 10번의 계대 배양 후, RT-PCR에서 양성반응을 보이는 바이러스가 야외주 바이러스인지 확인하기 위해 spike protein 에 대한 sequencing 을 수행하였다. Sequencing 분석 결과, 대부분의 분리주의 경우 백신주와 유사한 염기서열을 보였으며 일부 분리주의 경우 백신주와 큰 차이를 보였다. 이전 보고에 따르면 야외주의 경우 기존에 보고된 백신주와 염기서열의 차이를 보이므로 sequencing 결과 차이를 보이는 4 개의 분리주를 이용하여 백신으로서의 효율성을 검사하기 위해 중앙백신과 함께 시험백신을 생산하였으며 임상검사 및 효율성 실험 등을 수행하였다.

Group	ID	Ori	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6	P-7	P-8	P-9	P-10
A	031901	-		+++		-					+++	
	031902	-		+++		+++					+++	
	031903	++		+++		-					+++	
	031904	+		-		-					+++	
	031905	-		-		-					-	
B	041601	+++		+++			+++	+++		+++		+++
	041602	+++		++			-					
	041603	-		+++			++	-		+++		+++
	041604	+++		++			+	++		+++		+
	041605	+++		++			-					+++

표 2. PEDV 감염의심 intestine sample을 이용한 blind passage 결과

Strain	Amino acid homology (%)				
	CV777	DR13	Chinju99	KNU-0901	CNU - 091222-01
CV777 <sup>a</sup>	-	99.7	92.8	93.5	92.9
DR13 <sup>b</sup>	99.9	-	92.6	93.4	92.8
Chinju99 <sup>c</sup>	94.4	94.3	-	95.2	91.9
KNU-0901 <sup>d</sup>	94.2	94.2	96.3	-	94.2
CNU-091222-01 <sup>e</sup>	93.9	93.9	94.0	95.0	-

표 3. sequence homology

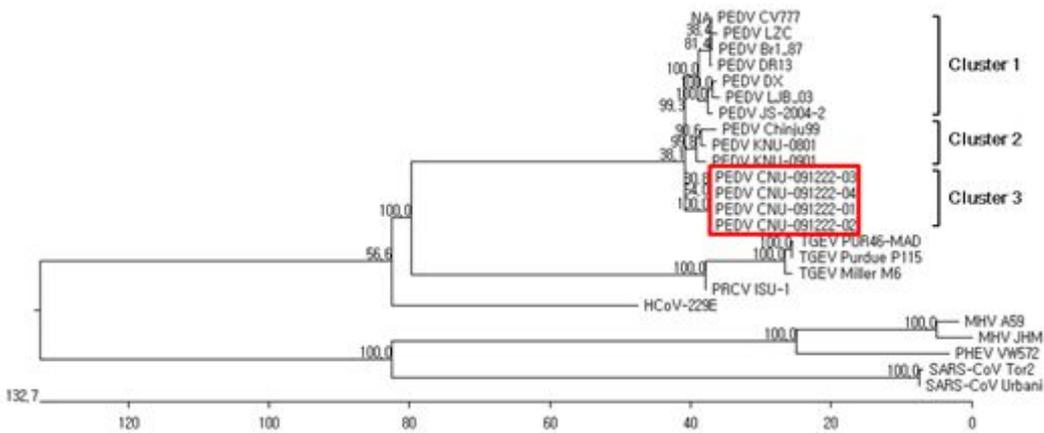


그림 4. phylogenetic tree

### 1. PEDV spike protein을 이용한 백신 개발 및 효율성 검사

PEDV spike protein은 바이러스의 binding과 attachment에 관여하며 가장 dominant한 surface protein 이다. 이뿐 아니라 이 단백질은 PEDV의 항원성에도 관여하여 중화항체를 유

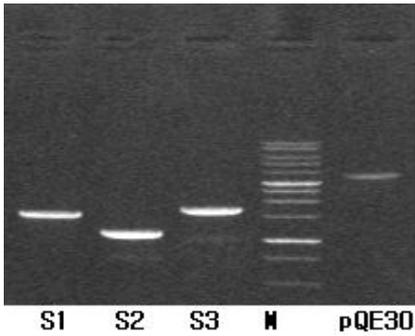
도하는 단백질로 알려져 있다. 우리는 효율적인 백신 개발의 일환으로 이 단백질을 과발현함으로써 새로운 백신개발방법을 모색하고자 하였다. PEDV spike protein의 발현은 prokaryotic system, eukaryotic system 의 방법으로 수행하였다.

(1) Prokaryotic system 을 이용한 Spike protein expression

우선, prokaryotic cell에서의 효율적인 PEDV S 발현을 위해 S gene을 세 개의 fragment로 구분하였다. 각각의 fragment 는 1-1458 bp, 1447-2520 bp, 2515-4149 bp 이며 각각 S1, S2, S3 라고 명명하였으며 PCR을 이용하여 각각의 fragment를 증폭하였다. PCR을 위해 사용된 primer는 다음과 같다.

Name	Sequence	Target size
PEDV S1 F	5`-GGA TCC ATG AGG TCT TTA ATT TAC TTC-3`	1479bp
PEDV S1 R	5`-GGT ACC TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG AGA AGA GAT GGG GTA-3`	
PEDV S2 F	5`-GGA TCC CCC ATC TCT TCT AGA AAC-3`	1095bp
PEDV S2 R	5`-GGT ACC TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG AAG CCT AGC GCT GAG TTG-3`	
PEDV S3 F	5`-GGA TCC AGG CTT GAG TCC GTT GAA-3`	1656bp
PEDV S3 R	5`-GGT ACC TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG CTG CAC GTG AAC CTT TTC-3`	

증폭된 PCR product는 돌연변이 유무를 확인하기 위하여 pGEMT-easy vector에 서브클로닝하였다. 이를 위해 PCR purification kit 을 이용하여 PCR product를 정제한 후 4 도에서 O/N ligation 하고 DH5a competent cell 에 transformation 하였다. tranformation 방법은 lygate를 competent cell 에 넣고 ice에서 30 분간 incubation 한 후 42 도에서 90 초간 heat shock을 주는 방법을 사용하였으며 이후 ice에서 5분간 더 incubation 하고 LB media 를 가한 후 37 도 shaking 배양기에서 1시간 배양하였다. transformation 된 colony 을 쉽게 선별해내기 위해 LB plate 에 미리 X-gal 과 IPTG를 가한 후 배양된 세포를 도말하였다. 24 시간 후 white colony만을 LB broth에 배양하고 DNA 염기서열분석을 시행한 결과 돌연변이가 없음을 확인하였다. expression plasmid 의 제작을 위해 서브클로닝된 plasmid DNA와 pQE30 vector 를 각각 BamH I-Kpn I 제한효소를 처리하여 잘라내었다. 1% agarose gel에서 insert와 vector를 확인 한 후 gel purification kit 을 이용하여 정제해내고 ligation 을 시행하였다. 4도에서 O/N incubation한 후에 앞서 언급한 방법으로 M15 competent cell 에 transformation 하였다. colony를 LB broth에 배양한 후 plasmid DNA를 분리 정제해 내고 제한효소처리를 통해 클로닝을 확인하였다.

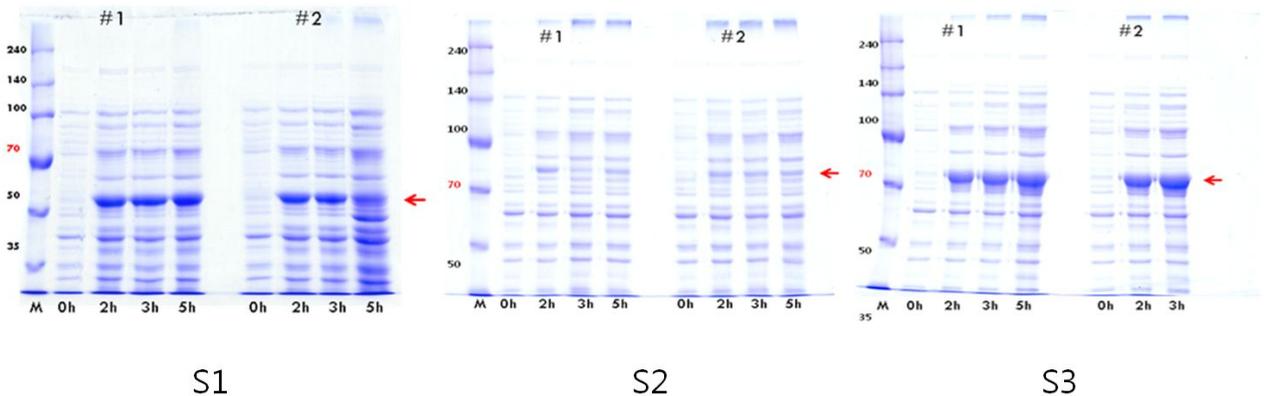


**PCR composition :**  
 S primer 1ul  
 AS primer 1ul  
 Template(1/10) 1ul  
 dNTP 2ul  
 10x B buffer 2.5ul  
 Perpetual opti taq 0.5ul  
 DW 17ul  
 total 25ul

**PCR condition :**  
 95°c 5min  
 94°c 30sec  
 52°c (S1) or 54°c (S2,S3) 30sec  
 72°c 2min  
 40 cycle  
 72°c 10min

**target size :**  
 S1 1465bp  
 S2 1096bp  
 S3 1637bp  
 pQE30 3400bp

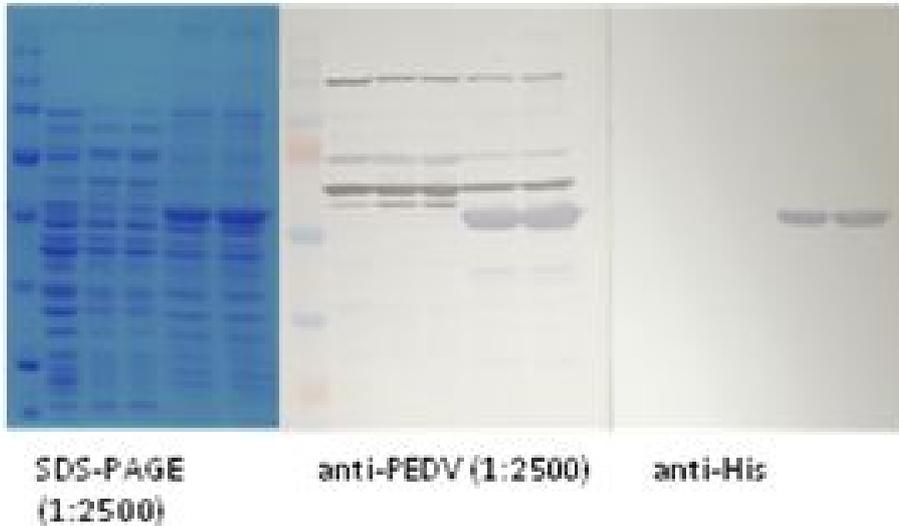
확인된 클론을 이용하여 expression 실험을 수행하였다. 미리 배양해 놓은 배양액을 1% 정도 100 ml LB broth에 넣은 후 37 도 shaking 배양기에서 OD600이 0.4~0.6 정도가 될 때까지 배양하였다. final concentration이 1mM 이 되도록 IPTG 를 가한 후 30 도에서 배양하며 3시간마다 샘플을 채취하였다. 채취한 샘플은 3000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 PBS를 이용하여 2번 정도 washing하였다. 마지막으로 세포 펠렛을 PMSF가 포함된 PBS에 부유시킨 뒤 sonication 에 의해 세포를 파쇄하였다. 발현된 단백질의 solubility를 확인하기 위해 펠렛과 상층액을 분리한 뒤 각각 sample buffer와 섞어 10분간 100도에서 boiling한 후 SDS-PAGE를 위해 사용하였다. 10% running gel 을 이용하여 단백질을 분리한 후 coomassie blue 염색을 실시하였다. 그 결과, pQE30-S1-his, pQE30-S2-his, pQE30-S3-his 가 각각 55 kda, 63 kda, 57 kda로 발현됨을 확인하였다. S1과 S3 는 IPTG iduction 후 6시간째 가장 많은 양의 단백질의 발현되었다.



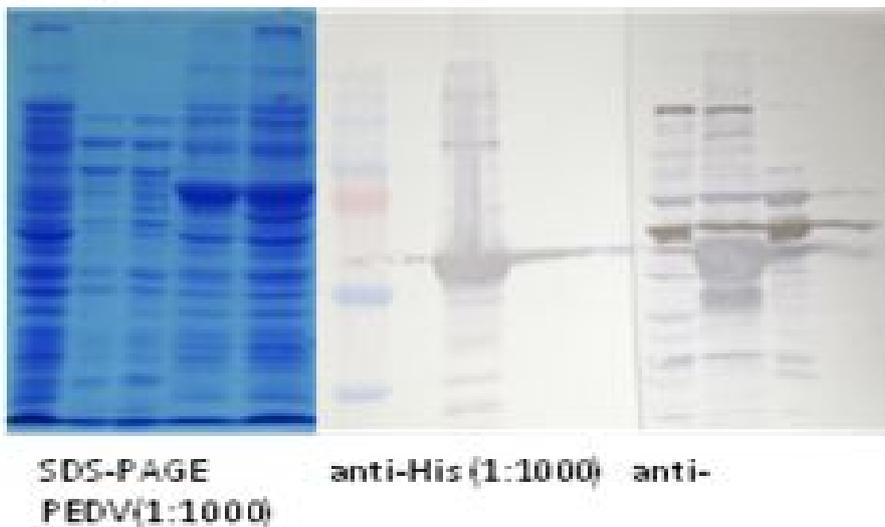
강하게 발현된 S1 과 S3 를 이용하여 western blot 을 실시하였다. SDS-PAGE 를 통해 protein separation 을 수행한 뒤, PVDF membrane 으로 protein 을 transfer 하였다. transfer 된 membrane은 상온에서 30분 동안 blocking 을 수행한 뒤, anti-PEDV polyclonal serum (1:1000) 과 anti-histidine antibody (1:2000) 을 1차 항체로 사용하여 probing 하였다. 과발현된

단백질은 anti-PEDV polyclonal serum 과 anti-histidine antibody에 모두 강하게 바인딩하였으며 효율적으로 단백질이 발현되고 있음을 확인할 수 있었다.

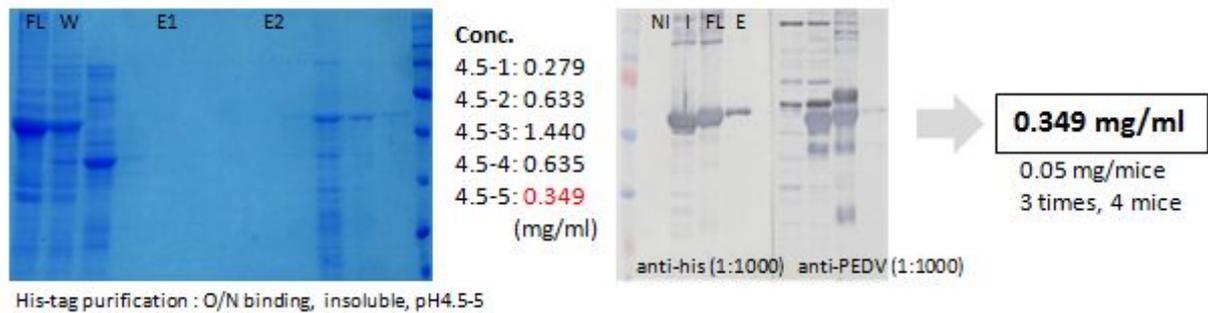
### pQE30-S1-His



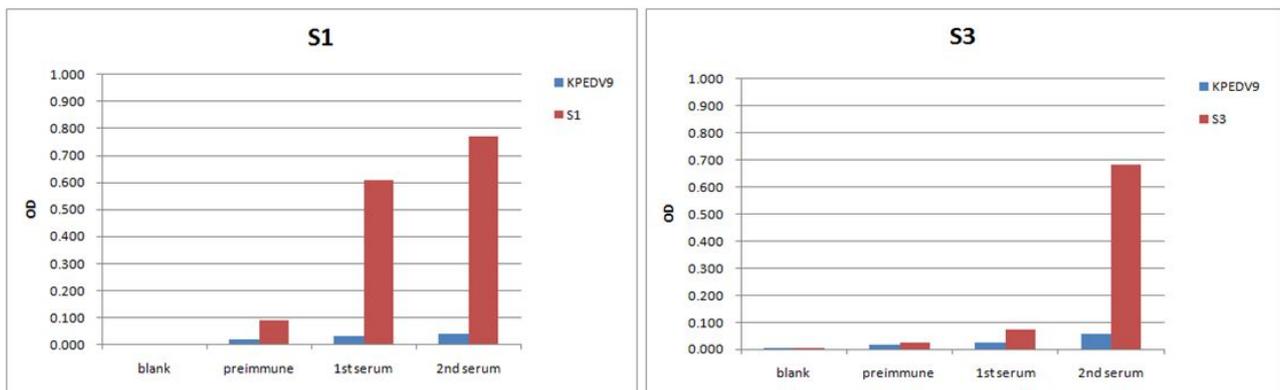
### pQE30-S3-His



발현된 단백질은 그 항원성을 증명하기 위해 mice에 inoculation하기 위해 his tag을 이용하여 정제하였다. his tag 을 이용한 단백질의 정제를 위해 Quigen magnetic bead를 사용하였다. 발현된 단백질의 solubility test 결과 대부분의 단백질이 insoluble 하게 발현되었으므로 denaturation condition으로 실험을 진행하였다. 8 M urea (pH 8.0)가 포함된 lysis buffer을 이용하여 만든 cell lysate 를 bead와 O/N binding 하여 his tag이 잘 interaction 할 수 있도록 하였다. bead는 pH를 6.3, 5.9, 4.5 로 낮춰가면서 이루어졌으며 각 faction의 산물을 이용하여 SDS-PAGE와 western blot을 수행하였다. S1 protein의 정제 결과 Histidine 과 polyclonal serum 에 모두 binding 하였으며 농도는 0.289 mg/ml 이었다. S3 protein의 정제 결과 Histidine 과 polyclonal serum 에 모두 binding 하였으며 농도는 0.349 mg/ml 이었다.



재조합단백질의 백신으로서의 활용가능성을 검증하기 위해 mice 에 inoculation 하였다. mouse inoculation 을 위해 6-week-old BALB/C mouse 를 사용하였다. his tag antibody를 이용해 정제한 단백질은 inoculation 에 앞서 urea 를 제거하기 위해 투석을 수행하였으며 complete adjuvant와 잘 혼합하여 mouse 에 피하주사하였다. 첫 번째 immunization을 수행한 후 2 주, 4 주 후에는 incomplete adjuvant 와 정제된 단백질을 함께 섞어 피하주사 하였으며 마지막 immunization 을 수행한 후 1 주 후에 mouse 로부터 serum 을 채취하여 항체의 생성 여부 및 중화능을 검사하였다. 현재 S1 과 S3 protein을 이용하여 mouse immunization 실험을 수행하였으며 항체의 생성여부를 위해 ELISA 를 수행한 결과 각 항원물질 (재조합 단백질) 에 대한 반응성은 좋은 것에 비해 KPEDV 에 대한 반응성은 좋지 않았다.



이는 단백질의 정제 과정에서 insoluble protein 정제를 위해 denature condition 을 사용하게 되므로 원래의 단백질 구조가 깨어짐으로 PEDV spike protein 과 효과적으로 결합하지 못하는 것으로 생각되어 soluble 한 condition 으로 단백질을 발현할 수 있는 새로운 prokaryotic vector system 과 정제 후 refolding 여부를 고려중이다. PEDV 에 대한 높은 ELISA 결과를

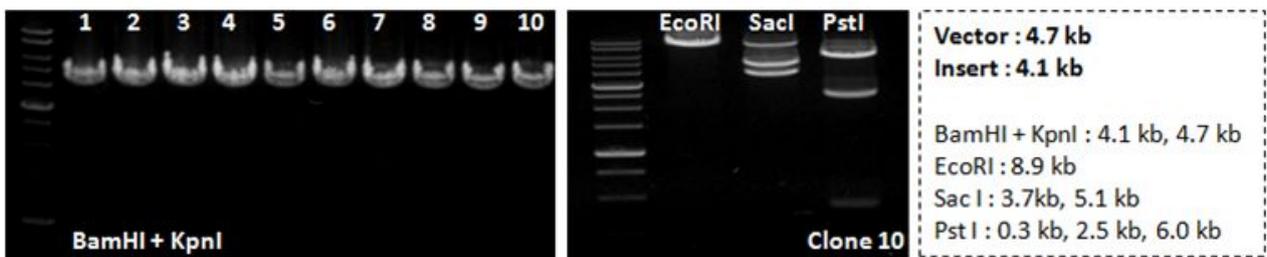
얻게 되면 SN test 를 수행하여 in vitro condition 에서의 바이러스 감염 억제능을 확인할 것이다. 이 후, 돼지에서 직접 challenge 실험을 통해 백신으로의 가능성을 최종적으로 검증하고자 한다.

(2) Eukaryotic system 을 이용한 PEDV spike protein expression

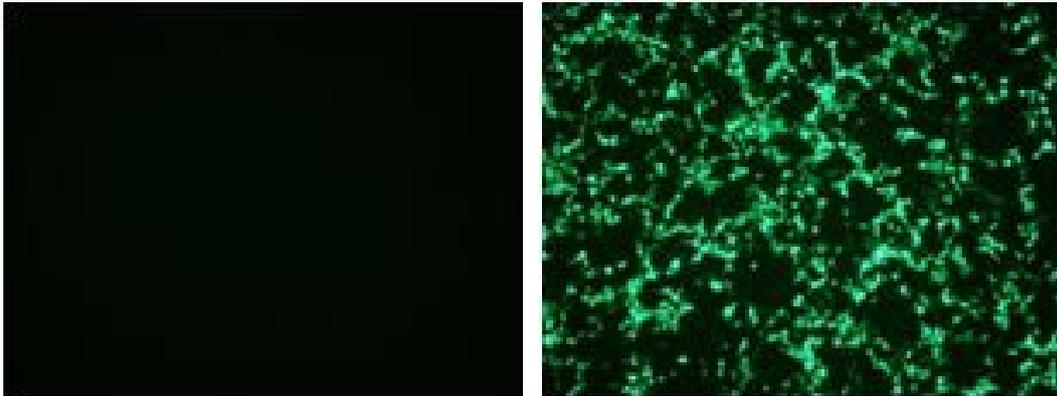
Prokaryotic system 을 이용한 protein expression 은 보다 적은 비용으로 다량의 단백질을 얻을 수 있다는 장점이 있지만 제대로 된 단백질의 구조를 형성할 수 없다는 단점이 있으므로 이를 보완하고 검증하기 위해 eukaryotic system 을 이용한 spike protein expression 을 추가적으로 수행하였다. 우선 pcDNA3.1(+) vector system을 이용하여 pcDNA3-PEDV-S 를 클로닝하였으며 이에 tagging protein 을 추가하여 pcDNA3-PEDV-S-His의 클로닝 또한 진행하여 웨스턴 블롯시 tagging protein을 이용할 수 있도록 하였다. 또한 pEGFPN3 vector 와 pFlagCMV vector system 을 이용하여 각각 단백질의 C-term 과 N-term 에 tagging protein 을 fusion 하였다. PCR에 사용된 프라이머는 다음과 같다.

pcDNA3-S	
Forward	5` GGT ACC <b>ATG</b> AGG TCT TAA ATT TAC 3`
Reverse	5` GGA TCC <b>TTA</b> CTG CAC GTG GAC CTT 3`
pcDNA3-S-his	
Forward	5` GGT ACC <b>ATG</b> AGG TCT TAA ATT TAC 3`
Reverse	5` GGA TCC <b>TTA</b> GTG ATG GTG ATG GTG ATG CTG CAC GTG GAC CTT 3`
pFlagCMV2-S	
Forward	5`GGT ACC <b>ATG</b> CAA GAT GTC ACT AGG TGC 3`
Reverse	5` GGA TCC <b>TTA</b> CTG CAC GTG GAC CTT 3`
pEGFPN3-S	
Forward	5` GGT ACC <b>ATG</b> AGG TCT TAA ATT TAC 3`
Reverse	5` GGA TCC <b>CTG</b> CAC GTG GAC CTT 3`

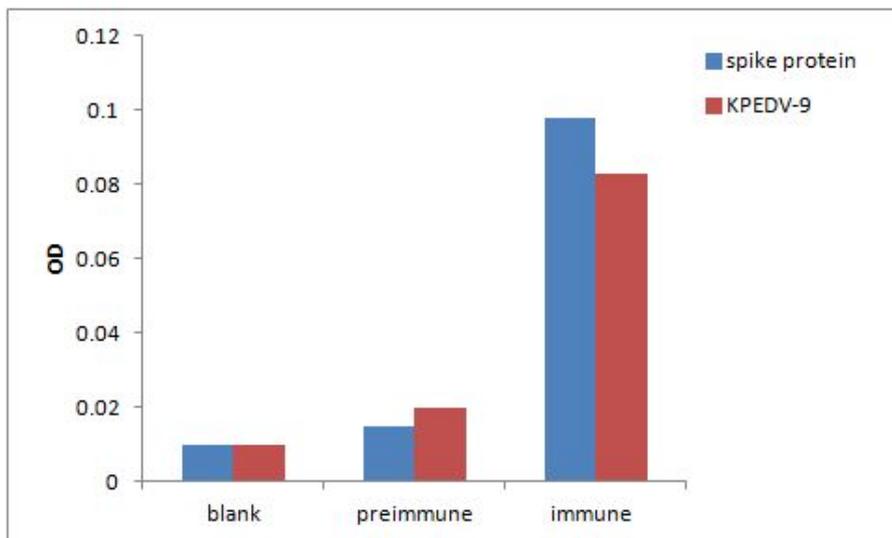
증폭된 PCR product는 pGEMT-easy vector 에 서브클로닝하여 돌연변이를 확인한 후 BamH I-Kpn I 제한효소를 처리하여 각각의 vector에 클로닝 하였다.



Transfection 을 수행한 후, 48시간에 protein expression 을 확인하기 위해 형광현미경하에 서 관찰해본 결과, 약 70 % 의 세포에서 GFP tagging protein 이 발현되는 것을 확인하였다.



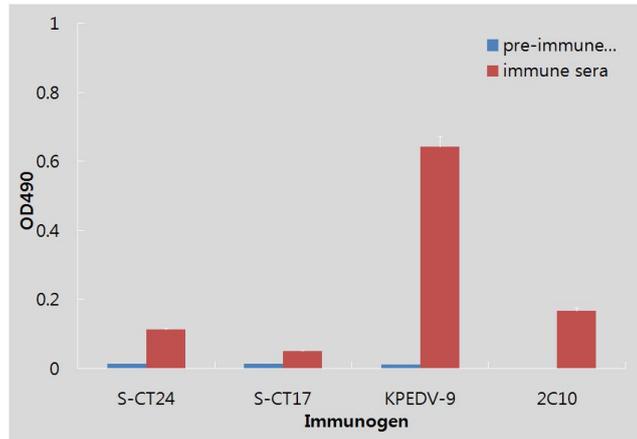
Eukaryotic system 을 이용한 재조합단백질의 발현은 단백질의 구조를 가장 비슷하게 재현 해낼 수 있다는 장점이 있으나 진핵세포를 이용해야 하기 때문에 비용이 많이 드는 단점이 있 기 때문에 eukaryotic system에서 발현된 재조합단백질을 백신으로 이용하는 것은 상당한 어 려움이 있다. 그러나 prokaryotic system에서 발현되는 단백질의 경우 얼마나 단백질의 구조가 제대로 갖춰져 있는지 확인하기가 어려워 항원성에 대한 검증이 어려우므로 실험실적 수준에 서 eukaryotic system에서 발현된 재조합단백질과 prokaryotic system에서 발현된 재조합단백 질의 항원성 및 중화능을 비교하고자 한다. 이를 위해 eukaryotic system에서 발현된 재조합단 백질 역시 tagging protein 인 his tag protein 을 이용하여 정제하고 prokaryotic expression system에서 발현된 재조합단백질과 마찬가지로 실험동물에 inoculation 한 뒤 혈청을 분리해 내 ELISA 를 수행하였다. prokaryotic system에서 생성된 spike 와 달리 eukaryotic system에 서 생성된 spike에 의해 생성된 항체의 경우, 바이러스의 spike 단백질에 높은 항원성을 보였 으며 중화능 test 결과 역시 높은 중화능 (1: 1600) 을 보였다.



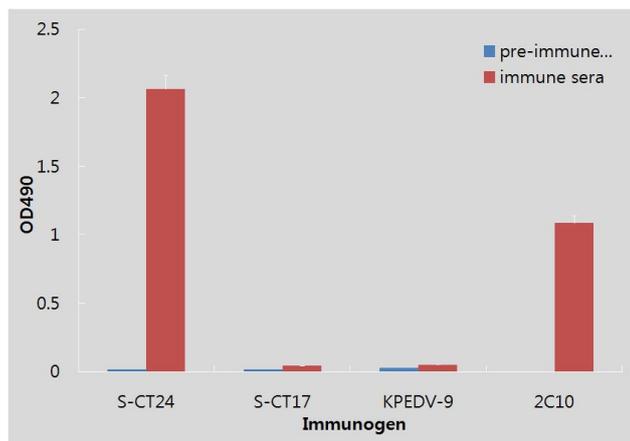
이를 바탕으로 볼 때, prokaryotic system 을 이용하여 합성된 단백질의 백신으로써의 효율 성은 낮은 것으로 생각되었다.

## 2. 중화항체 유도부위를 이용한 백신 개발 및 효율성 검사

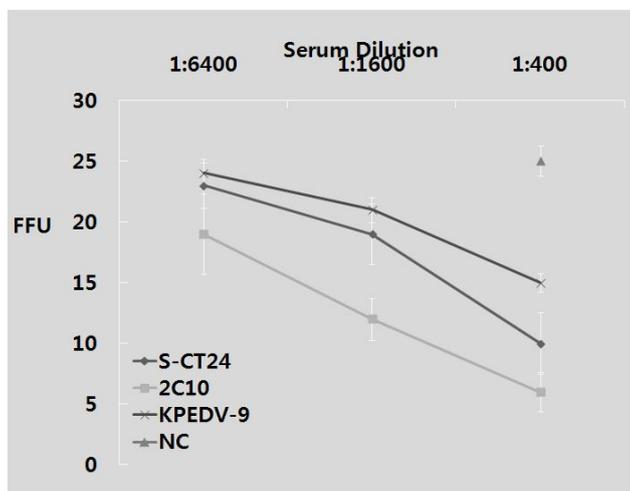
기초연구자료로서 본 연구팀은 phage display system 을 이용한 방법으로 PEDV에 대한 새로운 중화항체 유도부위를 증명하였다. 재조합 단백질을 이용하여 PEDV의 spike protein gene 의 3' end에 위치한 cytoplasmic tail 부위가 PEDV에 중화능이 있는 neutralizing epitope 이라는 것을 증명하였고 이는 7-mer의 아미노산으로 구성되어 있었다. 그러나 공교롭게도 이 중화



KPEDV-9 에 대한 항체가



SCT-24 에 대한 항체가



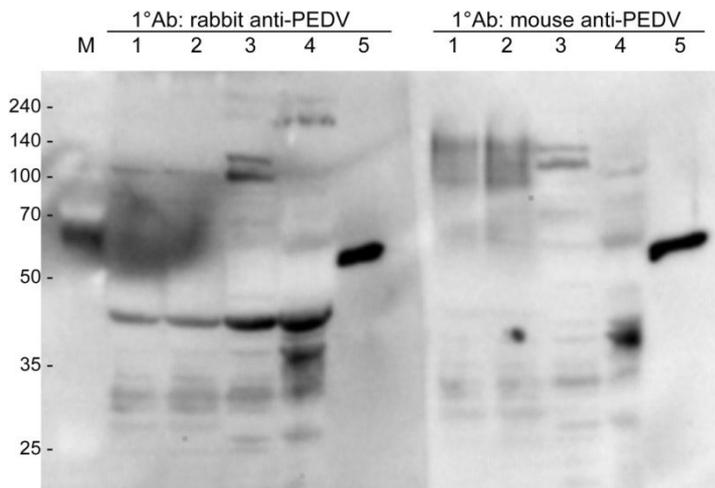
focus reduction neutralization test

항체 유도 부위의 위치가 cytoplasmic tail 부위에 위치해 있으며 또한 특히나 이 부위가 endodomain에 위치해 있기에 더욱 궁금증을 주고 있으며 이에 대한 규명이 이루어지고 있는 중이다. 이러한 중화항체 유도 부위의 특이한 위치에 대한 논쟁을 피하기 위하여 추가적인 실험으로 위에서 언급한 위치에 대한 synthetic peptide를 작성하여 이들을 Balb/c mice에 투여하여 이들의 항체 생성 정도를 측정하고 이들에 대한 항체들의 중화능력을 검증하였다.

### 3. PEDV receptor protein 검증

#### (1) VOPBA (virus overlay protein binding assay) 를 이용한 putative receptor protein 규명

PEDV가 감수성이 있는 유일한 세포주인 Vero cell이나 돼지 장세포에서의 PEDV의 receptor protein은 아직까지 전혀 알려져 있지 않은 새로운 분야이다. 바이러스의 receptor protein을 증명하는 연구는 특정 바이러스의 치료제나 백신 개발에 있어서 매우 중요한 연구이다. 이러한 맥락에서 PEDV의 receptor protein의 검증을 위한 연구를 수행하였다. ST cell, PEDV 에 감수성 있는 Vero cell 과 자돈의 enterocyte 를 이용하여 VOPBA 를 실시하였다. 각각의 cell 은 eukaryotic cell lysis buffer를 이용하여 lysis 하고 전기영동 후 membrane 으로 transfer하였다. Cell-adapted vaccine strain 인 KPEDV-9 으로 O/N binding 한 후, rabbit polyclonal anti-PEDV sera 와 mouse polyclonal anti-PEDV sera 를 이용하여 detection 하였다. Enterocyte 의 경우, rabbit serum 에 의해 100 kDa, 45 kDa 크기의 단백질이, mouse serum 에 의해 약 140 kDa 크기의 단백질이 발견되었다. Vero cell 의 경우, enterocyte 와는 다른 binding 양상을 보였다. 이는 enterocyte 의 100 kDa, 45 kDa, 140 kDa 단백질이 PEDV particle 과 interaction 한다는 것을 의미하며 receptor 로써의 가능성을 제시하며 이들 중 140 kDa 단백질은 이미 PEDV receptor 로써 관심을 받고 있는 pAPN 으로 생각되었다.

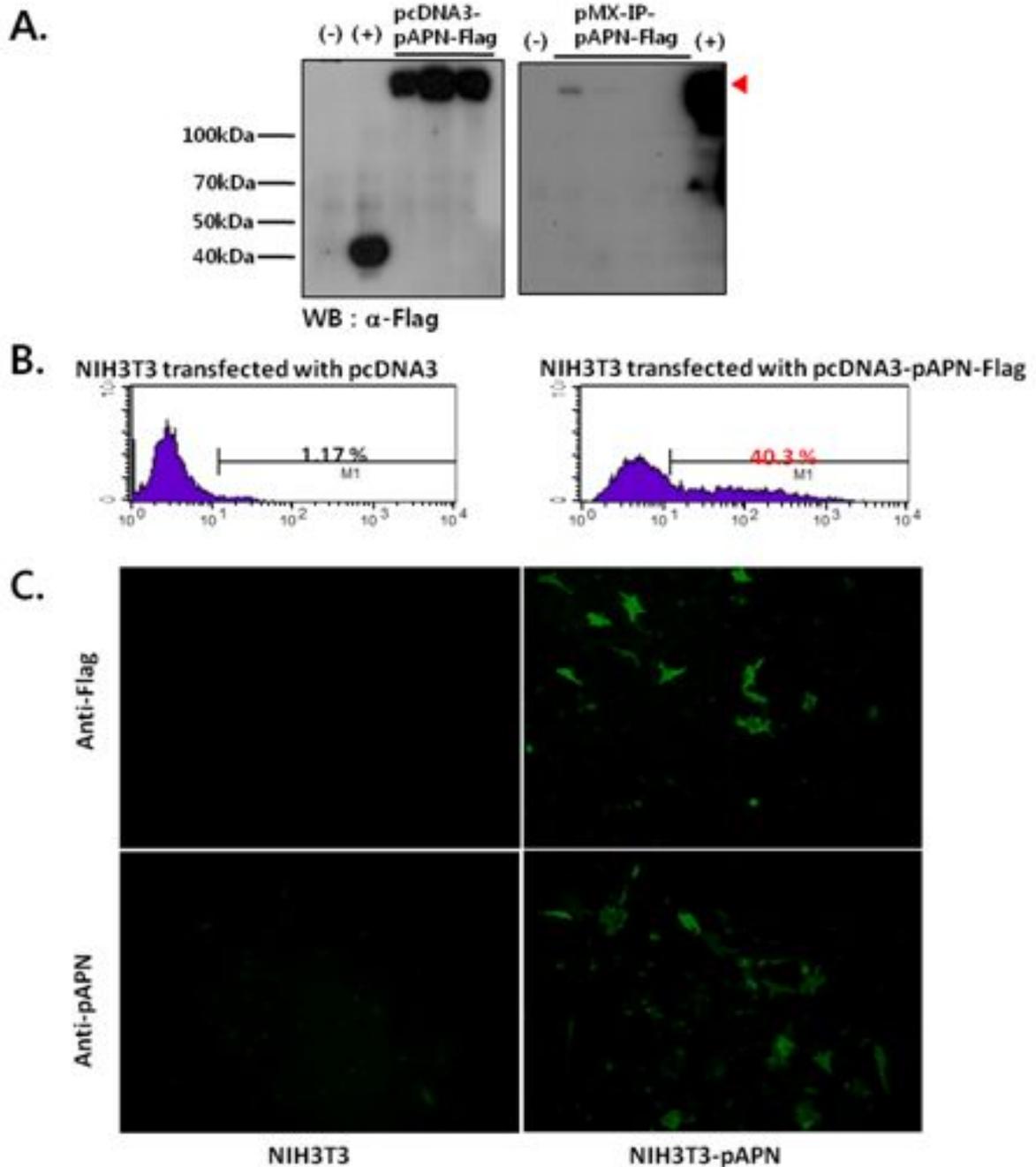


Legend:

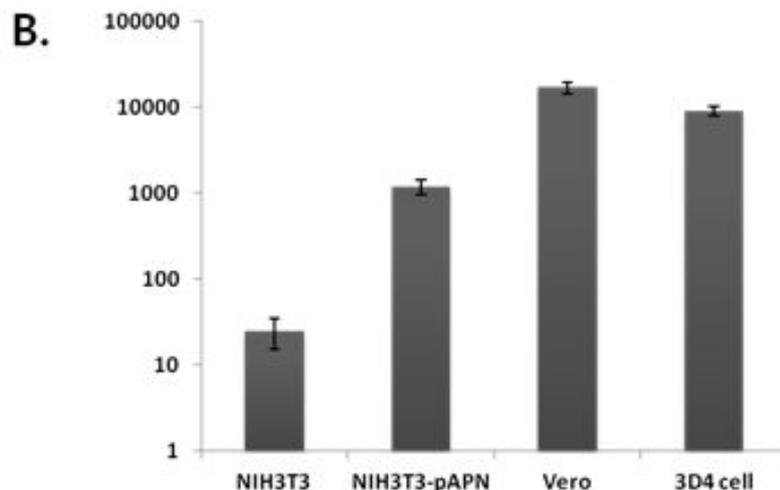
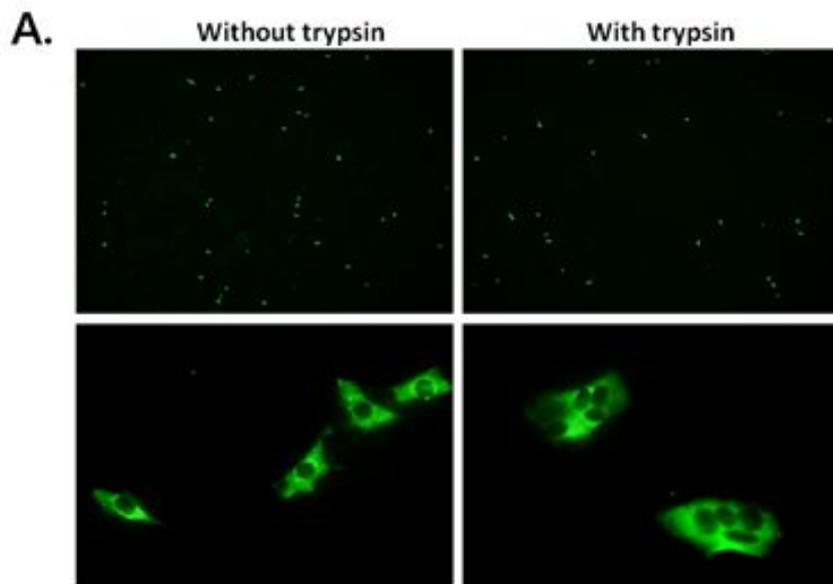
- 1, 2 - swine intestinal cells (trypsin detached)
- 3 - ST cell (EDTA detached)
- 4 - Vero cell (EDTA detached)
- 5 - purified PEDV (non-trypsin treated stock)

(2) pAPN 발현 세포주 개발

현재까지 pAPN은 PEDV의 receptor protein 으로 알려져 있으며 위의 VOPBA test의 결과에서도 약 140 kDa 의 단백질이 PEDV 와 interaction 하는 것을 확인할 수 있었다. PEDV에 감염되지 않는다고 알려진 세포주를 형질전환하여 APN을 발현시키거나 혹은 이미 감염된다고 알려져 있는 세포주에 형질전환하여 APN을 과발현시킨 경우에 있어서 PEDV에 대한 감수성이 달라질 수 있으므로 이를 이용하면 동물실험과 함께 세포수준에서도 쉽게 APN의 역할을 확인할 수 있을 것이다. 그러므로 돼지의 APN-Flag 단백질이 발현하는 세포주 제작을 진행하였다. 세포주는 NIH3T3 (mouse embryonic fibroblast)을 이용하였다.



NIH3T3 세포의 형질전환을 위하여 NIH3T3 세포를 DMEM(10% FBS) 배지에서 배양하였고, 60mm dish에  $1 \times 10^5$  cells/ml로 준비하였다. 다음날 준비된 NIH3T3세포에 각각 6ug의 pcDNA3.1-pAPN-Flag 플라스미드와 pcDNA3.1 플라스미드를 Fugene HD transfection reagent를 이용하여 형질 전환하였다. 형질전환 24시간 뒤에 400 ug/ml의 G418을 처리하여 선택배양하였다. 실험에 사용한 pcDNA3.1 플라스미드는 내부에 Neomycin 항생제 내성 유전자를 가지고 있기 때문에 이 플라스미드가 들어간 세포의 경우 G418을 처리했을 때 살아남을 수 있게 된다. 3일마다 배지교환과 함께 G418을 동량으로 처리하면서 7일간 배양하였다. 3일 이후부터 플라스미드가 들어가지 않은 대조군 세포가 죽기 시작하는 것을 관찰하였고, 7일째에는 약 95%이상의 대조군 세포가 죽는데 반하여 형질전환 시킨 세포는 지속적으로 살아남아 증식하는 것을 확인함으로써 형질전환이 완료되었음을 확인하였다. 형질전환된 NIH3T3세포는 계대 배양을 통하여 stock vial을 확보하였고, flow cytometry, 웨스턴 블롯팅, 면역형광염색 등을 수행하여 발현을 확인하였다. 우선, 일부세포는 세포용해용액을 처리하여 얻은 세포추출물을 이용한 웨스턴 블롯팅 결과, 형질전환된 NIH3T3 세포주에서 정상적으로 APN-Flag이 발현함을 확인하였다. NIH3T3 세포 표면에서의 pAPN 발현을 확인하기 위해 flow cytometry를 수행한 결과, 약 40%의 세포에서 pAPN 이 발현되는 것을 확인할 수 있었다 또한, anti-pAPN



antibody를 이요한 면역형광염색을 수행한 결과, anti-Flag antibody 뿐 아니라 polyclonal anti-pAPN antibody도 NIH3T3에 발현된 pAPN을 잘 detection 하는 것을 확인하였다.

### (3) pAPN 발현 세포주의 PEDV에 대한 감수성 검사

pAPN의 발현을 확인한 뒤, NIH3T3 와 NIH3T3-pAPN에 KPEDV-9 을 감염시킨 후 면역형광염색과 바이러스 titration 을 통해 감염력을 평가하였다. anti-pAPN antibody 를 이용하여 면역형광염색을 실시한 결과, pAPN이 발현된 NIH3T3에서 KPEDV-9 이 성공적으로 replication 하는 것을 알 수 있었다. Vero cell의 경우, trypsin 에 의해 PEDV의 증식이 촉진되고 CPE가 형성되는 것으로 보아 NIH3T3 에서의 trypsin 의 역할을 규명하기 위해 trypsin 을 처리한 결과, 일부 감염된 세포에서 CPE가 관찰되었다. NIH3T3 와 NIH3T3-pAPN cell 에 KPEDV-9을 감염시킨 뒤, 48시간동안의 감염된 세포의 상층액을 분리하여 바이러스의 양을 측정하였다. 그 결과, NIH3T3에서는 KPEDV-9이 증식하지 못하고 사멸하는 반면 pAPN이 발현된 NIH3T3에서는 KPEDV-9이 증식하여 감염 후 24시간에는 약 30배 많은 바이러스가 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 pAPN의 발현에도 불구하고 24시간 이후 급속도로 바이러스가 사멸하는 것을 확인할 수 있었으며 이를 규명하기 위한 추가적인 실험을 진행 중이다.

## 4. 면역병리조직학적 연구

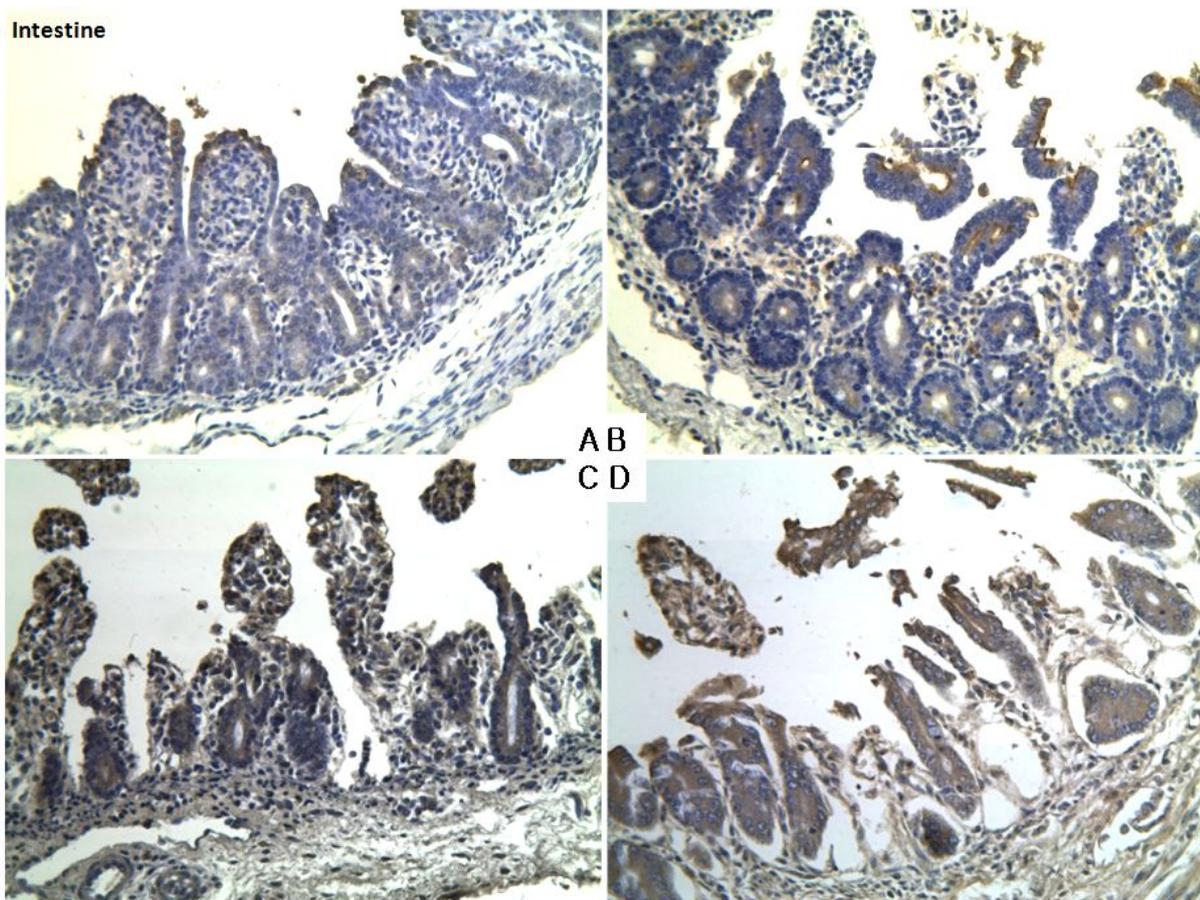
추가적으로 PEDV의 pathogenesis 에 관한 연구를 수행하였다. RT-PCR 결과 PEDV 양성반응을 보이는 자돈 중 2 마리로부터 면역병리조직학적 연구를 수행하기 위해 양성돈으로부터 장, 폐, 간, 신장, 비장 등 각 주요장기를 적출하였다. 적출된 장기의 일부는 viral RNA isolation 을 위해 PBS에 보관하고 나머지는 조직학적 연구를 위해 10 % 중성 포르말린에 고정하였다. 우선, viral RNA isolation 을 위해 조직을 멸균한 가위로 잘게 파쇄하고 supernatant 를 RNA 분리에 사용하였다. 인트론사에서 구입한 viral RNA isolation kit 을 이용하여 viral RNA 를 분리하고 PEDV nucleocapsid protein 에 대한 RT-PCR 을 수행하였다 (Table 6). 091223-02 자돈의 경우, 장, 신장 및 비장에서 PCR 양성반응이 폐와 간에서는 PCR 음성반응이 나타났으며 091223-03 자돈의 경우, 실험을 실시한 모든 장기에서 PCR 양성반응이 나타나 개체별로 약간의 차이를 나타내었다.

	<b>Intestines</b>	<b>Lung</b>	<b>Liver</b>	<b>Kidney</b>	<b>Spleen</b>
<b>Pig No. 1</b>	+	-	-	+	+
<b>Pig No. 3</b>	+	+	+	+	+

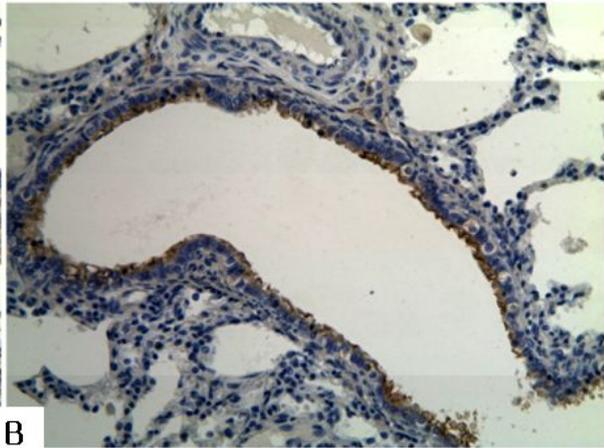
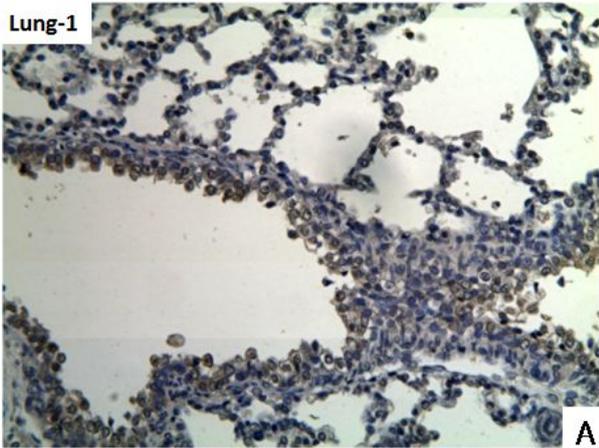
다음으로 고정된 장기조직을 이용하여 PEDV 에 대한 면역염색을 수행하였다.

면역염색을 위해 우선 중성 포르말린에 고정되어 있는 조직으로부터 적당한 크기로 트리밍한 후 파라핀 포매를 하였다. 파라핀 포매한 조직은 약 5 um 의 두께로 잘라 슬라이드 글라스에 올리고 건조시킨 후 면역조직학적 관찰에 이용하였다. 슬라이드는 xylene에서 3분씩 3회 incubation 하여 deparaffination 을 하고 100 % alcohol부터 50 % alcohol 까지 2분씩

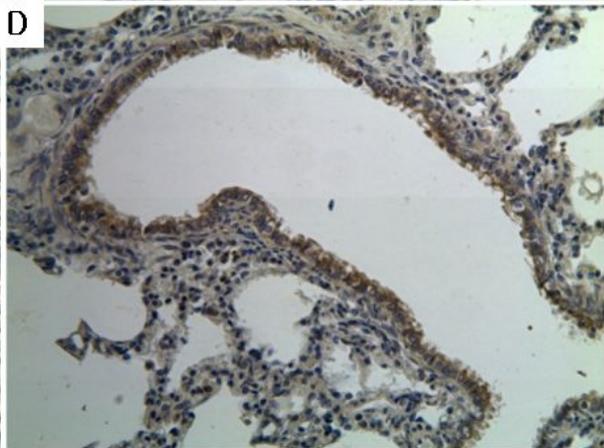
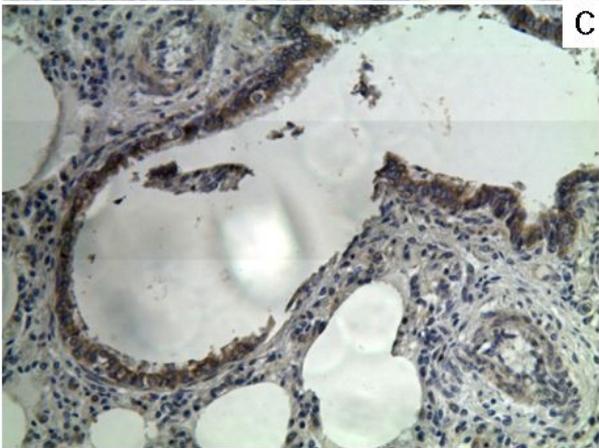
incubation 하여 수화시켰다. tap water에서 10분간 수세를 한 뒤, antigen retrieval solution 하에서 약 15분간 끓지 않을 정도로 boiling 하였다. 상온에서 천천히 슬라이드를 식히고 다시 tap water에서 10분간 수세한 뒤, DW에서 2분간 2회 수세를 하고 조직 내에 있는 peroxidase 의 억제를 위해 methanol + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution 에 30분간 incubation 하였다. normal horse serum (150 ul in 10 ml PBS) 을 가하고 상온에서 30분간 incubation 한 후, PBS에 희석한 1차 항체를 처리한 후 4도에서 O/N incubation 하였다. 본 실험에 사용된 1차 항체는 PEDV antigen 을 검출하기 위한 것으로 polyclonal mouse anti-PEDV 를 PBS에 1000배 희석하여 사용하였다. 다음날 PBS 로 5분간 3회 수세한 후, 2차 항체를 처리하고 상온에서 30분동안 incubation 하였다. 2차 항체는 polyclonal mouse anti-PEDV 를 검출하기 위한 것으로 biotin conjugated horse anti-mouse IgG 를 PBS에 200배 희석하여 사용하였다. 30분 후, PBS로 5분씩 4회 수세한 후, 미리 만들어 놓은 avidin-biotin solution 을 처리하고 상온에서 30분간 incubation 하였다. PBS로 5분씩 4회 수세한 후 DAB staining 을 실시하고 hematoxylin 으로 count staining 을 수행하였다. count staining 후 tap water에서 10 분 정도 수세하고 탈수를 위해 75 % alcohol부터 100 % alcohol 까지 2분씩 incubation 하고 xylene 에 3분씩 3회 incubation 한 후 발삼용액으로 mounting 하였다. 완전히 슬라이드를 건조시킨 뒤 현미경하에서 관찰하였다.



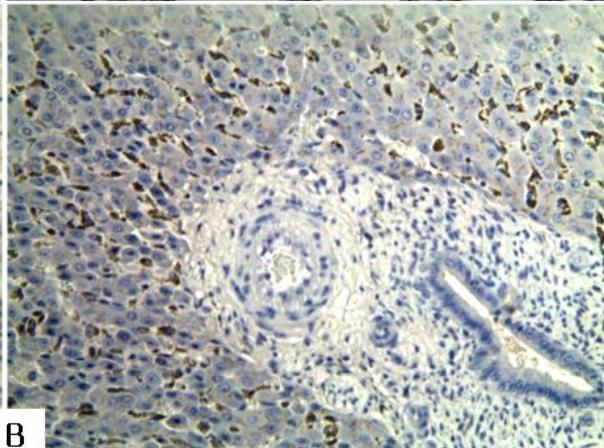
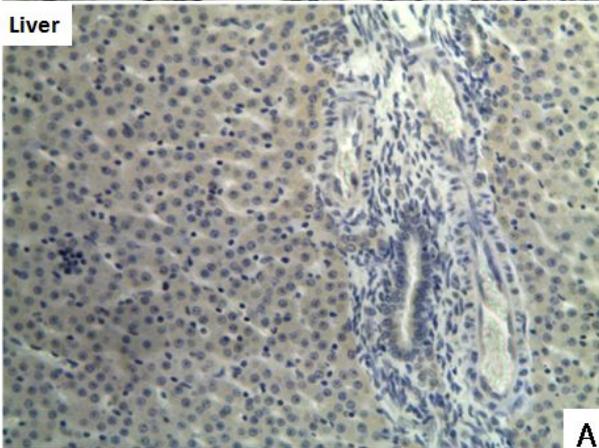
Lung-1



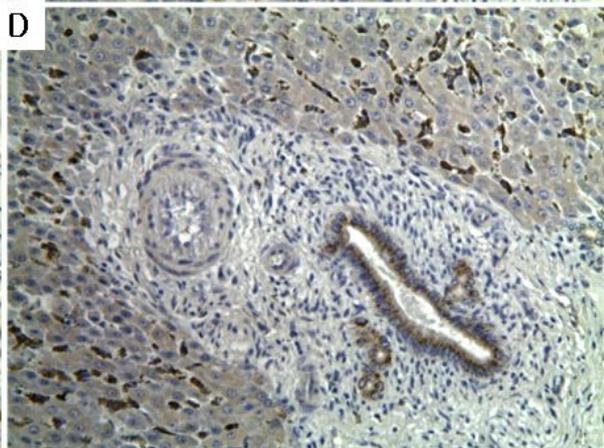
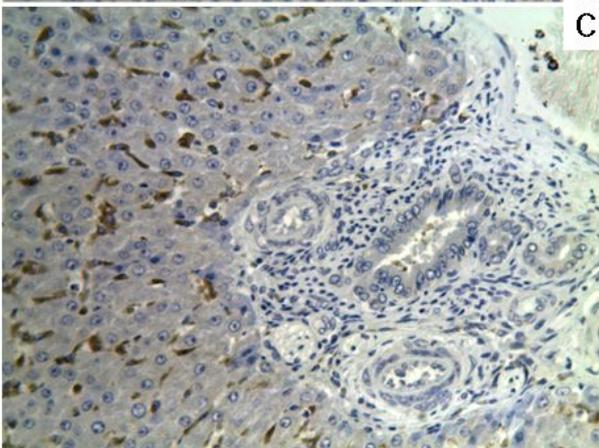
AB  
CD

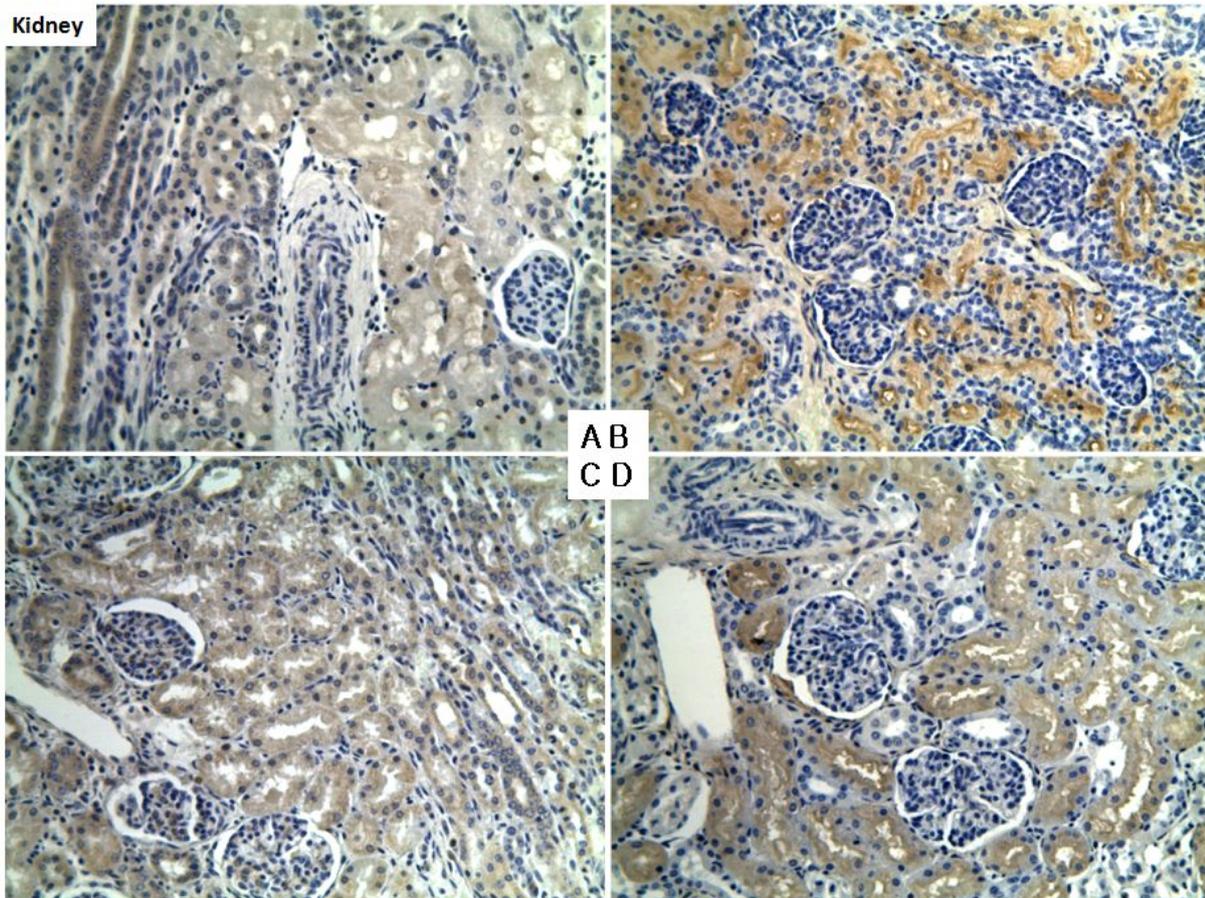


Liver



AB  
CD





양성돈의 장기별 IHC result (A: non-infected piglet, C: 091223-01, D: 091223-02)

## 제 2 절 초대배양세포주를 이용한 새로운 PEDV 야외주 분리 및 백신주 개발

동물의 태아조직으로부터 초대배양 된 세포는 그 동물의 근원적 생물학적 특성을 그대로 보유하고 있어서 기존의 세포주로는 검출하기 어려운 바이러스의 검출 및 증식 등에 사용될 수 있을 뿐만 아니라 생물학적 연구에 다양하게 사용될 수 있는 가치가 있다. 세포배양기술이 발전하면서 여러 가지 조직에서의 세포배양이 가능하게 되었는데, 배양하고자 하는 조직의 종류와 동물이 다를 경우 세포배양 방법도 서로 상이하게 된다. 따라서 그에 적합한 초대배양 방법이 연구되어지고 있다. 초대배양법에는 크게 조직절편을 그대로 배양하는 조직소편배양법과 조직을 단일세포로 분리하여 배양하는 분리세포배양법의 두 가지가 있다.

초대배양 시 가장 문제가 되는 섬유아세포의 제거를 위하여 edetate disodium dihydrate ( $\text{Na}_2\text{EDDA}$ )를 이용하는 방법이 연구되었는데,  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 는 섬유아세포의 세포 간 결합의 가장 큰 비중을 차지하는  $\text{Ca}^{2+}$ 결합 사이에 들어가서 섬유아세포들 간의 결합을 효과적으로 저해 할 수 있었다. 물론 상피세포 또한  $\text{Ca}^{2+}$ 결합을 가지고 있지만 섬유아세포에 비하여 그 비율이 낮으므로  $\text{Ca}^{2+}$ 의 결합만을 제거해 주면 섬유아세포의 박리가 먼저 일어나게 된다. 이러한 섬유아세포와 상피세포간의 박리가 이루어지는 시간적 차이를 이용하면 효과적으로 섬유아세포와 상피세포를 분리할 수 있다. 또한 상피세포와 섬유아세포가 초대배양 시 배양 용기에 붙기 위해 필요한 부착인자의 양에도 차이가 있다. 섬유아세포는 상피세포에 비해 초기 배양 용기에 부착을 위해 더 많은 fetal bovine serum(FBS)을 필요로 하지만 상피세포는 적은 양의 FBS만으로도 충분히 부착이 가능하다. 이러한 세포종류에 따른 특성을 이용하면 효과적으로 섬유아세포를 제거할 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 돼지태아의 상피세포를 효과적으로 초대배양하기 위한 조건을 탐색하기 위하여 돼지 태아의 각 장기를 mincing한 후 RBC의 효과적인 제거방법을 찾고 mincing된 조직에 최적의 collagenase와 dispase의 처리 조건을 알아보는데 목적이 있다. 또한 collagenase와 dispase를 이용하여 초대배양한 후  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 의 농도와 시간별 처리조건과 세포배양에 사용하는 배지의 FBS 농도에 따른 세포의 부착 강도를 이용하여 최적의 섬유아세포 제거 방법을 확인 후 돼지유래 세포의 불멸화를 하여 PED에 감수성이 높은 새로운 세포주를 구축하고자 하였다.

### 1. 다양한 돼지조직으로부터 초대배양세포의 구축

도축장을 통하여 돼지의 태아를 확보하고 무균적으로 자궁을 적출 한 후 무균 비닐봉지 등을 이용하여 냉장상태에 신속히 실험실로 이송하여 초대배양 재료로 사용하였다. 돼지 태아가 들어 있는 자궁은 70% 에탄올을 사용하여 자궁표면을 소독하고 클린벤치로 옮겨서 태아를 적출하였다. 외과용 수술가위를 사용하여 자궁을 절개하고 실크 봉합사를 이용하여 텃줄을 결찰한 후 절단하였다. Potadine 용액을 사용하여 태아의 피부를 소독하고 chlorhexidine 용액으로 Potadine 용액을 닦아낸 후 2차 소독을 실시하였다. 복강을 절개하여 무균적으로 신장, 인후두, 소장, 폐, 뇌를 적출하였다. 본 연구에서의 모든무균 실험은 제주대학교균 실험윤리위원회 (Animal Care and Use Committee of Cheju National University, ACUCC)의 승인 하에 균 실험

협표준작업지침서(standard operation procedures, SOP)에 따라 수행되었다.

무균적으로 적출된 각 장기 조직을 Dulbecco's modified essential medium (DMEM) 배지 속에 넣은 후 무균가위 등으로 유리 비이커 안에서 가능한 잘게 자르고(mincing) 50 ml conical tube로 옮겼다. 1~2분 정치시킨 후 RBC를 제거하기 위하여 조직 소편이 다 가라앉으면 상층액을 비웠다. 조직소편이 남아있는 50 ml conical tube에 DMEM (GIBCO, New York, USA) 배지를 30 ml 첨가하여 전동 피펫을 사용하여 조직소편을 다시 부유시킨 후 30초간 정치시켜 조직소편이 가라앉기를 기다린 후 상층액을 비웠다. 이와 같은 처리를 2~3회 반복하여 RBC를 충분히 제거하였다. 각 장기 중 신장과 폐는 특히 RBC가 많이 포함되어 있어 4~5회 반복하였다. 희석법에 의한 RBC제거와 적혈구 파괴를 통한 제거 방법을 비교하기 위하여  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{HEPES}$  (0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.01 M HEPES)용액을 사용하였다. 장기조직을 원심분리하여 상층액을 제거하고  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{HEPES}$  용액 4.5 ml를 mincing된 조직에 서서히 넣어 부유시키고 3분간 정치시켰다. 새로운 15 ml conical tube에 조직 부유액을 넣고 160 x g로 5분 동안 원심분리하고 상층액을 버린 후 5 ml의 DMEM 배지를 첨가하였다. RBC가 제거된 조직소편에 trypsin/ EDTA (0.05%/ 0.53 M, GIBCO, New York, USA)를 2 ml 첨가하고 36°C에서 3분 동안 처리하고 20회 천천히 피펫팅을 하여서 단일세포로 분리한 후 10% FBS (GIBCO, USA)가 첨가된 DMEM배지(DMEM-10)를 30 ml 첨가하고 160 x g로 3분 동안 원심분리한 후 단일세포를 수거하였다. 수거된 단일세포를 24-well cell culture cluster에  $1 \times 10^4$ 개씩 분주한 후 10% FBS가 첨가된 DMEM배지를 1 ml 첨가하고 36°C,  $\text{CO}_2$  인큐베이터에서 12시간 배양한 후 바닥에 부착된 세포의 비율을 구하였다.

돼지 태아의 각 조직을 잘게 절편하고 RBC가 제거된 1 g의 각 조직을 실험에 사용하였다. 각 조직을 단일세포로 분리하기 위하여 1차와 2차를 통하여 효소처리를 하였다. 37°C DMEM 배지 5 ml에 0.25% collagenase를 첨가하여 10~60분 동안 37°C,  $\text{CO}_2$  인큐베이터에서 처리하고, collagenase의 처리가 완료되면 0.01%의 dispase를 첨가하여 10분 ~ 60분 동안 반응을 시킨 후 천천히 20번 가량 피펫팅을 하여서 세포를 분리하였다. 상층액을 수거하고 DMEM 배지를 10 ml 첨가한 후 160 x g에서 3분간 원심분리 하였다. 가라앉은 세포만을 새로운 배지에 부유시키고 T25 세포배양용 flask에 배양하였다.

Trypsin에 의한 효소처리는 다음과 같이 실시하였다. trypsin/EDTA (0.05%/ 0.53 M) 1 ml을 조직소편에 첨가하고 3분간 37°C 인큐베이터에서 반응 시킨 후 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 10 ml 첨가하여 trypsin의 작용을 정지시켰다. 160 x g에서 3분간 원심분리한 후 가라앉은 세포만을 새로운 배지에 부유시키고 T25 세포배양용 플라스크에 배양하였다. 돼지 태아의 소장 조직은 내강에 효소를 채워서 세포를 분리하는 방법과 잘게 절편한 후 효소를 처리하는 방법을 비교하였다. 돼지 태아 소장 조직을 4 Cm 길이로 잘라내고 PBS를 이용하여 소장 조각의 외부를 세척한 후 1 ml 주사기를 이용하여 소장의 내강에 바늘을 삽입하고 실크 봉합사를 이용하여 바늘의 삽입부분을 결찰한 후 PBS를 이용하여 내부를 세척하였다. 내부가 세척된 소장의 내강에 0.25% collagenase 500  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 10분~60분 동안 37°C,  $\text{CO}_2$  인큐베이터에서 처리하고, collagenase의 처리가 완료되면 0.001% ~ 0.05%의 dispase 를 첨가하여 10 ~ 60분 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 소장의 내강에 DMEM 배지를 흘려보내서 단일세포로 분리한 후 상피세포를 모은 후 160 x g에서 3분간 원심분리한 후 세포수를 세고 T25 세포배양용 플라스크에 배양하였다. 한편, 소장의 조직을 mincing한 후 RBC를 제거하고 1 g의 소장 조직을 37°C DMEM 배지 5 ml에 0.25% collagenase를 첨가하여 10분 ~ 60분 동안 37°C,

CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 처리하고, collagenase의 처리가 완료되면 0.01%의 dispase를 첨가하여 10분 ~ 60분 동안 반응을 시킨 후 피펫을 이용하여 천천히 20번 가량 피펫팅을 하여 세포를 분리하였다(Table 1). 분리된 세포를 모으기 위하여 DMEM 배지를 20 ml 첨가하고 상층액을 160 x g에서 3분간 원심분리한 후 세포수를 카운팅 하고 T25 세포배양용 flask에 배양하였다.

Table 1. Enzyme treatments for tissue digestion

Organs	1 <sup>st</sup> treatment (collagenase)		2 <sup>nd</sup> treatment		
	Concentration (%)	Time* (min)	Enzyme	Concentration (%)	Time* (min)
Kidney	0.25	10~60	dispase	0.01	10~30
			trypsin/EDTA	0.05/0.53 M	3
Lung	0.25	10~60	dispase	0.01	10~30
Small intestine	0.25	10~60	dispase	0.01	10~30
			trypsin/EDTA	0.05/0.53 M	3

\* Reaction time of enzyme treatments

효소처리를 마치고 단일세포로 분리된 각 장기의 세포를 배양하여 효소의 최적 처리 조건을 알아보았다. T25 세포배양용 플라스크에  $1 \times 10^5$ 개로 초대배양된 세포의 부착율과 최초배양 3일 후 계대배양 시 생존하는 세포수를 비교하였다. 세포를 처음 초대배양 하고 12시간이 지난 후 부착된 세포의 수를 현미경으로 관찰하여 부착된 세포수와 부착을 하지 못하고 죽은 세포의 비율을 구하였다. 처음 배양 후 72시간이 지나서 세포가 자라고 있는 T25 세포배양용 플라스크를 세포세척용 PBS를 이용하여 2회 세척을 하고 trypsin/ EDTA (0.05%/0.53 M) 500  $\mu$ l를 이용하여 세포를 분리시키고 FBS가 10% 첨가된 DMEM 배지 10 ml를 첨가하여 160 x g, 2분간 원심분리하여 세포를 모았다. 5 ml의 배지를 첨가하고 피펫을 이용하여 잘 부유시킨 후 100  $\mu$ l의 배지를 추출하여 trypan blue(Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) 용액을 첨가하여 피펫으로 잘 섞은 후 혈구계산판에 넣은 후 현미경으로 생세포를 카운트하여 세포의 수를 구하였다.

최적의 처리조건을 탐색하여 얻어진 내용을 바탕으로 각 장기에서 상피세포를 분리하고 상피세포가 사멸할 때 까지 계속 계대배양을 해서 몇 세대까지 계대가 가능한지 알아보고 대수 증식기로부터 접촉에 의한 증식저해까지 2일 간격으로 한번에 3개의 well에서 검사하여 증식 곡선을 검사하였다.  $1 \times 10^3$ 개의 세포를 6-well plate 6개(36well)에 분주 하고 1일, 2일, 4일, 6일, 8일, 10일, 12일에 세포수를 측정하였다. PBS로 원심세척하고 세포를 crystal violet (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)으로 염색한 후 세포농도를 혈구계산판으로 측정하여 3개의 well의 평균을 구하였다.

초대배양 후 세포의 성장 상태를 확인하고 섬유아세포 제거 작업을 시행하였다. 돼지 태아의 신장, 폐 그리고 소장으로부터 초대배양 2세대인 세포를 각각 3개의 T25 세포배양용 flask에 24시간 배양하여 세포단층이 70%가 되도록 하고, DMEM-10을 이용하여 24시간 동안 배양하였다. 배양된 flask에 섬유아세포와 상피세포가 혼재하여 있는 것을 현미경으로 확인하고, 세포

세척용 PBS를 4 ml 첨가하여 세포를 세척하였다. 세척 후 각각의 flask에 0.01%와 0.05% 그리고 0.5%의  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 1 ml씩 첨가하였다.  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 첨가하고 3~5분 동안 현미경을 통하여 섬유아세포가 박리되는지를 관찰하였다. 섬유아세포가 박리되기 시작하면 flask를 손가락으로 가볍게 쳐주면서 상피세포가 박리되기 직전까지 처리를 하였다. 상피세포의 세포질이 수축을 시작하면  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  용액을 흡입하여 완전히 비운 후 20% FBS가 함유된 DMEM배지(DMEM-20)를 1 ml 첨가하여 세척한 후 흡입하여 비우고, 다시 DMEM-20을 1 ml 첨가하여 세척하였다. 세척을 완료하고 DMEM-10을 5 ml를 첨가하여 배양하고 6시간 후 섬유아세포가 제거된 정도를 현미경을 통하여 관찰 하였다.

계대수가 1번, 4번, 8번, 그리고 12번인 신장 세포를 대상으로 각각 24시간 후 70%의 세포단층을 이루도록 세포수를 조절하여 plating하였다. 그리고 각각 12, 24, 36 그리고 48시간동안 배양한 후 0.01%  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 이용한 섬유아세포의 제거 실험을 실시하였다. 시간별로 배양된 flask에 섬유아세포와 상피세포가 혼재하여 있는 것을 현미경으로 확인을 하고, 세포세척용 PBS를 4 ml 첨가하여 세포를 세척하였다. 세척 후 각각의 flask에 0.01%  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 1 ml씩 첨가하고 3~5분 동안 현미경을 통하여 섬유아세포가 박리되는지를 관찰하였다. 섬유아세포가 박리되기 시작하면 flask를 손가락으로 가볍게 쳐주면서 상피세포가 박리되기 직전까지 처리를 하였다. 상피세포의 세포질이 수축을 시작하면  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 흡입하여 완전히 비운 후 1 ml의 DMEM-20을 첨가하여 두 번 세척하였다. 세척을 완료하고 5 ml의 DMEM-10을 첨가하여 배양하고 6시간 후 섬유아세포가 제거된 정도를 현미경을 통하여 관찰 하였다.

0.01%  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처음 처리하고 2차로 처리하기까지 세포를 배양할 때 사용하는 배지의 FBS농도와 배양시간이  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 의 2차 처리 시 섬유아세포의 제거효율에 미치는 영향을 조사하였다. 초대배양 계대수가 4번인 신장세포를 100%의 세포단층이 되도록 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 세포세척용 4 ml의 PBS로 세척한 후 0.01%  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 1 ml씩 첨가하여 3분 동안 현미경을 통하여 섬유아세포가 박리되는지를 유심히 관찰하였다. 섬유아세포가 박리되기 시작하면 DMEM-20 배지를 5 ml 첨가하고 flask를 가볍게 쳐주어서 섬유아세포를 부유시켰다. 배지를 수거하여  $160 \times g$ 로 3분간 원심분리하여 섬유아세포를 모은 후 trypsin/EDTA (0.05%/0.53 M)를  $500 \mu\text{l}$  첨가하여 1분간 반응시켜 멎쳐있는 섬유아세포를 단일세포로 분리하였다. 1분 후 5 ml의 DMEM-10을 첨가하여 반응을 정지시킨 후  $160 \times g$ 로 3분간 원심분리하여 단일세포로 분리된 섬유아세포를 모았다. 24-well 세포배양용 plate에 섬유아세포를  $1 \times 10^3$ (unit/ml)이 되도록 분주하고 각각 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지와 2% FBS가 포함된 DMEM배지(DMEM-2), 5% FBS가 포함된 DMEM배지(DMEM-5) 그리고 DMEM-10 배지로 배양하였다. 앞의 실험에서 섬유아세포가 제거된 상피세포에 trypsin/EDTA를  $500 \mu\text{l}$  첨가하여 1분간 반응시킨 후 단일세포로 분리가 되면 DMEM-10을 5 ml 첨가한 15 ml tube로 옮기고  $160 \times g$ 로 3분간 원심분리하여 상피세포를 모았다. 24-well 세포배양용 plate에 상피세포를  $1 \times 10^3$ (unit/ml)이 되도록 분주하고 각각 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지와 DMEM-2, DMEM-5 그리고 DMEM-10 배지로 배양하였다. 24-well 세포배양용 plate에서 배양되고 있는 각각의 섬유아세포와 상피세포를 6시간, 12시간, 18시간 그리고 24시간 간격으로 관찰하여 배양용기에 부착한 비율을 구하고, 시간별로 0.01%  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리하여 세포가 분리되는 시간과 비율을 관찰하였다.

현재까지 실험된 결과를 바탕으로 초대배양 후 섬유아세포를 제거하기 위한 최적의 조건을 알아보기 위한 실험계획을 정하고 각각의 장기에서 처리조건을 탐색하였다. 초대배양 계대수가

4번인 각 장기 유래의 세포를 1차로 0.01% Na<sub>2</sub>EDDA를 처리하고 DMEM-2 배지로 각각 6시간, 12시간 그리고 24시간 배양 후 2차로 0.01% Na<sub>2</sub>EDDA를 처리를 하였다. 2차 처리가 끝난 후 DMEM-2 배지로 각각 6시간, 12시간 그리고 24시간 배양을 하고 0.01% Na<sub>2</sub>EDDA를 3차로 처리하였다. 각 처리 단계에서의 섬유아세포의 제거 비율과 상피세포가 박리되기 시작하는 시점의 시간을 관찰하였다.

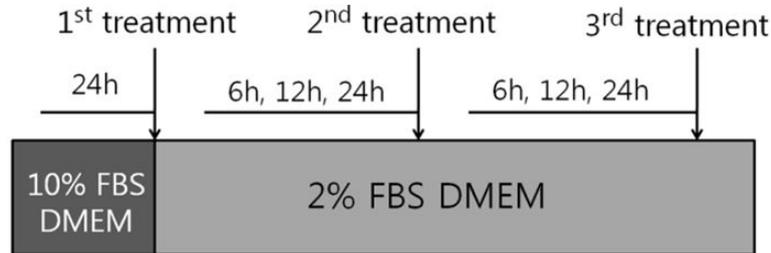


Fig. 1. Schematic diagram of Na<sub>2</sub>EDDA treatments for the separation of fibroblasts from epithelial cells. DMEM containing 10% FBS was used for primary culture and DMEM containing 2% FBS was used just after first treatment. Hours of cell culture before treatment were indicated.

돼지태아의 조직을 적출하고 상피세포의 생존율을 높이기 위하여 RBC제거를 하였다. 희석에 의한 RBC제거 방법을 사용하였을 경우 1 ml의 세포부유액에 남아있는 RBC 숫자를 비교하였다. RBC의 제거 효율을 비교한 결과 남아있는 RBC의 개수는 서로 비슷하여서 희석에 의한 RBC의 제거로도 충분히 RBC의 제거 효과를 얻을 수 있었다. RBC를 제거하고 수거된 단일세포를 24-well 세포배양용 plate에 12시간 배양한 후 바닥에 부착된 세포의 비율을 관찰한 결과 NH<sub>4</sub>Cl/HEPES 용액을 이용하면 RBC의 제거는 효율적으로 이루어지지만 희석에 의한 RBC 제거방법에 비교하여 초대배양 시 세포의 생존율은 낮아지는 것을 관찰하였다(Fig. 2).

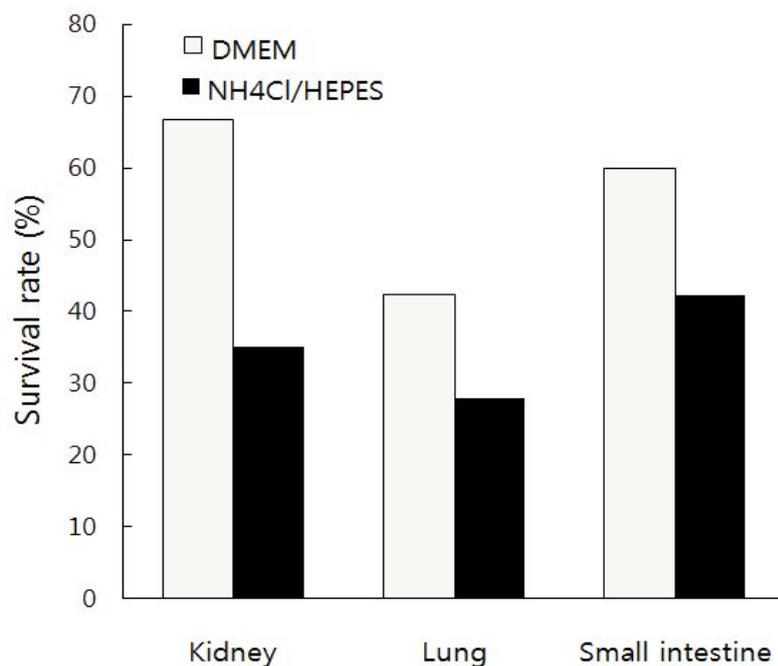


Fig. 2. Survival rate of digested cells from different organs after removing RBC either by dilution method or by lysis method. Dilution of minced tissues with culture medium (DMEM) and discard supernatant 2 minutes after sedimentation. Treatment of minced tissues with 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in HEPES.

Collagenase 처리 후 30분까지는 분리되는 세포의 수가 꾸준히 증가하였지만 50분 이후부터는 더 이상 세포수의 증가는 보이지 않았다. 신장의 경우 세포를 많이 얻기 위해서는 30분 이상 collagenase를 계속 처리하는 것이 좋으나 30분이 지나면 섬유아세포가 함께 분리되는 비율이 폭발적으로 증가하게 된다. 따라서 섬유아세포의 분리를 최소화하여 상피세포를 얻기 위해서는 30분 이내로 처리하는 것이 유리하였다. 다른 장기들도 40~50분까지 계속하여 분리되는 세포의 양은 증가하지만 collagenase의 처리가 20분이 지나면 섬유아세포의 분리 비율이 증가하게 되었다(Fig. 3). Dispase의 처리시간은 장기별로 25분이 될 때 까지 수거되는 세포의 총량은 계속 증가하였다. 신장과 폐의 경우 15분 그리고 소장인 경우 20분이 지나면서부터 섬유아세포의 분리비율이 현저히 증가되었다(Fig. 3). 소장의 경우 내강에 효소를 충전하는 방법과 mincing에 의한 효소처리의 방법에서 모두 좋은 결과를 나타내었다.

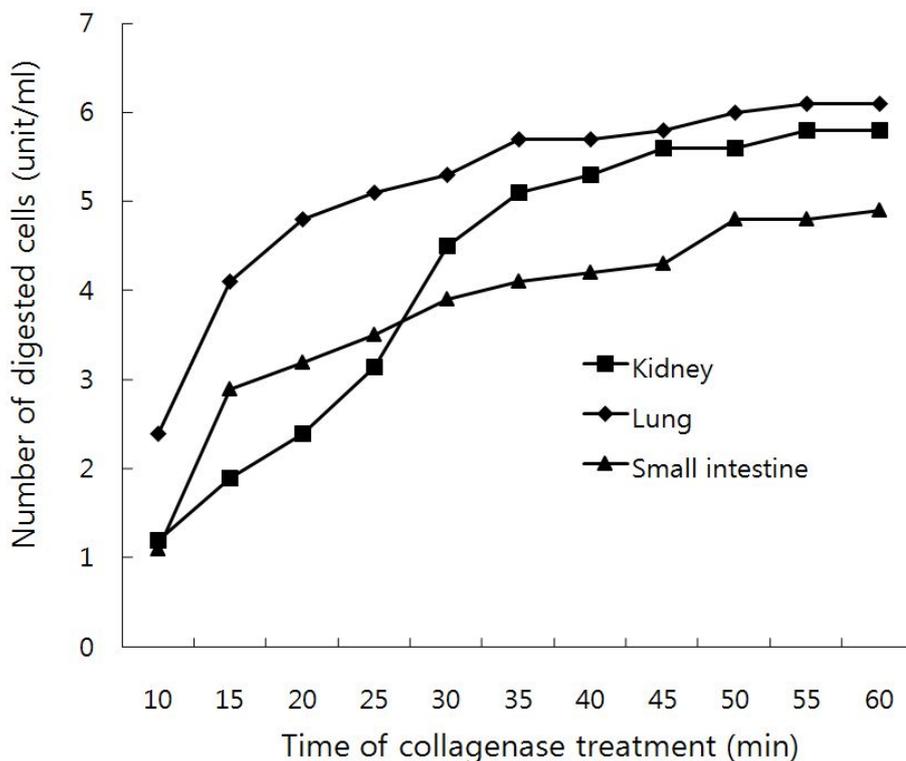


Fig. 3. Digestion of minced organs by collagenase treatment. Proper time of collagenase treatment was about 30 minutes since longer treatment than 30 minutes resulted in more contamination of fibroblasts as well as low survival of digested cells after plating.

현재까지 확인된 최적의 효소처리조건을 사용하여 각 조직에서 세포를 분리한 다음 T25 세포배양용 플라스크에  $1 \times 10^5$ 개씩 분주하고 12시간 후 현미경으로 관찰하여 세포의 부착률을 확인하였다. 세포의 부착률은 각 조직에 따라서 다소 차이가 있었지만 55% - 70% 정도 되었고

신장유래 세포가 배양용기 표면에 부착이 가장 잘되는 것으로 확인되었다(Fig. 4). 또한 72시간 배양한 후 생세포수를 비교하여 각 장기유래 세포들의 성장속도를 조사하였다. 초기에 배양된 각 장기의 세포가 일정한 속도로 분열을 하는 것이 아니라 조직의 특성에 따라서 세포분열 속도가 확연히 다르다는 것을 알 수 있었는데 신장세포와 소장세포가 폐 조직유래의 세포 보다 분열 속도가 빠름을 알 수 있었다(Fig. 4).

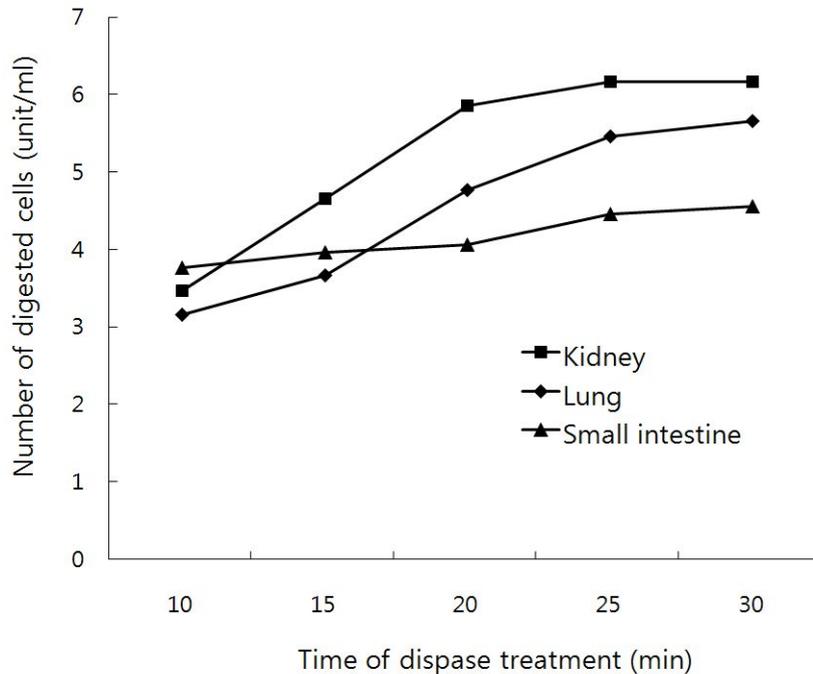


Fig. 4. Digestion of minced organs by dispase treatment. Proper time of dispase treatment was about 10–15 minutes since longer treatment than 15 minutes resulted in more contamination of fibroblasts as well as low survival of digested cells after plating.

최적의 효소처리 조건을 정리하면 Table 2와 같다. 이 조건으로 섬유아세포가 전혀 없는 순수한 상피세포만을 얻는 것은 어려웠고 각 장기별로 최적의 효소처리 조건은 유사하였다.

Table 2. Determination of optimal digestion conditions for fetal pig tissues using two-step enzyme treatments

Organs	1 <sup>st</sup> treatment (collagenase)		2 <sup>nd</sup> treatment (dispase)	
	Concentration(%)	Time(min)	Concentration(%)	Time(min)
Kidney	0.25	30	0.01	10
Lung	0.25	20	0.01	10
Small intestine	0.25	40	0.01	20

돼지 태아의 신장, 폐 그리고 소장의 초대배양 2세대인 세포를 각각 배양하고 0.01%와 0.05% 그리고 0.5%의  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 1 ml씩 첨가하여 섬유아세포를 제거한 결과 섬유아세포가 박리되어 나오는 시점과 상피세포가 박리되기 시작하는 시점간의 시간적인 차이는  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 의 농도가 높아질수록 줄어들었으나 분리되는 섬유아세포의 양에는 유의한 차이점이 없었다. 하지만 높은 농도에서 처리할 경우 섬유아세포와 상피세포의 분리가 이루어지는 시간적인 차이가 줄어들게 되어 실험자가 처치를 하기위한 충분한 시간적 여유가 없는 경우가 발생하기도 하였다. 따라서 이후의 실험에서는 시간적 여유가 충분하고, 유사한 실험에서 다른 연구자가 선택하였던 0.01%  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 로 실험을 시행하였다.

돼지 태아의 장기를 초대배양한 후 계대수와 배양 시간에 따른 섬유아세포의 제거 효율을 실험하였다. 초대배양의 계대수가 증가하면서 섬유아세포가 제거되는 비율은 점점 감소하였다 (Fig 5). 초대배양 세포를 4번 계대할 때 까지는 섬유아세포의 제거율이 높지만 8번 계대를 한 장기들은 50% 이하의 제거율을 보였다. 또한 계대수가 12번을 넘어가면  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 처리에 의한 섬유아세포의 분리와 상피세포의 분리가 거의 같이 이루어지는 것을 관찰 할 수 있었다. 12번 계대를 한 세포에서  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 이용하여 섬유아세포만을 분리하기는 사실상 어려웠다. 섬유아세포가  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리하여도 세포질이 완전히 수축하지 않았다. 계대수가 4번 이하의 경우는  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리하고 현미경으로 관찰하면 Fig. 6의 B 사진에서 보는바와 같이 섬유아세포의 세포질이 빠르게 수축하여 서로 엉겨 붙는 모습을 관찰 할 수 있었지만, 계대수가 12번인 경우는 섬유아세포의 세포질이 50% 정도만 수축하고 더 이상 수축을 하지 않았다.

세포의 배양시간에 따른 섬유아세포의 분리율도 상당한 차이점이 있었다. 배양 12시간과 24시간에 0.01%  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리하면 섬유아세포의 분리가 잘 되었다. 하지만 24시간이 지나면 섬유아세포의 분리 시까지 많은 시간을 필요로 하고 이에 따라서 상피세포가 같이 탈락되는 현상을 관찰 할 수 있었다. 따라서  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 는 배양 후 12시간에서 24시간 사이에 사용하는 것이 유리하였다.

초대배양 계대수가 증가하여 더 이상  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 를 처리를 통한 섬유아세포의 제거를 기대하지 못할 시  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 와 trypsin/EDTA를 함께 사용하여 섬유아세포를 제거할 수 있었다. 10번 이상 계대가 된 초대배양세포를 24시간 배양 후 100%의 단층이 형성되도록 배양하고, 배양 24~48시간 사이에 0.01%  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ 로 3분간 처리를 하면 섬유아세포의 세포질은 50% 정도 수축을 하게 되고 배양용기를 가볍게 쳐 주어도 배양용기에서 박리가 되지 않는 상태가 된다. 이때 trypsin/EDTA를 일반 세포계대 시 사용하는 양과 농도로 약 15~30초간 36°C에서 처리를 하고 trypsin/EDTA 처리가 끝나면 곧바로 배양용기에 가볍게 충격을 주면 섬유아세포가 박리 되는데, DMEM-10을 첨가하여 세척을 하고 흡인하여 배지를 버리면 섬유아세포의 70% ~ 90%를 제거할 수 있었다.

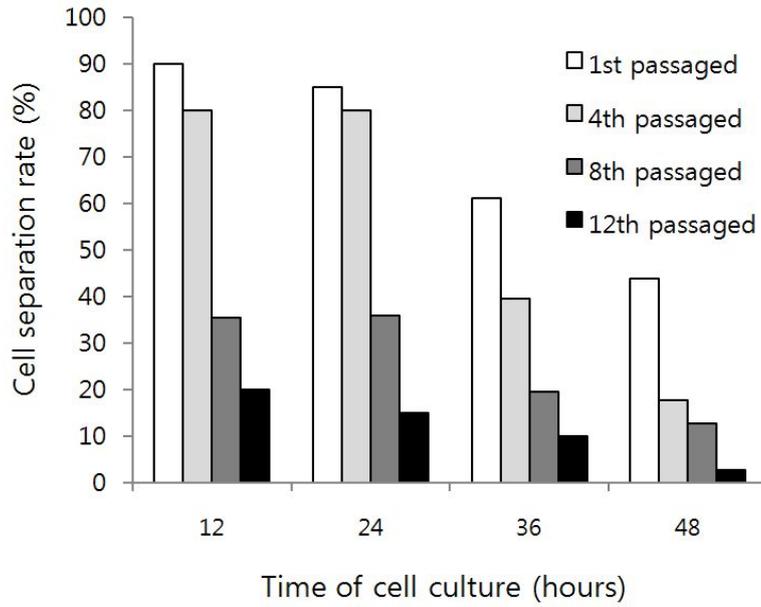


Fig. 5. Effects of culture time and number of passages on the separation of fibroblasts by  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  treatments.

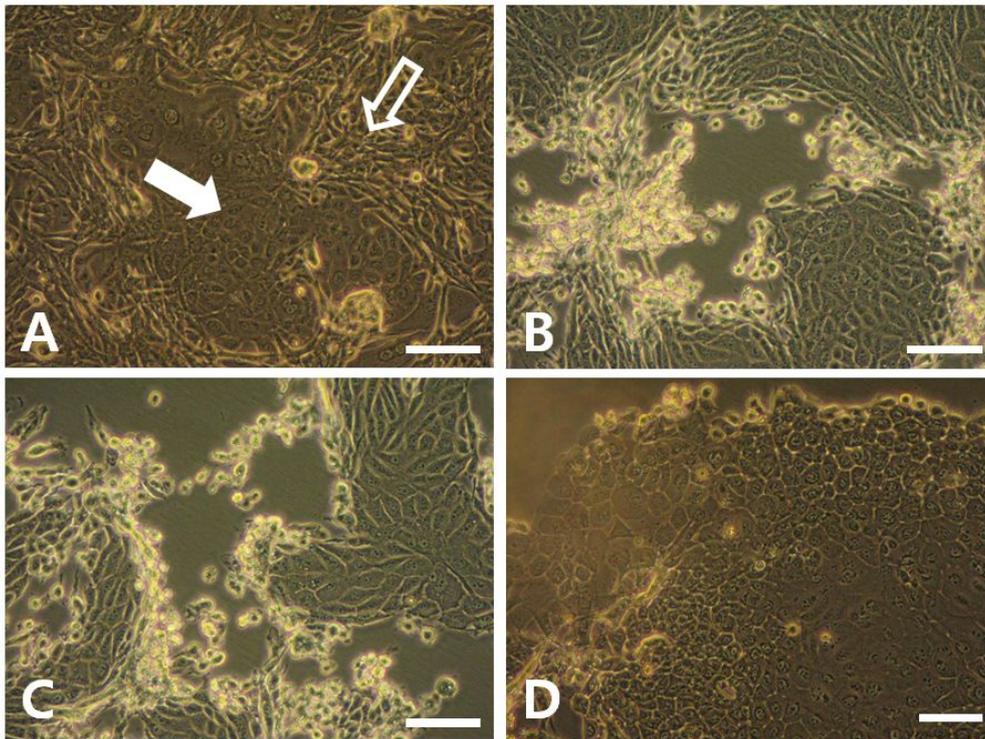


Fig. 6. Separation of fibroblasts from epithelial cells by treating with  $\text{Na}_2\text{EDDA}$ . A: Cultured cells before  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  treatment. Empty arrow indicates fibroblasts and filled arrow indicates epithelial cells. B: Fibroblasts were rounded and detached from culture-flask by the first  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  treatment. C: Fibroblasts were detached from culture-flask by the second  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  treatment. D: Fibroblasts were completely removed from the flask by the third  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  treatment. Scale-bar:  $40 \mu\text{m}$ .

섬유아세포와 상피세포를 분리하고 FBS 농도에 따른 세포의 부착 시간과 Na<sub>2</sub>EDDA를 처리했을 시 세포가 분리되는 시간을 비교하였다. 실험결과 6시간동안 DMEM-2 배지로 배양한 섬유아세포의 경우 60% 정도 부착을 하고 세포간의 연결도 약하여 Na<sub>2</sub>EDDA를 처리할 경우 약 30~40초면 완전히 세포가 부유하기 시작하였다. 6시간동안 DMEM-2 배지로 배양한 상피세포의 경우는 80% 정도 부착을 하였으나 섬유아세포에 비교하면 세포간의 연결이 더 단단하여 약 50~60초간 Na<sub>2</sub>EDDA를 처리하여야 세포가 완전히 부유하였다. 12시간동안 배양한 섬유아세포와 상피세포는 모두 90% 이상의 부착률을 보였다. 하지만 Na<sub>2</sub>EDDA를 처리 시 세포가 부유하는 시간에는 차이가 있었다. 섬유아세포는 2분 30초 정도 지나면 부유하기 시작하고 상피세포는 3분 30초 정도가 지나면 부유하기 시작하였다. 세포를 배양하고 18시간이 지나면 상피세포와 섬유아세포 모두 100% 가까이 부착을 하였고 상피세포의 세포질은 풍부해 졌지만 섬유아세포의 세포질은 상피세포에 비하여 풍부하지 못하였다. Na<sub>2</sub>EDDA를 처리할 경우 섬유아세포와 상피세포의 분리가 시작되는 시간의 차이는 30초 정도였다. 24시간이 지나면 섬유아세포와 상피세포는 모두 100% 가까이 부착을 하였다. 하지만 Na<sub>2</sub>EDDA를 처리 시에는 섬유아세포와 상피세포의 분리 시작 시간은 20초 정도 차이를 보였다. DMEM-5를 사용하여 배양한 경우 6시간이 경과한 세포의 부착률은 80% 이상이였으며 Na<sub>2</sub>EDDA를 처리 시에 세포분리가 이루어지는 시간은 섬유아세포가 3분 정도였다. 상피세포도 섬유아세포와 비슷한 결과를 보였으며 Na<sub>2</sub>EDDA처리 시 세포가 분리되기 시작하는 시간은 3분 보다는 길었으나 큰 차이는 없었다. 12시간 이상 배양한 섬유아세포와 상피세포의 부착률은 100%였다. Na<sub>2</sub>EDDA를 처리할 경우 섬유아세포와 상피세포의 분리가 시작되는 시간에는 유의성 있는 차이는 없었다. DMEM-10을 사용하여 배양한 경우의 결과도 DMEM-5배지를 사용한 경우와 비슷한 결과를 나타냈다. 결과적으로 DMEM-2를 사용하여 배양을 하게 되면 섬유아세포와 상피세포의 분리가 시작되는 시간적 차이가 커지므로 Na<sub>2</sub>EDDA를 처리하여 두 종류의 세포를 분리하는 데 더욱 유리하였다.

Table 3. Cell attachment rate and optimal time of Na<sub>2</sub>EDDA treatment to separate fibroblasts and epithelial cells

Using medium	6 hours <sup>a</sup>			12 hours			18 hours			24 hours		
	attachment rate(%)		Time <sup>b</sup> (sec)	attachment rate(%)		Time (sec)	attachment rate(%)		Time	attachment rate(%)		Time (sec)
	F <sup>c</sup>	E <sup>d</sup>		F	E		F	E		F	E	
DMEM-2 <sup>e</sup>	60	80	30	90	90	60	100	100	30	100	100	20
DMEM-5 <sup>f</sup>	80	80	20	100	100	10	100	100	0	100	100	0
DMEM-10 <sup>g</sup>	80	90	20	100	100	10	100	100	0	100	100	0

a Time of cell culture before Na<sub>2</sub>EDDA treatment

b Optimal time of Na<sub>2</sub>EDDA treatment to separate fibroblast and epithelial cells

c Fibroblasts

d Epithelial cells

e DMEM medium containing 2% fetal bovine serum

f DMEM medium containing 5% fetal bovine serum

g DMEM medium containing 10% fetal bovine serum

현재까지 실험된 결과를 바탕으로 초대배양한 각 장기에서 섬유아세포를 제거하기 위한 조건을 설정하였다. 초대배양을 하고 계대수가 4번인 세포에서 24시간 이후에 세포단층이 100%가 되도록 배양하고 1차로 0.01% Na<sub>2</sub>EDDA 처리하여 DMEM-2배지로 교환하여 6시간동안 배양한 후 2차로 Na<sub>2</sub>EDDA를 처리하는 것이었다. 2차 처리 후 섬유아세포의 제거가 완전하지 않으면 DMEM-2배지로 12시간 배양한 후 3차 처리를 하여 섬유아세포의 대부분을 제거할 수 있었다(Fig. 7). 1차와 2차 그리고 3차까지 Na<sub>2</sub>EDDA를 처리하면 계대수가 4번 이하인 경우는 섬유아세포를 90% 이상 제거가 가능하였고 상피세포의 소실도 거의 없었다. 하지만 계대수가 증가한 상태에서 Na<sub>2</sub>EDDA처리를 하게 되면 섬유아세포의 제거율도 낮아지고 상피세포의 소실율도 증가하게 되었다. 이러한 결과는 초대배양 초기에 섬유아세포의 제거가 이루어져야 한다는 점을 보여준다.

## 2. Telomerase 의 과발현을 통한 세포의 불멸화 유도

레트로바이러스 벡터는 Michiie Sakamoto (Department of Pathology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku 160-8582, Tokyo)로부터 공여 받아 실험에 사용하였다. 벡터의 제작과정은 다음과 같다.

### 가. pCLXSN-ACC-hTERT

(1) poly(A)+RNA : HeLa Cell을 이용하여 RT-PCR (Thermoscript reverse transcriptase(Invitrogen, California, USA) 와 KOD polymerase (TOYOBO, Osaka, Japan)을 통하여 RNA 추출하였다. 본 연구에서 사용한 primer는 다음과 같다.

forward primer GGAATTCGCCGCGCGCTCCCCGCTGCCGAGCC

reverse primer GCTCTAGATTAGTCCAGGATGGTCTTGAAGTCT

(2) recombining two clones

forward primer AAAAAGCAGGCTCCACCATGCCGCGCGCTCCCCGCTGCCGAGC

reverse primer AGAAAGCTGGGTTAGTCCAGGATGGTCTTGAAGTCT

adaptor primers

forward primer GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT

reverse primer GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

(3) pDONR201벡터로 BP reaction을 통하여 cDNA cloning하였다.

(4) pCLXSN 벡터(Imgenex, San Diego, CA, USA)의 multicloning site에 attR, ccdB (Invitrogen)가 들어가도록 제작하여 pDEST-CLXSN을 제작하였다.

(5) pDEST-CLXSN에 hTERT (cDNA)삽입하여 pCLXSN-ACC-hTERT를 제작하였다.

### 나. pCMSCV-puro-hBmi-1

(1) K526 cell에서 RT-PCR (Thermoscript reverse transcriptase (Invitrogen, California, USA) 와 KOD polymerase를 통하여 RNA 추출하였다.

forward primer     ACGCGTCGACCGCCATGCATCGAACAACGAGAAT  
reverse primer     CGGATCCTCAACCAGAAGAAGTTGCTG

- (2) pDONR201 벡터로 BP reaction을 통하여 cDNA cloning하였다.
- (3) pMSCVpuro vector의 5'LTR 위치에 CMV/LTR fusion promoter를 삽입하여 pCMSCV-puro vector를 제작하였다.
- (4) pCMSCV-puro vector의 MCS에 hbmi-1 (cDNA)을 삽입하여 pCMSCV-puro-hBmi-1 벡터를 제작하였다.

안정적으로 세포내로 유전자를 도입시키기 위하여 불멸화에 사용할 레트로바이러스 입자를 Retrovirus Packing System (TAKARA Bio, Osaka, Japan)을 사용하여 co-transfection을 통하여 제작하였다(Fig. 7). 293cell에 recombinant retrovirus vector와 pGP vector 그리고 pE-ampho vector를 calcium phosphate transfection method로 co-transfection을 하였다. co-transfection 후 7~11시간동안 5% CO<sub>2</sub>, 37°C로 incubating한 후 새로운 배지로 교환해 주었다. Transfection 48시간 후 원심분리로 상층액을 수거하고 0.45 μm sterilized filter를 사용하여 filter후 -80°C에 보관하고 transduction에 사용하였다.

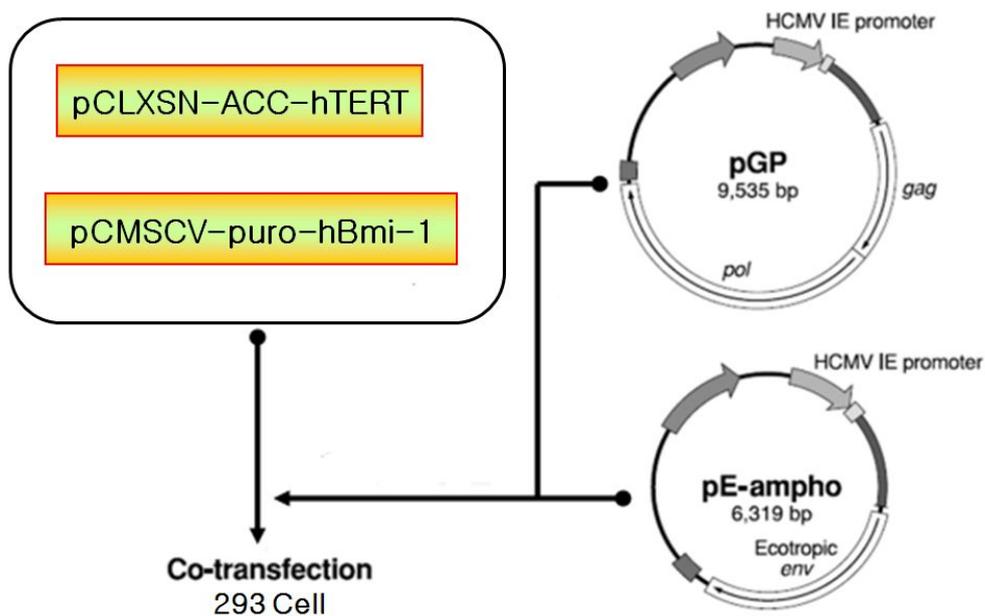


Fig. 7. Diagram of total process for retrovirus particle production.

Telomerase가 발현되는 세포를 선별하기 위해 G418 (geneticin)을 배지에 500 ug/ml로 첨가하고 매일 G418이 첨가된 배지로 갈아주면서 2주일 정도 배양을 지속하였다. 살아남은 세포는 G418 농도를 반으로 줄인 배지를 이용하여 배양하면서 불멸화 여부를 확인하였다.

불멸화 과정을 거친 세포들을 5세대별로 나누어 telomerase 발현양상을 TRAPeZe<sup>®</sup>RT Telomerase Detection Kit, FAM detection (Chemicon international, California, USA)을 사용

하여 Real-Time PCR (iQ5 Real-Time PCR Detection System, Bio-RAD, California, USA)을 통하여 조사 하였다. 각각의 제작 세포주 세포를  $1 \times 10^6$ 개씩 5세대 별로 준비하고 TSR8 quantitation control, 1000 cell equivalents of telomerase positive extract control, minus telomerase control, no template control (NTC), experimental sample control (and heat treated)을 제작하여 real-time PCR을 수행하였다. Real-Time PCR을 위한 디자인은 Table 4와 같다.

Table 4. Real-time PCR assay design for the telomerase detection

	1	4	7	10
	2	5	8	11
	3	6	9	12
A	TRS8 <sup>a</sup> 40 amoles	Sample 1	Sample 1 Heat Treated	Sample 1 + TSK <sup>b</sup>
B	TRS8 4 amoles	Sample 2	Sample 2 Heat Treated	Sample 2 + TSK
C	TRS8 0.4 amoles	Sample 3	Sample 3 Heat Treated	Sample 3 + TSK
D	TRS8 0.04 amoles	Sample 4	Sample 4 Heat Treated	Sample 4 + TSK
E	Positive Extract <sup>c</sup>	Sample 5	Sample 5 Heat Treated	Sample 5 + TSK
F	Minus telomerase control	Sample 6	Sample 6 Heat Treated	Sample 6 + TSK
G	NTC <sup>d</sup>	Sample 7	Sample 7 Heat Treated	Sample 7 + TSK
H		Sample 8	Sample 8 Heat Treated	Sample 8 + TSK

a Control template, TRS8 is an oligonucleotide with a sequence identical to the

TS primer extended with 8 telomeric repeats AG (GGTTAG)

b Inhibition/normalization control, 0.2 amole/ $\mu$ L TSK template

c Telomerase positive cells ( $10^6$  cells)

d No template control

불멸화된 세포의 마이코플라즈마 감염여부를 PCR을 통하여 확인하였다. 마이코플라즈마 감염여부는 PCR kit (Mycoplasma PCR detection kit. iNtRON, Seoul, Korea)을 통하여 확인하였다. PCR 조건은 Table 5와 같다.

Table 5. PCR conditions for the detection of mycoplasma

PCR condition		Temp.	Time
Initial denaturation		94°C	1 min
35 Cycles	Denaturation	94°C	30 sec
	Annealing	60°C	20 sec
	Extension	72°C	1 min
Final extension		72°C	5 min

초대배양세포를 불멸화하기 위한 레트로바이러스벡터를 제한효소를 사용하여 확인하였다 (Fig. 8).

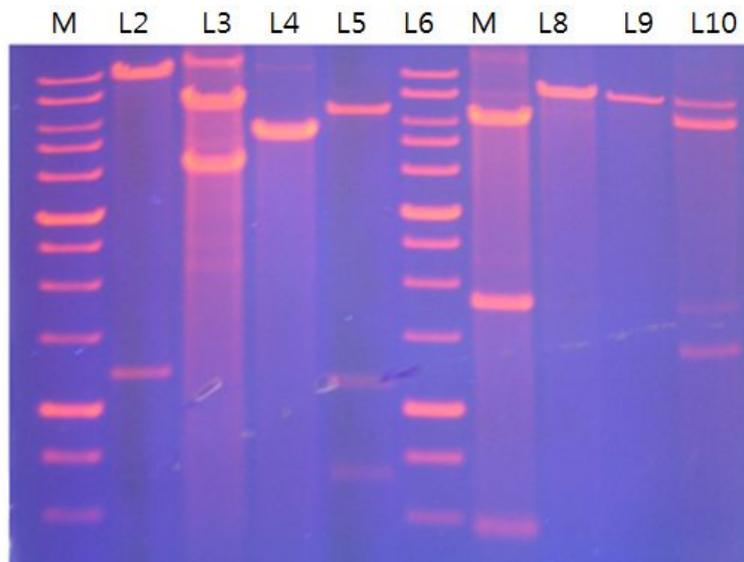


Fig. 8. PCR detection of retrovirus vector. M: 1kb Marker, lane L2: hTERT (Xba I, Hind III), lane L3: hTERT (Xcm I, Xba I), lane L4: hTERT (Afl II, Xba I), lane L5: hbmi-1 (Cla I, Hind III), lane L7: hbmi-1 (EcoR I, Cla I), lane L8: hbmi-1 (BamH I, Cla I), lane L9: hbmi-1 (Xba I), lane L10: hbmi-1 (Nde I, Xho I)

불멸화세포를 선별하기 위해 G418 (geneticin)을 배지에 500 ug/ml로 첨가하고 매일 G418이 첨가된 배지로 갈아주면서 2주일 정도 배양을 지속하였다. 살아남은 세포는 G418 농도를 반으로 줄인 배지를 이용하여 배양하면서 불멸화 여부를 확인하였다. 불멸화가 확인된 세포는 세포의 성장특성과 모양을 기준으로 장기별로 세포 type을 구별하여 cloning 하였다. 세포를 계대 배양하면서 상피세포의 모양 유지, contact inhibition 현상, 복층(multi-layer)으로 증식하는 현상 등이 있는지를 관찰하여 세포가 암세포화 되었는지 그리고 상피세포의 특성을 유지하는 지를 확인하였다. Fig. 9는 불멸화된 돼지유래 세포의 모습이다. Fig. 9의 그림 A는 신장유래 상피 세포의 type-1 모습으로 2배수 분열에 2일이 걸렸다. 그림 B는 신장유래 상피 세포의 type-2 모습으로 2배수 분열에 2.5일이 걸렸고 Na<sub>2</sub>EDDA 처리시 가장 강하게 부착을 유지하

였다. 그림 C는 신장유래 상피 세포의 type-3의 모습으로 신장 유래 세포들 가운데 2배수 분열에 가장 긴 4일이 소요되었다. 그림 D는 폐 유래의 세포로 2배수 분열에 2일이 소요 되었고  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  처리시에 대부분이 탈락하였다. 그림 E는 소장 유래의 세포로 2배수 분열에 2일이 소요되었고  $\text{Na}_2\text{EDDA}$  처리에도 강한 부착력을 보여주었다.

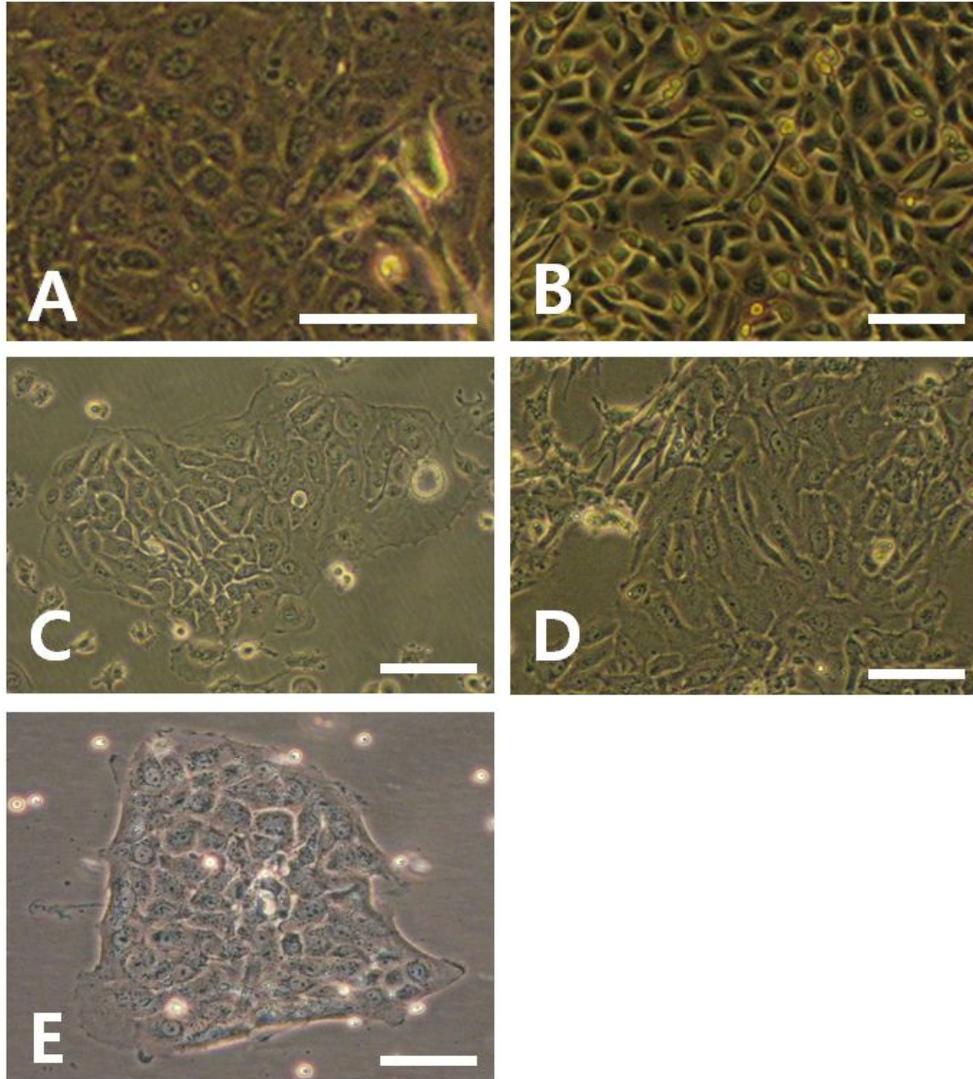


Fig. 9. Immortalized primary pig epithelial cell lines. A: kidney type-1 cell line, B: kidney type-2 cell line, C: kidney type-3 cell line, D: Lung cell line, E: small intestine cell line. Scale-bar: 40  $\mu\text{m}$ .

불멸화 과정을 거친 세포들을 5세대별로 나누어 telomerase 발현양상을 Real Time PCR을 통하여 조사하였다(Fig. 10). 초대배양 세포의 telomerase 양이 가장 낮게 나왔으며 신장 Type-1와 신장 Type-2의 telomerase이 가장 높게 검사되었다.

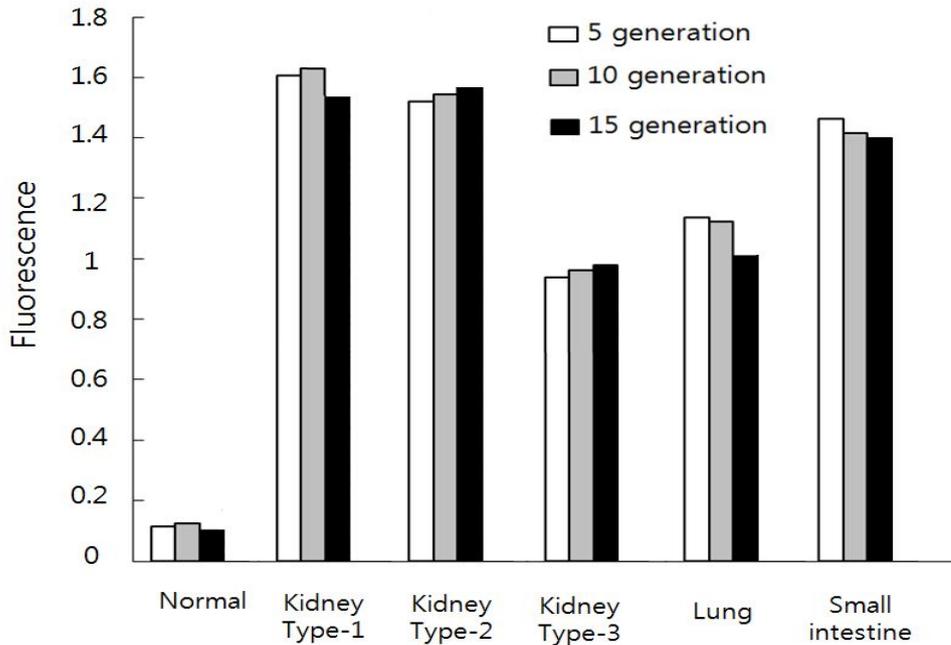


Fig. 10 Real-time PCR analysis of telomerase expression in immortalized primary pig epithelial cell lines.

불멸화된 세포의 마이코플라즈마 감염여부와 바이러스 감염여부를 PCR을 통하여 확인하였다. 검사결과 모두 음성으로 나왔다 (Fig. 11).

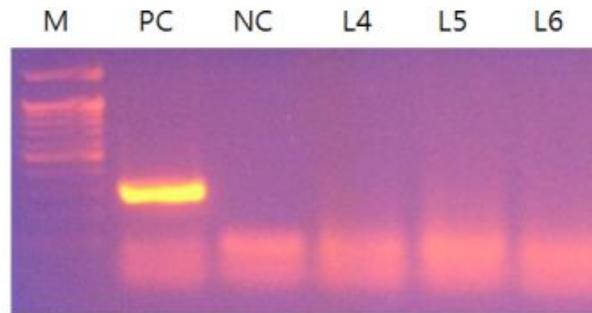


Fig. 11. PCR analysis of mycoplasma contamination in established cell lines. M: 100bp DNA marker , lane PC: positive control, lane NC: negative control, lane L4:

### 3. 20세대 이상 계대의 가능성 확인과 증식능력 검사

돼지태아의 신장조직을 순수하게 상피세포만을 초대배양하고 telomere reverse transcriptase 를 이용하여 영구적으로 불멸화시킨 신장유래의 돼지상피세포주를 만들어 JNUSK-1, JNUSK-2, JNUSK-3 그리고 JNUSK-4라고 명명하고 소장유래의 돼지상피세포주는 JNUSSI-1과 JNUSSI-2라고 명명하였다.

최적의 처리조건을 탐색하여 얻어진 내용을 바탕으로 각 장기에서 상피세포를 분리하고 상피세포가 사멸할 때 까지 계속 계대배양을 해서 몇 세대까지 계대가 가능한지 알아보고 대수 증식기로부터 접촉에 의한 증식저해까지 2일 간격으로 한번에 3개의 well에서 검사하여 증식 곡선을 검사하였다.  $1 \times 10^3$ 개의 세포를 6-well plate 6개(36well)에 분주 하고 1일, 2일, 4일, 6

일, 8일, 10일, 12일 그리고 14일에 세포수를 측정하였다. PBS로 원심세척하고 세포를 crystal violet (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)으로 염색한 후 세포농도를 혈구계산판으로 측정하여 3개의 well의 평균을 구하였다. 대수증식기로부터 접촉에 의한 증식저해까지 2일에 한번에 3개의 well에서 검사하였고 대수증식기 이후 confluent로 된 후 증식곡선(Fig. 12)을 조사하였다. 신장 유래 세포주의 대수증식기 이후 세포의 수는 신장유래인 JNUSK-1과 JNUSK-2가 가장 많았고 신장 같은 유래인 JNUSK-3는 낮은 수를 나타냈다. 소장 유래인 JNUSSI-1과 JNUSSI-2 세포주는 전반적으로 낮은 수를 보였다. 12일이 지나면서부터 대부분의 세포주에서 세포수의 감소가 관찰되었다.

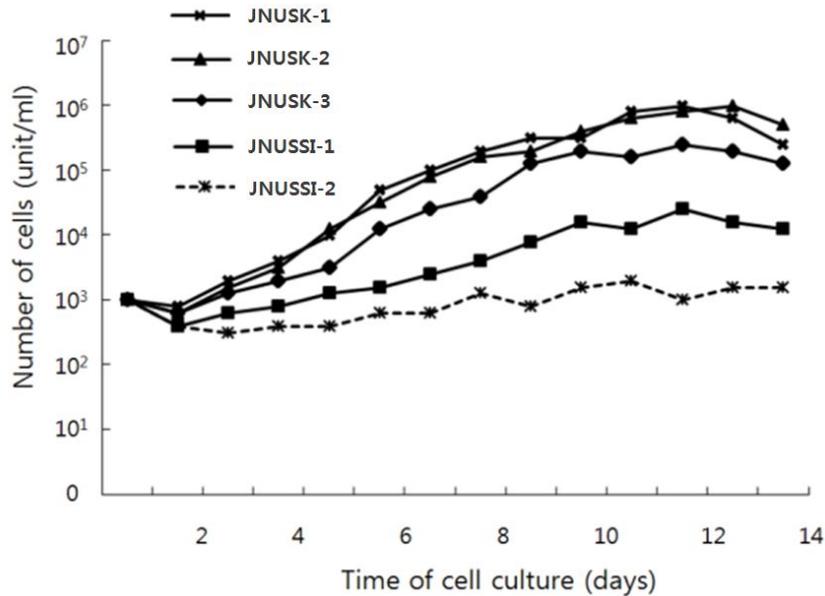


Fig. 12. The growth curve of immortalized swine kidney cell lines.

세포의 증식능력을 검사하기 위하여 각각 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24 세대 째 배양되고 있는 세포를 대상으로 tritium 표지 thymidine을 취득하게 하고 scintillation counter(베타카운터)로 방사능을 아래와 같이 측정하였다. 각 재료마다 T25 2개를 4시간 배양하고 배양액을 교환한 후 세포증식 자극제를 0.01 ml 추가하였다. 1시간 배양한 후 tritium 표지 thymidine (0.5  $\mu$ Ci/ml)을 첨가하여 4~24시간 배양하였다. 아이스박스에서 1%  $\text{NaN}_3$  0.01 ml를 추가해 반응을 정지시키고 PBS로 2번 세척한 후 0.2 N 수산화나트륨 0.5 ml로 세포를 용해시켰다. 5분 뒤 용해 세포액을 시험관으로 옮기고, 0.5 ml의 0.2 N 수산화나트륨액으로 씻어서(well에서 남은 세포 수거) 시험관에 추가한 후 2 N 염산 0.2 ml로 중화시켰다. 50% trichloroacetic acid 0.15 ml를 첨가해 4°C에서 30분간 정치한 후 원심침전하고 침전을 5% TCA로 한번 씻었다. 침전을 글라스필터에 옮기고 5% TCA에 2번, 그리고 에틸알콜과 아세톤을 이용하여 차례로 씻었다. 글라스필터를 바이알에 넣고 scintillation (New England Nuclear, USA) 10 ml를 첨가한 뒤 베타카운터에서 방사능 측정하였다. 제작된 세포주의 population doubling time은 Fig. 13에서 보는 바와 같이 JNUSK-1과 JNUSK-2는 24세대까지 일정한 population doubling time을 보여주었다.

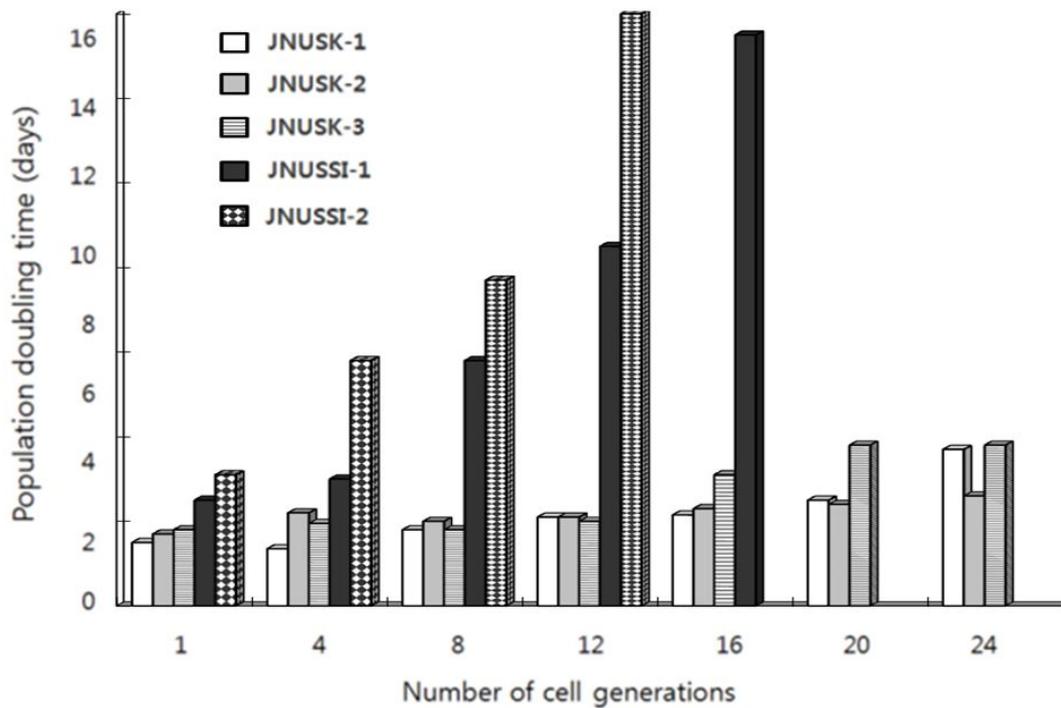


Fig. 13. The population doubling time of immortalized primary swine cell lines.

#### 4. 세포배양특성 및 모양 관찰 및 잡균과 바이러스 감염여부 확인

세포를 계대배양하면서 상피세포의 모양 유지, contact inhibition 현상, 복층(multi-layer)으로 증식하는 현상 등이 있는지를 현미경상으로 관찰한 결과 꾸준히 상피세포의 모양을 유지하였으며 contact inhibition 현상으로 인한 복층으로 증식하는 모습을 보이지 않았다. 또한 불멸화된 세포의 마이코플라즈마 감염여부를 PCR을 통하여 확인하였다. 마이코플라즈마 검사결과 모두 음성으로 나왔다.



Fig. 14. PCR analysis of mycoplasma contamination in established cell lines. M: 100 bp DNA marker, PC: positive control, NC: negative control, L4: kidney, L5: lung, L6: small intestine.

#### 5. PEDV 야외주 분리 실험

기존에는 vero 세포에 트립신을 첨가하여 PEDV를 증식시키는 방법을 사용하였다. 하지만

최근 연구에서 대부분의 코로나 바이러스 그룹 I에 속하는 바이러스들이 aminopeptidase N (APN)을 세포 수용체로 사용함을 이용하여 세포에 APN을 첨가하여 PEDV를 증식시키는 방법이 더 효율적이라는 확인이 있었다(바이러스 역가 또한 10배 이상 증가함). 이에 따라서 vero 세포주와 JNUSK-1 그리고 JNUSK-2 세포주를 이용하여 APN 10 ug/ml을 1시간 처리하고 PEDV 야외주 분리를 하였다.

PED로 의심이 되는 자돈의 분변 샘플을 확보하여 샘플 각각의 총 볼륨이 5 ml가 되도록 FBS가 첨가되지 않고 0.01%의 항생제와 항진균제가 첨가된 DMEM 배지를 첨가하여 300 × g로 3분간 원심분리 한 후 바로 3000 × g로 5분간 원심분리를 한 후 상층액만을 수거하였다. 수거된 상층액을 다시 3000 × g로 5분간 원심분리를 하여 상층액을 수거하여 0.45 um필터로 오염물질을 제거하고 1 ml씩 1.5 ml microtube에 나누어 -70℃ 냉동고에 보관하여 사용하였다.

PEDV RNA 분리를 위하여 Viral Gene-spin™ viral DNA/RNA Extraction Kit (iNtRON, Kor)을 사용하였다. 샘플 300 ul에 Lysis buffer 500 ul를 첨가한 후 15초 동안 vortexing을 하고 상온에서 10분간 정치하였다. 700 ul의 binding buffer를 넣고 섞은 후 spin column에 넣어 13,000 rpm으로 1분간 원심분리를 한 후 500 ul의 washing buffer A를 각각 첨가하여 13,000 rpm으로 1분간 원심분리를 반복하였다. 50 ul의 elution buffer를 첨가한 후 13,000 rpm으로 1분간 원심분리를 하여 RNA를 수거하였다. 이렇게 확보된 자돈의 샘플은 기존에 알려진 RT-PCR 방법을 통하여 PEDV 양성 샘플임을 확인하였다.

Table 6. Primers for PCR to detect viral genomes

Target	Primer	Size	Procedure
S gene	TTCTGAGTCACGAACAGCCA	651bp	94℃/30s, 53℃/30s 72℃/30m, 30 cycles
	CATATGCAGCCTGCTCTGAA		
OFF3 gene	TCCTAGACTTCAACCTTACG	833bp	94℃/30s, 53℃/30s 72℃/30m, 30 cycles
	GGTGACAAGTGAAGCACAGA		
M gene	GTCTTACATGCGAATTGACC	808bp	94℃/30s, 53℃/30s 72℃/30m, 30 cycles
	GGCATAGAGAGATAATGGCA		

총 21개의 샘플을 이용한 RT-PCR의 결과는 아래와 같다.

Group	Number	PEDV	Number	PEDV
A (대전)	100825-1	-	100825-2	-
	100825-3	+	100825-4	-
	100825-5	-	100825-6	+
B (제주)	100512-1	-	100512-2	-
	100512-3	-	100512-4	-
	100719-1	-	100719-2	-
	100719-3	+	101002-1	-
	101002-2	-	101002-3	-

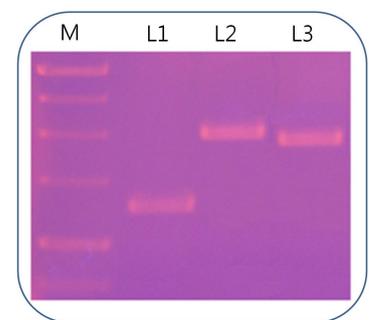


Fig. 15. PCR analysis of PEDV S gene, ORF3 and M gene. M: 100 bp DNA marker, L1: PEDV S gene, L2: PEDV ORF3 gene, L3: PEDV M gene.

RT-PCR 결과 PEDV가 확인된 샘플 0.5 ml을 vero 세포주와 JNUSK-1 그리고 JNUSK-2 세포주에 APN 10 ug/ml을 1시간 처리하고 접종 한 후 36°C, CO<sup>2</sup> 인큐베이터에서 4시간동안 배양시킨 후 2% FBS와 0.01% Antibiotics 첨가된 12 ml의 DMEM 배지를 첨가하여 36°C, CO<sup>2</sup> 인큐베이터에서 배양을 하였다. 4일이 지난 후 CPE가 약 70% 발생한 것을 확인한 후 배지를 수거하여 50 ml cornical tube에 넣고 130 x g에 5분간 원심분리하여 부유세포들을 가라앉히고 상층액을 수확하였다. 수확된 상층액을 다시 vero 세포주와 JNUSK-1 그리고 JNUSK-2 세포주에 APN 10 ug/ml을 1시간 처리하고 접종 하였다. 이렇게 바이러스를 8세대 동안 계대배양을 한 후 시퀀싱 확인을 하였다.

NNNNNtcaaccttacgaagcttttgaaaagggtccacgtgcagtgatgtttcttgg  
cttttcaatacacgattgacacagttgtcaaagatgtctcaaagtctgctaactgtcttt  
ggatgctgtccaagagttggagctcaatgtagttccaattagacaagcttcaaagtga  
cgggttttctttcaccagtgttttatcttctttgcaactgtttaaagcgtcttcttt  
gaggcgcaattatattatgttggcagcgcttttgctgtcattgttctttattgcccacttt  
tatattattgtggtgcatttttagatgcaactattattgttgccacacttattggcag  
gctttgtttagtctgcttttactcctggcgctataaaaatgcgctctttattatctttaatac  
tacgacactttctttcctcaatggtaaagcagcttattatgacggcaaatccattgt  
gattttagaagggtggtgaccattacatcacttttgccaactctttgttgctttcgttagta  
gcattgacttgatctagctatacgtggcgggcaagaagccgacctacagctgttgcg  
aactgttgagcttcttgatggcaagaagctttatgtcttttcgcaacatcaaattgttggc  
attactaatgctgcatttgactcaattcaactagacgagtatgctacaattaNNNNN

## 6. 바이러스 배양특성 확인 및 수율향상 실험

본 실험에서는 vero 세포주(현재 PEDV 백신주의 분리와 증식에 주로 사용됨)와 돼지신장유래 불멸화상피세포주인 JNUSK-1과 JNUSK-2 세포주의 PEDV 감수성 검사를 실시하였다. 또한 돼지태아의 소장추출물과 대장추출물을 이용하여 PEDV 야외주의 바이러스의 수율을 증가시키기 위한 예비실험을 수행하였다.

### (1) Seed virus 준비

T75 세포배양용 flask에 JNUSK-1 세포를 계대배양 하고 24시간 후 70~80% 정도로 monolayer를 형성하도록 하였다. 배지를 제거하고 세포세척용 PBS 15 ml로 3회 세척하였다. 세척된 세포에 PEDV (PED-VAC 생백신, 중앙백신연구소) 2 ml을 접종하고 2 ml의 DMEM (Dulbecco's modified essential medium, GIBCO<sup>®</sup>, Carlsbad, CA, USA) 배지를 추가해주었다. 36°C, CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 5시간동안 배양시킨 후 2% FBS (GIBCO<sup>®</sup>)가 첨가된 11 ml의 DMEM 배지를 첨가하여 지속적인 배양을 하였다. 바이러스 접종 후 4일이 경과한 후 배지를 수거하여 50 ml conical tube에 넣고 130 x g에서 5분간 원심분리를 하고 상층액을 수확한 후 3000 x g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수거하였다. 수거된 상층액은 0.45 um필터를 사용하여 여과한 후 바이러스 용액을 0.5 ml씩 1.5 ml microtube에 나누어 -70°C 냉동고에 보관하여 사용하였다.

PEDV seed virus를 제작하고 역가 측정을 한 결과  $1.44 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml로 50 µl씩 분주된 60개의 vial을 얻을 수 있었다.

### (2) 소장과 대장의 추출물 준비

돼지의 태아를 무균적으로 소장과 대장을 4 cm 길이로 잘라낸 후 적출된 장기 조직을 DMEM 배지 속에 넣어 무균가위 등으로 멸균된 페트리디쉬 안에서 가능한 잘게 자르고 (Mincing) 50 ml conical tube로 옮긴 후 160 x g에서 3분간 원심분리를 했다. 원심분리를 한 상층액을 수거하여 15 ml conical tube로 옮긴 후 다시 원심분리를 하는 과정을 세 번 반복하였다. 최종적으로 수거된 상층액은 45 um필터를 통과시킨 후 소장 추출액과 대장 추출액을 각각 0.4 ml과 0.2 ml씩 1.5 ml microtube에 나누어 -70°C 냉동고에 보관하여 사용하였다.

### (3) 돼지태아 추출물에 의한 CPE 변화와 바이러스 수율변화 확인

JNUSK-1 세포주를 24-well plate 8개의 well에 다음날 80%의 monolayer가 형성되도록 접종하였다. 하루가 지나고 80%정도의 monolayer가 형성되어 있을 때 배지를 제거하고 PBS 15 ml로 2분간 3회 세척한 후 소장추출물 200 µl에 0% FBS DMEM배지 3.2 ml를 첨가하여 4개의 각 well당 200 µl씩 접종했다. 나머지 4개의 well에는 각각 대장추출물 그리고 대장추출물과 소장추출물을 1:1로 섞은 첨가물을 200 µl에 0% FBS DMEM 배지 3.2 ml를 첨가하여 각 well당 200 µl씩 첨가했다. 각각의 추출물을 넣고 12시간 동안 배양을 한 후 PEDV를 접종하였다. DMEM 배지 9.95 ml에 위에서 얻어낸 seed virus를 50 µl 더한 후 각 well에 400 µl를 접종하고 DMEM 배지를 200 µl 더해서 총 600 µl가 되도록 단계별로 1/10씩 희석시키며 접종했다. 36°C, CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양시켜 5일이 지난 후 TCID<sub>50</sub>/ml을 계산하였다.

DMEM 배지에 대장추출물과 소장추출물을 첨가하여 TCID<sub>50</sub>/ml를 관찰한 결과 소장추출물을 첨가하는 것이 대장추출물을 첨가할 때보다 더 많은 CPE가 형성됨을 알 수 있었다(Fig. 5). 추출물의 비율이 2% 이상만 된다면 CPE발생의 비율에는 영향이 없었다. 소장추출물과 대장추출물 그리고 소장추출물과 대장추출물을 1:1로 혼합한 첨가물을 각각 비교하면 서로간의 유의성은 발견되지 않았다. 이는 대장보다는 소장에 있는 미지의 물질에 의하여 PEDV의 CPE가

증가됨을 추측할 수 있었다. 또한 CPE 발생이 높아짐에 따라서 배양액 중의 바이러스 역가 (TCID<sub>50</sub>/ml)가 높아졌다.

(4) Vero 세포주와 제작 세포주의 바이러스 수율 비교

PEDV 백신주의 분리와 증식에 주로 사용되는 vero 세포주와 돼지신장유래 불멸화상피세포주인 JNUSK-1과 JNUSK-2 세포주의 PEDV 수율을 비교하였다. vero 세포와 JNUSK-1 그리고 JNUSK-2 세포를 24시간동안 배양하여 90%의 세포단층이 형성되도록 T25 세포배양용 flask에 계대배양 하였다. 계대배양 후 20시간 경과하고 세포단층의 비율을 확인하여 세포세척 용 PBS로 2회 세척한 후 PEDV를 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지를 이용하여 0.1 MOI로 희석하고 1 ml 접종하였다. 바이러스 접종 4시간 후에 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 4 ml씩 추가하고 CPE가 70% 발생할 때까지 배양하였다. CPE가 70% 발생하면 배지를 수거하여 160 x g로 3분간 원심분리하여 상층액을 모은 후 96-well 세포배양용 plate에서 자라고 있는 vero 세포에 10진 희석하여 접종한 후 바이러스 수율을 관찰하였다.

Vero 세포와 JNUSK-1 그리고 JNUSK-2의 PEDV 감수성 비교실험결과 JNUSK-1과 JNUSK-2 세포주가 모두 vero 세포주보다 높은 감수성이 있음을 확인할 수 있었다. 또한 JNUSK-1의 경우 vero 세포주보다 100배 이상 높은 감수성을 나타냈다(Fig.5).

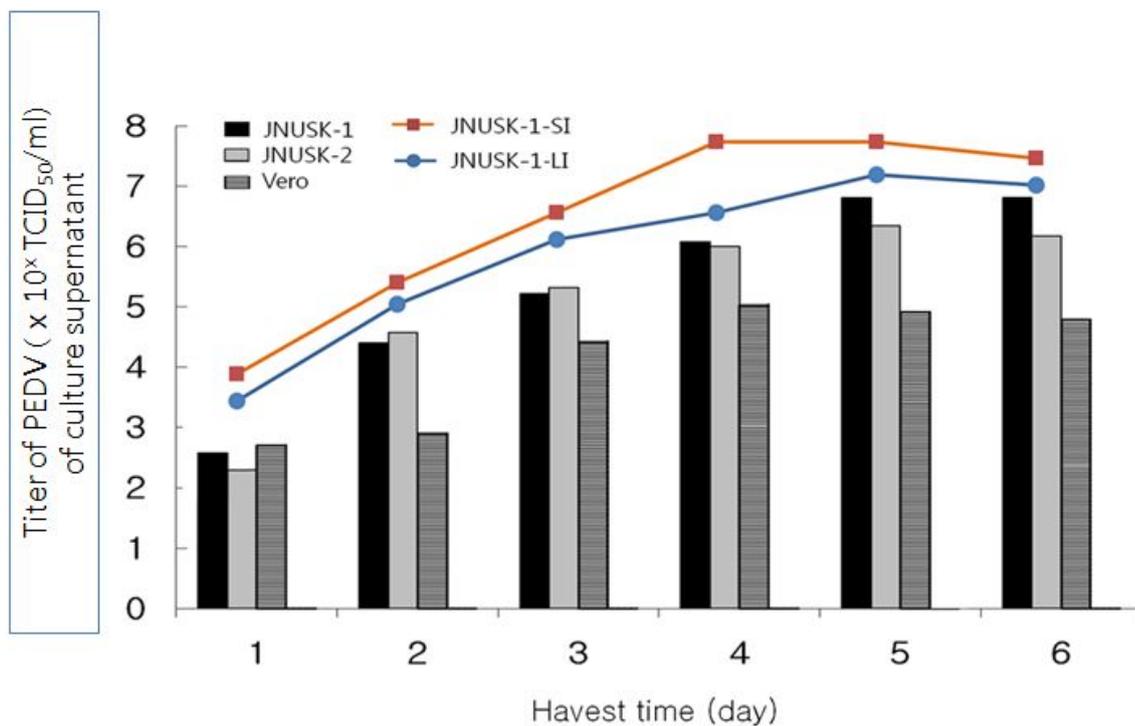


Fig. 16. Titers of PEDV in various culture supernatants. JNUSK-1 was about 100times more sensitive to produce PEDV than vero cell line. Small intestine soup added in culture produce more PEDV.

## 7. JNUSK 세포의 클로닝

JNUSK 세포를 계대배양한 후 96-well 세포배양용 플레이트의 각 well에 하나의 세포가 들어가도록 계대배양을 하였다. 각각의 well의 세포가 분열을 시작하면 세포의 분열속도와 세포의 모양을 관찰하였다. 각 well의 세포에 번호를 부여 한 후 각각의 독립된 세포주로 구별을 하여 특성 조사를 하였다. 예비실험을 통하여 PCV-2에 감수성이 가장 높은 세포주를 JNUSK-1B로 명명하였다.

## 8. 배양특성 및 모양 관찰

세포를 계대배양하면서 상피세포의 모양 유지, contact inhibition 현상, 복층(multi-layer)으로 증식하는 현상 등이 있는지를 관찰하여 세포가 암세포화 되었는지 그리고 상피세포의 특성을 유지하는 지를 확인하였다.

## 9. 세포배양 가능 계대수의 측정

세포를 계대배양하여 30대 이상 계대가 가능한지, 그리고 대수증식기로부터 접촉에 의한 증식저해까지 2일 간격으로 한번에 3개의 well에서 검사하였고 대수증식기 이후 confluent로 된 후 증식곡선을 검사하였다.  $1 \times 10^3 \times 36$ (개)의 세포를 6-well plate 6개에(36well) 분주 하고 1일, 2일, 4일, 6일, 8일, 10일 그리고 12일에 세포를 수거하여 PBS세척 후 crystal violet 염색을 하여 세포농도를 혈구 계산판으로 측정하고 한번에 3개의 well의 평균을 구하였다.

세포의 증식능력을 검사하기 위하여 tritium 표지 thymidine을 취득한 세포를 scintillation counter로 방사능을 측정하였다. T25 세포배양용 flask 2개에 4시간 배양하여 배양액을 교환하고 세포증식 자극제를 0.01 ml 추가하고 1시간 배양한 후 tritium 표지 thymidine을(0.5  $\mu$ Ci/ml)을 첨가하여 4~24시간 배양하였다. 아이스박스에서 1%  $\text{NaN}_3$  0.01 ml 추가해 반응 정지시키고 PBS 2번 세척, 0.2 N NaOH 0.5 ml로 세포를 용해시켰다. 5분 뒤 용해 세포액을 시험관으로 옮기고, 0.5 ml의 0.2 N NaOH 용액으로 씻어서(well에서 남은 세포 수거) 시험관에 추가한 후 2 N 염산 0.2 ml로 중화시켰다. 50% TCA 0.15 ml 첨가해 4°C에서 30분 정치하여 침전을 시키고 원심침전 한 후 침전을 5% TCA로 한번 씻었다. 침전을 글라스필터에 옮기고 5% TCA에 2번, 그리고 에틸알콜과 아세톤을 이용하여 차례로 씻었다. Glass filter를 vial에 넣고 10 ml의 scintillation을 첨가한 뒤 베타카운터에서 방사능 측정하였다.

## 10. 마이코플라즈마 감염검사

불멸화된 세포의 마이코플라즈마 감염여부와 바이러스 감염여부를 PCR을 통하여 확인하였다. 마이코플라즈마 감염여부는 PCR kit (Mycoplasma PCR detection kit. iNtRON, Seoul, Korea)을 통하여 확인하였다. PCR 조건은 Table 7과 같다.

Table 7. PCR conditions for the detection of mycoplasma

PCR condition	Temp.	Time
Initial denaturation	94℃	1 min
35 Cycles	Denaturation	94℃
	Annealing	60℃
	Extension	72℃
Final extension	72℃	5 min

## 11. Immunocytochemistry

JNUSK-1B 세포를 계대배양 48시간 후에 eight-chamber slide에 30,000 개의 세포수가 되도록 분주하여 계대하고 24시간 동안 배양을 하였다. 배지를 비운 후 pan-cytokeratin antibody를 첨가하여 인큐베이터에서 반응을 시킨 후 10% normal goat serum을 이용하여 상온에서 1시간동안 반응을 정지시켰다. Acidic (Type I)과 basic (Type II) keratin의 혼합물인 AE1/AE3 antibody를 1차 항체로 사용하였고 2차 항체로 goat anti-mouse IgG (HRP conjugate)를 사용하였다.

상피세포임을 증명하기 위해서 불멸화된 JNUSK-1B 5세대와 35세대의 세포주에서 keratin의 발현을 확인한 결과 keratin이 성공적으로 발현하고 있음을 확인하였다(Fig. 17).

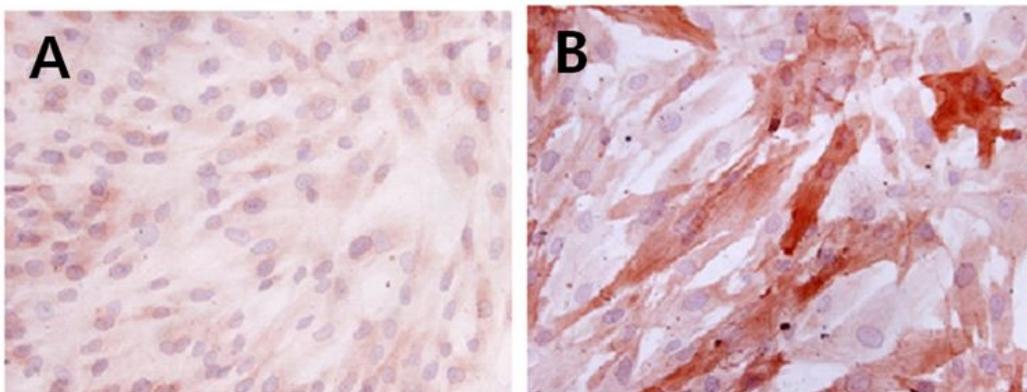


Fig. 17. Keratin staining for the confirmation of epithelial cell. A: primary bovine kidney epithelial cell (5th passage), B: JNUSK-1B (35th passage) were stained by anti-keratin antibodies

## 12. 배양특성 및 모양 관찰

세포를 계대배양하면서 상피세포의 모양 유지, contact inhibition 현상, 복층(multi-layer)으로 증식하는 현상 등이 있는지를 현미경상으로 관찰한 결과 꾸준히 상피세포의 모양을 유지하였으며 contact inhibition 현상으로 인한 복층으로 증식하는 모습을 보이지 않았다(Fig. 18).

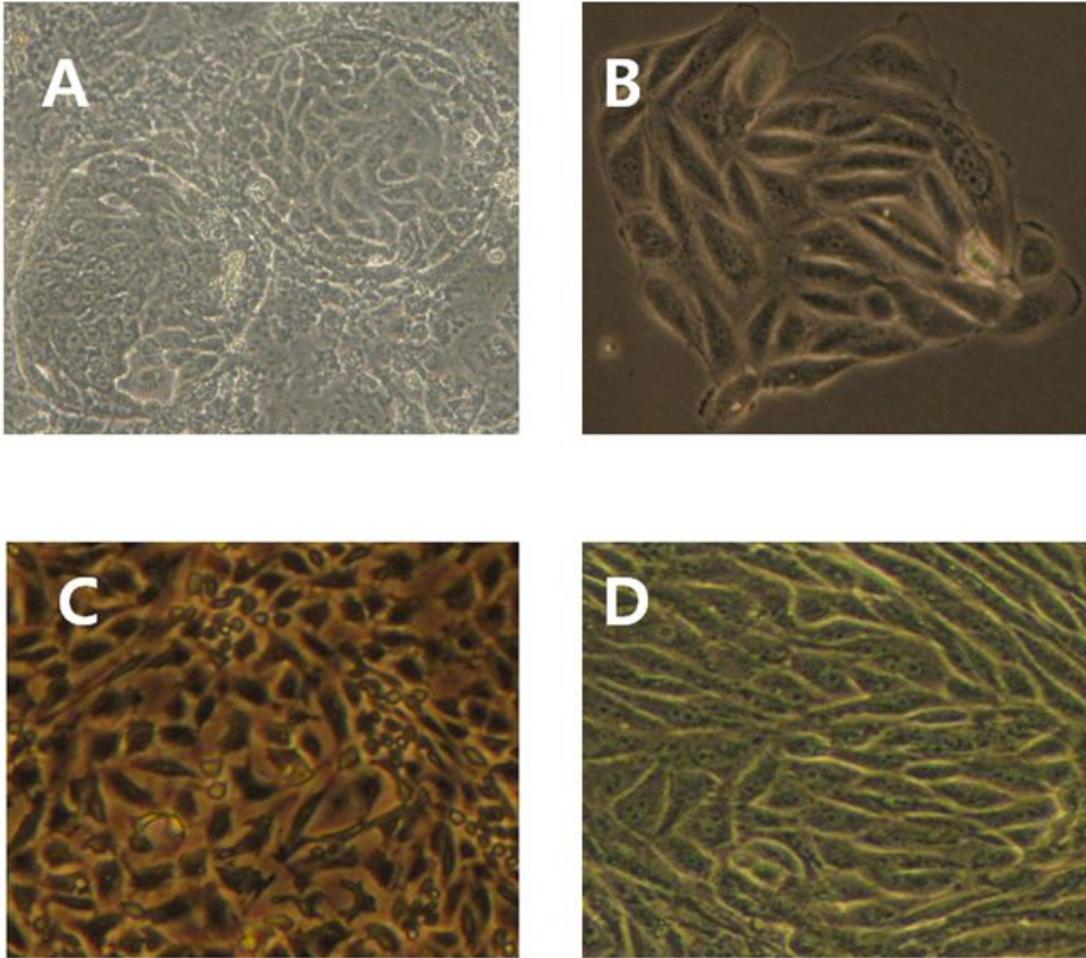


Fig. 18. Immortalized swine epithelial cells and primary swine epithelial cells. A: primary cells (5th passages), B: JNUSK-1B (5th passages), C: JNUSK-1B (25th passages), D: JNUSK-1B (45th passages).

### 13. 세포배양 가능 계대수의 측정

세포를 계대배양하여 30대 이상 계대가 가능한지, 그리고 3일 간격 1:3 비율로 계대배양 하면서 조사하였다. 대수증식기로부터 접촉에 의한 증식저해까지 2일에 한번에 3개의 well에서 검사하였고 대수증식기 이후 confluent로 된 후 증식곡선과 제작된 세포주의 population doubling time을 검사하였다. 신장 유래 세포주의 대수증식기 이후 세포의 수는 5세대의 초대배양 신장세포주와 JNUSK-1B가 가장 많았고 15세대의 초대배양 신장세포주는 불멸화된 세포주 보다 낮은 세포수를 보였다. 제작된 세포주의 population doubling time은 초대배양 신장 세포주와는 달리 JNUSK-1B 세포주는 35세대까지 일정한 population doubling time을 보여주었다. 초대배양 신장 세포주의 population doubling time은 점점 증가 하다가 더 이상 분열하지 못하고 사멸하였다.

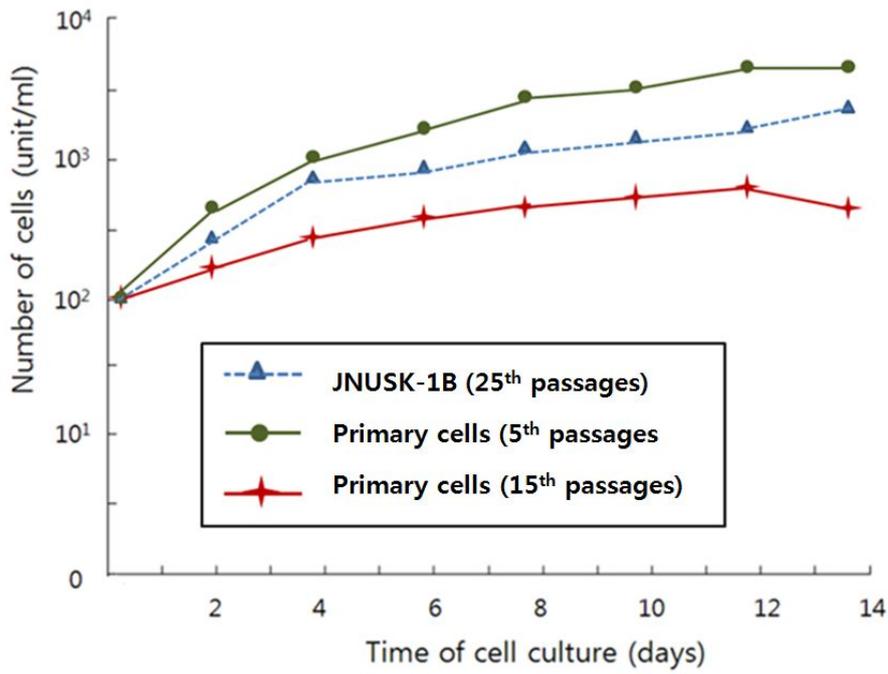


Fig. 19. The growth curve of immortalized swine epithelial cells (JNUSK-1B) and primary cells.

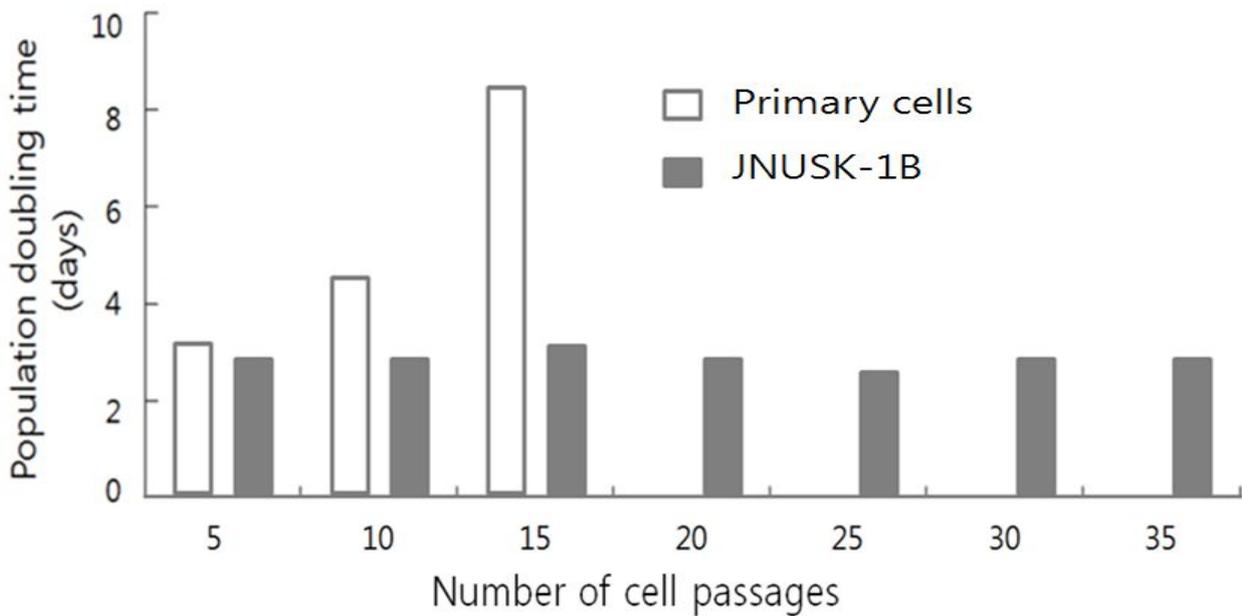


Fig. 20. The population doubling time of immortalized swine epithelial cells line (JNUSK-1B) and primary cells.

## 14. 대량배양을 위한 조건 실험

PEDV를 대량배양 하기 위한 조건을 알아보기 위하여 vero cell과 JNUSK 세포주 그리고 JNUSK-1B 세포주의 최적 MOI와 수거 타이밍을 알아보는 실험을 하였다.

### (1) virus의 titration

소분시켜놓은 PEDV vial 하나를 녹여 96 well plate에 10진 희석하고 미리 96well plate에 배양시킨 JNUSK-1B cell에 virus를 접종하였다. 접종량은 각 well당 20  $\mu$ l로 하고 2시간 후 2%FBS 함유된 DMEM 배지를 첨가하여 total volume을 100 $\mu$ l/well이 되도록 보정한 후, 4~5 일 배양한 후 IFA를 하였다.

IFA는 다음과 같이 시행하였다. JNUSK-1B 세포주를 96-well plate에 배양하여 다음날 80%의 monolayer가 형성되도록 배양하였다. 하루가 지나고 80%의 monolayer가 형성되어 있을 때 배지를 제거하고 PBS 15 ml로 3회 세척한 후 DMEM배지 1.95 ml에 위에서 얻어낸 seed virus를 50  $\mu$ l 희석한 후 각 well에 200  $\mu$ l를 접종하고 다음 well은 200  $\mu$ l가 되도록 단계별로 1/10씩 희석시키며 접종했다. 3일 동안 36°C, CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양시켜 IFA로 PCV-2의 titer를 확인하였다. 감염된 세포를 PBS로 세척하고 PBS 완충액에 4%의 paraformaldehyde (PFA)를 첨가한 고정액을 사용하여 실온에서 30분간 고정하였다. 고정 후, 세포를 0.1% Triton 용액에 15분간 정치시킨 후 3%의 bovine serum albumin (BSA)을 첨가한 PBS-Tween (PBS-T)을 사용하여 실온에서 1시간동안 반응을 시켰다. 1차 항체로 PCV-2 antibody (rabbit 유래)를 1:500으로 희석하여 37°C에서 1시간동안 처리하였다. PBS로 3번 세척 후 anti-rabbit fluorescein isothiocyanate (FITC)가 부착된 2차 항체를 3% BSA가 첨가된 PBS에 희석 후 37°C에서 1시간 반응 시켰다. PBS로 세척 후 형광현미경을 통하여 관찰하였다.

### (2) PEDV의 대량 배양 관련 최적의 MOI 선정

JNUSK-1B 세포주를 20시간 배양하여 약 50%, 70%, 100%의 세포단층이 형성되도록 한 후 PEDV seed 바이러스 ( $1.2 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml)를 FBS가 2%로 첨가된 DMEM배지로 희석하여 접종량을 달리하여 (MOI 0.5, 1, 2, 4) 접종하였다. virus seed 접종 4시간 후에 접종액을 제거하고 PBS로 2번 세척 후(2분간 정치) 각각 2% FBS가 첨가된 DMEM배지와 혈청이 첨가되지 않은 DMEM배지를 첨가하여 virus 증식 효율을 5일 후 측정하였다. MOI 확인결과 JNUSK-1B의 경우 70% 세포단층이 형성 되었을 때 MOI 1로 접종하는 것이 가장 높은 역가를 나타내었다.

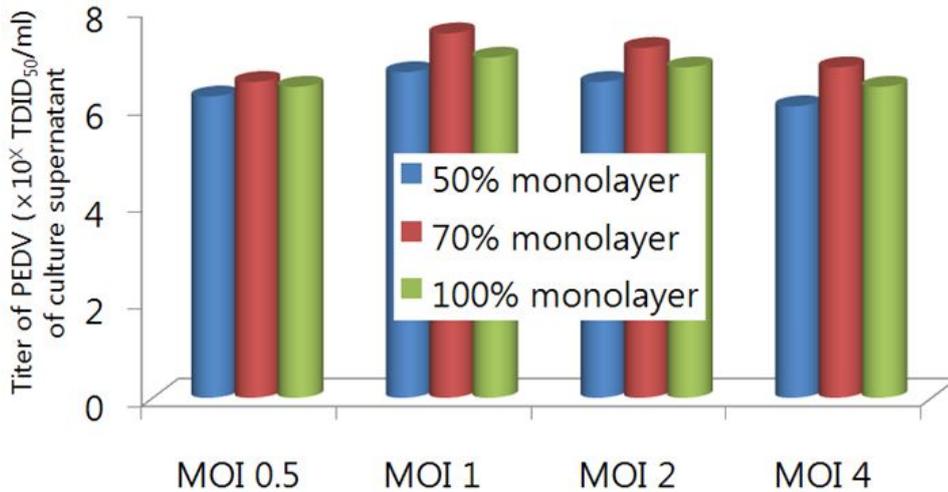


Fig. 21. Titers of porcine epidemic diarrhea virus(PEDV) in culture supernatant were measured at 5 days post inoculation of the virus into JNUSK-1B cells with different amount of multiplicity of infection (MOI)

### (3) 대량배양을 통한 PEDV 항원의 제조

실험에서 확립한 바이러스 최적 생산 조건을 적용하여 PEDV 항원을 제조하였다. T150 (배양면적 150 cm<sup>2</sup>) flask 20개에 JNUSK-1B 세포를 동일한 조건으로 계대배양하고 다음날 약 70~80%정도의 단층이 형성되었음을 확인하고 바이러스를 접종하였다. Seed 바이러스를 DMEM배지에 희석하여 MOI가 1이 되도록 각 flask에 4 ml씩 접종하고 4시간동안 반응시킨 후 2% FBS가 첨가된 DMEM배지를 20 ml씩 첨가하였다. 12시간 배양한 후 배지를 완전히 제거하고 PBS로 2번 세척(3분간 정치)한 후 무혈청의 DMEM배지를 flask 당 8 ml씩 첨가하여 약 20시간 정도 배양을 하였다. 최종적으로 1 x 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/ml의 역가를 가지는 160 ml의 바이러스 배양액을 얻을 수 있었다.

# 제 3 절 PEDV 백신의 효율성 검증 및 효율성 검사 kit 개발

## 1. 돼지유행성 설사병 검사 kit 개발

돼지 유행성 설사(Porcine epidemic diarrhea)는 돼지유행성설사 바이러스(Porcine epidemic diarrhea virus: PEDV)의 감염에 의하여 연령에 관계없이 발생한다. 이 바이러스는 코로나바이러스과(*Coronaviridae*)의 코로나바이러스(*Coronavirus*)에 속하는 RNA 바이러스이다. 이 질병은 돼지의 전염병으로 주요 임상 증상으로 수양성의 심한 설사와 탈수증, 구토 등과 같이 돼지 전염성위장염(Porcine transmissible gastroenteritis:TGE)과 매우 유사한 증상을 일으킨다. 모든 경우에는 비유저하가 특징이며 2주 미만 신생 자돈의 경우에는 폐사율이 높고 비육돈 및 성돈에서의 발병은 돼지 전염성 위장염(TGE)보다 흔하다. 연중 발병하나 겨울철에 많이 발생하는 것이 특징이고, 구입한 돼지 또는 구입한 돼지와 접촉한 예방주사하지 않은 모든 새끼 돼지에서 발생한다. 이병의 진단은 해부 검사로서, 소장내 노란색의 액체가 차 있거나, 병리 조직 검사로 소장의 융모 상피세포 탈락 및 공포변성을 관찰 할 수 있다. 또한 소장의 동결 절편을 직접 또는 간접 형광항체법으로 염색 검경 하는 형광항체검사, 소장 또는 설사 변을 이용한 중합효소 연쇄반응, vero 세포를 이용한 조직배양검사 등이 있으나 현장에서 신속한 진단을 하기에는 부적절하다. 따라서 당사는 신속 면역 크로마토그래피 방법을 응용하여 Porcine epidemic diarrhea virus를 매우 신속하게 진단할 뿐만 아니라, 민감도와 특이도가 매우 우수한 제품으로, 5~15분 안에 신속한 판정을 내릴 수 있는 방법으로 숙련된 전문가가 아니라도 즉석에서 쉽게 사용할 수 있는 장점을 가진 진단시약을 개발하게 되었다.

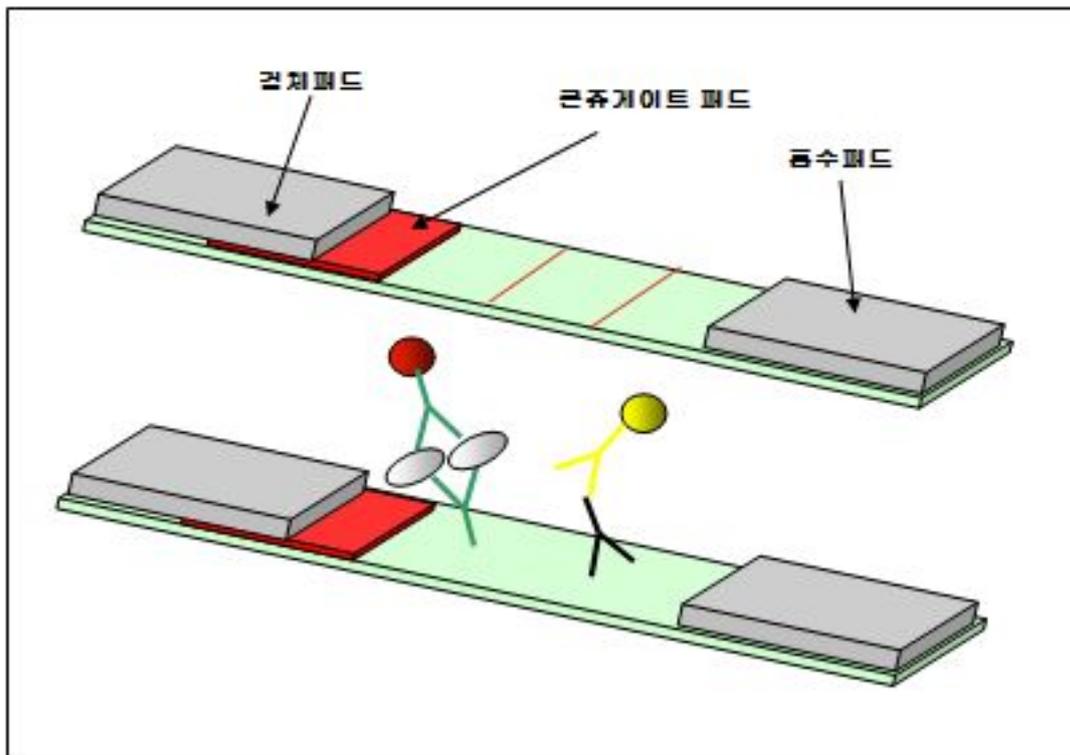
Pro-Check PED Ag Rapid Kit는 면역 크로마토그래피법을 원리로 하여 검사선 부위에 포획 물질(Capture)인 단클론 항-돼지 유행성설사 바이러스(PEDV) 항체를 고정(immobilization)시킨 나이트로셀룰로스 멤브레인 상에 돼지분변의 검체 추출물을 전개 시켜 돼지 유행성설사 바이러스(PEDV)의 존재 유무를 검사하는 시약이다.

검체에 존재하는 돼지 유행성설사 바이러스(PEDV)가 골드 콘쥬게이트와 먼저 반응한 다음, 검사선 부위의 단클론 항-돼지 유행성설사 바이러스항체가 재차 반응하면 적자색을 띠는 골드 복합체가 침적되어 발색이 되도록 고안 되었다. 또한 대조선 부위에서는 단클론 마우스 면역글로블린지 골드 콘쥬게이트가 산양 항-마우스 면역글로블린-지와 항원+항체 반응에 의하여 포획되므로 대조선은 항상 발색 되도록 하였다.

우선, PED SM98P strain을 사용하여 단클론 항체를 제조하고, Capture용 항체와 Detector용 항체를 각각 선정하였다. 세포융합에 사용할 mouse는 4~5주령의 BALB/C strain을 사용하였다. Sucrose cushion법으로 순수 분리한 PED SM98P(200 $\mu$ g/ml)를 동량의 Freund's adjuvant와 혼합해서 마우스의 foot-fad에 4일 간격으로 3회 접종하였으며 1차 접종 시는 Freund's complete adjuvant를 사용하였고 2차와 3차 접종 시는 Freund's incomplete adjuvant와 혼합하여 접종하였다.

세포융합은 PED SM98P로 면역된 mouse의 서혜임과질과 비장을 적출하여 면역세포를 분리한 후 SP2/0 myeloma 세포와 polyethylene glycol 1500(PEG, Roche)을 사용하여 일반적인 세포융합 방법에 따라 수행하였다. 세포융합 후 20% FCS와 HAT(50 $\mu$ M hypoxanthine, 0.4  $\mu$ M aminopterin, 16 $\mu$ M thymidine)가 함유된 RPMI 1640(Gibco BRL)배지에 부유시켜 96-well 조

직배양용 plate에 well 당  $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% 이산화탄소 조건하에서 5일 배양한 후 새로운 HAT 첨가배지 1 drop를 첨가하여 3일 배양하였다. 3일 배양 후, 2일 간격으로 HT 첨가배지로 2회 교체하고 최종적으로 10% FCS가 함유된 RPMI 1640배지로 1회 교체하였다. Hybridoma 세포가 well의 30% 이상 증식하였을 때(세포 융합 10-15일) 효소면역흡착법 (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)을 이용하여 PEDV에 특이적으로 반응하는 양성 hybridoma를 선별하였다. 가장 좋은 hybridoma 세포를 각각 5H10B7, 5B10A9으로 각각 명명하고, limiting dilution법으로 2회 이상 크로닝 하고 단클론항체로 확인된 hybridoma 세포의 일부는 액체질소에 저장하고 일부는 pristane으로 미리 감염된 BALB/C mouse의 복강 내로  $1 \times 10^6$ 개의 세포를 접종하고 10일 후 복수를 채취하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관 하였다.

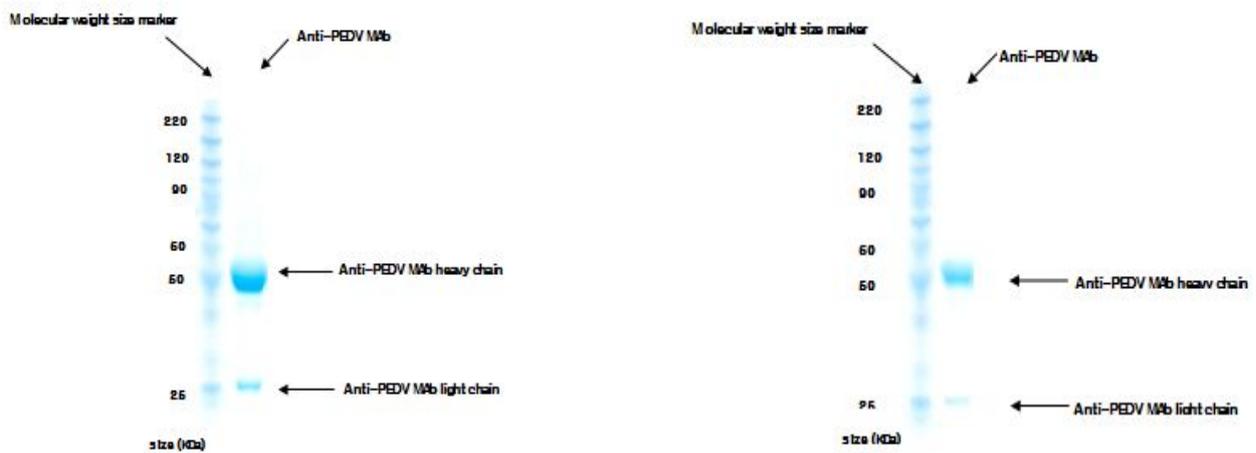


-  PED Virus
-  단클론 항-PEDV 항체-colloidal gold
-  단클론 항-PEDV 항체
-  산양 항-마루스면역글로블린지
-  마루스 IgG - colloidal Gold

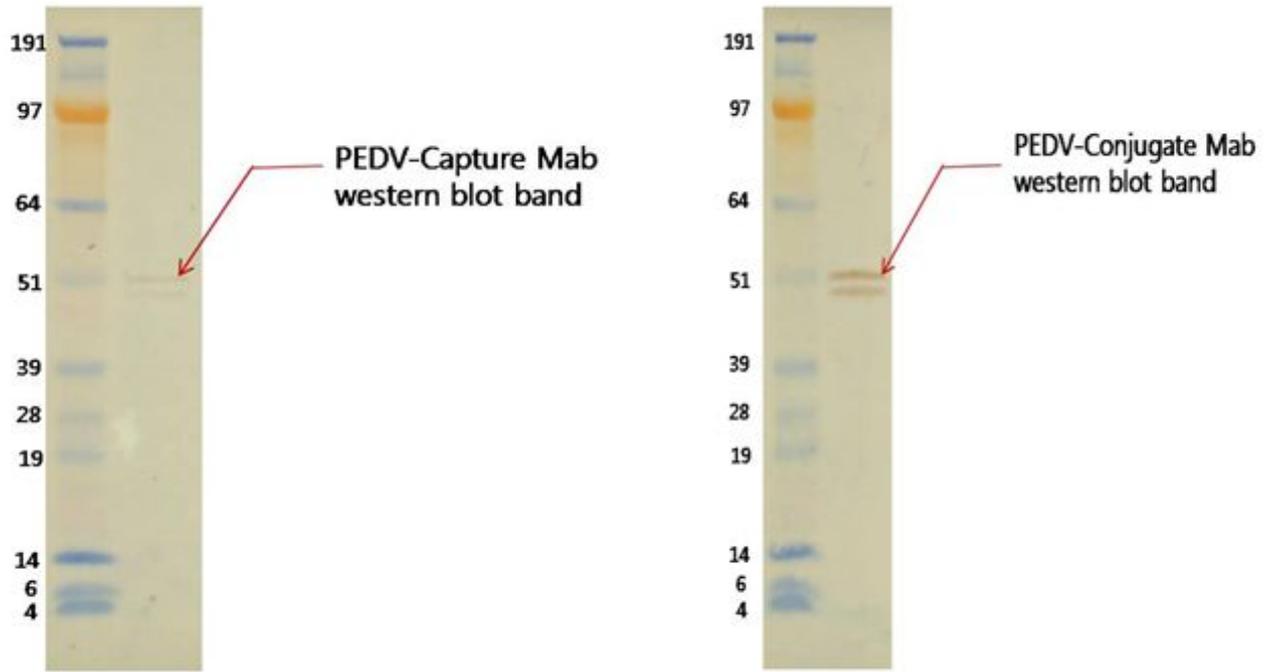
그림 1 반응모식도

단클론항체의 isotype을 확인하기 위해 mouse monoclonal antibody isotyping kit(Sigma)를 이용하여 제조사의 술식에 따라 단클론 항체의 isotype을 결정하였다. 즉, 6개 isotype에 대한 항체를 coating buffer에 1:100으로 희석하여 96-well plate에 100 $\mu$ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 흡착시켰다. PBS-T로 3회 세척 후 5% skim milk로 같은 온도에서 2시간 blocking 시켰다. 2시간 blocking 후 hybridoma 배양상층액을 넣고 같은 온도에서 1시간 반응시키고 PBS-T로 3회 세척하였다. 세척 후 horseradish peroxidase가 conjugate된 goat anti-mouse IgG를 1:2,000 으로 희석하여 각 well 에 100 $\mu$ l씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. 1시간 후 PBS-T로 세척하고 기질로 OPD를 첨가하여 10분간 발색시킨 후에 stop solution(1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 넣어 반응을 중지시키고 492nm에서 흡광도를 측정하여 항체의 isotype은 IgG 2a로 판명되었다.

단클론항체는 다음과 같은 방법으로 정제하고 정량 하였다. 즉, protein G agarose (Kirkegaard & Perry Laboratories) column을 TBS(50mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20)로 2회 세척한 후 생산된 복수를 TBS와 1:5로 희석하여 0.45 $\mu$ m filter로 여과한 후 column에 넣어 중력을 이용하여 통과시켜 protein G agarose에 결합되도록 하였다. column을 통과시킨 후 20ml의 TBS를 넣어 binding 되지 않은 물질을 제거하였다. 낮은 pH에 의한 단백질 손상을 방지하기 위해 0.5M tris 50 $\mu$ l씩 첨가된 각각의 tube에 0.1M glycine(pH 3.0)을 컬럼에 500 $\mu$ l씩 5~8회 반복 용출 시킴으로써 protein G agarose에 결합된 항체를 수집하였다. 수집한 각각의 tube에서 50 $\mu$ l씩 꺼내어 0.01% brilliant blue G가 첨가된 3% perchloric acid 용액 500 $\mu$ l와 반응시켜 항체유무를 확인하였다. 확인된 항체는 상용화된 bradford 시약 (PRO-MEASURE protein measurement solution, iNtRON Biotechnology)으로 단백질 양을 측정하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하며 사용하였다.



PED SM98P strain을 SDS-PAGE gel에 전기영동한 후 정제한 Capture Mab와 Conjugate Mab를 이용하여 Western blotting을 실시하였다. 전기영동한 PAGE gel를 membrane에 transfer하고 1차 항체로 capture, conjugate mab를 각각 사용하고, 2차 항체로 Anti-Mouse IgG conjugated HRP를 처리하였다. 이후 DAB로 developing하여 band를 확인하였다. 실험 결과 50kDa에서 capture 및 conjugate Mab western band가 확인된다.



본 제품의 검출한계를 측정하기 위하여 돼지 유행성 설사 바이러스의 표준 검체를  $5 \times 10^2$ TCID<sub>50</sub>/ml,  $1 \times 10^3$ TCID<sub>50</sub>/ml,  $5 \times 10^3$ TCID<sub>50</sub>/ml,  $1 \times 10^4$ TCID<sub>50</sub>/ml,  $5 \times 10^4$ TCID<sub>50</sub>/ml,  $1 \times 10^5$ TCID<sub>50</sub>/ml,  $5 \times 10^5$ TCID<sub>50</sub>/ml, 까지 희석하여 ‘용법 및 용량’ 항에 따라 시험하였다. 그 결과, 본 제품으로 시험하였을 때의 돼지 유행성 설사 바이러스 항원 검출한계는  $1 \times 10^4$ TCID<sub>50</sub>/ml 이상에서 양성을 보였다.

TCID <sub>50</sub> /ml	$5 \times 10^2$	$1 \times 10^3$	$5 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$5 \times 10^5$
Pro-Check PED Ag Rapid Kit							
판 정	-	-	+/-	+	+	++	+++

검사 시간에 따른 변화를 검사하여, 정확한 판정을 위한 검사시간을 결정하기 위해 검체액 120  $\mu\text{l}$ 를 디바이스 하단에 있는 검체 점적 부위에 떨어뜨리고 시간별 (3분, 5분, 10분, 15분, 20분)로 검사하였다. 음성검체액은 시간의 변화에 관계없이 검사선에서 발색을 나타내지 않는다. 양성검체액의 경우는 시간이 경과함에 따라 고역가부터 발색이 나타나기 시작하여 저역가까지 발색이 나타나는 것을 볼 수 있다. 시험 개시 후, 5~15분 사이에서 골드 콘쥬게이트 전개가 거의 다 이루어지게 되고 음/양성을 판단하기가 용이하였다. 정확한 판정을 위한 시간은 검사 시작 후 5~15분 사이로 결정하고, 시간이 더 경과하면 골드 콘쥬게이트가 역류하는 현상 등으로 음성 검체가 양성으로 판독되는 등 오판할 가능성이 있으므로 15분 이후의 결과는 판정에 포함시키지 않는다.

표준검체	음 성 1					$5 \times 10^4$ TCID <sub>50</sub>				
	3	5	10	15	20	3	5	10	15	20
결 과										
판 정	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

표준검체	$1 \times 10^5$ TCID <sub>50</sub>					$1 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub>				
	3	5	10	15	20	3	5	10	15	20
결 과										
판 정	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++

단클론 항-돼지 유행성 설사 바이러스 항체(5H10)를 여러 가지 농도로 나이트로셀룰로스 막에 코팅한 후, 음성 및 양성 표준 검체를 이용 검사하여 코팅 항체의 포화점을 찾아 민감도와 특이도 모두에 가장 최적의 조건을 선택하여 코팅 항체의 농도를 결정하기 위해, 다음 실험을 시행하였다. 나이트로셀룰로스 막에 단클론 항-돼지 유행성 설사 바이러스 항체를 각각 1.0, 1.5, 2.0, mg/ml 의 농도로 나이트로셀룰로스 막에 흡착시켜 각각을 조립하고, 검체액 120 $\mu$ l를 디바이스 하단에 있는 검체 점적 부위에 떨어뜨린 후 5~15 분 이내에 검사하였다. 단클론 항-돼지 유행성 설사 바이러스 항체 농도가 1.5mg/ml로 코팅하였을 경우 검사선의 포화점을 나타내었다. 이는 한 스트립당 0.4cm 이므로 총 단백질이 0.6 $\mu$ g/strip 이상에서 포화 되므로, 0.6 $\mu$ g/strip 을 나이트로셀룰로스 막에 코팅하는 최적량으로 결정하였다.

산양 항-마우스 면역글로블린지를 여러 가지 농도로 나이트로셀룰로스 막에 코팅한 후, 음성 및 양성 표준 검체를 이용 검사하여 코팅 항체의 포화점을 찾아 민감도와 특이도 모두에 가장 최적의 조건을 선택하여 코팅 항체의 농도를 결정하기 위해 나이트로셀룰로스 막에 산양 항-마우스 면역글로블린지를 각각 1.5, 2.5, 3.0, mg/ml 의 농도로 나이트로셀룰로스 막에 흡착시켜 각각을 조립하였다. 산양 항-마우스 면역글로블린지 농도가 2.5mg/ml로 코팅하였을 경우 대조선의 포화점을 나타내었다. 이는 한 스트립당 0.4cm 이므로 총 단백질이 1 $\mu$ g/strip 이상에서 포화 되므로, 1 $\mu$ g/strip 을 나이트로셀룰로스 막에 코팅하는 최적량으로 결정하였다.

검사선과 대조선에서 정한 항체 Coating 농도와 Anti-Porcine epidemic diarrhea virus monoclonal antibody(5B10)-gold conjugate의 O.D<sub>520</sub>=10을 아래의 시험방법으로 돼지 유행성 설사 음성 및 양성 표준 검체로 검사하여 콘쥬게이트양의 포화점을 찾아 민감도와 특이도 모두에 가장 최적의 조건을 선택하여 결정하기 위해 Anti-Porcine epidemic diarrhea virus monoclonal antibody (5B10)-gold conjugate (O.D<sub>520</sub>=10)의 양을 각각 25, 50, 100 $\mu$ l의 양이 되도록 콘쥬게이트 패드에 흡착시켜 각각을 조립하였다. Anti-Porcine epidemic diarrhea virus monoclonal antibody-gold conjugate (O.D<sub>520</sub>=10)의 양이 50 $\mu$ l 이상에서 검사선과 대조선이 포화점을 나타내었다. 따라서 50 $\mu$ l 양을 최적 흡착량으로 결정하였다.

인산염 생리식용액 Casein 1%w/v, 보존제 아지화 나트륨 0.01%w/v의 조성대로 조제하고 검사선과 대조선 및 골드 콘쥬게이트는 위에서 정한 농도대로 코팅 및 접합하여 용액을 적정하여 돼지 유행성 설사 음성 및 양성 표준 검체를 이용하여 검사하고 포화점을 찾아 민감도와 특이도에 적합한 양을 결정하기 위해 각 검체 60, 120, 180 $\mu$ l를 디바이스 하단에 있는 검체 점적 부위에 분주하였다. 검체액의 양 변화에 따른 신호 변화는 60 $\mu$ l 일 경우에는 골드 콘쥬게이트가 결과창에서 전개가 깨끗하게 이루어지지 않아 판독하기 어려울 뿐만 아니라 판독에 오차가 발생할 수 있었다. 검체액의 양이 120 $\mu$ l 이상에서 발색도가 음성 및 양성을 판정하기에 충분하다고 판단되며, 180  $\mu$ l 이상의 검체액을 이용한 경우 전개된 후에도 점적부위에 남는 양이 많아지므로 전개에 필요한 양과 검체액 점적부위에 남는 양을 고려해볼 때 검체액 90 $\mu$ l~120 $\mu$ l (검체액 점적기구로 약 3방울 정도)를 반응의 최적량으로 결정하였다. 이는 통상 rapid test에 요구되는 수준이다.





양성표준검체	$5 \times 10^4$ TCID <sub>50</sub>			$1 \times 10^5$ TCID <sub>50</sub>			$1 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub>		
전개 용액( $\mu$ l)	60	120	180	60	120	180	60	120	180
결과									
판정	Invail d	+	+	Invail d	++	++	Invail d	+++	+++

음성표준검체	음 성 1			음 성 2			음 성 3		
전개 용액( $\mu$ l)	60	120	180	60	120	180	60	120	180
결과									
판정	Invail d	-	-	Invail d	-	-	Invail d	-	-

## 2. 시험백신의 제조

### (1) Seed 생산

#### ① Master seed 생산

최종적으로 선발된 Strain을 단층이 형성된 Vero세포에 접종하여 37℃에서 3~4일간 배양한 후, 접종 바이러스에 의한 세포변성효과가 약 80%이상 일어났을 때 감염배양액을 채득하여 무균검사, 미립바이러스검사, 마이코플라즈마 오염검사, 바이러스 함유량 시험 등을 거쳐서 이상이 없음을 확인하였으며, -80℃의 냉동고에 동결보존 및 동결건조하여 Master seed를 생산하였다.

## ② Working seed 생산

생산시 Master seed의 연속계대에 의한 면역원성의 변화를 최소화하기 위하여 Master seed 생산 시와 같은 방법으로 배양하고 무균검사, 미립바이러스검사, 마이코플라즈마 오염검사, 바이러스 함유량시험 등을 거쳐서 이상이 없음을 확인하고, -80℃의 냉동고에 동결보존 및 동결 건조하여 Working seed를 생산하였다.

## (2) Vaccine 생산

### ① 바이러스 배양

Vero세포를 세포증식용 배양액에 ml당 15~30만개의 세포를 분산시킨 후 배양 세포가 단층을 형성하였을 때 배양액을 제거한 후 위에서 만들어진 Working seed를 0.1 M.O.I 접종하고 37℃에서 1시간 흡착배양한 후 바이러스 증식용배양액을 가한 후 37℃에서 3~4일간 배양하였다. 세포변성효과가 약 80%이상 일어났을 때 배양감염액을 채독하고, 무균검사, 미립바이러스 검사, 마이코플라즈마 오염검사, 바이러스 함유량시험 등을 거쳐서 이상이 없음을 확인하였다.

### ② 바이러스 불활화

채독한 배양감염액에 0.1M BEI를 100배 희석하여 최종농도가1%(1mM) 되도록 37℃에서 약 18시간 동안 magnetic bar로 stirring하면서 불활화 시킨 다음, 4℃에서 냉각시킨 후 sodium thiosulfate를 최종농도 2mM이 되도록 가하여 중화 시킨 다음, 1% Thimerosal용액의 최종농도가 0.01%가 되도록 가하여 2~7℃의 냉실에 보존하였다.

### ③ 분병

불활화 된 돼지 유행성설사병 바이러스 감염배양액과 동량의 Adjuvant (Montanide IMS 1313 NPR)을 가하여 1,000rpm에서 30분간 혼합한 후 규정된 용기에 규정량을 소 분병 한 다음 2~7℃ 냉실에 보존하였다.

## (3) 시험백신의 생산

야외임상시험 및 안정성 시험 등 백신의 인허가를 위한 시험을 진행하기 위하여 아래와 같이 3 lot의 시험백신을 제조하였다.

시험백신 (Lot. No)	불활화 전 바이러스함량 (TCID <sub>50</sub> /ml)	혼합비율	생산수량
TPEDK01	10 <sup>7.0</sup>	PEDV : 8,000ml Adjuvant : 8,000ml	7,500두분 (30ml/병)
TPEDK02	10 <sup>7.2</sup>	PEDV : 8,000ml Adjuvant : 8,000ml	7,500두분 (30ml/병)
TPEDK03	10 <sup>7.0</sup>	PEDV : 8,000ml Adjuvant : 8,000ml	7,500두분 (30ml/병)

### 3. 시험백신의 일반시험

#### (1) 특성시험

##### ① 시험방법

2개 이상의 백신에 대하여 무색투명한 용기의 백신은 백신 회석액으로 용해하고, 불투명한 용기의 백신은 직경 18~20 mm의 무색투명한 유리 용기에 옮겨서 색조, 투명도(혼탁도), 이물, 이취, 내용물의 균일성에 대하여 검사하였다.

##### ② 시험결과

아이보리색의 투명한 액체로서 이물, 이취 등이 없고 내용물의 성상이 균일하였다.

Lot. No.	시험결과				
	색 조	혼탁도	이물질	이 취	균일성
TPEDK01	-*	-	-	-	균 일
TPEDK02	-	-	-	-	균 일
TPEDK03	-	-	-	-	균 일

\*이상없음

#### (2) 무균시험

##### ① 시험방법

시험백신을 Nutrient agar(NA), Nutrient broth(NB), Fluid thioglycollate medium(Thio)에 각각 2개의 시험관에 접종하여 22℃와 37℃에서 7일간 배양하면서 잡균의 존재 여부를 관찰하였다.

##### ② 시험결과

어떠한 세균의 발육도 관찰할 수 없었다.

Lot. No.	22℃			37℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
TPEDK01	-*	-	-	-	-	-
TPEDK02	-	-	-	-	-	-
TPEDK03	-	-	-	-	-	-

\*세균의 발육이 확인되지 않음

#### (3) 수소이온 농도시험

① 시험방법

간이용 pH 측정법을 이용하여 Lot 별로 간이용 pH 측정법을 이용하여 검사품의 pH를 측정하였다.

② 시험결과

생산된 시험백신 3 Lot 모두 pH 7.0 ~ 8.0 이내에 있었다.

Lot. No.	수소이온 농도(pH)
TPEDK01	7.5
TPEDK02	7.3
TPEDK03	7.3

(4) 방부제 정량시험

① 시험방법

동물약품공정서의 일반시험법 중 ICP 발광분광분석법에 따라 시험하여 Thimerosal을 정량하였다.

② 시험결과

Thimerosal 함량은 0.01% 이하로 확인되었다.

Lot. No.	Thimerosal 함량(%)
TPEDK01	0.0085
TPEDK02	0.0095
TPEDK03	0.0085

(5) 불활화 확인시험

① 시험방법

불활화 된 바이러스 감염배양액을 원심 한 다음 그 상층액을 투석하여 시험품을 Vero세포에 0.1ml씩 각각 접종하고, 대조 세포와 함께 37℃에서 7일간 배양한 후 돼지유행성설사병 바이러스 및 기타 바이러스에 의한 특유의 세포변성효과(CPE)가 나타나는지 확인하였으며, 세포 상층액에서의 적혈구 응집성(HA)을 확인 하였다.

② 시험결과

시험백신 (Lot.No)	배양세포	접종량(ml)	배양온도/시간 (°C/일)	결과	
				CPE	혈구응집
TPEDK01		0.1	37/7	-	-
TPEDK02	Vero세포	0.1	37/7	-	-
TPEDK03		0.1	37/7	-	-
대조	Vero세포	-	37/7	-	-

#### 4. 안전시험

##### (1) 마우스

###### ① 시험방법

시험백신 각 Lot별로 체중 15~20g의 건강한 마우스 8마리씩을 선발하여 복강에 0.5ml씩 각각 접종하고 무처리 대조 2마리와 함께 7일간 임상증상을 관찰하였다.

###### ② 시험결과

관찰기간동안 동안 이상없이 모두 생존하였다.

구분	시험백신 (Lot. No)	접종수	접종경로/접종량(ml)	관찰기간(일)	임상관찰 결과
시험군	TPEDK01	8	IP/0.5	7	생존
	TPEDK02	8	IP/0.5	7	생존
	TPEDK03	8	IP/0.5	7	생존
대조군	-	2	-	7	생존

##### (2) 기니픽

###### ① 시험방법

체중 300~350 g의 기니픽을 그룹별로 4마리를 준비하여, 2마리에는 근육에 2 ml를, 다른 2마리에는 복강에 2 ml를 접종하고 대조군과 함께 7일간 관찰한다.

###### ② 시험결과

관찰기간동안 동안 이상 없이 모두 생존하였다.

구분	시험백신 (Lot. No)	접종수	접종경로/ 접종량(ml)	관찰기간(일)	임상관찰 결과
시험군	TPEDK01	2	IP/2.0	7	생존
		2	IM/2.0	7	생존
	TPEDK02	2	IP/2.0	7	생존
		2	IM/2.0	7	생존
	TPEDK03	2	IP/2.0	7	생존
		2	IM/2.0	7	생존
대조군	-	2	-	7	생존

### (3) 돼지

#### ① 시험방법

체중 8~10 kg(4~6주령)의 건강한 돼지 2마리에 백신의 2두분을 이근부 근육에 접종한 후 접종부작용에 의한 과민반응 여부를 확인하고 21일간 관찰하면서 주사 부위의 화농, 괴사 및 발열, 설사 등 임상증상을 관찰하였다.

#### ② 시험결과

구분	시험백신 (Lot.No)	접종량	두수	관찰 일수	임 상 증 상					
					체온* (°C)	과민 반응	발열	설사	화농	괴사
시험	TPEDK01	4.0ml	2	21	38.7/ 38.9	- **	-	-	-	-
	TPEDK02	4.0ml	2	21	38.6/ 39.2	-	-	-	-	-
	TPEDK03	4.0ml	2	21	38.8/ 39.3	-	-	-	-	-
대조	-	무처치	2	21	38.8/ 39.3	-	-	-	-	-

\*관찰기간동안 체온(최저/최고), \*\*이상없음

## 5. 효능성시험

### ① 시험방법

체중 300~350 g의 기니픽 8마리에 1.0 ml씩 근육 주사하고 3주후에 다시 1.0 ml씩 접종한 후 2주 후에 대조군 2마리와 함께 채혈하여 돼지유행성설사 바이러스에 대하여 중화 항체가를 측정하였다.

### ② 시험결과

3가지의 시험백신 모두 1차 접종 3주후에는 2~16배의 역가를 나타냈으며 2차 접종 2주후에는 8~64배의까지 항체역가가 상승하여 검정기준(8배 이상)을 통과하였다.

구분	시험백신	PED 바이러스 함유량	접종경로/ 접종량(ml)	개체 번호	PEDV 중화 항체가		
					접종전	1차접종 3주 후	2차접종 2주 후
시험군	TPEDK01	$10^{7.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml	IM/1.0	1	<2	8	16
				2	<2	4	8
				3	<2	4	16
				4	<2	4	8
				5	<2	8	8
				6	<2	16	16
				7	<2	4	8
				8	<2	4	8
	TPEDK02	$10^{7.2}$ TCID <sub>50</sub> /ml	IM/1.0	1	<2	4	8
				2	<2	2	8
				3	<2	8	64
				4	<2	4	16
				5	<2	4	8
				6	<2	4	16
				7	<2	8	16
				8	<2	4	8
	TPEDK03	$10^{7.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml	IM/1.0	1	<2	16	32
				2	<2	8	16
				3	<2	4	16
				4	<2	4	8
				5	<2	8	16
				6	<2	4	8
				7	<2	8	8
				8	<2	8	16
대조군	-	-	무처리	1	<2	<2	<2
				2	<2	<2	<2
				3	<2	<2	<2
				4	<2	<2	<2

## 6. 야외농장시험 (야외임상시험)

야외농장에서의 대규모 사용에 의한 안정성 확인과 효능을 확인하기 위하여 3개의 농장을 시험농장을 선정하였으며, 아래와 같이 시험하였다.

(1) 제1농장

(가) 농장개요

농장명	세부내역	사육규모
충무농장	농장주: 박 영 서 주 소: 충남 천안시 병천면 관성2리 765번지 전화번호: 041-553-2282	모돈(후보돈 포함) 230두 자돈(비육돈 포함) 2,070두

(나) 농장 세부사항

① 최근 병력현황

구 분	세부사항
임산·분만사	<input type="checkbox"/> 수정율: 88% <input type="checkbox"/> 분만율: 85% <input type="checkbox"/> 평균산자수: 10.2두 <input type="checkbox"/> 평균이유두수: 9.6두 <input type="checkbox"/> 분만성적 및 이유성적 모두 정상적이었으며, 모돈의 몸에 약간의 옴이 관찰됨.
자돈사	<input type="checkbox"/> 평균폐사율 - 1%
육성·비육사	<input type="checkbox"/> 평균폐사율 - 2% <input type="checkbox"/> 농장의 가장 문제화 되고 있는 구간으로 흉막폐렴으로 인한 폐사율이 다른 농장에 비하여 높게 나타나고 있는 상태임. 농장의 항생제 감수성결과 항생제(아목사실린)로 클리닝 하였음.

② 시험백신 사용 전·후 농장 현황

구 분	세부사항
시험백신 사용전	<input type="checkbox"/> PED의 병력이 없었음.
시험백신 사용후	<input type="checkbox"/> PED의 병력이 없었음. <input type="checkbox"/> 분만성적 및 이유성적 모두 시험백신 사용전과 크게 변화 하지 않았음.

③ 모돈 백신접종 프로그램

구 분	세부사항
종부 2주 전	<input type="checkbox"/> 돼지 Parvo 불활화 백신 <input type="checkbox"/> 돈단독 생균백신
종부 4~5주 전	<input type="checkbox"/> PED 생독백신 <input type="checkbox"/> AR, Pm, App. 불활화 혼합백신 <input type="checkbox"/> TGE-Rota 혼합 생독백신
분만 2~3주 전	<input type="checkbox"/> 대장균 불활화백신 <input type="checkbox"/> AR, Pm, App. 불활화 혼합백신

(다) 임신돈에 대한 안전성시험

시험 모든 13두(시험10두, 대조3두)를 선정하여 모든 10두에 시험 백신을 분만 5주전에 1두분(3.0ml)씩을 이근부 근육에 각각 접종하고 분만 2주전에 1두분을 추가 접종한 후 무처치 대조군 3마리와 함께 분만 시까지의 임상증상 및 평균 산자수, 유·사산, 허약자돈수 등 임상관찰을 실시하였던 바, 임신돈(13두) 모두 임상증상(과민반응, 접종부위의 부종 및 화농, 설사, 폐사 등)이 관찰되지 않았으며, 체온도 38.6~39.3℃로 정상을 유지하였다. 시험 모든 13두에 대한 평균 산자수도 시험군에서 복당 10.2두, 대조군에서는 10.3두로 평균 10.25두로서 최근 6개월간 농장에서 분만한 평균 산자수와 거의 일치 하였으며, 유·사산 및 허약자돈이 없어 임신돈에 대한 시험 백신의 안전성이 인정되었다.

시험 백신 Lot. No	접종방법/ 접종부위/ 접종량	임신 두수	평균 산자수	유·사산	허약 자돈	임 상 증 상				
						체온 (℃)	과민 반응	화농	설사	폐사
1	1차 : 분만5주전, 2차 : 분만2주전/ 이근부 근육/ 1두분(3.0ml)	10	10.2	-	-	38.6 ~ 39.3	-	-	-	-
대조	무처치	3	10.3	-	-	38.6 ~ 39.2	-	-	-	-

(라) 임신모돈에 대한 면역원성시험

시험백신을 임신모돈 13두(시험10두, 대조 3두)를 선정하여 시험모돈 10두에는 분만 5주전, 분만 2주전에 1두분(3.0ml)씩 이근부 근육에 각각 접종 하였다. 분만 직후 시험 모든 10두와 무처치 대조 3마리와 함께 채혈하여 돼지 유행성설사병 바이러스에 대한 중화항체를 측정 한 결과, 시험 모든의 돼지 유행성설사병 바이러스에 대한 항체가는 접종 전 <2~4배, 분만 직후에는 16~64배 이었으며, 무처치 대조군에서는 접종 전 항체가를 유지하였다.

시험백신 (Lot. No.)	접종방법/접종부위/ 접종량	임신돈 번호	PEDV 중화항체가	
			접종전	분만직후
1	1차 : 분만5주전 2차 : 분만2주전 / 이근부 근육 / 1두분(3.0ml)	1	2	16
		2	2	16
		3	2	16
		4	2	16
		5	2	32
		6	4	64
		7	<2	32
		8	<2	16
		9	<2	16
		10	4	64
대조	무처치	1	<2	<2
		2	<2	<2
		3	4	4

(2) 제2농장

(가) 농장개요

농장명	세부내역	사육규모
부대농장	농장주: 이 성 휘 주 소: 충남 천안시 부대동 90번지 전화번호 : 041-563-9989	모돈(후보돈 포함) 200두 자돈(비육돈 포함) 1,800두

(2) 농장 세부사항

① 최근 병력현황

구 분	세부사항
임신·분만사	<input type="checkbox"/> 수정율 - 83% <input type="checkbox"/> 분만율 - 80% <input type="checkbox"/> 평균산자수 - 9.9두 <input type="checkbox"/> 평균이유두수 - 9.2두 <input type="checkbox"/> 수정율이 조금 낮은편이며, 모돈의 영양상태가 전체적으로 좋지 않음. 포유중인 모돈의 유방염도 많이 관찰됨. <input type="checkbox"/> 유방염을 가지고 있으면서 노산차인 모돈을 위주로 하여 모돈교체를 실행하고 있음.
자돈사	<input type="checkbox"/> 평균폐사율 - 4.5% <input type="checkbox"/> 자돈사의 지속적인 설사가 문제화 되고 있었으며, 따라서 지속적으로 바이오락을 꾸준히 먹이고 있음.
육성·비육사	<input type="checkbox"/> 평균폐사율 - 1% 이하 <input type="checkbox"/> 육성, 비육사에서는 큰 문제 없이 성장하고 있으며, 출하시 위축되어 출하되지 못하는 돼지가 5% 이내로 관찰됨

② 시험백신 사용 전·후 농장 현황

구 분	세부사항
시험백신 사용전	<input type="checkbox"/> TGE 및 PED의 병력이 없었음.
시험백신 사용후	<input type="checkbox"/> TGE 및 PED의 병력이 없었음. <input type="checkbox"/> 시험백신 접종 모돈에서 분만된 자돈의 크기가 시험백신 비접종군에 비해 약간 큼.

③ 모든 백신접종 프로그램

구 분	세부사항
종부 2주 전	<input type="checkbox"/> 돼지 Parvo 불활화 백신 <input type="checkbox"/> 돈단독 생균백신
종부 4~5주 전	<input type="checkbox"/> PED 생독백신 <input type="checkbox"/> AR, Pm, App. 불활화 혼합백신 <input type="checkbox"/> TGE-Rota 혼합 생독백신
분만 2~3주 전	<input type="checkbox"/> 대장균 불활화백신 <input type="checkbox"/> AR, Pm, App. 불활화 혼합백신

(다) 임신돈에 대한 안전성시험

시험 모든 13두(시험10두, 대조3두)를 선정하여 모든 10두에 시험 백신을 분만 5주전에 1두분(3.0ml)씩을 이근부 근육에 각각 접종하고 분만 2주전에 1두분을 추가 접종한 후 무처치 대조군 3마리와 함께 분만 시까지의 임상증상 및 평균 산자수, 유·사산, 허약자돈수 등 임상관찰을 실시하였던 바, 임신돈(13두) 모두 임상증상(과민반응, 접종부위의 부종 및 화농, 설사, 폐사 등)이 관찰되지 않았으며, 체온도 38.6~39.5℃로 정상유지하였다. 시험 모든 13두에 대한 평균 산자수도 시험군에서 복당 10.4두, 대조군에서는 10.3두로 평균 10.35두로서 최근 6개월간 농장에서 분만한 평균 산자수와 거의 일치 하였으며, 유·사산 및 허약자돈이 없어 임신돈에 대한 시험 백신의 안전성이 인정되었다.

시험 백신 Lot. No	접종방법/ 접종부위/ 접종량	임신 두수	평균 산자수	유·사산	허약 자돈	임 상 증 상				
						체온 (℃)	과민 반응	화농	설사	폐사
2	1차 : 분만5주전, 2차 : 분만2주전 / 이근부 근육 / 1두분(3.0ml)	10	10.4	-	-	38.6 ~39.5	-	-	-	-
대조	무처치	3	10.3	-	-	38.8 ~39.3	-	-	-	-

-: 없음

(라) 임신모돈에 대한 면역원성 시험

시험백신을 임신모돈 13두(시험10두, 대조 3두)를 선정하여 시험모돈 10두에는 분만 5주전, 분만 2주전에 1두분(3.0ml)씩 이근부 근육에 각각 접종 하였다. 분만 직후 시험 모든 10두와 무처치 대조 3마리와 함께 채혈하여 돼지 유행성설사병 바이러스에 대한 중화항체가를 측정 한 결과, 시험 모든의 돼지 유행성설사병 바이러스에 대한 항체가는 접종 전 <2~4배, 분만 직후

에는 16~64배 이었으며 무처치 대조군에서는 접종 전 항체를 각각 유지하였다.

시험백신 (Lot. No.)	접종방법/접종부위/ 접종량	임신돈 번호	PEDV 중화항체가	
			접종전	분만직후
2	1차 : 분만5주전 2차 : 분만2주전 / 이근부 근육 / 1두분(3.0ml)	1	<2	16
		2	<2	16
		3	<2	16
		4	4	16
		5	<2	32
		6	2	16
		7	<2	16
		8	<2	16
		9	4	64
		10	2	16
대조	무처치	1	4	2
		2	<2	<2
		3	2	2

### (3) 제3농장

#### (가) 농장개요

농장명	세부내역	사육규모
정화농장	농장주: 김 대 봉 주 소: 충북 청원군 남이면 석판리 45번지 전화번호: 041-563-9989	모돈(후보돈 포함) 200두 자돈(비육돈 포함) 1,800두

#### (나) 농장 세부사항

구 분	세부사항
임신·분만사	<input type="checkbox"/> 수정율 - 90% <input type="checkbox"/> 분만율 - 89% <input type="checkbox"/> 평균산자수 - 10.9두 <input type="checkbox"/> 평균이유두수 - 9.6두 <input type="checkbox"/> 정율 및 분만율은 정상이상으로 유지되고 있었으나, 분만사의 자돈들이 신경증상, 관절염, 삼출성표피염, 대장균성설사 등으로 인하여 포유자돈의 폐사율이 높은 편임.
자돈사	<input type="checkbox"/> 평균폐사율 - 3% <input type="checkbox"/> 환돈방의 부재로 인한 환돈들의 관리부족으로 인한 폐사율이 높게 나타나고 있었음.
육성·비육사	<input type="checkbox"/> 평균폐사율 - 1% 이하 <input type="checkbox"/> 육성, 비육사에서는 큰 문제 없이 성장하고 있음.

(다) 임신돈에 대한 안전성시험

시험 모든 13두(시험10두, 대조3두)를 선정하여 모든 10두에 시험 백신을 분만 5주전에 1두분(3.0ml)씩을 이근부 근육에 각각 접종하고 분만 2주전에 1두분을 추가 접종한 후 무처치 대조군 3마리와 함께 분만 시까지의 임상증상 및 평균 산자수, 유·사산, 허약자돈수 등 임상관찰을 실시하였던 바, 임신돈(13두) 모두 임상증상(과민반응, 접종부위의 부종 및 화농, 설사, 폐사 등)이 관찰되지 않았으며, 체온도 38.6~39.4℃로 정상을 유지하였다. 시험 모든 13두에 대한 평균 산자수도 시험군에서 복당 10.2두, 대조군에서는 10.3두로 평균 10.25두로서 최근 6개월간 농장에서 분만한 평균 산자수와 거의 일치 하였으며, 유·사산 및 허약자돈이 없어 임신돈에 대한 시험 백신의 안전성이 인정되었다.

시험 백신 Lot. No	접종방법/ 접종부위/ 접종량	임신 두수	평균 산자수	유·사산	허약 자돈	임 상 증 상				
						체온 (℃)	과민 반응	화농	설사	폐사
3	1차 : 분만5주전, 2차 : 분만2주전/ 이근부 근육/ 1두분(3.0ml)	10	10.2	-	-	38.6 ~39.4	-	-	-	-
대조	무처치	3	10.3	-	-	38.8 ~39.3	-	-	-	-

(라) 임신돈에 대한 면역원성 시험

시험백신을 임신모돈 13두(시험10두, 대조 3두)를 선정하여 시험모돈 10두에는 분만 5주전, 분만 2주전에 1두분(3.0ml)씩 이근부 근육에 각각 접종 하였다. 분만 직후 시험 모든 10두와 무처치 대조 3마리와 함께 채혈하여 돼지 유행성설사병 바이러스에 대한 중화항체를 측정 한 결과, 시험 모든의 돼지 유행성설사병 바이러스에 대한 항체는 접종 전 <2~2배, 분만 직후에는 16~64배 이었으며, 무처치 대조군에서는 접종 전 항체를 각각 유지하였다.

시험백신 (Lot. No.)	접종방법/접종부위/ 접종량	임신돈 번호	PEDV 중화항체가	
			접종전	분만직후
3	1차 : 분만5주전 2차 : 분만2주전 / 이근부 근육 / 1두분(3.0ml)	1	2	16
		2	<2	16
		3	<2	16
		4	<2	32
		5	<2	16
		6	<2	16
		7	2	64
		8	<2	16
		9	<2	32
		10	2	32
대조	무처치	1	4	2
		2	<2	<2
		3	4	4

#### (4) 임상시험 결과

- ① 3개 농장 야외실증 안전시험에서 시험백신을 접종한 임신모돈 39두(시험 30두, 대조 9두)에 대한 안전성시험 결과 임상증상 없이 생존 내과하였으며, 체온도 38.6~39.5℃로 정상을 유지하였다. 또한, 유·사산 없이 정상 분만하였고 평균 산자수는 최근 해당 농장 6개월간의 산자수와 거의 동일한 수준으로서 임신 모돈에 대한 시험백신의 안전성이 인정되었다.
- ② 시험 백신의 임신 모돈에 대한 면역원성 시험에서 돼지 유행성설사병 바이러스에 대한 항체는 접종 전 <2~4배, 분만 직후에는 16~64배 이었으며, 무처치 대조군에서는 접종 전 항체가를 각각 유지하여 시험백신의 면역원성이 인정되었다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구는 우선적으로 많은 백신에도 불구하고 아직까지 매년 발생하고 있는 돼지 유행성설사병의 발병 이유를 분석하고자 현재 사용되고 있는 백신 strain과 농장에서 발병하고 있는 wild type과의 유전자 비교 결과 현재 wild type strain들이 변화하고 있음을 증명함으로써 새로운 백신 균주의 준비에 대한 기초 자료를 공급했다. 이는 blind하게 pass 되고 있는 돼지 유행성설사병 백신 균주의 검증과 또한 보다 효율적인 백신 균주의 개발에 대한 기초자료라고 평가된다. 특히나 많은 백신의 노력에도 불구하고 매년 양돈 농가에서의 경제적 피해를 유발하는 돼지 유행성설사병 바이러스에 대한 많은 기초 연구 자료를 획득 할 수 있었으며, 야외 균주 확보를 통한 새로운 백신 개발에 노력하였다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 SCI 논문 발표 및 해외 학회에서의 연구 결과를 발표한 실적을 이루었다. 또한 학문 분야에서 뿐 아니라 실제 양돈 농가와 밀접한 연관이 있는 양돈 수의사들과의 지속적인 연구 결과를 바탕으로한 논의를 통하여 실제 농가에서의 적용 범위와 문제점 해결을 위하여 노력하였다.

야외 균주의 분리가 이루어져 이들의 특성 분석 및 여러 가지 돼지 유행성설사병바이러스에 대한 많은 연구 결과를 획득했다고 평가된다. 또한 돼지 유행성설사병 바이러스에 대한 monoclonal antibody를 활용한 진단 kit의 개발이 성공적으로 이루어져 상품 등록을 실시하였고, 그 이외에 돼지 유행성설사병 바이러스의 receptor protein에 대한 추가적인 연구 결과를 바탕으로 이를 활용한 새로운 백신 개발의 기초 자료 또한 마련했다는 점에서 연구 결과에 대한 높은 평가를 기대한다.

이 이외에 본 연구진들이 이룩한 기초 및 응용 연구 결과를 바탕으로 추가적인 백신 개발 노력 또한 연구 진행 중이며, 동물 실험 단계에 있다. 이러한 신기술에 의한 백신의 개발로 다량의 백신에도 불구하고 아직까지 양돈 농장에서 심각한 문제를 야기하고 있는 돼지 유행

성설사병에 대한 효과적인 예방법을 적용함으로써, 양돈 농장 및 국내 축산업, 또한 사료 업계에도 상당한 파급 효과를 높일 수 있으리라 기대된다. 또한 이러한 신기술을 이용한 방법을 이용하여 현재 양돈, 양계 산업에 영향을 미치고 있는 다른 질병 등의 예방법에 대해서도 연구함으로써, 우리나라 축산업에 상당한 기여를 할 수 있으리라 기대된다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1. 기대성과-기술적 측면

현재 우리나라 행해지고 있는 PEDV에 대한 백신 프로그램은 일반적으로 모돈으로 부터의 모체 항체를 유도하는 방법을 사용하고 있다. 종부 전 및 분만 전에 백신을 접종하여 항체의 형성을 유발하고 이렇게 유발된 모체 항체가 어린 포유자돈으로 이행되는 시스템을 택하고 있다. PED의 질병 특성상 백신 항체가 유발되기 전의 어린 포유자돈에서 일반적으로 이 질병이 발생하기 때문에 모체 항체에 의존하는 방법을 사용하고 있다. 앞에서 언급한대로 꾸준한 백신의 노력에도 불구하고 PED는 아직까지 우리나라 양돈 농가에서 매년 피해를 입히고 있는 제2종 법정 전염병이다. 본 연구진들의 선행 연구 결과에 따르면 백신주와 현재 질병을 유발하고 있는 야외주 사이에 상당한 유전자적 상이성이 발견되고 있다. 이러한 문제점을 해결하는 가장 효율적인 방법은 현재 질병을 유발하고 있는 야외주와 유전자형과 항원성이 비슷한 새로운 야외주를 분리하여 백신주를 확보하는 방법일 것이지만, 이 바이러스의 분리가 매우 어렵다고 알려져 있어서 어려움을 겪고 있다. 또한 야외주의 부재로 인해 질병 유발 challenge strain이 없기 때문에, 현재 시판되고 있는 백신들의 효율성을 검증할 방법이 없는 현실이다.

본 연구진들에 의해 추진된 연구결과는 기존의 방식인 Vero cell을 사용하지 않고 이제까지의 오랜 경험과 전문성을 살려서 아직까지 시도되지 않았던 새로운 방식인 돼지 초대배양 세포주를 이용한 분리법을 확립하고 이를 이용하여 야외주 분리를 시도하여 유전자형과 항원성이 비슷한 구조를 가진 새로운 백신주를 이용한 효율성이 높은 백신은 기술적인 측면에서 여러 가지 기대성과를 가지게 된다. 첫째로 이제까지 확립되지 않은 새로운 PEDV 분리법의 확립이다. 이는 거의 불가능하거나 매우 어렵다고 여겨지던 PEDV 분리 방법에 새로운 기술적 제안이 될 것이다. 선행 연구에서 보듯이 이 바이러스의 유전자는 매우 빠르고 다양하게 변화하고 있다. 이러한 이 바이러스의 특성상 유전자형이 변화함에 따라서 새로운 백신주의 개발이 꾸준히 요구될 것으로 생각된다. 이러한 문제점을 해결할 수 있는 새로운 분리법의 확립은 효율적인 PED 백신 개발 기술의 확립이라고 할 수 있을 것이다. 둘째로 본 연구진들이 확립하고자 하는 돼지 초대배양 세포주를 이용하면 단순한 PEDV 분리 뿐 아니라 다른 돼지에서의 전염성 질환 원인체 등을 분리한다거나 백신을 개발하거나, 과학적인 연구를 수행함에 있어서

기본적인 매체로 작용할 것이라고 확신하며 이러한 기술의 발전으로 수의학 분야 연구에 이바지 할 것으로 기대된다.

## 2. 기대성과-경제 · 산업적 측면

본 연구진들이 추진하고자 하는 PED에 대한 다양한 접근법으로 인한 백신 개발 연구, 즉 돼지 초대배양 세포주의 확보 및 이를 이용한 새로운 PEDV 분리법 확립, 중화항체 유도부위와 receptor protein을 이용한 유전자 백신 개발, PEDV 백신의 효율성 검사 kit 개발, 이 모든 것을 포함하는 효율적인 백신의 개발 등을 이용하여 지금 시판 되는 백신의 문제점을 해결하는 새로운 백신의 개발로 아직까지 많은 양돈 농가에 경제적 피해를 입히고 있는 제2종 법정 전염병인 돼지 유행성 설사병의 정확한 진단과 효율적인 예방법을 확립함으로써 양돈 농가의 피해를 최소화 할 것으로 기대되며, 또한 이러한 효율적인 백신의 산업화를 통하여 백신 회사의 매출 증대에 적극 활용될 것으로 기대된다.

## 3. 활용방안

최우선적으로 새로이 분리된 야외주를 이용한 효율적인 백신의 사업화이다. 협력과제 책임자 이면서 참여기업인 (주)중앙백신 연구소는 우리나라 동물 백신 업계의 선두 주자중 하나로써 이제까지 많은 동물 백신에 대한 꾸준한 연구 개발로 우리나라 축산 및 수의 업계에 많은 공헌을 해 오는 회사로서 이번에 새로이 분리될 PEDV 야외주를 이용한 효율적인 백신의 개발로 사업화를 추진하고 기존의 국내 및 해외 영업망을 이용하여 효율적인 PED 백신의 매출을 극대화 할 것이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 7 장 참고문헌

1. Anderson, H.A., Chen, Y., Norkin, L.C., 1996. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol. Viol. Cell* 7, 1825-1834
2. Benbacer, L., Kut, E., Besnardeau, L., Laude, H., Delmas, B., 1997. Interspecies aminopeptidase-N chimeras reveal species-specific receptor recognition by canine coronavirus, feline infectious peritonitis virus, and transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* 71, 734-737

3. Blumenthal, R., Gallo, S.A., Viard, M., Raviv, Y., Puri, A., 2002. Fluorescent lipid probes in the study of viral membrane fusion. *Chem. Phys. Lipids* 116, 39-55
4. Brodsky, F.M., Chen, C., Knuehl, C., Towler, M.C., Wakeham, D.E., 2001. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 517 - 568
5. Choi, K.S., Aizaki, H., Lai, M.M., 2005. Murine coronavirus requires lipid rafts for virus entry and cell-cell fusion but not for virus release. *J. Virol.* 79, 9862 - 9871
6. Cruz, D.J.M., Shin, H.J., 2007. Application of a focus formation assay for detection and titration of porcine epidemic diarrhea virus. *J. Virol. Meth.* 145, 56 - 61
7. Debouck, P., Pensaert, M., 1980. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus CV777. *Am. J. Vet. Res.* 41, 219 - 223
8. Eifart, P., Ludwig, K., Böttcher, C., de Haan, C.A., Rottier, P.J., Korte, T., Herrmann, A., 2007. The role of endocytosis and low pH in cell entry of the murine hepatitis virus strain MHV-A59. *J. Virol.* 81, 10758 - 10768
9. Gonsalez, J.M., Gomez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A.E., Enjuanes, L., 2003. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Arch. Virol.* 148, 2207-2235
10. Hamme, E.V., Dewerchin, H.L., Cornelissen, E., Verhasselt, B., Nauwynck, H.J., 2008. Clathrin- and caveolae-independent entry of feline infectious peritonitis virus in monocytes depends on dynamin. *J. Gen. Virol.* 89, 2147-2156
11. Hansen, G.H., Delmas, B., Besnardeau, L., Vogel, L.K., Laude, H., Sjöström H., Norén, O., 1998. The coronavirus transmissible gastroenteritis virus causes infection after receptor-mediated endocytosis and acid-dependent fusion with an intracellular compartment. *J. Virol.* 72, 527 - 534
12. Hofmann, H., Pyrc, K., Hoek, L.V.D., Geier, M., Berkhout, B., Pöhlmann, S., 2005. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 7988 - 7993
13. Hofmann, M., Wyler, R., 1988. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2235-2239
14. Huang, I.C., Bosch, B.J., Li, F., Li, W., Lee, K.H., Ghiran, S., Vasilieva, N., Dermody, T.S., Harrison, S.C., Dormitzer, P.R., Farzan, M., Rottier, P.J., Choe, H., 2006. SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect

ACE2-expressing cells. *J. Biol. Chem.* 281, 3198 - 3203

15. Inoue, Y., Tanaka, N., Tanaka, Y., Inoue, S., Morita, K., Zhuang, M., Hattori, T., Sugamura, K., 2007. Clathrin-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into target cells expressing ACE2 with the cytoplasmic tail detected. *J. Virol.* 81, 8722 - 8729
16. Kadoi, K., Sugioka, H., Satoh, T., Kadoi, B.K., 2002. The propagation of a porcine epidemic diarrhea virus in swine cell lines. *New Microbiol.* 25, 285 - 290
17. Kawase, M., K. Shirato, S. Matsuyama, and F. Taguchi. 2009. Protease-mediated entry via the endosome of human coronavirus 229E. *J. Virol.* 83:712 - 721.
18. Kooi, C., M. Cervin, and R. Anderson. 1991. Differentiation of acid-ph-dependent and -nondependent entry pathways for mouse hepatitis virus. *Virology* 180:108 - 119.
19. Koopmans, M., and M. C. Horzinek. 1994. Toroviruses of animals and humans: a review. *Adv. Virus Res.* 43:233-273.
20. Kusanagi, K., H. Kuwahara, T. Katoh, T. Nunoya, Y. Ishikawa, T. Samejima, and M. Tajima. 1992. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *J. Vet. Med. Sci.* 54:313 - 318.
21. Lai, M. M., and D. Cavanagh. 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 48:1-100.
22. Li, B. X., J. W. Ge, and Y. J. Li. 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for PEDV coronavirus. *Virology* 365:166 - 172.
23. Li, W., M. J. Moore, N. Vasilieva, J. Sui, S. K. Wong, M. A. Berne, M. Somasundaran, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga, T. C. Greenough, H. Choe, and M. Farzan. 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426:450-454.
24. Matlin, K. S., H. Reggio, A. Helenius, and K. Simons. 1981. Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J. Cell Biol.* 91:601-613.
25. Matsuyama, S., and F. Taguchi. 2002. Receptor-induced conformational changes of murine coronavirus spike protein. *J. Virol.* 76:11819 - 11826.
26. Matsuyama, S., M. Ujike, S. Morikawa, M. Tashiro, and F. Taguchi. 2005. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:12543 - 12547.
27. Matveev, S., X. Li, W. Everson, and E. J. Smart. 2001. The role of caveolae and

- caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 49:237 - 250.
28. Nash, T. C., and M. J. Buchmeier. 1997. Entry of mouse hepatitis virus into cells by endosomal and nonendosomal pathways. *Virology* 233:1 - 8.
  29. Nichols, B. J. 2002. A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 4:374-378.
  30. Nichols, B. J., A. K. Kenworthy, R. S. Polishchuk, R. Lodge, T. H. Roberts, K. Hirschberg, R. D. Phair, and J. Lippincott-Schwartz. 2001. Rapid recycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J. Cell Biol.* 153:529-541.
  31. Nomura, R., A. Kiyota, E. Suzaki, K. Kataoka, Y. Ohe, K. Miyamoto, T. Senda, and T. Fujimoto. 2004. Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *J. Virol.* 78:8701 - 8708.
  32. Oh, J. S., D. S. Song, and B. K. Park. 2003. Identification of a putative cellular receptor 150 kDa polypeptide for porcine epidemic diarrhea virus in porcine enterocytes. *J. Vet. Sci.* 4:269 - 275.
  33. Park, S. J., H. J. Moon, J. S. Yang, C. S. Lee, D. S. Song, B. K. Kang, and B. K. Park. 2007. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *Virus Genes* 35:321 - 332.
  34. Payne, H. R., J. Storz, and W. G. Henk. 1990. Initial events in bovine coronavirus infection: analysis through immunogold probes and lysosomotropic inhibitors. *Arch. Virol.* 114:175 - 189.
  35. Pelkmans, L., and A. Helenius. 2002. Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3:311 - 320.
  36. Pelkmans, L., and A. Helenius. 2003. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:414-422.
  37. Pietiäinen, V., V. Marjomäki, P. Upla, L. Pelkmans, A. Helenius, and T. Hyypiä. 2004. Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Mol. Biol. Cell* 15:4911 - 4925.
  38. Qiu, Z., S. T. Hingley, G. Simmons, C. Yu, J. Das Sarma, P. Bates, and S. R. Weiss. 2006. Endosomal proteolysis by cathepsins is necessary for murine coronavirus mouse hepatitis virus type 2 spike-mediated entry. *J. Virol.* 80:5768-5776.
  39. Regan, A. D., R. Shraybman, R. D. Cohen, and G. R. Whittaker. 2008. Differential role for low pH and cathepsin-mediated cleavage of the viral spike protein during entry

- of serotype II feline coronaviruses. *Vet. Microbiol.* 132:235 - 248.
40. Rothenberger, S., B. J. Iacopetta, and L. C. Kuhn. 1998. Endocytosis of the transferrin receptor requires the cytoplasmic domain but not its phosphorylation site. *Cell* 49:423-431.
  41. Savarino, A., J. R. Boelaert, A. Cassone, G. Majori, and R. Cauda. 2003. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *Lancet Infect. Dis.* 3:722 - 727.
  42. Simmons, G., D. N. Gosalia, A. J. Rennekamp, J. D. Reeves, S. L. Diamond, and P. Bates. 2005. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:11876 - 11881.
  43. Smith, A. E., and A. Helenius. 2004. How viruses enter animal cells. *Science* 304:237-242.
  44. Spaan, W., D. Cavanagh, and M. C. Horzinek. 1988. Coronaviruses: structure and genome expression. *J. Gen. Virol.* 69:2939 - 2952.
  45. Tan, K., B. D. Zelus, R. Meijers, J. H. Liu, J. M. Bergelson, N. Duke, R. Zhang, A. Joachimiak, K. V. Holmes, and J. H. Wang. 2002. Crystal structure of murine sCEACAM1a[1, 4]: a coronavirus receptor in the CEA family. *EMBO J.* 21:2076-2086.
  46. Thorp, E. B., and T. M. Gallagher. 2004. Requirements for CEACAMs and cholesterol during murine coronavirus cell entry. *J. Virol.* 78:2682 - 2692.
  47. Takano T., Y. Katada, S. Moritoh, M. Ogasawara, K. Satoh, R. Satoh, M. Tanabe, and T. Hohdatsu. 2008. Analysis of the mechanism of antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection: aminopeptidase N is not important and a process of acidification of the endosome is necessary. *J. Gen. Virol.* 89:1025 - 1029.
  48. Tresnan, D. B., R. Levis, and K. V. Holmes. 1996. Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine and human coronaviruses in serogroup I. *J. Virol.* 70:8669 - 8674.
  49. Turk, B., I. Dolenc, B. Lenarcic, I. Krizaj, V. Turk, J. G. Bieth, and I. Björk. 1999. Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity. *Eur. J. Biochem.* 259:926 - 932.
  50. Tusell, S. M., S. A. Schittone, and K. V. Holmes. 2007. Mutational analysis of aminopeptidase N, a receptor for several group 1 coronaviruses, identifies key determinants of viral host range. *J. Virol.* 81:1261 - 1273.

51. Van Hamme, E., H. L. Dewerchin, E. Cornelissen, B. Verhasselt, and H. J. Nauwynck. 2008. Clathrin- and caveolae-independent entry of feline infectious peritonitis virus in monocytes depends on dynamin. *J. Gen. Virol.* 89:2147 - 2156.
52. Wang, H., P. Yang, K. Liu, F. Guo, Y. Zhang, G. Zhang, and C. Jiang. 2008. SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway. *Cell Res.* 18:290 - 301.
53. Yang, Z. Y., Y. Huang, L. Ganesh, K. Leung, W. P. Kong, O. Schwartz, K. Subbarao, and G. J. Nabel. 2004. pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by the dendritic cell transfer through DC-SIGN. *J. Virol.* 78:5642 - 5650.
54. Bundo-Morita, C., Torres, A.K., Chanyasanha, C., May La Linn, Igarashi, A., 1986. Antibody response in Japanese encephalitis and dengue hemorrhagic fever patients measured by indirect ELISA. *Trop. Med.* 28, 101 - 114.
55. Buratti, E., Tisminetzky S.G., d'Agaro, P., Baralle, F.E., 1997. A neutralizing monoclonal antibody previously mapped exclusively on Human Immunodeficiency Virus type 1 gp41 recognizes an epitope in p17 sharing the core sequence IEEE. *J. Virol.* 71, 2457 - 2462.
56. Cavanagh, D., 1995. The coronavirus surface glycoprotein, in: Siddell, S.G. (Ed.), *The Coronaviridae*, Plenum Press, New York, pp.73-113.
57. Chae, C., Kim, O., Choi, C., Min K., Cho, W.S., Kim, J., Tai, J.H., 2000. Prevalence of porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs. *Vet. Rec.* 147, 606-608.
58. Chang, S.H., Bae, J.L., Kang, T.J., Kim, J., Chung, G.H., Lim, C.W., Laude, H., Yang, M.S., Jang, Y.S., 2002. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus. *Mol. Cells* 14, 295-299.
59. Cruz, D.J.M., Kim, C.J., Shin, H.J., 2006. Phage-displayed peptides having similarities with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) neutralizing epitopes. *Virology* 354, 28 - 34.
60. Delmas, B., Laude, H., 1990. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J. Virol.* 64, 536 - 537.
61. Delmas, B., Laude, H., 1994. Sequence of the spike protein of porcine epidemic diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.* 75, 1195 - 1200.

62. Ducatelle, R., Coussement, W., Charlier, G., DeBouck, P., Hoorens, J., 1981. Three-dimensional sequential study of the intestinal surface of experimental porcine CV777 coronavirus enteritis. *J. Vet. Med.* 28, 483 - 493.
63. Gallagher, T.M., Buchmeier, M.J., 2001. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* 279, 371 - 374.
64. Godeke, G.J., de Haan, C.A.M., Rossen, J.W.A., Vennema, H., Rottier, P.J.M., 2000. Assembly of spikes into coronavirus particles is mediated by the carboxy-terminal domain of the spike protein. *J. Virol.* 74, 1566-1571.
65. Hofmann, M., Wyler, R., 1988. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2235-2239.
66. Kang, T.J., Han, S.C., Yang, S.Y., Jang, Y.S., 2006. Expression of synthetic neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus fused with synthetic B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco plants. *Prot. Exp. Purif.* 46, 16 - 22.
67. Kweon, C.H., Kwon, B.J., Lee, J.G., Kwon, G.O., Kang, Y.B., 1999. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Vaccine* 17, 2546-2553.
68. Okuno, Y., Fukunaga, T., Tadano, M., Okamoto, Y., Ohnishi, T., Takagi, M., 1985. Rapid focus reduction neutralization test of Japanese encephalitis virus in microtiter system. *Arch. Virol.* 86, 129 - 135.
69. Song, D.S., Yang, J.S., Oh, J.S., Han, J.H., Park, B.K., 2003. Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF3. *Vaccine* 21, 1833 - 1842.
70. Ye, R., Montalto-Morrison, C., Masters, P. S., 2004. Genetic analysis of determinants for spike glycoprotein assembly into murine coronavirus virions: distinct roles for charge-rich and cysteine-rich regions of the endodomain. *J. Virol.* 78, 9904 - 9917.
71. Yoo, D.W., Parker, M.D., Babiuk, L. A., 1991. The S2 subunit of the spike glycoprotein of bovine coronavirus mediates membrane fusion in insect cells. *Virology* 180, 395 - 399.

## 주 의

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