발 간 등 록 번 호
11-1541000-000866-01

특이난황항체를 이용한 뉴캣슬병 및 조류인플루엔자 예방 사료 첨가제제 개발

(Development of functional feed additives using specific antibodies of newcastle disease virus and avian influenza virus)

(주)애드바이오텍

농림수산식품자료실

0002104

농 림 수 산 식 품 부

20.7
239ㅌ
2011-87

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “특이 난황항체를 이용한 뉴캣슬병 및 조류인플루엔자 예방 사료 첨가제제 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011 년 9 월 2 일

주관연구기관명 : (주)애드바이오텍
주관연구책임자 : 임 환
연 구 원 : 박 정 금
연 구 원 : 백 두 연
연 구 원 : 성 지 현
연 구 원 : 권 혁 세
연 구 원 : 김 보 미
연 구 원 : 한 선 미
연 구 원 : 원 미 경
위탁연구기관명 : 강원대학교
위탁연구책임자 : 성 환 우
위탁연구기관명 : 강원도 가축위생시험소
위탁연구책임자 : 이 호 원

요 약 문

Ⅰ. 제 목

특이 난황항체를 이용한 뉴캣슬병 및 조류인플루엔자 예방 사료 첨가제제 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

뉴캣슬병과 조류인플루엔자는 국내 양계산업에서 경제적 피해를 가장 크게 유발하는 질병들이다. 뉴캣슬병(Newcastle disease ; ND)는 급성 전염병으로 면역이 안된 닭에 감염시에는 감염 5~6일 이내에 거의 100%가 사망하게 되는 무서운 전염병이다. 백신을 접종하였더라도 면역수준이 충분하지 않은 닭에 감염할 경우에는 치사율은 낮으나 심한 설사와 호흡기 증상 및 목이 뒤틀리는 신경증상이 나타나기도 하며 산란중인 닭은 산란율이 크게 감소하는 피해가 나타나기도 한다. 감염되는 동물도 닭뿐만 아니라 비둘기, 꿩, 메추리 등 241종 이상의 조류에 감염할 정도로 대부분의 조류가 감염될 수 있으며 사람에도 감염하여 결막염을 유발하기도 한다. 뉴캣슬병은 발병될 경우 피해가 크기 때문에 발생국은 국제동물보건기구(OIE)에 발생사실을 의무적으로 보고하여야 하는 질병으로 구제역이나 고병원성 AI와 같이 발생국은 닭고기나 오리고기 등의 가금관련 제품들의 수출이 전면적으로 통제되기도 한다.

조류인플루엔자(Avian influenza ; AI)는 대부분의 조류에 감염되는 질병으로 병원성이 없는 경우에서부터 치사율이 100%인 고병원성에 이르기까지 다양하며, 병원체 혈청형이 매우 많은 특징이 있다. AI중 고병원성 AI는 전파속도가 빠를 뿐만 아니라 치사율도 100%에 달하기도 하여 한번 발생될 경우 경제적 피해가 크기 때문에 OIE에서는 발생사실을 의무적으로 보고해야 하는 질병으로 분류하여 관리하고 있다. AI 바이러스중 H5N1, H7N7, H9N2 등 일부 혈청형들은 사람감염이 가능하며 이중 H5N1 혈청형은 사람에 감염 시 치사율이 63%에 이를 정도로 매우 높다. 따라서 AI는 동물에서의 경제적 손실뿐만 아니라 국민 보건위생 측면에서도 철저한 방역과 예방조치가 반드시 이루어져야 할 질병이다.

본 연구는 국내 양계산업에서 경제적 피해가 가장 큰 질병인 ND와 AI를 효과적으로 예방하기 위하여 기존의 백신접종 예방법과는 다른 신기술 예방법을 개발하고자 하였다. 즉, 닭이 생산하는 계란내에 방어효능이 우수한 특이난황항체 IgY를 대량 생산시켜 이를 닭의 사료에 첨가하는 방법으로 특정 질병에 방어효능이 발휘될 수 있는 난황항체를 이용한 방어기술을 개발하는 연구로 뉴캣슬병과 조류인플루엔자에 대한 방어능이 우수한 고역가 특이 난황항체를 생산하고 이들 난황항체를 이용한 사료첨가제의 개발 및 산업화를 이루고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

주요 연구개발 내용으로는 방어능 및 안전성이 우수한 항원생산용 ND 및 AI 바이러스를 선발하고 이를 닭이 생산하는 계란내에 방어효능이 우수한 특이난황항체 IgY를 대량 생산시켜 닭의 사료에 첨가하는 방법으로 특정 질병에 방어효능이 발휘될 수 있는 난황항체를 이용한 방어기술을 개발하는 것을 주요 내용으로 하였다.

방어능 및 안전성이 우수한 항원생산용 ND 및 AI 바이러스를 선발하기 위해서는 야생조류 등 다양한 조류로부터 각각의 바이러스를 분리하여 국내에 유행하는 바이러스와 유전학적 혹은 항원적 관련성을 파악하는 방법 등으로 후보주를 선발하였다. 선발된 후보주를 이용하여 불활화 백신을 제조하고 닭에 고도 면역하는 방법으로 닭의 계란에서 고농도 IgY 난황항체를 대량 생산하였으며 생산된 IgY 난황항체의 효능을 바이러스 중화시험 혹은 야외 농장에서의 효능시험 등으로 확인하였다.

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용방안

1. 방어능 및 안전성이 우수한 항원생산용 ND 및 AI 바이러스 선발

방어능 및 안전성이 우수한 항원생산용 ND 바이러스를 선발하기 위하여 야외계군 및 야생조류 등에서 ND바이러스 분리하여 병원성, 생물학적 특성 및 유전학적 특성을 조사하였다. NDV 분리주중 F유전자의 특성분석에서도 백신바이러스와 유사한 특성을 보인 KNUGP09주는 저병원성 바이러스 계열인 genotype I로 분류되었고, 백신주인 V4와 가장 높은 상동성을 보일 뿐만 아니라 다른 이종 ND 바이러스에 대하여도 높은 혈구 응집억제 항체가를 나타내어 항원생산용 ND바이러스로 선발하였다.

방어능 및 안전성이 우수한 항원생산용 H9N2 혈청형 AI 바이러스를 선발하기 위하여 야외계군 및 재래시장 유통 닭으로부터 AI 바이러스를 분리하여 항원성 및 유전학적 특성을 조사하였다. AIV 분리주중 분리하였다. KNU07033주는 HA단백질의 혈청학적 관련성을 조사 결과 기존 국내 유행주와 혈청학적 차이는 크지 않았으며 방어와 관련있는 바이러스 표면유전자인 HA 유전자 및 NA 유전자 특성에서도 기존 국내 유행 H9N2 분리주과 근연관계가 높아 항원생산용 AI 바이러스로 선정하였다.

2. 조류 대장균(*Escherichia coli*) 및 Salmonella균의 야외 분리주 선발

항원생산용 조류 대장균은 닭의 분변 및 임상시료로부터 대장균을 분리하여 선발하였다. 분리한 대장균의 병원성 검사는 heat-labile toxin(LT), heat-stable toxin(ST) 인자를 PCR 방법으로

확인하였으며 분리된 균주는 MacConkey agar에서 분홍색 집락을 선택하여 그람염색한 후 IMViC(Indole (+), MR(+), VP(-), Citrate(-)), Vitek (GNI card) 또는 API kit를 이용하여 최종 동정 선발된 야외분리주는 20주중 5주를 선정하여 *E. coli* 항원생산용으로 선발하였다.

항원생산용 살모넬라균은 닭의 분변 및 임상시료로부터 증균배양, 선택배양, 분리배양을 실시하여 TSI 또는 LIA 검사결과 살모넬라균으로 추정되는 균에 대하여 indole(-), MR(+), VP(-), citrate(+), urease(-), Lysine(+), KCN broth 증식(-) 등의 생화학검사를 실시하고 MacConkey Agar에 배양하여 Mucap test로 자외선조사시 형광을 나타내는지 확인하고 Salmonella의 혈청학적 검사를 통해 5주를 항원생산용으로 선발하였다.

3. 선발된 항원을 이용한 고농도의 IgY 난황항체 생산

닭의 계란에서 고농도의 IgY 난황항체를 생산하였다. 닭 면역에 사용하기 위하여 선발된 ND, AI 등 항원을 생산하여 formalin으로 불활화 처리한 항원을 ISA70과 약 3:7 비율로 혼합한 후 homogenizer를 이용하여 진탕하여 사독백신을 제조한 뒤 닭 접종용 백신으로 사용하였다.

고농도의 특이 난황항체를 생산하기 위하여 제조된 백신을 22주령된 Hy-Line Brown 산란계에 1ml씩 가슴에 근육 주사하였으며 3주간격으로 4회 재접종을 실시하여, 3일간격으로 15주간 항체수준을 분석하였다. E. coli와 살모넬라균에 대한 난황에서의 항체가는 첫접종 2주후부터 상승하기 시작하여 2차접종 2주후인 5주부터 가장 높은 역가를 나타내었다. ND와 AI 바이러스에 대한 혈청 및 난황내 항체가를 혈구응집억제반응을 통해 조사한 결과 ND 항체가는 2차접종 3주후부터 혈청에서는 8.7±0.8(Log_2), 난황에서는 8.3±0.9(Log_2) 정도의 고역가 항체 생성이 가능하였고 AI 항체가도 3차접종 1주후부터 혈청에서는 7.0±0.8(Log_2), 난황에서는 6.4±0.5(Log_2) 수준의 고역가 항체 생성이 가능하였다.

4. 생산된 난황항체의 중화효능

생산된 난황항체의 방어효능을 응집반응 혹은 중화시험 등으로 평가하였다. 살모넬라균에 대한 중화효능을 *Salmonella gallinarum*을 배양시 난황항체 첨가여부에 따라 응집효과를 탁도 측정으로 분석한 결과 난황항체가 첨가되지 않은 대조군에서의는 균들이 24시간 안에 고농도로 증식하여 평균 OD 0.727의 값을 나타내었으나 난황항체 2.5mg/ml의 농도로 첨가한 시험군에서는 OD 0.240 , 5mg/ml 의 농도에서는 OD 0.108 로 흡광도가 난황항체 첨가 농도에 따라 점차 낮아지는 것을 확인하였고 현미경을 통해 *Salmonella gallinarium* 균에 난황항체가 응집되는 것이 관찰되는 것으로 보아 난황항체는 살모넬라균에 대한 중화효능이 있는 것으로 확인되었다.

ND 바이러스에 대한 난황항체의 중화능은 국내 유행 강독주인 교정원주를 이용하여 계태아섬유아세포에서 분석하였다. 난황항체를 2~1,024배까지 희석하여 200 $TCID_{50}$ 용량의 바이러스와 동량 혼합한후 바이러스 사멸정도를 계태아섬유아세포에서의 세포변성 유무로 평가한 결과 생산된 난황항체는 32배까지 바이러스를 사멸하는 중화효능이 있는 것으로 확인되었다. AI 바이러스에 대한 난황항체의 중화능은 국내 유행 H9N2 바이러스를 이용하여 10일령의 계태아

종란을 이용하여 분석하였다. 난황항체를 2~1,024배까지 희석하여 200 EID_{50} 용량의 바이러스와 동량 혼합한후 바이러스 사멸정도를 종란에 접종하여 평가한 결과 생산된 난황항체는 256배까지 바이러스를 사멸하는 중화효능이 있는 것으로 확인되었다.

5. 시제품 사료첨가제 안정성 시험

시제품의 원료는 면역기능이 강화된 허브추출물 분말과 소화 및 기호성 개선을 위한 생균제 및 기타 추출물을 일부 포함시키고, 야외에서 분리 선발된 ND 바이러스, AI 바이러스, *E. coli*, Salmonella 항체역가를 가진 특이난황항체 분말을 첨가하여 시제품을 조제하였다.

시제품의 안정성 시험결과는 프락토 올리고당을 첨가한 난황분말과 부형제를 첨가한 시제품에서의 온도 및 기간에 따른 미생물 분석시험을 통해 일반난황분말을 첨가한 시제품보다 열에 안정성이 있다는 것을 확인하였고, 부형제를 첨가한 시험에서 보존기간이 길어지는 것을 확인하였다.

6. 농장에서의 시제품 사료첨가제 적용시험

ND, AI, E. coli 및 Salmonella에 대한 특이난황항체역가가 함유된 시제품을 육계 및 산란계를 대상으로 적용시험을 실시하였다. 육계적용시험에서는 시제품을 사료내 0.2% 혼합하여 육계사료에 첨가하여 급이하였을 때 생산지수와 육성률이 개선되었다. 산란계적용시험에서는 시제품을 산란계 사료내 0.2% 혼합하여 급여하였을때 사료섭취량과 난중에서는 차이가 없었으나 산란율은 시제품을 첨가한 시험구에서 높은 경향을 나타내었다.

7. 제품 산업화 및 지적재산권 확보

제품명은 "아이지-가드(양계)"로 명칭을 정했으며, 천연유래 허브 25종과 효모배양물(사카로마잇스 세르비지에)을 사용하여 항생제 저감/대체, 악취 저감을 통한 환경개선 효과를 기반으로 한 국내기술로 개발된 조류인플루엔자(AI) 및 뉴캣슬병(ND) 원인체에 대한 특이난황항체가 '중화능력'을 야기하여 친환경 축산을 위한 "유기보조사료" 인증 가능한 복합 기능성 제품이다.

야외에서 분리된 ND 바이러스와 AI의 바이러스에 대한 특허출원은 "뉴캣슬병을 유발하는 신규의 바이러스 및 이에 대한 IGY 타입의 항체를 포함하는 가축사료 첨가제" (출원번호 : 10-2011-0026544) 와 "조류인플루엔자를 유발하는 신규의 바이러스 및 이에 대한 IgY 타입의 항체를 포함하는 가축사료 첨가제"(출원번호 :10-2011-0026545)로 출원하였다.

SUMMARY
(영문요약문)

The development of drug-independent control strategies against several diseases have been studied. One of these new control strategies is passive immunization strategy using hyperimmune, pathogen-specific secretory IgY antibodies. Egg yolk IgY antibodies are often used for passive immunization because of their feasibility for large-scale commercial production. In this study, we tested the possibility that IgY isolated from eggs of hens immunized with avian influenza (AI) virus and Newcastle disease (ND) virus provide prophylaxis and therapy of AI and ND virus infection.

Several AI and ND viruses have been isolated from chickens in live bird markets and layer farm. Two viruses (one is for AI and the other is for ND) were selected as vaccine strains because of their antigenic and genetic similarities with recent epidemic Korean strains. Twenty-two-week-old Hy-Line brown hens were immunized intramuscularly with inactivated AI and ND vaccine strains mixed with ISA70 adjuvant. The hens were immunized four times with three weeks between the immunization. High titers of ND virus-specific IgY in eggs can be elicited in three weeks after second vaccination and high titers of AI virus-specific IgY in eggs can also detected in one week after third vaccination.

The neutralizing titer of anti-ND or AI virus IgY was determined by the cytopathic effect of ND virus on chicken embryo firbroblast cells or the liability of AI virus on chicken embryo. The neutralization titers of the egg yolk powder against ND and AI virus were 32 and 256, respectively, suggesting that IgY antibody produced in this study could kill ND and AI virus. These results suggest that egg yolk IgY antibodies against ND and AI virus could be used as feed additive for prevention of ND and AI in chickens.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction ····· 9

Chapter 2. Current status of technique ····· 11

Chapter 3. Research contents and result ····· 12

1. Selection of ND virus and AI virus as vaccine strains
2. Selection of E. Coli and Salmonella as vaccine strains
3. Production of high titer of specific IgY
4. Neutralization activity of the egg yolk powder against ND and AI virus
5. Stability of prototype
6. The results of field trials
7. The development of design of product

Chapter 4. Achievements and contributions ····· 65

Chapter 5. Application ····· 68

Chapter 6. International trend and scientific information ····· 70

Chapter 7. Reference ····· 72

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ····· 9

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ····· 11

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ····· 12

제 1 절 방어능 및 안전성이 우수한 항원생산용 ND 및 AI 바이러스 선발

제 2 절 양계 E. Coli, 양계 Salmonella의 야외 분리주 선발

제 3 절 항원을 이용한 고역가의 특이난황항체 생산

제 4 절 특이난황항체의 ND 바이러스 및 AI 바이러스에서의 중화능시험

제 5 절 시제품 안정성 시험

제 6 절 농장에서의 시제품 사료첨가제 적용시험

제 7 절 제품 디자인 개발

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 65

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 ····· 68

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 70

제 7 장 참고문헌 ····· 72

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목표 및 내용

가. 연구개발 목표

국내 양계산업에서 경제적 피해가 가장 큰 질병인 뉴캣슬병(Newcastle disease ; ND)과 조류인플루엔자(avian influenza ; AI)를 효과적으로 예방하기 위하여 기존의 백신접종 예방법과는 다른 신기술 예방방법을 개발하고자한다. 즉, 닭이 생산하는 계란내에 방어효능이 우수한 특이난황항체 IgY를 대량 생산시켜 이를 닭의 사료에 첨가하는 방법으로 특정 질병에 방어효능이 발휘될 수 있는 난황항체를 이용한 방어기술을 개발하는 연구로, 본 연구에서는 뉴캣슬병과 조류인플루엔자에 대한 방어능이 우수한 고역가 특이 난황항체를 생산하고 이들 난황항체를 이용한 사료첨가제의 개발 및 산업화를 최종 연구목표로 한다.

나. 연구개발의 내용

세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
뉴캣슬병 및 조류인플루엔자 항원생산 및 고역가의 항체생산	○항원생산용 ND virus(NDV) 선발	- 최근 국내 유행 NDV 수집 - 분리 NDV의 병원성 및 주요 생물학적 특성 - 분리 NDV의 항원적 관련성 및 유전학적 특성 - 항원생산용 ND 바이러스 선발
	○항원생산용 AI virus(AIV) 선발	- 최근 국내유행 H9N2 혈청형 AIV 수집 - 분리 AIV간의 항원적 관련성 및 유전학적 특성 - 항원생산용 AI 바이러스 선발
	○항원의 대량생산 조건 설정	- 선발된 ND 바이러스의 최적배양조건 확립 - 선발된 AI 바이러스의 최적배양조건 확립
	○ 야외균주(E. Coli, Salmonella) 선발	- 야외균주(E Coli) 20종 선발 - 야외균주(Salmonella) 5종 선발
	○면역항원의 대량생산법 확립	- 종란에서의 ND 및 AI 바이러스 대량생산 - 양계 E.Coli(5종), Salmonella(3종) 불활화 조건 확립 - 항원성에 영향 없는 방법으로 바이러스 불활화 조건 확립 - 고농도 난황항체 생산을 위한 불활화 항원 농축

세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
뉴캣슬병 및 조류인플루엔자 항원생산 및 고역가의 항체생산	○특이난황항체 (IgY) 대량생산	- 산란계에 면역원 접종하여 ND, AI, E. Coli, Salmonella에 대한 특이난황항체 생산 - 난황내 역가분석 확인을 통해 음성대조군의 160X이상이 되는 5주부터 14주까지의 계란을 집중적으로 집란 ,할란후 난황만을 수거하여 동결건조
	○특이난황항체 위내안정성 실험	- 난황 과 전란내 레반과 올리고당을 첨가하여 위내 및 담즙산내의 안정성 실험
	○특이난황항체 평가	- SDS-PAGE 및, Western 분석을 통해 특성 규명 - 특이난황항체의 항균성 실험
닭에서 특이난황항체의 중화능시험	○생산된 난황항체의 실험실 조건에서의 중화능 시험	- ND 바이러스에 대한 KNUGP09주로 생산된 난황항체를 대상으로 국내분리 강독주 KJW에 대한 중화능 보유여부를 확인하기 위하여 계태아섬유아세포에서 중화시험을 실시한 결과, 32배까지 중화능 확인 - AI 바이러스에 대한 KNU07033주로 생산된 난황항체를 대상으로 KNU07033주에 대한 중화능 보유여부를 확인하기 위하여 10일령 종란에서 중화시험을 실시한 결과 256배까지 중화능 확인
시제품 농장 적용시험	○육계 및 산란계에서의 적용시험	- 육계시험농장에서 대조군과 시제품 사료첨가제를 급여한 군에 대한 효능시험 - 산란계 시험농장에서 대조군과 시제품 사료첨가제를 급여한 군에 대한 효능시험
제품디자인 개발 및 제품화	○시제품 안정성 시험	- 부형제 첨가에 따른 기간별 항체가 분석 - 보관온도에 따른 기간별 항체가 분석 및 미생물 검사를 통해 시제품의 안정성 시험 확인
	○제품디자인 개발	- 제품컨셉에 맞는 제품디자인을 개발하여 제품화

제 2 장 국내외 기술개발 현황

최근 1차 산업계통의 바이오벤처 기업이 많아지면서 사료첨가제 제조업체도 급증하고 있으며, 국내의 사료첨가제 제조업체도 수천을 헤아리며, 사료첨가제의 종류도 수백가지를 넘고 있다. 하지만 주된 첨가물질은 그 수가 한정되어 있어 비슷한 item으로 제조업체 간에 치열한 경쟁이 이루어지고 있다. 최근에 국내에서 한국생명공학원 이우송 박사팀이 생약으로부터 얻은 인플루엔자 바이러스 예방용 생물소재를 개발하여 스테비아 식물에 접목시킨 조류인플루엔자 예방용 사료제를 개발한 사례가 있고, ND 바이러스와 AI 바이러스, E. Coli, Salmonella에 효능있는 IgY를 응용하여 개발된 사료첨가제는 개발되어 있지 않다.

국내 관련 산업체 중에서 면역강화용 사료첨가제를 개발하여 시판하고 있는 업체가 있으나, 이들 기업에서도 ND 바이러스, AI 바이러스, E. Coli, Salmonella를 갖춘 감염방어에 유효한 소재는 개발되어 있지 않다. 본 연구진이 개발하고자 하는 경구용 제제를 통한 ND 바이러스 , AI 바이러스 감염억제 뿐만 아니라 양계의 소화기성 질병을 많이 일으키는 E. Coli 와 Salmonella의 감염 억제에도 효과가 있는 면역증강용 기능성 양계 사료 첨가제는 국내는 물론 국외에 있어서도 그 예를 찾아보기 힘들며, 가축의 면역체계를 활성화 시켜 질병을 예방하고 생산성을 향상시킴으로서 고수익을 창출한다는 의미에서 기존의 주사제를 통한 백신접종 또는 ND 바이러스의 분무접종과는 다른 차별적인 부분이 강하다고 할 수 있다.

○ 국내외 사료첨가제 연구 현황

연구수행기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
(주)이지바이오	면역강화용 사료첨가제 개발	일반적인 면역강화 제품
(주)CTC 바이오	면역강화용 사료첨가제 개발	일반적인 면역강화 제품
한경대	겨우살이 추출물을 이용한 AI 사료첨가제 개발	AI 바이러스 감염억제를 위한 점막면역 증강용 기능성 양계 사료첨가제
한국 스테비아(주)	생약으로부터 추출한 AI 바이러스 증식에 관여하는 뉴라미니데이즈 효소의 활성을 억제하는 물질과 면역증진용 스테비아 식물에 접목시킨 조류인플루엔자 예방용 사료 개발 및 소독제 개발	사료첨가제 및 소독제

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 방어능 및 안전성이 우수한 항원생산용 뉴캣슬병(ND) 및 조류독감(AI) 바이러스 선발

1. 항원생산용 ND 바이러스 선발

가. 최근 국내 유행 ND 바이러스 수집

방어능 및 안전성이 우수한 항원생산용 ND 바이러스를 선발하기 위하여 야외계군 및 야생조류 등에서 ND 바이러스 분리를 시도하여 현재까지 3주의 바이러스를 분리하였다. KNU07034는 강원도 춘천시소재의 한 농장에 사육중인 오리로부터 분리되었으며 KNUSH09는 경기도 시흥지역에서 수거한 야생철새 분변으로부터 분리되었다. 또한 KNUGP09는 경기도 가평지역의 재래시장에서 유통중이던 오리로부터 분리되었다(표 1-1).

표 1-1. ND 분리주의 내력

분리주	분리숙주	분리장기	분리지역
KNU07034	사육오리	분변	강원도 춘천시
KNUSH09	야생철새	분변	경기도 시흥
KNUGP09	재래시장유통 오리	맹장편도	경기도 가평

나. 분리 NDV의 병원성 및 주요 생물학적 특성

분리된 바이러스의 병원성을 확인하기 위하여 10일령 종란에 접종하는 방법으로 평균치사시간(mean death time; MDT)을 조사한 결과 KNU07034는 36시간으로 강독주로 분류되었다. 반면 KNUSH09와 KNUGP09는 MDT가 각각 89시간과 84시간으로 중간독(mesogenic NDV)으로 분류되었다.

분리주 혈구응집소(hemagglutinin)의 열에 대한 안정성을 표준주와 비교하여 조사한 결과 분리주 3주 모두는 56℃ 30분 열처리후에는 혈구응집능이 완전히 소실되는 것으로 나타나 모두 이열성 바이러스로 분류되었다(표 1-2).

표 1-2. ND 분리주 혈구응집소의 열에 대한 안정성

분리주 및 표준주	56℃에서 해당시간 열처리후의 HA 역가					분류
	처리전	5분	10분	20분	30분	
KNU07034	128	128	128	0	0	이열성
KNUGP09	128	0	0	0	0	이열성
KNUSH09	16	0	0	0	0	이열성
Lasota	128	0	0	0	0	이열성
KJW	256	256	128	0	0	이열성

분리주의 혈구응집 해리양상을 조사한 결과 KNU07034는 혈구응집후 24시간 경과이후에는 해리가 일어나는 것으로 나타나 rapid eluter로 분류되었으나 KNUSH09와 KNUGP09는 24시간 이후에도 해리가 나타나지 않는 slow eluter로 분류되었다(표 1-3).

표 1-3. ND 분리주의 혈구응집 해리양상

분리주 및 표준주	경과시간에 따른 HA 역가			분류
	1시간	24시간	재부유 2시간후	
KNU07034	16	0	0	Rapid eluter
KNUGP09	128	64	64	Slow eluter
KNUSH09	16	16	16	Slow eluter
Lasota	256	32	64	Slow eluter
KJW	256	0	0	Rapid eluter

다. 분리 NDV간의 항원적 관련성

분리주간의 항원적 관련성을 알아보기 위하여 분리주로 면역한 항혈청을 대상으로 혈청학적 관련성을 조사하였다. 분리주의 항혈청생산은 각각의 바이러스로 오일사독백신을 제조하여 6주령의 특정병원체부재 (specific pathogen free; SPF) 병아리에 1차 접종하고 8주령때 2차접종하였다. 2차접종 2주후에 채혈하여 표준주 및 분리주간의 교차 혈구응집억제반응으로 항체역가를 조사하였다. KNU07034는 동종항원에 대한 항체역가보다 국내표준주 KJW에 대한 항체역가가 2~4배 낮은 것으로 나타나 항원적 차이가 뚜렷하지 않았으나 KNUGP09에 대하여는 4~8배, KNUSH09에 대하여는 8배가 낮은 것으로 나타나 항원적 차이가 다소 있는 것으로 파악되었다. KNUGP09와 KNUSH09는 다른 바이러스와의 항원적 차이가 뚜렷하지 않았으며 특히 KNUGP09는 이종항원에 대하여도 높은 수준의 HI 항체역가를 보였다(표 1-4).

표 1-4. ND 분리주간의 혈청학적 관련성

구분		바이러스별 HI 항체가			
		KNU07034	KNUGP09	KNUSH09	KJW
항혈청	KNU07034-1	**2048**	512	256	512
	KNU07034-2	**2048**	256	256	1028
	KNUGP09-1	256	**256**	128	256
	KNUGP09-2	512	**512**	256	512
	KNUSH09-1	32	32	**64**	64
	KNUSH09-2	64	16	**32**	64
	KJW-1	64	32	32	**256**
	KJW-2	128	128	64	**512**

라. 분리 NDV의 유전학적 특성

분리주의 유전학적 특성을 분석하기 위하여 F유전자 염기서열을 분석하였다. F 유전자중 총 1,594bp(42~1,636)의 염기서열을 분석하여 그중 cleavage site를 포함하는 hypervariable region (47~435)의 염기서열을 기준으로 다른 바이러스와의 상동성 및 phylogenetic tree를 분석하였다. 병원성과 관련있는 cleavage site의 아미노산 서열을 조사한 결과 KNU07034는 ^{112}RRQKR/FIG^{119} 로 병원성주의 특징을 보였다. 반면 KNUGP09와 KNUSH09는 ^{112}GKQGR/LIG^{119}, ^{112}GRQGR/LIG^{119}로 비병원성주의 아미노산 서열을 가지는 것으로 확인되었다(표 1-5).

표 1-5. 병원성관련 cleavage site의 아미노산 서열

바이러스	cleavage site 아미노산 서열	병원성분류
KNU07034	^{112}RRQKR/FIG^{119}	고병원성주
KNUGP09	^{112}GKQGR/LIG^{119}	저병원성주
KNUSH09	^{112}GRQGR/LIG^{119}	저병원성주

분리주간의 상동성을 염기 및 아미노산서열 기준으로 분석하였다. KNUGP09는 염기서열 기준으로 다른 바이러스와 상동성이 86.4%에서 98.9% 정도이었다. KNUGP09는 백신주인 V4와 98.9%로 가장 높은 상동성을 보였다. KNUSH09는 다른 바이러스와 상동성이 86.1%에서 97.9%이었다. KNUSH09는 미국에서 분리된 오리분리주(mallard/US)와 상동성이 97.9%로 가장 높았다(표 1-6).

Hypervariable region의 염기서열을 기준으로 phylogenetic tree를 분석한 결과 KNUGP09와 KNUSH09는 모두 비병원성주 바이러스들이 포함된 genotype I에 속하는 것으로 나타났다(Fig.1-1).

표 1-6. ND 분리주간의 염기 및 아미노산 상동성

		nucleotide similarity (%)																
		KNU GP09	KNU SH09	98-1154	mallard/US	V4	BI/47	ULS	D26/76	LaS	VG/GA	BEAu	Warwick	SNU-5074	Taiwan95	SNU-0202	SNU-5070	KBNP-4152
amino acid similarity (%)	KNUGP09	ID	93.3	98	94	98.9	89.6	95.7	97.2	88.9	88.9	90.1	88.8	86.8	86.7	86.8	86.8	86.4
	KNUSH09	81.4	ID	93.5	97.9	94	89.8	95.4	93.9	89.4	89.3	90	88.1	86.3	86.7	86.5	86.6	86.1
	98-1154	96.1	81.4	ID	94	99.1	89.6	95.5	97.4	89.1	89.1	90.3	89.6	87.4	87.3	87.5	87.4	87.1
	mallard/US	83.2	93.6	82.7	ID	94.6	89.1	95.7	94.4	88.9	88.6	89.5	88	86.3	86.6	86.6	86.6	86.1
	V4	98.4	82.7	97.7	84.1	ID	90.2	96.4	98.2	89.6	89.6	90.8	89.8	87.5	87.4	87.6	87.5	87.1
	BI/47	72.4	71.7	71.5	69.7	73.1	ID	90.6	89.8	98.7	98.8	97.7	85.8	85	84.6	84.9	85	84.6
	ULS	88.7	86.5	87.3	87.1	89.6	74.7	ID	95.7	90.1	90	91	89.3	87.3	87.5	87.3	87.3	86.9
	D26/76	93.4	82.5	92.7	83.6	95	72	87.8	ID	89.3	89.1	90.3	89.7	87.4	87.4	87.5	87.4	87.1
	LaS	70.9	70.8	70.3	69.3	71.6	96.1	73.3	70.9	ID	98.4	97.2	85.6	84.7	84.5	84.6	84.7	84.4
	VG/GA	70.4	70.4	69.7	68.4	71.1	96.6	72.7	70	95.7	ID	96.9	85.1	84.5	84.1	84.4	84.5	84.1
	BEAu	74.9	73.1	73.8	71.5	75.6	94.1	76.2	74.3	92.8	92.1	ID	86.7	85.1	85.2	85	85.1	84.7
	Warwick	72.2	68.9	72.6	68.5	73.1	63.7	72.1	73.3	63	61.9	66.3	ID	91.4	92.4	91.8	91.7	91.1
	SNU-5074	66.8	63.7	67	64	67.2	61.1	65.6	67.2	60	59.5	61.6	76.1	ID	94	98.7	98.7	99.4
	Taiwan95	65.7	64.8	66.3	64.6	66.3	60.1	66.5	66.5	59.4	58.3	61.8	78.4	83.4	ID	94.3	84.2	93.9
	SNU-0202	67.4	64.8	67.7	65.5	67.9	61.1	66	67.9	60	59.5	61.6	76.7	96.3	83.8	ID	99.6	98.6
	SNU-5070	67.2	65.3	67.4	65.5	67.7	61.4	65.8	67.7	60.3	59.7	61.8	76.7	96.1	83.5	98.8	ID	98.5
	KBNP-4152	65.7	63.1	66	63.4	66.2	60.1	64.5	66.2	59	58.5	60.6	75.2	98.1	82.9	95.9	95.7	ID

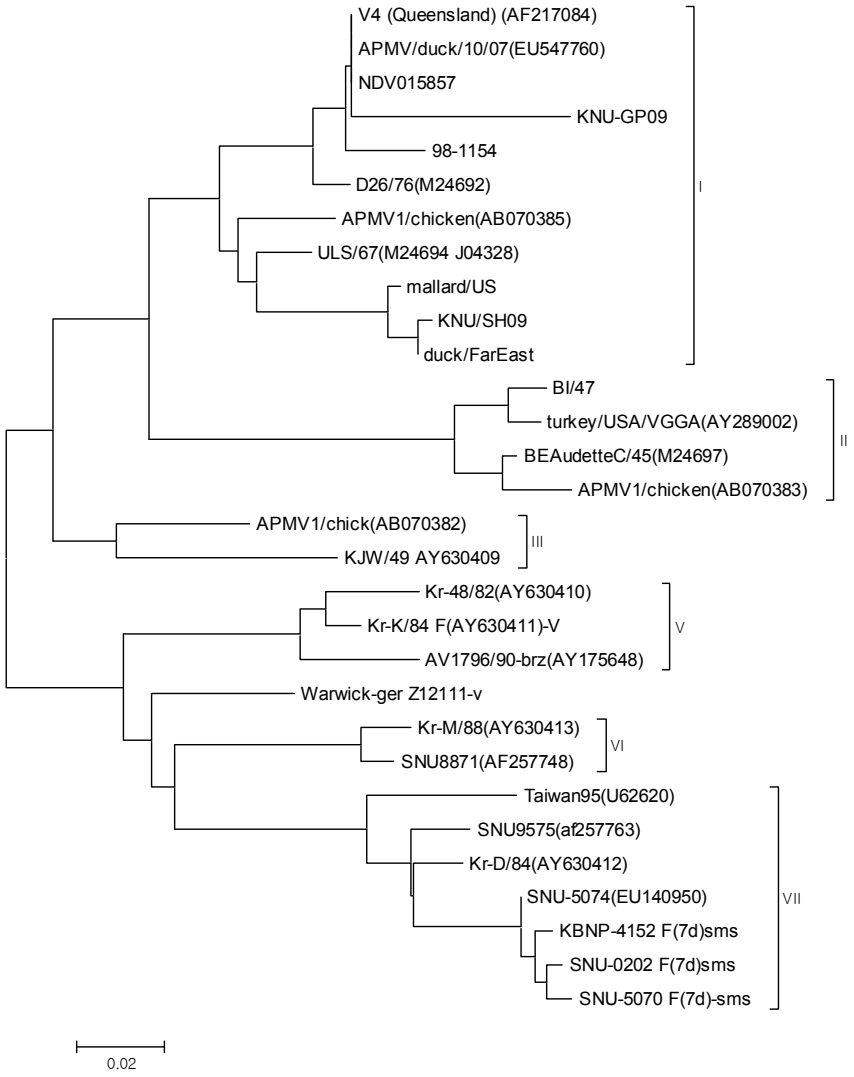


Fig. 1-1. ND 분리주의 phylogenetic tree

마. 항원생산용 ND 바이러스 선발

NDVGP09는 비병원성 바이러스일뿐만 아니라 F유전자의 특성분석에서도 백신바이러스와 유사한 특성을 보였다. 또한 NDVGP09 항혈청은 동종항원뿐만 아니라 다른 이종 NDV에 대하여도 높은 정도의 혈구응집억제 항체가를 보이는 것으로 나타나 NDVGP09는 항원생산용 ND 바이러스로 선발하였다.

2. 항원생산용 AI 바이러스 선발

가. 최근 국내 유행 H9N2혈청형 AI 바이러스 수집

방어능 및 안전성이 우수한 항원생산용 H9N2 혈청형 AI 바이러스를 선발하기 위하여 야외 계군 및 재래시장 유통 닭으로부터 AI 바이러스 분리하였다. 총 3주의 H9N2 혈청형바이러스가 분리되었으며 이중 KNU07033은 야외농장의 산란계로부터 분리되었으며 KNUGJ와 KNUSWR은 재래시장에서 유통되고 있는 닭으로부터 분리되었다(표 1-7).

표 1-7. AI 분리주의 내력

분리주	분리숙주	분리장기	분리지역
KNU07033	사육산란계	맹장편도	경북 경주시
KNUGJ	재래시장 유통 닭	기관	경기도 파주시
KNUSWR	재래시장 유통 닭	맹장편도	경기도 포천시

나. 분리 AIV간의 항원적 관련성

분리주간의 항원적 관련성을 알아보기 위하여 분리주로 면역한 항혈청을 대상으로 혈청학적 관련성을 조사하였다. 분리주의 항혈청생산은 각각의 바이러스로 오일사독백신을 제조하여 6주령의 SPF 병아리에 1차 접종하고 8주령때 2차접종하였다. 2차접종 2주후에 채혈하여 표준주 01301 및 분리주간의 교차 혈구응집억제반응으로 항체역가를 조사하였다. KNU07033에 대한 항혈청은 동종항원에 대한 항체역가와 표준주 01301과 역가차이를 보이지 않는 것으로 나타나 항원적 차이는 거의 없는 것으로 보였다. KNUSWR는 표준주 01301과의 혈구응집억제반응결과 동종보다 01301 항원에 대하여 2~4배 더 높은 반응성을 보였으며 KNUGJ09는 동종 항원보다 표준주 01310에 대한 항체가가 2배정도 낮은 것으로 나타나 이들 바이러스는 표준주 01301과는 항원적 차이가 크지는 않은 것으로 확인되었다(표 1-8).

표 1-8. AI 분리주간의 혈청학적 관련성

구 분		바이러스에 따른 혈구응집억제 항체가			
		KNU07033	KNUSWR09	KNUGJ09	01310
항혈청	KNU07033-1	256	128	128	256
	KNU07033-2	256	128	256	256
	KNU07033-3	256	128	256	256
	KNUSWR09-1	128	64	128	256
	KNUSWR09-2	64	32	256	128
	KNUSWR09-3	64	64	128	128
	KNUGJ09-1	32	32	128	64
	KNUGJ09-2	32	32	128	64
	KNUGJ09-3	32	32	128	64
	01310	32	32	128	64

다. 분리 AIV의 유전학적 특성

(1) HA 유전자 특성분석

분리주에 대하여 표면단백질 유전자인 HA 전체 유전자 염기서열을 조사하였다. 최근 국내 H9N2 분리주 3주 모두 HA유전자는 1,742 bp의 염기로 구성되어 있었다. 분석한 염기서열을 토대로 HA 유전자 염기 상동성을 다른 분리주와 비교조사한 결과 분리주 3주 모두 한국에서 분리되던 기존 분리주(S21, MS96, 01310)와 가장 가까운 상동성(92.1%~97.5%)을 보였으나 중국분리주(G1, Y280, BJ1/94), 사람 감염주(HK1073, HK1074), 북미분리주(Cal189/66, Mi/383916/95) 및 일본분리주(Hok9/99, Hok13/00)와는 낮은 상동성을 보였다(표1-9). KNU07033은 1992년 국내 최초 분리주인 MS96과 92.6%의 상동성을 보였으며 현재 국내에서 백신주로 이용되고 있는 01310주와도 93.7%의 상동성이 있었으며 최근 분리된 S21주와는 97.3%의 비교적 높은 상동성을 보였다.

표 1-9. AI 분리주의 HA 유전자 염기 및 아미노산 상동성

		nucleotide similarity (%)														
		KNU 07033	KNUGJ	KNUSWR	S21	MS96	01310	G1	Y280	BJ 1/94	HK 1073	HK 1074	Cal 189/66	Mi/383 916/95	Hok 9/99	Hok 13/00
amino acid similarity (%)	KNU 07033	100.0	96.1	96.0	97.3	92.6	93.7	81.8	77.7	84.0	84.6	84.7	81.5	817	89.0	88.5
	KNUGJ	96.7	100.0	99.8	97.5	92.1	93.6	81.2	77.1	83.1	83.8	84.0	80.8	80.9	88.4	88.1
	KNUSWR	96.4	99.6	100.0	97.3	92.0	93.5	81.1	77.0	83.0	83.7	83.9	80.6	80.8	88.3	87.9
	S21	97.5	96.9	96.6	100.0	93.4	94.7	81.5	77.7	83.8	84.3	84.5	81.1	81.3	89.4	89.0
	MS96	95.1	94.4	94.1	94.6	100.0	95.4	82.4	77.9	84.3	85.5	85.5	81.4	81.9	91.9	91.3
	01310	95.1	95.7	95.3	95.3	95.8	100.0	81.9	77.8	84.0	84.9	84.9	81.6	81.5	90.9	90.6
	G1	84.4	83.7	83.3	83.7	84.6	83.2	100.0	87.1	91.6	95.6	95.9	80.8	80.4	82.7	82.8
	Y280	81.0	80.7	80.3	81.0	81.9	81.6	87.1	100.0	90.4	84.2	84.3	77.3	76.9	78.1	78.1
	BJ/1/94	88.0	87.1	86.7	87.3	87.8	87.1	91.1	90.2	100.0	91.9	92.1	83.1	83.4	85.0	85.2
	HK/1073	87.6	86.9	86.6	86.9	87.8	86.4	95.8	84.4	91.7	100.0	99.4	81.6	80.8	85.8	85.8
	HK/1074	87.5	86.7	86.4	86.7	87.6	86.2	96.0	84.2	91.6	99.4	100.0	81.8	81.0	85.7	85.7
	Cal/189/66	87.8	87.1	86.7	86.9	87.5	87.5	86.4	82.4	89.1	87.3	86.9	100.0	83.2	82.9	82.7
	Mi/383916/95	89.8	89.1	88.7	88.9	90.0	89.4	86.4	83.3	90.6	87.5	87.3	93.6	100.0	83.6	83.5
	Hok/9/99	93.2	91.9	91.6	92.5	93.7	92.8	86.4	83.7	90.5	89.6	89.2	91.2	92.5	100.0	99.1
	Hok/13/00	92.8	91.6	91.2	92.1	93.3	92.5	86.2	83.9	90.7	89.4	89.1	91.7	92.5	98.9	100.0

HA 유전자중 닭에서 병원성과 관련이 있는 cleavage site의 아미노산 서열을 조사한 결과 KNU07033은 ^{333}PAASGR/GL^{340}을, KNUGJ09와 KNUSWR은 ^{333}PATSGR/GL^{340}을 가지고 있는 것으로 나타나 국내분리 H9N2 바이러스 분리주 모두는 닭에서 저병원성의 특성을 가지는 것으로 확인되었다. 또한 receptor binding site의 아미노산 서열을 분석한 결과 국내 분리주는 H-E-Q 서열을 가지고 있었으며 특히 226번의 아미노산은 사람에 감염가능한 바이러스들이 보유하고 있는 lysine 대신 조류 감염 바이러스들이 공통으로 보유하고 있는 glutamin을 보유하고 있는 것으로 나타나 국내 분리주 모두는 사람에는 감염되지 않는 바이러스일 것으로 추정되었다(표1-10).

표 1-10. HA Cleavage site와 receptor binding site의 아미노산 특징

Viruses	Amino acid sequence at the cleavage site	Receptor binding site		
	333-340	191 (183)[a]	198 (190)[a]	234 (226)[a]
A/Chicken/korea/KNUGJ09/09	PA**T**SGR/GL	H	E	Q
A/Chicken/korea/KNUSWR/09	PA**T**SGR/GL	H	E	Q
A/Chicken/korea/KNU07033/07	PAASGR/GL	H	E	Q
A/Chicken/Korea/164/04	PAASGR/GL	H	E	Q
A/Chicken/Korea/01310/01	PA**T**SGR/GL	H	E	Q
A/Chicken/Korea/99029/99	PAASGR/GL	H	E	Q
A/Chicken/Korea/25232-9600/96	PAAS**V**R/GL	H	E	Q
A/Chicken/Korea/ms96/96	PAAS**Y**R/GL	H	E	**P**
A/dove/Korea/S14/03	PAASGR/GL	H	E	Q
A/silky chicken/Korea/S3/03	PA**T**SGR/GL	H	E	Q
A/Turkey/California/189/66	PAVSDR/GL	H	E	Q
A/turkey/Wisconsin/1/66	PAVSDR/GL	H	E	Q
A/Shaoguan/408/98(human)	PARSSR/GL	N	A	L
A/Hong Kong/1074/99(human)	PARSSR/GL	H	E	L
A/Duck/Hong Kong/Y280/97	PARSSR/GL	N	T	L
A/Quail/Hong Kong/G1/97	PARSSR/GL	H	E	L

[a] H3 혈청형 바이러스의 HA 유전자 아미노산서열 번호기준

HA 유전자 염기서열을 토대로 다른 H9N2 바이러스들과 phylogenetic tree를 작성하여 계통을 비교하였다(Fig. 1-2). 국내분리주 모두는 North America lineage와는 완전히 다른 Eurasia lineage로 분류되었다. 국내분리주들은 Eurasia lineage중에서도 중국, 일본, 동남아 등의 바이러스와는 별개로 Korea sublineage로 분류되는 별개의 계열로 분리되었다. 또한 최근 한국분리주들은 사람감염을 보이는 홍콩 H9N2 바이러스와도 완전히 다른 계열로 분리됨을 확인할 수 있었다.

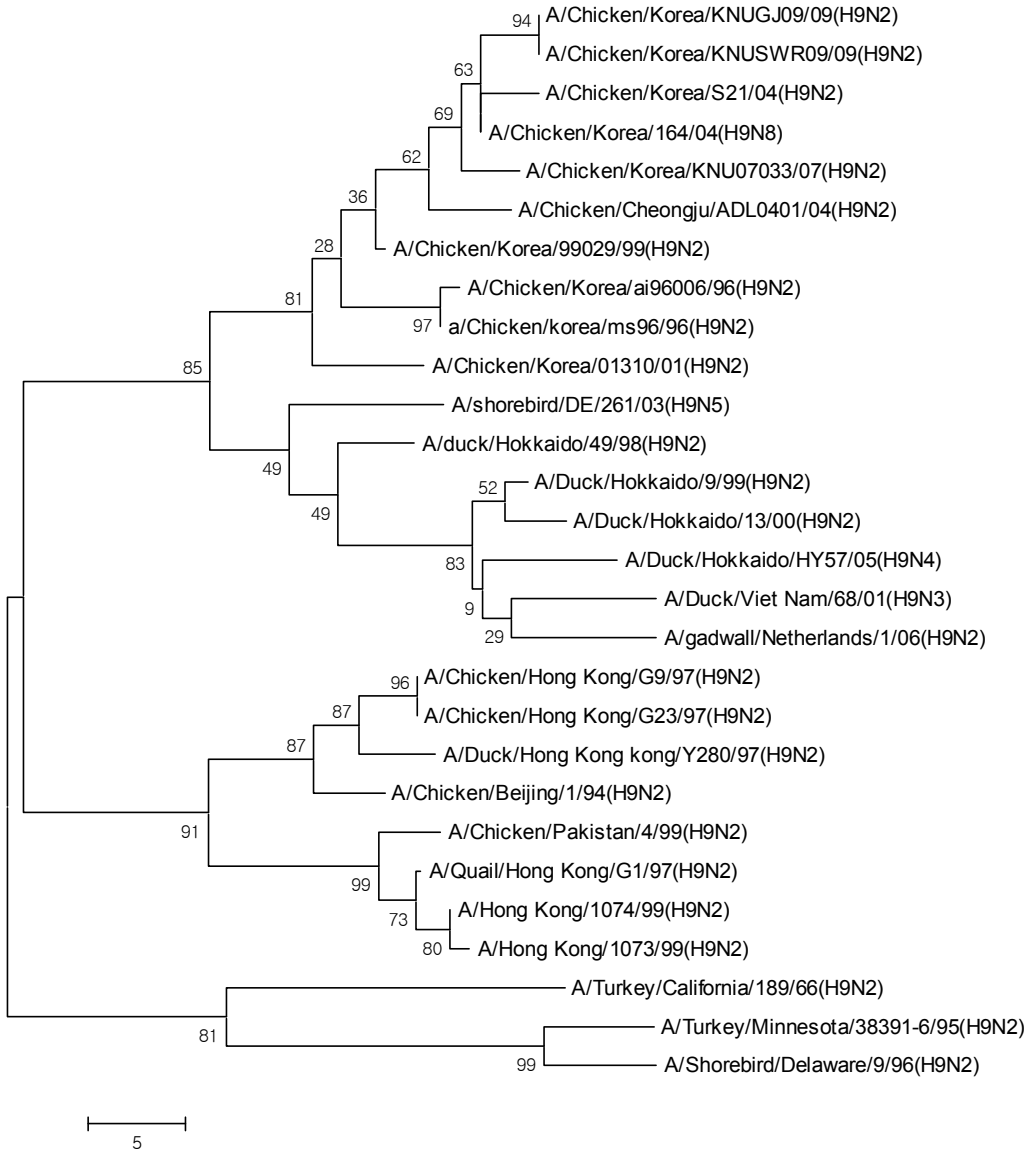


Fig. 1-2. 분리 AIV HA 유전자의 계통비교

(2) NA 유전자 특성분석

분리주들의 NA 표면유전자 염기서열을 분석하였다. NA 전체 유전자 1,467bp 염기서열을 분석하여 다른 N2 혈청형 바이러스의 NA 유전자와 염기 및 아미노산 상동성을 비교하였다(표 1-11). 염기서열 기준으로 상동성을 비교한 결과 산란계 농장에서 분리된 KNU07033주는 국내 분리주 MS96주와 93.0%, 01310주와 93.7%, S21주와 96.3% 정도의 상동성을 보였으나 재래시장 닭에서 분리된 KNUGJ주와 KNUSWR주와는 상동성이 각각 90.1%로 낮은 상동성을 보였다. 또한 KNU07033은 사람감염 H9N2주인 HK/1073, HK1074와는 30.6%의 낮은 상동성이 있었으며 국내 사람에 유행하고 있는 H3N2 혈청형 바이러스의 NA 유전자와는 79.3%~80.5%의 상동성을 보였다. 재래시장에서 분리된 KNUGJ와 KNUSWR주는 서로간에는 99.7%의 높은 상동성을 보였으나 국내 유행 H9N2 바이러스와는 89.5%~92.8%의 낮은 상동성을 보였다. 그러나 야생조류에서 분리되고 있는 H5N2 혈청형의 NA 유전자와는 96.5%~98.5%까지 높은 상동성을 보이는 것으로 확인되었다.

표 1-11. NA 유전자 염기 및 아미노산 상동성 비교

		nucleotide similarity (%)																		
		KNU 07033	KNUG J	KNU SWR	S21	MS9 6	01310	99029	Xuyi /10/05	Xuyi 18/05	Aki /714/0 6	Shi /02/07	Nii /477/ 07	G1	Y280	HK /1073	HK /1074	Busan 10/07	Chung /447/0 2	Kor AF05/0 8
amino acid similarity (%)	KNU0703 3	100	90.1	90.1	96.3	93.0	93.7	90.4	90.0	89.9	89.6	88.6	88.5	29.6	33.0	30.6	30.6	79.3	80.4	80.5
	KNUGJ	94.0	100	99.7	90.3	92.3	92.6	89.4	98.3	98.1	98.0	96.9	96.9	30.3	34.2	31.3	31.3	81.4	82.2	82.6
	KNUSW R	94.3	99.7	100	90.4	92.2	92.8	89.4	98.5	98.3	98.2	97.1	97.1	30.2	34.0	31.2	31.2	81.4	82.3	82.6
	S21	97.2	94.5	94.7	100	93.6	94.2	92.9	90.6	90.5	89.9	91.0	90.9	30.0	33.1	30.6	30.6	81.2	82.4	80.4
	MS96	94.9	95.5	95.7	95.5	100	96.6	94.4	92.6	92.4	92.1	91.0	91.1	29.8	33.3	30.9	30.9	80.7	81.5	81.9
	01310	95.7	96.8	97.0	96.4	97.2	100	93.8	92.9	92.8	92.4	91.7	91.3	29.9	32.7	30.9	30.9	80.3	81.6	81.6
	99029	91.9	92.8	93.0	94.6	94.7	94.5	100	89.6	89.5	89.2	90.2	90.3	30.6	33.6	30.3	30.3	81.	81.6	80.0
	Xuyi/10/0 5	94.5	99.1	99.3	94.9	95.9	97.2	93.2	100	99.8	98.3	97.2	97.1	30.2	34.2	31.1	31.1	81.2	82.3	82.4
	Xuyi/18/0 5	94.3	98.9	99.1	94.7	95.7	97.0	93.0	99.7	100	98.1	97.1	97.0	30.2	34.2	31.1	31.1	81.1	82.2	82.3
	Aki/714/0 6	93.6	98.3	98.5	94.0	95.1	96.4	92.6	98.7	98.5	100	98.2	97.8	30.6	34.0	31.5	31.5	81.2	82.3	82.3
	Shi/02/07	92.8	97.4	97.6	95.3	94.3	95.5	93.8	97.8	97.6	98.7	100	99.0	30.9	34.2	31.5	31.5	82.2	83.4	81.4
	Nii/477/07	93.2	97.4	97.6	95.7	94.7	95.9	94.2	97.8	97.6	98.3	99.5	100	30.9	34.3	31.5	31.5	82.4	83.4	81.5
	G1	13.0	12.6	12.6	13.2	12.6	12.8	12.9	12.6	12.6	13.2	13.2	13.2	100	32.1	96.8	96.7	31.5	31.1	31.1
	Y280	17.0	17.0	16.8	17.0	16.6	17.0	16.5	16.8	16.8	16.6	16.8	17.2	13.0	100	31.7	31.7	32.	31.9	31.6
	HK/1073	13.4	13.0	13.0	13.3	13.0	13.2	12.9	13.0	13.0	13.6	13.3	13.3	96.6	12.7	100	99.3	31.8	31.4	31.9
	HK/1074	13.4	13.0	13.0	13.3	13.0	13.2	12.9	13.0	13.0	13.6	13.3	13.3	96.3	12.7	99.3	100	31.8	31.3	31.9
	Busan/10/0 7	81.0	82.9	82.9	82.9	82.4	82.2	81.8	82.2	82.0	82.2	83.3	83.7	12.7	15.7	12.5	12.5	100	98.0	98.1
	Chung/447/0 2	81.6	83.1	83.3	83.7	82.9	83.1	82.7	83.1	82.9	83.1	84.2	84.6	12.3	15.7	12.0	12.0	98.2	100	96.9
	Kor/AR05/0 8	81.6	83.5	83.5	81.6	83.1	82.9	81.0	82.9	82.7	82.9	82.0	82.4	12.8	15.4	12.8	12.8	98.1	96.4	100

최근 국내분리주 모두는 NA 단백질의 HB site의 아미노산 서열은 ^{366}ISKDSRSG^{373}과 ^{399}DNNNWS^{404}을 가지고 있는 것으로 나타나 사람감염 H9N2 바이러스(HK/1073/99)와는 차이를 보였다. 또한 NA 단백질의 stalk region에서도 결손이 없는 것으로 나타나 사람감염 H9N2 주와는 차이를 보였다(표 1-12).

표 1-12. NA 단백질의 HB site 아미노산 및 stalk region에서의 유전자 결손여부

Vrius	subtype	Amino acid of HB site		Deletion in the stalk region
		366-373	399-404	
A/Ck/Kor/KNU07033/07	H9N2	ISKDSRSG	DNNNWS	-
A/Ck/Kor/KNUGJ09/09	H9N2	.....	.....	-
A/Ck/Kor/KNUSWR09/09	H9N2	.....	.....	-
A/ck/Kor/S21/04	H9N2	.....	.....	-
A/ck/Kor/01310/01	H9N2	.....	.....	-
A/ck/Kor/MS96/96	H9N2	.N.....	.....	-
A/Dove/Kor/S14/03	H9N2	.....	AITTC.	-
A/Chungnam/447/02 (human)	H3N2	..EKL...	.RG.R.	-
A/Swine/Korea/CY02/02	H1N2	.NEKL...	.RGDR.	-
A/mallard/Xuyi/10/2005	H5N2	.....	.....	-
A/ck/Bj/1/94	H9N2	.KE.....	.SD...	-
A/ck/Bj/1/00	H9N2	.KE.....	.SD...	63-65
A/DK/HK/Y280/97	H9N2	.KE.....	.SD...	63-65
A/Qa/HK/G1/97	H9N2	.K.....	.SDIR.	38-39
HK/1073/99	H9N2	.K.....	.SD...	38-39
Ck/PE/1370/83	H5N2	.....	.....	63-82
Ck/CA/6643/01	H6N2	.....	.....	63-80

NA 유전자의 염기서열을 토대로 phylogenetic tree를 작성하여 계통분석을 실시하였다. 국내분리주중 산란계농장에서 분리된 KNU07033은 과거 국내분리주와 유사한 한국계열로 분류되었다. 그러나 재래시장에서 분리된 KNUGJ와 KNUSWR은 기존 한국분리주와은 다르게 야생조류에서 분리되는 H5N2 혈청형의 NA 유전자와 같은 계열로 분류되었다(Fig. 1-3).

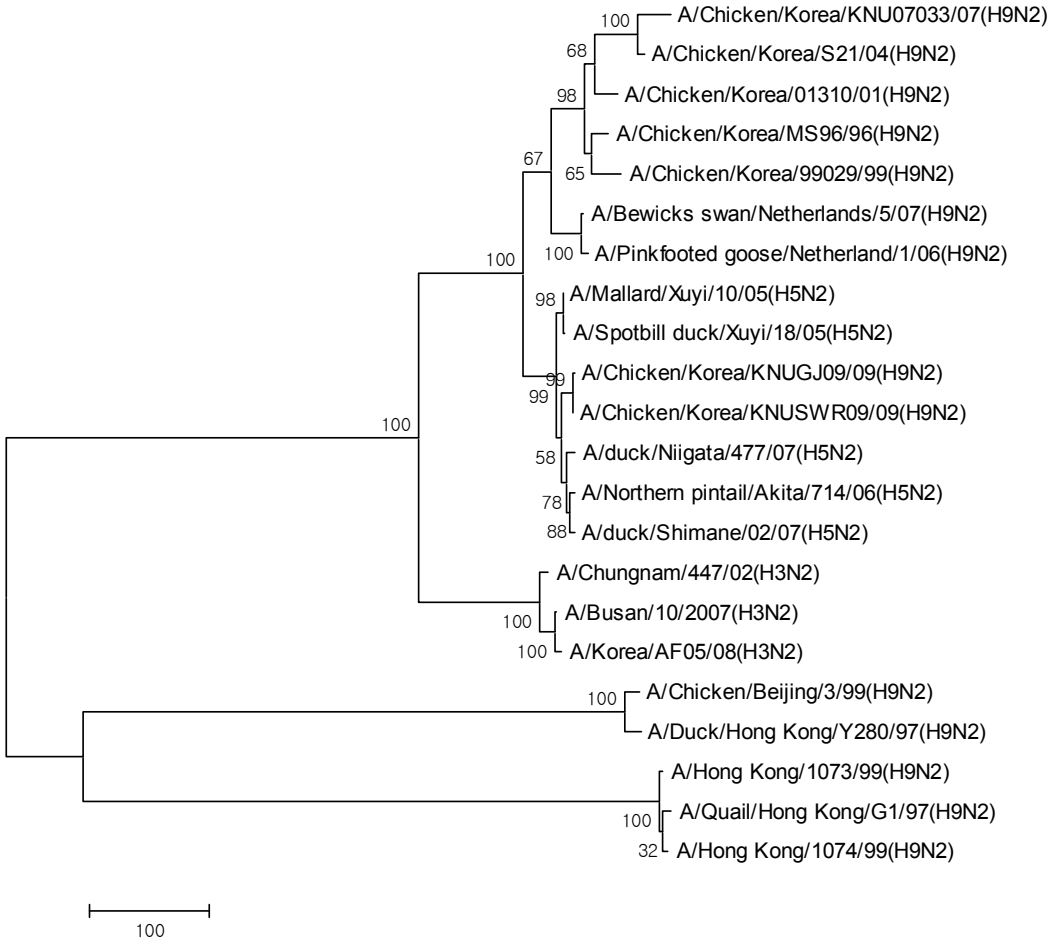


Fig. 1-3. 분리주의 NA 유전자 phylogenetic analysis

3. 요약 및 결론

방어능 및 안전성이 우수한 항원생산용 ND 및 AI 바이러스를 선발하기 위하여 바이러스 수집 및 항원 및 유전학적 특성 등의 연구를 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 사육오리, 야생조류 및 재래시장 유통 오리 등으로부터 ND 바이러스 3주를 확보하여 병원성여부를 조사한 결과 사육오리 분리주는 고병원성 바이러스이었으나 기타 분리주는 저병원성 바이러스이었다.

2) 분리 NDV주에 대한 혈청학적 관련성을 조사한 결과 분리주 및 기존 국내유행주간의 혈청학적 차이 는 뚜렷하지 않았으며 재래시장 유통오리에서 분리된 NDVGP09는 동종항원뿐만 아니라 이종 항원에 대하여도 비교적 높은 혈구응집억제항체를 유도하였다.

3) NDV F 유전자 염기서열을 분석하여 기존분리주 및 분리주간 유전학적 관련성을 조사한 결과 KNUGP09주와 KNUSH09주는 모두 저병원성 바이러스 계열인 genotype I로 분류되었다. 또한 KNUGP09주는 백신주인 V4와 가장높은 상동성(98.9%)을 보였으며 KNUSH09주는 미국에서 분리보고된 오리분리주(mallard/US)와 가장 높은 상동성(97.9%)이 있는 것으로 확인되었다.

4) 산란계농장 및 재래시장 유통 닭으로부터 AI 바이러스 3주를 확보하여 병원성여부를 조사한 결과 3주 모두 닭에 대한 병원성은 저병원성 바이러스로 분류되었다.

5) 분리 AIV에 대한 HA 단백질의 혈청학적 관련성을 조사한 결과 분리주 및 기존 국내유행주간의 혈 청학적 차이는 많지 않았으며 최근 분리주 모두는 국내유행 H9N2 바이러스에 대한 혈구응집억제 항체를 유도하는 것으로 확인되었다.

6) 분리 AIV의 표면유전자인 HA 유전자 및 NA 유전자를 분석한 결과 산란계에서 분리된 KNU07033주는 HA 및 NA 유전자 모두 기존 국내분리 H9N2 분리주들과 근연관계가 높았다. 그러나 재래시 장 유통닭으로부터 분리된 2주는 HA유전자는 기존 국내분리 H9N2 바이러스들과 유사하였으나 NA 유전자는 국내분리주와는 다르게 야생조류에서 분리되는 H5N2바이러스와 유사한 계열로 분류되었다.

이상의 결과를 토대로 방어능 및 안전성이 우수한 항원생산용 ND 바이러스는 재래시장 유통 닭에서 분리된 KNUGP09주를 선정하였고 항원생산용 AI 바이러스는 산란계에서 분리된 KNU07033주를 선정하였다.

제 2 절 양계 E. Coli 및 양계 Salmonella의 야외 분리주 선발

1. 양계용 대장균(*Escherichia coli*) 야외분리주 선발

가. 증균배양

대장균을 분리하기 위해서는 시료 현탁액 1㎖를 Brilliant green lactose bile(BGLB) broth 9㎖에 42℃, 48시간 증균 배양 한다. 환축의 분변시료는 증균과정 없이 직접 선택배지에서 분리한다.

나. 분리배양

Chromogenic E. coli/Coliform medium에 37℃에서 18~24시간 배양한 후 보라색 집락을 시료당 3개의 집락을 선택하여 Eosin Methylene Blue(EMB) agar에 도말한다. EMB agar는 37℃에서 18~24시간 배양 한 후, 금속성 광택을 나타내는 집락을 3개 선택하여 MacConkey agar(MA)에 도말하여 37℃, 18~24시간 배양한다.

다. 병원성인자 검사

임상시료에서 분리한 대장균의 병원성 검사는 Heat-labile toxin(LT), Heat-stable toxin(ST) 인자를 PCR 방법을 이용하여 검출한다.

닭의 경우, 실질장기 병변부에서 분리한 대장균은 병원성 대장균 즉 Avian pathogenic *E. coli*(APEC)로 분류하고 그 밖의 건강한 닭의 장내용물 및 분변 등에서 분리한 대장균은 일반 대장균으로 구분한다.

o DNA 추출

순수 분리한 균주는 Brain Heart Infusion (BHI) broth에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한다. 배양액 1㎖를 취하여 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 펠렛을 다시 증류수(DW)로 2회 세척하고 이를 다시 DW로 재부유시킨다. 부유시킨 균 현탁액은 100℃에서 10분간 가열한 후 상층액을 새 튜브에 취하여 4℃에 보관하면서 사용한다.

o Heat-labile toxin(LT)과 heat-stable toxin(ST) 검출에 사용하는 primers는 시판되고 있는 것을 이용한다 (LT: TaKaRa S003, ST: TaKaRa S005). LT와 ST의 최종 증폭산물은 각각 263bp과 123bp이다.

o PCR 반응조성 및 온도 조건

PCR 반응은 DNA polymerase, dNTPs 및 reaction buffer 등 PCR 수행에 필요한 구성 성분을 혼합하여 1회 분량씩 동결건조시킨 상품화된 PCR premix를 이용한다. 개개의 PCR premix tube에 template DNA, primer set(foward, reverse) 및 증류수를 첨가하여 mixing한 후 Thermocycler에서 반응시킨다.

표 2-1. LT, ST 유전자 검출

〈 PCR 반응 조성 〉

o DW 17㎕
o Primer foward(100 pMol) 1㎕ Primer reverse(100 pMol) 1㎕
o Template DNA 1㎕ Total 20㎕

〈 PCR 온도 조건 〉

Step	Temp. and time	Cycle
Initial heating	94℃ 5min	1
Cycle reaction	94℃ 30sec 55℃ 30sec 72℃ 1min	35
Last extension	72℃ 10min	1

o 전기영동

PCR 증폭산물은 1.5% agarose gel상에서 100V에서 약 40분간 전기영동 후 gel을 ethidium bromide로 15분간 염색하고, 15분간 증류수로 탈색시킨 다음, 자외선을 조사하여 증폭산물을 확인한다.

라. 확인시험

MA에서 분홍색 집락을 선택하여 그람염색한 후 IMViC(Indole (+), MR(+), VP(-), Citrate(-)), Vitek (GNI card) 또는 API kit를 이용하여 최종 동정한다.

표 2-2. 대장균 판정결과

Indole	MR	VP	Citrate	Type
+	+	−	−	Typical E.coli
−	+	−	−	Atypical E.coli
+	+	−	+	Typical intermediate
−	+	−	+	Atypical intermediate
−	−	+	+	TypicalE.aerogenes
+	−	+	+	AtypicalE.aerogenes

- 전형적인 대장균 - - 비전형적인 대장균 -

► IMViC test (Indole + Methyl red + Voges-Proskauer + Citrate)

① Indole test

SIM agar를 TT에 고층배지로 만든후, 콜로니에서 백금선으로 채취해 배지 안으로 천자배양한다. Kovac's reagent를 스포이드로 몇방울 넣어 반응을 살핀다.

양성: Red reagent layer, 음성: no red colorization

** Methyl red, Voges-Proskauer, Citrate실험할 때도 Indole test할 때 채취한 같은 콜로니를 사용해야 한다. 이유는 4가지시험을 통합해 결론을 이끌어 내는데, 혹 콜로니가 비대장균을 채취할 수 있기 때문에, 결과 취합시 균이 달라질 수 있다.

② Methyl red test

MR-VP broth를 TT에 넣은 후, 콜로니에서 백금이로 채취해 배지 안에 넣고 배양한다. Methyl red solution을 스포이드로 몇 방울 넣어 반응을 살핀다.

양성: Red, 음성:Yellow

③ Voges-Proskauer test
MR-VP broth를 TT에 넣은 후, 콜로니에서 백금이로 채취해 배지 안에 넣고 배양한다. Barritt's reagent A를 10방울, 곧이어 Barritt's reagent B를 10방울 넣고 반응을 살핀다.
양성 : Deep red color, 음성 : no red colorization
④ Citrate Utilization test
Simmon's citrate agar를 완전사면배지로 만든후, 사면에 백금이로 도말한다. 배양후 Bromthylmol blue을 몇방울 넣어 반응을 살핀다.
양성 : growth, blue colorization, 음성 : no growth remain green

2. 양계용 살모넬라균(*Salmonella* spp.) 야외분리주 선발

가. 증균배양
닭의 분변시료 및 임상시료는 Buffered Peptone Water(BPW)에 시료를 약 5g 넣어 균질화한 후 37℃에서 16~20시간 배양한다.

나. 선택배양
닭의 분변 및 임상시료는 BPW 증균액 0.1㎖를 10㎖의 RV broth에서 접종한 후 42℃에서 하룻밤 배양한다.

다. 분리배양
닭의 분변 및 임상시료는 RV 증균액을 Rambach agar에 도말한 후 37℃에서 18~24시간 배양한다. Rambach agar에서 빨간색(또는 핑크색) 집락을 선택하여 MacConkey에서 도말하여 37℃에서 18~24시간 배양한 후 혈청형 동정을 한다. 가금티푸스 원인균인 *Sal. gallinarum*의 경우 투명한 핑크 집락을 형성한다.

라. 생화학시험
살모넬라균 의심집락에 대해서는 TSI agar 또는 LIA 사면배지에 천자하여 37℃, 18~24시간 배양한다. TSI 또는 LIA 검사결과 살모넬라균으로 추정되는 균에 대해서는 그람음성 간균임을 확인하고 indole(-), MR(+), VP(-), citrate(+), urease(-), Lysine(+), KCN broth 증식(-) 등의 생화학검사를 실시한다. MacConkey Agar에 배양하여 Mucap test로 자외선조사시 형광을 나타내는지 확인한다.

마. 살모넬라균의 유전자검출(Polymerase chain reaction)
< Boiling 방법에 의한 세균 DNA 추출>
① 200㎕의 PCR-grade water에 멸균 loop를 이용하여 혈액배지상에서 자란 세균 colony를 채취하여 부유시킨다.
② 7,500 ~ 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한다.
③ 조심스럽게 상층액을 버린다.
④ Pellet을 100㎕의 멸균증류수를 가하여 vortexing하여 부유시킨다.
⑤ 100℃에서 10~15분간 boiling 한 후 ice에서 즉시 식힌다.

⑥ 4℃, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 한다.
⑦ 새 tube에 조심스럽게 상층액을 옮겨 PCR에 template로 사용한다.
⑧ 바로 사용하지 않을 경우 -20℃에 보관해 둔다.

< PCR 술식>

① Single PCR Primer 준비 :
② stock primer:제조사의 술식에 의해 Sterile TE를 이용하여 희석하며 일반적으로 100pmole/㎕로 희석
③ Working primer mix : Forward primer와 reverse primer를 한 tube에 각각 10uM의 농도로 희석하여 사용한다.
④ Primers

Bac species	Target	Product size (bp)	Primer	Sequence(5'-3')
Salmonella spp..	InvA	443	F	TTT ACG GTC TAT TTT GAT TTG
			R	TAT GCT CCA CAA GGT TAA TG

<Working primer mix 제조방법>

Stock forward primer (100 pmole/㎕) 각각	10㎕	1종*
Stock reverse primer (100 pmole/㎕) 각각	10㎕	
TE buffer (pH 8.0)	80㎕	
Total	100㎕	

⑤ PCR 조성 : PCR master mix가 동결건조된 상태로 들어있는 tube를 사용하는 경우
(예> Bioneer premix PCR 제품)

Template	2㎕	
Working primer mix (each 10pmole/㎕)	4㎕	
D.W.	15㎕	
Total	20㎕	

⑥ PCR conditions

Initial activation step	95℃ at 5min	1cycle	
Denaturation	94℃ at 1min	35cycle	
Annealing	54℃ at 30sec		
Extension	72℃ at 30sec		
Final extension	72℃ at 10min	1cycle	

⑦ 전기영동

- 농도의 gel 농도 1.5%, 1X TAE buffer, Loading dye, 100bp ladder, Gel illuminator
- 방법

o PCR product에 적당한 농도의 gel을 선택하여 전기영동장치에 장착한다.
o 전기영동장치에 1XTAE buffer를 gel이 잠길 정도로 붓는다.

o PCR product를 well에 loading한다.

o PCR premix에 loading dye가 포함되어 있는 경우에는 바로 product를 5-10㎕ 취하여 loading한다.

※ Loading dye가 포함되어 있지 않은 경우는 6Xloading dye 1과 PCR product 5volume을 섞어 loading한다.

o 100volt에서 40분정도 전기영동을 실시 후 UV illuminator로 전기영동 결과를 확인한다.

바. 혈청학적 진단

*Salmonella*의 혈청형 동정은 somatic(O) antisera와 flagella(H) antisera의 각각의 응집여부로써 분류된다.

- 균체항원 동정시험 : 균체(O) 항원 동정시험을 평판응집반응으로 실시하며, 식염수 20~30㎕를 평판에 떨어뜨리고 적당량의 의심되는 균을 잘풀어 놓는다. 동량의 살모넬라 폴리그룹혈청(A-G)을 차례로 가하고 잘 혼합하여 반응여부를 관찰한다. 폴리그룹혈청에 양성인 경우 같은 방법으로 반응시켜 그에 속한 그룹혈청을 결정하고 다시 단일 항혈청과 반응시켜 O type을 결정한다.
- 편모(H)항원 동정시험 : 시험관 응집반응으로 실시하며 시험관, 또는 에펜돌프 튜브를 이용하며, 후자의 경우 시약이 절약되고 시험 조작이 간편한 잇점이 있다. 먼저 motility GI me야um 또는 semisolid agar 에 2~3차례 계대하여 편모항원을 활성화 시킨다.

BHI broth 또는 TSB에 5~6시간 배양하거나 하루동안 배양하여 적당히 균을 희석하여(McFarland No 2-3)하여 시험관의 경우 0.5㎖, 에펜돌프 튜브 0.3㎖를 분주하고 권장되는 희석배수에 따라 희석된 H-항혈청을 3~4방울 가한 후 50℃에 항온수조에 반응시키며 응집여부를 판독한다. 1차 phase 항원이 결정되고 2차 phase 항원을 시험하기 위해서는 결정된 1차 항원의 항혈청으로 blocking(브리찌)하고 활성이 억제된 균을 배양하여 재차 시험한다.

표 2-3. 살모넬라균의 항원구조 및 주요 혈청형

Serotype	Group	Antigenic Fomula		
		Somatic (O)	Flagella (H)	
			phage 1	phage2
paratyhi-A	A	1, 2, 12	a	-
paratyhi-B	B	1, 4, 5, 12	b	1,2
derby	B	1, 4, 5, 12	f,g	(1,2)
typhimurium	B	1, 4, 5, 12	i	1,2
cholerasuis	C1	6, 7	c	1,5
paratyhi-C	C1	6, 7	c	1,5
oranienburg	C1	6, 7, 14	m,t	-
thompson	C1	6, 7, 14	k	1,5
infantis	C1	6, 7, 14	r	1,5
newport	C2	6, 8	e,h	1,2
kentucky	C3	8, 20	i	z6
typhi	D1	9, 12, (Vi)	d	(z66)
enteritidis	D1	1, 9, 12	g,m	(1,7)
dublin	D1	1, 9, 12	g, p	-
pullinarum	D1	9, 12	-	-
gallinarum	D1	1, 9, 12	-	-
ontario	D2	9, 46	d	1,5
anatum	E1	3, 10	e, h	1,6
london	E1	3, 10	l,v	1,6
newington	E2	3, 15	e, h	1,6
illinosis	E3	3, 15, 34	y	1,5
senftenberg	E4	1, 3, 19	g, s, tI	-
aberdeen	F	11	i	1,2
washington	G1	13, 22	m,t	-
mississippi	G2	1, 13, 23	b	(1,5)
carrau	H	6, 14, 24	y	1,7
hvittingfoss	I	16	b	e,n,x

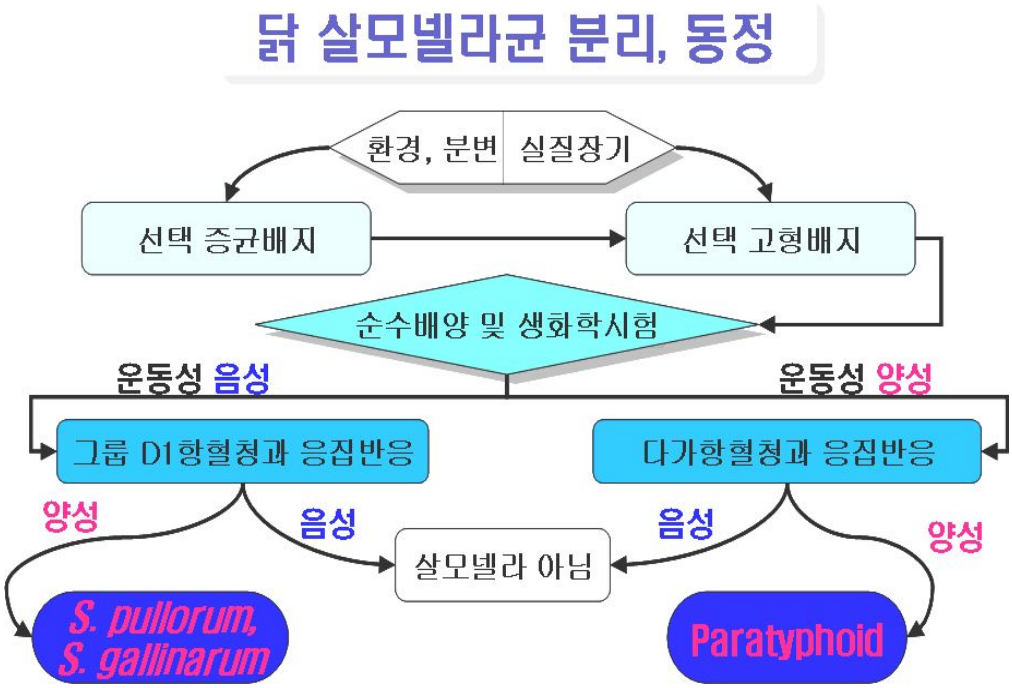


Fig. 2-1. 닭 살모넬라균 분리, 동정 모식도

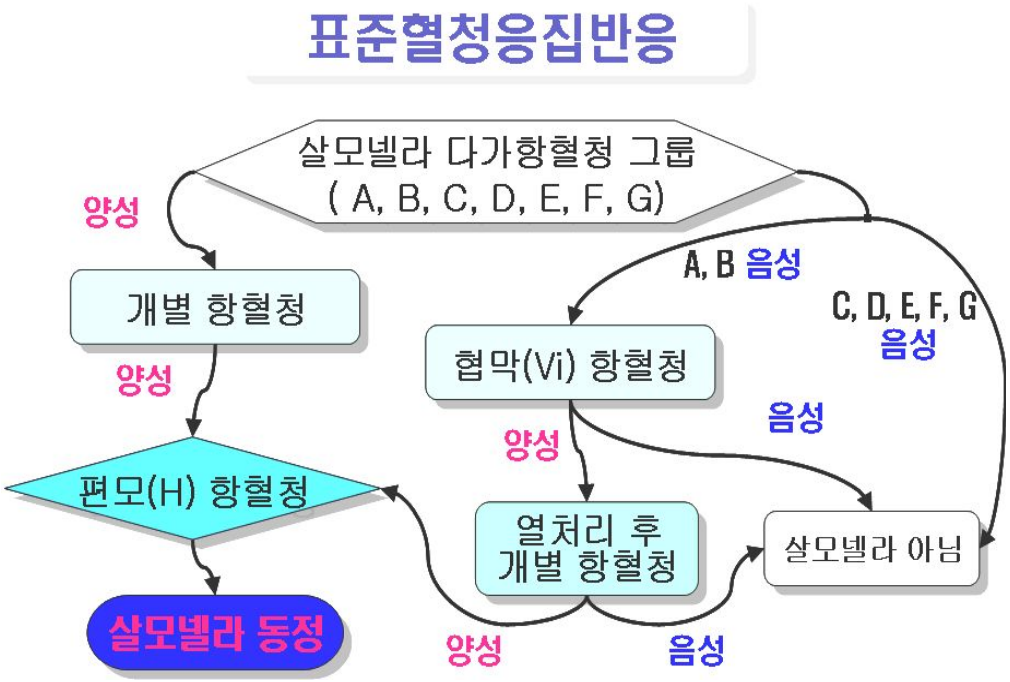


Fig. 2-2. 닭 살모넬라균 표준혈청 응집반응 판별 모식도

3. 요약 및 결과

양계용 *E. coli* 및 Salmonella균을 야외분리주로 분리한 내용은 표 2-4에 정리하였다. 본 기술개발을 통해 E. coli는 19주를 분리하였고, Salmonella는 5주를 분리하여 보관하였고, 이들 중에 병원성이 높은 분리주는 양계의 백신항원주로 사용하였다.

표 2-4. *E. coli* 및 Salmonella균 항원선발 - 분리주 계대보존 처리 균주명

균주번호	분리주	비고	균주번호	분리주	비고
No.2009-001	pathogenic *E. coli*		No.2009-014	pathogenic *E. coli*	
No.2009-002	pathogenic *E. coli*		No.2009-015	pathogenic *E. coli*	
No.2009-003	pathogenic *E. coli*		No.2009-016	pathogenic *E. coli*	
No.2009-004	pathogenic *E. coli*		No.2009-017	pathogenic *E. coli*	
No.2009-005	pathogenic *E. coli*		No.2009-018	pathogenic *E. coli*	
No.2009-006	pathogenic *E. coli*		No.2009-019	pathogenic *E. coli*	
No.2009-007	pathogenic *E. coli*		No.2009-020	pathogenic *E. coli*	
No.2009-008	pathogenic *E. coli*		No.2009-01	Salmonella spp.	
No.2009-009	pathogenic *E. coli*		No.2009-02	Salmonella spp.	
No.2009-010	pathogenic *E. coli*		No.2009-03	Salmonella spp.	
No.2009-011	pathogenic *E. coli*		No.2009-04	Salmonella spp.	
No.2009-012	pathogenic *E. coli*		No.2009-05	Salmonella spp.	
No.2009-013	pathogenic *E. coli*		계	25주	

제 3 절 항원을 이용한 고역가의 특이난황항체 생산

1. 항원생산 기법확립

가. 양계 야외분리주 E.coli.

가축위생시험소로부터 분양받은 야외 분리주 E.coli 를 Blood agar 배지를 사용하여 37℃에서 incubator에서 호기 배양하였다. Colony 확인 후 BHI broth 1000ml에 접종후 24시간에서 36시간 진탕 배양하였다.배양이 끝난후 Formalin 0.3%로 48시간 실온에서 불활화 시켰다. 불활화 된 항원을 6000rpm 원심 시행하여 수거하였다. 수거된 항원을 PBS(PH 7.2)로 푼뒤 Formalin 0.1%를 첨가하여 1일간 실온에 방치후 4℃ 냉장고 보관하였다. 제조된 항원을 spectrophotometer를 이용하여 410 nm에서 OD치가 1.0이 되도록 항원 산정하여 농도를 맞추었다.

나. 양계 야외분리주 Salmonella gallinarium, Salmonella pullorium, Salmonella enteritidis

가축위생시험소로부터 분양받은 야외 분리주 Salmonella 및 Salmonella gallinarium, Salmonella pullorium, Salmonella enteritidis를 Blood agar 배지를 사용하여 37℃에서 incubator에서 호기 배양하여 용혈성 colony를 1차 확인하였다. Colony 확인 후 BHI broth 1000ml에 접종후 24시간에서 36시간 진탕 배양하였다.배양이 끝난후 Formalin 0.3%로 48시간 실온에서 불활화 시켰다. 불활화 된 항원을 6000rpm 원심 시행하여 수거하였다. 수거된 항원을 PBS(PH 7.2)로 푼뒤 Formalin 0.1%를 첨가하여 1일간 실온에 방치후 4도시 냉장고 보관하였다. 제조된 항원을 spectrophotometer를 이용하여 410 nm에서 OD치가 1.0이 되도록 항원 산정하여 농도를 맞추었다.

다. Avian influenza viru(AIV) 및 Newcastle Virus(NDV)

11일령 발육계란을 준비 하여 기실부위를 소독 후 ,검란기를 이용하여 기실을 확인 후 표시하여, $10^{4.5}$ ~$10^{5.5}$ ELD50의 농도로 계란당 0.2ml씩 혈관을 건드리지 않도록 주사기를 이용하여 바이러스 희석액을 접종하였다. 접종 후에는 오염이 되지 않도록 막아준 후 37℃ incubator에서 48시간 배양한다. 검란 시 바이러스 감염에 의해 죽은 것은 냉장보관하고 48시간 후 에는 모두 냉장보관 하였다. 감염된 계란의 기실부위를 깨고 주사기를 이용하여 바이러스가 감염된 요막강액을 뽑아 배양된 바이러스를 수거 하였다. 수거된 바이러스 항원에 포르말린 0.1% 처리하고 실온에서 12시간 교반하여 불활화 시켜 고농도의 혼합 백신생산을 위한 바이러스 항원농축을 시행하였다.

2. 생산된 항원을 이용한 고농도 혼합백신제조

양계 혼합백신 제조를 위해 ND virus, AI virus, 양계 야외분리주 E.coli. 양계 야외분리주 Salmonella gallinarium, Salmonella pullorium, Salmonella enteritidis를 배양한 후 formalin으로 불활화하여 준비하였다.
배양된 항원과 ISA70을 약 3:7 비율로 혼합한 후 Homogenizer를 이용하여 사독백신을 제조한 뒤 무균검사와 불활화 확인 시험을 거쳐 특이난황항체 생산을 위한 혼합백신을 준비하였다.

3. 산란계 접종 시험

가. 산란계 면역

제조된 백신을 22주령된 Hy-Line Brown 산란계에 1ml씩 가슴에 근육 주사하였으며 3주간격으로 3회 Boosting을 실시하였다.

나. 난황 샘플수집 및 분석

난황샘플 수집은 접종일 하루 전 부터 매일 계란 수거를 시작, 날짜별로 기입하여 3일 간격으로 15주간 항체가 분석을 실시하였다.

4. 백신접종 난황의 특이난황 항체 역가의 측정

가. 난황항체 샘플제조

처리구별 수집한 계란을 난황 분리하여 1개의 난황 당 50 ml의 멸균 DW로 희석한 후 50 ml tube에 옮긴 후 24시간 냉동시킨다. 24시간 후 37℃ 중탕시켜 녹인 뒤 centrifuge tube에 넣어 3,000 rpm에서 30 min간 원심분리 하였다. 원심분리 한 후 상등액을 취해 IgY 항체역가를 측정하였다.

나. 항체역가 측정을 위한 OMP (Outer membrane protein)의 분리

생산된 항원(양계 야외분리주 E.coli. 양계 야외분리주Salmonella gallinarium)을 8000rpm에서 50분간 원심분리 시행한다. 원심분리 후 상층액을 버리고 pellet을 10mM HEPES buffer로 suspension 후 초음파 파쇄(sonication) 하여 세균을 Lysis 한다. Lysis한 상층액을 8000rpm 4℃에서 30분간 원심하여 상층액을 수확한다. 수확한 상층액에 1% N-Lauroly sarcosine(SIGMA,L-9150)을 최종 농도 0.01% 가 되도록 첨가한 후 실온에서 10분간 처리하였다. 처리 후 15,000rpm 4℃에서 50분간 원심 시행하여 N-Lauroly sarcosine (SIGMA, L-9150)을 제거하여 주고, 10mM HEPES buffer 50ml로 다시 부유시켜 15,000rpm 4℃에서 50분간 원심 분리하여 OMP를 수거하였다.

수거된 항원은 BCA법으로 단백질 정량 후 200㎍/ml이 되도록 코팅하여 항체역가측정에 사용하였다.

다. ELISA 에 의한 항체가 측정

난황항체의 활성은 Mine(1997)이 사용한 ELISA 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 난황중의 특이난황항체의 역가는 Indirect ELISA method를 이용하였으며 난황항체의 활성은 Mine(1997)가 사용한 ELISA 방법을 응용하여 측정하였다. 먼저 항원을 200 ng/ml의 농도로 coating buffer에 희석하여 각 well당 100ul씩 96 well polystyrene plate에 Coating 하여 4℃에서 over night 시킨다(또는, 37℃에서 1시간 방치시킨다). PBS-T(phosphate buffer saline, 0.05% Tween 20, pH 7.4)로 세척 후 2% BSA가 함유된 PBS buffer로 1시간동안 37℃에서 blocking하며 상기와 같은 방법으로 세척하였다. 음성대조군, 양성대조군 및 샘플을 2X씩 희석하여 Well당 100㎕씩 넣고 37℃에서 1시간 정치한다. 1시간 후 3번 세척하고 2차 항체(anti-chicken: Sigma, U.S.A)를 PBS에 적정량 희석하여 각 Well 에 100 ul 씩 분주한 후 37℃에 1시간 반응시킨다. 그 후 3번 세척을 하고 substrate OPD, full name) 를 각 well에 100ul씩 분주한 다음 실온에서 약 10분간 반응 시키고 Stop solution 50ul을 분주하여 반응을 중지시켜 450 nm의 파장에서 ELISA reader 로 각 well의 흡광도를 측정하여 ELISA value 로 나타내었다. 측정된 결과에 음성의 값을 2배수 하여 처리된 난황의 측정값에 대입하여 분석 Data의 역가를 나타내었다.

라. 산란계 접종에 따른 항체가 변화

양계 질병의 원인 항원으로 면역된 산란계에서 얻은 계란의 IgY 항체의 역가를 ELISA로 측정한 결과를 Fig. 3-1, Fig. 3-2에 나타내었다. 산란계에 면역 1주 후에 계란의 IgY 항체역가가 증가하기 시작하였고 2주 후부터 역가 8(1280)의 항체가를 나타내었다.

2차 접종 2주 후인 5주부터 E.coli 와 Salmonella 모두 가장 높은 역가를 나타내었다.

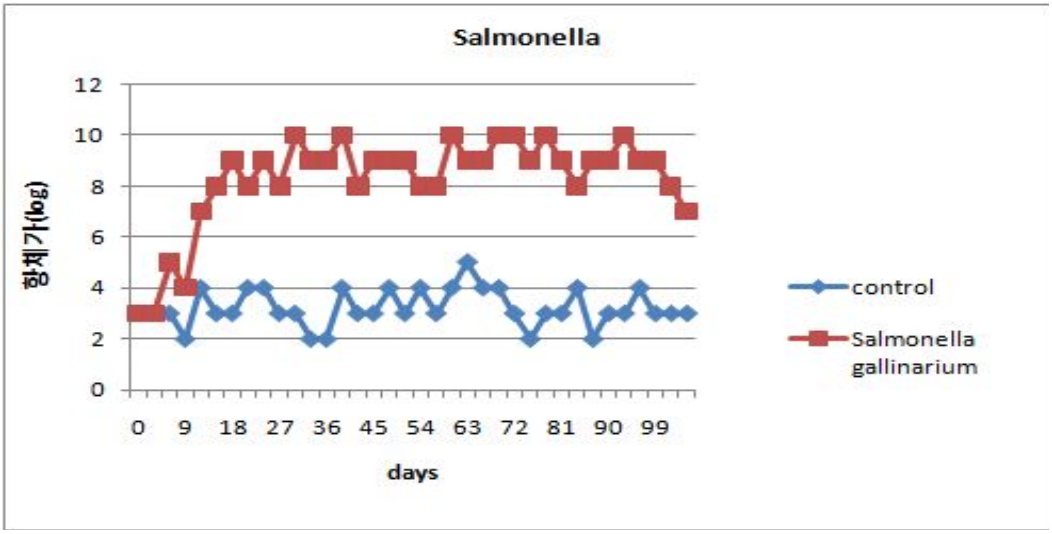


Fig. 3-1. *Salmonella gallnarium*의 특이난황항체가 변화

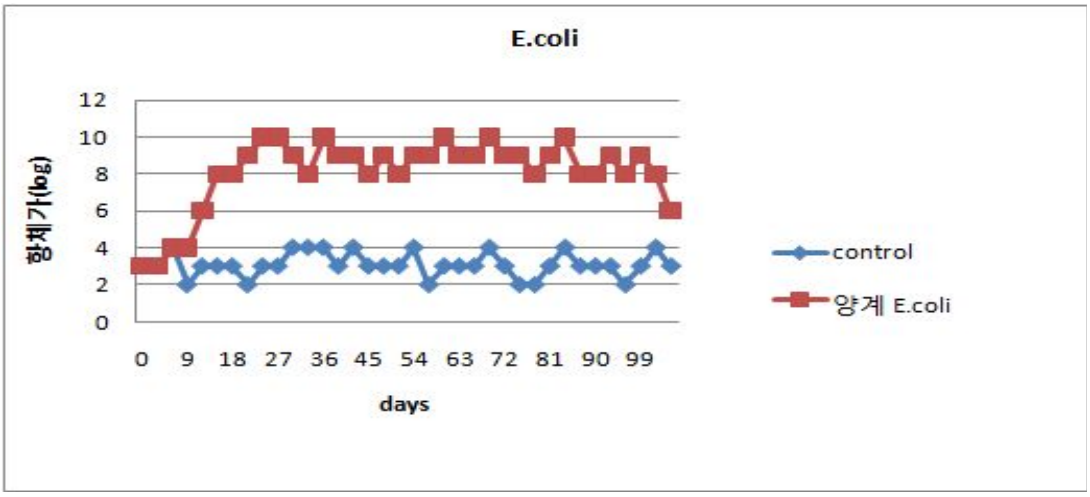


Fig. 3-2. *E.coli*에 대한 특이난황항체가 변화

5. 면역 후 시간 경과에 따른 NDV, AIV 항체수준

: 혈구응집억제반응법 (Hemaglutination inhiition test)

가금인플루엔자(Avian ifluenza virus, AIV)와 뉴캣슬 바이러스(Newcastle disease virus, NDV) 에는 적혈구 응집소가 존재한다. 이런 바이러스 감염 또는 백신에 의해 형성된 항체와 바이러스를 혼합하면 바이러스 입자의 응집소는 혈청내의 항체와 결합되어 불활화되고 적혈구의 수용기와는 결합할 수 없게 된다. 즉, 적혈구 응집소가 저지되는데 이러한 현상을 적혈구 응집억제반응 (Hemagglutination Inhibition test; HI Test)이라 한다.

혈구응집 반응 시 혈구응집소(Hemagglutinin)에 대한 특이 항체가 존재하면 혈구응집이 억제

된다. 이러한 혈구응집억제 정도의 많고 적음을 측정하여 혈청 및 난황내의 항체수준을 측정하였다.

가. 시료준비

(1) 가검혈청

(2) 혈액채취 : 면역을 위한 백신접종 시 혈액채취

(3) 백신접종 난황샘플

(4) 혈청 비동화 : 가검 혈청은 56℃, 30분에서 불활화시킨다.

나. 항원의 혈구응집 측정(HA test)

HI test를 위해서는 사용되는 항원의 정확한 혈구응집역가를 알아야 하므로 반드시 혈구응집반응 (HA test)이 선행되어야 한다.

(1) 시료준비 및 방법

① 닭 적혈구의 준비

채혈하고자 하는 양과 동량의 Alsever's solution을 주사기에 넣은 후 가능한 검사를 원하는 질병에 대한 항체를 가지지 않는 닭에서 같은 양의 닭 혈액을 채취하여 잘 섞는다.

② 채혈한 혈액을 눈금이 있는 원심관에 옮긴 후 1,500rpm에서 10분간 원심침전하여 진공펌프나 파스퇴르피펫을 이용하여 상층액과 백혈구층을 제거시키고 다시 PBS를 더하여 적혈구를 재부유시 킨 후 앞과 같은 방법으로 혈구를 3회 세척한다.

※ Alsever's solution

- NaCl ---------- 0.42g
- Sodium citrate ---------- 0.92g
- Dextrose ---------- 2.05g
- D.W ---------- to 100ml

(2) 실험방법

① 마이크로플레이트에서 하원을 2진 희석한다.

② 1% 적혈구 부유액 250ul를 희석된 항원에 각각 넣는다. 이때 항원이 함유되지 않은 PBS well에 1% 적혈구 부유액을 동량으로 넣는다(대조군).

③ 항원과 적혈구를 잘 흔들어 혼합시킨다.

④ 실온에서 40분간 정치시킨 후 end-poin를 판독한다.

다. 항체의 혈구응집 억제가 측정(Hemagglutination Inhibition test; HI Test)

(1) 실험방법

① U자형 96well 마이크로 플레이트 전체에 PBS를 0.025ml씩 분주한다.

② 가검혈청을 첫 번째 well에 각각 0.025ml씩 분주한다. 각각의 플레이트에는 양성혈청과

음성혈청을 포함한다.

③ 자동희석기 또는 마이크로 피펫을 이용하여 2진 희석한다.

④ 4HAU 항원 0.025ml을 각 well에 넣어준 후 진탕기로 잘 흔들어 혼합하고 실온에서 30분간 반응 시킴.

⑤ 30분 후에 1%wjrgufrn 부유액 0.025ml을 각 well에 넣어주고 plate를 잘흔들어 실온에서 40분간 정치시킨 후 혈구응집억제 정도를 관찰한다.

(2) 판정기준

① HI 역가는 4HAU의 항원을 완전히 억제하는 혈청의 최대 희석배수이다. 혈구응집은 플레이트를 45°정도 세워 일정시간이 지난 후 혈구가 흘러 내리는 점을 endpoint로 하면 보다 정확함.

② 양성반응 : HI 역가 1:8 ($log2^3$) 이상을 양성으로 함.

라. NDV, AI 항체수준 결과

면역 후 시간경과에 따른 혈청 및 난황 내 항체가를 혈구응집반응 억제 실험을 통해 알아본 결과 백신접종에 의해 NDV, AIV 항체가 형성되었음을 확인할 수 있었다.

NDV의 항체는 혈청과 난황내에서 모두 8이상의 높은 역가를 확인하였다. AIV의 항체는 3차 접종 후 혈청과 난황에서 5이상의 항체역가를 확인하였고 항체의 형성이 ND 바이러스 항체 형성보다 늦게 이루어지는 현상을 확인하였다.

표 3-1. 면역 후 경과에 따른 항체역가(Log2)

			접종전	2차접종 3주 후	3차접종 1주 후	3차접종 3주 후	3차접종 4주 후	4차접종 3주 후
ND	혈청	대조군	0	0	0	1.5	1	0
		접종군	0	8.7±0.8	8.4±0.5	8.0±0.7	7.9±0.7	7.5±0.6
	난황	대조군	0	0	0	1.3	1	0
		접종군	0	8.25±0.9	8.0±1	7.3±1	7.2±0.4	8.0±0.1
AI	혈청	대조군	0	0	0	0	1	0
		접종군	0	5.8±1.1	7.0±0.8	6.5±1.2	6.2±0.7	6.0±0.2
	난황	대조군	0	0	0	0	0	0
		접종군	0	5.5±1.3	6.4±0.54	6.0±0	5.8±0.4	5.6±0.5

6. 특이 난황항체 위내 안정성 실험

가. IgY 레반, 올리고당 코팅 소화효소 안정성 실험

난황 항체를 기능성 식품 소재 및 기능성 사료 소재로 이용하기 위해 가장 중요한 것은 구조 안정성이다. 항원 결합력의 저하를 최소화할 수 있는 안정한 조건에서의 분리, 정제 및이용되어야 한다. 그러므로 본 연구는 난황항체의 이용효율을 높이기 위해 난황 항체의 소화효소에 대한 안정성을 검토하였다. 고농도의 당은 수용액 중에서 단백질을 안정화 시키므로 당은 단백질의 안정제로 이용되고 있으며, IgY가 50% 설탕용액 중에서 산에 대해 큰 안정성을 나타낸다고 보고된 바 있다.

본 연구는 fructon의 일종인 Levan과 기능성 당질인 올리고당에서의 IgY 안정성을 비교, 검토 하였다.

(1) 레반, 올리고당 IgY 분말 준비

백신 접종 난황 및 전란으로부터 얻어진 분말에 올리고당 분말과 레반 분말을 중탕 처리하여 표 3-2와 같이 혼합하였다.

표 3-2. 올리고당 및 레반 코팅 난황/전란 샘플 제조

sample	구분 (원료/코팅재료)	제조
A	난황 / 대조구	난황 200g
B	난황 / 올리고당 8%	난황 200g + 올리고당 분말 12g
C	난황 / 레반 8%	난황 200g + 레반 분말 12g
A-1	전란 / 대조구	전란 200g
B-1	전란 / 올리고당 12%	전란 200g + 올리고당 분말 12g
C-1	전란 / 레반 12%	전란 200g + 레반 분말 12g

(2) 인공 위액 및 담즙액 준비

인공위액은 Kobayashi 등(1973)의 방법 및 용해성 측정에 따라 01.N HCl을 사용하여 pH2.5로 조정한 증류수에 pepsin (Sigma, USA) 1%를 첨가하여 조제하였고, 인공 담즙액은 증류수에 1% pancreatin을 첨가한 후 여과하여 제균 된 10% oxgall 용액을 1% 첨가하여 pH 6.8로 조정하여 사용하였다.

(3) 인공 위액에서의 항체가 측정

레반 및 올리고당 코팅 후 준비 된 난황 및 전란분말 10g을 인공위액 100ml에 혼합하여 37℃, 24시간 진탕 반응시킨 후 PBS로 중화시켰다. 반응 후 9000rpm에서 20분간 원심분리시켜 남은 고형분과 상층액을 얻었으며, 위액 상층액의 IgY 항체역가와 남은 난황 및 전란

고형분에서의 IgY 항체 역가는 효소면역측정법(ELISA)에 의해 측정하였다.

(4) 인공 담즙액에서의 항체가 측정

레반 및 올리고당 코팅 후 준비 된 난황 및 전란분말 0.5g을 인공담즙액 100ml에 혼합하여 37℃, 24시간 진탕 반응시킨 후 PBS로 중화시켰다. 반응 후 담즙액 내의 IgY 항체 역가는 효소면역측정법(ELISA)에 의해 측정하였다.

(5) 위내 안정성 실험결과

시험결과 인공 위액 처리 후 상층액과 난황 펠렛, 전란 펠렛 내의 IgY 항체역가는 올리고당을 처리한 시험군에서 항체 보존율이 가장 높은 것으로 나타났다. 소화효소를 처리하지 않은 대조구에 비하여 당처리를 하지 않은 시험군과 레반을 처리군, 올리고당 처리군에서 항체역가가 감소되는 경향을 관찰한 결과 당처리를 한 시험군에서 당처리를 하지 않은 시험군보다 당처리를 한 레반처리군, 올리고당 처리군에서 소화효소에 의한 항체감소현상이 줄어드는 것으로 나타났다. 또한 레반과 올리고당 처리군을 비교해볼 때 올리고당 처리구에서 레반처리구보다 항체역가 파괴가 적은 것으로 나타났으나 큰 유의차는 보이지 않았다(Fig. 3-3, Fig. 3-4, Fig. 3-5).

경제적 측면에서 볼 때 올리고당의 단가가 레반의 단가보다 낮으므로 원료의 가공 및 난황항체의 이용효율을 높이기 위해서는 올리고당의 사용이 효율적일 것으로 판단되었다.

또한 프럭토올리고당을 난황항체에 첨가하였을때 열과 산에 대해 안정성이 있다는 결과와 일치한다(Lee Kyung Aee, 1998).

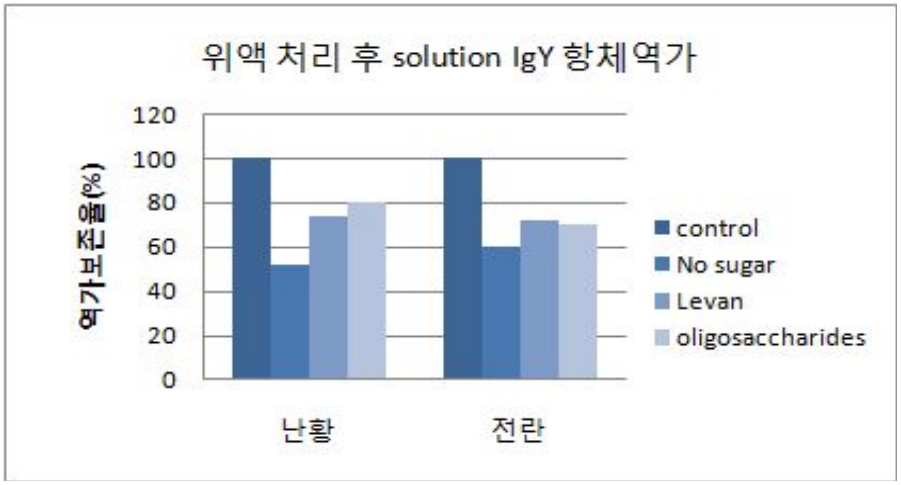


Fig 3-3. 레반 및 올리고당 코팅에 의한 위액 처리 후 인공 위액내 IgY 항체역가 보존율

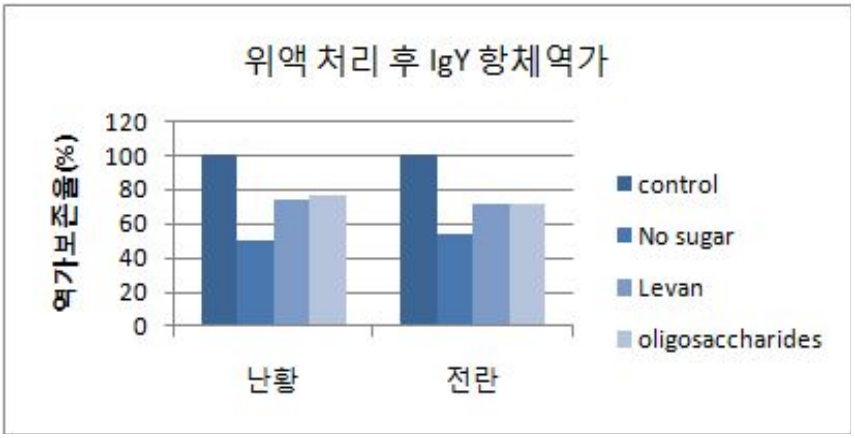


Fig 3-4. 레반 및 올리고당 코팅에 의한 위액 처리 후 난황 및 전란 펠렛내 IgY 항체역가 보존율

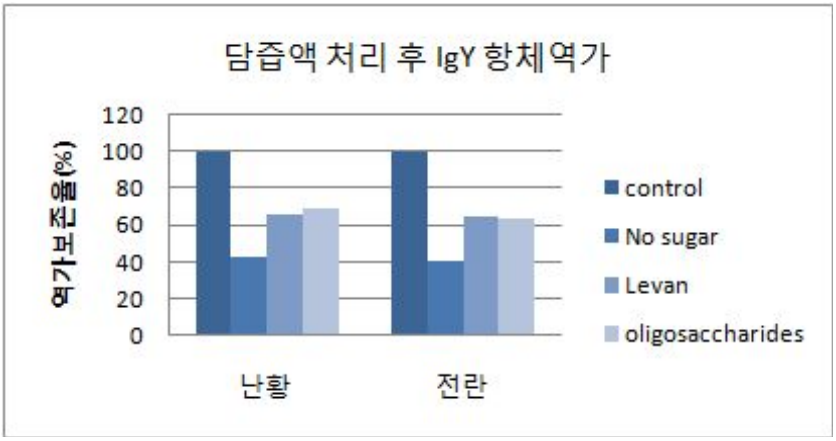


Fig 3-5. 레반 및 올리고당 코팅에 의한 담즙액 처리 후 난황 및 전란내 IgY 항체역가 보존율

7. 특이난황항체 분석

가. Ammonium sulfate를 이용한 IgY 항체분리 시험

난황을 난막을 제거하고, 1:4의 비율로 pH2.5 D.W와 희석하여, -20℃에 2일간 냉동시킨 후 7000rpm에서 30분간 원심분리하고 filteration하여 수용성 단백질을 분리한다. 분리된 단백질을 과포화된 ammonium sulfate용액으로 순수 단백질을 침전 시킨다. 침전된 용액을 원심분리하여 pellet을 얻고 PBS로 재부유 후 4℃ PBS buffer에서 투석 후 분리된 항체 샘플을 수거한다.

나. SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel) 분석

단백질 정량은 BCA kit를 이용하여 정량을 하였으며, SDS-PAGE는 5% stacking gel과 10% seperating gel을 사용하여 전기영동을 실시하였으며, 전기영동 후 gel을 Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 30분간 염색하고, destaining buffer를 이용하여 분리된 IgY 항체를 확인하였다.

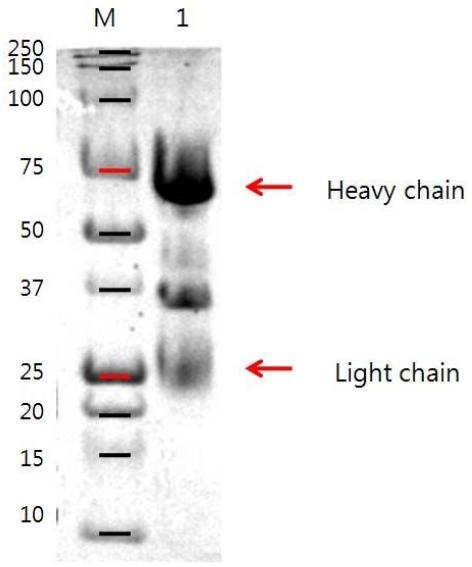


Fig. 3-6. 양계 IgY SDS-PAGE 분석

SDS-PAGE 상에서 분리된 항체를 전기영동하여 분리된 항체를 확인 하였다(Fig. 3-6). 각 각의 백신 접종 난황에서 분리된 항체에서 75kda 부분에 Heavy chain과 25kda 부분의 Light chain을 확인을 할 수 있었으며, 37kda부분의 진한 밴드는 여러 자료와 논문등의 자료를 참조(김영대 등,2004; Mine, 1997; Patterson 등, 1962; Rho 등, 1999)한 결과 난황내 존재하는 단백질인 b-livetin인 것으로 나타났다.

다. Western blot (양계 E.coli-specific IgY의 검증) 분석

항원균을 전기영동한 후 겔을 transfer장치를 이용하여 PVDF transfer membrane에 전이시켰다. membrane은 5% skim milk로 60분간 처리한 후 TBS-Tween 20으로 3번 수세하였다. membrane은 항원균에 대항하는 분리된 IgY 항체를 4℃에서 overnight하고 TBS-Tween 20 으로 3회 수세한 후 Anti-chicken IgY-HRP로 1시간 반응 시킨 후 HRP substrate solution(Millipore, USA)로 반응 시킨 후 developer 하였다.

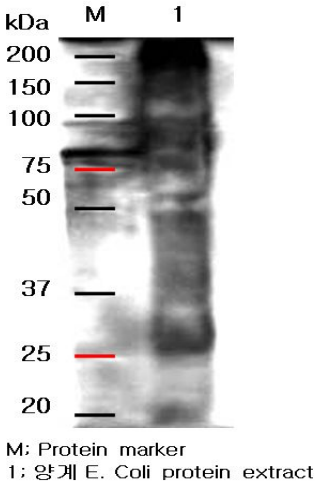


Fig. 3-7. 양계 E. Coli-specific IgY Western-blot 결과

양계 E.coli 야외 분리주에 대한 specific-IgY에 대한 항원균과 항체와의 결합을 알아보기 위하여 Western blot시험을 시행하였다. E.coli 균을 protein Lysis buffer를 이용하여 단백질을 추출하고, 전기영동을 실시하고 transfer membrane에 단백질을 transfer하고 Anti-Ecoli-IgY를 1차 항체로 하여 overnight로 반응 시킨 후 2차 항체로 Anti-chicken-IgY-HRP와 반응 시킨 후 결과를 보았다 IgY 항체와 균체 단백질과 결합으로 여러 밴드가 나온 것이 확인이 되었고, 특히 25kDa부근에 강한 결합을 하는 것으로 나타났으며, 50~100kDa 사이에서 4~5개의 밴드 결합이 확인, 75kDa 부근에서도 강한 결합을 보였다. 결과로 보아 양계 E.coli 야외 분리주에 specific하게 반응하는 IgY 항체가 존재한다는 것을 증명하는 결과가 나타났다(Fig. 3-7).

8. IgY 항균성 테스트

가. Salmonella gallinarium 의 배양 및 테스트 항원 준비

Blood Agar에 균주 배양하여 24시간 후 단일 colony 수거하였으며 Macfarland Standard 로 균주 농도를 측정 하여 멸균 PBS로 희석하여 농도 측정 후 BHI broth에 농도별로 접종 하였다.

나. IgY 항체의 준비 : Ammonium sulfate법을 이용하여 항체분리

① Whatman paper No.1 과 난황분리기를 이용하여 난막을 제거한 백신접종 난황만을 분리 하여 난황 10㎖에 HCl (pH2.5) 40㎖을 섞어서 -20℃에서 48hr보관 후 실온(25℃)에서 녹인다.

② Centrifuge 15000rpm에서 30분간(10℃)시행 후 상층액 filtration(whatman paper no.1)

③ Filtration한 용액에 amonium sulfate 포화용액 (132.1g, 99% 일때)을 1:1로 동량처리한다.

④ 4℃에서 overnight(침전시키는 과정) 후 침전된 항체만 수거하여 원심분리(10,000rpm/ 30min, 10℃) 후 상층액을 제거하고 pellet에 PBS 2~3ml을 넣고 부유시켜준다.

⑤ Dialysis tubing bag 을 이용하여 48hr, 4℃ 투석 (change PBS buffer)

⑥ Dialysis 끝나면 BCA법을 이용해 수거된 항체를 정량 후 사용한다.

다. 접종

10^6CFU/ml 로 준비된 Salmonella gallinarium broth에 2.5mg/ml, 5mg/ml, 7mg/ml의 농도로 IgY항체를 접종하여 37℃ 24시간 incubation 후 Sal.gallinarium-specific IgY 의 sal.gallinarium 균주 항균성을 확인하였다.

[접종농도]

Sal.gallinarum	10^6CFU/ml			
양계 IgY	0 mg/ml	2.5 mg/ml	5 mg/ml	7 mg/ml

라. 항균성 확인

항균성 확인은 spectrophotometer 660nm 흡광도 측정 방법과 methylen blue 염색을 이용한 응집반응 현미경 관찰을 통하여 확인하였다.

바. 항균성 결과

Salmonella gallinarum 의 성장에 anti-S. galinarium IgY (양계 IgY) 의 응집효과를 탁도 측정을 통해 확인 하였다(Fig. 3-8).

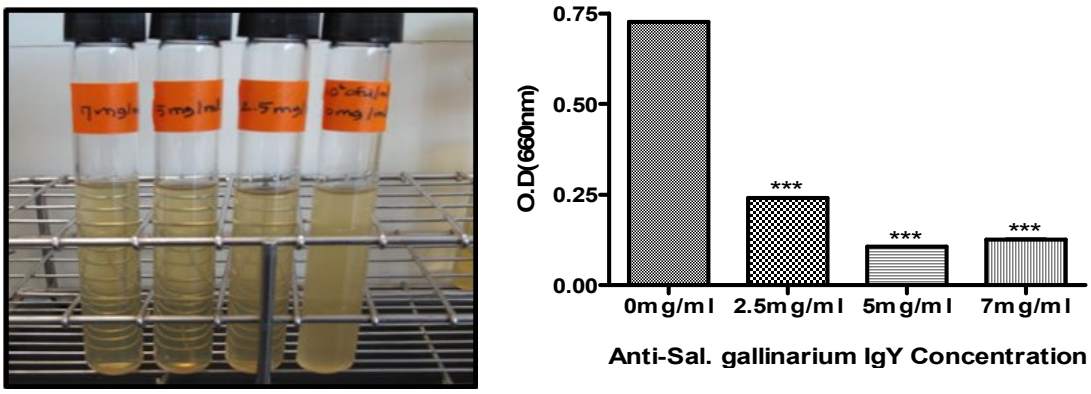
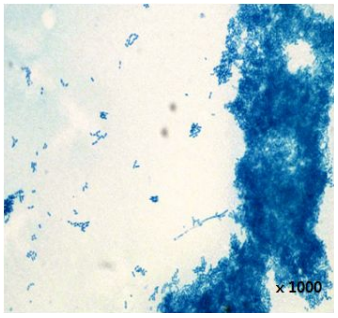


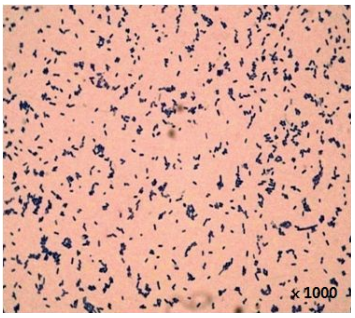
Fig. 3-8. Anti-Sal.galinarium IgY의 농도에 따른 항체 응집반응 OD_{660nm} 값 측정

Anti-S.gallinarium IgY (양계 IgY)가 첨가되지 않은 대조구에서 균들이 24시간 안에 고농도로 자라나 평균 OD 0.727의 값을 나타내었으나 anti-S.gallinarium IgY (양계 IgY) 가 2.5mg/ml의 농도로 첨가된 sample에서는 OD 0.240 , 5mg/ml 의 농도에서는 OD 0.108 로 흡광도가 IgY 농도에 따라 점차 낮아지는 것을 보였다(Fig. 3-8). 또한 5mg/ml 농도에서 가장 낮은 OD 값을 나타내고 7mg/ml 에서는 0.02 정도 높지만 유사한 OD 값을 나타내었다. 따라서, 0.5mg/ml 농도 이후의 anti-S.galinarium IgY(양계 IgY) 첨가는 대조구에 비하여 낮은 OD값을 보여 anti-S.gallinarium IgY(양계 IgY) 항균력을 통해 균체 활성을 억제하는 것을 확인하였다.

면역화 여부에 따른 anti-S.gallinarium IgY (양계 IgY)의 효과를 현미경으로 관찰 하였다 (Fig. 3-9). anti-S.galinarium IgY (양계 IgY)가 첨가되지 않은 대조구에서 균들이 응집되지 않고 독립된 형태로 존재 하는 것을 관찰하였다. 그러나 anti-S.gallinarium IgY (양계 IgY)가 첨가된 sample에서는 침전물을 보인 2.5mg/ml 첨가 sample 에서 부터 균들이 대부분 응집되는 것을 현미경을 통하여 관찰되었다. Salmonella gallinarium 균에 anti-S.gallinarium IgY (양계 IgY)를 첨가함으로 인해 확실하게 응집되는 효과를 나타냈으며 이러한 응집에 의해 세균들의 성장이 방해 받는 것으로 판단되어진다.



[Sal.galinarium 106 CFU/ml]



[Sal.galinarium 106 CFU/ml - IgY 7 mg/ml]

Fig. 3-9. Anti-S.galinarium IgY의 항원-항체 응집반응 현미경 관찰
staining solution : methylen blue 1.5g + 95% ethanol 100ml

제 4 절 특이난황항체의 ND 바이러스 및 AI 바이러스에서의 중화능시험

1. ND 바이러스에 대한 중화능

생산된 난황항체가 ND 바이러스를 중화할 수 있는지 여부를 시험하였다. 중화시험은 국내 유행 강독주인 교정원주를 이용하여 계태아섬유아세포에서 분석하였다. 즉, 난황항체를 2~1,024배까지 희석하여 200 $TCID_{50}$ 용량의 바이러스와 동량 혼합한후 미리 배양된 계태아섬유아세포에 접종하였다. 접종후 5일간 배양하여 ND 바이러스 특이 세포변성효과를 관찰하여 바이러스 사멸정도를 평가하였다. 중화시험결과 생산된 난황항체는 2~32배까지는 ND 바이러스를 사멸하는 중화효능이 있는 것으로 확인되었다(표 4-1).

표 4-1. ND 바이러스에 대한 난황항체의 중화능 시험결과

구분	난황항체 희석배수										대조군
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	
CPE 양성 well수/접종 well수	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6

2. AI 바이러스에 대한 중화능

AI 바이러스에 대한 난황항체의 중화능은 H9N2 혈청형인 KNU07033주를 이용하여 10일령의 계태아종란에서 분석하였다. 즉, 난황항체를 2~1,024배까지 희석하여 200 EID_{50}/0.2ml 용량의 바이러스와 동량 혼합한후 실온에서 45분간 반응시켰다. 반응후 희석배수당 5개의 종란에 종란당 0.2ml씩 요막강내로 접종하였다. 접종한 종란은 37℃ 배양기에서 5일간 배양한 후 요막강을 채취하여 혈구응집반응으로 바이러스 유무를 조사하였다. 중화시험결과 생산된 난황항체는 2~256배까지 바이러스를 사멸하는 중화효능이 있는 것으로 확인되었다(표 4-2).

표 4-2. AI 바이러스에 대한 난황항체의 중화능 시험결과

구분	난황항체 희석배수										대조군
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	
HA 양성종란수/접종 종란수	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5

제 5 절 시제품 안정성 시험

1. 특이 난황항체 시제품 안정성 실험

난황 항체를 기능성 식품 소재로 이용하기 위해 가장 중요한 것은 안정성이다. 항원 결합력의 저하를 최소화할 수 있는 안정한 조건에서의 분리, 정제 및 이용되어야 한다. 그러므로 본 연구는 난황항체의 이용효율을 높이기 위해 시제품 내 특이 난황항체의 열에 대한 안정성을 검토하였다.

가. 부형제 첨가실험

본 연구는 난황항체의 이용효율을 높이기 위해 부형제 첨가에 의한 난황 항체의 안정성을 검토하였다. 고농도의 당은 수용액 중에서 단백질을 안정화 시키므로 당은 단백질의 안정제로 이용되고 있으며, IgY가 50% 설탕용액 중에서 산에 대해 큰 안정성을 나타낸다고 보고된 바 있어 당류의 부형제 첨가실험을 통한 기간별 항체역가 분석 및 미생물검사, 성상확인 등을 시행하였다. 본 연구는 기능성 당질인 프럭토올리고당 용액 중에서의 시제품 IgY안정성을 설탕 용액 중에서의 안정성과 비교 검토하였다.

(1) 프럭토올리고당, 슈크로즈 첨가 IgY 샘플준비

ND, AI, E.coli, Slamonella 혼합 백신 접종 난황에 프럭토올리고당 분말과 슈크로즈 분말을 표 5-1과 같이 혼합 후 동결건조하였다.

표 5-1. 프럭토 올리고당 및 슈크로즈 난황 샘플 제조

sample	구분 (부형제 재료)	제조
A	난황 /대조구	난황 200g
B	난황 /슈크로즈 5%	난황 200g + 슈크로즈 10g
B-1	난황 /슈크로즈 7%	난황 200g + 슈크로즈 14g
B-2	난황 /슈크로즈 10%	난황 200g + 슈크로즈 20g
B-3	난황 /슈크로즈 15%	난황 200g + 슈크로즈 30g
C	난황 /프럭토올리고당 5%	난황 200g + 프럭토올리고당 10g
C-1	난황 /프럭토올리고당 7%	난황 200g + 프럭토올리고당 14g
C-2	난황 /프럭토올리고당 10%	난황 200g + 프럭토올리고당 20g
C-3	난황 /프럭토올리고당 15%	난황 200g + 프럭토올리고당 30g

(2) ELISA 에 의한 항체가 측정

동결건조 후 샘플1g을 취하여멸균PBS 10ml에 희석하여 IgY를 용해시킨 후 10분간 원심분리 시행, 상층액을 취하여 항체역가분석 샘플로 사용하여 효소면역측정법(ELISA)으로 측정하였다.

난황항체의 활성은 Mine(1997)이 사용한 ELISA 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 난황중의 특이난황항체의 역가는 Indirect ELISA method를 이용하였으며 난황항체의 활성은 Mine(1997)가 사용한 ELISA 방법을 응용하여 측정하였다. 먼저 항원을 200 ng/ml의 농도로 coating buffer에 희석하여 각 well당 100ul씩 96 well polystyrene plate에 Coating 하여 4℃에서 over night 시킨다(또는, 37℃에서 1시간 방치시킨다). PBS-T(phosphate buffer saline, 0.05% Tween 20, pH 7.4)로 세척 후 2% BSA가 함유된 PBS buffer로 1시간동안 37℃에서 blocking하며 상기와 같은 방법으로 세척하였다. 음성대조군, 양성대조군 및 샘플을 2X씩 희석하여 Well당 100㎕씩 넣고 37℃에서 1시간 정치한다. 1시간 후 3번 세척하고 2차 항체 (anti-chicken: Sigma, U.S.A)를 PBS에 적정량 희석하여 각 Well 에 100 ul 씩 분주한 후 37℃에 1시간 반응시킨다. 그 후 3번 세척을 하고 substrate OPD (O-PhenyleneDiamine) 를 각 well에 100ul씩 분주한 다음 실온에서 약 10분간 반응 시키고 Stop solution 50ul을 분주하여 반응을 중지시켜 450 nm의 파장에서 ELISA reader 로 각 well의 흡광도를 측정하여 ELISA value 로 나타내었다. 측정된 결과에 음성의 값을 2배수하여 처리된 난황의 측정값에 대입하여 분석 Data의 역가를 나타내었다.

(3) 항체역가 측정을 위한 OMP (Outer membrane protein)의 분리

생산된 항원(양계 야외분리주 E.coli. 양계 야외분리주Salmonella gallinarium)을 8000rpm에서 50분간 원심분리 시행하였다. 원심분리 후 상층액을 버리고 pellet을 10mM HEPES buffer로 suspension 후 초음파 파쇄(sonication) 하여 Lysis 하였다. Lysis한 상층액을 8000rpm 4℃에서 30분간 원심하여 상층액을 수확하고, 수확한 상층액에 1% N-Lauroly sarcosine(SIGMA,L-9150)을 최종 농도 0.01% 가 되도록 첨가한 후 실온에서 10분간 처리하였다. 15,000rpm 4℃에서 50분간 원심 시행하여 N-Lauroly sarcosine(SIGMA,L-9150)을 제거하여 주고, 10mM HEPES buffer 50ml로 다시 부유시켜 15,000rpm 4℃에서 50분간 원심 분리하여 OMP를 수거하였다. 수거된 항원은 BCA법으로 단백질 정량 후 200ng/ml이 되도록 코팅하여 항체역가측정에 사용하였다.

(4) 미생물 검사

프락토올리고당 및 수크로즈를 처리하여 동결건조된 샘플을 원료로 사용하기 위하여 미생물 검사를 실시하였다. 미생물 검사는 식품공전 알가공품 성분규격에 따라 PCA agar, MacConkey agar, SS agar, Sabouraud agar를 이용하여 총균수, 대장균군, 살모넬라균을 측정하는 미생물검사를 실시하였다. 식품공전 알가공품의 성분규격은 표 5-2 와 같다.

표 5-2. 식품공정 알 가공품 미생물검사 성분규격

성분규격	
성상	고유의 색택과 향미를 가지고 이미/이취가 없어야 한다
총균수	1g당 10,000이하 (살균제품에 한하며, 피단의 경우에는 음성이어야 한다)
대장균군	1g당 10이하 (살균제품에 한한다.)
살모넬라균	음성이어야 함

(5) 프럭토올리고당, 슈크로즈 첨가에 의한 동결건조 처리 후 IgY 항체역가

시험결과 프럭토올리고당과 수크로즈를 첨가한 처리구에서 모두 높은 비율로 항체역가가 유지되는 것을 확인하였다. 당류를 첨가하지 않은 그룹은 동결건조 후 약 85%의 항체역가를 유지하는데 비해 당류를 첨가한 그룹은 모두 90%이상의 항체 역가 보존율을 나타내었다. 수크로즈와 프럭토올리고당 첨가에 의한 차이는 유의성이 나타나지 않았다. 나타났으나 큰 유의차는 보이지 않았으며 5%와 7% 첨가 사이에는 약 2%의 역가보존율이 상승되는것을 관찰할 수 있었으나 그 이상의 첨가 농도에서는 큰 차이가 없었다 (Fig. 5-1).

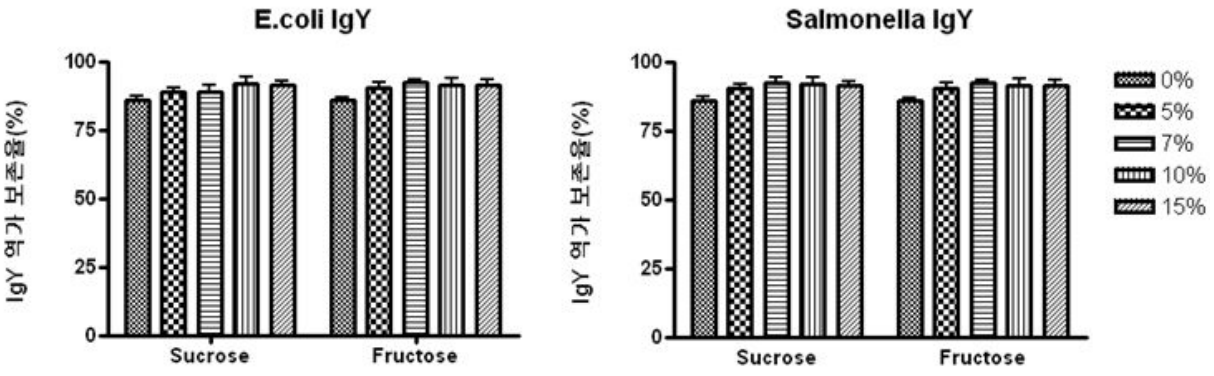


Fig. 5-1 프럭토올리고당 및 수크로즈 처리에 의한 동결건조 후 IgY 항체역가 보존율

프럭토올리고당(FO)은 설탕에 β-글루코시다제를 작용시켜 설탕의 과당 잔기에 1~3개의 과당 분자를 β 결합 시킨 것이다. 프럭토 올리고당은 장내 균총 개선, 혈중 콜레스테롤 개선, 저충치성, 면역력의 강화, 저열량원 등 다양한 생리 특성을 갖는 유익한 당질이다(Tomomatsu, H., 1994). 또한 프럭토 올리고당의 감미는 설탕의 1/4~1/2정도로 설탕과 함께 사용하면 감미가 좋아지며 설탕과 유사한 점도를 나타낸다. 또한 프럭토 올리고당은 식품의 수분활성을 저하시켜 식품의 저장성을 향상시킬 수 있는 기능성 식품소재로서 현재 널리 이용되고 있으므로 부형제 첨가로 사용하였을 경우 항체 역가보존 뿐만 아니라 동물 영양 및 사료효율의 증가에 기여할 수 있어 7% 프락토올리고당 처리가 가장 효율적일 것으로 판단되어진다.

(6) 동결건조 처리 후 미생물검사 결과

5~15%의 슈크로즈 및 프럭토올리고당 처리한 난황 샘플을 동결건조 시행한 후 미생물검사를 실시하여 표 5-3에 나타내었다. 9개의 검사군에서 모두 식품공전 알가공품 성분규격에 맞는 수치로 총균수 10,000 이하, 대장균군 10 이하의 값(cfu/g)이 측정되었으며 모든 군에서 살모넬라와 곰팡이균은 검출되지 않았다. 당류 처리에 의한 균수 차이는 보이지 않았다.

표 5-3. 당류 첨가 동결건조 처리 샘플의 미생물 검사

sample	총균수(cfu/g)	대장균군(cfu/g)	살모넬라/곰팡이균
대조구	137.82 ± 74.04	2.36 ± 3.44	음성
슈크로즈 5%	160.91 ± 69.38	1.55 ± 2.46	음성
슈크로즈 7%	131.82 ± 94.43	1.64 ± 2.84	음성
슈크로즈 10%	119.18 ± 53.46	1.00 ± 1.48	음성
슈크로즈 15%	164.91 ± 150.72	1.55 ± 2.30	음성
프럭토올리고당 5%	188.55 ± 142.56	1.82 ± 2.32	음성
프럭토올리고당 7%	136.73 ± 74.16	1.27 ± 2.37	음성
프럭토올리고당 10%	150.82 ± 95.68	1.45 ± 3.01	음성
프럭토올리고당 15%	182.73 ± 95.84	1.18 ± 1.72	음성

나. 부형제 첨가를 통한 시제품의 보관 온도별, 주차별 안정성 시험

항체보존율이 좋다고 판단되는 그룹을 선정하여 4℃, 25℃, 37℃, 50℃에서 0주차, 2주차, 4주차, 8주차, 12주차, 16주차의 기간동안 항체가 분석(ELISA) 및 성상확인, 미생물검사를 실시하였다.

(1) 시제품 원료 및 시제품 준비

시제품 원료는 부형제 시험에서 효율적, 경제적 효과를 보였다고 판단되는 7%프럭토올리고당 난황액과 0%프럭토올리고당 난황액을 동결건조하여 준비하였다. 시제품의 제조는 산란계 사료 내에 백신접종난황 동결건조 분말을 10%로 혼합하여 허브제, 비타민제와 함께 시제품을 준비하여 밀폐된 용기에 넣고 보관 온도별, 기간별 분석 시행하였다.

(2) 항체역가분석 및 미생물검사

프럭토올리고당(Fructooligosaccaride)이 처리된 원료와 처리되지 않은 원료간의 보관온도 및 기간별 샘플을 취하여 효소면역측정법(ELISA)으로 항체역가를 측정하였다. 양계 Salmonella 분리주 OMP 를 이용하여 제품내 Salmonella specific IgY를 측정하였다.

(3) 미생물 검사

준비된 시제품을 0주~16주까지 보관온도별 샘플을 취하여 PCA agar, MacConkey agar, SS agar, Sabouraud agar를 이용해 미생물검사를 실시하였으며 향취 및 성상변화도 관찰하였다.

(4) 부형제 첨가를 통한 시제품의 보관 온도별, 주차별 항체역가 변화

프럭토올리고당 처리군과 무처리군의 원료 두가지를 시제품 원료로 사용된 시제품의 보관온도별, 주차별 양계Salmonella-specific IgY 항체역가 보존율을 측정하였다.

두 시제품 모두 4℃에서는 90%이상의 항체역가를 유지하는 것으로 나타났으며 25℃보관 샘플도 16주간 90%정도의 항체 역가가 유지되는 것이 확인되었다. 그러나 37℃와 50℃ 보관시에는 8주차부터 항체보존율이 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 5-2). 항체보존율이 감소되는 시점의 37℃와 50℃샘플 역가를 살펴보면 프럭토올리고당을 첨가한 시제품 군에서 첨가하지 않은 시제품보다 항체보존율이 높은경향을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다. 50℃ 보관시 16주차 시점에서는 프락토올리고당 처리 시제품이 약 14%이상 항체보존율이 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 이는 당류의 첨가가 IgY 열안정성에 기여한다는 문헌의 결과와 일치하였다(Lee Kyung Aee, 1998).

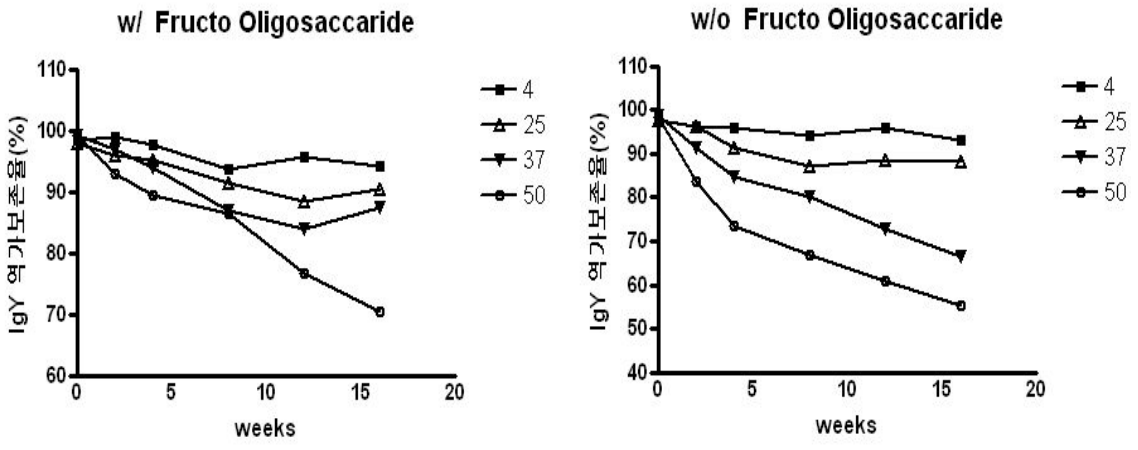


Fig. 5-2 프럭토올리고당 처리군과 무처리군의 시제품내 양계Salmonella-specific IgY 항체역가 보존율

(5) 동결건조 처리 후 미생물검사 결과

7%프럭토올리고당 처리한 동결건조 난황 샘플 및 부형제가 첨가된 시제품을 일정온도에서 주차별 보관 후 미생물 검사를 시행하였다. 총균수 및 대장균군의 수는 보관온도 및 주차에 따라 증가하지 않았으므로 16주차의 결과만 표로 나타내었다(표 5-4). 미생물검사 시행 결과 모든 군에서 살모넬라와 곰팡이균은 검출되지 않았다. 당류 처리에 의한 균수 차이는 보이지 않았다. 37℃보관 16주차 샘플에서 약간 새콤한 향취가 발견되는 군이 한그룹 있었으나 성상의 변화 및 총균수 등의 유의차는 없었으므로 이는 미생물 증식 및 오염에 의한 것이 아니라 허브제 및 당류의 첨가에 의한 발효로 사료된다.

표 5-4. 시제품의 보관온도에 따른 미생물 검사 (16주차)

보관온도	총균수(cfu/g)	대장균군(cfu/g)	살모넬라/곰팡이균	성상
4℃	37.66 ± 14.24	3.36 ± 3.44	음성	변화없음
25℃	200.91 ± 69.38	2.58 ± 1.05	음성	변화없음
37℃	186.92 ± 65.43	1.94 ± 2.02	음성	변화없음
50℃	99.58 ± 43.46	2.80 ± 1.39	음성	변화없음

다. 시제품 원료 및 시제품 열안정성 시험

IgY가 제품화 될 경우 여러 공정과정, 운송과정, 살균과정에서 온도변화가 생기게 되므로 온도변화에 의한 IgY 역가파괴여부를 ELISA 방법으로 확인해보았다. 프럭토올리고당 처리하여 가공된 시제품 원료 및 시제품을 50, 60, 70, 80, 90, 100℃ 열처리하여 항체가 분석(ELISA)을 통한 원료 및 제품에서의 역가 안정성 확인하였다.

(1) 시제품 원료 및 시제품 준비

시제품 원료는 부형제 시험에서 효율적, 경제적 효과를 보였다고 판단되는 7%프럭토올리고당 난황액을 동결건조하여 준비하였으며, 시제품의 제조는 산란계 사료내에 백신접종난황 동결건조 분말(7%프럭토올리고당 처리)을 10% 혼합하여 시제품을 준비하여 열처리에 사용하였다.

(2) 열처리

시제품 원료 및 시제품을 10g씩 tube에 분주 50 , 60 , 70 , 80 , 90 , 100 ℃로 중탕처리하여 1분/3분/ 5분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1g을 취하여 PBS 10ml에 녹인 후 원심분리 시행, 상층액을 취하여 항체역가분석에 사용하였다. 항체역가분석은 효소면역측정법

(ELISA)에 의해 측정하였다.

(3) 원료 열안정성 시험 결과

원료에 대하여 50~100℃에서의 항체보존율을 측정한 결과 80℃ 처리까지 열처리를 시행하지 않은 원료대비 약70%의 항체역가가 보존되는 것을 확인할 수 있었으며 그 이상의 온도에서는 역가가 파괴됨을 알 수 있었다. 이는 salmonella-specific IgY와 E.coli-specific IgY 모두 같은 경향을 나타내었다(Fig. 5-3, 5-4).

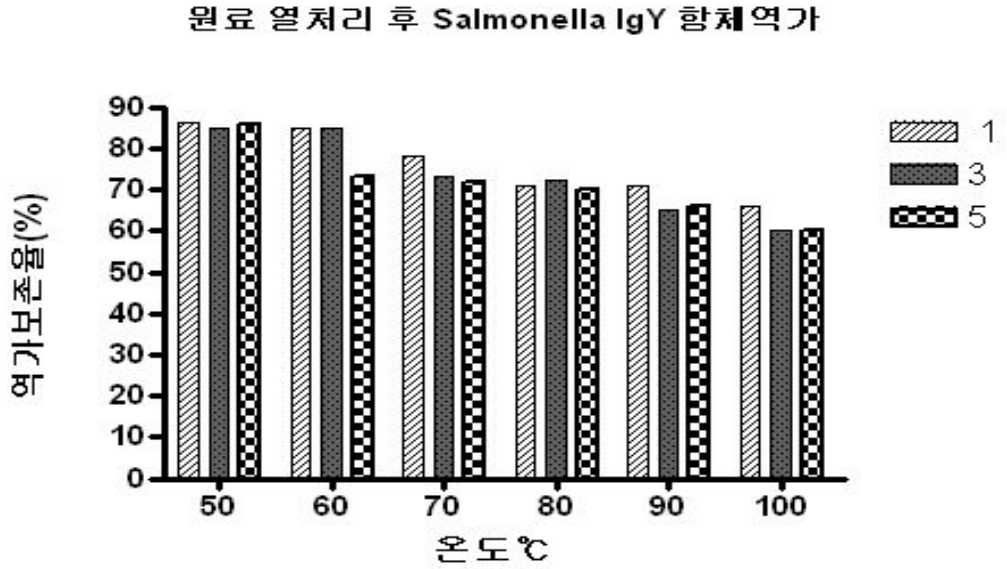


Fig. 5-3. 프럭토올리고당 처리에 의한 열처리 후 시제품 원료 내 양계 salmonella-specific IgY 항체역가 보존율

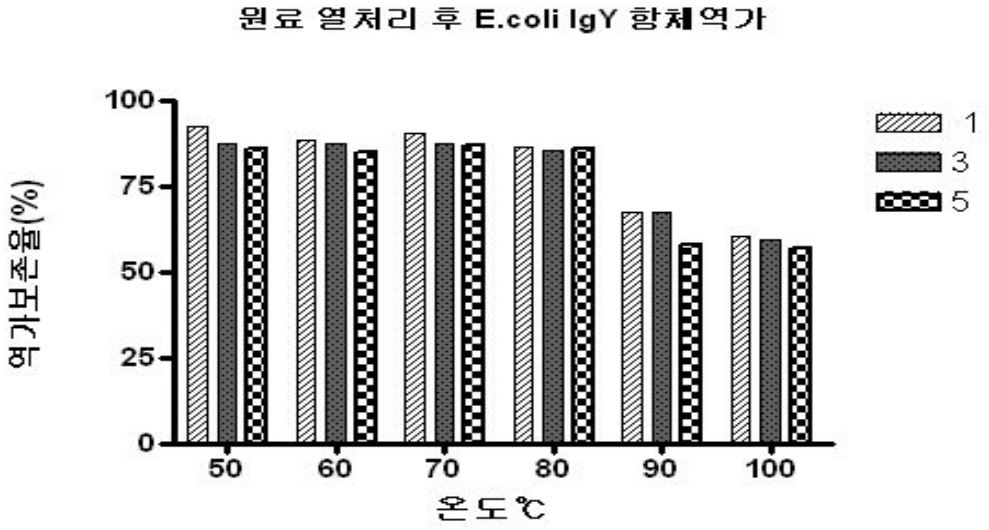


Fig. 5-4. 프럭토올리고당 처리에 의한 열처리 후 시제품 원료 내 양계 E.coli-specific IgY 항체역가 보존율

(4) 시제품 열안정성 시험 결과

시제품에 대하여 50~100℃에서의 항체보존율을 측정한 결과 80℃ 처리까지 열처리를 시행하지 않은 시제품대비 약70%의 항체역가가 보존되는 것을 확인할 수 있었으며 90℃와 100℃에서도 60% 이상의 역가가 보존됨을 확인하였다. 이는 원료 가공시 사용한 프럭토올리고당 등 부형제에 의한 항체안정 효과로 판단되며, 이는 salmonella-specific IgY와 E.coli-specific IgY 모두 같은 경향을 나타내었다(Fig. 5-5, 5-6)

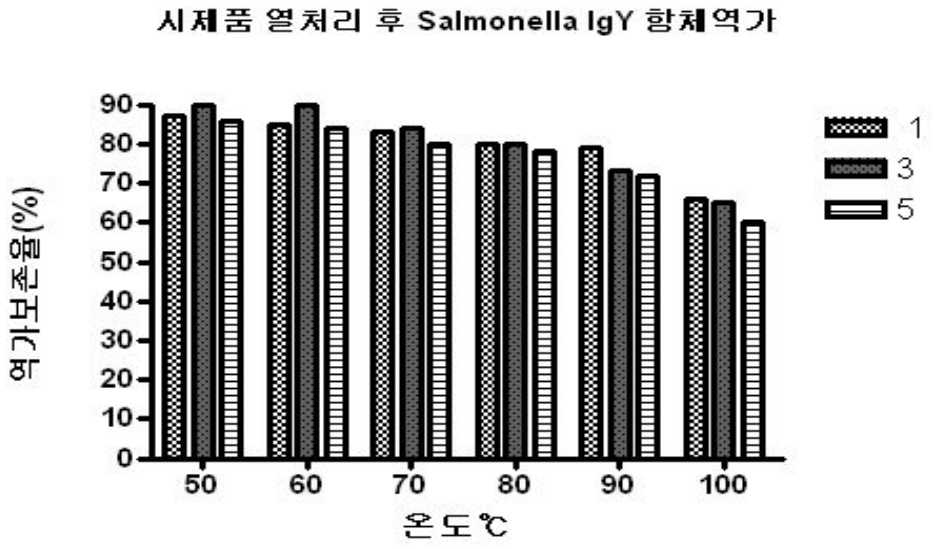


Fig. 5-5 프럭토올리고당 처리에 의한 열처리 후 시제품 내 양계 Salmonella-specific IgY 항체역가 보존율

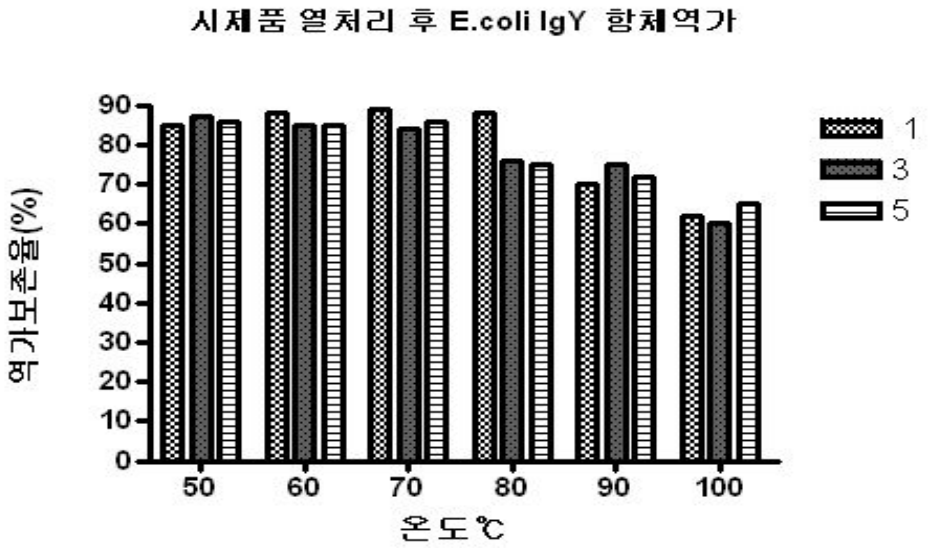


Fig. 5-6 프럭토올리고당 처리에 의한 열처리 후 시제품 내 양계 E.Coli-specific IgY 항체역가 보존율

제 6 절 농장에서의 시제품 사료첨가제 적용시험

1. 육계 사양시험

가. 재료 및 방법

(1) 실험동물과 실험설계

강원도 화천 소재의 육계농장에서 1,000수의 육계(ross종)를 가지고 대조군(비투여군)과 사료내 시제품을 0.2%로 투여한 시험군으로 나누어 사양실험을 실시하였다. 1일령의 사료와 물은 자유급식토록 하였으며, 총 5주간 실험을 실시하였다. 육계군은 1일령에 ND백신에 대하여 분무살포하였으며, 시험기간 동안은 ND 와 AI에 대한 백신투여를 하지 않았다.

(2) 조사항목 및 분석방법

① 생산성

최종체중은 실험 종료시의 총 체중을 사육두수로 나누어 평균치로 나타냈고, 이 수치에서 개시 체중을 뺀 후의 증체량을 구하였다. 육성률은 출하수수에서 입추수수를 나눈 후 100을 곱하여 %로 나타냈다. 생산지수는 육성률에 평균 체중을 곱한 값을 사료요구율에 출하일수를 곱한 값으로 난누고 여기에 100을 곱하여 계산하였다.

② 혈액생화학분석

혈액특성 변화를 조사하기 위해 시험종료시 처리당 15수씩 선발하여 익하정맥에서 혈액을 채취하여 생화학조성을 측정하는데 이용하였다. 혈액 생화학 조성은 자동혈액분석기(HEMACYTE; OSI, Oxford Science, Inc)를 이용하여 수치를 측정하였다.

③ ND 및 AI에 대한 항체역가 측정

난황내 ND(New castle Disease, 뉴캐슬병), AI(Avian Influenza, 조류독감), E. coli 및 Salmonella에 대한 특이난황항체역가가 함유된 시제품을 사료내 0.2% 혼합급여한 처리구에서 항체역가가 상승하였는지를 살펴보기 위하여 다음과 같이 ELISA 검사를 실시하였다.

ND와 AI를 각각 1ug/ml의 농도로 조정하여 100㎕씩 96well plate에 주입하여 하룻밤 반응시켰다. 이어 50mM PBS 완충액(pH 7.0)으로 3회 세척한 후, 5% 탈지유를 포함한 50 mM PBS 완충액으로 1시간 동안 실온에서 blocking 시켰으며, 다시 50mM PBS 완충액으로 3회 세척하였다. 각 well에 닭의 혈청을 100㎕씩 첨가하여 37℃에서 1시간 반응 후 같은 방법으로 3회 세척하였다.

항체역가를 측정하기 위하여 Rabbit-anti-chicken IgG-HRP(Sigma, USA)를 각 well에 100㎕ 첨가하고 1시간 반응 후 세척하였다. Tetramethylbenzidine 기질 용액을 각

well에 분주 후 30분간 반응시켰으며, 최종적인 OD값은 ELISA Reader(Tecan, Austria)를 이용하여 415nm에서 측정하였다.

(3) 통계처리

모든 분석 결과의 통계분석은 SAS (Ver. 9.1, Statistical analysis system, 2004)를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 유의성은 5% 수준, ANOVA test 및 T-test를 실시하였다.

나. 육계에서의 효능시험 결과

(1) 육계 생산성

난황내 ND(New castle Disease, 뉴캐슬병), AI(Avian Influenza, 조류독감), E. coli 및 Salmonella에 대한 특이난황항체역가가 함유된 시제품을 사료내 0.2% 혼합급여한 처리구에서 증체량이 대조군 1895g에 비해 1915g으로 수치적으로 높았으나 처리구간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다(그림 6-1). 육계의 육성률에서는 시제품첨가군이 대조군에 비하여 6.5% 이상 증가하면서(그림 6-2), 생산지수 또한 난황항체가 투여된 시제품 첨가군이 폐사율이 감소하면서 대조구에 비하여 개선되는 것이 확인되었다(그림 6-3).

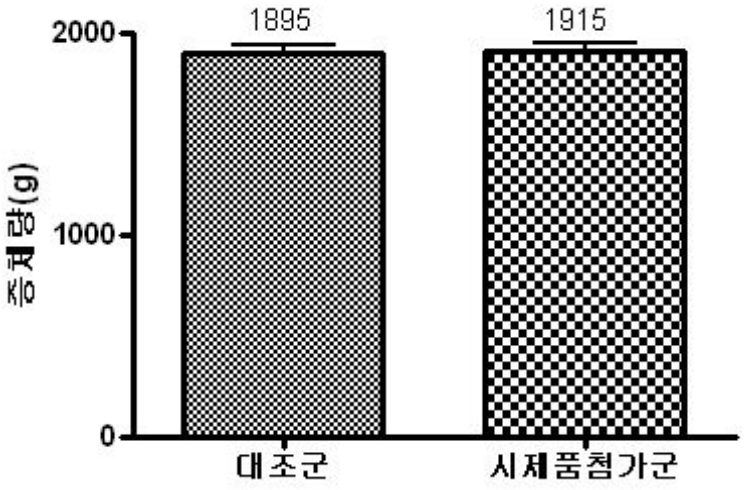


그림 6-1. 시제품을 급이한 육계의 증체량

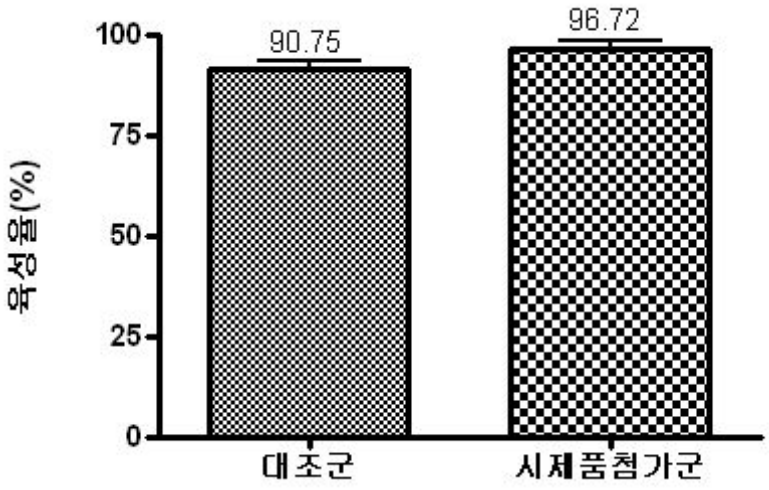


그림 6-2 시제품을 급이한 육계의 육성률

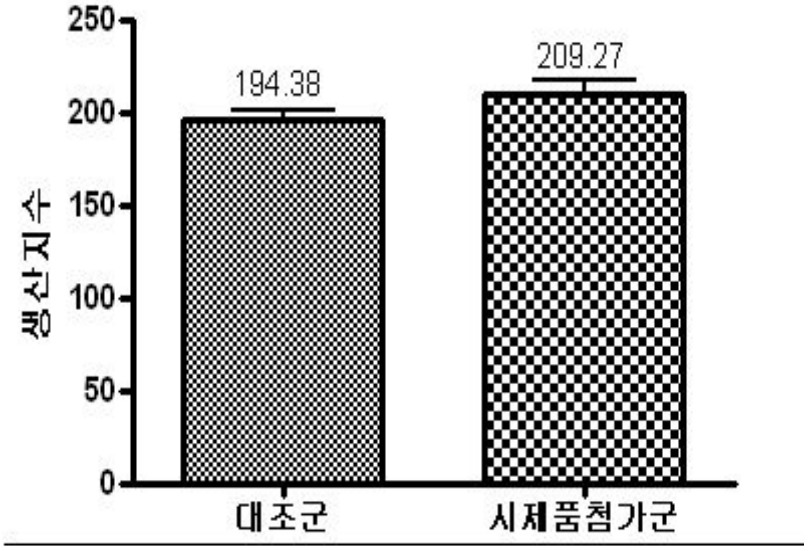


그림 6-3 시제품을 급이한 육계의 생산지수

(2) 혈액생화학 분석

육계에서의 혈액내 albumin, GOT, uric acid, glucose, total protein의 처리구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다(표 6-1).

표 6-1. 시제품을 급여한 육계에서의 혈액생화학 분석

항목	Treatments	
	대조구	처리구
Albumin(g/㎗)	2.3±0.13	2.3±0.20
GOT(U/L)	98.6±4.61	99.36±3.73
Uric acid(mMol/L)	195.4±23.6	212.6±32.6
Glucose(mMol/L)	6.7±0.25	6.9±0.57
Total protein(g/L)	18.0±1.63	18.2±1.64

*GOT: glutamic-Oxaloacetic transaminase

(3) ND 및 AI에 대한 항체역가 측정

그림 6-4에서는 시제품을 급이한 육계에서의 ND의 항체역가를 나타내었다. ND의 항체역가는 대조구에 비해 시제품 0.2%를 첨가구가 약 3배이상 증가하는 것으로 나타났다. 이런 결과는 육계에서 초기 ND 분무백신이후 대조구에는 어떠한 처리도 하지 않았으므로 항체역가가 감소하는 결과가 나타났고, 시제품을 첨가한 구에서는 경구투여를 통해 난황항체를 통한 항체역가가 혈청내 잔존하는 결과로 추정된다. 본 결과에 대해서는 작용기전의 연구 등 추가적인 연구 진행이 필요할 것으로 보여진다. 또한 시제품을 급이한 육계의 AI의 항체역가는 그림 6-5에 나타내었다. 사양시험기간동안 AI백신접종을 하지 않아 대조구에서는 항체역가가 관측되지 않았고, 시제품을 첨가한 구에서는 ND의 항체역가보다는 낮은 AI의 항체역가가 나타났다.

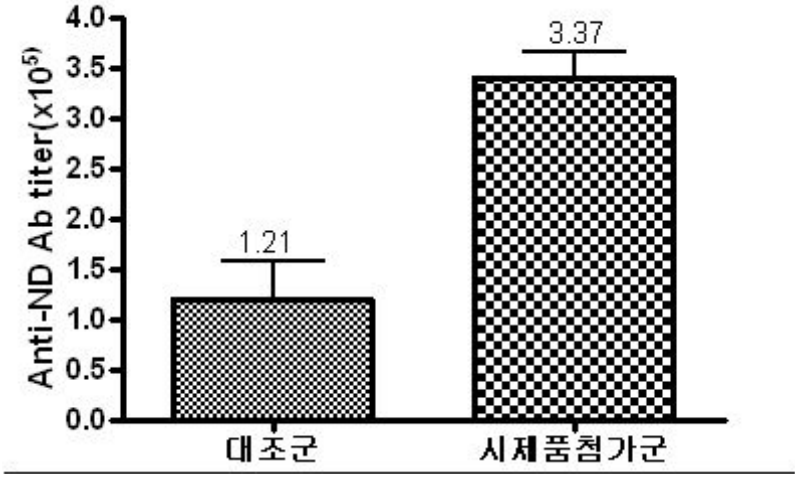


그림 6-4. 시제품을 급이한 육계의 ND 항체역가

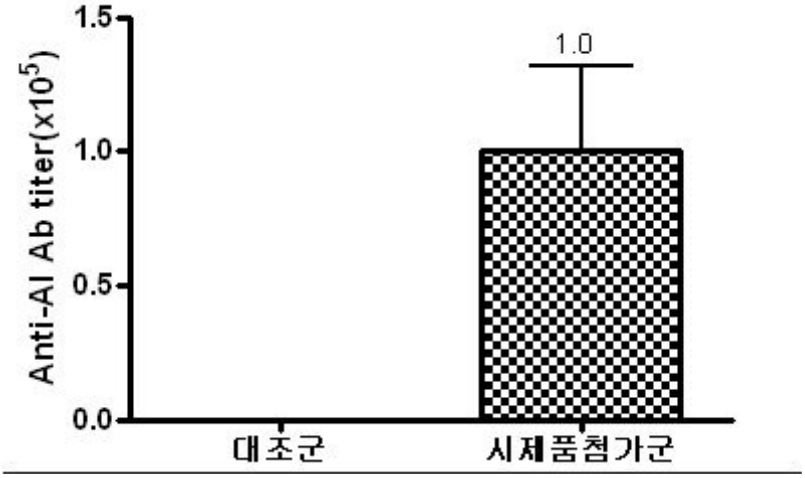


그림 6-5. 시제품을 급이한 육계의 AI 항체역가

이상의 결과를 보면 난황내 ND(New castle Disease, 뉴캐슬병), AI(Avian Influenza, 조류독감), E. coli 및 Salmonella에 대한 특이난황항체역가가 함유된 시제품을 사료내 0.2% 혼합하였을때 생산지수와 육성률이 개선되고, 경구투여를 통해 면역증강력을 높일 수 있음을 확인 할 수 있었다. 또한 ND, AI의 특이난황항체 역가는 경구투여를 통해 육계내 면역체계를 자극하여 항체생성의 체액성 면역 기능이 증가하는 것에 기인하는 것으로 사료된다.

2. 산란계 사양시험

가. 재료 및 방법

(1) 실험동물과 실험설계

경기도 양주 소재의 산란계농장에서 60주령 Hy-line Brown 산란계 5,000마리를 공시동물로 선정하여 5주간 실험하였다.

시험설계는 대조구(기본배합 사료급여구)와 처리구(시제품첨가제 급여구)의 2동으로 나누어 임의배치하였고, 시험사료느 산란계용 시판 배합사료를 산란계 사양관리 기준에 준하여 급여하였다. 처리구는 기본 배합사료에 시제품첨가제를 판매단가를 고려한 0.2% 수준으로 첨가하여 급여하였으며, 시험기간 동안 물과 사료는 자유섭취하게 하였다.

(2) 조사항목 및 분석방법

① 사료섭취량 및 난 생산성

사료섭취량은 총급여 사료량에서 잔여사료를 감하여 구하였고, 실험기간동안 매일 수집한 산란개수와 연란, 파란 등을 합한 총 산란개수를 사육수수로 나누어 산란율을 구하였다. 수집된 계란중 처리구별 약 30판을 무작위로 선정하여 무게를 측정한후 계란 수로 나누어 평균 난중을 산출하였다.

② 혈액생화학분석

혈액특성 변화를 조사하기 위해 시험종료시 처리당 15수씩 선발하여 익하정맥에서 혈액을 채취하여 생화학조성을 측정하는데 이용하였다. 혈액 생화학 조성은 자동혈액분석기(HEMACYTE; OSI, Oxford Science, Inc)를 이용하여 수치를 측정하였다.

(3) 통계처리

모든 분석 결과의 통계분석은 SAS (Ver. 9.1, Statistical analysis system, 2004)를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 유의성은 5% 수준, ANOVA test 및 T-test를 실시하였다.

나. 산란계에서의 효능시험 결과

(1) 사료섭취량 및 산란율

난황내 ND(New castle Disease, 뉴캐슬병), AI(Avian Influenza, 조류독감), E. coli 및 Salmonella에 대한 특이난황항체역가가 함유된 시제품을 사료내 0.2% 혼합하여 산란계에 급여하였을때 대조구와 처리구간에 사료섭취량의 차이는 나타나지 않았다(그림 6-6). 60주령된 산란계에서의 산란율은 대조구의 70.1%에 비해 처리구에서 73.3%로 높은 경향을 보였으며, 난중에서는 대조구와 처리구간에 차이를 보이지 않았다(그림 6-7, 6-8).

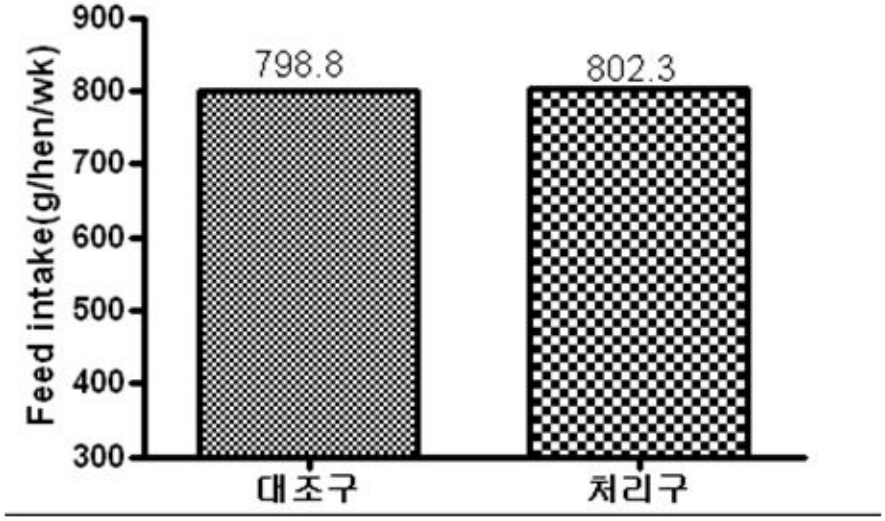


그림 6-6 시제품을 급이한 산란계에서의 사료섭취량

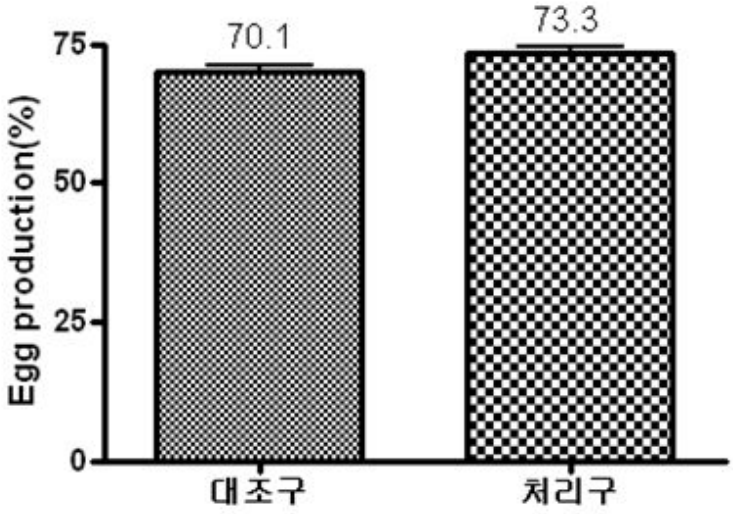


그림 6-7. 시제품을 급이한 산란계에서의 산란율

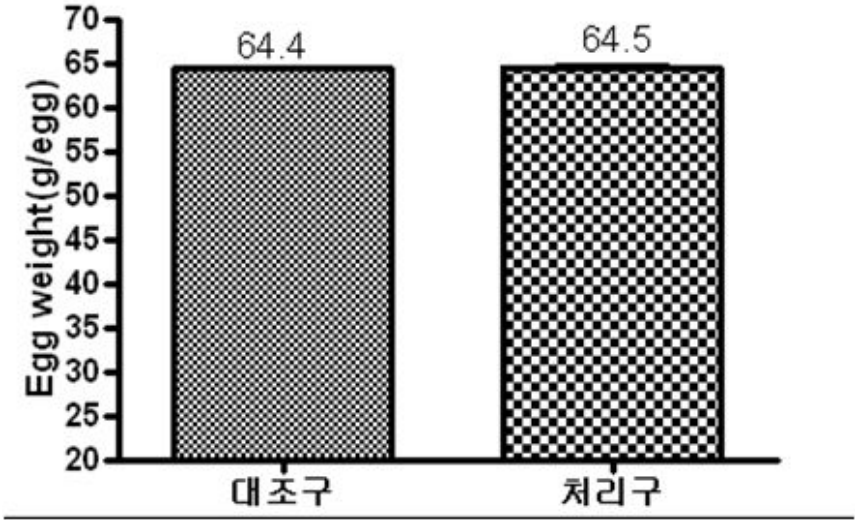


그림 6-8. 시제품을 급이한 산란계에서의 난중

(2) 혈액생화학 분석

산란계에서의 혈액내 albumin, GOT, uric acid, glucose, total protein의 처리구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다(표 6-2).

표 6-2. 시제품을 급여한 육계에서의 혈액생화학 분석

항목	Treatments	
	대조구	처리구
Albumin(g/㎗)	2.1±0.13	2.2±0.16
GOT(U/L)	169.8±4.56	172.36±5.73
Uric acid(mMol/L)	212.4±17.6	209.6±12.6
Glucose(mMol/L)	6.9±0.25	7.0±0.57
Total protein(g/L)	18.3±1.63	18.0±1.64

이상의 결과를 보면 난황내 ND(New castle Disease, 뉴캐슬병), AI(Avian Influenza, 조류독감), E. coli 및 Salmonella에 대한 특이난황항체역가가 함유된 시제품을 산란계 사료내 0.2% 혼합하여 급여하였을때 사료섭취량과 난중에서는 차이가 없었으나 산란율은 시제품을 첨가한 구에서 높은 경향을 나타내었다.

제 7 절 제품 디자인 개발

"아이지-가드[양계]"의 부형제로는 천연 유래 허브 25종과 효모배양물(사카로마이세스 세르비지에)을 사용하여 항생제 저감/대체, 악취 저감을 통한 환경개선 효과를 기반으로 하고 있으며, 순수 국내 기술로 개발된 조류인플루엔자(AI) 및 뉴캐슬(ND) 원인체에 대한 특이난황항체가 '중화작용'을 야기하여 병원체의 체내 유입을 방지하는 기능을 가지는 친환경축산을 위한 "유기보조사료" 인증 가능한 복합 기능성 제품이다.

[사용목적]

1. 조류인플루엔자(AI) 및 뉴캐슬병(ND) 바이러스의 체내 유입 저감
2. 생존율 및 증체율 향상
3. 면역력 증가
4. 사료효율 증대
5. 스트레스 예방 및 영양 장애 개선

[사용방법]

1. 질병방어 및 면역력 증강

초기 및 전기사료	후기사료
0.1% 사료첨가(사료 톤당 1kg 첨가)	0.05% 사료첨가(사료 톤당 0.5kg 첨가)

2. 질병방생 시

초기 및 전기사료	후기사료
0.2~0.3% 사료첨가(사료 톤당 2~3kg 첨가)	0.1~0.2% 사료첨가(사료 톤당 1~2kg 첨가)

ADBIOTECH

제조원 : ㈜애드바이오텍
강원도 춘천시 퇴계동 857-4
TEL. 033)261-4907 FAX. 033)261-4920
www.adbiotech.com

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구 연차별 목표 대비 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행결과
1차 연도 (2009)	뉴캣슬병 및 조류인플루엔자 항원생산 및 고역가의 항체생산	○ 항원생산용 ND virus(NDV) 선발	100	- 최근 국내 유행 NDV 수집 - 분리 NDV의 병원성 및 주요 생물학적 특성 - 분리 NDV의 항원적 관련성 및 유전학적 특성 - 항원생산용 ND 바이러스 선발
		○항원생산용 AI virus(AIV) 선발	100	- 최근 국내유행 H9N2 혈청형 AIV 수집 - 분리 AIV간의 항원적 관련성 및 유전적 특성 - 항원생산용 AI 바이러스 선발
		○ ND, AI 중화능 확인시험	80	- 특이난황항체의 NDV 중화능 평가 - 특이난황항체의 AIV 중화능 평가
		○항원의 대량생산 조건 설정	100	- 선발된 ND 바이러스의 최적배양조건 확립 - 선발된 AI 바이러스의 최적배양조건 확립
		○ 야외균주(E. Coli, Salmonella) 선발	100	- 야외균주(E Coli) 20종 선발 - 야외균주(Salmonella) 5종 선발
		○면역항원의 대량생산법 확립	100	- 종란에서의 ND 및 AI 바이러스 대량생산 - 양계 E.Coli(5종), Salmonella(3종) 불활화 조건 확립 - 항원성에 영향이 없는 방법으로 바이러스 불활화 조건 확립 - 고농도 난황항체 생산을 위한 불활화 항원농축
		○특이난황항체 (IgY) 대량생산	100	- 산란계에 면역원 접종하여 ND, AI, E. Coli, Salmonella에 대한 특이난황항체 생산 - 3일간격으로 계란 난황내 역가분석 확인 - 음성대조군의 160X 이상이 되는 5주부터 14주까지의 계란을 집중적으로 집란, 할란후 난황을 수거하여 동결건조
		○특이난황항체 위내안정성 실험	100	- 난황 과 전란내 레반과 올리고당을 첨가하여 위내 및 담즙산내의 안정성 확인
		○특이난황항체 평가	100	- SDS-PAGE, Western 분석 - 항균성 실험

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2010)	닭에서 특이 난황항체의 중화능시험	○생산된 난황항체의 중화능시험	100	- 생산된 난황항체는 ND 바이러스에 대한 중화능이 32배까지 인정되어 ND 바이러스 사멸효능을 확인하였음 - 생산된 난황항체는 AI 바이러스에 대한 중화능이 256배까지 인정되어 AI 바이러스 사멸효능을 확인하였음
	시제품 농장 적용시험	육계에서의 적용시험	100	- 시제품급여군에서 생산지수 및 육성률이 수치적으로 증가 - 시제품급여구에서 ND, AI의 항체역가가 대조구에 비해 높은 역가 관측됨. - 혈액학적 변화는 나타나지 않음
		산란계에서의 적용시험	100	- 시제품을 산란계 사료내 0.2% 혼합하여 급여시 사료섭취량과 난중에서는 차이가 없었으나 산란율은 증가함.
	제품디자인 개발 및 제품화	○시제품 안정성 시험	100	- 프락토 올리고당을 첨가한 난황분말과 부형제를 첨가한 시제품에서 열안정성과 보존기간을 확인함.
		○제품디자인 개발	100	- ND, AI의 특이난황항체와 부형제를 첨가한 유기보조사료 인증이 가능한 기능성 복합제품으로 출시 예정
		○신기술 특허 출원 (2건)	200	1) "뉴캣슬병을 유발하는 신규의 바이러스 및 이에 대한 IGY 타입의 항체를 포함하는 가축사료 첨가제" (출원번호 : 10-2011-0026544)와 2) "조류인플루엔자를 유발하는 신규의 바이러스 및 이에 대한 IgY 타입의 항체를 포함하는가축사료첨가제"(출원번호 :10-2011-0026545)

2. 핵심기술과 관련분야의 기여도

핵심기술명	관련분야 기여도	비고
국내 ND 바이러스 신규 발굴 및 기탁 (KNUGP09)	미생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC)에 바이러스 기탁 : KCTC 11891BP (2011. 3. 11)	특허출원
국내 AI 바이러스 신규 발굴 및 기탁 (KNU07033)	미생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC)에 바이러스 기탁 : KCTC 11892BP (2011. 3. 11)	특허출원
항원(E. Coli, Salmonella, ND virus, AI virus) 대량생산 기술	lab scale 규모에서 박테리아의 경우 culture 배양을 통한 대량기술 및 ND 바이러스 및 AI 바이러스 최적의 생산 기술 확립	제조공정
특이난황항체 대량생산 및 특성 규명	산란계접종을 통한 ND 바이러스, AI 바이러스, E. Coli, Salmonella에 대한 특이난황항체 고역가 생산기술	
특이난황항체의 ND 바이러스에 대한 중화능 시험 기법	특이난황항체를 통해 ND 바이러스의 중화능 확인 규명	
특이 난황항체의 AI 바이러스에 대한 중화능 시험 기법	특이난황항체를 통해 AI 바이러스의 중화능 확인 규명	
뉴캣슬병 및 조류인플루엔자 예방 양계 기능성 사료 첨가제의 제품 개발 및 상용화 기술	뉴캣슬병 및 조류인플루엔자 예방 효능이 있는 양계 기능성 사료 첨가제의 Formulation 개선을 통한 제품 상용화 기술	시제품 개발

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

(주) 애드바이오텍에서는 야외에서 분리한 대장균, 살모넬라로부터 오는 질병을 예방할 수 있는 특이난황항체와 ND, AI 바이러스 감염 예방 및 치료효능이 특이 난황 항체를 개발하여 스트레스가 심한 백신을 이용한 질병예방 차원이 아닌 사료첨가 형태로 사용하고자 한다. 이로써 질병이 발생되는 계절별, 사육단계별로 사료에 첨가하여 사용함으로서, 본 질병에 대한 예방을 적절히 농장에서 수행 할 수 있도록 제공 할 수 있게 된다. 또한 백신 투여 후 스트레스로 인한 생산성 저하를 막을 수 있으며, 특히 우리나라 양계농장(육계, 산란계)의 고질적인 질병 ND 바이러스, 저병원성 AI 바이러스에 대하여 항생제가 아닌 안전한 천연물 사료첨가제로 예방 및 치료효과를 거둘 수 있다

본 연구를 통하여 개발된 사료 첨가제 적용 시 사육농가의 생산성 극대화에 크게 기여함으로써 국민경제(소비자)에게 안정성 및 안전성이 보장된 축산물을 공급 할 수 있다.

또한 국가적으로 주요 문제가 되고 있는 인수공통 전염병인 조류 인플루엔자에 대한 방어체계를 확립 할 수 있으며, 본 기술에 대한 국제적 특허획득으로 해외에서 수입에 의존하는 본 질병의 백신 수입을 대폭 줄일 수 있을 것이다

본 연구개발은 가축에 있어 치료, 예방이 곤란한 질병에 대하여 적용하여 특이난황항체의 제조기술을 가축질병 예방 및 치료를 위한 기초 자료를 제공함으로써, 질병으로 인한 폐사에 따른 경제적 손실을 최소화 하는데 이바지 할 수 있을 것이다.

동물복지 차원에서 다수 사육농가의 백신 투여 횟수를 줄일 수 있으며 기능성 사료의 개발을 통하여, 사료에 질병예방 및 치료, 사료생산 기술 분야에 미치는 파급 효과도 매우 클 것이라 보여 진다.

가. 연구개발결과의 활용방안

(1) 본 기술개발을 통한 기술개발 자료의 마켓팅 홍보 효과
(2) 각 지역 대리점 및 사료공장을 통한 판매
(3) 자사의 해외 네트워크를 통한 세계시장 공략(필리핀, 대만, 중국, 독일, 이란 등)
(4) 해외박람회를 통한 수출 증대
(시기별, 지역별로 개최되는 박람회를 이용하여 지속적인 바이어 발굴)
(5) 고급육 양계 브랜드 사업체 납품
(6) 기술 축적 및 기능강화로 독보적 위치 확보

나. 기대성과

(1) 기술적 측면

○ 최근사료시장의 HACCP 요건강화, 성장 촉진에 필요한 식육내 화학 물질 및 항생제 잔류 물질의 문제점 대두, 항생물질의 사료내 첨가의 제한으로 천연항균 및 천연 기능성 물질개발 기술의 향상을 도모 할 수 있음.

○ 생산품을 사료로 활용시 가축의 면역증강, 성장촉진, 질병의 예방효과를 거두어 가축 사육 농가의 경제적 이익이 증진하고 축산 산업의 발전 및 유기농업 (친환경 농업)의 기초를 삼을 수 있음.

(2) 경제적 · 산업적 측면

○ 안정성(화학물질이 없는), 안전성(악성 질병이 없는)에 맞춘 깨끗한 축산물을 생산하기 위한 천연물질을 이용한 시장전환이 예상됨

○ 우리기술로 개발하여, 로얄티 및 기타 제반 비용을 줄여, 기업의 이윤 창출

○ 사료 첨가제 시장(항생제대체효과) 및 안전한 축산업 생산으로 축산물의 소비촉진 등 국민 식생활의 깨끗한 먹거리를 제공함으로서 국민 보건향상을 이룸

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

Newcastle Disease Virus Vaccine on the Horizon

Newcastle disease virus (NDV) is an important pathogen that causes disease and death not only in domestic and commercial poultry, but also in wild bird populations around the world. Current Newcastle disease (ND) vaccines are used widely in commercial poultry and protect the vaccinated birds from disease but do not prevent them from becoming infected and carrying the virulent virus or shedding it in their feces. Therefore, the current vaccines do not eliminate virulent virus transmission from infected to healthy birds.

A vaccine that reduces virulent virus shed and transmission is sorely needed by the poultry industry. Using reverse genetics technology, researchers in the Endemic Poultry Viral Disease Research Unit and the Exotic and Emerging Viral Diseases Research Unit of the Southeast Poultry Research Laboratory in Athens, Georgia, have developed a new vaccine from parts of a virus that is similar to the wild-type NDV circulating in the environment today. This new vaccine not only reduces mortality and severity of ND symptoms in poultry, but it also decreases the amount of virulent virus shed from vaccinated birds.

"Currently, most vaccines used in the United States are formulated with NDV isolated in the 1940s, which is similar to the virulent NDV circulating at that time," says poultry unit microbiologist Qingzhong Yu. "Unfortunately, with time, new NDV strains have emerged that are genetically very different from commonly used vaccine strains.

"Reverse genetics technology enabled us to generate a new vaccine by exchanging a gene from the original vaccine with a similar gene of the current circulating virus. We found that when the new vaccine, containing gene sequences similar to the wild-type virus, was used in vaccination studies, the vaccinated birds were protected from disease and shed less of the wild-type virus after challenge," says Yu.

Yu, Daniel King (retired researcher), David Suarez, Patti Miller, and former ARS researcher Carlos Estevez (now with Texas A&M) submitted a patent application for the vaccine in 2009. Licensing by the USDA Animal and Plant Health Inspection Service's Center for Veterinary Biologics would have to follow before the vaccine could be used.

NDV causes disease in more than 250 species of birds and typically affects the respiratory, gastrointestinal, and/or nervous system. Symptoms may include gasping, coughing, lack of appetite, drooping wings, and diarrhea. ND is clinically similar to avian influenza, and the two diseases may be confused, which impairs the rapid diagnosis of a disease outbreak.

The most severe form of ND can result in disease and mortality rates exceeding 90 percent in susceptible chickens. The most recent U.S. outbreak—which occurred in 2002-2003 in California, Nevada, Arizona, and Texas—illustrates the devastation and financial cost that can result: More than 3.4 million birds were destroyed, and the cost of controlling the outbreak in California alone was more than $160 million.

"Newcastle disease continues to be a danger to the commercial poultry industry because it can spread rapidly and can exact a heavy toll," says Yu. "Vaccines for ND have been used for more than 50 years to control the disease and are successful in reducing mortality and the severity of symptoms. Our goal is to create a vaccine to decrease virus spread as well."—By Agricultural Research Service Information Staff.

This research is part of Animal Health, an ARS national program (#103) described at .

is in the USDA-ARS , 934 College Station Rd., Athens, GA 30605; (706) 546-3628.

Veterinary Immunology and Immunopathology 135 (2010) 173–180

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Immunology and Immunopathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetimm

Review paper

IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy

Wilmar Dias da Silva *, Denise V. Tambourgi

Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, Av. Vital Brazil 1500, 05503-900 São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 October 2009
Received in revised form 16 December 2009
Accepted 30 December 2009

Keywords:
Immunoglobulin
Diversity
Chicken
IgY
Egg
Purification
Immunodiagnostic
Immunotherapy

ABSTRACT

Immunoglobulin IgY is the major antibody produced by chickens (*Gallus domesticus*). After their V-C gene is rearranged in B cells, IgY is continually synthesized, excreted into the blood and transferred to the egg yolk, where it is accumulated. IgY is produced by hens to provide their offspring with an effective humoral immunity against the commonest avian pathogens until full maturation of their own immune system. In this review we aim to give an overview about the generation, structure, properties of IgY, as well as the advantages of chicken antibodies use over mammalian antibodies in immunodiagnostics and immunotherapy.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction 173
2. Immunoglobulin diversity 175
3. Active transfer of IgY from serum to egg yolk 176
4. Methods for purification and quantification of IgY antibodies 176
5. IgY and immunodiagnostics 177
6. IgY antibodies for passive immunization against enteric infections 178
7. Concluding remarks 178
References 179

1. Introduction

B lymphocytes and their mature counterpart, plasmocytes, are highly specialized secretor type of cells whose exclusive products are glycoproteins, the immunoglobulins (Igs) or antibodies. These cells are found in several animal groups including mammals and birds. According to the "*clonal selection theory*" proposed by F. MacFarlane Burnet in the 1950s, which has now been demonstrated to be correct, an enormous number of antibody-producing cells are constantly differentiated and each one expresses on its surface an Ig specific for a unique antigen.

In the human immunoglobulin molecule, the protein prototype has two identical 25 kDa light (L) chains and also two identical 55–77 kDa heavy (H) chains. Two structurally distinct regions are found in both chains: in light

* Corresponding author. Tel.: +55 11 37267222.
E-mail address: wds@butantan.gov.br (W. Dias da Silva).

0165-2427/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.vetimm.2009.12.011

제 7 장 참고문헌

1. Baek BS, Han JP, Bea MJ. 1999. Properties and antimicrobial activity of egg yolk antibody against food poison bacteria. *J, EastAsian Soc.Dietary Life* 9: 207-213

2. Hidaka, H., Eida, T., Takijima T., Tokunaga, T. and Tashuro, Y. 1986. Effect of fructooligosaccharide on intestinal flora and human health, Bifidobacteria Microflora, 5: 37.

3. Kobayashi, Y., Tohyama, K. and Terashima T. 1973. Tolerace of the multiple antibiotic resistant strain, L. casei PSR 3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Miocrobiol.*, 29, 691-697.

4. Makoto Shimizu, Hitoshi Nagashima, Kei Hashimoto and Toshihiro Suzuki. 1994. Egg yolk antibody(IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentration. Journal of food science, 59:4.

5. Mine, Y. 1997. Seperation of Salmonella enteritdis from experimentally containated liquid eggs using a hen IgY immobilized immunomanetic separation system. *J. Agric. Food Chem,* 45, 3723-3727.

6. Patterson, R., Youngner, J.S., Weigle, W.O. and Dixon, F.J. 1962. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. Immumol.* 89:272-278..

7. Rho et al. 1999. The effet of age of hens and vaccination on anti-*Streptococcus mutans* specific IgY level in eggs. *Kor. J. Anim. Sci.* 41(5) 563-574.

8. Spiegel, J.E., Rose, R., Karabell, P., Frankos, V.H. and Schmitt, D.F. 1994. Safety and benefit of fructooligosaccharide as food ingredients, *Food Tech.*, 48: 85.

9. Tomomatsu, H. 1994. Health effects of oligosaccharides, *Food Tech.*, 48: 61.

10. 日高秀昌. 1994 프락토올리고당의 기능, 식품과학과 산업, 27: 103.

11. 김미현, 노정해, 김영붕, 손동화, 정순희, 2007. Salmonella gallinarum에 대한 specific IgY의 항균력, 한국식품학회지. 39(5): 552~557.

12. 김영붕, 노정해, 손동화, 김희주, 성기승,이남형. 2000. Streptpcpccus mutans에 대한 specific IgY의 항균력. 한국식품학회지. 32(6):1319~1325.

13. 김영대, 오명주, 정태성, 정성주. 2004. Edwardsiella tarda에 대한 계란난황항체의 분리와 정제 , *J.fish Pathol.*,17(1) : 11~20 (2004)
14. 김정열, 육 철, 권혁진, 홍성용, 박찬구, 박경. 1995. 이소말토올리고당과 프락토올리고당의 물리적 및 생리학적 특성, 한국식품과학회지, 27:170.

15. 박관화. 1992. 탄수화물 신소재의 개발, 식품과학과 산업, 25:73(1992).

16. 이경애. 1998. 난황 중 항체의 안정화에 대한 당류의 효과: I. 프럭토올리고당 용액 중에서 난황항체의 안정성, 한국식품과학회지, 14:5.

17. 한국어병학회지 제 17권 제 1호 (2004) ; *Edwardsiella tarda*에 대한 계란난황항체의분리와 정제