

발간등록번호

11-1543000-001249-01

보안과제(), 일반과제(○)

과제번호 314080-1

국내 HPAI 예방용 백신 도입 타당성 분석 및
효능평가 연구

The feasibility and efficacy studies for field application of
HPAI vaccines

서울대학교 산학협력단

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “국내 HPAI 예방용 백신 도입 타당성 분석 및 효능평가 실증 연구” 과제 (제1세부과제 “국내 HPAI 예방용 백신 도입 타당성 분석 및 효능평가”, 제2세부과제 “국내외 HPAI 백신주 특성 비교 분석 및 백신 조성 최적화”)의 보고서로 제출합니다.

2015년 12월 18일

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 김 재 홍

세부연구책임자 : 김 재 홍

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 권 혁 준

요 약 문

I. 제 목

국내 HPAI 예방용 백신 도입 타당성 분석 및 효능평가 실증 연구

II. 연구성과 목표 대비 실적

| 성과목표 | 사업화지표 | | | | | | | | 연구기반지표 | | | | | | | |
|----------|--------|----|------|-----|------|------|------|-------|--------|----|------|------|------|-------|-----------------|--------|
| | 지식 재산권 | | 기술이전 | 사업화 | | | | 기술인증 | 학술성과 | | 교육지도 | 인력양성 | 정책홍보 | | 기타 (타 연구용 활용 등) | |
| | 출원 | 등록 | | 제품화 | 기술창업 | 매출창업 | 고용창업 | | 투자유치 | 논문 | | | 학술발표 | 정채 활용 | | 홍보 전 시 |
| | | | SCI | | | | | 비 SCI | | | | | | | | |
| 최종목표 | | | | | | | | | 1 | | | 1 | | 1 | | |
| 당해 년도 | 목표 | | | | | | | | - | | | 1 | | 1 | | |
| | 실적 | | | | | | | | - | | | 1 | | 1 | | |
| 달성율(%) | | | | | | | | | - | | | 100 | | 100 | | |

III. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 해외 백신 접종 현황

- 1997년부터 2014년 5월까지 63개국의 가금 및 야생조류에서 7,526건 이상의 HPAI 발생 사례가 보고되었으며 H5N1 HPAI 연중 발생(endemic) 국가로는 베트남, 방글라데시, 인도네시아, 인도, 이집트, 중국이 있음 (OIE). 이들 국가 중 베트남, 인도네시아, 중국, 이집트에서는 백신접종 정책을 채택하였고, 멕시코에서는 저병원성 및 고병원성 H5N2 예방을 위해 백신정책을 채택하였음 (OIE).
- 국가 주도의 전국적인 백신정책이 성공하기 위해서는 가금 집단의 항체양성율과 항체역가를 일정 수준 이상으로 유지하는 것이 중요한데 이를 뒷받침하기 위해서는 상당한 예산과 인력이 확보 되어야 함. 국가 주도의 백신 정책 사례들 중 이집트의 경우 실패 사례로 꼽히는 데 낮은 백신 접종율과 항체 양성율, 백신 접종팀의 비위생적 행태, 자국에서 유행하는 백신 주와 다른 상용 백신 사용 등이 원인으로 지목되고 있음 (FAO, 2011).

□ 반면, 중국의 경우 2004년 3km 살처분 구역 바깥 5km 지역에 처음으로 백신을 허가한 이후로 2005년부터 무상으로 백신을 공급하고 있으며, 유행하는 바이러스와 일치하는 항원성을 갖는 백신을 지속적으로 개발하여 보급하고 있음. 2008년에는 150억회 접종 분량이 넘는 백신이 사용되었음. - 비록 백신 접종을 한 가금에서 발생 사례들이 보고되고 있고, 백신 접종이 이루어지지 않는 경우 (특히 오리)가 있어 백신 접종 정책에 대한 회의도 있으나, 중국 당국은 대대적인 백신 정책으로 인한 발생 사례 감소와 바이러스 감소를 확신하고 있음 (FAO, 2011).

□ 백신을 채택한 국가에서 백신접종 전후의 H5 HPAI 발생율과 백신 접종군 분리주의 유전자 변이 연구를 통해 백신 후 HPAI 발생 및 바이러스 load 감소 등 긍정적인 결과들이 보고되고 있으나, 변이주 발생 위험성이 증가하고 있는 것으로 보고되어 유행 바이러스에 대한 지속적인 모니터링과 현재 유행하는 바이러스를 이용한 백신 접종을 주문하고 있음.

2. 국내 현황

□ 국내 고병원성 조류인플루엔자 (HPAI)는 1차 (2003년 12월-2004년 3월), 2차 (2006년 11월-2007년 3월), 3차 (2008년4월-5월), 4차 (2010년 12월-2011년 5월), 5차 (2014년 1월-현재)까지 총 다섯 차례 발생하여 막대한 경제피해를 초래하였음. 4차 고병원성 조류 인플루엔자의 경우 살처분 보상금 669억원, 생계 안정자금 18억원, 경영 안정자금 1,221억원, 수매 도태자금 733억원을 포함한 직접 피해액은 2,641억원 수준임. 가공·유통업체, 외식업체, 소매업체 등을 포함하는 경우 총 피해규모 6,324억원에 이르는 것으로 보고 (한국농촌경제연구원) 되어 막대한 경제피해를 초래하고 있음.

□ 특히 5차 발생의 경우 겨울 철새 도래 이전에 재발한 후 현재까지 발생하고 있어 엔데믹에 대한 우려가 커지고 있음. 구제역 사례처럼 차단 방역에 실패하고 백신에 대한 준비도 이루어지지 않아 도입 시점을 놓치는 경우 산업기반 붕괴는 물론 국민 안전을 위협할 수 있으므로 국내 HPAI 예방용 백신 도입 타당성 평가를 위한 정보와 실증 데이터 확보가 필요함.

□ 우리나라가 철새이동경로 상 중요한 위치를 차지하고 있어 철새에 의한 바이러스 유입 차단은 불가능하며, 오리농장의 방역위생관리 부실과 유통경로 불투명성으로 인해 과거처럼 1년 걸러 발생하거나 앞으로 매년 발생하는 최악의 상황도 배제할 수 없음.

3. HPAI 백신 개발 현황

□ 중국은 PR8 바이러스의 6개 내부 유전자(internal gene: PB2, PB1, PA, NP, M, NS)와 유행하는 바이러스로부터 약독화시킨 HA (cleavage site의 -RRRKKR-을 -RETR-로 치환하여 약독화한 HA)와 NA 유전자를 갖는 재조합 바이러스를 역 유전학(reverse genetics) 기술로 제작하여 사독백신을 사용하고 있음.

- HA5와 NA1 공여 바이러스들의 발육란 증식성이 낮았으나, 재조합 바이러스들의 증식성은 상당히 개선된 것으로 알려져 있음. 이들 사독백신을 접종하는 경우 오랜 기간 혈구응집억제 항체가 지속되며 오리나 거위에 대한 효과도 좋은 것으로 알려져 있음.

- 생독백신으로는 재조합 계두 벡터 백신과 뉴캐슬병 바이러스 벡터 백신이 개발되었으나 상기의 PR8 재조합 바이러스를 이용한 사독백신들이 지속적으로 많이 사용되고 있음.

□ 국내에서는 저병원성 H5 바이러스 사독백신이 개발된 바 있고, PR8 6개 유전자와 국내에서 발생한 HA5, NA1을 갖는 재조합 바이러스들이 백신주로 개발된 바 있음. 본 연구자들은 PR8 바이러스에 잔존하는 포유류 병원성 제거, HA, NA 조합에 따른 바이러스 증식성 저하 문제 해소, 공통 HA2 에피토프 면역원성 향상을 위한 연구를 수행하여 새로운 H5N1, H5N2 및 H5N3 재조합 백신주 수종을 개발하였음. 따라서 국내외에서 개발된 백신주들이 국내에서 유행하는 H5N1/H5N8 HPAIV를 효과적으로 예방할 수 있는가를 평가하는 백신 타당성 연구가 필요함.

□ 최근 국내 연구결과에 의하면 오리에 대한 H5N1 백신의 효과가 매우 낮아 일회 접종으로 질병 방어는 물론 바이러스 배출을 완벽하게 예방하기 어렵기 때문에 2회 접종이 필요하나 육용오리의 경우 7주령 출하시기와 맞지 않는 문제가 해결되지 않고 있음. 따라서 새롭게 개발된 백신주의 접종 경로와 접종일령, 다양한 면역증강제 조성 백신의 오리 효능 평가가 필요함.

IV. 연구개발 내용 및 범위

○ 주변국 HPAI 발생상황 및 백신 도입여부 사례조사

- 국내 및 해외 유행 HPAI 바이러스의 유전자형 (clade) 조사
- 해외 가금농장 (닭, 오리)의 HPAI 백신 도입 사례 (현지 실사 포함) 및 사용 백신주 조사

○ 백신 도입으로 인한 HPAI 발생상황 변화 사례조사 및 위험요소 예측

- 주변국의 백신도입 사용 후 HPAI 발생률 변화 조사
- 주변국의 백신도입 사용 후 HPAI 바이러스 특성 변화 조사
- 백신 도입으로 발생 가능한 위험요소 예측

○ 국내 상황을 반영하는 HPAI 백신 효능 평가 시험연구

- 해외 및 국내 HPAI 백신 종류 및 효능조사
- 백신주 유전자 특성 분석
- 국내외 백신주의 효능 비교
- 특정병원체 부재 (SPF) 닭 및 오리에서의 백신 효능 평가
- 주변국 사용백신 및 국내 개발 백신을 활용한 방어능 평가 (국내 유입 HPAI 바이러스에 대한 교차방어 효능평가)
- 가금종별 HPAI 백신 접종 시 배출억제 및 전파억제효율 평가
- 국내 백신 조성 최적화
- 국내 백신 용법 용량 최적화

○ HPAI 백신도입의 타당성 분석

- 국내 고병원성 AI 백신 도입 적부성 검토
- 국내 고병원성 AI 백신 도입 시 파급효과
- 국내에서 사용 가능한 AI 백신 종류 검토 분석
- 백신 접종방법 (주사, 경구, 면역증가제 혼합, 점안 등)에 대한 조사 및 타당성 검토
- 가금 축종별 백신 접종 효능조사

○ 기타

- 주변국 HPAI 유행 및 방역정책 사례 확보
- 상용화 (수입) 및 국내 개발 HPAI 백신의 국내 적용 실효성 평가자료 확보
- 현장 상황을 반영한 HPAI 백신 도입 실효성 검토 시험자료 포함
- 국내 HPAI 예방용 백신 도입 시 예상되는 위험요소 예측
- 과제추진 시 농림축산식품부 정책부서와 정책 자문회의 추진 (2회 이상/년)
- 연구 성과의 정책적 연계 방안 제시

V. 연구개발결과

1) 국내 HPAI 예방용 백신 도입 타당성 검토에 활용 할 수 있는 해외 사례 조사결과 확보

- 주변국 HPAI 발생상황 및 백신 도입여부 사례조사
- 백신 도입으로 인한 HPAI 발생상황 변화 사례조사 및 위험요소 예측
- 주변국의 백신도입 후 HPAI 발생률 변화 조사
- 주변국의 백신도입 후 HPAI 바이러스 특성 변화 및 위험요소 조사

2) 국내 상황을 반영하는 HPAI 백신 효능평가 시험연구

- 중국 사용 백신 (4종)을 활용한 방어능/배출억제/전파억제효율 평가
- 국산 개발 백신 (2종)을 활용한 방어능/배출억제/전파억제효율 평가
- 특정병원체 부재 (SPF) 닭에서의 백신 효능 평가

3) HPAI 백신도입의 타당성 분석

- 국내 고병원성 AI 백신 도입 적부성 검토
- 국내 고병원성 AI 백신 도입 시 파급효과
- 국내에서 사용 가능한 AI 백신 종류 검토 분석
- 백신 접종방법 (주사, 경구, 면역증가제 혼합, 점안 등)에 대한 조사 및 타당성 검토
- 가금 축종별 백신 접종 효능조사

4) 국내외 HPAI 백신주 특성 비교 분석

- 해외 유행 HPAI 바이러스의 유전자형 (clade) 조사
- HPAI 바이러스 별로 혈구응집소(hemagglutinin, HA) 유전자의 특성 비교 분석
- HPAI 바이러스 별로 NA (neuraminidase) 유전자의 특성 비교 분석
- HPAI 바이러스 별로 내부 유전자의 특성 비교 분석

5) 연구성과의 정책적 연계 방안 제시

6) 유니버설 백신주 제작 및 방어효능 평가

- 백신 후보 바이러스 제작
- 백신 후보 바이러스 효능 평가

7) 국내 백신 조성 최적화

- Adjuvant
- 특정 병원체 부재 (SPF) 닭에서의 백신 효능 평가

8) 국내 백신 용법 용량 최적화

- 특정 병원체 부재 (SPF) 닭에서의 백신 효능 평가

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

- 효과적인 HPAI 예방용 백신 제작기술 검증
- H5 HPAI 백신 평가 방법 확립
- 백신 제작기술이 검증되는 경우 다양한 인플루엔자 백신 개발에 활용할 수 있어 백신산업 성장에 기여
- 국내 HPAI 백신을 도입하는 경우 백신 생산기술 발전과 동물약품산업 성장 기대
- 백신 접종 후 지속적인 농장관리 필요에 따른 오리산업의 선진화 기대
- HPAI 사후 처리 비용대비 백신 및 추적관리 비용이 낮은 경우 국가 재정에 기여
- 가금산업 기반 안정화 및 고부가가치 제품 생산 기반 마련

SUMMARY

(영문요약문)

Vaccine policy against highly pathogenic avian influenza (HPAI) has been successful in reduction of outbreaks in humans and domestic poultry, and environmental spill-over of virus. Considering the past experience of HPAI in Korea the possibility of uncontrollable spread of HPAI is not high. However, vaccine policy should be considered as one of measures to eradicate HPAI and decided on the basis of decision tree which is established by experts from university, government and industry. To succeed in vaccine policy four prevention strategies, education, biosecurity, surveillance and complete destroy of infected flock, should be combined. Although vaccine policy is not implemented strain bank or antigen bank should be prepared for contingency plan. In contrast to strain bank antigen bank requires cost for production and storage of vaccine antigens but it is valuable for prompt response to emergency.

For the success in vaccine policy vaccination coverage is one of important factors and it should be 80% in poultry population with high risk of infection. In case of Egypt the vaccination coverage were only 36% and 50-60% in small and large scale poultry farms, respectively. Antigenic similarity between vaccine and field strains is also important factor and it was clearly demonstrated in the case of Egypt. In China a panel of PR8-derived recombinant vaccine strains were developed and recently Re-6 or Re-6/Re-7 are used in the field. The commercial vaccine products from China and Mexico induced relatively low haemagglutinin inhibition antibody titers against Korean H5N8 HPAIV at 3-week-post vaccination and could not protect virus shedding in oral cavity. The tested commercial vaccines are contained internal genes of PR8 and the internal genes code for NP, M, polymerases and nonstructural proteins with B- and T-cell epitopes which has been reported to play important roles in heterosubtypic protection of live or inactivated vaccines. Thus, basic results for development of universal/ heterosubtype protective vaccines in the present study may be valuable for development of more efficacious vaccines.

Vaccine policy requires exit plans. The exit plans can include evaluation of vaccine efficacy, monitoring of antigenic variation of field strains, development and field application of new vaccine strains, establishment and implement of virus extinction policy, and formation of cooperative relationship between stakeholders.

Thus, vaccine policy should be determined with great prudence after consideration of preparedness for all resources and conditions.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Outline of Research Project

Chapter 2. Present Situations of Research

Chapter 3. Methods and Results

Chapter 4. Achievements and Contributions in Relevant Research Field

Chapter 5. Plans of Practical Uses

Chapter 6. Data Collections during Project

Chapter 7. The Present Condition of Research Facilities and Machines

Chapter 8. Laboratory Safety Management

Chapter 9. References

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 연구시설·장비 현황
- 제 8 장 연구실 안전관리 이행실적
- 제 9 장 참고문헌

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구개발 목표

1. 연구 목적

가. 반복적으로 발생하고 있는 고병원성 조류인플루엔자 (HPAI, Highly Pathogenic Avian Influenza)의 해결을 위하여 현재까지 보고된 문헌조사 및 국내 상황을 반영한 실증 연구 등을 통하여 백신 도입의 타당성을 검토하고자 함.

2. 연구 목표

- 가. 국내 HPAI 예방용 백신 도입 타당성 검토에 활용할 수 있는 해외 사례 조사 결과 확보
- 나. 국내 상황을 반영하는 HPAI 백신 효능 평가 시험 결과 확보
- 다. 국외 백신주와 국내 백신주 효능 비교
- 라. 국내 백신 조성 최적화

제 2 절 연구 내용

1. 주변국 HPAI 발생상황 및 백신 도입여부 사례조사

- 가. 국내 및 해외 유행 HPAI 바이러스의 유전자형 (clade) 조사
- 나. 해외 가금농장 (닭, 오리)의 HPAI 백신 도입 사례 (현지 실사 포함) 및 사용 백신주 조사

2. 백신 도입으로 인한 HPAI 발생상황 변화 사례 조사 및 위험요소 예측

- 가. 주변국의 백신 도입 후 HPAI 발생률 변화 조사
- 나. 주변국의 백신 도입 후 HPAI 바이러스 특성 변화 조사
- 다. 백신 도입으로 발생 가능한 위험요소 예측

3. 국내 상황을 반영하는 HPAI 백신 효능 평가 시험연구

- 가. 해외 및 국내 HPAI 백신 종류 및 효능조사
- 나. 특정병원체 부재 (SPF) 닭 및 오리에서의 백신 효능 평가
- 다. 주변국 사용백신 및 국내 개발 백신을 활용한 방어능 평가 (국내 유입 HPAI 바이러스에 대한 교차방어 효능평가)
- 라. 가금종별 HPAI 백신 접종 시 배출억제 및 전파억제효율 평가

4. HPAI 백신도입의 타당성 분석

- 가. 국내 고병원성 AI 백신 도입 적부성 검토
- 나. 국내 고병원성 AI 백신 도입 시 파급효과
- 다. 국내에서 사용 가능한 AI 백신 종류 검토 분석
- 라. 백신 접종방법 (주사, 경구, 면역증가제 혼합, 점안 등)에 대한 조사 및 타당성 검토
- 마. 가금 축종별 백신 접종 효능조사

5. 기타

- 가. 주변국 HPAI 유행 및 방역정책 사례 확보
- 나. 상용화 (수입) 및 국내 개발 HPAI 백신의 국내 적용 실효성 평가자료 확보
- 다. 현장 상황을 반영한 HPAI 백신 도입 실효성 검토 시험자료 포함
- 라. 국내 HPAI 예방용 백신 도입 시 예상되는 위험요소 예측
- 마. 과제추진 시 농림축산식품부 정책부서와 정책 자문회의 추진 (2회 이상/년)
- 바. 연구 성과의 정책적 연계 방안 제시

제 3 절 연구개발에 따른 기대성과

1. 오리에서의 효능이 검증된 HPAI 예방용 백신 확보
2. 효과적인 HPAI 예방용 백신 제작기술 검증
3. H5 HPAI 백신 평가 방법 확립
4. 백신 제작기술이 검증되는 경우 다양한 인플루엔자 백신 개발에 활용할 수 있어 백신산업 성장에 기여
5. 국내 HPAI 백신을 도입하는 경우 백신 생산기술 발전과 동물약품산업 성장 기대
6. 백신 접종 후 지속적인 농장관리 필요에 따른 오리산업의 선진화 기대
7. HPAI 사후 처리 비용대비 백신 및 추적관리 비용이 낮은 경우 국가 재정에 기여
8. 가금산업 기반 안정화 및 고부가가치 제품 생산 기반 마련

제 4 절 연구개발결과의 성과 및 활용목표

(단위 : 건수)

| 성과목표 | 지식재산권 | | 논문 | | 학술 발표 | 기술 거래 | 교육 지도 | 사업 화 | 기술 인증 | 인력 양성 | 정책 활용 | 홍보 전시 | 기 타 |
|---------|-------|----|-----|----------|----------|----------|----------|---------|----------|----------|----------|----------|--------|
| | 출원 | 등록 | SCI | 비 SCI | | | | | | | | | |
| 최종목표 | | | 1 | | | 1 | 1 | | | | 1 | | |
| 1차년도 | | | 1 | | | 1 | 1 | | | | 1 | | |
| 소 계 | | | 1 | | | 1 | 1 | | | | 1 | | |
| 종료 1차년도 | | | | | | | | | | | | | |
| 종료 2차년도 | | | | | | | | | | | | | |
| 종료 3차년도 | | | | | | | | | | | | | |
| 종료 4차년도 | | | | | | | | | | | | | |
| 종료 5차년도 | | | | | | | | | | | | | |
| 소 계 | | | | | | | | | | | | | |
| 합 계 | | | 1 | | | 1 | 1 | | | | 1 | | |

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 해외 백신 접종 현황

1. 1997년부터 2014년 5월까지 63개국의 가금 및 야생조류에서 7,526건 이상의 HPAI 발생 사례가 보고되었으며 H5N1 HPAI 연중 발생(endemic) 국가로는 베트남, 방글라데시, 인도네시아, 인도, 이집트, 중국이 있음 (OIE). 이들 국가 중 베트남, 인도네시아, 중국, 이집트에서는 백신접종 정책을 채택하였고, 멕시코에서는 저병원성 및 고병원성 H5N2 예방을 위해 백신정책을 채택하였음 (OIE).
2. 국가 주도의 전국적인 백신정책이 성공하기 위해서는 가금 집단의 항체양성율과 항체역가를 일정 수준 이상으로 유지하는 것이 중요한데 이를 뒷받침하기 위해서는 상당한 예산과 인력이 확보 되어야 함. 국가 주도의 백신 정책 사례들 중 이집트의 경우 실패 사례로 꼽히는데 낮은 백신 접종율과 항체 양성율, 백신 접종팀의 비위생적 행태, 자국에서 유행하는 백신주와 다른 상용 백신 사용 등이 원인으로 지목되고 있음 (FAO, 2011).
3. 반면, 중국의 경우 2004년 3km 살처분 구역 바깥 5km 지역에 처음으로 백신을 허가한 이후로 2005년부터 무상으로 백신을 공급하고 있으며, 유행하는 바이러스와 일치하는 항원성을 갖는 백신을 지속적으로 개발하여 보급하고 있음. 2008년에는 150억회 접종 분량이 넘는 백신이 사용되었음. - 비록 백신 접종을 한 가금에서 발생 사례들이 보고되고 있고, 백신 접종이 이루어지지 않는 경우 (특히 오리)가 있어 백신 접종 정책에 대한 회의도 있으나, 중국 당국은 대대적인 백신 정책으로 인한 발생 사례 감소와 바이러스 감소를 확신하고 있음 (FAO, 2011).
4. 백신을 채택한 국가에서 백신접종 전후의 H5 HPAI 발생율과 백신 접종군 분리주의 유전자 변이 연구를 통해 백신 후 HPAI 발생 및 바이러스 load 감소 등 긍정적인 결과들이 보고되고 있으나, 변이주 발생 위험성이 증가하고 있는 것으로 보고되어 유행 바이러스에 대한 지속적인 모니터링과 현재 유행하는 바이러스를 이용한 백신 접종을 주문하고 있음.

제 2 절 국내 현황

1. 국내 고병원성 조류인플루엔자 (HPAI)는 1차 (2003년 12월-2004년 3월), 2차 (2006년 11월-2007년 3월), 3차 (2008년4월-5월), 4차 (2010년 12월-2011년 5월), 5차 (2014년 1월-현재)까지 총 다섯 차례 발생하여 막대한 경제피해를 초래하였음.

가. 4차 고병원성 조류 인플루엔자의 경우 살처분 보상금 669억원, 생계 안정자금 18억원, 경영 안정자금 1,221억원, 수매 도태자금 733억원을 포함한 직접 피해액은 2,641억원 수준임. 가공, 유통업체, 외식업체, 소매업체 등을 포함하는 경우 총 피해규모 6,324억원에 이르는 것으로 보고 (한국농촌경제연구원) 되어 막대한 경제피해를 초래하고 있음.

2. 특히 5차 발생의 경우 겨울 철새 도래 이전에 재발한 후 현재까지 발생하고 있어 엔데믹에 대한 우려가 커지고 있음. 구제역 사례처럼 차단 방역에 실패하고 백신에 대한 준비도 이루어지지 않아 도입 시점을 놓치는 경우 산업기반 붕괴는 물론 국민 안전을 위협할 수 있으므로 국내 HPAI 예방용 백신 도입 타당성 평가를 위한 정보와 실증 데이터 확보가 필요함.

3. 우리나라가 철새이동경로 상 중요한 위치를 차지하고 있어 철새에 의한 바이러스 유입 차단은 불가능하며, 오리농장의 방역위생관리 부실과 유통경로 불투명성으로 인해 과거처럼 1년 걸러 발생하거나 앞으로 매년 발생하는 최악의 상황도 배제할 수 없음.

제 3 절 HPAI 백신 개발 현황

1. 중국은 PR8 바이러스의 6개 내부 유전자 (internal gene: PB2, PB1, PA, NP, M, NS)와 유행하는 바이러스로부터 약독화시킨 HA (cleavage site의 -RRRKKR-을 -RETR-로 치환하여 약독화한 HA)와 NA 유전자를 갖는 재조합 바이러스를 역 유전학 (reverse genetics) 기술로 제작하여 사독백신을 사용하고 있음.

가. HA5와 NA1 공여 바이러스들의 발육란 증식성이 낮았으나, 재조합 바이러스들의 증식성은 상당히 개선된 것으로 알려져 있음. 이들 사독백신을 접종하는 경우 오랜 기간 혈구응집 억제 항체가 지속되며 오리나 거위에 대한 효과도 좋은 것으로 알려져 있음.

나. 생독백신으로는 재조합 계두 벡터 백신과 뉴캐슬병 바이러스 벡터 백신이 개발되었으나 상기의 PR8 재조합 바이러스를 이용한 사독백신들이 지속적으로 많이 사용되고 있음.

2. 국내에서는 저병원성 H5 바이러스 사독백신이 개발된 바 있고, PR8 6개 유전자와 국내에서 발생한 HA5, NA1을 갖는 재조합 바이러스들이 백신주로 개발된 바 있음. 본 연구자들은 PR8 바이러스에 잔존하는 포유류 병원성 제거, HA, NA 조합에 따른 바이러스 증식성 저하 문제 해소, 공통 HA2 에피토프 면역원성 향상을 위한 연구를 수행하여 새로운 H5N1, H5N2 및 H5N3 재조합 백신주 수 종을 개발하였음. 따라서 국내외에서 개발된 백신주들이 국내에서 유행하는 H5N1/H5N8 HPAIV를 효과적으로 예방할 수 있는가를 평가하는 백신 타당성 연구가 필요함.

3. 최근 국내 연구결과에 의하면 오리에 대한 H5N1 백신의 효과가 매우 낮아 일회 접종으로 질병 방어는 물론 바이러스 배출을 완벽하게 예방하기 어렵기 때문에 2회 접종이 필요하나 육용오리의 경우 7주령 출하시기와 맞지 않는 문제가 해결되지 않고 있음. 따라서 새롭게 개발된 백신주의 접종 경로와 접종일령, 다양한 면역증강제 조성 백신의 오리 효능 평가가 필요함.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 수행 내용

[제1세부과제: 국내 HPAI 예방용 백신 도입 타당성 분석 및 효능평가]

1. 주변국 HPAI 발생상황 및 백신 도입 여부 사례조사

가. 해외 가금 농장 (닭, 오리) HPAI 백신 도입 사례 (현지 실사 포함) 및 사용 백신주 조사

(1) 해외 전문가 네트워크를 이용한 조사

(2) 성공사례 (중국)

(가) 현지 실사 및 전문가 면담

① 현지 현장 전문가 네트워크 구축

② 현장에서의 백신접종 및 질병 모니터링 관련 문제점 및 해결책 수집

(나) 사용 백신주 확보

(3) 실패사례 (이집트): 현지 실사 또는 전문가 면담 (optional)

나. 백신 도입으로 인한 HPAI 발생상황 변화 사례조사 및 위험요소 예측

2. 주변국의 백신도입 후 HPAI 발생률 변화 조사

가. 베트남, 중국, 인도네시아 축종 간 (닭, 오리) 백신 접종률 향체 수준/양성률 조사

나. 베트남, 중국, 인도네시아 HPAI 발생률 조사

3. 주변국의 백신도입 후 HPAI 바이러스 특성 변화 및 위험요소 조사

가. 베트남, 중국, 인도네시아 HPAI 바이러스 유전자 변이 조사

나. 베트남, 중국, 인도네시아 HPAI 바이러스 항원성 변이 조사

다. 베트남, 중국, 인도네시아 HPAI 바이러스 병원성 변이 조사

4. 국내 상황을 반영하는 HPAI 백신 효능평가 시험연구

가. 주변국 사용백신 및 국내 개발백신을 활용한 방어능/배출억제/전과억제효율 평가

(1) 국내 유입 HPAI 바이러스에 대한 교차방어 효능평가

(2) SPF 닭 백신 효능 평가

(가) 외국백신 1종

(나) 국내 백신 2종 (포유류 무병원성 백신주 선발)

표1. 국내 H5N1 HPAIV 방어능/배출억제/전파억제효율 평가

| 시험군 | 백신 접종 ^a | 바이 러스 ^c | 공격접종 ^b | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|--|--------|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|---|--|--|
| | | | 폐사율 | | 분비 바이러스 역가 (EID ₅₀ /sample) | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | 3일 후 | | | | 5일 후 | | | | 7일 후 | | | | |
| | | | 공 격 ^d | 접 촉 ^e | OP ^f | | C ^g | | OP | | C | | OP | | C | | |
| 공 격 | 접 촉 | 공 격 | | | 접 촉 | 공 격 | 접 촉 | 공 격 | 접 촉 | 공 격 | 접 촉 | 공 격 | 접 촉 | | | | |
| 국외백신 | + | H5N1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 국내백신1 | + | H5N1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 국내백신2 | + | H5N1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 무백신공격 | - | H5N1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 음성대조 | - | - | | | | | | | | | | | | | | | |

- ^a SPF 닭 3주령(또는 1일령/2주령) 사용
- ^b 백신 접종 3주후 공격
- ^c 2010년 국내 분리 H5N1 HPAIV K10-483주(건국대학교)
- ^d 공격: 5수
- ^e 접촉: 3수
- ^f OP: oropharyngeal swab
- ^g C: cloacal swab
- * 상황에 따라 시험조건 변경 가능

표 2. 국내 H5N8 HPAIV 방어능/배출억제/전파억제효율 평가

| 시험군 | 백신 접종 ^a | 바이 러스 ^c | 공격접종 ^b | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|--|--------|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|---|--|--|
| | | | 폐사율 | | 분비 바이러스 역가 (EID ₅₀ /sample) | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | 3일 후 | | | | 5일 후 | | | | 7일 후 | | | | |
| | | | 공 격 ^d | 접 촉 ^e | OP ^f | | C ^g | | OP | | C | | OP | | C | | |
| 공 격 | 접 촉 | 공 격 | | | 접 촉 | 공 격 | 접 촉 | 공 격 | 접 촉 | 공 격 | 접 촉 | 공 격 | 접 촉 | | | | |
| 국외백신 | + | H5N8 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 국내백신1 | + | H5N8 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 국내백신2 | + | H5N8 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 공격군 | - | H5N8 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 음성대조군 | - | - | | | | | | | | | | | | | | | |

- ^a SPF 닭 3주령(또는 1일령/2주령) 사용
- ^b 백신 접종 3주후 공격
- ^c 2014년 국내 분리 H5N8 HPAIV Gochang 1/14 (QIA)
- ^d 공격: 5수
- ^e 접촉: 3수
- ^f OP: oropharyngeal swab
- ^g C: cloacal swab
- * 상황에 따라 시험조건 변경 가능

(3) 오리 백신 효능 평가

표 3. 국내 H5N1 HPAIV 방어능/배출억제/전파억제효율 평가

| 시험군 | 백신 접종 ^a | 바이러스 ^c | 공격접종 ^b | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------|--|----|----------------|----|------|----|----|----|------|--|---|--|--|
| | | | 폐사율 | | 분비 바이러스 역가 (EID ₅₀ /sample) | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | 3일 후 | | | | 5일 후 | | | | 7일 후 | | | | |
| | | | 공격 ^d | 접촉 ^e | OP ^f | | C ^g | | OP | | C | | OP | | C | | |
| 공격 | 접촉 | 공격 | | | 접촉 | 공격 | 접촉 | 공격 | 접촉 | 공격 | 접촉 | 공격 | 접촉 | | | | |
| 국외백신 | + | H5N1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 국내백신1 | + | H5N1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 국내백신2 | + | H5N1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 공격군 | - | H5N1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 음성대조군 | - | - | | | | | | | | | | | | | | | |

^a AI 음성 오리 3주령(또는 1일령/2주령) 사용

^b 백신 접종 3주후 공격

^c 2010년 국내 분리 H5N1 HPAIV K10-483주(건국대학교)

^d 공격: 5수

^e 접촉: 3수

^f OP: oropharyngeal swab

^g C: cloacal swab

* 상황에 따라 시험조건 변경 가능

표 4. 국내 H5N8 HPAIV 방어능/배출억제/전파억제효율 평가

| 시험군 | 백신 접종 ^a | 바이러스 ^c | 공격접종 ^b | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------|--|----|----------------|----|------|----|----|----|------|--|---|--|--|
| | | | 폐사율 | | 분비 바이러스 역가 (EID ₅₀ /sample) | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | 3일 후 | | | | 5일 후 | | | | 7일 후 | | | | |
| | | | 공격 ^d | 접촉 ^e | OP ^f | | C ^g | | OP | | C | | OP | | C | | |
| 공격 | 접촉 | 공격 | | | 접촉 | 공격 | 접촉 | 공격 | 접촉 | 공격 | 접촉 | 공격 | 접촉 | | | | |
| 국외백신 | + | H5N8 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 국내백신1 | + | H5N8 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 국내백신2 | + | H5N8 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 공격군 | - | H5N8 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 음성대조군 | - | - | | | | | | | | | | | | | | | |

^a AI 음성 오리 3주령(또는 1일령/2주령) 사용

^b 백신 접종 3주후 공격

^c 2014년 국내 분리 H5N8 HPAIV Gochang 1/14 (QIA)

^d 공격: 5수

^e 접촉: 3수

^f OP: oropharyngeal swab

^g C: cloacal swab

* 상황에 따라 시험조건 변경 가능

5. HPAI 백신도입의 타당성 분석

가. 아래의 원칙에 따라 실험결과를 바탕으로 방역당국과의 협의를 통해 타당성 분석을 진행함



6. 연구성과의 정책적 연계 방안 제시

가. H5 HPAI가 엔데믹이 되는 경우 (오리 백신 정책 제안 예시)

(1) 1일령-2주령 백신 프로그램 적용: 부화장 1일령 의무 접종 (다른 오리질병 백신 병용가능)

(2) 예산확보 방안 제안

(가) 부화장-정부 (1일령 백신) 공동부담

(나) 육성농가-정부 (2주령 백신) 공동부담

(3) 인력확보 및 운용 방안

(가) 백신접종팀 방역/위생 교육 이수팀에게만 접종 허용

(나) 접종 일정 공개 및 현장 관리 (접종팀 현장 동영상 자체 촬영 및 업로드 의무화)

(4) 모니터링

(가) 4주령 혈청 검사 (10수 이상 검사)

(나) 출하 1주전 cloacal swab 분자진단 검사 합격증 첨부해야 출하 가능토록 함

(5) 백신 접종 필요성과 타당성이 인정되는 경우, AI 백신접종 정책 채택과 현장 적용 전에 방역당국에서 생산자 단체와 학계, 관련업계의 의견을 수렴하는 절차를 거쳐야 할 것임

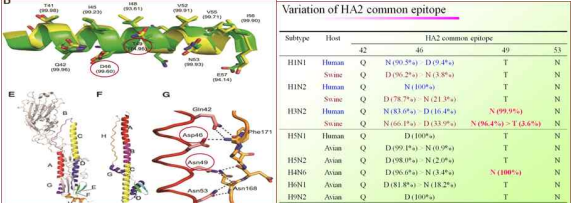
[제2세부과제: 국내외 HPAI 백신주 특성 비교 분석 및 백신 조성 최적화]

1. 유전자 분석

가. 해외 유행 HPAI 바이러스의 유전자형 (clade) 조사

나. 백신주 유전자 특성 분석

(1) HPAI 바이러스 별로 혈구응집소(hemagglutinin, HA) 유전자의 특성 비교 분석

| 항목 | 기능 | 비고 |
|------------------------|-----------------------------|---|
| Isoelectric point | 내산성 | |
| N-linked glycosylation | Receptor affinity, 에피토프 마스킹 | 158N-glycan 등 |
| HA2-common epitope | 교차방어 |  |
| Cleavage site | 병원성 | RRRKKR -> R-X-X-R, X-X-X-R |
| Receptor binding site | 숙주범위 | Q226L, G228S |
| 중요 돌연변이 | 증식성 관련 | HA1: H103Y, K161E, L317P; HA2: R51K |

(2) HPAI 바이러스 별로 NA (neuraminidase) 유전자의 특성 비교 분석

| 항목 | 기능 | 비고 |
|------------------------|----------------------------------|--------|
| Isoelectric point | 내산성 | |
| N-linked glycosylation | Protein folding | |
| Stalk length | Enzyme activity (solid receptor) | |
| 중요 돌연변이 | 증식성 관련 | R51K 등 |

2. 국내외 백신주의 효능 비교

가. 백신주 특성 비교

(1) 증식성: 중국 재조합 백신주인 Re-1, 3, 4, 5 중 확보 가능한 바이러스 1종 (Re-1 최우선 확보)과 국내주의 종란접종 시의 증식성(EID₅₀/ml) 비교 (Re-1 생바이러스 확보 불가로 Re-1에 대한 평가는 수행하지 않음)

(2) BALB/c 마우스 병원성: Re-1 10^6 EID₅₀/수 8수의 BALB/c 마우스에 접종한 후 체중 측정 (5수 14일간) 및 접종 3일에 3수를 안락사 시켜 폐장 내 바이러스 역가 측정 (Re-1 생바이러스 확보 불가로 Re-1에 대한 평가는 수행하지 않음)

(3) 항원성: Re-1 및 국내 2종 이상 백신주를 사용하여 사독오일백신 제조하여 3주령 SPF 닭 각 5수에 피하 접종하고, 2주와 3주에 채혈하여 HI 및 VN 항체 교차역가 측정 (Re-1 생바이러스 확보 불가로 Re-1에 대한 평가는 수행하지 않음)

3. 국내 백신 조성 최적화

가. Adjuvant

(1) ISA 70 등 Mineral oil 이용: [항원 ($10^{9.4}$ EID₅₀/ml):오일] 3:7 또는 4:6 오일백신 제조

(2) Aluminium hydroxide gel 백신 제조: 경제성을 고려하여 whole inactivated virus로 대체하여 실험을 수행함

나. 동물실험

(1) 국내 백신주 1로 백신 제조

(2) 수당 0.3ml 접종

| 실험동물 | 접종경로 | 백신 조성 | 동물수 | 항체역가 (log2) | | | |
|----------------|-----------|-------|-----|-------------|----|----|----|
| | | | | 2주 | | 3주 | |
| | | | | HI | VN | HI | VN |
| SPF 닭 (3주령) | 근육 | 3:7 | 5 | | | | |
| | | 4:6 | 5 | | | | |
| | | 겔 | 5 | | | | |
| 오리 (3주령) | 근육 | 3:7 | 5 | | | | |
| | | 4:6 | 5 | | | | |
| | | 겔 | 5 | | | | |
| | 피하 (목) | 3:7 | 5 | | | | |
| | | 4:6 | 5 | | | | |
| | | 겔 | 5 | | | | |

* 오리의 경우 유사 시 백신을 하는 경우 조기 백신이 중요하므로 1일령 오리에 대해 WIV 면역원성 측정함

(3) 효과 있는 조성으로 나머지 국내 백신주 2로 백신 제조하여 닭과 오리에서 시험

- PR8 내부유전자를 갖는 경우 야외주와 차이를 보여 heterosubtypic protection이 어려울 것으로 예상되어 유니버설 백신 개발을 위한 기초실험을 위해 신규 제작한 internal gene recombinant viruses의 효능을 BALB/c에서 평가하는 실험으로 대체함.

| 실험동물 | 접종 경로 | 백신 조성 | 동물수 | 항체역가 (log2) | | | |
|----------------|-------|-------------|-----|-------------|----|----|----|
| | | | | 2주 | | 3주 | |
| | | | | HI | VN | HI | VN |
| SPF 닭 (3주령) | 근육 | 국내백신2 최적 | 5 | | | | |
| | | 국외 백신1 | 5 | | | | |
| 오리 (3주령) | 근육 | 국내백신2 최적 | 5 | | | | |
| | | 국외 백신1 | 5 | | | | |

4. 국내 백신 용법 용량 최적화

가. 특정 병원체 부재(SPF) 닭 및 오리에서의 백신 효능 평가

(1) 방역 및 위생수준이 비교적 낮은 오리농장의 **현장 상황을 반영한 HPAI 백신 도입 실험 효능 검토 및 효과적인 백신 접종법 개발**: 외국 자료 및 연구결과 필수적 확보

(2) **국내 백신주 1로 평가**

| 실험동물 | 접종경로 | 백신시점 | 동물수 | HI 항체역가 (log2) | | | | |
|-------|-------------|---------------------|-----|----------------|-----|-----|-----|-----|
| | | | | 2주후 | 3주후 | 4주후 | 5주후 | 6주후 |
| SPF 닭 | 근육 | 1차: 1일령* 2차: 2주령 | 5 | | | | | |
| | | 3주령 | 5 | | | | | |
| 오리 | 근육 or 피부 | 1차: 1일령* 2차: 2주령 | 5 | | | | | |
| | | 3주령 | 5 | | | | | |

* Sheared oil emulsion vaccine: standart oil emulsion vaccine + 생리식염수 (5:5) 혼합 0.3ml/수 접종
 * 오리의 경우 유사 시 백신을 하는 경우 조기 백신이 중요하므로 1일령 오리에 대해 whole inactivated vaccine의 면역원성을 측정함

(3) **국내 백신주 2로 최적의 백신 시점평가**

| 실험동물 | 접종경로 | 백신시점 | 동물수 | HI 항체역가 (log2) | | | | |
|-------|------|------|-----|----------------|-----|-----|-----|-----|
| | | | | 2주후 | 3주후 | 4주후 | 5주후 | 6주후 |
| SPF 닭 | 최적 | 최적 | 5 | | | | | |
| 오리 | 최적 | 최적 | 5 | | | | | |

제 2 절 연구 결과

[제1세부과제: 국내 HPAI 예방용 백신 도입 타당성 분석 및 효능평가]

1. 발생 실태와 백신의 세계적 사용 현황

가. 1959년부터 2015년까지의 고병원성 조류인플루엔자 (highly pathogenic avian influenza, HPAI)의 세계적 발생상황을 정리해 보면 총 33회 발생하였으며 (표 1, 그림 1), H5 또는 H7 아형(subtype)에 속하는 HPAI 바이러스에 의하여 발생하였음. 이들 중 30번째에 해당하는 H5N1 HPAI는 2006년 이후에 세계 최초로 중국에서 시작하여 전 세계적으로 유행하였고, 그 전에 발생한 다른 29개의 유행병을 합친 것 보다 비교가 어려울 정도로 훨씬 많은 피해를 일으켰음.

표 1. 1959년부터 2012년 사이에 발생한 가금 및 야생조류의 HPAI 발생 현황

Table 1. List of the 30 epizootics of HPAI in domestic poultry and wild birds between 1959 and 2012 (30).

| Year | Country | Subtype | Species |
|--------------------------|-------------------------------|---------|--|
| 1959 | Scotland | H5N1 | Chickens (<i>Gallus gallus domesticus</i>) |
| 1961 | South Africa | H5N3 | Common terns (<i>Sterna hirundo</i>) |
| 1963 | England | H7N3 | Turkeys (<i>Meleagris gallopavo</i>) |
| 1966 | Canada | H5N9 | Turkeys |
| 1975 | Australia | H7N7 | Chickens and ducks (<i>Anas platyrhynchos</i>) |
| 1979 | Germany | H7N7 | Chickens and geese (<i>Anser anser domesticus</i>) |
| 1979 | England | H7N7 | Turkeys |
| 1983-84 | USA | H5N2 | Chickens, turkeys, partridges (<i>Alectoris chukar</i>), guinea fowl (<i>Numida meleagris</i>), and miscellaneous poultry |
| 1983 | Ireland | H5N8 | Turkeys, chickens, ducks |
| 1985 | Australia | H7N7 | Chickens |
| 1991 | England | H5N1 | Turkeys |
| 1992 | Australia | H7N3 | Chickens, ducks |
| 1994 | Australia | H7N3 | Chickens |
| 1994-95 | Mexico | H5N2 | Chickens |
| 1995 & 2004 | Pakistan | H7N3 | Chickens |
| 1996-cont. | Asia, Africa, Europe | H5N1 | Various poultry and wild birds |
| 1997 | Australia | H7N4 | Chickens, emus (<i>Dromaius novaehollandiae</i>) |
| 1997 | Italy | H5N2 | Various poultry |
| 1999-2000 | Italy | H7N1 | Chickens, turkeys, guinea fowl, quail, ducks, pheasants, ostriches (<i>Struthio camelus</i>) |
| 2002 | Chile | H7N3 | Chickens, turkeys |
| 2003 | Netherlands, Belgium, Germany | H7N7 | Chickens and various other poultry |
| 2004 | USA | H5N2 | Chickens and various other poultry |
| 2004 | Canada | H7N3 | Chickens |
| 2004 & 2006 ^A | South Africa | H5N2 | Ostriches and various other poultry |
| 2005 | Peoples' Republic of Korea | H7N7 | Chicken |
| 2007 | Canada | H7N3 | Chickens |
| 2008 | England | H7N7 | Chickens |
| 2009 | Spain | H7N7 | Chickens |
| 2011-cont. | South Africa | H5N2 | Ostriches |
| 2012-cont. | Chinese Taipei | H5N2 | Chickens |

^AAdditional studies are needed to determine if these are two distinct lineages for the hemagglutinin genes of these H5N2 viruses. In this table, they are grouped together as one lineage of virus.

(출처: Avian Diseases, 2012, 56(4s1):818-828)

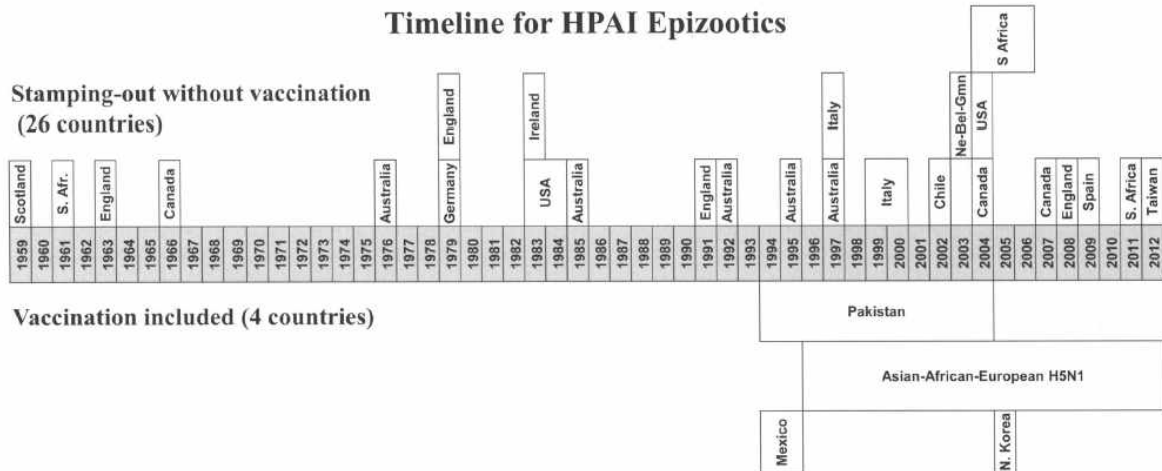


Fig. 2. Time line for the 30 reported HPAI epizootics from 1959 to early 2012.

그림 1. 1959년부터 2012년까지 유행한 HPAI의 연대별 발생국가

(출처: Avian Diseases, 2012, 56(4s1):818-828)

나. 마지막 33번째는 2014년 1월 이후 중국과 우리나라, 일본, 홍콩, 베트남 등에서 최초로 발생한 H5N8 HPAI로 볼 수 있음. H5N8 바이러스는 기존의 H5N1 바이러스와는 HA 유전자의 유전적 clade를 달리하는 새로운 변이종에 속함. 이 바이러스는 야생조류에서의 광범위한 감염능력을 보이면서, 철새의 이동경로를 따라 북미지역까지 확산됨. 캐나다는 물론 미국에서 수개월 만에 무려 5천만 수에 이르는 가금류를 살처분하는 비극을 초래하였고, 국내에서도 2년에 걸쳐 발생이 지속된 유일한 사례로 기록됨.

다. 30번째 H5N1 HPAI는 1996년 중국 광둥에서 발병하여 63개의 국가에서 2억5천만 수의 가금류와 야생조류의 폐사 또는 도태를 유발함 (그림 2).

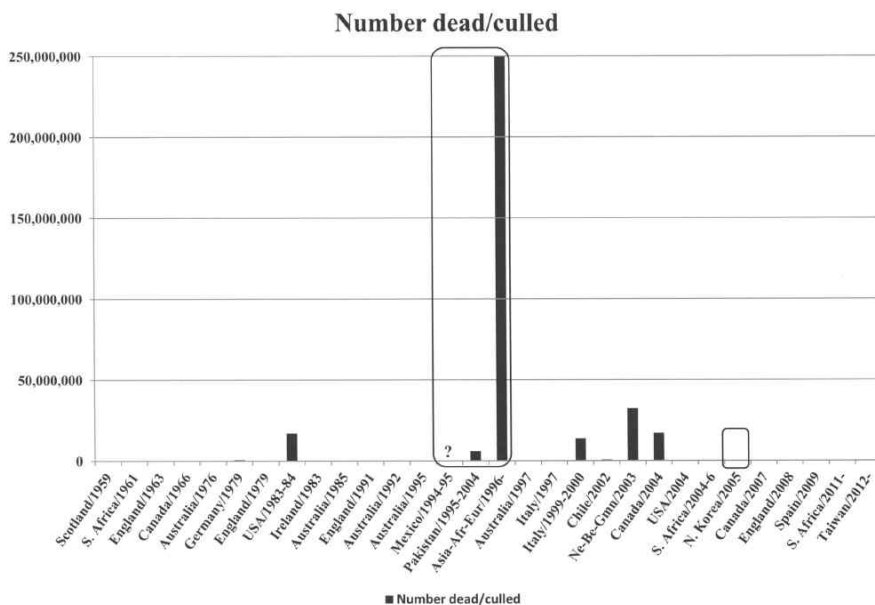


Fig. 1. Number of birds that died or were culled for HPAI in the 30 reported epizootics from 1959 to early 2012. Lack of visible bar indicates < 1 million birds.

그림 2. 1959년부터 2012년까지 유행한 HPAI에 의한 가금류 및 야생조류의 폐사 또는 도태 수

(출처: Avian Diseases, 2012, 56(4s1):818-828)

라. 대부분의 국가들은 H5N1 HPAI를 조기 박멸하기 위해 이동통제와 예방살처분 방식을 사용했지만, 그 중 15개의 국가는 재정적, 사회적 여건과 함께 전국적 확산과 상재화로 인하여 전면적 예방살처분 방법의 적용이 불가능한 조치였기 때문에 이들 국가에서는 통제 전략의 일환으로 백신접종 정책을 대안으로 채택하였으며, 질병의 근절보다는 피해 감소에 주력하게 됨. 이들 국가의 백신 사용량을 보면 2002년부터 2010년까지 1,130억수 분이 넘는 것으로 집계됨. 방글라데시와 인도 동부지역은 H5N1 HPAI가 토착화 되었음에도 불구하고 백신 정책을 사용하지 않고 있음.

마. 백신접종국 15개국 중에서 중국, 이집트, 인도네시아, 베트남, 홍콩의 5개국은 HPAI가 상재화 (토착화, endemic) 됨으로써 전국적인 백신 프로그램을 가동하였으며, 이들 국가의 백신 사용량이 세계 전체 사용량의 99%를 차지함. 구체적으로 살펴보면, 중국 90.9%, 이집트 4.6%, 인도네시아 2.3%, 베트남 1.4%, 홍콩 0.01%의 순이며, 그 외에 네덜란드, 코트디부아르, 수단, 북한, 이스라엘, 러시아 및 파키스탄은 AI 백신의 1%만 사용한 것으로 집계되고 있음 (그림 3).

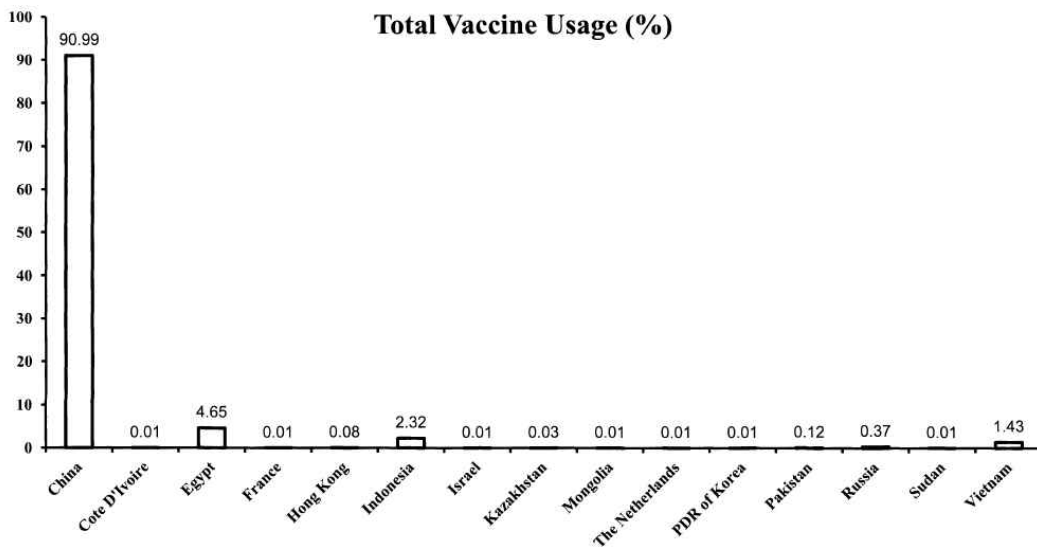


Fig. 5. Percentage of total vaccine doses used in poultry by the 15 countries vaccinating poultry against HPAI from 2002 to 2010.

그림 3. 전세계 HPAI 백신 사용량

(출처: Avian Diseases, 2012, 56(4s1):818-828)

마. 중국에서는 1996년 세계에서 최초로 H5N1 바이러스 분리 사례를 논문으로 보고하였고, 그 이후 동일한 유래의 H5N1 HPAI가 전 세계적으로 유행하였음. 1997년 홍콩에서 H5N1 HPAI로 인한 18명의 인체 감염과 6명의 사망사례가 최초로 보고되어 지구촌을 충격으로 몰아넣었으며, 그 이후 홍콩에서 HPAI가 수차례 추가로 발생하여 가금 산업에 심대한 피해를 유발하였음. 그러나 중국에서는 매년 산발적으로 발생하였음에도 불구하고 중국이 OIE에 가입한 2004년까지 공식적인 HPAI 발생 보고는 없었음. 우리나라가 2003년 12월 H5N1 HPAI의 가금류 집단발생을 국제사회에 최초로 보고한 이후인 2004년에야 최초로 H5N1 HPAI 발생을 OIE에 보고하였는데, 2004년 첫 두 달 동안 전국적으로 16개 주에서 48회의 발병이 보고됨. 중국 본토의 백신접종은 2005년 이후에 본격적으로 추진됨.

바. 인도네시아의 첫 H5N1 HPAI는 2003년 7월에 발생하였고, 2004년 6월까지 312건의 HPAI가 발생하여 1,090만수가 폐사하였으며, 2004년 중순부터 백신접종을 시작함. 2003년부터 HPAI가 발생한 베트남에서는 2005년 10월까지 백신접종을 하지 않고 이동통제와 살처분 정책을 추진하였으나, 근절정책의 실패로 지속적 발생과 전국적 확산으로 인하여 결국 백신접종 정책을 채택함. 결과적으로 동남아국가에서의 백신접종은 H5N1 HPAI가 전국적으로 토착화하여 상재성 질병이 된 이후 시행되었음을 의미함.

사. 2012년까지 세계적으로 사용한 백신 중 불활화 AI 백신은 백신사용량의 95.5%, 병원성이 없는 특정 바이러스에 AI 유전자를 재조합하여 만든 생 바이러스 벡터 백신은 4.5%가 사용됨. 후자는 주로 Newcastle 병 바이러스나 계두바이러스 (fowl pox)를 벡터로 사용하여 H5 influenza 유전자가 삽입된 재조합 백신임.

2. HPAI 방제 프로그램의 국가별 비교

가. 2002년부터 2010년을 대상으로 한 국가별 HPAI 및 H5/H7 저병원성(low pathogenic, LP) AI (LPAI) 방제 프로그램에 대한 설문조사 결과, 69개의 국가 중 27개국 (39%)의 가금류에서 HPAI가 발생했으며, 11개국 (16%)에서 야생조류의 HPAI 발생을 보고함. 그 중, 26개국 (38%)에서는 가금과 야생조류 모두에서 HPAI가 발생함.

나. HPAI에 대한 국가적 긴급방제시스템과 대처프로그램은 대부분의 국가에서 구축되어 있지만 실질적으로 어느 정도 시행되고 있으며, 얼마나 효율적으로 실시되는 지는 국가별로 많은 차이가 존재함. 격리와 이동제한 또는 통제, 발생농장과 역학적 관련농장의 신속한 살처분, 발생경로에 대한 역학적 추적, 농가 차원의 차단방역 (biosecurity)에 대한 실효성 평가, 질병 발생 예찰 및 감시, 조기 진단, 언론 홍보와 농가 교육, 살처분농장에 대한 보상체계 및 재입식 지원 등 다양한 분야에서 여러 요인이 고려됨.

다. 감염농장의 살처분 정책도 국가별로 상황에 따라 매우 다양함. HPAI의 경우, 감염 농장만 도태하는 국가가 있는 반면, 발생농장으로부터 거리별로 방역대 (zone)를 설정하여 접촉 우려가 있거나 전파를 확산시키는 요인으로 작용할 우려가 있는 인근 농장까지 모두 예방적 살처분을 실시하는 국가도 있음. 선진국은 대부분 후자에 속하는데 각 요소별 양적, 질적 시행 여부에 따라 박멸의 신속성이 결정된다고 볼 수 있음.

라. 백신접종 정책만 해도 앞서 기술한 바와 같이 국가별로, 상황별로 매우 다르게 적용되고 있음. 국가별로 보면, 1) 위험에 노출될 가능성이 높을 때 예방의 도구로서 사용하거나, 2) 질병 발생 초기의 비상조치용, 3) 전국적 상재화로 인하여 일상적인 백신접종프로그램의 일환으로서의 사용으로 구분할 수 있음.

마. HPAI가 상재화된 있는 베트남, 인도네시아, 중국, 이집트 4개국의 백신접종 정책을 위주로 한 국가별 HPAI 방제 프로그램을 비교해 보면 다음과 같음.

(1) 중국

(가) 중국 본토는 전 세계 가금 산업의 20%와 오리 사육수수의 70%를 차지하며, 이들의 약 60%는 작은 농장이나 뒷마당에서 키우는 가금류임. 2005년부터 백신이 정부로부터 무료로 제공되어 대량의 백신접종이 이루어짐. 중국 정부는 현재 대부분의 지역의 가금류에 백신접종을 의무화하는 정책을 펴고 있음.

(나) 백신은 중국 국내에서 생산되는 불활화백신과 재조합 벡터백신을 이용하고 있음. 전국적인 백신의 광범위한 사용은 과거 5년간 HPAI 인체 발생사례를 1년에 1-2 건 정도로 매우 낮게 감소시켰고, 조류에서의 감염건수도 감소시켰음. 시골 농가의 뒷마당에서 방사하는 농가가 많음에도 불구하고 대량 백신접종 정책은 H5N1과 관련된 위험을 관리하는데 유용한 것으로 평가됨.

(다) 백신접종 이후 예상대로 질병은 근절되지 않고 상재화된 상태에서 매년 발생이 지속되었으며, 국가방역 차원에서는 백신접종으로 인하여 감염 농장 색출해 내기가 매우 어려워졌을 뿐만 아니라 농가 단위의 발생보고도 현저히 줄어들게 되어 백신접종으로 인한 부정적 측면이 부각된 계기가 됨.

(라) 2005년 본격적인 백신의 대량접종 이후 HPAI 발생률의 감소를 나타내고 있지만 (그림 4), 베트남의 사례와 같이 실질적 감소 외에 발생보고 또는 질병 진단이 어려워진 부분도 발생건수 감소에 기여했다는 사실이 간과되어서는 안 됨.

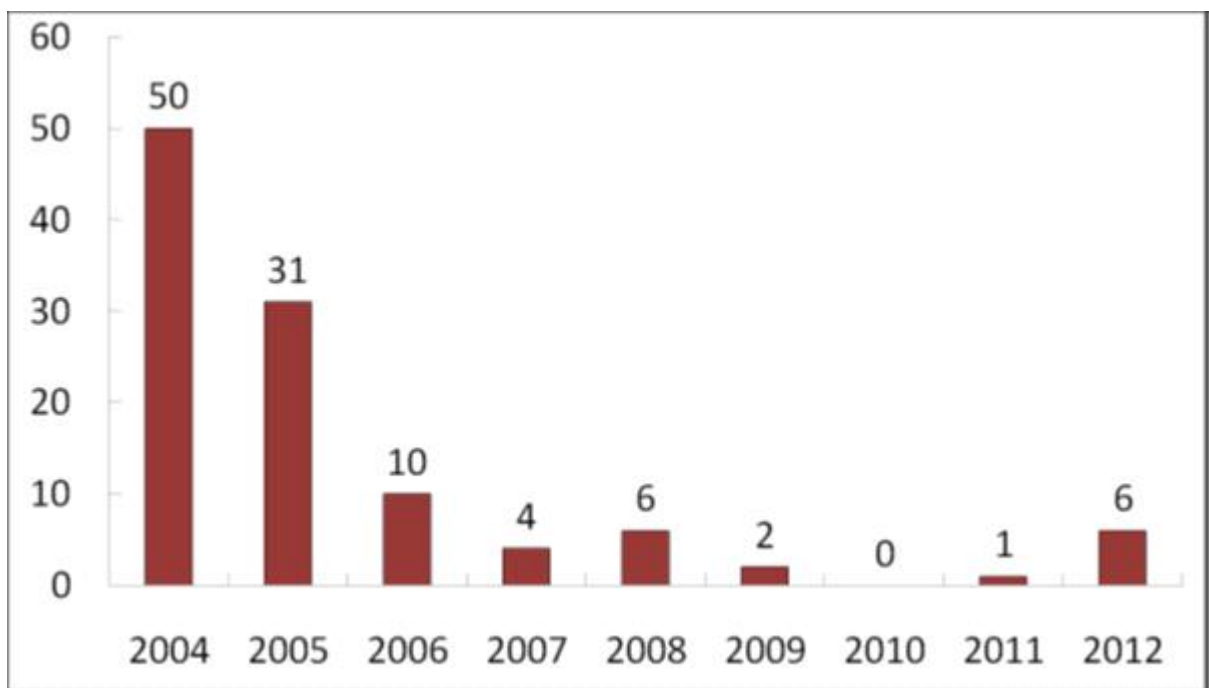


그림 4. 2005년도 이후 백신접종을 실시한 중국 가금에서의 연도별 HPAI 발생상황
(출처: Lessons learnt from H5 subtype HPAI vaccination in China, Jiming Chen, 2013)

(마) H5N1 HPAI 바이러스가 1996년에 중국에서 최초로 발견된 이래 공간적 확산에 따라 해를 거듭할수록 많은 변이가 나타났고, 중국이라는 거대한 영토적 특성상 다양한 종류의 H5N1 바이러스가 분포하고 있음이 밝혀짐. 현재 중국에서 분포하고 있는 H5N1 바이러스는 clade 2.3.4, 2.3.2 및 7 이며, 우점하는 유행주에 따라서 백신주의 선택이 이루어짐.

(바) 홍콩은 HPAI 발생에 있어서 중국과 같은 관점에서 보면 이해가 전혀 어렵지 않음. 1997년 세계최초로 H5N1 바이러스 감염으로 인하여 6명의 사망자가 발생함으로써 H5N1 HPAI에 대한 전 세계의 이목이 집중된 바 있음. 2001년까지는 강력한 살처분 박멸정책으로 일관하여 조기에 근절에 성공하였으나, 중국 접경지역으로부터 지속적으로 바이러스가 새로이 유입되어 HPAI가 계속 발생함으로써, 상시적 유입 위험에 대한 대책으로서 백신 접종 정책이 채택됨. 농장에서 시행된 최초의 백신은 2002년이었고, 그 이후로 더 이상의 인체 감염 사례는 나타나지 않음.

(사) 시간이 지나면서 다양한 바이러스 변이형의 출현에 따라 백신 효능은 감소하였고, 2013년의 연구에 따르면 오직 Harbin Re-5 백신만이 바이러스의 배출과 임상증상 발현 방지에 효과적인 것으로 밝혀짐.

(2) 인도네시아

(가) 2003년 여름경에 H5N1 HPAI가 최초로 발생하여 유행하였지만 OIE에 보고된 것은 2004년이 최초임. 공식적인 발생보고 이후인 2004년 초부터 인도네시아 정부에서는 백신 접종 정책을 채택하였고, 전국적으로 백신접종 캠페인을 시작함. 수많은 섬나라로 구성된 인도네시아에서는 소규모 계군이나 시골농가의 안마당에서 키우는 방사계군이 수없이 많았으며, 이들 농가는 HPAI 차단방역의 사각지대에 놓여 있었기 때문에 이러한 소규모 계군이나 방사계군에서의 HPAI 발생과 확산을 감소시키는데 백신접종 캠페인의 목적이 있었음.

(나) 백신접종 정책의 결과는 일면에서는 성공적인 것으로 평가됨. 백신 도입 후에도 인체 감염 건수는 높았지만, 2012년 이후로는 그 수가 일관되게 감소하고 있음. 특히 대단위 상업농장에서 널리 사용됨으로써 질병을 완전히 근절하지는 못했지만, 가금농장에서의 질병 발생은 매우 감소하였음.

(다) 마을 단위에서의 결과는 그다지 긍정적이지 않은데, H5N1 발생 예방에 있어서 한계를 나타내었기 때문임. 이는 부적절한 백신접종 외에도 인도네시아에서 나타난 H5N1 바이러스의 항원적 다양성으로 인하여 기존 백신주로는 방어능력이 불충분하고, 여기서 비롯된 부실한 면역체계는 오히려 면역학적 압박 (immune press)에 대한 회피기전으로서의 바이러스의 변이를 촉발하는 부정적 결과도 초래한 것으로 밝혀짐.

(3) 베트남

(가) 베트남에서는 2004년 초에 H5N1 HPAI를 OIE에 처음으로 보고함. 베트남 정부는 처음에 대규모 살처분 도태로 근절을 시도하였으나, 대단위 방역 예산 (1억 1700만 달러)을 투입하였음에도 불구하고, H5N1 바이러스 근절에 실패함. 게다가, 2005년 중반에는 어떤 나라에서보다 많은 수의 인체 감염이 전국적으로 나타나게 됨. 따라서 베트남 정부에서는 전략을 변경하여 H5N1을 통제하기 위한 방안으로 백신접종 정책을 도입함으로써 질병의 근절보다도 우선적으로 인체 감염을 최소화 하고자 하였음.

(나) 대량 백신접종 프로그램의 시행은 2006년 초반에 종료됨. 공중보건의 관점에서 HPAI 상재국에서의 백신접종은 인체감염 사례를 감소시키는 데에는 매우 성공적으로 평가 받았음. 실제로, 2005년 1월부터 11월까지 61건의 인체감염사례가 있었음에도 불구하고 2006년에는 단 한 건의 감염도 보고되지 않았음. 동물에서도 감염된 조류의 수와 발생건수가 크게 감소하여 효과가 있는 것으로 나타남. 그림 5는 백신접종 후 HPAI 인체 감염건수와 조류에서의 발생건수의 감소 현황을 나타낸 것으로서 4500백만 수의 조류가 백신 접종 이전에 감염된 것에 반해 백신 접종 후에는 몇 천 마리의 조류만 감염되었으며, 감염계군 또는 개체는 백신 접종이 되지 않았거나 정확히 접종되지 않은 계군에서만 발생한 것으로 분석됨. 더 중요한 사실은 지역 간의 HPAI 확산이 현저하게 감소하였음.

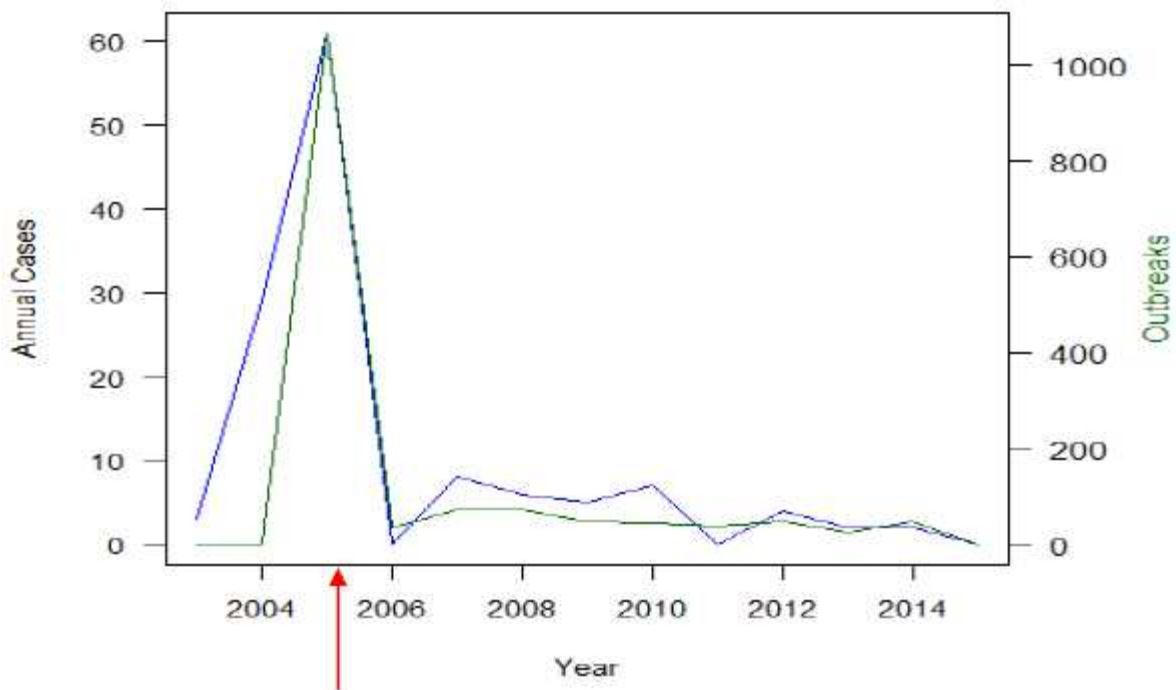


그림 5. 2003-2005년 베트남에서의 H5N1의 인체감염(파란선)과 조류 감염 건수(녹색선). 적색 화살표는 가금류의 백신 도입 시기임. (출처: MS thesis, Christopher John, University of Hong Kong, 2015)

(다) 부정적 측면에서 보면, 감염 농장을 색출해 내기가 매우 어려워졌다는 사실과 2007년 보고된 약 66%의 발생 감소는 발생율도 낮아졌지만 실제적으로는 발생농장 검색과 보고율의 감소가 많은 관련이 있는 것으로 파악됨. 백신접종을 실시한 이후로 10년이 지났지만 바이러스는 아직 상재하고 있으며 면역수준이 부실한 오리 농장과 관련하여 인체 감염도 산발적으로 발생하고 있음. 심지어 발생사례들 중에서 백신 접종된 것으로 보고된 계군은 단 36.9% 밖에 안 되는 것으로 보고되고 있음.

(4) 이집트

(가) 2006년 초 H5N1이 최초 발생한 이후로 정부는 상업적인 농장에서의 백신접종을 허가하였으며, 같은 해에 일반 가정에서 소규모로 사육하는 가금류에도 적용됨. 그러나 백신접종에 의한 면역획득 (vaccination coverage)이 매우 낮았기 때문에 (가정 사육 가금류는 20% 이하), 지역 내에서 HPAI 전파를 효과적으로 방지할 수 있는 적절한 수준이 아니었으며, 오히려 백신접종팀은 바이러스를 확산시키는 부정적 역할을 하게 됨.

(나) 이집트에서는 기대한 만큼의 백신 접종의 효과가 나타나지 않았고, 당연히 백신접종이 인체 감염 예방과 가금류 감염 예방에 효과가 크지 않다는 인식이 확산됨. 이는 여러 조건이 적절하게 충족되지 않으면 예방접종 정책은 심대한 부작용만 초래할 뿐 효과를 기대하기 어렵다는 사실을 확인시켜 주는 계기가 됨.

3. 백신접종의 양면성: 긍정적 측면과 부정적 측면

가. 백신 접종국에서 백신접종으로 인한 야외 HPAI 바이러스 변이주 발생 우려는 항상 제기되어 왔고, 일부 국가에서는 실제 상황이 그렇게 진행된 것으로 나타남. 백신접종 개체의 면역체계를 회피하기 위하여 유전자의 변이를 통하여 새롭게 진화한 HPAI 바이러스가 지속적으로 출현하였고, 이는 백신접종에 의한 HPAI 예방에 상당한 혼선을 초래함. 변이주 출현에 대한 과학적 조사 결과, 자연 상태의 변이과정 외에 인위적 백신접종으로 인한 바이러스 변이는 사용하는 백신의 부적절 또는 부족한 용량이 가장 결정적인 이유로 제시되고 있음. 즉, HPAI에 대한 부실한 면역수준은 감염 방어 역할도 불충분하지만 면역 회피(immune escape)를 통한 바이러스의 변이를 촉발할 수 있다는 이론임. 실제로 중국, 이집트, 인도네시아, 베트남 및 홍콩에서 H5N1 야외주 바이러스의 항원성 소변이 (antigenic drift)에 의한 면역 실패 (vaccine failure)가 발생한 바 있음.

나. 그럼에도 불구하고, 즉각적이고 광범위한 박멸정책의 실현이 불가능한 특정한 상황에서는 백신접종 정책을 대안으로 채택하여 시행할 수밖에 없는 상황임. 이는 박멸을 위한 우선적인 전략이 개발되고 시행되기 전까지의 단계에서 인체 감염 위험 감소와 HPAI로 인한 식품 안전성 (food safety) 확보 및 임상적 피해 최소화라는 전략적 목표에 근거함.

다. 중국, 베트남 및 홍콩에서는 백신접종에 의하여 인체감염 사례의 현저한 감소와 가금류에서의 발생건수가 격감하는 매우 긍정적 효과를 도출함. 또한 백신접종측은 바이러스 시에도 바이러스의 체외배출이 매우 감소하게 되어 전염원으로서의 위험성이 매우 낮아짐으로써 농장간, 지역간 전파와 확산을 방지하는데 유효한 수단으로 작용할 수 있음. 이와 함께 감염계의 임상증상이나 폐사를 낮추는데 현저한 효과를 발휘하여 가금 산업의 안정화를 기할 수 있는 장점도 있음.

라. 백신접종 외의 방역의 기본정책이 충실히 시행되고 있지 않는 상황에서 백신접종을 실시한다면, 장기적으로는 오히려 상황을 악화시키는 요인으로 작용하며, 사양가들이 백신접종에만 의지하고 차단방역은 무시하는, 결과적으로 신고의식마저 결여되게 만드는 국가방역 정책의 치명적 결함요인으로 작용하게 됨.

마. 중국에서의 백신접종으로 야기된 단점을 보면, 고비용이 소요되며, 백신접종 농가의 관리하기가 너무 어렵고, 감염된 계군을 식별해 내기가 매우 어려워진다는 점임. 또한 백신접종을 한 가금들 사이에서 바이러스가 끊임없이 순환할 수 있게 되며, 백신을 피하기 위한 바이러스의 돌연변이로 인하여 바이러스의 다양화를 일으킬 수 있음. 결과적으로 제거되어야 할 소규모 농가들이 살아남아 대규모 가금 산업에 HPAI 전파를 조장하는 역할을 함으로써 국가 방역에서는 부정적인 면을 조성하였다고 함.

바. 더구나 우리나라 소비자의 성향을 견주어 보면, 소량이나마 인체감염 우려가 있는 HPAI 바이러스가 오염되어 있는 생닭고기가 시중에 유통되었을 경우 엄청난 충격과 파장을 불러올 것으로 예상되며, 공포심과 소비자의 기피로 인하여 관련 산업이 붕괴될 수도 있음. 아무리 백신을 접종하더라도 전염이나 임상증상 및 폐사는 줄일 수 있을지언정, 감염계의 체외로 바이러스가 배출되는 것까지 완벽하게 제어할 수 없는 백신의 특성상 백신접종 정책 시행 시에는 중국이나 동남아시아 국가와는 달리 국내에서는 이런 우려가 현실화 될 가능성이 매우 높다고 볼 수 있음.

4. 백신의 사용과 이에 따른 돌연변이주의 출현 빈도 증가

가. H5N1 야외주의 항원성 변이는 이집트, 중국, 베트남, 홍콩 및 인도네시아에서 주로 나타났으며, 기존의 H5 백신주에 저항성을 보이는 돌연변이주의 출현으로 이어짐. 2006년부터 가금에서 백신접종을 했던 이집트에서는 백신주인 Mexico/94와 Re-1 백신주에 저항성을 보이는 일부 야외 바이러스가 확인됨. 중국 역시 기존의 H5형 백신주의 효능 감소를 경험한 사례가 있어 야외에서 발생하는 변이주 출현과 저항성 여부에 따라 새로운 백신주로의 선택 등 시의적절한 변화가 필요함.

나. 아래 표 2는 백신의 사용 이후 H5N1 야외 바이러스의 돌연변이 빈도가 훨씬 높아질 수 있음을 나타내어 주는 자료임. 중국과 인도네시아에서 백신접종 이후에 H5N1 바이러스의 표면단백질 hemagglutinin (HA) 유전자의 점변이 (point mutation) 율이 비접종국 또는 비접종 시기에 비하여 확연히 증가한 것을 나타내고 있음.

표 2. 국가별 HPAI 백신의 사용과 H5N1 야외주의 HA 유전자 변이율

| Country | Period | Mass Vaccination | HA1 substitution rate ($\times 10^{-3}$ substitution/site/yr) | |
|-----------|-----------|------------------|--|----------|
| | | | HA1 gene | HA2 gene |
| China | 2005–2010 | Yes | 7.28 | 3.97 |
| Indonesia | 2003–2009 | Yes | 7.75 | 4.37 |
| China | 1996–2004 | No | 3.37 | 2.34 |
| Thailand | 2004–2008 | No | 2.69 | 2.44 |

(출처: Chinese Science Bulletin, 2012, Vol 57(19))

다. 2006년부터 시작하여 세계적으로 대유행한 H5N1 HPAI 는 시간적, 공간적 특성과 한계에 적응하는 과정을 통하여 바이러스의 유전자 다양성 (특히 H5N1 HPAI)이 기존의 과학적 상식을 초월할 정도로 확대되었고, 기원이 유사한 바이러스의 유전자 집단 (genetic clade)에 대한 분류체계도 점점 세분화될 수밖에 없었음 (그림 6).

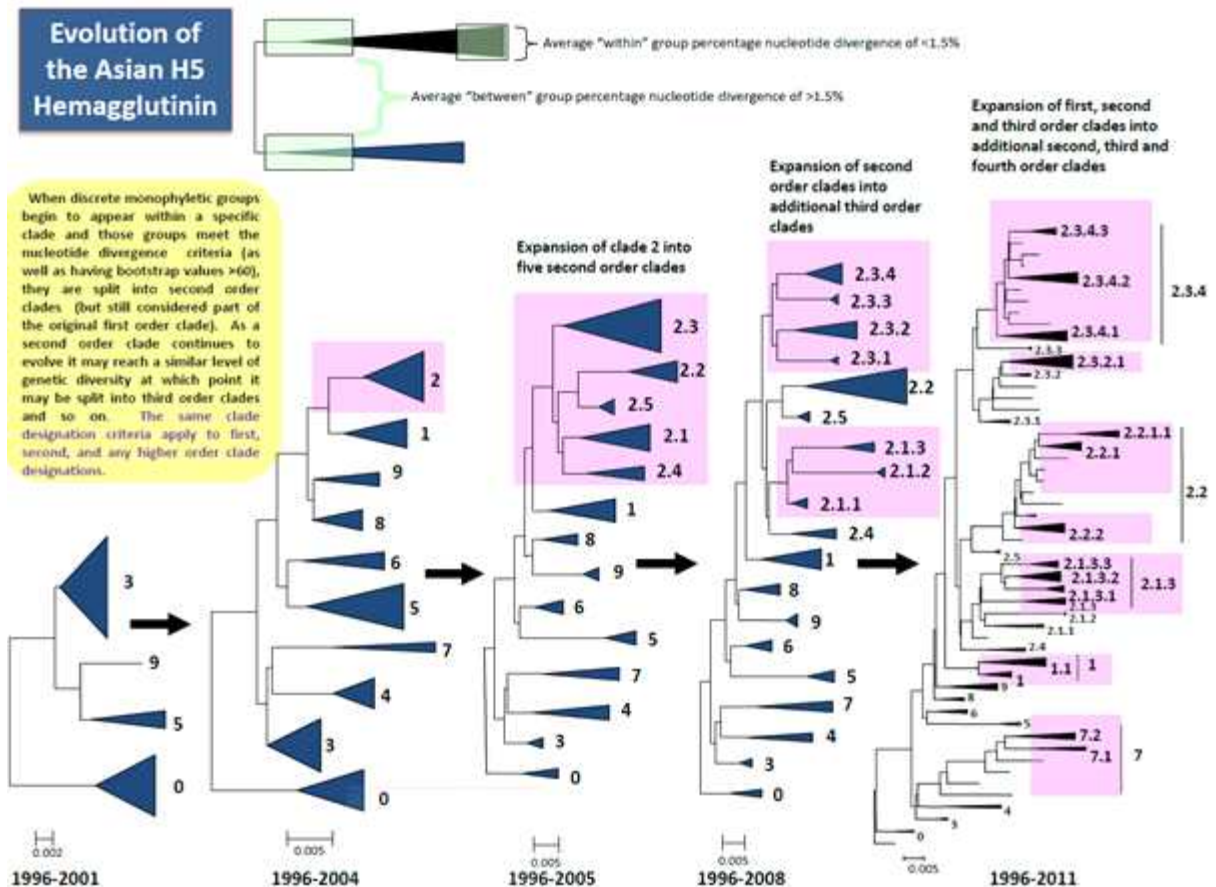


그림 6. 2006년 이후 H5 형 HPAI 바이러스의 유전자 분류체계 (clade)의 세분화 과정 (출처: FAO 2015)

라. 특히 2013년 이후에 출현한, 가금류에서는 병원성이 매우 낮지만 인체 감염과 사망률이 매우 높은 새로운 H7N9 바이러스의 출현 (중국)은 과학자들의 예측을 초월하는 바이러스의 변이와 유전적 다양성을 증명해 주는 사례임. 또한 2014년에 새롭게 등장한 H5N8 신종 HPAI 바이러스의 존재는 앞으로 우리 인류가 인플루엔자 바이러스와 관련된 비상상황에 대처할 기본 플랫폼을 마련하고, 바이러스의 변이를 최소화 할 수 있는 국가적 노력은 물론 이 플랫폼의 전 세계적 통용이 이루어 질 수 있도록 공동의 노력이 절실한 과제임.

5. 백신 사용 현황과 백신주의 선택

가. 불가피한 상황으로 인하여 백신접종 정책을 채택할 경우에도 여론에 밀려 이를 선택하거나 비전문가 집단의 단순 논리 또는 정치적 논리에 의하여 채택된다면 국가적으로 돌이킬 수 없는 큰 손실을 가져올 우려가 높아짐. 백신접종 시에는 이 정책의 성공을 뒷받침할 수 있는 여러 부대적 환경이 조성되어야만 하고, 정책 당국은 어떤 비난이 있더라도 이러한 환경이 연속적으로 조성되고 지원될 수 있도록 주도면밀한 전문가적 자세를 견지하여야만 함.

나. 백신주의 선택

(1) 백신주의 선택은 매우 신중하고 과학적 근거에 따라 결정되어야 하지만 때에 따라서는 매우 신속하게 결정되어야 할 사항임. 백신주의 선택이 잘못되거나 사용상의 오류가 있다면 더 큰 재앙을 초래할 수 있음. 백신접종 정책의 실패 요인은 무수히 많겠지만 일반적으로 다음의 몇 가지 범주로 나눌 수 있음.

(가) H5N1 바이러스를 근간으로 한 조류 인플루엔자 바이러스의 조류에 대한 강한 감염력 및 태생적인 변이의 용이성.

(나) 미흡한 대응체제로 인한 후진국 또는 개발도상국에서의 HPAI 상재화와 결과적으로 초래되는 변이에 적절한 환경.

(다) 항원적 일치성이 부족한 백신의 사용 또는 항원 역가가 부족한 불량 백신의 사용은 물론 현장에서의 백신접종 잘못 등으로 인하여 HPAI에 대한 면역이 미흡한 상태에서 HPAI 바이러스에 감염 시 면역 회피 (immune escape) 기전에서 비롯되는 변이주의 출현.

(라) 백신 공급 물량의 부족, 야외 농가에서의 백신접종 기피 또는 대상 가금류 중 일부만 접종하여서 백신이 부여할 수 있는 면역획득률 (vaccination coverage)이 낮다면 아무리 좋은 백신을 선택하여 사용하여도 HPAI의 발생과 확산을 제어하기 어려움.

(마) 가금류 중 닭이나 오리 등 특정한 종 (species)을 목표로 한 target vaccine의 개발이 필요하며, 현재로서는 오리에 효과적인 백신의 미개발로 인한 오리에서의 면역획득률 부족이 문제시되고 있음.

(2) 이런 관점에서 2004년 이후 세계적으로 다양한 백신 또는 백신주를 선택하여 사용해 왔음. 특히 중국에서는 바이러스의 변이와 유행주의 유전자적 특성에 따라 시기별로 다른 종류의 백신이 이용됨 (표 3).

- (가) 2004년도: H5N1과 동일한 아형 (subtype)에 속하는 저병원성 H5 A/Turkey/England/1973 (H5N2) 바이러스의 사용
- (나) 2004 ~ 2008년도: 역유전학 기술 (reverse genetic, RG)을 이용한 유전자재조합 바이러스인 RE-1, A/goose/Guangdong/1/1996 (H5N1), clade 0 lineage virus
- (다) 2006 ~ 2007년도: RE-4, an rgA/chicken/Shanxi/2006 (H5N1), clade 7 lineage virus
- (라) 2008년 이후: RE-5, a rgA/duck/Anhui/1/2006 (H5N1), clade 2.3.4 lineage virus
- (마) 2012년 이후: RE-6, a rgA/duck/Guangdong/S1322/2010 (H5N1), clade 2.3.2 lineage virus

표 3. 중국에서 사용 중인 HPAI 백신

Table 2. Vaccines developed in China for H5N1 AI control

| Vaccine | Seed virus generated | Seed name | HA and/or NA gene donor virus (HA clade) | Doses used in each year (billions)* | | | | | | | | | Total | Country where used | |
|---------------------------|-------------------------|--|--|-------------------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|---|--|
| | | | | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | | | |
| Inactivated vaccine | H5N2 subtype | A/Turkey/England/N-28/73 (H5N2) (N-28) | Not applicable | 2.5 | 4.08 | 3.6 | / | / | / | / | / | / | 10.18 | China | |
| | | H5N1 subtype | H5N1/PR8 (Re-1) | A/goose/Guangdong/1/1996 (0) | 0.57 | 3.3 | 4.57 | 9.6 | 4.6 | / | / | / | / | 22.64 | China, Vietnam, Mongolia, Indonesia, Egypt |
| | | H5N1/PR8 (Re-4) | A/chicken/Shanxi/2/2006 (7.2) | / | / | 0.84 | 0.42 | 0.59 | 0.54 | 0.95 | 0.24 | 0.025 | 3.605 | China | |
| | | H5N1/PR8 (Re-5) | A/duck/Anhui/1/2006 (2.3.4) | / | / | / | / | 4.4 | 7.20 | 6.80 | 6.77 | 3.71 | 28.88 | China, Vietnam, Indonesia, Burma, Egypt | |
| | | Re-1/Re-4 | - | / | / | / | 2.2 | 1.5 | / | / | / | / | 3.7 | China | |
| | | Re-4/Re-5 | - | / | / | / | / | 1.5 | 9.08 | 7.51 | 7.67 | 4.03 | 29.79 | China | |
| | | H5N1/PR8 (Re-6) | A/duck/Guangdong/S1322/2006 (2.3.2) | / | / | / | / | / | / | / | / | / | 3.66 | 3.66 | China, Indonesia, Egypt |
| | | Re-4/Re-6 | - | / | / | / | / | / | / | / | / | / | 4.23 | 4.23 | China |
| Live virus vector vaccine | Recombinant FPV vaccine | H5N1/PR8 (Egypt-1) | A/chicken/Egypt/18-H/09 (2.2.1.1) | / | / | / | / | / | / | / | / | 0.25 | 0.2 | 0.45 | Egypt |
| | | rFPV-HA-NA | A/goose/Guangdong/1/1996 (0) | / | 0.615 | / | / | / | / | / | / | / | / | 0.615 | China |
| | Recombinant NDV vaccine | rLH5-1 | A/goose/Guangdong/1/1996 (0) | / | / | 2.6 | 1.3 | 0.5 | / | / | / | / | 4.4 | China | |
| | | rLH5-5 | A/duck/Anhui/1/2006 (2.3.4) | / | / | / | / | 0.7 | 1.47 | 1.74 | 1.71 | 1.03 | 6.65 | China | |
| | rLH5-6 | A/duck/Guangdong/S1322/2006 (2.3.2) | / | / | / | / | / | / | / | / | / | 0.72 | 0.72 | China | |

*/, denotes that the vaccine was not used in that particular year.

(출처: Trends in Biotechnology, 2014, 32(3):147-156)

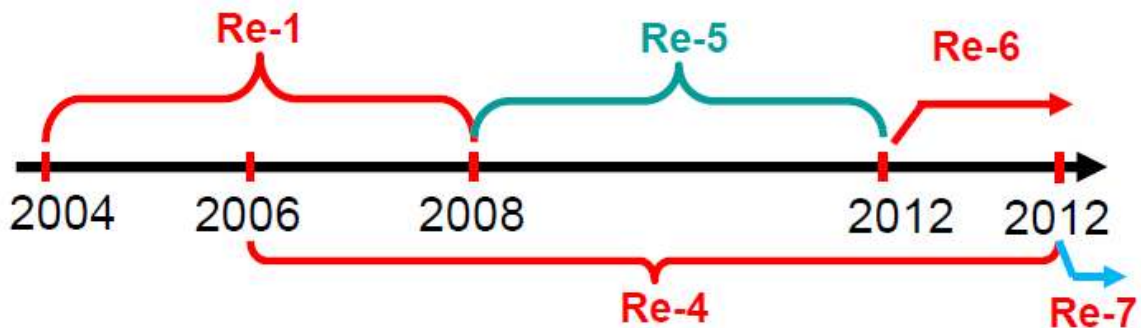


그림 7. 중국에서의 연도별 HPAI 백신 사용

(출처: OIE Regional Workshop on Enhancing Influenza A Viruses National Surveillance, 2014)

(3) 한편, 베트남에서는 2011년 Re-1과 Re-5 백신에 저항성을 보이는 clade 2.3.2.1에 속하는 야외변이주가 확인됨으로써 2012년부터 새로운 Re-6 백신이 권장됨.

(4) 홍콩은 2008년에 백신접종으로 충분히 면역이 형성된 계군에 H5N1 HPAI가 발생된 것을 경험함. 분리된 바이러스는 clade 2.3.4 이었으며, Mexican/94 백신주의 방어력에도 저항성이 있는 변이주였음.

(5) 인도네시아는 2007년에 이미 유사한 경험을 하였음. 이러한 현상은 기존의 H5 백신이 부여하는 항원성과 면역원성을 초월하는 새로운 변이주의 출현에 의한 것이었고, 이러한 경우 기존의 백신에 의한 예방체계는 방어력의 한계 (vaccine break)를 드러낼 수밖에 없었음.

(6) 시기적, 지리적 상황에 따라 유행하는 HPAI 바이러스가 다르게 지속적인 변이주가 출현하기 때문에 그 시점에 유행하는 바이러스와 항원적으로 일치하는 백신바이러스를 선택하여야 하며, 이것이 불가능하다면 역유전학 기술에 의하여 신속하게 유행주에 맞는 백신주가 개발되어야만 함. 이를 위해서는 사전에 충분한 기술 확보와 이를 위한 연구투자가 선행되어야만 함. 국내에서도 각 연구소와 대학에서 백신주 작성에 대한 연구를 하고 있지만 방역당국에서는 보다 체계적이고 집약적으로 연구를 추진하고 역할을 분담하여 비상시에 대한 대비태세를 갖추어 놓는 것이 바람직함.

다. 백신의 사용현황과 고려사항

(1) 야외에서 유행하는 HPAI 바이러스와 항원적으로 일치하는 백신주의 선택이 가장 중요하지만, 항원적으로 부합되는 백신주를 이용하여 백신을 제조할 때 백신바이러스의 함량, 즉 항원의 함유량도 매우 중요한 사항임. 현재까지 보고된 바에 의하면, 항원성이 일치할 경우 효과적인 백신으로서의 항원의 함량은 혈구응집 (hemagglutination, HA) 항원 0.3~7.8 µg 또는 512 HA units/dose를 유지하여야 함. 간접적 평가방법으로는 백신접종 시 동종의 항원에 대하여 접종개체의 혈구응집억제 (hemagglutination inhibition, HI) 항체역가가 1:32 이상이 되어야만 하고, 방어력 시험에서 백신 접종량 1수당 최소 50 PD50 (50% protective dose)의 역가를 보유하고 있어야만 함.

(2) 역유전학 기법을 이용한 불활화 백신 외에 가금류에서 상업용으로 등록되어 있는 생 바이러스 백신을 이용한 주요 유전자재조합 생독백신은 다음과 같음.

- (가) Trovac-AI H5 (fowlpox vector) Merial
- (나) Volvac (fowlpox vector) Boehringer Ingelheim
- (다) Fowlpox vector-AI H5 not used Harbin Institute China
- (라) NDV-AI H5 Avimex
- (마) NDV-AI H5 Harbin Institute China
- (바) Vectormune HVT-AI CEVA

(3) H5형 HPAI의 인체 감염에 대비하여 인체용으로 개발되었거나 개발되고 있는 백신바이러스의 종류는 매우 많고 다양함. 이는 국가별, 시기별 바이러스의 유행과 변이에 따라 이에 대응하기 위하여 각국의 연구기관에서 개발하고 있는 것이며, H1N1 신종플루의 유행처럼 세계적으로 만연되었을 경우에 대비하여 기술적으로 확보하고 있는 것으로 볼 수 있음 (참고: Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness, WHO, September 2015).

6. 국내 상황을 반영하는 HPAI 백신 효능평가 시험연구

가. 해외 HPAI 백신 효능 평가

(1) 총 4가지 해외 백신을 이용하여 시험하였으며, 시험군 및 대조군 설정은 표 4와 같음.

표 4. 해외 HPAI 백신의 국내 H5N8에 대한 방어능 시험 그룹

| | 백신명 | H5 clade 구분 | 접종경로 | 마리 수 |
|----|----------------|---------------------|------|------|
| G1 | Re-6 (S사) | 2.3.2.1-like | IM | 9 |
| G2 | Re-6 (Y사) | 2.3.2.1-like | IM | 9 |
| G3 | Re-6+7 (Y사) | 2.3.2.1-like 7.2 | IM | 9 |
| G4 | Volvac B.E.S.T | 2.3.2. | SC | 9 |
| G5 | PBS control | - | IM | 9 |

(2) Re 백신은 중국에서 주로 사용되는 백신으로 전 세계 HPAI 백신 사용량의 90% 이상을 차지하는 백신임. 그 중 가장 최근 개발된 Re-6와 Re-6/7을 공수하여 사용함. Volvac 백신은 남미에서 주로 사용되는 백신으로 다국적 수의약품 제조회사인 베링거인겔하임(Boehringer Ingelheim)의 제품임. 멕시코에서 생산되어 이용되고 있으며, 남미 지역 이외에 동남아시아에 수출되고 있음. 모든 백신은 cold-chain을 철저히 이용하여 냉장 (2-8℃)상태를 유지한 상태로 공수함.

(3) 모든 백신의 권장접종 방법은 2주령 이상의 닭을 이용 할 것을 요구하였으며 RE 백신은 가슴 근육에 0.3ml, Volvac 백신은 목뒤부분 피하로 접종 할 것을 권장함. 따라서 각 백신의 권장 접종 방법에 따라 그룹 당 9마리를 접종함.

(3) 백신 후 1, 2, 3주 후에 경정맥 채혈로 혈청을 분리하여 hemagglutinin inhibition (HI) test를 실시하여 백신 접종으로 인한 체액성 면역 반응을 측정함.

(4) 공격 접종 바이러스에 대한 HI 역가는 아래 표와 같음. 4개의 백신이 H5N8 항원에 대해 HI 역가가 대체적으로 낮은 (평균 16이하) 수치를 보였으며 각 백신은 유의적인 차이를 보이지 않았음 (그림 8). Re시리즈 백신에 대해서는 백신균주와 동일 항원에 대한 HI test를 진행할 수 없었으나 Re-6와 유사 균주로 추정되는 clade 2.3.2.1 해당 항원 (2010년 발생 국내 H5N1 바이러스)으로 HI를 실시한 결과 백신 접종 3주후 8~16의 낮은 항체역가를 보임. Volvac 백신에 대해서 동일 항원에 대해 HI test를 진행한 결과 백신 접종 3주 후 높은 HI 역가 (평균 256이상)를 확인함 (그림 9).

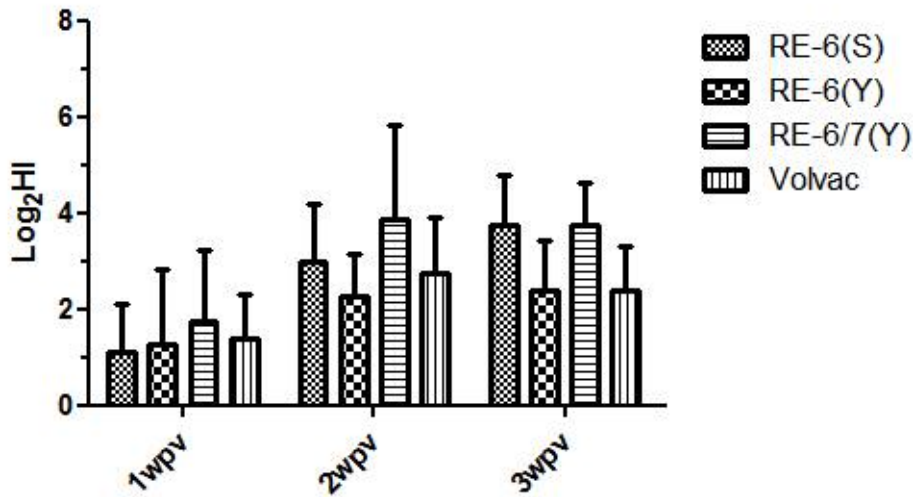


그림 8. 백신 접종 3주 후 혈청의 H5N8에 대한 HI 역가

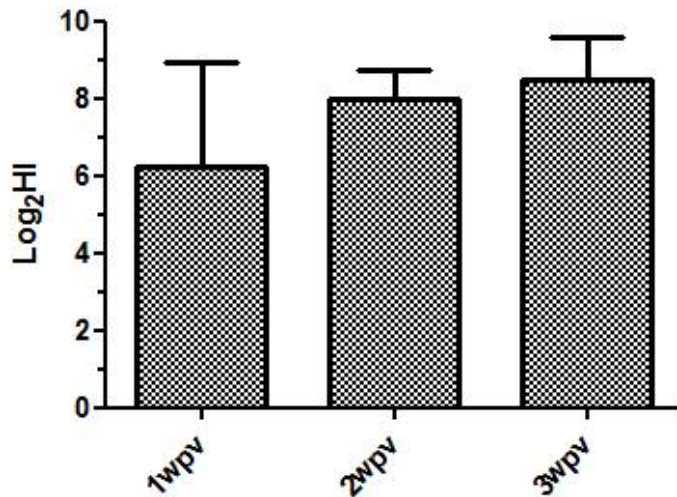


그림 9. Volvac 백신 접종 3주 후 동일항원에 대한 HI 역가

(5) 공격접종 바이러스는 2015년 국내에서 분리된 H5N8 (A/mallard/Korea/KU3-2/2015)을 이용하였으며, 백신 접종 3주 후에 ABL3 시설에서 실시함. 양쪽 비강으로 10^{6.0} EID₅₀/100uL의 바이러스 주입하였고, 2주 동안 매일 임상증상을 관찰함. 각 개체별 임상증상 경과는 아래 표 5와 같음. G1, G3는 특이 임상증상이 없었으나, G2, G4에서 각각 3마리, 1마리에서 임상증상이 나타남. 4가지 임상증상에 대해 평가하였으며, 임상증상이 있던 날은 노란색으로, 폐사를 보인 날은 붉은색으로 표시함.

표 5. SPF 닭에서 해외백신 후 H5N8 감염 임상증상

| Greeny Fececs ; G, Diarrhea ; D, Comb Redness ; R, None ; N, Depression ; E | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|-------|---|-------|---|-----|---|---|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| 1-1 | | | N | | N | | N | | N | | N |
| 1-2 | | | N | | N | | N | | N | | N |
| 1-3 | | | N | | N | | N | | N | | N |
| 1-4 | | | N | | N | | N | | N | | N |
| 1-5 | | | N | | N | | N | | N | | N |
| 1-6 | | | N | | N | | N | | N | | N |
| 1-7 | | | N | | N | | N | | N | | N |
| 1-8 | | | N | | N | | N | | N | | N |
| 1-9 | | | N | | N | | N | | N | | N |
| | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| 2-1 | | | N | | N | | N | | N | | |
| 2-2 | | | N | | N | | N | | N | | |
| 2-3 | | | N | | N | | N | | N | | |
| 2-4 | | | G | | R/G | | R/G | | | | |
| 2-5 | | | G/D/E | | R/G/D | | | | | | |
| 2-6 | | | N | | N | | N | | N | | |
| 2-7 | | | N | | D | | N | | N | | |
| 2-8 | | | N | | N | | N | | N | | |
| 2-9 | | | N | | N | | N | | N | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| 3-1 | | | N | | N | | N | | N | | |
| 3-2 | | | N | | N | | N | | N | | |
| 3-3 | | | N | | N | | N | | N | | |
| 3-4 | | | N | | N | | N | | N | | |
| 3-5 | | | N | | N | | N | | N | | |
| 3-6 | | | N | | N | | N | | N | | |
| 3-7 | | | N | | N | | N | | N | | |
| 3-8 | | | N | | N | | N | | N | | |
| 3-9 | | | N | | N | | N | | N | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| 4-1 | | | N | | N | | | | | | |
| 4-2 | | | N | | N | | | | | | |
| 4-3 | | | N | | D | | D | | | | |
| 4-4 | | | N | | N | | | | | | |
| 4-5 | | | N | | N | | | | | | |
| 4-6 | | | N | | N | | | | | | |
| 4-7 | | | N | | N | | | | | | |
| 4-8 | | | N | | N | | | | | | |
| 4-9 | | | N | | N | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| 5-1 | | | R/D | | | | | | | | |
| 5-2 | | | E/D | | | | | | | | |
| 5-3 | | | E/D | | | | | | | | |
| 5-4 | | | R/D | | | | | | | | |
| 5-5 | | | R/D | | | | | | | | |
| 5-6 | | | N | | R/D | | | | | | |
| 5-7 | | | E/D | | | | | | | | |
| 5-8F | | | N | | E/D | | | | | | |
| 5-9F | | | E/D | | | | | | | | |

(6) 각 그룹의 생존 그래프는 아래 그림 10와 같음. Re-6(Y) 백신을 제외 한 나머지 백신은 실시한 닭은 모두 생존 (100%생존)하였으며, PBS control은 감염 3일 후부터 폐사하기 시작하여 6일째에 완전히 폐사함 (0%생존). Re-6(Y) 백신을 실시 한 닭은 감염 7, 8 일에 각 1마리가 폐사함 (77.8%생존).

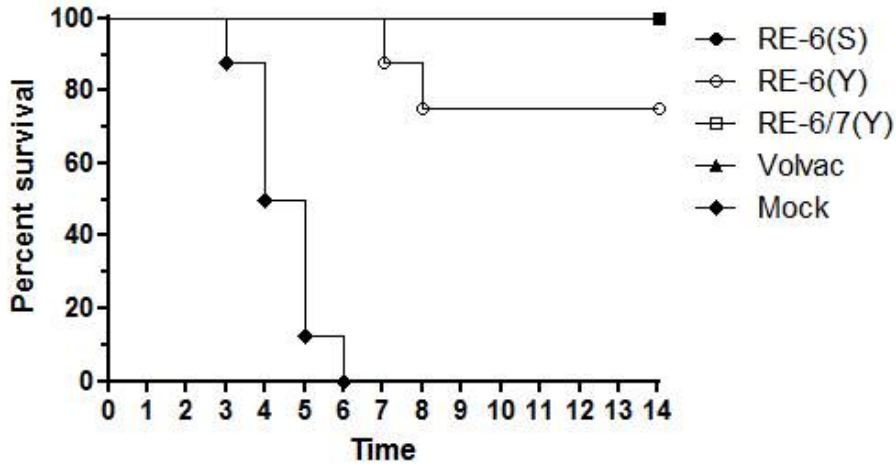


그림 10. 해외 백신 실시 후 H5N8 감염 시 생존율

(7) 구강과 총배설장의 바이러스 배출양 (감염 후 3, 5, 7, 9일)을 분석 한 결과 Re-6 (YEBIO, SINDER)를 제외한 나머지 백신은 총배설장 바이러스 배출을 막을 수 있었으나 모든 백신에서 비슷한 정도의 구강 바이러스 배출을 나타냄 (그림 11-14).

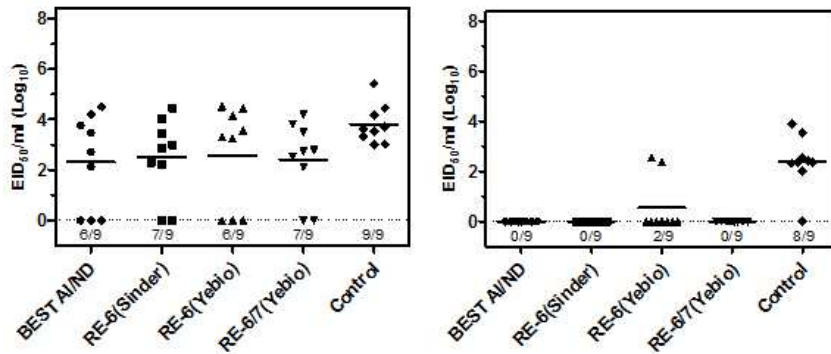


그림 11. 공격접종 3일 후 구강(왼쪽) 및 총배설장(오른쪽) 바이러스 배출량

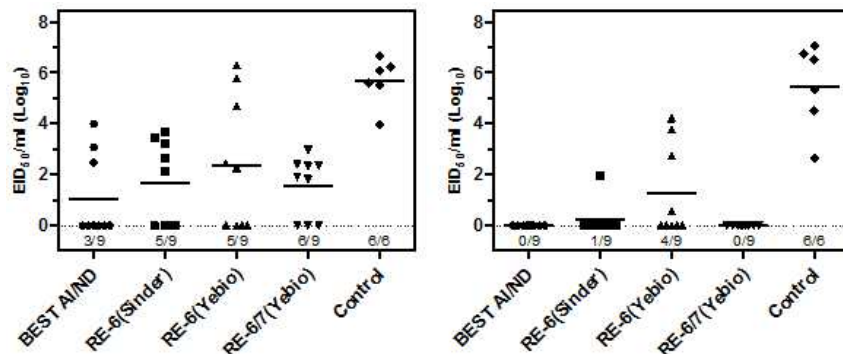


그림 12. 공격접종 5일 후 구강(왼쪽) 및 총배설장(오른쪽) 바이러스 배출량

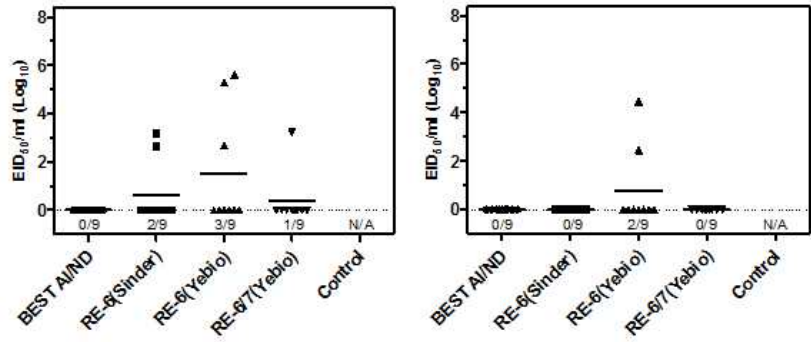


그림 13. 공격접종 7일 후 구강(왼쪽) 및 총배설강(오른쪽) 바이러스 배출량

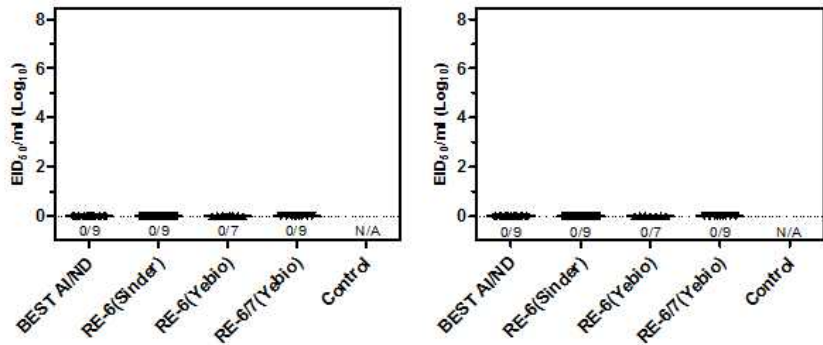


그림 14. 공격접종 9일 후 구강(왼쪽) 및 총배설강(오른쪽) 바이러스 배출량

(8) 공격접종 14일 후 살아남은 개체의 항체역가는 비슷한 수준을 보였다 (그림 15).

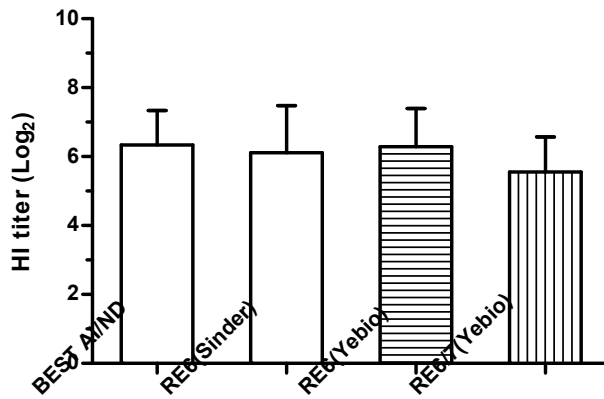


그림 15. 공격접종 14일 후 혈액 내 감염 바이러스에 대한 항체 역가

나. 주변국 사용백신 및 국내 개발백신을 활용한 방어능/배출억제/전파억제효율 평가

(1) SPF 닭에서의 HPAI 백신 효능 평가

(가) 외국 백신 1종: Re-6 (Y)

① Re 백신은 중국에서 주로 사용되는 백신으로 전 세계 HPAI 백신 사용량의 90% 이상을 차지하는 백신임. 그 중 가장 최근 개발 되어 사용 중인 백신이 Re-6과 Re-6/7임. Re-7의 경우 국내에서는 아직 분리된 적이 없는 clade 7.2에 속하는 H5N1 HPAI에 대한 백신이므로 clade 2.3.2에 속하는 Re-6를 사용함. Re-6는 국내 3차 (2008), 4차 (2010-2011) HPAI 발생 시 분리된 바이러스와 같은 clade임.

(나) 국내 백신 2종 (포유류 무병원성 백신주 선발)

- ① 국내 백신은 제 2세부과제에서 개발한 유니버설 백신주 중 효능평가를 통해 선택된 백신후보주 2주를 사용함.
- ② rH5N2-GM(01310)
- ③ rH5N2-GM(0028)
- ④ 국내 백신 바이러스는 BEI를 이용하여 불활화 한 다음, ISA 70과 3:7로 비율로 혼합하여 오일에멸전 백신을 제조함.

(다) 모든 백신의 3주령 SPF 닭을 이용하여 가슴 근육에 0.3ml씩 그룹 당 9마리를 접종함.

(라) 백신 접종 2, 3주 후에 경정맥 채혈로 혈청을 분리하여 HI test를 실시하여 백신 접종으로 인한 체액성 면역 반응을 측정함.

① 공격 접종 바이러스에 대한 HI 역가는 아래 표 6과 같음. Re-6 백신에 대해서는 백신균주와 동일 항원에 대한 HI test를 진행 할 수 없었으나 Re-6와 유사 균주로 추정되는 clade 2.3.2.1 해당 항원 (2010년 발생 국내 H5N1 바이러스)으로 HI를 실시한 결과 백신 접종 2주후 4~64의 낮은 항체역가를 보임. 반면 국내 백신 2종에 대해서는 128~256의 높은 항체역가를 보임.

표 6. HPAI 백신의 항원성 확인

| 실험동물 | 백신조성 접종경로 | 백신 시점 | 백신 | HI 항체역가 (log2) | | |
|-------|--------------|----------|-----------------|----------------|-------------|-------------|
| | | | | 1주 후 | 2주 후 | 3주 후 |
| SPF 닭 | 3:7 근육 | 3주령 | Re-6 (Y) | nt | 4.78 ± 1.64 | 7 ± 1.22 |
| | | | rH5N2-GM(01310) | nt | 7.22 ± 1.09 | 9.44 ± 0.73 |
| | | | rH5N2-GM(0028) | nt | 7.22 ± 0.44 | 8.66 ± 0.71 |

(마) 공격접종 바이러스는 2015년 국내에서 분리된 H5N8 (A/mallard/Korea/KU3-2/2015)을 이용하였으며, 백신 접종 3주 후에 ABL3 시설에서 실시함. 양쪽 비강으로 $10^{6.0}$ EID₅₀/100uL의 바이러스 주입하였고, 2주 동안 매일 임상증상을 관찰함.

표 7. 국내 H5N8 HPAIV 방어능/배출억제/전파억제효율 평가

| 시험군 | 백신 접종 a | 바이 러스 ^c | 폐사율 공격 ^d | 공격접종 ^b | | | | | |
|---------------------|---------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|----------|---------|----------|---------|
| | | | | 폐사율 | | | | | |
| | | | | 2일 후 | | 3일 후 | | 5일 후 | |
| | | | | OP ^f 공격 | C ^g 공격 | OP 공격 | C 공격 | OP 공격 | C 공격 |
| Re-6 (Y) | + | H5N8 | 0/9 | 3/9 | 0/9 | 4/9 | 1/9 | 2/9 | 1/9 |
| rH5N2 -GM(01310) | + | H5N8 | 0/9 | 3/9 | 0/9 | 3/9 | 1/9 | 4/9 | 2/9 |
| rH5N2 -GM(0028) | + | H5N8 | 0/9 | 7/9 | 1/9 | 8/9 | 1/9 | 7/9 | 1/9 |
| 음성대조군 | - | - | 8/9 | 6/7 | 5/7 | 7/7 | 7/7 | 7/7 | 7/7 |

| 시험군 | 백신 접종 a | 바이 러스 ^c | 폐사율 공격 ^d | 공격접종 ^b | | | | | |
|---------------------|---------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|----------|---------|----------|---------|
| | | | | 폐사율 | | | | | |
| | | | | 7일 후 | | 9일 후 | | 14일 후 | |
| | | | | OP ^f 공격 | C ^g 공격 | OP 공격 | C 공격 | OP 공격 | C 공격 |
| Re-6 (Y) | + | H5N8 | 0/9 | 1/9 | 0/9 | 1/9 | 1/9 | nt | nt |
| rH5N2 -GM(01310) | + | H5N8 | 0/9 | 0/9 | 1/9 | 0/9 | 0/9 | 4/9 | nt |
| rH5N2 -GM(0028) | + | H5N8 | 0/9 | 2/9 | 1/9 | 0/9 | 0/9 | nt | nt |
| 음성대조군 | - | - | 8/9 | 5/7 | 5/7 | 1/7 | 0/7 | nt | nt |

^a SPF 닭 3주령 사용

^b 백신 접종 3주후 공격

^c 2015년 국내 분리 H5N8 HPAIV A/mallard/Korea/KU3-2/2015 (KNU)

^d 공격: 9수

^f OP: oropharyngeal swab

^g C: cloacal swab

① 각 개체별 H5N8형 HPAI 공격접종에 따른 생존율은 위 표 7과 같음. Re-6(Y) 백신과 국내 백신 후보주를 접종한 계군 모두 생존하였음 (100%). 음성대조군의 경우 공격접종 7일 후 1수를 제외하고 모두 폐사함 (11.1%)

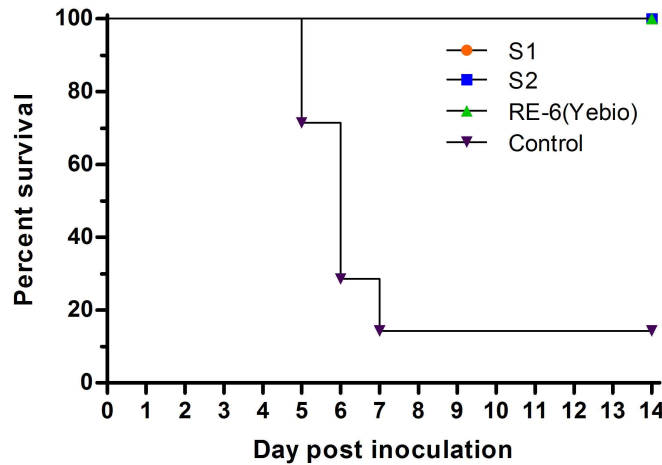


그림 16. 백신 접종 후 H5N8 감염 시 생존율

② 구강과 총배설장의 바이러스 배출양 (감염 후 2, 3, 5, 7, 9일)을 분석 한 결과 총배설장 바이러스 배출을 막을 수 있었으나, rH5N2-GM(0028)의 경우 구강 바이러스 배출을 나타냄 (표 7).

③ 공격접종 14일 후 살아남은 개체의 항체역가는 아래와 같은 수준을 나타내었다 (표 8).

표 8. H5N8형 HPAI 공격접종 후 H5N8 HPAI에 대한 항체역가 확인

| 실험동물 | 백신조성 접종경로 | 백신 시점 | 백신 | HI 항체역가 (log2) |
|-------|--------------|----------|-----------------|----------------|
| | | | | 2주 후 |
| SPF 닭 | 3:7 근육 | 3주령 | Re-6 (Y) | 5.66 ± 2.29 |
| | | | rH5N2-GM(01310) | 6.11 ± 0.78 |
| | | | rH5N2-GM(0028) | 7.11 ± 1.05 |

7. 국내 백신접종 정책의 타당성

가. 백신접종 정책 검토를 위한 배경과 전제

(1) HPAI는 H5N1 HPAI 바이러스의 거둬들 변이로 인하여 인수공통전염병 중 가장 심각한 질병 중의 하나가 되었으며, 잠재적 범유행 인플루엔자 (Pandemic influenza, PI)를 유발할 수 있는 질병으로 간주됨. 따라서, 조류 HPAI 바이러스에 의한 인체 감염 위험성과 신종 PI 출현 위험성을 최소화할 위해서는 HPAI 발생과 확산을 동물감염 단계에서 관리하고 원천적으로 차단하는 것이 매우 중요함.

(2) 2007년 홍콩의 H5N1 HPAI 발생 이후, H5N1 바이러스를 비롯한 각종 HPAI 바이러스의 발생과 세계적 확산, 조류에서의 병원성은 약하지만 인체 감염 위험성은 치명적인 H7N9 AI 바이러스의 중국 출현 (2013), 2014년에 새로이 등장한 H5N8 HPAI 바이러스의 독특한 성질과 북미주까지 확산된 전파력 등 HPAI 바이러스의 지속적이고 급격한 변이와 인체 감염 능력 획득은 이미 인류에 대한 잠재적 PI 출현 우려를 기정사실화 하고 있음.

(3) 부실한 국가방역체계를 가진 후진국에서 초동방역의 실패로 인한 HPAI 상재화 (풍토병화)와 인체 감염 사례의 지속적 증가는 이러한 위험성을 더욱 부각시켰고, 결과적으로 조기 근절보다는 백신을 사용함으로써 피해를 최소화 할 수밖에 없는 상황을 조성함. HPAI 백신 접종국 15개국 중에서 전국적인 HPAI 접종을 실시하는 나라는 중국, 이집트, 인도네시아, 베트남, 홍콩 5개국이며, 이들 모두가 HPAI가 이미 상재화된 이후 전국적 백신을 실시했다는 것은 HPAI로 인한 위급한 국면을 타개하기 위한 수단으로 백신접종 정책이 채택되었음을 입증하는 사례임.

(4) 우리나라에서는 선진적인 국가방역 체계로 보아 HPAI를 통제할 수 없을 정도로 상황이 악화되거나 상재화로 인하여 전국적인 백신접종 필요성이 검토될 정도의 상황은 오지 않을 것으로 생각됨. 백신접종을 검토해야 할 정도로 상황이 악화된다면, 어느 개인이나 집단에 의하여 백신접종 정책을 결정하는 것보다 전문가 그룹과 관련 축산단체와 협회, 행정 그룹의 충지를 모아서 신중하게 결정하는 것이 시행착오를 피하는 길이 될 것으로 보임. 여론의 질타나 비전문가의 단순논리에 의하여 백신접종 정책이 결정될 우려도 배제할 수 없는 만큼, 일시적인 감정이나 위험성에 근거한 공포심에서 결정을 하기 보다는 객관적 사실에 의하여 접근할 수 있는 백신접종의 의사결정 구조 (decision tree)를 만들어 두는 것이 필수적임. 어떠한 경우에도 백신접종의 이해와 득실을 충분히 검토한 후 결정되어야만 함.

나. 백신접종 정책 시행시의 필수 조건

(1) 상황에 따라서 백신접종 정책을 채택하여 시행할 경우 절대적으로 이를 위한 전제조건이 충족되어야함. 현재 상황에 적합한 종합적 방제프로그램의 일환으로서만 적용하여야 하며, 다음과 같은 질병 방제를 위한 기본 원칙 및 수단과 병행하여야만 성공적인 성과를 기대할 수 있음.

(2) 이 기본축이 가동되지 않는 상태에서 백신접종만을 시행한다면 근절은커녕 백신접종을 하였다는 방심에서 비롯된 방역인식의 와해와 함께 전국적 만연을 초래하는 역작용을 초래할 우려가 있음. 게다가, 야외 바이러스의 변이를 촉진하여 동물과 인체에 해로운 HPAI 바이러스 변이형의 출현을 촉진하는 위험한 환경을 조성해 주는 치명적 오류를 범할 수 있음. 특히 백신접종 후 야외바이러스 변이에 대한 감시체계는 백신의 효과를 평가하는데 결정적으로 작용하며, 이 결과에 따라 백신주의 선택이 탄력적으로 변경될 수 있어야 함. 이와 함께 감염농장의 신속한 살처분 정책은 이 바이러스의 전파와 감염 확산을 차단하기 위한 필수적인 조치임.

- (가) 감염 또는 감염 의심축의 인도적 살처분 및 사체의 안전한 처리와 소독, 이동통제 등을 통한 철저한 사후관리
- (나) 질병의 확산을 차단하기 위한 위험요인에 대한 효과적 이동통제
- (다) 농장이나 소규모 사육농가, 관련 산업 및 시장에서의 철저한 차단방역 (biosecurity)
- (라) 사육현장 및 시장 형태의 개선: 감염 위험을 최소화 하기 위하여 가금 사육형태는 물론 가금의 수송체계 및 운반차량에 대한 개선, 방역에 부적절한 시장 형태의 변화를 함께 도모하여야 함.
- (마) 사육 및 유통현장에 대한 철저한 능동적 감시체계 (active surveillance)와 조기진단 시스템 유지: 가금 사육 현장이나 소규모 방사 가든형 식당은 물론 살아있는 닭이나 오리 등 생 조류를 판매하는 재래시장 (live bird market, LBM)과 여기에 동물을 공급하는 중개상인에 대한 감염실태 조사와 조치 및 조기진단 체계의 적용이 조기 검색과 확산 방지에 매우 중요함.
- (바) 생산자/관련 단체 및 국민에 대한 정확한 정보제공 및 소통체계를 구축하고 질병 예방법 등 적절한 교육을 통하여 국민적 협조와 신뢰성을 확보하는 것이 필수적임.

다. 백신접종 면역 획득률 (vaccination coverage)의 중요성

- (1) 백신접종에 의한 면역획득(vaccination coverage)은 백신접종 정책의 실효성과 밀접한 관련이 있음. 집단적 개념으로 볼 때, 백신접종에 의한 면역획득률이 어느 정도인가에 따라서 실제로 특정집단의 가금류에 HPAI가 감염되었을 때 예방효과와 전염에 대한 차단 효과가 결정되기 때문임. 아무리 백신접종을 했다 하여도 그 지역 또는 특정 집단의 면역 수준이 낮다면 백신에 의한 효과적인 예방은 기대할 수 없음.
- (2) 효과적인 백신접종 정책을 위해서는 백신접종에 의한 면역획득 수수가 최소 60%가 되어야 하지만, 감수성을 가진 감염 위험이 있는 가금류에서는 최적의 면역 효과를 위해 80% 이상이 되어야 함. 백신 1회 접종만으로는 일반적으로 이러한 기대를 충족시키기 어려움. 백신접종은 2회 이상 실시하여야 충분한 면역효과를 기대할 수 있으며, 백신의 공급량이 불충분하거나 백신접종 회수가 부족할 경우 vaccination coverage는 급격히 낮아지게 됨.
- (3) 야외 농장에서 백신과 백신접종 실패의 가장 주된 이유는 백신 접종량이 적거나 낮은 면역획득률로 인하여 감수성 있는 계군이 80% 이상의 면역 획득에 실패하는 것임. 이집트는 vaccination coverage가 낮아서 백신접종이 실패한 경우에 속하며, 개별 농가 단위로는 36%의 가금만이 백신을 접종하였고, 상업적 대규모 농장 단위에서는 50%~60% 만이 백신을 접종하였음.
- (4) 최근의 백신과 백신접종의 국지적 실패 요인으로 항원적으로 부적절한 백신주를 사용한 오류도 지적되고 있음. H5N1 HPAI 바이러스가 야외에서 전 세계적으로 끊임없이 순환하고 있기 때문에 그만큼 돌연변이의 가능성이 높아졌고, 결과적으로 항원성 면에서 백신주가 야외주를 충분히 방어할 수 없을 정도로 변이가 지속되고 있어 기존의 백신에 의한 방어면역 획득률이 낮아지게 됨.

라. 백신접종으로 인한 기대효과

(1) 순기능

(가) HPAI 유행 국가에서의 백신접종 정책의 기능은 직접적으로 질병을 근절하기 보다는 바이러스의 박멸이 가능한 시점이 올 때까지 감염 확산과 질병 발생을 차단하거나 최소화 하고, 궁극적으로 백신접종 중단과 발생농장에 대한 강력한 살처분 정책을 통하여 질병의 근절을 도모할 수 있는 유력한 수단으로 이용되고 있음. 백신접종 프로그램 실시로 인체 감염사례 및 가금류 발병 수가 감소한 것은 매우 긍정적 효과이며, 환경에 미치는 영향 등도 긍정적인 결과를 보였음.

(나) HPAI 발생 피해가 지속되거나 상재화 된 국가에서 야외농장에 백신을 광범위하게 사용한 경험과 현재까지의 시험 결과 및 야외 상황을 종합해 볼 때, 유행하는 야외주와 항원성이 일치하면서 방어에 충분한 함량을 가지고 있는 백신은 아래와 같이 상당한 효과를 발휘하는 것으로 평가됨.

- ① HPAI 감염에 대한 닭의 저항성 증가
- ② 감염 닭의 임상증상 완화 및 폐사율 감소.
- ③ 면역 획득에 의한 감염 시 HPAI 바이러스 배출 감소.
- ④ 가금의 HPAI 감염 가능성 감소로 다른 동물 및 사람의 감염 가능성을 감소시킬 수 있으며, 총체적으로 AI의 방제와 예방에 있어서 효과적인 보조적 수단으로 사용될 수 있음.

(2) 역기능

(가) 세계적 추세와 마찬가지로 국내에도 매년 다른 항원성을 가진 변이주가 유입되기 때문에 사전 예측만으로 적합한 항원성을 가진 백신주를 선발하여 백신을 제조, 확보해 두기란 거의 불가능하며, 사전 비축의 효용성보다는 폐기 비용만 증가시킬 수 있음.

(나) 장기적으로는, 전국적 백신접종 비용과 관리비용, 진단에 소요되는 추가 비용, 근절 지연으로 인한 산업적, 사회적 피해 등 종합적인 면을 고려하면 국가방역에 있어서 훨씬 더 많은 비용이 요구될 것임. 따라서 현재 백신접종을 하는 상재국에서도 전국적 백신접종 정책을 수정하여 위험성이 높은 특정 목표 또는 지역을 한정하여 집중적으로 백신접종을 하는 targeting vaccination 정책으로 변화하는 추세에 있음. 이 경우, 백신접종축과 감염축에 대한 확실한 감별 백신과 진단체계 (DIVA)를 갖추고 있지 않으면 오히려 혼란을 초래할 수 있음.

(다) 백신 역가가 낮거나 항원성이 일치하지 않는 백신을 사용했을 때, 또는 부적절한 백신 사용 전략 (정책) 수립과 잘못된 백신접종 프로그램을 적용했을 경우에는 질병 방어 효과 및 바이러스 배출 억제 효과가 매우 낮게 나타날 뿐만 아니라 야외바이러스의 돌연변이를 유발할 수 있음.

(라) 중국과 국내에서는 양계장보다는 오리농장에서 더 문제를 일으켜 왔고, 종오리 및 육용오리가 질병 확산과 피해를 증가시키는 역할을 해 왔지만, 현 시점에서 오리에 효과적인 백신은 세계적으로 아직 미개발 상태임. 따라서 오리산업이 큰 국가에서는 닭에 대한 백신접종 만으로 피해 최소화 외의 다른 성과를 기대하기는 어려움.

(마) 부적합한 백신이 유통될 경우, 제조자들에게는 잘못된 방역 인식을 유발하고, 사육가들에게는 백신과 정부의 방역정책에 대한 불신을 초래할 우려가 높음.

(바) 백신접종은 국가방역의 한 축으로 활용해야 하지만 백신접종 정책 채택 후에는 방역인식이 와해되거나 해이해 질 우려가 매우 높아짐.

(사) 백신접종 자체만으로는 AI 바이러스를 완전히 제거하거나 질병을 근절할 수는 없음.

마. 가금류 백신접종이 사람의 공중보건에 미치는 영향

(1) 순기능

(가) 국가방역이 실패한 HPAI 상재국에서 가금류에 대한 백신접종 또는 백신을 접종한 가금산물이 HPAI 인체 감염에 부정적 영향을 미친다는 증거는 없음. 국가방역체계가 성공적으로 작동되지 않거나 통제되지 않은 상황에서는 HPAI 만연으로 인한 인체 감염 가능성이 증가한다는 사실에 견주어 보면, 백신접종으로 인한 질병 감소와 감염계의 바이러스 배출량 감소는 오히려 공중보건에 유리한 조건을 조성함. 이런 측면에서, 또한 백신을 접종한 가금산물이 안전성에 관한 소비자의 요구에 심대한 부정적 영향을 미친다고 보기는 어려움.

(2) 역기능

(가) HPAI 상재국이 아닌 상황에서 HPAI 예방 또는 방역을 위하여 신중한 검토 없이 백신을 접종한다면, 여러 면에서 심각한 상황을 초래할 수 있음.

(나) 상당수의 개체는 백신접종을 하여도 이 병에 감염될 수 있고, 증상이 약하거나 증상이 없는 개체일지라도 소량이지만 바이러스를 체외로 배출하여 체표면과 주위 환경을 오염시킬 수 있음. 이런 개체는 지속적으로 바이러스를 전파, 확산시키는 전염원 역할을 하지만 방역당국에서는 이를 인지하기 어려움

(다) 백신접종축은 감염되어도 증상이 없거나 약하므로 축주는 이를 인지하지 어려움 (silent infection). 따라서, 축주의 무지 또는 고의적 미신고로 무방비 상태에서 바이러스에 오염된 가금산물이 시중에 유통될 위험성이 높아짐. 오염된 가금산물이 소비자의 가정 또는 도마에까지 침투한다면 인체 감염 차단에 대한 위험요인이 될 수 밖에 없고, 이에 극도로 민감한 국내 소비자의 성향으로 보아 관련산업이 단기간에 붕괴되는 산업적 재앙이 초래될 우려가 있음.

(라) 구제역 백신접종 사례에서 보듯이 백신접종 후에는 사육농가의 차단방역 의지가 해이해지고, 감염되어도 증상이나 피해가 미약하여 신고의식마저 없어짐으로써 대국적으로는 국가방역에 큰 손실요인으로 작용할 수도 있음.

8. 비상 시에 대비한 백신(주) 은행 구축과 백신 제조기술 확립

가. 백신접종 정책을 시행하지 않더라도 만약의 사태에 대비하여 백신 제조기술을 개발하고 확립하여야 하는 것이 바람직함. 백신 제조기술은 국내에서도 각 대학이나 연구소에서 이미 단편적으로는 개발하여 확보하여 두고 있지만 정부기관을 중심으로 기술을 결집하여 단일화된 총체적 대응방안을 준비해 두어야함.

(1) 긴급 비상조치용 백신(emergency vaccination)의 개발과 확보(stockpiling)

(가) 비상사태에 대비한 긴급용 백신을 제조하거나 확보하기 위해서는 백신주은행 (strain bank)을 구축할 것인지, 항원은행 (antigen bank)을 구축할 것인지 전문가와 행정가 집단에 의한 심층적인 검토가 요구됨.

(나) 백신주은행은 사용할 수 있는 효과적인 백신주 (strain)를 모두 확보해 두는 것이고, 항원은행은 오일백신 제조직전 단계의 항원을 미리 만들어 비축해 두는 것으로서 각자 장단점을 가지고 있음.

(다) 긴급백신용 stockpile이라는 점을 전제로 한다면 후자가 더 바람직하지만, 사용하지 않을 경우에는 유효기간이 지난 대량의 항원은 모두 폐기해야 하며, 이에 따른 사회적 비용이 요구됨.

(라) 이러한 백신은행은 긴급 백신접종 프로그램 준비에서 매우 중요한 부분을 차지함. H5 백신을 포함한 백신은행을 가지고 있는 국가는 모두 10개국이며, 그 중 3개국은 H5와 H7 모두를 백신 은행에 보유하고 있음. 백신의 양은 subtype별로 50만에서 5천5백만 수로 다양하지만 대부분 국가들은 subtype별로 평균 350만 dose 정도를 보유하고 있는 것으로 조사됨.

(마) 국내에 유입된 5회의 HPAI 바이러스가 매번 다른 유전적 clade에 속하고, 교차면역원성이 부족할 정도로 변이가 많은 것이었다는 사실을 가정하면, 미래에 유입될 바이러스의 예측은 거의 불가능하므로 확보해 둔 긴급백신용 stockpile은 주기적으로 폐기될 가능성이 매우 높음. 이에 따른 국가적 비용을 감수해야함. 백신은행을 보유하고 있는 대부분 국가들은 정부 주도의 백신 은행을 유지하는 것은 너무 큰 비용이 소요된다고 결론지음.

(2) 비상용 HPAI 백신 효능 및 안전성 조기평가와 초단기 허가제도 (fast-track registration)의 구비

(가) 통제할 수 없을 정도로 HPAI가 확산되었을 경우에 대비한 백신의 긴급 개발과 사용을 위해서는 백신의 효능과 안전성 평가를 위한 조기검정 시스템이 구축되어야 하며, 제조 백신에 대한 긴급 허가제도도 구비되어야 함. 통상적 평가시스템과 허가제도를 긴급 백신 사용에 적용할 경우, 장기간이 소요되어 실기할 위험성이 매우 높음. 따라서 백신접종 정책을 결정하는 전후의 수주 이내에 효과적인 백신의 개발과 허가가 될 수 있는 별도의 긴급 검정시스템을 마련해 두는 것이 안전함.

9. HPAI 백신접종을 통한 교훈

- 가. OFFLU와 FAO, OIE이 주관하는 동물 인플루엔자 전문가들의 연합 네트워크는 2013년 12월 중국 베이징에서 HPAI 백신에 대한 기술 회의를 개최함. 그 동안의 세계 각국의 발생경험과 백신사용 특성에 대한 평가를 바탕으로 2007년 이탈리아 베로나에서 개최된 권고 사항을 수정, 보완하는 작업이 진행됨. 특히, 중국, 이집트, 베트남, 인도네시아와 멕시코 등의 많은 국가에서 실제로 야외에서 HPAI 백신을 사용한 경험과 장단점, 고려사항 등에 대한 많은 경험을 제시하였고, 이들 국가의 대표들과 FAO와 OIE, WHO의 참가자들은 함께 모여서 경험을 공유하고, HPAI에 대한 백신접종의 지역적, 국가적인 수준을 높이기 위해 토론하였음.
- 나. 2013년 현재 HPAI H5N1은 7개 국가에서 유행하고 있고, 이 중 4개 국가 (중국, 인도네시아, 이집트, 베트남)는 상재화 된 이후 피해 최소화 수단으로서 백신접종을 실시한 이후 아직도 백신접종을 하고 있음. 현재까지의 결과로 보면, 철저한 살처분 박멸정책을 병행한 홍콩의 사례 외에 어떠한 국가도 백신정책으로 HPAI H5N1을 박멸하지는 못했음.
- 다. 하지만 HPAI가 상재화 된 국가에서는 백신접종의 목표가 질병 박멸이 아니기 때문에 HPAI 근절 여부만으로 백신접종 효과를 평가할 수는 없음. 질병의 근절을 목적으로 백신을 실시한 국가로는 프랑스, 네덜란드, 이스라엘, 코트디부아르, 러시아가 있지만, 상재화 단계의 예방접종이 아닌 초기 단계의 비상조치로서 특정구역에 대한 제한적 예방접종이나 방역대를 중심으로 한 ring vaccination을 실시하였고, 백신접종 정책 외에도 감염지역에 대한 철저한 이동통제와 살처분 박멸정책을 병행하였기 때문에 성공 가능성이 높았다고 할 수 있음.
- 라. 일부 HPAI 상재국에서는 대량 백신접종 정책을 시행해 왔으나 장기간 적용하기에는 너무 재정적인 부담이 컸기 때문에 특정한 타겟을 대상으로 한 소규모, 국지적 백신접종으로 정책을 수정함. 즉, 집단 예방접종에서 특정 목표를 타겟으로한 예방접종으로 백신접종 정책을 전환하는 시점에 있으며, 베트남, 이집트, 인도네시아, 중국에서도 위험농장에 대한 타겟 접종으로 백신정책으로 바꾸고 있는 중임.

마. HPAI가 토착화되어 끊임없이 발생하거나 인근 발생국가로부터 지속적으로 유입되는 위험성을 안고 있는 동남아시아 국가에서는 향후 잠정적으로 백신 사용을 허가하는 것도 한 방편으로 제시됨. 또한 HPAI 바이러스 유행주에 맞는 새로운 백신의 선택과 사용은 조류인플루엔자의 확산을 막고 통제하는데 필수적이지만 국제 시장에서 지속적으로 이용 가능한 백신을 만드는 것은 많은 난제에 봉착해 있는 것이 현실임.

바. 결과적으로, 백신사용의 공과와 득실은 다음과 같이 정리되어 권고사항으로 제시됨.

- (1) HPAI를 통제하기 위한 도구로서의 백신접종의 긍정적인 면과 부정적인 면을 고려할 것
- (2) 재정적인 자원과 인적 자원의 필요성과 확보 역량이 검토되어야 함.
- (3) 국제적으로 지역적인 수준의 수의학적 서비스를 강화할 필요성과 OIE에 AI 보고의무에 따른 필요성
- (4) 백신접종 캠페인을 위해 필요한 정책적인 약속과 이에 대한 이행의 중요성
- (5) 국가나 지역에서 백신접종 정책을 시행하기 전에 백신 전략의 목적을 구체적으로 정의할 필요성과 중요성
- (6) 필요시 백신접종 전략을 주기적으로 평가하고, 탄력적으로 수정 적용할 수 있는 유연성에 대한 중요성.

사. 이와 함께, 백신접종 시의 출구전략 수립의 중요성도 매우 중요한 사항 중의 하나로 논의 됨.

아. 민간과 공공 부문 사이의 협력 또한 매우 중요한 포인트 중의 하나인데 공공 부문은 백신의 등록 사용과 효과적인 백신 정책을 결정하고 시행하는 책임을 지고 있음. 이것은 두 파트간에 열린 마음으로 접근하여야 가능한 일이라 할 수 있음. 특히 긴급 비상사태용 백신은 통상적인 방법이 아닌 조속한 등록체계를 가지고 있어야만 긴급사태 발생 시 사용이 가능해 지므로 이 부분에 대한 사전 논의와 협력도 강조되어야 함.

10. 백신접종 출구 전략

가. 국내에서의 구제역 백신접종 후 장기간에 걸친 전국적 만연과 상재화 사례에서 보듯이 백신접종 후 출구전략의 중요성은 아무리 강조해도 모자란다고 할 수 있음. 적합한 출구전략이 없다면 백신접종은 전략의 부재를 뜻하는 것이고, 결과적으로 백신접종 후 농가의 차단 방역 인식 해이, 자율방역 및 신고 의식의 결여 등으로 연결될 수밖에 없으며, 이것은 국가 방역이나 산업진흥의 측면에서는 심대한 손실을 초래하는 결과로 이어질 수 있음.

나. 백신접종 후의 효능에 대한 지속적 평가, 야외주의 변이와 이에 항원적으로 부합되는 새로운 백신의 개발과 적용, 발생 최소화 이후의 근절정책 수립과 이행, 관련 농가 및 3자적 이익단체 (stakeholder)의 설득 등의 백신접종 출구 전략이 구체적으로 짜여 있어야만 하고, 이에 대한 방역당국의 이행의지가 수반되어야만 함.

[제2세부과제: 국내의 HPAI 백신주 특성 비교 분석 및 백신 조성 최적화]

1. 유전자 분석

가. 해외 유행 HPAI 바이러스의 유전자형 (clade) 조사

표 9. H5 HA clade

Table 3 H5 HA clade emergence

| Clade ¹ | Year | Geographical location | Description/prototype virus |
|--------------------|-----------|---|--------------------------------------|
| 0 | 1996–2002 | China, HK SAR* | Gs/Guangdong/1/1996 |
| 3 | 2000–2001 | China, HK SAR, Vietnam | Chicken/Hong Kong/YU562/2001 |
| 4 | 2002/2003 | China, HK SAR | Gs/Guiyang/337/2006 |
| 5 | 2000–2003 | China, Vietnam | Gs/Guangxi/914/2004 |
| 6 | 2002/2004 | China | Chicken/Hunan/01/2004 |
| 7 | 2002/2004 | China: Yunnan, Hubei, Shanxi | Chicken/Shanxi/2/2006 |
| 7.1 | 2007 | China | Chicken/Vietnam/NCVD-16/2008 |
| 7.2 | 2008 | China | Chicken/Hebei/A-8/2009 |
| 8 | 2001–2004 | HK SAR, China | Chicken/Hong Kong/YU777/2002 |
| 9 | 2003–2005 | China | Duck/Guangxi/2775/2005 |
| 1 | 2002/2006 | HK SAR, China Vietnam, Cambodia, Thailand, Laos, Malaysia | Vietnam/1203/2004 |
| 1.1 | 2004 | Vietnam | Duck/Vietnam/1233/2005 |
| 1.1.1 | 2007 | Vietnam | Duck/Vietnam/NCVD-010/2008 |
| 1.1.2 | 2008 | Vietnam | Duck/Vietnam/NCVD-366/2009 |
| 2.1.1 | 2003–2005 | Eastern Indonesia | Chicken/Indonesia/BL/2003 |
| 2.1.2 | 2005–2006 | Western Indonesia | Indonesia/538H/2006 |
| 2.1.3 | 2004–2007 | Eastern and Western | Indonesia/5/2005 |
| 2.1.3.1 | 2004 | Indonesia | Chicken/Gunung Kidul/BBVW/2005 |
| 2.1.3.2 | 2004 | Indonesia | Indonesia/CDC292N/2005 |
| 2.1.3.2a | 2006 | Indonesia | Chicken/Indonesia/Tangerang/1/2007 |
| 2.2 | 2005 | China, Mongolia, Europe, Middle East, Africa | Bar headed goose/Qinghai/1/2005 |
| 2.2.1 | 2005 | China, Middle East, Africa | Chicken/Egypt/06207-NLQP/2006 |
| 2.2.1.1 | 2007 | Egypt | Chicken/Egypt/07701S-NLQP/2007 |
| 2.2.1.1a | 2009 | Egypt | Chicken/Egypt/F10/2009 |
| 2.2.2 | 2006 | Bangladesh, India | Chicken/Bangladesh/364/2007 |
| 2.2.2.1 | 2008 | Bangladesh | Chicken/Bangladesh/CD-48-BL-165/2008 |
| 2.3.1 | 2003–2005 | Hunan, Guangdong (China) | Duck/Hunan/303/2004 |

(continued)

Table 3 (continued)

| Clade ¹ | Year | Geographical location | Description/prototype virus |
|--------------------|-----------|---|--------------------------------------|
| 2.3.2 | 2004–2006 | HK SAR, Southern China | Chicken/Guangxi/2461/2004 |
| 2.3.2.1 | 2006 | China | Peregrine falcon/Hong_Kong/1143/2007 |
| 2.3.2.1a | 2008 | China, Vietnam, Bangladesh | Environment/Chang_Sh25/2009 |
| 2.3.2.1b | 2008 | China, Vietnam | Feral pigeon/Hong_Kong/3409/2009 |
| 2.3.2.1c | 2008 | China, Indonesia, Vietnam | Bar-headed goose/MongoliX53/2009 |
| 2.3.3 | 2004 | Guiyang and Hunan (China) | Chicken/Guiyang/3055/2005 |
| 2.3.4 | 2005–2006 | HK SAR, China, Thailand, Laos, Malaysia | Duck/Fujian/1734/2005 |
| 2.3.4.1 | 2008 | China | Guizhou/1/2009 |
| 2.3.4.2 | 2006 | China | Duck/Yunnan/6490/2006 |
| 2.4 | 2002–2005 | Yunnan and Guangxi (China) | Chicken/Yunnan/115/2004 |
| 2.5 | 2003/2004 | China, Korea, Japan Shantou | Chicken/Korea/ES/2003 |

* Hong Kong Special Administrative Region

¹ Based on previously publications; (WHO-OIE-FAO 2008, 2009, 2012, 2014)

(출처: Influenza pathogenesis and control, 403-440)

- (1) H5 HA clade는 항원형에 따라 clade 0에서 clade 9까지 총 10개의 clade로 나뉜.
- (2) 국내에서는 clade 2.5 (1차; H5N1), clade 2.2 (2차; H5N1), clade 2.3.2.1 (3차, 4차; H5N1), clade 2.3.4.6 (5차; H5N8) HPAI가 발생하였음.
- (3) 현재 중국에서 분포하고 있는 H5N1 바이러스는 clade 2.3.4, 2.3.2 및 7이며, 베트남의 경우 clade 1.1, 2.3.2 및 7 HPAI가 분포하고 있음. 두 나라의 경우 백신 사용으로 인한 면역 회피에 의해 새로운 변이주들이 지속하여 나타나고 있음.

나. 백신주 유전자 특성 분석

- (1) HPAI 바이러스 별로 혈구응집소(hemagglutinin, HA) 유전자의 특성 비교 분석
 - (가) pI 값에는 큰 차이가 관찰되지 않았으며 (2014년 H5N8 바이러스 제외) HA2 common epitope은 모두 보존되어 있음.

표 10. HPAI 바이러스 별로 혈구응집소(hemagglutinin, HA) 유전자의 특성 비교 분석

| Clade | Virus | Acc. no. | pI | Common epitope | | | |
|----------|---|----------|------|----------------|----|----|----|
| | | | | 42 | 46 | 49 | 53 |
| 1 | A/Viet Nam/1203/2004(H5N1) | EU122404 | 6.01 | Q | D | T | N |
| 1.1.2 | A/Cambodia/W0526301/2012(H5N1) | KF369214 | 6.30 | - | - | - | - |
| 2.1 | A/Indonesia/CDC742/2006(H5N1) | CY014537 | nt | - | - | - | - |
| 2.1 | A/Indonesia/CDC1047S/2007(H5N1) | CY019432 | 6.30 | - | - | - | - |
| 2.2 | A/Bar-headed Goose/Qinghai/59/05(H5N1) | DQ095612 | 6.42 | - | - | - | - |
| 2.2 | IS/2006 | | 6.31 | - | - | - | - |
| 2.2.1 | A/Egypt/N03072/2010(H5N1) | CY062484 | 6.42 | - | - | - | - |
| 2.2.1.1 | A/Egypt/3300-NAMRUB/2008(H5N1) | FJ226061 | 6.44 | - | - | - | - |
| 2.3.2 | A/whooper swan/Mongolia/21/2010 (H5N1) | AB569609 | 6.27 | - | - | - | - |
| 2.3.2 | A/mallard/Korea/1195/2010(H5N1) | HQ695910 | 6.37 | - | - | - | - |
| 2.3.2 | A/chicken/Korea/Gimje/2008(H5N1) | GQ412053 | 6.14 | - | - | - | - |
| 2.3.4.6 | A/breeder duck/Korea/Gochang1/2014 | KJ413834 | 6.61 | - | - | - | - |
| 2.3.4.6 | A/baikal teal/Korea/Donglim3/2014 | KJ413850 | 7.21 | - | - | - | - |
| 2.5 | A/crow/Kyoto/53/2004(H5N1) | AB189053 | 6.30 | - | - | - | - |
| 2.5 | ES | AY676035 | 6.55 | - | - | - | - |
| 2.3.2.1 | A/common magpie/Hong Kong/5052/2007(H5N1) | CY036173 | 6.15 | - | - | - | - |
| 2.3.2.1a | A/duck/Bangladesh/19097/2013(H5N1) | KE715205 | 6.77 | - | - | - | - |
| 2.3.2.1b | A/barn swallow/Hong Kong/1161/2010(H5N1) | KC357320 | 6.24 | - | - | - | - |
| 2.3.4.2 | A/Anhui/1/2005(H5N1) | HM172104 | 6.20 | - | - | - | - |
| 4 | A/goose/Guizhou/337/2006(H5N1) | DQ992765 | 6.20 | - | - | - | - |
| 7.1 | A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008(H5N1) | FJ842476 | 6.55 | - | - | - | - |
| 7.1 | A/chicken/Vietnam/NCVD-03/2008(H5N1) | FJ842481 | 6.34 | - | - | - | - |

표 11. HPAI 바이러스 별로 혈구응집소(hemagglutinin, HA) 유전자의 특성 비교 분석

Table 1. Amino acid residues at sites of protease cleavage, receptor binding, epitopes of antigenic sites and a site of variable glycosylation of the H5 hemagglutinin polypeptide

| Virus strains | Country/Territory | Clade | Cleavage site | Receptor binding site | Antigenic sites | | | Glycosylation change | |
|---------------------------------------|-------------------|----------|---------------|-----------------------|-----------------|--------|----------------|----------------------|---------|
| | | | 338-345/346 | 238-240 | 69 | 99-102 | 140-145 Site 1 | 152-157 Site 2 | 170-172 |
| A/Dk/VN/HT5 (2014) ^a | Vietnam | 2.3.2.1c | QRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | NHEVSL | SYQGNS | DNA |
| A/Ck/VN/KH23 (2013) ^a | Vietnam | 2.3.2.1c | QRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | DHEASL | SYQGNS | DNA |
| A/Dk/Tegal/1727-11 (2012) | Indonesia | 2.3.2.1c | QRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | DHEASL | SYQGNS | DNA |
| A/BHG/Qinghai/1 (2009) | China | 2.3.2.1c | QRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | DHEASL | PYQGNS | DNA |
| A/HK/6841 (2010) ^a | Hong Kong | 2.3.2.1c | QRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | DHEASL | SYQGNS | DNA |
| A/Mdk/VN/LBM66 (2011) | Vietnam | 2.3.2.1b | QIERARRKRG | QSG | K | ANPA | DHEASL | SYQGNS | DNA |
| A/Barn-sw/HK/1161 (2010) ^a | Hong Kong | 2.3.2.1b | QIERARRKRG | QSG | K | ANPA | DHEASL | SYQGNS | DNA |
| A/Dk/VN/LBM136 (2012) | Vietnam | 2.3.2.1a | QRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | DHEASL | PYQGNS | DNA |
| A/Ck/VN/TH2c1 (2012) ^a | Vietnam | 2.3.2.1a | QRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | DHEASL | PYQGNS | DNA |
| A/Dk/VN/OT801 (2011) ^a | Vietnam | 2.3.2.1a | QRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | DHEASL | PYQGSS | DNA |
| A/Hubei/1 (2010) ^a | China | 2.3.2.1a | QRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | DHEASL | PYQGKS | DNA |
| A/MalDk/KR/K10/515 (2011) | South Korea | 2.3.2.1 | QRERARRK-RG | QSG | K | AKPA | EHEASL | PYQGNS | DNA |
| A/Pfalcon/Tochigi/15 (2011) | Japan | 2.3.2.1 | QRERARRK-RG | QSG | K | AKPA | DHEASL | SYQGNS | DNA |
| A/Gc/Grebe/Dinghai/1 (2009) | China | 2.3.2.1 | QRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | DHEASL | PYQGNS | DNA |
| A/BHG/Mongolia/X53 (2009) | Mongolia | 2.3.2.1 | QRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | DHEASL | SYQGNS | DNA |
| A/Ck/NP/81 (2010) | Nepal | 2.3.2.1 | QRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | DHEASL | SYQGNS | DNA |
| A/Dk/LA/469 (2010) | Laos | 2.3.2.1 | QRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | DHEASL | SYQGNS | DNA |
| A/Grebe/Tyva/3 (2009) | Russia | 2.3.2.1 | QRERARRK-RG | QSG | K | AKPA | DHEASL | SYQGNS | DNA |
| A/LittleEgret/HK/8863 (2007) | Hong Kong | 2.3.2 | QRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | DHEASL | PYQGNS | DNA |
| A/BcnHeron/HK/659 (2008) | Hong Kong | 2.3.2 | QRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | DHEASL | PYQGNS | DNA |
| A/Guangxi/1 (2008) | China | 2.3.4.3 | LRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | DHEASS | PYQGSP | NNT |
| A/VN/HN31242 (2007) | Vietnam | 2.3.4.3 | LRERARRK-RG | QSG | K | ANPA | DHEASS | PYQGVV | NNT |
| A/Ck/VN/NCVD-093 (2008) | Vietnam | 7.2 | QIEGRRARRKRG | QSG | K | ASPA | NHETSL | SYLENP | NNT |
| A/Ck/VN/NCVD-016 (2008) | Vietnam | 7.1 | QREGRRARRKRG | QSG | K | ASPA | NHEASS | SYLGEP | NNT |
| A/Mdk/VN/OIE-0043 (2012) | Vietnam | 1.1.2 | QREERARRKRG | QSG | R | ANPV | SHEASL | PYQGNS | NST |
| A/Md/VN/OIE-559 (2011) | Vietnam | 1.1.1 | QREGRRARRKRG | QSG | R | ANPV | SHEASL | PYQGNS | NST |
| A/KH/R0405050 (2007) | Cambodia | 1.1 | QREGRRARRKRG | QSG | R | ANPV | SHEASL | PYQGNS | NST |
| A/VN/1194 (2004) | Vietnam | 1 | QREERARRKRG | QSG | K | ANPV | SHEASL | PYQGKS | NST |
| A/VN/1203 (2004) | Vietnam | 1 | QREERARRKRG | QSG | K | ANPV | SHEASL | PYQGKS | NST |
| A/Gs/Guangdong/1 (1996) | China | 0 | QREERARRKRG | QSG | R | ASPA | NHDASS | PYHGNS | NSA |

Bold letter of amino acid indicates a change in comparison to other strains of same clade.

Dk, duck; Ck, chicken; BHG, black headed gull; HK, Hong Kong; Mdk, muscovy duck; VN, Vietnam; sw, swallow; MalDk, mallard duck; KR, South Korea; KH, Cambodia; Gs, goose.

^aViruses from our own study.

^bPrototype reference strains for clade 2.3.2.1a/b/c.

(2) HPAI 바이러스 별로 NA (neuraminidase) 유전자의 특성 비교 분석

표 12. HPAI 바이러스 별로 NA (neuraminidase) 유전자의 특성 비교 분석

| Clade | Virus | Acc. no. | pI |
|----------|---|----------|------|
| 1.1.2 | A/Cambodia/W0526301/2012(H5N1) | KF369216 | 6.26 |
| 2.1 | A/Indonesia/CDC742/2006(H5N1) | CY014539 | 6.37 |
| 2.1 | A/Indonesia/CDC1047S/2007(H5N1) | CY019434 | 6.07 |
| 2.2 | A/Bar-headed Goose/Qinghai/59/05(H5N1) | DQ095652 | 6.26 |
| 2.2 | IS/2006 | EU233677 | 6.26 |
| 2.2.1 | A/Egypt/N03072/2010(H5N1) | CY062485 | 5.93 |
| 2.2.1.1 | A/Egypt/3300-NAMRU3/2008(H5N1) | FJ461658 | 6.09 |
| 2.3.2 | A/whooper swan/Mongolia/21/2010 (H5N1) | AB569610 | 6.07 |
| 2.3.2 | A/mallard/Korea/1195/2010(H5N1) | HQ695911 | 6.21 |
| 2.3.2 | A/chicken/Korea/Gimje/2008(H5N1) | GQ412064 | 6.37 |
| 2.3.2.1 | A/common magpie/Hong Kong/5052/2007(H5N1) | CY036175 | 6.21 |
| 2.3.2.1a | A/duck/Bangladesh/19097/2013(H5N1) | KF715206 | 6.78 |
| 2.3.2.1b | A/barn swallow/Hong Kong/1161/2010(H5N1) | KF735645 | 6.26 |
| 2.3.4.2 | A/Anhui/1/2005(H5N1) | HM172189 | 6.21 |
| 2.3.4.6 | A/breeder duck/Korea/Gochang1/2014 | KJ413836 | 6.71 |
| 2.3.4.6 | A/baikal teal/Korea/Donglim3/2014 | KJ413852 | 6.71 |
| 2.5 | A/crow/Kyoto/53/2004(H5N1) | AB189055 | 6.15 |
| 2.5 | ES | AY676043 | 6.50 |
| 4 | A/goose/Guizhou/337/2006(H5N1) | AB745479 | 6.00 |
| 7.1 | A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008(H5N1) | HM444790 | 6.46 |
| 7.1 | A/chicken/Vietnam/NCVD-03/2008(H5N1) | KR732462 | 6.70 |

(3) HPAI 바이러스 별로 internal gene 유전자의 특성 비교 분석

(가) 고병원성 인플루엔자 바이러스의 internal 유전자 분석

- ① 고병원성 인플루엔자 바이러스는 H5, H7 subtype을 가지며, cleavage site의 polybasic amino acid를 가짐으로써 여러 기관에 존재하는 furin-like enzyme에 의하여 분열됨으로써 다양한 기관에서 증식할 수 있는 특징을 가지며 특히 가금산업에 막대한 피해를 입히는 바이러스임.
- ② 한국에서는 2003-2004, 2006-2007, 2008, 2010-2011 4차례의 H5N1형 고병원성 인플루엔자 바이러스의 발생보고가 있으며, 최근에는 2014년 H5N8형 고병원성 인플루엔자 바이러스 (clade 2.3.4.6)가 발생하여 가금 산업에 큰 피해를 입혔음 (Lee *et al.*, 2014).
- ③ A/HK/156/97 (HK156; HPAI H5N1) 바이러스와 내부 유전자에서 98% 정도의 유사성을 가지는 A/Quail/HK/G1/97 (QHKG1; H9N2)을 마우스에 접종한 후 HK156을 공격접종 하였을 때 마우스 폐사를 완벽히 방어 (15% 정도의 체중감소만 관찰)함 (O'Neill *et al.*, 2000). 내부 유전자의 유사성이 고병원성 인플루엔자 바이러스 방어에 중요하게 작용함을 확인할 수 있음 .
- ④ 현재 중국에서 사용하는 Re-1, Re-4, Re-5, 그리고 Re-6 등 대부분의 상용화된 고병원성 인플루엔자 바이러스 백신의 경우 내부 유전자에 대한 고려 없이 PR8 (H1N1) 바이러스를 사용하고 있음.

(나) 고병원성 인플루엔자 바이러스의 내부 유전자 비교

① 고병원성 인플루엔자의 내부 유전자 분석을 위하여 재조합 바이러스의 주된 backbone 으로 사용되는 PR8 바이러스와 유행했던 고병원성 인플루엔자 바이러스를 22개 선별하여 내부 유전자의 상동성을 분석함 (표 13).

표 13. PR8 바이러스와 HPAI 바이러스 internal 유전자간 상동성 분석

| Virus Strain | PB2 | PB1 | PA | NP | M | NS |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| PR8 | 95.3* | 95.3 | 94.3 | 92.5 | 86.6 | 73.5 |
| Buan2 (H5N8) | 96.5 | 97.2 | 96.0 | 97.2 | 96.0 | 87.5 |
| Gochang1 (H5N8) | 97.1 | 97.2 | 95.8 | 97.3 | 96.2 | 87.3 |
| Donglim3 (H5N8) | 96.4 | 97.2 | 96.0 | 97.1 | 96.0 | 87.5 |
| A/duck/Jiangsu/k1203/2010 (H5N8) | 96.4 | 97.5 | 94.9 | 96.6 | 96.5 | 87.5 |
| A/duck/Shandong/Q1/2013 (H5N8) | 96.8 | 97.5 | 96.0 | 96.5 | 96.3 | 87.2 |
| A/goose/Zhejiang/925104/2014 (H5N8) | 95.9 | 97.4 | 95.1 | 96.3 | 95.9 | 87.6 |
| A/mallard/Idaho/AH0008597/2015 (H5N8) | 96.2 | 97.2 | 95.8 | 96.8 | 96.0 | 87.5 |
| A/mallard/Shanghai/SH-9/2013 (H5N8) | 97.1 | 97.2 | 95.7 | 97.2 | 95.7 | 87.1 |
| A/mandarin duck/Korea/PSC24-24/2010 (H5N1) | 97.2 | 97.2 | 95.9 | 97.3 | 96.7 | 90.4 |
| A/Eurasian eagle owl/Korea/23/2010 (H5N1) | 97.1 | 97.2 | 96.0 | 97.3 | 96.7 | 91.0 |
| A/chicken/Korea/Gimje/2008 (H5N1) | 96.9 | 97.6 | 96.1 | 97.4 | 94.7 | 90.3 |
| A/Duck/Hong Kong/380.5/2001 (H5N1) | 97.2 | 97.1 | 96.1 | 96.4 | 95.7 | 90.4 |
| A/chicken/Bangladesh/12VIR-7140-3/2012 (H5N1) | 96.2 | 94.7 | 94.8 | 96.7 | 95.9 | 87.3 |
| A/chicken/Bangladesh/14VIR2665-25/2014 (H5N1) | 97.2 | 96.7 | 95.0 | 90.4 | 95.5 | 80.8 |
| A/chicken/Egypt/096L-NLQP/2009 (H5N1) | 95.9 | 96.4 | 95.0 | 95.9 | 95.6 | 89.2 |
| A/chicken/Egypt/14VIR784-5-1318S/2013 (H5N1) | 93.8 | 96.0 | 94.6 | 97.2 | 94.8 | 87.3 |
| A/chicken/Egypt/Q1995D/2010 (H5N1) | 96.3 | 97.0 | 95.0 | 95.7 | 95.3 | 88.5 |
| A/chicken/Egypt/S3280B/2011 (H5N1) | 96.7 | 97.0 | 94.8 | 95.8 | 93.8 | 88.4 |
| A/chicken/Hebei/108/02 (H5N1) | 96.5 | 96.3 | 96.0 | 96.6 | 94.9 | 87.0 |
| A/chicken/Hebei/326/2005 (H5N1) | 96.5 | 97.5 | 95.1 | 97.3 | 96.7 | 89.9 |
| A/chicken/India/03CL488/2011 (H5N1) | 96.7 | 96.5 | 94.6 | 96.8 | 96.4 | 89.0 |
| A/chicken/India/82544/2008 (H5N1) | 96.7 | 97.3 | 95.3 | 96.2 | 96.0 | 89.8 |
| A/chicken/India/NIV33487/06 (H5N1) | 96.9 | 97.1 | 95.6 | 96.6 | 96.0 | 89.9 |
| HPAI간 상동성 평균 | 96.5 | 97.0 | 95.4 | 96.5 | 95.8 | 88.2 |

* 상동 아미노산/전체 아미노산*100의 평균값

② 분석 결과 인플루엔자 바이러스의 polymerase 유전자의 경우 상동성에서의 차이가 크지 않았으나 (PB2: 95.3% vs 96.5%; PB1: 95.3% vs 97.0%; PA: 94.3 vs 95.4%), NP, M, NS 등 많은 T cell epitope을 포함하는 유전자에서는 차이가 나타남 (NP: 92.5% vs 96.5%; M 86.6% vs 95.8%; NS 73.5% vs 88.2%).

③ 고병원성이 인플루엔자의 내부 유전자는 현재 재조합 backbone으로 사용하는 PR8 바이러스와 많은 차이를 보이며 이는 위의 연구 결과에 따라 세포성 면역뿐 아니라 체액성 면역의 유도를 효과적으로 이끌지 못할 것으로 예측됨.

④ 추가적으로 위에서 확인된 T cell epitope 및 linear epitope에서의 PR8과 고병원성 인플루엔자 바이러스의 차이를 비교하였을 때, 아래의 표와 같이 PR8의 epitope과 차이가 보이는 epitope들이 발견되었으며 이 차이에 의하여 PR8을 backbone으로 한 고병원성 인플루엔자 바이러스 백신은 internal 단백질에 의한 면역 유도가 효과적으로 일어나지 않을 것으로 예측됨 (표 14, 15).

표 14. 고병원성 인플루엔자 바이러스의 internal gene내 T cell epitope 아미노산 서열 차이












| T cell epitope | PR8 | 고병원성 인플루엔자 바이러스 |
|-------------------------|-----------------|--|
| PB1 ₇₀₃₋₇₁₁ | SSYRRPVGI |  |
| PB1-F ₂₆₂₋₇₀ | LSLRNPILV |  |
| PA ₂₂₄₋₂₃₃ | SSLENFRAYV |  |
| NP ₃₆₆₋₃₇₄ | ASNENMETM |  |
| NP ₃₁₁₋₃₂₅ | QVYSLIRPNENPAHK |  |
| NP ₂₆₁₋₂₇₅ | RSALILRGSVAHKSC |  |
| M1 ₁₂₈₋₁₃₅ | MGLIYNRM |  |
| NS2 ₁₁₄₋₁₂₁ | RTFSFQLI |  |

표 15. 고병원성 인플루엔자 바이러스의 NP linear epitope 분석

| Linear epitope | PR8 | 고병원성 인플루엔자 바이러스 |
|-----------------------|--------------|--|
| NP ₃₄₇₋₃₅₈ | IKGTKVLPRGKL |  |
| NP ₃₆₅₋₃₇₆ | IASNENMETMES |  |
| NP ₄₆₇₋₄₇₈ | SDEKAASPIVPS |  |

⑤ 즉 기존의 방식대로 재조합 백신의 backbone 바이러스로 PR8 바이러스를 온전히 사용하는 것은 백신의 효과를 반감시키며 항원성이 다른 바이러스가 출현하였을 때 효과적으로 방어할 수 없을 것으로 예측됨. 그리하여 증식성 및 병원성 여부에 대한 확인이 진행된 후, 내부 유전자 역시 조류 인플루엔자 바이러스의 유전자로 일부 치환하는 작업을 통하여 체액성 면역뿐 아니라 숙주 감염 정도에 큰 영향을 미치는 세포성 면역에도 효과적으로 유도하는 백신이 생산 가능할 것으로 생각됨.

(다) 백신 바이러스의 교차 방어에 대한 내부 단백질의 역할

① PR8 바이러스 유전자에 A/chicken/Korea/KBNP-0028/2000 (0028) (H9N2) 바이러스의 NS 유전자를 재조합하여 마우스 병원성을 제거한 백신 후보 바이러스를 접종 후 교차 방어능을 비교하면, A/wild duck/Korea/SNU50-5/2009 (SNU50-5) (H5N1) 바이러스의 경우 낮은 농도의 백신 역가 (10^4 EID₅₀) 접종 시에는 방어가 되지 않는 것이 관찰된 반면, SNU50-5의 HA, NA 단백질을 가지며 내부 유전자를 PR8 바이러스와 동일화시킨 HN(50-5) 재조합 바이러스의 경우 10^4 EID₅₀의 백신 접종 시에도 마우스에서 전수 방어를 확인할 수 있었음. 이를 통하여 내부 유전자가 백신의 교차 방어에 중요하게 작용함을 확인할 수 있었음.

(라) 내부 단백질의 세포성 면역 유도

① Powell et al.에 따르면 마우스에서 A/X31 (H3N2) 바이러스를 이용하여 낮은 농도 (50 EID₅₀)로 백신 접종 6일 후, 10^6 - 10^4 EID₅₀ 역가의 PR8 바이러스를 접종하였을 때, 10^6 EID₅₀의 공격 접종 농도에서도 5마리 중 4마리가 체중 감소 후 회복됨을 확인하였음. 특히 10^4 EID₅₀로 PR8 바이러스를 공격접종 할 시에서는 체중 감소 없이 바이러스 방어가 되는 것을 확인함 (Powell et al., 2007).

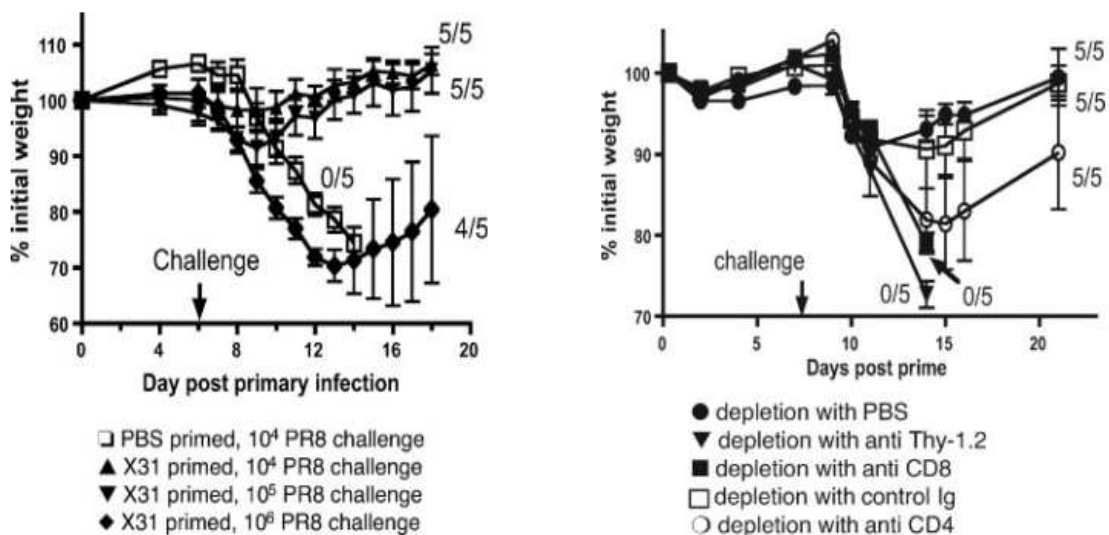


그림 17. A/X31 (H3N2) 바이러스의 PR8 교차방어능 평가

② A/X31 (H3N2) 바이러스로 면역 후 항체 형성기간보다 짧은 6일 후 PR8 바이러스를 공격접종 하였다는 점과 anti-CD8 또는 anti-CD4를 마우스에 접종함으로써 세포성 면역을 억제하였을 때 교차 방어가 되지 않는 점을 확인하였을 때, 체액성 면역으로 형성된 항체에 의한 바이러스의 방어보다 T cell이 관여하는 세포성 면역이 다른 아형의 인플루엔자 바이러스에 대한 방어능 향상에 기여했음을 확인할 수 있음 (Powell *et al.*, 2007)

③ PR8 바이러스를 5 PFU/mouse, A/X31 (H3N2) 바이러스를 3×10^5 PFU/mouse로 각각의 마우스 그룹에 백신 접종을 하고, 백신 접종 42일 후 A/California/04/2009 (CA/E3/09) (H1N1) 바이러스를 3×10^3 PFU/mouse 접종한 결과, 마우스의 폐사를 막을 정도의 방어가 관찰됨 (Guo *et al.*, 2011).

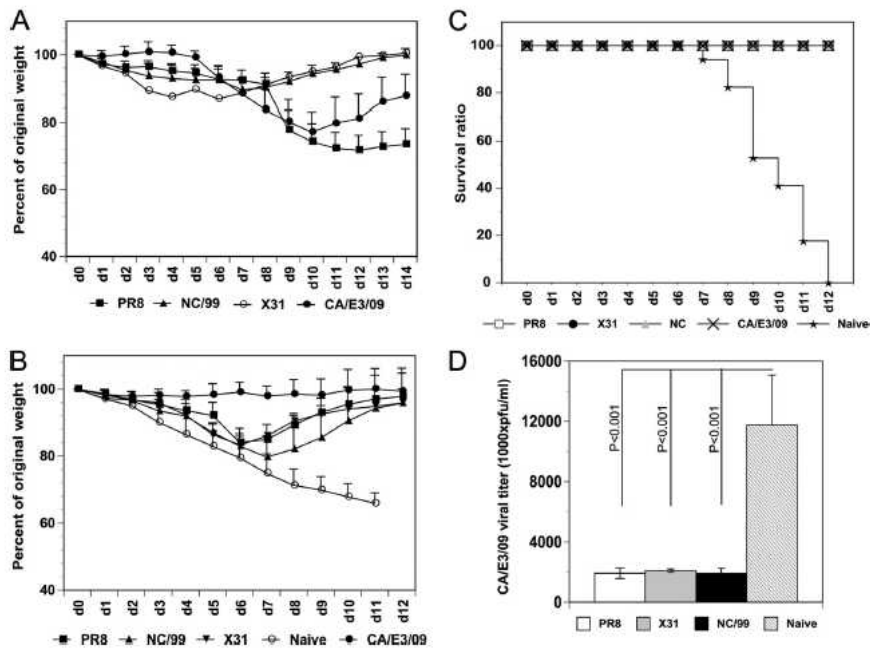


그림 18. A/E3/09 바이러스에 대한 교차 방어능

④ PR8, A/X31 바이러스로 백신 접종 후 충분한 시간 (42일) 동안 항체 형성 및 면역을 유도한 후 2009 신종플루 바이러스를 공격접종 하였지만, Powell의 실험만큼 마우스에서의 체중감소를 막을 정도의 완전한 방어가 나타나지는 않음.

⑤ 위의 사실들을 종합하였을 때, 백신과 다른 아형 (subtype)의 인플루엔자 바이러스에 대한 방어능을 향상시키기 위해서는 인플루엔자 바이러스의 내부 유전자가 중요하게 작용함. 특히 내부 유전자에 존재하는 T cell epitope과 반응하는 세포성 면역이 인플루엔자 방어기전에 중요하게 작용함을 확인할 수 있음.

⑥ 다음의 가설을 증명하기 위하여 Powell과 Guo가 사용하였던 A/X31 (H3N2), CA/E3/09 (H1N1)와 SNU50-5 (H5N1) 바이러스의 내부 유전자를 PR8의 내부 유전자와 비교함.

⑦ A/X31 바이러스는 H3N2 바이러스이며 PR8과 유사한 내부 유전자를 가지고 있음. 이와 비교하여 SNU50-5, CA/E3/09 바이러스의 경우 PR8 바이러스와 비교 시 내부 유전자에서 많은 차이가 나타남을 확인할 수 있었음 (표 16). 이를 통하여 바이러스의 아형의 차이가 보임에도 불구하고 내부 유전자가 유사할 경우 공격 집중하는 바이러스에 대한 상당히 높은 수준의 방어능을 보이는 것을 확인할 수 있었으며, 반대로 백신 집중하는 바이러스의 아형이 동일하더라도 내부 유전자의 차이가 있을 경우 그 방어능이 제한된다는 것을 확인할 수 있었음.

표 16. PR8 바이러스 대비 내부 유전자에서의 아미노산 차이

| | SNU50-5 | A/X31 | CA/E3/09 |
|---------|-----------------|-------|----------------|
| PB2 | 23 ¹ | 3 | 34 |
| PB1 | 22 | 2 | 37 |
| PB1-F2 | 37 | 0 | - ² |
| PA | 27 | 1 | 29 |
| NP | 27 | 2 | 42 |
| M1 | 7 | 1 | 13 |
| M2 | 14 | 0 | 14 |
| NS1 | 74 | 1 | 38 |
| NS2/NEP | 30 | 0 | 15 |

¹ PR8 대비 차이나는 아미노산 개수

² Pandemic 2009 H1N1은 PB1-F2를 coding하지 않음

⑧ 현재까지 많이 알려져 있는 T cell epitope에 대한 바이러스 간 차이를 확인한 결과 아미노산 차이와 마찬가지로 높은 방어능을 보이는 A/X31 바이러스의 경우 PR8과 모두 일치하는 것이 확인되었으며, SNU50-5, CA/E3/09 바이러스에서는 일부 에피토프에서 차이를 나타냄 (표 17). 즉 내부 유전자의 유사성 및 T cell epitope의 유사성이 특정 백신 바이러스의 교차 방어능에 관여하며 백신의 항체로 인해 유도되는 체액성 면역뿐 아니라 T cell에 의해 유도되는 세포성 면역 또한 백신의 방어율에 큰 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었음.

표 17. T cell epitope 에서의 아미노산 차이

| | A/X31 | PR8 | SNU50-5 | CA/E3/09 | Reference |
|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| PB1 ₇₀₃₋₇₁₁ | SSYRRPVGI | SSYRRPVGI | SSYRRPVGI | SSYRRPVGI | Chen et al., 2001 |
| PB1-F2 ₆₂₋₇₀ | LSLRNPILV | LSLRNPILV | LFLKNPTQG | _1 | Chen et al., 2001 |
| PA ₂₂₄₋₂₃₃ | SSLENFRAYV | SSLENFRAYV | SSLENFRAYV | PSLENFRAYV | Belz et al., 2000 |
| NP ₃₆₆₋₃₇₄ | ASNENMETM | ASNENMETM | ASNENMETM | ASNENVETM | Townsend et al., 1984 |
| NP ₃₁₁₋₃₂₅ | QVYSLIRPNE NPAHK | QVYSLIRPNE NPAHK | QVFSLIRPNE NPAHK | QVVSMLRPNE NPAHK | Crowe et al., 2006 |
| NP ₂₆₁₋₂₇₅ | RSALILRGSV AHKSC | RSALILRGSV AHKSC | RSALILRGSV AHKSC | RSALILRGSVA HKSC | Crowe et al., 2006 |
| M1 ₁₂₈₋₁₃₅ | MGLIYNRM | MGLIYNRM | MGLIYNRM | MGLIYNRM | Chen et al., 2001 |
| NS2 ₁₁₄₋₁₂₁ | RTFSFQLI | RTFSFQLI | RTFSFQLI | RAFSFQLI | Chen et al., 2001 |

¹ PB1-F2를 coding하지 않음

(마) 내부1 단백질의 체액성 면역 유도

① 인플루엔자 바이러스의 내부1 단백질 중 특히 NP 단백질의 경우 NP에 특이적인 항체 형성을 유도할 수 있음. 그러나 이러한 항체는 바이러스 자체를 중화시키지 못하기에 (non-neutralizing Ab) 주목받지 못했음. 하지만 최근 연구에 따르면 이런 anti-NP mAbs 에 의하여 면역 유도에 중요하게 작용하는 dendritic cell의 성숙, Th1 사이토카인 형성의 촉진, anti-influenza CD8+ CTL 반응을 유도하는 등의 인플루엔자 바이러스 면역에 중요한 역할을 하는 점이 새롭게 밝혀지고 있음 (Zheng *et al.*, 2007). 또한 H3N2 인플루엔자 바이러스를 감염시킨 마우스의 혈청을 이용한 수동 면역을 통하여 서로 다른 아형인 H1N1 바이러스를 방어한 연구 결과를 보면, 이 혈청은 H1, N1, M2e 등의 바이러스 표면 단백질을 중화시키는 능력이 없음을 보았을 때 다른 내부 단백질에 의한 항체 역시 바이러스를 방어할 수 있으며 이 항체들이 교차 방어에 중요하게 작용함을 시사하고 있음 (Rangel-Moreno *et al.*, 2008). 즉 내부 단백질에 의해 유도되는 세포성 면역 외에 내부 단백질, 특히 NP 단백질에 의하여 유도되는 체액성 면역 역시 인플루엔자 바이러스의 효과적인 방어에 필수적임을 확인할 수 있음.

② SNU50-5와 HN(50-5) 바이러스 간 백신에 대한 방어능 차이를 확인하기 위하여 linear epitope prediction tool (IEDB analysis resource)을 통한 선행연구로 확보된 NP의 B cell epitope을 조사하였을 때 SNU50-5와 PR8 바이러스의 linear epitope 서열에 많은 차이가 있음을 확인할 수 있었음 (표 18).

표 18. SNU50-5와 PR8 바이러스 간 NP linear epitope

| Linear epitope | PR8 | SNU50-5(H5N1) |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|
| NP ₃₄₇₋₃₅₈ | IKGTKVLP RG KL | IRGTRV V PRGQL |
| NP ₃₆₅₋₃₇₆ | IASNENMETMES | IASNENMETM DS |
| NP ₄₆₇₋₄₇₈ | SDEKAASPIVPS | SDEKA TN PIVPS |

③ 이런 내부 단백질의 차이에 따라 발생하는 T cell epitope, B cell epitope에서의 차이, 그로 인해 유도되는 세포성 면역, 체액성 면역의 차이에 의하여 SNU50-5, HN(50-5) 바이러스의 백신 바이러스에 대한 방어능 차이에 기여했음을 예측할 수 있음.

2. 유니버설 백신주 제작 및 방어효능 평가

가. PR8 virus를 이용한 백신 후보 바이러스의 제작

- (1) 최근까지도 전 세계적으로 유행하고 있는 고병원성 H5N8 바이러스 (Clade 2.3.4.4)는 항원성 측면에서 기존의 고병원성 인플루엔자 바이러스와 차이를 보이며 현재 중국에서 사용되고 있는 고병원성 인플루엔자 바이러스 백신에 의한 방어 역시 효과적이지 않음이 확인됨 (Sun *et al.*, 2016). 그리하여 서로 다른 항원성의 바이러스에 대하여도 방어능을 가지는 인플루엔자 백신 바이러스의 생산을 계획함.
- (2) 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 경우 백신 바이러스의 생산 및 평가에 대한 시설적, 제도적 제약이 많으므로 사람 인플루엔자 재조합 백신 합성 시 많이 쓰이는 백신주인 A/Puerto rico/8/34 (PR8) (H1N1) 바이러스를 이용한 백신 후보 바이러스의 생산을 계획하여 그 효과를 확인 후 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스 백신 생산에 적용할 계획을 수립함.
- (3) 우선 인플루엔자의 주된 항원성을 나타내는 HA 유전자 중, 비교적 보존된 구조를 가지는 HA2 단백질의 stalk region에 대한 면역원성을 높이기 위한 전략을 수립. 항원 결정기 부위의 항체 결합을 방해하는 stalk region 특정 부위의 N-glycosylation site를 제거함으로써 백신 바이러스의 교차 방어 효과를 유도함 (Ekiert *et al.*, 2009).
- (4) 바이러스 표면 단백질 대부분을 차지하는 HA, NA 단백질 중 NA 단백질의 stalk region에는 다수의 N-glycosylation site가 존재하며 이는 HA stalk region에 결합하는 항체의 접근성을 제한할 것으로 예상됨. 그리하여 NA 단백질 stalk region의 N-glycosylation site를 제거한 NA 유전자를 확보함.

(5) M2 extracellular domain (M2e) 단백질은 인플루엔자 바이러스 표면에 존재하며 이온 채널의 기능을 함. M2e 단백질은 거의 모든 인플루엔자 바이러스에서 비슷한 구조를 가지며 HA, NA 단백질 같은 면역 우성 (immunodominant) 단백질은 아니지만 숙주의 체액성 면역을 이끌어낼 수 있음이 알려져 있음 (Neiryneck *et al.*, 1999). M2e domain의 말단 부위에 존재하는 N-glycosylation site는 HA 단백질의 stalk region에서와 마찬가지로 항체의 접근성을 제한할 것으로 예상됨에 따라 N-glycosylation site를 제거함으로써 M2e에 대한 더 높은 체액성 면역 유도과 함께 백신 바이러스의 교차 방어 효과를 유도함.

(6) 위의 3가지 전략을 통하여 더 높은 체액성 면역을 유도하며 다양한 아형의 인플루엔자 바이러스에 대한 방어능을 가진 백신 바이러스 후보주를 생산한 후 그 바이러스의 안전성 및 방어능을 측정함으로써 백신 바이러스의 효과를 확인함 (표 19).

표 19. GKL 백신 후보주 바이러스의 gene segment 조성

| | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS |
|-----|-----|-----|-----|------------------------------|-----|------|------------------------------|------|
| GKL | PR8 | PR8 | PR8 | PR8 (HA2의 N-glycan 제거) | PR8 | kNAs | PR8 (M2e의 N-glycan 제거) | 0028 |

나. 조류 인플루엔자 바이러스 내부 유전자의 백신 바이러스 증식성

(1) 현재의 재조합 백신 바이러스의 제작 시스템은 백신주의 내부 유전자에 면역 우성적 (immunodominant)인 HA, NA 유전자를 원하는 바이러스로 치환하는 방식으로 하고 있음. 이를 통하여 충분한 체액성 면역을 유도할 수는 있으나, 내부 유전자에 주로 존재하는 T-cell epitope에 대한 세포성 면역 유도는 부족할 수 있음.

(2) 특히 NP, M 단백질에 존재하는 T cell epitope의 경우 많은 세대동안 거의 변형되지 않은 상태로 유지되고 있음이 확인됨 (Thomas *et al.*, 2006). 즉 NP, M 단백질을 조류 유래의 바이러스 유전자로 치환한 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스 백신이 생산된다면 체액성 면역 뿐 아니라 NP, M 단백질에 의하여 효과적으로 세포성 면역을 유도해 고병원성 인플루엔자 바이러스의 제거, 바이러스에 의한 폐사를 줄일 수 있을 것으로 기대됨.

(3) 하지만 중국 유래의 고병원성 조류 인플루엔자인 Re-1, Re-4, Re-5, Re-6등 재조합 백신 바이러스의 경우 backbone으로 사용하는 내부 유전자는 모두 PR8 바이러스 유래로 이런 세포성 면역을 기대할 수 없을 것이라 추측됨 (Qiao *et al.*, 2006; Chen and Bu, 2009).

(4) 조류 유래의 NP, M 유전자를 이용한 바이러스를 생산하여 그 증식성을 비교하는 실험을 통하여 조류 유래 NP, M 유전자의 백신 바이러스 적용에 대한 고찰을 진행함.

다. 조류 유래 NP 유전자 재조합 바이러스의 증식성 비교

(1) A/chicken/Korea/01310/2001 (01310) (H9N2), A/Korea/KBNP-0028/2000 (0028) (H9N2), A/wild duck/Korea/SNU50-5/2009 (SNU50-5) (H5N1) 바이러스의 NP 유전자를 이용한 PR8 재조합 바이러스를 합성한 후 바이러스의 역가를 각각 TCID₅₀, EID₅₀를 통하여 측정함.

(2) rPR8-NP(0028), rPR8-NP(SNU50-5)의 경우 대조군 바이러스인 rPR8에 비하여 계태아에서의 증식성은 감소하였으나, rPR8-NP(01310)의 경우 계태아에서의 증식성에 영향을 미치지 않음을 확인함 (표 20).

표 20. NP 재조합 바이러스의 계태아 증식성 비교

| | Recombinant virus | Log ₁₀ (EID ₅₀ /ml) |
|---|-------------------|---|
| 1 | rPR8 | 8.75±0.08 |
| 2 | rPR8-NP(0028) | 8.29±0.37 |
| 3 | rPR8-NP(01310) | 8.7±0.28 |
| 4 | rPR8-NP(SNU50-5) | 7.9±0.14 |

(3) 하지만 조류 유래의 NP 유전자를 치환한 경우, 내부 유전자를 모두 PR8의 유전자로 가지고 있는 경우보다 MDCK cell line에서의 증식성이 억제되는 것으로 확인됨 (표 21).

표 21. NP 재조합 바이러스의 MDCK 세포에서의 증식성 비교

| | Recombinant virus | Log ₁₀ (TCID ₅₀ /ml) |
|---|-------------------|--|
| 1 | rPR8 | 6.67±0.06 |
| 2 | rPR8-NP(0028) | 4.83±0.06 |
| 3 | rPR8-NP(01310) | 5.41±0.12 |
| 4 | rPR8-NP(SNU50-5) | 4.08±0.12 |

라. 조류 유래 M 유전자 재조합 바이러스의 증식성 비교

(1) 01310, 0028, SNU50-5의 matrix 유전자를 이용한 PR8 재조합 바이러스를 합성한 후 바이러스의 역가를 각각 TCID₅₀, EID₅₀를 통하여 측정함.

(2) 조류 바이러스 유래의 Matrix 유전자의 경우 재조합 바이러스로 합성하였을 때 계태아에서의 증식성뿐만 아니라 MDCK cell line에서의 증식성에 영향을 미치지 않음을 확인함 (표 22, 23).

표 22. Matrix 재조합 바이러스의 계태아 증식성 비교

| | Recombinant virus | Log ₁₀ (EID ₅₀ /ml) |
|---|-------------------|---|
| 1 | rPR8 | 8.75±0.08 |
| 2 | rPR8-M(0028) | 8.77±0.25 |
| 3 | rPR8-M(01310) | 8.97±0.19 |
| 4 | rPR8-M(SNU50-5) | 8.98±0.08 |

표 23. Matrix 재조합 바이러스의 MDCK 세포에서의 증식성 비교

| | Recombinant virus | Log ₁₀ (TCID ₅₀ /ml) |
|---|-------------------|--|
| 1 | rPR8 | 5.92±0.21 |
| 2 | rPR8-M(0028) | 5.67±0.12 |
| 3 | rPR8-M(01310) | 5.25±0.31 |
| 4 | rPR8-M(SNU50-5) | 5.54±0.06 |

(3) 위의 실험 결과를 통하여 특정 조류 인플루엔자 바이러스의 NP, M 유전자는 PR8 바이러스를 backbone으로 한 재조합 바이러스 합성 시 바이러스 계태아에서의 증식성에 크게 영향을 미치지 않을 것으로 기대되며, 이는 향후 고병원성 인플루엔자 백신 생산 시 활용할 수 있을 것으로 생각됨.

마. 백신 후보 바이러스의 안전성 평가

(1) 마우스 실험 적용을 위한 live-attenuated vaccine으로의 활용을 위하여 마우스에서의 병원성을 없애며 면역원성은 유지시키는 0028의 NS 유전자를 삽입한 백신 바이러스를 제작함 (Kim *et al.*, 2015).

(2) 백신 후보주 바이러스의 마우스 안전성을 평가하기 위하여, 6주령 암컷 Balb/C 마우스를 마취 후, 백신 바이러스를 10⁶, 10⁴ EID₅₀의 농도로 비강으로 접종하여 2주간 폐사율과 체중을 측정함. 마우스 체중이 접종 전 무게의 30% 이상 감소하였을 때 안락사를 진행하였음.

(3) 양성 대조군 PR8 바이러스의 경우 접종 후 5일째에 마우스 전수 폐사가 관찰되었으며, PBS를 접종한 음성 대조군의 경우 체중의 감소, 폐사가 관찰되지 않았음. 백신 후보주 바이러스 (GKL)의 경우 10⁶ EID₅₀ 접종 시 유의적인 체중의 감소 또는 폐사가 관찰되지 않았음 (그림 19).

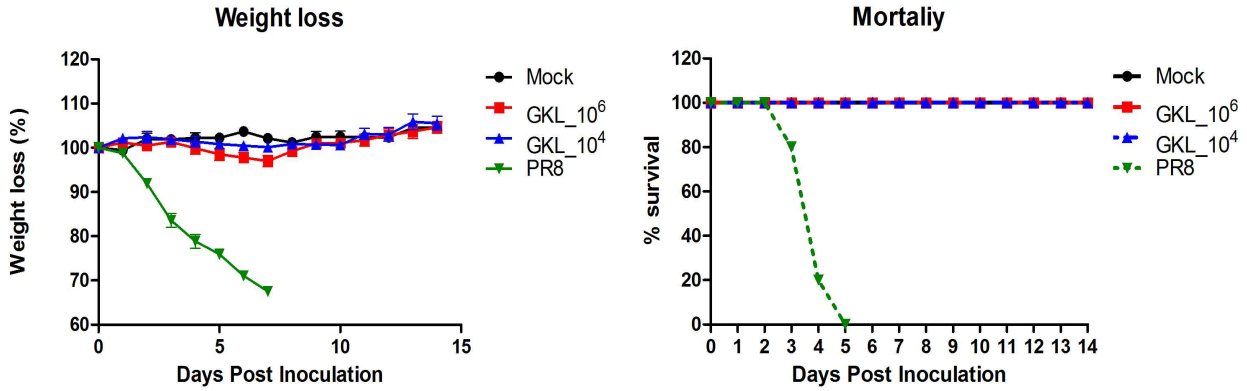


그림 19. 백신 후보주 바이러스 (GKL)를 접종한 Balb/C 마우스에서의 병원성 비교

(4) 이를 통하여 백신 후보주 바이러스는 live-attenuated vaccine으로 사용하여도 숙주에서 병원성을 나타내지 않음을 확인함. 또한 0028바이러스의 NS 유전자를 인플루엔자 바이러스에 도입하면 포유류에서의 병원성이 없는 live-attenuated vaccine의 생산이 가능함을 확인함.

바. 백신 후보 바이러스의 접종 농도에 따른 PR8 및 SNU50-5 바이러스에 대한 방어능 평가

(1) 백신 후보주 바이러스의 방어능 평가 및 교차 방어능 평가를 위하여 백신 후보주 바이러스 접종 2주 후 PR8 바이러스와 마우스에서 전수 폐사를 일으킬 정도로 높은 병원성이 확인된 SNU50-5 바이러스를 각각 10^6 EID₅₀ 접종함으로써 백신 후보주 바이러스의 방어능을 평가함. 마우스의 경우 접종 전 무게의 30% 이상 감소하였을 때 안락사를 진행함.

(2) PR8 바이러스는 마우스에서 고병원성을 나타내는 바이러스로 PBS를 접종한 음성대조군에서는 접종 후 5일 만에 마우스에서 전수 폐사가 관찰됨. 반면 GKL 백신주를 접종한 경우 상대적으로 낮은 역가인 10^4 EID₅₀로 접종하더라도 마우스에서 체중변화 없이 PR8 바이러스를 방어할 수 있음을 확인함 (그림 20).

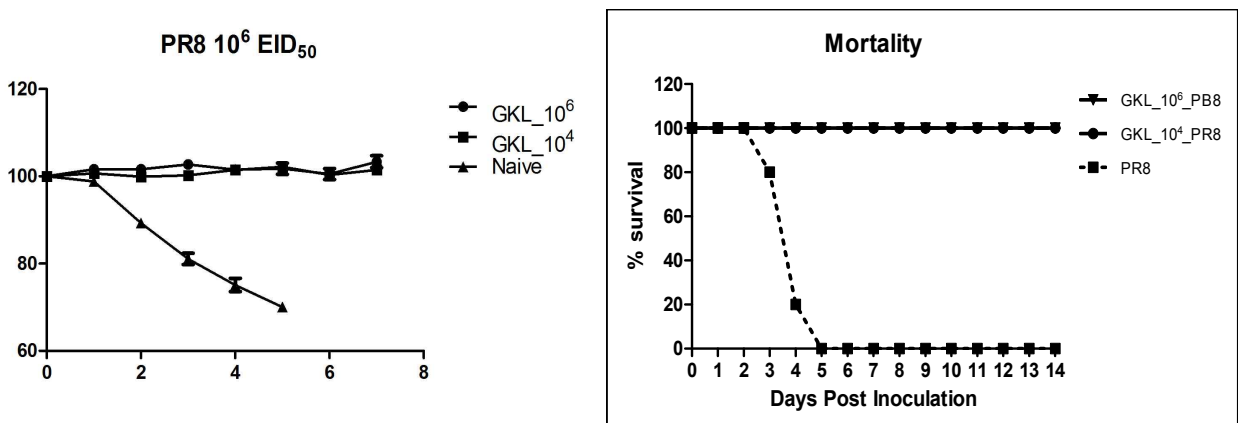


그림 20. 백신 후보주 바이러스 (GKL) PR8 바이러스에 대한 방어능

(3) SNU50-5 바이러스는 마우스 고병원성이 확인된 바이러스로 백신을 하지 않은 그룹에서 60%의 마우스 폐사가 관찰됨. 하지만 GKL 바이러스를 10^6 EID₅₀로 면역한 개체에 대해서는 SNU50-5 바이러스에서 7일 동안 유의적인 체중변화 없이 폐사가 관찰되지 않음. GKL 바이러스를 10^4 EID₅₀로 면역한 개체에 SNU50-5 바이러스를 공격접종을 한 경우 체중 감소와 함께 80% 폐사를 확인함 (그림 21).

(4) 즉, GKL 바이러스는 비교적 낮은 농도인 10^4 EID₅₀의 역가로 백신 접종을 하였을 때도 PR8 바이러스에 대해서 높은 방어능을 가짐. SNU50-5 바이러스에 대해서는 10^4 EID₅₀의 낮은 역가로 백신 접종 시에는 방어능을 확인하는 것이 어려웠으나, 10^6 EID₅₀의 역가로 충분히 면역하였을 경우 체중 변화 없이 완벽하게 방어하는 것을 확인함.

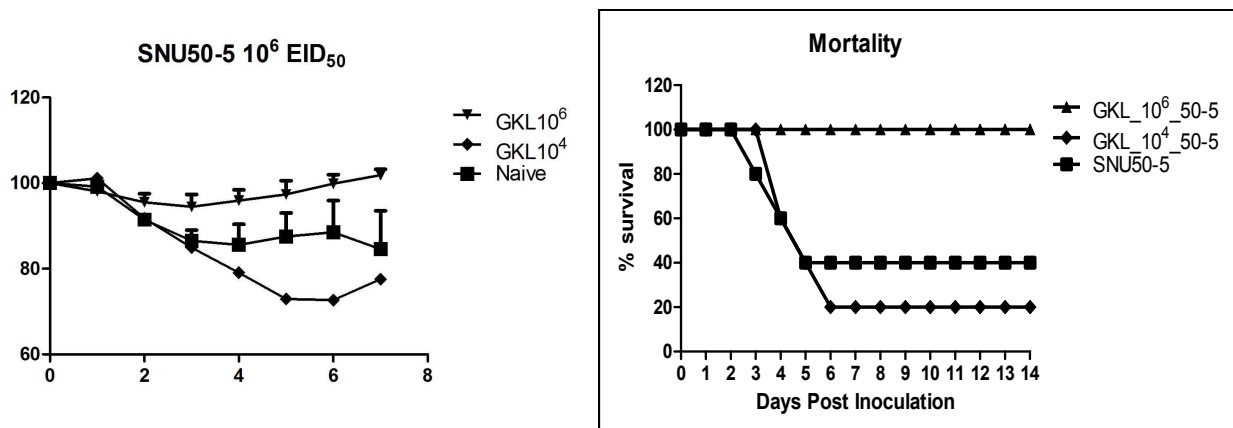


그림 21. 백신 후보주 바이러스 (GKL)의 SNU(50-5) 바이러스에 대한 방어능

(5) 인플루엔자 바이러스의 서로 다른 아형에 대한 교차면역은 보통 인플루엔자 바이러스의 감염을 막기보단 인플루엔자 바이러스의 감염 후 감염정도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있음 (Anker *et al.*,1978; Flynn *et al.*,1998; Liang *et al.*,1994; Nguyen *et al.*,1999; O'Neill *et al.*, 2000). 하지만 GKL 백신주 (H1N1)를 접종했을 때 유의적인 체중감소 없이 내부 유전자 및 아형이 완전히 다른 인플루엔자 바이러스 (H5N1)를 방어한 이번 실험 결과를 보면, HA 공통 에피통 노출 및 M2e N-glycan 제거에 따른 공통 에피통에 대한 항체 형성 증가가 백신 바이러스와 아형이 다른 인플루엔자 바이러스에 대한 방어능에 영향을 미쳤을 것이라 예측됨.

사. 백신 후보 바이러스 접종 농도에 따른 PR8 및 HN(50-5)에서의 방어능 평가

(1) 백신 바이러스의 내부 유전자에 의한 방어능을 비교하기 위하여 SNU50-5 바이러스의 HA와 NA 유전자를 가지고 PR8의 내부 유전자를 가지는 HN(50-5) 바이러스를 합성함. 또한 PR8 바이러스에 NS 유전자만 0028 바이러스의 NS 유전자로 치환한 NS0028 바이러스를 합성함. 이 두 재조합 바이러스와 GKL 바이러스의 백신주로서의 효과를 비교함 (표 24).

표 24. 실험에 사용되는 바이러스의 gene segment 조성

| | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS |
|----------|---------|---------|-----|------------------------------|-----|------|------------------------------|------|
| GKL | PR8 | PR8 | PR8 | PR8 (HA2의 N-glycan 제거) | PR8 | kNAs | PR8 (M2e의 N-glycan 제거) | 0028 |
| NS0028 | PR8 | PR8 | PR8 | PR8 | PR8 | PR8 | PR8 | 0028 |
| HN(50-5) | SNU50-5 | SNU50-5 | PR8 | PR8 | PR8 | PR8 | PR8 | PR8 |

(2) 6주령 암컷 Balb/C 마우스를 마취한 후 10^4 , 10^6 EID₅₀의 역가로 백신후보주 (GKL, NS0028)를 각각 50ul씩 비강으로 접종 한 후, 2주간 체중 변화 및 폐사 여부를 관찰함. 2주 후 각각의 그룹에 PR8, HN(50-5) 바이러스를 10^4 , 10^6 EID₅₀의 역가로 50ul씩 비강으로 공격 접종함. 공격접종 후 2주간 체중의 변화 및 폐사를 관찰함. 마우스는 접종 전 무게의 30% 이상 감소 시 안락사를 진행함.

(3) PR8을 공격접종 하였을 때, 백신을 하지 않은 음성대조군에서는 전수 폐사가 관찰되었음. GKL, NS0028 백신 후보주로 백신을 한 그룹에서는 모든 농도에서 유의적인 체중 변화 없이 성공적으로 바이러스를 방어함을 확인할 수 있었음 (그림 22, 23).

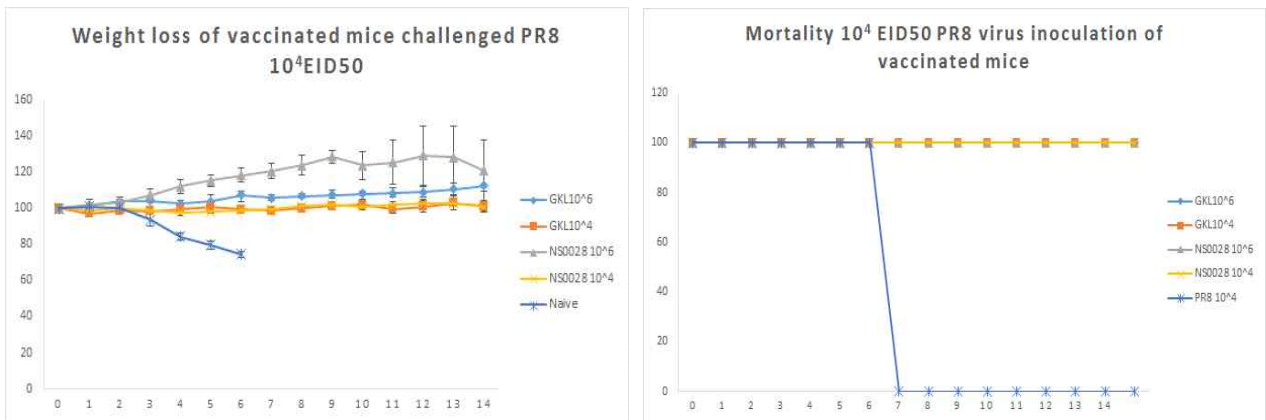


그림 22. PR8 10^4 EID₅₀ 공격접종 후 방어능 평가

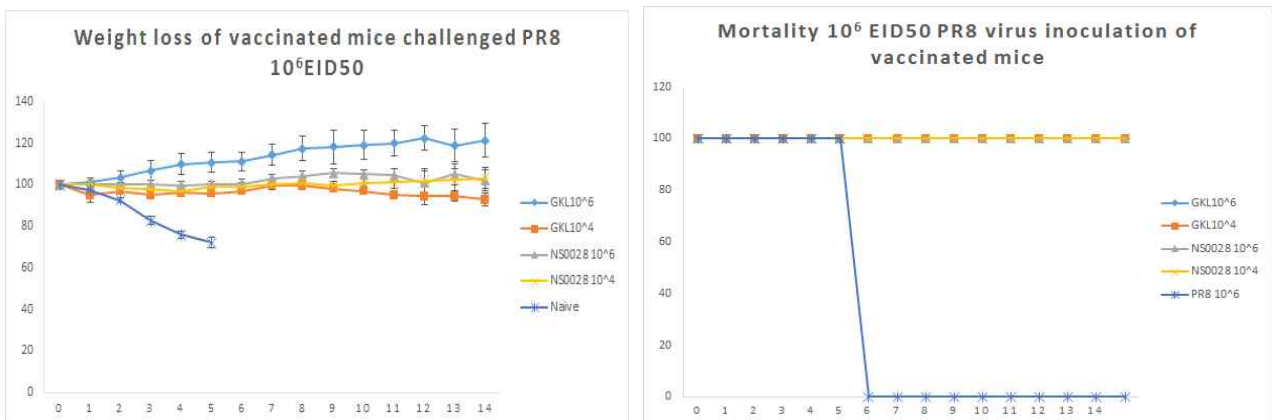


그림 23. PR8 10^6 EID₅₀ 공격접종 후 방어능 평가

(4) HN(50-5) 바이러스를 10^4 EID₅₀로 공격접종 하였을 때는 GKL, NS0028 백신 후보주 모두 마우스에서 유의적인 체중 감소 없이 바이러스가 방어됨을 확인함. 백신을 하지 않은 음성 대조군에서는 마우스 체중이 80%까지 감소한 후 회복됨을 확인함.. HN(50-5) 바이러스를 10^6 EID₅₀로 공격접종 한 경우, GKL, NS0028 백신 후보주를 10^6 EID₅₀로 백신접종을 한 경우 마우스에서 유의적인 체중 감소 없이 방어되는 것이 관찰되었으나, 10^4 EID₅₀로 백신접종을 한 경우 체중감소 후 회복되는 경향을 보임. 백신 접종을 하지 않은 음성대조군은 공격접종 6일째에 전수 폐사함 (그림 24, 25).

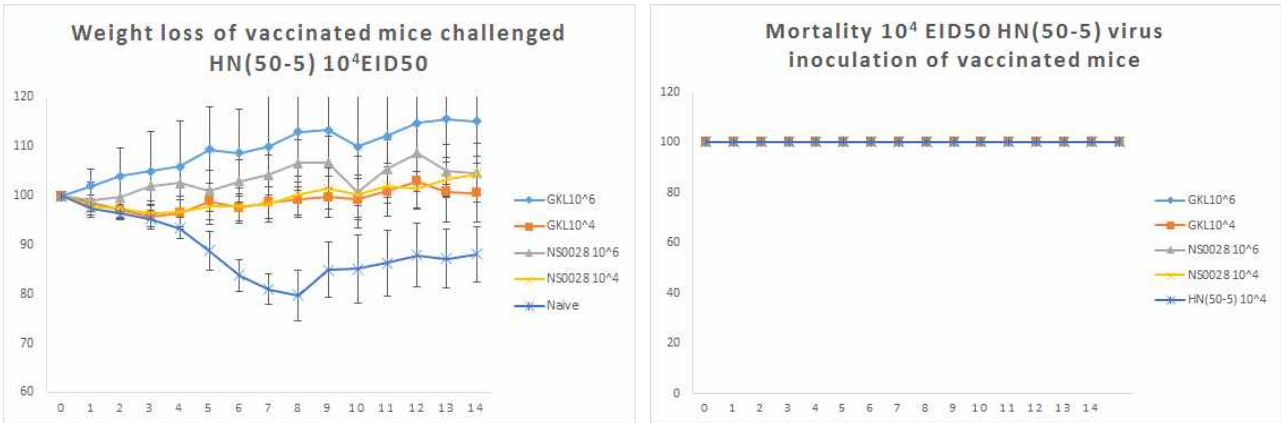


그림 24. HN(50-5) 10^4 EID₅₀ 공격 접종 후 방어능 평가

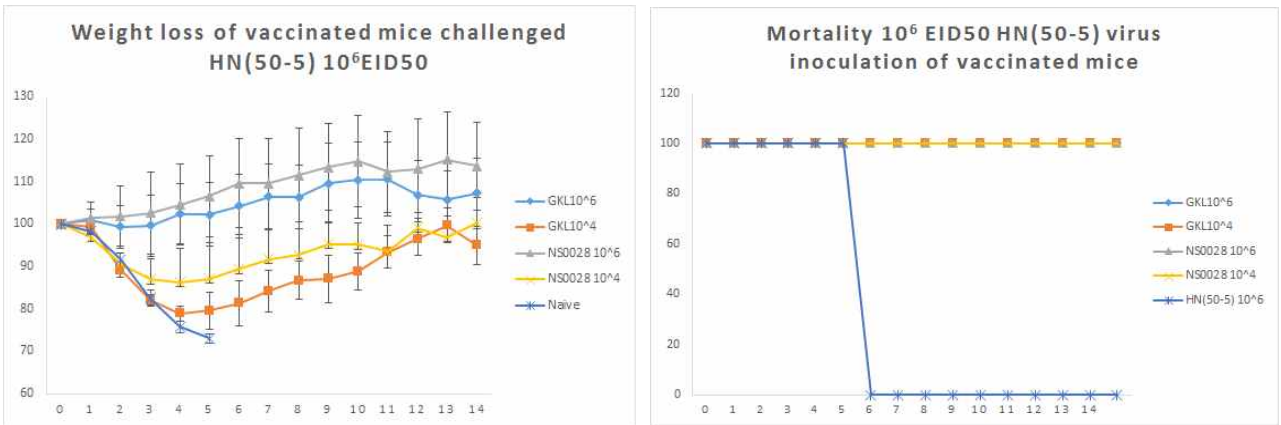


그림 25. HN(50-5) 10^6 EID₅₀ 공격 접종 후 방어능 평가

(5) 백신 후보주와 아형이 같은 PR8 바이러스의 경우 상대적으로 낮은 농도에서도 완벽하게 공격 접종한 바이러스의 병원성을 방어하는 것이 확인되었으며, 다른 아형의 HN(50-5) 바이러스의 경우 PR8 바이러스 대비 백신의 효과는 조금 떨어졌지만 마우스의 병원성을 감소시킬 수 있는 것이 확인됨.

(6) GKL 백신 후보주는 내부 유전자가 PR8의 유전자로 치환된 HN(50-5) 바이러스를 SNU50-5에 비하여 상대적으로 잘 방어할 수 있는 것을 확인됨. 즉 동일한 내부 유전자를 보유하였을 때 같은 아형의 인플루엔자 바이러스에 대해 더 높은 방어능을 기대할 수 있음을 확인함.

(7) 내부 유전자를 같게 만든 후 백신 후보주의 방어능을 평가한 결과, 위에서 언급한 HA, M2e 단백질의 N-glycan 제거에 따른 다른 아형의 인플루엔자 바이러스에 대한 방어능 향상을 완벽히 예측하기는 어려움. 그러나 HN(50-5) 바이러스의 공격접종에 실험에서 유의미한 체중 변화 없이 공격접종 한 바이러스를 방어하는 현상을 통하여 백신 후보주의 항체 형성 역시 백신 바이러스의 방어능에 영향을 미쳤을 것이라 예측됨.

아. 국내 분리 H5N1형 HPAI를 이용한 백신 후보주 제작

(1) PR8 바이러스의 polymerase gene을 저병원성 조류인플루엔자 01310, 0028의 polymerase 로 치환 할 경우 마우스에서의 증식성 및 병원성의 변화가 일어나는 것을 확인함 (Kim et al., 2014).

(2) PR8 바이러스의 NS 유전자를 저병원성 조류인플루엔자 0028의 NS 유전자로 치환할 경우 마우스에서의 증식성 및 병원성의 변화가 일어나는 것을 확인함 (Kim et al., 2015).

(3) 마우스에서 병원성을 나타내는 H5N1 LPAIV SNU50-5의 HA 유전자와 NA 유전자를 가지는 재조합 바이러스의 PB2 유전자와 NS 유전자를 각각 01310 PB2와 0028 NS로 치환한 재조합 바이러스의 경우 마우스에서의 병원성과 증식성이 감소하며, H5N1 LPAIV와 H5N1 HPAIV에 대한 방어능을 확인함 (Kim et al., 2015).

(4) 2010년 국내에서 분리된 H5N1 HPAIV인 A/mandarin duck/Korea/K10-483/2010 (K10-483) 바이러스의 HA와 NA 유전자를 이용한 PR8-derived recombinant virus를 제작하고, 01310 PB2 와 0028 NS 유전자가 치환된 재조합 바이러스와 비교하여, 해당 유전자의 효과를 확인하고 백신으로서의 가능성을 평가함.

(가) 고병원성 조류인플루엔자의 병원성을 없애기 위해 K10-483 HA gene의 cleavage site (-RERRRKR-)을 저병원성 조류인플루엔자 0028의 cleavage site (-ASGR-)로 치환함. 내부 유전자는 포유류에서 병원성의 감소를 나타내는 01310, 0028의 PB2 유전자를 치환한 재조합 바이러스를 각각 제작함.

(나) 백신접종을 한 개체와 야외 감염이 된 개체를 구별하기 위한 새로운 재조합 백신이 요구됨 (DIVA vaccine). K10-483의 NA 유전자 대신 01310의 NA를 이용한 재조합 바이러스를 제작함.

(다) 상기의 조합에 GKL 백신 후보주의 결과를 보완한 유니버설 백신을 제작하고 (표 25), 백신으로서의 가능성을 평가함.

표 25 실험에 사용되는 바이러스의 gene segment 조성

| | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS |
|-----------------|-------|-----|-----|------------------------|-----|-------|------------|-----|
| rH5N2-GM(01310) | 01310 | PR8 | PR8 | K10-483/ASGR /154N- | PR8 | 01310 | PR8 /Av | PR8 |
| rH5N2-GM(0028) | 0028 | PR8 | PR8 | K10-483/ASGR /154N- | PR8 | 01310 | PR8 /Av | PR8 |

(5) 재조합 바이러스를 10일령 특정병원체 부재 (SPF) 종란 및 CEK에 접종하여, 계태아 및 세포에서의 증식성을 측정함. 증식성 확인 결과 rH5N2-GM(01310)의 경우 계태아와 CEK에서 rPR8과 유사한 증식성을 나타내었으나, rH5N2-GM(0028)의 경우 계태아에서의 증식성이 감소하는 것으로 나타남 (표26).

표 26. 백신 후보주 증식성 평가

| | Recombinant virus | HAU | EID ₅₀ /ml (log ₁₀) | TCID ₅₀ /ml (CEK; log ₁₀) |
|---|-------------------|-----|--|--|
| 1 | rPR8 | nt | 8.75 | > 8.5 |
| 2 | rH5N2-GM(01310) | 256 | 8.78 | > 8.5 |
| 3 | rH5N2-GM(0028) | 256 | 8.20 | nt |

(5) 백신 후보주 바이러스를 BEI로 불활화 한 다음 ISA70과 3:7의 비율로 혼합하여 오일에 멸균 백신을 만듦. 제작된 백신을 3주령 특정병원체 부재 (SPF) 닭에 접종하고, 백신 접종 2주, 3주 후 채혈하여 HI test를 통해 항체형성 여부를 확인함. 그 결과 백신 접종 후 2주 후 256, 3주 후 2048 이상의 항체역가를 보임 (표 27). 따라서 백신 후보주를 접종 시 충분한 면역을 나타내는 것을 확인 함.

표 27 백신 후보주 항원성 평가

| 실험동물 | 접종경로 | 백신조성 | 동물수 | 항체역가 (log ₂) | |
|----------------|------|---------|-----|--------------------------|------|
| | | | | 2주 | 3주 |
| SPF 닭 (3주령) | 근육 | 3:7 1ml | 6 | 8 | 11.3 |

(6) 지금까지의 실험 결과를 토대로 포유류에 병원성을 나타내지 않으며, 증식성이 높고, 높은 면역원성을 나타내는 백신 후보주 (rH5N2-GM(310))을 선별하고, 제 1세부 과제에서 백신 효능을 평가함.

3. 국내 백신 조성 최적화

가. 백신 조성에 따른 최적의 방법을 찾기 위하여 백신 후보주를 BEI로 불활화 시킴. 백신 접종을 위해 SPF 닭을 4그룹으로 나누어 그룹1은 불활화 바이러스 (whole inactivated vaccine; WIV) 1ml, 그룹2는 불활화 바이러스 0.5ml, 그룹3은 ISA 70과 3:7의 비율로 혼합한 오일에멸전 백신 1ml, 그룹4는 PBS 1ml을 각각 가슴 근육에 접종함. 백신 접종 후 6일, 10일에 각각의 그룹으로부터 채혈을 한 다음, HI test를 통해 항체역가를 측정함.

나. 백신 접종 6일 후, 불활화 백신 1ml을 접종한 그룹을 제외한 다른 그룹에서는 항체형성이 확인 되지 않았음 (그룹2 1수에서 2의 항체역가를 나타냄). 그룹1의 경우 모든 개체에서 항체가 형성된 것을 확인하였으나, 모두 4이하로 매우 낮은 역가를 나타냄 (표 28).

다. 백신 접종 10일 후, 음성대조군을 제외한 모든 그룹에서 항체형성이 확인 됨. 오일에멸전 백신을 한 그룹3이 가장 높은 항체 역가 (8.2)를 나타내었고, 이어서 그룹1 (6.3), 그룹2 (3.5)의 순서대로 나타냄 (표 28).

표 28. 백신 조성에 따른 항원성 평가

| 실험동물 | 접종경로 | 백신조성 | 동물수 | HI 항체역가 (log2) | | |
|----------------|------|----------------------|-----|----------------|-------|-------|
| | | | | 6일 후 | 10일 후 | 14일 후 |
| SPF 닭 (3주령) | 근육 | WIV ^a 1ml | 6 | 1.60 | 6.33 | 6.50 |
| | | WIV 0.5ml | 6 | 0.17 | 3.50 | 3.67 |
| | | 3:7 1ml | 6 | 0 | 8.20 | 9.83 |
| | | PBS | 5 | 0 | 0 | 0 |
| 오리 (1일령) | 근육 | WIV 0.5ml | 6 | 0 | 0 | 0 |
| | | 3:7 0.5ml | 6 | 0 | 0 | 1.2 |
| | | PBS | 5 | 0 | 0 | 0 |
| 오리 (2주령) | 근육 | WIV 1ml | 6 | - | - | 3 |
| | | 3:7 1ml | 6 | - | - | 5 |
| | | PBS | 5 | 0 | 0 | 0 |

^a Whole inactivated vaccine

라. 위 결과를 볼 때, 백신 접종 초기에는 불활화 백신을 바로 접종한 계군에서만 항체 형성이 확인되지만, 시간이 지남에 따라 오일에멸전 백신을 한 계군에서 더 높은 역가로 항체가 형성되는 것을 나타냄. 불활화 백신 접종 시 접종 초기에 항체 형성이 확인되지만, 백신 접종 시간이 경과할수록 오일에멸전 백신에 비해 낮은 항체 형성 역가를 확인함.

4. 국내 백신 용법 용량 최적화

가. 오일백신 (3:7)의 경우 백신3 및 백신5의 경우 조기에 높은 항체 역가를 나타냈으며 오랫동안 높은 혈구응집억제 항체를 유지하여 항원바이러스 역가 ($10^{9.0}$ EID₅₀/ml이상, 불활화 후 256HAU 이상)와 면역원성과의 관계가 재확인됨.

표 29. 백신 용법 용량에 따른 항원성 평가

| 실험동물 | 백신조성 접종경로 | 백신 시점 | 백신 | HI 항체역가 (log2) | | | | | | | | |
|-------|--------------|----------|-----|----------------|-----|------|------|------|------|------|------|---------|
| | | | | 2주 | 3주 | 4주 | 5주 | 6주 | 7주 | 8주 | 9주 | 10 주 |
| SPF 닭 | 3:7 근육 | 3주 | 백신2 | 4.3 | 8.3 | 9.7 | 10.0 | 10.7 | 9.0 | 9.0 | 8.0 | 7.0 |
| | | | 백신3 | 7.7 | 9.7 | 10.3 | 11.0 | 11.0 | 10.0 | 10.0 | 9.3 | 9.0 |
| | | | 백신4 | 4.0 | 7.7 | 10.3 | 11.0 | 10.7 | 9.3 | 8.3 | 7.7 | 7.0 |
| | | | 백신5 | 7.7 | 9.7 | 11.0 | 11.0 | 11.3 | 10.7 | 10.7 | 10.0 | 9.0 |

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

[제 1세부과제]

- 주변국 HPAI 발생상황 및 백신 도입여부 사례조사가 완료되었는가?
 - 주변국 HPAI 발생상황 및 백신 도입여부 사례조사가 완료함
- 백신 도입으로 인한 HPAI 발생상황 변화 사례조사 (2개국 이상) 및 위험요소 제시되었는가?
 - 백신 도입으로 인한 HPAI 발생상황 변화 사례조사 (중국, 베트남, 인도네시아, 이집트) 완료함.
- 국내외 백신 3종에 대해 닭에서 H5N1 및 H5N8 바이러스에 대한 방어효능이 평가되었는가?
 - 국외 백신 4종에 대한 H5N8에 대한 방어효능 평가 완료함
 - 국내 백신 2종에 대한 H5N8에 대한 방어효능 평가 완료 및 데이터 정리 중
- 국내외 백신 3종에 대해 오리에서 H5N1 및 H5N8 바이러스에 대한 방어효능이 평가되었는가?
 - 오리의 경우 종란 수급 및 부화율 저조로 지체되어 현재 진행 중
- HPAI 백신도입의 타당성 분석이 완료되어 결론이 도출되었는가?
 - HPAI 백신도입의 타당성 분석 완료함
- 연구성과의 정책적 연계 방안이 제시되었는가?
 - 연구성과의 정책적 연계 방안 제시함

[제 2세부과제]

- 국내외 백신주의 성능 비교가 완료 되었는가?
 - 유전자 분석 완료
 - 해외 유행 HPAI 바이러스 유전자형 (clade) 조사 완료함
 - 백신주 유전자 특성 비교 분석 완료함
 - 국내외 백신주의 성능 비교 완료
 - 백신주 특성 비교: 증식성 (국내 백신주는 국외백신주와 동등 이상), 포유류 병원성 (국외 백신주는 PR8 내부유전자를 보유하고 있어 마우스 병원성 있으나 국내 백신주는 병원성 없음), 항원성 (국외 백신주의 경우 PR8 내부유전자를 사용하므로 야외주와 heterosubtypic protection에 관련된 항원성에는 차이가 있으며 국내 백신주 개발 시 이런 단점을 보완하기 위한 후보 유전자 확보함)

○ 국내 백신 조성 최적화 실험이 완료 되었는가?

Adjuvant 종류 및 항원량 설정: 불활화 후 HAU 256 이상의 WIV 접종 권고

동물실험: 데이터 정리 중

○ 국내 백신 용법 용량 최적화 시험이 완료 되었는가?

특정 병원체 부재 (SPF) 닭 및 오리에서의 백신 효능 평가: 3주령 SPF 닭에서 오일백신 접종하는 경우 ($10^{9.0}$ EID₅₀/ml이상, 불활화 후 256 HAU 이상) 장기간 높은 항체역가 관찰 됨.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 활용방안

가. 국내 HPAI 백신 도입 타당성 분석 결과: 현장적용을 위한 정책부서, 실행부서, 산업계 관계자, 현장전문가 협의체를 구성하여 실행 계획 도출에 활용하며 타당성이 없는 경우 효과적인 백신 및 용법·용량 개발과 개선된 차단방역 기술 및 시스템 개발을 위한 기초 자료로 활용

나. 국외 HPAI 백신 개발 기술 및 국내 개발 HPAI 백신 제작기술의 검증 결과: 유니버설 백신 개발에 활용할 수 있을 것으로 기대되며 효과적인 백신주 개발을 위한 방향성을 제시한 것으로 평가

2. 기대성과

가. 기술적 측면

- (1) HPAI 예방용 백신 후보주 확보
- (2) 효과적인 HPAI 예방용 백신 제작기술 확보
- (3) H5 HPAI 백신 평가 방법 확립

나. 경제·산업적 측면

- (1) 백신정책의 타당성 및 출구전략 수립을 위한 가이드라인 제시
- (2) 유니버설 백신 제작을 위한 기초기술 확보로 다양한 인플루엔자 백신 개발에 활용할 수 있어 동물약품산업 발전에 기여
- (3) HPAI 사후 처리 비용대비 백신 및 추적관리 비용이 낮은 경우 국가 재정에 기여
- (4) 가금산업 기반 안정화 및 백신 제품 생산 기반 구축 및 경험 축적

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 중국에서는 바이러스의 변이와 유행주의 유전자적 특성에 따라 시기별로 다른 종류의 백신이 이용됨.
 - 가. 2004년도: H5N1과 동일한 아형 (subtype)에 속하는 저병원성 H5 A/Turkey/England/1973 (H5N2) 바이러스의 사용
 - 나. 2004 ~ 2008년도: 역유전학 기술 (reverse genetic, RG)을 이용한 유전자재조합 바이러스인 RE-1, A/goose/Guangdong/1/1996 (H5N1), clade 0 lineage virus
 - 다. 2006 ~ 2007년도: RE-4, an rgA/chicken/Shanxi/2006 (H5N1), clade 7 lineage virus
 - 라. 2008년 이후: RE-5, a rgA/duck/Anhui/1/2006 (H5N1), clade 2.3.4 lineage virus
 - 마. 2012년 이후: RE-6, a rgA/duck/Guangdong/S1322/2010 (H5N1), clade 2.3.2 lineage virus
2. 역유전학 기법을 이용한 불활화 백신 외에 가금류에서 상업용으로 등록되어 있는 생 바이러스 벡터를 이용한 주요 유전자재조합 생독백신은 다음과 같음.
 - 가. Trovac-AI H5 (fowlpox vector) Merial
 - 나. Volvac (fowlpox vector) Boehringer Ingelheim
 - 다. Fowlpox vector-AI H5 not used Harbin Institute China
 - 라. NDV-AI H5 Avimex
 - 마. NDV-AI H5 Harbin Institute China
 - 바. Vectormune HVT-AI CEVA
3. Powell et al.에 따르면 마우스에서 A/X31 (H3N2) 바이러스를 이용하여 낮은 농도(50 EID_{50})로 백신 접종 6일 후, 10^6 - 10^4 EID_{50} 역가의 PR8바이러스를 접종하였을 때, 10^6 EID_{50} 의 공격 접종 농도에서도 5마리 중 4마리가 체중 감소 후 회복됨을 확인하였음. 특히 10^4 EID_{50} 로 PR8 바이러스를 공격접종 할 시에서는 체중 감소 없이 바이러스 방어가 되는 것을 확인함 (Powell *et al.*, 2007).
4. A/X31 (H3N2) 바이러스로 면역 후 항체 형성기간보다 짧은 6일 후 PR8 바이러스를 공격 접종 하였다는 점과 anti-CD8 또는 anti-CD4를 마우스에 접종함으로써 세포성 면역을 억제 하였을 때 교차 방어가 되지 않는 점을 확인하였을 때, 체액성 면역으로 형성된 항체에 의한 바이러스의 방어보다 T cell이 관여하는 세포성 면역이 다른 아형의 인플루엔자 바이러스에 대한 방어능 향상에 기여했음을 확인할 수 있음 (Powell *et al.*, 2007)

5. PR8 바이러스를 5 PFU/mouse, A/X31 (H3N2) 바이러스를 3×10^5 PFU/mouse로 각각의 마우스 그룹에 백신 접종을 하고, 백신 접종 42일 후 A/California/04/2009 (CA/E3/09) (H1N1) 바이러스를 3×10^3 PFU/mouse 접종한 결과, 마우스의 폐사를 막을 정도의 방어가 관찰됨 (Guo *et al.*, 2011).

6. 인플루엔자 바이러스의 서로 다른 아형에 대한 교차면역은 보통 인플루엔자 바이러스의 감염을 막기보단 인플루엔자 바이러스의 감염 후 감염정도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있음 (Anker *et al.*,1978; Flynn *et al.*,1998; Liang *et al.*,1994; Nguyen *at al.*,1999; O'Neill *et al.*, 2000).

제 7 장 연구시설·장비 현황 (해당 사항 없음)

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

1. 연구실 안전 관리 계획

가. 위험인자 분석

- (1) 화학 분야 : 사용 시약의 특성별 위험요소 확인 및 안전표지 부착
- (2) 생물 분야 : 병원균 미생물 및 바이러스 등 인체 유해물질 확인 및 안전표지 부착
- (3) 기타 분야 : 전기, 기계, 환기, 폐기물 등 연구실내 위험, 유해인자 확인 및 개선

나. 안전 교육

- (1) 자체교육 : 월 1회 연구실 자체 안전교육 실시 (위험물질 취급 및 폐기요령, 보호구 착용 등)
- (2) 정기교육 : 연 1회, 교내 생물안전교육 참석(연구과제 참여자 전원)

다. 안전점검

- (1) 일일점검 : 매일 연구실책임자 및 연구실종사자가 실시 및 기록
- (2) 정기점검 : 연구실안전팀에서 년 2회 측정장비 등을 이용하여 연구실내 불안전사항 점검 실시
- (3) 특별점검 : 연구실 안전사고 발생시 점검을 실시하여 문제점 개선 및 재발방지 계획 수립

2. 추가 이행 계획

- 가. 실험종사자 건강검진 실시
- 나. 실험실 공기질 관리, 환기
- 다. 유기용매 별도 보관
- 라. 실험실 환경안전지침 게시
- 마. 안전보호장비 시설 보완

제 9 장 참고문헌

1. **Damian C. Ekiert, Gira Bhabha, Marc-Andre Elsliger, Robert H. E. Friesen, Mandy Jongeneelen, Mark Throsby, Jaap Goudsmit, and Ian A. Wilson, 2009, Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope, Science, 324 (5924); 246-251.**
2. **Sabine Neirynek, Tom Deroo, Xavier Saelens, Peter Vanlandschoot Willy Min Jou, and Walter Fiers, 1999, A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein, Nature Medicine, 5; 1157-1163.**
3. **Il-HWAN Kim, Hyuk-Joon Kwon, Su-Hyung Lee, Dae-Yong Kim, and Jae-Hong Kim, 2015, Effects of different NS genes of avian influenza viruses and amino acid changes on pathogenicity of recombinant A/Puerto Rico/8/34 viruses, Veterinary Microbiology, 175 (1); 17-25.**
4. **W. J. J. Anker, A. K. Bakker, and N. Masurel, 1978, Cross-protection in mice after immunization with H2N2, H3N2, and Heq2Neq2 influenza virus strains, Infection and Immunity, 21 (1); 96-101.**
5. **Kirsten J. Flynn, Gabrielle T. Belz, John D. Altman, Rafi Ahmed, David L. Woodland, and Peter C. Doherty, 1998, Virus-specific CD8+ T cells in primary and secondary influenza pneumonia. Immunity, 8 (6); 683-691.**
6. **Shaohong Liang, Krystyna Mozdzanowska, Giuseppe palladino, and Walter Gerhard, 1994, Heterosubtypic immunity to influenza type A virus in mice: Effector mechanisms and their longevity, Journal of Immunology, 152; 1663-1661.**
7. **Huan H. Nguyen, Zina Moldoveanu, Miroslay J. Novak, Frederik W. van Ginkel, Elisabeth Ban, Hiroshi Kiyono, Jerry R. McGhee, and Jiri Mestecky, 1999. Heterosubtypic immunity to lethal influenza A virus infection is associated with virus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses induced in mucosa-associated tissues, Virology, 254 (1); 50-60.**
8. **Eduardo O'Neill, Scott L. Krauss, Janice M. Riberdy, Eobert G. Webster, and David L. Woodland, 2000, Heterologous protection against lethal A/HongKong/156/97 (H5N1) influenza virus infection in C57BL/6 mice. Journal of General Virology, 81; 2689-2696.**

9. **Timothy J. Powell, Tara Strutt, Joyce Reome, Joseph A. Hollenbaugh, Alan D. Roberts, David L. Woodland, Susan L. Swain, and Richard W. Dutton, 2007.** Priming with cold-adapted influenza A does not prevent infection but elicits long-lived protection against supralethal challenge with heterosubtypic virus, *Journal of Immunology*, 178 (2); 1030-1038.
10. **Hailong Guo, Felix Santiago, Kris Lambert, Toru Takimoto, and David J. Topham, 2011.** T cell-mediated protection against lethal 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection in a mouse model. *Journal of Virology*, 85 (1); 448-455.
11. **Weisan Chen, Jack R. Bennink, and Jonathan W. Yewdell, 2001.** Quantitating presentation of MHC class I-restricted antigens. *Methods in Molecular Biology*, 156; 245-254.
12. **Cabrielle T. Belz, Philip G. Stevenson, and Peter C. Doherty, 2000,** Contemporary analysis of MHC-related immunodominance hierarchies in the CD8+ T cell response to influenza A viruses, *Journal of Immunology*, 165 (5); 2404-2409.
13. **Sherry R. Crowe, Shannon C. Miller, and David L. Woodland, 2006,** Identification of protective and non-protective T cell epitopes in influenza, *Vaccine*, 24 (4); 452-456.
14. **Biao Zheng, Yongxin Zhang, Hongxia He, Ekaterina Marinova, Kirsten Switzer, Daniel Wansley, Innocent Mbawuike, and Shuhua Han, 2007,** Rectification of age-associated deficiency in cytotoxic T Cell response to influenza A virus by immunization with immune complexes, *Journal of Immunology*, 179 (9); 6153-6159.
15. **Javier Rangel-Moreno, Damian M. Carragher, Ravi S .Misra, Kim Kusser, Louise Hartson, Amy Moquin, Frances E. Lund, and Troy D. Randall, 2007,** B Cells promote resistance to heterosubtypic strains of influenza via multiple mechanisms, *Journal of Immunology*, 180 (1); 454-463.
16. **Youn-Jeong Lee, Hyun-Mi Kang, Eun-Kyoung Lee, Byung-Min Song, Jipseol Jeong, Yong-Kuk Kwon, Hye-Ryoung Kim, Kyu-Jun Lee, Mi-Seon Hong, Il Jang, Kang-Seuk Choi, Ji-Ye Kim, Hyun-Jeong Lee, Min-su Kang, Ok-Mi Jeong, Jong-Ho Baek, Yi-Seok Joo, Yong Ho Park, and Hee-Soo Lee, 2014,** Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses, South Korea, 2014, *Emerging Infectious Diseases*, 20 (6); 1087-1089.

17. **Paul G. Thomas, Racheal Keating, Diane J. Hulse-Post, and Peter C. Doherty**, 2006, Cell-mediated protection in influenza infection, *Emerging Infectious Diseases*, 12 (1); 48-54.
18. **Chuanling Qiao, Guobin Tian, Yongping Jiang, Yanbing Li, Jianzhong Shi, Kangzhen Yu, and Hualan Chen**, 2006, Vaccines developed for H5 highly pathogenic avian influenza in China, *Annals of the New York Academy Sciences*, 1081; 182-192.
19. **Hualan Chen, and Zhigao Bu**, 2009, Development and application of avian influenza vaccines in China. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 333; 153-162.
20. **Thanh Hoa Le, and Nga Thi Bich Nguyen**, 2014, Evolutionary dynamics of highly pathogenic avian influenza A/H5N1 HA clades and vaccine implementation in Vietnam, *Clinical and experimental vaccine research*, 3; 117-127.
21. **Chengjun Li, Zhigao Bu, and Hualan Chen**, 2014, Avian influenza vaccines against H5N1 'bird flu', *Trends in Biotechnology*, 32 (3); 147-156.
22. **Jeong-Ki Kim, Ghazi Kayali, David Walker, Heather L. Forrest, Ali H. Ellebedy, Yolanda S. Griffin, Adam Rubrum, Mahmoud M. Bahgat, M. A. Kutkat, M. A. A. Ali, Jerry R. Aldridge, Nicholas J. Negovetich, Scott, Krauss, Richard J. Webby, and Robert G. Webster**, 2010, Puzzling inefficiency of H5N1 influenza vaccines in Egyptian poultry, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (24); 11044-11049.
23. **Timothee Vergne, Vladimir Grosbois, Yilma Jobe, Ahmed Saad, Amira Abd El Nabi, Shereen Galal, Mohamed Kalifa, Soheir Abd El Kader, Gwenaelle Dauphin, Francois Roger, Juan Lubroth, and Marisa Peyre**, 2012, Avian influenza vaccination of poultry and passive case reporting, Egypt, *Emerging Infectious Diseases*, 18 (12); 2076-2078.
24. **David E. Swayne, David L. Suarez, Erica Spackman, Samadhan Jadhao, Gwenaelle Dauphin, Mia Kim-Torchetti, James McGrane, John Weaver, Peter Daniels, Frank Wong, Paul Selleck, Agus Wiyono, Risa Indriani, Tuni Yupiana, Elly Sawitri Siregar, Teguh Prejitno, Derek Smith, and Ron Fouchire**, 2015, Antibody titer has positive predictive value for vaccine protection against challenge with natural antigenic-drift variants of H5N1 high-pathogenicity avian influenza viruses from Indonesia, *Journal of Virology*, 89 (7); 3746-3762.

25. **Erica Spackman, and David E. Swayne**, 2013, Vaccination of gallinaceous poultry for H5N1 highly pathogenic avian influenza: Current questions and new technology, *Virus Research*, 178; 121-132.
26. **G. Kayalie, A. Kandeil, R. El-Shesheny, A. S. Kayed, M. R. Gomaa, M. A. kutkat, J. Debeauchamp, P. P. Mckenzie, R. G. Webster, R. J. Webby, and M. A. Ali**, 2013, Do commercial avian influenza H5 vaccines induce cross-reactive antibodies against contemporary H5N1 viruses in Egypt?, *Poultry Science*, 92; 114-118.
27. **Marisa Peyre, Hamid Samaha, Yilma Jobre Makonnen, Ahmed Saad, Amira Abd-Elnabi, Saber Galal, Toni Ettel, Gwenaelle Dauphin, Juan Lubroth, Francois Roger, and Joseph Domenech**, 2009, Avian influenza vaccination in Egypt: Limitation of the current strategy, *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 3 (2); 198-204.
28. **Tingsong Hu, Jianling Song, Wendong Zhang, Huanyun Zhao, Bofang Duan, Qingliang Liu, Wei Zeng, Wei Qiu, Gang Chen, Yinggou Zhang, Quanshui Fan, and Fuqiang Zhang**, 2015, Emergence of novel clade 2.3.4 influenza A (H5N1) virus subgroups in Yunnan Province, China, *Infection, Genetics and Evolution*, 33; 95-100.
29. **Y. H. Connie Leung, Geraldine Luk, Sin-Fun Sia, Yu-On Wu, Chuk-Kwan Ho, Kai-Chi Chow, Shing-Chun Tang, Yi Guan, and J. S. Malik Peiris**, 2013, Experimental challenge of chicken vaccinated with commercially available H5 vaccines reveals loss of protection to some highly pathogenic avian influenza H5N1 strains circulating in Hong Kong/China, *Vaccine*, 31; 3536-3542.
30. **Christian Grund, El-Sayed M Abdelwhab, Abdel-Satar Arafa, Mario Ziller, Mohamed K. Hassan, Mona M. Aly, Hafez M. Hafez, Timm C. Harder, and Martin Beer**, 2011, Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 from Egypt escapes vaccine-induced immunity but confers clinical protection against a heterologous clade 2.2.1 Egyptian isolate, *Vaccine*, 29; 5567-5573.
31. **Ra Mi Cha, Diane Smith, Eric Shepherd, C. Todd Davis, Ruben Donis, Tung Nguyen, Hoang Dang Nguyen, Hoa Thi Do, Ken Inui, David L. Suarez, David E. Swayne, and Mary Pantin-Jackwood**, 2013, Suboptimal protection against H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses from Vietnam in ducks vaccinated with commercial poultry vaccines, *Vaccine*, 31; 4953-4960.

32. **Vuong Nghia Bui, Haruko Ogawa, Dai Quang Trinh, Tham Hong Thi Nguyen, Nga Thi Pham, Duc Anh Truong, Anh Ngoc Bui, Jonathan Runstadler, Kunitoshi Imai, and Khong Viet Nguyen**, 2014, Genetic characterization of an H5N1 avian influenza virus from a vaccinated duck flock in Vietnam, *Virus genes*, 49; 278-285
33. **Tony Velkov, Chi Ong, Mark A. Baker, Hyunsuh Kim, Jian Li, Roger L. Nation, Johnny X. Huang, Matthew A. Cooper, Steve Rockman**, 2013, The antigenic architecture of the hemagglutinin of influenza H5N1 viruses, *Molecular immunology*, 56; 705-719
34. **M. Peiris, and H. L. Yen**, 2014, Animal and human influenzas, *Revue Scientifique et technique*, 33 (2); 539-553.
35. **David E. Swayne**, 2012, Impact of vaccines and vaccination on global control of avian influenza, *Avian Diseases*, 56; 818-828
36. **Mary J. Pantin-Jackwood, and David L. Suarez**, 2013, Vaccination of domestic ducks against H5N1 HPAI: A review, *Virus Research*, 178; 21-34
37. **David E. Swayne, Erica Spackman, and Mary J. Pantin-Jackwood**, 2014, Success factors for avian influenza vaccine use in poultry and potential impact at the wild bird-agricultural interface, *EcoHealth*, 11; 94-108
38. **Yu-na Lee, Min-Chul Kim, Young-Tae Lee, Yu-Jin Kim and Sang-Moo Kim**, 2015, Mechanisms of cross-protection by influenza virus M2-based vaccines, *Immune Network*, 15(5); 213-221

<첨부>

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

| | | | |
|---------|---------------------------------------|------|-------|
| 신청과제명 | 국내 HPAI 예방용 백신 도입 타당성 분석 및 효능평가 실증 연구 | | |
| 주관연구책임자 | 김 재 홍 | 주관기관 | 서울대학교 |

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

| 개발기술명 | 관련기술 최고보유국 | 현재 기술수준 | | 기술개발 목표수준 | 비고 |
|------------------|---------------|---------|-------|--------------|----|
| | | 우리나라 | 연구신청팀 | | |
| H5 HPAI 백신 생산 기술 | 중국 | 50 | 50 | 100 | |
| H5 HPAI 백신 평가 기술 | 호주 | 50 | 50 | 100 | |

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

| | |
|-------|------------------------------------|
| 대상국가 | 국내, 국외(미국, 일본, 유럽) |
| 특허 DB | 특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), google |
| 검색기간 | 무제한 |
| 검색범위 | 제목 및 초록 |

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

| 개발기술명 | | H5 HPAI 백신 생산 기술 | H5 HPAI 백신 평가 기술 |
|---------------|------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| Keyword | | H5N1, HPAI, vaccine production | H5N1, HPAI, vaccine evaluation |
| 검색건수 | | 50 | 0 |
| 유효특허건수 | | 1 | 0 |
| 핵심특허 및 관련성 | 특허명 | 인플루엔자 바이러스의 생산을 위한 다중 플라스미드시스템 | - |
| | 보유국 | 미국 | - |
| | 등록년도 | 2012(국내) | - |
| | 관련성(%) | 100 | - |
| | 유사점 | PR8 재조합 백신주 | - |
| 차이점 | DIVA 안됨; 포유류 병원성 | - | |

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
- 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

| | |
|-------|---|
| 대상국가 | 미국, 일본, 유럽 |
| 논문 DB | Pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), google |
| 검색기간 | 무제한 |
| 검색범위 | 제목, 초록 및 키워드 |

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

| 개발기술명 | | H5 HPAI 백신 생산 기술 | H5 HPAI 백신 평가 기술 |
|---------------|------------|---|--|
| Keyword | | H5N1, H5N8, H5N2, & vaccine & production | H5N1, H5N8, H5N2, & vaccine & evaluation |
| 검색건수 | | 100 | 100 |
| 유효논문건수 | | 10 | 10 |
| 핵심논문 및 관련성 | 논문명 | Protective efficacy in chickens, geese and ducks of an H5N1-inactivated vaccine developed by reverse genetics | Efficacy of inactivated vaccines against H5N1 avian influenza infection in ducks |
| | 학술지명 | Virology | Virology |
| | 저자 | Tian G 등 | Middleton D 등 |
| | 게재년도 | 2005 | 2007 |
| | 관련성(%) | 100 | 100 |
| | 유사점 차이점 | PR8 기반의 H5N1 재조합 백신 DIVA 안됨; 포유류 병원성; 교차면역 | 3주령 Pekin duck 목 피하 단회접종 1일령-2주령 목 피하 2회접종 |

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
- 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

- 1) 국내 제품생산 및 시장 현황
 - 국내 HPAI 백신 제품생산 및 시장형성 전무
- 2) 국외 제품생산 및 시장 현황
 - 중국의 경우 2008년 120억 dose가 사용 되었는데 dose 당 가격을 알 수 없으나 오일백

신임을 고려하여 수당 한화 50원을 가정하면 6,000억원에 해당

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향 (제품의 특징, 대상 등)

- 최근 유행하는 바이러스를 항원으로 사용하며 닭과 오리 모두에 사용
- 고역가 항원을 사용하고, DIVA가 가능하며 교차방어가 가능한 백신주를 사용하는 경향

2) 산업화를 통한 기대효과

- HPAI 백신 오리 접종하는 경우 가정
 - 연간 1억2000만수를 수당 1차 25원/2차 50원 2회 백신 접종하는 경우 90억원
- HPAI 발생 직접피해액 2,641억원, 3차 산업피해액 3,701억원

(단위 : 백만원)

| 산업화 기준 항 목 | 1차년도 | 2차년도 | 3차년도 | 4차년도 | 5차년도 | 계 |
|---------------|------|------|---------|---------|---------|-----------|
| 직접 경제효과 | 0 | 0 | 9,000 | 9,000 | 9,000 | 27,000 |
| 경제적 과급효과 | 0 | 0 | 264,100 | 264,100 | 264,100 | 792,300 |
| 부가가치 창출액 | 0 | 0 | 370,100 | 370,100 | 370,100 | 1,110,300 |
| 합 계 | 0 | 0 | 643,200 | 643,200 | 643,200 | 1,929,600 |

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 과급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

- 본 과제는 신규한 특허를 출원하는 과제가 아님.

2) 논문분석 측면

- 기존 논문은 PR8 바이러스의 6개 유전자와 HPAI의 HA 및 NA를 사용하여 제작한 재조합 바이러스를 사용하여 생산한 백신을 평가한 것으로 PR8 바이러스가 갖는 포유류 병원성을 가지고 있으며 DIVA가 불가능하고, 교차방어 능력이 낮을 것으로 판단되므로, 본 연구과제에서는 이런 조건을 충족하는 신규한 백신주로 실험을 수행하여 백신 효능 평가 결과를 국제학술지에 투고할 계획임
- 기존 논문은 오리 백신 접종 시 3주령에 한 번 접종한 결과로 본 연구과제에서는 조기방어를 위해 1일령에 묶은 백신을 1차로 접종하여 항원 노출을 단기간에 이루고 2주령에 보강접종을 통해 항체 수준을 끌어올려 그 결과를 국제학술지에 투고할 계획임

3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 H5N1 HPAI 예방용 백신제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 본 연구과제에서는 국내 유행한 바이러스와 동일한 항원성을 갖고, 상기한 특징을 갖는 백신에 대한 효능 평가를 추진하여 백신 타당성이 있는 경우 H5N1 백신 제품을 생산하여 국내에 판매할 계획임

주 의

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