발 간 등 록 번 호
11-1543000-001478-01

오리의 고병원성 조류인플루엔자 및 살모넬라 백신 개발 최종보고서

2016. 10. 12.

주관연구기관 / 건국대학교 산학협력단
협동연구기관 / 농림축산검역본부

농림축산식품자료실
0025100

농 림 축 산 식 품 부

오리의 고병원성 조류인플루엔자 및 살모넬라 백신 개발 R&D Report

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “오리의 고병원성 조류인플루엔자 및 살모넬라 백신 개발”(개발기간 : 2013. 08. ~ 2016. 08.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016 . 10. 12.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) (인)
협동연구기관명 : 농림축산검역본부 (대표자) (인)
참여기관명 : 한국과학기술원 (대표자) (인)
참여기관명 : 메디안디노스틱 (대표자) (인)
참여기관명 : 코미팜 (대표자) (인)
참여기관명 : 씨티씨바이오 (대표자) (인)

주관연구책임자 : 송 창 선
협동연구책임자 : 강 민 수
참여기관책임자 : 김 유 천

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>313013-3</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>2015.08.26.~
2016.08.25</td><td>단 계 구 분</td><td>3/3</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>중 사 업 명</td><td colspan="4">가축질병기술개발사업</td></tr>
<tr><td>세부 사업명</td><td colspan="4">가축질병기술개발사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4">해당 없음</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">오리의 고병원성 조류인플루엔자 및 살모넬라 백신 개발</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">송 창 선</td><td>해당단계
참 여
연구원 수</td><td>총: 137명
내부: 137명
외부: 0명</td><td>해당단계
연 구 개 발 비</td><td>정부: 500,000천원
민간: 100,001천원
계: 600,001천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참 여
연구원 수</td><td>총: 137명
내부: 137명
외부: 0명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부:1,500,000천원
민간: 300,003천원
계: 1,800,003천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="3">건국대학교 산학협력단 - 수의과대학
농림축산검역본부 - 조류질병과</td><td colspan="2">참여기업명
메디안디노스틱
코미팜
씨티씨바이오</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="3">연구기관명:
한국과학기술원</td><td colspan="2">연구책임자:
김유천</td></tr>
<tr><td colspan="4">요약
역유전학 기법을 이용한 고병원성 조류인플루엔자 백신 개발함.
곤충세포 발현을 이용한 고병원성 조류인플루엔자 백신 개발함.
고병원성 조류인플루엔자 백신을 위한 DIVA ELISA 개발함.
오리 불활화 백신 면역원성 향상을 위한 어주번트를 개발함.
오리 불활화 백신 면역원성 향상을 위한 피내접종기를 개발함.
오리분리 살모넬라 티피뮤리움을 백신을 개발함.</td><td colspan="2">보고서 면수

130</td></tr>
</table>

< 국문 요약문 >

	D-01

연구의 목적 및 내용	[제1세부 목표: 오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 및 키트 개발, 오리용 식중독 유발 살모넬라 백신 개발] - 오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 항원 개발 - 오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 개발 및 효능평가 - 오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신의 시제품 제작 - 오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 시제품의 효능평가 및 산업화 - 오리용 고병원성 조류인플루엔자 백신/감염개체 혈청학적 감별(DIVA)키트 개발 - 오리용 식중독 유발 살모넬라 백신항원 개발 - 오리용 식중독 유발 살모넬라 백신개발 및 효능평가 - 오리용 식중독 유발 살모넬라 백신의 시제품 제작 - 오리용 식중독 유발 살모넬라 백신 시제품의 효능평가 및 산업화 [제2세부 목표: 오리용 백신 어쥬번트 개발 및 백신전달방법 개선] - 불활화 바이러스 항원의 면역원성을 증가시킬 수 있는 오리용 백신 어쥬번트 개발 - 불활화 세균 항원의 면역원성을 증가시킬 수 있는 오리용 백신 어쥬번트 개발 - 오리에서 백신의 면역원성을 증가시킬 수 있는 백신전달 방법 개선 - 개선된 오리용 백신 어쥬번트 및 전달방법의 효과기전 연구 [제1협동 목표: 국내 오리농장유래 식중독유발 살모넬라 모니터링 및 특성분석] - 국내 오리농장유래 식중독유발 살모넬라 모니터링 - 국내 오리농장유래 식중독유발 살모넬라 특성분석 - 살모넬라 최신 분리주를 사용한 오리용 살모넬라백신 효능평가
연구개발성과	- 역유전학 기법을 이용한 고병원성 조류인플루엔자 백신 개발함. - 곤충세포 발현을 이용한 고병원성 조류인플루엔자 백신 개발함. - 고병원성 조류인플루엔자 백신을 위한 DIVA ELISA 개발함. - 오리 불활화 백신 면역원성 향상을 위한 어주번트를 개발함. - 오리 불활화 백신 면역원성 향상을 위한 피내접종기를 개발함. - 오리분리 살모넬라 티피뮤리움을 백신을 개발함.
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	- 오리용 고병원성 조류인플루엔자 백신 개발을 통한 국내 가금용 긴급방역 백신의 확보 - 참여기업과의 공동 연구를 통한 오리용 고병원성 조류인플루엔자 백신의 산업화 및 해외(국가별 H5N1형 HPAI 유행상황: 중국 clade2.3.2, 파키스탄 clade 2.3.2, 인도네시아 clade 2.1, 2.3.2, 베트남 clade1, 2.3.2) 에서의 판매를 통한 국내기업의 경쟁력 확보 - 오리에서 불활화 바이러스 및 세균 항원의 면역원성을 증가시킬 수 있는 신규 어쥬번트의 특허등록 및 산업화를 통한 가금백신 산업에서의 광범위한 상업적 활용 - 오리에서 백신효능을 증가시킬 수 있는 백신전달방법 연구를 통한 학술적 자료 확보 - 개발된 오리용 식중독 유발 살모넬라 백신의 산업화 및 오리농장 적용을 통한 경제적 가치 창출 - 오리농장에의 살모넬라 백신적용 및 오리육 유래 식중독 발생위험 최소화를 통한 안전한 식품생산에 기여

중심어 (5개 이내)	오리	고병원성 조류인플루엔자	살모넬라	백신	면역증강제

〈 SUMMARY 〉

	D-02

Purpose & Contents	[Goal of the first division : Development of highly pathogenic avian influenza(HPAI) differential(DIVA) vaccine and diagnosis kit for duck use] - Development of HPAI differential(DIVA) vaccine antigens for duck use - Development and efficacy evaluation of HPAI differential(DIVA) vaccine for duck - Prototype production of HPAI differential(DIVA) vaccine for duck use - Efficacy evaluation and industrialization of prototype HPAI differential(DIVA) vaccine for duck use - Development of serological HPAI vaccinated/infected objects differentiation (DIVA) kit for duck use - Vaccine antigen development of food poisoning Salmonella for duck use - Development and efficacy evaluation of food poisoning Salmonella vaccine - Prototype production of food poisoning Salmonella vaccine for duck use - Efficacy evaluation and industrialization of prototype of food poisoning Salmonella vaccine for duck use [Goal of the second division : Development of vaccine adjuvant for duck use and improving vaccine delivery methods] - Development of vaccine adjuvant for ducks that can increase the immunogenicity of inactivated viral vaccine antigen - Development of vaccine adjuvant for ducks that can increase the immunogenicity of inactivated bacterial vaccine antigen - Improving vaccine delivery methods that can increase the immunogenicity - Effectiveness mechanism study of improved vaccine adjuvants and delivery methods for duck [Goal of the first collaborative : Monitoring and characterization of food poisoning Salmonella derived from domestic duck farms] - Monitoring of food poisoning Salmonella derived from domestic duck farms - Characterization of food poisoning Salmonella derived from domestic duck farms - Efficacy evaluation of Salmonella vaccine using the latest Salmonella isolates
Results	We developed HPAI vaccine using reverse genetics techniques - We developed HPAI vaccine using insect cell expression - We developed DIVA ELISA for HPAI vaccine - We developed vaccine adjuvant for enhancing the immunogenicity of inactivated HPAI vaccine for duck use - We developed intradermal inoculation device for enhancing the immunogenicity of inactivated HPAI vaccine for duck use - We developed Salmonella typhimurium vaccine originated from ducks
Expected Contribution	- Securing emergency vaccine for domestic poultry quarantine through the development of HPAI vaccines for duck use - industrialization of HPAI vaccines for duck use through the collaboration with participating companies and securing the competitiveness of domestic enterprises through the international sale (H5N1 HPAI type epidemic by country: China clade2.3.2, Pakistan clade 2.3.2, Indonesia clade 2.1, 2.3.2, Vietnam clade1, 2.3.2) - Patent registration of new adjuvants that can increase immunogenicity of inactivated viral and bacterial antigens in ducks and extensive commercial utilization through industrialization in poultry vaccine industry - Securing academical data through study of vaccine delivery methods that can increase vaccine efficacy in ducks - Creation of economic value through industrialization and application of food poisoning Salmonella vaccine for duck use - Contribution to safe food production through Salmonella vaccine application to the duck farms and minimizing risk of food poisoning caused by duck meat

Keywords	Duck	Highly Pathogenic Avian Influenza	Salmonella	Vaccine	Adjuvant

〈 Contents 〉

I. Overview fo research ····· 7
1. Objects of the project ····· 7
2. Background of the project ····· 7
3. Scope of the project ····· 12

II. Status of the technology development in Korea and foreign countries ··· 13
1. Market trends in Korea and other countries ····· 13
2. Research trends in Korea and other countries ····· 15
3. Current status of this project ····· 16

III. Contents and results ····· 18
1. Contents and results on 1st year ····· 18
2. Contents and results on 2nd year ····· 53
3. Contents and results on 3rd year ····· 89
4. Accomplishment of this project ····· 106

IV. Achievements and Contribution to related fields ····· 109
1. Achievements on research objective ····· 109
2. Impact on related fields ····· 112

V. Research output and plan for application of research output ····· 114

VI. Overseas technology information collected during the research ····· 116

VII. Security level of research output ····· 123

VIII. Status of the facility and equipment ····· 124

IX. Safety management of the laboratory ····· 125

X. Representative research results of this project ····· 126

XI. Other details ····· 128

XII. References ····· 129

〈 목 차 〉

제 1 장. 연구개발과제의개요 ····· 7
1. 연구개발목표 ····· 7
2. 연구개발의 필요성 ····· 7
3. 연구개발범위 ····· 12

제 2 장. 국내외 기술개발 현황 ····· 13
1. 국내외 시장현황 ····· 13
2. 국내외 연구개발 현황 ····· 15
3. 본 연구의 기술개발 수준 ····· 16

제 3 장. 연구수행 내용 및 결과 ····· 18
1. 1차년도 연구수행 내용 및 결과 ····· 18
2. 2차년도 연구수행 내용 및 결과 ····· 53
3. 3차년도 연구수행 내용 및 결과 ····· 89
4. 연구개발 성과 ····· 106

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 109
1. 연구개발목표의 달성도 ····· 109
2. 관련분야 기여도 ····· 112

제 5 장. 연구결과의 활용계획 등 ····· 114

제 6 장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 116

제 7 장. 연구개발성과의 보안등급 ····· 123

제 8 장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비현황 ····· 124

제 9 장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 ····· 125

제 10 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적 ····· 126

제 11 장. 기타사항 ····· 128

제 12 장. 참고문헌 ····· 129
<별첨> 자체평가의견서

제 1 장. 연구개발과제의 개요

	D-03

1절. 연구개발 목표

○ 오리의 고병원성 조류인플루엔자 (HPAI) 와 살모넬라 백신 및 진단키트 개발을 통한 안전 오리 사육 시스템 구축

○ 오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 개발 및 산업화

○ 오리용 고병원성 조류인플루엔자 백신/감염개체 혈청학적 감별(DIVA)키트 개발

○ 오리용 백신 어쥬번트 개발

○ 개발된 백신 어쥬번트의 효과기전 연구

○ 오리용 식중독 유발 살모넬라 백신 개발 및 산업화

2절. 연구개발의 필요성

○ 최근 소비자들의 웰빙 식품에 대한 욕구에 따라 최근 5년간 국내 오리고기 소비량 증가(152%)가 쇠고기(31%), 돼지고기(8%), 닭고기(42%)에 비해 두드러지고, 오리 산업 규모도 증가하여 2010년도에는 총 생산액이 1조원을 돌파하는 등 사육 규모가 급속하게 증가하고 있음.

○ 오리시장의 규모 성장에 비해 질적인 성장은 이루어지지 않고 있는 것으로 평가되며, 닭에 비해 소규모 농장으로 운영하여 아직까지 체계적인 사육환경 및 위생시설이 미비한 실정임.

○ 농림축산식품부는 축산물의 안전·위생을 확보하기 위해 2015년까지 가축의 사육부터 유통까지 모든 단계에서 HACCP(위해요소중점관리기준)을 적용 할 계획이지만, 농장 사육환경의 악화와 위생관리의 미비로 질병에 대한 노출이 쉽고, 특히 수생생활을 선호는 오리의 습성으로 인해 다른 가금류에 비해 비위생적으로 사육되고 있음.

○ 오리는 국내 축산업의 주요 식품원 중 하나로서 자리 잡고 있지만, 그 사육 특성에 의하여 바이러스성 및 세균성 인수공통 전염병의 매개체로써 그 위험성이 증가하고 있음.

○ 조류인플루엔자는 오리에서 사람으로 직접적, 간접적 전파가 가능하며, 특히 야생 조류에서 유행하는 고병원성 조류인플루엔자가 사육 오리에 유입된 후 전국적으로 전파되어 국내 가금산업에 막대한 피해를 주고 공중보건학적 우려를 낳은 예가 있음.

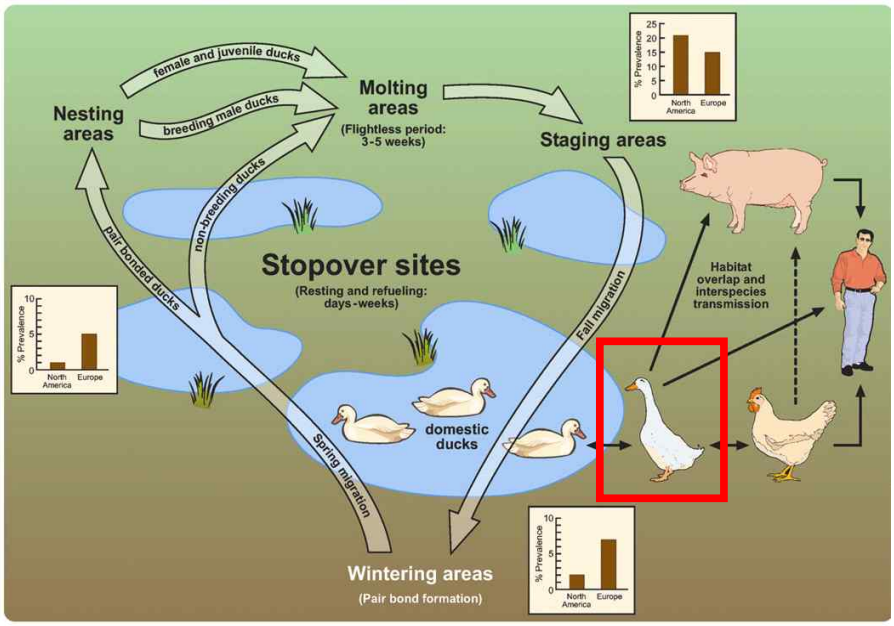


그림1-1. 야생오리의 패턴과 사육오리의 조류인플루엔자 전파관계
(출처 : Influenza other respi viruses, 2009)

○ 오리에서 고병원성 조류인플루엔자가 높은 빈도로 발생하고 있으며(2003년 47%, 2006년 53%, 2008년 38%), 2010/2011년 국내 고병원성 조류인플루엔자 양성판정 91개 농장 중 56개 농장은 종오리 및 육용오리에서 검사된 것이며, 이것은 양성농장 중 반 이상(61.5%)을 차지함.

○ 고병원성 인플루엔자가 상재하는 동남아에서는 고병원성 인플루엔자 백신을 실시하고 있지만 높은 항체를 얻기 어렵고, 개체마다 면역원성 형성 정도의 차이가 큰 단점이 있음.

○ 동남아 지역을 중심으로 최근 발생보고중인 H5N1형 HPAI는 clade 2.3.2.1에 속하는 바이러스이며 사육 오리에서 많은 보고가 있고, 이곳을 지나는 철새의 국내 유입과 함께 H5N1형 HPAI의 한국으로 유입가능성이 상재하므로 대비책을 세우는 것이 필수적임.

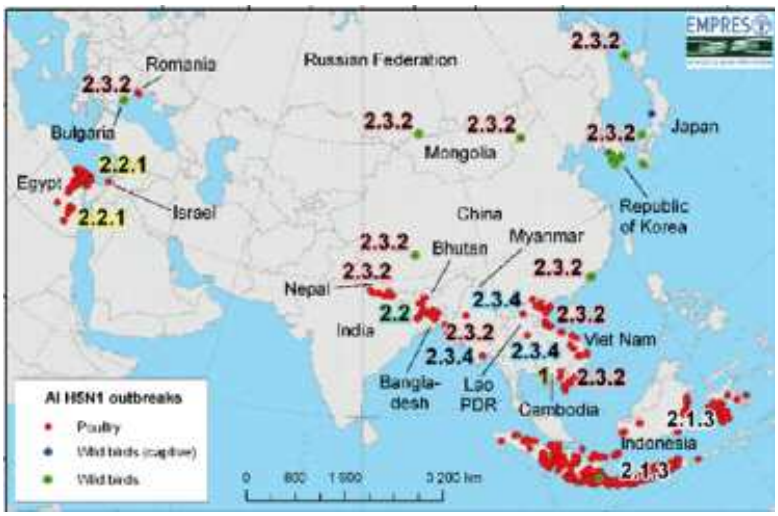


그림1-2. HPAI H5N1 clade 분포 양상.
(출처 : Fourth Report on the Global Programme for the Prevention and Control of HPAI)

○ 현재 국내에는 가금류에서의 HPAI 백신이 사용되고 있지 않지만 유사시를 대비한 긴급용 방역백신의 비축을 위한 백신의 개발이 필요하며 이를 통하여 꾸준한 수요가 있는 HPAI 상재국 으로의 수출이 가능할 것으로 예상됨.

○ 고병원성 조류인플루엔자의 특성상 항원을 증폭시키는 수단인 종란에서의 병원성으로 인해 많은 항원을 얻지 못하는 단점이 있으며, 이를 극복하기 위해 종란에서의 증식능과 항원성을 모두 갖춘 재조합 백신주의 개발 및 항원성이 높으면서도 산업화에 적합한 생산 조건을 갖춘 재조합 항원의 개발이 필요함.

○ 또한 오리의 경우 닭 등의 가금류와는 달리 백신접종을 실시하여도 이에 따른 항체형성이 잘 일어나지 않으며 (표1-1), 이를 극복하기 위하여 면역원성을 확보하기 위한 백신 항원개발과 더불어, 다양한 고도면역 백신 전달방법을 응용한 차별화된 백신 연구가 필요함.

Vaccine group	HI antigen source	HI (GMT)		
		At vacc.	3 wk postvacc.	2 wk postchallenge
INDO	Vaccine strain	0/6 (<8)	6/6 (12)	6/6 (91)
	Challenge strain	0/6 (<8)	6/6 (12)	6/6 (91)[a]
TK/WI	Vaccine strain	0/6 (<8)	6/6 (13)	6/6 (91)
	Challenge strain	0/6 (<8)	0/6 (<8)	6/6 (39)[a]
HGO	Vaccine strain	0/6 (<8)	6/6 (23)	6/6 (147)
	Challenge strain	0/6 (<8)	0/6 (<8)	6/6 (104)[a]
ENG	Vaccine strain	0/6 (<8)	6/6 (16)	6/6 (446)
	Challenge strain	0/6 (<8)	0/6 (<8)	6/6 (111)
Sham	Vaccine strain	NA	NA	NA
	Challenge strain	0/12 (<8)	0/12 (<8)	12/12 (223)

표1-1. 기존 어쥬번트를 사용한 H5N1형 HPAI 사독백신을 접종한 오리에서 백신 3주 후 유도된 항체가

(출처 : Dawn Eggert and David E. Swayne, Avian Disease 2010)

○ 현재 국내에서는 가금류를 대상으로 한 고병원성 조류인플루엔자 백신접종이 금지되어 있으나, 본 연구로 오리에서 실용화가 가능한 백신항원 및 어쥬번트의 개발이 이루어지고 백신의 효능을 증강시킬 수 있는 백신전달방법 연구가 이루어 질 경우 비상용 백신 및 접종법 확보를 통한 국내 방역 대책 수립에 결정적인 기여를 할 수 있음.

○ 또한 동남아시아를 포함한 고병원성 조류인플루엔자 상재국가로의 백신 수출을 위해서는 오리에서 면역원성이 우수한 백신항원, 어쥬번트 및 백신전달방법의 연구개발이 필요한 상황임.

○ 오리는 전 세계적으로 증가하고 있는 세균성 식중독 발생의 가장 큰 원인체인 살모넬라의 오염률이 매우 높으며, 미국 CDC 통계에 따르면, 사람에서 분리한 상위 20종의 식중독 관련 살모넬라 중 9종의 살모넬라가(Sal. Heidelberg, Typhimurium, Enteritidis, I 4,[5],12:i:-, Montevideo, Thompson, Agona, Infantis, Muenchen) 가금 유래 살모넬라와 일치하는 것으로

나타남 (표 1-2).

Pathogen	Year													National health objective†
	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	
Bacterial														
Campylobacter	23.59	24.55	19.42	14.82	15.37	13.61	13.34	12.59	12.79	12.67	12.70	12.78	12.68	12.30
Listeria	0.46	0.47	0.55	0.46	0.34	0.27	0.26	0.33	0.27	0.30	0.31	0.27	0.29	0.24
Salmonella	14.46	13.55	13.61	16.07	14.08	15.01	16.20	14.42	14.61	14.49	14.72	14.86	16.20	6.80
Shigella	8.89	7.87	7.14	3.74	7.67	6.36	10.84	7.26	5.06	4.67	6.09	6.24	6.59	N/A§
STEC¶ O157	2.62	2.09	2.37	1.94	2.03	1.55	1.69	1.06	0.90	1.05	1.30	1.19	1.12	1.00
STEC NONO157	-	-	-	-	0.12	0.17	0.09	0.11	0.25	0.29	0.47	0.59	0.45	N/A
Vibrio	0.15	0.32	0.24	0.19	0.18	0.23	0.27	0.26	0.28	0.27	0.34	0.24	0.29	N/A
Yersinia	1.03	0.86	0.87	0.63	0.43	0.41	0.45	0.39	0.40	0.36	0.36	0.36	0.36	N/A
Parasitic														
Cryptosporidium	-	2.90	2.26	1.46	1.57	1.68	1.38	1.19	1.44	2.98	1.96	2.70	2.25	N/A
Cyclospora	-	0.31	0.04	0.05	0.06	0.09	0.11	0.04	0.03	0.15	0.10	0.03	0.04	N/A
Surveillance population (millions)	14.27	16.13	20.71	25.86	30.64	34.90	37.95	41.87	44.47	45.00	45.44	45.95	45.95	

*Per 100,000 population

†Healthy People 2010 objectives for incidence of *Campylobacter, Salmonella*, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infections for year 2010 and for incidence of *Listeria* infections for year 2010

§Not applicable because no national health objective exists regarding infection with this pathogen

¶Shiga toxin-producing *Escherichia coli*.

표 1-2. 미국 내 세균성 및 기생충성 식중독 연도별 발생 건수
(출처 : CDC, MMWR, 2009)

순위	사람 유래 살모넬라 혈청형	가금 유래 살모넬라 혈청형
1	**Typhimurium**	**Heidelberg**
2	**Enteritidis**	Kentucky
3	Newport	**Typhimurium**
4	**Heidelberg**	**Enteritidis**
5	Javiana	Seftenberg
6	**I 4,[5],12:i:-**	**I 4,[5],12:i:-**
7	**Montevideo**	**Montevideo**
8	**Muenchen**	Mbandaka
9	Saintpoul	Thompson
10	**Braenderup**	Schwarzengrund
11	Oranienburg	**Agona**
12	Mississippi	**Braenderup**
13	**Infantis**	**Infantis**
14	Paratyphi B var. L(+)tartrae+	**Muenchen**
15	Thompson	Kiambu
16	**Agona**	Anatum
17	Typhi	Worthington
18	Hartford	Ohio
19	Stanley	Uganda
20	Berta	Hadar

표 1-3. 사람 및 가금에서 높은 빈도로 분리된 살모넬라 혈청형의 종류 (출처: CDC, 2005)

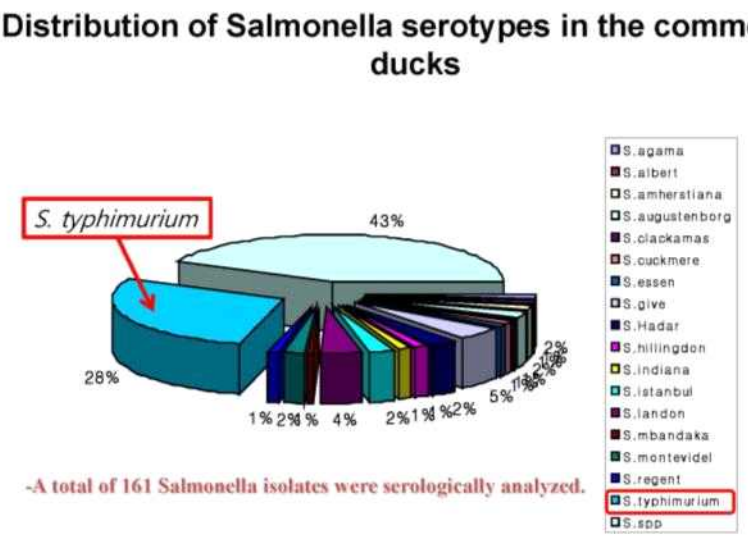
○ 국내에서 발표된 연구결과 역시 지속적인 국내 식중독 발생의 원인이 살모넬라임을 지적함 (표 1-4).

Rank	1998		1999		2000		2001		2002		2003		2004		2005		2006		2007	
	Serovar	No.	Serovar	No.	Serovar	No.	Serovar	No.	Serovar	No.	Serovar	No.	Serovar	No.	Serovar	No.	Serovar	No.	Serovar	No.
1	Enteritidis	626	Enteritidis	1,344	Enteritidis	718	Enteritidis	477	Enteritidis	385	Enteritidis	232	Enteritidis	270	Enteritidis	167	Enteritidis	135	Enteritidis	163
2	Typhi	297	Typhimurium	351	Typhi	153	Typhi	147	Typhimurium	105	Typhimurium	116	Typhimurium	95	Typhimurium	68	Typhi	37	Infantis	62
3	Typhimurium	213	Typhi	227	Typhimurium	142	Typhimurium	141	Paratyphi A	91	Typhi	77	Typhi	40	Typhi	34	Typhimurium	37	Typhi	44
4	Infantis	29	Newport	93	Braenderup	101	Schwarzengrund	35	Braenderup	84	Paratyphi A	38	Braenderup	17	Montevideo	16	London	28	Othmarschen	41
5	Bareilly	13	Infantis	43	Derby	51	London	33	Typhi	66	Braenderup	31	London	17	Braenderup	11	Braenderup	19	Typhimurium	27
6	Hadar	12	Braenderup	35	London	43	Montevideo	32	Schwarzengrund	61	London	24	Weltevreden	13	Rissen	10	Schwarzengrund	18	Paratyphi A	10
7	Ohio	12	Montevideo	31	Montevideo	25	Rissen	16	London	28	Bardo	21	Rissen	12	London	9	Hillingdon	17	Braenderup	7
8	Schwarzengrund	10	Give	15	Hadar	13	Litchfield	16	Montevideo	22	Haardt	11	Infantis	10	Infantis	8	Paratyphi A	14	Hillingdon	6
9	Give	8	Hadar	11	Infantis	9	Mbandaka	16	Heidelberg	14	Rissen	11	Paratyphi A	8	Paratyphi A	8	Infantis	11	Weltevreden	6
10	Livingstone	8	Derby	11	Rissen	7	Blockley	10	Pakistan	12	Blockley	8	Hadar	7	Anatum	8	Montevideo	9	Corvallis	6
11	Braenderup	7	Thompson	11	Senftenberg	7	Infantis	9	Rissen	7	Aagona	8	Larochelle	7	Virchow	6	Rissen	8	Anatum	5
12	Mbandaka	7	Mbandaka	6	Mbandaka	6	Braenderup	9	Senftenbergrg	6	Paratyphi B	8	Kingston	6	Agona	4	Virchow	6	Derby	5
13	Kentucky	6	Blockley	6	Bareilly	5	Paratyphi A	7	Haardt	6	Senftenbergrg	8	Montevideo	6	Corvallis	4	Weltevreden	6	Haardt	5
14	Agona	5	Goldcoast	6	Give	4	Haardt	6	Virchow	6	Pakistan	7	Thompson	6	Schwarzengrund	4	Give	6	Paratyphi B	4
15	Derby	5	Paratyphi A	5	Paratyphi A	3	Haifa	6	Paratyphi B	5	Infantis	6	Agona	5	Thompson	4	Corvallis	5	Virchow	4
Total*		1,303		2,252		1,336		1,027		957		677		607		429		422		462

표 1-4. 국내 식중독 유발 살모넬라 분리주의 혈청형 분포
(출처: Shkho Kim, Infectious Diseases, Microbiology & Parasitology 2010)

○ 본 연구팀의 지속적인 모니터링 결과 오리육 유래 살모넬라 분리주의 혈청형은 대부분 Salmonella typhimurium 인 것으로 밝혀짐 (그림 1-3, 1-4).

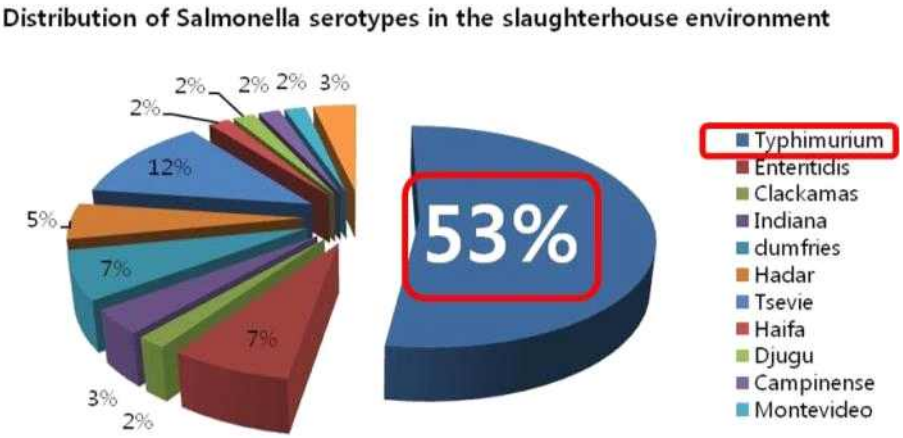
<그림1-3> 선행연구결과 - 농림축산검역본부
국내 오리농장 에서의 혈청형별 살모넬라 분리율을 조사한 본 연구팀의 선행연구결과.



○ 또한, 국내에서 2012년부터 축종에 관계없이 성장촉진용 항생제를 사료에 첨가하는 것이 전면 금지됨에 따라 살모넬라를 비롯한 세균성 질병의 발생 증가가 예상되고 있으며, 식중독 유발 살모넬라 균을 선진국과 마찬가지로 가축전염병 수준으로 관리하고, 종계장·부화장 및 농장에 대해 방역의무를 부과하는 방안이 추진 예정 (농식품부 '계란제품 위생관리 종합대책' 2010년 3월)이므로, 오리산업에서도 오리농장 및 도압장에서 활용이 가능한 가이드라인 확립 외에도 오리용 살모넬라 백신의 개발 및 적용이 필요한 상황임.

<그림1-4> 선행연구결과 - 건국대학교

국내 10개 도압장 에서의 혈청형별 살모넬라 분리율을 조사한 본 연구팀의 선행연구결과.



○ 따라서 최근 그 산업 규모가 급증하고 있는 오리산업에서 바이러스성 및 세균성 인수공통 전염병 방제를 위한 연구가 수행되어 이를 효과적으로 통제할 경우 관련 산업의 경쟁력을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 공중보건학적으로 가치가 매우 높을 것으로 기대됨.

3절. 연구개발 범위

○오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 항원 개발
○오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 개발 및 효능평가
○오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신의 시제품 제작
○오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 시제품의 효능평가 및 산업화
○오리용 고병원성 조류인플루엔자 백신/감염개체 혈청학적 감별(DIVA)키트 개발
○불활화 바이러스 항원의 면역원성을 증가시킬 수 있는 오리용 백신 어쥬번트 개발
○불활화 세균 항원의 면역원성을 증가시킬 수 있는 오리용 백신 어쥬번트 개발
○오리에서 백신의 면역원성을 증가시킬 수 있는 백신전달 방법 개선
○개선된 오리용 백신 어쥬번트 및 전달방법의 효과기전 연구
○오리용 식중독 유발 살모넬라 백신항원 개발
○오리용 식중독 유발 살모넬라 백신개발 및 효능평가
○오리용 식중독 유발 살모넬라 백신의 시제품 제작
○오리용 식중독 유발 살모넬라 백신 시제품의 효능평가 및 산업화

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04

제 1절 국내외 시장 현황

가. 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내 기반 동물 관련 백신생산 업체 및 국내 진출 해외 백신생산업체는 총 27개 업체이며 이 중 가금류 관련 백신을 9개 업체에서 생산하고 있음.
- 국내 오리에서 고병원성 인플루엔자는 2010년도를 마지막으로 총 4회 발생되었지만 국가 방역 정책으로 살처분 정책을 시행하며, 백신을 금지하고 있는 상황임.
- 총 9개의 가금류 백신 생산 업체 중 국내판매 오리 질병 전용 백신은 중앙백신연구소, 녹십자수의약품에서 판매하는 리미렐라(Riemerella) 감염증 백신과 오리간염(Duck hepatitis)백신이 있으며, 살모넬라(Salmonella)감염증 백신은 없음.

구분	회사	백신		
		인플루엔자	살모넬라	기타 오리 질병
국내기업	㈜고려비엔피	LPAI H9N2 vac.(양계용)	없음	없음
	㈜중앙백신연구소	LPAI H9N2 vac.(양계용)	Salmonella Gallinarum vac.	Rimerella
	㈜대성미생물연구소	LPAI H9N2 vac.(양계용)	Salmonella Gallinarum vac.	없음
	녹십자수의약품(주)	LPAI H9N2 vac.(양계용)	없음	Duck hepatitis
	코미팜	LPAI H9N2 vac.(양계용)	Salmonella Gallinarum vac.	없음
다국적 기업	한국조에티스	없음	없음	없음
	메리알코리아	없음	Salmonella Enteritis vac.	없음
	MSD animal health	없음	Salmonella Gallinarum/Enteritis vac.	없음

표2-1. 국내 오리 및 양계 관련 백신 출시 현황 (건국대학교조사)

나. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 전세계 인플루엔자 백신 생산 기업 중 주요 27개 업체 중 고병원성 인플루엔자 H5/H7형 백신을 생산하는 회사는 17개 기업이며, 이 중 다국적 기업 및 수출용으로 해외 판매

자격을 인정받은 회사는 8개 기업임. 대부분 자국의 회사에서 자체적으로 백신주를 개발하고 있음. (Iowa state university)

- 총 32국가에서 조류 인플루엔자 백신을 사용하고 있으며, 이 중 31개 국가는 자국의 백신 외에 타 국가에서 판매하는 백신을 수입해서 사용 하고 있음. (Iowa state university)
- 인도네시아, 멕시코, 과테말라는 3개 이상의 국가에서 조류인플루엔자 백신 시장에 뛰어들고 있으며 그 외에 볼리비아, 레바논, 파키스탄, 이집트가 2개의 국가에서 판매권을 획득했음.(Iowa state university)
- 유럽은 고병원성인플루엔자 백신 정책의 일환으로 국가에서 지정하여 HPAI H5N6, H7N7을 막는 백신 균주의 생산을 국가의 통제 하에 허용 하고 있으며, 다국적기업인 MSD animal health 사에 통해 독점 생산방식을 채택함. (VETERINARY VACCINES 2010)
- 대한민국을 중심으로 아시아권에 오리에서 고병원성 조류인플루엔자 백신 접종을 법적으로 금지하는 나라는 말레이시아, 싱가폴, 부탄, 스리랑카로 한정되어있으며, 나머지 일본, 중국, 베트남, 인도네시아, 미얀마 인도, 파키스탄 태국, 필리핀 등은 백신을 실시하고 있음.

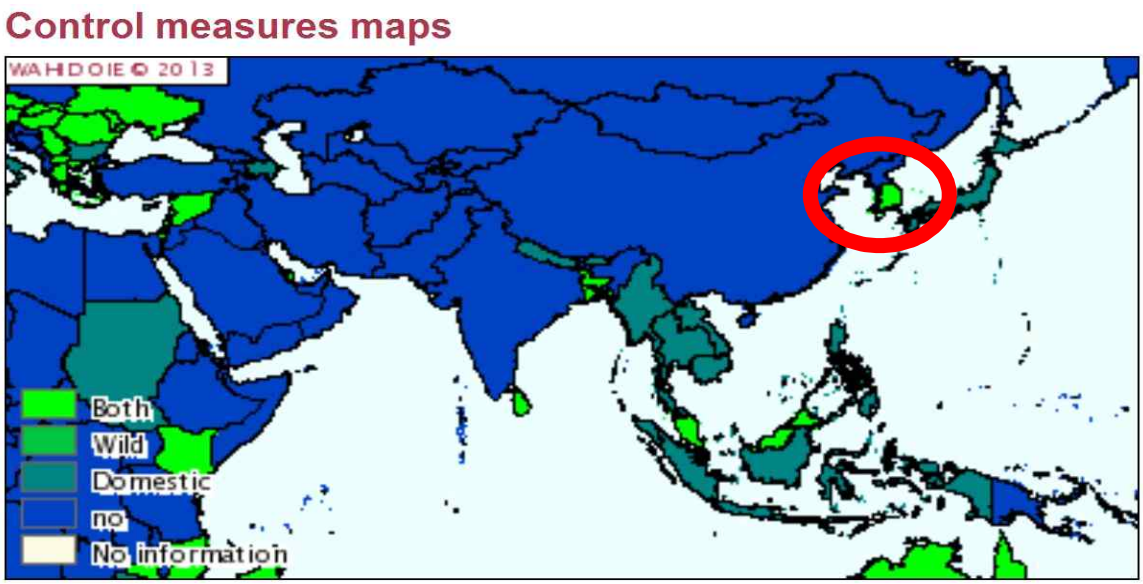
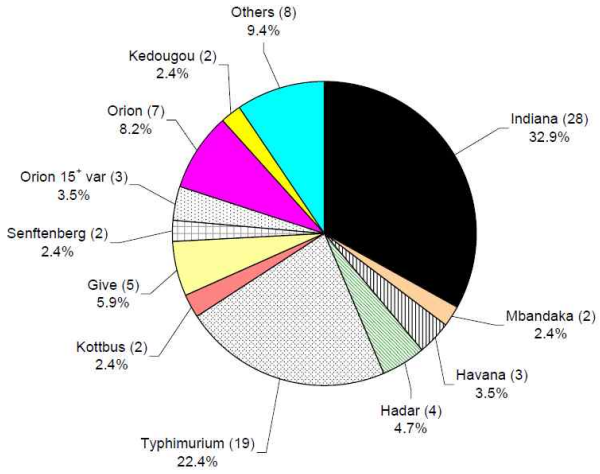


그림2-1. 고병원성 인플루엔자 백신 금지 국가 (국제수역사무국 2013)

- 살모넬라 백신 중 Salmonella Enteritis 백신은 9개의 기업에서 생산 하고 있으며, 이중 다국적 기업 및 수출용으로 해외 판매 자격을 인정받은 회사는 3개의 기업이 있음.
- 총 30국가에서 Salmonella Enteritis 백신을 사용하고 있으며, 이 중 26개 국가는 자국의 백신 외에 타 국가에서 판매하는 백신을 수입해서 사용 하고 있음. (Iowa state university)
- 농업 선진국으로 분류되는 영국의 경우 인체에서 식중독을 일으키는 살모넬라에 대해서 지속적인 검사를 해왔으며 특히 오리에서 Salmonella Typhimurium의 발생 비율이 해마

다 증가함에 따라 그 심각성을 인정하고 백신을 실시하고 있으며, 영국의 수역사무국(Animal Health and Veterinary Laboratories Agency)에서 살모넬라의 방제 정책운동을 실시하고 있음.



2010			
RANK	SEROVAR	NUMB	%
1	Indiana	28	35.9
2	Typhimurium	17	21.8
3	Orion	7	9.0
4	Give	5	6.4
5	Hadar	4	5.1
6	Havana	3	3.8
	Orion 15+ var	3	3.8
	Other serovars	11	14.1
Total		78	

그림2-2. 영국의 살모넬라 타입별 발생현황 (AHVLA 2010)

- 양계용 살모넬라 백신 제품 생산 기업인 Lohmann animal health 기업은 Avipro Megan VAC 1 백신을 개발하여 인체에 식중독을 일으키는 3종 살모넬라(S. Thphimurium, S. Enteritidis, S. Heidelberg)를 방어 할 수 있는 생균 백신을 개발하여 판매하고 있으며 미국, 뉴질랜드, 도미니카 공화국에서 판매하고 있다.

제 2 절. 국내외 연구 동향

가. 국외 연구 동향

- 최근 전 세계적으로 고병원성 조류 인플루엔자의 발생 사례가 이어짐에 따라 미국, 중국, 인도 등 여러 국가에서 이를 막기 위한 감별백신 개발에 힘을 쏟고 있는 상황임.
- 주로 reverse genetics를 이용한 감별백신 개발 연구가 이루어지고 있는데 특히 중국 하얼빈 대학교와 Qingdao Yebio Bioengineering co.에서 H5에 대한 RG백신연구가 활발히 진행되고 있음.
- 생명 과학 기술 분야의 세계적인 선두주자인 미국의 경우 5년간 최대 7천만 달러를 투자하여 vaccine adjuvant 개발하고 있으며, 발견한 7개의 adjuvant를 가치 평가한 결과 7천만 달러 이상의 기대가치를 가지고 있는 것으로 평가됨.
- 현재 시장에서 판매되고 있는 3개의 adjuvant (AS03, AS04, MF59)를 비롯해 20여종이상의 adjuvant가 시판 준비 중임.
- 미국, 유럽 등 공중보건 분야 선진국들은 식중독 유발을 막기 위해 가금류를 대상으로 식중독 병원체 예방 백신을 수행하고 있으며, 현재 이용되는 백신의 효율성과 안전성을 높이기 위해 백신개발 연구에 많은 투자를 하고 있음.

- 차세대 Salmonella vaccine 개발 전략은 주로 유전자 재조합이나 Sub-unit vaccine 개발을 목적으로 진행되고 있음.

나. 국내 연구 동향

- 국내에서는 지난 2015년 H5N8을 포함하여 총 5차례 고병원성 조류인플루엔자가 발생하면서 가금 산업 전반에 막대한 피해가 발생하고 있음.
- 이에 따라 다수의 고병원성 조류인플루엔자 백신 개발 과제가 진행되고 있지만, AI의 Natural reservoir인 오리를 대상으로 하는 감별백신 연구는 부족한 상황임.
- 현재 국내에서는 다양한 백신 전략 및 adjuvant 개발 연구가 미국, 일본 등과 같은 기술 선진국과 비슷한 수준에서 진행되고 있으나 백신의 전달부분에 대해서는 아직 기초적인 수준임.
- 살모넬라 백신 관련 동향을 살펴보면 현재 가금 티푸스를 막기 위한 백신은 이용되고 있으나 식중독을 유발하는 살모넬라에 대한 백신 정책은 도입되지 않았음.
- 도체에 의한 식중독 감염이 늘어나면서 최근 식중독 예방 백신에 대한 연구의 필요성이 증가하고 있는 상황임.

제 3 절 본 연구의 기술 개발 수준

- 본 연구는 국내 오리 산업에 있어서 큰 문제가 되고 있는 식중독 유발 살모넬라와 고병원성 조류인플루엔자를 효율적으로 예방하는 백신 개발 및 백신 전달 방법에 대해 연구한 종합적인 연구임.
- 오리는 국내 축산업의 주요 식품원 중 하나로서 자리 잡고 있지만, 그 사육 특성에 의하여 바이러스성 및 세균성 인수공통 전염병의 매개체로 여겨지고 있음.
- 그 중 조류인플루엔자는 오리에서 사람으로 직접적, 간접적 전파가 가능하며, 특히 야생조류에서 유행하는 고병원성 조류인플루엔자가 사육 오리에 유입된 후 전국적으로 전파되어 국내 가금 산업에 막대한 피해를 주고 있음.
- 현재 국내에서는 가금류를 대상으로 한 고병원성 조류인플루엔자 백신 접종이 금지되어 있지만 고병원성 조류인플루엔자의 지속적인 발생 상황에 비추어 볼 때, 비상용 백신의 개발이 필요하다고 할 수 있음.
- 본 연구를 통해 오리에서 실용화가 가능한 백신항원 및 어쥬번트의 개발에 성공하였으며, 백신의 효능을 증강시킬 수 있는 백신전달방법이 확립되었음.
- 이는 비상 시 국내 방역 대책 수립에 결정적으로 기여할 것이라는 점에서 의의가 크다할 수 있음.
- 또한 본 연구를 통해 개발한 티피뮤리움 백신은 전세계적으로 문제가 되고 있는 식중독의 원인균인 S. enteric serovar Typhimurium을 효과적으로 막을 수 있다는 점에서 시사하는 바가 크다고 할 수 있음.
- 본 과제를 통해 개발된 살모넬라 백신은 백신을 제조하는 과정이 복잡하지 않으면서 단가가 저렴하기 때문에 백신시장에서의 경쟁력도 포함하고 있는 기술임.

- 현재는 의무적인 백신접종이 아니지만 추후에 상황에 따라 반영될 수 있는 식중독유발 살모넬라 백신 접종 의무화 정책을 고려한다면 본 과제를 통해 많은 부가가치가 창출될 것으로 생각됨.

제 3 장. 연구수행 내용 및 결과

1절. 1차년도 연구수행 내용 및 결과

1. 오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 항원 개발

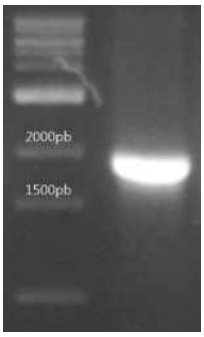
가. HPAI 역유전학(RG) 감별(DIVA)백신항원 개발

RG 기술을 이용하여 DIVA 백신항원의 개발을 위하여 2010년 국내 발생 고병원성 조류인플루엔자 H5N1 형 (clade 2.3.2.1) 분리주의 HA 유전자를 이용하였음.

1) HPAI HA 유전자의 확보

- 본 연구 팀은 2010년 천안 풍세천에서 철새의 분변을 취득하여 바이러스를 분리하였음. 원앙(Anasplatyrhynchos)의 분변에서 바이러스가 나온 것으로 확인 됐음.
- 유전자상으로 고병원성 조류인플루엔자임을 증명하는 다중 염기성 아미노산구조(PQRERRRKRGLF)를 가지고 있는 것을 확인됨. 몽골과 중국에서 발견된 H5N1과 99%의 상동성을 가지고 있으며 계통분류학적으로 HA유전자는 Clade 2.3.2에 해당하는 것으로 확인됨(Lee et al., 2010)
- 고병원성 조류인플루엔자(A/mandarin duck/Korea/K10-483/2010 (H5N1) 표면 단백질 HA, NA 유전자 중 숙주에 감염시 주요한 항원성을 나타내는 HA 유전자를 분리하기 위해 건국대학교 BL-3 시설에 보관되어있는 바이러스를 10일령 계태아난의 Allantoic fluid에 접종하고 37℃ 인큐베이터에서 바이러스를 증폭함.
- 바이러스를 접종한 계태아난은 3일 후 바이러스를 회수를 위해 4℃에서 30분간 냉장 후 Allantoic fluid를 수거함. 수거한 바이러스는 BL-3 시설에서 반출되기 전 바이러스의 불활화 및 유전자의 보존을 위해 viral lysis buffer(iNTRON)과 혼합함.
- 불활화된 바이러스는 viral gene spin kit(iNTRON)을 이용하여 바이러스 RNA의 추출함.
- 바이러스의 total RNA에서 HA 유전자를 확보하기위해 프라이머(Hoffmann et al., 2001)를 이용하여 RT-PCR을 실시함.

<그림 3-1. Hoffmann 프라이머를 이용한 HPAI 바이러스의 HA 유전자 RT-PCR 결과>



- RT-PCR 산물의 전기영동 확인 결과 약 1700bp의 밴드를 확인하였음. Sequencing 후 Pubmed 상의 BLAST 결과 A/mandarin duck/Korea/K10-483/2010 (H5N1)의 HA 유전자임을 확인함.

2) 백신 바이러스의 DIVA를 위한 NA 유전자의 확보

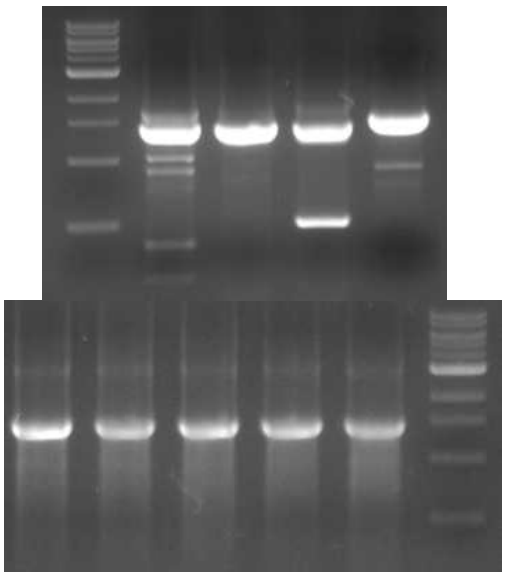
- DIVA(Differentiating Infected from Vaccinated Animal) 전략은 백신을 한 개체와 야외 감염 개체를 구분하기 위한 방법임.
- 본 연구팀에서 개발하는 방법은 조류인플루엔자의 표면단백질 HA와 NA 중 NA 유전자가 야외 분리 바이러스와 다른 백신 주 바이러스를 생성하는 방법임.
- 따라서 현재 알려진 NA type 중 본 실험실에서 야생조류 및 재래시장에서 분리한 조류인플루엔자 바이러스 NA type을 조사함.

<표 3-1. 본 연구팀 분리 조류인플루엔자 바이러스의 NA type>

NUMBER	NAME	NA SUBTYPE
NO.0	K10-483	N1
NO.1	8-G46	N5
NO.2	1-19	N5
NO.3	G5	N5
NO.4	05-G46	N5
NO.5	7-D3	N6
NO.6	K09-542	N6
NO.7	07-347	N8
NO.8	D-1	N2
NO.9	4-7	N8
NO.10	07-616	N9
NO.11	ENV1	N9
NO.12	ENV2	N7

- 본 연구팀 분리 조류 인플루엔자 바이러스 중 개발된 백신 주 바이러스의 HA 유전자 공여체인 A/mandarin duck/Korea/K10-483/2010(H5N1)을 포함한 13개의 바이러스를 위의 표와 같이 선정함.
- 선정된 바이러스의 NA type은 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9형을 포함하였으며 HA 유전자 공여체인 K10-483 바이러스를 제외하고 6가지의 NA type을 선정함.
- 선정된 바이러스는 Hoffmann 개발 universal primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하고, 유전자를 확보함.

<그림 3-2. RT-PCR을 이용한 NA 유전자의 증폭 결과>

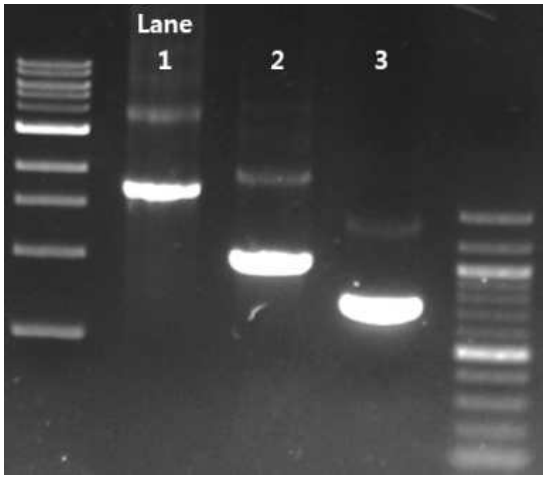


3) HA 유전자의 고병원성인자 제거 방법

- 인플루엔자 표면단백질인 HA는 숙주세포의 표면에 sialic acid(SA)와 접하여 세포안으로 침투하는 과정을 거치게 되는데 이 과정 중 HA 단백질의 절단부위(cleavage site) 숙주세포의 단백질 절단효소로 HA1과 HA2로 분리되어야 이후의 감염과정이 진행되는 특징이 있음.
- 저병원성 조류인플루엔자 HA의 절단부위는 trypsin-like enzyme만으로 잘리게 되어 제한적인 장기에서만 감염이 이루어지는 특성이 있는 반면 고병원성 조류인플루엔자 HA의 절단부위는 다중염기서열의 특성으로 생체내의 다수의 장기에서 생산하는 광범위한 단백질 절단효소에 의해서 잘리기 때문에 전신적인 감염이 이루어지게 되는 특성이 있음.
- 이러한 특징을 이용하여 고병원성 조류인플루엔자 HA 유전자의 다중염기성아미노산 발현 부위를 제거하면 약독화됨이 알려져있음(Amorosolo et al., 2009).
- Overlapping polymeraser chain reaction(PCR)을 이용하여 다중염기성아미노산 발현 부위를 제거하기위해 두가지 세트의 프라이머를 준비함.
- 첫 번째 세트의 프라이머인 Bm-HA-1(TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG G)와 H5NA-MBCS-removal-F(CCT CAA AGA GAG AAA AGA GGA CTG TTT GG)를 이용하여 PCR산물을 획득함.
- 두 번째 세트의 프라이머인 H5N1-MBCS-removal-R(CCA AAC AGT CCT CTT TTC TCT CTT TGA GG)와 Bm-NS-890R(ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT ATT TTT)를 이용하여 PCR 산물을 획득함.

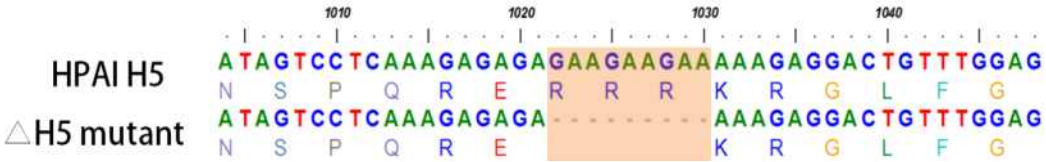
- 두가지 프라이머 세트로 만든 PCR산물을 하나의 PCR tube에서 반응시키면 각 PCR 산물이 서로가 프라이머로 작용하여 하나의 새로운 PCR산물을 생성함.

<그림 3-3. Overlapping polymeraser chain reaction을 이용한 고병원성 인자 제거>



- 두쌍의 프라이머 세트를 이용하여 위의 그림에서 Lane 2번과 3번 결과물을 생성함.
- 생성된 결과물을 이용하여 overlapping PCR을 실시하여 Lane 1변의 HA 유전자를 생산함.
- 생산된 HA 유전자는 sequecing을 후 다중염기성아미노산 발현부위가 제거됨을 확인함.

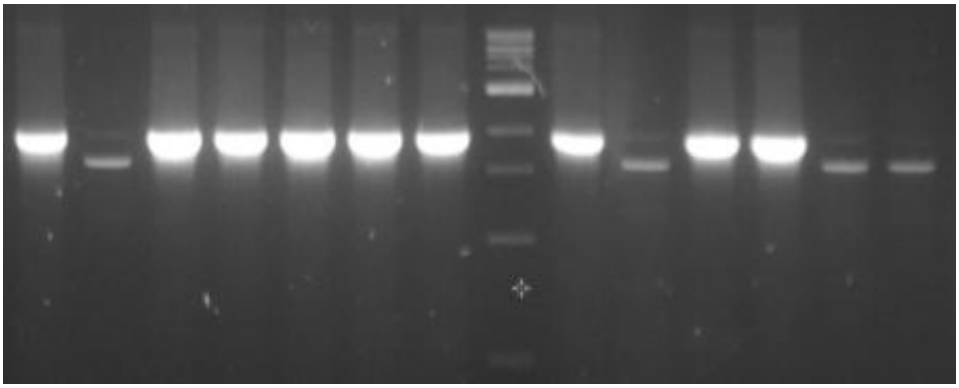
<그림 3-4. 다중염기성아미노산 발현 부위 유전자의 제거 확인>



4) 역유전학을 이용한 백신바이러스의 생산

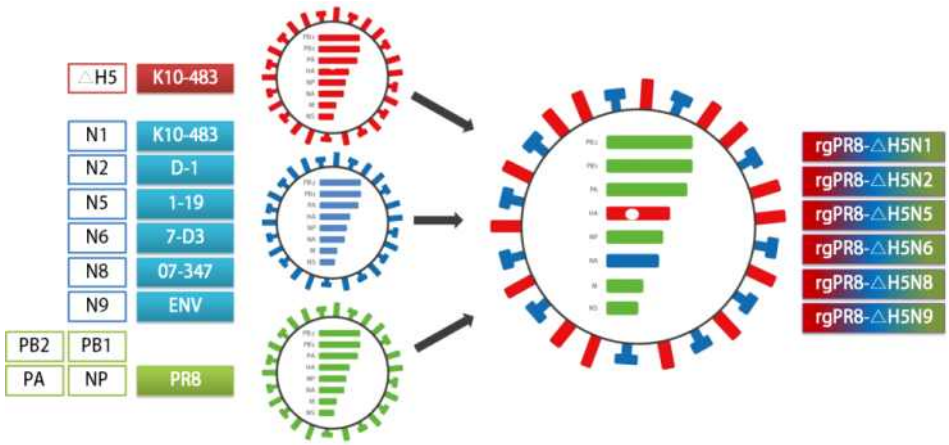
- 고병원성 조류인플루엔자 백신주 바이러스를 생산하기위한 HA, NA 유전자를 발현 백터인 pHW2000 백터에 클로닝을 실시함
- pHW2000 vector는 ampicillin 내성 유전자가 있음을 이용, transformation 후 LB agar 배지에서 자라는 colony를 1차 확인한 후, 각 colony에 대해 colony PCR을 실시하여 (Primer; PHW-F: 5′-TAAGCAGAGCTCTCTGGCTA-3′, PHW-R: 5′-TGGTGGCGTTTTTGGGGACA-3′) 정확한 사이즈의 PCR band가 나타나는 plasmid를 선정함. 그 후 정확한 insert의 염기서열을 확인하기 위해 direct sequencing을 실시하여 mutation이 없음을 확인함.

<그림 3-5. Colony PCR을 이용한 NA 유전자의 클로닝 확인>



- 백신주로 생산될 바이러스는 대량생산이 용이해야함으로 계태아란에서 증식시 계태아사를 일으키지 않으며 고증식 효율을 지녀야함.
- 따라서 HA 유전자의 고병원성 인자를 제거함과 동시에 계태아란에서 고증식 효율을 가지기 위해 내부 및 바이러스 유전자 증폭 유전자는 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) platform를 이용하였음.
- PR8 바이러스는 Puerto Rico 지역에서 발생한 인플루엔자 환자로부터 분리된 인플루엔자 A 바이러스의 H1N1 prototype임. PR8은 마우스나, 페렛, 계태아에서 많은 계대배양을 반복실시하였고, 그 결과 약독화되어 사람에서 복제 능력을 완전히 상실하여 비병원이 되었으며, 주로 사람을 위한 백신주로 연구개발 사용되고 있음(John et al., 2004).
- PR8 바이러스의 pHW2000에 클로닝된 백터(성백린, 연세대학교)를 제공받아 이용함.
- 6 well에 293T에 약 80% 이상 차도록 미리 준비하고, 8개의 plasmid (PB2, PB1, PA, HA, NP, M, NS)를 각각 300ng씩 혼합한 뒤, lipefectiamin(Invitrogen))과 혼합하여 transfection을 실시함.
- Transfection 과정부터는 Opti-MEM (Gibco, serum free media)을 세포배양배지로 사용함. 37℃, 5% CO2에서 48시간 동안 배양한 뒤, 각 well에 trypsin(1㎍/㎖)을 처리하고, 24시간 후 상층액을 회수함.
- 회수한 상층액은 다시 9-11일령의 SPF발육란에 200㎕씩 접종, 37℃, 72시간 배양 후, allantoic fluid를 회수하여, HA(Hemagglutinaion) test로 재조합 바이러스 생성 유무를 확인함. 재조합 바이러스의 정확한 염기서열 확인을 위해, 재조합 바이러스의 RNA를 RT-PCR로 증폭한 후 direct sequencing을 실시함.
- Rescue 된 바이러스는 아래 표와 같음. 고병원성인자가 제거된 △H5유전자와 DIVA가 가능한 2, 5, 6, 8, 9 형의 NA 유전자를 지닌 5개의 바이러스와 대조군으로 사용된 K10-483 바이러스의 1 형 NA 유전자를 지닌 바이러스를 생산함.

<그림 6. 생산된 백신주 후보 바이러스의 모식도>

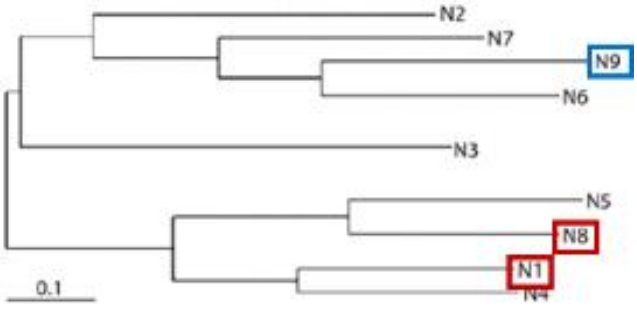


<표 3-2. Rescue된 바이러스 NA 유전자 정보>

Virus Number	Strain	Year	Sourse	Subtype
No. 0	A/PR/8/34	-	Yonsei University	H1N1
No. 1	K10-483	2010	Wild bird isolates	H5N1
No. 2	D-1	2007	Live bird market/Wild bird isolates	H2N2
No. 3	1-19	2004		H6N5
No. 4	7-D3	2005		H4N6
No. 5	07-347	2007		H3N8
No. 6	ENV	2013		H11N9

- 역유전학을 이용한 DIVA 백신이용을 위해 국내 뿐 만 아니라 해외에서 발생되었던 고병원성 조류인플루엔자의 아형을 Pubmed의 nucleotide 서비스를 이용하여 조사함.
- NA type의 발생 빈도를 조사한 결과 9형의 NA type의 빈도가 가장 낮은 것으로 조사됨.
- 또한 9형 NA 유전자는 아래 그림의 phylogenetic tree 분석에서 볼 수 있듯이 고병원성 조류인플루엔자 아형으로 가장 많이 존재하는 N1형 및 최근에 발생한 N8형과 유사성이 멀어 DIVA 전략으로 이용하기 적합한 것으로 판단됨. 따라서 개발된 9형 NA type의 백신주 바이러스를 RG AIV K10-483(△H5N9)로 명명하고 차후 면역원성 시험에 이용함.

<그림 3-7. NA 유전자의 유사성 관계(출처: Swayne et al., Avian influenza)>



5) 백신주 바이러스의 증식특성 연구

- 백신주로서 바이러스 생산성은 산업화 단계의 상품성과 연관되어있는 요소로 개발단계에서 확인해야할 요소임.
- 백신의 계태아란에서 증식성을 알아보기위해 Egg Infectious Dose 50(EID50)를 측정함.
- 계태아란에서 분리한 RG AIV K10-483 (H5N9) 바이러스를 6단계로 10진 희석 후 0.1ml씩 희석 단계별로 5개의 10일령 계태아란에 접종함.
- 37℃ 인큐베이터에서 3일동안 배양 후 allantoic fluid의 HA test를 실시하여 바이러스의 계태아란 반수 감염 역가를 계산한 결과 $10^{8.54}EID_{50}$/ml로 확인됨.
- 백신 바이러스의 시간별 증폭 역가를 확인하기위해 다시 계태아란에 6단계로 10진 희석 후 24, 48, 72 시간 후에 allantoic fluid의 바이러스를 micro HA test를 실시하여 확인 한 결과 아래와 같은 결과를 얻을 수 있었음.

<표 3-3. RG AIV K10-483 (H5N9) 바이러스의 시간별 증폭역가>

(A) 접종역가 ($logEID_{50}$/egg)	시간별 증폭역가 (HAU)		
	24 시간	48 시간	72 시간
6.5	5.8 ± 0.34	5.2 ± 0.12	6.3 ± 0.20
5.5	5.6 ± 0.24	6.4 ± 0.24	4.9 ± 0.43
4.5	5.6 ± 0.10	6.4 ± 0.51	6.5 ± 0.47
3.5	5.2 ± 0.20	7.8 ± 0.30	6.8 ± 0.38
2.5	4.8 ± 0.37	6.9 ± 0.43	8.1 ± 0.24
1.5	0.7 ± 0.70	0 ± 0	0 ± 0

- 바이러스의 최대 증폭 조건은 102.5logEID50/egg로 계태아란에 접종하고 72시간 후에 allantoic fluid를 수거했을 때 가장 높은 micro HA titer(8.1 $logEID_{50}$/ml)를 얻을 수 있었음.

나. HPAI 바이러스유사입자(VLP) 감별(DIVA)백신항원 개발

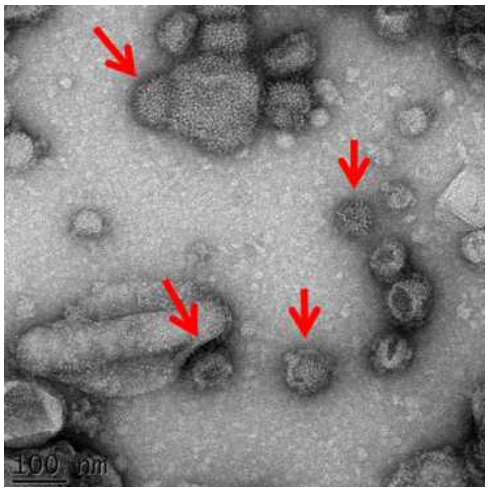
VLP를 사용한 DIVA 백신항원의 개발을 위하여 현재 중국 및 동남아시아에서 유행중인 대표적 clade 유래 (clade 1, clade 2) 의 HA 유전자를 발현하는 VLP를 제작함

1) Clade 1 HPAI H5N1 바이러스 HA 단백질 발현 VLP 항원 (clade 1 VLP) 개발

clade 1 바이러스는 베트남과 캄보디아에서 유행중인 HPAI H5N1 바이러스임.

- clade 1 에 속하는 A/Viet Nam/1194/2004 (H5N1) 바이러스의 HA 유전자를 다중 염기성 아미노산 서열이 제거된 상태로 합성함. 합성된 clade 1 HA 유전자를 pFastBac T1 plasmid vector (LifeTechnologies, USA) 에 삽입하여 clade 1 HA 유전자 transfer vector를 완성함. clade 1 HA 유전자 transfer vector 를 다시 DH10Bac competent cell (LifeTechnologies) 로 transformation 하여 clade 1 HA 유전자를 encoding 하는 재조합 baculovirus (rBV-clade 1 HA) 의 infectious clone을 제작함.
- 제작된 infectious clone을 곤충세포인 Sf9 세포에 transfection을 하며 이를 통하여 rBV-clade 1 HA을 확보함.
- 인플루엔자 바이러스의 matrix1 (M1) 유전자를 encoding 하는 재조합 baculovirus (rBV-M1)을 제작하기 위하여 A/PR/8/1934 (H1N1) 인플루엔자 바이러스로부터 M1 유전자를 중폭하고 상기와 동일한 방법으로 인플루엔자 M1 유전자를 encoding 하는 재조합 rBV-M1을 제작함.
- Clade 1 VLP 의 제작을 위하여 위의 방법으로 제작된 rBV-clade 1 HA 와 rBV-M1 을 Sf9 세포에 동시에 감염시킴. 3일 후 감염시킨 세포의 배양 상층액의 혈구응집능을 확인 하여 인플루엔자 HA 발현 VLP 의 생성 여부를 확인 한 후 상층액을 수거하고 저속원심분리 (2,000 x g, 30분, 4℃)를 통하여 부유물을 제거함. 부유물이 제거된 상층액에 존재하는 VLP를 초고속 원심분리기를 이용하여 농축하고 (30,000 x g, 90분, 4℃), 밀도구배원심분리 (20%-50% discontinuous sucrose gradient, 150,000 x g, 90분, 4℃)를 통하여 정제함.
- 전자현미경을 통하여 Clade 1 VLP 의 형성을 확인하며, VLP 항원의 혈구응집능을 평가함. 백신에 포함될 항원량의 정량을 위하여 branford assay를 통하여 총 단백질의 양을 측정함.
- 최종 정제된 Clade 1 VLP 의 농도는 3.0mg/ml 이였으며, 2^{13}HAU 의 혈구응집능을 보임.

<그림 3-8. 전자현미경으로 확인한 Clade 1 HPAI H5N1 VLP>

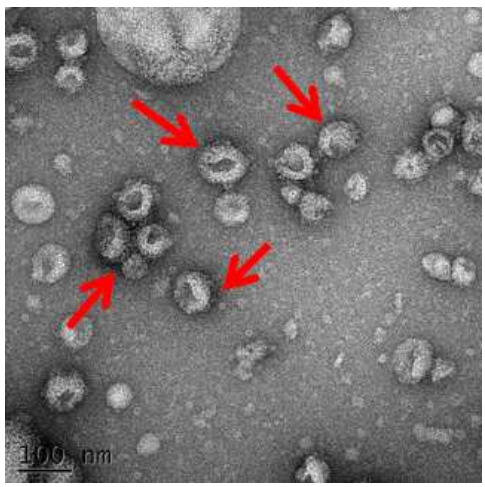


2) Clade 2 HPAI H5N1 바이러스 HA 단백질 발현 VLP 항원 (clade 2 VLP) 개발

Clade 2 VLP를 개발하기 위하여 본 연구에서는 clade 2.3.2 에 속한 HPAI H5N1 바이러스를 사용하였음. Clade 2.3.2 바이러스는 현재 중국 및 동남아시아에서 널리 유행중이며, 특히 국내에서 2008년 및 2010년 발생한 HPAI 가 모두 clade 2.3.2 에 속한다.

- Clade 2 VLP를 개발하기 위하여 본 연구팀에서 2010년 야생조류의 분변에서 분리한 Clade 2 에 속하는 A/mandarin duck/Korea/K10-483/10 (H5N1) 바이러스의 HA 유전자를 사용함. A/mandarin duck/Korea/K10-483/10 바이러스에서 유전자를 추출하고 HA 유전자를 증폭하여 상기 역유전학 바이러스를 제작한 방법과 동일한 방법으로 다중 염기성 아미노산 서열이 제거된 형태의 Clade 2 HA 유전자를 확보함.
- 상기 Clade 1 VLP 제작에 사용된 방법과 동일한 방법을 사용하여 Clade 2 HA 유전자를 encoding 하는 재조합 baculovirus (rBV-clade 2 HA)를 제작함.
- Clade 2 VLP 의 제작을 위하여 rBV-clade 2 HA 와 rBV-M1을 Sf9 세포에 동시에 감염시킴. Clade 1 VLP 의 농축 및 정제에 사용된 방법과 동일하게 Clade 2 VLP를 제작함. 혈구응집반응을 통하여 Clade 2 VLP 항원의 존재를 확인하며, branford assay를 통하여 총 단백질의 양을 측정함.
- 전자현미경을 통하여 Clade 2 VLP 의 형성을 확인하며, VLP 항원의 혈구응집능을 평가함. 백신에 포함될 항원량의 정량을 위하여 branford assay를 통하여 총 단백질의 양을 측정함.
- 최종 정제된 clade 2 VLP 의 농도는 2.5mg/ml 이였으며, 2^{13}HAU 의 혈구응집능을 보임.

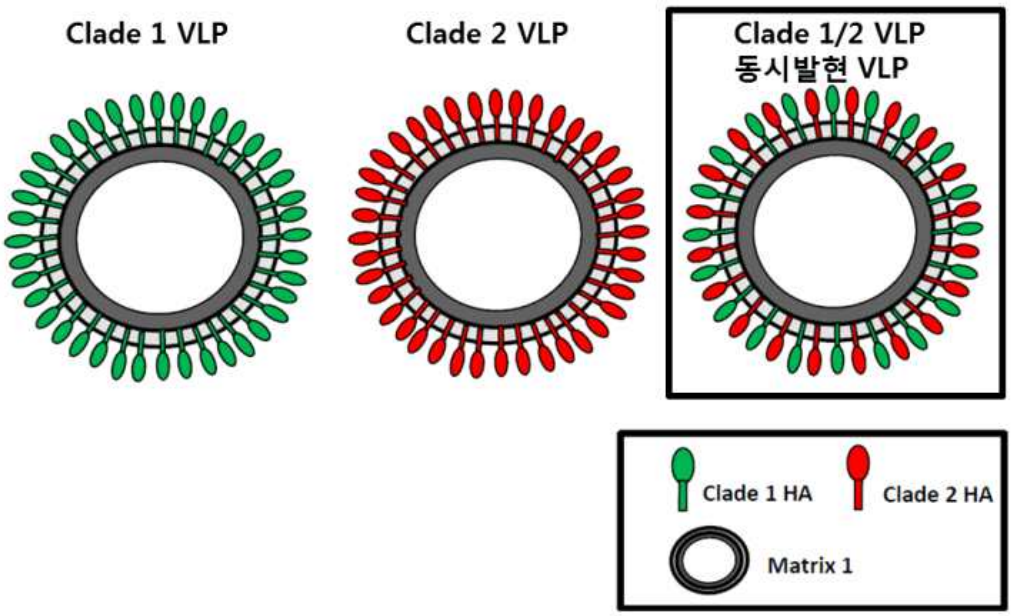
<그림 3-9. 전자현미경으로 확인한 Clade 2 HPAI H5N1 VLP>



3) Clade 1 및 Clade 2 HPAI H5N1 바이러스 HA 단백질 동시발현 VLP 항원 (Clade 1+2 VLP) 개발

- 본 연구에서는 교차방어능이 강화된 HPAI H5N1 VLP 백신을 개발하기 위하여 Clade 1 및 Clade 2 HPAI H5N1 바이러스의 HA를 동시에 발현하는 VLP (Clade 1+2 VLP)를 개발함. 개발된 Clade 1+2 VLP 는 현재 중국 및 동남아시아에서 유행중인 광범위한 유전형의 HPAI H5N1 바이러스에 보다 광범위한 교차 방어능을 갖는 백신의 개발에 활용될 수 있을 것으로 기대됨.

<그림 3-10. Clade 1, Clade 2 HPAI H5N1 바이러스 HA 단백질 동시발현 VLP 모식도>

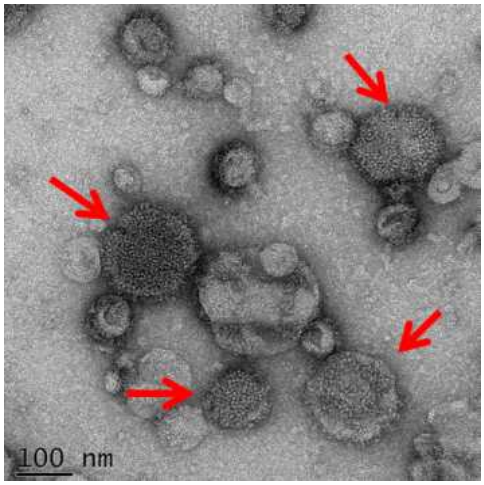


- Clade 1+2 VLP를 개발하기 위하여 상기의 방법 (나. 1항 및 2항) 으로 확보된 Clade 1 및 Clade 2 HA 유전자를 pFastBac T1 plasmid vector (LifeTechnologies) 에 동시에 삽입하여 clade 1+2 HA 유전자 transfer vector를 완성함. 상기 Clade 1 VLP 및 Clade 2 VLP 제작에 사용된 방법과 동일한 방법을 사용하여 Clade 1 및 Clade 2 HA 유전자를 동시에 encoding 하는 재조합 baculovirus (rBV-clade 1+2 HA)를 제작함.
- Clade 1+2 VLP 의 제작을 위하여 rBV-clade 1+2 HA 와 rBV-M1을 Sf9 세포에 동시에 감염시킴. Clade 1 VLP 의 농축 및 정제에 사용된 방법과 동일하게 Clade 1+2 VLP를 제작함. 혈구응집반응을 통하여 Clade 1+2 VLP 항원의 존재를 확인하며, branford assay를 통하여 총 단백질의 양을 측정함.
- 전자현미경을 통하여 Clade 1 VLP 의 형성을 확인하며, VLP 항원의 혈구응집능을 평가함. 백신에 포함될 항원량의 정량을 위하여 branford assay를 통하여 총 단백질의 양을 측정함.

- 최종 정제된 clade 1+2 VLP 의 농도는 1.5mg/ml 이였으며, 2^{12}HAU 의 혈구응집능을 보임.

<그림 3-11. 전자현미경으로 확인한 Clade 1+2 (동시발현) HPAI H5N1 VLP>

-



다. 개발된 RG 및 VLP 항원의 면역원성 평가

개발된 RG (가.) 및 VLP (나.) 항원의 면역원성을 오리에서의 면역원성을 평가함. 면역원성 평가를 위하여 이들 항원을 사용한 오일백신 (oil-adjuvanted vaccine)을 제작하고 오리에의 근육 접종을 통하여 인플루엔자 혈구응집억제 (HI) 시험을 실시함.

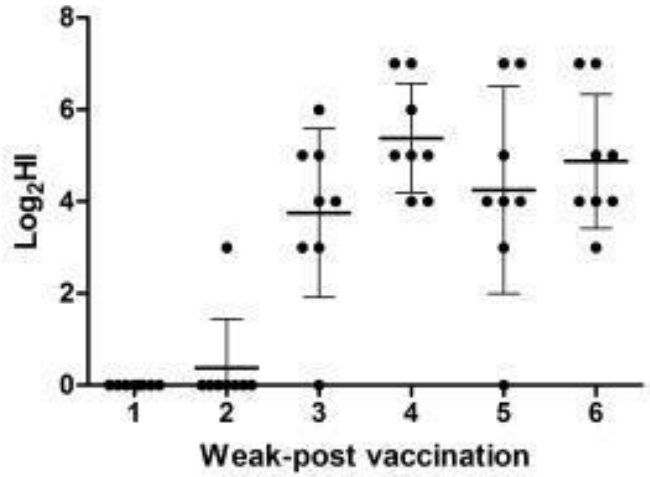
1) 개발된 RG 항원의 면역원성 평가

- RG AIV K10-483 바이러스의 오리에서 면역원성 평가를 위해 기존의 면역반응 유도 경로인 근육내 접종법(IM)을 이용하여 면역반응을 유도함.
- 면역반응은 체내 혈액을 목정맥을 이용하여 수거하고 혈청을 이용하여 Hemagglutination Inhibition test (HI test)를 실시함.
- HI test는 96-well plate에 비동화된 혈청을 PBS로 이진희석하고, 4 HAU의 항원(50-5)을 분주한 뒤, 상온에서 30분 반응함. 그 후 동량의 1% 칠면조 적혈구를 첨가하고 40분간 incubation한 뒤, 혈구응집을 완전히 억제하는 가장 높은 희석배수를 HI titer로 계산함.
- 선행연구 결과에 따르면 동일 RG 항원은 아니지만 H5형의 RG 항원을 근육으로 1일령 오리에 접종했을 때, $10^{6.7}EID_{50}$/dose의 접종으로 백신 접종 후 3주후에 면역반응을 유도하지 못했으며, 첫 번 째 백신 접종 4주 후에 boosting을 실시했을 때 면역반응을 유도했음으로, 첫 번째 백신 접종으로 면역반응을 유도하기 위해 이보다 3배 높은 $10^{7.2}EID_{50}$/dose을 이용하여 백신을 접종했음.
- RG AIV K10-483 항원의 불활화전 역가는 $10^{8.54}EID_{50}$/ml임으로 Oil 어쥬번트(ISA 70,

SEPPIC, France)와 제조사의 지시에따라 혼합하여 백신을 제조하였다. 제조된 백신은 오리의 근육으로 0.1ml로 접종했을 때 $10^{7.2}EID_{50}$/dose의 항원을 함량하게 제작되었음.

- 육용오리는 종오리와 다르게 6주령 까지 키우게 되며 이 기간 동안 고병원성 조류 인플루엔자에 충분한 면역반응을 생성하기 위해 1일령 오리에 백신을 실시하였음.

<그림 3-12. RG AIV K10-483 1일령 오리에서 면역원성 시험>



- 1일령 오리의 목 뒤 피하 접종을 0.1ml 접종하고, 육용오리가 도압되는 6주령까지 혈청에서 RG AIV K10-483에 대한 항체가를 HI test로 측정하였음.
- 백신 접종후 1주령에는 모든 오리에서 HI test 음성을 나타내었고, 2주령에는 8마리 중 1마리에서 3 log2 HI를 나타내었음. 백신 접종 3주령 이후에는 평균 4~5 log2 HI의 항체역가를 보였으며, 이 결과는 비교적 높은 항원량에도 불구하고 같은 조류인 닭에 비해서 낮은 항체 역가임.
- 본 과제 선행 자료와 마찬가지로 오리는 인플루엔자 항원에 기존의 오일 백신으로 낮은 면역반응을 보였으며, 이는 어린일령의 오리에 접종하여도 마찬가지의 결과를 얻을 수 있었음.

2) 개발된 VLP 항원의 면역원성 평가

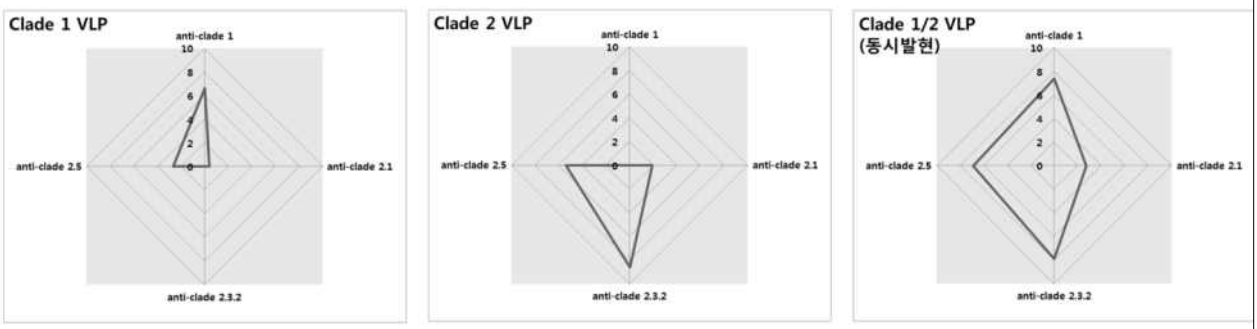
- 개발된 3종의 VLP 항원 (Clade 1 VLP, Clade 2 VLP, Clade 1+2 VLP) 의 면역원성을 평가하기 위하여 각각의 VLP 항원을 ISA70 oil-adjuvant (SEPPIC, France) 와 부피비 30:70 의 비율로 혼합하여 VLP oil-vaccine을 제작함. 제작된 VLP 백신을 오리 1수당 0.5ml 씩 접종하며 1수분에 포함된 VLP 항원의 양은 40ug 임. (40ug VLP/0.5ml/duck)
- 제작된 3종의 VLP oil-vaccine을 5주령 육용오리의 다리근육에 1차 접종 (Priming) 하고 1차 접종 2주, 3주후에 혈청을 채취하고 혈구응집억제반응 (HI test) 을 통하여 항체

형성능을 평가함. 3종 VLP 백신의 교차면역원성을 평가하기 위하여 아시아 지역유래 4종의 H5N1 항원을 사용하여 corss-HI test 를 실시함. 사용된 H5N1 항원은 역유전학을 사용하여 병원성이 제거된 형태로 제작되어 실험에 사용되었으며, 항원의 목록은 아래 표와 같음.

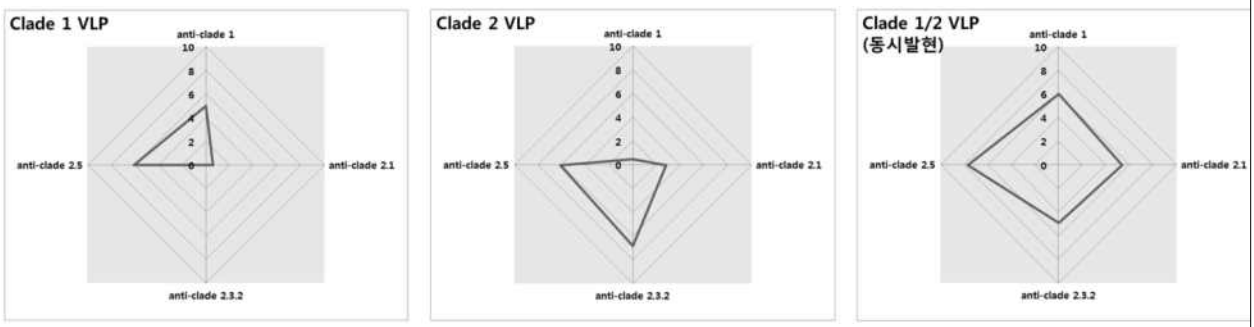
번호	Clade	HPAI H5N1 virus
1	Clade 1	A/Vietnam/1194/2004
2	Clade 2.1	A/Indonesia/5/2005
3	Clade 2.3.2	A/mandarin duck/K10-483/2010
4	Clade 2.5	A/chicken/Korea/ES/2003

- 또한 1차 접종 4주 후 2차 접종 (Boosting) 하고 2차 접종 4주 후 혈청을 채취하고 위와 동일한 방법으로 4종의 HPAI H5N1 항원에 대한 cross-HI test를 실시함.

<그림 3-13. 개발된 VLP (Clade 1, Clade 2, Clade 1+2) 항원의 면역원성>
(priming 3주 후 HI titer)



<그림 3-14. 개발된 VLP (Clade 1, Clade 2, Clade 1+2) 항원의 면역원성>
(Boosting 3주 후 HI titer)



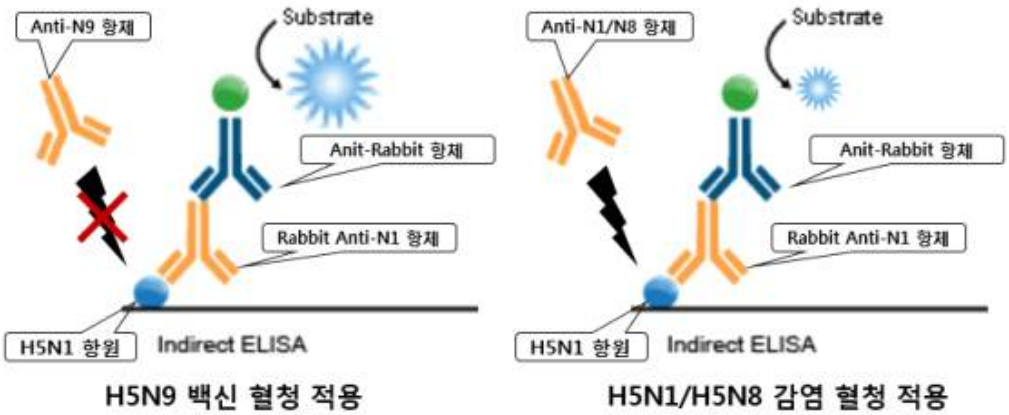
- cross-HI test 결과 Clade 1+2 동시발현 VLP 백신의 경우 단일 Clade 의 HA 만을 발현하는 VLP 와 비교하여 다양한 Clade 의 H5N1 바이러스에 대하여 강화된 교차면역원성을 보임.
- Clade 1+2 동시발현 VLP를 사용하여 백신을 개발하고 적용 할 경우 보다 다양한 HPAI H5N1 바이러스에 광범위한 교차 방어능을 제공 할 것으로 기대됨.

2. HPAI 백신/감염개체 혈청학적 감별(DIVA)을 위한 진단용 항원개발

가. HPAI 역유전학(RG) 감별(DIVA)을 위한 진단항원 개발

- Indirect competitive ELISA를 이용하여 백신한 개체와 야외감염 개체를 구별하기위해 위의 역유전학을 이용한 항원을 개발하여 백신주로 선정한 H5N9 형 백신과 구별하는 전략을 수립함.
- 2010년 국내 고병원성 조류인플루엔자 분리주인 H5N1형 바이러스를 competitive ELISA의 항원으로 사용하게위해 고병원성 인자를 제거하고 내부 유전자를 PR8으로 교체한 RG 바이러스를 생산하였음.
- 고병원성인자를 제거한 항원은 BL2시설에서 사용 할 수 있으며, 계란에서 고증식성이 있기 때문에 진단용 항원의 대량 생산에 적합함.

<그림 3-15. DIVA를 위한 진단요 항원의 15. Indirect competitive ELISA의 모식도>



- 위의 그림처럼 H5N1 진단용 항원의 H5N9형 백신에의해 생긴 항 N9 항체가 부착 할 수 없기 때문에 이를 이용하여 간접적으로 발색이 상대적으로 증가 되는 것을 이용함.
- H5N1 또는 H5N8형 감염에의해 생긴 항 N1 또는 N8 항체는 H5N1 진단용 항원에 Rabbit Anti-N1항체와 경쟁적으로 결합하게되어 간접적인 발색이 상대적으로 감소 되는 것을 이용함.

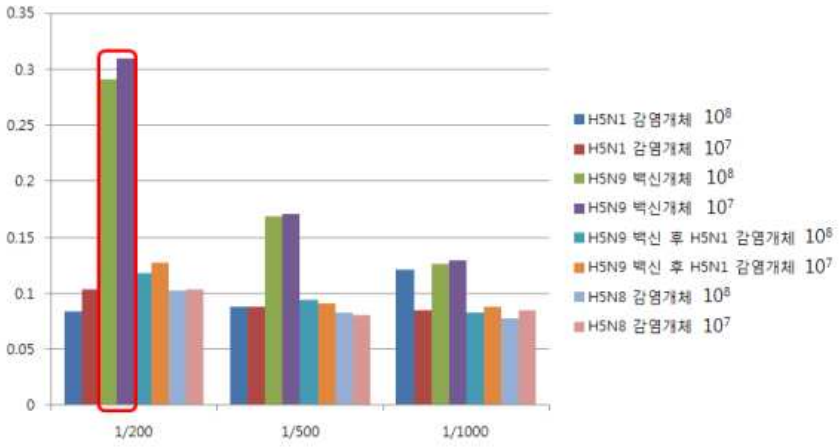
나. DIVA 항원의 검정

개발된 DIVA 항원을 96-well plate 에 코팅하고 competitive ELISA를 사용하여 백신개체와 감염개체를 구별함. 오리의 경우 연구가 매우 미흡하게 이루어져 있는 축종으로써 오리의 항체에 반응하는 2차 항체의 확보는 매우 제한적임. 따라서 축종에 구애받지 않고 적용이 가능한 ELISA 키트의 개발을 위하여 competitive ELISA 방식을 사용함. 실험을 위한 시료로는 HPAI 감염 오리의 혈청과 본 연구과제에서 개발된 DIVA 백신을 접종받을 오리의 혈청을 사용함.

1) DIVA 항원의 코팅 농도별 1차 항체의 적용 농도 별 DIVA 항원평가

- 개발된 DIVA 항원을 well 당 코팅량을 설정하기 위하여 불활화 DIVA 항원을 2가지의 농도로 나누어 코팅을 실시함. (10^8 및 10^7 EID_{50}/ml 의 바이러스를 well 당 100ul 씩 코팅함.)
- 1차 항체의 적용 농도를 설정하기 위하여 1차 항체 (rabbit anti-N1 poly clonal antibody) 를 각각 1:200, 1:500, 1:1000 로 희석하여 실험을 실시함.
- 적용 시료는 모두 오리혈청임. 시료의 종류는 1. HPAI H5N1 감염오리 혈청, 2. HPAI H5N8 감염오리 혈청, 3. DIVA 백신접종 오리혈청, 4. DIVA 백신접종 후 HPAI H5N1 감염혈청 으로 나누어 실시하였음. 1개 실험군은 각 종류별로 3마리의 오리를 사용하여 각각의 well 에 적용하였음.
- 항원이 코팅된 well에 시료(오리혈청)를 적용하고 wash 후 DIVA 항원 (H5N1항원) 의 NA 에 반응하는 1차 항체를 적용함. 1차 항체를 wash후 2차 항체를 1: 5000 으로 희석하여 적용하고 tetramethylbenzidine peroxidase (TMB) 를 사용하여 발색을 진행함. 발색 후 1M HCL을 첨가하여 발색을 중지하고 발색 정도를 측정하여 시료간의 차이를 비교 분석 하였음.

<그림 3-16. 항원 코팅 농도별, 1차 항체 적용 조건 별 DIVA 결과>



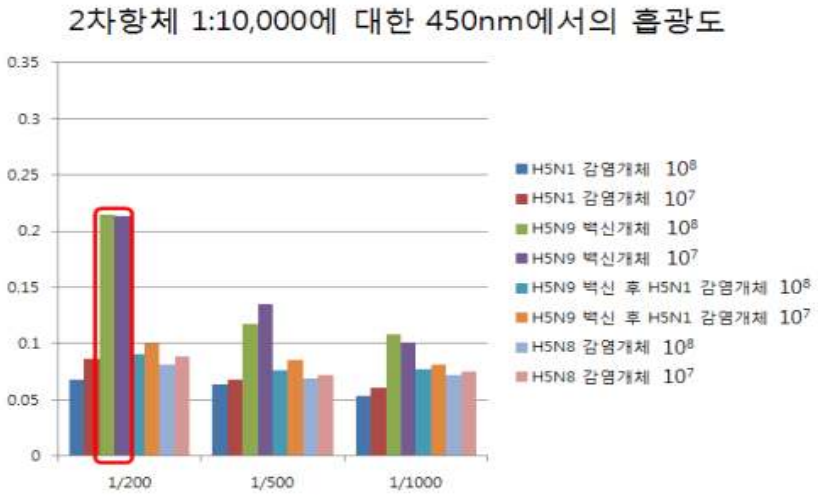
- 항원 코팅 농도별, 1차 항체 적용 조건 별 DIVA 실험 결과 두 가지의 항원 농도 모두에서 1차 항체 농도 1/200 또는 1/500에서 H5N9 백신 개체는 높은 흡광도 값을 나타낸 반면, H5N1 또는 H5N8 감염 개체 및 H5N9 백신 후 H5N1 감염 개체에서는 낮은 흡광도 값이 나타나 DIVA가 가능하였음. 본 실험을 통하여 최적의 코팅용 DIVA 항원 농도는 10^7EID_{50}/ml, 1차 항체의 희석배수는 1:200 로 확인되었음.

2) 2차 항체의 적용 농도 별 DIVA 항원평가

- DIVA 항원 코팅 농도별, 1차 항체 적용농도별 실험 결과를 바탕으로 2차 항체의 희석배율을 결정하기 위하여 상기실험과 동일한 조건으로 실험을 설정 하였으며, 2차 항체

의 농도만 1:10000 으로 희석하여 동일한 실험을 반복함.

<그림 3-17. 2차 항체 적용 조건(1:10000)에 따른 DIVA 결과>



- 2차 항체 농도를 줄인 경우 (희석배수 1:5,000 에서 1:10,000) 에도 DIVA 가 효율적으로 이루어졌음. 다만 2차 항체를 1:5000으로 했을 시보다 백신개체와 감염 개체 간의 차이가 줄어드는 경향이 관찰되었음.

- 결론적으로, 본 연구에서 개발된 DIVA 항원을 사용한 DIVA 는 효과적으로 이루어 졌으며, 최적화 작업을 위한 코팅 항원 농도는 10^7 EID_{50}/ml (100ul/well), 1차 항체 희석배수는 1:200, 2차 항체 희석배수는 1:5000 으로 결정함.

3. 오리용 신규 어쥬번트 개발

가. 오리의 Toll-like receptor(TLR)를 자극하는 agonist 선별

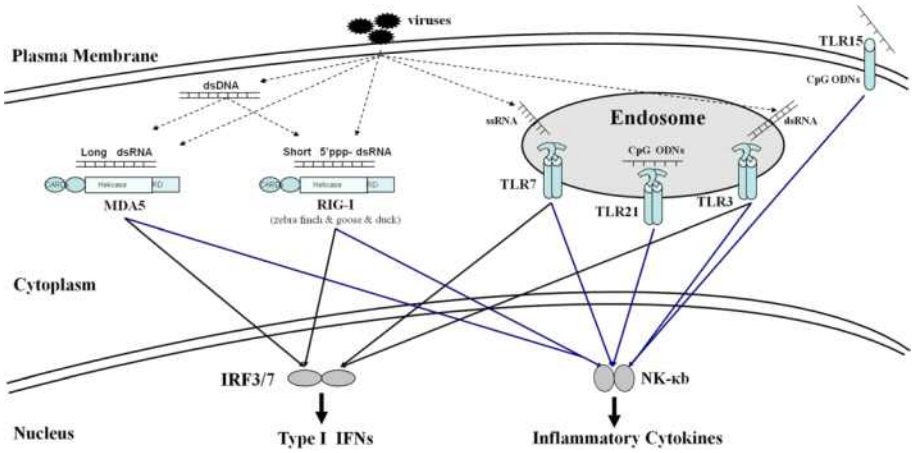
- Toll-like receptor는 체내 선천성 면역반응의 초기에 매우 중요한 역할을 하는 시그널을 전달하는 receptor로서 외래 미생물 구조를 감지하는 역할을 함.
- 일찍이 포유류에서 다양한 pattern recognition receptors (PRR)이 밝혀졌고, 조류에서는 최근에 많은 연구가 이루어져 많은 부분이 포유류의 TLR과 유사한 것으로 조사됨.
- 그러나 몇 가지 예외 인 점은 pseudo TLR8을 가지며, TLR9dl 없으며, 추가적으로 TLR1La, TLR1Lb, TLR15, TLR21이 별도로 존재함.
- 특이 오리는 대표적인 가금류인 닭과 달리, 바이러스를 감지하는 데 매우 중요한 요소인 dsRNA를 감지하는 RIG-1을 가지고있음이 밝혀져 조류인플루엔자에 닭보다 저항성이 좋은 것으로 알려져 있음.

<표 3-4. 오리와 닭의 TLR의 비교(출처; Shun Chen et al., 2013>

Pattern recognition receptor (PRR)	Human	Chicken	Duck/Goose	Origin of ligand
Membrane-bound PRR (TLR)				
On plasma membrane	TLR1/6/10	TLR1La TLR1Lb	Not reported	Unknown; bacteria
	TLR2	TLR2a TLR2b	Present in duck; Not reported in goose	Unknown; Bacteria
	TLR4	Present	Present	Unknown
	TLR5	Present	Not reported in duck; Present in goose	Bacteria
	TLR11	Absent	Not reported	Unknown
	Absent	TLR15	Not reported in duck; Present in goose	Bacteria; Virus
In intracellular vesicles	TLR3	Present	Present in duck; Not reported in goose	Virus
	TLR7	Present	Present	Virus
	TLR8		Pseudogene	
	TLR9		Absent	
	Absent	TLR21	Not reported	Unknown
Cytoplasmic PRR				
RLR				
	RIG-I	Absent	Present	Virus
	MDA5	Present	Present	Virus
	LGP2	Present	Present	Virus
NLR				
NOD	NOD1	Present	Not reported	Unknown
	NOD2	Absent	Not reported	Unknown

- 본 과제에서 개발하고자 하는 백신은 고병원성 조류인플루엔자와 살모넬라에 대한 백신으로서, 기본적으로 바이러스와 세균을 감지 할 수 있는 TLR이 TLR ligand를 어쥬번트 후보로서 선택하는 기준이 되었음.
- 바이러스를 감지 할 수 있는 오리의 TLR은 TLR-3, 7, 21이 있고 이외에 Pattern recognition receptor(PRR)의 일종으로 Rod-like receptor로서 RIG-1, MDA5, LGP2 가 있음.
- 박테리아를 감지 할 수 있는 오리의 TLR은 TLR-1, 2, 5, 6, 10이 존재함.
- 아직까지 오리에서 TLR를 이용한 백신 시험은 이루어져있지 않으나 가금류인 닭에서는 연구가 진행중임.
- TLR2, 5번은 peptidoglycan, lipoprotein, flagellin을 ligand로 하는 receptor로서 닭에서 어쥬번트로 쓰일 시 조류인플루엔자 백신의 방어를 증진시킨다고 알려져있음(St Paul M et al., 2014).
- TLR3, TLR4, TLR21이 감지 할 수 있는 poly I:C, LPS, CpG를 예방적 투여 시 백신을 하지 않고도 면역자극을 일으켜 조류인플루엔자에 대한 방어능을 보인다고 알려져 있음(St Paul M et al., 2012).
- 살모넬라의 flagellin 구조는 TLR5번을 자극하는 물질로서 닭에서 조류인플루엔자 백신의 어쥬번트로 이용 시 점막면역을 활성화시킨다고 알려져있음(Hso-Chi Chaung et al., 2012)

<그림 3-18. 조류의 바이러스에 대한 선천면역 반응인지>



- 위의 선행연구들을 기반으로 널리 알려진 LPS, poly I:C, CpG, Chitosan을 선천면역 어쥬번트로 선정하고 차후 어쥬번트의 개발에 이용함.
- LPS, poly I:C, chitosan은 SIGMA-ALDRICH사의 제품을 이용하였고, CpG-ODN은 CANADA, Saskatchewan 대학의 Gomis 교수로부터 제공받음.

나. TLR agonist를 어쥬번트에 첨가 신규 백신 어쥬번트 효능평가

1) 살모넬라 백신의 신규 어쥬번트 개발

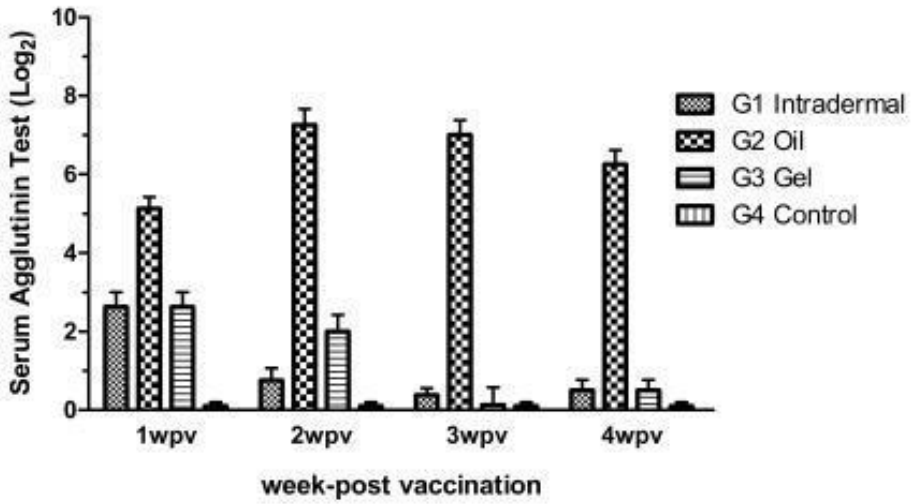
- 오리에서 Salmonella typhimurim 항원과 신규 어쥬번트와 면역반응 연구를 위해 면역반응을 일으키는 항원과 기존에 사용 중인 오일, 젤 어쥬번트와 비교 실험을 실시함.
- 면역반응 연구용 시험 항원을 생산하기 위해 도압장에서 분리된 Salmonella typhimurim 1ml을 150ml TSB배지에 넣어 12시간도안 1차 증균함.
- 1차 증균된 150ml을 1.5liter TSB배지에 18시간동안 2차 증균함.
- 2차 증균된 세XLD 배지에서 $\times 10\ cfu/ml$로 증균 되었음을 확인함.
- 6500rpm으로 15분동안 농축하여 최종적으로 $6\times10^{8} cfu/ml$로 PBS로 희석한 후 3일동안 37℃에서 3일동안 0.3% formalin용액으로 만들어 불활화시킴.
- 불활화된 세균은 다시 TSB배지에 접종하여 증균 여부를 확인함.

<표 3-5. 기존 어쥬번트의 오리에서 면역반응 유도 시험군>

	G1	G2	G3	G4
항원량	$\times 10\ cfu$			(-) control
어쥬번트	없음	oil	gel	
접종경로(용량)	피내(50ul)	근육(0.5ml)	근육(0.5ml)	

- 본 과제의 목표이자 인플루엔자 바이러스 항원 전달 경로로 선행연구결과가 존재하는 피내접종 방법을 포함하여 기존에 이용하고 있는 오일, 젤 어쥬번트를 위에서 제작한 시험 항원과 혼합하여 4주령 오리에 피내접종 또는 근육접종으로 면역반응을 유도함.

<그림 3-19. 기존 어쥬번트의 오리에서 면역반응 유도 시험 결과>



- 면역반응 유도 후 1, 2, 3, 4주 후에 목정맥에서 체혈 후 serum separation tube(BD, USA)를 이용하여 혈청을 분리함.
- 분리된 혈청은 농림축산검역본부의 국가검정동물용의약품 검정기준 고시에따라 생산된 표준항원과 serum agglutinin test(SAT) 반응으로 항체 역가를 측정함.
- 어쥬번트 없이 피내접종으로 면역반응 유도 시 접종 1주 후에는 SAT 반응으로 약 2.7의 항체역가를 보였으나 이후 역가는 떨어짐.
- Oil 어쥬번트를 이용하여 근육에 면역반응 유도 시 접종 1주 후에 다른 시험군보다 유의적으로 높은(약 5) 항체역가를 보였으며, 2주 후에는 약 7의 항체역가를 보이고 이후 서서히 떨어지는 것을 관찰 할 수 있었음.

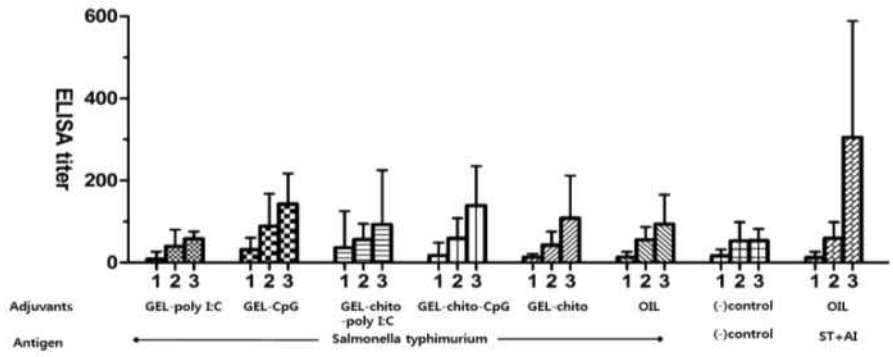
- Gel 어쥬번트를 이용하여 근육에 면역반응 유도 시 접종 1, 2주 후에 약 2의 항체역가를 보였고 이후 백신 접종 3, 4주에 항체역가를 관찰 할 수 없었음.
- 본 시험 결과로 4주령 오리에는 불활화 S. *typhimurium* 항원이 Oil 어쥬번트를 적용했을 때 가장 높은 면역반응을 일으킨다는 것을 확인하였음.
- 육용오리의 살모넬라 백신을 위해서는 어린 일령의 면역력형성이 이루어져야함. 따라서 시험결과를 바탕으로 TLR agonist를 이용하여 면역력을 향상시키기 위해 1일령 오리에 면역시험을 실시함.

<표 3-6. 어린일령의 오리에서 면역반응 유도 시험군>

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
항원량	$\times 10\ cfu$ (*Salmonella typhimurium*)						(-) control	ST+AI
어쥬번트-1	GEL					OIL		OIL
어쥬번트-2	poly I:C	CpG	poly I:C	CpG	-	-		-
어쥬번트-3	-	-	chito	chito	chito	-		-
접종경로(용량)	피하 접종(0.1ml)							

- 전 실험에서 4주령 오리에서 가장 좋은 효과를 보였던 Oil 어쥬번트를 적용 전, 어린일령임을 감안하여 염증반응이 상대적으로 적은 Gel 백신에 TLR agonist를 적용함.
- Poly I:C, CpG-ODN, chitosan 총 3가지 TLR agonist 어쥬번트에 GEL 백신을 기반으로 어쥬번트를 제작하였음. LPS는 Salmonella thyphimurium 자체에 LPS가 있음을 가만하여 그룹에서 제외하였음.
- G8은 역유전학 기술로 개발한 고병원성 조류인플루엔자 백신주와 살모넬라를 Oil 어쥬번트에 혼합한 군으로서 살모넬라 백신과 고병원성 조류인플루엔자 백신 기능을 동시에 수행 할 수 있는 백신임과 동시에 두 항원이 동시에 서로의 어쥬번트로서 효과를 기대 하는 실험군임.

<그림 3-20. 어린일령의 오리에서 면역반응 유도 시험 결과>



- 백신 후 1, 2, 3주 후 목정맥에서 혈액을 수거 한 후 ELISA(Bio-check)를 이용하여 항체 역가를 측정함.
- 측정한 역가는 주령이 지남에 따라 상승하는 경향을 보였으나 유의적인 증가는 보이지 않았음.
- G8 그룹의 항체를 제외하고 모든 혈청에서 항 살모넬라 항체를 검출 할 수 없었으며, 어린 일령에서는 TLR agonist를 첨가한 어쥬번트가 강력한 면역반응을 유발하지 않았음.
- 결과적으로 오리용 살모넬라 백신의 개발에는 젤 형태의 어쥬번트 보다는 오일 어쥬번트의 효능이 우수한 것으로 확인 되었음.

2) 고병원성 인플루엔자의 신규 어쥬번트 개발

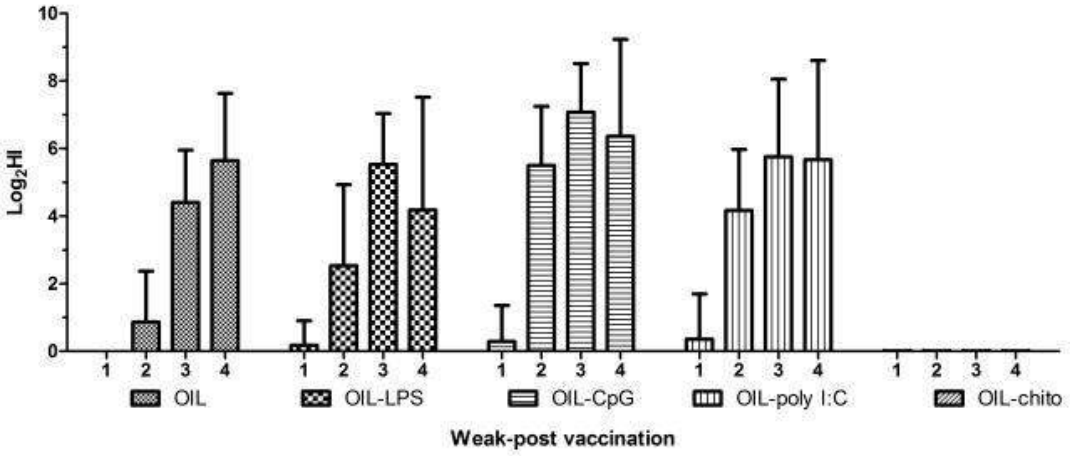
- 개발된 RG AIV K10-483 항원을 이용하여 육용오리에서 TLR agonist를 이용하여 면역력을 향상시키기 위해 1일령 오리에 면역시험을 실시함.

<표 3-7. 어린일령의 오리에서 면역반응 유도 시험군>

	G1	G2	G3	G4	G5
항원량	0^{-2} $ID_{50}/dose$				
어쥬번트-1	OIL				
어쥬번트-2	CpG	poly I:C	LPS	chito	-
접종경로(용량)	피하 접종(0.1ml)				

- 전 실험에서 4주령 오리에서 가장 좋은 효과를 보였던 Oil 어쥬번트를 적용하고 TLR agonist를 추가함.
- 백신 접종 1, 2, 3, 4주 후에 목정맥에서 혈액을 수거하고 혈청을 분리 한 후 위의 HI test로 항체 역가를 측정함.

<그림 3-21. 어린일령의 오리에서 면역반응 유도 시험 결과>



- Oil 어쥬번트와 함께 LPS, CpG, poly I:C, chitosan을 혼합하여 1일령 오리에 피하로 면역반응을 유도한 결과 chitosan을 제외한 나머지 3가지 TLR agonsit는 높은 면역반응을 유도하였음.
- Oil 어쥬번트만을 사용 하였을 때 백신 접종 2주 후 항체 반전을 HI test로 확인 할 수 있었고, 백신 후 4주까지 항체가는 상승하여 약 6 Log_2HI의 역가를 얻을 수 있었음.
- 특히 Oil-CpG 어쥬번트로 백신을 실시한 그룹에서는 백신 접종 2주 후에 급격히 항체 역가가 상승하여 유의적인 차이로 6 Log_2HI를 기록하였고 이후 항체 역가는 더 높아져 약 7 Log_2HI를 기록하였음.
- 본 실험결과로 고병원성 조류인플루엔자 백신의 어쥬번트로서 Oil-CpG를 이용한 백신이 가장 면역반응이 좋았음을 알 수 있었음.

4. 개발된 항원 및 어쥬번트의 실험실내 제작 원가분석을 통한 산업화 전략수립

가. RG 항원의 산업화 전략수립

- 역유전학으로 만든 백신주 항원은 계태아란에서 고증식성을 가지는 PR8 균주를 이용함
- 불활화전 allantoic fluid의 바이러스 역가는 약 $10^{8.6}EID_{50}$/ml이며 현재 국내에 상업화된 불활화 저병원성 조류인플루엔자 백신 원액 역가 $10^{10}EID_{50}$/ml에 비하여 낮음 농도임.
- 따라서 바이러스의 역가를 상승을 도모하기 위해 계태아란에 계대배양을 시행 할 필요가 있음. 2차년도에 이를 보완하기위해 계대배양 시험을 계획함.
- 계태아란 원액에서 약 8ml의 allantoic fluid 원액을 얻을 수 있음. 따라서 수당 0.5ml의 백신 중 순수한 allantoic fluid만을 백신제조용으로 사용하였을 때 150ul를 사용하게됨.

10일령 계태아란은 알당 300원이어서 결국 수당 백신 항원은 5.625원을 사용하게 됨.

나. VLP 항원의 산업화 전략

- Serum-free 배지를 이용한 VLP의 생산은 농축과정을 제외한 순수 항원 확보에 오리 1수당 800원의 단가가 예상되고 이것은 기존의 계태아란 생산법보다 약 160배의 항원 생산 원가임. Serum 백지를 사용할 경우 약 절반정도 상산단가를 낮추어 1수당 약 400원에 항원을 생산 할 수 있으나, 이 역시도 불활화 바이러스 항원과 비교 시 액 80배의 원가가 필요하므로, 이를 극복하기 위한 대량 생산 및 Bio-tank를 이용한 공정방법에 대한 추가 기술 확보가 필요함.

다. 살모넬라 항원의 산업화 전략수립

- 살모넬라 항원제조용으로 쓰이는 TSB배지는 리터당 가격이 67650원임. 따라서 108cfuml/dose또는 109cfu/ml/dose로 백신을 생산 할 때 수당 4.2~42원의 항원제조 비용이 소모됨. 4.2~42원의 항원제조 비용은 살모넬라 백신의 산업화로 적합한 가격으로 기대됨.

라. 어쥬번트의 산업화 전략수립

- 본 실험에서 수당 사용된 어쥬번트의 양은 각각 CpG 50ul, LPS 250ug, poly I:C 80ug으로, 접종 수당 가격으로 계산 할 때 CpG는 수당 3000천원, LPS는 수당 2857원, poly I:C는 수당 240원으로 계산 할 수 있음.
- 본 실험에서 사용된 Oil, Gel 어쥬번트는 Oil 1리터에 3만 2천원(수당 11.2원), Gel 1리터당 2만 8천원(수당 2.8원)으로 Oil 어쥬번트가 Gel 보다 4배 비싼 것으로 나타났음.
- TLR agonist 중 가장 효과가 있었던 CpG는 실험용으로 정제된 것임을 감안하여도 매우 비싼 가격이기 때문에 이를 대체 할 수 있는 세균내 CpG motif를 이용한 어쥬번트의 개발 및 발굴이 필요함.

5. 오리 살모넬라 공격접종 모델 확립

가. 오리에서 접종경로별 *S.* Typhimurium의 병원성 및 균배설율 조사

1) 1일령 오리에서 *S.* Typhimurium의 근육접종시 병원성 및 균배설율 조사 결과

- 국내 분리 S. Typhimurium중 오리 유래 3주(DST001, DST005, DST020)와 닭 유래 2주(CST015, CST026) 등 대표균주 5주를 선발하여 오리에서의 병원성 정도를 비교조사하였음.

- 1일령 육용오리에 S. Typhimurium을 수당 ~10^8 CFU/0.1ml씩 근육에 접종하여 폐사율과 균배설율을 조사하였음.

<표 3-8. 1일령 오리에서 *S.* Typhimurium 근육접종시 병원성 및 균배설율 조사 결과>

Strains	Dose (CFU/0.1ml)	Mortality(%)	*Salmonella* isolation from cloacal swabs after inoculation		
			1 dpi	3 dpi	7 dpi
DST-001	6.5 x 10^7	1/10 (10)	3/10	6/9	7/7
DST-005	9.9 x 10^7	10/10 (100)	9/10	-	-
DST-020	1.1 x 10^7	0/10 (0)	1/10	8/10	10/10
CST-015	1.0 x 10^8	10/10 (100)	10/10	-	-
CST-026	1.6 x 10^8	9/10 (90)	9/10	0/1	1/1
Control	-	0/10 (0)	0/10	0/10	0/10

- 위의 표에서와 같이, 폐사는 공격접종후 1일째부터 4일째까지 나타났고 폐사율이 0%(DST-020)에서 100%(DST005, CST015)까지 다양하게 확인되었으며, 생존개체에 대한 주기적인 균배설율 조사에서는 1주일째까지 균배설이 확인되었음.

2) 1일령 오리에서 *S.* Typhimurium의 경구접종시 병원성 및 균배설율 조사 결과

- 동일한 5주의 S. Typhimurium 대표균주(DST001, DST005, DST020, CST015, CST026)를 이용하여 1일령 육용오리에 각 균주를 수당 ~108 CFU/0.1ml씩 경구로 접종하여 병원성과 주기적인 균배설 정도를 비교 조사하였음.

<표 3-9. 1일령 오리에 S. Typhimurium을 경구접종시 병원성 및 균배설율 조사 결과>

Strains	Dose (CFU/0.1ml)	No. of infected ducks	No. of bacterial growth on mediums after oral inoculation					Mortality (%)
			Day1 (cloaca)	Day 3 (cloaca)	Day 5 (cloaca)	Day 7 (cecum)	Day 7 (spleen)	
DST001	7.7×10^{-7}	10	10/10	9/10	7/10	10/10	5/10	0/10 (0)
DST005	8.3×10^{-7}	10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	0/10 (0)
DST020	5.6×10^{-7}	10	4/10	10/10	10/10	9/10	3/10	0/10 (0)
CST015	6.4×10^{-7}	10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	1/10 (10)
CST026	1.0×10^{-8}	10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	0/10 (0)
Control	-	10	0/10	-	-	0/9	0/9	1/10 (10)

- CST015 접종군에서의 공격접종 5일째에 1수 폐사가 일어났으며 섬유소성 간포막염이 관찰되었음. 다른 균주를 접종한 시험군에서는 폐사는 확인되지 않았으나, 주기적인 균배설율 조사에서 1주일의 관찰기간내내 높은 균분리율을 보였음.
- 특히, 오리 유래 DST005와 닭 유래 CST015 및 CST026의 경우 지속적으로 100%의 균배설율을 보였고, 7일째 안락사시켜 비장과 맹장에서 균분리를 시도한 결과 모두 100%의 균분리율을 보였음.

나. 공격균주 선발 및 오리 공격접종 모델에서의 조사항목 결정

1) 공격균주 선발 및 접종균 농도 설정

- 오리에서의 S. Typhimurium 공격접종을 위한 공격균주로 병원성 비교조사에서 사용된 5주의 대표균주 중 오리에서 유래했으면서 근육접종 및 경구접종에서 공히 높은 폐사율 또는 균배설율을 보인 DST005 균주를 공격접종 균주로 선발하였음.
- 접종균 농도는 근육접종시 100%의 폐사율과 경구접종시 100%의 균배설율을 보인 농도인 ~108 CFU 보다 10배 높은 수당 ~109 CFU를 접종하는 것으로 잠정 결정하였음.

2) 공격접종실험에서의 공격접종후 조사항목 결정

- 임상학적 관찰: 임상증상, 폐사, 접종부위 국소반응 등에 대하여 매일 관찰하면서 이상여부를 판단하여 기록하고, 최소 1주 단위로 체중을 측정하여 공격접종 전후의 변화정도를 분석함
- 세균학적 관찰: 공격접종후 1일째부터 수일 간격으로 총배설강을 통한 균배설 여부에 대하여 지속적인 조사를 수행하고, 공격접종후 2주째에 안락사 시켜 간, 비장, 맹장 등의 내부장기로부터 균분리를 실시하여 균 오염정도를 조사함.

6. 오리용 식중독 유발 살모넬라 백신항원 개발

가. 오리유래 *S.* Typhimurium 균주들의 특성분석 및 백신주 선발

2009년부터 2013년까지 국내 사육 오리의 분변 등으로부터 총 85주의 S. Typhimurium 주를 분리하였으며, 이들의 유전적 특성, 병원성을 비교분석하고 이를 토대로 백신후보주 2주를 선발하여 시험에 사용하였음.

1) Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)를 이용한 *S.* Typhimurium 균주들의 특성분석

- 국내 분리 오리 유래 S. Typhimurium 균주 85주를 대상으로 XbaI 제한효소를 이용한

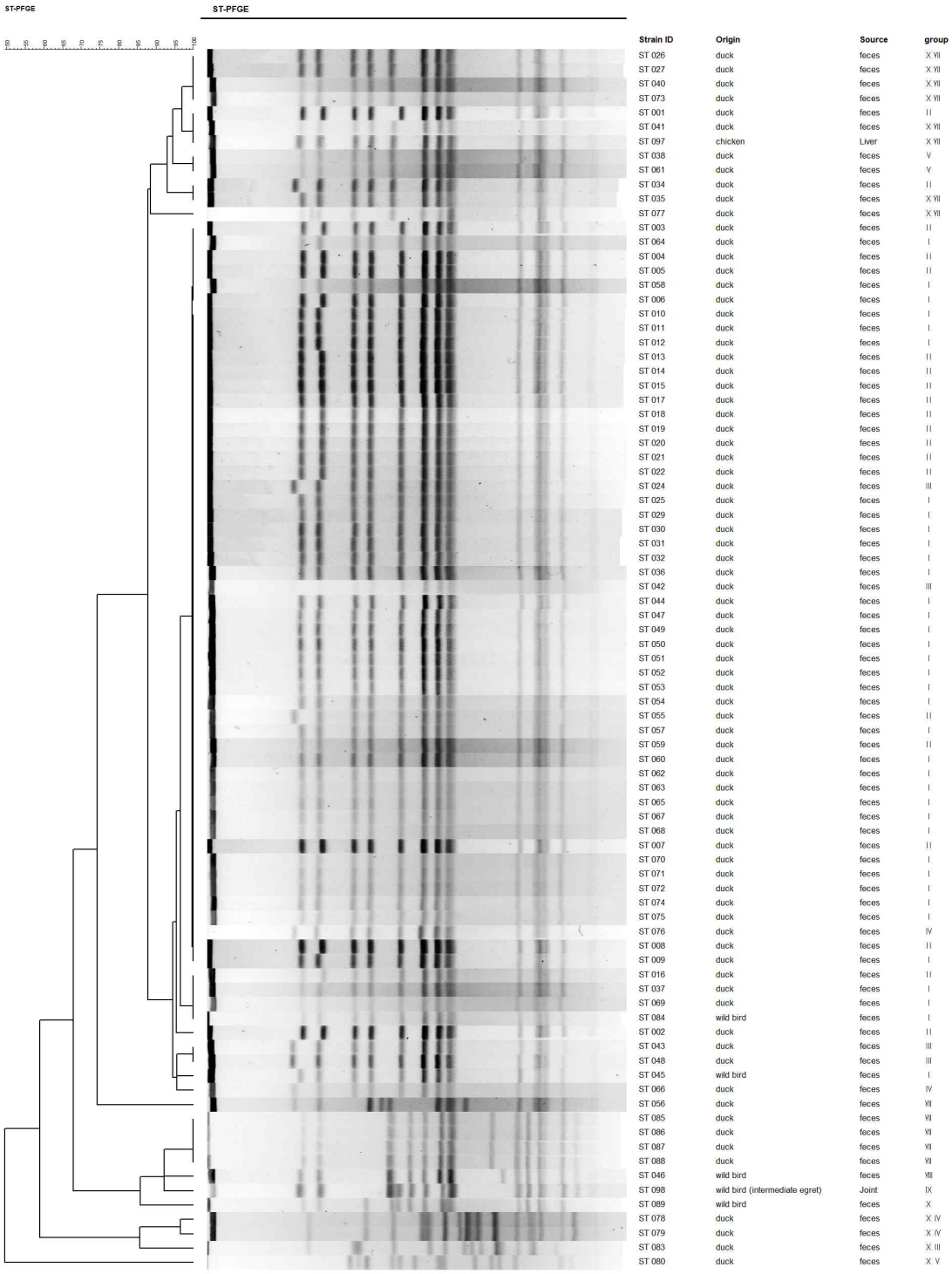
PFGE 분석으로 유전자형을 조사하여 총 11가지의 유형으로 나타남을 확인하였으며 특히 I형이 51.8%를 차지하여 가장 대표적인 유전자형으로 확인되었음.

<표 3-10. *S.* Typhimurium의 PFGE 패턴별 분포>

PFGE type	균수(분포율%)
Ⅰ	44 (51.8 %)
Ⅱ	20 (23.5 %)
Ⅲ	4 (4.7 %)
Ⅳ	2 (2.4 %)
Ⅴ	2 (2.4 %)
Ⅵ	1 (1.2 %)
Ⅶ	5 (5.9 %)
Ⅷ	1 (1.2 %)
Ⅸ	1 (1.2 %)
Ⅹ	1 (1.2 %)
ⅩⅢ	1 (1.2 %)

- 위의 PFGE 유형을 dendrogram으로 나타내면 다음과 같이 나타남.

<그림 22. Dendrogram of PFGE types obtained by *Xba*I-PFGE of 85 *Salmonella*>
Typhimurium strains isolated from ducks and wild birds.



Strain ID	Origin	Source	group
ST 026	duck	feces	X YII
ST 027	duck	feces	X YII
ST 040	duck	feces	X YII
ST 073	duck	feces	X YII
ST 001	duck	feces	II
ST 041	duck	feces	X YII
ST 097	chicken	Liver	X YII
ST 038	duck	feces	V
ST 061	duck	feces	V
ST 034	duck	feces	II
ST 035	duck	feces	X YII
ST 077	duck	feces	X YII
ST 003	duck	feces	II
ST 064	duck	feces	I
ST 004	duck	feces	II
ST 005	duck	feces	II
ST 058	duck	feces	I
ST 006	duck	feces	I
ST 010	duck	feces	I
ST 011	duck	feces	I
ST 012	duck	feces	I
ST 013	duck	feces	II
ST 014	duck	feces	II
ST 015	duck	feces	II
ST 017	duck	feces	II
ST 018	duck	feces	II
ST 019	duck	feces	II
ST 020	duck	feces	II
ST 021	duck	feces	II
ST 022	duck	feces	II
ST 024	duck	feces	III
ST 025	duck	feces	I
ST 029	duck	feces	I
ST 030	duck	feces	I
ST 031	duck	feces	I
ST 032	duck	feces	I
ST 036	duck	feces	I
ST 042	duck	feces	III
ST 044	duck	feces	I
ST 047	duck	feces	I
ST 049	duck	feces	I
ST 050	duck	feces	I
ST 051	duck	feces	I
ST 052	duck	feces	I
ST 053	duck	feces	I
ST 054	duck	feces	I
ST 055	duck	feces	II
ST 057	duck	feces	I
ST 059	duck	feces	II
ST 060	duck	feces	I
ST 062	duck	feces	I
ST 063	duck	feces	I
ST 065	duck	feces	I
ST 067	duck	feces	I
ST 068	duck	feces	I
ST 007	duck	feces	II
ST 070	duck	feces	I
ST 071	duck	feces	I
ST 072	duck	feces	I
ST 074	duck	feces	I
ST 075	duck	feces	I
ST 076	duck	feces	IV
ST 008	duck	feces	II
ST 009	duck	feces	I
ST 016	duck	feces	II
ST 037	duck	feces	I
ST 069	duck	feces	I
ST 084	wild bird	feces	I
ST 002	duck	feces	II
ST 043	duck	feces	III
ST 048	duck	feces	III
ST 045	wild bird	feces	I
ST 066	duck	feces	IV
ST 056	duck	feces	VII
ST 085	duck	feces	VII
ST 086	duck	feces	VII
ST 087	duck	feces	VII
ST 088	duck	feces	VII
ST 046	wild bird	feces	VIII
ST 098	wild bird (intermediate egret)	Joint	IX
ST 089	wild bird	feces	X
ST 078	duck	feces	X IV
ST 079	duck	feces	X IV
ST 083	duck	feces	X III
ST 080	duck	feces	X V

2) Microarray법을 이용한 *S.* Typhimurium 균주들의 병원성 유전자 검색조사

- PFGE에 의한 유전자형 분석 결과를 토대로 각 유형별 대표균주 12주(ST01, ST26, ST46, ST56, ST76, ST77, ST79, ST80, ST83, ST88, ST97, ST98)를 선발하고, 기존에 알려진 214개의 Salmonella 병원성 유전자로 구성된 microarray를 제작하여 이 균주

들의 병원성 유전자 함유 정도를 비교분석하였음(아래 그림에서 각 균주가 함유한 유전자는 파란색으로 표시됨).

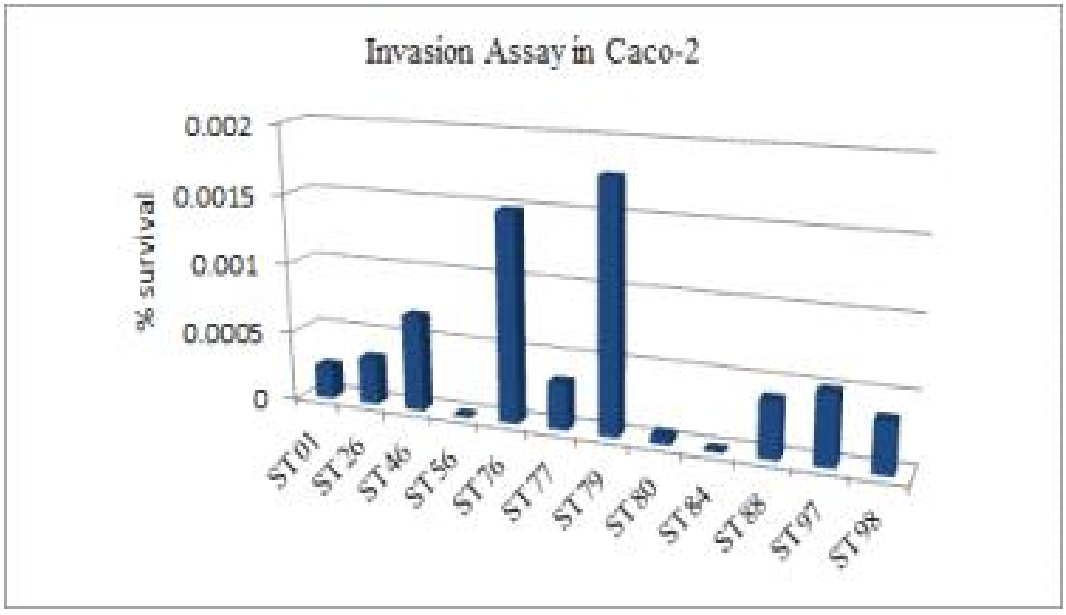
<그림 23. Microarray scanning results of *Salmonella* Typhimurium strains using GenePix 4100A Scanner (Positive genes are indicated as blue color)>

- 총 214개의 병원성 유전자 중 각 균주별 함유율은 ST01(60.7%), ST26(76.1%), ST46(77.1%), ST56(78.0%), ST76(79.0%), ST77(64.5%), ST79(63.6%), ST80(66.8%), ST83(87.9%), ST88(88.3%), ST97(92.1%), ST98(93.5%)로 나타났으며, 빈도가 높은 유전자형을 가지는 균주중 microarray 분석에 의한 병원성 유전자 양성률이 높으며 I 형에 속하는 균주인 ST26을 선발 하였음.

3) 세포주를 이용한 *S.* Typhimurium 균주들의 실험실내 병원성 비교 조사

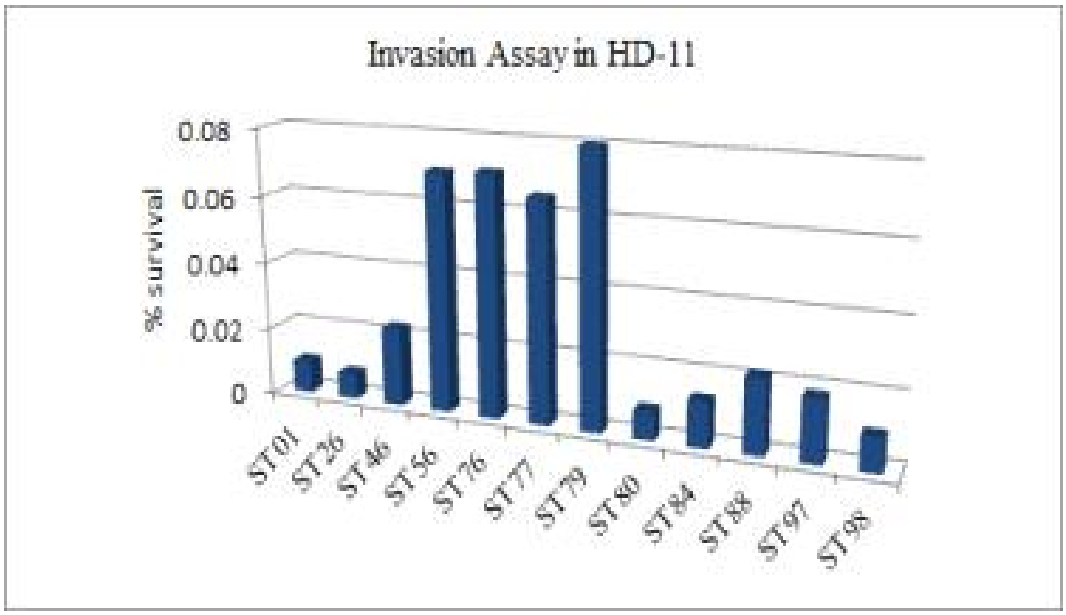
- Microarray 분석을 위해 선발된 동일한 12개의 대표균주에 대해서 2종의 세포주(Caco-2, HD-11)를 이용하여 실험실내 병원성 정도를 비교분석하였음.
- 사람 장상피세포에서 유래한 Caco-2 세포에 감염시켜 침습성(invasion)을 비교해본 결과, ST76고 ST79에서 상대적으로 침습성이 높게 나타났음.

<그림 3-24. Pathogenicity of *Salmonella* Typhimurium isolates in Caco-2 cells>



- 닭 유래 탐식세포인 HD-11 세포에 균을 감염시켜 탐식세포내에서의 균 생존능을 비교한 결과, ST56, ST76, ST77, ST79 등에서 상대적으로 균 생존능이 높은 것으로 나타났음.

<그림 3-25.> Pathogenicity of *Salmonella* Typhimurium isolates in HD-11 cells>



4) *S.* Typhimurium 백신주 선발

- PFGE에 의한 유전자형 분석에서 가장 빈도가 높은 유형으로 확인된 I형에 속하면서 Microarray 분석에서 병원성 유전자 양성율이 높은 균주인 ST26주를 백신후보주의 하나로 선발하였음.
- 12개의 대표균주에 대한 세포주를 이용한 실험실내 병원성 비교시험에서 두 세포주 Caco-2 및 HD-11에서 공히 높은 병원성을 보이고 PFGE 유전자형에서도 I형과 유사한 IV형을 보이는 ST76주를 또 다른 백신후보주로 하여 최종 2주의 백신후보주를 선발하였음.

나. 선발된 *S.* Typhimurium 백신주를 사용하여 제조한 시험백신의 면역원성 평가

1) *S.* Typhimurium 시험백신의 제조

- 시험백신 제조를 위하여 각 백신후보주를 배양후 원심분리하여 세포를 회수하고 0.2% 포르말린이 함유된 멸균 생리식염수(formalized physiological saline solution)에 부유시켜 불활화시킨후 Seppic ISA 70 오일과 균일하게 혼합한 후 이를 시험백신으로 사용하였음.
- 시험백신의 수당 접종농도를 기존 백신의 균수함량을 참고하여 2가지 108 CFU와 109 CFU로 결정하여 2주의 백신후보주에 대하여 각각 2가지의 다른 농도의 시험백신을 제조하여 동물접종실험에 사용하였음.

2) 오리에서의 *S.* Typhimurium 시험백신의 증체량에 미치는 영향 조사

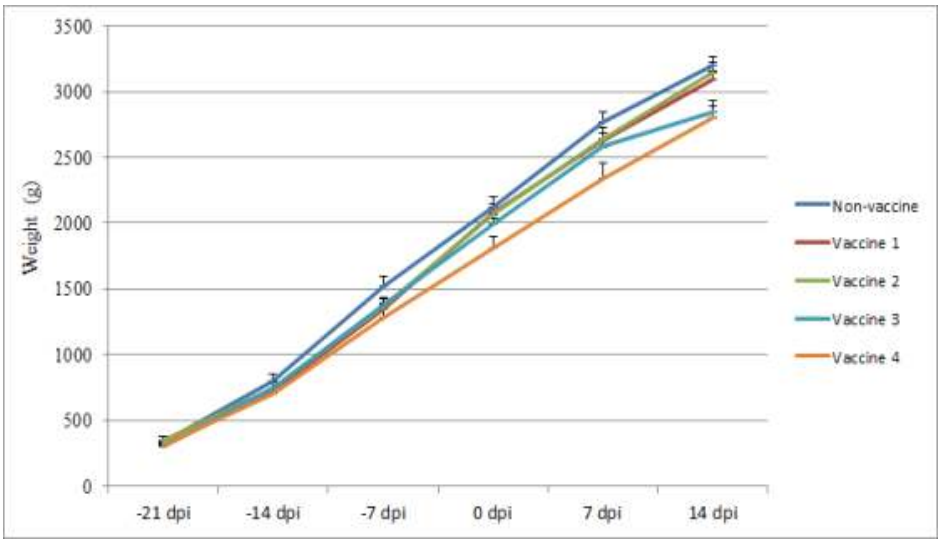
- 2주령의 오리로 구성된 4종의 시험백신 접종군과 무백신 대조군을 포함한 5개의 시험군을 작성하여 각 시험군별로 해당 시험백신을 접종하고, 3주후인 5주령에 각 시험군에 오리 유래 S. Typhimurium 병원성 균주(DST005)를 공격접종하여 2주간 방어수준을 비교 조사하였음.

<표 3-11. 오리에서의 *S.* Typhimurium 불활화 백신의 방어효과 조사 시험군>

Group	Vaccine strains	Vaccine dose (CFU/0.5ml/수)	Challenge dose (CFU/0.5ml/수)	No. of ducks
Non-vaccine	-	-	1×10^9	9
Vaccine 1	ST26	1×10^8	1×10^9	9
Vaccine 2	ST26	1×10^9	1×10^9	9
Vaccine 3	ST76	1×10^8	1×10^9	9
Vaccine 4	ST76	1×10^9	1×10^9	9

- 백신 접종 후 3주 동안(-21 dpi ~ 0 dpi)의 체중변화는 유의차를 보이지 않았으나, 공격접종(0 dpi) 후부터 대조군(non-vaccine)과 백신접종 시험군과의 유의성 있는 차이가 관찰되었음. 아래 그래프에서와 같이, 7 dpi에서는 vaccine 4 시험군, 14dpi에서는 vaccine 3 시험군과 vaccine 4 시험군에서 대조군과 비교하여 유의하게 체중이 감소하였음. 따라서, vaccine 1 시험군과 vaccine 2 시험군이 백신접종 및 공격접종 후에 증체량의 감소 없이 안전한 것으로 확인되었음.

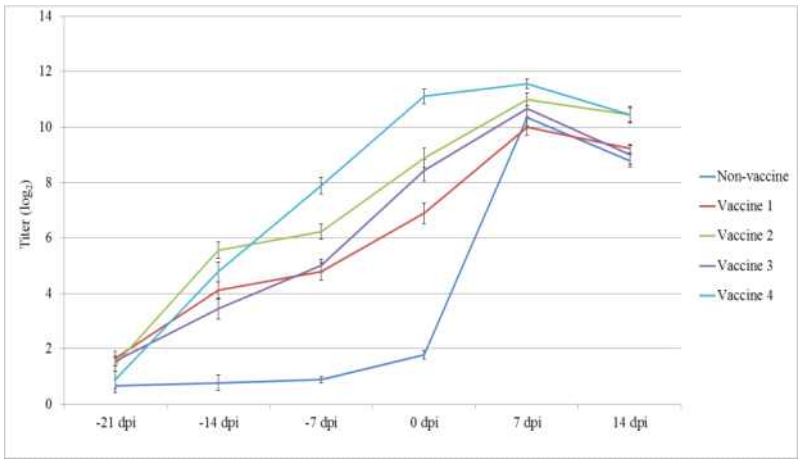
<그림 3-26. Effects of S. Typhimurium vaccines on body weight>



3) 시험백신의 오리에서의 면역원성(항체가) 조사

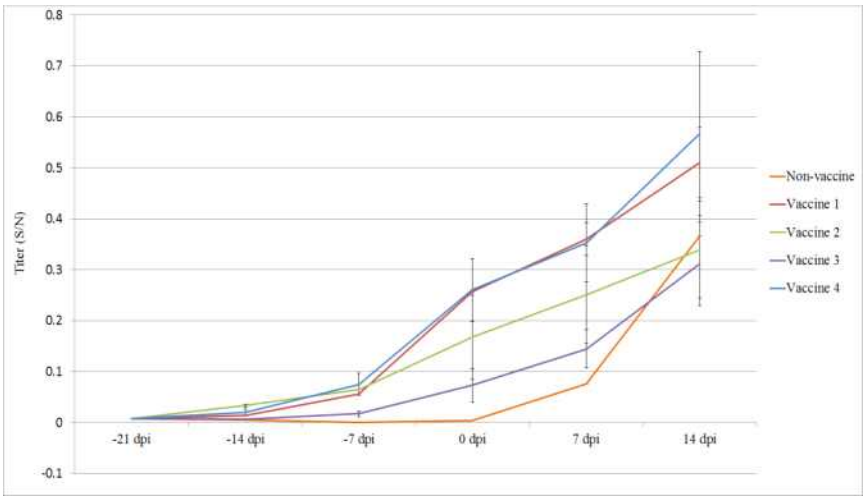
- 백신접종직전(-21 dpi), 공격접종직전(0 dpi), 공격접종 후 7일(7 dpi), 14일(14 dpi)에 오리 혈청에 대하여 S. Typhimurium 특이 항체가를 microplate agglutination test (MAT)와 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 사용하여 측정하였음.
- MAT의 경우 백신접종 시험군(vaccine 1, vaccine 2, vaccine 3, vaccine 4)에서는 7 dpi까지 급속하게 증가하다가 그 이후에는 비슷한 항체가를 나타내었으며, 반면 대조군의 경우 0 dpi까지는 항체가 거의 검출되지 않다가 공격접종 후부터 항체가가 급속하게 상승되어 역가수준은 실험군과 비슷하게 나타났음.
- 14 dpi부터 0 dpi까지 모든 백신접종 시험군은 대조군과 비교하였을 때 유의성을 띤 높은 항체가를 나타냈으며, -7 dpi부터는 vaccine 4 시험군이 가장 높은 항체가를 나타내었음.

<그림 3-27. Antibody titers against *S.* Typhimurium detected by MAT>



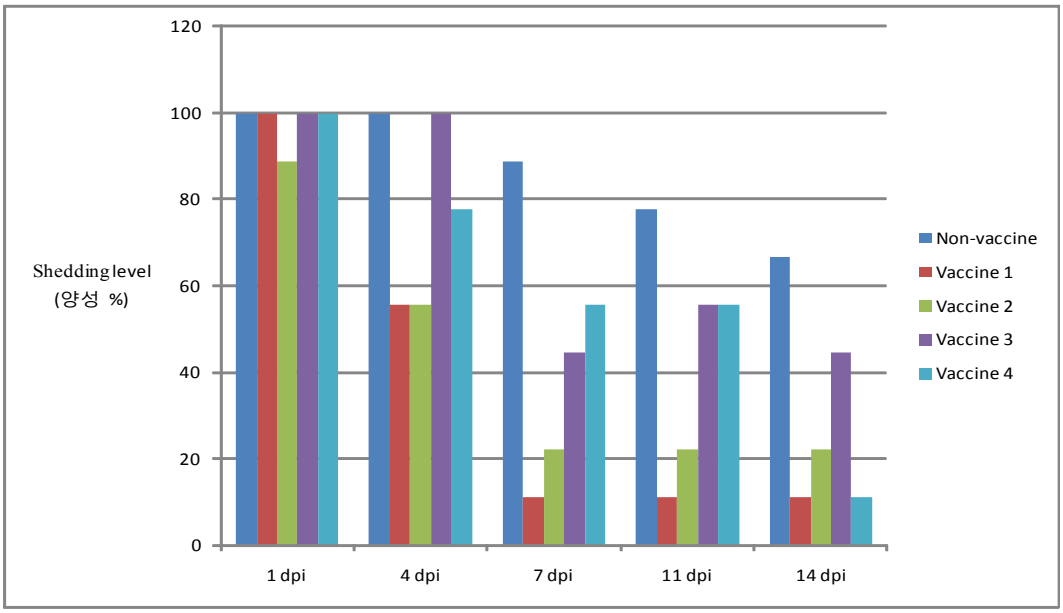
- ELISA로 항체가를 측정한 경우 아래의 그래프에서와 같이 백신접종 시험군의 항체가는 -7dpi부터 급격히 상승하는 것으로 나타났으며, 대조군의 항체가는 공격 접종(0 dpi) 후 상승하는 것으로 관찰되었음. 모든 실험군들이 -14 dpi부터 0 dpi까지 대조군과 유의차를 나타내었으며, vaccine 1 시험군과 vaccine 4 시험군이 높은 항체가를 나타내었음.

<그림 3-28. Antibody titers against *S.* Typhimurium detected by ELISA>



4) 시험백신의 *S.* Typhimurium 공격접종에 대한 방어효과 조사

- 공격접종후 시험기간인 14dpi 까지 대조군과 백신접종 시험군 모두에서 폐사는 확인되지 않았으며, 백신 접종 후 총배설강에서 swab하여 *S.* Typhimurium의 검출을 시도하였음. 총배설강내 *S.* Typhimurium은 4 dpi부터 대조군과 백신접종 시험군 간의 차이가 나타나기 시작하여, 14 dpi에서 vaccine 1, vaccine 2, vaccine 4 시험군이 대조군과 비교하였을 때 통계적 유의차를 보이며 균 배설이 감소한 것으로 나타났음.



- 또한, 시험종료일이 14 dpi에 대조군과 백신접종 시험군의 오리를 모두 안락사시켜 간, 비장, 맹장에서 균분리를 시도하여 분석한 결과, vaccine 1, vaccine 3 시험군의 일부 개체의 간에서 *S.* Typhimurium이 분리되었고, 모든 시험군의 맹장에서 *S.* Typhimurium이 검출되었으나, 유의적 차이를 나타내지는 않았음.

	Liver	Spleen	Cecum
Non-vaccine	0/9 (0 %)	0/9 (0 %)	4/9 (44 %)
Vaccine 1	1/9 (11 %)	0/9 (0 %)	2/9 (22 %)
Vaccine 2	0/9 (0 %)	0/9 (0 %)	5/9 (55 %)
Vaccine 3	3/9 (33 %)	0/9 (0 %)	3/9 (33 %)
Vaccine 4	0/9 (0 %)	0/9 (0 %)	7/9 (77 %)

- **결과적으로,** 4종의 시험백신 중에서 안전성, 높은 면역원성(항체가 형성수준), 총배설강 균배설의 유의한 감소를 보인 **vaccine 1(ST26, 10^8CFU/수)**이 오리에서의 *S.* Typhimurium 백신주로서 가장 안전하고 유효한 것으로 확인되었음.

- 결론적으로, 1년차 연구개발을 통하여 82종의 오리유래 S. Typhimurium 균주 중 2종의 백신 후보주를 선발하였으며, 이들 백신 후보주의 면역원성 평가를 종료하였음. 2년차에는 본 균주들을 사용한 백신을 제작하고 S. Typhimurium 공격접종 균주를 사용한

방어효능 평가를 통하여 최종 1종의 백신균주를 선발하고 백신에 포함될 항원의 함량을 결정하고 이를 이용한 산업화를 진행할 예정임.

7. 2014년 국내 발생 HPAI H5N8 바이러스에 대한 개발된 항원의 방어능 평가.

본 연구과제는 1년차 진행 중인 2014년 1월 국내에서 H5N8 고병원성 조류인플루엔자 가 발생함. 국내에서 최초로 발생하는 혈청형의 바이러스로 기존에 국내에 발생했던 HPAI H5N1 바이러스와는 Clade 가 다른 바이러스인 만큼 과학기술정책과 주관의 연구조정 회의 에서는 본 연구과제에서 개발중인 백신항원을 사용한 방어실험의 필요성을 제기함. 따라서 본 연구 사업에서 개발예정인 백신항원과 동일한 HA 유전자를 갖는 H5 RG 백신 균주 및 기존 사용화된 저병원성 H9N2 사독백신을 사용한 교차 방어능 평가를 긴급 수행하기로 함에 따라 HPAI H5N8 바이러스를 사용한 공격접종 실험을 실시하였음. 추가적으로 국내분리 H9N2 바이러스 감염 개체에서의 2014년 발생 HPAI H5N8 바이러스의 감염 특성도 조사하였음. 본 실험은 백신 균주들의 2014년 HPAI 발생균주에 대한 교차방어능을 평가하기 위한 실험으로써 동물 모델의 경우 치사모델의 평가가 완료된 닭모델을 사용하여 진행 되었음.

가. 백신종류별, 바이러스 감염별 실험군의 준비 및 공격접종

1) 실험군의 준비

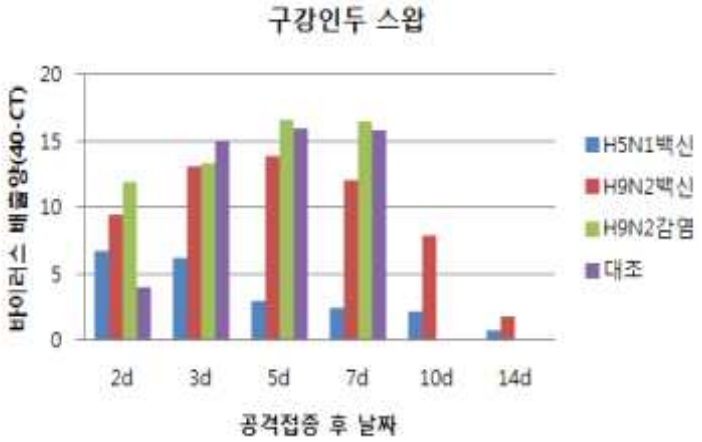
- 본 연구과제에서 개발중인 HPAI DIVA 백신 균주와 동일한 HA 항원을 사용하는 RG H5 백신주를 불활화하고 이를 ISA 70 oil-adjuvant (SEPPIC) 와 혼합하여 사독백신을 제작함. 제작된 백신을 닭의 근육 경로로 0.5ml 씩 접종하고 접종 3주 후 2014년 발생 HPAI H5N8 균주를 비강경로로 접종함.
- 현재 국내에서 사용 중인 H9N2 사독백신을 닭의 근육 내로 접종하고 3주 후 2014년 발생 HPAI H5N8 균주를 접종함.
- 국내 토종닭에서 최근에 분리된 저병원성 조류인플루엔자 H9N2형 야외분리주를 닭의 비강 경로로 감염시킴. 감염 2주 후 2014년 발생 HPAI H5N8 균주를 접종함.

2) HPAI H5N8 와의 교차 면역원성 및 교차방어능 평가

- 공격접종 실시 2, 3, 5, 7, 10, 14일 후 구강인두와 총배설강을 면봉으로 스왑하고 바이러스의 분리여부를 reverse-transcription Real-time PCR (rRT-PCR)을 사용하여 평가

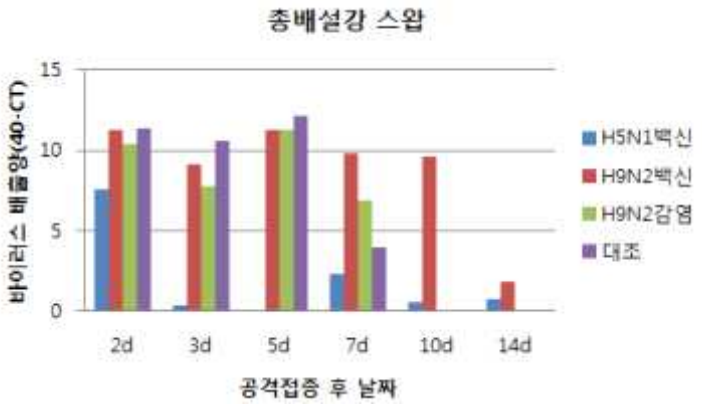
함.

<그림 3-29. 공격접종 HPAI H5N8 바이러스의 구강인두 배출>



- 구강인두 스왑의 경우 RG H5 백신 그룹에서는 바이러스 공격접종 2일 이후로 점차적으로 바이러스 배출양이 줄어드는 모습을 보임.
- H9N2 백신군, H9N2 감염군, 대조군은 공격접종 후 꾸준히 바이러스 배출양이 늘어나 공격접종 7일후 까지 많은 양의 공격접종 바이러스를 배출함을 확인 할 수 있었음. RG H5 백신균주의 경우 실험 종료 시까지 모든 동물이 임상증상없이 생존하였으나, H9N2 감염군 및 대조군은 전수 폐사하였음.
- H9N2 사독백신을 접종한 실험군의 경우 H9N2 바이러스에 대해 높은 HI능을 나타낸 개체의 경우 HPAI H5N8 공격접종 으로부터 생존함으로써 높은 수준의 H9 HI 항체가와 H5N8에 대한 방어능 과의 상관관계에 대한 가능성을 확인 할 수 있었음.
- RG H5백신주의 경우 바이러스의 배출을 완벽하게 차단하지는 못하였지만 백신개체들을 폐사 및 임상증상으로부터 보호하였음.

<그림 3-30. 공격접종 HPAI H5N8 바이러스의 구강인두 배출>



- 총배설강 스왑도 구강인두 스왑과 마찬가지로 RG H5 백신군에서 가장 낮은 공격접종 바이러스 배출량을 보였으며, 공격접종 3일 후부터 바이러스 배출량이 검출한계 수준에 가깝게 감소하였다.

- 다른 실험군의 경우 공격접종 바이러스의 배출을 효과적으로 방어하지 못하는 것으로 나타났음.
- 결론적으로, RG H5 백신주의 경우 총 공격접종 바이러스의 배출을 완벽하게 차단하지는 못하였지만 다른 백신군과 비교 시 바이러스 배출양이 유의적으로 감소하였으며, 백신개체들을 폐사 및 임상증상으로부터 보호함으로써 2014년 국내발생 주인 clade 2.3.4.6의 H5N8 바이러스에 대해 일정 수준의 교차 방어능이 있음을 보였음.

2절. 2차년도 연구내용 및 결과

1. 오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 개발 및 효능평가

가. 1차 년도에 1세부과제에서 개발된 고병원성 조류인플루엔자 항원과 2세부에서 개발된 오리용 백신 어쥬번트를 이용한 백신의 개발

1) H5N9 RG 바이러스와 면역어주번트를 이용한 백신의 개발

- 1차년도에 개발된 DIVA가 가능한 RG 바이러스(1세부)를 이용하여 면역능이 시험된 어주번트(2세부)와 함께 오일 배이스의 면역 어주번트를 생산함
- 각각의 면역어주번트 농도는 다음 참고논문을 활용하여 계산하였으며, 오일 어주번트는 SEPPIC(FRACE)사의 ISA 70을 이용하였음

① Archive Virology, Zhu Cui et al., 2013
② Journal of Microencapsulation, Wenlong Zhang et al., 2010
③ Developmental and Comparative Immunology, Katharine E. Magor, 2011
④ Avain Diseases, Carn Cagle et al., 2012
⑤ Veterinay Research, Shun Chen et al., 2013
⑥ Virus Research, Mary J. Patin-Jackwood et al., 2013
⑦ Virus Research, Erica Spackman et al., 2013
⑧ Viral immunology, Amirul I. Mallick et al., 2012
⑨ Current Drug Delivery, Azita Taghavi et al., 2009

- 각각의 면역어주번트는 [표3-12]와 같은 회사의 것을 이용하였으며, 이멀전을 생성 Homogenizer(T.K robomix, Primix corporation)을 이용함[그림3-31]

Group	BASE 1	BASE 2	ADJUVANT DOSE	SOURCE
A	OIL	CpG	50ug	Eurofins MWG Operon
B		LPS	25ug	SIGMA (0111:B4)
C		poly IC	80ug	SIGMA
D		Chitosan	1%	SIGMA
E		-	-	
F		PBS	-	

표3-12 사용된 면역어주번트의 종류와 용량

그림3-31 이멀전 생성에 이용된 Homogenizer

나. 개발 백신의 면역원성 평가

1) 닭에서 H5N9 RG 백신의 최소면역원성 시험

- 오리에 앞서 개발 백신의 닭에서 최소면역원성을 시험하기 위해 시험백신 항원을 10일령 SPF 종란에 십만배 희석하여 0.1ml 접종하고, 3일 후 장요막강액을 취득함
- 취득한 장요막강액을 10일령 SPF 종란을 이용하여 계란 반수감염 역가를 계산함
- 취득한 장요막강액을 10%(v/v) 닭 혈구와 평판응집반응으로 바이러스를 확인 한 후 0.2%(v/v) 포르말린을 희석하여 상온에서 24시간 불활화함

- 불활화된 항원을 아래 [표3-13]과 같은 항원량에 맞추어 시험어주번트와 제조사의 지시대로 제조함

그룹	항원량 (EID_{50}/bird)	마리 수	어주번트
1	10^7.5	7	ISA 70
2	10^7.0		
3	10^6.5		
4	10^6.0		

표3-13 그룹 및 백신 실시

- SPF 닭의 6주령 닭의 가슴근육에 제조된 백신을 주사함

- 혈청역가 검사는 OIE Terretrial Manual 2015에 따라서 Hemagglutinin inhibtion test를 실시하였음

- 시험결과는 다음 [그림3-32]와 같이 측정되었음

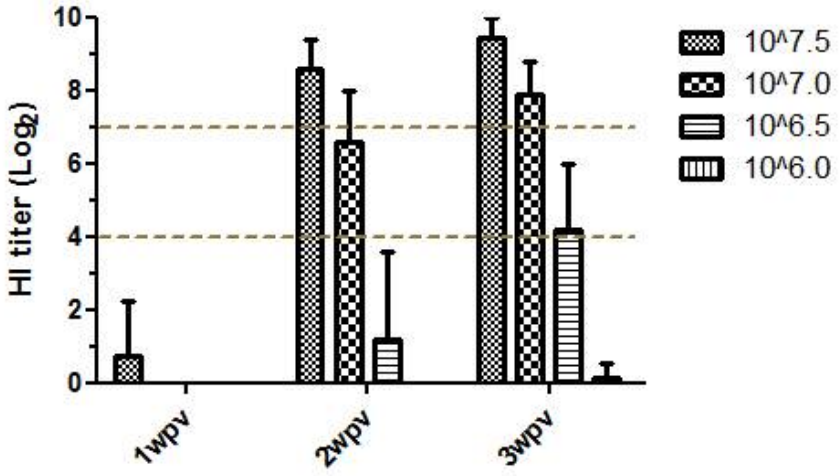


그림3-32 H5N9 백신의 닭에서 최소면역원성 평가

(Week-post vaccination : wpv)

- 혈청역가는 백신 바이러스 역가와 비례하게 측정되었음

- 일반적으로 닭에서 고병원성 조류인플루엔자 감염에 의한 폐사를 막을 수 있는 혈청역가인 2^4 HI titer를 넘기는 백신의 역가는 10^6.5 이상으로 나타났으나 개체별 편차가 큼

- 일반적으로 닭에서 고병원성 조류인플루엔자 감염에 의한 바이러스 배출을 막을 수 있는 혈청역가인 2^7 HI titer를 넘기는 백신의 역가는 10^7.0 이상으로 나타났음

- 본 시험 결과를 미루어보아 닭에서 개발 백신의 수당 접종 역가는 최소 10^7.0이상이 되어야 할 것으로 판단됨

2) 오리에서 H5N9 RG 백신과 어주번트의 면역원성 평가

- 오리에서 개발 백신의 면역원성을 평가하기 1일령 오리를 이용하여 백신을 실시함

- 1일령 오리를 90마리를 이용하여 AIV-ELISA를 이용하여 인플루엔자에 대한 모체 이행 항체가 없음을 확인함

- 확인된 오리는 10^7.2 EID50/bird의 농도를 이용하여 피하에 0.5ml을 주사함

- 백신 후 7주간 혈청 내 백신 항체 생성을 알아보기 위해 오리의 경정맥을 이용하여 채혈 후 혈청을 분리함

- 분리된 혈청은 HI test를 이용하여 백신과 동일한 항원을 이용하여 항체 역가를 측정

함[그림3-33]

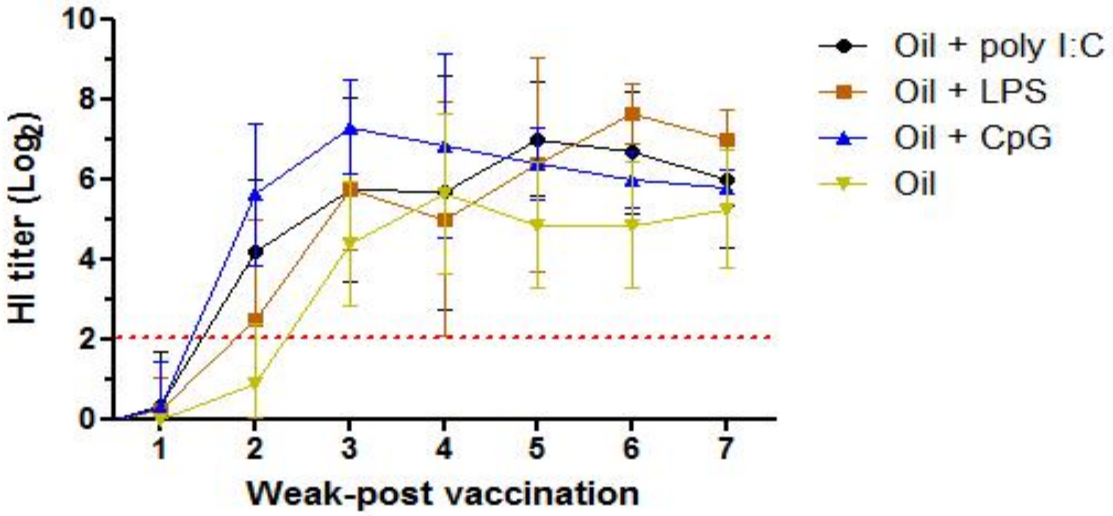


그림3-33 어주번트 별 H5N9 RG 백신 후 혈청 항체 역가 측정 결과

- 측정 결과 측전 전 결과를 통틀어 oil 어주번트만 들어간 백신이 가장 낮은 항체가 생성함

- 측정 전반기(1~3주) 항체가 생성에는 oil과 CpG를 혼합한 어주번트가 백신 3주 후에 유의적으로 가장 높은 혈청 역가를 생성하였음

- 측정 후기(5~7주) 항체가 생성에는 oil과 LPS를 혼합한 어주번트가 백신 6주 후에 가장 높은 것으로 나타났으나 이는 다른 어주번트를 이용한 백신과 유의적인 차이를 보이지 않았음

- 백신 2주 후에는 HI test로 측정 할 수 있는 최소 항체 반전 한계치인 2^2 HI titer를 백신을 실시한 오리 반수이상이 넘지 못하는 것으로 측정되었음

- 측정 전 결과를 통틀어 오일 백신의 항체 역가가 개체의 편차가 가장 큰 것으로 조사되었음

- 개발 항원과 어주번트의 면역원성 평가를 바탕으로 실제 오리에서 백신의 방어효능을 평가에 이용함

다. H5N1형 HPAI 공격접종을 통한 백신의 방어효능 평가 (방어율 80%이상)

1) 오리의 H5N1 감염 반수치사량 측정 시험

- 오리의 H5N1 감염 시 오리에서 반수치사량을 측정하여 백신 실험의 바이러스 감염 역가를 설정하기 위함
- 1일령 오리를 33마리 공수하여 AIV ELISA(바이오노트)를 이용하여 항체 유무를 확인하여 음성임을 확인 한 후 사육함
- 6주령의 오리를 이용하여 아래 [표3-14]와 같이 나누고 BL3 시설로 이동함

	Group				
	G1	G2	G3	G4	G5
NO. Duck	6	6	6	6	6
Virus (EID_{50}/0.1ml)	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3

표3-14 오리의 분류와 바이러스 감염 농도 설정 및 시험 방법

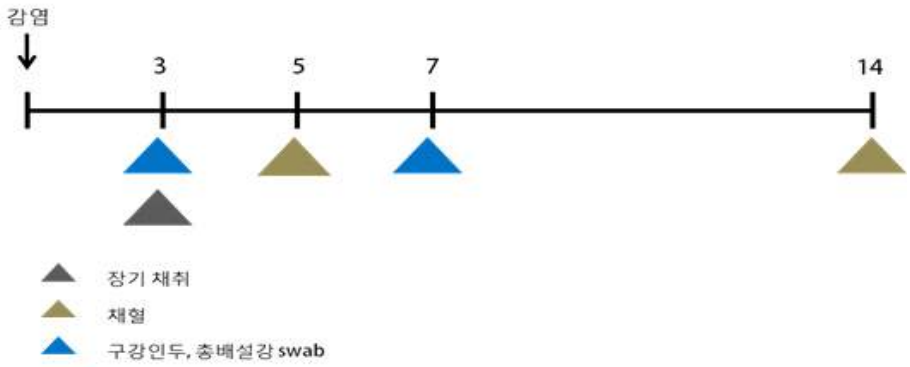


그림3-34 오리의 감염과 바이러스 배출 및 폐사 측정 스케줄

- 바이러스 감염 3일, 7일 후 oropharynx와 cloaca에서 면봉으로 배출된 바이러스를 채취하여 real-time RT-PCR을 이용하여 바이러스 의 배출 여부를 확인함[그림3-34]
- 바이러스 감염 14일 후 살아남은 오리의 혈청에서 HI test를 실시함
- 감염 후 14일 동안 임상증상을 평가함
- 시험결과는 [표3-15]와 같으며 10^7.0 EID50/ml의 역가로 공격접종 시 전수가 폐사하는 것으로 측정됨
- 공격접종 바이러스 원액은 10^9.0 EID50/ml 이며 이 바이러스를 이용하여 반수치사용량을 측정 하였을 때 10^4.625 Lethal dose 50 (LD50/ml)로 측정되었음
- 본 실험 결과를 토대로 오리의 백신 후 바이러스 감염시험은 전수가 폐사 할 것으로 측정되는 100 LD50 (10^6.425 EID50/ml)용량을 이용하여 동일한 경로로 감염 할 것을 산정함

Dose (EID50)	Time of death (day-post challenge)	Virus isolation (ct value)		Antibody titer	
		Day 5[a]	Day7[a]	Day 5	Day 14
10^7	4	24.6 / 36.0	NA / NA	-	NA
	3	23.2 / 35.5	NA / NA	-	NA
	5	24.0 / 33.9	NA / NA	-	NA
	5	27.1 / 37.8	NA / NA	-	NA
	4	26.7 / 35.1	NA / NA	-	NA
	3	22.5 / 37.1	NA / NA	-	NA
	Total average	24.7(6/6) / 35.9(6/6)	NA / NA	-	NA
10^6	7	28.0 / 35.2	NA / NA	-	NA
	7	29.0 / 37.8	NA / NA	-	NA
	5	25.8 / 31.7	NA / NA	-	NA
	7	23.2 / 33.7	NA / NA	-	NA
	-	26.8 / 34.3	ND / ND	-	7
	-	25.0 / ND	ND / ND	-	8
	Total average	26.3(6/6) / 34.5(5/6)	- (0/2) / - (0/2)	-	7.5
10^5	7	28.9 / 35.9	NA / NA	-	NA
	-	29.2 / ND	36.9 / 37.2	-	6
	7	29.4 / 35.3	NA / NA	-	NA
	-	22.1 / 31.0	ND / 36.5	-	5
	-	23.5 / 34.7	37.5 / ND	-	5
	-	23.7 / 37.8	36.7 / ND	-	7
	Total average	26.1(6/6) / 34.9(5/6)	37.0(3/4) / 36.9(2/4)	-	5.75
10^4	5	25.4 / 34.5	NA / NA	-	NA
	-	24.0 / ND	ND / ND	-	6
	-	25.1 / 33.5	35.8 / ND	-	6
	-	25.8 / 32.6	ND / ND	-	8
	-	23.6 / ND	ND / ND	-	6
	-	22.4 / 32.5	36.3 / ND	-	6
	Total average	24..4(6/6) / 33.3(4/6)	36.0(2/5) / - (0/5)	-	6.4
10^3	-	28.7 / 35.7	ND / ND	-	6
	-	24.4 / 37.7	ND / ND	-	6
	5	26..3 / 36.7	NA / NA	-	NA
	-	27.2 / ND	ND / ND	-	7
	-	30.0 / ND	35.8 / ND	-	5
	5	28.5 / 38.2	NA / NA	-	NA
	Total average	27.5(6/6) / 37.1(4/6)	35.8(1/4) / - (0/4)	-	6

[a] Positive or negative for virus in the pharynx/cloaca

ND ; not detectable

NA ; not applicapable

표3-15 오리의 반수치사 바이러스 역가 시험 결과

2) 오리의 H5N9 RG 백신 후 감염시험

- 오리에서 개발 백신의 방어능을 평가하기 1일령 오리를 이용하여 백신을 실시함
- 1일령 오리를 90마리를 이용하여 AIV-ELISA를 이용하여 인플루엔자에 대한 모체 이행 항체가 없음을 확인함

- 확인된 오리는 10^7.2 EID50/bird의 농도를 이용하여 피하에 0.5ml을 주사함

- 백신 후 4주간 혈청 내 백신 항체 생성을 평가하고, 약 100 LD50에 해당하는 10^6.3 EID50/ml을 choanal slit으로 감염시킴

- 분리된 혈청은 HI test를 이용하여 백신과 동일한 항원을 이용하여 항체 역가를 측정함[그림3-35]

- 감염 후 3, 5, 7, 9, 12일에 구강과 총배설강에서 멸균 면봉을 이용하여 swab을 실시함

- swab sample에서 vRNA를 추출 한 후 Matrix gene을 이용한 Real time RT-PCR을 실시하여 바이러스 유전자를 상대 정량으로 비교함

- 감염 후 총 14일 동안 임상증상(신경증상, 설사, 각막혼탁)과 폐사를 관찰함

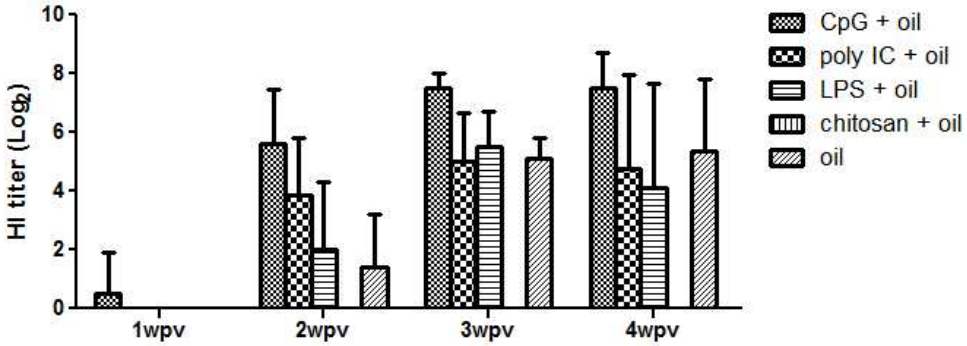


그림3-35 H5N9 RG 백신 후 항체 역가

(Week-post vaccination : wpv)

- 백신 2주 후 오리의 혈청은 CpG를 첨가한 혈액에서 가장 높았으며 유의적인 차이를 보였음

- 백신 3, 4주 후 오리의 혈청은 CpG를 첨가한 백신에서 가장 높았으나 유의적인 차이를 보이지 않았으며, poly IC, LPS를 첨가한 백신은 oil만 첨가한 백신과 비슷하게 역가의 편차가 큰 것으로 나타났음

- 항체 역가만으로 볼 때 chitosan 어주번트를 제외한 나머지 어주번트에서 폐사를 방어할 수 있는 2^4 HI titer 이상의 역가를 보였으며, 이 결과는 1일령 오리에서 특히 CpG 어주번트의 효과가 효과적임을 증명하는 결과임

- 항체역가 측정에서 chitosan 어주번트를 이용한 백신은 항체를 생성하지 못하여 감염시험에서 제외함

Groups	Number of ducks (positive/total)			Mean death time (days)
	Neurological sign	Diarrhea	Dead	
Oil + poly I:C	0/8	3/8	0/8(0%)	-
Oil + LPS	0/8	4/8	0/8(0%)	-
Oil + CpG	0/8	1/8	0/8(0%)	-
Oil	0/8	2/8	0/8(0%)	-
Non-vaccinated	7/8	7/8	7/8(87.5%)	7.3

표3-16 H5N9 RG 감염 후 임상증상 및 폐사율

- 감염 후 폐사는 백신을 실시한 그룹 모두에서 일어나지 않아 100%의 방어율을 보였음
- 그러나 백신을 실시하지 않은 그룹에서는 7/8(87.5%)의 오리가 폐사하였으며 폐사 직전 모두 신경증상(사경)을 나타냈음
- 설사 증상은 백신은 실시한 그룹에서도 나타났으며 투명한 점액양의 설사를 하는 것이 관찰되었음. LPS를 첨가한 백신에서 반수가 설사증상을 나타내어 가장 빈도가 높았으며, 백신을 하지 않은 대조군에서는 폐사한 7마리 모두가 폐사전 설사 증상을 나타냈음
- 대조군의 평균 폐사 시간은 7.3일로 측정되었으며 상세한 개체 별 임상증상 및 폐사일자는 다음 [그림3-36]과 같음

그림3-36 오리 백신 후 감염 상세 경과
(A : CpG / B : poly IC / C : LPS / E : oil only / F : control)

- 감염 후 바이러스의 구강 및 총배설강 배출은 위의 설명과 같이 real time RT-PCR로 측정하였으며 측정 된 Ct value는 다시 감염력 지표인 EID50로 환산함[표3-17]

Groups	Virus titers from swabs collected at different days after challenge No. of positive ducks/total ducks (EID_{50} equivalents)									
	Day 3		Day 5		Day 7		Day 9		Day 12	
	Oral	Cloacal	Oral	Cloacal	Oral	Cloacal	Oral	Cloacal	Oral	Cloacal
Oil + poly I:C	0/8	0/8	0/8	1/8(1.8)	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
Oil + LPS	1/8(2.5)	1/8(0.1)	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8(0.8)	0/8	0/8	0/8
Oil + CpG	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8(0.3)	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
Oil	0/8	0/8	1/8(1.8)	1/8(1.9)	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
Non-vaccinated	8/8(3.1)	1/8(0.3)	7/7(2.8)	5/7(0.4)	4/4(2.5)	2/4(1.9)	3/8(2.3)	2/8(1.0)	1/1(2.5)	1/1(0.2)

표3-17 오리 백신 후 감염 시 바이러스 배출 측정 결과

- poly IC를 첨가한 백신은 감염 후 5일 째 총배설강 1마리 샘플에서 바이러스의 배출이 있었으며 이후 바이러스의 배출이 없었음
- LPS를 첨가한 백신은 감염 당시 항체역가는 oil, oil + poly IC와 비슷하나 1마리에서 감염 후 3일 때 바이러스의 배출이 구강과 총배설강 샘플에서 있었음. 감염 이후 9일 째 구강에서 미약한 배출이 있었음
- CpG를 첨가한 백신은 전반적으로 가장 낮은 바이러스 배출을 보였으며, 감염 후 7일 째 구강에서 미약한 배출이 있었음
- Oil 만을 첨가한 백신에는 감염 이후 5일 째 1마리에서 구강과 총배설강 샘플에서 바이러스 배출이 있었으며 이후 바이러스의 배출이 없었음
- 백신을 실시하지 않은 대조군은 바이러스 감염후 구강 샘플에서 다량의 바이러스의 배출이 있었으며, 감염 후 5~12일에 걸쳐 폐사가 진행되었음
- 바이러스 배출 데이터로 미루어보아 오일어주번트에 추가한 CpG, poly IC, LPS 중 poly IC가 가장 낮은 바이러스 배출을 보였으며, 이것은 유의적인 차이는 아니었음
- 그러나 임상증상으로 미루어보아 LPS와 poly IC는 미약한 임상증상을 나타내어 결론적으로 CpG의 효능이 가장 좋은 것으로 판단됨.

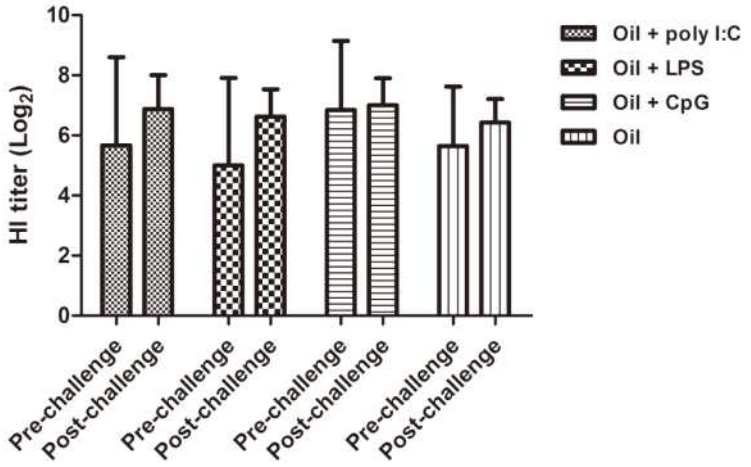


그림3-37 오리의 감염 전 후 항체 역가 측정

- 감염 14일 후 바이러스의 배출이 종료된 것을 확인하고 혈청을 취득함
- 감염 전 백신에 의한 혈청 역가와 감염 후 혈청 역가를 비교 해 볼 때 CpG를 제외하고 나머지 백신에서는 감염으로 인한 혈청역가가 상승 된 것을 알 수 있음
- 이로 미루어보아 모든 그룹에서 감염이 성공적으로 이루어 졌음을 알 수 있었으며, 백신 및 감염으로 인한 혈액 내 항체 역가는 약 2^7 HI titer 임을 알 수 있음
- 백신의 오일과 젤 어주번트의 효능을 비교하기위해 1일령 오리를 6개의 그룹으로 나눈 후 3개의 그룹에서는 오일 어주번트를 이용하여 10^8, 10^7, 10^6 EID50/ml을 용량의 백신을 하였고 3개의 그룹에는 젤 어주번트를 이용하여 10^8, 10^7, 10^6 EID50/ml을 용량의 백신을 하였다. 그 결과 젤 어주번트는 혈중 항체가가 2^4 HI titer를 넘지 못하여 오리에서 gel 어주번트의 사용이 적합하지 않다고 판단함.
- 오일을 이용한 어주번트 사용에서는 아래 그림과 같은 항체가 및 백신 후 체중 증가를 관찰함

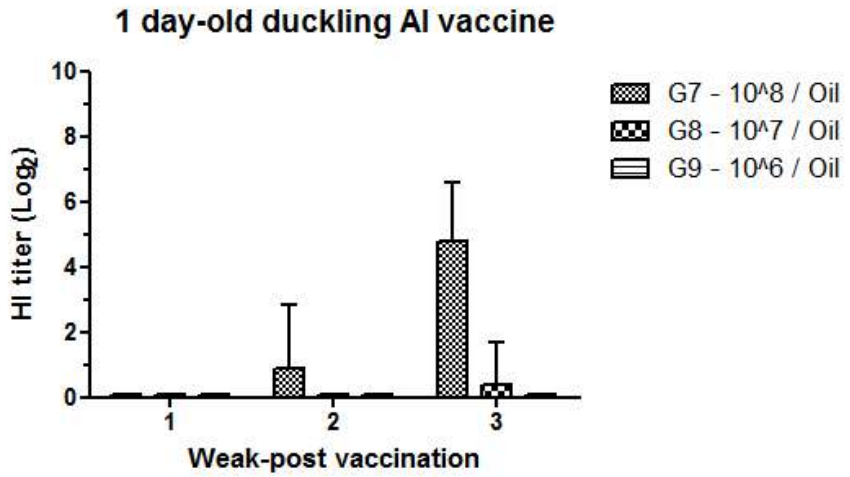


그림3-38 1일령 오리의 오일어주번트 백신 후 항체 역가 측정 결과

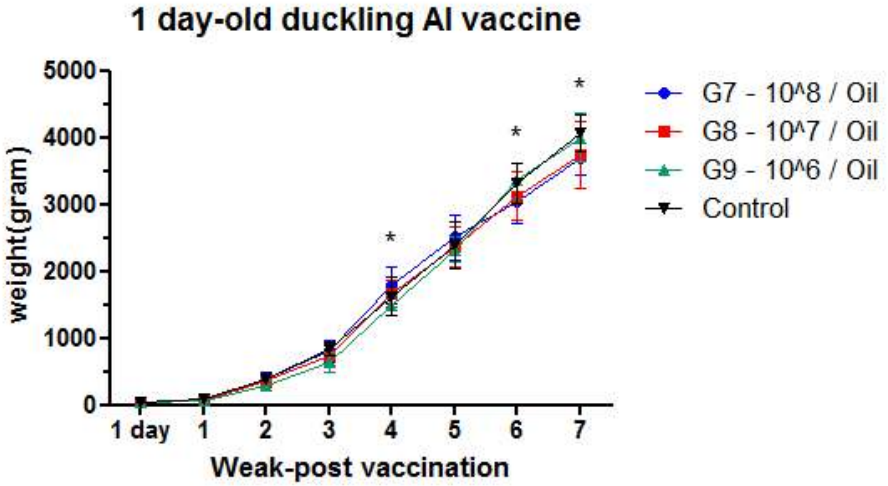


그림 3-39 1일령 오리의 오일 어주번트 백신 후 체중 측정 결과

- 1일령에 백신을 적용 했을 때 백신 후 3주령에 유의적으로 항체가가 증가한 것을 관찰 할 수 있었다.
- 체중 변화는 10^8, 10^7을 접종 한 오리에서 유의적으로 10^6, control 오리보다 낮은 증체율을 보였다. 국내 오리의 평균 출하일령 42일, 평균 출하체중 3200g을 기준으로 봤을 때 6주령에서 백신에 의한 항체가가 생성된 10^8을 접종 한 오리의 평균 체중은 3042g으로 약 160g의 증체율 저하가 있는 것으로 판단됨.
- 따라서 어린 일령의 오리에 백신이 증체율에 영향을 미치는 것으로 판단되어 백신의 dose를 높이는 것 외에 충분한 면역반응을 일으킬 수 있는 방법으로 선발된 CpG-ODN 어주번트를 이용한 백신을 이용한 백신 시험을 계획중임

라. H9N2 사독백신 및 감염의 2014년 국내 유행 H5N8형 HPAI 공격접종 방어효능 평가

1) 닭의 H9N2 사독백신 및 감염의 H5N8 방어능 평가 시험

- 국내 2014년도 발생한 H5N8 바이러스의 경우 바이러스의 전파능 및 병원성이 기존 국내 H5N1 분리주와 달리 상대적으로 낮은 것으로 알려짐
- 따라서 국내에 시행하고 있는 H9N2 사독백신 또는 국내 농장 유래 H9N2 바이러스의 감염이 H5N8 바이러스의 전파능 및 병원성 약화에 영향을 미치는지에 대해 확인하기 위해 실험을 실시함
- 일반적으로 사독 백신을 실시하는 6주령의 hyline-brown 계통의 산란계 30마리에 AIV-ELISA를 이용하여 인플루엔자에 대한 항체가 없음을 확인함
- 10마리의 산란계에는 현재 국내에 실시되고 있는 인플루엔자 백신을 0.5ml씩 흉근에 접종함 (A/chicken/Korea/01310/2001(H9N2))
- 10마리의 산란계에는 2010년 농장에서 분리된 바이러스를 $10^{6.0}EID_{50}$/chicken의 농도로 비강을 통해 접종함 (A/Korean native chicken/Korea/K040110/2010(H9N2))
- 다른 10마리의 산란계는 음성 대조군으로써 실험에 사용함
- 백신 및 감염 3주 후, H9N2 바이러스 및 공격접종용 H5N8 바이러스에 대해 HI titer를 확인하여 항체가 형성되었는지 확인함.

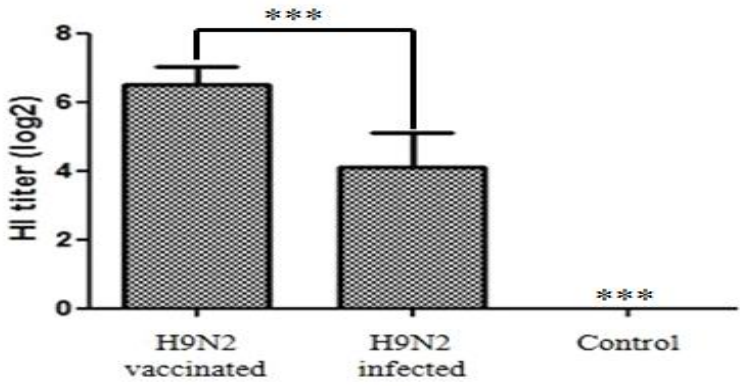


그림3-40 H9N2 백신 및 감염 이후 H9N2에 대한 항체 역가

- H9N2 백신, H9N2 감염 모두 대조군에 비해 유의적으로 증가된 HI titer가 관찰됨
- H9N2 백신의 경우 H9N2 감염에 비해 유의적으로 증가된 HI titer가 관찰됨
- H9N2 백신 및 감염군에서 모두 H5N8에 대한 HI titer는 나타나지 않음

- 면역 3주 후, H5N8 고병원성 조류인플루엔자 바이러스를 $10^{6.0}EID_{50}$/chicken의 농도로 비강을 통해 접종함 (A/Baikal teal/Korea/K14-E16/2014(H5N8))

그림3-41 산란계의 감염과 바이러스 배출 및 폐사 측정 방법

- 바이러스 감염 3일, 5일, 7일, 10일, 14일 후 oropharynx와 cloaca에서 면봉으로 배출된 바이러스를 채취하여 real-time RT-PCR을 이용하여 바이러스 의 배출 여부를 확인함[표3-18]
- 바이러스 감염 14일 후 살아남은 닭의 혈청에서 HI test를 실시함
- 감염 후 14일 동안 임상증상을 평가함

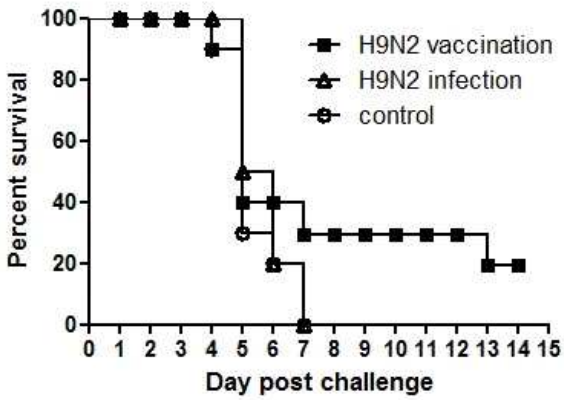


그림3-42 H9N2 백신 및 감염 후 H5N8 감염시험 폐사율

- 공격접종 2주 후까지 닭의 생존을 평가한 결과 평균 폐사 시간(mean death time ; MDT)은 H9N2 백신군 6.25일, H9N2 감염군 5.7일, 대조군 5.5일로 백신군 및 감염군 모두 대조군에 비해 증가하긴 했지만 유의적인 차이는 나타나지 않았음
- 하지만 H9N2 백신군은 H9N2 감염군이나 대조군과 달리 2마리의 개체가 폐사하지 않고 실험 종료시까지 살아남음

Groups	Virus titers from swabs collected at different days post-challenge (dpc) # of positive/total chickens (Mean titer ±SD)[a]									
	3dpc		5dpc		7dpc		10dpc		14dpc	
	OP	C	OP	C	OP	C	OP	C	OP	C
H9N2 vaccinated	10/10 (3.63± 1.02)	9/10 (1.38± 0.77)	8/10 (3.71 ±2.00)	8/10 (2.09± 1.37)	4/4 (3.36± 0.39)	3/4 (1.50± 0.93)	3/3 (2.26± 0.21)	3/3 (1.56± 1.24)	0/2 (0)	0/2 (0)
H9N2 infected	10/10 (3.69+ 0.77)	7/10 (1.01± 0.74)	10/10 (4.56 ±0.97)	9/10 (2.12± 1.23)	2/2 (4.52± 0.41)	2/2 (0.81± 0.23)	-	-	-	-
Control	10/10 (4.14 ±0.75)	9/10 (1.94± 0.80)	9/10 (4.36± 1.84)	8/10 (2.37± 1.46)	2/2 (4.34 ±0.14)	1/2 (0.55± 0.55)	-	-	-	-

표3-18 H5N8 공격접종 후 바이러스의 배출량 확인

- 배출된 바이러스를 Real-time RT-PCR로 검출한 결과 3개의 그룹에서 유의성 있는 차이 없이 바이러스의 배출이 관찰되었으며 2마리가 생존한 H9N2 백신군의 경우 점차적으로 배출량이 줄어들면서 10일째까지 바이러스의 배출이 관찰됨

Groups	Mean HI titer against H9N2 (±SD)		Mean HI titer against H5N8 (±SD)	
	Pre H5N8-challenge[a]	Post H5N8-challenge[b]	Pre H5N8-challenge	Post H5N8-challenge
Survived chickens	6(0)	6(0)	0(0)	10(±1.41)
Dead chickens	6.63(±0.51)	-	0(0)	-

표3-19 H9N2 백신군 중 살아남은 개체들과 죽은 개체들의 HI titer 비교

- H9N2 백신군 중 살아남은 개체들은 H5N8에 대한 HI titer가 올라감으로써 공격접종이 정상적으로 이루어졌음을 확인함
- H9N2 백신군 중 살아남은 개체들의 H9N2에 대한 HI titer는 변화가 없어 H9N2와 H5N8 바이러스간에 HA의 항원성은 상당히 다른 것으로 파악됨
- 살아남은 개체들의 공격접종 전 H9N2에 대한 HI titer는 유의적이진 않았지만 죽은 개체들에 비해 상대적으로 낮아, H9N2에 대한 HI titer가 생존에 직접적인 영향은 미치지 않았을 것으로 추정됨

Groups	Virus titers from swabs collected at different days post-challenge (dpc) # of positive/total chickens (Mean titer ±SD)									
	3dpc		5dpc		7dpc		10dpc		14dpc	
	OP	C*	OP	C	OP	C	OP	C	OP	C
Survived chickens	2/2 (2.75± 1.32)	1/2 (0.34± 0.48)	2/2 (3.54± 0.17)	1/2 (0.43± 0.61)	2/2 (3.14± 0.11)	1/2 (0.80± 1.13)	2/2 (2.23± 0.36)	2/2 (0.68± 0.01)	0/2 (0)	0/2 (0)
Dead chickens	8/8 (3.85± 0.98)	8/8 (1.64± 0.66)	6/8 (3.75± 2.38)	7/8 (2.50± 1.29)	2/2 (3.58± 0.63)	2/2 (2.19± 0.46)	1/1 (2.33± 0)	1/1 (3.31± 0)	-	-

표3-20 H9N2 백신군 중 살아남은 개체와 죽은 개체의 바이러스 배출량 비교

- H9N2 백신군 중 살아남은 개체와 죽은 개체의 바이러스 배출량을 비교해본 결과, 구강인두 배출량은 큰 차이가 없는 데 비해 총배설강으로의 바이러스 배출량이 적은 것으로 관찰됨
- 총배설강 바이러스 배출량의 경우 3일, 5일, 7일, 10일 모두 살아남은 개체가 죽은 개체보다 적었으나, 개체수가 적어 유의적인 차이는 3일차에만 관찰됨
- 본 실험을 통해 H9N2 바이러스 백신 후 H5N8 공격접종 시 일부 개체가 생존하는 것이 확인됨
- 따라서 H9N2 바이러스에 대해 이미 형성된 면역력이 H5N8 바이러스에 대한 방어능에 일부 영향을 미치고 바이러스의 전파가 느려지는 데 기여했을 것으로 추정됨

2. 오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신의 시제품 제작

가. 본 연구개발 사업을 통하여 개발된 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 생산기술의 기술이전을 통한 참여기업에서의 백신 시제품 제작

- 참여기업(CTCBIO, 코미팜)에 개발된 균주의 배양방법을 전수하기 위해 『고병원성 조류인플루엔자 백신 rgH5N9의 종란 증폭 특성 및 최소면역원성 시험』 시험 결과를 인수인계함
- CTC바이오는 본 과제에서 개발한 균주를 생산 할 수 있는 BL2시설 인증을 받지 못한 관계로 균주 분양에 실패함
- 코미팜은 균주분양에 성공하였으며 농림축산검역본부의 허가 절차를 받고 있음
- rgH5N9의 시간대별 증폭 특성을 위한 시험방법
- 백신 균주 원액을 희석배수별로 6개의 10일령 SPF 종란에 접종함
- 24, 48, 72 시간 후에 종란을 냉장(4℃, 1시간) 후 장요막강액을 수거함
- 수거된 장 요막강액은 HAU로 증폭된 백신균주를 상대 정량함

희석배수	시간별 증폭역가 (HAU)		
	24 시간	48 시간	72 시간
10^2	5.8 ± 0.34	5.2 ± 0.12	6.3 ± 0.20
10^3	5.6 ± 0.24	6.4 ± 0.24	4.9 ± 0.43
10^4	5.6 ± 0.10	6.4 ± 0.51	6.5 ± 0.47
10^5	5.2 ± 0.20	7.8 ± 0.30	6.8 ± 0.38
10^6	4.8 ± 0.37	6.9 ± 0.43	8.1 ± 0.24
10^7	0.7 ± 0.70	0 ± 0	0 ± 0

표3-30 rgH5N9의 시간대별 증폭 특성

- 시제품 백신의 제작 방법 및 최소면역원성 시험

- 시험백신항원 CE3를 십만배 희석하여 10일령 SPF 종란에 0.1ml 접종하고, 3일 후 장요막강액을 취득함

- 취득한 장요막강액을 10일령 SPF 종란을 이용하여 계란 반수감염 역가를 계산함

- 취득한 장요막강액을 10%(v/v) 닭 혈구와 평판응집반응으로 바이러스를 확인 한 후 0.2%(v/v) 포르말린을 희석하여 상온에서 24시간 불활화함

- 불활화된 항원을 아래 [표3-31]과 같은 항원량에 맞추어 시험어주번트와 제조사의 지시대로 제조함

그룹	항원량 (EID_{50}/bird)	HIU(SD)		
		1wpv	2wpv	3wpv
1	10^7.5	0.71(1.50)	8.57(0.79)	9.43(0.53)
2	10^7.0	0.00(0.00)	6.57(1.40)	7.86(0.90)
3	10^6.5	0.00(0.00)	1.17(2.40)	4.17(1.83)
4	10^6.0	0.00(0.00)	0.00(0.00)	0.14(0.38)

표3-31 오리에서 개발 백신의 최소면역원성 시험

3. 오리용 고병원성 조류인플루엔자 백신/감염개체 혈청학적 감별(DIVA)키트 개발

가. 1차년도 개발 진단용 항원을 이용한 혈청학적 감별(DIVA)키트의 제작

- 1차년도에 전 실험 데이터를 바탕으로 참여기관인 (주)메디안디노스틱에 c-ELISA에 경쟁 혈청으로 쓰일 항체 생산을 의뢰함
- 현재 마우스에서 N1에 대한 항체를 생산하기위해 1차 시도로 H5N1의 NA 표면단백질과 M 단백질을 함께 VLP로 발현하여 면역을 시도함 boosting immunization 이후에도 항체 selection이 가능 할 정도의 항NA 생성이 되지 않음

- VLP에 N1의 발현이 명확하지 않은 것으로 판단되어 계란에서 생성된 포르말린 불활화 RG H5N1 바이러스를 마우스에 접종한 결과 마찬가지로 boosting immunization 이후에도 항체 selection이 가능 할 정도의 항NA 생성이 되지 않음
- 포르말린 불활화 과정에서 항원의 면역원성에 영향을 준 것으로 판단하여 계란에서 생성된 RG H5N1을 BEI로 불활화 한 후 중화시킴. Ultra centrifuge(25000rpm)로 농축 후 sucrose cusion으로 정제 함. 정제한 항원은 0.2um pore filter로 정제한 후 다시 ultra centrifuge(25000rpm)으로 농축함
- 농축 이 후 현재 면역 진행 중임. 2차년도 과제 종료 전 까지 항체를 생산하여 시제품을 제작하는 것을 목표로 하며, 3차년도에 시제품을 본격적으로 테스트 할 계획임

4. 오리용 식중독 유발 살모넬라 백신개발 및 효능평가

가. 1차 년도에 1협동 과제에서 개발된 살모넬라 항원과 2세부에서 개발된 오리용 백신 어쥬번트를 이용한 백신의 개발

- 1차년도 어주번트 테스트 결과 Oil 어주번트를 이용한 백신이 가장 높은 면역반응을 보였음으로, 오일을 이용한 살모넬라 백신의 면역원성 및 안전성을 평가함
- 오일과 더불어 세균백신의 면역 어주번트로 이용되고있는 Gel 어주번트도 동시에 평가하여 백신의 면역원성 및 안전성을 평가함
- 선발된 균주(ST26)을 150ml의 TSB 배지에 1ml을 접종하여 shaking incubator를 이용하여 37℃에서 12시간 증균함
- 1.5L의 TSB에 1차 증균된 150ml을 넣고 37℃에서 18시간 증균함
- 증균된 TSB는 원심분리기를 이용하여 6500rpm에서 15분동안 농축을 실시함
- 농축된 균주는 XLD 배지를 이용하여 Colony forming unit(CFU/ml)을 확인함과 동시에 PBS에 재부유하고 0.3%(v/v) formalin 용액으로 불활화함. shaking incubator를 이용하여 37℃에서 3일동안 불활화함
- 농축 후 백신의 역가는 $\times 10$ CFU/ml 로 측정되었으며, 시험 백신의 역가는 $10^9, 10^8, 10^7$로 설정하였음

나. 개발된 백신의 면역원성 및 안전성 평가 (1일령, 4주령)

- 백신의 면역원성을 평가하기 위해 (주)모란식품에서 공급하는 육용오리를 받아 백신을 실시함
- Dose 별($10^9, 10^8, 10^7$), 어주번트 별(Oil, Gel)로 총 6가지 테스트 백신이 생산되었으며, 백신의 적절한 적용시기를 알아보기 위해 1일령 오리를 이용한 백신과 3주령 오리를 이용한 백신으로 나누어 총 120마리의 오리를 12개 그룹으로 나누어 사육하였음
- 백신의 안전성은 폐사율을 관찰 함과 동시에 백신으로 인한 증체율 변화를 측정하였음
- 사육장소는 건국대학교 충주 종합실습목장에서 실시하였으며, 평사를 이용하여 12개 그룹으로 분동하였으며, 물과 사료를 무한으로 공급하여 증체율에 영향을 주지 않도록 하였음

그림3-43 건국대학교 충주 종합실습목장 오리 사육사

	Ag	EID50/0.3 ML	Adjuvant	priming	boosting
G1	ST	10^9	oil(ISA71)	1day-old	4 week
G2	ST	10^8	oil(ISA71)	1day-old	4 week
G3	ST	10^7	oil(ISA71)	1day-old	4 week
G4	ST	10^9	gel	1day-old	4 week
G5	ST	10^8	gel	1day-old	4 week
G6	ST	10^7	gel	1day-old	4 week
G13	ST	10^9	oil(ISA71)	3 week	N/A
G14	ST	10^8	oil(ISA71)	3 week	N/A
G15	ST	10^7	oil(ISA71)	3 week	N/A
G16	ST	10^9	gel	3 week	N/A
G17	ST	10^8	gel	3 week	N/A
G18	ST	10^7	gel	3 week	N/A

표3-32 시험 그룹 설정, 백신 조성 및 실시 방법

- 각 그룹은 위의[표12]와 같이 나누어졌으며, 1일령 오리에는 목뒤 덜미를 이용한 피하 백신을 실시하고 4주령 boosting 백신과 3주령 백신은 오른쪽 다리 근육을 이용하여 백신을 주입함
- Oil 어주번트는 SEPPIC 사의 ISA70을 이용하였으며, Gel 어주번트는 General Chemical 사의 Aluminium hydroxide gel을 이용함
- 1일령 백신 접종 오리들은 백신 접종 4주 후에 boosting 백신을 실시하였으며 1, 2, 3, 5, 6, 7 주차에 경정맥에서 혈액을 채취 한 후 혈청을 분리하였음
- 3주령 백신 접종 오리들은 백신 접종 후 4, 5, 6, 7 주차에 경정맥에서 혈액을 채취 한 후 혈청을 분리하였음
- 모든 오리들은 매주 저울을 이용하여 체중을 측정하였음
- 혈청은 Chicken salmonella antibody test kit (LPS B and D combined) ELISA (BioChek)를 이용하여 백신에의한 항체 역가를 측정하였음

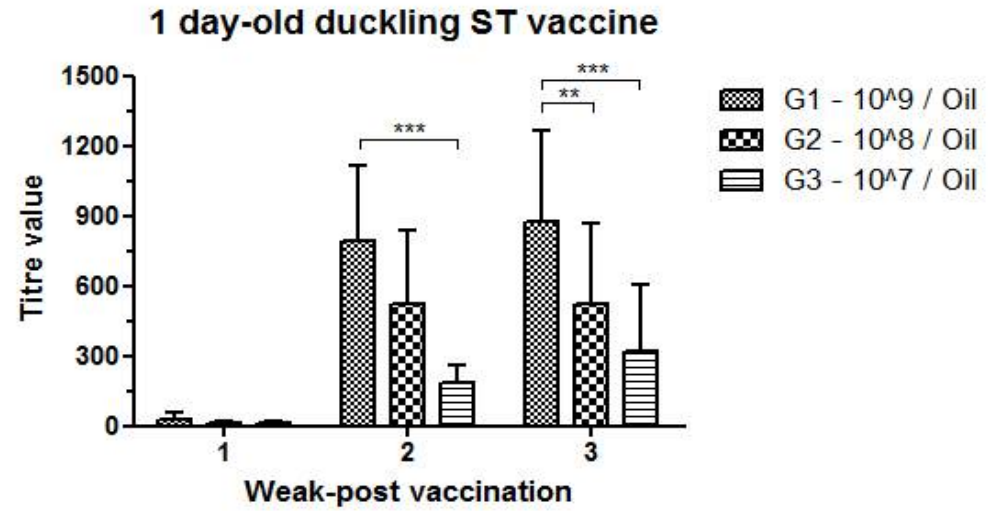


그림3-44 1일령 오리 살모넬라 Oil 어주번트 백신 후 1, 2, 3주차 살모넬라 항체 역가

- 위의 그림은 1일령 오리에 Oil 어주번트 백신 후 항체 역가를 나타낸 그림임
- 백신 1주 후에는 항체가 검출 되지 않았으며 2, 3주 후에는 백신의 항원 함량이 클수록 높은 항체가를 보였음
- 가장 높은 항원 함량(10^9CFU/dose)은 낮은 항원 함량의 백신과 통계적으로 유의성 있게 높은 항체 역가를 생성하였음

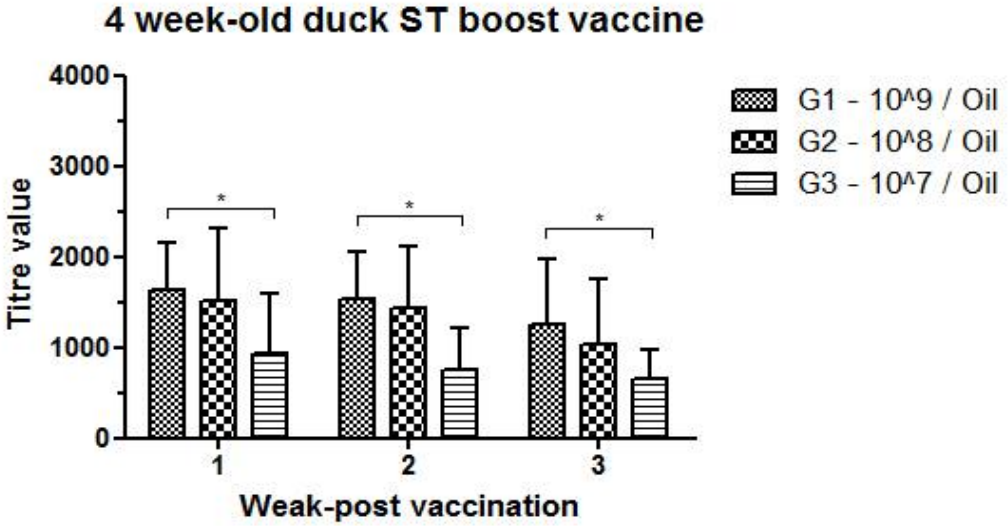


그림3-45 4주령 오리 살모넬라 Oil 어주번트 부스팅 백신 후 1, 2, 3주차 살모넬라 항체 역가

- 위의 그림은 1일령 오리에 적용했던 동일 백신을 4주령오리에 부스팅 백신을 실시하고 1, 2, 3주 후에 혈청 내 역가를 나타냄
- 가장 낮은 항원 함량(10^7CFU/dose) 백신과 가장 높은 항원 함량(10^9CFU/dose) 백신을 비교했을 때 유의적으로 낮은 항체 역가를 생성하였음

- 중간 항원 함량(10^8CFU/dose) 백신은 가장 높은 항원 함량(10^9CFU/dose) 백신과 미교했을 때 조금 낮은 항체역가생성 경향을 보였으나 유의적인 차이를 보이지 않았음
- 1일령 priming과 4주령 boositng 결과로 미루어보아 오일 어주번트를 이용한 백신은 1일령에 적용 했을 때 높은 항원 함량(10^9CFU/dose) 백신만이 항체반전 기준인 645.3 titre value를 넘겨서 항체 역가 생성에 유효한 항원 함량인 것으로 판단됨
- 4주령 booting 이후에는 세 가지 백신 함량 백신 모두 항체반전 기준을 넘는 역가를 보였으나 가장 높은 항원 함량과 중간 항원 함량의 백신은 boosting에서 항체 역가생성 차이를 보이지 않는 것으로 판단됨

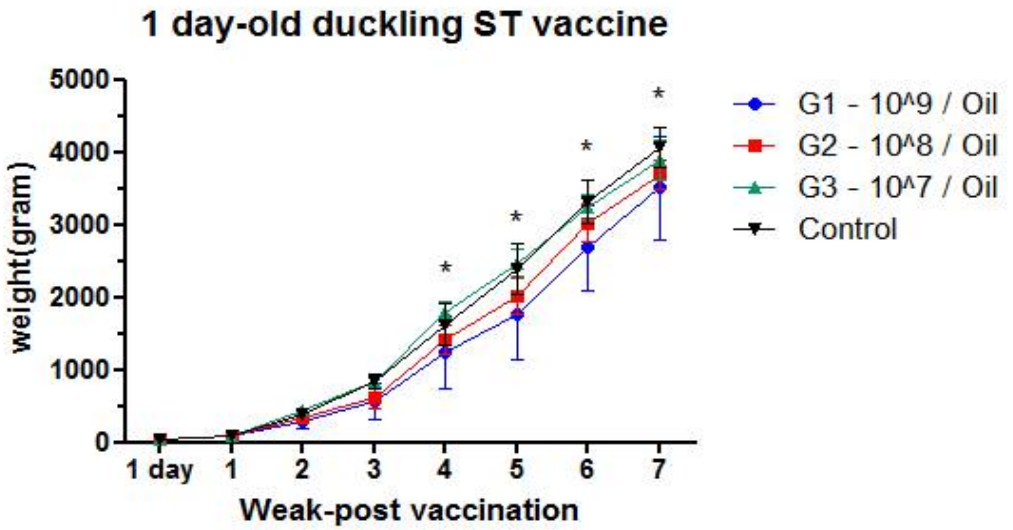


그림3-46 오리 살모넬라 priming-boosting(1일령, 4주령) Oil 어주번트 백신 후 1, 2, 3, 5, 6, 7주차 체중

- 체중은 육용오리의 상품성과 농장의 수입과 직결된 수치임으로 체중 증가를 방해 하지 않는 백신의 함량이 안전성면에서 우수한 백신으로 판단됨
- 모든 오리에서 백신 접종 후 백신 접종으로 인한 폐사는 없었으나 백신의 항원 함량으로 인한 증체율의 차이는 존재하였음
- 1일령 백신 이후에 백신을 접종 하지 않은 대조군과 비교했을 때 1, 2, 3주령에는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 4, 5, 6, 7주령에는 높은 함량과 중간 함량 오리들의 평균체중이 대조군과 유의적인 차이를 보이며 줄었음
- 본 결과로 미루어보아 Oil 어주번트를 이용한 백신은 10^9, 10^8 CFU/dose를 이용한 백신에서 유의적인 항체반전이 있었으나 대조군에 비해 증체율이 떨어지는 단점이 있었음
- 본 결과를 국내 평균 오리 출하일령(42일)의 평균 체중(3.2~3.3kg)과 비교해 봤을 때 가장 차이가 적은 그룹은 10^7 CFU/dose을 접종 한 그룹이었으며 그 다음 10^8, 10^9 CFU/dose 순 이었음
- 따라서 증체율 차이가 작으면서 항체반전을 일으키는 10^8 CFU/dose 항원을 함량한

백신이 적합한 것으로 판단됨

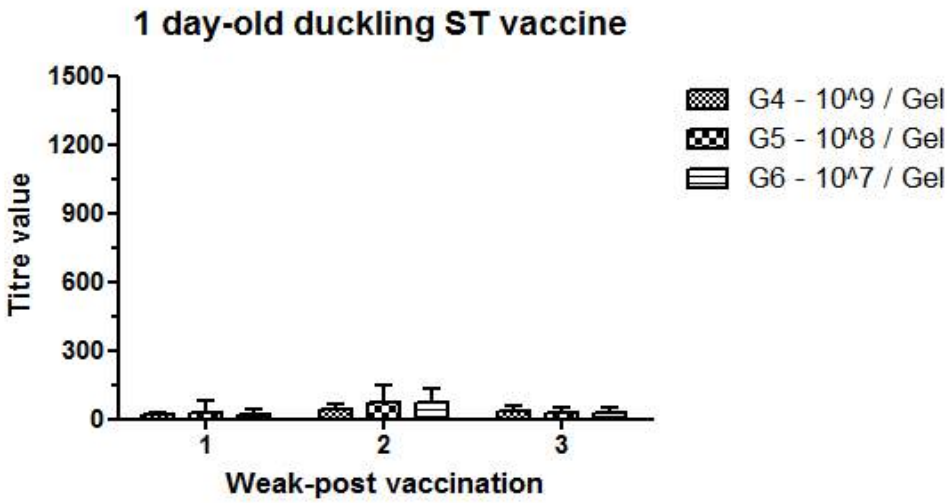


그림3-47 1일령 오리 살모넬라 Gel 어주번트 백신 후 1, 2, 3주차 살모넬라 항체 역가

- 위의 그림은 1일령 오리에 Gel 어주번트 백신 후 항체 역가를 나타낸 그림임
- 백신 1, 2, 3주 후에 모두 항체가 검출 되지 않았음
- 본 결과를 미루어보아 1일령 오리의 Gel 어주번트 백신은 항체반전에 적합하지 않은 것으로 판단됨

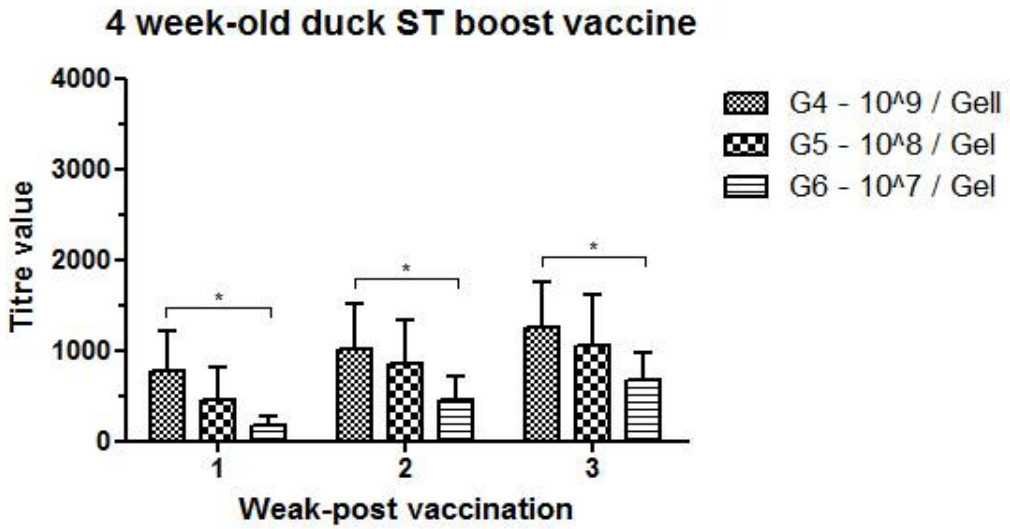


그림3-48 4주령 오리 살모넬라 Gel 어주번트 부스팅 백신 후 1, 2, 3주차 살모넬라 항체 역가

- 위의 그림은 Oil 어주번트 백신을 4주령오리에 부스팅 백신을 실시하고 1, 2, 3주 후에 혈청 내 역가를 나타냄
- 가장 낮은 항원 함량(10^7CFU/dose) 백신과 가장 높은 항원 함량(10^9CFU/dose) 백신을 비교했을 때 유의적으로 낮은 항체 역가를 생성하였음

- 중간 항원 함량(10^8CFU/dose) 백신은 가장 높은 항원 함량(10^9CFU/dose) 백신과 비교했을 때 조금 낮은 항체역가생성 경향을 보였으나 유의적인 차이를 보이지 않았음
- 4주령 booting 이후에는 높은 항원 함량(10^9CFU/dose)과 중간 항원 함량(10^8CFU/dose) 백신이 항체반전 기준인 645.3 titre value를 넘겨서 gel-priming / oil-boosting 항체 역가 생성에 유효한 항원 함량인 것으로 판단됨

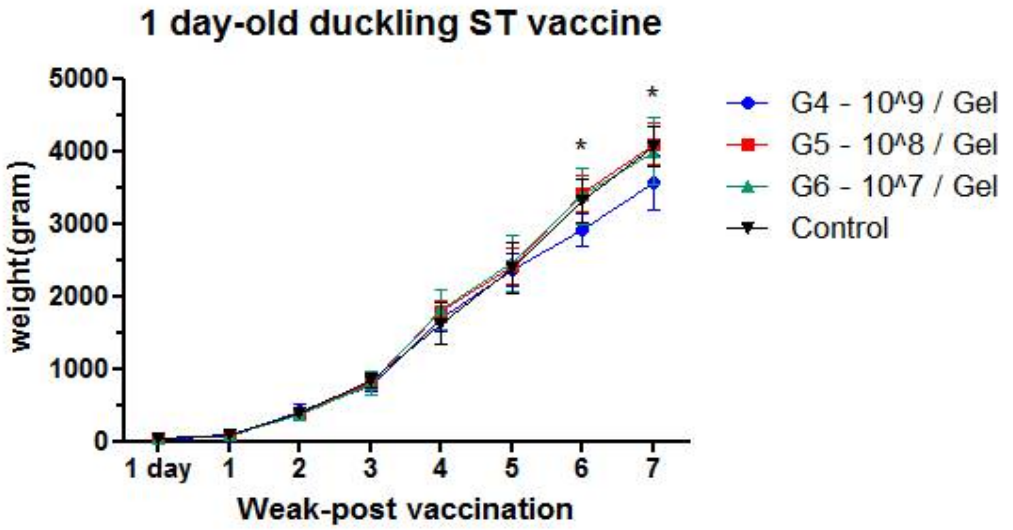


그림3-49 1일령 gel-priming, 4주령 oil-boosting 살모넬라 백신 후 1, 2, 3, 5, 6, 7주차 체중

- 체중은 육용오리의 상품성과 농장의 수입과 직결된 수치임으로 체중 증가를 방해 하지 않는 백신의 함량이 안전성면에서 우수한 백신으로 판단됨
- 모든 오리에서 백신 접종 후 백신 접종으로 인한 폐사는 없었으나 백신의 항원 함량으로 인한 증체율의 차이는 존재하였음
- 1일령 백신 이후에 백신을 접종 하지 않은 대조군과 비교했을 때 1, 2, 3, 4, 5주령에는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 6, 7주령에는 높은 항원 함량 오리들의 평균체중이 대조군과 유의적인 차이를 보이며 줄었음
- 본 결과로 미루어보아 gel-priming / oil-boosting 이용한 백신은 oil-boosting 이 후 10^9, 10^8 CFU/dose를 이용한 백신에서 유의적인 항체반전이 있었으나 10^9 CFU/dose를 이용한 백신은 증체율이 저하가 있었음
- 본 결과를 국내 평균 오리 출하일령(42일)의 평균 체중(3.2~3.3kg)과 비교해 봤을 때 증체율의 차이가 없으며 항체반전이 있는 10^8 CFU/dose을 이용한 백신이 가장 적합한 것으로 판단됨

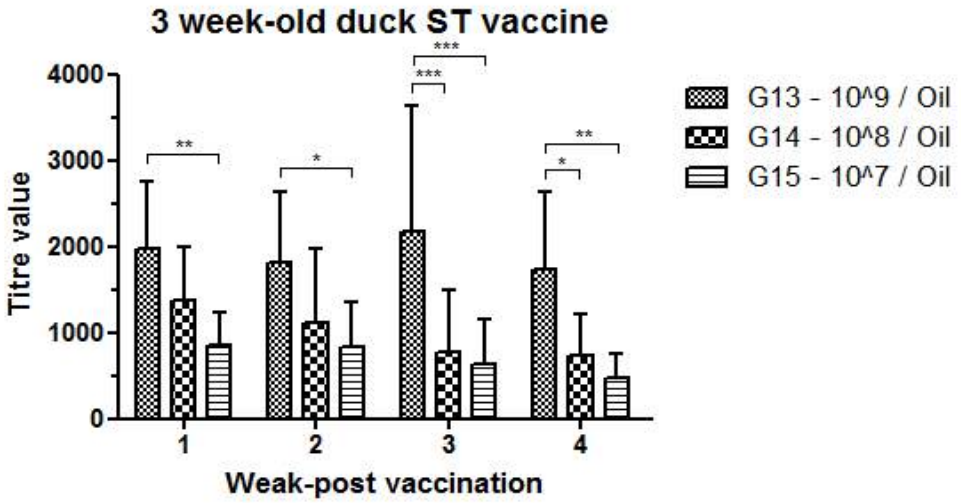


그림3-50 3주령 오리 살모넬라 Oil 어주번트 백신 후 1, 2, 3주차 살모넬라 항체 역가

- 위의 그림은 Oil 어주번트 백신을 3주령오리에 백신을 실시하고 1, 2, 3주 후에 혈청 내 역가를 나타냄
- 가장 낮은 항원 함량(10^7CFU/dose) 백신과 가장 높은 항원 함량(10^9CFU/dose) 백신을 비교했을 때 가장 낮은 항원 함량(10^7CFU/dose) 백신이 유의적으로 낮은 항체 역가를 생성하였음
- 높은 항원 함량 백신과 중간 항원 함량 백신이 항체반전 기준인 645.3 titre value를 넘겨서 3주령 오리 백신에 적합한 것으로 판단됨

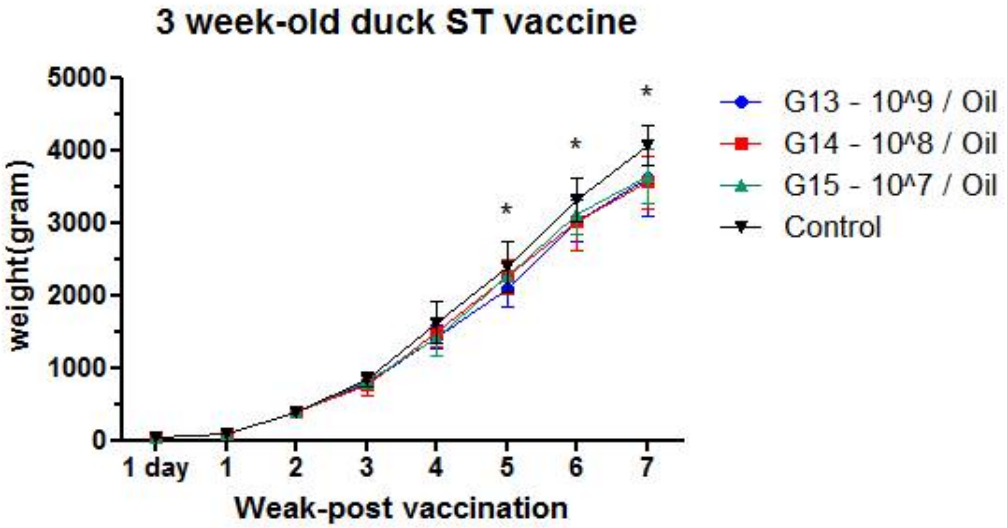


그림3-51 3주령 오리 살모넬라 Oil 어주번트 백신 후 1, 2, 3, 5, 6, 7주차 체중

- 체중은 육용오리의 상품성과 농장의 수입과 직결된 수치임으로 체중 증가를 방해 하지 않는 백신의 함량이 안전성면에서 우수한 백신으로 판단됨
- 모든 오리에서 백신 접종 후 백신 접종으로 인한 폐사는 없었으나 백신의 항원 함량

으로 인한 증체율의 차이는 존재하였음
- 국내 오리 출하일령(42일)을 기준으로 볼 때 가장 높은 항체반전을 일으키면서 증체율 감소가 적은 10^9 CFU/dose 백신이 적합한 것으로 판단됨

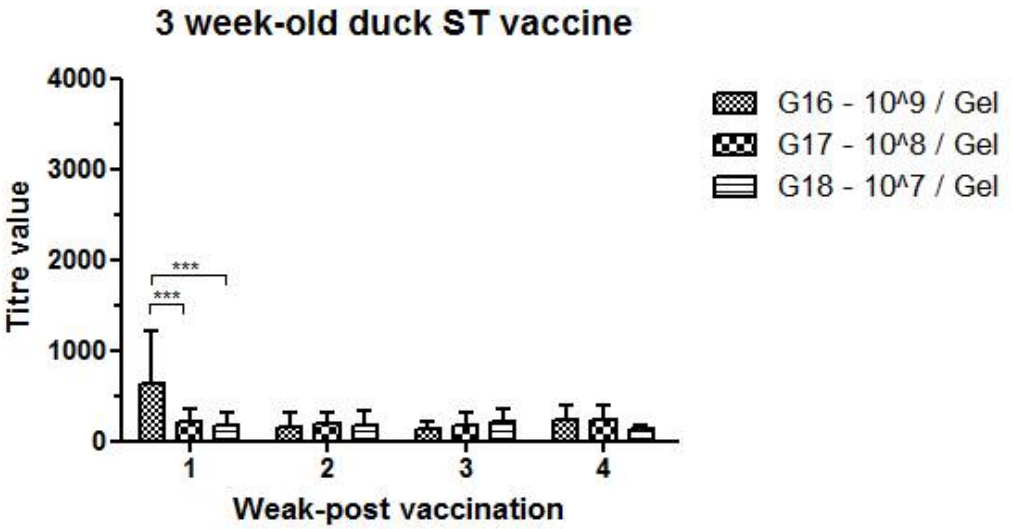


그림3-52 3주령 오리 살모넬라 Gel 어주번트 백신 후 1, 2, 3주차 살모넬라 항체 역가

- 위의 그림은 Gel 어주번트 백신을 3주령오리에 백신을 실시하고 1, 2, 3주 후에 혈청 내 역가를 나타냄
- 가장 높은 항원 함량(10^9CFU/dose) 백신만이 백신 후 1주에 항체반전을 나타내고 이후에 항체 반전이 나타나지 않음
- 본 시험 결과로 미루어 보아 Gel 어주번트를 이용한 살모넬라 백신은 항체 반전이 지속되지 않아 적합한지 않은 것으로 판단됨

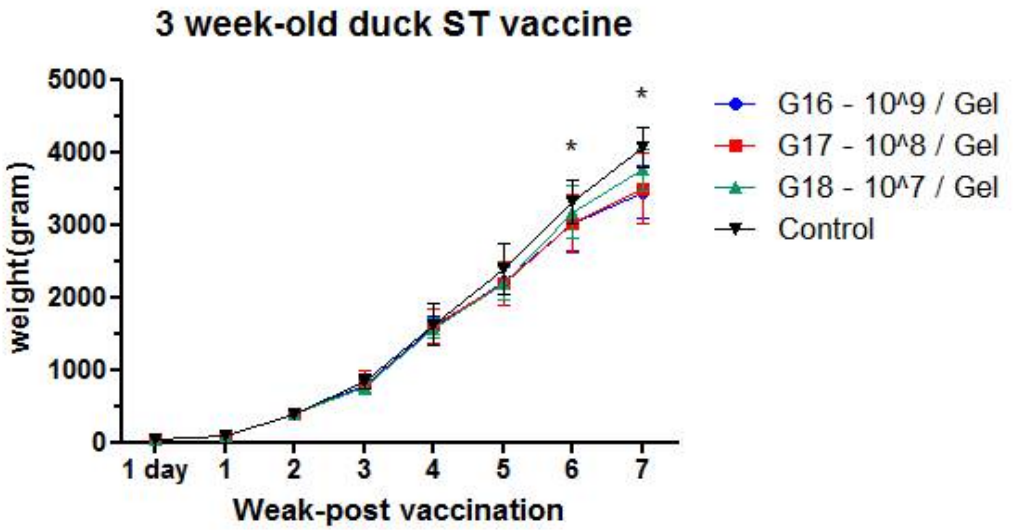


그림3-53 3주령 오리 살모넬라 Gel 어주번트 백신 후 1, 2, 3, 5, 6, 7주차 체중

- 높은 항원 함량 백신에서 백신 후 1주차만 항체 반전이 있었음에도 증체율이 유의적

으로 줄어 든 것으로 보아 반드시 항체반전이 증체율 저하에 비례하여 영향을 미치는 것이 아님을 보여줌

- 이는 올에서 면역반응으로 인한 증체율 저하가 아닌 백신 스트레스로 인한 증체율 저하임을 증명하는 데이터임

다. S. typhimurium 균주의 공격접종을 통하여 개발된 백신의 방어효능 평가 (방어율 80% 이상)

- 공격접종후 시험기간인 14dpi 까지 대조군과 백신접종 시험군 모두에서 폐사는 확인되지 않았으며, 백신 접종 후 총배설강에서 swab하여 *S.* Typhimurium의 검출을 시도하였음. 총배설강내 *S.* Typhimurium은 4 dpi부터 대조군과 백신접종 시험군 간의 차이가 나타나기 시작하여, 14 dpi에서 vaccine 1, vaccine 2, vaccine 4 시험군이 대조군과 비교하였을 때 통계적 유의차를 보이며 균 배설이 감소한 것으로 나타났음.

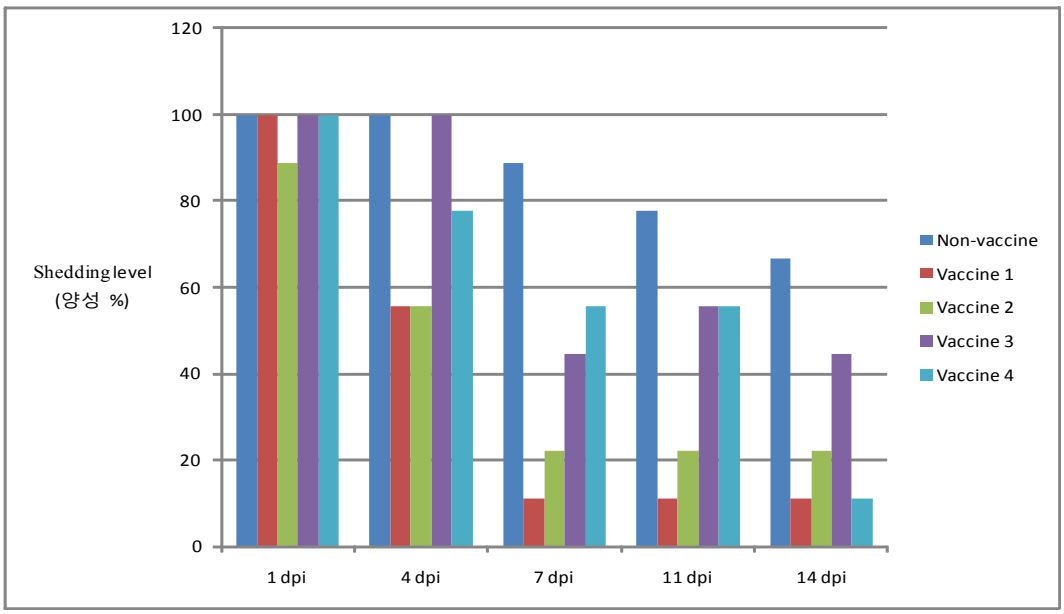


그림3-54 ST 백신 후 감염시험 균 배설 분석
(day-post infection : dpi)

- 또한, 시험종료일이 14 dpi에 대조군과 백신접종 시험군의 오리를 모두 안락사시켜 간, 비장, 맹장에서 균분리를 시도하여 분석한 결과, vaccine 1, vaccine 3 시험군의 일부 개체의 간에서 *S.* Typhimurium이 분리되었고, 모든 시험군의 맹장에서 *S.* Typhimurium이 검출되었으나, 유의적 차이를 나타내지는 않았음.

	Liver	Spleen	Cecum
Non-vaccine	0/9 (0 %)	0/9 (0 %)	4/9 (44 %)
Vaccine 1	1/9 (11 %)	0/9 (0 %)	2/9 (22 %)
Vaccine 2	0/9 (0 %)	0/9 (0 %)	5/9 (55 %)
Vaccine 3	3/9 (33 %)	0/9 (0 %)	3/9 (33 %)
Vaccine 4	0/9 (0 %)	0/9 (0 %)	7/9 (77 %)

표3-33 백신 별 장기 균 분리율

- 결과적으로, 4종의 시험백신 중에서 안전성, 높은 면역원성(항체가 형성수준), 총배설강 균배설의 유의한 감소를 보인 vaccine 1(ST26, 10^8CFU/수)이 오리에서의 *S.* Typhimurium 백신주로서 가장 안전하고 유효한 것으로 확인되었음.

5. 오리용 식중독 유발 살모넬라 백신의 시제품 제작

가. 본 연구개발 사업을 통하여 개발된 오리용 식중독유발 살모넬라 백신 생산기술의 기술이전을 통한 참여기업에서의 백신 시제품 제작

- 150ml TSB에 도압장 분리된 Salmonella typhimurim 1ml 접종, 12시간 증균
- 1.5liter TSB에 2차 증균, 18시간, 농축조건 6500rpm 15min
- 역가 확인은 XLD에 CFU/ml 확인
- 0.3% formalin PBS 용액으로 불활화함 (3일, 37도)
- 백신 역가는 ×10 CFU/ml 확인

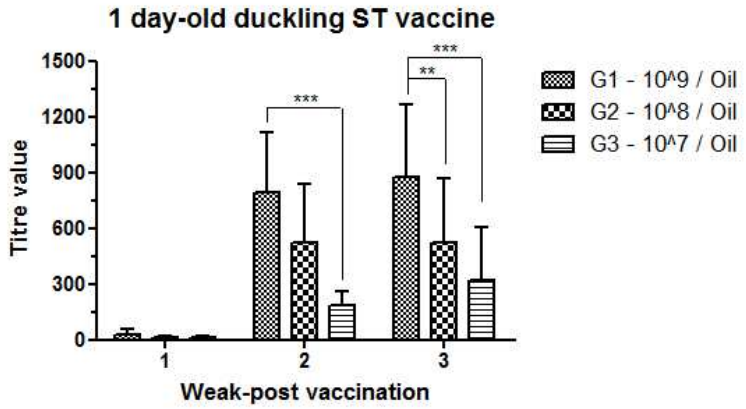


그림3-55 오리 체내 혈청에서 측정한 항체 역가

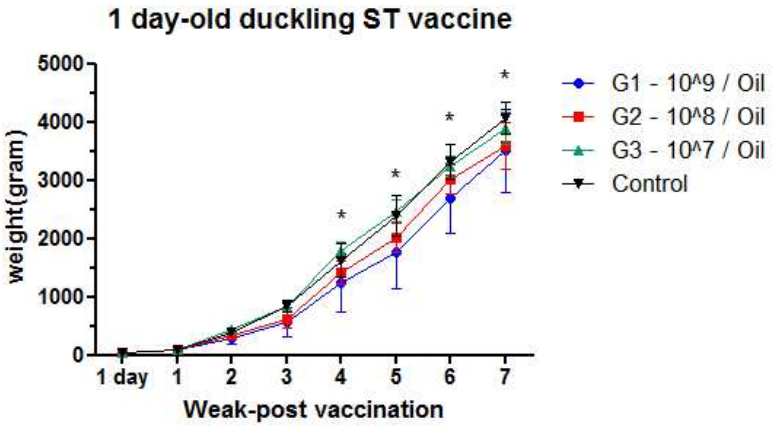


그림3-56 백신 후 오리 체중 변화

- 정상 오리와 유의적인 체중 변화를 보이지 않으면서 면역반응을 유도한 10^8.5 CFU/ml로 백신항원 역가를 설정함

6. 오리에서 백신의 면역원성을 증가시킬 수 있는 백신전달 방법 개선

가. 피내접종법, 난내 접종법 및 점안접종법 등의 신규 접종경로 탐색

- 오리 알에서 난 내 접종법을 시험하기 위해 모란식품에서 0 일령 오리알(120개)을 구함
- 오리 알을 19일 동안 37℃에 배양함
- 배양된 오리알의 기실 부위의 중앙에 Punch를 이용하여 구멍을 뚫고 1cc 주사기를 이용하여 백신을 가상한 염색액을 0.1ml을 접종함
- 접종된 염색액의 분포위치를 확인하기 위해 종란을 깨어 확인함(60개)

그림3-57 오리 알의 In ovo 접종 후 기실 막 염색약 분포

그림3-58 오리 알의 In ovo 접종 후 Allantoic fluid 염색약 분포

그림3-59 오리 알의 In ovo 접종 후 Amnionic fluid 염색약 분포

그림3-60 오리 알의 In-ovo 접종 후 근육 내 염색약 분포

- 총 4가지 접종 부위가 확인되었음
- 오리 알의 크기에 따라서 접종부위가 다른 것이 확인되었으며 가장 깊게 접종된 부위부터 근육내 > 양수(Amnionic fluid) > 요수(Allantoic fluid) > 기실막 순으로 접종되었음
- 알을 깨어 확인 한 오리 알의 접종 부위 분포는 아래 표와 같이 나타났음

	염색약 분포 부위			
	근육 내	양수	요수	기실막
개 수	33	2	10	15

표3-34 19일령 오리 알 In-ovo 염색약 접종 후 분포

- 동일하게 나머지 60알 중 30알에 In-ovo 접종 후 부화율을 관찰하기위해 다시 37℃인큐베이터에 배양하였으며 부화율을 관찰함
- 나머지 In-ovo 접종을 실시하지 않은 알 30개 중 29개가 부화 성공(96.67%)한 반면 In-ovo 접종을 실시한 알은 30개 중 14개 만이 부화 성공(46.67%) 함

- 본 시험 결과로 미루어보아 오리 알에 In-ovo 접종은 부화율 저하 영향을 미치는 것으로 판단되며, 계란과 달리 오리알은 크기의 편차(약 ±10%)가 커 접종 부위가 균일하지 않은 것으로 나타남
- 따라서 난 내 접종 방법은 백신 투여 경로로 적합하지 않은 것으로 판단됨
- 백신의 피내 접종법을 타진하기위해 오리의 피내 접종 방법을 연구함
- 1일령 오리를 모란식품으로부터 공급받아 3주령으로 충주 농장에서 사육함
- 적절한 피내접종 부위를 탐색하기위해 털이 비교적 없어 피부에 접근하기 쉬운 세 부위를 선정하였음(가슴, 옆구리, 물갈퀴)
- 세가지 부위에 백신(H5N1 RG) 을 접종 한 후 1, 2, 3주 후에 경정맥으로 채혈을 실시하고 혈청에서 항체역가를 HI test로 실시하여 면역반응이 가장 높은 부위를 선정함

그림3-61 충주종합실습농장 1일령 오리 사육시작 및 3주령 피내 접종

그림3-62 피내 백신 접종에 이용한 니들의 크기 비교(가장 오른쪽 31G 니들)

- 세가지 부위를 비교 한 결과 가장 좋은 결과는 물갈퀴를 부위에 접종 한 결과이며 백신

3주 동안 평균 2^6 HI 역가를 나타냈음(물갈퀴피부 > 옆구리피부 > 가슴피부)

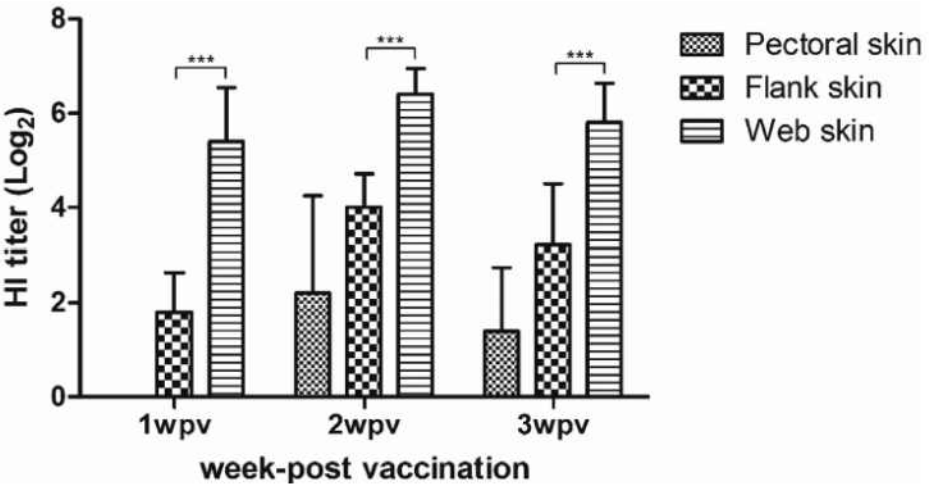


그림3-63 3주령 오리에 인플루엔자불활화 백신 후 물갈퀴, 옆구리, 가슴 피부의 면역반응

- 실험 결과 차후 피내접종시험을 물갈퀴를 이용하는 것으로 결정했음
- 본실험 결과를 바탕으로 피내접종을 이용한 백신의 dose-sparing effect 및 면역반응을 관찰하기위한 본 실험으로 88마리의 오리를 공급받음
- 공급받은 오리는 11개의 그룹으로 나누었으며 아래 표와 같이 백신경로, 백신용량을 구분하였음

Table 1. Antigen dose, adjuvant, and group designation.

Group Number	Route	Number of Ducks	Dose (EID_{50}/dose)	Adjuvant[1]
1	Intradermal administration	11	Low[2] ($10^{4.7}$)	N/A
2		8	Medium ($10^{5.7}$)	N/A
3		8	High ($10^{6.7}$)	N/A
4		11	Low[2] ($10^{4.7}$)	CpG-ODN
5		8	Medium ($10^{5.7}$)	CpG-ODN
6		8	High ($10^{6.7}$)	CpG-ODN
7	Intramuscular administration	8	High ($10^{6.7}$)	N/A
8		8	High ($10^{6.7}$)	CpG-ODN
9		8	High ($10^{6.7}$)	Oil
10		8	High ($10^{6.7}$)	Oil + CpG-ODN
11		8	High ($10^{6.7}$)	N/A

[1]N/A = Not applicable.
[2]Low dose of antigen did not elicit an immune response.

표3-35 1일령 오리의 인플루엔자불활화 백신 그룹 설정

- 피내접종의 adjuvant로 기존의 근육접종경로에서 이용했던 Oil과 Gel 어주번트는 점성이 높고 피내에 과도한 염증반응을 일으키는 역효과가 있는 것으로 판단되어 1차년도에 검증된 신규 어주번트 중 가장 효과가 좋았던 CpG-ODN 어주번트를 피내접종과 결합 시도함

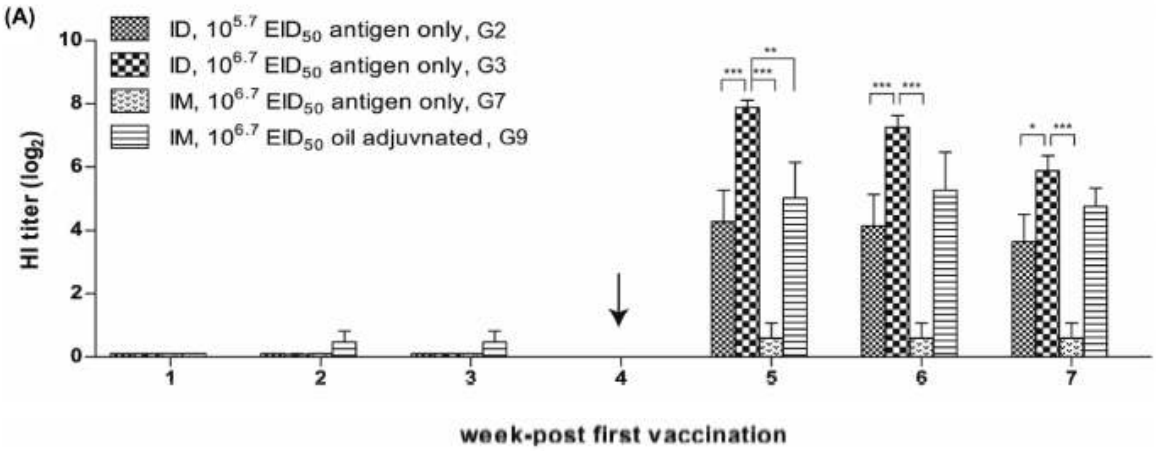


그림3-64 백신의 근육접종과 피내접종 후 면역분석

- 동량의 항원을 근육접종과 피내접종으로 1일령오리에 접종 시 백신 후 3주까지 면역반응이 유의적으로 증가하지 않은 것으로 나타남
- 피내 접종은 높은 양의 항원을 접종 할 수 없음으로 낮은 항원을 접종하였고 이에 따라 기존의 근육 및 피내접종에서 모두 면역반응이 나타나지 않은 것으로 판단됨
- 이후 boosting 백신으로 같은 백신용량과 접종경로로 4주령의 오리에 접종 했을 때 피내접종을 실시 했던 오리에서 근육접종을 했을 때보다 유의적으로 높은 면역반응이 나타는 것으로 나타났음
- HI 역가로 boosting 백신 후 5주령에 약 8배 높은 항체역가를 보였으며, 이는 boosting 이후 7주령까지 지속됐음

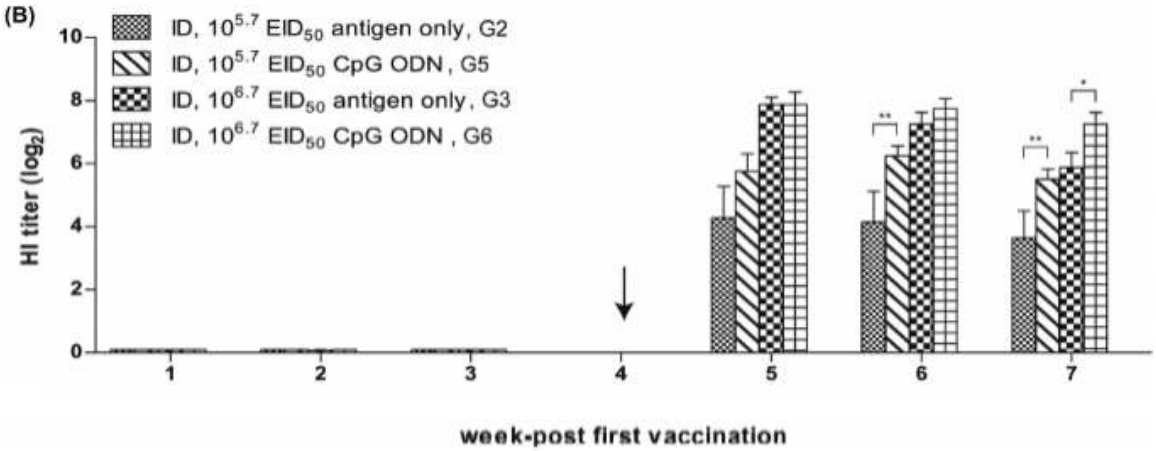


그림3-65 백신의 피내접종과 CpG 어주번트 적용 면역분석

- 동량의 항원을 피내접종으로 CpG 어주번트와 함께 1일령오리에 접종 시 백신 후 3주까지 면역반응이 유의적으로 증가하지 않은 것으로 나타남
- 피내 접종은 높은 양의 항원을 접종 할 수 없음으로 낮은 항원을 접종하였고 이에 따라 기존의 근육 및 피내접종에서 모두 면역반응이 나타나지 않은 것으로 판단됨

- 이후 boosting 백신으로 같은 백신용량과 접종경로로 4주령의 오리에 접종 했을 때 CpG-ODN 어주번트를 적용했던 오리에서 근육접종을 했을 때보다 유의적으로 높은 면역반응이 나타는 것으로 나타났음
- Boosting 이후에는 항원만 접종했던 피내접종과 CpG-ODN을 적용한 피내접종과 비교했을 때 항원역가가 차이 없었지만 이후 면역의 지속에서 CpG-ODN을 첨가한 백신에서 유의적으로 높은 면역반응을 나타냈음

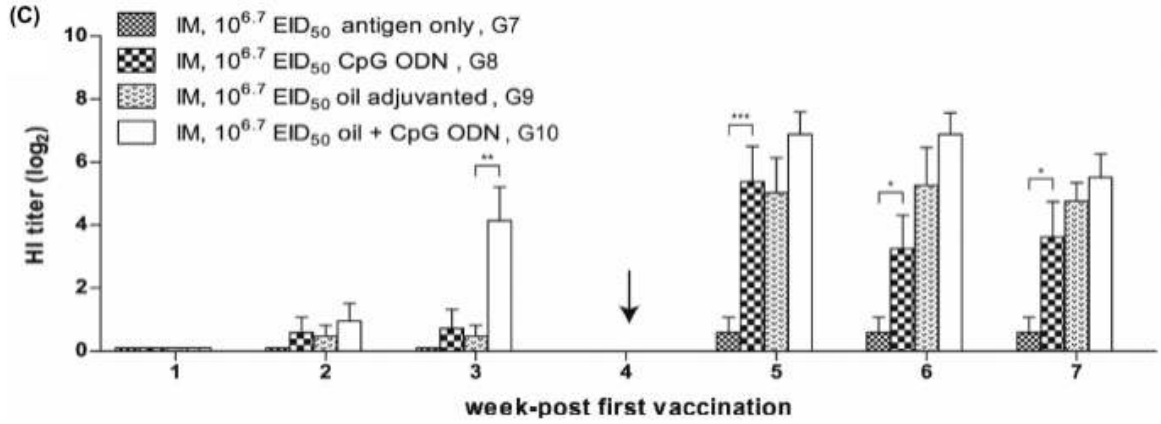


그림3-66 백신의 CpG 어주번트 적용 시 피내접종과 근육접종의 비교 면역분석

- 동량의 항원을 피내접종과 근육접종으로 CpG 어주번트와 함께 1일령오리에 접종 시 백신 후 3주령에 근육접종과 CpG-ODN을 함께 적용 한 백신에서 유의적으로 높은 면역반응이 있었음
- 이후 boosting 백신으로 같은 백신용량과 접종경로로 4주령의 오리에 접종 했을 때 CpG-ODN 어주번트를 적용했던 근육접종, 피내접종 모두 유의적으로 높은 면역반응이 있었음
- 본 연구결과를 바탕으로 신규 어주번트인 CpG-ODN을 적용했을 때 피내접종과 근육접종 모두에서 유의적으로 높은 면역반응으로 나타났으며 특히 피내접종 백신에 적용 할 때 항체역가 상승 효과 가 있는 어주번트임을 증명함

나. 오리에서의 대량 피내접종법 적용이 가능한 백신접종장비 (device) 연구 진행
- 협력연구기관인 카이스트와 함께 피내 접종이 가능하게 하기 위해 5개의 니들이 장착된 기구를 제작함
- 5개의 바늘로 고르게 백신이 분포되도록 하고, 니들의 길이는 2mm, 31G 로 제작함
- 기존의 주사기에 호환 가능하게 제작함
- 니들이 길이를 1mm로 줄일 수 있도록 젠더를 함께 제작함

그림3-67 개발된 마이크로니들의 전면부

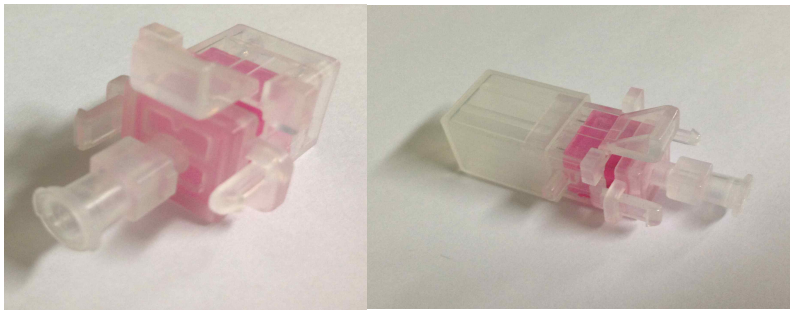


그림3-68 마이크로니들의 후면 부와전면 안전 캡

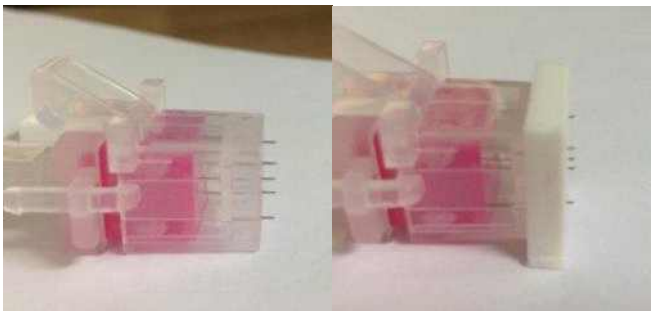


그림3-69 마이크로니들의 길이 비교(좌 젠더미장착(2mm), 우 젠더장착(1mm))

- 개발된 본 기구를 이용하여 위탁연구기관에서 오리를 이용한 면역시험을 실시함
- 이외에 기존 백신을 실시하는 니들을 개조하는 방법으로 피내접종을 실시 할 수 있는 방법을 모색하는 중임

다. HPAI 백신항원과 살모넬라 백신항원을 혼합한 합제백신의 제작 및 면역원성 평가
- 1세부에서 확립 된 최적의 살모넬라, 인플루엔자 항원양을 이용하여 오일백신을 제작하고 오리 10마리를 이용하여 3주령에 접종함
- 인플루엔자에 대한 항체역가는 백신 접종 후 2주령에는 약 2^5 HIU 3주령에는 약 2^6 HIU 인플루엔자 항원 단독으로 백신을 실시했을 때와 견줄 수 있는 항체 역가를 보였음
- 그러나 살모넬라에 대한 항체는 ELISA로 측정 한 결과 항체 반전의 기준이 될 수 있는

465 ELISA titer를 넘지 못하여 충분한 항체를 생성하지 못하는 것으로 판단됨

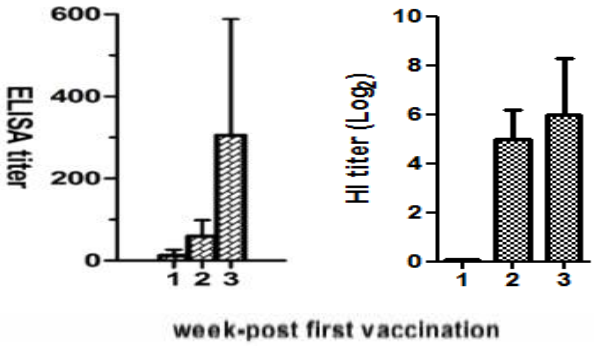


그림3-70 인플루엔자와 살모넬라 합제백신의 면역원성 평가

7. 개발된 항원 및 어쥬번트의 시제품 제작 원가분석을 통한 산업화 전략수립

가. HPAI 백신 시제품생산 원가분석

- 백신주를 분양한 코미팜에 의뢰하여 인플루엔자 백신 단가계산을 의뢰함
- 종란, 어주번트, 인건비 및 기타 재료비를 계상한 결과 오리 1수당 12원으로 분석됨

백신 조성 (0.5 ㎖/1수분 기준)		
• RG AIV_K10-483 (△H5N9) ---------- $10^{7.5}EID_{50}$ 이상 • ISA70 (v/v%) ---------- 70%		
	재료비 (1,000수분 × 2,200 vial 기준)	1,000수분 1 vial 기준
SPF 종란	6,900,000 원	3,136 원
ISA70	16,638,600 원	7,563 원
인건비 및 기타 재료비	2,861,400 원	1,301 원
합계	26,400,000 원	12,000 원

표3-36 오리의 고병원성 조류인플루엔자 불활화 백신 원가분석

나. 오리용 어쥬번트 시제품생산 원가분석

- 개발 및 평가된 오리용 어주번트 중 기존(Oil, Gel) 어주번트를 제외하고 가장 효율이 좋은 CpG-ODN의 가격을 분석함
- 현재 CpG-ODN high purity grade로 1mg당 약 5만원
- 오리 1수당 필요 CpG-ODN은 50ug임을 감안하면 수당 2500원임
- 오일백신을 기준으로 오리 1수당 완제품이 11~12원임을 감안 할 때 CpG-ODN의 수당 가격은 매우 비싼 것으로 사료되며, 현실적 이용이 불가능함
- 따라서 purity를 낮추고 대량 생산이 가능한 CpG-ODN의 필요성이 있으며, 대량생산으

로 단가를 낮추고 purity가 낮은 CpG-ODN의 면역반응을 연구 할 필요성이 있음

다. 살모넬라 백신 시제품생산 원가분석

- 백신주를 분양한 코미팜에 의뢰하여 살모넬라 백신 단가계산을 의뢰함
- 종란, 어주번트, 인건비 및 기타 재료비를 계상한 결과 오리 1수당 11원으로 분석됨

백신 조성 (0.5 ㎖/1수분 기준)		
• *Salmonella* ST 26 ---------- $10^{9.0}$CFU 이상 • ISA70 (v/v%) ---------- 70%		
	재료비 (1,000수분 × 1,000 vial 기준)	1,000수분 1 vial 기준
TSB broth	1,200,000 원	1,200 원
ISA70	7,563,000 원	7,563 원
인건비 및 기타 재료비	2,237,000 원	2,237 원
합계	11,000,000 원	11,000 원

표3-37 오리의 살모넬라 불활화 백신 원가분석

라. 오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA) 바이러스 유사입자 (VLP) 백신 단가감소 연구

1) 재조합단백질 고효율 발현 세포주를 이용한 VLP 감별(DIVA)백신항원의 제작

- 1차년도에 HPAI VLP 항원 개발에 사용된 Sf9 곤충세포보다 단백질 생산량이 높은 High-5 곤충세포주를 사용하여 VLP 항원을 생산함.

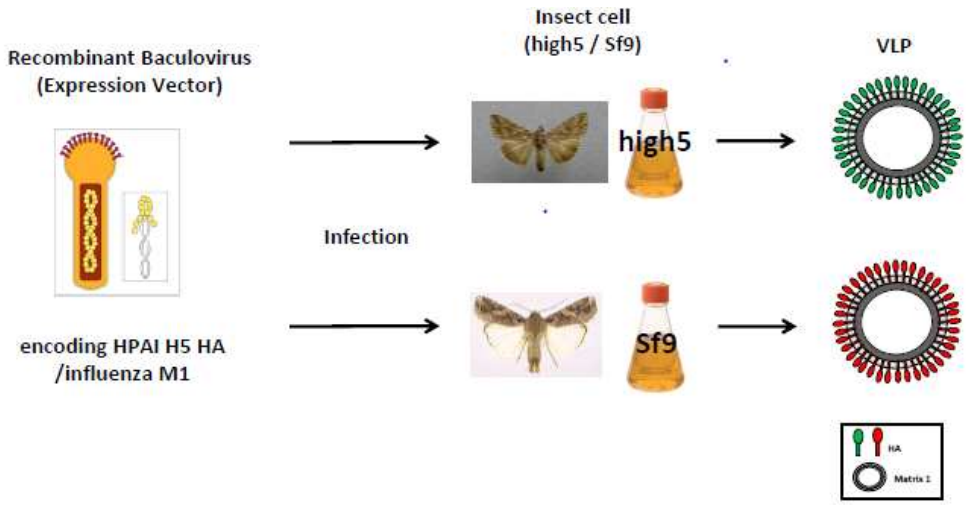


그림3-71 HIGH5, SF9을 이용한 VLP 생산 모식도

- 1차년도에 개발된 HPAI Clade 2 VLP를 Sf9 세포주와 High-5 세포주를 사용하여 각각 제작하고 그 발현 효율을 비교함.
- High-5 세포주의 경우 배지 1L를 사용할 경우 14mg 의 정제된 VLP를 생산 할 수 있었으며, 기존에 사용중인 Sf-9 세포주의 경우 배지 1L 당 8mg 의 VLP를 생산함으로써 High-5 세포주의 VLP 생산능력이 약 2배정도 높은 것을 확인함.

2) High-5 및 Sf9 세포주에서 생산된 항원을 이용한 백신의 제작 및 면역원성 및 방어효능 비교

- SEPPIC(FRACE)사의 ISA 70 오일 어주번트를 이용하여 1수당 40ug 및 10ug의 VLP 항원을 포함하도록 백신을 제작함.
- 제작된 백신을 6주령의 SPF 닭에 근육경로를 통하여 접종하고 4주 후 위에 기술된 방법을 사용하여 혈구응집 억제능을 평가함.
- 또한 백신 4주 후 H5N1형 고병원성 조류인플루엔자 바이러스인 A/chicken/Korea/K10-483/2010 바이러스를 비강 경로로 접종하고 10일간 폐사율 및 임상증상을 관찰함.

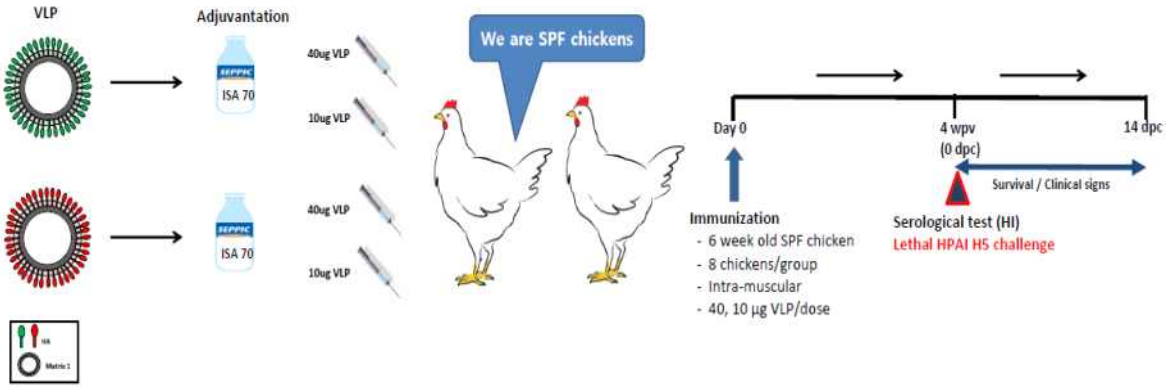


그림3-72 생산된 VLP 항원을 이용한 면역시험 개요

- 혈구응집능 평가결과 Sf9 세포주 또는 High-5 세포주를 사용하여 제작된 VLP 에는 유의적인 면역원성의 차이가 발견되지 않음.

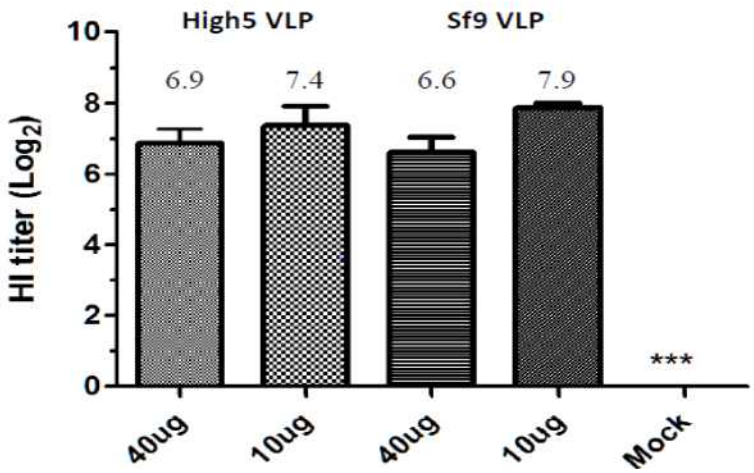


그림3-73 Sf9 세포주, High-5 세포주를 이용한 면역원성 비교

- 또한 모든 백신접종군은 A/chicken/Korea/K10-483/2010 바이러스의 치사접종 후 임상증상 없이 건강하게 생존함.
- 따라서 본 과제에서 개발된 HPAI VLP 항원의 경우 High-5 세포주를 사용하여 제작 할 경우 제작원가를 크게 감소시킬 수 있을 것으로 기대됨.

8. 국내 오리농장유래 식중독유발 살모넬라 모니터링

가. 국내 오리농장 모니터링을 통한 식중독유발 살모넬라의 지속적 확보

- 국내 소제 오리 도압장 1곳의 동의를 얻고 구역별 환경조사를 실시함
- BPW를 적신 스타키넷을 이용하여 오리도압장 구역별로 벽 2개 바닥 2개 환경 Sampling 을 진행하였다.
- Sampling 한 스타키넷을 BPW 30ml에 넣어서 37도 24시간 배양을 한다.
- 24시간 배양한 BPW 100ul를 10ml RV broth에 넣어서 42도 48시간 배양한다.
- 48시간 배양한 RV broth 를 loop를 이용하여 선택배지(Chrom agar salmonella plus)에 dilution streaking 한 후 37도 24시간 배양한다.
- 24시간 배양한 선택배지(Chrom agar salmonella plus)에서 Salmonella 성상을 띠는 colony를 이용하여 Salmonella colony PCR을 진행한다.
- Salmonella colony PCR 결과 양성으로 확인된 Sample들을 이용하여 Serotyping을 진행한다.

Sampling 장소		Salmonella colony PCR결과	Serotype
복도	벽	(+)VE	S.typhimurium
	바닥	(+)VE	S.typhimurium
선별실	벽	(-)VE	-
	바닥	(+)VE	S.typhimurium
포장실	벽	(-)VE	-
	바닥	(-)VE	-
워터칠링	벽	(-)VE	-
	바닥	(+)VE	S.typhimurium
에어칠링	벽	(-)VE	-
	바닥	(+)VE	S.typhimurium
2차 내장실	벽	(-)VE	-
	바닥	(-)VE	-
1차 내장실	벽	(-)VE	-
	바닥	(+)VE	S.typhimurium
출하실	벽	(-)VE	-
	바닥	(+)VE	S.typhimurium
탕박실		(+)VE	S.typhimurium
왁스실		(+)VE	S.typhimurium
부산물처리실		(+)VE	S.typhimurium
방혈실		(+)VE	S.typhimurium
계류실		(+)VE	S.typhimurium

표3-38 오리 도압장 구역 별 *S.typhimurium* 분리

9. 국내 오리농장유래 식중독유발 살모넬라 특성분석

가. Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)를 이용한 S. Typhimurium 균주들의 특성분석

- 순수분리된 ST를 blood agar에서 lawn을 만듦
- Lysis buffer를 이용하여 균의 탁도(OD value)를 640A 에서 1.0으로 조정
- Gold sekem agar를 이용하여 plug 제작
- XbaI enzyme 처리 및 washing 과정
- Gel 제작
- Chef electrophoresis field를 이용하여 영동
- Numeric analyzer를 이용한 분석

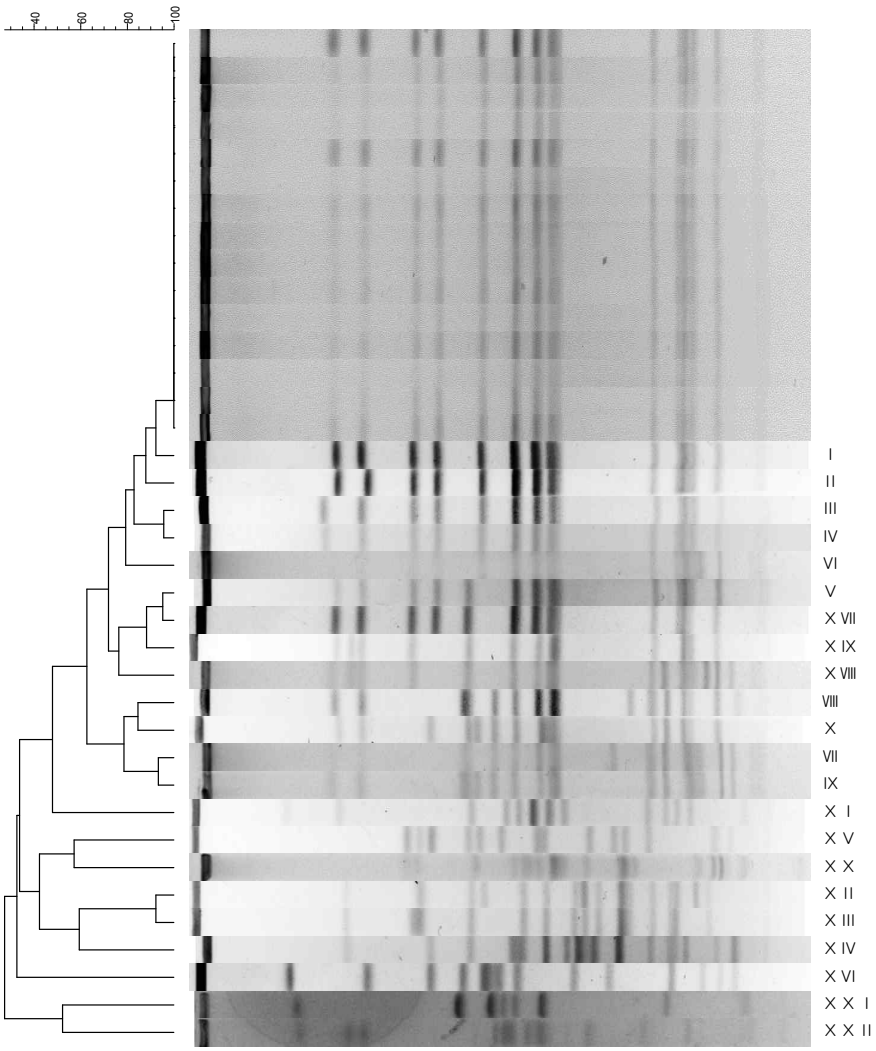


그림3-74 Salmonella Typhimurium의 PFGE 분석 결과

3절. 3차년도 연구내용 및 결과

1. 오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 시제품의 효능평가 및 산업화

가. 해외백신 비교시험 데이터

- 오리에 적용 전 해외백신과 국내 백신의 효능을 먼저 닭에서 비교하기 위해 고병원성 조류인플루엔자 백신의 95% 이상을 소모 하는 중국의 대표적 백신 3가지와 다국적 회사 백신 1가지를 동물용의약품등(연구시험용)수입함.

	G1	G2	G3	G4
회사	SinderBio	Yebio	Yebio	Boehringer Ingelheim
백신	Re-6	Re-6	Re-6/7	BEST AI/MD
생산	MDCK cell	Egg	Egg	Insect cell

표3-39 시험백신 정보

- 40마리의 3주령 SPF 닭을 구입하여 5그룹으로 위의 표와 같이 나누고 NP ELISA를 이용하여 감염개체가 없을 확인 후 백신을 실시함. 백신 후 1,2,3주 후 혈청을 수거하여 HI 시험으로 항체 역가를 측정하였으며 3주차에는 BL3 시험실로 인계하여 국내 2015년 발생 H5N8 HPAI를 비강을 통해 접종함0.2 mL of $10^{7.0}EID_{50}$/mL)

- 모든 개체는 매일 임상증상(폐사, 침울, 설사, 신경증상)을 관찰하였고 바이러스 접종 3, 5, 7, 9, 12 일에 구강과 총배설강에서 바이러스 배출을 관찰하기 위해 멸균면봉으로 점액을 취득함.

- 취득한 점액은 PBS에 희석하여 Viral RNA를 추출하고(MP96 Viral exprep) 상대 정량을 위해 Matrix 유전자를 이용하여(Erica spackman) Real-time RT-PCR(ABI7500)을 실시함. 도출된 Cycle threshold 값은 감역역가로 환산하기위해 Egg infectious dose 50로 환산하였으며, 이는 점액 채취 샘플을 무작위로 취득하여 계란에서 감염역가를 측정한 값의 추세선으로 설정함.

	Vaccine	Route	Dose	Clade
G1	RE-6, Sinder Bio, China	IM	0.3mL	Clade 2.3.2.1 (RE-6)
G2	RE-6, Yebio, China	IM	0.3mL	
G3	RE-6/7, Yebio, China	IM	0.3mL	Clade 2.3.2.1 (RE-6) Clade 7.2 (RE-7)
G4	BEST AI/ND, Boehringer	SC	0.5mL	Clade 2.3.2
G5	Sham-inoculation	IM	0.3mL	None

표 3-40 시험그룹 설정

- 위의 표와 같이 각 제조사의 권장사항대로 백신량 및 접종경로를 선택하였으며, 백신주의 H5 clade를 밝힘.

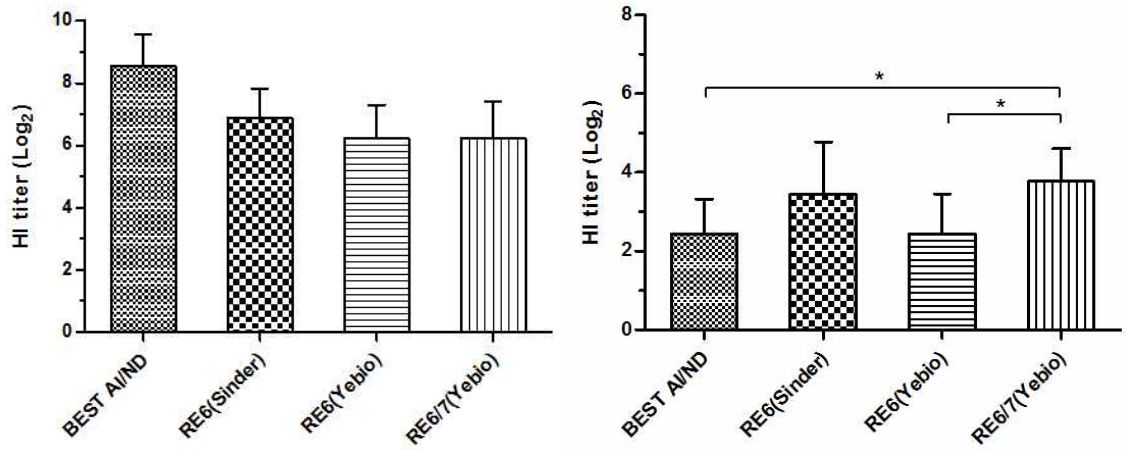


그림 3-75 백신 접종 3주후 HI 결과

- 백신접종 3주후에 혈청에서 각 백신과 동일한 상동성의 항원과 HI시험을 실시했을 때 위의 왼쪽 그림과 같은 결과를 보임. BEST AI/ND 백신이 가장 높은 항체 역가를 보였으며 SinderBio와 Yebio 제품은 평균 6~7사이의 항체 역가를 나타냄. 그러나 중국백신에 대한 HI 항원은 완벽히 동일한 항원은 얻을 수 없어 국내 2010년 발생 H5N1 clade 2.3.2.1.을 이용하여 한 결과임으로 중국백신끼리의 비교는 가능하나 BEST AI/ND와 직접적 비교는 불가능함.
- 백신접종 3주후 혈청에서 challenge 바이러스 항원과 HI를 실시했을 때는 위의 오른쪽 그림과 같은 결과를 보임. RE-6/7 혼합백신이 가장 높은 역가를 보였고, RE-6(Yebio) 및 BEST AI/ND 백신과 유의적인 차이를 보임 그러나 이 수치는 OIE에서 권장하는 고병원성 조류인플루엔자 백신의 폐사를 막을 수 있는 수준의 HI 역가(10^5 HIU)에 미치지 못하여 바이러스 접종 후 폐사를 막을 수 없을 것으로 예상되었음.

그림 3-76 바이러스 공격접종 후 임상증상

- 대조군은 바이러스 접종 3일부터 위 사진과 같이 벼슬에 가피 및 출혈이 형성되고, 자극에도 반응이 없을 정도의 침울한 상태를 보임.
- 백신을 접종 그룹에서는 Yebio의 RE-6 백신접종 개체 2마리에서 미약한 침울함이 있었고, 이외에 다른 백신 개체들은 외형적인 임상증상을 보이지 않음.

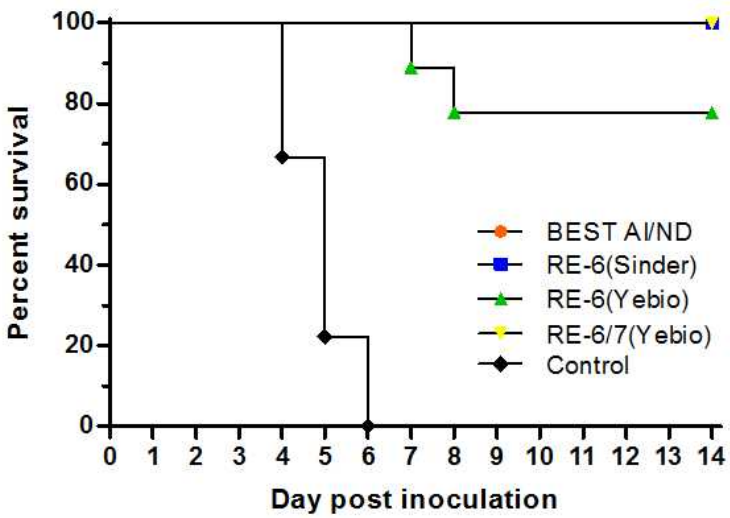


그림 3-77 공격접종 후 생존율 그래프

- 바이러스 접종 후 2주간의 관찰결과 대조군 SPF 닭은 6일에 모든 개체가 사망하였고, challenge 바이러스에 대해 가장 낮은 교차 HI 역가를 보인 RE-6(Yebio)에서 예상대로 2마리의 폐사가 있었음 이는 감염 후기인 7~8일 째에 나타났으며, 두 개체는 미약하거나 중등도의 침울을 보일 뿐 가피 형성 및 두부 종창 등의 외형적 이상은 보이지 않았음.
- 바이러스 접종 2주 후 살아있는 모든 개체에서 혈청을 수거하고, 안락사 후 부검을 실시하여 백신을 한 개체에서 내장 조직의 손상여부를 확인하고자했음.

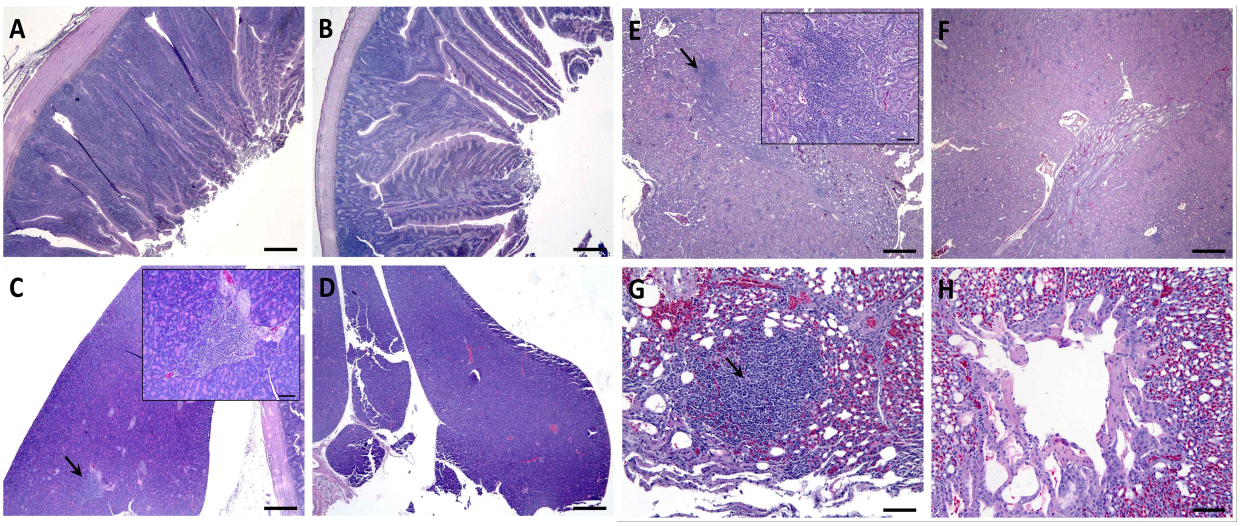


그림 3-78 부검 후 조직 슬라이드 사진

- 부검 시 외적으로 충혈 및 종창을 보인 십이지장, 이자, 신장, 폐를 관찰한 결과임. RE-6와 RE-6/7백신을 한 그룹에서는 폐에서 충혈 및 림프구의 결집을 관찰 할 수 있었으며, 십이지장에서 염증성 비대가 있었다. 이자와 신장에서는 focal 또는 multifocal한 단핵구의 침윤이 관찰되었음.

Vaccines	Organs							
	Lung		Duodenum		Pancreas		Kidney	
BEST AI/ND	4/4	(2.5±0.3)	0/4	(0.0±0.0)	0/4	(0.0±0.0)	0/4	(0.0±0.0)
RE-6(Sinder)	4/4	(1.8±0.3)	3/4	(2.0±0.7)	4/4	(1.8±0.3)	2/4	(0.8±0.3)
RE-6(Yebio)	4/4	(3.3±0.5)	3/4	(1.8±0.8)	2/4	(0.8±0.5)	3/4	(1.5±0.5)
RE-6/7(Yebio)	4/4	(1.8±0.3)	3/4	(2.0±0.7)	4/4	(1.3±0.3)	2/4	(0.5±0.3)

표 3-41 장기별 조직 손상 Scoring 결과

- 위 표는 모든 조직 검사 소견을 전문 병리학자에 의뢰하여 얻은 scroing 결과임. 모든 백신개체의 폐에서 조직 손상 소견이 있었으나 특히 RE-6(Yebio)에서 많은 조직 손상을 관찰할 수 있었음.
- 그러나 BEST AI/ND는 폐 외에 십이지장, 이자, 신장에서는 뚜렷한 조직 손상 소견이 보이지 않아 다른 clade의 백신(2.3.2.1. vs. 2.3.4.4.)에도 내장 기관의 손상이 중국 백신에 비해 낮은 것으로 관찰됨. 이유는 BEST AI/ND 백신 균주로 사용된 항원이 clade 2.3.2이가 clade 2.3.2.1.로 분화 전 clade 2.3.2를 사용한 것, 또는 곤충세포 발현 백신의 계란 생산 항원 대비 선천면역 반응 증대의 원인으로 추정해 볼 수 있음(Samg-Moo Kang et al., 2009, Virus Research, Influenza vaccines based on virus-like particles).

- 아래 그림 3-79는 바이러스 접종 후 3, 5, 7, 9일에 바이러스의 배출을 인후두 및 총배설강에서 측정한 결과임.

- 바이러스 접종 3일 후에는 2~3개체를 제외하고 모든 백신 개체의 인후두에서 바이러스가 관찰되었음. 백신을 접종하지 않은 군은 모든 개체에서 바이러스가 배출되었으나, 백신군에서 바이러스를 배출하는 군과 그 양을 비교했을 때 유의적인 차이가 없었음. 대조군에서는 3일 째부터 높은 역가의 바이러스 배출이 총배설강에서 있었으며, 이때 RE-6(Yebio) 백신 개체 2마리에서 비슷한 수준의 총배설강 바이러스 배출이 관찰됨.

- 바이러스 접종 5일 째는 높은 수준의 바이러스 배출이 대조군에서 있는 반면 백신 군에서는 배출이 점차 줄어드는 것을 관찰 할 수있었으며, 7일 째는 대부분의 개체들이 바이러스 배출이 멈추었음. BEST AI/ND 백신군이 가장 먼저 바이러스 배출이 줄어들었으며, 초기에 총배설강 배출을 보인 RE-6(Yebio)백신군 2마리는 7일 까지도 높은 수준의 바이러스 배출이 있었음.

- 바이러스 배출 결과로 미루어보아 국내 유행 H5N8 clade 2.3.4.4 바이러스에 대해 널리 쓰이는 중국 및 다국적회사 백신이 적합하지 않음을 알 수 있었고, 최근 유행주에 대한 새로운 백신주를 개발 필요성이 있음. 특히 백신군에 폐사가 일어났으며, 폐사 개체는 백신을 접종하지 않은 개체에 비해 긴 기간 바이러스를 배출하는 것으로 나타남.

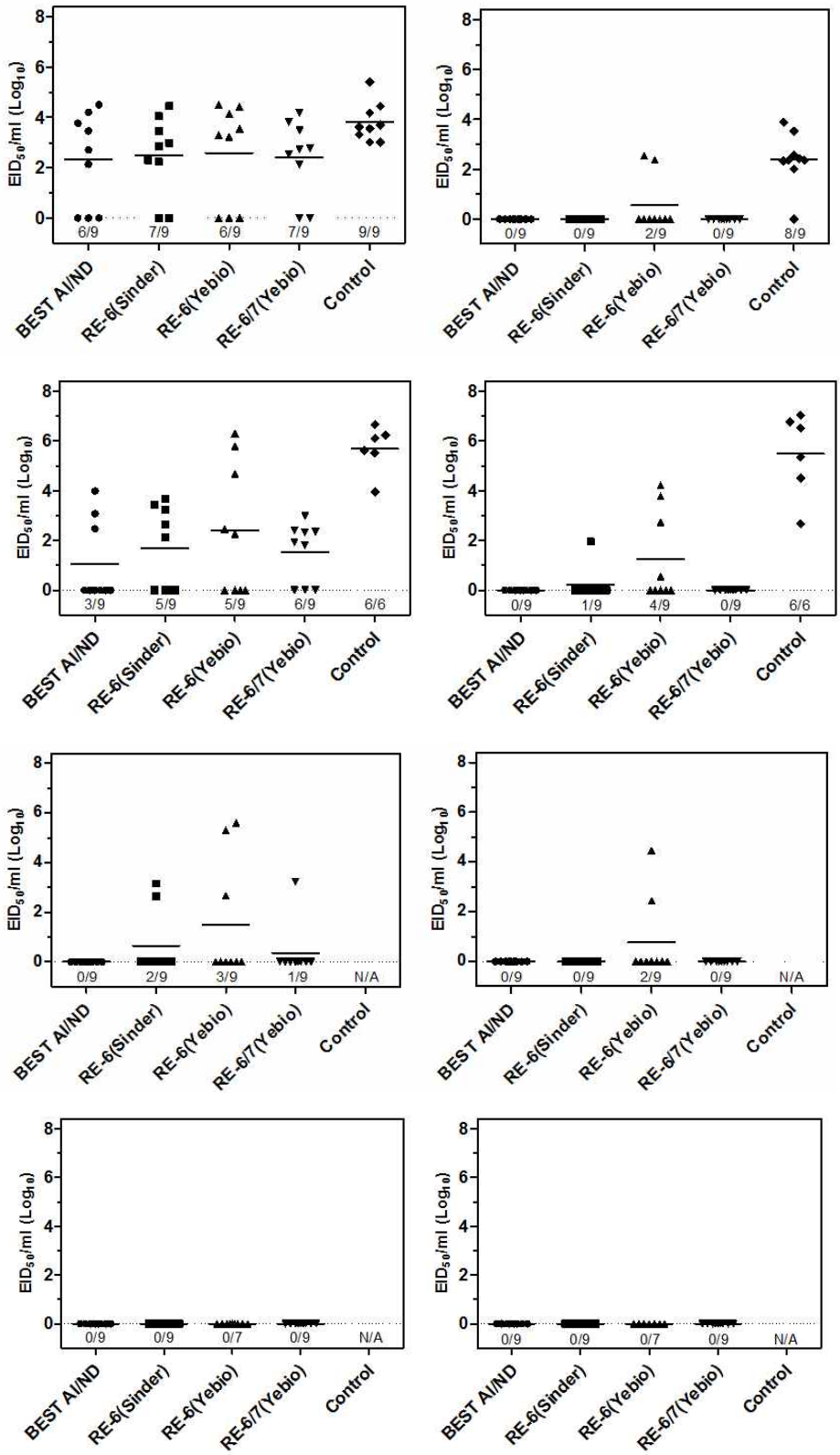


그림 3-79 접종 3, 5, 7, 9일 후 바이러스 배출량

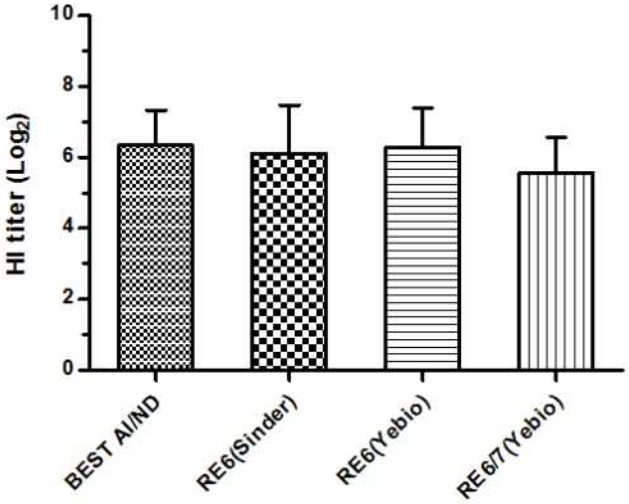


그림 3-80 바이러스 감염 2주후 HI 역가

- 바이러스 감염 2주 후 HI 역가는 위의 그래프와 같으며 감염 전보다 상승한 것으로 미루어보아 감염이 일어났음을 알 수 있음.

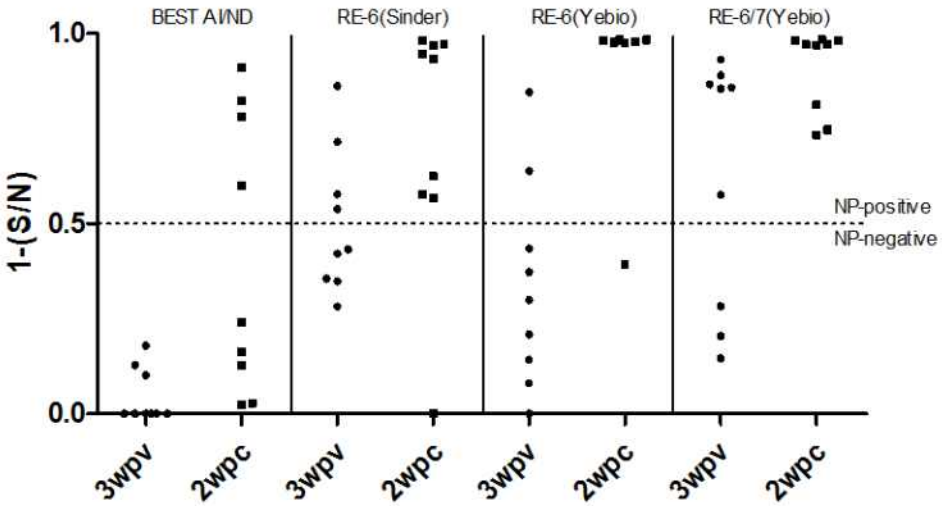


그림 3-81 백신 3주후 및 감염 2주후 혈청에 대한 NP ELISA 결과

- 백신접종 개체의 감염 여부를 확인하기위해 NP ELISA로 백신후 3주 혈청과 감염후 2주 혈청을 분석하였음.
- BEST AI/ND 혈청의 경우 insect cell 발현 백신이기 때문에 백신 후에 nucleoprotein에 대한 항체 역가 상승하지 않았으나, 감염 2주후에는 4마리에서 양성을 나타내었음. 중국백신 3종은 계란 또는 세포에서 바이러스를 증식하여 백신을 제작하기 때문에 NP ELISA로 감염 여부를 분간 할 수 없었음.

Group	No. birds died/total no. birds at 14 day post challenge	Mean death time (days)	No. birds shedding from oropharynx/total no. birds	No. birds shedding from cloaca/total no. birds	Mean no. of days of virus shedding from oropharynx/cloaca
BEST AI/ND	0/9***	-	6/9	0/9***	3.5 / 0
Sinder RE-6	0/9***	-	7/9	1/9***	4.3 / 2.0
Yebio RE-6	2/9**	7.5	6/9	3/9**	5.2 / 5.0
Yebio RE-6/7	0/9***	-	8/9	0/9***	3.6 / 0
Mock vaccinated	9/9	4.9	9/9	9/9	3.9 / 3.7

표 3-42 감염 후 바이러스 배출 개체 및 평균 바이러스 배출 기간

- 위 표는 감염 후 바이러스 배출 개체 및 평균 바이러스 배출 기간을 표시한 표임. 대조군에 비해 구강인두로의 바이러스 배출은 유의적으로 줄지 않았음. 그러나 총배설강으로 바이러스 배출 개체수를 유의적으로 줄일 수 있었음. RE-6(Yebio)의 폐사개체 2마리의 바이러스 배출이 지속되어 가장 긴 바이러스 배출 결과를 보임.

- 본 해외 백신 시험 결과로 기존의 H5N1 clade 2.3.2에 속하는 백신이 최근 유행 clade 2.3.4.4를 방어하기에 적합하지 않은 것으로 나타남. 특히 부분적으로 폐사가 있었으며, 바이러스 배출 뿐 만 아니라 내장 장기의 손상이 닭의 성장 효율에 좋지 않을 것으로 예상됨.

나. 개발 H5N9 백신의 시제품 생산 및 임상시험

- 1~2차년도 개발 H5N9 백신주(2010) 중 역유전학 제작 균주가 기존 동물용의약품 생산 시스템에서 시제품을 생산 할 수 있어, 총 4개 회사 (주)고려비엔피, 녹십자수의약품(주), (주)대성미생물연구소, 중앙백신연구소(주)에 시제품을 생산하고, 효능을 평가함.

- 각 회사마다 만든 시제품은 다음과 같음

1. ㈜고려비엔피 : 달구방 AI(H5N9)오일백신 - H5N9
2. 녹십자수의약품㈜ : BANB 시험백신 - H5N9 + M41 + 40/09 + ND
3. ㈜대성미생물연구소 : H5N9 오일백신 - H5N9
4.중앙백신연구소㈜ : RG AIV H5N9 - H5N9

- 각 백신당 8마리의 닭을 이용하여 가슴근육에 0.5ml의 백신을 접종함. 감염 바이러스는 2010년 발생 고병원성 조류인플루엔자 (A/mandarin duck/Korea/K10-483/2010) H5N1 바이러스를 이용함.

- 시험 개요

A. 백신접종 및 면역원성 시험

가. 사용 방법에 따라 3주령 SPF 닭의 가슴근육에 0.5mL의 시험약 또는 대조약을 각각 9마리, 8마리 접종함

나. 백신 접종 3주 후 경정맥에서 혈액을 채취하였으며, 혈청을 분리함

다. 분리된 혈청은 백신과 동을 항원(RG-H5N9)을 이용하여Hemagglutinin test를 실시함

B. 바이러스의 감염 및 임상증상관찰

가. 백신 접종 3 주 후 공시축의 양쪽 구비강으로 6.3 EID50/200ul/bird를 주입함

나. 14일 간 매일 공시축의 임상증상 및 폐사를 기록함

다. 바이러스 주입 14일 이후 경정맥에서 혈액을 채취하여 혈층을 분리함

라. 분리된 혈청은 백신과 동을 항원(RG-H5N9)을 이용하여Hemagglutinin test를 실시함

C. 바이러스 배출 검사

가. 공격접종 바이러스 주입 후 3, 5, 7, 9, 11일에 구강 및 총배설강에 배출되는 샘플을 수거함

나. 수거된 샘플에서 바이러스를 검출하기 위해 RNA를 추출함

다. 추출된 RNA는 Real time RTPCR을 이용하여 바이러스 유전자의 유무 및 양을 판단함

- 백신 접종 3주 후 혈청 역가는 아래 표와 같으며 공격접종 2주후 혈청 역가가 상승한 것으로 미루어보아 감염이 이루어짐을 알 수 있음.

		HI titer (log2HAU)(HI positive/totoal)	
		백신 3주 후	공격접종 후
G1	㈜고려비엔피 달구방 AI(H5N9)	6.6 ± 0.7 (8/8)	9.8 ± 1.2 (8/8)
G2	녹십자수의약품㈜ BANB 시험백신	6.2 ± 1.4 (9/9)	6.8 ± 1.8 (9/9)
G3	㈜대성미생물연구소 H5N9 오일백신	4.4 ± 1.2 (8/8)	6.3 ± 1.6 (7/7)
G4	중앙백신연구소㈜ RG AIV H5N9	0.4 ± 1.3 (1/9)	8.5 ± 0.7 (2/2)
G5	Control	0 (0/8)	NA

표 3-43 백신 3주 후 및 공격접종 2주 후 HI titer

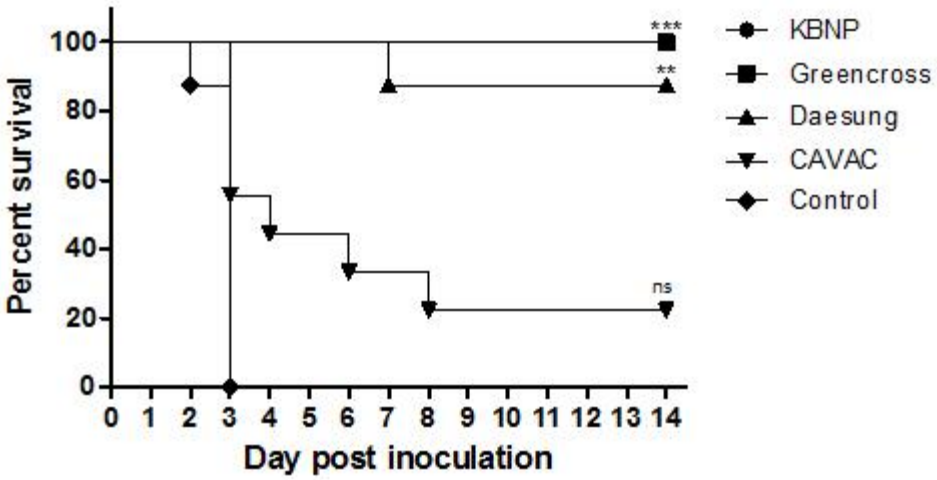


그림 3-82 바이러스 감염 후 생존율 그래프

- 통계적 유의성은 Fisher's exact test를 이용하여 검정하였다. 대조군 대비 유의성을 검정하였다(***; P>0.05, **; P>0.01, ns; Not significant).
- 고려비엔피 백신은 8마리 중 8마리 모두 생존하였다. 녹십자수의약품의 백신은 9마리중 9마리 모두 생존하였다. 대성미생물연구소의 백신은 8마리중 7마리가 생존하였다. 중앙백신연구소의 백신은 9마리중 2마리가 생존하였다. 대조군은 8마리중 8마리 모두 사망하였다.

Day post inoculation	Number of viral shedding chickens to total chickens(Avg EID_{50}/ml)									
	3		5		7		9		11	
	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent
G1	0/9	0/9	1/9 (0.5)	0/9	2/9 (1.1)	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
G2	0/9	0/9	2/9 (1.5)	0/9	2/9 (1.3)	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
G3	0/8	0/8	1/8 (1.8)	0/8	1/8 (3.5)	1/8 (1.7)	0/7	0/7	0/7	0/7
G4	7/9 (3.0)	3/9 (1.0)	3/4 (2.4)	1/4 (2.8)	0/3	0/3	0/2	0/2	0/2	0/2
G5	7/7 (3.1)	4/7 (2.0)	na	na	na	na	na	na	na	na

표3-44 접종 후 3, 5, 7, 9, 11일 째 바이러스 배출 개체수

- 바이러스 접종 5일 및 7일 째에 구강에서 미약한 바이러스 배출이 있었으며, 대성미생물연구소 및 중앙백신연구소의 시제품은 폐사와 함께 구강인두와 총배설강에서 바이러스 배출이 있었음.

- 본 시험을 바탕으로 시제품에 대한 고려비엔피 및 녹십자수의약품의 시제품은 2010년 발생 H5N1에 대해 H5N9이 효과적으로 막을 수 있는 것을 알 수 있었으며, 대성미생물연구소와 중앙백신 연구소의 시제품은 시제품 제작에 문제가 있음을 발견함. 따라서 과제 이후 추가적인 백신제작에 대한 follow-up이 계획되어야함.

다. 2014-2015년 발생 H5N8에 대한 역유전학 유래 H5N9 백신개발

- 2014-2015발생 고병원성 조류인플루엔자에 대해 기존 2010년 발생 바이러스로 만든 백신균주의 상동성이 떨어짐을 확인하고, 이에 역유전학 플랫폼을 이용하여 백신을 제작함. 제작 방법 및 백신시험 개요는 아래 그림과 같음

- 제작한 백신은 기존 DIVA 전략을 위해 기존 백신과 동일한 내부 유전자와 NA(N9) subtype을 이용하여 제작하였으며, MBCS 부위를 제거하여 병원성 인자를 제거함.

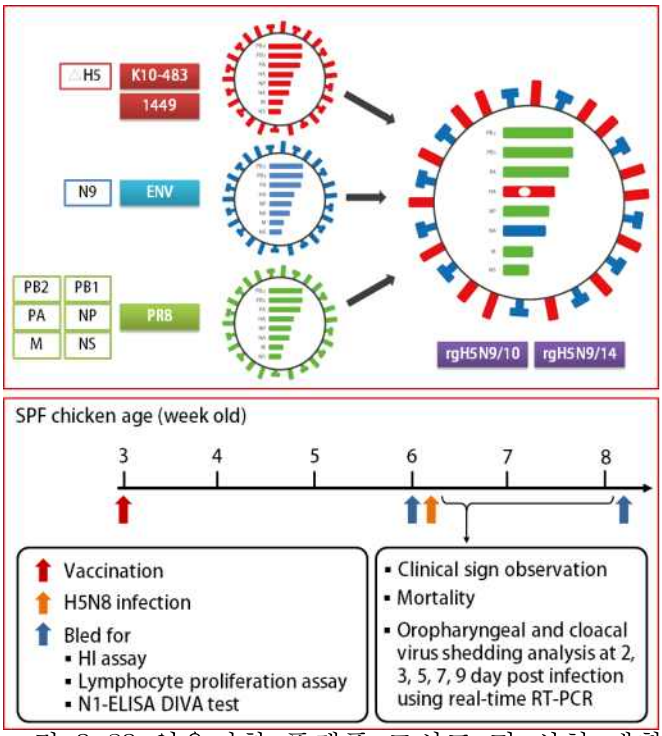


그림 3-83 역유전학 플랫폼 모식도 및 실험 계획

- 총 45마리를 이용하여 5그룹으로 나누었으며 그룹 설정은 아래 표와 같음.

	Vaccine	Route	Dose
G1	rgH5N9(2010)	IM	0.5mL
G2	rgH5N9(2014)	IM	0.5mL
G3	rgH5N9(2010/2014)	IM	0.5mL
G4	Control	IM	0.5mL

표 3-45 시험 그룹 설정

- 3주령의 닭 45마리를 위의 표와 같이 나누고 각 불활화 오일 백신을 실시한 후 3주 후에 백신을 채혈을 실시하여 HI 역가를 측정하였음.
- 동시에 3마리의 닭에서는 혈액을 수거하여 Peripheral Blood Mononuclear Cell을 분리함. 분리된 시료는 Cytotoxic T lymphocyte assay와 Lymphocyte proliferation assay를 이용하여 백신 후 innate 자극 정도를 측정하였음.
- 이후 최근 2015년 유행 고병원성 조류인플루엔자를 백신 3주후에 비강으로 접종하여 매일 임상증상을 관찰하고, 2,3,5,7,9일에 구강인두와 총배설강 점액을 채취함
- 취득한 점액은 PBS에 희석하여 Viral RNA를 추출하고(MP96 Viral exprep) 상대 정량을 위해 Matrix 유전자를 이용하여(Erica spackman) Real-time RT-PCR(ABI7500)을 실시함. 도출된 Cycle threshold 값은 감염역가로 환산하기위해 Egg infectious dose 50로 환산하였으며, 이는 점액 채취 샘플을 무작위로 취득하여 계란에서 감염역가를 측정한 값의 추세선으로 설정함.

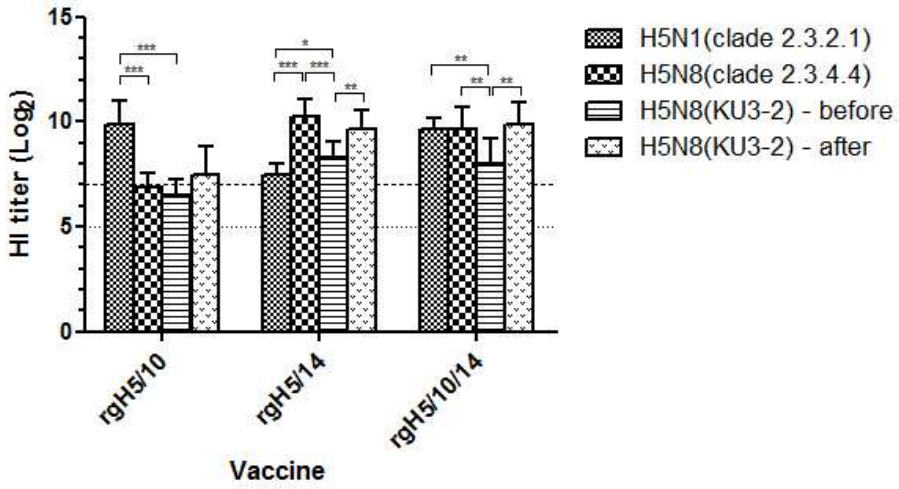


그림 3-84 백신 접종 3주후 HI 결과

- 백신 접종 3주후 측정 HI 결과는 위의 그림과 같음. 백신과 동일 항원으로 HI를 실시했을 때는 2^9~2^10 HIU의 높은 항체 역가를 관찰할 수 있었음. 그러나 2.3.2.1로 제작한 백신의 경우 H5N8 제작 동일 항원 및 challenge 바이러스에 대해 비교적 낮은 2^7 HIU 이하의 평균 항체 역가를 보였음 이는 OIE에서 권장하는 고병원성 인플루엔자 바이러스의 shedding을 막는 기준(2^7 HIU)에 비해 떨어지는 것임.
- 이에 비해 2014년 발생 H5N8바이러스로 제작한 백신주는 동일 한원 뿐만아니라 최근 2015년 유행 항원에 대해서도 평균 2^8 HIU 이상의 교차 HI 결과를 나타냄.
- 바이러스 접종 2주후 생존 개체의 HI 역가는 감염전 역가에 비해 상승한 것으로 보아 감염이 성공적으로 이루어짐을 증명함.

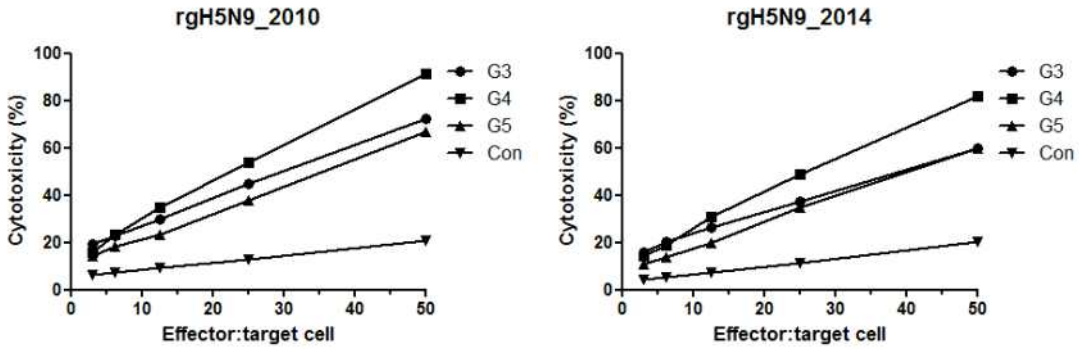


그림 3-85 Cytotoxic T lymphocyte assay 결과

- 위의 그림은 Cytotoxic T lymphocyte assay 결과를 나타냄.
- 10일령 계태아에서 primary chicken embryo fibroblast를 제작하고, rgH5N8을 감염시킴. 준비 된 CEF에 백신 개체에서 분리한 PBMC를 co-culture하여 림프구의 CEF 탐식능을 측정함.
- rgH5N9-2010 및 rgH5N9-2014를 감염시킨 CEF에서 모든 백신 군이 높은 Cytotoxicity를 보였음. 특히 rgH5N9-2014 단독백신을 한 개체에서 좀더 높은 탐식능이 관찰됨.

- 대조군에 비해서는 백신 그룹에서 유의적인 차이로 높은 탐식능이 관찰되었으나, rgH5N9-2014 백신이 다른 백신에 비해 유의적인 차이를 보이지 않음.

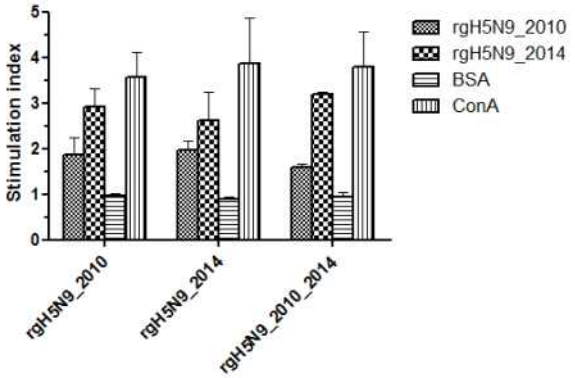


그림 3-86 Lymphocyte Proliferation Assay

- 위 그림은 Lymphocyte Proliferation Assay 결과임. 세가지 백신 개체의 PBMC에 rgH5N9-2010, rgH5N9-2014, BSA, ConA를 자극 시켰을 때 림프구의 증식을 관찰하였음.
- 음성 대조 자극(BSA)에 비해 rgH5N9-2010, rgH5N9-2014 자극시 높은 stimulation index를 보였음.
- 위의 CTL, LPA 결과로 미루어보아 백신이 innate immune response를 충분히 자극 하는 것으로 사료됨.

d.p.i.	rgH5N9/10		rgH5N9/14		rgH5N9/10/14		Mock vaccinated	
	No. of positive/total	Virus yield (logEID50/ml*)	No. of positive/total	Virus yield (logEID50/ml)	No. of positive/total	Virus yield (logEID50/ml)	No. of positive/total	Virus yield (logEID50/ml)
2	3/9	2.1	0/9	-	1/9	2.6	7/9	2.5
3	3/9	2.5	0/9	-	0/9	-	9/9	2.9
5	3/9	1.7	1/9	1.9	0/9	-	9/9	4.4
7	0/9	-	0/9	-	0/9	-	6/6	4.1
9	0/9	-	0/9	-	0/9	-	1/1	1.8

표 3-46 구강 인두 바이러스 배출 양상

d.p.i.	rgH5N9/10		rgH5N9/14		rgH5N9/10/14		Mock vaccinated	
	No. of positive/total	Virus yield (logEID50/ml*)	No. of positive/total	Virus yield (logEID50/ml)	No. of positive/total	Virus yield (logEID50/ml)	No. of positive/total	Virus yield (logEID50/ml)
2	0/9	-	0/9	-	0/9	-	5/9	2.3
3	0/9	-	0/9	-	0/9	-	9/9	2.0
5	1/9	2.5	2/9	1.8	0/9	-	9/9	3.9
7	0/9	-	0/9	-	0/9	-	6/6	3.7
9	0/9	-	0/9	-	0/9	-	0/1	-

표 3-47 총배설강 바이러스 배출 양상

- 바이러스 배출 분석은 위의 표와 같음. 역유전학 백신 3종은 미약한 구강인두 및 총배설강 배출을 보였음. 대조군은 9마리 중 8마리가 폐사(생존률 11%)하였고 접종 5일째에 높은 바이러스 배출양을 보였음.

- 본 시험으로 미루어보아 최근 유행 2015년 바이러스에 대해 실험실 제작 rgH5N9-2010, rgH5N9-2014 백신이 대조군에 비해 유의적으로 바이러스 배출을 막을 수 있었으나, rgH5N9-2010 백신은 2015년 H5N8에 대해 초기 감염 구강인두 바이러스 배출이 있는 것으로 나타남. 따라서 동남아 유행 clade 2.3.2.1과 중국 유래 clade 2.3.4.4를 동시에 방어하기 위한 전략으로 rgH5N9-2010, rgH5N9-2014 혼합백신(G3)가 가장 국내 상비 백신으로 가장 적합한 것으로 예상됨.

2. 오리용 고병원성 조류인플루엔자 백신/감염개체 혈청학적 감별(DIVA)키트의 임상시험

가. rgH5N9-2010, rgH5N9-2014 백신의 Neuraminidase subtype을 이용한 DIVA

- 2014-2015년 발생 H5N8에 대한 역유전학 유래 H5N9 백신개발시험의 시료를 이용하여 백신 개체와 감염 개체를 구별하기위해 백신 후 3주 혈청과 감염 2주후 혈청을 이용하여 N1-ELISA kit를 시험함.
- AIV N1 Blocking Ab ELISA를 제작하기 위해 Neuraminidase sutype 1에 대한 유전정보 및 발현 백터를 제공하고 Hybridoma selection을 위한 대조 및 시험 항체를 제공함.
- 제작된 시제품은 아래 사진과 같이 실험실로 인계되었으며, 시료를 이용하여 테스트함

그림 3-87 제작 시제품

Vaccine	1- S/N ratio (Avg ± SD) *	
	3 weeks after vaccination	2 weeks after infection
rgH5N9/2010	0.201 ± 0.14	0.641 ± 0.15
rgH5N9/2014	0.147 ± 0.10	0.786 ± 0.05
rgH5N9/2010/2014	0.221 ± 0.22	0.816 ± 0.14

표 3-48 백신 후 및 감염 후 혈청에 대한 시제품 테스트 결과

- 위의 표는 세가지 백신에 대해 백신 후와 백신개체에 감염 후 혈청에 대한 시제품 테스트 결과임. 전 후 수치에 유의적인 차이가 있었으며 백신 개체와 감염개체를 구분하기에 충분할 것으로 기대됨. 추가적으로 대량 샘플에 대한 테스트가 향후 있어야 할 것임.

3. 오리에 대한 피내접종을 위한 멀티채널 주사기 제작
- 5개의 바늘을 가지는 마이크로니들패치/멀티채널 주사기 제작 완료

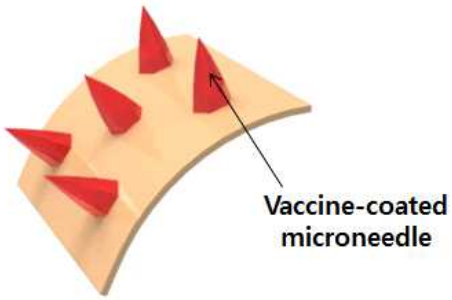


그림 3-88 유연한 기판을 이용한 피부에
부착 마이크로니들 패치 모식도

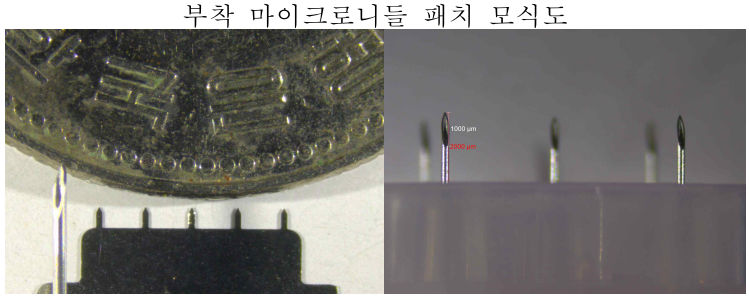


그림 3-89 마이크로니들 패치(좌)와 멀티채널주사기(우)

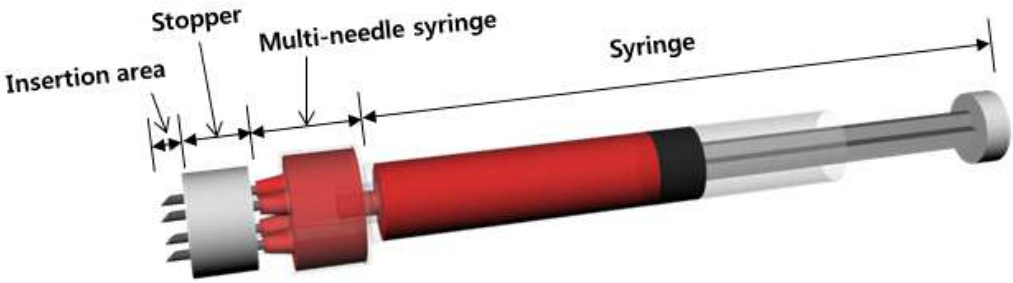


그림 3-90 오리의 물갈퀴 내 진피로 피내접종을 위한 다중 주입 주사기 모식도.

- 멀티채널 주사기는 약 1mm~2mm 높이의 32G 주사바늘 5개를 저장소에 고정해 일반 주사기 기구와 호환되도록 제작하였으며, 마이크로니들 패치의 경우, 750um 높이의 스테인레스 스틸 재질로 제작

4. 멀티채널 주사기와 마이크로니들 패치 적용부위 선정을 위한 연구 진행
- 기존 조류의 접종 부위와, 육안으로 관찰한 결과를 바탕으로 목 뒤, 가슴, 꼬리, 물갈퀴

부위를 접종부위 후보군으로 선정

- 4군데 후보군의 피부조직을 주령별로(1주령, 2주령, 3주령) 채취하여 동결 절편을 관찰하여, 표피/진피 형성 정도를 확인함

그림 3-91 주령별(왼쪽부터 각 1, 2, 3주령) 오리 물갈퀴 부위 피부조직의 동결 절편 사진

- 용액을 도포하여 건조시켜 제작한 도포형 마이크로니들 패치와 멀티채널 주사기를 오리의 목/가슴/꼬리/물갈퀴에 각각 적용시도
- 물갈퀴부의 경우 피부조직이 멀티채널주사기의 주사바늘에 비하여 매우 얇아 멀티채널주사기를 적용하기에 부적절하다고 판단되어짐
- 목/가슴/꼬리 부위의 경우 깃털이 많이 분포하여 도포형 마이크로니들 패치를 적용하기 부적절하다고 판단되어짐

5. 형광물질을 탑재한 멀티채널 주사기와 마이크로니들을 이용한 접종 기구 평가

- Fluorescein sodium salt 수용액을 탑재한 멀티채널 주사기와 마이크토니들을 제작
- 실제 오리의 목/가슴/꼬리/물갈퀴 부위에 각각 접종

그림 3-92 형광물질을 탑재한 접종기구를 이용하여 각 부위에 접종하는 모습
(왼쪽부터 물갈퀴, 목, 꼬리)

- 접종 부위의 피부조직을 채취하여 냉동조직 절편을 제작 후 형광현미경으로 관찰함
- 형광현미경으로 관찰한 이미지에서 형광물질이 피부 조직 내에 골고루 분포되어 있음을 확인

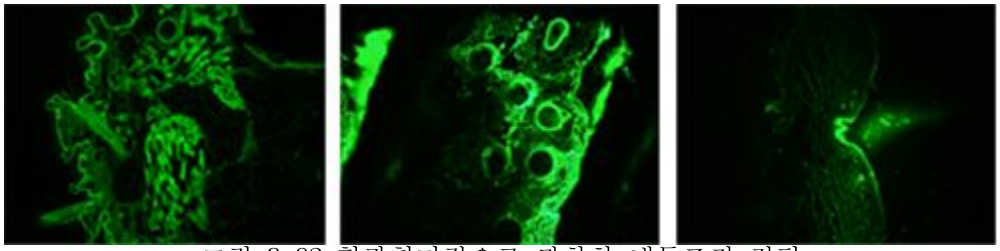


그림 3-92 형광현미경으로 관찰한 냉동조직 절편
(왼쪽부터 멀티채널주사기로 접종한 목/가슴 부위, 도포형 마이크로니들로 접종한 물갈퀴 부위)

- 실험 과정에서 꼬리부위의 경우 피부조직이 지나치게 얇아 피내접종 부위로 적합하지 않은 것으로 평가됨.

6. 백신을 탑재한 멀티채널 주사기와 마이크로니들을 이용한 접종 기구 평가

- 백신을 탑재한 멀티채널 주사기와 마이크로니들을 이용하여 서로 다른 부위에 접종하여 면역원성 평가. 멀티채널 주사기의 경우 접종부위로 물갈퀴 부위를 제외한 목/가슴 부위를 선정, 반면에 마이크로니들의 경우 목/가슴/물갈퀴 부위를 접종부위로 선정.
- 접종 후 4주 뒤 부스팅을 목적으로 2차 접종 실시.
- 멀티채널 주사기의 경우, 접종 시 탑재된 백신이 새어나오거나 중간에 손실되는 과정 없이 피내로 잘 접종됨. 반면에, 도포형 마이크로니들의 경우, 도포된 백신이 깃털에 의해 손실되는 현상이 발견됨.
- 실험 결과, 부위에 따라 다르지만, 피내접종이 근육접종 결과와 견줄 만하거나 더 나은 결과를 보여줌.

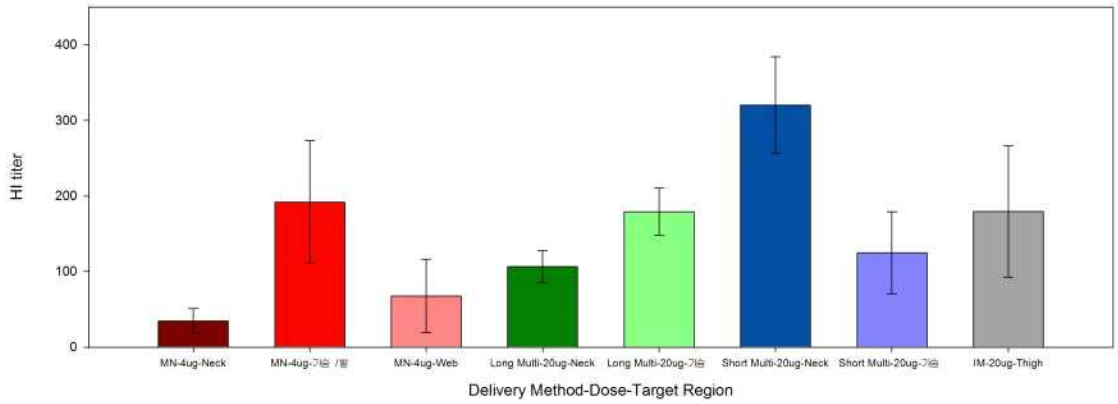


그림 3-93 백신을 탑재한 멀티채널 주사기와 마이크로니들을 이용한 접종 결과

4절. 연구개발성과

1. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

성과목표		사업화지표									연구기반지표							
		지식재3산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타 연구활용 등)
		출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문 SCI	논문 비SCI	학술발표			정책활용	홍보전시	
최종목표		3	2	6	3						6	1	9	4				
1차년도	목표	1									1		2					
	실적										1		4	1	1			
2차년도	목표	2									2		3	1				
	실적	2									2		4	1	2		1	
3차년도	목표		2	6	3						3	1	4	3		1	2	1
	실적	2		1							4		4	3			5	
소계	목표	3	2	6	3						6	1	9	4		1	2	1
	실적	4		1							7		12	5	3		6	
종료 1차년도			1	2													2	
종료 2차년도				2													2	
종료 3차년도				2														
종료 4차년도				2														
종료 5차년도				2														
소 계			1	10													4	
합 계		4	3	16	3						6	1	9	4		1	10	1

2. 논문게재 성과

연도	논문명	학술지명	주저자명	호	국내외	SCI여부(SCI/비SCI)
2014	Prevalence and characterization of Salmonella species in entire steps of a single integrated broiler supply chain in Korea	Poultry Science	S.W. Choi	93(5)	국외	SCI
2015	Microneedle vaccination elicits superior protection and antibody response over intranasal vaccination against swine-origin influenza A(H1N1) in mice	PLOS ONE	Juhyung Shin	10(6)	국외	SCI

2015	Immune response in domestic ducks following intradermal delivery of inactivated vaccine against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus adjuvanted with oligodeoxynucleotides containing CpG motif	Poultry science	Seong-Su Yuk	94(8)	국외	SCI
2016	Poultry vaccination directed evolution of H9N2 low pathogenicity avian influenza viruses in Korea	Virology	Dong-Hun Lee	488	국외	SCI
2016	Increased efficacy of inactivated vaccine candidates prepared with Salmonella enterica serovar Typhimurium strains of predominant genotypes in ducks	Poultry Science	S.Y. Youn	95(8)	국외	SCI
2016	Development of the novel coating formulations for skin vaccination using stainless steel microneedle	Drug Delivery and Translational Research	Seong-Jin Kim	6	국외	SCI
2016	Chimeric Bivalent Virus-Like Particle Vaccine for H5N1 HPAI and ND Confers Protection against a Lethal Challenge in Chickens and Allows a Strategy of Differentiating Infected from Vaccinated Animals (DIVA)	PLos One	Jin-Yong Noh	11(9)	국외	SCI

3. 특허성과

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
지식재산권 (발명특허)	고병원성 조류 인플루엔자(H5N1) 및 뉴캣슬병 바이러스 융합 바이러스 유사 입자 백신 및 이를 이용한 백신	대한민국	송창선	2015.09.	10-2015-0127241				
지식재산권 (발명특허)	여러 클레이드의 고병원성 조류인플루엔자 H5 바이러스에 대한 넓은 항체반응을 유도하는 키메릭 바이러스 유사입자 백신	대한민국	송창선	2015.09.	10-2015-0127242				
지식재산권 (발명특허)	여러 클레이드의 고병원성 조류인플루엔자 H5 바이러스에 대한 넓은 항체반응을 유도하는 키메릭 바이러스 유사입자 백신	중국	송창선	2016.09.	201610804163.4				

지식재산권(발명특허)	신규한 조류 인플루엔자 H5N9 재조합 바이러스 및 이를 포함하는 백신 조성물	대한민국	송창선	2016.06	10-2016-0075701				
지식재산권(발명특허)	신규한 조류 인플루엔자 H5N9 재조합 바이러스 및 이를 포함하는 백신 조성물	대한민국	송창선	2016.06	10-2016-0075701				

4. 생물자원

연도	생물자원명	기탁일	등록/기탁번호
2016	Influenza A virus (rgH5N9-2344)	2016-05-24	KCTC 13027BP
2016	Influenza A virus (rgH5N9-2321)	2016-05-24	KCTC 13026BP
2015	rBV HAM1F/HA	2015-06-12	KCTC 12844BP
2015	rBV Viet+483HA	2015-06-12	KCTC 12845BP

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

	D-06

1절. 목표달성도

구분(연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도(%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	[제1세부] 오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA) 백신 및 키트 개발	오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 항원 개발	100	- H5N1형 HPAI 역유전학(RG) 감별(DIVA)백신항원 개발 - H5N1형 HPAI 바이러스유사입자(VLP) 감별(DIVA)백신항원 개발 - 개발된 항원의 면역성 평가
		오리용 고병원성 조류인플루엔자 백신/감염개체 혈청학적 감별(DIVA)키트 개발	100	- 고병원성 조류인플루엔자 백신/감염개체 혈청학적 감별(DIVA)을 위한 진단용 항원개발
	[제2세부] 오리용 백신 어쥬번트 개발 및 백신전달방법 개선	불활화 바이러스 항원의 면역원성을 증가시킬 수 있는 오리용 백신 어쥬번트 개발	100	- 오리의 Toll-like receptor(TLR)를 자극하는 agonist 선별 - TLR agonist를 어쥬번트에 첨가하여 4종 이상의 신규 백신 어쥬번트 후보확보 - 안전성 및 효능평가
		불활화 세균 항원의 면역원성을 증가시킬 수 있는 오리용 백신 어쥬번트 개발	100	- 오리의 Toll-like receptor(TLR)를 자극하는 agonist 선별 - TLR agonist를 어쥬번트에 첨가하여 4종 이상의 신규 백신 어쥬번트 후보확보 - 안전성 및 효능평가
		개발된 항원 및 어쥬번트의 실험실내 제작 원가분석을 통한 산업화 전략수립	100	- HPAI H5N1 백신항원 제작원가 분석 - 신규 어쥬번트 제작원가 분석 - 살모넬라 백신항원 제작원가 분석
	[제1협동] 오리용 식중독 유발 살모넬라 백신 개발	오리 살모넬라 공격접종 모델 확립	100	- 개발된 백신의 효능평가 시험을 위한 오리에서의 살모넬라 공격접종 모델 확립
		오리용 식중독 유발 살모넬라 백신항원 개발	100	- *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) 균주들의 특성 분석 - 분석 결과를 바탕으로 한 백신주 선발 - 개발된 항원의 면역원성 평가

2차 년도 (2014)	[제1세부] 오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 및 키트 개발 / 오리용 식중독 유발 살모넬라 백신 개발	오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 개발 및 효능평가	100	- 1차 년도에 1세부과제에서 개발된 고병원성 조류인플루엔자 항원과 2세부에서 개발된 오리용 백신 어쥬번트를 이용한 백신의 개발 - 개발된 백신의 면역원성을 평가 - H5N1형 HPAI 공격접종을 통한 백신의 방어효능 평가 (방어율 80% 이상)
		오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신의 시제품 제작	100	- 본 연구개발 사업을 통하여 개발된 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 생산기술의 기술이전을 통한 참여기업에서의 백신 시제품 제작
		오리용 고병원성 조류인플루엔자 백신/감염개체 혈청학적 감별(DIVA)키트 개발	70	- 1차년도 개발 진단용 항원을 이용한 혈청학적 감별(DIVA)키트의 제작
		오리용 식중독 유발 살모넬라 백신개발 및 효능평가	100	- 1차 년도에 1협동 과제에서 개발된 살모넬라 항원과 2세부에서 개발된 오리용 백신 어쥬번트를 이용한 백신의 개발 - 개발된 백신의 면역원성 및 안전성 평가 (1일령, 4주령) - S. typhimurium 균주의 공격접종을 통하여 개발된 백신의 방어효능 평가 (방어율 80%이상)
		오리용 식중독 유발 살모넬라 백신의 시제품 제작	100	- 본 연구개발 사업을 통하여 개발된 오리용 식중독유발 살모넬라 백신 생산기술의 기술이전을 통한 참여기업에서의 백신 시제품 제작
	[제2세부] 오리용 백신 어쥬번트 개발 및 백신전달방법 개선	오리에서 백신의 면역원성을 증가시킬 수 있는 백신 전달 방법 개선	100	- 피내접종법, 난내 접종법 및 점안 접종법 등의 신규 접종경로 탐색 - 오리에서의 대량 피내접종법 적용이 가능한 백신접종장비 (device) 연구 진행 - HPAI 백신항원과 살모넬라 백신항원을 혼합한 합제백신의 제작 및 면역원성 평가
		개발된 항원 및 어쥬번트의 시제품 제작 원가분석	100	- HPAI 백신 시제품생산 원가분석 - 오리용 어쥬번트 시제품생산 원가

		을 통한 산업화 전략수립		분석 - 살모넬라 백신 시제품생산 원가분석
	[제1협동] 국내 오리농장유래 식중독유발 살모넬라 모니터링 및 특성분석	국내 오리농장유래 식중독유발 살모넬라 모니터링	100	- 국내 오리농장 모니터링을 통한 식중독유발 살모넬라의 지속적 확보
		국내 오리농장유래 식중독유발 살모넬라 특성분석	100	- Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)를 이용한 S. Typhimurium 균주들의 특성분석 - Microarray법을 이용한 S. Typhimurium 균주들의 병원성 유전자 검색조사

구분(연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도	연구개발 수행내용
3차년도(2015)	[제1세부] 오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 및 키트 개발 / 오리용 식중독 유발 살모넬라 백신 개발	오리용 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA)백신 시제품의 효능평가 및 산업화	100	- 해외 백신 회사에서 제작한 고병원성 조류인플루엔자 백신을 대상으로 면역원성, 방어능 테스트를 실시 - 참여기업에서 제작한 시제품의 면역원성, 방어능 및 DIVA 적용실험을 건국대학교에서 자체보유 BSL3 시설을 사용하여 실시
		오리용 고병원성 조류인플루엔자 백신/감염개체 혈청학적 감별(DIVA)키트의 임상시험	100	- 백신 및 감염개체의 혈청을 시료로 사용한 혈청학적 감별(DIVA) 키트의 평가
	[제2세부] 오리용 백신 어쥬번트 개발 및 백신전달방법 개선	개선된 오리용 백신 어쥬번트 및 전달방법의 효과기전 연구	80	- 오리에 대한 피내접종을 위한 멀티채널 주사기 제작 - 오리에 대한 피내접종을 위한 멀티채널 주사기 제작 - 멀티채널 주사기와 마이크로니들 패치 적용부위 선정을 위한 연구진행 - 백신을 탑재한 멀티채널 주사기와 마이크로니들을 이용한 접종 기구 평가
	[제1협동] 국내 오리농	오리용 식중독 유발 살모넬라 백신 시제품의 효능	80	- 참여기업에서 제작한 시제품의 면역원성 및 방어능을 건국대학교 및

	장유래 식중독유발 살모넬라 모니터링 및 특성분석	평가 및 산업화		농림축산검역본부에서 실시 - 시제품 평가결과를 바탕으로 농림축산검역본부에 국내 야외임상시험 계획서 제출 - 농림축산검역본부에서 요구하는 추가실험수행

2절. 관련분야 기여도

- 현재 국내에는 가금류에서의 HPAI 백신이 사용되고 있지 않지만 유사시를 대비한 긴급용 방역백신의 비축을 위한 백신의 개발이 필요하며 이를 통하여 꾸준한 수요가 있는 HPAI 상재국 으로의 수출이 가능할 것으로 예상됨.

- HPAI 백신 정책을 성공적으로 수행하기 위해서는 야외 감염 개체와 백신 감염 개체를 구분할 수 있는 DIVA 백신의 적용이 필수적이며, 본 과제에서 개발된 clade 2.3.2.1, 2.3.4.4. H5N9 백신은 최근 유행하고 있는 HPAI에 대한 높은 방어능을 보여줌과 동시에 야외주와의 NA 혈청형 차이로 인한 DIVA 방식을 채택함으로써 야외 감염 개체와 백신 감염 개체를 효과적으로 구분할 수 있을 것으로 생각됨.

- 본 과제를 통해 개발된 AIV N1 ELISA kit는 상기한 DIVA 전략의 성공적 수행을 위한 필수 요소로써 본 kit를 통해 야외 감염 개체와 백신 감염 개체를 혈청학적으로 쉽게 구분할 수 있을 것으로 기대됨.

- 오리의 경우 닭 등의 가금류와는 달리 백신접종을 실시하여도 이에 따른 항체형성이 잘 일어나지 않는 한계가 있었지만, 본 과제를 통해 개발된 신규 어쥬번트 및 고도면역 전달 방법을 활용하면 이러한 한계를 극복할 수 있을 것으로 생각됨.

- 오리에서 불활화 바이러스 및 세균 항원의 면역원성을 증가시킬 수 있는 신규 어쥬번트의 연구를 통한 학술적 자료 확보를 통해 향후 백신 산업에서의 광범위한 상업적 활용을 기대해 볼 수 있음.

- 오리는 전 세계적으로 증가하고 있는 세균성 식중독 발생의 가장 큰 원인체인 살모넬라의 오염율이 매우 높음. 또한, 국내에서 2012년부터 축종에 관계없이 성장촉진용 항생제를 사료에 첨가하는 것이 전면 금지됨에 따라 살모넬라를 비롯한 세균성 질병의 발생 증가가 예상되고 있으며, 식중독 유발 살모넬라 균을 선진국과 마찬가지로 가축전염병 수준으로 관리하고, 종계장·부화장 및 농장에 대해 방역의무를 부과하는 방안이 추진될 예정이므로, 본 과제에서 개발된 살모넬라 백신의 적용을 통해 오리에서의 살모넬라 감염율 감소 효과를 가져올 수 있을 것으로 기대됨.

- 개발 기술에 대한 SCI 논문 게재를 통한 관련 과학기술 분야의 발전에 기여함.

- 개발 기술의 특허 출원 및 제품화를 통하여 관련 산업 발전에 기여함.

- 본 과제를 통해 수행된 오리산업 관련 바이러스 및 세균성 인수공통전염병 방제 연구는 안전 오리 사육 시스템 구축을 통한 관련 산업의 경쟁력 강화 및 나아가 공중보건학적 가치에 기여할 것으로 생각됨.

제 5 장. 연구결과의 활용계획

	D-07

1절. 산업화 계획

1. 고병원성 조류인플루엔자 감별(DIVA) 백신 및 감별 키트

- 기존의 국내 백신은 양계용 백신으로서 오일 백신 첨가제를 이용하여 면역원성을 향상시켰다면 오리 맞춤형 백신 첨가제의 개발로 높은 면역원성과 동시에 안정적인 백신 반응, 적은 부작용, 백신 원가 절감효과를 기대 할 수 있음.
- 오리의 고병원성 인플루엔자 백신의 특징으로 새로운 변이주의 고병원성 인플루엔자가 감염 되었을 경우 백신주와 야외주의 감염을 감지 할 수 있는 DIVA 전략을 이용해 감염을 쉽게 알 수 있음.
- 역유전학으로 만들어진 백신은 계란에서 증식성이 탁월하여 높은 역가의 바이러스를 생산 할 수 있으며, 많은 량의 바이러스를 생산하기에 적절한 방법임.
- 개발된 시제품의 평가 결과를 바탕으로 농림축산검역본부에 수출품목 허가 접수를 하여 해외 시장 진출을 모색하고자 함.
- DIVA 키트의 경우 시제품의 제품화 및 메디안디노스틱(주) 내 대량생산 시설을 통하여 산업화를 완료할 계획임.
- 현재 고병원성 조류인플루엔자가 상재하고 있는 중국, 베트남, 캄보디아 등을 중심으로 해외 바이어를 발굴하여 국내 개발 백신의 해외 시장 점유율 향상을 도모하고자 함.
- 본 과제를 수행하는 건국대학교 수의과대학은 중국의 주요 백신 생산업체인 Sinder-bio, Yebio와 전략적 협약 관계인 중국청도대학과 MOU를 체결하였고, 중국의 백신 수출 know-how와 platform을 이용하는 전략을 공유 할 예정임
- HPAI 발생국인 동남아 시장 및 KOTRA 해외시장 서비스를 이용하여 중국을 포함한 동남아시아 등에 관심 바이어를 지속적으로 발굴하여 수출을 확대해나갈 계획임.

2. 식중독 유발 살모넬라 백신 시제품의 효능평가 및 산업화

- 개발된 백신의 국내 런칭을 위해 살모넬라 백신주의 국내 주요 동물용 백신 회사로의 기술이전을 추진함.
- 오리에서 살모넬라 백신으로 성장하고 있는 오리육 시장에 식품위생 개념의 백신을 도입하여 안전한 먹거리 제공에 기여 할 수 있음.

3. 오리용 마이크로니들 멀티채널 주사기 산업화

- 시제품의 제품화 및 자조금 협회를 통한 농가 및 업체 수요조사를 할 예정이며, 주사기 업체와의 협조를 통하여 산업화를 완료할 예정임.

2절. 특허 확보 계획

- 본 과제를 수행하면서 개발된 고병원성 조류인플루엔자 감별 백신과 관련하여 '신규한 조류 인플루엔자 H5N9 재조합 바이러스 및 이를 포함하는 백신 조성물'의 주제로 clade 2.3.2.1과 2.3.4.4 각각 1건씩의 특허를 출원한 상태이며 향후 PCT 국제 특허 출원 및 국내

특허 등록이 완료될 것으로 예상됨.

3절. 추가 연구 계획

- 현재 개발된 DIVA 백신 및 키트의 성능 향상을 위한 연구를 추가적으로 수행하여 계란에서 고역가를 생산해 낼 수 있는 바이러스 균주 및 ELISA kit의 민감도와 특이도를 증가시키고자 함.
- 공격접종 균주의 지속적인 업데이트를 통하여 수출용 DIVA 백신의 효능 검증을 실시하고자 하며 궁극적으로 multi-clade에 대한 방어가 가능한 DIVA 백신 기술 확립 연구를 수행하고자 함.
- 개선된 면역전달방식의 대량적용을 위해 필요한 멀티채널 주사기의 자동화를 위한 연구를 수행하고자 함.
- Salmonella typhimurium 외에 다른 인체감염 살모넬라 백신 균주 개발을 위한 연구를 수행하고자 함.
- CpG-ODN과 비슷하거나 우수한 효능을 보이면서 생산단가는 줄일 수 있는 신규 분자면역증강제를 탐색하기 위한 연구를 수행하고자 함, 추가로 CpG가 효과를 나타낼 수 있는 최소면역원성 시험을 진행하고자함.
- 추가로 유산균(사균)의 어주번트 효과에 대한 연구를 본 과제와 마찬가지로 진행하고자 하며, “가금용 유산균 첨가제 및 면역증강제 개발“ 과제에서 연계하여 진행하고 있음. 본 과제에서 시험한 분자면역증강제와 비교하여 시험을 진행 할 예정임.
- RG, VLP 플랫폼을 이용하여 2016년 신규 발생 H5N6에 대한 상비 백신을 제작함
- RG, VLP 플랫폼을 이용하여 국내 발생 canine influenza A virus에 대한 연구를 실시하고자함.
- 중국에서 최근 유행하는 clade는 2.3.4.4/2.3.2.1c/7.2 세가지가 유행하고있음으로 이 세가지를 한번에 발현하는 VLP를 개발하고자함
- 실용화 가능성이 높은 백신은 RG백신이나, 2~3가지 항원을 동시 발현하는 VLP를 개발할 경우 이도 실용화 가능성이 있을 것으로 예상됨. 따라서 개발은 두가지 플랫폼을 모두 이용하되 현 시점에서 기술이전 및 산업화는 RG에 집중함(최종보고서 116 쪽에 제시함)

제 6 장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08

1. Prime-boost vaccination with recombinant H5-fowlpox and Newcastle disease virus vectors affords lasting protection in SPF Muscovy ducks against highly pathogenic H5N1 influenza virus. Vaccine. 2013 Aug 28;31(38):4121-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.06.074. Epub 2013 Jul 8. Niqueux E, Guionie O, Amelot M, Jestin V.

야생 철새류는 Influenza A virus의 natural reservoir로 일반적으로 감염이 되어도 증상을 나타내지 않는다. 그러나 2002년에 발견된 High Pathogenic Avian Influenza H5N1은 오리에서도 이환율과 사망률이 높게 나타났다. 주된 전파 경로인 철새부터의 전파를 막기 위한 백신개발이 시급해졌으며, HPAI의 전파를 막고 virus의 근절을 위해서는 야외 분리주와 구분할 수 있는 백신(DIVA vaccine)이 필요한 실정이다. 본 논문에서는 Muscovy duck에서 재조합 Fowl pox를 이용해서 priming한 후, H5N1-Newcastle vector 을 이용해 HPAIV를 완전히 방어할 수 있다고 밝혔다. 이를 통해 Prime- boost 방법을 이용한 vaccination은 필수적인 DIVA strategy에 적합할 뿐 아니라 효과도 뛰어나다는 것을 증명했다.

<그림 6-1 Vaccination과 Challenge후의 H5 ELISA test와 NP ELISA test결과>

2. Reverse genetics based rgH5N2 vaccine provides protection against high dose challenge of H5N1 avian influenza virus in chicken. Microb Pathog. 2016 Aug;97:172-7. doi: 10.1016/ j.micpath.2016.06.011. Epub 2016 Jun 11. Bhatia S, Khandia R, Sood R, Bhat S, Siddiqui A, Jahagirdhar G, Mishra S, Mishra A, Pateriya AK, Kulkarni DD.

High Pathogenic Avian Influenza가 만연하게 되면 이를 막기 위한 방법은 많지 않다. 고려해볼 수 있는 방법 중 하나는 endemic strain에 대한 백신을 접종하는 방법이다. 본 연구에서는 Reverse genetics를 이용한 rgH5N2 백신을 만들었다. H5는 clade 2.2 에 속하며 multiple cleavage site를 변형시켰고, 야외주와 감별하기 위해 NA 부분은 Low Pathogenic Avian influenza H9N2에서 유래하였다. 이를 이용해 백신 접종 후 공격접종을 실시 한 결과

(A) Before challenge

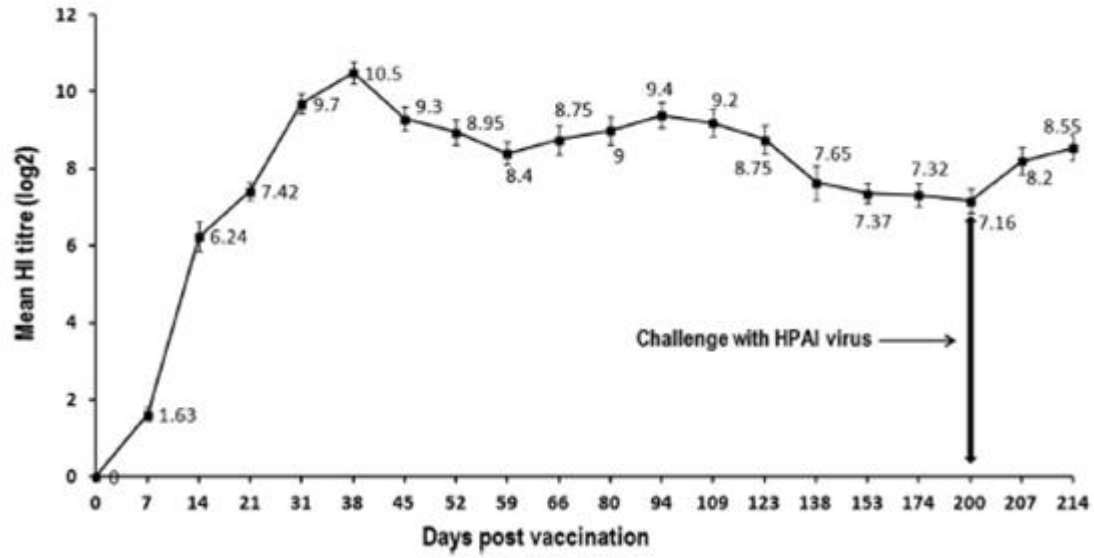
Group/Name	Experiment (day of challenge)	D15		D35		D40		D64		D85	
		H5	NP	H5	NP	H5	NP	H5	NP	H5	NP
1/Unvaccinated	Exp. 1 (D43)	0/5[a]	0/5	ND	ND	0/5	0/5	–	–	–	–
	Exp. 2 (D65)	ND	ND	0/4	0/5	ND	ND	0/5	0/5	–	–
	Exp .3(D86)	ND	ND	0/4	0/5	ND	ND	ND	ND	0/5	0/5
2/vNDV-H5	Exp. 1 (D43)	0/5	0/5	ND	ND	1/5	0/5	–	–	–	–
	Exp. 2 (D65)	ND	ND	0/8	0/8	ND	ND	0/8	0/8	–	–
	Exp .3(D86)	ND	ND	0/9	0/9	ND	ND	ND	ND	0/9	0/9
3/vFP89 + vNDV-H5	Exp. 1 (D43)	0/5	0/5	ND	ND	2/5	0/5	–	–	–	–
	Exp. 2 (D65)	0/7	0/8	0/8	0/8	ND	ND	1/8	0/8	–	–
	Exp .3(D86)	0/8	0/8	0/8	0/8	ND	ND	ND	ND	0/8	0/8
4/Re-5	Exp. 3 (D86)	ND	ND	0/8	8/8	ND	ND	2/8	3/8	3/8	2/8

(B) After challenge

Group/Name	Experiment 1 (challenged at D43) tested at D57		Experiment 2 (challenged at D65) tested at D78		Experiment 3 (challenged at D86) tested at D99	
	H5	NP	H5	NP	H5	NP
1/Unvaccinated	–	–	–	–	1/1	1/1
2/vNDV-H5	5/5	5/5	8/8	8/8	8/8	8/8
3/vFP89 + vNDV-H5	5/5	5/5	8/8	8/8	8/8	8/8
4/Re-5	ND	ND	ND	ND	8/8	8/8

[a] Number of positive sera/number of tested sera (interpretation of OD results was done according to the manufacturer's instructions).

높은 역가의 공격접종에도 방어능을 보이는 것을 확인했고 200일 이상 동안 높은 수준의 항체수치를 유지하였다. 또한 ELISA를 통해 야외주와도 감별이 가능했다.



<그림 6-2 rgH5N2 vaccine 의 HI titer 지속능 결과>

3. Efficacy of a high-yield attenuated vaccine strain wholly derived from avian influenza viruses by use of reverse genetics. Vet Microbiol. 2012 Dec 28;161(1-2):43-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.07.005. Epub 2012 Jul 10. Liu M, Liu CG, Zhang Y, Shi WL, Wang W, Liu YY.

백신을 개발하고 생산하는 데 있어서 중요한 점 중 하나는 백신의 역가를 높이는 일이다. 이러한 노력에는 여러 가지 방법이 있는데 그 중 하나로 각광받고 있는 것은 Reverse genetics system (RG)이다. 본 연구에서는 기존과는 다른 backbone을 이용한 RG system를 이용해 새로운 바이러스를 만들었다. 이를 통해 고역가의 백신을 만들어 낼 수 있었고, 동종

바이러스의 공격접종에 대해서 뛰어난 방어능을 가진 것을 확인했다. 또한 야외주와 구분할 수 있는 DIVA 백신으로서 역할도 기대해볼 수 있다.

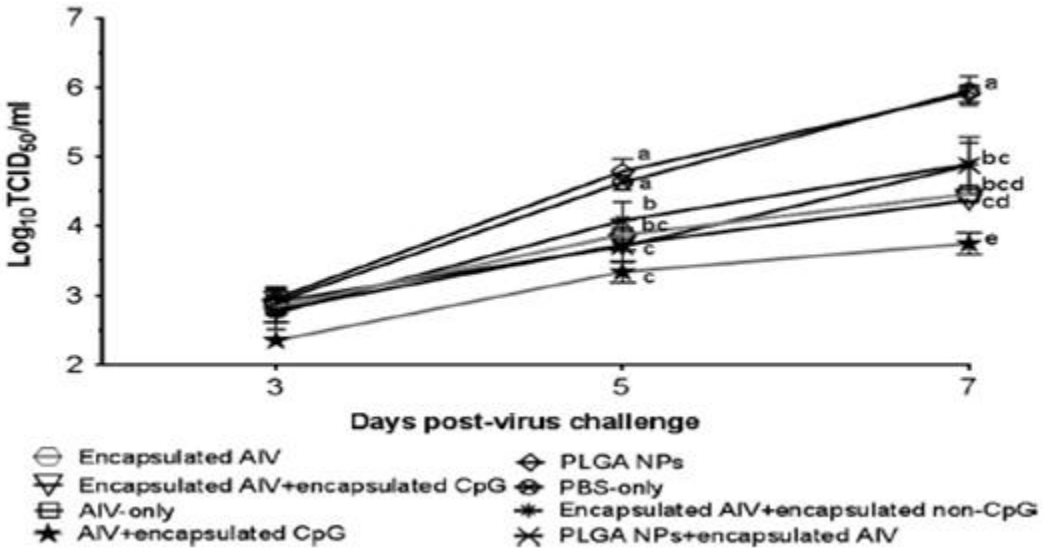
Group	Virus strain	Pre-challenge HI titer (GMT)	Sick/Dead/Total	Virus isolation/Total	Post-challenge HI titer (GMT)
Vaccine	Gs/GD/1/96	1:188	2/2/10	2/10	1:561
Control	Gs/GD/1/96	<1:10	10/10/10	10/10	-
Vaccine	Gs/Anhui/08	1:512	0/0/10	0/10	1:695
Control	Gs/Anhui/08	<1:10	10/10/10	10/10	-

GMT, geometric mean titer.

<그림 6-3 rH5N3로 vaccination한 닭의 공격접종 결과>

4. Delivery of an inactivated avian influenza virus vaccine adjuvanted with poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) encapsulated CpG ODN induces protective immune responses in chickens. Vaccine. 2016 Sep 14;34(40):4807-13. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.08.009. Epub 2016 Aug 16. Singh SM, Alkie TN, Nagy É, Kulkarni RR, Hodgins DC, Sharif S.

가금산업에서 Avian influenza virus 백신을 비롯한 불활화 백신은 충분한 면역반응을 만들어 내기 위해 adjuvant를 함께 사용한다. 이러한 백신의 한계점은 바이러스의 shedding을 막기 위한 점막면역반응을 충분히 나타내지 못한다는 점이다. 그러므로 가금의 Anti-AIV 면역반응을 향상시킬 수 있는 adjuvant의 개발이 필요하다. 본 연구에서는 기존의 adjuvant중 효과적이라고 알려진 CpG-ODN과 최근 활발히 연구중인 PLGA nanoparticle을 이용해 Low Pathogenic Avian influenza H9N2 vaccine의 vaccine adjuvant로서의 가능성을 평가했다. 결론적으로 PLGA encapsulated CpG-ODN을 이용 했을때 점막면역 ,바이러스 shedding, 전신면역 등의 지표에서 대조에 비해 돋보이는 효과를 보였다.

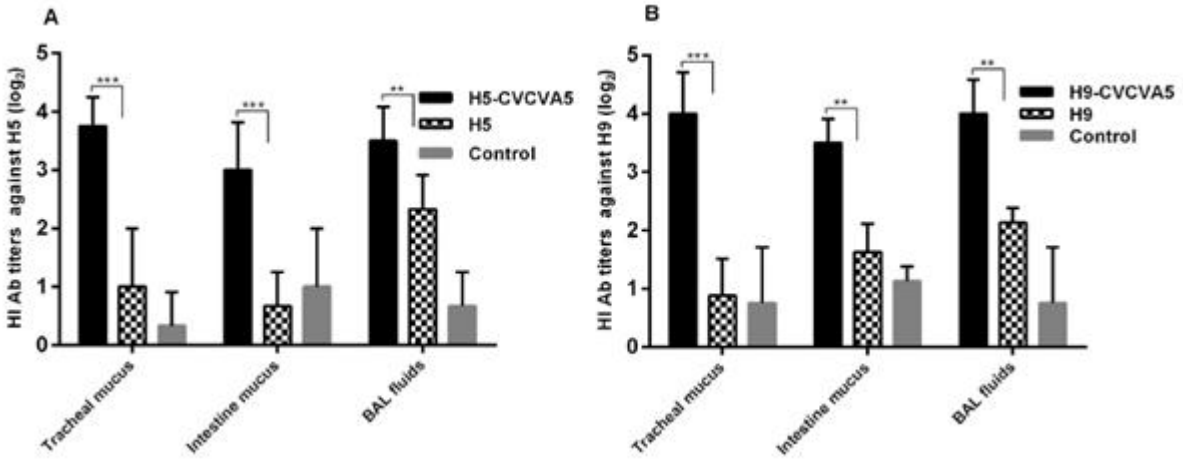


<그림 6-4 H9N2 공격접종 후 그룹별 virus shedding 양 측정 결과>

5. Immunopotentiators Improve the Efficacy of Oil-Emulsion-Inactivated Avian Influenza

Vaccine in Chickens, Ducks and Geese. PLoS One. 2016 May 27;11(5):e0156573. doi: 10.1371/ journal.pone.0156573. eCollection 2016. Lu J, Wu P, Zhang X, Feng L, Dong B, Chu X, Liu X, Peng D, Liu Y, Ma H, Hou J, Tang Y.

백신의 adjuvant로 이용될 수 있는 물질들은 많이 있지만 모두 같은 기전으로 작용을 하는 것은 아니다. 최근 효과가 입증되고 있는 adjuvant 물질 중 하나는 Immunopotentiator 이다. 본 연구에서는 CVCVA5라는 물질을 이용했는데 polyriboinosinic polyribocytidylic, resiquimod, imiquimod, muramyl dipeptide 그리고 levomisole로 구성된 복합물이다. 이 복합물질을 이용해 Avian Influenza 백신의 adjuvant로서 효능 평가를 진행했다. 3종의 가금류와 오리 그리고 거위에서 높은 수치의 점막항체수치와 높은 항체 지속능을 확인하였다. 뿐만 아니라 세포성 면역능력도 대조군에 비해 현저하게 증가하였다.

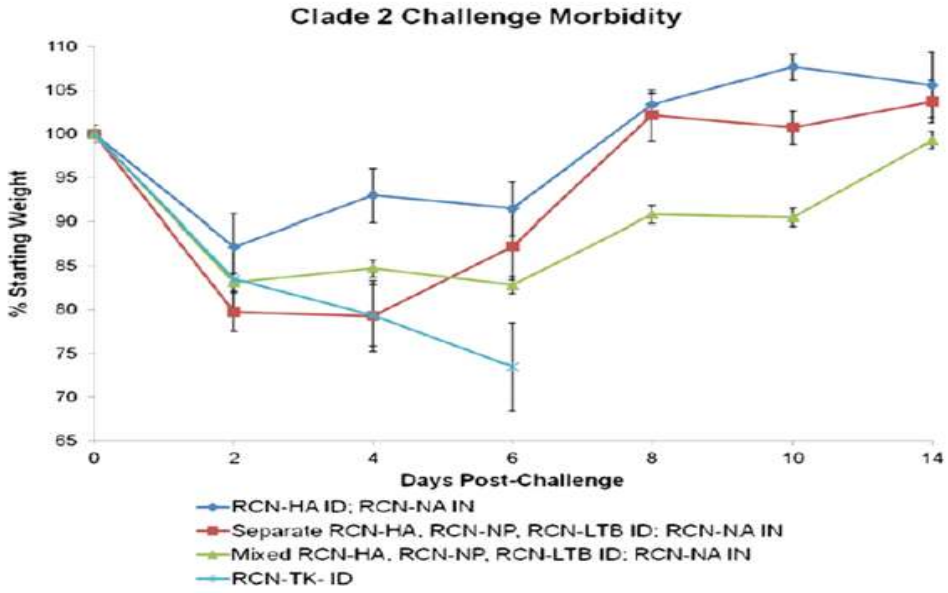


<그림 6-5 3wpv에 H5, H9 항원에 대한 점막항체 정량 결과>

6. Effects of route and coadministration of recombinant raccoon poxviruses on immune responses and protection against highly pathogenic avian influenza in mice. Vaccine. 2012 Oct 5;30(45):6402-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.08.018. Epub 2012 Aug 22. Kingstad-Bakke B, Brewoo JN, Mai le Q, Kawaoka Y, Osorio JE.

High Pathogenic Avian Influenza (HPAI) H5N1은 가금산업에 치병적일 뿐만 아니라 공중보건학적으로도 중요한 질병으로 인식되어 왔다. HPAI를 막기 위한 다양한 백신들이 개발되고 있는데 이와 더불어 투여 경로도 중요하다는 연구결과들이 발표 되고 있다. 본 연구에서는 H5N1재조합 raccoon poxvirus를 mouse에 피하, 비강, 피내 경로를 통한 백신 후 공격접종에 대한 방어능을 평가하였는데, 다른 투여 경로에 비해 피내(intradermal) 접종경로가 높은 방어능을 보이는 것을 확인하였다.

<그림 6-6 마우스에 H5N1 재조합 vaccine 투여 후 공격접종 결과>



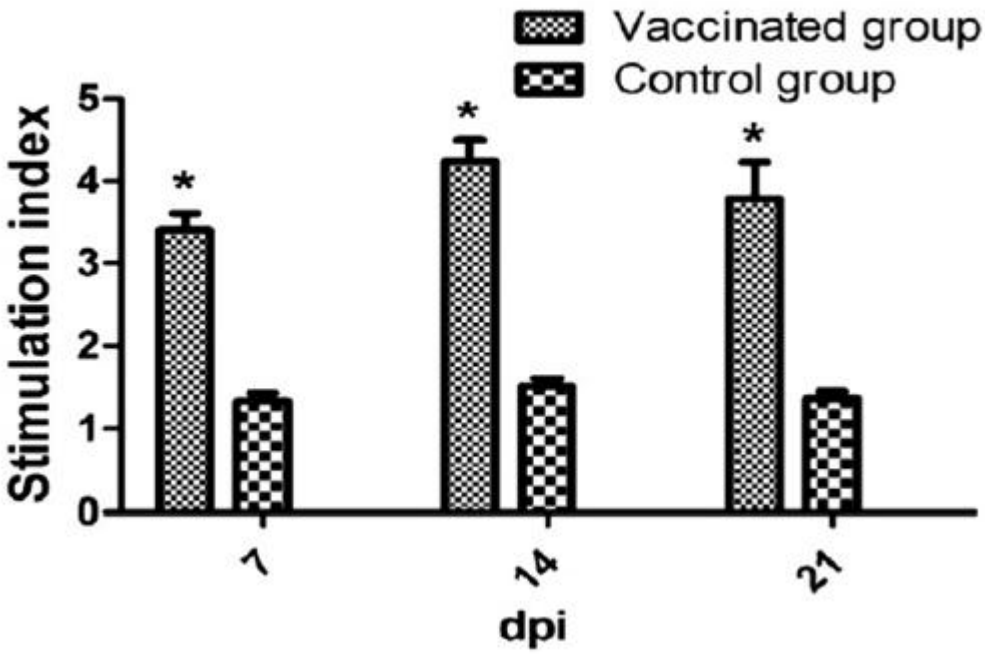
7. Safety and protective efficacy of a spiC and crp deletion mutant of Salmonella gallinarum as a live attenuated vaccine for fowl typhoid. Res Vet Sci. 2016 Aug;107:50-4. doi: 10.1016/j.rvsc.2016.05.007. Epub 2016 May 25. Cheng Z, Yin J, Kang X, Geng S, Hu M, Pan Z, Jiao X.

Fowl typhoid는 *Salmonella* gallinarum 에 의해 일어나는 질병으로 가금류에게 치명적인 임상증상을 나타내는 질병으로 가금산업에 큰 손실을 일으키는 질병이다. 현재 이용되고 있는 백신은 사균 백신과 약독화 백신이 있는데, 사균백신의 문제점은 면역원성이 충분하지 않은 단점이 있고, 약독화 백신은 지난 60여년동안 사용해 왔지만 안전성과 효능성에서 문제가 제기되고 있다. 본 연구에서는 deletion mutation을 이용한 약독화 백신을 개발하였다. 병원성을 일으키는데 중요한 유전자인 spiC, crp 부분을 제거하여 백신한 결과 높은 수준의 체액성, 세포성 면역반응이 증가되는 것이 확인되었고, *S.*gallinarum 공격접종에도 대조군에 비해 높은수준의 방어능을 보였다.

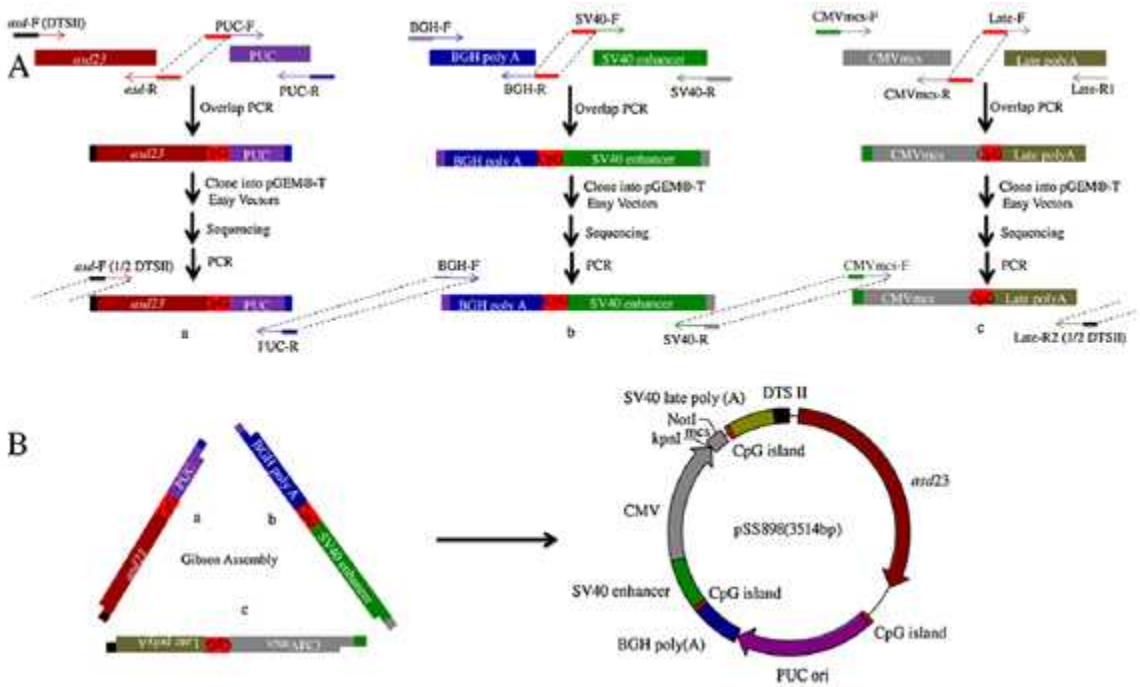
<그림 6-7 닭의 말초혈액 림프구의 Stimulation Index (SI)>

8. Attenuated Salmonella Typhimurium delivery of a novel DNA vaccine induces immune responses and provides protection against duck enteritis virus. Vet Microbiol. 2016 Apr 15;186:189-98. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.03.001. Epub 2016 Mar 5. Liu X, Liu Q, Xiao K, Li P, Liu Q, Zhao X, Kong Q.

DNA vaccine은 전염성 질병을 대처하는데 있어서 널리 쓰이고 있는 백신 중 하나이다. 그러나 다른 백신들에 비해 상대적으로 낮은 면역원성을 가지고 있다는 점이 사용하는데 단점으로 지적되고 있다. 본 논문에서는 오리 장염바이러스 (DEV) 와 다른 바이러스성 질병에



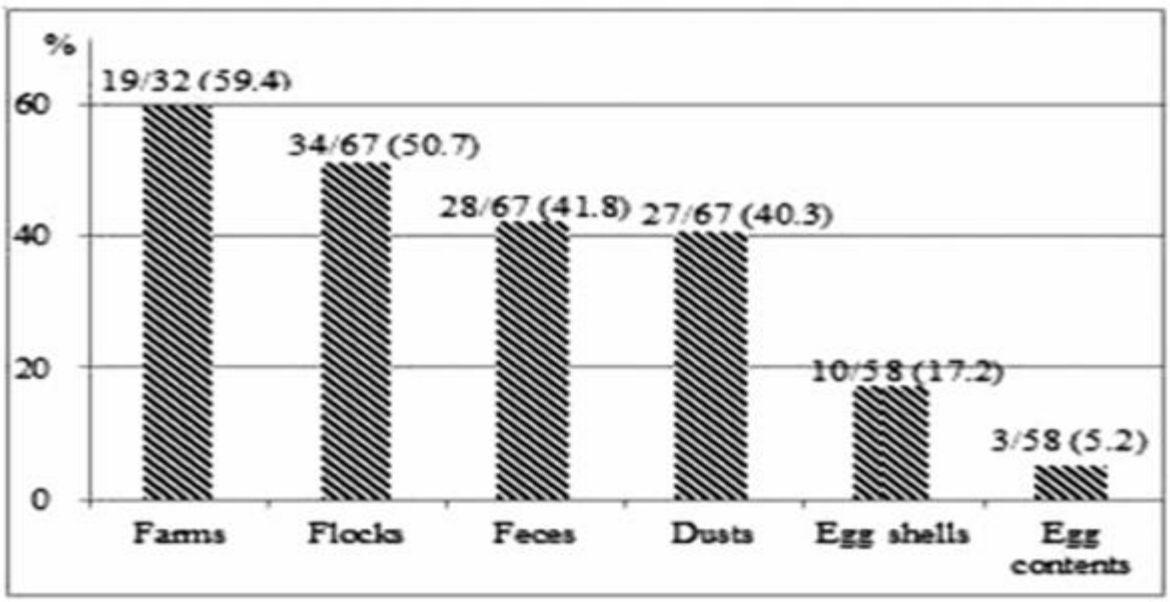
대해 방어능을 가지고 있는 universal DNA 백신 벡터를 개발했다. 이 백신 벡터는 선천면역 원성, 효과적인 nuclear trafficking등 다양한 장점을 가지고 있는데, 실제 어린 일령의 오리에 경구로 백신을 한 후 치사량의 DEV를 공격접종 한 결과 뛰어난 저항성과 강한 면역반응을 확인하였다.



<그림 6-8 DNA vector vaccine 제조 원리>

9. Prevalence and characteristics of Salmonella spp. isolated from commercial layer farms in Korea. Poult Sci. 2015 Jul;94(7):1691-8. doi: 10.3382/ps/pev137. Epub 2015 May 25. Im MC, Jeong SJ, Kwon YK, Jeong OM, Kang MS, Lee YJ.

Salmonellosis는 가장 흔한 식중독의 원인 중 하나로서 특히 계란을 통해서 자주 발생하곤 한다. 본 연구에서는 한국의 산란계 농장에서 *Salmonella*의 특징과 전파 양상에 대해 조사하였다. 또한 이러한 농장에 salmonella 가 퍼지게 된 취약점에 대해서도 다루고 있다. 32개의 농장과 67개의 계군을 조사하였는데, 19개의 농장(59.3%)과 34개의 계군(50.7%)이 *Salmonella* 에 오염되있는 것으로 확인되었다. 그리고 환경 Sampling을 했을 때 분변(41.8%), 먼지(40.3%), 난각(17.2%), 심지어 난중(5.2%)에도 발견되었다. 발견된 *Salnonella*의 혈청형은 *Salmonella* Bareilly (41.2%),*Salmonella* Mbandaka (32.4%), 그리고 *Salmonella* Rissen(17.6%)인 것으로 확인되었다. 항생제 저항성 실험 결과는 101개의 분리주중 93개는 저항성이 없는 것으로 확인되었고, 남은 분리주는 ampicillin (4.0%), nalidixic acid (3.0%), tetracyclin (1.0%), cephalothin (1.0%),그리고 gentamicin (1.0%)에 대해 저항성을 보였다.



<그림 6-9 산란계 농장과 계군에서의 *Salmonella* Prevalence>

10. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Salmonella isolates in Pekin ducks from South Korea. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2013 Sep;36(5):473-9. doi: 10.1016/j.cimid.2013.03.004. Epub 2013 Apr 22. Cha SY, Kang M, Yoon RH, Park CK, Moon OK, Jang HK.

지난2011년부터 2012년까지 한국의 오리 농장에서 sampling 한 후 항생제 저항성 검사를 실시했다. 총 72개의 농장에서 7119개의 sample을 채취하였다. *Salmonella* 의 분포 양상은 65.2%의 농장으로부터 43.4%(69/159)의 오리군에서 나타났다. 69개의 오리군에서 84개의 strain이 발견되었는데 그 중 공중보건학적으로 중요한 serotype인 *S.*Typhimurium(39/85), *S.*Enteritidis(44/85)등임을 확인했다. 한 분리주만을 제외하고 모든 분리주는 한가지 이상의 항생제에서 저항성을 나타냈고 그 중 27%가 5~16개의 항생제에 저항성을 보이고 있었다.

O antigen	Serotype	Number of isolates (%)
B	S. Typhimurium	39(45.8)
D1	S. Enteritidis	44(51.8)
E1	S. London	2(2.4)
Total		85(100)

<그림 6-10 한국의 오리 농장에서 분리된 Salmonella 혈청형 분석 결과>

제 7 장. 연구개발결과의 보안등급

	D-09
- 공개	

8 장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

							D-10	
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9 장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	D-11

○ 모든 병원체는 건국대학교 생물안전위원회의 ‘실험실 생물 안전관리 지침’에 따라 Biosafety cabinet 안에서 안전하게 실험을 진행함.

○ 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 경우 신규 분리한 바이러스는 농림축산검역본부에 분리 신고를 하였으며, 산업통상자원부에 ‘생물작용제 등 제조변경신고서’를 제출한 후 BSL-3 실험실에서 건국대학교 SOP에 따라 Biosafety cabinet을 이용하여 안전하게 실험을 수행함.

○ 모든 연구수행자는 건국대학교에서 진행하는 동물윤리교육 및 생물안전교육 이수 후 실험을 진행함.

○ 본 실험실은 LMO 관리 실험실로 등록이 되어 있으며 건국대학교 생물안전위원회에서 제공하는 ‘생물 및 유전자변형생물체 연구시설 설치·운영·관리 점검표’를 기준으로 매일 점검을 실시함.

○ 연구수행 중 발생한 모든 감염성 폐기물은 건국대학교 생물안전위원회에서 제공하는 ‘감염성 폐기물 지침서’에 따라 감염성 폐기물 전문 처리 업체인 ㈜부국크린에 양도하여 안전하게 처리함.

○ 이외 모든 사항은 「연구실 안전ㄴ환경 조성에 관한 법률」에 따른 연구실 안전조치를 성실히 이행하였으며, 「건국대학교 생물안전위원회 표준작업지침서」에 따라 모든 연구를 수행함.

제 10 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

D-12

번호	구분(논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/특허등록국가	Impact Factor	논문게재일/특허등록일	사사여부(단독사사 또는 중복사사)	특기사항(SCI여부/인용횟수 등)
1	논문	Prevalence and characterization of Salmonella species in entire steps of a single integrated broiler supply chain in Korea	건국대학교	제1저자	Poulry Science	1.544	2014.05.01	단독사사	SCI
2	논문	Immune response in domestic ducks following intradermal delivery of inactivated vaccine against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus adjuvanted with oligodeoxynucleotides containing CpG motifs	건국대학교	제1저자	Poultry Science	1.672	2015.06.11	단독사사	SCI
3	논문	Microneedle Vaccination Elicits Superior Protection and Antibody Response over Intranasal Vaccination against Swine-Origin Influenza A (H1N1) in Mice	한국과학기술원	제1저자	PLos One	3.234	2015.06.18	중복사사	SCIE

4	논문	Chimeric Bivalent Virus-Like Particle Vaccine for H5N1 HPAI and ND Confers Protection against a Lethal Challenge in Chickens and Allows a Strategy of Differentiating Infected from Vaccinated Animals (DIVA)	건국대학교	제1저자	PLos One	3.234	2016.09.14	단독사사	SCIE
5	논문	Development of the novel coating formulations for skin vaccination using stainless steel microneedle	한국과학기술원	제1저자	Drug Delivery and Translational Research	1.887	2016.10	중복사사	SCIE

제 11 장. 기타사항

		D-13
- 없음		

12. 참고문헌

	D-14

1. Influenza other respi viruses, 2009
2. Fourth Report on the Global Programme for the Prevention and Control of HPAI
3. Eggert D, Swayne DE. Single vaccination provides limited protection to ducks and geese against H5N1 high pathogenicity avian influenza virus.Avian Dis. 2010 Dec;54(4):1224-9.
4. CDC, MMWR, 2009
5. Swayne et al., Avian influenza
6. Chen S, Cheng A, Wang M.Innate sensing of viruses by pattern recognition receptors in birds.Vet Res. 2013 Sep 9;44:82. doi: 10.1186/1297-9716-44-82. Review.
7. Zhang W, Yin Z, Liu N, Yang T, Wang J, Bu Z, Wu D. DNA-chitosan nanoparticles improve DNA vaccine-elicited immunity against Newcastle disease virus through shuttling chicken interleukin-2 gene. J Microencapsul. 2010;27(8):693-702. doi: 10.3109/02652048.2010.507881.
8. Magor KE Immunoglobulin genetics and antibody responses to influenza in ducks.Dev Comp Immunol. 2011 Sep;35(9):1008-16. doi: 10.1016/j.dci.2011.02.011. Epub 2011 Mar .4. Review.
9. Cagle C, Wasilenko J, Adams SC, Cardona CJ, To TL, Nguyen T, Spackman E, Suarez DL, Smith D, Shepherd E, Roth J, Pantin-Jackwood MJ. Differences in pathogenicity, response to vaccination, and innate immune responses in different types of ducks infected with a virulent H5N1 highly pathogenic avian influenza virus from Vietnam.Avian Dis. 2012 Sep;56(3):479-87.
10. Pantin-Jackwood MJ, Suarez DL. Vaccination of domestic ducks against H5N1 HPAI: a review. Virus Res. 2013 Dec 5;178(1):21-34. doi: 10.1016/j.virusres.2013.07.012. Epub 2013 Aug 3. Review.
11. Spackman E, Swayne DE. Vaccination of gallinaceous poultry for H5N1 highly pathogenic avian influenza: current questions and new technology.Virus Res. 2013 Dec 5;178(1):121-32. doi: 10.1016/j.virusres.2013.03.004. Epub 2013 Mar 21. Review.
12. Mallick AI, Kulkarni RR, St Paul M, Parvizi P, Nagy E, Behboudi S, Sharif S. Vaccination with CpG-adjuvanted avian influenza virosomes promotes antiviral immune responses and reduces virus shedding in chickens. Viral Immunol. 2012 Jun;25(3):226-31. doi: 10.1089/vim.2011.0085. Epub 2012 Apr 18.
13. Taghavi A, Allan B, Mutwiri G, Foldvari M, Van Kessel A, Willson P, Babiuk L, Potter A, Gomis S. Enhancement of immunoprotective effect of CpG-ODN by formulation with polyphosphazenes against E. coli septicemia in neonatal chickens. Curr Drug Deliv. 2009 Jan;6(1):76-82.
14. Kang SM, Song JM, Quan FS, Compans RW. Influenza vaccines based on virus-like particles. Virus Res. 2009 Aug;143(2):140-6. doi: 10.1016/j.virusres.2009.04.005. Epub 2009 Apr 15. Review.