

3

cm

11-1543
000-001
481-01

4cm

발간등록번호

11-1543000-001481-01

(건고덕31p)

5cm

국내분리 H5N1형 HPAI의 주요
야생조류 종별 병원성 및
병리기전 연구
최종보고서

(0.1cm)

2016. 8. 25.

0.15cm

(건고덕15p)

(별색바탕 : C50, M20, Y59, K0)

주관연구기관 / 서울대학교
협동연구기관 / 건국대학교
협동연구기관 / 농림축산검역본부
위탁연구기관 / 건국대학교 2cm
(건고덕 15.5p)

국내분리
H5N1형
HPAI의 주요
야생조류 종별
병원성 및
병리기전 연구

최
종
보
고
서

(건고덕
14p)

2002
(건고덕13p)

가출질병기술개발사업 R&D Report

5cm

농림축산식품부

3

cm

(건고덕
17p)

(건 고 덕
25p)

(백색바탕)

농림축산식품부

(건고덕 20p)

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내분리 H5N1형 HPAI의 주요 야생조류 종별 병원성 및 병리기전 연구” (개발기간 : 2013. 8. 26 ~ 2016. 8. 25)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 8. 25.

주관연구기관명 : 서울대학교
협동연구기관명 : 건국대학교
협동연구기관명 : 농림축산검역본부

산학협력단장 (인)
산학협력단장 (인)
농림축산검역본부장 (인)

주관연구책임자 : 김 재 홍
협동연구책임자 : 남 상 섭
참여기관책임자 : 이 윤 정



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	313016-3	해 당 단 계 연구 기 간	2013.08.26.~ 2016.08.25	단 계 구 분	(3단계)/ (총 3 단 계)
연구 사업 명	중 사업 명	농림축산식품 연구개발사업			
	세부 사업명	가축질병기술개발사업			
연구 과제 명	대 과제 명				
	세부 과제명	국내분리 H5N1형 HPAI의 주요 야생조류 종별 병원성 및 병리기전 연구			
연구 책임자	김재홍	해당단계 참 여 연구원 수	총: 26 명 내부: 7 명 외부: 19 명	해당단계 연구 개발비	정부: 430,000 천원 민간: 천원 계: 430,000 천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 73 명 내부: 24 명 외부: 49 명	총 연구개발비	정부: 1,290,000 천원 민간: 천원 계: 1,290,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	서울대학교 수의과대학 건국대학교 수의과대학 농림축산검역본부			참여기업명	
위탁 연구	연구기관명: 건국대학교 수의과대학			연구책임자: 송창선	
요약				보고서 면수	
<ol style="list-style-type: none"> 1. HPAI 발생지역 주변 및 환경에서의 H5N8형 바이러스 오염도 조사 2. 야생조류에 대한 조류인플루엔자 바이러스 병원성 관련 신규 분자표지 발굴 및 기전 규명 3. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류, 텃새류에서의 증식성 및 병원성 조사 4. 야생조류의 조류인플루엔자 바이러스 감염 부위와 리셉터 분포의 상관관계 분석 5. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 야생조류에서 가금으로의 중간감염 기전 규명 6. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류에서의 증식성 및 병원성 비교분석 DB 구축 7. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI에 대한 한국형 감시종 선발 				145면	

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01
<p>연구의 목적 및 내용</p>			<p>○ AI예찰 및 방역대책 수립을 위하여 국내 주요 야생조류의 종별 H5N1형 HPAI의 병원성 및 병리기전 연구결과 확보가 필요함</p> <p>○ 최근 국내분리 H5N1형 HPAI 바이러스의 주요 야생조류 (오리류 포함 8종 이상)에서의 증식성 및 병원성 비교분석 DB 구축 완료</p> <p>○ 야생조류에 대한 조류인플루엔자 병원성 관련 신규 분자표지 발굴 및 기전 규명</p> <p>○ 국내 주요 야생조류의 조류인플루엔자 리셉터 분포 분석을 통한 감염기전 연구</p> <p>○ H5N1형 HPAI 바이러스에 대한 한국형 감시종 (Sentinel species) 선발</p> <p>○ HPAI의 야생조류와 가금으로의 중간감염 기전 구명</p>
<p>연구개발성과</p>			<p>1. 제 1세부과제: 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류 병원성 및 관련 신규 분자표지 연구 가. HPAI 발생지역 주변 및 환경에서의 H5N8형 바이러스 오염도 조사 나. 야생조류에 대한 조류인플루엔자 바이러스 병원성 관련 신규 분자표지 발굴 및 기전 규명 다. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 갈매기류에서의 증식성 및 병원성 조사</p> <p>2. 제 1협동과제: 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류 병원성 및 리셉터 분포 상관관계 분석 가. 야생조류의 조류인플루엔자 바이러스 감염 부위와 리셉터 분포의 상관관계 분석 나. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 야생조류에서 가금으로의 중간감염 기전 규명 다. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 오리류 및 텃새류에서의 증식성 및 병원성 조사</p> <p>3. 제2협동과제: 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류 병원성 분석 및 DB 구축 가. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 오리류 및 기러기류에서의 증식성 및 병원성 조사 나. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류에서의 증식성 및 병원성 비교분석 DB 구축 다. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI에 대한 한국형 감시종 선발</p>

<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>1. 활용방안</p> <p>가. 국내 주요 야생조류 종별 바이러스 배출 패턴 및 감염 리셉터 분포 분석 자료 제시를 통한 AI예찰 및 방역대책 수립을 위한 기초자료로 활용</p> <p>나. 야생조류에서 가금으로의 전파방식 규명을 통한 농장 내 차단방역 및 방역대책 기초자료로 활용</p> <p>다. 국내유행 조류인플루엔자 고감수성 야생조류 종 규명을 통한 한국형 감시종 (sentinel species) 선발</p> <p>라. 병원성 분자표지 발굴 및 규명을 통한 고위험 바이러스 모니터링/백신주 약독화 기법 등 연구 기초기반기술 확보 및 제공</p> <p>마. AI 바이러스에 대한 유전자 기능 분석으로 AI 예방 및 치료 방법 개발의 기초 자료로 활용</p> <p>바. 조류인플루엔자 바이러스와 감염숙주와의 상호연관관계를 규명하여, 조류인플루엔자 바이러스의 인체감염 방지에 관련된 연구의 기초자료로 활용</p> <p>(2) 기대성과</p> <p>가. 국제적인 야생조류 조류 인플루엔자 바이러스 관련 기술 확보로 기술 우위선점과 질병전파 역학정보 DB 구축으로 해외질병유입에 의한 피해액 최소화</p> <p>나. 한국형 감시종 선발을 통한 바이러스 유입 조기파악으로 인한 피해 최소화</p> <p>다. 국내 야생조류 종별 바이러스 배출패턴 파악으로 인한 방역활동의 효율 증대</p> <p>라. 조류인플루엔자 바이러스에 대한 감염숙주의 면역반응 및 세포전달 체계의 변화 등을 관찰하여 조류인플루엔자 바이러스의 감염에 대한 숙주에서의 반응연구로 학술적 파급효과 기대</p> <p>마. 기존 조류인플루엔자의 발표자료 중 활발하게 연구되고 있는 분야인 interspecies barrier에 관한 선진연구로 학술적 파급 효과 기대</p> <p>바. 병원성 분자표지 발굴 및 규명을 통한 고위험 바이러스 모니터링/백신주 약독화 기법 등 연구 기초기반기술 확보를 통한 국가 경쟁력 강화</p> <p>사. 최근 유행되고 있는 고병원성 인플루엔자에 대한 연구를 통해 백신 및 키트 개발의 기술 우위 선점으로 인한 향후 경제적 가치 산출</p> <p>아. 다양한 종에 대한 항인플루엔자 검정시험 공격접종 시험 모델 개발로 향후 Live-bird market 이나 철새 도래지 등에서의 바이러스 생태학 및 병리적 연구에 기초자료로 활용</p>				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>조류인플루엔자</p>	<p>야생조류</p>	<p>병리기전</p>	<p>분자표지</p>	<p>재조합 바이러스</p>

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Requirement for researches on a susceptibility and pathogenesis of wild bird species against Korean H5N1 and H5N8 HPAI viruses for surveillance of AI and establishment of preventive measures. - Establishment of DB on productivity and susceptibility of wild birds (over 8 species including wild ducks) against H5N1 and H5N8 HPAI isolated in Korea currently - Identification of pathogenic mechanisms and molecular marker related to pathogenicity of avian influenza viruses against wild birds - Studies on infection mechanisms through analysis of avian influenza receptor distribution in wild birds in Korea - Selection of sentinel species against H5N1 and H5N8 HPAI viruses - Identification of mechanisms for interspecies transmission of HPAI between wild birds and poultry 		
Results	<ol style="list-style-type: none"> 1. Surveillance of H5N8 HPAIV from the environment and wild bird in Korea 2. Identification of molecular marker related to pathogenicity of avian influenza viruses against wild birds 3. Identification of pathogenic mechanisms of avian influenza viruses against wild birds 4. Studies on infection mechanisms through analysis of avian influenza receptor distribution in wild birds in Korea 5. Identification of mechanisms for interspecies transmission of HPAI between wild birds and poultry 6. Establishment of DB on productivity and susceptibility of wild birds against H5N1 and H5N8 HPAI isolated in Korea currently 7. Selection of sentinel species against H5N1 and H5N8 HPAI viruses 		

<p>Expected Contribution</p>	<p>1. Application plan</p> <ul style="list-style-type: none"> (1) Application of research data for establishment of preventive measures and surveillance of AI (2) Use for bio-security in domestic farms (3) Selection of sentinel species through identification for highly susceptible wild birds to HPAI in Korea (4) Ensure of basic technology on high-risk virus monitoring, vaccine strain attenuation technique (5) High-risk avian influenza virus monitoring/development of vaccine strain attenuation methods (6) AI prevention/development of AI treatment methods <p>2. Expected contribution</p> <ul style="list-style-type: none"> (1) Reduction of economic losses (2) Early identification of avian influenza virus (3) Increasement of AI prevention efficacy (4) Researches on host factor against infection of AI (5) Researches on interspecies barrier related to HPAI (6) Economic value for HPAI vaccine and detection kit (7) Virus ecologic, pathologic studies in live bird market or migratory birds 				
<p>Keywords</p>	<p>Avian influenza</p>	<p>Wild bird</p>	<p>Pathogenesis</p>	<p>Molecular marker</p>	<p>recombinant virus</p>

6. CONTENTS

1. Outline of Research Project	1
2. Present situations of Research	24
3. Methods and Results	25
4. Achievements and Contributions in Relevant Research Field ·	119
5. Plans of Practical Uses	120
6. Data Collections during Project	122
7. Security Level of Research Results	125
8. Present Condition of Research Facilities	126
9. Laboratory Safety Management	127
10. Main Research achievements of Project	131
11. Etc	132
12. References	133

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	24
3. 연구수행 내용 및 결과	25
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	119
5. 연구결과의 활용계획 등	120
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	122
7. 연구개발성과의 보안등급	125
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	126
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	127
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	131
11. 기타사항	132
12. 참고문헌	133

<별첨> 자체평가의견서

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

1. 연구개발과제의 개요

코드번호

D-03

1-1. 연구개발 목적

1. 최종목표

가. AI 예찰 및 방역대책 수립을 위한 국내 야생조류의 종별 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 병원성 및 병리기전 연구결과 확보

2. 과제별 목표

가. 제 1세부과제: 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류 병원성 및 관련 신규 분자표지 연구

(1) HPAI 발생지역 주변 및 환경에서의 H5N8형 바이러스 오염도 조사

(2) 야생조류에 대한 조류인플루엔자 바이러스 병원성 관련 신규 분자표지 발굴 및 기전 규명

(3) 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 갈매기류에서의 증식성 및 병원성 조사

나. 제 1협동과제: 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류 병원성 및 리셉터 분포 상관관계 분석

(1) 야생조류의 조류인플루엔자 바이러스 감염 부위와 리셉터 분포의 상관관계 분석

(2) 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 야생조류에서 가금으로의 중간감염 기전 규명

(3) 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 오리류 및 텃새류에서의 증식성 및 병원성 조사

다. 제2협동과제: 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류 병원성 분석 및 DB 구축

(1) 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 오리류 및 기러기류에서의 증식성 및 병원성 조사

(2) 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류에서의 증식성 및 병원성 비교분석 DB 구축

(3) 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI에 대한 한국형 감시종 선발

1-2. 연구개발의 필요성

1. 발생 현황

가. 조류인플루엔자 (Avian Influenza, AI) 바이러스는 병원성에 따라 닭에 감염 시 가벼운 호흡기 증상, 1-30% 내외의 폐사와 산란저하를 유발하는 저병원성 조류인플루엔자 (Low Pathogenic Avian Influenza, LPAI) 그리고 95% 이상의 높은 치사성을 보이는 고병원성 조류인플루엔자 (Highly Pathogenic Avian Influenza, HPAI)로 크게 2가지 병형으로 구분할 수 있음.

나. HPAI는 H5와 H7형의 바이러스의 감염에 의해서만 발생하여 세계동물보건기구 (OIE)에서는 두 가지 혈청형의 바이러스 감염증을 notifiable avian influenza (NAI)로, 국내에서는 제 1종 가축전염병으로 분류하고 있으며, HPAI 발생 시 해당국 방역기관 및 OIE 보고를 의무화하고 있음.

다. HPAI 발생은 대부분 양계산업의 문제로만 알려져 왔으나, 1997년 홍콩에서 발생한 H5N1형을 시작으로 하여 조류인플루엔자에 의한 인체 감염사례가 증가하고 있을 뿐만 아니라 60%를 상회하는 치사율을 보이고 있어 문제 시 되고 있음.

라. 더욱이 사람 간 전파가 가능해 질 경우 1918년 스페인 독감과 같은 인플루엔자 대유행이 야기될 가능성이 높아 조류인플루엔자의 유입을 조기에 진단하고 확산을 막을 수 있는 기술의 개발은 국민의 보건, 국가경제력 및 국방력 제고에 필수적임.

마. 2002년까지 야생조류에서의 H5N1형 HPAI의 발생은 거의 보고 되지 않았으나, 2003년 이후 부터는 H5N1형 HPAI의 진화에 의해 야생조류에서도 지속적으로 H5N1 발생건수가 보고되고 있으며, 중국의 칭하이호수를 중심으로 유럽 및 아프리카 등의 지역으로 광범위하게 철새의 이동과 함께 바이러스가 전파됨.

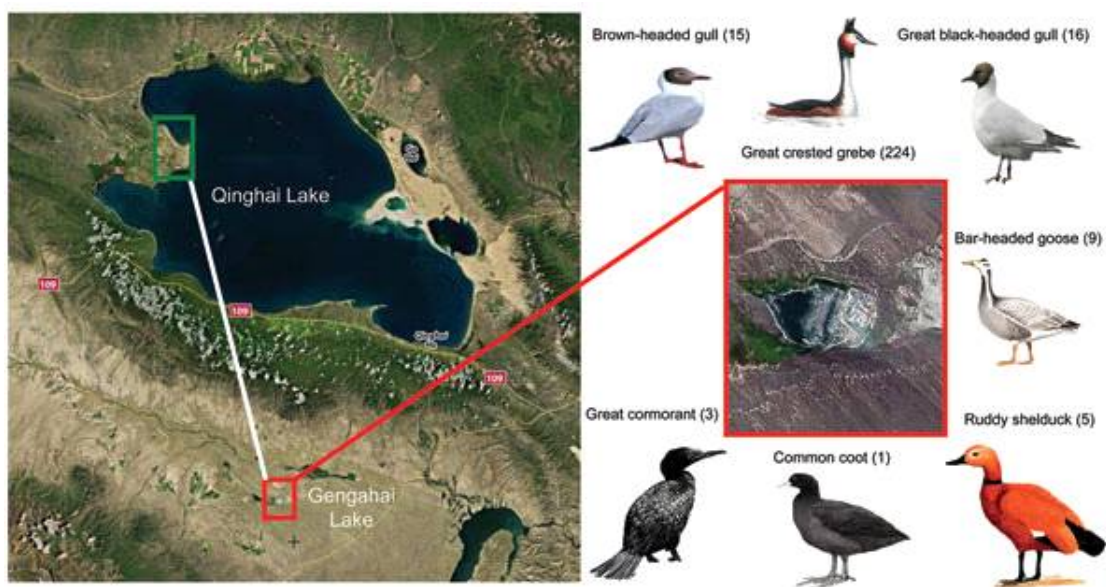


그림 1. 2010년 중국 칭하이호수에서 발생한 고병원성 인플루엔자. 출처: New Avian Influenza Virus (H5N1) in Wild Birds, Qinghai, China. CDC

2. 전파 경로

가. 국내에서는 2003년 최초로 H5N1형 HPAI가 발생한 이후 현재까지 2010-2011년 최근 발생을 포함하여 4차례의 HPAI가 발생하여, 국가적으로 큰 손실을 초래하였음. 특히, 2010-2011년에 발생한 HPAI는 H5N1형 clade 2.3.2에 속하는 바이러스로 기존 바이러스 보다 세계적으로 야생조류에서 많은 발생이 보고되고 있으므로 추후 겨울철새의 대규모 이동 시 가금류로의 빈번한 전파가 예상됨.

나. 한국은 지리적으로 HPAI 발생국인 중국, 몽골과 인접해 있으며 GPS를 이용한 철새이동경로 연구에서 몽골, 러시아, 중국, 아메리카 지역으로부터 다양한 종류의 철새들이 유입되고 있는 것으로 밝혀졌으며, 바이러스 유전학 연구결과 철새 이동경로와 바이러스의 이동경로가 일치하는 것으로 확인됨. 특히, 4차례의 HPAI 발생 시 겨울철새의 이동경로인 몽골-한국-일본의 H5N1 분리주가 99%이상의 상동성을 가진 것으로 확인되어 철새에 의한 바이러스 유입의 중요한 증거로 발표됨.

다. 조류인플루엔자의 자연숙주인 야생물새류들은 기온에 따라 남-북 이동을 하며 breeding site, moulting site, stopover site, wintering site를 공유하며 직접접촉 및 호수의 물을 통해 fecal-oral route로 바이러스를 전파하는 것으로 알려져 있으며, 동종 간 릴레이 방식의 순차적 바이러스 전파를 통해 장거리 바이러스 전파에 기여하는 것으로 알려짐.

라. 최근 본 연구팀의 연구결과에 의해 국내에서 유럽-아시아 계통의 바이러스뿐만 아니라 아메리카 계통 유래의 바이러스가 발견되면서 아메리카-일본-한국-중국을 횡단하는 철새들에 의한 저병원성 인플루엔자 바이러스 전파가 확인됨. 이러한 철새들에 의한 HPAI의 전파 가능 여부에 대한 연구가 요구됨.

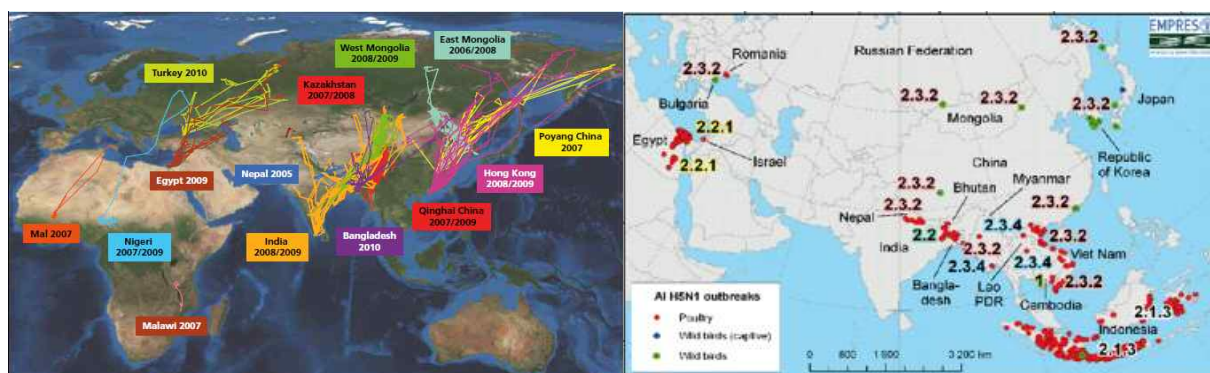


그림 2. GPS부착 야생조류의 이동경로 모식도 및 HPAI H5N1 clade 분포 양상. 출처: Fourth Report on the Global Programme for the Prevention and Control of HPAI

3. 조류 종류별 감수성 및 병원성

가. 기존의 연구결과에서는 HPAI의 경우 대체로 야생조류의 호흡기에서 주로 증식하는 것으로 알려져 있으나 특정 종들에서는 소화기에서의 증식이 더 우세한 것으로 나타나 야생조류의 종에 따라 바이러스 증식 부위 및 병리기전이 다르며 감수성 또한 다양한 것으로 보고됨.

나. 해외의 연구 결과들은 대부분 clade 2.2에 속하는 A/whooper swan/Mongolia/244/05 (H5N1) 바이러스를 이용하여 야생조류에서의 병리기전에 대해 분석하였으며, 국내 연구 결과는 A/chicken/Korea/ES/03 (H5N1) 등의 국내 분리주를 이용함. 그러나 clade 2.5 및 2.2에 속하는 바이러스들은 현재 아시아 지역에서 사라지고 있는 추세이며, 최근에 유행하고 있는 clade 2.3.2 바이러스의 야생조류에서의 병리기전에 대한 연구는 단 한 건만 존재함.

다. 흑고니는 유럽 및 아시아 지역에서 서식하는 야생조류로 clade 2.2 바이러스에 대한 감수성이 높아 도래지 내의 우수한 sentinel bird로써 연구되어 왔음. 그러나 2008년 H5N1 바이러스에는 낮은 감수성을 보이며 무증상으로 감염되는 흑고니 사례가 발견되어 sentinel bird로써의 역할에 의문점이 생기기 시작하여 현재 유행 중인 clade 2.3.2 바이러스에 대한 흑고니를 포함한 야생조류들의 감수성에 대한 연구가 시급함.

라. 해외에서는 기러기목, 참새목, 매목 등 다양한 야생조류에서 H5N1형 HPAI에 대한 감수성 및 병리기전에 대한 연구가 수행되고 있으나, 국내에서는 까치에서의 2003년 분리주 연구, 청둥오리, 원앙, 흑고니, 회색기러기, 황오리에서의 clade 2.2 바이러스에 대한 일부 연구 결과만 보고됨. Clade 2.3.2 바이러스에 대하여서는 최근 일본에서 원앙에 대한 병리기전 연구가 유일함. 그러므로 clade 2.3.2 바이러스에 대한 국내의 야생조류의 종별 감수성 및 병리기전 연구를 통하여 국내 주요 야생조류 종별 바이러스 배출 패턴을 규명하고 이를 근거로 신규 바이러스에 대한 야생 sentinel bird의 선별에 대한 기초자료를 제시할 수 있을 것이라 기대됨.

마. 장기간 바이러스 배출, 동종 및 가금류로의 전파 가능 여부를 관찰하여 국가 간 H5N1형 HPAI의 확산 예방을 위한 위험 종 선별에 대한 기초자료를 제시할 수 있을 것이라 기대됨.

바. H5형 LPAI에 노출된 야생조류의 경우 H5N1형 HPAI에 대한 병원성 및 치사율에 변화가 나타나 바이러스 배출기간이 연장되고 전파가능 범위가 넓어짐. 해외에서 청둥오리 및 아메리카원앙 (wood duck)에 대하여 이에 관한 연구가 진행되었으나 다른 야생조류 및 clade 2.3.2 바이러스에 대한 연구가 부족함. H5형 LPAI의 야생조류 노출 시 국내 H5N1형 HPAI 분리주에 대한 영향 관찰을 통해 잠재적인 전파가능성 평가가 요구됨.

사. 야생조류를 통한 HPAI의 가금으로의 전파가 확인되었으나 직접적인 전파 기전 및 경로에 대한 연구는 미미함. 야생조류에서 가금으로의 전파방식의 규명에 따라 농장 내 차단방역, 방역활동의 기준 확립 및 효율성 향상에 기여할 것으로 기대됨.

4. 조류의 종별 AIV에 대한 세포 수용체 차이와 감염 상관성

가. 조류인플루엔자 바이러스는 숙주에 감염 시 바이러스 표면에 존재하는 hemagglutinin (HA) 단백질과 숙주세포 표면 sialic acid 사이의 특이적인 상호작용에 의해 매개되는 것으로 알려짐. 특히, 다양한 동물 중에서 α 2,3-gal 또는 α 2,6-gal linked receptor의 분포 및 발현량에 따라 감염되는 바이러스의 종류 및 감염부위별 감수성이 달라지는 것으로 알려짐.

나. 본 연구팀을 포함한 많은 해외 연구팀에서 여러 가금류 및 야생조류를 대상으로 조류인플루엔자 수용체 분포에 대한 연구를 진행하였으나, 대부분의 연구에서 단순히 장기별 수용체 분포만을 분석하는데 치중되어 실제 수용체 분포와 바이러스 감염의 상관관계에 대한 병리기전은 연구가 부족한 실정임.

다. 본 연구에서는 조류인플루엔자 리셉터 - 바이러스 동시 염색기법 (dual-labeling)을 통한 조류의 장기별 α 2,3-gal 및 α 2,6-gal linked receptor의 분포에 따른 조류인플루엔자 바이러스 감염 양상을 비교분석하여 야생조류에서의 조류인플루엔자 감염기전을 규명하고자 함. 주요 기러기목 조류, 갈매기 및 도요류, 야생 텃새류를 대상으로 바이러스 감염실험 결과와 장기별 조류인플루엔자 수용체 타입 및 바이러스 감염 세포를 비교분석하여 야생조류의 수용체 분포 양상에 따른 장기별 바이러스 감염형태가 분석될 것으로 기대됨.

5. 병원성 관련 AIV 분자 표지

가. 2003년 발생한 국내 최초의 HPAI는 닭에서는 고병원성이나 오리에서의 병원성은 높지 않았지만 2006년, 2008년, 2010년 발생한 HPAI는 닭뿐만 아니라 오리와 야생조류 병원성이 높은 것으로 알려져 있어 국내 가금 산업에 위협이 되고 있고, 국내 겨울 철새들이 서식하는 몽골과 러시아 등지에서 바이러스가 지속적으로 분리되어 국내 유입될 수 있는 위험성이 있음. 그러나 이들의 병원성 기전 및 관련 분자표지는 밝혀져 있지 않음.

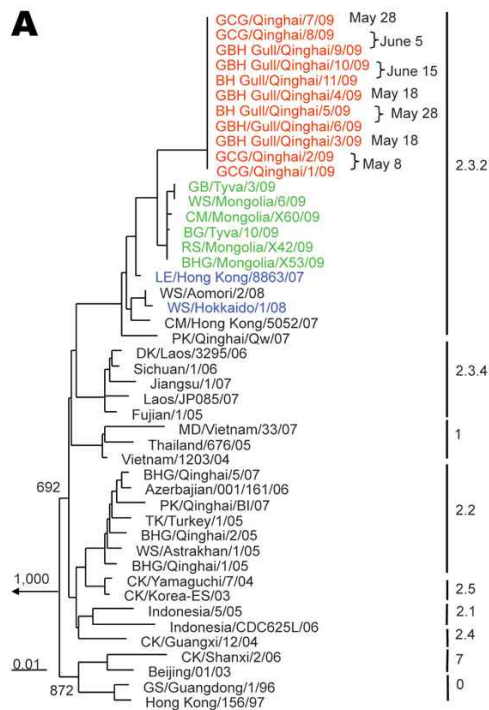


그림 3. Hemagglutinin (HA) 유전자를 이용한 H5N1형 HPAI 계통분석 결과. 출처: New Avian Influenza Virus (H5N1) in Wild Birds, Qinghai, China. CDC

나. HA 유전자를 이용한 계통분석 결과 2003년 분리된 바이러스들은 clade 2.5, 2006년 분리된 바이러스들은 칭하이호수에서 다양한 야생조류들의 폐사를 초래한 clade 2.2, 2008년과 2010년 분리된 바이러스들은 모두 clade 2.3.2에 속하는 것으로 보고되었는데 이 중 오리에 대한 병원성이 낮은 clade 2.5 바이러스들은 병원성이 높은 clade 2.2 바이러스들과 phylogenetic tree 상 같은 클러스터를 형성하므로 서로 차이를 보이는 아미노산 서열을 역유전학 기술을 이용하여 교체하고, 오리 유래 세포에서의 증식성 차이를 비교하면 병원성 관련 분자표지를 발굴할 수 있을 것으로 기대됨.

다. 조류인플루엔자 바이러스는 오리와 닭에서 뚜렷한 병원성의 차이를 보이고 있으며 관련된 바이러스 유전자의 변이가 알려져 있으나 국내 발생한 고병원성 H5N1 바이러스의 병원성에 대해서는 명확한 해답을 제공하지 못하므로 본 연구를 통한 신규 병원성 분자표지 발굴이 필요함.

라. 본 연구과제의 수행을 통해 신규 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 여러 야생조류에서 병원성 및 병리기전 연구를 통해 H5N1 바이러스의 변화양상 및 야생조류 종별 감수성 및 바이러스 배출량을 파악하여, HPAI 감염역학 및 예방정책 수립을 위한 기초 자료로 활용될 것으로 기대됨. 또한, 병리기전 분석 결과를 토대로 sentinel 야생조류를 선정, 활용 방법을 제시하고, 야생조류의 병원성 분자표지의 규명을 통해 HPAI 바이러스의 모니터링 및 관련 키트, 백신 제작에 연구 기초기반기술 확보를 통한 기술 우위 선점 및 국가경쟁력 상승에 기여함.

1-3. 연구개발 범위

1. HPAI 발생지역 주변 및 환경에서의 H5N8형 바이러스 오염도 조사

가. 현재 철새에 의한 H5N8형 HPAI 바이러스의 전파 위험성이 부각되고 있으나 발생농장 주위 (논, 밭, 수로, 저수지 등)의 H5N8형 HPAI 바이러스 오염실태 조사가 전혀 없기 때문에 AI 방역 및 이론적 근거 확립을 위하여 발생지역을 중심으로 철새 배설물, 저수지 물, 기타 환경 등에 대한 긴급 조사, 연구 필요

(1) 시료 채취

(가) 야생조류 분변

① H5N8형 HPAI 발생농장 주변의 논, 밭 및 저수지에 있는 야생조류 분변

(나) 저수지

① H5N8형 HPAI 발생농장 주변의 철새가 머무르는 저수지, 수원지 물

(다) 기타 환경

① H5N8형 HPAI 발생농장 주변의 주변 환경

(2) AIV의 분리 및 혈청형 동정

(가) 바이러스 분리

① 채취한 시료로부터 유제액을 만든 다음 10일령의 특정병원체부재 (specific pathogen free; SPF) 부화란에 접종하여 37°C에서 3일간 배양

② SPF 종란에서 채취한 장요막강액 (allantoic fluid)을 1% 닭 적혈구와 반응시켜 AI 바이러스의 HA 항원에 의한 혈구응집 여부를 확인

(나) 바이러스의 혈청형 동정

① SPF 종란에서 채취한 장요막강액으로부터 RNA를 추출하여 모든 AIV를 검출할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 증폭된 유전자를 확인

② PCR 결과 AIV가 양성일 경우 H5/N8 혈청형 특이 프라이머를 이용한 PCR로 H5/N8 여부 확인

2. 야생조류에 대한 조류인플루엔자 병원성 관련 신규 분자표지 발굴 및 기전 규명

가. 야생조류에 대한 조류인플루엔자 병원성 관련 신규 분자표지 발굴

(1) 수생조류 고증식성 조류인플루엔자 바이러스 선발 및 병원성 관련 후보 분자표지 수집

(가) H9N2 분리주들의 계태아신장세포 (CEK) 및 압태아신장세포 (DEK) 온도별 (32°C, 37°C, 42°C) 증식성 비교 (선행결과 예시; 표 1)

표 1. H9N2 분리주들의 계태아신장세포 (CEK) 및 압태아신장세포 (DEK) 온도별 증식성 비교.

H9N2	Virus titre (TCID ₅₀ /ml)				분류
	CEK 37°C	CEK 32°C	DEK 37°C	DEK 32°C	
090316S	1.70 × 10 ⁵	1.70 × 10 ⁴	4.22 × 10 ³	< 10 ²	DEK 저증식성
090320	1.70 × 10 ⁷	4.64 × 10 ⁶	4.22 × 10 ³	< 10 ²	DEK 저증식성
090422-9	3.16 × 10⁶	4.64 × 10⁵	1.0 × 10⁷	2.15 × 10⁵	DEK 고증식성
090207S	4.64 × 10 ⁷	3.16 × 10 ⁷	1.0 × 10 ⁶	4.64 × 10 ⁵	CEK 고증식성
091010S	3.16 × 10 ⁷	4.64 × 10 ⁵	3.16 × 10 ⁵	3.16 × 10 ⁵	CEK 증식성
090209S	1.0 × 10 ⁶	4.64 × 10 ⁴	3.10 × 10 ⁵	1.0 × 10 ⁵	-

(나) 2주령 오리 바이러스 조직분포 및 증식성 비교

Influenza virus	Virus replication (EID ₅₀ /0.1ml)			
	SPF chicken ^a		Duck ^b	
	인후두	총배설강	인후두	총배설강
Strain				

(다) 증식성에 따라 CEK 고증식성, DEK 고증식성, DEK 저증식성 바이러스들로 분류 후 전체 유전자를 분석하여 서로 다른 아미노산 선정 (특히 PB2, PB1, PA & NS) 후 구조-기능 분석하여 후보 분자표지 확정

(2) 2003/2004 국내 분리 H5N1 바이러스 (1차 HPAI, clade 2.5)와 2006/2007 (2차 HPAI, clade 2.2), 2008 (3차 HPAI, clade 2.3.2), 2010/2011 (4차 HPAI, clade 2.3.2) 국내 분리 H5N1 바이러스 유전자를 비교하여 서로 다른 아미노산 선정 후 후보 분자표지 확정

나. 신규 분자표지 mutant 재조합 바이러스 제작 및 특성 분석

(1) Reassortant 바이러스 제작 및 특성 분석

(가) CEK 대비 DEK 증식성 급격히 감소 (1,000배)하는 H9N2 바이러스 (SNU090320) 역유전자 벡터 제조 및 바이러스 작출 (rSNU090320)

(나) DEK 증식성 높은 H9N2 및 H5N1 (2003 분리 1주, 2010 분리 1주) 유전자 1개씩을 rSNU090320의 해당 유전자와 치환하여 7+1 [H9N2 5종; H5N1 2003/2010 분리주 각 5종 (총 15종)] reassortant 작출 (총 15종)

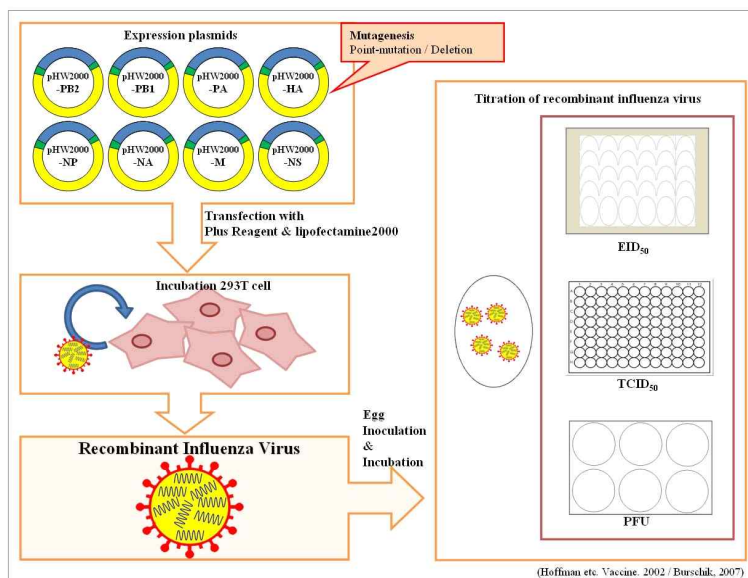
(다) CEK/DEK 온도 증식성 비교: 온도와 세포에 따라 증식성의 차이 ($P < 0.05$)를 보이는 분자표지 발굴

Recombinant virus	Virus titre (TCID ₅₀ /ml)			
	CEK 37°C	CEK 32°C	DEK 37°C	DEK 32°C

(라) 2주령 오리 바이러스 증식성 비교: 닭이나 오리의 인후두 및 총배설강에서의 증식성 차이 ($P < 0.05$)를 보이는 분자표지 확인

Influenza virus	Virus replication (EID ₅₀ /0.1ml)			
	SPF chicken ^a		Duck ^b	
Strain	인후두	총배설강	인후두	총배설강

(2) One-point mutant 재조합 바이러스 제작 및 특성 분석



(가) 병원성 관련 핵심 유전자 돌연변이 (지금까지 보고되지 않은 신규 돌연변이)를 갖는 H5N1 바이러스 관련 재조합 바이러스 제작 (선행 실험 결과 반영하여 선정)

Gene	Mutant
PB2	I67V, T108A, T147I, Q368R, N390D (5종)
PB1	M171V, M655V (2종)
PA	I13T, I61M, E237K, N254S, L/M261Q, I322V, V323A, H452Y, K643Y, K643Y, K643R, V645L (10종)
NP	I408V (1종)
NS1	S3P, F22L, F/Y133L (3종)

(나) H9N2 유전자 분석 후 후보 분자표지 확정하여 재조합 바이러스 제작

(다) CEK/DEK 온도 증식성 비교: 온도와 세포에 따라 증식성의 차이 ($P < 0.05$)를 보이는 분자표지 발굴

Recombinant virus	Virus titre (TCID ₅₀ /ml)			
	CEK 37°C	CEK 32°C	DEK 37°C	DEK 32°C

(라) 2주령 오리 바이러스 증식성 비교: 닭이나 오리의 인후두 및 총배설강에서의 증식성 차이 ($P < 0.05$)를 보이는 분자표지 확인

Influenza virus	Virus replication (EID ₅₀ /0.1ml)			
	SPF chicken ^a		Duck ^b	
	인후두	총배설강	인후두	총배설강
Strain				

(3) Combination mutant 재조합 바이러스 제작 및 특성 분석

(가) 상기 one-point mutant 중 DEK 증식성이 증가되는 돌연변이 조합한 재조합 바이러스 제작 (실험결과에 따라 작출 바이러스 변동 가능)

Recombinant virus	Combined mutation
1	mPB2 (optional)
2	mPA (optional)
3	mHA (optional)
4	mNA (optional)
5	mNS (optional)
6	mPB2/mPA/mPB1 (optional)
7	mPB2/mPA/mPB1/mNS (optional)
8	mPB2/mPA/mPB1/mNP (optional)
9	mPB2/mPA/mPB1/mNP/mNS (optional)
10	mHA/mNA (optional)

(나) CEK/DEK 온도 증식성 비교: 온도와 세포에 따라 증식성의 차이 ($P < 0.05$)를 보이는 분자표지 발굴

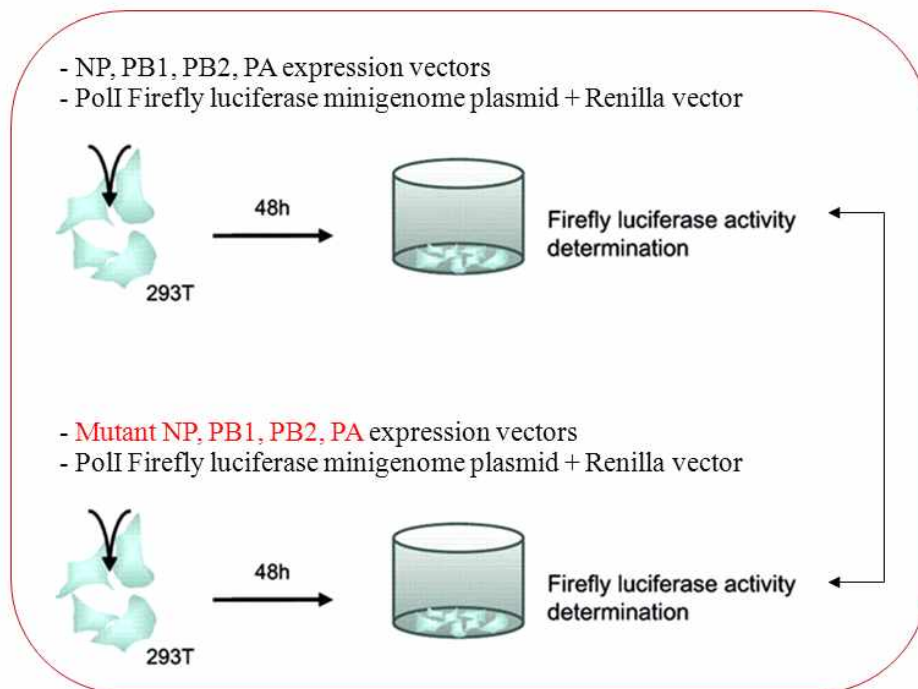
Recombinant virus	Virus titre (TCID ₅₀ /ml)			
	CEK 37°C	CEK 32°C	DEK 37°C	DEK 32°C

(다) 2주령 오리 바이러스 증식성 비교: 닭이나 오리의 인후두 및 총배설강에서의 증식성 차이 ($P < 0.05$)를 보이는 분자표지 확인

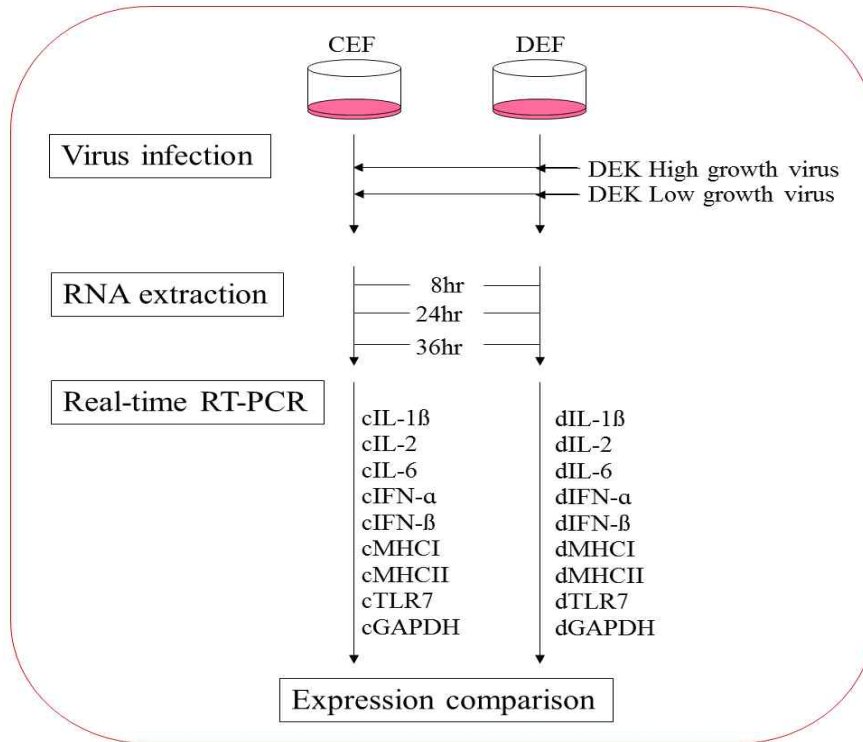
Influenza virus	Virus replication (EID ₅₀ /0.1ml)			
	SPF chicken ^a		Duck ^b	
Strain	인후두	총배설강	인후두	총배설강

다. 야생조류에 대한 조류인플루엔자 병원성 관련 신규 분자표지의 기전 규명

- (1) Egg white hemagglutination inhibition test: 닭과 오리의 종란으로부터 난백을 수확하여 50% PBS 부유액을 제조해 2진 희석한 후 재조합 또는 야외 분리 바이러스의 닭혈구 응집 능력에 대한 억제역가 측정하여 HA 단백질의 활성 차이 규명
- (2) Neuraminidase activity test: neuraminidase 활성에 차이를 보이는 분자표지 발굴
- (3) Polymerase activity assay (중합효소 활성 시험)



(4) Immune response comparison between recombinant virus-infected CEF and DEF by real-time RT-PCR



3. 야생조류의 조류인플루엔자 감염 부위와 리셉터 분포의 상관관계 분석

가. 조류인플루엔자 리셉터 - 바이러스 동시 염색기법 연구

(1) 조류인플루엔자는 숙주에 감염 시 바이러스 표면에 존재하는 hemagglutinin 단백질과 숙주세포 표면 sialic acid사이의 특이적인 상호작용에 의해 매개되는 것으로 알려짐.

(2) 다양한 동물 종에서 α 2,3-gal 또는 α 2,6-gal linked receptor의 분포 및 발현량에 따라 감염되는 바이러스의 종류 및 감염부위별 감수성이 달라지는 것으로 알려짐.

(3) 본 연구에서는 기러기목 조류를 모델로 선정하고 α 2,3-gal 및 α 2,6-gal linked receptor의 분포와 바이러스 동시 염색을 통하여 상관관계를 분석하고 야생조류에서의 조류인플루엔자 감염기전을 규명하고자 함.

(4) 연구방법

(가) 대상 장기: 호흡기, 소화기, 신경계 등

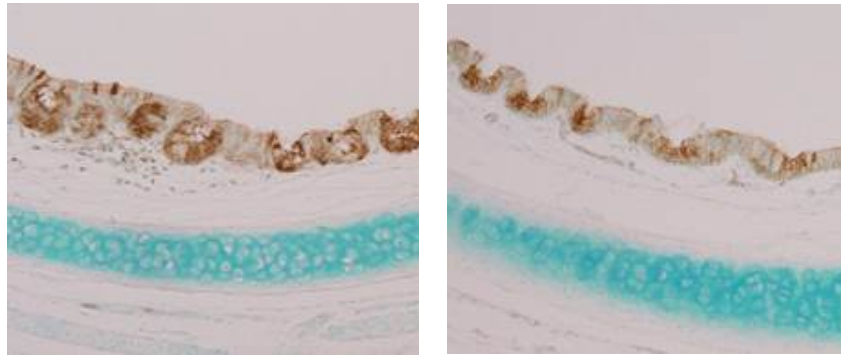
- ① 호흡기: Trachea (상부/중부/하부), lung
- ② 소화기: Small intestine, large intestine
- ③ 신경계: Brain

(나) 조직 고정

- ① 신선 조직을 4% paraformaldehyde에 24-72시간 고정함
- ② Paraffin 포매 후 microsection을 실시함

(다) Receptor 및 바이러스 염색

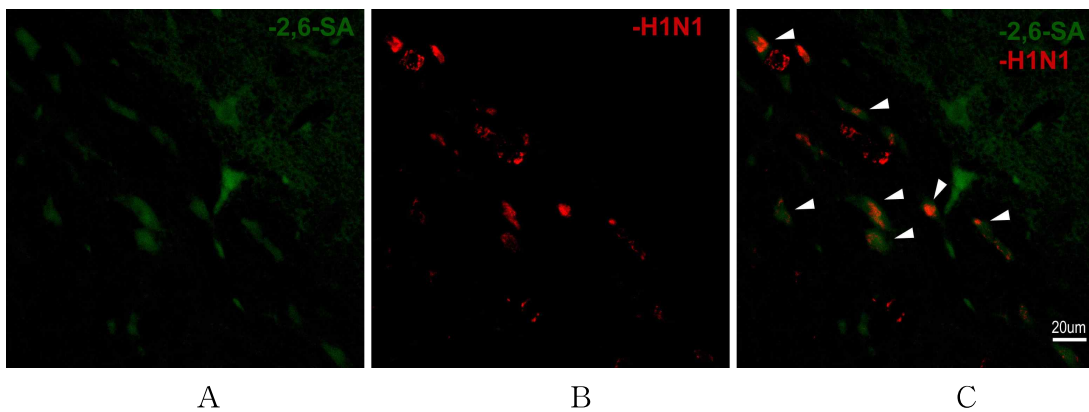
- ① α 2,3- linked sialic acid: maackia amurensis lectin II
- ② α 2,6- linked sialic acid: sambucus nigra lectin
- ③ Avian influenza virus: anti-NP monoclonal antibody
- ④ 각각의 receptor에 특이적으로 결합하는 biotinylated lectin을 이용하여 histochemistry를 수행함.
- ⑤ Lectin signal은 diaminobendizine으로 detection하며 methyl green으로 대조 염색을 실시함.
- ⑥ Receptor 발현의 상대적인 intensity를 5단계로 분류하여 평가함.
- ⑦ 조류인플루엔자 NP 단백질에 대한 항체를 이용하여 receptor와 dual labeling 기법 개발 및 조건의 최적화를 실시함.



(A) Trachea 상부

(B) Trachea 하부

그림 4. 메추리의 α 2,6- linked sialic acid 발현 분석.



A

B

C

그림 5. 인플루엔자 바이러스 및 receptor dual-labeling을 통한 감염형태 분석. 마우스의 뇌조직을 조류인플루엔자 리셉터 (A)와 인플루엔자 바이러스 (B)에 대해 면역형광염색을 실시한 뒤 두 사진을 합쳐 관찰한 결과 (C) 리셉터를 발현하는 세포에 인플루엔자 바이러스가 감염된 것을 확인할 수 있음

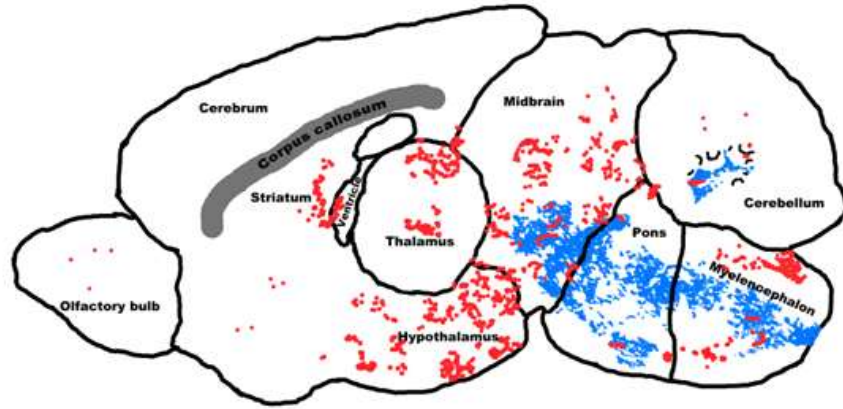


그림 6. 마우스 뇌의 인플루엔자 바이러스 감염부위와 리셉터 발현의 상관관계. 그림 5에서 관찰한 내용을 바탕으로 마우스 뇌 전체부위에 인플루엔자 바이러스 감염부위 (빨간색)와 리셉터 발현부위 (파란색)의 상관관계를 밝힐 수 있음

나. 국내 주요 야생조류 호흡기와 소화기의 조류인플루엔자 리셉터 분포에 대한 바이러스 감염 상관관계 분석

- (1) 본 연구과제 1차년도에 개발된 조류인플루엔자 리셉터 - 바이러스 동시 염색기법을 통하여 호흡기와 소화기의 리셉터 분포에 대한 바이러스 감염도를 세포 수준에서 분석함.
- (2) 1협동, 2협동 상호 공동연구를 통해 주요 기러기목 조류를 대상으로 고병원성 조류인플루엔자 바이러스를 생물안전 3등급 시설 내에서 감염시키고, 장기별 (호흡기, 소화기 등) 조류인플루엔자 리셉터 타입 및 발현량과 바이러스 감염양상을 비교함.

다. 야생조류의 조류인플루엔자의 신경계 리셉터 분포 및 바이러스 감염 상관관계 분석

- (1) 기존의 연구결과에서는 야생조류에 고병원성 조류인플루엔자 감염 시 신경증상을 유발하고 폐사를 일으키는 것으로 알려져 있으나 신경증상을 일으키는 기전에 대하여 연구가 부족한 실정임.
- (2) 본 연구과제 1차년도에 개발된 조류인플루엔자 리셉터 - 바이러스 동시 염색기법을 통하여 신경계의 리셉터 분포에 대한 바이러스 감염 분포를 세포 수준에서 분석함.
- (3) 1협동, 2협동 상호 공동연구를 통해 주요 기러기목 조류를 대상으로 고병원성 조류인플루엔자 바이러스를 생물안전 3등급 시설 내에서 감염시키고, 신경계의 조류인플루엔자 리셉터 타입 및 발현량과 바이러스 감염양상을 비교함.
- (4) 고병원성 조류인플루엔자 감염에 따른 뇌의 부위별 신경세포의 병리학적 변화를 분석하고 바이러스 및 리셉터 분포와 비교하여 신경계 병리기전을 연구함.

4. 국내분리 H5N1 및 H5N8형 HPAIV의 주요 야생조류에서의 병원성 분석

가. 국내분리 H5N1 및 H5N8형 HPAIV의 주요 갈매기류에서의 증식성 및 병원성 분석

(1) 갈매기류에 2010/2011 국내 분리 H5N1 바이러스 (HPAI, clade 2.3.2) 및 2014년 국내 분리 H5N8 바이러스 (HPAI, clade 2.3.4)를 감염시키고 장기별 증식성 및 종별 감수성/병원성을 비교분석함

(2) 실험장소 및 실험장비

(가) 서울대학교 BL3 시설 내 중동물 isolator 사용

(3) 대상 종

(가) 재갈매기, 붉은부리갈매기

종 (species)	영문명	학명	사진
재갈매기	Herring gull	<i>Larus argentatus</i>	
붉은부리갈매기	Black-headed gull	<i>Larus ridibundus</i>	

(4) 접종경로

(가) 비강 (IN) 접종

(5) 바이러스

(가) 접종용량 및 경로

① 비강경로: 각 바이러스를 $10^{6.5}$ EID₅₀/ml 역가로 희석하여 0.1ml씩 개체별로 접종

(나) 바이러스 종류

① H5N1 HPAI clade 2.3.2 분리주

② H5N8 HPAI clade 2.3.4 분리주

(6) 관찰 및 시료처리 방법

(가) 병원성 측정

① 각각 3마리의 공격접종군 이용

② 공격접종 후 14일간 임상증상 발현 유무 및 정도, 폐사율 관찰

③ 폐사체의 부검 및 주요 장기의 조직병리학적 검사

(나) 바이러스 배출량/배출기간 측정

- ① Oropharynx 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정
- ② Cloaca 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정

(다) 동종간 접촉전과 여부 측정

- ① 동일 isolator 내 2마리 비접종 접촉전과 관찰군
- ② Oropharynx 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정
- ③ Cloaca 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정

나. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 오리류에서의 증식성 및 병원성 분석



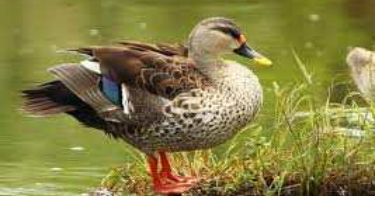
(1) 야생오리류에 2010/2011 국내 분리 H5N1 바이러스 (HPAI, clade 2.3.2) 및 2014년 국내 분리 H5N8 바이러스 (HPAI, clade 2.3.4)를 감염시키고 장기별 증식성 및 종별 감수성/병원성을 비교분석함

(2) 실험장소 및 실험장비

(가) 건국대학교 BL3 시설 내 중동물 isolator 사용

(3) 대상 종

(나) 쇠오리, 고방오리, 흰뺨검둥오리

종 (species)	영문명	학명	사진
쇠오리	Common Teal	<i>Anas crecca</i>	
고방오리	Northern Pintail	<i>Anas acuta</i>	
흰뺨검둥오리	Spot-billed Duck	<i>Anas poecilorhyncha</i>	

(4) 접종경로

(가) 비강 (IN) 접종

(5) 바이러스

(가) 접종용량 및 경로

① 비강경로: 각 바이러스를 $10^{6.5}$ EID₅₀/ml 역가로 희석하여 0.1ml씩 개체별로 접종

(나) 바이러스 종류

- ① H5N1 HPAI clade 2.3.2 분리주
- ② H5N8 HPAI clade 2.3.4 분리주

(6) 관찰 및 시료처리 방법

(가) 병원성 측정

- ① 각각 3마리의 공격접종군 이용.
- ② 공격접종 후 14일간 임상증상 발현 유무 및 정도, 폐사율 관찰
- ③ 폐사체의 부검 및 주요 장기의 조직병리학적 검사

(나) 바이러스 배출량/배출기간 측정

- ① Oropharynx 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정
- ② Cloaca 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정

(다) 동종간 접촉전파 여부 측정

- ① 동일 isolator 내 2마리 비접종 접촉전파 관찰군
- ② Oropharynx 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정
- ③ Cloaca 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정

다. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 텃새류에서의 증식성 및 병원성 분석


(1) 주요 텃새류에 2010/2011 국내 분리 H5N1 바이러스 (HPAI, clade 2.3.2) 및 2014년 국내 분리 H5N8 바이러스 (HPAI, clade 2.3.4)를 감염시키고 장기별 증식성 및 종별 감수성/병원성을 비교분석함

(2) 실험장소

(가) 건국대학교 BL3 시설 내 중동물 isolator 사용

(3) 대상 종

(가) 까마귀

종 (species)	영문명	학명	사진
까마귀	Carrion crow	<i>Corvus corone orientalis</i>	

(4) 접종경로

(가) 비강 (IN) 접종

(5) 바이러스

(가) 접종용량 및 경로

① 비강경로: 각 바이러스를 $10^{6.5}$ EID₅₀/ml 역가로 희석하여 0.1ml씩 개체별로 접종

(나) 바이러스 종류

- ① H5N1 HPAI clade 2.3.2 분리주
- ② H5N8 HPAI clade 2.3.4 분리주

(6) 관찰 및 시료처리 방법

(가) 병원성 측정

- ① 각각 3마리의 공격접종군 이용.
- ② 공격접종 후 14일간 임상증상 발현 유무 및 정도, 폐사율 관찰
- ③ 폐사체의 부검 및 주요 장기의 조직병리학적 검사

(나) 바이러스 배출량/배출기간 측정

- ① Oropharynx 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정
- ② Cloaca 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정

(다) 동종간 접촉전파 여부 측정

- ① 동일 isolator 내 2마리 비접종 접촉전파 관찰군
- ② Oropharynx 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정
- ③ Cloaca 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정

라. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 오리류에서의 증식성 및 병원성 분석


(1) 야생오리류에 2010/2011 국내 분리 H5N1 바이러스 (HPAI, clade 2.3.2) 및 2014 국내 분리 H5N8 바이러스 (HPAI, clade 2.3.4)를 감염시키고 장기별 증식성 및 종별 감수성/병원성을 비교분석함

(2) 실험장소 및 실험장비

(가) 농림축산검역본부 BL3 시설 내 중동물 isolator 사용

(3) 대상 종

(나) 청둥오리

종 (species)	영문명	학명	사진
청둥오리	Mallard	<i>Anas platyrhynchos</i>	

(4) 접종경로

(가) 비강 (IN) 접종

(5) 바이러스

(가) 접종용량 및 경로

① 비강경로: 각 바이러스를 $10^{6.5}$ EID₅₀/ml 역가로 희석하여 0.1ml씩 개체별로 접종

(나) 바이러스 종류

- ① H5N1 HPAI clade 2.3.2 분리주
- ② H5N8 HPAI clade 2.3.4 분리주

(6) 관찰 및 시료처리 방법

(가) 병원성 측정

- ① 각각 3마리의 공격접종군 이용
- ② 공격접종 후 14일간 임상증상 발현 유무 및 정도, 폐사율 관찰
- ③ 폐사체의 부검 및 주요 장기의 조직병리학적 검사

(나) 바이러스 배출량/배출기간 측정

- ① Oropharynx 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정
- ② Cloaca 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정

(다) 동종간 접촉전과 여부 측정

- ① 동일 isolator 내 2마리 비접종 접촉전과 관찰군
- ② Oropharynx 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정
- ③ Cloaca 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정

마. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 기러기류에서의 증식성 및 병원성 분석


(1) 기러기류에 2010/2011 H5N1 바이러스 (HPAI, clade 2.3.2) 및 2014 H5N8 바이러스 (HPAI, clade 2.3.4)를 감염시키고 장기별 증식성 및 종별 감수성/병원성을 비교분석함

(2) 실험장소 및 실험장비

(가) 농림축산검역본부 BL3 시설 내 중동물 isolator 사용

(3) 대상 종

(가) 쇠기러기

종 (species)	영문명	학명	사진
쇠기러기	White-fronted goose	<i>Anse albifrons</i>	

(4) 접종경로

(가) 비강 (IN) 접종

(5) 바이러스

(가) 접종용량 및 경로

① 비강경로: 각 바이러스를 $10^{6.5}$ EID₅₀/ml 역가로 희석하여 0.1ml씩 개체별로 접종

(나) 바이러스 종류

- ① H5N1 HPAI clade 2.3.2 분리주
- ② H5N8 HPAI clade 2.3.4 분리주

(6) 관찰 및 시료처리 방법

(가) 병원성 측정

- ① 각각 3마리의 공격접종군 이용
- ② 공격접종 후 14일간 임상증상 발현 유무 및 정도, 폐사율 관찰
- ③ 폐사체의 부검 및 주요 장기의 조직병리학적 검사

(나) 바이러스 배출량/배출기간 측정

- ① Oropharynx 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정
- ② Cloaca 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정

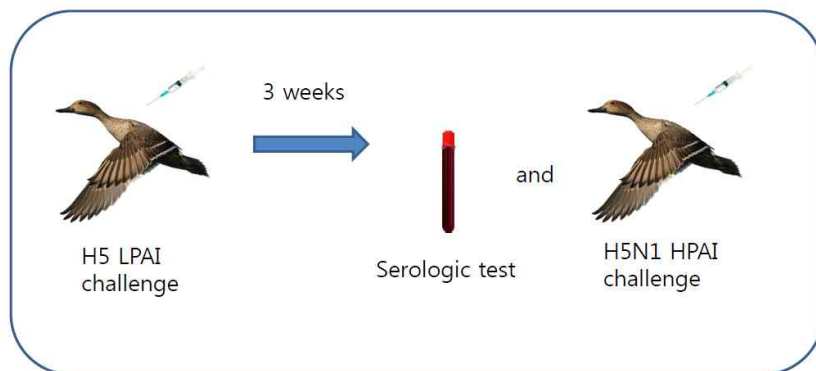
(다) 동종간 접촉전과 여부 측정

- ① 동일 isolator 내 2마리 비접종 접촉전과 관찰군
- ② Oropharynx 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정
- ③ Cloaca 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정

5. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 야생조류에서 가금으로의 중간감염 기전 규명

가. 야생조류의 H5형 LPAI 노출에 의한 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 병원성 변화 관찰

- (1) 주요 야생조류에 철새 분리 H5형 LPAI 접종 3주 후 2010/2011 (HPAI, clade 2.3.2) 국내 분리 H5N1 바이러스 및 2014 (HPAI, clade 2.3.4) 국내 분리 H5N8 바이러스를 감염시키고 증식성 및 중별 감수성/병원성 변화를 비교분석함



(2) 실험장소

(가) 건국대학교 BL3 시설 내 중동물 isolator 사용

(3) 대상 종

(가) 병원성 실험 결과 높은 치사율을 보이는 종

(4) 접종경로

(가) 비강 (IN) 접종

(5) 바이러스

(가) 접종용량 및 경로

① 비강경로: 각 바이러스를 $10^{6.5}$ EID₅₀/ml 역가로 희석하여 0.1ml씩 개체별로 접종

(나) 바이러스 종류

- ① 철새분리 H5형 LPAI
- ② H5N1 HPAI clade 2.3.2 분리주
- ③ H5N8 HPAI clade 2.3.4 분리주

(6) 관찰 및 시료처리 방법

(가) 병원성 측정

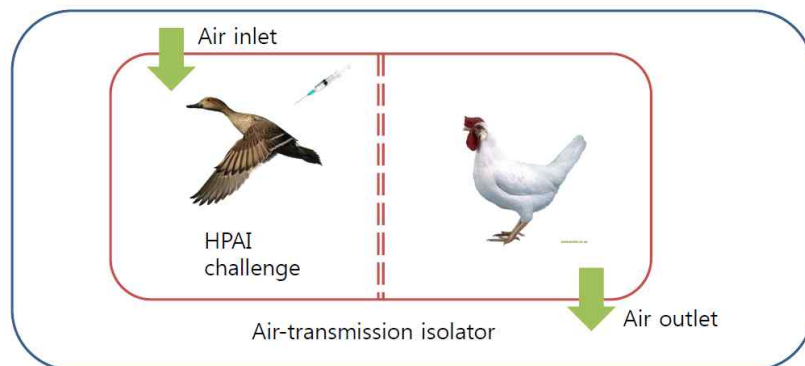
- ① 각각 3마리의 공격접종군 이용
- ② 공격접종 후 14일간 임상증상 발현 유무 및 정도, 폐사율 관찰
- ③ 폐사체의 부검 및 주요 장기의 조직병리학적 검사

(나) 바이러스 배출량/배출기간 측정

- ① Oropharynx 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정
- ② Cloaca 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정

나. 야생조류에서 가금으로의 공기-매개 전파 확인실험

(1) 주요 야생조류에 2010/2011 (HPAI, clade 2.3.2) 국내 분리 H5N1 바이러스 및 2014 (HPAI, clade 2.3.4) 국내 분리 H5N8 바이러스를 감염시키고 공기순환이 연결된 옆 isolator SPF 닭의 감수성 및 바이러스 배출 확인



(2) 실험장소

(가) 건국대학교 BL3 시설 내 공기전과용 중동물 isolator 사용

(3) 대상 종

(가) 병원성 실험 결과 높은 바이러스 배출을 보이는 종

(4) 접종경로

(가) 비강 (IN) 접종

(5) 바이러스

(가) 접종용량 및 경로

① 비강경로: 각 바이러스를 $10^{6.5}$ EID₅₀/ml 역가로 희석하여 0.1ml씩 개체별로 접종

(나) 바이러스 종류

① H5N1 HPAI clade 2.3.2 분리주

② H5N8 HPAI clade 2.3.4 분리주

(6) 관찰 및 시료처리 방법

(가) 병원성 측정

① 3마리의 공격접종군과 공기 전파로 노출된 3마리의 SPF 닭 이용

② 공격접종 후 14일간 임상증상 발현 유무 및 정도, 폐사율 관찰

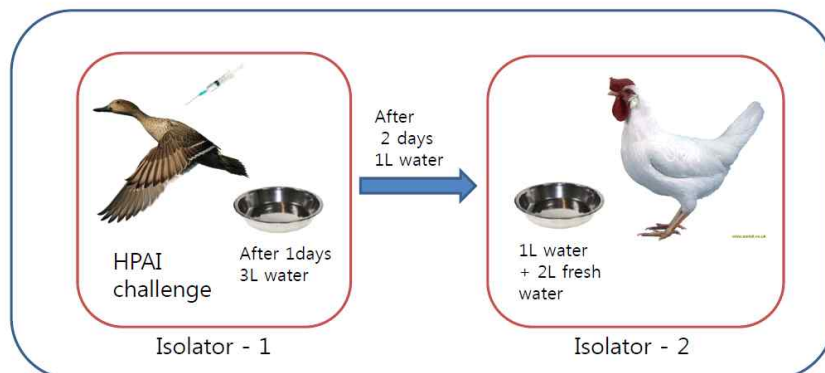
(나) 바이러스 배출량/배출기간 측정

① Oropharynx 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정

② Cloaca 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정

다. 야생조류에서 가금으로의 물-매개 전파 확인실험

(1) 주요 야생조류에 2010/2011 (HPAI, clade 2.3.2) 국내 분리 H5N1 바이러스 및 2014 (HPAI, clade 2.3.4) 국내 분리 H5N8 바이러스를 감염시키고 사용한 물에 대한 SPF 닭의 감수성 및 바이러스 배출 확인



(2) 실험장소

(가) 건국대학교 BL3 시설 내 중동물 isolator 사용

(3) 대상 종

(가) 병원성 실험 결과 높은 바이러스 배출을 보이는 종

(4) 접종경로

(가) 비강 (IN) 접종

(5) 바이러스

(가) 접종용량 및 경로

① 비강경로: 각 바이러스를 $10^{6.5}$ EID₅₀/ml 역가로 희석하여 0.1ml씩 개체별로 접종

(나) 바이러스 종류

① H5N1 HPAI clade 2.3.2 분리주

② H5N8 HPAI clade 2.3.4 분리주

(6) 관찰 및 시료처리 방법

(가) 병원성 측정

① 3마리의 공격접종군과 물 전파로 노출된 3마리의 SPF 닭 이용

② 공격접종 후 14일간 임상증상 발현 유무 및 정도, 폐사율 관찰

(나) 바이러스 배출량/배출기간 측정

① Oropharynx 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정

② Cloaca 배출량 측정: 공격접종 후 14일간 swab후 역가 측정

6. H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류에서의 증식성 및 병원성 비교분석 DB 구축

가. H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 야생조류 증식성 및 병원성에 대한 본 과제 연구결과 및 기존 연구결과 취합

나. H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 clade별, 야생조류 종별 증식성 및 병원성 비교분석 DB 구축 및 분석

다. H5N1형 및 H5N8형 HPAI에 대한 한국형 감시종 선발

(1) 본 과제 수행을 통해 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 높은 병원성을 보이는 야생조류 종 선발

(2) 감시종 후보주의 국내 분포 및 관찰성에 대한 평가

(3) H5N1형 및 H5N8형 HPAI에 대한 한국형 감시종 선발 및 적용

라. H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류에서의 증식성 및 병원성 비교분석 DB 구축

(1) H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 야생조류 증식성 및 병원성에 대한 본 과제 연구결과 및 기존 연구결과 취합

(가) 국내 및 해외의 기존 연구결과를 취합하여 clade 2.1, 2.2 및 2.5 바이러스에 대한 야생 조류종별 증식성 및 병원성 연구결과 취합

(나) 본 연구과제 수행을 통해 밝혀진 clade 2.3.2 및 clade 2.3.4 바이러스에 대한 야생조류 종 별 증식성 및 병원성 연구결과 취합

(2) H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 clade별, 야생조류 종별 증식성 및 병원성 비교분석 DB 구축 및 분석

(가) Clade 2.1, 2.2, 2.5, 2.3.2 및 2.3.4 바이러스에 대한 야생조류 종별 증식성 및 병원성 비교분석 DB 구축

(나) DB 분석을 통한 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 야생조류에서의 병리기전 변화 패턴 분석

(다) DB 분석을 통한 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 야생조류 종별 장거리 전파 가능성 분석

(라) 기존 야생조류 이동경로 추적 결과를 활용하여 주변 국가에서 국내로 HPAI의 전파에 기여하는 야생조류 확인

7. H5N1형 및 H5N8형 HPAI에 대한 한국형 감시종 선발

가. 본 과제 수행을 통해 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 높은 병원성을 보이는 야생조류 종 선발

(1) 세부 및 협동 간 상호 공동연구결과를 활용을 통해 높은 폐사율 (mortality) 및 낮은 평균 균치사시간 (MDT)을 보이는 종 선발

나. 감시종 후보주의 국내 분포 및 관찰성에 대한 평가

(1) 선별된 종의 국내 분포 및 대략적인 개체 수 조사

(2) 선별된 종의 국내 도래지, 서식지 및 이동 시기 조사

(3) 야생조류의 개체 크기, 색 및 개체 수에 기반하여 폐사 시 관찰 용이성에 대한 평가

다. H5N1형 및 H5N8형 HPAI에 대한 한국형 감시종 선발 및 적용

(1) 국내 시기별 감시종 선발

(2) 선별된 감시종에 대한 관찰을 통한 HPAI의 국내 유입 가능성 예찰

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
○	

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

3-1. 제 1세부과제: 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류 병원성 및 관련 신규 분자표지 연구

1. HPAI 발생지역 주변 및 환경에서의 H5N8형 바이러스 오염도 조사

가. HPAI 발생지역 오염도 조사 (과제 설계 변경)

(1) 현재 철새에 의한 H5N8형 HPAI 바이러스의 전파 위험성이 부각되고 있으나 발생농장 주위 (논, 밭, 수로, 저수지 등)의 H5N8형 HPAI 바이러스 오염실태 조사가 전혀 없기 때문에 AI 방역 및 이론적 근거 확립을 위하여 발생지역을 중심으로 철새 배설물, 저수지 물, 기타 환경 등에 대한 긴급 조사, 연구 필요.

(2) H5N8형 HPAI 발생에 따른 농림축산식품부 방역대책협의회의 협의 결과, 이 과제를 설계 변경하여 관련 연구내용을 포함토록 결정함 (관련공문: 농림축산식품부 과학기술정책과-488. 2014. 2. 13).



그림 20. 2014년 H5N8형 HPAI 전국 발생 현황 (~14.5.7)

그림 7. 2014년 H5N8형 HPAI 전국 발생 현황 (~14.05.07)

나. HPAI 발생 농장 선정

(1) HPAI 발생 농장 중 발생 농장 접근성, HPAI 발생 농장 주변의 야생조류 분포 상황, 발생 농장 주변 저수지 및 하천 존재 여부 등을 고려하여 7개 지역, 13개소를 선정

(가) 전북 김제 : 원평천, 신평천, 능제저수지, 백산저수지, 만경강 (그림 8)

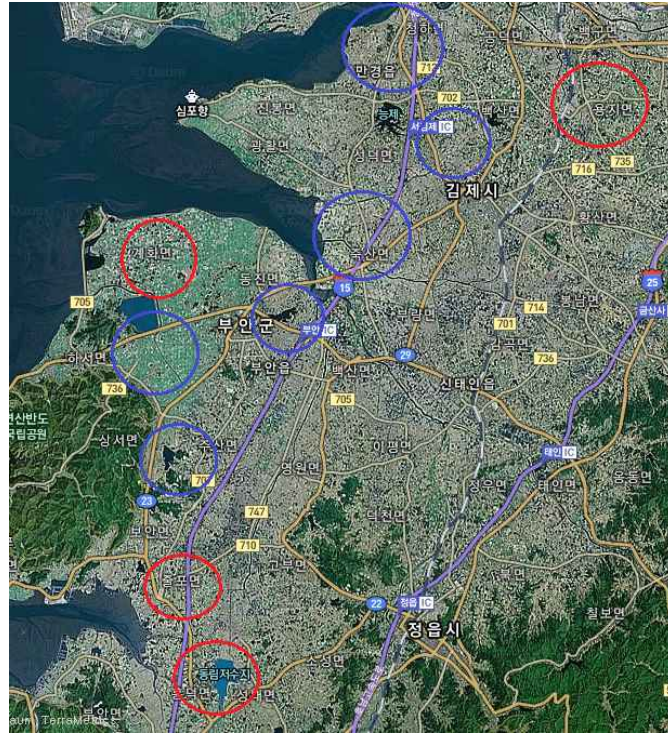


그림 8. 고창-김제 HPAI 발생 지역 및 시료 채취지역. ○,HPAI 발생지역; ○,시료 채취지역

(나) 전북 군산 : 만경강 및 금강 하구 철새도래지 (그림 9)

(다) 충남 서천 : 금강 하구 철새도래지 (그림 9)

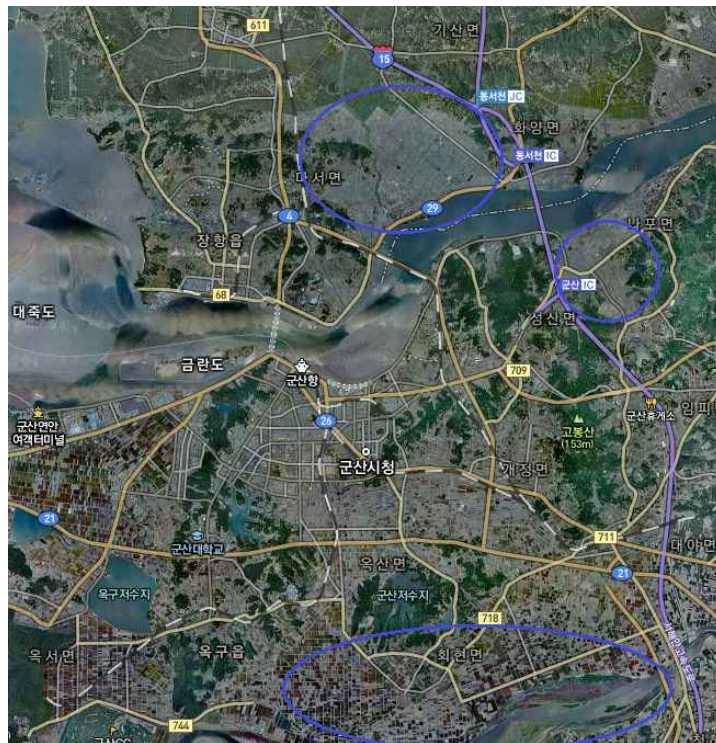


그림 9. 군산-서천 HPAI 발생 농장 근처 주요 철새도래지 및 시료 채취지역. ○,시료 채취지역

(라) 경기 화성 : 자안천, 대성저수지 (그림 10)



그림 10. 경기 화성 HPAI 발생 지역 및 시료 채취지역. ○,HPAI 발생지역; ○,시료 채취지역

(마) 충남 천안 : 풍세천, 성환천, 어룡저수지 (그림 11, 12)



그림 11. 충남 천안 HPAI 발생 지역 및 시료 채취지역. ○,HPAI 발생지역; ○,시료 채취지역

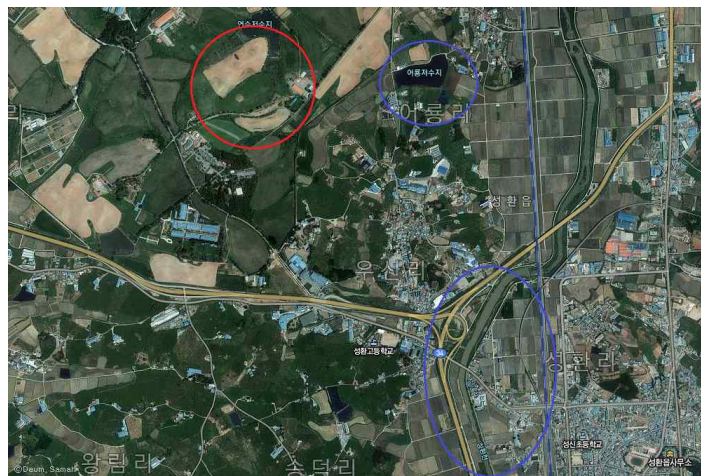


그림 12. 충남 천안 HPAI 발생 지역 및 시료 채취지역. ○,HPAI 발생지역; ○,시료 채취지역

(바) 전북 익산 : 금마저수지, 연동제, 왕국저수지, 원수저수지 (그림 13)

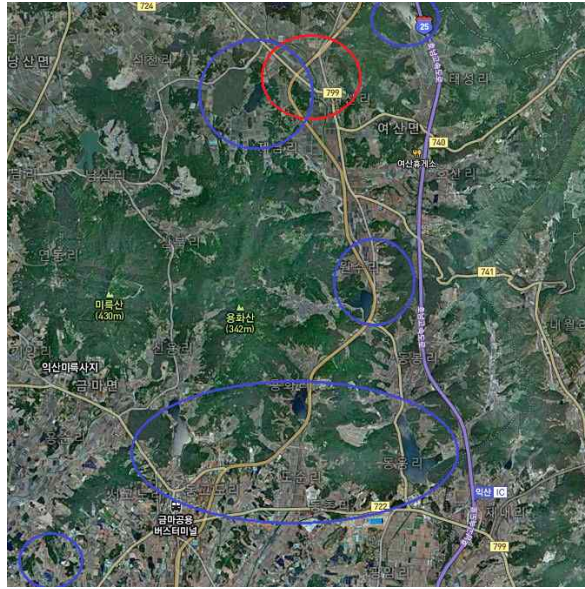


그림 13. 전북 익산-논산 HPAI 발생 지역 및 시료 채취지역. ○,HPAI 발생지역; ○,시료 채취지역

(사) 충북 음성 : 미호천 (그림 14)

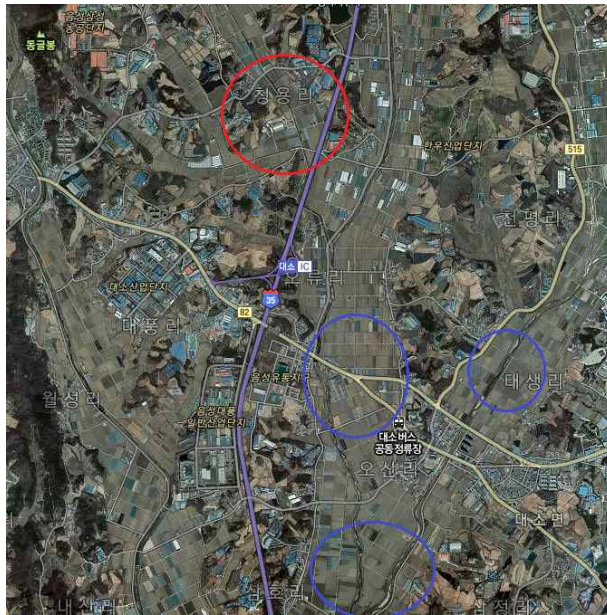


그림 14. 충북 음성 HPAI 발생 지역 및 시료 채취지역. ○,HPAI 발생지역; ○,시료 채취지역

다. 시료 채취

(1) 2014년 1월 22일부터 3월 10일까지 7개 지역, 13개소에서 야생조류 분변 305건, 저수지, 수원지 및 환경 샘플 11건 채취

(가) 야생조류 분변

① H5N8 HPAI 발생농장 주변의 논, 밭 및 저수지에 있는 야생조류 분변 채취

(나) 저수지 및 환경샘플

② H5N8 HPAI 발생농장 주변의 철새가 머무르는 저수지, 수원지 물 채취

라. AIV의 분리 및 혈청형 동정

(1) 바이러스 분리

(가) 채취한 시료로부터 유제액을 만든 다음 10일령의 SPF 종란에 접종하여 37℃에서 3일간 배양한 후, SPF 종란에서 장요막강액을 채취하여 1% 닭 적혈구와 반응시켜 조류인플루엔자 바이러스의 HA 항원에 의한 혈구응집 여부를 확인한 결과 천안 성환전에서 채취한 시료에서 4건이 양성으로 확인됨 (표 2)

(2) 바이러스의 혈청형 동정

(가) SPF 종란에서 채취한 장요막강액으로부터 RNA를 추출하여 모든 AIV를 검출할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 증폭된 유전자를 확인한 결과 4건 중 2건이 AIV 양성으로 확인됨. 추가 검사 결과 나머지 2건의 샘플은 paramyxovirus로 확인됨 (표 2)

(나) 분리된 2건의 AIV는 저병원성 AIV로 판명됨. H5/N8 혈청형 특이 프라이머를 이용한 PCR 결과, H5 혈청형은 아니며 N8 혈청형으로 확인됨. 유전자 분석 결과 두 바이러스 모두 H3N8으로 확인되었으며 N8 유전자의 경우 H5N8의 N8 유전자는 서로 간에 관련성이 낮은 것으로 분석됨 (표 2)

표 2. HPAI 발생지역 주변 및 환경에서의 H5N8형 바이러스 오염도.

구분		개소	HA test		RT-PCR ^a		혈청아형
			분변	환경	분변	환경	
경기	화성	1	0 / 50 ^b	-	-	-	-
충북	음성	1	0 / 41	0 / 2	-	-	-
충남	천안	3	4 / 88	0 / 5	2 / 4 ^d	-	B220:H3N8 ^c B231:H3N8
전북	서천	1	0 / 41	-	-	-	-
	김제	2	0 / 50	-	-	-	-
	군산	1	0 / 25	-	-	-	-
	익산	4	0 / 10	2 / 4	-	0 / 2 ^d	-
계		13	4 / 305	2 / 11	2 / 4	0 / 2	

^a HA test 검사 결과 양성으로 확인된 샘플에 대하여 모든 AIV를 검출할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행

^b 양성 샘플 수 / 검사 샘플 수

^c 시료 번호 : 혈청아형 (subtype)

^d PCR 음성 샘플은 paramyxovirus로 확인

(다) 익산 인근 저수지 4개소로부터 채취한 샘플에서 2건의 혈구응집 (HA) 검사 양성이 확인되었으나, 정밀검사 결과 paramyxovirus로 확인됨.

2. 야생조류에 대한 조류인플루엔자 병원성 관련 신규 분자표지 발굴

가. 조류 인플루엔자 바이러스의 CEK 및 DEK 증식성 비교

(1) H9N2 분리주들의 DEK 증식성 비교

(가) CEK와 DEK에서 증식성 차이를 보이는 바이러스 선별을 위해 2009년부터 2012년까지 분리된 저병원성 H9N2 바이러스의 DEK에서의 증식성을 확인함 (표 3 - 6).

(나) 2009년에 분리된 H9N2의 경우 31개의 분리주 중에서 5개 바이러스가 10^5 TCID₅₀/ml 이상의 증식성을 나타냄. 이 바이러스들은 닭에서 분리되었으나, DEK에서 높은 증식성을 나타냄. 또한 10개의 바이러스에서는 10^3 - 10^5 TCID₅₀/ml의 증식성을 나타내는 것으로 확인됨. 오리에서 분리된 바이러스의 경우 090209D를 제외하고는 모두 DEK에서 증식성이 낮은 것으로 확인됨 (표 3).

표 3. 2009년 분리된 H9N2 바이러스의 DEK에서의 증식성 결과.

Year	Virus	Source	TCID ₅₀ /ml (DEK)
2009	090129S	Chicken	1.00×10^6
	090207S	Chicken	1.00×10^6
	090209D	Duck	3.16×10^3
	090209S	Chicken	3.10×10^5
	090210S	Chicken	1.00×10^4
	090316S	Chicken	4.22×10^3
	090320S	Chicken	4.22×10^3
	090416S	Chicken	5.62×10^4
	090422-10S	Chicken	3.16×10^3
	090422-12S	Chicken	1.00×10^4
	090422-7S	Chicken	5.62×10^3
	090422-8S	Chicken	$< 10^2$
	090422-9	Chicken	1.00×10^7
	091010S	Chicken	3.16×10^5
	091027S-3C	Chicken	$< 10^2$
	091027S-3D	Duck	$< 10^2$
	091027S-4C	Chicken	$< 10^2$
	091027S-4D	Duck	$< 10^2$
	091029S	Chicken	$< 10^2$
	091112S-20C	Chicken	$< 10^2$
	091112S-40C	Chicken	$< 10^2$
	091112S-41C	Chicken	$< 10^2$
	091112S-42C	Chicken	$< 10^2$
	091124S-44C	Chicken	$< 10^2$
	091126S-24C	Chicken	$< 10^2$
	091126S-24D	Duck	$< 10^2$
	091126S-27D	Duck	$< 10^2$
	091126S-30C	Chicken	$< 10^2$
	091126S-31D	Duck	$< 10^2$
	091127S-49	Chicken	3.16×10^3
	091127S-50	Chicken	1.00×10^3

(다) 2010년도 분리주의 경우 방사사육 농장에서 분리된 BC96을 제외하고는 10^2 - 10^5 TCID₅₀/ml의 증식성을 나타냄. 2009년도 분리주와 비교 시 10^5 TCID₅₀/ml 이상의 증식성을 나타내는 바이러스는 확인되지 않았음 (표 4).

표 4. 2010년 분리된 H9N2 바이러스의 DEK에서의 증식성 결과.

Year	Virus	Source	TCID ₅₀ /ml (DEK)
2010	BC96	Chicken	$< 10^2$
	SL10006	Pigeon	5.62×10^2
	SL10015	Mallard	3.16×10^3
	SL10016	Mallard	3.16×10^3
	SL10022	Chicken	5.62×10^4
	SL10026	Chicken	5.62×10^2

(라) 2009년 분리주와 달리 2010년, 2011년 가금농장에서 분리된 BC96, SNU11058의 경우 DEK에서의 증식성이 매우 낮은 것으로 확인됨. 재래시장에서 분리된 바이러스의 경우 DEK에서 증식이 안 되거나 증식성이 낮은 것으로 확인됨. 오리에서 분리된 바이러스 역시 DEK에서의 증식성이 낮은 것으로 확인됨 (표 5).

표 5. 2011년 분리된 H9N2 바이러스의 DEK에서의 증식성 결과.

Year	Virus	Source	TCID ₅₀ /ml (DEK)
2011	SNU11058	Chicken	$< 10^2$
	SL11033	Chicken	1.78×10^4
	SL11035	Duck	$< 10^2$
	SL11038	Chicken	$< 10^2$
	SL11043	Chicken	1.00×10^3
	SL11051	Chicken	$< 10^2$
	SL11053	Chicken	$< 10^2$
	SL11055	Chicken	$< 10^2$
	SL11057	Chicken	$< 10^2$
	SL11063	Chicken	1.78×10^4
	SL11065	Chicken	3.16×10^3
	SL11067	Chicken	1.00×10^4
	SL11080	Chicken	1.78×10^2
	SL11081	Chicken	$< 10^2$
	SL11082	Chicken	$< 10^2$
	SL11083	Duck	$< 10^2$
	SL11084	Chicken	1.78×10^3
	SL11086	Duck	1.00×10^3
	SL11094	Chicken	5.62×10^3

(마) 2012년 분리주의 경우 2009-2011년 분리주에 비해 전반적으로 DEK에서 낮은 증식성을 나타내는 것으로 확인됨 (표 6).

표 6. 2012년 분리된 H9N2 바이러스의 DEK에서의 증식성 결과.

Year	Virus	Source	TCID ₅₀ /ml (DEK)
2012	SL12001	Chicken	< 10 ²
	SL12002	Duck	< 10 ²
	SL12003	Duck	< 10 ²
	SL12004	Duck	< 10 ²
	SL12005	Duck	< 10 ²
	SL12009	Goose	< 10 ²
	SL12010	Chicken	5.62 × 10 ³
	SL12011	Duck	1.78 × 10 ³
	SL12012	Duck	3.16 × 10 ³
	SL12013	Chicken	< 10 ²
	SL12014	Chicken	< 10 ²
	SL12015	Duck	1.00 × 10 ³
	SL12016	Duck	< 10 ²
	SL12017	Duck	3.16 × 10 ³
	SL12018	Duck	1.78 × 10 ²
	SL12034	Duck	< 10 ²
	SL12038	Chicken	< 10 ²
	SL12053	Chicken	< 10 ²
	SL12059	Duck	1.78 × 10 ²
	SL12060	Chicken	< 10 ²
	SL12061	Chicken	< 10 ²
	SL12062	Chicken	< 10 ²
	SL12063	Chicken	< 10 ²
	SL12064	Chicken	< 10 ²
	SL12065	Chicken	1.78 × 10 ²
	SL12067	Chicken	< 10 ²
	SL12068	Duck	< 10 ²
	SL12070	Chicken	< 10 ²
	SL12125	Chicken	< 10 ²
	SL12133	Chicken	< 10 ²
SL12141	Duck	< 10 ²	

(2) 조류 인플루엔자 바이러스의 CEK 및 DEK 증식성 비교

(가) DEK에서의 증식성 실험 결과를 토대로 DEK 저증식성/고증식성을 보이는 바이러스를 선별함.

(나) 선별한 바이러스에 대해 CEK / DEK에서의 증식성을 동시에 측정하여 증식성을 비교함 (표 7).

표 7. H9N2 분리주들의 계태아신장세포 (CEK) 및 압태아신장세포 (DEK) 증식성 비교 결과.

H9N2	Virus titre (TCID ₅₀ /ml)				분류
	CEK 37℃	CEK 32℃	DEK 37℃	DEK 32℃	
090316S	1.70×10 ⁵	1.70×10 ⁴	4.22×10 ³	<10 ²	DEK저증식성
090320	1.70×10 ⁷	4.64×10 ⁶	4.22×10 ³	<10 ²	DEK저증식성
090422-9	3.16×10 ⁶	4.64×10 ⁵	1.0×10 ⁷	2.15×10 ⁵	DEK고증식성
090207S	4.64×10 ⁷	3.16×10 ⁷	1.0×10 ⁶	4.64×10 ⁵	CEK고증식성
091010S	3.16×10 ⁷	4.64×10 ⁵	3.16×10 ⁵	3.16×10 ⁵	CEK증식성
090209S	1.0×10 ⁶	4.64×10 ⁴	3.10×10 ⁵	1.0×10 ⁵	-

(다) CEK/DEK 증식성 비교를 통해 각각의 바이러스를 CEK 증식성, CEK 고증식성, DEK 저증식성, DEK 고증식성 바이러스로 분류하였음.

(라) 090320의 경우 CEK에서는 높은 증식성 (1.70×10⁷ TCID₅₀/ml)을 나타내지만 DEK에서 증식할 경우 1,000배가량 증식성의 저하 (4.22×10³ TCID₅₀/ml)가 나타나므로 DEK 저증식성 바이러스로 분류함.

(마) 090422-9의 경우 같이 비교한 바이러스들에 비해 CEK에서의 증식성이 낮지만 (3.16×10⁶ TCID₅₀/ml), DEK에서 높은 증식성 (1.0×10⁷ TCID₅₀/ml)을 나타내므로 DEK 고증식성 바이러스로 분류함.

(바) 090207S, 091010S는 CEK (각각 4.64×10⁷ TCID₅₀/ml, 3.16×10⁷ TCID₅₀/ml)와 DEK (각각 1.0×10⁶ TCID₅₀/ml, 3.16×10⁵ TCID₅₀/ml)의 증식성을 보여 CEK 고증식성 바이러스로 분류함

나. DEK 저증식성 및 증식성 저병원성, 증식성 고병원성 바이러스 유전자 분석

(1) 선별된 바이러스의 내부 유전자 아미노산 비교

(가) 증식성에 따라 CEK 고증식성, DEK 고증식성, DEK 저증식성 바이러스들로 분류한 바이러스들의 전체 유전자를 분석하여 서로 다른 아미노산 선정 (PB2, PB1, PA, M & NS)

(나) 유전자 분석 결과 PB2 유전자에서 1개, PB1 유전자에서 4개, PA 유전자에서 5개, M과 NS 유전자에서 각각 2개씩 총 14개의 아미노산 차이를 확인함 (표 8).

(다) 기존에 특성이 확인된 인플루엔자 바이러스 A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1; PR8), A/chicken/Korea/01310/2011 (H9N2; 01310), A/chicken/Korea/KBNP-0028/2000 (H9N2; 0028)과 비교해본 결과 14개의 아미노산 중 PB2 79번 아미노산, PB1 198번 아미노산, PA 216번 아미노산은 DEK 고증식성 바이러스인 090422-9에 특이적으로 나타나는 아미노산으로 확인됨 (표 8).

표 8. 선별된 바이러스의 내부 유전자 아미노산 비교 결과.

Segment	Location of amino acid	PR8	01310	0028	090422-9 (DEK 고증식성)	090320 (DEK 저증식성)	090316S (DEK 저증식성)
PB2	79	S	S	S	N	S	S
PB1	164	I	I	I	I	M	M
	198	K	K	K	R	K	K
	211	R	R	R	R	K	K
	317	M	M	M	M	V	V
PA	216	D	D	D	N	D	D
	269	R	R	R	R	K	K
	308	I	V	I	I	V	V
	497	K	K	K	K	R	R
M	545	I	I	I	I	V	V
	144	F	F	F	F	L	L
NS	167	T	T	T	T	S	S
	84	V	V	V	V	I	I
	176	N	N	N	N	I	I

(라) 나머지 11개의 아미노산의 경우 DEK 저증식성 바이러스와는 차이를 보이지만 기존의 바이러스와는 같은 아미노산을 가지는 것으로 확인됨.

(2) 국내 분리 HPAI 바이러스와 내부 유전자 아미노산 비교

(가) 확인된 아미노산 분자 표지가 국내에서 분리된 HPAI 바이러스의 내부 유전자와 어떠한 차이를 보이는지 분석을 진행함.

(나) 분석 결과 위의 유전자 비교결과와 마찬가지로 3개의 유전자에서 DEK 고증식성 바이러스 특이적인 아미노산이 확인 되었으며, 11개의 아미노산의 경우 기존의 바이러스와 같은 아미노산 서열을 가지는 것으로 확인됨 (표 9).

(다) 2003/2004 국내 분리 H5N1 바이러스 (1차 HPAI, clade 2.5)와 2006/2007 (2차 HPAI, clade 2.2), 2008 (3차 HPAI, clade 2.3.2), 2010/2011 (4차 HPAI, clade 2.3.2) 국내 분리 H5N1 바이러스, 2014 (5차 HPAI, clade 2.4) 유전자를 비교하여 서로 다른 아미노산 선정 후 후보 분자표지 확정.

표 9. DEK 고증식성 바이러스와 국내 분리 HPAI 바이러스 내부 유전자 아미노산 비교 결과.

Segment	Amino acid residue	PR8	01310	0028	090422-9 (DEK 고증식성)	090320 (DEK 저증식성)	090316S (DEK 저증식성)	2003/2004 HPAI	2006/2007 HPAI	2008 HPAI	2010/2011 HPAI	2014 HPAI
PB2	79	S	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S
PB1	164	I	I	I	I	M	M	I	I	I	I	I
	198	K	K	K	R	K	K	K	K	K	K	K
	211	R	R	R	R	K	K	R	R	R	R	R
	317	M	M	M	M	V	V	M	M	M	M	M/I
PA	216	D	D	D	N	D	D	D	D	D	D	D
	269	R	R	R	R	K	K	R	R	R	R	R
	308	I	V	I	I	V	V	I	I	I	I	I
	497	K	K	K	K	R	R	K	K	K	K	K
	545	I	I	I	I	V	V	I	I	I	I	I
M	144	F	F	F	F	L	L	F	F	F	F	F
	167	T	T	T	T	S	S	T	T	T	T	T
NS1	84	V	V	V	V	I	I	-	-	-	-	V
	176	N	N	N	N	I	I	N	N	N	N	N

3. PR8 재조합 바이러스를 이용한 야생조류 병원성 인자 발굴

가. PR8 virus 오리, 닭 신장 세포에서의 증식성 비교

(1) 사람 인플루엔자 바이러스의 재조합 백신의 backbone으로 주로 사용되는 PR8 바이러스의 오리, 닭 신장 세포에서의 증식성을 비교함으로써 야생조류에서의 조류 인플루엔자 바이러스 병원성 인자를 발굴하고자 함.

표 10. PR8 바이러스의 CEK, DEK에서의 증식성.

	DEK	CEK
A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	5.9 ± 0.55 ^a	7.25 ± 0.48

^a Log₁₀ (TCID₅₀/0.1ml)

(2) PR8 바이러스는 CEK에서 높은 수준으로 증식할 수 있음을 확인하였으며, DEK에서는 CEK에서의 증식성에 비해 낮지만 높은 수준의 증식성을 가짐 (표 10).

나. Subtype 차이에 따른 인플루엔자 바이러스 증식성 비교

(1) 이전 연구를 통하여 닭에서 유행하는 H9N2 조류인플루엔자 바이러스의 CEK, DEK에서의 증식성 차이를 비교하였으며 대부분의 H9N2 조류인플루엔자 바이러스는 DEK에서 원활하게 증식하지 못함을 확인함. 따라서 H9N2 조류인플루엔자 외에 야생조류 및 닭에서 유행하는 다양한 subtype의 조류인플루엔자 바이러스의 CEK, DEK에서의 증식성을 비교하여 상대적인 증식성 차이를 비교함 (표 11).

표 11. 조류인플루엔자 바이러스의 CEK, DEK에서의 증식성 비교.

	DEK	CEK
01310 (H9N2) E4	1.50 ± 0.00 ^a	4.75 ± 0.25
01310 (H9N2) E22	2.96 ± 0.56	6.50 ± 0.35
0028 (H9N2)	2.50 ± 0.00	7.29 ± 0.33
SNU50-5 (H5N1)	4.42 ± 0.14	6.00 ± 0.25
J83 (H7)	3.50 ± 0.00	5.50 ± 0.25
F187 (H6N2)	< 1.5	< 1.5
O50 (H4)	3.67 ± 0.14	5.58 ± 0.14
B222 (H3N8)	2.50 ± 0.00	3.75 ± 0.43
B231 (H3N8)	2.50 ± 0.00	5.00 ± 0.25
M10 (H9N2)	< 1.5	3.50 ± 0.00

^a Log₁₀ (TCID₅₀/0.1ml)

(2) 각각의 조류인플루엔자 바이러스 별로 CEK, DEK에서의 증식성에 큰 차이가 있음을 확인함. 이는 (가) DEK 저증식성/CEK 고증식성, (나) DEK 고증식성/CEK 고증식성 (다) DEK 저증식성/CEK 저증식성 바이러스로 크게 분류할 수 있음.

(가) DEK 저증식성/CEK 고증식성 바이러스: 01310 (H9N2), 0028 (H9N2), SNU50-5 (H5N1 LPAIV), J83 (H7), O50 (H4), B231 (H3N8)

(나) DEK 고증식성/CEK 고증식성 바이러스: PR8 (H1N1)

(다) DEK 저증식성/CEK 저증식성 바이러스: F187 (H6N2), B222 (H3N8), M10 (H9N2)

(3) H9N2 조류인플루엔자 바이러스뿐만 아니라 대부분의 subtype의 조류인플루엔자 바이러스는 DEK에서 상대적으로 증식성이 감소하는 것을 확인함. 이는 자연숙주인 야생조류에서는 조류인플루엔자 바이러스의 증식이 억제됨으로써 CEK 대비 낮은 증식성을 가질 것으로 생각됨. 조류인플루엔자 바이러스 감염에 따른 분비, 발현되는 다양한 인자에 대한 연구도 진행할 예정임.

(4) 오리, 닭에서의 상대적인 증식성 차이를 비교하고자 CEK 대비 DEK에서의 증식성을 비교함 (그림 15).

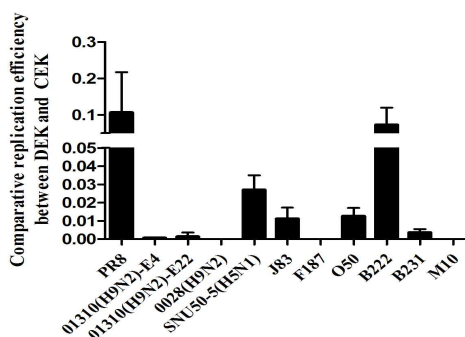


그림 15. 조류인플루엔자 바이러스의 CEK 대비 DEK 증식성 비교.

(5) PR8 바이러스의 경우 CEK에서 높은 증식성을 보유하였으며, DEK에서는 CEK에 비하여 10배 정도 낮은 증식성을 확인함. B222 (H3N8) 바이러스의 경우 PR8 바이러스와 비슷한 DEK/CEK 증식성의 차이가 관찰되나, CEK와 DEK에서 모두 낮은 증식성이 관찰되어 조류에서 낮은 증식성을 나타내는 것으로 확인함. 그 외의 조류인플루엔자 바이러스에서는 CEK 대비 DEK에서 증식성이 억제가 확연하게 관찰됨.

(6) PR8 바이러스의 경우 CEK, DEK에서 다른 바이러스 대비 상대적으로 높은 증식성을 보유하고 있는 것을 확인함. 역유전학 시스템을 이용하여 PR8 바이러스를 backbone으로 오리에서 증식성이 억제되는 바이러스의 유전자를 가지는 재조합 바이러스를 제작 및 평가하여 조류인플루엔자 바이러스의 야생조류에서의 증식성 관련 인자를 찾고자 함.

다. HA, NA 유전자 내 야생조류 증식성 관련 인자 발굴

- (1) 고병원성 H5N1 인플루엔자 바이러스는 닭에서는 높은 병원성을 가지고 있는 것에 반해 오리 및 야생조류에서는 약한 병원성 또는 무증상 감염이 경우가 대부분임.
- (2) 과거의 연구를 통하여 고병원성 H5N1 바이러스의 경우 다른 subtype의 인플루엔자 바이러스와 비교할 때 숙주에서 다른 반응을 나타내며, 이는 H5N1 바이러스의 병원성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있음 (Kenrie at al., Scientific reports, 2016; Suresh et al., Veterinary Research, 2014).
- (3) 이러한 숙주반응의 차이가 오리에서의 증식성에 영향을 미칠 것으로 예상하여, DEK 저증식성/CEK 고증식성을 나타내는 SNU50-5의 HA, NA 유전자를 삽입한 재조합 바이러스를 합성하여 CEK, DEK에서의 증식성을 비교함 (표 12).

표 12. HA, NA 치환 재조합 바이러스 제작.

	Recombinant virus	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
1	SNU(50-5)	SNU 50-5	SNU 50-5	SNU 50-5	SNU 50-5	SNU 50-5	SNU 50-5	SNU 50-5	SNU 50-5
2	HN(50-5)	PR8	PR8	PR8	SNU 50-5	PR8	SNU 50-5	PR8	PR8

- (4) 새로 제작된 재조합 바이러스는 SPF 종란, MDCK 세포를 이용하여 바이러스의 역가를 측정함. 또한 CEK, DEK에 접종하여 세포에서의 증식성을 평가함 (표 13).
- (5) PR8 바이러스의 내부 유전자를 가지며 HA, NA 유전자를 SNU50-5로 치환한 HN(50-5) 바이러스는 SNU(50-5)에 비해 DEK에서의 증식성이 10배 가까이 낮아짐을 확인할 수 있음 (표 13).

표 13. HA, NA 치환 재조합 바이러스의 증식성 비교.

	EID ₅₀	TCID ₅₀ (MDCK)	TCID ₅₀ (DEK)	TCID ₅₀ (CEK)
PR8	8.52 ± 0.23 ^a	5.67 ± 0.07 ^b	5.91 ± 0.55 ^b	7.25 ± 0.48 ^b
SNU(50-5)	nt	5.63 ± 0.13	4.42 ± 0.14	6.00 ± 0.25
HN(50-5)	7.03 ± 0.40	5.04 ± 0.07	3.46 ± 0.10	5.92 ± 0.44

^a Log₁₀ (EID₅₀/0.1ml)

^b Log₁₀ (TCID₅₀/0.1ml)

nt, not tested.

(6) HA/NA 재조합 바이러스의 DEK/CEK 상대증식성을 비교함 (그림 16). HA, NA 유전자를 치환한 HN(50-5) 바이러스는 PR8 대비 DEK/CEK 증식성 비율이 유의적으로 감소함 $p < 0.05$. 이는 HA, NA 유전자를 치환한 것만으로도 오리세포에서의 증식성을 확연하게 감소시킬 수 있음을 의미함. 인플루엔자 바이러스의 HA, NA 유전자 변이에 따른 오리에서의 증식성, 병원성 변화에 대한 추가적인 연구가 필요함.

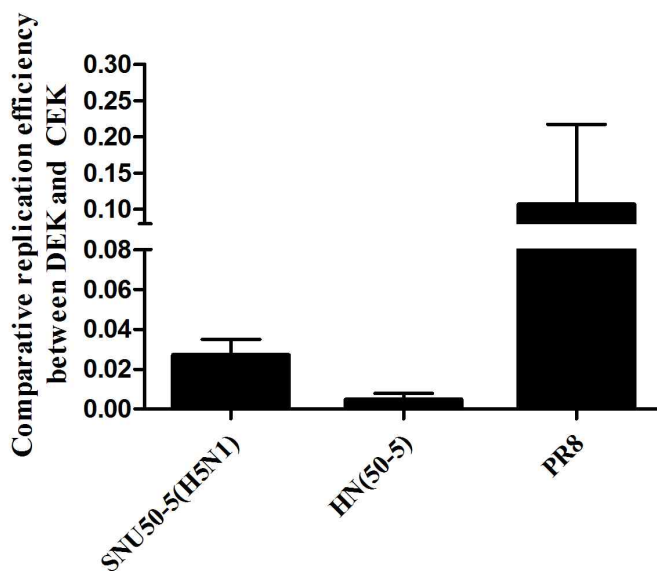


그림 16. HA/NA 재조합 바이러스의 CEK 대비 DEK 증식성 비교.

라. PB2 유전자 내 야생조류 증식성 관련 인자 발굴

(1) PB2 유전자에 의한 CEK, DEK 증식성 변화 비교

(가) DEK 저증식성/CEK 고증식성 바이러스인 0028, 01310 바이러스의 PB2 유전자를 PR8 바이러스에 재조합하는 7+1 reassortant 바이러스를 제작함 (표 14).

표 14. PB2 유전자 재조합 바이러스 제작.

	Recombinant virus	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
1	rPR8-PB2(0028)	0028	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8
2	rPR8-PB2(00310)	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8

(나) 제작된 재조합 바이러스의 CEK, DEK에서의 증식성을 비교함으로써 PB2 유전자가 DEK에서의 증식성에 미치는 영향을 확인함.

(다) 0028 바이러스의 PB2 유전자를 치환한 재조합 바이러스 [rPR8-PB2(0028)]은 DEK에서의 증식성이 유의적으로 감소함 ($p < 0.05$). 01310 바이러스의 PB2 유전자를 치환한 재조합 바이러스 [rPR8-PB2(01310)]은 숙주에 상관없이 높은 증식성을 나타냄 (표 15).

표 15. PB2 치환 재조합 바이러스의 CEK, DEK에서의 증식성.

	DEK	CEK
PR8	5.91 ± 0.55 ^a	7.25 ± 0.48
rPR8-PB2(0028)	3.80 ± 0.41	5.40 ± 0.14
rPR8-PB2(01310)	6.08 ± 0.28	6.91 ± 0.21

^a Log₁₀ (TCID₅₀/0.1ml)

(라) rPR8-PB2(0028)는 DEK/CEK 상대증식성이 유의미하게 감소함을 확인할 수 있음. 이는 0028 PB2 유전자에 인플루엔자 바이러스의 오리에서의 증식을 억제하는 특성이 있음을 의미함. 01310 바이러스의 PB2 유전자는 CEK, DEK에서 모두 높은 증식성을 유지하고 있음 (그림 17).

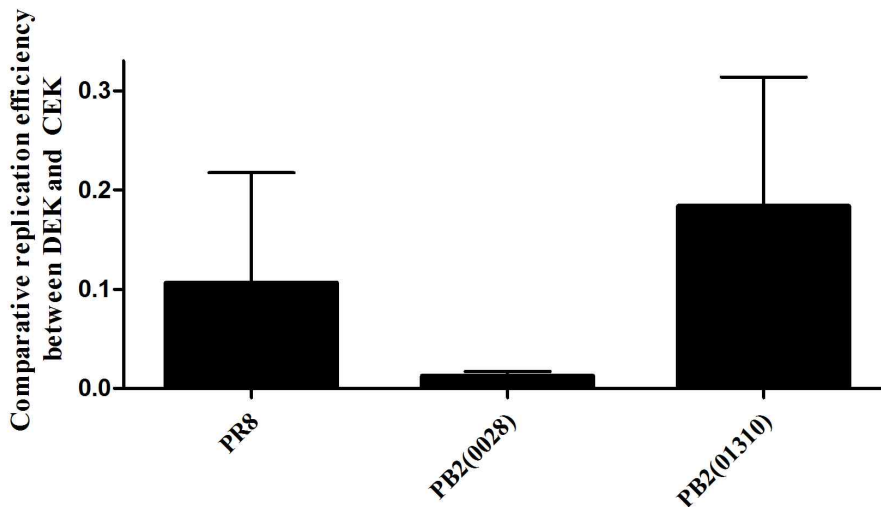


그림 17. PB2 재조합 바이러스의 CEK 대비 DEK 증식성 비교.

(2) PB2 유전자 돌연변이에 의한 CEK, DEK 증식성 변화 비교

(가) 01310의 PB2 유전자의 특정 아미노산을 0028, PR8 바이러스의 PB2 유전자와 비교한 후, 각 아미노산을 치환한 돌연변이 바이러스를 제작하여 오리에서의 증식성에 영향을 미치는 PB2 유전자 내 아미노산을 찾고자 함 (표 18).

표 18. PR8을 기반으로 한 01310 PB2 유전자 돌연변이 재조합 바이러스 제작.

Virus	Amino residues of PB2				
	66	109	133	627	674
A/Puerto rico/8/1934	M	V	V	K	T
A/chicken/Korea/KBNP-0028/2000	M	V	V	E	G
A/chicken/Korea/01310/2001	I	I	I	E	A
MS1	M	I	V	E	A
MS2	M	V	V	E	A
MS3	M	V	V	K	A
MS4	M	V	V	E	T
MS5	M	V	V	K	T

(나) 제작된 PB2 돌연변이 재조합 바이러스를 각각 CEK, DEK에 접종한 후 증식성을 비교 평가함 (표 19).

표 19. PB2 돌연변이 재조합 PR8 바이러스의 계태아, MDCK, CEK 및 DEK에서의 증식성.

	EID ₅₀	TCID ₅₀ (MDCK)	TCID ₅₀ (DEK)	TCID ₅₀ (CEK)
PR8	8.52 ± 0.23 ^a	5.67 ± 0.07 ^b	5.91 ± 0.55 ^b	7.25 ± 0.48 ^b
rPR8-PB2(01310)	8.73 ± 0.25	2.75 ± 0.00	6.08 ± 0.28	6.91 ± 0.21
MS1	8.70 ± 0.43	4.17 ± 0.14	5.75 ± 0.25	7.33 ± 0.14
MS2	8.77 ± 0.42	3.95 ± 0.19	5.58 ± 0.14	8.00 ± 0.25
MS3	8.57 ± 0.23	5.79 ± 0.19	5.00 ± 0.66	7.67 ± 0.63
MS4	8.37 ± 0.23	3.88 ± 0.13	5.42 ± 0.14	7.33 ± 0.38
MS5	8.22 ± 0.23	5.63 ± 0.13	5.33 ± 0.14	7.41 ± 0.29

^a Log₁₀ (EID₅₀/0.1ml)

^b Log₁₀ (TCID₅₀/0.1ml)

(다) PB2 돌연변이 재조합 바이러스는 rPR8-PB2(01310)에 비해 CEK에서의 증식성이 증가하는 것으로 나타남. 반면 DEK에서의 증식성은 MS3에서 10배 이상 감소하는 것으로 나타남 (표 19). 또한 MS 바이러스 모두 MDCK에서의 증식성이 rPR8-PB2(01310)보다 10배 - 1,000배 이상 증가하는 것을 확인함.

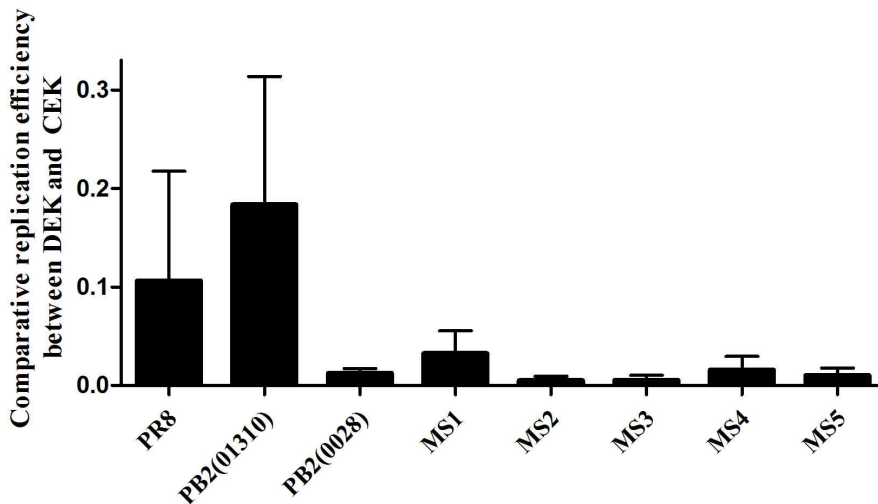


그림 18. PB2 돌연변이 재조합 바이러스의 DEK/CEK 상대증식성 비교.

(라) PB2 돌연변이 재조합 바이러스의 CEK 대비 DEK에서의 증식성이 rPR8-PB2(01310)와 비교 시 유의적으로 감소하여 rPR8-PB2(0028)와 비슷한 수준으로 떨어지는 것으로 나타남 (그림 18). MS1 바이러스와 MS2 바이러스를 비교하면, 109V 돌연변이가 추가되었을 때 상대적인 증식성이 더 떨어지는 것을 볼 수 있으며 이는 66M, 109V, 133V 아미노산 변이가 인플루엔자 바이러스의 오리 세포 증식성에 synergistic하게 작용함을 확인할 수 있음.

(3) 증식성 관련 PB2 유전 인자 변이에 따른 CEK, DEK 증식성 변화 비교

(가) 인플루엔자 바이러스의 PB2 유전자는 바이러스의 숙주 특이성에 가장 중요하게 작용하는 유전자로 알려져 있으며, 특히 E627K 와 같은 돌연변이는 단일 아미노산 변이만으로도 인플루엔자 바이러스의 포유류 세포에서의 증식성을 증가시키며, 그로 인해 바이러스의 포유류 병원성을 증가시킴.

(나) 대부분의 포유류 병원성 인자는 인플루엔자 바이러스의 증식성에 영향을 미치며, 만약 각각의 인자들이 모든 숙주에서의 바이러스 증식성에 영향을 미치는 인자라면 이 병원성 인자들은 오리에서의 증식성에도 영향을 미칠 것으로 기대됨. 이에 따라 알려진 포유류 병원성 인자를 가지는 PB2 재조합 바이러스를 합성함 (표 20).

표 20. 포유류 병원성 인자를 가지는 PB2 돌연변이 재조합 바이러스 제작.

바이러스	01310	병원성 인자
rPR8-PB2(01310)-701N	D	N
rPR8-PB2(01310)-627K	E	K
rPR8-PB2(01310)-591K	Q	K
rPR8-PB2(01310)-591R	Q	R
rPR8-PB2(01310)-588I	A	I
rPR8-PB2(01310)-526R	K	R
rPR8-PB2(01310)-271A	T	A
rPR8-PB2(01310)-253N	D	N
rPR8-PB2(01310)-192K	E	K
rPR8-PB2(01310)-158G	E	G

표 21. 포유류 병원성 인자를 가지는 PB2 돌연변이 재조합 바이러스의 CEK, DEK에서의 증식성.

Virus	DEK	CEK
PR8	5.91 ± 0.55 ^a	7.25 ± 0.48
rPR8-PB2(01310)	6.08 ± 0.28	6.91 ± 0.21
rPR8-PB2(01310)-158G	5.92 ± 0.30	5.75 ± 0.16
rPR8-PB2(01310)-192K	6.58 ± 0.30	6.79 ± 0.19
rPR8-PB2(01310)-253N	5.46 ± 0.37	5.50 ± 0.00
rPR8-PB2(01310)-271A	6.63 ± 0.26	7.42 ± 0.40
rPR8-PB2(01310)-526R	5.96 ± 0.53	6.83 ± 0.20
rPR8-PB2(01310)-588I	6.71 ± 0.19	7.08 ± 0.34
rPR8-PB2(01310)-591R	5.92 ± 0.20	5.79 ± 0.33
rPR8-PB2(01310)-591K	6.08 ± 0.30	6.54 ± 0.25
rPR8-PB2(01310)-627K	5.58 ± 0.83	5.29 ± 0.90
rPR8-PB2(01310)-701N	6.38 ± 0.34	6.71 ± 0.29

^a Log₁₀ (TCID₅₀/0.1ml)

(다) 포유류 병원성 인자를 가지는 PB2 돌연변이 재조합 바이러스를 각각 CEK, DEK에 접종한 후 증식성을 비교 평가함.

(라) 포유류 병원성 인자를 가지는 돌연변이 바이러스는 DEK, CEK에서 증식을 잘 하는 것을 확인할 수 있음 (표 21).

(마) 포유류 병원성 인자 돌연변이 바이러스는 대조군 바이러스인 PB2(01310) 바이러스 보다 월등히 높은 오리/닭 세포 증식성을 보임. 즉 PB2 유전자 내의 포유류 병원성 인자들은 인플루엔자 바이러스의 닭 세포 대비 오리 세포에서의 증식성을 월등하게 증가시키며 이는 현재 알려져 있는 포유류 병원성 인자는 오리 세포에서의 증식성 및 병원성에도 영향을 미칠 수 있음을 의미함.

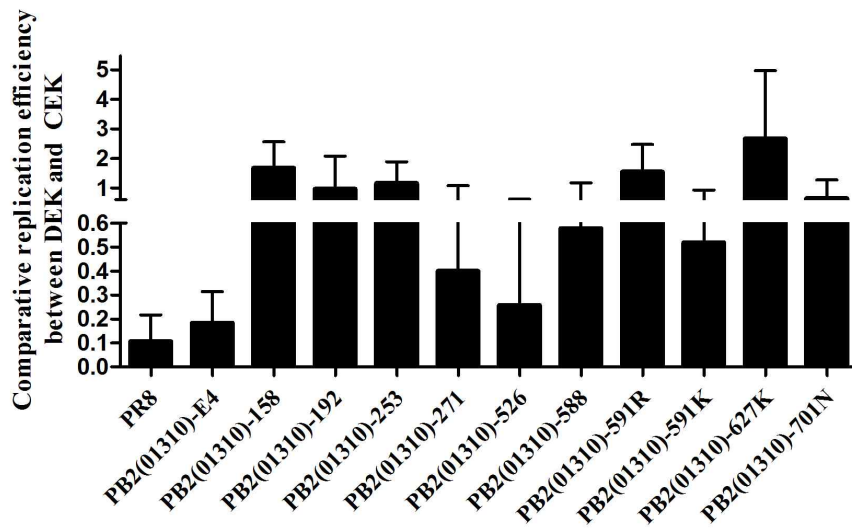


그림19 . 포유류 병원성 인자 돌연변이 PB2 재조합 바이러스의 오리/닭 세포 증식성 비교.

마. PB1 유전자 내 야생조류 증식성 관련 인자 발굴

(1) PB1 유전자에 의한 CEK, DEK 증식성 변화 비교

(가) DEK에서의 상대적인 증식성 감소가 관찰된 0028, 01310 바이러스의 PB1 유전자를 이용한 재조합 PR8 바이러스를 제작하였음 (표 22).

표 22. PB1 유전자 재조합 바이러스 제작.

	Recombinant virus	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
1	rPR8-PB1(0028)	PR8	0028	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8
2	rPR8-PB1(00310)	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8

(나) 제작된 각각의 재조합 바이러스를 CEK, DEK에 접종한 후 증식성을 비교 평가함.

표 23. PB1 유전자 재조합 PR8 바이러스의 CEK, DEK 증식성 비교.

	DEK ^a	CEK
PR8	5.91 ± 0.55	7.25 ± 0.48
rPR8-PB1(0028)	3.58 ± 0.73	5.75 ± 0.50
rPR8-PB1(01310)	1.88 ± 0.18	4.08 ± 0.29

^a Log₁₀ (TCID₅₀/0.1ml)

(다) PR8의 PB1 유전자를 0028, 01310의 PB1 유전자로 치환하였을 때, CEK와 DEK 모두 유의적으로 증식성이 감소하였으며, 특히 rPR8-PB1(01310)의 경우 DEK에서의 증식성이 10,000배 이상 감소하는 것으로 나타남 (표 23).

(라) 0028, 01310 바이러스의 PB1 유전자로 치환할 경우 PR8 바이러스의 PB1 유전자 대비 DEK/CEK 상대증식성의 감소를 보임. 즉 01310, 0028 바이러스 내의 특정 인자로 인하여 인플루엔자 바이러스의 DEK 증식성을 감소시키는 것으로 생각됨.

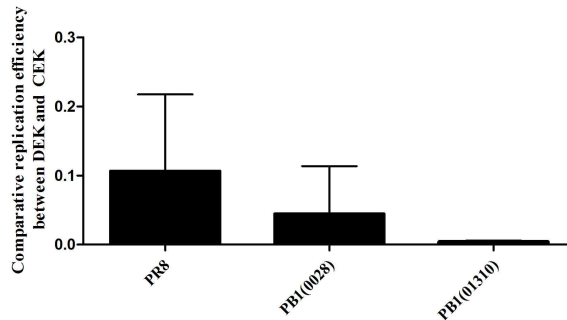


그림 20. PB1 유전자 재조합 바이러스의 DEK/CEK 상대증식성 비교.

(2) PB1 유전자 돌연변이에 의한 CEK, DEK 증식성 변화 비교

(가) PB1 유전자 중 DEK 증식성 관련 인자를 찾기 위하여 0028 PB1 유전자를 PR8 바이러스의 PB1 유전자와 비교함으로써 후보 아미노산을 특정함. 후보 아미노산을 변이시킨 돌연변이 바이러스를 제작함으로써 DEK 증식성 관련 인자를 찾고자 함 (표 24).

표 24. PB1 유전자 돌연변이 재조합 바이러스 제작.

	Amino acid residue	Recombinant virus
1	3	rPR8-PB1(0028)-V3I
2	6	rPR8-PB1(0028)-T6I
3	172	rPR8-PB1(0028)-E172G
4	179	rPR8-PB1(0028)-M179V
5	581	rPR8-PB1(0028)-E581V
6	740	rPR8-PB1(0028)-F740L

(나) 제작된 PB1 돌연변이 재조합 바이러스를 각각 CEK, DEK에 접종한 후 증식성을 비교 평가함.

(다) PB1 내의 아미노산들은 E581V, F740L 돌연변이를 제외하고는 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않음 (그림 21). E581V, F740L 돌연변이의 경우 DEK/CEK 상대증식성을 증가시켰으나, 이는 CEK 증식성 감소에 따른 결과임 (표 25). E581V, F740L 돌연변이 인자는 DEK에서의 증식성보다 CEK에서의 증식성을 감소시키는 인자로서 작용할 가능성이 있음. DEK 증식성을 향상시킬 것으로 기대된 PB1 유전 인자들은 결과상 큰 차이가 관찰되지 않음.

표 25. PB1 유전자 변이에 따른 CEK, DEK 증식성 비교.

	EID ₅₀	TCID ₅₀ (DEK)	TCID ₅₀ (CEK)
PR8	8.5 ± 0.2 ^a	5.91 ± 0.55 ^b	7.25 ± 0.48 ^b
rPR8-PB1(0028)	8.1 ± 0.3	3.58 ± 0.73	5.75 ± 0.05
rPR8-PB1(0028)-V3I	8.6 ± 0.1	4.67 ± 0.14	6.08 ± 0.38
rPR8-PB1(0028)-T6I	8.0 ± 0.4	3.67 ± 0.29	5.08 ± 0.29
rPR8-PB1(0028)-E172G	8.4 ± 0.1	4.67 ± 0.14	6.00 ± 0.25
rPR8-PB1(0028)-M179V	8.6 ± 0.2	4.75 ± 0.25	6.08 ± 0.29
rPR8-PB1(0028)-E581V	8.2 ± 0.4	4.00 ± 0.25	4.75 ± 0.25
rPR8-PB1(0028)-F740L	8.4 ± 0.2	4.08 ± 0.14	4.75 ± 0.25

^a Log₁₀ (EID₅₀/0.1ml)

^b Log₁₀ (TCID₅₀/0.1ml)

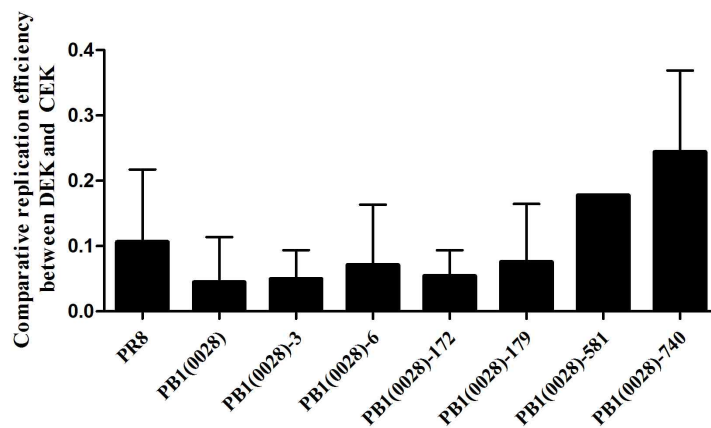


그림 21. PB1 돌연변이 재조합 바이러스의 DEK/CEK 상대증식성 비교.

(3) PB1-F2 유전자 돌연변이에 의한 CEK, DEK 증식성 변화 비교

(가) PB1 유전자의 다른 전사체인 PB1-F2 유전자에서는 어떤 차이가 있는지 확인하기 위하여 0028 바이러스의 PB1-F2 유전자를 PR8 바이러스의 유전자와 비교하였으며 5개의 아미노산을 특정지음. 특정된 아미노산 변이를 가지는 PB1-F2 돌연변이 바이러스를 제작함 (표 26).

표 26. PB1-F2 유전자 돌연변이 재조합 바이러스 제작.

	Amino acid residue	Recombinant virus
1	16	rPR8-PB1-F2(0028)-I16T
2	44	rPR8-PB1-F2(0028)-K44R
3	59	rPR8-PB1-F2(0028)-R59K
4	82	rPR8-PB1-F2(0028)-L82S
5	83	rPR8-PB1-F2(0028)-F83S

(나) 제작된 바이러스의 SPF 종란, CEK, DEK 증식성을 비교 평가함.

표 27. PB1-F2 유전자 변이에 따른 재조합 바이러스의 증식성 비교.

	EID ₅₀	TCID ₅₀ (DEK)	TCID ₅₀ (CEK)
PR8	8.5 ± 0.2 ^a	5.91 ± 0.55 ^b	7.25 ± 0.48 ^b
rPR8-PB1(0028)	8.1 ± 0.3	3.58 ± 0.73	5.75 ± 0.50
rPR8-PB1-F2(0028)-I16T	8.3 ± 0.4	4.17 ± 0.29	4.91 ± 0.63
rPR8-PB1-F2(0028)-K44R	8.6 ± 0.1	4.83 ± 0.38	6.67 ± 0.63
rPR8-PB1-F2(0028)-R59K	8.1 ± 0.5	4.58 ± 0.14	5.58 ± 0.52
rPR8-PB1-F2(0028)-L82S	8.5 ± 0.2	4.75 ± 0.25	6.08 ± 0.29
rPR8-PB1-F2(0028)-F83S	8.0 ± 0.5	4.67 ± 0.14	5.67 ± 0.38

^a Log₁₀ (EID₅₀/0.1ml)

^b Log₁₀ (TCID₅₀/0.1ml)

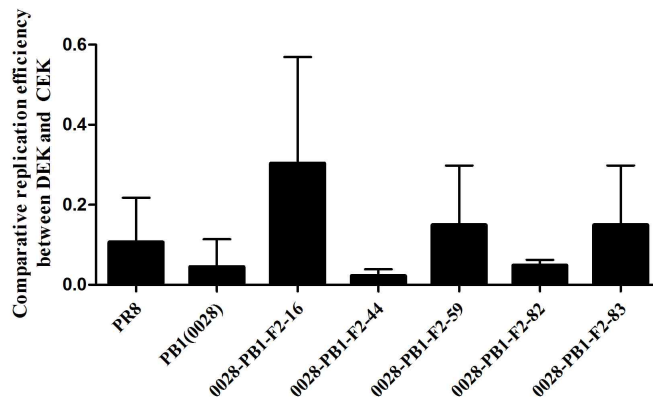


그림 22. PB1-F2 유전자 돌연변이 재조합 바이러스의 DEK/CEK 상대증식성 비교.

(다) PB1-F2의 I16T 변이는 DEK/CEK 상대증식성을 증가시켰지만, 이는 CEK에서의 증식성 감소에 의한 것임 (표 27). 즉 I16T 변이는 PB1 유전자 상의 E581V, F740L 변이와 마찬가지로 DEK에서의 증식성에 영향을 미치는 것보다 CEK에서의 증식성에 영향을 미치는 인자로 생각됨.

(라) PB1-F2 유전자의 R59K, F83S 변이는 CEK에서의 증식성은 큰 차이 없이 DEK에서의 증식성을 증가시키며, 이로 인하여 DEK/CEK 상대적 증식성을 증가시킴 (그림 22). 즉 R59K, F83S 변이는 PB1-F2 유전자상에 DEK에서의 증식성에 영향을 미치는 인자로 추정됨.

바. PA유전자 내 야생조류 증식성 관련 인자 발굴

(1) PA 유전자에 의한 CEK, DEK 증식성 변화 비교

(가) DEK에서 상대적인 증식성 감소가 관찰된 0028, 01310 바이러스의 PA유전자를 이용한 재조합 PR8 바이러스를 제작함 (표 28). 제작된 바이러스의 DEK, CEK에서의 증식성을 비교함.

표 28. PA 유전자 재조합 바이러스 제작.

	Recombinant virus	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
1	rPR8-PA(0028)	PR8	PR8	0028	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8
2	rPR8-PA(00310)	PR8	PR8	01310	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8

표 29. PA 유전자 재조합 PR8 바이러스의 CEK, DEK 증식성 비교.

	TCID ₅₀ (DEK)	TCID ₅₀ (CEK)
PR8	5.91 ± 0.55 ^a	7.25 ± 0.48
rPR8-PA(0028)	3.58 ± 0.14	3.42 ± 0.14
rPR8-PA(01310)	2.17 ± 0.38	4.17 ± 0.14

^a Log₁₀ (TCID₅₀/0.1ml)

(나) PR8 바이러스의 PA 유전자를 0028, 01310 바이러스의 PA로 치환한 재조합 바이러스는 CEK, DEK에서 유의적인 증식성의 감소가 관찰됨 (표 29). 최근 여러 연구를 통하여 PA 유전자는 야생조류 숙주에서의 인플루엔자 바이러스 병원성과 깊은 관계가 있다고 알려져 있음 (Hulse-Post et al., J Virol, 2007; Song et al., J Virol, 2011; Hu et al., J Virol, 2013; Kajihara et al., Virol J, 2013).

(2) PA 유전자 돌연변이에 의한 CEK, DEK 증식성 변화 비교

(가) 조류 세포에서의 증식성을 낮추는 0028, 01310 PA 유전자와 PR8 바이러스의 PA 유전자를 비교하여 증식성에 영향을 미칠 것으로 예상되는 변이들을 선별한 후 각각의 아미노산이 조류세포 증식성에 미치는 영향을 평가함.

표 30. PA 유전자 돌연변이 재조합 바이러스 제작.

	Recombinant virus	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
1	rPR8_PA(0028)_T129I	PR8	PR8	0028-T129I	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8
2	rPR8_PA(0028)_G351E	PR8	PR8	0028-G351E	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8
3	rPR8_PA(0028)_M628V	PR8	PR8	0028-M628V	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8
4	rPR8_PA(0028)_E684G	PR8	PR8	0028-E684G	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8

표 31. PA 유전자 변이에 따른 재조합 바이러스의 증식성 비교.

	EID ₅₀	TCID ₅₀ (MDCK)	TCID ₅₀ (DEK)	TCID ₅₀ (CEK)
rPR8_PA(0028)_T129I	7.7 ± 0.35 ^a	4.50 ± 0.22 ^b	4.58 ± 0.14 ^b	4.91 ± 0.38 ^b
rPR8_PA(0028)_G351E	7.0 ± 0.23	4.25 ± 0.13	2.50 ± 0.00	2.50 ± 0.00
rPR8_PA(0028)_M628V	7.3 ± 0.72	4.83 ± 0.14	2.67 ± 0.14	2.67 ± 0.29
rPR8_PA(0028)_E684G	7.8 ± 0.31	5.04 ± 0.19	4.75 ± 0.25	5.00 ± 0.25
rPR8_PA(0028)	7.0 ± 0.30	3.71 ± 0.07	3.58 ± 0.14	3.42 ± 0.14

^a Log₁₀ (EID₅₀/0.1ml)

^b Log₁₀ (TCID₅₀/0.1ml)

(나) 0028 PA 유전자의 129번 아미노산을 threonine (T)에서 isoleucine (I)으로 치환한 돌연변이 바이러스, 684번 아미노산을 glutamate (G)에서 glycine (E)으로 치환한 돌연변이 바이러스는 계태아와 MDCK 에서의 증식성 대비 CEK, DEK에서의 증식성이 상당히 증가한 것을 확인할 수 있음. 반면, 351번을 glutamate (G), 628을 valine (V)으로 치환한 돌연변이 바이러스는 rPR8-PA(0028) 바이러스 대비 CEK, DEK에서의 증식성이 상당히 감소된 것으로 관찰됨 (표 31). 즉 PA 유전자의 T129I, E684G 변이는 인플루엔자 바이러스의 조류세포 증식성 향상에 관여하는 것으로 예측되며, G351E, M628V 변이는 조류세포에서의 증식성 감소에 관여하는 것으로 예측됨.

(다) PA 유전자내 각 인자들의 야생조류 병원성 관련성은 오리 또는 닭을 이용한 in vivo 실험을 통하여 병원성과의 관련 여부를 규명해야 될 것으로 생각됨.

(3) 증식성 관련 PA 유전 인자 변이에 따른 CEK, DEK 증식성 변화 비교

(가) PA 유전자는 인플루엔자 바이러스의 야생조류 병원성과 깊은 영향이 있다고 알려져 있으며, 현재까지 알려져 있는 인자들은 다음과 같음 (표 32).

표 32. PA 유전자내 야생조류 병원성 관련 인자.

Substitutions	Effects	Reference
PA-T515A	Polymerase activity 감소에 따라 오리에서의 병원성 감소	Hulse-Post et al., J Virol, 2007
PA-S224P	Mallard duck에서의 높은 병원성. DEF에서의 증식성 향상.	Song et al., J Virol, 2011
PA-N383D	Mallard duck에서의 높은 병원성. polymerase activity 증가 및 PA, PB1 단백질의 핵내 축적을 지연시킴.	Song et al., J Virol, 2011
PA-D101G	오리에서의 높은 병원성.	Hu et al., J Virol, 2013
PA-K237E	오리에서의 높은 병원성. PA 단백질의 핵내 축적을 증가시킴.	Hu et al., J Virol, 2013

(나) 야생 조류 병원성 인자와 이번에 평가된 아미노산 변이 부분을 PA 유전자상에서 조사해본 결과 PR8, 01310, 0028 바이러스의 PA 유전자는 병원성 인자로 알려져 있는 237E, 383D 변이를 가지고 있는 것으로 확인됨 (그림 23).

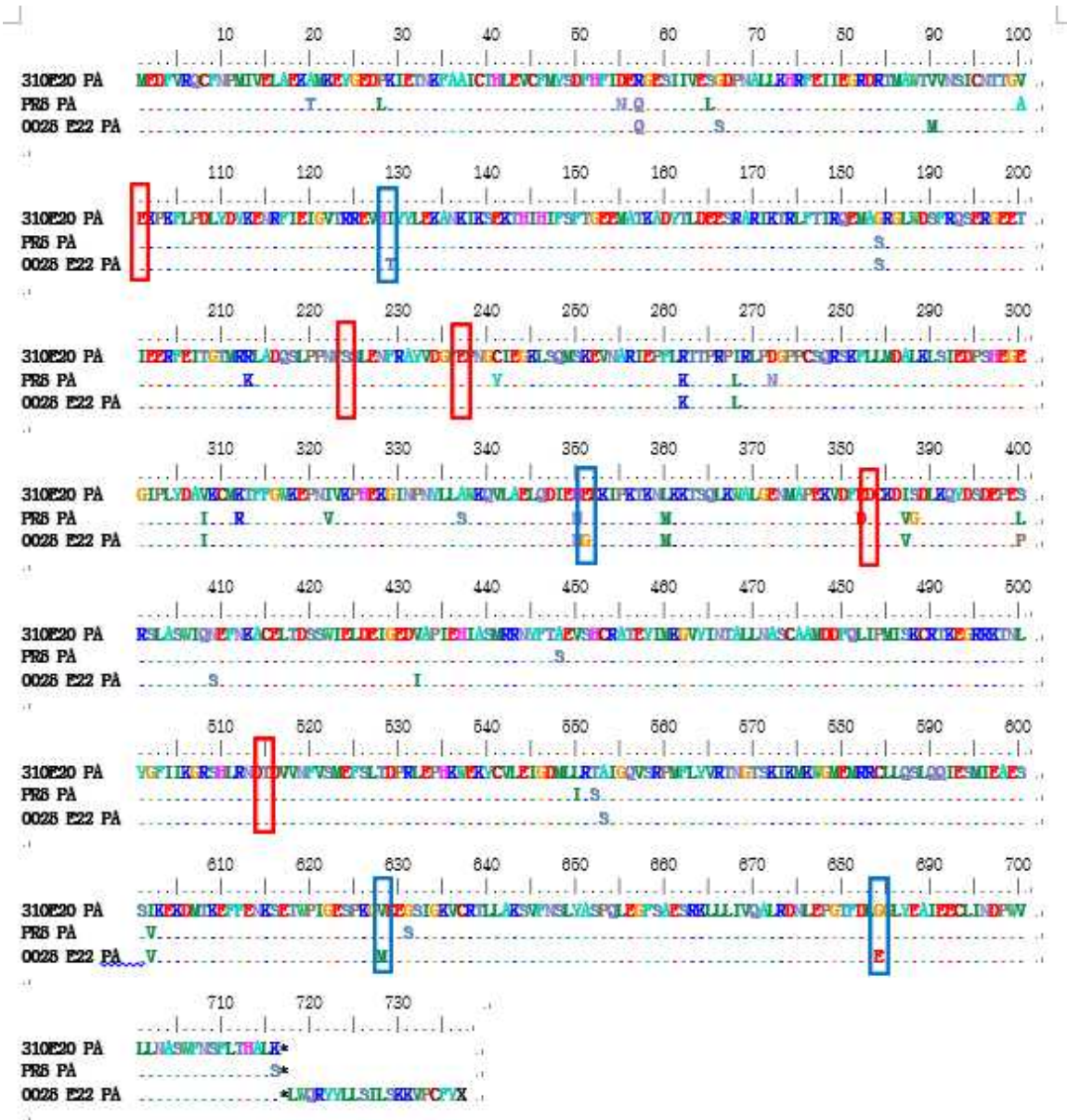


그림 23. PA 유전자 상의 야생조류 병원성 인자 비교.

(다) 야생조류에서 상당히 증식성이 억제되어 있는 0028, 01310 PA 유전자의 경우도 야생조류 병원성인자를 일부 가지고 있는 것을 고려하였을 때 현재까지 알려져 있는 인자 외의 다른 인자들이 증식성 억제에 관여했을 것으로 기대되며 이번 연구를 통하여 밝혀진 PA 유전자 내 4개의 인자도 야생조류 증식성에 큰 영향을 미칠 것으로 생각됨.

사. NP 유전자 내 야생조류 증식성 관련 인자 발굴

(1) PR8의 NP 유전자를 DEK 저증식성/CEK 고증식성을 나타내는 01310, 0028, SNU50-5 바이러스의 NP 유전자로 치환하는 7+1 재조합 바이러스를 제작함으로써 NP 유전자가 DEK 증식성에 미치는 영향을 평가하고자 함 (표 33).

표 33. NP 유전자 치환 PR8 재조합 바이러스 제작.

	Recombinant virus	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
1	rPR8-NP(0028)	PR8	PR8	PR8	PR8	0028	PR8	PR8	PR8
2	rPR8-NP(00310)	PR8	PR8	PR8	PR8	01310	PR8	PR8	PR8
3	rPR8-NP(50-5)	PR8	PR8	PR8	PR8	50-5	PR8	PR8	PR8

(2) 제작된 재조합 바이러스를 평가하기 위하여, 계태아 및 MDCK 세포를 이용하여 바이러스의 역가를 측정하고, 재조합 바이러스를 CEK, DEK에 각각 접종한 후 증식성을 비교 평가함.

표 34. NP 재조합 PR8 바이러스의 증식성 비교.

	EID ₅₀	TCID ₅₀ (MDCK)	TCID ₅₀ (DEK)	TCID ₅₀ (CEK)
PR8	8.52 ± 0.23 ^a	5.67 ± 0.07 ^b	5.91 ± 0.55 ^b	7.25 ± 0.48 ^b
rPR8-NP(01310)	7.70 ± 0.37	4.42 ± 0.14	3.58 ± 0.14	6.50 ± 0.25
rPR8-NP(50-5)	6.90 ± 0.14	3.08 ± 0.14	3.67 ± 0.29	5.83 ± 0.14
rPR8-NP(0028)	7.29 ± 0.37	3.83 ± 0.07	3.58 ± 0.14	6.33 ± 0.14

^a Log₁₀ (EID₅₀/0.1ml)

^b Log₁₀ (TCID₅₀/0.1ml)

(3) DEK 저증식성/CEK 고증식성 바이러스의 NP 유전자 치환 재조합 바이러스는 DEK에서의 증식성이 상대적으로 억제되는 것으로 나타남 (표 34).

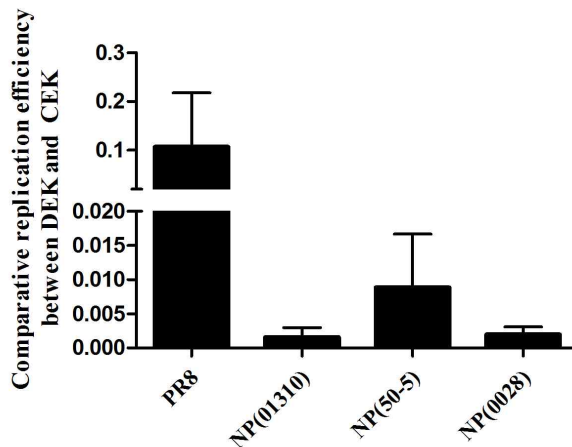


그림 24. NP 유전자 재조합 PR8 바이러스의 DEK/CEK 상대증식성 비교

(4) PR8 바이러스 대비 NP 치환 재조합 바이러스는 오리에서의 상대적인 증식성이 억제됨을 확인할 수 있으며, 특히 H9N2 바이러스인 01310, 0028 바이러스의 NP 유전자를 치환하였을 때는 약 1,000배 정도의 상대적인 증식성 억제가 관찰됨. 즉 조류 인플루엔자 바이러스의 NP 유전자는 야생조류에서의 증식성에 큰 영향을 미치는 인자임을 확인할 수 있음.

아. M 유전자 내 야생조류 증식성 관련 인자 발굴

(1) PR8 바이러스의 M 유전자를 DEK 저증식성/CEK 고증식성을 나타내는 01310, 0028, SNU50-5 바이러스의 M 유전자로 치환하는 7+1 재조합 바이러스를 제작하여 CEK, DEK에서의 증식성 차이를 비교함 (표 35).

표 35. M 유전자 치환 PR8 재조합 바이러스 제작.

	Recombinant virus	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
1	rPR8-M(0028)	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	0028	PR8
2	rPR8-M(00310)	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	01310	PR8
3	rPR8-M(50-5)	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	50-5	PR8

(2) M 유전자 재조합 바이러스는 PR8 대비 DEK에서 확연한 증식성의 억제가 관찰됨 (표 36).

표 36. M 유전자 재조합 PR8 바이러스의 증식성 비교

	EID ₅₀	TCID ₅₀ (DEK)	TCID ₅₀ (CEK)
PR8	8.52 ± 0.23 ^a	5.91 ± 0.55 ^b	7.25 ± 0.48 ^b
rPR8-M(01310)	7.98 ± 0.08	4.33 ± 0.14	6.58 ± 0.52
rPR8-M(50-5)	7.97 ± 0.19	3.58 ± 0.14	6.00 ± 0.43
rPR8-M(0028)	7.77 ± 0.25	4.17 ± 0.29	6.75 ± 0.25

^a Log₁₀ (EID₅₀/0.1ml)

^b Log₁₀ (TCID₅₀/0.1ml)

(3) DEK 저증식성/CEK 고증식성을 나타내는 조류 인플루엔자 바이러스의 M 유전자는 CEK 대비 DEK에서의 증식성을 100배 이상 억제하는 것으로 관찰되었음. M 유전자 역시 조류 인플루엔자 바이러스의 야생조류 증식성에 큰 영향을 미칠 수 있음을 확인할 수 있음 (그림 25).

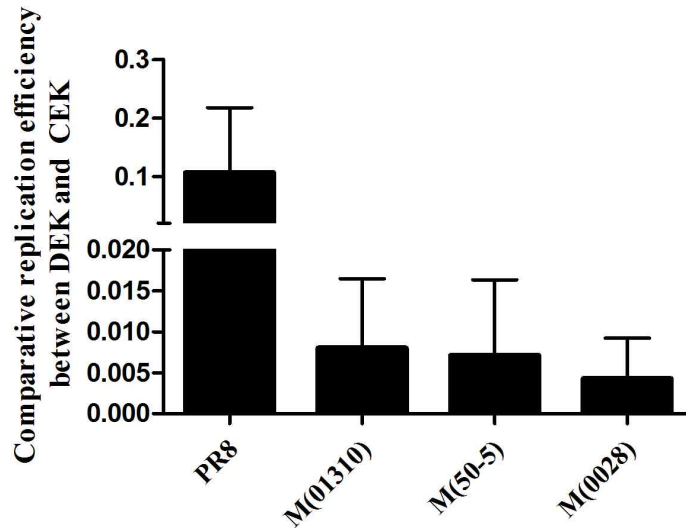


그림 25. M 유전자 치환 재조합 PR8 바이러스의 DEK/CEK 상대증식성 비교

4. 국내 유행 고병원성 인플루엔자 바이러스의 야생조류 병원성 인자 발굴

가. 국내 유행 고병원성 인플루엔자 바이러스의 야생조류에서의 병원성 차이를 비교하고자 실험적으로 규명된 오리에서의 병원성을 비교함 (표37).

표 37. 국내 유행 고병원성 인플루엔자 바이러스의 실험적 오리 병원성 평가.

	1차발생	2차발생	3차 발생	4차 발생	5차 발생
발생연도	2003년	2006년	2008년	2010년	2014년
Subtype	H5N1	H5N1	H5N1	H5N1	H5N8
Clade	2.5	2.3	2.3.2.1	2.3.2.1	2.3.4.4
실험시 사용한 strain	A/duck/Korea/ESD1/03 A/chicken/Korea/ES/03	A/chicken/Korea/IS/06	A/chicken/Korea/Gimje/ 2008	A/mandarin duck/Korea/PSC24-24/2 010 A/Eurasian eagle owl/Korea/23/2010	A/breeder duck/Kr/ Gochang1/2014 A/broiler duck/Kr/Buan2/2014 A/Baikal teal/Kr/Donglim3/2014
접종 루트 및 접종 농도	Intranasal route로 10 ^{6.5} EID ₅₀ 접종	Intranasal route로 10 ^{6.5} EID ₅₀ 접종	Intranasal route로 10 ^{6.5} EID ₅₀ 접종	Intranasal route로 10 ^{6.0} EID ₅₀ 접종	Intranasal route로 10 ^{6.5} EID ₅₀ 접종
실험군	2주령 Pekin ducks	2주령 Cherry Valley ducks	2주령 Pekin ducks	10 days old commercial Pekin ducks	2주령 Pekin ducks
폐사율	0%(0/20) ~25%(2/8)	0% (0/20)	100% (8/8)	PSC24-24(50%, 4/8) EEO/23 (100%, 8/8)	Gochang1 (20%,1/5) Buan2 (0%,0/5) Donglim3 (20%, 1/5)
Reference	Lee et al., J Virol, 2005	Jeong et al.,J.vet.Sci.,2009	Kang et al., Vet Microbiol.,2013	Choi et al., Viruses, 2013	Kang et al., Emerg Infect Dis., 2015

나. 국내에서 유행한 2003, 2005년 H5N1 고병원성 인플루엔자 바이러스는 오리에서 치사율이 없거나, 낮은 것으로 평가됨 (0%-25% 치사율). 하지만 2008년 2010년 발생한 H5N1 고병원성 인플루엔자 바이러스는 오리에서 높은 병원성이 확인됨 (50%-100% 치사율). 2014년 전국적으로 확산되어 국내 오리, 양계 산업에 큰 피해를 입힌 H5N8 고병원성 인플루엔자 바이러스는 오리에서 낮은 병원성이 확인됨 (0%-20% 치사율).

표 38. 고병원성 인플루엔자 바이러스의 오리 병원성 차이에 기인한 것으로 예상되는 아미노산 비교 (PB2,PB1 유전자).

		PB2					PB1		
		65	473	588	590	627	215	383	644
오리 병원성	A/Duck/Anyang/AVL-1/2001 (H5N1)	E	M	A	G	E	K	E	V
	A/duck/Korea/ESD1/03 (H5N1)	E	M	A	G	E	K	E	V
	A/chicken/Korea/ES/03 (H5N1)	E	M	A	G	E	K	E	V
	A/chicken/Korea/IS2/2006 (H5N1)	E	T	A	G	K	K	E	V
	A/chicken/Korea/IS/2006 (H5N1)	E	T	A	G	K	K	E	V
	A/breeder duck/Korea/Gochang1/2014 (H5N8)	E	M	A	G	E	K	E	V
오리 고병원성	A/broiler duck/Korea/Buan2/2014 (H5N8)	E	M	A	G	E	K	E	V
	A/baikal teal/Korea/Donglim3/2014 (H5N8)	E	M	A	G	E	K	E	V
	A/duck/Korea/JEQ149/2008 (H5N1)	E	L	T	S	E	R	D	I
	A/chicken/Korea/Gimje/2008 (H5N1)	E	L	T	S	E	R	D	I
	A/duck/Korea/Cheonan/2010 (H5N1)	D	L	T	G	E	R	D	I
	A/whooper swan/Mongolia/6/2009 (H5N1)	D	L	T	G	E	-	-	-
오리 병원성	A/mandarin duck/Korea/PSC24-24/2010 (H5N1)	D	L	T	G	E	R	D	I
	A/Eurasian eagle owl/Korea/23/2010 (H5N1)	D	L	T	S	E	R	D	I

표 39. 고병원성 인플루엔자 바이러스의 오리 병원성 차이에 기인한 것으로 예상되는 아미노산 비교 (PA, NS 유전자)

		PA					NS1		
		101	224	237	383	515	207	209	217
오리 병원성	A/Duck/Anyang/AVL-1/2001 (H5N1)	E	S	K	D	T	N	G	K
	A/duck/Korea/ESD1/03 (H5N1)	D	S	K	D	T	D	D	S
	A/chicken/Korea/ES/03 (H5N1)	D	S	K	D	T	D	D	N
	A/chicken/Korea/IS2/2006 (H5N1)	E	S	E	D	T	G	D	D
	A/chicken/Korea/IS/2006 (H5N1)	E	S	E	D	T	G	D	D
	A/breeder duck/Korea/Gochang1/2014 (H5N8)	D	S	K	D	T	N	D	K
오리 고병원성	A/broiler duck/Korea/Buan2/2014 (H5N8)	D	S	K	D	T	N	D	K
	A/baikal teal/Korea/Donglim3/2014 (H5N8)	D	S	K	D	T	N	D	K
	A/duck/Korea/JEQ149/2008 (H5N1)	D	S	K	D	T	D	G	N
	A/chicken/Korea/Gimje/2008 (H5N1)	D	S	E	D	T	D	G	N
	A/duck/Korea/Cheonan/2010 (H5N1)	D	S	E	D	-	D	G	N
	A/whooper swan/Mongolia/6/2009 (H5N1)	-	-	-	-	-	D	G	N
오리 병원성	A/mandarin duck/Korea/PSC24-24/2010 (H5N1)	D	S	E	D	T	D	G	N
	A/Eurasian eagle owl/Korea/23/2010 (H5N1)	D	S	E	D	T	D	G	N

다. 각 고병원성 인플루엔자 바이러스는 발생 strain 별로 야생조류에서의 병원성에 차이가 관찰되었으며 이를 바탕으로 야생조류 병원성에 관여할 것으로 생각되는 아미노산을 비교함 (표38, 39).

5. 인플루엔자 바이러스에 대한 숙주의 감염 저항성 평가

가. 인플루엔자 바이러스 감염 후 CEK, DEK 면역 관련 유전자 발현량 비교

(1) 인플루엔자 감염 시 면역 반응에 관여한다고 알려져 있는 단백질인 signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3)와 interferon-induced transmembrane protein-3 (IFITM-3), RIG-1의 발현량을 시간대별로 CEK, DEK에서 비교함.

(2) STAT-3 발현량 비교

(가) STAT-3는 JAK-STAT pathway에서 JAK에 의해 활성화되면 강한 항염증반응을 유도함 (Kasmi et al, Journal of Immunology, 2006).

① 닭과 오리에 고병원성 인플루엔자를 감염시킨 후 STAT-3 발현량 비교

㉞ 닭: STAT-3 발현량이 대조군에 비해 감소

㉟ 오리: 대조군과 큰 차이가 없거나 더 증가

② IL-6, IL-8 등과 같은 pro-inflammatory cytokine gene의 발현량

㉞ 닭: 대조군보다 매우 증가

㉟ 오리: 대조군보다 낮아짐

(나) STAT-3의 발현량이 높으면 염증반응이 심하게 일어나지 않아서 오리에서는 고병원성 인플루엔자의 병원성이 높게 나타나지 않는 것으로 추측.

(다) 닭에 STAT-3유전자 transfection을 통해 발현량을 높여주고 인플루엔자 감염시킨 결과 pro-inflammatory cytokine이 감소했음. (Kuchipudi et al. Veterinary Research 2014, 45:118).

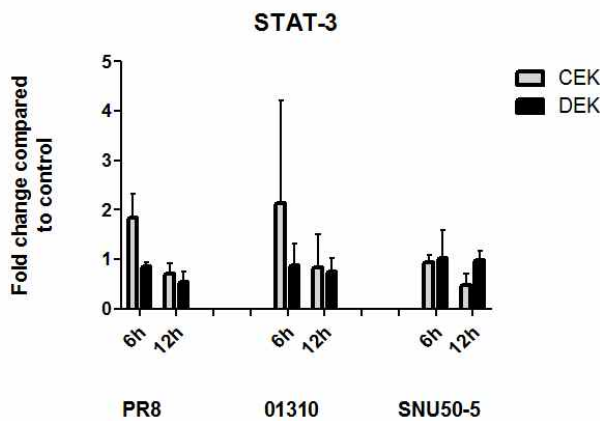


그림 26. CEK, DEK에서의 바이러스 감염 후 시간대별 STAT-3 발현량 비교

(라) CEK, DEK에서의 시간대 별 STAT-3 발현량 비교

① CEK

㉞ 접종 6시간 후: 대조군과 비교하여 STAT-3 발현량 증가

㉟ 접종 12시간 후: 접종 6시간 후 보다 발현량 감소

② DEK: 시간의 추이에 따른 발현량 차이 없음

(마) CEK는 인플루엔자 감염 시 STAT-3 단백질 발현의 증가로 pro-inflammatory cytokine이 감소하고 염증반응이 줄어 바이러스가 증식하기 더 좋은 환경이 되었을 것으로 추측됨.

(바) DEK의 경우 세 가지 바이러스 모두에서 STAT-3 발현량의 변화가 없어 인플루엔자 바이러스 감염과 오리 STAT-3 발현과는 상관관계를 찾을 수 없었음.

(3) IFITM-3 발현량 비교

(가) IFITM-3는 인터페론에 의해서 유도되는 막단백질로 인플루엔자 바이러스가 host cell과의 fusion을 못하게 해서 감염 초기에 바이러스의 entry를 막는 역할을 함.

- ① 오리에 인플루엔자 바이러스 감염을 시키는 경우 IFITM-3, 5, 10이 증가
- ② 오리 IFITM-3를 발현시킨 DF-1 cell에서는 바이러스 증식이 감소 (Graham et al, Journal of Virology, 2015).
- ③ 닭에서도 비슷한 연구 결과 존재.

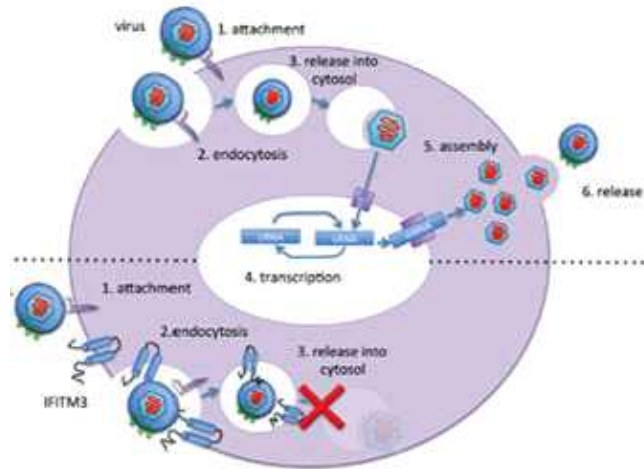


그림 27. Schematic depicting the stage during the viral replication cycle targeted by IFITM-3. 출처: <http://biomedicalsciences.unimelb.edu.au>

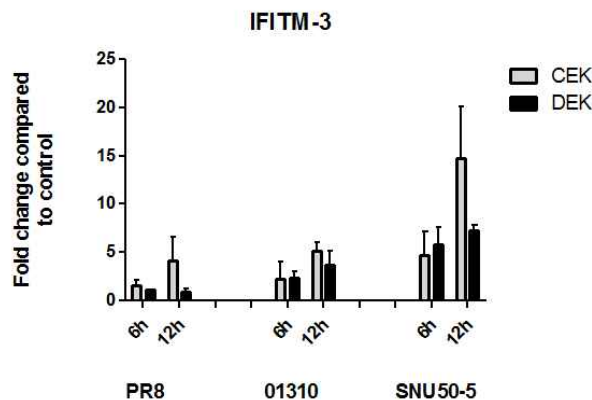


그림 28. CEK, DEK에서의 바이러스 감염 후 시간대별 IFITM-3 발현량 비교

(나) IFITM-3는 CEK와 DEK 둘 다에서 시간이 지날수록 증가했으며, 특히 H5 subtype인 SNU50-5에서 가장 높은 발현량을 보임.

(다) 닭과 오리 모두에서 인플루엔자 감염에 대한 방어 기전으로 IFITM-3가 작동한다는 것을 알 수 있음.

(4) RIG-1 발현량 비교

(가) RIG-1은 바이러스에 감염된 세포의 세포질에서 바이러스의 증식으로 만들어진 ssRNA를 인식해 type-1 interferon을 유도함.

(나) RIG-1은 오리에는 존재하나 닭에서는 존재하지 않는 것으로 보임 (Megan et al, PNAS, 2010).

- ① CEF 세포주인 DF-1 cell이 RIG-1 ligand에 반응하지 않았고, 유전자 상에서도 유사한 서열을 찾을 수 없었음.
- ② 오리에는 포유류와 유사한 RIG-1서열이 존재
- ③ H5N1 바이러스를 감염시킨 결과 RIG-1 발현이 약 200배 증가
- ④ DF-1 cell에 RIG-1 유전자를 발현시키면 저병원성이나 고병원성 인플루엔자 바이러스 모두에 대한 인터페론 반응이 증가하고, 바이러스 증식이 억제됨
- ⑤ 이 차이로 인해 인플루엔자 바이러스의 병원성이 닭에서보다 오리에서 더 낮게 나타날 수 있는 것으로 추측됨

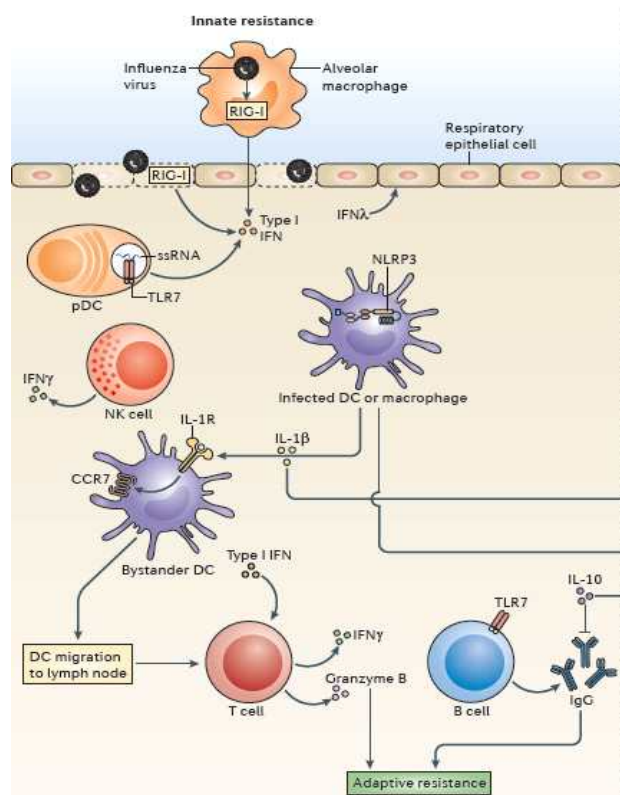


그림 29. 바이러스 감염 후 DEK에서의 RIG-1 발현량. 출처: Akiko et al, Nature reviews, 2014

(다) CEK에서는 RIG-1이 detection되지 않았음. 반면 접종 1dpi에 DEK에서 RIG-1 발현량을 측정 한 결과 세 가지 바이러스 접종군에서 모두 대조군 대비 발현이 증가함 (그림 30).

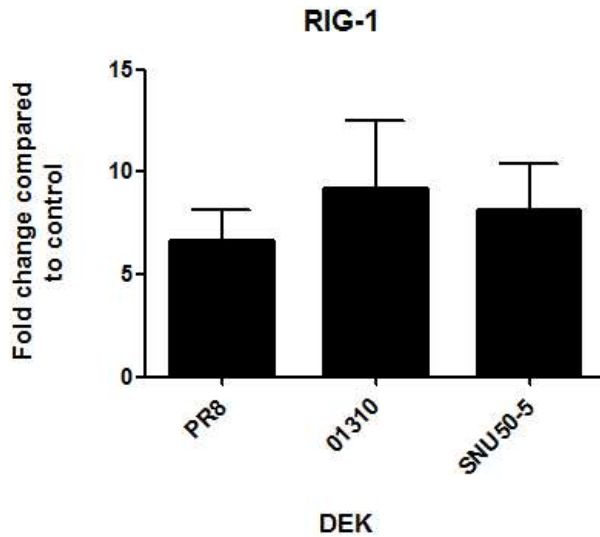


그림 30. 바이러스 감염 후 DEK에서의 RIG-1 발현량

6. 가금, 야생조류에서의 인플루엔자 바이러스 백신 효능 차이 규명

가. 현재 판매되는 고병원성 인플루엔자 백신 접종 후 2주 후의 항체 형성능을 HI titer로 평가하였을 때, 전반적으로 닭의 혈청에 비해 오리의 혈청에서 낮은 HI titer과 관찰됨 (Pfeiffer at al., 2010). 즉 백신 접종 후 오리는 닭에 비하여 항체 형성능이 떨어짐을 확인할 수 있음.

나. 닭, 오리의 혈청내 성분에 의하여 인플루엔자 바이러스의 백신 효능에 차이가 관찰된 것으로 추측되어, 인플루엔자 바이러스의 불활화 백신을 각각 오리, 닭 혈청과 반응시킨 후 닭에 접종하여 항체 형성능을 평가함.

다. 저병원성 H5N1 인플루엔자 바이러스인 SNU50-5의 HA, NA를 가지며 나머지 유전자는 백신 strain인 PR8 바이러스의 유전자를 가진 HN(50-5)를 BEI를 이용하여 불활화 처리함. 불활화한 백신은 오리 혈청, 닭 혈청과 1:1 로 섞은 후 1시간동안 상온에서 반응 시킴. 그 후 ISA70을 통한 oil-adjuvanted 백신을 제작하여 닭에 접종한 후 3주, 5주째에 HI titer를 측정함.

표 40. 오리, 닭 혈청과 섞은 백신접종 후 3, 5주째 항체가 측정

Vaccine group	Range of post-vaccination HI titer	
	3 week	5 week
Duck serum+불활화 백신	6.17 ± 0.40 ^a	8.33 ± 0.52
Chicken serum+불활화백신	7.67 ± 0.52	9.50 ± 0.55

^a log₂ (HI titer)

라. 오리 혈청과 섞은 백신에 비하여 닭의 혈청과 섞은 백신이 3주, 5주 짜 항체 형성능이 뛰어난 (표 40). 즉 닭 혈청과 비교하였을 때 오리 혈청내의 성분이 인플루엔자 바이러스의 백신 형성능을 저해할 수 있음을 확인함. 혈청 내 어떤 성분에 의하여 백신의 항체 형성능에 차이가 유발되었는지에 대한 추가 연구가 필요함.

3-2. 제 1협동과제: 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류 병원성 및 리셉터 분포 상관관계 분석

1. 야생조류의 조류인플루엔자 바이러스 감염 부위와 리셉터 분포의 상관관계 분석

가. 조류인플루엔자 바이러스와 수용체의 동시 염색기법을 확립

(1) 연구의 개요

(가) 인플루엔자 바이러스는 세포 표면의 바이러스 수용체에 일차적으로 부착하게 되는데, 바이러스의 종류에 따라 조류인플루엔자 수용체 (AIV-R)와 사람 인플루엔자 수용체 (HuIV-R)로 구분함.

(나) 이 수용체는 각각 구조적으로 다른 당단백질의 특성을 보이고 있어 조류인플루엔자 수용체에는 sialic acid와 galactose가 alpha 2,3-gal 형태로 연결되어 있고, 사람인플루엔자 수용체는 alpha 2,6-gal 형태로 연결됨.

(다) 이와 같은 화학적 특성 때문에 각각의 수용체는 당단백질을 인지하는 lectin을 이용하여 염색할 수 있음.

- ① 조류 인플루엔자 수용체: Maackia amurensis lectin
- ② 사람 인플루엔자 수용체: Elderberry bark lectin

(라) 이론적으로 조류 인플루엔자 바이러스인 H5N1, H5N8은 조류 인플루엔자 수용체에 특이적으로 부착하게 되므로, 인플루엔자 바이러스의 감염부위는 조류 인플루엔자 수용체 발현부위와 상관성을 가질 것으로 판단되어, 조류 인플루엔자 수용체 발현부위를 조사하면 감염부위를 예상할 수 있게 되므로 감염부위와 수용체 발현부위의 상관관계를 이해하는 것이 중요함.

(마) 조류인플루엔자 바이러스와 수용체의 동시 염색기법을 확립

- ① 대상 동물의 수용체 발현 여부를 조사
- ② 감염된 바이러스와 수용체의 동시염색을 실시

(2) 대상동물과 인플루엔자 바이러스 공격 집중

(가) 4종의 야생물새류 (쇠오리, 청둥오리, 홍머리오리, 흰뺨검둥오리)

- ① 쇠오리: 1마리
- ② 청둥오리, 홍머리오리, 흰뺨검둥오리: 2마리

(나) 생물안전3등급 시설 내에서 국내 분리 H5N1형 HPAI (2010/2011 분리주, clade 2.3.2)를 2×10^7 EID₅₀/ml 역가로 희석하여 0.1ml씩 비강 내로 개체별 접종

(다) 공격접종 후 폐사한 개체는 폐사 직후, 살아있는 개체는 5 dpc (days post challenge)에 부검을 실시하여 샘플을 채취하였음.

- ① 흰뺨검둥오리: 4 dpc에 폐사, 샘플 채취
- ② 쇠오리: 3 dpc에 폐사, 샘플 채취
- ③ 청둥오리 및 홍머리오리: 5 dpc에 부검 실시, 샘플 채취

(3) 조직 채취 및 처리

(가) 폐와 같은 호흡기와 소장, 대장, 십이지장-이자를 포함한 소화기 외에도 뇌, 심장, 콩팥, 간, 비장, 맹장편도와 같은 실질 장기를 적출하여 10% neutral buffered formalin에 고정함 (표 41)

(나) 고정된 조직은 조직처리과정을 거쳐 paraffin으로 포매한 후 5um로 미세절편을 실시함 (Leica Biosystems, Germany).

표 41. 대상동물과 채취 장기.

종	영문명	학명	마리수	채취 장기
쇠오리	Common Teal	Anas crecca	1	Br, CT, LI, Liv, Lu, SI, Sp
청둥오리	Mallard	Anas platyrhynchos	2	Br, CT, D-P, Ht, Kid, LI, Liv, Lu, SI, Sp
홍머리오리	Eurasian Wigeon	Anas penelope	2	Br, CT, D-P, Ht, Kid, LI, Liv, Lu, SI, Sp
흰뺨검둥오리	Spot-billed Duck	Anas poecilorhyncha	2	Br, CT, D-P, Ht, Kid, LI, Liv, Lu, SI, Sp

Br, 뇌; CT, 맹장편도; D-P, 십이지장-이자; Ht, 심장; Kid, 신장; LI, 대장; Liv, 간; Lu, 폐; SI, 소장; Sp, 비장; Tr, 기관

(4) 리셉터 분포 분석을 위한 렉틴 조직염색 (lectin histochemistry)

(가) 조류 및 사람 인플루엔자 수용체 (SA 2,3-gal와 SA 2,6-gal) 염색에는 각각의 바이러스 수용체에 특이적으로 결합하는 biotinylated lectin을 사용함.

(나) Maackia amurensis lectin I (Vector Laboratories, USA)은 SA 2,3-gal에 Elderberry bark lectin (Vector Laboratories, USA)은 SA 2,6-gal에 각각 특이적으로 결합하므로 이를 1:750으로 희석하여 조직염색을 실시함 (Kim et al., 2013).

(다) 비특이적으로 염색이 되는 것을 막기 위해 조직내의 peroxidase activity를 제거하고 (quenching) 비특이적 결합을 방지하기 위해 5% BSA로 blocking을 실시한 뒤, 조직과 렉틴을 4°C에서 하룻밤동안 반응시킨 후, 효소 (horseradish peroxidase 혹은 alkaline phosphatase)가 표지된 streptavidin (1: 2,500, Vector Laboratories, USA)과 실온에서 반응시키고 최종적으로 diaminobenzidine (현미경상 갈색) 혹은 alkaline phosphatase substrate (현미경상 빨간색)을 이용하여 발색함.

(라) 인플루엔자 바이러스 리셉터의 발현정도는 렉틴 양성 염색 정도에 따라 정성적 혹은 반정량적 분석을 실시함

(마) 시그널 없음(-) / 미약한 시그널(+) / 중간 시그널(++). 강한 시그널(+++) 등 총 네 단계로 분류하여 평가함 (Yu et al, 2011).

(5) 4 종의 야생물새류에서 조직 내 인플루엔자 바이러스 수용체 발현 분포

(가) 인플루엔자 수용체 발현 확인

① 조류 인플루엔자 수용체를 발현하는 장기에서 중간 차이가 확인되었음 (표 42).

표 42. 조직 내 조류 인플루엔자 수용체 발현 결과.

종	호흡기계				소화기계						
	Lu	D-P	LI	SI	Br	CT	Ht	Liv	Kid	Sp	
쇠오리	1	- ^a	nt	+++	-	-	++	nt	-	nt	-
청둥오리	1	++	+	+	+++	-	+++	-	-	++	-
	2	+	+	++	+	-	+	-	-	+++	-
홍머리오리	1	-	++	+++	+	-	++	-	-	+	-
	2	-	++	+	+++	-	+	-	-	+++	-
흰뺨검둥오리	1	-	nt	nt	-	-	+	nt	-	nt	-
	2	-	-	nt	-	-	++	-	-	++	-

^a -, 시그널 없음; +, 미약한 시그널; ++, 중간 시그널; +++, 강한 시그널; nt, not tested

Br, 뇌; CT, 맹장편도; D-P, 십이지장-이자; Ht, 심장; Kid, 신장; LI, 대장; Liv, 간; Lu, 폐; SI, 소장; Sp, 비장

② 사람 인플루엔자 수용체 발현 장기 또한 중간 차이를 보였으며, 조류 인플루엔자 수용체 발현과 다른 결과를 보이는 장기가 확인되었음 (표 43).

표 43. 조직 내 사람 인플루엔자 수용체 발현 결과.

종	호흡기계				소화기계						
	Lu	D-P	LI	SI	Br	CT	Ht	Liv	Kid	Sp	
쇠오리	1	+++ ^a	nt	+	-	+	-	nt	-	nt	-
청둥오리	1	+	+	+	++	+	+	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	++	-	-	-	-
홍머리오리	1	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	2	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
흰뺨검둥오리	1	+	nt	+	+	+	+	nt	-	nt	-
	2	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-

^a -, 시그널 없음; +, 미약한 시그널; ++, 중간 시그널; +++, 강한 시그널; nt, not tested

Br, 뇌; CT, 맹장편도; D-P, 십이지장-이자; Ht, 심장; Kid, 신장; LI, 대장; Liv, 간; Lu, 폐; SI, 소장; Sp, 비장

③ 조류 인플루엔자 수용체는 4종의 야생물새 모두 맹장편도에서 발현이 확인됨 (그림 31. A-D). 반면, 사람 인플루엔자 수용체는 쇠오리를 제외한 3종의 맹장편도에서 발현이 확인됨 (그림 31. E-H).

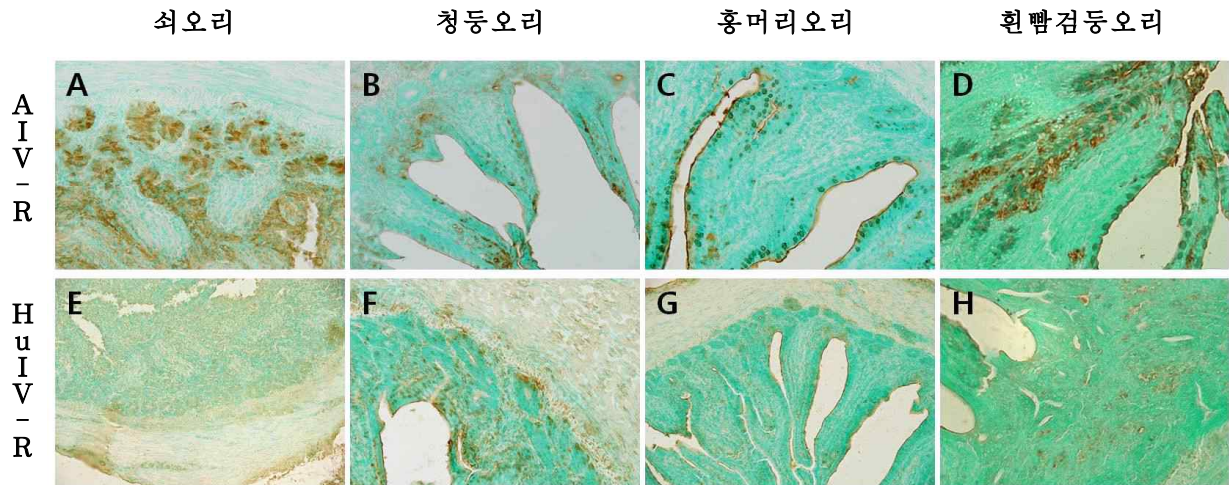


그림 31. 맹장편도의 인플루엔자 수용체 발현 확인. 조류 인플루엔자 수용체는 4종에서 모두 확인되었으나 (A-D), 사람 인플루엔자 수용체는 쇠오리를 제외한 3종에서만 확인됨 (E-F, AIV-R, 조류 인플루엔자 수용체; HuIV-R, 사람 인플루엔자 수용체)

- ④ 조류 인플루엔자 수용체가 쇠오리를 제외한 3종의 야생물세의 십이지장-이자, 콩팥에서 발현이 확인됨 (그림 32. A-C). 흰뺨검둥오리를 제외한 3종의 야생물세의 대장에서 발현이 확인됨. 소장에서는 청둥오리와 홍머리오리에서만 확인됨.
- ⑤ 사람 인플루엔자 수용체가 십이지장-취장은 조류인플루엔자 수용체와 마찬가지로 쇠오리를 제외한 3종에서 발현이 확인됨. 반면, 콩팥은 흰뺨검둥오리에서만 발현이 확인됨 (그림 32. D). 대장은 4종 모두에서 발현되었고 소장은 쇠오리를 제외한 3종에서 발현이 확인됨.

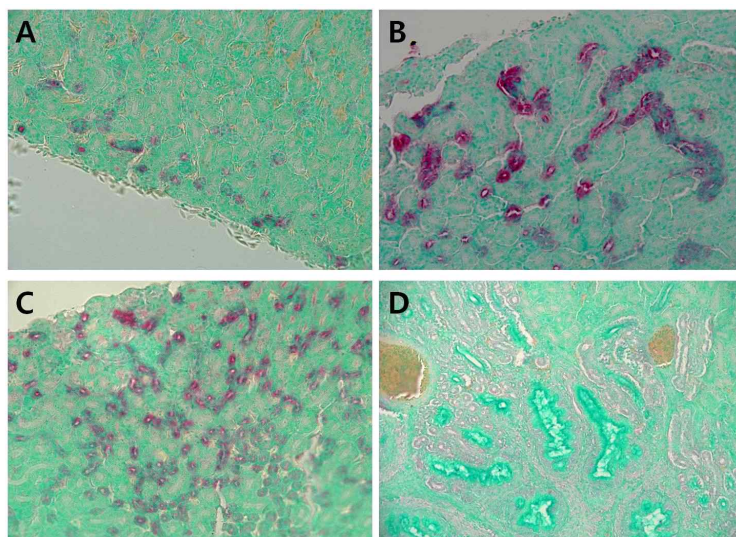


그림 32. 콩팥에서 인플루엔자 수용체 발현 확인. A-C, 조류 인플루엔자 수용체는 쇠오리를 제외한 3종에서 확인되었음. D, 사람 인플루엔자 수용체는 흰뺨검둥오리에서만 확인됨 (A, 청둥오리; B, 홍머리오리, C-D, 흰뺨검둥오리)

⑥ 폐는 조류 인플루엔자 수용체는 청둥오리에서만 발현이 확인됨 (그림 33. A-D). 사람 인플루엔자 수용체는 홍머리오리를 제외한 3종에서 발현이 확인됨 (그림 33. E-H).

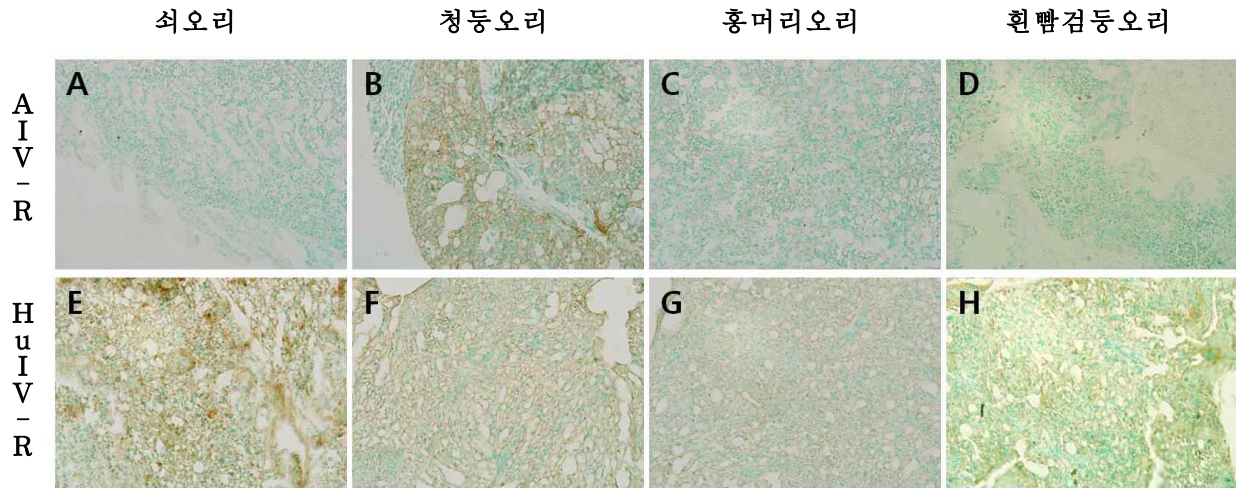


그림 33. 폐에서 인플루엔자 수용체 발현 확인. 조류 인플루엔자 수용체는 청둥오리에서만 확인되었으나, 사람 인플루엔자 수용체는 홍머리오리를 제외한 3종에서 확인됨 (AIV-R, 조류 인플루엔자 수용체; HuIV-R, 사람 인플루엔자 수용체)

⑦ 조류 및 사람 인플루엔자 수용체를 심장, 간, 비장은 4종 모두에서 확인하지 못함 (그림 34. A-D). 하지만 뇌는 4종 모두에서 사람 인플루엔자 수용체의 발현이 확인됨 (그림 34. E-H).

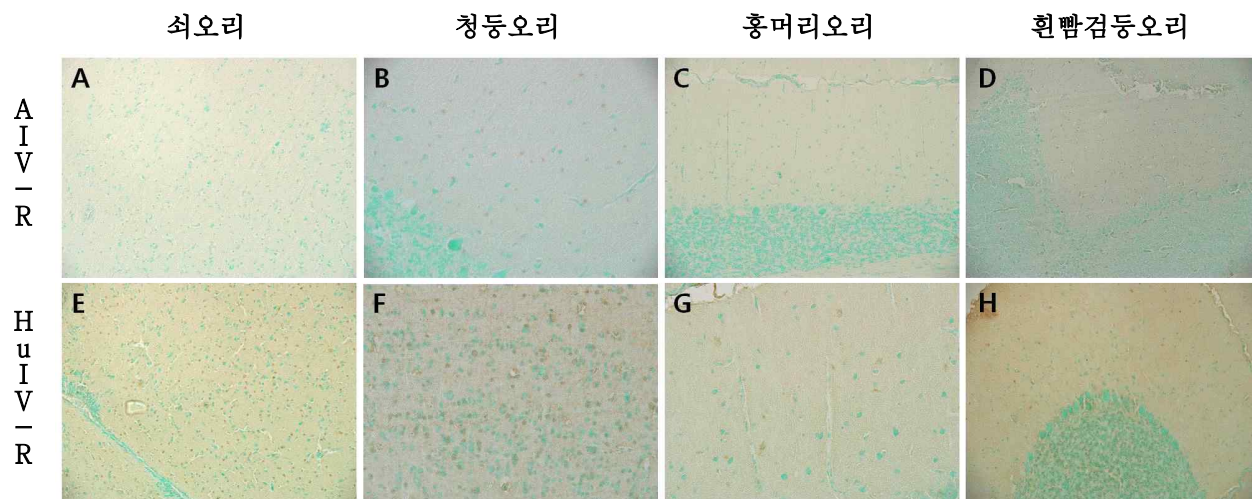


그림 34. 뇌에서 인플루엔자 수용체 발현 확인. 사람 인플루엔자 수용체만 4종 모두에서 발현이 확인됨 (AIV-R, 조류 인플루엔자 수용체; HuIV-R, 사람 인플루엔자 수용체)

(6) 조직 내의 바이러스 항원 검출

(가) Goat anti-influenza A virus polyclonal 항체 (Millipore, USA)를 1:200의 희석배율로 조직과 반응시켜 바이러스에 대한 면역조직화학염색을 실시함으로써 조직 내 바이러스 항원의 유무 및 분포를 확인함.

(나) 동일한 방법으로 quenching과 blocking을 실시한 후, biotinylated anti-goat secondary antibody와 조직을 실온에서 2시간 반응시킴.

(다) 조직 내에 혈액이 많이 남아 있는 간 및 비장 조직은 alkaline phosphatase substrate (광학현미경상 빨간색)를 이용하여, 그 외 다른 조직은 diaminobenzidine (광학현미경상 갈색)를 이용하여 발색함. 이것은 간과 비장 조직에 많이 분포하는 내재성 과산화효소 (endogenous peroxidase)의 활성 때문에 비특이적인 발색이 많아 예비실험 후 DAB 사용을 배제함.

(라) 바이러스 항원의 조직염색 결과는 렉틴 조직염색 결과와 비교 분석함.

표 44. 조직내 인플루엔자 바이러스 항원 검출 결과.

종		호흡기계		소화기계		신경계		기타 실질 장기			
		Lu	D-P	LI	SI	Br	CT	Ht	Liv	Kid	Sp
쇠오리	1	O ^a	nt	O	O	X	O	nt	X	nt	X
청둥오리	1	O	O	O	O	X	O	O	X	O	X
	2	O	O	O	O	X	O	O	X	O	X
홍머리오리	1	O	O	O	O	X	O	O	X	O	O
	2	O	O	O	O	X	O	O	X	O	X
흰뺨검둥오리	1	O	nt	O	X	O	X	nt	X	nt	X
	2	O	O	O	O	O	O	O	X	O	X

^a O, 바이러스 항원 검출; X, 바이러스 항원 미검출; nt, not tested

(마) 조직 내 인플루엔자 바이러스 검출 (표 44)

- ① 두 종류의 인플루엔자 수용체가 모두 발현하는 장기에서 바이러스 항원 검출.
- ② 4종 모두에서 소화기계의 장기들과 맹장편도에서 바이러스 감염이 확인됨 (그림 35).

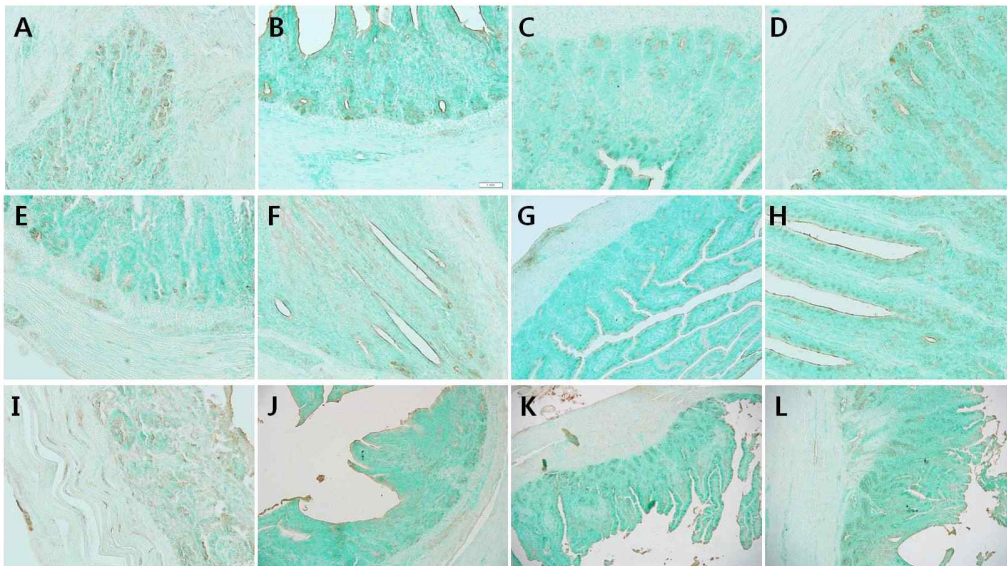


그림 35. H5N1 공격 접종 후 맹장편도 (A-D), 대장 (E-H), 소장 (I-L)의 면역조직화학염색 결과. 4종 모두 바이러스 감염이 확인됨. A, E, I, 쇠오리. B, F, J, 청둥오리. C, G, K, 홍머리오리. D, H, L, 흰뺨검둥오리.

② 한 종류의 인플루엔자 수용체만 발현하는 장기에서 바이러스 항원 검출

㉠ 폐의 경우 조류 인플루엔자 수용체 발현은 청둥오리에서만, 사람 인플루엔자 수용체는 쇠오리, 청둥오리, 흰뺨검둥오리에서 발현이 확인되었으나, 4종 모두 감염이 확인됨 (그림 36).

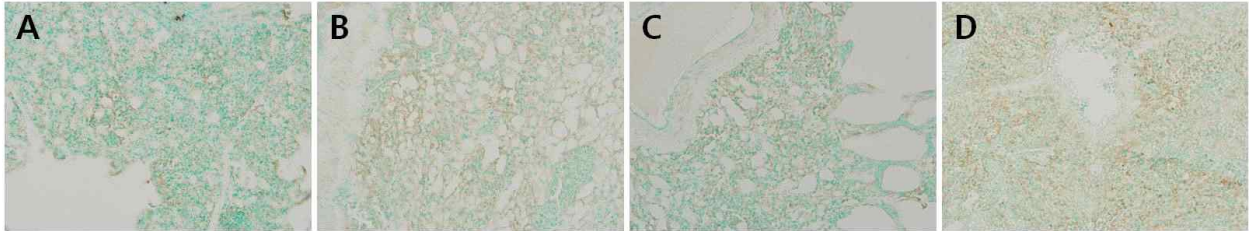


그림 36. H5N1 공격 접종 후 폐의 면역조직화학염색 결과. 4종 모두 폐에서 바이러스 감염이 확인됨. A, 쇠오리. B, 청둥오리. C, 홍머리오리. D, 흰뺨검둥오리.

㉡ 콩팥은 조류 인플루엔자 수용체는 쇠오리를 제외한 3 종에서, 사람 인플루엔자 수용체는 흰뺨검둥오리에서만 발현이 확인되었고 쇠오리를 제외한 3종에서 바이러스 감염이 확인됨 (그림 37).

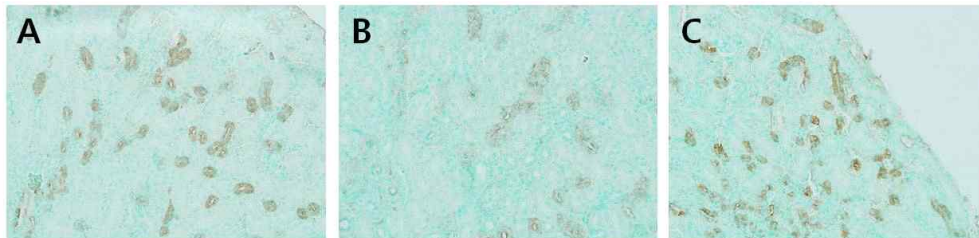


그림 37. H5N1 공격 접종 후 콩팥의 면역조직화학염색 결과. 쇠오리를 제외한 3종의 콩팥에서 바이러스 감염이 확인됨. A, 청둥오리. B, 홍머리오리. C, 흰뺨검둥오리.

㉢ 뇌는 4종 모두에서 사람 인플루엔자 수용체 발현만이 확인되었으나 바이러스 감염은 흰뺨검둥오리에서만 확인됨 (그림 38).

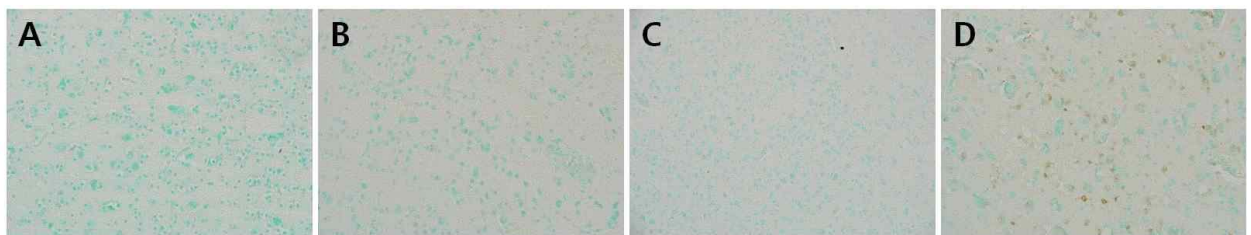


그림 38. H5N1 공격 접종 후 뇌의 면역조직화학염색 결과. 흰뺨검둥오리의 뇌에서만 바이러스 감염이 확인됨. A, 쇠오리. B, 청둥오리. C, 홍머리오리. D, 흰뺨검둥오리.

③ 두 종류의 인플루엔자 수용체가 모두 발현하지 않는 장기에서 바이러스 항원 검출.

㉠ 심장은 인플루엔자 수용체가 발현하지 않는 것으로 확인되었으나 청둥오리, 홍머리오리, 흰뺨검둥오리의 심장 조직에 바이러스 감염이 확인됨 (그림 39. A-C).

㉡ 비장은 홍머리오리 한 개체에서만 바이러스 감염이 확인됨 (그림 39. D).

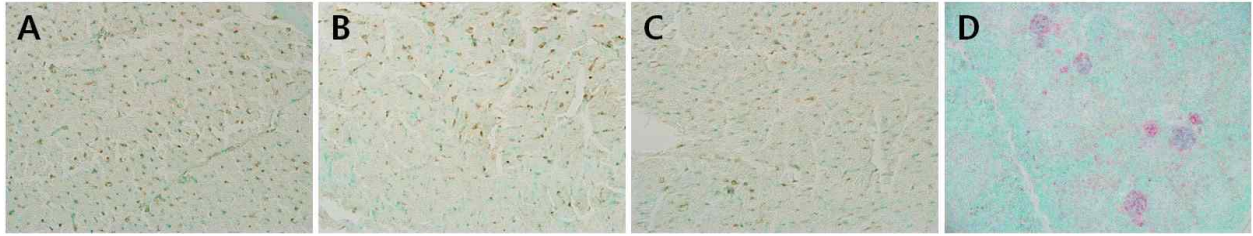


그림 39. H5N1 공격 접종 후 심장 (A-C)과 비장 (D)의 면역조직화학염색 결과. 청둥오리, 홍머리오리, 흰뺨검둥오리의 심장에서 바이러스 감염이 확인됨. 비장은 홍머리오리 1개체에서만 감염이 확인됨. A, 청둥오리. B, D, 홍머리오리. C, 흰뺨검둥오리.

(7) 인플루엔자 바이러스와 인플루엔자 수용체의 이중면역형광염색

(가) 동일한 조직에서 바이러스 항원과 수용체의 발현을 이중면역형광염색법으로 확인함.

(나) Biotinylated Maackia amurensis lectin과 Biotinylated Elderberry bark lectin을 1:750으로 희석하여 밤새 반응시킨 뒤 Dylight Streptavidin 488 (형광현미경상 녹색)을 실온에서 2시간 반응시켜서 리셉터를 먼저 렉틴으로 염색함.

(다) 연이어 Blocking을 한 번 더 실시한 다음 1:200으로 희석한 goat anti-influenza A (H1N1)과 밤새 반응시키고 Dylight594 (형광현미경상 빨간색)가 결합된 2차 항체와 실온에서 2시간동안 반응시킨 후 DAPI로 대조염색을 함.

(라) 형광현미경으로 바이러스 항원과 리셉터의 분포 확인하여 조류인플루엔자 바이러스의 감염 부위와 리셉터 분포의 상관관계를 분석함.

(마) 조직 내 인플루엔자 바이러스 수용체와 항원의 동시 확인

① 감염이 확인된 장기들에서 이중형광염색으로 바이러스 항원과 수용체를 동시에 확인함.

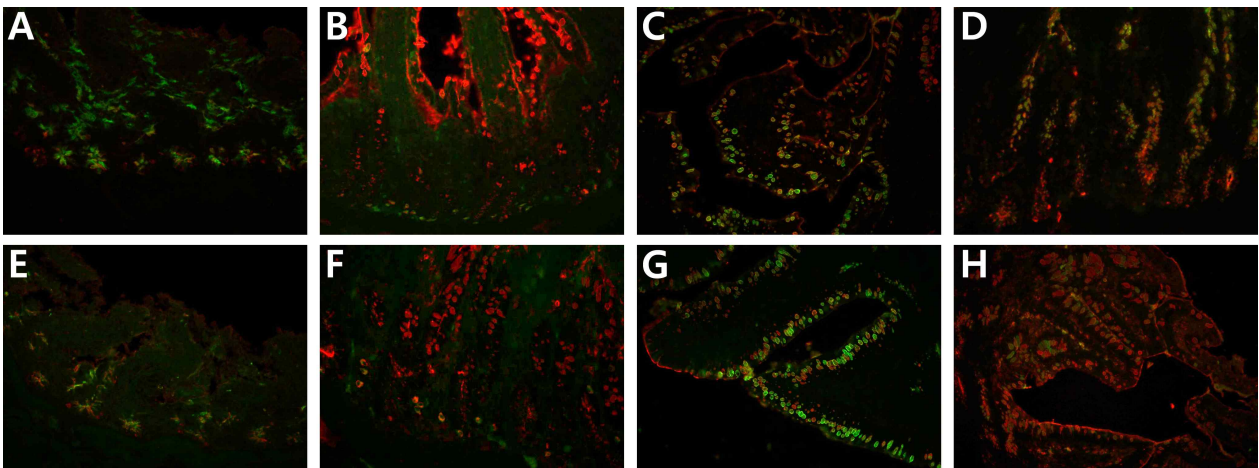


그림 40. 맹장편도(A-D)와 대장(E-H)에서 조류 인플루엔자 수용체(red)와 인플루엔자 바이러스(green)의 이중형광염색 결과. 조류 인플루엔자 수용체를 발현하나 감염되지 않은 세포는 녹색으로, 수용체 발현이 없이 감염된 세포는 빨간색으로, 수용체를 발현하면서 감염된 세포는 노랑-오렌지색으로 보임. A, E, 쇠오리. B, F, 청둥오리. C, G, 홍머리오리. D, H, 흰뺨검둥오리.

② 바이러스 수용체를 발현하나 바이러스가 감염되지 않는 세포, 수용체를 발현하지 않으나 감염된 세포, 그리고 바이러스 수용체를 발현하면서 감염된 세포를 모두 관찰할 수 있었음 (그림 40).

(바) 조류 인플루엔자와 사람 인플루엔자 수용체의 발현부위를 lectin histochemistry로 확인

(사) Lectin histochemistry와 조류 인플루엔자에 대한 면역조직화학염색을 동시에 실시하는 이중염색 기법을 확립

나. 호흡기 및 소화기계통의 조류인플루엔자 바이러스 수용체의 발현

(1) 연구 개요

(가) 위의 연구에서 확립한 이중면역형광염색기법을 이용하여 소화기와 호흡기 계통의 인플루엔자 수용체 발현 부위와 바이러스 감염부위의 일치 여부 판단

(2) 대상동물의 조직 채취 및 처리

(가) 네 가지 종의 야생물새류 (쇠오리, 청둥오리, 홍머리오리, 흰뺨검둥오리)를 대상으로 하였으며 쇠오리를 제외한 개체수는 각각 두 마리였음.

(나) 각 동물에서 호흡기와 소화기계통에서 장기를 채취하여 10% neutral buffered formalin에 고정함 (표 45).

(다) 고정한 조직은 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀으로 포매한 후 5um로 절편을 실시함 (Leica Biosystems, Germany).

표 45. 대상동물과 채취 장기

종	영문명	학명	마리수	채취 장기
쇠오리	Common Teal	<i>Anas crecca</i>	1	SI, LI, D-pan Lung, Trachea
청둥오리	Mallard	<i>Anas platyrhynchos</i>	2	SI, LI, D-pan Lung, Trachea
홍머리오리	Eurasian Wigeon	<i>Anas penelope</i>	2	SI, LI, D-pan Lung, Trachea
흰뺨검둥오리	Spot-billed Duck	<i>Anas poecilorhyncha</i>	2	SI, LI, D-pan Lung, Trachea

Abbreviation: SI=소장, LI=대장, D-pan=십이지장-이자, Lung=폐, Trachea=기관

(3) 수용체-인플루엔자바이러스 이중형광염색

- (가) 조직염색용으로 절편된 슬라이드는 탈파라핀화 시키고 항원복구 (antigen retrieval)를 위하여 10mM sodium citrate buffer (pH6)에서 1분간 microwave oven에서 가열함.
- (나) 비특이적 염색을 방지하기 위하여 조직내의 peroxidase activity를 0.3% H₂O₂ 용액을 이용하여 제거하고 (quenching), 5% normal equine serum을 이용하여 조직을 실온에서 1시간 동안 반응시킴.
- (다) 인플루엔자 바이러스 감염을 확인하기 위해서 Goat anti-influenza A virus polyclonal antibody (5mg/mL, Millipore)를 4°C에서 밤새 조직과 반응시.
- (라) Goat anti-influenza A virus polyclonal antibody에 대한 이차항체는 Anti-goat IgG Dylight 594 red (20ng/mL, Thermo scientific)를 사용하여 실온에서 2시간 반응시킴.
- (마) 조류인플루엔자 바이러스의 수용체는 Biotinylated Maackia Amurensis lection I (20ng/mL, Vector Laboratories)을 이용하여 4°C에서 밤새 염색함.
- (바) Maackia Amurensis lectin에 대한 염색은 Streptavidin Dylight 488 Green (30ng/mL, Vector Laboratories)을 이용하여 실온에서 2시간 진행함.
- (사) 이중형광염색이 실시된 조직은 Vectashield Mounting Medium with DAPI (1.5ng/mL, Vector Laboratories)로 봉입하고 형광현미경으로 검경함 (BX51, Olympus).

(4) 호흡기 및 소화기계통의 조류인플루엔자 바이러스 수용체의 발현

- (가) 위 연구를 통해 얻어진 고병원성 조류인플루엔자 바이러스와 이에 대한 수용체의 이중 면역형광염색 기법을 이용함.
- (나) 인플루엔자 바이러스 수용체는 Maackia Amurensis lectin을 이용하여 조류인플루엔자 바이러스에 대한 수용체 발현 여부를 확인함.
- (다) 조류인플루엔자 바이러스 수용체는 소장과 대장에서 네 종의 조류에서 공통적으로 발현되었고 나머지 장기는 종별 차이를 나타냈음.
- (라) 면역형광염색 방법으로 검출된 조류인플루엔자 바이러스 수용체 발현 부위는 대체적으로 DAB를 이용한 일반면역염색 결과와 동일하였음 (표 46, 47 및 그림 41 참조).

표 46. 면역형광염색을 통한 조류인플루엔자 바이러스 수용체 발현 여부

	흰뺨검둥오리		청둥오리		홍머리오리		쇠오리
	1	2	1	2	1	2	1
SI	×	○	○	○	○	○	○
LI	○	○	○	○	○	○	○
D-P	nt	○	○	○	○	○	nt
Lung	×	×	○	○	×	×	×
Tra	×	○	×	×	×	×	○

○, 리셉터 검출; X, 리셉터 미검출; nt, not tested

표 47. 기존 실험 결과 중 DAB를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 수용체 발현 여부

	흰뺨검둥오리		청둥오리		홍머리오리		쇠오리
	1	2	1	2	1	2	1
SI	×	×	○	○	○	○	×
LI	nt	nt	○	○	○	○	○
D-P	nt	×	○	○	○	○	nt
Lung	×	×	○	○	×	×	×
Tra	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt

○, 리셉터 검출; X, 리셉터 미검출; nt, not tested

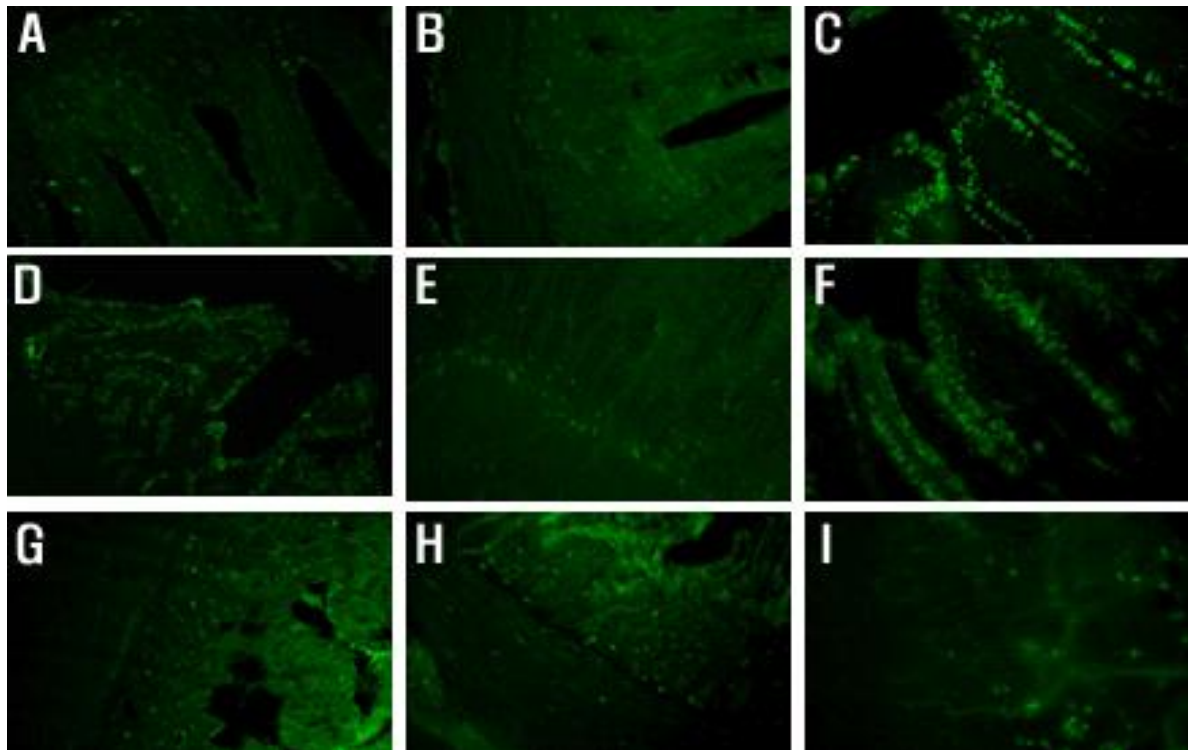


그림 41. 소장(A-C), 대장(D-F), 십이지장/이자(G-I)에서 조류 인플루엔자 수용체의 형광면역염색 결과. 조류인플루엔자 바이러스 수용체를 발현하는 세포는 녹색으로 보임. A, D, G, 흰뺨검둥오리. B, E, H, 청둥오리. C, F, I 홍머리오리.

(마) 따라서 면역형광염색 방법 역시 이중 면역형광염색을 실시해야 하는 경우 안정적인 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단됨

(바) 다만 흰뺨검둥오리의 소장과 쇠오리의 소장의 조류인플루엔자 바이러스 수용체 발현 여부가 면역형광염색과 일반면역염색 결과에 따라 차이를 보였는데 이는 1년차에 DAB로 염색된 수용체의 시그널이 약해서 판독자의 결과 판단에서 차이를 나타낸 것으로 보임

(5) 호흡기 및 소화기계통의 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 감염 검출

(가) 조직 내에 감염된 고병원성 조류인플루엔자 바이러스는 1년차에 실시했던 DAB를 이용한 일반면역염색과 동일한 민감도로 항원을 검출할 수 있었음.

(나) 고병원성 조류인플루엔자 바이러스는 염색이 완료된 거의 모든 조직에서 감염이 확인되었음.

(다) 특히 면역형광염색 결과는 기존에 실시한 DAB로 발색한 일반면역염색 결과와 매우 유사한 결과를 모여 염색방법에 따른 바이러스 검출 여부에 영향을 보이지 않음 (표 48, 49 및 그림 42 참조).

표 48. 면역형광염색을 통한 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 감염 검출

	흰뺨검둥오리		청둥오리		홍머리오리		쇠오리
	1	2	1	2	1	2	1
SI	×	○	○	○	○	○	○
LI	○	○	○	○	○	○	○
D-P	nt	○	○	○	○	○	nt
Lung	○	○	○	○	○	○	○
Tra	○	○	○	○	○	○	○

○, 바이러스 항원 검출; X, 바이러스 항원 미검출; nt, not tested

표 49. 기존 연구 결과 중 DAB를 이용한 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 감염 검출

	흰뺨검둥오리		청둥오리		홍머리오리		쇠오리
	1	2	1	2	1	2	1
SI	○	○	○	○	○	○	○
LI	○	○	○	○	○	○	○
D-P	nt	○	○	○	○	○	nt
Lung	○	○	○	○	○	○	○
Tra	○	○	○	○	nt	nt	○

○, 바이러스 항원 검출; X, 바이러스 항원 미검출; nt, not tested

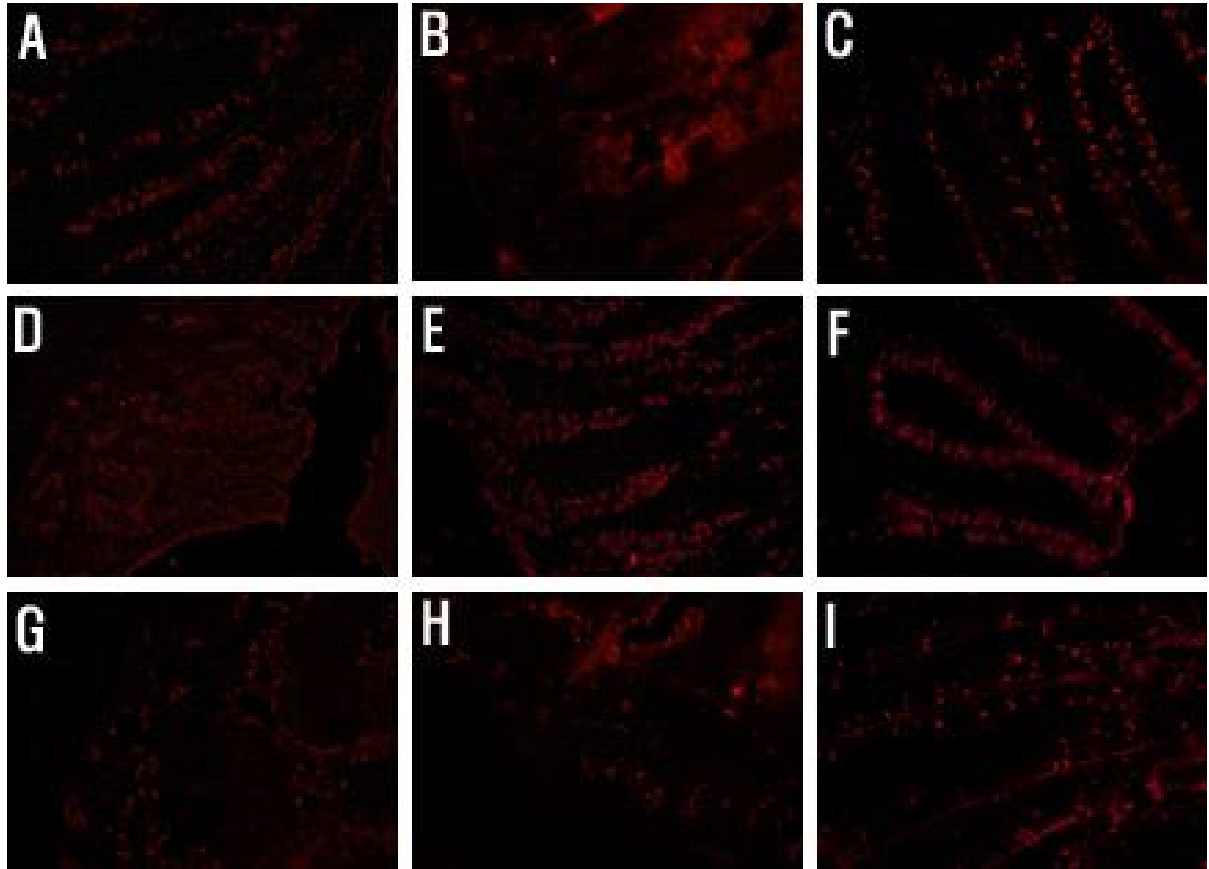


그림 42. 소장(A-C), 대장(D-F), 십이지장/이자(G-I)에서 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 형광면역염색 결과. 바이러스에 감염된 세포가 빨간색으로 관찰됨. A, D, G, 흰뺨검둥오리. B, E, H, 청둥오리. C, F, I 홍머리오리.

(라) 따라서 인플루엔자 바이러스 수용체와 인플루엔자 바이러스를 동시에 검출하는 이중면역형광염색에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단됨.

(6) 조류인플루엔자 바이러스 수용체와 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 이중면역형광염색 결과

(가) 실험에 사용된 네 종의 야생조류의 소화기 계통은 조류 인플루엔자 바이러스 수용체의 발현이 확인되었고, 이에 따른 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 감염이 확인되었음 (표 50 및 그림 43 참조).

(나) 반면 호흡기 계통에서는 흰뺨검둥오리와 청둥오리의 기관에 인플루엔자 바이러스 수용체의 발현이 확인되지 않았는데도 불구하고 바이러스 감염이 확인되었으며, 홍머리오리의 폐에 인플루엔자 바이러스 수용체 발현이 없었으나 바이러스 감염이 확인됨.

(다) 인플루엔자 바이러스 수용체가 발현되지 않는 장기에서 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 감염이 확인된 경우가 있었음.

(라) 수용체 발현이 없는 장기 또는 세포에서 인플루엔자 바이러스가 감염된 사례는 최근 마우스를 이용한 실험적 감염에서 보고되었음 (Kim et al., Journal of Chemical Neuroanatomy, 52: 49-57, 2013). 또한 인플루엔자 바이러스가 인위적으로 수용체를 제거한 MDCK 세포에도 감염된다는 보고가 있어 (Stray et al., Glycobiology, 10: 649-658, 2000) 인플루엔자 바이러스가 수용체가 없는 세포에 감염될 수 있는 가능성은 있을 것으로 예상됨. 그러나 수용체가 없는 세포에 인플루엔자 바이러스가 감염되는 이유에 대해서는 아직 밝혀진 것이 없음.

표 50. 조류인플루엔자 바이러스 수용체와 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 이중 면역형광염색 결과

	흰뺨검둥오리		청둥오리		홍머리오리		쇠오리
	1	2	1	2	1	2	1
SI	×	○	○	○	○	○	○
LI	×	○	○	○	○	○	×
D-P	nt	○	×	○	○	○	nt
Lung	×	×	○	×	×	×	×
Tra	×	○	×	×	×	×	○

○, 바이러스 항원/수용체 이중염색 세포 존재; X, 바이러스 항원/수용체 이중염색 세포 부재; nt, not tested

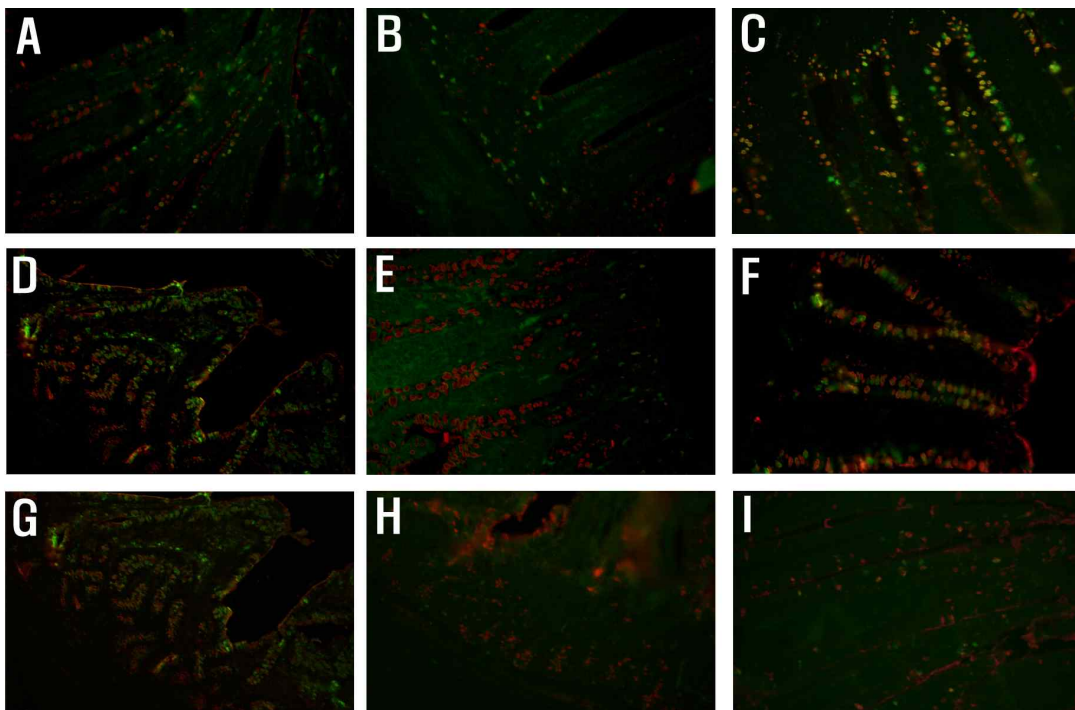


그림 43. 소장(A-C), 대장(D-F), 맹장편도(G-I)에서 조류 인플루엔자 수용체(green)와 인플루엔자 바이러스(red)의 이중 면역형광염색 결과. 조류 인플루엔자 수용체를 발현하나 감염되지 않은 세포는 녹색으로, 수용체 발현이 없이 감염된 세포는 빨간색으로, 수용체를 발현하면서 감염된 세포는 노란색 또는 오렌지색으로 보임. A, D, G, 흰뺨검둥오리. B, E, H, 청둥오리. C, F, I 홍머리오리.

다. 야생조류의 조류인플루엔자 바이러스 신경계 감염과 리셉터 분포의 상관관계 분석

(1) 연구의 개요

(가) 기존의 연구결과에서는 야생조류에 고병원성 조류인플루엔자 감염 시 신경증상을 유발하고 폐사를 일으키는 것으로 알려져 있으나 신경증상을 일으키는 기전에 대하여 연구가 부족한 실정임.

① 조류인플루엔자 수용체와 바이러스 동시 염색기법을 통하여 신경계의 리셉터 분포에 대한 바이러스 감염 분포를 세포 수준에서 분석함.

(나) 비둘기와 원앙과 같은 텃새류를 대상으로 고병원성 조류인플루엔자 바이러스를 생물안전3등급 시설 내에서 감염시키고, 조류인플루엔자 수용체의 종류와 바이러스 감염양상을 비교함

(다) 비둘기와 원앙의 고병원성 조류인플루엔자 감염에 따른 뇌의 부위별 신경세포의 병리학적 변화를 분석하고 바이러스 및 리셉터 분포와 비교하여 신경계 병리기전을 연구

(2) 대상동물의 조직 채취 및 이중면역염색

(가) 혈청학적 검사로 인플루엔자 바이러스에 감염 되지 않은 원앙 (n=3), 비둘기 (n=4)에 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 (H5N8)을 눈을 통해 공격접종 함 (0.2 ml of $10^{7.0}$ EID₅₀/mL)

(나) 각 동물에서 뇌, 기관, 폐, 심장, 간, 콩팥, 비장, 이자, 소장, 대장, 및 맹장편도를 채취하여 10% neutral buffered formalin에 고정함

(다) 고정된 조직은 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀으로 포매한 후 5um로 절편을 실시함 (Leica Biosystems, Germany)

(라) 인플루엔자 수용체와 인플루엔자 바이러스의 면역조직화학적 검출은 위에 기술한 것과 동일한 방법으로 수행함

(3) 원앙의 인플루엔자 바이러스 검출과 수용체 발현의 상관관계

(가) 원앙 3개체에서 인플루엔자 바이러스에 대한 면역조직화학염색 결과, 뇌, 기관, 폐, 간, 췌장, 소장, 대장 및 신장에서 바이러스가 검출되었음 (표 51, 그림 44)

(나) 바이러스가 검출된 장기는 개체별로 차이가 있었으며 모든 개체에서 공통적으로 검출된 곳은 소장, 대장 및 신장이었음

표 51. 원앙의 장기별 조류인플루엔자 (AIV) 검출 및 조류인플루엔자 수용체 (AIV-R), 사람인플루엔자 수용체 (HuI-R) 발현 분석 결과

	원앙 1번			원앙 2번			원앙 3번		
	AIV	AIV-R	HuI-R	AIV	AIV-R	HuI-R	AIV	AIV-R	HuI-R
Brain	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Tra	+	++	+	++	++	+	-	++	-
Lung	-	-	-	-	-	-	+	-	-
HT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Liver	-	-	+	+	-	+	++	-	+
Spl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pan	-	+	-	-	-	-	+	+	-
SI	+	+	+	+	+	-	++	+	+
CT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LI	++	+	+	+	+	-	++	+	+
Kidney	+	++	+	++	+	+	++	++	+

붉은 부분은 조류 인플루엔자 바이러스와 수용체가 동시에 검출된 경우임.

-, 시그널 없음; +, 미약한 시그널; ++, 중간 시그널; +++, 강한 시그널; nt, not tested

Abbreviation: Tra, 기관; Sp, 비장; Pan, 췌장; SI, 소장; CT, 맹장편도; LI, 대장

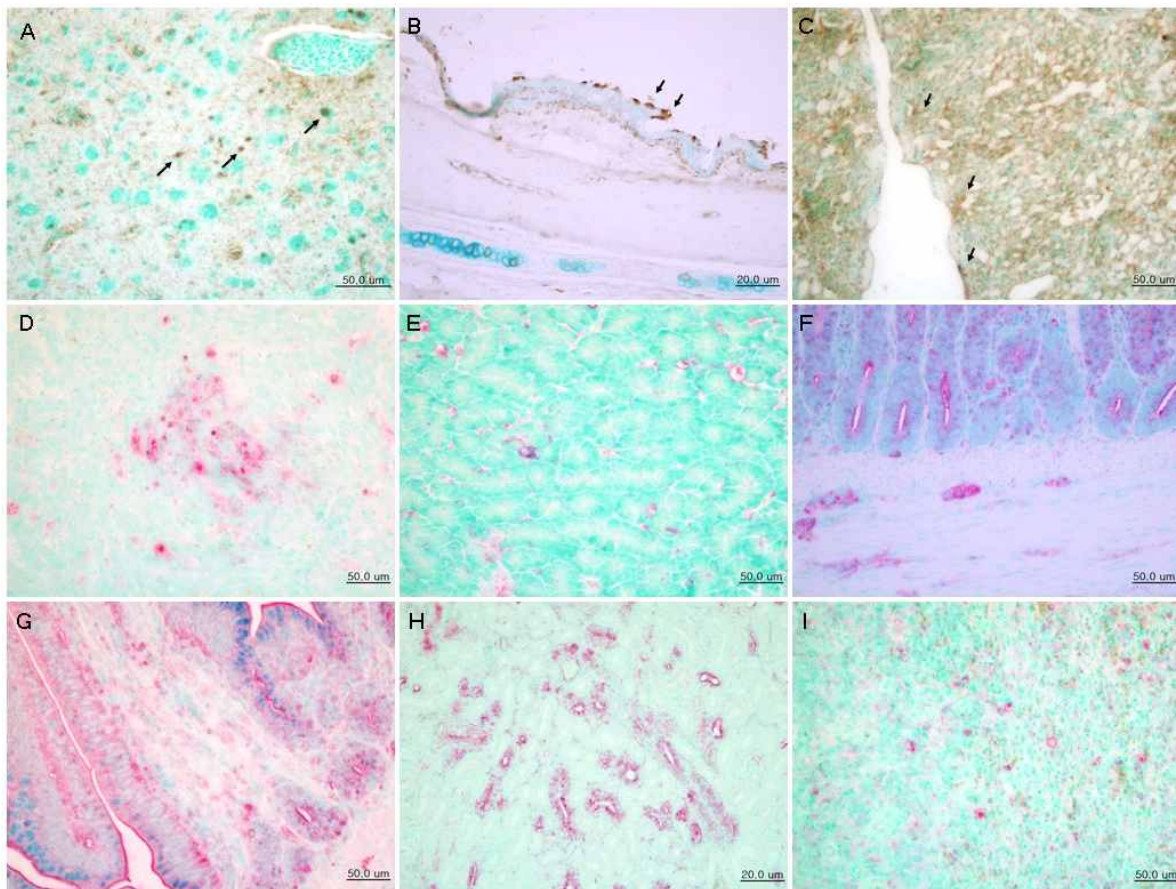


그림 44. 원앙의 각종 장기에서 고병원성 인플루엔자 바이러스에 대한 면역조직화학염색 결과. Brain (A), trachea (B), lung (C), liver (D), pancreas (E), small intestine (F), large intestine (G), kidney (H), and spleen (I). 작은 화살표로 표시된 세포는 인플루엔자 바이러스에 감염된 세포를 가리키며 DAB로 발색한 감염세포는 갈색, Vector Red®로 발색한 세포는 붉은색으로 관찰됨.

(다) 조류인플루엔자 바이러스 수용체 (AIV-R)의 분포는 기관, 췌장, 소장, 대장, 신장에서 확인되었으며, 췌장의 경우 한 개체에서는 발현되지 않는 차이를 보였음 (표 51, 그림 45)

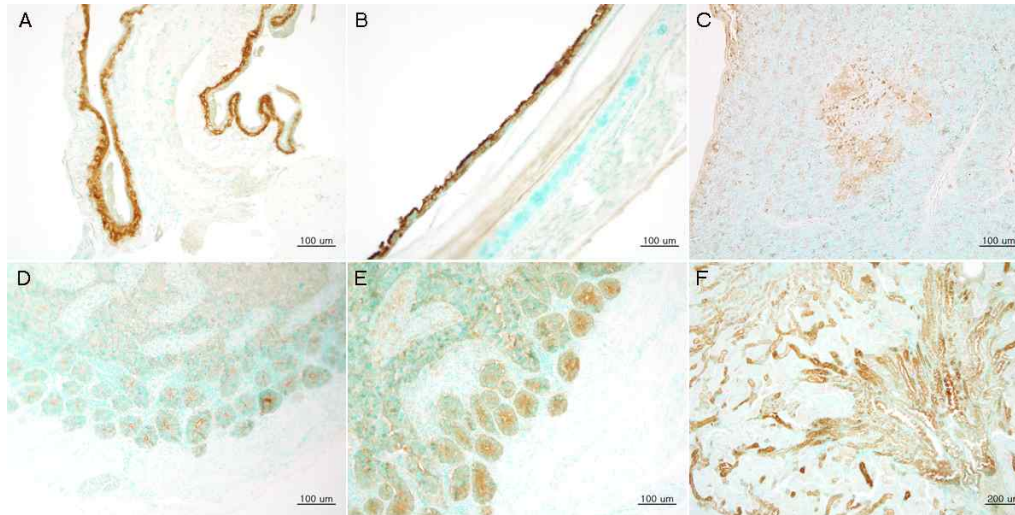


그림 45. 원앙의 각종 장기에서 발현된 조류인플루엔자 바이러스 수용체 (AIV-R) 염색 결과. Brain (A), trachea (B), liver (C), small intestine (D), large intestine (E), kidney (F). 갈색으로 염색된 세포는 *Makia amurensis* lectin으로 염색된 수용체 발현 세포임.

(라) 조류인플루엔자 바이러스 수용체는 뇌에서 발현을 보였으나 뇌 실질에서 발현되지 않고 뇌막(meninge)에서 발현되었음 (그림 45-A)

(마) 사람인플루엔자 바이러스 수용체 (HuIV-R)은 뇌, 기관, 간, 소장, 대장, 신장에서 발현되었으며, 기관과 소장에서는 개체별 차이를 확인 할 수 있었음 (그림 46)

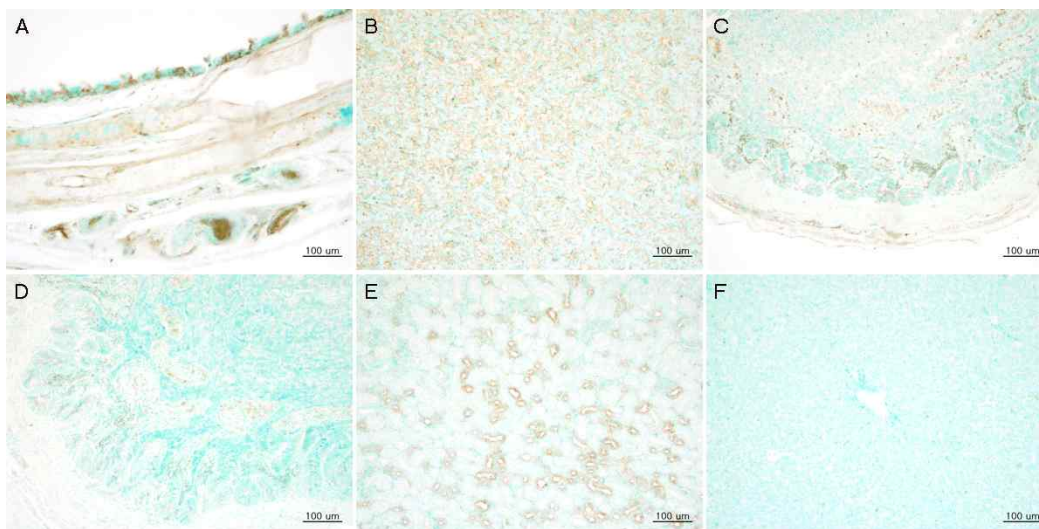


그림 46. 원앙의 각종 장기에서 발현된 사람인플루엔자 바이러스 수용체 (HuIV-R) 염색 결과. Trachea (A), liver (B), small intestine (C), large intestine (D), kidney (E), liver negative control (F). 갈색으로 염색된 세포는 Elderberry bark lectin으로 염색된 수용체 발현 세포임.

(4) 비둘기의 인플루엔자 바이러스 검출과 수용체 발현의 상관관계

(가) 비둘기 4개체에서 인플루엔자 바이러스에 대한 면역조직화학염색 결과 심장, 간, 소장, 맹장편도, 대장 및 신장에서 바이러스가 검출되었음 (표 52, 그림 47).

표 52. 비둘기의 장기별 조류인플루엔자 (AIV) 검출 및 조류인플루엔자 수용체 (AIV-R), 사람인플루엔자 수용체 (HuI-R) 발현 분석 결과

	비둘기 1번			비둘기 2번			비둘기 3번			비둘기 4번		
	AIV	AIV-R	HuI-R	AIV	AIV-R	HuI-R	AIV	AIV-R	HuI-R	AIV	AIV-R	HuI-R
Br	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tra	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Lung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Liver	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Spl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SI	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-
CT	+	nt	nt	-	nt	-	-	nt	nt	+	-	-
LI	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-
Kidney	+	++	+	-	++	+	-	++	+	-	++	+

붉은 부분은 조류 인플루엔자 바이러스와 수용체가 동시에 검출된 경우임

-, 시그널 없음; +, 미약한 시그널; ++, 중간 시그널; +++, 강한 시그널; nt, not tested

Abbreviation: Tra, 기관; Sp, 비장; Pan, 췌장; SI, 소장; CT, 맹장편도; LI, 대장

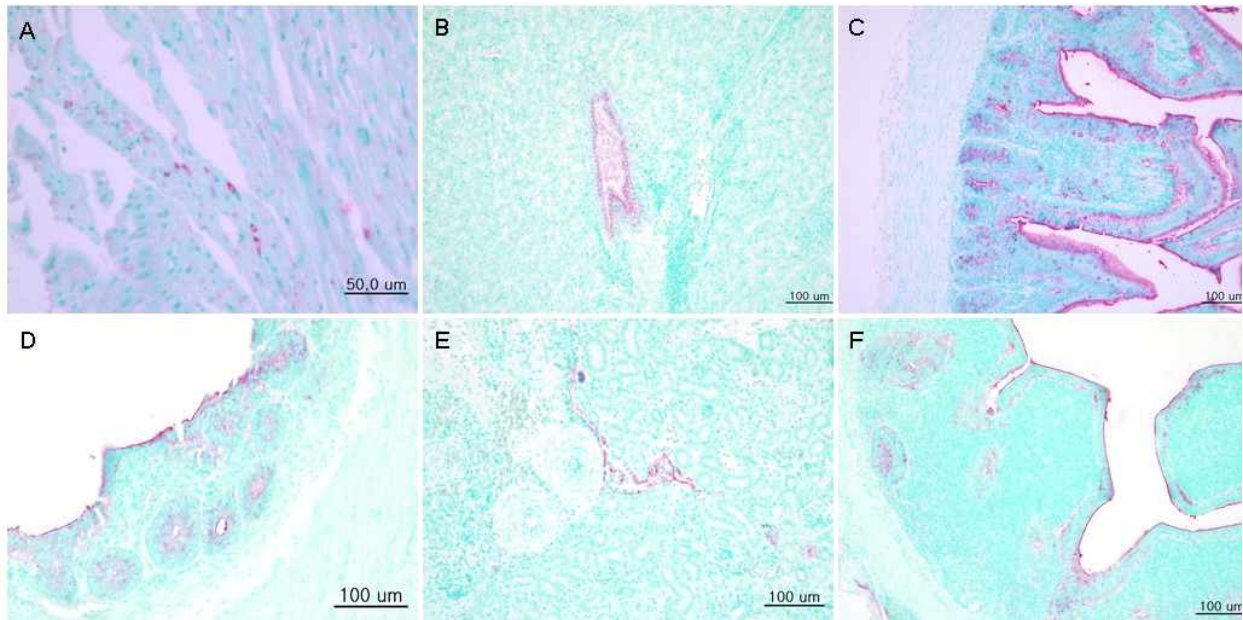


그림 47. 비둘기의 각종 장기에서 고병원성 인플루엔자 바이러스에 대한 면역조직화학염색 결과. Heart (A), liver (B), small intestine (C), large intestine (D), kidney (E), and cecal tonsil (F). 감염된 세포는 Vector Red로 발색하여 붉은색으로 관찰됨.

(나) 바이러스가 검출된 장기는 개체별로 차이가 있었으며 모든 개체에서 공통적으로 검출된 곳은 소장이었음.

(다) 조류인플루엔자 바이러스 수용체(AIV-R)의 분포는 기관, 소장, 대장, 신장에서 공통적으로 확인되었음 (그림 48).

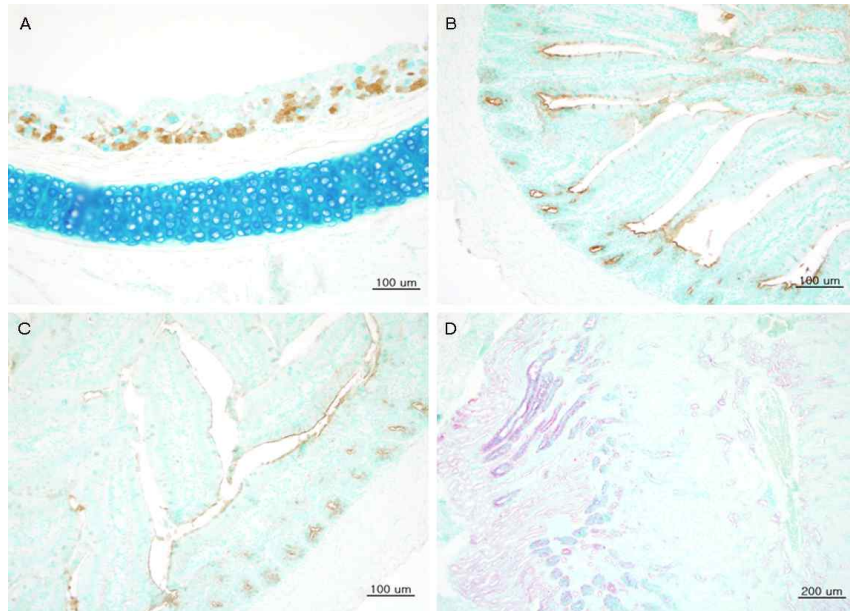


그림 48. 비둘기의 각종 장기에서 발현된 조류인플루엔자 바이러스 수용체 (AIV-R) 염색 결과. Trachea (A), small intestine (B), large intestine (C), kidney (D). 갈색 또는 붉은색으로 염색된 세포는 *Makia amurensis* lectin으로 염색된 수용체 발현 세포임.

(라) 사람인플루엔자 바이러스 수용체(HuIV-R)은 기관, 간, 신장에서 발현되었으며, 개체별 차이는 보이지 않음 (그림 49).

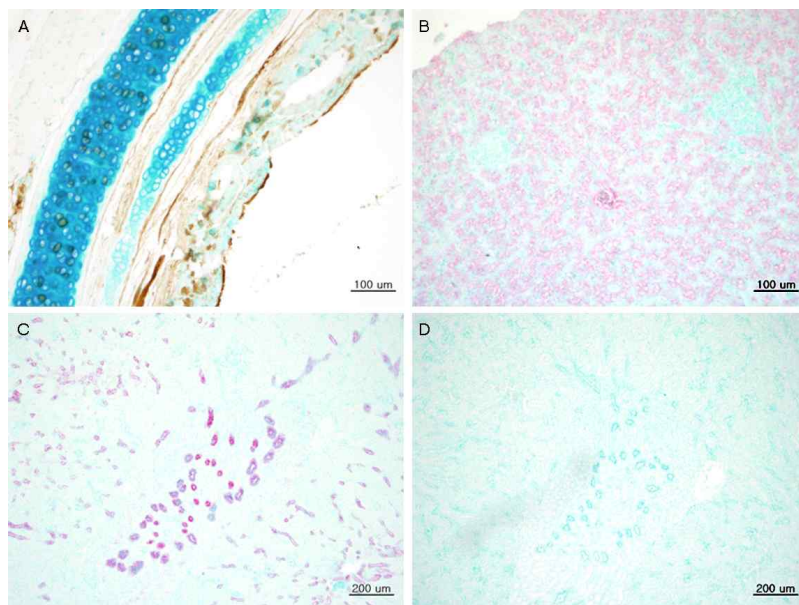


그림 49. 비둘기의 각종 장기에서 발현된 사람인플루엔자 바이러스 수용체(HuIV-R) 염색 결과. Trachea (A), liver (B), kidney (C), kidney negative control (D). 갈색 또는 붉은색으로 염색된 세포는 Elderberry bark lectin으로 염색된 수용체 발현 세포임.

(5) 원앙과 비둘기 감염조직의 병리학적 변화

(가) 인플루엔자에 감염이 확인된 조직에서는 조직병리학적 소견이 일부 관찰되었음 (그림 50).

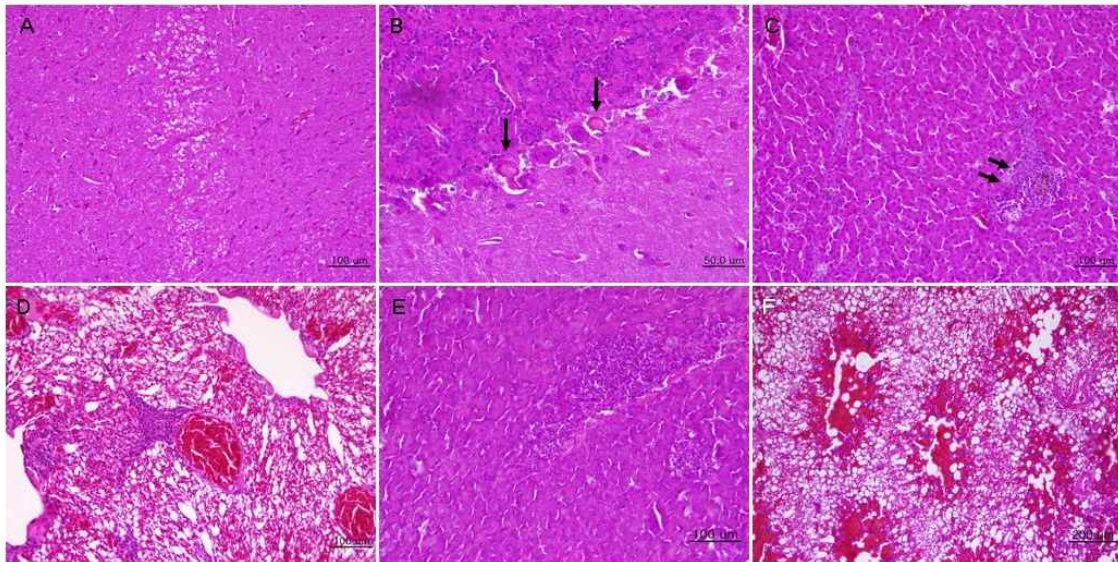


그림 50. Hematoxylin & Eosin 염색 결과. 바이러스에 감염된 원앙(A-D)과 비둘기(E-F) 조직에서 조직병리학적 소견이 관찰되었음. Brain (A and B), liver (C), and lung (D), pancreas (E), lung (F).

(나) 원앙의 대뇌에서는 탈수초 (demyelination)와 소뇌 배상세포 (Purkinj neuron)의 핵용해 (karyolysis)가 관찰됨.

(다) 원앙의 간에서는 multi-focal necrosis와 염증세포의 침윤이 관찰되었음.

(라) 원앙의 폐에서는 충혈을 동반한 림프구 침윤이 관찰되었음.

(마) 비둘기에서는 췌장염과 심한 폐의 부기관지 출혈이 관찰됨.

(6) 조류인플루엔자 바이러스의 신경계 감염과 수용체 발현의 상관관계

(가) 연구기간 중 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 신경계 감염은 흰뺨검둥오리와 원앙에서만 확인됨 (표 53).

표 53. 연구 대상 조류의 신경계 인플루엔자 감염과 수용체 발현의 상관관계

	흰뺨검둥오리	청둥오리	홍머리오리	쇠오리	원앙	비둘기
조류인플루엔자 감염 여부	+	-	-	-	+	-
조류인플루엔자 수용체 발현	-	-	-	-	+	-
사람인플루엔자 수용체 발현	+	+	+	+	+	-

(나) 조류 인플루엔자 바이러스 수용체 (AIV-R)는 원양에서만 발현되었고, 사람 인플루엔자 수용체는 비둘기를 제외한 모든 동물에서 발현이 되었음.

(다) 그러나 조류인플루엔자 바이러스에 감염이 확인되고 AIV-R 발현이 있는 원양에서도 이중염색을 통해 바이러스와 수용체가 동시에 염색된 경우는 관찰되지 않아 신경계통의 수용체 발현과 인플루엔자 바이러스 감염 사이의 상관관계는 찾을 수 없었음 (그림 51).

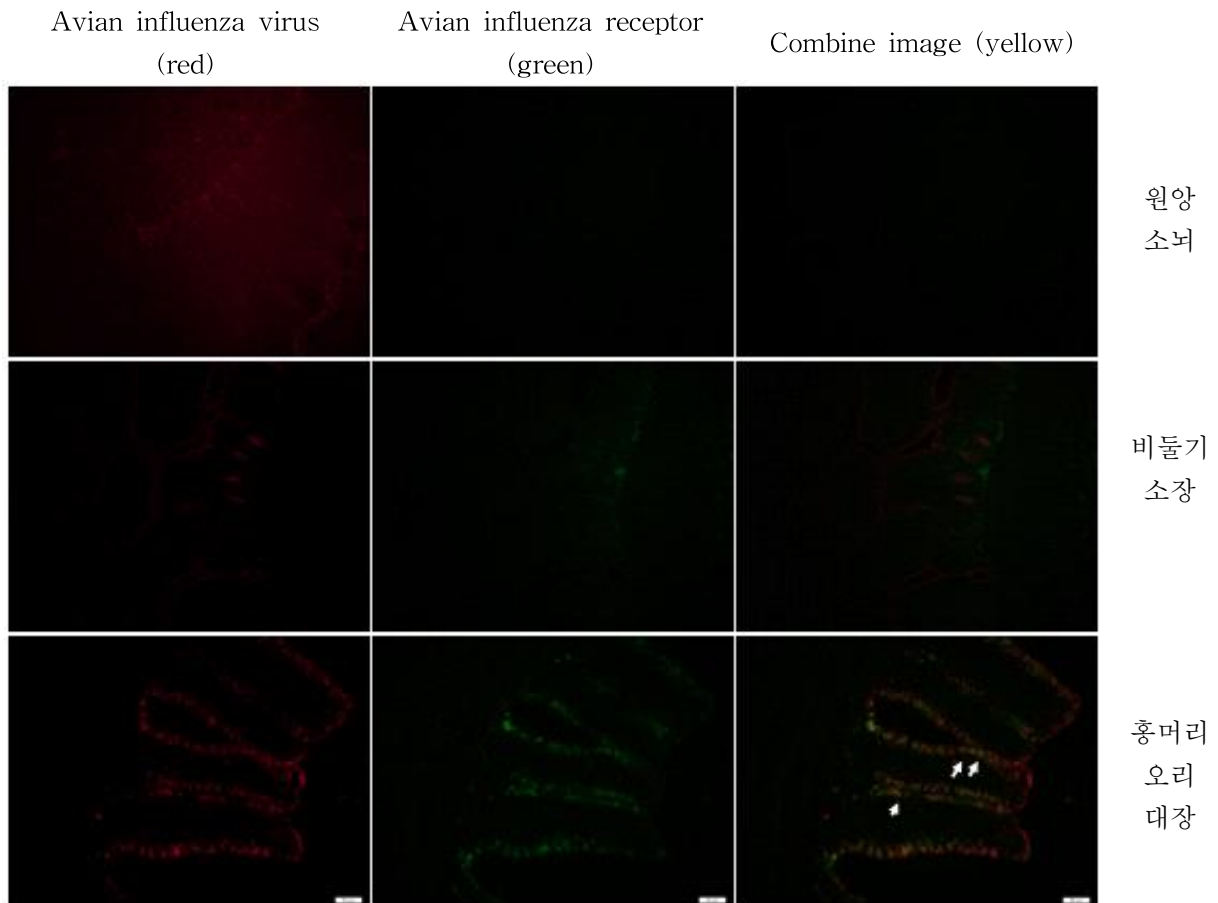


그림 51. 조류인플루엔자 바이러스와 조류인플루엔자 수용체 이중염색 결과. 인플루엔자 바이러스는 붉은색, 수용체는 녹색으로 염색하여 동일한 세포에 염색된 경우 노란색으로 관찰됨 (화살표)

(7) 인플루엔자 바이러스 감염과 수용체 발현의 상관관계에 대한 고찰

(가) 본 연구의 대상으로 한 조류의 바이러스 수용체 발현 부위와 실험적 감염의 결과로 검출된 감염부위는 소화기 계통에서는 상관관계가 높았으나 호흡기, 심장 및 뇌에서는 상관관계가 낮았음.

(나) 이와 같은 결과는 조사 대상 조류의 소화기 계통에서 스 수용체가 다른 장기에 비해 상대적으로 넓게 분포하기 때문으로 판단됨.

(다) 신경계통의 감염 중 뇌로 감염되는 경우는 비강으로 감염된 경우 1차적으로 후각신경을 따라 후각망울 (olfactory bulb)로 감염되는 경우와 (Park et al., 2002), 전신감염 후 2차적으로 뇌신경을 따라 감염되는 경우 (Jang et al., 2009), blood-brain barrier의 손상으로 혈액에서 직접 뇌실질로 감염되는 경우 (Wang et al., 2010) 등이 알려져 있음.

(라) 본 연구의 대상 조류 중 뇌실질 내에 조류인플루엔자 바이러스 수용체를 발현한 동물은 없었으며, 원양만이 뇌막 (menninge)에 조류인플루엔자 수용체를 발현하였음.

(마) 따라서 연구 대상 조류에서 검출된 고병원성 조류인플루엔자 바이러스는 1차적인 감염이 아닌 것으로 판단되며, 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 신경세포 감염은 수용체 존재 여부와 관련 없이 일어날 수 있는 것으로 사료됨.

2. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 오리류 및 텃새류에서의 증식성 및 병원성 조사

가. H5N1 Clade 2.3.2.1 바이러스의 야생오리류 4종에서 병원성 및 증식성 분석

(1) 야생조류 포획 및 사전 검사

(가) 야생조류 전문 연구팀인 한국환경생태연구소에 야생조류 포획을 위탁하여 2014년 1월 7일 전라북도 만경강 일대에서 포획한 야생조류를 수령함.

(나) 본래의 계획서의 종과는 다른 야생오리가 포획되어 청둥오리 30수, 흰뺨검둥오리 30수, 홍머리오리 10수, 쇠오리 3수를 수령하였으며 swab 및 채혈을 통하여 항원 및 항체검사를 실시함.

(다) 항체 검사는 NP-ELISA kit (Bionote) 및 H5항원에 대한 HI test를 실시하였으며, 항원 검사는 swab sample을 real-time RT-PCR을 이용하여 검사함 (그림 52).



그림 52. 포획 야생조류의 사전 검사 모습

(라) 항체 및 항원 검사의 결과를 확인하여 (표 54) 항원 및 항체 음성 개체를 실험에 이용하였으며, 양성 개체는 부검 후 조직을 채취하여 리셉터 분포 연구에 활용함.

표 54. 포획 야생조류 사전 검사 결과.

NP elisa result											
종	PI index										Negative/Total
흰뺨검둥	26.28	53.01	90.54	-13.01	97.16	10.51	92.87	95.45	28.09	50.63	10/19
	8.13	-35.14	-7.43	26.07	99.43	47.53	24.52	92.92	-14.25		
청둥오리	15.27	90.54	85.58	96.64	94.36	95.14	95.35	89.66	86.56	71.41	7/29
	-1.33	92.50	-37.88	24.94	34.65	54.82	89.61	9.68	40.13	91.73	
	75.65	97.83	76.01	72.29	93.69	81.54	49.44	78.55	63.71		
홍머리오리	17.85	20.75	17.08	95.92	14.75	11.24	-11.20	1.88	-1.33	-11.30	9/10
쇠오리	4.36	24.32	83.77								2/3

M gene real-time result											
종	CT value										Negative/Total
흰뺨검둥	0	0	33.1	33.3	0	37.6	0	39.1	0	0	16/19
	31.1	0	0	39.6	0						
청둥오리	0	0	0	0	0	0	0	32	0	0	27/29
	39.8	0	0	0	0	0	0	0	0	34.5	
	37.9	0	0	0	0	0	0	0	0		
홍머리오리	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10/10
쇠오리	0	0	30.4								2/3

위, 항체보유 여부 검사를 위한 Bionote의 NP-ELISA 키트 검사 결과; 아래, 바이러스 보유 여부 검사를 위한 AIV M gene real-time PCR 검사 결과

(2) 대상 종

(가) 흰뺨검둥오리 7수, 청둥오리 7수, 홍머리오리 7수, 쇠오리 3수

(3) 임상증상 및 폐사율 분석





(가) 야생조류는 건국대학교 수의과대학 내에서 사전검사 후 BL3 시설로 옮겨져 사육되었으며, 매일 사료와 물을 제공해 주었음.

(나) 야생조류 종별 각 5수씩 2010년 분리 H5N1 clade 2.3.2 바이러스를 2×10^7 EID₅₀/dose로 intracleft 및 점안 접종한 후 2주간 임상증상 및 폐사율을 관찰함. 그 중 각 2수씩 바이러스의 조직 분포 관찰을 위하여 감염 5일 후 부검을 실시하여 조직을 채취함.

(다) 야생조류 종별 각 2수씩 공격접종한 동종의 야생조류와 같은 isolator 안에서 사육하여 접촉전과 여부를 확인함 (포획 수량 부족으로 쇠오리 제외).

(라) 폐사 개체의 경우 부검을 실시하여 육안병변을 확인하고 조직검사를 위한 조직을 채취함. 채취조직은 10% 중화 완충 포르말린 (neutral buffered formalin)에 보관 후 외부소독 후 반출하여 검사를 실시함.

표 55. 병원성 및 증식성 분석에 사용된 야생오리류.

종 (species)	영문명	학명	BL-3 시설 내 사진
흰뺨검둥오리	Spot-billed Duck	<i>Anas poecilorhyncha</i>	
청둥오리	Mallard	<i>Anas platyrhynchos</i>	
쇠오리	Common Teal	<i>Anas crecca</i>	
홍머리오리	Eurasian wigeon	<i>Anas penelope</i>	

(마) 살아남은 개체의 경우 혈청을 채취하여 항체여부를 검사함. 채취 혈청은 56℃에서 30분간 비동화 및 바이러스 불활화 후 반출함.

(바) 2주간 임상증상 및 폐사율 관찰 결과 및 혈청검사 결과는 표 56와 같음

표 56. H5N1 바이러스 (clade 2.3.2) 접종 후 야생조류 종별 폐사율 및 혈청반전 검사 결과.

Species	Group	Morbidity (sick/total)	Mortality (dead/total) (day of dead)	Serologic test		
				Pre-challenge		Post-challenge
				NP-ELISA (mean PI ^A)	HI test (mean titer)	HI test (mean titer)
Spot-billed Duck (흰뺨검둥오리)	Challenge	1/3	1/3 (11d)	0/3	0/3	2/2 (8)
	Contact exposure	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Mallard (청둥오리)	Challenge	1/3	1/3 (10d)	0/3	0/3	2/2 (6)
	Contact exposure	1/2	1/2 (11d)	0/2	0/2	1/1 (6)
Eurasian Wigeon (홍머리오리)	Challenge	1/3	1/3 (9d)	0/3	0/3	2/2 (4)
	Contact exposure	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Common Teal (쇠오리)	Challenge	1/3	1/3 (4d)	1/3 (83.77)	0/3	2/2 (6.5)

(사) 흰뺨검둥오리의 경우 공격접종 3마리 중 1마리만 폐사 하였으며 나머지 살아남은 공격접종 개체의 경우 항체 반전이 관찰되어 감염이 일어났음을 확인할 수 있음. 그러나 접촉전과군의 경우 2마리 모두 임상증상을 나타내지 않고 항체 반전도 나타나지 않아 접촉전과가 일어나지 않았음이 확인됨. 폐사 개체는 폐사 전 1일간 침울, 호흡곤란 등의 임상증상을 나타냄.

(아) 청둥오리의 경우 공격접종개체 1수 및 접촉전과 개체 1수가 폐사하였으며 살아남은 개체의 경우 접촉전과군을 포함하여 모두 항체반전을 나타내어 감수성이 있으며 접촉전과도 일어나는 것으로 확인됨. 폐사 개체는 폐사 전 2일간 침울, 호흡곤란 등의 임상증상을 나타냄.

(자) 홍머리오리의 경우 공격접종군 1수만 폐사하였으며 나머지 살아남은 공격접종 개체의 경우 항체 반전이 관찰되어 감염이 일어났음을 확인할 수 있음. 그러나 접촉전과군의 경우 2마리 모두 임상증상을 나타내지 않고 항체 반전도 나타나지 않아 접촉전과가 일어나지 않았음이 확인됨. 폐사 개체는 폐사 전 임상증상을 나타내지 않았으며 앓은 자세로 갑자기 폐사한 것으로 확인됨.

(차) 쇠오리의 경우 공격접종 1수만 폐사하였으며 나머지 살아남은 공격접종 개체의 경우 항체 반전이 관찰되어 감염이 일어났음을 확인할 수 있음. 접촉전과는 실험하지 않음.

(4) 바이러스 배출양 분석

(가) 공격접종 후 2, 4, 6, 8, 11, 14일에 각각 구강 및 총배설장 swab을 실시함. Swab sample은 RNA 추출 키트의 lysis buffer로 처리하여 바이러스 불활화 후 배출함.

표 57. H5N1 바이러스 (clade 2.3.2) 접종 후 야생조류 swab sample의 real-time PCR 결과.

야생조류	2d		4d		6d		폐사일	HI titer
	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent		
흰뺨 공격 1	35.83 ^a	37.68	37.13	36.53	39.68	0.00		9
흰뺨 공격 2	37.55	38.28	38.70	38.66	0.00	0.00		7
흰뺨 공격 3	38.26	38.11	36.82	37.08	0.00	0.00	11d	
흰뺨 접촉 1	36.62	39.27	34.26	37.75	0.00	0.00		0
흰뺨 접촉 2	37.16	38.74	37.48	35.93	33.85	0.00		0
청둥 공격 1	29.66	38.10	33.66	35.21	36.99	39.96		5
청둥 공격 2	36.80	36.34	36.63	37.83	38.26	0.00	10d	
청둥 공격 3	37.17	0.00	38.22	39.76		0.00		7
청둥 접촉 1	37.48	37.65	32.93	36.37	37.05	39.86	11d	
청둥 접촉 2	36.04	36.34	30.00	35.45	36.69	0.00		6
홍머리 공격 1	39.65	0.00	0.00	32.24	38.61	0.00		4
홍머리 공격 2	0.00	0.00	0.00	36.93	0.00	0.00		4
홍머리 공격 3	39.96	0.00	37.67	39.47	0.00	0.00	9d	
홍머리 접촉 1	0.00	0.00	39.45	35.73	0.00	0.00		0
홍머리 접촉 2	0.00	0.00	0.00	37.63	0.00	0.00		0
쇠오리 공격 1	0.00	0.00	0.00	0.00			4d	
쇠오리 공격 2	0.00	0.00	0.00	37.91	34.00	39.50		5
쇠오리 공격 3	0.00	0.00	39.31	37.04	35.92	0.00		8

^a CT value

(나) 배출된 sample은 RNA를 추출하여 AIV M gene real-time PCR을 처리하여 정량 분석을 실시하였으며 결과는 표 57과 같음.

(다) 실험에 이용된 야생조류 모두 바이러스 감염 후 바이러스 배출 양은 매우 적은 것으로 나타났으며 기간은 공격접종 후 4일 까지 나타남. 접촉전과가 확인된 청둥오리에서 바이러스 배출이 상대적으로 높은 것으로 나타남.

(라) 2010년 분리 H5N1 clade 2.3.2 바이러스의 경우 실험에 이용한 야생조류의 호흡기 및 소화기에서 바이러스 증식성이 낮은 것으로 확인됨.

(5) 폐사체 부검 및 조직병변 관찰

(가) 공격접종 4일 후 죽은 쇠오리의 경우 특별한 부검소견을 나타내지 않았으나 임상증상 없이 갑자기 폐사하였음.

(나) 공격접종 9일 후 죽은 홍머리 오리의 경우 사전 임상증상 없이 폐사하였으며 앓은 자세 그대로 죽어 급사한 것으로 판단됨. 부검결과 뇌의 출혈이 확인됨.

(다) 공격접종 10일 및 11일에 죽은 청둥오리와 흰뺨검둥오리의 경우 모두 기낭의 농과 폐의 점상 출혈 등의 병변이 관찰되었으며, 이는 세균감염에 의한 것으로 확인됨. 바이러스에 의한 2차 감염 및 세균 단독감염과의 감별이 필요함.



그림 56. H5N1 바이러스 (clade 2.3.2) 접종 후 야생조류 부검 사진. 좌, 접종 9일 후 폐사한 홍머리 오리의 뇌; 중간, 10일 폐사한 청둥오리의 내부 장기; 우, 11일 폐사한 청둥오리의 내부 장기

(라) 채취한 조직은 포르말린 고정 후 병변부위를 절개하여 농립축산검역본부 조류 병리 전문연구팀인 조류질병과 권용국 연구관 연구팀에 조직검사를 의뢰함.

(마) 흰뺨검둥오리 조직검사 결과 감염 5일 후 부검을 실시한 2마리의 개체에서 비장의 림프구 소실 및 괴사, 뇌의 비화농성 뇌염, 췌장의 상피세포의 국소적인 괴사 등이 확인 됨. 또한, 감염 11일 후 폐사한 개체의 경우 뇌 및 비장에서 세균집락이 확인되었으며, 비장의 림프구 괴사 및 소실이 확인되어, HPAI에 기인한 2차 감염으로 전신 패혈증으로 폐사한 것으로 추정됨.

(바) 홍머리오리 조직검사 결과 감염 5일 후 부검을 실시한 개체의 경우 병변을 나타내지 않았으며, 감염 9일 후 폐사한 홍머리 오리의 경우 췌장에서 심한 실질세포 괴사가 확인되어 HPAI 감염으로 인한 폐사가 확인됨.

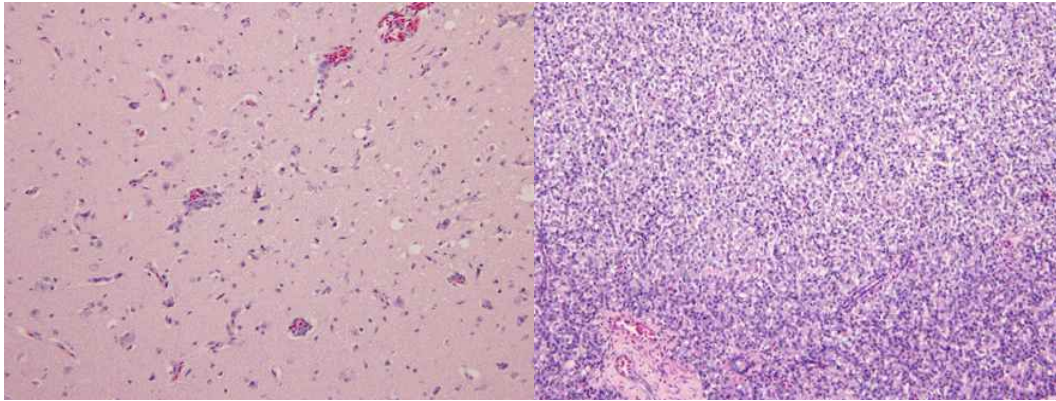


그림 57. H5N1 바이러스 (clade 2.3.2) 접종 후 야생조류 조직검사 결과. 좌-흰뺨검둥오리 비화농성 뇌염; 우-홍머리오리 췌장 괴사

나. H5N1 Clade 2.3.2.1 바이러스의 야생오리류 1종에서 병원성 및 증식성 분석

(1) 야생조류 포획 및 사전 검사

(가) 야생조류 전문 연구팀인 한국환경생태연구소에 야생조류 포획을 위탁하여 2016년 1월 14일 전라북도 만경강 일대에서 포획한 고방오리 11수를 수령함.

(나) Swab 및 채혈을 통한 항원 및 항체 검사결과 모두 음성으로 확인됨.

(2) 대상 종

(가) 고방오리 10수

(3) 임상증상 및 폐사율 분석

(가) 야생조류는 건국대학교 수의과대학 내에서 사전검사 후 BL3 시설로 옮겨져 사육되었으며, 매일 사료와 물을 제공해 주었음.

(나) 3마리 공격접종군의 경우 H5N1 clade 2.3.2 바이러스를 2×10^7 EID₅₀/dose로 intracleft 및 점안 접종한 후 2주간 임상증상 및 폐사율을 관찰함.

(다) 접촉전과군의 경우 접종 1일 후 각각의 공격접종군과 같은 케이지에 사육하였음. 공기전과군의 경우 공기전과 케이지를 이용하여 노출시켰음.

(라) 폐사 개체의 경우 부검을 실시하여 육안병변을 확인하고 조직검사를 위한 조직을 채취함. 채취조직은 10% 중화 완충 포르말린 (neutral buffered formalin)에 보관 후 외부소독 후 반출하여 검사를 실시함.

(마) 살아남은 개체의 경우 혈청을 채취하여 항체여부를 검사함. 채취 혈청은 56°C에서 30분간 비동화 및 바이러스 불활화 후 반출함.

(바) 2주간 임상증상 및 폐사율 관찰 결과 및 혈청검사 결과는 표 58과 같음

표 58. H5N1 바이러스 (clade 2.3.2) 접종 후 고방오리의 폐사율 및 혈청반전 검사 결과.

Species (challenge virus)	Group	Morbidity (sick/total)	Mortality (dead/total) (day of dead)	Serologic test		
				Pre-challenge		Post-challenge
				NP-ELISA (mean PI ^A)	HI test (mean titer)	HI test (mean titer)
Northern Pintail (H5N8/2014)	Challenge	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3 (2^6)
	Contact exposure	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Air exposure	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

(사) 14일 실험기간 동안 폐사한 개체는 없었으며 14일 혈청검사 결과 공격접종군 2개체 이외에는 항체가 확인되지 않아 공격접종 군만 감염되었으며 전파는 발생하지 않은 것으로 확인됨.

(4) 바이러스 배출양 분석

(가) 공격접종 후 2, 4, 6, 8, 11, 14일에 각각 구강 및 총배설장 swab을 실시함. Swab sample은 RNA 추출 키트의 Lysis buffer로 처리하여 바이러스 불활화 후 배출함.

(나) 배출된 sample은 RNA를 추출하여 AIV M gene real-time PCR을 처리하여 정량 분석을 실시하였으며 결과는 표 59과 같음.

표 59. H5N1 바이러스 (clade 2.3.2) 접종 후 야생조류 swab sample의 real-time PCR 결과.

고방오리 H5N1	2d		4d		6d		8d		10d		12d	
	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent
공격1			37.85 ^a									
공격2			31.26	39.65								
공격3			36.41		34.95							
접촉1												
접촉2					38.41							
접촉3												
공기1												
공기2												

^a CT value

(다) Clade 2.3.2.1 H5N1 바이러스의 경우 공격접종 4일 후 상대적으로 적은 바이러스를 배출하는 것으로 확인되어 고방오리에서 증식이 원활히 이루어지지 않음을 확인할 수 있음.

(라) 접촉전파균 및 공기전파균에서는 detection limit 이상의 바이러스가 확인되지 않아 역시 전파가 이루어지지 않았음을 확인함.

(마) Clade 2.3.2.1 H5N1 바이러스의 경우 고방오리에서의 증식성 및 전파력이 떨어지는 것으로 확인됨.

다. H5N8 Clade 2.3.4 바이러스의 야생오리류 2종에서 병원성 및 증식성 분석

(1) 야생조류 포획 및 사전 검사

(가) 야생조류에서 고병원성 H5N8 발생 보고가 잇따르면서, 방역 정책에 따라 야생조류 추가 포획을 진행하지 못함

(나) 2014년 1월 7일 전라북도 만경강 일대에서 포획한 야생조류 중 실험에 사용하고 남은 개체를 H5N8 clade 2.3.4 바이러스 공격접종에 사용하였으며, 사용 전 다시 검사를 실시함

(다) 항체 검사는 NP-ELISA kit (Bionote) 및 H5항원에 대한 HI test를 실시하였으며, 항원 검사는 swab sample을 real-time RT-PCR을 이용하여 검사함 (표 60).

표 60. 포획 야생조류의 항체보유 여부 검사를 위한 Bionote의 NP-ELISA 키트 검사 결과.

NP elisa result



종	PI index										Negative/Total	
흰뺨검둥	-65.16	96.62										1/2
청둥오리	66.73	80.24	78.89	54.74	88.94	75.26	72.73	-43.29	87.42	51.96		1/11
	51.28											
홍머리오리	-76.81	-25.89	-15.93									3/3

(라) 항체 검사의 결과는 표 8.과 같으며 항원 검사 및 HI test 결과는 모두 음성으로 나타남

(2) 대상 종

(가) 흰뺨검둥오리 2수, 홍머리오리 3수

표 61. 병원성 및 증식성 분석에 사용된 야생오리류.

종 (species)	영문명	학명	BL-3 시설 내 사진
흰뺨검둥오리	Spot-billed Duck	<i>Anas poecilorhyncha</i>	
홍머리오리	Eurasian wigeon	<i>Anas penelope</i>	

(3) 임상증상 및 폐사율 분석

- (가) 야생조류는 건국대학교 수의과대학 내에서 사전검사 후 BL3 시설로 옮겨져 사육되었으며, 매일 사료와 물을 제공해 주었음.
- (나) 흰뺨검둥오리 2수 및 홍머리오리 3수 각각 2014년 분리 H5N8 clade 2.3.4 바이러스를 2×10^7 EID₅₀/dose로 intracleft 및 점안 접종한 후 2주간 임상증상 및 폐사율을 관찰함.
- (다) 포획수량 부족으로 인하여 접촉전과 및 감염 5일 후 조직검사는 실험하지 못함.
- (라) 폐사 개체 혹은 14일 이후 생존개체는 부검을 실시하여 육안병변을 확인하고 조직검사를 위한 조직을 채취함. 채취조직은 10% 중화 완충 포르말린 (neutral buffered formalin)에 보관 후 외부소독 후 반출하여 검사를 실시함.
- (마) 살아남은 개체의 경우 혈청을 채취하여 항체여부를 검사함. 채취 혈청은 56°C에서 30분간 비동화 및 바이러스 불활화 후 반출함.
- (바) 2주간 임상증상 및 폐사율 관찰 결과 및 혈청검사 결과는 표 62와 같음

표 62. H5N8 바이러스 (clade 2.3.4) 접종 후 야생조류 종별 폐사율 및 혈청반전 검사 결과.

Challenge virus	Species	Morbidity (sick/total)	Mortality (dead/total) (day of dead)	Serologic test			
				Pre-challenge		Post-challenge	
				NP-ELISA (mean PI ^A)	HI test (mean titer)	NP-ELISA (mean PI)	HI test (mean titer)
H5N8 (BT/14)	Spot-billed duck	0/2	0/2	1/2 (96.62)	0/2	2/2 (82.75)	2/2 (8.5)
	Eurasian wigeon	0/2	0/2	0/3	0/3	3/3 (97.56)	3/3 (5)

- (사) 흰뺨검둥오리 및 홍머리오리 모두 H5N8감염 후 14일간 임상증상 및 폐사를 나타내지 않았으며, 혈청반전은 일어남.
- (아) 2014년 분리 H5N8 바이러스의 경우 흰뺨검둥오리 및 홍머리오리 감염 시 무증상 감염을 일으키는 것으로 판단됨.

(4) 바이러스 배출양 분석

- (가) 공격접종 후 2, 4, 6, 8, 11, 14일에 각각 구강 및 총배설장 swab을 실시함. swab sample은 RNA 추출 키트의 Lysis buffer로 처리하여 바이러스 불활화 후 배출함.
- (나) 배출된 sample은 RNA를 추출하여 AIV M gene real-time PCR을 처리하여 정량 분석을 실시하였으며 결과는 표 63과 같음.

표 63. H5N8 바이러스 (clade 2.3.4) 접종 후 야생조류 swab sample의 real-time PCR 결과.

야생조류	2d		4d		6d		폐사	NP-ELISA	HI titer
	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent			
흰뺨검둥 1	27.22 ^a	15.87	21.17	33.93	32.41	0.00		양성	9
흰뺨검둥 2	23.01	0.00	30.17	34.90	35.76	0.00		양성	8
홍머리 1	23.13	36.50	24.52	30.75	30.33	0.00		양성	5
홍머리 2	33.94	35.50	30.95	33.98	37.36	35.17		양성	3
홍머리 3	24.27	34.95	27.21	34.64	28.61	0.00		양성	7

^a CT value

(다) 홍머리오리 1수를 제외한 야생조류에서 바이러스 감염 후 바이러스 배출량은 매우 높은 것으로 나타났으며, 배출 기간은 공격접종 후 6일 까지 나타남. 전체적으로 총배설장 보다는 구강에서의 바이러스 배출이 많은 것으로 판단되며, 흰뺨검둥오리 1수의 경우 공격접종 2일 후 총배설장을 통한 바이러스 배출이 매우 많은 것이 확인됨.

(라) 2014년 분리 H5N8 clade 2.3.4 바이러스의 경우 실험에 이용한 야생조류의 호흡기 및 소화기에서 바이러스 증식성이 매우 높은 것으로 판단됨.

(5) 부검 및 조직병변 관찰

(가) 바이러스 접종으로 인한 폐사체는 없었으며, 공격접종 14일 후 부검 결과 췌장 (pancreas)에 약간의 출혈 양상 보임.

(나) 감염 개체의 14일 후 비장 및 췌장의 조직검사 결과 모든 조직에서 HPAI로 인한 병변이 확인되지 않음.

라. H5N8 Clade 2.3.4 바이러스의 야생오리 2종에서의 병원성 및 증식성 분석

(1) 야생조류 포획 및 사전 검사

(가) 한국환경생태연구소에 야생조류 포획을 위탁하여 쇠오리 17수, 고방오리 30수, 청둥오리 27수, 팽이갈매기 13수, 홍머리오리 15수를 수령함.

(나) 항체 검사는 NP-ELISA kit (Bionote) 및 RDE 처리 후 H5항원에 대한 HI test를 실시하였으며, 결과는 표 64와 같음.

(다) 2014년 포획 개체의 경우 총 61마리 중 28마리 (45.90%)만 양성을 나타내는데 반해 2015년도 포획 개체의 경우 102마리 중 95마리 (93.13%)가 양성 반응을 나타내 매우 높은 influenza 항체 보유량을 보임.

표 64. 포획 야생조류의 NP-ELISA kit 검사 결과.

종명 (포획일)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	양성
쇠오리 1/22	86.82 ^a	95.94	40.61	99.37	86.06	22.42	56.33	97.85	97.34	99.43	15/17
	98.04	99.24	90.37	98.92	98.86	96.64	72.11				
고방오리 1/28	14.24	98.92	98.92	69.64	98.23	81.68	99.24	0.00	93.54	98.80	27/30
	99.24	93.09	58.04	99.18	97.08	98.10	90.62	99.30	99.43	99.37	
	99.30	99.11	52.02	98.61	40.10	80.99	94.49	98.10	64.76	90.05	
청둥오리 1/28	93.47	50.75	96.96	93.34	72.75	98.04	97.53	92.71	66.28	95.56	13/13
	71.61	99.05	99.11								
청둥오리 2/11	96.82	92.28	75.63	96.83	95.60	93.45	95.92	92.81	84.56	-23.4	13/14
	90.41	95.92	96.54	96.79						8	
괭이갈매기 2/25	99.34	99.44	68.25	97.49	98.93	54.55	97.80	80.32	97.55	79.40	12/13
	94.17	93.87	42.08								
홍머리오리 3/16	91.05	99.39	96.32	98.06	57.11	74.49	96.37	99.18	98.26	94.63	15/15
	77.35	89.42	99.59	99.59	99.28						

^a 50 이하 음성

(라) Real-time RT-PCR을 통한 검사 결과 고방오리 1수 및 청둥오리 1수에서 고병원성 조류인플루엔자 바이러스가 분리되어 관련 개체를 모두 폐기시킴.

(마) 괭이 갈매기의 경우 실험 전 사육과정에서 모두 폐사하여 실험을 진행하지 못함.



(바) 폐기하거나 폐사하지 않은 홍머리오리 및 청둥오리의 경우 H5N8 항원에 대한 HI test를 실시하였으나 양성반응을 나타내지 않음.

(사) 2월 이후 포획한 청둥오리 및 홍머리오리를 이용하여 실험을 진행함.

(2) 실험이용 종 및 마릿수

(가) 청둥오리 14수 및 홍머리오리 7수

표 65. 병원성 및 증식성 분석에 사용된 야생오리류.

종 (species)	영문명	학명	BL-3 시설 내 사진
청둥오리	Mallard	<i>Anas platyrhynchos</i>	
홍머리오리	Eurasian wigeon	<i>Anas penelope</i>	

(3) 임상증상 및 폐사율 분석

(가) 야생조류는 수의대 내에서 사전검사 후 BL3 시설로 옮겨져 사육되었으며, 매일 사료와 물을 제공해 주었음.

(나) 항체보유 개체의 H5N8 HPAI 감염 시 감염여부 전과양상을 살펴보기 위하여 AIV 항체보유개체의 2014년 분리 H5N8 및 2015년 H5N8 바이러스에 대한 감염 실험을 실시함.

(다) 청둥오리 3수는 2014년 분리 H5N8 clade 2.3.4 바이러스를 2×10^6 EID₅₀/dose로 비강 및 intracleft를 통해 접종한 후 2주간 임상증상 및 폐사율을 관찰함. 비접종 청둥오리 3수는 공격접종 개체와 같은 Isolator 안에서 사육하여 접촉전과 여부를 확인함.

(라) 청둥오리 4수 및 홍머리오리 3수는 2015년 분리 H5N8 clade 2.3.4 바이러스를 2×10^6 EID₅₀/dose로 비강 및 intracleft를 통해 접종한 후 2주간 임상증상 및 폐사율을 관찰함. 비접종 청둥오리 4수 및 홍머리오리 2수는 공격접종 개체와 같은 isolator 안에서 사육하여 접촉전과 여부를 확인함.

(마) 폐사 개체의 경우 부검을 실시하여 육안병변을 확인하고 조직검사를 위한 조직을 채취함. 채취조직은 10% 중화 완충 포르말린 (neutral buffered formalin)에 보관 후 외부소독 후 반출하여 검사를 실시함.

(바) 살아남은 개체의 경우 혈청을 채취하여 항체여부를 검사함. 채취 혈청은 56°C에서 30분간 비동화 및 바이러스 불활화 후 반출함.

(사) 2주간 임상증상 및 폐사율 관찰 결과 및 혈청검사 결과는 표 66과 같음.

표 66. H5N8 바이러스 (clade 2.3.4) 접종 후 텃새 종별 폐사율 및 혈청반전 검사 결과.

Species (challenge virus)	Group	Morbidity (sick/total)	Mortality (dead/total) (day of dead)	Serologic test		
				Pre-challenge		Post-challenge
				NP-ELISA (mean PI ^A)	HI test (mean titer)	HI test (mean titer)
Mallard (H5N8/2014)	Challenge	0/3	0/3	3/3 (88.24)	0/3	3/3 (2 ⁶)
	Contact exposure	0/3	0/3	3/3 (95.29)	0/3	0/3
Mallard (H5N8/2015)	Challenge	0/4	0/4	3/4 (91.10)	0/4	4/4 (2 ³)
	Contact exposure	0/4	0/4	4/4 (94.91)	0/4	0/4
Eurasian Wigeon (H5N8/2015)	Challenge	0/3	0/3	3/3 (90.07)	0/2	2/3 (2 ³)
	Contact exposure	0/2	0/2	2/2 (98.825)	0/2	1/2 (2 ⁶)

(아) 2014년 H5N8 분리주를 공격접종한 청둥오리의 경우 폐사한 개체는 없었으며 항체 검사 결과 모두 항체반전이 관찰됨. 하지만 접촉전과군의 경우는 항체반전이 확인되지 않음.

(자) 2015년 H5N8 분리주를 공격접종한 청둥오리의 경우 폐사한 개체는 없었으며 항체 검사 결과 공격접종군의 경우 모두 항체반전이 관찰됨. 하지만 접촉전과군의 경우는 항체반전이 확인되지 않음.

(차) 2015년 H5N8 분리주를 공격접종한 홍머리오리의 경우 폐사한 개체는 없었으며 항체검사 결과 공격접종군의 경우 2개체에서 항체반전이 확인되었으며, 접촉전과군 1개체 에서도 항체반전이 확인됨. 접촉전과 여부는 바이러스 배출양 검사 등을 통해 확인이 필요함.

(4) 바이러스 배출양 분석

(가) 공격접종 후 2, 4, 6, 8, 10, 12일에 각각 구강 및 총배설장 swab을 실시함. Swab sample은 RNA 추출 키트의 Lysis buffer로 처리하여 바이러스 불활화 후 배출함.

(나) 배출된 sample은 RNA를 추출하여 AIV M gene real-time PCR을 처리하여 정량 분석을 실시하였으며 결과는 표 67, 68, 69와 같음.

표 67. 청둥오리의 2014년 분리 H5N8 clade 2.3.4 바이러스 접종 후 swab sample의 real-time PCR 결과.

청둥오리 H5N8/2014	2d		4d		6d		8d		비고
	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	
공격1									
공격2	26.81 ^a	30.94	28.00						
공격3	28.58								
전과1									
전과2									
전과3									

^a CT value

표 68. 청둥오리의 2015년 분리 H5N8 clade 2.3.4 바이러스 접종 후 swab sample의 real-time PCR 결과.

청둥오리 H5N8/2015	2d		4d		6d		8d		비고
	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	
공격1	31.06 ^a								
공격2	30.86								
공격3	27.00		20.44		23.96	30.94			
공격4	27.36		30.12		31.51				
전과1									
전과2									
전과3									
전과4									

^a CT value

표 68. 홍머리오리의 2015년 분리 H5N8 clade 2.3.4 바이러스 접종 후 swab sample의 real-time PCR 결과.

홍머리	2d		4d		6d		8d		비고
	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	
공격1 공격2 공격3									
접촉1 접촉2			32.31 ^a						

^a CT value

(다) 2014년 분리 H5N8 바이러스를 공격접종한 청둥오리의 경우 공격접종 3개체 중 2개체에서 공격접종 2일, 4일 후 바이러스 배출이 확인되었으며, 총배설장 보다는 구강으로의 바이러스 배출량이 높은 것으로 확인됨. 기존 연구결과에 따르면 청둥오리에서의 바이러스 증식 및 전파가 활발하게 이루어지는 것으로 나타남 (Kang et al., EID, 2014). 바이러스 배출량이 상대적으로 적고 배출기간도 짧은 것은 항체 보유의 영향으로 생각됨.

(라) 2015년 분리 H5N8 바이러스를 공격접종한 청둥오리의 경우 공격접종한 4개체 모두 바이러스 배출이 확인되었으며, 4개체 중 2개체의 경우 바이러스 배출이 공격접종 6일 후 까지 확인됨. 접촉전파군의 경우 바이러스 배출이 확인되지 않음. 2014년 분리 H5N8 바이러스 감염군 보다 바이러스 배출량이 상대적으로 많은 것은 신규 바이러스의 항원 변이에 대한 가능성을 제시함.

(마) 2015년 분리 H5N8 바이러스를 공격접종한 홍머리오리의 경우 공격접종군에서는 바이러스 배출이 확인되지 않았으나 접촉전파군 1개체에서 접종 4일 후 바이러스 배출이 확인됨. 공격접종군의 intermittent shedding에 의해 검출되지 않은 것으로 예상됨. 공격접종군의 항체반전이 그 근거로 생각됨. 1차년도 연구결과에 따르면 홍머리오리의 경우 H5N8 바이러스 감염 시 많은 양의 바이러스 배출과 접촉전파가 확인되었음. 이번 연구결과와의 차이는 항체보유에 의한 것으로 사료됨.

(바) 2015년도 포획 야생조류의 경우 NP-ELISA kit 검사 결과 높은 수준의 AIV 항체를 보유하고 있었으나 H5N8 항원에 대한 HI test에서는 anti-H5 항체가 검출되지 않음. 오리의 경우 HI test에서 검출되지 않는 항체를 보유하고 있는 경우가 있어 이를 확인하기 위한 microneutralization (MN) test가 필요한 실정임. MN test 진행을 위한 cleavage site를 제거한 reverse genetic 바이러스를 제조 중임.

마. H5N1 clade 2.3.2 바이러스의 텃새류 1종에서의 병원성 및 증식성 분석

(1) 텃새류 구입 및 사전 검사

(가) 애완조류 상가에서 사육 원앙 7수를 구입함.

(나) 구강 및 총배설강 swab 후 종란 접종 및 real-time RT-PCR로 검사한 결과 모두 AI 음성으로 나타남.

(다) 항체 검사는 NP-ELISA kit (Bionote) 및 RDE 처리 후 H5항원에 대한 HI test를 실시하였으며, 검사 결과 모두 음성으로 나타남.

(2) 실험이용 종 및 마릿수

(가) 사육 원양 7수

(3) 임상증상 및 폐사율 분석

(가) 야생조류는 수의대 내에서 사전검사 후 BL3 시설로 옮겨져 사육되었으며, 매일 사료와 물을 제공해 주었음.

(나) 원양 3수는 2010년 분리 H5N1 clade 2.3.2.1 바이러스를 2×10^6 EID₅₀/dose로 비강 및 intracleft를 통해 접종한 후 2주간 임상증상 및 폐사율을 관찰함.

(다) 원양 3수는 각각 공격접종한 류와 같은 isolator 안에서 사육하여 접촉전과 여부를 확인함.

(라) 폐사 개체의 경우 부검을 실시하여 육안병변을 확인하고 조직검사를 위한 조직을 채취함. 채취조직은 10% 중화 완충 포르말린 (neutral buffered formalin)에 보관 후 외부소독 후 반출하여 검사를 실시함.

(마) 살아남은 개체의 경우 혈청을 채취하여 항체여부를 검사함. 채취 혈청은 56°C에서 30분간 비동화 및 바이러스 불활화 후 반출함.

(바) 2주간 임상증상 및 폐사율 관찰 결과 및 혈청검사 결과는 표 70과 같음.

표 70. H5N1 바이러스 (clade 2.3.2) 접종 후 텃새 종별 폐사율 및 혈청반전 검사 결과.

Species	Group	Morbidity (sick/total)	Mortality (dead/total) (day of dead)	Serologic test		
				Pre-challenge		Post-challenge
				NP-ELISA (mean PI ^A)	HI test (mean titer)	HI test (mean titer)
Mandarin duck	Challenge	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Contact exposure	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

(사) 원양의 경우 실험기간 동안 폐사개체가 없었으며 공격접종군 3마리 중 1마리가 접종 후 약 9일째부터 신경증상 (torticollis)을 보임.

(아) 원앙의 경우 공격접종군 및 접촉전과군 모두에서 바이러스 배출이 확인되었으나 항체반전이 확인되지 않음. 이는 HI test의 경우 원앙의 혈청검사시 위음성 반응이 나올 수 있어 위음성으로 판단됨.

(4) 바이러스 배출양 분석

(가) 공격접종 후 2, 4, 6, 8, 10, 12일에 각각 구강 및 총배설장 swab을 실시함. Swab sample은 RNA 추출 키트의 Lysis buffer로 처리하여 바이러스 불활화 후 배출함.

(나) 배출된 sample은 RNA를 추출하여 AIV M gene real-time PCR을 처리하여 정량 분석을 실시하였으며 결과는 표 71과 같음.

표 71. 사육 원앙의 H5N1 clade 2.3.2 바이러스 접종 후 swab sample의 real-time PCR 결과.

원앙 H5N1	4d		6d		8d		10d		12d		14d	
	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent
공격1	24.06 ^a	36.63	29.26		32.50	36.12	35.61	34.79	37.20			
공격2	25.26	38.03	29.66	38.08	31.45	36.84	34.90	38.72	33.77	30.89		36.96
공격3	22.78	31.16	29.18	30.99	33.23	34.82	34.33	31.58	32.97	36.10	39.80	36.96
접촉1	27.24	30.43	31.53	28.13	30.93	36.35	34.30	27.83	31.68	37.92	36.73	38.59
접촉2	29.19	35.28	27.28		31.38	36.41	32.98	34.42	37.98	38.63		
접촉3	17.61	34.59	23.39	32.33	28.69	36.91	29.55	35.52	36.05	38.61	37.55	
조직용	21.93	30.57										

^a CT value

(다) 원앙 공격접종군, 접촉전과군 모두 높은 양의 바이러스를 배출 함. 공격접종군 및 접촉전과군 모두 공격접종 4일 후 대부분 shedding 양이 peak에 도달하였으며, 공격접종군의 mean peak titer는 CT value 24.04 (22.78 ~ 25.26)이고, 접촉전과군의 mean peak titer는 CT value 24.04 (17.61 ~ 27.28)로 많은 양의 바이러스를 배출하는 것으로 확인됨.

바. H5N8 Clade 2.3.4 바이러스의 텃새류 2종에서의 병원성 및 증식성 분석

(1) 텃새류 구입 및 사전 검사

(가) 애완조류 상가에서 사육 원앙 9수를 구입하였으며, 재래시장 상인의 중계를 통하여 비둘기 11수를 구입함.

(나) 구강 및 총배설장 swab 후 종란 접종 및 real-time RT-PCR로 검사한 결과 모두 AI 음성으로 나타남.

(다) 항체 검사는 NP-ELISA kit (Bionote) 및 RDE 처리 후 H5항원에 대한 HI test를 실시하였으며, 검사 결과 모두 음성으로 나타남 (표 72).

표 72. 포획 텃새류의 NP-ELISA kit 검사 결과.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	계
원앙	9.51 ^a	33.44	39.01	31.49	44.58	46.68	38.60	31.54	-23.0			0/9
비둘기	19.07	27.20	26.48	22.65	36.15	54.81	40.08	32.36	7.52	28.37	29.91	0/11

^a 50 이하 음성

(2) 실험이용 종 및 마릿수

(가) 사육 원앙 7수, 비둘기 8수

표 73. 병원성 및 증식성 분석에 사용된 텃새류.

종 (species)	영문명	학명	BL-3 시설 내 사진
원앙	mandarin duck	<i>Aix galericulata</i>	
비둘기	Pigeons	<i>Columba rupestris</i>	

(3) 임상증상 및 폐사율 분석

(가) 야생조류는 수의대 내에서 사전검사 후 BL3 시설로 옮겨져 사육되었으며, 매일 사료와 물을 제공해 주었음.

(나) 원앙 4수 및 비둘기 5수는 각각 2014년 분리 H5N8 clade 2.3.4 바이러스를 2×10^6 EID₅₀/dose로 비강 및 intracleft를 통해 접종한 후 2주간 임상증상 및 폐사율을 관찰함. 그 중 원앙 1수 및 비둘기 2수는 바이러스의 조직 분포 관찰을 위하여 감염 5일 후 부검을 실시하여 조직을 채취함.

(다) 원앙 3수 및 비둘기 3수는 각각 공격접종한 동종의 조류와 같은 isolator 안에서 사육하여 접촉전과 여부를 확인함.

(라) 폐사 개체의 경우 부검을 실시하여 육안병변을 확인하고 조직검사를 위한 조직을 채취함. 채취조직은 10% 중화 완충 포르말린 (neutral buffered formalin)에 보관 후 외부소독 후 반출하여 검사를 실시함.

(마) 살아남은 개체의 경우 혈청을 채취하여 항체여부를 검사함. 채취 혈청은 56°C에서 30분간 비동화 및 바이러스 불활화 후 반출함.

(바) 2주간 임상증상 및 폐사율 관찰 결과 및 혈청검사 결과는 표 74와 같음.

표 74. H5N8 바이러스 (clade 2.3.4) 접종 후 텃새 종별 폐사율 및 혈청반전 검사 결과.

Species	Group	Morbidity (sick/total)	Mortality (dead/total) (day of dead)	Serologic test		
				Pre-challenge		Post-challenge
				NP-ELISA (mean PI ^A)	HI test (mean titer)	HI test (mean titer)
Mandarin duck	Challenge	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Contact exposure	1/3	1/3 (4d)	0/3	0/3	1/3 (4)
Pigeon	Challenge	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Contact exposure	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

(사) 원앙의 경우 공격접종군 중에는 폐사개체가 없었으며 접촉전파군 3마리 중 1마리가 접종 후 4일째 폐사하였음. 공격접종군 및 접촉전파군 모두 항체반전이 확인되어 바이러스 감염 및 전파가 일어난 것이 확인됨. 모든 생존 개체는 임상증상을 보이지 않음.

(아) 비둘기의 경우 공격접종군 및 접촉전파군 모두 폐사 개체는 없었으며, 생존개체 모두 임상증상을 나타내지 않았음.

(4) 바이러스 배출양 분석

(가) 공격접종 후 2, 4, 6, 8, 10, 12일에 각각 구강 및 총배설장 swab을 실시함. Swab sample은 RNA 추출 키트의 Lysis buffer로 처리하여 바이러스 불활화 후 배출함.

(나) 배출된 sample은 RNA를 추출하여 AIV M gene real-time PCR을 처리하여 정량 분석을 실시하였으며 결과는 표 75, 76과 같음.

표 74. 사육 원앙의 H5N8 clade 2.3.4 바이러스 접종 후 swab sample의 real-time PCR 결과.

원앙	2d		4d		6d		8d		10d		12d		비고
	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	
공격1	28.10 ^a	27.48	29.22	24.99	31.80								
공격2	27.89	25.10	28.97	25.71	30.06	28.34							
공격3	20.87	28.50	19.80	22.69	27.50	25.37	29.72		33.74				
접촉1	31.48		19.84	26.41	21.65	22.08	28.35	30.41	30.99				
접촉2			17.51	21.75									4d 폐사
접촉3			20.38	27.13	20.51	22.86	28.52	27.11	29.97				
조직용	23.06	29.20	22.50	27.01									5d 부검

^a CT value

표 76. 비둘기의 H5N8 clade 2.3.4 바이러스 접종 후 swab sample의 real-time PCR 결과.

비둘기	2d		4d		6d		8d		10d		12d		비고
	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	
공격1													
공격2					22.30 ^a		28.95						
공격3													
접촉1													
접촉2													
접촉3													
조직용	32.12			27.39									5d 부검
조직용	32.71	24.80	26.82										5d 부검

^a CT value

(다) 원앙의 경우 공격접종군, 접촉전파 군 및 조직채취군 모두 높은 양의 바이러스를 배출 함. 공격접종군의 경우 공격접종 4일 후 대부분 shedding 양이 peak에 도달하였으며, 접촉전파군의 경우 공격접종 2일 후에는 바이러스 배출이 거의 없었으나 공격접종 4일 후 shedding 양이 peak에 도달함. 공격접종군의 mean peak titer는 CT value 23.30 (19.80 ~ 25.10)이고, 접촉전파군의 mean peak titer는 CT value 19.24 (17.51 ~ 20.38)로 많은 양의 바이러스를 배출하는 것으로 확인됨. 공격접종 4일 후 폐사한 원앙의 경우 4일째에 가장 높은 titer인 CT value 17.51을 나타냄.

(라) 비둘기의 경우 공격접종군 중 1개체에서 공격접종 6일 후 및 8일 후에 구강에서 바이러스 배출이 확인되었으며, 조직 채취용으로 공격접종한 2개체에서도 구강 및 총배설강으로 바이러스의 배출이 확인되었음. 접촉전파군의 경우 바이러스 배출이 확인되지 않음. 배출하는 개체수는 적으나 peak titer는 CT value 22.30 ~ 27.39로 많은 양의 바이러스를 배출하는 것으로 확인됨.

(5) 폐사체 부검 및 바이러스의 장기 분포 확인

(가) 공격접종 4일 후 죽은 원앙의 경우 심한 비장 (spleen)의 괴사, 췌장 (pancreas)의 출혈, 선위 외막의 출혈, 심장 주변 지방조직의 출혈 및 심장의 괴사등을 나타냄 (그림 58).

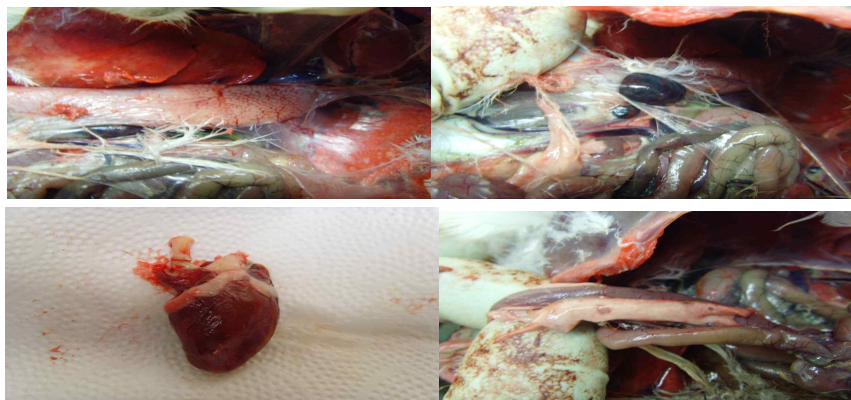


그림 58. 원앙 H5N8 바이러스 접촉전파 관찰군 폐사 개체의 부검 결과. 왼쪽 위: 선위 외막 출혈, 오른쪽 위: 비장 괴사, 왼쪽 아래: 심장 출혈 및 괴사, 오른쪽 아래: 췌장 출혈

(나) 각 장기는 조직검사 및 면역염색을 위하여 포르말린 고정 후 병변부위를 절개하여 반출하여 시험을 실시하였으며 결과는 표 77, 그림 59, 60과 같음,

표 77. 실험적으로 감염된 비둘기와 원앙의 장기별 고병원성 인플루엔자 바이러스 감염여부.

종		호흡기계		소화기계			신경계	기타실질장기				
		Lu	tra	D-P	LI	SI	Br	CT	Ht	Liv	Kid	Sp
비둘기	5d 부검	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	5d 부검	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
원앙	5d 부검	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
	4d 폐사	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+

Lu, lung; Tra, trachea; D-P, duodenum-pancreas; LI, large intestine; SI, small intestine; Br, brain; CT, cecal tonsil; Ht, heart; liv, liver; Kid, kidney; Sp, spleen.

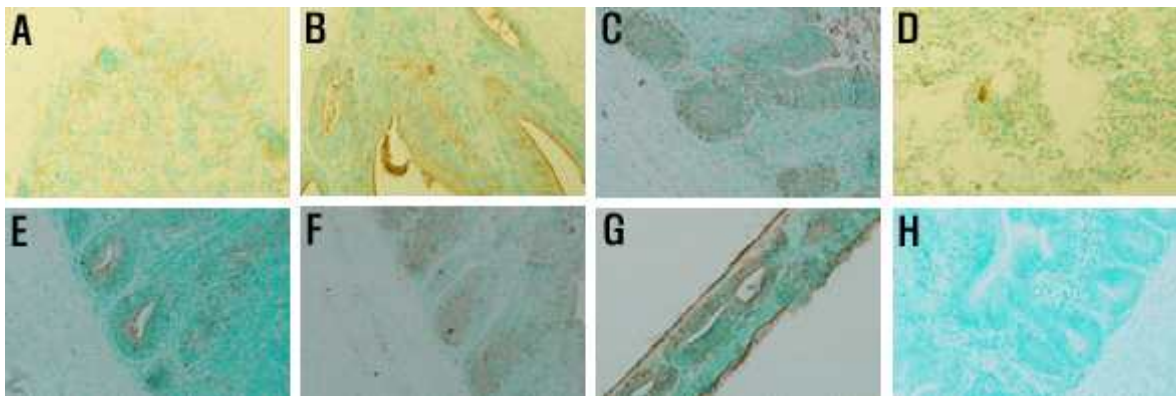


그림 59. 면역조직화학기법을 이용한 비둘기의 장기별 고병원성 인플루엔자 바이러스 검출. (A) brain, (B) cecal tonsil, (C) large intestine, (D) lung, (E) small intestine, (F) duodenum-pancreas, (G) trachea, (H) : negative control for small intestine.

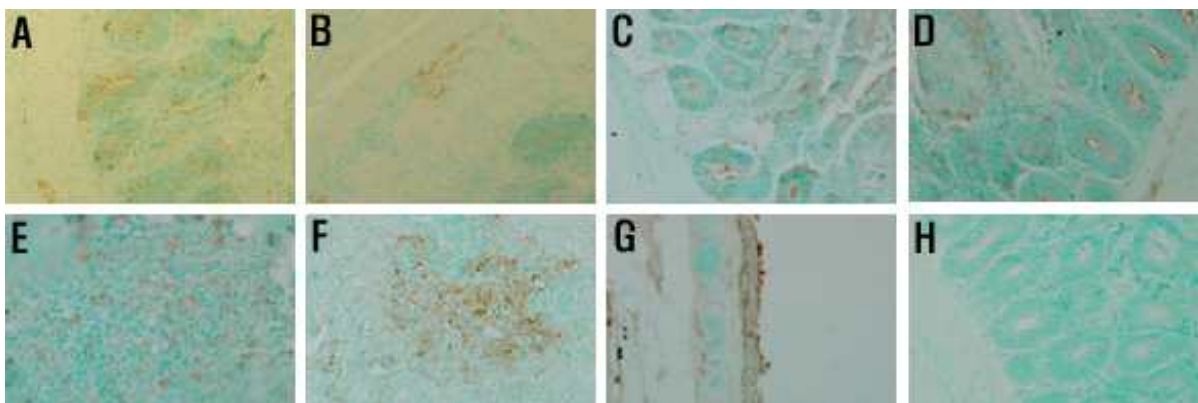


그림 60. 면역조직화학기법을 이용한 원앙의 장기별 고병원성 인플루엔자 바이러스 검출. (A) cecal tonsil, (B) large intestine, (C) small intestine, (D) duodenum-pancreas, (E) liver, (F) spleen, (G) trachea, (H) negative control for small intestine.

(다) 비둘기의 경우 한 개체에서는 호흡기계, 소화기계 및 신경계 장기에서 모두 바이러스가 검출되었으나 다른 개체의 경우 소화기계, 신경계 장기 및 신장 에서만 바이러스가 확인됨. 개체 차이는 보였으나 비둘기에서 바이러스 전신 감염이 가능한 것으로 확인됨.

(라) 원앙의 경우 폐사개체 및 부검개체의 호흡기계 및 소화기계에서 바이러스가 확인되었으며, 폐사개체에서는 비장 (spleen), 부검개체에서는 간에서 추가적으로 바이러스가 확인됨. 면역염색 결과 폐사개체의 경우 바이러스 감염으로 인한 폐사로 추정됨.

사. H5N8 Clade 2.3.4 바이러스의 사육 가금류 5종에서의 병원성 및 증식성 분석

(1) 사육 가금류 구입 및 사전 검사

(가) 산란계, 오리 및 메추리의 경우 각각 농장에서 직접 구입하였으며, 머스코비 오리 및 토종닭은 재래시장에서 구입함. 구입한 사육 가금류 5종에 대하여 swab 및 채혈을 실시하여 바이러스 보유 여부 및 항체 보유 여부를 검사함.

(나) 항체 검사는 NP-ELISA kit (Bionote) 및 H5항원에 대한 HI test를 실시하였으며, 항원 검사는 swab sample을 real-time RT-PCR을 이용하여 검사함. 검사결과 농장에서 구입한 산란계, 오리 및 메추리는 모두 항원, 항체 검사에서 음성반응을 나타냈으며, 머스코비오리 및 토종닭 일부의 경우 바이러스 및 항체를 보유하고 있어 실험에 제외함.

(2) 대상 종

(가) 산란계 16수, 오리 14수, 토종닭 10수, 머스코비오리 4수, 메추리 8수

(3) 임상증상 및 폐사율 분석




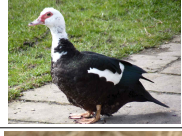

(가) 사육 가금류 5종은 건국대학교 수의과대학 내에서 사전검사 후 BL3 시설로 옮겨져 사육되었으며, 매일 사료와 물을 제공해 주었음.

(나) 각각 2014년 분리 H5N8 clade 2.3.4 바이러스를 10^6 EID₅₀/dose로 비강으로 접종한 후 2주간 임상증상 및 폐사율을 관찰함.

(다) 각 가금류 종별로 2 - 6마리의 동종의 접촉전과 관찰군을 두어 바이러스의 접촉전과 여부를 확인함. 산란계, 육용오리, 토종닭의 경우 각 2마리씩의 공기전과 관찰군을 두어 바이러스의 공기전과 여부를 확인함.

(라) 폐사 개체 혹은 14일 이후 생존개체는 부검을 실시하여 육안병변을 확인하고 조직검사를 위한 조직을 채취함. 채취조직은 10% 중화 완충 포르말린 (neutral buffered formalin)에 보관 후 외부로 반출함.

표 78. 병원성 및 증식성 분석에 사용된 사육 가금류.

종 (species)	영문명	학명	BL-3 시설 내 사진
산란계 (3주령)	Layer chicken (hy-line brown)	<i>Gallus gallus domesticus</i>	
육용오리 (2주령)	Duck (Pekin duck)	<i>Anas platyrhynchos domestica</i>	
토종닭 (약 10주)	Korea native chicken	<i>Gallus gallus domesticus</i>	
머스코비 오리 (약 10주)	Muscovy duck	<i>Cairina moschata</i>	
메추리 (4주령)	Quail	<i>Coturnix japonica</i>	

(마) 2주간 임상증상 및 폐사율 관찰 결과 및 혈청검사 결과는 표 79와 같음

표 79. 5N8 바이러스 (clade 2.3.4) 접종 후 가금류 종별 폐사율 및 혈청반전 검사 결과.

Species	Group	Morbidity (sick/total)	Mortality (dead/total) (MDT)	Serologic test			
				Pre-challenge		Post-challenge	
				NP-ELISA (mean PI [±])	HI test (mean titer)	NP-ELISA (mean PI)	HI test (mean titer)
산란계	Challenge	8/8	8/8 (5.4d)	0/8	0/8	-	-
	Contact	1/6	1/6 (10d)	0/6	0/6	0/5	0/5
	Air-born	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
육용오리	Challenge	5/6	5/6 (5.2d)	0/6	0/6	1/1 (97)	1/1 (6)
	Contact	2/4	2/4 (6d)	0/4	0/4	2/2 (81)	2/2 (5.5)
	Air-born	1/2	1/2 (6d)	0/2	0/2	1/1 (98)	0/1
토종닭	Challenge	3/5	3/5 (4.3d)	0/5	0/5	1/2 (92)	1/2 (6)
	Contact	1/3	1/3 (5d)	0/3	0/3	0/2	0/2
	Air-born	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
머스코비	Challenge	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2 (91)	2/2 (6.5)
	Contact	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2 (96)	2/2 (7)
메추리	Challenge	4/4	4/4 (2.5d)	0/4	0/4	-	-
	Contact	2/4	2/4 (7d)	0/4	0/4	0/2	0/2

(바) 산란계의 경우 공격접종 개체 모두 폐사 하였으며 접촉전과는 6마리 중 한 마리만 일어난 것으로 관찰되었음. 생존개체의 혈청검사 결과 항체가 발견되지 않아 전과가 일어나지 않는 것으로 확인됨.

(사) 육용오리의 경우 공격접종 6마리 중 한 마리는 생존 하였으며 항체반전이 일어나 무증상 감염이 나타난 것으로 확인됨. 접촉전과 관찰군 및 공기전과 관찰군에서 각각 50% 폐사가 나타났으며 생존개체 모두 항체가 확인되어 접촉전과 및 공기전과는 가능하며 무증상 감염이 나타날 수 있음이 확인됨.

(아) 토종닭의 경우 공격접종 5마리 중 2마리가 생존 하였으며 그 중 한 마리에서만 항체가 확인됨. 접촉전과 관찰군에서 3마리 중 1마리가 폐사 하였으며, 생존한 접촉전과 관찰군 및 공기전과 관찰군의 경우 항체가 확인되지 않음. 토종닭 또한 무증상 감염이 가능하며, 전과는 일어나지 않는 것으로 확인됨. 공격접종군 중 항체가 확인되지 않은 1개체의 경우 바이러스에 대한 감수성이 낮아 감염 자체가 이루어지지 않은 것으로 판단되며, 원인에 대하여는 추가 연구가 필요함.

(자) 머스코비 오리의 경우 공격접종 개체 및 접촉전과 관찰군 모두 폐사 없이 항체 반전이 나타남. 무증상 감염이 일어나며, 접촉전과도 일어나는 것으로 확인됨.

(차) 메추리의 경우 공격접종 개체 모두 이른 시기에 폐사하였으며, 접촉전과 관찰군의 경우 50%가 폐사함. 생존개체에서 항체가 발견되지 않아 무증상 감염은 일어나지 않는 것으로 확인되며, 감염 시 가장 이른 시기에 폐사가 나타나는 것으로 확인됨.

(4) 바이러스 배출양 분석

(가) 공격접종 후 2, 5, 7, 9, 11, 14일에 각각 구강 및 총배설장 swab을 실시함. Swab sample은 RNA 추출 키트의 Lysis buffer로 처리하여 바이러스 불활화 후 배출함.

(나) 배출된 sample은 RNA를 추출하여 AIV M gene real-time PCR을 처리하여 정량 분석을 실시하였으며 결과는 표 80과 같음.

표 80. H5N8 바이러스 (clade 2.3.4) 접종 후 가금류 swab sample의 real-time PCR 결과.

산란계	2d		5d		7d		9d		11d		폐사	HI
	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent		
공격 1	31.89 ^a	29.47	19.45	18.30							6d	
공격 2	27.16	27.79	16.29	23.61							5d	
공격 3	28.82	0.00	24.64	18.41							6d	
공격 4	25.85	29.29	31.31	21.45							6d	
공격 5			27.28	31.68	22.49	29.82					7d	
공격 6			15.64	21.24							5d	
공격 7											4d	
공격 8											4d	
접촉 1	36.90	32.22	34.72	0.00	26.59	33.28	22.63	24.70			10d	
접촉 2	0.00	31.59	34.54	34.63	35.07	35.18	0.00	35.47	0.00	34.44		0
접촉 3			33.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00				0
접촉 4			33.94	0.00	0.00	34.31	0.00	29.94				0
접촉 5			0.00	0.00	33.41	32.45	0.00	0.00				0
접촉 6			30.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00				0
공기 1			0.00	0.00	33.58	35.18	35.58	37.45	0.00	0.00		0
공기 2			35.58	37.77	34.77	35.87	0.00	34.50	0.00	0.00		0

오리	2d		5d		7d		9d		11d		폐사	NP-ELISA	HI
	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent			
공격 1	18.29 ^a	27.01	19.25	26.06							5d		
공격 2	19.56	25.45	23.58	25.52							5d		
공격 3	19.45	27.81	22.55	23.30							5d		
공격 4	20.49	30.11	24.17	31.57							6d		
공격 5			21.98	26.41	27.26	29.60	32.80	31.29				양성	6
공격 6			17.45	20.46							5d		
접촉 1	25.77	30.95	17.50	21.41							6d		
접촉 2	26.19	27.27	18.54	27.02							6d		
접촉 3			18.94	22.16	18.57	19.29	25.96	24.96				양성	4
접촉 4			18.38	24.96	24.82	29.32	24.26	0.00				양성	7
공기 1			31.93	36.45	33.41	35.96	0.00	0.00	0.00	0.00		양성	0
공기 2			20.72	29.93							6d		

토종닭	2d		5d		7d		9d		11d		폐사	NP-ELISA	HI
	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent			
공격 1	27.51 ^a	35.58									2d		
공격 2	0.00	35.76	34.69	0.00	34.68	36.02	32.86	35.39	32.13	31.46		양성	6
공격 3	36.41	33.07									4d		
공격 4	20.60	27.26	23.79	31.91	23.23	27.67					7d		
공격 5			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00					0
접촉 1	0.00	36.96	17.97	21.40							5d		
접촉 2	36.29	35.93	33.56	36.64	34.27	38.25	37.36	36.13	-	-		음성	0
접촉 3			34.35	0.00	34.02	0.00	0.00	0.00					
공기 1			34.41	0.00	36.01	35.89	37.47	-	-	-		음성	0
공기 2			37.01	36.22	35.05	35.18	-	-	-	-		음성	0

머스코비	2d		5d		7d		9d		11d		폐사	NP-ELISA	HI
	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent			
공격 1	21.56 ^a	26.35	22.11	24.46	27.39	30.73	32.60	30.27	33.15	34.85		양성	7
공격 2	24.50	24.17	28.26	30.43	32.56	35.59	34.92	0.00	36.52	0.00		양성	6
접촉 1	34.24	0.00	20.57	25.51	33.42	32.69	31.03	29.65	37.83	34.09		양성	8
접촉 2	35.25	0.00	27.88	25.45	26.57	29.48	29.95	33.95	33.38	32.98		양성	6

^a CT value

(다) 산란계의 경우 감염 후 폐사일 까지 높은 농도의 바이러스 배출을 보였으며, 바이러스 증식을 나타낸 개체는 모두 폐사함. 구강 및 총배설장 모두 높은 농도의 바이러스 배출을 보였으며, 총배설장으로의 배출이 더 높은 것으로 나타남.

(라) 육용오리의 경우 감염 후 폐사일 까지 높은 농도의 바이러스 배출을 보였으며, 생존개체의 경우 감염 후 9일까지 바이러스 배출을 나타내는 것으로 확인됨. 구강 및 총배설장 모두 높은 농도의 바이러스 배출을 보였으며, 구강으로의 배출이 더 높은 것으로 나타남. 접촉 전파 및 공기전파는 100% 일어났으나 일부는 바이러스 배출을 일으키는 무증상 감염으로 진행된 것으로 확인됨.

(마) 토종닭의 경우 개체차이가 크게 나타나 2일 폐사한 개체부터 무증상 감염 개체까지 다양한 반응을 나타냄. 폐사체의 경우 감염 후 폐사일 까지 높은 농도의 바이러스 배출을 보였으며, 상대적으로 산란계와 오리에 비하여 낮은 농도를 나타냄. 생존개체의 경우 항체 반전이 일어난 개체의 경우에도 바이러스 증식이 거의 확인되지 않음. 대체로 감수성이 낮은 것으로 판단됨.

(바) 머스코비 오리의 경우 무증상 감염으로 바이러스 배출이 감염 후 9일까지 매우 높은 농도로 분비되는 것이 확인됨. 접촉전파 또한 일어났으며 바이러스 증식은 구강 및 총배설장 모두에서 높은 것으로 확인됨. 바이러스 배출이 높은 무증상 감염으로 재래시장 내 바이러스 전파에 주요 역할을 할 수 있을 것으로 생각됨.

(사) 메추리의 경우 감염 후 폐사일 까지 높은 농도의 바이러스 배출을 보였으며, 바이러스 증식을 나타낸 개체는 모두 폐사함. 구강 및 총배설장 모두 높은 농도의 바이러스 배출을 보였으며, 구강으로의 배출이 더 높은 것으로 나타남. 접촉전파 개체의 경우 swab이 확인된 후 2일 안에 모두 폐사가 확인되어 HPAI 감염 시 폐사시간이 매우 짧은 것으로 확인됨.

(5) 부검 및 조직병변 관찰

(가) 바이러스 공격접종 후 폐사체의 경우 선위 출혈 및 췌장 출혈 등 뚜렷한 HPAI 감염 증상을 나타내기도 하였으나, 대부분 별다른 병변없이 폐사를 일으켰음 (그림 61)

(나) 가금류 종별 병변에는 큰 차이가 없었으나 토종닭에서 선위 출혈이 가장 뚜렷하게 관찰되었으며, 오리에서는 복수 및 흉수가 차있는 것이 특징적으로 나타남 (그림 61). 복수 및 흉수증의 경우 HPAI의 일반적인 증상은 아니나, 전신감염에 의한 심장 및 간의 생리 활성 저하 시 후대정맥의 혈압증가로 부검소견으로 관찰 가능함 (Wild Bird HPAI Surveillance, 2006).

(다) 췌장 출혈은 오리에서 가장 뚜렷하게 나타났으며, 산란계 및 메추리 등 이른 시기에 폐사한 개체에서는 병변이 뚜렷하지 않음.

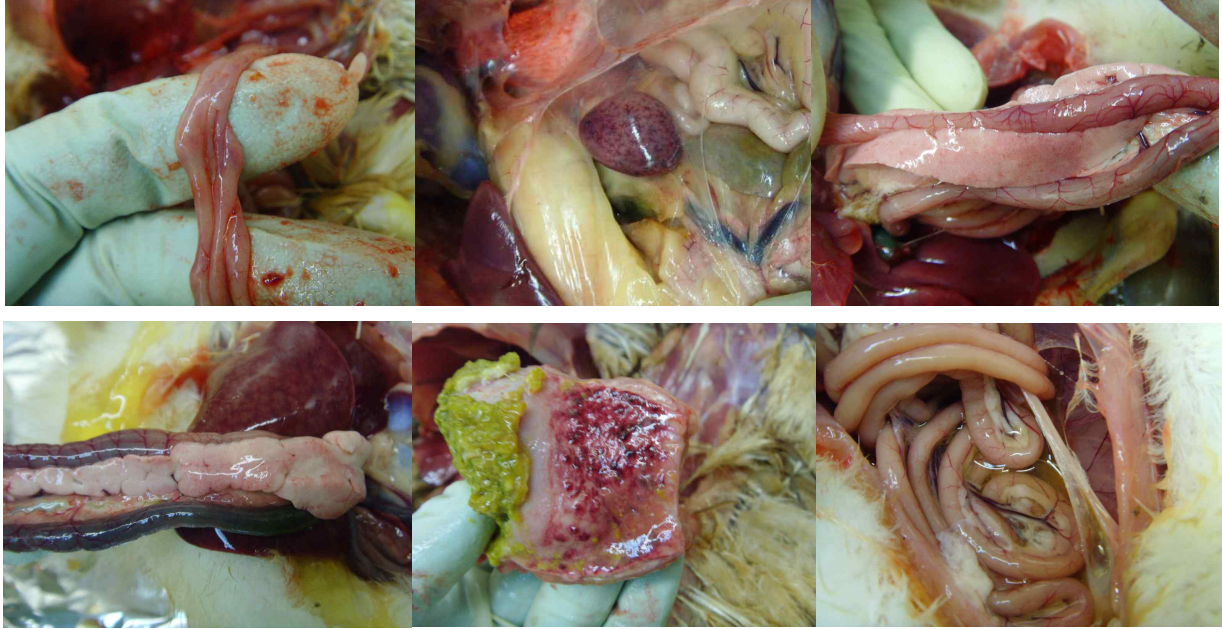



그림 61. H5N8 바이러스 (clade 2.3.4) 접종 후 사육 가금류 부검 사진. 왼쪽 위부터 맹장편도 종대, 비장 괴사, 췌장 괴사, 췌장 괴사, 선위 출혈, 복수

아. H5N8 Clade 2.3.4 바이러스의 개에서의 병원성 및 증식성 분석

(1) 대상 종

(가) 3개월령 비글 (Beagle) 12수 (체중 약 3kg)

표 81. 병원성 및 증식성 분석에 사용된 개.

종	영문명	학명	사진
비글	Beagle	<i>Canis lupus familiaris</i>	

(2) 임상증상 및 폐사율 분석

(가) 비글은 건국대학교 수의과대학 내에서 사전검사 후 BL3 시설로 옮겨져 사육되었으며, 매일 사료와 물을 제공해 주었음.

(나) 총 12수의 비글을 공격접종군 4수, 접촉전파군 4수, 공기전파군 4수로 나누어 실험을 진행함.

(다) 공격접종군은 마취 후 2014년 분리 H5N8 clade 2.3.4 바이러스를 $10^{7.0}$ EID₅₀/dose로 비강 접종한 후 2주간 체온, 임상증상 및 폐사율 관찰을 통해 감염 여부를 확인함.

(라) 접촉전파군은 각 1수씩 공격접종한 비글 각 1수와 같은 isolator 안에서 사육하며 2주간 체온, 임상증상 및 폐사율 관찰을 통해 접촉전파 여부를 확인함.

(마) 공기전파군은 공기전파용 중동물 isolator에서 공기전파군 2수를 공격접종군 1수, 접촉전파군 1수와 사육하며, 2주간 체온, 임상증상 및 폐사율 관찰을 통해 공기전파 여부를 확인함.

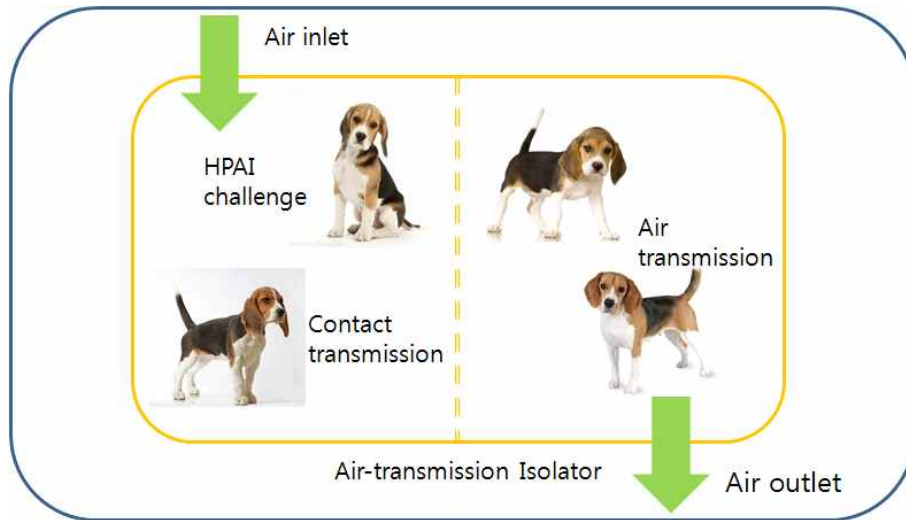


그림 62. 비글 공기 전파 케이지 실험 모습.

(바) 살아남은 개체의 경우 혈청을 채취하여 항체여부를 검사함. 채취 혈청은 56℃에서 30분간 비동화 및 바이러스 불활화 후 반출함.

(사) 2주간 체온, 임상증상 및 폐사율 관찰 결과 및 혈청검사 결과는 표 82, 83과 같음.

표 82. H5N8 바이러스 (clade 2.3.4) 접종 후 폐사율 및 혈청반전 검사 결과.

Group	Morbidity (sick/total)	Mortality (dead/total)	Serological test			
			Pre-challenge		Post-challenge	
			NP-ELISA (mean PI ^A)	HI test (mean titer)	NP-ELISA (mean PI ^A)	HI test (mean titer)
Challenge	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4 (85.07)	0/4
Contact exposure	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Air transmission	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

표 83. H5N8 바이러스 (clade 2.3.4) 접종 후 체온 변화.

		공격접종														
		0d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	
1		37.8	38.3	38.3	38.9	38.4	38.8	38.7	38.9	38.9	38.7	38.9	39.0	38.7	38.5	38.6
2		37.6	38.7	38.8	39.0	38.5	38.9	38.9	39.1	38.7	38.7	38.9	38.8	38.6	38.7	38.7
3		38.3	39.3	39.1	39.3	38.9	39.4	39.4	39.5	39.6	39.8	39.5	39.4	39.3	39.0	39.3
4		38.2	38.4	38.7	39.0	38.8	38.9	38.4	38.6	38.1	38.7	38.9	38.4	38.8	38.6	38.6
		38.0	38.7	38.7	39.1	38.7	39.0	38.9	39.0	38.8	39.0	39.1	38.9	38.9	38.7	38.8
		접촉전파														
1		38.6	38.4	38.5	38.3	38.1	38.4	38.1	38.8	38.8	38.5	38.9	38.5	38.8	38.7	38.5
2		38.3	38.7	38.9	38.6	38.4	39.1	39.0	39.2	38.8	39.0	39.1	38.7	38.6	38.8	38.8
3		38.9	38.8	38.7	39.0	38.8	38.2	38.9	39.1	39.3	39.1	39.0	39.3	39.2	38.2	38.9
4		37.9	38.7	38.7	38.7	38.6	38.5	38.6	39.0	39.2	38.9	38.8	39.2	39.1	38.5	38.7
		38.4	38.7	38.7	38.7	38.5	38.6	38.7	39.0	39.0	38.9	39.0	38.9	38.9	38.6	38.7
		공기전파														
1		38.5	38.0	38.5	38.5	38.5	38.4	38.4	38.6	38.1	39.1	38.5	38.1	38.3	38.4	38.4
2		38.4	38.3	38.8	38.2	38.9	38.3	38.6	38.4	37.9	38.5	38.2	38.0	37.9	38.6	38.4
3		37.9	38.0	38.3	38.4	38.4	38.4	38.7	38.2	38.4	38.8	38.9	38.5	38.7	38.9	38.5
4		38.4	37.9	38.4	38.3	38.3	38.4	38.2	38.4	38.4	38.4	38.2	38.6	38.6	38.8	38.4
		38.3	38.1	38.5	38.4	38.5	38.4	38.5	38.4	38.2	38.7	38.5	38.3	38.4	38.7	38.4

(아) 모든 실험군에서 임상증상 및 폐사는 나타나지 않았으며, 체온 분석에서도 공격접종군 3번 개체가 과흥분 상태로 인해 체온이 높게 기록되었을 뿐 바이러스 접종에 따른 차이는 나타나지 않음. 혈구응집억제반응 (HI test) 결과 12 마리 모두에서 혈청 반전이 관찰되지 않았으나 NP ELISA 결과 공격접종군 4마리 중 3마리에서 양성 반응이 나타남. 이에 따라 공격접종군 4마리 중 3마리가 공격접종을 통해 항체가 생성되었으나 1마리는 항체가 생성이 되지 않았으며, 접촉전파군, 공기전파군은 모두 임상증상을 나타내지 않고 혈청 반전도 나타나지 않아 접촉전파 및 공기전파가 일어나지 않았음이 확인됨.

(3) 바이러스혈증 및 바이러스 배출양 분석

(가) 공격접종 후 2, 3, 5, 7, 10, 14일에 바이러스혈증 분석을 위한 혈청 채취 및 바이러스 배출양 분석을 위한 비강 swab을 실시함. 채취 혈청 및 swab sample은 RNA 추출 키트의 Lysis buffer로 처리하여 바이러스 불활화 후 반출함.

(나) 배출된 sample은 RNA를 추출하여 AIV M gene real-time PCR을 처리하여 정량 분석을 실시하였으며 결과는 표 84, 85와 같음.

표 84. H5N8 바이러스 (clade 2.3.4) 접종 후 바이러스 혈증 Real-time PCR 분석.

바이러스혈증	2d	3d	5d	7d	10d	14d
공격접종1	34.74 ^a	34.53	35.85			
공격접종2			36.97	35.67	36.51	
공격접종3	34.88	36.03		34.53	31.87	33.73
공격접종4		37.00	37.02	36.72	36.65	36.34
접촉전파1		36.92	34.70			36.69
접촉전파2			36.93	36.44		
접촉전파3	36.63	37.21	36.49	34.56		
접촉전파4		35.83		36.51	35.77	36.95
공기전파1	36.99	35.44	36.53	35.00	36.80	
공기전파2	36.44	37.01				37.43
공기전파3		36.11	37.31	33.21	35.53	36.40
공기전파4		37.44	37.28	35.72		36.43

^a CT value

표 85. H5N8 바이러스 (clade 2.3.4) 접종 후 비강을 통한 바이러스 배출 Real-time PCR 분석.

비강 swab	2d	3d	5d	7d	10d	14d
공격접종1						
공격접종2						
공격접종3						
공격접종4	31.30 ^a					
접촉전파1						
접촉전파2						
접촉전파3			32.92			
접촉전파4				30.05		
공기전파1						
공기전파2						
공기전파3						
공기전파4						

^a CT value

(다) 바이러스 감염 후 바이러스혈증은 관찰되지 않음.

(라) 바이러스 감염 후 바이러스 배출 양은 매우 적은 것으로 나타났으며 혈청 반전이 일어나지 않은 접촉전파군 2마리에서 real-time PCR 양성 반응이 나타나 위양성인 것으로 추정됨. 바이러스 배출은 공격접종군 1마리에서만 접종 후 2일 까지 나타난 것으로 추정됨.

(마) 2014년 분리 H5N8 clade 2.3.4 바이러스의 경우 호흡기에서 바이러스 증식성이 낮은 것으로 확인됨.

자. 종합 고찰

(1) Clade 2.3.2.1 H5N1 감염 철새 4종 및 텃새 1종에 대한 바이러스 배출양 최대치는 아래 그림 63과 같으며 흰뺨검둥오리, 청둥오리, 홍머리오리, 고방오리 모두 감염은 이루어지나 높은 양의 바이러스를 배출하지는 못하였으며 원앙의 경우에서만 높은 양의 바이러스를 배출하는 것이 확인됨.

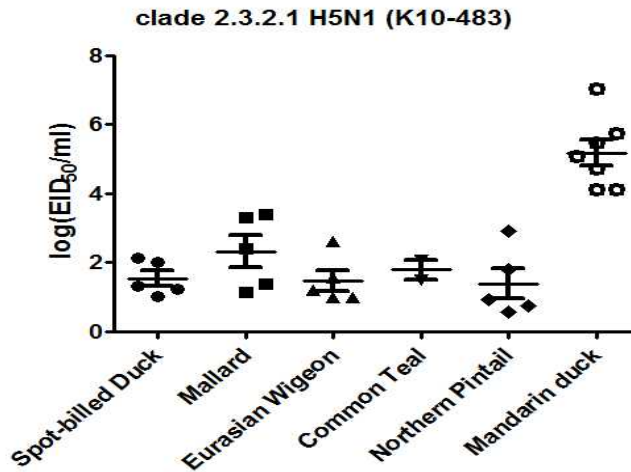


그림 63. Clade 2.3.2.1 H5N1 바이러스 감염 야생조류 4종 및 텃새 1종의 최대 바이러스 배출양.

(2) Clade 2.3.4.4 H5N8 감염 철새, 텃새 2종 및 가금류 4종에 대한 바이러스 배출양 최대치는 아래 그림 64와 같으며 모두 높은 양의 바이러스를 배출 가능한 것으로 확인됨. 흰뺨검둥오리, 원앙, 사육오리에서 가장 높은 양의 바이러스를 배출하는 것으로 확인됨. 산란계 및 토종닭의 경우 개체에 따라 바이러스 배출양의 차이가 큰 것으로 확인됨.

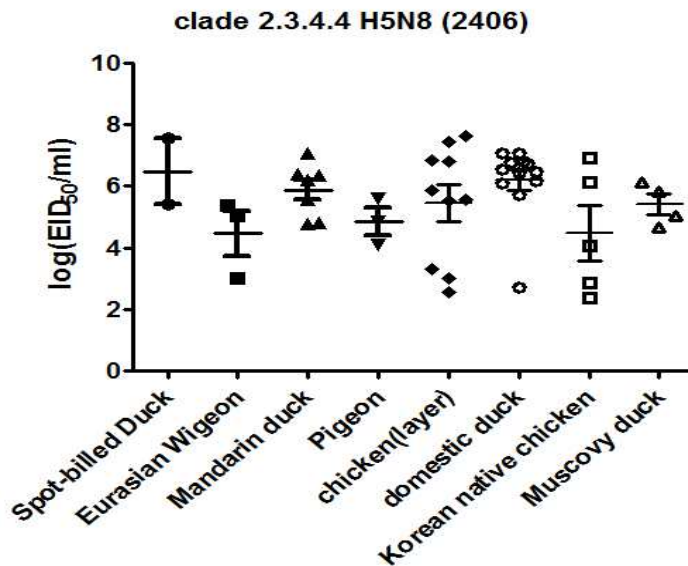


그림 64. Clade 2.3.4.4 H5N8 바이러스 감염 야생조류 2종, 텃새 2종 및 가금류 4종의 최대 바이러스 배출양.

(3) 2015년도 신규 분리주에 대한 야생조류 병리기전 실험을 타 용역과제를 통하여 수행하였으며 야생조류 5종, 텃새류 2종 및 가금류 1종에 대한 바이러스 배출양 최대치는 아래 그림 65과 같으며 모두 높은 양의 바이러스를 배출 가능한 것으로 확인됨.

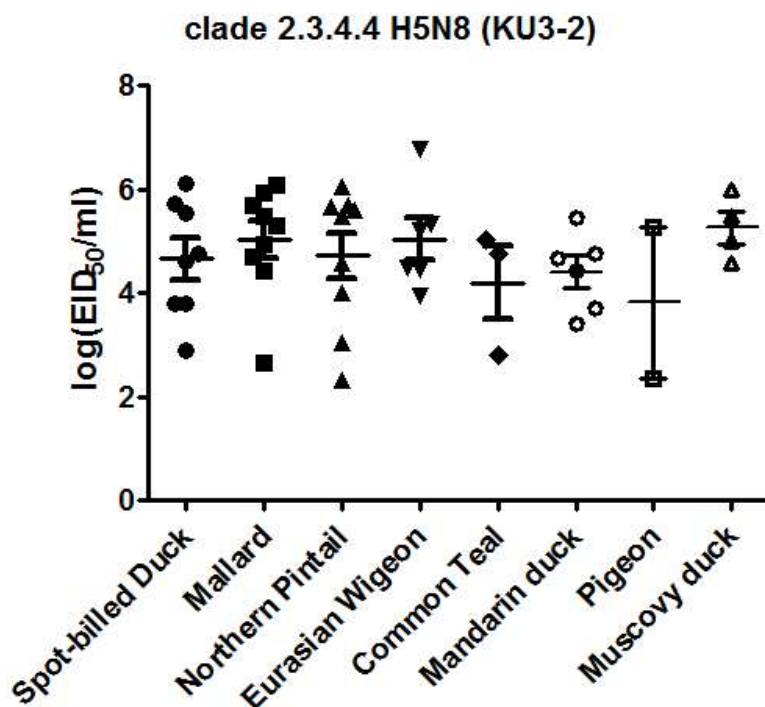


그림 65. 2015년도 신규 분리 clade 2.3.4.4 H5N8 바이러스 감염 야생조류 5종, 텃새 2종 및 가금류 1종의 최대 바이러스 배출양.

(4) 2010년도 발생 H5N1 바이러스의 경우 야생조류에서는 높은 양의 바이러스 배출이 확인되지 않았으며 원양에서만 높은 양의 바이러스가 확인됨. 반면 2014년도 발생 H5N8의 경우 야생조류 및 텃새류에서 높은 바이러스 배출양이 확인됨. 2015년도 분리주 H5N8 바이러스도 같은 양상을 나타냄. 이는 2014-5 H5N8 바이러스의 경우 야생조류에서 무증상 감염으로 바이러스 배출이 가능하다는 것을 시사하며, 발생 및 전파의 주원인이 야생조류인 것을 시사함.

3. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 야생조류에서 가금으로의 중간감염 기전 규명

가. 야생조류에서 고병원성 바이러스 간 교차방어능 확인

(1) 원양을 이용한 교차방어능 평가 시험

(가) 원양을 구매 후 BL3 실험실 안에서 각각 3수씩 H5N1 및 H5N8/2014 바이러스에 노출 시킨 뒤 2주 후 H5N8/2015 바이러스를 공격접종한 후 바이러스 배출양을 확인함. 대조군으로 항체 음성 개체 5수를 사전 바이러스 감염 없이 H5N8/2015 바이러스를 공격접종 함 (그림 66).

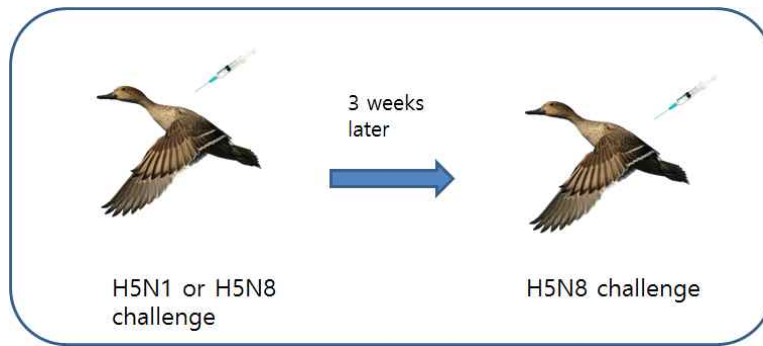


그림 66. 교차방어능 실험 모식도.

- (나) 공격접종 전 항체 검사 결과 H5N1, H5N8/2014 사전 감염개체 모두 각각의 항원에 대하여 양성반응을 나타냄.
- (다) H5N8/2014 바이러스 사전 접종 개체의 경우 실험 중 폐사하여 1개체만 교차방어능 실험에 이용함.
- (라) 공격접종 후 2, 4, 6, 8, 10일에 각각 구강 및 총배설장 swab을 실시함. Swab sample은 RNA 추출 키트의 Lysis buffer로 처리하여 바이러스 불활화 후 배출함.
- (마) 배출된 sample은 RNA를 추출하여 AIV M gene real-time PCR을 처리하여 정량 분석을 실시하였으며 결과는 그림 67과 같음.

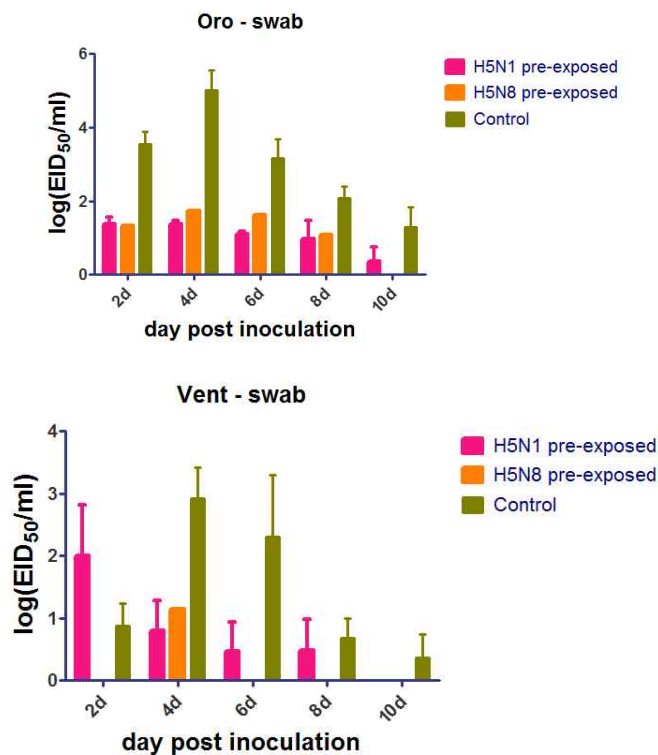


그림 67. 교차방어능 확인을 위한 원앙의 사전 바이러스 감염 후 H5N8 바이러스 공격접종 후 swab sample의 real-time PCR 결과. \log =logEID₅₀/ml

(바) 각각 바이러스에 대한 교차방어능 평가 결과 H5N1 및 H5N8 바이러스에 노출된 개체 모두 대조군에 비하여 유의적으로 낮은 바이러스 배출량을 나타냄.

(사) 공격접종 2, 4, 6일 후의 구강 swab 시료의 경우 통계학적으로 유의적으로 차이를 나타내었으며 (P value < 0.05), 특히 공격접종 4일 후에는 분명한 통계학적 유의성을 나타냄 (P value < 0.001). 다른 날짜 및 총배설강 swab 시료에서는 유의성을 나타내지 않음.

(아) 실험결과 항원적으로 유사성이 낮은 clade 2.3.2.1 바이러스에 감염된 원앙의 경우에도 clade 2.3.4.4 바이러스 감염 시 방어효능이 나타나는 것으로 확인됨. 이는 사독백신이 아닌 바이러스 감염의 경우 교차방어능이 더 높게 나타날 수 있으며 이를 통하여 바이러스의 연속감염이 쉽게 이루어질 수 없음을 나타냄.

(자) 현재 아시아 지역에 만연한 clade 2.3.2.1 바이러스는 바이러스 역학에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단되며, 야생조류에 의한 clade 2.3.4.4 바이러스 전파 양상 해석에 큰 도움을 줄 것으로 판단됨.

(차) 이는 clade 2.3.4.4 바이러스가 현재 clade 2.3.2.1이 유행하고 있는 동남아시아 및 동유럽지역에 큰 피해를 일으키지 않은 원인 중 하나로 파악됨.

(2) 고방오리를 이용한 교차방어능 평가 시험

(가) 포획한 고방오리 3수를 BL3 실험실 안에서 H5N1 바이러스에 노출 시킨 뒤 2주 후 H5N8/2015 바이러스를 공격접종한 후 바이러스 배출량을 확인함.

(나) 공격접종전 항체 검사 결과 H5N1 사전 감염개체 모두 각각의 항원에 대하여 양성반응을 나타냄.

(다) 공격접종 후 2, 4, 6, 8 10일에 각각 구강 및 총배설강 swab을 실시함. Swab sample은 RNA 추출 키트의 Lysis buffer로 처리하여 바이러스 불활화 후 배출함.

(라) 배출된 sample은 RNA를 추출하여 AIV M gene real-time PCR을 처리하여 정량 분석을 실시하였으며 결과는 그림 68과 같음.

(마) H5N1 바이러스에 대한 교차방어능 평가 결과 H5N1 및 H5N8 바이러스에 노출된 개체 모두 대조군에 비하여 유의적으로 낮은 바이러스 배출량을 나타냄.

(바) 공격접종 2, 4일 후의 구강 swab 시료의 경우 통계학적으로 유의적으로 차이를 나타내었으며 (P value < 0.01), 다른 날짜 및 총배설강 swab 시료에서는 유의성을 나타내지 않음.

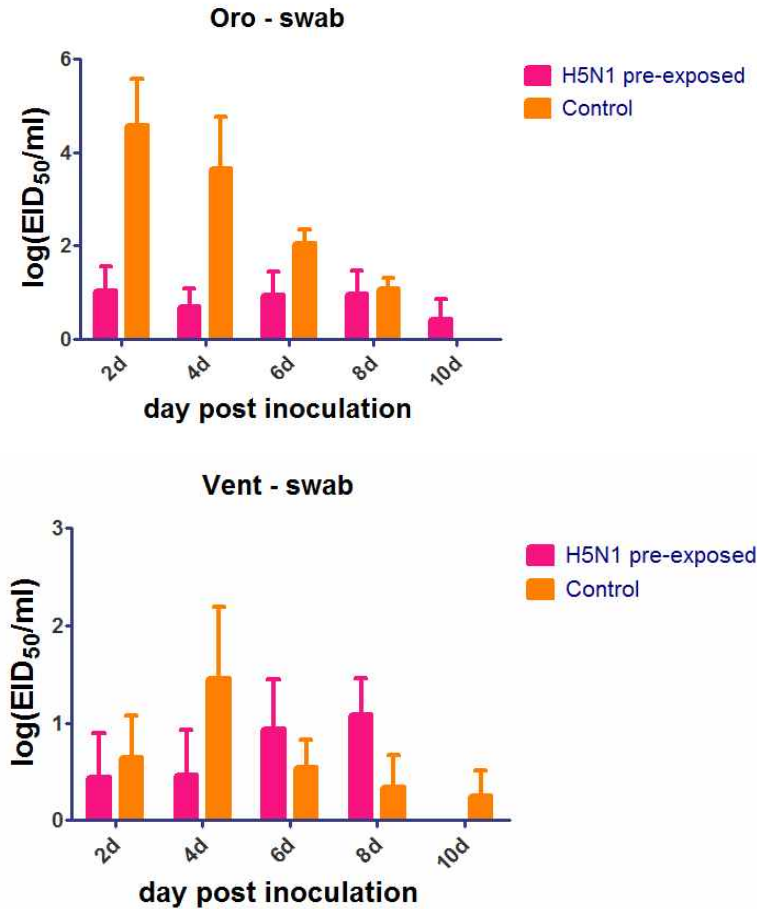


그림 68. 교차방어능 확인을 위한 고방오리의 사전 바이러스 감염 후 H5N8 바이러스 공격접종 후 swab sample의 real-time PCR 결과. 값=logEID₅₀/ml

(사) 고방오리의 경우 사전시험 결과 H5N1 감염 시 바이러스 배출량은 적었으나, 항체반전은 확인되었음. 이는 바이러스에 대한 감수성이 적은 경우에도 H5N1 바이러스의 노출된 개체의 경우 clade 2.3.4.4 H5N8 바이러스에 재감염이 어려울 수 있음을 시사함.

(아) 이 또한 clade 2.3.4.4 바이러스가 현재 clade 2.3.2.1이 유행하고 있는 동남아시아 및 동유럽지역에 큰 피해를 일으키지 않은 원인 중 하나로 파악됨.

나. 야생조류-닭 간 접촉전파 실험

- (1) 청계천 애완조류 상가에서 사육 원앙을 구입하여 원앙-닭 간 전파 실험을 실시함. 원앙의 경우 사전 실험에서 바이러스 감염 시 높은 배출량을 나타내었으며, 구매가 가능하여 타 야생조류에 비해 확보가 용이 하므로 본 실험에 이용함.
- (2) 원앙 4수에 2014년 분리 H5N8 clade 2.3.4 바이러스를 10⁶ EID₅₀/dose로 비강으로 접종하였으며, 접종 1일 후 6주령 SPF 닭 4수를 각각 접종한 원앙과 같은케이지에 사육함.

- (3) 2주간 임상증상을 관찰하고 각 2, 4, 6, 8d에 바이러스 배출양을 확인함.
- (4) 4마리의 접촉전과 SPF 닭 중 3마리가 각각 4, 6, 9d에 폐사 하였으며 접촉한 원앙은 모두 임상증상을 보이지 않음.
- (5) 각각 원앙 및 닭의 swab 시료의 real-time PCR 검사 결과는 아래 표 86과 같음.

표 86. H5N8 바이러스 (clade 2.3.4) 접종 후 원앙 및 접촉전과 SPF 닭의 swab sample의 Real-time PCR 분석

개체	2d		4d		6d		8d		비고
	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	
원앙1	19.52 ^a	31.47	21.26	21.89	29.94	26.94	34.78	35.07	
원앙2	18.51	34.90	21.94	26.89	26.27	27.14	28.89	37.52	
원앙3	24.93	34.06	20.67	27.73	26.62	31.83	34.70	34.74	
원앙4	31.12	34.40	29.50	25.01	28.52	29.24	35.87	38.39	
접촉전과 닭1	n/d	n/d	32.94	35.64	30.77	31.44	27.15	29.84	9d 폐사
접촉전과 닭2	n/d	35.73	n/d	32.73	37.23	36.26	36.80	n/d	
접촉전과 닭3	32.15	32.81	19.88	20.62					4d 폐사
접촉전과 닭4	38.07	32.39	28.75	30.59	21.50	18.13			6d 폐사

^a CT value

- (6) Swab 시료 분석결과 감염된 원앙 모두 CT value 21 이하 (약 $10^{6.0}$ EID₅₀/ml)의 높은 양의 바이러스를 배출하는 것으로 확인되었으며 접촉전과 닭의 경우 감염되어 CT value 21 이하 (약 $10^{6.0}$ EID₅₀/ml) 높은 바이러스 배출을 나타냄.
- (7) 실제 field 상황에 비하여 접촉 거리가 짧고 시간이 길었지만 본 실험을 통하여 원앙과 닭이 접촉할 경우 바이러스가 전파 될 수 있으며, 접촉 약 3일 후 폐사가 발생할 수 있음을 확인함.
- (8) 접촉전과의 매개체는 분변 및 물 등으로 추정됨.

다. 야생조류-닭 간 공기전파 실험

- (1) 청계천 애완조류 상가에서 사육 원앙을 구입하여 원앙-닭 간 전파 실험을 실시함. 원앙의 경우 사전 실험에서 바이러스 감염 시 높은 배출양을 나타내었으며, 구매가 가능하여 타 야생조류에 비해 확보가 용이 하므로 본 실험에 이용함.
- (2) 원앙 6수에 2014년 분리 H5N8 clade 2.3.4 바이러스를 10^6 EID₅₀/dose로 비강으로 접종하였으며, 접종 1일 후 6주령 SPF 닭 6수를 각각 2수씩 접촉한 원앙과 인접한 공기전과 케이지에 배치함.
- (3) 2주간 임상증상을 관찰하고 각 2, 4, 6, 8d에 바이러스 배출양을 확인함.

(4) 6마리의 접촉전파 SPF 닭 중 1마리가 접종 8일 후에 폐사 하였으며 접종한 원앙은 모두 임상증상을 보이지 않음.

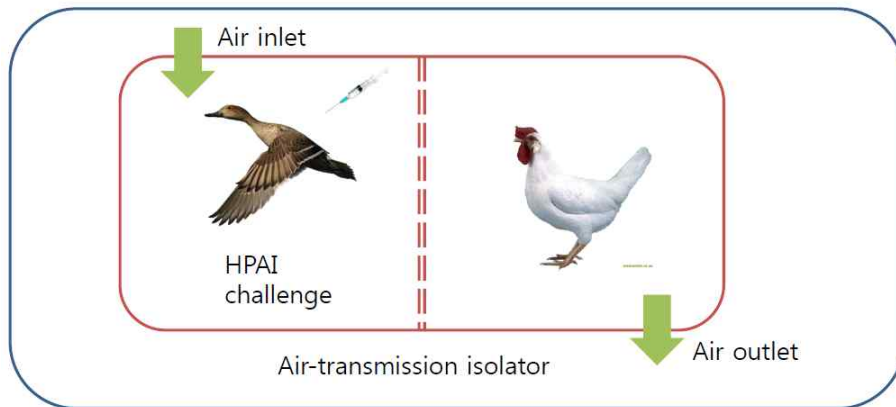


그림 69. 원앙 닭 간 공기전파 실험 모식도

(5) 각각 원앙 및 닭의 swab 시료의 real-time PCR 검사 결과는 아래 표 87과 같음.

표 87. H5N8 바이러스 (clade 2.3.4) 접종 후 원앙 및 공기전파 SPF 닭의 swab sample의 Real-time PCR 분석

개체	2d		4d		6d		8d		비고
	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	Oro	Vent	
원앙1	22.69 ^a	29.62	18.83	22.59	29.65	26.48	35.34	35.70	
원앙2	29.43	34.70	29.69	31.68	32.57	35.87	35.53	34.96	
원앙3	29.09	n/d	23.60	31.22	28.91	31.46	31.43	34.78	
원앙4	21.54	31.86	22.87	29.92	25.97	31.87	29.93	34.80	
원앙5	17.83	29.12	20.14	29.51	26.95	29.30	32.26	34.23	
원앙6	17.60	28.90	20.96	27.79	29.96	33.66	32.75	36.83	
공기전파 닭1	n/d	n/d	31.924	n/d	30.21	32.32	22.62	21.53	8d 폐사
공기전파 닭2	n/d	n/d	38.089	n/d	37.24	38.29	38.01	38.63	
공기전파 닭3	n/d	n/d	38.302	n/d	37.32	36.74	n/d	37.35	
공기전파 닭4	n/d	n/d	n/d	n/d	36.93	36.26	n/d	38.30	
공기전파 닭5	n/d	n/d	36.437	n/d	n/d	n/d	n/d	37.03	
공기전파 닭6	37.995	n/d	n/d	n/d	38.10	n/d	37.10	n/d	

^a CT value

(6) 실험결과 6마리의 닭 중 1마리만 공기전파에 의해 감염된 것으로 확인되었으며 다른 개체의 경우 항원 및 항체가 검출되지 않음.

(7) 본 실험을 통해 야생조류로부터 닭으로 공기전파가 가능한 것으로 확인되었으며, 공기전파로 인한 감염확률은 낮은 것으로 확인됨. 본 바이러스는 야생조류에 적응된 바이러스로 닭 등의 가금류에 감염을 일으키기 위해서는 높은 농도의 바이러스가 필요하여 이와 같은 결과가 나온 것으로 추측됨.

(8) 확률은 낮지만 공기전파가 가능한 것으로 확인됨에 따라 농장 내 뿐 아니라 농장 주변의 야생조류의 접근을 차단해야 농장 내 bio-security 유지가 가능한 것으로 확인됨.

3-3. 제 2협동과제: 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류 병원성 분석 및 DB 구축

1. 우리나라 과거 발생 H5N1 (2006년, 2010년 분리주 2종) 바이러스와 2014년 신규 발생한 H5N8 바이러스의 야생조류 (청둥오리)에서의 병원성 연구

표 88. 청둥오리에서의 바이러스 종류에 따른 병원성 분석

	A/chicken/Kr/IS/2006 (H5N1) (clade 2.2)	A/mandarin duck/Kr/PSC24-24/2 010 (H5N1) (clade 2.3.2.1)	A/broiler duck/Kr/Buan2/2014 (H5N8) (clade 2.3.4.6)
임상증상	없거나 미약	없거나 미약	없거나 미약
바이러스배출	주로 구강배출 (3일까지) 총배설강: 배출 안 됨	주로 구강배출 (3일까지) 총배설강: 배출 안 됨	주로 구강배출 (5일까지) 총배설강: 미약(3일까지)
조직내 바이러스 분포	분리 안 됨	분리 안 됨	대부분의 실질장기에서 분리
항체형성능(14일째)	16-64배	16배	128-1027배*
전파능	2/2	2/2	2/2

* 항체가가 높은 것은 포획된 청둥오리가 H5항체 이외의 다른 인플루엔자 대한 공통항체를 이미 지니고 있었기 때문인 것으로 확인

가. 바이러스 배출기간 및 경로

(1) 청둥오리가 감염 후 바이러스를 배출하는 것은 3-5일 이내의 짧은 기간이며, 2006년 이후 국내에서 발생한 H5 바이러스의 배출은 주로 구강으로 이뤄지고 있음.

나. H5N8 바이러스의 H5N1 바이러스 감염과의 차이점

(1) H5N8 바이러스는 청둥오리에 감염 시 H5N1 바이러스와 달리 구강으로 배출기간이 더 길고, 총배설강으로 배출도 확인됨.

(2) 또한 H5N8 바이러스는 H5N1 바이러스와 달리 기관, 폐, 심장 등 실질장기에서 낮은 역가이지만 대부분 바이러스가 분리됨.

(가) H5N8 바이러스가 H5N1 바이러스에 비해 청둥오리에서 좀 더 효과적으로 증식됨.

다. 청둥오리는 H5 HPAI에 감염되어도 임상증상이 없거나 미약하며, 감염개체에서의 바이러스 증식 및 배출이 잘 되며 청둥오리에서 청둥오리로의 전파 또한 효과적으로 일어난다.

(1) 청둥오리는 감염된 후 증상 없이 이동하며 지역 간 혹은 국가 간 바이러스를 전파시킬 수 있는 주요 야생조류종으로 추정됨.

2. 우리나라 과거 발생 H5N1 (2006년, 2010년 분리주 2종) 바이러스와 2014년 신규 발생한 H5N8 바이러스의 야생조류 (원앙)에서의 병원성 연구

표 89. 원앙에서의 바이러스 종류에 따른 병원성 분석

	A/Ck/Kr/IS/06 (H5N1) (clade 2.2)	A/mandarin duck/Kr/PSC24-24/10 (H5N1) (clade 2.3.2.1)	A/broiler duck/Kr/Buan2/2014 (H5N8) (clade 2.3.4.4)
임상증상	없거나 미약	없음	
바이러스배출	주로 구강배출(7일까지) 총배설강: 미약(5일까지)	주로 구강배출(7일까지) 총배설강: 미약(3일까지)	
조직내 바이러스 분포 항체형성능(14일째)	분리안됨 -	분리안됨 32-64배	실험예정
전파능	2/2	2/2	

가. 바이러스 배출기간 및 경로

(1) IS06 (clade 2.2) 및 PSC24-24 (clade 2.3.2.1) 바이러스를 원앙에 감염시킨 결과 3-7일까지 바이러스가 배출되는 것으로 나타났으며, 주로 구강을 통해 H5 바이러스가 배출되는 것으로 나타났음.

나. clade 2.2와 clade 2.3.2.1 바이러스 감염과의 차이점

(1) 원앙은 H5N1 HPAI에 감염되어도 임상증상이 없거나 미약하며, 인후두 및 총배설강에서 7일까지 낮은 역가로 바이러스를 배출하였으며, 주요 조직에서 바이러스 분리되지 않음.

(2) 한편, 두 바이러스 모두 그룹간 전파가 가능한 것으로 나타났으나, 항체 형성능 면에서는 차이를 보였음: IS06은 감염후 14일째 항체형성능이 관찰되지 않는 반면 PSC24-24는 32-64배의 항체가 형성.

다. 종합적으로 원앙은 H5N1 HPAI 바이러스에 감염되어도 임상증상이 없거나 미약하며, 감염개체에서 바이러스 배출은 7일까지 나타나며 그룹 간 바이러스 전파는 가능한 특성을 보임

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
<p>4-1. 목표달성도</p> <p>○</p> <p>[1차년도]</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> HPAI 발생지역 주변 및 환경에서의 H5N8형 바이러스 오염도 조사 완료 <input type="checkbox"/> 조류인플루엔자 바이러스-리셉터 동시 검색기법 개발 완료 <input type="checkbox"/> 오리류 (4종)에서의 H5N1 및 H5N8 증식성 및 병원성 분석 완료 <p>[2차년도]</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 병원성 관련 신규 분자표지 발굴이 완료 <input type="checkbox"/> 호흡기에서의 조류인플루엔자 리셉터 특성 분석 완료 <input type="checkbox"/> 소화기에서의 조류인플루엔자 리셉터 특성 분석 완료 <input type="checkbox"/> 텃새류 (1종)에서의 H5N1 및 H5N8 증식성 및 병원성 분석 완료 <input type="checkbox"/> 기러기류 (1종)에서의 H5N1 및 H5N8 증식성 및 병원성 분석 완료 <p>[3차년도]</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Mutant 재조합 바이러스 작출 완료 <input type="checkbox"/> Mutant 재조합 바이러스 특성 분석 완료 <input type="checkbox"/> 신규 분자표지의 병원성 기전 규명을 위한 실험 완료 <input type="checkbox"/> 신경계의 조류인플루엔자 리셉터 특성 분석 완료 <input type="checkbox"/> H5형 LPAI에 의한 H5N1 및 H5N8 증식성 및 병원성 변화 여부 확인 <input type="checkbox"/> H5N1 및 H5N8의 야생조류에서 가금으로 공기-매개 전파 여부 확인 <input type="checkbox"/> H5N1 및 H5N8의 야생조류에서 가금으로 물-매개 전파 여부 확인 <input type="checkbox"/> 갈매기류 (2종)에서의 H5N1 및 H5N8 증식성 및 병원성 분석 완료 <input type="checkbox"/> H5N1 및 H5N8의 주요 야생조류에서의 증식성 및 병원성 비교분석 DB 구축 완료 <input type="checkbox"/> H5N1 및 H5N8에 대한 한국형 감시종 선발 완료 (5%) 	

5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
<p>1. 활용방안</p> <p>(가) 국내 주요 야생조류 중별 바이러스 배출 패턴 및 감염 리셉터 분포 분석 자료 제시를 통한 AI예찰 및 방역대책 수립을 위한 기초자료로 활용</p> <p>(나) 야생조류에서 가금으로의 전파방식 규명을 통한 농장 내 차단방역 및 방역대책 기초자료로 활용</p> <p>(다) 국내유행 조류인플루엔자 고감수성 야생조류 중 규명을 통한 한국형 감시종 (sentinel species) 선발</p> <p>(라) 병원성 분자표지 발굴 및 규명을 통한 고위험 바이러스 모니터링/백신주 약독화 기법 등 연구 기초기반기술 확보 및 제공</p> <p>(마) AI 바이러스에 대한 유전자 기능 분석으로 AI 예방 및 치료 방법 개발의 기초 자료로 활용</p> <p>(바) 조류인플루엔자 바이러스와 감염숙주와의 상호연관관계를 규명하여, 조류인플루엔자 바이러스의 인체감염 방지에 관련된 연구의 기초자료로 활용</p> <p>2. 기대성과</p> <p>(가) 국제적인 야생조류 조류 인플루엔자 바이러스 관련 기술 확보로 기술 우위선점과 질병전파 역학정보 DB 구축으로 해외질병유입에 의한 피해액 최소화</p> <p>(나) 한국형 감시종 선발을 통한 바이러스 유입 조기파악으로 인한 피해 최소화</p> <p>(다) 국내 야생조류 중별 바이러스 배출패턴 파악으로 인한 방역활동의 효율 증대</p> <p>(라) 조류인플루엔자 바이러스에 대한 감염숙주의 면역반응 및 세포전달 체계의 변화 등을 관찰하여 조류인플루엔자 바이러스의 감염에 대한 숙주에서의 반응연구로 학술적 파급효과 기대</p> <p>(마) 기존 조류인플루엔자의 발표자료 중 활발하게 연구되고 있는 분야인 interspecies barrier에 관한 선진연구로 학술적 파급 효과 기대</p> <p>(바) 병원성 분자표지 발굴 및 규명을 통한 고위험 바이러스 모니터링/백신주 약독화 기법 등 연구 기초기반기술 확보를 통한 국가 경쟁력 강화</p>	

(사) 최근 유행되고 있는 고병원성 인플루엔자에 대한 연구를 통해 백신 및 키트 개발의 기술
우위 선점으로 인한 향후 경제적 가치 산출

(아) 다양한 종에 대한 항인플루엔자 검정시험 공격접종 시험 모델 개발로 향후 Live-bird
market 이나 철새 도래지 등에서의 바이러스 생태학 및 병리적 연구에 기초자료로 활용

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
<p>○ 신규 분리 바이러스의 특성 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 한국 유래 clade 2.3.4.4 H5 HPAI 바이러스는 초기에 부안 분리주로 대표되는 Group A와 고창 분리주로 대표되는 Group B로 나뉘었으며, 그 중 Group A는 다시 유럽 분리주의 icA1, 미국 분리주의 icA2, 한국/일본 분리주의 icA3로 나뉘는 것으로 보고되었음 (Lee et al., J Virol, 2015) - 2015년도 국내 야생조류 분리 바이러스의 특성 조사를 위하여 유전적 계통학적 분석을 실시하였으며, MEGA 5.0 프로그램을 통하여 Hasegawa-Kishino-Yano model을 이용한 Maximum Likelihood Tree 분석을 실시하였으며, Network ver. 4.613 프로그램을 통하여 Median-joining phylogenetic network 분석을 실시함 (Lee DH et al., SEPRL, USDA 협동 연구) - 유전자 계통학적 분석 결과 2015년도 초 우리나라 쇠오리 및 청둥오리 분리주 (A/common teal/Korea/KU-12/2015, A/mallard/Korea/KU3-2/2015) 2종의 경우 모두 icA3에 속하는 것으로 확인되었으며 (그림 4), 우리나라 가금 농장에서 분리되는 바이러스와는 유전적 특성이 다르며, 다른 변이 과정을 거친 것으로 확인됨 (그림 4) - icA3 분리주들의 공통 조상 추정을 위하여 BEAST v1.7 프로그램을 이용하여 Bayesian analysis를 실시한 결과 공통 조상은 약 2014년 8월의 바이러스로 추정되어 야생조류의 번식지(몽골, 러시아)에서 바이러스가 변이한 것으로 추정됨 - 본 연구결과는 icA3 subgroup 또한 국내 바이러스 변이에 의한 것이 아닌 야생조류의 유입에 의한 것임을 확인한 것이며, 기존의 국내 발생 바이러스와 다르게 발생 1년 후 다시 바이러스가 유입되었음을 시사함 - 해당 야생조류를 포함하여 바이러스 분리 보고가 된 다수의 야생조류 중에서 H5N8 HPAI 바이러스가 지속적으로 순환되고 있으며, 바이러스의 무증상 감염 및 바이러스 배출이 가능하다는 것이 간접적으로 증명됨 	

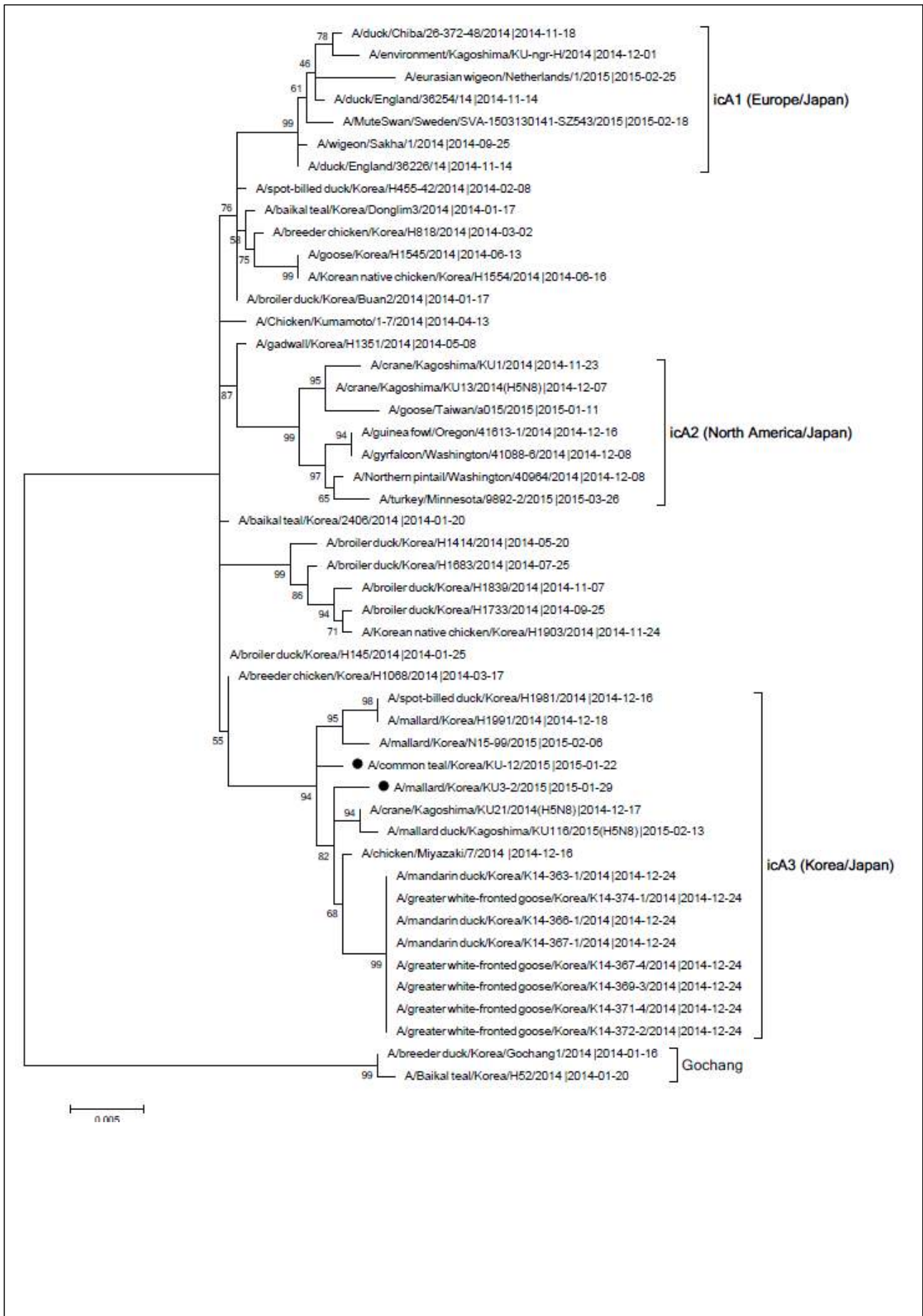


그림 4. 2015년도 야생조류 분리 H5N8 HPAI 바이러스의 phylogenetic analysis 결과 ●표시는 본 연구수행을 통하여 분리된 바이러스를 지시함

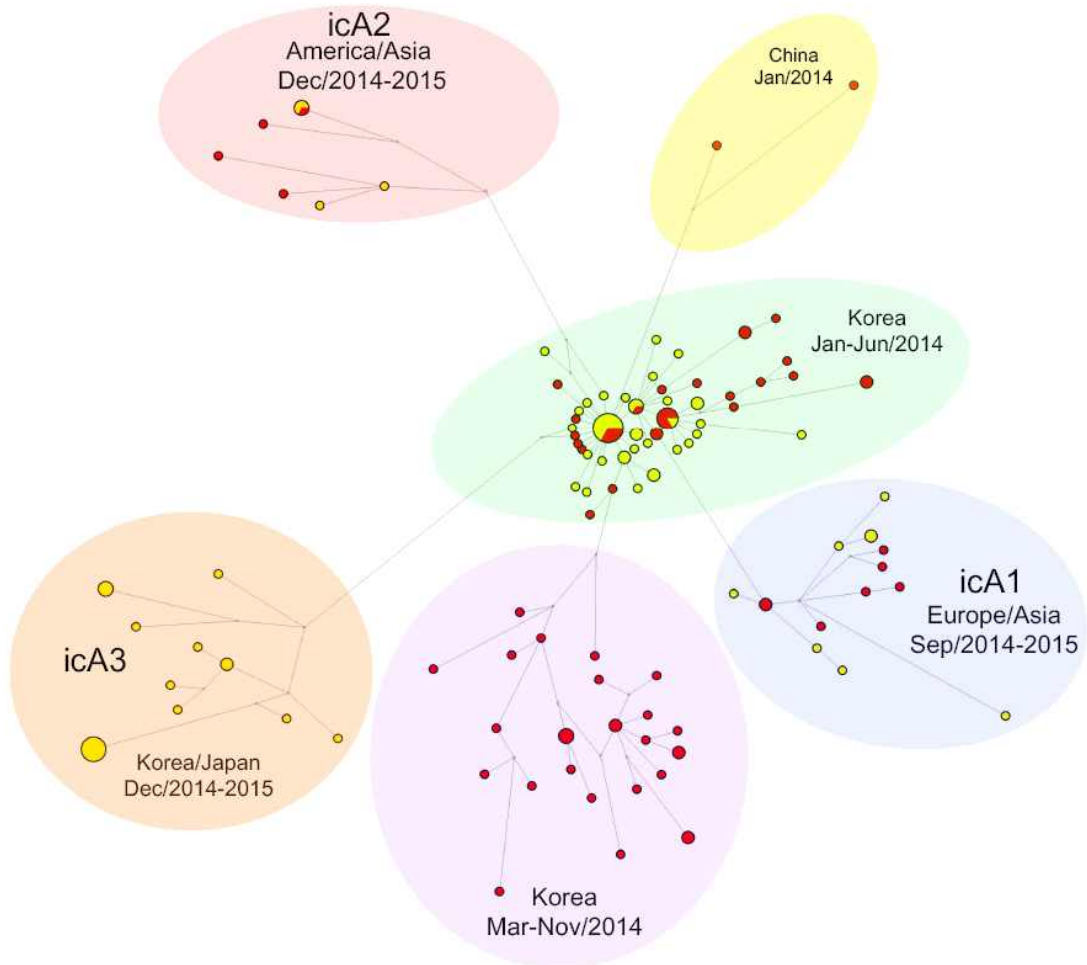


그림 5. 2015년도 야생조류 분리 H5N8 바이러스의 Network phylogenetic analysis 분석 결과

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
○	

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

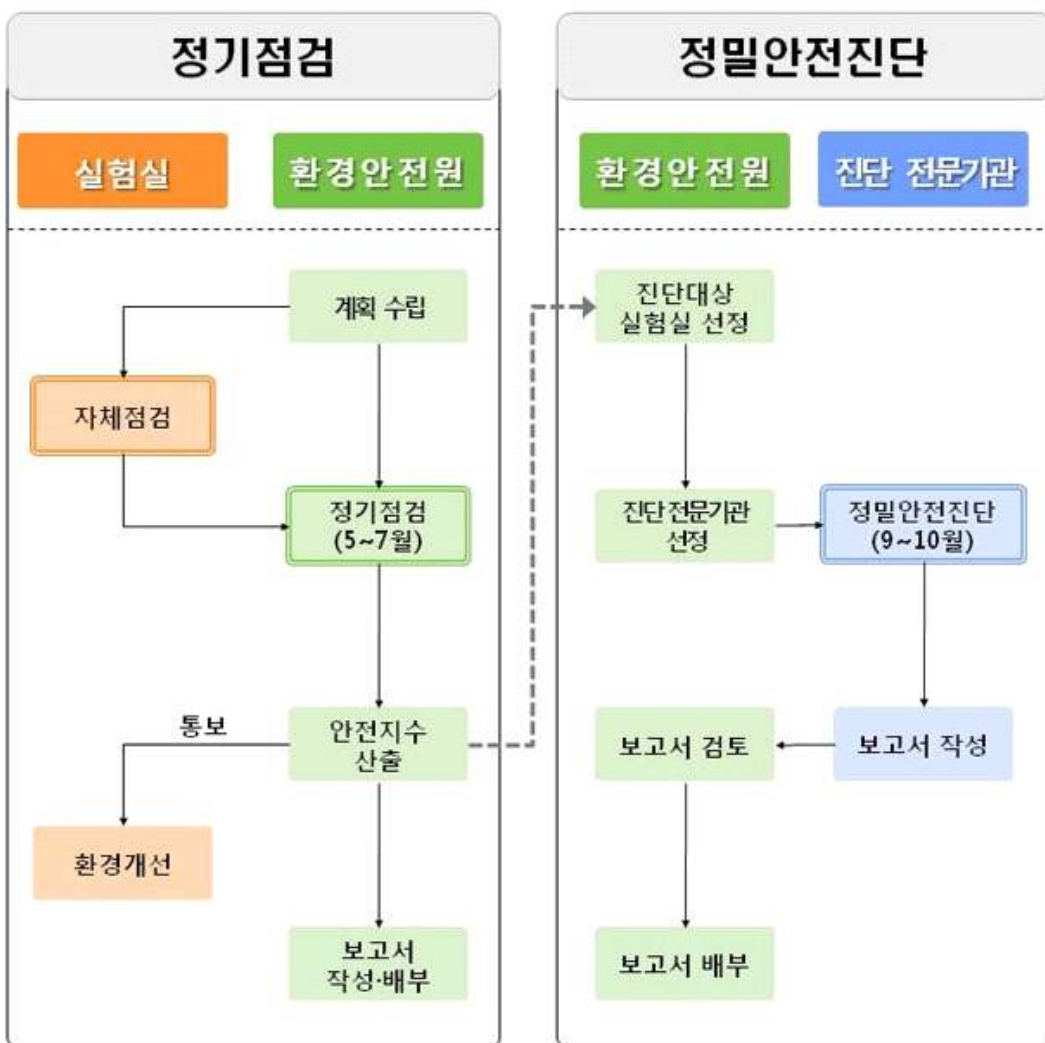
코드번호	D-11
------	------

○ 기술적 위험요소 분석

1) 실험실 안전점검 실시

- ‘서울대학교 연구실 안전 환경 관리규정’ 에 의거 실험, 실습실 안전자체점검을 분기 1회 이상 실시하고, 실험, 실습실 안전관리실태점검을 년 1회 이상 실시함
- 안전점검 실시 결과 안전지수가 낮은 연구실과 ‘연구실 안전환경 조성에 관한 법률’ 에서 규정한 연구실에 대하여 정밀안전진단을 실시하여야 함.

2) 실험실 안전점검 흐름표



○ 안전관리대책

1) 교육 훈련

■ 배경

- 안전한 연구환경 조성을 위해 ‘연구실 안전 환경 조성에 관한 법률’ (이하 ‘연안법’) 제18조(교육, 훈련 등)에서는 연구활동종사자에게 신규교육을 실시하고 이후 매 6개월마다 6시간의 정기교육을 의무적으로 실시할 것을 명시하고 있음.
- 이에 따라 ‘연안법’ 에서 요구하는 연구활동종사자 교육이수 의무사항을 ‘서울대학교 연구실 안전 환경 관리규정’ 을 개정을 통하여 반영하였음.

■ 안전환경 교육 대상자

- 실험, 실습을 수행하는 대학(원), 연구소, 부속기관 및 대학, 연구기관 등이 과학기술분야 연구개발 활동을 위하여 시설, 장비, 연구재료 등을 갖추어 설치한 실험실, 실습실, 실습준비실 의 교직원, 학생 및 연구원
- 의무교육 대상자: 학생 및 연구원
- 희망교육 대상자: 교직원

■ 교육 대상자별 교육시간 및 방법

대상	신규 교육		정기 교육	
	시간(년)	교육방법	시간(반기)	교육방법
대학원생 연구원	2	환경안전원 주관 집체교육 • 신입생을 대상으로 2시간의 신규교육을 포함하여 총 14시간의 교육을 진행 • 이를 이수한 자는 신규교육 2시간과 정기교육 12시간을 이수한 것으로 같음	6	연구실 주관 온라인교육 또는 자체교육 [온라인교육] 환경안전원 홈페이지 (http://ieps.snu.ac.kr) [자체교육] 담당교수 중심의 연구실별 교육 • 교육결과 : 실험실안전 통합관리시스템에 입력 (http://snulab.snu.ac.kr)
학부생	2	기관주관 신입생 오리엔테이션 안전교육 또는 학부(과)주관 실험 전 안전교육 • 환경안전원 홈페이지 자료 활용 • 교육결과 : 표준양식에 기록 환경안전원에 제출	6	환경안전원 주관 온라인교육 [온라인교육] 환경안전원 홈페이지 (http://ieps.snu.ac.kr)
교직원	2	환경안전원 주관 집체교육 • 관리기관안전담당자 워크숍 (1회/년)	6	환경안전원 주관 온라인교육 [온라인교육] 환경안전원 홈페이지 (http://ieps.snu.ac.kr)

※ 인턴생 : 연구실을 일시적으로 출입하는 경우, 연구실 주관으로 2시간의 신규교육을 이수하여야 하며, 장기적(6개월 이상)으로 출입하는 경우에는 환경안전원 주관 온라인교육(6시간/반기)을 이수하여야 한다.

■ 안전교육 과정

- 전공특성에 따라 A, B, C 반으로 구분하여 교육 실시
- A 반: 화학약품, 동물, 미생물 취급
- B 반: 화학약품 취급
- C 반: 기계, 전기, 컴퓨터 취급

■ 안전교육 절차



○ 기술적 위험요소 분석

1) 실험실 안전 점검

위험등급	점검주기	분류 기준
A등급	분기 1회	가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물의 취급, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
B등급	반기 1회	일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생 실험실
C등급	연 1회	이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

2) 실험실 정밀안전진단 실시

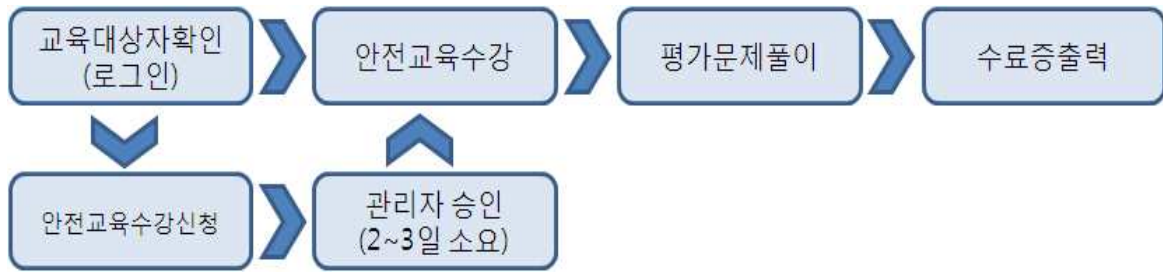
실험실안전관리규정에 의거 실험실의 위험정도에 따라, A,B,C로 관리등급을 분류하여, 실험실환경안전점검을 실시하고 있으며, 안전점검실시 결과 실험실의 재해예방과 안전성 확보 등을 위하여 필요하다고 인정되는 경우에는 전무기관에 의뢰하여 정밀 안전진단을 실시함.

○ 안전관리대책

1)교육 훈련

- a. 관련근거 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법령 제 18조, 동법 시행령 제 17조 및 동법 시행규칙 제 9조, 실험실 안전관리 규정 제 16조(안전교육), 제 17조(안전교육의 관리)
- b. 교육대상 : 실험실을 출입하는 모든 이용자 (교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등)
- c. 안전교육 시간 및 수료인정기간
 - 출입하는 실험실의 위험등급(A,B,C등급) 및 전공특성에 따라 안전교육을 받아야 하며, 1년에 8시간 이상 교육이수 필수
 - 수료인정기간은 수료증의 수료인정기간 까지(유효기간이 지나면 재교육 이수)
- d. 안전교육 과정
 - 전공특성에 따라 A,B,C 코스로 구분하여 교육 실시
 - A코스 : 생물·방사선 취급
 - B코스 : 화학·가스 취급
 - C코스 : 전기·기계 취급

e. 안전교육절차



2) 안전관리추진계획

- 각 실험 단과대학별 안전관리실무위원회 구성 및 운영
- 교내 전체 건물 소방시설 통합관리체계(FMS) 구성
- 실험실 내부 점검실시 후 실험등급 지정표찰 부착
- 건물별 복도 및 비상계단 통로 확보와 불법 사무실 철거
- 사이버 안전 교육 훈련

3) 2015년도 연구실 안전공제 증권

- 공제가입기간 : 2015.05.04 15시 ~ 2016.05.04. 15시(366일)
- 공제가입금액 : 사망/후유장해(1급시) : 100,000,000원, 상해 : 10,000,000원
- 총 공제료 : 53,391,000원

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Highly pathogenic avian influenza A (H5N8) viruses reintroduced into South Korea by migratory waterfowl, 2014-2015	건국대	주저자	Emerging Infectious Diseases		2016.03	중복	SCI
2	논문	Pathogenicity of the Korean H5N8 highly pathogenic avian influenza virus in commercial domestic poultry species	건국대	주저자	Avian Pathology		2016.04.21	단독	SCI
3	논문	Experimental infection of chickens with intercontinental reassortant H9N2 influenza viruses from wild bird	건국대	주저자	Avian diseases		2016.06	단독	SCI
4	논문	Novel reassortant influenza A (H5N8) viruses among inoculated domestic and wild ducks, South Korea, 2014	농림축산 검역본부	주저자	Emerging Infectious Diseases		2015.02	중복	SCI

11. 기타사항

코드번호	D-13
○	

12. 참고문헌

코드번호	D-14
○	Megan R. W. Barbera, Jerry R. Aldridge, Jr.b, Robert G. Websterb, and Katharine E. Magora, 2010, Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107 (13); 5913-18.
○	Suresh V. Kuchipudi, Meenu Tellabati, Sujith Sebastian, Brandon Z. Londt, Christine Jansen, Lonneke Vervelde, Sharon M. Brookes, Ian H. Brown, Stephen P. Dunham and Kin-Chow Chang, 2014, Highly pathogenic avian influenza virus infection in chickens but not ducks is associated with elevated host immune and pro-inflammatory responses, Veterinary Research, 45 (118).
○	Kenrie P. Y. Hui, Hung Sing Li, Man Chun Cheung, Renee W. Y. Chan, Kit M. Yuen, Chris K. P. Mok, John M. Nicholls, J. S. Malik Peiris and Michael C. W. Chan, 2016, Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus delays apoptotic responses via activation of STAT3, Scientific Reports 6 (28593).
○	Charles C. Bailey, Guocai Zhong, I-Chueh Huang and Michael Farzan, 2014, IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense, Annual Review of Virology, 1 (1); 261-83
○	Akiko Iwasaki and Padmini S. Pillai, 2014, Innate immunity to influenza virus infection, Nature Reviews Immunology, 14 (5); 315-28
○	Masahiro Kajihara, Yoshihiro Sakoda, Kosuke Soda, Kenji Minari, Masatoshi Okamatsu, Ayato Takada and Hiroshi Kida, 2013, The PB2, PA, HA, NP, and NS genes of a highly pathogenic avian influenza virus A/whooper swan/Mongolia/3/2005 (H5N1) are responsible for pathogenicity in ducks, Virology Journal, 10 (45).
○	D. J. Hulse-Post, J. Franks, K. Boyd, R. Salomon, E. Hoffmann, H. L. Yen, R. J. Webby, D. Walker, T. D. Nguyen and R. G. Webster, 2007, Molecular Changes in the Polymerase Genes (PA and PB1) Associated with High Pathogenicity of H5N1 Influenza Virus in Mallard Ducks, Journal of Virology, 81 (16); 8515-24
○	Jiasheng Song, Huapeng Feng, Jing Xu, Dongming Zhao, Jianzhong Shi, Yanbing Li, Guohua Deng, Yongping Jiang, Xuyong Li, Pengyang Zhu, Yuntao Guan, Zhigao Bu, Yoshihiro Kawaoka and Hualan Chen, 2011, The PA Protein Directly Contributes to the Virulence of H5N1 Avian Influenza Viruses in Domestic Ducks, Journal of Virology, 85 (5); 2180-8
○	Jiao Hu, Zenglei Hu, Qingqing Song, Min Gu, Xiaowen Liu, Xiaoquan Wang, Shunlin Hu, Chaoyang Chen, Huimou Liu, Wenbo Liu, Sujuan Chen, Daxin Peng and Xiufan Liu, 2013, The PA-Gene-Mediated Lethal Dissemination and Excessive Innate Immune Response Contribute to the High Virulence of H5N1 Avian Influenza Virus in Mice, Journal of Virology,

87 (5), 2660-72.

- Youn-Jeong Lee, Hyun-Mi Kang, Eun-Kyoung Lee, Byung-Min Song, Jipseol Jeong, Yong-Kuk Kwon, Hye-Ryoung Kim, Kyu-Jun Lee, Mi-Seon Hong, Il Jang, Kang-Seuk Choi, Ji-Ye Kim, Hyun-Jeong Lee, Min-su Kang, Ok-Mi Jeong, Jong-Ho Baek, Yi-Seok Joo, Yong Ho Park and Hee-Soo Lee, 2014, Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses, South Korea, 2014, *Emerging Infectious Diseases*, 20 (6); 1087-1089.
- Thanh Hoa Le, and Nga Thi Bich Nguyen, 2014, Evolutionary dynamics of highly pathogenic avian influenza A/H5N1 HA clades and vaccine implementation in Vietnam, *Clinical and experimental vaccine research*, 3; 117-127.
- Tingsong Hu, Jianling Song, Wendong Zhang, Huanyun Zhao, Bofang Duan, Qingliang Liu, Wei Zeng, Wei Qiu, Gang Chen, Yinggou Zhang, Quanshui Fan, and Fuqiang Zhang, 2015, Emergence of novel clade 2.3.4 influenza A (H5N1) virus subgroups in Yunnan Province, China, *Infection, Genetics and Evolution*, 33; 95-100.
- David E. Swayne, 2012, Impact of vaccines and vaccination on global control of avian influenza, *Avian Diseases*, 56; 818-828
- David E. Swayne, Erica Spackman, and Mary J. Pantin-Jackwood, 2014, Success factors for avian influenza vaccine use in poultry and potential impact at the wild bird-agricultural interface, *EcoHealth*, 11; 94-108

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 국내분리 H5N1형 HPAI의 주요 야생조류 종별 병원성 및 병리기전 연구 (영문) Susceptibility and pathogenesis of wild bird species against Korean HPAI H5N1 virus					
주관연구기관	서울대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 서울대학교 수의과대학		
참 여 기 업	건국대학교 농림축산검역본부		총 연 구 기 간	(성명) 김 재 흥		
총연구개발비 (1,290,000천원)	계	1,290,000 (천원)	총 참 연 구 원 수	2013.08.26. ~ 2016.08.25. (3년)		
	정부출연 연구개발비	1,290,000 (천원)		총 인 원	73	
	기업부담금			내부인원	24	
	연구기관부담금			외부인원	49	

○ 연구개발 목표 및 성과

1. 최종목표: AI예찰 및 방역대책 수립을 위하여 국내 주요 야생조류의 종별 H5N1형 HPAI의 병원성 및 병리기전 연구결과 확보가 필요함

2. 세부 목표

- (1) 최근 국내분리 H5N1형 HPAI 바이러스의 주요 야생조류 (오리류 포함 8종 이상)에서의 증식성 및 병원성 비교분석 DB 구축 완료
- (2) 야생조류에 대한 조류인플루엔자 병원성 관련 신규 분자표지 발굴 및 기전 규명
- (3) 국내 주요 야생조류의 조류인플루엔자 리셉터 분포 분석을 통한 감염기전 연구
- (4) H5N1형 HPAI 바이러스에 대한 한국형 감시종 (Sentinel species) 선발
- (5) HPAI의 야생조류와 가금으로의 종간감염 기전 규명

○ 연구내용 및 결과

1. 제 1세부과제: 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류 병원성 및 관련 신규 분자표지 연구

가. HPAI 발생지역 주변 및 환경에서의 H5N8형 바이러스 오염도 조사

나. 야생조류에 대한 조류인플루엔자 바이러스 병원성 관련 신규 분자표지 발굴 및 기전 규명

다. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 갈매기류에서의 증식성 및 병원성 조사

2. 제 1협동과제: 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류 병원성 및 리셉터 분포 상관관계 분석

가. 야생조류의 조류인플루엔자 바이러스 감염 부위와 리셉터 분포의 상관관계 분석

나. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 야생조류에서 가금으로의 종간감염 기전 규명

다. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 오리류 및 텃새류에서의 증식성 및 병원성 조사

3. 제2협동과제: 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류 병원성 분석 및 DB 구축
 - 가. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 오리류 및 기러기류에서의 증식성 및 병원성 조사
 - 나. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류에서의 증식성 및 병원성 비교분석 DB 구축
 - 다. 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI에 대한 한국형 감시종 선발

○ 연구성과 활용실적 및 계획

1. 활용방안

- 가. 국내 주요 야생조류 종별 바이러스 배출 패턴 및 감염 리셉터 분포 분석 자료 제시를 통한 AI예찰 및 방역대책 수립을 위한 기초자료로 활용
- 나. 야생조류에서 가금으로의 전파방식 규명을 통한 농장 내 차단방역 및 방역대책 기초자료로 활용
- 다. 국내유행 조류인플루엔자 고감수성 야생조류 종 규명을 통한 한국형 감시종 (sentinel species) 선발
- 라. 병원성 분자표지 발굴 및 규명을 통한 고위험 바이러스 모니터링/백신주 약독화 기법 등 연구 기초기반기술 확보 및 제공
- 마. AI 바이러스에 대한 유전자 기능 분석으로 AI 예방 및 치료 방법 개발의 기초 자료로 활용
- 바. 조류인플루엔자 바이러스와 감염숙주와의 상호연관관계를 규명하여, 조류인플루엔자 바이러스의 인체감염 방지에 관련된 연구의 기초자료로 활용

(2) 기대성과

- 가. 국제적인 야생조류 조류 인플루엔자 바이러스 관련 기술 확보로 기술 우위선점과 질병전파 역학 정보 DB 구축으로 해외질병유입에 의한 피해액 최소화
- 나. 한국형 감시종 선발을 통한 바이러스 유입 조기파악으로 인한 피해 최소화
- 다. 국내 야생조류 종별 바이러스 배출패턴 파악으로 인한 방역활동의 효율 증대
- 라. 조류인플루엔자 바이러스에 대한 감염숙주의 면역반응 및 세포전달 체계의 변화 등을 관찰하여 조류인플루엔자 바이러스의 감염에 대한 숙주에서의 반응연구로 학술적 파급효과 기대
- 마. 기존 조류인플루엔자의 발표자료 중 활발하게 연구되고 있는 분야인 interspecies barrier에 관한 선진연구로 학술적 파급 효과 기대
- 바. 병원성 분자표지 발굴 및 규명을 통한 고위험 바이러스 모니터링/백신주 약독화 기법 등 연구 기초기반기술 확보를 통한 국가 경쟁력 강화
- 사. 최근 유행되고 있는 고병원성 인플루엔자에 대한 연구를 통해 백신 및 키트 개발의 기술 우위 선점으로 인한 향후 경제적 가치 산출
- 아. 다양한 종에 대한 항인플루엔자 검정시험 공격집중 시험 모델 개발로 향후 Live-bird market 이나 철새 도래지 등에서의 바이러스 생태학 및 병리적 연구에 기초자료로 활용

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

			코드번호	D-15
			과제번호	313016-3
사업구분	농림축산식품 연구개발사업			
연구분야	동물질병예방		과제구분	단위
사업명	가축질병기술개발사업			주관
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음
과제명	국내분리 H5N1형 HPAI의 주요 야생조류 종별 병원성 및 병리기전 연구		과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	서울대학교		연구책임자	김재홍
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간
	1차년도		430,000	
	2차년도		430,000	
	3차년도		430,000	
	4차년도			
	5차년도			
	계		1,290,000	
참여기업	건국대학교, 농림축산검역본부			
상대국		상대국연구기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2016년 8월 25일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
서울대학교	교수	김재홍

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	---

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 고병원성 AIV 종별(H5N1 2종, H5N8 1종)로 10종의 야생조류에 대한 병원성과 장기별 바이러스 배출량, 전파력 등을 확인하고, 감시종을 선정하였으며, 종별로 야생조류 호흡기 상피세포의 AI 바이러스 수용체 밀도와 상호작용을 밝혀내어 AI 방역에 중요한 기술자료가 될 것임.
- AIV 병원성과 관련된 신규 분자표지를 발굴하여 위험성 예측과 예방 기술에 크게 기여

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- AIV 별, 야생조류 종별 병원성 차이는 국가의 AI 방역에 있어 중요한 기술자료로서 파급효과가 크며, 원양 등 감시종 선발은 야생조류 AI 예찰사업에 크게 기여할 것으로 기대됨.
- AIV 병원성 관련 신규 분자는 앞으로 AIV 위험성, 면역, 백신개발 등의 분야 기술 발전에 다방면으로 응용될 것으로 자평함.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- AIV 별, 야생조류 종별 병원성 차이는 국가의 AI 예찰과 방역에 있어서 직접적으로 활용될 가치가 매우 크며, 감시종 선발 또한 야생조류 AI 예찰사업에 활용성이 매우 클 것으로 판단됨.
- AIV 병원성 관련 신규 분자 발굴은 AIV 백신개발과 위험성 예측에 있어서 직접적으로 활용될 수 있으며, 추가 연구 결과가 뒷받침되면 백신 개발 단계까지 적용될 수 있음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 야생조류 포획, 고병원성 바이러스 공격집중, 알려지지 않은 새로운 AIV 병원성 분자표지 등 창의성과 기존 관행을 넘은 연구과정 때문에 많은 애로사항이 있었음에도 과제별로 이를 극복하고 좋은 결과를 도출하였고, 연구개발 수행의 완성도를 높일 수 있었음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 기존 결과를 넘는 새로운 창의적 결과를 찾아내는 데는 시일이 통상적 진행보다 더 소요되며, 따라서 연구개발 성과 중 진행중인 논문발표는 앞으로 충분히 목표 달성할 것으로 예상함.
- 지적소유권 등도 추후 목표를 초과하는 성과가 나올 것으로 예상함.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
H5N1 발생지역 주변 및 환경에서의 H5N1형 바이러스 오염도 조사	5	5	발생지역 주변 및 환경에서 예상보다 조기에 소실됨을 확인
조류인플루엔자 바이러스-리셉터 동시염색기법 개발	5	5	국내 최초로 바이러스-리셉터 염색기술 확립
감염 장기별 조류인플루엔자 리셉터 특성 분석	15	15	바이러스와 장기별 리셉터 특성 분석으로 장기별 병원성 발현 구명
오리류, 야생조류 및 텃새류에서의 H5N1 및 H5N8 증식성 및 병원성 분석	25	25	오리 및 야생 철새류, 텃새류에서의 증식성과 병원성의 다양성 확인
병원성 관련 신규 분자표지 발굴	10	10	미지의 병원성 분자표지 신규 확인
Mutant 재조합 바이러스 작출 및 특성분석	10	10	병원성 유전자를 배제한 재조합 바이러스 작출 및 특성 구명
신규 분자표지의 병원성 기전 구명	5	5	AIV 병원성 유전자 간의 상관성에 대한 추가 연구가 기대됨
H5N1 및 H5N8의 야생조류에서 가금으로 공기 및 물 매개 전파 시험	5	5	바이러스별, 숙주별로 전파력에 상당한 차이가 있음을 확인
H5N1 및 H5N8의 주요 야생조류에서의 증식성 및 병원성 비교분석 DB 구축	10	10	AIV 증식성 및 병원성 유전자에 관한 DB 구축 완료
H5N1 및 H5N8에 대한 한국형 감시종 선발	10	10	AIV 종류별로 원양 등 감수성이 높은 감시종 선발
합계	100점	100%	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 기존에 수행이 매우 어려웠던 AIV 종류별, 야생조류 종류별 병원성과 전파력에 관한 연구결과를 밝혔고, 바이러스와 수용체 간의 상호작용과 병원성 발현기전을 연계하여 규명하는 성과를 도출함.
- AIV 별로 다양한 병원성 발현 차이를 분자적 차원에서 규명하여 추후 AIV 위험성 예측과 면역발현에 적용할 수 있는 훌륭한 성과를 얻었음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 야생조류 종류별 포획이 매우 어렵고, 병원성 시험이 모두 ABSL-3 고도 차폐 안전시설에서 어렵게 행해진다는 점이 감안되어야 함.
- AIV의 병원성 관련 분자표지도 기존에 알려진 유전자 외에 새로운 병원성 관련 유전자를 밝히는 연구는 무수한 유전자 조합과 확인과정이 필요하다는 점이 고려되어야 함.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- AIV 종류별로 주요 야생조류 종별 병원성 발현 양상 차이와 다양한 바이러스 배출 패턴 및 감염 리셉터 분포 분석 자료 제시를 통한 AI예찰 및 방역대책 수립을 위한 국가방역 자료로 제공
 - 국내 유행 AI 고감수성 야생조류 종 규명을 통한 한국형 감시종 (sentinel species) 선발 및 AI 국가예찰 시스템에 활용
- 야생조류에서 가금으로의 전파방식 구명을 통한 농장 내 차단방역 및 방역대책 기초자료로 활용
- AIV 병원성 관련 분자표지 발굴 및 기전 구명을 통한 고위험 바이러스 모니터링/백신주 약독화 기법을 통하여 위험성 예측기술과 백신 개발 기술에 활용 예정임.
- 조류인플루엔자 바이러스와 감염숙주와의 상호연관관계를 규명하여, 조류인플루엔자 바이러스의 인체감염 방지에 관련된 연구의 기초자료로 활용

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	가축질병기술개발사업	
연구과제명	국내분리 H5N1형 HPAI의 주요 야생조류 종별 병원성 및 병리기전 연구			
주관연구기관	서울대학교		주관연구책임자	김재홍
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	1,290,000,000원			1,290,000,000원
연구개발기간	2013년 8월 26일 ~ 2016년 8월 25일 (3년)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(연구) <input type="checkbox"/> 미활용(사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① HPAI 발생지역 주변 및 환경에서의 H5N8형 바이러스 오염도 조사	○ H5N8 HPAI 바이러스의 전파 위험성 분석을 위한 발생농장 인근 환경의 H5N8 바이러스 오염 실태 조사 완료
② 병원성 관련 신규 분자표지 발굴 및 기전 규명	○ 야생조류에 대한 조류인플루엔자 병원성 관련 신규 분자표지 발굴 완료 ○ 신규 분자표지 mutant 재조합 바이러스 제작 및 특성 분석 완료 ○ 야생조류에 대한 조류인플루엔자 병원성 관련 신규 분자표지의 기전 규명 완료
③ 야생조류의 조류인플루엔자 감염 부위와 리셉터 분포의 상관관계 분석	○ 조류인플루엔자 바이러스와 리셉터의 동시 염색 기법 연구 완료 ○ 조류인플루엔자 바이러스 감염 부위와 리셉터 분포의 상관관계 분석 완료 ○ 야생조류의 조류인플루엔자 바이러스 신경계 감염과 리셉터 분포의 상관관계 분석 완료
④ H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류에서의 병원성 분석	○ 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 갈매기류에서의 증식성 및 병원성 분석 완료 ○ 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 오리류에서의 증식성 및 병원성 분석 완료 ○ 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 텃새류에서의 증식성 및 병원성 분석 완료

⑤ 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 야생조류에서 가금으로의 중간감염 기전 규명	○ 야생조류의 H5형 LPAI 노출에 의한 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 병원성 변화 관찰 완료 ○ 야생조류에서 가금으로의 공기-매개 전파 확인 실험 완료 ○ 야생조류에서 가금으로의 물-매개 전파 확인 실험 완료
⑥ 국내분리 H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 주요 야생조류에서의 증식성, 병원성 비교분석	○ H5N1형 및 H5N8형 HPAI의 clade별, 야생조류종별 증식성 및 병원성 비교분석 DB 구축 및 분석 완료

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표										연구반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SC I	비 SC I						
최종목표	3	2									10			4		2	5		
연기기간내 달성실적	2										6			4	1	2	5		
달성율(%)	67										60			100		100	100		

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	병원성 분자표지 발굴 및 규명
②	AIV에 대한 유전자 분석 및 기능 기술
③	AIV와 감염숙주와의 상호 연관 관계 규명
④	국내 주요 야생조류 종별 바이러스 배출 패턴 및 감염 리셉터 분포 관련성
⑤	국내유행 AI 고감수성 야생조류 종 규명을 통한 한국형 감시종 (sentinel species) 선발
⑥	오리 조류인플루엔자 내성 관련 유전자
⑦	오리 고증식성 분자 표지
⑧	오리 혈청 내 백신효능 저감 물질

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		v				v			v	v
②의 기술		v							v	v
③의 기술		v				v		v	v	v
④의 기술		v							v	
⑤의 기술		v						v	v	
⑥의 기술		v								v
⑦의 기술		v								v
⑧의 기술		v								v

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	○ 고위험 바이러스 모니터링/백신주 약독화 기법 등 연구 기초기반기술 확보 및 고 증식 저병원성 백신주 개발에 활용
②의 기술	○ AI 예방 및 치료 방법 개발의 기초 자료 및 유전자 비교평가 자료로 활용
③의 기술	○ AIV의 인체감염 방지에 관련된 연구의 기초자료로 활용하며, 위험성 평가 및 병 원성 사전 예측 자료로 응용 가능함
④의 기술	○ 신종 HPAI 바이러스 유입 시 조류 종별 바이러스 배출 패턴 예상 및 위험성 사 전 활용
⑤의 기술	○ 야생조류에서 가금으로의 전파방식 규명을 통한 농장 내 차단방역 및 방역대책 기초자료로 활용 ○ 청둥오리 등 감수종 집중 예찰로 유입 위험성 조기 검색 및 조기경보시스템 정립
⑥의 기술	○ 조류인플루엔자 내성 닭 품종 개발 ○ 작용 기전 연구 및 닭 homologs 발굴에 활용
⑦의 기술	○ 진단용 키트 개발에 활용 ○ 사람 인플루엔자 바이러스 유전자에서 빈도 조사 및 역류 위험성(사람->오리) 연구
⑧의 기술	○ 오리 백신 효능 개선에 활용 ○ 백신 면역원성 저하 기전 및 회피 기술 연구

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표							
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과		교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문				학술발표	정책활용	
											SC I	비 SC I						
최종목표	3	2										10		4		2	5	
연구기간내 달성실적	2											6		4	1	2	5	
연구종료후 성과창출 계획	1	2										4						

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)