발 간 등 록 번 호
11-1543000-001873-01

농생명산업기술개발사업 R&D Report

닭 바이러스성 호흡기 질병 (IB,ILT) 방제 대책 연구 최종보고서

2017. 10. 31.

주관연구기관 / 건국대학교 산학협력단
세부연구기관 / 건국대학교 산학협력단
협동연구기관 / ㈜구을리생명공학원

농 림 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "닭 바이러스성 호흡기 질병 (IB,ILT) 방제 대책 연구"
(개발기간 : 2014. 07. ~ 2017. 07.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 10. 31.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) 서정향 (인)
세부연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) 서정향 (인)
협동연구기관명 : ㈜구을리생명공학원 (대표자) 김원섭 (인)

주관연구책임자 : 이상원
세부연구책임자 : 송창선
협동기관책임자 : 김원섭

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>314012-3</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>2014.07.29~
2017.07.28</td><td>단 계 구 분</td><td>2014.07~
2017.07/
2014.07~
2017.07</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>단 위 사 업</td><td colspan="4">농식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td>사 업 명</td><td colspan="4">농생명산업기술개발사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4">(해당 없음)</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">닭 바이러스성 호흡기 질병 (IB, ILT) 방제 대책 연구</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">이 상 원</td><td>해당단계
참 여
연구원 수</td><td>총: 64 명
내부: 5 명
외부: 59 명</td><td>해당단계
연 구 개 발 비</td><td>정부:690,000천원
민간:1,080,000천원
계:1,770,000천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참 여
연구원 수</td><td>총: 64 명
내부: 5 명
외부: 59 명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부:690,000천원
민간:1,080,000천원
계:1,770,000천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="3">건국대학교 수의과대학</td><td colspan="2">참여기업명
㈜구을리생명공학원
㈜고려비엔피
㈜녹십자수의약품
㈜대성미생물연구소
㈜코미팜
㈜씨티씨바이오</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="3">연구기관명:</td><td colspan="2">연구책임자:</td></tr>
<tr><td colspan="4">-광범위 교차 면역원성 닭 전염성 기관지염 (Infectious bronchitis, IB) 바이러스 예방백신 개발 및 산업화
- 닭 전염성 후두기관염 (Infectious laryngotracheitis, ILT) 바이러스 생독백신 개발 및 산업화
- 닭 바이러스성 호흡기 질병 제어용 항바이러스 제제 및 증상완화제 개발</td><td colspan="2">보고서 면수

137</td></tr>
</table>

4. 국문 요약문

코드번호	D-01

연구의 목적 및 내용	<최종목표> - 광범위 교차 면역원성 닭 전염성 기관지염 (Infectious bronchitis, IB) 바이러스 예방백신개발 및 산업화 - 닭 전염성 후두기관염 (Infectious laryngotracheitis, ILT) 바이러스 생독백신 개발 및 산업화 - 닭 바이러스성 호흡기 질병 제어용 항바이러스 제제 및 증상완화제 개발 <과제별 목표> [1세부 과제: 닭 전염성 후두기관염 (ILT) 예방백신 개발] - ILT 생독 백신균주 개발 - ILT 생독 백신 기술이전 및 산업화 [2세부과제: 광범위 교차면역원성 닭 전염성 기관지염 (IB) 예방백신 개발] - IB 광범위 교차 면역원성 생독 백신균주 개발 - IB 광범위 교차 면역원성 생독 백신 기술이전 및 산업화 [1협동 과제: 닭 바이러스성 호흡기 질병 제어용 항바이러스제제 및 증상완화제 개발] - 닭 바이러스성 호흡기 질병 제어용 항바이러스제제 개발 및 산업화 - 닭 바이러스성 호흡기 질병 제어용 증상완화제 개발 및 산업화
연구개발성과	[1세부 과제: 닭 전염성 후두기관염 (ILT) 예방백신 개발] - 국내 야외분리주를 백신주와 구별할 수 있는 새로운 Genotyping 방법 개발 - 자연적인 유전자 재조합을 통해 독특한 염기서열을 갖는 야외주를 사용하여 tissue culture origin 백신과 temperature sensitive 백신주를 개발 - 기술 이전을 위한 실험 실시 [2세부과제: 광범위 교차면역원성 닭 전염성 기관지염 (IB) 예방백신 개발] - QX-like 및 KM91-like IBV의 재조합에 의하여 생성된 chimeric IBV를 사용하여 heat treatment 방식으로 생독백신 개발 - 녹십자 수의약품, 대성미생물, 고려비엔피 등 참여기업에 기술이전 - 기술이전을 통해 생산된 시제품의 효능 평가 - 야외임상실험 계획서 제출 [1협동 과제: 닭 바이러스성 호흡기 질병 제어용 항바이러스제제 및 증상완화제 개발] - IB 및 ILT 야외 분리주의 공격접종을 통한 닭 호흡기 증상완화제, 항바이러스제제 평가모델 개발 - 개발된 모델을 이용하여 항바이러스제 및 거담제 성분에 대한 효능 평가 - 선발된 항바이러스제제 및 증상완화제들의 조합을 통한 실용화 연구진행
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	- 개발 백신의 산업화(참여기업)를 통한 경제적 가치 창출 - 개발 백신의 국내 보급을 통한 수입백신 대체효과 - 개발 백신의 해외 수출(수출 예상국: 중국, 파키스탄, 인도네시아, 베트남)을 통한 국내기업의 국제경쟁력 확보 - IB 및 ILT 백신균주 개발에 관련된 학술적 자료 및 생독백신 개발 노하우 확보 - 개발된 항바이러스 제제 및 증상 완화제의 산업화를 통한 경제적 가치 창출 - 개발 백신, 항바이러스제제 및 증상완화제의 현장 적용을 통한 생산량 증대 및 농가의 수익증대

중심어 (5개 이내)	닭 전염성 기관지염	닭 전염성 후두기관염	예방백신	항바이러스제제	증상완화제

5. 영문 요약문

〈 SUMMARY 〉

코드번호	D-02

Purpose& Contents	<Final purpose> - Development and commercialization of infectious bronchitis, IB vaccine providing a broad range cross protection against various serotypes - Development and commercialization of infectious laryngotracheitis, ILT vaccine - Development of antiviral or mucolytic agents to help control of viral respiratory diseases in the poultry industry <Purposes of each research projects > [Research 1: Development of infectious laryngotracheitis, ILT vaccine] - Development of infectious laryngotracheitis, ILT vaccine - Technology transfer to local vaccine company and commercialization of infectious laryngotracheitis, ILT vaccine [Research 2: Development of infectious bronchitis, IB vaccine] - Development of infectious bronchitis, IB vaccine providing a broad range cross protection against various serotypes - Technology transfer to local vaccine company and commercialization of the developed infectious bronchitis, IB vaccine [Cooperative research 1: Development of antiviral or mucolytic materials to elp control of viral respiratory diseases in the poultry industry] - Development of antiviral agent to help control of viral respiratory diseases in the poultry industry - Development of mucolytic agent to help control of viral respiratory diseases in the poultry industry
Results	[Research 1: Development of infectious laryngotracheitis, ILT vaccine] - Development of a novel ILTV genotyping technology - Development of tissue culture origin and temperature sensitive vaccines for ILTV using a natural recombinant virus - Preparing experimental results for technology transfer to local vaccine companies [Research 2: Development of infectious bronchitis, IB vaccine] - Development of IBV vaccine using a natural recombinant virus generated by a recombination between QX-like and KM91-like IBVs - Technology transferred to Green cross veterinary products, Daesung microbiological labs, and KBNP, INC. - Safety and vaccine efficacy tests for prototype vaccines produced by vaccine companies - Submission of field trial protocol for the IBV vaccines [Cooperative research 1: Development of antiviral or mucolytic materials to help control of viral respiratory diseases in the poultry industry] - Development of animal model for an efficacy test of antiviral or

	mucolytic agents against chicken viral respiratory diseases - Efficacy tests of antiviral or mucolytic agents against chicken viral respiratory diseases - Development of practical application method for the selected antiviral or mucolytic agents				
Expected Contribution	- Creating economic value of the participating local animal vaccine companies through commercialization of the developed vaccines - Replacement of imported vaccines with locally produced vaccines - Export the developed vacciens to south east asian countries - Accumulation of scientific information for chicken viral diseases and know-how for live attenuated vaccine development - Creating economic value through commercialization of the antiviral and mucolytic agents - Increase income of poultry farms with application of the developed vaccines and antiviral, mucolytic agents				
Keywords	Infectiousbronchitis (IB)	Infectious laryngotracheitis (ILT)	Vaccine	antiviral agent	Mucolytic agent

6. 영문목차

〈 CONTENTS 〉

1. Overview of research ····· 1
2. Status of the technology development in Korea and foreign countries ··· 10
3. Contents and results ····· 12
4. Achievement and contribution to related field ····· 128
5. Research output and plan for application of research output ····· 130
6. Overseas technology information collected during the research ····· 131
7. Security rating of R & D achievement ····· 132
8. Research facilities registered in National Science and Technology Comprehensive Information System ····· 132
9. Implementation of safety measures in laboratories due to R & D tasks ····· 133
10. Representative research achievements of R & D tasks ····· 135
11. etc ····· 136
12. References ····· 136

7. 본문목차

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요 ····· 1
2. 국내외 기술개발 현황 ····· 10
3. 연구수행 내용 및 결과 ····· 12
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 128
5. 연구결과의 활용계획 등 ····· 130
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 131
7. 연구개발성과의 보안등급 ····· 132
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비현황 ····· 132
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 ····· 133
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 ····· 135
11. 기타사항 ····· 136
12. 참고문헌 ····· 136

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03

1-1. 연구개발 목적

○광범위 교차 면역원성 닭 전염성 기관지염 (IB) 바이러스 예방용 생독백신 개발 및 산업화
○닭 전염성 후두기관염 (ILT) 바이러스 생독백신 개발 및 산업화
○닭 바이러스성 호흡기 질병 제어용 항바이러스 제제 및 증상완화제 개발 및 산업화

1-2. 연구개발의 필요성

○**[1세부 과제: 닭 전염성 후두기관염 (ILT) 예방백신 개발]**

○ 닭 전염성후두 기관염 (Infectious laryngotracheitis, ILT) 바이러스는 닭의 상부 호흡기에 감염되어 급성의 전염성 질병을 일으킴. 전파는 느린편이나 감염된 계군은 심한 호흡기 증상을 동반한 폐사를 보이며, 폐사율은 감염주의 병원성에 따라 5 - 30%에 이름.

○ 특히 감염되었다 회복된 숙주는 바이러스가 뇌에 있는 삼차신경절에서 잠복감염을 하게 되어 보균계로 남게 되며, 이들 보균계의 면역력이 약화되었을 시 잠복 감염된 바이러스가 재활성화 되어 다른 개체로 전파될 수 있음.

○ 닭 전염성후두기관염을 막기 위해 과거부터 약독화된 생백신이 사용되어 왔음. 약독화된 생백신에는 종란계대에 의해 생산된 종란유래 (Chick Embryo Origin, CEO) 백신과 세포주계대에 의해 생산된 세포주유래 (Tissue Culture Origin, TCO) 백신이 있으며, 현재 국내에서 사용되고 있는 모든 상업용 백신은 종란유래 백신임.

○ 과거 실험 결과에 의하면 종란유래 백신이 세포주유래 백신보다 뛰어난 방어력을 보여주었으나, 종란유래 백신은 백신 후 숙주에서 수평전파를 통해 쉽게 그 병원성을 다시 획득하는 것으로 알려져 있음.

○ 대한민국을 포함하여 여러 국가에서 PCR-RFLP에 의해 진행된 분자생물학적 역학조사에 의하면 대부분의 병원성 야외주가 종란유래 백신과 동일한 RFLP 패턴을 보이는 것으로 나타나 백신주가 야외에서 병원성을 다시 획득하는 경우가 많음이 확인됨.

○ 또한 특이적으로 종란유래 백신은 심한 부작용을 일으켜 어린 연령의 병아리에 접종할 경우 폐사를 초래할 수 있음이 국내외에서 보고되어 농가에서 백신 접종을 꺼려하는 실정임.

○ 현재 시판되고 있는 세포주유래 생독 백신의 경우 안전성이 탁월한 반면 면역원성이 종란유래 생독 백신보다 떨어져 질병방어율이 높지 못함. 이러한 이유로 전세계적으로 차세대 ILT 백신 개발의 요구가 있는 실정임.

<표 1>

차세대 유전자 재조합 ILTV 백신 개발의 타겟이 되고 있는 유전자 리스트

Table 1. *Genes that have been targeted for generation of viral-vectored or deletion mutant recombinant ILTV vaccines.*

Gene name	Function
Glycoprotein B	Viral entry, involved in envelope-membrane fusion[a]
Glycoprotein C	Viral attachment to the cell surface[b]
Glycoprotein D	Viral entry mediator[c]
Glycoprotein G	Viral chemokine binding protein[d]
Glycoprotein I	Viral cell-to-cell spread[e]
Glycoprotein J	Viral egress[f]
Thymidine kinase	DNA synthesis[g]
UL0	Regulation of viral gene expression, DNA synthesis or encapsidation[h]
UL32	Cleavage and encapsidation of the viral genome[i]
UL47	Virion maturation in the cytoplasm. Gene regulation or particle assembly in the nucleus[j]

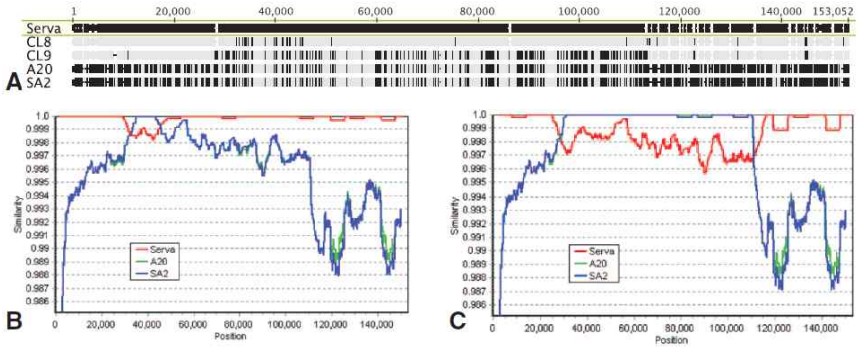
[a]Poulsen & Keeler (1997). [b]Kingsley *et al.* (1994) and Kingsley & Keeler (1999). [c]Spear & Longnecker (2003). [d]Devlin *et al.* (2006b, 2010). [e]Devlin *et al.* (2006a). [f]Mundt *et al.* (2011). [g]Griffin & Boursnell (1990) and Keeler *et al.* (1991). [h]Veits *et al.* (2003). [i]Lamberti & Weller (1998). [j]Helferich *et al.* (2007).

○ 2012년에 본 연구팀에서는 2007년도부터 호주에서 사용되기 시작한 유럽유래의 종란생산 백신이 과거에 사용되어져 왔던 호주유래의 종란생산 백신과 유전자 재조합을 일으켜 병원성이 강하고 전염력이 높은 새로운 야외주들을 만들어냄을 사이언스지에 보고하였음.

<그림 1> 선행연구결과

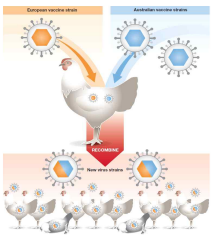
ILTV 전체 유전자 염기서열 비교분석 및 유전자 재조합 분석

[Lee *et al.* Science, 2012, 337: 188]



<그림 2>

ILT 생독 백신균주끼리의 재조합에 의한 새로운 병원성 바이러스의 생성

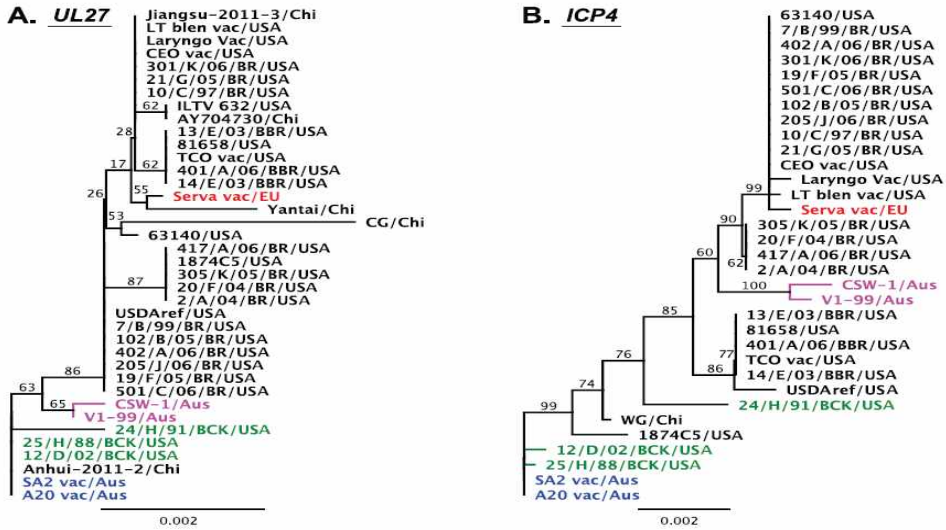


○ 또한 그 후에 진행된 유전자 서열 분석에 의하면 호주유래 백신주와 동일한 유전자 서열을 갖고 있는 전염성후두기관염 바이러스가 미국과 중국에서도 발견되었으며, 미국 및 중국에서 분리된 병원성 야외주 바이러스들의 유전자 서열에서 호주유래 백신주와 동일한 유전자 서열 부위가 발견되었음.

<그림 3> 선행연구결과

ILTV의 gB와 ICP4 유전자 염기서열 비교분석 및 유전적 계통 분석

[Lee *et al.* PLoS One, 2013, 8(2): e55121]

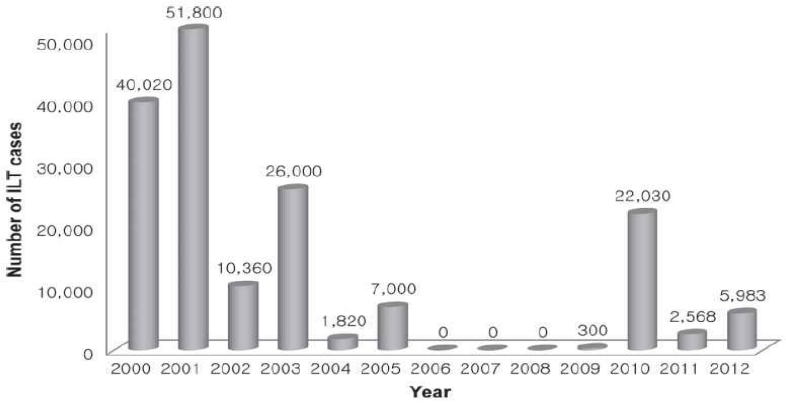


○ 종합적으로 전염성후두기관염 바이러스는 크게 2가지의 유전형 (호주유래 백신주와 유럽 유래 백신주가 그 대표적인 형태)이 자연계에 존재하며 이들 간에 유전자 재조합이 빈번하게 발생하여 새로운 병원성이 있는 야외 바이러스를 만들 수 있음.

○ 전염성후두기관염은 1982년 경기도 강화군 소재 산란계 농장에서 처음 발생하여 전국으로 빠르게 확산되었으며 2003년까지 높은 수로 발생됨이 농림축산검역본부에 의해서 진단됨. 2004년 이후로 발생이 줄어들어 2006년부터 2008년까지는 발생보고가 없었으나 2009년 다시 질병이 발생하여 그 이듬해 심각하게 높은 수로 발생보고가 되었고 현재까지 계속 발병 보고가 진행되고 있음.

<그림 4>

농림축산검역본부에서 발표한 국내 ILTV 발생 통계



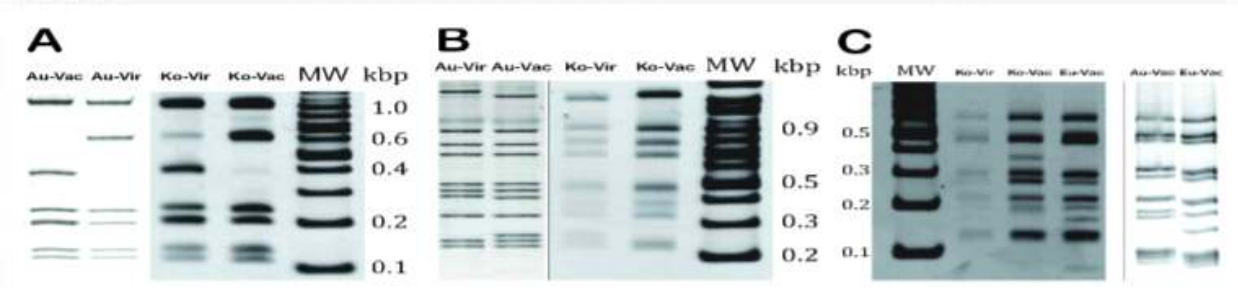
○ 검역본부에서 발표한 논문(Han *et al.* 2001)에 의하면 국내에서 분리된 야외주 중 국내에서 사용되는 백신주와 병원성 야외주의 유전자 서열을 모두 갖고 있는 야외주가 분리 보고된 적이 있으며, 이는 백신주와 병원성 야외주 간의 재조합에 의해 생성 되었을 가능성이 제기되어 우려를 낳고 있음.

○ 최근 국내 야외에서 유행하고 있는 야외주의 유전형을 PCR-RFLP에 의해 과거 분리주 및 현재 사용되고 있는 백신주와 비교하였을 때, 그 야외주가 국내유래 백신과 동일한 RFLP 패턴을 갖고 있는 것이 확인 되어 최근 야외주는 양외 농장에서 사용중인 종란유래 백신이 수평전염을 통해 다시 병원성을 회복한 것으로 확인됨.

○ 국내 분리주에 대한 RFLP 패턴을 호주의 RFLP 패턴과 비교 분석한 결과, 과거 국내에서 분리된 병원성 야외주가 호주유래 백신주와 거의 동일한 RFLP 패턴을 갖고 있는 것이 확인되었음.

<그림 5>

국내 병원성 야외주 및 국내유래 백신주의 RFLP 패턴과
호주 병원성 야외주 및 호주유래 백신주와 유럽유래 백신주의 RFLP 패턴 비교 분석



A, TK gene; B, ICP18.5 gene; C, ICP4 gene. Ko-Vir, 국내 병원성 야외주; Ko-Vac, 국내유래 백신주; Au-Vir, 호주 병원성 야외주; Au-Vac, 호주유래 백신주; Eu-Vac, 유럽유래 백신주 (Serva strain).

○ 이러한 결과는 국내에 호주유래 바이러스와 같은 유전형의 전염성후두기관염 바이러스가 존재할 수 있음을 상기하며, 이는 언제든 현재의 상용백신과 야외주 간에 재조합이 일어나 새로운 병원성 야외주가 탄생할 수 있음을 시사함.

○ 또한 현재 국내 양계농장에서 사용 중인 ILT 생백신은 백신접종 후 백신접종 반응이 강하게 유발되어 클레임 발생 사례가 많고 대부분의 농장에서 접종계에서 눈주위 짓무름, 호흡기증상발생을 감수하고 백신을 사용하고 있는 실정임.

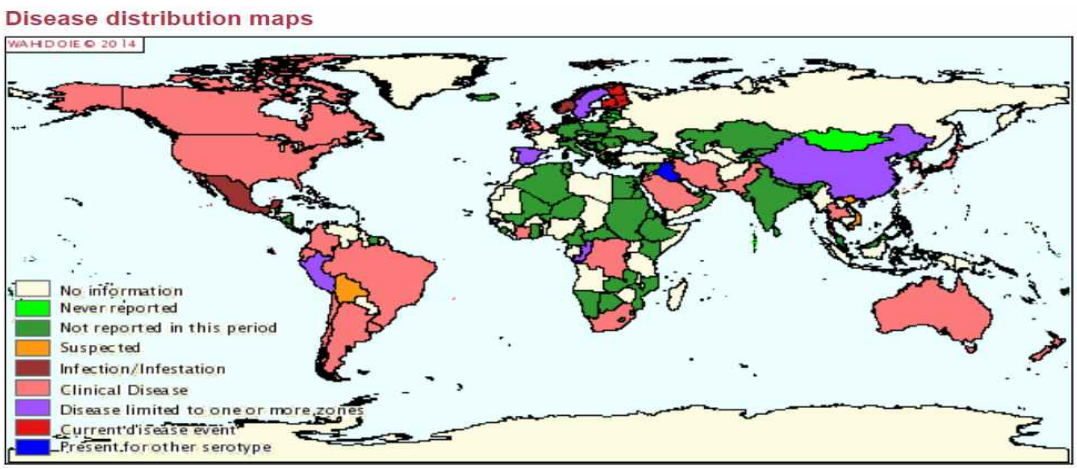
○ 따라서 본 연구에서는 기존에 사용중인 ILT 생백신 보다 백신접종반응을 최소화 시킴과 동시에 급성 및 만성 ILT 발생을 효과적으로 제어할 수 있는 ILT 생독 백신을 개발하고자 함.

[2세부과제: 광범위 교차면역원성 닭 전염성 기관지염 (IB) 예방백신 개발]

○ 닭 전염성기관지염 (Infectious bronchitis: IB)은 IB 바이러스 (IBV)에 의해서 발생되는 전파력이 매우 빠른 닭의 급성 바이러스성 전염병임. IB는 감염 시 폐사율은 높지 않으나 이환율이 높고 기침, 콧물, 증체율 저하, 외부 및 내부 난질저하를 동반하는 산란율 저하를 유발 할 뿐만 아니라 호흡기 후유증으로 대장균증이 수반되어 만성 폐사가 지속되는 등 매우 다양한 생산성 저하를 유발함.

○ IB 는 현재 전 세계적으로 광범위한 지역에서 유행중이며 양계산업에 막대한 경제적 피해를 입히고 있는 중요 질병 중 하나임.

<그림 6> IB 발생지역 현황 (WAHID, OIE, 2013년 1월-6월)



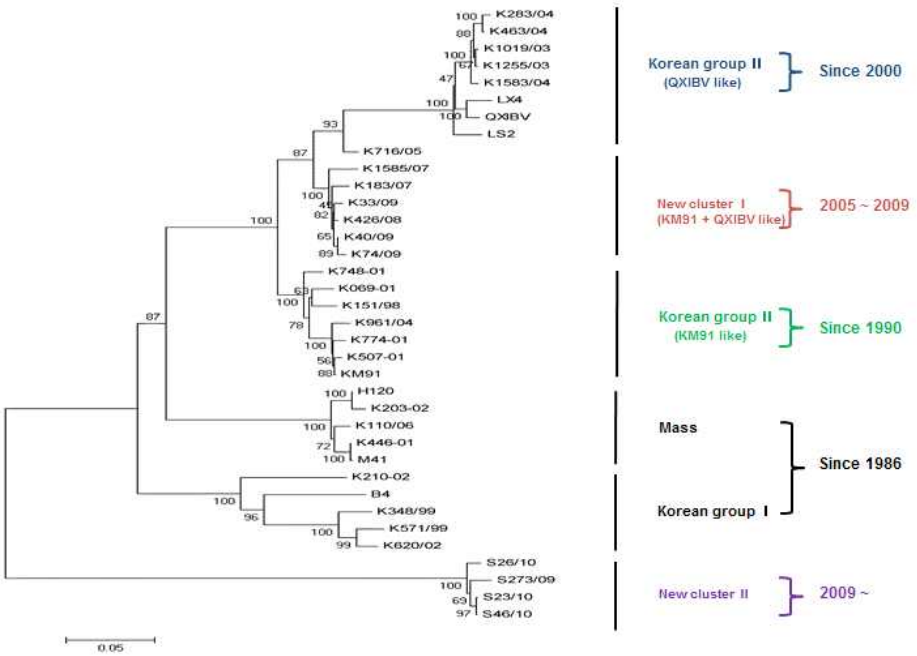
○ 현재 전 세계적으로 매우 다양한 혈청형의 IBV들이 분리 보고되고 있으며, 이들 각 혈청형에서 변이된 변이형 바이러스까지 포함하면 그 종류는 수십 종에 이를 것으로 추정됨.

다양한 혈청형만큼이나 바이러스의 감수성 장기 및 병원성이 다양하며 지역별 및 국가별로 유행하는 혈청형이 서로 다른 것 또한 특징임.

○ 이들 혈청형들 간에는 상호 교차반응이나 교차 면역이 잘되지 않아 질병의 예방과 통제에 많은 어려움을 초래하고 있음.

<그림 7> 선행연구결과

국내 유행중인 다양한 혈청형의 IBV 유전자를 사용한 계통수 분석결과



○ IB 백신의 경우 각 국가별로 그 나라에서 가장 유행하거나 피해가 큰 IB 바이러스 혈청형을 이용하여 백신주를 개발하여 사용하여 왔음. 국내의 경우 호흡기형 Massatusettes (Mass) type을 사용한 생독 및 사독 백신을 사용하여 왔으나, Mass type을 사용한 백신은 국내에서 유행 중인 신장형 IB 바이러스를 효율적으로 방어 할 수 없어 신장형 IBV 감염으로 인한 직접적인 호흡기도 손상 및 복막염 피해가 지속적으로 보고되어 왔음.

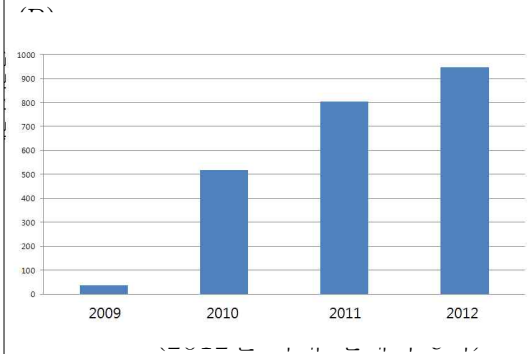
○ 따라서 이를 방어하기 위하여 본 연구팀에서는 신장형 IBV 유래 약독화 백신균주(K2 strain)를 개발 하였으며, 이를 사용한 생독백신은 2007년부터 상용화되어 현장에서 사용되고 있음.

<그림 8> 선행연구결과

IB 생독백신 (K2 strain) 개발 및 상용화

(A) 시판백신 및 (B) 국내 판매현황

(A)



○ 하지만 중국에서 유행중인 QX-like IBV strain 이 최근 국내에 유입하여 유행중이며, 현재 국내에서 시판중인 IBV 백신으로는 국내에 새롭게 유입된 신장형 IBV 변이주 의 호흡기 감염을 효율적으로 방어하지 못함.

<표 2> 선행연구결과

국내유입 신장형 IBV 변이주 에 대한 시판 생독백신 (K2 strain) 의 교차 방어능 평가결과.

IBV strain immunized	Genogroup of challenge virus	IBV strain of challenge virus	No. of challenge virus isolated/ no. of challenged			
			Trachea		Kidney	
			Control	Vaccinated	Control	Vaccinated
H120	New cluster 1	K245/09	10/10	10/10	10/10	8/10
		K40/09	10/10	10/10	10/10	9/10
		K716/05	10/10	9/10	10/10	5/10
	New cluster 2	K26/10	9/10	7/10	3/10	1/10
K2	New cluster 1	K245/09	10/10	1/10***,†††	10/10	0/10***,†††
		K40/09	10/10	5/10*,†	10/10	1/10***,††
		K716/05	10/10	3/10**,†	10/10	0/10***,†
	New cluster 2	K26/10	9/10	0/10***,††	3/10	0/10

[1]Three-wk-old chickens were immunized with IBV, H120, and K2 ($10^{3.0}$ 50% egg infective dose per bird) via the intraocular route. At 3 wk postimmunization, all birds were challenged with $10^{4.5}EID_{50}$ of 4 new Korean IBV strains via the intraocular route. Five days after challenge, protection was evaluated by the absence of the challenge virus in the kidney and trachea.

*$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$, by Fisher's exact test, compared with nonvaccinated control group.

†$P < 0.05$, ††$P < 0.01$, †††$P < 0.001$, by Fisher's exact test, compared with the H120 vaccinated group.

○ 원인으로는 현재 국내에서 유행하는 IBV 가 종래의 백신 바이러스와 항원성에 차이가 있다는 점을 들 수 있음. 따라서 국내에서 새롭게 유행하는 변이형 IBV 에 대하여 특이성이 높은 광범위 교차면역원성 백신개발 및 산업화를 통한 효과적인 제어가 필수적임.

[1협동 과제: 닭 바이러스성 호흡기 질병 제어용 항바이러스제제 및 증상완화제 개발]

○ 야외 양계농장에서 IB 발생 시 호흡기 증상이 유발됨과 동시에 하부 호흡기에 치즈양의 삼출물 (caseous exudate) 이 관찰 되며, 이로 인한 호흡곤란과 폐사가 동반됨.

<그림 9> 닭에 IBV 감염 시 호흡기 병변

<table>
<tr>
<td>

syrinx and primary bronchi 에 축적된 치즈양 삼출물</td>
<td>

기관 내에 축적된 치즈양 삼출물</td>
</tr>
</table>

○ 또한 ILT 발생 시 상부호흡기도에 많은 양의 치즈양의 삼출물이 축적되며, 이로 인한 호흡곤란으로 많은 폐사율이 발생함.

<그림 10> 닭에 ILTV 감염 시 호흡기 병변

<table>
<tr>
<td>

ILT 감염으로 인한 담혈 (혈액성 가래)</td>
<td>

ILT감염시 발생하는 점액성 삼출물 (Mucopurulent exudate)</td>
</tr>
</table>

○ IB 및 ILT 에 의한 호흡기에의 점액성 삼출물 및 담 (가래) 의 축적은 이들 질병에 의한 경제적 피해가 발생하는 주요원인으로 작용함. 이러한 임상증상을 경감하기 위하여 야외

양계농가에서는 거담성분이 있는 식물추출물들을 사료 첨가의 형태로 적용하고 있으나, IB 및 ILT 등의 닭 바이러스성 호흡기 질병에 적용 시의 효과에 대해서는 실질적인 연구 자료가 전무한 실정임. 또한 호흡기 증상완화제의 효과적 양계농장 적용법에 대해서도 일관된 매뉴얼이 없음.

○ 특히 현 동물용 거담제는 급-만성 호흡기 질병 (IB ILT APV MG MS 등) 발생 시 및 ND, IB, ILT 등 호흡기 생독백신 투여 후 호흡기 후유증 완화를 위하여 사료첨가제나 음수용 형태로 주로 투여하고 있으나 대부분 동물용의약품이나 호흡기완화용 전문 기능성이 있는 제형으로 상용화되어 있지는 않은 실정임.

○ 본 연구과제 에서는 기존 양계장에서 호흡기질환 발병 시 흔히 투여하고 있는 각종 거담제 뿐만 아니라 인체용 의약품으로 상용화되어있는 각종 거담제 및 호흡기완화제들을 닭에 적용 시 호흡기 증상 완화제로서의 효능을 평가하고 아울러 동물용의약품이나 기능성 사료첨가제로 상용화가능성을 조사하고자 함.

○ 이를 위하여 ILT 와 IB가 닭에 감염 시 각각 상부 및 하부호흡기가 유발됨을 착안하여 닭의 호흡기완화제 효능평가를 위한 질환모델동물을 개발하고 이를 이용하여 효과를 보이는 호흡기 완화제를 선발하고 양계용 호흡기완화제를 개발하고자 한다

○ 인체용 의약품 및 야외농가에서 무분별하게 사용 중인 증상완화제의 효과를 비교 분석하고, 적용방법 및 사용 매뉴얼을 작성할 경우 호흡기 증상을 경감시켜 경제적 손실을 최소화 할 수 있을 것으로 기대됨.

○ 또한 호흡기에 감염을 일으키는 바이러스에 대한 항 바이러스제제를 양계 농장에 적용 가능 한 상태로 개발하고 이를 음수, 사료 첨가 등의 형태로 야외농가에 적용할 경우 IB 및 ILT 생독 백신의 사용과 더불어 질병의 발생 및 이로 인한 경제적 손실을 큰 폭으로 줄일 수 있을 것으로 기대됨.

○ 따라서 본 연구를 통하여 닭 바이러스성 호흡기 질병 제어를 위한 IB 및 ILT 생독 백신을 개발하여 산업화하고, 항바이러스 제제 및 증상완화제의 개발 및 최적 사용 매뉴얼을 작성하여 양계 농가에 적용 할 경우 양계산업에서 크게 문제가 되고 있는 닭 바이러스성 호흡기 질병을 효과적으로 제어하고 농가의 수익을 극대화 할 수 있을 것임.

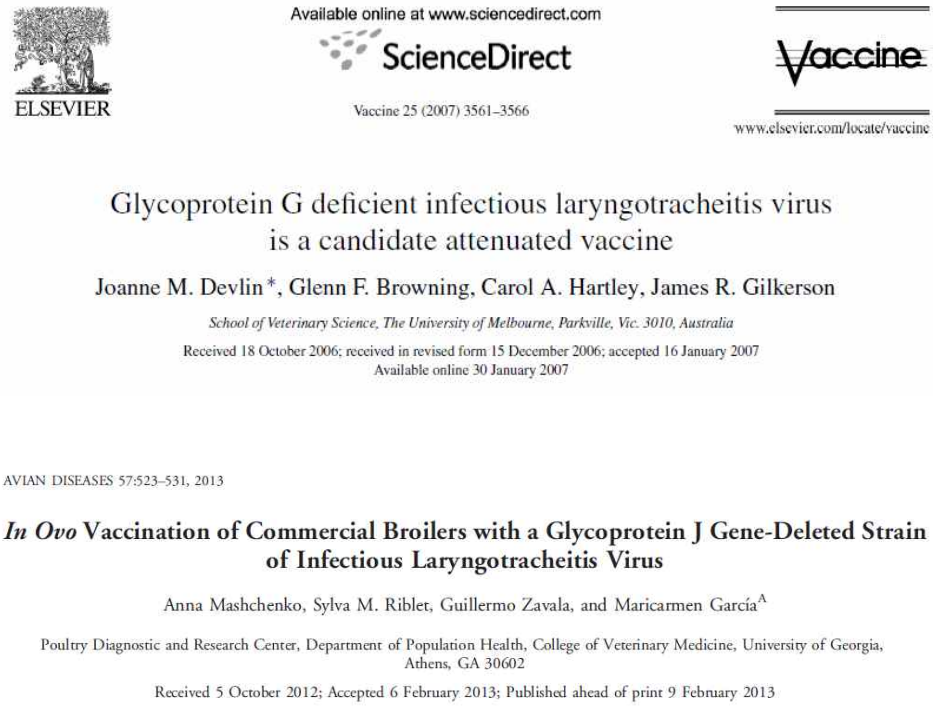
2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04

○ 전세계적으로 상용화되어 시판되고 있는 종란 유래 ILT 백신의 경우 백신 접종후 부작용이 심하게 일어나고 있어 특정 유전자를 결손시킨 새로운 백신의 개발이 진행되고 있음.

<그림 1>

ILTV에서 glycoprotein G 또는 glycoprotein J 유전자를 결손시킨 바이러스를 이용한 차세대 백신 개발



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Vaccine 25 (2007) 3561–3566

Vaccine

www.elsevier.com/locate/vaccine

Glycoprotein G deficient infectious laryngotracheitis virus is a candidate attenuated vaccine

Joanne M. Devlin*, Glenn F. Browning, Carol A. Hartley, James R. Gilkerson

School of Veterinary Science, The University of Melbourne, Parkville, Vic. 3010, Australia

Received 18 October 2006; received in revised form 15 December 2006; accepted 16 January 2007
Available online 30 January 2007

AVIAN DISEASES 57:523–531, 2013

***In Ovo* Vaccination of Commercial Broilers with a Glycoprotein J Gene-Deleted Strain of Infectious Laryngotracheitis Virus**

Anna Mashchenko, Sylva M. Riblet, Guillermo Zavala, and Maricarmen García[A]

Poultry Diagnostic and Research Center, Department of Population Health, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, GA 30602

Received 5 October 2012; Accepted 6 February 2013; Published ahead of print 9 February 2013

○ 육계의 출하 일령이 높은 호주나 미국 등의 다른 국가에서는 산란계만이 아닌 육계에서도 ILT로 인한 피해가 발생하고 있어 육계에서도 백신 접종을 진행하고 있으나 국내에서는 산란계에 한정되어 백신을 사용함.

○ 따라서 국내에서는 ILT의 연구가 많이 진행된 적이 없으며 2000-2001년과 2013년에 농림축산검역본부에서 진행된 연구를 제외하면 전무한 실정임.

○ 국내에서는 TK 유전자를 결손시킨 바이러스를 백신주로 사용하고자 하는 연구가 2001년에 보고된 바 있음.

○ IB 의 경우 일반적으로 백신 균주와 야외 바이러스 간의 serotype 및 genotype 이 다를 경우 효과적인 교차방어능이 형성되지 않는다는 특성이 있음.

○ 이러한 특성으로 인하여 국내에서 유행중인 야외 바이러스를 방어하기 위해서는 국내에서 유행중인 바이러스와 유사한 serotype 및 genotype을 지닌 생독백신의 적용이 필수적임.

○ 따라서 국내 양계농가의 IB 에 의한 피해를 막기 위해서는 국내 분리주를 사용한 약독화

백신의 사용이 필요하나 외국 기업에서는 국내의 요구를 충족시킬 수 있는 생독백신의 개발은 이루어지지 않음.

○ 현재 국내에서 상용화된 IB 생독 백신의 경우 본 연구팀에서 개발하여 2007년 상용화된 K2 strain 생독백신이 유일함.

○ ILT 백신 시장의 경우 2010년 총 매출액 3억 6천만 원 이며, 2011년에는 3억 7천만 원으로 비슷한 수준을 유지 하였음.

○ ILT 백신 시장의 특이점은 이 기간 동안 국산 백신이 차지하는 비중은 2010년 13%, 2011년 18% 로 정도로써 수입백신이 국내 ILT 백신 시장을 대부분 점유하고 있음.

2010~2011년도 ILT 시장

제품명	회사명	2010년		2011년	
		수량	금액(천원)	수량	금액(천원)
포울샷라링고	㈜ 중앙백신연구소	15,735	42,010	21,115	57,999
프로백 아이엘티	㈜ 코미팜	1,893	3,862	1,247	2,647
라링고-백	Zoetis	3,232	15,334	750	5,170
엘티블렌	Merial	16,280	108,392	22,422	150,752
NOBILIS ILT	MSD	26,800	189,752	19,910	150,805

○ IB 백신 시장의 경우 2010년 총 매출액 6억 3천만 원 이며, 2011년에는 8억 2천만 원으로 약 130% 증가하였음.

○ 특히 이 기간 동안 국산 백신이 차지하는 비중은 2010년 62%에서 2011년 83% 로 증하 하였으며, 이는 본 연구팀에서 국내 낮춤형 백신으로 개발하여 상용화한 K2 IBV strain 의 상용화가 큰 역할을 하였음.

2010~2011년도 IB 시장

제품명	회사명	2010년		2011년	
		수량	금액(천원)	수량	금액(천원)
힘백 아이비 생독백신	㈜ 고려비엔피	0	0	300	241
힘백 달구방 비플러스 생	㈜ 고려비엔피	63,594	214,951	129,154	417,433
대성 IBK2 생백신	㈜ 대성미생물연구소	24,327	170,534	81,384	252,014
프로백아이비	㈜ 코미팜	3,994	4,793	7,360	8,807
기관지염백	㈜ 코미팜	363	1,452	0	0
비오랄H-120	Merial	59,910	132,310	10,895	25,270
NOBILIS IB MA5	MSD	33,000	107,107	35,575	117,393

○ 2013년 IB 백신 국내 판매액은 13억 원 으로 지속적으로 증가하는 추세임.

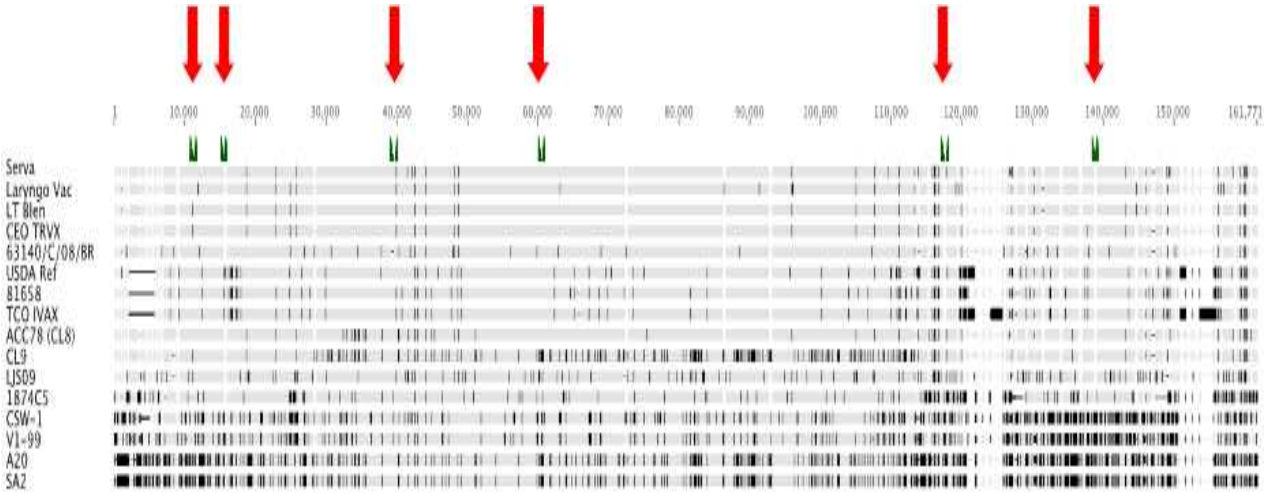
3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05

1. ILT 생독 백신균주 개발

(1) ILTV 야외 분리주 확보 및 ILTV 유전자형 검사법 확립 및 결과

- 본 연구팀에서는 선행 연구로써 병성감정을 통하여 10주의 ILT 야외주를 확보하였으며 ILT 야외 분리주의 유전자형을 결정하기 위한 새로운 검사법을 확립하기 위해 전장 유전체의 6부분을 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하였다. <그림 1, 표 1>



<그림 1>

ILTV 유전자형을 결정하기 위한 6개의 목적 유전자들의 위치

<표 1>

6개 목적 유전자의 PCR염기서열 분석을 위한 프라이머

Name	Sequence (5'- 3')	Expected size of PCR product
UL54-F	CACAATGTTCTGGCCGGGTC	544 bp
UL54-R	GTGATGATATCGATCGTGATAGAG	
UL52-F	CTATTACTGGCAACATGGCCTG	473 bp
UL52-R	CTTGGCTGACATGCTGGTCAG	
UL27-F	CTCTGGTGGCAAGTATCCTG	638 bp
UL27-R	CAGACGGTACTTTCTGTTGG	
UL36-F	CGATCGAAGAAGTTTTGTGCC	627 bp
UL36-R	GAGACGGCGAAAGCAAATGG	
ICP4-F	CAAGTTTTTGCCATGGGGAC	603 bp

ICP4-R	CATGACAGGCGCAAAAGAC	
US5-F	GAAACACACTTTTTCACTCAGGC	367 bp
US5-R	CATGGAATTCTGAAACAACAGTAGG	

- 기존에 전장 유전체의 염기서열이 보고되었던 16개의 ILTV 주를 사용해 표1의 6개의 프라이머들로 증폭될 수 있는 염기서열을 비교분석하였다. 본 연구에서 디자인된 유전자형 결정법은 기존의 PCR-RFLP법의 한계를 극복하여 16개의 ILTV주를 14개의 유전자형으로 분류할 수 있었다. <표 2>

<표 2>

본 연구에서 확립된 유전자형 검사법에 의한 유전자형 패턴 분석

Strains	Target genomic regions						Patterns	Sequence Type
	UL54	UL52	UL27	UL36	US5	ICP4		
Laryngo Vac	A	A	A	A	A	A	AAAAAA	ST1
Serva	A	A	A	A	A	B	AAAAAB	ST2
TCO IVAX	A	B	A	A	A	A	ABAAAA	ST3
81658	A	B	A	A	A	A	ABAAAA	ST3
CEO TRVX	B	A	A	A	A	A	BAAAAA	ST4
LT Blen	B	A	A	A	A	A	BAAAAA	ST4
63140/C/08/BR	A	A	E	A	A	A	AAEAAA	ST5
ACC78 (CL8)	A	A	B	A	A	B	AABAAB	ST6
USDA Ref	A	B	B	A	A	C	ABBAAC	ST7
1874C5	A	A	D	C	B	F	AADCBF	ST8
LJS09	B	A	A	B	A	B	BAABAB	ST9
CL9	B	A	B	F	A	B	BABFAB	ST10
V1-99	C	D	C	D	C	E	CDCDCE	ST11
CSW-1	C	C	C	E	F	D	CCCEFD	ST12
A20	D	C	B	F	E	G	DCBFEG	ST13
SA2	D	C	B	F	D	G	DCBFDG	ST14

- 본 연구팀에서 분리한 ILTV 야외주 10개 중 종란 및 조직배양을 통해 배양이 용이하며 증식률이 높은 6종의 ILTV 주를 선발하였다.

- 선발된 6개의 야외주 ILTV로부터 유전자를 분리하여 표1에 보여지는 6쌍의 프라이머를 사용해 유전자형을 검사하였다. 현재 국내에서 사용 중인 Nobilis ILT (serva) 백신주를 대조군으로 사용하였다. 유전자형 패턴의 분석결과 국내 야외 분리주 550/05, 40032/08는 종란유래 백신 중 하나인 Laryngo Vac과 동일한 유전자형을 보여 이들 야외주는 Laryngo Vac 백신이 병원성을 회복한 바이러스라고 판단되어졌다. 또한 야외주 0010/05는 유전자형이 Laryngo Vac과 매우 유사하나 US5 유전자에 하나의 SNP가 존재하였다. 이는 이 야외주 또한 Laryngo Vac으로부터 유래한 병원성 바이러스임을 나타낸다. 반면에 0798/04, 30678/14 와 12/07 야외주는 상용백신과는 상이한 유전자형 패턴을 보여주었다. 특히 30678/14 와 12/07은 같은 패턴임과 동시에 상용 백신주와 매우 상이한 패턴의 결과가 나왔다. <표 3>

<표 3>

본 연구에서 확립된 유전자형 검사법에 의한 국내 야외분리주 ILTV의 유전자형 패턴 분석

Strains	Target genomic regions						Patterns
	UL54	UL52	UL27	UL36	US5	ICP4	
Nobilis ILT(serva)	A	A	A	A	A	B	AAAAAB
0798/04	B	A	A	A	H	A	BAAAHA
0010/05	A	A	A	A	G	A	AAAAGA
550/05	A	A	A	A	A	A	AAAAAA
12/07	B	A	B	A	H	H	BABAHH
40032/08	A	A	A	A	A	A	AAAAAA
30678/14	B	A	B	A	H	H	BABAHH

- 야외주 ILTV의 유전자형이 종란유래 백신주들과 같을 경우 종란유래 백신주가 닭에서 계대 전파를 통해 병원성을 획득한 바이러스일 가능성이 많기 때문에 백신후보주로서는 부적합하다. 따라서 본 연구에서는 유전자형의 패턴이 상용 백신주들과 다른 야외주를 선정하는 것이 중요하며 유전자형 패턴 결과 중 백신주들과 가장 다른 패턴을 보인 30678/14 와 12/07이 최종 백신 후보주로 선발되었으며 이 두 개의 후보주 중 최근 양계농장에서 피해가 심했던 야외 분리주인 30678/14로 백신 후보주를 선발하였다.

- 본 실험 결과는 Avian Pathology 2016, Vol 45, 443-449에 게제

AVIAN PATHOLOGY, 2016
VOL. 45, NO. 4, 443–449
http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2016.1155692

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ORIGINAL ARTICLE

Genotyping of infectious laryngotracheitis virus using allelic variations from multiple genomic regions

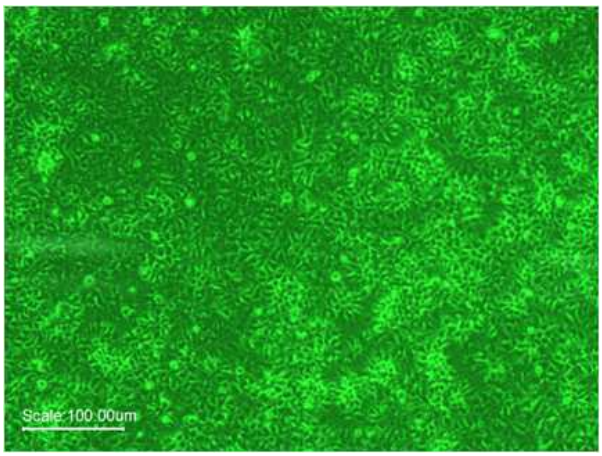
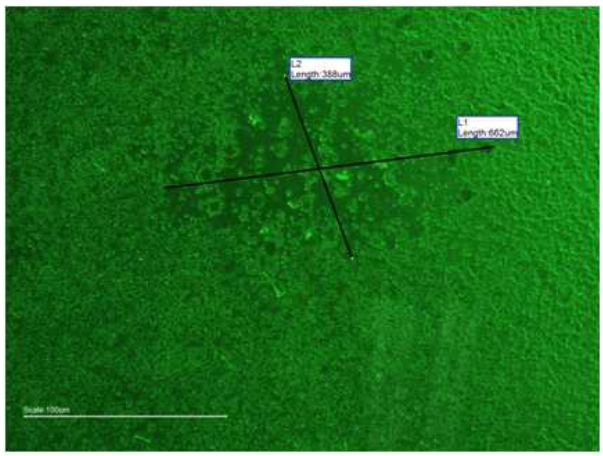
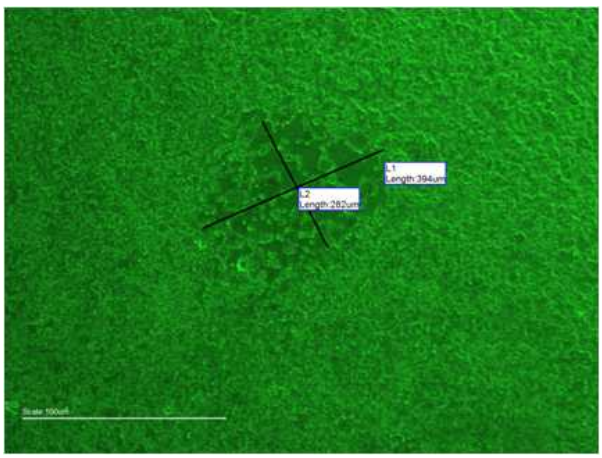
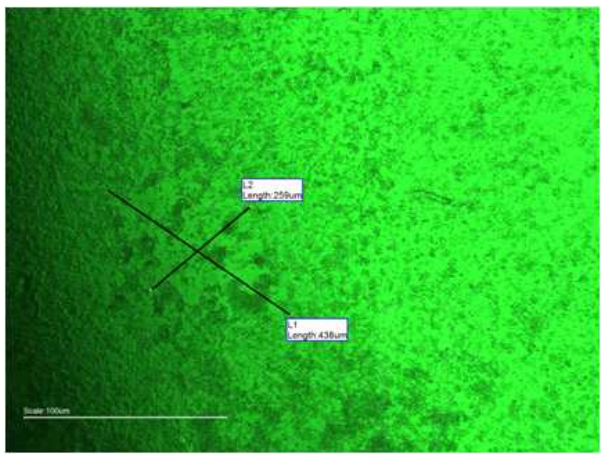
Eun-Jung Choi†, Tae-Min La†, In-Soo Choi, Chang-Seon Song, Seung-Yong Park, Joong-Bok Lee and Sang-Won Lee

College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul, Republic of Korea

(2) 선발된 백신후보주의 Plaque purification

- 선발된 백신후보 야외분리주를 순수분리하기 위해 닭 유래 간세포주에서 세 번의 Plaque purification을 시행하였다. 실험에 사용된 세포주는 닭 유래 간세포주인 LMH 세포주를 사용하였으며 30678/14를 포함하는 야외 임상샘플을 LMH세포에 접종하였다. 접종 시

바이러스는 10진 희석하여 최대 10^{-3}까지 접종하여 Plaque picking이 적절한 희석배수를 선정하였고 Plaque picking시 사용된 overlay medium으로는 DMEM을 포함하는 2% Methlycellulose를 사용하였다. Plaque picking은 10진 희석하여 접종된 배수 중 10^{-3}에서 얻은 plaque을 가지고 총 세 번의 Plaque picking을 하여 Plaque purification을 진행하였다. <그림 2>

control	첫 번째 Plaque purification
	
두 번째 Plaque purification	세 번째 Plaque purification
	

<그림 2>

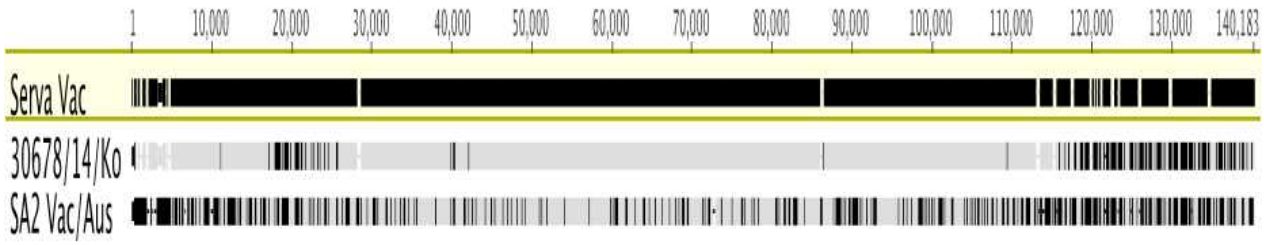
선발된 ILTV 백신후보 야외분리주의 Plaque purification을 진행한 LMH세포에서의 Plaque사진

(3)선발된 백신후보 야외분리주의 전장 유전체 염기서열 분석

- 선발된 백신후보주의 유전적 특성을 파악하기 위하여 High-throughput sequencing 기술을 사용하여 전장 유전체 염기서열 분석을 실시하였다. 전장 유전체 염기서열 분석을 위해

30678/14 바이러스를 LMH세포주에서 대량으로 배양한 후 초원심분리와 투석을 통해 Virus particle 만을 수거하였다. 바이러스 유전자를 유전자 추출 키트를 사용하여 추출한 후 IonTorrent를 사용한 High-throughput sequencing을 실시하였다. 시퀀싱 결과 확보된 짧은 가닥의 read들을 본 연구실에서 보유한 소프트웨어인 Geneious를 사용해서 Mapping을 진행하여 전장 유전체 염기서열을 확보하였다.

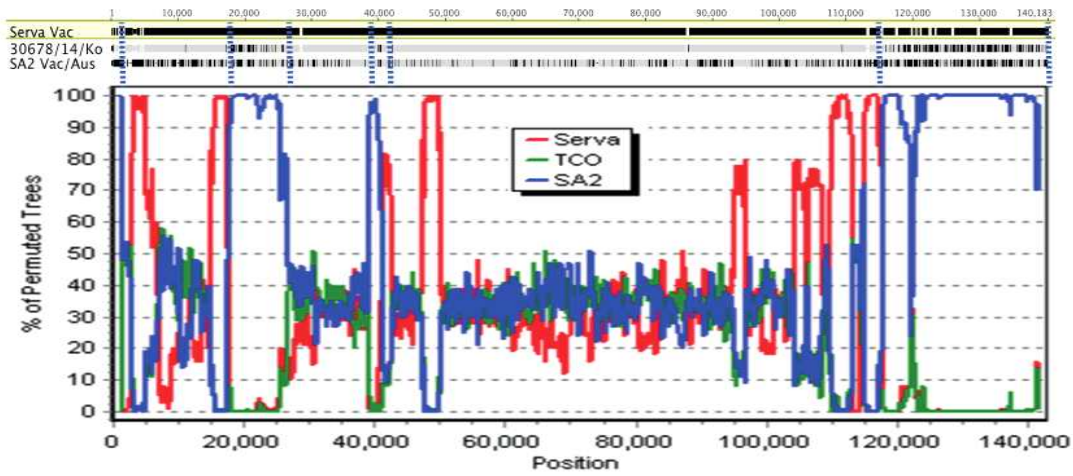
- 확보된 30678/14 야외분리주의 전장 유전체 염기서열을 기존에 알려진 ILTV 전장 유전체 염기서열과 비교 분석을 실시하였다. 본 연구에서 새로운 유전자형으로 확인된 30678/14 야외분리주의 전장 유전체 염기서열과 유럽 유래, 호주 유래 상용 백신의 전장 유전체 염기서열을 비교분석한 결과 30678/14 주는 유럽 유래, 호주 유래 상용 백신과 비슷한 ILTV 바이러스 간에 3-4번의 유전자 재조합으로 생성된 자연상태의 재조합 ILTV 바이러스인 것으로 확인되었다 <그림 3>.



<그림 3>

백신주와 선발된 백신후보 야외분리주의 complete genome sequence alignment 분석

- 30678/14 주의 전장 유전체가 보여주는 이러한 유전자 재조합은 Simplot analysis를 통한 유전자 재조합 분석을 통해 검증 되었다. 따라서 전장 유전체 염기서열 분석에 의하면 30678/14 백신 후보주는 ILTV 상용 백신주 및 야외주가 갖고 있는 다양한 당단백 유전자를 골고루 포함하고 있는 것이 확인되어 서로 다른 두 유전자형의 병원성 ILTV를 교차 방어할 수 있는 백신이 될 것으로 보인다 <그림4>.



<그림 4>

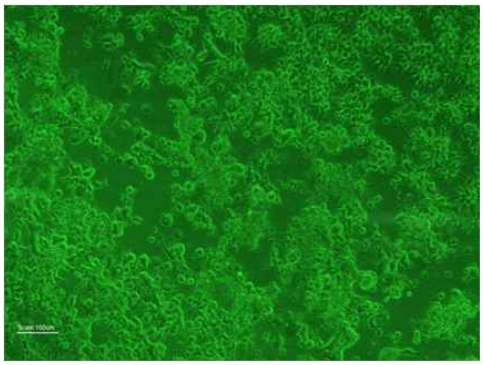
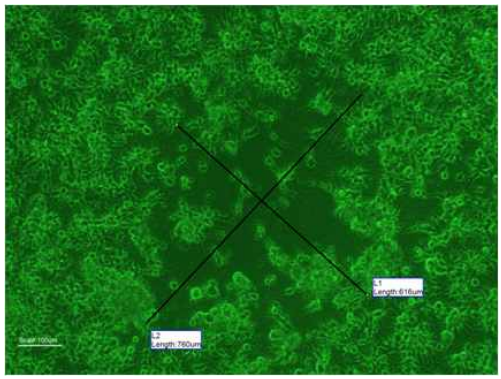
백신주와 선발된 백신후보 야외분리주의 complete genome sequence Simplot 분석

(4) ILTV 온도민감성 (Temperature sensitive) 백신 개발 연구방법 및 결과

- ILTV의 백신주가 상부호흡기에서만 감염되어 증식되고 하부호흡기에서는 잘 증식되지 못하도록 하기 위해서 온도 민감성 바이러스를 제작하여 이를 백신으로 사용하고자 하였다. 백신 후보주로 선정된 30678/14 야외분리주를 닭 유래 세포인 LMH 세포에 감염시킨 후 돌연변이 유도제인 Methlynitronitrosoguanidine을 서로 다른 농도별로 함께 처리한 후 31℃에서는 배양이 되나 38℃에서는 배양이 잘 되지 않는 온도민감성 바이러스를 선별한다. 31℃에서 배양 시 돌연변이 유도제의 농도는 5ug/ml, 10ug/ml, 20ug/ml을 각각 바이러스와 함께 처리하였으며 바이러스의 감염이 가장 잘 일어난 농도 군을 수거하여 Plaque assay를 진행하였다.

- Plaque assay시 생성되는 모든 plaque을 수한 후 깨끗한 LMH 세포에 다시 10진 희석하여 접종한 후 31℃와 38℃에서 2 로그 이상의 바이러스 증식율 차이를 보이는 온도 민감성 바이러스를 선별할 계획이다. 선별된 온도 민감성 바이러스의 약독화 수준은 10일된 종란의 Chorioallantoic membrane(CAM)에 바이러스를 접종하여 5일간 배양 후 바이러스에 의해 생성되는 Pock의 크기를 비교하여 평가한다.

- 실험 결과, 돌연변이 유도체를 처리하여 저온배양 시킨 결과 5ug/ml, 10ug/ml, 20ug/ml의 농도 중에서 CPE (Cytopathogenic effect)를 전체적으로 관찰 할 수 있었던 농도는 20ug/ml이었다. 농도 20ug/ml에서 수거한 바이러스를 LMH 세포에서 Plaque assay를 진행하였다 <그림5>.

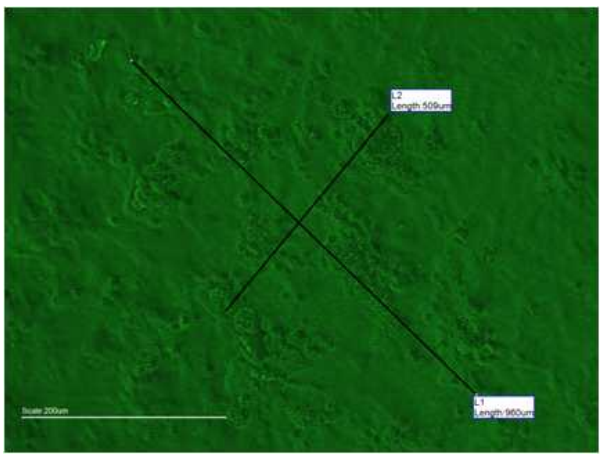
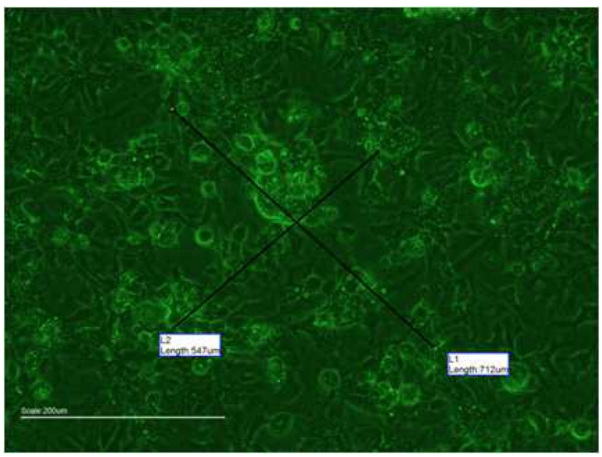
31℃에서 배양 후 CPE관찰 (20ug/ml)	31℃에서 배양 후 Plqaue관찰 (20ug/ml)
	

<그림 5>

TS mutant개발을 위해 31℃에서 배양시킨 세포에서의 CPE 및 Plaque관찰

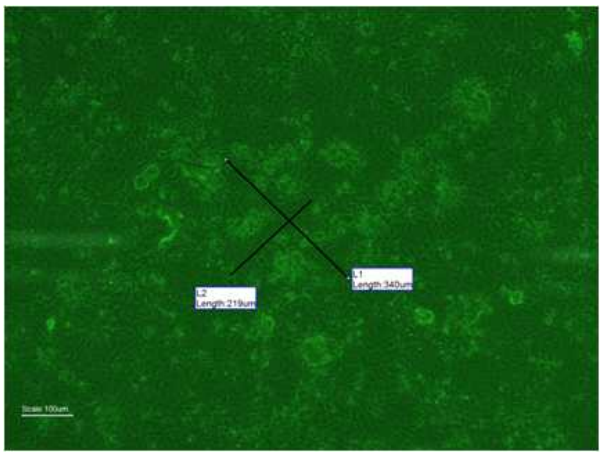
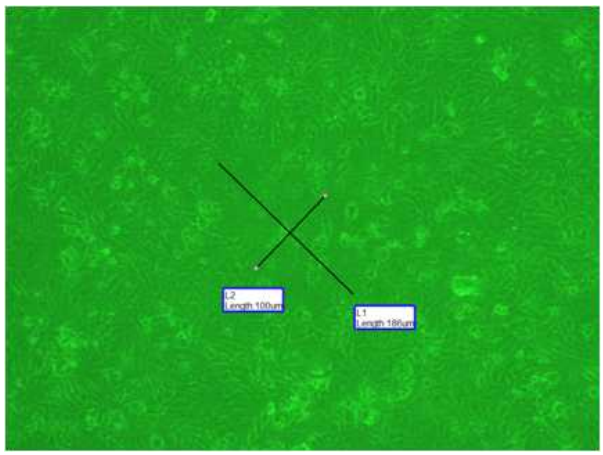
(5) ILTV TCO 백신개발 연구 및 결과

- 선발된 야외분리주의 TCO백신 개발을 위해 닭 유래 세포인 LMH세포에서 30번 계대 배양을 진행하였다. 약독화 실험은 Plaque purification이 된 야외분리주를 175T flask에서 전체적으로 CPE가 생성되는 시기에 수거하여 계대배양을 시키는 방법으로 30계대수까지 약독화를 진행하였다. 약독화 진행을 하면서 계대수 별 Plaque양상도 관찰하여 약독화 진행 여부를 확인하기 위해 Plaque assay를 통해 Plaque의 크기변화를 관찰하였다. 계대수별 Plaque assay는 약독화진행 계대수 1계대와 20계대의 Plaque의 양상을 비교하였다. 20계대 야외주의 약독화를 비교하기위해 ILT백신 Nobilis ILT(serva)의 Plaque도 함께 비교하였다 <그림6, 7>.

1계대 후 Plaque관찰	20계대 후 Plaque관찰
	

<그림 6>

세포에서의 계대수 별 Plaque양상 관찰

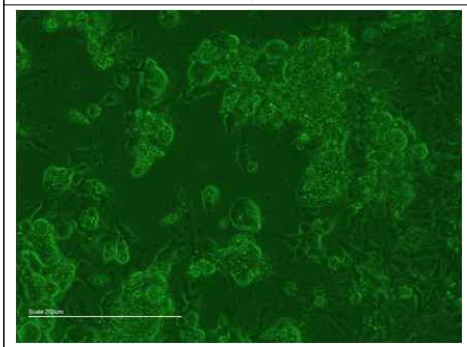
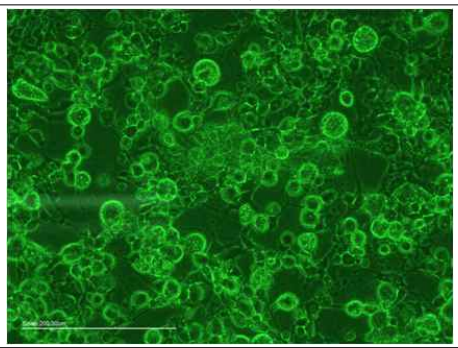
20계대 후 Plqaue관찰	Nobilis ILT(serva) Plqaue관찰
	

<그림 7>

20계대 ILTV와 ILTV 상용 백신의 Plaque 양상 비교

- 세포에서의 계대수 별 Plaque의 양상을 Plaque assay로 1계대, 20계대수와 비교하여 관찰한 결과 20계대의 Plaque이 1계대의 Plaque보다 크기가 작게 발생되는 것을 확인했으며 PFU는 1계대에서 $2x10^6$ PFU/ml, 20계대에서 $9.2x10^5$PFU/ml이었다. 20계대로 약독화 시킨 바이러스와 Nobilis ILT (serva)백신의 Plqaue assay에서 Plaque의 크기가 비슷한 것을 확인 할 수 있었다.

- 세포에서의 약독화 진행의 결과로 세포에서의 계대수 별 CPE의 양상을 1계대와 30계대를 사용하여 비교하였다 <그림8>. 결과적으로 계대배양을 통해 약독화 시킨 바이러스의 Plaque을 비교하였을 때 계대배양이 이루어지지 않은 1계대보다 Plaque의 크기가 작게 확인되었고 ILTV 백신주의 Plaque과 비교하였을 때 비슷한 것을 확인함으로써 약독화 진행이 되고 있음을 예상할 수 있다.

1계대 CPE관찰	30계대 CPE관찰
	

<그림 8>

세포에서의 계대수 별 CPE양상 관찰

- 30계대까지 약독화시킨 바이러스의 약독화여부를 확인해보기 위해 CAM에 접종한 결과 계대를 진행하지 않은 바이러스가 매우 크고 두꺼운 Pock를 CAM에서 형성하는 것과 달리 30 계대까지 약독화시킨 바이러스 샘플에는 매우 작은 크기의 Pock를 형성하는 약독화된 바이러스가 다수 포함되어 있음을 확인할 수 있었다 <그림 9>. 30번 계대된 바이러스 샘플에서 현저하게 작은 크기의 Pock를 purification하여 약독화가 정도를 파악한다.

1계대 Pock 크기 관찰	30계대 Pock 크기 관찰

<그림 9>
세포에서의 계대수 별 CAM에서의 Pock 크기 관찰

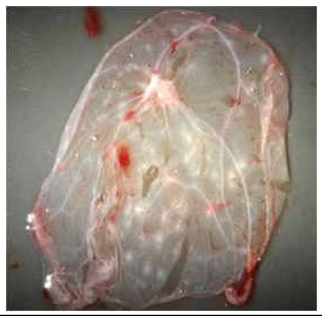
2. ILT 생독 백신 개발 및 효능평가

2-1. ILT바이러스 TCO 개발 백신의 안전성 및 효력평가

(1) 선발된 TCO 백신 후보주 5종 바이러스의 약독화 확인을 위한 종란의 CAM 접종

- 선발된 TCO 백신 후보주 5종 바이러스의 약독화 확인을 위해 SPF 10일령 종란의 CAM에 접종하여 5일간 배양 후 Pock의 크기를 비교한다. 약독화로 작아진 Pock의 크기를 비교하기 위해 기 개발백신을 함께 접종하여 크기를 비교하였다.

- 선발된 TCO 백신 후보주 5종 바이러스의 약독화 확인결과 5종 모두 매우 작은 pock들이 전체적으로 퍼져 CAM에 생성된 것을 확인 할 수 있었고 기 개발 백신의 pock 크기와도 큰 차이가 없었으며 따라서 충분한 약독화가 진행되었음을 확인하였다 <그림1>.

TCO 백신 후보 최종1	TCO 백신 후보 최종2	TCO 백신 후보 최종3
TCO 백신 후보 최종4	TCO 백신 후보 최종5	기 개발 백신
		

<그림 1>

약독화 확인을 위한 선발된 TCO 백신 후보주 5종과 기 개발백신의
CAM에서의 Pock 크기 비교 관찰

(2) 국가검정기준에 의한 ILT바이러스의 TCO백신 후보주의 안전성 및 효력시험

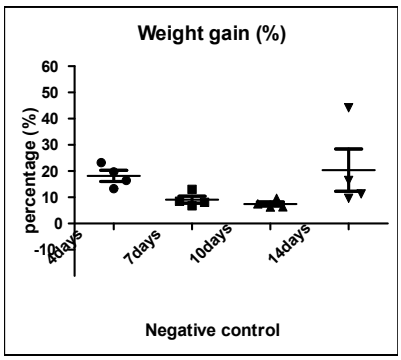
①안전성 및 효력 평가시험 방법

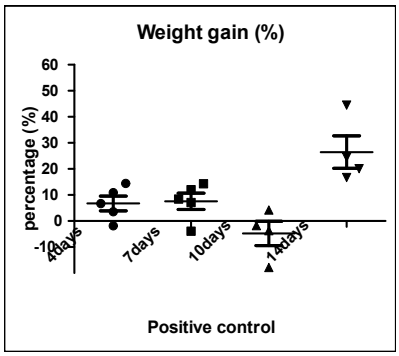
▶ 농림수산검역검사본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 닭 전염성 후두기관염 바이러스의 안전성 및 효력평가를 시험하였다. 닭 전염성 후두기관염 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령의 닭을 사용하여 시험군 별 10마리를 사용한다. 시험군에 백신의 1수분을 점안접종으로 후보백신을 접종하고 2주간 관찰하였다. 백신접종 후 2주 후 시험군 및 대조군에 공격용 바이러스를 0.1ml (104.0 EID50/마리)씩 기관내에 접종하고 14일간 이상 유무를 관찰하였다.

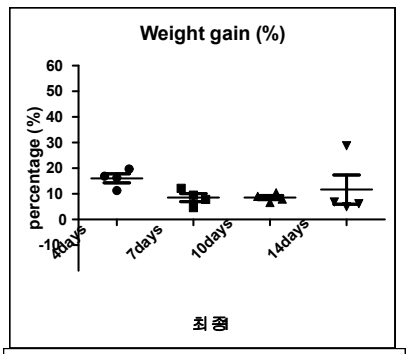
②TCO 개발 백신 5종의 안전성 및 효력시험 결과

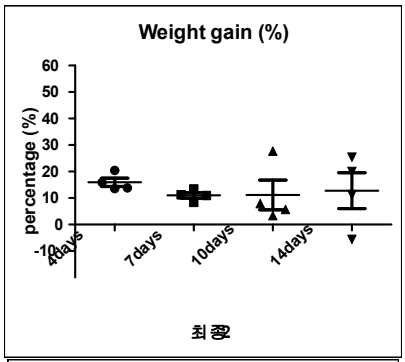
▶ ILT 안전성 및 효력 평가시험을 진행시 TCO 개발 백신 5종 접종 후 7일 간격으로 무게를 측정하여 주별 증체량변화를 평가하였다. 2주간의 안전성 평가시험에서는 백신 접종 후 바이러스 감염으로 인한 증체비율의 변화를 확인 하기위해 4일,7일,10일,14일 간격으로 각 개체들의 증체량을 측정 하였다. 증체량 확인 결과 공격접종을 한 양성 대조군에

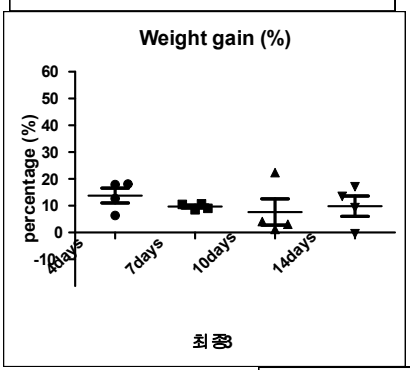
비해 백신 5종을 접종한 군들에서는 증체량 비율이 낮지 않음을 확인하였다. 일반적으로 바이러스에 의한 증체량의 변화는 4,7일에 감소하는 경향을 보이며 10일 이후에 증체량의 증가를 보이게 되는데 이것은 virus clearance되는 것을 의미하며 일반적인 약독화 백신 접종 후에 보이는 결과이다. 결과 적으로 TCO백신 군들의 증체량의 결과에서 10일 차 이후 negative comtrol군의 증체량과 비슷함을 보여 주고 있어 정상적으로 회복한 것으로 판단된다. <그림 2>

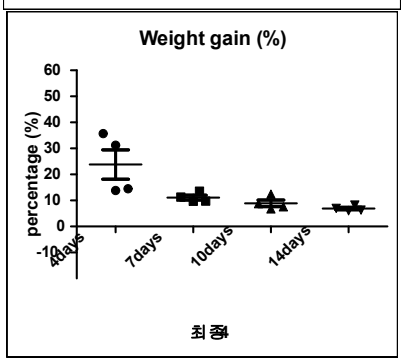


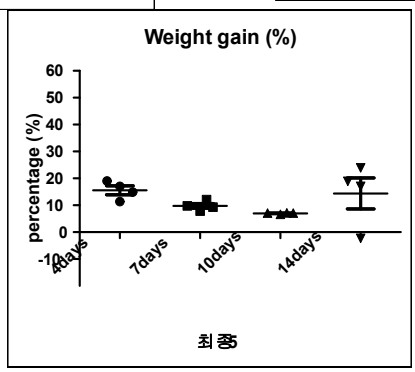












<그림 2>

각 개발 백신 접종 후 증체량변화

▶ TCO 개발 백신 5종 접종 후 14일간 ILT 바이러스 감염 시 관찰 되는 임상증상을 각 시험 군별 관찰하였다. 각 시험군 별 임상증상평가는 육안으로 관찰하였고 개구호흡, 기침, 눈부음, 목털음, 피가래의 임상증상을 보이는 개체들을 조사하였다. 그 결과 각 백신들의 그룹에서 최종3번 군의 한 개체에서만 눈 부음 증상을 제외하고 모두 양호한 상태를 확인하였다. 반면에 양성대조군의 개체들은 대부분 개체에서 임상증상을 확인할 수 있었다 <표1>.

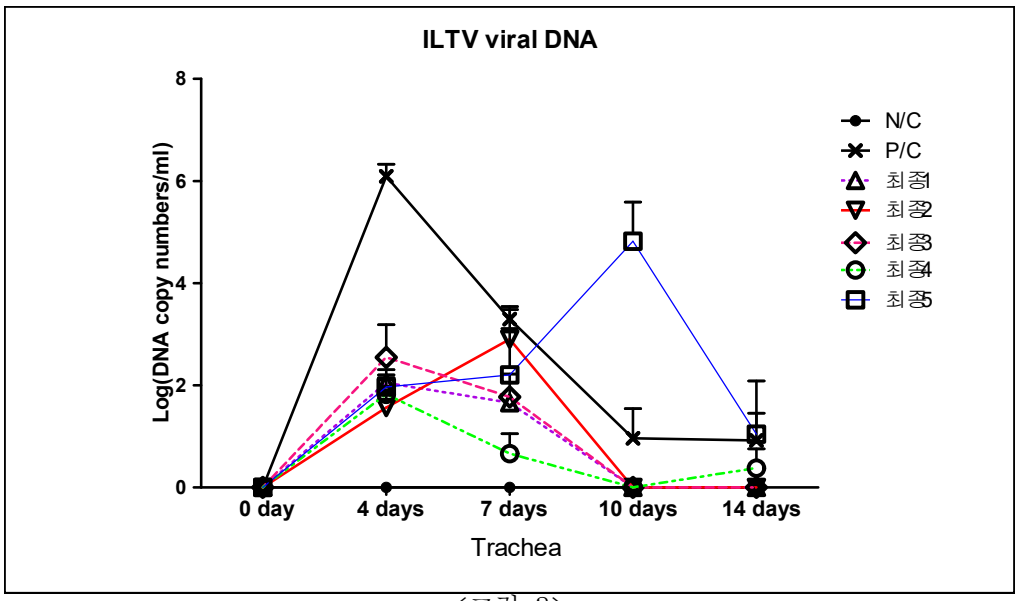
<표1>

각 개발 백신 접종 후 임상증상

	Gasping	Coughing	Extension of the neck during in spiration	Wet irritated eyes	Hemorrhagic mucus
Negative control	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Positive Control	6/10	0/10	1/10	1/10	1/10
최종1	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
최종2	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
최종3	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10
최종4	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
최종5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

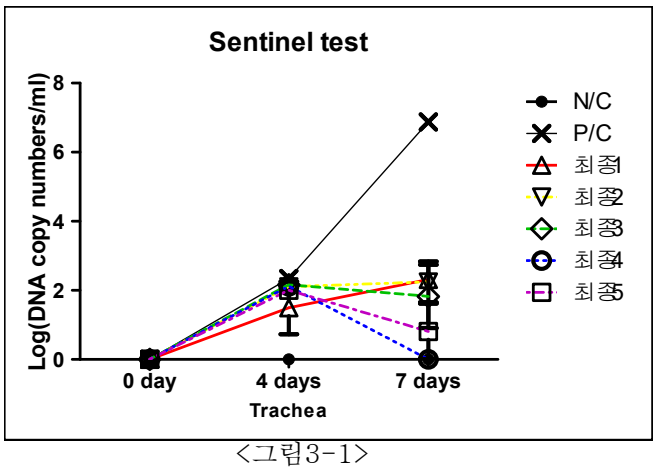
▶ TCO 개발 백신 5종 접종 후 viral load를 확인하기 위해 백신 접종 후 4일, 7일, 14일째 점안 샘플링을 하였다. 점안 샘플링의 DNA를 추출하여 real-time PCR을 통해 바이러스의 양을 확인하였다. 그 결과 바이러스의 활성이 가장 활발 한 4일차에 각 백신 그룹의 바이러스 양이 높이 올라가며 7일차부터 14일째 까지 점차 감소하였다. 그 중 4일차에서 양성대조군의 수치가 백신 군의 수치보다 약 2배정도 높았고, 최종 5번 군은 다른 1,2,3,4군과 다르게 4일차부터 10일차까지 바이러스의 양이 증가하였지만 14일차에는 다른 군들과 비슷하게 감소한 것을 확인하였다. 이것은 백신 접종으로 인한 바이러스의 반응으로 4,7일차에 바이러스가장 활발히 증가한 후 10일차 이후부터 virus clearance가 일어나 감소된 것을 확인하였다. 반면에 positive군은 백신군들에 비해 10일차 이후에도 viral load의 수치가 2배이상인 것을 확인하였다 <그림 3>. 또한 안전성 평가시험에서 sentinel군을 추가로 하여 sentinel군에서의 바이러스 감염에 따른 바이러스의 양을 확인하였다. 그 결과 7일차에 바이러스의 양이 감소하는 백신 군들에 비해 positive군은 4일 이후 7일까지 바이러스의 양이 급격히 올라가는 것을 확인하였다. 이는 백신을 한 후 직

접적으로 백신을 하지 않은 일부의 sentinel개체에도 전파가 가능하나 백신을 한 그룹들은 7일차에 감소하는 것을 보아 sentinel군에 대한 백신의 안전성을 확인 할 수 있었다 <그림 3-1>.



<그림 3>

TCO 개발백신의 viral genomic DNA copy number

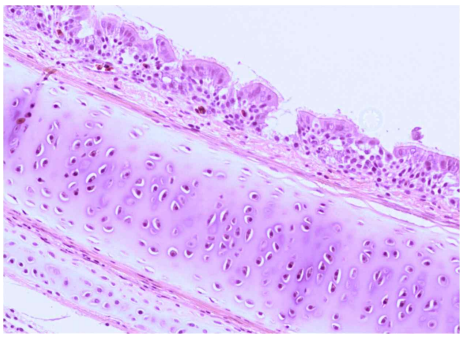
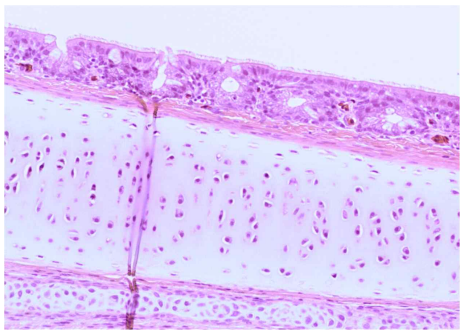
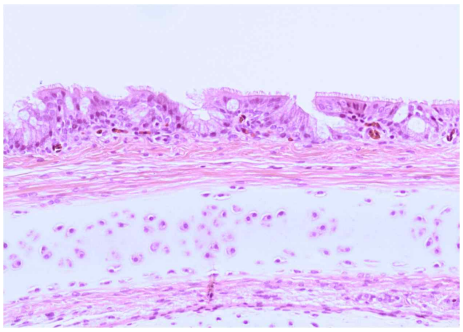
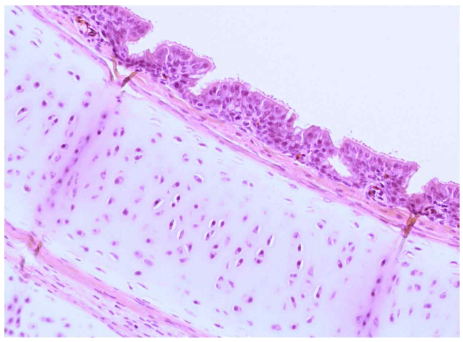
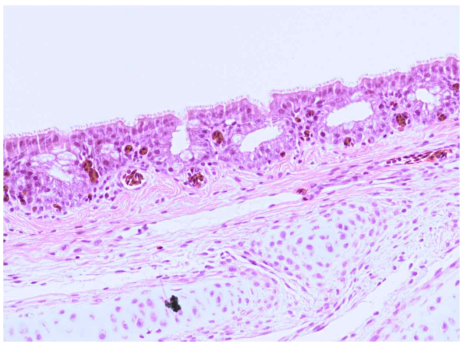
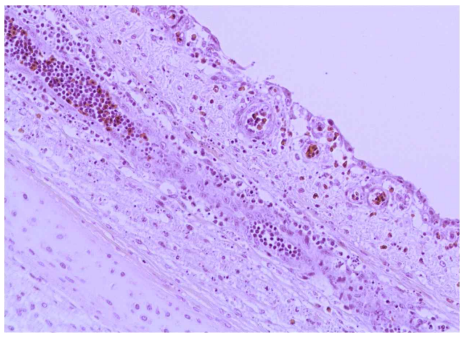
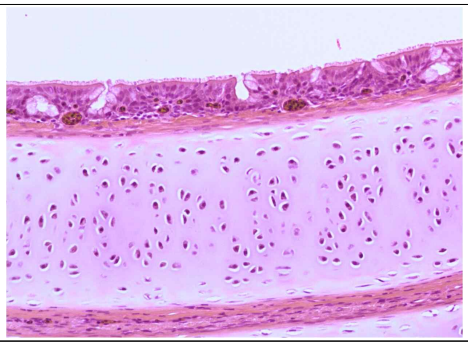


<그림3-1>

TCO 개발백신의 viral genomic DNA copy number

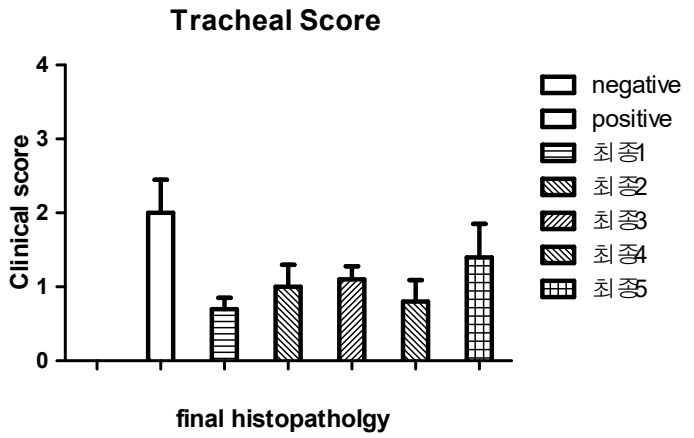
▶ TCO 개발 백신 5종 14일간 안전성 평가 진행 후 모든 개체들의 부검을 통해 기관지의 기관 상부 및 하부의 섬모소실 및 조직병변을 평가하였다. 전 개체들의 기관조직은 H&E 염색을 통해 조직평가를 진행하였다. positive군의 섬모소실지수 및 조직의 평가는 백신 그룹보다 확연히 차이를 보였으며 백신그룹에서는 최종1, 최종5군이 나머지 백신 그룹보다 기관 상부의 섬모소실 및 조직병변의 평가가 높은 것을 확인 할 수 있었다. 백신 접종 후 안전성 확인을 통해 2주간의 바이러스의 양 결과와 임상증상, 기관 조직병변 및 섬모소실지수 평가를 통해 TCO백신 최종후보로 최종2번과 최종3을 선정하였다<그림4,

4-1, 4-2, 표2>.

TCO 백신 후보 최종1	TCO 백신 후보 최종2
	
TCO 백신 후보 최종3	TCO 백신 후보 최종4
	
TCO 백신 후보 최종5	positive control
	
Negative control	
	

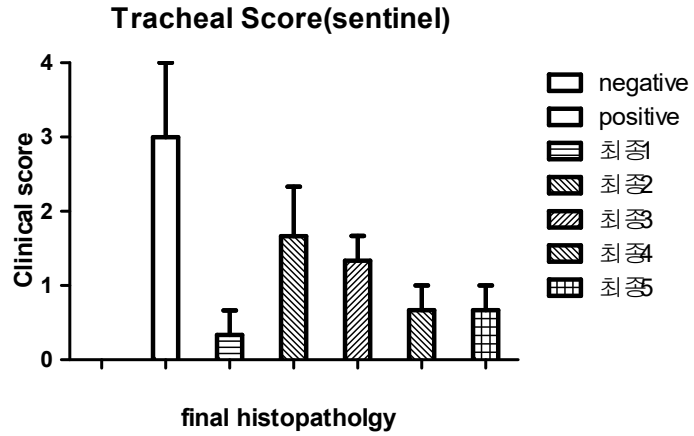
<그림 4>

TCO 개발 백신 5종의 안전성 확인을 위한 기관 조직병변 및 섬모소실지수 평가



<그림 4-1>

TCO 개발 백신 5종의 안전성 확인을 위한 기관 조직병변 및 섬모소실지수 평가



<그림 4-2>

TCO 개발 백신 5종의 안전성 확인을 위한 기관 조직병변 및 섬모소실지수 평가

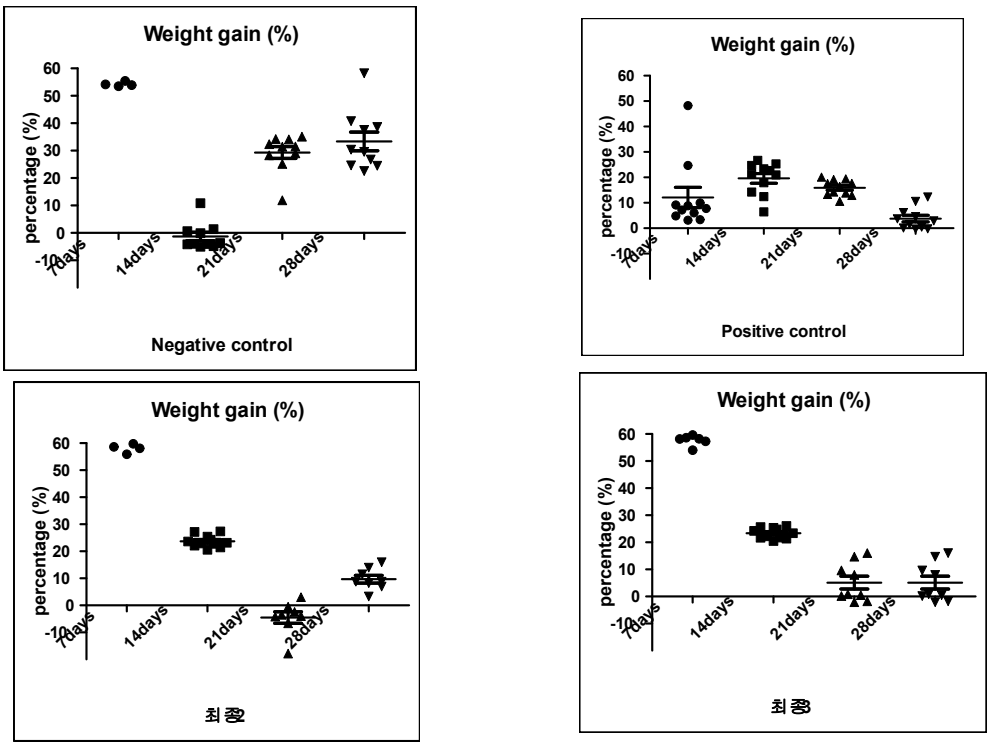
<표2>

기관 조직병변 및 섬모소실지수 평가기준

Loss of cilia (LC) grade and inflammatory responses (Inf) grade	기준
1	미약한 염증세포 침윤 및 cilia 약한 손상
2	다소 심한 염증세포 침윤소견 및 일부출혈소견, cilia 절반 소실
3	Trachea 구조다소 손실 및 심한 염증세포 침윤, cilia 대부분 소실
4	Trachea 구조 소실 및 심한 염증세포 침윤, cilia 완전 소실

- TCO백신 기관 조직 평가 및 온도민감성 백신 기관 조직 평가는 다음과 같은 기준으로 평가를 진행하였다. ILTV의 병원성을 판다하는 기준중 하나인 상부 기관 상피의 조직병리학적 평가법은 다음 논문 (Guy, J. S., Barnes, H. J., & Morgan, L. M. (1990). Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates. *Avian Diseases*, *34*(1), 106-113)에 따른 전세계에서 사용하는 방법으로 섬모소실 지수는 평가 기준에 일부에 해당하여 평가법에 크게 영향을 주지 않음. 또한 조직병변 검사와 더불어 임상증상과 Virus의 양을 측정하는 것, 증체량의 측정으로 백신효능 평가를 효과적으로 할 수 있음.

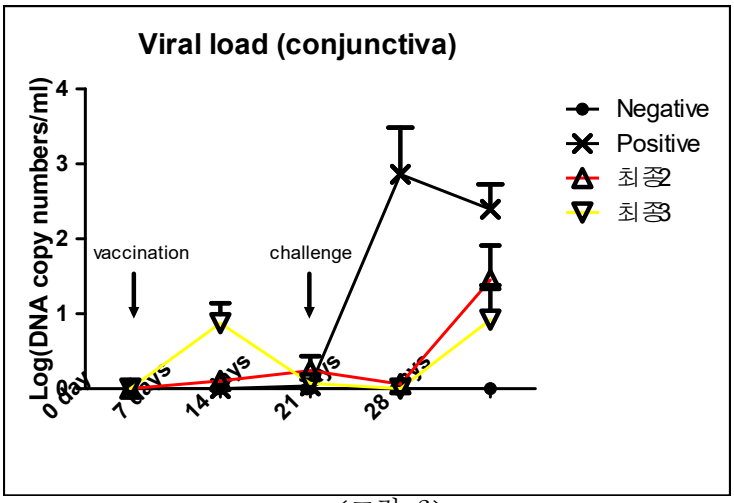
▶ 2주간의 안전성평가에서 임상증상 및 각 개체 점안 샘플의 바이러스분석, 최종 조직병변 지수를 통하여 최종 2종을 선발하였다. 최종 선발된 2종에 대한 고농도 역가접종 추가 실험으로 TCO 개발 백신 2종 접종 후 고농도(10^6/EID50)의 바이러스를 공격접종하여 총 4주간의 고농도에서의 생존력평가를 시험하였다. 4주간 7일 간격으로 무게를 측정하여 주별 증체량변화를 평가하였다. 백신 접종 후 14일 이후 공격접종을 진행하였고 공격접종 후 21일차에 백신그룹에서 다소 증체량이 감소를 보이나 28일차에는 증가하는 것을 확인하였다. 반면에 positive그룹은 14일차 까지는 증가하였지만 공격접종 이후인 21,28일차에는 계속해서 감소하는 것을 확인할 수 있었다<그림5>.



<그림 5>

TCO 개발백신 최종 2종의 고농도 공격접종 후 생존력평가시험 증체량변화

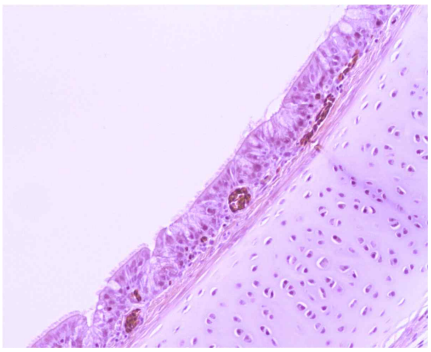
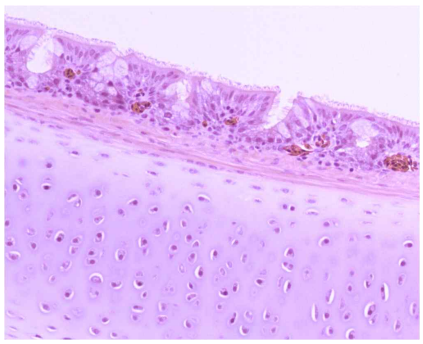
▶TCO 개발백신 최종 2종의 고농도 공격접종 후 생존력평가시험의 viral load를 확인하기 위해 4주간 7일간격으로 점안 샘플링을 하였다. 점안 샘플링의 DNA를 추출하여 real-time PCR을 통해 바이러스의 양을 확인하였다. 그 결과 백신그룹 최종2번 그룹에서는 백신 접종 후 14일간의 바이러스의 양은 최종 3번에 비해 증가 하지 않았지만 고농도의 공격접종이후의 바이러스의 양은 최종 3보다 높은 것을 확인하였다. 최종 3번의 바이러스 양 변화는 백신 접종 후 바이러스의 양은 증가하였다가 10일 이후에는 감소하였고 공격접종 후에 증가하는 것을 확인할 수 있었지만 최종적인 바이러스의 양은 최종 2번 그룹보다 낮은 것을 확인하였다<그림6>.

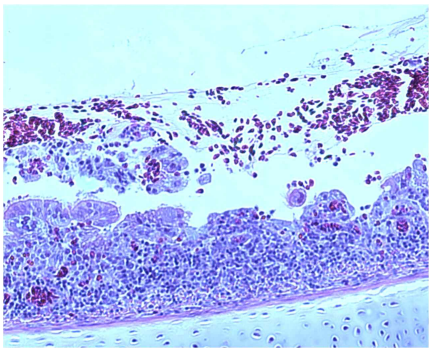
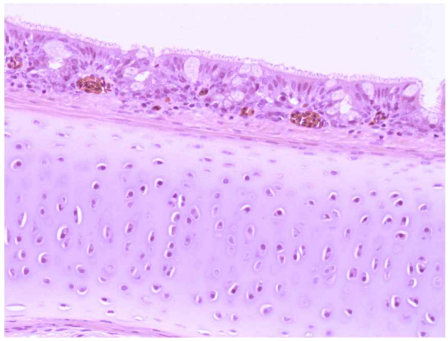


<그림 6>

TCO 개발백신 최종 2종의 고농도 공격접종 후 생존력평가시험 바이러스 양 변화

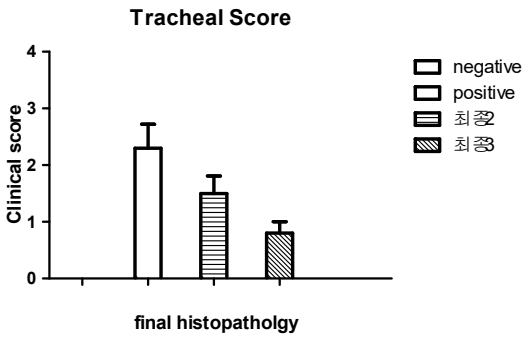
▶ TCO 개발 백신 2종의 고농도에서의 생존력 확인을 위한 SPF닭에서의 4주간의 동물시험 종료 후 부검을 통하여 기관 상부 및 하부의 섬모소실 및 조직병변을 평가를 하였다. 평가 결과 백신 후보 최종 3번의 섬모소실 및 조직병변평가결과가 가장 양호 하였다<그림 7, 7-1, 표 3>.

TCO 백신 후보 최종2	TCO 백신 후보 최종3
	

positive control	negative control
	

<그림 7>

TCO 개발 백신 2종의 생존력 확인을 위한 기관 조직병변 및 섬모소실지수 평가



<그림 7-1>

TCO 개발 백신 2종의 생존력 확인을 위한 기관 조직병변 및 섬모소실지수 평가

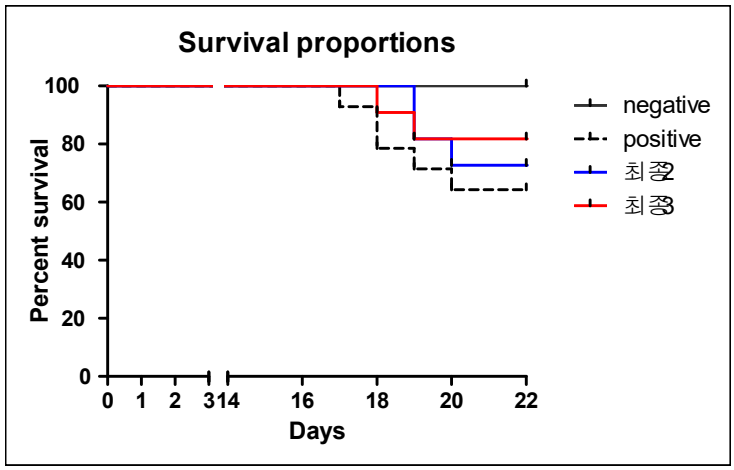
<표 3>

기관 조직병변 및 섬모소실지수 평가기준

Loss of cilia (LC) grade and inflammatory responses (Inf) grade	기준
1	미약한 염증세포 침윤 및 cilia 약한 손상
2	다소 심한 염증세포 침윤소견 및 일부출혈소견, cilia 절반 소실
3	Trachea 구조다소 손실 및 심한 염증세포 침윤, cilia 대부분 소실
4	Trachea 구조 소실 및 심한 염증세포 침윤, cilia 완전 소실

▶ 개발된 TCO 개발 백신접종 후 고농도 공격접종에서의 생존력을 평가하기 위해 시험한 4주간의 동물실험 종료 후 각 군별 생존력 평가 결과는 백신 그룹 최종3번이 80%이상의 생존율을 보였으며 최종 2번은 70%, positive그룹은 60%의 생존률을 보였다. 고농도에서의 생존력평가를 통해 최종 백신 후보 3번이 TCO 개발백신으로써의 가능성을 보였다

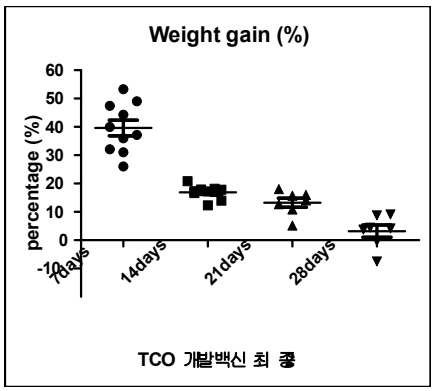
<그림 8>.

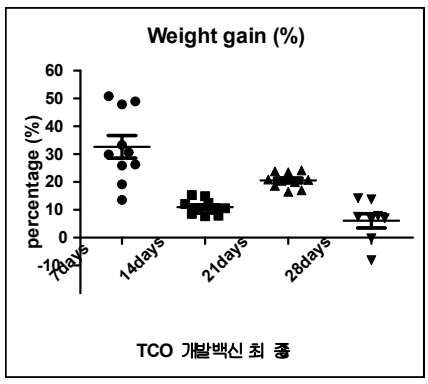


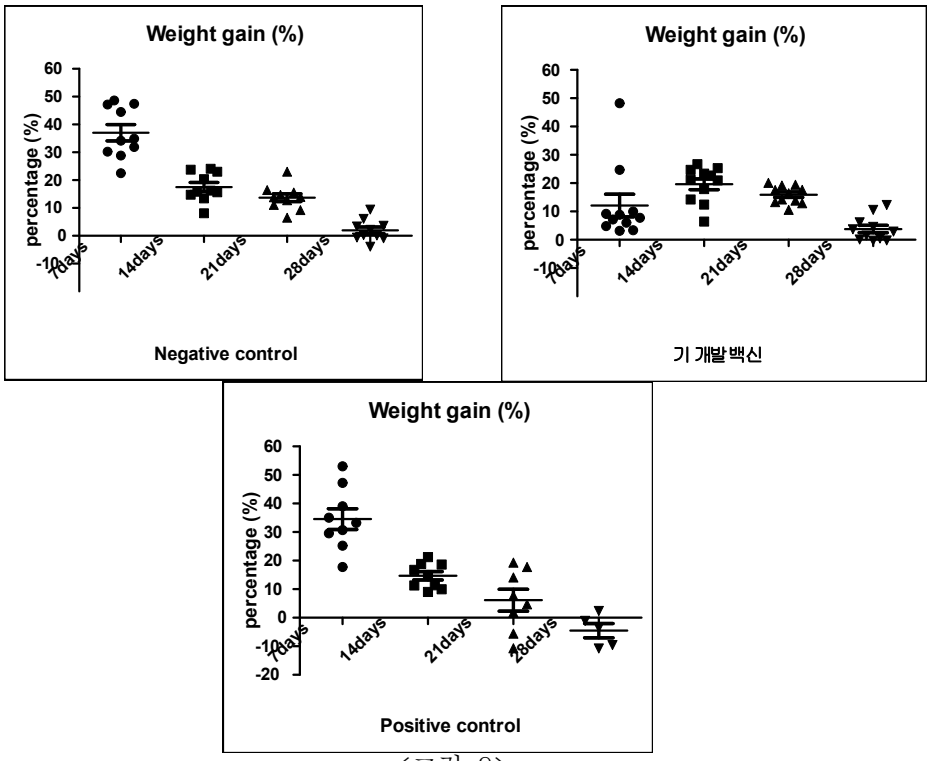
<그림 8>
TCO 개발 백신 2종의 생존력 평가 (고농도 공격접종)

③ TCO 개발 백신 최종 후보주 2종의 안전성 및 효력시험 결과 (기 개발백신 비교시험 포함)

▶ TCO 개발 백신 5종의 안전성 및 생존력평가를 통해 최종 선발된 2종의 안전성 및 효력평가를 위해 백신접종 2주 후 시험군 및 대조군에 공격용 바이러스를 0.1ml (104.0 EID50/마리)씩 기관내에 접종하고 2주간 이상 유무를 관찰하였다. 최종 선발된 2종은 기 개발 백신과 비교실험을 동시에 진행하였다. 공격접종 후 각 군의 증체량 변화를 확인하였다<그림9>.







<그림 9>

TCO 개발백신 최종 2종의 안전성 및 효력시험 증체량변화

▶ 공격접종 후 각 시험군 별 임상증상평가를 진행하였고 개구호흡, 기침, 눈부음, 목털음, 피가래의 임상증상을 보이는 개체들을 조사하였다. 그 결과 공격접종 4일 이후 임상증상을 보이는 몇 몇 개체들을 확인하였다. 양성대조군은 80%이상의 임상증상을 보였으며 최종3번 군은 2마리개체에서 임상증상을 보였다. 기 개발백신 군에서도 2마리에서 임상증상을 확인하였다<표 4>.

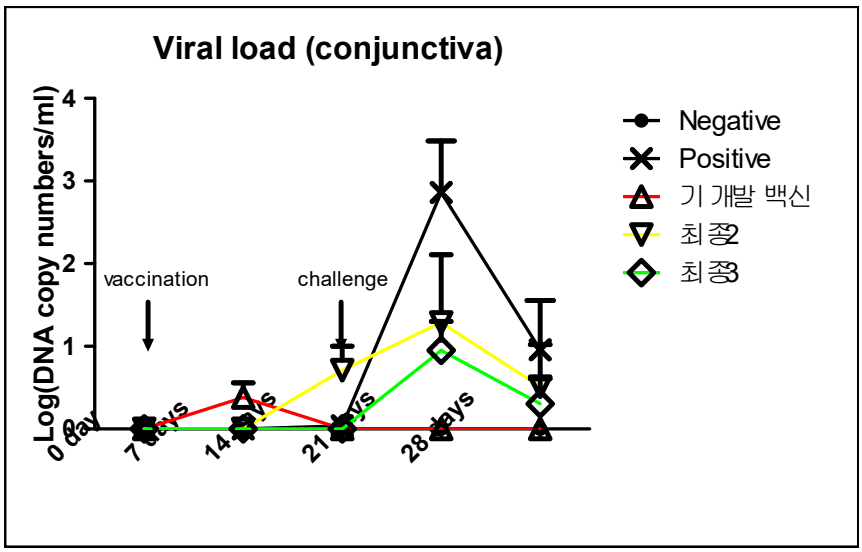
<표 4>

공격접종 후 임상증상 평가

	Gasping	Coughing	Extension of the neck during inspiration	Wet irritated eyes	Hemorrhagic mucus
Negative control	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Positive Control	10/10	10/10	6/10	0/10	5/10
최종2	4/10	4/10	4/10	2/10	1/10
최종3	2/10	2/10	2/10	0/10	0/10
기 개발백신	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10

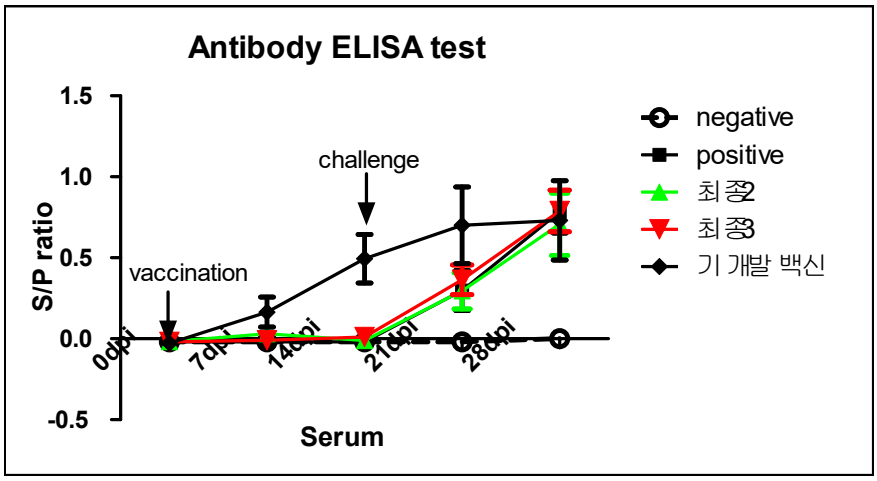
▶ 백신 접종 후 2주 뒤 공격접종을 진행하였다. 공격접종 후 각 시험군들의 viral load를 확인하기 위해 4주간 7일 간격으로 점안 샘플링을 하였다. 점안 샘플링의 DNA를 추출하

여 real-time PCR을 통해 주별 바이러스의 양을 확인하였다. 그 결과 공격접종 후 7일 뒤(21일) TCO개발 백신 2종 모두 바이러스의 양이 기 개발 백신 보다 증가하였으나 양성대조군과는 약 2배 정도의 차이를 보였다. 공격접종 후 2주 뒤(28일) 바이러스의 양은 모두 감소하는 것을 확인하였다<그림 10>.



<그림 10>
TCO 개발백신 2종의 안전성 및 효력평가시험의 viral load

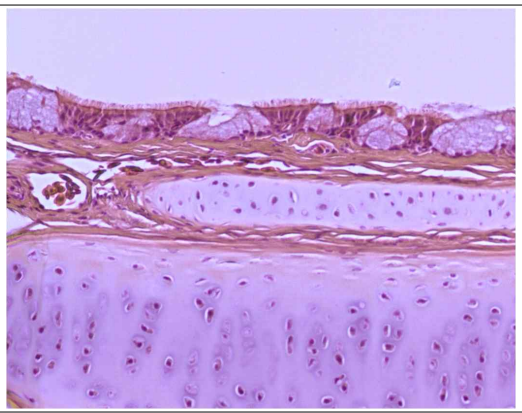
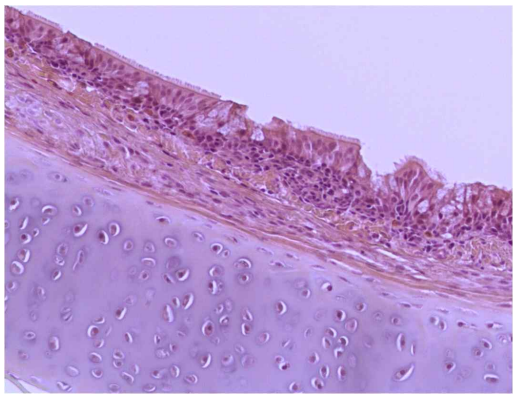
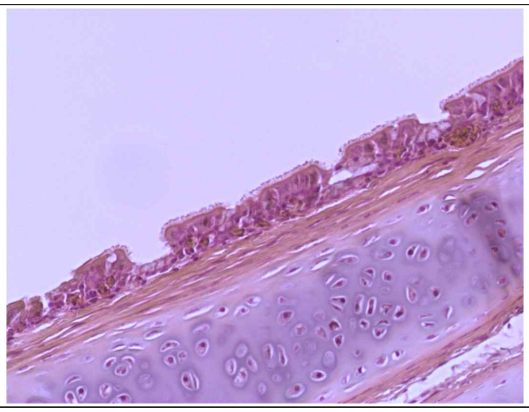
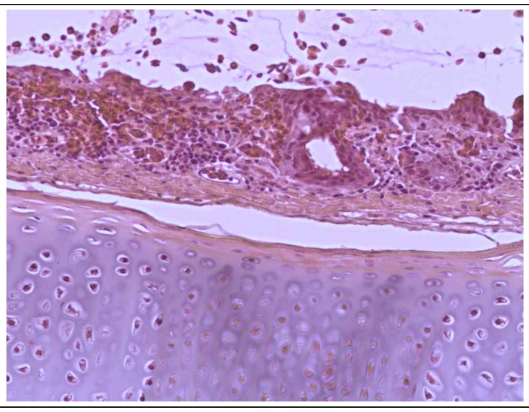
▶ 각 시험 군들의 항체 형성을 확인하기 위해 4주간 7일 간격으로 채혈을 진행하였다. 혈액의 혈청을 분리하여 ILT 항체를 측정할 수 있는 ILT ELISA kit (Bio Chek, Cat No. CK 124)를 통해 주별 ILT의 항체를 확인하였다. 기 개발 백신을 포함 한 실험으로 백신 접종 후 2주 뒤 공격접종을 한 그룹들과 백신접종 후 3주 뒤 공격접종을 실시한 그룹들을 나누어 공격접종 후 항체형성평가를 진행하였다. 백신 후 2주뒤 공격접종한 그룹들의 항체형성평가 결과는 기 개발백신의 경우 공격접종 이후 7일까지는 항체형성이 증가하였고 28일차에서는 증가하지 않았다. TCO개발 백신 후보 최종 2, 최종3그룹은 공격접종이 후 28일차까지 항체형성이 증가하는 것을 확인하였다. 백신 접종 후 3주 뒤 공격접종을 실시한 그룹의 결과는 기 개발 백신그룹에서는 백신 후 2주뒤 공격접종 한 그룹과 비슷한 수치를 보였고 TCO백신그룹에서는 기 개발 백신그룹의 항체형성보다는 낮은 항체가를 보였으나 28일차까지 증가하는 항체가을 확인하였다<그림 11>.

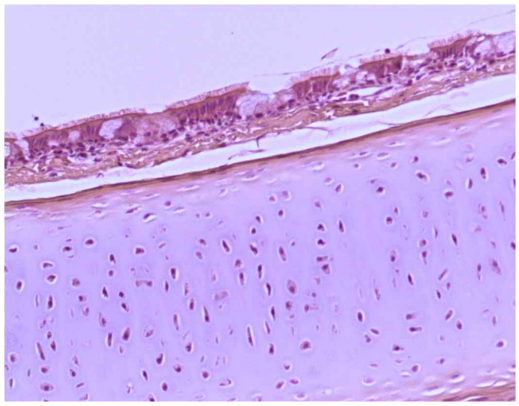


<그림 11>

TCO 개발백신의 공격접종 후 항체형성평가 (백신 후 2주 뒤 공격접종)

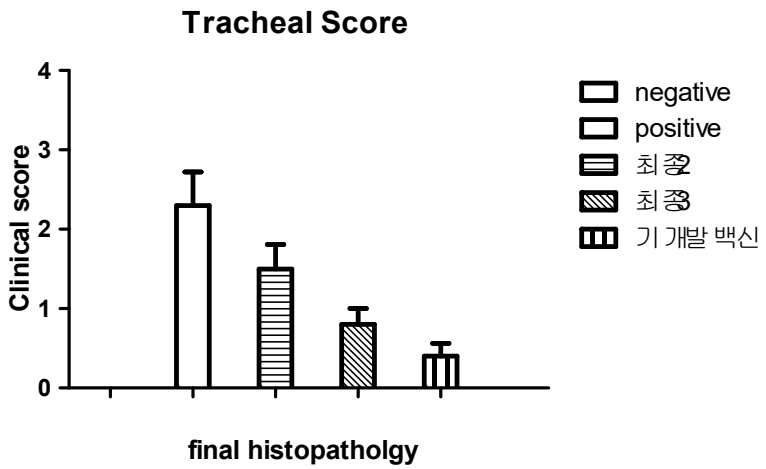
▶ TCO 개발 백신 2종의 안전성 및 효력평가를 위한 SPF닭에서의 4주간의 동물시험 종료 후 부검을 통하여 기관 상부 및 하부의 섬모소실 및 조직병변을 평가를 하였다. 그 결과 기 개발 백신의 섬모소실 및 조직병변이 가장 낮은 것을 확인하였고 TCO개발 백신의 최종 3번의 결과가 가장 차이가 적은 것을 확인하였다 <그림 12, 12-1, 표 5>.

TCO 백신 후보 최종2	TCO 백신 후보 최종3
	
기 개발 백신	positive control
	

negative control	
	

<그림 12>

TCO 개발 백신 2종의 안전성 및 효력평가시험의 기관 조직병변 및 섬모소실지수 평가



<그림 12-1>

TCO 개발 백신 2종의 안전성 및 효력평가시험의 기관 조직병변 및 섬모소실지수 평가

<표 5>

기관 조직병변 평가기준

inflammatory responses (Inf) grade	기준
1	미약한 염증세포 침윤 및 cilia 약한 손상
2	다소 심한 염증세포 침윤소견 및 일부출혈소견, cilia 절반 소실
3	Trachea 구조다소 손실 및 심한 염증세포 침윤, cilia 대부분 소실
4	Trachea 구조 소실 및 심한 염증세포 침윤, cilia 완전 소실

2-2. ILT바이러스 온도 민감성(Ts) 개발 백신의 안전성 및 효력평가

(1) ILT바이러스 온도 민감성(Ts) 개발 백신의 최종 4종의 선별과정

① Ts mutant 개발 백신 최종 4종의 선별 과정

- ILT 바이러스 온도 민감성(Ts) 개발 백신의 최종 후보주를 선별하기 위하여 총 4차에 걸친 선별과정을 진행하였다. plaque assay 진행 전 NTG농도를 선정하기 위해 31℃에서 LMH에 ILT 바이러스를 접종하여 농도별 5mg/ml, 10mg/ml, 15mg/ml, 20mg/ml의 NTG를 처리 한 후 3~5일간 바이러스를 배양하였다.

- 1차 선별과정으로 3~5일 후 NTG 농도별 바이러스의 CPE 확인 및 세포 사멸을 관찰한 후 CPE형성이 가장 잘 일어나는 적정 NTG 농도를 선정하였다. 선정된 NTG 농도인 10mg/ml 을 2차 처리한 후 ILT바이러스를 10진 희석하여 희석 배수별 plaque assay를 3번에 걸쳐 진행하였다. 그 결과 바이러스 희석 농도 10^{-5}, 10^{-6}를 적정 희석배수로 선정하여 2차 선별 과정을 진행하였다<표 1>.

<표 1>

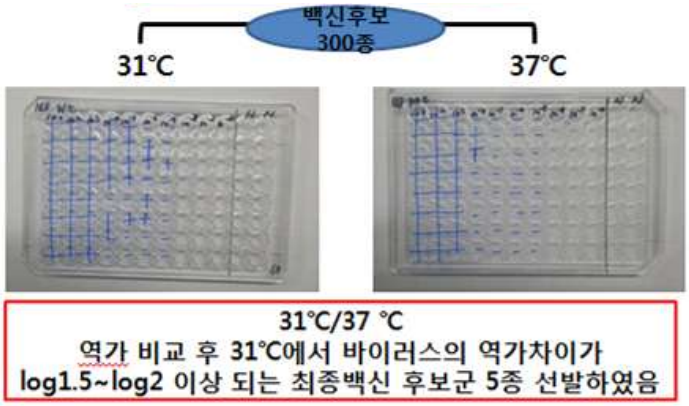
NTG 처리 후 ILT 희석 배수별 plaque 형성 결과

바이러스 희석배수	NTG 농도	1차 plaque assay (plaque/well)	2차 plaque assay (plaque/well)	2차 plaque assay (plaque/well)
10^{-1} ~10^{-4}	10mg/ml	셀 수 없음	셀 수 없음	셀 수 없음
10^{-5}	10mg/ml	250이상/well	약 200/well	143/well
10^{-6}	10mg/ml	약 200/well	187/well	103/well
10^{-7}	10mg/ml	약 200/well	154/well	88/well

- Ts mutant 2차 선별 과정으로 바이러스 희석 농도 10^{-5}, 10^{-6}를 SPF 종란 CAM에 접종하여 single pock를 수거하여 31℃에서 배양 후 plaque assay를 진행하였다. 바이러스 희석 농도 10^{-5}, 10^{-6}에서 plaque assay진행 하였고 총 300개의 plaque을 확보하였다.

- 확보한 총 300개의 plaque으로 3차 선별 과정을 진행하였다. 각각의 plaque을 24well plate에서 배양하여 3차 선별과정에 사용할 각각의 바이러스들을 확보하였다. 각각의 plaque 샘플들은 하나의 샘플당 31℃와 37℃에서 동시 배양하여 TCID50를 진행하였다.

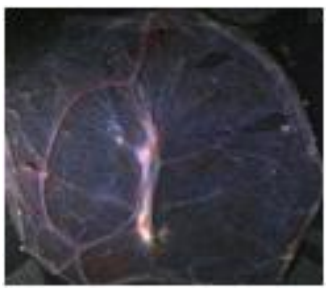
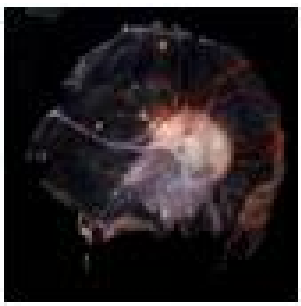
TCID50를 통한 역가 비교후 31℃에서 바이러스 감염율이 log1.5~2정도 높은 plaque을 최종 5종 선별하였다<그림1>.

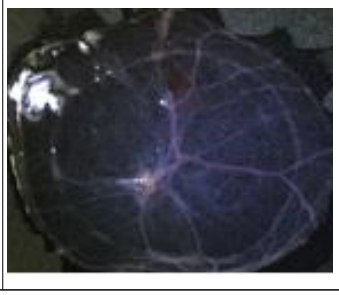


<그림1>

TCID50를 통한 Ts mutant 300종에서 개발 백신 후보5종의 선발과정

- 총 3차의 선별과정을 통해 확보한 5종의 약독화 여부를 확인하기 위하여 SPF 종란의 CAM에 접종하여 기존 백신과의 pock 크기를 비교하여 Ts 개발 백신의 최종 4차 선별을 완료 하였다. 그 결과 기존 백신의 pock 크기와 비슷한 후보 4종을 선별할 수 있었고 CAM 접종을 통해 NTG를 통한 약독화를 최종적으로 확인 할 수 있었다<그림2>.

NTG 처리 전	Ts 백신 후보 최종51번	Ts 백신 후보 최종89번
Ts 백신 후보 최종104번	Ts 백신 후보 최종105번	Ts 백신 후보 최종234번
		

	기 개발 백신	
		

<그림 2>
약독화 확인을 위한 선발된 Ts mutant 백신 후보주 5종과 기 개발백신의
CAM에서의 Pock 크기 비교 관찰

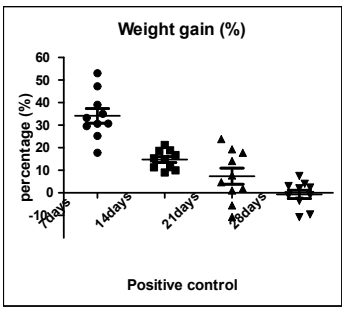
(2) 국가검정기준에 의한 ILT바이러스의 온도 민감성(Ts) 개발 백신 후보주 4종의 안전성 및 효력시험(기 개발 백신 비교시험 포함)

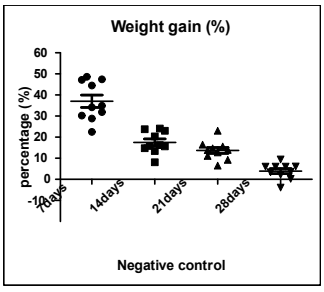
①안전성 및 효력 평가시험 방법

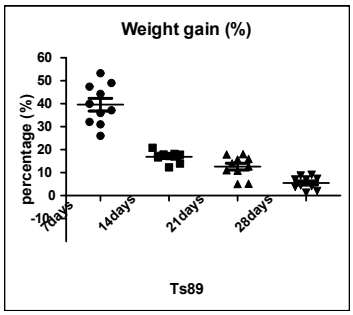
▶ 농림수산검역검사본부 고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 닭 전염성 후두기관염 바이러스의 안전성 및 효력평가를 시험하였다. 닭 전염성 후두기관염 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령의 닭을 사용하여 시험군 별 10마리를 사용한다. 시험군에 백신의 1수분 0.1ml 씩(104.0 EID50/마리)을 점안접종으로 후보백신을 접종하고 2주간 관찰하였다. 백신접종 후 2주 후 시험군 및 대조군에 공격용 바이러스를 0.1ml (104.0 EID50/마리)씩 기관내에 접종하고 14일간 이상 유무를 관찰하였다.

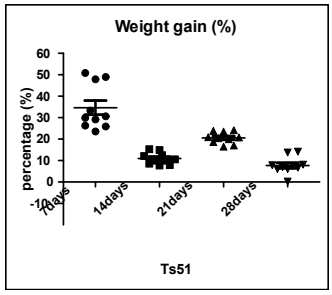
② ILT바이러스 온도민감성 개발 백신 4종의 안전성 및 효력시험 결과

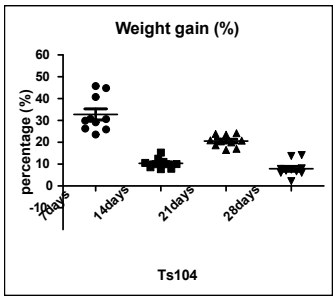
▶ ILT 안전성 및 효력 평가시험을 진행하면서 TCO 개발 백신 5종 접종 후 7일 간격으로 무게를 측정하여 주별 증체량변화를 평가하였다. 백신 접종 후 바이러스감염으로 인한 증체비율이 4일에서 7일차에 비해 증체량변화가 적은 것을 확인하였다<그림1>.

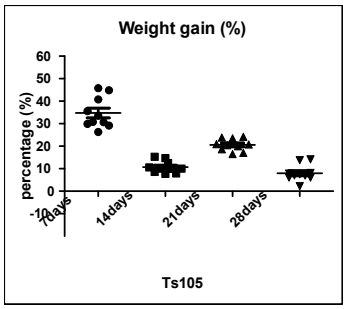












<그림 1>

각 개발 백신 접종 후 증체량변화

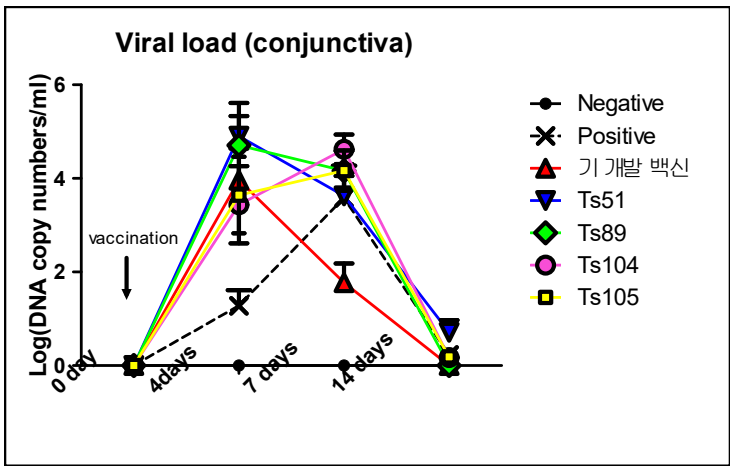
▶ ILT 온도 민감성 개발 백신 4종 접종 후 14일간 ILT 바이러스 감염 시 관찰 되는 임상증상을 각 시험 군별 관찰하였다. 각 시험군 별 임상증상평가는 육안으로 관찰하였고 개 구호흡, 기침, 눈부음, 목털음, 피가래의 임상증상을 보이는 개체들을 조사하였다. 그 결과 각 백신들의 그룹에서 최종 Ts104, Ts105군이 다른 후보군 Ts51, Ts89보다 임상증상이 현저히 적음을 확인 할 수 있었고 기 개발 백신 군에서도 눈 부음 증상을 보이는 두 마리 개체를 제외하고 모두 양호한 상태를 확인하였다. 반면에 양성대조군의 개체들은 대부분 개체에서 임상증상을 확인할 수 있었다<표 1>.

<표 1>

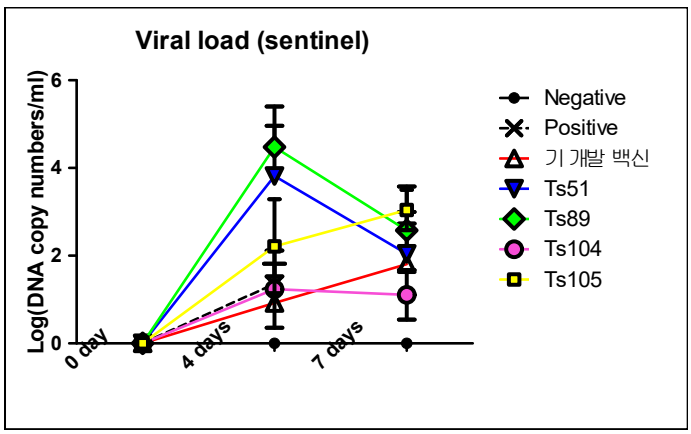
ILT 온도민감성 개발 백신의 안전성 및 효력평가시험의 임상증상 평가

	Gasping	Coughing	Extension of the neck during in spiration	Wet irritated eyes	Hemorrhagic mucus
Negative control	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Positive Control	8/10	5/10	1/10	1/10	3/10
Ts51	0/10	0/10	0/10	5/10	0/10
Ts89	0/10	0/10	0/10	7/10	0/10
Ts104	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10
Ts105	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10
기 개발백신	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10

▶ ILT 온도 민감성(Ts) 개발 백신 4종 접종 후 안전성 및 효력평가를 위한 viral load를 확인하였다. Ts백신 접종 후 안전성 평가를 위해 4일, 7일, 14일째 점안 샘플링을 하였다. 안전성 평가 시 군별 sentinel군 점안 샘플링의 DNA를 추출하여 real-time PCR을 통해 바이러스의 양을 확인하였다. 또한 안전성 평가시험에서 sentinel군을 추가로 하여 sentinel군에서의 바이러스 감염에 따른 바이러스의 양을 확인하였다. Negative그룹을 제외한 모든 그룹의 4일차에서 바이러스의 양이 가장 많이 증가하는 것을 보였고 7일차부터는 서서히 감소하는 것을 확인하였다. 또한 안전성 평가시험에서 sentinel군을 추가로 하여 sentinel군에서의 바이러스 감염에 따른 바이러스의 양을 확인하였다. 그 결과 백신 접종 그룹들과 동일하게 4일차까지는 증가하였고 7일차에 바이러스의 양이 감소하는 것을 확인하였다. 이는 백신을 한 후 직접적으로 백신을 하지 않은 일부의 sentinel개체에도 전파가 가능하나 7일차에 감소하는 것을 보아 sentinel군에 대한 백신의 안전성 또한 확인하였다<그림 2, 2-1>.

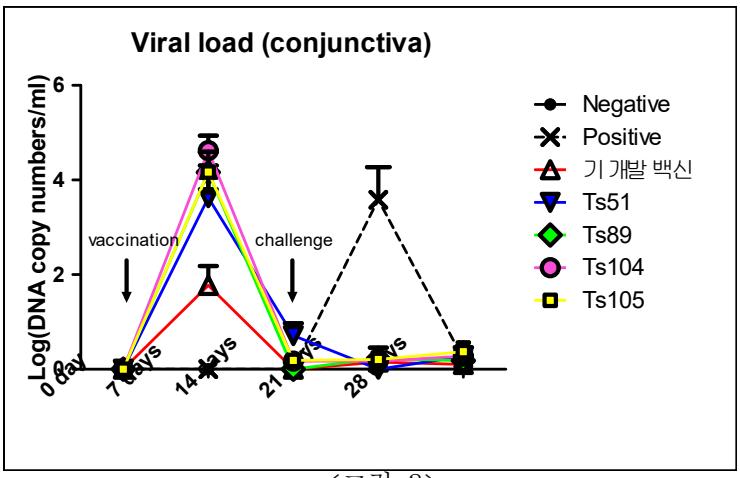


<그림 2>
ILT 온도민감성 개발 백신의 안전성 시험의 viral load 평가



<그림 2-1>
ILT 온도민감성 개발 백신의 안전성 시험의 viral load 평가

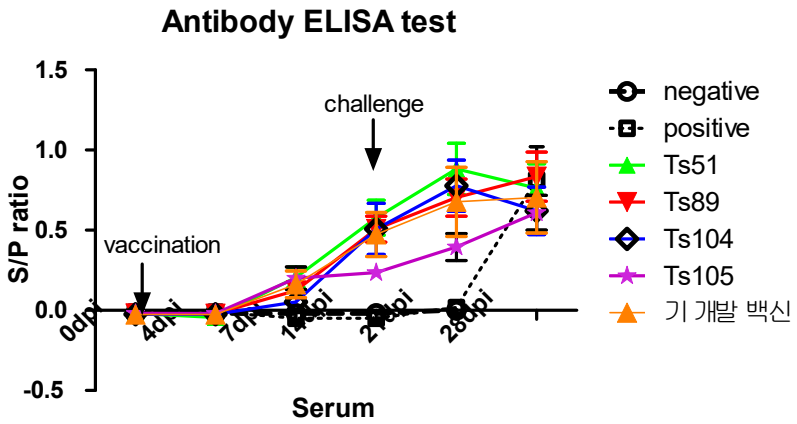
▶ ILT 온도 민감성(Ts) 개발 백신 4종의 2주간 안전성 평가확인 후 공격접종을 하여 효력평가 2주간 진행하였다. 효력평가를 위한 viral load를 확인하기위해 7일 간격으로 점안 샘플링을 하였다. 점안 샘플링의 DNA를 추출하여 real-time PCR을 통해 바이러스의 양을 확인하였다. 그 결과 공격 접종 이후 양성대조군과 다르게 ILT 온도민감성 후보백신 4군 모두 바이러스의 양이 2주간 증가하지 않음을 확인 하였고 기 개발 백신과 비교하였을 때도 큰 차이가 없음을 확인하였다. 결과적으로 온도 민감성 백신 후보군들 모두 기 개발 백신과 거의 동일한 안전성과 방어능을 가진 것을 확인하였다 <그림 3>.



<그림 3>

ILT 온도민감성 개발 백신의 효력평가 시험의 viral load 평가

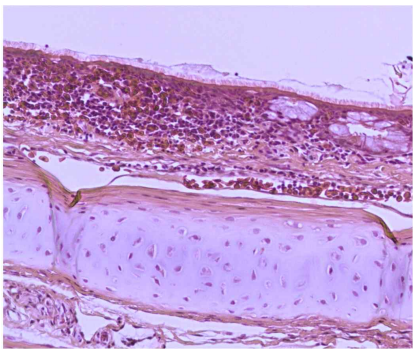
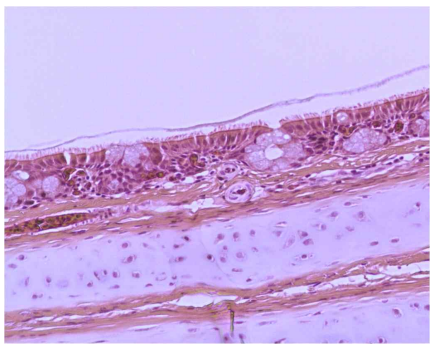
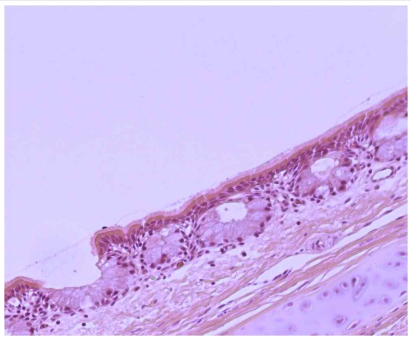
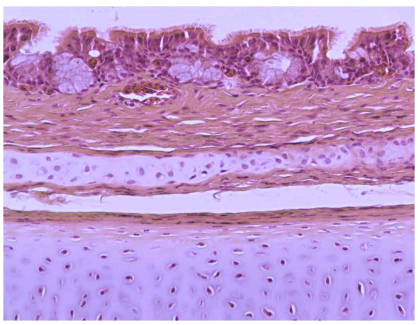
▶ 각 시험 군들의 항체 형성을 확인하기 위해 4주간 7일 간격으로 채혈을 진행하였다. 혈액의 혈청을 분리하여 ILT 항체를 측정할 수 있는 ILT ELISA kit(Bio Chek, Cat No. CK 124)를 통해 주별 ILT의 항체를 확인하였다. 모든 후보 백신군이 백신 접종 후 4일차 이후로 기 개발 백신과 동일 한 항체가로 증가하였고 결과적으로 Ts105번 군을 제외한 모든 군에서 기 개발 백신의 항체가와 동일한 수준의 수치를 확인할 수 있었다. 특히 공격접종 이후 바이러스 양이 활발히 증가하는 7일 동안의 항체가 수치에서는 Ts51,Ts89,Ts104그룹의 항체가가 기 개발 백신의 항체가 보다 높은 수치를 보였다<그림 4>.

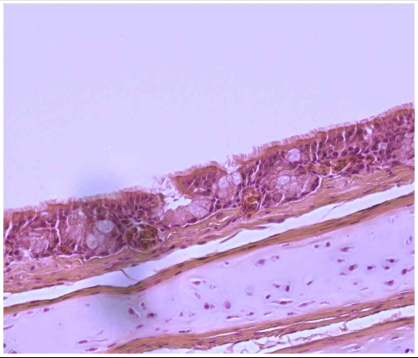
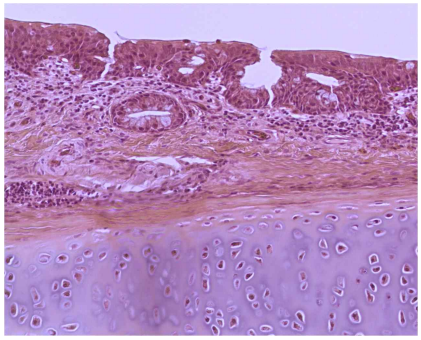
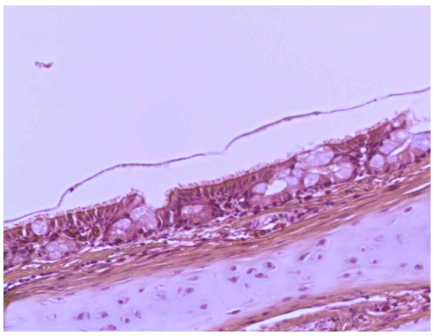


<그림 4>

ILT 온도민감성 개발 백신의 안전성 및 효력평가시험의 항체형성평가

▶ ILT 온도 민감성(Ts) 개발 백신 4종의 안전성 및 효력평가를 위한 SPF닭에서의 4주간의 동물시험 종료 후 부검을 통하여 기관 상부 및 하부의 섬모소실 및 조직병변을 평가를 하였다. 그 결과 positive그룹을 제외한 온도민감성 백신그룹들의 섬모소실 및 조직병변 평가는 4그룹 모두 positive그룹의 2배정도 낮은 결과를 확인 하였고 기 개발 백신그룹의 결과가 가장 낮았다<그림 5, 5-1, 표 2>.

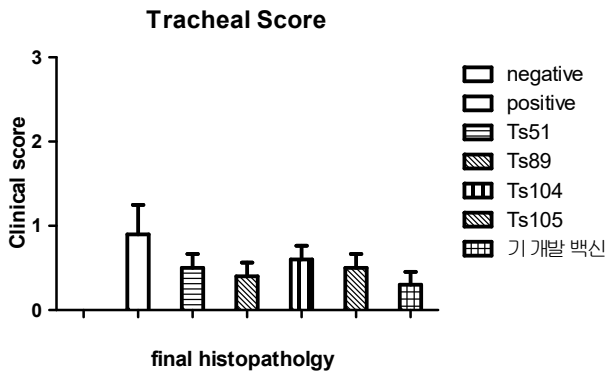
Ts51	Ts89
	
Ts104	Ts105
	

기 개발백신	positive control
	
Negative control	
	

<그림 5>

ILT 온도민감성 개발 백신의

안전성 및 효력평가시험의 기관 조직병변 및 섬모소실지수 평가



<그림 5-1>

ILT 온도민감성 개발 백신의

안전성 및 효력평가시험의 기관 조직병변 및 섬모소실지수 평가

<표 2>

기관 조직병변 및 섬모소실지수 평가기준

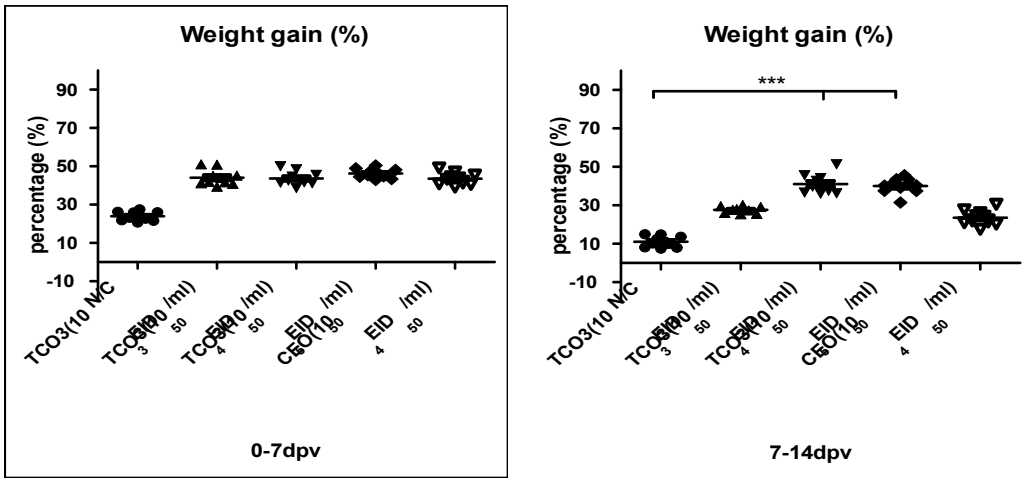
Loss of cilia (LC) grade and inflammatory	기준

responses (Inf) grade	
1	미약한 염증세포 침윤 및 cilia 약한 손상
2	다소 심한 염증세포 침윤소견 및 일부출혈소견, cilia 절반 소실
3	Trachea 구조다소 손실 및 심한 염증세포 침윤, cilia 대부분 소실
4	Trachea 구조 소실 및 심한 염증세포 침윤, cilia 완전 소실

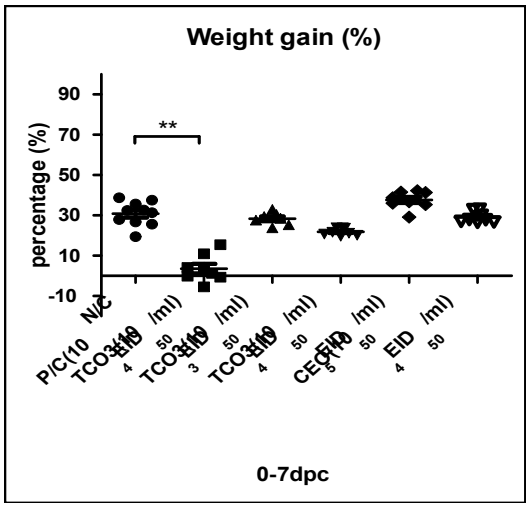
3. ILT 생독 백신 기술이전을 위한 농도별 효능평가

3-1. TCO 백신주의 농도별 안전성 및 효력평가

▶ 약독화 백신 최종 후보주인 TCO3의 4주간 안전성 및 효능평가를 진행하였다. 백신접종 농도는 그룹별 10^3EID50/ml, 10^4EID50/ml,10^5EID50/ml로 점안접종으로 접종하였다. 샘플링은 7일 간격으로 결막, 기관, 채혈을 하였다. 또한 임상증상과 증체량을 측정하였다.



<그림 1> 백신 접종 농도별 증체량평가



<그림 1-1> 공격접종 후 백신 접종 농도별 증체량평가

▶ 4주간의 안전성 및 효능평가의 증체량 결과는 그림<1>과 같다. 그 결과 백신접종 후 7일차까지 모든 그룹에서 큰 증체량의 차이를 발견하지 못했다. 7일에서 14일차에서 TCO3 백신을 10^4EID50/ml, 10^5EID50/ml로 접종한 그룹의 증체량이 다른 그룹보다 현저히 높게 나타나는 것을 확인하였다. 백신접종을 하지 않고 공격접종만 한 그룹P/C를 제외하고 공격접종 이후 모든그룹의 증체량은 P/C그룹보다 유의적으로 높았다.<그림 1-1>

<표1>

각 후보주들의 백신접종 후 및 공격접종 후 임상증상평가

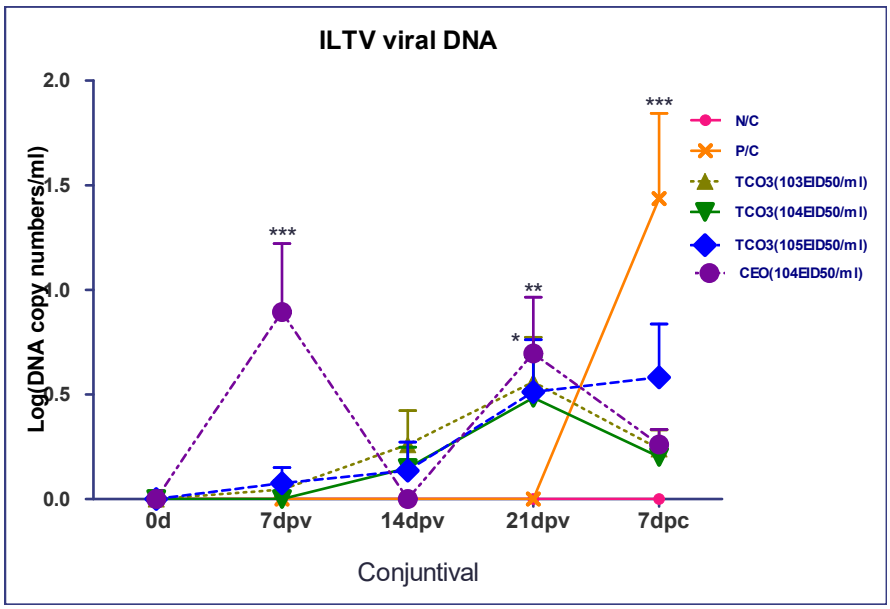
	Wet irritated eyes		Gasping		Hemorrhagic mucus	
	vaccination	challenge	vaccination	challenge	vaccination	challenge
N/C[A]	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
P/C[B]	-	0/10	-	6/10	-	3/10
TCO3(10^3EID$_{50}$/ml)	0/10	0/10	0/10	4/10	0/10	2/10
TCO3(10^4EID$_{50}$/ml)	0/10	0/10	0/10	3/10	0/10	2/10
TCO3(10^5EID$_{50}$/ml)	0/10	0/10	0/10	3/10	0/10	0/10
CEO (10^4EID$_{50}$/ml)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

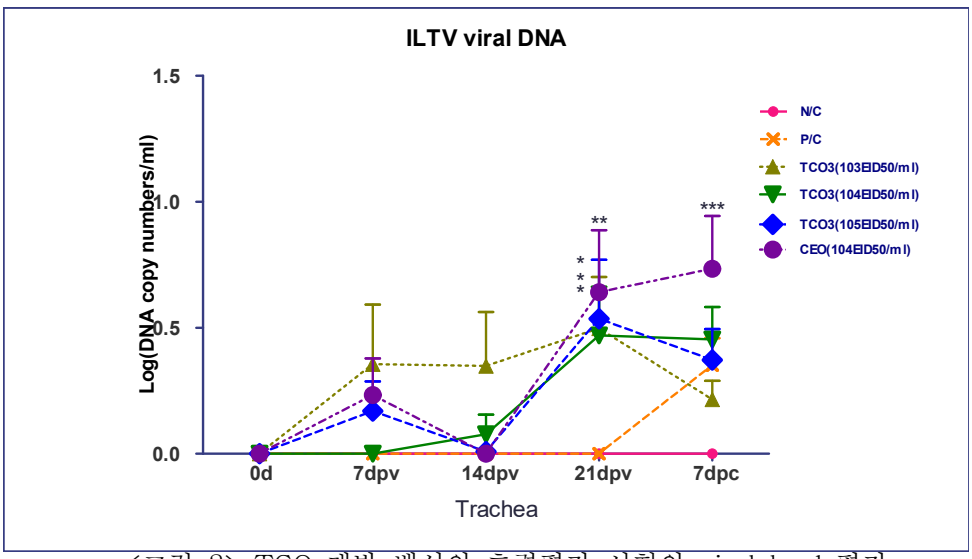
[A] N/C=negative control group (non-vaccinated and non-challenged)

[B] P/C=positive control group (non-vaccinated and challenged)

▶ 임상증상은 개구호흡, 결막염, 피가래를 육안으로 관찰하였다. 백신을 접종한 후 21일차

동안 모든 그룹에서 임상증상을 발견하지 못했다. 공격접종 이후 모든 TCO3그룹에서 개구호흡 증상을 보이는 개체를 4마리 이하로 확인하였다. TCO3 (10^3EID50/ml) 과 TCO3 (10^4EID50/ml)그룹은 피가래의 임상증상을 보이는 개체를 확인하였으나, TCO3 (10^5EID50/ml) 그룹과 기 개발 백신 접종 그룹의 경우 공격접종 이후에 피가래를 보이는 개체가 없었다. 임상증상의 결과로 세포유래 약독화 백신주가 안전성을 보이지만 공격접종 이후 백신의 효력은 기 개발 백신에 비해 방어력이 낮은 것을 확인할 수 있었다.<표 1>



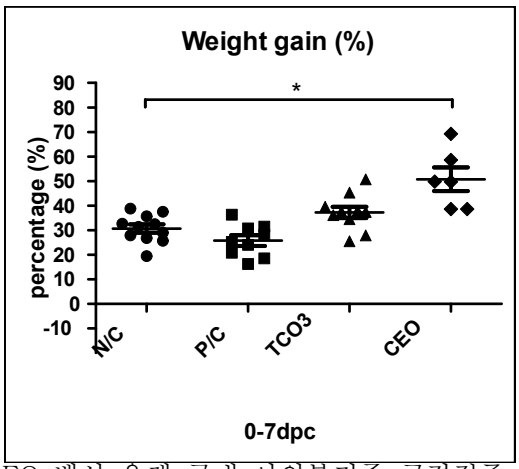


<그림 2> TCO 개발 백신의 효력평가 시험의 viral load 평가

▶ 4주 동안 결막과 기관지 스왑샘플에서 DNA를 추출하여 바이러스를 측정한 결과는 다음과 같다. 백신 후 7일차에 결막샘플에서 기 개발 백신 그룹의 viral load는 증가하였다가 14일차에는 감소하여 바이러스가 확인되지 않았다. 하지만 21일차에 다시 백신 바이러스

가 관찰되었다. 모든 TCO3 그룹들은 21일차까지 viral load가 매우 점진적으로 증가하였고, 공격접종이후에 백신을 접종한 그룹에서는 바이러스의 양이 감소하며 백신의 효능을 확인할 수 있었으나 백신을 접종하지 않고 공격접종한 P/C 그룹에서는 많은 양의 바이러스가 결막에서 확인되었다. 기관지 샘플에서의 결과로는 공격접종 이후 기 개발백신 그룹을 제외한 모든 TCO3그룹의 viral load가 감소함을 확인하였다. <그림 2>

▶ 또한 약독화 백신 최종 후보주인 TCO3의 10^4EID50/ml 접종 농도에 대한 4주간 안전성 및 효능평가를 hetero 공격접종 주를 사용하여 실시하였다. 공격접종시 사용한 바이러스는 백신의 parent strain보다 병원성이 낮고 국내에서 가장 많이 진단되고 있는 CEO 백신 유래 국내 야외분리주를 사용하였다.



<그림 3> CEO 백신 유래 국내 야외분리주 공격접종 후 증체량평가

▶ CEO 백신 유래 국내 야외분리주를 사용한 공격접종에서는 공격접종 후에도 모든 그룹에서 증체량이 줄어들지 않았다. <그림 3>

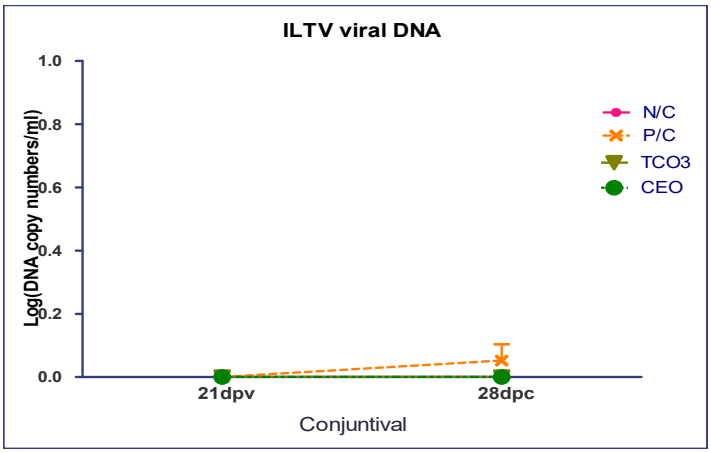
<표 2>

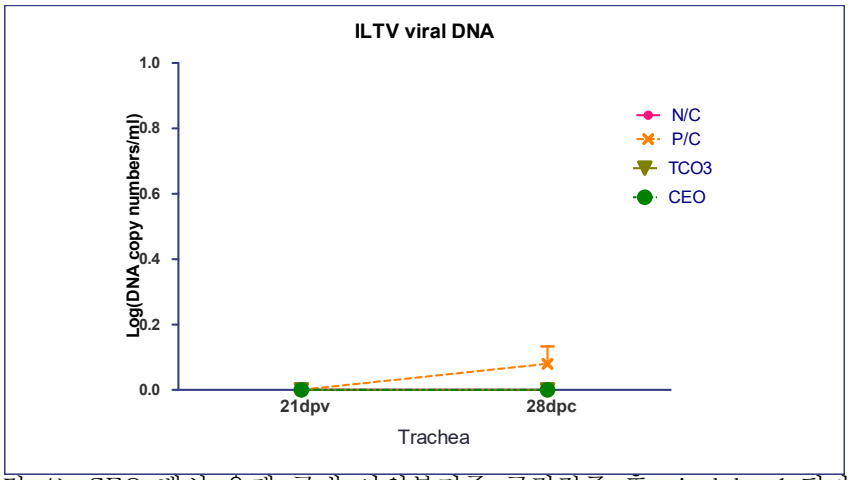
CEO 백신 유래 국내 야외분리주 공격접종 후 임상증상평가

	Wet irritated eyes		Gasping		Hemorrhagic mucus	
	vaccination	challenge	vaccination	challenge	vaccination	challenge
N/C[A]	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
P/C[B]	-	0/10	-	4/10	-	2/10
TCO3(10^4EID$_{50}$/ml)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
CEO (10^4EID$_{50}$/ml)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

N/C [A] =negative control group (non-vaccinated and non-challenged)
P/C [B]=positive control group (non-vaccinated and challenged)

▶ CEO 백신 유래 국내 야외분리주를 사용한 공격접종 후에도 백신을 접종하지 않고 공격접종한 그룹에서는 개구호흡과 피가래를 보이는 개체가 관찰되었으나 모든 백신 그룹에서는 임상증상이나 부검소견이 관찰되지 않았다. <표 2>





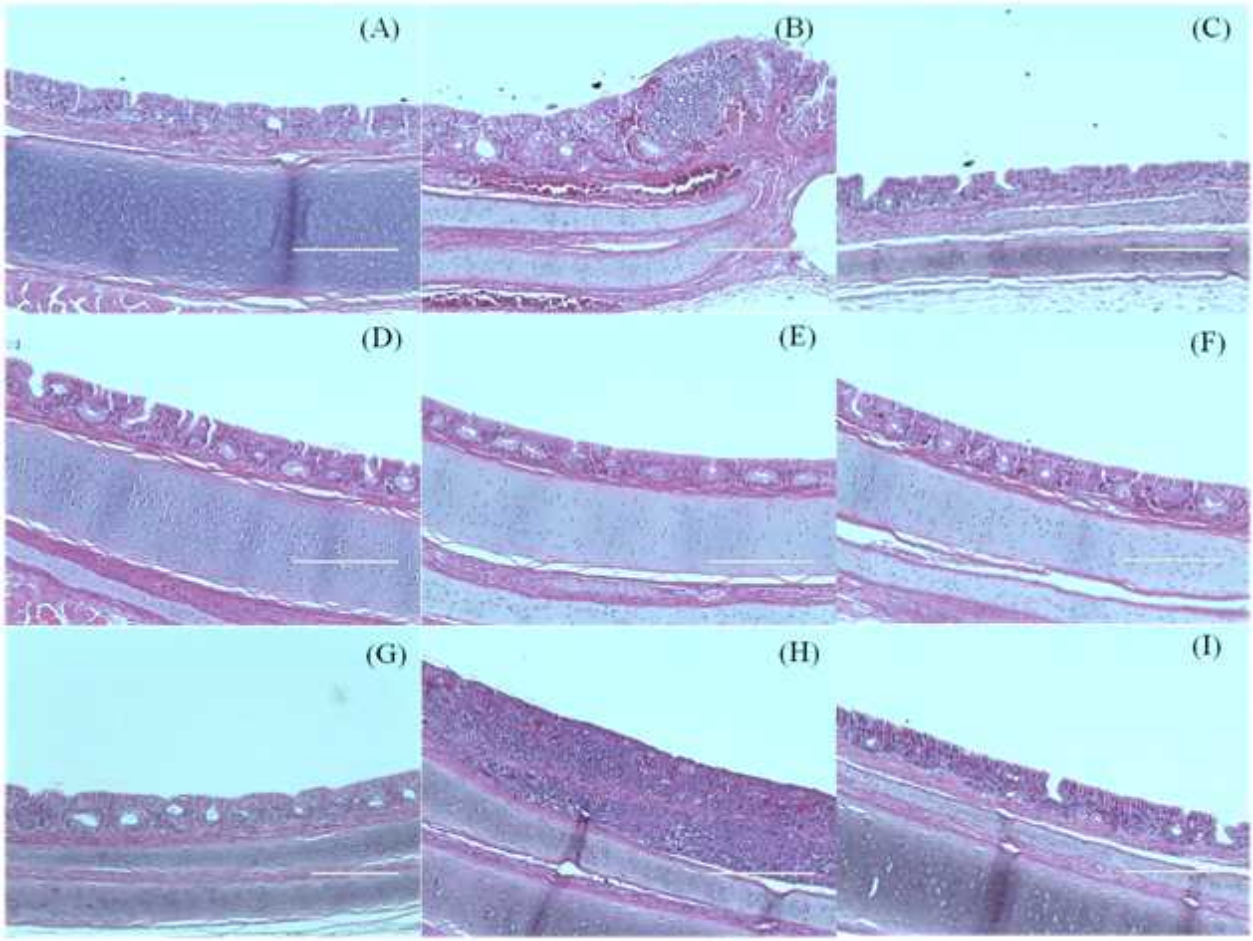
<그림 4> CEO 백신 유래 국내 야외분리주 공격접종 후 viral load 평가

▶ CEO 백신 유래 국내 야외분리주 공격접종 7일 후 백신 접종 그룹에서는 공격접종 바이러스가 결막과 기관에서 발견되지 않았으나, 백신을 접종하지 않은 P/C그룹에서는 낮은 농도의 바이러스가 확인되었다. 이는 TCO 백신이 국내에서 현재 유행하고 있는 CEO 백신 유래 국내 야외분리주를 방어할 수 있음을 보여준다. <그림 4>

▶ 총 4주간 실험 종료 시 모든 개체들의 기관지의 H&E 염색을 진행하여 스코어링을 하였다. 그 결과 백신 및 공격접종을 안한 N/C그룹의 기관지는 매우 건강한 기관조직임을 확인하였다. TCO3 그룹들과 기 개발 백신 그룹은 전체적으로 1이하의 점수로 일부에서 약간의 염증세포 침윤을 확인할 수 있었다. 백신접종을 하지 않고 공격접종만 진행한 P/C의 기관조직은 대부분의 cilia 소실과 심한 염증세포 침윤을 확인할 수 있었다. 또한

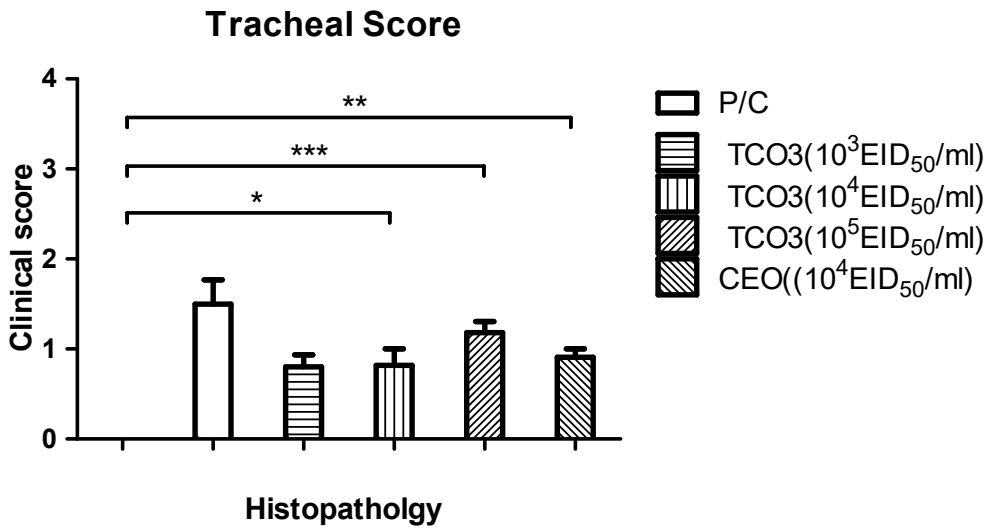
CEO 백신 유래 국내 야외분리주를 사용하여 공격접종한 경우에도 2~3정도의 염증세포 침윤을 확인하였다. histopathology의 결과로 parent strain이 hetero strain보다 심한 염증세포 침윤과 피가래, 실리아소실 등을 확인 하였고, 기 개발 백신과 비교하였을 때 비슷한 점수대로 효능을 확인하였다. <그림 5, 그림 5-1, 그림 5-2, 표 3>

▶ 모든 실험군은 4주간 안전성 및 효능 평가 진행 후 모든 개체들의 부검을 통해 기관지의 조직병변을 평가하였다. 기관지 조직은 H&E 염색을 진행하였고, 염증세포 침윤을 관찰하여 Guy, J.S., H.J. Barnes and L.M. Morgan, 1990에 나온 ILT 기관조직 평가를 따라 스코어링하였다.

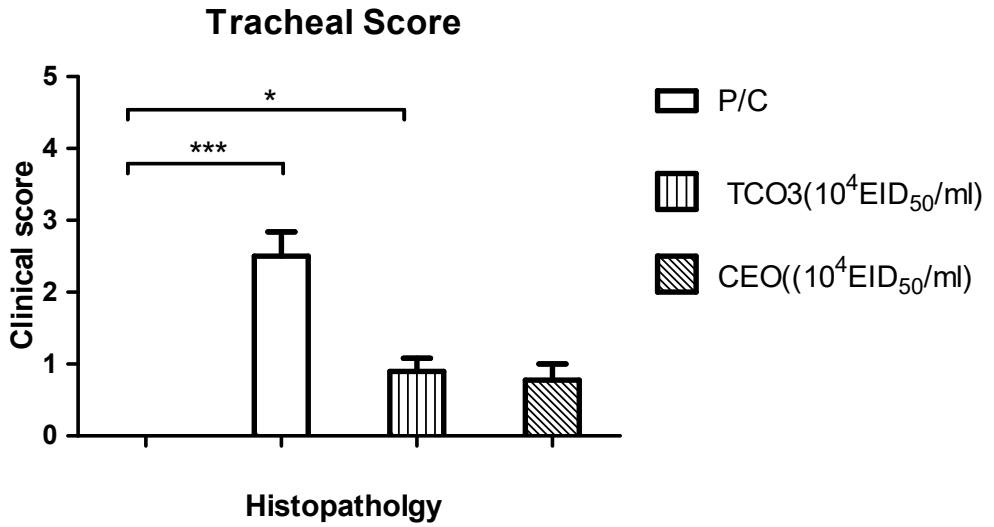


(a) N/C, (B) P/C(parent strain), (C) CEO(parent strain), (D) TCO3, (E) TCO3, (F) TCO3, (G) TCO3(hetero-840032), (H)P/C(hetero-840032), (I) CEO(hetero-840032).

<그림 5> 안전성 및 효능평가종료 후 기관 조직병변 평가



<그림 5-1> Parent strain으로 공격접종 후 기관 조직병변 평가



<그림 5-2> CEO 백신 유래 국내 야외분리주 공격접종 후 기관 조직병변 평가

<표 3>

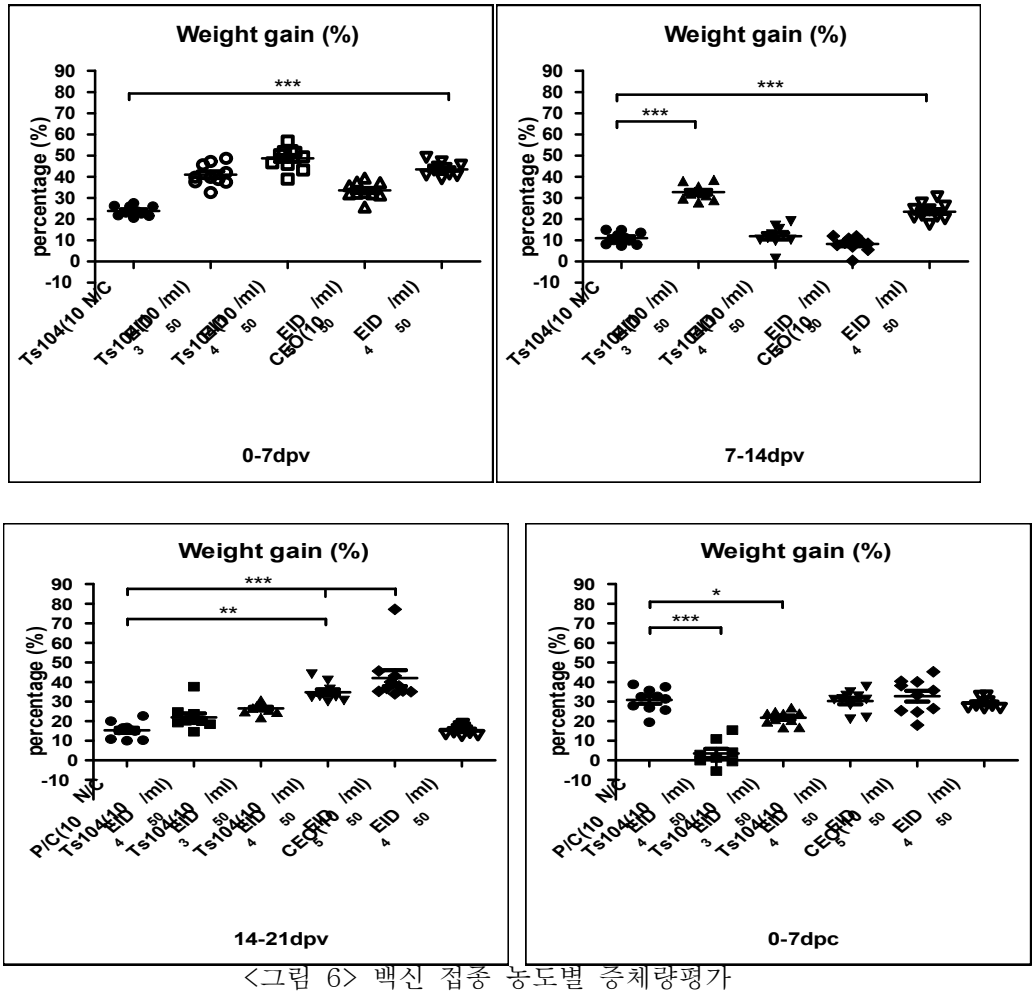
기관 조직병변 평가기준

inflammatory responses (Inf) grade	기준
1	미약한 염증세포 침윤 및 cilia 약한 손상
2	다소 심한 염증세포 침윤소견 및 일부출혈소견, cilia 절반 소실
3	Trachea 구조다소 손실 및 심한 염증세포 침윤, cilia 대부분 소실
4	Trachea 구조 소실 및 심한 염증세포 침윤, cilia 완전 소실

3-2. ILT 온도민감성 백신주(Ts)의 농도별 안전성 및 효력평가

(1) ILT 백신 후보주의 백신접종 농도별 안전성 및 효력시험

▶ 최종 후보주인 Ts104의 4주간 안전성 및 효능평가를 진행하였다. 백신접종농도는 그룹별 10^3EID50/ml, 10^4EID50/ml, 10^5EID50/ml로 점안접종으로 접종하였다. 샘플링은 7일 간격으로 결막, 기관, 혈액을 하였다. 또한 임상증상과 증체량을 측정하였다.



<그림 6> 백신 접종 농도별 증체량평가

▶ 4주간의 안전성 및 효능평가의 증체량 결과는 <그림 6>과 같다. 모든 그룹에서 백신후 7일차에 증체량의 감소가 나타나지 않았다. 백신 3주후 10^3EID50/ml의 농도의 parent strain을 공격 접종 바이러스로 기관내 접종을 하였다. 공격접종 후 7일 뒤 백신을 접종하지 않은 P/C그룹과 Ts104 (10^3EID50/ml) 그룹에서 증체량 감소가 보였으나 이를 제외한 나머지 그룹에서는 증체량 감소를 보이지 않았다. <그림 6>

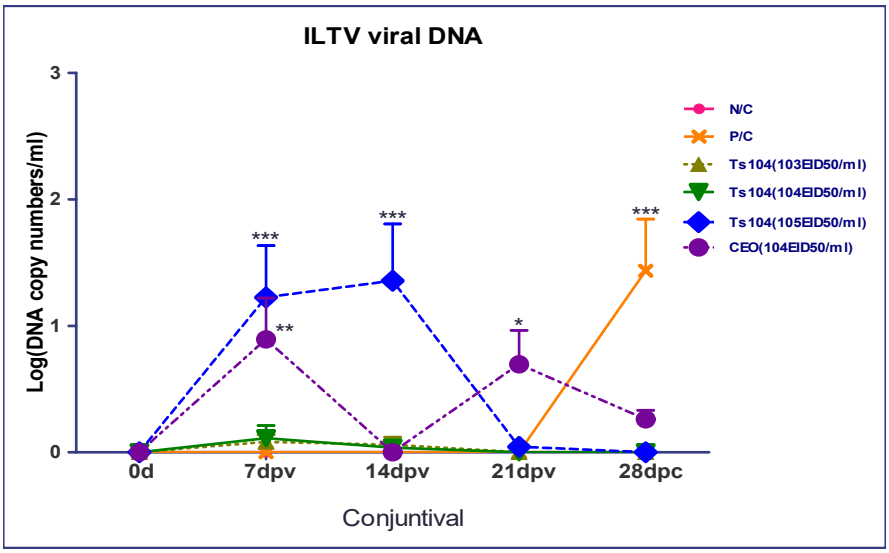
<표 4>

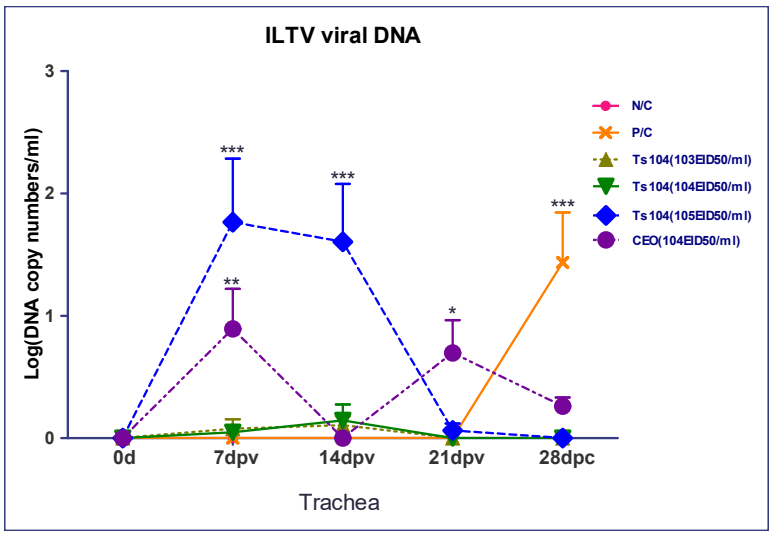
각 후보주들의 백신접종 후 및 공격접종 후 임상증상평가

	Wet irritated eyes		Gasping		Hemorrhagic mucus	
	vaccination	challenge	vaccination	challenge	vaccination	challenge
N/C[A]	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
P/C[B]	-	1/10	-	6/10	-	3/10
Ts104 (10^3EID_{50}/ml)	0/10	0/10	0/10	3/10	0/10	1/10
Ts104 (10^4EID50/ml)	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10	1/10
Ts104 (10^5EID50/ml)	0/10	2/10	0/10	0/10	0/10	0/10
CEO[C] (10^4EID50/ml)	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

[A] N/C=negative control group (non-vaccinated and non-challenged)
[B] P/C=positive control group (non-vaccinated and challenged)
[C]CEO=commercial vaccine

▶ 임상증상은 개구호흡, 결막염, 피가래를 육안으로 관찰하였다. 농도별 Ts104 후보백신주를 접종한 그룹에서는 백신 후 임상증상이 나타나지 않았다. 반면에 기 개발백신 그룹에서는 1마리의 닭에서 결막염을 관찰하였다. 공격접종 후 Ts104 (10^3EID50/ml) 그룹의 3마리 개체에서 개구호흡을 관찰하였다. Ts104 (10^4EID50/ml) 그룹에서는 2마리의 개구호흡을 하는 개체를 관찰하였다. 또한 이 두 그룹에서 피가래 증상을 보이는 개체를 1마리씩 확인하였다. Ts104 (10^5EID50/ml) 그룹에서는 2마리의 개체에서 약한 결막염증상을 확인 할 수 있었다. <표 4>



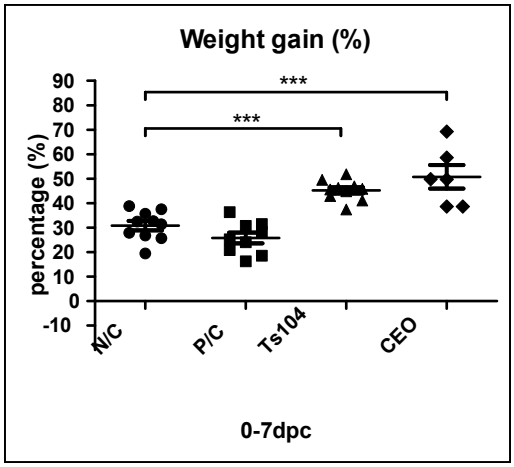


<그림 7> Ts104 개발 백신의 효력평가 시험의 viral load 평가

▶ 결막과 기관지 스왑샘플에서 DNA를 추출하여 바이러스를 측정한 결과는 다음과 같다. 백신 후 Ts104 (10^3EID50/ml), Ts104 (10^4EID50/ml) 그룹들에서는 결막과 기관에서 백신 바이러스가 거의 발견되지 않았으나, 기 개발 백신 그룹과 Ts104 (10^5EID50/ml) 그룹은 높은 viral genome copy numbers 를 보여주었다. 특히 Ts104 (10^5EID50/ml) 그룹의 경우 백신 후 14일까지 높은 바이러스 genome copy numbers를 보여주었다. 공격접종 이후, Ts104 그룹들과 기 개발 백신 그룹의 viral load는 감소하며 공격접종 바이러스에 대한 방어가 충분히 잘 이루어지고 있음을 확인하였다. 반면에 백신접종을 하지 않고 공격접종만 진행한 P/C그룹에서는 바이러스의 양이 급격히 증가하였다.<그림 7>

▶ 또한 약독화 백신 최종 후보주인 Ts104의 10^4EID50/ml 접종 농도에 대한 4주간 안전성 및 효능평가를 hetero 공격접종 주를 사용하여 실시하였다. 공격접종시 사용한 바이러스는 백신의 parent strain보다 병원성이 낮고 국내에서 가장 많이 진단되고 있는 CEO 백

신 유래 국내 야외분리주를 사용하였다.



<그림 8> CEO 백신 유래 국내 야외분리주 공격접종 후 증체량평가

▶ CEO 백신 유래 국내 야외분리주를 사용한 공격접종에서는 공격접종 후 모든 백신 그룹에서 증체량의 증가가 보였다. <그림 8>

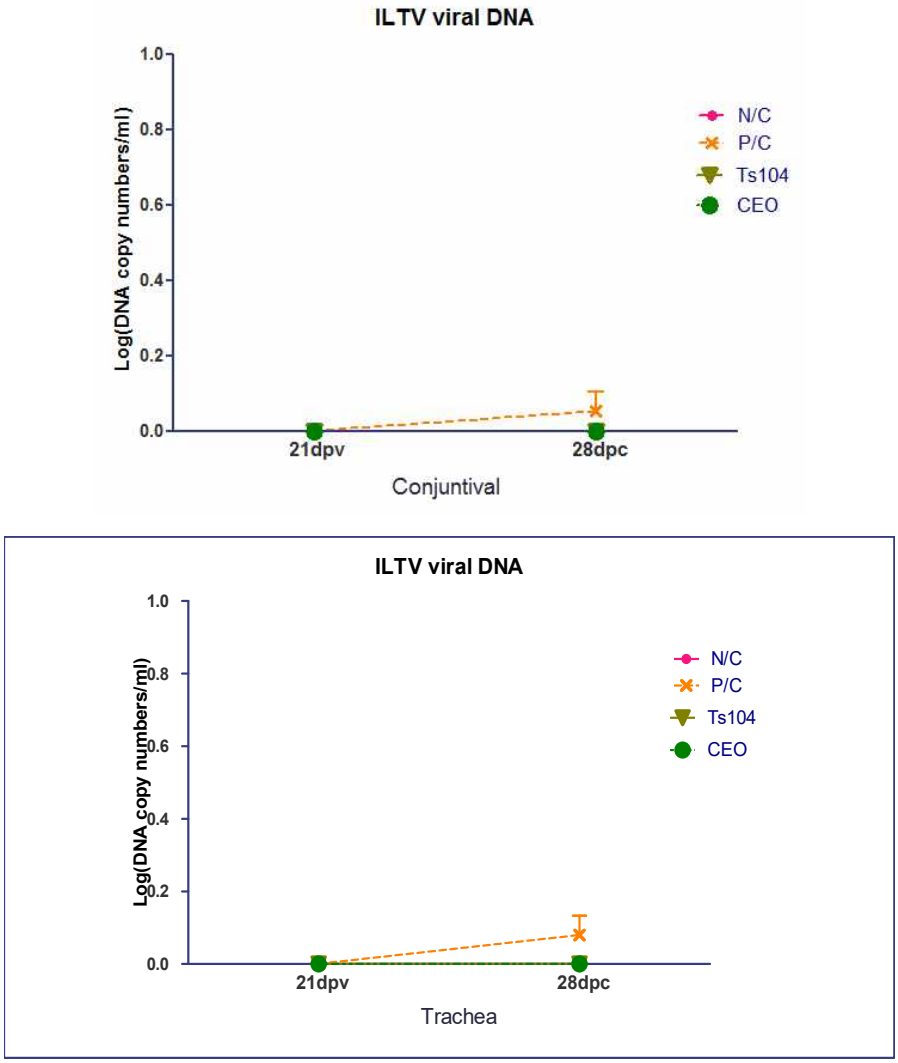
<표 4>

CEO 백신 유래 국내 야외분리주 공격접종 후 임상증상평가

	Wet irritated eyes		**Gasping**		Hemorrhagic mucus	
	vaccination	challenge	vaccination	challenge	vaccination	challenge
N/C[A]	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
P/C[B]	-	0/10	-	4/10	-	2/10
Ts104(10^4EID$_{50}$/ml)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
CEO (10^4EID$_{50}$/ml)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

N/C [A] =negative control group (non-vaccinated and non-challenged)
P/C [B]=positive control group (non-vaccinated and challenged)

▶ CEO 백신 유래 국내 야외분리주를 사용한 공격접종 후에도 백신을 접종하지 않고 공격접종한 그룹에서는 개구호흡과 피가래를 보이는 개체가 관찰되었으나, 모든 백신 그룹에서는 임상증상이나 부검소견이 관찰되지 않았다. <표 4>

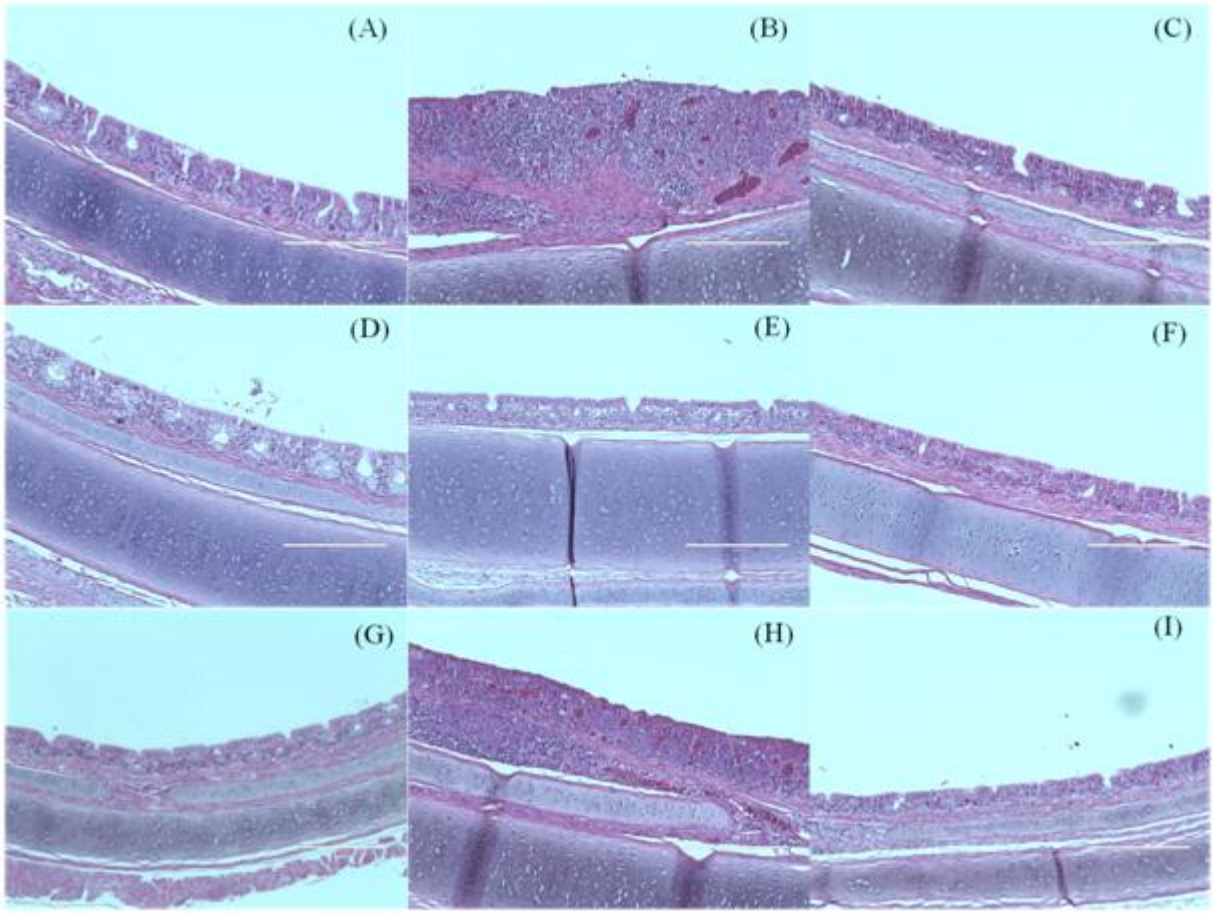


<그림 9> CEO 백신 유래 국내 야외분리주 공격접종 후 viral load 평가

▶ CEO 백신 유래 국내 야외분리주 공격접종 7일 후 백신 접종 그룹에서는 공격접종 바이러스가 결막과 기관에서 발견되지 않았으나, 백신을 접종하지 않은 P/C그룹에서는 낮은 농도의 바이러스가 확인되었다. 이는 TCO 백신이 국내에서 현재 유행하고 있는 CEO 백신 유래 국내 야외분리주를 방어할 수 있음을 보여준다. <그림 9>

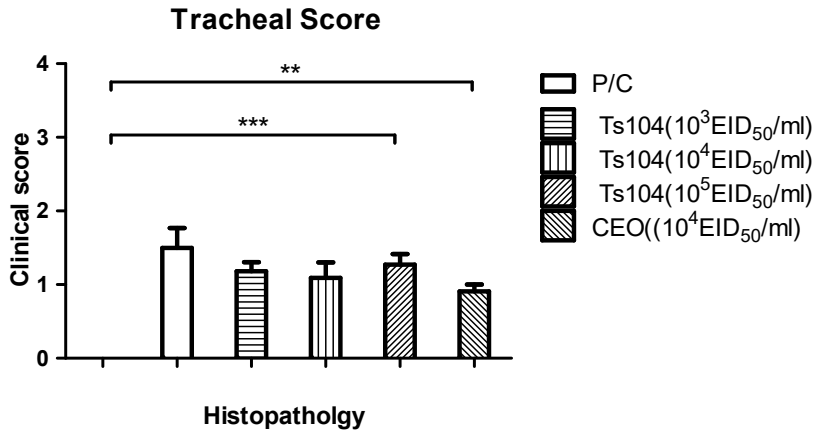
▶ 실험 4주 후, 종료 시 모든 개체들의 기관지의 H&E 염색을 진행하여 스코어링을 하였다. 그 결과 백신 및 공격접종을 안한 N/C그룹의 기관지는 매우 건강한 기관조직을 확인하였다. Ts104그룹들과 기 개발 백신 그룹은 전체적으로 건강한 기관지였고 부분적으로 1~2정도의 염증세포 침윤을 확인할 수 있었다. 백신접종을 하지 않고 공격접종만 진행한 P/C의 기관조직은 대부분의 cilia 소실과 염증세포 침윤을 확인할 수 있었다. 또한 백신을 하지 않고 CEO 백신 유래 국내 야외분리주를 사용하여 공격접종한 경우에도 심각한

염증세포 침윤을 확인하였다. <그림 10, 그림 10-1, 그림10-2, 표 5>

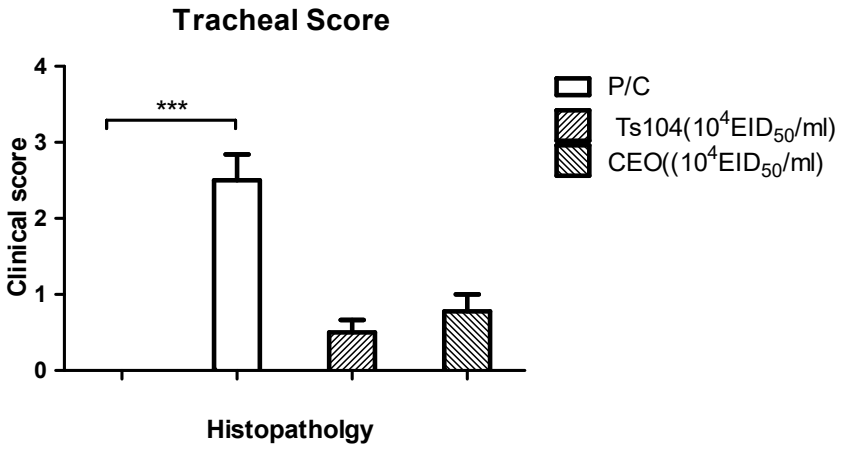


(a) N/C, (B) P/C(parent strain), (C) CEO(parent strain), (D) Ts104 (103EID50/ml), (E) Ts104 (104EID50/ml), (F) Ts104 (105EID50/ml), (G) Ts104(hetero-840032), (H)P/C(hetero-840032), (I) CEO(hetero-840032).

<그림 10> 안전성 및 효능평가종료 후 기관 조직병변 평가



<그림 10-1> Parent strain으로 공격접종 후 기관 조직병변 평가



<그림 10-2> CEO 백신 유래 국내 야외분리주 공격접종 후 기관 조직병변 평가

<표 5>

기관 조직병변 평가기준

inflammatory responses (Inf) grade	기준
1	미약한 염증세포 침윤 및 cilia 약한 손상
2	다소 심한 염증세포 침윤소견 및 일부출혈소견, cilia 절반 소실
3	Trachea 구조다소 손실 및 심한 염증세포 침윤, cilia 대부분 소실
4	Trachea 구조 소실 및 심한 염증세포 침윤, cilia 완전 소실

4. ILT 생독 백신주의 병원성 복귀 시험

▶ 병원성 복귀시험은 실제 백신주가 야외에서 적용하였을 때, 백신 바이러스의 개체 간 전파에 의해 닭에 대한 병원성이 복귀되는지 여부를 확인하기 위한 실험실내 실험이다.

▶ 4주령 SPF 닭 10수에 ILTV 생독 백신주를 점안으로 접종($10^{2.78}$pfu/수)하고 4일 후 Trachea를 scalpel blade 뒷면을 이용하여 scraping하여 시료를 채취한 후 DMED 1ml에 접종하고 상층액 500ul를 모아서 원액을 다시 4주령 SPF 닭 10수에 점안접종하는 방법으로 5회 맹목계대를 실시하였다.

▶ 각 계대마다 ILTV 바이러스의 존재를 확인하기 위하여 PCR을 진행하였다.

▶ 시험결과 5번의 계대를 통하여도 백신바이러스의 병원성이 복귀되지 않음을 확인하였다.

<표4-1. TCO백신 접종 후 병원성 복귀여부 확인>

계대수	접종수	결막염	호흡기 증상	Tracheal score	PCR 결과
1대	10수	0/10	0/10	1	-
2대	10수	0/10	0/10	1	-
3대	10수	0/10	0/10	1	-
4대	10수	0/10	0/10	1	-
5대	10수	0/10	0/10	1	-

<표4-2. Ts백신 접종 후 병원성 복귀여부 확인>

계대수	접종수	결막염	호흡기 증상	Tracheal score	PCR 결과
1대	10수	3/10	0/10	1	-
2대	10수	0/10	0/10	1	-
3대	10수	0/10	0/10	1	-
4대	10수	0/10	0/10	1	-
5대	10수	0/10	0/10	1	-

5. ILT 생독 백신주 경제성 분석

▶ 개발된 ILT 생독 백신은 닭 전염성후두기관염에 대한 효과적인 방어가 가능한 것으로 확인되었다. 이에 따라, 양계농가에서 닭 전염성후두기관염의 감염으로 발생할 수 있는 체중저하, 산란율 저하 및 이차감염과 같은 생산성에 악영향을 미치는 피해 상황을 예방할 수 있을 것으로 판단된다.

▶ 개발된 백신의 후보주는 ILTV 상용백신주 및 야외주가 갖고 있는 다양한 당단백 유전자를 골고루 포함하고 있는 것이 확인되어 서로 다른 두 유전자형의 병원성 ILTV를 교차방어할 수 있으며 현장에서 사용 될 경우 현재 국내에서 사용되고 있는 생독백신을 대체할 수 있을 것은 물론 해외로의 수출을 통해 국내 동물용의약품 생산업체의 경쟁력 향상이 기대된다.

<2세부 : 광범위 교차면역원성 닭 전염성 기관지염 (Infectious bronchitis, IB) 바이러스 예방 백신 개발 및 산업화>

1. IB 생독 백신균주 개발

(1) 우수한 교차방어능을 보이는 야외분리주 (백신후보주) 선발

- 국내에 새롭게 유행하고 있는 QX-like 신장형 IB 바이러스 및 기존에 유행중이던 호흡기형 IB 바이러스 KM91-like IBV 를 포함한 다양한 genotype 의 IBV 야외주를 방어하기 위하여 교차방어능이 가장 우수한 백신주를 선발하였다.

Infection, Genetics and Evolution 11 (2011) 678–685

Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

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

Short communication

An emerging recombinant cluster of nephropathogenic strains of avian infectious bronchitis virus in Korea

Tae-Hyun Lim, Hyun-Jeong Lee, Dong-Hun Lee, Yu-Na Lee, Jae-Keun Park, Ha-Na Youn, Myung-Seob Kim, Joong-Bok Lee, Seung-Yong Park, In-Soo Choi, Chang-Seon Song *

Avian Disease Laboratory, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, 1 Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul 143-701, Republic of Korea

<그림 1>

QX-like strain 과 KM91-like strain 의 재조합에 의해 생성된 K04/09 strain을 분리하여 보고한 본 연구팀의 선행연구 논문 (2011년 게재)

AVIAN DISEASES 57:667–670, 2013

Research Note—

Cross-Protective Immune Responses Elicited by a Korean Variant of Infectious Bronchitis Virus

Byoung-Yoon Kim,[A] Dong-Hun Lee,[A] Jun-Hyuk Jang, Tae-Hyun Lim, Soo-Won Choi, Ha-Na Youn, Jae-Keun Park, Joong-Bok Lee, Seung-Yong Park, In-Soo Choi, and Chang-Seon Song[B]

Avian Disease Laboratory, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, 1 Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul 143-701, Republic of Korea

Received 27 February 2013; Accepted 29 April 2013; Published ahead of print 29 April 2013

<그림 2>

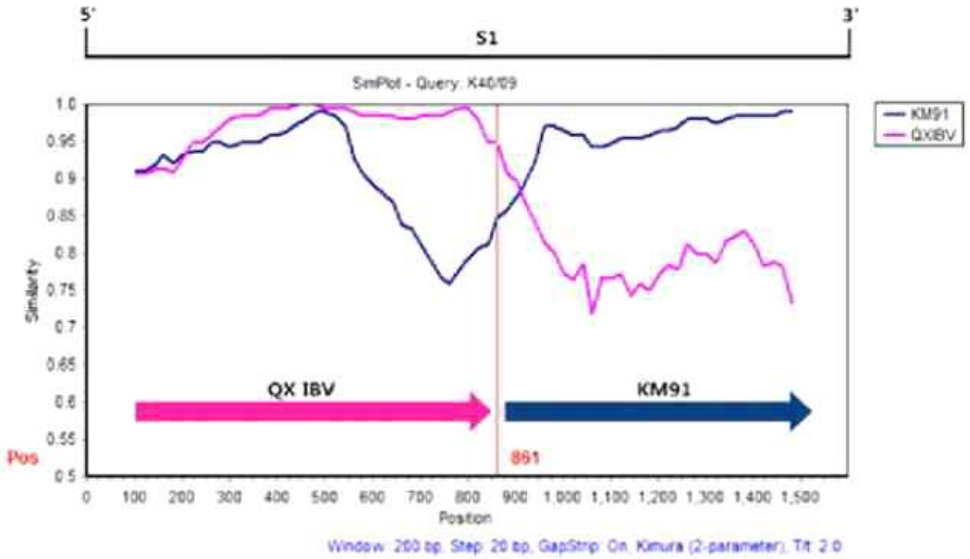
QX-like strain을 포함하여 국내에 유행중인 다양한 종류의 IBV 야외주에 광범위한 방어능을 제공하는 백신주인 K04/09 strain 의 교차 방어능을 평가하여 생독 백신균주로써의 가능성을 평가한 본 연구팀의 선행연구 논문 (2012년 게재)

Table 2. Protective effects in 3-wk-old SPF chickens immunized with K40/09 against challenge with seven different IBV strains.

Challenge virus genotype	Challenge IBV strain	No. of challenge virus isolated/no. of birds challenged[A]			
		Trachea		Kidney	
		Control	Immunized	Control	Immunized
Mass	M41	10/10	3/10**	10/10	0/10***
Korean I (B4-like)	K107/04	10/10	0/10***	10/10	1/10***
Korean II subgroup 1	KM91	10/10	1/10***	10/10	0/10***
Korean II subgroup 2 (QX-like)	K1277/03	10/10	0/10***	10/10	1/10***
Korean new genetic cluster 1	K40/09	10/10	1/10***	10/10	1/10***
Korean new genetic cluster 2	K26/10	10/10	0/10***	7/10	1/10*
4/91	4/91	10/10	3/10**	4/10	2/10

[A]Five days after challenge protection was evaluated by the absence of challenge virus in the kidney and trachea.
*$P < 0.01$, by Fisher exact test, compared to nonvaccinated control group.
**$P < 0.005$, by Fisher exact test, compared to nonvaccinated control group.
***$P < 0.001$, by Fisher exact test, compared to nonvaccinated control group.

<표 1> 백신주인 K04/09 strain 의 교차 방어능 평가결과



<그림 3> QX-like 및 KM91-like strain 의 재조합에 의해 생성된 K04/09 strain 의 S1 유전자 분석결과

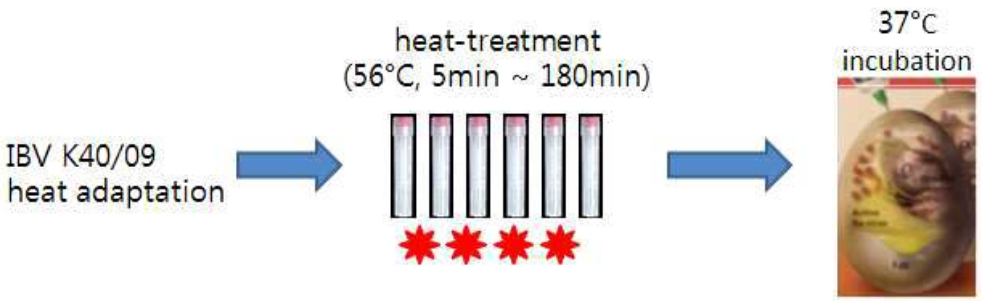
특히 <그림 3> 과 같이 K40/09 균주의 경우 QX-like 및 KM91-like IBV 의 재조합에 의하여 생성된 chimeric IBV 로써 그 유래 및 유전자 서열이 독특하여 해외 백신생산 업체의 음성적 사용을 방지 할 수 있어 수출 시 국내 기업의 권리 보호에 많은 도움을 줄 것으로 기대된다.

(2) 선발된 백신후보주 열처리 과정을 통한 바이러스의 약독화

- 분리된 IBV K40/09주를 생독백신주로 사용하기 위하여 10일령 SPF 계태아에 연속계대

배

양함으로서 바이러스 본연의 병원성을 약독화아였다. 약독화를 위한 계태아 연속계대 배양 사이에 Jackwood 등이 기술한 방법과 같이 (Rapid heat-treatment attenuation of infectious bronchitis virus, Avian Pathology (June 2010) 39(3), 227-233) 56℃ 의 온도로 열처리를 하여 바이러스 본연의 병원성이 약화될 때까지 반복하여 K40/09 하이 패시지 주를 확보하였다.

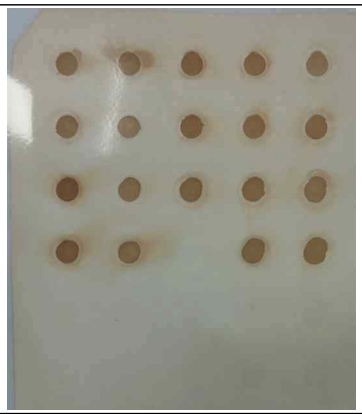


<그림 4> K40/09 백신주의 약독화를 위한 heat-adaptation 종란계대법

(3) IB 생독백신역가 확인시험

① 종란계대 및 증식시험

▶ IB K40/09 하이패시지 백신주의 함량을 확인하기 위하여 역가확인시험을 실시하였다. 백신을 인산완충용액으로 10-8까지 10진 희석한다. 10-3부터 10-8까지의 희석액을 5개의 10일령 발육계란의 장요막강 내에 0.1㎖ 접종하고, 접종 후 24시간 이내에 폐사한 것은 제외하고 24시간 이후에 폐사한 것 IB 바이러스에 의한 폐사임을 확인하고 72시간 후에 생존한 것에 대하여는 장요막강액을 채취하여 SPF 종란 50%를 감염시킬 수 있는 (EID50/ml) 바이러스 역가를 Dot-Imuunoblotting assay를 통해 확인하였다. IB K40/09 하이패시지 백신주를 동결건조하였을때 이를 3회 반복 실험하여 증식된 IBV K40/09 하이패시지의 평균역가를 측정하였다. 실험결과 IBV K40/09 하이패시지 백신주는 SPF 종란에서 평균 $10^{8.4}$EID50/병 역가로 증식됨을 확인하였다.

10^{-3}		IBV K40/09 하이패시지 동결건조 후 역가 $10^{8.4}$EID50/병
10^{-4}		
10^{-5}		
10^{-6}		
10^{-7}		
10^{-8}		

<그림 5>

증식된 IBV K40/09 백신주의 Dot-Imuunoblotting assay를 통한 역가 확인 시험

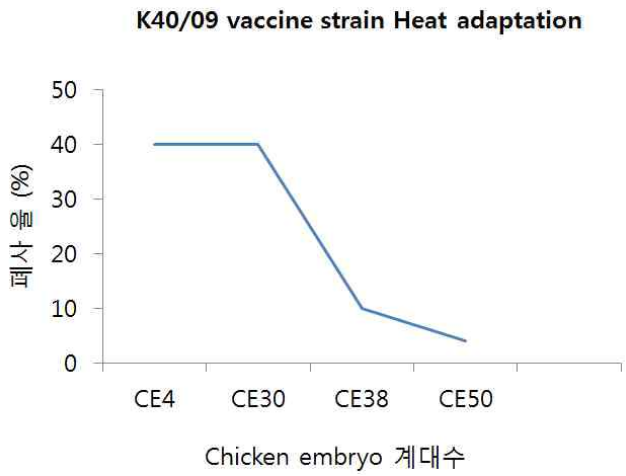
(4) IB 생독 백신 안전성

① 시험 방법

▶ 계대 횟수 별 약독화된 바이러스의 안전성 평가는1일령 SPF병아리 수당 IBV 104.5EID50

씩 SK-MO-Autu-3000 (쓰리샤인, 입자 사이즈 50um) 의 입자 크기로 분무하였다. 계대 별 분무 후 2주간 폐사율을 비교하여 K40/09 하이 패시지 주의 안전성을 확인하였다. (그림 6)

▶ 약독화된 바이러스의 평가는 1일령 SPF병아리 및 1일령 육계병아리에 수당 IBV $10^{4.5}EID_{50}$씩 SK-MO-Autu-3000 (쓰리샤인, 입자 사이즈 50um) 의 입자 크기로 분무하였다. 바이러스 약독화의 평가는 증류수를 분무한 음성대조군, 계대배양이 되지 않은 K40/09 로우 패시지 주, 계대 배양 된 K40/09 하이 패시지 주를 각각 분무한 후 2주간 폐사율을 비교하여 K40/09 하이 패시지 주의 안전성을 확인하였다. (표 2)



<그림 6> 계대 횟수 별 안전성 평가

축 종	분무	2주간 폐사수수/전체수수(%)
1일령 SPF 병아리	K40/09 로우 패시지	4/20 (20%)
	K40/09 하이 패시지	0/20 (0%)
	음성대조군	0/20 (0%)
1일령 육계병아리	K40/09 하이 패시지	0/20 (0%)
	음성 대조군	0/20 (0%)

<표2> K40/09 하이 패시지 1일령 분무 시 안전성 시험

② 시험 결과

▶ K40/09 주의 종란 계대 별 약독화 여부 평가 결과 heat-adaptation을 사용한 계대가 반복

될수록 K40/09 백신주의 병원성이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다.

▶ 안전성이 확인된 K40/09 하이 패시지 주의 열 저항성을 기존 개발백신과의 차이를 확인하기 위하여, 기존 백신주인 IBV K2p172주, IBV K40/09 로우 패시지 주 그리고 IBV K40/09 하이 패시지 주를 56℃에 반응 시킨 후, 10일령 SPF 발육란에 접종하여 바이러스의 56℃에서의 생존능을 확인하였다. 시험 결과 하이 패시지 주는 120분 이후로는 생존성이 떨어진 반면, 하이 패시지 주는 450분까지 생존성이 확인되어 K40/09 하이 패시지 주의 내열성을 확인하였다. (표 3)

바이러스	56℃ 열처리 시간 (분)					
	30	60	120	180	~	450
K2 하이패시지	생존	생존	생존	-	-	-
K40/09 로우패시지	생존	생존	생존	-	-	-
K40/09 하이패시지	생존	생존	생존	생존	생존	생존

<표 3> IBV K40/09 의 내열성

(5) 기존백신과 약독화 K40/09 백신주의 1일령 SPF 병아리에서의 안전성 비교시험

① 시험 방법

▶ 약독화 K40/09 백신주의 계대 별 1일령의 SPF 병아리에 분무접종하여 ($10^{4.5}$EID50/수) 국내에서 상용하고 있는 생독 백신주 신장형 IB K2 백신주와 안전성을 비교하였다. 시험 방

법은 총 40수의 1일령 SPF 병아리를 10수씩 4개의 그룹으로 구분한 다음 SK-MO-Autu-3000 (쓰리샤인, 입자 사이즈 50um)로 분무접종 후 14일간 호흡기 증상, 폐사율 등의 임상증상을 관찰하였다.

② 시험 결과

▶ 바이러스 약독화의 평가는 증류수를 분무한 음성대조군, 계대배양이 되지 않은 K40/09 로우 패시지 주, 계대배양된 K40/09 하이 패시지 주를 각각 분무한 후 2주간 폐사율을 비교하여 K40/09 하이 패시지 주의 안전성을 확인하였다(표4).

축종	분무	2주간 폐사수수/전체수수(%)
1일령 SPF 병아리	K2 하이패시지	0/10 (0%)
	K40/09 로우패시지	4/10 (40%)
	K40/09 하이패시지	0/10 (0%)
	음성대조군	0/10 (0%)

<표4> K40/09 백신주와 기존 생독 백신주의 약독화의 평가

(6) 기존백신과 약독화 K40/09 백신주의 1일령 육계 병아리에서의 안전성 비교시험

① 시험 방법

▶ 약독화 K40/09 백신주의 계대 별 1일령의 육계 병아리에 분무접종 하여 ($10^{4.5}$EID50/수)

국내에서 상용하고 있는 생독 백신주 신장형 IB K2 백신주와 안전성을 비교하였다. 시험 방법은 총 40수의 1일령 육계 병아리를 10수씩 4개의 그룹으로 구분한 다음 SK-MO-Autu-3000 (쓰리샤인, 입자 사이즈 50um)로 분무접종 후 14일간 호흡기 증상, 폐사율 등의 임상증상을 관찰하였다.

② 시험 결과

▶ 바이러스 약독화의 평가는 증류수를 분무한 음성대조군, 계대배양이 되지 않은 K40/09 로우 패시지 주, 계대배양된 K40/09 하이 패시지 주를 각각 분무한 후 2주간 폐사율을 비교하여 K40/09 하이 패시지 주의 안전성을 확인하였다(표5).

축종	분무	2주간 폐사수수/전체수수(%)
1일령 육계 병아리	K2 하이패시지	0/10 (0%)
	K40/09 로우패시지	2/10 (20%)
	K40/09 하이패시지	0/10 (0%)
	음성대조군	0/10 (0%)

<표5> K40/09 백신주와 기존 생독 백신주의 약독화의 평가

2. IB 생독 백신 개발 및 효능평가

(1) 국가검정기준에 의한 IBV 바이러스에 대한 면역원성 시험 및 방어효능시험

① 시험 방법

▶ IB 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 농림수산검역검사본부 고시 국가검정 동물용

의약품 검정기준에 의거한 혈청 역가시험을 실시하였다. 총 90수의 3주령 SPF 병아리를 30수씩 3개의 그룹으로 구분한 다음 1수분씩 점안으로 접종한다. 백신 접종 후 3주 후 채혈하여 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화 한 후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화한다. 중화 후 바이러스 함량시험법에 따라 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 계란의 장뇨막강액을 채취하여 Dot immunoblotting 을 통해 중화지수를 산출한다. 그리고 IBV에 대한방어능을 확인하기 위하여 백신접종 3주 후, 3종의 공격접종용 바이러스 국내 유행 신장형 바이러스인 KM91(KoreanⅡsubgroup 1), QXIBV주(KoreanⅡsubgroup 2) 및 K40/09주 (Korean New Genetic Cluster 1)를 마리당 $10^{4.5}$EID50을 점안으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장에서의 바이러스 재분리를 통한 방어능을 평가하였다. 또한, 3종 IB 공격접종 바이러스 재분리 시 기관 및 신장의 조직을 채취하여 공격접종 5일 후의 조직학적검사 결과를 평가하였다.

② 시험 결과

▶ 표 와 같이 중화시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였으며, 그림 10과 같이 공격접종 시험에서도 뛰어난 교차방어능을 보였다. 농림수산검역검사본부 고시 국가검정 동물용의 약품 검정기준에 고시된 바에 의하면 대조군의 혈청으로 한 중화지수와 백신군의 혈청으로 한 중화지수가 2.0 이상이 차이가 나야하는데, 모든 백신 시험군에서 2.0 이상차이를 확인하였다(표6).

▶ K40/09 하이패시지주 생독백신의 교차면역원성을 검정하기 위하여 IBV 공격접종 5일후 부검을 통하여 기관 및 신장을 채취하고 이들 장기로부터 공격접종 바이러스를 재분리 함으로써 백신의 교차 방어능을 평가한 결과 3종의 공격접종용 바이러스 국내 유행 신장형바이러스인 KM91(KoreanⅡsubgroup 1), QXIBV주(KoreanⅡsubgroup 2) 및 K40/09주(Korean New Genetic Cluster 1)에 대하여 높은 교차 방어율을 보인 것을 확인 할 수 있었다(표7).

▶ 또한, 3종 IB 공격접종 바이러스 재분리 시 기관 및 신장의 조직을 채취하여 공격접종 5일 후의 조직학적 검사 결과(염증 지수)(그림7) 및 기관의 섬모 소식지수(그림8)를 판단한 결과 대조군에 비하여 기관의 조직 병변 감소 및 섬모 소실 지수를 확인할 수 있었다.

시험백신	시험계수수	IBV 중화지수
K40/09 로우패시지	10	3.8
K40/09 하이패시지	10	3.6
대조군 (SPF)	10	0

<표6> 점안 백신 21일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 IB 바이러스에 대한 중화지수

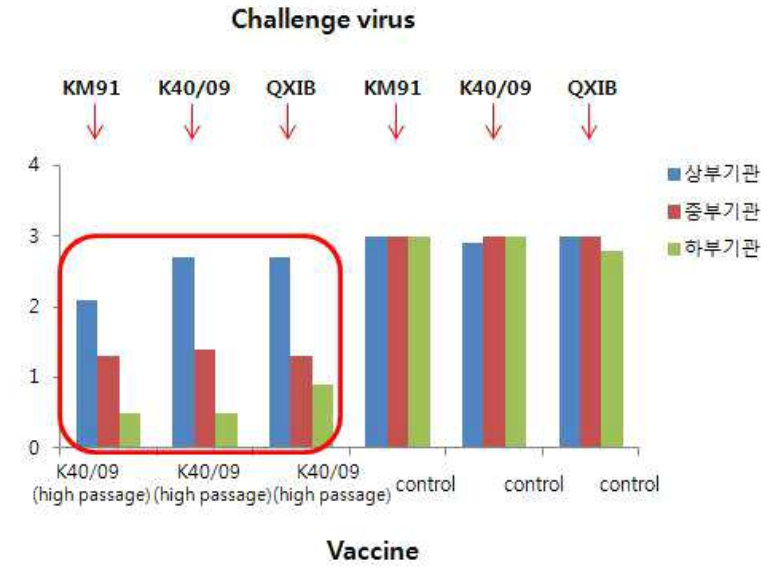
시험백신	공격접종균주	시험계수수	공격접종 후 전염성기관지염 바이러스 재분리비율[A]	
			기관[B]	신장[C]
K40/09 로우패시지	KM91	10	0/10	2/10
	K40/09	10	0/10	0/10
	QXIB	10	0/10	1/10
K40/09 하이패시지	KM91	10	0/10	0/10
	K40/09	10	0/10	0/10
	QXIB	10	1/10	0/10
대조군	KM91	10	10/10	9/10
대조군	K40/09	10	10/10	10/10
대조군	QXIB	10	10/10	10/10

[A]그룹별로 시험계의 기관 및 신장 유제액을 각각 종란에 접종한 후 장기별 증식억제효능을 Dot-Immunoblotting assay 방법으로 확인함

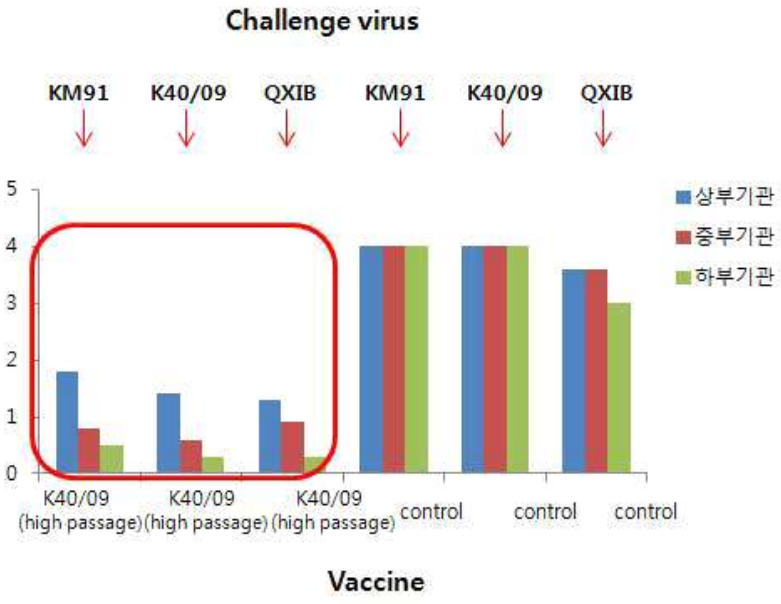
[B]그룹별로 시험계의 기관을 채취하여 종란에 접종한 후 전염성기관지 바이러스의 증식여부를 판단함: Dot-Immunoblotting assay 양성반응 샘플 수/검사 샘플 수

C그룹별로 시험계의 신장을 채취하여 종란에 접종한 후 전염성기관지 바이러스의 증식여부를 판단함: Dot-Immunoblotting assay 양성반응 샘플 수/검사 샘플 수

<표7> 점안 백신 21일 후 3종 IB 바이러스 교차방어 비교 실험



<그림7> 3종 IB 바이러스 공격접종 후 기관 조직병변지수



<그림8> 3종 IB 바이러스 공격접종 후 기관 섬모소실지수

(2) 초생추 분무 접종을 통한 IBV 바이러스에 대한 면역원성 시험 및 방어효능시험

① 시험 방법

▶ IB 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 농림수산검역검사본부 고시 국가검정 동물용

의약품 검정기준에 의거한 혈청 역가시험을 실시하였다. 총 90수의 1일령 SPF 병아리를 30

수씩 3개의 그룹으로 구분한 다음 10수분씩 국내에서 사용하는 50μm 분무입자 크기의 케비넷형 분무기 (SK-MO-Auto-3000, 쓰리샤인, 한국)를 이용하여 고운분무로 접종한다.
백신 접종 후 3주 후 채혈하여 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화 한 후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화한다. 중화 후 바이러스 함량시험법에 따라 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 계란의 장뇨막강액을 채취하여 Dot immunoblotting 을 통해 중화지수를 산출한다.
그리고 IBV에 대한 방어능을 확인하기 위하여 백신접종 3주 후, 3종의 공격접종용 바이 러스 국내 유행 신장형 바이러스인 KM91(KoreanⅡsubgroup 1), QXIBV주(KoreanⅡsubgroup 2) 및 K40/09주(Korean New Genetic Cluster 1)를 마리당 $10^{4.5}EID_{50}$을 점안으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장에서의 바이러스 재분리를 통한 방어능을 평가하였다.

② 시험 결과

▶ 표 와 같이 중화시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였으며, 그림 10과 같이 공격접종 시험에서도 뛰어난 교차방어능을 보였다. 농림수산검역검사본부 고시 국가검정 동물용 의약품 검정기준에 고시된 바에 의하면 대조군의 혈청으로 한 중화지수와 백신군의 혈청으로 한 중화지수가 2.0 이상이 차이가 나야하는데, 모든 백신 시험군에서 2.0 이상차이를 확인하였다 (표8).

시험백신	시험계수수	IBV 중화지수
K40/09 로우패시지	10	3.2
K40/09 하이패시지	10	3.0
대조군 (SPF)	10	0

<표8> 분무 백신 21일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 IB 바이러스에 대한 중화지수

시험백신	공격접종균주	시험계수수	공격접종 후 전염성기관지염 바이러스 재분리비율[A]	
			기관[B]	신장[C]
K40/09 로우패시지	KM91	10	0/8	0/8
	K40/09	10	0/7	1/7
	QXIB	10	0/8	1/8
K40/09 하이패시지	KM91	10	0/10	0/10
	K40/09	10	0/10	0/10
	QXIB	10	0/10	0/10
대조군	KM91	10	10/10	9/10
대조군	K40/09	10	10/10	10/10
대조군	QXIB	10	10/10	10/10

[A]그룹별로 시험계의 기관 및 신장 유제액을 각각 종란에 접종한 후 장기별 증식억제효능을 Dot-Immunoblotting assay 방법으로 확인함

[B]그룹별로 시험계의 기관을 채취하여 종란에 접종한 후 전염성기관지 바이러스의 증식여부를 판단함: Dot-Immunoblotting assay 양성반응 샘플 수/검사 샘플 수

[C]그룹별로 시험계의 신장을 채취하여 종란에 접종한 후 전염성기관지 바이러스의 증식여부를 판단함: Dot-Immunoblotting assay 양성반응 샘플 수/검사 샘플 수

<표9>분무 백신 21일 후 3종 IB 바이러스 교차방어 비교 실험

(3) 1일령 육계 분무 접종을 통한 IBV 바이러스에 대한 면역원성 시험 및 방어효능시험

① 시험 방법

▶ K40/09 하이패시지의 IB 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 농림수산검역검사본부

고시 국가검정 동물용의약품 검정기준에 의거한 혈청 역가시험을 실시하였다. 33수 중 1일령 육계 병아리를 11수씩 3개의 그룹으로 구분한 다음 10수분씩 국내에서 사용하는 50μm 분무입자 크기의 케비넷형 분무기 (SK-MO-Auto-3000, 쓰리샤인, 한국)를 이용하여 고운 분무로 접종한다. IBV에 대한 방어능을 확인하기 위하여 백신접종 3주 후, 3종의 공격접종용 바이러스 국내 유행 신장형 바이러스인 KM91(KoreanⅡsubgroup 1), QXIBV주(KoreanⅡsubgroup 2) 및 K40/09주(Korean New Genetic Cluster 1)를 마리당 $10^{4.5}EID_{50}$을 점안으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장에서의 바이러스 재분리를 통한 방어능을 평가하였다. 또한, 3종 IB 공격접종 바이러스 재분리 시 기관 및 신장의 조직을 채취하여 공격접종 5일 후의 조직학적 검사 결과를 평가하였다.

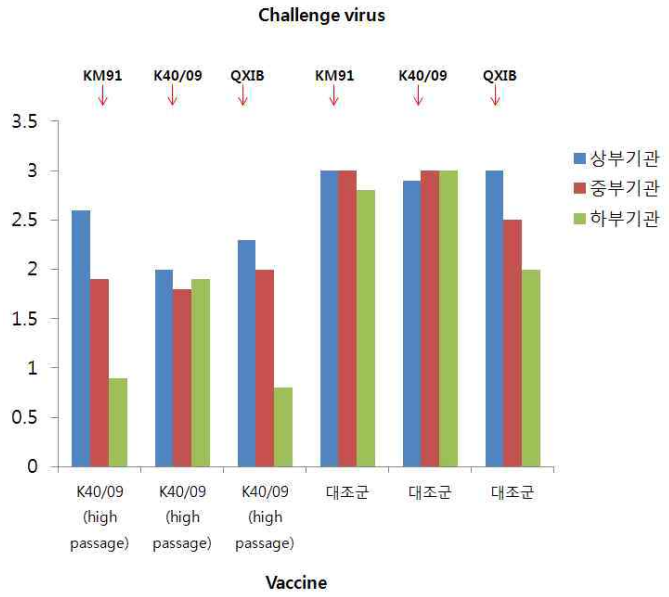
시험백신	공격접종균주	시험계수수	공격접종 후 전염성기관지염 바이러스 재분리비율[A]	
			기관[B]	신장[C]
K40/09 하이패시지	KM91	11	5/11	3/11
	K40/09	11	2/11	1/11
	QXIB	11	5/11	1/11
대조군	KM91	10	10/10	8/10
대조군	K40/09	10	10/10	10/10
대조군	QXIB	10	10/10	10/10

[A]그룹별로 시험계의 기관 및 신장 유제액을 각각 종란에 접종한 후 장기별 증식억제효능을 Dot-Immunoblotting assay 방법으로 확인함

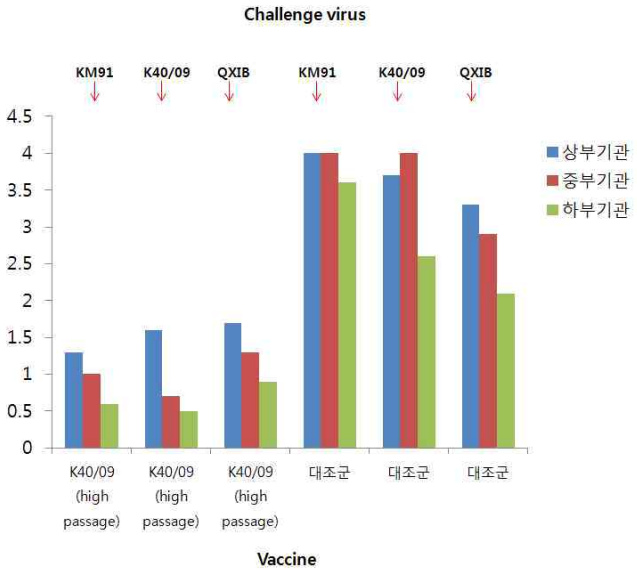
[B]그룹별로 시험계의 기관을 채취하여 종란에 접종한 후 전염성기관지 바이러스의 증식여부를 판단함: Dot-Immunoblotting assay 양성반응 샘플 수/검사 샘플 수

[C]그룹별로 시험계의 신장을 채취하여 종란에 접종한 후 전염성기관지 바이러스의 증식여부를 판단함: Dot-Immunoblotting assay 양성반응 샘플 수/검사 샘플 수

<표10> 분무 백신 21일 후 3종 IB 바이러스 교차방어 비교 실험



<그림9> 3종 IB 바이러스 공격접종 후 기관 조직병변지수



<그림10> 3종 IB 바이러스 공격접종 후 기관 섬모소실지수

3. IB 생독 백신 시제품 제작 및 효능평가

(1) IBV K40/09 생독백신 시제품 제작

- 본 연구개발 사업을 통하여 개발된 광범위 교차 면역원성 IB 생독백신 K40/09 균주 및 백신 생산기술을 녹십자수의약품, 대성미생물연구소, 고려비엔피에 기술이전 하여 백신 시제품을 제작하였다.

<그림1>

K40/09 업체별 백신 시제품 (녹십자수의약품, 대성미생물연구소, 고려비엔피)

(2) IBV K40/09 생독백신 시제품의 1일령 SPF 병아리에서의 안전성 시험

① 시험 방법

- K40/09 시재품을 1일령의 SPF 병아리에 마리당 10수분 분무 접종하여 ($10^{4.5}$ EID50/수) 국내에서 상용하고 있는 생독 백신주 호흡기형 IBV H120 생독백신과 안전성을 비교하였다. 시험 방법은 총 50수의 1일령 SPF 병아리를 10수씩 5개의 그룹으로 구분한 다음 SK-MO-Auto-3000 (쓰리샤인, 입자 사이즈 50㎛)로 분무접종 하였다. 분무접종 5일 후 모든 시험계를 안락사하여 기관 및 신장을 채취하여 중성 포르말린에 고정하였다. 기관은 상부, 중부, 하부로 나누어 조직학적 검사를 실시하였다.

② 시험 결과

- 백신 분무접종 5일 후 기관 및 신장의 조직을 채취하여 조직학적 검사를 진행한 결과 시제품 K40/09 백신이 대조백신(H120)에 비하여 조직병변지수(표1) 및 섬모손실지수(표2)가 유사하거나 적은 것으로 확인할 수 있었다.

<표1>

K40/09 시제품과 기존 생독백신주(H120)의 조직학적 검사

시험 백신	조직학적 검사[A]				임상증상[B]	폐사
	상부기관	중부기관	하부기관	신장		
녹십자수의약품 시제품	2.1	1.3	1.4	0.4	0/10	0/10
대성미생물연구소 시제품	2.3	1.6	1.5	0.7	0/10	0/10
고려비엔피 시제품	2.1	1.1	1.1	0.4	0/10	0/10
H120 생독백신	2.1	1.8	1.1	0.2	0/10	0/10
음성대조	0.0	0.0	0.0	0.3	0/10	0/10

[A]시험백신 접종 5일 후 채취한 기관 및 신장의 조직학적 병변지수 (0, normal; 1, extensively focal; 2, multifocal; 3, diffuse)

[B]백신 실시 후 5일 동안 임상증상 발현 수수/ 총 시험 수수

<표2>

K40/09 시제품과 기존 생독백신주(H120)의 섬모소실 지수 평가

시험 백신	섬모소실 검사[A]		
	상부기관	중부기관	하부기관
녹십자수의약품 시제품	1.6	1.6	1.7
대성미생물연구소 시제품	2.3	2.9	1.9
고려비엔피 시제품	1.9	1.3	1.4
H120 생독백신	2.1	1.8	1.1
음성대조	0.0	0.0	0.0

[A]백신 접종 5일 후 채취한 기관의 섬모소실 병변 지수

(0, normal cillia, 1, =<25% cilia danaged, 2, =<50%, 3, =<75%, 4, =>75%)

(3) IBV K40/09 생독백신 시제품의 1일령 SPF 병아리에서의 면역원성 시험 및 방어효능시험

① 시험 방법

- K40/09 시제품의 1일령 SPF 병아리에서 IB 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용 의약품 검정기준에 의거한 혈청 역가시험을 실시하였다. 총 40수의 1일령 SPF 병아리를 10수씩 4개의 그룹으로 구분한 다음 시제품 백신을 1수분씩 국내에서 사용하는 50μm 분무입자 크기의 케비넷형 분무기 (SK-MO-Auto-3000,

쓰리샤인, 한국)를 이용하여 고운분무로 접종한다. 백신 접종 3주 후 채혈하여 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화 한 후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화한다. 중화 후 바이러스 함량시험법에 따라 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 발육계란의 장뇨막강액을 채취하여 Dot immunoblotting을 통해 중화지수를 산출한다. 그리고 IBV에 대한 방어능을 확인하기 위하여 백신접종 3주 후, 공격접종용 바이러스 K40/09주(Korean New Genetic Cluster 1)를 마리당 $10^{4.5}$EID50을 점안으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장에서의 바이러스 재분리를 통한 방어능을 평가하였다.

② 시험 결과

- K40/09 시제품은 중화시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였으며, 공격접종 시험에서도 뛰어난 방어능을 보였다(표3). 모든 시제품 백신 시험군의 혈청의 중화지수가 2.0 이상임을 확인하여, IBV 생독백신에 대한 국가검정기준에 적합함을 확인하였다(표4).

<표3>

K40/09 시제품 분무 백신 21일 후 IBV에 대한 방어능 확인시험

시험백신	공격접종 균주	시험계 수수	IB 바이러스 재분리율[A]	
			기관[B]	신장[C]
녹십자수의약품 시제품	K40/09	10	0/10	0/10
대성미생물연구소 시제품	K40/09	10	0/10	0/10
고려비엔피 시제품	K40/09	10	0/10	0/10
대조군	K40/09	10	10/10	10/10

[A]그룹별로 시험계의 기관 및 신장 유제액을 각각 종란에 접종한 후 장기별 증식억제 효능을 Dot-Immunoblotting assay 방법으로 확인함

[B]그룹별로 시험계의 기관을 채취하여 종란에 접종한 후 전염성기관지염 바이러스의 증식여부를 판단함: Dot-Immunoblotting assay 양성반응 샘플 수/검사 샘플 수

[C]그룹별로 시험계의 신장을 채취하여 종란에 접종한 후 전염성기관지염 바이러스의 증식여부를 판단함: Dot-Immunoblotting assay 양성반응 샘플 수/검사 샘플 수

<표4>

K40/09 시제품 분무 백신 21일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 IBV에 대한 중화지수

시험 백신	시험계 수수	IBV 중화지수
녹십자수의약품 시제품	10	2.5
대성미생물연구소 시제품	10	2.7
고려비엔피 시제품	10	2.8

대조군	10	0

(4) IBV K40/09 생독백신 시제품의 1일령 SPF 병아리에서의 교차면역원성 시험 및 방어효능시험

① 시험 방법

- 녹십자수의약품 K40/09 시제품의 1일령 SPF 병아리에서 IB 바이러스에 대한 교차면역원성을 확인하기 위하여 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용 의약품 검정기준에 의거한 혈청 역가시험을 실시하였다. 총 60수의 1일령 SPF 병아리를 10수씩 6개의 그룹으로 구분한 다음 시제품 백신을 1수분씩 국내에서 사용하는 50μm 분무입자 크기의 케비넷형 분무기(SK-MO-Auto-3000, 쓰리샤인, 한국)를 이용하여 고운분무로 접종한다. 백신 접종 3주 후 채혈하여 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화 한 후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화한다. 중화 후 바이러스 함량시험법에 따라 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양한다. 접종 3일 후에 접종한 발육계란의 장뇨막강액을 채취하여 Dot immunoblotting을 통해 중화지수를 산출한다. 그리고 IBV에 대한 방어능을 확인하기 위하여 백신접종 3주 후, 3종의 공격접종용 바이러스 국내 유행 신장형 바이러스인 KM91(KoreanⅡsubgroup 1), QXIBV주(KoreanⅡsubgroup 2) 및 K40/09주(Korean New Genetic Cluster 1)를 마리당 $10^{4.5}$EID50을 점안으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장에서의 바이러스 재분리를 통한 방어능을 평가하였다.

② 시험 결과

- 녹십자수의약품 K40/09 시제품은 중화시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였으며, 공격접종 시험에서도 뛰어난 교차방어능을 보였다(표5). 시제품 백신 시험군의 혈청의 중화지수가 2.0 이상으로 확인되어, IBV 생독백신에 대한 국가검정기준에 적합함을 확인하였다(표6).

<표5>

녹십자수의약품 K40/09 시제품 분무 백신 21일 후 IBV에 대한 교차방어능 확인시험

시험백신	공격접종 균주	시험계 수수	IB 바이러스 재분리율[A]	
			기관[B]	신장[C]
녹십자수의약품 시제품	KM91	10	2/10	0/10

녹십자수의약품 시제품	K40/09	10	0/10	0/10
녹십자수의약품 시제품	QXIBV	10	0/10	0/10
대조군	KM91	10	10/10	10/10
대조군	K40/09	10	10/10	10/10
대조군	QXIBV	10	10/10	10/10

[A]그룹별로 시험계의 기관 및 신장 유제액을 각각 종란에 접종한 후 장기별 증식억제 효능을 Dot-Immunoblotting assay 방법으로 확인함

[B]그룹별로 시험계의 기관을 채취하여 종란에 접종한 후 전염성기관지염 바이러스의 증식여부를 판단함: Dot-Immunoblotting assay 양성반응 샘플 수/검사 샘플 수

[C]그룹별로 시험계의 신장을 채취하여 종란에 접종한 후 전염성기관지염 바이러스의 증식여부를 판단함: Dot-Immunoblotting assay 양성반응 샘플 수/검사 샘플 수

<표6>

녹십자수의약품 K40/09 시제품 분무 백신 21일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 IBV에 대한 중화지수

시험 백신	시험계 수수	IBV 중화지수
녹십자수의약품 시제품	10	2.5
대조군	10	0

(5) K40/09 시제품의 3주령 SPF 닭에서의 면역원성 시험 및 방어효능시험

① 시험 방법

- K40/09 시제품의 3주령 SPF 닭에서 IB 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용 의약품 검정기준에 의거한 혈청 역가시험을 실시하였다. 총 40수의 3주령 SPF 닭을 10수씩 4개의 그룹으로 구분한 다음 시제품 백신을 1수분씩 음수 접종하였다. 백신 접종 3주 후 채혈하여 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화 한 후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화하였다. 중화 후 바이러스 함량시험법에 따라 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양하였다. 접종 3일 후에 접종한 발육계란의 장뇨막강액을 채취하여 Dot immunoblotting을 통해 중화지수를 산출하였다. 그리고 IBV에 대한 방어능을 확인하기 위하여 백신접종 3주 후, 공격접종용 바이러스 K40/09주(Korean New Genetic Cluster 1)를 마리당 $10^{4.5}$EID50을 점안으로 공

격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장에서의 바이러스 재분리를 통한 방어능을 평가하였다.

② 시험 결과

- K40/09 시제품은 중화시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였으며, 공격접종 시험에서도 뛰어난 방어능을 보였다(표7). 모든 시제품 백신 시험군의 혈청의 중화지수가 2.0 이상임을 확인하여, IBV 생독백신에 대한 국가검정기준에 적합함을 확인하였다(표8).

<표7>

K40/09 시제품 음수 백신 21일 후 IBV에 대한 방어능 확인시험

시험백신	공격접종 균주	시험계 수수	IB 바이러스 재분리율[A]	
			기관[B]	신장[C]
녹십자수의약품 시제품	K40/09	10	0/10	0/10
대성미생물연구소 시제품	K40/09	10	0/10	0/10
고려비엔피 시제품	K40/09	10	0/10	0/10
대조군	K40/09	10	10/10	10/10

[A]그룹별로 시험계의 기관 및 신장 유제액을 각각 종란에 접종한 후 장기별 증식억제 효능을 Dot-Immunoblotting assay 방법으로 확인함

[B]그룹별로 시험계의 기관을 채취하여 종란에 접종한 후 전염성기관지염 바이러스의 증식여부를 판단함: Dot-Immunoblotting assay 양성반응 샘플 수/검사 샘플 수

[C]그룹별로 시험계의 신장을 채취하여 종란에 접종한 후 전염성기관지염 바이러스의 증식여부를 판단함: Dot-Immunoblotting assay 양성반응 샘플 수/검사 샘플 수

<표8>

K40/09 시제품 음수 백신 21일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 IBV에 대한 중화지수

시험 백신	시험계 수수	IBV 중화지수
녹십자수의약품 시제품	10	2.1
대성미생물연구소 시제품	10	2.0
고려비엔피 시제품	10	2.1
대조군	10	0

(6) IBV K40/09 생독백신 시제품의 3주령 SPF 닭에서의 광범위 교차면역원성 시험 및 방어효능시험

① 시험 방법

- 녹십자수의약품 K40/09 시제품의 3주령 SPF 닭에서 IB 바이러스에 대한 교차면역원성을 확인하기 위하여 농림축산검역본부 고시 국가검정 동물용 의약품 검정기준에 의거한 혈청 역가시험을 실시하였다. 총 60수의 3주령 SPF 닭을 10수씩 6개의 그룹으로 구분한 다음 시제품 백신을 1수분씩 음수 접종하였다. 백신 접종 3주 후 채혈하여 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화 한 후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화하였다. 중화 후 바이러스 함량시험법에 따라 발육계란에 접종하고 37℃에서 3일간 배양하였다. 접종 3일 후에 접종한 발육계란의 장뇨막강액을 채취하여 Dot immunoblotting을 통해 중화지수를 산출하였다. 그리고 IBV에 대한 방어능을 확인하기 위하여 백신접종 3주 후, 3종의 공격접종용 바이러스 국내 유행 신장형 바이러스인 KM91(KoreanⅡsubgroup 1), QXIBV주(KoreanⅡsubgroup 2) 및 K40/09주(Korean New Genetic Cluster 1)를 마리당 $10^{4.5}$EID50을 점안으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관과 신장에서의 바이러스 재분리를 통한 방어능을 평가하였다.

② 시험 결과

- 녹십자수의약품 K40/09 시제품은 중화시험 결과에서 우수한 항체 형성능을 보였으며, 공격접종 시험에서도 뛰어난 교차방어능을 보였다(표9). 시제품 백신 시험군의 혈청의 중화지수가 2.0 이상으로 확인되어, IBV 생독백신에 대한 국가검정기준에 적합함을 확인하였다(표10).

<표9>

녹십자수의약품 K40/09 시제품 음수 백신 21일 후 IBV에 대한 교차방어능 확인시험

시험백신	공격접종 균주	시험계 수수	공격접종 바이러스 재분리율[A]	
			기관[B]	신장[C]
녹십자수의약품 시제품	KM91	10	3/10	0/10
녹십자수의약품 시제품	K40/09	10	0/10	0/10
녹십자수의약품 시제품	QXIBV	10	0/10	0/10
대조군	KM91	10	10/10	10/10
대조군	K40/09	10	10/10	10/10
대조군	QXIBV	10	10/10	10/10

[A]그룹별로 시험계의 기관 및 신장 유제액을 각각 종란에 접종한 후 장기별 증식억제 효능을 Dot-Immunoblotting assay 방법으로 확인함

[B]그룹별로 시험계의 기관을 채취하여 종란에 접종한 후 전염성기관지염 바이러스의 증식여부를 판단함: Dot-Immunoblotting assay 양성반응 샘플 수/검사 샘플 수

[C]그룹별로 시험계의 신장을 채취하여 종란에 접종한 후 전염성기관지염 바이러스의 증식여부를 판단함: Dot-Immunoblotting assay 양성반응 샘플 수/검사 샘플 수

<표10>

녹십자수의약품 K40/09 시제품 음수 백신 21일 후 시험계로부터 채취한 혈청의 IBV에 대한 중화지수

시험 백신	시험계 수수	IBV 중화지수
녹십자수의약품 시제품	10	2.1
대조군	10	0

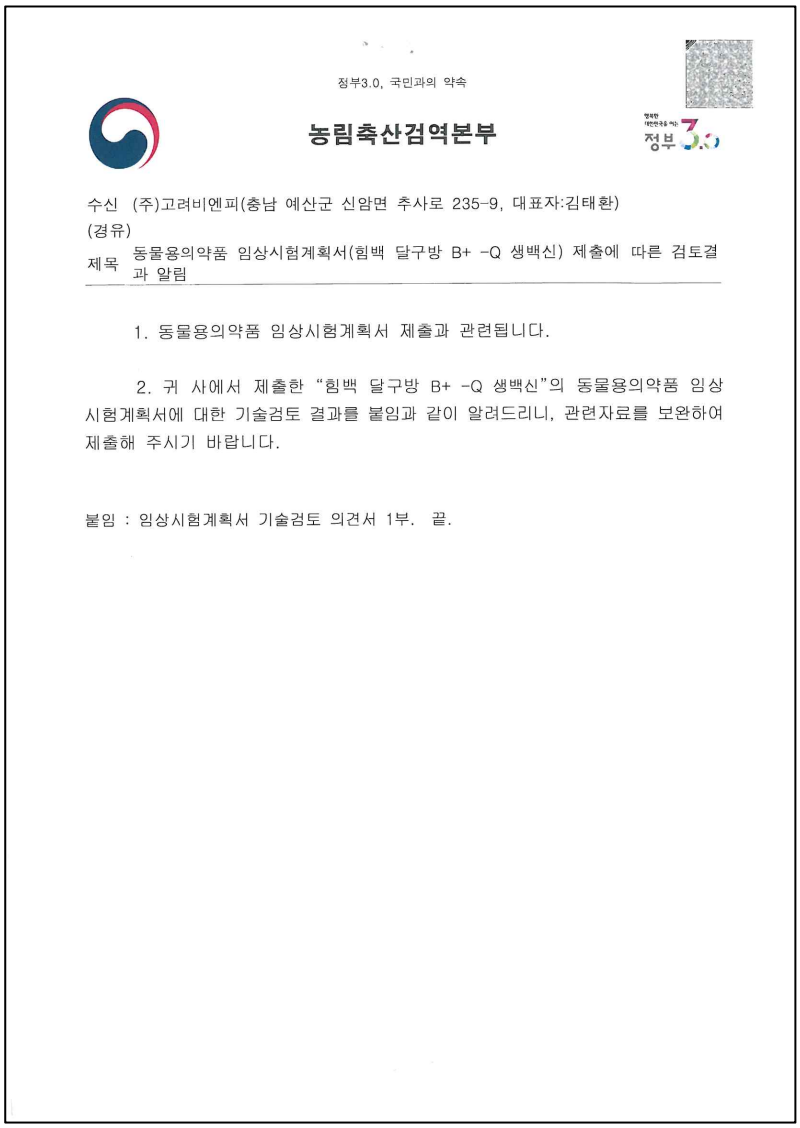
4. IB 생독 백신 야외임상시험 계획서 제출

① 업체별 K40/09 시제품의 실험실내 안전성 및 효능 평가 결과 송부

- 건국대학교 수의과대학 실험실 내에서 진행한 업체별 K40/09 시제품의 1일령 SPF병아리에 대한 안전성시험, 1일령 SPF 병아리에 대한 효능평가 시험, 3주령 SPF 닭에 대한 효능 평가시험 결과들을 정리하여 참여기업(녹십자수의약품, 대성미생물연구소, 고려비엔피)에 송부 완료하였다. 관련 균주 정보와 실험실내 시험결과를 바탕으로 야외시험계획서 제출.

② 야외시험 계획서 제출에 필요한 추가적인 실험 진행

- IBV K40/09 시제품의 야외시험계획서 제출에 필요한 추가적인 균주 안전성 시험을 진행하였다. 추가적인 균주 안전성 시험으로 병원성복귀시험, 바이러스 배출확인시험을 진행하였다.



정부3.0, 국민과의 약속

농림축산검역본부

정부 3.0

수신 (주)고려비엔피(충남 예산군 신암면 추사로 235-9, 대표자:김태환)
(경유)
제목 동물용의약품 임상시험계획서(힘백 달구방 B+ -Q 생백신) 제출에 따른 검토결과 알림

1. 동물용의약품 임상시험계획서 제출과 관련됩니다.

2. 귀 사에서 제출한 "힘백 달구방 B+ -Q 생백신"의 동물용의약품 임상시험계획서에 대한 기술검토 결과를 붙임과 같이 알려드리니, 관련자료를 보완하여 제출해 주시기 바랍니다.

붙임 : 임상시험계획서 기술검토 의견서 1부. 끝.

<그림. 야외임상시험 계획서 보완관련 공문>

③ K40/09 백신주의 병원성 복귀 시험

- 병원성 복귀시험은 실제 백신주가 야외에서 적용하였을 때, 백신 바이러스의 개체간 전파에 의해 닭에 대한 병원성이 복귀되는지 여부를 확인하기 위한 실험실내 시험이다.

- 1일령 SPF 병아리 10수에 IBV K40/09 하이패시지 주를 점안으로 접종($10^{4.5}EID_{50}$/수)하고 5일 후 Trachea 및 Kidney 시료를 채취한 후 PBS로 10% 유제액을 제조하여 원심분리 상층액 원액을 다시 1일령 SPF 병아리 10수에 점안접종하는 방법으로 5회 맹목계대를 실시하였다. 닭에 대한 맹목계대가 완료된 후에 1일령 병아리에 대한 안전성 확인 시험을 진행하였다.
- 시험결과 5번의 계대를 통하여도 백신 바이러스의 병원성이 복귀되지 않음을 확인하

였다.

<표__. 시험백신 접종 후 병원성 복귀여부 확인>

계대수	접종수	치사율	호흡기 증상	신장염, 요산염
1대	10수	0/10	0/10	0/10
2대	10수	0/10	0/10	0/10
3대	10수	0/10	0/10	0/10
4대	10수	0/10	0/10	0/10
5대	10수	0/10	0/10	0/10

<표__. 닭에 대한 맹목 계대 후, 1일령 병아리에 대한 안전성 시험 결과>

구 분	공격 접종수	치사율	호흡기 증상	신장염, 요산염	평균 증체율 (평균 ±표준편차)
5대 공격	20수	0/20	0/20	0/20	24.5 ±5.6
대 조 군	20수	0/20	0/20	0/20	23.3 ±5.1

④ K40/09 백신주의 바이러스 배출확인 시험

- 바이러스 배출확인 시험은 백신 접종 후 개체에서의 바이러스 추가 전파 가능여부를 확인하기 위한 시험으로 백신의 안전성을 보장하기 위하여 필요한 시험이다.
- 4주령 SPF 병아리 40수를 사용하여 IB K40/09주를 수당 $10^{3.5}EID_{50}$를 각각 점안접종하고 격리사육에서 사육하며 접종 3일 경과일로부터 2일 간격으로 3수씩 부검하여 기관 및 신장 채취하여 유제, 원심처리한 상층액을 10일령 SPF 발육계란에 접종하고 37℃부화기에서 3일간 배양하였다. 접종 3일 후에 접종한 계란의 장뇨막강액을 채취하여 Dot immunoblotting 을 통해 바이러스 증식여부를 확인하였다.
- 시험 결과 백신 접종 3주 후에는 기관 및 신장에서 바이러스가 분리되지 않은 것으로 확인되었다.

<표__. 시험백신 접종개체에서의 바이러스 배출시험 결과>

분리 장기	배 양 기 간(일)											
	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25
기관	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
신장	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−

+ : 바이러스 감염 양성 - : 바이러스 감염 음성

⑤ IB 생독 백신 야외임상시험 계획서 보완 서류 작성

- 각 업체(대성미생물연구소, 고려비엔피, 중앙백신연구소)에서 검역본부에 야외임상시험 계획서 제출을 완료하였다. 검역본부로부터 1차 보완요구가 들어와서 건국대와 각 업체간에 필요한 후속 동물시험을 진행할 예정이다.
- 추가로 진행해야 되는 실험은 각 백신회사 시제품 대상으로 “시제품에 대한 교차면역원성 평가”로 건국대에서 현재 진행중인 상황으로 9월 중에 시험이 종료될 예정이다.

- 용법에 따라 1일령 분무, 2주령 음수에 대한 효능을 평가하고, 시험군은 아래와 같다. 국내에서 분리된 IBV 중 대표적인 strain인 B4, QX, KM91에 대한 평가를 진행한다.

구분	시험군	공시수수	적용 백신	공격접종 균주
시험군	G1	10	IBV 생건조백신 시제품	B4
	G2	10	IBV 생건조백신 시제품	QX
	G3	10	IBV 생건조백신 시제품	KM91
공격접종 대조군	G4	10	−	B4
	G5	10	−	QX
	G6	10	−	KM91
음성 대조군	G7	10	−	−

- 해당 보완사항이 완료되는 데로 검역본부에 보완서류를 제출할 예정이고, 검토 후 허가를 받으면 야외시험을 진행할 계획이다.

5. IB 생독 백신 경제성 분석

① 개발된 IB 생독백신의 생산단가 분석

- 본 과제를 통해 개발된 생독백신의 경우 열처리 과정을 통해 기존 닭 전염성기관지염 백신 평균 개발시간인 5년에서 2년으로 단축하였다. 이를 통해서, 백신 개발에 사용되는 유정란 및 기타 실험 도구들의 사용량뿐만 아니라 시간 감축에 따른 인건비 역시 감소할 수 있을 것으로 예상된다.
- 이와 같이, 생산단가를 크게 줄일 수 있어 실제 양계농가에 상당히 저렴한 가격에 공급을 할 수 있을 것으로 예상된다.

② 현장 적용 시의 양계농가 생산성 향상

- K40/09 백신은 닭 전염성기관지염에 대한 효과적인 방어가 가능한 것으로 확인되었다. 이에 따라, 양계농가에서 닭 전염성기관지염의 감염으로 발생할 수 있는 체중저하, 산란율 저하 및 이차감염과 같은 생산성에 악영향을 미치는 피해 상황을 예방할 수 있을 것으로 판단된다.
- 기존 시중에 판매되고 있는 백신의 경우 하나의 백신으로 단 하나의 야외주만을 방어할 수 있는 것으로 알려져있다. 하지만, K40/09 백신은 국내에서 주로 발생하고 있는 두 가지 야외주의 자연적인 재조합으로 발생한 주를 이용해 개발한 백신으로, 현장에 적용했을 시 하나의 백신으로 두 가지의 국내 유행 야외주를 효과적으로 방어할 수 있어 같은 가격의 타 백신에 비해 높은 경쟁력을 갖출 수 있는 것으로 판단된다.

<표. 기존 닭 전염성기관지염 백신의 가격 비교>

제품명	달구방 B+	IB Ma5	대성 K2ND	Ma5+ Clone 30
가격	수당 3.9원	수당 4.6원	수당 7.2원	수당 7.7원
회사 (주요기업)	㈜고려비엔피 (국내기업)	MSD animal health (다국적기업)	㈜대성미생물연구소 (국내기업)	MSD Animal health (다국적기업)

6. IB 생독 백신 사용 매뉴얼 작성

① 경제적인 백신 접종 매뉴얼을 작성하기 위한 K40/09 백신 접종 경로별 최소면역원성 평가

- 접종경로별 최소면역원성을 확인하여 최적의 백신 dose를 설정하기 위한 시험을 진행하였다. 점안, 음수, 분무 등 접종방법에 따른 K40/09 생독백신주의 수당 dose별 항체형성능, 방어능 평가하였다.
- 1일령 병아리를 대상으로 분무, 점안 경로로 백신 역가를 1.5 log10 ~ 4.5 log10 으로 10배 단위로 희석하여 백신 접종 후 3주 뒤에 채혈하여 백신 항원에 대한 중화지수를 평가하였으며, 공격접종 후 5일 뒤 부검을 진행하여 신장, 기관에서의 바이러스 재분리를 통해 방어능을 평가하였다.
- 시험 결과, 1일령 분무의 경우 수당 $10^{4.5}EID_{50}$ 으로 백신 하였을 경우 백신 효능이 나타난 반면 점안은 $10^{2.5}EID_{50}$/수 에서도 백신 효능이 확인되었다.
- 3주령 병아리를 대상으로 음수 경로로 백신역가를 1.5log10 ~ 4.5log10으로 10배 단위로 희석하여 백신 접종 후 3주 뒤에 채혈하여 백신 항원에 대한 중화지수를 평가하였으며, 공격접종 후 5일 뒤 부검을 진행하여 신장, 기관에서의 바이러스 재분리를 통해 방어능을 평가하였다.
- 시험 결과, 3주령 음수의 경우 수당 $10^{3.5}EID_{50}$이 중화지수, 방어능이 확인되는 최소 접종 dose로 확인되었다.

<표__. 최소면역원성 시험 결과>

3주령 음수						
역가		1.5	2.5	3.5	4.5	대조
중화지수		0.3	0.4	3.4	3.6	0
재분리율	Trachea	10/10	10/10	0/10	0/10	10/10
	Kidney	10/10	8/9	0/10	0/10	10/10

1일령 분무						
역가		1.5	2.5	3.5	4.5	대조
중화지수		0.3	0.9	1.6	>4	0
재분리율	Trachea	12/12	0/13	0/11	1/11	10/10
	Kidney	11/12	4/12	3/10	1/10	10/10

1일령 점안					
역가		2.5	3.5	4.5	대조
중화지수		3.1	3.2	3.2	0
재분리율	Trachea	0/10	0/11	1/11	10/10
	Kidney	1/10	1/11	2/11	10/10

② 백신 적용 매뉴얼 작성

- 점안백신의 경우 백신 역가가 수당 $10^{2.5}EID_{50}$, 분무백신의 경우 $10^{4.5}EID_{50}$, 음수의 경우 $10^{3.5}EID_{50}$이상이 되어야 합니다.

가. 분무접종

1) 백신 1000수분 당 70~80ml의 상온(20~25℃)의 멸균증류수로 희석합니다.
2) 분무기는 노즐을 통해 한번에 7~8ml이 분사되도록 설정하고 닭의 머리부터 50~70cm 위에서 분무하도록 합니다.
3) 분무되는 입자의 크기는 약 50 마이크론(㎛)의 균일한 입자가 분무될 수 있도록 노즐의 크기를 조절합니다.
4) 100수의 병아리가 든 상자가 지나갈 때마다 분무입자가 한번에 골고루 퍼지도록 분사합니다.

나. 음수접종

1) 소독제가 함유되지 않은 물을 이용합니다.
2) 접종 전 후 최소한 24시간 동안은 음수관내 소독제나 세제를 사용하지 않습니다.
3) 최소한 계군의 2/3 정도가 동시에 음수할 수 있도록 급수기를 충분히 준비하여야 합니다.
4) 백신을 투여할 모든 병아리는 백신투여 2-3시간 전 급수 및 사료의 급여를 중지합니다.
5) 정상적으로 1~2시간 이내에 섭취할 수 있는 물에 백신을 희석한 후 투여합니다.

다. 점안접종

1) 지시된 희석액을 사용하여 희석하고, 희석한 백신은 적어도 30-60분 내에 모두 접종합니다.
2) 접종 후 바로 닭을 놓지 않고 완전히 백신을 흡수할 수 있도록 둔 뒤에 보정을 해제합니다.

<1협동 : 닭 바이러스성 호흡기 질병 제어용 항바이러스제제 및 증상완화제 개발>

1. 호흡기 증상완화제 효능평가 모델 개발

(1) 닭 호흡기 증상완화제를 위한 IB 야외 분리주의 선발

① 시험 방법

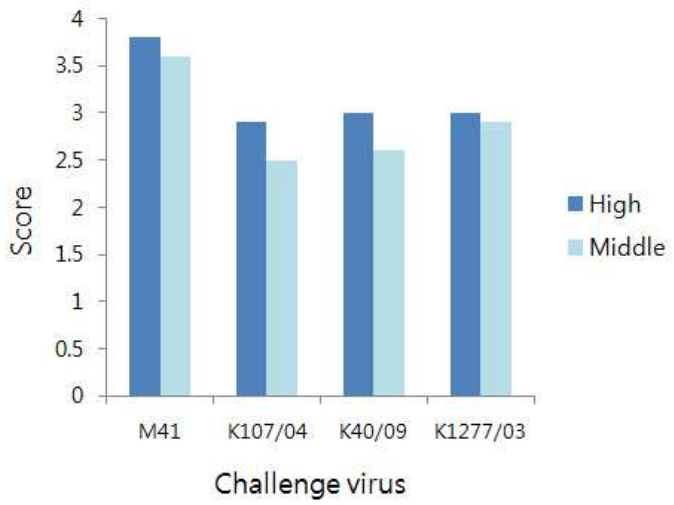
▶ IB 바이러스에 대한 닭 호흡기 증상완화제 평가 모델을 개발하기 위하여 다음과 같이 시험을 실시 하였다. 총 40수의 3주령 SPF 병아리를 10수씩 4개의 그룹으로 구분한다. 공격접종용 바이러스는 M41주 (Mass group), K107/04주 (Korean group 1), K40/09 (Korean New Genetic Cluster 1) 및 K1277/03 (Korean Ⅱ subgroup 2)를 마리당 $10^{4.5}EID_{50}$ 점안으로 공격접종하고 5일 후 부검하여 기관조직에서의 조직병변지수 및 섬모소실지수를 평가하였다.

② 시험 결과

▶ 4종의 IB바이러스 야외분리 주 공격접종 후 기관 상부 및 중부의 섬모소실지수와 조직병변지수를 비교 실험한 결과 다른 야외분리 주에 비하여 M41주 (Mass group)에서의 기관염증소견과 조직염증소견이 가장 잘 확인 되었다(그림1.그림2).

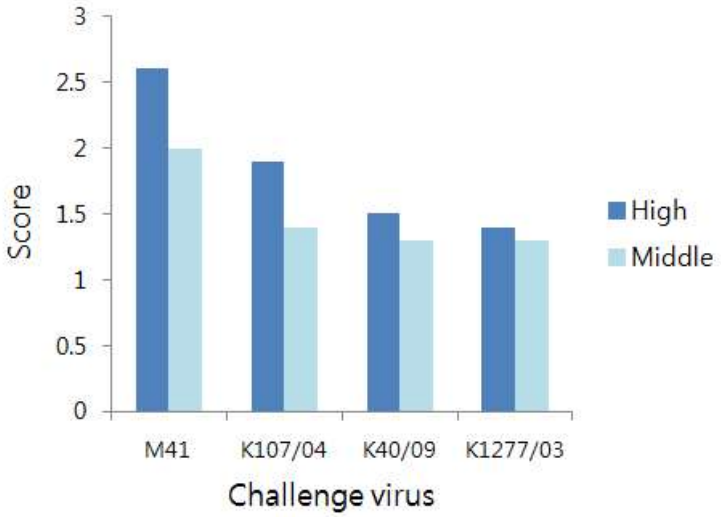
<그림 1>

야외 분리주 공격접종 후 기관 섬모소실지수 비교 실험



<그림 2>

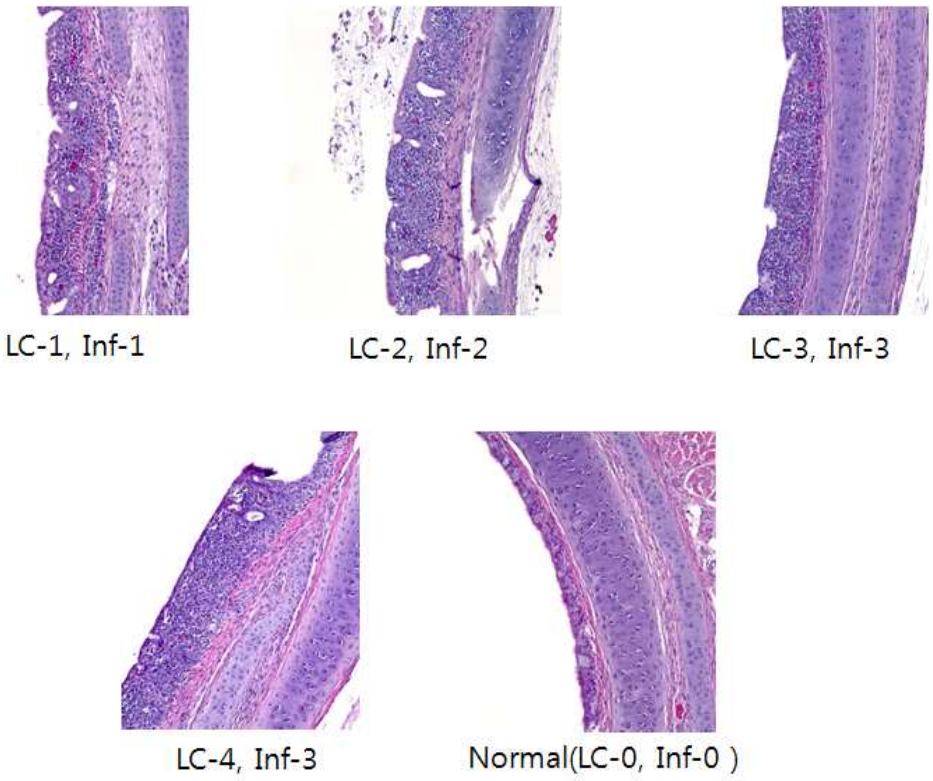
야외 분리주 공격접종 후 기관 조직병변지수 비교 실험



▶ IB바이러스 M41주 (Mass group) 공격접종 후 기관 상부 및 중부의 섬모소실지수와 조직병변지수의 평가는 그림3과 같이 나누어 확인 하였다(그림 3, 표1).

<그림 3>

M41주 (Mass group) 공격접종 후 기관 조직병변 및 섬모소실지수 평가



LC= Loss of cilia, Inf=inflammatory responses

<표1>

M41주 (Mass group) 공격접종 후 기관 조직병변 및 섬모소실지수 평가기준

Loss of cilia (LC) grade	inflammatory responses (Inf) grade	기준
LC-1	Inf-1	미약한 염증세포 침윤 및 cilia 약한 손상
LC-2	Inf-2	다소 심한 염증세포 침윤소견 및 일부출혈소견, cilia 절반 소실
LC-3	Inf-3	Trachea 구조다소 손실 및 심한 염증세포 침윤, cilia 대부분 소실
LC-4		Trachea 구조 소실 및 심한 염증세포 침윤, cilia 완전 소실

(2) 선발된 IB 야외 분리주의 닭 호흡기 증상완화제를 위한 동물모델

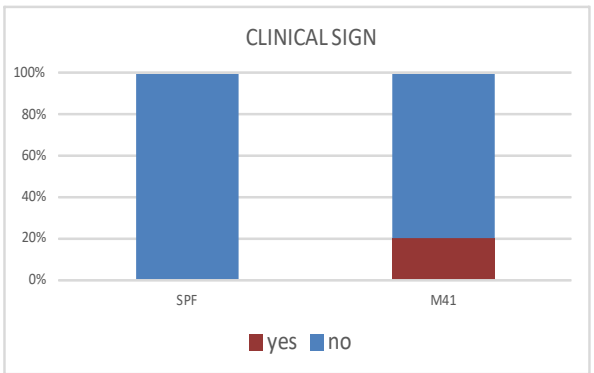
① 시험 방법

▶ 선발된 IB 바이러스 M41주 (Mass group)에 대한 닭 호흡기 증상완화제 평가 모델을 개발하기 위하여 다음과 같이 시험을 실시하였다. 총 20수의 4주령 SPF 병아리를 10수씩 2개의 그룹으로 구분한다. 공격접종군은 선발된 바이러스 M41주 (Mass group)를 마리당 $10^{5.5}EID_{50}$ 점안으로 공격접종하고 5일 후 임상증상, nasal exudate, rale sound를 개체별로 확인하고 부검하여 기관의 부검소견 및 laryngotracheal exudate, tracheal exudate, 기관조직에서의 조직병변지수 및 섬모소실지수를 평가하였다. 음성대조군은 인산완충용액으로 공격접종 군과 동일한 방법으로 점안으로 접종하였다.

② 시험 결과

▶ 선발된 IB 바이러스 M41주 (Mass group)를 공격접종 후 5일 동안 임상증상을 관찰한 결과 SPF 닭 음성대조군에 비하여 M41 공격접종 군에서 몇몇 개체에서 개구호흡 및 침울 증상을 보였으며(그림 4) 개체별로 nasal exudate 및 rale sound를 확인 할 수 있었다. IB 바이러스 공격접종 후 5일째 부검한 결과 비강 및 기관에서 삼출물 및 기관지 충혈 등의 소견을 확인하였다(그림 5)

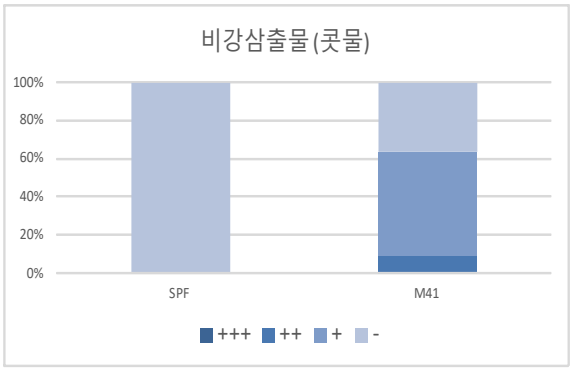
<그림 4>



<Clinical signs related to IBV infection consisted of open mouth breathing, swollen heads or

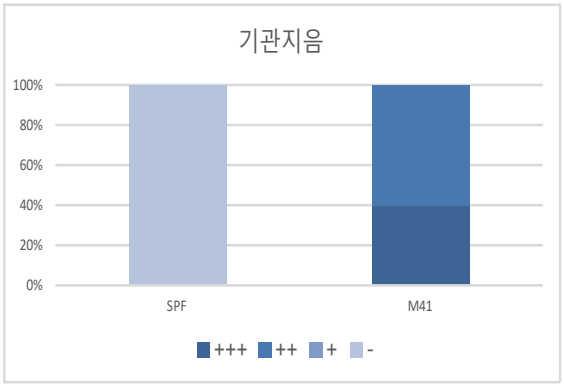
depression>

<그림 5>



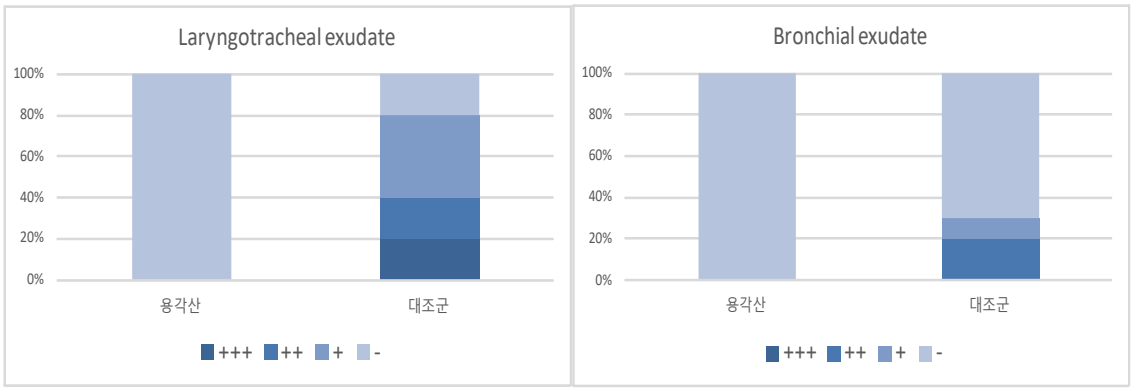
<Nasal exudate was scored as follows: 0:No nasal exudate, 1:moderate amount of nasal exudate, 2:severe amount of nasal exudate>

<그림 6>



<Rales were scored as follows: 0=No sound, 1:Mild nasal rales or upper respiratory tract sounds, 2:Moderate tracheal rales, 3:severe tracheal and bronchial rales>

<그림 7>



<Tracheal exudate were scored as follows: 0=No exudate, 1=Mild exudate, 2=Moderate exudate, 3=Severe exudate>

(3) 선발된 ILT 야외 분리주의 닭 호흡기 증상완화제를 위한 동물모델

① 시험 방법

▶ 선발된 ILT 바이러스 1430673주에 대한 닭 호흡기 증상완화제 평가 모델을 개발하기 위하여 다음과 같이 시험을 실시하였다. 총 50수의 3주령 SPF 병아리를 10수씩 5개의 그룹으로 구분한다. 공격접종군은 선발된 바이러스 1430673주 를 희석하여 농도별로 마리당 intratracheal로 공격접종하고 10일간 폐사율을 관찰한다. 또한, 공격접종 후 3일째 및 5일째 임상증상, nasal exudate, rale sound를 개체별로 확인하고 부검하여 기관의 부검소견 및 laryngotracheal exudate, tracheal exudate, 기관조직에서의 조직병변지수 및 섬모소실지수를 평가하였다. 음성대조군은 인산완충용액으로 공격접종 군과 동일한 방법으로 intratracheal로 접종하였다.

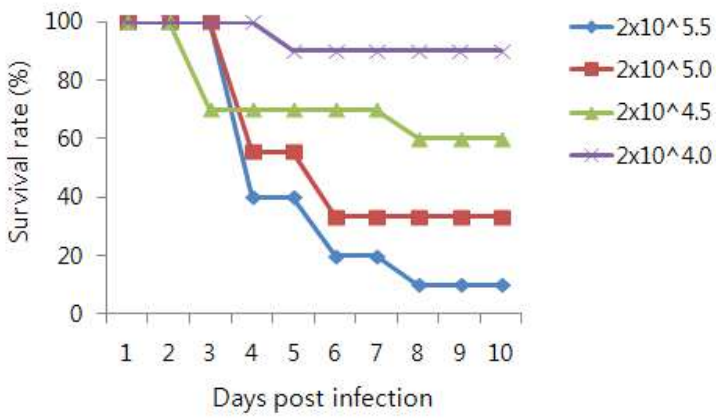
② 시험 결과

▶ 선발된 ILT 바이러스 1430673주를 공격접종 후 10일 동안 임상증상을 관찰한 결과 그림 8과 같이 농도별로 폐사율을 확인 할 수 있었다. 공격접종 바이러스 농도 $2x10^{5.5}$ 및 $2x10^{5.0}$ 투여 군에서는 높은 폐사율로 호흡기 증상완화제 효능평가 모델로서의 선발된 농도는 $2x10^{4.5}$ 및 $2x10^{4.0}$ 로 확인하였다. $2x10^{4.5}$ 및 $2x10^{4.0}$ 농도로 공격접종 후 3일 째 임상증상, nasal exudate, rale sound를 SPF 닭 음성대조군과 비교한 결과 $2x10^{4.0}$ 농도의 공격접종 군에서 음성대조군에 비하여 개구호흡 b등의 임상증상을 확인 할 수 있었다. 단, $2x10^{4.5}$ 농도의 공격접종 군에서는 빠른 폐사로 측정할 수 없었다. 개체별 부검소견에서는 두 농도에서 모두 비강 및 기관에서의 혈액이 함유된 삼출물, 기관지 충혈 등의 소견 등을 확인 할 수 있었다.

$2x10^{4.5}$ 및 $2x10^{4.0}$ 농도로 공격접종 후 5일 째 임상증상, nasal exudate, rale sound를 SPF 닭 음성대조군과 비교한 결과 $2x10^{4.5}$ 농도의 공격접종 군에서 음성조군에 비하여 개구호흡 등의 임상증상을 확인 할 수 있었다. 단, $2x10^{4.0}$ 농도의 공격접종 군에서는 미약한 임상증상을 보임을 확인 할 수 있었다. 개체별 부검소견에서는 두 농도에서 모두 미약한 기관 삼출물, 기관지 충혈 등의 소견 등을 확인 할 수 있었다.

<그림8>

ILT 바이러스 공격접종 후 임상증상 결과



<그림9>

ILT 바이러스 공격접종 후 폐사 계 부검소견

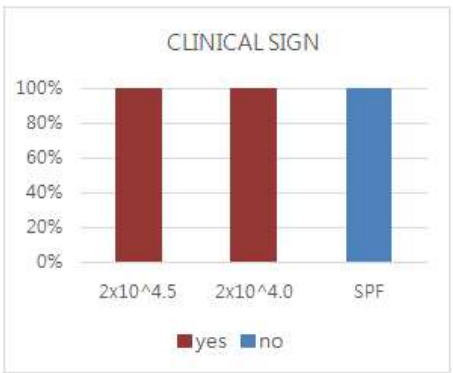
<그림10>

Primer	ILTV
CCT CAG ACT CCA GCT CAT CTG	ICP4-2F
AGT CAT GCG TCT ATG GCG TTG AC	ICP4-2R
Band size	635bp

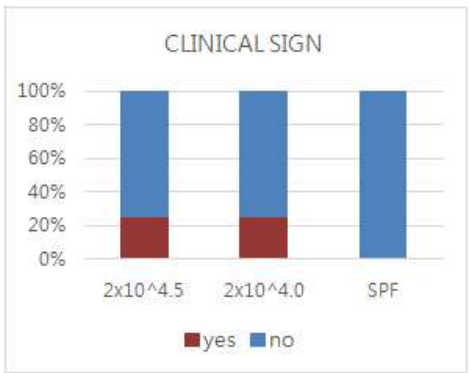
ILT 바이러스 공격접종 후 폐사 계 기관조직에서의 바이러스 확인

▶ 바이러스 증폭은 (94℃, 3분) x 1 cycle, (94℃, 1분, 62℃, 1분, 72℃, 1.5분) x 35 cycles, (72℃, 10분) x 1 cycle, 4℃, 16시간으로 사용하였다. PCR 반응이 완전히 끝난 후, 1.5% agarose gel을 만들어 PCR product 1ul를 전기 영동하여 폐사 계조직 에서의 ILT 바이러스를 확인하였다.

<그림11>



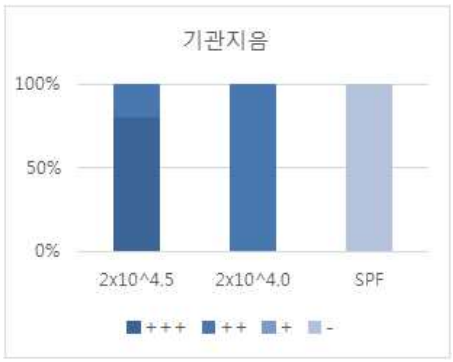
- 공격접종 후 3일째 -



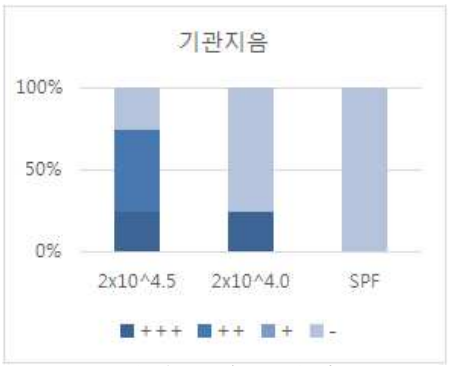
- 공격접종 후 5일째 -

<Clinical signs related to IBV infection consisted of open mouth breathing, swollen heads or depression>

<그림12>



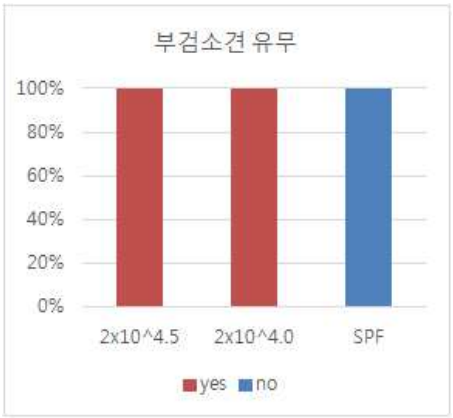
- 공격접종 후 3일째 -



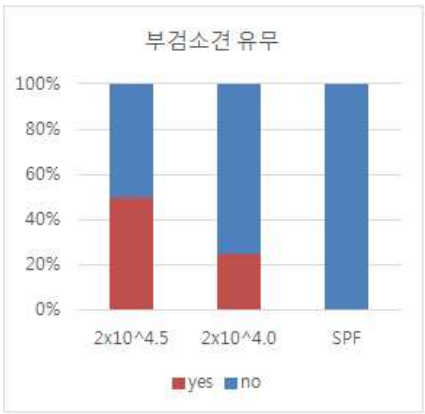
- 공격접종 후 5일째 -

<Rales were scored as follows: 0=No sound, 1:Mild nasal rales or upper respiratory tract sounds, 2:Moderate tracheal rales, 3:severe tracheal and bronchial rales>

<그림13>

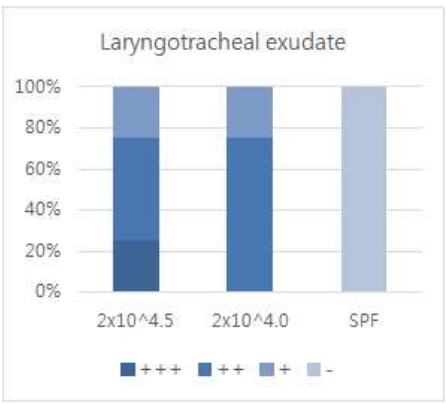


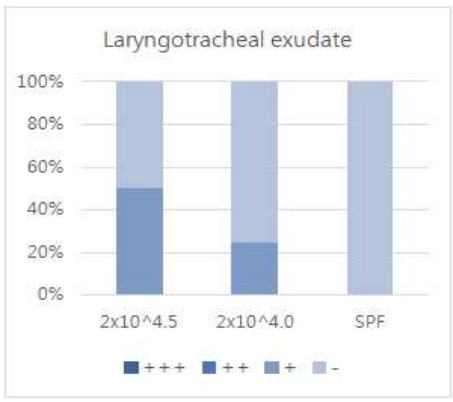
- 공격접종 후 3일째 -



- 공격접종 후 5일째 -

<그림14>





- 공격접종 후 3일째 - - 공격접종 후 5일째 -

<Tracheal exudate were scored as follows: 0=No exudate, 1=Mild exudate, 2=Moderate exudate, 3=Severe exudate>

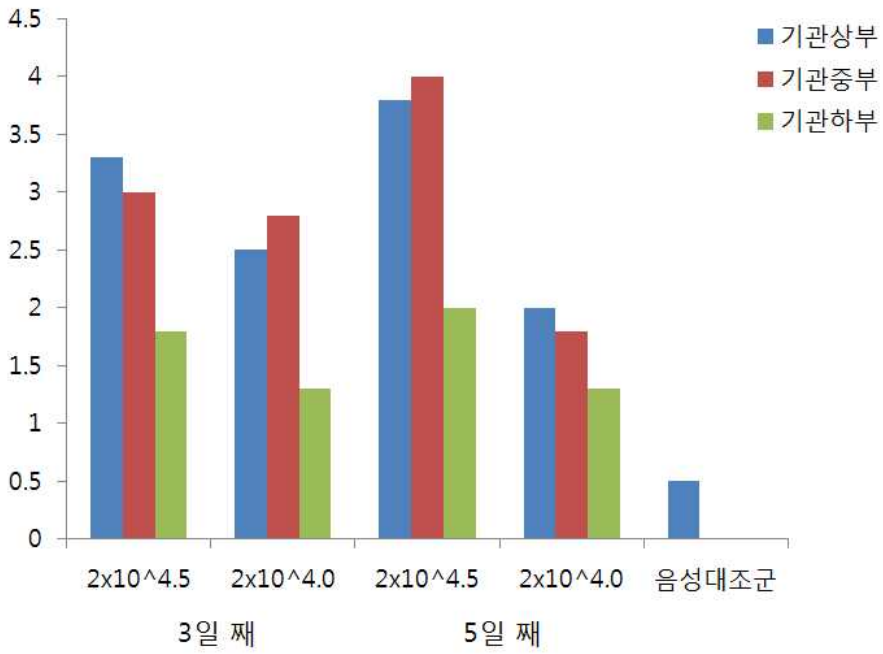
<그림15>

- 공격접종 후 3일째 - - 공격접종 후 5일째 -

<Tracheal exudate were scored as follows: 0=No exudate, 1=Mild exudate, 2=Moderate exudate, 3=Severe exudate>

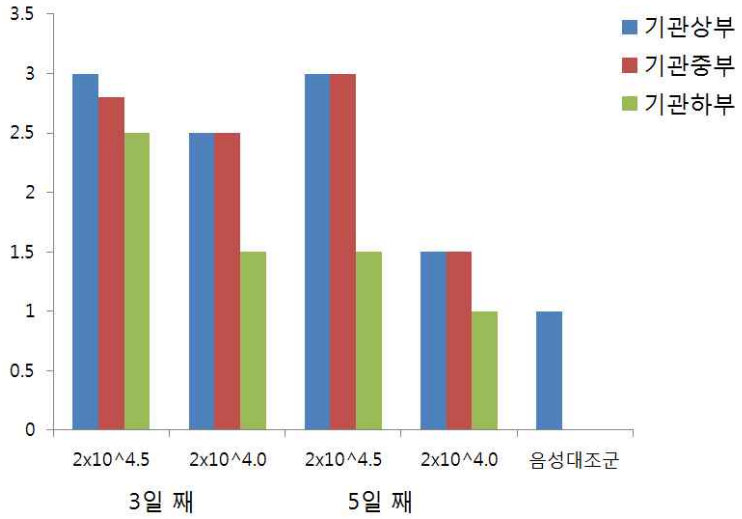
<그림 16>

Loss of cilia



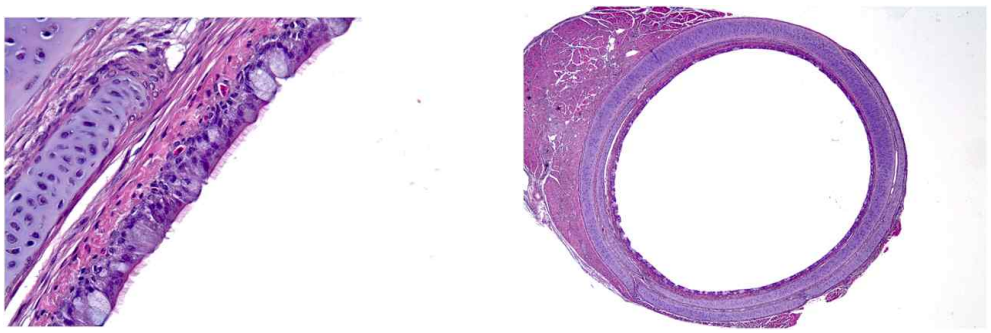
<그림 17>

Inflammatory responses

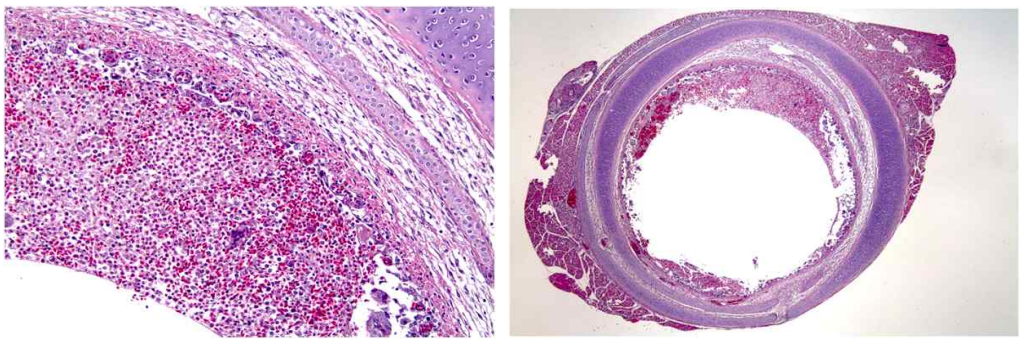


<그림 18>

ILT 바이러스 1430673주 공격접종 후 기관 조직병변 및 섬모소실 평가



- 음성대조군 (SPF 닭): 기관의 정상적인 형태 유지 -



- ILT 바이러스 1430673주 공격접종: 기관 상피층이 전반적으로 손상, 출혈소견 및 주로 heterophil로 이루어진 염증세포의 침윤, 손상된 상피세포들이 혼재된 양상 관찰 -

2. 호흡기 질병 제어용 항바이러스제제 및 증상완화제 개발

(1) 천연물 유래 항 IBV 제제 1종 개발 (in vitro)

① 시험 방법

▶ 시험관 내 IB 바이러스 증식억제 효능 시험을 실시 하였다. 천연물 유래 시험물질을 인산완충용액을 이용하여 농도별로 희석하여 IB 바이러스 M41주 (Mass group)와 동일한 용량으로 혼합 후 4℃에서 30분간 반응을 시킨다. 반응 후 혼합액을 인산완충용액으로 10^{-6}까지 10진 희선한다. 10^{-1}부터 10^{-6}까지의 희석액을 5개의 10일령 발육계 란의 장요막강 내에 0.1ml 접종하고, 접종 후 24시간 이내에 폐사한 것은 제외하고 24시간 이후에 폐사한 것 IB 바이러스에 의한 폐사임을 확인하고 72시간 후에 생존한 것에 대하여는 장요막강액을 채취하여 SPF 종란 50%를 감염시킬 수 있는 (EID50/ml) 바이러스 역가를 Dot-Immunoblotting assay를 통해 확인하였다.

▶ 시험물질

추출물	종류
한약제 추출물	패모, 오미자, 길경, 소자, 대추, 육계, 후박, 전호, 차가버섯
식물 추출물	등골짚신나물 (*Agrimony Eupatoire*), 덜꿩나무 (*Viburnum erosum*)-S 덜꿩나무 (*Viburnum erosum*)-L

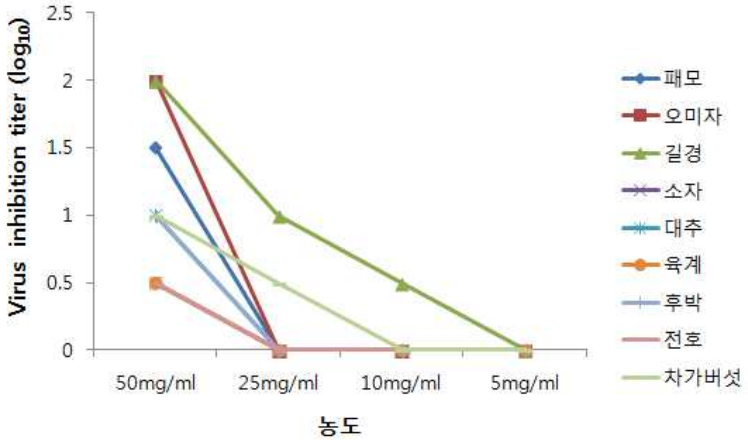
② 시험 결과

▶ 시험관 내 IB 바이러스 증식억제 효능 시험을 실시 한 결과 천연물 유래 시험물질 중 한약재제 9종을 인산완충용액을 이용하여 농도별로 희석하여 IB 바이러스 M41주 (Mass group)와 동일한 용량으로 혼합 후 4℃에서 30분간 반응을 시킨다. 반응 후 혼합액을 인산완충용액으로 10^{-6}까지 10진 희선한다. 10^{-1}부터 10^{-6}까지의 희석액을 5개의 10일령 발육계 란의 장요막강 내에 0.1ml 접종하고, 접종 후 24시간 이내에 폐사한 것은 제외하고 24시간 이후에 폐사한 것 IB 바이러스에 의한 폐사임을 확인하고 72시간 후에 생존한 것에 대하여는 장요막강액을 채취하여 SPF 종란 50%를 감염시킬 수 있는 (EID50/ml) 바이러스 역가를 Dot-Immunoblotting assay를 통해 확인하였다.

▶ 시험결과, IB 바이러스와 인산완충용액을 혼합한 바이러스 대조군에 비하여 천연물 유래 시험물질 중 한약제제인 길경 추출물에서 유의적이지는 않지만 감소함을 확인 하였으며 식물추출물에서는 덜꿩나무(*Viburnum erosum*) 추출물에서 바이러스 역가가 감소하였음을 확인 할 수 있었다.

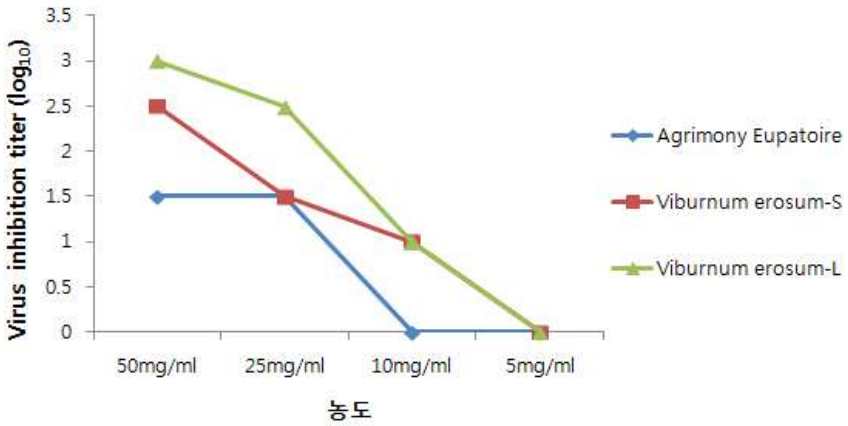
<그림19>

한약제제 추출물의 항 IB제제 효능실험



<그림20>

식물 추출물의 항 IB제제 효능실험



(2) 현재 양계농장에서 경험적으로 사용되는 거담성분제제 선발

① 시험 방법

▶ 선발된 IB 바이러스 M41주 (Mass group)에 대한 현재 양계농장에서 경험적으로 사용되는 닭 호흡기 거담성분제제에 대한 효능평가를 위하여 다음과 같이 시험을 실시하였다. 총 40수의 3주령 SPF 병아리를 10수씩 4개의 그룹으로 구분한다. 현재 양계농장에서 가장 많이 경험적으로 사용되는 거담성분제제 2종, 공격접종 양성대조군 1종, 공격접종 음성대조군 1종으로 나눈다. 거담성분제제 투여군은 공격접종 전 7일부터 공격접종 후 5일 동안 경구투여 하였다. 공격접종 양성대조군 및 음성대조군은 거담성분제제 투여군과 동일한 용량으로 인산완충용액을 경구투여 하였다. IB 바이러스 공격접종은 선발된 바이러스 M41주 (Mass group)를 마리당 $10^{5.5}EID_{50}$ 점안으로 공격접종하고 5일 후 임상증상,

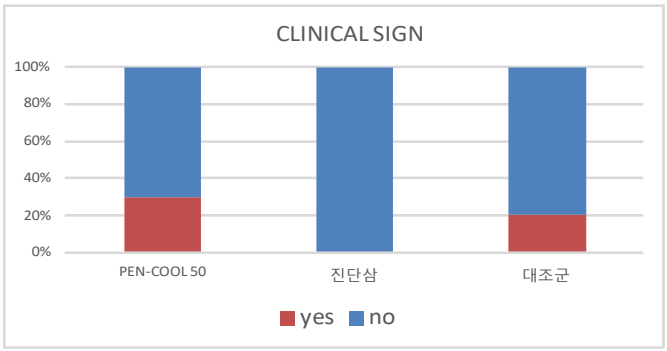
nasal exudate, rale sound를 개체별로 확인하고 부검하여 기관의 부검소견 및 laryngotracheal exudate, tracheal exudate, 기관조직에서의 조직병변지수 및 섬모소실지수를 평가하였다. 음성대조군은 인산완충용액으로 공격접종 군과 동일한 방법으로 점안으로 접종하였다.

② 시험 결과

▶ 현재 양계농장에서 경험적으로 사용되는 닭 호흡기 거담성분제제 효능시험을 실시한 결과 IB 바이러스 M41주 (Mass group)를 공격접종 후 5일 동안 임상증상을 관찰한 결과 몇몇 개체에서 개구 호흡 및 침울증상을 보인 공격접종 양성대조군에 비하여 진담산 경구투여군에서는 임상증상을 보이지 않았다 (그림20) 또한, 공격접종 양성대조군에 비하여 진담산 경구투여군에서 nasal exudate 증상을 보이는 개체도 감소하였다(그림21). IB 바이러스 공격접종 후 5일째 부검한 결과 비강 및 기관에서 삼출물 및 기관지 충혈등의 소견을 보이는 공격접종 양성대조군에 비하여 진담산 경구투여군에서 비강 및 기관에서의 부검소견이 줄어들었음을 확인 할수 있었다(그림22, 그림23).

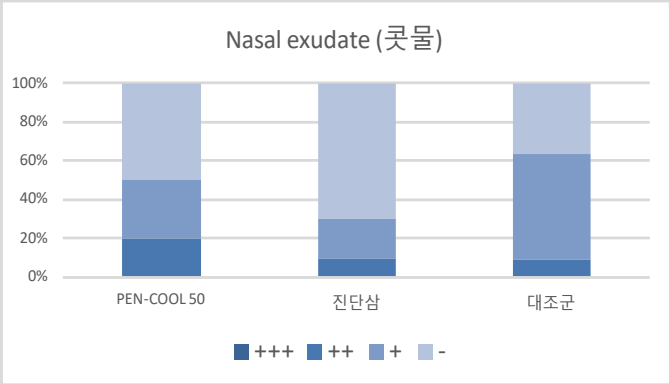
▶ IB 바이러스 공격접종 후 기관섬모소실소견 및 기관염증소견을 관찰한 결과 기관 상부 및 중부 기관 구조 소실 및 심한 염증세포 침윤 등 cilia의 소실을 나타낸 공격접종 양성대조군에 비하여 진담산 경구투여군에서 미약한 기관섬모소실 소견을 확인할 수 있었다(그림25). 그리고 기관 염증소견은 기관 중부에서 공격접종 양성 대조군에 비하여 감소함을 확인 할 수 있었다(그림26).

<그림 20>



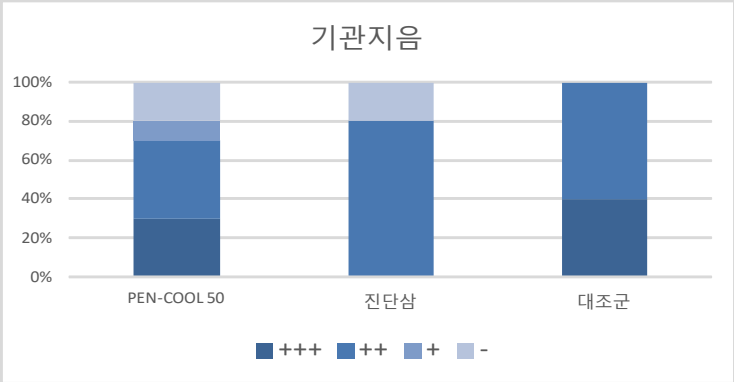
<Clinical signs related to IBV infection consisted of open mouth breathing, swollen heads or depression>

<그림 21>



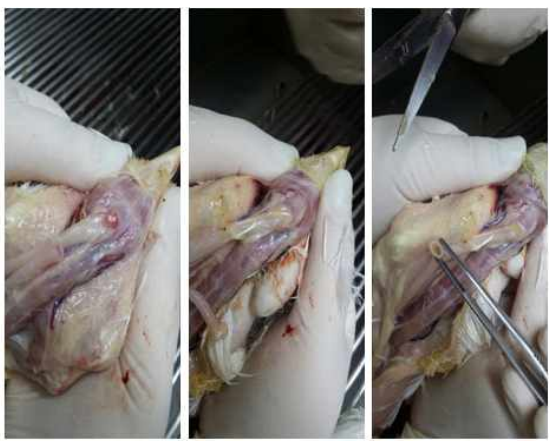
<Nasal exudate was scored as follows: 0:No nasal exudate, 1:moderate amount of nasal exudate, 2:severe amount of nasal exudate>

<그림 22>



<Rales were scored as follows: 0=No sound, 1:Mild nasal rales or upper respiratory tract sounds, 2:Moderate tracheal rales, 3:severe tracheal and bronchial rales>

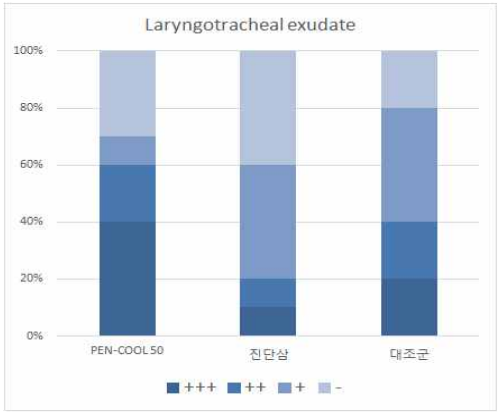
<그림 23>

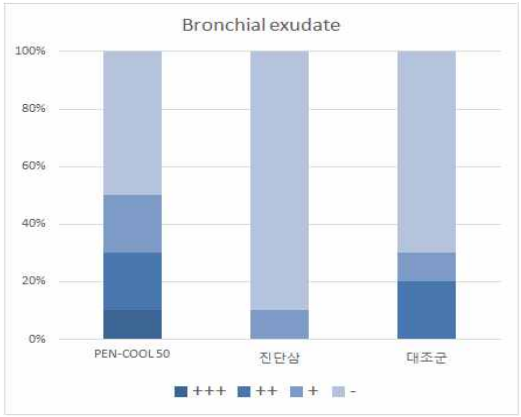


<Gross lesion of trachea includes tracheal congestion, hemorrhage or tracheal exudate>

<그림 24>

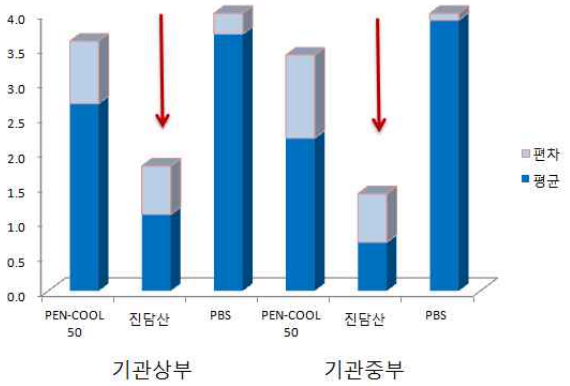
<Tracheal exudate were scored as follows: 0=No exudate, 1=Mild exudate, 2=Moderate exudate,





3=Severe exudate>

<그림 25> Loss of cilia



<0=normal cilia, 1=<25% cilia damaged, 2=<50%, 3=<75%, 4=>75%>

<그림26> Inflammatory responses

<Normal=1, moderate=2, severe=3>

3. 호흡기 질병 제어용 항바이러스 제제 효능평가

1. 1차 년도에 개발된 평가모델을 이용한 항바이러스제제의 효능평가

(1) 사람용 거담제를 이용한 닭 호흡기 바이러스 효능평가

① 시험 방법

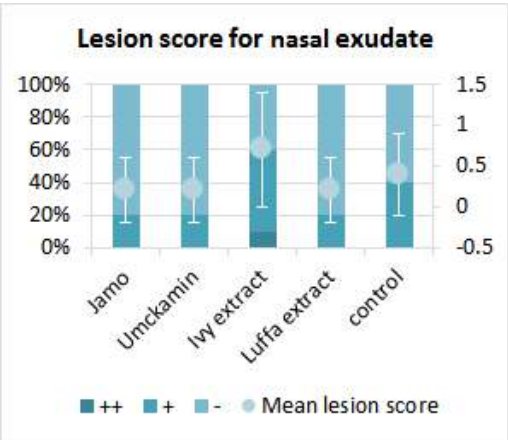
- 1차 년도에 개발된 닭 호흡기 바이러스 평가모델을 이용하여 거담제로서 효능을 검증받은 사람용 거담제 유효성분을 확인하기 위하여 다음과 같이 시험을 실시하였다. 총 50수의 3주령 SPF 병아리를 10수씩 5개의 그룹으로 구분하였다. 사람용 거담제 4종 중 2종은 JAMO(오스틴제약), Umckamin(한화제약) 제품을 사용하였으며, 1종은 시네츄라시럽(안국약품)의 주 원료 Ivy leaf extract, 1종은 천연물제제 Luffa extrac를 각각 개체별로 7일 예방 및 5일 치료로 경구투여 하였다. 공격접종 양성대조군은 인산완충용액으로 공격접종 군과 동일한 방법으로 경구투여하였다. 7일 후 공격접종용 바이러스 M41주 (Mass group)를 마리당 $10^{5.5}EID_{50}$ 점안으로 공격접종 후 5일간 임상증상 및 rale sound를 개체별로 확인하고 부검하여 기관의 부검소견 및 laryngotracheal exudate, tracheal exudate, 기관조직에서의 조직병변지수 및 섬모소실지수를 평가하였다.

② 시험 결과

▶ 닭 호흡기 바이러스 공격접종 5일 후 임상증상을 관찰한 결과 바이러스 공격접종 군에서 몇몇 개체에서 개구호흡 및 침울 증상을 보였으며 개체별로 nasal exudate 및 rale sound를 확인 할 수 있었다. 공격접종 후 5일째 부검한 결과 비강 및 기관에서 삼출물 및 기관지 충혈 등의 소견을 확인하였다. 사람거담제 투여군에서는 Jamo 및 Umkamin 투여군에서 유의적이지는 않으나 nasal exudate 및 임상증상이 감소함을 확인 할 수 있었으며, 공격접종 후 5일째 부검한 결과 비강 및 기관에서 삼출물 및 기관지 충혈 등의 소견도 감소함을 확인 할 수 있었다(그림1, 그림2.

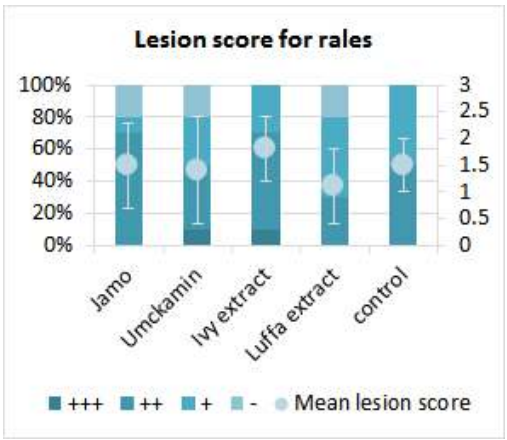
▶ 닭 전염성 기관지염 바이러스 공격접종 후 기관 상부 및 중부의 섬모소실지수와 조직병변지수의 평가는 그림2와 같이 나누어 확인하였다. 기관 상부 및 중부의 섬모소실지수와 조직병변지수를 비교 실험한 결과 바이러스 공격접종 군에 비하여 Jamo 및 Umkamin 투여군에서 섬모소실 소견이 감소함을 확인 할 수 있었다(그림3, 그림4).

<그림 1> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 후 임상증상 비교 실험

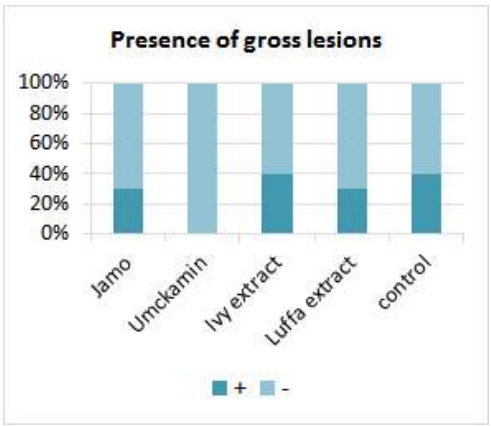


<Nasal exudate was scored as follows: 0:No nasal exudate, 1:moderate amount of nasal exudate, 2:severe amount of nasal exudate>

<Rales were scored as follows: 0=No sound, 1:Mild nasal rales or upper respiratory tract

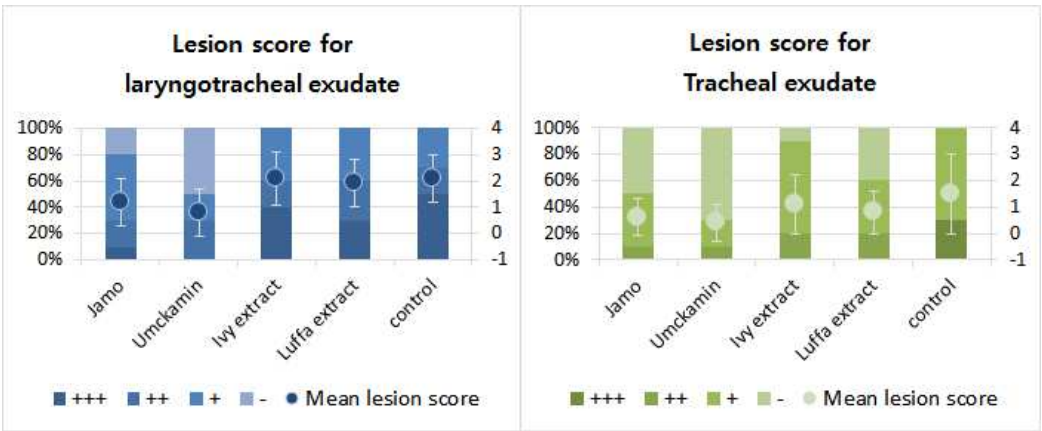


sounds, 2:Moderate tracheal rales, 3:severe tracheal and bronchial rales>



<Gross lesion of trachea includes tracheal congestion, hemorrhage or tracheal exudate>

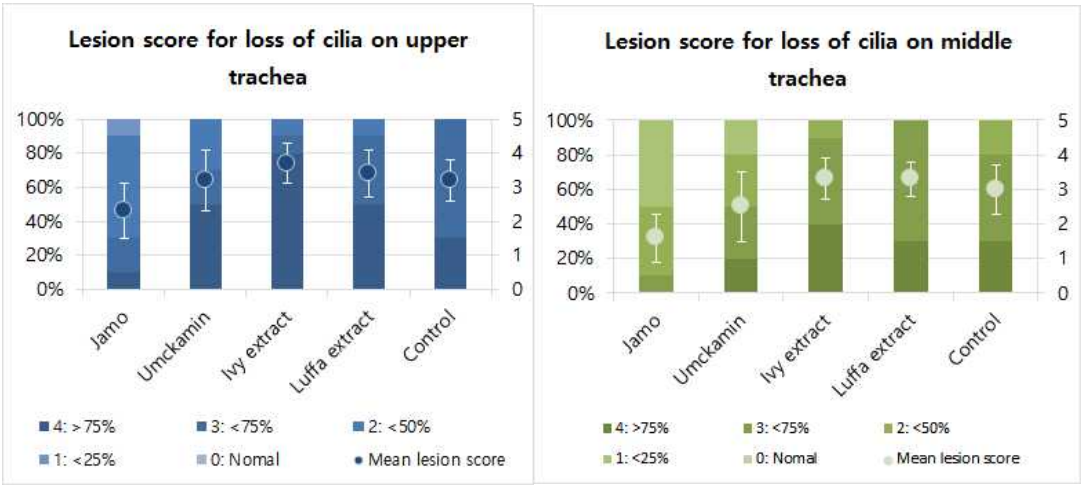
<그림 2> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 후 기관 삼출물 비교 실험



<Laryngotracheal exudate were scored as follows: 0=No exudate, 1=Mild exudate, 2=Moderate exudate, 3=Severe exudate>

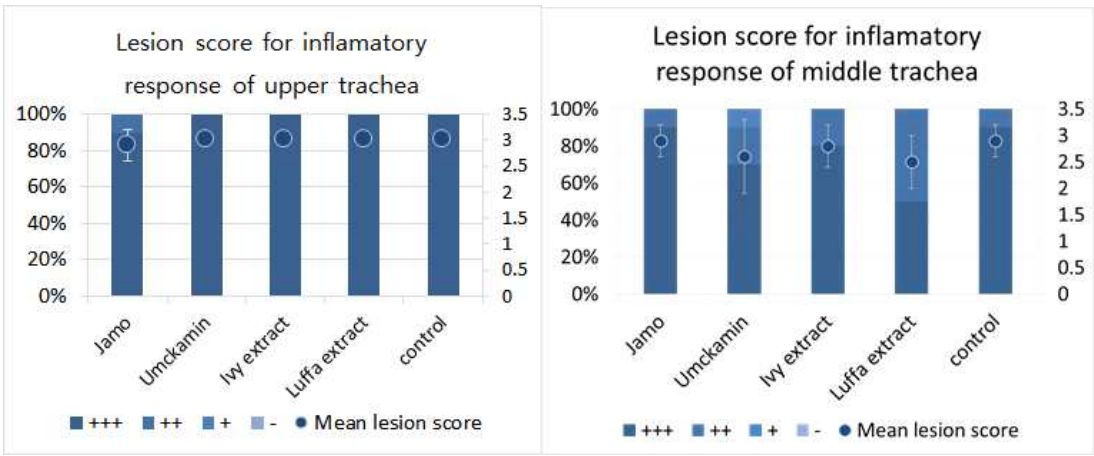
<Tracheal exudate were scored as follows: 0=No exudate, 1=Mild exudate, 2=Moderate exudate, 3=Severe exudate>

<그림 3> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 후 기관 상부 및 중부의 섬모소실지수비교 실험



<Loss of cilia: 0=normal cilia, 1=<25% cilia damaged, 2=<50%, 3=<75%, 4=>75%>

<그림 4> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 후 기관 상부 및 중부의 조직병변지수 비교 실험



<Inflammatory responses: normal=0, focal=1, mutifocal=2, diffuse=3>

(2) 천연물 제제 항바이러스 제제를 이용한 닭 호흡기 바이러스 효능평가

① 시험 방법

▶ 선행실험에서 선발된 천연물 유래 항 바이러스 후보제를 이용하여 닭 호흡기 바이러스에 대한 효능평가를 위하여 다음과 같이 시험을 실시 하였다. 총 60수의 4주령 SPF 병아리를 10수씩 6개의 그룹으로 구분하였다. 천연물 유래 항바이러스 후보제 3종(솔잎추출물, 맨드라미 추출물, 도라지 지하부추출물), 선발된 사람용거담제 1종(자모), 농장 사용중인 거담제 1종(진담산), 공격접종 양성대조군 으로 구분하였다. 천연물 유래 항바이러스 후보제 및 거담제를 각각 개체별로 7일 예방 및 5일 치료로 경구투여 하였다. 공격접종 양성대조군은 인산완충용액으로 공격접종 군과 동일한

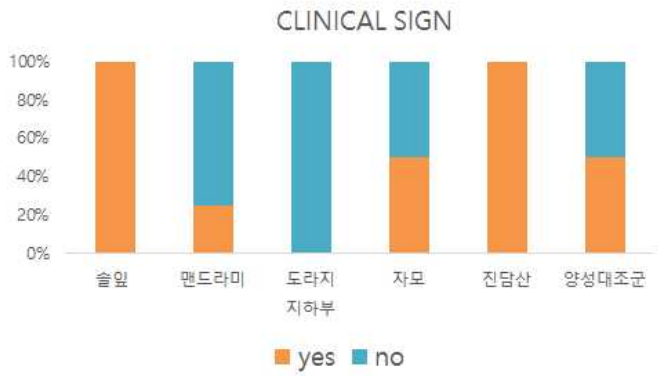
방법으로 경구투여하였다. 7일 후 공격접종용 닭 전염성 후두기관염(ILT) 바이러스 1430673주를 마리당 $10^{4.5}EID_{50}$농도의 intratracheal로 공격접종 후 3일째 임상증상 및 rale sound를 개체별로 확인하고 부검하여 기관의 부검소견 및 laryngotracheal exudate, tracheal exudate, 기관조직에서의 조직병변지수 및 섬모소실지수를 평가하였다.

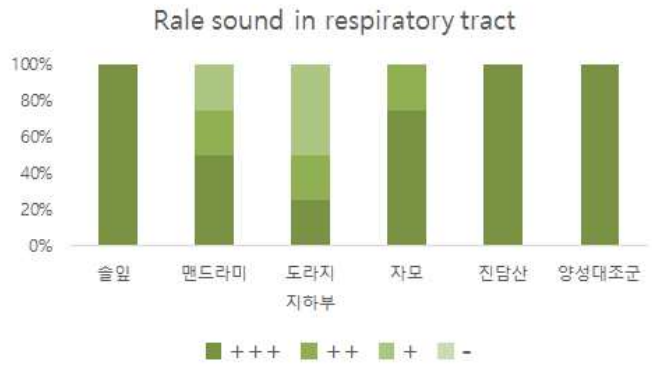
② 시험 결과

▶ 닭 전염성 후두기관염 바이러스 공격접종 3일째 임상증상을 관찰한 결과 바이러스 공격접종 군에서 몇몇 개체에서 개구호흡 및 침울 증상을 보였으며 개체별로 침울증상 및 rale sound를 확인할 수 있었다. 양성대조군은 공격접종 후 3일째 부검한 결과 기관에서 혈액삼출물 및 기관지 충혈 등의 소견을 확인하였다. 천연물제제 거담 후보제 투여군에서는 맨드라미 추출물 및 도라지지하부 추출물 투여군에서 유의적이지는 않으나 rale sound 및 임상증상이 감소함을 확인 할 수 있었으며, 공격접종 후 3일째 부검한 결과 기관에서 삼출물 및 기관지 충혈 등의 소견도 감소함을 확인할 수 있었다(그림5, 그림6).

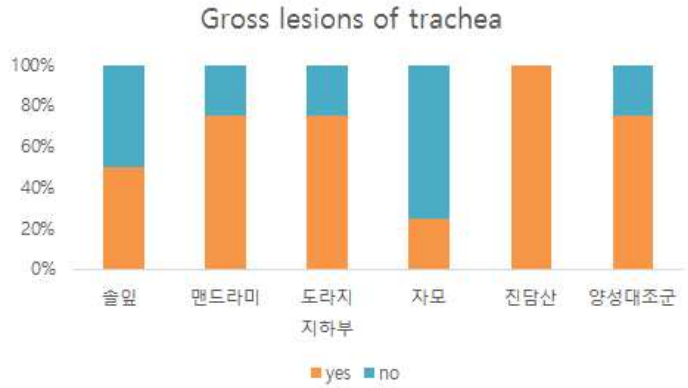
▶ 닭 전염성 후두기관염 바이러스 공격접종 후 기관 상, 중, 하부로 나누어 섬모소실지수와 조직병변지수를 평가 하였다. 기관 중부 및 하부의 섬모소실지수와 조직병변지수를 비교 실험한 결과 바이러스 공격접종 군에 비하여 솔잎추출물 및 맨드라미 추출물 그리고 도라지 지하부추출물 투여군에서 섬모소실 소견이 감소함을 확인 할 수 있었다(그림7, 그림8).

<그림 5> 닭 전염성 후두기관염 바이러스 공격접종 후 임상증상 비교 실험



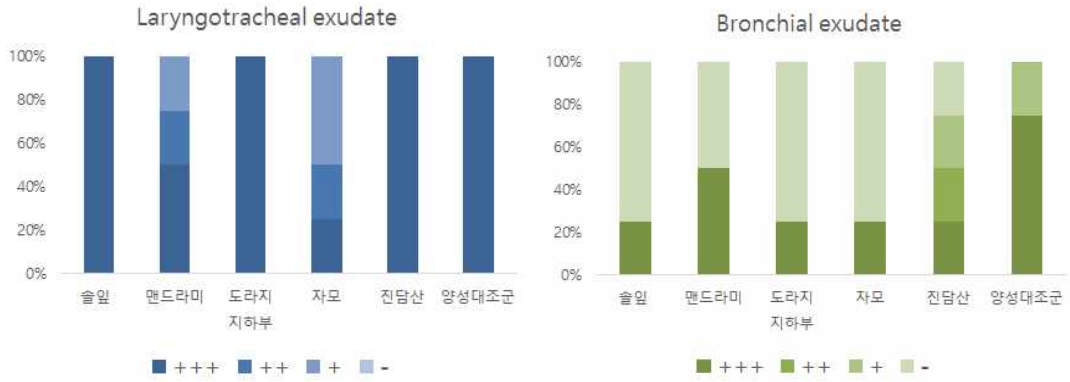


<Rales were scored as follows: 0=No sound, 1:Mild nasal rales or upper respiratory tract sounds, 2:Moderate tracheal rales, 3:severe tracheal and bronchial rales>



<Gross lesion of trachea includes tracheal congestion, hemorrhage or tracheal exudate>

<그림 6> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 후 기관 삼출물 비교 실험



<Laryngotracheal exudate were scored as follows: 0=No exudate, 1=Mild exudate, 2=Moderate exudate, 3=Severe exudate>

<Tracheal exudate were scored as follows: 0=No exudate, 1=Mild exudate, 2=Moderate

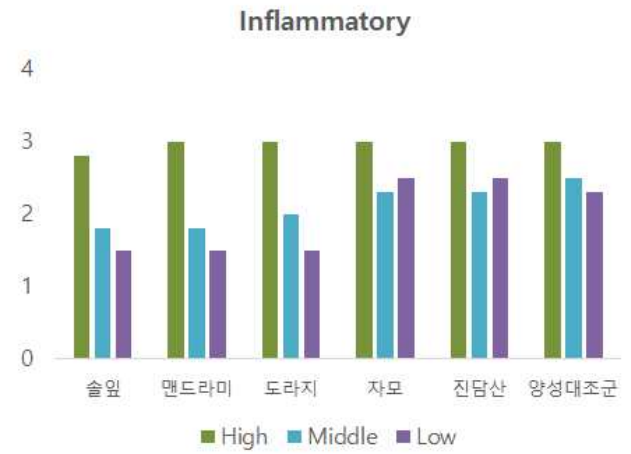
exudate, 3=Severe exudate>

<거담 후보제 투여군> <양성 대조군>

<그림 7> 닭 전염성 후두기관염 바이러스 공격접종 후 기관의 섬모소실지수 비교 실험

<Loss of cilia: 0=normal cilia, 1=<25% cilia damaged, 2=<50%, 3=<75%, 4=>75%>

<그림 8> 닭 전염성 후두기관염 바이러스 공격접종 후 기관의 조직병변지수 비교 실험



<Inflammatory responses: normal=0, focal=1, mutifocal=2, diffuse=3>

4. 호흡기 증상 완화제 선발 및 효능평가

1. 1차 년도에 개발된 평가모델을 이용한 호흡기 증상완화제 선발 및 효능평가

(1) 천연물제제 호흡기증상완화 후보제를 이용한 닭 전염성 후두기관염 바이러스효능평가

① 시험 방법

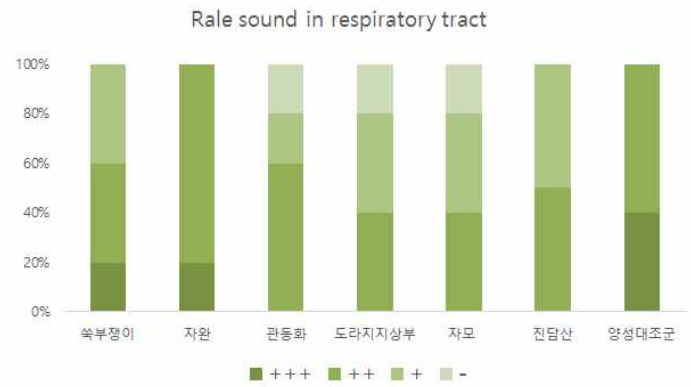
▶ 선행실험에서 선발된 천연물 유래 호흡기 증상완화 후보제를 이용하여 닭 호흡기 바이러스에 대한 효능평가를 위하여 다음과 같이 시험을 실시 하였다. 총 70수의 4주령 SPF 병아리를 10수씩 7개의 그룹으로 구분하였다. 천연물 유래 호흡기 증상완화 후보제 4종(쑥부쟁이추출물, 자완 추출물, 관동화 추출물, 도라지 지상부추출물), 선발된 사람용거담제 1종(자모), 농장 사용중인 거담제 1종(진담산), 공격접종 양성대조군 으로 구분하였다. 천연물 유래 호흡기 증상완화 후보제 및 거담제를 각각 개체별로 7일 예방 및 5일 치료로 경구투여 하였다. 공격접종 양성대조군은 인산완충용액으로 공격접종 군과 동일한 방법으로 경구투여하였다. 7일 후 공격접종용 닭 전염성 후두기관염(ILT) 바이러스 1430673주를 마리당 $10^{4.5}EID_{50}$농도의 intratracheal로 공격접종 후 3일째 임상증상 및 rale sound를 개체별로 확인하고 부검하여 기관의 부검소견 및 laryngotracheal exudate, tracheal exudate, 기관조직에서의 조직병변지수 및 섬모소실지수를 평가하였다.

② 시험 결과

▶ 닭 전염성 후두기관염 바이러스 공격접종 3일째 임상증상을 관찰한 결과 바이러스 공격접종 군에서 몇몇 개체에서 개구호흡 및 침울 증상을 보였으며 개체별로 침울증상 및 rale sound를 확인할 수 있었다. 양성대조군은 공격접종 후 3일째 부검한 결과 기관에서 혈액삼출물 및 기관지 충혈 등의 소견을 확인하였다. 천연물제제 호흡기 증상완화 후보제에서는 관동화 추출물 및 도라지지상부 추출물 투여군에서 유의적이지는 않으나 rale sound 및 임상증상이 감소함을 확인 할 수 있었으며, 공격접종 후 3일째 부검한 결과 기관에서 삼출물 및 기관지 충혈 등의 소견도 감소함을 확인 할 수 있었다(그림9, 그림10).

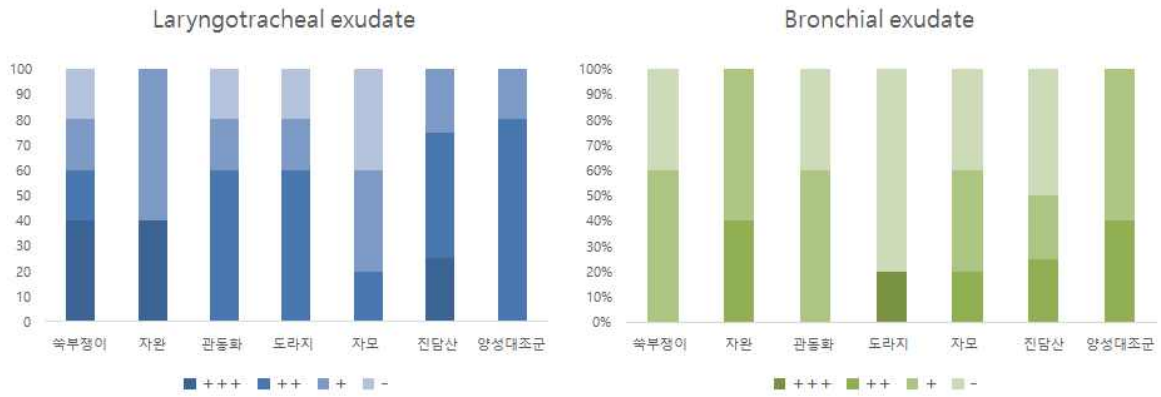
▶ 닭 전염성 후두기관염 바이러스 공격접종 후 기관 상, 중, 하부로 나누어 섬모소실지수와 조직병변지수를 평가 하였다. 기관 중부 및 하부의 섬모소실지수와 조직병변지수를 비교 실험한 결과 바이러스 공격접종 군에 비하여 관동화추출물 및 도라지 지하부추출물 투여군에서 섬모소실 및 조직병변지수 소견이 감소함을 확인 할 수 있었다(그림11, 그림12).

▶ <그림 9> 닭 전염성 후두기관염 바이러스 공격접종 후 임상증상 비교 실험



<Rales were scored as follows: 0=No sound, 1:Mild nasal rales or upper respiratory tract sounds, 2:Moderate tracheal rales, 3:severe tracheal and bronchial rales>

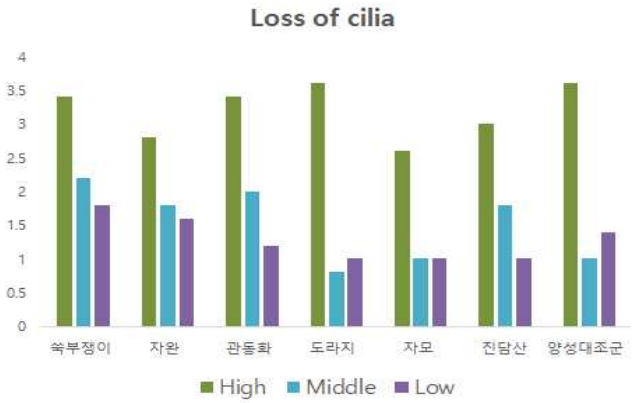
<그림 10> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 후 기관 삼출물 비교 실험



<Laryngotracheal exudate were scored as follows: 0=No exudate, 1=Mild exudate, 2=Moderate exudate, 3=Severe exudate>

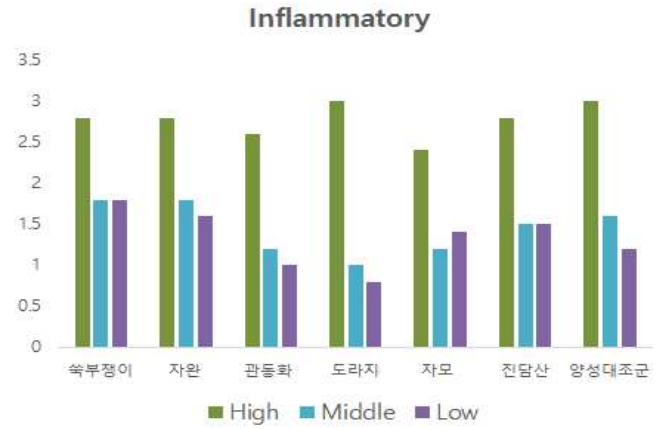
<Tracheal exudate were scored as follows: 0=No exudate, 1=Mild exudate, 2=Moderate exudate, 3=Severe exudate>

<그림 11> 닭 전염성 후두기관염 바이러스 공격접종후 기관의 섬모소실지수 실험



<Loss of cilia: 0=normal cilia, 1=<25% cilia damaged, 2=<50%, 3=<75%, 4=>75%>

<그림 12> 닭 전염성 후두기관염 바이러스 공격접종 후 기관의 조직병변지수 실험

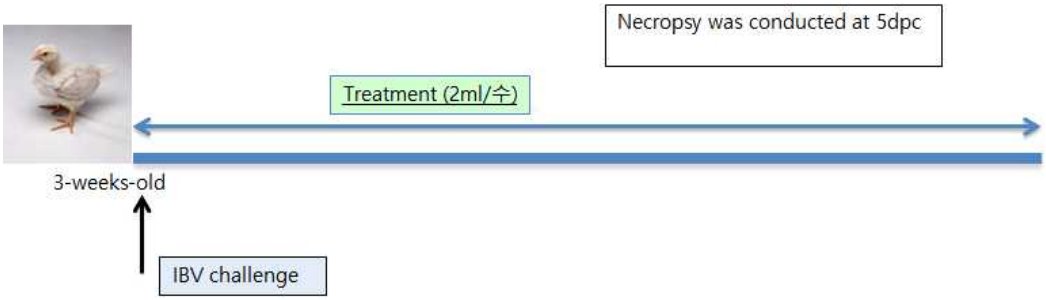


<Inflammatory responses: normal=0, focal=1, mutifocal=2, diffuse=3>

(2) 천연물제제 호흡기증상완화 후보제를 이용한 닭 전염성 기관지염 바이러스효능평가

① 시험 방법

▶ 선행실험에서 선발된 천연물 유래 호흡기 증상완화 후보제를 이용하여 닭 호흡기 바이러스에 대한 효능평가를 위하여 다음과 같이 시험을 실시 하였다. 총 60수의 3주령 SPF 병아리를 10수씩 6개의 그룹으로 구분하였다. 천연물 유래 호흡기 증상완화 후보제 3종(관동화 추출물, 도라지 지상부 추출물, 도라지 지하부추출물), 선발된 사람용거담제 1종(자모), 농장 사용중인 거담제 1종(진담산), 공격접종 양성대조군으로 구분하였다. 천연물 유래 호흡기 증상완화 후보제 및 거담제를 각각 개체별로 7일 치료로 경구투여 하였다. 공격접종 양성대조군은 인산완충용액으로 공격접종 군과 동일한 방법으로 경구투여하였다. 닭 전염성 기관지염 바이러스 M41주를 마리당 $10^{5.5}EID_{50}$농도의 점안접종으로 공격접종 후 5일째 임상증상 및 rale sound를 개체별로 확인하고 10일 동안 닭 체중을 측정하였다. 공격접종 후 5일째 부검하여 기관의 부검소견 및 laryngotracheal exudate, 기관조직에서의 조직병변지수 및 섬모소실지수를 평가하였다.



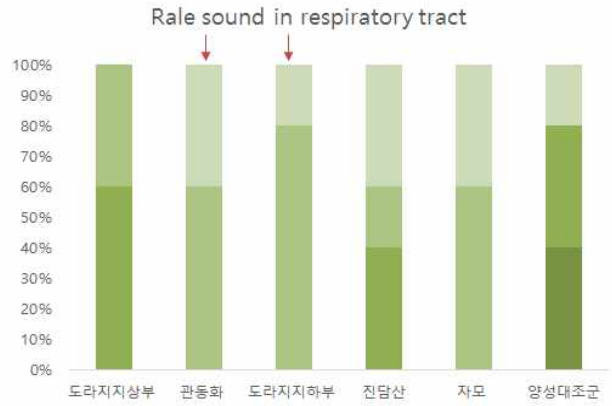
② 시험 결과

▶ 닭 전염성 기관지염 바이러스 공격접종 5일째 임상증상을 관찰한 결과 바이러스 공격접종 군에서 몇몇 개체에서 개구호흡 및 침울 증상을 보였으며 개체별로 침울증상 및 rale sound를 확인 할 수 있었다. 양성대조군은 공격접종 후 5일째 부검한 결과 기관에서 삼출물등의 소견을 확인하였다. 천연물제제 호흡기 증상완화 후보제에서는 관동화 추출물 및 도라지지하부 추출물 투여군에서 유의적이지는 않으나 rale sound 및 임상증상이 감소함을 확인 할 수 있었으며, 공격접종 후 5일째 부검한 결과 기관에서 삼출물 등의 소견도 감소함을 확인 할 수 있었다(그림13).

▶ 닭 전염성 기관지염 바이러스 공격접종 후 기관 상, 중, 하부로 나누어 섬모소실지수와 조직병변지수를 평가 하였다. 기관의 섬모소실지수와 조직병변지수를 비교 실험한 결과 바이러스 공격접종 군에 비하여 관동화추출물 및 도라지 지하부추출물 투여군에서 섬모소실지수가 기관 상부에서 감

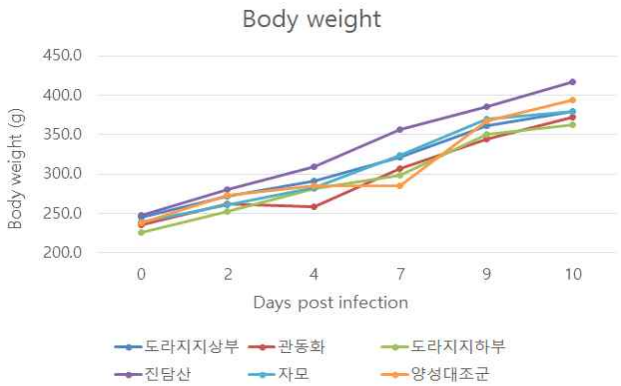
소함을 확인 할 수 있었다(그림16).

<그림 13> 닭 전염성 기관지염 바이러스 공격접종 후 임상증상 비교 실험

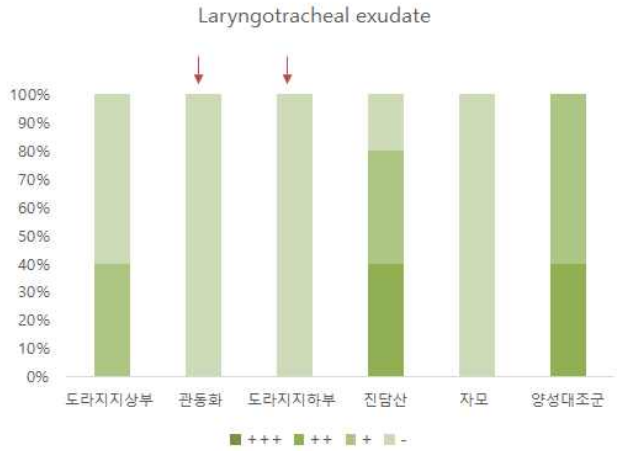


<Rales were scored as follows: 0=No sound, 1:Mild nasal rales or upper respiratory tract sounds, 2:Moderate tracheal rales, 3:severe tracheal and bronchial rales>

<그림 14> 닭 전염성 기관지염 바이러스 공격접종 후 체중변화



<그림 15> 닭 전염성 기관지염 바이러스 공격접종 후 기관삼출물 비교시험



<Laryngotracheal exudate were scored as follows: 0=No exudate, 1=Mild exudate, 2=Moderate exudate, 3=Severe exudate>

<호흡기 증상완화 후보제 투여군>

<양성 대조군>

<그림 16> 닭 전염성 후두기관염 바이러스 공격접종후 기관의 섬모소실지수 실험

<Loss of cilia: 0=normal cilia, 1=<25% cilia damaged, 2=<50%, 3=<75%, 4=>75%>

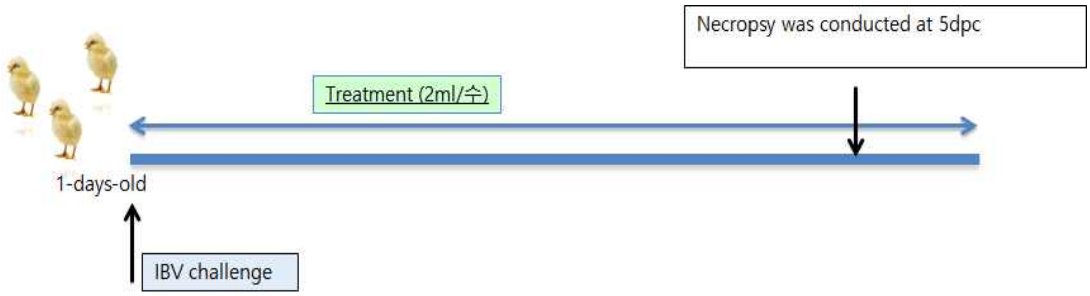
(3) 선발된 천연물제제 호흡기증상완화 후보제를 이용한 닭 전염성 기관지염 바이러스효능평가

① 시험 방법

▶ 선행실험에서 선발된 천연물 유래 호흡기 증상완화 후보제를 이용하여 닭 호흡기 바이러스에 대한 효능평가를 위하여 다음과 같이 시험을 실시 하였다. 총 60수의 1일령 SPF 병아리를 10수씩 3개의 그룹으로 구분하였다. 선발된 천연물 유래 호흡기 증상완화 후보제 2종(관동화 추출물, 도라지지하부추출물), 공격접종 양성대조군으로 구분하였다. 천연물 유래 호흡기 증상완화 후보제 및 거담제를 각각 개체별로 7일 치료로 경구투여 하였다. 공격접종 양성대조군은 인산완충용액으로 공격접종 군과 동일한 방법으로 경구투여하였다. 닭 전염성 기관지염 바이러스 M41주를 마리당 $10^{5.5}EID_{50}$농도의 점안접종으로 공격접종 후 5일째 임상증상 및 rale sound를 개체별로 확인하고 10일 동안 닭 체중을 측정하였다. 공격접종 후 5일째 부검하여 기관의 부검소견 및 laryngotracheal exudate, 기관조직에서의 조직병변지수 및 섬모소실지수를 평가하였다.

② 시험 결과

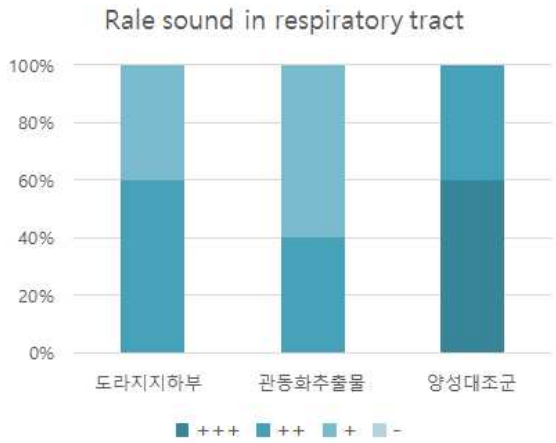
▶ 닭 전염성 기관지염 바이러스 공격접종 5일째 임상증상을 관찰한 결과 바이러스 공격접종 양성대



조군에서 몇몇 개체에서 개구호흡 및 침울 증상을 보였으며 개체별로 침울증상 및 rale sound를 확인 할 수 있었다. 선발된 천연물제제 호흡기 증상완화 후보제에서는 관동화 추출물 및 도라지지하부 추출물 투여군에서 유의적이지는 않으나 rale sound 및 임상증상이 감소함을 확인 할 수 있었다(그림17).

▶ 닭 전염성 기관지염 바이러스 공격접종 후 기관 상, 중, 하부로 나누어 섬모소실지수와 조직병변지수를 평가 하였다. 기관의 섬모소실지수와 조직병변지수를 비교 실험한 결과 바이러스 공격접종군에 비하여 도라지 지하부추출물 투여군에서 섬모소실지수가 기관 상, 중, 하부에서 감소함을 확인 할 수 있었다(그림18).

<그림 17> 닭 전염성 기관지염 바이러스 공격접종 후 임상증상 비교 실험



<Rales were scored as follows: 0=No sound, 1:Mild nasal rales or upper respiratory tract sounds, 2:Moderate tracheal rales, 3:severe tracheal and bronchial rales>

<그림 18> 닭 전염성 후두기관염 바이러스 공격접종후 기관의 섬모소실지수 실험

<Loss of cilia: 0=normal cilia, 1=<25% cilia damaged, 2=<50%, 3=<75%, 4=>75%>

5. 호흡기 질병 항바이러스 제제 및 증상완화제 실용화 방법 연구

- 2차 년도에 평가가 완료된 항바이러스제제 및 증상완화제들의 조합을 통한 실용화 연구

진행

(1) 선발된 동물용 화학제제 거담제 및 천연물 유래 항바이러스 후보 제제의 조합을 이용한 닭 호흡기 바이러스 효능평가

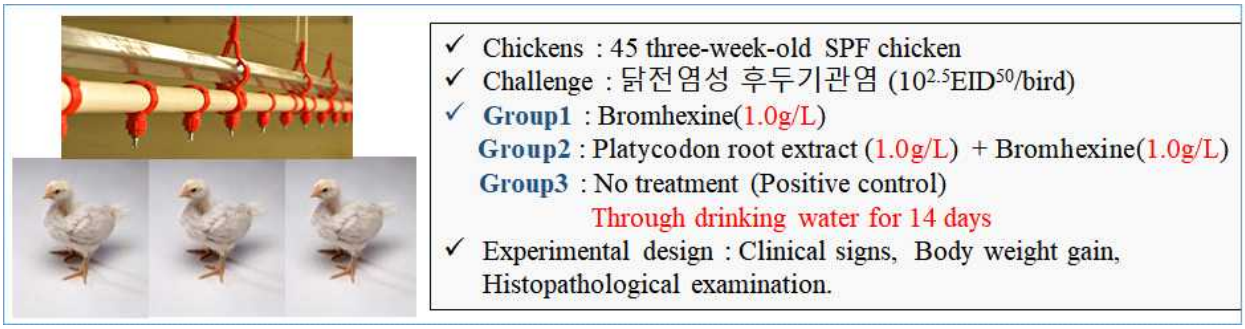
① 시험 방법

▶닭 호흡기 바이러스 평가모델을 이용하여 선행시험에서 시중에 판매되고 있는 거담제로서 효능을 검증받은 동물용 화학제제 거담제 브롬헥신(Bromhexine) 및 천연물 유래 항바이러스 후보제제 도라지 추출물 조합을 이용하여 닭 호흡기 바이러스에 대한 효능평가를 확인하기 위하여 다음과 같이 시험을 실시하였다(그림 1). 총 45수의 3주령 SPF 병아리를 15수씩 3개의 그룹으로 구분하였다. 3주령 SPF 병아리 45수에 닭 전염성 후두기관염 바이러스를 마리당 $10^{2.5}EID_{50}$ 기관 및 점안내 공격접종 하였다. 공격접종 후 동물용 화학제제 거담제 브롬헥신(Bromhexine)1.0g/L 투여 그룹, 선발된 천연물 유래 항바이러스 후보제제 도라지 추출물 1.0g/L + 도라지 추출물(1.0g/L) 투여그룹을 14일간 음수투여 하였다. 항바이러스 후보제제를 투여하지 않은 공격접종 양성대조군은 인산완충용액으로 시험군과 동일한 방법으로 투여하였다. 닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 임상증상 및 rale sound를 개체별로 확인하고 부검하여 기관의 부검소견 및 laryngotracheal exudate, tracheal exudate, 기관조직에서의 조직병변지수 및 섬모소실지수를 평가하였다. 또한, 14일간 증체율을 측정하였다(그림2, 그림3).

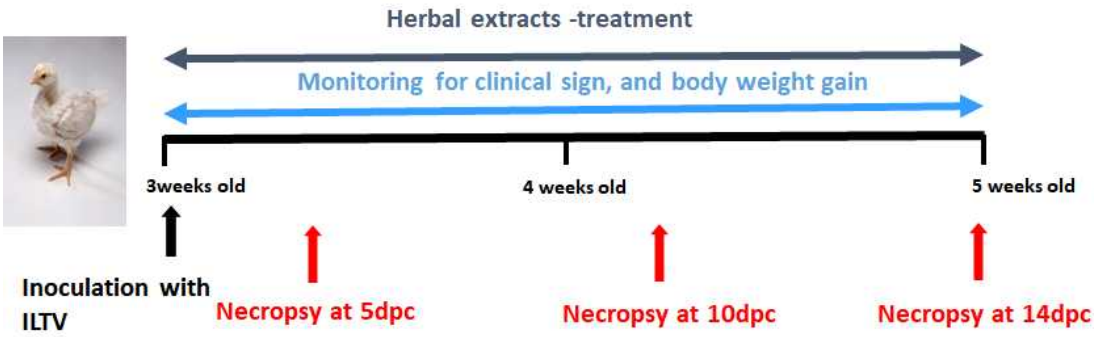
<그림 1> 선발된 동물용 화학제제 거담제 및 천연물 유래 항바이러스 후보 제제

도라지(Platycodon root) 브롬헥신(Bromhexine)

<그림 2> 선발된 동물용 화학제제 거담제 및 천연물 유래 항바이러스 후보 제제 투여 방법



<그림 3> 선발된 동물용 화학제제 거담제 및 천연물 유래 항바이러스 후보 제제 투여기간

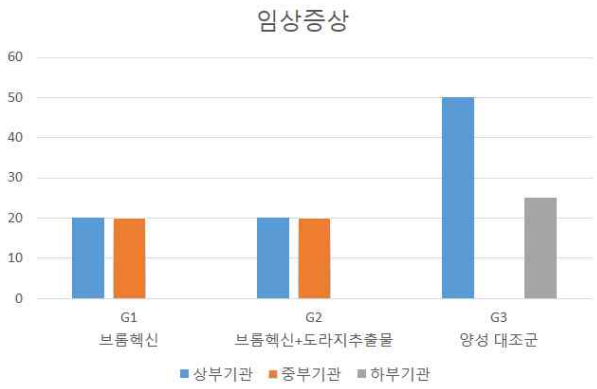


② 시험 결과

▶닭 호흡기 바이러스 공격접종 13일 동안 임상증상을 관찰한 결과 항바이러스 후보제제 투여를 하지 않은 바이러스 공격접종 군에서 몇몇 개체에서 개구호흡 및 침울 증상을 보였으며 개체별로 nasal exudate 및 rale sound를 확인 할 수 있었다. 공격접종 후 5일째 바이러스 공격접종 군 부검한 결과 비강 및 기관에서 삼출물 및 기관지 충혈 등의 소견을 확인하였다. 반면, 천연물 유래 항바이러스 후보제제 도라지 추출물+브롬헥신(Bromhexine)은 공격접종 양성대조군에 비하여 기관 상부기관 및 하부기관에서 유의적이지는 않으나 기관내

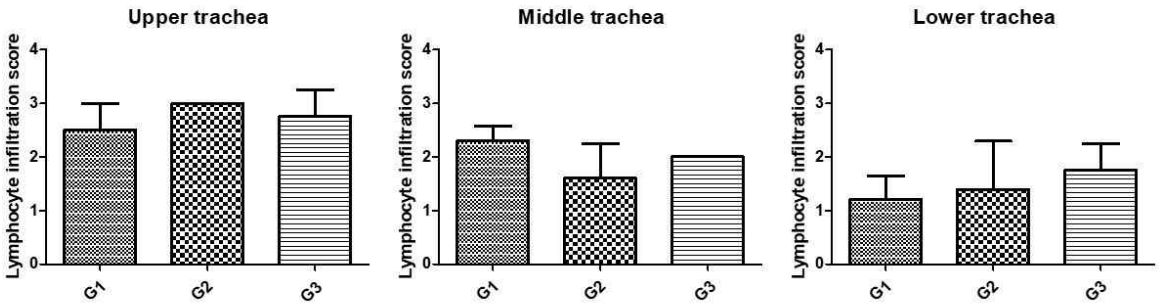
충출혈 임상증상이 감소함을 확인 할 수 있었다(그래프 1).

<그래프 1> 닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 기관내 충출혈 임상증상

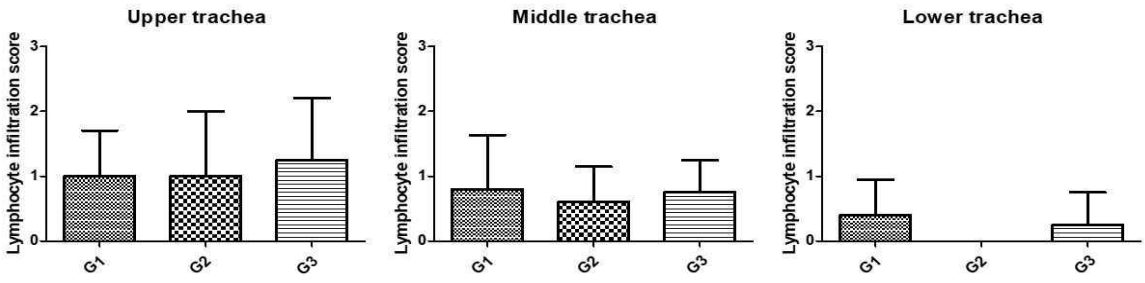


▶닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 5일, 10일, 14일째 그룹별 각각 기관조직을 상부, 중부, 하부로 나누어 조직병변지수를 검사한 결과 기관내 염증세포 침윤에서는 천연물 유래 항바이러스 후보제제 도라지 추출물+ 브롬헥신(Bromhexine) 투여군이 닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 10일째 부터 기관조직의 상부, 중부, 하부의 조직병변지수가 항바이러스 후보제제 투여하지 않은 공격접종 양성 대조군에 비하여 유의적이지는 않으나 감소함을 확인 할 수 있었다 (그래프 3, 그래프 4).

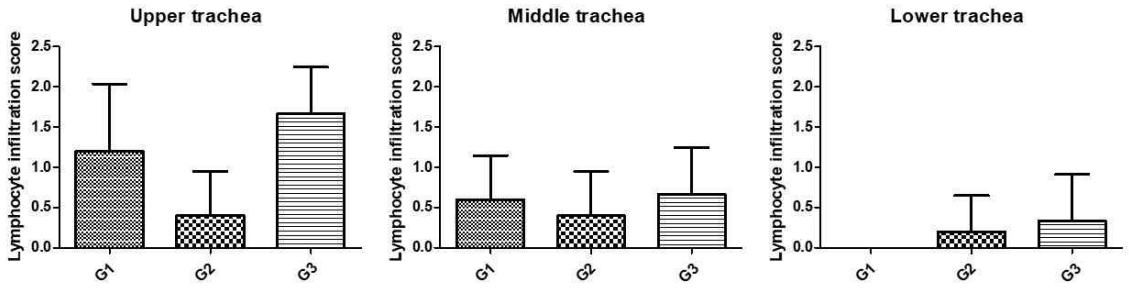
<그래프 2> 닭 호흡기 바이러스 공격접종 5일 후 조직병변지수



<그래프 3> 닭 호흡기 바이러스 공격접종 10일 후 조직병변지수

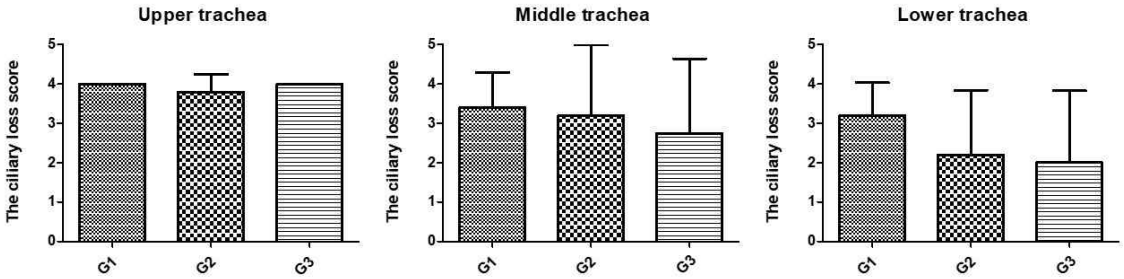


<그래프 4> 닭 호흡기 바이러스 공격접종 14일 후 조직병변지수

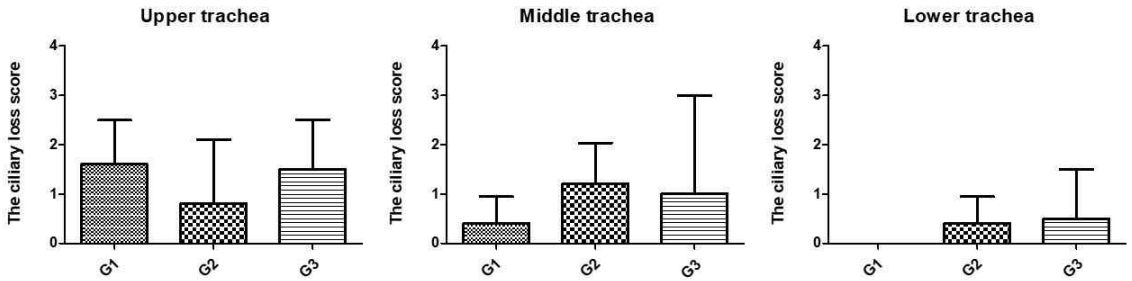


▶닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 그룹별 각각 기관조직을 상부, 중부, 하부로 나누어 섬모소실지수를 검사한 결과 천연물 유래 항바이러스 후보제제 추출물+브롬헥신(Bromhexine) 투여군이 바이러스 후보제제 투여하지 않은 공격접종 양성 대조군에 비하여 유의적인 차이를 확인 할 수 없었다.

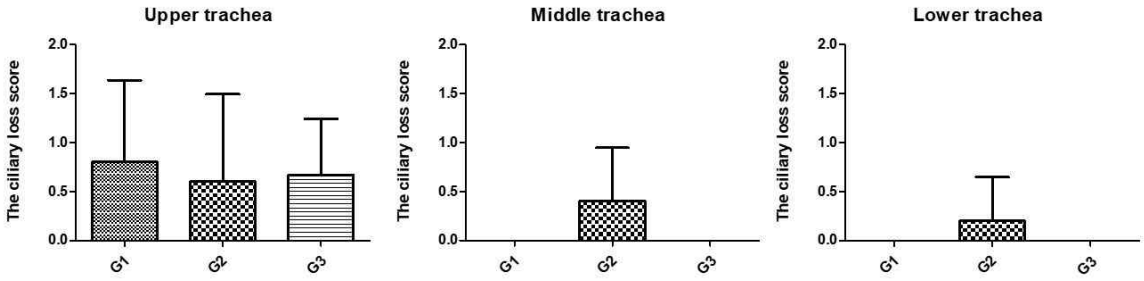
<그래프 5> 닭 호흡기 바이러스 공격접종 5일 후 섬모소실지수



<그래프 6> 닭 호흡기 바이러스 공격접종 10일 후 섬모소실지수



<그래프 7> 닭 호흡기 바이러스 공격접종 14일 후 섬모소실지수



2. 각 제제들의 효과기전이 다른 점을 활용하여 평가가 완료된 항바이러스제제 및 증상완화 제들의 적용방법에 따른 최적의 실용화 연구 진행

(1) 선발된 동물용 화학제제 거담제 및 천연물 유래 항바이러스 후보 제제들의 적용방법을 이용한 닭 호흡기 바이러스 효능평가

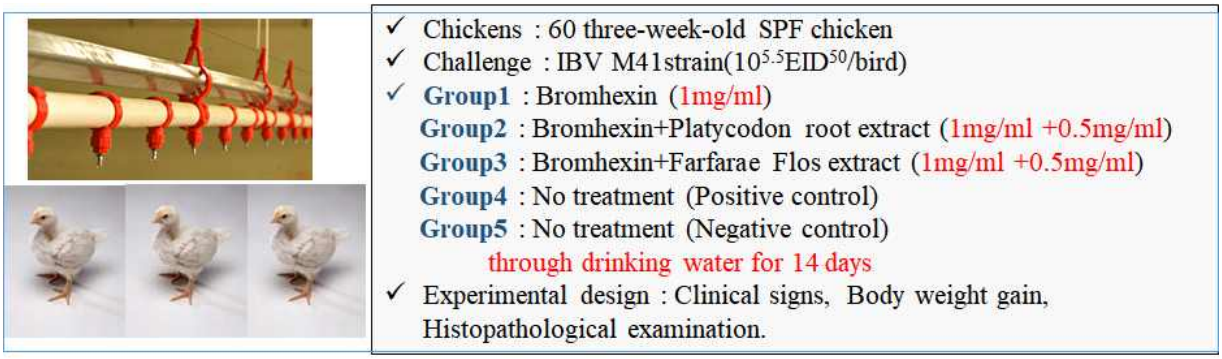
① 시험 방법

▶닭 호흡기 바이러스 평가모델을 이용하여 선행시험에서 시중에 판매되고 있는 거담제로서 효능을 검증받은 동물용 화학제제 거담제 브롬헥신(Bromhexine) 및 천연물 유래 항바이러스 후보제제 관동화 추출물 및 도라지 추출물 저농도 투여를 통하여 닭 호흡기 바이러스에 대한 효능평가를 확인하기 위하여 다음과 같이 시험을 실시하였다(그림 1). 총 75수의 3주령 SPF 병아리를 15수씩 5개의 그룹으로 구분하였다. 3주령 SPF 병아리 60수에 M41주(Mass group)를 마리당 $10^{5.5}EID_{50}$ 기관내 공격접종 하였다. 공격접종 후 선발된 천연물 유래 항바이러스 후보제제 도라지 지하부 추출물 0.5mg/ml, 관동화 추출물 0.5mg/ml, 브롬헥신(Bromhexine)+ 도라지 지하부 추출물(0.5mg/ml), 브롬헥신(Bromhexine)+ 관동화 추출물(0.5mg/ml)을 14일간 음수투여 하였다. 항바이러스 후보제제를 투여하지 않은 공격접종 양성대조군은 인산완충용액으로 시험군과 동일한 방법으로 투여하였다. 닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 임상증상 및 rale sound를 개체별로 확인하고 부검하여 기관의 부검소견 및 laryngotracheal exudate, tracheal exudate, 기관조직에서의 조직병변지수 및 섬모소실지수를 평가하였다. 또한, 14일간 증체율을 측정하였다(그림2, 그림3).

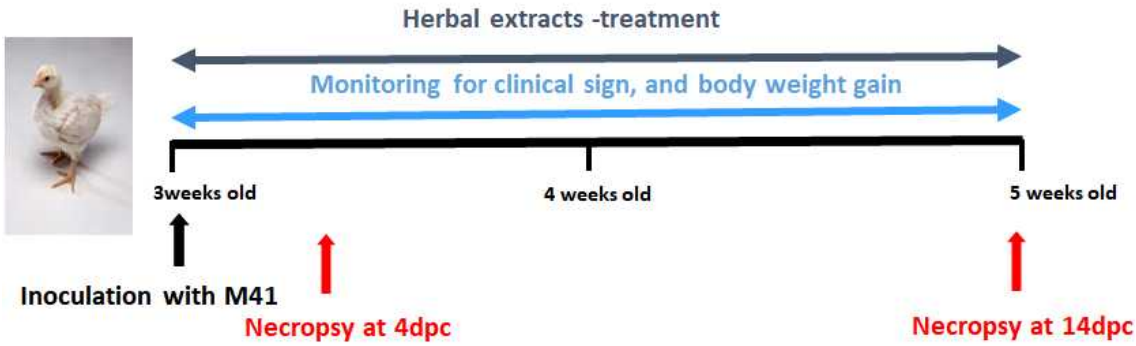
<그림 4> 선발된 동물용 화학제제 거담제 및 천연물 유래 항바이러스 후보 제제

관동화(Farfarae Flos)　　도라지(Platycodon root)　　브롬헥신(Bromhexine)

<그림 5> 선발된 동물용 화학제제 거담제 및 천연물 유래 항바이러스 후보 제제 투여 방법



<그림 6> 선발된 동물용 화학제제 거담제 및 천연물 유래 항바이러스 후보 제제 투여기간

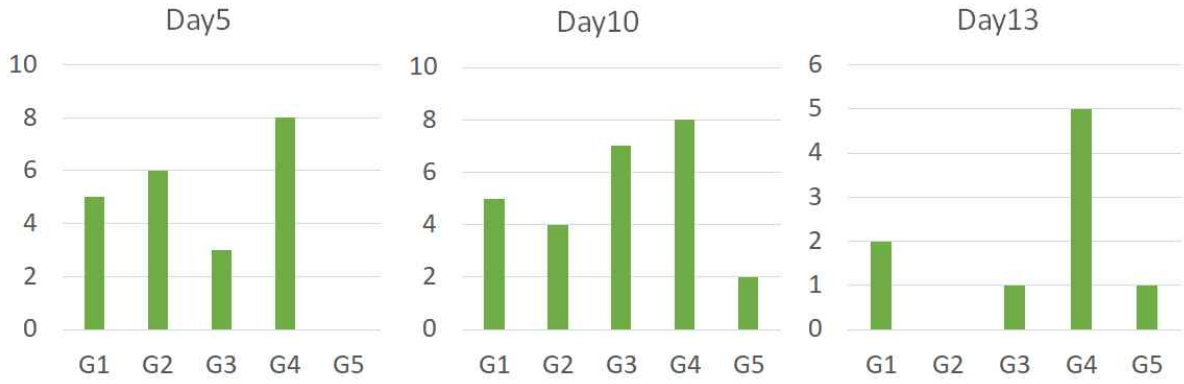


③ 시험 결과

▶닭 호흡기 바이러스 공격접종 13일 동안 임상증상을 관찰한 결과 항바이러스 후보제제 투여를 하지 않은 바이러스 공격접종 군에서 몇몇 개체에서 개구호흡 및 침울 증상을 보였으며 개체별로 nasal exudate 및 rale sound를 확인 할 수 있었다. 공격접종 후 5일째 바이러스 공격접종 군 부검한 결과 비강 및 기관에서 삼출물 및 기관지 충혈 등의 소견을 확인하였다. 반면, 천연물 유래 항바이러스 후보제제 도라지지하부 추출물+ 브롬헥신

(Bromhexine)은 공격접종 양성대조군에 비하여 임상증상이 감소하여 특히, 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 이후 14일째에 회복이 빨라짐을 확인 할 수 있었다. 또한, 천연물 유래 항바이러스 후보제제 관동화 추출물+브롬헥신(Bromhexine)은 공격접종 양성대조군에 비하여 기관내 삼출물 정도가 낮아 임상증상이 감소하여 특히, 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 이후 14일째에 회복이 빨라짐을 확인 할 수 있었다(그래프 1).

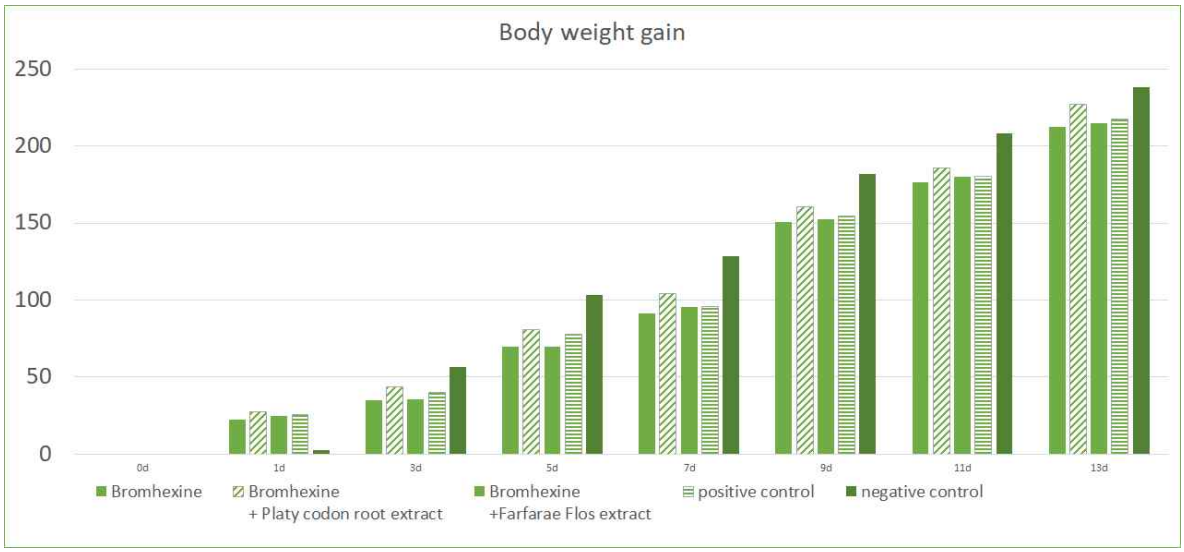
<그래프 8> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 후 임상증상 비교 실험



< Score as follows: 0=normal, 1=<25%, 2=<50%, 3=<75%, 4=>75% >

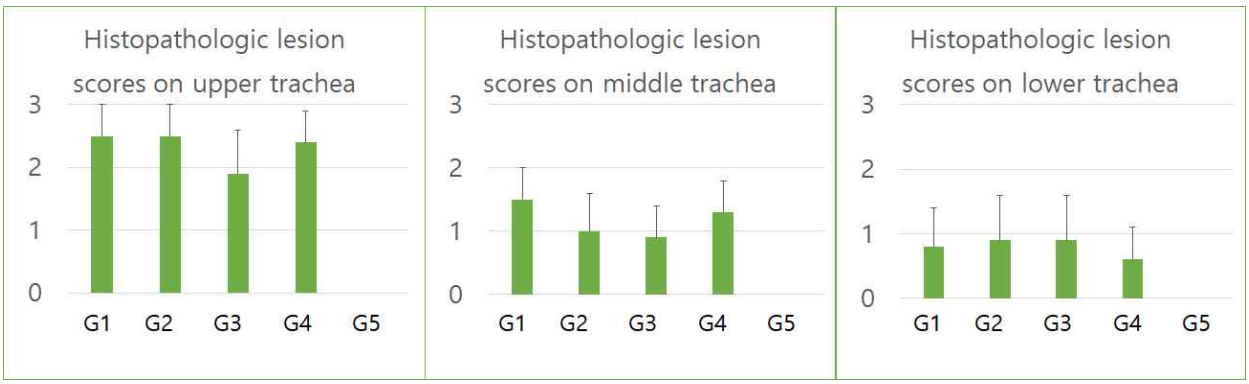
▶닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 14일 동안 그룹별 각각 체중변화를 측정한 결과 항바이러스 후보제제를 투여하지 않은 공격접종 양성대조군의 체중이 공격접종 음성대조군의 체중에 비하여 감소함을 확인 할 수 있었다. 반면, 천연물 유래 항바이러스 후보제제 도라지 추출물+브롬헥신(Bromhexine) 투여군은 공격접종 음성대조군에 비해 유의적이지는 않지만 유사한 증체율을 확인 할수 있었다.

<그래프 9> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 후 체중변화측정



▶닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 14일 째 그룹별 각각 기관조직을 상부, 중부, 하부로 나누어 조직병변지수를 검사한 결과 기관내 염증세포 침윤에서는 천연물 유래 항바이러스 후보제제 관동화 추출물+브롬헥신(Bromhexine)투여군이 기관 상부 및 중부에서 바이러스 후보제제 투여하지 않은 공격접종 양성 대조군에 비하여 유의적이지는 않지만 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(그래프 10).

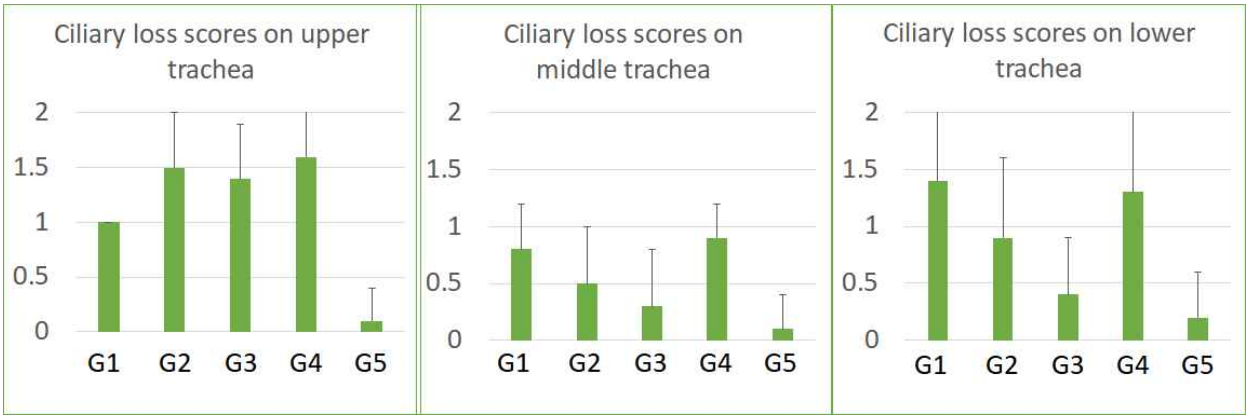
<그래프 10> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 14일 후 조직병변지수



<Inflammatory responses: normal=0, focal=1, mutifocal=2, diffuse=3>

▶닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 14일 째 그룹별 각각 기관조직을 상부, 중부, 하부로 나누어 섬모소실을 검사한 결과 천연물 유래 항바이러스 후보제제 도라지지하부 추출물+브롬헥신(Bromhexine) 투여군 및 항바이러스 후보제제 관동화 추출물+브롬헥신(Bromhexine) 투여군이 기관 중부 및 하부에서 바이러스 후보제제 투여하지 않은 공격접종 양성 대조군에 비하여 감소한 것을 확인 할 수 있었다(그래프 11).

<그래프 11> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 14일 후 섬모소실지수



<Loss of cilia: 0=normal cilia, 1=<25% cilia damaged, 2=<50%, 3=<75%, 4=>75%>

6. 호흡기 질병 항바이러스 제제 및 증상완화제 사용 매뉴얼 작성

- 2차 년도에 평가에 따른 호흡기 질병 항바이러스제제 및 증상완화제 투여 용법 및 적용시기를 평가함으로써 항바이러스제제 및 증상 완화제들의 동시적용 및 순차적 적용을 통한 최적의 실용화 매뉴얼 작성

(1) 선발된 사람용 거담제 및 천연물 유래 항바이러스 후보제제 고농도 및 단기간 치료에 대한 닭 호흡기 바이러스 효능평가

① 시험 방법

▶ 닭 호흡기 바이러스 평가모델을 이용하여 선행시험에서 거담제로서 효능을 검증받은 사람용 거담제 JAMO(오스틴제약) 및 천연물 유래 항바이러스 후보제제 관동화 추출물 및 도라지 추출물 고농도투여를 통하여 닭 호흡기 바이러스에 대한 효능평가를 확인하기 위하여 다음과 같이 시험을 실시하였다. 총 40수의 3주령 SPF 병아리를 10수씩 4개의 그룹으로 구분하였다. 3주령 SPF 병아리 40수에 M41주(Mass group)를 마리당 $10^{5.5}EID_{50}$ 기관내 공격접종 하였다. 공격접종 후 선발된 천연물 유래 항바이러스 후보제제 도라지지하부 추출물 25mg/ml, 관동화 추출물 25mg/ml, 사람용 거담제 JAMO 125mg/ml을 마리당 2ml 씩 7일간 경구투여하였다. 항바이러스 후보제제를 투여하지 않은 공격접종 양성대조군은 인산완충용액으로 시험군과 동일한 방법으로 투여하였다. 닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 임상증상 및 rale sound를 개체별로 확인하고 부검하여 기관의 부검소견 및 laryngotracheal

exudate, tracheal exudate, 기관조직에서의 조직병변지수 및 섬모소실지수를 평가하였다. 또한, 7일간 증체율을 측정하였다.

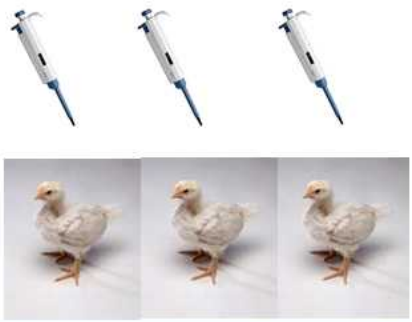
<그림 7> 선발된 사람용 거담제 및 천연물 유래 항바이러스 후보 제제

관동화(Farfarae Flos)

도라지(Platycodon root)

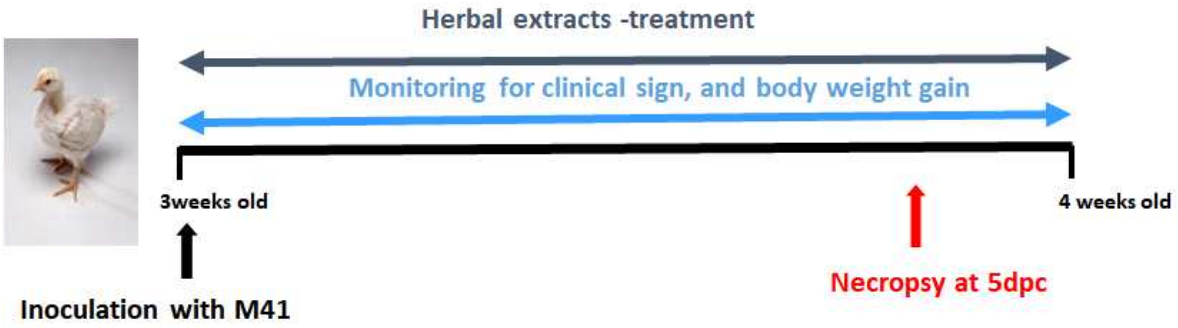
Jamo (herbal extract mixture)

<그림 8> 선발된 사람용 거담제 및 천연물 유래 항바이러스 후보 제제 투여 방법



- ✓ Chickens : 40 three-week-old SPF chickens
- ✓ Challenge : IBV M41strain($10^{5.5}EID^{50}$/bird)
- ✓ **Group1** : Farfarae Flos extract (25mg/ml)
  Group2 : Platycodon root extract (25mg/ml)
  Group3 : Jamo (125mg/ml)
  Group4 : No treat ment (Positive control)
  administerd 2ml once a day for 7 days
- ✓ Experimental design : Clinical signs, Gross lesions, Body weight gain, Histopathological examination.

<그림 9> 선발된 사람용 거담제 및 천연물 유래 항바이러스 후보 제제 투여기간



④ 시험 결과

▶닭 호흡기 바이러스 공격접종 5일 후 임상증상을 관찰한 결과 바이러스 공격접종 군에서 몇몇 개체에서 개구호흡 및 침울 증상을 보였으며 개체별로 nasal exudate 및 rale sound를 확인 할 수 있었다. 공격접종 후 5일째 바이러스 공격접종 군 부검한 결과 비강 및 기관에서 삼출물 및 기관지 충혈 등의 소견을 확인하였다.

천연물 유래 항바이러스 후보제제 도라지지하부 추출물, 관동화 추출물 투여군에서 유의적으로 rale sound 및 nasal exudate 지수가 감소함을 확인 할 수 있었다. 또한, 사람용 거담제 JAMO 투여군에서도 rale sound 및 nasal exudate 지수가 감소함을 확인 할 수 있었다(표 1).

<표 1> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 후 임상증상 비교 실험

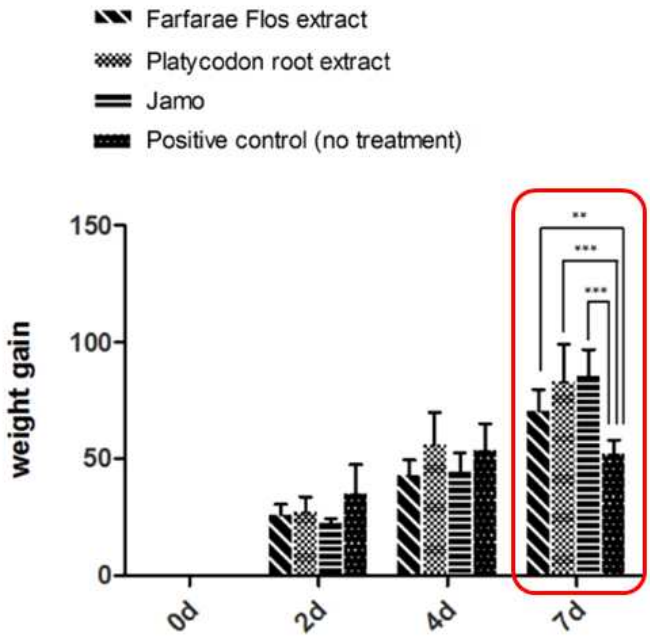
Mucolytic agent	Rale sound[A] (mean ± SD)	Tracheal exudate[B] (mean ± SD)
Farfarae Flos extract	$0.6 \pm 0.4^{**}$	$0.4 \pm 0.4^{***}$
Platycodon root extract	$0.8 \pm 0.4^{*}$	$0.6 \pm 0.4^{***}$
Jamo (herbal extract mixture)	$0.6 \pm 0.4^{**}$	$0.6 \pm 0.4^{***}$
Positive control (no treatment)	2.0 ± 1.0	2.4 ± 0.4

▶호흡기 바이러스 공격접종 후 7일 동안 그룹별 각각 체중변화를 측정한 결과 천연물 유래 항바이러스 후보제제 도라지 추출물 및 JAMO 투여군이 항바이러스 후보제제 투여하지 않은 공격접종 양성 대조군에 비하여 바이러스 공격접종 후 4일째부터 7일째에 그룹별로 각각 체중이 유의적으로 증가함을 확인 할수 있었다. 또한, 천연물 유래 항바이러스 후보제제 관동

화 추출물 투여군에서도 공격접종 양성 대조군에 비하여 바이러스 공격접종 후 4일째부터 7일째에 그룹별로 각각 체중이 유의적으로 증가함을 확인 할수 있었다(그래프 12).

▶닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 5일 째 그룹별 각각 기관조직을 상부, 중부, 하부로 나누어 조직병변지수를 검사한 결과 기관내 염증세포 침윤에서는 천연물 유래 항바이러스 후보제제 투여군이 바이러스 후보제제 투여하지 않은 공격접종 양성 대조군에 비하여 유의적인 차이를 확인 할 수 없었다(그래프 13).

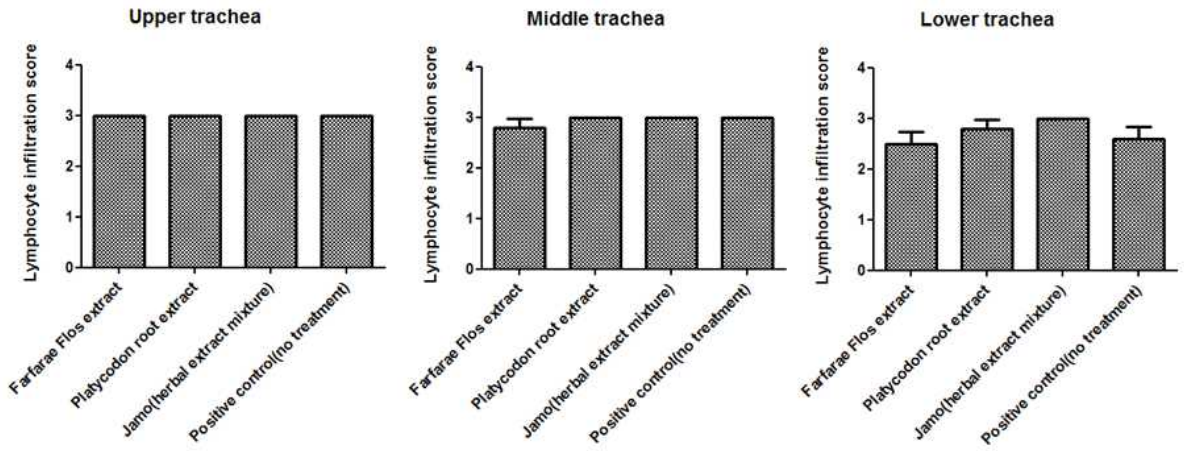
<그래프 12> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 후 체중변화측정



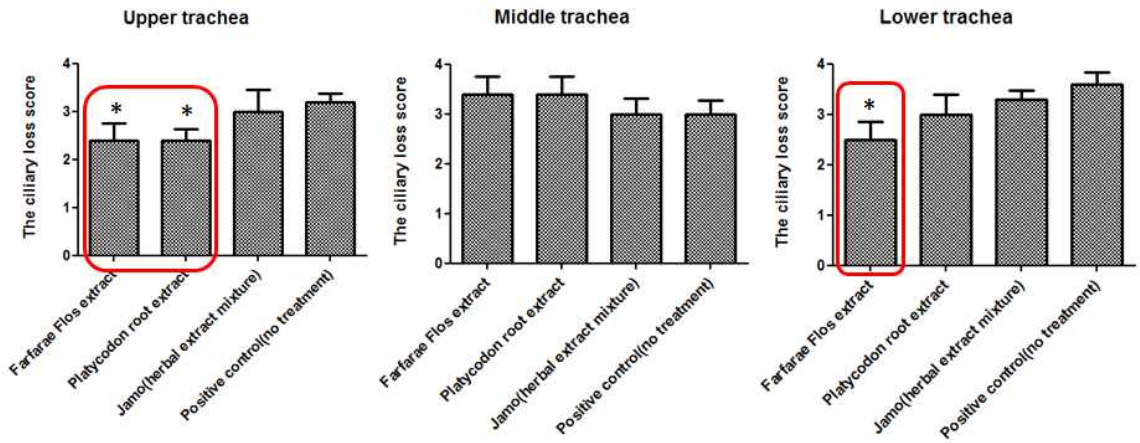
<그래프 13> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 후 조직병변지수

<Inflammatory responses: normal=0, focal=1, mutifocal=2, diffuse=3>

▶닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 5일 째 그룹별 각각 기관조직을 상부, 중부, 하부로 나누어 섬모소실을 검사한 결과 천연물 유래 항바이러스 후보제제 관동화 추출물 및 도라지 추출물 투여군이 기관 상부 및 하부에서 바이러스 후보제제 투여하지 않은 공격접종 양성 대조군에 비하여 유의적으로 감소한 것을 확인 할 수 있었다(그래프 14).



<그래프 14> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 후 섬모소실지수



<Loss of cilia: 0=normal cilia, 1=<25% cilia damaged, 2=<50%, 3=<75%, 4=>75%>

2) 선발된 천연물 유래 항바이러스 후보제제 저농도 및 장기간치료에 대한 닭 호흡기 바이러스 효능평가

① 시험 방법

▶닭 호흡기 바이러스 평가모델을 이용하여 선행시험에서 거담제로서 효능을 검증받은 천연물 유래 항바이러스 후보제제 관동화 추출물 및 도라지 추출물 저농도 투여를 통하여 닭 호흡기 바이러스에 대한 효능평가를 확인하기 위하여 다음과 같이 시험을 실시하였다. 총 60수의 3주령 SPF 병아리를 15수씩 4개의 그룹으로 구분하였다. 3주령 SPF 병아리 40수에 M41주(Mass group)를 마리당 $10^{5.5}EID_{50}$ 기관내 공격접종 하였다. 공격접종 후 선발된 천연물 유래 항바이러스 후보제제 도라지지하부 추출물 0.5mg/ml, 관동화 추출물 0.5mg/ml을 14일간 음수투여 하였다. 공격접종 양성대조군은 인산완충용액으로 시험군과 동일한 방법으로 투여하였다. 닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 임상증상 및 rale sound를 개체별로 확인하고 부검하여 기관의 부검소견 및 laryngotracheal exudate, tracheal exudate, 기관조직

에서의 조직병변지수 및 섬모소실지수를 평가하였다. 또한, 14일간 증체율을 측정하였다.

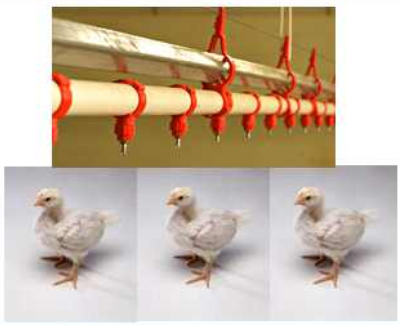
-

<그림 10> 선발된 천연물 유래 항바이러스 후보 제제

관동화(Farfarae Flos)

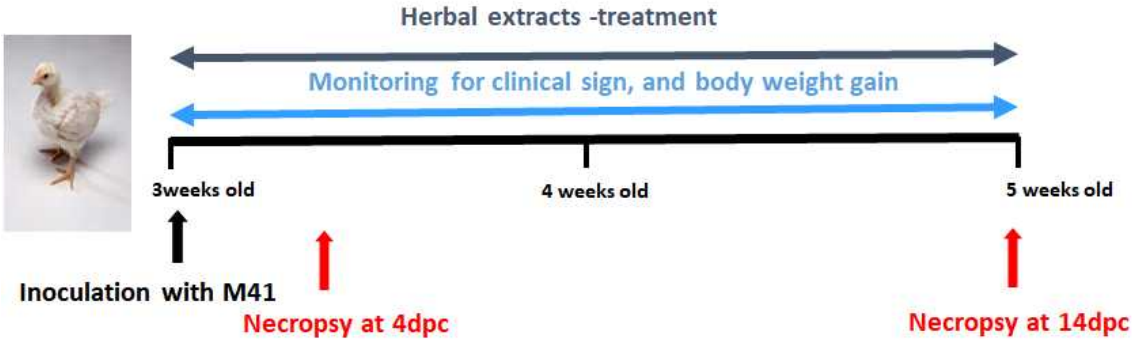
도라지(Platycodon root)

<그림 11> 선발된 천연물 유래 항바이러스 후보 제제 투여 방법



- ✓ Chickens : 60 three-week-old SPF chicken
- ✓ Challenge : IBV M41strain($10^{5.5}EID^{50}$/bird)
- ✓ **Group1** : Farfarae Flos extract (0.5mg/ml)
  Group2 : Platycodon root extract (0.5mg/ml)
  Group3 : No treatment (Positive control)
  Group4 : No treatment (Negative control)
  through drinking water for 14 days
- ✓ Experimental design : Clinical signs, Body weight gain, Histopathological examination.

<그림 12> 선발된 천연물 유래 항바이러스 후보 제제 투여기간



② 시험 결과

▶닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 13일 동안 임상증상을 관찰한 결과 바이러스 공격접종

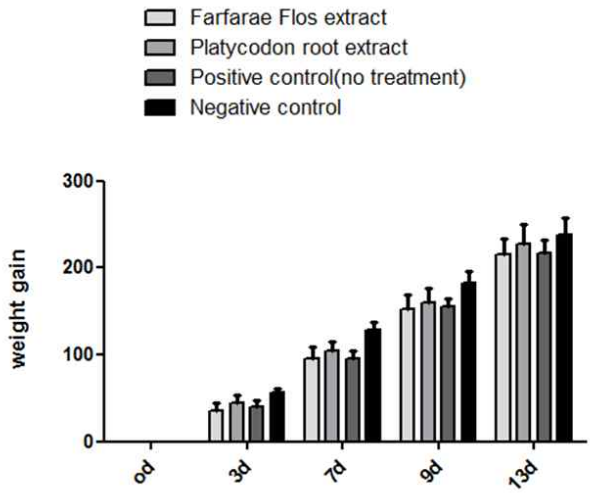
군에서 몇몇 개체에서 개구호흡 및 침울 증상을 보였으며 개체별로 nasal exudate 및 rale sound를 확인 할 수 있었다. 공격접종 후 13일째 천연물 유래 항바이러스 후보제제 도라지 추출물 투여군이 바이러스 후보제제 투여하지 않은 공격접종 양성 대조군에 비하여 임상증상이 감소하여 회복이 빨라짐을 확인 할수 있었다(표 2).

▶닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 13일 동안 그룹별 각각 체중변화를 측정한 결과 천연물 유래 항바이러스 후보제제 투여군이 항바이러스 후보제제 투여하지 않은 공격접종 양성 대조군에 비하여 유의적인 체중변화 차이를 확인 할 수 없었다(그래프 15).

<표 2> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 후 임상증상 비교 실험

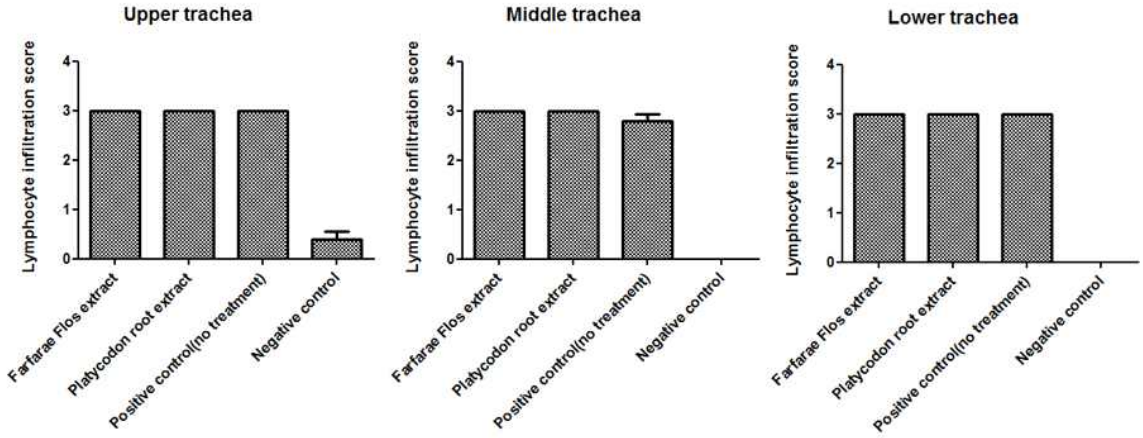
Mucolytic agent	Clinical signs			
	5dpc	7dpc	10dpc	13dpc
Farfarae Flos extract	3/10	7/10	7/10	1/10
Platycodon root extract	6/10	6/10	4/10	0/10
Positive control (no treatment)	8/10	6/10	8/10	5/10
Negative control	0/10	0/10	2/10	1/10

<그래프 15> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 후 체중변화측정



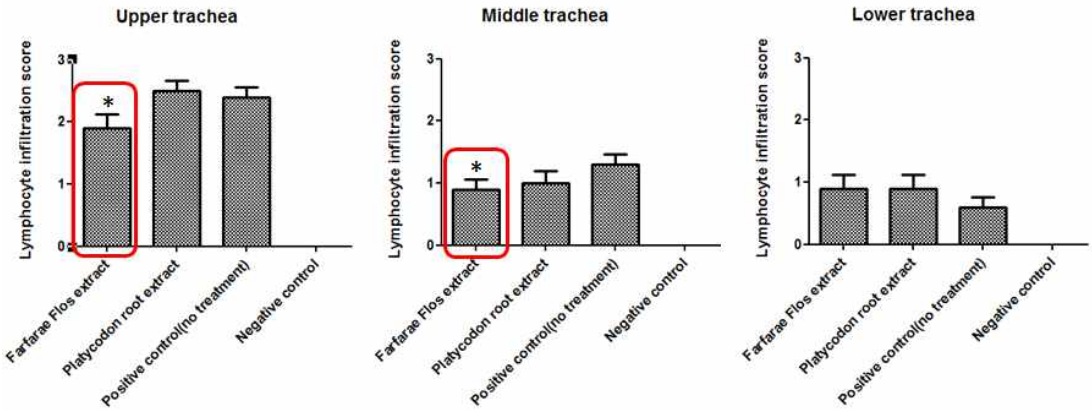
▶닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 4일 및 14일 째 그룹별 각각 기관조직을 상부, 중부, 하부로 나누어 조직병변지수를 검사한 결과 천연물 유래 항바이러스 후보제제 투여 4일째 기관내 염증세포 침윤에서는 천연물 유래 항바이러스 후보제제 투여군이 바이러스 양성 대조군에 비하여 유의적인 차이를 확인 할 수 없었다. 단, 천연물 유래 항바이러스 후보제제 투여 14일째 관동화 추출물 투여군 기관내 상부 및 중부에서 염증세포의 침윤도가 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다(그래프 16, 그래프 17).

<그래프 16> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 4일 후 조직병변지수



<Inflammatory responses: normal=0, focal=1, mutifocal=2, diffuse=3>

<그래프 17> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 14일 후 조직병변지수

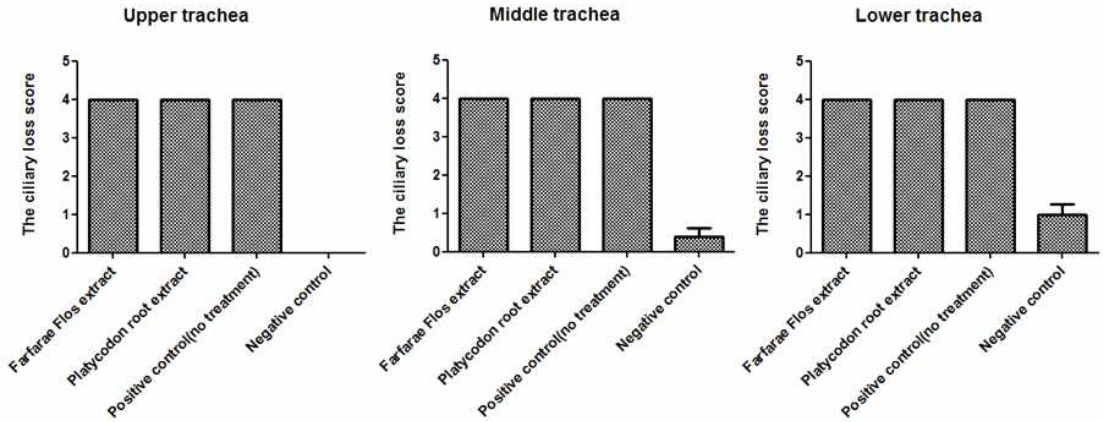


<Inflammatory responses: normal=0, focal=1, mutifocal=2, diffuse=3>

▶닭 호흡기 바이러스 공격접종 후 4일 및 14일 째 그룹별 각각 기관조직을 상부, 중부, 하

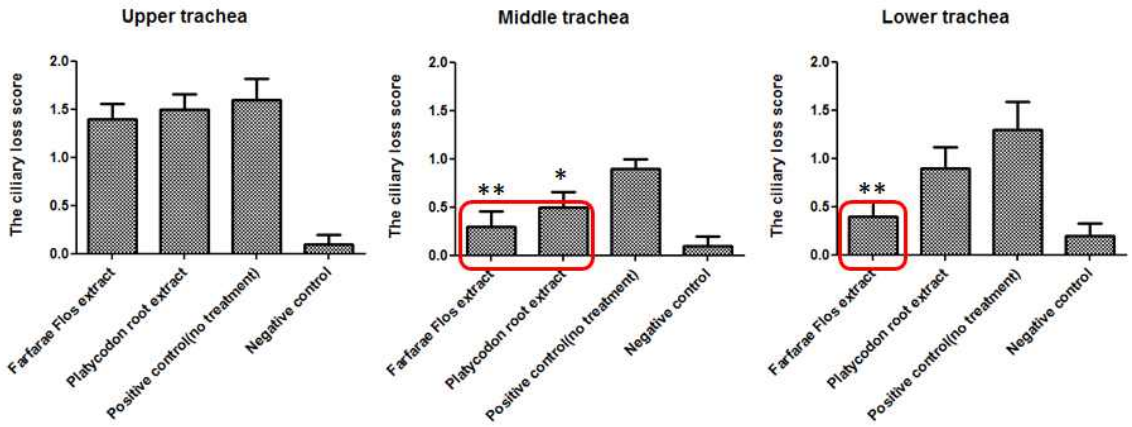
부로 나누어 섬모소실지수를 검사한 결과 천연물 유래 항바이러스 후보제제 투여 4일째 기관내 섬모소실도가 항바이러스 후보제제 투여하지 않은 바이러스 양성 대조군에 비하여 유의적인 차이를 확인 할 수 없었다. 단, 천연물 유래 항바이러스 후보제제 투여 14일째 관동화 추출물 및 도라지 추출물 투여군 기관 중부 및 하부에서 항바이러스 후보제제를 투여하지 않은 바이러스 양성 대조군에 비하여 유의적으로 섬모가 회복됨을 확인 할 수 있었다. 특히, 관동화 추출물 투여군에서 기관 중부 섬모소실도가 정상소견에 가깝게 회복됨을 확인 할 수 있었다(그래프 18, 그래프 19).

<그래프 18> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 4일 후 섬모소실지수



<Loss of cilia: 0=normal cilia, 1=<25% cilia damaged, 2=<50%, 3=<75%, 4=>75%>

<그래프 19> 닭 전염성기관지염 바이러스 공격접종 14일 후 섬모소실지수



<Loss of cilia: 0=normal cilia, 1=<25% cilia damaged, 2=<50%, 3=<75%, 4=>75%>

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	33D-06

4-1. 목표달성도

○<1세부>

구분	연구개발의 목표	달성도
1차년도 (2014/2015년)	ILT 생독백신 균주 개발	100%
2차년도 (2015/2016년)	ILT 생독백신 효능평가(기 개발백신과의 비교실험 포함)	100%
	ILT 생독 백신 시제품 제작 및 효능평가	50%
3차년도 (2016/2017년)	ILT 생독 백신 야외임상시험 계획서 제출	50%
	ILT 생독 백신 경제성 분석 및 사용 매뉴얼 작성	30%

○<2세부>

구분	연구개발의 목표	달성도
1차년도 (2014/2015년)	IB 생독백신 균주 개발	100%
	IB 생독백신 개발 및 효능평가	100%
2차년도 (2015/2016년)	IB 생독백신 시제품 제작 및 효능평가	100%
	IB 생독백신 야외임상시험 계획서 제출	100%
3차년도 (2016/2017년)	IB 생독백신 야외임상시험	90%
	IB 생독백신 경제성 분석 및 사용 매뉴얼 작성	100%

○<1협동>

구분	연구개발의 목표	달성도
1차년도 (2014/2015년)	호흡기 증상완화제 효능평가 모델 개발	100%
	호흡기 질병 제어용 항바이러스제제 및 증상완화제 개발	100%
2차년도 (2015/2016년)	호흡기 질병 제어용 항바이러스 제제 개발 및 효능평가	100%
	호흡기 증상완화제 선발 및 효능평가	100%
3차년도 (2016/2017년)	호흡기 질병 항바이러스제제 및 증상완화제 실용화 방법 연구	90%
	호흡기 질병 항바이러스제제 및 증상완화제 사용 매뉴얼 작성	100%

4-2. 관련분야 기여도

○ 본 연구과제에서 개발된 ILTV genotyping 방법은 현재 농림축산검역본부를 비롯해 전세계에서 ILTV 진단에 사용되고 있는 PCR-RFLP 법을 대체할 수 있을 것으로 예상됨

○ 본 연구과제를 통해 개발된 ILT 생백신의 산업화를 통해 수입산 ILT 백신을 국내 생산 ILT 백신으로 대체할 수 있을 것으로 예상됨

○ 본 연구과제를 통해 개발된 IB 생백신으로 인해 현재 유행하고 있는 QX-like strain을 효율적으로 예방하여 가금산업의 경제적 피해를 예방할 수 있을 것으로 예상됨

○ 신규 개발 기술을 통하여 국내 동물용 백신 시장의 경쟁력 강화에 기여

○ 화학적 제제와 천연물 제제의 혼합물을 사용함으로써 가금 산업에 만연하고 있는 호흡기 질환 증상을 감소시킬 수 있음.

5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07

○ 본 연구과제에서 적용된 Mutagen을 사용한 live attenuated 백신 개발 기술은 기존에 닭의 Mycoplasma 용 백신 개발에만 사용되었을 뿐 바이러스의 백신 개발에는 적용된 적이 없었음. 이 연구과제에서 얻어진 노하우는 추후 다른 병원체의 백신 개발에 있어 LMO로 지정되지 않는 방법으로 빠르게 live attenuated 백신을 개발할 수 있는 기술이 될 수 있음.

○ 본 연구과제에서 적용된 Heat treatment를 사용한 live attenuated 백신 개발법은 고전적인 계대 배양을 통한 백신주 개발 시간을 앞당길 수 있으며 개발된 백신이 내열성을 갖게 되어 추후 빠르게 live attenuated 백신을 개발할 수 있는 기술이 될 수 있음.

○ 닭의 호흡기 증상 완화제 능력을 평가할 수 있는 동물 질환 모델의 개발은 추후 닭 호흡기에 문제를 유발하는 병원체에 대한 항미생물 제제나 본 연구에서 발견한 증상완화제 외에 다른 천연물 및 화합물의 능력을 평가할 때 적용될 수 있음.

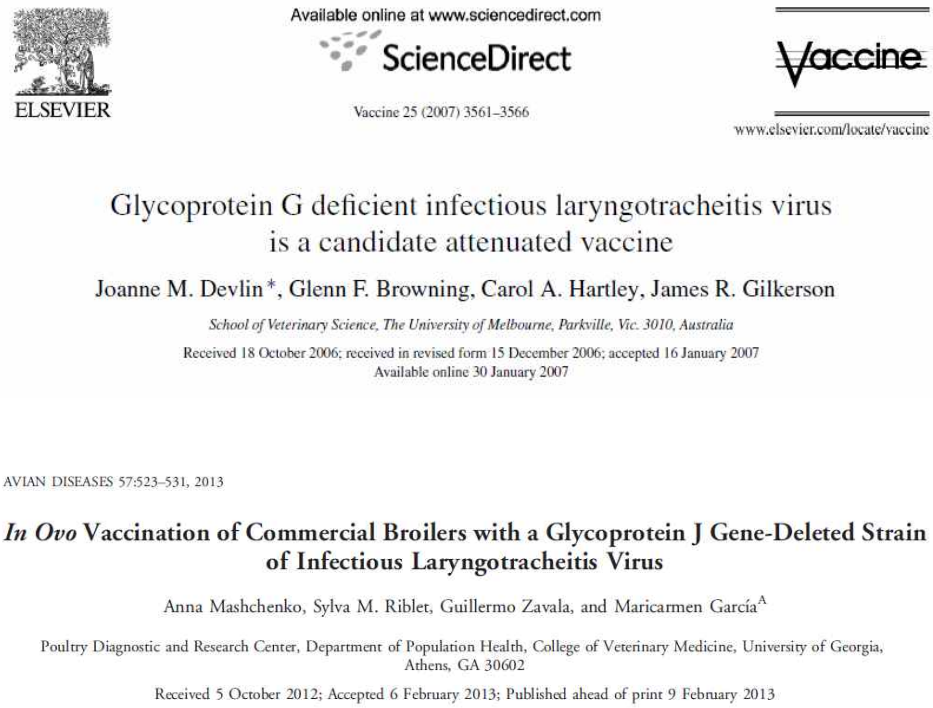
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08

○ 전세계적으로 상용화되어 시판되고 있는 종란 유래 ILT 백신의 경우 백신 접종후 부작용이 심하게 일어나고 있어 특정 유전자를 결손시킨 새로운 백신의 개발이 진행되고 있음.

<그림 1>

ILTV에서 glycoprotein G 또는 glycoprotein J 유전자를 결손시킨 바이러스를 이용한 차세대 백신 개발



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Vaccine 25 (2007) 3561–3566

Vaccine

www.elsevier.com/locate/vaccine

Glycoprotein G deficient infectious laryngotracheitis virus is a candidate attenuated vaccine

Joanne M. Devlin*, Glenn F. Browning, Carol A. Hartley, James R. Gilkerson

School of Veterinary Science, The University of Melbourne, Parkville, Vic. 3010, Australia

Received 18 October 2006; received in revised form 15 December 2006; accepted 16 January 2007
Available online 30 January 2007

AVIAN DISEASES 57:523–531, 2013

***In Ovo* Vaccination of Commercial Broilers with a Glycoprotein J Gene-Deleted Strain of Infectious Laryngotracheitis Virus**

Anna Mashchenko, Sylva M. Riblet, Guillermo Zavala, and Maricarmen García[A]

Poultry Diagnostic and Research Center, Department of Population Health, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, GA 30602

Received 5 October 2012; Accepted 6 February 2013; Published ahead of print 9 February 2013

- 육계의 출하 일령이 높은 호주나 미국 등의 다른 국가에서는 산란계만이 아닌 육계에서도 ILT로 인한 피해가 발생하고 있어 육계에서도 백신 접종을 진행하고 있으나 국내에서는 산란계에 한정되어 백신을 사용함.
- 따라서 국내에서는 ILT의 연구가 많이 진행된 적이 없으며 2000-2001년과 2013년에 농림축산검역본부에서 진행된 연구를 제외하면 전무한 실정임.
- 국내에서는 TK 유전자를 결손시킨 바이러스를 백신주로 사용하고자 하는 연구가 2001년에 보고된 바 있음.

- IB 의 경우 일반적으로 백신 균주와 야외 바이러스 간의 serotype 및 genotype 이 다를 경우 효과적인 교차방어능이 형성되지 않는다는 특성이 있음.
- 이러한 특성으로 인하여 국내에서 유행중인 야외 바이러스를 방어하기 위해서는 국내에서 유행중인 바이러스와 유사한 serotype 및 genotype을 지닌 생독백신의 적용이 필수적임.
- 따라서 국내 양계농가의 IB 에 의한 피해를 막기 위해서는 국내 분리주를 사용한 약독화 백신의 사용이 필요하나 외국 기업에서는 국내의 요구를 충족시킬 수 있는 생독백신의 개발은 이루어지지 않음.

- 현재 국내에서 상용화된 IB 생독 백신의 경우 본 연구팀에서 개발하여 2007년 상용화된 K2 strain 생독백신이 유일함.

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09

○ 보안 사유 없음

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

코드번호	D-10

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

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11

○ 1. 연구실 안전 점검 체계 및 실시

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, 실험실 환경안전점검을 실시하고 있으며, 안전점검실시 결과 실험실의 재해예방과 안전성 확보 등을 위하여 필요하다고 인정되는 경우에는 전무기관에 의뢰하여 정밀 안전진단을 실시함.

2. 교육 훈련

1) 관련근거 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법령 제 18조, 동법 시행령 제 17조 및 동법 실행규칙 제 9조

실험실 안전관리 규정 제 16조(안전교육), 제 17조(안전교육의 관리)

2) 교육대상 : 실험실을 출입하는 모든 이용자 (교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등

3) 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)

4) 안전교육 과정

- 전공특성에 따라 A,B,C 코스로 구분하여 교육 실시
- A코스 : 생물·방사선 취급
- B코스 : 화학·가스 취급
- C코스 : 전기·기계 취급

5) 안전교육절차

3. 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

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

						코드번호		D-12	
번호	구분(논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/특허등록국가	Impact Factor	논문게재일/특허등록일	사사여부(단독사사 또는 중복사사)	특기사항(SCI여부/인용횟수 등)
1	특허	온도 민감성 닭 전염성 후두기관염 바이러스 약독화주 및 이를 포함하는 백신 조성물	건국대학교 산학협력단	발명자	대한민국		2017.04.13	단독사사	
2	특허	닭 전염성 후두기관염 바이러스 약독화주 및 이를 포함하는 백신 조성물	건국대학교 산학협력단	발명자	대한민국		2016.05.26	단독사사	
5	특허	약독화된 전염성기관지염 바이러스 주 및 이를 이용한 전염성 기관지염 백신	건국대학교 산학협력단	발명자	대한민국		2017.01.03	단독사사	
4	논문	Genotyping of infectious laryngotracheitis virus using allelic variations from multiple genomic regions	건국대학교 산학협력단	주저자	Avian pathology	1.336	2016.03.09.	단독사사	SCI
5	논문	Successful cross-protective efficacy induced by heat-adapted live attenuated nephropathogenic infectious bronchitis virus derived from a natural recombinant strain.	건국대학교 산학협력단	주저자	Vaccine	3.624	2015.12.16	단독사사	SCI

11. 기타사항

	코드번호	D-13
○		

12. 참고문헌

	코드번호	D-14

○Guy, J. S., Barnes, H. J., & Morgan, L. M. (1990). Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates. *Avian Diseases*, *34*(1), 106-113

○ Rapid heat-treatment attenuation of infectious bronchitis virus, Avian Pathology, June 2010, 39(3), 227-233

○ Tolerance, safety and efficacy of Hedera helix extract in inflammatory bronchial diseases under clinical practice conditions: a prospective, open, multicentre postmarketing study in 9657 patients Phytomedicine: International journal of phytotherapy and phytopharmacology, 16, 17-24

○ Five new triterpenoid saponins from the roots of Platycodon grandiflorum, Chemical & pharmaceutical bulletin, 54, 557-560

○ Cellular response of the respiratory tract of chickens to infection with Massachusetts 41 and Australian T infectious bronchitis viruses, Avian diseases, 37, 951-960

○ Bacterial respiratory disease of poultry, Poultry science, 77, 1139-1142

○ Sputum liquefying agents: a comparative in vitro evaluation, The Journal of laboratory and clinical medicine, 74, 346-353

○ Review of infectious bronchitis virus around the world, Avian diseases, 56, 634-641

○ Evaluating Protection Against Infectious Bronchitis Virus by Clinical Signs, Ciliostasis, Challenge Virus Detection , and Histopathology, Avian diseases, 59, 368-374

○ Effects of Platycodon grandiflorum feeding on serum and liver lipid concentrations in rats with diet- induced hyperlipidemia, Journal of nutritional science and vitaminology, 41, 485-491

○ Flowering and Growth Response of Peanut platns (Arachis hypogaea L. var. Starr) at Two Levels of Relative Humidity, Plant physiology, 49, 190-193

○ Effects of Infectious Bronchitis on the Reproductive Tracts, Egg production, and Egg Quality of Laying Chickens, Avian diseases, 1, 136-164

○ Comparative mucolytic studies on dithiothreitol, N-acetyl,cysteine and L-cysteine on human respiratory mucus in vitro and their effects on the rate of flow of mucus in the exposed trachea of the rat on topical application, Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie, 189, 53-58

○ Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents, Avian dsieases, 46, 691-699
○ Molecular survey of avain respiratory pathogens in commercial broiler chicken flocks with respiratory diseases in Jordan, Poultry science, 87, 444-448
○ The reduction in vitro in viscosity of mucoprotein solutions by a new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine, Annals of the New York Academy of Sciences, 106, 298-310
○ Epidemiological and experimental evidence for immunodeficiency affecting avian infectious bronchitis, Avian pathology: journal of the W.V.P.A, 35, 455-464
○ Pharmacological research progress of Platycodon grandiflorum, china pharmacy
○ Clinical Application of expectorant therapy in chronic inflammatory airway diseases(Review), Experimental and therapeutic medicine, 7, 763-767