

발간등록번호

11-1543000-001911-01

동물용의약품 민간위탁연구대항조직(CRO) 육성을
위한 안전성 / 유효성 평가기술의 개발

최종보고서

2017.11.28.

주관연구기관 / 건국대학교 산학협력단
협동연구기관 / 크로엔리서치

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “동물용의약품 민간위탁연구대행조직(CRO) 육성을 위한 안전성/유효성 평가 기술의 개발”(개발기간 : 2014. 07. 29 ~ 2017. 07. 28)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 09. 11.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) 서정향 (인)
세부연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) 서정향 (인)
협동연구기관명 : ㈜크로엔 (대표자) 박영찬 (인)

주관연구책임자 : 송창선
세부연구책임자 : 송창선
협동연구책임자 : 백성진

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	314012-03	해당 단계 연구 기간	3	단계 구분	3 / 3
연구 사업 명	단 위 사 업	기술사업화지원			
	사 업 명	기술사업화지원			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	동물용의약품 민간위탁연구대행조직(CRO) 육성을 위한 안전성/유효성 평가 기술의 개발			
연구 책임자	송 창 선	해당단계 참 여 연구원 수	총: 22명 내부: 21명 외부: 1명	해당단계 연구 개발 비	정부: 300,000천원 민간: 50,000천원 계: 350,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 33명 내부: 32명 외부: 1명	총 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 150,000천원 계: 1,050,000천원
연구기관명 및 소속 부서 명	건국대학교 산학협력단 건국대학교 수의과대학			참여기업명 (주)크로엔	
위탁 연구	연구기관명: (해당 없음)			연구책임자: (해당 없음)	
요약				보고서 면수	
총6가지 동물용의약품 및 동물용의약외품의 안전성/유효성 평가 방법을 개발함. 1개의 동물용의약품 민간위탁연구대행조직(CRO)를 설립하고 12명을 고용창출 함. 개발 기술을 활용하여 사업화 지표로서 21건의 동물용의약품 매출성과 및 7건의 동물용의약외품 매출성과를 달성함. 개발 기술에 대해 2건의 정책제시가 있었음.				132	

< 요약 문 >

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동물용의약품 안전성/유효성 평가 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 전염성기관지염 백신의 검정 시험 프로토콜의 객관성 확보 및 간소화 - 뉴캐슬병(Newcastle disease) 생독 백신 검정의 조건에 따른 동물실험 모델 제시 - 닭 아데노바이러스(Fowl Adenovirus) 감염증에 대한 동물 실험 모델 확립 - 닭 괴사성 장염(Necrotic Enteritis)의 동물 실험 모델 확립 - 닭 마이코플라즈마 시노비아(Mycoplasma Synoviae) 감염증에 대한 동물 실험 모델 확립 ○ 동물용의약품 안전성/유효성 평가 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 소독제 안전성/유효성 평가 기술 개발 - 전염성기관지염 항체검사 키트 유효성 평가 기술 개발 ○ 개발된 동물 실험 모델을 통한 위탁연구 요청기관의 동물용의약품 함량시험 및 자체 시험 ○ 본 과제를 통해 개발된 동물 실험 모델을 통한 국가 동물용의약품 검정법 제·개정 안 정책 건의 ○ CRO 조직의 자립화 및 운영 방안 설립 ○ 현 GLP 인증 기관에 의한 전염성기관지염 백신검정 시험방법 표준화 및 인증 (GLP 수준) ○ 주관기관의 동물 실험 모델 (뉴캐슬병, 아데노바이러스 감염증, 괴사성장염 및 마이코플라즈마 감염증) 개발을 위한 시험법 및 실험 환경 기준 표준화 확립; 사육 환경, 실험 동물 종, 실험 기기, 시험법 및 종사자들에 대한 인증 및 표준 작업화 (SOP) ○ 제안된 백신 품질 및 검정 방법 표준화(SOP) 및 신뢰성 보증(QAU) 체계 개발 ○ 가금용 백신의 안전성 평가 시험을 통한 기준 시험법 제안 ○ 동물용의약품 (화학제품 및 소독제) 품질, 안전성 및 유효성 평가 시험 체계 확립 후 참여 위탁 기관(동물용의약품 회사) 인센티브 시험 수행 ○ 육성된 민간 CRO에 대한 다지점 GLP 운용(semi-GLP) 및 GCP 지정으로 동물용의약품 전문 위탁 시험 기관 (CRO)에 대한 신뢰성 보증 확립을 통하여 국제적 수준 (GLP)의 시험 기관 설립 지원 					
연구개발성과	<p>총6가지 동물용의약품 및 동물용의약품의 안전성/유효성 평가 방법을 개발함. 1개의 동물용의약품 민간위탁연구대행조직(CRO)를 설립하고 12명을 고용창출 함. 개발 기술을 활용하여 사업화 지표로서 21건의 동물용의약품 매출성과 및 7건의 동물용의약품 매출성과를 달성함. 개발 기술에 대해 2건의 정책제시가 있었음.</p>					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> - 확립된 동물 모델을 이용한 동물용의약품의 함량시험 및 자체시험을 통하여 제품의 질적 수준 강화 및 수출 자료 확보를 통한 글로벌화 - 기존의 CRO(GLP)기관인 제1 협동기관의 기술 및 운영 지원으로 통한 동물용의약품 전문 CRO의 지속적인 수익 창출 모델 확립 및 이를 기반으로 한 농림축산식품산업의 활성화 					
중심어 (5개 이내)	민간위탁연구대행조직	시험법 표준화	연구개발	동물 백신	전염성 질병	

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<p>○Developing techniques for evaluating safety/validity of animal medicine</p> <ul style="list-style-type: none"> -Simplification and securing objectivity of the qualification test protocols for Infectious Bronchitis vaccines. - Proposing an animal experiment model under the provision of live vaccine qualification of Newcastle disease. - Establishment of animal experiment model for Fowl Adenovirus - Establishment of animal experiment model for Necrotic Enteritis <p>○ Developing techniques for safety/validity of animal sanitary aids</p> <ul style="list-style-type: none"> - Developing evaluation techniques for disinfectants - Developing techniques for evaluating validity of antibody detection kit for Infectious Bronchitis <p>○ Content test and self-test of animal medicines by the organization that requested contract research through the developed animal experiment models.</p> <p>○ Proposing the amendment and establishment of National animal medicine qualification law through the animal experiment model developed in this project.</p> <p>○ Establishment of self-reliance and management plans for CRO organization.</p> <p>○ Standardization and certification of qualification methods of Infectious Bronchitis vaccine by current GLP certification authority.</p> <p>○ Establishing standardization of experiment methods and experimental environments for development of Animal experiment model (Newcastle disease, Fowl adenovirus infection, Necrotic Enteritis, Mycoplasma infection) in managing department; certification and Standardizing Operating Procedure (SOP) of feeding environment, experimental animal species, experiment equipments, experiment methods and workers.</p> <p>○ Establishing Standard Operating Procedure(SOP) and Quality Assurance Unit (QAU) system for quality of proposed vaccine.</p> <p>○ Proposing the standard experiment methods through the safety evaluation test of poultry vaccines</p> <p>○ Performing an incentive test of participant-consignment organization(Animal Medicine company) after the establishment of evaluation methods for safety and validity of Animal Medicine (Chemical products and disinfectants)</p> <p>○ Supporting foundation of Good Laboratory Practice(GLP) experiment organization at international level by establishment of reliability assurance of CRO of professional Animal medicine through management of semi GLP of promoted Nongovernmental CRO and designation of GCP.</p>				
Results	<p>Total 6 methods of safety/validity evaluation for animal medicine and animal sanitary aid were developed. One animal medicine Contract Research Organization (CRO) was founded and 12 employments were created. As the indication for commercialization, 21 animal medicine sales performances and 7 animal sanitary aid sales performances were established by application of developed techniques.</p>				
Expected Contribution	<p>-Globalization by enhancement in product quality and securing exportation data through application of established animal model at content test and self test.</p> <p>- Establishment of model in continual creation of profits on professional animal medicine CRO(GLP) organization with techniques and management support from preexisting CRO(GLP) cooperation organization and vitalization of food, agriculture and forestry industry based on the former description.</p>				
Keywords	Contract research organization	Good Laboratory Practice	Standard Operating Procedure	Vaccine	infectious disease

< Index >

1. Project overview	7
2. Current technology level	17
3. Research contents and results	22
4. Achievement of goal and contribution to related field	94
5. Research result utilization	100
6. Technology information collected during the research process	105
7. Security rating of R & D achievement	111
8. Research facilities registered in NTIS	112
9. Implementation of safety measures	113
10. Representative research achievements	114
11. Additional issues	116
12. Reference	117
13. Complement	123

<Enclosure 1> Abstract

<Enclosure 2> Self-assessment opinion

<Enclosure 3> Research Application Plan

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	7
2. 국내외 기술개발 현황	17
3. 연구수행 내용 및 결과	22
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	94
5. 연구결과의 활용계획 등	100
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	105
7. 연구개발성과의 보안등급	111
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	112
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	113
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	114
11. 기타사항	116
12. 참고문헌	117
13. 추가보완사항	123

<별첨 1> 연구개발보고서초록

<별첨 2> 자체평가의견서

<별첨 3> 연구성과활용계획서

1장. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1절. 연구개발 목적

- 가. 수입 백신 회사 및 국내 백신 제조 회사의 요구에 따른 백신의 수입 및 수출을 위한 동물용 의약품 제품 자체시험 모델 확립
- 나. 확립된 동물 모델을 이용한 동물용 의약품의 함량시험 및 자체시험을 통하여 제품의 질적 수준 강화 및 수출 자료 확보를 통한 글로벌화
- 다. 본 연구사업을 통해 개발된 모델을 이용한 국가 동물용 의약품 검정법 제·개정안 정책 건의
- 라. 동물용 의약품 관련 산업체의 요구사항에 부합하는 민간 임상 및 비임상 연계 R&D 민간위탁연구대행조직(CRO) 육성
- 마. 기존의 CRO(GLP)기관인 제1 협동기관의 기술 및 운영 지원으로 통한 동물용 의약품 전문 CRO의 지속적인 수익 창출 모델 확립 및 이를 기반으로 한 농림축산식품산업의 활성화

1-2절. 연구개발의 필요성

가. 동물용 의약품 생물학적제제 전문 민간위탁연구대행조직(CRO) 설립의 필요성

- 국내 닭고기, 계란 소비량이 점차 증가함에 따라 국내 양계산업의 사육 규모는 점차 증가하고 있는 추세임. (그림 1)

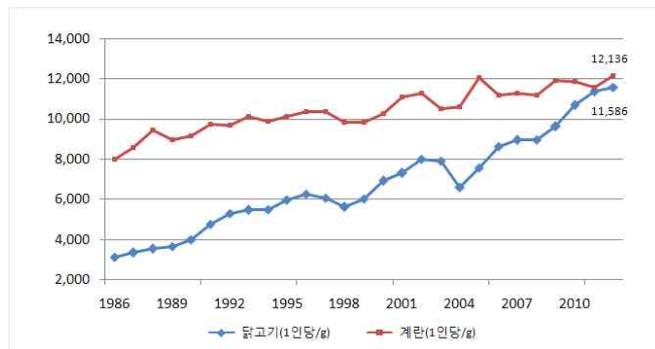


그림 1. 국내 닭고기, 계란 소비량
(출처 : 대한 양계협회)

- 양계 산업이 발달함에 따라 양계 백신의 연구 및 판매가 활발하게 이루어지고 있으며, 질병의 예방, 생산성 증대, 먹거리의 안전성을 위해 새롭게 발생하는 질병에 대한 백신 개발, 효과적인 백신 제형의 개발, 효과적인 백신 접종 방법 등에 대한 연구가 이루어지고 있음. (그림 2)

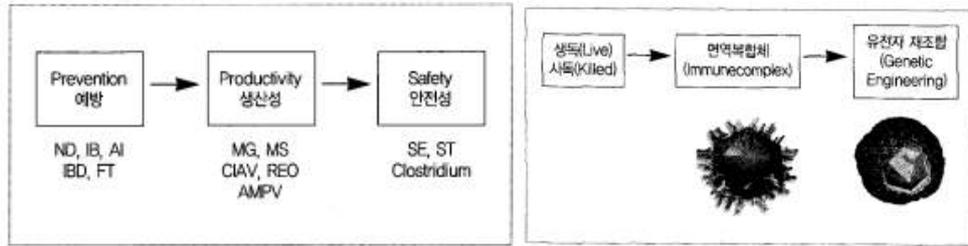
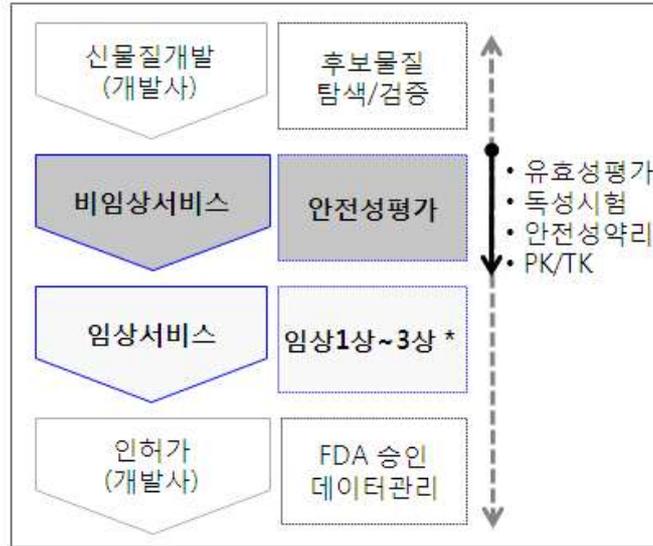


그림 2. 양계 백신시장 동향 및 백신 제형의 발전
(출처 : 월간 닭고기, 15(9) 2009)

- 현재 동물 백신의 등록 및 검정은 국가 검정기관인 농림축산검역본부에서 이루어지고 있음. 그러나 새롭게 대두되는 몇 가지 가금 질병에 대해 효능검정시험 기준이 없어 제품생산업체가 수출 또는 수입하지 못하는 제품이 발생하고 있음.
- 또한 기존의 양계용 백신의 국가 등록 및 검정 시험에서 구체적으로 명시되지 않은 시험법을 구체화하고, 제품의 효능 검정 시 판단이 주관적인 시험법의 객관성을 확보하기 위해 새롭게 개발할 필요가 있음.
- 이에 따라 제품생산업체는 백신의 수입 및 수출 시 객관적인 평가 자료가 요구되며 이에 알맞는 평가 시험을 연구·개발하는 수요가 발생함.
- 따라서 지속적인 R&D를 통하여 신규 동물용의약품의 등록 및 검정 시험시에 적용될 수 있는 합리적인 검사법을 개발 할 필요가 있음.
- 본 과제는 백신의 국가승인 주체인 농림축산검역본부의 자문을 통해 자체적인 R&D 연구로 기존에 검정 및 승인 기준에 대한 규정이 없는 동물용의약품 등에 대하여 검사 모델을 제시 하며 백신의 수입 및 수출시 제품의 객관적인 평가를 대행 할 수 있는 민간위탁연구대행조직(CRO)의 설립을 목적으로 함.

나. 동물용의약품 및 작물보호제의 신약 및 신제품 개발을 위한 CRO 산업

- CRO (Contract Research Organization) 산업은 의약(동물용의약품), 농약, 화학물질 등에 사용되는 신물질 및 신제품의 연구개발 과정을 대행하는 서비스 산업임.
이 중 의약품의 비임상시험연구 서비스(미국)의 단계는 아래 그림 3. 과 같다.



<그림 3> 비임상시험연구 서비스(미국)

- 이와 같은 비임상시험 분야는 크게 유효성 평가(신약 및 신제품의 *in vitro* 효능 시험), 독성시험(단회투여독성시험, 반복투여독성시험, 생식·발생독성시험, 유전독성시험, 항원성시험, 면역독성시험, 발암성시험, 국소독성시험, 국소내성시험, 단회투여흡입독성시험, 반복투여흡입독성시험, 기타독성시험, 의존성시험, 안전성약리시험, 혈액 및 조직병리학적 시험, 독성동태시험(PK/TK, ADME) 으로 구분 된다.
- 동물용의약품 및 작물보호제의 임상시험의 경우는 의약품과는 다르게 목적동물(작물)에 대해 직접 실시하여 신제품의 개발 초기 단계의 유효성 시험 결과를 최종 평가하는 과정으로 구성된다.

다. 농림축산식품 산업 분야 전문 CRO 구축의 필요성

- 동물용의약품 산업의 국내 대다수 기업이 100억 매출 미만의 영세성으로 인하여 개발 품목에 대한 시험 자료의 객관성이 확보되지 않아 품질이 보장되지 못하는 경우가 빈발하고 또한 수출에 필요한 안전성, 유효성 시험에 대한 국제 인증인 GLP 시험 자료 확보가 어려워 국가 위상에 상응하는 객관적 자료를 생산하지 못하고 있는 실정임.
- 작물보호제 분야 또한 GLP 도입 초기로 향후 상당히 다양한 시험항목 개발이 필요한 상황이며, 현재 국내 시험 기술 및 항목 구축의 취약으로 많은 부분이 해외로 위탁되고 있음. 이 중 향후 지속가능한 농림축산환경 유지/보존 및 국제적으로 위해성평가의 제도 및 기술개발 흐름의 핵심 분야인 생태환경독성 분야의 국내 전문 CRO 구축이 국내 산업계의 경쟁력 강화를 위해 매우 절실한 상황임.

라. CRO 구축 및 효과적인 운영을 위한 세부기관(민간기관)의 역량

- CRO 산업은 전문인력, 고가의 시설 및 장비 및 GLP(Good Laboratory Practice) 인증이 필요하여 진입 장벽이 매우 높은 고부가가치 기술서비스 산업군임.
- 제 1협동 기관인 (주)크로엔리서치의 경쟁력

- GLP 인증기관 : 농촌진흥청 7건, 환경과학원 6건
 - GLP 시험 실적: 최근 3년 간 약 500 건 이상 수행
 - 작물보호제 일반독성 및 생태독성 GLP 수탁시험: 500 건
 - 작물보호제 작물 및 환경 잔류분석 수탁시험: 700 건
 - 의약품 비임상 효능 위탁연구: 2 건(항암제, 파킨슨 치료제)
 - 의약품 비임상 독성 수탁연구: 3 건(고지혈증, 당뇨, 천식 치료제)
 - 특허보유: IgY/티올화 메타크릴레이트계 고분자의 복합체 및 제조방법 특허 출원
SDA/PEI 공중합체 및 이를 포함하는 유전자 전달체 특허 출원
 - 다국적 해외 CRO, CiToxLAB 국내 독점 Agent 체결 (의약, 농약분야 해외 IND package service)
 - 신약 개발 연구역량 보유 (국가정부과제 진행 기관)
 - : 폐암 치료제 개발을 위한 siRNA 개발 및 약효연구 과제, 지식경제부 (siRNA의 조제물 분석법을 당사에서 국내 최초로 시험)
 - : 사료첨가제 IgY의 개발 및 연구, 중소기업청
 - 국내 최고 수준의 분석 전문 기관 (LC/MS/MS 3대, GC 4대, HPLC 6대 보유)
 - 국내 최고 수준의 전문 연구인력 보유
 - : Ph. D - 5명, MS - 8명 -> 평균 연구 경력 15년 이상의 최고 수준의 전문 연구원 인력으로 구성
- 크로엔리서치의 비임상시험에서의 안전성 유효성 평가 기술을 바탕으로 한 평가의 결과물들은 전문화된 인력 및 기술을 바탕으로 하는 농약업계 그리고 동물의약품 업계를 리드하며, 평가 항목의 선정 및 평가 기간, 평가 대상 등의 선정과 관련된 컨설팅의 기능도 바탕이 되어야하므로, 단기간에 인력 인프라를 구축하여 사업화하기도 어려운 산업이라 쉽게 제품 모방을 할 수 있는 성격의 산업이 아니며 크로엔리서치가 보유하고 있는 비임상 시험의 안전성, 유효성 평가 기술 및 이에 파생되는 모든 결과물들은 이미 시장에서 충분히 검증이 되어 그 신뢰성 및 공정성이 증명된 상태이기 때문에 타 경쟁사가 단기간 내에 진입할 수 없는 기술적인 모방 장벽이라고 할 수 있음.

마. 닭 전염성 기관지염 백신 검정 기준 개선의 필요성

- 닭 전염성 기관지염(Infectious Bronchitis, IB) 바이러스의 함량 시험법 및 혈청 역가시험은 Endpoint Dilution Method를 이용한 반수종란감염용량(EID50)을 산출하는 방법임.
- EID50를 산출하기 위하여 종란 내에 IB 바이러스 증식을 확인할 때 사용되는 방법은 백신주 바이러스에 의한 계태아 병변을 확인하는 방법으로, 이는 종란에 적용된 IB 바이러스가 일으키는 계태아 병변인 Stunting 및 Dwarfing 병변을 확인하는 방법으로 바이러스의 증식 여부를 판정하는 방법임.
- 하지만 육안으로 바이러스의 증식을 확인하는 방법으로 역가를 확인할 때에는, 계태아 병변 유발의 여부가 측정자에 따라 주관적으로 판정 될 수 있음.
- 또한, IB 바이러스가 계태아 병변을 유발하기 위해서는 종란에 고도로 적용된 백신 바이러스여야 하기 때문에 백신 균주 외에 다른 균주로 해당 시험을 실시할 시에는 다른 검정 기준의 적용이 필요함. 따라서 바이러스의 증식 여부를 확인할 수 있는 객관적인 검사법

의 도입이 필요한 상황임.

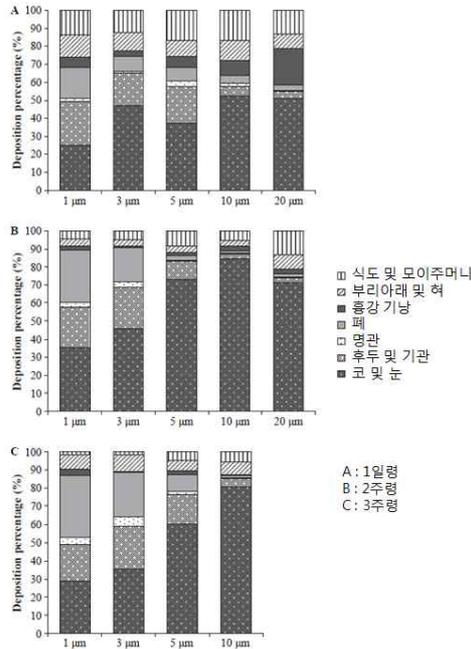
- 닭 전염성 기관지염(Infectious Bronchitis) 바이러스 백신의 검정 시험법 중 “혈청 역가시험”에서 공시되어있는 시험법은 종란을 이용한 중화시험임.
- 그러나 종란을 이용한 중화시험의 경우 채혈 시 시험계의 주령이 최소 3주령인 것을 감안하면, 시험에 필요한 혈청을 채취하기 위하여 필요한 혈청의 양이 많아 숙련자가 아니면 시료를 채취하기가 쉽지 않으며, 종란을 이용하여 바이러스 함량을 평가할 경우 검사자에 따라 일정한 결과를 도출하기가 쉽지 않아 정형화된 검정 기준이 요구됨.
- 특히 신장형 전염성 기관지염 백신의 경우, 혈구 응집 억제 시험(HI test)으로는 항체 형성을 확인할 수 없기 때문에 중화 시험을 통한 검정이 이루어지고 있음.
- 따라서, 검사자의 영향을 적게 받고 적은 혈청 시료로 검정시험을 할 수 있으며, 신장형 전염성 기관지염 백신의 항체 형성을 확인할 수 있는 객관적인 시험법이 필요함.

바. 닭 아데노바이러스 백신 효능 평가 모델 개발의 필요성

- 닭 아데노 바이러스는 닭에서 봉입체성 간염, 심낭수종, 선위궤양을 일으키는 바이러스로, 임상 보고가 점차 늘고 있어 양계 산업에 경제적으로 큰 손실을 일으키는 바이러스 중 하나임.
- 현재 닭 아데노 바이러스 백신의 경우 국가 검정 기준이 없고, 국제적으로도 효능 평가를 위한 동물시험 모델이 확립되어있지 않음.
- 총 12가지 혈청형 중 현재 국내에는 총 5가지 혈청형(3, 4, 8, 9, 11형)이 유행 하고 있어 단일 혈청형의 백신 등록 시 타 혈청형에 대해 교차방어능을 시험 할 필요가 있음.
- 4형을 제외한 아데노바이러스 혈청형의 경우 자연적인 감염 경로인 경구를 통한 공격접종에 의해 병변 및 폐사율이 유발되지 않아 해당 혈청형에 대한 새로운 공격접종 모델이 필요함.

사. 닭 뉴캐슬병 백신 검정 기준 개선의 필요성

- 닭 뉴캐슬병(NDV)의 경우 부화장 단계부터의 백신이 의무화되어 있으며, 특히 분무 백신 형태로 많이 시행하고 있음.
- 분무 백신은 양계 산업에서 상당히 효과적으로 백신을 투여할 수 있는 방법으로 많은 수의 동물에 대해 빠르고 경제적으로 백신을 투여할 수 있는 장점이 있음.
- NDV는 백신 바이러스의 종류에 따라 닭에 나타내는 병원성이 다르며, 백신 바이러스가 하부 호흡기계로 내려갈수록 병원성이 크게 나타나는 것으로 알려져 있음.
- 점안, 음수 백신은 균일하게 투여되는 반면 분무 백신은 분무의 입자크기, 백신 바이러스의 독력에 따라서 다른 효과를 초래 할 수 있음.
- 이에 관련하여 폴리스티렌 구형 입자 등을 사용하여 닭의 일령, 분무 입자 크기에 따라 각 입자가 호흡기에 분산되는 정도를 확인하는 연구가 이루어졌음. (그림 4)



<그림 4> 입자 크기별, 주령별 입자 분포 위치

출처 : Deposition of differently sized airborne microspheres in the respiratory tract of chickens, Avian pathology 2006, 35(6), 475-485

○ 따라서 각 백신 균주 종류에 따라 최적의 안전성 및 방어능이 확인되는 사용 시기, 입자의 크기에 대한 연구가 필요하며 이를 위한 동물 모델이 확립되어야함.

아. 닭 괴사성장염 백신 및 예방제제 효능 평가 모델 개발의 필요성

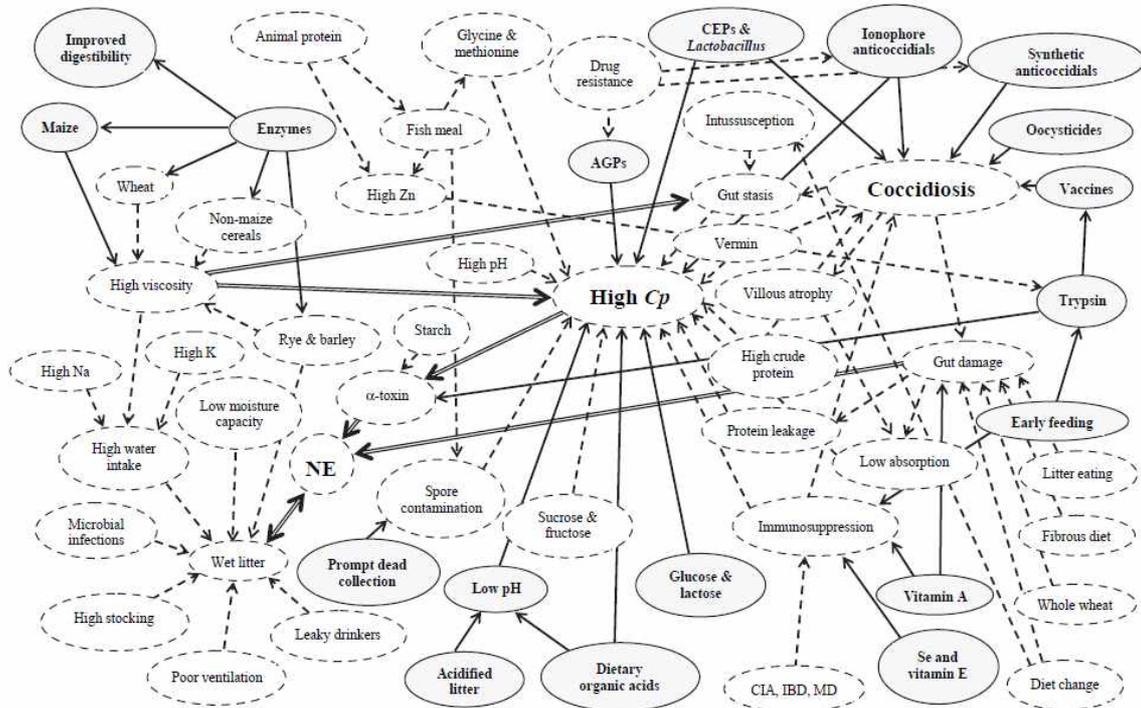
○ 2011년 7월을 기점으로 배합사료 항생제 첨가가 금지되는 상황에서 그동안 항생제 사용을 통해 억제되어 왔던 세균성 질병은 계군들에서 이미 큰 문제로 대두되고 있으며 그중 특히 클로스트리디움(Clostridium) 에 의한 괴사성 장염(Necrotic Enteritis)은 항생제 첨가 금지 후 대두되고 있는 육계의 질병임. (표 1)

일시	허가 항생제	기 타
~2005년 5월	44종	
2005년 5월~	16종	
2009년 1월~	9종	
2011년 7월~	전면금지	Enramycin, Tylosin, Virginiamycin, Bacitracin, Bambermycin, Tiamulin, Apramycin, Avilamycin, Sulfathiazol

<표 1>. 국내 배합사료 첨가용 항생제 규제현황

○ 클로스트리디움균은 정상적인 건강한 닭의 장관 내에서도 발견될 수 있는 닭의 정상 세균총(Normal Flora)의 일부로, 해당 병원체 자체보다는 여러 가지 복합적 요인에 의하여

육계의 장관계 질병을 유발하는 것으로 알려져 있음. (그림 5)



<그림 5>. 괴사성 장염(Necrotic Enteritis)발생에 있어 작용하는 선행요소(Predisposing factor)

(출처 : Avian Pathology (June 2005) 34(3), 159-180)

- 국내에서는 시판되어있지 않으나 괴사성장염의 원인균인 독소에 대한 백신도 유럽 일부 국가와 북미지역에서 개발되어 시판중이지만, 현재 국내에서는 해당 병원체를 목적으로 하는 백신에 대한 등록 기준이 전혀 마련되어있지 않고, 유효성을 평가할 수 있는 모델도 확립되어있지 않은 상황임.
- 따라서 괴사성 장염 치료 및 예방을 목적으로 하는 동물용의약품을 등록 시 해당 의약품의 효능을 평가할 수 있는 합당한 괴사성장염의 동물 질환 모델이 필요함.

자. 닭 마이코플라즈마 시노비에 백신 효능 평가 모델 개발의 필요성

- 마이코플라즈마 시노비에(Mycoplasma synoviae, MS) 감염증은 육계 및 산란계에서 발생하는 만성 호흡기성 질병으로, 자체적으로 호흡기 및 관절 증상을 유발하여 1차적 피해를 유발하고, 2차적으로 속발되는 대장균증 등의 세균성 감염으로 인하여 폐사를 유발하여 양계 산업에 피해를 유발하는 질병임.
- 또한 MS가 감염 되었을시, 수란관을 통한 수직 전파(Vertical transmission)을 일으켜 후대 병아리에 지속적인 피해를 유발하여 피해를 일으킬 수 있는 질병임.
- 현재 세계적으로 MS에 대한 생독 백신이 개발되어 안전성 및 효율이 확인되어 시판되고 있는 상황이며 국내 양계농가에서도 MS 백신에 대한 수요가 증가하고 있는 시점임.
- 따라서 개발 예정인, 또는 해외에서 개발된 MS 백신의 효능 및 안전성을 평가하기 위한 동물실험 모델의 확립이 절실한 상황임.

차. CRO 구축을 위한 주관연구기관의 역량

- 주관연구기관인 건국대학교 수의과대학 조류질병학 실험실의 우수한 인프라 및 연구기반을 바탕으로 다년간 신규 백신의 등록업무 시 동물실험 및 야외시험을 대행한 실적이 있음.
- 또한 기술이전사업을 통하여 국내기업인 (주)대성미생물연구소 및 (주)고려비엔피에 상용화 제품의 균주를 제공하고, 28억 매출을 달성한 이력이 있음(그림 6).



<그림 6> 주관연구기관의 기술이전 사업화 사례

- 또한 주관연구기관은 농림축산검역본부에서 지정한 “가축질병병성감정실시기관”으로, 가축질병검사 전 분야에 관한 검사가 가능한 연구인력 및 장비 등의 인프라가 갖추어져 있음
- 본 연구의 주관연구기관은 차후 동물용의약품 검사기관 승인을 획득함으로써 백신 검정 기능을 함께 하는 민간위탁연구대행조직(CRO) 시스템을 구축하고자 함. 이러한 기술 및 인프라를 기반으로 국내 백신 생산 업체 및 수입 백신 업체에 이르기까지 안정적인 동물용의약품 수급을 위한 토대를 마련함으로써 국내 시장뿐만이 아니라 양계 시장에 필요한 적절한 제품의 수출 수입을 원활하게 하고자 함.
- 본 연구에서는 위에서 제시한 양계 산업에 피해를 주는 전염성 질병에 대해 백신 및 치료제의 효능 검정 방법을 개발 및 비교 평가하여 국가 동물용의약품 검정기준에 정책 건의하고자 함.
- 더불어 과제 종료 후에도 자체적인 R&D 인프라를 기반으로 동물용의약품 백신 업체의 제품 함량시험 및 자체시험을 수주하여 자체적인 수익 창출이 가능한 시험대행기관의 설립을 목표로 함.

1-3절. 연구개발 범위

가. 과제별 연구개발 범위

- (1) 1세부 과제: 가금용 동물용의약품 동물 모델 확립 및 국가 동물용의약품 검정법 제·개정안 정책 건의

- 전염성기관지염 백신 함량시험 및 중화시험의 프로토콜의 객관성 확보와 간소화함
 - 전염성기관지염 백신 효능 검정 시 혈청학적 검사 지표인 중화시험법을 개선할 검사 방법을 제시함
 - 뉴캐슬병(Newcastle disease) 생독 백신의 검정 시험 시 종류별, 분무 입자 크기별 동물실험모델을 제시함
 - 생물학적 제재의 국가등록 방법이 확립되지 않은 닭 아데노바이러스(Fowl Adenovirus)백신의 동물 실험 모델을 제시함
 - 생물학적 제재의 국가등록 방법이 확립되지 않은 닭 괴사성 장염(Necrotic Enteritis)의 동물 실험 모델을 제시함
 - 생물학적 제재의 국가등록 방법이 확립되지 않은 닭 마이코플라즈마 시노비아(Mycoplasma Synoviae) 백신에 대한 동물 실험 모델을 제시함
 - 개발된 동물 실험 모델을 통한 위탁연구 요청기관 동물용의약품의 함량시험 및 자체시험을 수행함
 - 본 과제를 통해 개발된 동물 실험 모델을 통해 국가 동물용의약품 검정법 제·개정안을 정책 건의함
 - 본 과제에 참여하는 위탁연구 요청기관에 대해 인센티브 지급 방안을 마련함
 - CRO 조직의 자립화 및 운영 방안을 확립함
- (2) 1협동 과제: 국제 수준(GLP, GCP)의 동물용의약품 안전·유효성 평가 기관 확립 지원 및 인증 제안]

(가) 전염성기관지염 백신 시험 프로토콜 표준화 및 인증법 제안

- 품질 및 효능 시험 분야 시험법 인증 및 표준화 (SOP)
- 자료의 객관성 확보를 위한 시험 환경, 시험 동물 종, 기기 및 장비 표준화
- 신뢰성 보증을 위한 자료 및 방법 확립

(나) 가금용 백신 품질 및 유효성 평가 시험법 동물실험 모델 검증 및 표준화

- 가금용 백신 품질 및 효능 평가시험법 표준화 및 GLP 기관 인증을 통한 신뢰성보증
 - GLP 인증기관에 의한 주관기관의 새로운 검정 방법 제안 인증 확립

(다) 화학제에 대한 품질 및 안전성/유효성 평가시험 체계 개발 및 시험 항목 인증

- 화학제에 적합한 안전성 평가 시험 항목 구축 및 인증 제안 후 참여 위탁 기관의 제품에 대한 인센티브 시험 수행
- 이화학 분석, 항생제 잔류 분석 및 야외 효능시험 대체 시험법 개발 및 인증 제안

(라) 소독제 유효성/안전성 평가

- 오·남용 우려 및 환경 생태 독성 유발 가능성이 있는 동물용소독제에 대한 안전성/유효성 시험법 개발 및 제안

(마) GLP 수준의 민간 CRO 육성 지원 및 다지점 운용 방안 확립(운영책임자 및 QAU 지정)

나. 주요 기대성과

- (1) 기업의 요구사항에 부합하는 동물 모델 확립 및 이를 통한 동물용의약품의 함량시험 및 자체시험으로 동물용의약품 질적 수준 강화 및 수출 자료 확보를 통한 글로벌화
- (2) 보유기술 강화 및 품질 기능성 분석, 임상시험 등 기반구축을 통한 민간연구위탁대행조직(CRO)의 지속적인 자체 수익 창출

- (3) 건국대학교 내 동물용의약품 R&D 민간위탁연구대행 기능을 하는 자회사 설립
- (4) 본 과제를 통해 개발된 동물 실험 모델을 통한 국가 동물용의약품 검정법 제·개정안 정책 건의
- (5) 상품화 및 사업화; 신규 민간연구위탁대행조직(CRO)의 사업 분야 매출 발생
 - 농림부 등의 인증기관으로부터 시험 항목 신청 및 인증을 통하여 시험 항목 상품을 개발하고 위탁 기관으로부터 인증 시험 대행으로 매출 발생
 - 민간 CRO를 통한 동물용의약품 등록에 필요한 유효성/안전성시험 항목 수행
 - 생산 및 수입 제품 검정 시험 수행
 - 제품 개발 초기 및 등록 완료 시까지의 전과정에 필요한 시험법 개발 대행 및 시험 수행
 - 백신 제품 동물 시험 모델 개발
 - 수출에 필요한 안전성/유효성 자료 작성 대행

2장. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
------	------

2-1절. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
닭 전염성 기관지염의 <i>Dot immunoblotting</i> 을 이용한 측정	대한민국	70%	70%	100%	
닭 전염성 기관지염의 <i>ELISA kit</i> 를 이용한 측정	미국	60%	60%	100%	
닭 장염 동물 모델	미국	50%	50%	100%	
닭 뉴캐슬병 백신 입자별 분무 효율 측정 모델	벨기에	30%	30%	80%	
닭 아데노바이러스 공격접종 모델 동물	캐나다	50%	50%	100%	
닭 <i>Mycoplasma synoviae</i> 백신 검정을 위한 모델 동물	호주	30%	30%	80%	

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

2-2절. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록 (등록 및 공개특허)

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		면역학적 방법을 이용한 닭 전염성 기관지염 바이러스 검출법	
Keyword		infectious bronchitis, immunoassay	infectious bronchitis, ELISA
검색건수		7	35
유효특허건수		4	6
핵심특허 및 관련성	특허명	닭전염성기관지염 바이러스 S1 단백질 발현하는유전자재조합 마렉바이러스 및 그의 제조방법	신장형 및 호흡기형 감염성 기관지염 바이러스를 인식하는 항체 및 그의 용도
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2002	2013
	관련성(%)	50%	80%
	유사점	바이러스 표면 단백질 발현에 요구됨	전염성 기관지염 바이러스 인식 항체
차이점	단일클론 항체 생성 불가	진단 여부 판정에 관한 기술이 없음	

개발기술명		닭 장염백신 효능을 측정하기 위한 모델동물 개발	
Keyword		chicken, necrotic enteritidis, vaccine	
검색건수		53	
유효특허건수		12	
핵심특허 및 관련성	특허명	닭의 괴사성 장염을 예방하는 백신 조성물	
	보유국	대한민국	
	등록년도	2013	
	관련성(%)	30%	
	유사점	닭의 괴사성 장염에 관한 예방 물질	
차이점	괴사성 장염 유발 모델 동물이 아님		

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

2-3절. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		닭 <i>Mycoplasma synoviae</i> 백신 검정을 위한 모델 동물	
Keyword		chicken, Mycoplasma, challenge, animal model	
검색건수		51	
유효논문건수		5	
핵심논문 및 관련성	논문명	standardized method of aerosol challenge for testing the efficacy of mycoplasma gallisepticum vaccine	Determination of Effective dose of the live Mycoplasma synoviae vaccine, vaxsafe MS by protection against experimental challenge
	학술지명	AVIAN DISEASES	AVIAN DISEASES
	저자	K. G. Whithear	Jillian F. Jones
	게재년도	1995	2006
	관련성(%)	90%	90%
	유사점	Mycoplasma의 닭 호흡기로 감염 방법에 관련됨	Mycoplasma synoviae 백신의 효능검정
	차이점	본 과제에서 요구하는 Mycoplasma Synoviae 균에 대해서 자료가 없음	닭 전염성 기관지염 동시감염 strain이 국내 분리주와 다름

개발기술명		닭 뉴캐슬병 백신 입자별 분무 효율 측정 모델	닭 아데노바이러스 공격접종 모델 동물
Keyword		newcastle diseases, spray vaccine	fowl adenovirus, protection, vaccine
검색건수		45	11
유효논문건수		9	3
핵심논문 및 관련성	논문명	Spray drying of an attenuated live Newcastle disease vaccine virus intended for respiratory mass vaccination of poultry.	An inactivated oil-emulsion fowl Adenovirus serotype 4 vaccine provides broad cross-protection against various serotypes of fowl Adenovirus.
	학술지명	Vaccine	Vaccine
	저자	Corbanie EA	Kim MS
	게재년도	2007	2014
	관련성(%)	50%	90%
	유사점	Spray vaccine의 효능 검정	Adenovirus 백신의 효능검정
	차이점	분무 입자별 효능을 측정하지 않음	효능검정 백신이 다름

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

2-4절. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내 기반 동물 관련 백신생산 업체 및 국내 진출 해외 백신생산업체는 총 27개 업체이며 이 중 가금류 관련 백신을 9개 업체에서 생산하고 있음.
- 이 중 다국적 기업은 국내에 효능검정시험이 마련되지 않아 출시하지 못하는 경우가 있음.

구분	회사	백신				
		Mycoplasma Synoviae	뉴캐슬생독 백신	괴사성 장염	전염성기관지염	아데노바이러스
국내기업	(주)고려비엔피	없음	라소타 생독백신 B1 생독백신	콕시백-D	신장형 IB 생독백신 IB, ND 혼합백신 신장형 IB 백신 등	사독 힘백 달구방 아데노
	(주)중앙백신연구소	없음	AI, ND 혼합백신 B1 생독백신	없음	IB, ND 혼합백신 IB 2종혼합 백신 등	없음
	(주)대성미생물연구소	없음	AI, ND, IB 혼합백신	없음	IB, ND 혼합백신 IB 2종혼합 백신 등	없음
	녹십자수의약품(주)	없음	AI, ND 혼합백신 B1 생독백신 등	없음	신장형 IB 생독백신 IB, ND 혼합백신 IB 2종혼합 백신 등	없음
	코미팜	없음	IB, ND 혼합백신	없음	IB, ND 혼합백신	없음
다국적 기업	메리알코리아	MS-H	IB, ND 혼합백신	없음	IB, ND 혼합백신	없음
	MSD	MS1	IB, ND 혼합백신	없음	IB, ND 혼합백신	없음
	베링거인겔하임	없음	없음	없음	없음	없음

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- Bioproerties의 Dr. Chris morrow가 개발한 Mycoplasma synoviae vaccine (MSH) 백신이 유일한 MS백신이며, 최근 양계에 무항생제 사료를 사용하기 시작하며 문제가 되고 있어 더 주목 받고 있음. 최근 제품허가 득하여 시장에 판매중.

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향

- 현재 국내에 유일하게 양계백신의 검정을 맡아서 하고 있는 농림축산검역본부의 백신 검정 기능을 민간에 위탁 할 수 있도록 효능시험의 재현성 목표로 하며 건국대학교 수 의과대학이 그 기능을 할 수 있도록 함.

- 새롭게 개발되는 백신의 효능시험을 위탁받아 다양한 백신 업체의 빠른 백신 주 교체에도 발빠르게 효능시험을 진행 할 수 있도록 함.
- 민간 위탁을 함으로서 빠른 시일 안으로 백신 효능검정시험을 하고, 동시에 국가검정 허가를 진행 할 수 있도록 함.
- 백신 검정을 위탁받은 기관은 재현성 있는 공정한 효능 시험 결과를 빠르게 제공하고, 의뢰 업체는 합당한 시험 위탁료를 민간위탁기관 지불함.

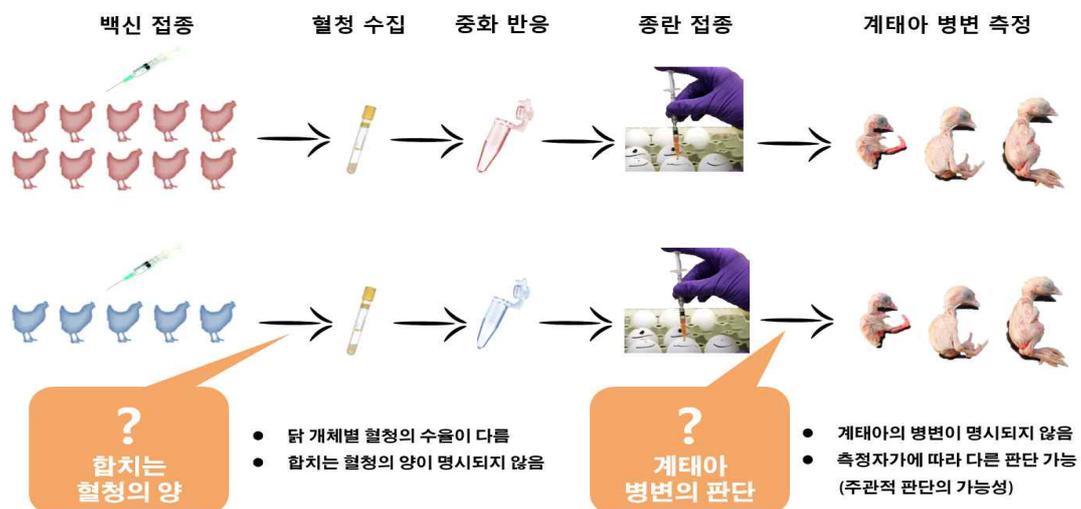
3장. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

3-1절. 1세부 연구개발의 내용

1. 전염성기관지염 백신 함량시험 및 중화시험의 프로토콜의 객관성 확보와 간소화가. 연구계획
 - (1) 기존 닭 전염성 기관지염 백신 바이러스 함량시험은 9~11일령 발육계란의 장노막강내에 0.1ml의 백신 바이러스를 접종 한 후 37°C에서 배양하고, 배양 7일 후 생존한 발육계란의 닭 전염성 기관지염 특유의 계태아의 위축 소견을 확인함 (그림 7)
 - (2) 위의 백신 업체의 자체 효능 바이러스 함량시험에서 발생 할 수 있는 주관적 판단 기준을 객관화하기 위함
 - (3) 백신 바이러스의 희석방법, 장노막강 접종방법, 발육계란의 배양방법 등 자세한 절차에 대한 타당성을 조사함
 - (4) 특히, 바이러스에 의한 계태아 병변이 정확히 명시되어있지 않고, 병변을 관찰하는 측정자에 따라 주관적인 판단이 개입 될 수 있음을 감안함
 - (5) 기존 닭 전염성 기관지염 백신 바이러스 혈청 역가시험은 닭 전염성 기관지염 바이러스에 감수성있는 3~4주령의 닭 15마리를 이용하여 10마리는 시험군 5마리는 대조군으로 한 후 백신 1수분을 사용법에 따라 접종함. 3주후에 혈청을 분리하고 희석한 바이러스와 혼합하여 중화시험을 실시함
 - (6) 위의 바이러스 함량시험에서 백신 업체의 자체 효능 실험에서 발생 할 수 있는 주관적 판정기준을 객관화하기 위함
 - (7) 3주 후 혈청의 분리 양, 합하는 혈청의 양, 중화시험 후 계태아 병변 관찰방법 등이 명시되어있지 않아 실험적 오차가 있을 수 있음을 감안함

『기존 닭 전염성 기관지염 백신 검정시험의 문제점』



<그림 7> 기존 닭 전염성 기관지염 백신 검정 시험

- (8) 바이러스 함량시험, 혈청역가시험에서 결과 해석에 문제 될 수 있는 계태아의 병변판단을 객관화하기 위해 육안으로 판단하는 법이 아닌 바이러스의 증식 여부로 판단할 수 있는 면역학적 진단 방법을 개발함
- (9) 선행 연구 결과로 본 실험실에서 보유한 기술인 Dot-immunoblotting assay(DIA) 기술은 닭 전염성 기관지염 바이러스에 특이적인 단일클론 항체를 생산하여 발육계란에 접종한 중화 항체가 증식 할 경우 장요막강에 있는 바이러스를 검출 할 수 있는 기술임.
- (10) 중화 혈청이 접종된 발육계란을 7일후 계태아의 병변을 읽는 것과 장요막강에 증식한 바이러스의 유무로 중화 역가를 계산 할 수 있으므로 실험자의 주관적 판단에 의존하지 않아도 되는 장점이 있음.
- (11) 아래 그림처럼 바이러스가 검출되면 발색이 된 원형이 나타나고, 그렇지 않을 경우에는 발색이 되지 않음으로, 별도의 해석 기기가 필요하지 않고 비숙련자에게도 쉬운 장점이 있음.(그림 8)
- (12) 육안으로 실시하는 병변의 판단보다 바이러스의 증식 여부를 판단함으로써 중화시험 및 바이러스 함량 시험에 더 적합할 것으로 예상됨.

AVIAN DISEASES 42:92-100, 1998

Detection and Classification of Infectious Bronchitis Viruses Isolated in Korea by Dot-Immunoblotting Assay Using Monoclonal Antibodies

Chang-Seon Song,^A Jae-Hong Kim,^A Youn-Jeong Lee,^A Sun-Joong Kim,^B Yoshihiro Izumiya,^D Yukinobu Tohya,^C Hyung-Kwan Jang,^D and Takeshi Mikami^{D,E}

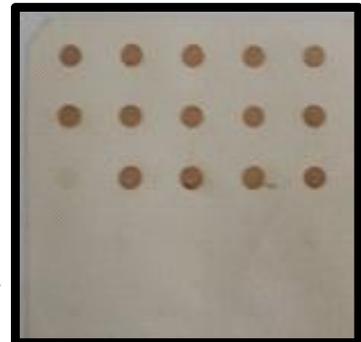
^AAvian Disease Division, National Veterinary Research Institute, RDA, Anyang 430-016, Korea

^BDepartment of Avian Disease, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-100, Korea

^CDepartment of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima 890, Japan

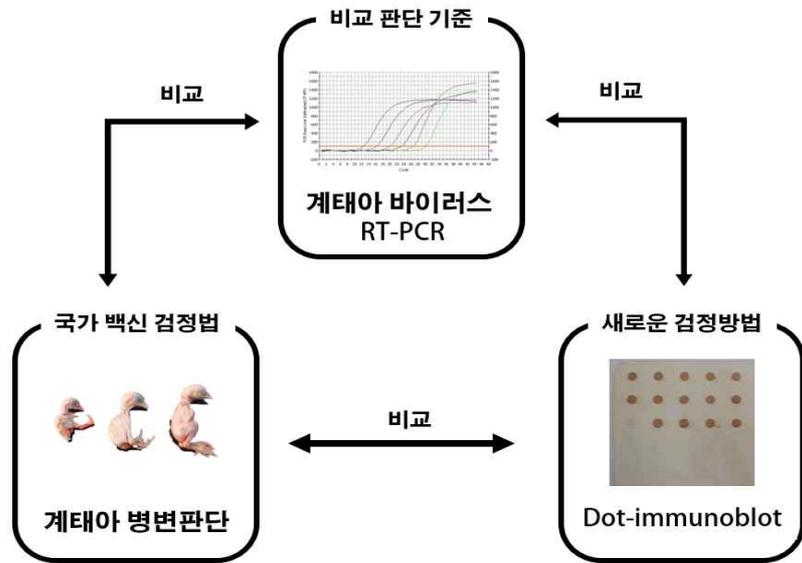
^DDepartment of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Tokyo 113, Japan

Received 14 May 1997



<그림 8>. Dot-immunoblotting assay(DIA)을 이용한 바이러스 검출 방법의 논문 및 실험결과

- (13) 국가 검정 기준에 부합하기 위해서 Dot-immunoblotting assay(DIA) 실험 방법을 규격화 및 정형화함. (그림 9)

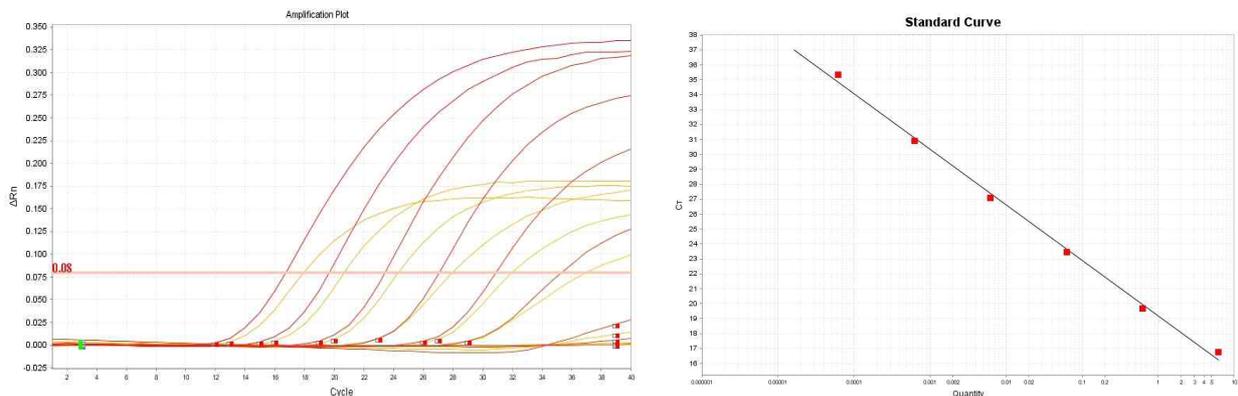


<그림 9>. 닭 전염성 기관지염 백신 검정법 유효성 평가 과정

나. 연구방법

(1) Real time RT-PCR 진단법 확립

- 기존의 농림축산검역본부에서 인정하는 닭 전염성기관지염 함량 테스트는 바이러스의 계태아 접종 후 병변(dwarfing, curling)으로 바이러스의 증식 유무를 판단하였음
- 본 연구에서 증명하고자하는 DIA(Dot immunoassay)와 계태아 병변 판단 법을 비교하기 위해 바이러스를 가장 민감하게 검출 할 수 있는 유전자 기반 진단 방법인 real time RT-PCR(rRT-PCR)을 이용하고자함
- 따라서 참고논문(Scott A. Callison et al., Journal of Virological Methods, 2006)에 따라 primer, probe를 준비함
- viral RNA 추출 장비로 Bioneer exiprep DX를 이용하고, rRT-PCR 장비로는 ABI 7500 (lifetechnology)를 이용함



< 그림 10. 닭 전염성기관지염 바이러스 rRT-PCR 검출 >

- 반복 시험 평균 결과로 calbraiont curve를 확립하였고, threshold값을 0.08으로 고정하였음 ($y = -3.4719x + 35.291$)

- 희석에 의한 detection limit은 cycle threshold(ct) 값으로 34.4473이하로 판정되었으며, 이것은 Egg Infection Dose 50 (EID50) 값으로 환산 하였을 때 0.243 으로 판정됨

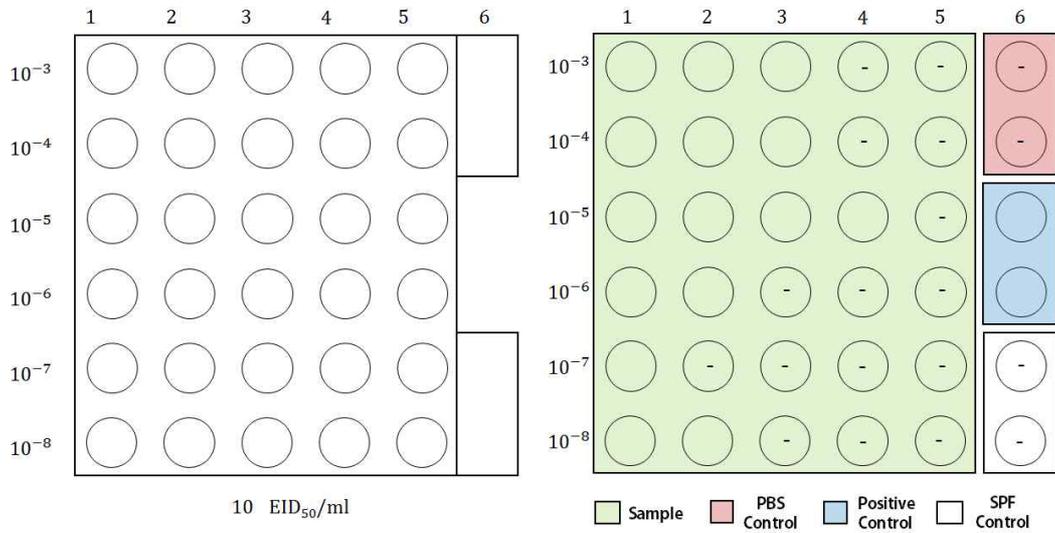
(2) DIA 시험법 표준화

- DIA 실험법을 표준화를 위해 Standard Opration Procedure(SOP) 초안을 작성함
- 초안은 기존의 최초 개발 논문(Chang-seon Song et al., Avian diseases, 1998)을 인용하여 제작하였고 상세 실험 품목을 다음과 같이 한정함(표 3.)

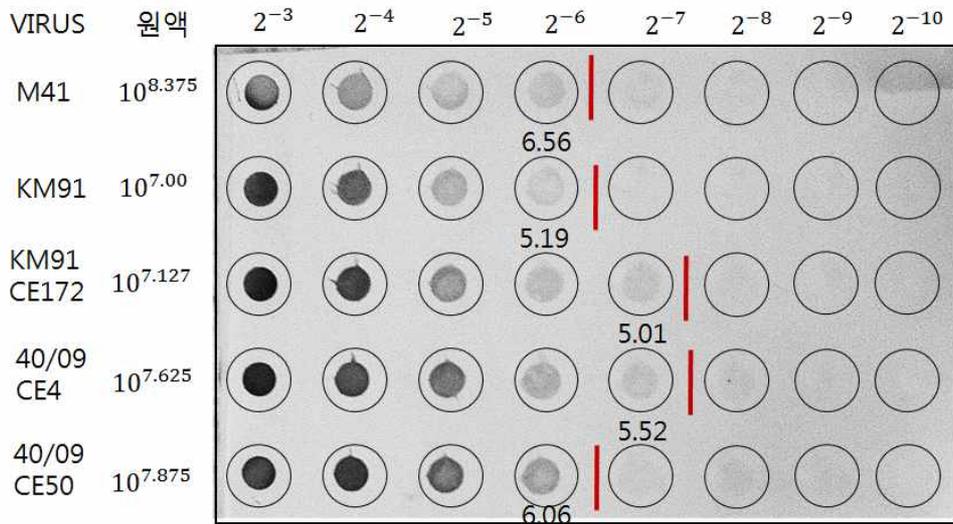
재료 목록	Company
Hybrid-Dot manifold	Bio-Rad
Nitrocellulose membrane	General Electric
Filter paper	General Electric
Peroxidase kits	Vectastatin Elite ABC
3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride	Sigma-aldrich
30% H2O2	Samchun chemical
Sodium chloride	Samchun chemical
1N HCl	Samchun chemical
Ablumin bovine serum	Sigma-aldrich
Tris(base)	Sigma-aldrich
Tris-buffered saline(TBS)	Sigma-aldrich
1% Tween20 + Tris-buffered saline	Sigma-aldrich
Monoclonal antibody (1st Ab)	3F5 monoclonal antibody
Biotinylated anti-mouse igG antibody (2nd Ab)	abcam

< 표 3. DIA 실험법 SOP에 이용된 실험 품목 >

- DIA 실험 발색에 쓰이는 Nitrocellulose membrane의 위치, PBS control, Positive control, SPF control의 위치를 설정하기위해 다음과 같이 고정된 형식을 이용함(그림 11.)
- DIA 시험법의 범용성을 시험 하기 위해 총 5가지 바이러스(M41, KM91(CE7), KM91(CE172), 40/09(CE4), 40/09(CE50))를 선정하였음
- 동일한 바이러스 양으로 반복성 실험에 이용하며, 저장에 의한 역가 감소를 최소화하기 위해 5가지 바이러스는 동량의 바이러스를 동결건조 법으로 저장함
- 각 바이러스를 10일령 specific pathogen free(SPF) 계란의 allantoic fluid에 접종 한 후 3일후 chilling 하였음
- 각 SPF 계란의 allantoic fluid를 수거 한 후 3000g, 10min 조건으로 원심분리하여 계란 유기물질을 침전시킴
- 상층액 각각 1ml 씩 소분되어 동량의 동결보호용액과 함께 섞여 동결건조기(ModulyoD Freeze Dryer, ThermoFisher SCIENTIFIC)를 이용하여 보존됨
- 최적화된 실험법을 이용하여 비교시험에 이용할 바이러스를 이용하여 DIA 시험법의 detection limit을 측정함(그림 12.)



< 그림 11. DIA 시험법에 형식 >



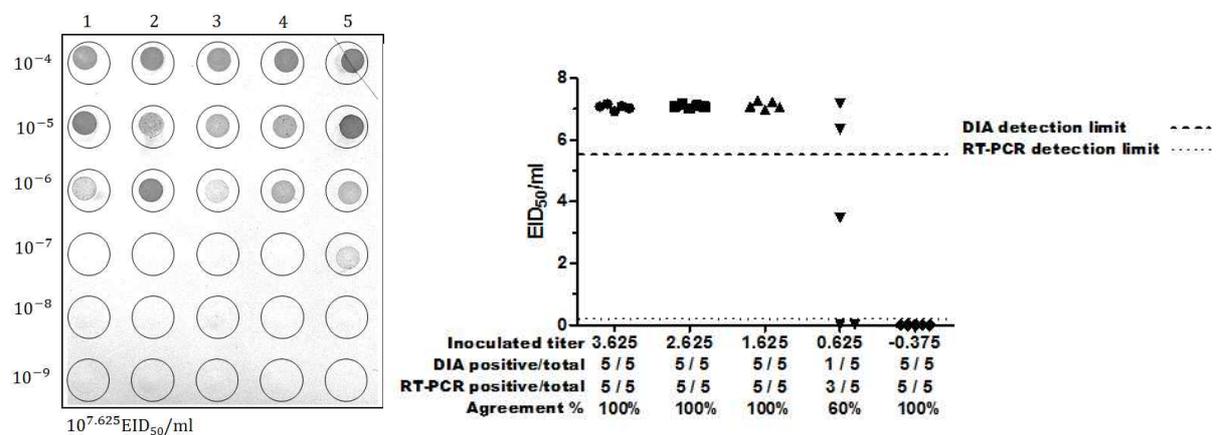
< 그림 12. IB 바이러스 strain에 따른 DIA detection limit 측정 >

- 각 동결보존 바이러스 원액을 2진 희석하여 DIA 법으로 발색하고 육안으로 관찰 할 수 있는 최하 역가를 측정하고자함
- 이를 위해 각 동결건조 바이러스 원액의 역가를 SOP에 준하여 측정하였음
- M41 바이러스의 DIA 발색시 육안 관찰 가능 역가는 $10^{6.56}$ 이상으로 판단됨
- KM91(CE7) 바이러스의 DIA 발색시 육안 관찰 가능 역가는 $10^{5.19}$ 이상으로 판단됨
- KM91(CE172) 바이러스의 DIA 발색시 육안 관찰 가능 역가는 $10^{5.01}$ 이상으로 판단됨
- 40/09(CE4) 바이러스의 DIA 발색시 육안 관찰 가능 역가는 $10^{5.52}$ 이상으로 판단됨
- 40/09(CE50) 바이러스의 DIA 발색시 육안 관찰 가능 역가는 $10^{6.06}$ 이상으로 판단됨
- 육안 관찰로 측정 할 수 있는 최대 희석 배수 바이러스를 확립된 rRT-PCR을 이용하여 측정하여 비교하였을 때 M41은 약 12만배, KM91(CE7)은 약 24만배, KM91(CE172)은 약 26만배, 40/09(CE4)은 약 7만배, 40/09(CE50)은 약 24만배 rRT-PCR이 더 민감한 것으로 측정됨

- 위의 결과로 DIA 방법보다 rRT-PCR이 바이러스의 Detection에는 유의적으로 민감한 것으로 나타났으며, 역가 측정에 가장 민감한 것으로 판단됨
- 그러나 rRT-PCR은 광학측정 장치가 추가된 고가의 thermocycler가 요구되며, DIA 방법보다 경제적이지 못한 것으로 판단됨
- 따라서 차후 실험에서 위의 DIA, rRT-PCR 법을 바탕으로 농림축산검역본부고시에 나온 계태아 병변 판단법과 역가 차이를 비교하여 DIA 실험법의 객관성을 확보하고자 하였습니다

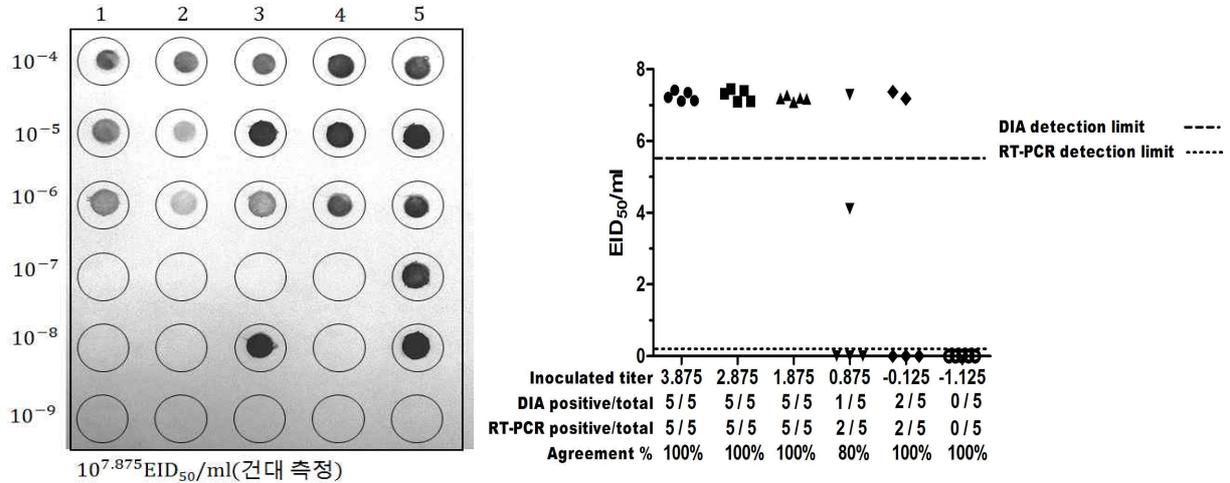
(3) DIA 방법과 rRT-PCR의 비교시험

- 기본적으로 DIA 방법은 계란에서 증식한 바이러스의 Egg Infectious Dose 50 (계란에서 반수 감염되는 바이러스 희석배수)를 이용하여 역가를 측정함
- 따라서 DIA와 rRT-PCR을 비교하기 위해서 SOP에 따라 M41 바이러스를 10진 희석하여 각 희석 배수를 계란에 0.1ml씩 접종하고, 3일 후 계란에서 allantoic fluid를 채취함
- 채취한 sample은 rRT-PCR을 위해 viral RNA를 뽑은 데 쓰이고 동시에 DIA를 진행함



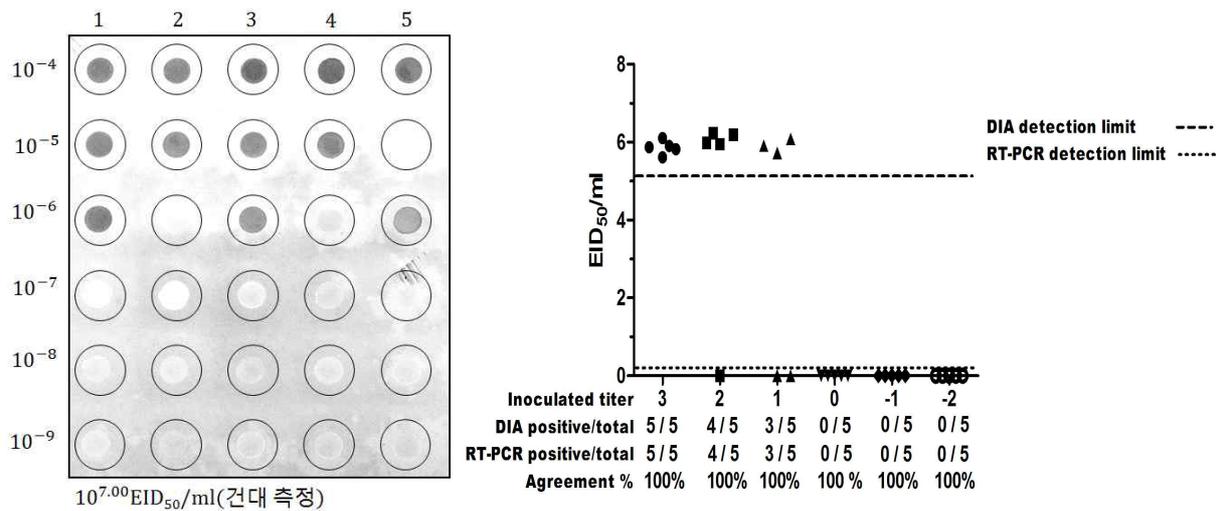
< 그림 13. 40/09(CE4) 바이러스의 DIA 방법과 rRT-PCR비교 >

- 40/09(CE4) 바이러스는 DIA로 $10^{7.625}$ 역가가 나왔으며 rRT-PCR로 측정한 역가 ($10^{7.83}$)와 약 1.6배 낮음(그림 13.)
- DIA 양성 유무와 rRT-PCR 측정 양성 유무가 $10^{0.625}$ 를 접종한 계란을 제외하고 100% 동일하게 나왔으며 DIA detection limit에 미치지 않으며 rRT-PCR에서 양성으로 검출된 계란이 1개 발견되었다. 이 계란은 약 $10^{3.5}$ EID50/mL로 자란 것으로 판명되었음
- 1 개의 계란 차이로 약 1.6 배의 역가 차이를 보였으며, 이 계란은 바이러스가 3일 안에 계란에서 자랄 수 있는 최대 역가로 자라지 못한 것으로 판단됨



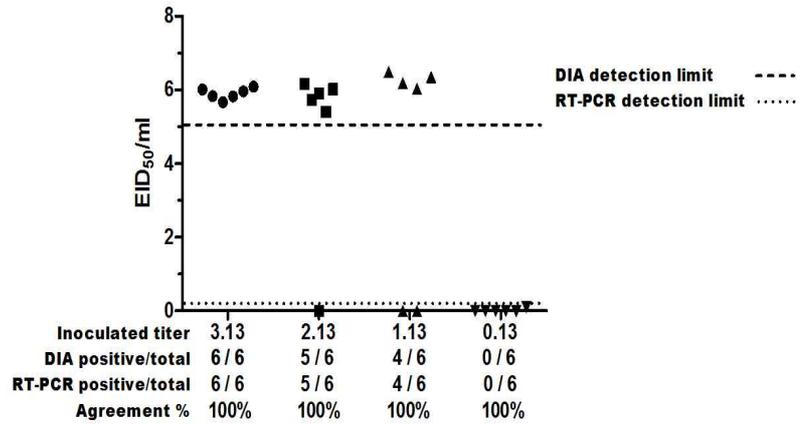
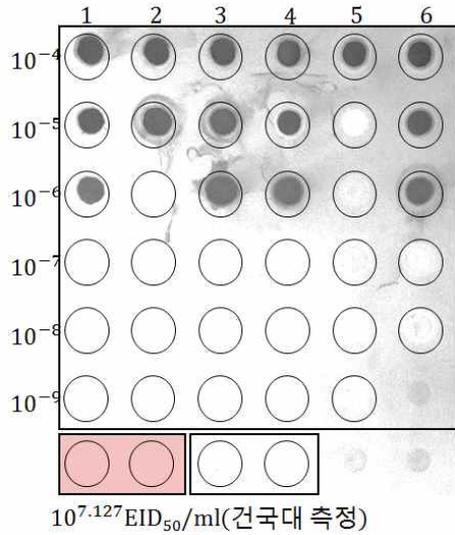
< 그림 14. 40/09(CE50) 바이러스의 DIA 방법과 rRT-PCR비교 >

- 40/09(CE50) 바이러스는 DIA로 $10^{7.875}$ 역가가 나왔으며 이는 rRT-PCR로 측정된 역가는 $10^{8.222}$ 로 측정됨(그림 14.)
- DIA 양성 유무와 rRT-PCR 측정 양성 유무가 $10^{0.875}$ 를 접종한 계란을 제외하고 100% 동일하게 나왔으며 DIA detection limit에 미치지 않으며 rRT-PCR에서 양성으로 검출된 계란이 1개 발견되었다. 이 계란은 약 10^4 EID₅₀/mL로 자란 것으로 판명되었음
- 1 개의 계란 차이로 약 2.2 배의 역가 차이를 보였으며, 이 계란은 바이러스가 3일 안에 계란에서 자랄 수 있는 최대 역가로 자라지 못한 것으로 판단됨



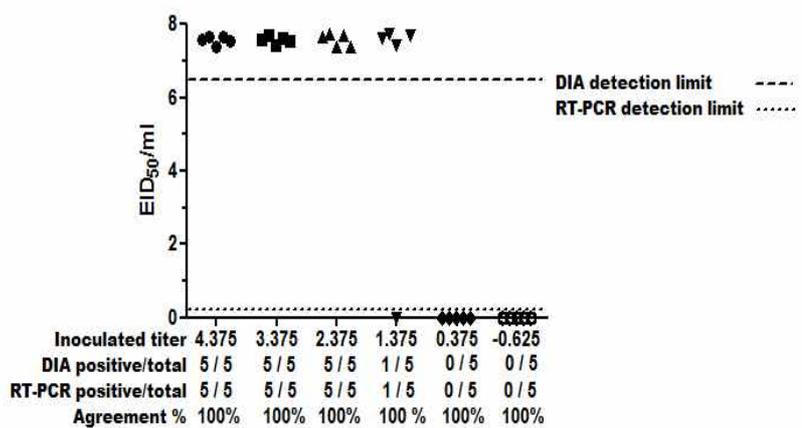
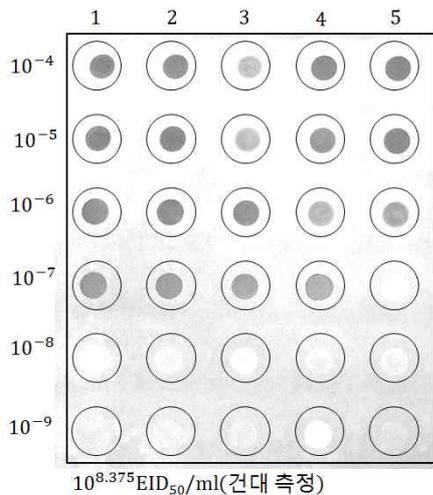
< 그림 15. KM91(CE7) 바이러스의 DIA 방법과 rRT-PCR비교 >

- KM91(CE7) 바이러스는 DIA로 $10^{7.00}$ 역가가 나왔으며 이는 rRT-PCR로 측정된 역가와 동일함(그림 15.)
- DIA 양성 유무와 rRT-PCR 측정과 100% 동일하게 나왔음



< 그림 16. KM91(CE172) 바이러스의 DIA 방법과 rRT-PCR비교 >

- KM91(CE172) 바이러스는 DIA로 10^{7.00} 역가가 나왔으며 이는 rRT-PCR로 측정 한 역가와동일함(그림 16.)
- DIA 양성 유무와 rRT-PCR 측정과 100% 동일하게 나왔음



< 그림 17. M41 바이러스의 DIA 방법과 rRT-PCR비교 >

- M41 바이러스는 DIA로 10^{8.375} 역가가 나왔으며 이는 rRT-PCR로 측정 한 역가와동일함(그림 17.)
- DIA 양성 유무와 rRT-PCR 측정과 100% 동일하게 나왔음
- 위의 결과로 미루어 볼 때 IB 바이러스의 strain 또는 계대 여부와 관계없이 DIA는 rRT-PCR과 매우 근접하게 역가를 측정 할 수 있었으며, DIA에서 위음성으로 판단된 계란이 미치는 역가는 약 2배 정도까지 차이 날 수 있음

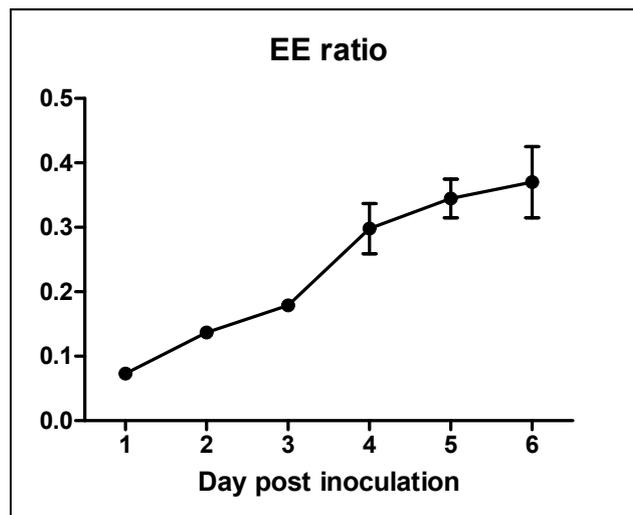
(4) 계태아 병변판단 방법과 rRT-PCR의 비교시험

- 닭 전염성기관염의 계태아 병변은 크게 두가지 임상증상으로 판단 할 수 있음
- Dwarfing(계태아 발육저하), Curling(계태아 오그러짐)으로 판단 할 수 있으며, 이러한 현상은 바이러스의 특성에 따라 달라질 수 있음(Disease of poultry, 2013)(그림 18.)



< 그림 18. IB 감염 계태아의 Curling과 Dwarfing (Disease of poultry) >

- 기존 동물용의약품 검정기준에는 병변판단 기준이 정해져 있지 않아 육안적으로 판단 할 수밖에 없었음
- 따라서 병변판단의 수치화와 객관화를 위해 Dwarfing 판단은 계란의 무게를 측정하여 평균(표준편차 범위 내) 미만인 개체는 병변이 있는 것으로 판단함
- 이를 위해 계태아의 Embryo to egg(EE) ratio를 10일령 종란에 멸균 PBS(0.1ML) 만을 접종 한 계태아를 이용하여 측정함(그림 19.)

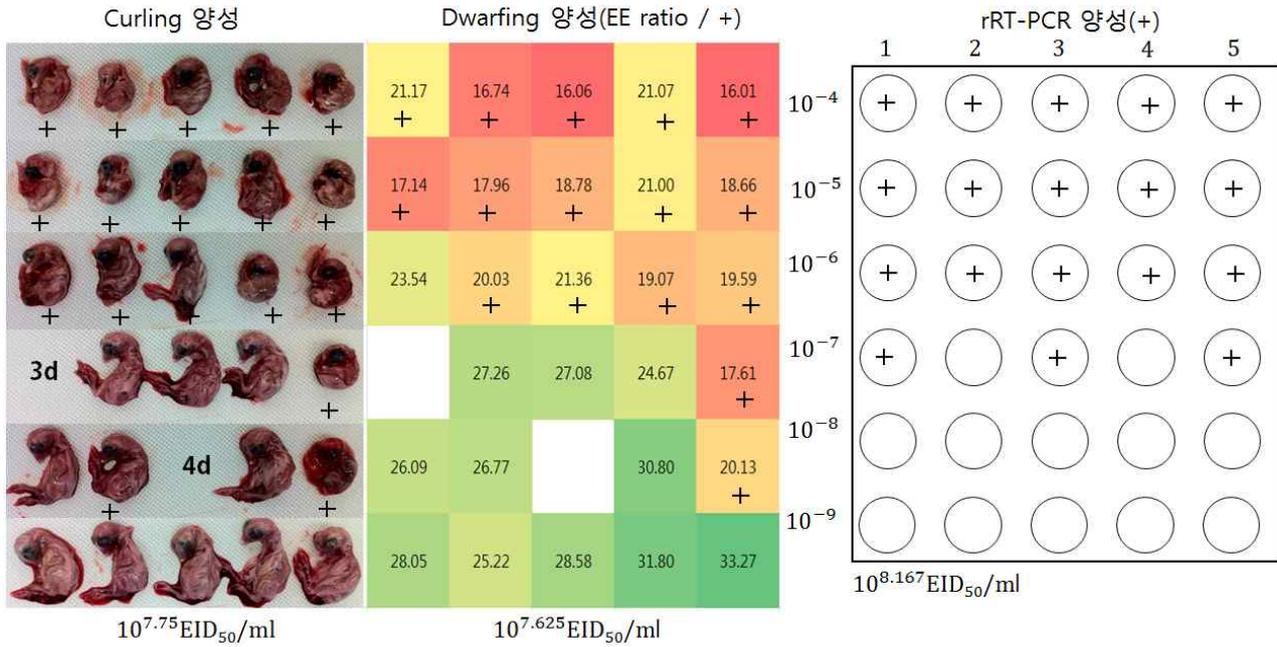


< 그림 19. 멸균 PBS를 접종 한 후 계란 무게 대비 계태아 무게 >

- 측정 결과 PBS를 접종 한 계란의 EE ratio는 평균 0.37이며 표준편차 최하 값은 0.31로 측정되어 Dwarfing 병변 판단 시 0.31 미만의 개체는 Dwarfing 이 있는 것으로 판단함
- Curling의 육안판단은 계태아의 망막을 벗겼을 때 다리 부분이 머리를 향하고 있는 것을 병변으로 판단하였으며, 판단하기 어려운 정도 일 때는 다리를 후방으로 당겼을 때도

다시 머리부분으로 향하는 것으로 병변을 판단하였음

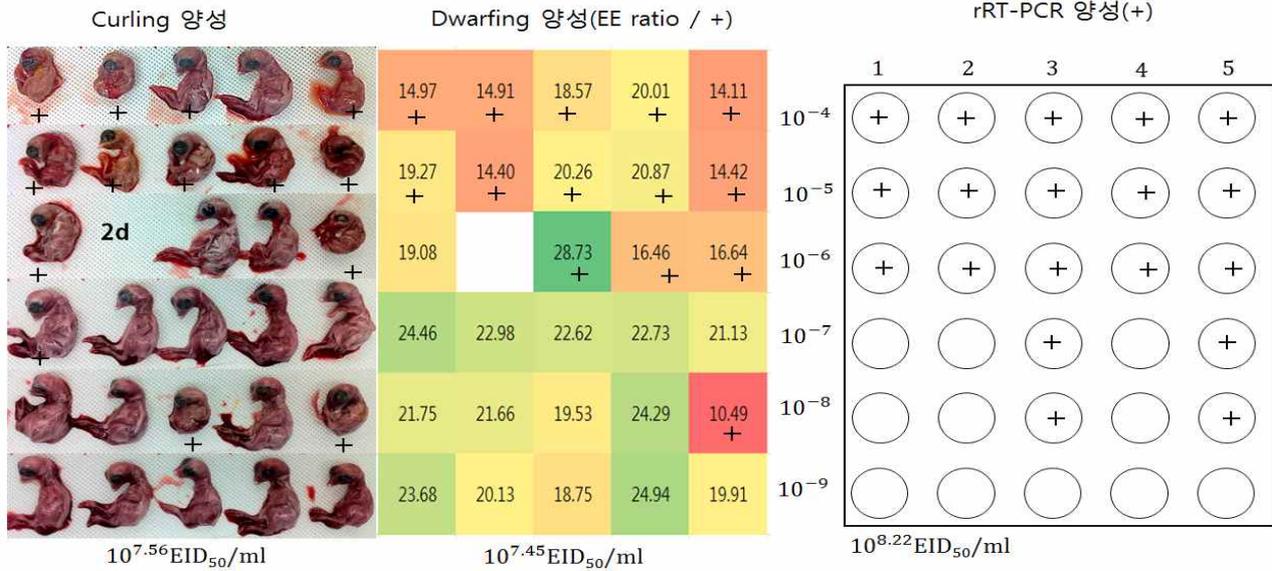
IBV 40/09 CE4 TITRATION



< 그림 20. 40/09(CE4) 바이러스의 계태아 병변판단 방법과 rRT-PCR비교 >

- 40/09(CE4) 바이러스는 Curling 판단으로 10^{7.75} Dwarfing 판단으로 10^{7.625} 역가가 나왔으며 이는 rRT-PCR로 측정 한 역가는 10^{8.167}로 측정됨(그림 20.)
- Dwarfing 판단의 경우 rRT-PCR과 전체 계란중 86.6%의 일치도를 보였으며 Curling 판단의 경우 90.0%의 일치도를 보였음
- Dwarfing 판단의 경우 rRT-PCR보다 3.48배 낮게 역가를 측정되었으며 Curling 판단의 경우 2.61배 낮게 측정되었음

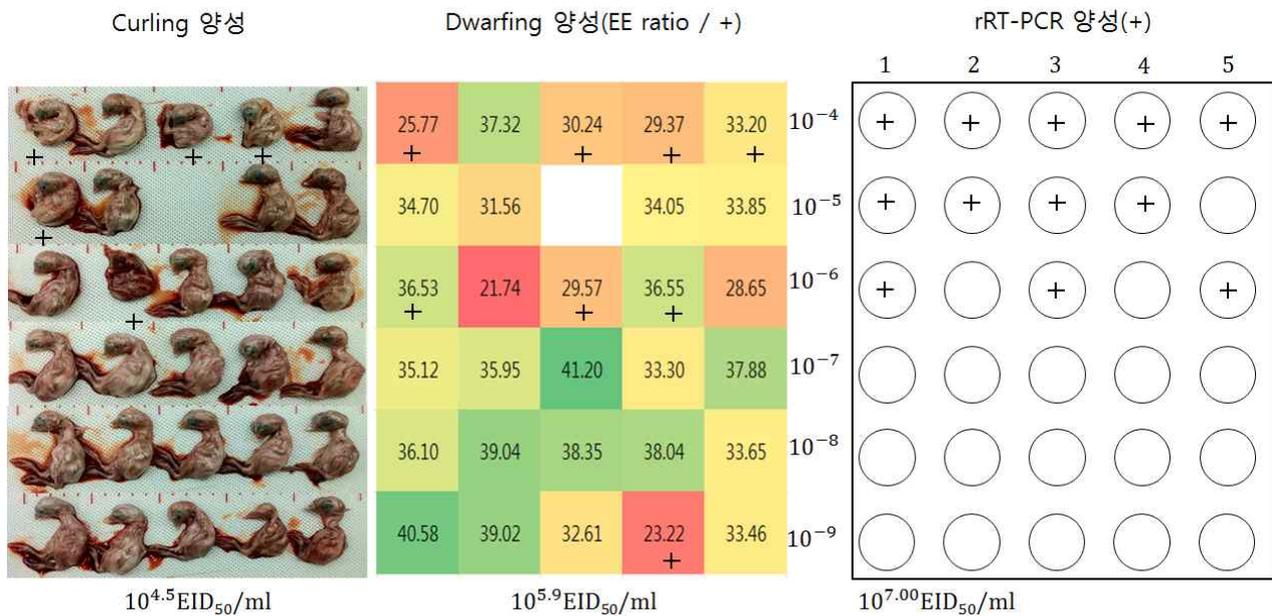
IBV 40/09 CE50 TITRATION



< 그림 21. 40/09(CE50) 바이러스의 계태아 병변판단 방법과 rRT-PCR비교 >

- 40/09(CE50) 바이러스는 Curling 판단으로 10^{7.45} Dwarfing 판단으로 10^{7.56} 역가가 나왔으며 이는 rRT-PCR로 측정된 역가는 10^{8.22}로 측정됨(그림 21.)
- Dwarfing 판단의 경우 rRT-PCR과 전체 계란중 86.2%의 일치도를 보였으며 Curling 판단의 경우 82.75%의 일치도를 보였음
- Dwarfing 판단의 경우 rRT-PCR보다 5.88배 낮게 역가를 측정되었으며 Curling 판단의 경우 4.57배 낮게 측정되었음

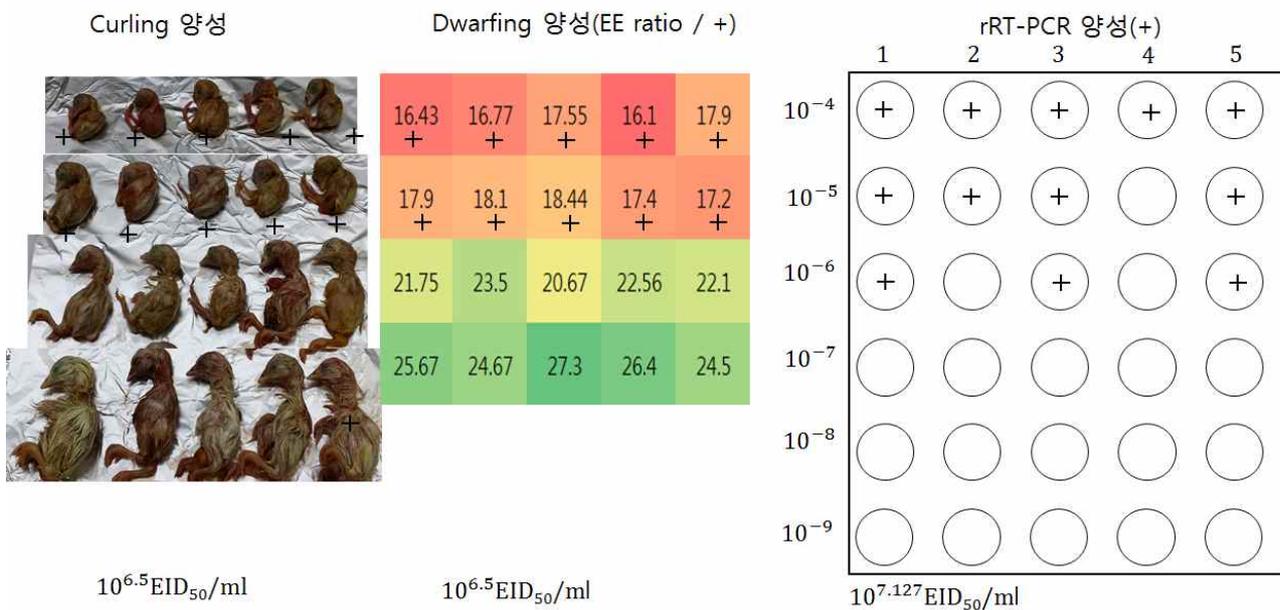
IBV KM91(CE7) TITRATION



< 그림 22. KM91(CE7) 바이러스의 계태아 병변판단 방법과 rRT-PCR비교 >

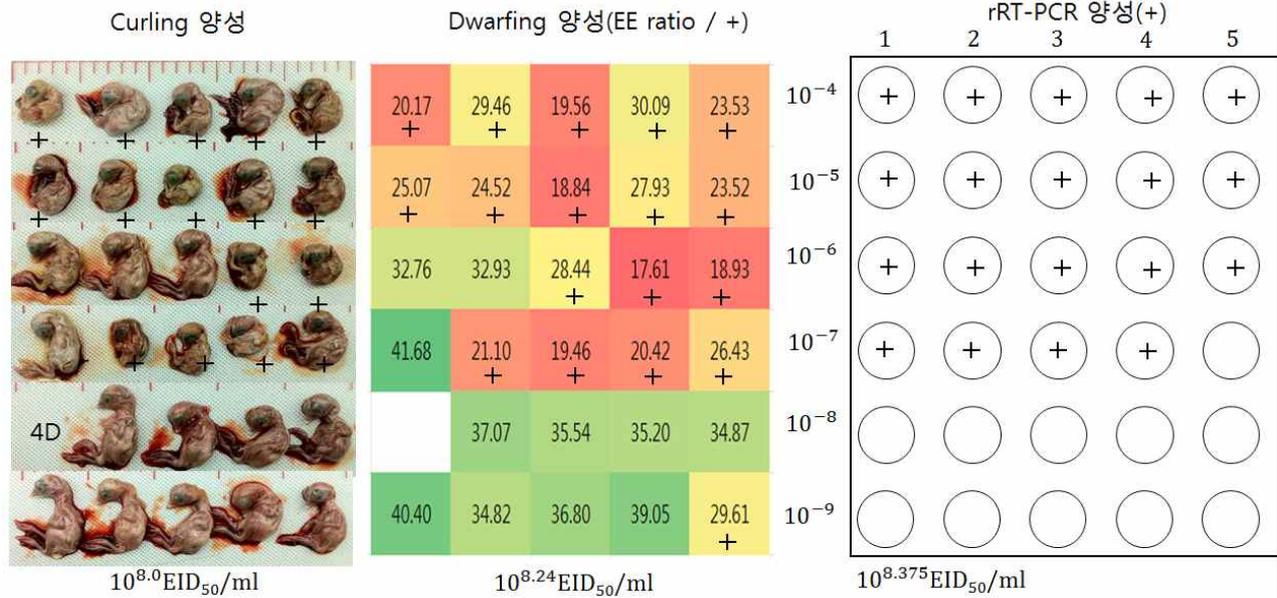
- KM91(CE7) 바이러스는 Curling 판단으로 $10^{4.5}$ Dwarfing 판단으로 $10^{5.9}$ 역가가 나왔으며 이는 rRT-PCR로 측정한 역가는 $10^{7.0}$ 로 측정됨(그림 22.)
- Dwarfing 판단의 경우 rRT-PCR과 전체 계란중 79.3%의 일치도를 보였으며 Curling 판단의 경우 72.41%의 일치도를 보였음
- Dwarfing 판단의 경우 rRT-PCR보다 12.6배 낮게 역가를 측정되었으며 Curling 판단의 경우 316.2배 낮게 측정되었음

IBV KM91 CE172 TITRATION



< 그림 23. KM91(CE172) 바이러스의 계태아 병변판단 방법과 rRT-PCR비교 >

- KM91(CE172) 바이러스는 Curling 판단으로 $10^{6.5}$ Dwarfing 판단으로 $10^{6.5}$ 역가가 나왔으며 이는 rRT-PCR로 측정한 역가는 $10^{7.127}$ 로 측정됨(그림 23.)
- Dwarfing 판단의 경우 rRT-PCR과 전체 계란중 86.67%의 일치도를 보였으며 Curling 판단의 경우 86.67%의 일치도를 보였음
- Dwarfing 판단의 경우 rRT-PCR보다 4.24배 낮게 역가를 측정되었으며 Curling 판단의 경우 4.24배 낮게 측정되었음



< 그림 24. M41 바이러스의 계태아 병변판단 방법과 rRT-PCR비교 >

- M41 바이러스는 Curling 판단으로 $10^{8.0}$ Dwarfing 판단으로 $10^{8.24}$ 역가가 나왔으며 이는 rRT-PCR로 측정 한 역가는 $10^{8.375}$ 로 측정됨(그림 24.)
- Dwarfing 판단의 경우 rRT-PCR과 전체 계란중 82.75%의 일치도를 보였으며 Curling 판단의 경우 79.31%의 일치도를 보였음
- Dwarfing 판단의 경우 rRT-PCR보다 1.36배 낮게 역가를 측정되었으며 Curling 판단의 경우 2.4배 낮게 측정되었음

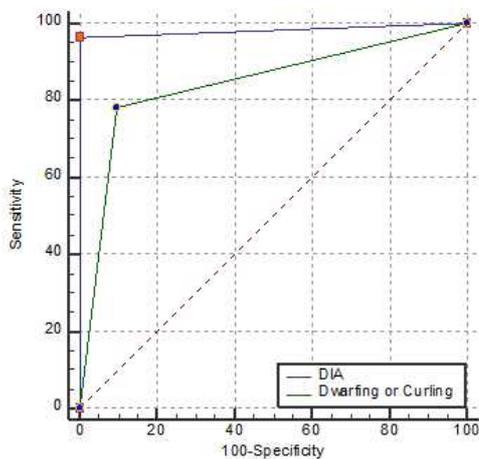
(5) 계태아병변 판단법, DIA, rRT-PCR 결과의 비교

- 세가지 측정 방법 중 rRT-PCR이 가장 민감한 측정 방법으로 판단됨(표 4.)
- 계태아 병변판단법과 DIA를 비교 했을 때 DIA방법이 rRT-PCR 결과에 가장 근접함
- KM91과 M41의 경우에는 DIA와 rRT-PCR이 동일한 측정 결과를 보였음
- 가장 차이가 많은 나는 경우는 40/09(CE50)로서 rRT-PCR 측정 방법보다 약 2.2배 적게 측정됨
- 계태아 병변판단법은 40/09에서 rRT-PCR과 비교했을 때 5.88배 적게 측정되었고 KM91에서는 특히 큰 차이를 보였음(KM91(CE7) ; 316배)

측 정 방 법	바이러스 역가 (LOG ₁₀)				
	40/09 (CE4)	40/09 (CE50)	KM91 (CE7)	KM91 (CE172)	M41
병 변 판 단	7.625	7.56	5.90	6.50	8.24
DIA	7.63	7.88	7.00	7.00	8.38
rRT-PCR	7.83	8.22	7.00	7.00	8.38

< 표 4. 계태아병변 판단법, DIA, rRT-PCR 측정 방법의 비교 >

- 위의 결과를 종합하여 볼 때 DIA 방법은 기존의 계태아병변 판단 방법보다 역가 측정 시간을 단축시킬 수 있을 뿐만아니라 계란에서 증식한 바이러스를 더 민감하게 측정 할 수 있는 것을 알 수 있음
- Detection limit는 유전자 검출 방법인 rRT-PCR에 미치지 못하지만 육안적 판단에 의존하는 계태아병변 판단 법 보다 객관적임을 증명하였음
- 또한 현재 백신주로 사용하고있는 닭 전염성기관지염 바이러스는 계란에서 많은 계대를 통해 약독화시키는 방법을 택하고 있어 계란에서 병변 판단으로 백신주 역가 측정 시 약독화로 인한 병변감소를 초래 할 수 있음
- rRT-PCR 대비 DIA와 계태아 병변법을 ROC curve로 비교 판단 한 결과 DIA 법이 rRT-PCR에 더 가까운 것으로 나타났으며 95% 신뢰구간이 0.947 ~ 0.997로 병변법 0.777 ~ 0.897 보다 높은 것으로 나타났음(표 5.)



Variable 1	DIA
Variable 2	Dwarfing_or_Curling
Classification variable	rRTPCR

Sample size	156
Positive group ^a	83 (53.21%)
Negative group ^b	73 (46.79%)

^a rRTPCR = 1
^b rRTPCR = 0

Variable	AUC	SE	95% CI
DIA	0.982	0.0103	0.947 to 0.997
Dwarfing_or_Curling	0.844	0.0286	0.777 to 0.897

< 표 5. 계태아병변 판단법, DIA, rRT-PCR 측정의 통계적 비교 >

- Chi-squared test 분석 결과 rRT-PCR 대비 DIA의 민감도/특이도가 100%/96.05% 인 것으로 나타났으며 병변판단법은 78.31%/90.40%로 나타났음
- 따라서 DIA 방법을 역가 측정의 지표로 선정하고, 시험의 반복성을 측정함

(6) DIA의 반복성 시험

- 작성된 SOP를 바탕으로 DIA의 반복성을 측정하여 시험의 균일도를 증명하고자함
- 각기 다른 세 기관(건국대학교, (주)구울리생명공학연구소, (주)대성미생물연구소)에서

각기다른 세 시험자가 동일한 SPF계란을 준비하여 SOP에 따라 세가지 바이러스(M41, KM91(CE7), KM91(172))의 역가를 DIA 방법으로 측정함(표 6. 7. 8.)

Virus dilution	KM91(CE7)			
	LAB1	LAB2	LAB3	Consensus
10 ⁻⁴	5/5	5/5	5/5	100%
10 ⁻⁵	5/5	5/5	5/5	100%
10 ⁻⁶	3/5	3/5	3/5	100%
10 ⁻⁷	0/5	1/5	1/5	80%
10 ⁻⁸	0/5	0/5	0/5	100%
10 ⁻⁹	0/5	0/5	0/5	100%
titer	10 ^{7.17}	10 ^{7.32}	10 ^{7.32}	

< 표 6. KM91(CE7)을 이용한 DIA 반복성 시험 >

Virus dilution	KM91(CE172)			
	LAB1	LAB2	LAB3	Consensus
10 ⁻⁴	5/5	5/5	5/5	100%
10 ⁻⁵	4/5	5/5	5/5	80%
10 ⁻⁶	3/5	3/5	5/5	100%
10 ⁻⁷	0/5	1/5	1/5	80%
10 ⁻⁸	0/5	0/5	1/5	80%
10 ⁻⁹	0/5	0/5	0/5	100%
titer	10 ^{7.00}	10 ^{7.32}	10 ^{7.75}	

< 표 7. KM91(CE172)을 이용한 DIA 반복성 시험 >

Virus dilution	M41			
	LAB1	LAB2	LAB3	Consensus
10 ⁻⁴	5/5	5/5	5/5	100%
10 ⁻⁵	5/5	5/5	5/5	100%
10 ⁻⁶	4/5	5/5	5/5	80%
10 ⁻⁷	2/5	0/5	2/5	60%
10 ⁻⁸	0/5	0/5	0/5	100%
10 ⁻⁹	0/5	0/5	0/5	100%
titer	10 ^{7.68}	10 ^{7.50}	10 ^{7.83}	

< 표 8. M41을 이용한 DIA의 반복성 시험 >

- 각 바이러스 별로 가장 역가 측정 폭이 컸던 결과는 KM91(CE7) 1.4배 KM91(CE172) 5.6배 M41 2.1배로 격차가 있었음

- 이것은 세 실험실의 환경이 같지 않고, SOP는 같으나 GLP 환경 조건이 아님을 가만 할 때 1 LOG₁₀ 이상의 격차가 일어나지 않음을 보여주는 반복 실험임

- 본 개발 시험 방법은 아래와 같은 성과에 이용됨.

① 가금용 ND IB QX 효능시험 - 한국 MSD 동물약품 위탁연구시험

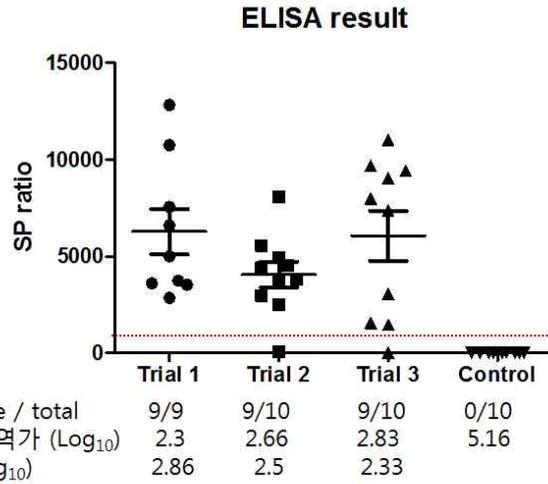
② 시험 모델을 이용한 위탁연구 요청기관의 동물용의약품 함량시험 및 자체시험 - 고려비엔피, 녹십자수의약품, 대성미생물연구소의 전염성기관지염 백신 함량에 대해 총 17 회 수행

2. 전염성기관지염 백신의 효능 검정 시 혈청학적 검사 지표인 중화시험법을 대체법 가. 연구계획

- (1) 사전 시험을 통하여 중화지수가 확인된 전염성기관지염에 대한 면역 혈청을 이용, 중화 지수와 위탁연구 요청기관의 ELISA 키트와의 결과를 비교함
- (2) 비교한 결과를 토대로 호흡기형 IB 면역 혈청과 신장형 IB 면역 혈청에 대하여 키트의 민감도와 특이도를 개선함
- (3) 산출된 중화 지수와 ELISA 결과를 바탕으로 새로운 백신 검정 기준의 혈청 역가 시험 기준을 제시함
- (4) 신장형 닭 전염성기관지바이러스 ELISA의 민감도 특이도를 개선하기위해 DIA를 이용한 중화시험과 ELISA 양성률을 조정하여 비교 실험을 실시함
- (5) 총 2회로 나누어 각각 3번의 면역을 실시함
- (6) 첫 번째 시험에서 3주령 SPF 닭을 이용하여 3가지 백신을 실시하였으며 백신 실시 3주 후 혈액에서 혈청을 수거하여 ELISA와 동시에 DIA를이용한 중화시험을 실시함

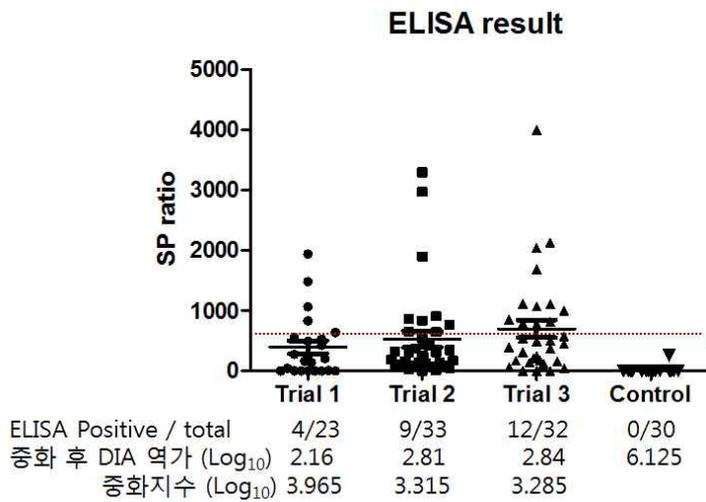
나. 연구결과

- (1) 첫 번째 시험에서 그림 25. 과 같은 결과를 얻을 수 있었으며 세가지 백신 모두 중화지수 2 이상을 보였음
- (2) ELISA 결과 각 trial 2, trial 3에 1마리씩을 제외 한 모든 닭에서 ELISA 양성을 보였으며 대조군과 비교할 때 ELISA의 평균 SP ratio가 중화 후 DIA 역가 낮을수록 높은 것을 확인 할 수 있음



< 그림 25. DIA를 이용한 중화지수와 ELISA의 비교 - 1 >

- (3) 두 번째 시험에서 1일령 SPF 닭을 이용하여 3가지 백신을 실시하였으며 백신 실시 3주 후 혈액에서 혈청을 수거하여 ELISA와 동시에 DIA를 이용한 중화시험을 실시함
- (4) 두 번째 시험에서 그림 26. 과 같은 결과를 얻을 수 있었으며 세가지 백신 모두 중화지수 2 이상을 보였음
- (5) ELISA 결과 높은 중화지수와 상이하게 낮은 양성률을 확인 할 수 있었음
- (6) 이것은 1일령 백신 항체에 대해서 바이러스의 중화지수로 평가 하는 것은 가능하나 ELISA를 이용한 판단은 가능 하지 않음을 의미 함
- (7) 따라서 결과에 따라 1일령 백신 후 3주후 혈청에 대한 ELISA 민감도/특이도 개선이 요구됨



< 그림 26. DIA를 이용한 중화지수와 ELISA의 비교 - 2 >

- (8) 위의 결과를 종합하여 미루어 볼 때 본 시험에서 쓰인 ELISA는 DIA를 이용한 중화시험

을 기준으로 미루어 판단 할 때 3주령 백신 후 혈청 샘플에는 적용 가능하나 1일령 백신 후 혈청 샘플에는 부적합 한 것으로 판단됨

(9) 연구개발계획서상 민간위탁연구협약을 맺은 동물용 진단키트 제조사인 (주)메디안디노스틱의 IB ELISA kit 시제품에 대해 중화시험을 대체 할 진단 기구로서 유효성을 평가함

(10) 진단에 필요한 검체를 확보하기 위해 1일령 SPF닭 30수를 이용하여 두 개의 백신(대성 K2-ND 치큰백, 건대 제조 K40/09-K148)과 대조군 각 10마리씩 분무 백신을 실시함(표 9)

그룹	백신 종류	병아리	시험 수수	백신
G1	대성 K2-ND 치큰백 (25K2ND01)	SPF	10	1일령 분무
G2	건대 K40/09+K14 8	SPF	10	1일령 분무
G3		SPF	10	-

< 표 9. 진단 검체 제조를 위한 백신 그룹 설정 >

(11) 백신 후 21일령이 되는 시점에 채혈을 실시하여 동일 혈청으로 중화시험 및 ELISA를 실시하여 비교함

Group	3주차		5주차	
	역가(EID ₅₀ /mL)	중화지수	역가(EID ₅₀ /mL)	중화지수
G1	10 ^{5.3}	1.2	10 ^{4.8}	1.7
G2	10 ^{2.6}	3.0	10 ^{0.6}	5.0
대조혈청 K2			10 ^{6.5}	
대조혈청 K40/09			10 ^{5.6}	

< 표 10. 백신 3주 후 혈청의 IB 중화지수 결과 >

(12) 민간위탁연구 협약을 맺은 (주)대성미생물연구소 제작 K2는 국가검정기준 중화지수 2.0 이하로 기준치 이하였으며 본 연구팀 제조 백신의 경우 높은 2.0 이상의 높은 중화역가를 나타냄(표 10)

(13) 동일 혈청에 대해 (주)메디안디노스틱 제작 ELISA를 이용하여 항체역가를 측정하였음(표 11)

Group	ELISA titer (항체 양성율 ^A)	
	3주차	5주차
G1	205 ± 327 (1/12)	143 ± 232 (0/12)
G2	1143 ± 794 (6/11)	676 ± 389 (4/11)
G3	2 ± 3 (0/10)	

< 표 11. 백신 3주 후 혈청의 IB ELISA 결과 >

(14) 문제점1. ELISA 결과 값이 균일하지 않은 것으로 나타남. 이는 두 가지 원인으로 추측할 수 있는데 첫 번째 원인은 개체 별 백신에 의한 면역이 고르게 일어나지 않은 것일 수 있고, 두 번째 원인으로서는 시제품 ELISA의 항체 역가 측정에 대한 특이도 및 민감도가 떨어지는 것일 수 있음

(15) 문제점 2. 평균 ELISA 값이 3, 5주차로 시간이 지남에 따라 감소하는 것이 관찰되는 것과 반대로 중화지수는 상승하는 것이 관찰됨

(16) 첫 번째 문제점 중 백신 실패에 의한 원인을 배제하기 위해 동시에 IB백신과 함께 접종된 ND에 대해 항체 역가를 측정하고 백신 역가를 측정함(표 12, 13, 14)

Group	3주차		5주차	
	1차	2차	1차	2차
G1	3.5 ±2.2	3.4 ±2.4	3.1 ±1.8	2.8 ±1.7
G2	5.0 ±2.6	4.9 ±2.7	4.5 ±2.7	4.6 ±2.5
G3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	1.0±0.0

< 표 12. 백신 3주 후 혈청의 ND ELISA 결과 >

Group	ELISA titer (항체 양성율 ^A)	
	3주차	5주차
G1	6322 ±7975 (11/12)	2058 ±3159 (8/12)
G2	9215 ±9131 (9/11)	7272 ±10532 (10/11)
G3	1 ±0 (0/10)	

< 표 13. 백신 3주 후 혈청의 ND ELISA 결과 >

Vaccine	대성 (24K2ND01)		건대 제조	
Virus	IBV	NDV	IBV	NDV
역가	10 ^{3.2}	10 ^{5.8}	10 ^{3.5}	10 ^{5.8}

< 표 14. 각 시험 백신의 역가측정 >

(17) IB와 ND를 계란에서 각각 Dot-immunoblotting과 Hemagglutinin assay를 이용하여 측정 한 결과 두 백신의 유의적인 역가차이는 없음

(18) ND 백신에 의한 면역 반응이 예상된 범위(4~6)에서 일어난 것으로 보아 백신 실패로 인한 ELISA 값 평가에 문제점을 배제 할 수 있었음

(19) 따라서 (주)메디안디노스틱의 K2 및 K40/09 항체에 대한 ELISA의 특이도 및 민감도 개선이 요구되며, 이후 개선 연구를 위해 후속연구 진행됨

(20) 본 개발 시험 방법은 아래와 같은 성과에 이용됨.

- ① 동물용의약품 진단키트 시험 IB ELISA KIT 효능 확인시험 - (주) 메디안디노스틱 위탁 연구시험
- ② 동물용의약품 진단키트 시험 Biocheck ELISA kit 효능 확인시험 - 삼화비엔이 위탁 연구시험

3. 뉴캐슬병(Newcastle disease) 생독 백신의 검정 시험 시 종류별, 분무 입자 크기별 동물실험 모델

가. 연구계획

- (1) 현재 뉴캐슬병 백신의 경우 업체에 따라 생독 백신용으로 사용하고 있는 균주가 다르며, 그에 따라 호흡기에 나타내는 병원성이 달라 병원성의 확인이 필요함.
- (2) 각 회사별 균주의 병원성을 확인하기 위해, 종류별로 생독백신을 1일령 병아리에 각 10마리씩 뇌내접종함.
- (3) 산출된 백신 균주의 병원성에 따라, 균주별로 닭에 임상증상을 나타내지 않으며 충분한 항체 생성능을 확인할 수 있는 적합한 분무 입자 크기를 선정함.
- (4) 닭의 혈청을 채취하여 혈구응집억제반응(HI)을 통해 생독 백신의 항체 생성능 및 방어능 검정을 실시함.

나. 연구결과

(1) 분무 입자 크기 조절 방법

- 분무 백신은 분무 입자 크기에 따라 백신주의 병원성 및 면역원성이 달라질 수 있기 때문에 분무 입자 크기 별 백신 효능 평가를 통해 최적 분무 입자 크기를 선정하는 것이 중요함

분무 형태	제품명	분무 입자 크기
네블라이저	Omron CompAir Pro NE-C29	5 μ m (고운 입자)
캐비닛형 분무기	Threshine SK-MO-Auto-3000	50 μ m (중간 입자)
휴대용 분무기	Desvac Kit 2	115 μ m (굵은 입자)

< 표 15. 분무 입자 크기별 백신 분무기 >

- 연구에서는 백신 분무 입자 크기 조절을 위해 현재 시판되고 있는 비가열식 네블라이저, 캐비닛형 백신 분무기, 휴대용 백신 분무기를 이용하였으며, 각 분무기의 제품명 및 제원은 표15와 같음

(2) 백신주 선정 및 실험군 설정

- 국내 및 전세계에서 사용되고 있는 백신주 4종을 선정하여 시험함
- V4, VG/GA, B1 및 K148/08 4종의 백신주를 대상으로 실험
- 각 백신주는 분무 입자 크기에 따라 총 3개 그룹으로 나뉘었으며 각 그룹은 1일령 SPF 병아리 11마리로 설정함

그룹명	백신주	ICPI	분무기	입자 크기	공시 수수
G1	V4	0.0	Omron	5 μ m (고운 입자)	11
G2			Threeshine	50 μ m (중간 입자)	11
G3			Desvac	115 μ m (굵은 입자)	11
G4	VG/GA	0.0	Omron	5 μ m (고운 입자)	11
G5			Threeshine	50 μ m (중간 입자)	11
G6			Desvac	115 μ m (굵은 입자)	11
G7	B1	0.2	Omron	5 μ m (고운 입자)	11
G8			Threeshine	50 μ m (중간 입자)	11
G9			Desvac	115 μ m (굵은 입자)	11
G10	K148/08	0.3	Omron	5 μ m (고운 입자)	11
G11			Threeshine	50 μ m (중간 입자)	11
G12			Desvac	115 μ m (굵은 입자)	11
G13	Control	-	-	-	11

< 표 16. 실험군 설정 >

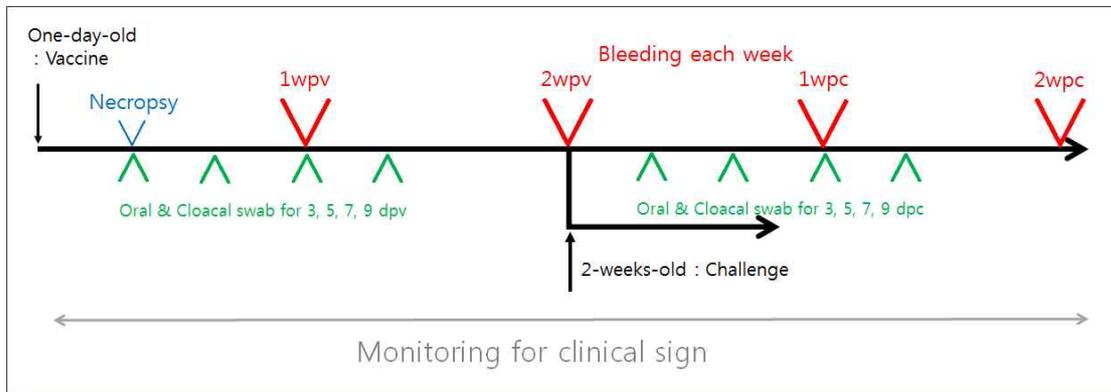
- 실험군 설정은 표16 와 같음.

(3) 실험 방법

- OIE terrestrial manual에 따라 각 백신주의 뇌내접종 병원성 지수(Intracerebral Pathogenicity Index : ICPI)를 측정함.
- 간략히 설명하면, 각 백신주의 신선한 Allantoic fluid 1/10 희석액 0.1ml을 1일령 SPF 병아리 10수에 뇌내접종한 뒤 8일간 임상증상 및 폐사를 관찰하여 점수화함.
- 측정 결과 : V4 : 0.0 / VG/GA : 0.0 / B1 : 0.2 / K148/08 : 0.3
- 각 그룹별로 사용된 백신 분무기의 분무시간 및 분무량이 상이하기 때문에 각 분무기의 1회 분무량에 100수분의 항원(1수분=10^{5.5}EID50/bird)이 동일하게 포함되도록 백신을 희석함
- 각 분무기 제조사의 권장 방법에 따라 그룹별로 백신을 한 뒤 2주간 매일 시험군 및 대조군의 임상증상 여부를 육안으로 관찰함
- 백신 접종 후 3, 5, 7, 9일에는 Oropharyngeal swab과 Cloacal swab을 실시하여 virus shedding량을 확인함
- 백신 접종 후 3일에는 각 그룹당 3마리씩 부검을 실시하여 폐 조직 고정 후 염증 소견 판

독과 육안 상 기낭염 여부를 확인함

- 백신 접종 후 1, 2주차에는 채혈 후 Hemagglutinin Inhibition Assay를 실시함
- 백신 접종 2주 후 NDV 공격접종 균주(Kr-005)로 1수당 $10^{5.5}$ EID₅₀/ml씩 근육접종함
- 공격 접종 이후 2주간 매일 시험군 및 대조군의 임상증상 및 폐사 여부를 육안으로 관찰함
- 공격 접종 후 3, 5, 7, 9일에는 Oropharyngeal swab과 Cloacal swab을 실시하여 virus shedding량을 확인함.
- 공격 접종 후 1, 2주차에 채혈을 실시하여 HI test를 실시함(그림27)



< 그림 27 Experimental design >

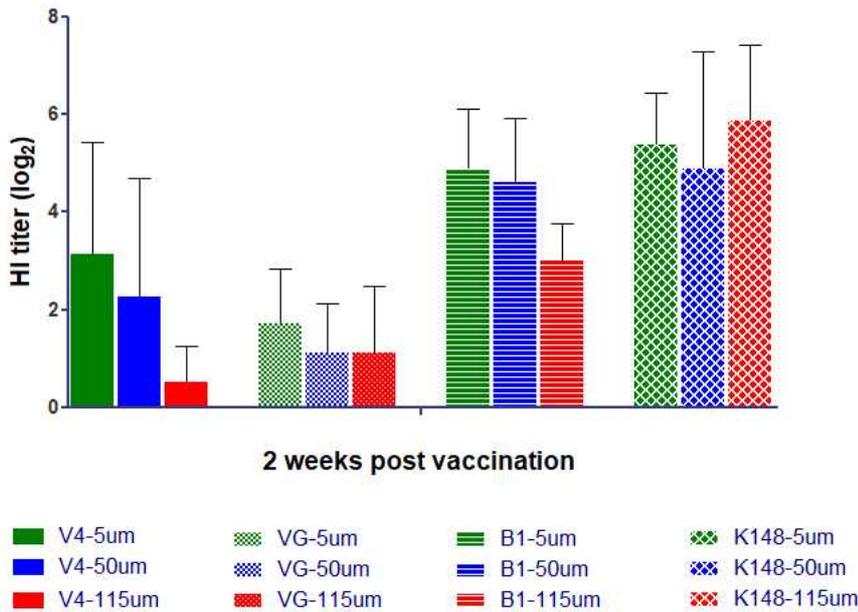
(4) 실험 결과

① 혈청학적 검사

- 각 그룹의 면역원성을 확인하기 위해 LaSota주를 항원으로 HI assay를 진행
- V4와 VG/GA, B1 그룹 안에서는 입자크기가 작을수록 더 빠르고 높은 HI titer가 관찰되었으며, K148 그룹은 전체적으로 B1 그룹에 비해 HI titer의 평균은 높았지만, 중간 크기 입자로 분무된 G5 그룹에서 백신 후 2주차에 개체별 HI titer 차이가 발생하였음.
- 전체적으로 B1과 K148 백신 그룹이 V4와 VG/GA 백신 그룹에 비해 항체가 높게 나오는 것을 확인할 수 있음.

그룹명	내용	NDV HI titer			
		1wpv	2wpv	1wpc	2wpc
G1	DSB-HP-5um	0.375±1.06	3.125±2.29	폐사 개체 다수 발생으로 인해 정확한 그룹별 항체 역가 측정 불가	
G2	DSB-HP-50um	0.125±0.35	2.25±2.43		
G3	DSB-HP-115um	0±0	0.5±0.76		
G4	VG/GA-5um	0.5±0.76	1.71±1.11		
G5	VG/GA-50um	0±0	1.125±0.99		
G6	VG/GA-115um	0±0	1.125±1.36		
G7	B1-5um	0.625±0.74	4.875±1.25	8.000±0.76	6.143±0.69
G8	B1-50um	0	4.625±1.30	7.375±0.92	6.250±1.28
G9	B1-115um	0	3.000±0.76	8.875±1.81	7.375±1.30
G10	K148-5um	1.500±1.31	5.375±1.06	7.375±0.92	6.250±1.04
G11	K148-50um	0.750±1.04	4.875±2.42	7.500±1.31	6.750±1.28
G12	K148-115um	1.500±1.20	5.875±1.55	7.375±1.51	6.125±1.36
G13	Control	0	0	0	0

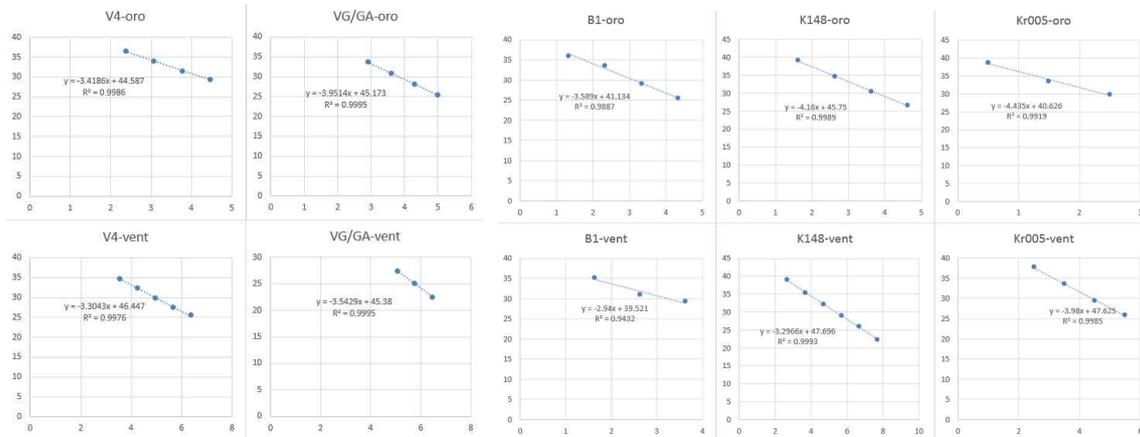
< 표 17. 그룹별 HI titer Table (mean ± SD, log2) >



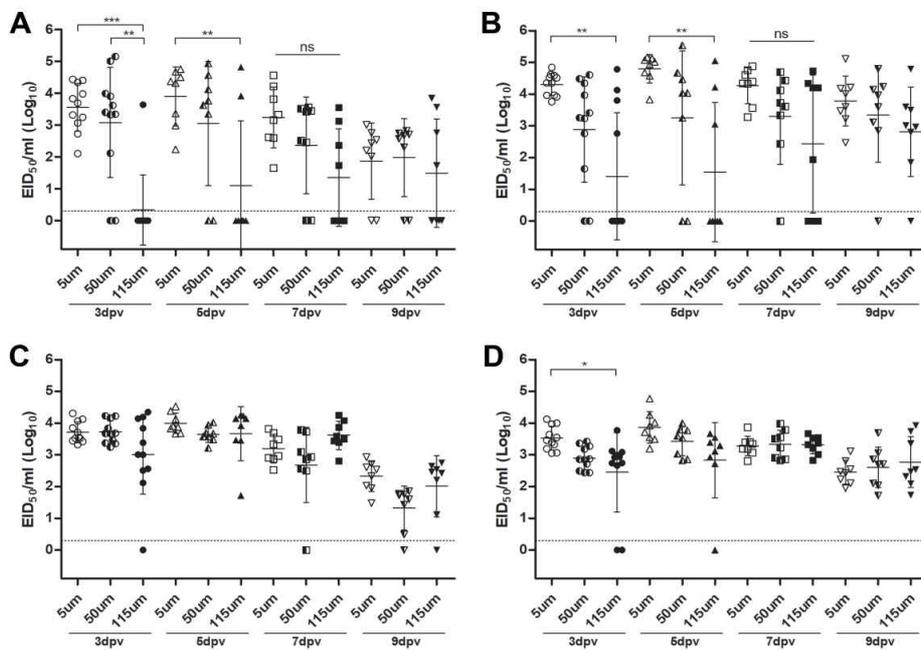
< 그림 28 백신 후 2주차 그룹별 HI titer >

③ 바이러스 배출량

- 각 그룹별 바이러스 배출량을 확인하기 위해 백신 후 3, 5, 7, 9일, 공격접종 후 3, 5, 7, 9일에 각각 Oropharyngeal swab과 Cloacal swab을 진행
- 각 Swab sample에서 RNA를 추출한 후 Real-time RT-PCR을 이용하여 CT value를 구함
- V4-oro, V4-vent, VG/GA-oro, VG/GA-vent, B1-oro, B1-vent, K148-oro, K148-vent, Kr005-oro, Kr005-vent sample 들에서 각각 CT value가 낮게 나온 sample 5개씩을 골라서 pooling 한 후 pooling 원액의 50% Egg Infectious Dose를 구하고 CT value와의 Standard Curve를 확립함(그림29)

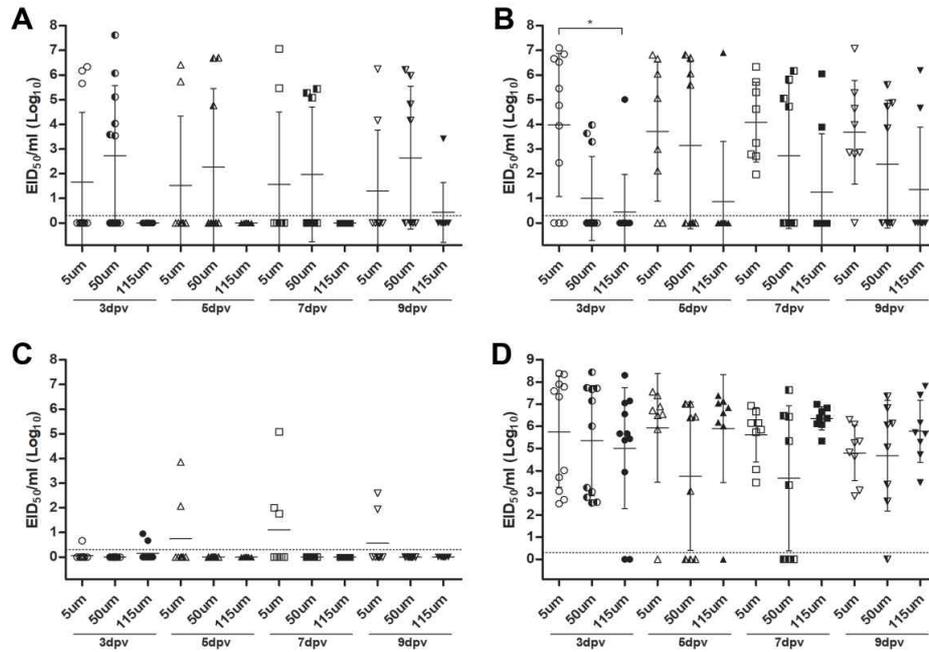


< 그림 29. Calibration from CT to EID₅₀ >



<그림 30. ND 백신 후 구강 백신바이러스 배출
(A : V4, B : VG/GA, C : B1, D : K148/08) >

- V4와 VG/GA의 경우, 백신 후 3일과 5일에 고운 입자로 분무한 그룹과 굵은 입자로 분무한 그룹 간에 구강 바이러스 배출의 유의적인 차이가 확인되었음. 백신 후 7일과 9일차에도 입자 크기가 클수록 더 적은 양의 바이러스 배출 경향이 확인되었으나 그룹 간 유의적인 차이는 없었음.
- B1과 K148의 경우, 백신 후 3일과 5일경에는 입자 크기가 클수록 더 적은 양의 바이러스 배출 경향이 확인되었으며, K148은 백신 후 3일차에 고운 입자 그룹과 굵은 입자 그룹 간에 유의적인 차이를 나타내었음. 백신 후 5일과 7일차에는 입자 크기에 따른 배출 정도 차이를 확인할 수 없었음.

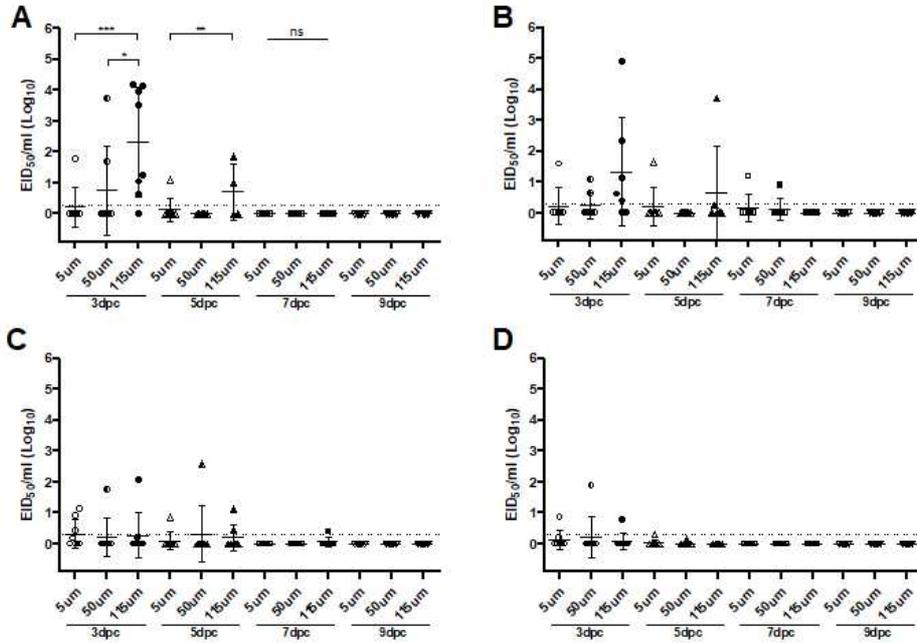


<그림 31. ND 백신 후 총배설강 백신바이러스 배출

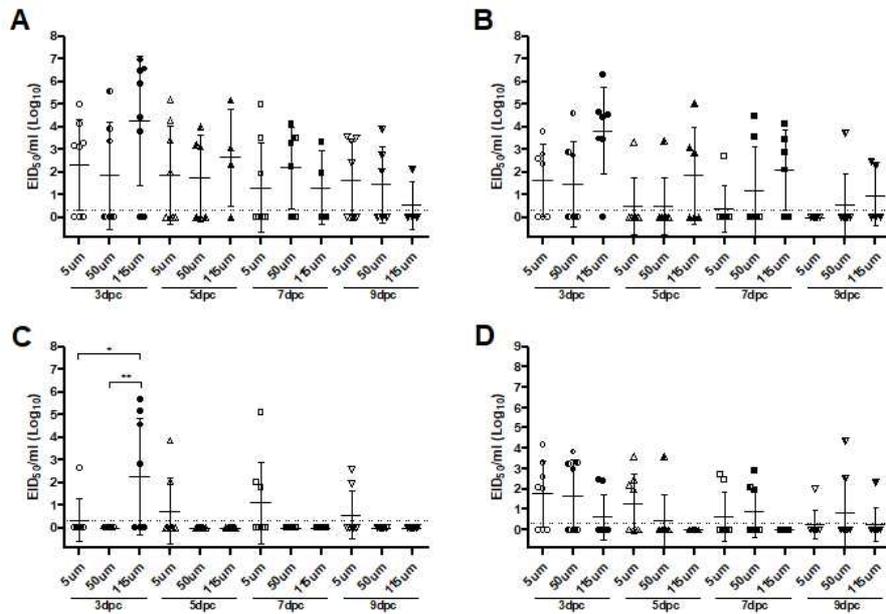
(A : V4, B : VG/GA, C : B1, D : K148/08) >

- V4의 경우, 굵은 입자로 분무한 그룹에서는 바이러스 배출이 거의 확인되지 않았으며, 중간 입자 그룹이 고운 입자 그룹 간에는 유의적인 차이가 발견되지 않았음.
- VG/GA의 경우, 백신 후 3일차에 고운 입자로 분무한 그룹이 굵은 입자로 분무한 그룹에 비해 유의적으로 더 많은 바이러스 배출이 확인되었으며, 백신 후 5, 7, 9일차에 걸쳐 백신 입자 크기가 커질수록 바이러스 배출이 더 적은 경향성이 확인됨.
- B1의 경우, 전체적으로 총배설강으로의 바이러스 배출이 거의 없었음.
- 반면에 K148의 경우, 전 그룹에 걸쳐 백신 후 9일까지 총배설강으로 많은 양의 바이러스가 배출됨을 확인할 수 있음.
- V4와 VG/GA 그룹의 경우, 공격접종 후 3일과 5일 차에는 굵은 입자로 백신한 그룹에서 타 그룹에 비해 더 많은 바이러스 배출이 확인되었으며, V4의 경우 그 차이가 유의적이었음. 반면 공격접종 후 7일과 9일차에는 두 바이러스 모두 구강으로의 바이러스 배출이 거의 확인되지 않았음.
- B1과 K148의 경우, 구강으로의 바이러스 배출이 거의 확인되지 않았음.
- V4와 VG/GA의 경우, 공격접종 후 3일과 5일차에 굵은 입자로 분무한 그룹에서 높은 바이러스 배출량을 보였으나 그 차이가 유의적이지는 않았음. 총배설강 바이러스 배출량은 공격접종 후 점점 감소하는 경향을 보임.
- B1경우, 공격접종 후 3일차에 굵은 입자로 분무한 그룹에서 유의적으로 많은 바이러스 배출이 확인되었으며 이후에는 거의 확인되지 않음. K148의 경우 전체적으로 총배설강으로의 바이러스 배출량이 적었음.

④ 임상 증상

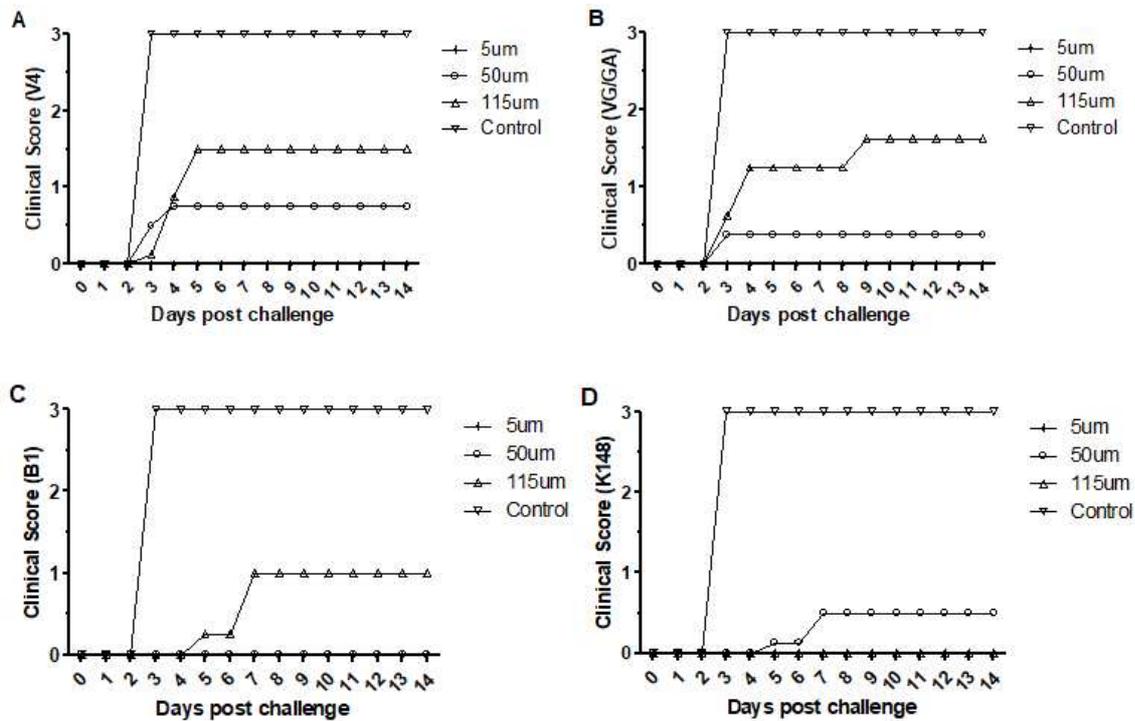


< 그림 32 공격접종 후 구강 공격접종 바이러스 배출
(A : V4, B : VG/GA, C : B1, D : K148/08) >



< 그림 33 공격접종 후 총배설강 공격접종 바이러스 배출
(A : V4, B : VG/GA, C : B1, D : K148/08) >

- 공격접종 후 개체별 임상 증상을 점수화하였음 : 정상 (0점), 미약한 우울 (1점), 심한 우울 및 신경증상 (2점), 폐사 (3점)
- V4 및 VG/GA의 경우, 분무 입자의 크기가 클수록 높은 임상증상 점수를 보였으며, 두 백신주 모두 공통적으로 가장 작은 입자 크기로 분무하였을 경우, 공격접종 시 임상증상을 보이지 않았음.
- B1의 경우, 고운 입자 및 중간 입자로 분무하였을 때는 임상증상을 보이지 않았으며, 굵은



< 그림 34 공격접종 후 그룹별 임상증상 >

입자로 분무하였을 때 일부 임상증상을 나타내었음.

- K148의 경우, 중간 입자로 분무하였을 때에만 약간의 임상증상을 나타내었음.

4. 생물학적 제재의 국가등록 방법이 확립되지 않은 닭 아데노바이러스(Fowl Adenovirus)백신의 동물 실험 모델

가. 연구계획

- (1) 닭 아데노바이러스 4형 혈청형의 경우 방어능을 확인할 수 있는 공격접종 모델이 확립되어 있음.
- (2) 닭 아데노바이러스 각 혈청형에 대해 방어능을 확인할 수 있는 공격접종 모델을 확립함.
- (3) 4형을 제외한 아데노바이러스 혈청형의 경우 자연적인 감염 경로인 경구를 통한 공격접종에 의해 병변 및 폐사율이 유발되지 않으므로 본 과제에서 새로운 감염 경로인 정맥 내 바이러스 접종 방법을 개발하여 병변 및 임상증상을 유발하고자함
- (4) 사독 백신 실시 후 안전성을 평가하기 위해 백신을 접종하고 닭의 폐사율 및 임상증상, 육아종 형성 여부 및 증체율을 관찰함.
- (5) 백신 접종 후 항체 생성능을 확인하고 바이러스를 공격 접종하여 방어능, 임상증상 및 폐사율을 관찰함.
- (6) 혈청형 및 품종에 따른 국내 유래 닭 아데노바이러스를 분리하여 국내 실정에 맞는 백신의 검정 방법을 개발함.
- (7) 백신 접종 후 생성 항체가 국내 주요 유행 5가지 혈청형에 대해 교차방어능을 가지는지에 대해 확인함.

나. 연구결과

(1) 닭 아데노바이러스의 동물 모델 시험

- 백신 시험을 실시하기위한 type 4 백신을 건국대학교에서 자체 제작함
- 불활화 백신을 제조하기위해 아래 표 18.과 같은 역가로 바이러스를 생산하였음
- 바이러스 생산 후 불활화 제조공정은 0.2% 포르말린으로 37°C에서 48시간 열처리 하였으며 백신 어주번트는 MONTANIDE ISA 70(SEPPIC)을 제조사의 방법대로 실시하였음
- 백신을 위한 SPF 닭의 그룹 편성은 아래 표 19.과 같이 시행되었음

Adeno Type 4	계대	역가
CEL 계대	CEL4-CEL5	10 ^{8.0} TCID ₅₀ /ml
CAM 계대	CEL4-CAM5	10 ^{7.4} TCID ₅₀ /ml

< 표 18. 백신 역가 및 제조 >

NO.	Vaccine	백신역가(수당)	Adjvant 비율	마리수	
G1	CEL 계대	7.0 (7.18)	3:7	7	
G2		6.5 (6.68)		7	
G3		6.0 (6.18)		7	
G4		5.5 (5.68)		7	
G5	CAM 계대	6.5 (6.58)		4:6	7
G6		6.0 (6.08)			7
G7		5.5 (5.58)		7	
G8	CEL 계대	6.0	4:6	7	
G9	CAM 계대	6.0		7	
G10	SPF	negative control		7	

< 표 19. 백신 그룹 편성 >

- 백신 후 3, 4, 5주 후 각 개체에서 채혈을 실시하였으며 혈청을 보관함
- 논문(Kim MS et al., Vaccine, 2014)에 따라서 닭 공격접종 모델을 SOP화 하였으며, 공격접종 이후 폐사율, 병변판단, 유전적진단 방법을 시험 중에 있음
- 공격접종 바이러스의 양에 따른 폐사율 관찰을 위해 시험 중이며 재현성을 구현중임

(2) 백신 후 ELISA, AGP, 중화시험을 이용한 혈청 역가 판단 비교시험

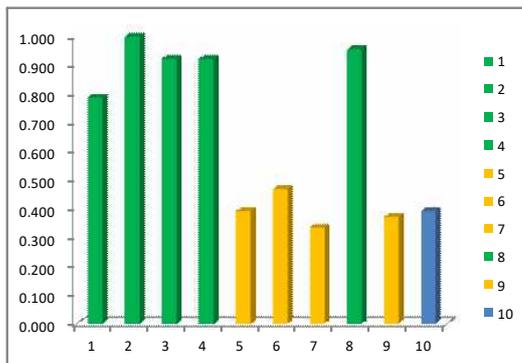
- 현 농림축산검역본부의 고시에 따라 Agar gel precipitation(AGP)방법을 이용하여 SOP를 작성하고 이에 맞게 시험을 실시함(표 20.)
- 9가지 백신에 대해 모두 AGP 양성 값을 얻을 수 없었음

- 이것은 본 시험에 쓰인 백신의 유전형 type이 4형인 것에 반해 고시에 나타나있는 AGP 실시 항원이 1형으로 항원의 상이함으로 반응이 일어나지 않은 것을 추측 할 수 있음
- 한편 AGP를 실시하기에 충분하지 않은 혈청이 생성되었을 가능성을 배제 할 수 없어 높은 DOSE의 백신을 재현성 구현 시험과 함께 실시 중임
- 동시에 시중에 판매중인 type 1형 ELISA(bio-check)를 이용하여 항체 유무를 검사함(표 20.)

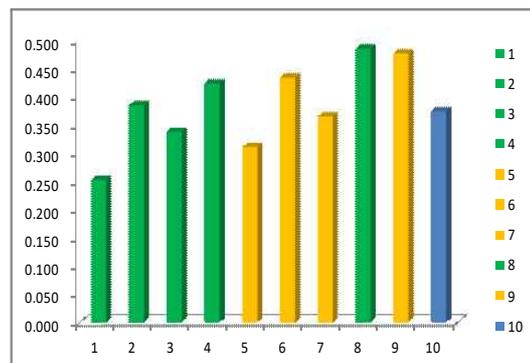
그룹	백신	백신역가(수당)	결과
G1	CEL계대 (3:7)	7.0 (7.18)	2/7
G2		6.5 (6.68)	0/7
G3		6.0 (6.18)	0/7
G4		5.5 (5.68)	0/7
G5	CAM계대 (3:7)	6.5 (6.58)	1/7
G6		6.0 (6.08)	0/7
G7		5.5 (5.58)	0/7
G8	CEL계대 (4:6)	6.0 (7.18)	0/7
G9	CAM계대 (4:6)	6.0 (6.68)	0/7

< 표 20. 시중 판매중 ELISA 반응 결과 >

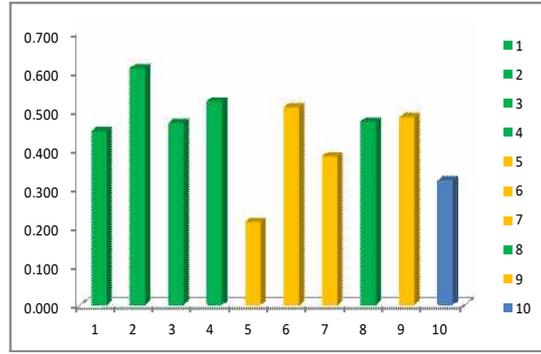
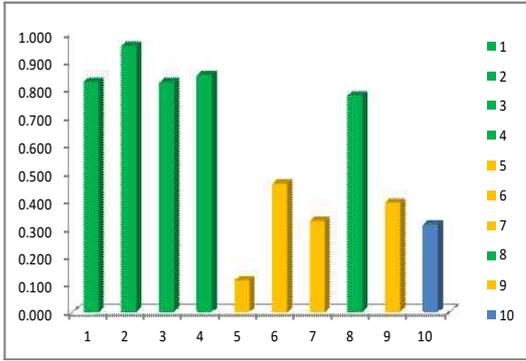
- 가장 높은 백신역가에서 만 type 1형 ELISA에 양성을 보인 것으로 보아 AGP결과보다 유의적이지 않게 민감도가 높은 것을 확인 할 수 있었음
- 따라서 type 1형 항원 ELISA가 type 4형 항체와 반응도 낮은 것을 의심하여 본 연구실에서 type 4형 ELISA를 자체 제작하여 실시함(표 21.)



항원 Live CEL



항원 Live CAM



항원 Dead CEL

항원 Dead CAM

< 표 21. 자체 제작 ELISA 결과 >

- 4가지 유형의 type 4 항원을 coating 한 ELISA를 시행 한 결과 CEL을 이용하여 항원을 생성한 ELISA에서 대조군보다 유의적으로 높은 양의 항체를 검출 할 수있었음
- 본 결과는 type 1형 항원을 이용한 AGP보다 type 4형을 이용한 ELISA가 민감하게 항체를 검출 할 수 있음을 알 수있음
- 본 시험 결과로 실제 항체의 중화능과 상관관계를 알아보기위해 동일 혈청을 이용하여 중화시험을 실시함(표 22.)

그룹	백신	백신역가(수당)	결과
G1	CEL계대 (3:7)	7.0 (7.18)	약 2560배 (평균)
G2			
G3			
G4			
G5	CAM계대 (3:7)	6.5 (6.58)	약 714배 (평균)
G6			
G7			

< 표 22. 중화시험 실시 결과 >

- 중화시험 결과 자체 제작 Coating ELISA와 유사한 경향의 결과를 얻었음
- 따라서 본 시험의 결과를 종합 할 때 type 4형의 백신의 항체 역가 측정에 AGP와 이외에 민감도가 높은 ELISA를 이용 할 필요가 있음을 증명함.

(3) 본 개발 시험 방법은 아래와 같은 성과에 이용됨.

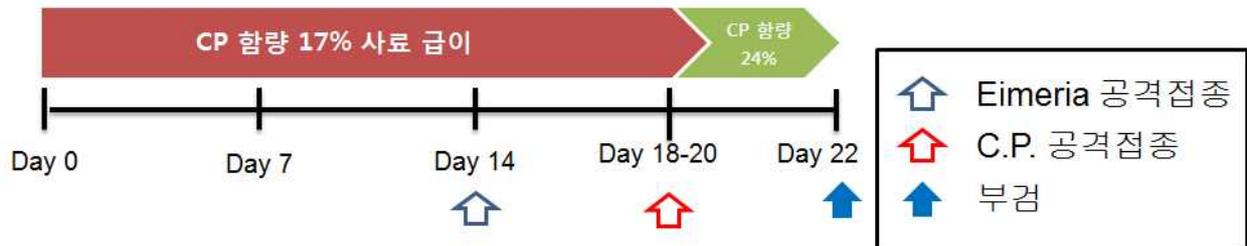
- ① 가금아테노바이러스 백신 기술이전 - 중앙백신연구소 (2016.5.30.)
- ② 가금아테노바이러스 백신 기술이전 - 대성미생물연구소 (2016.5.30.)
- ③ 가금아테노바이러스 경상기술실시료 - 고려비엔피 (4회)

5. 생물학적 제제의 국가등록 방법이 확립되지 않은 닭 괴사성 장염(Necrotic Enteritis)의 동

물 실험 모델

가. 연구계획

- (1) 일반적으로 발생하는 괴사성 장염의 경우 클로스트리디움균 단독이 아닌 콕시듐 등의 혼합 감염으로 발생하기 때문에 이를 감안하여 Eimeria Maxima 충란을 경구 투여함
- (2) 야외 분리주인 Clostridium Perfringens를 경구로 투여한 후 임상증상을 관찰함
- (3) 체중과 사료섭취량을 측정하고 부검을 실시하여 육안적 병변 및 조직학적 병변을 확인함



<그림 35>. 괴사성 장염 유발 시험 모델 모식도

(그림 35)

- (4) 산출된 육안적 병변 및 조직학적 병변 지수를 바탕으로 새로운 동물실험 모델의 매뉴얼 및 백신 검정 시험 시 적용 방안을 제시함

나. 연구결과

- (1) 1일령 Commercial broiler chicken 120수(Cobb)를 이용하여 위의 그림에 괴사성 장염 유발 시험 모델 모식도와 동일한 계획으로 유발함.
- (2) 시험 원충은 Eimeria maxima 291-3(E.maxima)를 이용하였으며 콕시듐 시판 백신 이외에 Clostridium perfringens 특이 박테리오파지(C. phage)를 이용함.
- (3) 시험 세균은 Clostridium perfringens KJW 및 OYS strain을 이용함.

구분	공시 수	적용	<i>C. perfringens</i>	
KJW 접종군	G1	10	C.phage 5%	
	G2	10	Coccidium vaccine	KJW
	G3	10	-	
OYS 접종군	G4	10	C.phage 5%	
	G5	10	Coccidium vaccine	OYS
	G6	10	-	
대조군	G7	10	C.phage 5%	-
	G8	10	-	-

< 표 23. 콕시듐 백신 및 박테리오파지 적용 그룹 설정 >

- (4) 시험계가 18일령이 될 때까지는 조단백질 함량 17%의 사료(전기사료)를 급이한다. 18일령 이후부터는 조단백질 함량 24%의 사료(후기사료)를 급이한다.
- (5) 시험계가 14일령이 되면, 모든 시험 개체들의 체중과 사료섭취량을 측정하고 음성대조군

- (G1)을 제외한 모든 군에 *E. maxima*를 마리당 104sporulatedoocysts로 경구투여한다.
- (6) 18, 19, 20일령에 각각의 *C. perfringens*를 마리당 108CFU씩 경구투여하고, 임상증상을 관찰한다.
- (7) 22일령에 체중과 사료섭취량을 측정하고 부검을 실시한다. 부검 시 장관에서의 괴사성 장염의 육안적 병변의 발생유무 및 발생수를 확인한다. 또한 맹장변을 채취하여 10진희석한 후 *C. perfringens* 선택배지인 Tryptone Sulfite Cycloserine(TSC) agar 에 도말하여 맹장변 내 *C. perfringens* 균 수를 측정한다.

구분	1일령 체중 (Mean±SD)	14일령 체중 (Mean±SD)	22일령 체중 (Mean±SD)	후기사료 섭취량(g)
G1	52 ± 8.2	376.5±46.5	514.7±51.7	3252
G2		381.2±36.5	502.9±81.7	3436
G3		473.7±69.0	586.5±51.7	3888
G4		499.5±45.8	611.3±71.6	3392
G5		492.1±96.1	585.1±61.1	3376
G6		441±32.1	561.5±53.5	3740
G7		447.8±37.7	573.5±56.5	3250
G8		437.5±44.0	578±67.0	3388

< 표 24. 체중 및 사료섭취량 >

구분	임상증상	폐사
G1	0/10	0/10
G2	0/10	0/10
G3	0/10	0/10
G4	0/10	0/10
G5	0/10	0/10
G6	0/10	0/10
G7	0/10	0/10
G8	0/10	0/10

< 표 25. 공격접종 후 임상증상 및 폐사율 >

구분	십이지장* (Mean±SD)	공장* (Mean±SD)	회장* (Mean±SD)
G1	1.8±0.4	1.3±0.5	1±0
G2	1.1±0.2	1.1±0.8	1±0
G3	1.7±0.5	1.6±0.7	1±0
G4	1.9±0.3	1.3±0.5	1±0
G5	1.3±0.5	0.9±0.5	1±0
G6	1.8±0.4	1.4±0.5	1.1±0.3
G7	1.9±0.3	1.1±0.3	1±0
G8	1.7±0.5	1.4±1.0	1±0

< 표 26. 장관에서 괴사성 장염의 육안적 병변 소견 >

*병변 소견은 다음과 같이 판정한다.

Lesion Score 1=정상: 괴사성 장염 병변을 보이지 않고, 소장 탄력이 유지되어 있는 상태 (장관을 횡단 절개시 절개면이 말려 올라가는 탄력 정도)

Lesion Score 2=미약: 소장벽이 얇아지고 탄력이 저하된 상태 (장관을 횡단 절개시 절개면이 말려 올라가지 않는 탄력 정도)로 점막을 덮고 있는 점액이 증가된 상태

Lesion Score 3=낮은 단계 병변: 소장 내강에 1~6개의 괴사성 장염 병변 (궤양 및 괴사소견으로 인한 포크)의 존재가 관찰

Lesion Score 4=중간 단계 병변: 소장 내강에 6개 이상의 괴사성 장염 병변 (궤양 및 괴사소견으로 인한 포크) 혹은 포크의 유착이 관찰

Lesion Score 5=심각 단계 병변: 소장에 괴사 및 궤양소견이 국한되지 않고 공간 개념으로 확대된 상태로 출혈이 동반되거나 점막에 탈락된 섬유소 혹은 괴사조직의 층이 관찰

Lesion Score 6=소장의 병변지수가 2 이상을 보이면서 개체가 폐사하거나 24시간 이내에 폐사가 예상되는 빈사상태인 경우

구분	Log CFU/g* (Mean±SD)
G1	4.39±0.6
G2	3.18±0.5
G3	5.19±0.6
G4	4.35±0.8
G5	5.15±1.5
G6	5.40±0.8
G7	1.60±1.5
G8	0.65±1.1

< 표 27. 맹장변 내에서 C. perfringens 균수 >

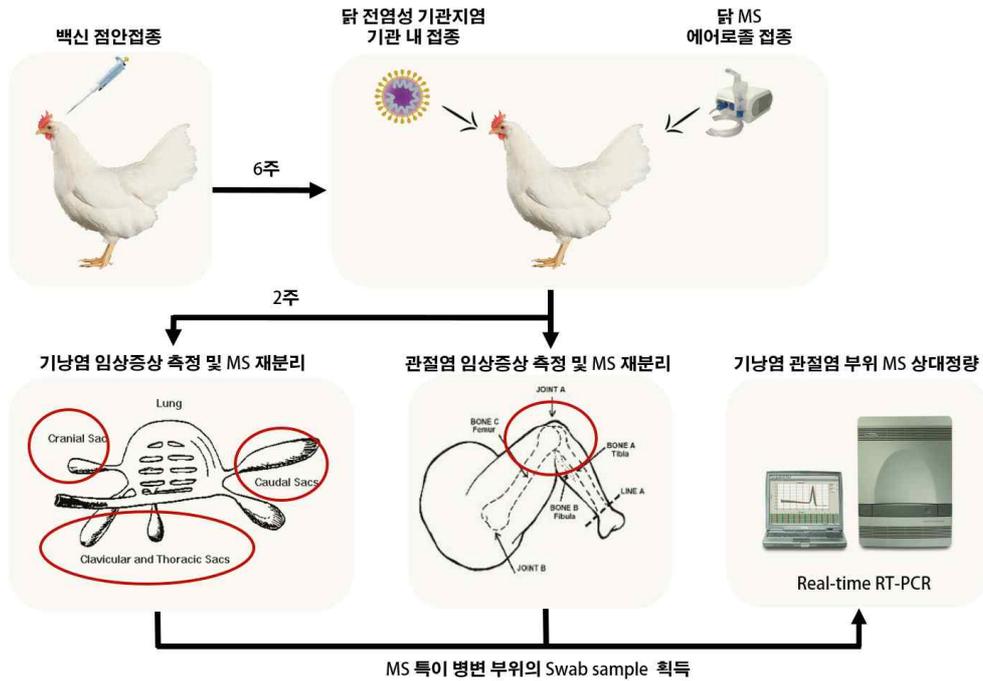
- (8) 본 시험에서 이용한 *C. perfringens*는 괴사성 장염 유발로 인해 체중 및 사료섭취에 유의적인 해를 가하지 않음을 확인 할 수 있었음. 이는 장염으로 인한 영양분 흡수에 차이를 보일 것이라 기대했던 결과에 미치지 못함.
- (9) 농장에서 일어나는 심각한 괴사성 장염은 장염 이외의 유해균이 증식하여 폐사 또는 심각한 임상증상을 일으키는 것이 발견됨. 그러나 실험실적으로 재현 했을 때는 그렇지 않음을 확인 할 수 있었음.
- (10) 모든 개체의 장 병변을 육안적으로 판단하기 위해 부검을 실시하였음. 그러나 클로스트리디움의 감염이 십이지장, 공장 또는 회장의 병변을 대조군에 비해 악화시키지 못함을 알 수 있음.
- (11) 그러나 백신을 실시한 그룹에서는 병변이 유의적으로 줄어들음을 알 수 있음.
- (12) 특히, 장내 동일량의 분변을 수거하여 균수를 측정 한 결과 클로스트리디움을 접종한 그룹에서는 유의적으로 많은 수의 균이 분리됨을 알 수 있음.
- (13) 백신의 경우 KJW 균주를 약 2 log 줄일 수있었다, OYS균주는 줄이지 못함.
- (14) 파지의 경우는 두 균주에 대해 모두 약 1 log정도의 균수를 줄일 수있었음.
- (15) 본 실험 결과를 증거로 증체량, 임상증상, 폐사 지표는 괴사성 장염 유발 모델의 지표로 사용 할 수 없을 것으로 판단하였고, 육안 병변 점수, 맹장변 내에서 균수의 측정이 괴사성 장염 판단 지표로 선정함.
- (16) **본 시험은 과제에 참여하는 위탁연구기관의 인센티브로서 수행되었음. 위탁 기관의 개발 클로스트리디움 특이 파지 효능 연구에 이용됨.**

6. 생물학적 제재의 국가등록 방법이 확립되지 않은 닭 마이코플라즈마 시노비아 (*Mycoplasma Synoviae*) 백신에 대한 동물 실험 모델

가. 연구계획

- (1) *Mycoplasma synoviae* 단독 감염으로는 뚜렷한 감염 증상을 나타내지 않는 것이 특징이며, 이러한 특징 때문에 동물 실험 모델의 확립에 어려움이 있음.
- (2) 따라서 동물에 감염 시켰을 때 *Mycoplasma synoviae* 감염으로 인한 특이 병변을 일으키는 동물 실험 모델을 개발하기 위해 급성호흡기 바이러스 질병인 닭 전염성 기관지염과 동시 감염시키는 방법을 개발 할 예정임.
- (3) 한편, *Mycoplasma synoviae*를 호흡기로 동물 모델에 감염시키는 방법으로 에어로졸 감염 방법이 기존에 연구 되어있음으로 이를 이용 할 예정임.
- (4) Specific pathogen free (SPF) 닭을 이용하여, 효능을 검정 할 백신을 지시된 양에 따라 1수분 점안 백신 실시 후 6주 뒤에 닭 전염성 기관지염 바이러스를 기관내 바이러스 접종법으로 감염시킨 직후, 특수 제작한 Aerosol chamber를 이용하여 정량의 *Mycoplasma synoviae*를 호흡기로 감염시킴.
- (5) 감염 2주 후에 닭을 안락사하고, *Mycoplasma synoviae*에 의한 특이 병변(임상증상)으로는 닭의 기낭염, 관절염이 주요 지표임으로 동시 감염으로 유발된 기낭염, 관절염을 *Mycoplasma synoviae* 백신 효능을 판단하는 기준으로 측정함.
- (6) 측정된 임상증상은 객관적인 판단을 위해 기낭, 관절액을 각각 멸균 면봉으로 흡수 한 후 *Mycoplasma*의 특이 Real-time RT-PCR을 측정하여 병변 균수를 상대 정량함.

(7) 또한 백신 후의 혈청에서 *Mycoplasma synoviae*에 대한 항체 역가를 측정하기 위해 혈청 검사를 실시하여 임상증상 지표와 상관관계를 측정함. 측정된 상관관계를 이용하여 항체 반전과 백신의 효능을 검증함. (그림 36)



<그림 36>. 닭 *Mycoplasma synoviae* 백신 효능 시험 모델 개발 개요

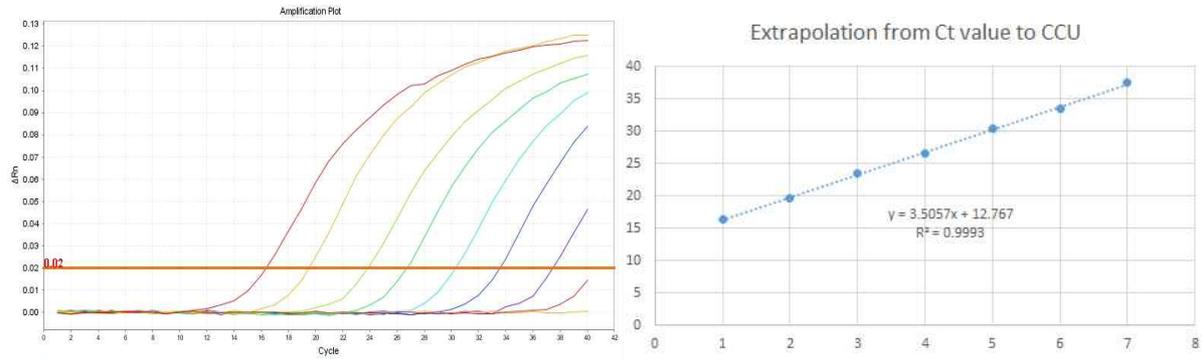
나. 연구결과

(1) *Mycoplasma synoviae*(MS)정량 방법인 Color Change Unit in Frey medium (CCU)를 간편화하기 위해 real time PCR로 정량화 하는 방법을 확립함

(2) 야외 분리 MS 진단 케이스 중 심한 관절 증상이 동반되는 MS를 순수 분리 하기 위해 plaque picking을 실시하였으며 순수 분리한 MS를 10^8 CCU/ml 농도로 증균함

(3) MS의 16sRNA에 대한 real time PCR을 setting 하기위해 논문을 참고하여 Primer 및 Probe를 구함(Aline Padilha Fraga et al., 2012)(그림 37)

- MS-F: 5'-GAA GCA AAA TAG TGA TAT CA- 3', MS-R: 5'-GCT GCA CTA AAT GAT ACG TCA AA-3', MS-P: 5'-(JOE)-AGC TAC GCT ACG GTG AAT ACG TTC TC-(TAMRA)-3'



< 그림 37. M. Synoviae의 Ct value를 통한 CCU 추정 값 환산 >

(4) 구비한 Primer, Probe의 Real time PCR 결과 CCU 값과 Ct value 값의 상관관계를 위의 그림과 같이 정립 함($y = 3.5057x + 12.767$)

(5) 70마리의 5주령 Specific pathogen free (SPF) 닭을 총 7개의 그룹으로 나누고 양압 격리사육사에 사육함

Group No.	Number of chicken ^a	Pathogens	M inoculation	S IB inoculation
1	10	MS + K1277/03 strain (QX-like IBV)	Aerosol	Intratracheal
2	10	MS + 40/09 strain (Recombinant IBV)	Aerosol	Intratracheal
3	10	MS + KM91 strain (Korean nephrogenic IBV)	Aerosol	Intratracheal
4	10	MS	Aerosol	NA
5	10	MS	Intravenous ^b	NA
6	10	KM91 strain	NA	Intratracheal
7	10	PBS	Intratracheal	Intratracheal

^a Three chickens were euthanized for necropsy at one week after challenge. Remaining 7 chickens from each group were euthanized for necropsy at the end of experiment.

^b The right jugular vein was used for MS challenge.

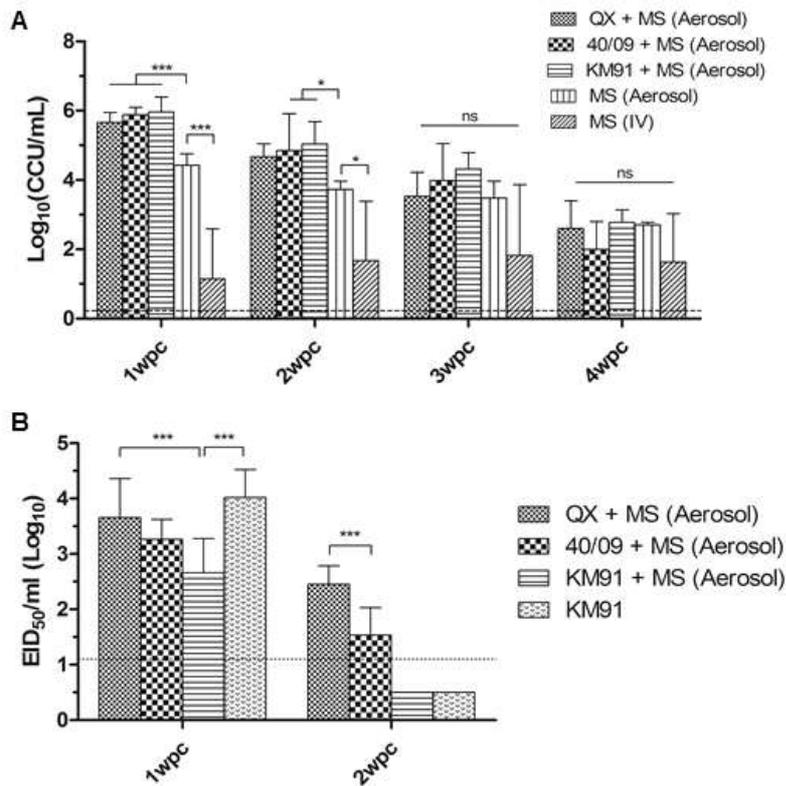
< 표 28. 시험 그룹 설정 >

1, 2, 3번 그룹에 3종류의 IB바이러스(QX, 40/09, KM91 strain)를 oral zonde를 이용하여 intratracheal route로 200ul(10^5 EID₅₀/ml)를 접종함

- IB바이러스 접종 다음 날 1, 2, 3, 4번 그룹에 10mL(10^7 CCU/ml)의 MS를 Nebulizer(Omron, 입자크기 <5 μ m)로 aerosol로 접종하고 30분간 들이 쉴 수 있도록 격리사육사 전원을 꺼둠

- 5번 그룹은 각 닭에 1ml(10^7 CCU/ml)의 MS를 목정맥을 이용하여 직접 주입하여 전신으로 퍼지도록함

(6) 접종 1, 2, 3, 4주 후에 기관내 swab 을 실시하여 MS의 유무를 기 확립된 Real time PCR로 확인함. 동시에 전염성기관지염에 대해 기 확립된 Real time PCR을 이용하여 바이러스 양을 측정함.

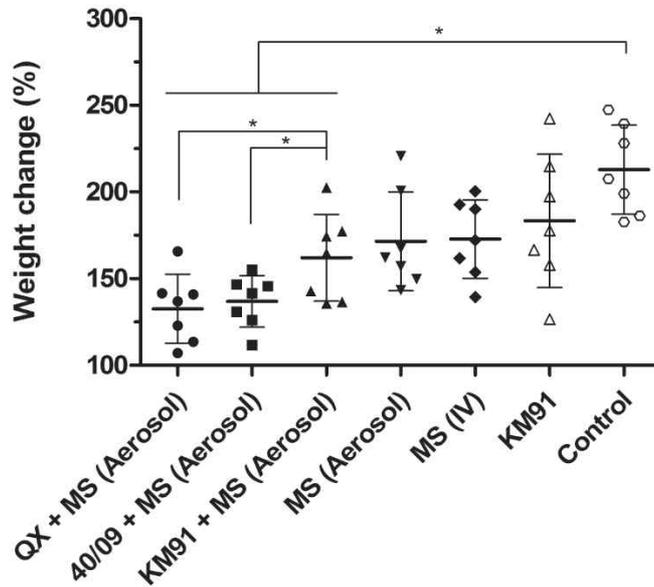


< 그림 38 기관내 MS 증식정도(A) 및 전염성기관지염 증식정도(B) Real time PCR 결과 >

- 신장형 전염성기관지염과 MS가 동시 감염된 개체에서는 MS만 감염된 개체보다 많은 MS가 검출되었으나, 반대로 IB는 KM91주(Korean nephropathotype)는 그렇지 못한 것을 확인함.

- 본결과는 MS와 IB동시 감염이 MS의 기관 내 증식을 촉진시키나 IB증식은 상대적으로 감소하는 결론을 얻음.

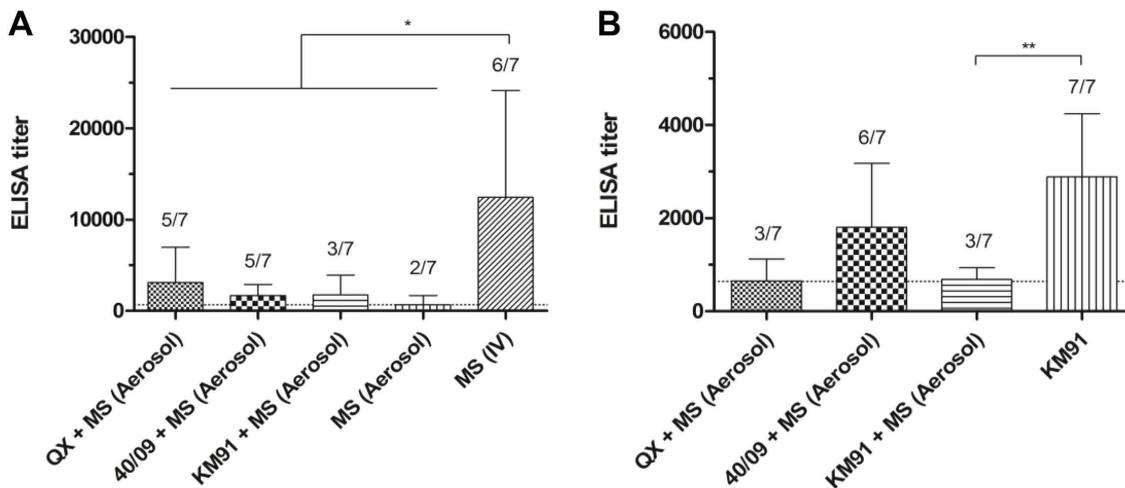
(7) 공격 접종 전 닭의 체중과 공격 접종 4주 후 체중을 비교하기위해 개체 구별을 하였으며 대조군에 비해 증체량을 측정하기 위해 음성 대조군과 비교함.



<그림 39. 공격 접종 전 닭의 체중과 공격 접종 4주 후 체중 차이 비교>

- 본 결과는 기존 호흡기형 IB와 동시감염된 MS가 증체율에 악영향을 끼친다는 결과와 유사함. 신장형 IB로 동시감염 결과는 최초 결과이며 특히, 중국에서 유래한 QX타입의 IB는 MS와 동시감염 시 더 강력한 증체율 저하는 초래함.
- 본 유의성을 바탕으로 MS의 정맥 또는 호흡기 단독 감염보다 QX타입 IB와 동시감염에서 유의하게 강력한 임상증상 지표를 보였으므로 이를 지표로 선정함.

(8) 감염 4주후 IB 및 MS의 항체 형성 정도를 알아보기 위해 혈청 내 항체를 ELISA를 이용하여 측정함.



< 그림 40. 감염 4주 후 MS(A) 및 IB(B) 항체 형성 정도 >

- 임상증상의 정도 및 기관 내 병원체 증식 정도와는 반대로 분무 접종보다 정맥내 접종이 더높은 항체 형성 정도를 보였음. 이는 정맥 MS는 일차 감염기관인 호흡기에 감염됨과 동시에 다량의 병원체가 혈류로 유입되어 면역장기에 도달하는 정도가 많아 항체형성이 높은

것으로 추측됨.

- 전염성 기관지염의 경우 IB만을 접종한 그룹보다 MS와 IB를 동시 감염시킨 그룹에서 IB의 항체 형성이 유의적으로 낮은 것을 확인 할 수 있음. 기존 논문에 비해 많은 양의 IB바이러스를 기관내로 감염시킨 것에 비해 낮은 항체 형성을 보인 것은 MS와 동시 감염 시 IB의 증식 저해로 인한 면역자극 약화로 추측됨.

(9) 기낭염(Airsaculitits) 및 관절염(Arthritis) 관찰을 위해 감염 1, 4주 후에 각 군당 3마리를 부검하여 membrane과 joint fluid 내 MS를 Real time PCR로 측정하였음. 감염 후 4주동안 임상증상(ale comb, lameness, and ruffled feather)을 관찰하고, 이를 점수를 산정하여 비교함.

Group	One week post challenge		Four weeks post challenge		Clinical score ^c
	Arthritis	Airsaculitis	Arthritis	Airsaculitis	
MS (aerosol) + K1277/03	0/3 ^a (0/3) ^b	3/3 (3/3)	0/7 (1/7)	0/7 (0/7)	1.4 ± 0.8 ^c
MS (aerosol) + 40/09	0/3 (0/3)	3/3 (3/3)	0/7 (0/7)	0/7 (0/7)	1.5 ± 0.9 ^e
MS (aerosol) + KM91	0/3 (0/3)	3/3 (3/3)	0/7 (0/7)	0/7 (0/7)	1.3 ± 1.0
MS (aerosol)	0/3 (0/3)	0/3 (0/3)	0/7 (0/7)	0/7 (0/7)	0.8 ± 0.9 ^d
MS (IV)	0/3 (0/3)	0/3 (0/3)	2/7 (2/7)	0/7 (0/7)	0.2 ± 0.5

^a Number

of affected birds / total number of birds

^b Number of RT-PCR positive birds / total number of RT-PCR examined birds

^c All chickens resulting sign of pale comb, lameness, and ruffled feather were observed every week at the end of experiment. Clinical scores were presented as mean ± standard deviation.

^d Mean clinical score differences are significant when compared with intravenous MS challenge alone.

^e Mean clinical score differences are significant when compared with aerosol MS challenge alone.

< 표29. 임상증상 및 관절염 관찰 결과 >

- 본 결과는 모델 동물로서 SPF white leghorn 에서는 필드 케이스에서 관찰 할 수 있는 강력한 관절염을 관찰 할 수 없다는 것을 반영함. 실제로 관절염이 호발하는 농장 산란계 및 육용 종계는 MS의 임상증상과 밀접한 관련 있는 면역저하 질병 또는 온도 변화가 복합적으로 작용하여 관절염을 유발 할 가능성이 높음.

- 본 모델에서는 IB와 동시감염이 임상증상을 강력하게 유발함을 발견하였으며, 기낭염 또한 모든 부검 개체에서 확인 할 수 있음.

- 따라서 동물모델로서 SPF 닭에서 MS 질병 모델은 체중, 임상증상, 기관 내 MS의 증식 정도를 대조군과 비교했을 때 유의적으로 악화되는 것을 발견하고 이를 지표로 선정함.

7. 개발된 실험 모델을 통한 위탁연구 요청기관 동물용의약품의 함량시험 및 자체시험을 수

행 (본 과제에 참여하는 위탁연구 요청기관에 대해 인센티브)

가. 연구계획

- (1) 국내 동물용 백신 제조업체인 (주)고려비엔피, (주)대성미생물연구소, (주)CTC바이오의 제품 수출을 위한 함량시험 및 자체시험을 실시함
- (2) 국내 동물용 백신 제조업체의 동물용의약품 질적 수준 강화 및 수출 자료를 확보함
- (3) 동물용 백신 수입 업체인 (주)메리알코리아, (주)조에티스, (주)삼지벳의 제품 수입 및 등록을 위한 함량시험 및 자체시험을 실시함
- (4) 위 위탁연구 요청기관과 함량시험 및 자체시험의 결과를 바탕으로 제품의 개선 방안을 모색함
- (5) 본 과제 위탁연구 요청기관에 대해 CRO 사업기간 중 수입 백신 회사의 경우 함량시험 및 자체시험 분기별 1회 무상 실시함
- (6) 본 과제 위탁연구 요청기관에 대해 CRO 사업기간 중 (주)고려비엔피, (주)대성미생물연구소, (주)CTC바이오에 대해 개발된 시험법을 이용해 뉴캐슬병·전염성기관지염 합제백신 함량시험을 분기별 1회 무상 실시함
- (7) 본 과제 위탁연구 요청기관에 대해 CRO 사업기간 중 (주)메리알코리아, (주)조에티스, (주)삼지벳에 대해 개발된 시험법을 이용해 뉴캐슬병 생건조백신에 대한 함량시험을 분기별 1회 무상 실시함

나. 연구결과

- (1) 민간위탁연구 협약이 성립된 기관 중 3개 회사(고려비엔피, 녹십자수의약품, 대성미생물연구소)의 백신 시제품의 역가 검정을 위해 1차년도에 개발된 동물용의약품 백신 함량시험법(Dot immunoblotting assay)를 이용함

<p>시험자-홍우택</p>	<p>시험자-권경빈</p>	<p>시험자-주효선</p>
<p>$10^{3.3}EID_{50}/수$</p>	<p>$10^{3.8}EID_{50}/수$</p>	<p>$10^{3.4}EID_{50}/수$</p>

< 표 30 고려비엔피 K40/09 HP60의 단미백신 1차 역가측정 결과 >

< 표 31 녹십자수의약품 K40/09 HP60의 단미백신 1차 역가측정 결과 >

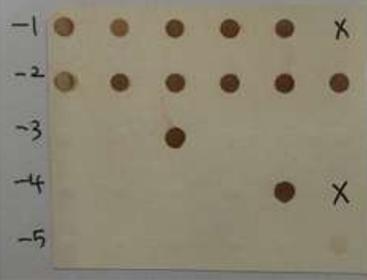
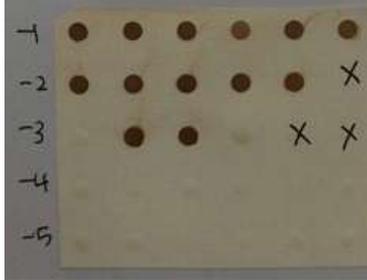
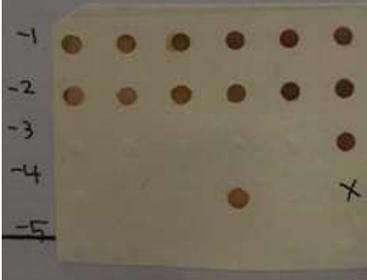
보관조건(4℃)	보관조건(-20℃)
$10^{3.2}EID_{50}/수$	$10^{3.5}EID_{50}/수$

1번 vial	2번 vial	3번 vial
$10^{3.5}EID_{50}/수$	$10^{3.5}EID_{50}/수$	$10^{3.7}EID_{50}/수$

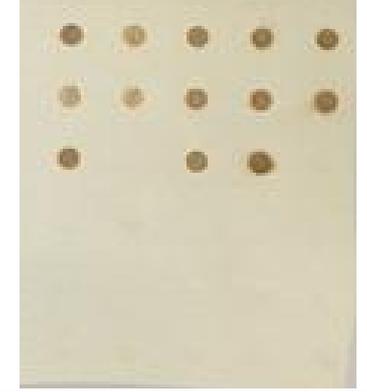
< 표 32 고려비엔피 K40/09 HP60의 단미백신 2차 역가측정 결과 >

1번 vial	2번 vial	3번 vial
$10^{1.5}EID_{50}/수$	$10^{2.5}EID_{50}/수$	$10^{1.8}EID_{50}/수$

< 표 33 대성미생물연구소 K40/09 HP60의 단미백신 1차 역가측정 결과 >

		
1번 vial	2번 vial	3번 vial
$10^{2.7}EID_{50}/수$	$10^{3.0}EID_{50}/수$	$10^{2.7}EID_{50}/수$

< 표 34 녹십자수의약품 K40/09 HP60의 단미백신 2차 역가측정 결과 >

		
1번 vial	2번 vial	3번 vial
$10^{2.5}EID_{50}/수$	$10^{3.2}EID_{50}/수$	$10^{2.5}EID_{50}/수$

< 표 35 대성미생물연구소 K40/09 HP60의 단미백신 2차 역가측정 결과 >

- 3개의 기관에서 각각 제조한 2배치의 백신에 대한 총 17회의 역가검정을 실시하였음. 본시험은 각 제조사의 요청에 의해 시행되었으며 총 3년의 과제기간에 걸쳐 시행되었음.
- 본 시험은 과제에 참여하는 위탁연구기관의 인센티브로서 수행되었음. 각 회사 백신의 전염성 기관지염 백신의 함량을 측정 하여, 정량의 백신을 제작 하는데 기여함.

(2) 가금 ND 및 IB 단독 또는 혼합백신 효능 및 안전성 위탁시험

- 한국 MSD 동물약품으로부터 본 과제로부터 도출된 ND 동물시험 모델 및 전염성기관지염 함량시험 및 중화시험 대체법을 이용하여 동물용의약품 등록시험 연구를 수주함.
- CTCBIO 로부터 가금 ND 생백신 효능 및 안전성 시험을 수주함. 본 과제로부터 도출된 ND 동물시험 모델을 이용하여 동물용의약품 등록시험 연구를 수주함.
- (주)비센으로부터 봉독분회의 가금용 어주번트 안전성 및 효능평가를 수주함. ND 백신 동물시험 모델을 이용하여 안전성 및 효능평가 연구를 수행함.

(3) IB ELISA KIT의 백신 및 야외주 적용 위탁시험

- 전염성기관지염 백신의 효능 검정 시 혈청학적 검사 지표인 중화시험법을 대체할 검사 방

법으로서 상용 ELISA KIT를 선정하고, 이를 평가하기 위해 (주)메디안디노스틱 및 삼화비엔이로부터 동물용의약품 진단키트 위탁연구를 수주하였음.

(4) 개발 소독제 시험법을 이용한 소독제 및 소독기의 평가 위탁시험

- 건국대학교 바이오산업공학과(건국대학산학협력단): 동물용의약품 소독제 효력시험을 수주하였으며, 민간위탁연구기관 내 개발 검정법을 바탕으로 평가함.
- 해성엔지니어링: 오존살균 소독장치 효능시험을 수주하여, 민간위탁연구기관 내 개발 검정법을 기반으로 평가함.
- LG전자: 이온발생장치의 동물 전염성 바이러스 소독효과 평가를 수주하여, 민간위탁연구기관 내 개발 검정법을 기반으로 평가함.
- 농림축산검역본부: 시중 판매 50개의 동물용의약품 소독제의 고병원성 AI에 대한 효력 평가를 슈탁 받음. 민간위탁연구기관 내 개발 검정법을 기반으로 평가함.
- 씨제이제일제당: 약용식물 및 바실러스를 이용한 항바이러스 사료첨가제 및 소독제 개발 연구를 수주함. 민간위탁연구기관 내 개발 검정법을 기반으로 평가함.

(5) 기타 민간위탁연구 계약

- 양돈질병 백신 효능 및 안전성: 돼지열병 백신 효능 및 안전성 연구(씨티씨바이오), PCV 백신 안전성 시험(씨티씨바이오), PRRS 백신 야외효능시험 및 안전성 시험(고려비엔피)

8. 본 과제를 통해 개발된 동물 실험 모델을 통해 국가 동물용의약품 검정법 제·개정안을 정책 건의

가. 계획

- (1) 본 과제의 연구원으로 참여하는 농림축산검역본부의 조류 질병과 최강석 연구관, 동물약품 평가과 윤선중 연구관의 자문을 바탕으로, 개발된 시험법의 적합성 및 유효성을 평가함
- (2) 기존 국가 동물용의약품 검정법과의 비교를 통해 개정안을 정책 건의함
- (3) 개발된 동물 실험 모델을 바탕으로 신규 국가 동물용의약품 검정법의 제정안을 정책 건의함

나. 결과

- (1) 개발된 동물용의약품 함량시험법(전염성기관지염)을 농림축산검역본부 동물용의약품평가과에 제안함
- 검역본부 동물용의약품검정기준을 개정 할 수는 없으나 본 과제의 성과로 발표된 논문을 첨부하면 본 Dot-immunoblotting 방법을 인정 할 것을 전달받음.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

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



Short communication

Comparison between dot-immunoblotting assay and clinical sign determination method for quantifying avian infectious bronchitis virus vaccine by titration in embryonated eggs



Seong-su Yuk^a, Jung-Hoon Kwon^a, Jin-Yong Noh^a, Woo-tack Hong^a, Gyeong-Bin Gwon^a, Jei-Hyun Jeong^a, Sol Jeong^a, Ha-Na Youn^a, Yong-Hwan Heo^b, Joong-Bok Lee^a, Seung-Yong Park^a, In-Soo Choi^a, **Chang-Seon Song^{a,*}**

^a Avian Disease Laboratory, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, 1 Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Republic of Korea
^b Daesung Microbiological Lab, 293 Sam-dong, Uiwang-city, Kyunggi-do 16103, Republic of Korea

< 그림 41 Dot-immunoblotting을 이용한 백신 함량 측정법 >

- (2) 개발된 동물용의약품 소독제 안전성(인체독성 및 환경독성)시험을 농림축산검역본부 동물용의약품평가과에 제안함
- 인체독성 및 환경독성에 대한 국민의 관심에 높아짐(최근 가슴기 살균제, 살충제 계란, 생리대 독성 등)에 따라 부합하는 제품 기준을 마련하기위해, 기존에 OECD에서 이용되고 있는 농약 및 원제의 등록기준 중 1협동 연구에 따라 5가지 인체독성 및 1가지 환경독성 시험을 제안함.

< 표 36 1차 제안 환경 및 인체 독성시험 >

	현재 기준 시험	제안 기준 시험	비 고
인체 독성	“동물용의약품의 안전성·유효성 심사에 관한 규정”에 의하여 “동물용의약품등 독성시험지침” 고시 기준 < 규정 제2장 제5조 4-8. 국소독성시험 > [지침 6. 국소독성시험] 1. 피부자극성시험 - 시험법 존재 2. 안점막자극성시험 - 고시된 시험법 없음 < 규정 제2장 제5조4-10. 그 밖의 특수독성 시험자료 > · 동물용의약품의 특성에 따라	“OECD Guideline For Testing Of Chemicals No. 423, Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method” 1. 급성 경구독성시험 2. 급성 경피독성시험 3. 피부자극성시험 4. 안점막자극성시험 5. 피부감작성시험(국소립프절시험)	1. 제안 기준 시험은 GLP 기준으로 실시함 2. 제시된 OECD 가이드라인은 현재 농약 등록을 위한 농진청 고시에 이용됨

	필요하다고 인정되는 독성(흡입 독성 등)시험자료 - 고시된 시험법 없음		
환경 독성	“동물용의약외품의 안전성·유효성 심사에 관한 규정”에 준함 < 규정 제2장 제5조 7-3. 자연환경에 미치는 영향 > - 시험법 없음	“농약 및 원제의 등록기준, [별표 13] 환경생물 독성 시험기준과 방법” 1. 어류 급성독성시험	1. 제안 기준 시험은 GLP 기준으로 실시함 2. 제시된 시험은 총 25가지의 환경생물 영향검토 시험 중 3가지에 해당함 모든 시험항목은 아래 표에 있음

- 기타

1. 현 동물용의약외품의 안전성·유효성 심사에 관한 규정은 제품의 특성에 따라 자료의 일부 또는 전부를 면제할 수 있으며(5조2항), 이미 허가된 바 있는 품목과 유효성분 등의 종류가 같은 경우(제3조) 유효성분에대한 독성시험자료를 기존의 인체·환경독성 자료로 갈음하는 경우가 다수임
2. 그러나 같은 유효성분일지라도(예: 4가 암모늄) 다양한 화학식을 가진 화학물이 있으며, 실제 소독제 원액 또는 희석 농도가 인체·환경에 적용되는 것을 고려하지 않음
3. 또한 여러 가지 유효성분이 혼합된 소독제의 경우, 각 성분에 대한 독성시험자료를 기존 연구로 갈음하게 되면 혼합된 최종 제품의 독성에 대한 평가가 이루어지지 않는 맹점이 있음

< 표 37 참고 - 농진청 고시 농약의 환경생물 영향검토 시험 >

환경생물종		검토단계별 시험내용			
		제1단계	제2단계	제3단계	기 타
수생생물종	어 류	급성독성시험	어류생육초기독성 미꾸라리 야외포장	어류생활사독성	-
		생물농축성시험 ¹⁾	모의생태계시험		-
	물벼룩	급성유명저해시험	번식독성시험	모의생태계시험	-
	藻 類	생장저해시험	-	-	-
육생생물종	鳥 類	급성경구독성시험 급성식이독성시험	번식독성시험 ²⁾	야외시험 ³⁾	농축성시험
		급성독성시험	번식독성시험	야외시험 ³⁾	농축성시험
	꿀 벌	급성접촉, 섭식독성시험	업상잔류독성시험 ⁴⁾	야외시험 ³⁾	-
	누 에	실내독성시험	-	殘毒시험 ⁵⁾	-
	천 적	실내시험	반야외시험 ⁶⁾	야외시험 ³⁾	-

- 실제로 동물용 방역 소독제는 거점 소독시설 뿐 만 아니라 광범위하게 살포 되고있으며, 기존 원료에 대한 과거 안전성 결과만 첨부하면 등록 시험이 쉽게 이루어지고 있음.



< 그림 42 동물용 방역 소독제의 광범위한 살포 범위 >

< 표 38 2차 제안 환경 및 인체 독성시험 >

	현재 제출 자료 < 동물용 의약품등의 안전성·유효성 심사에 관한 규정 >	제안 제출 시험	제안 경위
항 목	1. 기원 또는 발견 및 개발경위에 관한 자료	기존과 동일	1. 제안 시험은 모두 GLP 시험으로 이루어짐(부가세 별도, 6개월 소모) 2. 국소독성 시험자료 제안 경위는 ‘동물용 의약품등의 안전성·유효성 심사에 관한 규정’ 국소독성시험자료의 설명에 따라 제안됨 (동물용 의약품의 특성에 따라 우발적으로 또는 의도적으로 사람 및 동물의 피부 또는 점막에 접촉 가능성이 있는 것에 한함) 3. 기타 특수독성시험 자료에 대한 제안은 ‘동물용 의약품등의 안전성·유효성 심사에 관한 규정’ 특수독성시험자료의 설명에 따라 제안됨 (동물용 의약품의 특성에 따라 필요하다고 인정되는 독성 시험자료) 4. 원재에 대한 기존 소독제 허가는 동일 원재에 대한 시험 자료로 대체하지만 혼합 물질의 경우를 고려하지 않음
	2. 구조결정, 물리화학적 성질에 관한 자료	기존과 동일	
	3. 안정성에 관한 자료	기존과 동일	
	4. 독성에 관한 자료 4-1. 급성독성시험자료 (기존과 동일, 변동없음) 4-2. 아급성독성시험자료 (해당없음) 4-3. 만성독성시험자료 (해당없음) 4-4. 생식독성시험자료 (해당없음) 4-5. 변이원성시험자료 (해당없음) 4-6. 암원성시험자료 (해당없음) 4-7. 미생물학적독성시험자료 (해당없음) 4-8. 국소독성시험자료 (제안) 4-9. 면역계 이상 시험자료 (해당없음) 4-10. 기타 특수독성시험자료 (제안)	< 국소독성시험자료 대한 제안 > 1) 급성 경구독성시험 / Rat / \ 2,500,000 2) 급성 경피독성시험 / Rat / \ 2,500,000 3) 피부자극성시험 / Rabbit / \ 2,500,000 4) 안점막자극성시험 / Rabbit / \ 2,500,000 5) 피부감작성시험 / Mouse / \ 10,000,000 *위의 시험은 OECD Guideline For Testing Of Chemicals No. 423, Acute Oral Toxicity 에 준함 < 기타 특수독성시험자료 대한 제안 > 1) 어류 급성독성시험 / 잉어 / \ 10,500,000 2) 급성 지렁이 독성시험 / \ 5,000,000 3) 급성 꿀벌 독성시험 / 접촉 / \ 6,000,000 *위의 시험은 OECD Guideline에 기준함	
	5. 약리작용에 관한 자료	기존과 동일	

6. 임상시험 성적에 관한 자료	기존과 동일(효력시험에 관한자료와 동일)	
7. 잔류에 관한 자료	기존과 동일	
8. 외국의 사용현황 등에 관한 자료	기존과 동일	
9. 국내 유사제품과의 비교검토 및 기타 특성에 관한 자료	기존과 동일	

- 2차 제안에 대해 “동물용의약품등이 자연환경에 미치는 영향 평가 시험지침”이 적용 전 고시됨. 이에 대해 2015년 조달청 판매 관납 살균제인 팜닥터(참신약품)로 시물레이션 실시함.

< 2015년 조달청 판매 관납 살균제인 팜닥터(참신약품)에 대한 시험지침 시물레이션 >
 팜닥터는 2015년 조달물품으로만 144톤이 판매됨. 가장 많이 쓰는 4급 암모늄제제 중 하나임.

I. 제1상 동물용의약품등의 환경노출 가능성 평가

문항1. 동물용의약품등이 관련 법령이나 규정에 의해 환경영향평가를 면제받았는가?

그렇다면 종료

답: 아니오

문항2. 그렇지 않은 경우, 동물용의약품등의 사용으로 인해 환경 중에 해당 물질의 농도나 분포를 변화시키지 않을 천연 물질인가? 그렇다면 종료

천연 물질은 환경에 이미 존재하고 있거나 환경에 노출 시 신속히 분해된다는 가정 하에 여기에는 전해질, 펩타이드, 단백질, 비타민 및 환경에서 자연적으로 나타나는 화합물이 포함된다.

동물용의약외품의 경우 그렇지 않다면 환경유입농도를 산출하고 문항12 또는 문항18에 대해 답변한다.

답: 아니오. 소독제의 경우 동물용의약외품에 속함 따라서 환경 유입농도를 산출하고, 문항 12또는 18로 이동 해야 함. 이중 AI, 구제역 소독약품은 육상에 해당함으로 18번으로 이동 함.

다음은 시험지침에 공시된 소독제의 EIC 또는 PEC 계산법이다.

동물용의약외품(소독제, 살충제 등) EICaquatic 또는 PECsoil = 동물용의약외품의 사용농도 (mg/L 또는 mg/Kg) 보정 시에는 방출시 ①희석률, ②환경동태 시험자료 등을 검토한다.

①희석률에 따른 사용농도 보정

이부분에 있어 1. 소독제 제품 원액을 부표상의 희석량으로 희석 시 사용농도를 볼 것인가? 아니면, 사용 농도로 원료약품의 양이 최종 희석되었을 때의 사용농도를 기준으로 할 것인가?에 대한 의문점. 2. 만약 원료를 기준으로 한다면 소독 원료가 2가지 이상 혼합된 경우 각각을 따로 계산 할 것인가? 아니면 합칠것인가에 대한 의문점?이 존재함. 본 시나리오에서는 소독 원료약품의 최종 희석되었을 때의 사용농도를 기준으로 하며 2가지 원료 중 4급암모늄에 대해서 계산함.

소독제품 원액상의 원료(복합 4급암모늄 + 구연산) = 100g/kg = 100000mg/kg

아래는 부표상 소독 대상에 따라 희석시 원료약품의 최종 사용농도

	유기물이 적은 조건 (mg/kg)	유기물이 많은 조건 (mg/kg)
Salmonella typhimurium	20.0	166.7
브루셀라균	31.3	125.0
돼지열병	133.3	500.0
뉴캐슬	200.0	1000.0
조류인플루엔자	100.0	500.0
돼지생식기호흡기증후군	100.0	500.0
구제역	166.7	166.7
돼지유행성설사병 바이러스	333.3	1000.0

< 표 39 부표상 소독대상에 따른 희석시 원료약품의 최종 사용농도 >

②환경동태 시험자료에 따른 사용농도 보정

환경동태시험은 시험기준에 다음과 같이 정의되어있다.

환경동태시험 : 분해시험은 초기 노출이 육상 또는 수생 환경 여부에 따라 토양 또는 수생 계에서만 실시한다. 광분해 시험과 가수분해 시험은 선택사항이다.

시험항목	시험방법
토양 흡착/용탈시험	OECD 106
토양 생분해시험(경로 및 비율)	OECD 307
수생계 분해시험	OECD 308
광분해시험(선택사항)	-
가수분해시험(선택사항)	OECD 111

<표 40 환경동태시험항목 >

토양 흡착/용탈시험: 4급 암모늄은 대부분의 연구에서 토양 흡착/용탈시험 시 토양에 강한 결합으로 하천으로 흘러들어가지 못할 것 이라는 가정이 있다. 그러나 본 시물레이션에서는 실제 소독제 사용이 아래 그림과 같이 직접적인 환경살포가 이루어지는 것을 감안하여, 토양(농지)에 직접 살포할 경우와 하천(도로위살포)에 직접 살포할 경우를 모두 가정한다 (의문점?- 이 과정을 OECD 106 기준으로 모두 시험 해야 하는 것인가? 기 데이터를 차용하여 제출해도 되는 것인가? 4급암모늄 같은 경우 탄소 수에 따라 다양한 유도체가 존재하나 이를 4급암모늄 하나로 인정할 것인가?)

토양 생분해시험: 환경에서 4급 암모늄은 대부분의 연구에서 토양 내 미생물의 분해에 대해 안정하며 실험결과 1년 후에도 72.9%의 방사성이 검출되었고 호기적 반감기는 1,048일로 확인되었다. (기존의 internet searching 자료)

수생계 생분해시험: 수생계에서 그 침전물에서의 분해에 대해 실험한 결과 1년 보관 후 호기적 환경에서는 투여량의 평균 88.5%가 검출되었으며 반감기는 8,365일로, 혐기적 환경에서는 각각 90.8%, 6,218일로 확인되었다. 따라서 토양에 잔류하는 소독제의 농도는 다음 표와 같다. (기존의 internet searching 자료)

위의 토양 및 수 생계 분해시험은 다음과 같이 정리 할 수 있다. (mg/kg)

유기물 많은 조건	토양 생분해에 의한 환경유입농도		수생계 생분에 의한 환경유입농도			
	1달 후	1년 후	호기적 환경		혐기적 환경	
살포 후 환경사포농도	1달 후	1년 후	1달 후	1년 후	1달 후	1년 후

Salmonella typhimurium	163.4249	130.946	166.2861	161.7337	166.1434	160.0534
브루셀라균	122.5442	98.18984	124.6897	121.276	124.5827	120.0161
돼지열병	490.1768	392.7594	498.7586	485.1039	498.3307	480.0643
뉴캐슬	980.3536	785.5187	997.5172	970.2079	996.6614	960.1285
조류인플루엔자	490.1768	392.7594	498.7586	485.1039	498.3307	480.0643
돼지생식기호흡기증후군	490.1768	392.7594	498.7586	485.1039	498.3307	480.0643
구제역	163.4249	130.946	166.2861	161.7337	166.1434	160.0534
돼지유행성설사병 바이러스	980.3536	785.5187	997.5172	970.2079	996.6614	960.1285
유기물 적은 조건	토양 생분해에 의한 환경유입농도		수생계 생분에 의한 환경유입농도			
			호기적 환경		혐기적 환경	
살포 후 환경사포농도	1달 후	1년 후	1달 후	1년 후	1달 후	1년 후
Salmonella typhimurium	19.60707	15.71037	19.95034	19.40416	19.93323	19.20257
브루셀라균	30.68507	24.58674	31.22229	30.36751	31.1955	30.05202
돼지열병	130.6811	104.7096	132.969	129.3287	132.855	127.9851
뉴캐슬	196.0707	157.1037	199.5034	194.0416	199.3323	192.0257
조류인플루엔자	98.03536	78.55187	99.75172	97.02079	99.66614	96.01285
돼지생식기호흡기증후군	98.03536	78.55187	99.75172	97.02079	99.66614	96.01285
구제역	163.4249	130.946	166.2861	161.7337	166.1434	160.0534
돼지유행성설사병 바이러스	326.7518	261.8134	332.4725	323.3703	332.1872	320.0108

<표 41 토양 및 수생계 분해시험 결과 >

문항18(육상 동물용의약품에 해당). 그렇지 않으면, 토양의 예측 환경농도를 변화시킬 수 있는 자료 및 저감장치가 존재하는가? 그렇지 않으면 제2상 환경영양평가 시험이 요구된다.

답: 저감장치가 있습니다. (만약 축사 또는 소독액 수거 장치가 있는 거점 소독기에서만 소독제를 사용하는 경우 가능 할 것이다.) - 저감장치가있을경우의환경영향상의농도는본시물레이션에서직접해볼수없음으로가정하지않도록함.

답: 저감장치는 없으나 위의 희석률 및 환경동태 시험에 따른 재산출이 가능합니다. (만약 소독액 수거 장치가 없는 거점 소독기 또는 농경지, 하천등으로 직접 살포하는 경우는 아니므로 답해야 할 것이다.) -> 문항 19로 넘어간다.

문항19. 그렇다면, 재산출된 토양의 예측 환경농도가 100 ug/kg 미만인가? 그렇다면 종료 그렇지 않으면 제2상 환경영양평가 시험이 요구된다

위의 계산결과로 미루어보아 동물용의약품(소독제, 살충제 등)의 EICaquatic 또는 PEC soil은 예측 환경농도가 모두 100ug/kg(0.1mg/kg)을 초과함으로 제2상 환경영양평가 시험이 요구된다.

II. 제2상 동물용의약품등의 환경영향평가 시험

1. 일반 원칙

가. 시험절차

제2상 환경영향평가 시험은 제1단계 시험과 제2단계 시험으로 구분되며 단계적 시험 절차에 따라 실시한다. 제1단계(단기) 시험은 동물용의약품등이 환경으로 배출될 때 균일하게 분포한다는 가정 하에 실시하며 환경노출 결과에 근거한 위해성 평가로서 제한된 영향을 평가한다. 제1단계 시험에서 동물용의약품등의 환경 위해성이 예측되어 환경영향평가가 종료되지 않는다면 환경영향평가 결과를 보정하기 위해 제2단계(장기) 시험을 실시한다.

제2상의 시험은 원칙적으로 유효성분에 대해서 실시하며, 각 시험항목의 구체적 시험법은 OECD 또는 ISO 가이드라인을 준용한다. 환경독성시험의 경우 동물용의약품등의 환경 유

입 및 동태를 추정하여 노출될 생물 종을 대상으로 검토되어야 하며, 동물용의약품등의 용법(방역용 소독제 등)에 따라 제품(신물질이거나 새로운 조성일 경우에 한함)에 대해서도 요구될 수 있다.

이 시험절차에서도 환경영향평가가 종료되지 않는 경우 추가적 시험이나 사용제한·주의사항 등 규제가 검토되어야 된다.

나. 동물용의약품등의 환경노출

동물용의약품등의 용법용량에 근거한 환경유입 경로와 양에 따라 적용 가능한 위해성평가 시나리오와 범위가 결정된다. 환경으로의 방출은 동물용의약품등의 특성에 따라 다양하다. 동물용의약품의 경우 국소 적용이나 물에 직접 첨가를 제외하고는 대부분이 투여된 동물을 일차적으로 통과하므로 일반적으로 원 물질인 유효성분과 그 대사물질의 배출이 이 가장 유의한 환경노출이 된다. 배출 후 잔류물은 환경 중에 균일하게 분포되는 것으로 가정된다.

다. 위해성 지수(Risk quotient, RQ)

제2상 환경영향평가 시험은 위해성 지수에 근거하여 실시한다. 위해성 지수(RQ)는 예측환경농도(PEC)와 대상동물이 아닌 생물에서의 예측무영향농도 (PNEC)의 비율로 다음과 같이 산출한다

$$\text{위해성 지수} = \frac{\text{예측환경농도}}{\text{대상동물이 아닌 생물에서의 예측무영향농도}}$$

PEC: 토양, 물, 퇴적물에 존재할 것으로 예측되는 원 물질 및 대사물질의 농도

PNEC: 실험적으로 결정된 영향받은 독성값(endpoint)을 적정 평가계수(AF)로 나눈 값

AF: 10~1,000을 적용. 제한적 자료만 이용 가능한 경우 1,000을 적용하고 보다 많은 자료가 이용 가능할 경우는 10까지 낮춰 적용할 수 있음

본 시뮬레이션에서는 PNEC를 Directive 98/8/EC concerning the placing biocidal products on the market 의 Assessment report Didecyldimethylammonium chloride Product-type PT8을 차용하였으며, 가장 독성이 없을 조건을 가정하여 AF를 적용하지 않음. 결과는 아래와 같음.

적용 희석배수 및 유기물 조건에 따른 RQ factor 결과 - AF를 1로 적용했음에도 모두 RQ FACTOR가 1 이상임으로 환경 살포가 불가능함.

유기물 많은 조건	Water (mg a.s./l) = 0.001	sediment (mg a.s./kg) = 3.56	microorganism (0.11 mg/L) = 0.11	soil (0.281 mg/kg) = 0.281	birds (mg/kg) = 0.55	mammals (mg/kg) = 17
Salmonella typhimurium	166700	46.82584	4256.895	593.2384	10786.15	9.805882
브루셀라균	125000	35.11236	1136.364	444.8399	227.2727	7.352941
돼지열병	500000	140.4494	4545.455	1779.359	909.0909	29.41176
뉴캐슬	1000000	280.8989	9090.909	3558.719	1818.182	58.82353
조류인플루엔자	500000	140.4494	4545.455	1779.359	909.0909	29.41176
돼지생식기 호흡기증후군	500000	140.4494	4545.455	1779.359	909.0909	29.41176
구제역	166700	46.82584	4256.895	593.2384	10786.15	9.805882
돼지유행성 설사병 바이러스	1000000	280.8989	9090.909	3558.719	1818.182	58.82353
유기물 적은 조건	Water (mg a.s./l) = 0.001	sediment (mg a.s./kg) = 3.56	microorganism (0.11 mg/L) = 0.11	soil (0.281 mg/kg) = 0.281	birds (mg/kg) = 0.55	mammals (mg/kg) = 17
Salmonella typhimurium	20000	5.617978	181.8182	71.17438	36.36364	1.176471
브루셀라균	31300	8.792135	284.5455	111.3879	56.90909	1.841176
돼지열병	133300	37.44382	1211.818	474.3772	242.3636	7.841176
뉴캐슬	200000	56.17978	1818.182	711.7438	363.6364	11.76471
조류인플루엔자	100000	28.08989	909.0909	355.8719	181.8182	5.882353
돼지생식기 호흡기증후군	100000	28.08989	909.0909	355.8719	181.8182	5.882353
구제역	166700	46.82584	4256.895	593.2384	10786.15	9.805882
돼지유행성 설사병 바이러스	333300	93.6236	3030	1186.121	606	19.60588

<표 42 적용 희석배수 및 유기물 조건에 따른 RQ factor 결과 >

고찰1- 1상 시험에서 저감장치를 사용 하지 않을 경우를 가정하여 2상으로 넘어갔으나 RQ가 모두 1 이상임으로 결국 저감장치로 환경살포농도를 보정하지 않는 한 위의 그림과 같은 환경살포는 본 시험지침으로는 불가능함. 물론, PNEC를 차용하였기 때문에 실제 각 소독제를 PNEC를 실험적으로 구한다면 결과는 달라질 가능성이 있음. 대부분의 4급 암모늄

소독제가 본 시뮬레이션에서 적용한 소독제와 비슷한 원료 구성을 가지고 있어 대부분의 소독제가 시험지침 1상을 통과하지 못할 것으로 예상됨. 그렇다면 기존의 소독제는 저감장치를 반드시 사용하거나, 제2상 시험을 별도로 실시하여 RQ factor 실측 데이터를 다시 적용해 봐야 할 것으로 사료됨.

고찰2- 전문가 의견(독성평가전문가 000교수)

답변 - PEC(Predicted Environmental Concentration) 산정 시 오류가 있음. 실제로 환경에 살포 될 경우 하천, 토양의 수분 등에 섞인다. 따라서 소독약 사용 시 물에 희석되고 또 환경수에 희석되기 때문에 본 시뮬레이션에서 설정한 PEC는 과한 측면이 있다.

질문 - 본 시뮬레이션은 검역본부 환경시험지침을 그대로 따른 것인데, 그렇다면 환경동태 시험에서 환경수에 희석되는 과정이 추가적으로 있어야 한다는 것인가?

답변 - 그렇다.

질문 - 그렇다면 본 지침에서는 환경수에 소독제가 희석되는 것을 가정한 예시가 없다. 이 부분은 소독제 판매 업체 측에서 알아서 직접 환경동태 시험을 해서 알아와야 하는 것인가?

답변 - 그렇다.

질문 - 희석 될 때의 환경수의 양은 어떻게 계산하는 것인가? 이 부분에 대한 기준이 명확하지 않다.

답변 - 그것은 각 소독제 제조사의 시험 재량이다. 그리고 이 시험지침은 현재 등록된 소독제에 대해서는 적용 할 수 없다. 앞으로 새롭게 등록 되는 소독제에 대해서만 적용 될 기준으로 알고 있다.

질문 - 그렇다면 독성이 많을 것으로 예상되는 물질은 제조사가 고의로 환경수 희석량을 많게 설정하면 되지 않는가?

답변 - 그렇게 생각하면 통과 할 수 있는 국내 소독제는 없을 것이다. 이 법이 소독제를 못 쓰게 하려는 것은 아니지 않는가? 실제로 소독제의 대량 살포는 저감장치와 함께 사용 되는 것으로 알고 있다. 따라서 환경으로 유입되는 소독제는 전체에 일부에 지나지 않는다.

결론 - 환경 유입량 설정은 업체의 재량이다. 따라서 문항19의 환경수에 희석된 소독제 재산출 농도(<100ug/kg)을 넘게 설정 하는 일이 없을 것이다. **결국 2상으로 넘어 갈 일은 없다. 실질적으로 2상 환경노출 실험을 해야 할 필요가 있는 경우는 없을 것이다.**

9. CRO 조직의 자립화 및 운영 방안을 확립함

가. 계획

(1) 현재 본 과제 연구팀에서 보유하고 있는 주요 백신 등록 및 검정 관련 설비는 다음과 같음

구분	설비 대수	비고
멸균 장비	고압 멸균기 : 2대 건열 멸균기 : 1대	실험에 사용하는 기구 및 장비에 대한 멸균 처리
실험 장비	청정실험대 : 5대	멸균 처리된 기구를 이용하여 멸균을 유지한 상태로 실험 진행
동물 실험 설비	닭 아이솔레이터 : 18대	In vivo 실험과 관련되는 닭의 사육시설로 HEPA filter를 통해 각 칸의 교차오염을 막아 다양한 바이러스 및 세균 관련 실험 가능
세포 및 종란 설비	세포 배양기 : 5대 계란 부화기 : 2대 도립 현미경 : 2대	In vitro 실험과 관련되는 설비로 백신의 세포 검정 및 종란에의 접종을 통해 백신 검정
유전자 증폭 관련 장비	유전자 증폭기 : 2대 전기영동기 : 4대 실시간 유전자 증폭기 : 3대	유전자 증폭 및 확인을 통한 백신 바이러스 및 세균 검정
저장 장비	-80℃ 냉동고 : 5대 -20℃ 냉동고 : 11대	백신 및 관련 검정 시약의 보관 및 저장
계량 장비	pH 메타 : 1대 천평 : 3대	백신의 제형 및 성상 확인

<표 43 본 과제 연구팀에서 보유하고 있는 주요 백신 등록 및 검정 관련 설비 >

- (2) 개발된 동물 실험 모델을 바탕으로 백신 생산 업체의 합량시험 및 자체시험을 대행할 수 있는 민간위탁연구대행조직(CRO)을 설립함
- (3) 본 연구팀은 기존 과제들을 바탕으로 특허 등록 및 실용화(기술 이전) 실적을 통해 위탁 연구 요청 기관(산업체 등)과의 연계가 잘 이루어져 있음
- (4) 협의서를 제출한 위탁연구 요청 기관과의 지속적인 연계를 통해 백신 검정 사업을 진행 함으로써 정부지원 이후 자체 수익창출이 가능함
- (5) 또한 농림축산식품부 고시 제 2013-155호에서 지정하는 동물용의약품 검사기관 지정을 지원함
- (6) 사업 개시 1년차(2014년 내)에 건국대학교 자회사를 설립하여 본 과제 관련 백신 이외에도 동물 백신 분야 민간 검정 및 R&D 기관으로 수익을 창출함.
- (7) 동물용의약품 합량시험 및 자체시험 서비스 후 분석결과 지원 방안 확립(건국대학교 자회사의 기술을 이용한 제품의 품질 개선 방안 제시)

나. 결과

(1) 민간위탁연구대행조직(CRO)설립 투자 유치 성과 - 주식회사 카브

연차	성격	대상 업체	성 과
1차년도	지식재산	건국대학교 기술지주 주식회사	2,486 백만원
1차년도	기계/시설	주식회사 씨티씨 바이오	500 백만원
1차년도	기계/시설	(주)인트론바이오테크놀로지	250 백만원
총 액			3,236 백만원

<표 44 민간위탁연구대행조직(CRO)설립 투자 유치 성과 - 주식회사 카브 >

(2) 주식회사 카브 고용현황 (2017.7)

번호	이름	팀	직급	업무
1	송창선	대표이사		
2	오화균	영업팀	상무	영업
3	최항렬	연구개발팀	이사	백신
4	엄호숙	기획재정팀	본부장/이사	재무, 인사
5	장민영	기획재정팀	대리	연구비관리
6	고단비	기획재정팀	주임	총무
7	윤하나	연구개발팀	본부장/이사	연구원
8	주효선	연구개발팀	팀장/차장	연구원
9	이다예	연구개발팀	주임	연구원
10	고성혜	연구개발팀	연구원	연구보조
11	김태희	영업팀	대리	의약품관리
12	김보연	연구개발팀	연구원	연구보조

<표 45 주식회사 카브 고용현황 (2017.7)>

(3) 주식회사 카브 홍보 성과

내용	연차	매체	성 과
민간연구지원조직(CRO) 발족	1차년도	전자신문	10건
	1차년도	내일신문	
	1차년도	이데일리	
	1차년도	머니투데이	
	1차년도	뉴시스	
	1차년도	뉴스원	
	1차년도	베리타스알파	
	1차년도	Yakup	
	1차년도	미디어 펜	
	1차년도	이슈메이커	
기술이전	1차년도	NEWSWIRE	2건
	1차년도	Daily VET	
교육부장관상 표창	1차년도	NEWSWIRE	1건
총 계			13건

<표 46 주식회사 카브 홍보 성과 >

(4) 동물용의약품 기술이전 성과

연차	날짜	대상 업체	품목	과제 기여도
2차년도	2016-06-01	중앙백신연구소	가금아데노바이러스 백신(1차선급)	80%
2차년도	2016-06-01	중앙백신연구소	가금아데노바이러스 백신(2차선급)	80%
3차년도	2016-08-08	대성미생물연구소	가금아데노바이러스 백신(1차선급)	80%
3차년도	2016-11-07	대성미생물연구소	PRRS 백신(1차선급급)	40%
3차년도	2016-11-15	고려비엔피	PRRS 백신(1차선급급)	40%

< 표 47 동물용의약품 기술이전 성과 >

(5) 동물용의약품 경상기술실시료 성과

연차	날짜	대상 업체	품목	과제 기여도
2차년도	2016-01-11	고려비엔피	조류메타뉴모바이러스백신 2015 상반기 기술실시료 정산	40%
2차년도	2016-02-01	고려비엔피	조류메타뉴모바이러스백신 2015 하반기 기술실시료 정산	40%
2차년도	2016-02-01	고려비엔피	가금아데노바이러스백신 2015 하반기 기술실시료 정산	80%
2차년도	2016-07-21	고려비엔피	조류메타뉴모바이러스백신 2016 상반기 기술실시료 정산	40%
2차년도	2016-07-21	고려비엔피	가금아데노바이러스백신 2016 상반기 기술실시료 정산	80%
3차년도	2017-01-24	고려비엔피	조류메타뉴모바이러스백신 2016 하반기 기술실시료 정산	40%
3차년도	2017-01-24	고려비엔피	가금아데노바이러스백신 2016 하반기 기술실시료 정산	80%
3차년도	2017-01-24	고려비엔피	조류메타뉴모바이러스백신 2016 상반기 기술실시료 정산	40%
3차년도	2017-01-24	고려비엔피	가금아데노바이러스백신 2016 상반기 기술실시료 정산	80%

< 표 48 동물용의약품 경상기술실시료 성과 >

(6) 사업화

1) 동물용의약품 백신 안전성 및 효능시험 성과

연차	날짜	업체	품목	과제 기여도
2차년도	2016-04-01	한국MSD동물약품	가금 ND IB QX 효능(1차시험)	100%
2차년도	2016-06-22	씨티씨바이오	돼지열병, 단독 혼합 생백신	50%
3차년도	2016-07-01	(주)비센	봉독분획의 가금용 어주번트 안전성 및 효능 평가	50%
3차년도	2016-11-21	씨티씨바이오	가금 ND 생백신 안전성 시험	100%
3차년도	2016-11-21	씨티씨바이오	PCV 안전성 시험	50%
3차년도	2016-11-15	고려비엔피	PRRS 백신 안전성 시험	50%
3차년도	2016-12-01	고려비엔피	PRRS 백신 야외효능 시험	50%

< 표 49 동물용의약품 백신 안전성 및 효능시험 성과 >

2) 동물용의약품 소독제 효능시험 성과

연차	날짜	업체	품목	과제 기여도
2차년도	2016-04-06	건국대학산학협력단	바이오산업공학화 소독제 효력시험 평가	80%
2차년도	2016-06-01	해성엔지니어링	오존살균 소독장치 효능시험	80%
3차년도	2016-12-20	LG전자	이온 발생장치의 바이러스 소독효과 평가	80%
3차년도	2017-01-26	농림축산검역본부	고병원성AI방역용소독제효력검사	100%
3차년도	2017-07-01	씨제이제일제당	약용식물 및 바실러스를 이용한 항 바이러스 사료첨가제 및 소독제 개 발	50%

< 표 50 동물용의약품 소독제 효능시험 성과 >

3) 동물용의약품 진단키트 효능시험 성과

연차	날짜	업체	품목	과제 기여도
1차년도	2015-04-30	(주)메이안디노스틱	IB ELISA KIT 효능 확인시험	100%
2차년도	2016-06-01	삼화비엔이	Biocheck ELISA KIT 효능 확인시 험	100%

< 표 51 동물용의약품 진단키트 효능시험 성과 >

(7) 물용의약품 검사기관 지정을 지원하였으나 검역본부의 기준 변경 및 기타 이유로 거절됨. 같이 지정기관 지원을 실시한 타 기관 모두 거절됨. 과제 후 변경된 기준에 맞게 검사기관 지정 서류 정비 후 재신청 예정임.

3-2절. 1협동 연구개발의 내용

1. 전염성기관지염 백신 시험 프로토콜 표준화 및 인증법 제안

가. 연구계획

- 시험 프로토콜 인증
- 품질 및 효능 시험 분야 시험법 인증 및 표준화 (SOP)
- 자료의 객관성 확보를 위한 시험 환경, 시험 동물 중, 기기 및 장비 표준화
- 신뢰성 보증을 위한 자료 및 방법 확립

나. 연구결과

(1) 시험 프로토콜 인증

- 백신의 검정 시험법인 계태아병법법 과 DIA법의 시험법 비교를 위해 통계학적 방법 제시
- 결과 비교를 위해 반복실험 및 다른 장소에서의 실험 요청, 통계학적 방법(ROC curve 등을 제시)

(2) 품질 및 효능 시험 분야 시험법 인증 및 표준화(SOP)

- 현재 ‘농림축산검역본부’에 고시된 백신 검정법과 주관기관의 DIA 법 및 실험에 필요한

SOP 제정

- 해당 SOP는 주관기관의 실험실에 맞게 제정

2. 닭 아데노바이러스 감염증백신의 동물 실험 모델 검증 및 표준화

가. 연구계획

- 품질 및 유효성 평가용 동물 실험 모델 시험 평가법 표준화
- GLP 인증기관에 의한 주관기관의 새로운 검정 방법 제안 인증 확립

나. 연구결과

(1) 품질 및 유효성 평가용 동물 실험 모델 시험 평가법 표준화

- 닭 아데노바이러스 감염증백신의 평가를 위해 주관기관에서 제시한 시험법을 바탕으로 SOP 제정

- 해당 SOP는 주관기관의 실험실에 맞게 제정

3. 생물학적 제제의 이화학적 품질, 안전성 및 약동력학적 모델 개발

가. 연구계획

- 백신 제품의 중량, 성상, 함습도 등 기본 이화학적 검정 기준 마련
- 백신 종류 별/투여 경로 별 기본 안전성 시험법 확립 제안 (독성 시험 항목 확립)
- 주관기관에서 개발된 시험 동물 모델의 약동력학적 연구 기준 확립
- 표적 장기별 분포, 대사, 흡수 및 배출 확인 시험법 확립
- 표적 장기에 대한 병리조직학적 소견 확립으로 임상증상 및 병변 결정 기준치 확립
- 임상 병리학적 기준 확립

나. 연구결과

- (1) 동물용 의약품의 실험동물 또는 목적동물을 이용한 ADME, DMPK 시험 기술 조사서 작성
- (2) 생독, 사독 백신 별 / 경구, 피하주사, 근육주사 별 약동학적 연구 기준 조사서 작성 (IB 백신)

4. 뉴캐슬병 백신 검정 시험 모델 검증 및 표준화

가. 연구계획

- 시험 프로토콜 인증
- 품질 및 효능 시험 분야 시험법 인증 및 표준화 (SOP)
- 에어로졸 모델 개발에 필요한 흡입 독성용 분사 장치 활용 및 입자 크기 측정 기준 방법 확립 (GC 사용)
- 자료의 객관성 확보를 위한 시험 환경, 시험 동물 종, 기기 및 장비 표준화
- 신뢰성 보증을 위한 자료 및 방법 확립
- 백신 바이러스별 병원성 표준화 확립

나. 연구결과

(1) 뉴캐슬병 백신 검정 시험 모델 SOP작성

- 상기 백신 검정에 필요한 기기 및 장비에 대한 관리방법 SOP 제정

- 실험에 필요한 기기 추가 시 이에 해당하는 SOP는 추가 재정

(2) 흡입독성시험 일반절차 조사보고서 작성

5. 닭 마이코플라즈마 시노비에 감염증의 동물 실험 모델 검증 및 표준화

가. 연구계획

- 품질 및 유효성 평가용 동물 실험 모델 시험 평가법 표준화

- GLP 인증기관에 의한 주관기관의 새로운 검정 방법 제안 인증 확립

나. 연구결과

(1) 마이코플라즈마 시노비에 감염증 동물 실험 모델 SOP 작성

6. 생물학적 제제의 유효성 실험 방법 인증을 통한 주관 기관 GCP(Good Clinical Practice) 지정

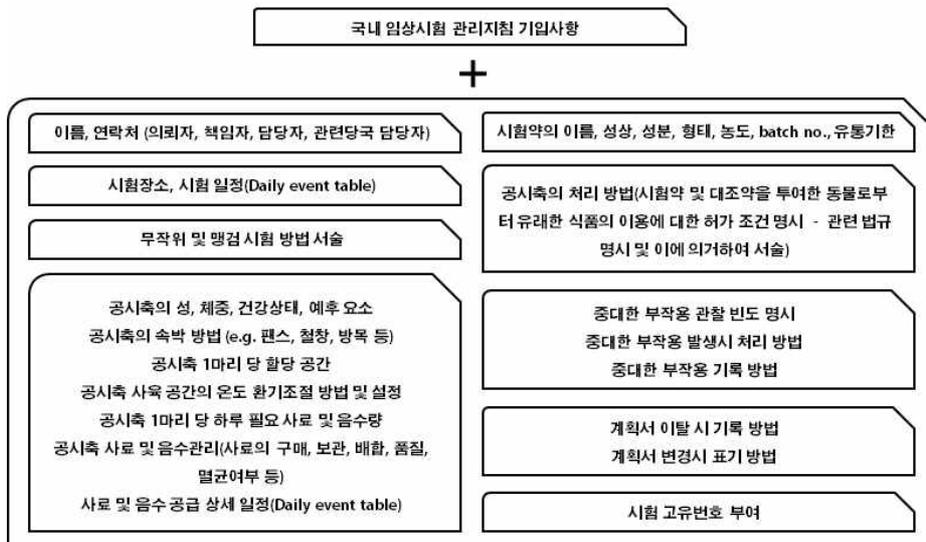
가. 연구계획

- 국제기준인 VICH (Vet. International Cooperation on Harmonization)에 대한 국내 적용 방안 확립

나. 연구결과

- 국제 가이드라인 임상시험 상세규정을 국내 관리지침 요구사항과 비교함

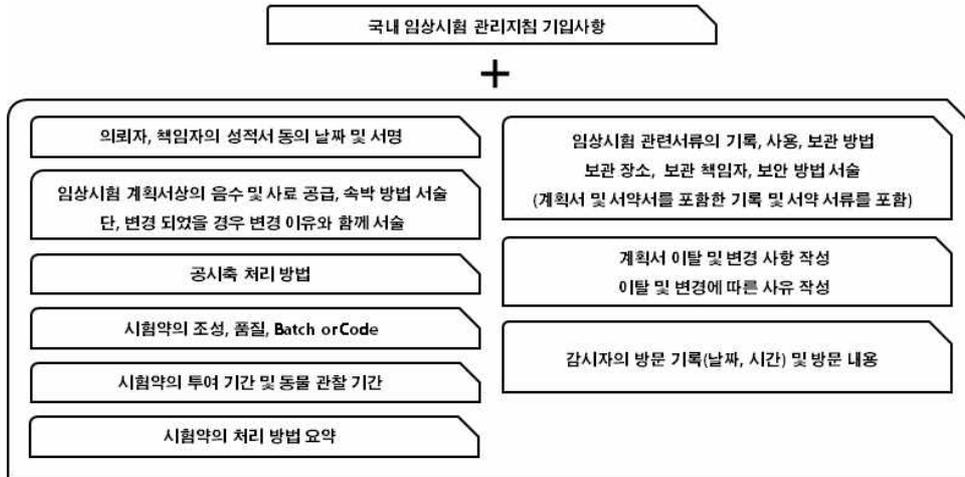
임상시험 계획서 기입 사항



< 그림 43 국제 가이드라인 임상시험 계획서 상세 기입 사항 >

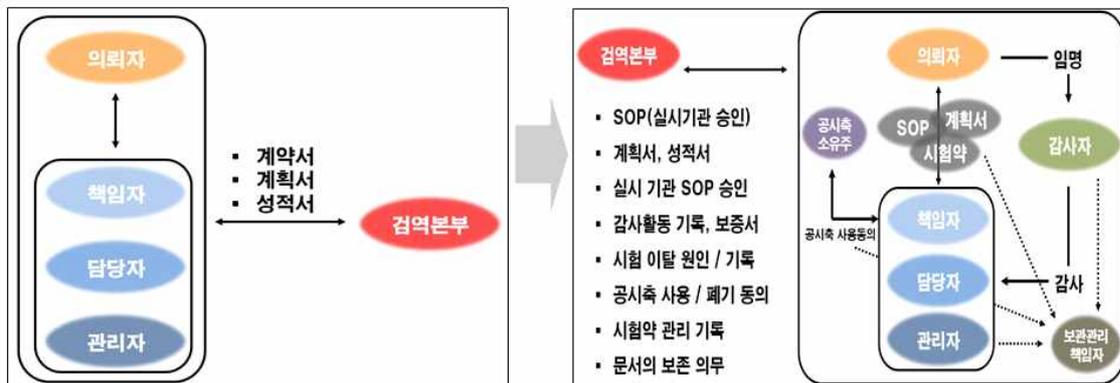
- 국제 가이드라인 임상시험 성적서 상세규정

임상시험 성적서 기입 사항



< 그림 44 국제 가이드라인 임상시험 성적서 상세 기입 사항 >

- 위의 조사 결과에 따라 임상시험 계획서의 기입사항을 구체적으로 변경함.
- 기존 임상시험 관리지침은 계획서의 시험방법, 시험약의 정보 외에 공시축의 이용·관리·처리, 시험의 기록, 부작용의 기록 방법, 시험약의 불출·관리·폐기, 품질 관리, 품질 감사, 시험의 탈락·중지 기준 항목을 상세히 명시하지 않아도 된다. 위에 나열된 항목들은 실험동물을 이용하는 시험의 특성상 문서로 확인하지 않으면 관련법에 저촉될 가능성이 있으며 의뢰자-책임자 사이의 시험 개시 후 있을 수 있는 책임소제 분쟁을 일으킬 수 있다. 계획서상에 이를 명시하도록 해설서(안)에 유도하였다.
- VICH 가이드라인의 임상시험성적서 개념은 단지 동물용의약품의 제조, 품목허가 신청을 위한 문서로 남지 않는다. 임상시험이 의뢰자-책임자의 계약에 의해 계획서에 명시된 대로 수행되었는지 증명하는 서류로서 그 법적 효력이 있음. 따라서 계획서에 시험 수행 방법뿐만 아니라 시험 수행 자체를 증명하는 모든 Raw data가 있음을 증명하는 하나의 보증서가 될 수 있다. 따라서 아래 그림과 같이 모든 시험 행위를 증명하고 변경하고, 감사자로 하여금 시험을 감사 한 결과를 모두 포함하도록 유도함.

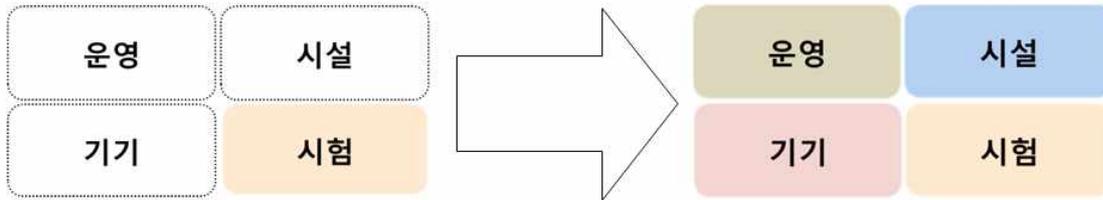


< 그림 45 주요 개념 요약도 >

- 현 동물용의약품 임상시험은 시험약의 안전성, 효력 평가에 대한 기준은 구체적이나, 시험을 실시한 기관의 실체를 검증하고, 시험에 이용된 기기, 시설, 인력에 대한 확인을 할 수 없음
- 따라서 아래 그림과 같이 운영, 시설, 기기에 대한 표준작업지침서를 구비하고, 의뢰자, 책임자, 담당자, 관리자 의무, 책임을 명확히 하도록 하였음.

< 현 임상시험 실험실 지침 >

< 임상시험 실험실 지침 안 >



< 그림 46 임상시험 실험실 승인 필요 표준작업지침서 개념 >

7. 소독제에 대한 품질 및 안전성/효능 평가시험 체계 개발 및 시험 항목 인증

가. 연구계획

- 소독제에 적합한 안전성 평가 시험 항목 결정; 항생제 등의 투여 경로 및 적응증에 따른 다음 중의 독성시험 항목 결정

나. 연구결과

- 민간위탁연구대행(CRO) 자체 개발 소독제에 대해 다음 OECD 화학제 환경독성 평가 항목 중 적합한 시험 방법을 선택함.

환경생물종		검토단계별 시험내용			
		제1단계	제2단계	제3단계	기 타
수생생물종	어 류	급성독성시험	어류생육초기독성 미꾸리 야외포장	어류생활사독성	-
		생물농축성시험 ¹⁾	모의생태계시험		-
	물벼룩	급성유명저해시험	번식독성시험	모의생태계시험	-
	藻類	생장저해시험	-	-	-
육생생물종	鳥類	급성경구독성시험 급성식이독성시험	번식독성시험 ²⁾	야외시험 ³⁾	농축성시험
		지렁이	급성독성시험	번식독성시험	야외시험 ³⁾
	꿀 벌	급성 접촉, 섭식독성시험	엽상잔류독성시험 ⁴⁾	야외시험 ³⁾	-
	누에	실내독성시험	-	殘毒시험 ⁵⁾	-
	천적	실내시험	반야외시험 ⁶⁾	야외시험 ⁷⁾	-

[표 52. 농진청 고시 농약의 환경생물 영향검토 시험 항목(OECD가이드라인 참고)]

- 위 시험 방법 중 동물용의약품 소독제로 사용되는 원료인 4급암모늄, 삼중염 재제에 대해 가장 적합하며 기본적으로 수행되는 3가지 항목을 선정함.

- (1) 어류급성독성시험 / 잉어
- (2) 급성 지렁이 독성시험

(3) 급성 꿀벌 독성시험/ 접촉

- OECD 화학제 인체독성 시험에 적합하며 기본적으로 수행되는 5가지 항목을 선정함. 호흡 독성시험은 분무 형태로 뿌려지는 소독제임을 감안 할 때 반드시 필요 할 것으로 판단되었으나, 시험 규모가 판매 시장 규모 대비 경제적이지 못하였음. 따라서 호흡기 독성 부분은 소독제 사용 indication을 통해 반드시 protector를 사용 할 것을 권장해야 할 것임.

- (1) 급성 경구독성시험/ 랫
- (2) 급성 경피독성시험 / 랫
- (3) 피부자극성시험/ 레빗
- (4) 안점막자극성시험 / 레빗
- (5) 피부감작시험(국소림프절시험) / 마우스

* 모든 시험은 “OECD Guideline For Testing Of Chemicals No. 423, Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method” 참고함.

8. 개발된 안전성/효능동등성 평가 시험법을 통해 위탁연구 요청기관의 동물용의약품 시험 가. 연구계획

- 개발된 시험법을 이용해 소독제(항생제 등)에 대한 시험 실시

나. 연구결과

- 민간위탁연구대행(CRO) 자체 개발 소독제에 대해 개발 시험법 SOP를 이용하여 안전성 및 효능 시험을 실시함.

< 주식회사 카브 개발 소독제 독성시험 Test set >

시험 대상 : 4-ever

원액 성분 : 액상 화합물(디데실디메칠 암모니아염 10%, 시트르산수화물 25%)

시험 항목

- 1. New Zealand White 토끼를 이용한 피부자극성 시험
 - 일차자극지수(Primary Irritation Index) = 4.0 (중도자극성)
- 2. New Zealand White 토끼를 이용한 안점막자극성 시험
 - 급성안자극지수(Acute Ocular Irritation Index)
 - 비세척군(원액) = 98.0 (강도자극성)
 - 세척군(원액) = 90.0 (강도자극성)
 - 살포액(64배 희석액) = 8.7 (비자극성)
- 3. CBA/J 마우스를 이용한 피부감작성 시험 : 국소림프절시험(LLNA)
 - 자극지수(Stimulation Index) -1.6 이상 때 양성 판정
 - 4배 희석액 = 2.5 (양성)
 - 2배 희석액 = 2.4 (양성)
 - 원액 = 1.9 (양성)
- 4. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 급성 경구투여 독성시험 (독성등급법)

- Test Procedure with a Starting Dose of 300 mg/kg Body Weight 에 따라 GHS(Globally Harmonized Classification System)의 분류 = Category 5 or Unclassified - 4급 저독성

5. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 급성 경피투여 독성시험

- 한계용량인 4000 mg/kg 고농도로 설정 시 사망개체 관찰되지 않음 (LD50 > 4,000 mg/kg) -4급 저독성

6. 어류(잉어, Cyprinus carpio)를 이용한 급성 독성 시험

1. 시험농도 - 0.1, 0.5, 2.0 및 10.0 mg/L
2. 48시간 노출 : * LC50 : 1.766mg/L (0.736~7.000), * NOEC : 0.5 mg/L
3. 96시간 노출 : * LC50 : 1.345mg/L (0.533~4.415), * NOEC : 0.5 mg/L
4. 어독성 II 급에 해당되는 결과이며, 이 경우는 사용 및 등록에 제한 요소가 있음*

*어독성 1급 : 0.5 미만으로 등록이 되지 않는 경우 많으며 매우 제한적인 사용 하 허가가능(ex/ 원예전용)

*어독성 2급 : 0.5 이상 ~ 2 미만으로 등록 가능하나 상수원 살포, 항공살포 등 에 대한 제한이 있음.

*어독성 3급 : 2이상으로 환경살포에 제한 없음.

7. 어류(잉어, Cyprinus carpio)를 이용한 급성 독성 시험

1. 시험농도 - 0.1, 0.5, 2.0 및 10.0 mg/L
2. 48시간 노출 : * LC50 : 2.991mg/L (2.118~4.581), * NOEC : 2.0 mg/L
3. 96시간 노출 : * LC50 : 2.991mg/L (2.118~4.581), * NOEC : 2.0 mg/L
4. 어독성 III 급에 해당되는 결과임. 환경 살포에 제한 없음.

*참고: 비교대상 소독제(D-125) - 전 세계에서 가장 많은 killing list를 가진 소독제

1. 어류(잉어, Cyprinus carpio)를 이용한 급성 독성 시험

1. 시험농도 - 0.1, 0.5, 2.0 및 10.0 mg/L
2. 48시간 노출 : * LC50 : 0.835mg/L (0.455 ~ 1.459), * NOEC: 0.1 mg/L
3. 96시간 노출 : * LC50 : 0.835mg/L (0.455 ~ 1.459), * NOEC: 0.1 mg/L
4. 어독성 II 급에 해당되는 결과이며, 이 경우는 사용 및 등록에 제한 요소가 있음

< 시판 소독제 환경 및 인체 독성시험 Test set >

	급성경구독성	급성경피독성	피부자극성	안점막자극성
TH4+ (pH 4.34)	Category 4(>300~2,000) LD50, 500mg/kg	LD50, >4000mg/kg 체중감소, 가피 및 진전	피부부식성 체중감소 (1.8~2.4%)	강도 자극성 MOI: 18-98.0-99.3-1 00
라이프가드-정 (pH 5.85)	Category 5(>2,000)	LD50, >4000mg/kg 임상증상 없음	자극 없음	자극 없음 MOI: 0.7-0

버큰-에스 (pH 1.87)	Category 5(>2,000)	LD50, >4000mg/kg 임상증상 없음	해당 없음 (시험안함)	해당 없음 (시험안함)
Neutral-Q (pH 7.16)	Category 5(>2,000)	LD50, >4000mg/kg 가피형성, 체중 감소	피부부식성 체중감소 없음	강도 자극성 MOI: 18-21.3-38.0-7 0.0
4-ever (최초)	Category 5(>2,000)	LD50, >4000mg/kg 가피형성, 체중 감소	중도 자극성 체중감소	강도 자극성 MOI: 8.7-4.0-98.0

< 주식회사 카브 개발 소독제 효능시험 Test set >

소독제 test 1. 친환경 소독제 검사결과							
목적: 친환경 생분해 소독제 개발							
함량: 본제 1L중							
1. 솔잎추출물 1mg/ml + 구연산 25%							
2. 솔잎추출물 1mg/ml + 구연산 12.5%							
3. 솔잎추출물 1mg/ml + 자몽종자추출물 2%							
4. 솔잎추출물 1mg/ml + 자몽종자추출물 5%							
바이러스 및 세균	시험 균주	소독제 유효 회색배수					
		소독제 제조 직후		3개월 상온보관후		6개월 상온보관후	
		경수	유기물	경수	유기물	경수	유기물
솔잎추출물 1mg/ml + 구연산 25%	AIV	100 배 이상					
	NDV	2 배	2 배	2 배	2 배	2 배	2 배
	Salmone lla	5 배	2 배	5 배	2 배	5 배	2 배
솔잎추출물 1mg/ml + 구연산 12.5%	AIV	100 배 이상					
	NDV	2 배	원액	2 배	원액	2 배	원액
	Salmone lla	2 배	원액	2 배	원액	2 배	원액
솔잎추출물 1mg/ml + 자몽종자추출물 2%	AIV	5 배	2 배	5 배	2 배	5 배	2 배
	NDV	2 배	원액	2 배	원액	2 배	원액
	Salmone lla	2 배	원액	2 배	원액	2 배	원액
솔잎추출물 1mg/ml + 자몽종자추출물 5%	AIV	10 배	5 배	10 배	5 배	10 배	5 배
	NDV	5 배	2 배	5 배	2 배	5 배	2 배
	Salmone lla	2 배	2 배	2 배	원액	2 배	원액

소독제 test 2. 케미칼 소독제 검사결과	
목적: 다목적 소독제 개발	
함량: 본제 1L중	

디테실디메칠암모늄 클로라이드 50% 10%
 구연산 25%
 정제수 Up to 100%

바이러스 및 세균	비고	소독제 유효 희석배수
AIV	경수	1600 배
	유기물	500 배
NDV	경수	200 배
	유기물	100 배
PRRSV	경수	300 배
	유기물	100 배
Salmonella	경수	800 배
	유기물	100 배

소독제 test 3. 케미칼 소독제 검사결과

목적: 다목적 소독제 개발

함량: 본제 1L중

Alkyl(60%C₁₄,30%C₁₆,5%C₁₂,5%C₁₈)dimethyl benzyl ammonium chloride).. 2.37%
 Alkyl (68%C₁₂,32%C₁₄) dimethyl ethylbenzyl ammonium chloride)..... 2.37%
 시트르산수화물 (Citric Acid Hydrate, KVP)..... 25%
 정제수Up to 100%

바이러스 및 세균	비고	소독제 유효 희석배수
AIV	경수	800 배
	유기물	500 배
NDV	경수	300 배
	유기물	50 배
PRRSV	경수	50 배
	유기물	30 배
Salmonella	경수	500 배
	유기물	30 배

소독제 test 3. 케미칼 소독제 검사결과

목적: 다목적 소독제 개발

함량: 본제 1L중

Alkyl(60%C₁₄,30%C₁₆,5%C₁₂,5%C₁₈)dimethyl benzyl ammonium chloride).. 2.37%
 Alkyl (68%C₁₂,32%C₁₄) dimethyl ethylbenzyl ammonium chloride)..... 2.37%
 시트르산수화물 (Citric Acid Hydrate, KVP)..... 25%
 정제수Up to 100%

바이러스 및 세균	비고	소독제 유효 희석배수
AIV	경수	800 배
	유기물	500 배
NDV	경수	300 배
	유기물	50 배
PRRSV	경수	50 배
	유기물	30 배
Salmonella	경수	500 배
	유기물	30 배

- 본 시험 결과로 도출된 환경독성 및 인체독성 결과는 차후 민간위탁연구대행 기관 자체 사업화를 위한 타블릿형 소독제 개발에 기초자료로 이용 될 예정임.
- 친환경 소독제는 전염성이 강한 바이러스성 질병에 대한 적용증으로 한정하여 동물용의약 외품 등록을 진행 할 예정임.
- (주)크로엔의 GLP시험 기준으로 환경 및 인체 독성 평가 후 최초 GLP 시험 소독제로서 판매 개시 기대함.

9. 닭 괴사성 장염 및 마이코플라스마 시노비아 효능 시험 모델 표준화

가. 연구계획

- 시험 프로토콜 인증
- 품질 및 효능 시험 분야 시험법 인증 및 표준화 (SOP)
- 자료의 객관성 확보를 위한 시험 환경, 시험 동물 종, 기기 및 장비 표준화
- 신뢰성 보증을 위한 자료/방법 확립

나. 연구결과

- (1) 괴사성장염 감염증 동물 실험 모델 SOP 작성
- (2) 괴사성장염 항생제 감수성 시험 SOP작성

10. 구축된 생물학적 제제의 유효성 실험 방법 인증 체계(GCP)를 통한 주관기관의 유효성 시험에 대한 신뢰성보증 활동

가. 연구계획

- 주관기관에서 실시하는 뉴캐슬병·전염성기관지염 합제백신 및 생건조백신에 대한 유효성 시험에 대해 구축된 GCP 체계를 통해 신뢰성보증 리포트 발급

나. 연구결과

(1) 신뢰성 보증 리포트 발급

11. GLP 수준의 민간 CRO 육성 지원 및 다지점 운용 방안 확립(운영책임자 및 QAU 지정)

가. 연구계획

- GLP 수준의 민간 CRO 육성 지원 및 다지점 운용 방안 확립(운영책임자 및 QAU 지정)
- 육성된 민간 CRO에 대한 다지점 GLP 운용(semi-GLP) 및 GCP 지정으로 동물용의약품 전문 위탁시험기관(CRO)에 대한 신뢰성 보증 확립을 통하여 국제적 수준(GLP)의 시험기관 설립 지원

나. 연구결과

(1) 다지점 운용에 대한 SOP 작성

(2) 동물용의약품 민간위탁연구대행조직 주식회사 카브의 향후 Semi-GLP 활동 지원

12. 동물용의약품 민간위탁연구대행 조직의 운영, 시험, 관리, 신뢰성 보증 등의 GLP 수준 SOP 작성 내역

종류	No.	SOP No.	SOP name
장비 및 기 기 관리	1	SOP-INM-101	Micropipette
	2	SOP-INM-102	Incubator
	3	SOP-INM-103	냉장 및 냉동고
	4	SOP-INM-104	Clean bench
	5	SOP-INM-105	pH meter
	6	SOP-INM-106	Deep freezer
	7	SOP-INM-107	미량냉장원심분리기
	8	SOP-INM-108	원심분리기
	9	SOP-INM-109	자동핵산추출기
	10	SOP-INM-110	실시간유전자증폭기
	11	SOP-INM-111	백신 분무기
시설관리	12	SOP-FAM-101	사육기자재의 세척 취급 및 관리
	13	SOP-FAM-101-W01	사육기자재 교환기록지
	14	SOP-FAM-102	동물사육구역의 청소 및 소독
	15	SOP-FAM-102-W01	청소 소독 기록지
	16	SOP-FAM-103	사육구역의 환경제어
	17	SOP-FAM-103-W01	사육환경 측정기록지
	18	SOP-FAM-103-W02	필터 교환 기록지
	19	SOP-FAM-103-W03	UV 램프 교환기록지
	20	SOP-FAM-103-W04	환경제어 변경의뢰서
	21	SOP-FAM-103-W05	환경제어 변경승인서
	22	SOP-FAM-103-W06	정기 환경측정 성적 종합보고서

	23	SOP-FAM-103-W07	환경측정 의뢰서
	24	SOP-FAM-103-W08	편차 확인 라벨
	25	SOP-FAM-104	일반실험실 및 감염실험실의 입실 및 퇴실
	26	SOP-FAM-104-W01	일반실험실 및 감염실험실 허가원
	27	SOP-FAM-104-W02	일반실험실 및 감염실험실 입퇴실기록
	28	SOP-FAM-105	동물사육구역의 입실 및 퇴실
	29	SOP-FAM-105-W01	사육구역 출입 허가원
	30	SOP-FAM-105-W02	동물실험실 입퇴실기록
동물실관리	31	SOP-ANM-101	질병모니터링 검사
	32	SOP-ANM-101-W01	검역검사의뢰기록지
	33	SOP-ANM-101-W02	검역용 부검 소견기록지
	34	SOP-ANM-101-W03	검역검사 확인서
	35	SOP-ANM-102	사료 및 음수의 관리
	36	SOP-ANM-102-W01	사료사용현황표
	37	SOP-ANM-102-W02	사료 급여 기록지
동물실험법	38	SOP-ANT-101	시험생물의 입수 및 관리
	39	SOP-ANT-101-W01	시험생물 입수 기록지
	40	SOP-ANT-101-W02	무균종란 사용 기록지
	41	SOP-ANT-101-W03	무균종란 관리 기록지
	42	SOP-ANT-101-W04	무균닭 사용 기록지
	43	SOP-ANT-101-W05	무균닭 관리 기록지
	44	SOP-ANT-101-W06	시험생물 라벨
	45	SOP-ANT-101-W07	시험생물 이상사태 조치 기록지
	46	SOP-ANT-102	시험생물의 접종 및 증상관찰
	47	SOP-ANT-102-W01	접종 기록지
	48	SOP-ANT-102-W02	증상관찰 기록지
	49	SOP-ANT-103	시험생물의 부검 및 병변관찰
	50	SOP-ANT-103-W01	닭 아데노바이러스 간 병변 관찰 기록지
	51	SOP-ANT-103-W02	닭 아데노바이러스 심낭 병변 관찰 기록지
시험물질 관리, 조제	52	SOP-FOM-101	공격접종 뉴캐슬병 바이러스 배양
	53	SOP-FOM-101-W01	평판응집반응 결과 기록지
시험관리	54	SOP-GER-101	시험접수 및 관리
	55	SOP-GER-101-W01	시험의뢰서
	56	SOP-GER-101-W02	시험일정총괄표
	57	SOP-GER-102	농장 시험
	58	SOP-GER-102-W01	농장 의뢰시험 업무 협약서
	59	SOP-GER-102-W02	농장 시험의뢰 동의서
일반시험법	60	SOP-GET-101	통계처리
	61	SOP-GET-102	샘플의 희석
	62	SOP-GET-102-W01	샘플의 희석 및 폐기

	63	SOP-GET-103	역가의 산출
	64	SOP-GET-103-W01	역가 산출 기록지
	65	SOP-GET-104	Dot-immunoblotting assay
	66	SOP-GET-104-W01	DIA 결과 기록지
	67	SOP-GET-105	Agar gel immunodiffusion
	68	SOP-GET-105-W01	AGID 결과 기록지
	69	SOP-GET-106	HI test 시험법
	70	SOP-GET-106-W01	HI test 결과 기록지
	71	SOP-GET-106-W02	Microhemagglutinin assay 결과 기록지
검정기준	72	SOP-KSA-101	닭 전염성 기관지염 생건조백신 검정기준
	73	SOP-KSA-102	닭 아데노바이러스 불활화백신 검정기준
	74	SOP-KSA-103	소독제 효력시험
	75	SOP-KSA-104	클로스트리듐 항생제 감수성 검사
	76	SOP-KSA-105	NDV 생독백신 효능 시험 모델 프로토콜
	77	SOP-KSA-106	MS 생건조 백신 시험 모델 프로토콜
	78	SOP-KSA-106-W01	Real-time_PCR_기록지
	79	SOP-KSA-106-W02	임상증상_기록지
신뢰성보증	80	SOP-QAU-101_	신뢰성보증부서의 업무
	81	SOP-QAU-101-W01	QAU 점검긴급보고서
	82	SOP-QAU-101-W02	Checklist 표준작업수순서
	83	SOP-QAU-101-W03	Checklist 시험일정총괄표
	84	SOP-QAU-102	시험위주의 점검
	85	SOP-QAU-102-W01	신뢰성보증업무담당자 지정서
	86	SOP-QAU-102-W02	신뢰성보증확인서
	87	SOP-QAU-102-W03	QA 점검 계획서
	88	SOP-QAU-102-W04	checklist_시험계획서
	89	SOP-QAU-102-W05	checklist_입수 및 검역
	90	SOP-QAU-102-W06	checklist_시험물질 및 대조물질의 보관조제
	91	SOP-QAU-102-W07	checklist_투여
	92	SOP-QAU-102-W08	checklist_관찰 및 평가
	93	SOP-QAU-102-W10	checklist_분석
	94	SOP-QAU-102-W11	checklist_시험기초자료
	95	SOP-QAU-102-W12	checklist_최종보고서
	96	SOP-QAU-102-W13	QA 점검결과보고서
	97	SOP-QAU-102-W14	checklist_전배양
	98	SOP-QAU-102-W15	checklist_시험물질의 처리
	99	SOP-QAU-102-W16	checklist_콜로니계수
	100	SOP-QAU-102-W17	checklist_검체 제작
	101	SOP-QAU-102-W18	checklist_검체 판독
	102	SOP-QAU-102-W19	checklist_부검
	103	SOP-QAU-102-W20	checklist_노출 및 측정

	104	SOP-QAU-103	시험기초자료 및 최종보고서 점검	
안전 및 보건	105	SOP-LAS-101	안전 보건	
	106	SOP-LAS-101-W01	실험실안전 보완 기록지	
	107	SOP-LAS-101-W02	실험실 정기안전점검리스트	
운영	108	SOP-OPP-101	(주)KCAV의 운영	
	109	SOP-OPP-101-W01	GLP 진술서	
	110	SOP-OPP-101-W02	GLP 의사결정기록지	
	112	SOP-OPP-101-W03	시험물질 의결기록지	
	113	SOP-OPP-101-W04	업무 인수 인계 확인서	
	114	SOP-OPP-101-W05	업무분장표	
	115	SOP-OPP-101-W06	GLP 조직도	
	116	SOP-OPP-102	표준작업수순서(SOP)의 작성 및 관리	
	117	SOP-OPP-102-W01	SOP 검토기록지	
	118	SOP-OPP-102-W02	SOP 배포 수령 폐기기록지	
	119	SOP-OPP-102-W03	SOP 개정 요청서	
	120	SOP-OPP-102-W04	SOP 정기검토 기록지	
	121	SOP-OPP-102-W05	SOP 사용중단 재사용 안내	
	122	SOP-OPP-102-W06	SOP 일탈 기록지	
	123	SOP-OPP-102-W07	SOP 목록지	
	124	SOP-OPP-103	책임자 및 담당자의 임명	
	125	SOP-OPP-103-W01	임명서	
	126	SOP-OPP-103-W02	GLP 인원 임명 현황서	
	127	SOP-OPP-104	동물실험운영윤리위원회의 구성과 운영	
	128	SOP-OPP-104-W01	동물실험계획 승인신청서	
	129	SOP-OPP-104-W02	건국대학교 동물실험윤리규정	
	130	SOP-OPP-105	시험계획서 작성과 관리	
	131	SOP-OPP-105-W01	시험계획서(기본품)_protocol 완성 후 작성	
	132	SOP-OPP-105-W02	시험계획서 검토 기록지	
	133	SOP-OPP-105-W03	시험계획서 변경 기록지	
	134	SOP-OPP-105-W04	시험계획서 일탈 기록지	
	135	SOP-OPP-105-W05	동물실 및 시험담당자 지정서	
	136	SOP-OPP-105-W06	시험설명 및 의결 기록지	
	137	SOP-OPP-106	최종보고서 작성과 관리	
	138	SOP-OPP-106-W01	최종보고서(기본품)_protocol 완성 후 작성	
	139	SOP-OPP-106-W02	최종보고서 검토 기록지	
	140	SOP-OPP-106-W03	최종보고서 변경 기록지	
	141	SOP-OPP-106-W04	번역증명 진술서	
	142	SOP-OPP-107	문서작성 및 관리	
	총 142 문건 작성			
	< 표 53 GLP 수준 SOP 작성 내역 >			

3-3절. 관련 성과 요약

1. 민간위탁연구대행조직(CRO)설립 투자 유치 성과 - 주식회사 카브

연차	성격	대상 업체	성 과
1차년도	지식재산	건국대학교 기술지주 주식회사	2,486 백만원
1차년도	기계/시설	주식회사 씨티씨 바이오	500 백만원
1차년도	기계/시설	(주)인트론바이오테크놀로지	250 백만원
총 액			3,236 백만원

2. 매출성과 (2014년 12월 ~ 2017년 7월)

분류	분야	성과	계약 액수 (백만원)
동물용의약품	기술이전	5건	137
	경상기술실시	9건	258
	동물용의약품 백신 안전성 및 효능	7건	319
동물용의약외품	소독제 효능시험	5건	473
	진단키트 효능시험	2건	72
합 계		28건	1,259

3. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부	게재일	등록번호
1	Viscerotropic velogenic Newcastle Disease Virus Replication in Feathers of Infected Chicken	Journal of Veterinary Science	Dong-hun Lee	17(1): 115-117	한국	The Korean Society of Veterinary Science	SCIE	2016/3/30	1229-845 X
2	comparison between dot-immunoblot assay and clinical sign determination method to titer IB in eggs	Journal of Virological Methods	Seong-su Yuk	230(2106): 13-17	영국	ELSEVIER	SCI	2016/1/21	0166-0934
3	Comparison of live Newcastle disease vaccines efficacy by different spray method (temporary title)	Avian Pathology	Seong-su Yuk	Under revision	International	World Veterinary Poultry Association	SCI	Under revision	Under revision
4	Coinfection of Mycoplasma synoviae with Nephropathogenic Infectious Bronchitis Strains in SPF chickens	Avian Pathology	Seong-su Yuk	Under revision	International	World Veterinary Poultry Association	SCI	Under revision	Under revision

4. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	American association of avian pathologists (AAP) annual meeting 2015	홍우택	2015년 7월 11일	Boston, MA, USA	미국
	Development of infectious bronchitis virus (IBV) ELISA kit for detection of antibodies against nephropathogenic IBV vaccine				
2	대한수의학회(국제학회)	육성수	2015년 10월 29일	The-K 호텔, 경주	한국
	Comparison between Dot-immunoblotting Assay and Clinical Sign Determination Method for Quantifying Avian Infectious Bronchitis Virus Vaccine				
3	한국실험동물학회	홍우택	2016년 2월 18일	강원도 용평리조트 그린피아콘도	한국
	Reversion to virulence test for novel Korean nephropathogenic IBV (Chicken Infectious Bronchitis virus) Vaccine candidate				
4	대한수의학회(국제학회)	김동윤	2016년 10월 28일	경남 진주 MBC 컨벤션센터	한국
	Toxicities of disinfectants of animal health and sanitation products using different test organisms				
5	대한수의학회(국제학회)	육성수	2016년 10월 28일	경남 진주 MBC 컨벤션센터	한국
	Comparison of Newcastle disease vaccines administered as different spraying machines in relation to immune response and protective efficacy in day old chicken				

5. 전문연구 인력양성

No	분류	성명	기준 년도	현 황										
				학위별				성별		지역별				
				박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	수의학	박재근	2015	1				1		1				
2	수의학	최수원	2015		1			1		1				
3	수의학	정 술	2015			1			1	1				
4	수의학	김규직	2016			1		1		1				
5	수의학	육성수	2017	1				1		1				

6. 수상실적

일자	수상명칭	내용
2015-10-28	수의학금우수논문상	Dot-immunoblotting assay와 기존 계태아 병변법을 비교하여 DIA가 닭 전염성기관지염 백신 균주의 역가 측정에 민감도/특이도가 높다는 것을 증명
2015-10-30	교육부장관표창	동물용의약품 검정 및 연구개발분야 선도 기업
2016-10-28	수의학금우수논문상	뉴켓슬 분무백신의 분무 입자에 따른 검정 효과 증명

○ 2차년도 세부연구목표

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	내용
뉴캐슬병(Newcastle disease) 생 독 백신 검정의 조건에 따른 동물 실험 모델 제시	15	15	- 백신바이러스의 분무 입자 크기별, 병원성 차이에 따른 생독 백신 검정 동물실험 모델 을 확립함
닭 마이코플라즈마 시노비아 (Mycoplasma Synoviae) 감염증 에 대한 동물 실험 모델 확립	15	15	- 전염성기관지염 바이러스와의 동시 감염을 통한 병변 모델을 확립함 - color change unit과 RRT-PCR의 비교 분 석을 통한 standard curve를 정립함
개발된 동물 실험 모델을 통한 위 탁연구 요청기관의 동물용의약품 함량시험 및 자체시험	15	15	- 개발된 시험법을 이용해 뉴캐슬병·전염성 기관지염 합제백신 함량시험을 실시함
정책건의 실시	5	5	- 뉴캐슬병 생독 백신 검정의 조건에 따른 동물실험 모델의 정책건의를 실시함
뉴캐슬병 백신 검정 시험 모델 검 증 및 표준화	15	15	- 시험 프로토콜 인증 - 품질 및 효능 시험 분야 시험법 인증 및 표준화 (SOP) - 에어로졸 모델 개발에 필요한 흡입 독성용 분사 장치 활용 및 입자 크기 측정 기준 방 법 확립 (GC 사용) - 자료의 객관성 확보를 위한 시험 환경, 시 험 동물 중, 기기 및 장비 표준화 - 신뢰성 보증을 위한 자료 및 방법 확립 - 백신 바이러스별 병원성 표준화 확립
닭 마이코플라즈마 시노비아 감염 증의 동물 실험 모델 검증 및 표 준화	15	15	- 품질 및 유효성 평가용 동물 실험 모델 시 험 평가법 표준화 - GLP 인증기관에 의한 주관기관의 새로운 검정 방법 제안 인증 확립
생물학적 제제의 유효성 실험 방 법 인증을 통한 주관 기관 GCP(Good Clinical Practice) 지 정	5	5	- 국제기준인 VICH (Vet. International Cooperation on Harmonization)에 대한 국내 적용 방안 확립
화학제(항생제)에 대한 품질 및 안전성/효능 평가시험 체계 개발 및 시험 항목 인증	10	10	- 항생제에 적합한 안전성 평가 시험 항목 결정; 항생제 등의 투여 경로 및 적응증에 따 른 다음 중의 독성시험 항목 결정 - 제네릭 항생제에 대한 야외 효능 평가 시 험 대체법 제안 (실험동물을 이용한 생물학적 동등성 평가 모델 제시)
개발된 안전성/효능동등성 평가 시험법을 통해 위탁연구 요청기관 의 동물용의약품 시험	5	5	- 개발된 시험법을 이용해 화학제(항생제 등)에 대한 시험 실시
합계	100	100	

○ 3차년도 세부연구목표

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	내용
닭 피사성 장염(Necrotic Enteritis)의 동물 실험 모델 확립	20	20	- 콕시듐과의 동시감염을 통한 피사성 장염 병변 모델을 확립함
개발된 동물 실험 모델을 통한 위탁연구 요청기관의 동물용의약품 함량시험 및 자체시험	15	15	- 개발된 시험법을 이용해 뉴캐슬병 생건조 백신에 대한 함량시험을 실시함
정책건의 실시	5	5	- 닭 피사성 장염의 동물실험 모델 정책건의 실시함
닭 피사성 장염 및 마이코플라스마 시노비에 효능 시험 모델 표준화	15	15	- 시험 프로토콜 인증 - 품질 및 효능 시험 분야 시험법 인증 및 표준화 (SOP) - 자료의 객관성 확보를 위한 시험 환경, 시험 동물 중, 기기 및 장비 표준화 - 신뢰성 보증을 위한 자료/방법 확립
구축된 생물학적 제제의 유효성 시험 방법 인증 체계(GCP)를 통한 주관기관의 유효성 시험에 대한 신뢰성보증 활동	10	10	- 주관기관에서 실시하는 뉴캐슬병·진염성 기관지염 합제백신 및 생건조백신에 대한 유효성 시험에 대해 구축된 GCP 체계를 통해 신뢰성보증 리포트 발급
화학제(소독제)에 대한 품질 및 안전성/효능 평가시험 체계 개발 및 시험 항목 인증	15	15	- 동물용 소독제 품질 검증 시험법 제안 및 인증 제안 - 소독제 안전성 시험항목 확립 및 제안
GLP 수준의 민간 CRO 육성 지원 및 다지점 운용 방안 확립(운영책임자 및 QAU 지정)	10	10	- GLP 수준의 민간 CRO 육성 지원 및 다지점 운용 방안 확립(운영책임자 및 QAU 지정) - 육성된 민간 CRO에 대한 다지점 GLP 운용(semi-GLP) 및 GCP 지정으로 동물용의약품 전문 위탁시험기관(CRO)에 대한 신뢰성 보증 확립을 통하여 국제적 수준(GLP)의 시험기관 설립 지원
개발된 이화학적 품질, 안전성 및 약동력학적 시험 체계를 통한 위탁연구 요청기관의 시험 실시	10	10	- 개발된 시험 체계를 통해 생물학적 제제, 화학제에 대한 시험 실시
3차년도 합계	100	100	

4-2절. 관련분야 기여도

○ DOT 법을 통한 전염성기관지염 백신의 함량 시험법

- Dot법을 통한 전염성기관지염 백신의 함량시험법은 기존 Dot-immunoassay를 이용한 바이러스 역가 검정법을 국내발생 nephropathogenic IBV에 적용함.
- 이는 기존의 계태아 병변판별법이 nephropathogenic IBV에서는 뚜렷하지 못한 점을 보완하는 기술임. 해외 동물용의약품 평가에는 아직 적용되지 못한 기술로서 동일분야에서 앞선 기술로 판단됨.



AVIAN DISEASES 42:92-100, 1998

Detection and Classification of Infectious Bronchitis Viruses Isolated in Korea by Dot-Immunoblotting Assay Using Monoclonal Antibodies

Chang-Seon Song,^A Jae-Hong Kim,^A Youn-Jeong Lee,^A Sun-Joong Kim,^B Yoshihiro Izumiya,^D Yukinobu Tohya,^C Hyung-Kwan Jang,^D and Takeshi Mikami^{D*}

^AAvian Disease Division, National Veterinary Research Institute, RDA, Anyang 430-016, Korea

^BDepartment of Avian Disease, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-100, Korea

^CDepartment of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima 890, Japan

^DDepartment of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Tokyo 113, Japan

Received 14 May 1997

Short communication

Comparison between dot-immunoblotting assay and clinical sign determination method for quantifying avian infectious bronchitis virus vaccine by titration in embryonated eggs



Seong-su Yuk¹, Jung-Hoon Kwon², Jin-Yong Noh³, Woo-tack Hong⁴, Gyeong-Bin Gwon², Jei-Hyun Jeong², Sol Jeong², Ha-Na Youn², Yong-Hwan Heo³, Joong-Bok Lee², Seung-Yong Park², In-Soo Choi², Chang-Seon Song^{1*}

¹Avian Disease Laboratory, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, 1 Hwasung-dong, Gwangju-gu, Seoul 05029, Republic of Korea

²Diseases Microbiology Lab, 203 Seom-dong, Ulsung-city, Kyunggi-do 10163, Republic of Korea

○ 아데노바이러스 감염에 대한 동물실험 모델

- 아데노바이러스 감염증은 주로 아시아 국가 가금류에 많은 피해를 일으키고 있는 질병으로 단독감염으로 인한 임상증상은 균주에 따라 상이하나 복합감염에 의한 피해가 주요함.
- 오리 사육 비중이 높은 중국에서는 최근 닭 뿐 만 아니라 오리에서도 문제가 되고 있음.
- 아데노바이러스는 여러 혈청형이 있어 주로 질병을 일으키는 혈청형을 혼합하여 다가(multivalent) 백신으로 사용함. 특히 동남아에서는 감염 개체의 비장과 간을 직접 이용하여 자가 백신을 실시하는 등 많은 피해가 있음에도 백신을 평가 할 수 있는 정형화된 틀이 없었음.
- 개발 동물 질병유발 모델 시험은 야외 분리주의 임상증상 및 질병의 정도를 정확히 측정하기 위해 바이러스의 정량법, 조직병변의 관찰 등을 이용하였음.
- 본 기술로 야외주 바이러스에 대한 백신주의 평가 방법을 확립하였으며, 국내 백신회사 3곳(고려비엔피, 대성미생물연구소, 중앙백신)에 기술이전을 실시했을 뿐만 아니라 제품화를 마친 1곳(고려비엔피)은 상용화를 완료함.
- 본 기술은 중국에서도 관심을 가지고 있으며, 중국 TIANJIN HLINTE BIO TECH에 기술이전 협약을 진행중임.

○ 뉴캐슬병(Newcastle disease) 생독 백신 검정의 조건에 따른 동물실험 모델

- 뉴캐슬병은 국내에 1일령 백신 정책이 안착되었으며, 이후 질병으로 인한 피해가 급격히 줄어들어 백신의 효과가 성공적이라고 평가됨
- 그러나 최근 동남아시아에서 유행하는 바이러스(7형)에 대한 대안이 제안되었고, 이에 따라 효과적인 백신 평가 및 사용을 위한 연구가 함께 진행됨.
- 약독 균주의 생독 백신으로서 사용은 바이러스의 특성에 따라 면역원성 형성 정도가 다를 수 있음. 특히 약독 균주라 할지라도 병원성, Trophism의 차이가 있음.
- 이에 착안하여 본 과제에서 분무입자에 따른 백신 효능 정도를 판별하는 동물시험 모델

을 확립하였음.

- 기존의 백신검정은 제조사가 지정하거나 또는 널리 사용되는 백신 분무기를 사용하였으나, 개발 검정법은 백신주에 따라 분무 입자의 정도까지 선정 할 수 있는 방법으로서 해외 백신 검정법에도 아직까지 적용되고 있지 못함.

○ 닭 마이코플라즈마 시노비아(Mycoplasma Synoviae) 감염증에 대한 동물 실험 모델

- 본 개발 시험법은 국내에 백신 검정 동물모델이 확립되어있지 않아 새롭게 시도한 사례임.
- 해외에서는 MS백신이 일찍이 도입되었고 이에 따라 검정법이 확립되어있음. 그러나 국내 MS백신 개발은 비교적 최근에 시작되었음.
- 이에 따라 백신을 평가하기 위한 동물 모델이 요구되었고, 해외 백신 평가방법과 유사하게 모델개발에 착수함.
- IB와 동시감염으로 인한 질병유발 모델을 만들고자 하였으나, 국내 유행 IB는 해외 균주와 상이하게 nephropathogenic IBV가 주로 유행함. 따라서 국내 유행 균주 또는 백신 균주를 이용한 질병 유발 모델을 만들기 위해 본 연구를 실시함.
- 특히 국내는 IB생백신의 1일령 분무가 시행되고 있으며, 추가 접종으로도 편의를 위해 생백신을 이용하는 경우가 많아 백신주와 동시감염 유발 모델이 요구됐음.
- 본 개발 모델은 해외 동물 시험 모델을 모사하였으나 국내 유행 IB 균주를 이용하여 국내 실정에 맞게 개조함.

○ 닭 괴사성 장염(Necrotic Enteritis)의 동물 실험 모델

- 괴사성 장염은 국내에 백신의 검정 동물모델이 확립되어있지 않아 새롭게 시도한 사례임.
- 백신 뿐 만아니라 항생제, 콕시듐 억제 사료첨가제 등 다각도로 시험하기위한 모델이 수요자로 하여금 동물 실험 모델을 개발하게 하였음.
- 괴사성 장염은 콕시듐증에 의해 유발되는 질병으로 가금의 식이에 영향을 받아 그 임상증상의 정도가 심화됨. 따라서 본 연구에서는 기존 해외 문헌 및 노하우를 바탕으로 장염의 정도를 판별하고 원충을 계수하는 방법을 동원하여 동물 질병 유발 모델의 지표를 선정함.
- 본 동물 모델 및 시험법 개발로 미국의 검정시험 모델에 근접한 수준의 민간위탁연구를 수행 할 수있게됨.

○ 소독제에 대한 품질 및 안전성/효능 평가시험 체계 개발

- 소독제의 효능평가 방법은 기존 동물용의약외품 소독제 검정법에 따라 SOP를 제작하였으며, GLP 체계에 따라 QAU 로 보증 시스템을 보장하는 형태로 개량됨.
- 소독제 안전성 평가 방법에 대한 구체적인 시험법이 국가 검정법에 제시되어있지 않음. 단, 기존 사용 원료와 동일한 제품에 대해서는 해외 안전성 자료를 인용하는 것으로 같음 하였음. 새로운 원료에 대해서는 자체 안전성 시험자료를 제출하면 평가 및 보완하는 방식임.

- 그러나 방역에 대한 의식수준이 높아지고 이에 따라 소독제의 사용량이 많아지면서, 환경 및 인체 노출량이 과거에 비해 많을 것으로 우려됨.
- 본 소독제 안전성 시험법은 기존 농약의 독성평가법을 동물용 소독제에 맞게 개조 및 차용한 것으로, 실제 판매 소독제 및 개발 소독제에 적용하여 실용성을 증명함.

5장. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

5-1절. 사업화대상기술의 개요

- 보유기술은 동물의 질병을 예방하기 위한 백신 개발 생산 기술로서 국내에서 분리하거나 제작한 항원(백신의 핵심 소재)을 포함
- 주식회사 카브는 현재 6가지 동물질병(가금 5종, 양돈 1종)에 대한 백신 개발 특허기술 (등록 5건, 출원 1건) 을 확보하고 있으며 국내 동물용 백신제조사에 기술이전되어 로열티 수익이 발생 중임
- 추가적으로 인플루엔자 바이러스에 저항성을 보이는 유산균에 대한 특허를 출원한 바 있으며 향후 살모넬라 억제용 가금용 기능성 사료첨가제 시장에 진출할 계획임

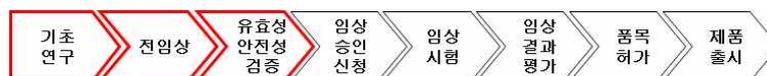
5-2절. 사업화대상기술의 핵심경쟁요인

- 국내에서 현재 주로 사용되고 있는 동물용 백신은 대부분 다국적 기업에서 생산한 수입 백신임. 다국적 기업에서 생산되는 백신의 항원은 외국에서 분리된 항원으로 국내에서 발생하는 질병에 대하여 방어능이 상대적으로 낮은 것으로 확인됨. 따라서 국내에서 분리된 항원을 사용한 백신 생산 기술을 활용한다면 기존 백신의 효능을 개선할 수 있을 것으로 기대됨
- 보유기술을 활용한 백신은 접종한 동물에서 높은 항체를 생산하도록 하며 현재 국내에서 유행하고 있는 병원체에 대하여 높은 방어능을 나타내는 백신임. 따라서 기존의 상용화된 백신과는 다르게 백신을 통한 효과적인 질병 예방이 가능함.
- 본 보유기술을 모방하기 위해서는 우수한 백신 후보주를 확보하는 것이 필수적임. 하지만 본 연구팀은 국내 양계, 양돈 농장뿐 아니라 도계장, 철새도래지, 재래시장 등에서 동물질병 조사를 진행하여 다량의 바이러스 균주를 보유하고 있으며, 현 질병현황 파악과 동시에 보유 균주에 대한 스크리닝 작업을 통해 현 유행 균주에 방어능이 탁월하며 다양한 변이주에 대한 방어능이 우수한 백신 후보주를 다수 확보하고 있고 그 중 적합한 백신을 선별하고 제작하여 특허를 확보하였기 때문에 모방가능성은 희박할 것으로 사료됨.

5-3절. 사업화대상기술의 지식재산권 현황

특허명	등록일	소유자	발명자	특허형태	보유국가
신규한 뉴캐슬병 바이러스 K148/08주, 및 그 바이러스를 함유하는 뉴캐슬병 백신	2011.12.21	주식회사 카브	송창선, 정승환, 이중복, 박승용, 최인수	등록	한국
신규 전염성 F낭병 바이러스 IBD K7주 및 이를 이용한 전염성 F낭병 백신	2015.04.07	주식회사 카브	송창선, 최강석	등록	한국
신규한 가금 아테노 바이러스 및 그 백신	2015.10.23	주식회사 카브	송창선, 이중복, 박승용, 최인수	등록	한국
신규한 조류메타뉴모바이러스 및 그 백신	2015.10.07	주식회사 카브	송창선, 이중복, 박승용, 최인수	등록	한국
전염성기관지염 바이러스 K40/09주 및 이를 이용한 전염성 기관지염 백신	2017.07.07	주식회사 카브	송창선, 이중복, 박승용, 최인수, 임태현	등록	한국
젖산균을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 예방 및 치료용 조성물	2017.06.14	주식회사 카브	송창선, 윤하나, 홍우택	등록	한국

- 현과제로 수행한 부분은 임상시험 전 단계인 개발 기술의 유효성 및 안전성 검증단계임



동물용 백신주 개발 및 효능평가 모델 개발 기술

- 1) 신규 백신주 (Vaccine strain) 개발 기술
 - 동물 질병 모니터링을 통한 백신 후보주 확보
 - 백신 후보주의 면역원성 및 방어능 확인
 - 백신 후보주의 약독화
 - 백신 개발 기술 융합을 통한 다양한 백신의 제작
- 2) 동물용 백신 실험 모델 개발 기술
 - 신규 제작 백신의 면역원성 및 방어 효능 검증 모델 개발
 - 신규 백신의 효능검정

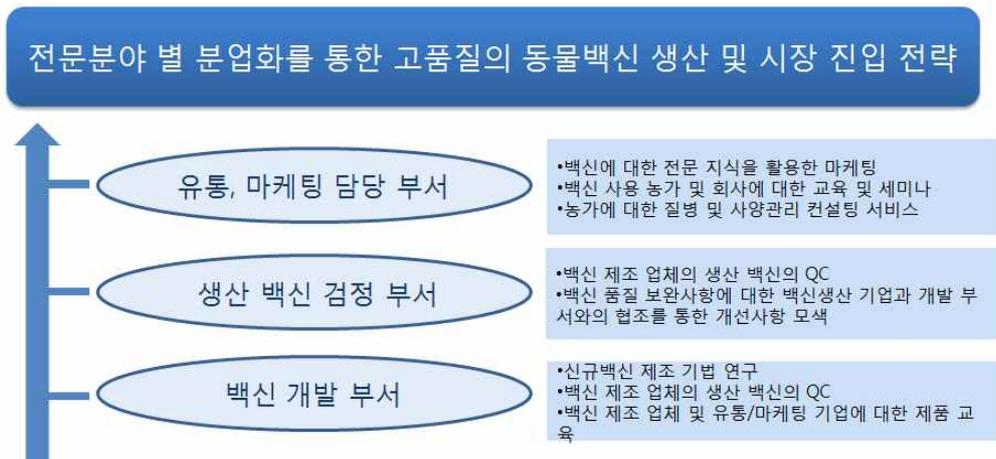
동물용 백신 개발과정 및 연구팀의 보유 핵심 기술

5-4절. 국내외 특허현황

- 동물용 백신 기술 관련 연도별 특허동향을 살펴보면, 1970년도 초반부터 최근까지 특허 출원 건수가 지속적으로 증가하고 있으며, 특히 1990년대 중반 이후부터 미국을 중심으로 급격한 증가 추세를 보이고 있음.
- 국가별로는 미국의 경우 1973년부터 특허가 발생되어 점차 증가하다가 1990년 후반부터 급격하게 출원건수가 증가하였으나, 이후 점차 급감되고 있는 추세임. 유럽·일본도 미국과 유사한 추세를 나타내고 있으며, 한국의 경우 1990년대 후반부터 출원건수가 증가하는 추세를 보이고 있으며, 2000년 후반 최고로 급증하여 최근까지 꾸준히 특허출원을 하고 있음.
- 국내출원인은 대부분이 다국적 기업이며, 그중에서 대한민국, 건국대학교, 중앙백신연구소, 카브가 국내국적을 가진 출원인이며, 건국대학교 및 카브의 특허는 본 과제 총괄책임자의 특허가 대부분임.
- 카브에서 개발된 신규 백신주들은 유효성 및 안전성이 검증되어 특허 출원 및 등록이 완료된 상태이며 국내 주요 동물용 백신 회사로 기술이전되어 로열티를 발생하고 있음.
- 기술이전이 완료된 백신주의 경우 각 회사의 제조공정을 통해 생산되어 동물용 의약품 평가기관에서 임상시험을 거친 후 평가결과에 따라 품목 허가를 받아 상품화되게 됨.

5-5절. 향후 민간위탁연구 및 사업화 계획

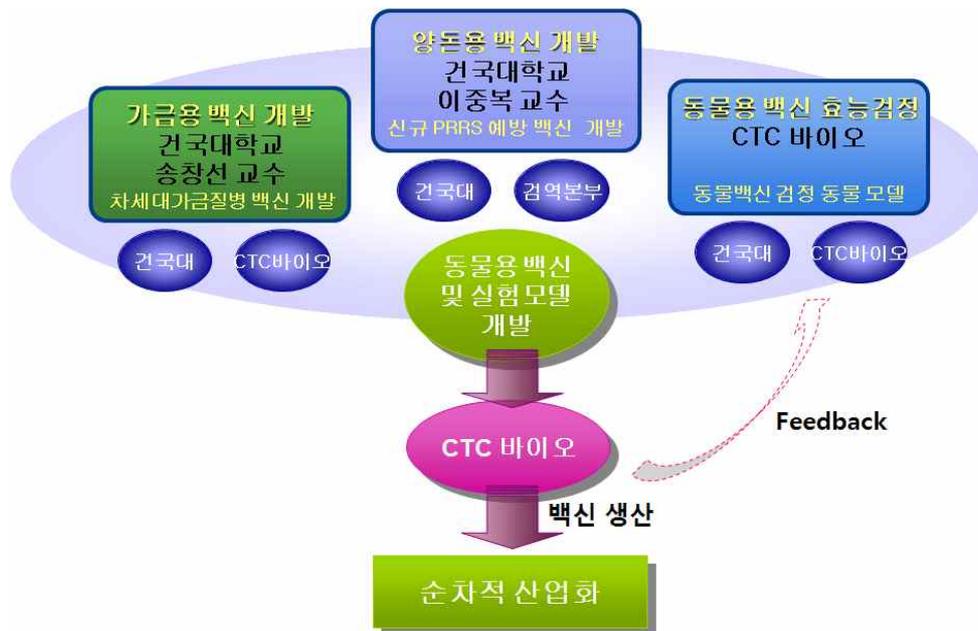
< 사업화 기술개발 추진전략 >



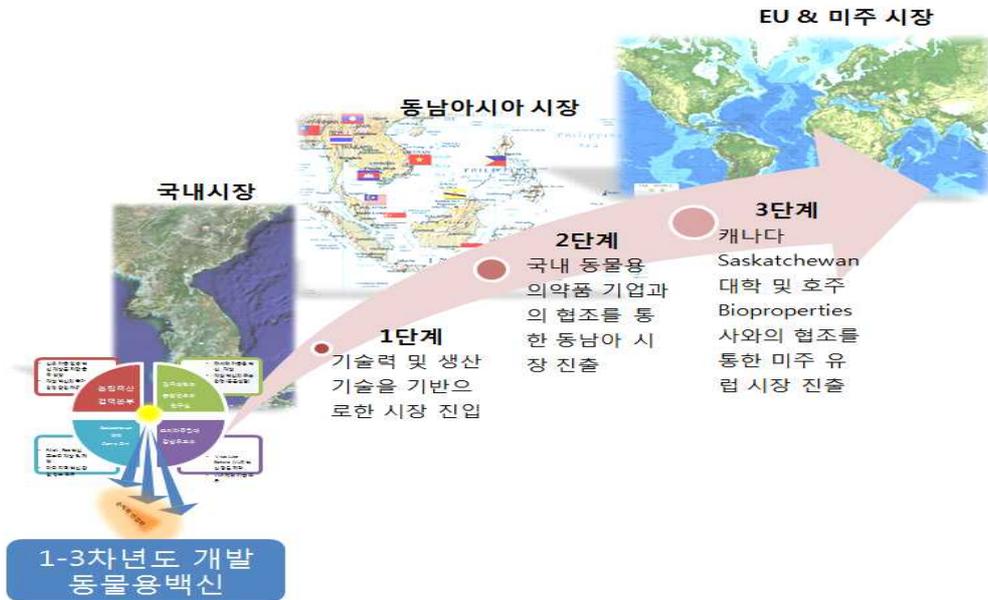
- 기존의 국내 및 다국적 백신 제조업체의 경우 백신의 개발 및 연구를 위한 국내 연구 시설이 부재한 상태임.
- 백신을 제조, 마케팅 및 판매까지 함께 하고 있어 백신의 제조 혹은 마케팅에 있어서 전문성이 뒤떨어지는 것이 현실임.
- 본 기업은 상기 그림에서 설명하는 바와 같이 백신의 개발, 제품검정, 유통 및 마

케팅을 전문으로 하는 세 개의 전문부서를 두어 각 분야의 전문성을 강화하여 시장으로의 진입을 모색하려함.

- 기존 동물약품제조업체들과는 차별화된 전문성이 높은 R&D 및 유통 자회사와 백신제조 업체의 기술력을 바탕으로 경쟁력 있는 높은 품질, 균일한 성능의 백신을 생산하여 시장으로의 진입을 할 계획임.
- 경쟁 제품에 비해 백신 생산 방식과 품질 및 기업구조에 있어 차별성을 갖고 있다는 점을 강조하여 경쟁을 할 계획임.
- 상품에 대한 이해를 돕기 위하여 잠재적 고객들을 상대로 세미나등을 개최하여 단기간에 사용 경험층을 만들 계획임.
- 현재 동물용 백신 시장은 다국적 기업의 점유율이 높은 것으로 보고되고 있으며, 그 중에서도 양계 백신은 상위 2개의 다국적 기업의 점유율이 50%에 이름
- 현 시장 상황을 극복하기 위하여 본 기업의 백신 개발 기술을 기반으로 국내 주요 동물백신 업체들의 참여를 유도하여 다국적 기업과 경쟁을 할 계획임.
- 국내 시장에서의 본 자회사 제품의 시장 점유율이 안정되는 시기에 국내 동물용 의약품 기업과의 협조를 통해 중국, 인도, 베트남, 요르단, 이집트 등 해외 시장으로의 진출을 모색할 계획임.
- 과제 종료 1차년도 계획(2017-2018)



- 과제 종료 2차년도 계획(2018-2019)



○ 장기 사업화 목표

구 분	사 업 화 년 도					
	(2018년) 과제종료후 1년	(2019년) 과제종료후 2년	(2020년) 과제종료후 3년	(2021년) 과제종료후 4년	(2022년) 과제종료후 5년	
사 업 화 품 목	동물용 백신					
투 자 계 획	인 건 비	3억	3억	4억	4억	4억
	재료비 및 설비투자비	4천만원	4천만원	4천만원	4천만원	4천만원
	경상운영비	1천만원	1천만원	1천만원	1천만원	1천만원
	계	2억 5천	2억 5천	2억 5천	2억 5천	2억 5천
생 산 계 획	기술이전 업체에서 생산					
판매계획 (단위:억원)	내 수	3억 5천	3억 5천	3억 5천	2억 5천	2억 5천
	수 출	-	-	70만 달러 (약 8.5억)	140만 달러 (약 16억)	140만 달러 (약 16억)
	계	2억 5천	2억 5천	11억	18억 5천	18억 5천

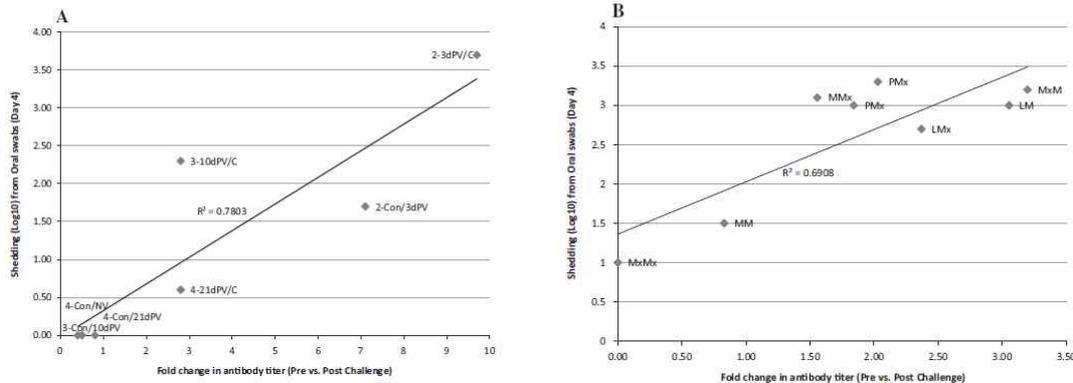
6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

○ Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses. Miller PJ, Afonso CL, El Attrache J, Dorsey KM, Courtney SC, Guo Z, Kapczynski DR. Dev Comp Immunol. 2013 Dec;41(4):505-13.

- 전통적으로 NDV는 class I과 class II의 두가지 주요한 유전형으로 구분되며, class II는 다시 세부적으로 16개의 genotype으로 나뉘어진다. NDV의 혈청형은 하나이나, 항원적으로나 유전적으로는 genotype간에 다양성이 관찰되고 있다. 최근 여러 나라에서 보고되고 있는 기존 백신의 실패는 현재 야외에서 돌고 있는 강독 NDV와 유전적으로 일치하는 새로운 백신의 개발을 요구한다. 이 논문에서는 사독백신에 의해 생성된 체액성 항체의 양과 특이도가 바이러스의 증식 및 방어능에 미치는 영향을 살펴 보았고, 생독백신에 의해 생성된 이형 항체가 vNDV의 전파와 어떤 연관이 있는지 측정하였다. 실험적인 조건 하에서, 모든 사독백신은 임상증상과 폐사를 막았으나, 바이러스 증식을 유의적으로 막기 위해서는 특이적이고 높은 양의 항체가 필요했다. 이때, 공격접종 바이러스와 유전적으로 같은 바이러스를 사용하였을 경우 좀 더 쉽게 바이러스 증식을 막을 수 있었다. 하지만 이형 항체가 충분히 높은 경우에도 바이러스의 전파를 막을 수는 없었다. 결론적으로 체액성 항체의 효능을 높이기 위해서는 공격접종 바이러스와의 유전적 상동성을 높임과 동시에, 면역 반응이 형성될 수 있는 최적의 시간이 필요한 것으로 보인다.



항체가와 바이러스 배출량의 상관관계

○ Genetic and antigenic variation of shedding viruses from vaccinated chickens after challenge with virulent Newcastle disease virus. Choi KS, Kye SJ, Kim JY, Lee HS. Avian Dis. 2013 Jun;57(2):303-6.

- LaSota로 백신한 그룹과 백신하지 않은 그룹에 vNDV variant E34Kmt를 공격접종한 후 배출되는 바이러스를 plaque assay를 통해 순수분리한 뒤 HN gene과 F gene의 시퀀스를 분석하였다. 모든 배출 바이러스의 F gene은 아미노산 시퀀스가 공격접종 바이러스와 동일하였으나, HN 단백질의 경우 백신 후 공격접종 그룹에서 4군데의 아미노산 치환이 발생하

였다. 아미노산 치환의 경우 347번에서 (K가 G나 V로) 자주 발생하였다. 몇몇 변이된 배출 바이러스 및 공격접종 바이러스 사이에는 약간의 항원적 차이가 존재하였지만, LaSota와의 항원적 R 값이 유의적으로 차이나지는 않았다. 이러한 결과는 백신 면역이 항원적 선택, 유전적 변이 등을 통해 바이러스의 진화를 촉진시킬 수도 있다는 점을 암시한다

Table 1. Amino acid (AA) substitutions in the HN protein of mutant viruses shed from vaccinated birds after challenge with NDV E347Kmt.

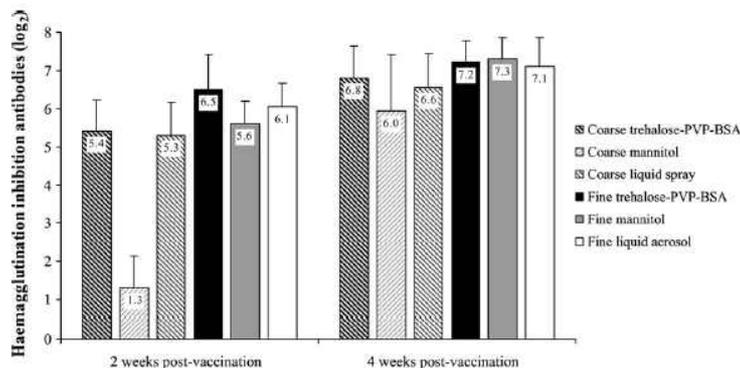
NDV	AA residue (nt sequence) ^A				GenBank accession no.
	72	347	466	517	
La Sota	S(TCT)	E(GAG)	V(GTT)	V(GTG)	AY845400
E347Kmt	S(TCT)	K(AAA)	I(ATT)	V(GTG)	JX047314
2.3.5d	P(CCT)	G(GGA)	I(ATT)	V(GTG)	JX047315
2.4.5d	P(CCT)	G(GGA)	I(ATT)	V(GTG)	JX047016
2.8.5d	S(TCT)	V(GTA)	V(GTT)	L(TTG)	JX047317
2.9.5d	P(CCT)	G(GGA)	I(ATT)	V(GTG)	JX047318
2.10.5d	S(TCT)	V(GTA)	I(ATT)	V(GTG)	JX047319

^ABold and italic type represent substitutions of amino acids and nucleotides, respectively, compared to NDV E347Kmt.

< 백신 후 공격접종군에서 배출된 변이 바이러스의 HN 단백질 중 치환 부위 >

○ Vaccination of broiler chickens with dispersed dry powder vaccines as an alternative for liquid spray and aerosol vaccination. Corbanie EA1, Vervaeet C, van Eck JH, Remon JP, Landman WJ. Vaccine. 2008 Aug 18;26(35):4469-76

- 본 논문은 분산형 건조 분말 형태의 백신과 상용화된 액상 백신을 비교하였다. Clone 30 NDV vaccine을 만니톨 혹은 trehalose, polyvinylpyrrolidone, bovine serum albumin의 합제를 부형제로 이용하여 분무건조 하였으며 각각의 백신은 30um 정도의 거친 분무 입자 크기와 7um 정도의 고운 분무 입자 크기를 갖도록 생산되었다. 상용 백신의 경우, 거친 액상 분무 (222um)와 고운 액상 분무 (24um)로 적용되었다. 분산/nebulization 시킨 후 공기 중에서 발생하는 바이러스 농도의 감소는 공기 포집을 통해 측정되었으며, 거친 입자의 침강과 고운 입자의 증발로 설명되었다. 백신은 4주령 육계의 혈청에서 높은 HI titer를 보였다. 입자의 증발로 인해 상당한 양의 바이러스 불활화가 발생하였음에도 불구하고 고운 액상 분무 그룹에서 높은 항체 반응이 나온 결과를 통해 입자 분무 방식을 사용한다면 백신 용량을 유의적으로 감소시킬 수 있을 것으로 예상되며 이러한 방식은 저역가 백신 분무 시 새로운 옵션을 제공할 수 있을 것으로 생각된다.



< 4주령 육계에 각각의 백신을 한 후 2주 및 4주 후의 HI titer 결과 >

- Evaluation of Factors Associated with infection of Commercial Layers with *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* Hussni O. Mohammed, Tim E. Carpenter and R. Yamamoto Avian Diseases, Vol.31, No. 3 (Jul -Sep., 1987)

Mycoplasma gallisepticum (MG)는 가금 산업에서 가장 난처한 결과를 초래하고 경제적으로도 큰 타격을 입히는 질병 중 하나이다. *M. synoviae* (MS) 또한 산란계 및 육계에서 MG와 비슷한 양상을 보이며 유행하는 질병이다.

Mycoplasma gallisepticum (MG) 또는 *M. synoviae* (MS) 감염에 연관되어 있을 수 있는 요소들을 조사하기 위하여 약 400개의 산란계 농장을 조사하였다. MG, MS 감염에 영향을 주는 요소들을 Vaccination factor와 Hygiene factor (위생 관련 요소)로 나누어서 정리하였고 통계학적 분석을 통하여 그들의 영향력을 계수(coefficients)로 산정하였다.

첫 번째로 Vaccination factor에서 Infectious bronchitis에 대한 백신을 많이 할수록 계수의 값이 작아져서 MG 감염에 덜 취약해지는 것을 알 수 있었고, Avian encephalomyelitis, Newcastle disease, ILT도 IB와 마찬가지로 백신을 여러 번 실시하거나 한번이라도 실시하였을 때 감염에 덜 취약해지는 것을 볼 수 있었다. MS 감염도 이와 마찬가지로 질병에 대한 백신을 실시 또는 다회 실시했을 시 감염에 덜 취약해지는 것을 확인하였다.

두 번째로 위생적인 요소에서 MG, MS 감염에 취약해질 수 있는 요소로는 죽은 개체를 치우는 빈도, 인공적인 환기, 노동자의 많은 일 분담이 있었고 감염에 덜 취약해질 수 있는 요소로는 화학비료처리, 분변을 치우는 빈도, 내부 냉방 시스템, 환기와 냉방의 상호작용 등이 있었다.

세 번째로 MG와 MS에 영향을 줄 수 있는 다른 요소들에 대한 분석 결과, 주령, F-strain vaccination 등을 분석하였고 각 요소들의 복합성을 파악하기 위해 주령, 백신의 정도, 위생의 정도, Multiple age, All-in-all-out 등의 요소들의 여부에 따라 분석하였다 <그림 1>. 분석 결과 계군의 나이가 많을 때, 다양한 주령이 한 계군에 있을 때, vaccination과 위생이 평균 이하의 수준이 때 감염계수가 증가하였다

Age	Vaccination/ housing hygiene level	Management system			
		Multiple-age		All-in-all-out	
		F-strain		F-strain	
		Yes	No	Yes	No
46-60 wks	+/+ ^A	N.C. ^B	0.29 ± 0.07 ^C	N.C.	0.14 ± 0.06
	-/-	N.C.	0.81 ± 0.05	N.C.	0.63 ± 0.08
	+/-	N.C.	0.48 ± 0.09	N.C.	0.27 ± 0.07
	-/+	N.C.	0.66 ± 0.08	N.C.	0.44 ± 0.10
>75 wks	+/+	0.86 ± 0.10	0.54 ± 0.08	0.46 ± 0.12	0.32 ± 0.08
	-/-	0.96 ± 0.02	0.92 ± 0.03	0.89 ± 0.05	0.83 ± 0.06
	+/-	0.83 ± 0.06	0.72 ± 0.07	0.66 ± 0.09	0.51 ± 0.12
	-/+	0.91 ± 0.04	0.84 ± 0.05	0.80 ± 0.07	0.69 ± 0.08

^A+ = above average and - = below average, e.g., +/- means that both the vaccination and hygiene levels for this flock were above average.

^BN.C. = not calculated.

^CValues are reported as probability ± standard error.

- W. J. M. Landman & A. Feberwee (2004) Aerosol-induced Mycoplasma synoviae arthritis: the synergistic effect of infectious bronchitis virus infection, Avian Pathology, 33:6, 591-598, DOI: 10.1080/03079450400013170

Infectious Bronchitis virus ($10^{4.5}$ median embryo infective dose) 감염이 Mycoplasma synoviae 감염에 주는 영향에 대한 연구 진행되었다. 약 5주령 산란계에 한 그룹은 IBV(D1466)야외주를 ocular-nasal route를 통해 감염 시킨 3일 후 10^{2-3} CFU의 M. synoviae를 감염시켰고 다른 한 그룹은 M. synoviae 만 감염, 양성 대조군으로 10^9 CFU의 M. synoviae를 intravenous route로 닭에 접종하였다. 그 결과 M. synoviae만 접종한 그룹에서는 31%가 관절염을 보였고 IBV와 혼합 감염을 시킨 그룹에서는 50%가 관절염을 보였다. 양성 대조군 에서는 95%에 관절염이 발생하였다. (Experiment1)

반복 실험에서는 그룹이 추가되어서 IBV M41주에 감염된 3일 후 M. synoviae을 aerosol로 감염시켰다. 이들 그룹에서는 M. synoviae를 14일 간격을 두고 두 번 접종하였다. ($\geq 10^{0-1}$ CFU/bird initially and $\geq 10^{1-3}$ after 14days). 10^6 CFU의 M. synoviae를 iv로 접종한 그룹이 양성대조군으로 설정되었다. 양성 대조군 중 50%는 14일 후 10^8 CFU의 M. synoviae가 재접종 되었다. M. synoviae만을 aerosol로 접종한 그룹에서는 21%가 관절염을 보였고, IBV D1466와 혼합감염 된 그룹에서는 33%, IBV M41이 혼합감염 된 그룹에서는 55%가 관절염을 보였다. 이후에 낮은 dose의 M. synoviae를 접종하였을 때는 11%가 관절에 병변을 나타냈다. 반면에 두 번 째 접종 이후에는 70%가 병변을 나타냈다. (Experiment 2.) 위 결과로 IBV가 M. synoviae에 의한 감염을 촉진시키고 IBV의 strain에 따라서 관절병변이 달라지는 것을 알 수 있다.

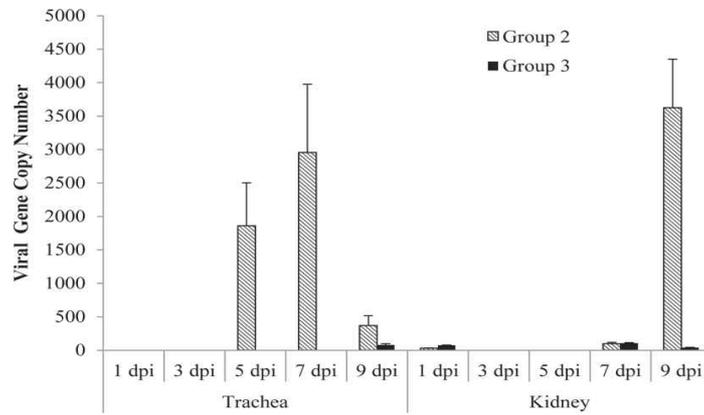
Group	<i>n</i> ^a	<i>M. synoviae</i> culture	Macroscopic arthritis	Microscopic arthritis	<i>n</i> ^a	<i>M. synoviae</i> culture	Macroscopic arthritis	Microscopic arthritis	Total arthritis (%)
Experiment 1	5 weeks post-aerosolization or inoculation				9 weeks post-aerosolization or inoculation				
ME broth	3	0/3	0/3	0/3	11	Not tested	0/11	0/5	0 ^b
<i>M. synoviae</i> aerosol	5	0/5	4/5	5/5	14	0/2	1/14	1/5	31.5 ^b
IBV D1466 and <i>M. synoviae</i> aerosol	5	1/5	5/5	5/5	13	1/3	4/13	4/5	50 ^b
<i>M. synoviae</i> intravenous	5	2/5	5/5	5/5	15	0/15	13/15	14/15	95 ^b
Experiment 2	6 weeks post-aerosolization or inoculation				14 weeks post-aerosolization or inoculation				
ME broth	7	0/7	0/7	0/7	13	Not tested	0/3	0/3	0
<i>M. synoviae</i> aerosol	6	1/6	3/6	3/6	13	1/1	1/13	1/13	21
<i>M. synoviae</i> aerosol and IBV D1466	7	1/7	6/7	6/7	11	Not tested	0/11	0/11	33
<i>M. synoviae</i> aerosol and IBV M41	7	1/7	7/7	7/7	13	0/4	4/13	4/13	55
<i>M. synoviae</i> intravenous	6	4/6	6/6	6/6	13	1/2	2/13	2/13	70 ^c

< Macroscopic & microscopic Arthritis in Experiment 1 and 2 >

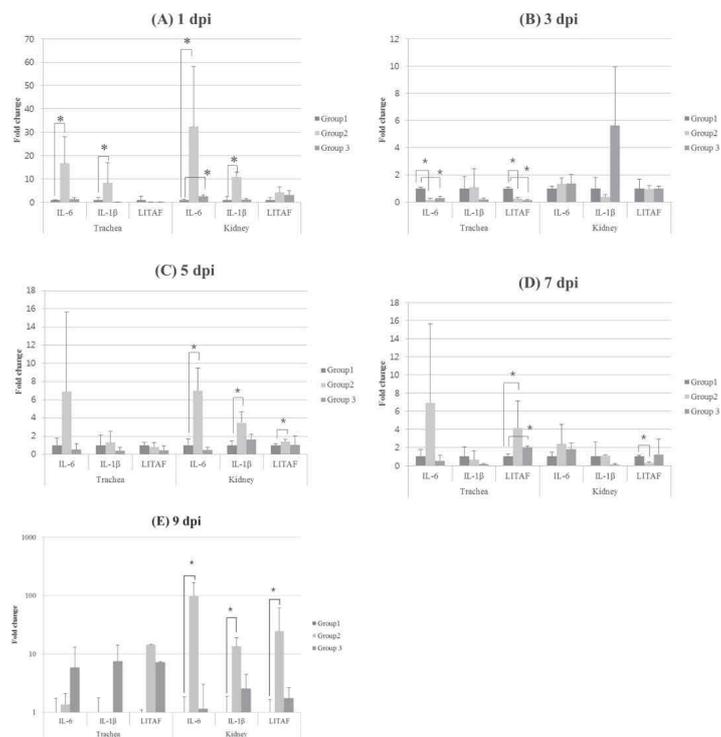
- Altered pro-inflammatory cytokine mRNA levels in chickens infected with infectious bronchitis virus.

Infectious Bronchitis (IB)는 전염성이 강하고 가금에서 급성바이러스 질병을 일으킨다. 이 바이러스는 호흡기계를 통해 감염되어서 신장, 생식샘, 장관계 등 다양한 상피세포에서 증식을 한다. 바이러스가 동정된 이래로 항원성 뿐만 아니라 병원성에 있어서도 다양한 종류의 분리주가 보고되었다. 이들은 유전자 분석법을 통해 S1 glycoprotein 유전자에 따라서 구분되어지고 있다. 한국에서는 3가지 genotype이 S1 sequence 분석을 통해 확인이 되었다. 하지만 이런 체계를 통한 바이러스의 tissue tropism 이 항상 실제 tissue tropism과는 차이가 있기 때문에 좀 더 세분화된 면역병리학적 IB 감염에 대한 연구가 필요하다. 따라서 이 실험에서는 2가지의 IBV strain을 접종한 후 선천적 면역과 관련된 세가지 pro-inflammatory cytokine의 수치를 transcriptional level에서 측정하여서 면역병리학적 기전을 파악하였다. 실험에는 KIIa genotype (Kr/ADL110002/2011) 바이러스와 ChVI genotype (Kr/ADL120003/2012) 바이러스가 사용되었고, IL-6, IL-1 β , lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α , 혈청 내 α 1-acid glycoprotein 의 농도가 측정되었다.

KIIa genotype의 감염시에는 임상 증상과 함께 과도한 pro-inflammatory cytokine의 생성과 함께 viral load 또한 높은 수치를 보여주었다. 또한 Viral copy number와 cytokine의 생산이 접종 7일째에 trachea에서, 9일째에 kidney에서 동시에 peak를 이루었다. 반면에 ChVI genotype virus에 감염된 닭에서는 감염 1일 째에 미약한 cytokine의 증가만을 보여주어서 바이러스가 성공적으로 체내에 침입을 한 것을 나타냈다. 위 실험을 통해 서로 다른 두 IBV 감염에서 다른 정도의 선천성 면역을 나타내는 것을 알 수 있고 과도한 선천성 면역이 닭에서 병리생리학적 효과의 정도에 영향을 준다는 것을 알 수 있다.



< IBV 감염 후 Trachea와 kidney에서의 viral load 측정. Group 2: KIla genotype, Group3: ChVI genotype >



< IBV 감염 후 pro-inflammatory cytokine의 mRNA 수준에서의 경과에 따른 정량분석. Group1: Unchallenged control group, Group2: KIla genotype, Group3: ChVI genotype group >

7장. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
해당없음	

8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
<p>○ 모든 병원체는 건국대학교 생물안전위원회의 '실험실 생물 안전관리 지침'에 따라 Biosafety cabinet 안에서 안전하게 실험을 진행함.</p> <p>○ 모든 연구수행자는 건국대학교에서 진행하는 동물윤리교육 및 생물안전교육 이수 후 실험을 진행함. 특히 새로이 발족한 민간위탁연구 대행조직 주식회사 카브는 다음 실험 수행자 5명에 대해 생물 및 LMO연구시설 교육을 득함</p> <p>(1) 송창선 17-01-155</p> <p>(2) 윤하나 17-01-156</p> <p>(2) 주효선 17-01-161</p> <p>(4) 이다예 17-01-157</p> <p>(5) 고성혜 17-01-150</p> <p>○ 본 실험실은 LMO 관리 실험실로 등록이 되어 있으며 건국대학교 생물안전위원회에서 제공하는 '생물 및 유전자변형생물체 연구시설 설치·운영·관리 점검표'를 기준으로 매일 점검을 실시함. 특히 새로이 발족한 민간위탁연구 대행조직 주식회사 카브는 연구시설에 대해 허가를 득함</p> <p>(1) 주식회사 카브 기업부설 연구소 시설신고번호 제 LML16-164호</p> <p>○ 연구수행 중 발생한 모든 감염성 폐기물은 건국대학교 생물안전위원회에서 제공하는 '감염성 폐기물 지침서'에 따라 감염성 폐기물 전문 처리 업체인 (주)부국크린에 양도하여 안전하게 처리함.</p> <p>○ 이외 모든 사항은 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」에 따른 연구실 안전조치를 성실히 이행하였으며, 「건국대학교 생물안전위원회 표준작업지침서」에 따라 모든 연구를 수행함.</p>	

10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Viscerotropic velogenic Newcastle Disease Virus Replication in Feathers of Infected Chicken	건국대학교	주저자 교신저 자	Journal of Veterinary Science/한국	1.164	2016/3/30	단독사사	SCI
2	논문	comparison between dot-immunoblot assay and clinical sign determination method to titer IB in eggs	건국대학교	주저자 교신저 자	Journal of Virological Methods/영 국	1.69	2016/1/21	단독사사	SCI
3	논문	Comparison of live Newcastle disease vaccines efficacy by different spray method (temporary title)	건국대학교	주저자 교신저 자	Avian Pathology/In ternational	1.59	Under review	단독사사	SCI
4	논문	Coinfection of Mycoplasma synoviae with Nephropathogenic Infectious Bronchitis Strains in SPF chickens	건국대학교	주저자 교신저 자	Avian Pathology/In ternational	1.59	Under review	단독사사	SCI
5	기타 (기술이 전)	신규한 가금 아테노바이러스 및 그 불활화 단미 오일 백신	주식회사 카브	제3자 통상실 시권이 전	한국	중앙백신연구소			
6	기타 (기술이 전)	신규한 가금 아테노바이러스 및 그 불활화 단미 오일 백신	주식회사 카브	제3자 통상실 시권이 전	한국	대성미생물연구소			
7	기타 (기술이 전)	면역원성이 증강된 돼지 생식기 호흡기증후군 바이러스의 제작과 그 이용	주식회사 카브	제3자 통상실 시권이 전	한국	대성미생물연구소			
8	기타 (기술이 전)	면역원성이 증강된 돼지 생식기 호흡기증후군 바이러스의 제작과 그 이용	주식회사 카브	제3자 통상실 시권이 전	한국	고려비엔피			
9	기타 (학술대 회)	Development of infectious bronchitis virus (IBV) ELISA kit for detection of antibodies against nephropathogenic IBV vaccine	건국대학교	주저자 교신저 자	American association of avian pathologists (AAAP) annual meeting 2015	-	2015/7/11	단독사사	-
10	기타 (학술대 회)	Comparison between Dot-immunoblotting Assay and Clinical Sign Determination Method for Quantifying Avian Infectious Bronchitis Virus Vaccine	건국대학교	주저자 교신저 자	대한수의학회(국제학회)	-	2015/10/29	단독사사	-
11	기타 (학술대 회)	Reversion to virulence test for novel Korean nephropathogenic IBV (Chicken Infectious	건국대학교	주저자 교신저	한국실용동물학 회	-	2016/2/18	단독사사	-

		Bronchitis virus) Vaccine candidate		자					
12	기타 (학술대회)	Toxicities of disinfectants of animal health and sanitation products using different test organisms	건국대학교	주저자 교신저자	대한수의학회(국제학회)	-	2016/10/28	단독사사	-
13	기타 (학술대회)	Comparison of Newcastle disease vaccines administered as different spraying machines in relation to immune response and protective efficacy in day old c	건국대학교	주저자 교신저자	대한수의학회(국제학회)	-	2016/10/28	단독사사	-
14	기타 (수상)	수의가금우수논문상	건국대학교	-	대한수의학회(국제학회)	-	2015/10/28	-	-
15	기타 (수상)	장관표창	건국대학교	-	교육부	-	2015/10/30	-	-
16	기타 (수상)	수의가금우수논문상	건국대학교	-	대한수의학회(국제학회)	-	2016/10/29	-	-

11장. 기타사항

코드번호	D-13
<ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="167 309 1420 387">○ 최근 가습기 살균제, 생리대 독성, 살충제 계란 등의 사건으로 비추어 볼 때 국민의 식품 및 의약품에 대한 안전 의식이 높아지고 있음.<li data-bbox="167 405 1420 526">○ 이에 따라 동물용의약품 소독제도 사안의 중요도를 따져가며 환경 및 인체 독성 평가를 느슨하게 할 경우 장기적으로 나쁜 결과를 초래 할 수 있음. 따라서 이 부분에 대해 환경 독성 부분은 환경부, 인체 독성 부분은 보건복지부에서 관심을 기울여야 할 것임.	

12장. 참고문헌

코드번호	D-14
○	Rosales RS, Puleio R, Loria GR, Catania S, Nicholas RAJ. Mycoplasmas: Brain invaders? <i>Res Vet Sci.</i> 2017 Sep 5;113:56-61
○	Umar S, Tanweer M, Iqbal M, Shahzad A, Hassan F, Usman M, Sarwar F, Qadir H, Asif S, Un-Nisa Q, Younus M, Ali A, Akbar M, Towakal F, Shah MA. Mycoplasma synoviae vaccine modifies virus shedding and immune responses of avian influenza (H9N2) infection in commercial layers. <i>Poult Sci.</i> 2017 Sep 1;96(9):3086-3095.
○	Xue J, Xu MY, Ma ZJ, Zhao J, Jin N, Zhang GZ. Serological investigation of Mycoplasma synoviae infection in China from 2010 to 2015. <i>Poult Sci.</i> 2017 Sep 1;96(9):3109-3112.
○	Kammon A, Mulatti P, Lorenzetto M, Ferre N, Sharif M, Eldaghayes I, Dayhum A. Biosecurity and geospatial analysis of mycoplasma infections in poultry farms at Al-Jabal Al-Gharbi region of Libya. <i>Open Vet J.</i> 2017;7(2):81-85.
○	Sun SK, Lin X, Chen F, Wang DA, Lu JP, Qin JP, Luo TR. Epidemiological investigation of Mycoplasma Synoviae in native chicken breeds in China. <i>BMC Vet Res.</i> 2017 Apr 26;13(1):115.
○	Kreizinger Z, Sulyok KM, Gróznér D, Bekő K, Dán Á, Szabó Z, Gyuranecz M. Development of mismatch amplification mutation assays for the differentiation of MS1 vaccine strain from wild-type Mycoplasma synoviae and MS-H vaccine strains. <i>PLoS One.</i> 2017 Apr 18;12(4):e0175969.
○	El-Gazzar M, Ghanem M, McDonald K, Ferguson-Noel N, Raviv Z, Slemons RD. Development of Multilocus Sequence Typing (MLST) for Mycoplasma synoviae. <i>Avian Dis.</i> 2017 Mar;61(1):25-32.
○	Dijkman R, Feberwee A, Landman WJM. Development, validation and field evaluation of a quantitative real-time PCR able to differentiate between field Mycoplasma synoviae and the MS-H-live vaccine strain. <i>Avian Pathol.</i> 2017 Aug;46(4):403-415.
○	Messa Júnior A, Taunde P, Zandamela AF, Junior AP, Chilundo A, Costa R, Bila CG. Serological Screening Suggests Extensive Presence of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae in Backyard Chickens in Southern Mozambique. <i>J Vet Med.</i> 2017;2017:2743187.
○	Feberwee A, Dijkman R, Klinkenberg D, Landman WJM. Quantification of the horizontal transmission of Mycoplasma synoviae in non-vaccinated and MS-H-vaccinated layers. <i>Avian Pathol.</i> 2017 Aug;46(4):346-358.
○	Sun S, Lin X, Liu J, Tian Z, Chen F, Cao Y, Qin J, Luo T. Phylogenetic and pathogenic analysis of Mycoplasma Synoviae isolated from native chicken breeds in China. <i>Poult Sci.</i> 2017 Jul 1;96(7):2057-2063.
○	Hutton S, Bettridge J, Christley R, Habte T, Ganapathy K. Detection of infectious bronchitis virus 793B, avian metapneumovirus, Mycoplasma gallisepticum and

Mycoplasma synoviae in poultry in Ethiopia. *Trop Anim Health Prod.* 2017 Feb;49(2):317–322.

- Limpavithayakul K, Sasipreeyajan J, Pakpinyo S. Characterization of Thai *Mycoplasma synoviae* Isolates by Sequence Analysis of Partial *vlhA* Gene. *Avian Dis.* 2016 Dec;60(4):810–816
- Ghaniei A. Molecular characterization of *Mycoplasma synoviae* isolated from broiler chickens of West Azarbaijan province by PCR of *vlhA* gene. *Vet Res Forum.* 2016 Summer;7(3):197–202. Epub 2016 Sep 15.
- Uddin MI, Abid MH, Islam MS, Rakib TM, Sen AB, Chowdhury SM, Anwar MN, Kamaruddin KM. Molecular identification of *Mycoplasma synoviae* from seroprevalent commercial breeder farms at Chittagong district, Bangladesh. *Vet World.* 2016 Oct;9(10):1063–1069. Epub 2016 Oct 10.
- Parsons NJ, Gous TA, Schaefer AM, Vanstreels RE. Health evaluation of African penguins (*Spheniscus demersus*) in southern Africa. *Onderstepoort J Vet Res.* 2016 Sep 20;83(1):e1–e13.
- Catania S, Gobbo F, Bilato D, Gagliazzo L, Moronato ML, Terregino C, Bradbury JM, Ramírez AS. Two strains of *Mycoplasma synoviae* from chicken flocks on the same layer farm differ in their ability to produce eggshell apex abnormality. *Vet Microbiol.* 2016 Sep 25;193:60–6.
- Kuo HC, Lo DY, Chen CL, Tsai YL, Ping JF, Lee CH, Lee PA, Chang HG. Rapid and sensitive detection of *Mycoplasma synoviae* by an insulated isothermal polymerase chain reaction-based assay on a field-deployable device. *Poult Sci.* 2017 Jan 1;96(1):35–41. Epub 2016 Jul 7.
- Catania S, Gobbo F, Ramirez AS, Guadagnini D, Baldasso E, Moronato ML, Nicholas RA. Erratum to: Laboratory investigations into the origin of *Mycoplasma synoviae* isolated from a lesser flamingo (*Phoeniconaias minor*). *BMC Vet Res.* 2016 Apr 12;12:75.
- Catania S, Gobbo F, Ramirez AS, Guadagnini D, Baldasso E, Moronato ML, Nicholas RA. Laboratory investigations into the origin of *Mycoplasma synoviae* isolated from a lesser flamingo (*Phoeniconaias minor*). *BMC Vet Res.* 2016 Mar 12;12:52.
- Feichtner F, Schachner A, Berger E, Hess M. Development of sensitive indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for specific detection of antibodies against fowl adenovirus serotypes 1 and 4 in chickens. *Avian Pathol.* 2017 Aug 29:1–31.
- Pan Q, Yang Y, Gao Y, Qi X, Liu C, Zhang Y, Cui H, Wang X. An Inactivated Novel Genotype Fowl Adenovirus 4 Protects Chickens against the Hydropericardium Syndrome That Recently Emerged in China. *Viruses.* 2017 Aug 8;9(8). pii: E216.
- Ackford JG, Corredor JC, Pei Y, Krell PJ, Bédécarrats G, Nagy EV. Foreign gene expression and induction of antibody response by recombinant fowl adenovirus-9-based vectors with exogenous promoters. *Vaccine.* 2017 Sep 5;35(37):4974–4982.
- Du D, Zhang P, Li X, Tian H, Cheng Y, Sheng D, Han X, Shan Y, Li X, Yuan Y,

Zhang H, Xue J, Liu W, Tian K. Cell-culture derived fowl adenovirus serotype 4 inactivated vaccine provides complete protection for virus infection on SPF chickens. *Virusdisease*. 2017 Jun;28(2):182-188.

- Wang X, Wang X, Jia Y, Wang C, Han Q, Lu ZH, Yang Z. Adenoviral-expressed recombinant granulocyte monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) enhances protective immunity induced by inactivated Newcastle Disease Virus (NDV) vaccine. *Antiviral Res*. 2017 Aug;144:322-329.
- Shah MA, Ullah R, March M, Shah MS, Ismat F, Habib M, Iqbal M, Onesti S, Rahman M. Overexpression and characterization of the 100K protein of Fowl adenovirus-4 as an antiviral target. *Virus Res*. 2017 Jun 15;238:218-225.
- Li PH, Zheng PP, Zhang TF, Wen GY, Shao HB, Luo QP. Fowl adenovirus serotype 4: epidemiology, pathogenesis, diagnostic detection, and vaccine strategies. *Poult Sci*. 2017 May 12.
- Shah MS, Ashraf A, Khan MI, Rahman M, Habib M, Chughtai MI, Qureshi JA. Fowl adenovirus: history, emergence, biology and development of a vaccine against hydropericardium syndrome. *Arch Virol*. 2017 Jul;162(7):1833-1843.
- Sarfraz M, Suleman M, Tikoo SK, Wheler C, Potter AA, Gerdt V, Dar A. Immune responses to in ovo vaccine formulations containing inactivated fowl adenovirus 8b with poly[di(sodium carboxylatoethylphenoxy)]phosphazene (PCEP) and avian beta defensin as adjuvants in chickens. *Vaccine*. 2017 Feb 7;35(6):981-986.
- Dhama K, Gowthaman V, Karthik K, Tiwari R, Sachan S, Kumar MA, Palanivelu M, Malik YS, Singh RK, Munir M. Haemorrhagic enteritis of turkeys - current knowledge. *Vet Q*. 2017 Dec;37(1):31-42.
- Changjing L, Haiying L, Dongdong W, Jingjing W, Youming W, Shouchun W, Jida L, Ping L, Jianlin W, Shouzhen X, Shangjin C, Yi Z, Yanbo Y. Characterization of fowl adenoviruses isolated between 2007 and 2014 in China. *Vet Microbiol*. 2016 Dec 25;197:62-67.
- Mahsoub HM, Evans NP, Beach NM, Yuan L, Zimmerman K, Pierson FW. Real-time PCR-based infectivity assay for the titration of turkey hemorrhagic enteritis virus, an adenovirus, in live vaccines. *J Virol Methods*. 2017 Jan;239:42-49.
- Li Y, Fu J, Chang S, Fang L, Cui S, Wang Y, Cui Z, Zhao P. Isolation, identification, and hexon gene characterization of fowl adenoviruses from a contaminated live Newcastle disease virus vaccine. *Poult Sci*. 2017 May 1;96(5):1094-1099.
- Hess M. Commensal or pathogen - a challenge to fulfil Koch's Postulates. *Br Poult Sci*. 2017 Feb;58(1):1-12.
- Park HS, Lim IS, Kim SK, Kim TK, Park CK, Yeo SG. Molecular analysis of the hexon, penton base, and fiber-2 genes of Korean fowl adenovirus serotype 4 isolates from hydropericardium syndrome-affected chickens. *Virus Genes*. 2017 Feb;53(1):111-116.
- Lokhandwala S, Waghela SD, Bray J, Martin CL, Sangewar N, Charendoff C, Shetti R,

- Ashley C, Chen CH, Berghman LR, Mwangi D, Dominowski PJ, Foss DL, Rai S, Vora S, Gabbert L, Burrage TG, Brake D, Neilan J, Mwangi W. Induction of Robust Immune Responses in Swine by Using a Cocktail of Adenovirus-Vectored African Swine Fever Virus Antigens. *Clin Vaccine Immunol.* 2016 Nov 4;23(11):888-900. Print 2016 Nov.
- Yugo DM, Hauck R, Shivaprasad HL, Meng XJ. Hepatitis Virus Infections in Poultry. *Avian Dis.* 2016 Sep;60(3):576-88.
 - Marek A, Kaján GL, Kosiol C, Benkő M, Schachner A, Hess M. Genetic diversity of species Fowl aviadenovirus D and Fowl aviadenovirus E. *J Gen Virol.* 2016Sep;97(9):2323-32.
 - Harakuni T, Andoh K, Sakamoto R, Tamaki Y, Miyata T, Uefuji H, Yamazaki K, Arakawa T. Fiber knob domain lacking the shaft sequence but fused to a coiled coil is a candidate subunit vaccine against egg-drop syndrome. *Vaccine.* 2016 Jun 8;34(27):3184-90.
 - Schachner A, Marek A, Grafl B, Hess M. Detailed molecular analyses of the hexon loop-1 and fibers of fowl aviadenoviruses reveal new insights into the antigenic relationship and confirm that specific genotypes are involved in field outbreaks of inclusion body hepatitis. *Vet Microbiol.* 2016 Apr 15;186:13-20.
 - Sabouri F, Vasfi Marandi M, Bashashati M. Characterization of a novel VIII sub-genotype of Newcastle disease virus circulating in Iran. *Avian Pathol.* 2017 Sep 6:1-44.
 - Takamura-Ishii M, Miura T, Nakaya T, Hagiwara K. Induction of antitumor response to fibrosarcoma by Newcastle disease virus-infected tumor vaccine. *Med Oncol.* 2017 Sep 1;34(10):171.
 - Mayahi V, Esmaelizad M. Molecular evolution and epidemiological links study of Newcastle disease virus isolates from 1995 to 2016 in Iran. *Arch Virol.* 2017 Sep 1.
 - Parikh SR, Lucidarme J, Bingham C, Warwicker P, Goodship T, Borrow R, Ladhani SN. Meningococcal B Vaccine Failure With a Penicillin-Resistant Strain in a Young Adult on Long-Term Eculizumab. *Pediatrics.* 2017 Sep;140(3). pii: e20162452.
 - de Graaf H, Sukhtankar P, Arch B, Ahmad N, Lees A, Bennett A, Spowart C, Hickey H, Jeanes A, Armon K, Riordan A, Herberg J, Hackett S, Gamble C, Shingadia D, Pallett A, Clarke SC, Henman P, Emonts M, Sharland M, Finn A, Pollard AJ, Powell C, Marsh P, Ballinger C, Williamson PR, Clarke NM, Faust SN. Duration of intravenous antibiotic therapy for children with acute osteomyelitis or septic arthritis: a feasibility study. *Health Technol Assess.* 2017 Sep;21(48):1-164.
 - Pitcovski J, Pitcovski E, Goldenberg D, Shahar E. Pair-epitopes vaccination: enabling offspring vaccination in the presence of maternal antibodies. *Avian Pathol.* 2017 Aug 22:1-4.
 - Malo A, de Wit S, Swart WAJM, Cook JKA. Alternative methods to compare safety of live-attenuated respiratory Newcastle disease vaccines in young chicks. *VetRec.* 2017

Sep 2;181(9):236.

- Hungerford D, Smith K, Tucker A, Iturriza-Gómara M, Vivancos R, McLeonard C, ACunliffe N, French N. Population effectiveness of the pentavalent and monovalent rotavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMC Infect Dis.* 2017 Aug 15;17(1):569.
- Liu J, Zhu J, Xu H, Li J, Hu Z, Hu S, And XW, Liu X. Effects of the HN Antigenic Difference between the Vaccine Strain and the Challenge Strain of Newcastle Disease Virus on Virus Shedding and Transmission. *Viruses.* 2017 Aug 15;9(8). pii: E225.
- Taebipour MJ, Dadras H, Nazifi S, Afsar M, Ansari-Lari M. Evaluation of blood monocyte and lymphocyte population in broiler chicken after vaccination and experimental challenge with Newcastle disease virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2017 Aug;190:31-38.
- El-Faham MH, Wheatcroft-Francklow KJ, Price HP, Sayers JR, Doenhoff MJ. Schistosoma mansoni cercarial elastase (SmCE): differences in immunogenic properties of native and recombinant forms. *Parasitology.* 2017 Sep;144(10):1356-1364.
- Choi KS. Newcastle disease virus vectored vaccines as bivalent or antigen delivery vaccines. *Clin Exp Vaccine Res.* 2017 Jul;6(2):72-82.
- Asl Najjari AH, Nili H, Asasi K, Mosleh N, Rohollahzadeh H, Mokhayeri S. Efficacy of thermostable I-2 Newcastle disease vaccine compared to B1 commercial vaccine in broiler chicken. *Iran J Vet Res.* 2017 Spring;18(2):103-107.
- Hemmatzadeh F, Kazemimanesh M. Detection of specific antigens of Newcastle disease virus using an absorbed Western blotting method. *Iran J Vet Res.* 2017 Spring;18(2):92-96.
- Wang X, Wang X, Jia Y, Wang C, Han Q, Lu ZH, Yang Z. Adenoviral-expressed recombinant granulocyte monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) enhances protective immunity induced by inactivated Newcastle Disease Virus (NDV) vaccine. *Antiviral Res.* 2017 Aug;144:322-329.
- Orabi A, Hussein A, Saleh AA, El-Magd MA, Munir M. Evolutionary insights into the fusion protein of Newcastle disease virus isolated from vaccinated chickens in 2016 in Egypt. *Arch Virol.* 2017 Jul 8.
- Yeates L, Slatter MA, Gennery AR. Infusion of Sibling Marrow in a Patient with Purine Nucleoside Phosphorylase Deficiency Leads to Split Mixed Donor Chimerism and Normal Immunity. *Front Pediatr.* 2017 Jun 19;5:143.
- Kim SH, Samal SK. Heterologous prime-boost immunization of Newcastle disease virus vectored vaccines protected broiler chickens against highly pathogenic avian influenza and Newcastle disease viruses. *Vaccine.* 2017 Jul 24;35(33):4133-4139.
- Taylor TL, Miller PJ, Olivier TL, Montiel E, Cardenas Garcia S, Dimitrov KM, Williams-Coplin D, Afonso CL. Repeated Challenge with Virulent Newcastle Disease Virus Does Not Decrease the Efficacy of Vaccines. *Avian Dis.* 2017 Jun;61(2):245-249.

- Esmailnejad A, Nikbakht Brujeni G, Badavam M. LEI0258 microsatellite variability and its association with humoral and cell mediated immune responses in broiler chickens. *Mol Immunol.* 2017 Jun 26;90:22-26.

13장. 추가보완사항

추가 보완 항목	평가 의견	답변
연구 수행	닭질병 위주의 연구 수행	<p>본 과제 최초 수립 및 선정 당시 닭 질병에 집중하여 연구개발 할 것을 제안하였음. 동물용의약품 CRO로서 산업 및 반려 동물 연구를 위해서 본 연구팀의 전문 분야인 가금 질병 연구를 우선적으로 수행하였음. 모든 축종에 대한 연구를 동시 다발적으로 수행하기보다 선택과 집중으로 CRO 자립화 달성에 초점을 둬. 향후 (주)카브의 연구 방향은 양돈 질병분야에 대한 투자 비중이 높아 질 것이며, 실제로 연구 3차년에 양돈 질병에 대한 CRO를 1건 수행 한 기록이 있음.</p>
과제 활용	개인회사 설립 관련 부분임으로 연구차원의 지원은 부적절함	<p>비록 본 과제로 탄생한 CRO가 이윤을 창출하는 기업 형태로 출발 한 것은 사실이나, 선정 당시 목적은 이 분야의 선도적 CRO를 최초로 설립하기 위함이었으며, 이것은 동물용의약품 전체에 양질의 서비스를 지원하는 측면에서 긍정적인 측면이 있음. 또한 이전에 개인 회사 또는 일부 연구팀에 한정되어 이루어지던 연구를 서비스 형태의 사업으로 양성화하여 위탁자(소비자) 입장에서 비교 할수 있음. 본 과제 수행 기간 동안 개발 시험법에 대해 CRO 서비스를 업계에 무상으로 제공한 점도 산업에 기여하였다고 사료됨</p>
불량 이유	없음	없음

주 의

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