

발간등록번호

11-1543000-002011-01

돼지  
대장균성  
이유자돈  
설사증  
및  
부종병  
백신개발  
  
농림축산식품부

돼지 대장균성 이유자돈 설사증 및  
부종병 백신 개발

(Development of vaccines for  
postweaning diarrhea and edema  
disease in pigs)

주관연구기관: 충북대학교 산학협력단  
협동연구기관: 농림축산검역본부  
중앙백신연구소

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지 대장균성 이유자돈 설사증 및 부종병 백신 개발” (개발기간 : 2014. 9. 25 ~ 2017. 9. 24) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 11.

주관연구기관명 : 충북대학교 산학협력단 (대표자) 이완규 (인)

제1협동연구기관명 : 농림축산검역본부 (대표자) 김종완 (인)

제2협동연구기관명 : 중앙백신연구소 (대표자) 원호근 (인)

주관연구책임자 : 이완규

제1협동연구책임자 : 김종완

제2협동연구책임자 : 원호근

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	114058-3	해당단계 연구기간	2014.9.25- 2017.9.24.	단계구분	(해당단계)/ (총단계)
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	돼지 대장균성 이유자돈 설사증 및 부종병 백신 개발			
연구책임자	이완규	해당단계 참여 연구원 수	총: 66명 내부: 63명 외부: 3명	해당단계 연구개발비	정부:540,000천원 민간:187,500천원 계:736,500천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 66명 내부: 63명 외부: 3명	총연구개발비	정부:540,000천원 민간:187,500천원 계:736,500천원
연구기관명 및 소속부서명	충북대학교 산학협력단			참여기업명	제1협동연구기관: 농림축산검역본부 제2협동연구기관: 중앙백신연구소
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 부종병 독소 대량생산 기법을 활용해 돼지 설사병 예방용 백신 조성물을 개발하였으며, 이 내용을 바탕으로 특허 출원 3건 (10-2016-0093099, 10-2016-0093101, 10-2015-0077810)과 특허 등록(1020150077810) 1건을 달성하였음. 또한 이 특허출원은 ㈜ 중앙백신연구소에 3건의 유상기술로 이전 실시가 완료되었음.</li> <li>2. 부종병 대장균 공정 개선방법을 통하여 대량의 Stx2e를 발현 시켰으며 이 독소를 포함한 대장균 자가백신을 개발, 2017년 1월 2일 제품을 출시하였으며 금년도 119,600천원의 매출액과 1명의 고용인원을 달성하였음.</li> <li>3. <i>E. coli</i> KVCC- BA1500104 (KCTC18389P)균주를 확보하여 부종병 대장균 배양기술 및 Stx2e 발현 기술을 확보하였으며, 2016년 11월 9일 농림축산 검역본부에 동물용의약품 임상시험 계획승인을 완료하고, 2017년 6월 8일 허가서류를 제출하고 현재 품목허가를 대기 중에 있음.</li> <li>4. 본 연구과제를 통하여 특허출원 3건, 등록 1건, 기술실시 3건, 기술료 3건, 제품화 3건, 매출액달성 1건, 고용창출 1건, 논문 1건, 학술발표 12건, 교육지도 5건, 인력양성 4건 홍보전시 3건, 기타 6건의 연구성과를 달성하였음.</li> </ol>				109	

## 〈 요약 문 〉

	코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	1. 국내 돼지 설사병 중 가장 경제적 피해가 심한 이유자돈 설사병 (postweaning diarrhea) 및 부종병 (edema disease)에 대한 예방백신 개발 2. 돼지 대장균 이유자돈 설사병 및 부종병 예방백신 효능평가를 위한 농장시험 3. 돼지 대장균설사병 및 부종병 백신 산업화				
연구개발성과	1. 부종병 독소 대량생산 기법을 활용해 돼지 설사병 예방용 백신 조성물을 개발 하였으며, 이 내용을 바탕으로 특허 출원 3건(10-2016-0093099, 10-2016-0093101, 10-2015-0077810)과 특허등록(1020150077810) 1건을 달성하였음. 또한 이 특허출원은 (주)중앙백신연구소에 3건의 유상기술로 이전 실시가 완료되었음. 2. 부종병 대장균 공정 개선방법을 통하여 대량의 Stx2e를 발현시켰으며 이 독소를 포함한 대장균 자가백신을 개발, 2017년 1월 2일 제품을 출시하였으며 금년도 119,600천원의 매출액과 1명의 고용인원을 달성하였음. 3. <i>E. coli</i> KVCC- BA1500104 (KCTC18389P)균주를 확보하여 부종병 대장균 배양기술 및 Stx2e 발현 기술을 확보하였으며, 2016년 11월 9일 농림축산검역본부에 동물용의약품 임상시험 계획승인을 완료하고, 2017년 6월 8일 허가서류를 제출하고 현재 품목허가를 대기 중에 있음. 4. 본 연구과제를 통하여 특허출원 3건, 등록 1건, 기술실시 3건, 기술료 3건, 제품화 3건, 매출액달성 1건, 고용창출 1건, 논문 1건, 학술발표 12건, 교육지도 5건, 인력양성 4건 홍보전시 3건, 기타 6건의 연구성과를 달성하였음.				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	1. 돼지 이유자돈 대장균 설사병 및 부종병 예방백신 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>· 국내 돼지 이유자돈 설사병 및 부종병 백신 개발을 통한 농가 생산성 증대</li> <li>· 돼지 이유자돈 설사병, 부종병을 백신 개발을 통한 산업화 및 수출증대</li> </ul> 2. 돼지 이유자돈 설사병 및 부종병 현황조사 및 백신 효능평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>· 국내 이유자돈 설사병 및 부종병 발생현황 조사</li> <li>· 국내 이유자돈 설사병 및 부종병 시험 백신 효능 평가(실험동물 및 돼지)</li> <li>· 실험동물에서 백신접종 후 면역원성 분석</li> <li>· 돼지 설사병 및 부종병 예방을 통한 양돈농가 질병발생 피해 감소 및 양돈 생산성 향상</li> </ul> 3. 돼지 대장균설사병 및 부종병 백신 산업화 <ul style="list-style-type: none"> <li>· 국내 돼지 대장균성 설사병 및 부종병의 백신 생산기술 구축</li> <li>· 시험백신의 현장적용 및 challenge 시험을 통한 백신효능 평가</li> <li>· 대장균 백신 생산 및 수출을 통한 국제 경제력 확보</li> </ul> <u>돼지의 대장균성 설사병 및 부종병으로 인한 농가 폐사 감소 및 사료효율 향상을 통해 FTA 체결에 따른 국내 양돈업의 세계시장 경쟁력 확보 및 안정적 수입원 창출 기여</u>				
중심어 (5개 이내)	돼지	대장균	이유자돈 설사병	부종병	장독소

## < SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose & Contents	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Development of preventive vaccine against edema disease and postweaning diarrhea which causes significant economic losses in Korean piggery.</li> <li>2. Field trial of the preventive vaccine against edema disease and postweaning diarrhea to evaluate efficacy.</li> <li>3. Industrialization of preventive vaccine against edema disease and postweaning diarrhea.</li> </ol>		
Results	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Establishment of technology to produce postweaning diarrhea in Korean piggeries.</li> <li>2. Development of edible vaccine against edema disease in Korean piggeries.</li> <li>3. Gene bank for Korean pathogen from causing postweaning diarrhea through analysis of important swine <i>Escherichia coli</i> gene.</li> <li>4. Establishment an animal test method for edema disease and postweaning diarrhea.</li> <li>5. Development of a rapid diagnosis program for <i>E. coli</i> that can be applied in Korean piggeries.</li> <li>6. Development of monoclonal antibody using Korean pathogen causing edema disease.</li> <li>7. Development of field diagnostic kit using monoclonal antibody.</li> <li>8. Establishment of mass-culture-technique for vaccine against edema disease and postweaning diarrhea.</li> <li>9. Industrialization, field application program and evaluating efficacy of vaccine against edema disease and postweaning diarrhea.</li> </ol>		
Expected Contribution	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Development of preventive vaccine against edema disease and postweaning diarrhea.               <ul style="list-style-type: none"> <li>· Industrialization and increasing farm productivity through the development of preventive vaccine</li> </ul> </li> <li>2. Present-condition investigation of edema disease and postweaning diarrhea, and evaluating efficacy of preventive vaccine.               <ul style="list-style-type: none"> <li>· Surveying the prevalence of edema disease and postweaning diarrhea in Korea.</li> <li>· Evaluating efficacy of vaccine using experimental animals and pigs.</li> <li>· Analyzing immunogenicity after vaccination in experimental animals.</li> <li>· Increasing productivity and decreasing disease incidence for reducing damage in piggeries through preventing edema disease and postweaning diarrhea.</li> </ul> </li> </ol>		

	<p>3. Industrialization of preventive vaccine against edema disease and postweaning diarrhea</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· Established vaccine production technology for edema disease and postweaning diarrhea.</li> <li>· Evaluating efficacy of vaccine through field trials and challenge test.</li> <li>· Securing international economic power through production and export of <i>Escherichia coli</i> vaccine.</li> </ul>				
Keywords	Pigs	<i>Escherichia coli</i>	Postweaning diarrhea	Edema disease	Enterotoxin

## < CONTENTS >

Chapter 1. Summary of research .....	8
Paragraph 1. Purpose of research .....	8
Paragraph 2. Necessity of research .....	8
Paragraph 3. Scope in R & D .....	11
Chapter 2. Preliminary research for current research development ....	13
Paragraph 1. Disease outbreak status in Korea .....	13
Paragraph 2. Vaccine industry status .....	13
Paragraph 3. Related technology trends .....	15
Chapter 3. Contents and results of research .....	16
Paragraph 1. R & D promotion strategy method, promotion system and schedule .....	16
Paragraph 2. Contents and results of R & D .....	20
Paragraph 3. Research achievement .....	89
Chapter 4. Objectives achievement and contribution of related fields	93
Chapter 5. Application of research outcome and expectational result	98
Chapter 6. Collected international scientific & technical information in the research process .....	99
Chapter 7. Security level of research achievement .....	101
Chapter 8. Registered research facilities & equipment on the NTIS	101
Chapter 9. Performance result for laboratory safety .....	102
Paragraph 1. Laboratory safety check&precision safety diagnosis	102
Paragraph 2. Training participating researchers .....	102
Paragraph 3. Lab safety assurance plan .....	102
Chapter 10. Primary research achievement .....	103
Chapter 11. Et cetera .....	103
Chapter 12. References .....	104

## 〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	8
1절 연구개발 목적 .....	8
2절 연구개발의 필요성 .....	8
3절 연구개발 범위 .....	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	13
1절 국내 질병발생현황 .....	13
2절 백신 산업화 현황 .....	13
3절 관련기술동향 .....	15
제 3 장 연구수행 내용 및 결과 .....	16
1절 연구개발 추진전략 방법·추진체계 및 추진일정 .....	16
2절 연구개발 내용 및 결과 .....	20
3절 연구성과 .....	89
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	93
제 5 장 연구결과의 활용계획 및 기대성과 .....	98
제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	99
제 7 장 연구개발성과의 보안등급 .....	101
제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	101
제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	102
1절 연구실 안전점검 및 정밀안전진단실시 .....	102
2절 참여연구원의 교육훈련 .....	102
3절 연구실안전 확보 계획 .....	102
제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	103
제 11 장 기타사항 .....	103
제 12 장 참고문헌 .....	104



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

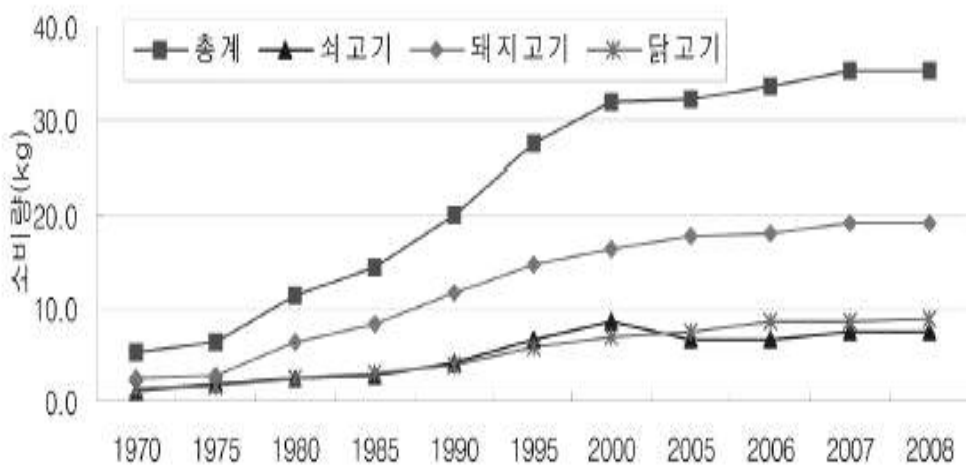
## 제 1 절 연구개발 목적

- 국내 돼지 설사병 중 가장 경제적 피해가 심한 이유자돈 설사병(postweaning diarrhea) 및 부종병(edema disease)에 대한 예방백신 개발
- 돼지 대장균 이유자돈 설사병 및 부종병 예방백신 효능평가를 위한 농장시험
- 돼지 대장균설사병 및 부종병 백신 산업화

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 국가간 지속적인 FTA 체결에 따른 양돈업 경쟁력 확보의 필요성

- FTA 체결에 따른 양돈산업 경쟁력 확보 및 축산농가의 수입원 창출을 위한 돼지의 대장균성 설사병의 치료 및 예방이 필수적임
- 안전한 축산물에 대한 욕구
  - 국내 축산업의 생산액은 1998년 7조 5천억원에서 2008년 13조 6천억원으로 연평균 6.1% 증가하였음. 이는 우리나라의 경제적 성장과 맞물려, 우리나라 국민이 소비하는 식품에서 차지하는 축산물의 비중과 국민 1인당 육류 소비량은 매년 증가하고 있음.



자료 : 농림수산물부, 「농림수산물주요통계」, 2009

Fig 1. 우리나라 1인당 육류 소비량

- 우리나라를 포함한 전세계에서 식품 대량 생산시대에 의한 식중독 발생이 지속적으로 보고되고 있는 추세이며, WHO (2002) 보고에 의하면 2000년도에만 전세계적으로 210만 명의 사람들이 식중독으로 사망하였다. 미국에서는 매년 650만 명에서 3,300만 명 정도의 환자가 발생하는데, 이중 9,000명 정도가 사망하였고 있으며, 주요 식중독 원인균(*Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium*, 병원성 대장균)에 의해 발생한 식중독으로 연간 56~94억 달러의 비용이 소요되는 것으로 추정됨 (Jean C Bubzy. 1996).

- 항생제는 그동안 우리나라 가축의 질병 방제와 성장촉진 등을 통해 사료 효율 증진 및 축산 대규모화 발전에 크게 기여하였음. 최근 국내 가축유래 병원성 세균의 경우 내성률이 다른 선진국들에 비해 높은 것으로 보고되고 있으며, 질병치료에 많은 어려움이 있는 실정임. 또한 최근에는 다제 내성균의 증가와 기존 항생제로는 치료가 불가능한 수퍼박테리아도 출현하고 있어 사회적 문제가 되고 있음. 따라서 효과적인 가축 질병 방제를 위해서는 합리적인 항생제를 사용하는 것이 요구되고 있음. 따라서 이러한 시대적 요구에 맞추어 이미 국내에서도 2012년을 기점으로 사료첨가용 항생제의 사용을 전면적으로 금지하고 있으며, 화학합성 항생제를 대체할 수 있는 생균제 및 백신개발 등의 개발이 절실히 요구되고 있음.
- 양돈산업에서 돼지 이유 후 설사에 의한 경제적 손실이 매우 높은 상황임. 또한 그동안 이 질병의 예방, 치료, 성장 촉진용으로 사료첨가하던 항생제 사용을 2012년 이후 전면금지함에 따라 현재 양돈농가에서 대장균 설사병 및 부종병이 급격히 증가하고 있음.
- 국내 대장균 예방백신은 포유자돈 설사병을 예방하기 위한 제품 및 자가백신이 판매되고 있으나, 자가백신은 설사병이 발병한 농장에서 분리한 대장균을 사용하고 있으나, 효과는 낮은 편임 이는 첫째 설사병에서 분리한 일반대장균과 병원성대장균의 구분이 어려움. 둘째, 특정항원 (F18 및 STX2e)은 배지에서서의 발현이 매우 낮음. 셋째, 포유자돈과 이유자돈의 장상피세포에 부착하는 인자가 변경됨 (F4 → F18) 등의 문제점이 있음.
- 현재 이유자돈설사병 및 부종병에 대한 백신은 현재 전무한 실정임. 따라서 국내에서 이유자돈 설사병 및 부종병에 대한 백신 개발 및 농가적용이 시급한 실정임.

## 2. 제1세부 <돼지 대장균 설사병 발생 상황 조사 및 현장적용시험의 필요성>

- 돼지 대장균성 설사병 및 부종병은 양돈 산업의 주요 경제적 손실 질병의 하나로서, 주로 폐사 및 생산성 저하에 따른 축산농가 손실이 매우 큼.
- 최근 새로운 부착인자 및 특이 O 항원 대장균에 의한 설사병 발생이 증가하는 추세임
- 최신 진단기술을 이용한 신속한 돼지 대장균 진단법 개발이 필요함.
- 따라서 국내 양돈장의 이유 후 대장균성 설사병 원인분석 및 백신개발을 통해 축산농가의 애로사항인 돼지대장균증 근절대책이 매우 중요함
- 관련기술동향
  - 돼지 대장균증을 일으키는 병원성대장균들은 연령별로 종류가 다양하게 나타난다 (Table 1). 이유 전 신생자돈이나 포유자돈에서는 F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P) 등의 부착인자가 장관 상피세포에 부착한 이후 독소 (주로 LT 또는 STb)를 분비함으로써 설사를 유발하는 것이 특징이다. 그러나 이유 후에는 부착인자가 F18이라는 섬모항원으로 바뀌고 독소 (이열성 독소 LT 또는 내열성 독소 STa, STb 및 STX (verotoxin))도 이유 전에 나타나는 대장균들과는 다른 복합적인 독소를 산

생하여 이유 후 자돈에 설사를 일으킨다. 일부 시가독소산생대장균 (F18, STX2e) 들은 육성·비육돈에서 부종병을 일으키기도 한다. 이와 같이 이유 후에 설사를 일으키는 대장균들은 F18을 분비하는 대장균이 많은데, F18의 아형에 따라 F18ab type은 주로 부종병과 연관성이 높으며, F18ac type은 설사발생과 연관성이 높은 것으로 알려져 있다. 최근에는 F18 new variant가 보고되고 있어 이에 대한 관심이 높아지고 있다.

Table 1. 연령별 병원성 대장균의 특징

질병명	연령(주령)	병원성대장균	호발부위
신생자돈설사병	0-1	장독소형(ETEC)	소장
포유자돈설사병	2-4	장독소형(ETEC)	소장
이유자돈설사병	4-8	장독소형/시가독소산생형 (ETEC/STEC)	소장/대장
부종병	4-8	시가독소산생형(STEC)	소장
출혈성 위장관염	1-8	장독소형(ETEC)	소장
폐혈증	0-4	비장관형/장독소형 (ExPEC/ETEC)	전신성

- 설사발생 자돈에서 분리된 병원성대장균 분포

농림축산검역본부에서 2009년부터 2011년까지 포유 및 이유자돈 (육성돈)에서 설사 및 부종병이 의심되어 검역검사본부 질병진단과로 의뢰된 분변 및 자돈에서 병원성 대장균의 조사한 결과 이유 전에는 F4 (K88) 부착인자 및 독소인자를 분비하는 장독소형 (ETEC)대장균이 대부분을 차지하고 있었지만 F5 (K99), F6 (987P), F41 등의 부착인자를 분비하는 장독소형 (ETEC) 대장균도 검출되었다. 이유자돈에서는 F4 (K88) 산생 장독소형 (ETEC)대장균은 감소하면서 F18 산생 장독소형 및 시가독소 산생대장균 (ETEC/STEC)이 급격히 증가하는 경향을 보였다. 이러한 패턴은 외국사례와 비슷한 경향을 보였다. 현재 국내에서는 병원성대장균을 치료 및 예방하기 위하여 항생제치료 및 백신사용이 일반적으로 사용하고 있으나, 항생제 처치는 내성 세균의 증가로 인해 치료효율이 감소하는 추세이며, 백신사용은 현재 포유자돈 설사병에 국한되어 사용되고 있어 이유자돈설사병 및 부종병 예방을 위한 백신개발이 시급한 실정이다.

**3. 제1협동 <돼지 이유자돈 대장균 설사병 및 부종병 예방 백신 개발 필요성>**

- 국내 대부분의 양돈농가에서 이유후 대장균설사병이 발생하고 있음.
- 국내 양돈농가에서 대장균설사병 및 부종병으로 인한 폐사 및 가축 생산성 저하로 경제적 피해가 매우 심각함

- 포유자돈설사병의 부착항원은 K88 (F4), K99 (F5) 및 독소 (LT)등에 의한 설사가 대부분이나, 이유자돈 설사병 원인균들은 부착항원 (F18)의 변형 및 STX2e 등과 같은 추가독소의 발현으로 설사가 발생하기 때문에 포유자돈용 백신으로 이유자돈 설사병을 예방하기 곤란함
- 특히 부종병은 이유자돈부터 육성돈 구간에 다발하며, 심할 경우 30-40% 이상의 폐사율을 특징으로 하기 때문에 발생 시 축산농가의 커다란 경제적 손실을 야기하고 있음. 따라서 현재 양돈 선진국에서는 부종병 백신을 개발하고 컨트롤 프로그램을 적용하고 있음
- 또한 항생제 내성에 대한 관심이 높아지면서, 사료첨가 항생제 사용을 금지한 이후 농가현장에서 설사병 및 부종병 발생이 증가하고 있으나, 이에 대한 치료법은 항생제 사용 이외에는 거의 전무한 실정임

Table 2. 각 나라별 대장균 및 부종병에 인한 손실액

Author	Date	Publication	Country	Pig Type	Reported Impact \$ US Per pigs
Tacha et al	Jan 2000	Swine Health production	US	weaned	\$5.88
Marquardt et al	Mar 2001	The Leman swine conference	US/Canada	Suckling	\$0.2~1 billion /year
Ngyuen et al	August 2013	Pigptrogress	EU	weaned	10% of herd /outbreak

#### 4. 제2협동 <돼지 대장균 설사병 및 부종병 백신 산업화 필요성>

- 국내 대장균성 질병발생 연구결과 대장균증에 의한 경제적 손실이 높을 것으로 예상됨
- 돼지의 대표적인 경제성 저하질병인 대장균설사병 및 부종병에 대한 폐사율 감소 방안 필요
- 대장균 설사병 및 부종병에 대한 컨설턴트 교육을 통하여 현장에서 대장균증을 진단하고 백신을 적용할 수 있는 시스템 구축이 필요함.

### 제 3 절 연구개발 범위

#### 1. 제1세부 <돼지 대장균 설사병 발생 상황 조사 및 백신효능평가>

##### 가. 연구개발 목표

- 국내 이유자돈 및 육성돈의 설사병 및 부종병 발생 현황 조사
- 백신 후보주에 대한 효능평가

##### 나. 연구개발 내용

- (1) 국내 이유자돈 설사병 및 부종병 발생 현황조사
  - 국내 돼지에서 발생하는 대장균증의 발생현황 파악
  - 병원성대장균의 주요 항원 및 병원성유전자검색을 통한 유전자 분석
  - 병원성대장균의 항생제 내성 패턴 분석 및 유전자 검색

- (2) 돼지 병원성대장균의 신속검출키트 산업화
  - 국내 돼지 부종병 원인물질 Mab작성 및 항원정제, immunochromatography법 작성
  - 부종병 진단법 개선
- (3) 백신 후보주에 대한 현장적용시험
  - 농장시험을 통한 병원성대장균 및 부종병 백신에 대한 효능평가

## 2. 제1협동 <돼지 이유자돈 대장균 설사병 및 부종병 예방 백신 개발>

### 가. 연구개발 목표

- 이유자돈 대장균 설사병 및 부종병의 부착 및 독소단백질의 검색 및 면역원성 확립
- 이를 이용한 국내 이유자돈 대장균 설사병 및 부종병 예방백신 개발

### 나. 연구개발 내용

- (1) 국내 이유자돈 설사병 및 부종병 원인 물질 검색
  - 면역원성 항원 (K88subtype, F18subtypes, LT, ST, EAST, STX2e) 유전자검색
  - 면역 단백질 항원 분석: 표준항원과의 교차면역 반응
  - 후보 유전자의 cloning 및 발현
- (2) 백신 후보물질을 이용한 면역원성시험
  - 면역 단백질 생산기법 확립(야외 및 cloning세포주)
  - 분자생물학적 기법을 통한 면역 단백질의 발현
  - 대량생산 배지조성 확립
    - 1) 항원 ELISA법을 통한 재현성 검증
    - 2) 엔도톡신 제거법: 3시간이내에 백신발현으로 엔도톡신 발현최소화
- (3) 실험동물을 통한 후보단백질 면역원성 분석
  - 면역원성이 확인된 항원을 이용한 실험동물 평가시험
- (4) 백신 adjuvant 선발 및 효능 평가

## 3. 제2협동 <돼지 대장균 설사병 및 부종병 백신 산업화>

### (1) 연구개발 목표

- 국내 이유자돈 설사병 및 부종병 백신에 대한 산업화

### (2) 연구개발 내용

- (가) 이유자돈 설사병 및 부종병 백신 대량생산 조건 확립
  - 설사병 및 부종병에 대한 면역원성 항원 대량생산기법 확립
  - 항원 추출 및 정제 기법을 확립하여 생산 효율 향상
  - 후보 백신에 대한 유효기간 및 안정성 평가
- (나) 부종병 신속진단키트(immunochromatography) 생산기법 확립
  - STX2e 생산 기법 확립
  - 면역 크로마토그래피법을 이용한 키트 생산
  - 효능 및 안정성평가

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

### 제 1 절 국내 질병발생현황

#### 1. 돼지 대장균증 발생현황

○ 2012년 농림축산검역본부 질병진단 자료에서 대장균증에 의한 피해가 가장 높게 조사됨.

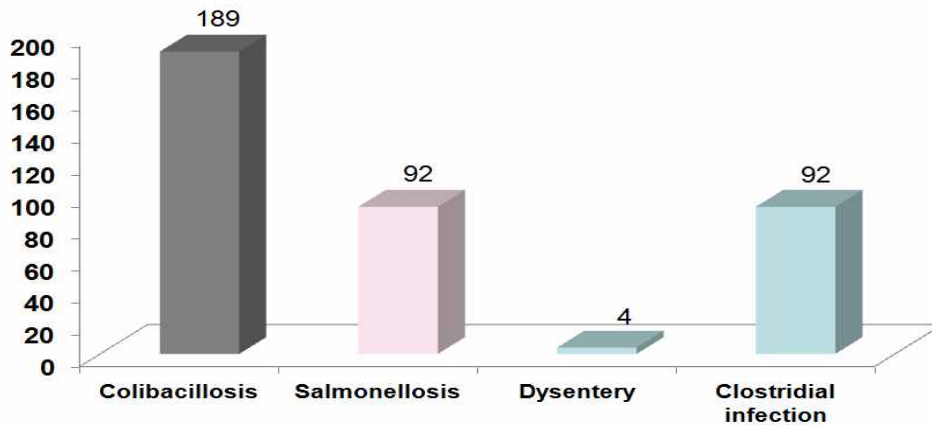


Fig 2. 국내 돼지에서 소화기 질병발생 현황 (KAHIS, 2012)

#### 2. 부종병 발생현황

○ 국내 부종병 발생상황은 정확히 알 수 없으나, 2013년 KAHIS 자료에 의하면 2012년 5건, 2013년 15건 등으로 계속적으로 증가하는 경향을 보이고 있음. 또한 농장에서 발생 시 농가에 매우 큰 경제적 피해를 주는 것으로 확인되고 있음.

Table 3. 부종병 발생 시 농장의 경제성 분석(모돈 1,00두 규모, 폐사율 평균 30%)

피해내용	내용(연)	금액
직접피해	폐사수=100(모돈)×2.3(회전수)×10(평균산자수)×0.3(30%폐사 적용)=600두/년 →600두×40만원(정상 출하시)	2억 4천만원
간접비용	처리비용=인건비 + 랜더링 및 소각	1천만원
추정비용		2억 5천만원

### 제 2 절 백신 산업화 현황

#### 1. 국내 현황

○ Table 4 에서 보듯이 국내 돼지에서 사용되는 백신시장은 2013년 기준 약 1300억 시장을 형성하고 있음. 이중 대장균 백신은 전체판매량의 1.25%, 판매액의 2%를 차지하고 있음. 이중 대부분이 외산제품이 90%이상을 차지하며 국산제품은 자가백신에 한정되어 있음

Table 4. 국내 대장균 백신 현황 (천두, 천원, 2013, 한국동물약품협회)

품명		판매량		판매액	
		국내	국외	국내	국외
돼지백신		163,663	35,927	127,534,229	5,172,337
대장균	단일*	1,734	0	1,644,246	0
	혼합	313	0	797,700	0
	소계	2,047	0	2,441,946	0
계(%)		1.25	0	1.92	

\* 자가백신 포함

- 국내 백신의 경우 1980년대 대장균에서 K88, K99, 987P 및 F41을 사용하는 백신이 개발되었으나, 현재 국내 이유자돈 및 부종병 백신의 생산은 거의 없는 실정임
- 국내에서는 대장균의 특성상 다양한 혈청형이 설사병에 관여하기 때문에 자가백신을 허가하였으나, 대장균에 대한 정확한 진단법이 확립되지 않아 자가백신에 대한 효과는 매우 제한적임

## 2. 국외 현황

- 돼지 대장균 설사병에 사용하는 백신의 경우 모두에 집중하여 초유를 통한 자돈 면역을 유도하는 백신과 자돈에 집중하여 능동면역을 유도하는 백신이 판매되고 있다. Table 5에 국외 대장균 백신에 대한 허가사항이 나타나 있다. 이들의 백신 항원은 균체백신 보다는 서브유닛 백신이나 유전적으로 변형된 백신의 사용하고 있음

Table 5. 국외 대장균 백신 허가 현황 (Trend in Biotechnology, 2012&2013 pig progress)

백신 타입		제품명	제조사	항원	출처
설사병	Subunit	포실리스 포콜리	인터벳	recombinant K88ab, K88ac, K99, 987P LT toxoid	1996(EU,EMA)
	Live (genetically modified)	Neocolipor	메리알	2개 균주 (F6, F41+F4, F5)	1998(EU, EMA)
부종병		None	IDT Biologika	Subunit of STX2e	2013 (pig progress)

- 따라서, 이유자돈 및 육성돈에 다발하는 대장균증을 예방하기 위하여 돼지의 설사병 및 부종병 백신을 개발하고 면역을 제공하는 동시에 돼지의 성장단계별 현장적용을 위한 산업화가 필요함

### 제 3 절 관련기술동향

- 돼지의 대장균증은 연령에 따라 포유자돈 설사병, 이유자돈 설사병 및 부종병으로 크게 구분하고 있음.
- 이 중에서 포유자돈 설사병은 주로 O149:F4ac:LT:STb로 대표되는 장독소형대장균 (enterotoxigenic *E. coli*)에 의한 설사병이 주된 것으로 알려져 있음(Fairbrother, 2005)
- 이유자돈설사병은 O149:F4ac:LT:ST도 관련하지만 연령이 증가함에 따라 장관내 F18 receptor가 증가하면서 F18:LT:ST로 대표되는 장독소형대장균 뿐만 아니라 F18:LT:ST:STX2e가 나타나는 등 매우 다양한 병원성인자를 보유한 대장균이 설사병을 일으키고 있음
- 부종병은 STX2e가 주된 병원성인자이나 근래에는 F18ab 타입의 부착인자와 연관성이 매우 높은 것으로 보고되고 있음. 따라서, 부종병 백신 개발 시 이에 대한 검토가 필요할 것으로 판단됨.
- 특히 STX2e 단백질은 매우 적은 양(2 pg/kg)으로도 돼지를 폐사시킬 수 있으나, 실제적인 생산량이 매우 낮은 단점을 가지고 있다. 따라서 근래 유전자기법을 이용한 단백질 발현이 진행되고 있으나, 산업화로 가는 예는 매우 적다.
- 기존에는 사료첨가 항생제를 이용하여 설사병과 부종병을 예방하였으나, 2012년 이후 사료첨가 항생제의 금지이후 양돈현장에서는 설사병 및 부종병의 발생이 증가하는 추세이다.
- 따라서 국내에서는 국내 실정에 맞는 대장균 설사병증 및 부종병에 대한 백신의 개발과 산업화가 시급한 실정이다.



# 제 3 장 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

## 제 1 절 연구개발 추진전략·방법·추진체계 및 추진일정

### 1. 연구개발 추진전략 및 방법

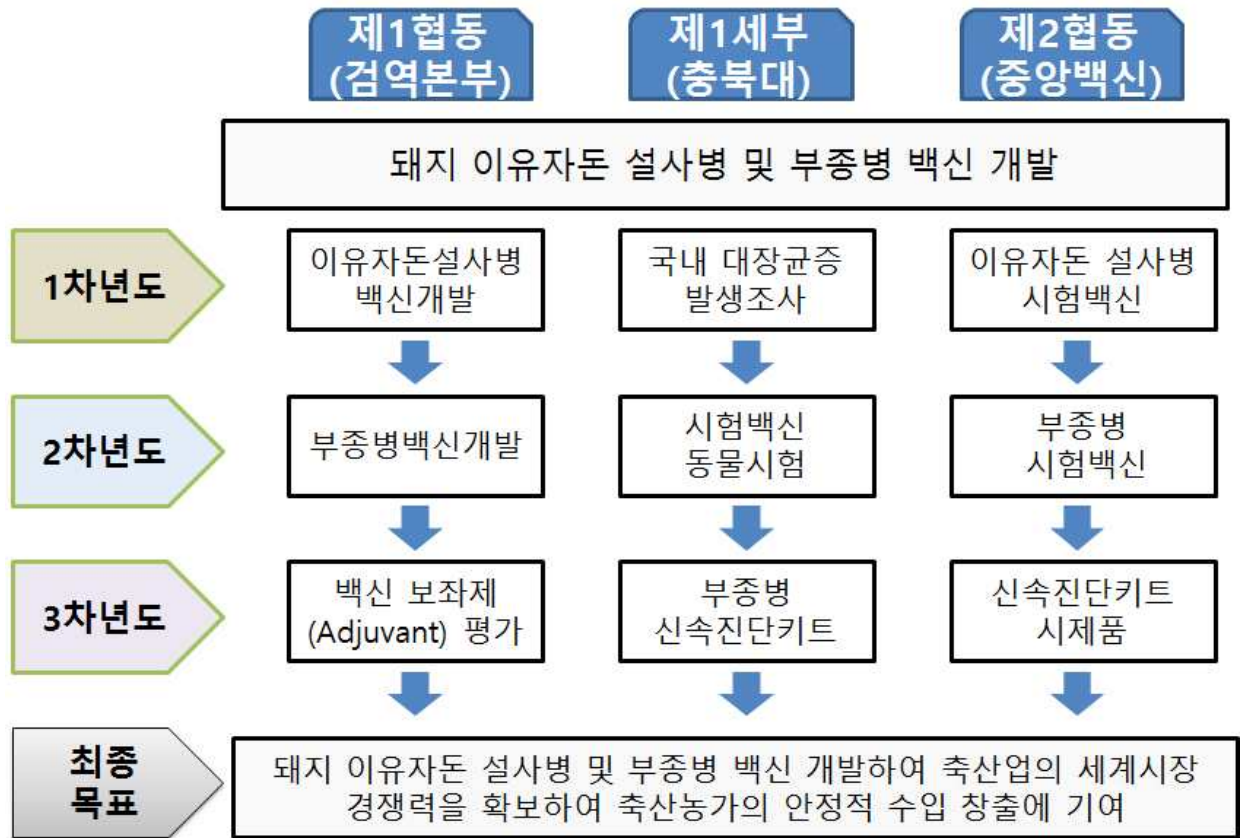
#### 가. 현재의 기술수준

- (1) 국내 이유자돈 및 부종병에 대한 백신 항원 검색 방법 (제1세부)
- (2) 국내 양돈장의 이유자돈 설사병 및 부종병에 대한 기초자료 보유 (제1세부)
- (3) 돼지 동물질병 병원체 동물시험 기술 보유(제1세부)
- (4) 돼지 병원성 대장균 병원체 감별 및 균 분리 기술 보유(제1협동)
- (5) 국내 분리 동물질병 병원체에 대한 백신개발 기술 보유(제1협동)
- (6) 현장 진단 키트 개발을 위한 항체 및 면역 크로마토 그래픽 키트 개발 기술 보유(제1협동)
- (7) 동물질병 병원체에 대한 monoclonal antibody 개발 기술 보유 (제2협동)

#### 나. 연구개발 추진 전략 및 방법

- (1) 성공적인 연구 수행을 위해 충북대학교 수의과대학, 농림축산검역본부, (주) 중앙가축전염병 연구소의 산·학·관 효율적으로 협력하고 기술 정보를 서로 공유함
- (2) 본 연구와 관련된 기술 정보는 Pubmed 등을 포함한 문헌정보 탐색 사이트를 이용하여 국제저널, 보고서 및 특허 등을 수집하며, 인터넷을 통해 최신 기술정보를 수집 활용함
- (3) 산·학·관의 공동 연구를 통해 연구개발 소요시간 단축 및 효과적인 산업화를 위해 노력
  - 국내 양돈장에서 사용할 수 있는 이유자돈 설사병 생산기술 확립 (제1세부)
  - 국내 양돈장에서 사용할 수 있는 부종병 백신 개발 (제1세부)
  - 돼지 대장균 중요 유전자 분석을 통한 국내유래 돼지 대장균 설사병 병원체 유전자 뱅크 (제1세부)
  - 이유자돈 설사병 및 부종병에 대한 동물시험법 확립 (제1협동)
  - 국내 양돈장에서 적용할 수 있는 대장균 신속진단 프로그램 개발 (제1협동)
  - 국내 부종병 분리균주를 이용한 monoclonal antibody를 개발 (제1협동)
  - Monoclonal antibody를 이용한 부종병 현장 진단 키트 개발 (제1협동)
  - 이유자돈 및 부종병 백신에 대한 대량 배양기법 확립(제2협동)
  - 돼지 이유자돈 설사병 및 부종병 백신 제제의 효능 평가, 산업화 및 현장 적용 프로그램 개발(제2협동)

2. 연구개발의 추진체계



### 3. 추진 일정

가. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

( 1 ) 차년도																
일련번호	연구내용	추진 일정												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	국내 이유자돈 설사병 발생상황 검색	■	■	■	■	■	■									이완규 (충북대)
2	대장균증 진단 현장적용 프로그램 개발							■	■	■	■	■	■			이완규 (충북대)
3	돼지에서 동물시험 (설사병) -기존 및 백신과의 비교시험 -면역원성비교시험				■	■	■	■	■	■	■					이완규 (충북대)
4	대장균 설사병 백신 후보주 및 항원 검색	■	■	■	■	■	■									김종완 (검역본부)
5	백신 후보주 및 항원 선발 및 특성분석	■	■	■	■	■	■									김종완 (검역본부)
6	최적 배양법 확립						■	■	■	■	■	■	■			김종완 (검역본부)
7	면역원성평가								■	■	■	■	■			김종완 (검역본부)
8	대량배양기술 및 시험백신 제조			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			원호근 (중앙백신)

( 2 )차년도																
일련번호	연구내용	추진 일정												연구개발비 (단위:천원)	책임자 (소속기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	국내 부종병 발생상황 검색	■	■	■	■	■	■									이완규 (충북대)
2	돼지에서 동물시험 (부종병) - 기존백신과의 비교시험 - 면역원성비교시험						■	■	■	■	■	■	■	■		이완규 (충북대)
3	부종병 항원(STX2e)에 대한 항체 생산						■	■	■	■	■	■	■	■		이완규 (충북대)
4	부종병 백신 후보 항원단백질 특성분석	■	■	■	■	■	■									김종완 (검역본부)
5	유전자 cloning을 통한 단백질 발현기술 확립					■	■	■	■	■	■					김종완 (검역본부)
6	면역원성 평가								■	■	■	■	■	■		김종완 (검역본부)
7	시험백신 제조	■	■	■	■	■	■	■								원호근 (중앙백신)
8	안전성 및 효능시험							■	■	■	■	■	■	■		원호근 (중앙백신)

( 3 )차년도																
일련 번호	연구내용	추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	부중병 신속진단 키트 개발	■	■	■	■	■	■									이완규 (충북대)
2	신속진단키트 활용 이유자돈 설사병 및 부중병 검색						■	■	■	■	■	■	■	■		이완규 (충북대)
3	백신 보좌제 (Adjuvant) 별 면역원성시험	■	■	■	■	■	■	■								김종완 (검역본부)
4	면역원성 평가						■	■	■	■	■	■	■	■		김종완 (검역본부)
5	부중병 신속진단 키트 대량생산기 법 확립	■	■	■	■	■	■									워호근 (중앙백신)
6	항원정제 및 시제 품 제조					■	■	■	■	■	■	■	■	■		워호근 (중앙백신)
7	농장적용 및 평가								■	■	■	■	■	■		워호근 (중앙백신)

## 제 2 절 연구개발 내용 및 결과

### 1. <제1세부> 돼지 대장균 설사병 발생 상황 조사 및 백신효능평가

#### 가. 국내 이유자돈 설사병 및 부중병 발생상황 검색

국내 이유자돈 설사병 / 부중병에 이환된 돼지에서 분리한 병원성대장균의 연도별 결과를 Table 6에 나타내었다. 총 500 농가에서 591 균주가 분리되었으며, 연도별로 2012년 ~ 2015년까지 110~179 균주별로 다양하게 나타났다. 이를 병원성 대장균별로 구분하면, 설사병을 일으키는 장독소형대장균(ETEC, ETEC/EPEC)가 380균주 (64.3%)가 분리되었다. 이 중에는 섬모는 없으면서 LT, ST등과 같은 독소인자를 가지고 있는 대장

균이 160균주 (42.1%)로 대부분을 차지하였으며, 이중 부착인자로 F4를 발현하는 대장균이 84균주 (22.1%), F18을 발현하는 대장균이 96균주 (25.3%)가 분리되었다. 이를 종합하면 장독소형 대장균 중 ETEC, ETEC:F18 및 ETEC:F4가 이유자돈 설사병 전체의 90%를 차지하였다.

설사 및 부종병을 일으키는 것으로 알려져 있는 ETEC/STEC는 101균주 (17.1%)가 분리되었다. 이 중 ETEC/STEC:F18균주가 76균주(75.2%)로 분리되었으며, ETEC/STEC가 21균주 (20.8%)를 차지하였다. 부종병을 일으키는 STEC 균주들은 STEC:F18이 71균주 (64.5%)가 분리되었으며, 부착인자가 없는 STEC는 37균주 (33.6%)가 분리되었다. 연도별 비교에서 부종병을 일으키는 것으로 알려져 있는 STEC 및 ETEC/STEC에서 상당한 변화가 보였다. 2012 ~ 2014년까지는 ETEC/STEC대장균이 전체의 분리균의 20% 정도를 보였으나, 2015년 이후에는 STEC대장균이 25%이상 분리율이 증가하였다. 이는 2014년 이후 부종병을 일으키는 대장균이 ETEC/STEC에서 STEC로 변경되는 것을 알 수 있었으며, 이는 지금까지도 현장에서 부종병이 지속적으로 농장에서 문제를 일으키는 것이 확인되었다.

Table 6. 설사 및 부종증상을 보이는 이유 및 육성돈에서 분리한 병원성 대장균의 연도별 분석

Pathotype	연도별 병원성 대장균 균주(%)					Total(%)	질병연관성
	2012	2013	2014	2015	2016		
ETEC	30	54	31	28	17	160 (42.1)	설사병
ETEC:F4	24	16	28	12	4	84 (22.1)	
ETEC:F5		5	2	2	1	10 ( 2.6)	
ETEC:F6				1	1	2 ( 0.5)	
ETEC:F18	29	27	8	20	12	96 (25.3)	
ETEC:F41	2	4	1	2	2	11 ( 2.9)	
ETEC:F4:F18	1		5	2	1	9 ( 2.4)	
ETEC:F4:F41				2		2 ( 0.5)	
EPEC					1	1 ( 0.3)	
ETEC/EPEC	3	2				5 ( 1.3)	
<b>Subtotal</b>	<b>89 (66.9)</b>	<b>108 (60.3)</b>	<b>75 (68.2)</b>	<b>69 (61.1)</b>	<b>39 (69.6)</b>	<b>380 (64.3)</b>	설사병/ 부종병
ETEC/STEC	3	7	4	4	3	21 (20.8)	
ETEC/STEC:F18	17	32	19	6	2	76 (75.2)	
ETEC/STEC:F4	1			1		2 ( 1.9)	
ETEC/STEC:F4:F41				1		1 ( 0.9)	
ETEC/STEC:F41				1		1 ( 0.9)	
<b>Subtotal</b>	<b>21 (15.8)</b>	<b>39 (21.8)</b>	<b>23 (20.9)</b>	<b>13 (11.5)</b>	<b>5 (8.9)</b>	<b>101 (17.1)</b>	부종병
STEC	9	10	3	9	6	37 (33.6)	
STEC:F4				2		2 ( 1.9)	
STEC:F18	14	22	9	20	6	71 (64.5)	
<b>Subtotal</b>	<b>23 (17.3)</b>	<b>32 (17.9)</b>	<b>12 (10.9)</b>	<b>31 (27.4)</b>	<b>12 (21.4)</b>	<b>110 (18.6)</b>	
<b>Total</b>	<b>133</b>	<b>179</b>	<b>110</b>	<b>113</b>	<b>56</b>	<b>591</b>	

\* 출처: Fairbrother and Gyles, 2012, Diseases of Swine 8th edition

이를 지역별로 분석한 결과 (Table 7)에서는 지역별 차이는 높지 않은 것으로 나타났다. 지역 내부에서도 비슷하게 설사병을 일으키는 ETEC가 380균주 (64.3%)로 가장 높게 분리되었으며, 부종을 일으키는 STEC가 110균주 (18.7%)를 차지하였다. 부종병을 일

으키는 STEC를 지역별로 살펴보면 충북, 전북, 경북에서 각각 30.6%, 25.7%, 및 25.3%로 높게 분리되었다.

Table 7. 설사증/부종병에 이환된 돼지에서 분리한 병원성 대장균의 지역별 분석

Pathotype	지역별 병원성대장균 분리건수 (%)										Total
	강원	경기	경남	경북	대전	전남	전북	제주	충남	충북	
ETEC		22	19	25	20	3	7	5	48	11	160 (42.1)
ETEC:F4		11	6	16	3	3	7	2	32	4	84 (22.2)
ETEC:F5		3	2	1	1	2			1		10 ( 2.6)
ETEC:F6									2		2 ( 0.5)
ETEC:F18	1	16	9	11	8	8	6	1	33	3	96 (25.3)
ETEC:F41			1	2	1	2	1		3	1	11 ( 2.9)
ETEC:F4:F18			1	1				3	4		9 ( 2.3)
ETEC:F4:F41			1							1	2 ( 0.5)
EPEC							1				1 ( 0.3)
ETEC/EPEC				1	1				1	2	5 ( 1.3)
<b>Subtotal</b>	<b>1</b> (25.0)	<b>52</b> (69.3)	<b>39</b> (69.6)	<b>57</b> (62.6)	<b>34</b> (59.6)	<b>18</b> (85.7)	<b>22</b> (62.9)	<b>11</b> (91.7)	<b>124</b> (60.8)	<b>22</b> (61.1)	<b>380</b> (64.3)
ETEC/STEC		3	2	3	1				11	1	21 (20.8)
ETEC/STEC:F18	1	7	8	8	10	1	4	1	34	2	76 (75.2)
ETEC/STEC:F4					1				1		2 ( 1.9)
ETEC/STEC:F4:F41						1					1 ( 0.9)
ETEC/STEC:F41			1								1 ( 0.9)
<b>Subtotal</b>	<b>1</b> (25.0)	<b>10</b> (13.3)	<b>11</b> (19.6)	<b>11</b> (12.1)	<b>12</b> (21.1)	<b>2</b> (9.5)	<b>4</b> (11.4)	<b>1</b> (8.3)	<b>46</b> (22.5)	<b>3</b> (8.3)	<b>101</b> (17.1)
STEC	1	4	2	3	7		2		16	2	37 (33.6)
STEC:F4				1					1		2 ( 1.8)
STEC:F18	1	9	4	19	4	1	7		17	9	71 (64.5)
<b>Subtotal</b>	<b>2</b> (50.0)	<b>13</b> (17.3)	<b>6</b> (10.7)	<b>23</b> (25.3)	<b>11</b> (19.3)	<b>1</b> (4.8)	<b>9</b> (25.7)	<b>0</b> (0.0)	<b>34</b> (16.7)	<b>11</b> (30.6)	<b>110</b> (18.7)
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>75</b>	<b>56</b>	<b>91</b>	<b>57</b>	<b>21</b>	<b>35</b>	<b>12</b>	<b>204</b>	<b>36</b>	<b>591</b>

분리된 대장균들을 연령별로 분석한 결과를 Table 8에 나타내었다. 이유자돈이 405균주로 가장 높게 분리되었으며, 육성돈 149균주, 비육돈 39균주가 분리되었다. 이유, 육성 및 비육돈에서는 대부분의 균주들이 각각 280, 70, 30균주가 설사를 일으키는 ETEC가 대부분을 차지하였다. 그러나 부종을 일으키는 ETEC/STEC 및 STEC 균주는 이유자돈에서 각각 64균주 (15.8%) 및 61균주 (15.1%)로 분리되었으나, 육성돈에서는 각각 33균주 (22.1%) 및 46균주 (30.9%)로 STEC 균주가 급격히 증가하는 것이 확인되었다. 그러나 비육돈에서는 이유자돈과 유사하게 10% 정도로 낮게 검출되는 것으로 보아 부종병은 육성돈에서 감수성이 매우 높은 것이 확인되었다.

Table 8. 설사증/부종병에 이환된 자돈에서 분리한 병원성 대장균의 연령별 분석

Pathotype	연령별 병원성대장균 분리건수(%)			Total
	이유	육성	비육	
ETEC	109	32	19	160 (42.1)
ETEC:F4	71	8	5	84 (22.2)
ETEC:F5	7	3		10 ( 2.6)
ETEC:F6	1	1		2 ( 0.5)
ETEC:F18	69	24	3	96 (25.3)
ETEC:F41	9		2	11 ( 2.9)
ETEC:F4:F18	7	1	1	9 ( 2.3)
ETEC:F4:F41	1	1		2 ( 0.5)
EPEC	1			1 ( 0.3)
STEC/EPEC	5			5 ( 1.3)
<b>Subtotal</b>	<b>280 (69.1)</b>	<b>70 (47.0)</b>	<b>30 (81.1)</b>	<b>380 (64.3)</b>
ETEC/STEC	10	8	3	21 (20.8)
ETEC/STEC:F18	51	24	1	76 (75.2)
ETEC/STEC:F4	2			2 ( 1.9)
ETEC/STEC:F4:F41	1			1 ( 0.9)
ETEC/STEC:F41		1		1 ( 0.9)
<b>Subtotal</b>	<b>64 (15.8)</b>	<b>33 (22.1)</b>	<b>4 (10.8)</b>	<b>101 (17.1)</b>
STEC	20	15	2	37 (33.6)
STEC:F4	1	1		2 ( 1.8)
STEC:F18	40	30	1	71 (64.5)
<b>Subtotal</b>	<b>61 (15.1)</b>	<b>46 (30.9)</b>	<b>3 (8.1)</b>	<b>110 (18.7)</b>
<b>Total</b>	<b>405</b>	<b>149</b>	<b>37</b>	<b>591</b>

나. 병원성 대장균의 항생제 내성 패턴 분석 및 유전자 검색

연령별로 설사에서 분리한 대장균의 항생제 내성패턴을 Table 9에 나타내었다. 전체적으로 이유자돈에서 육성비육돈보다 MIC가 높게 조사되었다. 이는 이유 후 설사 등을 예방할 목적으로 주사제 등의 사용이 증가한 영향으로 판단된다. 특히 농장에서 많이 사용하는 퀴놀론인 ciprofloxacin의 경우 이유자돈에서 분리된 균들이 (2µg/mL) 육성비육돈 (0.125µg/mL)보다 높게 나타났다. 또한 nalidixic acid에서도 이유자돈 (128µg/mL)이 육성비육돈 (2µg/mL)보다 높게 나타났다. 또한 최근에 문제되는 제3세대 항생제인 ceftiofur는 대부분의 연령에서 0.5µg/mL정도로 낮게 나타나 현재까지는 내성이 나타나지 않는 것으로 확인되었다.



Table 9. 설사돈에서 분리한 병원성 대장균의 최소억제농도 (MICs) 측정

Antimicrobial agents	Weaned (n = 50)			Grower-finisher (n = 20)		
	Range (µg/mL)	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Range (µg/mL)	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
GM	1 - 64	32	64	1 - 32	1	32
N	2 - 32	32	32	2 - 32	4	32
S	8 - 128	128	128	8 - 64	64	64
AM	2 - 64	64	64	2 - 64	16	64
AmC	4 - 64	8	16	2 - 8	2	8
CF	4 - 64	16	32	4 - 8	8	8
FOX	2 - 32	4	8	2 - 4	2	4
XNL	0.5 - 1	0.5	0.5	0.5 - 0.5	0.5	0.5
CIP	0.12 - 16	2	16	0.12 - 0.12	0.125	0.125
SXT	0.12 - 4	4	4	0.12 - 4	0.25	4
C	8 - 64	64	64	4 - 64	8	64
FFC	8 - 64	64	64	4 - 64	4	64
CL	2 - 2	2	2	2 - 2	2	2
NA	4 - 128	128	128	2 - 4	2	4
TE	2 - 128	128	128	2 - 128	64	128

GM = gentamicin, N = neomycin, S = streptomycin, Am = ampicillin, AmC = amoxicillin / clavulanic acid, CF = cephalothin, FOX = ceftioxin, XNL = ceftiofur, CIP = ciprofloxacin, SXT = sulfamethoxazole / trimethoprim, C = chloramphenicol, FFC = florfenicol, CL = colistin, NA = nalidixic acid, TE = tetracycline

MIC<sub>50</sub>=MIC required to inhibit growth of 50% of *Escherichia coli* isolates.

MIC<sub>90</sub>=MIC required to inhibit growth of 90% of *Escherichia coli* isolates.

#### 다. 돼지 부종병 공격접종 모델 확립 시험

##### (1) 병원성 유발시험

제 1협동으로부터 인계받은 3가지의 F18 아종(F18ab, F18ac, F18new variant)별 *E. coli*를 공격균주로 돼지에 경구 접종하고 음성대조균으로 Non-pathogenic 균주를 경구 접종하였다 (Table 10). 혈관 접종균은 균주 배양 상층액과 Anion chromatography법을 이용한 정제된 STX2e를 사용하여 진행하였다. 총 60마리의 돼지로 경구 접종의 경우 그룹별 5마리씩 식도 삼관을 통해 10ml씩 접종하였다. 혈관 접종의 경우 그룹별 5마리씩 이정맥에 1ml씩 공격 접종하였다. 임상증상은 Table 11 과 같이 확인하였다.

Table 10. 돼지 부종병 공격접종 실험군

Groups	Route	Group	No. of pigs	Method	Remarks	
Treat ment	Oral	A-1	5	F18ab	Wild type O139(F18ab)	
		A-2	5	F18ac	Wild type O35(F18ac)	
		A-3	5	F18new	Wild type O121(F18new)	
	Intra -Venous	B-1	5	정제원액 (270ug)	Purified samples	Wild type O139
		B-2	5	정제2X (135ug)		
		B-3	5	정제5X (54ug)		
		B-4	5	정제10X (27ug)		
		B-5	5	배양상층액 10X	0.378 O.D <sub>492</sub>	
		B-6	5	배양상층액 20X		
		B-7	5	배양상층액 30X		
Control	Oral	C-1	5	비병원성 균주	10 <sup>10</sup> CFU/ml O24 (Non pathogenic)	
	Non-	C-2	5			

Table 11. 돼지 부종병 임상증상 score

Score	Clinical sign
0	무증상
1	안와에 부종이 나타나며, 약간의 활력저하를 나타낸다.
2	안와 및 피하에 부종이 나타나며, 활력저하를 나타낸다 (Edema of eyelids and face, ataxia).
3	활력이 현저히 낮아지며, 약간의 신경증상을 동반한다 (recumbence, convulsion).
4	신경증상으로 인해 걷지 못하며, 전신에 마비가 나타난다 (padding legs, paralysis).
5	심한 신경증상으로 인해 호흡곤란이 나타나거나 폐사한다 (dyspnea, sudden death).

접종 후 1~2 시간 내에 과민 반응이 없는지 확인해 본 결과, 경구로 공격접종 한 그룹 (A group)에서는 접종반응이 나타나지 않았다. 반면 혈관접종 (B group)의 경우, 모든 자돈에서 과민반응을 나타냈으며, 정제 toxin를 공격 접종 (B-1~4)한 후 6시간 ~1 일 만에 그룹 내 모든 자돈이 폐사하였다. 경구 접종의 경우 F18ac (A-2) 및 F18new (A-3)에서도 병원성이 확인되었다. 음성대조군 (C1~2)에서는 임상증상을 보이지 않았다 (Table 12).

Table 12. 돼지 부종병 공격접종 실험 그룹별 누적 폐사 수

Day of Challenge		0	1	2	4	6	7		
Route	Groups	Method	No. of pigs	No. of accumulated death (clinical score)					
Oral	A-1	F18ab	5(11~15)	0	2 (2.8)	3 (4 )	3 (4 )	4 (4.4)	4 (4.6)
	A-2	F18ac	5(21~15)	0	1 (1.8)	1 (2.2)	1 (2.6)	2 (2.8)	2 (3.2)
	A-3	F18new	5(31~35)	0	0	0	1 (1.8)	1 (1.8)	1 (2.2)
Intra-Venous	B-1	STX2e(270ug)	2(41~42)	0	5 (5 )	5 (5 )	5 (5 )	5 (5 )	5 (5 )
	B-2	STX2e(135ug)	2(43~44)	0	5 (5 )	5 (5 )	5 (5 )	5 (5 )	5 (5 )
	B-3	STX2e(54ug)	2(45~46)	0	5 (5 )	5 (5 )	5 (5 )	5 (5 )	5 (5 )
	B-4	STX2e(27ug)	2(47~48)	0	5 (5 )	5 (5 )	5 (5 )	5 (5 )	5 (5 )
	B-5	culture supernatant (10X)	2(51~52)	0	0	5 (5 )	5 (5 )	5 (5 )	5 (5 )
	B-6	culture supernatant (20X)	2(53~54)	0	0	3 (3.8)	5 (5 )	5 (5 )	5 (5 )
	B-7	culture supernatant (30X)	2(55~56)	0	0	0	0	1 (1.8)	1 (2.2)
Oral	C-1	non-pathogenic strain	5(61~65)	0	0	0	0	0	0
Oral	PBS		5(66~70)	0	0	0	0	0	0

공격 접종 후 폐사돈 및 신경증상을 나타내는 자돈을 안락사하여 조직병변을 살펴본 결과 (Fig.2), 경구 접종 시 (F18ab) 뇌간이 액화 (연화)되어 신경증상이 나타나고 그 후 shock가 나타난 것을 확인 할 수 있었다. 십이지장, 공장 등 상부소화기에서는 F18ac (A-2)의 경우 혈관에 울혈 소견이 보이며 체중감소 및 설사병을 유발한 것으로 확인된다. 회장, 대장 등 하부소화기의 경우 장 융모세포의 탈락 및 부종으로 인한 혈관손상이 다소 보이긴 하나 부종병과 직접적인 연관을 나타내는 조직병변은 나타내지 않았다. 반면 정제 및 상층액을 이용한 혈관 접종 시 (D group) 회장 및 대장 혈관 내 막에 괴사소견이 관찰되었다. 또한 뇌간 및 대뇌피질의 혈관이 손상되면서 광범위한 연화소견이 관찰되었다. 또한 위와 상부소화기에는 심한 출혈소견이 관찰되었다. 하지만 면역기관에서는 별다른 조직병변을 나타내지 않았다. 이와 같은 결과를 바탕으로 돼지에서 부종병 STX2e 공격접종은 정제된 항원을 혈관 접종하여 생존율과 임상증상을 파악 하는 것으로 결정하였다.

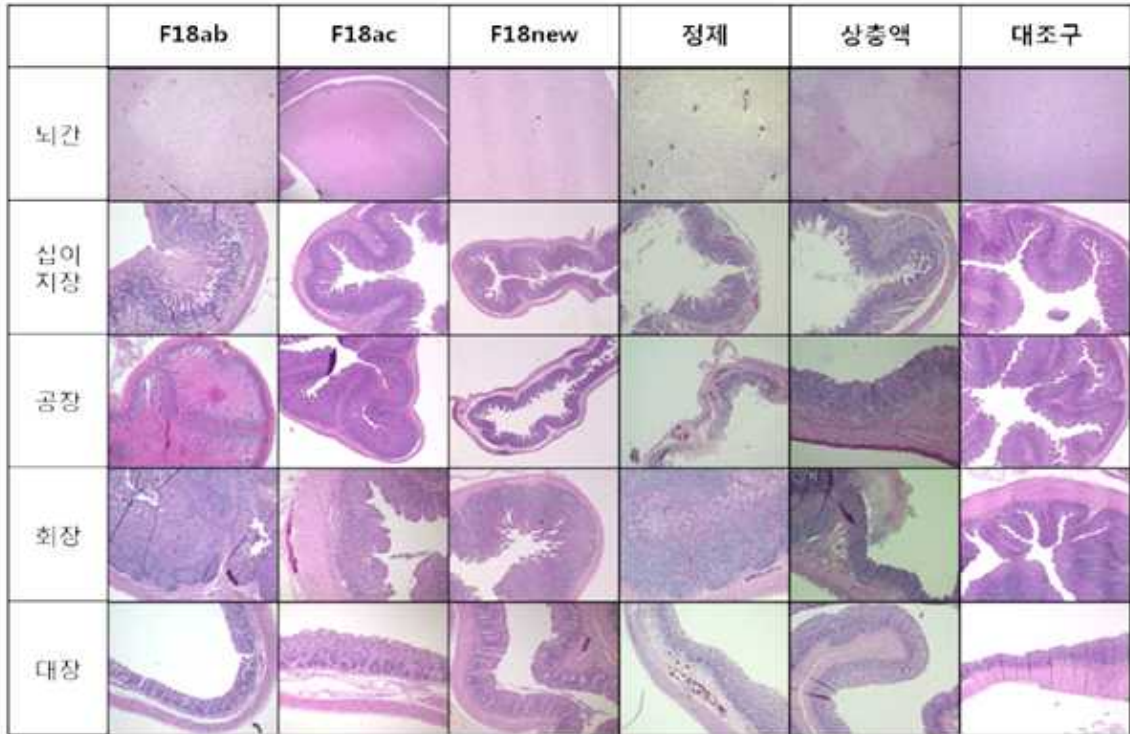


Fig 2. 부종병 공격접종 후 조직병변

### (2) 목적동물(돼지)에서 LD<sub>50</sub>선정 시험

정제된 STX2e를 이용하여 돼지 이정맥으로 1ml 씩 접종하여 7일 동안 관찰하였다. 그 결과 돼지의 LD<sub>50</sub>은 1.5 µg/kg으로 나타났다 (Table 13).

Table 13. 돼지 이정맥 접종 후 생존율 실험 결과

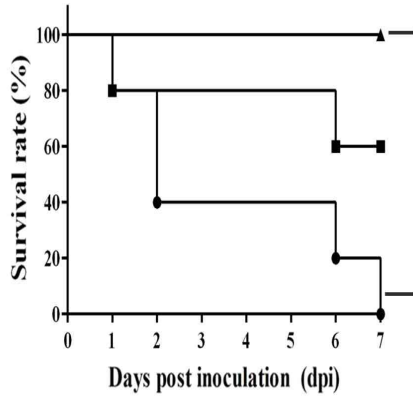
용량	공격접종 후 일자별 폐사수							생존수 / 총수	생존율 (%)
	1	2	3	4	5	6	7		
4µg / kg	3	.	.	.	.	.	.	0 / 3	0
2µg / kg	2	.	1	.	.	.	.	0 / 3	0
1µg / kg	.	.	.	.	.	.	.	3 / 3	100

### (3) 공격접종 후 Cytokine RNA 발현 조사

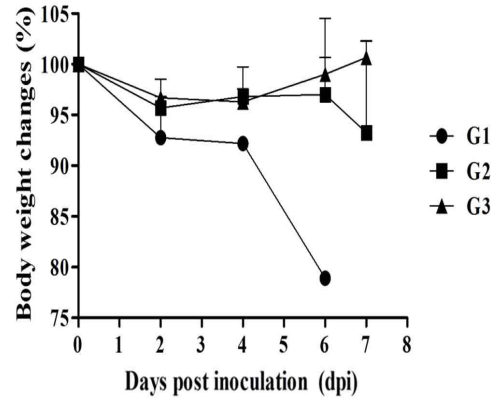
#### ○ 공격접종

병원성 대장균의 병원성여부를 확인하기 위하여 국내에서 설사병/부종병에서 분리된 대장균을 선발하였다. 대장균의 병원성인자 및 O type을 확인하였으며 (G1: O139:F18ab:STX2e:AIDA+, G2: O35:F18ac:LT:STa:STX2e:AIDA) 이를 혈액배지에서 2대 계대한 후 공격시험에 사용하였다 (Table 14). 이유된 30일령의 자돈 15두를 구입하여 그룹별로 5마리씩 7일간 순치하였다. 이후 접종군 (G1, G2)과 대조군 (PBS)로 구분하여 실험을 실시하였다. 경구접종군은 10<sup>10</sup>CFU/ml를 2ml 접종하였으며, 대조군은 PBS 10ml을 경구접종하였다. 또한 접종군은 Sodium deoxycholate

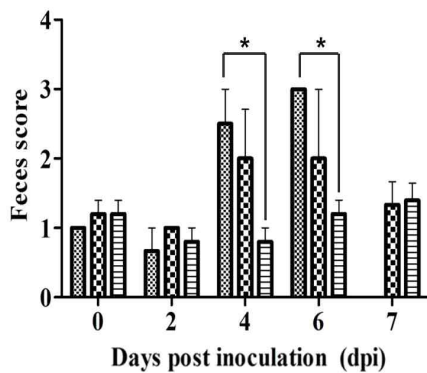
(5mM, 10ml)를 음수로 투여하였다. 총 7일간 매일 분변, 체중, 혈액 및 체온을 측정하였다. 또한 신경증상이나 폐사의 징후를 보인 개체는 안락사 후 부검하였다. 7일 후에는 모든 돼지를 부검하여 병리조직검사를 수행하였다.



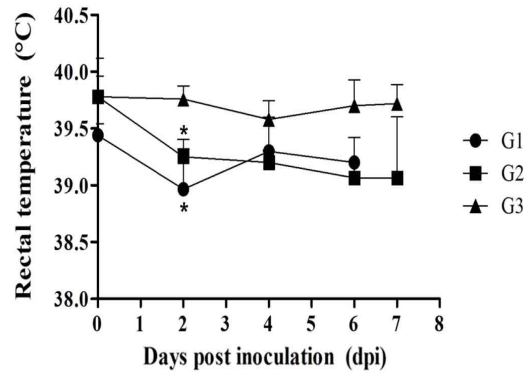
생존율 변화



체중변화



분변 scoring 변화



체온변화

Table 14. 공격접종시험 방법

구분	투여방법	마리수	접종량	비고
G1		5 (11~15)	10 <sup>10</sup> CFU/ml (wild A)	Sodium deoxycholate (5 mM, 10 ml)
G2	경구접종	5 (21~25)	10 <sup>10</sup> CFU/ml (wild B)	Sodium deoxycholate (5 mM, 10 ml)
G3		5 (66~70)	10 ml	PBS

조직 내 Cytokine 발현정도를 real-time PCR을 이용하여 확인하였다 (Fig. 3). GAPDH를 대조구로 사용하여 결과를 보정하였다. 장관에서 IL-6는 G1에서 1000배 이상 발현이 높은 것으로 확인되었다. 그러나 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 에서는 유의적인 증가가 나타나지 않았다. IL-10에서는 G1그룹이 G2보다는 십이지장 및 공장에서 증가하는 것을 확인하였다. IL-6는 호중구와 같은 면역세포를 유도하는 역할을 하는 것으로 알려져 있어 감염초기에 병변(괴사)에 영향을 미칠 것으로 판단되었다.

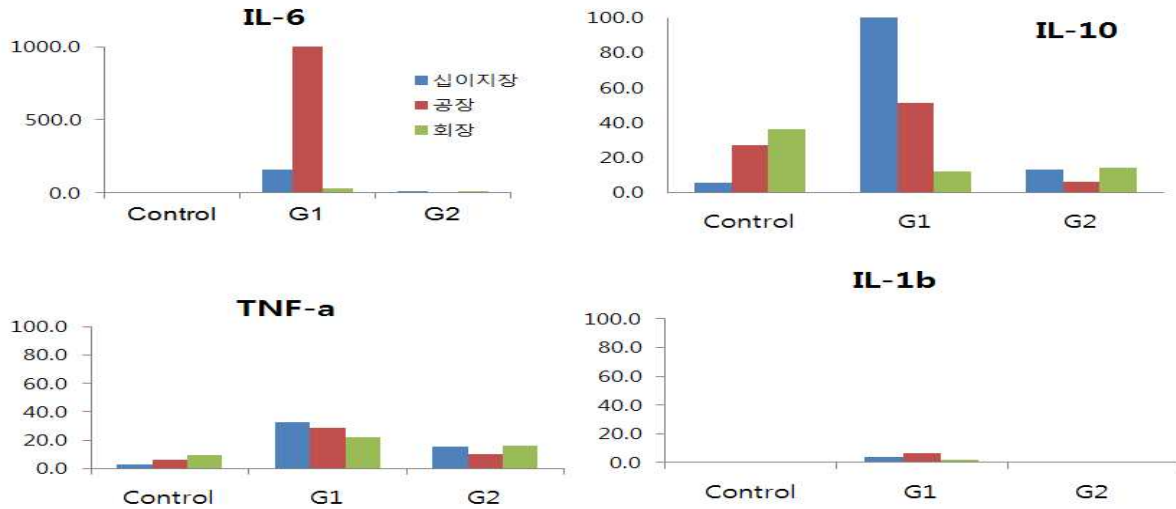


Fig 3. 투여군별 Cytokine RNA 발현율

#### 라. 돼지 부종병 Stx2e 항원에 대한 ELISA 시험법 확립

##### (1) 돼지에서 Shiga toxin 정제 항원 적합성 검사 (Fig. 4)

- 1차 항원 농도 설정 시험 : 8 ~ 512 ng/ml 항원 희석 구간에서 항원 coating 농도 및 conjugate 농도에 비례하게 양성 혈청 O.D값이 유의적으로 증가하며 음성 혈청 O.D값이 낮게 유지되는 것으로 보아 Shiga toxin 정제항원이 coating 항원으로 적합함을 확인하였다.

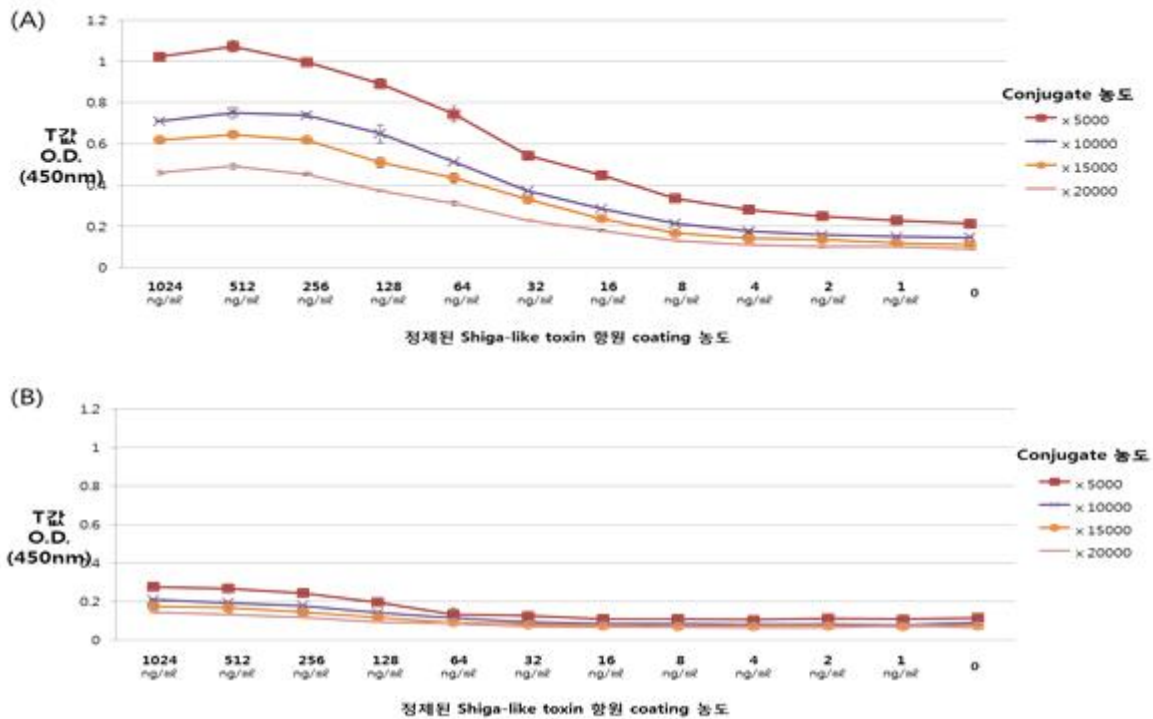


Fig 4. 돼지에서 Shiga toxin 정제 항원 coating 및 conjugate 농도별 ELISA 결과. (A)양성 혈청, (B) 음성 혈청

(2) 2차 항원 농도 설정 시험

- 1차 항원 농도 설정 시험 시 O.D 값이 높게 형성되었다고 판단하여 조건을 Conjugate 농도조건을 변경 하여 음성과 양성 구별에 유의적인 차이가 있는지 확인 하였다 (Fig 5). 그 결과 최종적으로 항원 농도는 128 ng/ml과 conjugate 20,000배 희석으로 시험법을 확립하였다.

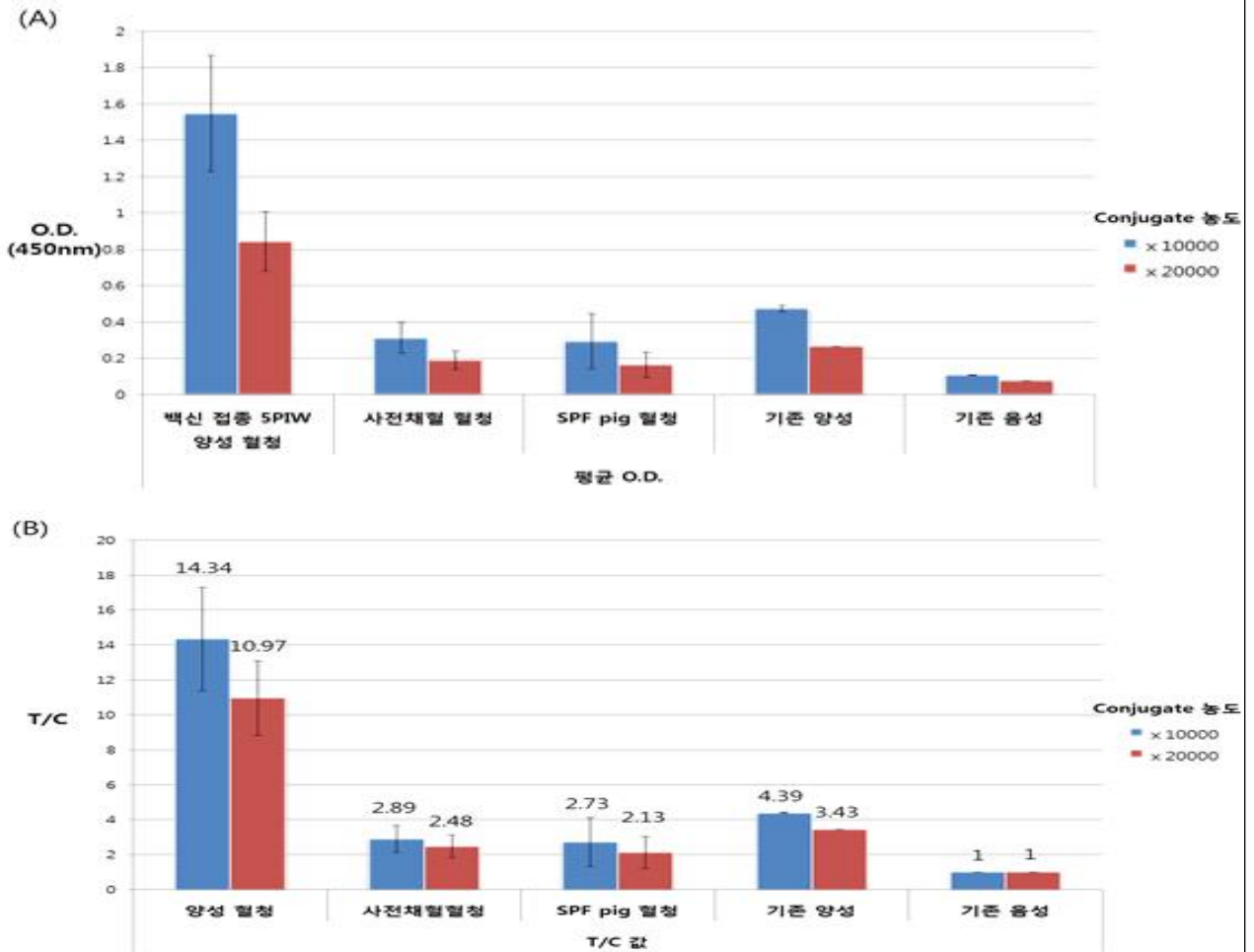


Fig 5. Conjugate 농도 비교 ELISA 결과. (A) 평균 O.D 값 (B) 평균 T/C 값.

(3) 돼지에서 혈청 희석 배율 비교 및 결정 시험

- 음성 cut-off value를 0.2 이하로 잡기 위해 혈청 희석 배율을 조정하여 실험을 실시 하였다 (Fig 6). 논문을 참고 하여 임의적으로 음성 cut-off value 값은 평균값에 표준편차 3배를 더한 값으로 설정하였으며 양성 cut-off value 값은 평균값에 표준편차 1.5배를 뺀 값으로 설정하였다. 그 결과 최종적인 혈청 희석 배율은 200배로 확립하였다.



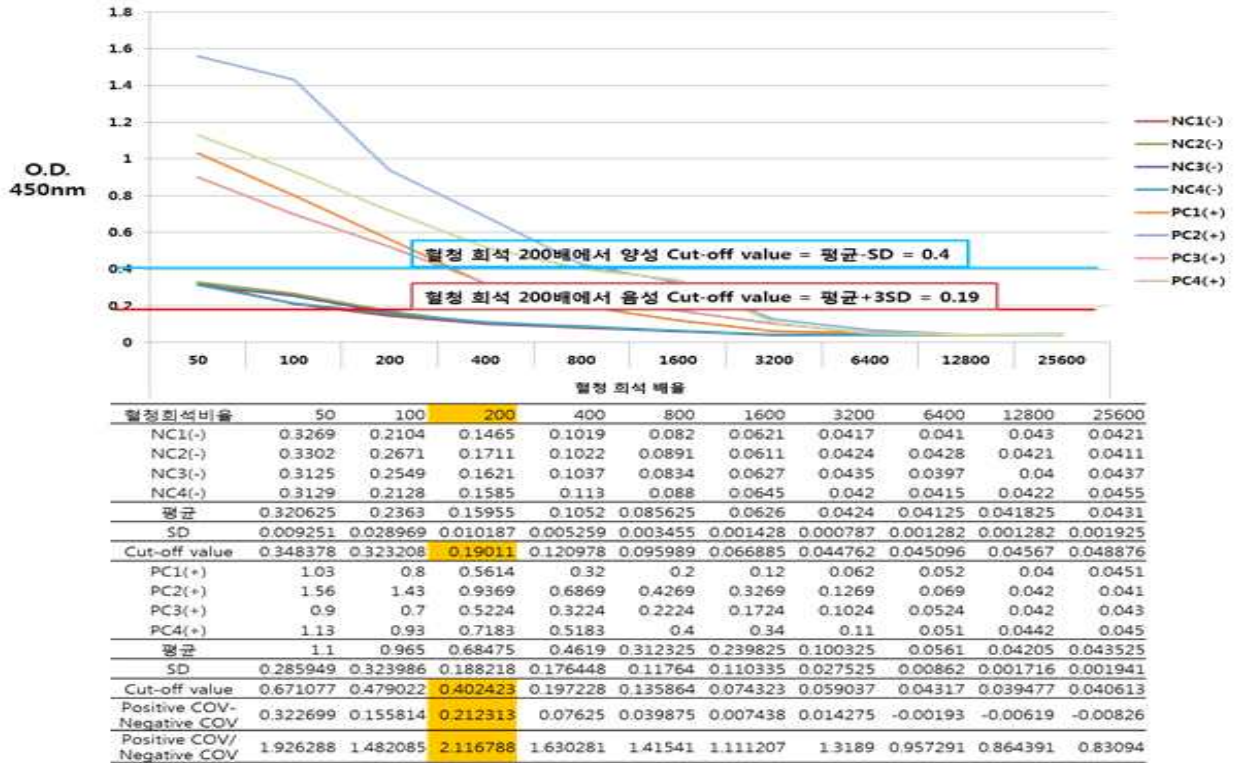


Fig 6. 혈청 희석 배수별 음성 및 양성 혈청 O.D 값 및 cut-off value

#### (4) 결과 재현성 실험

- 시험을 통해 얻어진 혈청을 통해 선정된 시험 방법의 재현성을 확인하였다. 3반복 실험 결과 통상적인 허용기준 20% 이내의 CV(Coefficient variation 표준편차/평균 값) 0.2~18.56 수준을 나타냈다.

#### 마. 돼지 부종병 세포 독성 시험 및 중화시험 확립

##### (1) Shiga toxin 감수성 차이에 의한 cell 결정 시험

- Shiga toxin에 의한 vero cell에서 감수성의 차이를 확인하기 위해 vero-k, vero-ky5, vero-clone cell을 이용하였다 (Table 15). 실험 결과 vero-ky5와 vero-clone cell은 STX2e toxin에 의한 세포 감수성이 거의 동일하였으며 이 두 세포와 달리 vero-k cell은 더 낮은 농도의 toxin에 의해서도 CPE가 나타났다. S/N 시험을 위해서는 독소에 대한 감수성이 더 민감하고 독소 함량을 적게 처리하는 cell이 효과적이기 때문에 부종병의 S/N test는 vero-k cell로 결정하였다.



Table 15. Shiga toxin 정제항원 및 ED 배양 상층액의 vero cell cytotoxicity assay

세포	세포독성조사(Cytotoxicity Assay)		
	정제된 단백질 총량		배양 상층액
	180mg/ml	250mg/ml	
Vero-ky5	10 <sup>4.41</sup> TCID50/ml	10 <sup>6</sup> TCID50/ml	10 <sup>5.53</sup> TCID50/ml
Vero-clonell	10 <sup>4.53</sup> TCID50/ml	10 <sup>6.2</sup> TCID50/ml	10 <sup>5.59</sup> TCID50/ml
Vero-K	10 <sup>7.2</sup> TCID50/ml	10 <sup>8.59</sup> TCID50/ml	10 <sup>7.1</sup> TCID50/ml

(2) Vero-K cell에서 S/N test-용 Shiga-toxin(항원) 함량 결정 시험

- ELISA 검사 결과 혈청가가 높은 마우스와 돼지의 혈청을 이용하여 시험을 진행하였다. 시험 결과 STX2e toxin에 대한 중화 반응이 성립이 되며 음성과 양성 혈청간의 역가 차이가 큰 함량은 320 ng/0.1ml이며 돼지 혈청에서만 성립된다 (Table 16).

Table 16. 마우스와 돼지 혈청에서 Shiga-toxin 함량별 중화 항체가

구분	마우스				
	2,560ng/0.1ml	1,280ng/0.1ml	640ng/0.1ml	320ng/0.1ml	160ng/0.1ml
Shiga-toxin 단백질 함량					
양성혈청1	NO CPE	NO CPE	NO CPE	NO CPE	NO CPE
양성혈청2	NO CPE	NO CPE	NO CPE	NO CPE	NO CPE
음성혈청1	NO CPE	NO CPE	NO CPE	NO CPE	NO CPE
음성혈청2	NO CPE	NO CPE	NO CPE	NO CPE	NO CPE
구분	돼지				
Shiga-toxin 단백질 함량	2,560ng/0.1ml	1,280ng/0.1ml	640ng/0.1ml	320ng/0.1ml	160ng/0.1ml
양성혈청1	< 2	< 2	2	8	NO CPE
양성혈청2	< 2	< 2	4	16	NO CPE
음성혈청1	< 2	< 2	< 2	< 2	NO CPE
음성혈청2	< 2	< 2	< 2	< 2	NO CPE

바. 마우스 및 토끼에서 STX2e에 대한 항체생산 (immunochromatography 용)

- STX2e (180ug/ml) 접종액을 1~1.5kg의 토끼와 15~20g 마우스에 피하접종 (Subcutaneous injection; SC) 방법으로 토끼는 1ml씩, 마우스는 0.2ml씩 접종 하였다. 접종 주기는 Freund's complete adjuvant로 제조 된 것을 최초 접종액, 이후 Freund's incomplete adjuvant로 제조하여 2주 간격으로 총 4차 접종을 진행하고, 4차 접종 2주 후에 심장에서 전체 채혈하였다. Rabbit에서는 1차 접종 2주 후부터 (3.75±0.5) log<sub>2</sub>항체를 보이며, 3차 접종 2주 후는 (5.75±0.5)log<sub>2</sub>,4차 접종 2주후는 (6.5±0.577) log<sub>2</sub>의 항체가 확인되었다. Mouse에서는 1차 접종 2주 후부터 평균 (2±0.1) log<sub>2</sub> 중화항체를 보이며, 3차 접종 2주 후는 (3.75±0.5)log<sub>2</sub>,4차 접종 2주 후는 (4.75±0.5) log<sub>2</sub>의 항체가 확인되었다 (Table 17).

Table 17. 마우스 및 토끼에서 STX2e 혈청 증화 항체가 (log<sub>2</sub>)

STX2e		채혈 차수별 혈청 증화항체가 (혈청 희석배수 ; log <sub>2</sub> , Rabbit n = 2, Mouse n = 10)		
		1차 접종 2주 후	3차 접종 2주 후	4차 접종 2주 후
Rabbit	시험혈청	3.75 ± 0.5	5.75 ± 0.5	6.5 ± 0.577
	음성혈청	0	0	0
Mouse	시험혈청	2.00 ± 0.1	3.75 ± 0.5	4.75 ± 0.5
	음성혈청	0	0	0

### 사. 부종병 신속진단키트 생산기법 확립

#### (1) 생산 원리

- Pro-Check Stx2e Ag Rapid Kit는 면역 크로마토그래피법을 원리로 하여 검사선 부위에 포획물질 (Capture)인 단클론 항-부종병 (Stx2e) 항체를 고정 (immobilization) 시킨 나이트로셀룰로스 멤브레인 상에 돼지분변의 검체 추출물을 전개 시켜 돼지 부종병 Stx2e항원의 존재 유무를 검사하는 시약이다.
- 검체에 존재하는 돼지 부종병 항원 (Stx2e)이 골드 콘쥬게이트와 먼저 반응한 다음, 검사선 부위의 단클론 항- 돼지 부종병 Stx2e 항체가 재차 반응하면 적자색을 띄는 골드 복합체가 침적되어 발색이 되도록 고안 되었다.

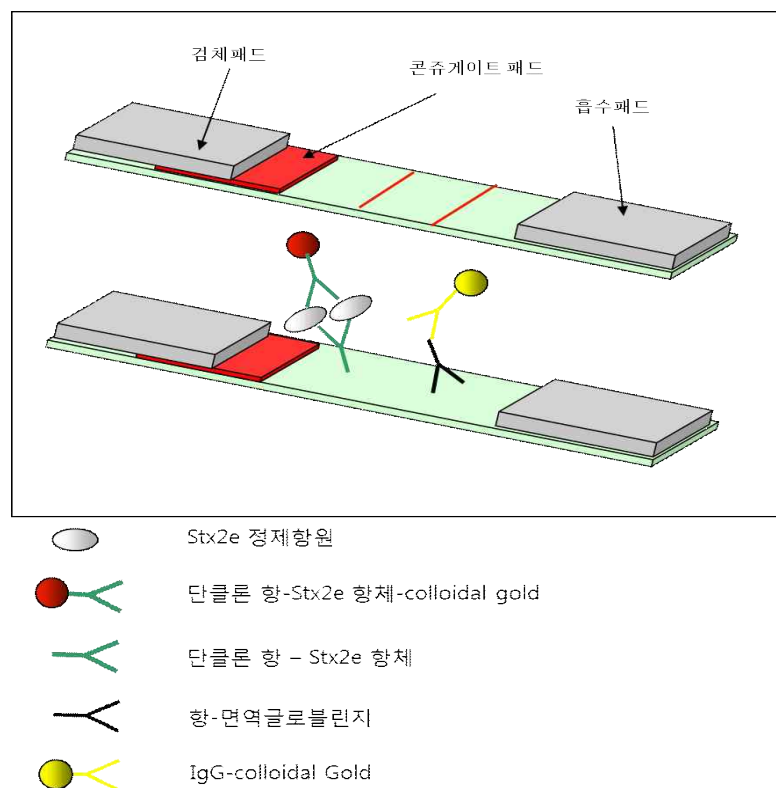


Fig 7. 반응모식도 (schematic diagram of reaction mode of Pro- Check PED Ag rapid Kit)

## (2) 시험방법

### (가) Antigen specific purified antibody

- 마우스 및 토끼에서 STX2e에 대한 항체생산을 통해 제작된 혈청 (Polyclonal antibody)를 이용하여 antigen affinity column (resin)을 이용하여 STX2e 항원을 코팅하여 이 항원에 반응하는 antibody를 capture하여 이용

- ① Gp : 1.0mg/ml
- ② Mouse : 0.7mg/ml
- ③ Swine : 1.0mg/ml 의 농도로 나이트로 셀룰로스 막에 흡착시킨다.



### (나) IgG-colloidal Gold 설정

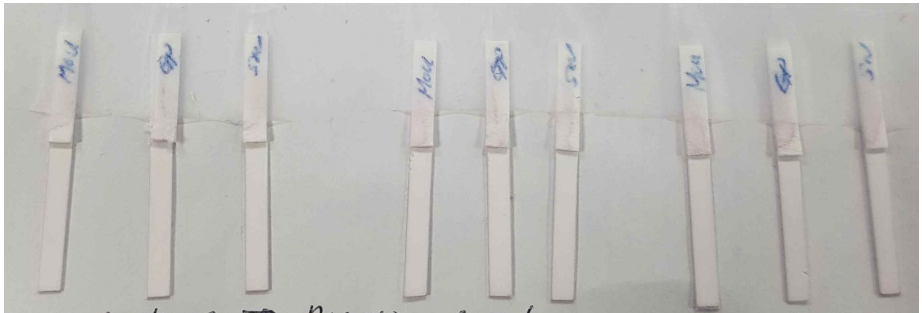
- ① GP : 0, 2.5ng/ml, 25ng/ml
- ② Mouse : 0, 2.5ng/ml, 25ng/ml
- ③ Swine : 0, 2.5ng/ml, 25ng/ml 의 농도로 conjugate 농도를 설정하여 골드 콘쥬게이트 양을 설정한다.

## (3) 시험결과

- 나이트로셀룰로스 막에 마우스 Antigen specific purified antibody를 흡착시키고 마우스 IgG-colloidal Gold로 설정하였을 시 반응이 좋음을 확인되었다 (Table 18).

Table 18. 부중병 진단키트 동물유래 단일클론항체별 반응농도 평가

콘쥬게이트 농도 (ng/ml)	0 ng/ml			2.5ng/ml			25ng/ml		
	mouse	GP	Swine	mouse	GP	Swine	mouse	GP	Swine
Antigen specific purified antibody (GP)									
판정	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antigen specific purified antibody (Mouse)									
판정	-	+	-	++	++	-	+++	+	-

Antigen specific purified antibody (Swine)										
판정	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 아. 부종병 신속진단키트 평가

- 나이트로셀룰로스 막에 Antigen specific purified antibody를 흡착시키고 마우스 IgG-colloidal Gold로 설정한 신속진단키트를 제작하여 다양한 시료를 이용하여 검사 진행하였다 (Fig 8).



Fig 8. 부종병 신속진단키트 완성품

##### (1) 실험 sample 종류

- 양성 대조군으로 세균배양 및 PCR 검사 결과 부종병 양성 진단을 받은 분변이나 조직 sample과 부종병 백신 균주의 상층액, 부종병 Stx2e 정제 항원을 사용한다. 음성 대조군으로 PCR검사 결과 음성이었던 분변과 PBS를 이용한다.

##### (2) 검사 결과

- 시험 결과 PCR을 통하여 양성 진단을 받은 sample 10개중 9개만 kit상으로 양성 판정이 되었다 (Fig 9, Table 19). kit의 부종병 독소의 stx2e 검출 한계는 정제 항원의 검사 결과  $\times 100000$ 배( $1 \times 10^4$ TCID<sub>50</sub>/ml) 회석까지 검출이 가능하였다. 백신 균주 원액은  $\times 10000$ 배( $3 \times 10^4$ TCID<sub>50</sub>/ml)까지 검출 되었다. 추가적으로 부종병 음성 판정을 받은 실험 분변과 이유자돈 설사증 양성이지만 부종병 음성 분변과 PBS에서는 모두 음성으로 검출되었다. 종합하여 실제 PCR과 세균배양보다는 검출 한계가 낮지만 실제 농장에서 유전자검사보다 특이하게 부종병을 평가하는데 충분히 사용 가능 할 것으로 판단된다.



Fig 9. 부종병 신속진단키트 양성 및 음성 반응

Table 19. 야외 농장 및 실험실내에서 부종병 시료에 대한 진단키트 효능평가

구분	Sample 종류	번호	세부내역	실험 결과
양성	세균 배양 및 PCR 검사 결과 양성 진단을 받은 분변이나 조직 sample	1	P161115-049 분변	++
		2	P160816-032 분변	+
		3	P160810-021 분변	+
		4	P160729-105 분변	+
		5	P160725-085 분변	+
		6	P160624-090 분변	-
		7	P161109-031 조직	+
		8	P160906-016 조직	++
		9	P160825-062 조직	+
		10	P160713-045 조직	+
	부종병 백신균주 상층액	1	균주 원액 ( $3 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub> /ml)	++
		2	균주 원액 × 10	++
		3	균주 원액 × 100	++
		4	균주 원액 × 1000	++
		5	균주 원액 × 10000	+
		6	균주 원액 × 100000	-
		7	균주 원액 × 1000000	-
	부종병 Stx2e 정제 항원	1	정제 항원 원액 ( $1 \times 10^9$ TCID <sub>50</sub> /ml)	++
		2	정제 항원 원액 × 10	++
		3	정제 항원 원액 × 100	++
		4	정제 항원 원액 × 1000	++
		5	정제 항원 원액 × 10000	++
		6	정제 항원 원액 × 100000	+
		7	정제 항원 원액 × 1000000	-
		8	정제 항원 원액 × 10000000	-

음성	부종병 음성 분변	1	자돈분변 1	-
		2	자돈분변 2	-
		3	자돈분변 3	-
		4	자돈분변 4	-
		5	자돈분변 5	-
	이유자돈설사증 양성 분변	1	F4항원 검출 분변1	-
		2	F4항원 검출 분변2	-
		3	F5항원 검출 분변1	-
		4	F5항원 검출 분변2	-
		5	F6항원 검출 분변1	-
		6	F7항원 검출 분변2	-
	PBS	1	PBS1	-
		2	PBS2	-

## 2. <제1협동> 돼지 이유자돈 대장균 설사병 및 부종병 예방 백신 개발

### 가. 대장균 설사 및 부종병 백신 후보주 및 항원 검색

- 국내 돼지 설사병 및 부종병 발생 농장에서 장 및 분변 등 200건에서 병원성 대장균을 분리하여 STX2e 유전자를 보유한 59균주를 분리하였으며 대부분의 경우 O139에 속하고 F18ab 유전자를 보유하는 균주들이었다. 이 중에서 KEFS218 (F18:LT:STa:STX2e) 균주를 최종선발하였다 (Table 20).

Table 20. 국내 양돈장에서 분리된 병원성 대장균 특성

F18아형/병원성 대장균	O 혈청형									계
	111	120	121	127	136	139	146	기타	NT	
<b>F18ab</b>										
ETEC:F18						1		0	0	1
STEC/EPEC:F18						2		0	0	2
STEC:F18					3	29		4	4	40
<b>F18new variant</b>										
ETEC:F18			2					2	0	4
ETEC/STEC:F18	1		1					1	0	3
STEC:F18			9			2	2	1	0	14
<b>계</b>	<b>1</b>		<b>12</b>		<b>3</b>	<b>34</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>64</b>

### 나. STX2e 독소생산배지 비교시험

- 선발된 병원성대장균 (KEFS218)를 이용하여 A broth의 배지를 선발하여 미토마이

신 (mitomycin C) 첨가 및 미토마이신 (mitomycin C)에 Sodium deoxycholate (SD)를 0.3% 첨가하여 배양한 경우 ELISA 검사 결과 미토마이신 첨가 배양액보다 소듐디옥시콜레이트를 추가한 배지에서 3.5배 이상의 독소생산 상승효과를 확인하였다. 또한 배양 상층액을 0.2 $\mu$ m 필터하여 배로세포에 접종한 후 세포변성 유무를 확인한 결과 A broth에 미토마이신만 첨가한 경우 보다 미토마이신 + SD를 함께 처리한 그룹에서 세포변성효과가 4배 이상 증가하였다 (Table 21, 22, Fig 10).

Table 21. 시가독소 생산능 시험

시간	평균 흡광도 (ELISA)		
	대조구 (A broth)	Mitomycin C 첨가	Mitomycin C +SD (0.3%)첨가
1hr	0.049	0.057	0.078 $\pm$ 0.012
2hr	0.049	0.069	0.063 $\pm$ 0.021
3hr	0.058	0.068	0.169 $\pm$ 0.024
4hr	0.059	0.088	0.204 $\pm$ 0.015
5hr	0.050	0.083	0.174 $\pm$ 0.016

Table 22. 배로 세포를 이용한 역가 시험

시간	배로세포 독성시험		
	대조구 (A broth)	Mitomycin C 첨가	Mitomycin C + SD (0.3%)첨가
1hr	100	200	400
2hr	100	400	400
3hr	200	1,600	1,600
4hr	200	3,200	12,800
5hr	200	3,200	12,800

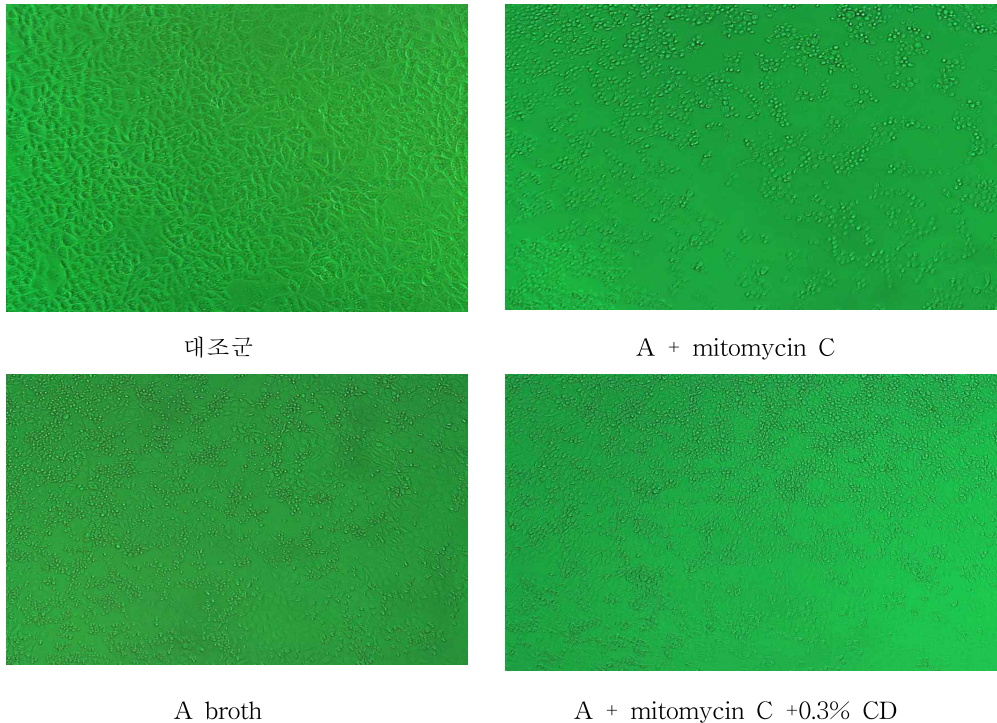


Fig 10. 배로세포에서 sodium deoxycholate 첨가 후 세포변성효과



#### 다. 부종병(STX2e) 단백질 정제

- 부종병 독소를 정제하기 위하여 대장균 배양액을 원심분리 (8,000 xg, 10 min) 후 상층액을 사용하였다. Anion exchange chromatography를 이용하여 HiTrap<sup>TM</sup> SP55column (GE,USA)을 사용하였다. FPLC를 사용하였다. 10mM Tris-HCl (pH7.6) buffer를 사용하여 5 M NaCl linear gradient로 단백질을 용출하였다 (Fig 11). 단백질 분획들은 12% SDS-PAGE (Mini-Cell kit, Invitrogen)를 실시하였다. 이후 nitrocellulose membrane에 transfer한 후 2% BSA로 blocking하였으며, 1차 항체 (anti-STX2 rabbit polyclonal antibody, Genetex)를 1:1000으로 희석액을 1시간 동안 처리하였다. Peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (KPL, 1:1,000)으로 1시간 반응 후 ECL detection kit (Amersham, Germany)를 이용하여 특이 단백질 밴드를 확인하였다 (Fig 12).

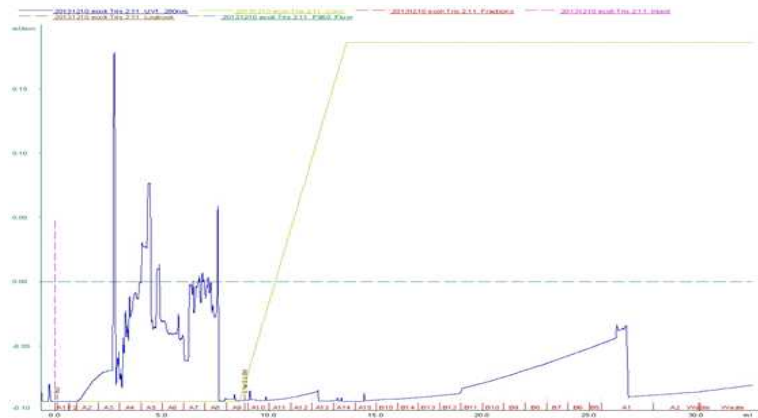


Fig 11. FPLC를 이용한 단백질 정제(anion exchange column)

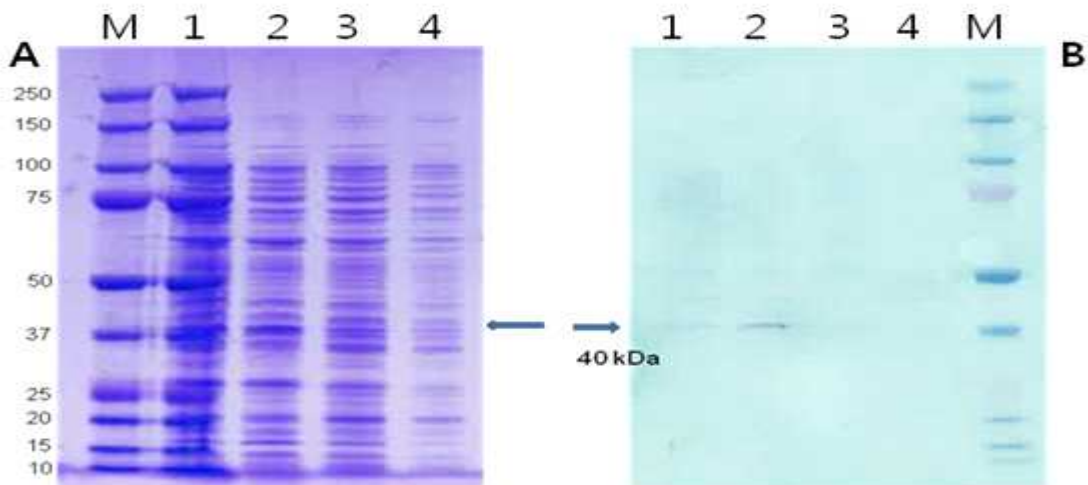


Fig 12. 정제된 STX2e 독소의 SDS-PAGE (A) and western blot (B)



라. 유전자 클로닝을 통한 부종병 항원 생산기법 확립

(1) STX2e cloning : 돼지 부종 원인 독소 (STX2e) 발현 벡터의 제조

- 돼지 부종병은 대장균 (Shiga toxin producing *E. coli*; STEC)이 생산하는 STX2e가 원인으로 A subunit 1개와 B subunit 5개로 구성된 독소 단백질로 B subunit toxin 부분이 타겟 세포에 부착하여 A subunit toxin이 세포를 투과할 수 있게 해주며 세포내로 삽입된 A subunit toxin이 세포의 단백질 합성을 방해하여 세포 괴사를 유발한다. 이 2개의 단백질 STX2eA와 STX2eB를 operon 구조로 대장균에서 발현 가능한 벡터를 제조하였다. 이때, 단백질 발현을 확인하기 위하여 STX2eB 유전자에 His tag을 같이 발현 시킨 벡터도 같이 제작하였다. operon 구조의 A subunit toxin과 B subunit toxin을 발현하는 플라스미드를 pET30 Stx2eA::B로 명명하고 His를 같이 발현하는 플라스미드를 pET30 Stx2eA::B his로 명명하였다.

또한, A subunit 의 2개의 아이노산 167번째 아미노산을 glutamic acid (E)에서 glutamine (Q)로 170번째 아미노산인 arginine(R)을 leucine(L)로 site directed mutagenesis kit (Stratagene)을 이용하여 point mutation시켜 세포독성을 상실하고 면역원성을 유지하고 있는 toxoid 발현 벡터를 제작하였다. operon구조의 toxoid 발현 플라스미드를 pET30 mStx2eA::B로 명명하고 His를 같이 발현하는 플라스미드를 pET30 mStx2eA::B his로 명명하였다. 벡터의 구조는 Fig 13과 같다.



Fig 13. 부종병 원인독소 (STX2e) 발현 벡터 구조

(2) 돼지 부종 원인 독소 (STX2e) 단백질 발현

- 제작한 발현 벡터를 대장균에 형질전환하여 수용성 단백질인 STX2e의 발현을 유도하였다. 이때 사용된 대장균은 B 계열 대장균 BL21(DE3) (*E. coli B F-dcm opmT hsdS (rB- mB-a) gal λ*, Novagen, USA)을 효소 유전자 발현을 위한 숙주세포로 사용하였으며, 상기 형질 전환체는 50 µg/ml 의 kanamycin을 함유하는 auto induction 배지를 이용하여 37°C, 25°C에서 각각 약 16시간 동안 배양하였다. 발현시스템은 auto induction 배지를 이용하여 락토오즈를 유도 물질로 대체하여, 재조

합 균주의 세포농도 증식과 단백질 과발현을 유도하였다. 과발현된 균주에서 단백질의 발현은 세포 파쇄 후 원심분리를 통해 수용성 단백질과 불용성 단백질을 분리한 뒤 SDS-PAGE로 확인하였다. His tag을 통한 웨스턴 분석으로 단백질 발현을 확인하였다 (Fig 14).

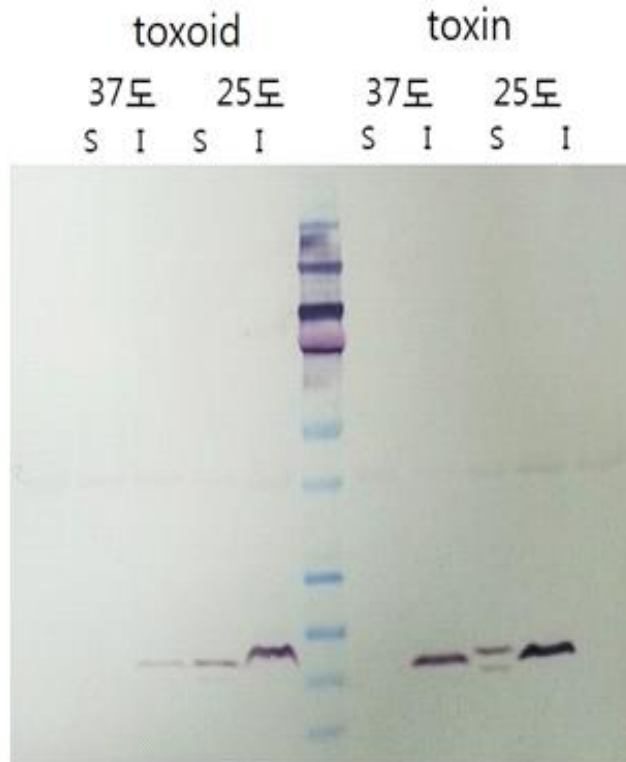


Fig 14. 독소 웨스턴 블릿을 이용한 STX2e 발현 확인

#### 마. 부착인자와 독소인자 동시 발현백터의 제조

- 부착인자 F4 (*FaeG*)와 F18 (*FedF*), 독소인자 LT (heat labile toxin, elt A linker elt B)를 코딩하는 유전자를 코돈 최적화하여 대장균에서 발현 가능한 백터를 제조하였다 (Fig 15). 이때 사용된 유전정보는 KEFS1057 (F4:LT:STb)의 F4 서열 중 1번째에서 197번째 아미노산을 참고하였고, KEFS218 (F18:LT:STa:STX2e)의 F18 서열 중 60번째에서 109번째 아미노산을 참고하고, LT 유전자는 KEFS1057를 주형으로 하고 *eltA* (accession no. ABV01336)의 1번째에서 60번째 아미노산, *eltB* (accession no. WP\_024168673)의 1번째에서 103번째 아미노산 서열을 참고하였다. 각 부착유전자와 독소유전자에 종결코돈을 제거하고 미국의 DNA2.0사에서 대장균에 맞는 코돈 최적화를 수행하였다. 코돈 최적화된 F4-F18-LT는 5'말단에 *EcoR* I, 3'말단에 *Xho* I 제한효소 사이트를 삽입하여 pJ201 백터에 삽입하여 제작되었으며, pJ201-F4-F18-LT로 명명하였다. 플라스미드를 *EcoR* I과 *Xho* I 제한 효소 처리 후, 같은 제한 효소로 분해된 pET28-MBP 백터에 도입되었다. 단백질의 수용성발현 증진을 위해서 부착인자와 독소인자 앞에 MBP 융합 단백질을 연결하였다.

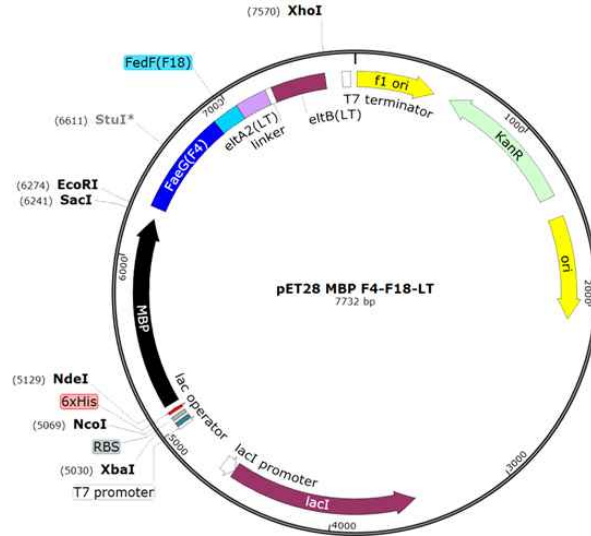


Fig 15. 부착인자와 독소인자 동시 발현벡터

#### 바. 재조합 유전자 발현

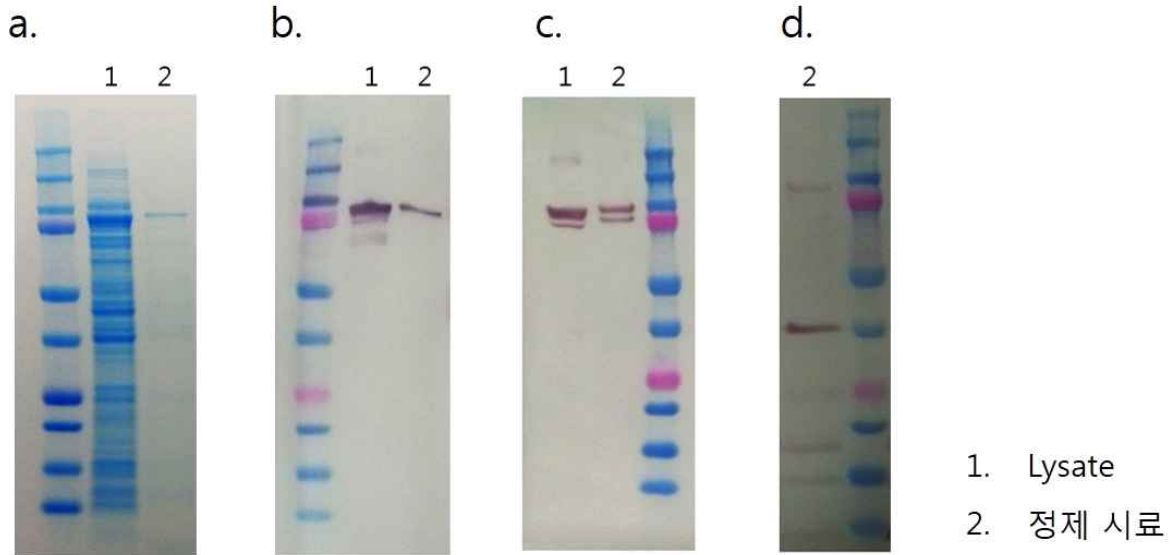
- 벡터 대장균을 형질전환하여 발현을 유도하였다. 이때 사용된 대장균은 B 계열 대장균 BL21(DE3) (*E. coli B F- dcm opmT hsdS(rB- mB-a) gal λ*, Novagen, USA)을 효소 유전자 발현을 위한 숙주세포로 사용하였으며, 상기 형질 전환체는 50 µg/ml의 kanamycin을 함유하는 auto induction 배지를 이용하여 37°C, 30°C, 25°C에서 각각 약 16시간 동안 배양하였다. 발현시스템은 일반적으로 고가의 IPTG를 이용하여 T7 promoter를 작동시켜 단백질의 과발현을 유도하나 본 연구에서 사용된 auto induction 배지를 이용하여 이 IPTG 대신에 락토오스를 유도 물질로 대체하여, 재조합 균주의 세포농도 증식과 단백질 과발현을 유도하였다. 발현된 세포를 수집하고, 세포 1g당 15ml의 양으로 완충액 1 (20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3M NaCl pH 7.4)로 현탁하였다. 현탁액을 초음파 처리한 후, 12000rpm, 4°C에서 30분 동안 원심분리하여 남아있는 세균 잔해를 제거하였다. 상층액을 면역 블롯팅 분석에 이용하였다.

발현된 재조합 단백질을 MBP-트랩 컬럼 (GE healthcare)으로 정제하였다. 상기 단백질 시료를 예비-평형화된 MBP-트랩 HP 1ml 컬럼에 가하였다. 결합된 단백질을 10ml의 완충액 1로 세척한 후, 용출 완충액 2 (20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3M NaCl, 10mM maltose pH7.4)를 이용하여 단백질을 컬럼으로부터 용출시켰다. 용출된 단백질을 면역 블롯팅 분석에 이용하였다.

#### 사. 재조합 단백질의 발현 확인 및 면역 블롯팅 분석

- 생산된 단백질은 SDS-PAGE를 수행한 후 얻어진 겔 (gel)을 니트로셀룰로오스 멤브레인 (Nitrocellulose (NC) membrane)에 옮겼다. 니트로셀룰로오스 멤브레인을 PBS에 용해된 5% 스킴 밀크 (skim milk)를 이용하여 1시간 동안 상온에서 블로킹시켜 비특이반응을 없애고, PBST (PBS, 0.05% Tween 20)로 15분간 3번 세척하였다. 그런 다음, 0.5% 스킴 밀크를 녹인 PBST에 각 항원 단백질 확인을 위한 1차 항체 1) mouse anti-*E. coli* heat labile toxin A (abcam), 2) sheep anti-*E. coli*

O149:K91:K88ac(F4; abcam), 3) mouse anti-His (Santacruz), 4) mouse anti-*E. coli* F18 hybridoma unconcentration을 각각 첨가하여 상온에서 1시간 동안 1차 반응을 한다. 니트로셀룰로오스 멤브레인을 PBST로 15분씩 3회 세척한 후, anti-mouse IgG AP-linked 항체 (sigma) 및 anti-sheep IgG AP-linked 항체 (Santacruz)로 상온에서 1시간 동안 2차 반응을 한다. 니트로셀룰로오스 멤브레인을 PBST로 15분씩 3회 세척하고, AP Conjugate Substrate Kit (bio-rad)을 사용하여 항원 단백질을 확인하였다. 그 결과, 부착인자 F4와 독소인자 LT 단백질이 항원성이 있음을 확인하였다 (Fig 16).



- a. SDS-PAGE 결과
- b. His 항체 결과
- c. 독소인자 LT 항원성 결과
- d. 부착인자 F4 항원성 결과

Fig 16. 재조합 단백질의 Expression 확인 시험

#### 아. 실험동물을 통한 면역평가지험

##### (1) 부종병 독소의 불활화 및 역가지험

- 부종병 독소 (STX2e)의 마우스에 대한 반수치사량 (LD<sub>50</sub>)은 독신 역가는 단백질량으로 10 ng/m이었다. 독소를 불활화시키기 위하여 배양 상층액에 0.3% 포르말린 (Formalin)을 첨가한 후 37°C 항온기에서 1주일간 보관하면서 독소의 불활화를 확인하였다 (Table 22).

Table 22. 시가 독소의 불활화 시험

접종량 (ml/mouse)	불활화 시간 (생존수 / 접종수)					
	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
0.5 ml/마리	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	3 / 5	5 / 5

- 부중병 독소 (STX2e)에 대한 독소이드 시험백신의 마우스에 대한 방어효과시험에서 100%의 방어효과를 확인하였다 (Table 23).

Table 23. 실험동물에 대한 방어효과 시험

접종 (ml/mouse)	시험구	공격접종	접종 두수	일별 폐사수					
				1	2	3	4	5	방어율(%)
0.5ml	시험백신	7일 후 STX2e	10	-	-	-	-	-	100
	대조구(PBS)		5	4	1	-	-	0	

(2) 시험동물(마우스)을 통한 시험백신 함량 및 adjuvant 결정 시험

- 체중 15~20g의 마우스 50마리를 준비하여 부중병 STX2e 함량이 다른 시험백신 4종류와 PBS를 넣는 음성 대조군 각각 10마리씩 복강에 0.2ml (백신의 1/10 dose)를 접종하고 2주후에 10LD<sub>50</sub>/0.2ml을 접종하여 10일간 관찰하였다 (Table 24).

Table 24. 부중병 Stx2e 함량결정 시험 백신 구성(마우스)

	Vac1	Vac2	Vac3	Vac4	Negative Control
STX2e 함량	50ug/ml	100ug/ml	200ug/ml	500ug/ml	
TCID <sub>50</sub> /ml	1.6×10 <sup>3</sup>	3.8×10 <sup>3</sup>	7.6×10 <sup>3</sup>	1.9×10 <sup>4</sup>	PBS
STX2e-150407 (1.36mg/ml)	11 ml	22 ml	44 ml	110 ml	
Gel(20%)	60 ml	60 ml	60 ml	60 ml	
PBS	229 ml	218 ml	196 ml	130 ml	
Total	300 ml	300 ml	300 ml	300 ml	

- 시험 결과 새로 추가될 검정기준 (마우스 효능 평가기준 80% 이상 생존)에 따라 STX2e함량을 100µg/ml (5.0×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml) 이상으로 선정하였다 (Table 25).

Table 25. 부종병 Stx2e 함량 결정 시험 마우스 결과

시험군	공격접종 후(dpi) 폐사수							(생존수/ 전체수)	생존율(%)	
	1	2	3	4	5	6	7			
함량 결정	Vac1	.	.	.	2	3	2	.	3/10	30
	Vac2	.	1	.	.	.	.	.	8/10	80
	Vac3	.	.	.	1	.	.	.	9/10	90
	Vac4	.	.	.	.	.	1	.	9/10	90
Control	.	1	.	3	2	3	1	0/10	0	

(3) 목적동물(돼지)을 통한 adjuvant 결정 시험

- 부종병 STX2e 마우스 함량 시험 결과 결정된 100ug/ml ( $3.8 \times 10^3$ TCID<sub>50</sub>/ml)에 의해 목적동물인 돼지에서 함량 결정 시험을 진행하였다. 함량은  $3.8 \times 10^3$ TCID<sub>50</sub>/ml,을 포함한 4 개의 시험 백신과 음성 대조군을 넣어 각각 자돈 5 마리에 백신 2 차 접종 후 공격접종을 진행하였다 (Table 26).

Table 26. 부종병 Stx2e 함량결정 시험 백신 구성 (돼지)

Groups	Method(I.M)			No. of pigs (Tag No.)	
	Vaccine (TCID <sub>50</sub> /ml*)	Adjuvant	Vaccination		
G1	$3.8 \times 10^3$	Gel	2회 접종 (2주 간격) 이근부(2ml)	백신 2차접종 2주 후 Challenge I.V. 1ml 1.33LD <sub>50</sub> (2ug/kg)	5 (11~15)
G2	FD** $3.8 \times 10^3$				5 (21~25)
G3	FD $3.8 \times 10^3$	eungen 10% (circo-ADJ)			5 (31~35)
G4		Non treated			5 (41~45)

\*TCID 측정은 vero-k cell 로 진행

\*\*FD: freez dry

- 백신 2 차 접종 2 주 후 이정맥에 1 ml (1.33LD<sub>50</sub>/2ug/kg) 씩 공격접종하였으며 14 일간 각 그룹의 돼지를 매일 관찰 하였다. 접종 후 1~2 시간 내에 백신의 과민 반응은 없었으며 14 일간 Table 27 과 같이 기준표를 작성하여 임상증상을 관찰하였다.
- 돼지 부종병 백신 /공격접종 이후 백신 생존율 (Table 27) : 백신 2 차 접종 2 주 후에 공격접종을 실시하여 자돈의 생존 유무와 임상 증상을 확인하였다. 혈관으로 공격접종 이후 1~2 시간 만에 폐사가 나오는 개체는 없었으며 다른 접종 부작용도 발견되지 않았다. 공격접종 하루부터 침울이나 기력 저하를 보였고 2 일차부터 사망한 개체가 발생하였다. 사망한 개체는 공격접종 2~3 일차까지 나타났으며 그 이후 생존한 돼지는 임상증상만 보였다.
- Gel 백신과 동결건조 Gel 백신의 생존에 따른 방어율은 동일하게 60%였으며 circo-adjvant (eungen 10%)와 음성 대조군의 방어율은 20%였다.

Table 27. 돼지 부종병 시험 백신 생존율

시험군 (TCID <sub>50</sub> /ml)	공격접종 후 (dpi) 폐사수							생존수/ 전체수	생존율(%)
	1	2	3	4	~	13	14		
백신 종류	G1		1	1				3/5	60
	G2			2				3/5	60
	G3		2	2				1/5	20
Control (G4)			4					1/5	20

- 돼지 부종병 백신/공격접종 이후 임상증상 결과 : 실험 결과 음성 대조군과 circo-adjutant (eungen 10%)를 사용한 백신은 통계적으로 유의적인 차이가 없었다. 즉 eungen 10%는 사용이 부적절함을 알 수 있다. 이와 다르게 액상의 100µg/ml+Gel 백신의 경우 음성 대조군과 유의적인 차이가 발생하였다. 또한 동결건조 형태의 100µg/ml+Gel 백신은 음성 대조군과 액상 형태 모두와 유의적인 차이가 있게 임상증상이 감소했음을 알 수 있다. 즉 액상 형태의 부종병 백신은 효과가 있으며 동결건조 형태의 백신은 이보다 더 우수한 백신 효과를 보인다 (Fig 17).

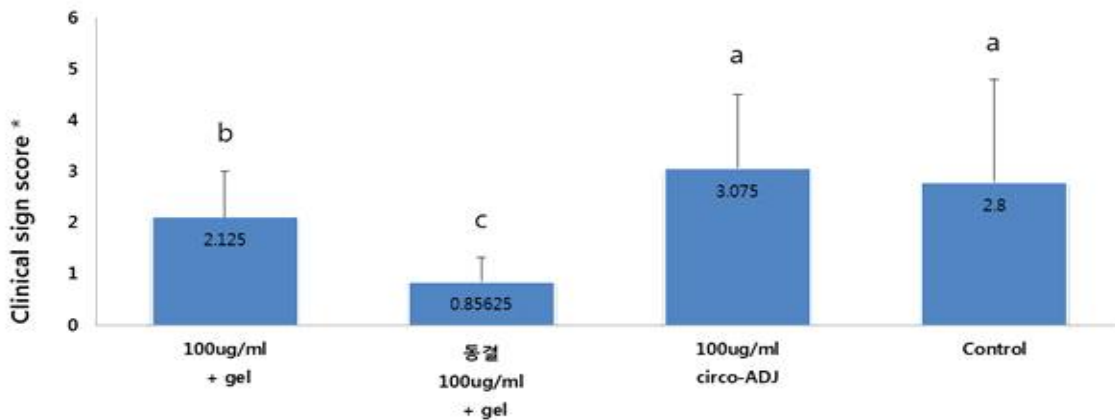


Fig 17. 부종병 백신 형태(adjuvant) 별 공격접종 이후 면역원성 및 임상증상 결과

\*Mean±SD Swine Edema Disease (N = 5)

a,b,c are significantly different from other groups. Duncan method ( $p < 0.05$ )

- 돼지 부종병 백신 및 공격 접종 이후 면역원성(ELISA) 결과 (Fig 18) : 백신 2차 접종 이후 1주차는 circo-adjutant (eungen 10%)가 가장 높은 ELISA 항체가를 나타냈으나, 2차 접종 2주 후 항체역가가 감소하여 백신 접종군 모두 비슷한 항체가를 보였다. 통계학적 유의성을 검토한 결과 백신 2차 접종 1주는 동결건조 형태의 백신만 음성 대조군과 유의적인 차이가 났으며 백신 2차 접종 2주 후에는 액상의 백신 형태까지 음성 대조군과 유의적인 차이를 보였다. 백신 접종에 따른 ELISA 항체가 변화와 무관하게 공격접종 이후 1주 항체역가는

공격접종에 의한 boosting 효과로 인해 모든 군에서 높게 형성하였으며, 항원에 처음 노출된 음성 대조군은 1주일 만에 반 이상 항체역가가 떨어지지만 다른 백신 접종 군은 늦게 감소되는 것을 확인할 수 있다.

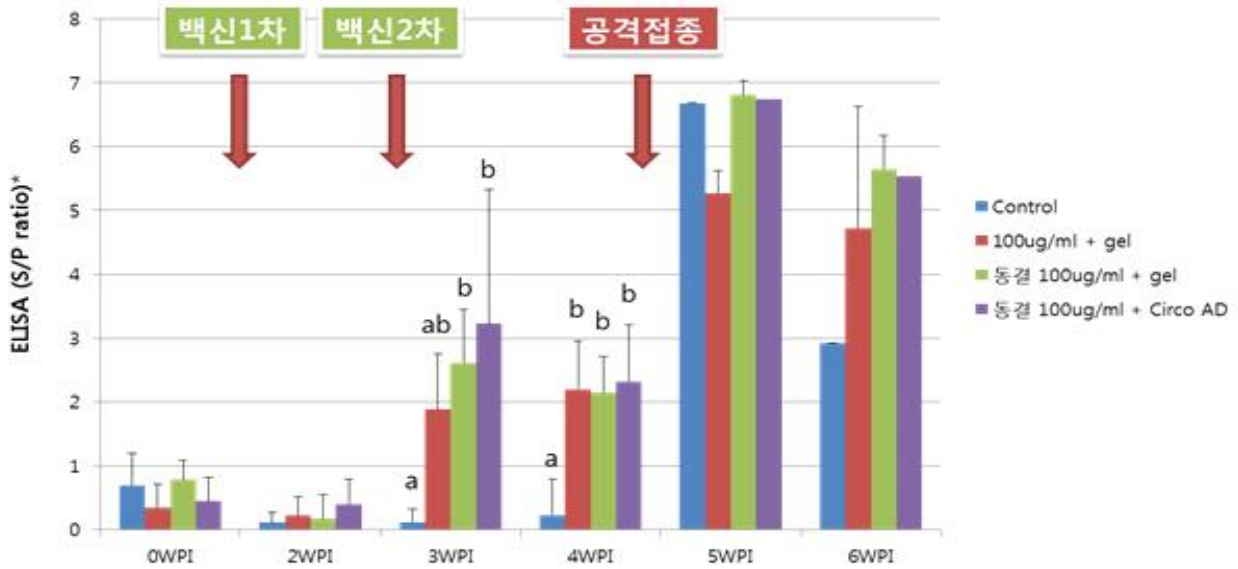


Fig 18. 부종병 백신 접종 및 공격접종 이후 항체가 변화 (ELISA)

WPI: Week Post Inoculation

\* (sample O.D. - Negative)/(Positive-Negative)

a,b,c are significantly different from other groups. Duncan method( $p < 0.05$ )

- 돼지 부종병 백신 및 공격 접종 이후 중화항체가 결과 (Fig 19) : 백신 접종 전 (0 WPI)부터 공격접종 2주 후 (6 WPI) 까지 혈청을 이용하여 중화 항체가 검사를 진행하였다. 검사 결과 음성 대조군과 유의적인 차이가 발생한 구간은 백신 1차 접종 2주차와 백신 2차 접종 1주차의 동결건조 형태의 Gel 백신과 백신 2차 접종 2주차의 모든 백신 접종군이었다. 임상증상평가에서도 가장 좋은 결과를 얻은 동결 백신의 Gel 형태는 중화 역가시험 결과에서도 최고 25 배를 백신 1차 접종 2주 (2 WPI)만에 보였고 백신 2차 접종 1주 (3 WPI)에 평균값이 가장 높았다. ELISA 결과에서 가장 높은 결과를 보였던 circo-adjuvant (eungen 10%) 시험군에서는 백신 2차 접종 1주까지 대조군과 비슷한 수준의 항체역가를 보였다. 이는 임상증상결과와 동일한 결과로 백신 2차 접종 1주를 백신 효능 평가 방법에 이용할 수 있을 것이다. 백신 접종에 따른 중화항체가 변화와 무관하게 공격접종 이후 살아남은 개체의 중화항체역가를 보면 역가가 모두 높게 형성되어 있다.



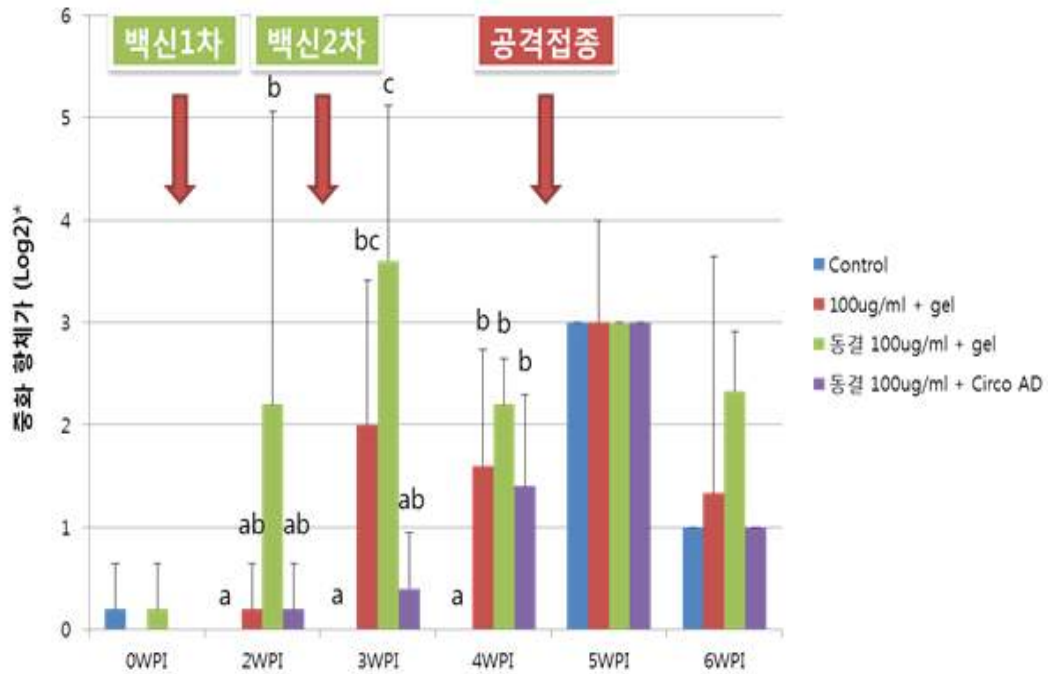


Fig 19. 부종병 백신 접종 및 공격접종 이후 중화항체가 변화 (S/N test)

WPI: Week Post Inoculation

\*(log2 중화역가희석배수)

a,b,c are significantly different from other groups. Duncan method ( $p < 0.05$ )

- 공격접종 후 14일간 임상 증상을 확인할 결과 백신 2회 접종에도 불구하고 100% 방어능을 나타내는 시험 백신은 없었다. 임상증상에 의한 백신 평가에서는 Gel 백신 모두 좋았지만 동결건조 형태가 유의적으로 좀 더 효과가 좋음을 확인할 수 있었다. 따라서 부종병 백신 개발은 동결건조 Gel 백신으로 개발되어야 한다.

3. <제 2 협동> 돼지 대장균설사병 및 부종병 백신 산업화

가. 돼지 부종병 시험백신 생산 및 일반 시험 (진공도 시험, 함습도 시험 추가)

- 최종적으로 선정된 STX2e 함량과 adjuvant, 성상에 의해 시험 백신을 3 lots 제조하였다 (Table 28).

Table 28. 부종병 시험 백신 구성

Trial Vaccine (Lot. No.)	Date of product	Production quantity (5doses/bottle)	Content (Per dose)
T315ET01	2015.07.01	1000	<i>Escherichia coli</i> Shiga 2e toxoid ..... 200 µg 보호제 ..... 정량 Formalin ..... 0.3%이하
T315ET02	2015.07.08	1000	<i>Escherichia coli</i> Shiga 2e toxoid ..... 200 µg 보호제 ..... 정량 Formalin ..... 0.3%이하
T315ET03	2015.07.15	1000	<i>Escherichia coli</i> Shiga 2e toxoid ..... 200 µg 보호제 ..... 정량 Formalin ..... 0.3%이하

(1) 특성시험

- 시험 방법 : 동물용 생물학적 제제 특성시험법 (1-11-20-01)에 따라 시험백신을 lot 별로 2 병씩 6 병에 대하여 색, 혼탁도, 이물 또는 이취에 대하여 검사하였다. 색, 혼탁도, 이물시험은 자연광 또는 1000 룩스 광도 하에서 실시하였으며, 현탁 상태를 검사할 때는 가볍게 흔들어서 용해도, 혼탁도, 색조를 검사하였다 (Table 29).
- 시험 결과 : 노란 백색의 균일한 수성현탁액으로써 약간의 침전이 있으나 흔들면 균등한 액체가 되며 이물, 이취가 없고 내용물의 성상이 균일하였다.

Table 29. 부종병 시험 백신 특성 시험 결과

Lot. No.	Tests				
	color	turbidity	sediment	foreign substance	foreign odor
T315ET01	- <sup>a</sup>	-	-	-	-
T315ET02	-	-	-	-	-
T315ET03	-	-	-	-	-

### (2) 진공도 시험

- 시험 방법 : 3 Lot.의 시험백신을 동물용 생물학적 제제 국가검정기준의 진공도 시험법에 따라 시험백신 각 Lot.별로 암실에서 테스터코일을 공시품으로부터 5mm 이내의 위치에 놓고 방전의 유무를 관찰하였다.
- 시험 결과 : 3 Lot.의 시험 백신 모두 방전이 인정되었다.

Table 30. 부종병 시험 백신 진공도 시험 결과

Lot. No.	Vaccum test
T315ET01	Normal
T315ET02	Normal
T315ET03	Normal

### (3) 무균시험

- 시험 방법 : 3 Lot.의 시험백신을 2~8℃의 냉암소에 보존하면서 제조일로부터 제조 후, 3개월 후, 6개월 후, 9개월 후 Lot.별로 2병씩 6병에 대하여 soybean casein digest 배지, soy casein digest broth, thioglycollate broth (0.5% beef extract 첨가)배지에 접종하여 22℃와 32℃에서 7일간 배양하면서 잡균의 혼입 여부를 관찰하였다 (Table 31).

Table 31. 부종병 시험 백신 무균 시험 결과

Lot. No.	22℃			32℃		
	SCD	SCDB	Thio	SCD	SCDB	Thio
T315ET01	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
T315ET02	-	-	-	-	-	-
T315ET03	-	-	-	-	-	-

SCD ; soy casein digest agar, SCDB ; soybean casein digest broth, Thio ; thioglycollate broth.

### (4) 수소이온농도 시험

- 시험 방법 : 3 lot의 시험백신을 동물용의약품 생물학적 제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-03 에 따라 시험백신 각 Lot별로 백신의 수소이온농도를 측정하였다 (Table 32).
- 시험 결과 : 3 lot의 시험백신에 대한 모든 시험에서 수소이온농도는 검정기준 (pH 6.0~8.0 이내)를 만족하였다.

Table 32. 부종병 시험 백신 특성 수소이온농도 결과

Lot. No.	pH (Mean ± SD)
T315ET01	7.31 ± 0.05
T315ET02	7.32 ± 0.03
T315ET03	7.33 ± 0.03

(4) 방부제 정량시험

- 시험 방법 : 동물용 생물학적제제 방부제정량시험법 (1-11-20-09) 따라 시험백신을 lot 별로 포르말린함량을 비색법으로 측정하였다.
- 시험 결과 : 3 lot의 시험백신 모두에서 0.2% 이하를 나타내었다 (Table 33).

Table 33. 부종병 시험 백신 방부제 정량시험 결과

Vaccine	Reagent	Method	Result
T315ET01	• Formalin reference fluid	• Add Schiff's reagent 2 ml to the vaccine and formalin reference fluid, respectively.	0.24%
T315ET02			0.25%
T315ET03	• Schiff's reagent	• Spectrophotometer at 520nm	0.23%

(5) 함습도 시험

- 시험 방법 : 3 Lot.의 시험백신을 동물용의약품 생물학적 제제 국가 검정기준의 함습도 시험법에 따라 시험백신 각 Lot별로 칼-피쉬법으로 함습도를 측정하여 시험한 성적 중 최고치를 함습도로 하였다.
- 시험 결과 : 3Lot.의 시험 백신 함습도는 3.78%, 3.76%, 3.76%로 검정기준인 6% 이하의 함습도를 확인하였다.

Table 34. 부종병 시험 백신 함습도 시험 결과

Lot. No.	Moisture content			Highest
	1	2	3	
T315ET01	3.75%	3.78%	3.75%	3.78%
T315ET02	3.76%	3.72%	3.74%	3.76%
T315ET03	3.72%	3.74%	3.76%	3.76%

**(6) 불활화 확인시험**

- 시험 방법 : 백신 2 ml를 2 회에 걸쳐 동결 및 용해하고, 원심분리한 상층액을 투석막에 넣고 4 °C에서 백신의 100 배량 이상의 인산완충식염수 (PBS: pH 7.2~7.4)에 하룻밤 투석한 것을 시험재료로 하였다. vero-k 세포를 조직배양용 flask (25cm<sup>2</sup>)에 증식시키고, 시험 전에 *E. coli* 및 STX2e의 감염이 없음을 확인하였다. 시험재료 1 ml를 조직배양세포에 접종하고, 37 °C에서 1 시간 감작시킨 후 1 시간 후 새로운 세포유지용 배지를 더하여 7 일간 배양하여 돼지 부종병 STX2e에 의한 특이한 세포변성효과 (CPE)을 관찰하였다.
- 시험 결과 (Table 35) : vero 세포에서 돼지 부종병 STX2e에 의한 특이한 세포변성효과 (CPE)를 이용하여 돼지 부종병 STX2e toxin의 활성 여부를 확인한 결과 3 lot의 시험 백신 모두 어떠한 세포변성 효과 (CPE)를 관찰할 수 없어서 불활화되었음을 확인하였다

Table 35. 부종병 시험 백신 특성 수소이온농도 결과

Vaccine	Cell line	Result
		CPE
T315ET01	Vero-k cell	-*
T315ET02		-
T315ET03		-

-\* : Negative, CPE : Cytopathic effect

**(7) 방부제 정량시험**

- 시험 방법 : 동물용 생물학적 제제 방부제정량시험법 (1-11-20-09) 따라 시험백신을 lot 별로 포르말린함량을 비색법으로 측정하였다.
- 시험 결과(Table 36) : 3 lot의 시험백신 모두에서 0.2% 이하를 나타내었다.

Table 36. 부종병 시험 백신 방부제 정량시험 결과

Vaccine	Reagent	Method	Results
T315ET01	• Formalin reference fluid	• Add Schiff's reagent 2 ml to the vaccine and formalin reference fluid, respectively.	0.24%
T315ET02			0.25%
T315ET03	• Schiff's reagent	• Spectrophotometer at 520nm	0.23%

**나. 돼지 부종병 시험백신 안정성 (장기보존성) 시험**

(기존 9개월에서 24개월로 증가, 진공도 시험, 함습도시험 추가)

- 제품의 안정성을 확인하기 위하여 3 Lots의 시험 백신을 2~8°C 냉암소에 보존하면

서 제조일로부터 제조직후, 3개월, 6개월, 9개월 후, 12개월 후, 18개월 후, 24개월 후에 검정기준에 따라 특성시험, 무균시험, 수소이온농도시험, 방부제 정량 시험, 안전시험, 효력 및 혈청 역가 시험을 수행하였다.

**(1) 특성시험**

- 시험 방법 : 3 Lot.의 시험백신을 2~8℃의 냉암소에 보존하면서 제조일로부터 제조직후, 3개월 후, 6개월 후, 9개월 후, 12개월 후, 18개월 후, 24개월 후 각 Lot.별로 2병씩 6병에 대하여 색, 혼탁도, 이물 또는 이취에 대하여 검사하였다. 색, 혼탁도, 이물시험은 자연광 또는 1,000룩스 광도 하에 실시하였으며, 가볍게 흔들어서 용해도, 혼탁도, 색조를 검사하였다.
- 시험 결과 (Table 37) : 특성시험결과 3 Lot.의 시험백신 모두 24개월까지 아이보리색의 균일한 수성현탁액으로, 정치하면 약간의 침전이 있으나 흔들면 쉽게 균등한 액체가 되며 내용물의 성상이 균일하고 이물 이취가 없었다.

Table 37. 부종병 시험 백신 안정성시험 결과

Lot. No.	Gross features						
	0 MPM	3 MPM	6 MPM	9 MPM	12 MPM	18 MPM	24 MPM
T315ET01	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-
T315ET02	-	-	-	-	-	-	-
T315ET03	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> : Negative  
MPM\* : Months Post Manufacture

**(2) 진공도 시험**

- 시험방법 : 3 Lot.의 시험백신을 2~8℃의 냉암소에 보존하면서 제조일로부터 제조직후, 3개월 후, 6개월 후, 9개월 후, 12개월 후, 18개월 후, 24개월 후 Lot.별로 2병씩 6병에 대하여 암실에서 테스트코일을 공시품으로부터 5mm 이내의 위치에 놓고 방전의 유무를 관찰하였다.
- 시험결과 : 진공도 시험 결과 3Lot.의 시험백신 모두 24개월까지 방전이 인정되었다.

Table 38. 부종병 시험 백신 진공도 시험 결과

Lot. No.	Vaccum test						
	0 MPM	3 MPM	6 MPM	9 MPM	12 MPM	18 MPM	24 MPM
T315ET01	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-
T315ET02	-	-	-	-	-	-	-
T315ET03	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Electrostatic discharge should occur  
MPM\* : Months Post Manufacture

**(3) 무균시험**

- 시험 방법 : 3 Lot.의 시험백신을 2~8℃의 냉장소에 보존하면서 제조일로부터 제조 직후, 3개월 후, 6개월 후, 9개월 후, 12개월 후, 18개월 후 Lot.별로 2병씩 6병에 대하여 nutrient agar (NA), nutrient broth (NB), fluid thioglycollate medium (Thio)에 접종하여 22℃와 37℃에서 7일간 배양하면서 잡균의 혼입여부를 관찰하였다.  
24개월 후 시험백신은 새로 변경된 동물용의약품 국가출하승인검정 기준(2016-74호)으로 검정하였다. Lot.별로 2병씩 6병에 대하여 tryptic soy agar (TSA), tryptic soy broth (TSB), fluid thioglycollate medium (Thio)에 접종하여 22℃와 32℃에서 7일간 배양하면서 잡균의 혼입여부를 관찰하였다.
- 시험 결과 (Table 39) : 무균시험결과 3 Lot.의 시험백신 모두 24개월까지 어떠한 세균의 발육도 인정되지 않았다.

Table 39. 부종병 시험 백신 무균 시험 결과

Lot. No.	At the date of manufacture						3 MPM					
	22℃			37℃			22℃			37℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
T315ET01	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T315ET02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T315ET03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Lot. No.	6 MPM						9 MPM					
	22℃			37℃			22℃			37℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
T315ET01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T315ET02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T315ET03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Lot. No.	12 MPM						18 MPM					
	22℃			37℃			22℃			32℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
T315ET01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T315ET02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T315ET03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Lot. No.	24 MPM					
	22℃			32℃		
	TSA	TSB	Thio	TSA	TSB	Thio
T315ET01	-	-	-	-	-	-
T315ET02	-	-	-	-	-	-
T315ET03	-	-	-	-	-	-

\* No growth of any bacteria

MPM : Months post manufacture, NA : nutrient agar, NB : nutrient broth, Thio : fluid thioglycollate medium, TSA : tryptic soy agar, TSB : tryptic soy broth

#### (4) 수소이온농도시험

- 시험 방법 : 3 Lot.의 시험백신을 2~8℃의 냉장소에 보존하면서 제조일로부터 제조 직후, 3개월 후, 6개월 후, 9개월 후, 12개월 후, 18개월 후, 24개월 후에 Lot.별로 3병씩 pH 측정기를 이용하여 수소이온농도를 측정하였다.
- 시험 결과 (Table 40) : 수소이온농도 시험결과 3 Lot.의 시험백신 모두 24개월까지 수소이온농도는 pH 6.0~8.0 범위 이내에 있었다.

Table 40. 부종병 시험 백신 수소이온농도 시험 결과

Lot. No.	Result (pH)						
	0 MPM	3 MPM	6 MPM	9 MPM	12 MPM	18 MPM	24 MPM
T315ET01	7.31±0.05	7.31±0.04	7.30±0.04	7.32±0.04	7.31±0.05	7.36±0.04	7.36±0.17
T315ET02	7.32±0.03	7.32±0.04	7.32±0.03	7.33±0.03	7.31±0.03	7.32±0.08	7.32±0.06
T315ET03	7.33±0.03	7.34±0.01	7.34±0.01	7.34±0.02	7.33±0.03	7.37±0.02	7.35±0.03

#### (5) 함습도 시험

- 시험 방법 : 3 Lot.의 시험백신을 2~8℃ 냉장소에 보관하면서 제조일로부터 제조 직후, 3개월 후, 6개월 후, 9개월 후, 12개월 후, 18개월 후, 24개월 후에 Lot.별로 두 개 이상의 백신에 대하여 칼-피셔법 (Karl-Fisher method)으로 함습도를 측정하여 시험한 성적 중 최고치를 함습도로 하였다.
- 시험 결과 : 함습도 시험 결과 3 Lot. 모두 24개월까지 함습도는 검정기준인 6% 이하인 것을 확인하였다.



Table 41. 부중병 시험 백신 함습도 시험 결과

MPM*	Lot. No.	Moisture content			Highest
		1	2	3	
0 MPM	T315ET01	3.75%	3.78%	3.75%	3.78%
	T315ET02	3.76%	3.72%	3.74%	3.76%
	T315ET03	3.72%	3.74%	3.76%	3.76%
3 MPM	T315ET01	3.74%	3.73%	3.75%	3.75%
	T315ET02	3.76%	3.76%	3.75%	3.76%
	T315ET03	3.72%	3.71%	3.73%	3.73%
6 MPM	T315ET01	3.75%	3.76%	3.77%	3.77%
	T315ET02	3.76%	3.76%	3.77%	3.77%
	T315ET03	3.72%	3.71%	3.75%	3.75%
9 MPM	T315ET01	3.74%	3.76%	3.77%	3.77%
	T315ET02	3.74%	3.75%	3.75%	3.75%
	T315ET03	3.73%	3.75%	3.75%	3.75%
12 MPM	T315ET01	3.73%	3.72%	3.73%	3.73%
	T315ET02	3.77%	3.77%	3.78%	3.78%
	T315ET03	3.74%	3.74%	3.74%	3.74%
18 MPM	T315ET01	3.74%	3.77%	3.79%	3.79%
	T315ET02	3.74%	3.79%	3.81%	3.81%
	T315ET03	3.73%	3.79%	3.76%	3.79%
24 MPM	T315ET01	3.75%	3.83%	3.84%	3.92%
	T315ET02	3.77%	3.81%	3.89%	3.88%
	T315ET03	3.72%	3.79%	3.92%	3.85%

MPM ; Month Post Manufacture

**(6) 방부제 정량시험**

- 시험 방법 : 3 Lot.의 시험백신을 2~8℃의 냉장소에 보존하면서 제조일로부터 제조직후, 3개월 후, 6개월 후, 9개월 후, 12개월 후, 18개월 후, 24개월 후에 Lot.별로 3병씩 포르말린 함량을 측정하였다. 시험백신과 포르말린 표준액 각각 1ml에 Schiff 시약 0.2ml를 가하여 실온에서 30분간 방치 한 후 520nm spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 표준액의 흡광도를 이용하여 다항식의 표준곡선을 작성하고, 백신과의 상관관계로 formalin 농도를 계산하였다.
- 시험 결과 : 방부제 정량 시험결과 3 Lot.의 시험백신 모두 24개월까지 0.3% 이하의 포르말린 함량을 나타내었다 (Table 42).

Table 42. 부중병 시험 백신 방부제 정량 시험 결과

Lot. No.	Content of Formalin (%)						
	0 MPM	3 MPM	6 MPM	9 MPM	12 MPM	18 MPM	24 MPM
T315ET01	0.23±0.01	0.23±0.02	0.23±0.02	0.23±0.02	0.23±0.02	0.22±0.02	0.24±0.01
T315ET02	0.22±0.02	0.23±0.03	0.24±0.03	0.23±0.03	0.23±0.02	0.23±0.02	0.24±0.01
T315ET03	0.24±0.02	0.24±0.02	0.24±0.03	0.24±0.03	0.24±0.03	0.24±0.02	0.22±0.02

MPM ; Months post manufacture

**(7) 불활화 확인시험**

- 시험 방법 : 3 lot의 시험백신을 2~8 °C의 냉장소에 보존하면서 제조일로부터 제조직후, 3개월 후, 6개월 후, 9개월 후, 12개월 후, 18개월 후, 24개월 후에 lot 별로 백신 2ml를 2 회에 걸쳐 동결 및 용해하고, 원심분리한 상층액을 투석막에 넣고 4 °C에서 백신의 100 배량 이상의 인산완충식염수 (PBS: pH 7.2~7.4)에 하룻밤 투석한 것을 시험재료로 하였다. vero-k 세포를 조직배양용 flask (25cm<sup>2</sup>)에 증식시키고, 시험 전에 E. coli 및 STX2e의 감염이 없음을 확인하였다. 시험재료 1 ml를 조직배양세포에 접종하고, 37 °C에서 1 시간 감작시킨 후 1 시간 후 새로운 세포유지용 배지를 더하여 7 일간 배양하여 돼지 부중병 STX2e에 의한 특이한 세포변성효과 (CPE)을 관찰하였다.
- 시험결과 : 불활화 확인시험 결과 3 lot의 시험백신 모두 24개월까지 vero-k 세포에서 돼지 부중병 STX2e에 의한 특이한 세포변성효과 (CPE)를 이용하여 돼지 부중병 STX2e toxin의 활성 여부를 확인할 결과 3 lot의 시험 백신 모두 어떠한 세포변성효과 (CPE)를 관찰할 수 없어서 불활화 되었음을 확인하였다 (Table 43).

Table 43. 부중병 시험 백신 불활화 확인 시험 결과

Lot. No.	Inactivation test						
	0 MPM	3 MPM	6 MPM	9 MPM	12 MPM	18 MPM	24 MPM
	CPE	CPE	CPE	CPE	CPE	CPE	CPE
T315ET01	**	-	-	-	-	-	-
T315ET02	-	-	-	-	-	-	-
T315ET03	-	-	-	-	-	-	-

**(8) 안전시험**

- 시험 방법: 3 Lot.의 시험백신을 2~8°C의 냉장소에 보존하면서 제조일로부터 제조직후, 3개월 후, 6개월 후, 9개월 후, 12개월 후, 18개월 후, 24개월 후에 마우스, 기니픽, 돼지에서 안전성을 확인하였다 (Table 44). 마우스에서의 안전성은 체중 15~20 g의 마우스 8마리를 준비하여, 8마리의 마우스 복강에 1/4 두분 (0.5 ml)를 접종하고 7일

간 관찰하였다. 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 한다. 기니픽에서의 안전성은 체중 300~350 g의 기니픽 6마리를 준비하여, 2마리의 기니픽 복강 및 피하에 각각 1두분 (2 ml)을, 다른 2마리의 기니픽 피내에 0.1 ml를 접종하고 7일간 관찰한다. 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 한다. 돼지에서의 안전성은 부종병 관련 백신을 접종하지 않았으며, 관련 질병에 노출되지 않는 체중 8~10 kg (4~6주령)의 건강한 돼지 2마리에 백신의 2두분을 근육 접종한다. 접종 후 1~2시간 내에 과민반응이 없어야 하며, 21일간의 관찰기간동안 주사부위의 화농 및 괴사 등의 부작용이 없어야 한다.

- 시험 결과 : 안전시험 결과, 3 lot.의 시험백신 모두 24개월까지 마우스, 기니픽, 돼지에서 관찰기간 부작용 없이 생존하였다.

Table 44. 부종병 시험 백신 안전 시험 결과

Lot. No.	Animals	Route	Results						
			0 MPM	3 MPM	6 MPM	9 MPM	12 MPM	18 MPM	24 MPM
T315ET01	Mouse	IP	0/8*	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	GP	SC	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
		ID	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	Pig	IM	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
T315ET02	Mouse	IP	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	GP	SC	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
		ID	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	Pig	IM	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
T315ET03	Mouse	IP	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	GP	SC	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
		ID	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	Pig	IM	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

\*: The number of abnormal animals / Total numbers of vaccinated animals

MPM : Months Post Manufacture

IP : Intraperitoneal, SC : Subcutaneous, ID : Intradermal, IM : Intramuscular

#### (9) 효력 및 혈청 역가 시험

- 3 Lot의 시험백신을 2~8℃의 냉장소에 보존하면서 제조일로부터 제조직후, 3개월 후, 6개월 후, 9개월 후, 12개월 후, 18개월 후, 24개월 후에 Lot별로 *Escherichia coli* STX2e toxin에 대하여 돼지 역가시험을 실시하였다 (Table 45). Lot별로 체중 15~20g의 건강한 마우스 15마리를 선정 사용하여 백신의 1/10 두분 (0.2 ml) 용량으로 하여 2주 간격으로 2회 복강에 접종하고 5마리는 대조로 두었다. 2차 접종 7일 후에 *Escherichia coli* STX2e toxin 정제 항원 10LD<sub>50</sub>/0.2 ml을 각각 복강에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰하였다. 시험 결과 *Escherichia coli* STX2e toxin에 역가시험결과 24개월까지 3 Lot의 시험백신 모두 80% 이상의 생존율을 확인하였다.

Table 45. 부종병 시험 백신 효력 및 역가 시험 결과

Lot. No.	The number of survival animals / Total numvers of tested aniamls (Survival rate, %)						
	0 MPM	3 MPM	6 MPM	9 MPM	12 MPM	18 MPM	24 MPM
T315ET01	14/15a (93.3%)	15/15 (100%)	15/15 (100%)	14/15 (93.3%)	14/15 (93.3%)	14/15 (93.3%)	14/15 (93.3%)
T315ET02	15/15 (100%)	14/15 (93.3%)	15/15 (100%)	13/15 (86.7%)	13/15 (86.7%)	14/15 (93.3%)	14/15 (93.3%)
T315ET03	14/15 (93.3%)	13/15 (86.7%)	15/15 (100%)	14/15 (93.3%)	14/15 (93.3%)	14/15 (93.3%)	14/15 (93.3%)
Control	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)

<sup>a</sup>: The number of survival animals / Total numbers of tested animals (survival rate, %)

MPM: Months post manufacture

#### 다. 돼지 부종병 백신 임상시험계획서 제출

##### (1) 야외시험의 개요

- 야외임상 시험을 수행하기 위하여 시험농장 3군데 (제1시험농장 제2시험농장, 제3 시험농장)를 선정하였다. 적용시험 전에 2두분 안전성 시험을 예비시험으로써 실시하여 백신의 안전성을 확인한 다음, 권장 접종 시기인 2~3주령 자돈에 대하여 지정된 용법 및 용량으로 접종하여 안전성과면역원성을 확인한다.

##### (2) 제 1시험농장

농장명	여천농장	
농장주	정○○	
사육규모	모든 100 두	
주소 및 연락처	경북 경산시 ○○○길 223	
사용시험백신	T315ET01	
시험담당 수의사	백○○	
수정률	90%	
분만을 및 분만두수	90%, 12 두	
평균포유개수두수	11 두	
평균이유두수	10 두	
이유자돈의 폐사율(6~25kg)	10%	
육성, 비육돈의 폐사율(25~110kg)	7%	
농장 특이사항	부종병이 육성초기 발생하여 자돈사로 진행	
백신프로그램	모든	PPV, PCV, 대장균
	자돈	PCV, HE, FMD

(3) 제 2 시험농장

농장명	홍농농장	
농장주	박○○	
사육규모	모든 100 두	
주소 및 연락처	경북 경주시 ○○면 ○○○○길 76-3	
사용시험백신	T315ET02	
시험담당 수의사	백○○	
수정률	90%	
분만율 및 분만두수	90%, 12 두	
평균포유개수두수	11 두	
평균이유두수	10 두	
이유자돈의 폐사율(6~25kg)	10%	
육성, 비육돈의 폐사율(25~110kg)	5%	
농장 특이사항	부종병 자돈사에서 발병	
백신프로그램	모든	PPV, PCV, AR, 대장균
	자돈	PCV, HE, FMD, APP

(4) 제 3 시험농장

농장명	재경농장	
농장주	정○○	
사육규모	모든 150 두	
주소 및 연락처	울산시 울주군 ○○면 ○○○○로 435	
사용시험백신	T3165ET03	
시험담당 수의사	백○○	
수정률	90%	
분만율 및 분만두수	90%, 12 두	
평균포유개수두수	11 두	
평균이유두수	10 두	
이유자돈의 폐사율 (6~25kg)	10%	
육성, 비육돈의 폐사율 (25~110kg)	4%	
농장 특이사항	부종병 자돈사에서 발병	
백신프로그램	모든	PPV, PCV, AR, 대장균
	자돈	PCV, HE, FMD, APP

라. 돼지 이유자돈 설사증

(1) 돼지 이유자돈 설사증 공격접종 모델 확립 시험

- 병원성 유발시험:

제 1협동으로부터 인계받은 분리균주 KEFS218(FedF: F18) *E. coli*를 공격균주  
로 돼지에 1 ml 경구 접종하고 음성대조군으로 Non-pathogenic 균주를 경구 접  
종하였다 (Table 46).

Table 46. 돼지 이유자돈 설사증 균주접종 실험군

Groups	Route	Group	No. of pigs (Taq. Num.)	Method	Remarks
선택 균주	Oral	A-1	5	병원성 균주	3×10 <sup>9</sup> CFU/ml FedF:F18
Control	Oral	C-1	5	비병원성 균주	3×10 <sup>9</sup> CFU/ml O24 (Non pathogenic)
	Non-	C-2	5		

- 접종 후 1~2 시간 내에 과민 반응이 없는지 확인해 본 결과, 경구로 공격접종 한  
그룹 모두 접종 반응이 나타나지 않았다. 이유자돈 설사 백신 후보 균주인  
KEFS218은 접종 2일부터 설사가 발생하였으며 접종 2주 후까지 설사가 유지되  
다가 3주가 되면 대부분 정상으로 돌아왔으며 폐사는 일어나지 않았다 (Table  
47).

Table 47. 돼지 이유자돈 설사증 균주접종 결과

Route	Group	Method	No. of pigs	Diarrhea Score (normal: -, mucous: +, watery: ++)								
				0dpi	1dpi	2dpi	3dpi	5dpi	7dpi	14dpi	21dpi	
Oral	A-1	균주원액	5	1	-	-	++	++	++	++	+	-
				2	-	+	++	++	++	++	+	-
				3	-	-	++	++	++	++	+	-
				4	-	+	++	++	++	++	+	+
				5	-	-	++	++	++	++	+	-
	C-1	비병원성 균	5	6	-	-	-	-	-	-	-	-
				7	-	-	-	-	-	-	-	-
				8	-	-	-	-	-	-	-	-
				9	-	-	-	-	-	-	-	-
				10	-	-	-	-	-	-	-	-
	C-2	PBS	5	11	-	-	-	-	-	-	-	-
				12	-	-	-	-	-	-	-	-
				13	-	-	-	-	-	-	-	-
				14	-	-	-	-	-	-	-	-
				15	-	-	-	-	-	-	-	-

- 마우스에서 공격모델 확립 시험:

마우스에  $10^9$  CFU/dose,  $10^8$  CFU/dose,  $10^7$  CFU/dose,  $10^6$  CFU/dose를 마우스에 경구 접종하고 음성대조군으로 PBS를 접종하였다.

Table 48. 마우스에서 돼지 이유자돈 설사증 균주 접종 실험군

Groups	Route	Group	No. of mice (Taq. Num.)	Method	Remarks
마우스 공격 모델 확립 시험	Oral	A-1	10	병원성 균주	$10^9$ CFU/dose
	Oral	A-2	10	병원성 균주	$10^8$ CFU/dose
	Oral	A-3	10	병원성 균주	$10^7$ CFU/dose FedF:F18
	Oral	A-4	10	병원성 균주	$10^6$ CFU/dose
	Oral	A-5	10	병원성 균주	$10^5$ CFU/dose
Control	Non-	C-2	5		

- 시험 결과  $10^9$  CFU/dose,  $10^8$  CFU/dose은 모두 마우스 폐사가 보였으며  $10^7$  CFU/dose은 접종 8일차에 70%,  $10^6$  CFU/dose은 접종 8일차에 40%,  $10^5$  CFU/dose은 접종 8일차에 10%의 마우스 폐사를 보였다. 이에 따라 마우스 LD<sub>50</sub>/dose는  $10^{7.68}$  CFU/dose으로 판정되었다 (Fig 20).

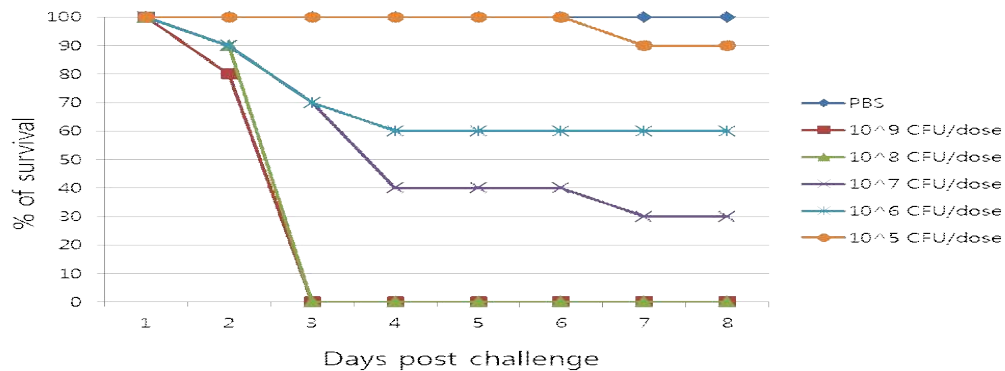


Fig 20. 마우스에서 돼지 이유자돈 설사증 균주 접종 결과

## (2) 후보주의 백신 항원 대량 배양 기술 확립

(가) Jar-fermentor에서 KEFS218균주 배양 조건 설정

- 초반 배양 적응기를 위해 rpm을 120~150rpm으로 유지하다가 배양 3시간부터 rpm을 200으로 높였다. 각 시간 별 균수를 측정 한 결과 배양 이후 3시간에서  $2.5 \times 10^9$  CFU/ml로 가장 많은 균수를 나타냈다 (Table 49).

Table 49. KEFS218 균주의 Jar-fermentation 배양 결과

배양시간	O.D600	생균수 (억CFU/ml)	pH	RPM
1hr	0.676	0.3	6.79	120
2hr	1.325	0.6	6.71	150
3hr	2.37	2.5	6.24	200
4hr	3.31	1.7	6.09	200

(나) 결론:

- 위 실험 결과에 따라 배양 3시간에서 대량생산에 적합함을 알 수 있었다. 이에 따라 3시간 배양 이후 원심분리하여 최종적으로 상층액을 수거하고 불활화를 진행하는 것으로 대량 생산 기법을 확립 하였다.

### (3) 시험 백신 제작

(가) 시험백신 제작

- 균주 배양 완료 후 60℃에서 30분간 가온처리한다. 가온처리 후 0.3%의 포르말린을 가하여 진탕한 후 실온에서 3일간 작용시킨 다음, 불활화된 배양액을 원심분리기를 이용하여 상층액을 제거하고, PBS로 1회 washing한 후에 PBS로 pellet을 풀어준 후 thimerosal을 0.01% 첨가하여 액체 배양액 8에 한천배양액 2의 비율로 혼합한다. 이때 최종제품의 균수가 ml당 2억 이상이 되도록 저장하여 2~7℃의 냉실에 보존한다. 처리된 배양균액을 Table 50과 같이 adjuvant를 가하여 1,000 rpm에서 30분간 혼합한 후 규정된 용기에 규정량을 분병한 다음 2~7℃ 냉실에 보존한다.

Table 50. 돼지 이유자돈 설사증 시험 백신 내역

Content	Vac1	Vac2	Vac3	Vac4
KEFS218 함량 ( $2 \times 10^8$ CFU/ml)	70%	70%	70%	70%
Adjuvant	Al(OH)3 10%	Al(OH)3 20%	Al(OH)3 20% IMS 1113 10%	IMS 1113 10%

(나) 마우스 효능 시험

- 체중 15~20g 마우스 50마리를 준비하여, 시험 백신 각각 10마리씩 마우스 복강에 0.2ml을 2주 간격으로 2회 접종하고 2차 접종 2주후에 10LD<sub>50</sub>/dose로 공격접종하여 시험백신 효능평가를 하였다. 시험 결과 Vac3에서 100% 방어 효과를 보였으며 대조군은 100% 폐사하였다. 따라서 추후 목적동물인 돼지에서 효능평가를 통해 최종적으로 adjuvant를 선정하고자 한다 (Fig 21).



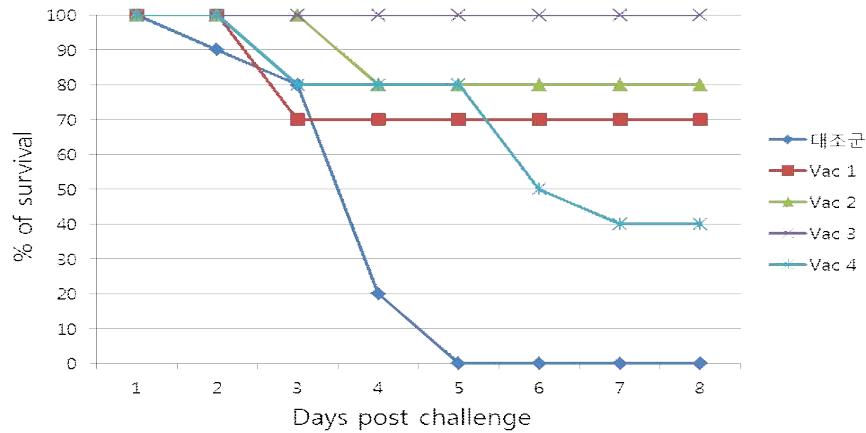


Fig 21. 시험 백신 마우스 효능 시험 결과

(다) 목적동물 효능 시험

- 공격접종 확인시험

○ 시험 방법

: 공격균주의 병원성을 확인하기 위하여 KEFS218(FedF:F18)를  $10^9$  CFU/ml로 희석하여 6주령 자돈에 경구로 공격접종 한 뒤 14일간 임상증상을 관찰 하였다. 관찰 기간 동안 직장 swab을 통해 설사의 유무를 판단하고 real-time PCR 방법을 통하여 분변 내 균수의 함량을 측정하였다 (참고문헌 : Rhouma M et al., 2016, Frane, 2011, Byun et al., 2013).

○ 시험 결과

임상증상 : 공격접종 이후 임상증상을 14일간 관찰 한 결과 2일차부터 접종군 모두에서 연변이나 점액성 설사 소견이 관찰되었으며 4일차에는 수양성 설사를 하는 개체도 관찰되었다. 그 이후 점차적으로 증상이 완화되는 경향을 보였다.

Table 51. 병원성 확인을 위한 돼지 이유자돈 설사증 균주 공격접종 후 임상증상 결과

Sample (Inoculum number, CFU/ml)	No. of piglets	DPI										
		0	1	2	3	4	5	6	7	9	12	14
KEFS218 (10 <sup>9</sup> )	1-1		*0	1	1	3	2	2	1	1	1	1
	1-2		0	2	2	2	2	1	2	1	1	0
	1-3	Challenge PO 1ml	0	1	1	3	2	2	1	1	1	0
	1-4		0	1	1	2	2	2	2	2	1	1
	1-5		0	1	1	2	2	1	1	1	0	0
PBS	2-1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2-2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2-3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* 0 : 설사 없음, 1 : 연변, 2 : 점액성설사, 3 : 수양성 설사, 4 : 폐사  
 N : negative-non diarrhea , P : positive-diarrhea, PO : Per Oral  
 DPI : Day per inoculation

분변 내 균수 함량 : 공격접종 이후 분변 내 균주 함량을 측정한 결과 공격접종 1일차부터 분변 내 확인되었다. 1일차부터 높은 수준으로 분변으로 배출되다가 6일차부터 감소하였지만 14일 이후에도 분변내 균주가 확인되었다. 임상 증상과 비교 시 실제 임상증상이 안 보이더라도 분변 내 균주를 확인할 수 있었다.

Table 52. 병원성 확인을 위한 돼지 이유자돈 설사증 균주 공격접종 후 분변 내 균수 함량 결과

시험군	분변 내 균수 함량 (log CFU/ml)										
	0dpi	1dpi	2dpi	3dpi	4dpi	5dpi	6dpi	7dpi	9dpi	12dpi	14dpi
공격접종 대조군	0	6.99±0.4	8.04±0.6	7.46±0.9	7.70±0.6	7.32±0.5	6.43±0.7	5.72±0.7	5.01±1.0	3.80±0.7	3.10±0.5
음성 대조군	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

○ 시험 결론

: KEFS218 (FedF:F18)의 동물 실험 결과 공격접종용 균주로 적합함을 확인하였다. 근거 자료를 참고하여 최종적인 공격접종 함량은 10<sup>9</sup> CFU/ml로 확인하였다.

- 이유자돈 Realtime PCR을 이용한 분변 내 균수측정시험

○ 시험 방법

: 시험 결과를 판정하기 위한 방법을 세팅하기 위해 문헌을 조사 분석한 결과 real-time PCR 방법이 균수 측정방법으로 가장 적합하다고 판단하여 기존 문헌상참고문헌 (Byun et al., 2013)의 방법이 KEFS218 (FedF:F18)균주에 적용되지는 살펴보았다. 추가적으로 K88ab(F4ab), K88ac(F4ac), K99(F5), 987P (F6), 일반 분변, PBS를 대조군으로 넣어 비특이 반응은 없는지 확인하였다.

<Real-time PCR 조건>

Table 53. Sequence of primer and probe

Target	gene	Sequence (5' → 3')
F18	Forward	AGG TTT TGC TAA TCA AGG GGG
	Reverse	GTG CTA TTC GAC GCC TTA ACC
	Probe	Fam- TCT GAA AAC CGT GAA CGG TAA AAC ACA G-BHQ1

Table 54. PCR composition

Reagent		Manufacturer	Volume
TaqMan Gene Expression Master Mix(2x)		Applied Biosystems	10 $\mu$ l
Primer (10pmol)	Forward	Neo-probe	1 $\mu$ l
	Reverse	Neo-probe	1 $\mu$ l
Probe (10pmol)		Neo-probe	1 $\mu$ l
DNA		-	2 $\mu$ l
D.W.		-	5 $\mu$ l
Total volume		-	20 $\mu$ l

Table 55. PCR condition

Step	Temp. (°C)	Time	Cycle
Initial denaturation	95	3 min	1
Denaturation	95	20 sec	40
Annealing/extension	64	25 sec	

○ 시험 결과

: 시험 결과 F18과 F4ab 균주에 대하여 PCR 양성 반응이 확인되었으며 다른 유전자 타입과 정상 분변 및 PBS에서는 검출되지 않았다.

Table 56. 공격접종군주에 대한 real-time PCR 실험결과

Sample	PCR 반응	판정
KEFS218(F18)	+	적합
K88ab(F4ab)	+	적합
K88ac(F4ac)	-	-
K99(F5)	-	-
987P(F6)	-	-
대장균 미검출 분변 1	-	-
대장균 미검출 분변 2	-	-
PBS	-	-

○ 시험 결론

: 공격접종군주는 F18 부착인자를 갖은 KEFS218군주를 사용하므로 real-time PCR 방법이 본 실험에 적용 가능함을 확인 하였다.

- 목적동물에서의 효능평가 시험

: “(나) 마우스 효능 시험”의 결과에 따라 Vac 3.에 대하여 목적동물에서의 효능평가를 실시하였다.

○ 시험 방법

: 재조합 protein 원액으로 제조된 시험 백신을 3주령 자돈에 1차 접종 이후 2주 후에 2차 접종하고 1주 후에 KEFS218 (FedF:F18)  $10^9$  CFU/ml를 구강 공격접종 하여 백신 효능 평가하였다. 시험백신 접종군은 5마리, 공격접종 대조군은 5마리, 음성 대조군은 3마리를 사용하였다. 공격접종 이후 28일간 병원성 및 설사반응을 관찰하였다. 0~28 dpi의 분변을 채취하여 세균수를 측정한다. sample은 채취함과 동시에 real-time PCR 방법을 통하여 균수를 각각 측정한다. 백신 접종 및 공격접종에 따른 자돈의 체중 증감을 확인하기 위해 일주일 간격으로 체중을 측정하였다.

Table 57. 돼지 이유자돈 설사증 군주 공격접종 실험군

Vaccine	Adjuvant	Animal	No. of Ani.	Vaccine inoculation	Challenge
Vac 3. (백신접종군)	Al(OH) <sub>3</sub> 20% IMS 1113 10%	돼지	5	3주령에 1차 근육접종 5주령에 2차 근육접종 각각 2ml씩 접종	KEFS218(FedF:F18) $10^9$ CFU/ml, PO, 1ml
공격접종 대조군	-		5	PBS	
음성 대조군	-		3	PBS	

○ 시험 결과

임상증상: 시험 결과 음성 대조군에서는 설사 및 특이 임상 증상이 관찰 되지 않았다. 백신 접종군의 경우는 공격접종이후 초반에 연변이 발생하였고 공격접종 대조군은 균주의 공격접종 시험결과와 비슷하게 2일 이후부터 임상증상이 관찰되었으며 3~5일차에 심한 설사 이후 2주간 연변이 지속되었다.

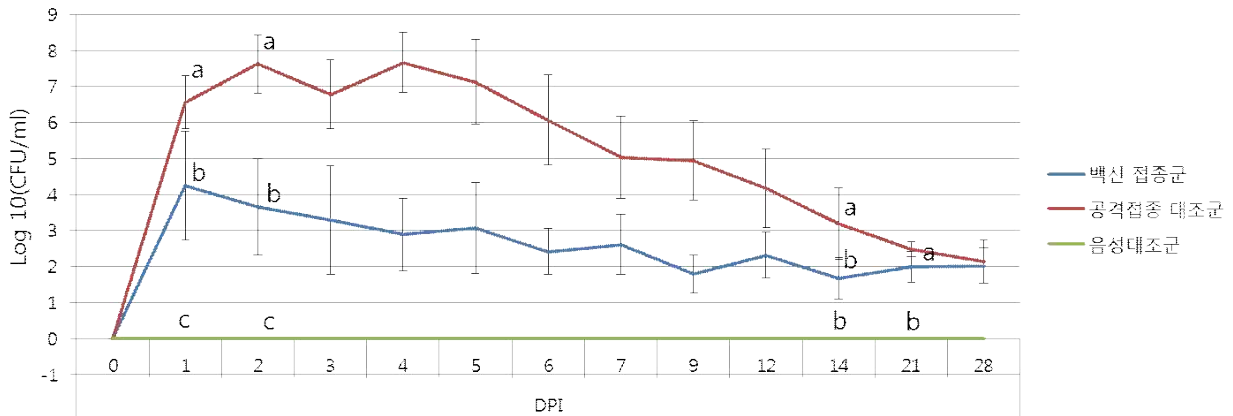
Table 58. 공격접종 이후 임상증상 결과

Sample (Inoculum number, CFU/ml)	No. of piglets	DPI												
		0	1	2	3	4	5	6	7	9	12	14	21	28
백신 접종군	1-1		*0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2		0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-3		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4	Challenge PO 1ml	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-5		0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
공격접종 대조군	2-1		0	1	2	2	3	2	2	1	1	1	1	0
	2-2		0	1	2	2	2	2	2	1	1	1	0	0
	2-3		0	1	2	3	3	2	1	1	1	1	0	0
음성 대조군	3-1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3-2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3-3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

분변 내 균수 함량: 공격접종 이후 분변 내 균주 함량을 측정된 결과 백신접종군과 공격접종군에서 공격접종 1일차부터 분변 내 확인되었다. 공격접종 대조군의 경우 1일차부터 높은 수준으로 분변으로 배출되다가 6일차부터 감소하였지만 27일 이후에도 분변 내 균주가 확인되었다. 백신 접종군의 경우 공격접종 1주일간  $10^{2-4}$  CFU/ml 수준으로 배출되다가 이후 감소하여 21일차 이후에 공격접종군과 동일한 수준의 균주를 확인 할 수 있었다. 임상 증상과 비교 시 실제 임상증상이 안 보이더라도 분변 내 균주가 적은 함량으로 존재함을 알 수 있었다.

Table 59. 공격접종 이후 분변 내 균수 함량 변화

시험군	분변 내 균수 함량 (log CFU/ml)												
	0dpi	1dpi	2dpi	3dpi	4dpi	5dpi	6dpi	7dpi	9dpi	12dpi	14dpi	21dpi	28dpi
백신 접종군	0	4.26 ± 1.5	3.65 ± 1.3	3.29 ± 1.5	2.89 ± 1.0	3.07 ± 1.3	2.42 ± 0.6	2.62 ± 0.8	1.04 ± 1.0	0.74 ± 1.1	1.67 ± 0.6	1.99 ± 0.4	2.02 ± 0.5
공격 접종 대조군	0	6.40 ± 0.9	7.58 ± 1.0	6.62 ± 1.3	7.41 ± 1.1	6.70 ± 1.3	5.43 ± 1.0	4.61 ± 1.3	4.41 ± 1.1	3.47 ± 0.4	2.53 ± 0.1	2.48 ± 0.2	2.14 ± 0.6
음성 대조군	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



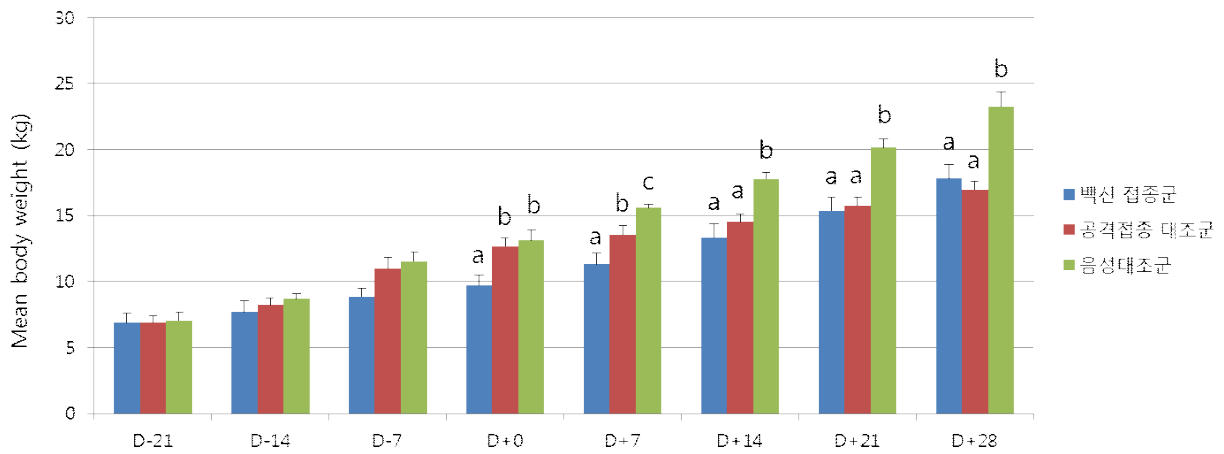
a, b, c ; Significant different compared with the control group. p<0.05.

Fig 22. 공격접종이후 분변 내 균수 함량 변화

체중변화: 백신 접종부터 공격접종 이후 28일간 체중변화를 살펴본 결과 백신 접종군의 경우 대조군에 비해 1차 접종 2주 후부터 유의적인 감소가 보였다. 공격접종 이후부터는 공격접종 대조군과 차이를 극복하여 공격접종 군보다 체중 증가 값이 큰 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 음성대조군과는 여전히 유의적인 차이가 발생하였다.

Table 60. 공격접종 이후 체중변화 결과

시험군	체중 변화(kg)							
	D-21	D-14	D-7	D+0	D+7	D+14	D+21	D+28
백신 접종군	6.9±0.72	7.68±0.88	8.86±0.66	9.74±0.72	11.32±0.87	13.36±1.01	15.38±1.00	17.8±1.04
공격접종 대조군	6.9±0.56	8.33±0.45	11.23±0.60	12.7±0.4	13.67±0.57	14.4±0.66	15.76±0.65	16.98±0.63
음성 대조군	7.07±0.61	8.7±0.4	11.53±0.71	13.13±0.81	15.6±0.26	17.77±0.51	20.17±0.67	23.27±1.11



a, b; Significant different compared with the control group.  $p < 0.05$ .

Fig 23. 백신 접종 및 공격접종 이후 체중 변화

○ 시험 결론

: 정제 항원 최대 함량으로 백신을 생산하여 자돈에 시험한 결과 백신의 방어능을 확인 하였지만 백신 부작용으로 체중감소가 확인되었다. 하지만 공격접종 이후 공격접종 대조군보다 체중 증감이 큰 것을 확인하였다. 백신 부작용이 나타나지 않으면서 효능을 보이는 정제항원 함량 결정을 위해 시험 백신을 제작하여 함량 결정 시험을 진행하여야 한다.

(4) 돼지 부종병 백신 임상시험계획서 승인

(가) 2016. 11. 09 승인 완료 (동물약품관리과-11421)



정부3.0, 국민과의 약속

농림축산검역본부



수신 (주)중앙백신연구소(대전시 유성구 유성대로 1476-37, 대표자:윤인중)

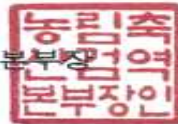
(경유)

제목 동물용의약품 임상시험계획(수이샷 부종병) 승인(알림)

1. 동물용의약품 임상시험계획 승인과 관련됩니다.

2. 귀사에서 제출한 "수이샷 부종병"의 동물용의약품 임상시험계획서 검토 결과에 따라 임상시험 계획을 승인합니다.

3. 다만, 당해 임상시험은 승인된 임상시험 계획서에 따라 실시되어야 하고, 임상시험실시중 변경이 불가피한 경우 변경사유 및 내용에 대하여 재승인을 받아야 하며, 기타 사항은 "동물용의약품등 임상시험 관리지침(농림축산검역본부 고시 제2015-29호)"에 따라야 함을 알려드립니다. 끝.



농림축산검역본부장

★주무관 이상희 동물약품관리과 수의사무관 김춘섭 수의연구관 전광

협조자

시행 동물약품관리과-11421 (2016. 11. 9.) 접수

주 39660 경상북도 김천시 혁신8로 177, (울곡동 960, 농림축산검역 / http://www.qia.go.kr  
본부) (울곡동)

전화번호 054-912-0542 팩스번호 054-912-0530 / vt0306@korea.kr / 비공개(7)

(나) 돼지 부종병 백신 야외농장 임상시험 실시

① 야외시험의 개요

야외임상시험을 수행하기 위하여 시험농장 3군데 (제1시험농장, 제2시험농장, 제3시험농장)를 선정하였다. 적용시험 전에 2두분 안전성 시험을 실시하여 예비 시험으로서, 백신의 안전성을 확인한 다음, 권장 접종 시기인 2~3주령 자돈에 대하여 지정된 용법 및 용량으로 접종하여 안전성과 면역원성을 확인한다.



② 제 1시험농장 성적 (여천농장)

Table 51. 여천농장 부종병 시험백신 성적표

농장명	여천농장	
농장주	정○○	
사육규모	모든 150 두	
주소 및 연락처	경북 경산시 ○○○길 223	
사용시험백신	T315ET01	
시험담당 수의사	백○○	
수정률	91%	
분만을 및 분만두수	89%, 12 두	
평균포유개수두수	11 두	
평균이유두수	10 두	
이유자돈의 폐사율(6~25kg)	10%	
육성, 비육돈의 폐사율(25~110kg)	7%	
농장 특이사항	부종병이 육성초기 발생하여 자돈시기에 실험 진행	
백신프로그램	모든	PPV, PCV, 대장균
	자돈	PCV, HE, FMD

㉠ 대규모 시험 전 2 두분 안전성 확인 예비시험

○ 시험방법

적용시험 전에 백신의 안전성을 확인하기 위하여 2~3 주령 자돈 30 두를 대상으로 10 두는 단일용량 반복접종시험으로서 1 두분 (2 ml)을 2 주 간격으로 반복접종하며 매 접종시기마다 과민반응, 국소적 반응 (부종, 염증, 괴사, 기타)과 전신적 반응 (폐사, 웅크림, 식불, 발열, 발적, 호흡곤란, 신경증상, 기타)을 비교 관찰한다. 10 두는 2 배 용량 접종시험으로서 2 두분 (4 ml)를 1 회 접종하여 백신 부작용 유무를 관찰한다. 나머지 10 두는 무처리 대조군으로 한다. 백신 접종 1 시간 후 (단일용량 반복 접종 시험의 경우, 2 차 접종 1 시간 후)에 직장에서 체온을 측정하여 기록한다.

○ 시험결과

- 단일용량 반복접종 시험(Table 61)

적용시험 전에 백신의 안전성을 확인하기 위한 단일용량 반복접종 시험 결과 모든 2~3주령 자돈개체에서 백신접종에 의한 특이증상을 관찰 할 수 없었다.

Table 61. 단일용량 반복접종 시험 결과

Group	Administration		Temperature (°C) <sup>a</sup>	Hypersensitivity	Clinical signs	
	1st	2nd			Local <sup>b</sup>	Systemic <sup>c</sup>
Vaccinates	2~3 weeks old, 2 ml, IM	4~5 weeks old, 2 ml, IM	39.4	0/10	0/10*	0/10
Control	No-treatment		39.2	0/10	0/10	0/10

<sup>a</sup> Within 1 hour

<sup>b</sup> Edema, inflammation, necrosis, etc

<sup>c</sup> Death, lethargy, anorexia, fever, redness, dyspnea, neurosis, etc

\* Clinical sign number/ Total number

- 2 배 용량 단일접종 시험(Table 62)

적용시험 전에 백신의 안전성을 확인하기 위한 2배 용량 단일접종 시험 결과 모든 2~3주령 자돈개체에서 백신접종에 의한 특이증상을 관찰 할 수 없었다.

Table 62. 2배 용량 단일접종 시험 결과

Group	Administration	Temperature (°C) <sup>a</sup>	Hypersensitivity	Clinical signs	
				Local <sup>b</sup>	Systemic <sup>c</sup>
Vaccinates	2~3 weeks old, 4 ml, IM	39.3	0/10	0/10*	0/10
Control	No-treatment	39.5	0/10	0/10	0/10

<sup>a</sup> Within 1 hour

<sup>b</sup> Edema, inflammation, necrosis, etc

<sup>c</sup> death, lethargy, anorexia, fever, redness, dyspnea, neurosis, etc

\* Clinical sign number/ Total number

㉞ 안전시험

○ 자돈의 폐사율 비교 시험

- 시험방법

2주령의 자돈에 용법 및 용량에 따라 접종군 (125 두수)과 대조군 (50 두수)으로 나눠 접종군에 백신 접종 후, 4주 간격으로 육성비육구간의 폐사율을 확인하였고, 폐사돈을 부검하여 그 원인체를 확인하였다. PCV2, PRRSV, SIV 등 바이러스 항원은 PCR을 이용하여 확인하고, PmA, PmD, HPS, Salmonella, APP등의 세균 항원은 균분리를 이용하여 폐사원인을 분석하였다.

- 시험결과

· 폐사율 비교 결과(Table 63)

2주령의 자돈의 백신 접종 후 폐사율을 비교한 결과 백신 접종군의 6주 이전 폐사돈은 125두수 중 2마리가 발생하였으며 백신 미 접종군의 경우 50두수 중 5마리가 폐사하였다. 이후 육성 구간에서 백신 접종군은 4마리, 대조군은 3마리가 추가적으로 폐사하여 18주까지 총 폐사율은 각각 4.8%와 16%로 확인되었다. 이는 백신 접종군이 대조군에 비해 약 11%의 유의적인 폐사율 감소효과를 확인 할 수 있었다 (Pearson chi-square test, p-value (2-sided) < 0.05).

Table 63. 폐사율 비교 결과

Group		Vaccinates	Control
No. of Pigs		125	50
Death rate (%)		4.8%*	16%
The Number of death at each period	6 week old	2	5
	10 week old	4	2
	14 week old	0	1
	18 week old	0	0

\* SPSS statistics ver.19/pearson chi-square tests, p-value(2-sided) < 0.05

· 폐사돈의 원인체 분리 결과 및 분석 (Table 64)

폐사돈에 대한 폐사원인을 분석하기 위해 부검과 가검 채취를 실시하였다. 부검결과 백신 접종군과 대조군 모두 경도의 간질성 폐렴 증상이 관찰되었고 PCR검사 결과 PRRS 수치가 낮게 확인 되었다. 하지만 폐사 자돈은 부종병 특이증상이 관찰되고 세균분리 및 PCR동정 결과 직접적인 폐사 원인은 부종병으로 확인되었다.

Table 64. 폐사돈의 원인체 분리 결과 및 분석

Week-old period	Group	No. of death	Isolation	PCR
6 week old	접종군	2	<i>E coli</i> (STEC, ETEC)	PRRSV
	대조군	5	<i>E coli</i> (STEC, ETEC)	PRRSV
10 week old	접종군	4	<i>E coli</i> (STEC, ETEC)	PRRSV
	대조군	2	<i>E coli</i> (STEC, ETEC)	PRRSV
14 week old	접종군	-	-	-
	대조군	1	<i>E coli</i> (STEC, ETEC)	PRRSV
18 week old	접종군	-	-	-
	대조군	-	-	-

○ 임상증상 관찰시험

- 시험방법

접종군과 대조군을 각각 30마리씩 구분하여 관찰하였다. 접종군은 2 주령에 1 차 접종하였고 2 주후 (4 주령)에 2 차 접종하였다. 1차 접종 시기인 2 주령부터 2차 접종 2 주 후인 6 주차까지 호흡, 기침여부, 활력, 피부 상태, 분변 상태 등을 확인하여 기록하였다. 임상증상이 보이는 개체에 대해서는 백신에 의한 영향 여부를 판단하였다.

- 시험결과

· 백신접종군 (Table 65)

백신 접종군의 자돈에서 호흡, 활력, 피부병변은 관찰 되지 않았지만 간헐적인 기침과 분변 정상에서 포유와 이유초기에 설사 및 연변을 관찰 할 수 있었다. 이는 대조군에서도 동일하게 관찰 되는 것으로 보아 백신 접종에 의한 접종 반응이라고 보기 어렵고 이유자돈 설사증 등 농장 상황에 따른 임상증상으로 확인되었다.

Table 65. 백신접종군의 임상증상 관찰 결과

CS	W	Number of pigs which show clinical signs at every week-old				
		2	3	4	5	6
호흡	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	복식	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
기침	정상	30/30	28/30	26/30	27/30	25/30
	간헐	0/30	2/30	4/30	3/30	5/30
	연속	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
활력	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	침울	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
피부	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	발적	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
	황달	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
분변	정상	21/30	19/30	20/30	20/30	25/30
	연변	8/30	8/30	7/30	8/30	5/30
	설사	1/30	3/30	3/30	2/30	0/30

W, Weeks old; CS, Clinical Signs.

· 대조군

대조군의 자돈 임상증상을 관찰 한 결과 백신 접종군과 거의 유사하게 분변 상태만 연변, 기침과 설사를 일부 자돈에서 관찰 할 수 있었다 (Table 57).

Table 66. 대조군의 임상증상 관찰 결과

CS	W	Number of pigs which show clinical signs at every week-old				
		2	3	4	5	6
호흡	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	복식	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
기침	정상	29/30	25/30	26/30	28/30	24/30
	간헐	1/30	5/30	4/30	2/30	6/30
	연속	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
활력	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	침울	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
피부	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	발적	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
	황달	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
분변	정상	17/30	15/30	19/30	18/30	24/30
	연변	9/30	9/30	8/30	6/30	5/30
	설사	4/30	6/30	3/30	6/30	1/30

W : Weeks old, CS : Clinical Signs.

㉔ 제 1시험농장 (여천농장) 결론

부종병 백신 2두분 및 1두분 2회 접종 안전성이 확인되었고, 자돈의 폐사율을 비교한 결과 부종병으로 인한 폐사가 백신 접종군에서 포유자돈과 이유자돈에서 유의적인 차이로 감소되었음을 확인하였다. 농장 자돈군의 호흡기 증상은 경미하게 관찰 할 수 있었으나 대조군과 접종군간 차이는 없었다. 또한 이유자돈설사증 상시 발생 농가다 보니 소화기 증상이 대조군과 접종군에도 관찰 되었고 이로 인한 설사에 대한 유의적인 차이는 보이지 않았다.

③ 제 2시험농장 성적 (동산농장)

Table 67. 여천농장 부종병 시험백신 성적표

농장명	동산농장	
농장주	박○○	
사육규모	모든 160 두	
주소 및 연락처	경북 경주시 ○○면 ○○○○길 76-3	
사용시험백신	T315ET02	
시험담당 수의사	백○○	
수정률	92%	
분만을 및 분만두수	90%, 11 두	
평균포유개수두수	11 두	
평균이유두수	10.02 두	
이유자돈의 폐사율(6 ~ 25kg)	7%	
육성, 비육돈의 폐사율(25 ~ 110kg)	4%	
농장 특이사항	부종병 자돈사에서 발병	
백신프로그램	모든	PPV, PCV, AR, 대장균
	자돈	PCV, HE, FMD, APP

㉔ 대규모 시험 전 2 두분 안전성 확인 예비시험

○ 시험방법

적용시험 전에 백신의 안전성을 확인하기 위하여 2~3 주령 자돈 30 두를 대상으로 10 두는 단일용량 반복접종시험으로서 1 두분 (2 ml)을 2 주 간격으로 반복접종하며 매 접종시기마다 과민반응, 국소적 반응 (부종, 염증, 괴사, 기타)과 전신적 반응 (폐사, 웅크림, 식불, 발열, 발적, 호흡곤란, 신경증상, 기타)을 비교 관찰하였다. 10 두는 2 배 용량 접종시험으로서 2 두분 (4 ml)를 1 회 접종하여 백신 부작용 유무를 관찰하였다. 나머지 10 두는 무처리 대조군으로 하였다. 백신 접종 1 시간 후 (단일용량 반복 접종 시험의 경우, 2 차 접종 1 시간 후)에 직장에서 체온을 측정하여 기록하였다.

○ 시험결과

- 단일용량 반복접종 시험 (Table 68)

적용시험 전에 백신의 안전성을 확인하기 위한 단일용량 반복접종 시험 결과 모든 2~3주령 자돈개체에서 백신접종에 의한 특이증상을 관찰 할 수 없었다.

Table 68. 단일용량 반복접종 시험 결과

Group	Administration		Temperature (°C) <sup>a</sup>	Hypersensitivity	Clinical signs	
	1st	2nd			Local <sup>b</sup>	Systemic <sup>c</sup>
	2~3 weeks old,	4~5 weeks old,				
Vaccinates	2 ml, IM	2 ml, IM	39.3	0/10	0/10*	0/10
Control	No-treatment		39.5	0/10	0/10	0/10

<sup>a</sup> Within 1 hour

<sup>b</sup> Edema, inflammation, necrosis, etc

<sup>c</sup> Death, lethargy, anorexia, fever, redness, dyspnea, neurosis, etc

\* Clinical sign number/ Total number

- 2 배 용량 단일접종 시험

적용시험 전에 백신의 안전성을 확인하기 위한 2배 용량 단일접종 시험 결과 모든 2~3주령 자돈개체에서 백신접종에 의한 특이증상을 관찰 할 수 없었다 (Table 69).

Table 69. 2배 용량 단일접종 시험 결과

Group	Administration	Temperature (°C) <sup>a</sup>	Hypersensitivity	Clinical signs	
				Local <sup>b</sup>	Systemic <sup>c</sup>
Vaccinates	2~3 weeks old 4 ml, IM	39.5	0/10	0/10*	0/10
Control	No-treatment	39.4	0/10	0/10	0/10

<sup>a</sup> Within 1 hour

<sup>b</sup> Edema, inflammation, necrosis, etc

<sup>c</sup> death, lethargy, anorexia, fever, redness, dyspnea, neurosis, etc

\* Clinical sign number/ Total number

㉞ 안전시험

○ 자돈의 폐사율 비교 시험

- 시험방법

2주령의 자돈에 용법 및 용량에 따라 접종군 (131 두수)과 대조군 (54 두수)으로 나뉘어 접종군에 백신 접종 후, 4주 간격으로 육성비육구간의 폐사율을 확인하고, 그 원인체를 확인하였다. PCV2, PRRSV, SIV 등 바이러스 항원은 PCR을 이용하여 확인하고, PmA, PmD, HPS, Salmonella, APP등의 세균 항원은 균분리를 이용하여 폐사원인을 분석하였다.

- 시험결과

· 폐사율 비교 결과 (Table 70)

2주령의 자돈의 백신 접종 후 폐사율을 비교한 결과 백신 접종군의 6주 이전 폐사돈은 131두수 중 3마리가 발생하였으며 백신 미 접종군의 경우 54두수 중 4마리가 폐사하였다. 이후 육성 구간에서 백신 접종군은 4마리, 대조군은 2마리가 추가 폐사하여 18주까지 총 폐사율은 각각 5.34%와 11.11%로 확인되었다. 이는 백신 접종군이 대조군에 비해 약 6%의 유의적인 폐사율 감소효과를 확인 할 수 있었다 (Pearson chi-square test, p-value (2-sided) < 0.05).

Table 70. 폐사율 비교 결과

Group		Vaccinates	Control
No. of Pigs		131	54
Death rate (%)		5.34%*	11.11%
The Number of death at each period	6 week old	3	4
	10 week old	4	1
	14 week old	0	1
	18 week old	0	0

\* Pearson chi-square test, p-value (2-sided) < 0.05

- 폐사돈의 원인체 분리 결과 및 분석(Table 71)

폐사돈에 대한 폐사원인을 분석하기 위해 부검과 가검 채취를 실시하였다. 부검결과 백신 접종군과 대조군 모두 PRRS 및 PCV2 감염이 확인되었지만 폐병변 수치는 바이러스성 간질성 폐렴만 확인하고, 세균성 폐렴은 관찰되지 않고 PCR 검사 결과에서 PRRS와 PCV2 양성 검출이 되었다. 눈 주위, 피하, 결장 주위 부종 소견으로 직접적인 폐사원인은 부종병으로 확인되었다.

Table 71. 폐사돈의 원인체 분리 결과 및 분석

Week-old period	Group	No. of death	Isolation	PCR
6 week old	접종군	3	<i>E. coli</i> (STEC, ETEC)	PRRSV, PCV2
	대조군	4	<i>E. coli</i> (STEC, ETEC)	PRRSV, PCV2
10 week old	접종군	4	<i>E. coli</i> (STEC, ETEC)	PRRSV, PCV2
	대조군	1	<i>E. coli</i> (STEC, ETEC)	PRRSV, PCV2
14 week old	접종군	-	-	-
	대조군	1	<i>E. coli</i> (STEC)	PRRSV, PCV2
18 week old	접종군	-	-	-
	대조군	-	-	-



○ 임상증상 관찰시험

- 시험방법

접종군과 대조군을 각각 30마리 씩 구분하여 관찰하였다. 접종군은 2 주령에 1차 접종하고 2 주후 (4 주령)에 2차 접종하였다. 1차 접종 시기인 2 주령부터 2차 접종 2 주 후인 6 주차까지 호흡, 기침여부, 활력, 피부 상태, 분변 상태 등을 확인하여 기록하였다. 임상증상이 보이는 개체에 대해서는 백신에 의한 영향 여부를 판단하였다.

- 시험결과

· 백신접종군 (Table 72)

백신 접종군의 자돈에서 호흡, 활력, 피부병변은 관찰 되지 않았지만 간헐적인 기침과 분변 성상에서 포유와 이유초기에 설사 및 연변을 관찰 할 수 있었다. 이는 대조군에서도 동일하게 관찰 되는 것으로 보아 백신 접종에 의한 접종 반응이라고 보기 어렵고 이유자돈 설사증 등 농장 상황에 따른 임상증상으로 확인되었다.

Table 72. 백신접종군의 임상증상 관찰 결과

CS	W	Number of pigs which show clinical signs at every week-old				
		2	3	4	5	6
호흡	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	복식	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
기침	정상	28/30	25/30	23/30	24/30	21/30
	간헐	2/30	5/30	7/30	6/30	9/30
	연속	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
활력	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	침울	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
피부	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	발적	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
	황달	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
분변	정상	24/30	25/30	26/30	24/30	28/30
	연변	3/30	4/30	3/30	5/30	2/30
	설사	3/10	1/10	1/10	1/10	0/10

W, Weeks old: CS, Clinical Signs.

· 대조군 (Table 73)

대조군의 자돈 임상증상을 관찰 한 결과 백신 접종군과 거의 유사하게 간헐적인 기침과 분변 상태만 연변과 설사를 일부 자돈에서 관찰 할 수 있었다.

Table 73. 대조군의 임상증상 관찰 결과

CS	W	Number of pigs which show clinical signs at every week-old				
		2	3	4	5	6
호흡	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	복식	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
기침	정상	25/30	21/30	25/30	24/30	27/30
	간헐	5/30	9/30	5/30	6/30	3/30
	연속	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
활력	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	침울	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
피부	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	발적	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
	황달	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
분변	정상	21/30	22/30	19/30	23/30	24/30
	연변	5/30	5/30	8/30	4/30	5/30
	설사	4/30	3/30	3/30	3/30	1/30

W : Weeks old, CS : Clinical Sign.

㉔ 제 2시험 농장 (동산농장) 결론

부종병 백신 2두분 및 1두분 2회 접종 안전성이 확인되었고, 자돈의 폐사율을 비교한 결과 부종병으로 인한 폐사가 백신 접종군에서 포유자돈과 이유자돈에서 유의적인 차이로 감소되었음을 확인하였다. 농장내 포유-이유자돈군 시기에 호흡기 증상은 대조군과 접종군 모두 경미하게 관찰 할 수 있었다. 또한 이유자돈설사증 상시 발생 농가다 보니 소화기 증상이 대조군과 접종군에도 관찰 되었지만 이로 인한 기침과 설사에 대한 접종에 의한 대조군과 접종군간의 유의적인 차이는 보이지 않았다.

④ 제 3시험농장 성적 (재경농장)

Table 74. 재경농장 부종병 시험백신 성적표

농장명	재경농장	
농장주	정○○	
사육규모	모돈 150 두	
주소 및 연락처	울산시 울주군 ○○면 ○○○○로 435	
사용시험백신	T3165ET03	
시험담당 의사	백○○	
수정률	90.5%	
분만율 및 분만두수	88.5%, 12 두	
평균포유개수두수	10.8 두	
평균이유두수	9.8 두	
이유자돈의 폐사율(6~25kg)	7%	
육성, 비육돈의 폐사율(25~110kg)	5%	
농장 특이사항	부종병 자돈사에서 발병	
백신프로그램	모돈	PPV, PCV, AR, 대장균
	자돈	PCV, HE, FMD, APP

㉔ 대규모 시험 전 2 두분 안전성 확인 예비시험

○ 시험방법

적용시험 전에 백신의 안전성을 확인하기 위하여 2~3 주령 자돈 30 두를 대상으로 10 두는 단일용량 반복접종시험으로서 1 두분 (2 ml)을 2 주 간격으로 반복접종하며 매 접종시기마다 과민반응, 국소적 반응 (부종, 염증, 괴사, 기타)과 전신적 반응 (폐사, 웅크림, 식불, 발열, 발적, 호흡곤란, 신경증상, 기타)을 비교 관찰한다. 10 두는 2 배 용량 접종시험으로서 2 두분 (4 ml)를 1 회 접종하여 백신 부작용 유무를 관찰한다. 나머지 10 두는 무처치 대조군으로 한다. 백신 접종 1 시간 후 (단일용량 반복 접종 시험의 경우, 2 차 접종 1 시간 후)에 직장에서 체온을 측정하여 기록한다.

○ 시험결과

- 단일용량 반복접종 시험 (Table 75)

적용시험 전에 백신의 안전성을 확인하기 위한 단일용량 반복접종 시험 결과 모든 2~3주령 자돈개체에서 백신접종에 의한 특이증상을 관찰 할 수 없었다.

Table 75. 단일용량 반복접종 시험 결과

Group	Administration		Temperature (°C) <sup>a</sup>	Hypersensitivity	Clinical signs	
	1st	2nd			Local <sup>b</sup>	Systemic <sup>c</sup>
Vaccinates	2 ~ 3 weeks old, 2 ml, IM	4 ~ 5 weeks old, 2 ml, IM	39.2	0/10	0/10*	0/10
Control	No-treatment		39.5	0/10	0/10	0/10

<sup>a</sup> Within 1 hour

<sup>b</sup> Edema, inflammation, necrosis, etc

<sup>c</sup> Death, lethargy, anorexia, fever, redness, dyspnea, neurosis, etc

\* Clinical sign number/ Total number

- 2 배 용량 단일접종 시험 (Table 76)

적용시험 전에 백신의 안전성을 확인하기 위한 2배 용량 단일접종 시험 결과 모든 2~3주령 자돈개체에서 백신접종에 의한 특이증상을 관찰 할 수 없었다.

Table 76. 2배 용량 단일접종 시험 결과

Group	Administration	Temperature (°C) <sup>a</sup>	Hypersensitivity	Clinical signs	
				Local <sup>b</sup>	Systemic <sup>c</sup>
Vaccinates	2 ~ 3 weeks old, 4 ml, IM	39.3	0/10	0/10*	0/10
Control	No-treatment	39.4	0/10	0/10	0/10

<sup>a</sup> Within 1 hour

<sup>b</sup> Edema, inflammation, necrosis, etc

<sup>c</sup> death, lethargy, anorexia, fever, redness, dyspnea, neurosis, etc

\* Clinical sign number/ Total number

㉔ 안전시험

○ 자돈의 폐사율 비교 시험

- 시험방법

2주령의 자돈에 용법 및 용량에 따라 접종군 (92 두수)과 대조군 (41 두수)으로 나눠 접종군에 백신 접종 후, 4주 간격으로 육성비육구간의 폐사율을 확인하고, 폐사돈을 부검하여 그 원인체를 확인하였다. PCV2, PRRSV, SIV 등 바이러스 항원은 PCR을 이용하여 확인하고, PmA, PmD, HPS, Salmonella, APP등의 세균 항원은 균분리를 이용하여 폐사원인을 분석하였다.

- 시험결과

· 폐사율 비교 결과

2주령의 자돈의 백신 접종 후 폐사율을 비교한 결과 백신 접종군의 6주 이전 폐사돈은 92두수 중 2마리가 발생하였으며 백신 미 접종군의 경우 41두수 중 3마리가 폐사하였다. 이후 육성 구간에서 백신 접종군은 2마리, 대조군은 2마리가 추가적으로 폐사하여 18주까지 총 폐사율은 각각 4.35%와 12.20%로 확인되었다. 이는 백신 접종군이 대조군에 비해 약 8%의 유의적인 폐사율 감소효과를 확인 할 수 있었다 (Pearson chi-square test, p-value (2-sided) < 0.05).

Table 77. 폐사율 비교 결과

Group		Vaccinates	Control
No. of Pigs		92	41
Death rate (%)		4.35%*	12.20%
The Number of death at each period	6 week old	2	3
	10 week old	2	2
	14 week old	0	0
	18 week old	0	0

\* SPSS statistics ver.19/pearson chi-square tests, p-value(2-sided) < 0.05

· 폐사돈의 원인체 분리 결과 및 분석

폐사돈에 대한 폐사원인을 분석하기 위해 부검과 가검 채취를 실시하였다. 부검결과 백신 접종군과 대조군 모두 PRRS 감염이 확인되었고 10주령 이후 폐사 자돈에서는 PmD도 분리되었다. 일부 개체에서 폐병변 수치가 높은게 보였지만 종합적인 부검 소견 결과 부종병 증상이 가장 심했으므로 직접적인 폐사 원인은 부종병으로 확인되었다.

Table 78. 폐사돈 원인체 분리 및 결과 분석

Week-old period	Group	No. of death	Isolation	PCR
6 week old	접종군	2	<i>E. coli</i> (STEC, ETEC)	PRRSV
	대조군	3	<i>E. coli</i> (STEC, ETEC)	PRRSV
10 week old	접종군	2	<i>E. coli</i> (STEC, ETEC), PmD	PRRSV
	대조군	2	<i>E. coli</i> (STEC, ETEC), PmD	PRRSV
14 week old	접종군	-	-	-
	대조군	-	-	-
18 week old	접종군	-	-	-
	대조군	-	-	-

○ 임상증상 관찰시험

- 시험방법

접종군과 대조군을 각각 30마리 씩 구분하여 관찰하였다. 접종군은 2 주령에 1 차 접종하고 2 주후 (4 주령)에 2 차 접종하였다. 1차 접종 시기인 2 주령부터 2차 접종 2 주 후인 6 주차까지 호흡, 기침여부, 활력, 피부 상태, 분변 상태 등을 확인하여 기록하였다.

- 시험결과

· 백신접종군

백신 접종군의 자돈에서 호흡, 활력, 피부병변은 관찰 되지 않았지만 간헐적인 기침과 분변 성상에서 포유와 이유초기에 설사 및 연변을 관찰 할 수 있었다. 이는 대조군에서도 동일하게 관찰 되는 것으로 보아 백신 접종에 의한 접종 반응이라고 보기 어렵고 이유자돈 설사증 등 농장 상황에 따른 임상증상으로 확인되었다.

Table 79. 백신접종군의 임상증상 관찰 결과

CS	W	Number of pigs which show clinical signs at every week-old				
		2	3	4	5	6
호흡	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	복식	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
기침	정상	30/30	30/30	28/30	29/30	29/30
	간헐	0/30	0/30	2/30	1/30	1/30
	연속	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
활력	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	침울	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
피부	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	발적	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
	황달	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
분변	정상	20/30	23/30	22/30	25/30	24/30
	연변	10/30	5/30	7/30	3/30	4/30
	설사	0/30	2/30	1/30	2/30	2/30

W, Weeks old: CS, Clinical Signs.

· 대조군

대조군의 자돈 임상증상을 관찰 한 결과 백신 접종군과 거의 유사하게 분변 상태만 연변, 기침과 설사를 일부 자돈에서 관찰할 수 있었다.

Table 80. 대조군의 임상증상 관찰 결과

CS	W	Number of pigs which show clinical signs at every week-old				
		2	3	4	5	6
호흡	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	복식	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
기침	정상	27/30	28/10	30/10	28/10	28/10
	간헐	3/30	2/10	0/10	2/10	2/10
	연속	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
활력	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	침울	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
피부	정상	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	발적	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
	황달	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
분변	정상	21/30	18/30	20/30	24/30	23/30
	연변	9/30	9/30	6/30	4/30	6/30
	설사	0/30	3/30	4/30	2/30	1/30

W : Weeks old, CS : Clinical Sign.

⑤ 제 3시험농장 (재경농장) 결론

부종병 백신 2두분 및 1두분 2회 접종 안전성이 확인되었고, 자돈의 폐사율을 비교한 결과 부종병으로 인한 폐사가 백신 접종군에서 포유자돈과 이유자돈에서 유의적인 차이로 감소되었음을 확인하였다. 농장내 포유-이유자돈군 시기에 간헐적인 기침의 호흡기 증상을 관찰 할 수 있었지만 접종군과 대조군간의 유의적인 차이는 관찰 되지 않았다. 또한 이유자돈 설사증 상시 발생 농가다 보니 소화기 증상이 대조군과 접종군에도 관찰 되었고 이로 인한 설사에 대한 유의적인 차이는 보이지 않았다.

⑥ 야외임상시험 종합 결론

야외임상 시험이 진행된 3개 농장에서 부종병 백신 2두분 및 1두분 2회 접종 안전성이 확인되었다. 2주령 자돈에 용법 및 용량에 따른 백신 접종시 부종병 발생에 따른 자돈의 폐사율이 유의적인 차이 (paired t-test,  $p < 0.05$ )로 감소함을 확인하였다. 부종병 백신 접종 농가 모두 기존에 이유자돈 설사증이 발생한 농가이며 포유와 이유시기에 소화기 병변 증상인 설사가 발생되었고 간헐적인 호흡기 증상



이 관찰되었지만 대조군과 접종군간의 유의적인 차이는 없었다. 백신 접종에 따른 설사예방 효과는 관찰되지 않았지만 부종병에 의한 폐사를 감소로 인해 출하 두수 및 돼지 생산성 향상에 도움이 됨을 확인하였다.

⑦ 야외농장 임상시험 기타 내용

㉑ 야외농장 임상 시험 돼지 ELISA 항체가 변화

야외농장 2군대의 혈청역가를 ELISA로 비교한 결과 부종병 백신 2차 접종 5주 후부터 양성 전환되었다 (Fig. 24, 25).

**부종병 백신 야외농장 임상 시험 돼지 실험 결과 (ELISA) : 여천 농장**

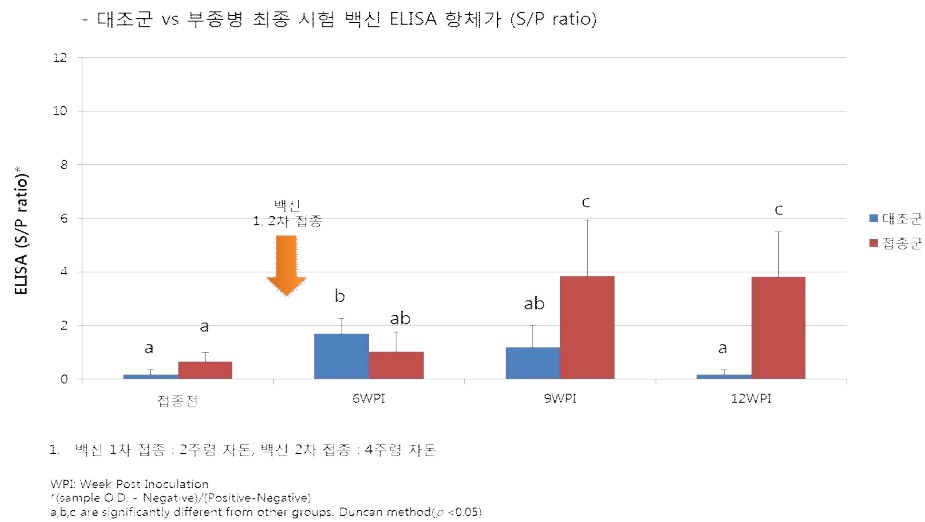


Fig 24. 여천농장 부종병 백신 접종 시기에 따른 ELISA 항체가

**부종병 백신 야외농장 임상 시험 돼지 실험 결과 (ELISA) : 재경 농장**

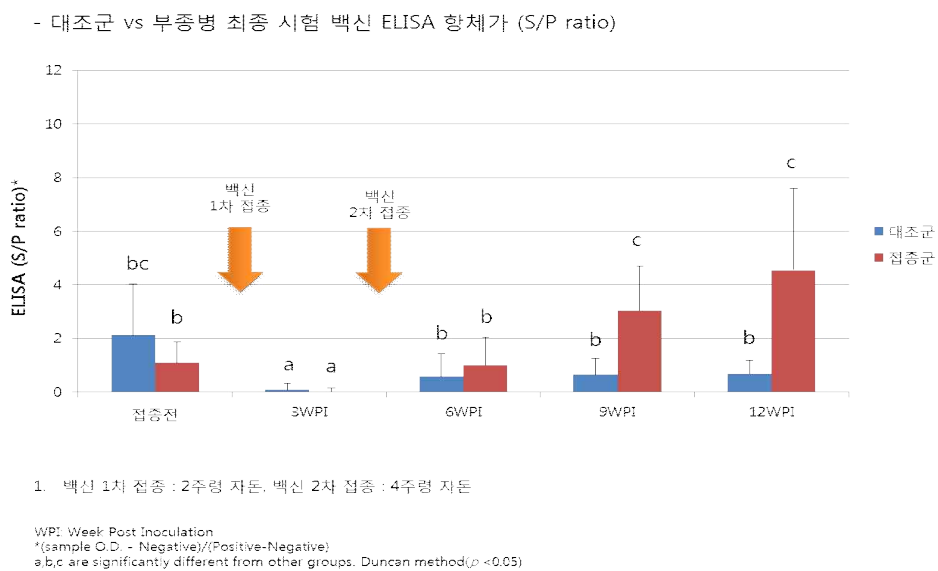


Fig 25. 재경농장 부종병 백신 접종 시기에 따른 ELISA 항체가

⑧ 종합

부종병 백신 야외농장 임상 시험 결과 접종군은 비접종군에 비해 자돈 폐사율을 최대 50%이상 감소시킴을 확인하였다. 또한 야외농장 자돈의 경우 부종병에 대한 ELISA 항체가는 백신 2차접종 5주 후에 양성 전환됨을 확인하였다.

(나) 부종병 허가서류 제출

2017년 6월 8일 허가 서류 수의과학 검역본부 제출

### 제 3 절 연구성과

1. 연구개발 성과목표 대비 실적

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SC I	비 SC I						
최종목표	3	3		2		3						3	5	9	3	3		2	1
1차년도													1	3	1	1			
1차년도	실적	1			1	1								7		1		3	2
2차년도	목표	2										1	2	3	1	1			
2차년도	실적	2			2	2						0	0	3	3	2			4
3차년도	목표	1	2		2		2					2	2	3	1	1		2	
3차년도	실적		1				3	1		1			1	2	2	1			
소계	목표	3	2		2		2					3	5	9	3	3		2	1
	실적	3	1		3	3	3	1		1		0	1	12	5	4		3	6
종료 1차년도		1				1													
종료 2차년도																			
종료 3차년도																			
소계		1				1													
합계		3	3		2		3					3	5	9	3	3		2	1

2. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	게재연도; 권(호)	논문게재지	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	Antimicrobial resistance of Stx2e positive <i>Escherichia coli</i> before and after ban on antibiotic growth promoters	Journal of Biomedical and Translational Research	도경효	2017; 18(3)	대한민국	비SCI

3. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2015 한국예방수의학회 추계학술대회	황혜련 외 9	2015.10.7	충남대학교	대한민국
2	2015 대한임상수의학회 추계학술대회	도경효 외 3	2015.10.24	서울대학교	대한민국
3	제7회 아시아 양돈수의사대회	백강현 외 6	2015.10.25	마닐라	필리핀
4	2015 대한수의학회 추계학술대회	변재원 외 5	2015.10.29	경주	대한민국
5	2015 대한수의학회 추계학술대회	변재원 외 5	2015.10.29	경주	대한민국
6	2015 대한수의학회 추계학술대회	변재원 외 5	2015.10.29	경주	대한민국
7	2015 대한수의학회 추계학술대회	도경효 외 3	2015.10.29	경주	대한민국
8	캐나다 미생물학회	강성일 외 6	2016.6.12	캐나다	캐나다
9	캐나다 미생물학회	강성일 외 6	2016.6.12	캐나다	캐나다
10	2016 대한수의학회 추계학술대회	박화성 외 3	2016.10.28	진주	대한민국
11	스페인 미생물학회	도경효 외 2	2017.7.10	스페인	스페인
12	2017 대한수의학회 추계학술대회	도경효 외 2	2017.10.27	여수	대한민국

4. 생명자원 (생물자원) / 화합물

No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도
1	<i>Escherichia coli</i> KVCC-BA1500105	KCTC18390P	한국생명공학연구원 미생물자원센터	2015
2	<i>Escherichia coli</i> KVCC-BA1500104	KCTC18389P	한국생명공학연구원 미생물자원센터	2015
3	<i>Escherichia coli</i> KEFS 218	KCTC18475P	생물자원센터	2016
4	<i>Escherichia coli</i> KEFS 1057	KCTC18476P	생물자원센터	2016
5	<i>Escherichia coli</i> pET28 MBP F4-F18-LT	KCTC18478P	생물자원센터	2016
6	<i>Escherichia coli</i> pET30 MBP ST-LT-pig IgG	KCTC18479P	생물자원센터	2016

5. 지식재산권 (특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	돼지 설사병 백신용 섬모 및 독소를 대량 생산하는 형질전환 대장균 및 이에 의해 생산되는 섬모 및 독소를 항원으로 포함하는 돼지 설사병 예방용 백신 조성물	대한민국	농림축산식품부 농림축산검역본부장	2016.07.22.	10-2016-0093099				
2	돼지 설사병 백신용 독소를 대량 생산하는 형질전환 대장균 및 이에 의해 생산되는 독소를 항원으로 포함하는 돼지 설사병 예방용 백신 조성물	대한민국	농림축산식품부 농림축산검역본부장	2016.07.22.	10-2016-0093101				
3	부종병 독소를 생산하는 대장균, 이를 이용한 부종병 독소의 생산방법 및 이를 포함하는 돼지 부종병 예방법 백신 조성물	대한민국	농림축산식품부 농림축산검역본부장	2015.06.02.	10-2015-0077810				
4	부종병 독소를 생산하는 대장균, 이를 이용한 부종병 독소의 생산방법 및 이를 포함하는 돼지 부종병 예방용 백신 조성물	대한민국				농림축산식품부 농림축산검역본부장	2017.03.07.	1020150077810	

특허성과(출원된 특허 및 등록된 특허를 모두 기재)

\* 출원: 출원연도, 특허명, 출원인, 출원국, 등록·기탁번호 / 등록: 등록연도, 특허명, 등록인, 등록·기탁번호

6. 전문연구 인력양성

No	분류	기준연도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	석사 인력양성	2016		1				1		1				
2	석사 인력취업	2016		1				1		1				
3	석사 인력취업	2016		1				1		1				
4	석박사 통합	2016		1			1			1				

7. 홍보실적

구분	제목	발간일	잡지명
전문지 게재	돼지 이유자돈 설사/부종병 발생 양상	2015.10.	월간한돈
월간잡지	돼지 부종병의 원인과 대책	2015.2.	월간한돈

8. 사업화 성과 및 매출 실적

가. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	1.19억원	
			향후 3년간 매출	3억원	
		관련제품	개발후 현재까지	억원	
			향후 3년간 매출	억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위

나. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세 부 항 목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		3		
	소요예산(백만원)		200		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			1.19	3	5
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내			
		국외			
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		양돈용 설사예방백신			

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

코드번호 D-06

### 4-1. 목표달성도

#### 가. 목표 평가의 착안점 및 기준

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	
1차 년도	2014	제1세부	1) 국내 이유자돈 설사병 및 부종 병 검색 및 농가지도	50%	- 국내 이유자돈 설사병 및 부종병 발생 원인 분석여부
			2) 돼지에서 동물시험(설사병)	50%	- 돼지 농장에서의 백신 효능 평가
		제1협동	1) 대장균 설사병 표준항원 선발	40%	- 표준 및 야외균주를 이용한 항원 단백질 생산 및 정제 여부
			2) 표준항원 특성분석 3) 최적 배양법 확립 4) 실험동물에서 면역원성 평가	20% 20% 20%	- 유전학적 비교 특성분석 - 생산배지 조성 확립(3종 이상) - 면역원성 평가(마우스 비교시험)
제2협동	1) 대장균성 설사병 백신 대량생산 기술 구축 2) 시험백신 생산	50% 30% 20%	- 항원 생산기법에 따른 생산비 비교 - 항원정제기술 확립 - 시험 백신 제조		
2차 년도	2015	제1세부	1) 국내 부종병 발생상황 검색	30%	- 국내 부종병 발생상황 검색 확인
			2) 돼지에서 동물시험(부종병)	50%	- 돼지 농장에서의 백신 효능 평가
			3) 부종병 항원(STX2e)에 대한 항체 생산	20%	- 부종병항원에 대한 항체생산여부
제1협동	1) 부종병 백신 후보 단백질에 대 한 cloning	40%	- 면역 단백질 유전자 vector 구축 및 cloning 여부		
	2) 표준항원 특성 분석 및 배양법 확립 3) 실험동물에서 면역원성 평가	30% 30%	- 클로닝 후 항원단백질발현 여부 - 실험동물에서 면역원성 평가 (동물시험 및 기존백신비교)		
제2협동	1) 돼지 부종병 백신 생산 확립 2) 대량생산기술 구축 3) 시험백신 생산	50% 30% 20%	- 항원 생산기법에 따른 생산비 비교 - 항원정제기술 확립 - 시험 백신 제조		
3차 년도	2016	제1세부	1) 부종병 신속진단키트 개발	80%	- Mab를 이용한 Chromatography를 이용한 진단키트 확립
			2) 신속진단키트 활용 이유자돈 설 사병 및 부종병 검색	20%	- 키트활용 설사병 및 부종병 검색확인
		제1협동	1) 백신 Adjuvant에 따른 항원별 면역원성 시험	60%	- Adjuvant(3종)별 방어역가 형성 (ELISA 평가)
2) 실험동물에서의 효능평가	40%		- 동물(마우스 및 돼지)안전성 및 냉장에서 안정성 검증(2개월)		
제2협동	부종병 신속진단키트 chromatography 생산기법 확립	30% 30% 40%	- 항원 생산기법에 따른 생산비 비교 - 항원 정제 - 시제품제조		

나. 연도별 연구 목표 및 달성도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도 (%)
1차 년도	2014	제1세부 1) 국내 이유자돈 설사병 및 부종병 검색 및 농가지도 2) 돼지에서 동물시험(설사병)	1) 국내 이유자돈 설사병 및 부종병 발생상황 검색, 병원성 대장균 분리 및 병원성인자 검색. 질병 예방을 위해 농가지도 2) 돼지를 이용한 동물시험(설사병) - 백신효능평가 (기존백신 및 개발백신) - 항체 생성능 조사 (ELISA) - 세포면역 지표 검색 (IL-1, 2, TNF-α)	100
		제1협동 1) 대장균 설사병 표준항원 선발 2) 표준항원 특성분석 3) 최적 배양법 확립 4) 실험동물에서 면역원성 평가	1) 표준 및 야외균주를 이용한 백신 후보주 (K88, LT, STb 및 Stx2e)에 단백질 생산능력 조사 2) 백신후보주 분자생물학적 특성분석 (부착인자 및 독소) 3) 백신 생산 최적배지 조건 확립 4) 실험동물을 이용한 면역원성확인	100
		제2협동 1) 대장균성 설사병 백신 대량생산 기술 구축 2) 시험백신 생산	1) 후보주를 이용한 백신 항원 대량 배양 기술 확립, 대량 배양 및 정제기술 확립 2) 시험백신 제조 - 안전성 및 안정성 시험 (4℃, 상온, 37℃에서 백신보존시험) - 3, 6, 12, 18, 24개월에서 효능시험	100

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용	달성도 (%)
2차 년도	2015	제1세부	1) 국내 부종병 발생상황 검색 2) 돼지에서 동물시험(부종병) 3) 부종병 항원(STX2e)에 대한 항체 생산	1) 국내 부종병 발생상황 검색 2) 돼지를 이용한 동물시험(부종병) - 백신효능평가 (기존백신 및 개발백신) - 항체 생성능 조사 (ELISA) - 세포면역 지표 검색 (IL-1, 2, TNF- $\alpha$ ) 3) 마우스 및 토끼에서 STX2e에 대한 항체생산 (Immunochromatography)	100
		제1협동	1) 부종병 백신 후보 단백질에 대한 cloning 2) 표준항원 특성 분석 및 배양법 확립 3) 실험동물에서 면역원성 평가	1) 백신 항원 단백질 분자생물학적 특성분석 - western blot - 항원정제(chromatography) 2) 유전자클로닝으로 항원 생산 최적화 3) 실험동물에서 면역원성 평가	100
		제2협동	1) 돼지 부종병 백신 생산 확립 2) 대량생산기술 구축 3) 시험백신 생산	1) 후보주를 이용한 백신 항원 대량 배양 기술 및 정제기술 확립 2) 시험백신 생산 3) 안전성 및 안정성 시험 - 4°C, 상온 및 37°C에서 백신보존시험 - 3, 6, 12, 18, 24개월에서 효능시험	100



구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용	달성도 (%)
3차 년도	2016	제1세부	1) 부종병 신속진단키트 개발 2) 신속진단키트 활용 이유자돈 설사병 및 부종병 검색	1) 국내 부종병 신속진단키트 개발 - STX2e 항원정제 - 면역크로마토그래피 strip 개발 - 농장적용 2) 신속진단키트를 사용한 국내 이유자돈 설사병 및 부종병 발생 상황 검색 (계속)	100
		제1협동	1) 백신 Adjuvant에 따른 항원별 면역원성 시험 2) 실험동물에서의 효능평가	1) Adjuvant 별 항원 흡착도 및 항체생성여부 평가 Adjuvant 안정성 및 안전성 평가 보존기간별 potency 검사 2) 실험동물에서 백신 효능 평가	100
		제2협동	1) 부종병 신속진단키트 chromatography 생산기법 확립	1) 대량생산기법 확립 2) 항원정제 3) 시제품 제조 4) 농장적용 및 평가	100

#### 4-2. 관련분야 기여도

- 국내 대장균 예방백신은 현재 포유자돈 설사병을 예방하기 위한 제품 및 자가백신이 판매되고 있음. 그러나 일반 대장균과 병원성 대장균의 구분이 어렵고, 특정항원 (F18 및 Stx2e)의 배지에서 발현이 어렵다는 이유로 자가백신은 설사병 예방 효과가 낮은 편임. 본 과제를 수행하면서 개발한 부종병 독소 대량생산 기법을 활용해 돼지 설사병 예방용 백신 조성물을 개발하였고, 이를 특허 출원 (10-2016-0093099, 10-2016-0093101, 10-2015-0077810)을 진행함.
- 기존 대장균 자가 백신의 경우 F4ab, F4ac, F5, F6 항원만 포함하여 이유자돈 설사증에만 방어 효과를 보임. 하지만 기술이전을 통한 F18 항원 균주의 Stx2e 발현기술을 도입하여 강화된 자가백신을 생산하여 부종병을 예방하는 기능까지 추가된 백신을 개발하였음.
- 자돈의 설사예방을 위하여 기존의 백신은 균체만을 사용한 형태로 제조되고 있으나, 본 연구를 통해 설사병의 주원인 단백질(LT, ST 및 F18)을 cloning하여 대량생산하고 불활화하여 설사병을 예방할 수 있는 백신 제조 가능성을 높였음.

○ 부종병은 양돈장에서 지속적인 문제를 일으키며, 증상이 나타났을 때는 이미 큰 경제적인 피해를 입은 상태이기 때문에 부종병을 신속진단할 수 있는 수단이 필요함. 기존 논문은 주로 부종병을 ELISA로 분석하여 진단하는 것이나 본 과제에서 개발한 신속진단키트는 항체를 이용한 chromatography법을 적용하여 현장에서 신속하게 반응함.

## 제 5 장 연구결과의 활용계획 및 기대효과

코드번호	D-07
<p><b>1. 돼지 이유자돈 대장균 설사병 및 부종병 예방 백신 개발</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 국내 돼지 이유자돈 설사병 및 부종병 백신 개발을 통한 농가 생산성 증대</li> <li>· 돼지 이유자돈 설사병, 부종병을 백신 개발을 통한 산업화 및 수출증대</li> </ul> <p><b>2. 돼지 이유자돈 설사병 및 부종병 현황조사 및 백신 효능평가</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 국내 이유자돈 설사병 및 부종병 발생현황 조사</li> <li>· 국내 이유자돈 설사병 및 부종병 시험 백신 효능 평가(실험동물 및 돼지)</li> <li>· 실험동물에서 백신접종 후 면역원성 분석</li> <li>· 돼지 설사병 및 부종병 예방을 통한 양돈농가 질병발생 피해 감소 및 양돈 생산성 향상</li> </ul> <p><b>3. 돼지 대장균설사병 및 부종병 백신 산업화</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 국내 돼지 대장균성 설사병 및 부종병의 백신 생산기술 구축</li> <li>· 시험백신의 현장적용 및 challenge 시험을 통한 백신효능 평가</li> <li>· 대장균 백신 생산 및 수출을 통한 국제 경제력 확보</li> </ul> <p>돼지의 대장균성 설사병 및 부종병으로 인한 농가 폐사 감소 및 사료효율 향상을 통해 FTA 체결에 따른 국내 양돈업의 세계시장 경쟁력 확보 및 안정적 수입원 창출 기여</p>	

## 제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호                      D-08

- 2015년 Italy에서 돼지 설사의 주요 요인 중 하나인 F4를 발현하는 병원성 대장균에 대해 항생제 감수성 검사를 수행함. 이를 통해 대장균성 설사증의 항생제 치료로 인한 대장균의 항생제 내성 증가에 대해 경고함.  
Antimicrobial Resistance of F4+ *Escherichia coli* Isolated from Swine in Italy (Luppi A. et al. 2015)
- 또, 2015년 중국에서 이유자돈 설사증에서 분리한 병원성에 대해 광범위 β-lactamase 유전자의 특징과 Prevalence에 대해 조사하였으며, 이를 통해 병원성 대장균의 항생제 내성이 크게 증가하고 있는 것을 밝힘.  
Prevalence and characteristics of extended-spectrum β-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from piglets with post-weaning diarrhea in Heilongjiang province, China (Xu et al. 2015)
- 돼지 대장균 설사병에 사용하는 백신의 경우 모돈에 접종하여 초유를 통한 자돈 면역을 유도하는 백신과 자돈에 접종하여 능동면역을 유도하는 백신이 판매되고 있는 것으로 파악됨. 이들의 백신 항원은 균체 백신보다는 서브유닛 백신이나 유전적으로 변형된 백신을 사용하고 있음 (Table 5).

Table 5. 국외 대장균 백신 허가 현황 (Trend in Biotechnology, 2012&2013 pig progress)

백신 타입		제품명	제조사	항원	출처
설사병	Subunit	포실리스 포콜리	인터벳	recombinant K88ab, K88ac, K99, 987P LT toxoid	1996(EU,EMA)
	Live (genetically modified)	Neocolipor	메리알	2개 균주 (F6, F41+F4, F5)	1998(EU, EMA)
부종병		None	IDT Biologika	Subunit of STX2e	2013 (pig progress)

- 돼지의 이유자돈 설사증 및 부종병 감수성에는 Fimbriae 중 F4와 F18의 Receptor의 유무가 중요하다고 알려져 있음. 2017년 벨기에에서 Flemish pig breeds 중 F4, F18의 Receptor의 출현률 및 발생패턴, 그리고 F4, F18 발현 대장균의 설사유발능을 평가함.  
High susceptibility prevalence for F4+ and F18+ *Escherichia coli* in Flemish pigs (Nguyen U. et al. 2017)
- 이유자돈 설사증 및 부종병의 발병에 중요한 요소에는 병원체의 Fimbriae가 있으며, 이중 자돈에서 가장 흔히 나타나는 Fimbriae는 F4와 F18인데, 2017년 캐나다에서 이 중요 발병인

자를 발현하는 F4, F18-ETEC에 대한 구강 투여 생백신의 개발 및 효능평가가 이루어짐.

Efficacy of a single oral dose of a live bivalent *E. coli* vaccine against post-weaning diarrhea due to F4 and F18-positive enterotoxigenic *E. coli*. (Nadeau E. et al. 2017)

- 병원성 대장균의 설사 유발 기전은 장독소의 생성에 있으며, 이러한 장독소 중 유명한 것으로는 LT와 ST toxin이 있음. 2017년 미국에서는 이러한 장독소에 대한 생균백신을 제작하기 위해 대장균에서 antigenic LT-ST fusion을 발현시키는 연구를 진행함.

Development of live attenuated bacterial vaccines targeting *Escherichia coli* heat-labile and heat-stable enterotoxins. (Zhu C. et al. 2017)

- 2016년 아르헨티나에서는 돼지의 설사병을 예방하기 위한 새로운 방법으로 실험적으로 ETEC를 접종하여 설사를 유발한 돼지에 hydrogel-carbon nanotube를 이용해 면역 글로블린 Y를 접종함으로써 설사예방능을 평가하였다.

IgY against enterotoxigenic *Escherichia coli* administered by hydrogel-carbon nanotubes composites to prevent neonatal diarrhoea in experimentally challenged piglets. (Alustiza F. et al. 2016)

- 부종병은 증상이 나타나고 난 뒤에는 치료가 큰 의미를 갖지 않기에 신속한 검출이 중요하나 신속하고 현장에서 사용가능한 키트는 아직까지 개발되어 있지 않음. 2016년 일본에서 이를 위해 Stx2e 생성 대장균을 immunochromatographic test로 신속검출하기 위한 진단기법을 개발함.

Development of a simple and rapid diagnosis method for swine edema disease to specifically detect Stx2e protein by immunochromatographic test. (Arimitsu H., et al. 2016)

## 제 7 장 연구개발성과의 보안등급

	코드번호	D-09
○		

## 제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황

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

## 제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호

D-11

### 제 1 절. 연구실 안전점검 및 정밀안전진단실시

#### 1. 일일 안전점검표 작성

- 일반안전: 연구실 정리정돈 및 청결상태, 연구실내 흡연, 안전수칙, 안전표지, 개인보호구, 구급약품 등 관리 상태 점검이행
- 전기안전: 미사용 전기기구의 전원투입 상태 확인 및 무분별한 문어발식 콘센트 사용 여부, 접지형 콘센트 사용, 전기 배선의 절연 피복 손상 및 배선 정리 상태, 기구의 외함접지 또는 정전기 장애방지를 위한 접지 실사 상태, 전기 분전반 주변 이물질 적재 금지 상태 여부 점검이행
- 화공안전: MSDS 비치, 화학물질 성상별 분류 및 시약장 등 안전한 장소에 보관 상태, 화학물질의 보관함에 경고표시 부착 여부, 실험폐액 및 폐기물 관리상태, 발암물질 및 독성물질 등 유해화학물질의 격리보관 및 시건장치 사용여부 점검이행
- 소방안전: 소화기 표지, 적정소화기 비치 및 정기적인 소화기 점검상태, 비상구 및 피난통로 확보 및 통로상 장애물 적재 여부, 소화전, 소화기 주변 이물질 적재 금지 상태 여부 점검이행
- 가스안전: 가스 용기의 전도 방지 및 환기 상태, 가스용기 외관의 부식, 변형, 노즐잠금 상태 및 가스용기 충전기한 초과 여부 점검이행
- 생물안전: 미생물 취급 및 보관하는 장소에 생물재해 표시 부착여부, 실험실 구역 관계자 외 출입금지 구분 및 손소독기 등 세척시설 설치 여부, 주사기, 핀셋 등 미생물 취급기구 별도 폐기 및 폐기용기 덮개설치 상태 점검이행

#### 2.정밀안전진단 실시

- 연구실 전반의 위험성에 대해 유자격자가 1년에 1회 이상 정기안전점검 실시 점검이행

#### 3. 건강검진 실시

- 매년 1회 참여연구원 전체 인원에 대하여 정기 건강검진 실시 점검이행

### 제 2 절. 참여연구원의 교육훈련

#### ○ 정기적인 안전교육 실시

- 안전보호구착용, 안전수칙 준수, 폐기물관리 철저 점검이행
- 정기교육: 학기별 1회 사이버안전교육 실시 이행  
연 1회 연구활동종사자 안전교육·훈련 실시 이행  
신규채용 연구활동종사자 대상 8시간 이상 교육 이행

### 제 3 절. 연구실안전 확보 계획

- 안전관리규정에 따른 연구실 안전확보 실시 및 보험 가입 이행

## 제 10 장 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	특허	돼지 설사병 백신용 섬모 및 독소를 대량 생산하는 형질전환 대장균 및 이에 의해 생산되는 섬모 및 독소를 항원으로 포함하는 돼지 설사병 예방용 백신 조성물	농림축산 검역본부 ,충북대 학교,중 양백신		대한민국		2016.07.22		출원
2	특허	돼지 설사병 백신용 독소를 대량 생산하는 형질전환 대장균 및 이에 의해 생산되는 독소를 항원으로 포함하는 돼지 설사병 예방용 백신 조성물	농림축산 검역본부 ,충북대 학교,중 양백신		대한민국		2016.07.22		출원
3	특허	부종병 독소를 생산하는 대장균, 이를 이용한 부종병 독소의 생산방법 및 이를 포함하는 돼지 부종병 예방법 백신 조성물	농림축산 검역본부 ,충북대 학교,중 양백신		대한민국		2015.06.02		출원
4	특허	부종병 독소를 생산하는 대장균, 이를 이용한 부종병 독소의 생산방법 및 이를 포함하는 돼지 부종병 예방용 백신 조성물	농림축산 검역본부 ,충북대 학교,중 양백신		대한민국		2017.03.07		등록
5	논문	Antimicrobial resistance of Stx2e positive <i>Escherichia coli</i> before and after ban on antibiotic growth promoters	충북대학 교, 농림축산 검역본부	제1저자, 교신저자	대한민국	0.03	2017.10.12		비SCI

## 제 11 장 기타



## 제 12 장 참고문헌

	코드번호	D-14
1. Alustiza F., Bellingeri R., Picco N., Motta C., Grosso M.C., Barbero C.A., Diego F.A., Vivas A. (2016). IgY against enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> administered by hydrogel-carbon nanotubes composites to prevent neonatal diarrhoea in experimentally challenged piglets. <i>Vaccine</i> , 34(28), 3291-3297.		
2. Arimitsu H., Sasaki K., Tsuji T. (2016). Development of a simple and rapid diagnosis method for swine edema disease to specifically detect Stx2e protein by immunochromatographic test. <i>Microbiology and immunology</i> , 60(5), 334-342.		
3. Baranzoni G.M., Fratamico P.M., Gangiredla J., Patel I., Bagi L.K., Delannoy S., Fach P., Boccia F., Anastasio A., Pepe T. (2016). Characterization of Shiga toxin subtypes and virulence genes in porcine Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> . <i>Frontiers in microbiology</i> , 7, 10.		
4. Bourgeois A.L., Wierzba T.F., Walker R.I. (2016). Status of vaccine research and development for enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> . <i>Vaccine</i> , 34(26), 2880-2886.		
5. Buzby J.C., Roberts T. (2009). The economics of enteric infections: human foodborne disease costs. <i>Gastroenterology</i> , 136(6), 1851-1862.		
6. Curcio L., Luppi A., Bonilauri P., Gherpelli Y., Pezzotti G., Pesciaroli M., Magistrali C.F. (2017). Detection of the colistin resistance gene mcr-1 in pathogenic <i>Escherichia coli</i> from pigs affected by post-weaning diarrhoea in Italy. <i>Journal of Global Antimicrobial Resistance</i> 10, 80 - 83.		
7. de la Torre E., Colello R., Fernández D., Etcheverría A., Conza J. Di Gutkind G.O., Tapia M.O., Dieguez S.N., Soraci A.L., Padola N.L. (2015). Multidrug resistance in <i>Escherichia coli</i> carrying integrons isolated from a pig farm with moderate antibiotic use. <i>The Journal of General and Applied Microbiology</i> 61, 270 - 273.		
8. Fairbrother J.M., Gyles C.L., Colibacillosis. In: Straw B.E., Zimmerman J.J., D’Allaire S., Taylor D.J. (eds.). Diseases of Swine. 10th ed. USA: A John Wiley Sons Inc.; 2012. p.723-749.		
9. Fairbrother J.M., Nadeau É., Gyles C.L. (2005). <i>Escherichia coli</i> in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. <i>Animal Health Research Reviews</i> , 6(1), 17-39.		
10. Fairbrother J.M., Nadeau É., Bélanger L., Tremblay C.L., Tremblay D., Brunelle M., Wolf R., Hellmann K., Hidalgo, Á. (2017). Immunogenicity and protective efficacy of a single-dose live non-pathogenic <i>Escherichia coli</i> oral vaccine against F4-positive enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> challenge in pigs. <i>Vaccine</i> , 35(2), 353 - 360.		
11. Holmgren J., Lebens M. (2016). U.S. Patent No. 9,511,133. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.		
12. Kusumoto M., Hikoda Y., Fujii Y., Murata M., Miyoshi H., Ogura Y., Gotoh Y., Iwata T., Hayashi T., Akiba M. (2016). Emergence of a Multidrug-Resistant Shiga		

Toxin-Producing Enterotoxigenic *Escherichia coli* Lineage in Diseased Swine in Japan. *Journal of clinical microbiology* 54, 1074 - 1081.

13. Luppi A., Bonilauri P., Dottori M., GherPELLI Y., Biasi G., Merialdi G., Maioli G., Martelli P. (2015). Antimicrobial Resistance of F4+ *Escherichia coli* Isolated from Swine in Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(1), 67 - 71.
14. Luppi A., Gibellini M., Gin T., Vangroenweghe F., Vandebroucke V., Bauerfeind R., Bonilauri P., Hidalgo, A. (2016). Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. *Porcine Health Management*, 2(1), 20.
15. Nadeau É., Fairbrother J.M., Zentek J., Bélanger L., Tremblay D., Tremblay C.L., Rohe I., Vahjen W., Brunelle M., Hellmann K., Cvejić D., Brunner B., Schneider C., Bauder K., Wolf R., Hidalgo A. (2017). Efficacy of a single oral dose of a live bivalent *E. coli* vaccine against post-weaning diarrhea due to F4 and F18-positive enterotoxigenic *E. coli*. *The Veterinary Journal*, 226, 32-39.
16. Nguyen U.V., Coddens A., Melkebeek V., Devriendt B., Goetstouwers T., Van Poucke M., Peelman L., Cox, E. (2017). High susceptibility prevalence for F4+ and F18+ *Escherichia coli* in Flemish pigs. *Veterinary microbiology*, 202, 52-57.
17. Pereira D.A., Vidotto M.C., Nascimento K.A., Santos A.C.R.D., Mechler M.L., Oliveira L.G.D. (2016). Virulence factors of *Escherichia coli* in relation to the importance of vaccination in pigs. *Ciência Rural*, 46(8), 1430-1437.
18. Sato J.P.H., Takeuti K.L., Andrade M.R., Koerich P.K.V, Tagliari V., Bernardi M.L., Cardoso M.R.I., Barcellos D.E.S.N., Ha A.S.J.P., Takeuti K.L., Andrade M.R., Koerich P.K.V, Tagliari V., Bernardi M.L. (2016). Virulence profiles of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from piglets with post-weaning diarrhea and classification according to fecal consistency 1. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 36, 253 - 257.
19. Seo B., Jeong C., Kang A., Cho H., Kim W. (2016). Evaluation of the virulence genes and Shiga toxin-producing abilities of *Escherichia coli* field isolates causing edema disease in pigs. *Korean Journal of Veterinary Service* 39, 87 - 92.
20. Xu G., An W., Wang H., Zhang, X. (2015). Prevalence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from piglets with post-weaning diarrhea in Heilongjiang province, China. *Frontiers in Microbiology* 6, 1 - 9.
21. Zhu C., Setty P., Boedeker E.C. (2017). Development of live attenuated bacterial vaccines targeting *Escherichia coli* heat-labile and heat-stable enterotoxins. *Veterinary Microbiology*, 202, 72-78.

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 돼지 대장균성 이유자돈 설사증 및 부종병 백신 개발				
	(영문) Development of vaccines for postweaning diarrhea and edema disease in pigs				
주관연구기관	충북대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 충북대학교	
참 여 기 업	(주) 중앙백신연구소			(성명) 이 완 규	
총연구개발비  (736,500 천원)	계	736,500 천원	총 연 구 기 간	2014. 9. 25 ~ 2017. 9. 24 (36개월)	
	정부출연 연구개발비	540,000 천원	총 참 연 구 원 수	총 인 원	66 명
	기업부담금	187,500 천원		내부인원	63 명
	연구기관부담금			외부인원	3 명
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 국내 돼지 설사병 중 가장 경제적 피해가 심한 이유자돈 설사병(postweaning diarrhea) 및 부종병(edema disease)에 대한 예방백신 개발을 완료하였음.</li> <li>2. 돼지 대장균 이유자돈 설사병 및 부종병 예방백신 효능평가를 위한 농장시험을 완료하였음.</li> <li>3. 돼지 대장균설사병 및 부종병 백신 산업화를 달성하였음.</li> </ol> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 본 과제를 수행하면서 개발한 부종병 독소 대량생산 기법을 활용해 돼지 설사병 예방용 백신 조성물을 개발하였으며, 이 내용을 바탕으로 특허 출원 3건(10-2016-0093099, 10-2016-0093101, 10-2015-0077810)과 특허등록(1020150077810) 1건을 달성하였음. 또한 이 특허출원은 (주)중앙백신연구소에 3건의 유상기술로 이전 실시가 완료되었음.</li> <li>2. 참여기업인 (주)중앙백신연구소에서는 부종병 대장균 공정 개선방법을 통하여 대량의 Stx2e를 발현시켰으며 이 독소를 포함한 대장균 자가백신을 개발, 2017년 1월 2일 제품을 출시하였으며 금년도 119,600천원의 매출액과 1명의 고용인원을 달성하였음.</li> <li>3. 참여기업인 (주)중앙백신연구소에서는 <i>E. coli</i> KVCC-BA1500104 (KCTC18389P)균주를 확보하여 부종병 대장균 배양기술 및 Stx2e 발현 기술을 확보하였으며, 2016년 11월 9일 농림축산 검역본부에 동물용의약품 임상시험 계획승인을 완료하고, 2017년 6월 8일 허가서류를 제출하고 현재 품목허가를 대기 중에 있음.</li> </ol> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <p>특허출원 3건, 등록 1건, 기술실시 3건, 기술료 3건, 제품화 3건, 매출액달성 1건, 고용창출 1건, 논문 1건, 학술발표 12건, 교육지도 5건, 인력양성 4건 홍보전시 3건, 기타 6건의 연구성과를 달성하였으며, 향후 지식재산권 등록 2건 제품화 1건, 논문 7건의 추가 달성을 계획하고 있음.</p>					

# 자체평가의견서

## 1. 과제현황

				코드번호	D-15
			과제번호	114058-3	
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야	가축질병연구			과제구분	단위
사업명	농식품기술개발사업				주관
총괄과제				총괄책임자	
과제명	돼지 대장균성 이유자돈 설사증 및 부종 병 백신 개발			과제유형	응용
연구기관	주관) 충북대학교 산학협력단 제1협동) 농림축산검역본부 제2협동) 중앙백신연구소			연구책임자	이완규
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2014.9.25. ~ 2015.9.24	180,000	62,500	242,500
	2차년도	2015.9.25. ~ 2016.9.24	180,000	62,500	242,500
	3차년도	2016.9.25. ~ 2017.9.24	180,000	62,500	242,500
	4차년도				
	5차년도				
	계				
참여기업	(주)중앙백신연구소				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2017. 11.

3. 평가자(연구책임자) : 이완규

소속	직위	성명
충북대학교	교수	이완규

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	이완규
----	-----

# I. 연구개발실적

## 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

### ■ 등급 : 아주우수

본 과제를 수행하면서 개발한 부종병 독소 대량생산 기법을 활용해 돼지 설사병 예방용 백신 조성물을 개발하였으며, 이 내용을 바탕으로 특허 출원 3건(10-2016-0093099, 10-2016-0093101, 10-2015-0077810)과 특허등록(1020150077810) 1건을 달성하였음. 또한 이 특허출원은 (주)중앙백신연구소에 3건의 유상기술로 이전 실시가 완료되었음.

참여기업인 (주)중앙백신연구소에서는 부종병 대장균 공정 개선방법을 통하여 대량의 Stx2e를 발현시켰으며 이 독소를 포함한 대장균 자가백신을 개발, 2017년 1월 2일 제품을 출시하였으며 금년도 119,600천원의 매출액과 1명의 고용인원을 달성하였음.

참여기업인 (주)중앙백신연구소에서는 *E. coli* KVCC-BA1500104 (KCTC18389P)균주를 확보하여 부종병 대장균 배양기술 및 Stx2e 발현 기술을 확보하였으며, 2016년 11월 9일 농림축산 검역본부에 동물용의약품 임상시험 계획승인을 완료하고, 2017년 6월 8일 허가서류를 제출하고 현재 품목허가를 대기 중에 있음.

## 2. 연구개발결과의 파급효과

### ■ 등급 : 아주우수

국내 이유자돈 설사병 및 부종병 발생현황 조사 결과를 바탕으로 국내 돼지 대장균성 설사병 및 부종병의 백신 생산기술 구축을 완료하였으며, 시험백신의 현장적용 및 challenge 시험을 통한 백신효능 평가를 완료 제품화에 성공하였다. 따라서 이와 같은 연구개발결과는 향후 국내 돼지 이유자돈 설사병 및 부종병 백신 개발을 통한 농가 생산성 증대는 물론이고 돼지 설사병 및 부종병 예방을 통한 양돈농가 질병발생 피해 감소 및 양돈 생산성 향상으로 파급되어 큰 경제적 이득을 갖고 올 것으로 판단됨.

## 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

### ■ 등급 : 아주우수

돼지 이유자돈 설사병과 부종병 백신 개발을 통하여 국내 양돈 산업에 중요한 동물용의약품 산업화에 기여할 것으로 판단된다. 또한 국내는 물론이고 향후 동남아시아를 포함한 수출증대로 이어져 대장균 백신 생산 및 수출을 통한 국제 경제력 확보가 가능할 것으로 판단됨. 따라서 본 연구개발 결과는 돼지의 대장균성 설사병 및 부종병으로 인한 농가 폐사 감소 및 사료효율 향상을 통해 FTA 체결에 따른 국내 양돈업의 세계시장 경쟁력 확보 및 안정적 수입원 창출 기여할 것으로 판단됨.

## 4. 연구개발 수행노력의 성실도

### ■ 등급 : 아주우수

본 연구에서는 성공적인 연구 수행을 위해 충북대학교 수의과대학, 농림축산검역본부, (주) 중앙백신연구소가 정기적인 연구협의회와 모임을 통하여 결과를 공유하였으며, 산, 학, 관의 효율적인 협력체계를 성실히 공유함으로써 연구개발 소요시간이 대폭 단축되었으며 효과적인 산업화에 성공하였다고 자부하고 있음. 따라서 그 결과 다수의 특허출원과 등록, 기술이전, 성공적인 산업화 등이 가능하였다고 생각되며, 연구개발 수행노력의 성실도 또한 매우 만족하고 있다고 판단됨.

5. 공개 발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

특허출원 3건, 등록 1건, 기술실시 3건, 기술료 3건, 제품화 3건, 매출액달성 1건, 고용창출 1건, 논문 1건, 학술발표 12건, 교육지도 5건, 인력양성 4건 홍보전시 3건, 기타 6건의 연구성과를 달성하였으며, 향후 지식재산권 등록 2건 제품화 1건, 논문 7건의 추가 달성을 계획하고 있음.

대부분의 연구개발성과는 성과목표 대비 달성 또는 초과달성하였지만, SCI 논문 3편과 비SCI 논문 5편의 달성도가 떨어지는 이유는 특허출원을 위한 논문선행투고가 문제가 되었기 때문이었던 이유와, 3차년도에 백신개발결과를 바탕으로 좀 더 좋은 외국의 SCI논문 투고를 목표로 하고 있기 때문에 종료 시점까지 달성하지 못하였지만 현재 투고 중에 있기 때문에 내년도에는 모두 달성될 것으로 예상됨.

## II. 연구목표 달성도

### <제 1세부과제>

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1) 국내 이유자돈 설사병 및 부종병 검색 및 농가지도 2) 돼지에서 동물시험(설사병)	30	100	- 국내 이유자돈 설사병 및 부종병 발생 원인 분석을 완료함 - 돼지 농장에서의 백신효능 평가완료
1) 국내 부종병 발생상황 검색 2) 돼지에서 동물시험(부종병) 3) 부종병 항원(STX2e)에 대한 항체 생산	50	100	- 국내 부종병 발생상황 검색 완료 - 돼지농장에서의 백신 효능 평가완료 - 부종병 항원에 대한 항체생산완료
1) 부종병 신속진단키트 개발 2) 신속진단키트 활용 이유자돈 설사병 및 부종병 검색	20	100	- Mab를 이용한 Chromatography를 이용한 진단키트 개발 완료 - 키트활용 설사병 및 부종병 검색 완료
합계	100점	100	

### <제 1협동과제>

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1) 대장균 설사병 표준항원 선발 2) 표준항원 특성분석 3) 최적 배양법 확립 4) 실험동물에서 면역원성 평가	40	100	- 표준 및 야외균주를 이용한 항원 단백질 생산 및 정제 완료 - 유전학적 비교 특성분석 완료 - 생산배지 조성 확립 수행 완료 - 마우스 비교시험을 통한 면역원성 평가 완료
1) 부종병 백신 후보 단백질에 대한 cloning 2) 표준항원 특성 분석 및 배양법 확립 3) 실험동물에서 면역원성 평가	30	100	- 면역 단백질 유전자 vector 구축 및 cloning 완료 - 클로닝 후 항원단백질발현 확인 - 실험동물에서 면역원성 평가 완료
1) 백신 Adjuvant에 따른 항원별 면역 원성 시험 2) 실험동물에서의 효능평가	30	100	- Adjuvant(3종)별 방어역가 형성 (ELISA 평가) 완료 - 동물(마우스 및 돼지) 안전성 및 냉 장에서 안정성 검증(24개월) 완료
합계	100점	100	

<제 2협동과제>

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1) 대장균성 설사병 백신 대량생산기술 구축 2) 시험백신 생산	50	100	- 항원생산기법에 따른 생산비 비교완료 - 항원정제기술 확립 완료 - 시험 백신 제조 완료
1) 돼지 부종병 백신 생산 확립 2) 대량생산기술 구축 3) 시험백신 생산	30	100	- 돼지 부종병 백신 생산 확립 완료 - 대량생산기술 구축 완료 - 시험백신 생산 완료
부종병 신속진단키트 chromatography 생산기법 확립	20	100	- 부종병 신속 진단 키트 chromato- graphy 생산기법 확립 완료
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 과제를 통한 연구개발 결과로는 부종병 독소 대량생산 기법을 활용해 돼지 설사병 예방용 백신 조성물을 개발하였으며, 이 내용을 바탕으로 특허 출원 3건 (10-2016-0093099, 10-2016-0093101, 10-2015-0077810)과 특허등록 (1020150077810) 1건을 달성하였으며, (주)중앙백신연구소에 3건의 유상기술로 이전 실시가 완료되었다. 또한 참여기업인 (주)중앙백신연구소에서는 부종병 대장균 공정 개선방법을 통하여 대량의 Stx2e를 발현시켰으며 이 독소를 포함한 대장균 자가백신을 개발, 2017년 1월 2일 제품을 출시하였으며 금년도 119,600천원의 매출액과 1명의 고용인원을 달성하였다. 그리고 현재 *E. coli* KVCC-BA1500104 (KCTC18389P)균주를 확보하여 부종병 대장균 배양기술 및 Stx2e 발현 기술을 확보하였으며, 2016년 11월 9일 농림축산 검역본부에 동물용의약품 임상시험 계획승인을 완료하고, 2017년 6월 8일 허가서류를 제출하고 현재 품목허가를 대기 중에 있다. 따라서 충북대학교 수의과대학, 농림축산검역본부, (주) 중앙백신 연구소 3개 기관은 본 연구개발결과에 대하여 매우 만족하고 있으며, 향후 본격적인 산업화를 위하여 상호 협력체계를 구축하고 있음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구과정을 통하여 특허출원 3건, 등록 1건, 기술실시 3건, 기술료 3건, 제품화 3건, 매출액달성 1건, 고용창출 1건, 논문 1건, 학술발표 12건, 교육지도 5건, 인력양성 4건 홍보전시 3건, 기타 6건의 연구성과를 달성하였으며, 향후 지식재산권 등록 2건 제품화 1건, 논문 7건의 추가 달성을 계획하고 있다. 그러나 계획하였던 논문 달성은 특허출원의 장벽과 외국투고과정의 시간소요 등을 감안하여 평가 시 고려해 주기를 바라고 있음.



### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

돼지 이유자돈 설사병과 부종병 백신 개발을 통하여 국내 양돈 산업에 중요한 동물약품 산업화에 기여할 것으로 판단된다. 또한 국내는 물론이고 향후 동남아시아를 포함한 수출증대로 이어져 대장균 백신 생산 및 수출을 통한 국제 경제력 확보가 가능할 것으로 판단됨. 따라서 본 연구개발 결과는 돼지의 대장균성 설사병 및 부종병으로 인한 농가 폐사 감소 및 사료효율 향상을 통해 FTA 체결에 따른 국내 양돈업의 세계시장 경쟁력 확보 및 안정적 수입원 창출 기여할 것으로 판단됨.

#### IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

보완성 필요 없음.

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

# 연구성과 활용계획서

## 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	돼지 대장균성 이유자돈 설사증 및 부종병 백신 개발			
주관연구기관	충북대학교 산학협력단	주관연구책임자	이 완 규	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	540,000	187,500		727,500
연구개발기간	2014.9.25. ~ 2017.9.24. (36개월)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(                      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:                      )			

## 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
1) 국내 이유자돈 설사병 및 부종병 검색 및 농가지도 2) 돼지에서 동물시험(설사병)	- 국내 이유자돈 설사병 및 부종병 발생 원인 분석을 완료함 - 돼지 농장에서의 백신효능 평가완료
1) 국내 부종병 발생상황 검색 2) 돼지에서 동물시험(부종병) 3) 부종병 항원(STX2e)에 대한 항체 생산	- 국내 부종병 발생상황 검색 완료 - 돼지농장에서의 백신 효능 평가완료 - 부종병항원에 대한 항체생산완료
1) 부종병 신속진단키트 개발 2) 신속진단키트 활용 이유자돈 설 사병 및 부종병 검색	- Mab를 이용한 Chromatography를 이용한 진단키트 개발 완료 - 키트활용 설사병 및 부종병 검색 완료
1) 대장균 설사병 표준항원 선발 2) 표준항원 특성분석 3) 최적 배양법 확립 4) 실험동물에서 면역원성 평가	- 표준 및 야외균주를 이용한 항원 단백질 생산 및 정제 완료 - 유전학적 비교 특성분석 완료 - 생산배지 조성 확립 수행 완료 - 마우스 비교시험을 통한 면역원성 평가 완료
1) 부종병 백신 후보 단백질에 대한 cloning 2) 표준항원 특성 분석 및 배양법 확립 3) 실험동물에서 면역원성 평가	- 면역 단백질 유전자 vector 구축 및 cloning 완료 - 클로닝 후 항원단백질발현 확인 - 실험동물에서 면역원성 평가 완료

1) 백신 Adjuvant에 따른 항원별 면역원성 시험	- Adjuvant (3종)별 방어역가 형성(ELISA 평가) 완료
2) 실험동물에서의 효능평가	- 동물(마우스 및 돼지) 안전성 및 냉장에서 안정성 검증(24개월) 완료
1) 대장균성 설사병 백신 대량생산 기술 구축	- 항원생산기법에 따른 생산비 비교완료
2) 시험백신 생산	- 항원정제기술 확립 완료
1) 돼지 부종병 백신 생산 확립	- 시험 백신 제조 완료
2) 대량생산기술 구축	- 돼지 부종병 백신 생산 확립 완료
3) 시험백신 생산	- 대량생산기술 구축 완료
부종병 신속진단키트 chromatography 생산기법 확립	- 시험백신 생산 완료
	- 부종병 신속 진단 키트 chromatography 생산기법 확립 완료

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표	정책 활용			홍보 전시		
												SC I	비 SC I						논문 평균 IF	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	3	3		2		3					3	5		9	3	3		2	1	
연구기간내 달성실적	3	1		3		3					0	1		12	5	4		3	6	
달성율(%)	100	33		150		100					0	20		133	166	133		150	600	

### 4. 핵심기술

구분	핵심 기술 명
①	돼지 설사병 백신용 섬모 및 독소를 대량 생산하는 형질전환 대장균 및 이에 의해 생산되는 섬모 및 독소를 항원으로 포함하는 돼지 설사병 예방용 백신 조성물
②	돼지 설사병 백신용 독소를 대량 생산하는 형질전환 대장균 및 이에 의해 생산되는 독소를 항원으로 포함하는 돼지 설사병 예방용 백신 조성물
③	부종병 독소를 생산하는 대장균, 이를 이용한 부종병 독소의 생산방법 및 이를 포함하는 돼지 부종병 예방법 백신 조성물

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)						
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복	외국기술 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해	결	정책 자료	기타
①의 기술		v					v	v				
②의 기술		v					v	v				
③의 기술		v					v	v				

\* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	국내 돼지 이유자돈 설사병 및 부종병 백신 개발을 통한 농가 생산성 증대
②의 기술	돼지 이유자돈 설사병, 부종병을 백신 개발을 통한 산업화 및 수출 증대
③의 기술	부종병을 백신 개발을 통한 산업화

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실 시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과			교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I							논 문 평 균 IF
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치																				
최종목표	3	3		2		3						3	5		9	3	3		2	1
연구기간 내 달성실적	3	1		3		3						0	1		12	5	4		3	6
연구종료 후 성과창출 계획	0	2		0		0						3	4		0	0	0		0	0



### 주 의

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