

115082-  
2

보안 과제( ), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개( ), 발간등록번호(O)

발 간 등 록 번 호

11-1543000-002251-01

미생물 유래 물질을 활용한 가금 면역증강제 개발  
최종보고서

미생물 유래 물질을 활용한  
가금 면역증강제 개발  
최종보고서

2018.03.30.

주관연구기관 / 서울대학교

농림축산식품부

농 립 축 산 식 품 부

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “미생물 유래 물질을 활용한 가금 면역증강제 개발” (개발기간 : 2015.12.18. ~ 2017.12.17.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018.03.30.



주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단

협동연구기관명 :

참여기관명 :

(인)

(인)

(인)

주관연구책임자 : 윤 철 희

협동연구책임자 :

참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호	115082-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2015.12.18.~ 2017.12.17.	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	미생물 유래 물질을 활용한 가금 면역증강제 개발			
연구책임자	윤 철 희	해당단계 참 여 연구원 수	총: 15 명 내부: 15 명 외부: 명	해당단계 연 구 개 발 비	정부: 200,000천원 민간: 천원 계: 200,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 15 명 내부: 15명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 200,000천원 민간: 천원 계: 200,000 천 원
연구기관명 및 소속부서명	서울대학교			참여기업명	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
본 연구는 기 확보한 미생물 유래 물질을 백신 어쥬번트로 활용하여 조류 인플루엔자 백신의 효능을 증진시키고 이에 대한 기전을 규명하는, 가금면역증강기술개발연구를 수행함. 본 연구를 통해 미생물 유래 물질 불활성화 인플루엔자와 함께 투여할 시 H9N2 특이적 항체 생성이 증가하고 특이적 T세포 반응이 증가하고 주요 면역조절 기능에 관여하는 사이토카인과 핵심 면역세포를 규명함. 또한 기존 백신을 이용해 효능 검증 시, 미생물 유래 물질에 의해 방어 면역이 증가하는 것을 확인할 수 있어, 미생물 유래 물질의 백신 어쥬번트로서의 면역증강 효과를 기대할 수 있음. 추가적으로 기술이전 및 필드테스트를 통해 산업화 및 실질적인 개발에 기여할 수 있을 것으로 기대됨.				보고서 면수 26	

#### 4. 국문 요약문

		코드번호		D-01	
연구의 목적 및 내용	<p>국내에서는 조류뿐만 아니라 가축 전반에 대한 기초 면역학 및 면역증진 연구가 미비한 실정임. 지금까지의 많은 연구가 단순한 효능연구이었던 것을 감안하면 면역증진 연구를 통해 초기에 조류 인플루엔자와 같은 전염병의 확산을 예방할 수 있는 백신 및 항원보조제의 개발은 필수적이라 할 수 있음. 따라서 본 연구에서는 기 확보된 바이오 유래 물질을 만들고 실제적으로 투여하여 가금에서의 조류 인플루엔자 백신 효능 증진을 규명하고, 결과적으로 가금 특이적 면역증강 기술을 개발하고자 하였음.</p>				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 가금에서의 미생물 유래 물질에 대한 안전성 검토</li> <li>- 미생물 유래 물질에 의한 가금 면역세포의 사이토카인 발현 조절 확인</li> <li>- 가금 추출 면역세포의 인플루엔자 특이적 가금 T세포 증식 유도 확인</li> <li>- 투여 방법에 따른 H9N2 특이적 방어 면역활성 최적화</li> <li>- 기존 백신과의 비교를 통한 미생물 유래 물질 활용 백신 효능 검증</li> <li>- 특허 등록 1건</li> <li>- SCI(E)논문 출판 4건</li> <li>- 학술(국제/국내) 발표(포스터 및 구두) 11건</li> <li>- 인력양성 5건</li> <li>- 목표 대비 100% 성과 달성</li> </ul>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>학술적으로 동물기초면역학 발전에 큰 이바지를 할 것으로 기대 됨. 기존 조류인플루엔자 백신제제들과 혼합하여 효능 개선과 새로운 백신전략을 구상하는데 활용할 수 있으며, 사료첨가제 형태로의 기술개발을 통해 AI 저항성을 높이는 사양 시스템 구축에 활용 가능 함. 조류인플루엔자 뿐 아니라 가금 관련 백신제제와의 효능 연구를 통해 universal adjuvant 연구에 활용할 수 있으며, 추후 응용분야로의 연구계획을 추진 시, 산업화를 위한 전임상시험이 가능할 것으로 판단 됨. 본 연구 결과를 바탕으로 과제 종료 후 필드테스트 및 기업 연계 과제 수행을 통한 상용화 전략 구축을 이뤄낼 수 있을 것으로 판단 됨. 본 기술을 가축 백신개발 산업체에 기술 이전 및/또는 제품화를 모색할 수 있을 것으로 판단 됨.</p>				
중심어 (5개 이내)	조류 인플루엔자	어쥬번트	생물유래물질	방어면역	백신

## 5. 영문 요약문

### < SUMMARY >

		코드번호		D-02	
Purpose& Contents	<p>In Korea, the basic researches on immunomodulation in domestic animals are poorly studied and, thus, are needed. It is essential to prevent the spread of pandemic disease such as avian influenza at early time point. In the present project, we investigated potential adjuvanticity of bio-particles from bacteria and performed the experiment using inactivated H9N2 to examine the mechanism by which vaccine response was enhanced in the avian system.</p>				
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Confirmation on the safety of bioparticle injected into chicken.</li> <li>- The ability of modulating cytokine production from chicken innate and adaptive immune cells.</li> <li>- Ability of bioparticle on H9N2-specific T cell response and H9N2 specific antibody production.</li> <li>- Enhancement of protective immunity by bioparticle.</li> <li>- Comparison with commercial vaccine for the adjuvant efficacy of bioparticle.</li> </ul>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>- To advance technology and knowledge in the area of animal immunology.</li> <li>- To expand the application into the field.</li> <li>- To increase the potency of adjuvant effect.</li> <li>- To reduce the production cost for bioparticle as an adjuvant.</li> <li>- To contribute as a high value-added business.</li> <li>- Through technology transfer, it will allow the company to develop the product for enhancing the avian specific immunity.</li> </ul>				
Keywords	Avian influenza	Adjuvant	Bioparticle	Protective immunity	Vaccine

## 6. 영문목차

1. Research project synopsis
2. Current situation of technique
3. Research content and result
4. Attainment and expected Contribution
5. Application plan
6. Reference

## 7. 본문목차

### < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	10
2. 국내외 기술개발 현황 .....	12
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	15
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	23
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	24
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	24
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	24
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	25
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	25
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	26
11. 기타사항 .....	27
12. 참고문헌 .....	27

## 8. 뒷면지

### 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.

1. 연구개발과제의 개요

코드번호 D-03

□ 연구개발의 필요성

**가금 사육 시 AI에 대한 위험성 및 예방 대책의 필요성**

조류 인플루엔자는 조류 인플루엔자 바이러스에 의해 조류에서 발생하는 급성 바이러스성 전염병으로 매년 닭과 오리농가에 큰 타격을 입히며, 발병건수 및 피해규모가 증가하고 있는 추세임.

**[표 1]** 조류 인플루엔자는 병원성에 따라 고병원성과 저병원성 조류 인플루엔자로 구분되며, 고병원성 조류인플루엔자의 경우 제 1종 가축 전염병으로 발생 시 세계동물보건기구(OIE)에 의무적으로 보고하게 되어있음. 조류 인플루엔자는 전파가 매우 빠르며, 감염 시 조류 산란율의 급격한 감소를 유도하고, 고병원성 조류인플루엔자의 경우에는 100%에 가까운 폐사율을 나타내고 있음. 또한 오리는 조류 인플루엔자에 대한 감수성이 낮았지만, 최근에 발생하고 있는 조류 인플루엔자는 오리에 대한 병원성이 증가하고 있어서 대책이 시급한 실정임. 하지만, 현재 개발되어 사용하고 있는 백신은 저병원성 조류인플루엔자(H9N2)에 대한 백신뿐이며, 고병원성 조류 인플루엔자에 대한 예방 백신은 없는 실정임. 조류 인플루엔자 발생 시 차단 방역을 통한 확산방지에 주력하고 있으며, 이를 위해 발생 농장 및 근방에 있는 모든 조류를 100% 살처분 하고 있음.

따라서 조류 인플루엔자에 대한 예방백신의 개발이 시급한 실정이지만, 수요에 비하여 공급이 부족하며, 생산비용 또한 높기 때문에 백신 개발에 걸림돌이 되고 있음. 또한 조류 인플루엔자는 인간의 인플루엔자와 마찬가지로 매년 유행하는 혈청형이 바뀌기 때문에 어떠한 혈청형이 유행할지 예측하기가 힘들며, 병원체의 변이가 매우 다양하기 때문에 그에 대응하는 맞춤형 백신 개발이 어려운 실정임. 이러한 바이러스의 특징으로 인해 **다양한 혈청형에 대응할 수 있는 새로운 백신 개발 및 적은 백신의 양으로도 백신의 효능을 극대화 시켜줄 수 있는 항원보조제(Adjuvant)의 개발이 절실함.**

효과적인 항원 보조제의 사용은 백신 투여 시 선천성 면역 반응(innate immunity)을 극대화시켜주고, 이를 통해 획득성 면역을 더 빠른 시간에, 더 강력하게 유도할 수 있음. 그러나 백신 자체의 개발에 대한 연구는 많은 데 반해, 항원 보조제에 대한 연구

구분	'03/'04년	'06/'07년	'08년	'10/'11년
발생 시기	겨울철(102일간) [03.12.10~04.3.20]	겨울철(104일간) [06.11.22~07.3.6]	봄철(42일간) [08.4.1~5.12]	겨울철(139일간) [10.12.29~5.16]
발생 지역	10개 시·군 19건 [닭 10, 오리 9]	5개 시·군 7건 [닭4, 오리2, 메추리1]	19개 시·군 33건 [닭25, 오리7, 기타1]	25개 시·군 53건 [닭18, 오리33, 메추리1, 꿩1]
발생 지도				
혈청형	H5N1 (유전형 2.5)	H5N1 (유전형 2.2)	H5N1 (유전형 2.3.2)	H5N1 (유전형 2.3.2)
유입 추정	야생 조류	야생 조류	야생 조류	야생 조류
방역 조치	392농가 5,286천수	460농가 2,800천수	1,500농가 10,204천수	286농가 6,473천수
피해액 (살처분 비용)	1,531억원	582억원	3,070억원	804억원(추정)
청정국 회복일	'04.9.21 (6개월 후)	'07.6.18 (3개월 후)	'08.8.15 (3개월 경과 후)	'11.9.5 (약 3.5개월 후)

**표 1** 고병원성 조류인플루엔자(HPAI) '13년 봄철 전망분석보고 (상주시농업기술센터)

는 그 시작이 늦어 상대적으로 연구가 부족한 상황임. 따라서 항원 보조제 자체에 대한 심도 있는 연구가 필수적이다. 최근 사람 혹은 가축용 백신을 점막 면역계로 전달하려는 연구가 진행되고 있지만, 점막 면역 백신용 항원 보조제는 개발이 거의 되어 있지 않음. 항원 보조제는 한 가지 백신에만 사용되는 것이 아닌 다양한 백신에 적용 시킬 수 있기 때문에, 효과적인 항원 보조제를 개발하면 다양한 조류 인플루엔자뿐만 아니라 다양한 가축 질병에 대한 백신 개발에 응용될 수 있음. 따라서 가축의 질병 백신에 이용할 수 있는 효과적인 항원 보조제 개발이 필요함.

하지만 국내에서는 조류뿐만 아니라 가축 대한 기초 면역학 및 면역증진에 대한 연구가 미비한 실정임. 따라서 경제동물에 대한 기초 면역학 및 면역증진에 대한 연구를 통해 조기에 조류 인플루엔자의 확산을 예방할 수 있는 백신 및 항원보조제의 개발이 요구됨.

**미생물 유래 물질 활용한 AI 대응 면역증강제 개발 연구 필요성**

지구온난화와 더불어 기상이변이 많이 발생하고 있는 요즘, 철새이동의 변화, 질병 발생을 증가 등에 따라 경제동물의 면역력을 증진시키는 연구는 필수적임. 그 중 조류에서 가장 문제시 되고 있는 조류 인플루엔자에 대한 연구는 현재도 많은 연구가 진행되고 있으나, 아직까지 정확한 면역활성 기전을 바탕으로 하여 효과적인 백신효능에 대한 연구는 부족한 실정임. 본 연구진은 상기된 바와 같이, 백신 효능 증진을 유도하기 위해 미생물 유래 입자를 활용하여 면역활성 향상에 대한 연구를 실시하였으며, 돼지, 닭과 같은 경제동물에서도 스트레스 대응 면역력 향상에 대한 다방면의 선행 연구를 실시하였음. 이를 바탕으로 본 연구진이 보유한 연구 결과와 관련 실험기술을 활용하여 미생물 유래 입자-가금 상호작용과 H9N2에 대한 면역 증강 효과를 규명하는 한편, 가금의 면역 특성과 면역방어기전에 대한 연구를 수행하였음

- 선행 연구**
- 미생물 유래 입자 활용 백신 항원 보조제 후보 연구
  - 항원보조제 활성 기전 연구
  - 가금에서 일·이차 면역기관에서의 면역세포 발현 양상 확인
  - 경제동물에서의 스트레스 대응 면역 증강 연구



- 수행 연구**
- 가금에서의 백신 항원보조제 후보 연구
  - 가금모델에서 미생물 유래 입자에 의한 면역활성 기전 연구
  - 가금에서의 인플루엔자 백신 효능 증진 기전 연구
  - 조류에서의 H9N2특이적 방어면역 연구

## 2. 국내외 기술개발 현황

		코드번호	D-04
□ 국내외 연구현황			
	<b>연구동향</b>	<b>출처</b>	
국 내	<p>● <b>AI 대응 가금에서의 면역활성 기전 규명 연구</b></p> <p>- 닭 배아의 기관지 상피 세포에서 인플루엔자 A 바이러스(H1N1) 감염 시 발생하는 면역반응에 대한 연구를 분자수준에서 진행한 결과, 감염 후 24시간 이내에 면역반응에 관련된 유전자인 gallinacin(GAL)의 발현이 증가되었고, GAL 조절 인자의 발현 패턴이 바이러스 감염 시 유도되는 면역 메커니즘 패턴과 동일함을 확인함으로써, 감염 초기 닭에서 일어나는 방어 메커니즘을 이해할 수 있게 함. 그러나 여전히 면역반응 관련 유전자의 전사조절메커니즘 연구는 부족한 상황임.</p> <p>- T cell 생성이 억제된 닭에서 저병원성조류인플루엔자인 H9N2 감염 시, 숙주 내 면역반응과 발병기전에 대한 연구를 진행한 결과 혈액 내 림프구에서 바이러스성 RNA 발현량이 증가되었고 바이러스성 단백질 또한 치사량에 이를 정도로 증가됨을 확인함으로써, 인플루엔자 바이러스 제거에 대한 T cell 매개성 면역반응의 중요성을 제시함. 하지만 구체적인 조절메커니즘 연구는 부족한 상황임.</p> <p>- 조류인플루엔자 바이러스(H9N2)가 감염된 닭에서 염증성 사이토카인과 TLR의 유도반응에 대한 연구를 진행한 결과 기관지와 폐, 그리고 장에서 TGF-β3, TNF-α, IFN-α,-β,-γ, TLR1, 2, 3, 4, 5, 7, 15가 유도되었고, 특히 폐에서는 TLR-15가 주로 유도되었음을 확인함으로써, H9N2 감염이 여러 기관에서 효과적으로 면역반응을 유도할 수 있음을 보임. 그러나 발현을 조절하는 원인에 대한 연구는 부족한 상황임.</p>	<p>Poultry Science (2010, 2011, 2015)</p> <p>Virus Research (2008)</p> <p>Veterinary Research (2011)</p> <p>미생물학회지 (2009)</p> <p>Journal of Microbiol (2013)</p>	
	<p>● <b>백신 효능 증진을 위한 어쥘번트 및 면역증강제 연구</b></p> <p>- 양계산업에 큰 위협이 되고 있는 H9N2 조류독감에 대해 불활성화 H9N2 LPAI 백신 투여 시 Oil adjuvant와 Gel adjuvant의 처리하였을 때, 면역반응을 증진하는 결과를 보임. 하지만 증진 기전 규명 및 바이오 유래 물질을 활용한 어쥘번트 연구는 부족함.</p> <p>- 닭에서 IBDV에 대한 방어면역을 유도하기 위해서 <i>in ovo</i> priming을 실시하고, pcDNA-ChIL-6를 어쥘번트로 활용한 유</p>		

	<p>전자백신에 효과를 확인하는 연구가 진행됨. 조류독감뿐 아니라 다른 질병에 있어서도 효과적인 어쥬번트를 개발하기 위한 연구가 진행 중인 상황임.</p> <p>- 외부막소포(mOMV)를 어쥬번트로 사용하여 교차반응을 일으킬 수 있는 항체 반응 유도과 H5N1과 H9N2 바이러스에 대한 방어력 증진을 확인하여 어쥬번트로의 활용가능성을 가늠하였으나, 마우스 수준의 연구에 그침. 조류에서의 연구가 부족한 실정임.</p> <p>● 미생물 유래 물질을 활용한 가금 면역기전 연구</p> <p>- 가금 생산성과 면역 반응에 미치는 영향에 관한 연구를 위해 클로렐라를 급여하여, 육계의 성장 향상 및 IgG 및 IgM 항체 생산반응 개선을 확인함. 이를 통하여 조류 미생물의 일종인 클로렐라가 사료 첨가를 통해서 항체 형성에 도움을 줄 수 있음을 시사 함. 하지만 이에 대한 정확한 세포/분자 수준의 기전 연구는 부족함.</p>	
국외	<p>● 질병 대응 가금에서의 면역 기전 규명</p> <p>- 조류인플루엔자 바이러스(H9N2)에 감염된 산란계의 난관에서 염증성 사이토카인의 분비와 세포사멸유도에 대한 연구를 진행한 결과, 난관에서 apoptosis와 조직 손상이 일어났고 닭의 면역반응을 유도하는 유전자 발현을 통하여 TLR3, 7, 21, MDA5, IL-2, IFN-<math>\beta</math>, CXCLi1, CXCLi2, XCL1, XCR1, CCR5의 생성이 증가됨을 확인함으로써, 가축의 생식계에서 조류인플루엔자의 위험성을 제시함. 하지만 돼지에서 생식계에 대한 연구가 활발히 진행되어온 것과 달리 가금에서는 생식계 관련 면역학적인 연구가 부족한 상황임.</p> <p>- 고병원성 조류인플루엔자 바이러스(H5N1) 감염 시 오리와 닭에서의 면역반응에 대한 연구를 진행한 결과 닭에서 STAT-3 신호전달로 매개되는 염증반응이 증가되었으나 오리에서는 STAT-3가 바이러스 감염에 영향을 미치지 못했음을 확인함으로써 가축에서 조류인플루엔자 바이러스의 주된 병원성의 요인을 제시함. 이를 통하여 바이러스에 대한 병인 기전 연구가 필요함을 제시함.</p> <p>- 조류인플루엔자(H4N6)에 감염된 닭에서 TLR 리간드와 바이러스의 감염사이의 관계에 대한 연구를 진행한 결과 감염 18시</p>	<p>Vaccine (2015)  Veterinary Microbiology (2015)  Poultry Science (2011)  Veterinary Research (2014)  Veterinary Immunology and Immunopathology (2011)</p>

간 전 리간드를 투여한 닭에서는 감염효과가 나타나지 않았고, 항바이러스 반응을 일으키는 Type 1 IFN 유전자가 기관지와 cecal tonsils에서 증가됨을 확인함으로써 닭에서 조류인플루엔자의 치료가능성을 제시함. 하지만 구체적인 TLR 관련 면역기전에 대한 연구는 부족한 상황임.

● **백신 효능을 증진시키는 어쥬번트 및 면역증강제 연구**

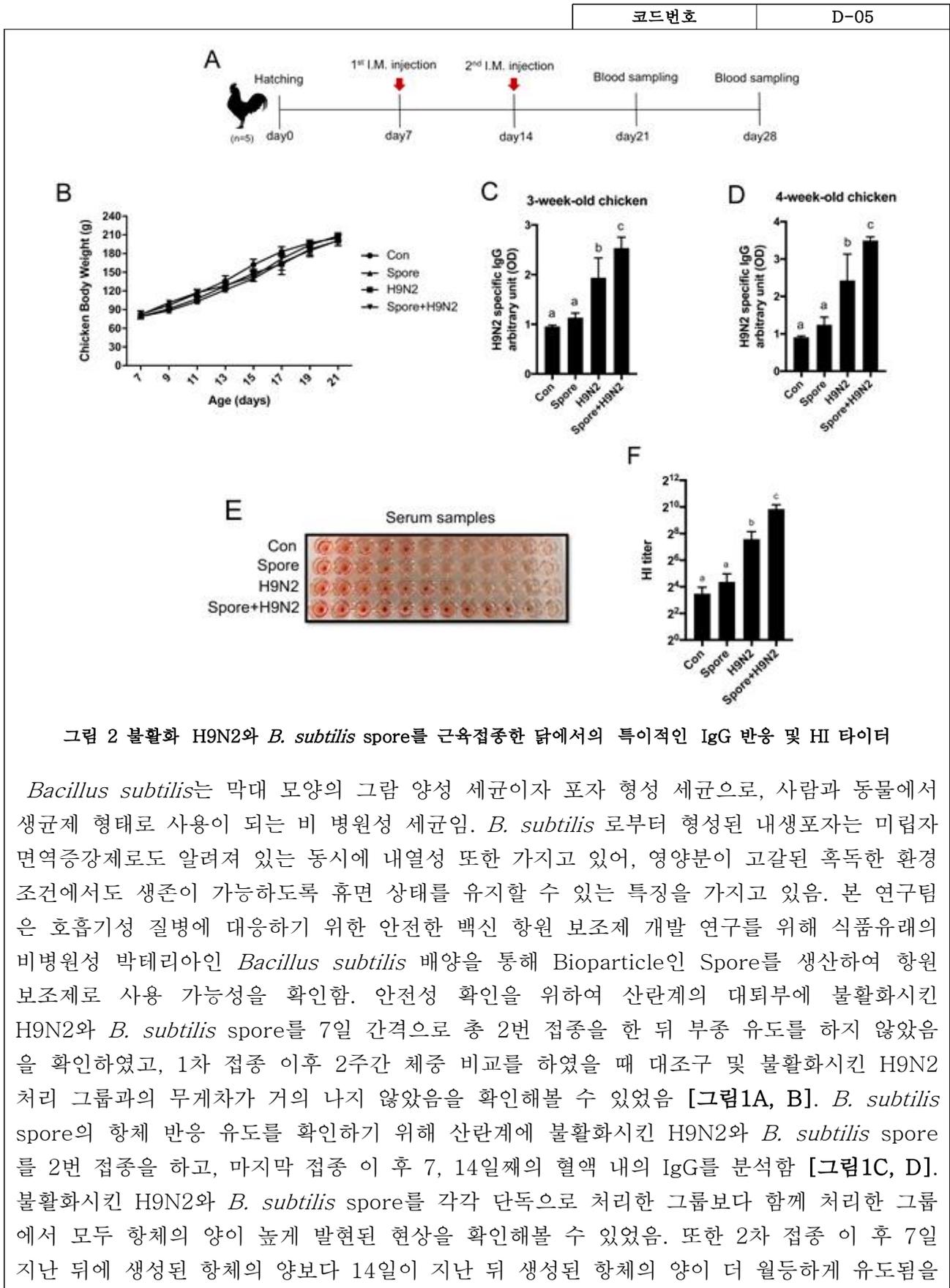
- 닭 모델에서 뉴캐슬병, 전염성 기관지염, 조류독감에 대해 Sargassum pallidum polysaccharides (SPP)가 적절한 사용량으로 처리했을 때 빠르고 지속적인 예방 효과를 위한 안전하고 효과적인 어쥬번트로 사용될 수 있다는 것을 확인함. 또한 다른 연구팀에서는 pimedium polysaccharide-propolis flavone adjuvant (EPA)가 닭 모델에서 조류독감과 뉴캐슬병에 대하여 림프구 증식과 항체 역가를 증가시키고 폐사율을 낮추는 효과가 있음을 보고하고 새로운 종류의 어쥬번트로 이용이 가능함을 밝혔음. 이를 통하여 국외에서도 조류 질병에 대응하여 안전성이 높고 효능이 좋은 어쥬번트 개발이 중요함을 시사함.

● **미생물 유래 물질을 활용한 가금의 TLR 발현 연구**

- 육계모델을 통해서 살모넬라균과 캄필로박터의 선천면역 반응을 관찰한 결과 살모넬라균의 경우 TLR4와 TLR21 gene의 발현이 증가시키고 캄필로박터의 경우 TLR5와 TLR15 gene의 발현이 증가시킴을 밝힘으로써, TLR의 gene을 발현을 닭에서 살모넬라와 캄필로박터를 어쥬번트로써 사용할 수 있는 가능성을 엿볼 수 있음.

기존 연구의 문제점	본 연구진의 연구방향
<p>- 다양한 종류의 어쥬번트 후보에 대한 연구들이 진행되고 있으나, 국내 가금 산업의 상황에 알맞고 AI에 특이적이며 실용성과 안전성을 두루 갖춘 어쥬번트에 대한 연구는 부족한 실정.</p> <p>- 특히 조류에서의 면역활성 증진 기전 규명에 대한 연구 부족함.</p>	<p>- 기 확보된 미생물 유래 물질을 활용하여, 실용적이고 안정성이 높은 면역 증강제의 연구가 필요.</p> <p>- 조류 모델을 활용하여 조류 특이적 면역활성을 연구하고 효과적인 어쥬번트 개발을 위하여 정확한 기전 규명을 연구함.</p>

### 3. 연구수행 내용 및 결과



확인할 수 있었음. 특히, 불활화시킨 H9N2와 *B. subtilis* spore를 함께 접종하였을 때 H9N2를 단독으로 접종한 산란계 그룹보다 접종 2주 후 양호한 혈구응집억제(HI) 항체 역가를 형성시켜주어 *B. subtilis* spore가 효과적인 항원보조제의 역할로서 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 H9N2의 공격에 대해 우수한 방어력을 제공할 가능성을 보여주었음 [그림1E, F].

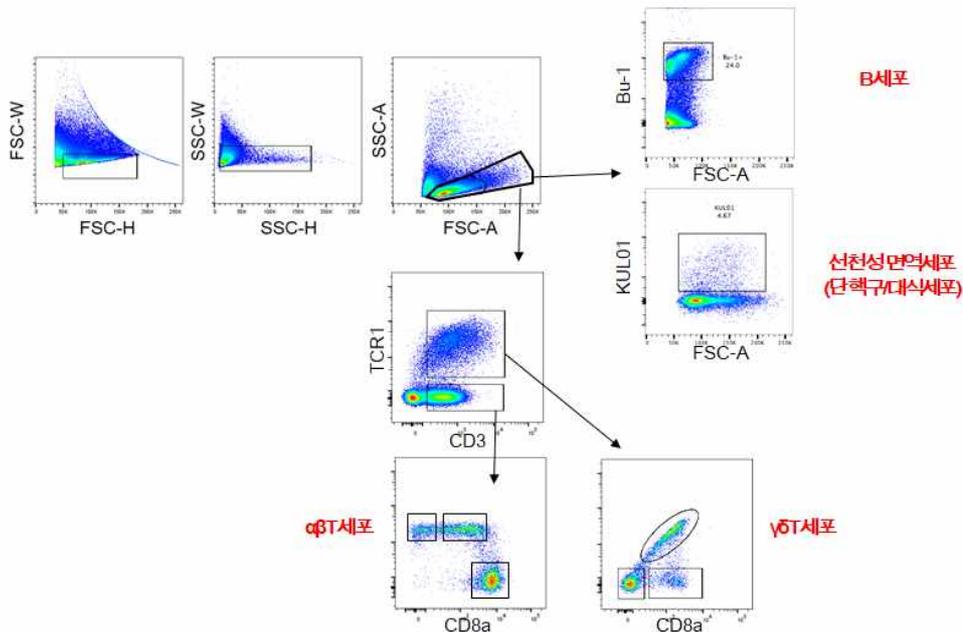


그림 3 조류 면역세포 분석 전략

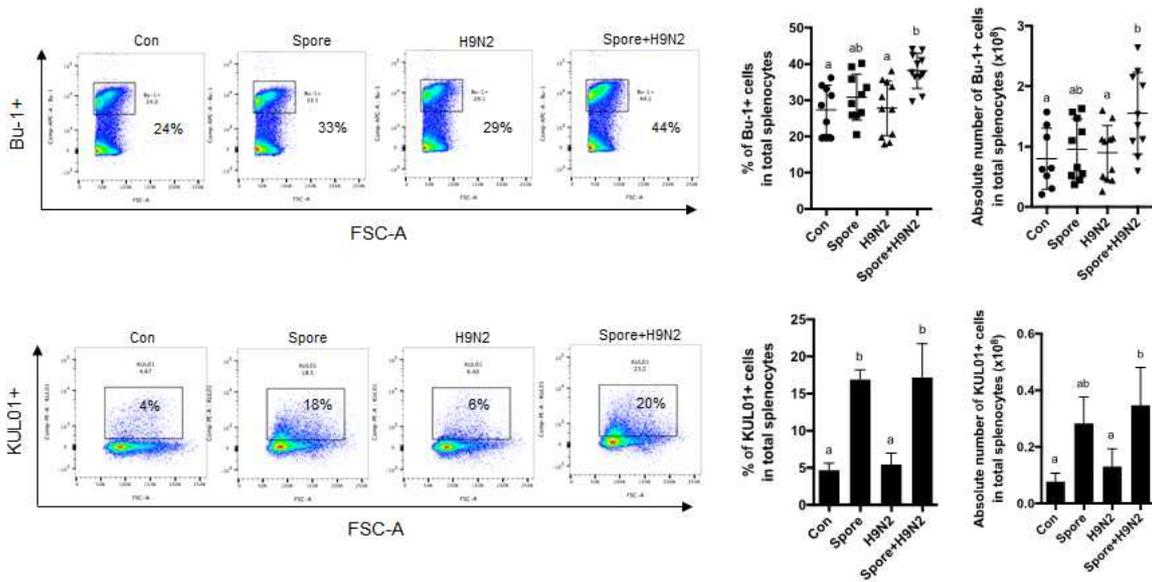
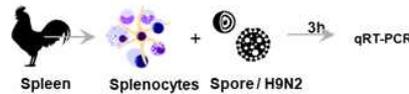


그림 4 불활화 H9N2와 *B. subtilis* spore를 근육접종한 닭에서 증가한 Splenic B 세포와 선천성 면역세포

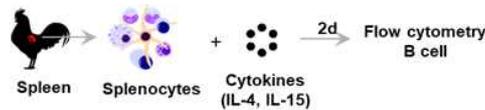
본 연구에서는 비활성화 된 조류 인플루엔자 바이러스 H9N2 및 *B. subtilis* 내생포자를 근육 내 투여 시킨 닭으로부터 *B. subtilis* 내생포자의 면역증강 능력 및 그 영향을 밝히고자 하였음. 선천성 면역반응 활성 확인 및 B 세포에서 *B. subtilis* spore의 처리에 따른 변화를

관찰하기 위하여 산란계의 대퇴부에 불활화시킨 H9N2와 *B. subtilis* spore를 2회 근육 접종한 뒤 monocytes/macrophages 마커인 항-KUL01 항체와 B세포 마커인 항-Bu-1항체를 염색하여 유세포분석기로 의 발현 정도를 확인함 [그림 2]. 마지막 접종 1주일 이 지난 뒤, 비장에서 전체 세포수를 분석해본 결과 각 접종그룹간의 차이가 보이지 않았음을 확인함. 이어서, monocytes/macrophages와 B 세포의 백분율과 절대수에서 모두 불활화시킨 H9N2와 *B. subtilis* spore를 같이 접종한 그룹에서 가장 높게 발현이 되었음을 확인하였음 [그림 3].

비장 내 면역세포와 미생물 유래물질/H9N2의 처리 후 면역활성 인자 확인



주요 면역활성 인자 첨가를 통한 B세포 활성화 확인



핵심면역세포 분리 기술을 이용한 면역활성 기전 확인



그림 5 면역활성 기전 규명 전략

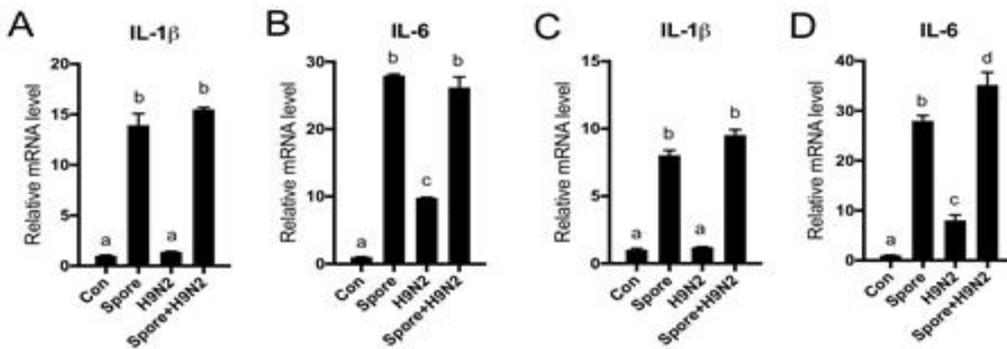


그림 6 불활화 H9N2와 *B. subtilis* spore 처리에 따른 total splenocytes와 monocytes/macrophages 에서의 염증성 사이토카인

*B. subtilis* spore에 의한 면역활성 기전을 규명하기 위해 in vitro 상에서의 주요 면역활성 인자 첨가 및 핵심면역세포 분리 기술을 이용하여 면역활성 기전을 규명하고자 함 [그림 4]. 더불어, 불활화시킨 조류 인플루엔자 바이러스 H9N2를 단독으로 처리한 그룹에 비하여 바이러스와 *B. subtilis* spore를 함께 처리해준 그룹의 비장으로부터 염증성 사이토카인 (pro-inflammatory cytokine)의 발현이 증가된 것을 확인하였음 [그림 5A, B]. 뿐만 아니

라 전체 비장세포로부터 monocytes/macrophages를 분리하여 마찬가지로 확인해본 결과, 바이러스와 *B. subtilis* spore를 함께 처리해준 그룹에서 염증성 사이토카인의 발현이 증가된 것을 확인하였음 [그림 5C, D]. 결과적으로 *B. subtilis* spore가 면역 증강제로서 조류 인플루엔자 바이러스 H9N2에 대한 효과적인 선천성 면역활성 작용을 확인하였으며, 이는 호흡기 바이러스 감염을 억제하는 백신 효율을 증가시켜 숙주 면역 시스템에 긍정적인 영향을 줄 수 있다고 판단됨.

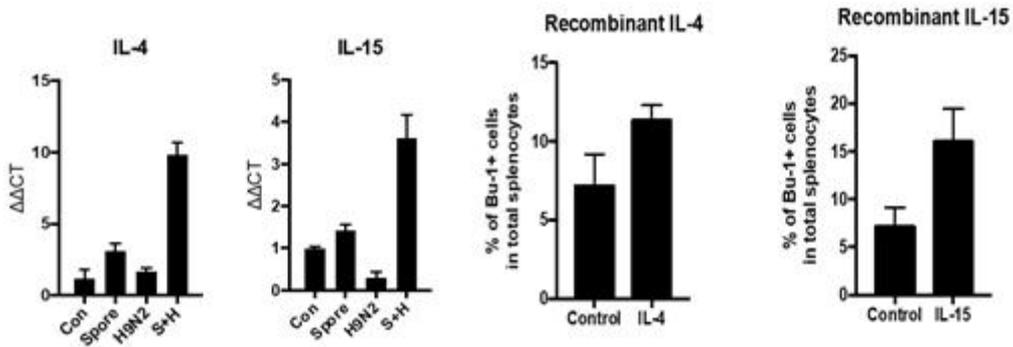


그림 7 불활화 H9N2와 *B. subtilis* spore 처리에 따른 IL-4와 IL-15 비교 및 첨가에 따른 B 세포 변화

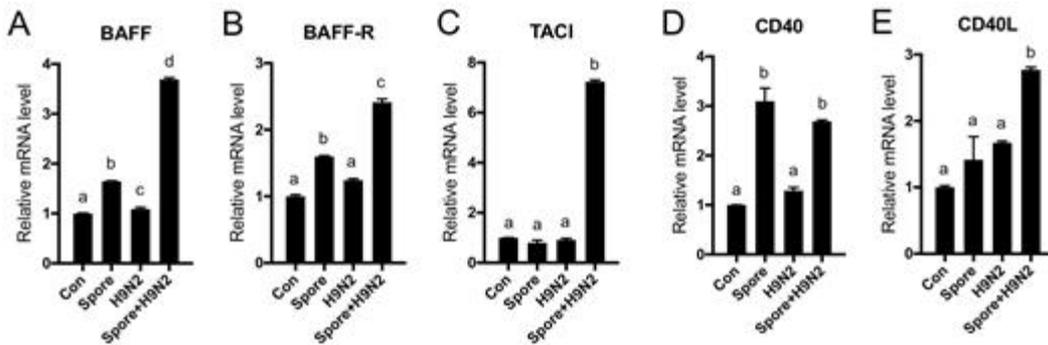
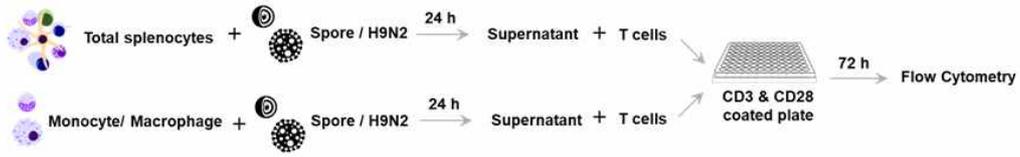


그림 8 불활화 H9N2와 *B. subtilis* spore 처리에 따른 B 세포 증식/생존 관련인자들의 발현도 비교

추가적으로, IL-4와 IL-15는 B세포 증식에 관련된 주 인자로, spore 처리시 증가함을 확인할 수 있었으며, IL-4와 IL-15를 B세포에 첨가해주었을 때 B 세포의 비율이 증가하는 것을 확인하였음 [그림 6]. B 세포의 생존, 분화, 증식 및 활성화와 관련된 조절 인자인 BAFF, BAFF 리셉터 (BAFF-R), TACI, CD40, CD40L의 발현 정도를 확인해본 결과, 불활화 시킨 조류 인플루엔자 바이러스 H9N2를 단독으로 처리한 그룹과 비교해 보았을 때 H9N2와 *B. subtilis* spore를 함께 처리해준 그룹에서 B 세포 관련 조절 인자들이 유의하게 높게 발현한 현상을 확인함 [그림 7]. 종합하여, B 세포 생존 신호의 조절 인자인 BAFF, BAFF-R, TACI, CD40, CD40L의 발현 정도를 비교해본 이 실험의 결과는 불활화시킨 H9N2를 단독으로 처리한 그룹에서보다 H9N2 및 *B. subtilis* spore를 공동으로 처리한 그룹에서 B 세포에서의 증식 및 분화 능력을 더 효과적으로 유도 함을 입증하였음. 이는 *B. subtilis* spore의 보조 효과가 B 세포의 생존 조절 인자에 대한 유전자의 분비 수준을 증가 시킨다는 것을 보여 주었음.

*In vitro* T 세포 반응 분석



*Ex vivo* H9N2-특이적 T 세포 subset 반응성 검증

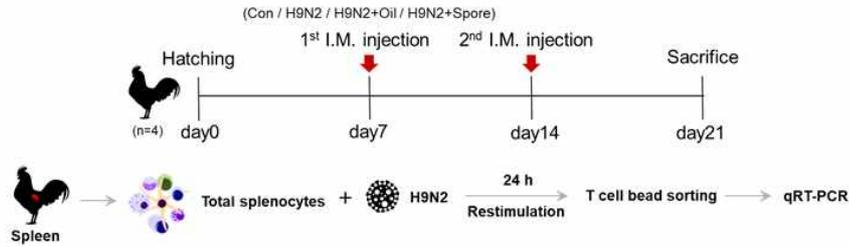


그림 9 T 세포 활성화 연구 전략

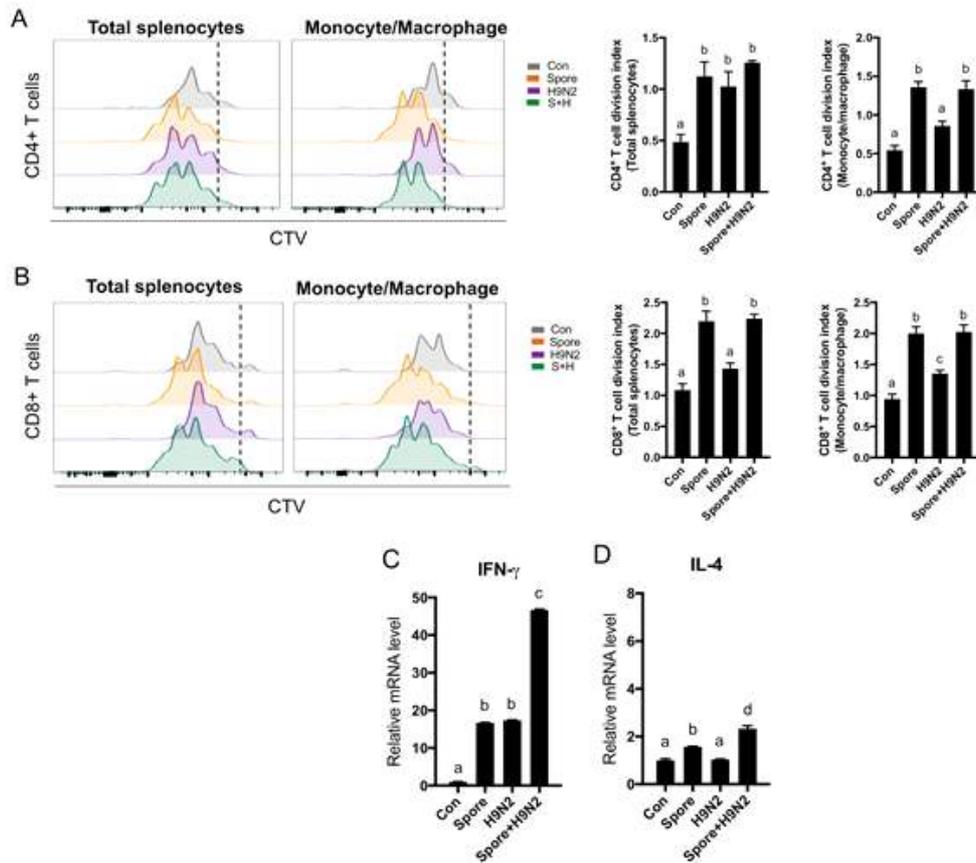


그림 10 불활화 H9N2와 *B. subtilis* spore를 이용한 *in vitro* TCR 자극에 따른 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 변화

다음으로, *in vitro* TCR stimulation을 수행하여 불활화시킨 H9N2 및 *B. subtilis* spore에 의해 자극된 항원제시세포 (APC; antigen presenting cell)에 의한 T cell proliferation의

유도를 확인함 [그림 8]. Total splenocytes와 monocytes/macrophages에서 CD4 T세포를 histogram과 division index로 나타내본 결과, 불활화시킨 H9N2와 *B. subtilis* spore를 함께 처리 해준 그룹에서 H9N2를 단독으로 처리해준 그룹에 비하여 높게 증가한 현상을 확인함 [그림 9A]. 마찬가지로 CD8 T 세포를 관찰하였을때, 불활화시킨 H9N2와 *B. subtilis* spore를 함께 처리 해준 그룹에서 H9N2를 단독으로 처리해준 그룹에 비하여 높게 증가한 현상을 확인함 [그림 9B]. 이어서 mRNA expression level을 관찰해본 결과, IFN- $\gamma$ 는 불활화시킨 H9N2와 *B. subtilis* spore를 함께 처리해준 그룹에서 유의적으로 가장 높게 발현이 되었음 [그림 9C]. 하지만 이와는 달리 IL-4의 발현은 IFN- $\gamma$ 와 비교하여 모든 처리군에서 발현도가 상대적으로 낮게 나왔음을 확인함 [그림 9D]. 이에 따라 *in vitro* TCR stimulation의 경우, 항원 보조제로서 *B. subtilis* spore가 Th2반응보다 Th1 반응을 유도할 가능성이 높다는 것을 확인함.

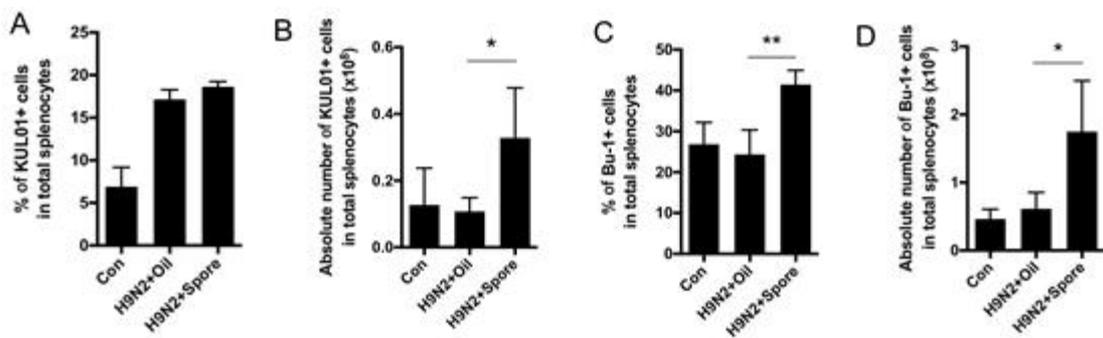


그림 11 항원보조제인 *B. subtilis* spore의 처리에 따른 Splenic B 세포와 monocytes/macrophages의 분포도의 변화

불활화시킨 H9N2에 대하여 *B. subtilis* spore가 항원 보조제 역할로서 산란계의 비장에서 monocytes/macrophages와 B 세포의 증가를 유도하였기 때문에, 이어서 실제 필드에서 사용 중인 oil adjuvant를 함유한 H9N2 오일 백신과 성능을 비교하고자 함. *B. subtilis* spore가 H9N2 오일 백신과 비교하여 항원에 대하여 특정 세포 집단을 효과적으로 유도할 수 있는지를 확인해 보고자 접종을 수행함. 그 결과, monocytes/macrophages의 백분율은 큰 차이를 보이지 않았으나 절대수에서는 불활화시킨 H9N2에 대하여 *B. subtilis* spore를 함께 접종해준 그룹이 H9N2 오일 백신을 접종한 그룹보다 유의적으로 높게 증가함을 확인할 수 있었음 [그림 10A, B]. 그리고, B 세포의 경우 백분율과 절대수 모두에서 불활화시킨 H9N2에 대하여 *B. subtilis* spore를 함께 접종해준 그룹이 H9N2 오일 백신을 접종한 그룹보다 유의적으로 높게 증가함을 확인할 수 있었음 [그림 10C, D]. 이러한 결과는 *B. subtilis* spore가 산란계에서 H9N2 oil adjuvant보다 monocytes/macrophage 및 B 세포를 증가시키는데 더 효과적인 항원 보조제임을 시사함.

항원 보조제를 함유하고 있는 백신이 더 효과적으로 백신으로서의 기능을 발휘하기 위해서는 T 세포의 반응을 향상시켜야 한다는 점이 알려져 있기 때문에, 불활화시킨 H9N2 및 *B. subtilis* spore를 근육 접종한 닭의 비장으로부터 T 세포를 관찰하였음. 항-CD4, -CD8 항체를 염색하여 유세포분석기로 발현 정도를 확인하였을 때, CD4<sup>+</sup>T세포에서는 그룹간의 차

이가 보여지지 않았음 [그림 11A, B]. 이와는 달리, CD8<sup>+</sup>T세포에서는 불활화시킨 H9N2와 *B. subtilis* spore를 함께 접종해준 그룹이 H9N2 오일 백신을 접종한 그룹보다 백분율과 절대수 모두에서 유의적으로 높게 증가함을 확인함 [그림 11C, D].

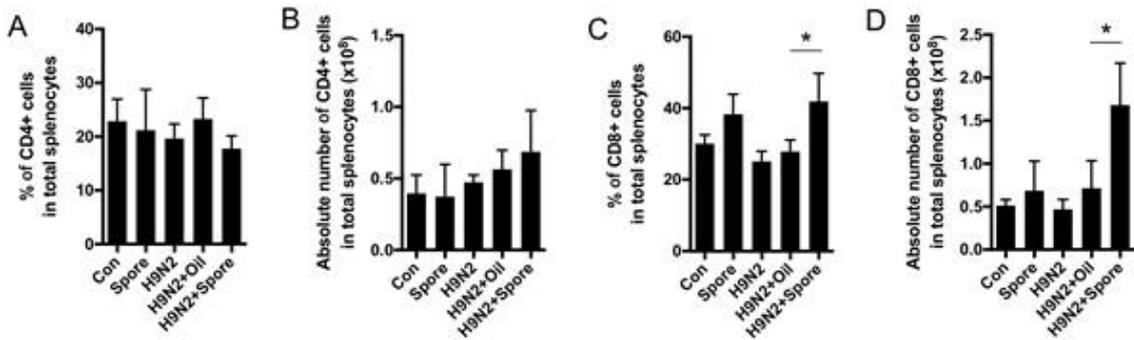


그림 12 불활화 H9N2와 *B. subtilis* spore 처리에 따른 T 세포의 군집 변화

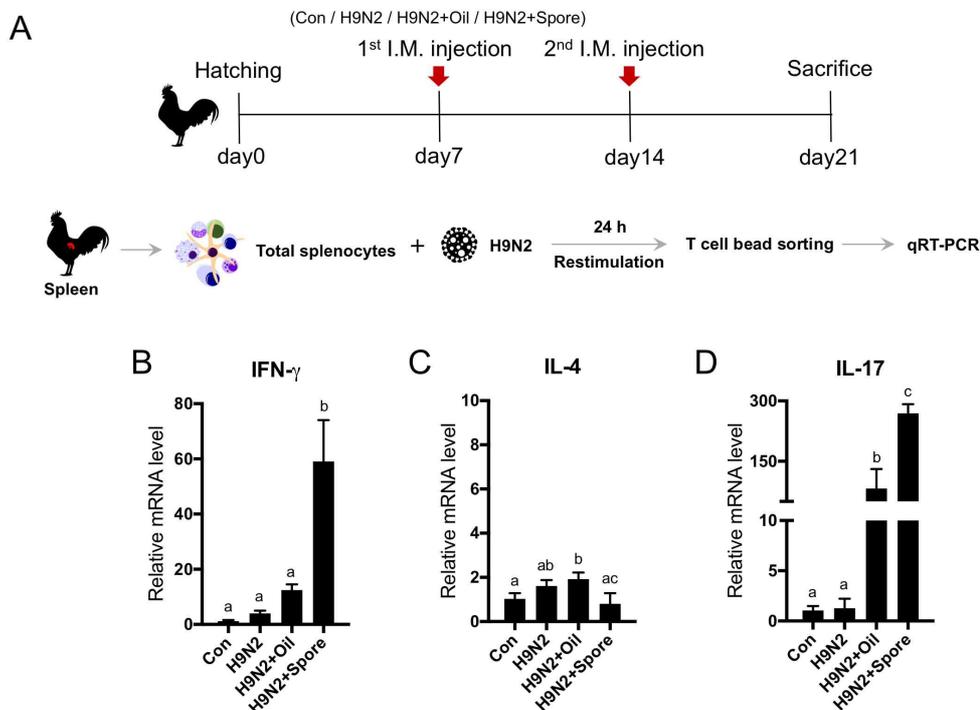


그림 13 불활화 H9N2, *B. subtilis* spore, 및 H9N2 오일백신 처리에 따른 H9N2 바이러스 특이적인 T 세포에서의 사이토카인 발현도 관찰

항원에 특이적인 T세포 반응을 관찰하기 위하여 injection 이 후 *in vitro*에서 H9N2로 re-stimulation을 준 뒤, H9N2에 특이적인 T세포 발현 정도를 mRNA level에서 확인함 [그림 12A]. H9N2 바이러스와 *B. subtilis* spore를 면역증강제로써 함께 처리해준 그룹에서 IL-4와는 달리 IFN- $\gamma$ 와 IL-17이 가장 높게 발현되는 현상을 확인하였으며, 이를 통해 H9N2 바이러스에 특이적인 T세포로부터 Th1, Th17 사이토카인의 발현이 증가하는 현상을 관찰했음 [그림 12B-D]. 종합적으로, 닭에서 *B. subtilis* spore는 항원에 특이적인 항체 반응 및 T세포의 발현 정도를 토대로 불활화 조류독감바이러스인 H9N2에 대하여 효과적으로 면역증강 능력을 보여주었으며, 이에 체액성 면역반응 및 세포성 면역 반응 유도 능력을

증명함으로써, 조류에서의 인플루엔자 바이러스에 대한 방어 전략 및 효과적인 면역증강제로써 *B. subtilis* spore의 이용 가능성을 시사함.

### 미생물 유래 물질 활용 AI 대응 면역활성 기전 및 면역어쥬번트 개발

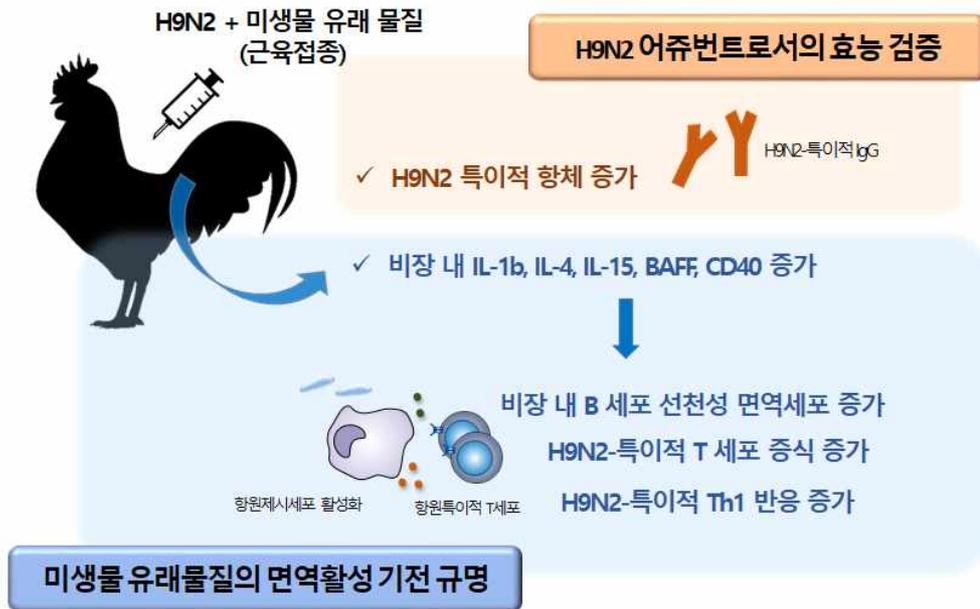


그림 14 연구결과 요약

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
4-1. 목표달성도			
연구목표	달성도 (%)	자체평가	
기 동정/확보한 미생물 유래 물질의 가금 대상 안전성 검증	100	<p><i>Bacillus subtilis</i> 사람과 동물에서 생균제 형태로 사용이 되는 비 병원성 세균임. 본 연구팀은 <i>Bacillus subtilis</i>의 spore 형태가 포유류뿐만 아니라 가금류에서의 안전성을 검증하였음. 관련 근거로 산란계의 대퇴부에 불활화시킨 H9N2와 <i>B. subtilis</i> spore를 접종시 부종 유도를 하지 않았음을 확인하였고, 1차 접종 이후 2주간 체중 비교를 하였을 때 대조구 및 불활화시킨 H9N2 처리 그룹과의 무게차가 거의 나지 않았음을 확인해볼 수 있었음.</p>	
미생물 유래 물질의 면역 활성화 유도 기전 규명	100	<p>불활화시킨 H9N2와 <i>B. subtilis</i> spore를 함께 처리시 H9N2 특이적인 항체의 양이 증가하는 것을 확인하였고 이러한 항체의 증가는 monocytes/macrophages와 B 세포의 백분율과 절대수 그리고 염증성 사이토카인의 증가로 인함을 발견함. 이렇게 증가한 염증성 사이토카인들이 T cell에 proliferation을 유도하는 것을 <i>in vitro</i> 실험을 통해 확인함. 위에 결과들을 통해 가금류에서 잘 연구되지 않은 선천성세포와 후천성세포의 연관관계를 좀 더 확인함.</p>	
면역활성 증진을 위한 투여 조건 최적화	100	<p>불활화시킨 H9N2와 <i>B. subtilis</i> spore를 각각 단독으로 처리한 그룹보다 함께 처리한 그룹에서 모두 H9N2 특이적인 항체의 양이 높게 발현된 현상을 확인해볼 수 있었음. 이를 통해 산란계의 대퇴부에 불활화시킨 H9N2와 <i>B. subtilis</i> spore를 7일 간격으로 총 2번 접종하는 것이 최적의 투여 조건임을 확인함.</p>	
기존 백신과의 비교를 통한 백신 효능 검증	100	<p>실제 필드에서 사용중인 oil adjuvant를 함유한 H9N2 오일 백신과 성능을 비교했을 시 monocytes/ macrophages의 절대수에서 불활화시킨 H9N2에 대하여 <i>B. subtilis</i> spore를 함께 접종해준 그룹이 H9N2 오일 백신을 접종한 그룹보다 유의적으로 높게 증가함을 확인할 수 있었음</p>	
4-2. 관련분야 기여도			
○ 조류 독감은 현재까지도 끊임없이 발생하고 있는 조류 질병으로 이에 대한 예방 및 치료에			

대한 관심은 매우 높은 실정임. 하지만 국내외 많은 그룹에서 백신 후보물질 및 어쥬번트를 개발하고자 노력하고 있으나, 면역활성 기전을 바탕으로한 효과적인 백신 효능 증진에 대한 연구는 미비한 실정임. 효과적인 항원 보조제의 사용은 백신 투여 시 선천성 면역 반응 (innate immunity)을 극대화시켜주고, 이를 통해 획득성 면역 반응을 더 빠른 시간에, 더 강력하게 유도할 수 있음. 그러나 백신 자체의 개발에 대한 연구는 많은 데 반해, 항원 보조제에 대한 연구는 그 시작이 늦어 상대적으로 연구가 부족한 상황임. 조류의 면역 및 백신개발 분야의 부족한 부분에 있어 본 연구는 모자란 부분을 일부 채워줄 수 있는 연구가 되었다고 판단됨. 본 과제에서는 조류 인플루엔자, 조류 면역세포, 그리고 미생물 유래 물질을 모두 이용해서 조류 독감 백신에 있어 미생물 유래 물질의 어쥬번트로서의 면역활성 기전을 밝혔음. 이러한 연구는 보다 효과적인 백신 개발을 하는 데 있어, 명확한 타겟 세포 및 면역활성을 선정할 수 있게 해주며, 학술적 측면에서도 조류면역학에 있어 큰 바탕이 되어줄 수 있음. 이러한 연구는 앞으로도 조류 백신 개발 기술의 향상에 이바지 할 뿐 아니라, 그 응용분야를 더욱 넓히는 것은 물론 고부가 가치 산업으로 연결시킬 수 있을 핵심 연구가 될 것으로 기대됨.

## 5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 조류 면역체계 기반의 동물 기초면역학의 학술적 기반을 구축함.</li> <li>○ 기존 AI 백신제제들과 혼합하여 효능 개선과 새로운 백신전략을 구상하는데 활용함.</li> <li>○ 사료첨가제 형태로의 기술개발을 통해 AI 저항성을 높이는 사양 시스템 구축에 활용함.</li> <li>○ AI 뿐 아니라 가금 관련 백신제제와의 효능 연구를 통해 universal adjuvant 연구에 활용함.</li> <li>○ 추후 응용분야로의 연구계획을 추진 시, 산업화를 위한 전임상시험 결과를 바탕으로 하여, 과제 종료 후 필드테스트 및 기업 연계 과제 수행을 통한 상용화 전략 구축</li> <li>○ 본 기술을 가축 백신개발 산업체에 기술 이전하여 제품화를 모색가능 함.</li> </ul>		

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
○ 해당사항 없음		

## 7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 본 과제는 일반과제로 분류		

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

				코드번호	D-11
<b>가. 연구실 안전 점검 체계</b>					
1) 안전 점검 체계					
본 연구진은 서울대학교 실험실환경 안전점검 기준 상 모두 A등급(실험실 점검기준 매일 1회, 대학별 점검기준 매분기 1회, 전담부서 기준 매분기 1회)에 속함.					
종류	기간	실시자	내용		
일상점검	년중	연구활동종사자	전 연구개발활동에 사용되는 실험 약품 및 장비의 이상 유무 점검		
정기점검	매년6-8월	서울대학교환경안전원	실험실 안전점검 프로그램을 사용하여 분야별 항목 점검		
특별안전 점검	년중 필요시	총장의 지시에 의거 환경안전원 실시 또는 외부기관에 의뢰	폭발사고, 화재사고 등 연구활동종사자의 안전에 치명적인 위험을 야기할 가능성이 있을 것으로 예상되는 경우에 총장의 지시에 의해 실시		
정밀안전 진단	매년 9-10월	외부전문 진단기관	정기점검 실시 후 도출된 위해요인에 대하여 외부 전문기관에 진단을 의뢰하여 위해요인의 개선방향 및 안전관리방안 수립		
2) 실험 폐기물 처리					
In vitro 실험에서 사용하는 폐기물은 모두 autoclave를 이용하여 멸균한 후 생물폐기물 처리위탁 업체 (두만 위생 산업)에 폐기물 처리하였음. 또한, in vivo 실험에서 나오는 동물의 사체 폐기물은 플라스틱 biohazard bag에 넣은 후 시건 장치가 달린 Deep freezer에 보관, 2주에 한 번씩 두만 위생 산업에 동물 사체로 폐기물 처리하였음.					
<b>나. 교육훈련</b>					
본 연구진의 연구 참여자들은 서울대 생물안전 교육 이수하였음.					
종류	기간	실시자	내용		
정기교육	매년 2월, 8월	이공계 대학원생 및 연구원	환경안전관리 외 14과목(전공별 12과목 수강)		

온라인 교육	매년 3월, 9월	정기교육을 수강하지 못한 연구활동종사자	환경안전관리 외 14과목(전공별 12과목 수강)
수시 교육	수시	이공계 대학원생 및 연구원	기관에 요청에 따라 상이함

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Rapamycin-induced autophagy restricts porcine epidemic diarrhea virus infectivity in porcine intestinal epithelial cells.	서울대학교	교신	Antiviral Research	4.271	2017.08.24	중복사사	
2	논문	H9N2-specific IgG and CD4+ CD25+ T cells in broilers fed a diet supplemented with organic acids.	서울대학교	교신	Poultry Science	1.908	2016.08.20	중복사사	
3	논문	Barrier protection via Toll-like receptor 2 signaling in porcine intestinal epithelial cells damaged by deoxynivalnol.	서울대학교	교신	Veterinary Research	2.798	2016.02.09	중복사사	
4	논문	Distinct pattern of immune tolerance in dendritic cells treated with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid.	서울대학교	교신	Molecular Immunology	3.236	2017.08.23	중복사사	

5	특허	락토바실러스 투레티 LR4 및 이를 포함하는 조성물	서울대 학교	대한민국	2018.02.27	중복사사	과제 종료 후 출원
---	----	------------------------------	--------	------	------------	------	------------

## 11. 기타사항

코드번호	D-13
○ 해당사항 없음	

## 12. 참고문헌

코드번호	D-14
○ Hyun-Jun Jang, Hyun-Jeong Lee, Kyung Soo Kang, Ki-Duk Song, Tae-Hun Kim, Chang-Seon Song, Mi Na Park. Molecular responses to the influenza A virus in chicken trachea-derived cells. Poultry Science, Volume 94, Issue 6, 1 June 2015, Pages 1190-1201.	
○ Ji-Sun Kwon a, Hyun-Jeong Lee a, Dong-Hun Lee a, Youn-Jeong Lee b, In-Pil Mo c, Sang-Seop Nahm a, Min-Jeong Kim b, Joong-Bok Lee a, Seung-Yong Park a, In-Soo Choi a, Chang-Seon Song. Immune responses and pathogenesis in immunocompromised chickens in response to infection with the H9N2 low pathogenic avian influenza virus. Virus Research, Volume 133, Issue 2, May 2008, Pages 187-194.	
○ Nguyen Tai Nang, Joo Sub Lee, Byung Min Song, Young Myong Kang, Hyun Soo Kim, Sang Heui Seo. Induction of inflammatory cytokines and toll-like receptors in chickens infected with avian H9N2 influenza virus. Veterinary Research 2011 42:64.	
○ D.-H. Lee, J.-S. Kwon, H.-J. Lee, Y.-N. Lee, W. Hur, Y.-H. Hong, J.-B. Lee, S.-Y. Park, I.-S. Choi, C.-S. Song. Inactivated H9N2 avian influenza virus vaccine with gel-primed and mineral oil-boosted regimen could produce improved immune response in broiler breeders. Poultry Science, Volume 90, Issue 5, 1 May 2011, Pages 1020-1022.	
○ 박정호, 성환우, 윤병일, 박선일, 권혁무. Efficacy of Genetic Adjuvant (Plasmid-Expressed Chicken Interleukin-6) and Chemical Adjuvant (Levamisole) on the Protective Immunity of Genetic Vaccine against Infectious Bursal Disease Virus. 미생물학회지 45권 2호, 2009.6, 91-98.	
○ Byeong-Jae Lee, Sang-Ho Lee, Min-Suk Song, Philippe Noriel Q. Pascua, Hyeok-il Kwon, Su-Jin Park, Eun-Ha Kim, Arun Decano, Se Mi Kim, Gyo Jin Lim, Doo-Jin Kim, Kyu-Tae Chang, Sang-Hyun Kim, Young Ki Choi. Adjuvant efficacy of mOMV against avian influenza virus infection in mice. Journal of Microbiology. October 2013, Volume 51, Issue 5, pp 682-688.	

- Jingyu Wang, Chao Tang, Qiuzhen Wang, Ruiqiao Li, Zhanli Chen, Xueying Han, Jing Wang, Xingang Xu. Apoptosis induction and release of inflammatory cytokines in the oviduct of egg-laying hens experimentally infected with H9N2 avian influenza virus. *Veterinary Microbiology*. Volume 177, Issues 3-4, 12 June 2015, Pages 302-314.
- Suresh V Kuchipudi, Meenu Tellabati, Sujith Sebastian, Brandon Z Londt, Christine Jansen, Lonneke Vervelde, Sharon M Brookes, Ian H Brown, Stephen P Dunham, Kin-Chow Chang. Highly pathogenic avian influenza virus infection in chickens but not ducks is associated with elevated host immune and pro-inflammatory responses. *Veterinary Research* 2014 45:118.
- L.zhai, Y. Li, W. Wang, S. Hu. Enhancement of humoral immune responses to inactivated Newcastle disease and avian influenza vaccines by oral administration of ginseng stem and leaf saponins in chickens. *Poultry Science*. 2011 Sep;90(9):1955-9.
- Fan Y1, Wang D, Liu J, Hu Y, Zhao X, Han G, Nguyen TL, Chang S. Adjuvanticity of epimedium polysaccharide-propolis flavone on inactivated vaccines against AI and ND virus. *Int J Biol Macromol*. 2012 Dec;51(5):1028-32.
- Li LJ1, Li MY, Li YT, Feng JJ, Hao FQ, Lun Z. Adjuvant activity of *Sargassum pallidum* polysaccharides against combined Newcastle disease, infectious bronchitis and avian influenza inactivated vaccines. *Mar Drugs*. 2012 Dec;10(12):2648-60.
- Barjesteh N1, Shojadoost B1, Brisbin JT2, Emam M1, Hodgins DC1, Nagy É1, Sharif S3. Reduction of avian influenza virus shedding by administration of Toll-like receptor ligands to chickens. *Vaccine*. 2015 Sep 11;33(38):4843-9.