

315029-3

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

발간등록번호

11-1543000-002386-01

돼지  
복합  
호흡기  
질병  
(PRDC)  
의  
예방을  
위한  
다가  
예방  
백신의  
개발

최  
종  
보  
고  
서

2018

농  
림  
축  
산  
식  
품  
부  
농  
림  
식  
품  
기  
술  
기  
획  
평  
가  
원

# 돼지복합호흡기질병 (PRDC)의 예방을 위한 다가 예방백신의 개발 최종보고서

2018. 11. 14.

주관연구기관 / 전북대학교 산학협력단  
위탁연구기관 / 농림축산검역본부  
협동연구기관 / (주) 중앙백신

농림축산식품부  
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지 복합 호흡기 질병(PRDC)의 예방을 위한 다가 예방 백신의 개발”  
(개발기간 : 2015. 08. 14. ~ 2018. 08. 13.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 11. 14.

주관연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 (대표자) 이철로 (인)  
위탁연구기관명 : 농림축산검역본부 (대표자) 박봉균 (인)  
협동연구기관명 : (주) 중앙백신 (대표자) 윤인중 (인)

주관연구책임자 : 김원일  
위탁연구책임자 : 차상호  
협동연구책임자 : 최환원

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	315029-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2015. 08. 14 ~ 2018. 08. 13	단 계 구 분	총 단 계
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	돼지 복합 호흡기 질병(PRDC)의 예방을 위한 다가 예방 백신의 개발			
	세 부 과 제 명				
연구책임자	김원일	해당단계 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 300,000천원 민간: 100,000천원 계: 400,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 300,000천원 계: 1,200,000천원
연구기관명 및 소속부서명	전북대학교 산학협력단			참여기업명 (주) 중앙백신	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 농림축산검역본부			연구책임자: 차상호	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반				

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

- **다양한 국내 유행 PRRSV의 감염에 효과적으로 대응할 수 있는 DNA 바탕 약독화 백신 생산 시스템의 개발**
  - 총 841개의 PRRS 양성 가검물에서 국내 PRRSV 127주 분리 하여 KVCC에 기탁하고 480개의 PRRSV ORF5유전자 분석하여 KAHIS에 등록함
  - 국내 유행 PRRSV 모니터링을 통하여 국내 유행 북미형 바이러스를 5개의 그룹(세계 유행 Lineage 1과 5, Korean lineage A, B, C)으로, 유럽형 바이러스를 2개의 그룹(EU vaccine과 Korean EU)으로 분류함
  - 7개의 그룹으로 분류한 국내 유행 PRRSV의 유전자를 DNA 바탕 약독화 백신 플랫폼에 혼합 도입하여 2개 또는 3개의 바이러스들을 동시에 방어할 수 있는 약독화 키메라 백신 시스템의 개발
- **공격접종실험을 바탕으로 PRRS의 호흡기증상과 유산 예방 효과 및 안전성이 증명된 저변이 키메라 PRRS 백신의 개발 및 산업화 준비**
  - 저변이 PRRSV인 RVRp22의 유전자를 도입한 변이 바이러스 평가를 바탕으로 nsp2 유전자의 변이 억제 역할 증명
  - 저변이 유전자를 도입한 약독화 백신주인 CB1을 자돈에 공격접종하여 3대 연속계대를 바탕으로 약독화 특성의 유지와 병원성 회복 기전 억제 증명
  - 저변이 유전자를 도입한 약독화 백신주인 CB1를 접종한 자돈에서 북미형 및 유럽형 바이러스 공격접종 후 호흡기증상의 효과적인 예방과 안전성을 증명
  - 저변이 유전자를 도입한 약독화 백신주인 CB1를 접종한 모돈에서 북미형 바이러스 공격접종 후 유산의 효과적인 예방과 안전성을 증명
- **공격접종실험과 농장적용 실험을 바탕으로 다른 유전형의 PCV2 바이러스들 간의 교차방어 효과 및 안전성이 증명된 PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신의 개발 및 산업화**
  - PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신의 실험실적 공격접종 및 농장적용 실험을 통한 방어효능 및 안전성 평가 완료
  - 수이샷 마이썬코원(마이코플라즈마/PCV2b) 혼합백신의 농림축산검역본부 허가승인(13-215호) 및 제품 생산
  - PCV2b 변이주(PCV2d) 분리 및 병원성 평가 완료
  - 수이샷 2피엠(마이코플라즈마/PCV2b/PCV2d) 3종 혼합백신의 시제품 생산

보고서 면수  
141

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 다양한 국내 유행 PRRSV의 감염에 효과적으로 대응할 수 있는 DNA 바탕 약독화 백신 생산 시스템의 개발</li> <li>● 공격접종실험을 바탕으로 PRRS의 호흡기증상과 유산 예방 효과 및 안전성이 증명된 저변이 키메라 PRRS 백신의 개발 및 산업화 준비</li> <li>● 공격접종실험과 농장적용 실험을 바탕으로 마이코플라즈마의 감염과 다른 유전형의 PCV2 바이러스들 간의 교차방어 효과 및 안전성이 증명된 PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신의 개발 및 산업화</li> </ul>
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 다양한 국내 유행 PRRSV의 감염에 효과적으로 대응할 수 있는 DNA 바탕 약독화 백신 생산 시스템의 개발             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 총 841개의 PRRS 양성 가검물에서 국내 PRRSV 127주 분리 하여 KVCC에 기탁하고 480개의 PRRSV ORF5유전자 분석하여 KAHIS에 등록함</li> <li>- 국내 유행 PRRSV 모니터링을 통하여 국내 유행 북미형 바이러스를 5개의 그룹(세계 유행 Lineage 1과 5, Korean lineage A, B, C)으로, 유럽형 바이러스를 2개의 그룹(EU vaccine과 Korean EU)으로 분류함</li> <li>- 7개의 그룹으로 분류한 국내 유행 PRRSV의 유전자를 DNA 바탕 약독화 백신 플랫폼에 혼합 도입하여 2개 또는 3개의 바이러스들을 동시에 방어할 수 있는 약독화 키메라 백신 시스템의 개발</li> </ul> </li> <li>● 공격접종실험을 바탕으로 PRRS의 호흡기증상과 유산 예방 효과 및 안전성이 증명된 저변이 키메라 PRRS 백신의 개발 및 산업화 준비             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 저변이 PRRSV인 RVRp22의 유전자를 도입한 변이 바이러스 평가를 바탕으로 nsp2 유전자의 변이 억제 역할 증명</li> <li>- 저변이 유전자를 도입한 약독화 백신주인 CB1을 자돈에 공격접종하여 3대 연속계대를 바탕으로 약독화 특성의 유지와 병원성 회복 기전 억제 증명</li> <li>- 저변이 유전자를 도입한 약독화 백신주인 CB1를 접종한 자돈에서 북미형 및 유럽형 바이러스 공격접종 후 호흡기증상의 효과적인 예방과 안전성을 증명</li> <li>- 저변이 유전자를 도입한 약독화 백신주인 CB1를 접종한 모돈에서 북미형 바이러스 공격접종 후 유산의 효과적인 예방과 안전성을 증명</li> </ul> </li> <li>● 공격접종실험과 농장적용 실험을 바탕으로 다른 유전형의 PCV2</li> </ul>

	<p><b>바이러스들 간의 교차방어 효과 및 안전성이 증명된 PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신의 개발 및 산업화</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신의 실험실적 공격접종 및 농장적용 실험을 통한 방어효능 및 안전성 평가 완료</li> <li>- 수이샷 마이씨코원(마이코플라즈마/PCV2b) 혼합백신의 농림축산검역본부 허가승인(13-215호) 및 제품 생산</li> <li>- PCV2b 변이주(PCV2d) 분리 및 병원성 평가 완료</li> <li>- 수이샷 2피엠(마이코플라즈마/PCV2b/PCV2d) 3종 혼합백신의 시제품 생산</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 다양한 국내 유행 PRRSV의 감염에 효과적으로 대응할 수 있는 약독화 백신 생산 시스템의 개발과 저변이 키메라 PRRS 백신의 개발을 통한 농가 생산성 증대</li> <li>● PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신의 개발 및 산업화를 통한 양돈장의 PRDC 피해 감소 및 생산성 증대에 기여</li> <li>● PRDC는 전 세계 양돈 국가에 큰 피해를 주고 있으므로 개발 백신의 성공적인 적용은 해외 시장으로의 진출을 가능하게 할 것으로 기대</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>돼지생식기호흡기증후군</p>	<p>씨코바이러스</p>	<p>마이코플라즈마</p>	<p>돼지호흡기복합체</p>	<p>다가백신</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>PRRS</p>	<p>PCV2</p>	<p>Mycoplasma</p>	<p>PRDC</p>	<p>Polyvalent vaccine</p>

<본문목차>

< 목 차 >

제 1장. 연구개발과제의 개요 .....	1
제 2장. 연구수행 내용 및 결과 .....	13
제 3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	135
제 4장. 연구결과의 활용 계획 등 .....	139
붙임. 참고 문헌 .....	140

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

# 제 1장 . 연구개발과제의 개요

## 제 1절. 연구개발 목적

### 1. 연구개발 목적

- 가. 다양한 국내 유행 PRRSV의 감염에 효과적으로 대응할 수 있는 DNA 바탕 약독화 백신 생산 시스템의 개발
- 나. 공격접종실험을 바탕으로 PRRS의 호흡기증상과 유산 예방 효과 및 안전성이 증명된 저변이 키메라 PRRS 백신의 개발 및 산업화 준비
- 다. 공격접종실험과 농장적용 실험을 바탕으로 마이코플라즈마의 감염과 다른 유전형의 PCV2 바이러스들 간의 교차방어 효과 및 안전성이 증명된 PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신의 개발 및 산업화

### 2. 연구개발의 필요성

- 가. PRDC 정의 및 국내 현황 및 문제점

#### (1) PRDC

PRDC(Porcine Respiratory Disease Complex) 즉 돼지호흡기질병 복합체(호흡기복합감염증)는 단순히 정의하면 한 가지 원인체가 아닌 세균, 바이러스 등 2종, 3종 또는 그 이상의 원인체가 복합 감염되어 발생하는 호흡기 질병이다. 최근 돼지에서 발생하는 PRDC는 바이러스, 세균 등의 원인체와 사육 환경 부실 스트레스 증가와 같은 여러 요소가 복합 작용하여 발생하는 질병으로 양돈장에서 지속인 피해를 주고 있는 것으로 알려져 있다. 일차적으로 작용하는 병원체는 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), mycoplasma hyopneumonia, swine influenza virus (SIV)이었으나 최근에는 porcine circovirus 2 (PCV-2), porcine respiratory corona virus (PRCV), pseudorabies virus (PRV)와의 관련성에 현재 지속적인 연구가 진행되고 있다. 한 종류 이상의 바이러스에 감염되어 돼지의 저항력을 약화 시키고, 농장에 상재하는 파스튜렐라 폐렴(pneumonic pasteurellosis), 글래서씨병(Glasser's disease), 흉막폐렴(pleuropneumonia) 등과 같은 세균 감염에 의해 2차 증상을 나타내는 실정이다. 주로 발생하는 연령은 9주에서 22주령의 육성 비육돈이고 임상 증상은 발열, 기침, 호흡곤란을 나타내며 식욕감퇴와 성장지연을 보인다. 국내에서도 1990년대 까지는 주로 한 가지 원인체에 의한 호흡기 질병이 대부분이었으나 2000년대에는 복합감염에 의한 증상을 보이는 경우가 절반을 넘어서는 등 호흡기복합감염증의 발생이 증가하는 추세이다.



## (2) 국내 현황 및 문제점

호흡기 질병의 원인체는 농장 내에 상재하면서 새로 입식 되는 개체에 지속적으로 감염되어 이환돈을 증가시키기 때문에 단기간에 질병을 근절하는데 어려움이 따른다. 대부분의 양돈 농가에서는 호흡기로 인한 이유자돈 폐사 원인을 진단하여 예방백신을 접종하고, 항생제 투여를 처방으로 하는 사양 체계를 가지고 있지만, 이러한 일차 감염 원인에 의한 피해 해결방안 없이 이차 감염에 한 항생제 투여만으로는 지속적인 질병 발생을 해결 할 수는 없다. 또한, 최근 이유자돈의 이유후신성소모성증후군(post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)이 이유 후 6~7주령의 자돈에 집단 발생하고 있어, 이유자돈의 폐사율을 감소시키기 위해 정부에서 4P (PMWS, PRRS, PRDC, PED)질병 차단의 근절 정책 추진과 함께 사양 생리를 강조하고 컨설팅을 실시하고 있으나 양돈장 시설의 노후, 집단사육과 사양관리의 부실로 인한 생산성 저하는 늘어나는 실정이다. 도축돈에서의 호흡기 질환 감염률은 최 등(2006)은 도축돈에서 PCV2가 51.0%가 양성이라 하였고, 김 등(2004)의 연구에서는 병성감정 의뢰된 210두에서 PCV2의 양성률이 68.1%로 나타났다. 추 등(2008)의 연구에서는 도축돈에서 PCV2, PRRSV, MH의 양성률 이 각각 93.8%, 17.5%, 17.5%로 조사되었다. Hansen 등(2010)의 연구에서는 PCV2, PRRSV, SIV, MH, HP, APP의 양성률이 각각 95.7%, 4.3%, 1.9%, 78.4%, 2.4%, 0.5%이었으며, Morrison 등(1985)의 연구에서는 출하돈 334두의 폐를 검사하여 MH, PM, APP의 균 분리율이 각각 24.0%, 34.1%, 27.0%로 나타났다. 2011년 인천 도축돈에서 조사한 결과, PCV2, PRRSV, SIV, MH, PM, APP serotype 2, APP serotype 5 and HP는 각각 45.5%, 12.5%, 10.4%, 60.1%, 1.7%, 13.9%, 12.2% 그리고 15.6% 항원 양성을 확인하였으며, PCV2와 MH의 복합감염이 가장 많이 관찰되었다.

### 나. 썬코바이러스 국내 현황 및 문제점

#### (1) 썬코바이러스

Porcine circovirus (PCV)는 single stranded circular DNA 바이러스로 형태학적으로 icosahedral symmetry를 가지고 피막이 없으며 크기는 직경이 15~17nm 정도로 가장 작은 바이러스에 속한다. Porcine circovirus는 chicken anemia virus, psittacine의 baek-and-feather disease virus와 함께 Circoviridae로 분류되며, 이유자돈의 전신성소모성증후군 (Postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS), PRDC (Porcine respiratory disease complex) 및 PDNS(Porcine dermatitis and nephropathy syndrome)등 PCVAD (Porcine circo virus associated disease)에 중요한 원인체로 밝혀진 바이러스이다. 최초의 보고는 1987년 Tischer등이 돼지 신장세포주 (PK-15, ATCC-CCL 33)에 오염되어 있는 것을 발견하여 보고한 이래 여러 연구자들이 혈청학적검사에서 PCV가 돼지에 광범위하게 감염되어 있음을 확인하였다. 이후 여러 연구자들이 돼지 신장세포주 유래 PCV를 돼지에 인공감염을 시켰던 바, 돼지의 장기에서 증식은 가능하나 임상증상은 발현되지 않는다는 사실이 밝혀져 있었으나 1990년대 후반에는 이유자돈의 위축등을 소견으로 하는 전신소모성증후군 (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome: PMWS)이 PCV의 감

염과 연관이 있다고 보고되었다. PMWS 증상을 보이는 돼지에서 분리된 PCV와 돼지 신장세포주에서 분리된 PCV는 유전적, 항원적 특성이 많은 차이가 있음이 밝혀졌기 때문에 기존의 돼지 신장세포주에서 분리된 PCV를 PCV1, PMWS 증상을 보이는 돼지에서 분리된 PCV를 PCV2로 구별하여 명명하게 되었다. 이 질병은 점진적인 체중감소, 호흡곤란, 빈혈, 설사 그리고 황달등의 임상증상을 특징으로 하며 급성 발생의 경우 폐사율이 10%정도 이나 심한 경우에는 50%까지 이른다. 부검소견으로는 림프절 종대, 육아종성 간염, 신장염, 간질성 폐렴등이 관찰된다. 인공감염시험에서 PCV2의 단독감염시에는 경미한 PMWS 증상을 나타내었으나 돼지 파보바이러스(porcine parvovirus, PPV)나 돼지 생식기 호흡기증후군 바이러스(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)를 PCV2와 동시 감염시켰을 때에는 PMWS와 거의 유사한 증상을 재현시킬 수 있음이 보고 되었으며, PCV2는 PMWS 외에도 증식성 괴사성 폐렴 (proliferating and necrotizing pneumonia), 모돈의 유산 및 폐사증후군 (sow abortion and mortality syndrome), 돼지 피부염 및 신증 증후군(porcine dermatitis and nephropathy syndrome)등 다양한 질병과의 연관성이 있는 것으로 보고되었다.

## (2) 국내발생 현황

국내에서는 1997년 처음으로 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 발생이 보고되었으며 이래로 발병양상은 해를 거듭하면서 폭발적인 증가양상을 보이고 있다. 국내 첫 발병을 보고한 1997년과 1998년에는 10건의 발병도 발생되지 않았지만 1999년에는 50건으로 1998년보다 10배 이상 발병되었으며, 2001년에는 225건으로 2년 전보다는 3배, 국내에서 첫 발병해인 1997년보다는 100배 이상의 폭발적인 발병양상이 관찰되고 있었다. 국내의 자돈들 중 약 70%에서 돼지 썩코바이러스 2형에 이미 감염되어 있으며, 대한양돈협회의 자료를 살펴보면 최근 PCVAD로 인하여 전국적으로 모돈 95만두에 이유두수 10두, 모돈 2회전을 기준으로 할 때 연간 약 600만두가 폐사하고 있으며, 2007년 한국농촌경제연구원의 자료에 따르면 치료비용 및 관련 산업의 영향을 제외하고도 돼지 폐사로 인한 양돈농가의 손실액이 1조 1,840억원에 달한다고 보고되었다. 2010년부터 다양한 사독백신이 개발되었고 이들 사독백신은 PCV2의 감염을 막고 생산성을 증가시키는 등 효과가 좋은 것으로 평가되고 있다.

## (3) 문제점

백신 생산은 cell culture를 통한 생산이 주를 이루고 있으나 동물세포를 이용한 백신생산은 비교적 단가가 비싼 배양배지 및 동물세포배양기 등 생산비가 높으며, 또한 혈청배지에 포함된 다양한 이종단백질로 인하여 백신을 접종 시 이러한 이종단백질들에 의한 부작용 발생이 상존하고 있다. 바이러스 감염 및 임상증상의 전개와 관련한 병원성인자만을 발현하는 기술은 다국적기업들의 특허에 의하여 규제당하고 있는 실정이다. 이에, 병원체가 아닌 다른 미생물로부터 생산 및 분리 정제하여, 백신의 구성항원으로 사용하는 차세대 재조합 서브유닛 백신 기술을 중점적으로 개발할 필요가 있으며 국내 고유한 유전공학 기술을 이용한 서브유닛 백신 개발로 국외 다국적기업과의 경쟁력을 확보할 필요가 있다.

## 다. 마이코플라즈마 국내 현황 및 문제점

### (1) 질병의 개요

돼지 유행성폐렴(Mycoplasmal Pneumonia in Swine)은 swine enzootic pneumonia (SEP)으로 불린다. *Mycoplasma hyopneumoniae*가 원인체이며, 돼지에 감수성이 있고, 15~65일의 잠복기를 가진다. 계절과 관계없이 연중 발생하며 비말, 접촉, 공기전염이 가능하여 치사율은 낮지만 전염성, 이환률이 높은 질병이다. 무증상상태로 만성 경과하는 것이 많고, 건성기침, 발열, 식욕부진 등의 임상증상을 보이고, 병리학적으로는 회백색, 대황색, 담도색의 투명한 폐병변 소견을 가지며, 조직학적으로는 세기관지 및 혈관주위조직에 림프구의 현저한 침윤과 림프여포의 과형성, 폐포 및 기관지상피세포의 탈락 또는 퇴행성변화, 기관지점막 고유층의 비후의 소견이 보인다. 전 세계 각국에 분포하는 질병으로 우리나라 농가에서도 성장률의 지연과 사료 효율의 저하로 양돈업에 많은 경제적 손실을 초래하는 만성 소모성 호흡기 질환이다. 발생 연령은 모체이행항체가 소실되는 4~5주령에 가장 많이 발생되며, 병원체가 상부 호흡기도에 감염되어 기관의 편모와 상피세포를 파괴시키고 1차적인 방어기능을 약화시켜 폐의 탐식 세포 면역력을 저하시켜 특히 다른 호흡기질환(바이러스, 세균)의 2차감염에 의해 폐병변이 악화되어 육성, 비육돈까지 폐사율이 높아지는 특징을 보인다. 진단방법은 액상배지를 이용한 분리·동정과 형광항체법으로 원인체를 동정하는 방법과 보체결합반응, 간접혈구응집반응, 응집반응 등의 혈청학적 검사방법이 있다.

### (2) 국내 발생 현황

‘2013년도 전국 양돈장 질병 실태조사보고서’에 따르면 사육단계별 폐사·도태 원인 질병으로 유행성폐렴(이유부터 비육시기)이 포함되고 있으며, 예방접종률은 2012년 대비 10.1% 감소한 81.4%로 분석되었다. 연도별 프로파일 분포를 분석하였을 때 2009년 42.2%였던 안정농장이 2013년 8.8%로 나타나 약 30%정도 감소하였다. 안정농장은 2009~2012년 까지 67.5%로 증가하는 추세를 보인 후 2013년 55.9%로 11.6% 감소하였고, 감염농장은 2012년 대비 16% 증가하였다고 보고되었다.

### (3) 문제점

마이코플라스마는 세포벽이 없으며, 매우 작은 병원체로 폐조직 밖인 기관, 세기관지, 폐포벽의 섬모 또는 상피세포에 부착하고 증식하면서 섬모를 파괴하여, 섬모가 가지는 방어능력이나 이물질 제거능력을 손상시키고 섬모의 점액분비 기능도 떨어뜨려 2차적으로 감염을 쉽게 만든다. 마이코플라스마를 단순히 유행성 폐렴(SEP)의 원인체로만 생각하는 것은 마이코플라스마를 너무 과소평가 하는 것이다. 또한, PRRSV, PCV2 바이러스에 의한 혼합감염 시 호흡기 증상이 극심해 지고, PMWS 문제를 더욱 악화시킴에 따라 단일 마이코플라스마 백신보다는 혼합백신이 필요함을 알 수 있다. 백신 접종 비용의 절감 및 농가의 편의성을 위해 돼지 썬코바이러스증 뿐만 아니라 마이코플라스마성 폐렴을 동시에 예방할 수 있는 혼합백신 형태로 제품 개발이 필요한 실정이다. 현재, 국내 마이코플라스마 단일백신

은 허가등록 21개 제품으로 그 중 판매하고 있는 백신은 9종류(표 1)이며 전체 판매금액의 70억여 원의 80% 정도를 외국회사인 한국화이자동물약품의 레스피슈어-원과 베링거의 인겔백 마이코플렉스가 차지하고 있다.

표 1. 국내외 주요시장 경쟁사 / 마이코플라즈마성 폐렴 백신 관련 시장 조사

제조사	제품명	2010년도		2011년도	
		판매금액 (천원)	점유율 (%)	판매금액 (천원)	점유율 (%)
한국화이자동물약품(주)	레스피슈어-원	3,238,786	0.8	2,837,177	0.6
베링거인겔하임동물약품(주)	인겔백 마이코플렉스	1,989,955	0.5	2,795,952	0.6
인터넷코리아(주)	엠+팩(M+Pac)	1,082,986	0.3	513,216	0.1
한국화이자동물약품(주)	레스피슈어	484,458	0.1	475,957	0.1
메리알코리아(주)	스프린트백	373,674	0.1	270,018	0.1
(주)한국히프라	히프라 마이백	-	0	76,500	0
(주)코미팜	프로백 엠피에스	4,294	0	46,133	0
베링거인겔하임동물약품(주)	인겔백 엠하이오	419,185	0.1	45,200	0
메리알코리아(주)	하이오레스	139,948	0	31,524	0

출처: VPDP 자료

## 라. PRRS 국내 현황 및 문제점

### (1) PRRS 국내 현황 및 문제점

돼지 생식기 및 호흡기 증후군 (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS) 은 돼지에서 유산, 생식기능 저하, 호흡기 증상에 의한 비육저하 및 폐사를 일으키는 질병으로, 우리나라를 포함한 전 세계 양돈 산업에 엄청난 경제적인 피해를 주고 있으며 현재 가장 중요한 바이러스 질병중의 하나로 간주되고 있다. 이 같은 질병의 중요성 때문에 PRRS의 원인체인 PRRS 바이러스를 발견한 이후 약 20년 동안 이 바이러스에 대한 예방법을 개발하기 위해 많은 노력이 투자되었음에도 아직까지 효과적인 예방법 및 관리법이 개발되어지지 않은 실정이다. PRRS 바이러스의 제어가 힘든 가장 주된 이유는 1) 유전적으로 다양한 PRRS 바이러스가 바이러스들 간의 교차면역의 부재로 지속적인 재감염이 일어나고 있으며, 2) PRRS 바이러스의 면역반응과 병원성이 유전형에 따라 다양하고, 3) 시판되고 있는 약독화 백신이 빠르게 강독의 야외주 바이러스로 회귀하는 것이다. 따라서 이

러한 문제점으로 인한 효과적인 방어법의 부재와 국내에 유행하는 바이러스의 정확한 정보의 부재 및 국내 양돈장의 PRRS 유입 위험도의 분석 및 예상이 어렵다는 점이 PRRS의 청정화로 가는 길에 큰 걸림돌이 되고 있다.

## (2) 국내외 연구현황과 문제점

(가) **PRRS 바이러스의 분류** PRRS 바이러스는 말의 Equine arteritis virus (EAV)와 영장류의 Simian hemorrhagic fever virus (SHFV) 등과 같은 Arteriviridae family에 속하며 Coronaviridae와 같이 Nidovirales order로 분류된다. PRRS 바이러스는 대략 15 kb의 positive, single-strand RNA 유전자를 가진 envelope 바이러스로 유전적으로 30% 이상 차이를 보이는 North American PRRS 바이러스 (북미주, type II)와 European PRRS 바이러스 (유럽주, type I)로 구분되며 두 type은 항원적으로 또한 매우 다른 것으로 알려져 있다.

(나) **PRRS 바이러스의 구성** PRRS 바이러스는 최소 10개의 open reading frame (ORF)를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. ORF 1a와 1b는 바이러스의 복제에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nsp (비구조단백질, nonstructural protein) 1a 와 1β 및 2~12 등의 13개의 비구조단백질을 생산하며 ORF 2~7는 구조단백질을 생산한다. 이들 구조단백질 유전자 중 ORF 2a, 3와 4는 각각 GP2a, GP3 와 GP 같은 minor envelope 단백질을 생산하며 이들 세 단백질들은 바이러스 envelope 상에서 heterotrimer (GP2a/GP3/GP4) 구조를 이루고 있다. 나머지 minor envelope 단백질은 GP2b 또는 E 단백질은 ORF2a에 포함된 ORF2b에 의해 생산되며 ion channel의 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. ORF 5 와 6는 각각 major envelope (GP5) 단백질과 membrane (M) 단백질을 생산하며 이 두 단백질은 heterodimer (GP5/M) 구조로 envelope 상에 존재한다. 이들 envelope 위의 heterotrimer 와 heterodimer 구조들은 바이러스와 세포 간의 결합에 아주 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 바이러스 중화항체 생성과 바이러스 독력에 밀접하게 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 마지막으로 ORF7은 바이러스의 nucleocapsid (N) 단백질을 생산한다(그림 1, 2). 바이러스 감염 초기에 N 단백질에 대하여 높은 수준의 항체가 생산되지만 이들 초기 항체들은 바이러스의 중화 작용이 없는 항체들이다.

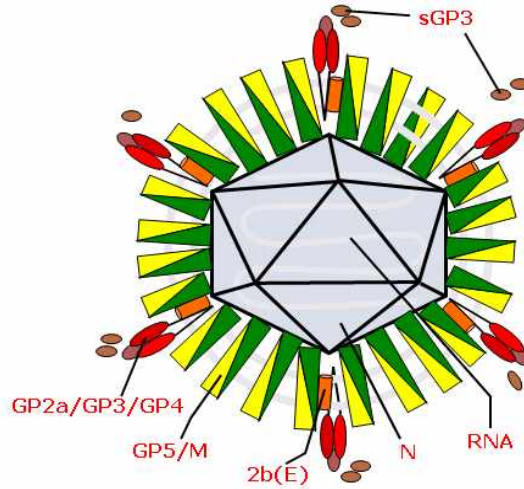


그림 1. PRRS 바이러스 입자의 구조

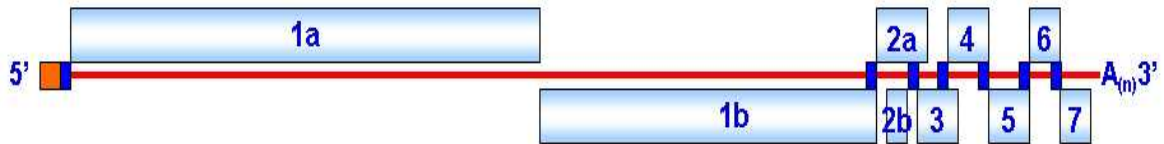


그림 2. PRRS 바이러스 유전자의 구성

(다) **PRRS 바이러스의 다양한 유전형** PRRS 바이러스는 미국에서 1987년에 처음으로 발견되었고, 그 후 몇 년 뒤인 1991년에 네델란드에서 확연히 다른 type의 PRRS 바이러스가 발견되었다. 이 후에 미국에서 발견된 type은 북미주 (North American 또는 type II)로 유럽에서 발견된 type은 유럽주 (European 또는 type I)로 분류가 되었다. 이들 PRRS 바이러스들은 유전적으로 매우 다양해서 North American type과 European type의 바이러스들은 유전적으로 30% 이상의 차이를 보이는 것은 물론이고, 같은 type의 PRRS 바이러스들도 일반적으로 5~20%의 유전적 차이를 보인다. 이와 같이 유전적으로 다른 두 바이러스들 간에는 효과적인 교차방어가 성립되지 않으므로 이 전에 PRRS 바이러스에 감염이 되었다하더라도 다른 유전형의 PRRS 바이러스에 의해 재감염이 빈번히 일어난다. 따라서 현재 시판되고 있는 약독화 백신들 (Ingelvac® PRRS MLV와 Ingelvac® PRRS ATP)은 유전적으로 다른 PRRS 바이러스들의 감염을 효과적으로 방어할 수가 없는 것으로 알려져 있다. 최근에 본 연구진은 다양한 PRRS 바이러스들 간의 교차면역에 대한 reverse genetics을 이용한 연구를 통하여 ORF 2~6의 구조단백질 유전자들이 다양한 PRRS 바이러스들 간의 교차중화항체 생성에 중요한 역할을 하고 있으며, 특히 ORF3, ORF5, 및 ORF6가 교차면역반응을 유도하는데 중요하다는 것을 밝혀내었다.

(라) **PRRS 바이러스의 다양한 면역반응과 병원성** PRRS 바이러스에 대한 방어에는 중화항체와 interferon-gamma를 분비하는 T cell의 작용이 모두 중요한 것으로 알려져 있다. 하지만, 다양한 유전형의 PRRS 바이러스들은 동물에 감염 시에 다양한 수준

의 면역반응을 일으킨다. 즉, 많은 PRRS 바이러스들이 감염 후에도 inflammatory cytokines과 type I interferon을 생산하지 않고 이 후에도 높은 중화항체거나 interferon-gamma를 분비하는 T cell를 생산하지도 않는 반면, 어떤 PRRS 바이러스들은 높은 수준의 중화항체와 interferon-gamma를 생산하여 높은 방어면역을 일으키기도 한다. 최근의 일련의 연구들에 의해 PRRS 바이러스의 nsp1 $\beta$ 가 inflammatory cytokines과 type I interferon의 분비와 관계가 있음이 밝혀졌지만 이러한 바이러스 간의 차이를 설명할 수 있는 정확한 유전자의 위치는 아직 알려지지 않았다. 또한 PRRS 바이러스들은 유전형에 따라 다양한 병원성을 보이는 것으로 보고가 되어있지만 병원성에 따른 바이러스의 체계적인 분류법이 개발되어 있지 않고 이러한 다양한 병원성의 기전은 아직 밝혀지지 않았다.

(마) **PRRS 바이러스 백신과 예방법**      능동적으로 증식하지 않는 불활화 백신 또는 ORF5 단백질 등의 일부 바이러스 단백질을 이용한 recombinant 백신은 효과적인 방어면역을 유도하지 못함으로 약독화 백신이 많이 사용되고 있다. 하지만, 시판되는 약독 백신들은 매우 빠르게 강독의 야외주 바이러스로 회귀해 버려 백신을 사용한 농장에 전파되어 또 다른 문제를 야기하기도 한다. 본 연구진은 이러한 약독 백신들의 야외주 바이러스의 회귀에 대한 연구를 바탕으로 PRRS 바이러스의 독력을 결정하는 유전자를 찾아내었고, 이 들 유전자를 PRRS 바이러스 infectious cDNA clone에 도입하여 백신 platform을 개발하였다. 하지만, 안정성이 높은 백신을 생산하기 위하여서는 약독화 백신의 강독 바이러스로의 변이를 막아내는 방법에 대한 연구가 시급하다. 또 다른 PRRS 바이러스에 대한 예방법으로, 시판되는 약독 백신들이 다양한 PRRS 바이러스들의 감염을 효과적으로 방어하지 못 하기 때문에 바이러스에 감염된 돼지의 혈청을 같은 농장의 돼지에 접종하여 바이러스에 노출시키는 serum therapy도 많이 이용되고 있다. 하지만, 이 방법은 강독의 야외주 바이러스를 그대로 씌므로 높은 위험이 따르고 다른 유전형의 유입을 빨리 알 수 있고 관리할 수 있는 시스템이 잘 갖추어진 농장에서 제한적으로 사용되어야 한다. PRRS 바이러스 단백질을 adenovirus 등에 도입하여 생산된 백신들도 마우스에 접종하였을 때 PRRS 바이러스 특이 면역을 일으키는 데는 성공하였으나 돼지를 이용한 동물실험에서는 괄목할 만한 성과를 얻지는 못하였다. PRRS 바이러스 유전자를 이용한 DNA 백신 또한 마우스 등을 이용한 실험에서 바이러스 특이 면역을 유도하는 데는 성공하였으나 실제로 돼지에서 상용화하기에는 현실적으로는 어려운 수준이다.

(바) **PRRS 국내 발생 양상**      PRRSV가 국내에 유입된 이후 급속히 확산되어 현재는 전국적으로 발생하고 있으며, 농장마다 다양한 변이주들이 동시에 감염되어 있는 경우가 대부분이다. 또한 농장상황에 따라 다른 질병의 동시감염과 사양관리상의 스트레스 요인이 질병의 발병양상이 다양하게 나타나고 있다. 돼지호흡기생식기증후군 (PRRS)은 단일질병으로 양돈업에 미치는 경제적 피해가 가장 큰 질병 중의 하나로 대부분의 국가에서 상재성으로 발생하고 있으며 한국은 약 1000억원의 직접적인 손실을 입고 있다.

(사) 최근의 국내 양돈장의 PRRS 발생양상을 분석하면 다음과 같은 특징을 나타내고 있다.

- ① 임상증상이 뚜렷하지 않은 준임상형 PRRS의 출현: 국내 유입초기에는 발생농장에 폭발적인 유사산과 자돈의 호흡기질병 악화로 인한 폐사율의 증가 등 뚜렷한 임상증상을 유발하던 전형적인 급성형의 생식기 호흡기형이 많았다. 그러나 현재는 임상증상이 뚜렷하지 않고 피해 정도도 명확하게 눈에 띄지 않는 준임상형으로 그 양상이 많이 바뀌어 졌다. 이에 따라 양돈업계 전반에 PRRS 질병에 대한 경각심이 저하되었고, 별다른 방역대책 없이 돼지를 사육하거나 판매, 이동하게 됨으로써 농장내의 지속 감염이나 타 농장으로의 질병 확산을 가속화하는 결과를 낳게 되었다.
- ② 단독감염에서 복합, 만성형으로 변화: 호흡기질병이 만연해 있는 국내 양돈 상황에서 PRRS가 다른 세균성 또는 바이러스성 호흡기질병 원인체와 혼합감염되는 호흡기질병복합감염증(porcine respiratory disease complex, PRDC) 형태로 질병양상이 변화하고 있다. PRDC는 PRRS, 인플루엔자, 돼지썩코바이러스 및 마이코플라즈마가 주로 원인체가 되며, 기타 세균성 호흡기질병이 혼합감염되어 복합적인 호흡기질병을 유발하는 것으로 외국에서도 많은 피해사례가 보고되고 있으며, 우리나라에서도 많은 농장에서 이러한 PRDC로 인한 피해를 호소하고 있는 실정이다. 또 일부 농장에서는 살모넬라병이 복합감염되어 40% 이상의 높은 육성돈 폐사로 인해 막대한 피해를 입고 있으며, 이 경우 부검소견이 돼지지열병과 유사하게 나타나기 때문에 당황하게 된다. 이러한 다양한 PRRS의 복합감염상황에서 적절한 피해 방지대책을 세우기 위해서는 무엇보다 정확한 진단이 우선되어야 하므로 가축질병 진단기관과 상의하여 정확한 진단을 받아야 한다. 최근에는 돼지 썩코바이러스와 인플루엔자 바이러스의 발생동향이 심상치 않아 이들 질병까지 가세하고 있는 것으로 판단된다. 따라서 앞으로의 PRRS 및 호흡기질병의 방제를 위해서는 단일 원인체의 방어를 목표로 할 것이 아니라 PRDC의 방제차원에서 종합적인 호흡기질병 방제대책을 수립, 적용해야 PRRS 및 호흡기질병의 피해를 경감시킬 수 있다.
- ③ 북미형과 유럽형 그리고 다양한 변이주의 출현: 변이를 병원성의 각도에서 보면 2가지 방향 즉, 앞서 언급한대로 준임상형의 출현 등 병원성이 약한 쪽으로도 진행이 되지만, 90년대 후반 들어 미국에서 모든의 심한 폐사를 동반한 급성 PRRS(Acute PRRS, 또는 Atypical PRRS)의 예와 같이 병원성이 강한 쪽으로도 변이가 이루어질 수 있다는 사실을 주목해야 한다. 특히 최근 우리나라에서도 기존의 북미형 바이러스와 함께 유럽형의 바이러스가 동일농장에 감염되어 있는 경우가 많이 검색된다. 이러한 다양한 변이주의 출현은 향후 PRRS 질병에 대한 진단과 예방 등 방역대책을 수립, 추진하는데 큰 장애요인이 될 것이므로 이 부분에 대한 정부 및 학계의 지속적인 연구가 뒤따라야 될 것으로 판단된다.



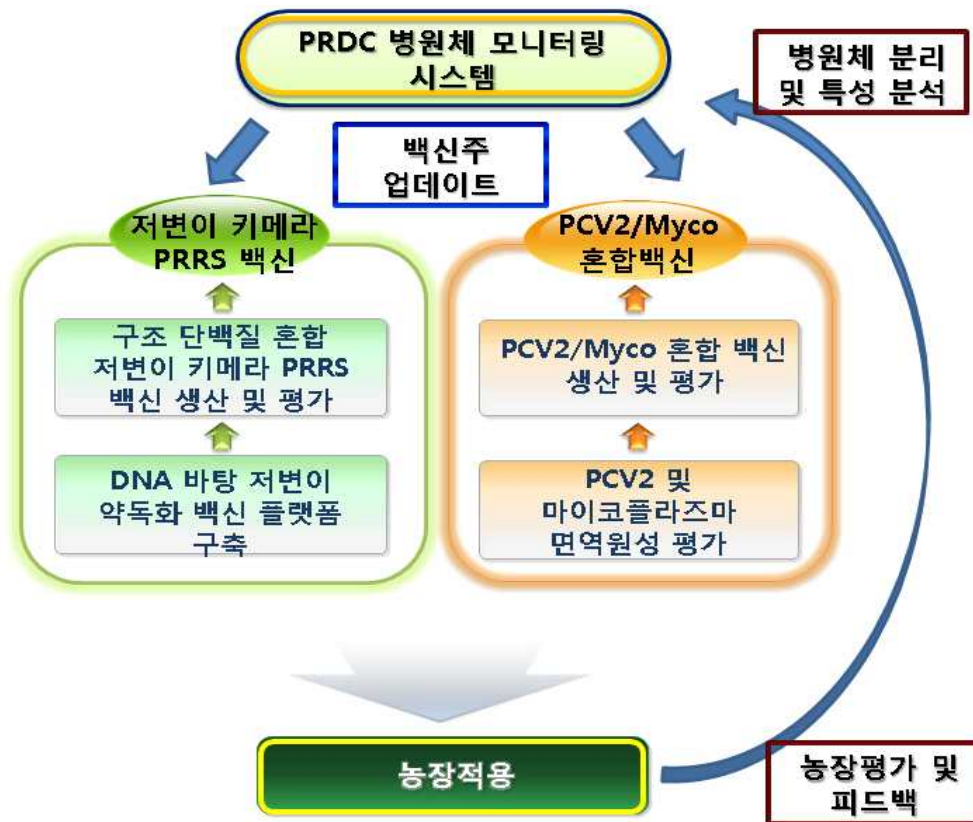
따라서 본 연구과제에서는 국내 양돈장의 PRDC에 의한 피해를 최소화하기 위해 크게 아래의 최종 목표를 가지고 진행될 예정이다.

- 1) 국내에 발생하는 PRRSV의 유전형과 병원성 및 면역학적인 특성 분석 시스템을 바탕으로 다양한 국내 바이러스 주를 예방할 수 있는 저변이 PRRS 키메라 백신을 개발하고
- 2) 마이코플라즈마의 감염과 다른 유전형의 PCV2 바이러스들 간의 교차방어 효과 및 안전성이 증명된 PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신을 개발하고 산업화하고자 함이다.

**PRRSV 근절의 문제점과 본 과제에서의 연구방향 및 기대효과**

PRRS 바이러스 근절의 문제점	질병관리의 문제점	연구개발현황	본 과제의 연구 수행 목표
다양한 유전적 변이형의 존재	다른 유전형 간에는 교차방어가 되지 않으므로 다양한 유전형의 바이러스를 막아낼 백신 개발이 어려움	다양한 PRRSV의 교차방어를 유도하는 중요 T 세포 및 B 세포 에피토프들이 보고되어 있음	다양한 PRRSV의 증식에 필수적인 단백질의 기능을 억제하는 항체 및 T 세포 반응을 유도하는 유전자들을 혼합하여 키메라 백신을 개발
동물에서 약한 면역반응의 유발	많은 PRRSV들이 감염 시에 높은 수준의 면역을 형성하지 않음으로 효과적인 백신의 개발이 어려움	효과적인 면역반응을 일으키는 PRRSV 유전형을 백신 platform으로 사용하여 키메라 바이러스 생산	효과적인 면역반응을 일으키는 유전형을 백신의 platform으로 사용함으로써 일정하고 높은 수준의 방어 면역 형성이 가능함
사독 및 유전자 재조합 백신 등의 불활화 백신은 효과적인 면역반응을 일으키지 못함	안전성이 뛰어난 불활화 백신이나 재조합 백신의 개발이 어려움	PRRSV의 독력에 관계하는 유전자의 조작에 의하여 안전한 약독화 백신 개발	면역방어능이 뛰어나고 안정성이 우수한 저변이 백신의 개발로 효과적인 질병관리가 가능함
시판되는 약독화 백신의 빠른 독력화	약독화 백신이 빠른 속도로 강독의	바이러스의 유전자 변이에 대한 내성에	백신의 강독 바이러스로의

(reversion)	야외주로 변화함으로 또 다른 질병을 야기함	관계된 유전자를 찾아내고 백신 플랫폼에 도입하여 백신의 안정성을 높임	회귀를 막아냄으로 백신의 부작용을 최소화함
-------------	-------------------------------	--	-------------------------------



<PRDC의 효과적인 예방 및 관리를 위한 본 연구과제의 개발 목표>

### 3. 연구개발 범위

가. 다양한 국내 유행 PRRSV의 감염에 효과적으로 대응할 수 있는 DNA 바탕 약독화 백신 생산 시스템의 개발

- (1) 국내 양돈장 유행 PRRSV의 유전자 정보의 실시간 모니터링 시스템 구축
- (2) 국내 유행 PRRSV의 방어면역 관련 유전자를 DNA 바탕 약독화 백신 플랫폼 시스템에 도입하여 다양한 국내 유행 PRRSV들에 대응할 수 있는 백신 생산 시스템의 개발

나. 공격접종실험과 농장적용 실험을 바탕으로 PRRS의 호흡기증상과 유산 예방 효과 및 안전성이 증명된 저변이 키메라 PRRS 백신의 개발 및 산업화 준비

- (1) 저변이 키메라 PRRS 백신의 공격접종실험을 통한 호흡기증상과 유산 예방 효과 및 안전성 평가
- (2) 저변이 키메라 PRRS 백신의 유전자 변이 안정성 및 병원성 회복 억제능 평가
- (3) 저변이 키메라 PRRS 백신의 PRRS 상시 발생 농장 적용을 통한 방어효능과 안전성 평가

다. 공격접종실험과 농장적용 실험을 바탕으로 마이코플라즈마의 감염과 다른 유전형의 PCV2 바이러스들 간의 교차방어 효과 및 안전성이 증명된 PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신의 개발 및 산업화

- (1) 동물실험을 바탕으로 마이코플라즈마의 면역원성 물질에 대한 효력 평가와 PCV2a, 2b, 2b 변이종에 교차방어 여부 평가
- (2) PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신 생산 및 공격접종실험을 통한 혼합 백신의 방어효능과 안전성 평가
- (3) PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신의 야외농장에서의 방어효능 및 안전성 평가
- (4) 혼합백신의 동물약품 허가 추진과 산업화

## 제 2장. 연구수행 내용 및 결과

### 제 1절. 다양한 유전형의 국내 PRRSV를 예방할 수 있는 저변이 키메라백신의 개발 (제1세부)

[1차년도]

#### 1. 국내 양돈장 유행 PRRSV 유전자 정보의 실시간 모니터링 시스템 구축

가. 국내 양돈장내 유행하는 PRRSV의 분리 및 기초 특성 분석

(1) 유전자 분석이 가능한 총 229호의 가검물로부터 PRRSV 항원타입(EU/NA) 확인하였다. Type 1(EU Type)은 80호, Type 2(NA type)는 96호, 그리고 Type 1/2(EU/NA)는 27호로 분류되었다.

(2) PRRS 양성 가검물을 확보 하여 세포를 이용한 바이러스 분리를 진행하였다.

(가) Type 1 (EU Type)

- ① 107개의 Type 1(EU type) PRRSV PAM에서 분리 시도
- ② 36개의 Type 1(EU type) PRRSV CPE 관찰
- ③ 계대배양 및 바이러스 특성 분석 중



그림 1. PRRSV isolates in PAM

(가) Type 2 (NA Type)

- ① 123개의 Type 2(NA type) PRRSV Marc-145 에서 분리 시도

② 53개의 Type 2(NA type) PRRSV CPE 관찰

③ 계대배양 및 바이러스 특성 분석 중

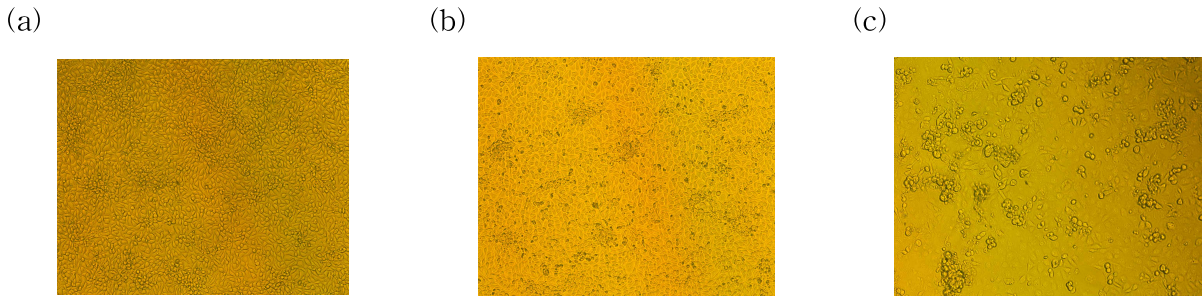


그림 2. PRRSV isolates in MARC 145

(3) 검출된 바이러스 구조단백질(ORF5)에 대한 유전자 증폭 및 단백질 염기서열 분석하였다. 국내에서 검출된 국내에서 검출된 120개의 Type 1(EU Type) PRRSV와 Prototype virus(LV)간의 상동성 분석한 결과 Nucleotide는 86.14%~98.35%의 상동성을 보였고 Amino acid는 84.65%~96.53%의 상동성을 보였다.

(4) 국내에서 검출된 국내에서 Type 2(NA Type) 86개는 PRRSV와 Prototype virus(VR2332)간의 상동성 분석한 결과 Nucleotide는 83.58%~99.34%의 상동성을 보였고 Amino acid는 81.59%~99.00%의 상동성을 보였다. (표1)

표 1. 2015년 분리 및 등록 PRRSV ORF5

Genotype	Prototype	Number of isolates	Nucleotide (%)	Amino acid (%)
Type 1	LV	120	86.14~98.35	84.65~96.53
Type 2	VR-2332	86	83.58~99.34	81.59~99.00

(5) 국내에서 2015년 동안 검출된 PRRSV의 ORF5 유전자는 참고 유전자와 함께 분석한 결과 (Phylogenetic analysis), Type 1(EU type) PRRSV는 subtype 1로 분류되었다. 한편, Type 2(NA type) PRRSV는 Lineage 1, 5 그리고 새로운 그룹으로 분류되었다(그림3).

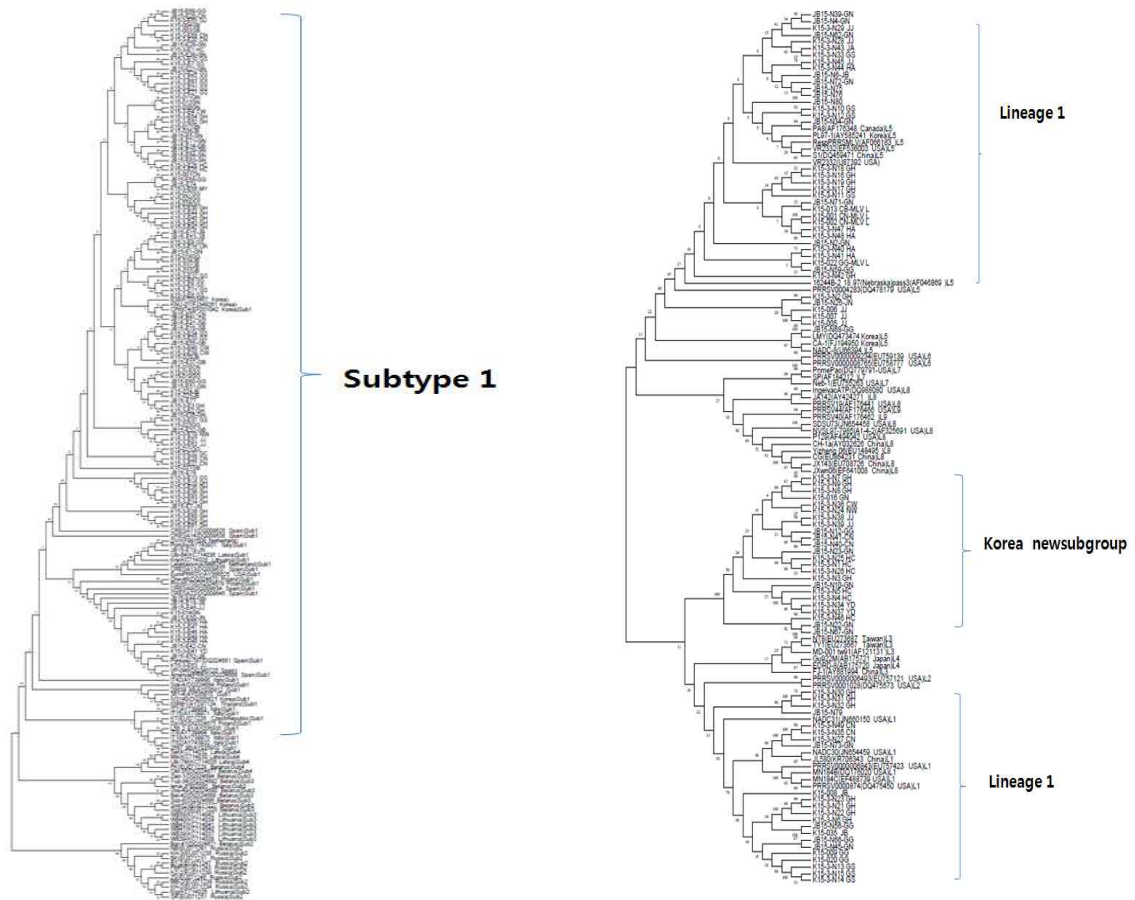


그림 3. PRRSV EU ORF5 NT phylogenetic tree 및 PRRSV NA ORF5 NT phylogenetic tree

(6) 백신주와 같은 cluster에 포함되는 PRRSV 분리주들은 백신주의 변이로 추정된다. 또한, 지리적으로 인접한 지역에서 분리된 바이러스들은 대부분 지역간 염기서열의 유사성은 보였지만, 유사성이 상이한 분리주들도 확인되었다. 이전에 분리된 국내 분리주와의 상관관계에서도 같은 지역에서 분리된 바이러스는 동일한 cluster에 포함되는 것으로 보아 이전 분리주들의 변이로 추정할 수 있다. 이제까지의 결과는 유전자 변이가 심하게 일어나거나 외부에서 유입된 바이러스는 없는 것으로 추정된다.

나. 국내 유행 PRRS 바이러스의 면역원성, 병원성 분석 및 बैं킹 관리

(1) 현재 40주의 바이러스 분리를 수행하여 한국수의유전자원은행(KVCC)에 기탁하였다.

표 2. 2015년 분리 및 등록 PRRSV strains

번호	학명	개체번호	KVCC (기탁번호)
1	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J163	KVCC - VR1500089
2	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J78	KVCC - VR1500090
3	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J80	KVCC - VR1500091
4	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J81	KVCC - VR1500092
5	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J82	KVCC - VR1500093
6	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J83	KVCC - VR1500094

7	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J85	KVCC - VR1500095
8	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J166	KVCC - VR1500096
9	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J86	KVCC - VR1500097
10	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J88	KVCC - VR1500098
11	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J167	KVCC - VR1500099
12	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J90	KVCC - VR1500100
13	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J92	KVCC - VR1500101
14	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J93	KVCC - VR1500102
15	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J94	KVCC - VR1500103
16	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J96	KVCC - VR1500104
17	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J170	KVCC - VR1500105
18	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J97	KVCC - VR1500106
19	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J175	KVCC - VR1500107
20	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J98	KVCC - VR1500108
21	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J176	KVCC - VR1500109
22	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J100	KVCC - VR1500110
23	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J179	KVCC - VR1500111
24	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J180	KVCC - VR1500112
25	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J181	KVCC - VR1500113
26	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J102	KVCC - VR1500114
27	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J182	KVCC - VR1500115
28	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J103	KVCC - VR1500116
29	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J184	KVCC - VR1500117
30	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J185	KVCC - VR1500118
31	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J107	KVCC - VR1500119
32	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J186	KVCC - VR1500120
33	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J109	KVCC - VR1500121
34	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J190	KVCC - VR1500122
35	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J192	KVCC - VR1500123
36	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J193	KVCC - VR1500124
37	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J113	KVCC - VR1500125
38	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J194	KVCC - VR1500126
39	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J116	KVCC - VR1500127
40	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J121	KVCC - VR1500128

다. KAHIS 유전자변이관리시스템을 이용한 유전자 정보 보존 및 활용 PRRSV 변이 추적 시스템과 연계하여 PRRSV 유전자 데이터베이스 구축

- (1) 분리된 PRRSV의 ORF5 유전자를 분석, PRRSV 변이 추적 시스템과 연계하여 PRRSV 유전자 데이터베이스 구축하였다. 국가동물방역통합시스템(www.kahis.go.kr)에 1년차(2015)에는 299개(C15002448~C15002747)를 등록하였다(그림 4).

국가동물방역통합시스템(KAHIS) (ver. 9.2.0.330)

KAHIS 국가동물방역통합시스템

유전자변이관리 > 변이분석관리 > 변이분석접수대장

바이러스: PRRSV  
 변이분석접수일: 2015-07-01 ~ 2016-06-06  
 신청구분: 전체  
 농장명: [ ]  
 시료번호: [ ]  
 변이분석신청기관: [ ]  
 농장주소: 전체

※신변종확인 "확인대기" 상태만 선택이 가능합니다.

시료번호	변이분석접수일	변이분석접수번호	바이러스	신청구분	농장명	농장주소	변이분석신청기관	분석상태	신변종확인
<input type="checkbox"/>	C15002459	2015-11-25	AV15000511	PRRSV	수기등록	신안군	산검역본부 동식물위생	분석완료	확인대기
<input type="checkbox"/>	C15002458	2015-11-25	AV15000510	PRRSV	수기등록	익산시 오산면	산검역본부 동식물위생	분석완료	확인대기
<input type="checkbox"/>	C15002457	2015-11-24	AV15000509	PRRSV	수기등록	고창군	산검역본부 동식물위생	분석완료	확인대기
<input type="checkbox"/>	C15002456	2015-11-24	AV15000508	PRRSV	수기등록	경산시	산검역본부 동식물위생	분석완료	확인대기
<input type="checkbox"/>	C15002455	2015-11-24	AV15000507	PRRSV	수기등록		산검역본부 동식물위생	분석완료	확인대기
<input type="checkbox"/>	C15002454	2015-11-24	AV15000506	PRRSV	수기등록	창원시	산검역본부 동식물위생	분석완료	확인대기
<input type="checkbox"/>	C15002453	2015-11-24	AV15000505	PRRSV	수기등록	순천시 낙안면	산검역본부 동식물위생	분석완료	확인대기
<input type="checkbox"/>	C15002452	2015-11-24	AV15000504	PRRSV	수기등록	임실군 운암면	산검역본부 동식물위생	분석완료	확인대기
<input type="checkbox"/>	C15002451	2015-11-24	AV15000503	PRRSV	수기등록	고성면 개천면	산검역본부 동식물위생	분석완료	확인대기
<input type="checkbox"/>	C15002450	2015-11-24	AV15000502	PRRSV	수기등록	합천군 옥곡면	산검역본부 동식물위생	분석완료	확인대기
<input type="checkbox"/>	C15002449	2015-11-24	AV15000501	PRRSV	수기등록	하동군 약양면	산검역본부 동식물위생	분석완료	확인대기
<input type="checkbox"/>	C15002448	2015-11-24	AV15000500	PRRSV	수기등록	하동군 북천면	산검역본부 동식물위생	분석완료	확인대기
합계		300							

그림 4. 2015년 국가동물방역통합시스템 유전자 접수증거

## 2. 다양한 유전형의 국내 PRRSV를 예방할 수 있는 저변이 키메라백신의 개발

### 가. 저변이 키메라 PRRS 백신 생산

- (1) 본 연구팀의 선행연구 결과를 바탕으로 PRRS 야외주 바이러스와 백신주 바이러스의 유전자를 비교분석하여 병원성과 관련된 유전자들을 선별하고 이들 유전자들이 포함된 변이 바이러스를 생산하고 돼지에 접종하여 병원성을 평가하는 방법으로 PRRSV의 병원성이 ORF1a, ORF2와 ORF6에 포함되어있다는 것을 증명하였다 (특허출원: PRRSV 변이주 및 이를 포함하는 돼지 생식기 호흡기 증후군 예방 또는 치료용 백신 조성물, 출원번호 10-2014-0104848).
- (2) 또한 본연구팀은 또 다른 선행연구 결과, 바이러스의 RNA에 치명적인 변이를 일으키는 항바이러스성 변이제의 일종인 리바비린이 포함된 배지에서 연속 계대하여 선발한 리바비린 저항성 PRRSV 변이주 중 돼지에서 연속적으로 계대감염하여도 유전자의 변이를 거의 보이지 않는 저변이 약독화 바이러스를 선별하였으며 이러한 변이바이러스 들의 유전자를 분석하여 변이에 관련된 유전자가 nsp2와 nsp7 단백질에 존재한다는 것을 증명하였다 (특허출원: 유전적으로 안정된 약독화 돼지생식기호흡기증후군 바이러스 및 이를 포함하는 돼지생식기호흡기증후군 예방 또는 치료용 백신 조성물, 출원번호 10-2014-0167449).



- (3) 따라서 저변이 키메라 PRRS 백신을 생산하기 위해 위의 병원성과 관련된 ORF1a (nsp1 $\beta$ ) 유전자를 약독화 백신 바이러스인 MLV 염기서열로 치환하고 변이에 관련된 nsp2와 nsp7 유전자를 치환한 VR2332 기반 감염성 클론을 이용하여 구조 유전자 (ORFs 2-6)을 국내 분리 PRRS 바이러스 주로 치환한 키메라 백신을 생산하였다.
- (4) 즉 ORF5 유전자 기준으로 10% 이상의 차이가 나는 두 북미형 바이러스들 (K07-2273 과 K08-1054)의 ORFs 2-4와 ORFs 5-6 유전자를 각각 치환하여 저변이 키메라 약독화 백신(CB1)을 생산하였다(그림 5).

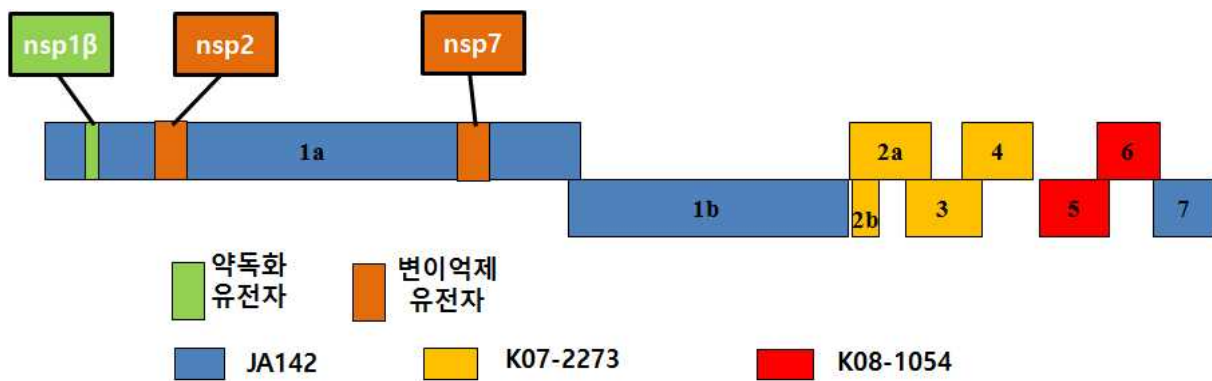


그림 5. 저변이 키메라 PRRS 백신 (CB1) 생산

나. 저변이 키메라 PRRS 백신의 자돈 호흡기 증상 예방 효과 및 안전성 평가

- (1) 위와 같이 생산된 CB1 백신 후보주를 현재 가장 많이 사용되고 있는 약독화 백신 (Ingelvac MLV)과 비교하여 북미형 바이러스 (VR2332)와 유럽형 바이러스 (EUD40) 등의 다양한 바이러스에 대한 예방효과와 안전성을 평가하기 위하여 자돈을 이용하여 평가하였다.
- (2) 즉, PRRS 음성인 4주령 자돈 18마리를 구매하여 6마리씩 3 그룹으로 나누어 3개의 돈 방에 사육한다. 3일간 순치를 실시한 후 그룹 1은 CB1 백신 후보주를  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml로 근육 접종하였고 그룹 2는 MLV 백신 바이러스를  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml로 근육 접종하였다. 그룹 3은 비접종군으로 처치하였다.
- (3) 백신을 접종한 4주 후에 각 그룹의 자돈을 3마리씩 더 분리하여 각각 VR2332 또는 EUD40 바이러스 주를  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/m로 비강 접종하였고 2주간 관찰 후 부검을 실시하였다 (표3).

표 3. CB1 백신후보주 효능 및 안전성 평가를 위한 동물실험

그룹	백신접종	공격접종	비교
1	CB1	VR2332	CB1/VR2332
		EUD40	CB1/EUD40
2	MLV	VR2332	MLV/VR2332
		EUD40	MLV/EUD40
3	미접종	VR2332	VR2332 공격접종 대조군
		EUD40	EUD40 공격 접종 대조군

(4) CB1과 MLV를 접종한 뒤 4주 동안 혈중 바이러스 농도를 측정하고 임상증상을 관찰한 결과 MLV 접종 그룹과 비교하여 특이적인 임상증상을 관찰할 수 없었으며 비슷한 수준의 혈중 바이러스 농도가 검출되었다. 즉 4주간  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml 이하의 혈중 바이러스 역가가 관찰되어 전형적인 약독화 바이러스의 증식 수준을 보였다(그림 6, After vaccination).

### Serum viremia

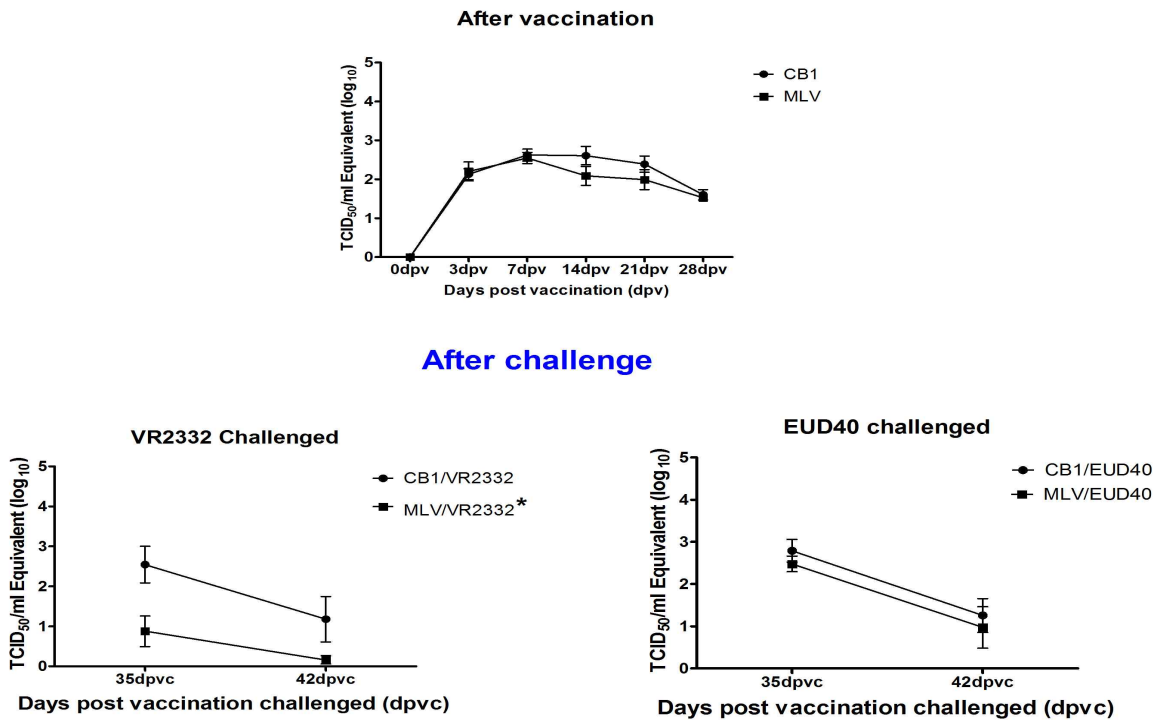


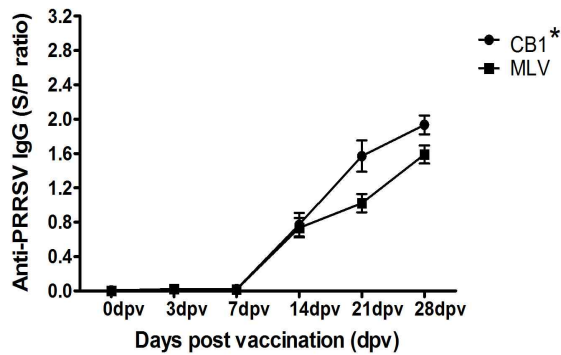
그림 6. CB1과 MLV 백신 후 및 북미형과 유럽형 바이러스 공격접종 후 혈중 바이러스 농도

(5) VR2332 또는 EUD40 공격접종 후 2주간 혈중 바이러스 농도를 측정한 결과 MLV 백신은 전체적인 유전자 상동성이 높은 북미형 바이러스인 VR2332에 다소 높은 수준의 방어력을 보였고 유럽형 바이러스인 EUD40에 대해 CB1와 MLV 모두 비슷한 수준의 예방효과를 보였다(그림 6, After challenge).

- (6) 비슷하게 CB1과 MLV를 접종한 뒤 4주 동안 ELISA 항체가를 측정한 결과 두 그룹 모두 비슷한 수준의 항체가가 검출되었다(그림 7, After vaccination).
- (7) VR2332 또는 EUD40 공격접종 후 2주간 ELISA 항체가를 측정한 결과 MLV 백신은 전체적인 유전자 상동성이 높은 북미형 바이러스인 VR2332 공격감염 후에 다소 낮은 수준의 항체가 유도를 보였고 유럽형 바이러스인 EUD40 공격감염 후에 CB1와 MLV 모두 비슷한 수준의 항체가 유도를 보였다(그림 7, After challenge).

## Serum ELISA

### After vaccination



### After challenged

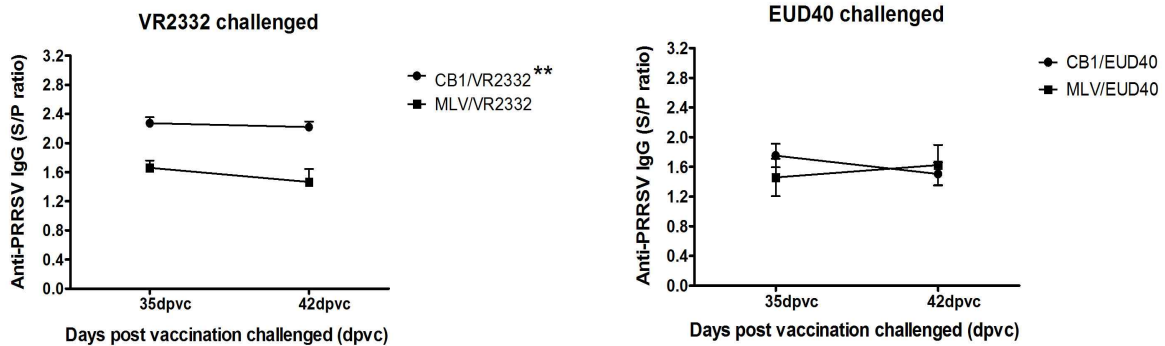


그림 7. GB1과 MLV 백신 후 및 북미형과 유럽형 바이러스 공격접종 후 ELISA 항체 역가

- (8) 비슷하게 CB1과 MLV를 접종 4주 후에 바이러스 중화항체가를 측정한 결과 MLV 백신 접종 그룹은 전체적인 유전자 상동성이 높은 북미형 바이러스 VR2332에 높은 수준의 중화항체가를 유도하였고 CB1 접종 그룹은 VR2332 및 FL12, K07-2273, K08-1054 등의 다양한 바이러스에 낮은 수준이지만 폭넓은 중화항체가를 유도하였다 (그림 8).

- (9) VR2332 또는 EUD40 공격접종 2주 후에 폐 내 잔존 바이러스 농도를 측정한 결과 MLV 백신은 전체적인 유전자 상동성이 높은 북미형 바이러스인 VR2332 공격감염에 유의적으로 낮은 수준의 바이러스 농도를 보였고 유럽형 바이러스인 EUD40에 대해 CB1와 MLV 모두 비슷한 수준의 폐 내 잔존 바이러스 농도를 보였다. 반면 VR2332 또는 EUD40 공격접종 2주 후에 폐 병변을 평가한 결과 CB1을 접종한 그룹이 MLV를 접종한 그룹과 비교하여 VR2332를 공격접종 후 낮은 수준의 폐병변을 보였으며 EUD40 공격접종 후 비슷한 수준의 폐 병변이 관찰되었다(그림 9).
- (10) 비슷하게 CB1과 MLV를 접종 4주 후에 바이러스 중화항체가를 측정한 결과 MLV 백신 접종 그룹은 전체적인 유전자 상동성이 높은 북미형 바이러스 VR2332에 높은 수준의 중화항체가를 유도하였고 CB1 접종 그룹은 VR2332 및 FL12, K07-2273, K08-1054 등의 다양한 바이러스에 낮은 수준이지만 폭넓은 중화항체가를 유도하였다 (그림 8).
- (11) VR2332 또는 EUD40 공격접종 2주 후에 폐 내 잔존 바이러스 농도를 측정한 결과 MLV 백신은 전체적인 유전자 상동성이 높은 북미형 바이러스인 VR2332 공격감염에 유의적으로 낮은 수준의 바이러스 농도를 보였고 유럽형 바이러스인 EUD40에 대해 CB1와 MLV 모두 비슷한 수준의 폐 내 잔존 바이러스 농도를 보였다. 반면 VR2332 또는 EUD40 공격접종 2주 후에 폐 병변을 평가한 결과 CB1을 접종한 그룹이 MLV를 접종한 그룹과 비교하여 VR2332를 공격접종 후 낮은 수준의 폐병변을 보였으며 EUD40 공격접종 후 비슷한 수준의 폐 병변이 관찰되었다(그림 9).

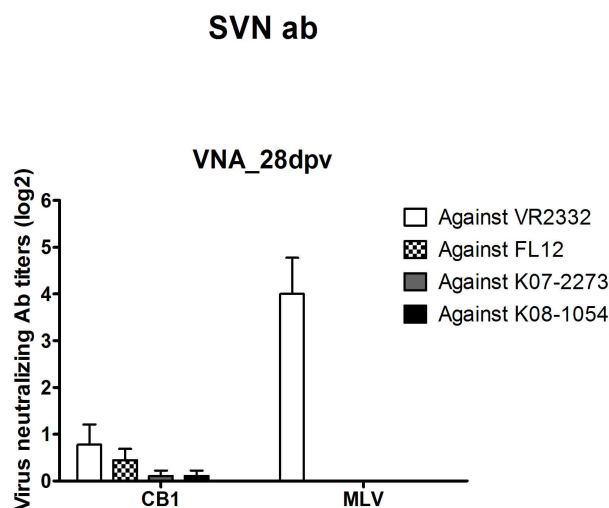
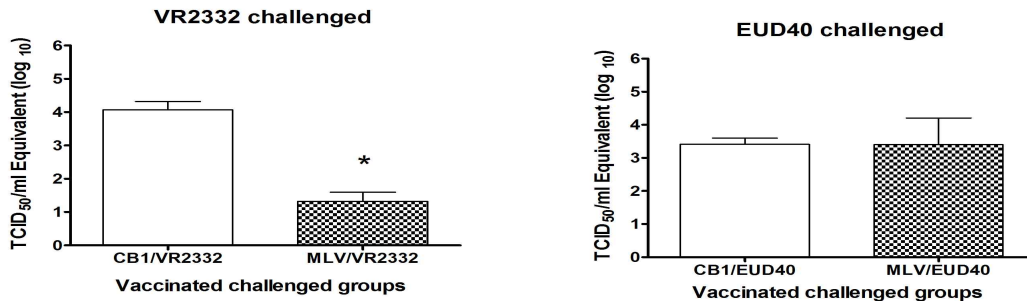


그림 8. CB1과 MLV 백신 후 바이러스 중화 항체 역가

### Virus loads in lungs



### Lungs gross lesions

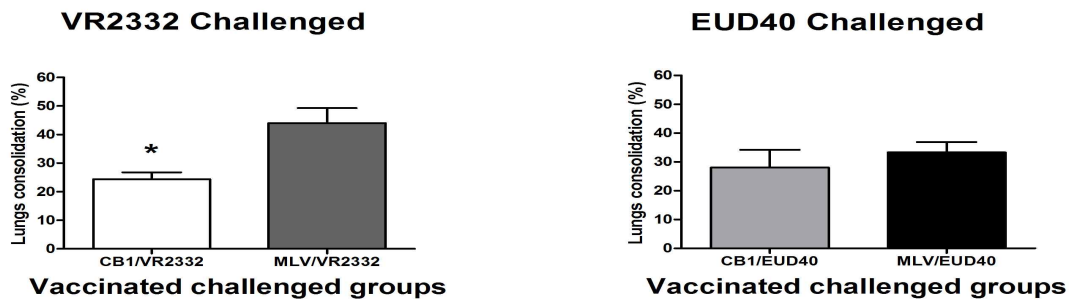


그림 9. CB1과 MLV 백신 후 북미형과 유럽형 바이러스 공격접종에 의한 폐 잔존 바이러스 농도 및 폐병변

- (12) CB1과 MLV를 접종 후 4주 동안 및 공격접종 2주(42 dpc) 후 T 세포 활성화를 평가하였다. 즉 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>(활성 Th1 cells), CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>(활성 cytotoxic T cells), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>(Regulatory T cells) 및 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (활성 T cells) 들의 활성화를 평가한 결과 CB1 또는 MLV를 접종한 그룹에서 비슷한 수준의 T 세포 활성화를 보였다 (그림 10).
- (13) CB1과 MLV를 접종 후 4주 동안 및 공격접종 2주 동안 PBMC를 분리하여 cytokine 유도를 측정하였다. 즉 IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$  등의 초기염증성 cytokine 반응, IL-1, IL-12, IFN- $\gamma$  등의 세포독성 cytokine 반응 및 IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 등의 체액성 cytokine 반응을 평가한 결과 CB1 또는 MLV를 접종한 그룹에서 비슷한 수준의 cytokine 반응을 보였다(그림 11).

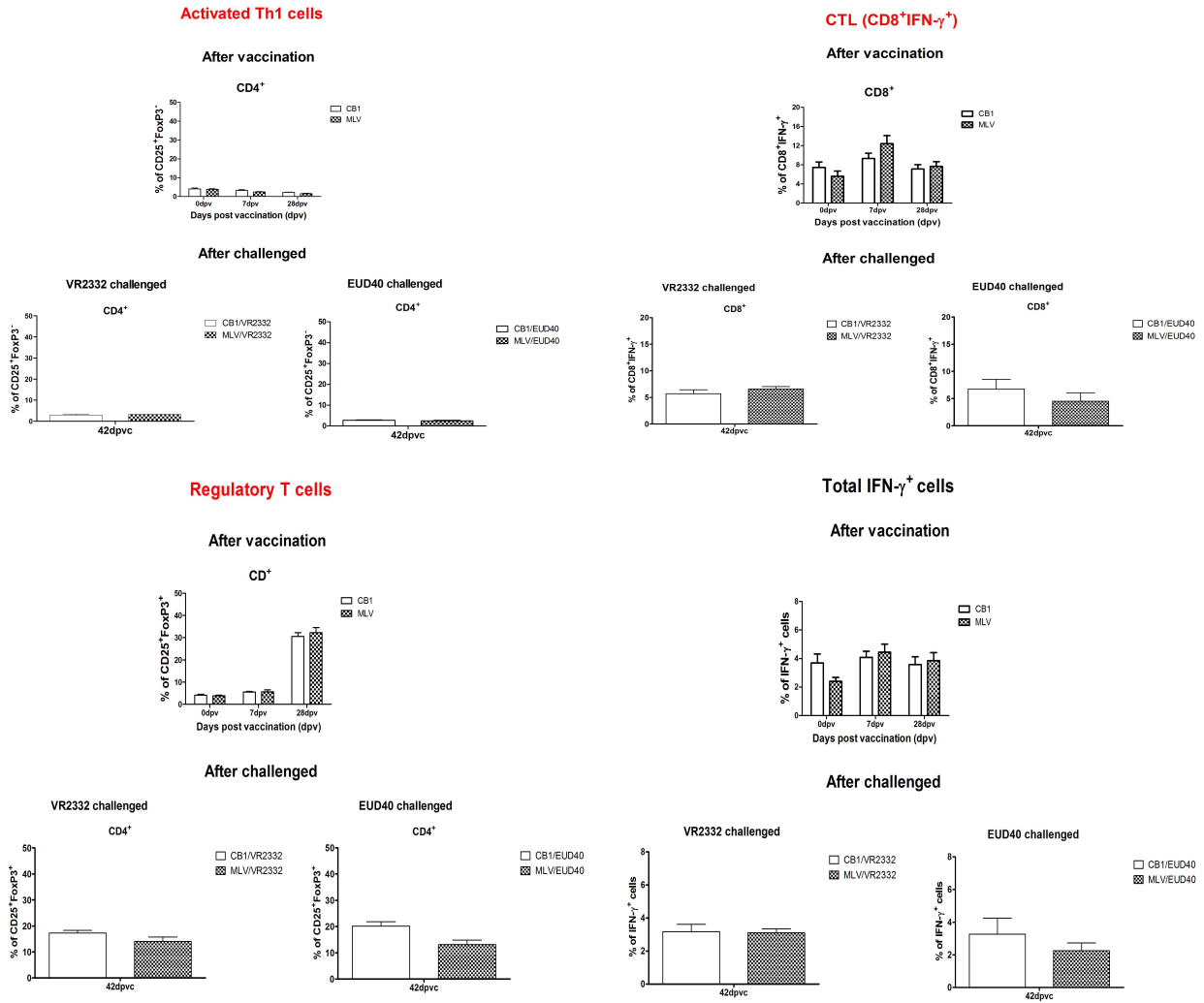


그림 10. CB1과 MLV 백신 접종 및 북미형과 유럽형 바이러스 공격접종에 의한 T 세포 활성화

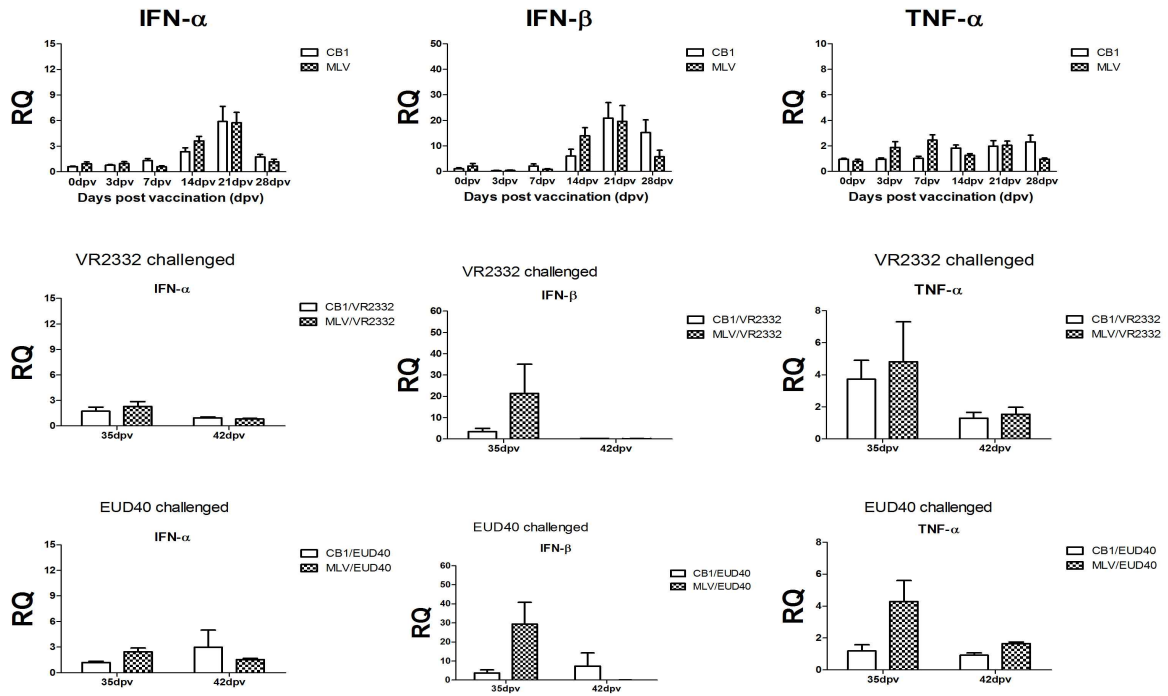


그림 11-1. CB1과 MLV 백신 접종 및 북미형과 유럽형 바이러스 공격접종에 의한 IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$  반응

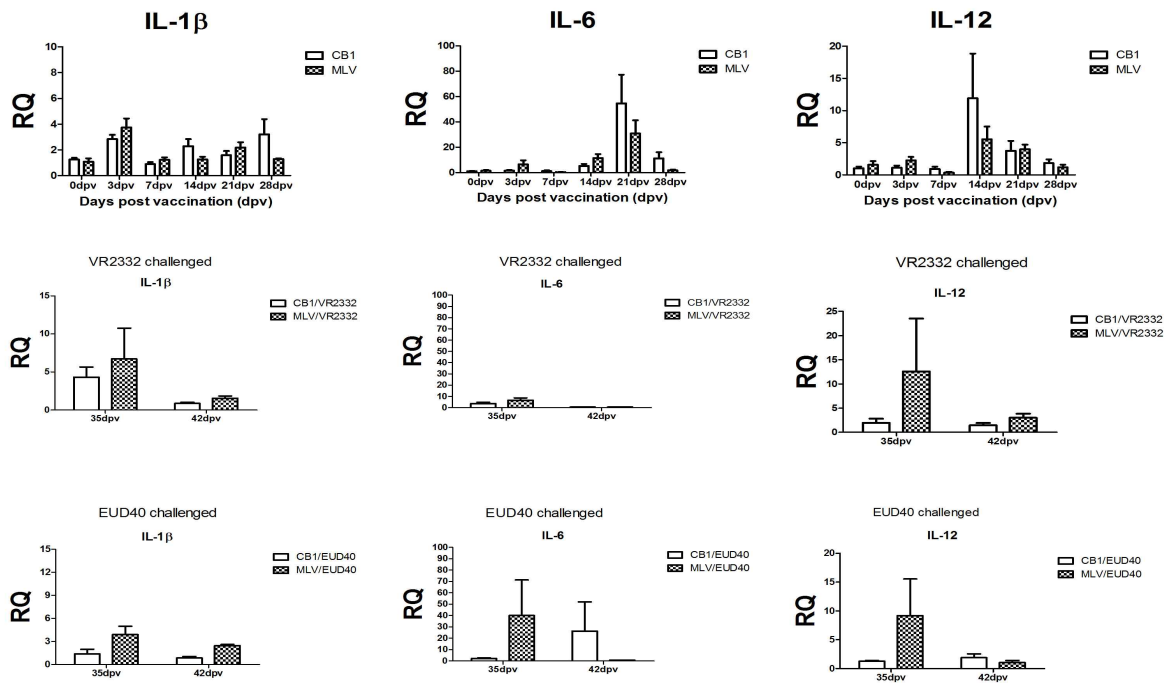


그림 11-2. CB1과 MLV 백신 접종 및 북미형과 유럽형 바이러스 공격접종에 의한 IL-1, IL-6, IL-12 반응

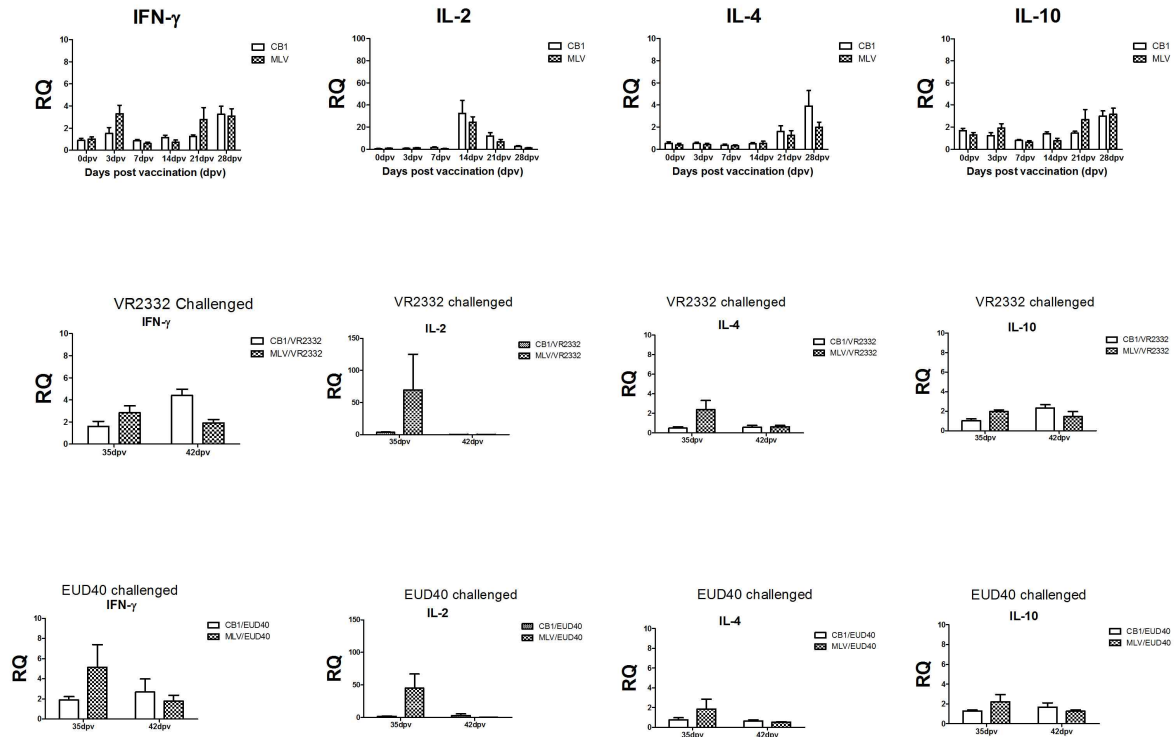


그림 11-3. CB1과 MLV 백신 접종 및 북미형과 유럽형 바이러스 공격접종에 의한 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10 반응

다. 저변이 키메라 PRRS 백신의 변이 안정성 평가

- (1) 저변이 키메라 약독화 백신 후보주인 CB1이 자돈의 감염을 통한 약한 독력과 유전자 변이의 안정성을 평가하였다. 즉 CB1을 4주령 PRRS 음성 자돈 2마리에  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml로 근육 접종한 후 4주간 관찰한 후 편도, 폐, 림프절을 수거하여 바이러스를 분리한 후 다음 2마리의 자돈에 다시 접종하여 계대하여 바이러스의 병원성 및 유전자 변이를 측정하였다.
- (2) CB1를 1차 접종한 결과  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml이하의 혈중 바이러스 농도를 보인 반면 2차 계대 자돈에서는 접종 7일 후  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml 수준의 혈중 바이러스 농도를 보여 다소 바이러스 증식성이 상승한 결과가 관찰되었다 (그림 12). 비슷하게 CB1를 1차 접종 후 폐, 림프절, 편도의 바이러스 잔존 농도를 평가한 결과  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml 이하의 바이러스 농도를 보인 반면 2차 계대 자돈에서는 특히 편도에서  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml 수준의 바이러스 농도를 보여 역시 바이러스 증식성이 다소 상승한 결과가 관찰되었다(그림 13).



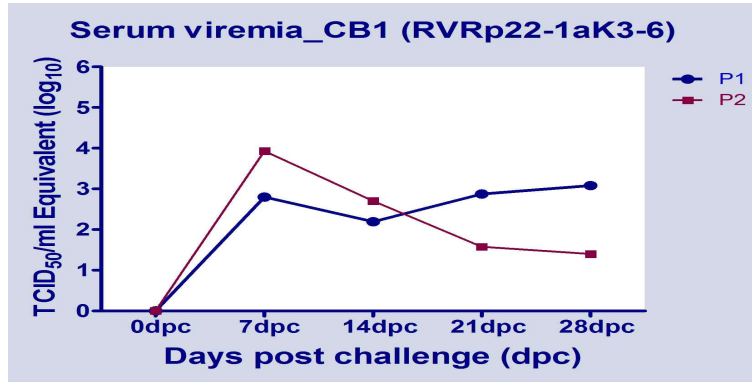


그림 12. CB1 백신후보주의 자돈에서의 연속계대 후 혈중 바이러스 역가

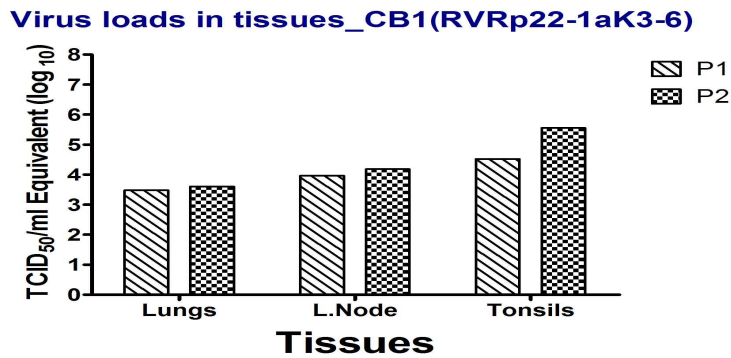


그림 13. CB1 백신후보주의 자돈에서의 연속계대 후 폐 잔존 바이러스 역가

(3) MARC-145 세포에서 연속계대 되어 약독화 된 MLV 등의 백신 바이러스는 PRRSV의 돼지에서의 주요 증식 세포인 porcine alveolar macrophages(PAM)에서는 낮은 수준의 증식을 보이는 특성이 있으며 이를 이용하여 세포수준의 바이러스 특성 변화를 평가한 결과 CB1을 2대까지 돼지에서 계대한 바이러스가 아직 원래 바이러스의 특성인 PAM에서의 낮은 수준의 증식을 여전히 유지하고 있는 것으로 관찰되었다(그림 14).

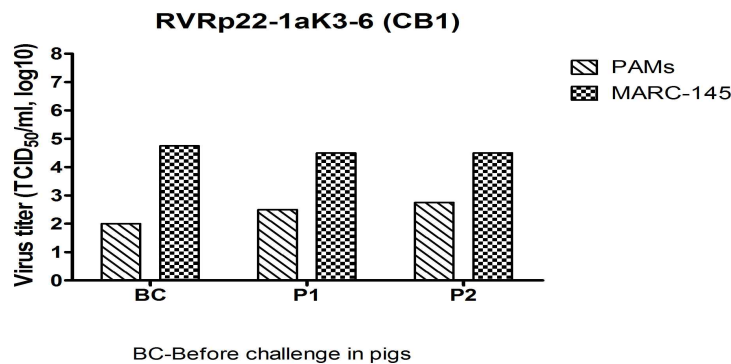


그림 14. CB1 백신후보주의 자돈에서의 연속계대 후 바이러스의 MARC-145와 PAMs에서 증식

## [2차년도]

### 1. 국내 양돈장 유행 PRRSV 유전자 정보의 실시간 모니터링 시스템 구축

가. 국내 양돈장내 유행하는 PRRSV의 분리 및 기초 특성 분석

(1) 유전자 분석이 가능한 총 241호의 가검물로부터 PRRSV 항원타입(EU/NA) 확인하였다. Type 1(EU Type)은 128호, Type 2(NA type)는 101호, 그리고 Type 1/2(EU/NA)는 12호로 분류되었다.

(2) PRRS 양성 가검물을 확보 하여 세포를 이용한 바이러스 분리를 진행하였다.

(가) Type 1 (EU Type)

① 102개의 Type 1(EU type) PRRSV PAM에서 분리 시도하여 30개에서 CPE 관찰

② 계대배양 및 바이러스 특성 분석 중

③ Type 2 (NA Type)

㉞ 128개의 Type 2(NA type) PRRSV Marc-145 에서 분리 시도하여 48개에서 CPE 관찰

㉟ 계대배양 및 바이러스 특성 분석 중

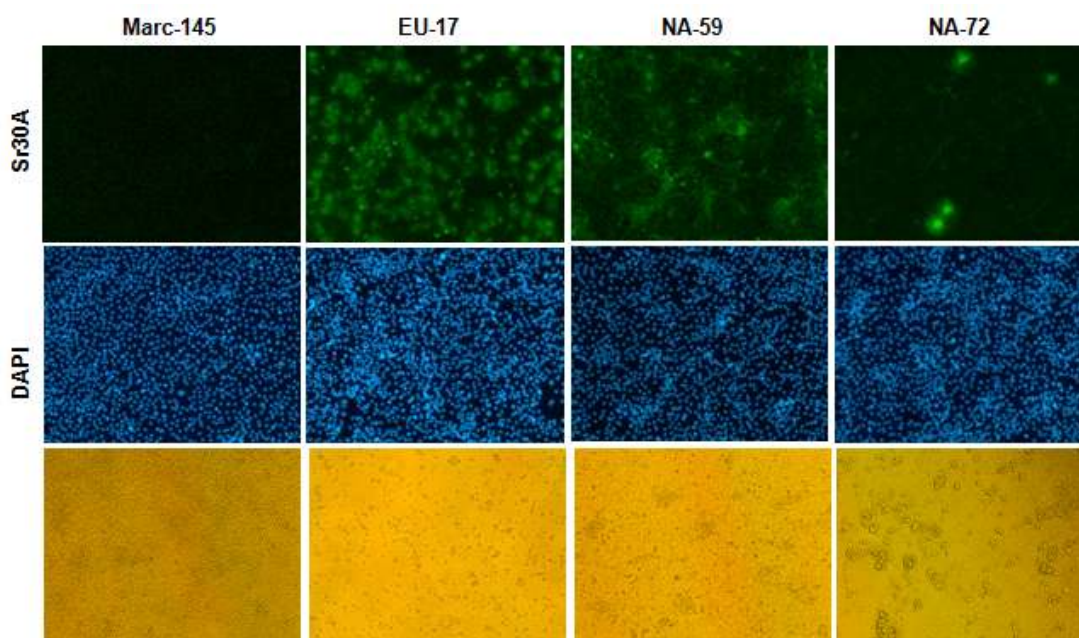


그림1. PRRSV isolates in MARC 145 and PAM

(3) 검출된 바이러스 구조단백질(ORF5)에 대한 유전자 증폭 및 단백질 염기서열 분석하였다.

(가) 국내에서 검출된 49개의 Type 1(EU Type) PRRSV와 Prototype virus(LV)간의 상동성 분석 결과 Nucleotide 및 Amino acid는 각각 84.49%~94.88%, 82.18%~93.56%의 상동성을 보였다.

(나) 국내에서 검출된 46개의 Type 2(NA Type) PRRSV와 Prototype virus(VR2332)간의 상동성 분석 결과 Nucleotide 및 Amino acid는 각각 82.18%~93.56%, 82.09%~99.00%의 상동성을 보였다(표1).

표 1. 2016년 분리 및 등록 PRRSV ORF5

Genotype	Prototype	Number of isolates	Nucleotide (%)	Amino acid (%)
Type 1	LV	49	84.49~94.88	82.18~93.56
Type 2	VR-2332	46	84.25~99.34	82.09~99.00

(4) 국내에서 2016년 동안 검출된 PRRSV의 ORF5 유전자는 기보고된 국내외 참고 유전자와 함께 분석한 결과 (Phylogenetic analysis), Type 1(EU type) PRRSV는 모두 subtype 1로 분류된 한편, Type 2(NA type) PRRSV는 Lineage 1, 5로 분류되었다(그림2).

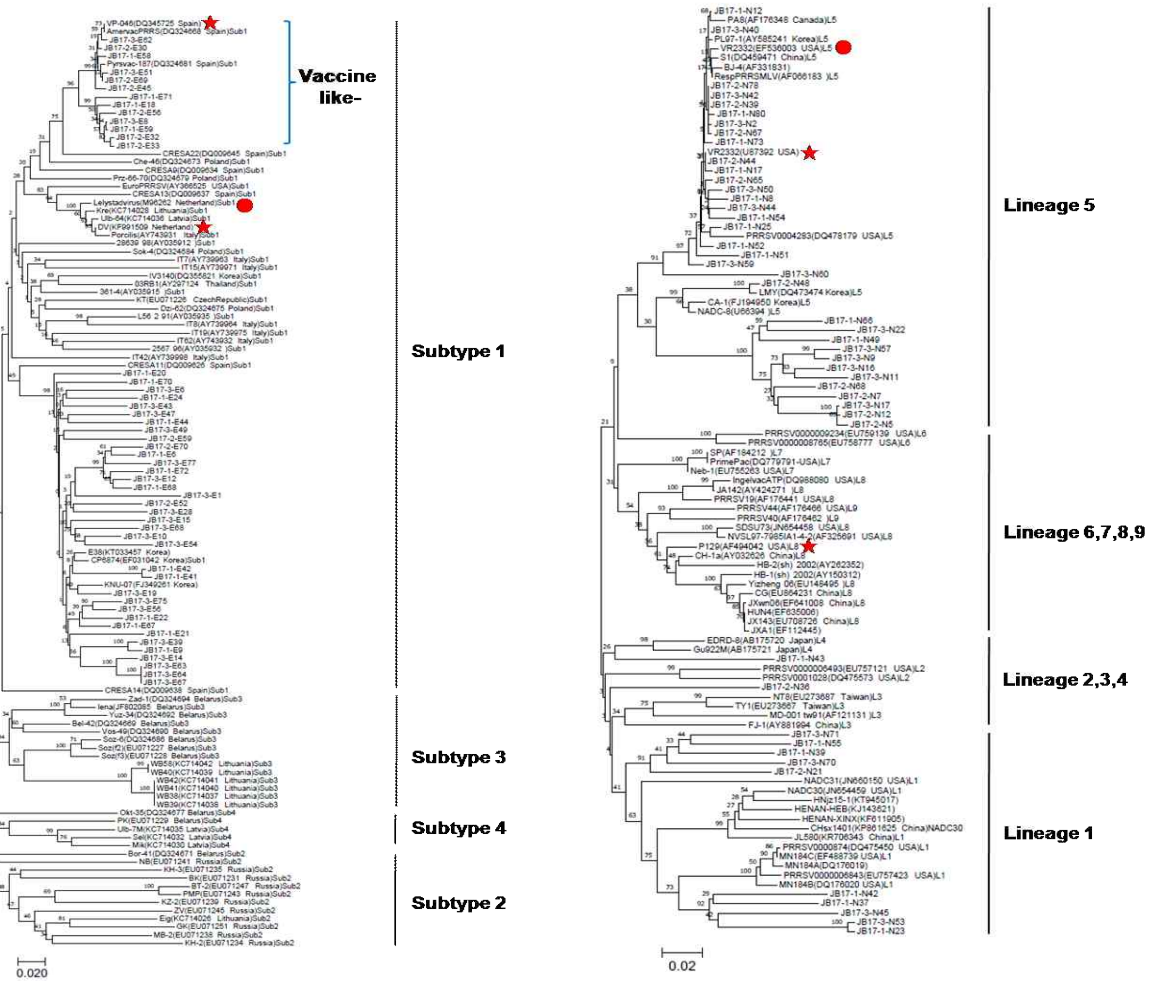


그림 2. PRRSV EU ORF5 NT phylogenetic tree 및 PRRSV NA ORF5 NT phylogenetic tree

(5) 백신주와 같은 cluster에 포함되는 PRRSV 분리주들은 백신주의 변이로 추정된다. 또한, 지리적으로 인접한 지역에서 분리된 바이러스들은 대부분 지역간 염기서열의 유사성은 보였으며, 심한 유전자 변이나 바이러스의 외부 유입은 없는 것으로 추정된다.

나. 국내 유행 PRRS 바이러스의 면역원성, 병원성 분석 및 बैं킹 관리

(1) 2년차에 47주의 바이러스 분리를 수행하여 한국수의유전자원은행(KVCC)에 기탁하였다.

표 2. 2016년 분리 및 등록 PRRSV strains

번호	학명	개체번호	KVCC (기탁번호)
1	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-1	KVCC - VR1700007
2	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-2	KVCC - VR1700008
3	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-3	KVCC - VR1700009
4	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-4	KVCC - VR1700010
5	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-6	KVCC - VR1700011
6	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-14	KVCC - VR1700012

7	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-17	KVCC - VR1700013
8	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-18	KVCC - VR1700014
9	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-20	KVCC - VR1700015
10	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-22	KVCC - VR1700016
11	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-23	KVCC - VR1700017
12	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-29	KVCC - VR1700018
13	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-31	KVCC - VR1700019
14	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-36	KVCC - VR1700020
15	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-37	KVCC - VR1700021
16	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-47	KVCC - VR1700022
17	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-52	KVCC - VR1700023
18	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-59	KVCC - VR1700024
19	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-60	KVCC - VR1700025
20	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-61	KVCC - VR1700026
21	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-62	KVCC - VR1700027
22	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-63	KVCC - VR1700028
23	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-65	KVCC - VR1700029
24	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-66	KVCC - VR1700030
25	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-68	KVCC - VR1700031
26	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-69	KVCC - VR1700032
27	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-79	KVCC - VR1700033
28	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-87	KVCC - VR1700034
29	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-89	KVCC - VR1700035
30	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-94	KVCC - VR1700036
31	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	JBU(4)-102	KVCC - VR1700037
32	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	16JBU(3)-2	KVCC - VR1700038
33	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	16JBU(3)-9	KVCC - VR1700039
34	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	16JBU(3)-22	KVCC - VR1700040
35	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	16JBU(3)-29	KVCC - VR1700041
36	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	16JBU(3)-35	KVCC - VR1700042
37	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	16JBU(3)-36	KVCC - VR1700043
38	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	16JBU(3)-47	KVCC - VR1700044
39	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	16JBU(3)-49	KVCC - VR1700045
40	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	16JBU55-5	KVCC - VR1700046
41	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	16JBU55-42	KVCC - VR1700047
42	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	16JBU55-8	KVCC - VR1700048
43	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	16JBU55-20	KVCC - VR1700049
44	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	16JBU55-32	KVCC - VR1700050
45	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	16JBU55-38	KVCC - VR1700051
46	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	16JBU55-46	KVCC - VR1700052
47	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	16JBU55-52	KVCC - VR1700053

다. KAHIS 유전자변이관리시스템을 이용한 유전자 정보 보존 및 활용 PRRSV 변이 추적 시스템과 연계하여 PRRSV 유전자 데이터베이스 구축

- (1) 분리된 PRRSV의 ORF5 유전자를 분석, PRRSV 변이 추적 시스템과 연계하여 PRRSV 유전자 데이터베이스 구축하였으며 국가동물방역통합시스템(www.kahis.go.kr)에 2년차(2016)에는 96개(C17002878~C17002973)를 등록하였다.

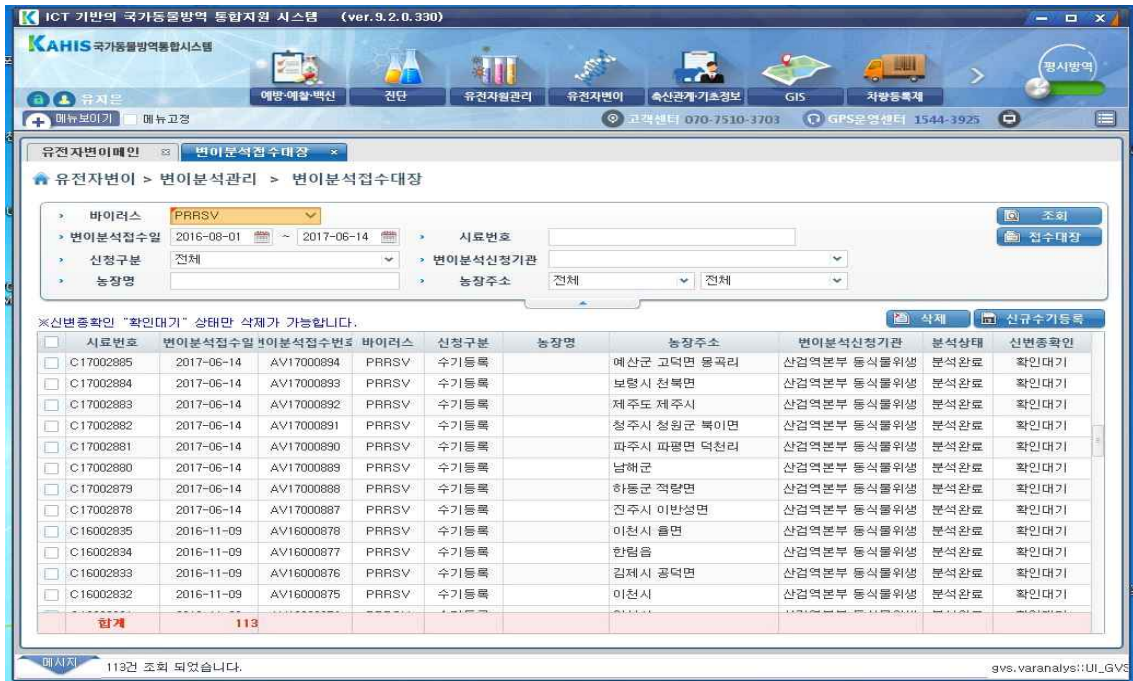


그림 3. 2016년 국가동물방역통합시스템 유전자 접수증거

## 2. 다양한 유전형의 국내 PRRSV를 예방할 수 있는 저변이 키메라백신의 개발

가. 확장형 저변이 키메라 PRRS 백신 생산

- (1) 1차년도에 생산한 저변이 키메라 PRRS 백신을 생산하기 위해 위의 병원성과 관련된 ORF1a (nsp1 $\beta$ ) 유전자를 약독화 백신 바이러스인 MLV 염기서열로 치환하고 변이에 관련된 nsp2와 nsp7 유전자를 치환한 VR2332 기반 감염성 클론을 이용하여 구조 유전자 (ORFs 2-6)을 국내 분리 PRRS 바이러스 주로 치환한 키메라 백신을 생산하였다. 즉 ORF5 유전자 기준으로 10% 이상의 차이가 나는 두 북미형 바이러스들 (K07-2273과 K08-1054)의 ORFs 2-4와 ORFs 5-6 유전자를 각각 치환하여 저변이 키메라 약독화 백신 (CB1)을 생산하였다 (그림 4).
- (2) 이와 같이 생산된 CB1 백신 후보주를 현재 가장 많이 사용되고 있는 약독화 백신 (Ingelvac MLV)과 비교하여 북미형 바이러스 (VR2332)와 유럽형 바이러스 (EU D40) 등의 다양한 바이러스에 대한 예방효과와 안전성을 평가하기 위하여 자돈을 이용하여 평가한 결과 약독화 백신 (Ingelvac MLV)과 유사하게 북미형과 유럽형 바이러스 공격감염 모두에 대해 혈중바이러스 농도와 폐 내 잔존 바이러스 농도를 낮추는 방어효과를 보였

다. 2차년도에는 이를 바탕으로 유럽형 PRRSV들에서 공통적으로 발견되는 T cell common epitope (TCE)들을 nsp9과 nsp10에 추가로 도입한 키메라 약독화백신 CB3를 생산하였다(그림 4).

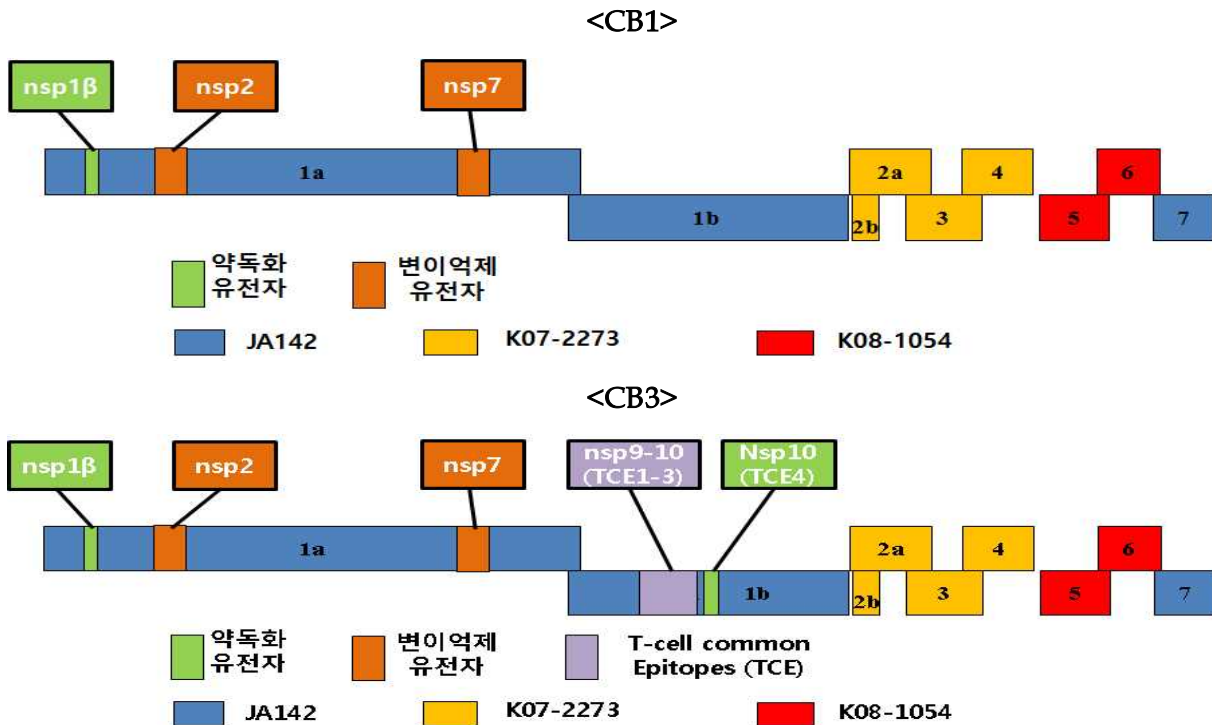


그림 4. 저변이 키메라 PRRS 백신 (CB1과 CB3) 생산

(3) 또한 보다 넓은 방어범위를 가지는 키메라 백신을 생산하기 위하여 다양한 키메라 백신 바이러스를 추가로 생산하였다. PRRSV의 구조 단백질들은 각각 중복된 구조를 가지고 있으므로 각 구조 단백질의 중복된 부분을 분리하여 독립적인 유전자를 가지는 변이 바이러스를 만들고자 하였다.

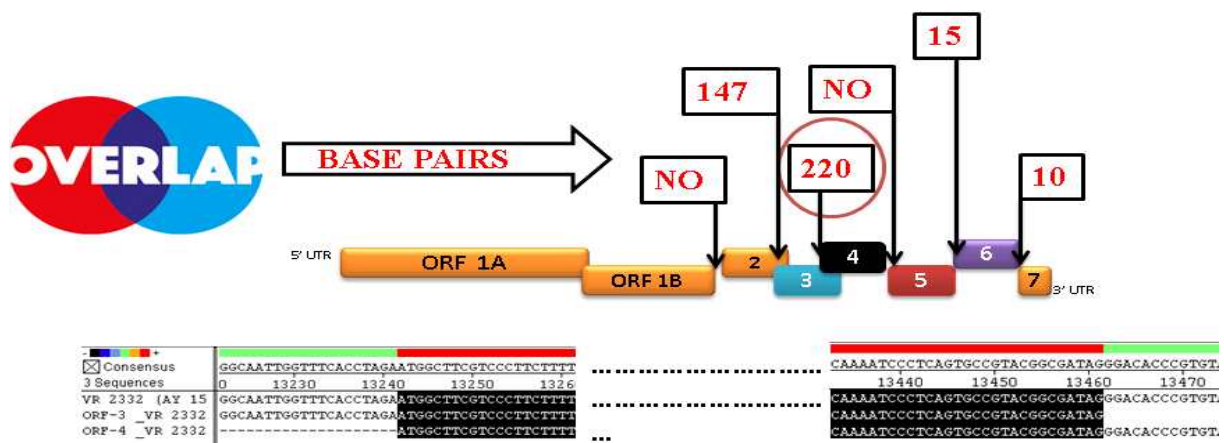


그림 5. PRRSV 구조단백질의 중복(overlap) 유전자 구조 및 중복 유전자 핵산 수

- (4) 일단 중복범위가 가장 큰 ORF3와 ORF4 유전자를 독립적으로 분리하기 위하여 ORF4의 start codon을 GTG로 변이하고 원래의 중복된 ORF4 유전자를 증폭하여 ORF3 stop codon 뒤로 반복되도록 키메라 바이러스를 생산하였다 (그림 6). 또한 두 유전자를 완전하게 분리하고 면역반응 증강에 도움이 되도록 돼지의 GM-CSF 유전자를 ORF3와 ORF4 사이에 삽입하여 변이 바이러스를 생산하였다(그림 7). 하지만, 바이러스 생산 후 연속계대 과정에서 삽입된 GM-CSF 유전자가 소실되는 문제가 관찰되어 삽입 유전자의 바이러스 증식과정 중의 안정성이 부족한 것으로 판단되었다.
- (5) ORF3와 4를 분리하기 위해 삽입한 GM-CSF 유전자와 반복된 ORF4 유전자는 변이 바이러스 생산 후 MARC-145 세포에서 2계대까지 존재하지만 2계대 이후에는 사라지는 것으로 관찰되어 삽입 유전자의 안정성을 높이기 위해 PRRSV 저변이 유전자와 ORF4 유전자 발현을 위해 삽입한 transcription regulatory sequence(TRS) 4 앞에 존재하는 기존의 유전자 염기서열을 현재 5개 뉴클레오타이드에서 15개에서 50개까지 늘려가는 작업이 3 차년도에 진행하였다.

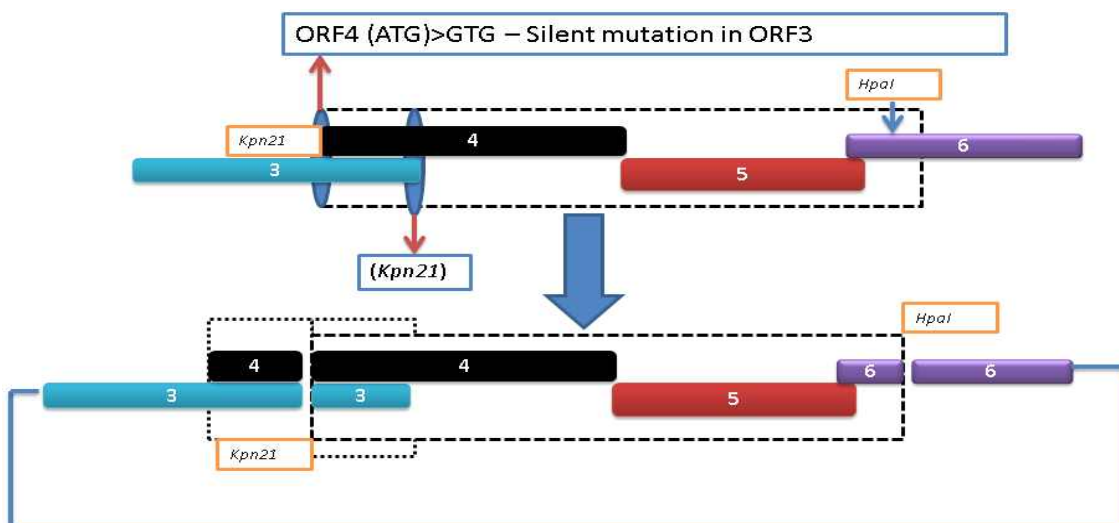


그림 6. PRRSV의 ORF3와 ORF4 유전자 분리 변이 바이러스 생산

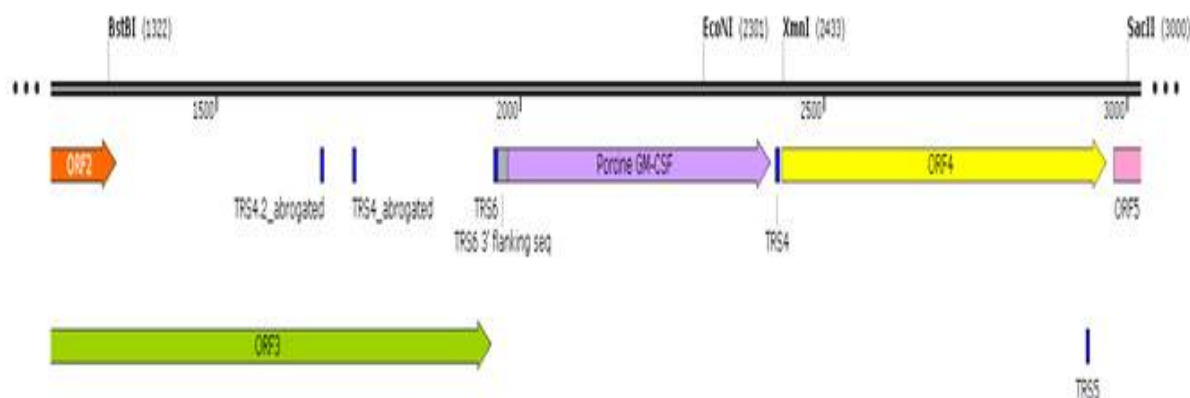


그림 7. GM-CSF 유전자 삽입 ORF3/ORF4 분리 변이 PRRS 바이러스 생산



나. 저변이 키메라 PRRS 백신의 모돈 호흡기 증상 및 유산 예방 효과 및 안전성 평가

(1) 공격접종을 위한 북미형 및 유럽형 PRRSV들의 임신모돈 호흡기 및 생식성 병원성 증명

(가) CB1 백신 후보주(그림 4)를 모돈에서 평가하기 위하여 공격접종으로 사용할 북미형 및 유럽형 바이러스들의 임신 모돈에서의 호흡기 증상 및 생식성 병원성을 평가하였다. 즉 9마리의 모돈에 동일하게 교배를 실시하고 임신 90일에 북미형 바이러스 2주(K07-2273, K08-1054)와 유럽형 바이러스 2주(D40, CBNU0495)를 2마리의 임신 모돈에  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml의 농도로 각각 공격접종을 하였다(표3). 공격접종 전과 접종 3, 7, 14, 21일에 모돈에서 채혈을 실시하고 분만 3일 전(공격접종 21후)에 안락사를 실시하여 모돈과 태아에 부검을 실시하고 조직을 채취하였다.

(나) 공격접종 후 북미형 바이러스 감염군 중 K07-2273를 접종한 모돈 1마리와 유럽형 바이러스 감염군 중 CBNU0495을 접종한 모돈 1마리에서 부검 전 유사산이 발생하였고 부검 후 다른 모돈들의 태아 상태를 평가한 결과 표3과 같이 미이라화, 자가용해 또는 사산된 태아들이 다수 발견되어 공격감염에 사용한 4주의 바이러스는 모두 생식성 병원성을 가지고 있는 것으로 증명되었으며 특히 북미형 바이러스 K07-2273과 유럽형 바이러스 CBNU0495이 다른 바이러스들에 비해 높은 생식 병원성을 보이는 것으로 관찰되었다.

표3. 임신모돈의 바이러스 공격접종(임신 90일) 정보와 공격접종 3주 후 태아의 생존여부 및 체중

모돈번호	Virus	기록	태아 번호															
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
J1 (NA-1)	K07-2273	태아 상태	17.03.31 유사산 발생															
		태아 체중	1.0	1.6	1.3	1.4	1.2	1.2	1.3									
J2 (NA-1)	K07-2273	태아 상태	V	V	A	D	A	A	D	D	V	A	V	D				
		태아 체중	1.4	1.5	1.6	1.1	0.85	1.3	1.6	1.3	1.45	1.2	1.4	1.6				
J3 (NA-2)	K08-1054	태아 상태	V	V	V	V	V	V	V	V	A	V						
		태아 체중	1.7	1.6	1.4	1.8	1.6	1.8	1.6	1.7	1.25	1.45						
J4 (NA-2)	D40	태아 상태	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	V	V	V	M	M	
		태아 체중	0.9	1.1	1.3	0.7	1.4	1.1	1.1	1.0	0.6	0.6	1.5	1.2	1.3	0.4	0.2	
J5 (EU-1)	D40	태아 상태	A	A	V	V	V	A	V	A	A	V	A	V	A			

		태아 체중	1.0 5	1.1	1.5	1.3 5	1.4 5	0.8	1.6	1.2	0.9	1.1	1.1	1.5	1.3
J6 (EU-1)		태아 상태	V	V	A	V	V	A	V	A	D	D	V	D	
		태아 체중	1.2 5	7.5	1.2	1.5	1.3	1.1	1.7	1.3	1.3	1.1	1.1	1.1	
J7 (EU-2)		태아 상태	V	V	A	A	V	V	A	A	A	V	D	A	
	CBNU 0495	태아 체중	1.3	1.4	0.9	1.5	1.1	1.2	0.9	1.5	1.2 5	1.2	1.2	1.0	
J8 (EU-2)		태아 상태	17.04.02 유사산 발생												
		태아 체중	1.2	1.1	1.5	1.1	1.3	1.8	1.2	1.0	1.0	1.6	M		
J9	Negative	태아 상태	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		
		태아 체중	1.7	1.8	1.6	1.5	1.5	1.9	1.5	1.6	2.1	1.5	1.6		

\* 태아 체중 (kg)

\* 태아 상태 : 생존 (V), 자가용해 (A), 사산 (D), 미이리화 (M)

(다) 또한 공격감염 후 3주간 임신모돈의 혈중바이러스역가를 검사한 결과 모든 4주의 바이러스가 모돈에 잘 감염되어 혈중바이러스를 일으키는 것으로 관찰되었으며 특히 유럽형 바이러스 CBNU0495이 공격접종 3일 후에 다른 바이러스들에 비해 가장 높은 혈중바이러스 역가를 보였고 북미형 바이러스 K08-1054가 높은 혈중바이러스 역가를 보였다. 높은 생식성 병원성을 보였던 북미형 바이러스 K07-2273는 모돈에서는 다소 낮은 수준의 혈중바이러스 역가를 보였다(그림 8).

(라) 공격감염 3주에 임신모돈에 안락사를 실시하고 각 모돈의 태반에 존재하는 태아의 조직과 제대혈을 수거하여 바이러스 역가를 검사하였다. 그 결과 유럽형 바이러스 D40와 CBNU0495 모두 다 모든 태아의 제대혈에서 높은 역가의 바이러스가 검출된 반면 북미형 바이러스 K08-1054를 접종한 모돈의 태아들에서는 단 4마리에서만 높은 역가의 바이러스가 검출되었고 나머지 태아들에서는 바이러스가 검출되지 않았다. 북미형 바이러스 K07-2273는 다른 바이러스에 비해 다소 낮은 수준의 바이러스 역가지만 한 마리를 제외한 모든 태아에서 바이러스가 검출되었다.

(마) 따라서, 모돈에서의 공격감염 결과를 바탕으로 모든 4주의 바이러스들이 임신모돈에서 생식성 병원성을 유발하는 것으로 관찰되었으며 특히 북미형 바이러스 K07-2273과 유럽형 바이러스 CBNU0495는 다른 바이러스들에 비해 높은 생식 병원성을 보이는 것으로 관찰되어 모든 유산에 대한 방어실험에 적합한 것으로 판단되었다.

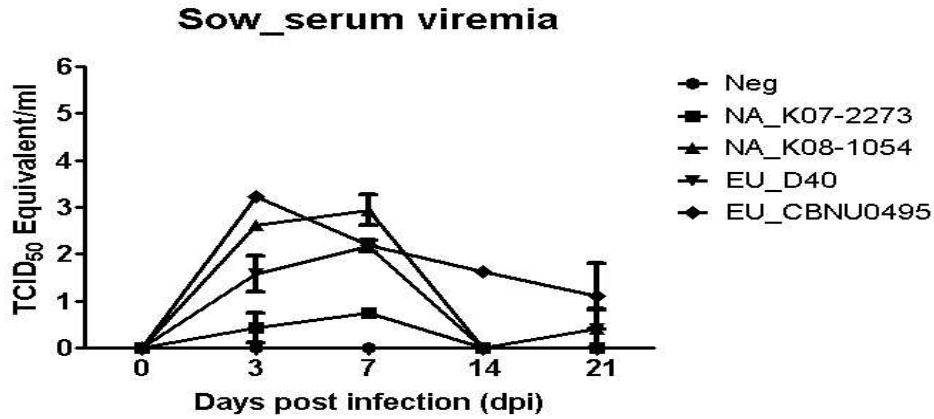


그림 8. PRRSV 공격접종 후 임신모돈의 혈중 바이러스 역가

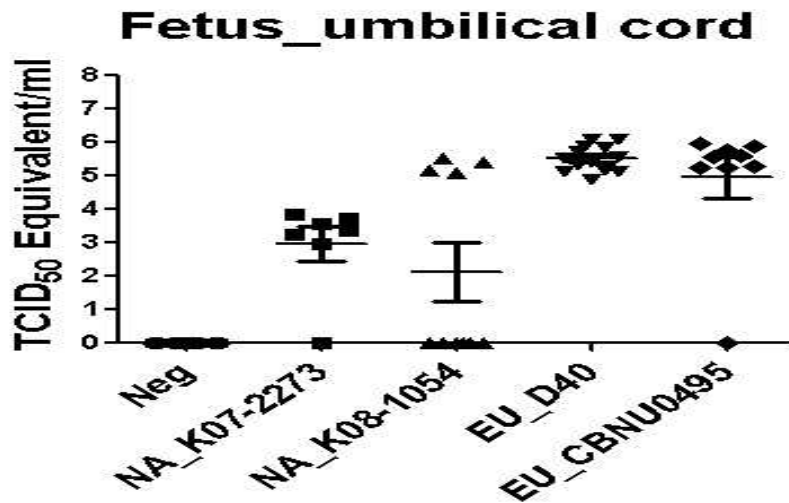


그림 9. PRRSV 공격접종 후 태아 제대혈의 바이러스 역가

다. 저변이 키메라 PRRS 백신의 변이 안정성 평가 계속

- (1) RVRp22의 저변이 안전성은 ORF1a에 존재하는 nsp2와 nsp7 $\beta$ 의 유전자에 의해 결정되는 것으로 1차년도 연구결과 증명되었고 이를 바탕으로 저변이 키메라 약독화 백신 후보주인 CB1과 CB3가 생산되었다. 이러한 안전성에 관련된 유전자를 염기서열 수준으로 증명하기 위하여 각각의 nsp2와 nsp7 $\beta$  유전자를 RVRp22 염기서열로 치환한 변이 바이러스들 (RVRp22-nsp2, RVRp22-nsp7 $\beta$ , RVRp22-nsp2\_nsp7 $\beta$ )을 추가로 생산하였다(그림10).

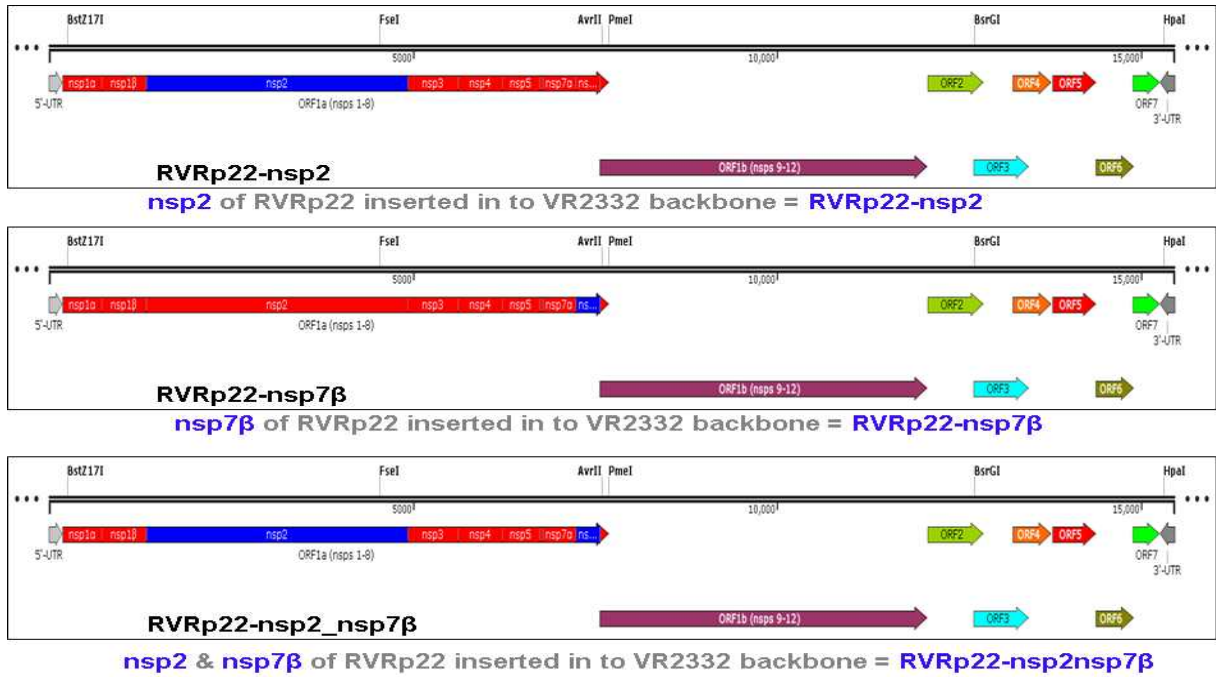


그림 10. 저변이 키메라 백신의 변이 안정성관련 유전자 증명을 위해 생산한 변이 바이러스들

- (2) CB1 키메라 백신후보주를 4주령 자돈에 28일간 3회 계대한 결과 바이러스 접종 후 1계대에서 보여진 바이러스 증식 패턴이 3 계대에 까지 크게 변화가 없이 유지가 되었고 현재 사용되고 있는 MLV 백신은 자돈에서 2계대할 때 바이러스 증식이 매우 증가하여 약독화 특성에 변화가 생기는 것으로 관찰되었다(그림11). 또한 RVRp22-nsp2 (RVRp22의 nsp2 유전자만 치환한 변이 바이러스)도 자돈에서의 3계대 동안 유의성 있는 변이가 관찰되지 않았으며 RVRp22-nsp7 $\beta$ 와 RVRp22-nsp2\_nsp7 $\beta$  변이 바이러스들은 생산이 완료되었으며 3차년도에 자돈에서 3회까지 계대하여 병원성 변이 여부를 관찰하였다.

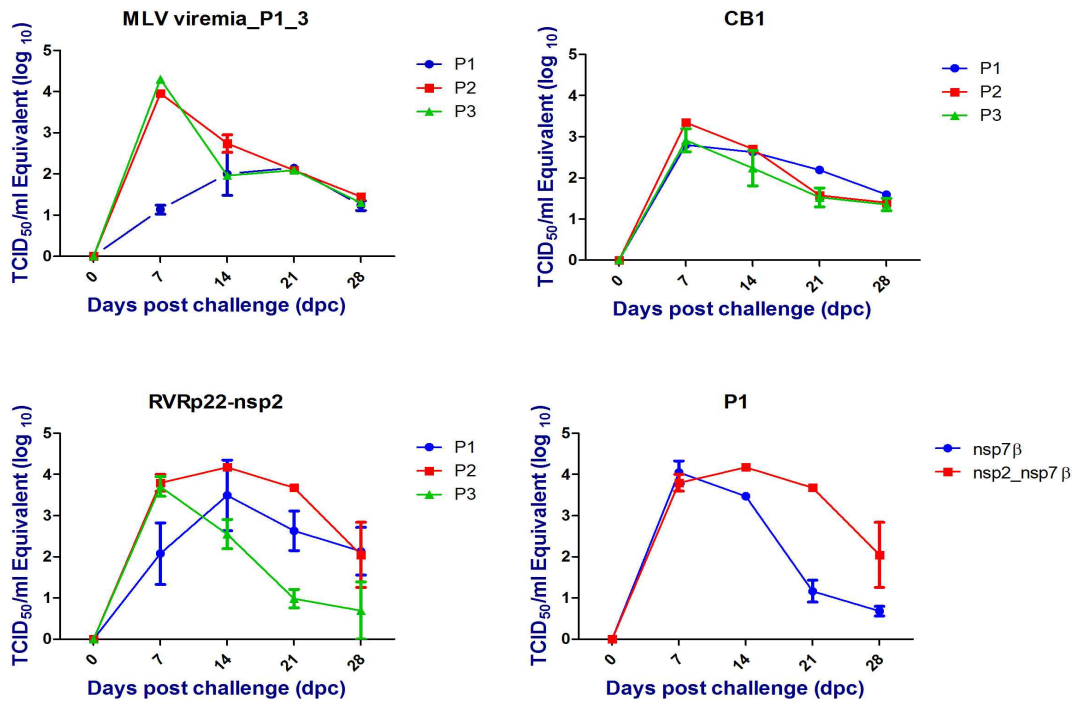


그림 11. CB1 백신후보주 및 변이 바이러스들의 자돈에서의 연속계대 후 혈중 바이러스 역가

- (3) CB1 키메라 백신후보주를 4주령 자돈에 28일간 3회 계대한 결과 바이러스 접종 후 1계대에서 보여진 폐 잔존 바이러스 역가가 3 계대에 까지 크게 변화가 없이 유지가 되었고 현재 사용되고 있는 MLV 백신은 자돈에서 2-3계대할 때 폐내 잔존 바이러스 역가가 지속적으로 증가하는 것으로 관찰되었다(그림12).

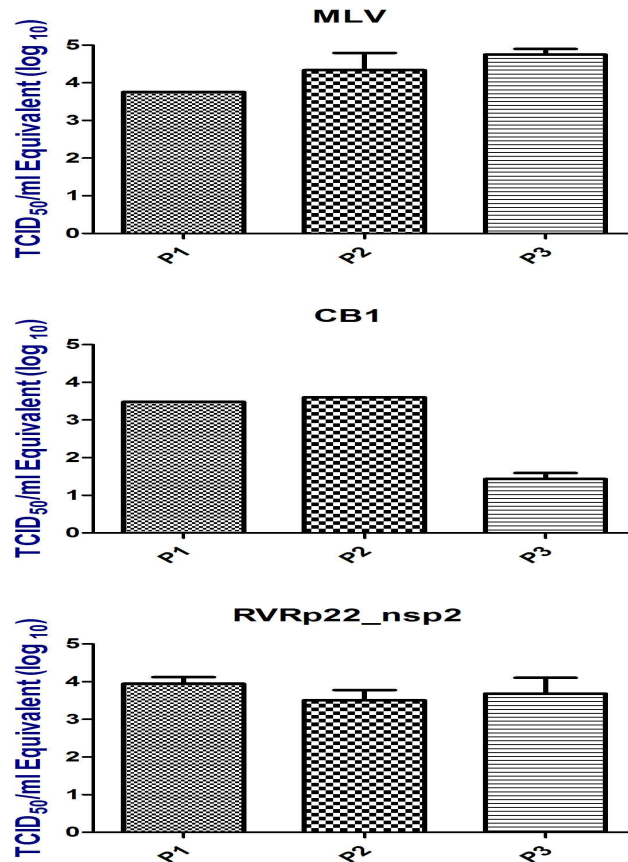


그림 12. CB1 백신후보주 및 변이 바이러스의 자돈에서의 연속계대 후 폐 잔존 바이러스 역가

- (4) 일반적으로 약독화 PRRSV는 porcine alveolar macrophages(PAMs) 보다 MARC-145 세포에서 증식이 증대되는 특징이 있으므로 이를 이용하여 자돈에서 3회 계대한 변이 바이러스 및 백신 바이러스들의 약독성이 연속계대 조건에서 변화하는 과정을 평가하였다(그림 13). 평가결과 저변이 키메라 약독화 백신 후보주인 CB1이 MARC-145와 비교하여 PAMs에서 잘 증식하지 못하는 약독화 특성이 자돈에서 3회 계대 후에도 유지가 되는 반면 MLV는 자돈에서 2회 계대 후에 PAMs에서 바이러스 증식력을 MARC-145에서의 수준으로 회복하는 것이 관찰되었다. 또한 RVRp22-nsp2도 자돈에서의 3계대 동안 PAMs에서 잘 증식하지 못하는 약독화 특성이 유지되며 RVRp22-nsp7 $\beta$ 와 RVRp22-nsp2\_nsp7 $\beta$  변이 바이러스들도 자돈에 접종 전 (Before challenge, BC)에 PAMs에서 잘 증식하지 못하는 약독화 특성을 보였다(그림 13).

# Invitro growth comparison

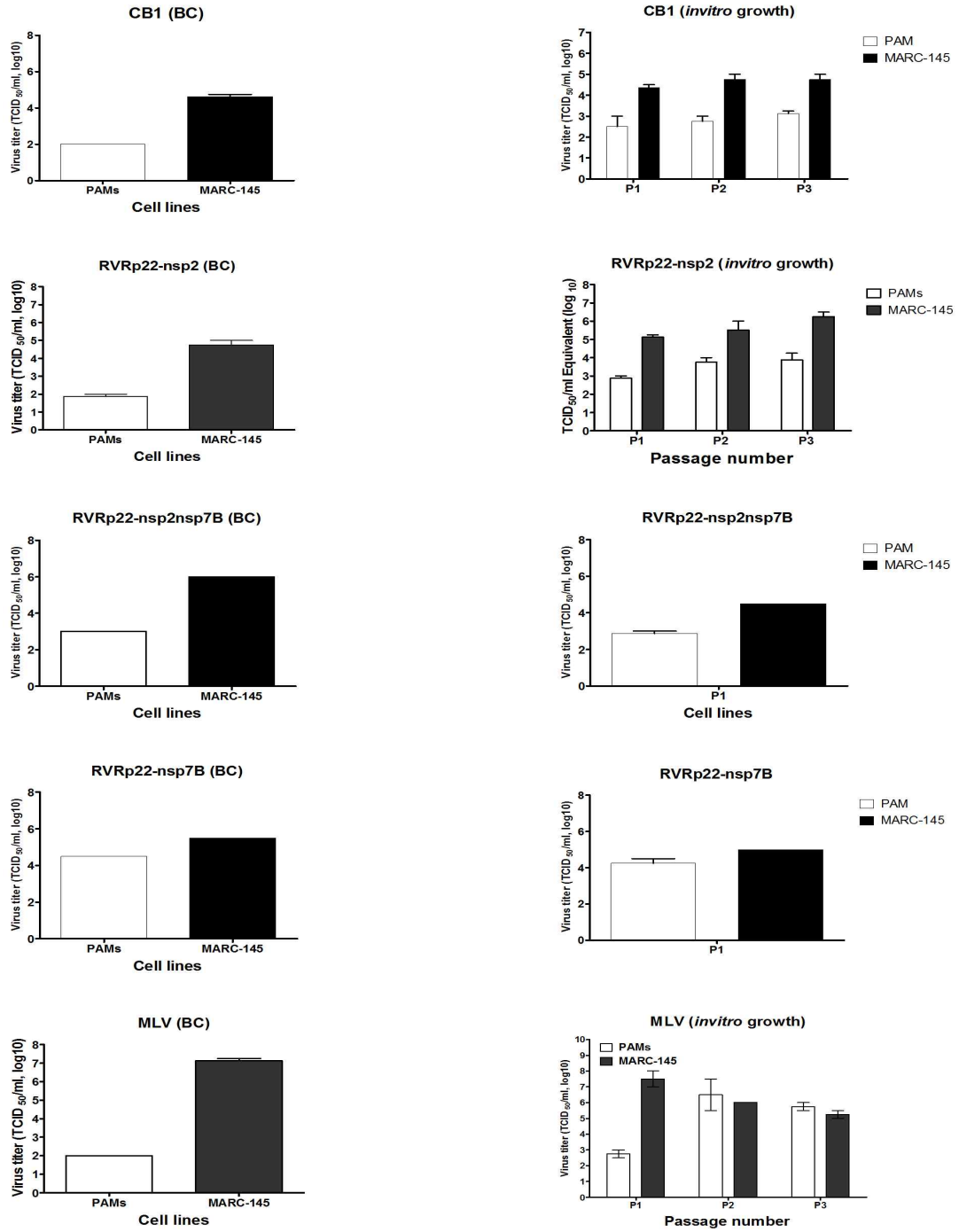


그림 13. CB1 백신후보주의 자돈에서의 연속계대 후 바이러스의 MARC-145와 PAMs에서 증식

### [3차년도]

#### 1. 국내 양돈장 유행 PRRSV 유전자 정보의 실시간 모니터링 시스템 구축

가. 국내 양돈장내 유행하는 PRRSV의 분리 및 기초 특성 분석

(1) 유전자 분석이 가능한 총 371호의 가검물로부터 PRRSV 항원타입(EU/NA) 확인하였다. Type 1(EU Type)은 181호, Type 2(NA type)는 136호, 그리고 Type 1/2(EU/NA)는 54호로 분류되었다.

(2) 검출된 바이러스 구조단백질(ORF5)에 대한 유전자 증폭 및 단백질 염기서열 분석하였다.

(가) 국내에서 검출된 104개의 Type 1(EU Type) PRRSV와 Prototype virus(LV)간의 상동성 분석 결과 Nucleotide 및 Amino acid는 각각 85.31%~94.72%, 80.79%~94.55%의 상동성을 보였다.

(나) 국내에서 검출된 75개의 Type 2(NA Type) PRRSV와 Prototype virus(VR2332)간의 상동성 분석 결과 Nucleotide 및 Amino acid는 각각 83.25%~99.34%, 81.09%~99.00%의 상동성을 보였다(표1).

표 1. 2018년 분리 및 등록 PRRSV ORF5

Genotype	Prototype	Number of isolates	Nucleotide (%)	Amino acid (%)
Type 1	LV	104	85.31~94.72	80.79~94.55
Type 2	VR-2332	75	83.25~99.34	81.09~99.00

(3) 국내에서 2018년 동안 검출된 PRRSV의 ORF5 유전자는 기보고된 국내외 참고 유전자와 함께 분석한 결과 (Phylogenetic analysis), Type 1(EU type) PRRSV는 모두 subtype 1로 분류된 한편, Type 2(NA type) PRRSV는 Lineage 1, 3, 5, 8로 분류되었다(그림1).



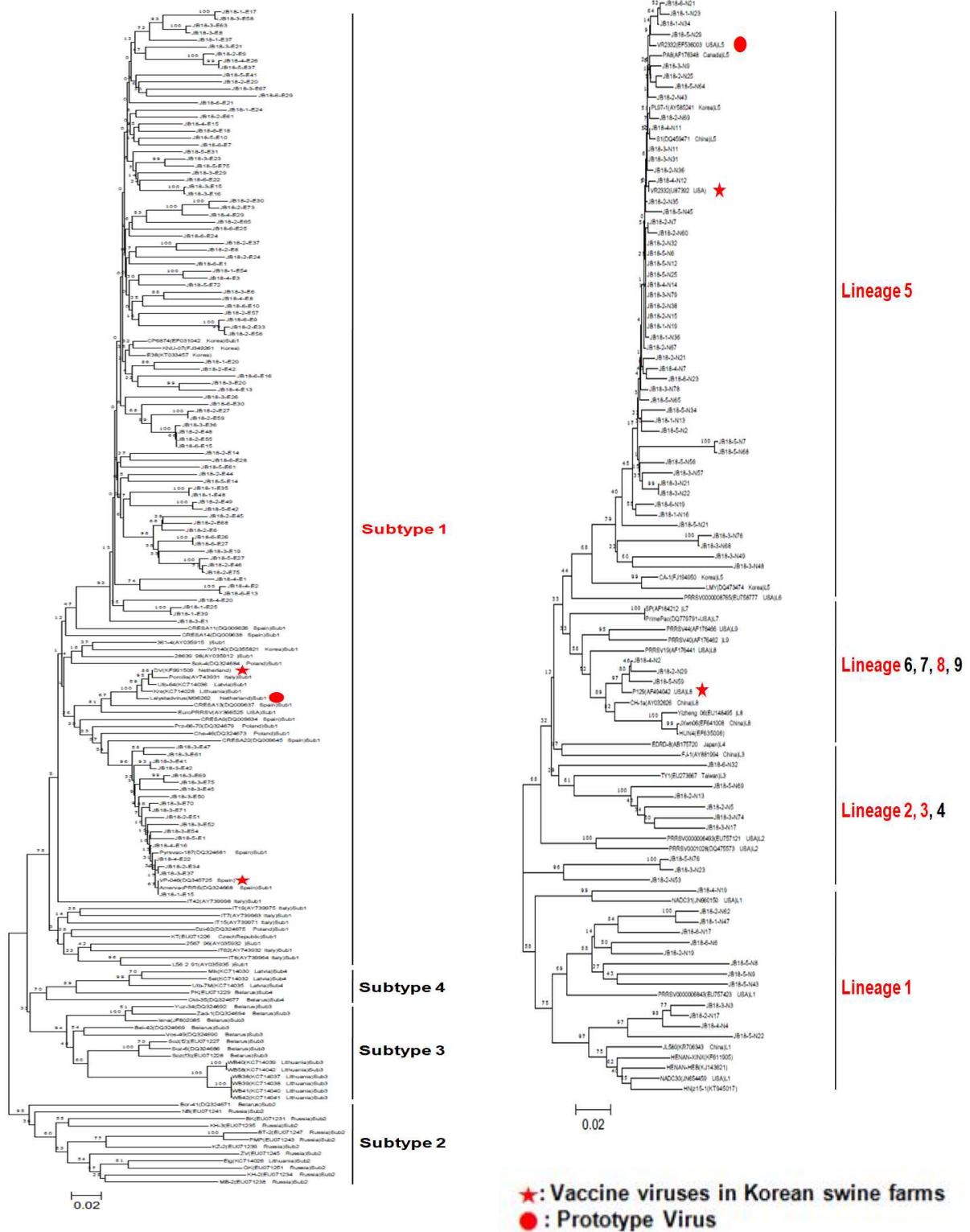
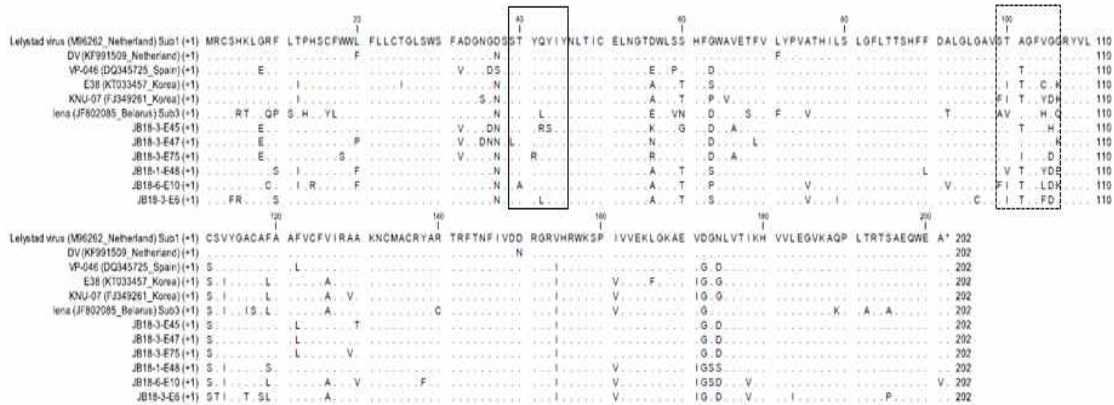


그림 1. PRRSV EU ORF5 NT phylogenetic tree 및 PRRSV NA ORF5 NT phylogenetic tree

(4) 백신주와 같은 cluster에 포함되는 PRRSV 분리주들은 백신주의 변이로 추정된다. 또한, 국내 검출 분리주들은 Type 1 백신주인 DV와 VP-046와 각각 85.31~94.39%, 84.65~100.00%의 상동성을 보이며, Type 2 백신주인 Ingelvac@PRRS MLV 및 Fostera@PRRS와 각각 83.25~99.67%, 83.91~98.84%의 상동성을 보였다.

(5) 바이러스 중화 및 면역학적 방어에 밀접한 관련이 있는 N-glycosylation profile을 분석하였다(그림2). 서로 다른 ORF5 glycoprotein amino acid 서열 Type 1 6개와 type 2 14개를 확보하였으며, 비교 결과 type 1의 경우 39-45, type 2의 경우 32-39, 57-61 등의 위치에서 상당한 수준의 유전적 변이를 확인하였다.

(Type 1)



(Type 2)

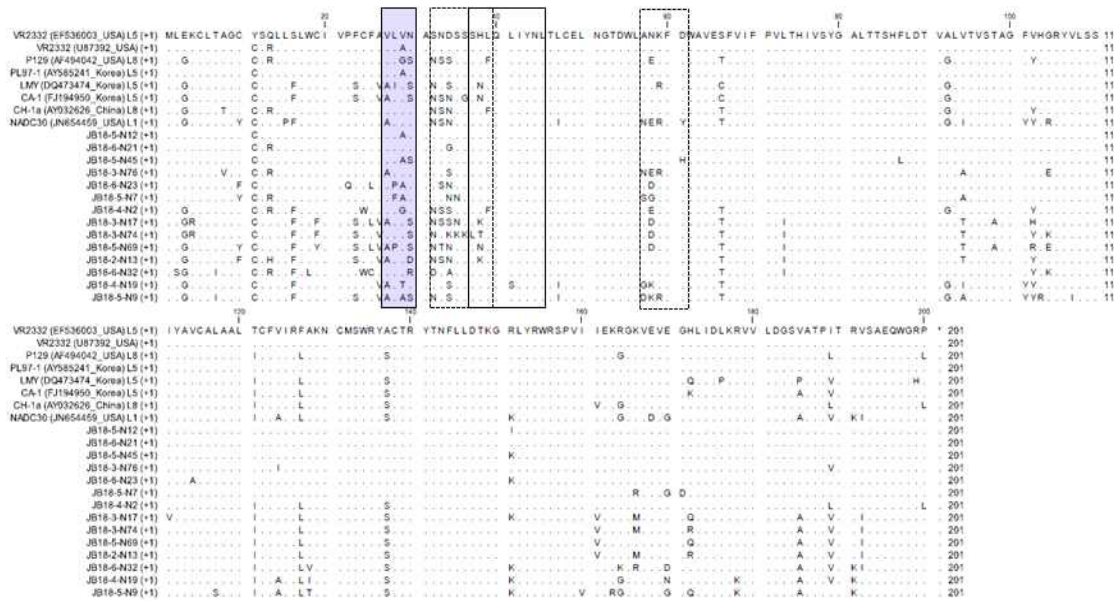


그림 2. glycoprotein 5 (GP5) 아미노산 서열 비교 분석

나. 국내 유행 PRRS 바이러스의 면역원성, 병원성 분석 및 बैं킹 관리

(1) 3년차에 연구수행과정에서 분리된 바이러스주 40주에 대해 한국수의유전자원은행(KVCC)에 기탁완료 예정임

다. KAHIS 유전자변이관리시스템을 이용한 유전자 정보 보존 및 활용 PRRSV 변이 추적 시스템

과 연계하여 PRRSV 유전자 데이터베이스 구축

- (1) 분리된 PRRSV의 ORF5 유전자를 분석, PRRSV 변이 추적 시스템과 연계하여 PRRSV 유전자 데이터베이스 구축하였으며 국가동물방역통합시스템(www.kahis.go.kr)에 3년차(2017-2018)에는 71개(C18003007~C18003077)를 등록하였다.

## 2. 다양한 유전형의 국내 PRRSV를 예방할 수 있는 저변이 키메라백신의 개발

가. 확장형 저변이 키메라 PRRS 백신 생산

- (1) ORF3와 4를 분리하기 위해 삽입한 GM-CSF 유전자와 반복된 ORF4 유전자는 변이 바이러스 생산 후 MARC-145 세포에서 2세대까지 존재하지만 연속 계대 조건에서 소실되는 것으로 관찰되어 삽입 유전자의 안정성을 높이기 위해 PRRSV 저변이 유전자와 ORF4 유전자 발현을 위해 삽입한 transcription regulatory sequence(TRS) 4 앞에 존재하는 기존의 유전자 염기서열을 현재 5개 뉴클레오타이드에서 33, 65, 88 bp의 염기서열을 늘려가며 각각의 변이주를 생산하였다(그림 3, 4).
- (2) ORF3와 4를 분리하기 위해 TRS4 앞에 33, 65, 88 bp 염기서열을 연장하여 삽입한 변이주들은 1-2 계대 후 삽입한 염기서열들이 소실되는 것으로 관찰되었다.

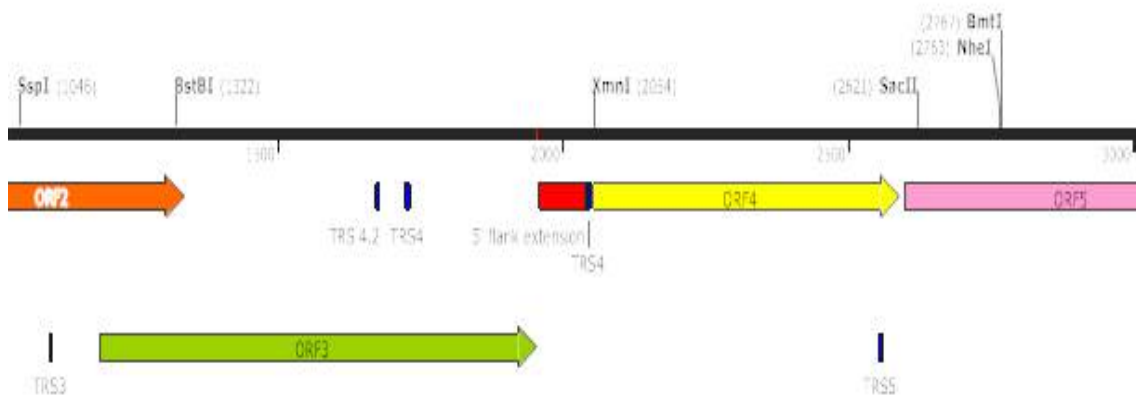
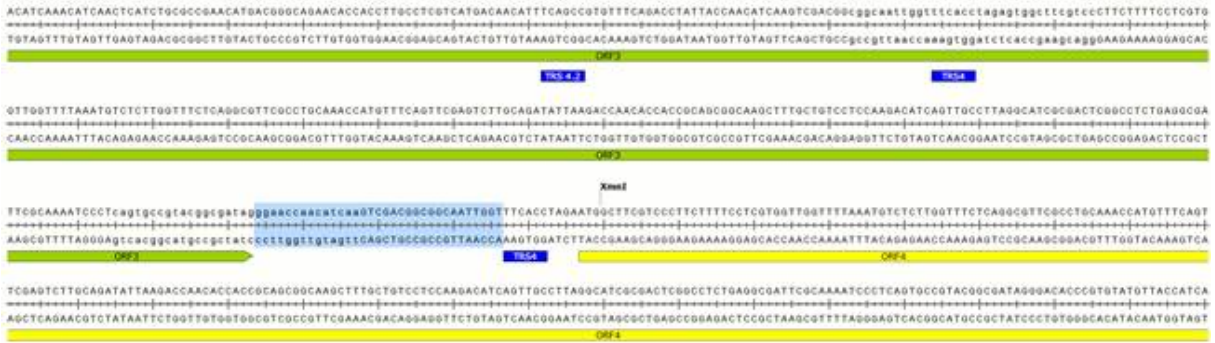


그림 3. ORF3/4를 분리하기 위한 TRS4 5' 부분의 염기서열 연장 전략

(A)



(B)



(C)

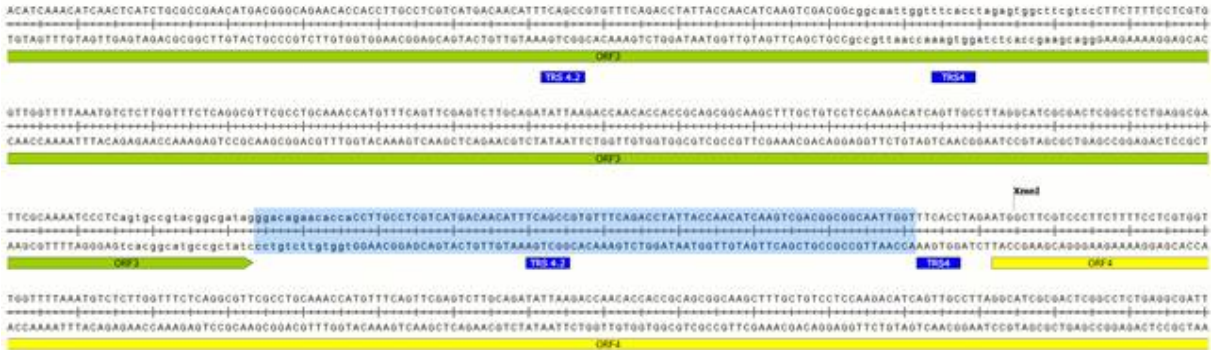


그림 4. ORF3/4를 분리하기 위한 TRS4 5' 부분의 33bp(A), 65bp(B), 88bp(C) 연장 변이주 생산

(3) ORF3와 4를 분리하기 위해 TRS4 앞에 33, 65, 88 bp 염기서열을 연장하여 삽입한 변이주들이 계대 조건에서 삽입한 유전자가 소실되는 것으로 관찰되어 삽입 유전자의 안정성을 높이기 위해 저변이 키메라 백신에서 적용한 것과 마찬가지로 RVRp22의 ORF1a 유전자를 ORF3와 4를 분리 변이주에 삽입하여 변이주를 생산하였다. (그림 5).

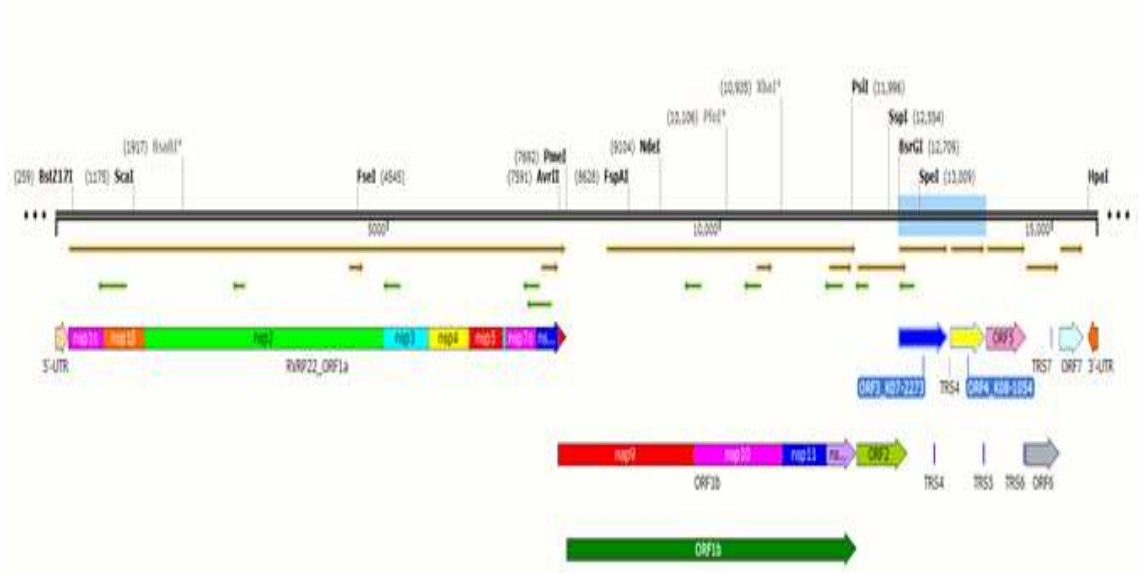


그림 5. ORF3/4를 분리 유전자의 안정성을 높이기 위한 RVRp22 ORF1a 유전자 삽입 변이주의 생산

(4) ORF3와 4를 분리 유전자의 안정성을 높이기 위해 저변이 키메라 백신에서 적용한 것과 마찬가지로 RVRp22의 ORF1a 유전자를 ORF3와 4를 분리 변이주에 삽입한 변이주를 생산하여 유전자의 안정성을 평가한 결과 3대의 연속세대 동안 분리 유전자가 안정적으로 유지되는 것을 확인하였다(그림 6).

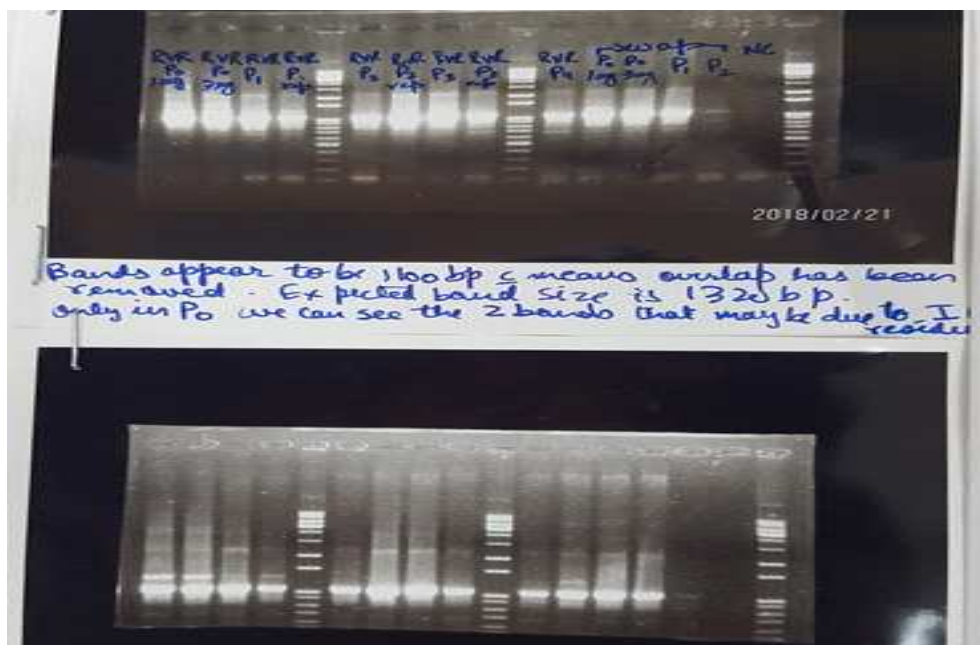
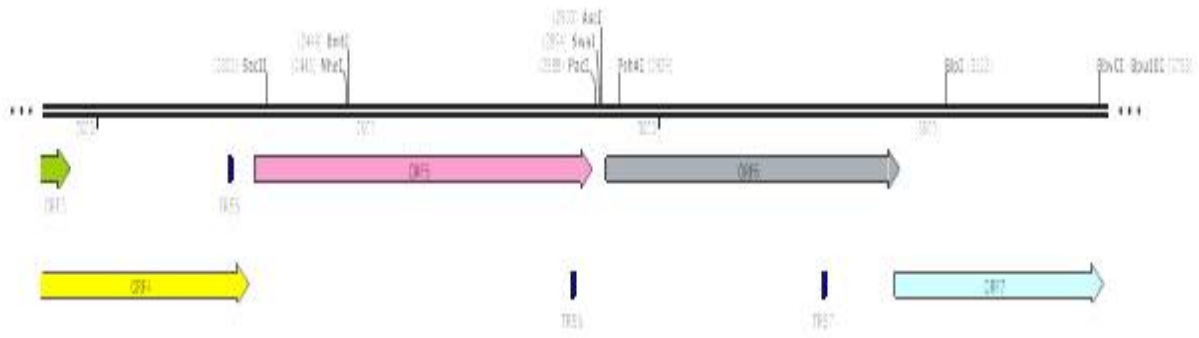


그림 6. ORF3/4를 분리 유전자의 안정성을 높이기 위한 RVRp22 ORF1a 유전자 삽입 변이주의 생산

(5) ORF3와 4를 분리한 변이주의 안정성이 확인되었으므로 ORF5와 6의 중첩된 유전자 부위를 분리하기 위한 변이주를 동일한 구성으로 생산하였으며 유전자의 안정성을 평가한 결과 3대의 연속계대 동안 분리 유전자가 안정적으로 유지되는 것을 확인하였다(그림 7).

(A)



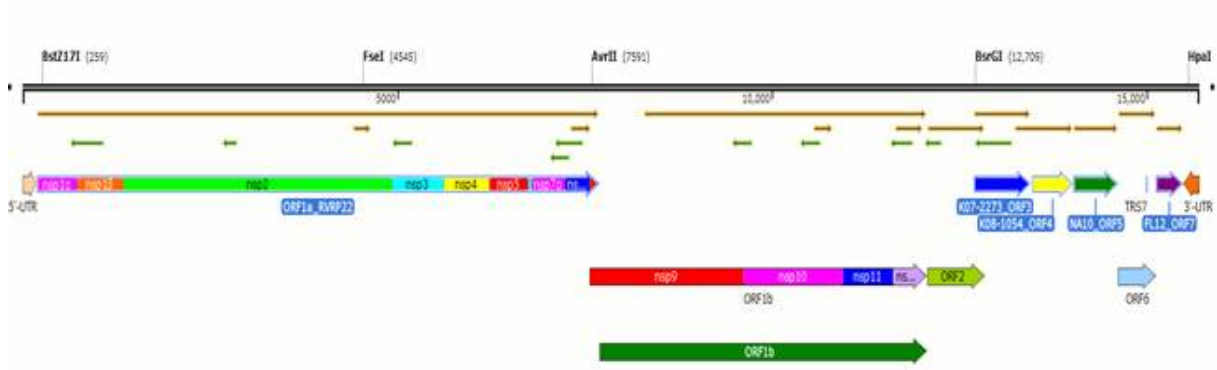
(B)



그림 7. ORF5/6 분리 유전자의 안정성을 높이기 위한 RVRp22 ORF1a 유전자 삽입 변이주의 생산

(6) 이상과 같이 ORF3와 4의 중첩된 유전자를 분리하고 ORF5와 6의 중첩된 유전자 부위를 분리한 변이주의 연속계대에 의한 유전적 안정성이 확인되었으므로 이 기술을 이용하여 3개의 국내 북미형 분리주들(K07-2273, K08-1054와 NA10)의 유전자를 ORF3, ORF4 와 ORF5에 각각 삽입한 3종 바이러스 기반의 키메라 백신 바이러스를 생산하였으며 이를 CB5로 명명하였다(그림 8).

(A)



(B)



그림 8. 국내 PRRS 바이러스 3주 바탕의 약독화 키메라 백신(CB5)의 생산

나. 저변이 키메라 PRRS 백신의 임신모돈 적용 및 유산에 대한 효과 검증

(1) 저변이 키메라 백신의 임신모돈 유산에 대한 방어효능 및 안전성 평가

(가) 2017년 4월 30일에 모든 9마리에 동시에 교배를 실시하여 임신 60일이 되는 6월 30일에 표2에서 나타내진 것과 같이 CB1과 CB3 2 종류의 저변이 키메라 백신을 접종하고 접종 전과 접종 후 30일간 매주 채혈을 실시하고 이상 유무를 관찰할 것이다.

(나) 임신 90일이 되는 2017년 7월 30일에 표2에서처럼 북미형 바이러스 2주(K07-2273, K08-1054)를 공격접종하고 분만까지 매주 채혈을 실시하고 이상 유무를 관찰하였다.

표2. 임신모돈에서의 저변이 키메라 백신의 방어효능 및 안전성 평가

모돈번호	백신 바이러스 (임신 60일)	공격 바이러스 (임신 90일)
J1	CB1	K07-2273 (NA1)
J2		
J3		
J4		
J5		
J6	CB3	K07-2273 (NA1)
J7		K08-1054 (NA2)
J8	Negative	K07-2273 (NA1)
J9		K08-1054 (NA2)

(다) 백신접종 후 30일에 공격접종을 실시한 결과 CB1과 CB3 모두 K07-2273 또는 K08-1054 공격감염에 대한 효과적인 방어효과를 보이는 것으로 관찰되었으며 백신접종 후 14일 부터 높은 수준의 항체를 형성하였다(그림 9). 모돈 J9에 대한 K08-1054 공격감염은 2차례의 접종시도에도 불구하고 성공적으로 진행되지 않아 J9는 공격접종 후에도 음성으로 유지되었다.

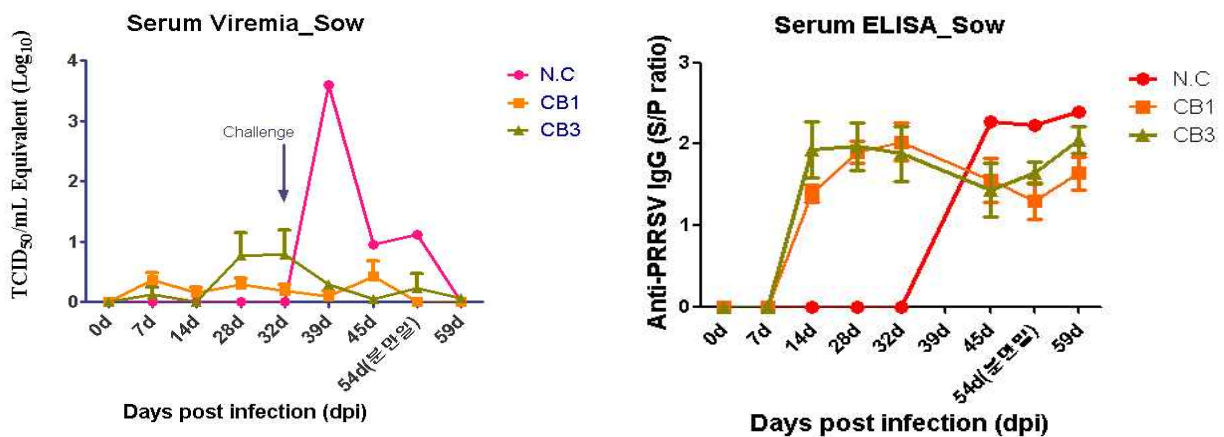


그림 9. 백신접종 및 공격접종 후 모돈의 혈청 viremia 및 항체가 변화

(라) 백신접종 후 30일에 공격접종을 실시하고 사산율을 관찰한 결과 CB1을 백신으로 접종한 경우 K07-2273을 공격접종 한 후에는 사산 자돈이 없었고 K08-1054를 접종한 경우는 총 25마리 자돈 중 1마리만 사산이 일어나 유산을 효과적으로 예방하고 안전성이 높은 것으로 관찰되었으며 CB3를 공격접종 한 후에는 다소 높은 수준의 사산율(14.30-30.77%)이 관찰되어 안전성이 다소 떨어지는 것으로 평가되었다. 백신 미접종 대조군에서는 K07-2273과 K08-1054를 접종한 경우 각각 16.67%와 17.65%의 사산율을 보이는 것으로 관찰되었다(표 3).



표3. 임신모돈에서의 저변이 키메라 백신의 유산 예방 및 안전성 평가

모돈번호	백신접종	공격접종	총 자돈생산수	사산수	사산율
J1	CB1	K07-2273	9	0	0%
J2			6	0	
J3		K08-1054	12	1	
J4			13	0	
J5	CB3	K07-2273	3	2	14.30%
J6			11	0	
J7		K08-1054	13	4	
J8	-	K07-2273	12	2	16.67%
J9	-	K08-1054	17	3	17.65%

(마) 백신접종 후 30일에 공격접종을 실시하고 분만 후 모돈의 병변을 관찰한 결과 CB1 또는 CB3를 백신으로 접종한 경우 K07-2273 또는 K08-1054를 공격접종 한 후에도 폐포벽이 미약하게 두꺼워지고 미약한 수준의 간질성 폐렴 등의 폐병변이 관찰되었으나 다른 장기에서 심각한 수준의 병변이 관찰되지 않았고 백신 미접종 대조군에서도 비슷한 수준의 병변들이 관찰되어 두 공격접종 바이러스들의 모돈 자체에 대한 병원성은 높지 않은 것으로 관찰되었다(표 4).

표4. 임신모돈에서 저변이 키메라 백신 접종 후 분만 모돈의 현미경적 병변분석

Microscopic findings	Grade	Groups								
		CB1				CB3		Non-Vaccine		
		K07-2273	K08-1054	K07-2273	K08-1054	K07-2273	K08-1054			
		J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9
Alveolar wall thickening	+	2/4	3/5	1/4	1/5	0/1	3/5	2/4	0/1	3/5
	++	0/4	1/5	1/4	3/5	0/1	1/5	1/4	0/1	0/5
	+++	0/4	0/5	0/4	1/5	0/1	0/5	1/4	0/1	0/5
Pneumonia (bronchointerstitial or interstitial pneumonia)	+	0/4	0/5	0/4	3/5	0/1	0/5	3/4	0/1	0/5
	++	0/4	1/5	0/4	1/5	0/1	0/5	0/4	0/1	0/5
	+++	0/4	0/5	0/4	0/5	1/1	0/5	0/4	1/1	0/5
Peribronchiolar and perivascular inflammatory cell infiltration	+	0/4	0/5	1/4	1/5	1/1	1/5	2/4	1/1	1/5
Pleurisy	+	0/4	1/5	0/4	0/5	0/1	0/5	0/5	0/1	1/5
	++	0/4	0/5	1/4	0/5	0/1	0/5	0/5	0/1	0/5
Atelectasis	+	1/4	0/5	0/4	1/5	0/1	0/5	0/5	0/1	0/5

(2) 저변이 키메라 PRRS 백신의 분만 자돈에서의 효과 검증

(가) 저변이 키메라 PRRS 백신(CB1과 CB3)을 접종한 모돈과 비접종 모돈에서 분만된 자돈들을 평가하였다.

- ① 백신 접종 모돈과 비접종 모돈에서 분만된 자돈들의 생시체중을 측정하고 PRRSV 혈중 바이러스 농도를 측정하였다.
- ② 이유 기간까지 매주 채혈을 측정하여 PRRS 감염상황을 파악하고 기타 질병발생, 폐사율과 증체율을 측정하였으며 분만 4주에는 모두 안락사하여 병리학적 검사를 진행하였다.

(나) 백신접종 후 30일에 공격접종을 실시하고 분만 시 분만 자돈의 체중을 측정한 결과 K07-2273과 K08-1054를 접종한 경우 모두 평균 1.5 kg 이상의 분만 체중이 관찰되었고 백신 미접종 대조군에 K07-2273과 K08-1054를 접종한 경우는 모두 평균 1.0 kg의 분만 체중이 관찰되어 백신접종 모돈에서 분만된 자돈들의 분만체중이 통계적으로 유의성 있게 높은 것으로 관찰되었다(그림 10).

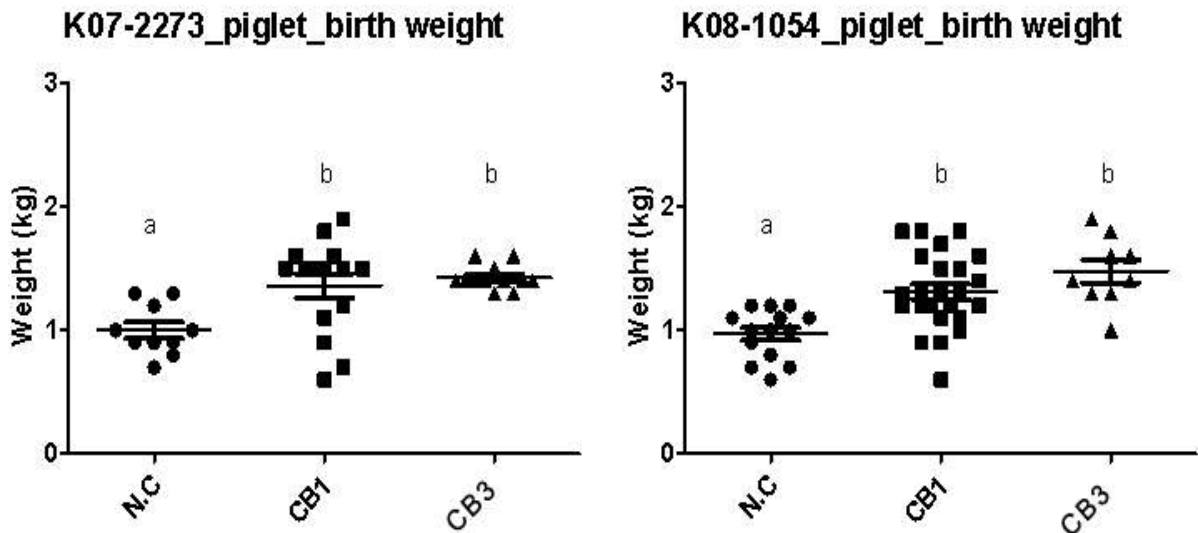


그림 10. 백신접종 및 공격접종 후 분만 자돈들의 분만 체중

(다) 백신접종 후 30일에 공격접종을 실시하고 분만 후 분만 자돈의 혈중 바이러스 농도를 주단위로 측정한 결과 CB1 또는 CB3을 접종한 그룹이 백신 비접종 대조군과 비교하여 K07-2273 또는 K08-1054의 공격접종에 대해 효과적인 방어력을 형성하는 것으로 관찰되었으나 CB1이 보다 높은 수준의 방어능력을 보였다(그림 11). J9 백신 비접종 모돈에 대한 K08-1054의 공격접종이 성공적으로 수행되지 않아 그에서 분만된 자돈들에서도 혈중 바이러스가 관찰되지 않았다.

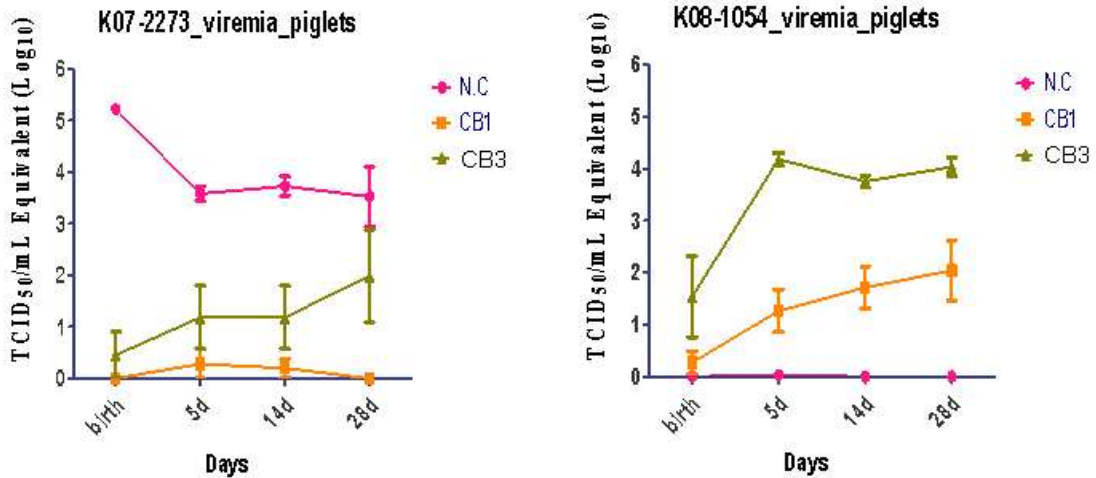


그림 11. 백신접종 및 공격접종 후 분만 자돈들의 혈청 viremia 및 항체가 변화

(라) 백신접종 후 30일에 K07-2273 또는 K08-1054 공격접종을 실시하고 분만 후 분만 자돈의 폐병변을 측정된 결과 백신을 접종한 모돈에서 분만된 자돈들이 백신 비접종 대조군에서 분만된 자돈들과 비교하여 보다 낮은 수준의 간질성 폐렴을 보였다(그림 12). K08-1054의 공격접종이 성공적으로 수행되지 않은 J9 모돈에서 분만된 자돈들에게서는 특징적인 병변이 관찰되지 않았다.

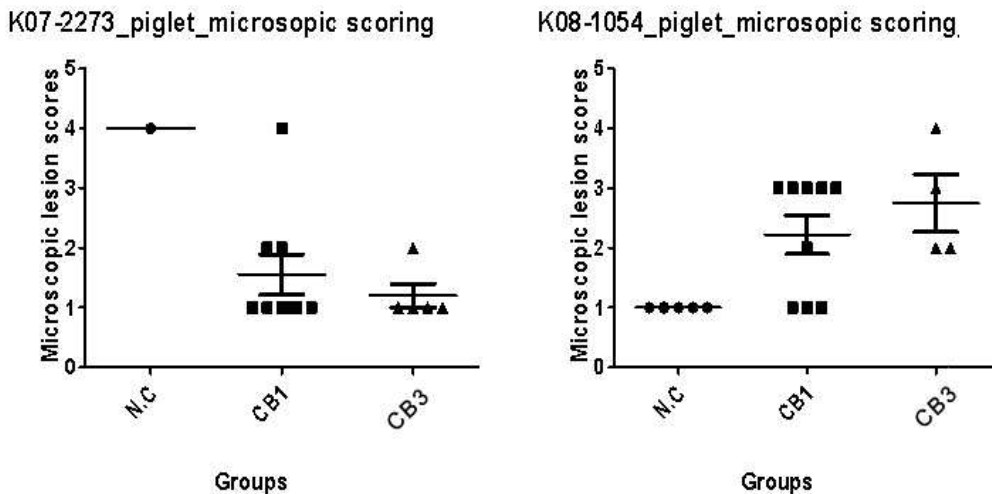


그림 12. 백신접종 및 공격접종 후 분만 자돈들의 폐병변

다. 저변이 키메라 PRRS 백신의 변이 안정성 평가 계속

(1) 유전적 안정성과 관련된 유전자를 확정하기 위해 RVRp22-nsp7 $\beta$ 와 RVRp22-nsp2\_nsp7 $\beta$  변이 바이러스들을 2차년도에 생산하였으며 MARC-145와 PAM 세포에서 특성을 분석한 결과 MARC-145에서의 바이러스 증식과 비교하여 원 숙주유래 세포인 PAM에서의 증식이 약화된 약독화 바이러스 특징들이 관찰되었다(그림 13).

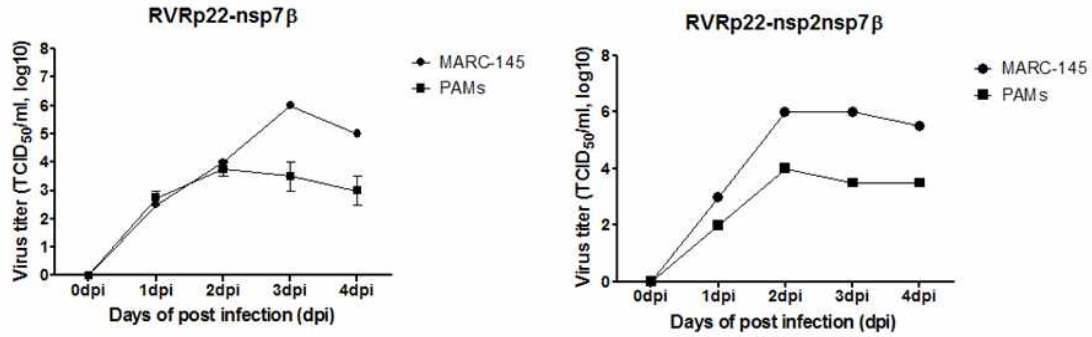


그림 13. 변이주들의 MARC-145와 PAM 세포에서 바이러스 증식 추이

(2) 세포 수준의 평가에서 RVRp22-nsp7β와 RVRp22-nsp2\_nsp7β 변이 바이러스들 모두 약독화 특성을 보였으나 자돈에서 연속계대를 실시한 결과 두 변이바이러스 모두 2번째 계대에서 유의성 있는 병원성 획득이 관찰되었다(그림 14).

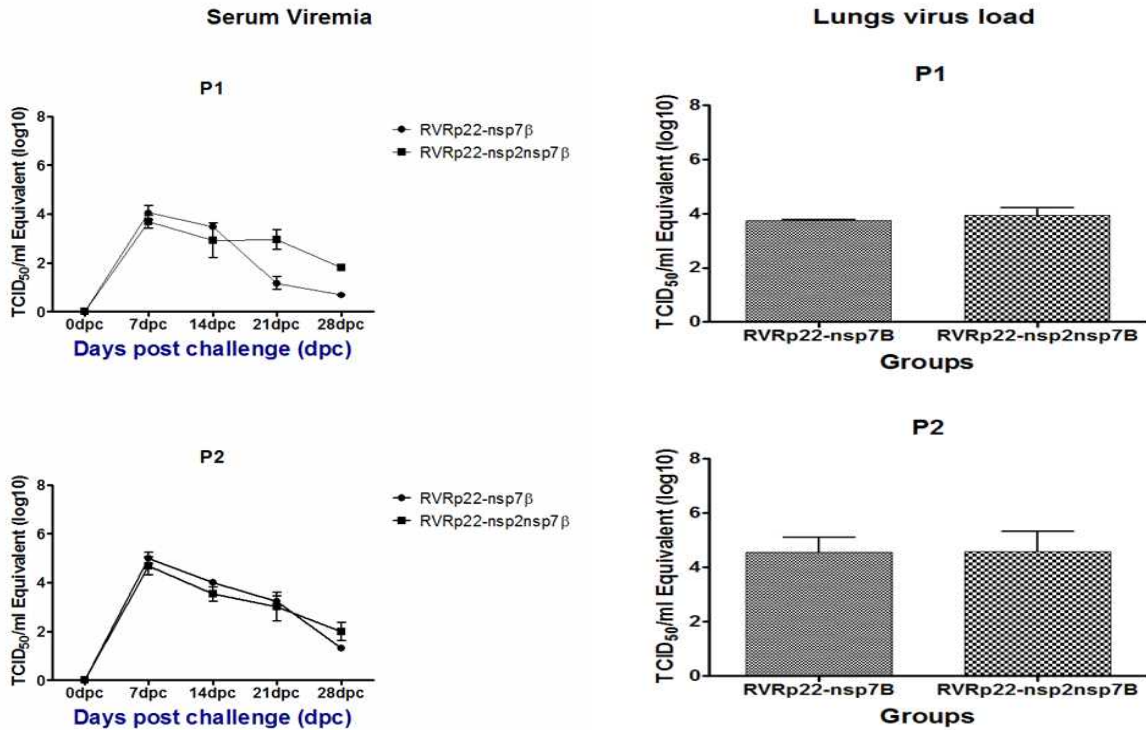


그림 14. 변이주들의 자돈에 공격감염을 통한 병원성 회복 평가 실험 결과

(3) 자돈에서의 연속계대 평가에서 RVRp22-nsp7β와 RVRp22-nsp2\_nsp7β 변이 바이러스들 모두 2번째 계대에서 유의성 있는 병원성 획득이 관찰되었으며 2번의 계대에서 분리한 바이러스의 특성을 분석한 결과 계대 전(before challenge, BC)에서 관찰되었던 원 숙주유래 세포인 PAM 세포에서 약화된 바이러스의 증식이 2계대를 거치는 동안 거의 회복되는 것이 관찰되어 MARC-145와 PAM 모두에서 잘 증식하는 전형적인 병원성 바이러스로 회귀하는 것으로 평가되었다(그림 15).

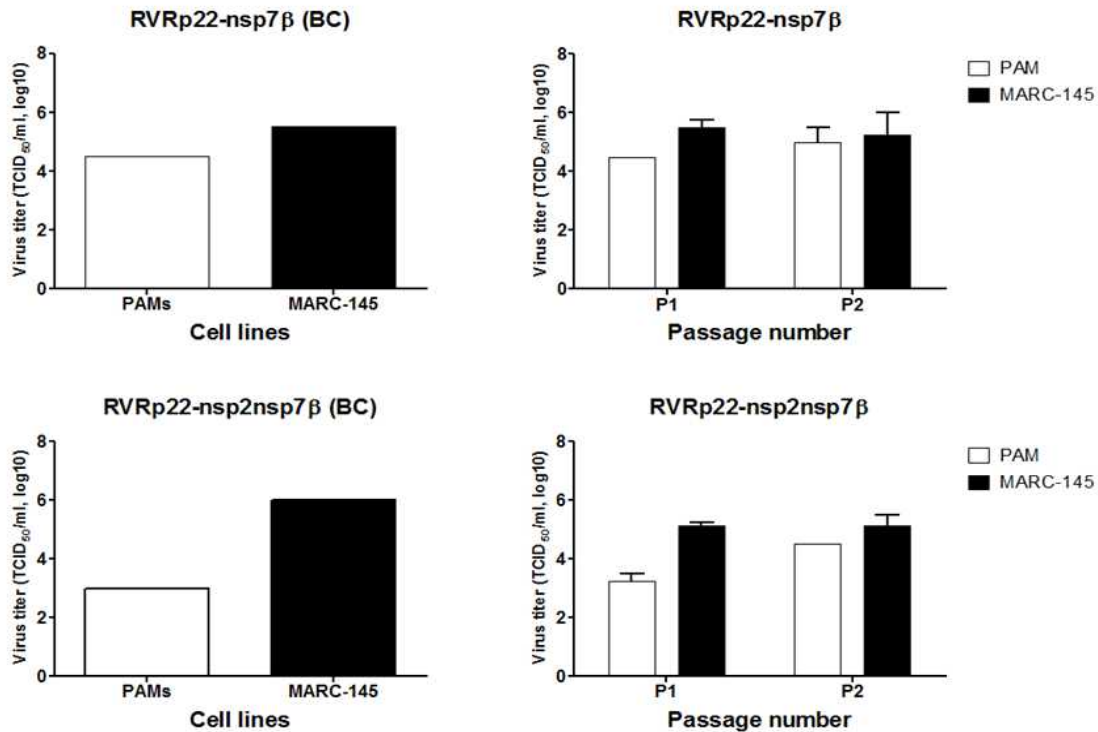


그림 15. 변이주들의 MARC-145와 PAM 세포에서 바이러스 증식 추이

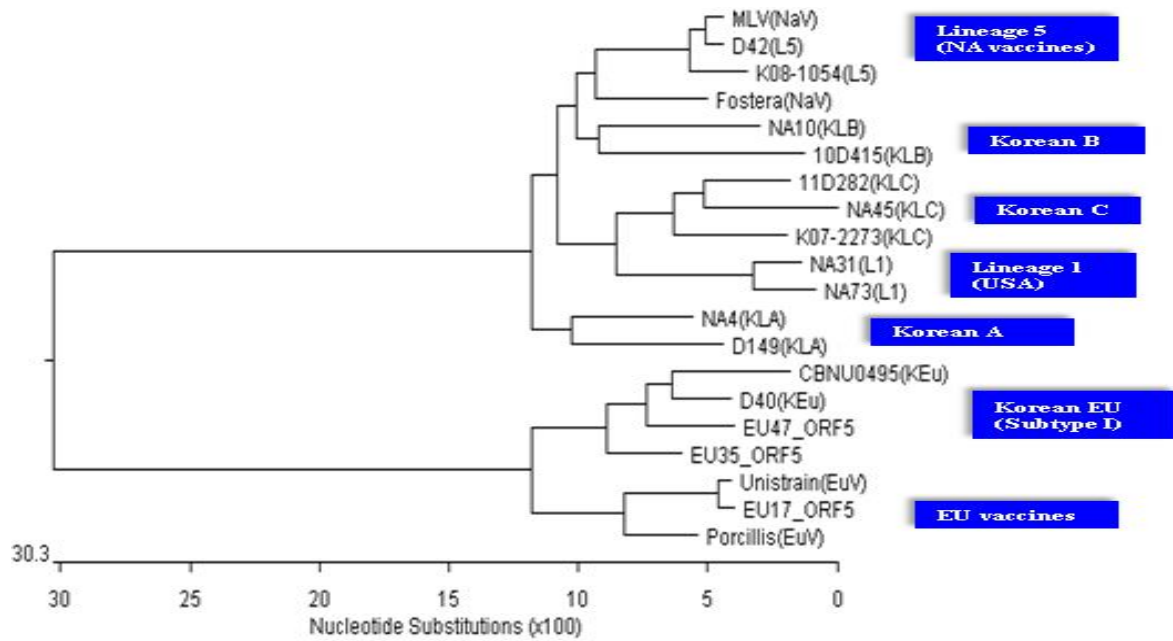
(4) 따라서 3년간의 다양한 변이 바이러스들의 생산과 동물에서의 연속계대를 이용하여 평가한 결과 RVRp22에서 관찰된 유전적 안정성은 RVRp22에서 특징적으로 발견되는 nsp2 유전자 7개의 변이에 의해 일어나는 것으로 판단된다.

라. 국내 유행 PRRS 바이러스를 폭넓게 방어할 수 있는 PRRS 저변이 키메라 백신 시스템 개발

(1) 현재까지 분석된 410주의 북미형 바이러스와 409주의 유럽형 바이러스를 합한 총 819주의 국내 발생 PRRS 바이러스들의 유전자를 분석한 결과

(가) 북미형 바이러스는 전 세계적으로 발생하는 lineage 1형과 lineage 5형(MVL vaccine 계열)과 국내에서만 유일하게 발생하는 Korean lineage A, B, C형 등 총 5개 그룹으로 분류가 되는 것으로 관찰되었으며 각 그룹간은 ORF5 기준으로 약 15%이상의 유전적 차이를 보였으며 그룹 내에서는 약 10% 이하의 유전적 차이를 보이는 것으로 분석되었다(그림 16).

(나) 유럽형 바이러스는 전 세계적으로 가장 많이 발생하는 serotype I에 속하는 바이러스가 국내에서도 지속적으로 발생하고 있으나 같은 serotype I에 속하는 국외 발생 바이러스들과 비교하여 15% 이상의 유전적 차이를 보이는 Korean EU 바이러스주가 현재 발생하는 대부분의 유럽형 바이러스로 분석되었다(그림 16).



		Percent Identity																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Divergence	1	■	59.5	60.9	86.8	91.1	85.4	85.6	87.5	83.9	86.8	92.1	86.6	61.1	61.4	84.7	61.6	61.6	60.9	83.4	82.3	1	11D282(KLC)
	2	55.2	■	93.6	61.4	60.2	61.2	61.4	61.9	60.8	61.7	58.5	61.0	86.8	87.0	58.0	87.5	91.1	91.3	62.5	57.1	2	CBNU0495(KEu)
	3	52.8	6.9	■	61.9	60.9	62.2	62.7	62.7	61.0	62.7	62.5	62.2	89.1	88.9	59.3	89.1	94.1	94.2	63.7	62.4	3	D40(KEu)
	4	14.9	54.0	52.9	■	86.7	90.4	91.4	88.6	88.7	86.4	84.7	86.6	63.3	62.9	87.8	63.0	63.5	63.2	91.7	87.5	4	Fosterera(NaV)
	5	9.7	60.8	57.9	15.0	■	85.9	86.9	87.7	86.2	88.6	90.9	87.7	61.0	60.5	83.7	61.0	60.4	61.4	86.0	85.3	5	K07-2273(KLC)
	6	16.7	55.1	52.8	10.4	16.1	■	96.7	86.9	88.3	85.7	84.2	84.9	63.2	62.9	86.4	63.0	63.3	63.3	96.4	85.5	6	K08-1054(L5)
	7	16.5	54.7	53.2	9.3	14.8	3.4	■	88.2	88.5	86.1	84.4	85.6	63.5	63.9	87.1	63.9	64.2	63.4	98.6	87.0	7	MLV(NaV)
	8	14.0	53.5	51.6	12.6	13.7	14.8	13.1	■	86.8	86.4	85.6	86.2	62.5	62.4	84.0	62.7	63.2	63.3	88.1	90.3	8	NA4(KLA)
	9	18.5	55.9	55.6	12.5	15.7	13.4	12.8	15.0	■	85.3	83.5	85.2	62.7	61.8	87.0	62.7	62.7	62.3	87.4	86.5	9	NA10(KLB)
	10	15.1	57.3	55.7	15.4	12.8	16.2	15.8	15.4	16.6	■	85.6	95.9	61.9	61.2	83.9	61.9	63.7	62.2	85.7	84.6	10	NA31(L1)
	11	8.5	60.6	55.1	17.7	9.9	18.3	18.1	16.5	19.4	16.7	■	86.2	63.2	61.2	82.8	61.5	62.5	62.4	84.3	83.4	11	NA45(KLC)
	12	15.3	58.8	56.7	15.2	13.8	17.3	16.5	15.6	17.2	4.3	15.7	■	62.4	61.4	83.2	61.7	63.3	62.0	85.2	83.6	12	NA73(L1)
	13	50.4	15.0	12.0	49.8	55.8	50.7	51.0	50.6	52.8	55.9	52.7	55.1	■	93.4	59.9	93.2	87.6	86.1	64.6	63.1	13	Porcillis(EuV)
	14	51.2	14.8	12.2	52.4	57.5	51.8	52.6	52.1	54.5	57.1	53.8	57.5	7.0	■	58.5	98.8	87.5	86.5	63.2	63.1	14	Unistrain(EuV)
	15	17.6	55.1	54.7	13.5	19.0	15.8	14.5	18.4	14.1	18.8	20.3	19.7	54.3	53.1	■	59.9	60.5	59.9	85.1	80.6	15	10D415(KLB)
	16	52.1	14.1	12.1	52.4	57.1	52.2	53.4	52.9	53.8	57.2	54.7	57.6	7.2	1.2	54.0	■	88.0	87.3	63.2	63.8	16	EU17_ORF5
	17	50.9	9.7	6.3	49.6	57.5	50.3	50.6	49.1	52.5	52.6	53.2	53.9	13.9	14.1	52.0	13.5	■	91.9	64.6	63.6	17	EU35_ORF5
	18	51.5	9.5	6.1	52.7	57.2	51.5	51.9	51.5	55.0	55.9	54.2	57.8	15.8	15.4	53.7	14.3	8.7	■	63.7	63.4	18	EU47_ORF5
	19	16.3	52.8	51.3	8.9	15.9	3.7	1.4	13.3	13.8	16.3	18.2	17.0	49.9	51.8	14.0	52.6	49.4	50.4	■	87.0	19	D42(L5)
	20	17.5	56.3	52.3	14.0	16.9	16.7	14.7	10.6	14.6	17.8	19.5	19.3	49.3	51.9	19.9	51.1	49.3	51.8	14.7	■	20	D149(KLA)

그림 16. 2013-2017년 국내 발생 PRRS 바이러스 표준주 선정

(2) 이들 국내 발생 PRRS 바이러스들의 검출 비율을 분석해보면 북미형 바이러스 중에서는 국내에서는 MLV 백신과 유사한 lineage 5가 전체의 32.19% 검출율을 보이므로 국내에서 가장 많이 유행하는 바이러스로 분석되며 그 다음으로 Korean lineage A, C, B, 그리고 lineage 1의 순으로 각각 21.70, 19.26, 15.60, 4.14%의 비율로 검출되는 것으로 분석되었다 (그림 17).

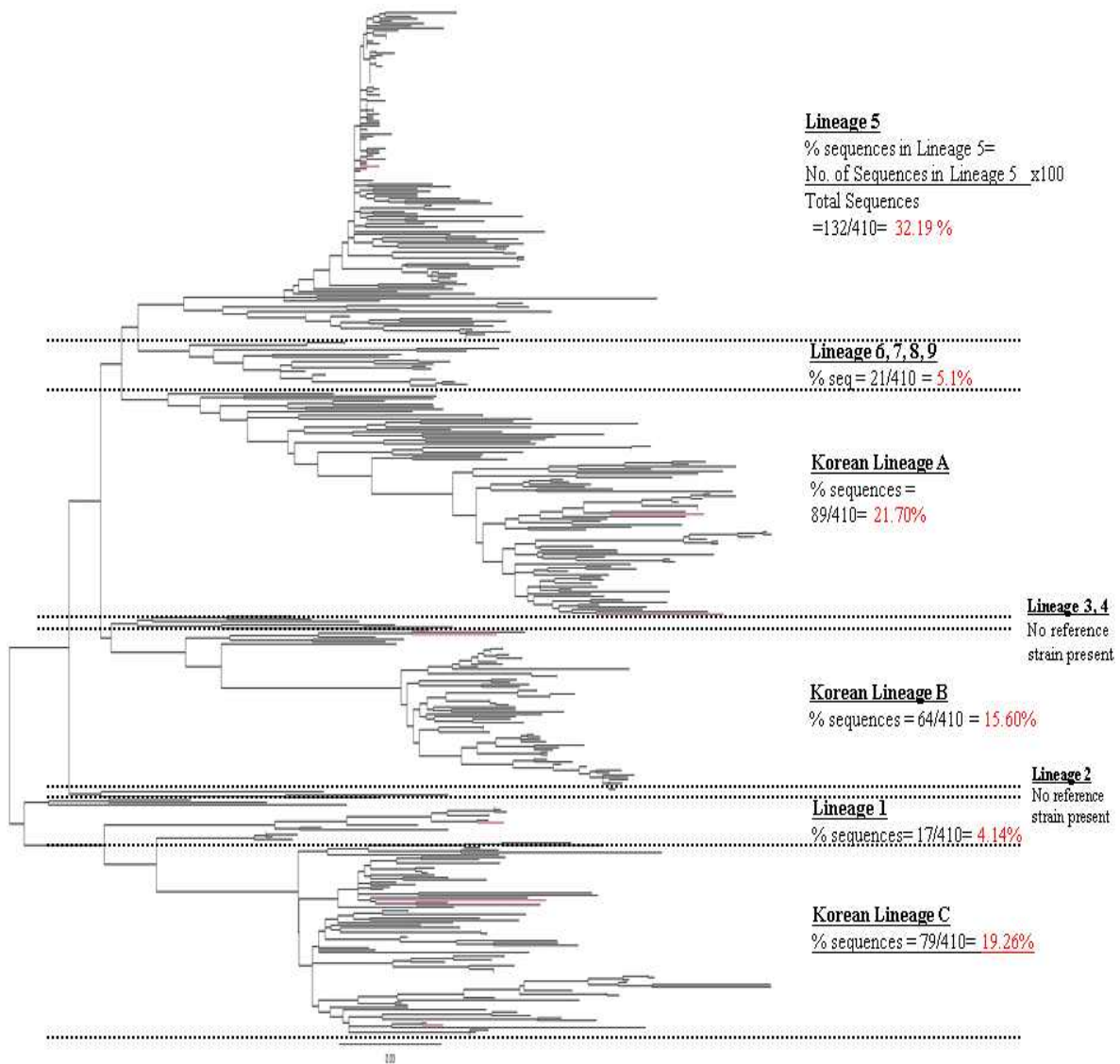


그림 17. 국내 발생 북미형 PRRS 바이러스의 분포 (총 410주)

(3) 국내 발생 유럽형 PRRS 바이러스 중에서는 ORF5 기준 약 10% 이하의 유전적인 차이를 보이는 Korean EU 바이러스들이 전체의 81.66%의 비율로 검출되므로 대부분을 차지하며 EU 백신주와 유사한 바이러스들이 6.84%의 비율로 검출되었다(그림 18).



그림 18. 국내 발생 유럽형 PRRS 바이러스의 분포 (총 409주)



(4) 따라서 위의 발생현황을 바탕으로 국내 북미형 PRRS 예방을 위해 2개의 키메라 백신과 유럽형 PRRS 예방을 위한 1개의 키메라 백신을 현장에 적용하면 국내 발생 북미형 PRRSV 발생의 88.75%, 유럽형 PRRSV의 88.50%를 현재 약독화 백신들의 동종 바이러스에 대한 방어력 이상으로 예방할 수 있을 것으로 기대된다(표5).

표5. 국내 PRRS 예방용 키메라 백신 사업화

키메라백신	유래 바이러스			방어범위
	ORF1	ORF3-4	ORF5-6	
Korean NA1	CB1	K07-2203 (Korean C)	K08-1054 (Lineage 5)	51.45
Korean NA2	CB1	NA4 (Korean A)	NA10 (Korean B)	37.30%
Korean EU1	CB1	EU17 (EU Vaccine)	CBNU0495 (Korean EU)	88.50%

## 제 2절. 돼지 복합 호흡기 질병을 예방하기 위한 PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신의 개발 및 산업화 (제2세부)

### [1차년도]

#### 1. 마이코플라즈마의 면역원성 물질(효모 발현 P97 재조합단백질)에 대한 효력시험

- 선발한 면역원성 물질이 효력에 미치는 영향에 대하여 확인한다.
- 3-4주령 자돈 10마리를 구입하여 처치군 및 비처치군 각 5 마리씩으로 나누어 중앙백신 연구소 내에 있는 동물실험동에 입식하고 마이코플라즈마의 면역원성 물질에 대한 효과를 증명한다.
- 효력 확인 시 세포성 면역 및 체액성 면역을 측정하고 폐, 비강내에서 마이코플라즈마 검출을 억제하는지 유무를 확인한다.

#### 가. 시험백신

- (1) 아래와 같이 효모발현 P97재조합 단백질이 마이코플라즈마 효력에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자, 마이코플라즈마 균체 단일, 균체와 단백질 혼합, 단백질 단일을 각각 제조하였다.

Group	Test vaccine contents	
	Antigen	Adjuvant
Vaccine 1	MHP ..... $2 \times 10^{9.0}$ CCU 이상	Eungen (30%)
Vaccine 2	MHP ..... $2 \times 10^{9.0}$ CCU 이상 p97 ..... 150yg/ml	Eungen (30%)
Vaccine 3	p97 ..... 150yg/ml	Eungen (30%)

#### 나. 시험방법

- (1) MHP에 대한 목적동물에서의 효능을 확인하기 위하여 MHP 항체 음성인 건강한 3~4주령의 자돈 20마리를 선정하여 15마리의 자돈에 시험백신을 각각 2ml (1두분 용량)씩 이근부에 접종하고 나머지 5마리를 대조군으로 하였다.
- (2) 재조합 단백질의 안전성을 확인하고자 백신접종 후에 접종 1~2시간 내의 과민반응을 확인하였다. 백신 접종전과 백신접종 3주후에 채혈하여 항체가(IDEXX kit)를 확인하였으며, 백신 접종 후 접종 3주후에 목적동물을 적정량의 마취제(xylazine 1.5mg/kg과

zolazepam 1.5mg/kg)로 마취를 유도 한 후 기관에 삽관하고 수액라인을 이용하여 마이코플라즈마 공격균주( $1 \times 10^{4.5}$  CCU/ml)를 5ml씩 서서히 주입한다. 공격접종 후 1주일 간격으로 비강액 면봉채취를 진행하여 PCR 진단방법으로 MHP 재분리율(양/음성)을 비교하여 백신의 효능 효과를 확인하였다.

#### 다. 시험결과

##### (1) 안전성 결과

(가) 백신접종 후 30분부터 Vaccine 2와 3을 접종한 그룹에서 일부 구토 및 경련 등이 발생하여 p97에 의한 접종 부작용으로 확인되었다.

시험백신	접종 두수	접종반응 확인						비고
		10분후	20분후	30분후	40분후	50분후	60분후	
Vaccine 1	5	-	-	-	-	-	-	부작용 없음
Vaccine 2	5	-	-	구토 3두	헛구역질 1두	구토 1두	구토 2두	구토 5두 발생
Vaccine 3	5	-	-	-	구토 2두	구토 1두	구토 1두	구토 3두 발생
음성 대조군	5	-	-	-	-	-	-	-

##### (2) 면역원성 결과

(가) MHP 균제가 포함된 백신 1과 백신 2의 경우 3주후에 항체가가 1.0이상으로 상승하였으나, P97만 포함되어 있는 백신인 백신 3의 경우 항체가 0.48정도로 양성전환된 수준이다.

Group	Number	Average of ELISA titer	
		BI	3WPI
Vaccine 1	5	0.05	1.40
Vaccine 2	5	0.04	1.39
Vaccine 3	5	0.04	0.48
음성 대조군	5	0.04	0.04

##### (3) 효능결과

(가) 공격접종전, 공격접종 1, 2, 3, 4주후에 비강에서 PCR을 통한 MHP 재분리 결과 공격접종 3주후에는 접종군(Vaccine 1과 2)은 0%(0/5), 접종군(Vaccine 3)은 80%(4/5), 음성대조군은 100%(5/5)로 가장 큰 양성률의 차이를 확인하였다.

Group	Number	<i>M. hyopneumoniae</i> reisolation results by PCR				
		before	1 WPC	2 WPC	3 WPC	4 WPC
Vaccine 1	1	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
	2	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	5	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Results*	0/5 (0%)	2/5 (40%)	1/5 (20%)	<b>0/5 (0%)</b>	1/5 (20%)
Vaccine 2	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	2	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	3	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
	4	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
	5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Results*	0/5 (0%)	2/5 (40%)	1/5 (20%)	<b>0/5 (0%)</b>	1/5 (20%)
Vaccine 3	1	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
	2	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
	3	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
	4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	5	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
	Results*	0/5 (0%)	1/5 (20%)	2/5 (40%)	<b>4/5 (80%)</b>	2/5 (40%)
공격접종 대조군	1	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
	2	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
	3	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
	4	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
	5	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
	Results	0/5 (0%)	3/5 (60%)	3/5 (60%)	<b>5/5 (100%)</b>	2/5 (40%)

\* : The number of positive animals /Total numbers of tested animals (Positive rate, %)

WPC: Weeks post challenge

#### 라. 결론

(1) 안전성 및 효력 부분에서 MHP 균체 그룹에 비해 효력이 감소하였고 p97 재조합 단백질에 의한 접종 부작용(구토 등)이 발생하여 안전성에 문제로 인해 제외하고 진행하였다.

## 2. 썬코 바이러스 2a, 2b, 2b 변이종에 교차방어 여부 확인시험

- PCV2 whole bacterin vaccine(2b), PCV2 ORF2 발현 재조합 백신에 대하여 2a, 2b, 2b 변이종에 대한 교차방어 여부를 확인한다.
- 3-4주령 자돈 10마리를 구입하여 처치군 및 비처리군 각 5 마리씩으로 나누어 중앙백신 연구소 내에 있는 동물실험동에 입식하고 PCV2 whole bacterin vaccine(2b), PCV2 ORF2 발현 재조합 백신을 접종하여 면역을 측정하고 PCV2a, 2b 및 2b 변이종 바이러스에 대한 중화항체 형성을 평가한다.

### 가. PCV2 2b에 대한 방어여부 확인시험

#### (1) 시험백신

- (가) 아래와 같이 PCV2 whole bacterin vaccine(2b), PCV2 ORF2 발현 재조합 백신을 대상으로 부형제 선정시험에서 선정된 부형제 Adjuvant를 가지고 백신을 제조하였다.

Group	Test vaccine contents	
	Antigen	Adjuvant
Vaccine 1	PCV2 (CAKY98, 10 <sup>6.2</sup> FAID50이상) ----- 37%	Eungen (30%)
Vaccine 2	rPCV2Y ----- 2 x 10 <sup>7</sup> CFU/ml	Eungen (30%)

#### (2) 시험방법

##### (가) 효능확인 방법

- ① PCV2에 대한 목적동물에서의 효능을 확인하기 위하여 PCV2 항체 음성인 건강한 3주령의 자돈 20마리를 선정하여 5마리의 자돈에 각각의 시험백신을 2ml (1두분 용량)씩 이근부에 접종하고, 나머지 5마리는 공격접종 대조군과 음성대조군으로 두었다. 백신 접종 3주후에 PCV2 (ISUVDL98-15237, PCV2 2b) 바이러스 10<sup>6.0</sup>TCID<sub>50</sub>/ml을 비강(2.5ml) 및 근육(2.5ml)으로 각각 공격접종 한 다음, 1, 2, 3, 4주 후에 채혈하여 Real-time PCR을 이용한 혈청내 바이러스 함유량을 비교하여 백신의 효능 효과를 확인하였다.

##### (나) 면역원성확인 방법

- ① PCV2에 대한 목적동물에서의 효능을 확인하기 위하여 PCV2 항체 음성인 건강한 3주령의 자돈 20마리를 선정하여 5마리의 자돈에 각각의 시험백신을 2ml (1두분 용량)씩 이근부에 접종하고, 나머지 5마리는 공격접종 대조군과 음성대조군으로 두었다. 접종 전, 백신접종 3주후, 공격접종 1주, 2주, 3주, 4주후에 각각 채혈하여 확인하였다.

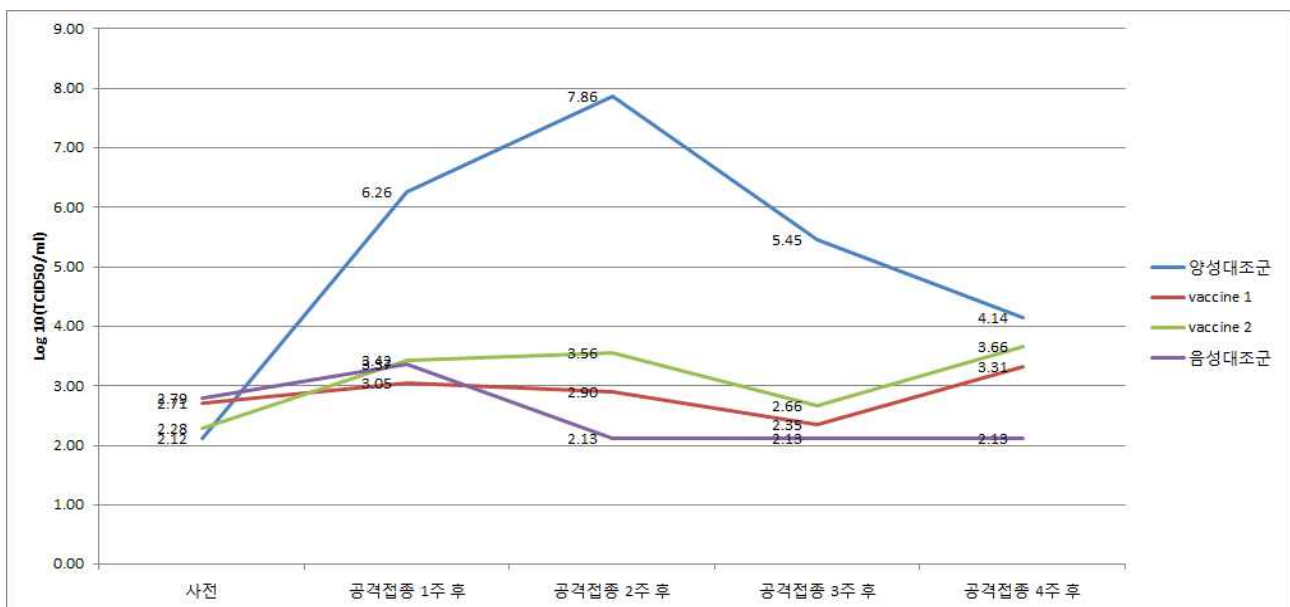
(3) 시험결과

(가) 효능확인 방법

- ① Real-time PCR을 통하여 혈청내 바이러스 함유량을 비교한 결과 음성대조는 실험 종료전까지 바이러스 함량이  $10^3$ 이내였다 (real-time PCR 결과 103이하는 음성으로 판단). 양성 대조군은 공격접종 2주차대 가장 높은 바이러스 함유량을 보이다가 접종 3주 후부터 감소하였다. 반면 백신 접종군은 공격접종 1주 후에 개체별 차이가 있지만 PCV2 바이러스 역가가 약간 증가하다가 공격접종 2주후부터 음성에 가까운 수치를 보였다.

Group	Number	Average of Antigen quantity (Log <sub>10</sub> PCV2 TCID <sub>50</sub> /ml, Average mean)				
		BI	7 DPI	14 DPI	21 DPI	28 DPI
Vaccine 1	5	2.12	6.26 <sup>a</sup>	7.86 <sup>a</sup>	5.45 <sup>a</sup>	4.14 <sup>a</sup>
Vaccine 2	5	2.71	3.05	2.90	2.35	3.31
양성 대조군	5	2.28	3.42	3.56	2.66	3.66
음성 대조군	5	2.79	3.37	2.13	2.13	2.13

<sup>a</sup> : Significant different compared with the control group.  $p < 0.05$ ., BI ; Before infection, 7 dpi ; 7 days post challenge, 14 dpi ; 14 days post challenge, 21 dpi ; 21 days post challenge, 28 dpi ; 28 days post challenge.

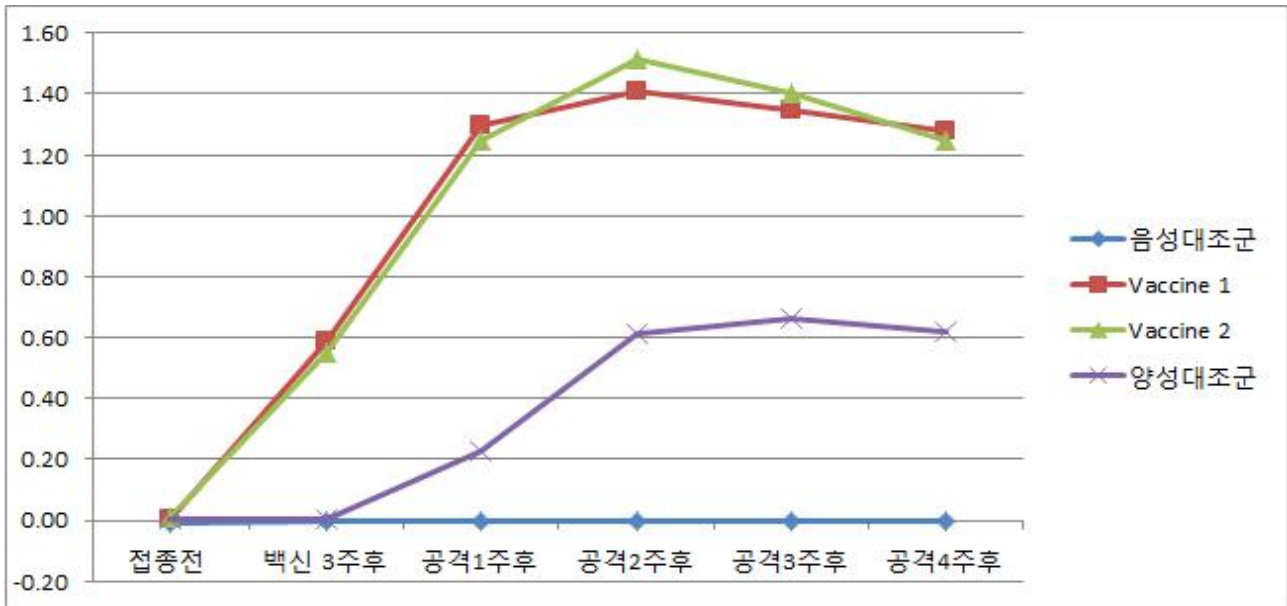


(나) 면역원성확인 방법

- ① 백신 후 공격접종 하였을 때 PCV2 항체가 전환 양상을 살펴보기 위해 ELISA(VD pro PCV2 NC AB ELISA Kit, 메디안디노스틱)를 실시하였다. 검사 결과 음성대조군은 실험 종료 시까지 항체가 음성이었으며, 양성대조군인 공격접종 대조군은 공격접종 2주후부터 양성으로 전환되었다. 백신 접종군은 백신 3주차 때부터 중화항체가 수치가 올라가기 시작하여 공격접종 1주후부터 높은 수치를 보였다.

Group	Number	S/P ration for ELISA					
		BI	3WPI	7 DPI	14 DPI	21 DPI	28 DPI
Vaccine 1	5	0.00	0.59	1.29	1.41	1.35	1.28
Vaccine 2	5	0.01	0.55	1.25	1.51	1.40	1.25
양성 대조군	5	0.00	0.00	0.23	0.61	0.66	0.62
음성 대조군	5	-0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

BI : Before infection, 3WPI: 3weeks post vaccination, 7 dpi : 7 days post challenge, 14 dpi ; 14 days post challenge, 21 dpi ; 21 days post challenge, 28 dpi ; 28 days post challenge.



### 3. 썬고와 마이코플라즈마 혼합백신 생산

- 안전성과 효능성이 인정된 백신보조제 선별 시험
- 항원량 결정시험
- 3Lot 혼합백신 생산
- 혼합백신의 일반시험
  - : 특성시험, 수소이온농도시험, 방부제 정량시험, 무균시험, 불활화 확인시험
- 혼합백신의 실험동물에서의 안전성과 효능성 시험
  - : 농림축산검역본부의 검정기준 또는 OIE 기준에 따른 시험

#### 가. 안전성과 효능성이 인정된 백신보조제 선별 시험

- 수산화알루미늄겔, ISA11R, IMS 1113, Eungen(자사개발)을 각 부형제의 사용권장량에 따라 함량을 적용하고, 항원함량은 백신에 첨가 가능한 최대용량으로 하여 아래와 같이 시험백신을 제조하였다. 제조된 시험백신에 대하여 안정성(성상), 안전성, 역가시험을 진행하여 개발백신의 부형제를 선정하였다.

	Test vaccine			
	TAdjuvant01	TAdjuvant02	TAdjuvant03	TAdjuvant04
<b>Adjuvant</b>	<b>수산화알루미늄겔 (20%)</b>	<b>ISA11R(15%)</b>	<b>IMS1113 (30%)</b>	<b>Eungen (30%)</b>
Antigen	MHP .....	2×10 <sup>9.0</sup> CCU 이상	rPCV2 .....	4×10 <sup>8.0</sup> CFU 이상
	PCV2 .....	10 <sup>6.2</sup> TCID <sub>50</sub> 이상		

MHP; *Mycoplasma hyopneumoniae*, rPCV2 ; PCV recombinant *Saccharomyces cerevisiae* (ORF2-SC 주), PCV2 ; *Porcine circovirus* type 2 (CAKY98 주)

#### (1) 안정성 시험

##### (가) 시험방법

- ① 제조된 시험백신들 중 부형제에 따른 성상 안정성을 확인하기 위하여 7일동안 1일 4℃ 보관 후 1일 37℃ 보관을 반복하며 성상변화를 관찰하였다.



(나) 시험결과

- ① 7일 동안 안정성을 확인한 결과 TAdjuvant03의 부형제가 성상의 변화(층분리, 투명도, 영김현상 등)가 많았으며, 나머지 시험백신의 부형제(수산화알루미늄겔, ISA11R, Engen)는 성상 변화가 크지 않았다.

	성상 변화 관찰							
	0D(4℃)*	1D(37℃)	2D(4℃)	3D(37℃)	4D(4℃)	5D(37℃)	6D(4℃)	7D(37℃)
TAdjuvant01	-	-	-	-	-	-	-	-
TAdjuvant02	-	-	-	-	-	-	+	+
TAdjuvant03	-	-	-	+	++	+++	+++	+++
TAdjuvant04	-	-	-	-	-	-	-	-

\*; 성상 변화 관찰(D; Day) / (보관온도, ℃), -; 성상변화 없음, +; 변화가 약간 있음, ++; 변화가 뚜렷함, +++; 변화가 심함.

(2) 안전성 시험

- 안정성 시험에서 성상변화가 심하게 나타난 TAdjuvant03을 제외한 나머지 시험백신(TAdjuvant01, 02, 04)을 대상으로 마우스, 기니픽, 목적동물(돼지)에서 안전성을 확인하였다.

(가) 시험방법

① 마우스

- ㉠ 체중 15~20 g의 마우스 8마리를 준비하여, 8 마리의 마우스 복강에 0.5ml를 접종하고 7일간 관찰한다. 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 한다.

② 기니픽

- ㉠ 체중 300~350 g의 기니픽 4마리를 준비하여, 2마리의 기니픽 근육 또는 피하에 2ml를, 다른 2마리의 기니픽 복강에 2ml를 접종하고 7일간 관찰한다. 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 한다.

③ 돼지

- ㉠ 체중 8~10 kg(4~6주령)의 건강한 돼지 2마리에 백신의 2두분을 근육 접종한다. 접종 후 1~2시간 내에 과민반응이 없어야 하며, 21일간의 관찰하는 동안 주사부위의 화농 및 괴사 등의 부작용이 없어야 한다.

④ 시험결과

㉞ 안전시험 결과, TAdjuvant02 시험백신은 기니픽 안전시험 중 복강 및 피하 접종 개체군에서 폐사가 발생됨에 따라 안전성이 보장되지 못하는 것으로 판단하였으며, 나머지 TAdjuvant01과 TAdjuvant04는 마우스, 기니픽, 돼지에서 관찰기간 동안 부작용 없이 생존하였다.

Animals	Route	Test vaccine (Lot. No.)		
		TAdjuvant01	TAdjuvant02	TAdjuvant04
Mouse	IP	0/8*	0/8	0/8
GP	SC	0/2	1/2	0/2
	IP	0/2	2/2	0/2
Pig	IM	0/2	0/2	0/2

\* ; The number of abnormal animals / Total numbers of vaccinated animals, IP : Intraperitoneal, SC : Subcutaneous, IM : Intramuscular

(3) 역가시험

□ 안전성 시험에서 TAdjuvant02는 기니픽 안전에서 폐사가 발생되어 선정 대상에서 제외되었다. 이를 제외한 나머지 시험백신(TAdjuvant01, 04)를 대상으로 마우스(MHP 항체가)와 기니픽(PCV2 항체가)에서 역가시험을 진행하여 좀 더 역가형성에 유리한 부형제를 선정하였다.

(가) 시험방법

① *M. hyopneumoniae*

㉞ *M. hyopneumoniae* 음성인 15~20g의 마우스 25마리를 선정하여 시험백신별로 10마리씩 1/10두분(0.2ml)을 피하에 접종하고 대조군 5마리와 같이 2주후에 채혈하여 ELISA 항체가를 검사하였다.

② Porcine Circovirus type2

㉞ Porcine Circovirus type2 항체 음성인 체중 300~350g의 기니픽 8마리를 선정하여 1/2두분(1ml)씩 근육접종하고 3주후에 대조군 2마리와 채혈하여 Sandwich indirect ELISA 항체가를 검사하였다.

(나) 시험결과

① *M. hyopneumoniae* 항체가 측정 결과

㉞ *M. hyopneumoniae*에 대한 항체가 측정결과 TAdjuvant04가 TAdjuvant01 보다 항체가 형성 능력이 좋은 것으로 확인되었다.

Lot No.	No.	<i>M. hyopneumoniae</i> ELISA antibody titer(GMT)
TAdjuvant01	10	520
TAdjuvant04	10	1372
Control	5	<10

GMT ; Geometric mean titer, TAdjuvant01; Aluminum hydroxide gel adjuvant Vaccine, TAdjuvant04; Eungen adjuvant Vaccine

② PCV2 ELISA 항체가 실험결과

㉞ PCV2에 대한 항체가 측정결과 TAdjuvant04가 TAdjuvant01 보다 항체가 형성 능력이 좋은 것으로 확인되었다.

Lot No.	No.	Test	PCV2 ELISA antibody titer
TAdjuvant01	8	OD average	0.649
		T/C value	2.820
TAdjuvant04	8	OD average	2.247
		T/C value	9.772
Control	2	OD average	0.255

T/C : Test serum optical density/ average of Control serum optical density

③ 부형제 결정시험 결론

㉞ 부형제 결정을 위한 시험백신 4종에 대한 시험결과 안정성, 안전성, 역가형성 능력에서 TAdjuvant04 시험백신이 가장 유리하였다. 이로서 개발백신인 Myco-X의 부형제를 TAdjuvant04에 사용된 Eungen으로 선정하게 되었다.

나. 항원량 결정 시험

(1) *M. hyopneumoniae* 항원량 결정시험

- '5.1.1. 부형제 결정시험'에서 결정된 부형제를 사용하였을 때 *M. hyopneumoniae*의 항원량을 결정하기 위하여 아래와 같이 시험백신을 제조하였다.

Test vaccine				
	TMHP01	TMHP02	TMHP03	TMHP04
Antigen	MHP ..... 2×10 <sup>6.0</sup> CCU 이상	MHP ..... 2×10 <sup>7.0</sup> CCU 이상	MHP ..... 2×10 <sup>8.0</sup> CCU 이상	MHP ..... 2×10 <sup>9.0</sup> CCU 이상
Adjuvant	Eungen (30%)			

MHP; *Mycoplasma hyopneumoniae*.

(가) 시험방법

- ① *M. hyopneumoniae* 음성인 15~20g의 마우스 45마리를 선정하여 시험백신별로 10마리씩 1/10두분(0.2ml)을 피하에 접종하고 대조군 5마리와 같이 2주후에 채혈하여 ELISA 항체가를 검사하였다.

(나) 시험결과

- ① *M. hyopneumoniae*에 대한 함량별 역가 시험결과 2×10<sup>7.0</sup>CCU/dose (2ml) 함량을 포함하는 TMHP02부터 국가검정기준(512배) 이상의 항체가를 보였고, 2×10<sup>8.0</sup>CCU/dose (2ml) 함량의 시험백신 (TMHP03)이 가장 높은 항체가를 보였다. 이에 국가검정기준을 만족할 수 있는 MHP 최저 항원 함량은 2×10<sup>7.0</sup>CCU/dose (2ml)이었으나, 백신의 안정성을 고려 할 때 2×10<sup>8.0</sup>CCU 이상/dose (2ml)이 적정 항원량이라 판단하였다.

Lot No.	No.	<i>M. hyopneumoniae</i> ELISA antibody titer(GMT)
TMHP01	10	80
TMHP02	10	520
TMHP03	10	1470
TMHP04	10	1280
Control	5	<10

GMT ; Geometric mean titer

(2) PCV recombinant *Saccharomyces cerevisiae* 항원량 결정시험

- PCV recombinant *Saccharomyces cerevisiae* (ORF2-SC 주)의 항원량을 결정하기 위하

여  $4 \times 10^{8.0}$ ,  $4 \times 10^{7.0}$ ,  $4 \times 10^{6.0}$ ,  $4 \times 10^{5.0}$  CFU/dose의 함량으로 조절하여 아래와 같이 시험백신을 제조하였다.

	Test vaccine (dose, 2ml)			
	TrPCV01	TrPCV02	TrPCV03	TrPCV04
Antigen	rPCV2 ..... $4 \times 10^{5.0}$ CFU 이상	rPCV2 ..... $4 \times 10^{6.0}$ CFU 이상	rPCV2 ..... $4 \times 10^{7.0}$ CFU 이상	rPCV2 ..... $4 \times 10^{8.0}$ CFU 이상
Adjuvant	<b>Eungen (30%)</b>			

rPCV2 ; PCV recombinant *Saccharomyces cerevisiae* (ORF2-SC 주)

(가) 시험방법

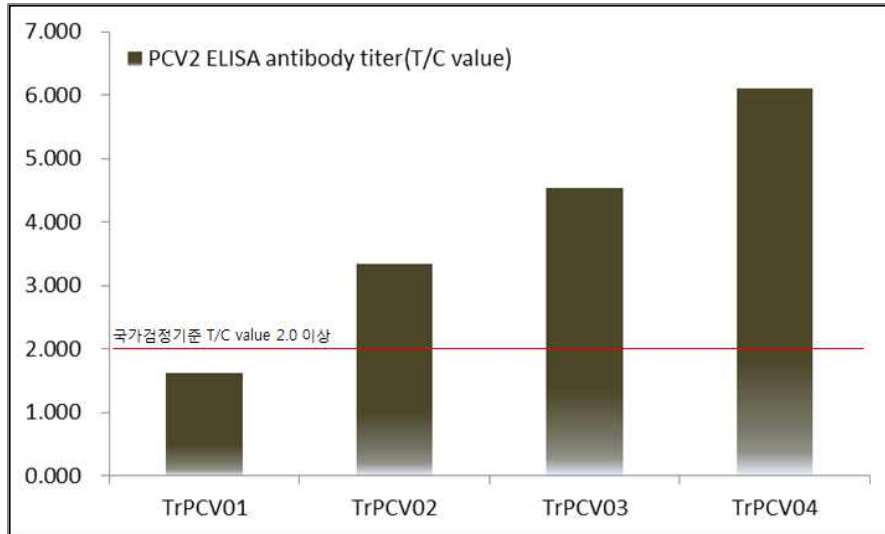
- ① 제조된 시험백신별로 Porcine Circovirus type2 항체 음성인 체중 300~350g의 기니픽 34마리를 선정하여 시험백신별로 1/2두분(1ml)을 근육접종하고 3주후에 대조군 2마리와 채혈하여 Sandwich indirect ELISA 항체가를 검사하였다.

(나) 시험결과

- ① PCV2에 대한 PCV recombinant *Saccharomyces cerevisiae* (rPCV2)의 함량별 역가 시험결과  $4 \times 10^{6.0}$  CFU/dose(2ml) 함량을 포함하는 TrPCV02부터 국가검정기준(T/C value 2.0) 이상의 항체가를 보였다. 국가검정기준을 만족할 수 있는 rPCV2의 최저 항원 함량은  $4 \times 10^{6.0}$  CFU/dose(2ml)이었으나, 백신의 안정성을 고려 할 때  $4 \times 10^{7.0}$  CFU 이상/dose(2ml)이 적정 항원량이라 판단하였다.

Lot No.	No.	Test	PCV2 ELISA antibody titer
TrPCV01	8	OD average	0.366
		T/C value	1.614
TrPCV02	8	OD average	0.758
		T/C value	3.346
TrPCV03	8	OD average	1.026
		T/C value	4.530
TrPCV04	8	OD average	1.382
		T/C value	6.099
Control	2	OD average	0.227

T/C : Test serum optical density/ average of Control serum optical density



PCV2 ELISA 항체가 결과비교

(3) Porcine circovirus type 2 항원량 결정시험

- ORF2만 발현된 재조합 항원만을 사용하는 것보다 더욱 넓은 항원 영역을 제공해 주기 위한 보조역할로서 PCV2 whole virus 항원을 포함시키고자 하였으며, 항원량 결정을 위한 시험백신은 항원량  $10^{3.2}$ ,  $10^{4.2}$ ,  $10^{5.2}$ ,  $10^{6.2}$  TCID<sub>50</sub>의 시험백신을 제조하여 시험하였다.

	Test vaccine			
	TPCV01	TPCV02	TPCV03	TPCV04
Antigen	PCV2 ..... $10^{3.2}$ TCID <sub>50</sub> 이상	PCV2 ..... $10^{4.2}$ TCID <sub>50</sub> 이상	PCV2 ..... $10^{5.2}$ TCID <sub>50</sub> 이상	PCV2 ..... $10^{6.2}$ TCID <sub>50</sub> 이상
Adjuvant	<b>Eungen (30%)</b>			

PCV2 ; Porcine circovirus type 2 (CAKY98 주)

(가) 시험방법

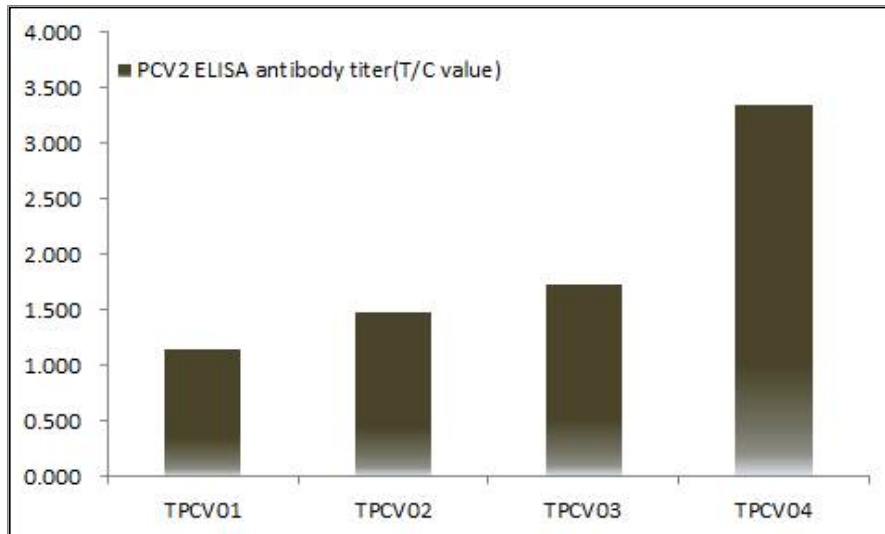
- ① 제조된 시험백신별로 Porcine Circovirus type2 항체 음성인 체중 300~350g의 기니픽 8마리를 선정하여 1/2두분(1ml)씩 근육접종하고 3주후에 대조군 2마리와 채혈하여 Sandwich indirect ELISA 항체가를 검사하였다.

(나) 시험결과

- ① PCV2에 대한 PCV2 whole virus 항원함량별 역가 시험결과  $10^{6.2}$ TCID<sub>50</sub> 이상 /dose(2ml) 함량을 포함하는 TPCV04가 국가검정기준(T/C value 2.0) 이상의 항체가를 보였으며, 이를 적정 항원량이라 판단하였다.

Lot No.	No.	Test	PCV2 ELISA antibody titer
TPCV01	8	OD average	0.260
		T/C value	1.153
TPCV02	8	OD average	0.334
		T/C value	1.484
TPCV03	8	OD average	0.392
		T/C value	1.739
TPCV04	8	OD average	0.757
		T/C value	3.359
Control	2	OD average	0.225

T/C : Test serum optical density/ average of Control serum optical density



PCV2 ELISA 항체가 결과비교

다. 항원량 결정 시험

(1) 시험백신 제조

(가) 백신 보조제 선별시험과 항원량 결정시험에서 결정된 항원과 adjuvant로 3 Lot 백신 (T316MX01, T316MX02, T316MX03)을 각각 500병씩 아래와 같이 생산하였다.

Group	Date of product	Production quantity (25doses/bottle)	Content (per 1dose, 2ml)
T316MX01	2016.02.22.	500	<i>M. hyopneumoniae</i> ..... 2×10 <sup>8.0</sup> CCU 이상 rPCV2 ..... 4×10 <sup>7.0</sup> CFU 이상 PCV2 ..... 10 <sup>6.2</sup> TCID <sub>50</sub> 이상 Adjuvant (부기 1.) ..... 30% 불활화제 (부기 2.) ..... 0.2%
T316MX02	2016.02.29.	500	<i>M. hyopneumoniae</i> ..... 2×10 <sup>8.0</sup> CCU 이상 rPCV2 ..... 4×10 <sup>7.0</sup> CFU 이상 PCV2 ..... 10 <sup>6.2</sup> TCID <sub>50</sub> 이상 Adjuvant (부기 1.) ..... 30% 불활화제 (부기 2.) ..... 0.2%
T316MX03	2016.03.04.	500	<i>M. hyopneumoniae</i> ..... 2×10 <sup>8.0</sup> CCU 이상 rPCV2 ..... 4×10 <sup>7.0</sup> CFU 이상 PCV2 ..... 10 <sup>6.2</sup> TCID <sub>50</sub> 이상 Adjuvant (부기 1.) ..... 30% 불활화제 (부기 2.) ..... 0.2%

*M. hyopneumoniae* ; *Mycoplasma hyopneumoniae*, rPCV2 ; PCV recombinant *Saccharomyces cerevisiae* (ORF2-SC 주), PCV2 ; *Porcine circovirus* type 2 (CAKY98 주)

라. 혼합백신의 일반시험

(1) 특성시험

(가) 시험방법

- ① 3 Lot의 시험백신을 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준 일반시험법 1-11-20-01에 따라 Lot별 시험백신 2병씩 6병에 대하여 색, 혼탁도, 이물 또는 이취에 대하여 검사하였다. 색, 혼탁도, 이물시험은 자연광 또는 1000룩스 광도하에서 실시하였으며, 현탁상태를 검사할 때는 가볍게 흔들어서 용해도, 혼탁도, 색조를 검사하였다.

(나) 시험결과

- ① 특성시험결과 3개 Lot 모두에서 백색 내지 노란백색의 수성현탁주사액으로서 약간의 침전이 있으나 흔들면 균등한 액체가 되며 이물, 이취가 없고 내용물의 성상이 균일하였다.



Lot. No.	Tests				
	color	turbidity	sediment	foreign substance	foreign odor
T316MX01	—*	—	—	—	—
T316MX02	—	—	—	—	—
T316MX03	—	—	—	—	—

—\* : Normal or negative

(2) 무균시험

(가) 시험방법

- ① 3 Lot의 시험백신을 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준 일반시험법 1-11-20-06에 따라 시험백신을 Nutrient agar(NA), Nutrient broth(NB), Fluid thioglycollate medium (Thio)에 각각 2개의 시험관에 접종하여 22℃와 37℃에서 7일간 배양하면서 잡균의 혼입 여부를 관찰하였다.

(나) 시험결과

- ① 무균시험결과 3개 Lot 모두에서 어떠한 잡균의 혼입도 인정되지 않았다.

Lot. No.	22℃ Incubator			37℃ Incubator		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
T316MX01	—*	—	—	—	—	—
T316MX02	—	—	—	—	—	—
T316MX03	—	—	—	—	—	—

—\* : No growth of any bacteria

(다) 수소이온농도 시험

① 시험방법

- ㉠ 3 Lot의 시험백신을 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준 일반시험법 1-11-20-03에 따라 시험백신 각 Lot별로 pH 측정기를 이용한 측정법 또는 간이 시험법을 이용하여 측정하였다.

② 시험결과

- ㉠ 수소이온농도 시험결과 3개 Lot 모두에서 검정기준 (pH 6.0~8.0 이내)를 만족하

였다.

Lot. No.	Result(pH)
T316MX01	7.3
T316MX02	7.5
T316MX03	7.3

(라) 방부제 정량시험

① 시험방법

- ㉞ 3 Lot의 시험백신을 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준 일반시험법 1-11-20-09에 따라 시험백신 각 Lot별로 포르말린 함량을 비색법으로 측정하였다.

② 시험결과

- ㉞ 방부제 정량 시험결과 3개 Lot 모두에서 0.2% 이하를 나타내었다.

Lot. No.	Reagent	Method	Result
T316MX01	• Formalin reference fluid	• Add Schiff's reagent 2ml to the vaccine and formalin reference fluid, respectively.	0.07
T316MX02			0.10
T316MX03	• Schiff's reagent	• Spectrophotometer at 520nm	0.13

(마) 불활화 확인시험

① PCV2 불활화 확인시험

㉞ 시험방법

- 3 Lot의 시험백신을 Lot 별로 백신 2ml를 2 회에 걸쳐 동결 및 용해하고, 원심한 상층액을 투석막에 넣고 4 °C에서 백신의 100 배량 이상의 인산완충식염수 (PBS: pH 7.2~7.4)에 하룻밤 투석한 것을 시험재료로 하였다. 조직배양세포로 PK-15세포를 flask (25 cm<sup>2</sup>)에 증식시키고, 시험재료 1ml를 접종한 다음 37 °C에서 1시간 감작시켰다. 1 시간 후 새로운 세포유지용 배지를 더하여 7 일간 배양한다. 상층액을 제거한 후 형광항체법 (FA: fluorescent antibody method)을 이용하여 돼지 쉼코바이러스 증식여부를 확인하였다.

㉞ 시험결과

- 형광항체법(FA)을 이용하여 불활화 확인시험 결과 PK-15세포에서 돼지 썩코 바이러스 증식에 의한 형광(fluorescent)이 관찰되지 않아 불활화 되었음을 확인하였다.

Lot. No.	Cell line	Inactivation test (Fluorescent antibody method: FA)
T316MX01		-*
T316MX02	PK-15	-
T316MX03		-

-\* : Negative

② 마이코플라즈마 불활화 확인시험

㉠ 시험방법

- 보완의견에 따른 시험방법 추가사항이므로 최초 생산 직후에 시험자료는 없으며, 제조 후 21개월 경과된 3 Lot의 시험백신을 Lot 별로 백신 1ml를 3ml의 *Mycoplasma hyopneumoniae* 배지(부기 3.)에 접종하고, 37℃에서 7일간 진탕 배양하고 배양액의 색상 변화 여부를 통하여 증식여부를 확인하였다.

㉡ 시험결과

- 21개월 경과된 3 Lot의 시험백신 모두 7일간 배양 후, 배양액에서 어떠한 색상의 변화도 관찰되지 않아 불활화 되었음을 확인하였다.

Lot. No.	Inactivation test result (Media Color change)
T316MX01	-*
T316MX02	-
T316MX03	-

\* : Negative

마. 안정성 확인 시험 (실험동물)

(1) 안전성 확인시험 (실험동물)

- 시험백신의 안전성을 확인하기 위하여 실험동물인 기니픽과 마우스를 이용하여 접종 후 임상증상을 관찰하였으며, 목적동물(자돈)에 백신접종후 임상증상을 비교하였다. 또한 접종부위의 반흔을 확인하기 위하여 접종 3주후 부검하여 접종부위에 백신의 반흔이 남

아 있는지를 확인하였다.

(가) 마우스

① 시험방법

㉠ 체중 15~20 g의 마우스 32 마리를 준비하여, 시험백신 각 Lot별로 8 마리의 마우스 복강에 0.5ml를 접종하고 7 일간 관찰하였다.

② 시험결과

㉠ 3 lot의 시험백신 모두 시험기간 7일 동안 모두 이상 없이 생존하였다.

Lot No.	No. of mouse	Method	Observation days	Result
T316MX01	8	IP, 0.5ml	7	-*
T316MX02	8			-
T316MX03	8			-
대조군	8	No-treatment		-

-\* : Survived without any clinical sings, IP ; Intra-peritoneally

(나) 기니픽

① 시험방법

㉠ 체중 300~350g의 건강한 기니픽 14마리를 준비하여 시험백신 각 Lot별로 2마리는 피하에 2.0ml, 나머지 2마리는 복강으로 2.0ml씩 각각 접종하고, 무처리 대조 2마리와 함께 7일간 임상관찰을 관찰하였다.

② 시험결과

㉠ 3 lot의 시험백신 모두 시험기간 7일 동안 모두 이상 없이 생존하였다.

Lot No.	No. of Gp.	Method	Observation days	Result
T316MX01	2	SC, 2.0ml	7	-*
	2	IP, 2.0ml		-
T316MX02	2	SC, 2.0ml		-
	2	IP, 2.0ml		-
T316MX03	2	SC, 2.0ml		-
	2	IP, 2.0ml		-
대조군	2	No-treatment		-

-\* : Survived without any clinical sings, SC ; Subcutaneous, IP ; Intra-peritoneally

## 2. 혼합 백신의 써코에 대한 호흡기 증상 예방 효과 및 안전성 평가

### - 안전성 시험

- 접종 후 국소적인 접종반응 (부종, 화농 등)과 전신적인 접종반응 (쇼크 또는 전신 발작)을 확인하며, 접종 전 체온측정과 접종 1일 후 체온측정으로 백신의 안전성을 확인한다.

### - 효능성 시험

- 접종 후 1주간격으로 채혈하여 면역을 측정하고 접종 3주후에 공격접종 후 혈청내 바이러스 함유량 및 조직(폐, 림프절, 편도)내의 바이러스 함유량을 대조군과 비교한다.

가. 목적동물(자돈)에서의 안전성 확인시험

#### (1) 실험방법

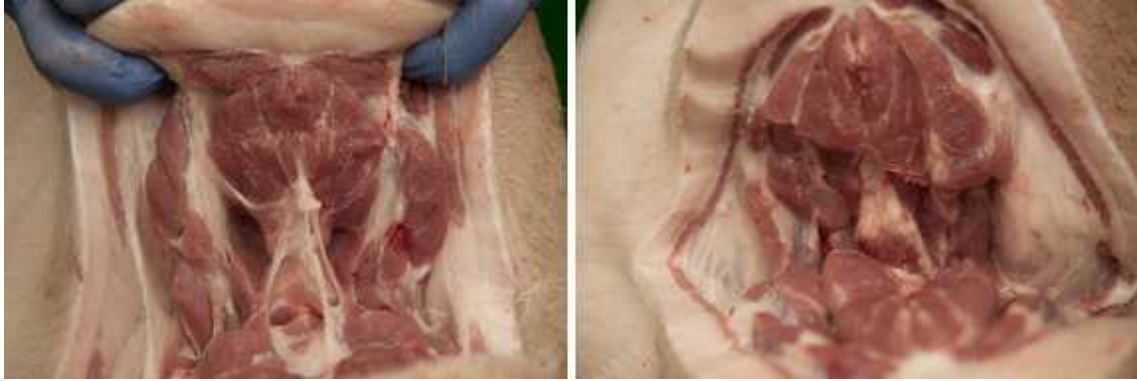
- (가) 체중 8~10kg(4~6주령)의 건강한 돼지 8마리에 백신의 2두분(4ml)을 근육접종 하고, 접종 후 1~2시간 내에 과민반응을 확인하였으며, 21일간의 관찰하는 동안 주사부위의 화농, 괴사, 발열 및 피부병변 등의 부작용을 확인하였다.

#### (2) 실험결과

- (가) 안전시험 결과, 3 lot의 시험백신 돼지에서 관찰기간 동안 부작용없이 생존하였으며, 목적동물을 21일 후 부검을 실시하여 관찰한 결과 접종부위의 반흔이 관찰되지 않았다.

Lot No.	No. of pig	Method	임 상 증 상 (21일 관찰)					
			체 온 (°C)	과민반응*	발열	설사	화농	괴사
T316MX01	2	4ml	38.4~39.5	-	-	-	-	-
T316MX02	2	4ml	38.5~39.5	-	-	-	-	-
T316MX03	2	4ml	38.5~39.6	-	-	-	-	-
대조군	2	4ml	38.7~39.5	-	-	-	-	-

\* 접종 1시간 후 과민반응, - ; 임상증상 없음, + ; 임상증상 있음



시험백신을 접종한 목적동물의 접종부위 근육절개 사진

나. Poccine circovirus type 2 (PCV2)에 대한 효능시험

- PCV2에 대한 목적동물에서의 효능을 확인하기 위하여 PCV2 항체 음성인 건강한 5주령의 자돈 10마리를 선정하여 5마리의 자돈에 시험백신(T316MX02)을 2ml (1두분 용량)씩 이근부에 접종하고, 다른 5마리는 대조군으로 두었다. 백신접종 및 PCV2 공격접종을 실시하여 혈청학적 평가, 바이러스배출과 조직학적 평가를 실시하였다.

(1) 시험방법

(가) 혈청학적 평가

- ① 백신 접종 후 1주 간격으로 채혈하여 주차별 항체가 (PCV2, 제노바이오텍 PCV2-AB)를 확인하였으며, 접종 3주후에 PCV2 (ISUVDL98-15237) 바이러스  $10^{6.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 을 비강(2.5ml) 및 근육(2.5ml)으로 각각 공격접종 한 다음, 1, 2주 후에 채혈하여 Real-time PCR을 이용한 혈청내 바이러스 함유량을 비교하여 백신의 효능 효과를 확인하였다.

(나) 조직학적 평가

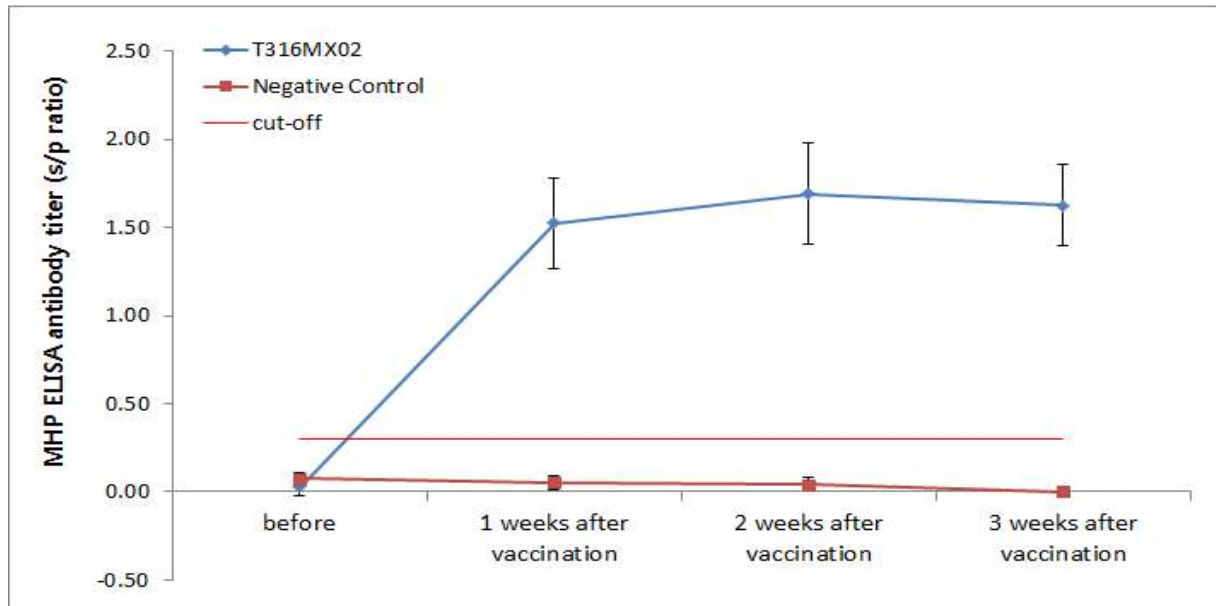
- ① 백신 접종 3주후에 PCV2 (ISUVDL98-15237) 바이러스  $10^{6.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 을 비강(2.5ml) 및 근육(2.5ml)으로 각각 공격접종 4주 후에 부검을 실시하여 폐, 비장, 서혜림프절 조직을 채취하였다. 채취 조직으로부터 q-PCR을 통하여 조직내 바이러스 함유량 ( $\text{Log}_{10} \text{PCV2 TCID}_{50}/\text{g}$ )을 측정하고, 접종군과 대조군의 측정값에 대하여 Student's t-test 분석을 실시하여 분석하였다.

(2) 시험결과

(가) 혈청학적 평가

① PCV2에 대한 자돈 항체가

㉞ 자돈에서 PCV2에 대한 항체를 측정하는 결과 접종전에 모든 개체가 양성으로 확인되었지만 대조군은 주차별로 항체가 감소되는 경향을 보인 반면 접종군은 점차 항체가 상승하여 접종 2주후부터 접종군의 S/P ratio 0.9~1.5 수준으로 대조군과 유의적인 차이( $P < 0.05$ )를 나타내었다.



PCV2에 대한 주차별 자돈 항체가 추이

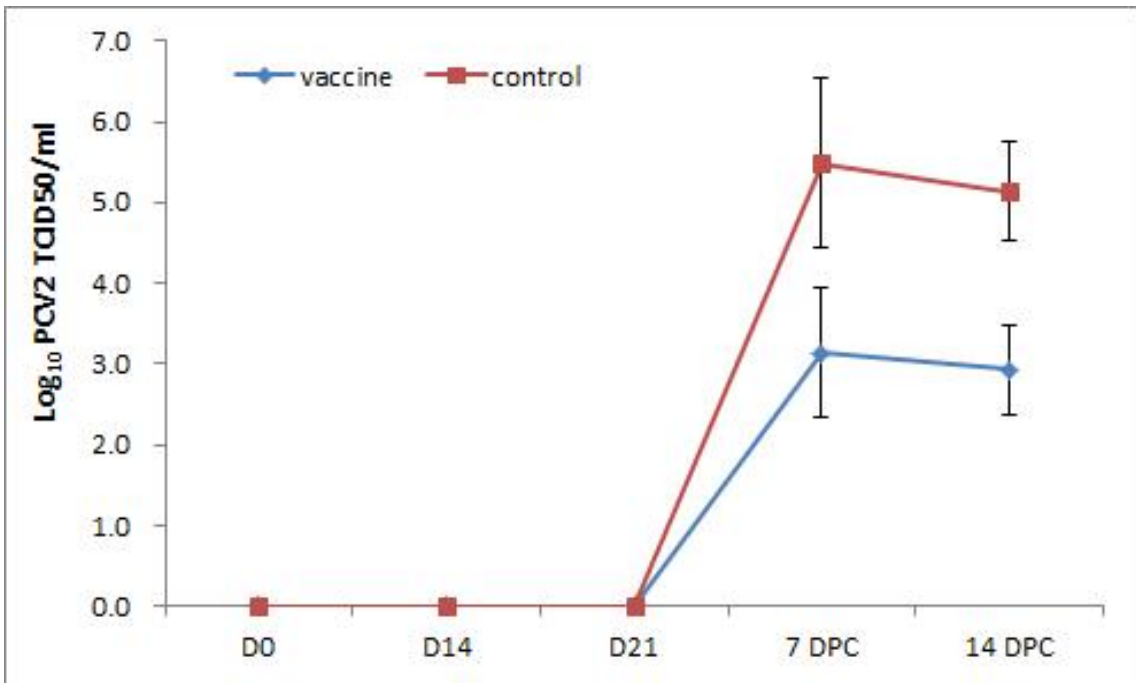
\* ; Significant different compared with the control group.  $p < 0.05$

② PCV2 혈청내 바이러스 함유량

㉞ Real-time PCR을 통하여 혈청내 바이러스 함유량을 비교한 결과 백신접종군은 공격접종 1주후에 3.14, 2주후에 2.93 ( $\text{Log}_{10}$  PCV2 TCID<sub>50</sub>/ml)으로 검출되었으며, 대조군은 각각 1주후에 5.49, 2주후에 5.14 ( $\text{Log}_{10}$  PCV2 TCID<sub>50</sub>/ml)로 검출되었다. 백신접종군 혈청내에서의 바이러스 함유량이 대조군에 비하여 유의적으로 낮게 검출되었음을 확인하였다( $P < 0.05$ ).

Group	Number	Average of Antigen quantity (Log <sub>10</sub> PCV2 TCID <sub>50</sub> /ml, Mean±SD)				
		Day 0	Day 14	Day 21	7 dpc	14 dpc
T316MX02	05	-	-	-	3.14±0.81 <sup>a</sup>	2.93±0.56 <sup>a</sup>
Control	05	-	-	-	5.49±1.05	5.14±0.61

<sup>a</sup> ; Significant different compared with the control group.  $p < 0.05$ , Day 0 ; Before vaccination, Day 14 ; 2 weeks after vaccination, Day 21 ; 3 weeks after vaccination and Challenge, 7 dpi ; 7 days post challenge, 14 dpi ; 14 days post challenge.



PCV2 공격접종 후 혈청내 바이러스 함유량 결과

\* ; Significant different compared with the control group. student's t-test,  $p < 0.05$

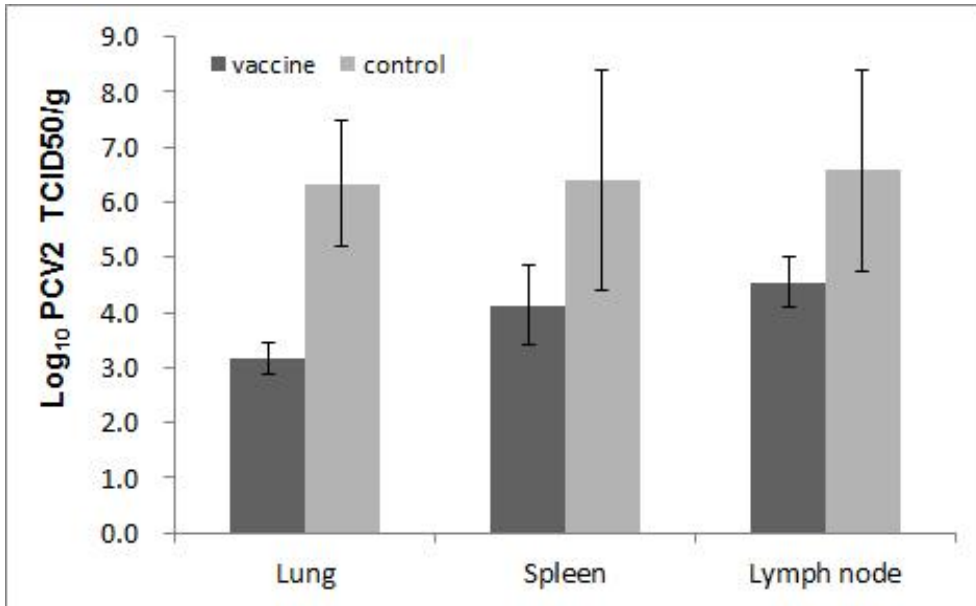
(나) 조직학적 평가

- ① PCV2 공격접종 4주후에 부검조직(폐, 비장, 서혜림프절)에서 q-PCR을 통해 조직내 바이러스 함유량을 측정하여 비교한 결과 백신접종군은 폐, 비장, 서혜림프절에서 각각  $3.17 \pm 0.28$ ,  $4.13 \pm 0.72$ ,  $4.54 \pm 0.45$  (Log<sub>10</sub> PCV2 TCID<sub>50</sub>/g)로 나타났으며, 대조군은 각각  $6.33 \pm 1.14$ ,  $6.39 \pm 1.99$ ,  $6.58 \pm 1.82$  (Log<sub>10</sub> PCV2 TCID<sub>50</sub>/g)로 접종군이 대조군에 비하여 유의적( $P < 0.05$ )으로 낮은 바이러스 함유량을 확인하였다.



Group	Antigen quantity (Log <sub>10</sub> PCV2 TCID <sub>50</sub> /g, N=5)		
	Lung	Spleen	Lymph node
Vaccine	3.17±0.28*	4.13±0.72*	4.54±0.45*
Control	6.33±1.14	6.39±1.99	6.58±1.82

\* ; Significant different compared with the control group. student's t-test,  $p < 0.05$ , Lymph node; Inguinal lymph node



PCV2 바이러스의 공격접종에 따른 조직내 바이러스 함유량(N=5)

\* ; Significant different compared with the control group. student's t-test,  $p < 0.05$ , Lymph node; Inguinal lymph node

### (3) PCV2에 대한 효능시험 종합결론

(가) 혈청학적 평가에서 PCV2에 대하여 백신접종군이 대조군과 유의적( $P < 0.05$ )으로 높은 항체가 형성되었으며, 공격접종 후 혈청 내 바이러스 함유량 또한 백신접종군이 대조군보다 유의적으로 낮게 검출되었다( $P < 0.05$ ). 조직학적 평가결과에서도 부검조직(폐, 비장, 서혜림프절) 내 바이러스 함유량이 대조군보다 백신접종군에서 유의적( $P < 0.05$ )으로 낮은 바이러스 함유량이 확인됨을 볼 때 백신접종이 PCV2에 대한 항체가 형성과 PCV2 항원의 공격접종에 대한 효능(항원검출 감소 효과)이 있는 것으로 판단된다.

## [2차년도]

### 1. 혼합 백신의 마이코플라즈마에 대한 호흡기 증상 예방 효과 및 안전성 평가

#### 가. 안전성시험

- 접종 후 국소적인 접종반응 (부종, 화농 등)과 전신적인 접종반응 (쇼크 또는 전신발적)을 확인하며, 접종 전 체온측정과 접종 1일 후 체온측정으로 백신의 안전성을 확인한다.

#### (1) 2배용량 접종시험

##### (가) 시험방법

- ① 시험백신 각 Lot별로 1주령의 건강한 돼지 12 마리를 준비하여, 백신의 2두분(4.0 ml)을 3마리씩 이근부에 접종하고, 접종 후 1~2 시간 내에 급성과민반응을 확인하였으며, 무처치 대조 3마리와 함께 21 일 동안 임상증상 (체온, 과민반응, 식불, 설사, 화농, 괴사)을 확인하였다.

##### (나) 시험결과

- ① 과민반응, 발열, 설사, 주사부위의 화농 및 괴사 등 어떠한 임상증상도 나타나지 않았으며, 체온도 38.7~39.7℃로 정상을 유지하여 시험백신의 안전성이 확인되었다.

Group	No.	Administration	O/D	B/T (°C)	Clinical Signs				
					HPS	ANR	DRH	SPR	NCR
T316MX01	3	1 week old, IM, 4ml		39.1 ~ 39.6	—*	—	—	—	—
T316MX02	3	"	21	38.7 ~ 39.7	—	—	—	—	—
T316MX03	3	"		38.7 ~ 39.5	—	—	—	—	—
Control	3	Not-treatment		38.9 ~ 39.6	—	—	—	—	—

\*No-clinical sign

O/D, observation days; B/T, body temperature; HPS, hypersensitivity; ANR, Anorexia; DRH, diarrhea; SPR, suppuration; NCR, necrosis

#### (2) 2회 반복 접종시험

##### (가) 시험방법

- ① 시험백신 각 Lot별로 1주령의 건강한 돼지 12 마리를 준비하여, 백신의 2두분(4.0 ml)을 3마리씩 이근부에 접종하고, 접종 후 1~2 시간 내에 급성과민반응을 확인하였으며 14 일 동안 식불, 설사, 화농, 괴사등의 부작용을 확인하였다. 2주후인 3주령

에 다시 2두분(4.0 ml)을 이근부에 접종하였으며 접종 후 1~2 시간 내에 급성과민 반응을 확인하였으며, 무처치 대조 3마리와 함께 21 일 동안 임상증상 (체온, 과민 반응, 식불, 설사, 화농, 괴사)을 확인하였다.

(나) 시험결과

① 1차 접종후 관찰결과

㉠ 1차 접종 이후 과민반응, 발열, 설사, 주사부위의 화농 및 괴사 등 어떠한 임상증상도 나타나지 않았으며, 체온도 38.7~39.7℃로 정상을 유지하여 시험백신의 안전성이 확인되었다.

Group	No.	Administration	O/D	B/T (°C)	Clinical Signs				
					HPS	ANR	DRH	SPR	NCR
T316MX01	3	1 week old, IM, 4ml	14	38.9 ~ 39.7	-*	-	-	-	-
T316MX02	3	"		38.5 ~ 39.6	-	-	-	-	-
T316MX03	3	"		38.7 ~ 39.5	-	-	-	-	-
Control	3	Not-treatment		38.9 ~ 39.6	-	-	-	-	-

① 2차 접종후 관찰결과

㉠ 2차 접종 이후 과민반응, 발열, 설사, 주사부위의 화농 및 괴사 등 어떠한 임상증상도 나타나지 않았으며, 체온도 38.7~39.7℃로 정상을 유지하여 시험백신의 안전성이 확인되었다.

Group	No.	Administration	O/D	B/T (°C)	Clinical Signs				
					HPS	ANR	DRH	SPR	NCR
T316MX01	3	1 & 3 weeks old, IM, 4ml	14	38.9 ~ 39.7	-*	-	-	-	-
T316MX02	3	"		38.5 ~ 39.6	-	-	-	-	-
T316MX03	3	"		38.7 ~ 39.5	-	-	-	-	-
Control	3	Not-treatment		38.9 ~ 39.6	-	-	-	-	-

\*No-clinical sign, O/D, observation days; B/T, body temperature; HPS, hypersensitivity; ANR, Anorexia; DRH, diarrhea; SPR, suppuration; NCR, necrosis

나. 효능성 시험

□ 접종전, 1차 접종 2주후, 2차접종 3주후에 채혈하여 항체가를 측정하고 2차 접종 3주후에 공격접종 후 임상증상을 관찰하고, 비강내와 폐 조직내의 마이코플라즈마 검출율을 대조군과 비교한다.

(1) 목적동물에서의 효력 시험

(가) 시험방법

- ① MHP 항체 음성인 건강한 1주령의 자돈 10마리를 선정하여 5마리의 자돈에 시험백신(T316MX01)을 2ml(1두분)씩 2주 간격으로 2회 이근부에 접종하고 나머지 5마리를 대조군으로 하여 접종전, 1차접종 2주후, 2차 접종 3주후에 채혈하여 MHP 항체가(IDEXX kit)를 확인하였다.
- ② 백신 접종 후 접종 3주후에 목적동물을 적정량의 마취제(xylazine 1.5mg/kg과 zolazepam 1.5mg/kg)로 마취를 유도 한 후 마이코플라즈마 공격균주( $1 \times 10^{4.75}$  CCU/ml)를 5ml씩 기관으로 공격접종한다. 공격접종 후 7, 14, 21, 28일에 체중을 측정하고 임상증상을 관찰하였으며 비강액을 채취하여 PCR 진단방법으로 MHP 재분리율(양/음성)을 비교하여 백신의 효능 효과를 확인하였다. 공격접종 4주 후에 부검하여 폐병변을 육안 관찰하여 전체 폐엽을 그림 1.와 같이 각 부피비율에 따라 육안병변을 점수화하여 비교분석하였다. 통계분석은 SigmaPlot(ver. 12.5)을 이용하여 one-way ANOVA방법으로 분석하였다.

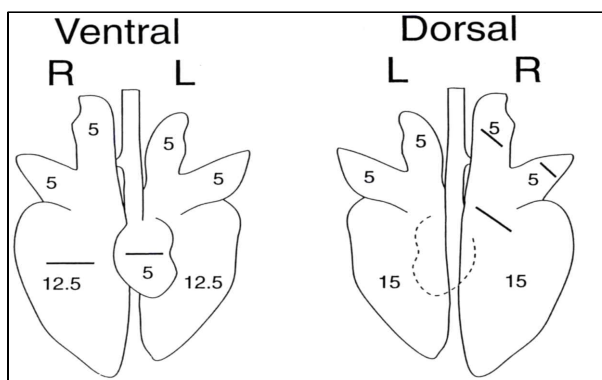


그림 1. 폐장의 엽단위의 점수

(2) 시험결과

(가) MHP 항체가

- ① 항체결과, 음성대조군은 음성을 유지하였으며 접종군은 항체전환(S/P ratio 0.4이상)이 되었음을 확인하였다. 접종군과 대조군에서 1차 접종 2주후, 2차 접종 3주후에 유의적인 차이( $p<0.05$ )를 확인하였다.

Group	MHP ELISA (S/P ratio)			
	BI	2 weeks after 1st vaccination	3 weeks after 2nd vaccination	
T316MX01	1	0.06	0.78	1.78
	2	-0.03	0.95	2.03
	3	-0.03	0.73	1.81
	4	-0.02	0.68	1.84
	5	0.00	0.45	1.51
	average	0.00	0.72 <sup>a</sup>	1.79 <sup>a</sup>
	S.D.	0.04	0.18	0.19
Negative control	6	-0.02	-0.02	-0.02
	7	-0.02	0.01	-0.02
	8	0.06	0.00	-0.02
	9	0.11	-0.02	-0.02
	10	-0.02	-0.01	0.08
	average	0.02	-0.01 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>
	S.D.	0.06	0.01	0.04

BI ; Before inoculation

S/P ratio ; Sample to positive ratio.

a,b ; Different letters indicate significant differences in mean values. ( $p<0.05$ )

(나) 임상증상관찰

① 공격접종 7, 14, 21, 28일 후에 임상증상 관찰결과 공격접종 3주후인 21일에 대조군 보다 접종군이 유의적( $p<0.05$ )으로 낮은 점수를 확인하였다.

Group	Number	Clinical sign score* (Average±SD, n=5)				
		BI	1 WPC	2 WPC	3 WPC	4 WPC
T316MX01	1	0	0	0	0	1
	2	0	1	1	1	0
	3	0	0	1	1	1
	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	1
	Average	0.00	0.20	0.40	0.40 <sup>a</sup>	0.60 <sup>a</sup>
Negative control	6	0	0	0	1	1
	7	0	0	1	2	2
	8	0	0	1	1	1
	9	0	0	2	3	3
	10	0	0	1	2	1
	Average	0.00	0.00	1.00	1.80 <sup>b</sup>	1.60 <sup>b</sup>

Clinical sign score: 0 ; normal, 1 ; mild dyspnea and/or tachypnea when stressed, 2 ; mild dyspnea and/or tachypnea when at rest, 3 ; moderate dyspnea and/or tachypnea when stressed, 4 ; moderate dyspnea and/or tachypnea when at rest, 5 ; severe dyspnea and/or tachypnea when stressed, 6 ; severe dyspnea and/or tachypnea when at rest., WPC ; Weeks Post Challenge

a,b ; Different letters indicate significant differences in mean values. ( $p<0.05$ )

(다) 비강 재분리 및 폐병변지수

- ① 비강에서의 재분리결과, 공격접종 3주후에는 접종군은 20%(1/5), 대조군은 100%(5/5)로 가장 큰 양성률의 차이를 확인하였다. 또한, 공격접종 28일 후에 폐병변지수 결과, 평균점수에서 접종군과 대조군의 유의적인 차이를 확인하여 백신접종에 의한 폐병변을 감소시킴을 확인 할 수 있었다.

Group	Number	<i>M. hyopneumoniae</i> reisolation results by PCR					Pneumonia scores**
		BI	1 WPC	2 WPC	3 WPC	4 WPC	
T316MX0 1	1	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	1.40±0.55 <sup>a</sup>
	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
	3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
	4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
	5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
	Result*	0/5 (0%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)	
Negative control	6	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	11.90±3.78 <sup>b</sup>
	7	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	
	8	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	
	9	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	
	10	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	
	Result*	0/5 (0%)	2/5 (60%)	3/5 (60%)	5/5(100%)	4/5 (80%)	

\* ; The number of positive animals /Total numbers of tested animals (Positive rate, %)

\*\* ; Average of total pneumonia scores ± standard deviation

WPC ; Weeks Post Challenge

a,b ; Different letters indicate significant differences in mean values. ( $p<0.05$ )

## 2. 혼합 백신의 안정성 평가

- 제품의 안정성을 확인하기 위하여 3 Lot의 시험백신을 2~8℃ 냉장소에 보존하면서 제조일로부터 제조직후, 3개월 후, 6개월 후, 9개월 후, 12개월 후, 18개월 후, 24개월 후, 27개월 후에 특성시험, 무균시험, 수소이온농도시험, 방부제 정량시험, 불활화 확인시험, 안전시험 및 역가시험을 수행하였다. 실험결과, 27개월까지 안정성을 확인하였다.

시험개요	
시험백신	T316MX01, T316MX02, T316MX03
시험담당자	동물시험 담당자 김진
	일반시험 담당자 김용주
	혈청역가시험 담당자 김승리
시험책임자	과제책임자 노윤희
시험기간	제조직후                      2016-03-04                      ~                      2016-04-01
	3개월 후                      2016-06-07                      ~                      2016-07-05
	6개월 후                      2016-09-08                      ~                      2016-10-06
	9개월 후                      2016-12-12                      ~                      2017-01-09
	12개월 후                      2017-03-15                      ~                      2017-04-12
	18개월 후                      2017-09-11                      ~                      2017-10-09
	24개월 후                      2017-12-12                      ~                      2018-01-09
	27개월 후                      2018-03-14                      ~                      2018-04-11
시험장소	동물시험                      소동물 실험동물센터
	일반시험                      품질관리실험실
	혈청역가시험                      품질관리실험실

### 가. 특성시험

#### (1) 시험방법

- (가) 3Lot의 시험백신을 2~8℃의 냉장소에 보존하면서 제조일로부터 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월, 27개월 후 Lot별로 2병씩 6병에 대하여 동물용의약품 생물학적 제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-01에 따라 색, 혼탁도, 이물 또는 이취에 대하여 검사하였다. 현탁 상태를 검사할 때는 가볍게 흔들어서 용해도, 혼탁도, 색조를 검사하였다.

#### (2) 시험결과

- (가) 3Lot의 시험백신 모두 27개월까지 노란백색 내지 백색의 균일한 수성현탁주사액으로



서 약간의 침전이 있었으나 흔들면 균등한 액체가 되며 이물, 이취가 없고 내용물의 성상이 균일하였으며, 변화가 관찰되지 않았다.

Lot. No.	Gross features							
	0 MPM	3 MPM	6 MPM	9 MPM	12 MPM	18 MPM	24 MPM	27 MPM
T316MX01	-*	-	-	-	-	-	-	-
T316MX02	-	-	-	-	-	-	-	-
T316MX03	-	-	-	-	-	-	-	-

MPM : Months Post Manufacture, \* Normal or negative

나. 수소이온농도시험

(1) 시험방법

(가) Lot의 시험백신을 2~8℃의 냉장소에 보존하면서 제조일로부터 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월, 27개월 후 각 Lot별로 3병씩의 시험백신에 대하여 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-03에 따라 수소이온농도를 측정하였다.

(2) 시험결과

(가) 3Lot의 시험백신 모두 제조 27개월까지 수소이온농도는 pH 6.0~8.0 범위 이내에 있었다.

Lot. No.	test	pH							
		0 MPM	3 MPM	6 MPM	9 MPM	12 MPM	18 MPM	24 MPM	27 MPM
T316MX01	1	7.13	7.15	7.15	7.15	7.13	7.16	7.15	7.09
	2	7.12	7.14	7.16	7.16	7.15	7.16	7.13	7.15
	3	7.14	7.12	7.12	7.12	7.15	7.15	7.12	7.13
	<b>Average</b>	7.13	7.14	7.14	7.14	7.14	7.16	7.13	7.12
T316MX02	1	7.15	7.16	7.15	7.16	7.15	7.15	7.15	7.16
	2	7.16	7.17	7.10	7.12	7.09	7.14	7.15	7.11
	3	7.15	7.12	7.12	7.13	7.16	7.13	7.13	7.13
	<b>Average</b>	7.15	7.15	7.12	7.14	7.13	7.14	7.14	7.13
T316MX03	1	7.15	7.15	7.12	7.13	7.19	7.16	7.09	7.15
	2	7.19	7.15	7.15	7.15	7.13	7.15	7.15	7.16
	3	7.15	7.16	7.16	7.16	7.15	7.12	7.10	7.11
	<b>Average</b>	7.16	7.15	7.14	7.15	7.16	7.14	7.11	7.14

MPM ; Months Post Manufacture

다. 무균시험

(1) 시험방법

(가) 3 Lot의 시험백신을 2~8 °C의 냉장소에 보존하면서 제조일로부터 제조직후, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월, 27개월 후 시험백신을 Lot 별로 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-06에 따라 nutrient agar (NA), nutrient broth (NB), fluid thioglycollate medium (Thio)에 각각 2개의 시험관에 접종하여 22°C와 37°C에서 7일간 배양하면서 잡균의 존재 여부를 관찰하였다.

(2) 시험결과

(가) 3 Lot의 시험백신 모두 27개월까지 어떠한 세균의 발육도 인정되지 않았다.

MPM	Lot. No.	22°C			37°C		
		NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
0 MPM	T316MX01	-*	-	-	-	-	-
	T316MX02	-	-	-	-	-	-
	T316MX03	-	-	-	-	-	-
3 MPM	T316MX01	-	-	-	-	-	-
	T316MX02	-	-	-	-	-	-
	T316MX03	-	-	-	-	-	-
6 MPM	T316MX01	-	-	-	-	-	-
	T316MX02	-	-	-	-	-	-
	T316MX03	-	-	-	-	-	-
9 MPM	T316MX01	-	-	-	-	-	-
	T316MX02	-	-	-	-	-	-
	T316MX03	-	-	-	-	-	-
12 MPM	T316MX01	-	-	-	-	-	-
	T316MX02	-	-	-	-	-	-
	T316MX03	-	-	-	-	-	-
18 MPM	T316MX01	-	-	-	-	-	-
	T316MX02	-	-	-	-	-	-
	T316MX03	-	-	-	-	-	-
24 MPM	T316MX01	-	-	-	-	-	-
	T316MX02	-	-	-	-	-	-
	T316MX03	-	-	-	-	-	-
27 MPM	T316MX01	-	-	-	-	-	-
	T316MX02	-	-	-	-	-	-
	T316MX03	-	-	-	-	-	-

MPM ; Months Post Manufacture,

NA ; nutrient agar, NB ; nutrient broth, Thio ; fluid thioglycollate medium

\* ; No growth of any bacteria

라. 방부제 정량시험

(1) 시험 방법

(가) 3 Lot의 시험백신을 2~8℃의 냉장소에 보존하면서 제조일로부터 제조직후, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월, 27개월 후에 Lot 별로 각 3 병씩 포르말린 함량을 측정하였다. 시험백신과 포르말린 표준액 각각 1 ml에 Schiff 시약 0.2 ml를 가하여 실온에서 30 분간 방치한 후 520nm spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 표준액의 흡광도를 이용하여 다항식의 표준곡선을 작성하고 백신과의 상관관계로 포르말린 농도를 계산하였다.

(2) 시험 결과

(가) 3 Lot의 시험백신 모두 27개월까지 0.2% 이하의 포르말린 함유량을 나타내었다.

Lot. No.	test	Preservative contents (% , Mean)							
		0 MPM	3 MPM	6 MPM	9 MPM	12 MPM	18 MPM	24 MPM	27 MPM
T316MX01	1	0.15	0.15	0.15	0.16	0.15	0.11	0.15	0.12
	2	0.13	0.13	0.13	0.12	0.13	0.12	0.12	0.13
	3	0.12	0.12	0.12	0.13	0.12	0.15	0.14	0.15
	Average	0.13	0.13	0.13	0.14	0.13	0.13	0.14	0.13
T316MX02	1	0.14	0.12	0.15	0.16	0.12	0.14	0.15	0.15
	2	0.11	0.13	0.12	0.15	0.15	0.11	0.13	0.13
	3	0.12	0.14	0.16	0.12	0.13	0.12	0.12	0.12
	Average	0.12	0.13	0.14	0.14	0.13	0.12	0.13	0.13
T316MX03	1	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.15	0.13	0.11
	2	0.15	0.16	0.15	0.15	0.14	0.13	0.13	0.15
	3	0.11	0.12	0.14	0.14	0.12	0.14	0.14	0.14
	Average	0.13	0.14	0.14	0.14	0.13	0.14	0.13	0.13

MPM ; Months Post Manufacture

마. 불활화 확인시험

(1) 시험방법

(가) 3 Lot의 시험백신을 2~8 ℃의 냉장소에 보존하면서 제조일로부터 제조직후, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월, 27개월 후에 Lot별로 백신 2 ml를 2 회에 걸쳐 동결 및 용해하고, 원심한 상층액을 투석막에 넣고 4 ℃에서 백신의 100 배량 이상의 인산완충식염수 (PBS: pH 7.2~7.4)에 하룻밤 투석한 것을 시험재료로 하였다. 조직배

양세포로 PK-15세포를 flask (25 cm<sup>2</sup>)에 증식시키고, 시험재료 1 ml를 접종한 다음 37 °C에서 1시간 감작시켰다. 1 시간 후 새로운 세포유지용 배지를 더하여 7 일간 배양한다. 상층액을 제거한 후 형광항체법 (FA: fluorescent antibody method)을 이용하여 돼지썩코바이러스 증식여부를 확인하였다.

(2) 시험결과

(가) 3 Lot의 시험백신 모두 27개월까지 돼지 썩코바이러스에 의한 특이한 형광항체반응 (FA)이 확인되지 않았으며 세포 상층액에서 닭, 돼지 혈구에 응집(HA)이 확인되지 않았다.

Lot. No.	Inactivation test (fluorescent antibody method)																
	0 MPM		3 MPM		6 MPM		9 MPM		12 MPM		18 MPM		24 MPM		27 MPM		
	FA	HA	FA	HA	FA	HA	FA	HA	FA	HA	FA	HA	FA	HA	FA	HA	
T316MX01	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-*	-
T316MX02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T316MX03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MPM ; Months Post Manufacture, \* ; Negative

바. 안전시험

(1) 시험방법

□ 3 Lot의 시험백신을 2~8 °C의 냉장소에 보존하면서 제조일로부터 제조직후, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월, 27개월 후에 마우스, 기니픽, 돼지에서 안전성을 확인하였다.

(가) 마우스

① 체중 15~20 g의 마우스 8 마리를 준비하여, 8 마리의 마우스 복강에 1/4 두분 (0.5 ml)을 접종하고 7 일간 관찰하였다.

(나) 기니픽

① 체중 300~350 g의 기니픽 6마리를 준비하여, 근육 및 피하에 각각 2 마리씩 1 두분 (2 ml)을 접종하고, 2 마리는 2 ml씩 복강에 접종하여 7 일간 관찰하였다.

(다) 돼지

① 과거 관련 질병에 노출되지 않은 4~6 주령 돼지 2 마리에 백신의 2 두분을 근육 접

중하였다. 접종 후 1~2 시간 내에 과민반응을 확인하였으며, 21 일 동안 주사부위의 화농, 괴사, 발열 및 피부병변 등의 부작용을 확인하였다.

(2) 시험결과

(가) 3 Lot의 시험백신 모두 27개월까지 마우스, 기니픽, 돼지에서 관찰기간 동안 부작용 없이 생존하였다.

Lot. No.	Animals	Route	Results							
			0 MPM	3 MPM	6 MPM	9 MPM	12 MPM	18 MPM	24 MPM	27 MPM
T316MX01	Mouse	IP	0/8*	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
		IM	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	GP	SC	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
		IP	0/2	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
T316MX02	Mouse	IP	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
		IM	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	GP	SC	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
		IP	0/2	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
T316MX03	Mouse	IP	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
		IM	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	GP	SC	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
		IP	0/2	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

MPM ; Months Post Manufacture,

\* ; The number of abnormal animals / Total numbers of vaccinated animals,

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

사. 역가시험

(1) *Mycoplasma hyopneumoniae* (MHP)

(가) 시험방법

- ① 3 Lot의 시험백신을 2~8℃의 냉장소에 보존하면서 제조일로부터 제조직후, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월, 27개월 후에 Lot 별로 *Mycoplasma hyopneumoniae* 에 대하여 마우스 혈청 역가시험을 실시하였다. 각 Lot별로 15~20g의 마우스 15마리를 준비하여 접종군 10마리는 백신의 1/10두분(0.2ml)을 피하에 접종하고, 5마리는 대조군으로 설정하였다. 접종 2주후에 접종군과 대조군을 같이 채혈하여 ELISA 항체가를 검사하였다.

(나) 시험결과

- ① 3 Lot의 시험백신 모두 27개월까지 512배 이상이었으며 대조군은 10배 미만으로 확인되었다.

Lot. No.	Test	ELISA antibody titer for MHP (Antibody titer)							
		0 MPM	3 MPM	6 MPM	9 MPM	12 MPM	18 MPM	24 MPM	27 MPM
T316MX01	1	1280.0	1280.0	1280.0	640.0	1280.0	640.0	640.0	1280.0
	2	1280.0	1280.0	640.0	640.0	640.0	640.0	640.0	1280.0
	3	640.0	640.0	640.0	640.0	640.0	640.0	1280.0	640.0
	4	1280.0	1280.0	1280.0	640.0	640.0	640.0	640.0	640.0
	5	640.0	640.0	640.0	1280.0	640.0	320.0	640.0	640.0
	6	640.0	1280.0	640.0	1280.0	320.0	1280.0	640.0	640.0
	7	1280.0	640.0	320.0	640.0	640.0	1280.0	640.0	320.0
	8	1280.0	640.0	640.0	1280.0	1280.0	640.0	1280.0	320.0
	9	640.0	640.0	1280.0	640.0	1280.0	640.0	320.0	640.0
	10	640.0	640.0	1280.0	320.0	640.0	640.0	320.0	640.0
	<b>GMT</b>	905.1	844.5	787.9	735.2	735.2	685.9	640.0	640.0
T316MX02	1	1280.0	1280.0	1280.0	1280.0	1280.0	1280.0	1280.0	1280.0
	2	1280.0	640.0	640.0	640.0	1280.0	640.0	640.0	640.0
	3	1280.0	640.0	640.0	1280.0	1280.0	1280.0	640.0	640.0
	4	640.0	640.0	640.0	640.0	640.0	1280.0	1280.0	320.0
	5	640.0	1280.0	640.0	640.0	640.0	640.0	640.0	320.0
	6	640.0	1280.0	640.0	640.0	640.0	640.0	320.0	640.0
	7	640.0	640.0	640.0	1280.0	640.0	640.0	320.0	1280.0
	8	1280.0	640.0	1280.0	640.0	640.0	320.0	640.0	640.0
	9	1280.0	640.0	640.0	320.0	320.0	320.0	640.0	640.0
	10	640.0	1280.0	640.0	640.0	320.0	640.0	640.0	640.0
	<b>GMT</b>	905.1	844.5	735.2	735.2	685.9	685.9	640.0	640.0
T316MX03	1	1280.0	1280.0	1280.0	1280.0	1280.0	1280.0	1280.0	1280.0
	2	1280.0	1280.0	640.0	640.0	1280.0	640.0	640.0	640.0
	3	1280.0	1280.0	640.0	640.0	640.0	640.0	640.0	640.0
	4	640.0	640.0	640.0	640.0	320.0	1280.0	640.0	1280.0
	5	640.0	640.0	1280.0	1280.0	640.0	640.0	1280.0	640.0
	6	640.0	640.0	640.0	640.0	640.0	320.0	640.0	640.0
	7	1280.0	1280.0	640.0	640.0	640.0	320.0	320.0	320.0
	8	640.0	640.0	640.0	640.0	640.0	640.0	320.0	320.0
	9	1280.0	640.0	1280.0	1280.0	640.0	640.0	640.0	640.0
	10	1280.0	1280.0	640.0	640.0	1280.0	1280.0	640.0	640.0
	<b>GMT</b>	970.1	905.1	787.9	787.9	735.2	685.9	640.0	640.0
Control	1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	3	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	4	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	5	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	<b>GMT</b>	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

MPM ; Months post manufacture, GMT ; Geometric mean titer

Antibody titer ; Titer that has higher O.D. value than cut-off value

## (2) Porcine Circovirus type2 (PCV2)

### (가) 시험방법

- ① 3 Lot의 시험백신을 2~8℃의 냉장소에 보존하면서 제조일로부터 제조직후, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월, 27개월 후에 Lot 별로 Porcine Circovirus type2 에 대하여 기니픽 혈청 역가시험을 실시하였다. 각 Lot별로 체중 300~350g의 기니픽 10마리를 준비하여 8마리는 접종군, 2마리는 대조군으로 하여 접종군에는 피하로 1/2두분(1ml)을 접종하고, 3주후에 대조군 2마리와 같이 채혈하여 sandwich indirect ELISA를 통하여 항체가를 확인하였다.

### (나) 시험결과

- ① 3 Lot의 시험백신 모두 27개월까지 T/C 값이 2.0 이상이였다.



Lot. No.	Test	ELISA antibody titer for PCV2 (O.D. value)							
		0 MPM	3 MPM	6 MPM	9 MPM	12 MPM	18 MPM	24 MPM	27 MPM
T316MX01	1	1.05	1.19	1.12	1.20	1.12	1.41	1.19	1.11
	2	1.25	1.02	1.18	1.22	1.11	1.08	1.12	1.03
	3	1.08	1.12	1.32	1.35	1.29	1.24	1.31	1.17
	4	1.09	1.25	1.09	1.42	1.28	1.08	1.08	0.89
	5	1.29	1.35	1.29	1.02	1.05	1.04	1.28	1.24
	6	1.19	1.29	1.22	1.05	1.08	1.05	1.24	1.19
	7	1.29	1.12	1.25	0.98	1.25	1.05	1.02	1.23
	8	1.39	1.02	1.32	1.19	1.39	1.18	1.04	1.15
	평균	1.20	1.17	1.22	1.18	1.20	1.14	1.16	1.13
	<b>T/C</b>	6.69	6.39	6.11	6.35	6.22	6.71	6.60	6.02
T316MX02	1	1.18	1.24	1.13	1.15	1.18	1.27	1.08	1.08
	2	1.24	1.18	1.16	1.18	1.05	1.04	1.11	1.24
	3	1.08	1.31	1.28	1.02	1.22	1.11	1.03	1.16
	4	1.10	1.08	1.34	1.09	1.07	1.09	1.14	1.04
	5	1.06	0.92	1.21	1.06	1.14	1.26	1.26	1.19
	6	1.21	1.34	1.39	1.27	1.16	1.03	1.14	0.89
	7	1.03	1.05	1.02	1.23	1.23	1.08	1.28	1.16
	8	1.28	1.13	1.33	1.31	1.34	1.02	1.03	1.21
	평균	1.15	1.16	1.23	1.16	1.17	1.11	1.13	1.12
	<b>T/C</b>	6.37	6.32	6.16	6.27	6.10	6.54	6.45	5.99
T316MX03	1	1.24	1.06	1.16	1.16	1.31	1.27	1.13	1.01
	2	1.07	1.19	1.17	1.31	1.08	1.24	1.18	1.21
	3	1.15	1.27	1.31	1.04	1.10	1.11	1.24	1.23
	4	1.12	1.02	1.12	1.21	1.19	1.09	1.06	1.18
	5	1.24	1.04	1.25	1.12	1.24	1.04	1.09	1.19
	6	1.08	1.21	1.26	1.30	0.99	1.10	1.04	1.05
	7	1.09	1.25	1.28	1.04	1.27	1.01	1.02	1.02
	8	1.14	1.15	1.22	1.17	1.17	1.12	1.11	1.13
	평균	1.14	1.15	1.22	1.17	1.17	1.12	1.11	1.13
	<b>T/C</b>	6.34	6.28	6.10	6.30	6.08	6.60	6.31	6.03
Control	1	0.19	0.15	0.19	0.18	0.21	0.16	0.18	0.20
	2	0.17	0.21	0.21	0.19	0.17	0.18	0.17	0.17
	평균	0.18	0.18	0.20	0.19	0.19	0.17	0.18	0.19

MPM ; Months post manufacture

T/C : Test serum optical density/ average of Control serum optical density (O.D.)

### 3. 혼합 백신의 야외농장에서의 안전성 및 효능평가

- Porcine circovirus 관련 질환으로 인한 이유자돈의 전신성 소모성 증후군 (PMWS) 또는 유행성 폐렴으로 진단을 받고 현재 임상증상이 나타나고 있거나 특별한 질병이 문제 되지 않고 있는 대규모 사육농장 최소 3군데 이상을 선정하여 백신접종군과 대조군과의 백신의 안전성을 비교한다.
- 안전성시험
  - 접종 후 국소적인 접종반응 (부종, 화농 등)과 전신적인 접종반응 (쇼크 또는 전신발적)을 확인하며, 접종 전 체온측정과 접종 7일 후 체온측정으로 백신의 안전성을 확인한다.
- 각 농장당 백신접종군과 대조군을 구분하여 출하 때까지 사육하며, 일정 간격으로 채혈하여 항체가의 변화를 관찰하고, 폐사율 비교, 임상지수를 관찰함으로써 백신의 효력을 확인한다.

#### 가. 제1시험농장(신흥농장)

##### (1) 농장개요

농장명	신흥농장
농장주	김선구
사육규모	모돈 500두
주소	경기도 평택시 지산동 197
시험담당수의사	이경원
수정률	85%
분만을 및 분만복수	80%, 22~23복 분만
평균포유개수두수	10.5두
평균이유두수	9.5두
이유자돈의 폐사율 (6~25kg)	15~20%
육성, 비육돈의 폐사율 (25~110kg)	5~8%
농장 특이사항	선진 계열 농장, PRRS, Salmonella, HPS 문제농장
적용 Lot	T316MX01

## (2) 안전성 시험

### (가) 시험방법

- ① 일주간 분만 자돈중에서 12복(121마리)에 대하여 시험백신을 1두분(2ml)씩 1주령 과 3주령에 이근부로 근육접종하고, 대조군으로 10복(98마리)과 같이 국소적 반응(부종, 염증, 괴사, 기타)과 전신적 반응(폐사, 웅크림, 식불, 발열, 발적, 호흡곤란, 신경증상, 기타)을 비교 하였다. 체온측정은 접종군과 대조군 각각 20마리를 무작위로 추출하여 백신접종 3일전(-3DPI), 백신접종전(0 Days post inoculation), 접종후 1일(1DPI), 3일(3DPI), 5일(5DPI), 7일(DPI)에 대조군과 같이 직장에서 체온을 측정하여 백신접종에 의한 안전성을 확인하였다.

### (나) 시험결과

#### ① 접종반응에 대한 관찰 결과

##### ㉠ 1주령 자돈의 접종반응 확인 결과

- 접종군(n=121), 대조군(n=98) 모두에서 각각 3마리, 4마리씩 생시위축 자돈의 폐사가 발생하였으나, 백신에 의한 국소적 반응(부종, 염증, 괴사, 기타)과 전신적 반응(폐사, 웅크림, 식불, 발열, 발적, 호흡곤란, 신경증상, 기타)을 관찰할 수 없었다.

Group	Administration	No	Observation days	Clinical signs	
				Systemic <sup>a</sup>	Local <sup>b</sup>
Test	1 week old, 2ml, IM	121	14	*3/121	0/121
Control	No-treatment	98		4/98	0/98

<sup>a</sup> : Death, Lethargy, Anorexia, Fever, Reddening, Dyspnea, Neurosis, etc

<sup>b</sup> : Edema, Inflammation, Necrosis, etc

\* : Clinical sign number/ Total number

##### ㉡ 3주령 자돈의 접종반응 확인 결과

- 접종군(n=118), 대조군(n=94) 모두에서 백신에 의한 국소적 반응(부종, 염증, 괴사, 기타)과 전신적 반응(폐사, 웅크림, 식불, 발열, 발적, 호흡곤란, 신경증상, 기타)을 관찰할 수 없었다.

Group	Administration	No	Observation days	Clinical signs	
				Systemic <sup>a</sup>	Local <sup>b</sup>
Test	3 weeks old, 2ml, IM	118	14	*0/118	0/118
Control	No-treatment	94		0/94	0/94

<sup>a</sup> : Death, Lethargy, Anorexia, Fever, Reddening, Dyspnea, Neurosis, etc

<sup>b</sup> : Edema, Inflammation, Necrosis, etc

\* : Clinical sign number/ Total number

㉔ 접종 후 체온변화 확인 결과

□ 백신접종 전후 및 대조군과의 비교에서 특이한 체온변화를 관찰할 수 없었다.

1주령 자돈의 접종후 체온변화 확인 결과

Group	No	Time	Body temperature(Mean ± SD)					
			-3 DPI	0 DPI	1 DPI	3 DPI	5 DPI	7 DPI
Vaccinates	20	A.M.	39.7±0.5	39.6±0.5	39.7±0.6	39.6±0.5	39.6±0.5	39.6±0.5
		P.M.	39.7±0.5	39.7±0.4	39.9±0.5	39.8±0.5	39.7±0.5	39.5±0.4
Control	20	A.M.	39.5±0.5	39.3±0.6	39.5±0.5	39.7±0.5	39.6±0.5	39.6±0.6
		P.M.	39.9±0.3	39.7±0.3	39.6±0.5	39.8±0.5	39.7±0.4	39.5±0.4

DPI, Days post inoculation; SD, standard deviation

3주령 자돈의 접종후 체온변화 확인 결과

Group	No	Time	Body temperature(Mean ± SD)					
			-3 DPI	0 DPI	1 DPI	3 DPI	5 DPI	7 DPI
Vaccinates	20	A.M.	39.3±0.6	39.2±0.5	39.4±0.7	39.2±0.6	39.3±0.6	39.2±0.5
		P.M.	39.5±0.6	39.4±0.6	39.4±0.5	39.6±0.6	39.5±0.6	39.6±0.5
Control	20	A.M.	39.3±0.5	39.1±0.6	39.1±0.4	39.4±0.6	39.3±0.7	39.2±0.6
		P.M.	39.4±0.6	39.2±0.4	39.3±0.6	39.4±0.6	39.6±0.5	39.4±0.4

DPI, Days post inoculation; SD, standard deviation

### (3) 임상증상 비교시험

#### (가) 시험방법

- ① 백신접종군과 대조군을 각각 20두씩 이각하여 구분하여 사육하면서 3주령(2차접종 전), 6주령, 9주령, 12주령, 16주령에 체중을 측정하여 체중변화를 비교하였으며, 3주령부터 주령별로 임상증상(호흡, 기침, 활력, 피부, 분변)을 보이는 개체수를 확인하여 백신접종군과 대조군간의 임상증상을 비교하였다.

#### (나) 시험결과

##### ① 체중변화 비교시험결과

- ㉔ 접종군과 대조군에서의 체중차이는 확인할 수 없었다.

Group	No	Weight (Mean ± standard deviation)				
		3 Weeks	6 Weeks	9 Weeks	12 Weeks	16 Weeks
Vaccinates	20	6.7±0.7	10.6±1.1	20.5±2.5	33.4±3.9	56.2±5.3
Control	20	6.5±0.8	10.8±1.3	19.0±3.5	34.7±4.0	51.4±9.8

##### ② 임상증상 관찰 점수 비교결과

- ㉔ 접종군과 대조군에서의 일부 호흡, 기침, 활력, 피부, 분변에서의 증상을 보이는 개체가 있었으나, 이는 백신에 의한 증상은 아니었으며, 대조군과의 차이도 없었다.

백신접종군

CS \ W		Pig Number of Clinical sign													
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
호흡	정상	20	20	20	20	20	19	19	18	19	19	19	19	18	19
	개구	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-
	복식	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-
기침	정상	20	20	20	19	19	20	20	20	19	19	19	18	17	19
	간헐	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-
	연속	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
활력	정상	20	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19
	침울	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-
피부	정상	20	20	20	20	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19
	발적	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	황달	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
분변	정상	20	18	17	19	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19
	연변	-	2	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	설사	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

W, Weeks old; CS, Clinical Sign

대조군

CS \ W		Pig Number of Clinical sign													
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
호흡	정상	20	20	20	20	17	15	15	15	15	17	17	17	16	17
	개구	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
	복식	-	-	-	-	3	5	4	3	2	-	-	-	-	-
기침	정상	20	20	20	20	20	20	17	18	17	17	17	15	16	17
	간헐	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2	1	-
	연속	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
활력	정상	20	20	20	20	17	15	15	15	14	15	15	14	16	16
	침울	-	-	-	-	3	5	4	3	3	2	2	3	1	1
피부	정상	20	20	20	20	18	16	16	16	15	16	16	17	17	17
	발적	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	황달	-	-	-	-	2	4	3	2	2	1	1	-	-	-
분변	정상	20	17	18	19	20	20	19	18	17	17	17	17	17	16
	연변	-	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	설사	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

W, Weeks old; CS, Clinical Sign

#### (4) 면역원성 비교 시험

##### (가) 시험방법

- ① 접종군과 대조군을 각각 10두씩 이각하여 구분하여 사육하면서, 1주령(1차접종전) 3주령(2차접종전), 6주령, 9주령, 12주령, 16주령에 채혈하여 항체가를 비교하였다.

##### (나) 시험결과

###### ① PCV2

- ㉠ 모체이행항체가 높게 형성되어 있어서, 1주령, 3주령, 6주령까지 접종군과 대조군에서는 항체가가 차이를 보이지 않았으나 9주령 이후에는 백신접종군과 대조군은 유의적인 차이를 확인하였다.

Group	No	ELISA antibody					
		1 Week	3 Weeks	6 Weeks	9 Weeks	12Weeks	16Weeks
Vaccinates	10	0.80±0.03	0.80±0.03	0.90±0.05	1.03±0.14	1.00±0.13	0.89±0.10
Control	10	0.78±0.03	0.81±0.03	0.82±0.03	0.77±0.03	0.76±0.03	0.79±0.03

###### ② *M. hyopneumoniae*

- ㉠ 모체이행항체가 높게 형성되어 있어서, 1주령, 3주령까지 접종군과 대조군에서는 항체가가 차이를 보이지 않았으나 6주령 이후에는 백신접종군과 대조군은 유의적인 차이를 확인하였다.

Group	No	ELISA antibody					
		1 Week	3 Weeks	6 Weeks	9 Weeks	12Weeks	16Weeks
Vaccinates	10	0.69	0.42	0.96	1.34	1.41	1.31
Control	10	0.63	0.44	0.25	0.02	0.03	0.01

#### (5) 폐사돈 비교 시험

##### (가) 시험방법

- ① 접종군 118마리와 대조군 94마리의 주간 폐사율을 기록하면서 17주령에 최종 폐사율을 비교하였다. 또한 폐사돈의 임상증상 및 부검소견을 비교하며, 임파절, 폐, 비장에서의 Real-time PCR을 통하여 PCV2 바이러스 감염을 비교하였다.

(나) 시험결과

① 폐사율 비교결과

㉔ 4주령부터 17주령까지 주간별로 폐사율을 기록하여 관찰한 결과 접종군(n=118)은 5두 폐사가 발생하여 4.2% 폐사율을 기록하였으며, 대조군(n=94)은 13두가 폐사하여 13.8%의 폐사율을 기록하였다. 접종군이 대조군에 비하여 9.6%의 폐사율 감소를 확인할 수 있었다.

Group	No	Deaths															No of Death	Death rate
		4 W	5 W	6 W	7 W	8 W	9 W	10 W	11 W	12 W	13 W	14 W	15 W	16 W	17 W			
Vaccinates	118			1			1		1	1					1		5	4.2
Control	94	1					2	1	3	1	2	1	1	1			13	13.8

W, Weeks old

② 폐사돈의 임상증상 및 부검소견 비교시험 결과

㉔ 폐사돈의 임상증상과 부검소견을 관찰하여 기록하였으며, 다른 항원의 감염유무를 판단하기 위하여 PRRSV, SIV, HPS, Salmonella, APP의 항원에 대한 혼합감염 유무를 판단하였다.

Group	No	Death Weeks	Clinical sign	Autopsy sign	Other infection *
Vaccinates	1	9	위축, 황달	장벽비대	PRRS
	2	11	급사	-	PRRS
	3	12	설사	결장염	PRRS, Sal
Control	1	9	위축, 설사, 황달	심낭염, 흉강염	PRRS, HPS, Sal.
	2	9	위축, 설사, 황달	간질성폐렴	PRRS, HPS, Sal.
	3	11	위축, 설사	간질성폐렴	PRRS, Sal
	4	11	위축, 설사	심낭염, 복막염	PRRS, Sal, HPS
	5	11	위축, 설사	심낭염, 흉강염	PRRS, HPS, Sal.
	6	12	관절종대	관절염	PRRS

\* : PRRSV, SIV, HPS, Salmonella, APP



③ 폐사돈 조직내 바이러스 함량 비교 시험 (Real-time PCR)

㉔ 폐사돈을 부검하여 폐, 비장, 임파절의 조직을 Pooling하고 Real-time PCR을 이용하여 바이러스 함유량을 비교한 결과 접종군의 조직내 바이러스 함유량이  $10^{2.2\sim 3.1}$ FAID<sub>50</sub>/ml으로 대조군  $10^{4.2\sim 5.4}$ FAID<sub>50</sub>/ml 보다 낮은 바이러스를 함유하고 있음을 확인하였다.

Group	No	Antigen quantity (Log <sub>10</sub> FAID <sub>50</sub> /ml)		
		Lung	Spleen	Lymph node
Vaccinates	3	2.2	3.1	2.7
Control	6	4.2	5.2	5.4

나. 제2시험농장(대영축산)

(1) 농장개요

농장명	대영축산
농장주	정성윤
사육규모	모돈 500두
주소	경기도 이천시 대월면 대대리 133-1
시험담당수의사	이경원
수정률	85%
분만율 및 분만복수	80%, 월 73복
평균포유개수두수	9.9두
평균이유두수	9.45두
이유자돈의 폐사율 (6~25kg)	8~10%
육성, 비육돈의 폐사율 (25~110kg)	2~3%
농장 특이사항	설사는 거의 없음
적용 Lot	T316MX02

(2) 안전성 시험

(가) 시험방법

① 일주간 분만 자돈중에서 10복(95마리)에 대하여 시험백신을 1두분(2ml)씩 1주령 과 3주령에 이근부로 근육접종하고, 대조군으로 8복(78마리)과 같이 국소적 반응(부종,

염증, 괴사, 기타)과 전신적 반응(폐사, 웅크림, 식불, 발열, 발적, 호흡곤란, 신경증상, 기타)을 비교 하였다. 체온측정은 접종군과 대조군 각각 20마리를 무작위로 추출하여 백신접종 3일전(-3DPI), 백신접종전(0 Days post inoculation), 접종후 1일(1DPI), 3일(3DPI), 5일(5DPI), 7일(DPI)에 대조군과 같이 직장에서 체온을 측정하여 백신접종에 의한 안전성을 확인하였다.

(나) 시험결과

① 접종반응에 대한 관찰 결과

㉠ 1주령 자돈의 접종반응 확인 결과

□ 접종군(n=95), 대조군(n=78) 모두에서 각각 2마리, 2마리씩 생시위축 자돈의 폐사가 발생하였으나, 백신에 의한 국소적 반응(부종, 염증, 괴사, 기타)과 전신적 반응(폐사, 웅크림, 식불, 발열, 발적, 호흡곤란, 신경증상, 기타)을 관찰할 수 없었다.

Group	Administration	No	Observation days	Clinical signs	
				Systemic <sup>a</sup>	Local <sup>b</sup>
Test	1 week old, 2ml, IM	95	14	*2/95	0/95
Control	No-treatment	78		2/78	0/78

<sup>a</sup> : Death, Lethargy, Anorexia, Fever, Reddening, Dyspnea, Neurosis, etc

<sup>b</sup> : Edema, Inflammation, Necrosis, etc

\* : Clinical sign number/ Total number

㉡ 3주령 자돈의 접종반응 확인 결과

□ 접종군(n=118), 대조군(n=94) 모두에서 백신에 의한 국소적 반응(부종, 염증, 괴사, 기타)과 전신적 반응(폐사, 웅크림, 식불, 발열, 발적, 호흡곤란, 신경증상, 기타)을 관찰할 수 없었다.

Group	Administration	No	Observation days	Clinical signs	
				Systemic <sup>a</sup>	Local <sup>b</sup>
Test	3 weeks old, 2ml, IM	93	14	*0/93	0/93
Control	No-treatment	76		0/76	0/76

<sup>a</sup> : Death, Lethargy, Anorexia, Fever, Reddening, Dyspnea, Neurosis, etc

<sup>b</sup> : Edema, Inflammation, Necrosis, etc

\* : Clinical sign number/ Total number

㉔ 접종 후 체온변화 확인 결과

□ 백신접종 전후 및 대조군과의 비교에서 특이한 체온변화를 관찰할 수 없었다.

1주령 자돈의 접종후 체온변화 확인 결과

Group	No	Time	Body temperature(Mean ± SD)					
			-3 DPI	0 DPI	1 DPI	3 DPI	5 DPI	7 DPI
Vaccinates	20	A.M.	39.2±0.4	39.4±0.4	39.4±0.4	39.4±0.4	39.0±0.4	39.3±0.5
		P.M.	39.8±0.5	39.8±0.6	39.5±0.5	39.6±0.5	39.8±0.4	39.8±0.5
Control	20	A.M.	39.4±0.4	39.2±0.4	39.1±0.4	39.3±0.4	39.3±0.4	39.3±0.5
		P.M.	39.6±0.5	39.7±0.6	39.8±0.5	39.8±0.4	39.8±0.5	39.7±0.4

DPI, Days post inoculation; SD, standard deviation

3주령 자돈의 접종후 체온변화 확인 결과

Group	No	Time	Body temperature(Mean ± SD)					
			-3 DPI	0 DPI	1 DPI	3 DPI	5 DPI	7 DPI
Vaccinates	20	A.M.	39.2±0.6	39.2±0.6	39.3±0.5	39.3±0.5	39.3±0.4	39.3±0.5
		P.M.	39.7±0.5	39.4±0.5	39.5±0.6	39.5±0.6	39.4±0.5	39.6±0.5
Control	20	A.M.	39.2±0.6	39.1±0.5	39.2±0.6	39.2±0.6	39.3±0.6	39.2±0.5
		P.M.	39.4±0.6	39.6±0.5	39.4±0.6	39.5±0.6	39.4±0.6	39.7±0.5

DPI, Days post inoculation; SD, standard deviation

(3) 임상증상 비교시험

(가) 시험방법

- ① 접종군과 대조군을 각각 20두씩 이각하여 구분하여 사육하면서 3주령(2차접종전), 6주령, 9주령, 12주령, 16주령에 체중을 측정하여 체중변화를 비교하였으며, 3주령부터 주령별로 임상증상(호흡, 기침, 활력, 피부, 분변)을 보이는 개체수를 확인하여 백신접종군과 대조군간의 임상증상을 비교하였다.

(나) 시험결과

- ① 체중변화 비교시험결과

㉔ 접종군과 대조군에서의 체중차이는 확인할 수 없었다.

Group	No	Weight (Mean ± standard deviation)				
		3 Weeks	6 Weeks	9 Weeks	12 Weeks	16 Weeks
Vaccinates	20	6.6±0.8	10.8±1.2	19.3±2.6	35.7±3.2	61.3±4.8
Control	20	6.7±0.6	11.0±1.2	19.0±3.5	32.2±6.5	46.0±8.7

② 임상증상 관찰 점수 비교결과

㉔ 접종군과 대조군에서의 일부 호흡, 기침, 활력, 피부, 분변에서의 증상을 보이는 개체가 있었으나, 이는 백신에 의한 증상은 아니었으며, 대조군과의 차이도 없었다.

백신접종군

CS	W	Pig Number of Clinical sign													
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
호흡	정상	20	20	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
	개구	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	복식	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
기침	정상	20	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19	16	19	19
	간헐	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
	연속	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
활력	정상	20	20	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
	침울	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
피부	정상	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
	발적	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	황달	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
분변	정상	20	17	20	20	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19
	연변	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	설사	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

W, Weeks old; CS, Clinical Sign

대조군

CS	W	Pig Number of Clinical sign													
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
호흡	정상	20	20	20	20	18	16	16	16	16	18	18	18	18	18
	개구	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	복식	-	-	-	-	2	4	3	2	2	-	-	-	-	-
기침	정상	20	20	20	20	20	20	19	18	18	18	18	16	17	18
	간헐	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	연속	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	-
활력	정상	20	20	20	20	18	16	16	17	17	18	18	18	18	18
	침울	-	-	-	-	2	4	3	1	1	-	-	-	-	-
피부	정상	19	20	20	20	20	20	19	18	18	18	18	18	18	18
	발적	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	황달	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
분변	정상	20	15	19	20	20	20	19	18	18	18	18	18	18	18
	연변	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	설사	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

W, Weeks old; CS, Clinical Sign

(4) 면역원성 비교 시험

(가) 시험방법

- ① 접종군과 대조군을 각각 10두씩 이각하여 구분하여 사육하면서, 1주령(1차접종전) 3주령(2차접종전), 6주령, 9주령, 12주령, 16주령에 채혈하여 항체가를 비교하였다.

(나) 시험결과

① PCV2

- ㉔ 모체이행항체가 높게 형성되어 있어서, 1주령, 3주령까지 접종군과 대조군에서는 항체가가 차이를 보이지 않았으나 6주령 이후에는 백신접종군과 대조군은 유의적인 차이를 확인하였다.

Group	No	ELISA antibody					
		1 Week	3 Weeks	6 Weeks	9 Weeks	12Weeks	16Weeks
Vaccinates	10	0.86±0.03	0.90±0.03	0.91±0.04	1.03±0.12	1.04±0.16	0.98±0.13
Control	10	0.85±0.03	0.81±0.03	0.71±0.03	0.77±0.03	0.67±0.03	0.67±0.03

② *M. hyopneumoniae*

㉔ 모체이행항체가 높게 형성되어 있어서, 1주령, 3주령까지 접종군과 대조군에서는 항체가가 차이를 보이지 않았으나 6주령 이후에는 백신접종군과 대조군은 유의적인 차이를 확인하였다.

Group	No	Immunogenicity (ELISA antibody)					
		1 Week	3 Weeks	6 Weeks	9 Weeks	12Weeks	16Weeks
Vaccinates	10	0.95	0.55	0.75	1.10	1.34	1.22
Control	10	0.89	0.44	0.32	0.09	0.03	0.04

(5) 폐사돈 비교 시험

(가) 시험방법

① 접종군 93마리와 대조군 76마리의 주간 폐사율을 기록하면서 17주령에 최종 폐사율을 비교하였다. 또한 폐사돈의 임상증상 및 부검소견을 비교하며, 입파절, 폐, 비장에서 Real-time PCR을 통하여 PCV2 바이러스 감염을 비교하였다.

(나) 시험결과

① 폐사율 비교결과

㉔ 4주령부터 17주령까지 주간별로 폐사율을 기록하여 관찰한 결과 접종군(n=93)은 4두 폐사가 발생하여 4.3% 폐사율을 기록하였으며, 대조군(n=76)은 9두가 폐사하여 11.8%의 폐사율을 기록하였다. 접종군이 대조군에 비하여 7.5%의 폐사율 감소를 확인할 수 있었다.

Group	No	Deaths														No of Death	Death rate
		4 W	5 W	6 W	7 W	8 W	9 W	10 W	11 W	12 W	13 W	14 W	15 W	16 W	17 W		
Vaccinates	93			1		1			1						1	4	4.3
Control	76				2	1	2	2	1	1						9	11.8

W, Weeks old

② 폐사돈의 임상증상 및 부검소견 비교시험 결과

㉔ 폐사돈의 임상증상과 부검소견을 관찰하여 기록하였으며, 다른 항원의 감염유무를 판단하기 위하여 PRRSV, SIV, HPS, Salmonella, APP의 항원에 대한 혼합감염 유무를 판단하였다.

Group	No	Death Weeks	Clinical sign	Autopsy sign	Other infection*
Vaccinates	1	8	위축, 황달	장벽비대	PRRS
	1	8	위축	간질성폐렴	PRRS Sal.
Control	2	9	정상	폐출혈	APP
	3	9	관절종대	-	PRRS

\* : PRRSV, SIV, HPS, Salmonella, APP

③ 폐사돈 조직내 바이러스 함량 비교 시험 (Real-time PCR)

㉔ 폐사돈을 부검하여 폐, 비장, 임파절의 조직을 Pooling하고 Real-time PCR을 이용하여 바이러스 함유량을 비교한 결과 접종군의 조직내 바이러스 함유량이  $10^{1.2-2.7}$ FAID<sub>50</sub>/ml으로 대조군  $10^{4.2-5.8}$ FAID<sub>50</sub>/ml 보다 낮은 바이러스를 함유하고 있음을 확인하였다.

Group	No	Antigen quantity (Log <sub>10</sub> FAID <sub>50</sub> /ml)		
		Lung	Spleen	Lymph node
Vaccinates	1	1.2	2.9	2.7
Control	3	4.2	5.9	5.8

다. 제3시험농장(진영농장)

(1) 농장개요

농장명	진영농장
농장주	이진영
사육규모	6,000두
주소	전북 부안군 부안면 남포리 378-1
시험담당수의사	양홍석
수정률	87%
분만을 및 분만복수	90%, 주 28~30복
평균포유개수두수	10.5두
평균이유두수	9.7두
이유자돈의 폐사율 (6~25kg)	10%
육성, 비육돈의 폐사율 (25~110kg)	5~8%
농장 특이사항	PRRS(음성), 무항생제농장으로 등록후 급격히 폐사율 증가 접종전 조직내 PCV2 바이러스 함유량 : $10^{4.37}$ FAID <sub>50</sub> /ml
적용 Lot	T316MX03

(2) 안전성 시험

(가) 시험방법

- ① 6주간 분만 자돈에 대하여 시험하였으며, 처음 2주간(58복, 598마리)을 대조군으로 두었으며, 그 후 4주간의 생산자돈(11복, 1,249마리)를 시험군으로하여 시험백신을 1두분(2ml)씩 1주령 과 3주령에 이근부로 근육접종하고, 대조군과 같이 국소적 반응(부종, 염증, 괴사, 기타)과 전신적 반응(폐사, 웅크림, 식불, 발열, 발적, 호흡곤란, 신경증상, 기타)을 비교 하였다. 체온측정은 접종군과 대조군 각각 20마리를 무작위



로 추출하여 백신접종 3일전(-3DPI), 백신접종전(0 Days post inoculation), 접종후 1일(1DPI), 3일(3DPI), 5일(5DPI), 7일(DPI)에 대조군과 같이 직장에서 체온을 측정하여 백신접종에 의한 안전성을 확인하였다.

(나) 시험결과

① 접종반응에 대한 관찰 결과

㉠ 1주령 자돈의 접종반응 확인 결과

□ 접종군(n=1,249), 대조군(n=598)에서 각각 57마리, 28마리씩 생시위축 자돈의 폐사가 발생하였으나, 백신에 의한 국소적 반응(부종, 염증, 괴사, 기타)과 전신적 반응(폐사, 웅크림, 식불, 발열, 발적, 호흡곤란, 신경증상, 기타)을 관찰할 수 없었다.

Group	Administration	No	Observation days	Clinical signs	
				Systemic <sup>a</sup>	Local <sup>b</sup>
Vaccinates	1 week old, 2ml, IM	1249	14	*57/1249 (4.5%)	0/1249
Control	No-treatment	598		28/598 (4.6%)	0/598

<sup>a</sup> : Death, Lethargy, Anorexia, Fever, Reddening, Dyspnea, Neurosis, etc  
<sup>b</sup> : Edema, Inflammation, Necrosis, etc  
\* : Clinical sign number/ Total number

㉡ 3주령 자돈의 접종반응 확인 결과

□ 접종군(n=1192), 대조군(n=570)에서 각각 3마리, 2마리씩 설사에 의한 폐사가 발생하였으나, 백신에 의한 국소적 반응(부종, 염증, 괴사, 기타)과 전신적 반응(폐사, 웅크림, 식불, 발열, 발적, 호흡곤란, 신경증상, 기타)을 관찰할 수 없었다.

Group	Administration	No	Observation days	Clinical signs	
				Systemic <sup>a</sup>	Local <sup>b</sup>
Vaccinates	3 weeks old, 2ml, IM	1192	14	*3/1192	0/1192
Control	No-treatment	570		2/570	0/570

<sup>a</sup> : Death, Lethargy, Anorexia, Fever, Reddening, Dyspnea, Neurosis, etc  
<sup>b</sup> : Edema, Inflammation, Necrosis, etc  
\* : Clinical sign number/ Total number

㉔ 접종 후 체온변화 확인 결과

백신접종 전후 및 대조군과의 비교에서 특이한 체온변화를 관찰할 수 없었다.

1주령 자돈의 접종후 체온변화 확인 결과

Group	No	Time	Body temperature(Mean ± SD)					
			-3 DPI	0 DPI	1 DPI	3 DPI	5 DPI	7 DPI
Vaccinates	20	A.M.	39.4±0.5	39.3±0.4	39.2±0.4	39.3±0.5	39.1±0.4	39.2±0.4
		P.M.	39.5±0.6	39.6±0.5	39.7±0.5	39.6±0.4	39.6±0.5	39.7±0.4
Control	20	A.M.	39.2±0.5	39.4±0.4	39.0±0.4	39.2±0.5	39.0±0.4	39.2±0.4
		P.M.	39.7±0.5	39.5±0.6	39.5±0.5	39.4±0.4	39.5±0.5	39.5±0.5

DPI, Days post inoculation; SD, standard deviation

3주령 자돈의 접종후 체온변화 확인 결과

Group	No	Time	Body temperature(Mean ± SD)					
			-3 DPI	0 DPI	1 DPI	3 DPI	5 DPI	7 DPI
Vaccinates	20	A.M.	39.2±0.5	39.5±0.5	39.4±0.5	39.8±0.5	39.4±0.6	39.3±0.6
		P.M.	39.7±0.6	39.4±0.5	39.3±0.4	39.6±0.6	39.5±0.5	39.8±0.4
Control	20	A.M.	39.2±0.6	39.1±0.5	39.2±0.6	39.2±0.6	39.3±0.6	39.2±0.5
		P.M.	39.6±0.5	39.6±0.5	39.6±0.5	39.6±0.6	39.6±0.5	39.7±0.5

DPI, Days post inoculation; SD, standard deviation

(다) 임상증상 비교시험

① 시험방법

㉔ 접종군과 대조군을 각각 20두씩 이각하여 구분하여 사육하면서 3주령(2차접종 전), 6주령, 9주령, 12주령, 16주령에 체중을 측정하여 체중변화를 비교하였으며, 3주령부터 주령별로 임상증상(호흡, 기침, 활력, 피부, 분변)을 보이는 개체수를 확인하여 백신접종군과 대조군간의 임상증상을 비교하였다.

② 시험결과

㉔ 체중변화 비교시험결과

접종군과 대조군에서의 체중차이는 확인할 수 없었다.

Group	No	Weight (Mean ± standard deviation)				
		3 Weeks	6 Weeks	9 Weeks	12 Weeks	16 Weeks
Vaccinates	20	6.0±0.8	11.9±1.6	17.9±1.5	38.3±3.3	59.2±5.4
Control	20	6.3±0.6	11.4±1.5	20.5±2.7	28.6±5.3	51.0±6.6

③ 임상증상 관찰 점수 비교결과

㉔ 접종군과 대조군에서의 일부 호흡, 기침, 활력, 피부, 분변에서의 증상을 보이는 개체가 있었으나, 이는 백신에 의한 증상은 아니었으며, 대조군과의 차이도 없었다.

백신접종군

CS	W	Pig Number of Clinical sign													
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
호흡	정상	20	20	20	20	20	19	19	20	20	20	20	20	20	20
	개구	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	복식	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
기침	정상	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	18	20
	간헐	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	연속	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-
활력	정상	20	20	20	19	19	19	19	20	20	20	20	20	20	20
	침울	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
피부	정상	20	19	19	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	발적	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	황달	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
분변	정상	15	17	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	연변	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	설사	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

W, Weeks old; CS, Clinical Sign

대조군

CS \ W		Pig Number of Clinical sign													
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
호흡	정상	20	20	19	19	18	16	12	11	13	15	14	14	15	15
	개구	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
	복식	-	-	1	1	2	2	3	4	2	-	1	-	-	-
기침	정상	20	20	20	20	20	18	14	15	15	15	15	12	11	15
	간헐	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
	연속	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	4	-
활력	정상	20	20	20	19	18	13	9	12	15	15	15	15	15	15
	침울	-	-	-	1	2	5	6	3	-	-	-	-	-	-
피부	정상	18	17	20	20	20	18	15	15	15	15	15	15	15	15
	발적	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	황달	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
분변	정상	16	16	19	20	20	18	15	15	15	15	15	15	15	15
	연변	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	설사	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

W, Weeks old; CS, Clinical Sign

(라) 면역원성 비교 시험

① 시험방법

㉞ 접종군과 대조군을 각각 10두씩 이각하여 구분하여 사육하면서, 1주령(1차접종전) 3주령(2차접종전), 6주령, 9주령, 12주령, 16주령에 채혈하여 항체가를 비교하였다.

② 시험결과

㉞ PCV2

□ 1주령, 3주령까지 접종군과 대조군에서는 항체가가 차이를 보이지 않았으나 6주령 이후에 항체가 상승을 확인하였으나 대조군에서도 같이 상승되어 감염역가로 추정되었다.

Group	No	ELISA antibody					
		1 Week	3 Weeks	6 Weeks	9 Weeks	12Weeks	16Weeks
Vaccinates	10	0.53±0.03	0.58±0.04	0.52±0.03	0.77±0.03	0.78±0.03	0.89±0.03
Control	10	0.51±0.03	0.57±0.03	0.53±0.06	0.78±0.11	0.82±0.11	0.82±0.05

㉔ *M. hyopneumoniae*

- 1주령까지 접종군과 대조군에서는 항체가 차이가 보이지 않았으나 접종군과의 유의적인 차이를 확인하였다.

Group	No	ELISA antibody					
		1 Week	3 Weeks	6 Weeks	9 Weeks	12Weeks	16Weeks
Vaccinates	10	0.66	0.89	1.43	1.46	1.35	1.12
Control	10	0.65	0.45	0.33	0.21	0.02	0.02

(마) 폐사돈 비교 시험

① 시험방법

- ㉔ 접종군 1,192마리와 대조군 570마리의 주간 폐사율을 기록하면서 17주령에 최종 폐사율을 비교하였다. 또한 폐사돈의 임상증상 및 부검소견을 비교하며, 입파절, 폐, 비장에서 Real-time PCR을 통하여 PCV2 바이러스 감염을 비교하였다.

② 시험방법

㉔ 폐사율 비교결과

- 4주령부터 17주령까지 주간별로 폐사율을 기록하여 관찰한 결과 접종군 (n=1,192)은 57두 폐사가 발생하여 4.8% 폐사율을 기록하였으며, 대조군 (n=570)은 81두가 폐사하여 14.2%의 폐사율을 기록하였다. 접종군이 대조군에 비하여 9.43%의 폐사율 감소를 확인할 수 있었다.

Group	No	Deaths															No of Death	Death rate
		4 W	5 W	6 W	7 W	8 W	9 W	10 W	11 W	12 W	13 W	14 W	15 W	16 W	17 W			
Vaccinates	1192	3	4	3	9	11	12	5	3	2		1	2	1	1	57	4.782	
Control	570	1	2	5	13	15	26	5	3	2	1	2	3	2	1	81	14.21	

W, Weeks old

㉔ 폐사돈의 임상증상 및 부검소견 비교시험 결과

- 폐사돈의 임상증상과 부검소견을 관찰하여 기록하였으며, 다른 항원의 감염유무를 판단하기 위하여 PRRSV, SIV, HPS, Salmonella, APP의 항원에 대한 혼합감염 유무를 판단하였다.

Group	No	Death Weeks	Clinical sign	Autopsy sign	Other infection*
Vaccinates	1	8	위축, 황달	장벽비대	Sal. Strep
	2	9	피부 발적	-	Sal
	3	9	급사(정상)		-
Control	1	8	위축	간질성폐렴	
	2	8	정상	폐출혈	HPS
	3	8	급사(정상)	-	HPS
	4	9	관절종대	관절염	Strep
	5	9	황달, 위축	결장염, 위염	-

\* : PRRSV, SIV, HPS, Salmonella, APP

㉕ 폐사돈 조직내 바이러스 함량 비교 시험 (Real-time PCR)

- 폐사돈을 부검하여 폐, 비장, 임파절의 조직을 Pooling하고 Real-time PCR을 이용하여 바이러스 함유량을 비교한 결과 접종군의 조직내 바이러스 함유량이  $10^{1.2\sim 2.7}$ FAID<sub>50</sub>/ml으로 대조군  $10^{6.2\sim 7.8}$ FAID<sub>50</sub>/ml 보다 낮은 바이러스를 함유하고 있음을 확인하였다.

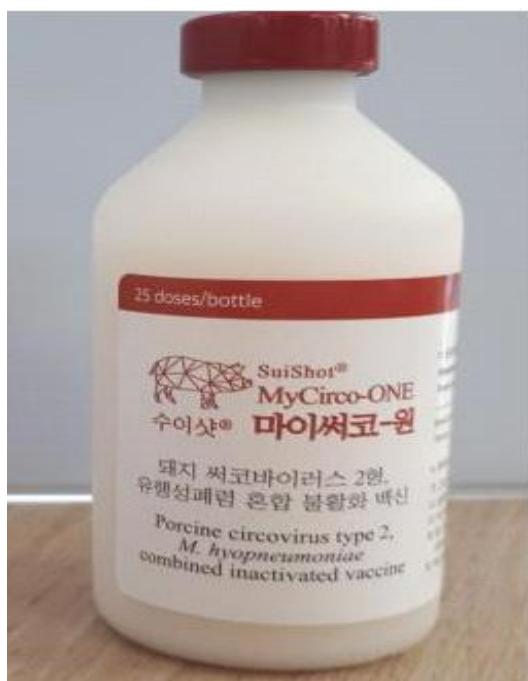
Group	No	Antigen quantity (Log <sub>10</sub> FAID <sub>50</sub> /ml)		
		Lung	Spleen	Lymph node
Vaccinates	3	1.2	2.9	2.7
Control	5	6.2	7.9	7.8

## [3차년도]

### 1. 수이샷 마이썬코원의 제품화(허가승인) 및 매출 창출

가. 2년간의 실험결과를 토대로 수이샷 마이썬코-원(마이코플라즈마 및 PCV2 혼합백신)에 대하여 농림축산검역본부로부터 허가승인(2017.07.26., 13-215호)완료

나. 매출 창출을 위하여 시제품(318MPCV01, 2018.08.29.생산)을 생산하여 농림축산검역본부 고시 자가검정 및 국가검정을 거쳐서 18년 12월경 출시 예정임. (매출은 2019년 발생 예정임.)

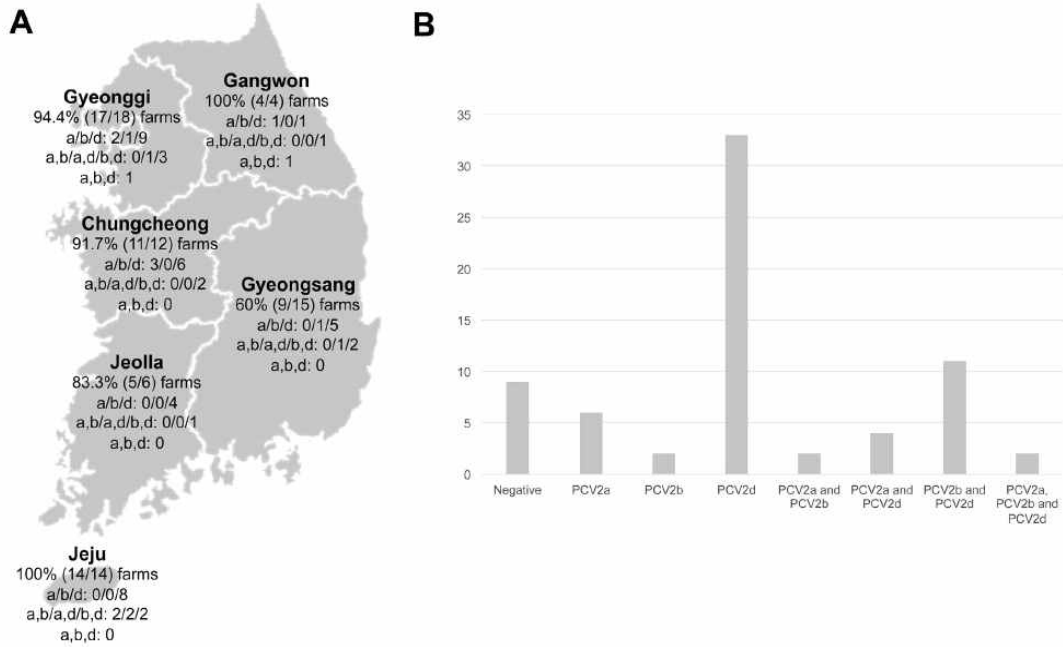


### 2. PCV2 (2d) Type 분리

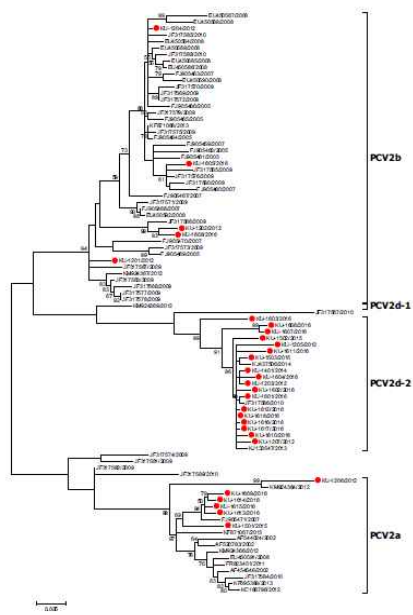
□ PCV2 바이러스들 간의 교차방어 효과를 확인하고자, 수이샷 마이썬코-원(PCV2 및 마이코플라즈마 혼합백신)내의 PCV2 (2b) type과의 다른 type 바이러스 분리하였다.

가. PCV2 국내 발생상황

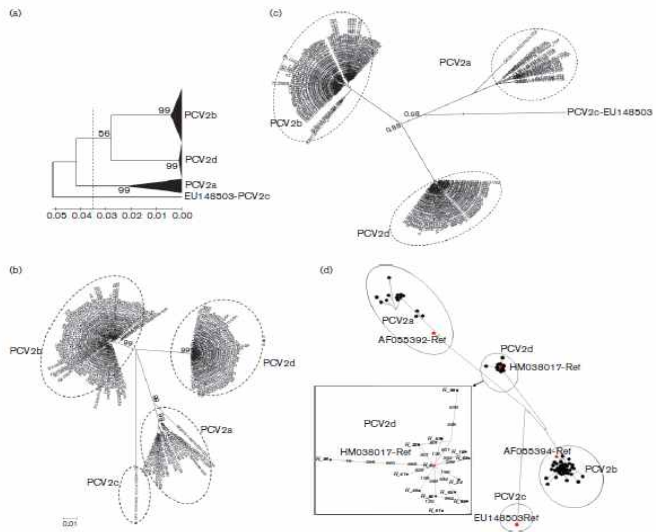
(1) 최근에 발표되는 논문[Ref 1, 2]들을 살펴보면 아래와 같이 국내외적으로 2d type의 썬코바이러스가 대부분 유행하고 있으며, 현재 시판중에 백신에는 2d type의 썬코바이러스를 포함하는 백신이 없기 때문에 국내외적으로 보다 광범위한 면역능력을 제공할수 있는 백신이 필요한 상황이다. 그 일환으로 PCV 2d type stain을 분리하여 특성을 분석하고 향후 백신으로 사용하고자 한다.



**Fig. 1.** Geographic distribution of PCV2 genotypes and infection pattern of different PCV2 genotypes at the farm level in South Korea in 2016. A) Geographic distribution of PCV2 genotypes by province. Bold represents provinces of Korea and the following is the prevalence of PCV2. a/b/d: single infection of PCV2a, PCV2b, and PCV2d, respectively; a,b/a,d/b,d: dual infection of PCV2a and PCV2b, PCV2a and PCV2d, and PCV2b and PCV2d, respectively; a,b,d: triple infection of PCV2a, PCV2b and PCV2d. B) Infection pattern of different PCV2 genotypes at the farm level.



**Fig. 2.** Phylogenetic trees based on the complete genome of Korean PCV2. The tree was constructed using the maximum-likelihood method based on the GTR model with G + I, and tested using 1000 bootstrapping values.



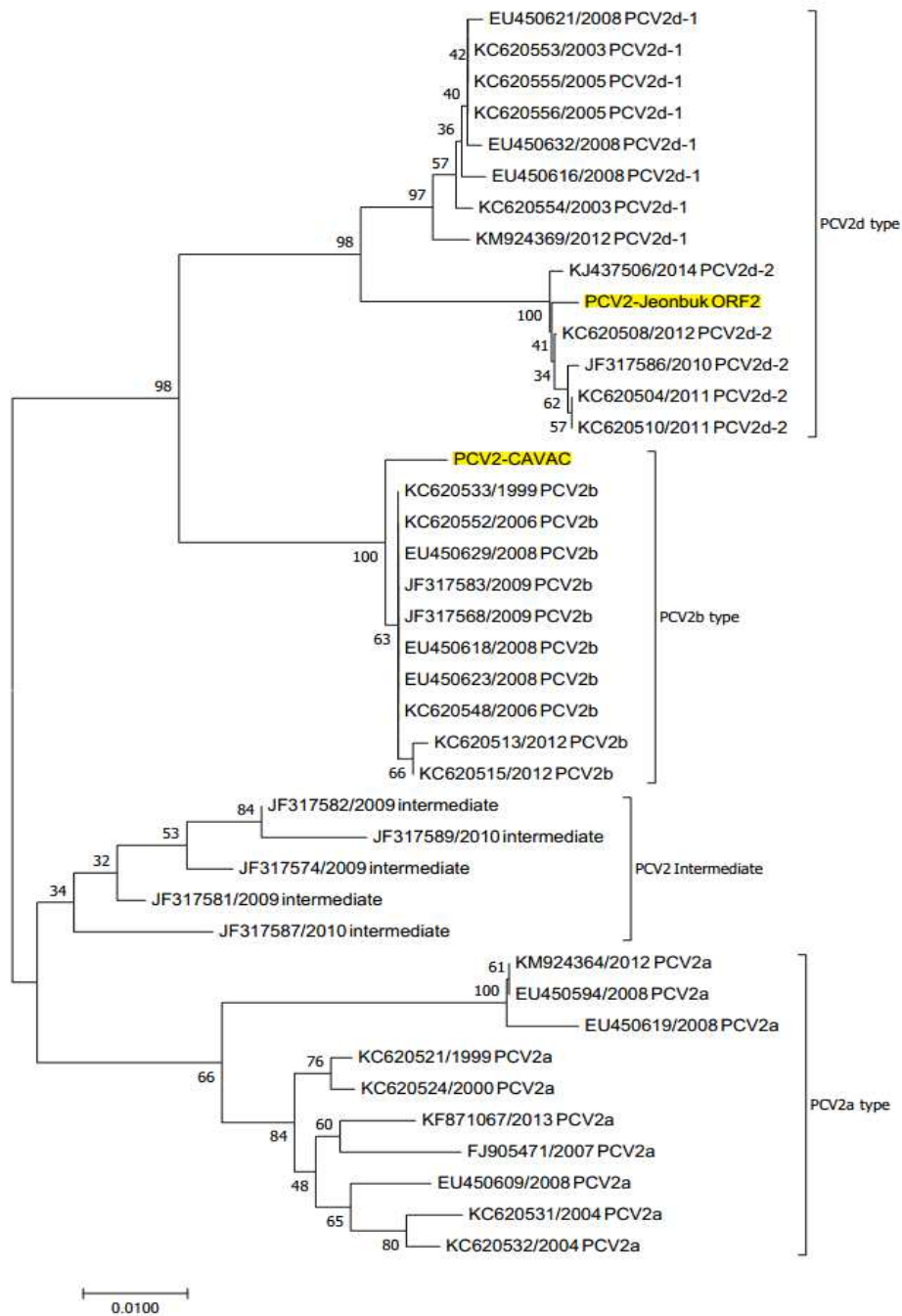
**Fig. 3.** Evolutionary analysis based on 147 PCV2 ORF2 sequences. The 147 PCV2 sequences include 143 recent sequences from the USA and the four genotype reference strains of PCV2a (AF055392), PCV2b (AF056394), PCV2c (EU148503) and PCV2d (HM038017). (a) Linearized neighbour-joining tree based on p-distance model. The dashed line indicates the previously defined PCV2 genotype-defining threshold of 0.035. (b) Maximum-likelihood analysis based on the General Time Reversible (GTR) model with rates of gamma distributed and proportion of invariant sites ( $\Gamma+I$ ). (c) Maximum clade credibility tree inferred by Bayesian inference with model of GTR +  $\Gamma+I$ . (d) Networks indicate the relationship of the haplotypes defined by the 143 US sequence and four reference sequences. The red dots indicate the haplotypes of the four reference sequences. The sequences and their corresponding haplotypes are shown in Table S6.



나. PCV2 2d 분리

□ 썩코 증상이 있는 돼지의 폐에서 바이러스를 분리하여 배양하였다.

(1) PCV2 phylogenetic tree (ORF2 region)



분리한 PCV2균주의 ORF2 region에 대한 Sequencing을 진행한 결과, PCV2d type으로 확인이 되었다.

(2) PCV2 ORF2 region sequence 정보

ATGACGTATCCAAGGAGGCGTTTCCGCAGACGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCT  
TGGCCAGATCCTCCGCCGCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCCGCCACCGTTACCGCTGG  
AGAAGGAAAAATGGCATCTTCAACACCCGCCTCTCCCGCACCATCGGTTATACTGT  
CAAGAAAACCACAGTCAGAACACCCTCCTGGAATGTGGACATGATGAGATTTAAT  
ATTAATGATTTTCTTCCCCCAGGAGGGGGCTCAAACCCCTCACTGTGCCCTTTGA  
ATACTACAGAATAAGGAAGGTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCAATCACC  
CAGGGTGACAGGGGAGTGGGCTCCACTGCTGTTATTCTAGATGATAACTTTGTAA  
CAAAGGCCAATGCCCTAACCTATGACCCCTATGTAAACTACTCCTCCCGCCATAACC  
ATAACCCAGCCCTTCTCCTACCACTCCCGGTACTTTACCCCGAAACCTGTCCTTGA  
TGGGACAATCGATTACTTCCAACCCAATAACAAAAGAAATCAACTCTGGCTGAGA  
CTACAAACTACTGGAAATGTAGACCATGTAGGCCTCGGCACTGCGTTTCGAAAACA  
GTATATACGACCAGGACTACAATATCCGTATAACCATGTATGTACAATTCAGAGA  
ATTTAATCTTAAAGACCCCCCACTTAACCCTAA

(3) PCV2 ORF2 region sequence 비교





## 다. 분리한 PCV2 2d 병원성 평가

### (1) Summary

- PCV-2b의 변이 형태인 PCV-2d (mutant PCV-2b)가 전세계적으로 증가함에 따라 현재 상용화된 백신이 PCV-2d에 대해 교차방어를 할 수 있는지에 대한 평가가 필요한 실정이다. 자사백신(수이샷 마이씨코-원)의 PCV-2d에 대한 방어능을 평가하기 전에 사전실험으로 PCV-2d 병원성 평가실험을 실시하였다. 결과는 다음과 같다.

#### (가) 임상증상

- ① 접종 후 3주간 관찰 결과, 시험군 3두 중 접종 후 19일차에 1두가 폐사하였고 나머지 개체의 경우 PMWS의 임상증상인 wasting, 무기력, 피모거침 등이 관찰되었다.

#### (나) 바이러스 혈증 및 바이러스 배출

- ① 시험기간 동안 바이러스 혈증은 접종 후 21일까지 지속적으로 상승하여 최대  $10^{3.95 \pm 1.46}$ TCID<sub>50</sub>/ml의 역가를 보였고 비강으로 최대  $10^{4.72 \pm 0.77}$ TCID<sub>50</sub>/ml (접종 14일 후), 분변으로 최대  $10^{4.81 \pm 0.53}$ TCID<sub>50</sub>/ml (접종 14일 후)의 바이러스 배출 양상을 보였다.

#### (다) 조직 내 바이러스 평가

- ① 모든 장기에서  $10^4$ TCID<sub>50</sub>/ml이상의 바이러스가 검출되었으며 가장 많은 바이러스가 검출된 장기는 간 ( $10^{6.03}$ TCID<sub>50</sub>/ml)이었다.

#### (라) 항체가 검사 결과

- ① 항체가 검사결과 접종 3주 후 에도 양성전환이 관찰되지 않는 것을 보아 PCV-2 감염에 기인한 humoral immunity 억제로 인한 결과로 보인다.

#### (마) 육안병변 및 조직검사 결과

- ① 부검 시 육안상 림프절의 종대가 관찰되었고 조직 검사 결과 PMWS의 필요충분조건인 lymphoid depletion 및 Lymphoid tissue의 histiocytic 변화와 해당 장기의 PCV-2 항원 검출 또한 확인되었다. 그밖에 폐에서는 PCV-2 감염 후의 2차감염으로 인한 화농성 기관지폐렴 및 간질성 폐렴의 급성 병변인 혈관/기관주위 염증세포 침윤이 관찰되었다. 또한 두 개체 모두 간염 및 간괴사 소견이 관찰되었고 한 개체의 경우 간 병변으로 인한 간 손상성 황달(hepatic icterus) 및 이로 인한 문맥성 고혈압(portal hypertension)으로 인한 복수(ascites)가 관찰되었다.

- ② 종합하자면, 이번 접종 시험에서 분양받은 PCV-2d 균주에 의해 전형적인 PMWS가 유도되었으며 systemic한 PCV-2 감염 및 2차감염으로 인한 내부 장기에서의 병변 및 임상증상 유도가 확인되어 해당 균주 및 접종방법을 추후 접종 모델로 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 그리고 추후 자사백신 (수이샷 써코원, PCV2 2b Type) 방어능 평가시 PCV-2d에 대한 교차방어여부 평가 및 기존 균주인 PCV-2b (CAKY strain)과의 병원성 비교 평가 또한 필요할 것이다.

## (2) Materials and Methods

### (가) 실험동물

- ① 3주령의 건강한 PCV-2 항원/항체 음성 SPF돼지 6두를 이용하여 접종군(1~3) 및 대조군(c1~c3)으로 아래 표와 같이 배정하였다. 시험은 논산 동물사 접종방에서 실시한다.

Table 1. Details of SPF piglets used in this study

Pig ID	Sex	Farrowing date	Days of ages	Body weight (kg)
1	Female	2018-05-28	20	2.64
2	Female	2018-05-28	20	2.51
3	Female	2018-05-28	20	2.36
C1	Female	2018-05-28	20	2.45
C2	Female	2018-05-28	20	2.65
C3	Female	2018-05-28	20	2.59

### (나) 시험방법

#### ① 접종

- ㉠ 접종군의 돼지에 PCV-2d strain 바이러스를  $10^{6.82} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 의 역가로 비강 (2ml) 및 근육 (1ml) 으로 접종을 한다. 접종 역가는 최대 역가로 진행하였고 접종 경로는 Ref 3.을 참조하였다. 대조군의 돼지에 PBS를 접종군과 동일 경로인 비강 (2ml) 및 근육 (1ml) 으로 접종을 한다.

#### ② 임상증상 및 일당증체량 평가

- ㉠ 바이러스 접종 후 3주동안 매일 임상증상(폐사, 무기력, 호흡기 증상, 식욕부진, 파행 등) 을 관찰한다. 또한 접종 후 0, 7, 14, 21일의 체중을 측정하여 일당 증체량 (Average daily gain)을 평가한다.

③ 바이러스 혈증, 바이러스 배출, 및 조직 내 바이러스 평가 [Ref 4.]

㉔ 바이러스 접종 후 0, 7, 10, 14, 21일에 채혈하여 Realtime PCR을 통한 혈중 Viremia를 평가하며 접종 후 0, 3, 5, 7, 10, 14, 21일 에 비강 및 분변 swab을 실시하여 바이러스의 배출 여부를 평가한다. 또한 접종 3주후에 부검하여 폐, 림프절(superficial inguinal, mediastinal, tracheobronchial, mesenteric), 편도, 흉선, 소장 (회장), 대장 (결장), 비장, 간, 기관을 채취 후 Realtime PCR을 통한 조직 내 바이러스를 평가한다. Realtime PCR의 경우 PCV 2a/2b/2d 감별 multiplex realtime PCR 방법을 참조하여 다음의 PCV 2b/2d 감별 프라이머 (Table 2.) 및 PCR 조건 (Table 3. and 4.)을 이용해 실시한다.

Table 2. Primer used for PCV 2b/2d differential multiplex realtime PCR

Primer/Probe name	Sequense
PCV-2 differential Forward	5'-GCAGGGCCAGAATTCAACC-3'
PCV-2 differential Reverse	5'-GGCGGTGGACATGATGAGA-3'
PCV-2b probe	5'-JOE-CTCAAACCCCGCTCTGTGCCC-BHQ-3'
PCV-2d probe	5'-FAM-CTCAAACCCCTCACTGTGCCC- BHQ-3'

Table 3. Compositions of realtime PCR reaction

Reagent	Volume	Kit name
TaqMan Reagent	10 µl	TaqMan®GeneExpression Master Mix
RNase-free water	4 µl	-
Primer (10 pmol) Forward	1 µl	-
Primer (10 pmol) Reverse	1 µl	-
PCV 2b Probe (10 pmol)	0.5 µl	
PCV 2d Probe (10 pmol)	0.5 µl	
DNA	3 µl	-
Total	20ul	-

Table 4. Conditions of PCR reaction

Step	Temperature	Time	Cycle
UDG incubation	50°C	2 min	1
Enzyme activation	95°C	10 min	1
Denature	95°C	15 sec	40
Anealing/Extension	60°C	1 min	
Cooling	4°C	Forever	1

④ 항체가 평가

- ㉑ 접종 후 0, 7, 10, 14, 21일에 채혈하여 PCV-2 ELISA (VD pro PCV2 NC AB ELISA Kit, 메디안디노스틱)를 통해 항체를 평가한다.

⑤ Macroscopic lesion

- ㉑ 접종 3주후에 부검하여 전 장기의 육안 소견을 평가하며 특히 자돈의 외관, 림프절의 종대 여부, 간 및 신장의 병변, 폐 퇴축 여부, 간질성 폐렴 여부 등을 주로 관찰하며 다음과 같이 폐 병변 지수를 측정한다 [Ref 5] (Figure 1.).

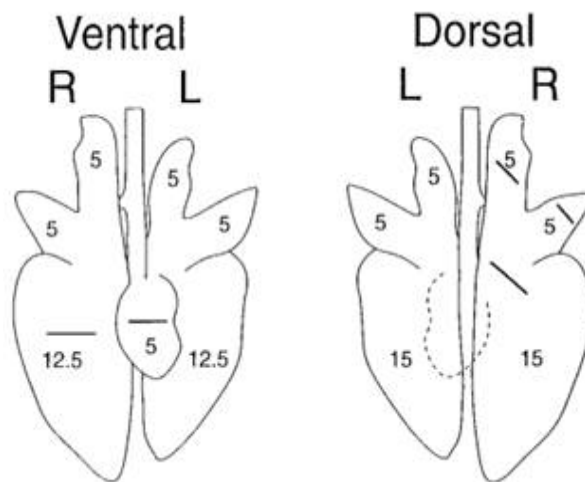


Figure 1. Lung gross lesion scoring system (100 points)

⑥ Microscopic lesion

- ㉑ 접종 3주후에 부검하여 폐, 림프절(superficial inguinal, mediastinal, tracheobronchial, mesenteric), 편도, 흉선, 소장 (회장), 대장 (결장), 비장, 간, 기관을 채취하여 포르말린에 고정 후 조직검사 및 PCV-2 IHC를 의뢰한다.

Score	0 point	1 point	2 point	3 point
Lymphoid depletion	Not present	Mild with loss of overall cellularity	Moderate	Severe with loss of lymphoid follicle structure
Histiocytic-to-granulomatous inflammation	Not present	Mild	Moderate	Severe with replacement of follicles
PCV2 antigen*	Not present	Less than 10%	10~50%	More than 50%

### (3) Results

#### (가) 임상증상 및 일당증체량 평가

- ① 접종 후 1주차에 2번 및 3번 개체에서 연변이 관찰되었으며 접종 후 3주차에는 1번 과 3번 개체는 무기력, 쇠약, 피모거침이 확인되었고 2번 개체는 폐사하였다. 음성 대조군은 정상으로 확인되었다.

#### (나) 바이러스 혈증, 바이러스 배출 및 조직 내 바이러스 평가

##### ① 바이러스 혈증 및 바이러스 배출 결과 (Table 5.)

- ㉠ 바이러스 혈증은 접종 후 21일까지 지속적으로 상승하였으며 최대  $10^{3.95 \pm 1.46}$  TCID<sub>50</sub>/ml의 Viremia를 보였다.
- ㉡ 비강으로의 배출은 점차 증가하는 양상을 보이다가 접종 10일차에 감소하였다가 다시 상승하였으며 접종 후 21일차에는 감소하는 양상을 보였다. 최대 배출은 접종 후 14일이었으며  $10^{4.72 \pm 0.77}$  TCID<sub>50</sub>/ml의 바이러스 배출을 보였다.
- ㉢ 분변으로의 바이러스 배출은 접종 후 3일차에 높다가 5일차에 감소 후 14일까지 상승하여 최대 바이러스 배출을 보였다 ( $10^{4.81 \pm 0.53}$  TCID<sub>50</sub>/ml).
- ㉣ 음성대조군은 비강 및 분변으로의 바이러스 배출, 혈중내 Viremia 모두 음성으로 확인되었다.

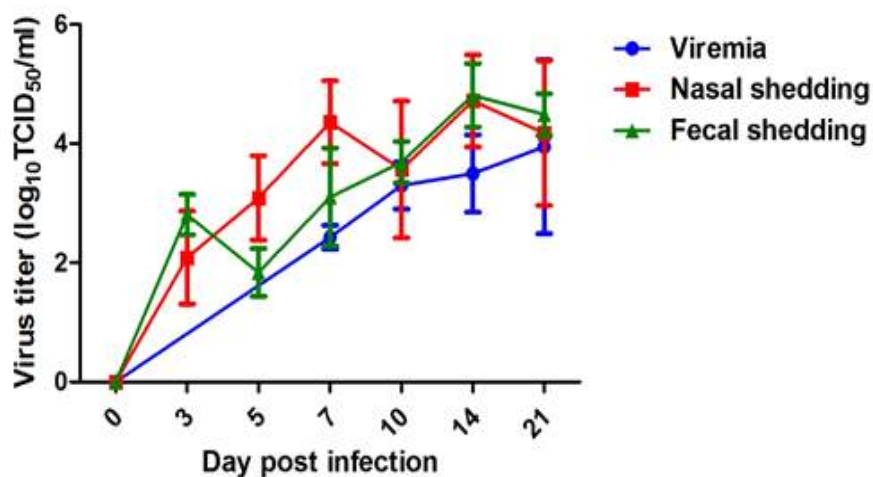


Figure 2. PCV-2d virus titer pattern in serum, nasal swab, and fecal swab of pigs during experiment



Table 5. Virus titer in serum, nasal swab, and fecal swab after PCV-2d challenge during experiment

Group	Pig ID	Sample	Virus titer (Log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml)afterPCV-2dchallenge						
			0d	3d	5d	7d	10d	14d	21d
접종군	1	Serum	0.00	NT	NT	2.24	2.85	3.83	2.91
	2		0.00	NT	NT	2.41	3.47	2.75	Death
	3		0.00	NT	NT	2.63	3.58	3.91	4.98
	Average		0.00	NT	NT	2.43	3.30	3.50	3.95
접종군	1	Nasal swab	0.00	2.12	3.90	5.12	3.01	3.93	3.32
	2		0.00	1.29	2.57	3.76	2.81	4.74	Death
	3		0.00	2.85	2.80	4.20	4.88	5.48	5.04
	Average		0.00	2.09	3.09	4.36	3.57	4.72	4.18
접종군	1	Fecal swab	0.00	2.57	2.09	2.19	3.42	4.22	4.24
	2		0.00	2.65	2.05	3.79	3.56	5.26	Death
	3		0.00	3.20	1.38	3.33	4.08	4.95	4.73
	Average		0.00	2.81	1.84	3.10	3.69	4.81	4.49

NT: Not tested

② 조직 내 바이러스 평가

㉞ 시험 결과, 접종군의 모든 조직에서 바이러스가 검출되었으며 10<sup>4</sup>TCID<sub>50</sub>/ml이상의 많은 바이러스가 관찰되었다 (Figure 3). 가장 많은 바이러스가 검출된 장기는 간 (10<sup>6.03</sup>TCID<sub>50</sub>/ml)이었으며 가장 적은 바이러스가 검출된 장기는 신장 (10<sup>4.18</sup>TCID<sub>50</sub>/ml)이었다. 음성 대조군은 모두 음성으로 확인되었다.

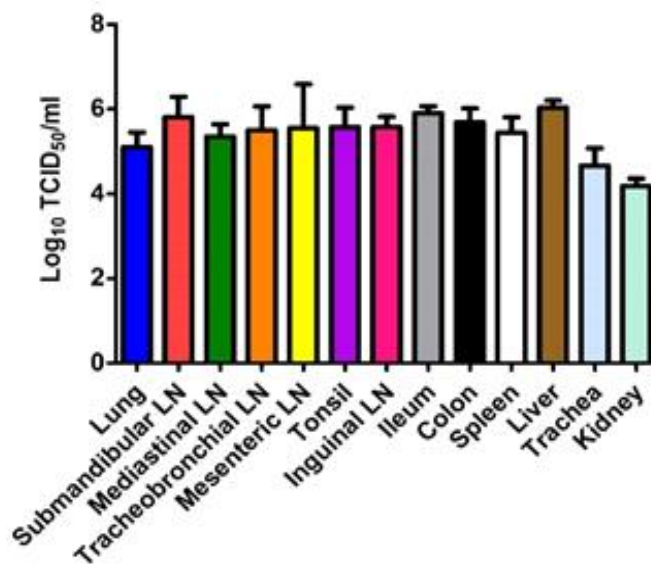


Figure 3. PCV-2d virus titer in tissue at 21 day post infection

(다) PCV-2 항체가 평가

- ① PCV2d를 접종한 모든 개체에서 접종 후 3주동안 항체(ELISA)가 양성전환이 관찰되지 않았다 (Table 6.).

Table 6. ELISA result during experiment

Group	Pig ID	S/P ratio				
		0dpi	7dpi	10dpi	14dpi	21dpi
접종군	1	0.00	0.02	0.07	0.03	0.03
	2	0.00	0.00	0.02	0.00	Death
	3	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
음성대조군	C1	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
	C2	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01
	C3	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00

(라) 부검소견

- ① 부검 결과 1번, 2번 개체의 경우 외관 상 거친 피모, 위축, 창백한 피부 등을 보였고 부검 시 심낭수가 관찰되었다. 또한 림프절의 경우 경도-중등도의 림프절 부종 및 종창이 관찰되었고 몇몇 림프절에서는 충출혈 소견이 관찰되었다. 또한 폐의 경우 심각한 퇴축부전, 고무 질감의 얼룩덜룩한 폐, multifocal에서 diffuse한 엽상의 패턴 및 간질의 두드러지는 부종을 보여 심각한 간질성 폐렴의 소견을 보였다. 또한 왼쪽의 침엽/심장엽 및 좌/우측 횡격막엽에 산발적으로 경계가 뚜렷한 자적색의 병변이 관찰되었으며 오른쪽 침엽과 왼쪽 횡격막엽에 국소적인 회색 병변이 관찰되었다. 위의 폐 병변들의 단면을 관찰한 결과 기관지에 화농성 삼출물이 가득한 suppurative bronchopneumonia로 확인되었다. 폐 스코어를 확인한 결과 62점 정도의 높은 점수를 보였다.
- ② 3번 개체의 경우 외관상 거친 피모, 위축을 보였으며 부검 시 복수가 가득 차 있었고 전체적으로 장기의 황변이 관찰되어 황달 증상이 있었던 것으로 추정된다. 림프절의 경우 역시 경도-중등도의 부종, 종대 및 충혈 소견이 관찰되었으나 이중 장간막 림프절의 경우 매우 심한 종대가 관찰되었고 충출혈 소견 또한 관찰되었다. 폐장의 경우 오른쪽 횡격막엽에 미약한 퇴축부전이 관찰되었고 비교적 미약하고 multifocal한 간질성 폐렴 소견을 보였다. 그러나 왼쪽 심장엽의 국소적인 출혈성 병변이 관찰되었는데 이 병변의 폐 단면 관찰 결과 역시 삼출물을 동반한 suppurative bronchopneumonia를 보였다. 이 개체의 폐 병변 점수는 13점이었다. 흥미로운 점은 이 개체의 결장간막(mesocolon)에 부종성 병변이 관찰되었고 또한 간의 황변과 국소 농양이 관찰되어 1번 및 2번 개체와는 다른 양상의 병변을 보인 것으로 확인되었다.

- ③ 음성 대조군은 정상폐와 동일하게 부검 당시 정상적으로 lung collapse가 발생하였으며 바이러스성 및 세균성 폐렴 증상을 관찰 할 수 없었다.

(마) 조직 소견 (Table 7.)

- ① 폐에서는 1번, 2번 개체의 경우 기도 내 점액화농성 염증삼출물이 특징적인 기관지 폐렴을 동반한 무기폐 소견을 보였으며 3번 폐에서는 화농성 세기관지염을 동반한 무기폐 소견이 관찰되었는데, 공통적으로 두 개체에서 간질성 폐렴의 초기 병변인 세기관지 및 혈관주위 염증세포 침윤 (peribronchiolar and perivascular inflammatory cell infiltration)이 관찰된 것으로 보아 PCV-2 감염에 의한 2차 감염으로 인한 병변으로 판단된다.
- ② 기관에서는 1번 개체만 국소부위에서 중등도의 점막하적 염증세포 침윤과 더불어 기관 점막상피의 변성 및 괴사가 관찰되었지만 PCV-2 단독에 의한 병변으로 보기는 어렵다.
- ③ 편도, 림프절, 비장에서 PCV2 감염과 연관된 소견은 림프구내 고갈과 고갈된 부위의 조직구 대체로 모두에서 중등도 이상으로 관찰되었다.
- ④ 간에서는 문맥구역 간염과 간세포의 변성 및 괴사가 관찰되었고, 간에서 다수의 PCV2 항원이 관찰된 점으로 미루어 보아 PCV2 감염과 관련이 있는 병변으로 판단하였다.
- ⑤ 각 장기별 PCV2에 대한 면역조직화학염색 결과, 항원은 두 개체의 기관과 1 개체의 신장을 제외하고 대부분의 장기에서 관찰되었으며, 항원의 분포는 PCV2 감염성 병변의 형성 정도와 비례하는 경향을 보였다. 주요 장기인 폐, 비장, 서혜림프절에 대해 림프구 소실, 대식세포에서의 육아종성 염증, PCV2 항원 존재가 관찰되었다.
- ⑥ 음성대조군은 특이적인 병변을 관찰되지 않았다.

**Table 7. Histopathologic findings in internal organs**

Pig ID	Organ	Histopathological findings	Presence of PCV2 antigens
1	Lung	Mild bronchopneumonia with atelectasis Mild peribronchiolar and perivascular inflammatory cell infiltration	1
	Trachea	Moderate focal epithelial degeneration/necrosis Moderate focal inflammatory cell infiltration in the submucosa	0
	Tonsil	Severe lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles	2
	Spleen	Moderate lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles	1
	Liver	Moderate portal hepatitis Mild hepatocellular degeneration/necrosis	3
	Lymph node	Severe lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles	2
	Kidney	No remarkable lesions	0
	Ileum	Severe lymphoid depletion and histiocytic replacement of Peyer's patch	2
	Colon	No remarkable lesions	1
2	Lung	Mild bronchopneumonia with atelectasis Mild peribronchiolar and perivascular inflammatory cell infiltration	2
	Trachea	No remarkable lesions	0
	Tonsil	Severe lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles	3
	Spleen	Moderate lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles	1
	Liver	Moderate portal hepatitis Mild hepatocellular degeneration/necrosis	2
	Lymph node	Severe lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles	2
	Kidney	No remarkable lesions	0
	Colon	No remarkable lesions	1
3	Lung	Mild suppurative bronchiolitis with atelectasis Minimal peribronchiolar and perivascular inflammatory cell infiltration	2
	Trachea	No remarkable lesions	0
	Tonsil	Severe lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles Numerous intranuclear/intracytoplasmic inclusion bodies in the histiocytes	3
	Spleen	Severe lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles	3
	Liver	Moderate portal hepatitis Severe hepatocellular degeneration/necrosis	3
	Lymph node	Severe lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles Numerous intranuclear/intracytoplasmic inclusion bodies in the histiocytes	3
	Kidney	No remarkable lesions	1
	Ileum	Moderate lymphoid depletion and histiocytic replacement of Peyer's patch	3
	Colon	Mild inflammatory cell infiltration in the submucosa Mild crypt abscess	3

### 3. 마이코플라즈마 및 PCV2(2b+2d) 3종 혼합백신 생산

- 분리한 PCV2 (2d)균주를 기존 백신(수이샷 마이썬코-원)에 포함하여 신규 백신(수이샷 2피엠) 허가 진행 예정임.

가. 수이샷 2피엠의 원료약품 및 분량 (본제 1두분 중)

- (1) *Mycoplasma hyopneumoniae* ..... OD 0.12 at 410nm
- (2) Porcine circovirus type2b (CAKY98) .....  $10^{6.0}$ FAID<sub>50</sub>이상
- (3) Porcine circovirus type2d (CBNU0324) .....  $10^{6.0}$ FAID<sub>50</sub>이상
- (4) Adjuvant(부기 1.) ..... 10%
- (5) 불활화제(부기 2.) ..... 0.2%이하

나. 시험백신 생산

- (1) 야외적용을 실시하기 위하여 3 랫트의 시험백신을 생산



다. 허가진행상황

- (1) 농림축산검역본부의 허가승인을 받기 위한 절차 진행 필요함.
- (2) 임상시험을 실시하기 전에 관련 내용에 대해 임상시험계획서에 대해 승인 필요하며, 2018년 하반기에 농림축산검역본부에 임상시험계획서를 제출 예정임.
- (3) 승인받은 임상시험계획서에 따라, 3농장에 대해 임상시험을 실시
  - 절차 : 임상시험계획서 제출 ⇒ 임상시험 실시 ⇒ 허가서류 ⇒ 허가보완서류 제출 ⇒ 허가승인

## 제 3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

### 3-1. 목표

#### <정성적 목표>

- 다양한 국내 유행 PRRSV의 감염에 효과적으로 대응할 수 있는 DNA 바탕 약독화 백신 생산 시스템의 개발
- 공격접종실험을 바탕으로 PRRS의 호흡기증상과 유산 예방 효과 및 안전성이 증명된 저변이 키메라 PRRS 백신의 개발 및 산업화 준비
- 공격접종실험과 농장적용 실험을 바탕으로 마이코플라즈마의 감염과 다른 유전형의 PCV2 바이러스들 간의 교차방어 효과 및 안전성이 증명된 PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신의 개발 및 산업화

#### <정량적 목표>

성과 목표	사업화지표				연구기반지표			
	지식 재산권	기술실시 (이전)	사업화		학술성과			인력 양성
	특허 출원	건수	제품화	매출액	논문		학술발표	
SCI					비 SCI			
단위	건	건	건	백만원	건	건	건	명
가중치	10	30	30	10			10	10
1차년도	1				1	1	2	2
2차년도	1		1		1	1	2	2
3차년도	1	1	1	1	2	1	2	2
계	3	1	2	1	4	3	6	6

### 3-2. 목표 달성여부

#### <정성적 목표> - 달성완료

- 다양한 국내 유행 PRRSV의 감염에 효과적으로 대응할 수 있는 DNA 바탕 약독화 백신 생산 시스템의 개발(달성완료)
  - 총 841개의 PRRS 양성 가검물에서 국내 PRRSV 127주 분리 하여 KVCC에 기탁하고 480개의 PRRSV ORF5유전자 분석하여 KAHIS에 등록함
  - 국내 유행 PRRSV 모니터링을 통하여 국내 유행 북미형 바이러스를 5개의 그룹(세계 유행 Lineage 1과 5, Korean lineage A, B, C)으로, 유럽형 바이러스를 2개의 그룹(EU vaccine과 Korean EU)으로 분류함
  - 7개의 그룹으로 분류한 국내 유행 PRRSV의 유전자를 DNA 바탕 약독화 백신 플랫폼에

혼합 도입하여 2개 또는 3개의 바이러스들을 동시에 방어할 수 있는 약독화 키메라 백신 시스템의 개발

- 공격접종실험을 바탕으로 PRRS의 호흡기증상과 유산 예방 효과 및 안전성이 증명된 저변이 키메라 PRRS 백신의 개발 및 산업화 준비(달성완료)
  - 저변이 PRRSV인 RVRp22의 유전자를 도입한 변이 바이러스 평가를 바탕으로 nsp2 유전자의 변이 억제 역할 증명
  - 저변이 유전자를 도입한 약독화 백신주인 CB1을 자돈에 공격접종하여 3대 연속계대를 바탕으로 약독화 특성의 유지와 병원성 회복 기전 억제 증명
  - 저변이 유전자를 도입한 약독화 백신주인 CB1를 접종한 자돈에서 북미형 및 유럽형 바이러스 공격접종 후 호흡기증상의 효과적인 예방과 안전성을 증명
  - 저변이 유전자를 도입한 약독화 백신주인 CB1를 접종한 모돈에서 북미형 바이러스 공격접종 후 유산의 효과적인 예방과 안전성을 증명
  
- 공격접종실험과 농장적용 실험을 바탕으로 마이코플라즈마의 감염과 다른 유전형의 PCV2 바이러스들 간의 교차방어 효과 및 안전성이 증명된 PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신의 개발 및 산업화(달성완료)
  - PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신의 실험실적 공격접종 및 농장적용 실험을 통한 방어 효능 및 안전성 평가 완료
  - 수이샷 마이썬코원(마이코플라즈마/PCV2b) 혼합백신의 농림축산검역본부 허가승인 (13-215호) 및 제품 생산
  - PCV2b 변이주(PCV2d) 분리 및 병원성 평가 완료
  - 수이샷 2피엠(마이코플라즈마/PCV2b/PCV2d) 3종 혼합백신의 시제품 생산

<정량적 목표> - 일부 초과달성 및 일부 미달성

정량적 목표 항목	달성	달성율 (%)	가중치	비고
특허출원 3건	1	33.3	10	2건 출원 중
기술이전 1건	2	200	30	초과달성
제품화 2건	2	100	30	
매출액 1건	0	0	10	2019년부터 집계 가능
SCI급 논문 4건	4	100	-	1건 출판 중, 1건 심사 중
비SCI급 논문 3건	0	0	-	1건 출판 중 (SCI급 논문 초과달성)
학술발표 6건	7	116.7	10	초과달성
인력양성 6명	9	150	10	초과달성
생물자원(바이러스 분리주) 등록	127	1,270	-	추가달성
합계	152		100	

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

● 특허출원: 2건 출원 준비 중

- PCV2 변이 바이러스를 국내 최초로 분리하였고 병원성 증명을 위해 연구 일정이 다소 지연되었으나 2018년 11월 중으로 “국내 분리 2형 돼지췌코바이러스 변이주(PCV2d) 및 이를 포함하는 돼지췌코바이러스(PCV2) 예방 또는 치료용 백신 조성물”이라는 명칭으로 특허출원 완료 예정임
- 국내 발생 PRRSV의 정확한 분류를 하고 세 바이러스 주의 유전자를 혼합한 변이 바이러스를 생산하기 위해 연구 일정이 다소 지연되었으나 2018년 11월 중으로 “방어범위가 증가된 돼지생식기호흡기증후군 백신 및 이를 생산하기 위한 조성물과 기술”이라는 명칭으로 특허출원 완료 예정임

● 논문출판: SCI급 논문 1건 및 비SCI급 논문 1건 출판 중, SCI급 논문 1건 심사 중

- “In vitro immune responses of porcine alveolar macrophages reflect host immune responses against porcine reproductive and respiratory syndrome viruses”라는 제목으로 2018년 03월에 BMC Veterinary Research(SCI급)에 투고하여 아래와 같이 2018년 08월 21일에 출판수락 되어 2018년 11월 중으로 출판될 예정임
- “Effect of polymorphisms in porcine guanylate-binding proteins on host resistance to PRRSV infection in experimentally challenged pigs”라는 제목으로 2018년 06월 25일에 Journal of Virology(SCI급)에 투고하여 아래와 같이 심사 중임
- “PRRS 저항성 유전형 자돈의 생산 및 평가”라는 제목으로 2018년 6월에 투고하여 2018년 09월 17일에 Korean Journal of Veterinary Service(학진등재지, 비SCI급)에 출판수락 되어 2018년 12월호에 출판 예정임

● 매출액 달성

- 2년간의 실험결과를 토대로 수이샷 마이췌코-원(마이코플라즈마 및 PCV2 혼합백신)에 대하여 농림축산검역본부로부터 허가승인(2017.07.26., 13-215호)완료하였으며 매출 창출을 위하여 시제품(318MPCV01, 2018.08.29.생산)을 생산하여 농림축산검역본부 고시 자가검정 및 국가검정을 거쳐서 2018년 12월경 출시 예정임
- 매출은 2019년 발생 예정임



## 제 4장. 연구결과의 활용 계획 등

- 다양한 국내 유행 PRRSV의 감염에 효과적으로 대응할 수 있는 약독화 백신 생산 시스템의 개발과 저변이 키메라 PRRS 백신의 개발을 통한 농가 생산성 증대
  - 국내 유행 PRRSV 모니터링을 통하여 국내 유행 북미형 바이러스를 5개의 그룹(세계 유행 Lineage 1과 5, Korean lineage A, B, C)으로, 유럽형 바이러스를 2개의 그룹(EU vaccine과 Korean EU)으로 분류함
  - 7개의 그룹으로 분류한 국내 유행 PRRSV의 유전자를 DNA 바탕 약독화 백신 플랫폼에 혼합 도입하여 2개 또는 3개의 바이러스들을 동시에 방어할 수 있는 약독화 키메라 백신 시스템의 개발함
  - 관련 PRRS 키메라 백신 시스템 관련 특허 2건을 중앙백신에 기술 이전
  - 향후 동물약품검증과정을 완료하여 제품 허가를 추진하고 PRRS 키메라 백신에 대한 상용화 진행 예정
  - 농장 유행 바이러스 분석을 바탕으로 농장 맞춤형 PRRS 키메라 백신 공급 체계 구축 예정
- PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신의 개발 및 산업화를 통한 양돈장의 PRDC 피해 감소 및 생산성 증대에 기여
  - 수이샷 마이썬코-원(마이코플라즈마 및 PCV2b 혼합백신): 2018년 양돈장 대상 제품 출시하여 2019년 부터 매출 발생 예정
  - 수이샷 2피엠(마이코플라즈마 및 PCV2b/PCV2d 혼합백신): 2020년 양돈장 대상 제품 출시하여 2021년 매출 발생 예정
  - 이 상 두 종의 개발 제품과 기존 제품의 비교 평가를 통한 개발 백신의 비교평가 자료 확보 예정
  - PRDC는 전 세계 양돈 국가에 큰 피해를 주고 있으므로 이러한 혼합 백신의 성공적인 적용은 해외 시장으로의 진출을 가능하게 할 것으로 기대
- 키메라 PRRS 백신의 허가를 완료한 후에 PCV2와 마이코플라즈마 혼합백신에 추가하여 PRRSV/PCV2/마이코플라즈마를 동시에 예방할 수 있는 다가 백신으로 개발하여 양돈장의 PRDC 피해 감소 및 생산성 증대에 기여

## 붙임. 참고문헌

1. Neumann, E.J., J.B. Kliebenstein, C.D. Johnson, J.W. Mabry, E.J. Bush, A.H., Seitzinger, A.L. Green, and J.J. Zimmerman. 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* **227**:385-392.
2. Chang, C.C., K.J. Yoon, J.J. Zimmerman, K.M. Harmon, P.M. Dixon, C.M. Dvorak, and M.P. Murtaugh. 2002. Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. *J Virol* **76**:4750-4763.
3. Key, K.F., D. K. Guenette, K. J. Yoon, P. G. Halbur, T. E. Toth, and X. J. Meng. 2003. Development of a heteroduplex mobility assay to identify field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with nucleotide sequences closely related to those of modified live-attenuated vaccines. *J Clin Microbiol* **41**:2433-2439.
4. Kim, W. I., D. S. Lee, W. Johnson, M. Roof, S. H. Cha, and K. J. Yoon. 2007. Effect of genotypic and biotypic differences among PRRS viruses on the serologic assessment of pigs for virus infection. *Vet Microbiol* **123**:1-14.
5. Mengeling, W.L., K.M. Lager, and A.C. Vorwald. 1998. Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of "atypical" PRRS. *Am J Vet Res* **59**:1540-1544.
6. Nielsen, T. L., J. Nielsen, P. Have, P. Baekbo, R. Hoff-Jorgensen, and A. Botner. 1997. Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* **54**:101-112.
7. Scortti, M., C. Prieto, E. Alvarez, I. Simarro, and J. M. Castro. 2007. Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV. *Vet Rec* **161**:809-813.
8. Kim, W. I., J. J. Kim, S. H. Cha, and K. J. Yoon. 2008. Different biological characteristics of wild-type porcine reproductive and respiratory syndrome viruses and vaccine viruses and identification of the corresponding genetic determinants. *J Clin Microbiol* **46**:1758-1768.
9. Allende, R., T.L. Lewis, Z. Lu, D.L. Rock, G.F. Kutish, A. Ali, A.R. Doster, and F.A. Osorio. 1999. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virol* **80**:307-315.
10. Dea, S., C.A. Gagnon, H. Mardassi, B. Pirzadeh, and D. Rogan. 2000. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol* **145**:659-688.
11. Kim, W. I. and K. J. Yoon. 2008. Molecular assessment of the role of envelope-associated structural proteins in cross neutralization among different PRRS viruses. *Virus Genes* **37**:380-91.
12. Murtaugh, M.P., Z. Xiao, and F. Zuckermann. 2002. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol* **15**:533-547.
13. Beura L.K., S. N. Sarkar, B. Kwon, S. Subramaniam, C. Jones, A. K. Pattnaik, F. A. Osorio. 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate response by antagonizing IRF3 activation. *J Virol* **84**:1574-1584.

14. **Chen Z., S. Lawson, Z. Sun, X. Zhou, X. Guan, J. Christopher-Hennings, E. A. Nelson, Y. Fang.** 2010. Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist. *Virology* **398**: 87–97.
15. **Lowe, J. F., F. A. Zuckermann, L. D. Firkins, W. M. Schnitzlein, and T. L. Goldberg.** 2006. Immunologic responses and reproductive outcomes following exposure to wild-type or attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine under field conditions. *J Am Vet Med Assoc* **228**:1082–1088.
16. **Wang, X., J. Li, P. Jiang, Y. Li, B. Zeshan, J. Cao, X. Wang.** 2009. GM-CSF fused with GP3 and GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus increased the immune responses and protective efficacy against virulent PRRSV challenge. *Virus Res* **143**: 24–32.
17. **Huang, Q., Q. Yao, H. Fan, S. Xiao, Y. Si, H. Chen.** 2009. Development of a vaccine vector based on a subgenomic replicon of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Viol Methods* **160**:22–28
18. **Sun D., W. I. Kim, Y. I. Cho, V. C. Cooper, S. H. Cha , S. H. Kim, E. J. Choi, K. J. Yoon.** 2009. Roles of structural proteins in conferring protection among different PRRS viruses and application to the development of vaccine candidate sfor broad cross-protection. *Proceedings, 28th Annual Meeting of American Society for Virology* W33-10.
19. **Vignuzzi, M., J. K. Stone, J. J. Arnold, C. E. Cameron, and R. Andino.** 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**:344–348.
20. **Taeyong Kwon and Young S. Lyoo.** 2017. Genotypic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) and genotype shift to PCV2d in Korean pig population, *Virus Research* **228**: 24 - 29,
21. **Chao-Ting Xiao.** 2015. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d, *Journal of General Virology* **96**: 1830 - 1841,
22. **McKeown, N. E., Opriessnig, T., Thomas, P., Guenette, D. K., Elvinger, F., Fenaux, M., & Meng, X. J.** 2005. Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, **12**: 1347–1351.
23. **Opriessnig, T., Xiao, C. T., Gerber, P. F., & Halbur, P. G.** 2013. Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the US concurrently infected with PPV2. *Veterinary microbiology* **163**: 177–183.
24. **Paladino, E. S., Gabardo, M. D. P., Lunardi, P. N., Morés, N., & Guedes, R.** 2017. Anatomopathological pneumonic aspects associated with highly pathogenic *Pasteurella multocida* in finishing pigs. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **37**: 1091–1100.

주 의

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