기술사업화지원사업 R&D Report

발 간 등 록 번 호
11-1543000-002417-01

돼지열병 그린 마커백신 개발 및 상용화 기술 개발 최종보고서

2018. 10. 18.

주관연구기관 /
(주)바이오앱

협동연구기관 /
(재)포항산업과학연구원
농림축산검역본부
(주)코미팜
부산가톨릭대학교산학협력단

농 림 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지열병 그린 마커백신 개발 및 상용화 기술 개발”(개발기간 : 2015. 08. 14 ~ 2018. 08. 13.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 10. 18.

주관연구기관명 : (주)바이오앱 (대표자) 손 은 주 (인)
협동연구기관명 : (재)포항산업과학연구원 (대표자) 박 성 호 (인)
농림축산검역본부 (대표자) 박 봉 균 (인)
(주)코미팜 (대표자) 문 성 철 (인)
부산가톨릭대학산학협력단 (대표자) 장 경 수 (인)

주관연구책임자 : 손은주
협동연구책임자 : 정성우, 최세은, 이오수, 장경수

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>1545015551</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>2015.08.14. ~
2018.08.13</td><td>단 계 구 분</td><td>1/1</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>단 위 사 업</td><td colspan="4">농식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td>사 업 명</td><td colspan="4">기술사업화지원 사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4">(해당 없음)</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">돼지열병 그린 마커백신 개발 및 상용화 기술 개발</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">손은주</td><td>해당단계
참여연구원
수</td><td>총: 26명
내부: 26명
외부: 명</td><td>해당단계
연구개발비</td><td>정부: 400,000천원
민간: 64,000천원
계: 464,000천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참여연구원
수</td><td>총: 79명
내부: 79명
외부: 명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부: 1,200,000천원
민간: 192,000천원
계: 1,392,000천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="3">㈜바이오앱
(재)포항산업과학연구원
농림축산검역본부
㈜코미팜
부산가톨릭대학산학협력단</td><td colspan="2">참여기업명
㈜바이오앱
㈜코미팜</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="3">상대국명:</td><td colspan="2">상대국 연구기관명:</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="3">연구기관명:포항공과대학교 산학협력단</td><td colspan="2">연구책임자: 이용직/강향주</td></tr>
</table>

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및	

사유	

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

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

요약

- 형질전환 담배 수경재배 주년생산기술 및 자동화 요소기술 개발
- 식물 유래 돼지열병 그린마커 백신용 항원 생산 공정 개발
- 항원 단백질 대량 생산 공정 확립
- 면역원성 향상된 up-version 백신 물질 개발-특허 출원
- 돼지열병 그린마커 백신은 자돈에서 1회 및 2회 접종에서 매우 우수한 방어 효능 확인
- 돼지열병 그린마커 백신 시제품 생산 및 실험실 내 평가(장기 보존성)
- 임상시험계획서 승인, 임상시험과 시료 분석 완료 및 품목허가 신청서 제출
- 특허 출원 7건, 논문 발표 1건, 고용 창출 16명, 투자 161억, 학술발표 10건, 인력양성 3건 달성

보고서 면수

113

<요약문>

연구의 목적 및 내용	1. 본 연구의 목적은 경제적이고 안전한 식물 발현 시스템을 이용하여 돼지열병 청정화를 위한 마커백신을 개발하고자 함 2. 식물 유래 돼지열병 그린마커 백신 개발을 위한 연구 내용은 항원 생산을 위한 식물 배양 및 항원 단백질 분리정제 공정 개발과 인허가를 위한 연구(방어능 실험, 시제품생산 및 평가, 임상시험계획서 승인, 야외농장 임상시험, 품목허가서 제출)로 구성됨 - 형질전환 담배 수경재배 주년생산기술 및 자동화 요소기술 개발 - 식물 유래 돼지열병 그린마커 백신용 항원 생산 공정 개발 - 항원 단백질 대량 생산 공정 개발 - 면역원성 향상된 up-version 백신 물질 개발 - 돼지열병 그린마커 백신의 목적동물에서의 방어능 조사 - 조직병리학적 분석을 통한 그린마커 백신의 효능과 안전성 분석 - 돼지열병 그린마커 백신 시제품 생산 및 실험실 내 평가(장기 보존성) - 임상시험계획서 승인, 임상시험과 시료 분석 완료 및 품목허가서 제출
연구개발성과	1. 돼지열병 마커백신 상용화를 위한 원료식물 *N. benthamiana*의 주년재배 체계확립과 생산자동화를 위한 요소기술 개발 - 그린백신용 형질전환 *N. benthamiana* 대량생산용 수경재배시스템 개발 - 밀폐형 식물공장 재배운용지침 확립 - 항원단백질 고함량 재배기술 확립 - *N. benthamiana*의 고효율 생산을 수경재재 자동화 요소기술 및 파종장치 개발 2. 돼지열병 그린마커 백신의 목적동물에서의 방어능 및 안전성 조사 - 돼지열병 그린 마커 백신의 자돈에서의 방어능 조사 - 그린 마커백신의 자돈 공격접종 후 병리조직 및 면역조직학적 검사 - 모돈에 그린마커 백신 접종실험을 통한 항체 형성능 확인함 - 모돈 방어능 실험을 위한 공격접종 바이러스 함량 확인함 - 도축 출하 전 비육돈 방어능 실험을 위한 공격접종 바이러스 접종량 확인 - 도축 출하전 비육돈 돼지열병 방어항체가 유지 및 야외주에 대한 방어능 확인 - 모돈 방어능 실험을 위한 공격접종용 바이러스 병원성 확인 - 돼지열병 그린마커 백신의 임신모돈에서의 방어능 조사(진행 중) 3. 돼지열병 그린 마커백신 제품화를 위한 항원·시제품 생산 및 품목허가 - 셀룰로오스를 이용한 경제적인 돼지열병 그린마커 백신용 항원 생산 공정 개발 - 밀폐형 식물공장 생산 식물 활용 백신 항원 단백질 대량 생산 공정 개발 - 면역글로불린 fragment를 활용하여 면역원성 향상된 up-version 백신 물질 개발 - 식물발현 돼지열병 재조합 항원의 돼지 면역원성 확인 - 돼지열병 마커백신 시제품 제작 (연속 3 Lot 시제품 제작) - 돼지열병 마커백신 시제품의 실험실 내 평가 - 재조합 항원의 장기 보존성 실험 - 돼지열병 마커백신의 야외 임상시험 - 허바백 돼지열병 그린마커주 품목허가 신청서 제출 4. 돼지열병 그린마커 백신 공격접종 후 조직병리학적 분석을 통한 효능 및 안전성 조사 - 다양한 항원 접종량 별 공격접종 돼지 부검시료의 조직병리학적 분석 - 1회 접종/공격접종 돼지 부검 시료의 조직병리학적 분석으로 방어효능 확인 - 모돈 공격접종용 접종량 실험용 부검시료의 조직병리학적 분석

연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	- 품목허가를 득하여, 국내 마커백신 사용으로 돼지열병 청정국 지위 확보를 위한 마커 백신으로서 활용 가능함 - 청정지역 지위를 최근에 상실한 제주도에 선제적으로 공급하여 제주도의 돼지열병 청정지역 회복에 기여할 수 있음 - 해외 특허 출원을 통하여 권리 확보와 동시에 개별 국가 인허가를 진행할 계획임 - 본 연구 성과의 노하우와 경험을 활용하여 아프리카 돼지열병을 비롯한 다양한 동물용 식물백신 개발을 기대할 수 있음 - 품목허가와 시장 확대를 통하여 기업의 투자를 확대하여 신규 고용 창출에 크게 기여할 것으로 기대함				
국문핵심어 (5개 이내)	밀폐형 식물공장	돼지열병	마커백신	임상시험	제조허가

〈 목 차 〉

제1장. 연구개발과제의 개요 ····· 1
제1절. 연구개발 목적 ····· 1
제2절. 연구개발의 필요성 ····· 1
제3절. 연구개발 범위 ····· 1

제2장. 연구수행 내용 및 결과 ····· 2
제1절. 돼지열병 그린백신 원료 항원 시제품 생산 기술 개발 ····· 2
제2절. 돼지열병 마커백신용 형질전환 작물의 주년재배 체계 확립 및 생산자동화 요소기술 개발 ····· 18
제3절. 목적동물에서 돼지열병 그린 백신의 방어능 조사 ····· 43
제4절. 돼지열병 마커백신 생산 및 제품화 ····· 64
제5절. 병리조직 및 면역조직학적 검사를 통한 그린 마커백신 효능 및 안전성 검증 ····· 87

제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ····· 107
제1절. 목표 ····· 107
제2절. 목표 달성범위 ····· 108
제3절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등) 111

제4장. 연구결과의 활용 계획 등 ····· 112

붙임. 참고 문헌 ····· 114

<별첨1> 연구개발보고서 초록
<별첨2> 주관연구기관의 자체평가의견서
<별첨3> 연구성과 활용계획서

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발 목적

○ 돼지열병 그린 마커백신 선행연구결과를 바탕으로 산업화를 위한 그린 백신 항원 원료 및 제품 제조 기술 확보 및 품목허가를 위한 백신 효능 검증을 완료하여 세계 최초 식물유래 돼지열병 마커백신을 개발하고자 함

제2절 연구개발의 필요성

○ 국가 연구 개발과제 연구 결과의 사업화를 위하여 제품화를 위한 생산 및 임상 시험 지원이 필요함
○ 돼지열병 청정국 지위 확보를 통하여 돼지고기 수출재개를 위해서 꼭 필요한 마커백신을 안전하고 경제적인 방법으로 개발할 필요가 있음
○ 돼지열병 마커백신은 이미 농림축산검역본부에서 곤충세포를 이용하여 개발한 사례가 있으나 제품화에 이르지 못하여 좀 더 경제적이고 효과적인 마커백신 개발이 필요함

제3절 연구개발 범위

○ 식물 유래 돼지열병 그린마커 백신 개발을 위하여, 밀폐형 식물공장 파일럿 시설을 구축하여 실증을 거친 후 kvGMP 인증이 가능한 생산시설(manufacturing) 구축
○ 밀폐형 식물공장내 항원 생산 원료 식물 배양 기술 개발(주년 재배 체계 확립 및 생산 자동화 요소 기술 개발)
○ 안정적인 백신 원료 항원 생산을 위한 scale 별 생산 공정 개발 및 표준화 확립
○ 식물 유래 돼지열병 그린마커백신의 목적동물에서 방어능 조사
○ 식물 유래 돼지열병 그린마커백신 안전성 및 안정성 조사
○ 그린 백신용 면역 증강제 및 서방형 제형 개발
○ 임상시험계획서 승인 및 임상 시험 수행
○ 품목허가서 제출
○ 효능 및 가격 경쟁력을 가지는 업그레이드 백신 물질 개발

제2장 연구수행 내용 및 결과

제1절 돼지열병 그린백신 원료 항원 시제품 생산 기술 개발

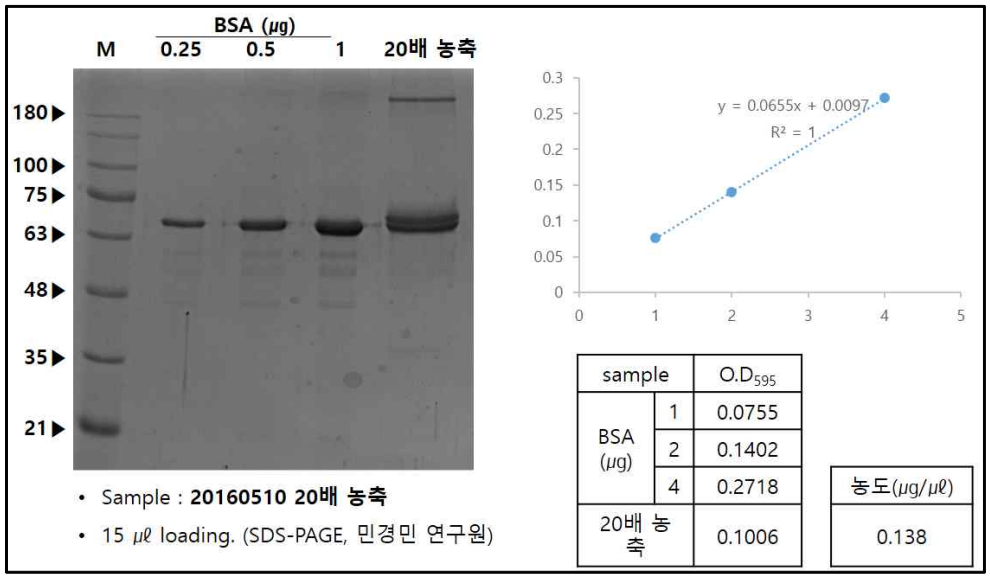
1. 항원 단백질 분리 공정 기술 제조 시설 10kg 적용 및 시제품 원료 생산

가. 그린백신 분리 정제 시설 구축 및 운영

- ○ 10kg 이상의 식물 조직 파쇄 작업에서 기존 장비의 열교환기의 부하 문제가 발생하여 판형열교환기에서 냉각코일 방식으로 변경 보완함
- ○ AMC 반응기의 필터가 10kg scale 작업용 AMC 제작에서 무리가 발생하여 수리 보완하여 최종 AMC 반응기 작동법을 확정지음
- ○ 저장용 식물을 이용한 분리공정에서 식물 온도가 -70도씨 정도까지 낮을 경우는 식물 파쇄작업에 시간이 많이 소요됨. 식물 저장 기간 및 작업일정에 맞추어 식물 저장 조건 변경하도록 반영함

나. 10kg scale 분리 공정 기술 개발

- ○ 10kg식물 조직으로부터 분리정제 작업을 수행하고 최종 elution 분획을 centricon을 이용하여 20배 농축한 결과 농도는 0.138 ug/ul 수준이고, 총량은 103.5mg로 추정함
- ○ SDS-PAGE 결과 10 kg scale로 통상의 랩 scale인 2g의 5,000배 정도의 대량 작업에도 고순도가 유지되는 장점을 확인함



sample		O.D$_{595}$
BSA (μg)	1	0.0755
	2	0.1402
	4	0.2718
20배 농축		0.1006

농도(μg/μℓ)
0.138

- ○ 최종 elution fraction을 UF system을 통하여 대량 농축하는 과정을 통해서도 충분히 타겟 단백질 손실 없이 회수됨을 확인함
- ○ 백신 원료의 최종 보관 방법으로 0.22 um 필터링을 통한 멸균방법을 선택하였고, 최종 농축된 post-UF 제품을 0.22 um 필터링 전후의 단백질 농도를 비교해보았을 때, 단백질 손실 없이, 변성 없이 유지되고 있음을 확인함
- ○ 본 방식으로 코미팜으로 보낸 제품을 대상으로 검사한 결과 합격 판정 받고 백신 시제

품 생산하였음

○ 최종 제품 멸균 저장 방법으로 clean bench안에서 0.22 um filtration하는 것으로 확정함

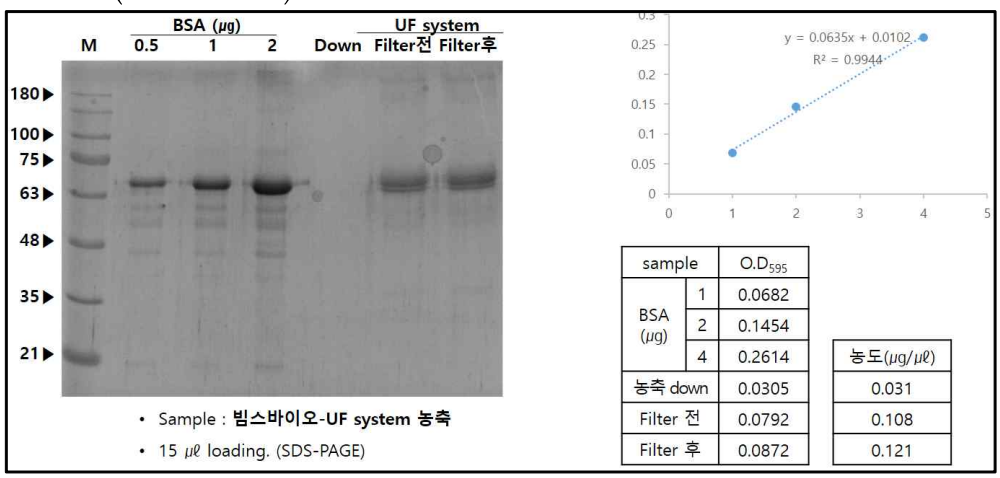
다. 항원 단백질 재료 제공

○ 농림축산검역본부 자돈 방어능 실험을 위한 항원 단백질 보냄

○ 시제품 생산 및 면역증강제 실험을 위해 코미팜으로 항원 원료 단백질 보냄

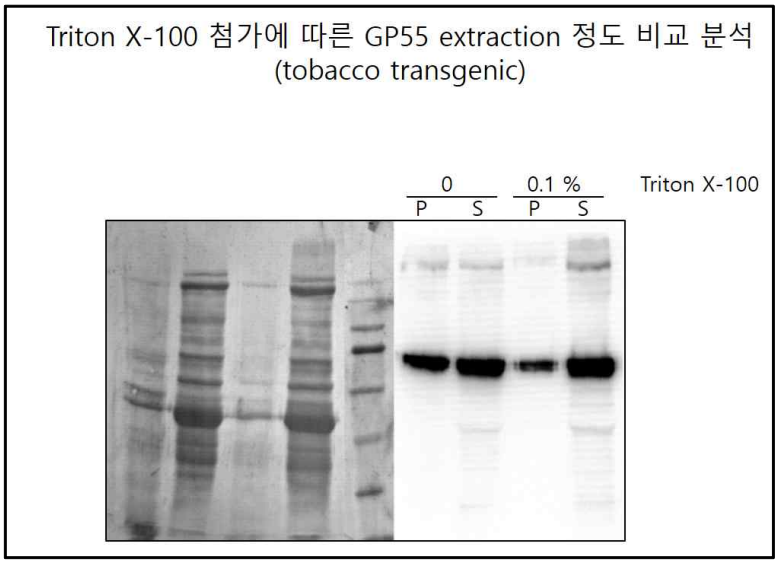
라. 공정 개선(편의성, 재료비 절감, 시간 절감) 연구 : TritonX-100

○ 식물 조직 파쇄 버퍼에 Triton X-100을 0.1% 사용하는데 추출 효율 증대를 위해서 circulation시키면서 연속 파쇄를 하는 과정에서 기포가 발생하여 편의성이 떨어지는 문제점이 발생(대량화 과정)



sample		$O.D_{595}$	농도(μg/μℓ)
BSA (μg)	1	0.0682	
	2	0.1454	
	4	0.2614	
농축 down		0.0305	0.031
Filter 전		0.0792	0.108
Filter 후		0.0872	0.121

○ 랩 scale에서 Triton X-100을 사용하지 않은 조건과 비교하여 항원 단백질 추출 정도를 비교하였을 때, 항원 단백질은 비교적 solubility가 좋은 편임을 확인하였고 향후 Triton X-100을 제외 하는 조건과, 그 사용량을 줄이는 테스트를 수행하여 최종 결정할 예정임



마. 공정 개선(재료비 절감) 연구 : cellobiose 대체

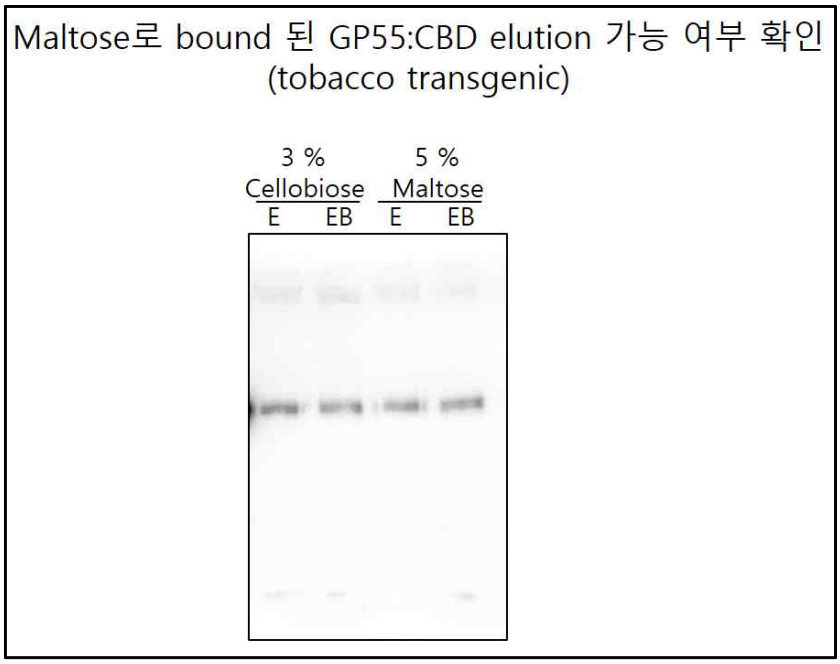
○ 최종적으로 AMC 레진에 흡착한 항원단백질을 레진으로부터 분리할 때 셀로바이오스를

사용하고 있는데, 분리정제 공정에서 셀로바이오스 가격이 원가 상승에 큰 비중을 차지함

- ○ 이당류이면서 상대적으로 가격이 저렴한(1/6 수준) 말토오스로 셀로바이오스를 대체할 수 있을지 확인함
- ○ 랩 scale에서는 5% maltose를 이용하면 3% cellobiose를 대체할 수 있을 것으로 판단됨
- ○ 향후 large-scale에서 대체 가능할지 테스트를 거쳐 최종 결정하고, 비용 절감 정도를 분석할 예정임

바. 공정 개선(재료비 절감, 소요 시간 단축) 연구 : elution buffer 조건 개선

- ○ elution buffer를 알려진 일반적으로 알려진 basic pH조건에서 수행할 경우, 최종 백신 제품 품질 조건의 pH를 만족하기 위해서는 buffer 교환 과정이 필요한데, additional step이 포함되면서 비용이 많이 증대할 것임
- ○ 가장 일반적인 생물학 제제의 버퍼 조건인 pH 7.2로 조정하고, $CaCl_2$도 제외시키고 테스트 한 결과, pH 7.2에서 무난하게 elution이 되고, $CaCl_2$가 없이도 충분한 양이 elution 됨을 확인 함에 따라, 이후 large-scale에서 이 조건을 적용하여 분리정제를 수행함



- ○ 버퍼 제조 및 버퍼 교환 작업 제거 등의 이익을 얻고, $CaCl_2$ 비용을 절감하였음

사. 보존성 조사

- ○ 분리정제된 항원 단백질의 안정성을 생화학, 면역학적으로 조사함
- ○ 분리정제된 항원 단백질 12ug에 IMS1313을 혼합한 샘플과 혼합하지 않은 샘플을 각각 4도씨 냉장고와 -20도씨 냉동고에 보관하면서 1개월 간격으로 항원성을 조사함
- ○ 항원성을 조사하는 방법으로는 메디안디노스틱에서 판매하는 CSFV-Ag ELISA kit을 이용하여 분석함

○ well 당 5ng의 항원을 코팅하고 dilution 버퍼로는 carbonate buffer(pH 9.6)을 사용함

○ 항원성 판정기준은 대조군의 흡광도를 이용한 CPC 값을 계산하여 0.6 이상이 나온 경우 실험이 유효하다고 판단하였고, (%) S/P 값을 계산하여 20 이상의 수치가 나오면 양성으로 판정함

○ 결과, 항원 단백질은 4도씨와 -20도씨 등의 온도에는 큰 차이를 나타내지는 않고, IMS1313을 혼합하거나 혼합하지 않거나 항원성 보존에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났음

○ kit를 새로 구입하거나, 항원 단백질 stock을 freeze-thaw를 반복하는 경우 등에서 수치가 변동 양상(아래 그림 빨간색 화살표)을 보이지만 최종적으로 24개월까지는 순수 분리된 항원단백질은 adjuvant 유무, 온도 등에 큰 차이 없이 잘 보존되는 것으로 판단됨

☐ **Storage test of purified-GP55 protein : antigenicity**

1. Storage 내역

조건 표기	E. tube material	Storage condition	단백질 확인(24개월)
Ag only	GP55 60 ㎕(12 ㎍)	**4℃, -20℃**	1개월 간격
Ag + IMS1313	GP55 60 ㎕(12 ㎍) IMS1313 60 ㎕	**4℃, -20℃**	1개월 간격

2. Antigenicity

- 확인 방법 : CSFV-Ag ELISA kit(메디안디노스틱)
- Ag coating ≒ GP55 protein **5 ng/ well**
- Protein diluent : carbonate buffer(pH 9.6)

대조 OD, 유효기준				(%)S/P, 판정기준		
SPC	WPC	NC	CPC	양성	의양성	음성
>0.8	>0.35	<0.3	>0.6	≥20	≥15, <20	<15

* CPC=SPC흡광도-NC흡광도

* (%)S/P=[(검체흡광도-NC흡광도)/CPC]x100

조건 / 개월	4℃, (%)S/P		-20℃, (%)S/P		대조 OD. 450 nm				4℃, OD		-20℃, OD	
	GP55	GP55+IMS	GP55	GP55+IMS	SPC	WPC	NC	CPC	GP55	GP55+IMS	GP55	GP55+IMS
1	41	53	40	48	1.74	0.97	0.14	1.6	0.79	0.98	0.78	0.91
2	36	41	34	46	1.60	0.82	0.13	1.47	0.66	0.73	0.63	0.81
3	170	204	154	199	1.04	0.50	0.05	1.00	1.73	2.08	1.58	2.03
4	172	196	146	191	0.99	0.43	0.04	0.95	1.69	1.91	1.42	1.85
5	156	172	129	170	0.94	0.45	0.04	0.89	1.44	1.58	1.20	1.56
6	184	213	140	196	1.07	0.49	0.05	1.02	1.93	2.22	1.48	2.05

아. 그린백신용 면역증강제 및 서방형 제형 개발(1세부 위탁과제)

(1) 사포닌, 탄닌산, 카테킨 등 식물 유래 2차 대사산물들의 그린 백신 면역 증강 효과 조사

○ 분자면역증강제로 널리 연구된 flagellin, CTB(cholera toxin B)와 LTB(heat labile entero toxin B)등과 같이 분리정제된 항원 단백질의 항원성 증강 여부를 조사함

○ 각 3마리 마우스를 대상으로 5 ug의 항원을 아래 표와 같은 함량을 혼합하여 각각 주사함

2. Antigenicity

조건 / 개월	4℃, (%)S/P		-20℃, (%)S/P		대조 OD. 450 nm				4℃, OD		-20℃, OD	
	GP55	GP55+IMS	GP55	GP55+IMS	SPC	WPC	NC	CPC	GP55	GP55+IMS	GP55	GP55+IMS
7	210	221	183	216	0.87	0.38	0.06	0.81	1.76	1.85	1.54	1.81
8	209	230	198	231	0.82	0.35	0.05	0.77	1.66	1.82	1.58	1.83
9	183	200	170	196	0.89	0.39	0.05	0.84	1.59	1.73	1.48	1.7
10	147	197	148	188	1.42	0.56	0.05	1.37	2.07	2.75	2.08	2.63
11	129	145	125	139	1.28	0.54	0.04	1.24	1.64	1.83	1.59	1.77
12	157	163	137	167	1.20	0.52	0.04	1.15	1.85	1.91	1.62	1.96
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	2.19	1.76	1.3	1.75
15	235	278	178	237	0.92	0.41	0.05	0.87	2.09	2.47	1.60	2.11
16	231	242	131	234	0.66	0.20	0.04	0.62	1.47	1.54	0.85	1.49
17	149	110	56	105	1.44	0.59	0.04	1.40	2.13	1.58	0.82	1.51
18	119	150	107	151	1.84	0.92	0.04	1.80	2.18	2.74	1.96	2.76
19	41	93	62	112	1.83	0.94	0.04	1.79	0.77	1.71	1.15	2.04
20	24	94	33	91	1.94	0.95	0.05	1.90	0.50	1.87	0.67	1.79
21	32	99	50	104	1.67	0.83	0.04	1.63	0.56	1.66	0.86	1.73
22	32	109	57	107	1.94	1.15	0.05	1.89	0.65	2.12	1.13	2.08
23	35	95	59	105	1.79	1.03	0.05	1.74	0.66	1.71	1.08	1.89

○ 3차에 걸친 면역 주사를 실시하고 혈액을 채취하여 혈청 분리작업을 수행함

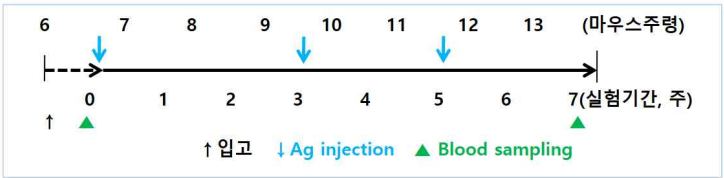
□ **마우스에서 식물 유래 돼지열병 바이러스 E2 단백질의 주사투여 실험 계획(1)**

1. 투여조건

Ag(회, 개체)		PBS	5 μg	5 μg	5 μg	5 μg	5 μg	5 μg	5 μg
Adj.	종류	-	-	CTB	catechin	flagellin	LTB	saponin	tannic acid
	용량	-	-	5 μg	0.7 mg	40 ng	5 μg	50 μg	4 mg
개체수		3	3	3	3	3	3	3	3

LTB : Heat Labile enteroToxin B subunit

2. 실험 일정



3. 항체 확인 및 역가 결정

- CBD(*E. coli*), GP55-CBD(plant, self) : ELISA
- CSFV Ab ELISA kit : 메디안

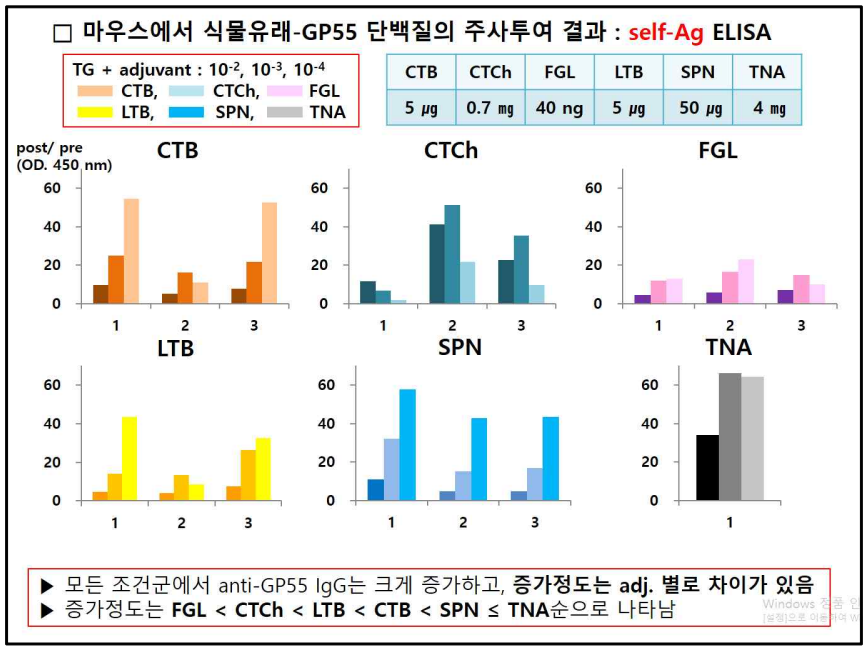
(2) 주사 항원에 대한 항체 형성능 조사

○ 혈청을 100배, 1,000배, 10,000배 희석하여 주사 항원에 대한 항체 반응을 주사 전후 비율로 조사한 결과, 탄닌산과 사포닌에서 항체가 다른 실험군에 비해 상대적으로 높게 형성되었음을 확인함

○ 3마리 마우스를 실험 대상으로 하였는데 탄닌산 그룹에서 2마리 마우스가 폐사함. 이는 실험에 사용한 량이 독성이 있는 수준으로 생각됨

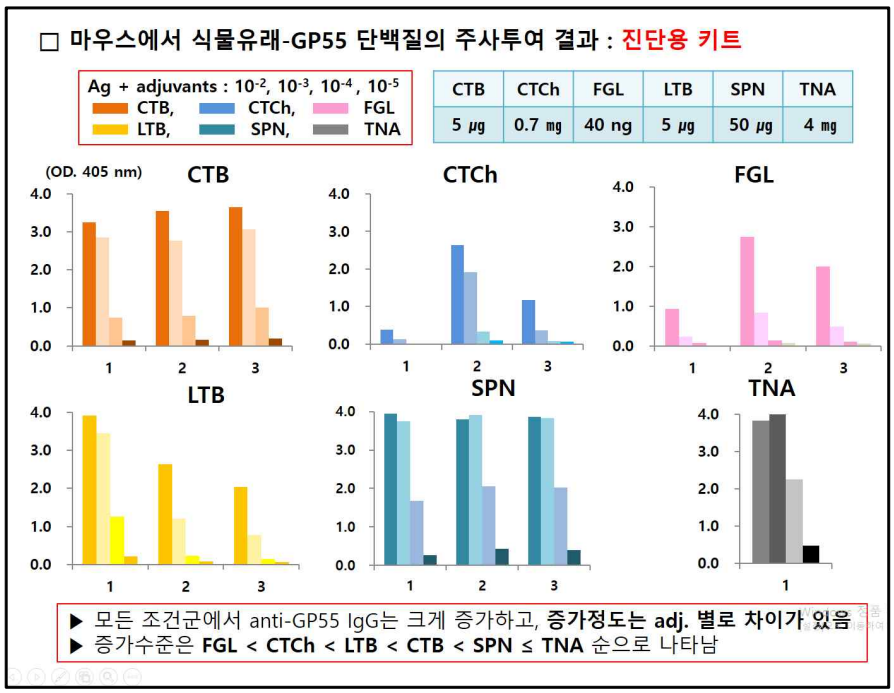
○ 특히 사포닌 그룹은 개체간 차이도 상대적으로 적어 비교적 균일한 효과를 보임

(3) Commercial 항체 진단 키트를 이용한 항체 형성능 조사



○ 메디안디노스틱사에서 판매하는 CSFV-Ab ELISA kit를 이용하여 항체 형성능을 조사한 결과, 사포닌과 탄닌산 그룹에서 높은 항체 형성능을 확인하였음

○ 항체 반응성이 전반적으로 높아 혈청 희석을 100배부터 100,000배까지 테스트 하였을 때, 사포닌과 탄닌산 그룹에서는 10,000 배 희석 혈청에서도 흡광도 약 2정도로 높은 반응성을 확인하였음



○ 흡광도를 기준으로 한 ELISA 판정을 보면, 사포닌과 탄닌산의 경우 100,000배 희석을 한 경우에도 항체 양성으로 판정됨으로 사포닌과 탄닌산은 강력한 면역증강제로서의 가능성을 보여줌. 다만 탄닌산의 경우는 실제 동물 백신으로 사용하고자 할 경우, dose결정 시험을 통하여 독성에 대한 조사를 할 필요가 있음

□ 마우스에서 식물유래-GP55 단백질의 주사투여 결과 : 진단용 키트

대조	NC	0.17
	PC	1.38
	CPC	1.21

▶ 유효성 평가기준을 만족하여 성적은 신뢰할 수 있음
(NC < 0.3, PC ≥ 0.5, CPC ≥ 0.3)

* 양성판정 기준 : S/ P value ≥ 0.14

성적	S/ P value				성적	S/ P value			
희석	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	희석	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
PBS	< 0	-	-	-	Ag	0.71	0.00	0 <	0 <
	< 0	-	-	-		1.98	0.34	0 <	0 <
	< 0	-	-	-		0.95	0.11	0 <	0 <
CTB	2.74	2.21	0.48	0 <	CTCh	0.22	0.11	-	-
	3.00	2.14	0.52	0 <		2.19	1.59	0.28	0.08
	3.10	2.40	0.69	0.01		0.91	0.30	0.07	0.05
FGL	0.68	0.06	0 <	-	LTB	3.33	2.71	0.90	0.04
	2.29	0.54	0 <	0 <		2.20	0.86	0.04	0 <
	1.64	0.26	0 <	0 <		1.67	0.50	0 <	0 <
TNA	3.24	3.31	1.86	0.39	SPN	3.35	2.96	1.24	0.09
	-	-	-	-		3.24	3.09	1.56	0.22
	-	-	-	-		3.29	3.03	1.53	0.19

▶ 양성판정 수준은 **TG < FGL < CTCh < LTB < CTB < SPN ≤ TNA** 순으로 나타남

2. 항원 단백질 분리 공정정제 기술 20kg 적용 및 실증, 항체 지속력 강화를 위한 biopolymer engineering

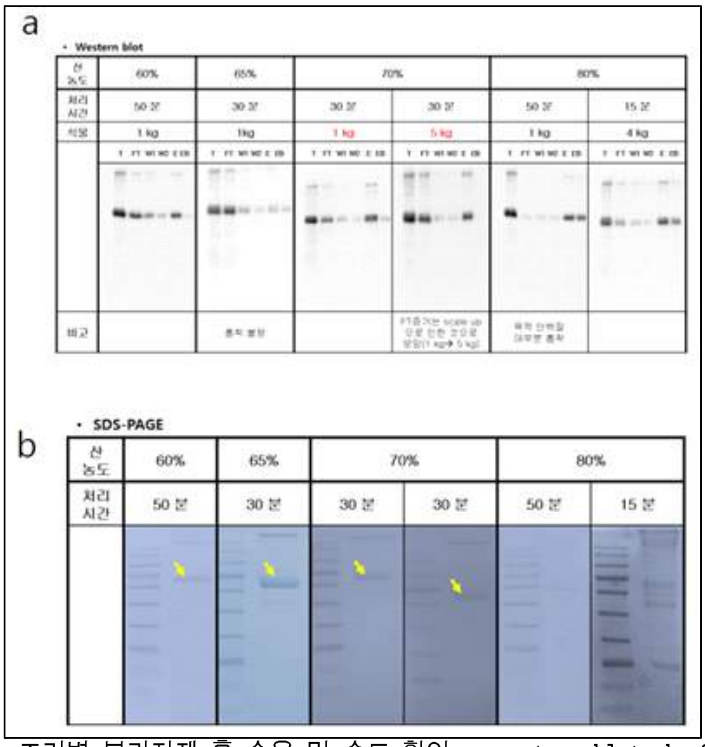
가. 항원 단백질 분리정제 공정 개선

○ 크리스탈 셀룰로오스에 산(acid)을 처리하는 시간에 따른 항원 분리 효율을 비교하였을 때, 70% 30분이 가장 적절하다고 판단함(그림 1)

산 농도	60%	65%	70%		80%	
처리 시간	50 분	30 분	30 분	30 분	50 분	15 분
식물 무게	1 kg	1kg	1 kg	5 kg	1 kg	4 kg
AMC	200 g (1:5)	100 g (1:10)	100 g (1:10)	500 g (1:10)	200 g (1:5)	80 g (1:50)
수율 (mg/kg)	14.34	3	23.4	19.4	623	135
순도	양호	양호	양호	양호	불량	불량

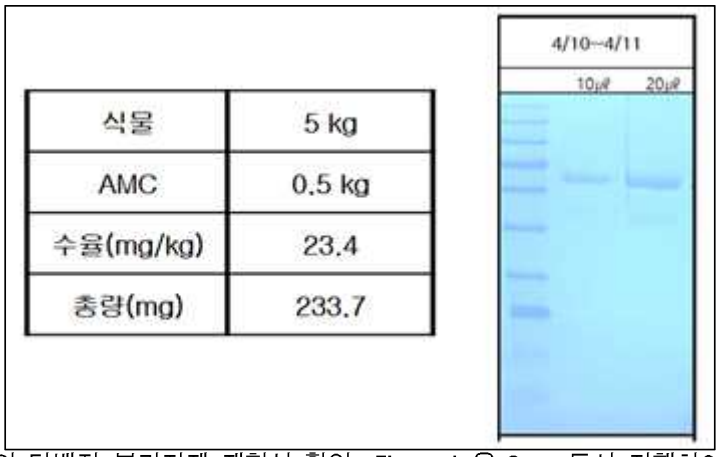
<그림1. 산처리에 따른 분리정제 수율 비교 >

○ 그림 2 b.에서 보는 바와 같이 산의 농도가 높을수록 증가하는 효과가 있는 듯하지만, 80%에서는 비특이적인 결합이 증가하여 부적절한 조건임



<그림 2. 조건별 분리정제 후 수율 및 순도 확인. a:western blot b: SDS-PAGE>

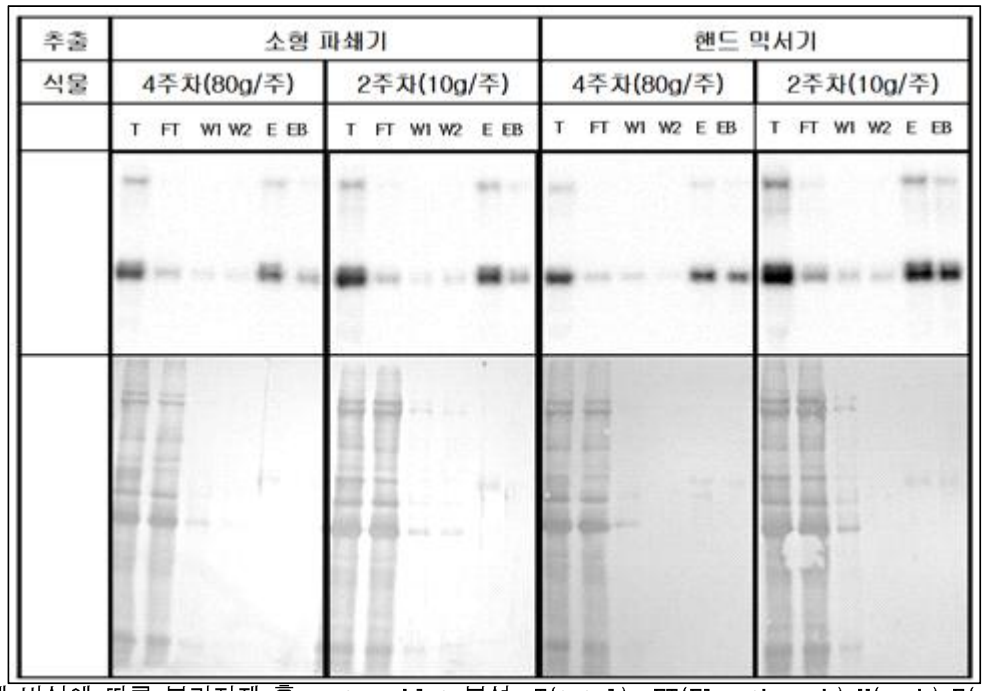
○ 가장 효율적인 생산 프로토콜을 정립하는데 있어 재현성이 중요하고 또한 인력 운영이 최종 제품 가격에 가장 크게 영향을 주는 관계로, 최종적으로는 5kg단위를 4set동시에 진행하여 1 batch 는 20kg scale로 결정하였고, ㅈ현성 확인한 결과는 그림 3과 같음



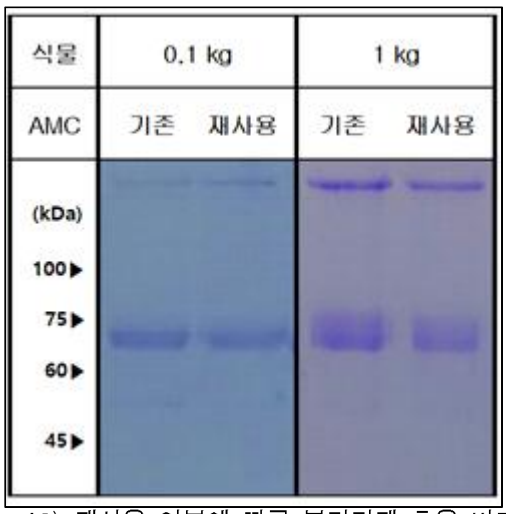
<그림 3. 식물 5 kg unit의 단백질 분리정제 재현성 확인. 5kg unit을 2set 동시 진행하여 기대한 결과를 얻음>

○ 5kg unit으로 식물을 파쇄 할 경우, 핸드 믹서기와 기존 사용하는 파쇄기를 이용한 분리정제 하였을 때 그 결과는 차이가 없어 최종적으로 5 kg 식물을 파쇄기를 이용하여 extract하기로 함(그림 4)

○ 생산 공정에서 재료비 비중이 높은 산(acid)를 사용 후 회수하여 다시 사용할 때 항원 단백질 분리정제 수율과 순도를 비교한 결과 그림 5와 같이 단백질 분리정제 효율이 거의 유사하게 유지되어 재활용 방침을 결정함. 재료비 자체비용과 사용한 폐산 처리 비용을 줄일 수 있는 방법이라 원가 절감에 크게 도움이 됨



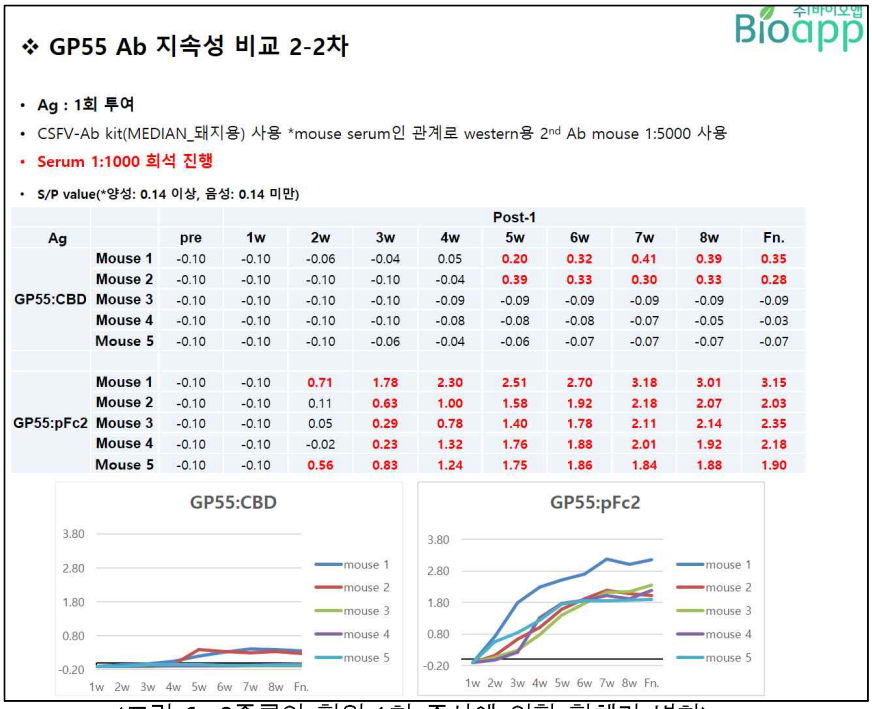
<그림 4. 파쇄 방식에 따른 분리정제 후 western blot 분석. T(total), FT(Flow-through) W(wash) E(eluate)>



<그림 5. 산(acid) 재사용 여부에 따른 분리정제 효율 비교 SDS-PAGE>

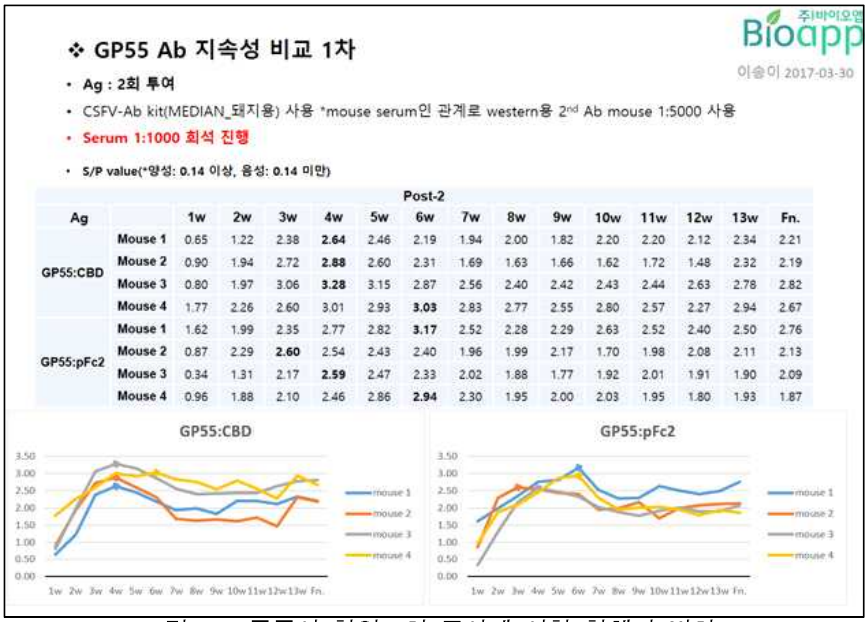
나. 항체 지속능 증대를 위한 biopolymer engineering

- 예정했던 셀룰로오스 분말화 관련 실험은 항체를 신속하게 생성할 수 있고 항체 지속성을 높이는 목적이었으나, 분말화 공정에 시간이 많이 소요되고, 단백질의 항원성 유지가 어렵다는 판단하에, 두 가지 목적을 만족할 수 있는 새로운 tag를 개발하게 되었음
- 돼지의 Fc3 종을 비교하여 가장 식물내 발현이 좋은 pFc2을 항원인 E2와 융합하여 벡터를 제작하였고, transient expression방식으로 단백질을 확보하여 마우스 실험을 수행하였음
- CBD와 pFc2에 융합된 단백질을 각각 마우스에 1회 접종하고 주차별로 채혈하여 항체가를 조사한 결과 pFc2에 융합된 항원은 2-3주 이후에 5마리 모두에서 항체 양성이 나타나는 반면 CBD융합항원은 2마리에서만 양성이 확인되었음(그림 6)



<그림 6. 2종류의 항원 1회 주사에 의한 항체가 변화>

○ 2회 주사한 마우스에서는 항체 지속능을 관찰하기 위하여 최종 14주까지 항체가를 조사한 결과, 두 항원 모두 2회 주사후 1주부터 모두 양성값을 나타내었고 최종 채혈까지 모든 개체가 양성값을 유지하였음. 하지만 CBD 융합항원에 비하여 pFc2융합 항원이 개체간 차이가 적은 경향을 나타내었음(그림 7)



<그림 7. 2종류의 항원 2회 주사에 의한 항체가 변화>

3. 야외 임상 시험을 위한 시제품 생산 및 kvGMP 공장 구축

가. 자돈용 그린백신(단미) 야외임상 시험용 시제품 3 lot 생산 및 공급

○ 허바백 돼지열병 그린마커주 야외 임상 시험에 사용될 시제품 생산 의뢰를 위한 항원 단백질 생산하여 3협동기관인 코미팜에 송부하였음

○ 코미팜은 식물 항원으로 허바백 돼지열병 그린마커주 시제품을 생산하여 안정성 및 면역원성 분석을 시행함(결과는 3 협동 기관에서 기술)

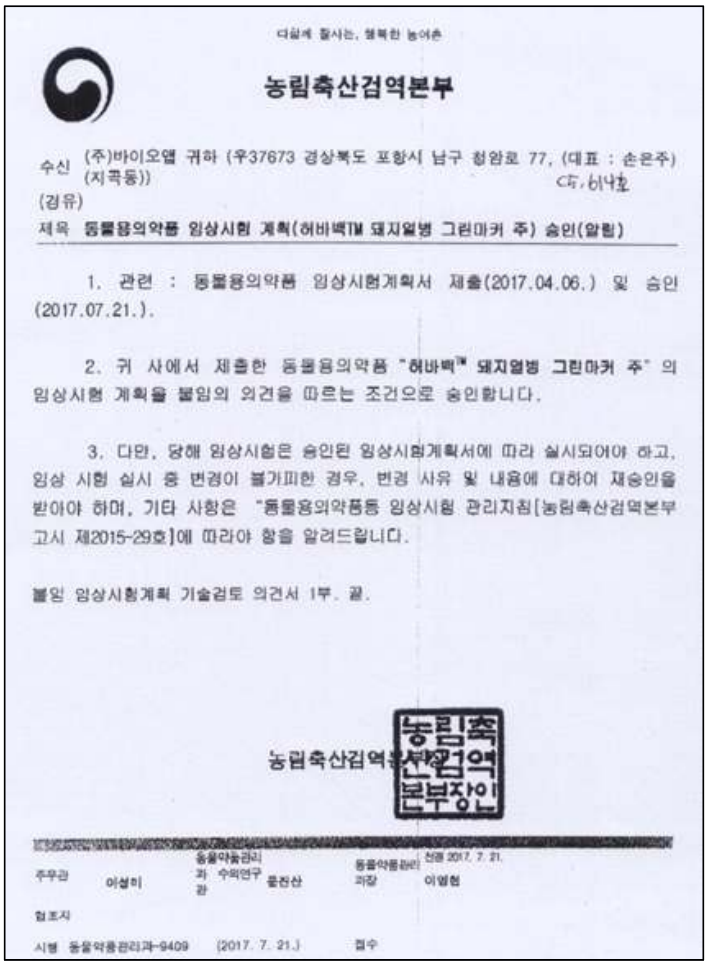
나. 야외농장 임상 시험 수행 및 품목허가 신청서 제출

○ 농림축산검역본부로부터 임상시험계획서를 승인받고(2017년 7월 21일) 무더위가 지난 후 전국에 3개 농장을 대상으로 야외 임상 시험을 수행하였음

○ 임상 시험 시료들은 3 협동 기관인 코미팜으로 보내어 분석을 실시하였음(결과는 3협동 기관에서 기술)

○ 임상 시험 계획서 제출전 농림축산검역본부 약품 관리과 사전 미팅을 수행하였고, 항원 함량 검증 분석법을 위한 사전 미팅을 하는등 인허가를 위한 노력을 기울여 진행하고 있음

○ 품목허가 신청서 제출 완료함



다음에 찾아는, 행복한 농어촌

농림축산검역본부

수신 (주)바이오앱 귀하 (우37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, (대표 : 손은주) (지곡동))

(경유)

제목 동물용의약품 임상시험 계획(허바백TM 돼지열병 그린마커 주) 승인(알림)

1. 관련 : 동물용의약품 임상시험계획서 제출(2017.04.06.) 및 승인(2017.07.21.).

2. 귀 사에서 제출한 동물용의약품 "허바백™ 돼지열병 그린마커 주" 의 임상시험 계획을 붙임의 의견을 따르는 조건으로 승인합니다.

3. 다만, 당해 임상시험은 승인된 임상시험계획서에 따라 실시되어야 하고, 임상 시험 실시 중 변경이 불가피한 경우, 변경 사유 및 내용에 대하여 재승인을 받아야 하며, 기타 사항은 "동물용의약품등 임상시험 관리지침[농림축산검역본부 고시 제2015-29호]에 따라야 함을 알려드립니다.

붙임 임상시험계획 기술검토 의견서 1부. 끝.

농림축산검역본부장 농림축산검역본부장인

주무관 이성희 동물약품관리과 수의연구관 문진산 동물약품관리과장 이영현 전결 2017. 7. 21.

협조자

시행 동물약품관리과-9409 (2017. 7. 21.) 접수

다. 국내 최초 그린백신 생산용 제조 시설 구축

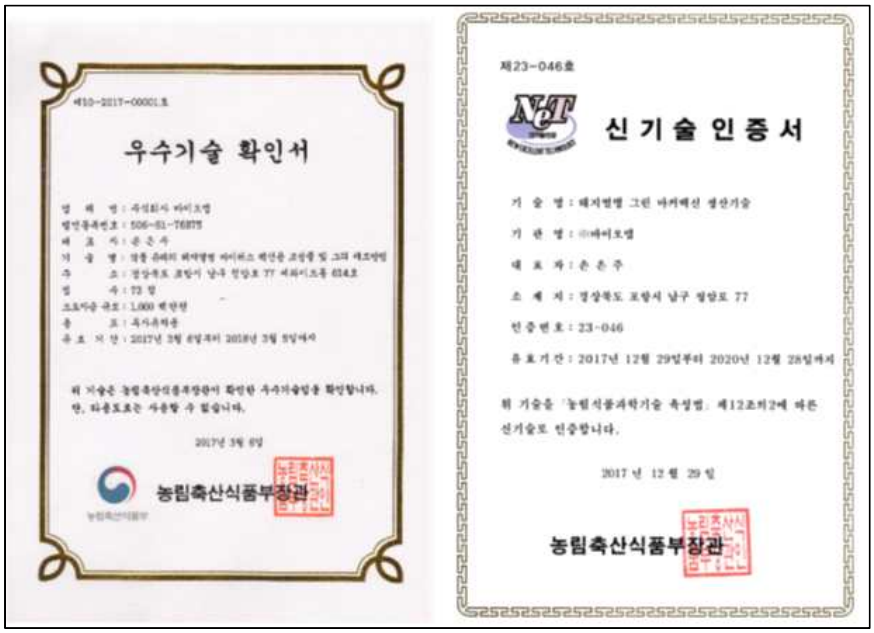
○ 밀폐형 식물공장 건립(밀폐형 식물배양실, 분리정제실, QC 실험실 등)

○ kvGMP 제조시설 인증 예정

라. 신기술 인증

○ 2017년 3월 우수기술 확인

○ 2017년 12월 NeT 신기술 인증



우수기술 확인서

농림축산식품부장관

제23-046호

신 기 술 인 증 서

기 술 명 : 태지법랩 그린 바이백신 생산기술

기 관 명 : ㈜바이오앱

대 표 자 : 손 은 주

소 재 지 : 경상북도 포항시 남구 청암로 77

인증번호 : 23-046

유효기간 : 2017년 12월 29일부터 2020년 12월 28일까지

위 기술을 「농림식품과학기술 육성법」 제12조의2에 따른 신기술로 인증합니다.

2017 년 12 월 29 일

농림축산식품부장관

마. 언론 소개

○ 2016년 국내 최초 그린백신 생산용 파일럿 시설 구축

㈜바이오앱, 국내 최초 그린백신 생산용 시설 개소

포항창조경제혁신센터와 강소기업 육성을 위한 MOU체결

머니투데이 신계호 기자 | 입력 : 20160427 21:55

이기사주소 : http://news.mt.co.kr/mtview.php?no=2016042717393333873&type=1 복사

(사진설명)국내 최초 식물공장형 그린마커백신 생산용 파일럿 플랜트 개소한 ㈜바이오앱과 포항창조경제혁신센터 관계자 등이 자리를 함께 했다/사진제공=포항창조경제혁신센터

포항창조경제혁신센터(센터장 박성호)의 지원을 받고 있는 ㈜바이오앱(대표 손은주)이 27일 국내 최초로 식물공장형 그린마커백신 생산용 파일럿 플랜트 개소식을 개최했다고 밝혔다.

이날 행사에는 미래창조과학부, 농림축산식품부, 농촌진흥청, 농림축산검역본부와 포스코, 포항시, 포스텍, RIST 등 지역 산.학.연 기관이 참여해 바이오앱의 차세대 그린백신 개발현황 발표와 식물공장형 그린백신 생산시설 투어가 진행됐다.

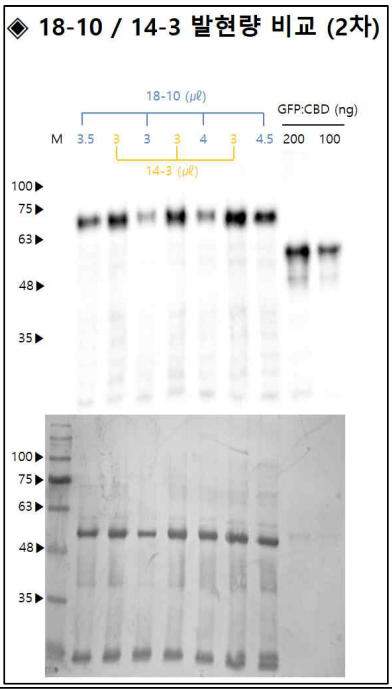
○ 2018년 2월 그린백신 개발 내용 소개

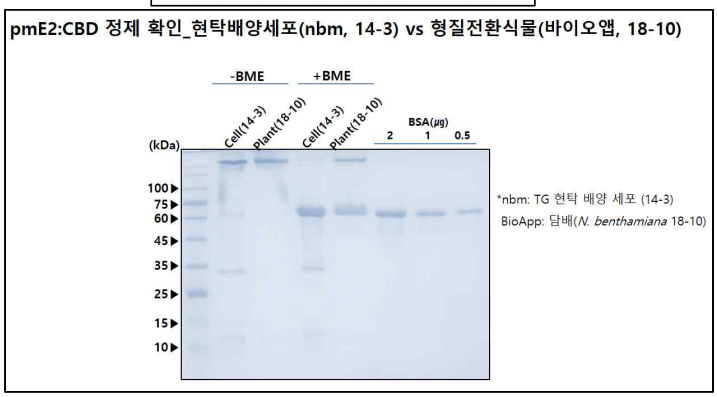
바. 형질전환 식물로부터 캘러스 배양을 통한 세포배양법에 의한 백신 항원 생산 가능성 검증

○ (주)엔비엠의 도움으로 형질전환 식물로부터 캘러스를 유도하여 배양한 후 항원 발현 및 분리 정제를 수행함

○ 형질전환 식물체가 homozygous single insertion인 경우에는 캘러스 배양법도 적용 가능하나, 생산 단가 측면에서는 식물 공장 재배법이 경제적임

○ 사용한 식물은 14-3과 18-10 두 계통을 사용하였는데, 14-3이 발현량이 2배가 높음에도 불구하고, 14-3 캘러스에서 분리한 단백질과 18-10 식물에서 분리한 단백질 양이 대동소이한 것으로 보아 캘러스 유도후 분리정제는 효율이 떨어지는 것으로 판단됨





○ 추후 돼지 열병보다 더 고가의 백신 생산 방법으로는 적용 가능할 것으로 생각됨

사. 돼지를 이용한 E2:CB D 와 E2:pFc2 항체 형성 속도와 지속능 비교 실험

○ 마우스 실험 결과에서는 pFc2가 tagging된 E2 항원이 항체 형성 속도가 빨랐고 항원성이 더 강하게 나타났지만 자돈을 이용한 실험 결과, 두 종류의 항원은 큰 차이를 보이지 않음

○ ELISA 분석 결과, pFc2가 tagging할 경우 반응성이 조금 향상된 것을 확인하였음

CSF-CBD와 CSF-Fc 비교 실험

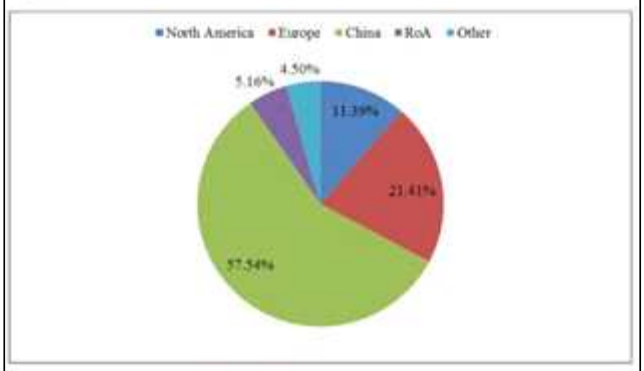
샘플명 (개체번호)		백신 접종 후 경과일별 ELISA 항체가 (S/P 값)				
		1차 접종 전 (08.18일)	2차 접종 전 (09.01일)	2차 접종 2주 후 (09.14일)	2차 접종 4주 후 (09.29일)	2차 접종 6주 후 (10월13일)
pmE2 -CBD	1	0.09	0.76	1.11	1.15	0.99
	3	0.11	0.13	0.76	0.66	0.54
	4	0.51	0.54	1.02	1.05	0.86
	5	0.00	0.03	1.07	0.99	0.82
평균		0.18	0.37	0.99	0.96	0.80
PmE2 -Fc	7	0.00	0.08	1.15	1.02	1.08
	8	0.00	0.09	1.13	1.11	1.09
	9	0.01	0.24	1.03	0.98	0.9
	10	0.04	0.14	1.16	1.01	1.03
평균		0.01	0.14	1.12	1.03	1.03

○ 추후 항원 생산 단가를 비교하여 pFc2의 가격경쟁력 여부를 조사할 필요가 있음

아. 돼지 열병 백신 해외 시장 조사

○ 2016년 돼지열병 백신 글로벌 시장을 보면 약 30억 도스가 생산되었고, 그중 절반 이상은 중국에서 생산 된 것으로 조사됨

Figure 2016 Global Classical Swine Fever Vaccines Production Market Share by regions



Source: QYR Pharm & Healthcare Research Center, Aug 2017

Table 2016 Global and China Key Manufacturers Classical Swine Fever Vaccines Capacity and Establish Date

NO.	Manufacturers	2016 Capacity(M Doses)	Establish Date
1	WINSUN	730	1958
2	CAHIC	830	1998
3	Merial	280	1997
4	MSD Animal Health (Merck)	150	1940s
5	Chopper Biology	260	1971
6	Ceva	110	1999
7	ChengDu Tecbond	190	2004
8	HVRI	130	1992
9	Ringpu Biology	140	1998
10	Qilu Animal Health	110	1958
11	DHN	110	2004
12	CAVAC	30	1968
13	Komipharm	20	1972
14	Agrovet	10	1991
15	Bioveta	10	1918
16	Jinyu Bio-Technology	15	1993
17	18Institutul Pasteur	3	1895
18	MVP	4	1989
19	Tecon	27	1958

Source: Above companies, QYR Pharm & Healthcare Research Center, Aug 2017

○ 2017년 중국 농무부에서 돼지열병 청정화 계획을 발표하였고, 중국에서 곤충세포 발현 돼지열병 마커백신이 허가를 받았으며 그 가격은 15RMB/dose로 (직접 문의) 2천 5백 원이라고 함(바이오앱 제품은 1,200원 이하)

○ 2018년 9월 9일 일본에서 돼지열병 발생

○ 돼지열병 청정화 계획을 수립한 중국시장이 마커백신의 대규모 시장이 될 것으로 생각됨

○ 일본 돼지열병이 살처분 정책에도 불구하고 전국적 전파가 우려되는 경우 마커백신 도입을 고려할 가능성이 있다고 판단됨

제2절 돼지열병 마커백신용 형질전환 작물의 주년재배 체계 확립 및 생산자동화 요소기술 개발

1. 밀폐형 식물공장 내 형질전환 담배 재배생산 시설 구축 및 환경제어 모니터링 적용기술 개발

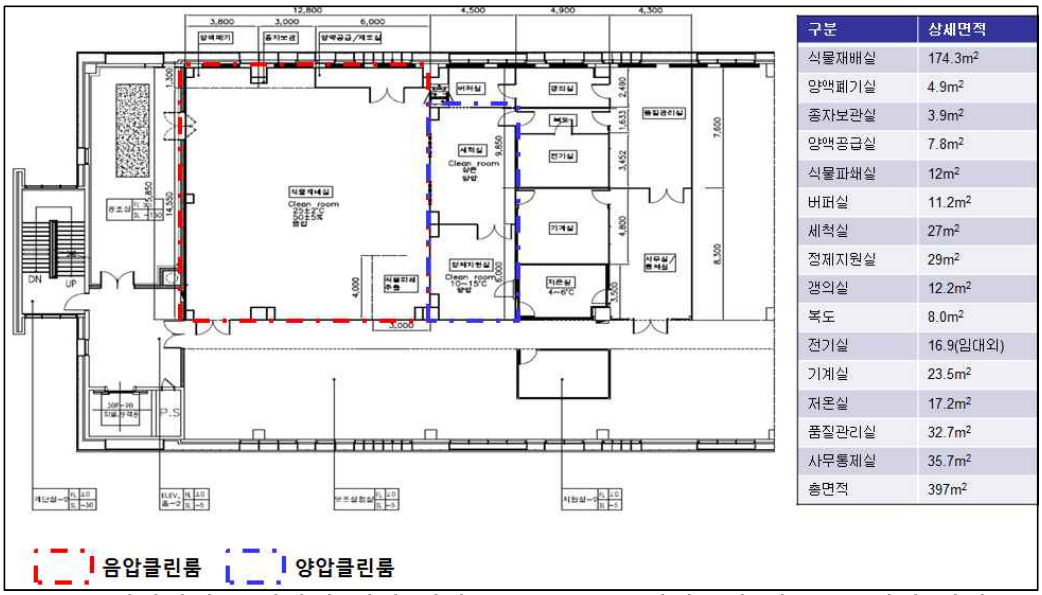
가. 돼지열병 마커백신용 형질전환 작물 생산시스템 구축 및 주년생산 모니터링

(1) 형질전환 *N. benthamiana* 주년생산을 위한 수경재배시스템 구축

○ 본 연구진행에 이용되고 있는 돼지열병 그린마커백신 생산용 Pilot-Plant의 면적은 120평 규모로 구축되었으며, 설계에서 구축완료까지의 총기간은 약 6개월이 소요되었음

○ 형질전환 식물의 외부 유출 및 생태교란의 위해요소를 사전 차단시키기 위해 식물재배실은 음압클린룸으로 설계/구축하여 외부의 대기압이 식물재배실로 들어오도록 하였으며 청정도는 class 10,000/m^3 가 유지 될 수 있도록 공조장치의 capacity가 결정되었음

○ 한편, 정제지원실 및 세척실은 내부의 대기압이 외부로 나가도록 양압클린룸으로 설계 및 구축되었으며 청정도는 GMP기준 보다 강화된 class 1,000/m^3 가 유지 될 수 있도록 capacity가 반영되었음



구분	상세면적
식물재배실	174.3m²
양액펌기실	4.9m²
종자보관실	3.9m²
양액공급실	7.8m²
식물파쇄실	12m²
버퍼실	11.2m²
세척실	27m²
정제지원실	29m²
갱의실	12.2m²
복도	8.0m²
전기실	16.9(임대외)
기계실	23.5m²
저온실	17.2m²
품질관리실	32.7m²
사무통제실	35.7m²
층면적	397m²

<돼지열병 그린마커 백신 생산 Pilot-Plant 배치도면 및 주요 실별 면적>

(2) 돼지열병 그린마커백신 형질전환 *N. benthamiana* 주년재배를 위한 수경재배시스템 구축 및 생산

○ 본 Pilot-Plant의 식물재배실은 1) 파종을 위한 식물생장상(3KW), 2) 육묘를 위한 담액육묘대, 3) 재배를 위한 NFT재배대로 각각 구성되어 있음

○ Photo 1에서는 형질전환 *N. benthamiana* 종자를 식물생장상에 파종한 직후(좌)와 7일 경과 후 자엽이 전개된 생육을 확인 할 수 있음(사진 1)

○ 형질전환 *N. benthamiana*의 발아조건은 온도 30±2℃, 상대습도 60%, 그리고 광도 150㎛ol/m2/s(광주기 16h)로 설정되었음

○ 담액수경시스템을 기본으로 한 육묘대에서의 *N. benthamiana*의 생육조건은 사전 실험의 최적조건인 온도 25℃±2, 상대습도 60%±10로 유지토록 설정되었으며, 광원은 LEDs array를 이용하여 white+red의 조합으로 150㎛ol/m2/s 이상의 광도를 유지시키고 있음. 이 때 자엽이 전개된 7일된 개체를 암면배지에 치상하여 육묘하게 되는데, 급액은 야마자키 상추전용양액(Yun, 1997) EC 0.6ds/m로 공급하고 있음(사진 2)

○ 파종 3주차 *N. benthamiana* seedlings는 순환식 NFT재배대로 정식이 이루어 졌으며 재배조건은 사전 실험의 최적조건인 온습도, 및 광도를 유지시켰으며 조건은 육묘조건과 동일하게 적용되었음. 급액은 야마자키액 EC 1.2dS/m로 하여 연속 공급하였음(사진 3)

○ 본 Pilot-plant를 이용하여 형질전환 *N. benthamiana*의 수확은 파종 후 7주째 이루어졌으며 수확된 지상부의 생체무게는 총 47kg였음

사진 1. 종자번식을 통한 형질전환 *N. benthamiana* 파종 직후 및 7일 경과 후 생육

사진 2. 종자번식을 통한 형질전환 *N. benthamiana*

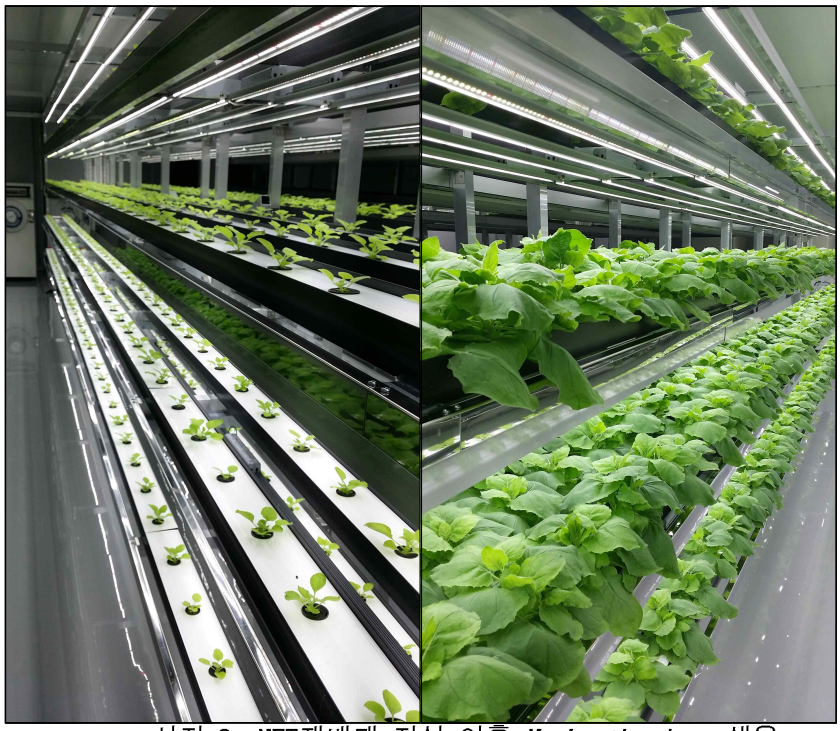


사진 3. NFT재배대 정식 이후 *N. benthamiana* 생육

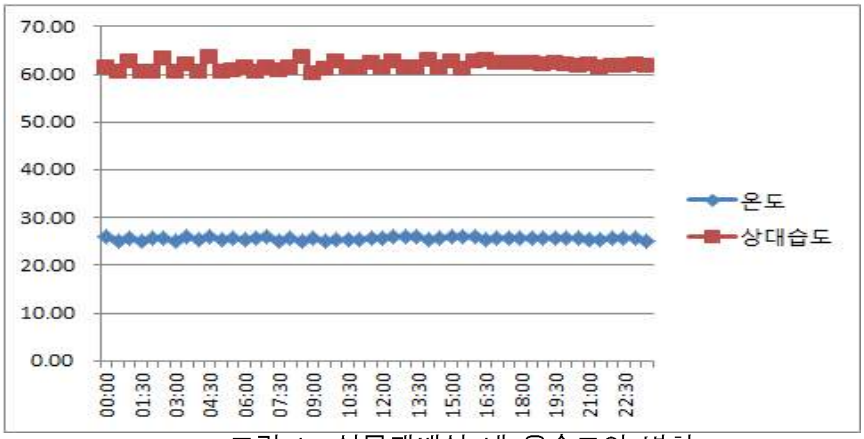


그림 1. 식물재배실 내 온습도의 변화

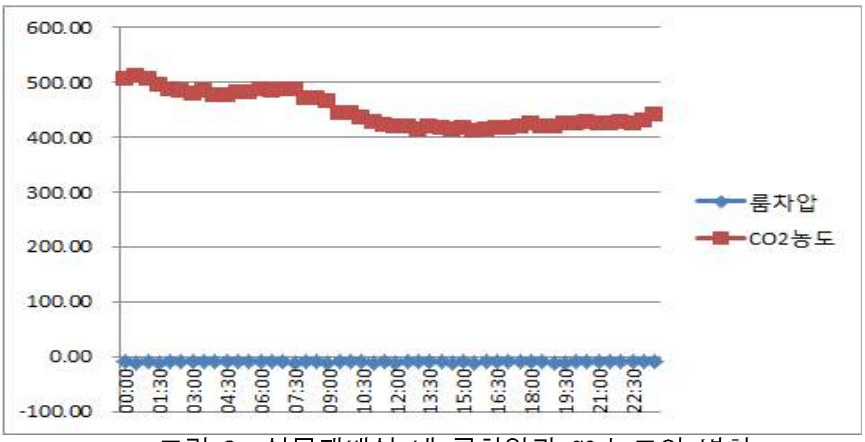


그림 2. 식물재배실 내 룸차압과 CO_2농도의 변화

(3) 광주기가 형질전환 *N. benthamiana*의 생체중과 항원단백질 발현량에 미치는 영향

○ LEDs array의 광조사를 통한 광주기별 처리에서 정식 4주 경과후 형질전환 *N. benthamiana*의 생육을 조사한 결과

- 생체중은 12/12h처리에서 가장 낮았으며 14/10h, 16/8h 그리고 18/6h의 처리에서는 차이가 나타나지 않았음
- 한편, GP55 항원단백질 함량을 분석한 결과(Fig. 3)에서는 14/10h과 18/6h의 광주기에서 다소 높게 나타났으며, 12/12h, 16/8h에서 다소 낮게 나타났음
- 이상의 결과로 볼 때, 광주기는 14/10h로 조사해주는 것이 바람직한 것으로 판단됨

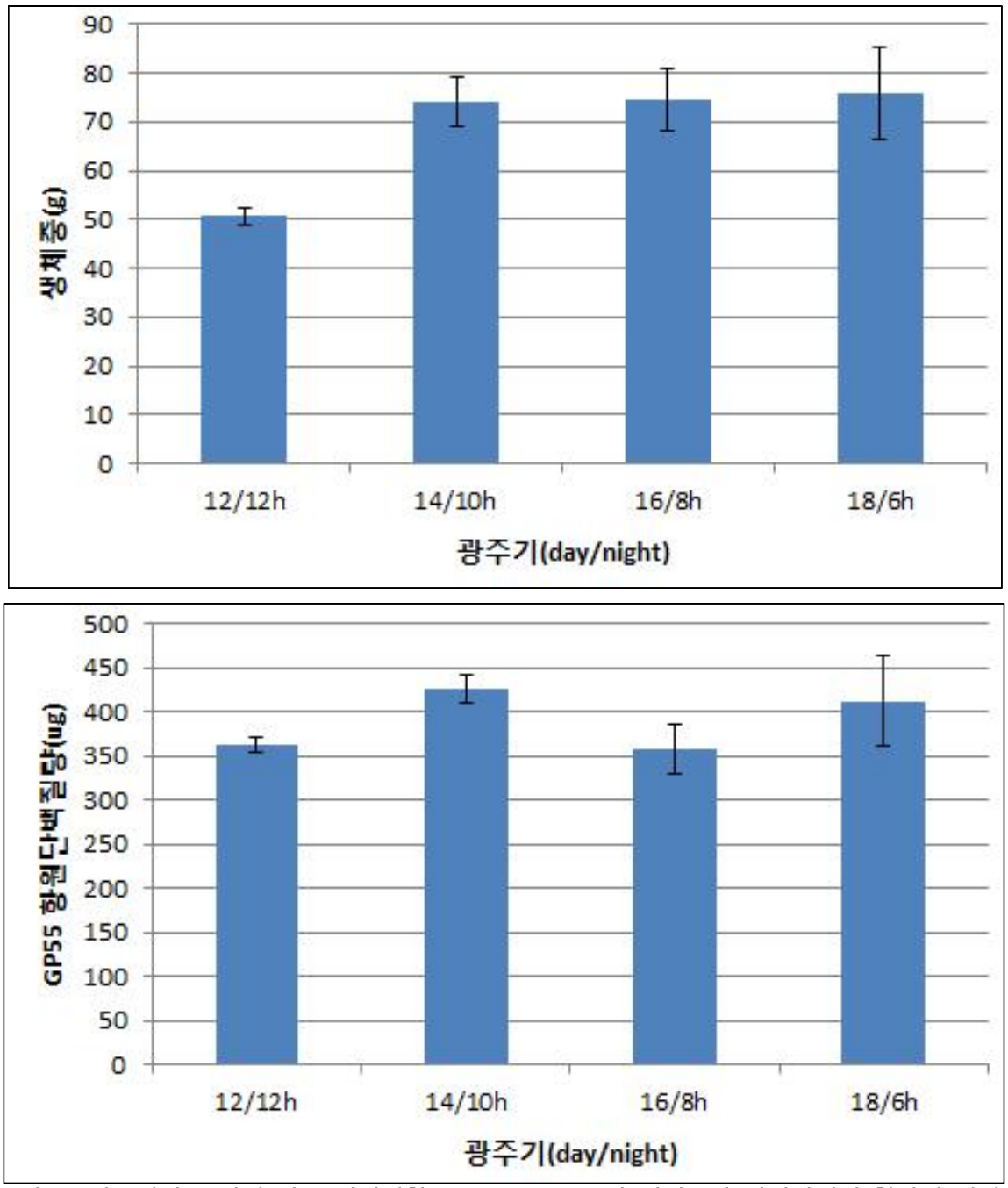


그림 3. 광주기의 조건에 따른 형질전환 *N. benthamiana*의 생체중과 항원단백질 함량에 미치는 영향

2. 형질전환 담배 수경재배기술 확립 및 영양번식 기술 개발

가. 돼지열병 마커백신 원료식물 *N. benthamiana* 생육 모니터링

(1) 형질전환 *N. benthamiana* 정식 후 시간경과에 따른 생장량 변화

○ 국내 최초 돼지열병 마커백신 생산용 Pilot-Plant(그림 1)이용 형질전환 원료식물 대량생산을 위한 수경재배시스템 적용

그림 1. 밀폐형 식물생산시스템 [발아실(좌), 담액형 육묘대(중), 박막형 재배대(우)]

○ 밀폐형 식물생산시스템에서 형질전환 *N. benthamiana*의 정식 후 생육량 변화를 모니터링하기 위해 다음과 같은 조건으로 파종, 육묘, 재배 그리고 수확 후 저장하였음

- 형질전환 *N. benthamiana*의 발아는 포수된 원예용 무비상토에 파종을 하였으며 복토는 버미큘라이트(질석)로 실시하였음
- 습도를 유지하기 위해 PE(폴리에틸렌)필름으로 피복하였으며, 식물생장상내 온도 30±2℃, 상대습도 60%±10%, 그리고 광도 150㎛ol/m2/s(광주기 14h)로 유지하였음
- 본엽이 전개된 유묘는 암면셀에 이식을 하여 담액수경장치에서 육묘를 실시하였으며 육묘 환경조건은 온도 25℃±2, 상대습도 60%±10로 유지하였음. 인공광원은 LEDs array를 이용하여 white+red(90%+10%)의 조합으로 150㎛ol/m2/s 이상의 광도를 유지하였으며 광주기는 14시간으로 설정하였음. 급액은 야마자키 상추배양액으로 EC= 0.6 μS/cm로 공급하였음.
- 파종 3주가 경과한 유묘는 암면셀에 폴리스틸렌(스펀지)을 감싸서 순환식 NFT재배대로 정식을 하였음
- 재배조건은 사전 lab실험에서 선발된 조건인 온습도, 및 광도를 유지하였으며 이 때의 세부 생육환경 조건은 육묘시 와 동일하게 적용되었음. 급액은 야마자키액 EC 1.2 μS/cm로 하여 1시간당 10분간 공급하였음

○ 밀폐형 식물생산 시설에서 정식 후 생장량의 변화를 조사한 결과(그림 2), *N. benthamiana*의 5일째 경과 0.926g에서 26일째 69.06g으로 생육은 지수함수 변화양상으로 증가하였음

○ 본 시험의 결과를 바탕으로, 재식밀도 0.2m × 0.2m에서 정식 후 재배일수 경과에 따른 생육량의 변화를 Pilot운영 시험결과로 validation을 실시하였음

(2) Pilot-Plant 식물재배시스템 이용 형질전환 *N. benthamiana* 급액 EC변화에 따른 생장량 변화

○ 형질전환 *N. benthamiana*의 종자는 최적 광발아조건인 온도 30±1℃, RH 60±10%로 유지되는 항온 항습실에서 광주기 12h과 광도 150㎛ol/cm/s의 광환경에서 치상되었음

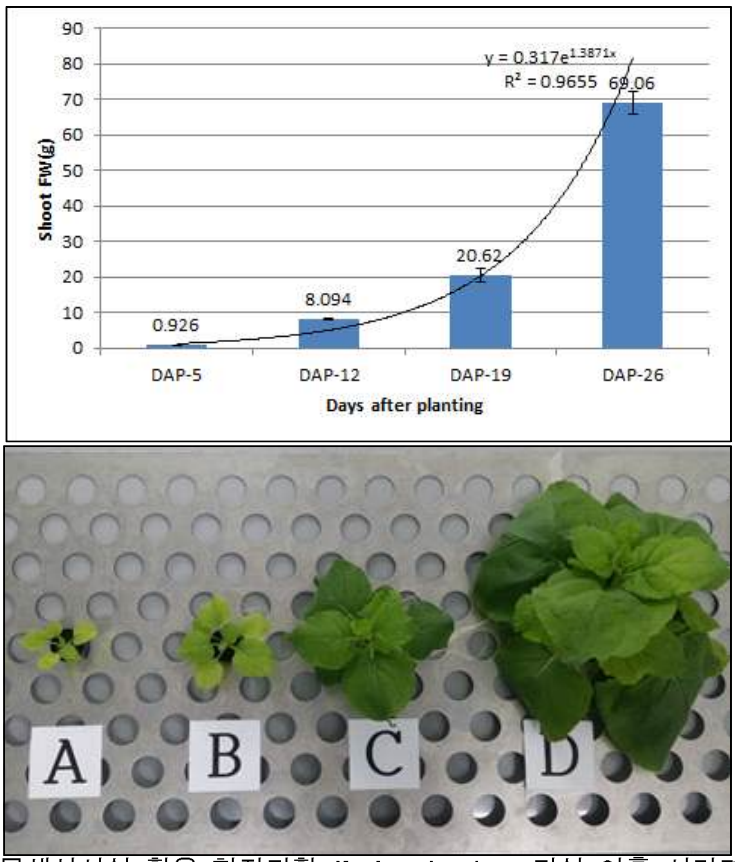


그림 2. 밀폐형 식물생산시설 활용 형질전환 *N. benthamiana* 정식 이후 시간경과에 따른 생육량의 변화

○ 밀폐형 식물생산 시스템에서 *N. benthamiana*의 파종이후 적정 수확시기를 결정하기 위해 정식일수에 따른 수확시기를 달리하여 생체량을 조사한 결과(그림 3),

- 파종 24일째 정식 실시하여 26일째인 50일 이후로 생체량의 변화를 pilot test하였음. 그림 2 에서 나타난 바, 파종 50일(정식 26일)이후에는 수확량의 변화가 방사상으로 나타나는 것을 확인 할 수 있었음
- 이러한 결과는 20×20cm의 재식밀도 하에서 나타난 것으로 *N. benthamiana*의 수확적기는 파종 후 50일 전후(정식 후 26일 전후)로 이루어지는 것이 바람직한 것으로 판단되었음

(3) Pilot-Plant 식물재배시스템 이용 형질전환 *N. benthamiana* 급액 EC변화에 따른 생장량 변화

○ 공급 배양액(야마자키 상추전용액)의 재배 중 EC변화가 형질전환 *N. benthamiana*의 생육변화에 미치는 영향을 조사한 결과,

- 정식 이후 EC를 1.2μS/cm로 유지시킨 처리에서는 생체중이 85.4g이었으며 정식 4주째 EC를 1.6과 2.0μS/cm으로 각각 상승시켰을 경우 생체중은 95.9g와 112.8g으로 증가되어, 야마자키 배양액으로 재배생산 할 경우 정식 4주차 이후에는 배양액의 농도를 EC를 1.6μS/cm에서 2.0μS/cm으로 관리하는 것이 *N. benthamiana*의 생산성 향상에 효과적인 것으로 사료되었음.

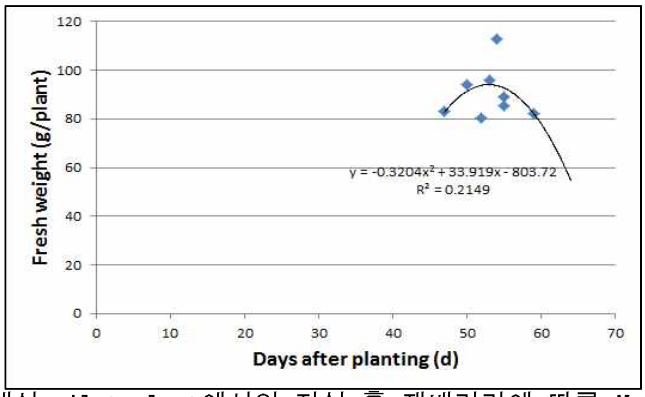


그림 3. 밀폐형 식물생산 pilot-plant에서의 정식 후 재배기간에 따른 *N. benthamiana* 생육량 변화

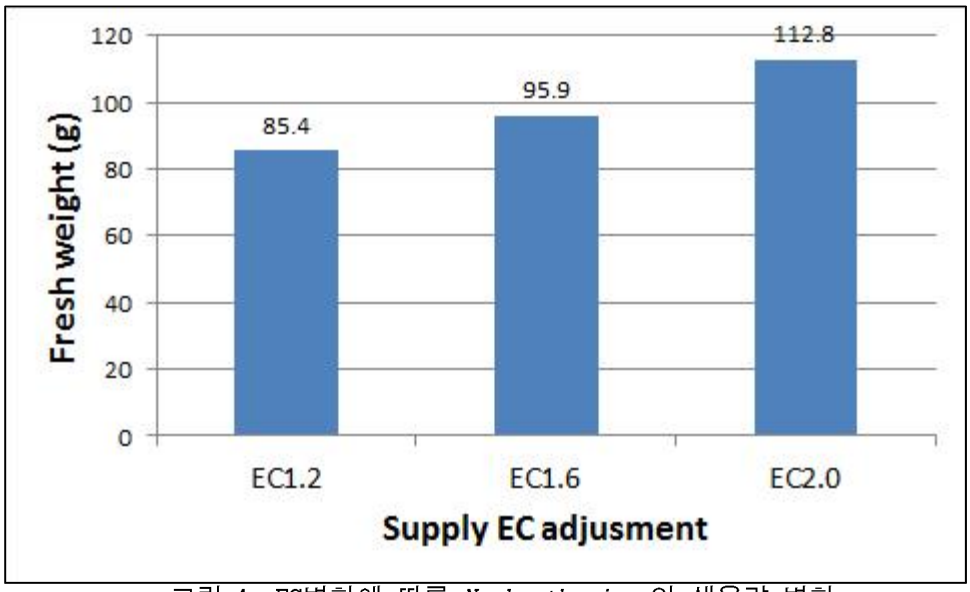


그림 4. EC변화에 따른 *N. benthamiana*의 생육량 변화

나. 인공 광 환경에 따른 *N. benthamiana* 생육과 항원단백질에 미치는 영향

(1) LEDs를 이용한 광질변화에 따른 형질전환 *N. benthamiana* 생육과 항원단백질 함량 변화

○ 밀폐형 식물생산시스템 하에서는 광도와 광주기를 최적제어 할 수 있는 인공광원을 이용하여 작물의 광수용 환경을 조성해 주는 것이 바람직함

- LEDs array는 이러한 조건에 알맞은 인공광원으로서 선택적 광질조성, 경제적 유지비용 및 내구성이 뛰어나 활용도가 높은 실정임
- 이에 본 시험에서는 LEDs array의 몇 가지 광질 조성에 따른 *N. benthamiana*의 생육변화와 항원단백질 함량에 미치는 영향을 알아보고자 하였음
- 광질조성으로는 100% white LEDs, 90% white + 10% red 혼합광, 75% white + 25% red 혼합광, 50% white + 50% red 혼합광 처리를 두었음. 일반적으로 백색광원은 삼원색광으로 인공광원으로 널리 이용되고 있으며 적색광원은 작물의 광합성에 유리한 파장대를 보유하고 있어 적색광원의 비율이 *N. benthamiana*의 생육과 항원단백질에 미치는 영향을 조사하였음
- 본 시험에서 정식 후 4주간 광질별 조사 결과, 백색광(100% white LEDs) 단독조사일 때 생체량이 가장 낮은 것으로 나타났으며(그림 5) 백색광원에 10%이상 적색광이 혼합된 처리에서는 유사한 생체량을 나타내었음

- 한편, 항원단백질 함향에 미치는 영향을 조사한 결과(그림 6), 통계적 유의성 있는 차이를 나타내지 않아 본 시험에서 *N. benthamiana*의 재배생산 시 인공광원의 광질조성은 백색광에 10%~50%사이의 적색광을 혼합한 광질조성이 적합할 것으로 판단되었음

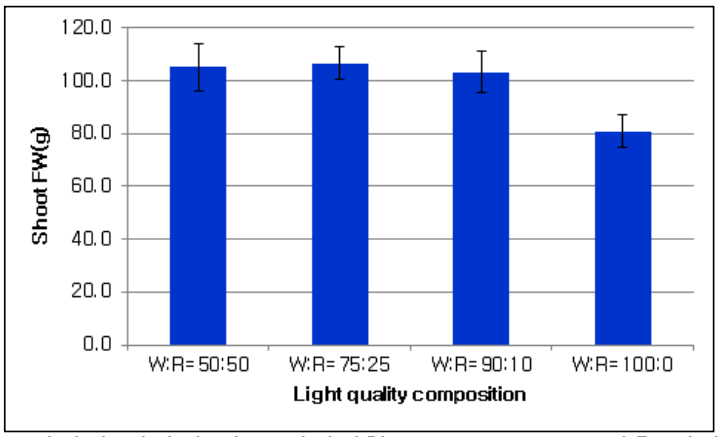


그림 5. 광질의 변화에 따른 형질전환 *N. benthamiana* 생육 변화

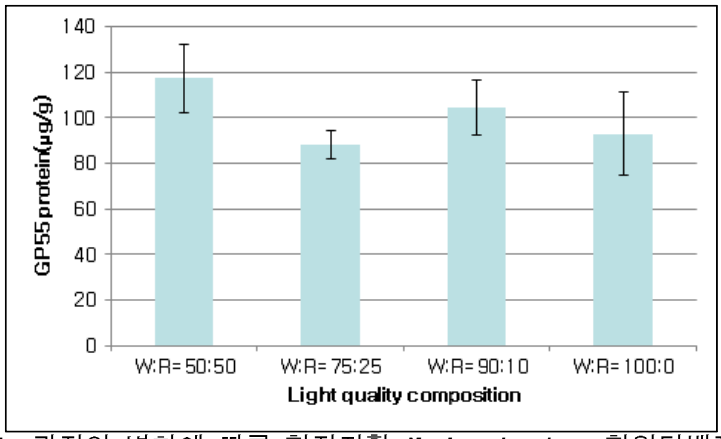


그림 6. 광질의 변화에 따른 형질전환 *N. benthamiana* 항원단백질 변화

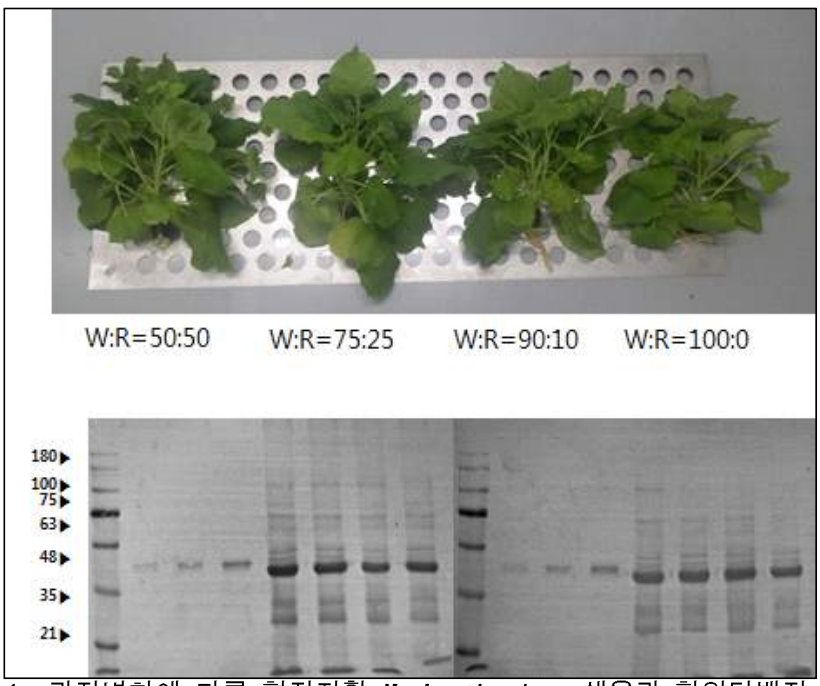


사진 1. 광질변화에 다른 형질전환 *N. benthamiana* 생육과 항원단백질 변화

(2) LEDs array 이용 광주기 변화에 따른 형질전환 *N. benthamiana* 생장량과 항원단백질 함량 변화

○ 본 시험에서는 LEDs array(90% white + 10% red 혼합광) 이용 광주기에 따른 *N. benthamiana*의 생육변화와 항원단백질의 함량에 미치는 영향을 알아보고자 하였음

- 광주기의 처리는 12h/12h, 14h/10h, 16h/8h, 그리고 18h/6h 시간으로 하였으며 정식 후 24일간 재배시험 하였음
- 시험의 결과, 광주기 12h/12h처리에서 *N. benthmiana*의 생육이 51g으로 가장 낮았으며 다른 세 처리의 광주기에서 70g을 상회하는 생체중을 나타내었음(그림 7)
- 한편, 항원단백질의 함량은 14h/10h와 16h/8h에서 높게 나타났으며, 광주기 12h/12h 처리와 18h/6h의 처리에서는 항원단백질의 함량이 낮았음
- 이상의 결과에서 형질전환 *N. benthamiana* 수경재배 생산 시 LEDs array(90% white +10% red)를 조사할 경우 14h/10h 내지는 16h/8h의 광주기로 조사하는 것이 바람직한 것으로 판단되었음

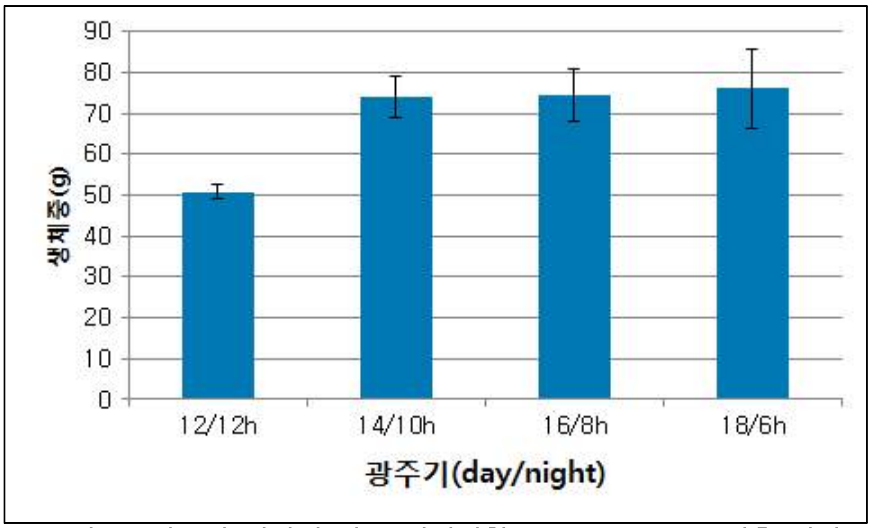


그림 7. 광주기 변화에 따른 형질전환 *N. benthamiana* 생육 변화

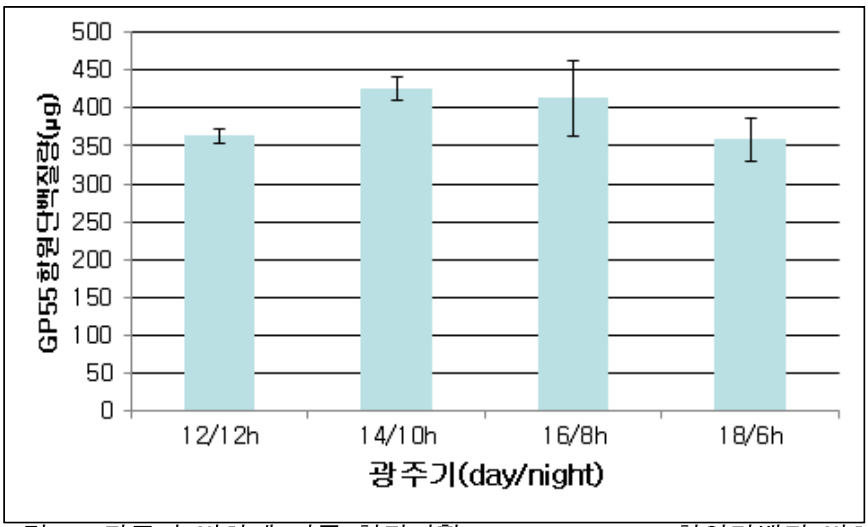


그림 8. 광주기 변화에 따른 형질전환 *N. benthamiana* 항원단백질 변화

다. CO_2 공급에 따른 *N. benthamiana* 생육과 항원단백질 함량에 미치는 영향

(1) CO2 공급농도 처리에 따른 형질전환 *N. benthamiana* 생육 변화

○ *N. benthamiana*의 광합성과 생장에 필요한 CO2의 적정 농도를 구명하기 위해 본 시험을 실시하였음

- 시험에 이용된 CO2는 99.95% 의료용으로 정제농축된 제품으로 기체상의 성분을 확인하기 위해 폴리에틸렌 필름에 포집하여 GC-MS/MS로 정성분석 하였음(그림 13)
- 정성분석 결과, 일산화탄소, 에틸렌 등 ppm단위의 유해한 물질은 확인 되지 않았음
- 24일간 육묘한 유묘를 식물생장상 내에 직경 9cm pot에 정식하였으며 온습도 및 양액관리는 관행방법과 동일하게 하고 CO2 농도만 다르게 설정하여 공급하였으며 CO2 농도는 무처리(ambient), 700ppm, 그리고 1,000ppm으로 설정하였음.

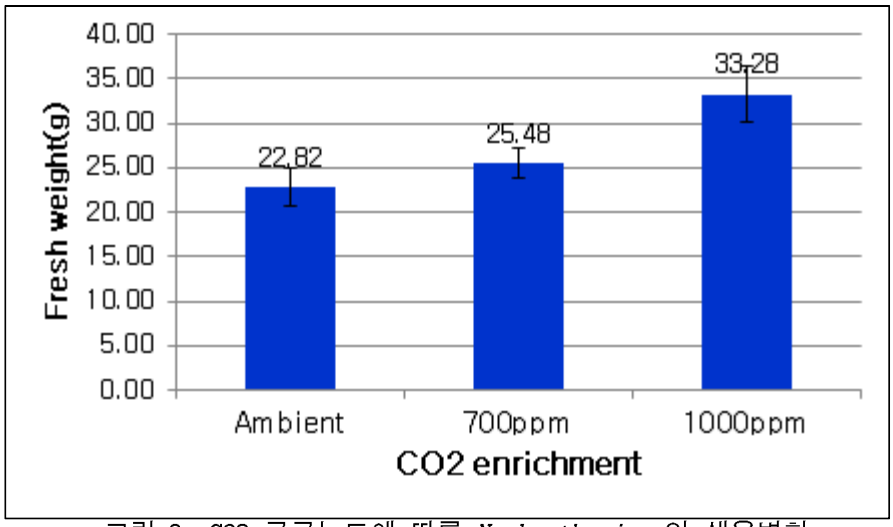


그림 9. CO2 공급농도에 따른 *N. benthamiana*의 생육변화

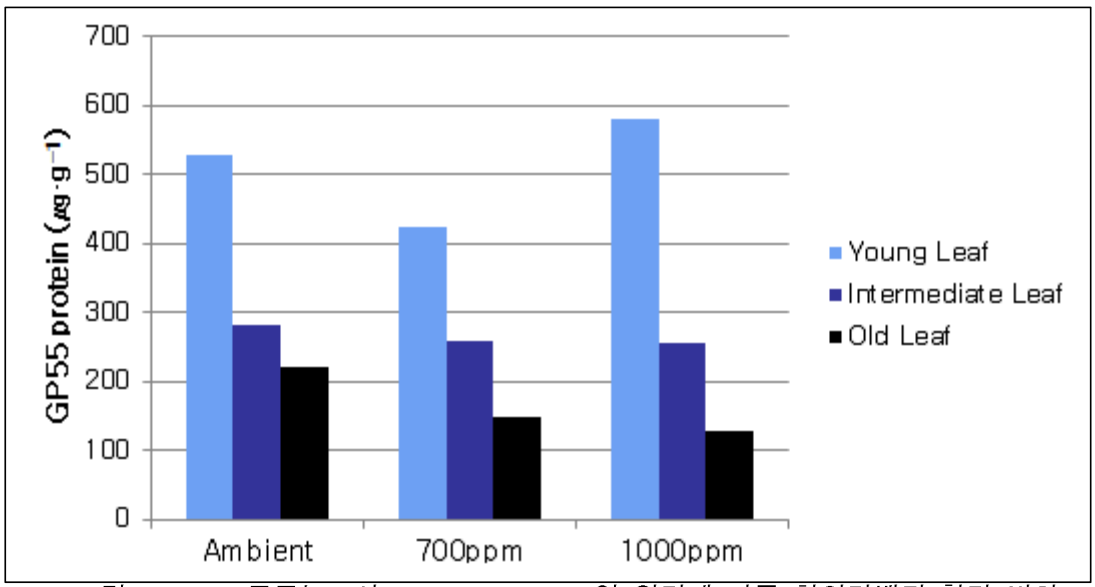


그림 10. CO2 공급농도와 *N. benthamiana* 엽 월령에 따른 항원단백질 함량 변화

○ 재배시험 결과, 무처리구에서는 *N. benthamiana* 생체중이 22.8g으로 가장 낮게 나타났음

- 한편 700ppm으로 CO2 공급한 처리구에서는 25.4g로 그 다음 순이었으며, 1,000ppm으로 공급한 처리에서 *N. benthamiana*의 생체중이 33.2g으로 가장 무겁게 나타났는데, 이는 무처리에 비해 각각 11%와 45%의 생체중 증가를 유도하였음
- 항원단백질의 함량은 잎을 월령별로 각각 구분하여 분석하였는데 각 처리 공히 신엽에서 단백질의 함량이 높게 나타났으며 노엽에서 상대적으로 단백질의 함량이 낮게 나타났음
- CO2농도 처리간의 차이는 크게 나타나지 않아 생체중의 증가를 유도하는 1,000ppm의 공급이 *N. benthamiana*의 재배생산에는 바람직 한 것으로 사료되었음

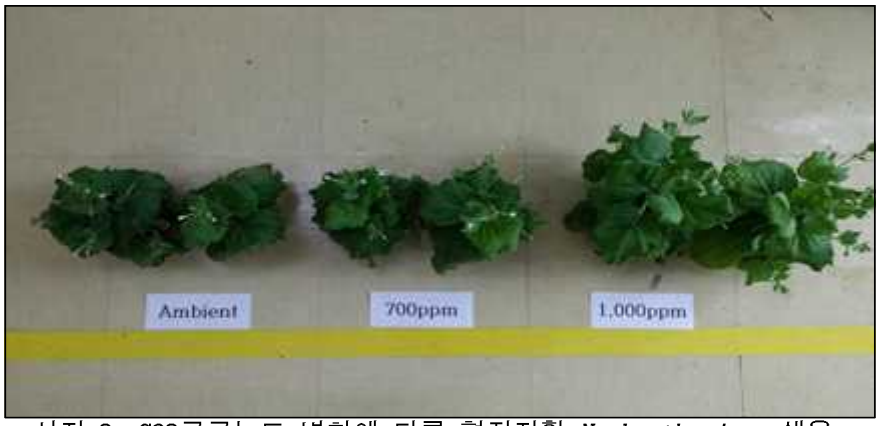


사진 2. CO2공급농도 변화에 다른 형질전환 *N. benthamiana* 생육

○ 고농도 CO2공급에 따른 *N. benthamiana*의 생육변화를 조사하고자 식물생장상을 이용하여 시험을 수행하였음

- 본 시험은 파종 24일된 유묘와 파종 34일된 묘를 각각 이용하였음. 일반적으로 고농도의 CO2는 작물에 기체장해를 유도하는 것으로 알려져 있는데 본 시험의 결과에서도 생리적 장해가 발생되었음(사진 3)
- 무처리에 비해 5,000ppm의 고농도 CO2처리에서는 유묘의 월령과 관계없이 잎의 엽록소 함량과 생체중을 감소시키는 것으로 나타났으며(그림 11과 12) *N. benthamiana*의 수경재배 생산시 CO2농도가 과하게 높게 나타나면 생리적 장해를 입을 수 있으니 고농도 처리나 농도조절에 있어 유의할 필요가 있는 것으로 판단되었음

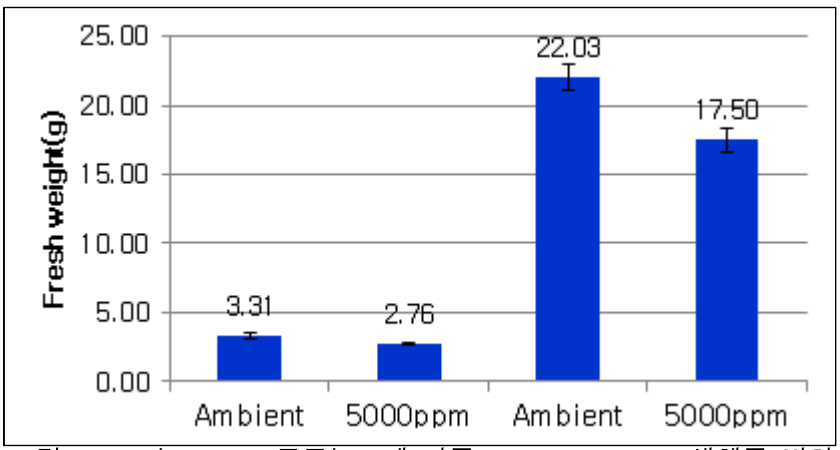


그림 11. 고농도 CO2 공급농도에 따른 *N. benthamiana* 생체중 변화

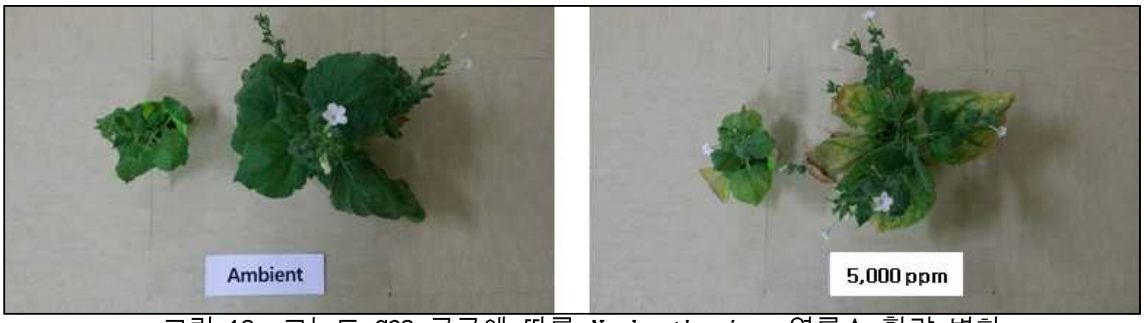


그림 12. 고농도 CO2 공급에 따른 *N. benthamiana* 엽록소 함량 변화

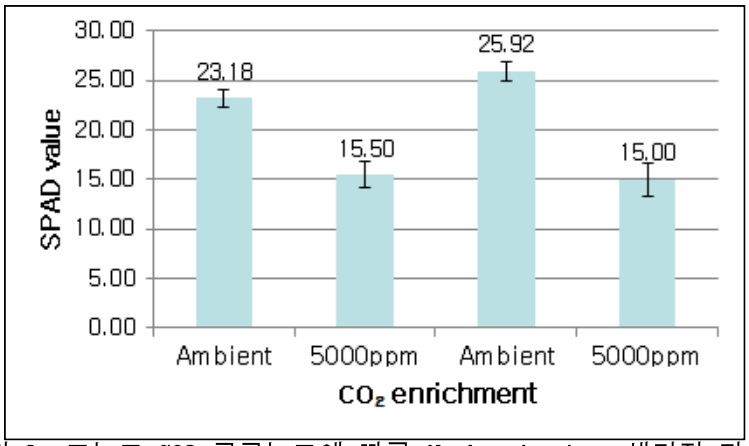


사진 3. 고농도 CO2 공급농도에 따른 *N. benthamiana* 생리적 장해 현상

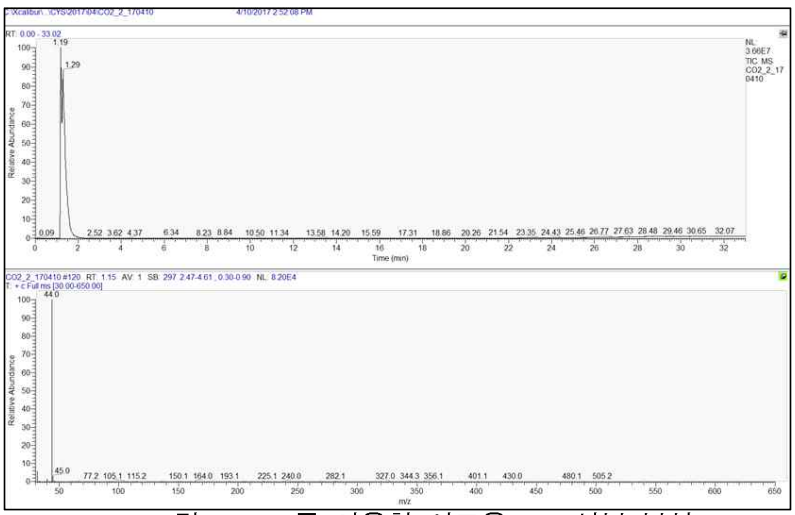


그림 13. GC를 이용한 의료용 CO2 성분 분석

라. *N. benthamiana* 영양번식 체계 확립

(1) 배지종류에 따른 경삽이 *N. benthamiana*의 발근에 미치는 영향

○ 본 시험은 *N. benthamiana*의 경삽시 배지의 종류가 발근에 미치는 영향을 구명하고자 수행하였음

- 경삽을 실시하기 위해 20g 이상의 개체를 대상으로 적심을 하고 생장점으로부터 5cm 이하 줄기를 cutting하여 삽수로 이용하였음. 배지는 암면, 그로우폼, 원예용복합상토, 버미큘라이트, 버미큘라이트 50%+펄라이트 50% 혼용배지를 각각 이용하였음

- 삽목을 실시한 다음 광원은 50㎛ol/cm/s로 유지하고 상대습도 70% 그리고 온도는 25℃로 유지하였으며 발근율을 조사하기 위해 삽목 후 10일째 수확하여 발근율을 조사하였음
- 삽목 실시 10일 후 발근에 미치는 영향은 그림 14에 나타내었음. 암면과 상토에서의 발근율이 40%와 31%를 나타내었으며 그로우폼과 버미큘라이트는 전혀 발근이 되지 않았음
- *N. benthamiana*의 발근율을 높이기 위한 발근촉진제 적용 필요성이 있는 것으로 판단되었음

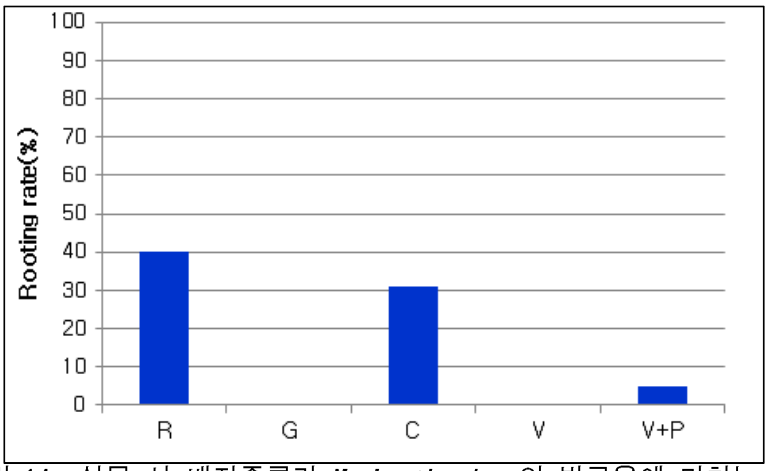


그림 14. 삽목 시 배지종류가 *N. benthamiana*의 발근율에 미치는 영향

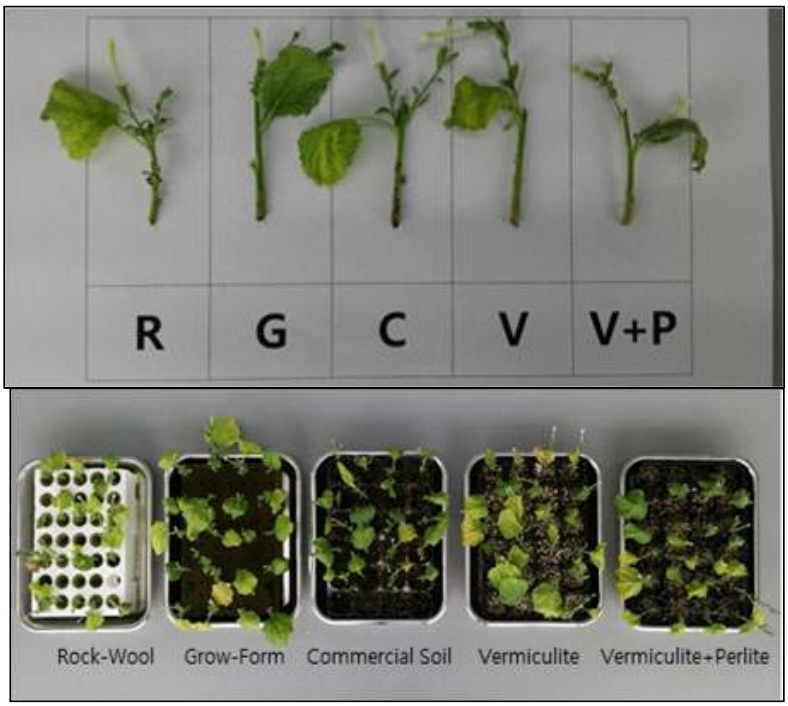


사진 4. 배지종류에 따른 경삽이 *N. benthamiana*의 발근에 미치는 영향

(2) 발근촉진제의 종류와 처리농도에 따른 삽목이 *N. benthamiana*의 발근에 미치는 영향

○ 경삽실시 결과에서 암면배지와 원예용상토에서 *N. benthamiana*의 발근이 확인되어 두 배지를 이용하여 발근 식물호르몬인 IBA와 식물발근촉진제인 루톤(동부한농제품)을 두 농도(100mg/L와 1,000mg/L)에 침지처리하여 10일 후 발근율과 삽목번식 가능여부를 조

사하였음

- 우선 원예용상토를 배지로 하여 IBA와 루톤에 침지처리한 시험구에서는 무처리구와 큰차이없는 발근율을 나타내었으며 발근율이 40%이하로 나타나 삽목에 효과적이지 못하였음(그림 15, 사진 4).
- 한편, 암면배지의 경우 루톤과 IBA 침지처리가 무처리에 비해 발근율이 유의적으로 높게 나타났으며 IBA침지 처리에서 발근율이 80% 이상 되는 것으로 확인하였음(그림 16). 특히, 근장은 IBA 1,000mg/L의 침지처리에서 길게 나타나는 것을 확인 할 수 있었음(사진 5)
- 그러나 본 시험의 결과에서 삽목 실시 10일째까지 신초와 신엽의 전개는 유도되지 않아 삽목을 통한 영양번식은 *N. benthamiana* 의 대량생산을 위한 방법으로 적합하지 않은 것으로 판단되었음

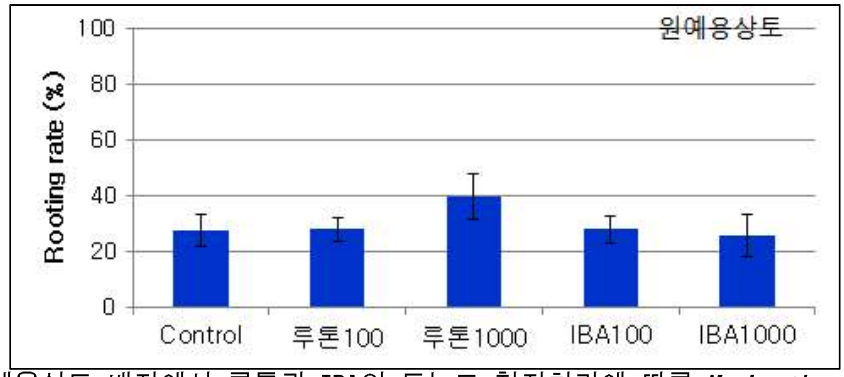


그림 15. 원예용상토 배지에서 루톤과 IBA의 두농도 침지처리에 따른 *N. benthamiana*의 발근율

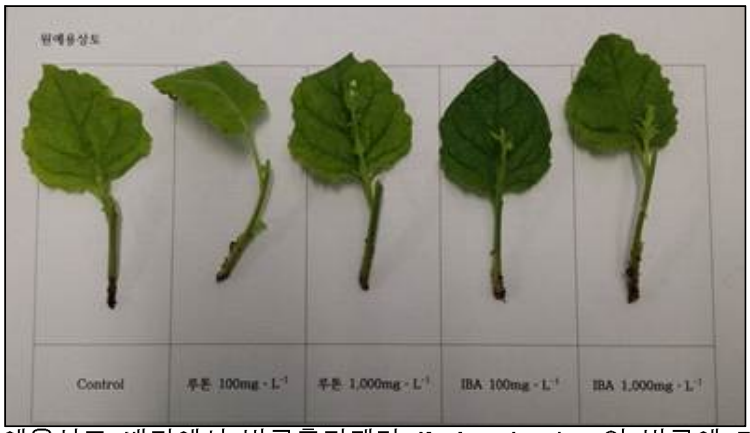


사진 5. 원예용상토 배지에서 발근촉진제가 *N. benthamiana*의 발근에 미치는 영향

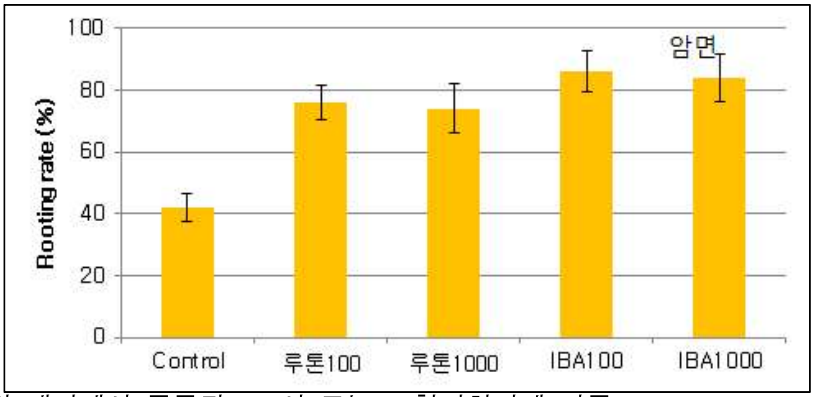


그림 16. 암면 배지에서 루톤과 IBA의 두농도 침지처리에 따른 *N. benthamiana*의 발근율

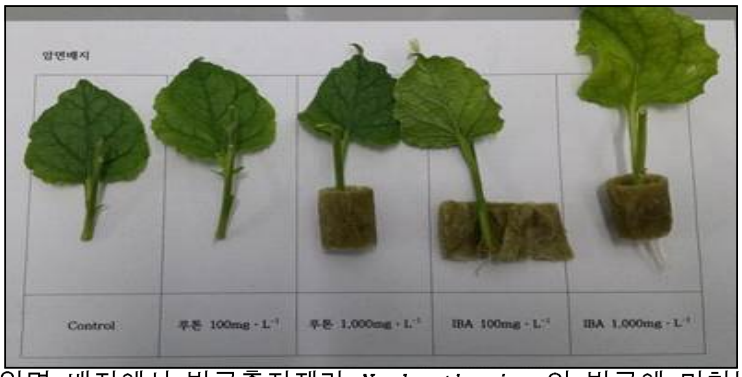


사진 6. 암면 배지에서 발근촉진제가 *N. benthamiana*의 발근에 미치는 영향

마. *N. benthamiana* 생육시기에 따른 잎의 항원단백질 함량 변화

(1) 형질전환 *N. benthamiana* 잎의 월령별 항원단백질의 함량 조사

○ 본 조사는 *N. benthamiana* 수확기 80g이상 되는 개체에 한하여 잎의 월령을 상위 신엽, 중엽 1, 중엽 2, 하위 하엽으로 나뉘어서 GP55 항원단백질의 함량을 조사하였음. 시료는 엽장이 7cm이상 확보되는 잎을 선발하여 분석하였음

- 본 시험의 결과는 그림 15에 나타내었음. 상부 생장점 주위에 있는 신초엽에서 항원단백질의 함량이 유의성 있게 높았으며 중위엽 (5번~8번)은 낮게 나타났음
- 한편, 하위 엽의 경우 항원단백질의 함량은 상위엽의 12%정도만이 있는 것으로 조사되었음
- 본 시험의 결과에서와 같이 형질전환 *N. benthamiana*의 잎의 월령별 항원단백질의 함량이 다르게 나타나는 것으로 확인되어 적심처리에 따른 신초엽을 생산해내는 경종적 재배방법 확립이 필요할 것으로 판단되었음

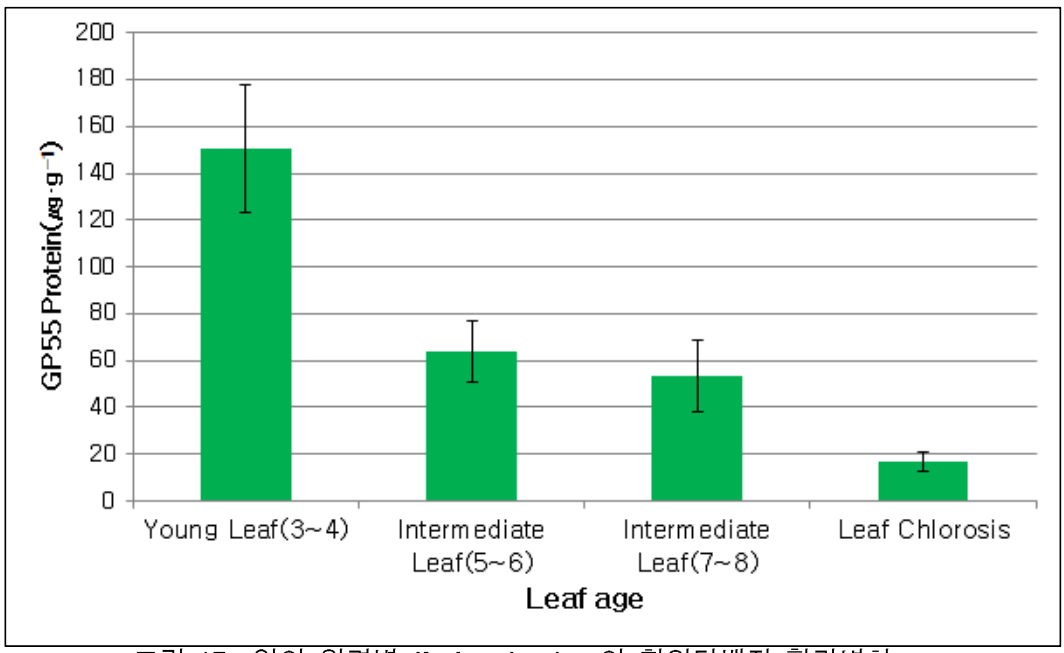


그림 17. 잎의 월령별 *N. benthamiana*의 항원단백질 함량변화

3. 돼지열병 그린마커백신 산업화를 위한 원료식물의 주년재배 시스템 확립 및 생산 자동화 요소기술 개발

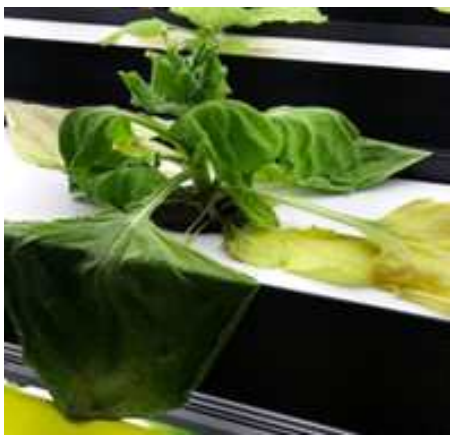
가. 생리적 장해 및 기계적 상해 예방을 위한 재배관리 기술 확립

(1) 고온 stress에 따른 *N. benthamiana* 생육과 생리적 장해에 미치는 영향

○ 본 시험은 인공광원을 이용한 밀폐형 식물공장에서 빈번히 야기되는 내부 온도상승에 따른 식물의 생육에 미치는 영향을 조사하고자 수행되었음 본 시험은 Pilot-Plant의 순환식 박막수경재배시스템에서 이루어졌으며 공조장치의 온도설정은 순환된 공기가 배기되는 곳의 센서에 의해 제어되었다. 사진 1에서 나타난 바와 같이 Pilot-Plant내에 *N. benthamiana*의 개체가 지상부의 잎이 마르며 위조현상이 나타나는 경우가 자주 야기되고 있었다. 일반적으로 식물은 생육적온을 벗어난 고온스트레스에 노출되면 활성산소종의 생성으로부터 야기되는 지질과산화와 세포막의 변성이 진행된다(Foyer et al., 1994; Liu et al., 2008). 한편, 재배단별 온도를 측정한 결과(그림 1), 설정온도와는 다르게 하단부터 상단부에 이르기까지 온도가 직선상 상승양상을 나타내었다. 특히 최상층재배대인 4단에서는 무려 33℃에 이르렀다. *N. benthamiana*의 경우 생육한계온도에 대한 선행연구 결과는 없지만, 가지과작물에 있어 32℃를 고온한계온도로 규정하고 있다(www.nongsaro.go.kr/portal/ps/psr/psrb). 따라서 밀폐형 식물공장의 경우 인공광원의 발열과 공조시스템의 특징을 고려하여 작물체온을 기준으로 온도설정이 이루어져야 할 것으로 판단된다.

○ 밀폐형 Pilot-Plant를 이용하여 *N. benthamiana*의 연속재배생산 하는 경우 주간온도의 상승이 나타날 수 있고 주간온도의 상승을 적정범위로 제어 하지 않은 경우 사진 1에서와 같이 지상부의 잎이나 줄기가 마르는 현상이 나타날 수 있다. 따라서 인공광원의 발열과 밀폐형 공조장치의 경우 환기 및 필터부분에 대한 상시점검과 주간온도의 적정범위 설정 및 제어를 위한 조치가 필요할 것으로 생각되었다.

<정상개체>



<비정상개체>

사진 1. 시설내부 온도상승에 따른 비정상개체 발생현상

(2) 배양액 온도에 따른 *N. benthamiana* 생육과 생리장해에 미치는 영향

○ 그림 1은 공조시스템의 온도설정(25℃)하에서 순환되는 배양액 온도를 연속하여 측정한

결과이다. 밀폐형 식물공장 내 대기온도가 30℃로 상승하는 경우 측정되는 배양액의 온도가 25℃로 나타났다. 상추를 이용한 수경재배 시 배양액의 온도설정에 따른 상추의 생육과 품질을 살펴본 Nam과 Kwon(1997)의 결과에서 25℃의 배양액은 상추의 잎품질이 낮아지고 생육이 불량하다고 보고하였다. 본 실험의 결과에서는, chiller의 적용을 통해 배양액의 온도를 22℃이하로 낮출 수 있었다.

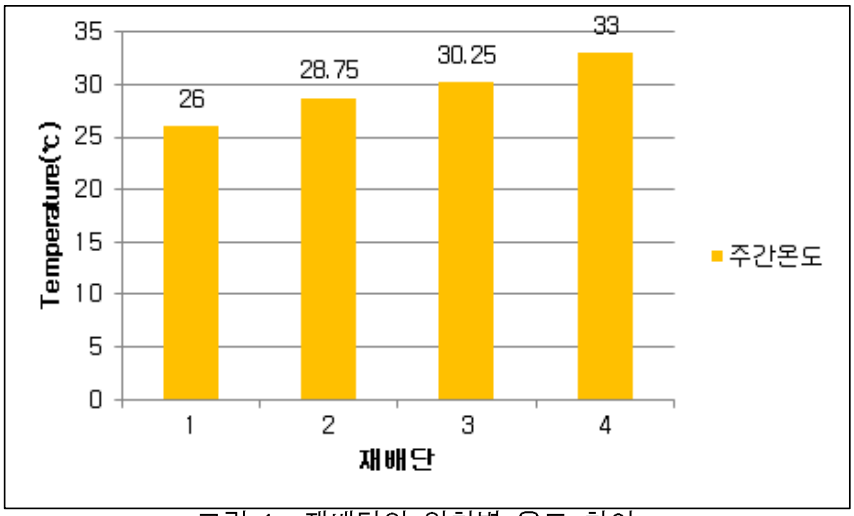


그림 1. 재배단의 위치별 온도 차이

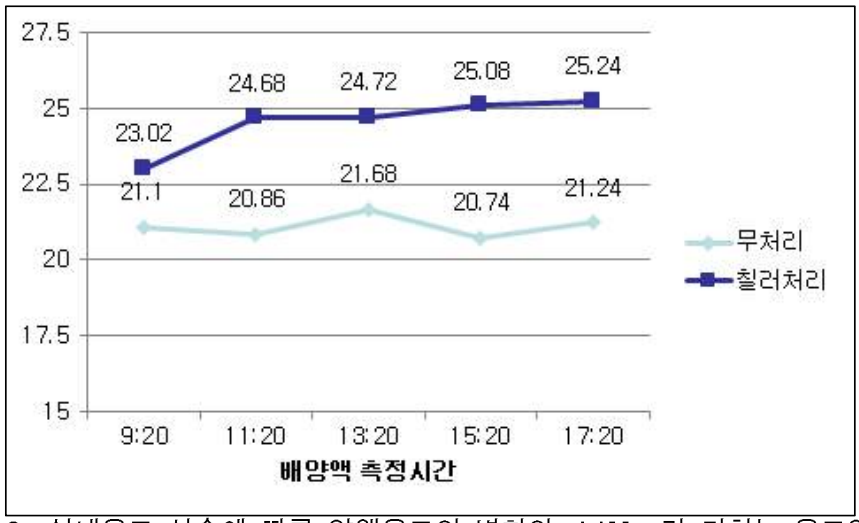


그림 2. 실내온도 상승에 따른 양액온도의 변화와 chiller가 미치는 온도영향

(3) 공조장치 설정온도와 air circulation 가동에 따른 내부온도 변화

○ 그림 3는 밀폐형 식물재배시설의 공조장치 설정온도와 air-circulation가동 유무가 작물체 군락사이의 온도에 미치는 영향을 조사한 결과이다. 그림 1에서 나타난 것처럼 설정온도 25℃에서는 재배단의 온도가 26-33℃로 실제 작물체의 군락내부온도는 설정온도보다 약 1℃에서 8℃까지 높다. 이러한 온도상승에 따라 형질전환 담배의 고온에 의한 생리적 장해 발생(사진 1)이 나타나게 되는 것으로 사료되었다. 시설내부의 온도상승이 지속되면 작물은 기공을 열어 증산을 통해 체온을 낮추게 되지만 임계치에 다르면 오히려 기공을 닫아 체내의 수분손실을 억제하려고 한다. 이와 같은 현상이 지속이 되면 위조현상이 나타나게 되고 심하게 되면 고사에 이르기까지 한다(Aphalo and Sánchez., 1986;

Nautiyal et al., 1994)). 따라서 본 실험에서는 공조장치의 온도설정을 다르게 하고 air-circulation을 작동시켜 작물체의 군락내부에 미치는 온도 영향을 살펴보고자 하였다.

○ 설정온도 24℃의 경우 주간온도의 최고치는 28.05℃로 최상위 재배대에서 확인되었다(그림 1). 공조장치를 통한 공기의 흐름이 하부에서 상부로 올라가는 현상에 기인된 결과로 생각된다. 설정온도 25℃와 비교해보면 최고온도가 5℃정도 낮아지는 것으로 나타났다. 설정온도를 23℃로 낮추었을 경우 주간온도의 변화는 24℃보다 다소 낮아졌다. 그러나 야간온도의 변화는 크지 않았다. 따라서 주간온도의 상승은 인공광원의 발열에 의해 크게 영향을 받는 것으로 생각된다. 일반적으로 백열등이나 메틸할라이드에 비해 LEDs는 발열이 적고 내구성도 뛰어난 것으로 시설재배에서 널리 이용되고 있다(Jeong et al., 2012; Jeong et al., 2014).

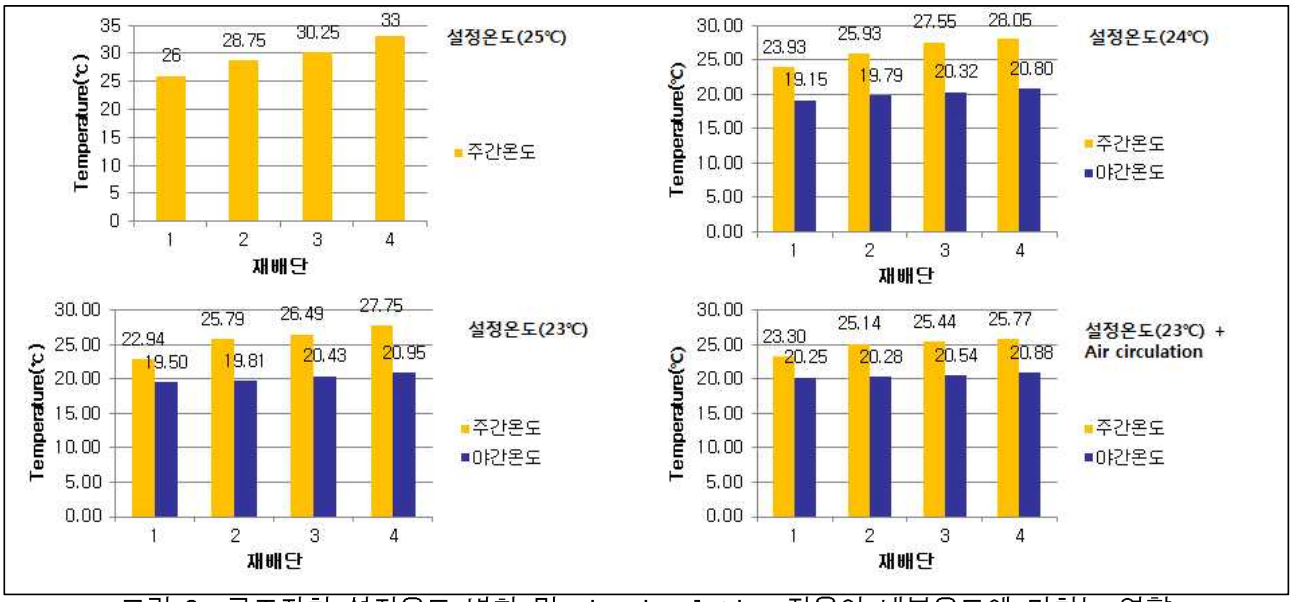


그림 3. 공조장치 설정온도 변화 및 air circulation 적용이 내부온도에 미치는 영향

○ 주간 시 작물의 군락 내 온도를 일반원예작물의 생육적온으로 낮추기 위하여 공조장치의 설정온도를 23℃로 하고 air-circulation에 대한 효과를 살펴보고자 하였다(그림 3). Air-circulation을 작동하지 않은 처리에서의 주간온도는 재배단수에 따라 22.9℃에서 27.8℃까지의 분포를 나타내었다(그림 3). 반면 야간온도는 21℃이하로 주간온도와의 차이가 있었다. 한편, Air-circulation을 작동시킨 처리에서는 그림 3에 나타나있는 것처럼 주간온도의 범위가 23.3℃에서 25.7℃로 한정되어 온도편차가 낮아졌으며, 원예작물의 생육적온의 범위 내에 분포되었다. 주간온도의 상승은 작물의 호흡율을 상승시키고 호흡에 따른 많은 동화산물로 유래된 에너지를 사용하게 되어 작물은 생장량이 둔화되게 되고, 주간온도의 상승범위가 고온의 스트레스에 달하게 되면 과다한 증산량의 야기나 기공의 폐쇄로 인해 결국 고사에 이르는 등 생육장해를 나타낼 수 도 있다(식물생리학, 2006). 본 실험에서는 다양한 온도실험을 수행하지 못하여 *N. benthamiana*의 생육적온을 구명하지는 못하였으나, 일반 원예작물의 적정 생육적온을 고려할 때 밀폐형 온실이나 식물공장에서 *N. benthamiana*의 재배에서는 공조장치를 가동할 경우 설정온도의 면밀한 검토와 온도의 상승에 따른 공기순환장치의 도입을 적극 고려해볼 필요가 있는 것으로 생각되었다.

(4) 단근(root pruning)처리가 *N. benthamiana* 생육에 미치는 영향

○ *N. benthamiana*의 정식 5주차 지하부의 생육을 확인해보면(사진 2), 길이생장에 따른 뿌리 엉킴이 발생되었다. 뿌리의 엉킴으로 인해 거터 내 배양액이 막히거나 수확 이 용이하지 못하는 등 문제점이 발생되는 것을 확인하였다. 이러한 문제를 해결하기 위해 정식 후 단근처리를 하여 지하부의 과다한 길이생장을 억제시키고자 하였다. 실험은 *N. benthamiana*의 정식 2주와 3주 후 단근처리를 실시하였으며 2.5cm와 5.0cm 또는 5.0cm와 7.5cm의 길이로 각각 단근처리 하였다.

사진 2. 수확기 지하부 뿌리 끊어짐 현상

사진 3. *N. benthamiana*의 수경재배 시 단근처리

○ 본 실험의 결과는 그림 4와 같다. 정식 2주 후 단근처리 실시에서 2.5cm 단근처리의 경우 지상부의 생육이 크게 억제되었으며, 5.0cm의 처리에서도 무처리에 비해 지하부의 생장이 크게 억제되었으나 지상부생육도 억제되어 정식 2주 후 단근처리는 효과적이지 않은 것으로 생각되었다. 딸기재배 시 정식초기 지하부의 50% 단근처리는 딸기의 생육과 과실의 수량을 크게 억제시킨다고 하였다(Choi et al., 2017). 한편, 정식 3주 후 단근처리를 수행한 결과, 5.0cm 단근처리에서는 역시 지상부의 생육과 지하부이 무처리에 비해 억제되었다. 그러나 7.5cm 단근처리에서 지상부의 생육에는 유의성 있는 차이 없이 지하부의 생육을 억제시키는 것으로 확인되었다. *N. benthamiana*의 박막수경재배 시스템을 이용하여 생산할 경우 정식 5주 이상 시간이 경과할 경우 지하부의 과다한 길이생장으로 문제점들이 발생할 수 있다. 따라서 정식 3주 후 지하부의 길이 7.5cm에서 단근처리는 상기의 문제점들을 해결할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나, 단근처리 시 기계적 상처에 의한 세균감염과 재배자의 추가 작업이 필요한 점을 고려하여 할 것으로 생각되었다.

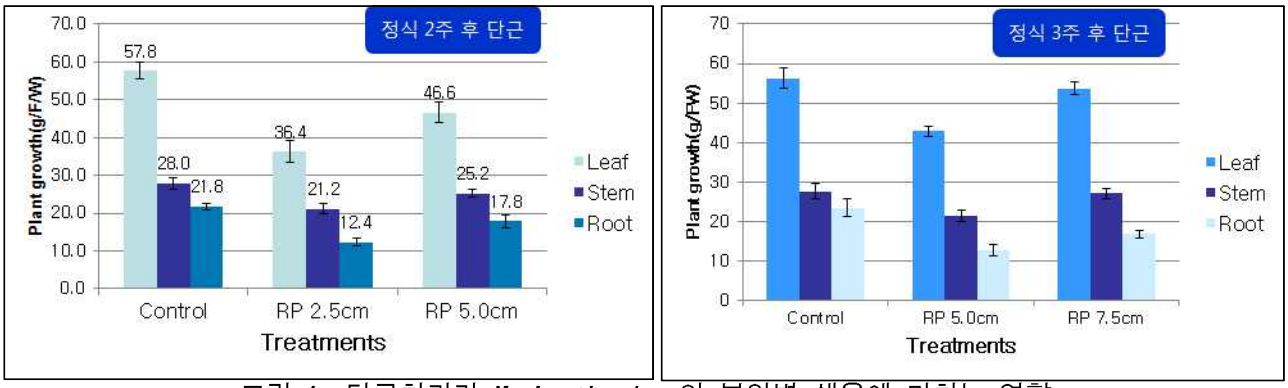


그림 4. 단근처리가 *N. benthamiana*의 부위별 생육에 미치는 영향

나. 항원단백질 양적 변화 최적화를 위한 적심처리

(1) 적심의 정도가 *N. benthamiana* 생육 및 항원단백질 함량에 미치는 영향

○ 2차년도의 실험결과에서 형질전환 *N. benthamiana*의 수경재배 시 잎의 월령에 따른 항원단백질의 함량차이가 현저하게 나타났으며, 오래된 잎에서의 단백질 함량이 신초에 출현되는 신엽보다 낮았다. 따라서 신엽을 더 많이 출현시키는 것이 개체당 항원단백질의 총량을 증진시킬 수 있을 것이라고 판단되었다. 본 실험에서는 적심을 통한 신엽을 출현시키고 개체당 생육과 항원단백질의 함량을 조사하여 효율적인 재배방법을 구명하고자 하였다.

○ 적심처리를 위해서 본 실험에서는 적심의 처리정도(생장점으로부터 적심 깊이)와 처리시기를 나누어 수행하였다.

표 1. 적심처리의 정도가 *N. benthamiana* 생육에 미치는 영향

Treatment	Plant height(cm)	Fresh weight(g)		Total FW(g)	No. of Leaves
		Leaf	Stem		
무처리(1)	17.5±2.3a[z]	58.3±8.2ab	41.7±7.5a	99.0±11.4a	30.5±3.4b
생장점下 2cm적심(2)	14.3±1.8b	68.7±4.3a	35.7±7.3a	104.3±4.9a	37.0±1.3a
생장점下 7cm적심(3)	11.6±1.7c	50.5±7.7b	20.9±4.4b	71.4±8.1b	28.5±3.6b

[z]Values with the same letter within column are not significantly different at $p<.05$ according to Tukey's H.S.D. test.

사진 4. 적심 정도에 따른 *N. benthamiana* 생육

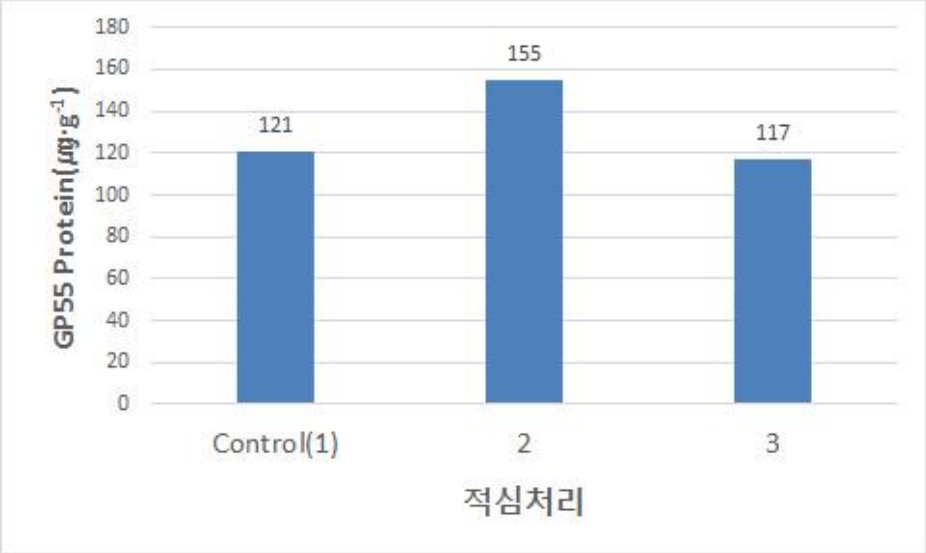


그림 5. 적심처리 정도에 따른 잎과 줄기의 항원단백질 함량 차이

○ 표 1과 사진 4는 적심의 처리정도가 *N. benthamiana*의 생육에 미치는 영향을 조사한 결과이다. 본 실험에서는 정식 15일 후 적심을 실시하였다. 정식 5주째 수확을 실시하고 생육조사를 한 결과, 생장점아래 2cm적심처리는 지상부의 생육이 무처리와 큰 차이를 나타내지 않은 반면 생장점아래 7cm적심처리에서 지상부의 생육을 크게 감소시켰다. 특히, 초장을 37% 억제시켰으며 잎과 줄기의 감소도 현저하였다. 한편, Jeong et al. (2006)의 숙근안개초의 적심처리 연구결과에서는 적심처리가 측지의 발달을 유도하여 절화량 및 뿌리의 생장을 촉진시킨다고 하였다. 적심처리에 따른 잎과 줄기의 항원단백질 함량을 분석하였다(그림 5). 무처리에 비해 신엽의 발생량이 많은 적심처리구의 잎에서 항원단백질의 함량은 높았으나 생장점 7cm아래 적심처리구의 지상부에서 항원단백질의 함량은 무처리와의 차이가 없었다. 줄기의 경우 항원단백질의 함량이 다르게 나타나 추후 면밀한 검토가 필요할 것으로 생각되었다. 본 연구의 결과를 통해 적심시기가 *N. benthamiana*의 생육과 항원단백질 함량에 미치는 효과를 추가 조사해야할 필요성이 있다고 판단하여 2차 시험을 수행하였다.

(2) 적심의 처리시기가 *N. benthamiana* 생육 및 항원단백질 함량에 미치는 영향

○ 2차 적심실험에서는 적심의 처리정도를 생장점으로부터 2cm아래에서 실시하고 정식 후 15일째와 정식 후 22일째 각각 처리하는 것으로 시기를 달리하였다. 정식 15일째 적심처리는 무처리와 비교하여 초장만 다소 억제시켰을 뿐 잎과 줄기의 무게에서 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다(표 2). 신엽의 경우 정식 15일째 적심처리한 경우 무처리에 비해 9장 정도가 많이 출현되는 것을 확인하였다. 반면, 정식 22일째 적심처리한 경우 지상부의 생육이 무처리에 비해 다소 억제되었으며 신엽의 발생정도도 무처리와 차이가 없어 신엽생장을 촉진하는 적심은 정식 15일째 수행하는 것이 바람직 한 것으로 생각되었다.

○ 적심의 처리시기가 *N. benthamiana*의 항원단백질에 미치는 영향을 조사한 결과는 그림 6과 같다. 항원단백질의 함량은 적심처리구에서 무처리에 비해 높게 나타났으나, 시기간 큰 차이를 나타내지 않았다. 따라서 *N. benthamiana*의 생육에 부정적인 영향을 미치지

않고 항원단백질의 함량을 높일 수 있는 정식후 15일에 생장점아래 적심하는 것이 항원단백질을 고함량으로 축적시켜 생산해 낼 수 있는 경종적 방법으로 선택할 수 있을 것이라 생각되었다.

표 2. 적심의 처리시기가 *N. benthamiana* 생육 및 항원단백질 함량에 미치는 영향

Treatment	Plant height(cm)	Fresh weight(g)		Total FW(g)	No. of Leaves
		Leaf	Stem		
무처리(A)	16.9±1.7a	51.3±6.8a	35.4±5.1a	86.7±9.4a	30.2±4.6b
정식 15일(B)	14.2±1.3b	55.6±7.8a	31.2±3.0a	86.7±6.9a	39.0±2.6a
정식 22일(C)	11.6±1.7c	31.3±9.7b	19.2±1.5b	50.5±10.3b	28.7±4.5b

[z]Values with the same letter within column are not significantly different at $p<.05$ according to Tukey's H.S.D. test.

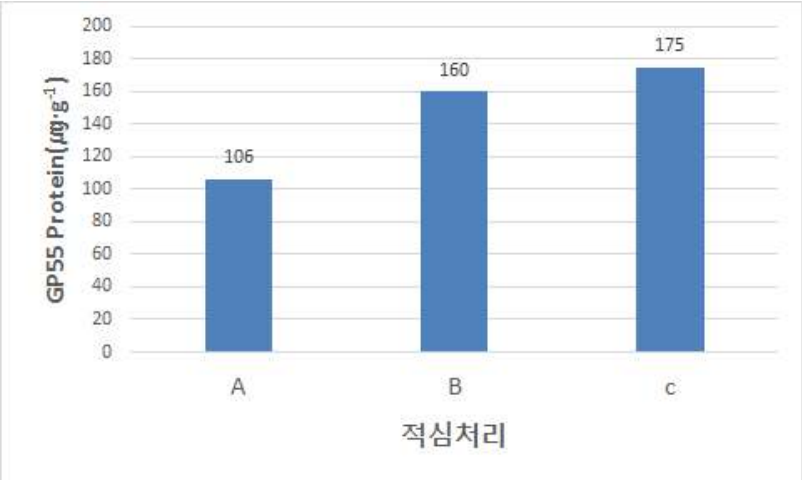


그림 6. 적심의 처리시기에 따른 *N. benthamiana* 의 잎과 줄기 항원단백질 함량

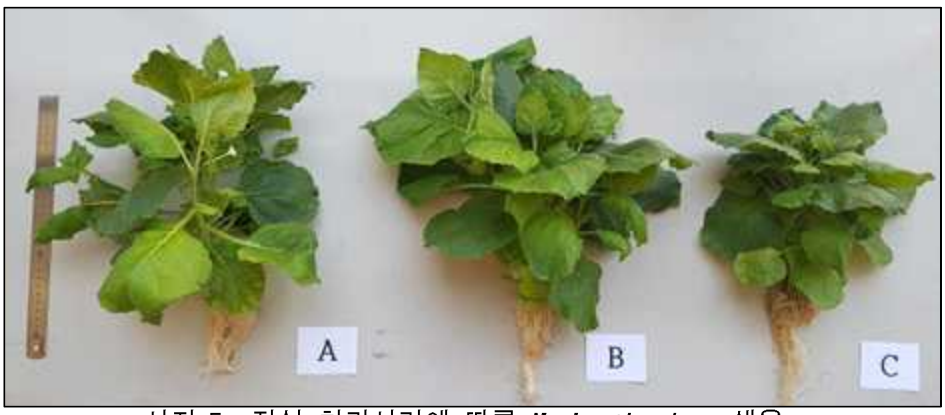


사진 5. 적심 처리시기에 따른 *N. benthamiana* 생육

다. 파종 생력화를 위한 채종조건 확립 및 자동화 요소기술 개발

(1) *N. benthamiana* 종자의 채종시기가 발아율에 미치는 영향

○ 형질전환 *N. benthamiana*의 파종자동화 기술을 확립하기 위해 종자의 채종조건과 저장

조건에 대해 조사하고자 하였다. 본 실험은 온도와 습도가 조절되고 인공광원으로 광도와 광주기를 제어할 수 있는 식물생장상에서 수행되었다. 종자의 파종방법 및 치상 후 관리는 일반원예작물의 파종관리 방법을 준용하였다.

○ 채종은 *N. benthamiana*의 개화 후 화판이 열리지 않은 상태의 종자를 탈리전 종자로, 꽃잎에서 종자가 자연 탈리된 종자를 탈리종자로, 그리고 자방속에서 탈리되기 직전의 종자를 자방속종자로 하였다. 종자는 발아시험 전까지 암상태 4℃ 저온저장을 하였다.

○ 그림 1은 종자의 채종시기별(숙기에 따른) 발아시험의 결과이다. 탈리전 종자를 채종하여 치상한 시험구의 경우 발아율이 41%였다. 반면, 탈 리가 이루어진 종자와 자방속 종자는 발아율이 90%이상이었으며, 발아세의 경우에서도 평균발아소요일수가 각각 4.1일과 4.3일로 나타났다. *N. benthamiana*의 채종시 종자를 선별할 경우 완전 탈 리가 유도된 종자나 자방속에서 녹숙기가 끝난 종자를 수확하여 저온저장하는 것이 바람직 한 것으로 판단되었다.

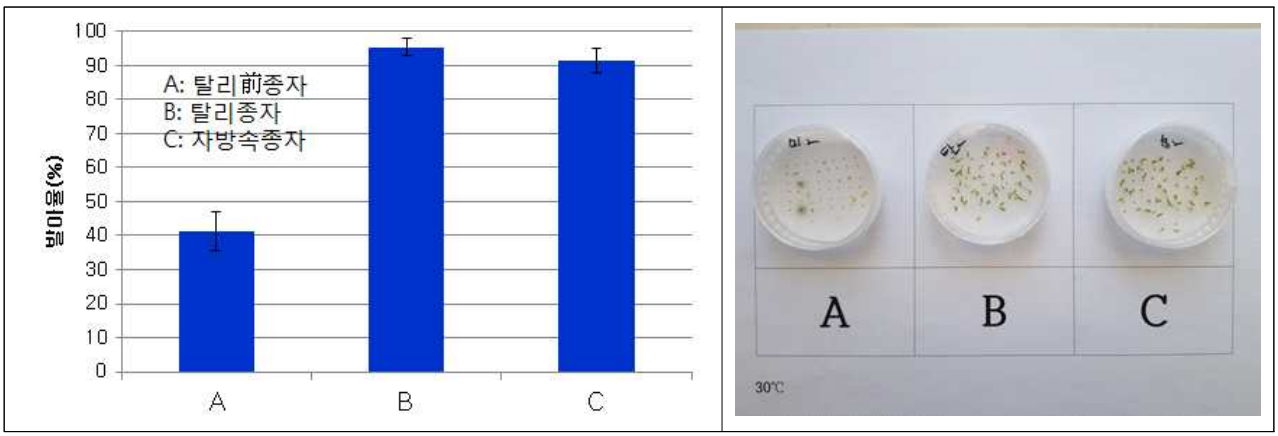


그림 1. 채종시기가 *N. benthamiana*의 발아율에 미치는 영향

(2) *N. benthamiana* 종자의 저장기간이 발아율에 미치는 영향

○ 그림 2는 *N. benthamiana* 종자의 탈리가 이루어진 종자를 채종하여 저장하고 저장기간별 발아시험 수행 결과이다. 종자의 저장은 저온저장고 4℃ 암상태로 하였다. 숙기가 끝난 종자의 경우 채종 후 저장기간을 최대 12개월까지 실험에 적용하였다. 실험의 결과 12개월이 경과한 종자에서도 발아율은 85%를 나타내었다. 채종된 종자의 암상태 저온저장을 할 경우 1년까지의 발아성에는 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

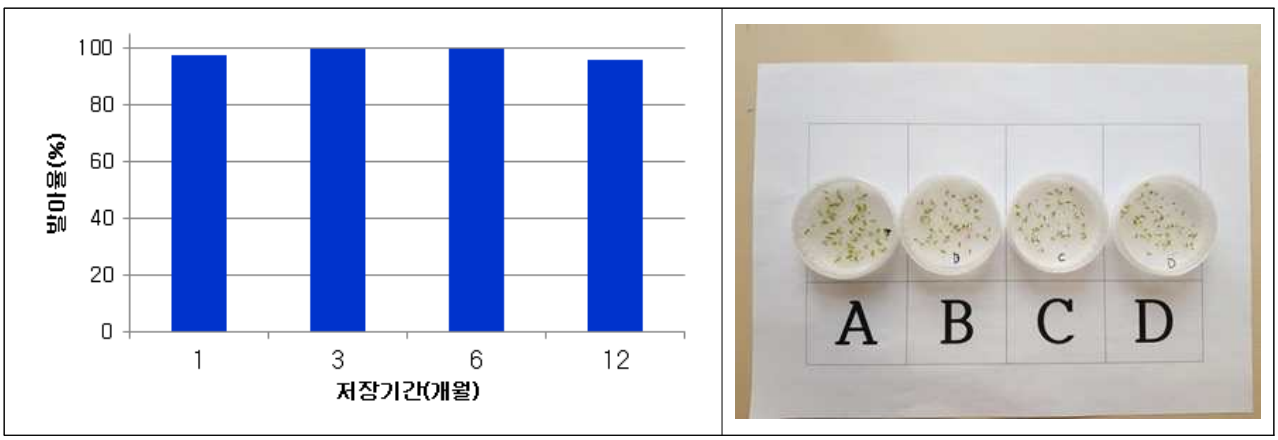


그림 2. 채종시기가 *N. benthamiana*의 발아율에 미치는 영향

(3) *N. benthamiana* 파종 자동장치 요소기술 개발

○ *N. benthamiana* 종자는 그 크기가 매우 작고 무게가 가벼워 일반 작물의 종자에 비해 파종하는데 시간과 노동력이 많이 소요된다. 원예작물의 종자중 도라지 종자크기 정도로 현미경으로 관찰하여 조사한 결과(사진 1), 종자의 직경은 2.67mm내외이고 무게는 약 6 μg 정도였다.

○ 종자의 모양은 타원형의 모양으로 표면은 다소 거칠게 이루어져 있다. 본 연구에서는 *N. benthamiana* 종자를 일반 파종기에 적용 가능한지 타당성을 검토하였다. 우선 일반파종기에 적용하려면 종자의 크기를 최소한 직경 5mm이상으로 확보해야 했다. 발아성에 부정적 영향을 미치지 않고 종자를 코팅 처리하여 크기를 5mm 이상 확보하여야 적용가능성이 있다. 그러나 점착제와 코팅제를 처리하여 종자의 크기를 확보하는 데 어려움이 있어 코팅을 통한 상용 파종기의 적용은 추진하지 않았다.

사진 1. *N. benthamiana* 종자의 크기 및 진공흡입장치를 통한 파종기

○ 따라서 본 연구에서는 진공흡착을 원리를 이용한 장치로 *N. benthamiana* 종자를 보다 빠르고 편리하게 파종하도록 시험하였다. 아크릴 판에 직경 2mm의 구멍을 전기드릴로 5cm 간격으로 만들어 진공모터를 연결한 후 진공을 걸었을 때 아크릴 판으로 *N. benthamiana* 종자가 흡착이 되었으며, 진공을 풀면 105공트레이에 안착되는 것을 확인하였다. 따라서, 진공흡착 모터와 2mm의 작은 구멍을 통해 기존 파종용 플라스틱 트레이에 연속파종을 하면 파종에 소요되는 시간과 노동력을 크게 줄일 수 있을 것으로 사료되었다.

라. 종합결론

○ 돼지열병 그린마커 백신 생산을 위한 원료식물의 주년재배 체계 확립과 생산자동화 요소기술을 개발하기 위하여 일련의 연구를 종합해 보면

○ 돼지열병 그린마커 백신 원료식물 형질전환 *N. benthamiana*의 재배생산 실험은 밀폐형 식물공장을 제작하여 별도의 재배실을 마련하고 환경제어 시스템 하에서 수행하였으며 *N. benthamiana*의 재배는 박막수경(NFT) 시스템을 적용하고, 육묘생산은 담액수경(DFT) 시스템을 적용하였음.

○ 밀폐형시설에서 형질전환 식물체의 생산은 외부보다 기압이 낮은 음압시설로 운용하여 내부의 식물체가 유출되지 않도록 하였음.

○ 형질전환 *N. benthamiana* 수경재배 생산 시 적정 재배기간은 정식이후 26일이 적정하며, 배양액은 오오츠카양액으로 공급되는 배양액의 농도는 1.0μS/cm에서 수확 1주전 1.2에서 2.0μS/cm으로 상향조정하는 것이 지상부 생체중을 향상시킬 수 있는 것으로 확인되었음.

○ 인공광원 LEDs 적용에서 광주기는 14h/day가 적정하며 이 때 광질은 백색과 적색의 혼합광이 적합한 것으로 판단되었음.

○ 생장촉진을 위한 CO2 공급은 1,000ppm의 농도가 유리할 것으로 판단되었음.

○ *N. benthamiana*의 영양번식을 위한 삽목시험 결과, 발근촉진제 처리에 의한 발근을 유도할 수 있었으나 잎과 줄기의 출현이 되지 않아 종자번식이 바람직한 것으로 사료되었음.

○ *N. benthamiana*의 *주년생산을 위한* 신엽에서 항원단백질의 함량이 유의적으로 높아 적심 재배에 따른 항원단백질 함량을 증진 시킬 수 있는 경종적 방법구명이 필요한 것으로 판단되었음.

○ 배양액의 온도상승(25℃ 이상)은 세균번식의 원인과 작물의 호흡량 증대 및 위조현상을 초래할 수 있다. 배양액의 온도상승은 인공광원의 발열에 기인될 수 있어 배양액 순환시 칠러의 적용이 필요할 수 있음.

○ 인공광 이용형(LEDs) 밀폐형 식물생산 시스템에서 광원의 발열로 인해 공조장치의 설정온도보다 작물군락 내 온도가 상승하는 문제가 야기될 수 있음. 이러한 온도상승을 막기 위해 온도설정의 센서는 작물의 군락 내 위치하는 것이 바람직 할 것으로 판단됨.

○ *N. benthamiana*의 수경재배 시 수확시기에 달하면 지하부의 생육이 왕성하여 개체간 뿌리의 엉킴이 발생되어 수확시 문제가 야기될 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 단근처리를 실시 할 경우 정식 2주 후 7.5cm에서 단근처리를 하는 경우 지상부의 생육감소 없이 지하부의 생육을 약 25%까지 감소시킬 수 있음.

○ 형질전환 *N. benthamiana*의 항원단백질 함량은 신엽에서 더 높다. 적심을 통한 신엽수의 확보와 항원단백질 함량을 높이고자 하는 경우 정식 15일에 생장점으로부터 2cm아래 적심을 하는 것이 효과적 이었음.

○ 형질전환 *N. benthamiana*의 파종 자동화를 위한 채종 시 탈 리가 유도되거나 자방 내 성숙된 종자의를 암상태로 저온저장을 하면 1년간 발아성에 문제가 없음.

○ *N. benthamiana*의 파종 자동화를 위한 방법은 종자코팅제를 이용한 방식은 효율적이지 않았음. 따라서 진공흡입장치를 통한 직경 2mm 홀을 셀트레이에 맞도록 제작하면 파종을 생력화 할 수 있었음.

제3절 목적동물에서 돼지열병 그린 백신의 방어능 조사

1. 돼지열병 그린 백신 항원량 결정 실험

가. 동물실험계획

(1) 시험목적 : 돼지열병 그린백신의 항원량 결정을 위하여 자돈에 5, 10, 25, 50, 100ug/dose를 2회 접종하고 공격접종을 수행함

(2) 실험방법

그룹	두수	접종량	접종 횟수	채혈
1	3	GP55 100ug/두	2회	접종 전 1차 접종 후 2주 2차 접종 후 4일 2차 접종 후 10일 2차 접종 후 14일
2	3	GP55 50ug/두	2회	
3	3	GP55 25ug/두	2회	
4	3	GP55 10ug/두	2회	
5	3	GP55 5ug/두	2회	
6	1	대조군		

*** 접종량은 2ml (E2 1ml + IMS1313 1ml)**

나. 돼지열병 그린마커백신 접종 후 항체가 조사(ELISA 및 중화항체검사)

개체번호	접종량	접종 전		1차 접종 후 2주		2차 접종 후 4일		2차 접종 후 7일		2차 접종 후 10일		2차 접종 후 14일	
		S/P ratio	LOM	S/P ratio	LOM	S/P ratio	LOM	S/P ratio	LOM	S/P ratio	LOM	S/P ratio	LOM
77	100ug	0.016	<4	1.332	4	1.481	256	0.843	1024	1.125	1024	1.064	1024
78		0.091	<4	1.141	4	1.160	128	0.583	512	0.791	512	1.139	256
79		0.035	<4	1.050	<4	1.062	512	0.526	1024	0.754	1024	0.862	1024
80	50ug	0.075	4	0.791	4	1.306	512	1.147	1024	0.764	2048	0.957	512
81		0.027	<4	1.096	4	1.334	512	0.785	1024	0.611	256	1.100	1024
82		0.014	<4	0.034	8	1.093	1024	0.762	2048	0.821	1024	1.009	2048
83	25ug	0.005	<4	1.278	16	1.124	1024	0.870	2048	0.880	2048	1.121	>4096
84		0.045	<4	1.052	8	1.457	128	1.192	1024	1.180	1024	1.225	512
85		0.021	<4	0.769	<4	0.808	256	1.080	1024	1.371	256	1.206	512
86	10ug	-0.024	<4	0.305	<4	1.040	64	0.527	512	1.022	2048	1.156	2048
87		-0.031	<4	0.228	<4	1.400	128	0.650	512	0.908	512	0.786	256
88		0.031	4	0.348	<4	1.222	512	0.580	2048	1.099	1024	0.988	1024
302	5ug		<4	0.786	<4	0.963	32	0.777	64	1.032	128	0.961	512
306			<4	0.429	4	0.897	32	0.635	256	0.929	256	0.845	512
307			<4	1.271	<4	0.906	128	1.104	256	1.079	512	1.163	1024
NC247	control		<4	-0.003	<4	0.003	<4	0.007	<4	-0.013	<4	-0.032	<4

○ 그린백신 접종 후 항체검사 결과 그린백신 미접종 그룹만 항체 음성로 확인되었으며, 그린백신 접종한 경우 단순하게 ELISA로 확인하였을 때에는 항체가가 높은 것으로 확인되었으나 중화시험 결과는 ELISA에 비하여 다소 낮게 확인되었음.

○ 그린백신 접종 후 중화항체가로 확인하였을 때에는 2차 접종을 수행하야 항체가 확실하게 양성으로 상승함.

○ 그린백신 접종 후에 ELISA 보다는 중화항체검사를 통하여 항체가 확인이 필요하며 2회 접종하여 충분한 항체가 상승을 시켜야 함을 간접적으로 확인함

※ 돼지열병 항체 ELISA(Median diagnostic, CSFV indirect ELISA) 사용, S/P ratio가 0.14 이상의 경우 양성으로 판정함. 생백신의 경우 중화항체는 10배 이상 양성이며 항체가 32배 이상시 야외 바이러스에 대한 방어 가능

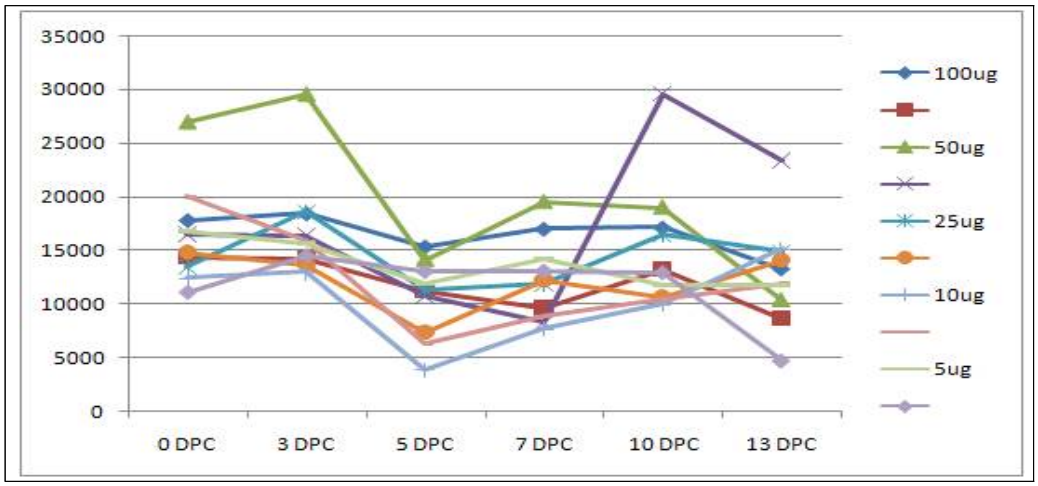
다. 공격접종 수행

○ 각 그룹별 2두씩 선정하여 돼지열병 야외주로 공격접종하고 임상증상 등 방어능 조사 수행함.

○ 공격접종은 야생멧돼지에서 분리한 YC11WB주는 강병원성 타입으로 $10^{6.0}TCID_{50}/ml$ 2ml(1ml 근육+1ml 비강 접종)를 접종함.

라. 공격접종 후 백혈구 수 측정

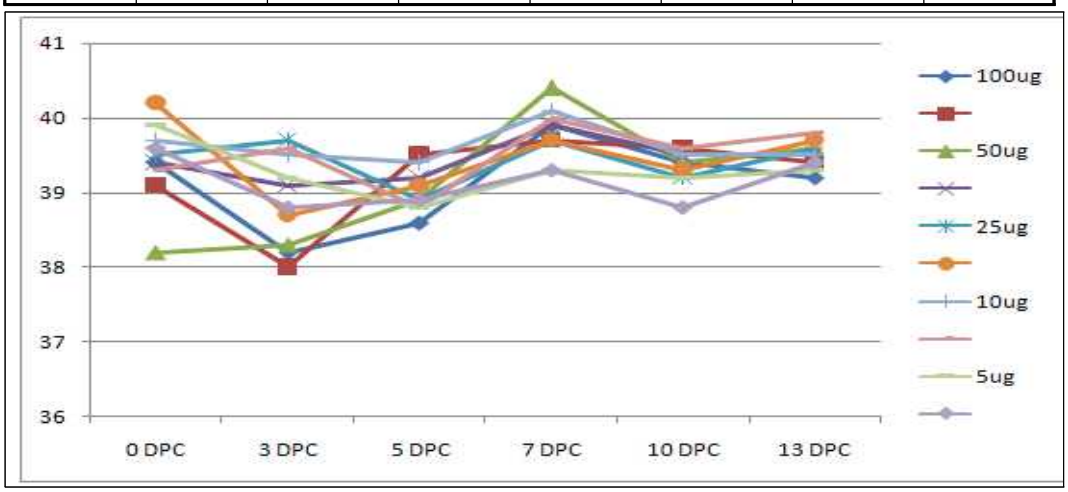
접종량	개체번호	0 DPC	3 DPC	5 DPC	7 DPC	10 DPC	13 DPC
100ug	77	17800	18440	15300	16980	17100	13220
	78	14340	14260	11220	9640	13240	8640
50ug	80	27000	29600	14160	19540	19040	10360
	82	16520	16420	10700	8300	29600	23400
25ug	83	13480	18580	11280	11880	16500	14880
	84	14780	13700	7360	12180	10600	14080
10ug	87	12420	12940	3840	7700	10000	15160
	88	20000	15840	6320	8840	10440	11900
5ug	306	16780	15660	11980	14240	11840	11800
	307	11100	14520	13020	13060	12920	4680



○ 돼지열병 임상증상 중의 하나로 특징적인 것이 백혈구감소증임. 백혈구수가 8,000/mm^3 일 경우 백혈구감소증이라 함. 일부 개체에서 백혈구감소증을 확인할 수 있었음.

마. 공격접종 후 체온 측정

접종량	개체번호	0 DPC	3 DPC	5 DPC	7 DPC	10 DPC	13 DPC
100ug	77	39.4	38.2	38.6	39.9	39.4	39.2
	78	39.1	38	39.5	39.7	39.6	39.4
50ug	80	38.2	38.3	38.9	40.4	39.4	39.6
	82	39.4	39.1	39.2	39.9	39.5	39.5
25ug	83	39.5	39.7	38.9	39.7	39.2	39.6
	84	40.2	38.7	39.1	39.7	39.3	39.7
10ug	87	39.7	39.5	39.4	40.1	39.5	39.5
	88	39.3	39.6	38.8	40	39.6	39.8
5ug	306	39.9	39.2	38.8	39.3	39.2	39.3
	307	39.6	38.8	38.9	39.3	38.8	39.4



○ 또한, 돼지열병 임상증상 중의 하나로 고열이 나타나며, 체온이 40℃ 이상의 경우 고열이라 함. 50ug, 25ug, 10ug 접종한 경우 일부 개체에서 고열 증상 확인됨.

바. 공격접종 후 항원검사

(1) 혈액 내 항원검사(Viremia)

< 전혈(Viremia) >

접종량	개체번호	9.11 0 DPC	9.14 3 DPC	9.16 5 DPC	9.18 7 DPC	9.21 10 DPC	9.23 13 DPC
100ug	77						
	78						
50ug	80				+		
	82				+		
25ug	83				+		
	84			+			
10ug	87			+	+	+	
	88			+	+	+	
5ug	306						
	307						

○ 공격접종 후 전혈에서 돼지열병 항원검사 결과 50ug, 25ug, 10ug 접종 그룹에서 PCR로 야외 바이러스가 검출됨. 공격접종 후 2주째 전개체를 부검하여 조직별로 항원검사를 수행한 결과 전 개체의 편도에서 항원이 검출되었으며 25ug 이하 접종 개체에서는 편도 이외의 조직에서도 항원이 검출되었음.

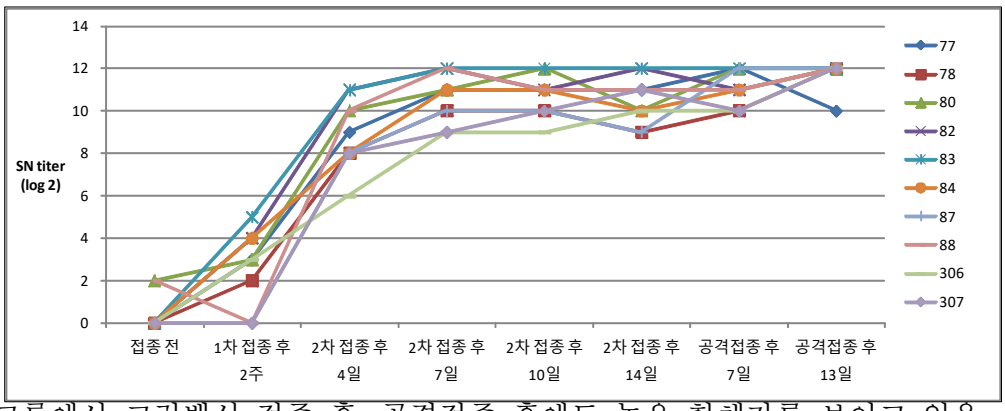
(2) 부검 후 장기내 항원검사

<조직내 항원검사>

접종량	개체번호	편도	심장	간	폐	신장	비장	장간막LN	회장	맹장	뇌
100ug	77	+									
	78	+									
50ug	80	+									
	82	+									
25ug	83	+					+				
	84	+			+					+	
10ug	87	+									
	88	+			+						
5ug	306	+									
	307	+					+	+			

○ 그린백신 접종 후 공격접종 수행한 결과 전체적으로 돼지열병 임상증상을 심하게 보이지 않았으나 50ug 이하 접종한 개체에서는 바이러스혈증, 백혈구감소증, 고열을 보였음

사. 중화항체 검사



○ 전 그룹에서 그린백신 접종 후, 공격접종 후에도 높은 항체가를 보이고 있음

아. 항원량 결정시험 결론

○ 최종적으로 돼지열병 방어를 위하여 그린백신 함량을 최소 100ug 으로 선정함

○ 5ug을 접종한 개체는 다른 그룹의 개체에 비하여 일령대가 높아 임상증상(백혈구감소

증, 고열 등), 항원 검출 등에 차이를 보이며 돼지열병 야외주에 대하여 방어하는 것으로 보여 추후 돼지 일령대와 항원간의 변역반응관계를 고려해야함(5ug 접종 개체 : 비육돈, 나머지 그룹 개체: 자돈(70일령))

2. 돼지열병 그린백신의 초기 방어능 및 1회 접종 가능성 확인 실험

가. 동물실험계획

(1) 시험목적 : 그린백신의 초기 방어능 및 1회 접종 가능성을 확인하기 위하여 백신 접종 후 일자별로 공격접종을 수행

(2) 실험방법 : 백신접종 후 14일, 11일, 7일 이후에 야외 바이러스를 공격 접종하여 임상증상 및 항체검사 등을 수행함. 공격접종은 야생멧돼지에서 분리한 YC11WB 강 병원성 타입으로 $10^{6.0}TCID_{50}/ml$ 의 역가로 2ml(1ml 근육+1ml 비강 접종)를 접종함.

그룹	Schedule	두수	실험
G1 (식물)	V 3D 14D Challenge	4	* 채혈 – 백신접종 전, 공격접종 전
G2 (식물)	V 11D Challenge	4	<공격접종 후> 1. 채혈 및 시료채취 (비즙, 타액, 분변) : 공격접종 전, 3, 7, 10, 14, 17, 21일 2. 백혈구수 측정 3. 체온 측정 4. 임상증상 관찰 5. 혈청 : 항체검사 및 cytokine 측정
G3 (식물)	V 7D Challenge	4	
G4 (LOM)	V 3D 7D 10D 14D Challenge	4	
(대조)	Challenge	4	

나. 공격접종 후 백혈구 수 측정

접종			3 DPC	7 DPC	10 DPC	14 DPC	17 DPC	21 DPC
그린 백신 1회 접종 14일 후 공격접종	51	G1	5780	8180	15440	9840	9560	9640
	52		11900	12100	11400	14760	16620	23000
	53		14080	16760	24000	9300	17740	17720
	54		5080	9220	17660	16220	13180	11760
그린 백신 1회 접종 11일 후 공격접종	55	G2	6700	2460	8000	8440	8900	9860
	56		13000	5600	1866	7420	9700	16840
	57		9320	6460	5620	8160	9740	15080
	58		6820	3060	4540	4500	5100	11180
그린 백신 1회 접종 7일 후 공격접종	59	G3	4560	5100	4840	3220		
	60		11600	7600	6840	4680		
	61		5480	4360	3980	3060		
	62		7640	4220	3280	4500		
LOM 백신 1회 접종 14일 후 공격접종	63	G4	7200	14900	14240	9460	10680	10140
	64		6860	10100	9000	9840	9460	10220
	65		22800	11740	11540	8160	8580	9280
	66		16400	15440	11420	12600	8280	12640
양성대조군 (공격접종군)	71	G6	8800	7400				
	72		7360					
	73		7140	10380				
	74		16400					

○ 공격접종 후 대조군은 7일정도에 폐사하였으며, 그린 백신 1회 접종 후 7일 후 공격접종한 경우에도 2주 정도에 모두 폐사하였음. 그린 백신 1회 접종 11일 후 공격접종한 경

우에도 전개체에서 백혈구감소증이 확인되었으며 일부 고열증상을 보였음. 그린백신 1회 접종 14일 후 공격접종한 개체 일부에서도 백혈구감소증, 고열 증상을 보임

다. 공격접종 체온 측정

접종			3 DPC	7 DPC	10 DPC	14 DPC	17 DPC	21 DPC
그린 백신 1회 접종 14일 후 공격접종	51	G1	39.1	40.0	40.5	39.3	38.3	39.3
	52		38.8	40.2	39.3	39.1	38.8	39.1
	53		37.5	39.3	39.9	38.4	38.7	39.5
	54		39.6	40.1	39.2	39.5	39.1	39.7
그린 백신 1회 접종 11일 후 공격접종	55	G2	39.8	39.9	39.9	39.7	39.6	39.7
	56		39.6	41.4	40.3	38.8	38.7	39.5
	57		39.1	38.7	39.8	39.2	39.6	37.4
	58		38.9	39.4	39.3	39.4	38.8	39.6
그린 백신 1회 접종 7일 후 공격접종	59	G3	39.4	41.1	41.3	41		
	60		39.4	41.6	41.4	40.5		
	61		39.1	40.7	40.6	41.3		
	62		39.1	40.1	40.2	39.3		
LOM 백신 1회 접종 14일 후 공격접종	63	G4	38.9	39.7	39.6	39.2	39.3	39.6
	64		39.8	39.5	39.8	39.5	39.6	39.5
	65		39.6	40.0	39.3	36.9	37.9	39
	66		39.2	40.1	39.8	39.4	39.6	39.9
양성대조군 (공격접종군)	71	G6	39.2					
	72		40.2					
	73		39.4					
	74		40.3					

라. 항원검사

(1) 혈액 내 항원검사(Viremia)

접종	개체번호	그룹	3 DPC	7 DPC	10 DPC	14 DPC	17 DPC	21 DPC
그린 백신 1회 접종 14일 후 공격접종	51	G1		+				
	52			++	++			
	53							
	54			+++	+			
그린 백신 1회 접종 11일 후 공격접종	55	G2		+++	+	+		
	56			+++	+	+++	+	
	57			+++		+		++
	58			+++	+	+++		+
그린 백신 1회 접종 7일 후 공격접종	59	G3	+	+++	+	+++	+++	
	60		+	+++	+	+++	+++	
	61			+++	+++	+++	+++	
	62			+++	+++	+++		
LOM 백신 1회 접종 14일 후 공격접종	63	G4		+	+			
	64							
	65							+
	66					+		
양성대조군 (공격접종군)	71	G6		++				
	72		+	+				
	73		+	++				
	74			++				

(2) 비즙 내 항원검사

접종	개체번호	그룹	3 DPC	7 DPC	10 DPC	14 DPC	17 DPC	21 DPC
그린 백신 1회 접종 14일 후 공격접종	51	G1	+	+				+
	52		+	+++	+			
	53				+	+	+	
	54			+++		+		
그린 백신 1회 접종 11일 후 공격접종	55	G2	+	+++	+++	+		+
	56		+	+++	+++		+	
	57			+++			+	+
	58		+	+++		+		+
그린 백신 1회 접종 7일 후 공격접종	59	G3		+++	+++	++		
	60		+	+++	+++			
	61			+++	+++	++		
	62		+	+++	+++	++		
LOM 백신 1회 접종 14일 후 공격접종	63	G4	+		+++	+		+
	64		+			+		+
	65				+	+		
	66					+		+
양성대조군 (공격접종군)	71	G6	+	+++				
	72			+++				
	73		+					
	74		+					

(3) 부검 후 조직내 항원검사

<조직내 항원검사>

접종량	개체번호	그룹	편도	심장	간	폐	신장	비장	서혜부LN	장간막LN	회장	맹장
그린 백신	51	G1	+									W+
1회 접종	52		+	W+		W+			W+		W+	
14일 후	53		W+				W+	W+		W+		W+
공격접종	54		+			++						
그린 백신	55	G2	+			W+					++	
1회 접종	56		W+				W+				W+	W+
11일 후	57		W+				+		+			
공격접종	58						W+			W+	W+	W+
그린 백신	59	G3	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
1회 접종	60		+++	+	+++		+++	+++	++	+++		
7일 후 공	61			+	W+	+++		+++	+++	+++	+++	
격접종	62			W+	+	W+	+	W+	+	+	W+	+
LOM 백신	63	G4										
1회 접종	64		W+									
14일 후	65											
공격접종	66						W+	W+				
양성대조	71	G6	+++		++	++	++	+++			++	++
군	72											
(공격접종	73		++	W+	W+	+	W+	++		+	+	
군)	74											

마. 항체검사(중화항체검사)

접종	개체번호	그룹	백신접종 전	백신접종 3일	백신접종 7일	백신접종 10일	백신접종 14일	3 DPC	7 DPC	10 DPC	14 DPC	17 DPC	21 DPC
그린 백신 1회 접종 14일 후 공격접종	51	G1	<4	<4	<4	4	32	64	128	2048	2048	1024	4096
	52		8	8	8	8	32	32	256	2048	4096	2048	4096
	53		4	4	<4	16	64	256	1024	2048	4096	2048	2048
	54		<4	<4	<4	8	8	32	512	2048	2048	1024	2048

접종	개체번호	그룹		백신접종 전	백신접종 4일	백신접종 7일	백신접종 11일	3 DPC	7 DPC	10 DPC	14 DPC	17 DPC	21 DPC
그린 백신 1회 접종 11일 후 공격접종	55	G2		4	16	4	32	32	64	128	512	512	1024
	56			4	8	16	32	16	128	512	1024	2048	1024
	57			4	<4	8	4	4	64	512	256	1024	2048
	58			<4	8	16	16	16	64	1024	1024	1024	1024

접종	개체번호	그룹			백신접종 전	백신접종 3일	백신접종 7일	3 DPC	7 DPC	10 DPC	14 DPC	17 DPC	21 DPC
그린 백신 1회 접종 7일 후 공격접종	59	G3			<4	<4	<4	4	4	<4	8	16	
	60				<4	<4	<4	4	4	4	8	16	
	61				<4	<4	<4	8	16	32	32	32	
	62				4	<4	<4	16	8	16	16		

접종	개체번호	그룹	백신접종 전	백신접종 3일	백신접종 7일	백신접종 10일	백신접종 14일	3 DPC	7 DPC	10 DPC	14 DPC	17 DPC	21 DPC
LCM 백신 1회 접종 14일 후 공격접종	63	G4	8	16	16	8	32	64	64	256	1024	1024	1024
	64		8	4	8	16	32	128	256	256	1024	1024	1024
	65		<4	<4	8	32	32	128	128	128	512	512	512
	66		4	<4	16	32	128	128	128	256	512	512	512

접종	개체번호	그룹	백신접종 전	백신접종 3일	백신접종 7일	백신접종 10일	백신접종 14일	3 DPC	7 DPC	10 DPC	14 DPC	17 DPC	21 DPC
양성대조군 (공격접종군)	71	G6	8	8	4	4	4	4	<4				
	72		<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4				
	73		<4	<4	4	4	4	4	<4				
	74		<4	<4	4	4	4	4	<4				

○ 그린백신 1회 접종 및 일자별 공격접종 후 항체가를 측정해본 결과 그린 백신 접종 후 11일 이상 되어야 야외 바이러스 방어 가능한 항체가가 형성됨을 확인할 수 있었음(공격접종 대조군은 모두 항체 음성)

바. 그린백신 1회 접종 결론

○ 결과적으로, 그린백신 접종 후 항체가가 형성되기 시작해야 야외주로 부터 충분한 방어 가능한 것으로 보임.

○ 1회 접종하고 14일째 되어야 야외주 방어 가능성 확인됨. 충분한 방어능 형성을 위해서는 2회 접종을 수행해야하며, 긴급방역용 등으로 1회 접종시에는 접종 후 11일이상 되어야 방어 가능할 것으로 보임. (단, 공격접종 바이러스의 병원성에 따라 달라질 수 있음)

3. 돼지열병 그린백신 모돈에서 안전성 확인 실험 수행

가. 그린백신 접종 후 임상증상을 관찰함. 관찰항목은 5가지(1. 무기력함, 2. 구토, 3. 설사, 4. 발열, 5. 식욕저하)로 그린백신 접종 전과 1차 접종 후, 2차 접종 후 현재까지 관찰함.

나. 백신접종 전에는 특이한 임상증상이 관찰되지 않았으나 그린백신 1차 접종 및 2

차 접종 후 1일까지 식욕저하가 관찰됨.

다. 몇몇 개체는 2일까지 지속됨을 관찰함. 이후로는 식욕이 정상으로 회복되었으며, 무기력함, 구토, 설사, 발열과 같은 임상증상은 관찰되지 않음. 그린백신의 접종량(100ug과 200ug)과는 임상증상에서 큰 차이를 보이지 않음

그룹	개체 번호	임상 증상	백신 접종전	그린백신 1차접종	1차접종 후 1일	1차접종 후 2일		그린백신 2차 접종	2차접종 후 1일	2차접종 후 2일		2차백신 접종 후 12일
G1 (그린백신 100ug접종)	9635	무기력함										
		구토										
		설사										
		발열										
		식욕저하		√	√			√	√			
	3968	무기력함										
		구토										
		설사										
		발열										
		식욕저하		√	√	√		√	√			
G2 (그린백신 200ug접종)	5522	무기력함										
		구토					중략				중략	
		설사										
		발열										
		식욕저하		√	√			√	√	√		
	6037	무기력함										
		구토										
		설사										
		발열										
		식욕저하		√	√			√	√			
G3 (대조군)	4455	무기력함										
		구토										
		설사										
		발열										
		식욕저하										

4. 모돈 그린백신 접종 후 면역원성 변화 확인

가. 모돈에 그린백신 접종 후 항체검사 결과(중화항체검사 결과)

그룹	접종	개체번호	백신접종전	1차 백신접종 후 14일	2차 백신접종 후 12일	2차 백신접종 후 70일
G1	그린백신 (100ug) 2회 접종	9635	<2	2	256	64
		3968	<2	<2	32	16

그룹	접종	개체번호	백신접종전	1차 백신접종 후 14일	2차 백신접종 후 12일	2차 백신접종 후 70일
G2	그린백신 (200ug) 2회 접종	5522	<2	<2	128	16
		6037	<2	16	512	64

그룹	접종	개체번호	백신접종전	1차 백신접종 후 14일	2차 백신접종 후 12일	2차 백신접종 후 70일
G3	백신미접종 (음성대조군)	4455	<2	<2	<2	<2

나. 모돈에 그린백신 접종 후 항체검사 결과(CSFV cELISA 결과)

그룹	접종	개체번호	백신접종 전	1차 백신접종 후 14일	2차 백신접종 후 12일	2차 백신접종 후 70일
G1	그린백신 (100ug) 2회 접종	9635	-3.551745	38.08	104.07	113.32
		3968	-10.77	6.51	104.22	69.30

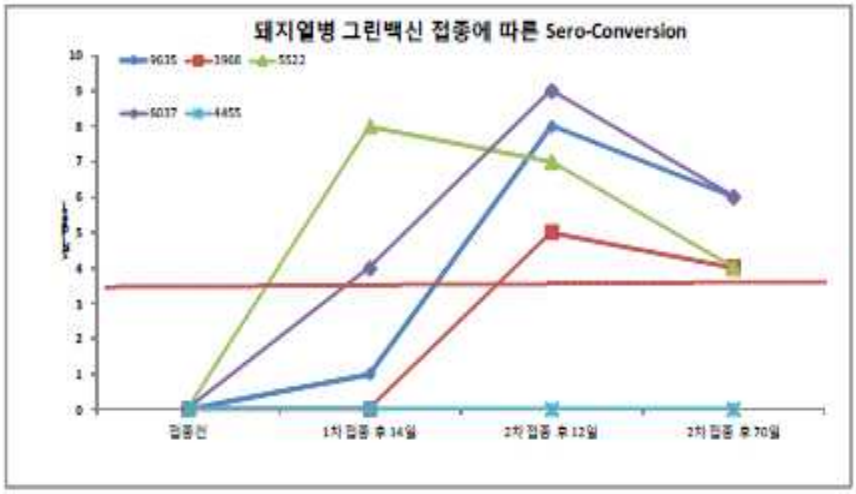
그룹	접종	개체번호	백신접종 전	1차 백신접종 후 14일	2차 백신접종 후 12일	2차 백신접종 후 70일
G2	그린백신 (200ug) 2회 접종	5522	-10.90	-7.67	85.62	62.50
		6037	-0.73	42.28	104.07	109.27

그룹	접종	개체번호	백신접종 전	1차 백신접종 후 14일	2차 백신접종 후 12일	2차 백신접종 후 70일
G3	백신미접종 (음성대조군)	4455	-50.33	-47.79	-35.97	-0.19

※ 돼지열병 항체 CSFV E2 cELISA(Median Diagnositc, CSFV cELISA) 사용, S/N ratio가 40 이상의 경우 양성으로 판정함

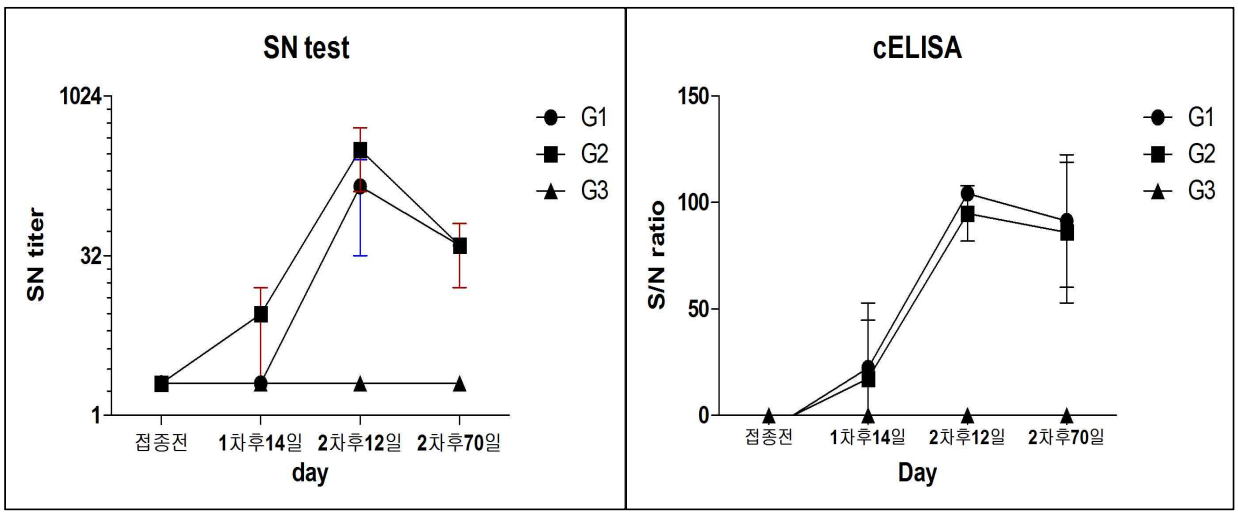
- ○ 그린백신 접종 후 항체검사 결과 그린백신 미접종 그룹만 항체 음성으로 확인되었으며, 그린백신 접종한 경우 단순하게 ELISA로 확인하였을 때는 항체가가 높은 것으로 확인되었으나 중화시험 결과는 ELISA에 비하여 다소 낮에 확인되었음.
- ○ 그린백신 접종 후 2차 접종을 수행하여야 항체가 확실하게 양성으로 상승함. 즉 2회 접종을 해야 돼지열병 방어항체가 형성됨.
- ○ 그린백신의 접종량(100ug과 200ug)은 항체형성에는 큰 차이는 없었음. 하지만 백신 2차 접종 후 70일의 항체가는 양성이지만 각 그룹의 1두씩은 방어항체가 이하로 떨어짐을 확인함

5. 모돈 그린백신에 따른 Sero-conversion 변화 확인



○ 그린백신 접종 후 항체검사 결과 G1그룹(그린백신 100ug 접종 그룹)은 2차 접종 후 돼지열병의 방어항체가(중화항체 32배 이상)를 보였고, G2그룹(그린백신 200ug 접종 그룹) 또한 2차 접종 후 돼지열병 방어항체가(중화항체 32배 이상)을 보임

○ 따라서 모돈에서 그린백신 100ug 이상 접종 시 돼지열병 방어항체가를 형성하기 위해서는 2회 접종하여 충분한 항체가 상승을 시켜야 함을 간접적으로 확인함.



○ 그린백신 접종 후 항체검사를 중화항체검사(SN test) 및 cELISA를 수행하였고, 서로의 진단법 결과와 비교해봤을 시 두 진단법 모둔 1차 접종 후 G2그룹의 1두(6037)만 돼지열병 항체 양성을 보였고, 나머지 3두는 2차 접종 후 돼지열병 항체 양성을 보임. 이 결과는 중화항체검사(SN test)와 cELISA 검사 결과는 상관성이 있음을 확인함.

○ 그린백신 100ug을 접종한 G1그룹과 200ug을 접종한 G2그룹의 중화항체가 및 cELISA결과 그린마커백신의 항원양이 돼지열병 항체형성에 큰 영향을 미치지 않음을 확인함.

6. 모돈에서의 공격접종용 바이러스의 접종용량 조사

가. 동물실험계획

(1) 시험목적 : 모돈에서 그린백신 방어능 조사를 위한 공격접종용 바이러스 접종량 조사

(2) 접종(돼지열병 항원·항체 음성 모돈)

- ○ 접종액 : 돼지열병 바이러스 YC11WB주 배양액(10^6 TCID50/ml)
- ○ 접종두수 : 2두에 접종(1두 대조군)
- ○ 접종방법 : 1두당 2ml(IN 1ml + IM 1ml)

(3) 시료채취 및 검사

- ○ 채혈 및 비강, 타액, 분변 swab : 접종 후 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15일
- ○ 채혈 시 체온 측정
- ○ 10일째 부검(병리조직검사, 조직내 항원 검출 여부 확인)

(4) 검사항목

- ○ 체온
- ○ 백혈구수 측정
- ○ 항원검사(PCR, 전혈 및 비강, 타액, 분변 swab, 부검조직, 로프)
- ○ 항체검사(ELISA 및 중화시험)
- ○ 병리조직검사

나. 접종 후 체온 및 백혈구 수 측정

DPI	11		12		1188(음성대조)	
	백혈구	체온	백혈구	체온	백혈구	체온
0	22,000	39.6	16,700	40.1	12,520	38
1	25,800	39.2	10,680	38.3	12,760	37.9
3	26,400	39.6	20,000	38.8	NT	NT
6	8,800	41.2	7,940	38.4	NT	NT
8	7,160	41.3	9,400	40.0	26,400	38.1
10	9,960	41.1	11,660	40.3	NT	NT

다. 항원검사 결과

DPI	11				12				1188
	전혈	비즙	타액	분변	전혈	비즙	타액	분변	전혈
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	w+	-	-	-	w+	-
3	w+	-	-	w+	-	-	-	w+	-
6	++	+	+	+	+	w+	w+	w+	-
8	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	-
10	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	-

라. 임상증상 및 부검소견

(1) 임상증상

○ 11번 : 접종 6일째부터 고열(40℃ 이상), 백혈구 감소증(8,000개 이하), 접종 10일째 기립 불능, 견좌자세, 떨림 등의 증상을 보임

○ 12번 : 접종 8일째부터 고열(40℃ 이상), 접종 6일째부터 백혈구 감소증(8,000개 이하), 접종 10일째 약간의 떨림 증상, 식욕저하

(2) 부검소견(접종 10일째 안락사 후 부검실시)

○ 11번 : 악하림프절 충혈・종창, 심장의 국소적 점상출혈, 신장의 국소적 점상출혈(1~2개소), 방광점막에 점상출혈 산재, 복수

○ 12번 : 악하림프절 종창, 장간막림프절 충출혈(주연성 출혈), 심장의 국소적 점상출혈, 담낭 점막의 점상출혈 산재, 방광점막에 점상출혈 산재, 복수

(3) 조직소견

○ CNS : meningitis, gliosis, perivascular cuffing

○ Spleen : LPC depletion, RE cell hyperplasia, endotheliosis

○ Lymphnode : LPC depletion, RE cell hyperplasia

마. 부검 후 항원검사

구분	DPI	조직												
		편도	폐	심장	비장	간	장간막 LN	신장	회장	맹장	서혜부 LN	대뇌	소뇌	척수
11번	10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
12번	10	++	++	++	++	-	-	-	++	++	++	+	+	++
1188번	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

※ 항체검사 결과 : 음성

바. 공격접종 바이러스 함량 결론

○ 모돈에서 그린백신의 방어능 조사를 위하여 공격 접종할 바이러스 YC11WB는 강병원성으로 확인됨. 돼지열병의 임상증상 중 하나로 특이적인 백혈구 감소증을 보임. 백혈구수가 9000/mm^3 일 경우 백혈구감소증이라 함. 또한 돼지열병 임상증상 중의 하나로 고열이 나타나며, 체온이 40℃ 이상의 경우 고열이라고 함. 따라서 그린백신의 모돈에 대한 방어능 조사를 위해 사용될 YC11WB의 양은 1x10^6 TCID50/ml로 IN을 1ml과 IM으로 1ml 접종하여 수행 가능함

7. 출하전 비육돈에서 야외주 공격접종량 선정 실험

가. 동물실험계획

(1) 시험목적 : 모돈에서 그린백신 방어능 조사를 위한 공격접종용 바이러스 접종량 조사

(2) 실험방법

그룹	두수	번호	실험동물	접종바이러스	접종량	접종방법
A	2	19	170일령비육돈 (체중 약 95-100 kg, 돼지열병 항원항체 음성)	YC11WB	$2 \times 10^{6.0}$ $TCID_{50}$/두	이근부 근육접종(IM) 비강접종(IN)
		20				
B	2	17			$2 \times 10^{5.0}$ $TCID_{50}$/두	
		18				
C	2	21			$2 \times 10^{4.0}$ $TCID_{50}$/두	
		22				
D	1	16			$2 \times 10^{3.0}$ $TCID_{50}$/두	
총두수	7					

(3) 시료채취 및 검사

- 채혈 및 비강, 타액, 분변 swab : 접종 후 2, 5, 7, 9, 14, 21일
- 채혈 시 체온 측정
- 21일째 부검(병리조직검사, 조직내 항원 검출 여부 확인)

(4) 검사항목

- 체온
- 백혈구수 측정
- 항원검사(PCR, 전혈 및 비강, 타액, 분변 swab, 부검조직)
- 항체검사(ELISA)

나. 공격접종 후 백혈구 수 측정

그룹			DPI 0	DPI 2	DPI 5	DPI 7	DPI 9	DPI 14	DPI 21
A	$2 \times 10^{6.0}$ $TCID_{50}$/두	19	23,400	17,175	8,100	5,700	5,830	8,450	8,850
		20	16,250	14,400	6,550	5,975	4,508	4,228	9,175
B	$2 \times 10^{5.0}$ $TCID_{50}$/두	17	17,050	20,475	9,750	6,275	6,300	10,775	**폐사**
		18	11,125	12,300	5,550	5,575	5,095	4,605	3,603
C	$2 \times 10^{4.0}$ $TCID_{50}$/두	21	17,900	16,225	14,825	5,900	5,825	5,075	9,825
		22	14,675	11,900	6,825	6,725	8,250	12,300	13,300
D	$2 \times 10^{3.0}$ $TCID_{50}$/두	16	24,675	17,375	8,375	8,600	7,450	11,025	13,800

다. 공격접종 후 체온 측정

그룹			DPI 0	DPI 2	DPI 5	DPI 7	DPI 9	DPI 14	DPI 21
A	2 x $10^{6.0}$ $TCID_{50}$/두	19	37.2	37.9	39.2	39.4	40.5	40.6	NT*
		20	37.9	39.1	39.8	39.4	40.7	38.3	NT
B	2 x $10^{5.0}$ $TCID_{50}$/두	17	39.3	39.5	39.9	40.6	41.4	36.4	NT
		18	39.1	39.8	39.9	39.8	40.2	39.4	NT
C	2 x $10^{4.0}$ $TCID_{50}$/두	21	38	38.9	38	37.2	37.7	37.2	NT
		22	37.8	39.2	38.5	39.6	39.7	38.8	NT
D	2 x $10^{3.0}$ $TCID_{50}$/두	16	39.5	36.7	39.5	38.7	36.8	38.6	NT

*** NT : 체온측정 안함**

라. 항체검사(c-ELISA)

그룹			DPI 0	DPI 2	DPI 5	DPI 7	DPI 9	DPI 14	DPI 21
A	2 x $10^{6.0}$ $TCID_{50}$/두	19	28.51441	20.4434	24.61197	21.59645	23.54767	60.35476	62.39468
		20	31.52993	14.05764	13.96895	13.70288	12.2838	67.00665	82.97118
B	2 x $10^{5.0}$ $TCID_{50}$/두	17	17.69401	11.84035	18.84700	17.07317	17.60532	57.25055	폐사
		18	25.49889	48.55875	50.15521	51.13082	50.8647	70.46563	82.97118
C	2 x $10^{4.0}$ $TCID_{50}$/두	21	35.52106	5.809312	12.63858	5.898004	7.405764	79.24611	83.05987
		22	27.62749	9.356984	25.49889	1.374722	19.91130	80.04434	93.70288
D	2 x $10^{3.0}$ $TCID_{50}$/두	16	26.385809	26.38580	18.40354	25.76496	24.43458	61.50776	97.42794

마. 항원검사(RT-PCR)

(1) 혈액 내 항원검사(Viremia)

그룹			DPI 0	DPI 2	DPI 5	DPI 7	DPI 9	DPI 14	DPI 21
A	2 x $10^{6.0}$ $TCID_{50}$/두	19			+	+++	++	+++	+++
		20				+	+++	++	+
B	2 x $10^{5.0}$ $TCID_{50}$/두	17				+++	+++	+++	폐사
		18			++	+	+++	++	++
C	2 x $10^{4.0}$ $TCID_{50}$/두	21			++	+++	+++	++	++
		22			+	++	+		
D	2 x $10^{3.0}$ $TCID_{50}$/두	16				+	++		

(2) 비즙 내 항원검사

그룹			DPI 0	DPI 2	DPI 5	DPI 7	DPI 9	DPI 14	DPI 21
A	2 x $10^{6.0}$ $TCID_{50}$/두	19				+++	+++	+++	+++
		20				+	++	+++	+++
B	2 x $10^{5.0}$ $TCID_{50}$/두	17				+++	++	+++	폐사
		18				++	++	+++	+++
C	2 x $10^{4.0}$ $TCID_{50}$/두	21			+	+++	+++	+++	+++
		22				++	+	+	+
D	2 x $10^{3.0}$ $TCID_{50}$/두	16					+		

(3) 분변 내 항원검사

그룹			DPI 0	DPI 2	DPI 5	DPI 7	DPI 9	DPI 14	DPI 21
A	2 x $10^{6.0}$ $TCID_{50}$/두	19					+++	+++	+++
		20				+++	+++	+++	+++
B	2 x $10^{5.0}$ $TCID_{50}$/두	17					+	+++	폐사
		18					+++	+++	+++
C	2 x $10^{4.0}$ $TCID_{50}$/두	21				+	+++	+++	+++
		22					+		
D	2 x $10^{3.0}$ $TCID_{50}$/두	16							

(4) 부검 후 장기 내 항원검사

Group			뇌	심장	간	비장	폐	신장	방광	회장	편도	림프절		
												장간막	악하	서혜
A	2 x $10^{6.0}$ $TCID_{50}$/두	19	+++	+++	+++		+++	++	+		+++	NT	+++	+++
B	2 x $10^{5.0}$ $TCID_{50}$/두	18	++	++		+++	+++		++			+++		+++
C	2 x $10^{4.0}$ $TCID_{50}$/두	21	+++	+		+++	+++		++		++	++	+++	
D	2 x $10^{3.0}$ $TCID_{50}$/두	16												

바. 비육돈에 대한 공격접종량 결론

○ 도축장 출하전 비육돈의 그린백신 방어능 조사를 위하여 공격 접종할 바이러스 YC11WB주는 병원성이 강한 공격접종용 바이러스로 확인됨. 돼지열병 임상증상 중 하나로 특이적인 백혈구 감소증을 보였으며, 백혈구수가 8000/mm^3 일 경우 백혈구감소증이라 함. 또한 돼지열병 임상증상 중 하나로 고열이 나타나며, 체온이 40℃ 이상의 경우 고열이라고 함. 따라서 그린백신의 모돈에 대한 방어능 조사를 위해 사용될 YC11WB주의 양은 1x10^6 $TCID_{50}$/ml로 IN을 1ml과 IM으로 1ml 접종하여 수행하기로 함

8. 식물발현 그린마커 돼지열병백신 비육돈 공격 접종 실험

가. 동물실험계획

(1) 시험목적 : 식물발현 그린마커 돼지열병백신 자돈용 품목허가 진행 중 임상시험에서 출하전 비육돈 방어항체가 유지 및 공격접종을 통한 방어능 조사

(2) 실험방법

그룹		1차 백신 접종 40일령	2차 백신 접종 60일령	공격접종 210일령	부검 230일령	기타
그린마커 백신군	B9	150μg/두 접종	150μg/두 접종	YC11WB $2 \times 10^{6.0}$ $TCID_{50}$/두 이근부 근육접종 (IM) + 비강접종(IN)	공격접종 21일째 부검수행	
	B27					
	B13					
	B26					
LOM 백신군	94	50일령 LOM 백신 1회 접종				
	B6					
비백신군 (음성대조)	B18	백신 미접종				
	B30					

(3) 시료채취 및 검사

- ○ 채혈 및 비강, 타액, 분변 swab : 접종 후 3, 7, 10, 14, 17, 21일
- ○ 채혈 시 체온 측정
- ○ 21일째 부검(병리조직검사, 조직내 항원 검출 여부 확인)

(4) 검사항목

- ○ 체온
- ○ 백혈구수 측정
- ○ 항원검사(PCR, 전혈 및 비강, 분변 swab, 부검조직)
- ○ 항체검사(ELISA)

나. 공격접종 후 백혈구 수 측정

그룹		DPI 3	DPI 7	DPI 10	DPI 14	DPI 17	DPI 21
그린마커 백신군	9	20000	10850	15625	16525	16425	17475
	27	18225	13525	15575	17475	18475	15925
	13	11200	8275	9100	11775	11025	13850
	26	20775	13600	18850	20375	23125	24275
LOM 백신군	6	17325	12425	17525	16150	16950	15350
	94	10875	23125	16250	20475	26200	31000
비백신군 (음성대조)	18	5900	5825	5075	9825	14,825	13450
	30	8075	5020	6275	10950	15500	13250

다. 공격접종 후 체온 측정

그룹		DPI 3	DPI 7	DPI 10	DPI 14	DPI 17
그린마커 백신군	9	39.0	39.6	39.3	39.0	38.3
	27	39.5	38.2	39.1	38.8	38.5
	13	38.3	39.4	39.1	38.9	37.5
	26	39.2	38.4	38.3	39.3	38.6
LOM 백신군	6	38.4	38.2	38.1	38.9	38.5
	94	38.6	38.9	38.3	38.1	38.1
비백신군 (음성대조)	18	37.9	39.4	40.5	40.6	39.4
	30	39.2	39.6	40.2	39.4	38.3

라. 항체검사

(1) 중화항체검사

그룹		접종 전	40일령 (1차 접종)	60일령 (2차 접종)	80일령	120 일령	150 일령	210 일령	DPI3	DPI 7	DPI 10	DPI 14	DPI 17	DPI 21
그린마커 백신군	B9	0	2	8	512	1,024	256	512	512	2,048	>4,096	>4,096	>4,096	>4,096
	B27	4	4	8	2,048	1,024	256	512	256	4,096	>4,096	>4,096	>4,096	>4,096
	B13	4	4	8	2,048	512	128	256	128	1,024	>4,096	>4,096	>4,096	>4,096
	B26	4	4	4	2,048	1,024	128	128	64	4,096	>4,096	>4,096	>4,096	>4,096
LOM 백신군	94	8	8	8	512	512	512	>4,096	2,048	>4,096	>4,096	>4,096	>4,096	>4,096
	B6	4	4	8	8	128	256	1,024	1,024	4,096	>4,096	>4,096	>4,096	>4,096
비백신군 (음성대조)	B18	2	2	8	<2	<2	<2	<2	<2	<2	4	16	64	64
	B30	4	4	8	<2	<2	<2	<2	<2	<2	2	8	64	64

(2) C-ELISA

그룹		DPI 0	DPI 3	DPI 7	DPI 10	DPI 14	DPI 17	DPI 21
그린마커 백신군	B9	101.41	100.62	102.54	103.55	102.99	102.42	103.01
	B27	102.26	101.54	102.87	103.22	103.22	102.13	103.48
	B13	101.60	100.71	102.45	103.63	103.05	102.42	103.48
	B26	101.69	100.62	102.71	103.71	103.16	102.32	102.54
LOM 백신군	94	103.01	102.62	102.87	103.71	103.45	102.61	103.09
	B6	102.45	101.95	103.21	103.71	102.93	102.32	103.09
비백신군 (음성대조)	B18	7.87	1.71	19.29	34.058	64.074	78.95	84.62
	B30	6.64	3.71	15.12	16.96	44.074	76.10	87.073

마. 항원검사

(1) 혈액 내 항원검사(Viremia)

그룹		DPI 3	DPI 7	DPI 10	DPI 14	DPI 17
그린마커 백신군	9					
	27					
	13					
	26					
LOM 백신군	6					
	94					
비백신군 (음성대조)	18		+++	+++	++	+
	30		++	++	+	

(2) 비즙 내 항원검사

그룹		DPI 3	DPI 7	DPI 10	DPI 14	DPI 17
그린마커 백신군	9					
	27					
	13					
	26					
LOM 백신군	6					
	94					
비백신군 (음성대조)	18		+++	+++	+++	++
	30		+++	++	++	+

(3) 분변 내 항원검사

그룹		DPI 3	DPI 7	DPI 10	DPI 14	DPI 17
그린마커 백신군	9					
	27					
	13					
	26					
LOM 백신군	6					
	94					
비백신군 (음성대조)	18		++	++	+++	+++
	30		+	++	++	++

(4) 부검 후 장기 내 항원검사

그룹		간	폐	신장	심장	방광	편도	비장	회장	뇌	악하 LN	장간막 LN	서혜부 LN
그린마커 백신군	9						+				+		
	27						+						
	13								+				
	26						+						
LOM 백신군	6												
	94												
비백신군 (음성대조)	18		++		++	++	+++	++		+++	++	+++	++
	30		++		+	++	++	+++		+		++	++

바. 식물발현 그린마커 돼지열병백신 비육돈 방어능 조사 결론

○ 식물발현 그린마커백신을 자돈(40일령, 60일령)에 접종 후 도축출하(180일령)까지 방어항체 유지 및 돼지열병 야외주에 대한 방어능 조사를 수행. 도축출하 전(180일령)까지 128~512배의 중화항체가를 보유하였으며, 야외주 공격접종 시(YC11WB주) 고열이나 백혈구 감소증과 같은 임상증상은 보이지 않음. 또한 혈액내 항원(viremia), 비즙과 분변내 항원검출은 없었음. 다만, 돼지열병 야외주 공격접종 후 3주 후에 부검을 수행한 결과 장기 내 특이병변은 검출되지 않았으나, 일부조직(편도, 악하림프절, 회장)에서 소량의 항원이 검출되었고 바이러스 분리 및 배양은 되지 않았음.

9. 모돈에서 공격접종용 바이러스 접종용량 재확인 조사

가. 동물실험계획

(1) 시험목적 : 식물발현 그린마커 돼지열병백신 임신중기 모돈의 야외주에 대한 방어능을 조사를 위한 공격접종량 재확인 실험

(2) 접종(돼지열병 항원·항체 음성 모돈)

○ 접종액 : 돼지열병 바이러스 YC11WB주 배양액 P5 (10^6 $TCID_{50}$/ml)

○ 접종두수 : 2두에 접종(음성대조 1두)

○ 접종방법 : 1두당 2ml(IN 1ml + IM 1ml)

(3) 시료채취 및 검사

○ 채혈 및 비강, 타액, 분변 swab : 접종 후 7, 14일

○ 14일째 부검(병리조직검사, 조직내 항원 검출 여부 확인)

나. 접종 후 백혈구 수 측정

그룹	모돈번호	DPI 0	DPI 7	DPI 14	비고
접종군	2844	16,700	2,108	4,973	백혈구 감소증 관찰
	3024	22,000	3,265	3,990	
음성대조군	1171	17,325	12,425	17,525	

다. 임상증상 및 부검소견

(1) 임상증상

○ 2844모돈 : 접종 5일째 식욕감소, 접종 7일째 백혈구 감소증 (8,000개 이하), 접종 10일째 기립 불능, 떨림 등의 증상을 보였고, 14일째 폐사 직전 부검하였음

○ 3024모돈 : 접종 5일째 식욕감소, 접종 7일째부터 백혈구 감소증(8,000개 이하), 접종 13일째 떨림 증상 및 기립불능 증상을 보임

(2) 부검소견(접종 14일째 안락사 후 부검실시)

○ 2844모돈 : 장간막림프절 충혈・종창, 비장의 경색 및 종대

○ 3024모돈 : 비장의 경색 및 종대

마. 부검 후 항원검사

구분	DPI	조직(RT-PCR)											
		편도	폐	심장	비장	간	신장	회장	방광	뇌	악하 LN	서혜부 LN	장간막 LN
2844	14	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3024	14	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++

10. 임신중기 모돈에 돼지열병백신(식물발현 그린마커 백신) 접종 후 야외주에 대한 방어능 조사

가. 동물실험계획

(1) 시험목적 : 식물발현 그린마커 돼지열병백신을 임신중기 모돈에 접종한 후 야외주에 대한 방어능을 조사

(2) 실험방법

그룹	두수	1. 돼지열병 항원 항체 음성 확인	2. 종부수행 및 임신 확인	3. 백신 1차 접종 (임신 66일령)	4. 백신 2차 접종 (임신 80일령)	5. 돼지열병야외주 공격접종 (임신94일령)	6. 출산 (임신 114일)	7.부검
A (백신접종군)	5	ELISA 및 중화항체 시험 수행	6마리 모두 종부 및 임신여부 확인	1. 접종량 : 300μg/두 2. 접종방법 : 이근부 근육접종(IM)	1. 접종량 : 300μg/두 2. 접종방법 : 이근부 근육접종(IM)	1. 공격접종 임신일령 : 중기 (94일령) 2. 야외주 : YC11.W6주 3. 접종량 : 1x10^{6}TCID$_{50}$(IM) 1x10^{6}TCID$_{50}$(IN)	출산시 자돈의 산자수, 폐사수(마이크, 흑자, 백자 등) 확인 (임신 114일/출산)	임신 모돈 및 자돈 (유산, 사산, 미이라 및 생존)을 부검하여 수직 감염 확인 및 항체가 확인
B (음성대조)	1			비접종	비접종			
종두수	6							

나. 3년차 시험계획 변경 사항

시험항목	변경 전	변경 후	비고
접종량	100μg ~ 200μg	300μg	2년차 시험결과 출산까지 방어항체가 유지를 위하여 항원량 증가
백신 접종 시기	종부 전 2회	임신 중기 2회	주관기관의 동물실험계획 변경 요청
공격접종 시기	임신 중기	임신 말기	
부검 자돈	공격접종 후 3주 후에 태반감염 여부 확인을 위하여 부검 계획	공격접종 3주 후가 출산시기. 따라서 출산후 산자를 부검하여 태반감염 여부 확인	

제4절 돼지열병 마커백신 생산 및 제품화

1. 돼지열병 마커백신의 조성 연구 결과

가. 시험백신 제조

○ Table 1. 면역증강제 조성에 따른 시험백신 6종 제조

제조번호	항원함량 (㎖ 당)	면역증강제
56-CSF-E2-01	Purified GP55 protein 100 ㎍	Emuligen-D (MVP, oil)
56-CSF-E2-02		Carbigen (MVP, carbomer)
56-CSF-E2-03		Polygen (MVP, polymer)
56-CSF-E2-04		Montanide gel (Seppic, polymer)
56-CSF-E2-05		IMS1313 (Seppic, nanoparticle)
56-CSF-E2-05S		IMS1313 + Saponin

나. 백신접종

(1) 실험동물

○ 제주도에서 4주령의 CSF 항체 음성자돈 14마리를 구입하여 코미팜 동물사로 이동하고, 1주간 순치 후 실험에 사용하였다. 총 14마리 중 12마리는 시험백신 접종군, 나머지 2마리는 대조군으로 하였다.

(2) 백신접종

○ 시험백신 접종군을 2마리씩 6그룹으로 세분화하고, 각각의 그룹에 시험백신 1종씩을 적용한다. 접종 주령은 5주령이며, 5주령에 각각의 시험백신 1 ㎖씩을 이근부 근육에 접종한다.

다. 채혈 및 중화항체가 측정

(1) 채혈

○ 시험백신 접종군 6그룹 및 비접종 대조군에 대하여 백신 접종 전 (5주령), 백신 접종 2주 후 (7주령), 백신 접종 4주 후 (9주령), 백신 접종 6주 후 (11주령), 백신 접종 8주 후 (13주령), 백신 접종 10주 후 (15주령), 백신 접종 12주 후 (17주령)에 각각 채혈하여 CSF LOM주에 대한 혈중 중화항체가를 각각 확인한다.

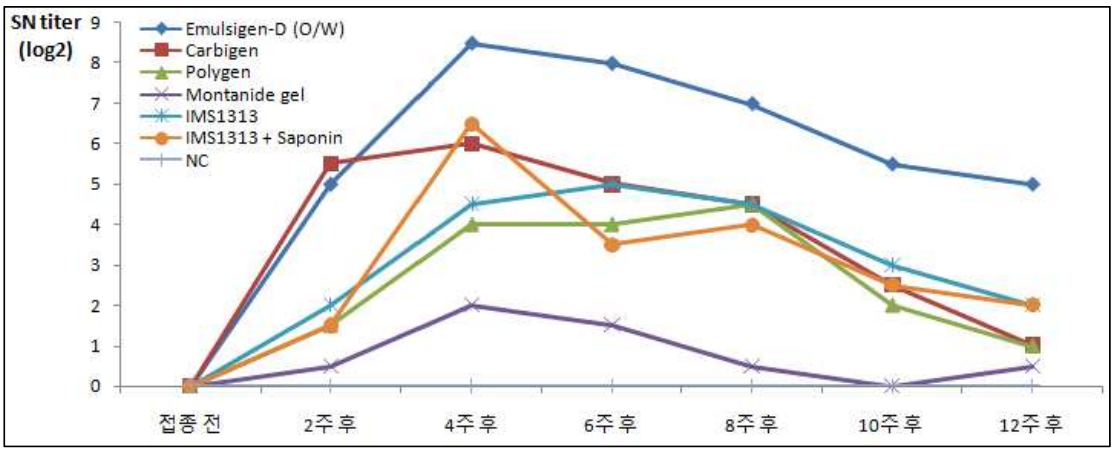
(2) 중화항체가 측정

○ NPLA (Neutralizing Peroxidase-Linked Assay)법을 사용하여 중화항체가를 측정하였다. 실험방법을 간략하게 설명하자면, 가검 혈청을 2진 희석하여 동량의 CSFV (LOM주, 200 TCID50/㎖)와 혼합한 후 37℃에서 1시간 감작시키고, 이를 미리 준비한 PK-15 cell에 접종하여 2일간 37℃ (5% CO2)에서 배양한다. 배양 상층액을 제거하고, 세포를 80% cold acetone으로 고정시킨 후, CSFV 단크론 항체를 반응시키고, 이어서 biotinylated

anti-mouse IgG 용액을 반응시킨다. 반응이 종료되면 AB solution과 substrate DAB를 이어서 반응시켜 발색 여부로 항체 유무를 확인한다.

라. 중화항체가 측정 결과

○ Figure 1. 시험백신 6종의 그룹별 평균 중화항체가



○ 백신 접종 전 혈중 중화항체가 측정 결과, 실험에 사용된 전 개체 모두 음성으로 확인되었고, 비접종 대조군은 실험기간 내내 항체 음성을 유지하였다. 백신 접종군의 경우, 그룹별로 편차가 있었으나 백신 접종 4주차에는 혈중 중화항체 모두 양성으로 변하였고, 동시에 혈중 최고치를 기록하였다. 이후 모든 그룹에서 서서히 항체가가 감소하는 양상을 보였으며, 마지막 관찰시점인 백신 접종 12주 후 (17주령)에는 2그룹을 제외하고 모두 혈중 중화항체가가 4배 이하로 떨어졌다. Emulsigen-D (V-1)와 IMS1313 (V-5) 그룹에서는 백신 접종 12주 후에도 여전히 혈중 중화항체가가 16배 이상인 개체가 확인되어, 식물발현 돼지열병 재조합 항원에 적합한 면역증강제로 확인되었다.

○ Table 2. 그룹별 항체가 raw data

그룹		시기별 중화 항체가						
		접종 전	2주 후	4주 후	6주 후	8주 후	10주 후	12주 후
백신 접종 군	56-CSF -E2-01	< 2	16	512	256	128	64	32
		< 2	64	256	256	128	32	32
	56-CSF -E2-02	< 2	32	64	16	16	4	2
		< 2	64	64	64	32	8	2
	56-CSF -E2-03	< 2	8	16	64	64	8	4
		< 2	< 2	16	4	8	2	< 2
	56-CSF -E2-04	< 2	2	8	4	2	< 2	< 2
		< 2	< 2	2	2	< 2	< 2	2
	56-CSF -E2-05	< 2	16	256	256	128	32	16
		< 2	< 2	2	4	4	2	< 2
	56-CSF -E2-05S	< 2	8	256	8	8	8	4
		< 2	< 2	32	16	32	4	4
대조군		< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
		< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2

2. 돼지열병 마커백신 시제품 제작 결과

○ 주관 연구기관 및 협동 연구기관의 임상시험 결과를 종합하여 아래와 같은 조성으로 연속 3 Lot의 시험백신을 제작하였고, 동일한 조성으로 제품화를 위한 품목허가 실험을 수행하였다.

가. 시제품의 조성

[백신의 성분 및 함량 (백신 1.0 ㎖ 중)]
- 식물유래 돼지열병 바이러스 항원 단백질 (pmE2:CBD) ---------- 100 ㎍ 이상
- IMS1313 ---------- 50 %
- Thimerosal ---------- 0.01% 이하

나. 연속 3 Lot 시제품의 제조 성적

(1) 제조 수량

○ Table 3. 연속 3 Lot 시험백신 제조 성적

Lot No.	제조번호	제조 일자	제조수량
Lot 1	16-HBVAC-01	2016.05.15	10 ㎖ × 100 vial
Lot 2	16-HBVAC-02	2016.05.18	10 ㎖ × 100 vial
Lot 3	16-HBVAC-03	2016.05.22	10 ㎖ × 100 vial

(2) 시험백신의 검정시험 방법

○ 연속 3 Lot 시험백신에 대한 품질 평가를 동물용의약품 생물학적제제 국가검정기준 중 "1-2-04-12 돼지열병 (E2 marker) 유전자재조합 불활화백신 검정기준"에 준하여 실시하였으며, 실험 방법은 아래와 같다.

① 특성시험 : 동물용의약품 생물학적제제 검정기준의 일반시험법 1-10-20-01에 따른다.
② 수소이온농도시험 : 동물용의약품 생물학적제제 검정기준의 일반시험법 1-10-20-03에 따라 검사한 결과 백신의 수소이온농도는 pH 6.0~8.0 이내에 있어야 한다.
③ 무균시험 : 동물용의약품 생물학적제제 검정기준의 일반시험법 1-10-20-06에 따른다.
④ 방부제 정량시험 : 동물용의약품 생물학적제제 검정기준의 일반시험법 1-10-20-09에 따른 검사결과에서 포르말린 함량은 0.2% 이하, 치메로살 함량은 0.01% 이하이어야 한다.
⑤ 안전시험
 ㉮ 마우스 : 체중 15~20 g의 마우스 8마리를 준비하여, 8마리의 마우스 복강에 0.5 ㎖를 접종하고 7일간 관찰한다. 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 한다.
 ㉯ 기니픽 : 체중 300~350 g의 기니픽 4마리를 준비하여 2마리의 기니픽 근육 또는 피하에 2 ㎖를, 다른 2마리의 기니픽 복강에 2 ㎖를 접종하고 7일간 관찰한다. 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 한다.
 ㉰ 돼지 : 체중 8~10 kg(4~6주령)의 돼지열병 항체 음성인 돼지 2마리를 준비하여, 백신 2두분을 근육접종한다. 접종 후 1~2시간 이내에 과민반응이 없어야 하며, 14일 이상의 관찰기간동안 주사부위의 화농 및 괴사, 발열, 설사 등의 부작용이 없어야 한다. (단, 오일백신의 경우는 21일간 관찰한다.)

⑥ Erns 항체음성시험

㉮ 동 물 : 체중 8~10 kg(4~6주령)의 돼지열병 항체 음성인 돼지 4마리를 사용한다.

㉯ 시 험 : 돼지 2마리에는 1두분을 근육접종하고, 2마리는 대조군으로 한다. 2마리의 접종군은 2주 간격으로 1두분을 2회 접종하고, 2차 접종 2주 후에 접종군과 대조군을 채혈하여 Erns에 대한 항체를 검사한다.

㉰ 시험방법 : 혈청을 분리하여 돼지열병 마커항체를 감별할 수 있는 효소면역법(ELISA) 키트 (별첨 1) 또는 이와 동등하다고 인정된 것을 사용한다.

㉱ 판 정 : 1두분 접종 2마리 돼지 혈청에서 Erns 항체가 인정되어서는 안 되며, 대조군은 중화항체 음성이어야 한다.

⑦ 혈청 역가시험

㉮ 동 물 : 체중 300~350 g의 기니픽 10마리를 사용한다.

㉯ 시 험 : 기니픽 8마리에 1두분씩 2주 간격으로 2회 근육 접종하고, 2마리는 무처치 대조로 둔다. 2차 접종 2주 후 채혈하여 NPLA법(별첨 2) 또는 FASN법(별첨 3으로 중화항체가를 측정한다.

㉰ 판 정 : 접종군 기니픽의 중화항체가는 256배 이상이어야 하며 대조군은 음성이어야한다.

⑧ 검정의 반복 : "①"항에서 "⑦"항까지의 그 결과를 판정하기 곤란할 때에는 해당시험을 반복한다.

<별첨 1> 돼지열병 Erns 항체검사법

검사법은 제조회사별 제품의 사용설명서의 술식에 따라 시험을 수행한다.

<별첨 2> NPLA(Neutralizing Peroxidase- Linked Assay)

1. Microplate에 가검 혈청을 2진 희석하여 well당 50 ㎕가 되도록 하여, CSFV를 0.1 ㎖당 200 $TCID_{50}$ 되게 하여 well당 50 ㎕씩 넣는다.
2. 진탕기에 20초간 혼합하여 37℃, 1시간 감작한 후 PK-15 cell(2.0×10^5cells/㎖)를 100 ㎕/well씩 넣고 2일간 37℃(5% CO2)에 배양한다.
3. 배양 상층액을 버리고 PBS로 1회 세척한 후 microplate를 완전히 건조시킨다.
4. 80% cold acetone를 넣고 -20℃에서 10분간 고정한 후 고정액을 완전히 버리고 PBS로 1회 세척한다.
5. CSFV 단크론 항체를 2% 말 혈청이 함유된 PBS로 희석한 후 100 ㎕/well씩 넣어 37℃, 1시간 반응시킨다.
6. PBS로 3~4회 세척한 후 biotinylated anti-mouse IgG용액 (kit solution)을 100㎕/well씩 넣어 37℃에서 40~60분간 반응시킨다.

   <Biotinylated anti-mouse IgG용액 제조법>

   - PBS ..... 9.9 ㎖
   - 말혈청 ..... 0.1 ㎖
   - biotinylated anti mouse IgG ..... 1 drop

7. 동시에 다음 단계의 시약을 제조하여 실시한다.

   <AB solution 제조법>

   - PBS-T (0.05% Tween20) ..... 10 ㎖
   - A Solution (Avidin PH) ..... 2 drop
   - B Solution (Biotinylated HRPH)..... 2 drop

8. PBS로 4회 세척한 후 AB solution을 100 ㎕/well씩 넣고 37℃에서 40~60분간 반응시킨다.
9. PBS-T로 3회 세척한 후, 1회 PBS로 세척한 후 물기를 완전히 제거한다.
10. Substrate DAB(10×, 60 ㎎ DAB/9 ㎖ D.W)을 100 ㎕/well씩 넣는다.

<Working solution(1×)>

- PBS .... 9 ㎖
- 30% H2O2 .... 10 ㎕
- DAB solution(10×) .... 1 ㎖

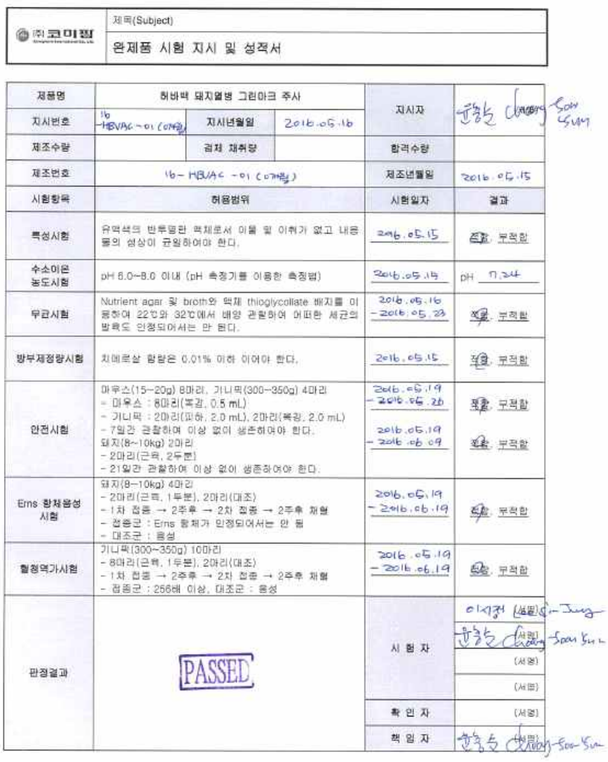
11. 증류수로 세척한 후 판독한다.

<별첨 3> FASN(Fluorescent antibody serum neutralization)법

1. Microplate에 가검 혈청을 2진법으로 희석하여 well당 50 ㎕가 되도록 한다.
2. CSFV를 0.1 ㎖당 200 TCID50 되도록 well당 50 ㎕씩 넣고 진탕기에 20초간 혼합하여 37℃, 1시간 감작한다.
3. PK-15 cell(2.0×105cells/㎖)를 100 ㎕/well씩 넣고 3~4일간 37℃(5% CO2)에 배양한다.
4. 3~4일 후 PBS로 2~3회 세척한 후 80% cold acetone으로 -20℃에서 10분간 고정한다.
5. 고정액을 버린 후 PBS로 1회 세척한다.
6. CSFV 단크론 항체를 넣어 37℃, 1시간 감작하고 PBS로 10분간 세척한다.
7. D.W로 세척 후 건조시킨 후 rabbit anti-mouse FITC conjugate로 37℃, 1시간 감작한 다음 PBS로 세척하고 cover glass를 덮은 후 형광현미경으로 특이형광을 관찰한다.

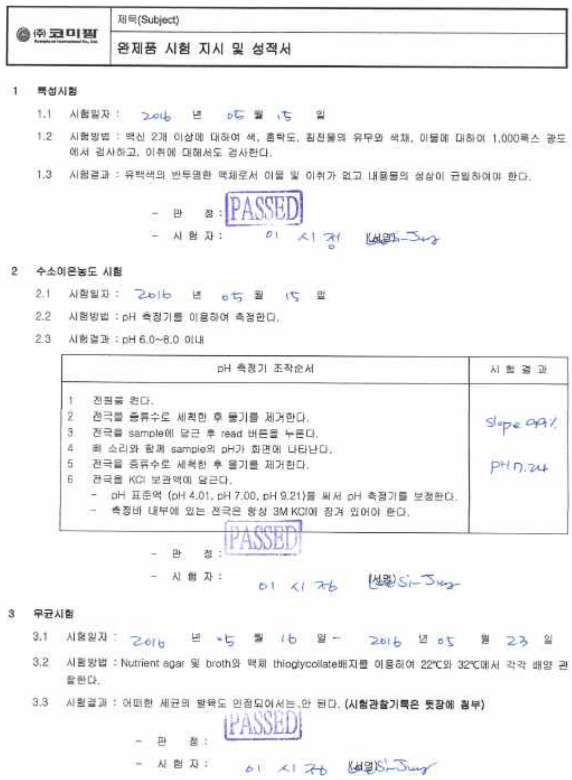
(3) 시험백신의 검정시험 결과

○ Figure 2. 16-HBVAC-01 lot의 시험성적



㈜코미팜 | 제목(Subject) 완제품 시험 지시 및 성적서

제품명	허바백 돼지열병 그린마크 주사			지시자	
지시번호	16-HBVAC-01 (0개월)	지시년월일	2016.05.16		
제조수량		검체 채취량		합격수량	
제조번호	16-HBVAC-01 (0개월)			제조년월일	2016.05.15
시험항목	허용범위			시험일자	결과
특성시험	유백색의 반투명한 액체로서 이물 및 이취가 없고 내용물의 성상이 균일하여야 한다.			2016.05.15	적합, 부적합
수소이온 농도시험	pH 6.0~8.0 이내 (pH 측정기를 이용한 측정법)			2016.05.15	pH 7.24
무균시험	Nutrient agar 및 broth와 액체 thioglycollate 배지를 이용하여 22℃와 32℃에서 배양 관찰하여 어떠한 세균의 발육도 인정되어서는 안 된다.			2016.05.16 - 2016.05.23	적합, 부적합
방부제정량시험	치메로살 함량은 0.01% 이하 이어야 한다.			2016.05.15	적합, 부적합
안전시험	마우스(15~20g) 8마리, 기니픽(300~350g) 4마리 - 마우스 : 8마리(복강, 0.5 mL) - 기니픽 : 2마리(피하, 2.0 mL), 2마리(복강, 2.0 mL) - 7일간 관찰하여 이상 없이 생존하여야 한다. 돼지(8~10kg) 2마리 - 2마리(근육, 2두분) - 21일간 관찰하여 이상 없이 생존하여야 한다.			2016.05.19 - 2016.05.26 2016.05.19 - 2016.06.09	적합, 부적합 적합, 부적합
Erns 항체음성 시험	돼지(8~10kg) 4마리 - 2마리(근육, 1두분), 2마리(대조) - 1차 접종 → 2주후 → 2차 접종 → 2주후 채혈 - 접종군 : Erns 항체가 인정되어서는 안 됨 - 대조군 : 음성			2016.05.19 - 2016.06.19	적합, 부적합
혈청역가시험	기니픽(300~350g) 10마리 - 8마리(근육, 1두분), 2마리(대조) - 1차 접종 → 2주후 → 2차 접종 → 2주후 채혈 - 접종군 : 256배 이상, 대조군 : 음성			2016.05.19 - 2016.06.19	적합, 부적합
판정결과	PASSED			시험자	이시정 (서명) (서명) (서명) (서명)
				확인자	(서명)
				책임자	(서명)



㈜코미팜 | 제목(Subject) 완제품 시험 지시 및 성적서

1 특성시험
1.1 시험일자 : 2016 년 05 월 15 일
1.2 시험방법 : 백신 2개 이상에 대하여 색, 혼탁도, 침전물의 유무와 색채, 이물에 대하여 1,000룩스 광도에서 검사하고, 이취에 대해서도 검사한다.
1.3 시험결과 : 유백색의 반투명한 액체로서 이물 및 이취가 없고 내용물의 성상이 균일하여야 한다.
- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 이 시 정 (서명) Si-Jung

2 수소이온농도 시험
2.1 시험일자 : 2016 년 05 월 15 일
2.2 시험방법 : pH 측정기를 이용하여 측정한다.
2.3 시험결과 : pH 6.0~8.0 이내

pH 측정기 조작순서	시 험 결 과
1 전원을 켠다. 2 전극을 증류수로 세척한 후 물기를 제거한다. 3 전극을 sample에 담근 후 read 버튼을 누른다. 4 삐 소리와 함께 sample의 pH가 화면에 나타난다. 5 전극을 증류수로 세척한 후 물기를 제거한다. 6 전극을 KCl 보관액에 담근다. - pH 표준액 (pH 4.01, pH 7.00, pH 9.21)를 써서 pH 측정기를 보정한다. - 측정바 내부에 있는 전극은 항상 3M KCl에 잠겨 있어야 한다.	Slope 99% pH 7.24

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 이 시 정 (서명) Si-Jung

3 무균시험
3.1 시험일자 : 2016 년 05 월 16 일 ~ 2016 년 05 월 23 일
3.2 시험방법 : Nutrient agar 및 broth와 액체 thioglycollate배지를 이용하여 22℃와 32℃에서 각각 배양 관찰한다.
3.3 시험결과 : 어떠한 세균의 발육도 인정되어서는 안 된다. **(시험관찰기록은 뒷장에 첨부)**
- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 이 시 정 (서명) Si-Jung

㈜코미팜

제목(Subject)

완제품 시험 지시 및 성적서

4 방부제 정량시험

4.1 시험일자 : 2016 년 05 월 15 일

4.2 시험방법 : 2개 이상의 백신을 동량 혼합하고 검사재료, 치메로살 표준용액 및 증류수를 동일하게 조작하여 검사, 표준 및 대조 측정액을 조제한다. 검사 측정액과 표준 측정액을 취하여 대조 측정액을 대조로하여 10mm의 비색관으로 490nm에서의 흡광도 Ea 및 Eb를 측정하여 치메로살의 함량은 아래 식으로 산출한다.

치메로살의 량 (mg) = 표준품의 량(mg) x Ea/Eb

4.3 시험 결과 : 치메로살의 함유량은 0.01% 이하 이어야 한다.

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 이 시 정 Lee Si-Jung

5 안전시험

5.1 마우스, 기니픽

5.1.1 시험일자 : 2016 년 05 월 19 일 ~ 2016 년 05 월 26 일

5.1.2 시험동물 : 마우스 (15~20g) 8마리, 기니픽 (300~350g) 4마리

5.1.3 접종방법 : 마우스 8마리 (복강, 0.5 mL),
기니픽 2마리 (피하, 2.0 mL), 2마리 (복강, 2.0 mL)

5.1.4 관 찰 : 7일간 관찰하여 시험기간 중 이상 없이 생존하여야 한다. (시험관찰기록은 뒷장에 첨부)

5.2 돼지

5.2.1 시험일자 : 2016 년 05 월 19 일 ~ 2016 년 06 월 09 일

5.2.2 시험동물 : 8~10kg의 돼지열병 항체 음성인 돼지 2마리

5.2.3 접종방법 : 2마리 (근육, 2두분)

5.2.4 관 찰 : 21일간 관찰하여 시험시간 중 이상 없이 생존하여야 한다. (시험관찰기록은 뒷장에 첨부)

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 윤창순 Chang-Soon Yun

㈜코미팜

제목(Subject)

완제품 시험 지시 및 성적서

6 Ems 항체음성시험

6.1 시험일자 : 2016년 05 월 19 일 ~ 2016 년 06 월 19 일

6.2 시험동물 : 8~10kg의 돼지열병 항체 음성인 돼지 4마리

6.3 접종방법 : 2마리 (근육, 1두분)

6.4 관 찰 : 2주 간격으로 2회 접종하고, 2차 접종 2주 후에 채혈하여 Ems에 대한 항체를 검사한다.

6.5 항 체 가 : 접종군 - Ems 항체가 인정되어서는 안됨, 대조군 - 음성

6.6 시험결과 : 접종군 - Ems항체음성 대조군 - 음성 (시험관찰기록은 뒷장에 첨부)

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 윤창순 Chang-Soon Yun (서명)

7 혈청역가시험

7.1 시험일자 : 2016 년 05 월 19 일 ~ 2016 년 06 월 19 일

7.2 시험동물 : 기니픽 (300~350g) 10마리

7.3 접종방법 : 8마리 (근육, 1두분), 2마리 (대조)

7.4 관 찰 : 2주 간격으로 2회 접종하고, 2차 접종 2주 후에 채혈하여 중화항체가를 측정한다.

7.5 항 체 가 : 접종군 - 256배 이상, 대조군 - 음성

7.6 시험결과 : 접종군 - 256 X 이상, 대조군 - 음성 (시험관찰기록은 뒷장에 첨부)

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 윤창순 Chang-Soon Yun

㈜코미팜

제목(Subject)

무균 시험 성적서

제 품 명	허바텍 돼지열병 그람마크 주사	시 험 자	이 시 정 Lee Si-Jung
시 험 일	2016 . 05 . 16	판 정 일	2016 . 05 . 23

1 — Lot No. 16-HBVAC-01 (그람마크) - ①

	32℃			22℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
1 일	—	—	—	—	—	—
2 일	—	—	—	—	—	—
3 일	—	—	—	—	—	—
4 일	—	—	—	—	—	—
5 일	—	—	—	—	—	—
6 일	—	—	—	—	—	—
7 일	—	—	—	—	—	—
8 일						
9 일						
10 일						
판정	PASSED					

2 — Lot No. 16-HBVAC-01(그람마크) - ②

	32℃			22℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
1 일	—	—	—	—	—	—
2 일	—	—	—	—	—	—
3 일	—	—	—	—	—	—
4 일	—	—	—	—	—	—
5 일	—	—	—	—	—	—
6 일	—	—	—	—	—	—
7 일	—	—	—	—	—	—
8 일						
9 일						
10 일						
판정	PASSED					

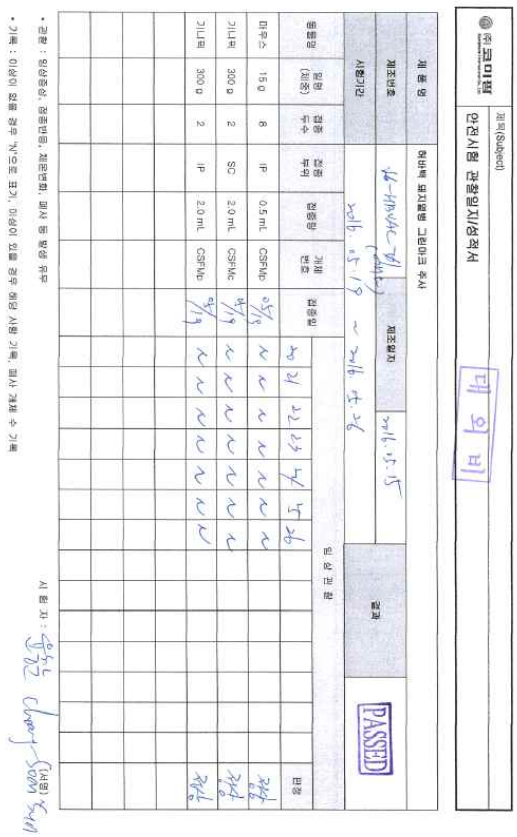
3 — Lot No. - ①

	32℃			22℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
1 일						
2 일						
3 일						
4 일						
5 일						
6 일						
7 일						
8 일						
9 일						
10 일						
판정						

4 — Lot No. - ②

	32℃			22℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
1 일						
2 일						
3 일						
4 일						
5 일						
6 일						
7 일						
8 일						
9 일						
10 일						
판정						

Form :QS0201-05-02(Rev.1.00,시행:2016.03.09) ㈜코미팜 Page :1 / 1



(주)코미팜

제목(Subject): 안전시험 관찰일지/성적서 [대외비]

제 품 명	허바백 돼지열병 그린마크 주사																						
제조번호	16-HBVAC-01 (0개월)			제조일자	2016.05.15											결과	PASSED						
시험기간	2016.05.19~2016.06.09																						
동물명	일령(체중)	접종두수	접종부위	접종량	개체번호	접종일	임상관찰																
							20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	06/01	02	03	04	
돼지	8 kg	1	IM	2 dose	CSFM 1	05/19	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
돼지	8 kg	1	IM	2 dose	CSFM 2	05/19	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

• 관찰 : 임상증상, 접종반응, 체온변화, 폐사 등 발생 유무

• 기록 : 이상이 없을 경우 "N"으로 표기, 이상이 있을 경우 해당 사항 기록, 폐사 개체 수 기록

시 험 자 : 윤충순 Chong-Son Sun (서명)

(주)코미팜

제목(Subject): 안전시험 관찰일지/성적서 [대외비]

제 품 명	허바백 돼지열병 그린마크 주사																			
제조번호	16-HBVAC-01 (0개월)			제조일자	2016.05.15											결과	PASSED			
시험기간	2016.05.19~2016.06.09																			
동물명	접종두수	접종부위	개체번호	임상관찰																판정
				06/05	06	07	08	09												
돼지	1	IM	CSFM 1	N	N	N	N	N												정상
돼지	1	IM	CSFM 2	N	N	N	N	N												정상

• 관찰 : 임상증상, 접종반응, 체온변화, 폐사 등 발생 유무

• 기록 : 이상이 없을 경우 "N"으로 표기, 이상이 있을 경우 해당 사항 기록, 폐사 개체 수 기록

시 험 자 : 윤충순 Chong-Son Sun (서명)

(주)코미팜

제목(Subject): 역가시험 성적서

제품명	허바백 돼지열병 그린마크 주사	제조번호	16-HBVAC-01 (0개월)
시험명	Ems 항체음성시험	시험일자	2016.06.17~06.19
검사샘플	Serum X 4	검사법	ELISA / 중화항체
시험자	윤충순 Chong-Son Sun		

시 험 결 과

개체번호	ELISA	중화항체
접종-1	-ve	-
접종-2	-ve	-
비접종-1	-ve	<2
비접종-2	-ve	<2
결 과	접종: Ems항체 음성	비접종: 음성

(주)코미팜

제목(Subject): 역가시험 성적서(중화항체가 시험)

제품명	허바백 돼지열병 그린마크 주사	제조번호	16-HBVAC-01 (0개월)
시험명	혈청역가시험	시험일자	2016.06.17~06.19
검사샘플	Serum X 10	전처리	Kaolin RBC Non
검사법	NPLA	항원	CSFV 200TCID$_{50}$/0.1 mL
Conjugate		Host cell	PK-15
Dilution	2 Fold (Initial 1X, 2X, 10X)		
시험자	윤충순 Chong-Son Sun		

시 험 결 과

	샘플번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	결과
A	Exp. 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	2048
B	Exp. 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	2048
C	Exp. 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1024
D	Exp. 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1024
E	Exp. 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1024
F	Exp. 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	2048
G	Exp. 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1024
H	Exp. 8	+		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1024

㈜코미팜	제목(Subject)
	역가시험 성적서(중화항체가 시험)

제품명	허바백 돼지열병 그린마크 주사	제조번호	16-HBVAC-01 (0개월)
시험명	혈청역가시험	시험일자	2016.06.17 ~ 2016.06.19
검사샘플	Serum X 10	전처리	Kaolin RBC Non
검사법	NPLA	항원	CSFV 200TCID50/0.1 mL
Conjugate		Host cell	PK-15
Dilution	2 Fold (initial 1X, 2X, 10X)		
시험자	윤충순 Chung-Soon Sun		

시 험 결 과

	샘플번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	결 과
A	Cont. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2
B	Cont. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2
C	Cell control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D	Back 10^{-1}	-	-	-	-	-								
E	Back 10^{-2}	-	-	-	-	+								
F	Back 10^{-3}	+	+	+	+	+								
G														
H														
시 험 결 과	시험군 : 256 배 이상													
	대조군 : 음성													

○ Figure 3. 16-HBVAC-02 lot의 시험성적

㈜코미팜	제목(Subject)
	완제품 시험 지시 및 성적서

제품명	허바백 돼지열병 그린마크 주사			지시자	윤충순 Chung-Soon Sun
지시번호	16-HBVAC-02 (0개월)	지시년월일	2016.05.19		
제조수량		검체 채취량		합격수량	
제조번호	16-HBVAC-02 (0개월)			제조년월일	2016.05.18
시험항목	허용범위			시험일자	결과
특성시험	유백색의 반투명한 액체로서 이물 및 이취가 없고 내용물의 성상이 균일하여야 한다.			2016.05.18	적합, 부적합
수소이온 농도시험	pH 6.0~8.0 이내 (pH 측정기를 이용한 측정법)			2016.05.18	pH 7.19
무균시험	Nutrient agar 및 broth와 액체 thioglycollate 배지를 이용하여 22℃와 32℃에서 배양 관찰하여 어떠한 세균의 발육도 인정되어서는 안 된다.			2016.05.19 ~2016.05.26	적합, 부적합
방부제정량시험	치메로살 함량은 0.01% 이하 이어야 한다.			2016.05.18	적합, 부적합
안전시험	마우스(15~20g) 8마리, 기니픽(300~350g) 4마리 - 마우스 : 8마리(복강, 0.5 mL) - 기니픽 : 2마리(피하, 2.0 mL), 2마리(복강, 2.0 mL) - 7일간 관찰하여 이상 없이 생존하여야 한다. 돼지(8~10kg) 2마리 - 2마리(근육, 2두분) - 21일간 관찰하여 이상 없이 생존하여야 한다.			2016.05.19 ~2016.05.26 2016.05.19 ~2016.06.09	적합, 부적합 적합, 부적합
Erns 항체음성 시험	돼지(8~10kg) 4마리 - 2마리(근육, 1두분), 2마리(대조) - 1차 접종 → 2주후 → 2차 접종 → 2주후 채혈 - 접종군 : Erns 항체가 인정되어서는 안 됨 - 대조군 : 음성			2016.05.19 ~2016.06.14	적합, 부적합
혈청역가시험	기니픽(300~350g) 10마리 - 8마리(근육, 1두분), 2마리(대조) - 1차 접종 → 2주후 → 2차 접종 → 2주후 채혈 - 접종군 : 256배 이상, 대조군 : 음성			2016.05.19 ~2016.06.14	적합, 부적합
판정결과	PASSED			시 험 자	이시정 (서명)Si-Jung 윤충순 Chung-Soon Sun (서명) (서명)
				확 인 자	(서명)
				책 임 자	윤충순 Chung-Soon Sun

㈜코미팜	제목(Subject)
	완제품 시험 지시 및 성적서

1 특성시험

1.1 시험일자 : 2016 년 05 월 18 일

1.2 시험방법 : 백신 2개 이상에 대하여 색, 혼탁도, 침전물의 유무와 색채, 이물에 대하여 1,000룩스 광도에서 검사하고, 이취에 대해서도 검사한다.

1.3 시험결과 : 유백색의 반투명한 액체로서 이물 및 이취가 없고 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 이 시 정 (서명)Si-Jung

2 수소이온농도 시험

2.1 시험일자 : 2016 년 05 월 18 일

2.2 시험방법 : pH 측정기를 이용하여 측정한다.

2.3 시험결과 : pH 6.0~8.0 이내

pH 측정기 조작순서	시 험 결 과
1 전원을 켠다. 2 전극을 증류수로 세척한 후 물기를 제거한다. 3 전극을 sample에 담근 후 read 버튼을 누른다. 4 삐 소리와 함께 sample의 pH가 화면에 나타난다. 5 전극을 증류수로 세척한 후 물기를 제거한다. 6 전극을 KCl 보관액에 담근다. - pH 표준액 (pH 4.01, pH 7.00, pH 9.21)을 써서 pH 측정기를 보정한다. - 측정바 내부에 있는 전극은 항상 3M KCl에 잠겨 있어야 한다.	slope 98% pH 7.19

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 이 시 정 (서명)Si-Jung

3 무균시험

3.1 시험일자 : 2016 년 05 월 19 일 ~ 2016 년 05 월 26 일

3.2 시험방법 : Nutrient agar 및 broth와 액체 thioglycollate배지를 이용하여 22℃와 32℃에서 각각 배양 관찰한다.

3.3 시험결과 : 어떠한 세균의 발육도 인정되어서는 안 된다. **(시험관찰기록은 뒷장에 첨부)**

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 이 시 정 (서명)Si-Jung

(주)코미팜

제목(Subject)

완제품 시험 지시 및 성적서

4 방부제 정량시험

4.1 시험일자 : 2016 년 05 월 18 일

4.2 시험방법 : 2개 이상의 백신을 동량 혼합하고 검사재료, 치메로살 표준용액 및 증류수를 동일하게 조작하여 검사, 표준 및 대조 측정액을 조제한다. 검사 측정액과 표준 측정액을 취하여 대조 측정액을 대조로하여 10mm의 비색관으로 490nm에서의 흡광도 Ea 및 Eb를 측정하며 치메로살의 함량은 아래 식으로 산출한다.

치메로살의 량 (mg) = 표준품의 량(mg) x Ea/Eb

4.3 시험 결과 : 치메로살의 함유량은 0.01% 이하 이어야 한다.

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 이 시 정 (서명) Si-Jung

5 안전시험

5.1 마우스, 기니픽

5.1.1 시험일자 : 2016 년 05 월 19 일 ~ 2016 년 05 월 26 일

5.1.2 시험동물 : 마우스 (15~20g) 8마리, 기니픽 (300~350g) 4마리

5.1.3 접종방법 : 마우스 8마리 (복강, 0.5 mL),

기니픽 2마리 (피하, 2.0 mL), 2마리 (복강, 2.0 mL)

5.1.4 관 찰 : 7일간 관찰하여 시험기간 중 이상 없이 생존하여야 한다. (시험관찰기록은 뒷장에 첨부)

5.2 돼지

5.2.1 시험일자 : 2016 년 05 월 19 일 ~ 2016 년 06 월 09 일

5.2.2 시험동물 : 8~10kg의 돼지열병 항체 음성인 돼지 2마리

5.2.3 접종방법 : 20마리 (근육, 2두분)

5.2.4 관 찰 : 21일간 관찰하여 시험시간 중 이상 없이 생존하여야 한다. (시험관찰기록은 뒷장에 첨부)

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 윤충순 (서명) Chang-Soon Sun

(주)코미팜

제목(Subject)

완제품 시험 지시 및 성적서

6 Erns 항체음성시험

6.1 시험일자 : 2016 년 05 월 19 일 ~ 2016 년 06 월 19 일

6.2 시험동물 : 8~10kg의 돼지열병 항체 음성인 돼지 4마리

6.3 접종방법 : 2마리 (근육, 1두분)

6.4 관 찰 : 2주 간격으로 2회 접종하고, 2차 접종 2주 후에 채혈하여 Erns에 대한 항체를 검사한다.

6.5 항 체 가 : 접종군 – Erns 항체가 인정되어서는 안됨, 대조군 – 음성

6.6 시험결과 : 접종군 – Erns 항체 음성 대조군 – 음성 (시험관찰기록은 뒷장에 첨부)

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 윤충순 (서명) Chang-Soon Sun

7 혈청역가시험

7.1 시험일자 : 2016 년 05 월 19 일 ~ 2016 년 06 월 19 일

7.2 시험동물 : 기니픽 (300~350g) 10마리

7.3 접종방법 : 8마리 (근육, 1두분), 2마리 (대조)

7.4 관 찰 : 2주 간격으로 2회 접종하고, 2차 접종 2주 후에 채혈하여 중화항체가를 측정한다.

7.5 항 체 가 : 접종군 – 256배 이상, 대조군 – 음성

7.6 시험결과 : 접종군 – 256배이상 X 이상, 대조군 – 음성 (시험관찰기록은 뒷장에 첨부)

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 윤충순 (서명) Chang-Soon Sun

(주)코미팜

제목(Subject)

무균 시험 성적서

제 품 명	허바백 돼지열병 그린마크 주사	시 험 자	이 시 정 Lee Si-Jung
시 험 일	2016. 05. 19	판 정 일	2016. 05. 26

1	Lot No. 16-HBVAC-02 (이제희) ①					
	32℃			22℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
1 일	–	–	–	–	–	–
2 일	–	–	–	–	–	–
3 일	–	–	–	–	–	–
4 일	–	–	–	–	–	–
5 일	–	–	–	–	–	–
6 일	–	–	–	–	–	–
7 일	–	–	–	–	–	–
8 일						
9 일						
10 일						
판정	PASSED					

2	Lot No. 16-HBVAC-02 (이제희) – ②					
	32℃			22℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
1 일	–	–	–	–	–	–
2 일	–	–	–	–	–	–
3 일	–	–	–	–	–	–
4 일	–	–	–	–	–	–
5 일	–	–	–	–	–	–
6 일	–	–	–	–	–	–
7 일	–	–	–	–	–	–
8 일						
9 일						
10 일						
판정	PASSED					

3	Lot No. – ①					
	32℃			22℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
1 일						
2 일						
3 일						
4 일						
5 일						
6 일						
7 일						
8 일						
9 일						
10 일						
판정						

4	Lot No. – ②					
	32℃			22℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
1 일						
2 일						
3 일						
4 일						
5 일						
6 일						
7 일						
8 일						
9 일						
10 일						
판정						

(주)코미팜

제목(Subject)

안전시험 관찰일지/성적서

대외비

제 품 명	허바백 돼지열병 그린마크 주사	
제조번호	16-HBVAC-02 (이제희)	제조일자 2016.05.18
시험기간	2016.05.19 ~ 2016.05.26	
결과	PASSED	

동물명	일령 (체중)	접종 두수	접종 부위	접종량	개체 번호	접종일	임상관찰 20	21	22	23	24	25	26	판정
마우스	15 g	8	IP	0.5 mL	CSFMp	05/19	N	N	N	N	N	N	N	정상
기니픽	300 g	2	SC	2.0 mL	CSFMc	05/19	N	N	N	N	N	N	N	정상
기니픽	300 g	2	IP	2.0 mL	CSFMp	05/19	N	N	N	N	N	N	N	정상

• 관찰 : 임상증상, 접종반응, 체온변화, 폐사 등 발생 유무

• 기록 : 이상이 없을 경우 "N"으로 표기, 이상이 있을 경우 해당 사항 기록, 폐사 개체 수 기록

시 험 자 : 윤충순 Chang-Soon Sun (서명)

(주)코미팜

제목(Subject)

안전시험 관찰일지/성적서

제 품 명	허바백 돼지열병 그린마크 주사		
제조번호	16-HBVAC-Ø2 (0개월)	제조일자	2016. 05. 18
시험기간	2016. 05. 19 ~ 2016. 06. 09	결과	PASSED

동물명	일령(체중)	접종두수	접종부위	접종량	개체번호	접종일	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	6/1	02	03	04
돼지	8 kg	1	IM	2 dose	CSFM 1	05/19	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
돼지	8 kg	1	IM	2 dose	CSFM 2	05/19	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

• 관찰 : 임상증상, 접종반응, 체온변화, 폐사 등 발생 유무

• 기록 : 이상이 없을 경우 "N"으로 표기, 이상이 있을 경우 해당 사항 기록, 폐사 개체 수 기록

시 험 자 : 윤창순 Chang-Soon Sun (서명)

(주)코미팜

제목(Subject)

안전시험 관찰일지/성적서

제 품 명	허바백 돼지열병 그린마크 주사		
제조번호	16HBVAC-Ø2 (0개월)	제조일자	2016. 05. 18
시험기간	2016. 05. 19 ~ 2016. 06. 09	결과	PASSED

동물명	접종두수	접종부위	개체번호	06/05	06	07	08	09	판정
돼지	1	IM	CSFM 1	N	N	N	N	N	정상
돼지	1	IM	CSFM 2	N	N	N	N	N	정상

• 관찰 : 임상증상, 접종반응, 체온변화, 폐사 등 발생 유무

• 기록 : 이상이 없을 경우 "N"으로 표기, 이상이 있을 경우 해당 사항 기록, 폐사 개체 수 기록

시 험 자 : 윤창순 Chang-Soon Sun (서명)

(주)코미팜

제목(Subject)

역가시험 성적서

제품명	허바백 돼지열병 그린마크 주사	제조번호	16-HBVAC-Ø2 (0개월)
시험명	Erns 항체음성시험	시험일자	2016. 06. 17 ~ 2016. 06. 19
검사샘플	Serum X 4	검사법	ELISA / 중화항체
시험자	윤창순 Chang-Soon Sun		

시 험 결 과

개체번호	ELISA	중화항체
접종-1	-ve	-
접종-2	-ve	-
비접종-1	-ve	<2
비접종-2	-ve	<2
결 과	접종: Erns 항체 음성	비접종: 음성

(주)코미팜

제목(Subject)

역가시험 성적서(중화항체가 시험)

제품명	허바백 돼지열병 그린마크 주사	제조번호	16-HBVAC-Ø2 (0개월)
시험명	혈청역가시험	시험일자	2016. 06. 17 ~ 2016. 06. 19
검사샘플	Serum X 10	전처리	Kaolin RBC Non
검사법	NPLA	항원	CSFV 200TCID$_{50}$/0.1 mL
Conjugate		Host cell	PK-15
Dilution	2 Fold (Initial 1X, 2X, 10X)		
시험자	윤창순 Chang-Soon Sun		

시 험 결 과

	샘플번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	결 과
A	Exp. 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	2048
B	Exp. 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1024
C	Exp. 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1024
D	Exp. 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1024
E	Exp. 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1024
F	Exp. 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1024
G	Exp. 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	2048
H	Exp. 8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1024

㈜코미팜

제목(Subject)

역가시험 성적서(중화항체가 시험)

제품명	허바백 돼지열병 그린마크 주사	제조번호	16-HBVAC-03 (0개월)
시험명	혈청역가시험	시험일자	2016.05.17 ~ 2016.06.19
검사생물	Serum X 10	전처리	Kaolin RBC Non
검사법	NPLA	항원	CSFV 200TCID$_{50}$/0.1 mL
Conjugate		Host cell	PK-15
Dilution	2 Fold (Initial 1X, 2X, 10X)		
시험자	윤창순 Chang-Soon Yun		

시 험 결 과

	샘플번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	결 과
A	Cont. 1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	↓
B	Cont. 2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	↓
C	Cell control	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
D	Back 10^{-1}	—	—	—	—	—								
E	Back 10^{-2}	—	—	—	—	+								
F	Back 10^{-3}	+	+	+	+	+								
G														
H														
시 험 결 과		시험군 : 256배 이상												
		대조군 : 음성												

○ Figure 4. 16-HBVAC-03 lot의 시험성적

㈜코미팜

제목(Subject)

완제품 시험 지시 및 성적서

제품명	허바백 돼지열병 그린마크 주사			지시자	윤창순 (Chang-Soon Yun)
지시번호	16-HBVAC-03 (0개월)	지시년월일	2016.05.23		
제조수량		검체 채취량		합격수량	
제조번호	16-HBVAC-03 (0개월)			제조년월일	2016.05.22
시험항목	허용범위			시험일자	결과
특성시험	유백색의 반투명한 액체로서 이물 및 이취가 없고 내용물의 성상이 균일하여야 한다.			2016.05.22	적합. 보적함
수소이온농도시험	pH 6.0~8.0 이내 (pH 측정기를 이용한 측정법)			2016.05.22	pH 11.22
무균시험	Nutrient agar 및 broth와 액체 thioglycollate 배지를 이용하여 22℃와 32℃에서 배양 관찰하여 어떠한 세균의 발육도 인정되어서는 안 된다.			2016.05.23 ~2016.05.30	적합. 부적합
방부제정량시험	치메로살 함량은 0.01% 이하 이어야 한다.			2016.05.22	적합. 보적함
안전시험	마우스(15~20g) 8마리, 기니픽(300~350g) 4마리 - 마우스 : 8마리(복강, 0.5 mL) - 기니픽 : 2마리(피하, 2.0 mL), 2마리(복강, 2.0 mL) - 7일간 관찰하여 이상 없이 생존하여야 한다. 돼지(8~10kg) 2마리 - 2마리(근육, 2두분) - 21일간 관찰하여 이상 없이 생존하여야 한다.			2016.05.23 ~2016.06.30 2016.05.23 ~2016.06.13	적합. 보적함 적합. 보적함
Erns 항체음성시험	돼지(8~10kg) 4마리 - 2마리(근육, 1두분), 2마리(대조) - 1차 접종 → 2주후 → 2차 접종 → 2주후 채혈 - 접종군 : Erns 항체가 인정되어서는 안 됨 - 대조군 : 음성			2016.05.23 ~2016.06.23	적합. 보적함
혈청역가시험	기니픽(300~350g) 10마리 - 8마리(근육, 1두분), 2마리(대조) - 1차 접종 → 2주후 → 2차 접종 → 2주후 채혈 - 접종군 : 256배 이상, 대조군 : 음성			2016.05.23 ~2016.06.23	적합. 보적함
관정결과	PASSED			시 험 자	이시정 (서명) Si-Jung 윤창순 (Chang-Soon Yun) (서명) (서명)
				확 인 자	(서명)
				책 임 자	윤창순 (Chang-Soon Yun)

㈜코미팜

제목(Subject)

완제품 시험 지시 및 성적서

1 특성시험

1.1 시험일자 : 2016 년 05 월 22 일

1.2 시험방법 : 백신 2개 이상에 대하여 색, 혼탁도, 침전물의 유무와 색채, 이물에 대하여 1,000룩스 광도에서 검사하고, 이취에 대해서도 검사한다.

1.3 시험결과 : 유백색의 반투명한 액체로서 이물 및 이취가 없고 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 이 시 정 (서명) Si-Jung

2 수소이온농도 시험

2.1 시험일자 : 2016 년 05 월 22 일

2.2 시험방법 : pH 측정기를 이용하여 측정한다.

2.3 시험결과 : pH 6.0~8.0 이내

pH 측정기 조작순서	시 험 결 과
1 전원을 켠다. 2 전극을 증류수로 세척한 후 물기를 제거한다. 3 전극을 sample에 담근 후 read 버튼을 누른다. 4 삐 소리와 함께 sample의 pH가 화면에 나타난다. 5 전극을 증류수로 세척한 후 물기를 제거한다. 6 전극을 KCl 보관액에 담근다. - pH 표준액 (pH 4.01, pH 7.00, pH 9.21)을 써서 pH 측정기를 보정한다. - 측정바 내부에 있는 전극은 항상 3M KCl에 잠겨 있어야 한다.	Slope 98% pH 11.22

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 이 시 정 (서명) Si-Jung

3 무균시험

3.1 시험일자 : 2016 년 05 월 23 일 ~ 2016 년 06 월 30 일

3.2 시험방법 : Nutrient agar 및 broth와 액체 thioglycollate배지를 이용하여 22℃와 32℃에서 각각 배양 관찰한다.

3.3 시험결과 : 어떠한 세균의 발육도 인정되어서는 안 된다. (시험관찰기록은 뒷장에 첨부)

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 이 시 정 (서명) Si-Jung

㈜코미팜	제목(Subject)
	완제품 시험 지시 및 성적서

4 방부제 정량시험

4.1 시험일자 : 2016 년 05 월 22 일

4.2 시험방법 : 2개 이상의 백신을 동량 혼합하고 검사재료, 치메로살 표준용액 및 증류수를 동일하게 조작하여 검사, 표준 및 대조 측정액을 조제한다. 검사 측정액과 표준 측정액을 취하여 대조 측정액을 대조로하여 10mm의 비색관으로 490nm에서의 흡광도 Ea 및 Eb를 측정하며 치메로살의 함량은 아래 식으로 산출한다.

치메로살의 량 (mg) = 표준품의 량(mg) x Ea/Eb

4.3 시험 결과 : 치메로살의 함유량은 0.01% 이하 이어야 한다.

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 이 시 정 Lee Si-Jung (서명)

5 안전시험

5.1 마우스, 기니픽

5.1.1 시험일자 : 2016 년 05 월 23 일 ~ 2016 년 05 월 30 일

5.1.2 시험동물 : 마우스 (15~20g) 8마리, 기니픽 (300~350g) 4마리

5.1.3 접종방법 : 마우스 8마리 (복강, 0.5 mL),

기니픽 2마리 (피하, 2.0 mL), 2마리 (복강, 2.0 mL)

5.1.4 관 찰 : 7일간 관찰하여 시험기간 중 이상 없이 생존하여야 한다. **(시험관찰기록은 뒷장에 첨부)**

5.2 돼지

5.2.1 시험일자 : 2016 년 05 월 23 일 ~ 2016 년 06 월 13 일

5.2.2 시험동물 : 8~10kg의 돼지열병 항체 음성인 돼지 2마리

5.2.3 접종방법 : 2마리 (근육, 2두분)

5.2.4 관 찰 : 21일간 관찰하여 시험기간 중 이상 없이 생존하여야 한다. **(시험관찰기록은 뒷장에 첨부)**

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 윤종순 Chong-Soon Sun (서명)

대외비

㈜코미팜	제목(Subject)
	완제품 시험 지시 및 성적서

6 Erns 항체음성시험

6.1 시험일자 : 2016 년 05 월 23 일 ~ 2016 년 06 월 23 일

6.2 시험동물 : 8~10kg의 돼지열병 항체 음성인 돼지 4마리

6.3 접종방법 : 2마리 (근육, 1두분)

6.4 관 찰 : 2주 간격으로 2회 접종하고, 2차 접종 2주 후에 채혈하여 Erns에 대한 항체를 검사한다.

6.5 항 체 가 : 접종군 – Erns 항체가 인정되어서는 안됨, 대조군 – 음성

6.6 시험결과 : 접종군 – Erns항체 음성, 대조군 – 음성 **(시험관찰기록은 뒷장에 첨부)**

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 윤종순 Chong-Soon Sun (서명)

7 혈청역가시험

7.1 시험일자 : 2016 년 05 월 23 일 ~ 2016 년 06 월 23 일

7.2 시험동물 : 기니픽 (300~350g) 10마리

7.3 접종방법 : 8마리 (근육, 1두분), 2마리 (대조)

7.4 관 찰 : 2주 간격으로 2회 접종하고, 2차 접종 2주 후에 채혈하여 중화항체가를 측정한다.

7.5 항 체 가 : 접종군 – 256배 이상, 대조군 – 음성

7.6 시험결과 : 접종군 – 256 X 이상, 대조군 – 음성 **(시험관찰기록은 뒷장에 첨부)**

- 판 정 : PASSED
- 시 험 자 : 윤종순 Chong-Soon Sun (서명)

대외비

㈜코미팜	제목(Subject)
	무균 시험 성적서

제 품 명	허바백 돼지열병 그린마크 주사	시 험 자	이 시 정 Lee Si-Jung
시 험 일	2016. 05. 23	판 정 일	2016. 05. 30

1	Lot No. 16-HBVAC-03(이재철) ①					
	32℃			22℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
1 일	–	–	–	–	–	–
2 일	–	–	–	–	–	–
3 일	–	–	–	–	–	–
4 일	–	–	–	–	–	–
5 일	–	–	–	–	–	–
6 일	–	–	–	–	–	–
7 일	–	–	–	–	–	–
8 일						
9 일						
10 일						
판정	PASSED					

2	Lot No. 16-HBVAC-03(이재철) – ②					
	32℃			22℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
1 일	–	–	–	–	–	–
2 일	–	–	–	–	–	–
3 일	–	–	–	–	–	–
4 일	–	–	–	–	–	–
5 일	–	–	–	–	–	–
6 일	–	–	–	–	–	–
7 일	–	–	–	–	–	–
8 일						
9 일						
10 일						
판정	PASSED					

3	Lot No. – ①					
	32℃			22℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
1 일						
2 일						
3 일						
4 일						
5 일						
6 일						
7 일						
8 일						
9 일						
10 일						
판정						

4	Lot No. – ②					
	32℃			22℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
1 일						
2 일						
3 일						
4 일						
5 일						
6 일						
7 일						
8 일						
9 일						
10 일						
판정						

㈜코미팜	제목(Subject)
	안전시험 관찰일지/성적서

대외비

제 품 명	허바백 돼지열병 그린마크 주사	
제조번호	16-HBVAC 03(이재철)	제조일자 2016.05.22
시험기간	2016.05.23 ~ 2016.05.30	결과 PASSED

동물명	일령 (체중)	접종 두수	접종 부위	접종량	개체 번호	접종일	임상관찰 24	25	26	27	28	29	30	판정
마우스	15 g	8	IP	0.5 mL	CSFMp	05/23	N	N	N	N	N	N	N	정상
기니픽	300 g	2	SC	2.0 mL	CSFMc	05/23	N	N	N	N	N	N	N	정상
기니픽	300 g	2	IP	2.0 mL	CSFMp	05/23	N	N	N	N	N	N	N	정상

• 관찰 : 임상증상, 접종반응, 체온변화, 폐사 등 발생 유무

• 기록 : 이상이 없을 경우 "N"으로 표기, 이상이 있을 경우 해당 사항 기록, 폐사 개체 수 기록

시 험 자 : 윤종순 Chong-Soon Sun (서명)

대외비

(주)코미팜

제목(Subject)

안전시험 관찰일지/성적서

제품명	허바백 돼지열병 그린마크 주사		
제조번호	16-HBVAC-Ø3 (0개월)	제조일자	2016.05.22
시험기간	2016.05.23 ~ 2016.06.13		

동물명	일령 (체중)	접종 두수	접종 부위	접종량	개체 번호	접종일	임상관찰 24	25	26	27	28	29	30	31	6/01	02	03	04	05	06	07	08
돼지	8 kg	1	IM	2 dose	CSFM 1	05/23	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
돼지	8 kg	1	IM	2 dose	CSFM 2	05/23	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

결과: PASSED

• 관찰 : 임상증상, 접종반응, 체온변화, 폐사 등 발생 유무

• 기록 : 이상이 없을 경우 "N"으로 표기, 이상이 있을 경우 해당 사항 기록, 폐사 개체 수 기록

시 험 자 : 윤충순 Choong-Soon Yun

대외비

(주)코미팜

제목(Subject)

안전시험 관찰일지/성적서

제품명	허바백 돼지열병 그린마크 주사		
제조번호	16-HBVAC-Ø3 (0개월)	제조일자	2016.05.22
시험기간	2016.05.23 ~ 2016.06.13		

동물명	접종 두수	접종 부위	개체 번호	임상관찰 6/09	10	11	12	13									비고
돼지	1	IM	CSFM 1	N	N	N	N	N									정상
돼지	1	IM	CSFM 2	N	N	N	N	N									정상

결과: PASSED

• 관찰 : 임상증상, 접종반응, 체온변화, 폐사 등 발생 유무

• 기록 : 이상이 없을 경우 "N"으로 표기, 이상이 있을 경우 해당 사항 기록, 폐사 개체 수 기록

시 험 자 : 윤충순 Choong-Soon Yun

(주)코미팜

제목(Subject)

역가시험 성적서

제품명	허바백 돼지열병 그린마크 주사	제조번호	16HBVAC-Ø3 (0개월)
시험명	Erns 항체음성시험	시험일자	2016.05.21 – 06.23
검사샘플	Serum X 4	검사법	ELISA / 중화항체
시험자	윤충순 Choong-Soon Yun		

시 험 결 과		
개체번호	ELISA	중화항체
접종-1	-ve	—
접종-2	-ve	—
비접종-1	-ve	<2
비접종-2	-ve	<2
결 과	접종: Erns 항체 음성	비접종: 음성

(주)코미팜

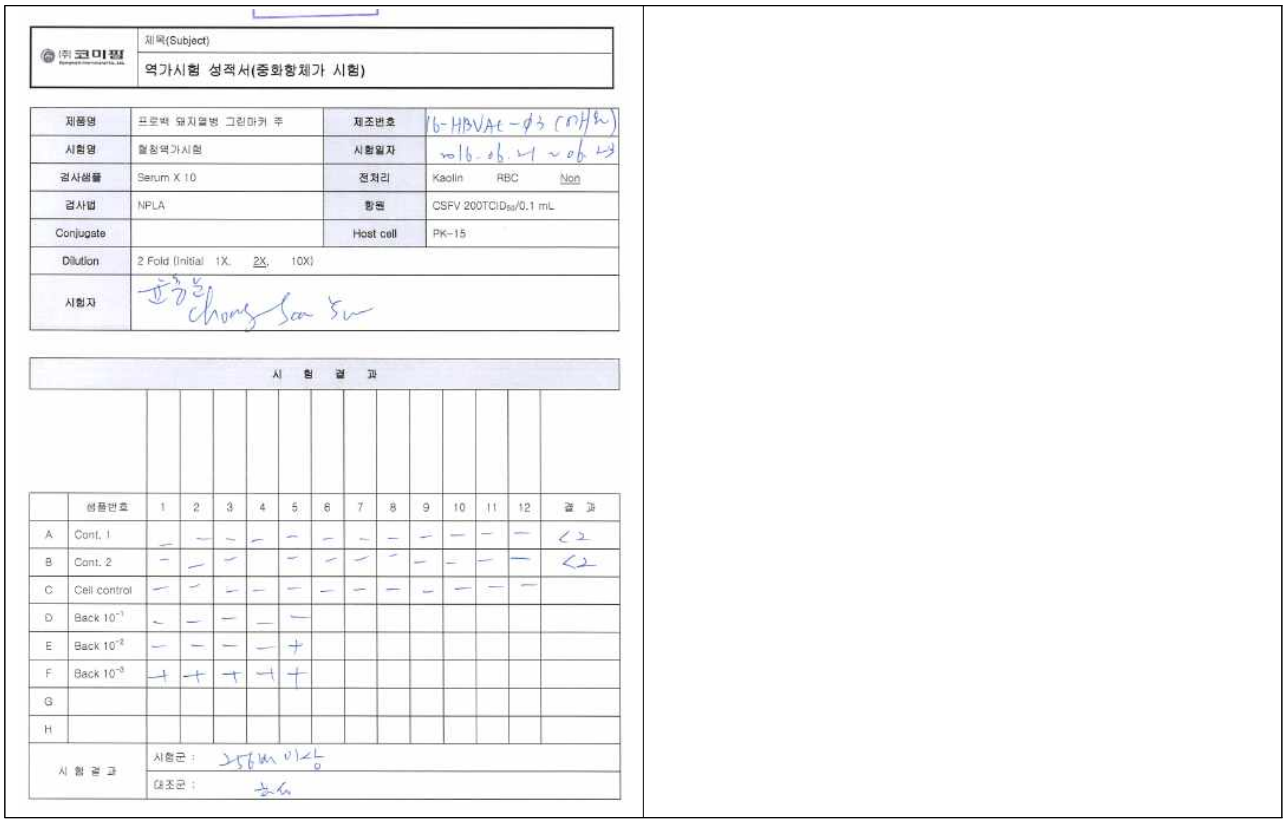
제목(Subject)

역가시험 성적서(중화항체가 시험)

제품명	허바백 돼지열병 그린마크 주사	제조번호	16-HBVAC-Ø3 (0개월)
시험명	혈청역가시험	시험일자	2016.06.21 ~ 06.23
검사샘플	Serum X 10	전처리	Kaolin RBC Non
검사법	NPLA	항원	CSFV 200TCID$_{50}$/0.1 mL
Conjugate		Host cell	PK-15
Dilution	2 Fold (Initial 1X, 2X, 10X)		
시험자	윤충순 Choong-Soon Yun		

시 험 결 과

	샘플번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	결 과
A	Exp. 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	1024
B	Exp. 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	1024
C	Exp. 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	1024
D	Exp. 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	2048
E	Exp. 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	2048
F	Exp. 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	2048
G	Exp. 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	1024
H	Exp. 8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	1024



㈜코미팜

제목(Subject)

역가시험 성적서(중화항체가 시험)

제품명	프로벅 돼지열병 그림마커 주	제조번호	16-HBVAc-03 (마무리)
시험명	혈청역가시험	시험일자	2016. 06. 21 ~ 06. 29
검사샘플	Serum X 10	전처리	Kaolin RBC Non
검사법	NPLA	항원	CSFV 200TCID50/0.1 mL
Conjugate		Host cell	PK-15
Dilution	2 Fold (Initial 1X, 2X, 10X)		
시험자	조정순 Chong Soon Cho		

시 험 결 과

	샘플번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	결 과
A	Cont. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2
B	Cont. 2	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	<2
C	Cell control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D	Back 10^{-1}	-	-	-	-	-								
E	Back 10^{-2}	-	-	-	-	+								
F	Back 10^{-3}	+	+	+	+	+								
G														
H														
시 험 결 과		시험군 : 256배 이상												
		대조군 : 2배												

○ 돼지열병 (E2 marker) 유전자재조합 불활화백신 검정기준에 준하여 연속 제작된 3 Lot 시험백신 (16-HBVAC-01, 16-HBVAC-02, 16-HBVAC-03)에 대한 검정시험을 실시한 결과, 특성시험, 수소이온농도시험, 무균시험, 방부제정량시험, 안전시험, Erns 항체음성시험, 혈청역가시험 모두 검정기준에 적합한 것으로 확인되었다.

3. 돼지열병 마커백신 시제품의 실험실 내 평가 결과

○ 생물학적제제의 허가 과정에서 제품의 유효기간을 설정하기 위해서는 적정 보관 온도에서 시제품을 장기 보관하면서, 제조직후 시험 성적과 동등한 조건에서 연속 3 Lot 시험백신에 대한 품질 평가를 실시하고, 보존 기간에서 3개월을 뺀 개월 수를 최종 유효기간으로 확정한다. 이 과정에서 제조직후부터 12개월 경과 시점까지는 매 3개월 간 해당 실험을 반복하며, 12개월 경과 시점부터 24개월 경과 시점까지는 매 6개월 간격으로 해당 실험을 반복한다. 또한 유효기간을 기준으로 +3개월째에 최종 실험을 실시하여 유효기간 경과 3개월 후에도 백신의 품질이 여전히 기준에 적합한지를 확인해야 한다. 본 과제를 통하여 개발한 돼지열병 마커백신 시제품의 경우, 최종 24개월의 유효기간을 목표로 제조직후부터 27개월 경과 시점까지 장기보존성 확인 실험을 실시하였으며, 제조직후 시험성적과 동일하게 동물용의약품 생물학적제제 국가검정기준 중 “1-2-04-12 돼지열병 (E2 marker) 유전자재조합 불활화백신 검정기준”에 준하여 실험을 실시하였다.

가. 특성시험

○ 동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 따라 제조직후부터 제조 후 27개월까지 국가검정기준에 따라 시험백신에 대한 색, 혼탁도, 침전물과 이물의 유무를 1000룩스 광도

에서 검사하고, 이취에 대해서도 검사하였다. 그 결과, 제조 후 27개월 경과까지도 성상의 변화 없이 균일하게 유지되고 있음을 확인하였다.

○ Table 4. 연속 3 Lot 시험백신의 특성시험 결과

제조번호	제조 직후	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	27개월
16-HBVAC-01	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합
16-HBVAC-02	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합
16-HBVAC-03	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합	적 합

나. 수소이온농도 시험

○ 동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 따라 각 Lot에 대한 수소이온농도를 측정한 결과, 제조 후 27개월 경과까지도 pH 6.0~8.0으로 정상 범위내로 측정되었다.

○ Table 5. 연속 3 Lot 시험백신의 수소이온농도시험 결과

제조번호	제조 직후	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	27개월
16-HBVAC-01	7.24	7.26	7.31	7.35	7.38	7.41	7.42	7.45
16-HBVAC-02	7.19	7.21	7.24	7.27	7.31	7.33	7.36	7.39
16-HBVAC-03	7.22	7.25	7.29	7.32	7.35	7.37	7.39	7.42

다. 무균시험

○ 동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 준하여 각각의 Lot에 대하여 제조직후부터 27개월까지 무균검사법에 따라 Lot별로 Nutrient agar(NA), Nutrient broth(NB), Thioglycollate(Thio) 배지에 각각 접종하여 22 ℃ 및 37 ℃에서 각각 배양 관찰하였다. 그 결과, 제조 후 27개월 경과까지도 무균상태가 유지되고 있었다.

○ Table 6. 연속 3 Lot 시험백신의 무균시험 결과

제조번호	온도	배지	제조 직후	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	27개월
16-HBVAC-01	22 ℃	NA	-*	-	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-	-	-
	37 ℃	NA	-	-	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-	-	-
16-HBVAC-02	22 ℃	NA	-	-	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-	-	-
	37 ℃	NA	-	-	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-	-	-
16-HBVAC-03	22 ℃	NA	-	-	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-	-	-
	37 ℃	NA	-	-	-	-	-	-	-	-
		NB	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thio	-	-	-	-	-	-	-	-

*** 세균 발육 없이 무균상태가 유지됨**

라. 방부제 정량시험

○ 동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 따라 제조직후부터 27개월경과 시점까지 치메로살 함량시험을 실시한 결과, 0.01% 이하로 정상 범위내로 측정되었다.

○ Table 7. 연속 3 Lot 시험백신의 치메로살 함량시험 결과

제조번호	제조 직후	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	27개월
16-HBVAC-01	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하
16-HBVAC-02	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하
16-HBVAC-03	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하	0.01% 이하

마. 안전시험

○ 동물용의약품 생물학적제제 일반검정기준에 따라 제조직후부터 27개월경과 시점까지 실험동물 (마우스, 기니픽) 및 목적동물 (돼지)에 대한 안전성 시험을 실시하였다.

(1) 마우스 안전성 실험

○ 체중 15~20 g의 건강한 마우스 8마리를 Lot 별로 공시하고 복강에 공시백신 0.5 ㎖를 접종한 후 21일 동안 임상증상을 관찰한다. 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 한다.

○ Table 8. 시험백신 3 Lot의 마우스 안전성 시험 결과

제조번호	접종 경로	공시 수	접종량	임상증상							
				제조 직후	3 개월	6 개월	9 개월	12 개월	18 개월	24 개월	27 개월
16-HBVAC-01	복강	8	0.5 ㎖	N*	N	N	N	N	N	N	N
16-HBVAC-02	복강	8	0.5 ㎖	N	N	N	N	N	N	N	N
16-HBVAC-03	복강	8	0.5 ㎖	N	N	N	N	N	N	N	N

*** N : 관찰기간 중 이상 없이 생존**

○ 실험 결과, 27개월 경과시점까지 마우스에서 안전성이 확인되었다.

(2) 기니픽 안전성 실험

○ 체중 300~350 g의 건강한 기니픽 4마리를 Lot 별로 준비하여, 2마리의 기니픽 근육에 2 ㎖를, 다른 2마리의 기니픽 복강에 2 ㎖을 접종하고 21일간 관찰한다. 관찰기간동안 이상 없이 생존하여야 한다.

○ Table 9. 시험백신 3 Lot의 기니픽 안전성 시험 결과

제조번호	접종경로	공시수	접종량	임상증상							
				제조직후	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	27개월
16-HBVAC-01	근육	2	2.0 ㎖	N*	N	N	N	N	N	N	N
	복강	2	2.0 ㎖	N	N	N	N	N	N	N	N
16-HBVAC-02	근육	2	2.0 ㎖	N	N	N	N	N	N	N	N
	복강	2	2.0 ㎖	N	N	N	N	N	N	N	N
16-HBVAC-03	근육	2	2.0 ㎖	N	N	N	N	N	N	N	N
	복강	2	2.0 ㎖	N	N	N	N	N	N	N	N

○ 실험 결과, 27개월 경과시점까지 기니픽에서 안전성이 확인되었다.

(3) 자돈 안전성 실험

○ 체중 8~10 ㎏ (4~6주령)의 건강한 돼지열병 항체 음성인 돼지 2마리를 Lot 별로 준비하여, 백신의 2두 분을 근육으로 접종하고 21일간 관찰한다. 관찰기간동안 주사부위의 화농 및 괴사, 발열, 설사 등의 부작용이 없어야 한다.

○ Table 10. 시험백신 3 Lot의 돼지 안전성 시험 결과

제조번호	접종경로	공시수	접종량	임상증상							
				제조직후	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	27개월
16-HBVAC-01	근육	2	4.0 ㎖	N*	N	N	N	N	N	N	N
16-HBVAC-02	근육	2	4.0 ㎖	N	N	N	N	N	N	N	N
16-HBVAC-03	근육	2	4.0 ㎖	N	N	N	N	N	N	N	N

*** N : 관찰기간 중 이상 없이 생존**

○ 실험 결과, 27개월 경과시점까지 자돈에서 안전성이 확인되었다.

바. Erns 항체음성시험

(1) 실험방법

○ 시험백신 각 Lot 별로 체중 8~10 ㎏ (4~6주령)의 돼지열병 항체 음성인 돼지 4마리를 사용한다. 각 Lot에 대하여 돼지 2마리에 1두분씩 2주 간격으로 2회 근육 접종하고, 2마리는 무처치 대조로 둔다. 2차 접종 2주 후에 접종군과 대조군을 채혈하여 Erns에 대한 항체를 검사한다. 혈청을 분리하여 돼지열병 마커항체를 감별할 수 있는 효소면역법(ELISA) 키트 또는 이와 동등하다고 인정된 것을 사용한다. 백신 접종 돼지 혈청에서 Erns 항체가 인정되어서는 안 되며, 대조군은 중화항체 음성이어야 한다.

(2) 실험결과

○ Table 11. 시험백신 3 Lot의 Erns 항체음성시험 결과

제조번호	구 분	항체가*							
		제조 직후	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	27개월
16-HBVAC-01	시험군	N	N	N	N	N	N	N	N
	대조군	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
16-HBVAC-02	시험군	N	N	N	N	N	N	N	N
	대조군	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
16-HBVAC-03	시험군	N	N	N	N	N	N	N	N
	대조군	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2

*** 시험군 : Erns 항체가, N : negative, P : positive**
대조군 : 중화항체가

○ 실험 결과, 백신 접종군 (시험군) 에서는 27개월 경과시점까지 Erns에 대한 항체가 모두 음성으로 확인되고, 백신 비접종 대조군 (대조군)에서는 CSFV에 대한 중화항체가 모두 음성으로 확인되어 27개월 경과시점까지도 마커백신의 기능을 온전히 잘 유지하고 있는 것으로 확인되었다.

사. 혈청 역가시험

(1) 실험방법

○ 시험백신 각 Lot 별로 체중 300~350 g의 기니픽 10마리를 사용한다. 각 Lot에 대하여 기니픽 8마리에 1두분씩 2주 간격으로 2회 근육 접종하고, 2마리는 무처치 대조로 둔다. 2차 접종 2주 후 채혈하여 NPLA법으로 중화항체가를 측정한다. 접종군 기니픽의 중화항체가는 256배 이상이어야 하며 대조군은 음성이어야 한다.

(2) 실험결과

○ Table 12. 16-HBVAC-01 Lot의 혈청 역가시험 결과

제조번호	구 분	평균 중화항체가 (log2)							
		제조 직후	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	27개월
백신 접종군	1	2048	2048	1024	1024	1024	1024	1024	512
	2	2048	1024	1024	2048	1024	512	512	256
	3	1024	2048	2048	1024	1024	1024	1024	256
	4	1024	1024	1024	1024	1024	2048	512	512
	5	1024	1024	1024	1024	2048	1024	1024	512
	6	2048	2048	1024	1024	1024	512	1024	256
	7	1024	1024	1024	2048	1024	1024	256	256
	8	1024	1024	2048	1024	1024	1024	512	512
	평균	1408	1408	1280	1280	1152	1024	736	384
비접종 대조군	1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2

○ Table 13. 16-HBVAC-02 Lot의 혈청 역가시험 결과

제조번호	구 분	평균 중화항체가 (log2)							
		제조 직후	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	27개월
백신 접종군	1	2048	2048	1024	1024	1024	1024	1024	512
	2	1024	1024	1024	2048	1024	512	256	512
	3	1024	1024	2048	1024	1024	1024	512	256
	4	1024	1024	1024	1024	2048	1024	512	256
	5	1024	1024	2048	1024	1024	2048	1024	256
	6	1024	2048	2048	1024	2048	1024	512	256
	7	2048	1024	1024	1024	1024	1024	512	256
	8	1024	1024	1024	2048	1024	1024	1024	512
	평균	1280	1280	1408	1280	1280	1088	672	352
비접종 대조군	1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2

○ Table 14. 16-HBVAC-03 Lot의 혈청 역가시험 결과

제조번호	구 분	평균 중화항체가 (log2)							
		제조 직후	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	27개월
백신 접종군	1	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	2	1024	2048	2048	1024	1024	512	1024	256
	3	1024	1024	1024	1024	1024	1024	256	256
	4	2048	2048	2048	2048	1024	1024	256	512
	5	2048	1024	2048	1024	2048	1024	512	512
	6	2048	2048	1024	1024	1024	1024	512	256
	7	1024	1024	1024	2048	1024	1024	1024	256
	8	1024	1024	1024	1024	1024	512	1024	256
	평균	1408	1408	1408	1280	1152	896	704	416
비접종 대조군	1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2

○ 실험 결과, 3 Lot 모두 27개월 경과시점까지 백신 접종 후 256배 이상의 중화항체 형성능을 유지하고 있었다.

4. 돼지열병 마커백신의 야외 임상시험 결과

○ 주관연구기관인 (주)바이오앱과의 공동연구개발을 통해 식물발현 CSF E2 재조합 단백질을 활용한 돼지열병 불활화 백신의 개발을 성공적으로 수행하였고, 농림축산검역본부로부터 야외 임상시험을 정식으로 승인받았다. 이에 따라, 3개 농장에 대한 야외 임상시험을 실시하였으며, 임상시험을 통해 얻어진 백신 면역 혈청 및 비접종 대조군 혈청에 대한 CSFV 중화항체가 검사를 코미팜에서 위탁받아 수행하였다.

가. 자돈 면역원성 확인

(1) 실험방법

○ 각 농장별로 40일령의 돼지열병 항체음성 자돈을 대상으로 시험백신 접종군 20두 이상, 대조군 20두 이상을 선정하고, 시험백신 접종군에 대하여 백신 1두 분을 이근부 근육으로 접종한다. 각 그룹별로 40일령, 60일령, 80일령, 120일령, 150일령에 각각 채혈하여 CSFV 대하여 NPLA (Neutralized Peroxidase Linked Assay)법으로 혈중 중화항체가 변화를 측정하였다.

(2) 실험결과

○ Table 15. 각 농장별 자돈의 CSFV에 대한 NPLA 중화항체가 측정 결과

농장명	구분	측정 시기별 평균 CSFV 중화지수 (log2)				
		40일령	60일령	80일령	120일령	150일령
시험농장 1	시험백신 접종군	2.3	4.0	9.4	7.8	6.9
	비접종 대조군	2.1	0.9	< 1	< 1	< 1
	p-value*	0.22	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
시험농장 2	시험백신 접종군	2.4	3.9	9.2	7.6	6.8
	비접종 대조군	1.7	0.9	< 1	< 1	< 1
	p-value	0.06	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
시험농장 3	시험백신 접종군	2.6	3.7	9.3	7.6	6.8
	비접종 대조군	3.2	0.9	< 1	< 1	< 1
	p-value	0.08	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

○ 임상시험이 실시된 3개 농장 모두 백신접종 전 자돈의 평균 항체가 수준은 2~8배 정도였고, (3개 농장 모두 백신 접종군과 비접종 대조군 간에 항체가의 유의적이 차이 없음, $p>0.05$) 40일령에 1차 백신을 접종한 이후 증가하기 시작하여 60일령에 2차 백신을 접종한 후, 급격히 증가하여 80일령에 평균 512배 이상의 높은 중화항체가 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 비접종 대조군의 경우, 40일령을 기점으로 모체이행 항체가 지속적으로 감소하여 80일령에는 모든 개체가 2배 미만의 혈중 중화항체가를 보였다. 3개 농장 모두 2차 백신 접종 시점부터는 백신 접종군이 비접종 대조군과 비교하여 유의적으로 높은 항체 수준을 보였으며 ($p<0.05$), 실험이 종료되는 150일령까지도 그 차이가 인정되었다.

○ Table 16. 각 농장별 자돈의 Erns 항체 측정 결과

농장명	구분	Erns 항체 양성 개체 수/총 개체 수				
		40일령	60일령	80일령	120일령	150일령
시험농장 1	시험백신 접종군	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
	비접종 대조군	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
시험농장 2	시험백신 접종군	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
	비접종 대조군	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
시험농장 3	시험백신 접종군	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
	비접종 대조군	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20

○ 최초 백신 접종주령인 40일령을 기점으로 CSFV E2에 대한 혈중 중화항체는 적게는 2배, 많게는 8배까지 남아 있었으나, Erns는 상대적으로 항원성이 약하여 백신 접종 전부터 모든 개체가 Erns에 대한 항체를 지니고 있지 않았다. 본 과제를 통해서 개발한 돼지열병 마커백신의 마커로써의 기능은 백신을 접종했음에도 불구하고, CSFV Erns에 대한 항체가 형성되지 않는 것으로, 혈중 중화항체가 최고수준에 도달한 80일령의 경우에도 여전히 Erns에 대한 항체는 모두 음성인 것을 확인할 수 있다. 이를 통해 시험백신이 마커백신으로의 기능을 온전히 발휘하고 있다고 볼 수 있을 것이다.

○ Table 17. 시험농장 1의 항체가 raw data

시험농장 1		일령별 항체가									
		40일령		60일령		80일령		120일령		150일령	
		SN	Erns	SN	Erns	SN	Erns	SN	Erns	SN	Erns
백신접종군	1	2	N	4	N	9	N	7	N	6	N
	2	4	N	6	N	10	N	9	N	8	N
	3	2	N	4	N	10	N	8	N	8	N
	4	3	N	4	N	10	N	9	N	7	N
	5	3	N	4	N	8	N	7	N	6	N
	6	2	N	3	N	9	N	7	N	7	N
	7	1	N	3	N	7	N	6	N	6	N
	8	1	N	3	N	11	N	9	N	8	N
	9	2	N	5	N	8	N	7	N	6	N
	10	1	N	4	N	9	N	7	N	6	N
	11	2	N	4	N	8	N	6	N	6	N
	12	2	N	5	N	10	N	7	N	7	N
	13	3	N	5	N	10	N	8	N	7	N
	14	4	N	4	N	10	N	8	N	6	N
	15	2	N	4	N	9	N	8	N	6	N
	16	2	N	5	N	10	N	9	N	8	N
	17	3	N	4	N	9	N	8	N	7	N
	18	4	N	3	N	9	N	7	N	7	N
	19	2	N	4	N	10	N	8	N	8	N
	20	1	N	3	N	11	N	10	N	8	N
평균		2.3	-	4.1	-	9.4	-	7.8	-	6.9	-
대조군	1	0	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	2	2	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	3	3	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	4	1	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	5	1	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	6	4	N	2	N	0	N	0	N	0	N
	7	2	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	8	3	N	2	N	0	N	0	N	0	N
	9	4	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	10	4	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	11	2	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	12	1	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	13	1	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	14	2	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	15	3	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	16	2	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	17	1	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	18	3	N	2	N	0	N	0	N	0	N
	19	2	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	20	1	N	1	N	0	N	0	N	0	N
평균		2.1	-	0.9	-	0	-	0	-	0	-

○ Table 18. 시험농장 2의 항체가 raw data

시험농장 2		일령별 항체가									
		40일령		60일령		80일령		120일령		150일령	
		SN	Erns	SN	Erns	SN	Erns	SN	Erns	SN	Erns
백신접종군	1	3	N	5	N	10	N	9	N	8	N
	2	3	N	4	N	10	N	8	N	8	N
	3	3	N	5	N	8	N	7	N	6	N
	4	3	N	3	N	7	N	6	N	6	N
	5	2	N	4	N	10	N	8	N	7	N
	6	1	N	4	N	10	N	8	N	7	N
	7	1	N	5	N	9	N	7	N	6	N
	8	2	N	4	N	9	N	8	N	7	N
	9	1	N	5	N	8	N	7	N	7	N
	10	1	N	2	N	8	N	7	N	6	N
	11	3	N	4	N	10	N	8	N	7	N
	12	3	N	4	N	10	N	8	N	6	N
	13	2	N	3	N	8	N	7	N	7	N
	14	2	N	6	N	8	N	8	N	7	N
	15	3	N	4	N	11	N	8	N	7	N
	16	3	N	2	N	10	N	9	N	8	N
	17	4	N	3	N	9	N	6	N	6	N
	18	5	N	6	N	10	N	7	N	6	N
	19	2	N	3	N	11	N	9	N	7	N
	20	0	N	1	N	8	N	6	N	6	N
평균		2.4	-	3.9	-	9.2	-	7.6	-	6.8	-
대조군	1	1	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	2	0	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	3	2	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	4	2	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	5	2	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	6	3	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	7	2	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	8	2	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	9	3	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	10	2	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	11	2	N	2	N	0	N	0	N	0	N
	12	0	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	13	2	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	14	2	N	2	N	0	N	0	N	0	N
	15	1	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	16	4	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	17	1	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	18	1	N	3	N	0	N	0	N	0	N
	19	0	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	20	2	N	1	N	0	N	0	N	0	N
평균		1.7	-	0.9	-	0	-	0	-	0	-

○ Table 19. 시험농장 3의 항체가 raw data

시험농장 3		일령별 항체가									
		40일령		60일령		80일령		120일령		150일령	
		SN	Erns	SN	Erns	SN	Erns	SN	Erns	SN	Erns
백신접종군	1	3	N	2	N	7	N	7	N	5	N
	2	3	N	3	N	7	N	6	N	6	N
	3	1	N	3	N	6	N	5	N	5	N
	4	2	N	5	N	8	N	6	N	6	N
	5	4	N	3	N	9	N	7	N	5	N
	6	2	N	5	N	9	N	7	N	6	N
	7	4	N	4	N	9	N	8	N	6	N
	8	3	N	3	N	9	N	7	N	5	N
	9	4	N	6	N	8	N	7	N	5	N
	10	4	N	4	N	9	N	8	N	6	N
	11	3	N	4	N	8	N	6	N	6	N
	12	2	N	6	N	8	N	7	N	7	N
	13	2	N	3	N	9	N	7	N	5	N
	14	3	N	4	N	7	N	7	N	6	N
	15	2	N	2	N	8	N	6	N	5	N
	16	3	N	3	N	7	N	7	N	6	N
	17	2	N	5	N	7	N	6	N	5	N
	18	1	N	2	N	8	N	7	N	5	N
	19	3	N	4	N	10	N	7	N	6	N
	20	2	N	5	N	7	N	6	N	5	N
평균		2.7	-	3.8	-	8	-	6.7	-	5.6	-
대조군	1	2	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	2	2	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	3	3	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	4	4	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	5	1	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	6	3	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	7	2	N	2	N	0	N	0	N	0	N
	8	3	N	2	N	0	N	0	N	0	N
	9	5	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	10	3	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	11	5	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	12	3	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	13	3	N	2	N	0	N	0	N	0	N
	14	6	N	3	N	0	N	0	N	0	N
	15	3	N	2	N	0	N	0	N	0	N
	16	2	N	1	N	0	N	0	N	0	N
	17	3	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	18	1	N	0	N	0	N	0	N	0	N
	19	5	N	2	N	0	N	0	N	0	N
	20	4	N	0	N	0	N	0	N	0	N
평균		3.2	-	0.9	-	0	-	0	-	0	-

제5절 병리조직 및 면역조직학적 검사를 통한 그린 마커백신 효능 및 안전성 검증

1. 돼지열병 그린백신의 항원량(10, 25, 50, 100ug/dose)에 따른 장기별 병리조직학적 검사

가. 제2협동과제 상에서 1차적으로 항체 유도가 충분한 백신의 항원량 선정을 위해, 아래 조건의 실험을 수행하였음.

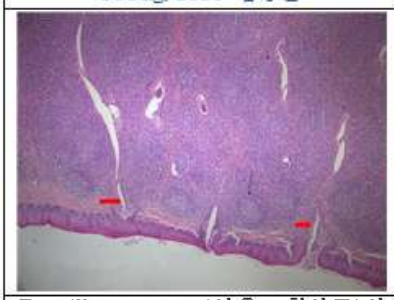
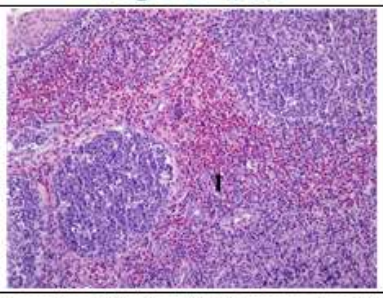
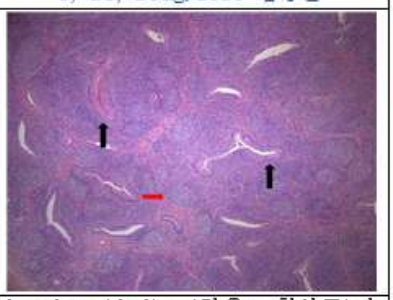
- 접종: 일반양돈장 자돈-돼지열병 항체 음성돈
- 식물발현 E2 단백질 각, 2회씩 접종 [접종량: 5, 10, 25, 50, 100ug/dose]
- 1차접종 (15.08.13), 2차접종 (15.08.27), 공격접종 (15.09.11), 부검 (15.09.23)
- 각 실험군당 4두씩 수행

나. 본 과제에서는 해당 각 실험군의 자돈으로부터 부검, 장기로부터 조직을 채취하였으며, 확보한 검체는 통상적인 처리과정을 통해 병리 조직학적 검사를 수행하였음.

다. 검사장기 목록 : 편도, 비장, 간, 심장, 폐, 신장, 림프절(서혜부), 림프절(장간막), 회장, 맹장, 뇌

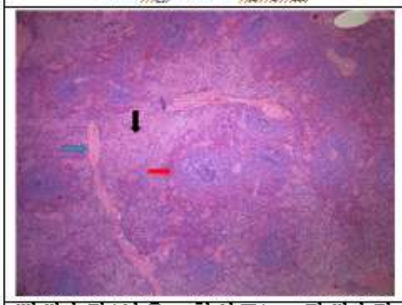
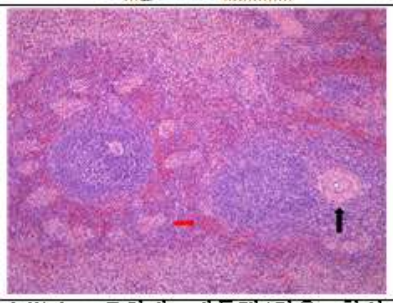
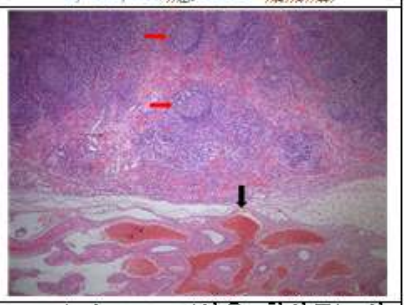
라. 결과

(1) 편도

100ug/dose 접종군	50ug/dose 접종군	5, 10, 25ug/dose 접종군
		
Tonsillar crypts(붉은 화살표)와 germinal center(검은 화살표) 발달.	lymph follicle 주변에 eosinophil 침윤이 심함.	lymphoepithelium(검은 화살표)과 germinal center(붉은 화살표)발달.

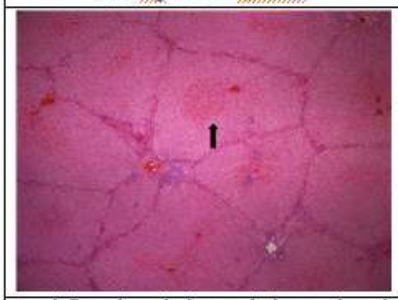
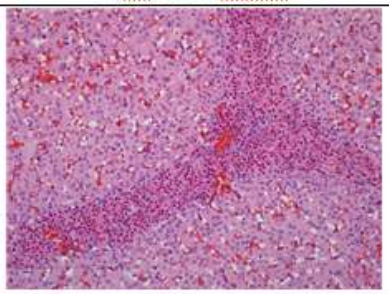
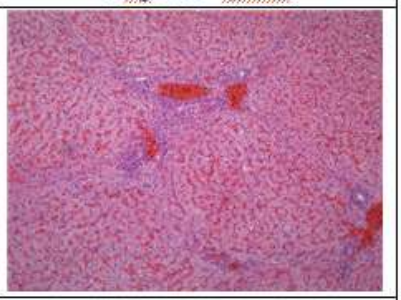
- crypt(움)는 100μg 투여한 경우에서 가장 발달되어 있었고, 투여량이 적을수록 lymphoepithelium이 발달되고, 그 안에 림프구와 형질세포의 축적을 볼 수 있었음.
- 염증의 소견은 50μg 투여한 조직에서 eosinophil의 과한 출현을 볼 수 있었고. lymph follicle은 투여량이 적을수록 germinal center를 잘 유지하고 있었음.

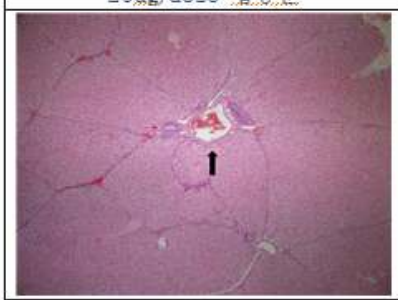
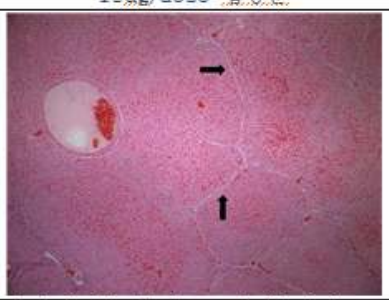
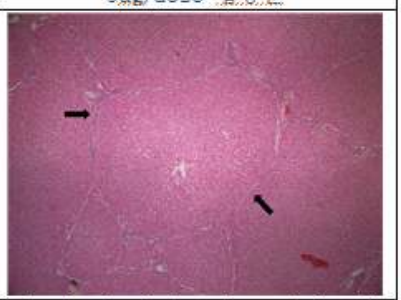
(2)비장

100μg/dose 접종군	50μg/dose 접종군	5, 10, 25μg/dose 접종군
		
백색속질(붉은 화살표), 적색속질(검은 화살표), trabeculae(기둥, 푸른 화살표) 발달	follicle 주위에 세동맥(검은 화살표) 발달 & eosinophil(붉은 화살표) 침윤	germinal center(붉은 화살표) 와 주변 혈관(검은 화살표) 발달. 적색속질내 출혈 양상

○ 백신 투여량이 감소함에 따라 백색속질과 적색속질의 구분이 불분명해지고, 출혈의 경향이 증가하는 것을 보여주고 있음.

(3) 간

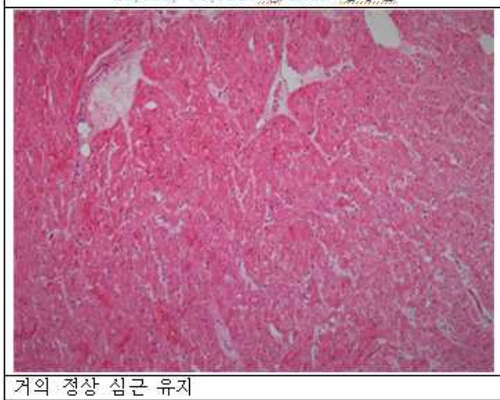
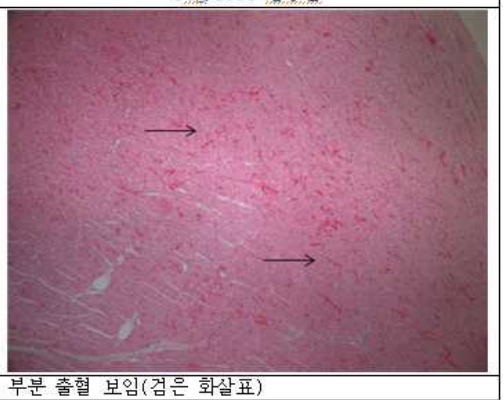
100μg/dose 접종군	50μg/dose 접종군	50μg/dose 접종군
		
소엽은 양호하게 유지하고 있으나 중심정맥이 소실되고, 주변으로 출혈(검은 화살표) 양상 보임	간소엽 사이 결합조직에 eosinophil 침윤	간소엽 내 출혈 양상

25μg/dose 접종군	10μg/dose 접종군	5μg/dose 접종군
		
간문맥 확장	중심정맥을 중심으로 출혈 양상. 소엽사이 결합조직 증식(검은 화살표)	간소엽 양호하게 유지, 소엽간 결합조직 증식(검은 화살표)

○ 간소엽의 형태와 중심정맥은 백신 투여량이 적을수록 잘 유지하고 있었고, 문정맥은 투여량이 적을수록 확장된 형태를 보였음.

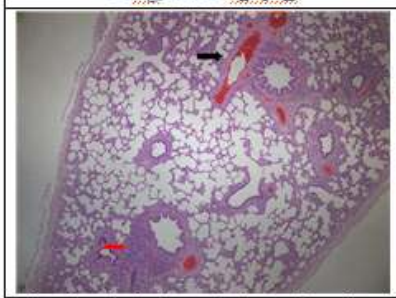
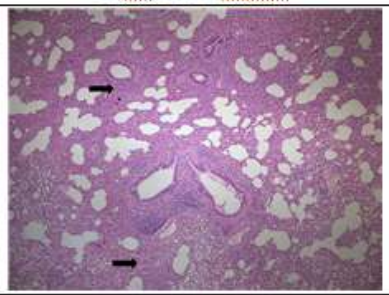
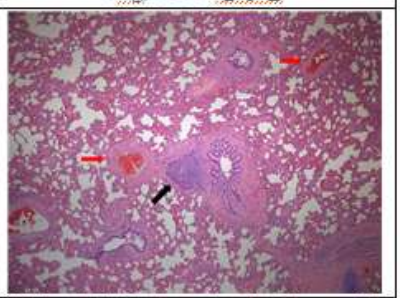
○ 출혈의 경향은 투여량과 상관없이 중심정맥을 중심으로 고르게 나타나는 경향을 보였음. 특히, 50μg 투여한 경우에서 소엽사이 결합조직에 많은 eosinophil의 침착을 볼 수 있었음.

(4) 심장

10, 25, 50, 100ug/dose 접종군	5ug/dose 접종군
	
거의 정상 심근 유지	부분 출혈 보임(검은 화살표)

○ 심근세포는 백신 투여량과 상관없이 정상 형태를 잘 유지하고 있었으나, 5㎍ 투여한 조직에서 신근세포 사이에서 약간의 출혈 소견을 보였음.

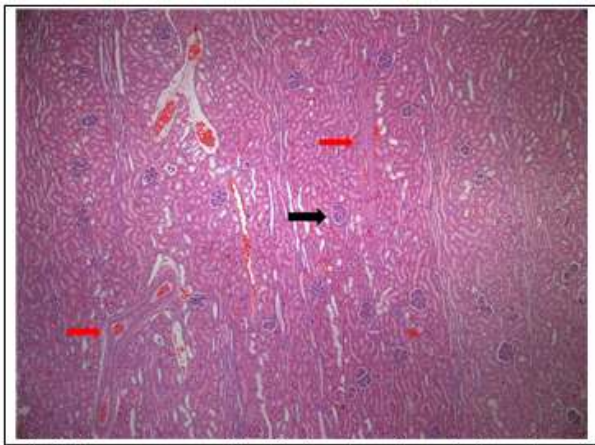
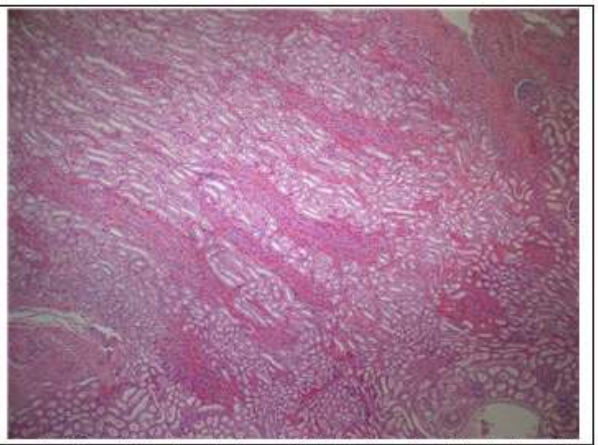
(5) 폐

25ug/dose 접종군	10ug/dose 접종군	5ug/dose 접종군
		
폐포는 적당히 유지되고 있으나 세기관지 주변의 혈관 확장(검은 화살표)과 림프 침윤(붉은 화살표) 보임	폐포는 염증세포 및 형질세포로 채워짐	혈관(붉은 화살표)이 발달하고 세기관지 주변 림프 침윤(검은 화살표)이 있음

○ 투여량이 많을수록 폐포벽을 잘 유지하고 있었으며, 투여량이 적을수록 폐포벽이 구분되지 않고 염증세포와 대식세포로 가득 찬 것을 볼 수 있었음.

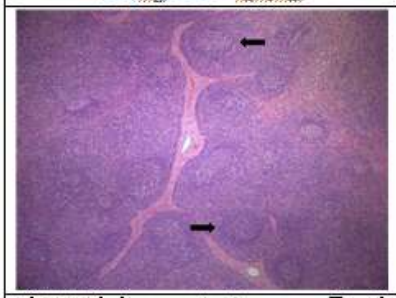
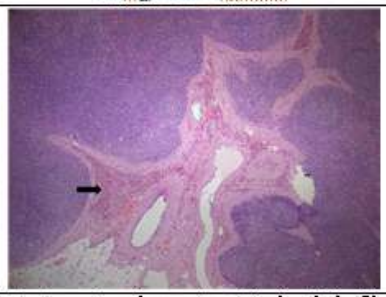
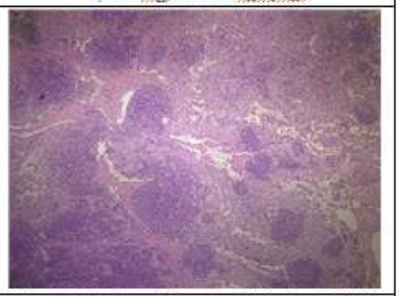
○ 투여량이 줄어들수록 세기관지 주변 림프구의 침윤이 두드러지게 나타나는 경향을 보였음.

(6) 신장

	
피질의 Glomeluri(검은 화살표)는 잘 보존되고 있으나 혈관의 과한 증식을 보임(붉은 화살표)	수질에는 원위세뇨관과 집합관들이 잘 발달되어 있는 것을 볼 수 있음

○ glomeruli는 투여량에 상관없이 잘 유지되고 있었으나, 투여량이 줄어들수록 신피질에 출혈 경향이 증가하는 것을 볼 수 있었음.

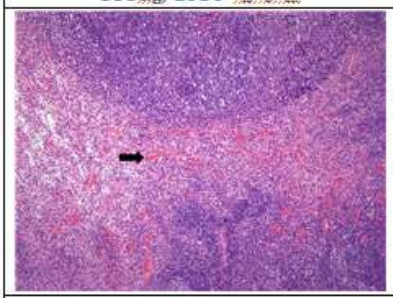
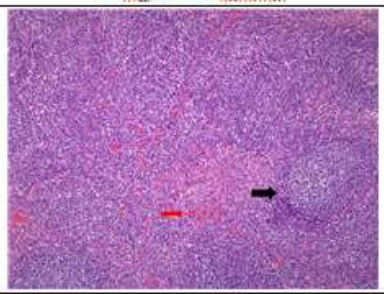
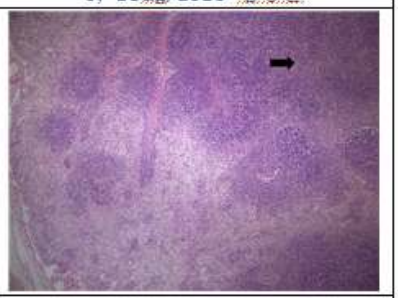
(7) 림프절 (서혜부)

100㎍/dose 접종군	50㎍/dose 접종군	5, 10㎍/dose 접종군
		
림프소절이 germinal center를 잘 유지하고 있음	Trabeculae에 eosinophil이 많이 침윤되어 있음	림프소절이 거의 소실되어 구분이 잘 되지 않음

○ 전체적으로 비대해져 있고, 림프소절이 잘 구분되어 있었으나, 투여량이 감소할수록 germinal enter의 구분이 흐려지는 경향을 보였음.

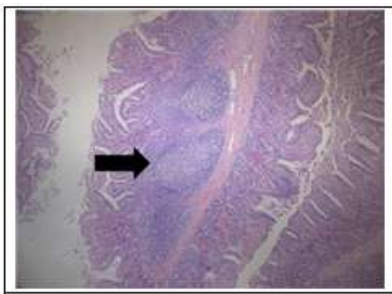
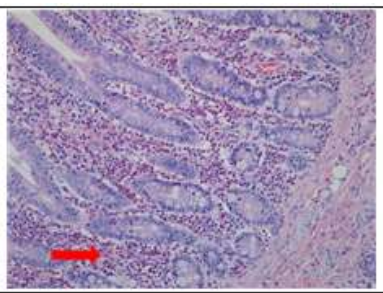
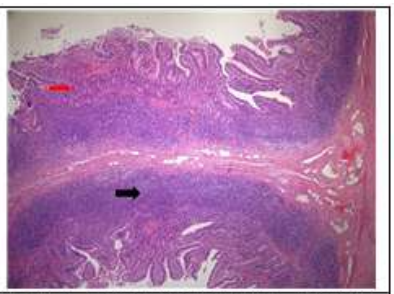
○ 특히 50㎍ 투여한 경우 trabeculae와 lymph follicle에 eosinophil이 많이 침윤되어 있음을 보여 주었음.

(8) 림프절 (장간막)

100㎍/dose 접종군	25㎍/dose 접종군	5, 10㎍/dose 접종군
		
Follicle 주변 혈관 발달	Germinal center(검은 화살표)가 구분이 되고 소절 주변에 혈관(붉은 화살표)이 풍부하게 발달	림프구 사이에 eosinophil이 많이 출현

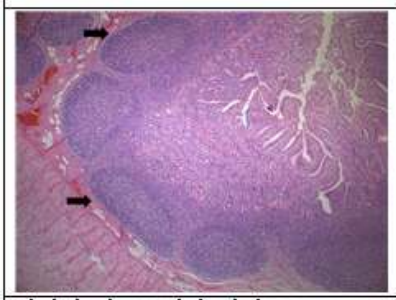
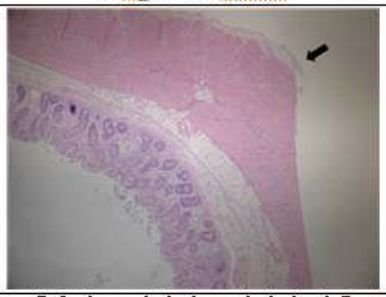
○ 전체적으로 비대해져 있고, 림프소절은 비교적 구분이 되었으나, 특히 25㎍투여한 경우 림프절 내 뚜렷한 혈관 발달을 보여 주고 있었음.

(9) 회장

		
점막하 림프소절이 잘 발달	장샘 사이에 eosinophil의 침윤이 심함	점막하 림프구의 침윤(검은 화살표)이 심하고 eosinophil(붉은 화살표)이 다수 출현

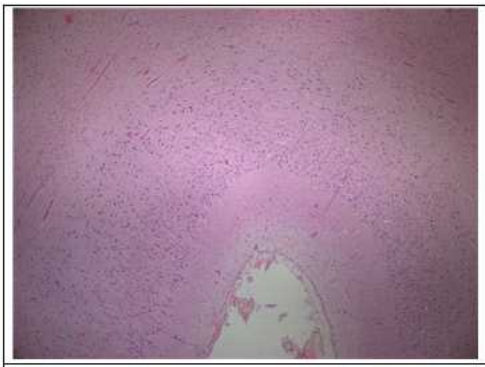
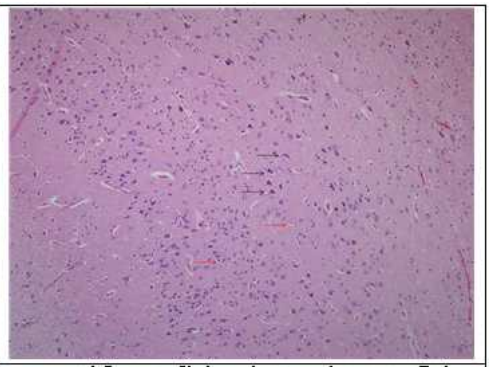
○ 투여량에 상관없이 villi는 잘 유지하고 있었으며, 모든 경우에서 장샘 사이에 eosinophil이 심한 침윤을 보이고 있었음.

(10) 맹장

-	10ug/dose 접종군	5ug/dose 접종군
		
점막밑 림프소절이 발달	근육층이 뚜렷하게 두꺼워져 있음	점막밑 장샘이 뚜렷이 발달

○ 전체적으로 점막밑 림프소절의 집합을 잘 보여주고 있었음.
○ 특히 10㎍을 투여한 조직의 근육층이 두꺼워져 있음을 볼 수 있었음.
○ 투여량이 적을수록 장샘이 발달된 경향을 보여주었음.

(11) 뇌

	
대뇌 피질의 구조를 잘 유지하고 있음	Neuron(검은 화살표)이 잘 보존되고 oligodendrocyte(붉은 화살표)의 정상적 분포를 볼 수 있

○ 투여량에 상관없이 neuron과 oligodendrocyte의 형태를 잘 유지하고 있었음.

(11) 결론

○ 모든 장기가 접종량에 병원성 방어능이 비례하는 것은 아니나, 대체적으로 접종량이 적을수록 조직 병리학적 소견이 많이 보였음.
○ 즉, 접종량 100ug/dose 의 실험그룹이 가장 조직 병리학적 소견이 경미하였음.
○ 뇌의 경우엔 모든 실험군에 있어 조직 병리학적 특정 소견이 보이지 않았음.

2. 돼지열병 그린백신의 항원량 선정후, 공격접종 실험

가. 제2협동과제 상에서 그린백신의 방어능과 관련, 아래 조건의 실험을 수행하였음.
나. 그린백신의 1회 접종으로 방어 가능성
다. 그린백신의 접종 후 초기 방어 가능성
라. LOM주와의 방어능 비교

○ 접종 : 일반양돈장 자돈-돼지열병 항체 음성돈
○ 식물발현 E2 단백질 각, 1회씩 접종 [접종량: 100ug/dose]
○ 각 실험군당 4두씩 수행

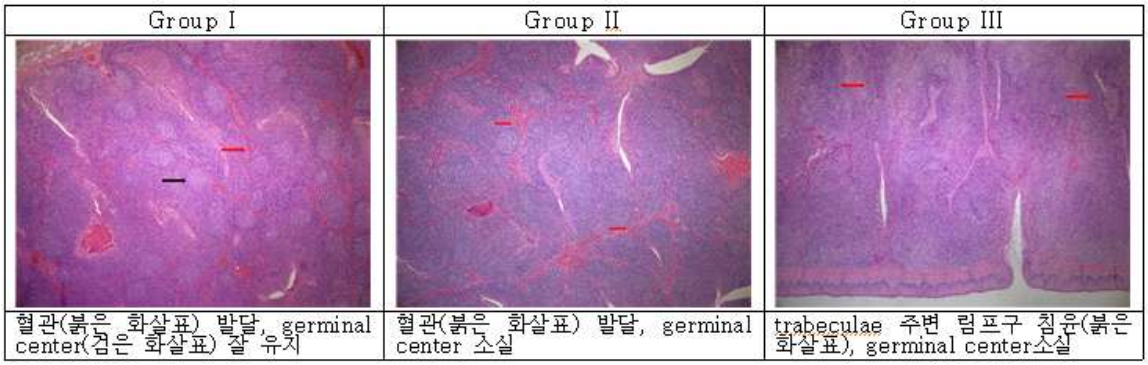
분류	개체	그룹 특성 및 접종 방법	부검
Group1	4	그린백신 1회 → 14일 후 공격접종	2015.11.09
Group2	4	그린백신 1회 → 11일 후 공격접종	2015.11.09
Group3	4	그린백신 1회 → 7일 후 공격접종	2015.11.03 : 62 폐사 2015.11.04 : 59,60,61
Group4	4	LOM 백신 1회 → 14일 후 공격접종	2015.11.09
Group5	4	BErns 백신 1회 → 14일 후 공격접종	2015.11.09
Group6 (양성대조군)	4	2015.10. 19 공격접종	2015.10.23 : 74 폐사 2015.10.24 : 72 폐사 2015.10.26 : 71,73 폐사

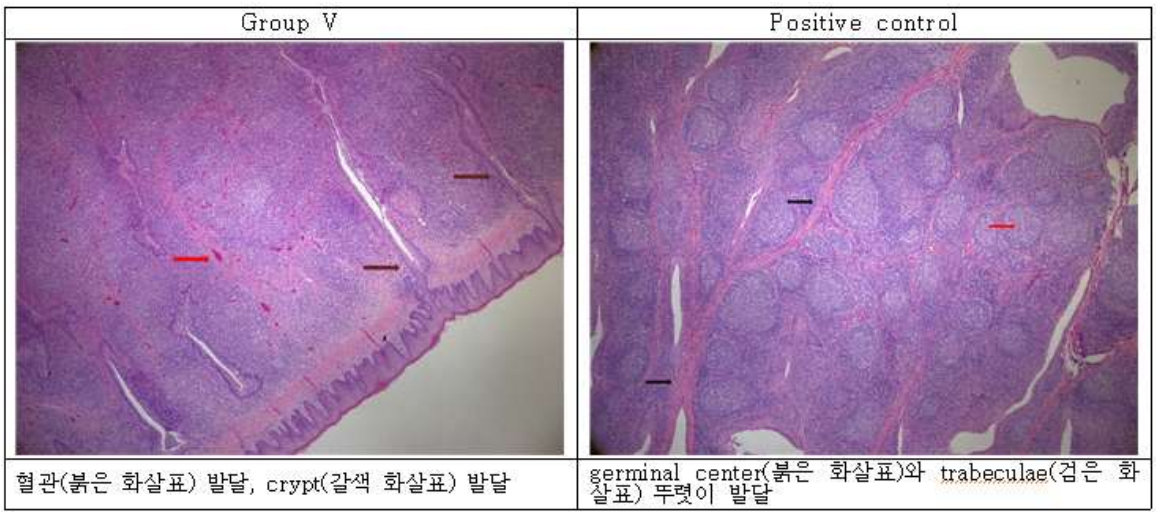
마. 본 과제에서는 해당 각 실험군의 자돈으로부터 부검, 장기로부터 조직을 채취하였으며, 확보한 검체는 통상적인 처리과정을 통해 병리 조직학적 검사를 수행하였음.

바. 검사장기 목록: 편도, 비장, 간, 심장, 폐, 신장, 림프절 (서혜부), 림프절 (장간막), 회장, 맹장

사. 결과

(1) 편도

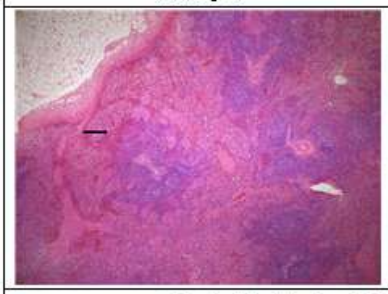
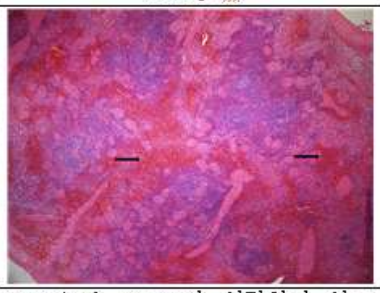


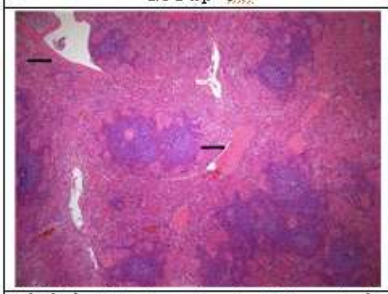
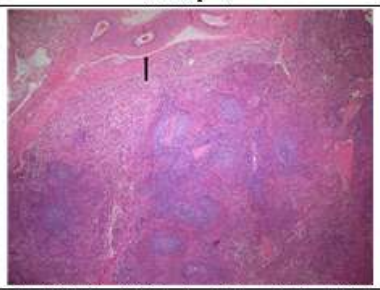
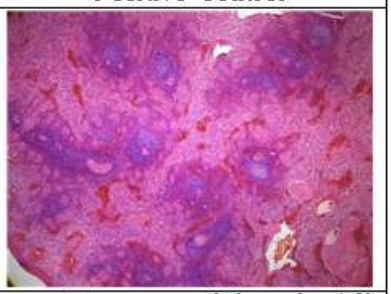


○ Group1과 2에서는 풍부한 혈관 발달을 보였고, G3에서는 trabeculae주변 림프구의 침윤을 보였음. - G4와5에서는 crypt의 발달을 보였음.

○ Positive Control(PC)에서는 trabeculae의 뚜렷한 발달을 보였음.

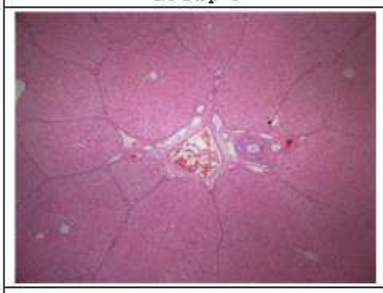
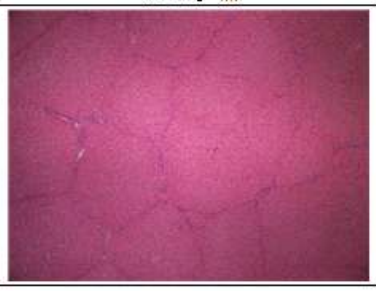
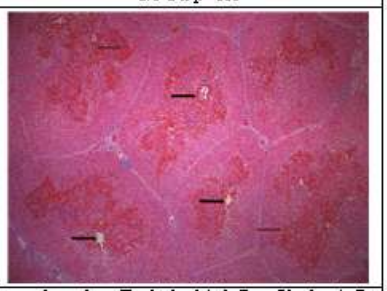
(2) 비장

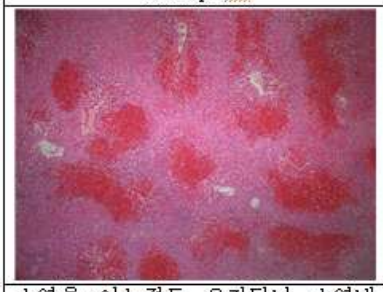
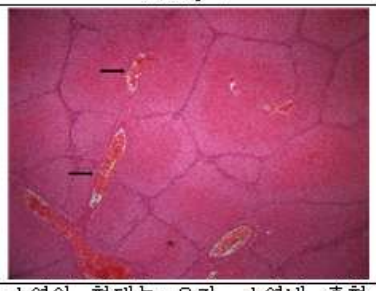
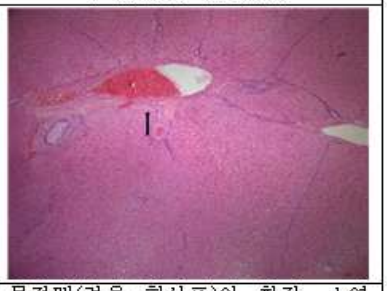
Group I	Group II	Group III
		
lymph follicle이 잘 형성되어 있지 않고, 출혈 소견(검은 화살표) 보임	germinal center가 분명하지 않고 심한 출혈(검은 화살표) 경향을 보임	lymph follicle이 완전히 소실되고, 심한 출혈 소견

Group IV	Group V	Positive control
		
부분적으로 lymph follicle 유지, trabeculae(검은 화살표) 발달	혈관(검은 화살표) 발달, 출혈 경향 보임	germinal center 부분 유지, 출혈 경향

○ G1,2,3와 PC에서 심한 출혈 경향을 보였고, G4,5,PC에서 germinal center를 잘 유지하고 있었음.

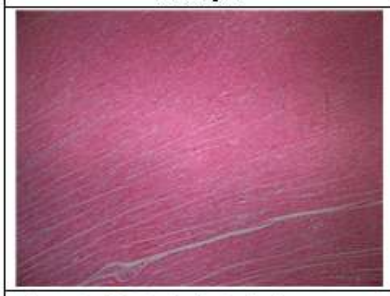
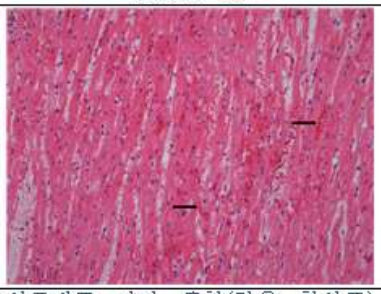
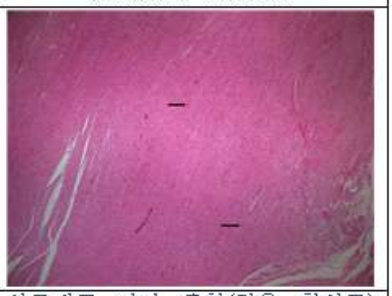
(3) 간

Group I	Group II	Group III
		
간문로 비대	중심정맥 소실, 출혈 경향	소엽 및 중심정맥(검은 화살표)은 잘 유지하고 있으나 출혈(갈색 화살표) 심함

Group IV	Group V	Positive control
		
소엽은 어느정도 유지되나 소엽내 과다출혈 보임	소엽의 형태는 유지, 소엽내 출혈 경향, 혈관(검은 화살표) 확장	문정맥(검은 화살표)의 확장, 소엽내 출혈 경향

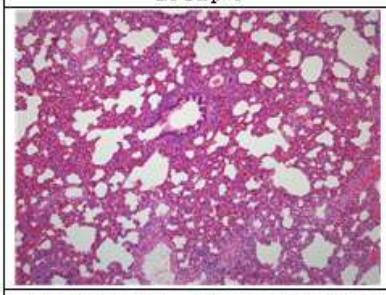
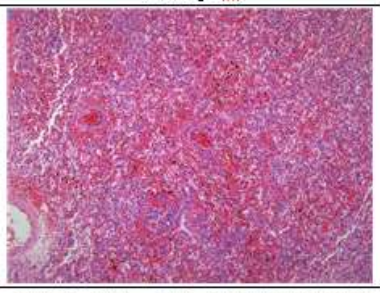
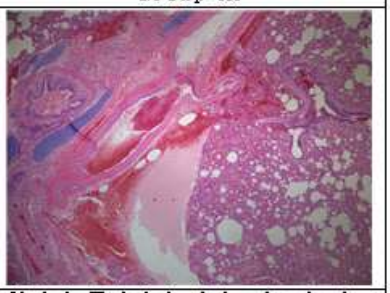
○ PC를 제외한 각 그룹에서는 소엽은 대체로 유지하고 있었으나, G1에서는 간문로의 비대를 보였고, G3와4에서는 소엽내 심한 출혈을 보였음.

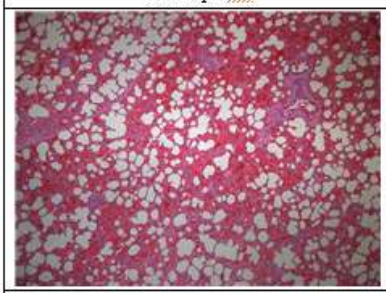
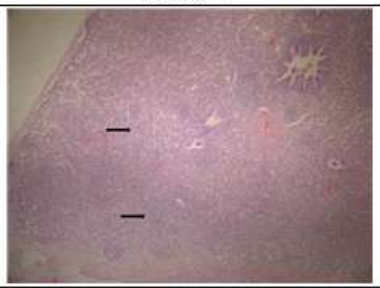
(4) 심장

Group I	Group IV	Positive control
		
심근세포들의 정상적 배열	심근세포 사이 출혈(검은 화살표) 경향	심근세포 사이 출혈(검은 화살표) 경향

○각 그룹 심근세포는 비후되지 않았으나 G4와 PC에서 심근세포 사이 출혈 경향을 보임.

(5) 폐

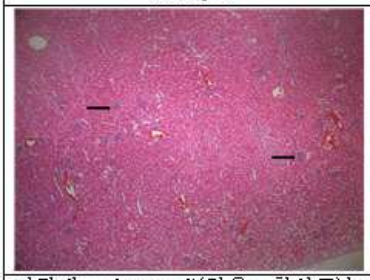
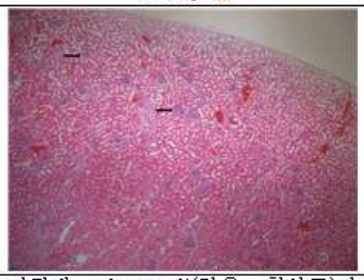
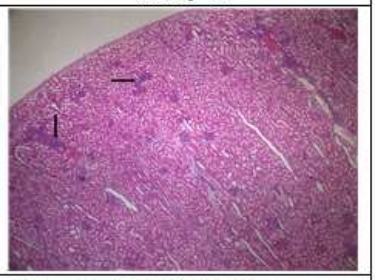
Group I	Group II	Group III
		
폐포 부분 소실, 폐포내 출혈 및 림프구 침윤	폐포벽 소실, 폐포가 림프구와 형질구, 대식세포 등으로 채워짐	혈관이 풍부하게 발달, 폐포가 림프구, 형질세포, 대식세포 등으로 채워짐

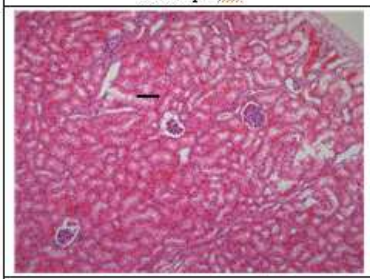
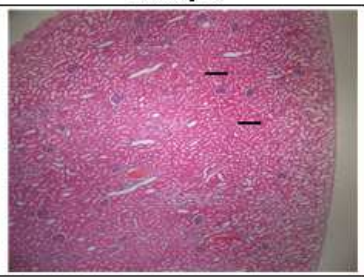
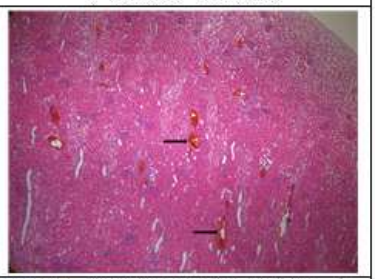
Group IV	Group V	Positive control
		
폐포 사이에 출혈 경향	폐포내 염증세포(검은 화살표)가 가득차서 폐포벽의 구분이 안됨	종말기관지내에 림프구, 형질세포, 대식세포가 가득 참(검은 화살표)

○ G1,2,3,5,PC는 폐포가 거의 소실되고 염증세포와 대식세포들로 채워져 있었으며, G4는 폐포는 어느 정도 유지하고 있었으나 출혈을 동반하고 있었음.

○ 특히 G5와 PC는 폐포벽이 구분이 안될 정도로 염증세포와 대식세포로 꽉 차 있었음.

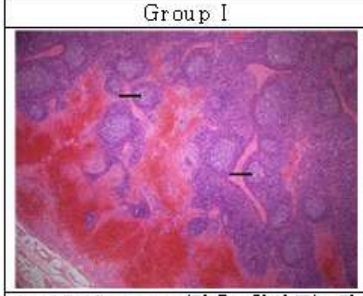
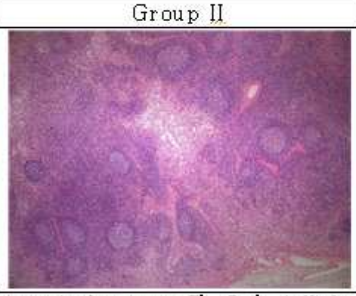
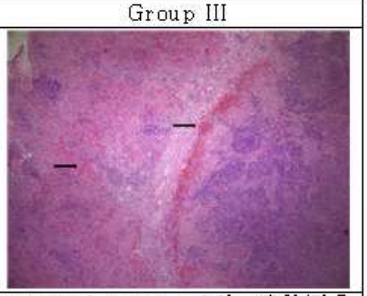
(6) 신장

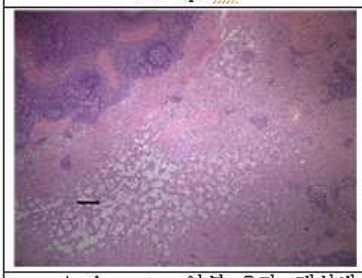
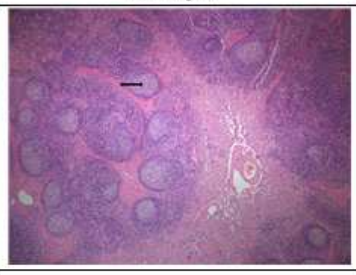
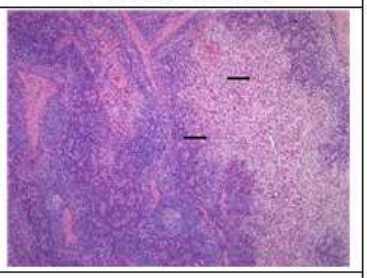
Group I	Group II	Group III
		
피질에 glomeruli(검은 화살표)는 정상 분포, 혈관 발달	피질에 glomeruli(검은 화살표)가 약간 비대해서 분포, 혈관 발달	혈관 주변에 림프구의 침윤

Group IV	Group V	Positive control
		
피질미로 사이에 출혈	피질미로내 출혈 경향	피질내 혈관(검은 화살표) 발달, 피질미로 사이 출혈 경향

○ 각 그룹 모두와 PC에서 출혈현상을 볼 수 있었고, G2에서는 glomeruli의 비대를, G3에서는 혈관 주위 림프구의 뚜렷한 침윤을 볼 수 있었으며 PC에서는 눈에 띄게 혈관이 비대해 있었음.

(7) 림프절(서혜부)

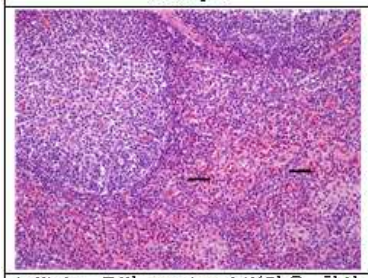
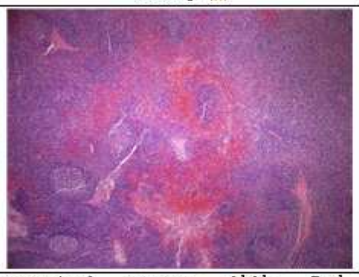
Group I	Group II	Group III
		
germinal center(검은 화살표) 잘 유지, follicle 사이 출혈 심함	germinal center 잘 유지, follicle 수 감소	germinal center 소실, 출혈(검은 화살표)

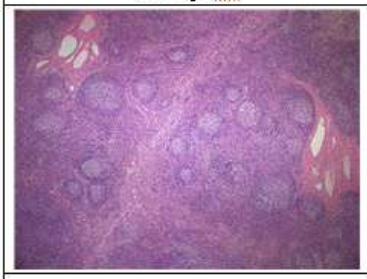
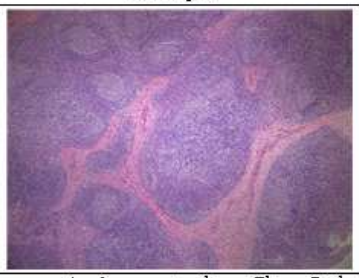
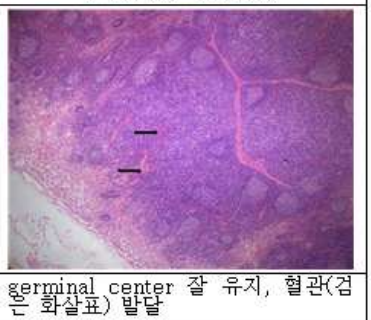
Group IV	Group V	Positive control
		
germinal center 일부 유지, 대식세포(검은 화살표) 다수 분포	germinal center(검은 화살표) 잘 유지	follicle 사이 eosinophil(검은 화살표) 침윤이 심함

○ G1,2,5는 germinal center를 잘 유지하고 있었으며, G3,4,PC는 follicle을 잘 형성하지 못

하고 있었으며, G1과3에서 심한 출혈을 보였음.

(8) 림프절(장간막)

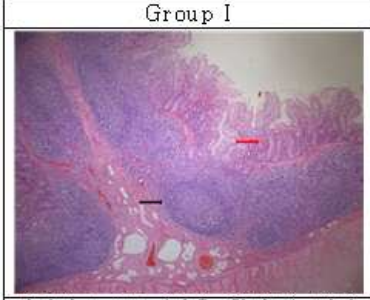
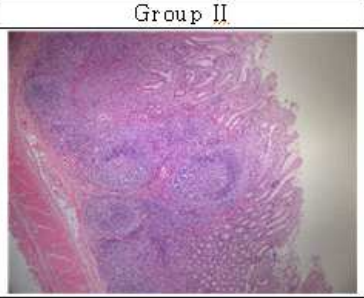
Group I	Group II	Group III
		
follicle 주변 eosinophil(검은 화살표)침윤이 심함	germinal center 부분 유지, follicle 사이 출혈	germinal center 소실, 출혈 심함

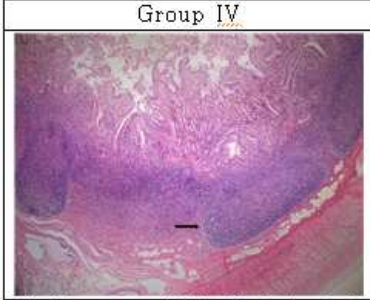
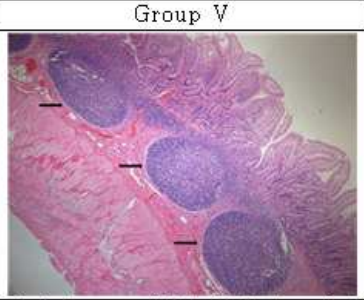
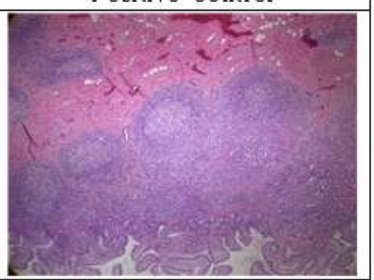
Group IV	Group V	Positive control
		
germinal center 잘 유지	gereminal center는 잘 유지, trabeculae에 eosinophil 침윤	germinal center 잘 유지, 혈관(검은 화살표) 발달

○ G2와3에서 심한 출혈을 보였고, G4,5,PC는 germinal center를 잘 유지하고 있었음.

○ 특히G1에서는 eosinophil의 심한 침윤을 확인할 수 있었음.

(9) 회장

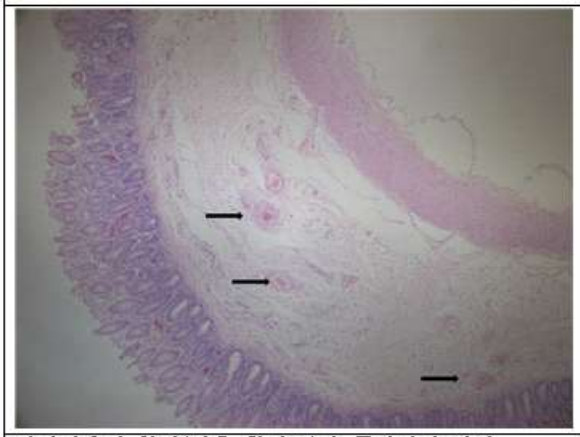
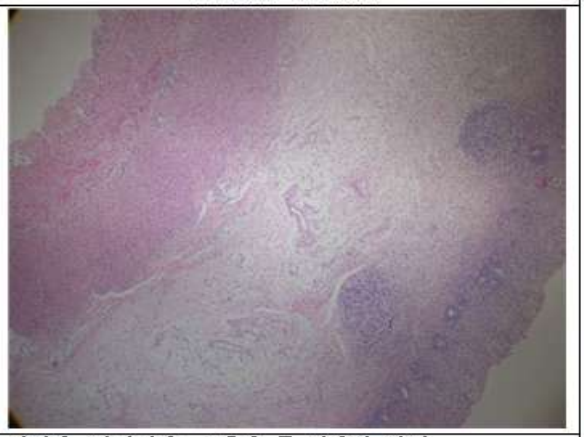
Group I	Group II	Group III
		
점막밑 follicle(검은 화살표) 발달, 점막 사이 eosinophil(붉은 화살표) 침윤	점막밑 follicle 발달, 점막 사이 eosinophil 침윤	점막밑 혈관(붉은 화살표) 발달

Group IV	Group V	Positive control
		
장샘밑 follicle(검은 화살표) 발달, 출혈 경향	장샘밑 follicle(검은 화살표) 뚜렷이 발달, 점막 사이 eosinophil 침윤	점막밑 follicle 발달, 혈관 발달

○ 각 그룹 모두와 PC에서 점막밑 림프소절의 발달을 볼 수 있었고, 점막 사이 eosinophil의 침윤을 볼 수 있었음.

○ 특히 PC에서는 점막밑에 풍부한 혈관 발달을 보였음.

(10) 맹장

-	Positive Control
	
점막밑층에 혈관(검은 화살표)이 풍부하게 발달	점막층, 점막밑층, 근육층 등 전층이 비대

○ 각 그룹 모두 점막 밑 조직에 혈관이 발달된 것을 볼 수 있었고, 특히 PC에서는 전 층이 확연히 두꺼워져 있었음.

아. 결론

각 실험 그룹에 따른 장기별 병리조직학적 검사 결과, 장기별로 나타난 병원성이 그룹별로 약간의 차이가 있으나, 다음과 같은 결과가 도출되었음.

○ 모든 실험그룹들의 장기들에서 조직병변의 염증이나, 출혈 등의 증상이나 특이적 양상이 나타나긴 하였으나, 대체로 양성대조군 (공격접종만 수행)에 비해 증상이 경미하였음.

○ 상용 백신주 Group에서는 LOM주 접종주(Group IV)가 방어능이 가장 우수한 것으로 보여지며, 그린백신 실험군에서는 Group I(백신회 접종후 14일 경과후 공격접종군)이 이와 가장 유사한 방어능을 보였음.

○ BErns주 접종주(Group V)는 그린백신을 접종후 11일째 공격접종한 Group II와 비슷한 방어능 및 병원성을 나타냄

○ 반면, Group III(백신 1회 접종 7일 경과 후 공격접종군)의 경우에는 조직 병변의 증상이 양성대조군 보다 경미하나 큰 차이를 보이지 않았음.

3. 모돈에서 그린백신 방어능 조사를 위한 공격접종용 바이러스 접종량 평가를 위한 실험

가. 접종: 일반양돈장 모돈-돼지열병 항원, 항체 음성돈

나. CSFV YC11WB strain ($10^{6.0}$ TCID50/ml)

다. 실험군 모돈 2두에 대해 접종 수행

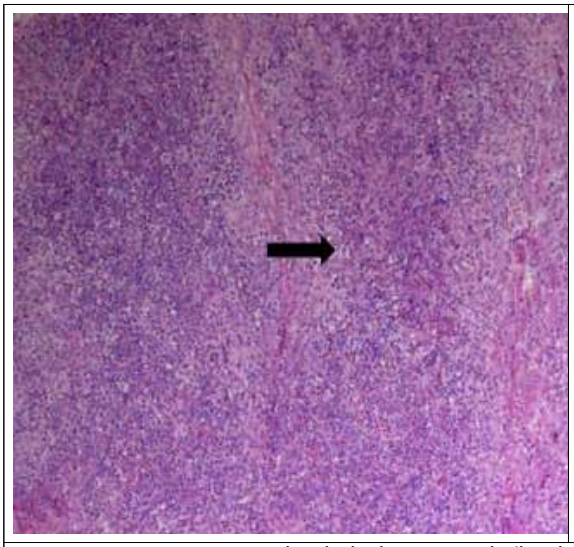
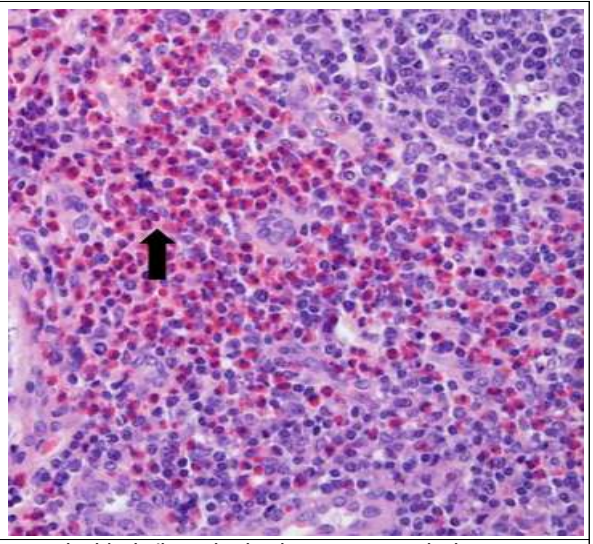
라. 접종 후, 10일째 부검 (병리조직검사, 조직 내 항원 검사 진행)

○ 본 과제에서는 해당 실험군 모돈으로부터 부검, 장기로부터 조직을 채취하였으며, 확보한 검체는 통상적인 조직 병리학적 처리과정을 통해 병리 조직학적 검사를 수행하였음

○ 검사장기 목록: 편도, 비장, 심장, 간, 폐, 신장, 림프절(서혜부), 림프절(장간막), 회장, 맹장

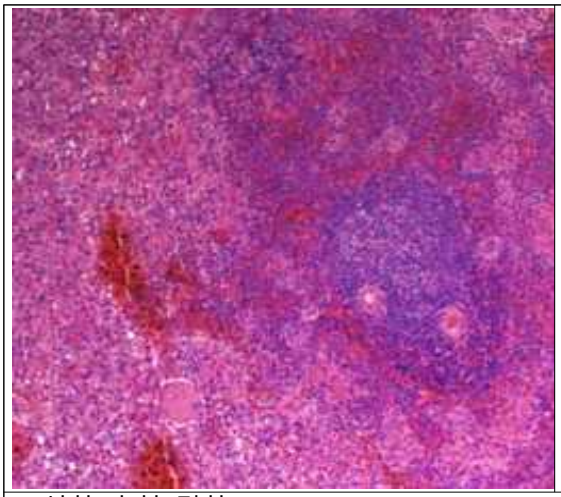
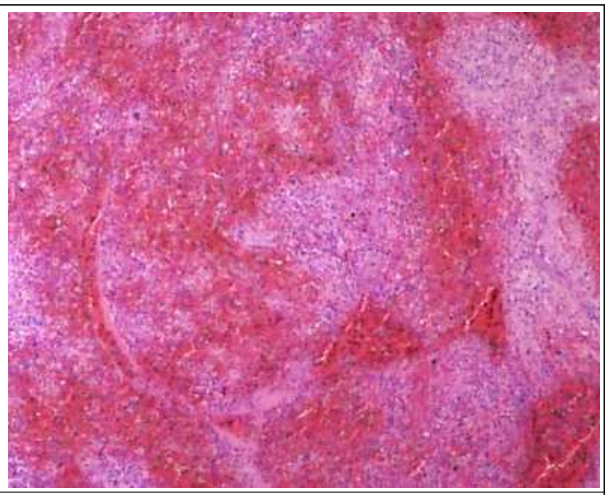
마. 결과

(1) 편도

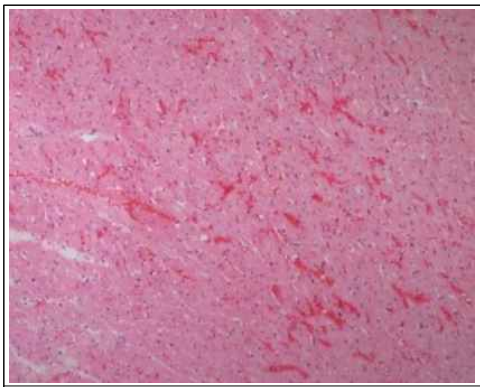
- Lymphoepithelium이 발달되고, 그 안에 림프구와 형질세포의 축적을 볼 수 있었음.
- 출혈 소견 및 eosinophil의 과한 침윤 현상을 볼 수 있었음.

(2) 비장

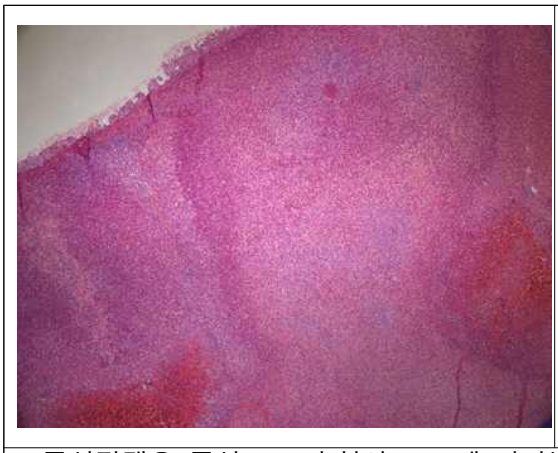
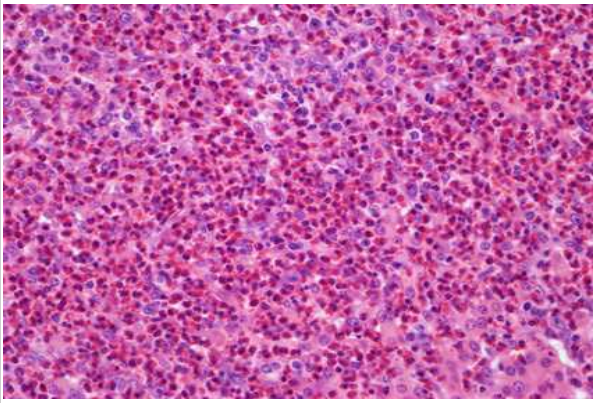
- 심한 출혈 경향.
- LPC(lymphocyte) depletion, RE(reticuloendothelial) cell hyperplasia, endotheliosis 경향.

(3) 심장



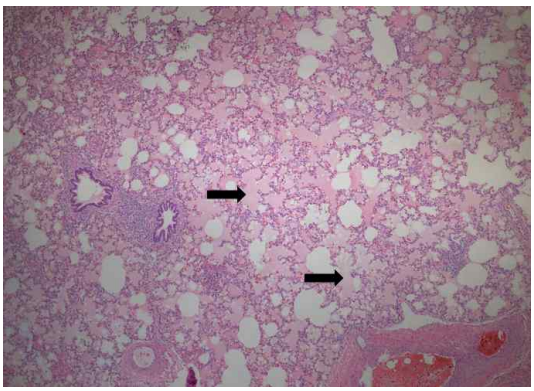
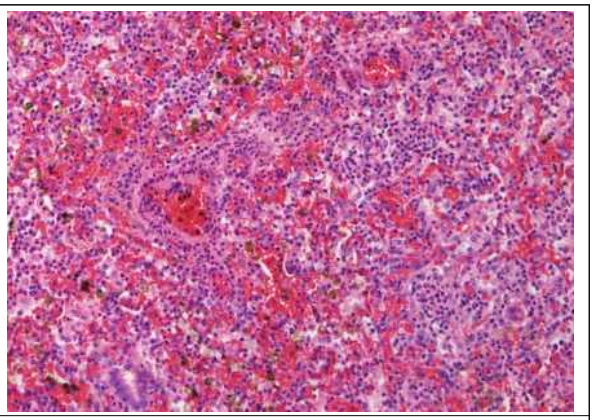
- 심근의 구조는 유지되어 있으나 약간의 출혈을 보임.

(4) 간

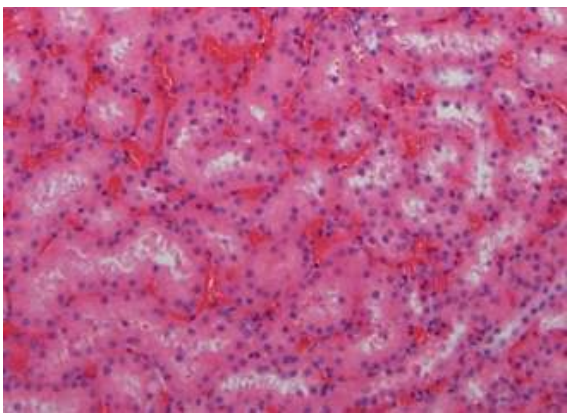
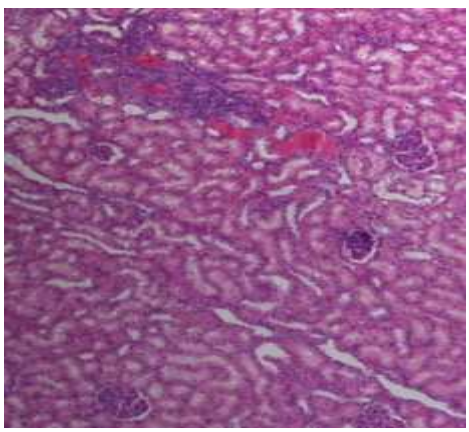
- 중심정맥을 중심으로 출혈이 고르게 나타남.
- 간 소엽사이 결합조직에 많은 eosinophil의 침윤이 나타남.

(5) 폐

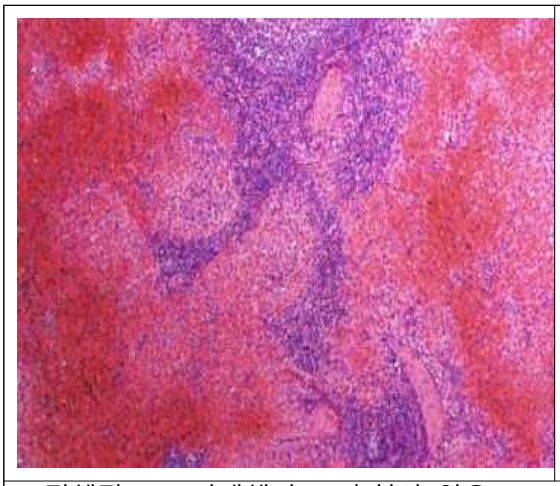
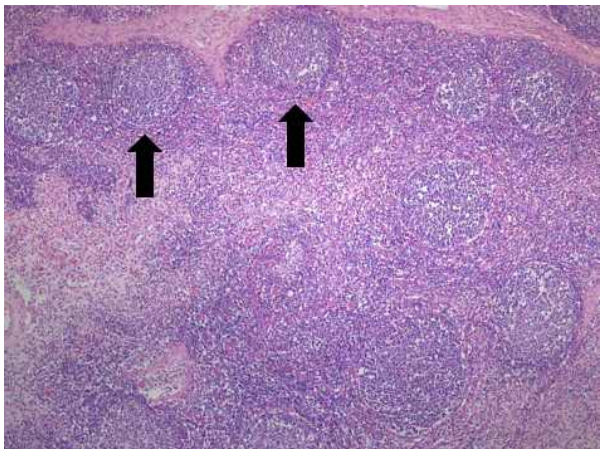
- 폐포벽이 잘 구분되지 않고, 폐포내 염증세포와 대식세포로 가득 차있음.
- 세기관지 주변 림프구의 침윤이 확인.
- 출혈이 있음.

(6) 신장

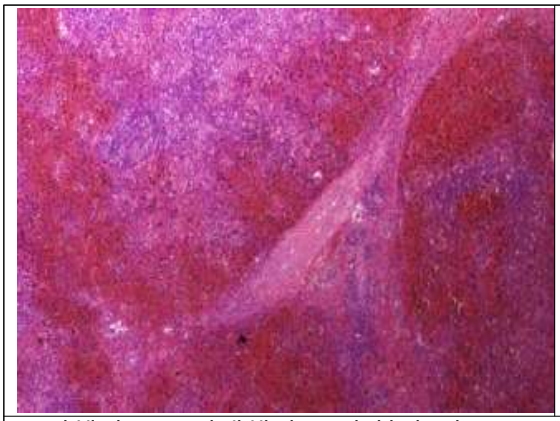
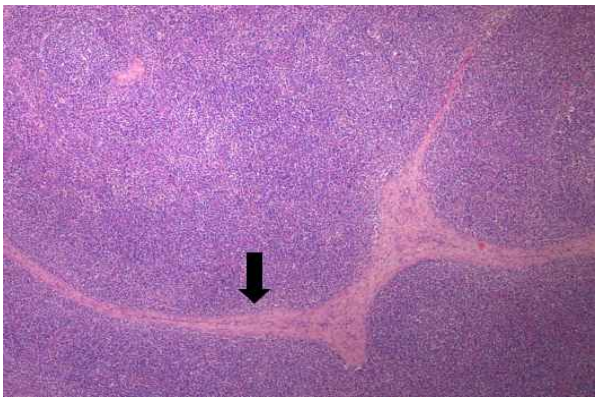
- 혈관의 비대와 함께 신피질에 출혈 경향.
- 혈관 주위 림프구의 뚜렷한 침윤양상.

(7) 림프절 (서혜부)

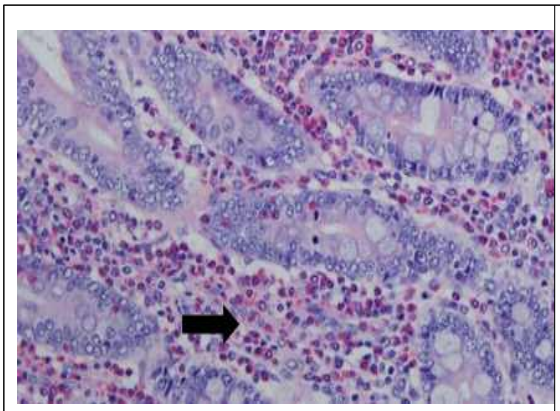
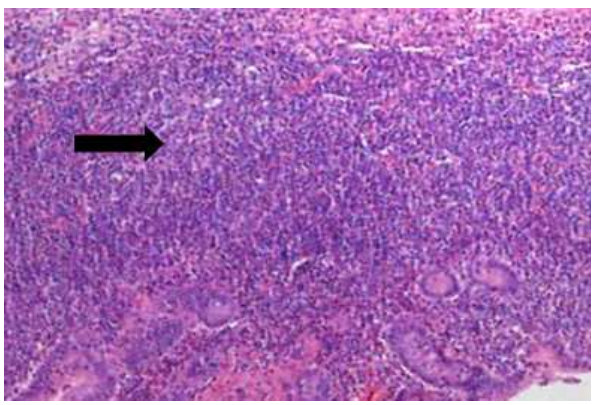
- 전체적으로 비대해지고, 출혈이 있음.
- Trabeculae와 lymph follicle에 eosinophil이 많이 침윤을 보임.

(8) 림프절 (장간막)

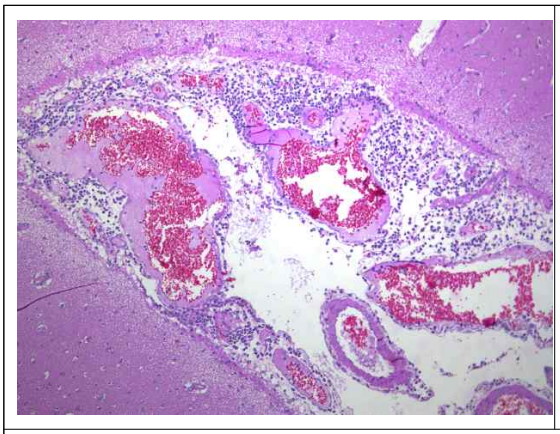
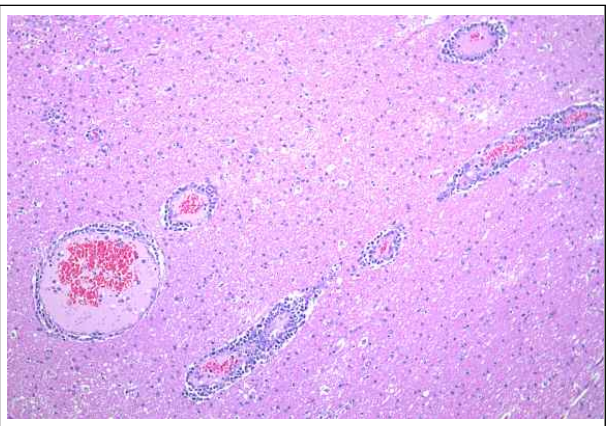
- 전체적으로 비대해지고, 출혈이 있음.
- 지주막하 림프소절의 구분이 명확치 않음.
- Folicle 주변 eosinophil이 많이 침윤을 보임.

(9) 회장

- 장샘 사이에 eosinophil이 심한 침윤을 보임.
- 점막하 림프구의 침윤이 심함.

(10) CNS (central nervous system)

- 혈관 주변 침윤양상 (perivascular cuffing) 보임.
- 수막염(menigitidis) 및 신경아교증(gliosis) 양상을 보임.

바. 결론

(1) 부검소견(접종 10일째 안락사 후 부검실시)

○ E1번(11) : 악하림프절 충혈·종창, 심장의 국소적 점상출혈, 신장의 국소적 점상출혈 (1~2개소), 방광점막에 점상출혈 산재, 복수

○ E2번(12) : 악하림프절 종창, 장간막림프절 충출혈(주연성 출혈), 심장의 국소적 점상출혈, 담낭 점막의 점상출혈 산재, 방광점막에 점상출혈 산재, 복수

(2) 조직소견 (11, 12번 모두)

○ CNS : meningitis, gliosis, perivascular cuffing

○ Spleen : LPC depletion, RE cell hyperplasia, endotheliosis

○ Lymphnode : LPC depletion, RE cell hyperplasia

(3) 모든 실험군의 장기들에서 조직병변 증상인 염증이나, 출혈 및 장기별 특이적 양상이 모든 실험동물에게서 확인되어졌음 (12번 실험돼지의 경우, 전체적으로 병변이 11번 돼지에 비해 경미하였음)

4. 모돈에서의 그린백신의 방어능 평가를 위한 실험

가. 백신 2회 접종 80일 후, 공격 접종 수행

○ 접종 : 임신모돈-돼지열병 항원, 항체 음성돈.

○ 공격접종 : CSFV YC11WB strain ($10^{6.0}$ $TCID_{50}$/ml)

○ 실험군 모돈 1두에 대해 공격접종 수행

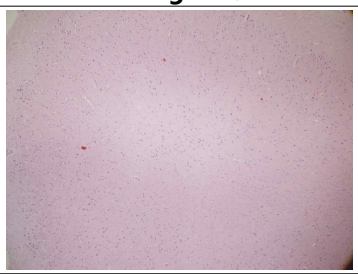
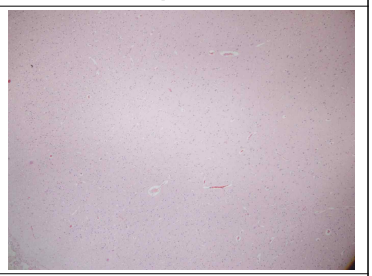
나. 모든 예정된 실험이 종료되는 시점에 실험동물 부검, 장기로부터 조직을 채취 예정, 확보한 검체는 통상적인 조직 병리학적 처리과정을 통해 병리 조직학적 검사를 수행함

다. 검사장기 목록: 편도, 비장, 심장, 간, 폐, 신장, 림프절 (서혜부), 림프절 (장간막), 회장, 맹장

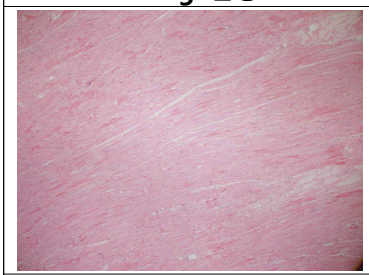
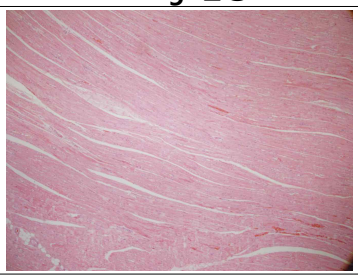
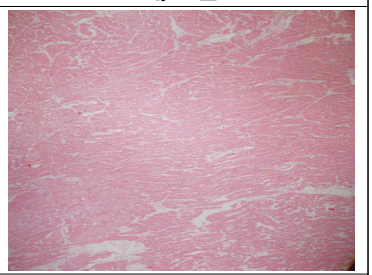
그룹	Schedule	두수	실험
G1 (100ug)	V 1st 14D 2nd 80D Challenge	2	* 채혈 – 백신접종 전, 공격 접종 전 <공격접종 후> 1. 채혈 및 시료채취 (비즙, 타액, 분변) : 공격접종 후, 3, 7, 10, 14, 17, 21일 2. 백혈구수 측정 3. 체온 측정 4. 임상증상 관찰 5. 혈청 : 항체검사 및 cytokine 측정
G2 (200ug)	V 1st 14D 2nd 80D Challenge	2	
G3 (대조)	Challenge	1	

라. 실험 결과

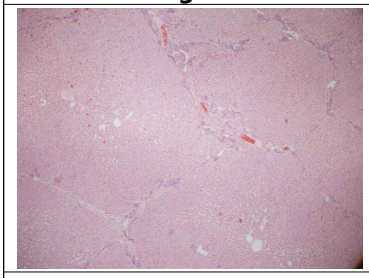
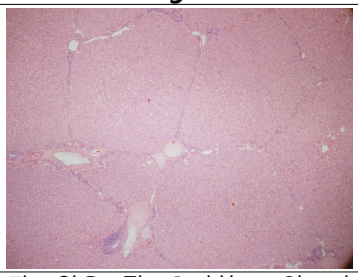
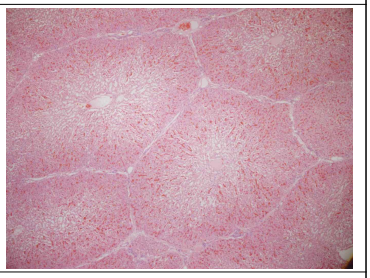
(1) 뇌

100ug 접종	200ug 접종	대조군
		
Oligodendrocyte는 양호하게 보존되고 있으나 약간의 모세혈관 확장을 보임	Oligodendrocyte가 잘 보존되고 있음	Neuron과 oligodendrocyte의 위축을 보임

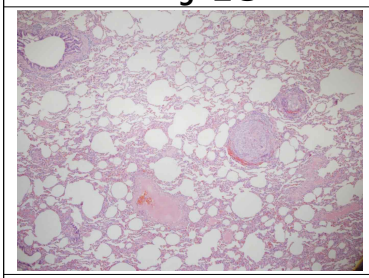
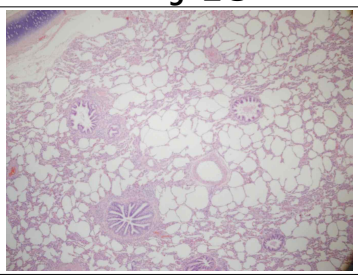
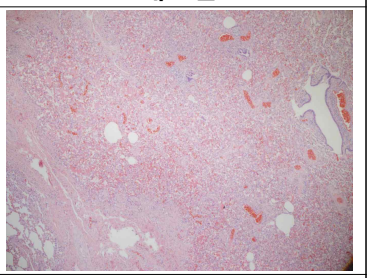
(2) 심장

100ug 접종	200ug 접종	대조군
		
심근세포 사이에 약간의 출혈을 보임	거의 정상적인 심근세포의 분포를 보임	심근세포의 구조가 약간의 변성을 보이고 핵도 많이 위축되어 있음

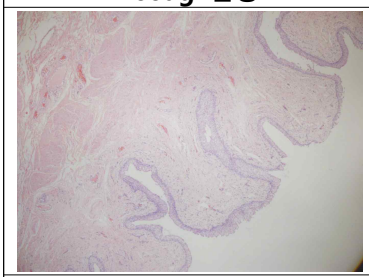
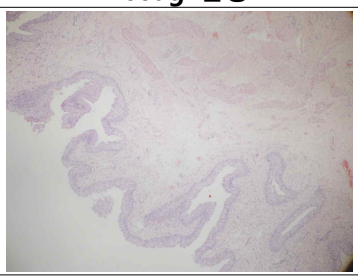
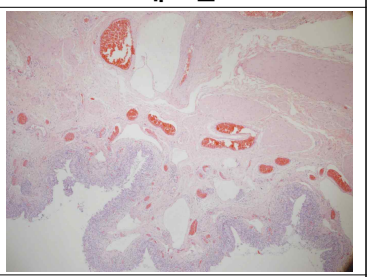
(3) 간

100ug 접종	200ug 접종	대조군
		
일부 간소엽이 소실되고, 간문로가 확장되어 있음	간소엽을 잘 유지하고 있으나 일부에서 중심정맥의 소실을 보임	간소엽을 잘 이루고 있으나 간세포 사이 심한 출혈을 보임

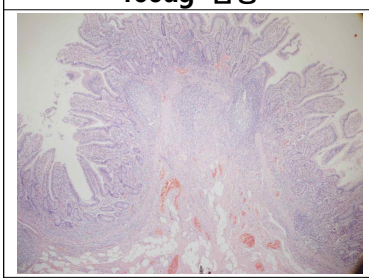
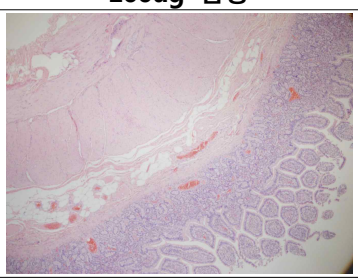
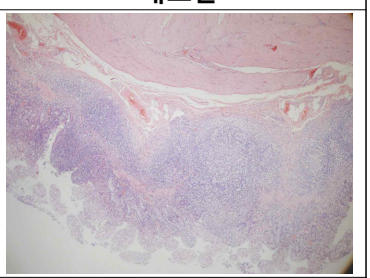
(4) 폐

100ug 접종	200ug 접종	대조군
		
폐포벽이 두꺼워져 있고, 폐포벽 사이 약간의 출혈	폐포벽과 세기관지가 잘 보존되고 있음	출혈과 무기폐 양상을 보임

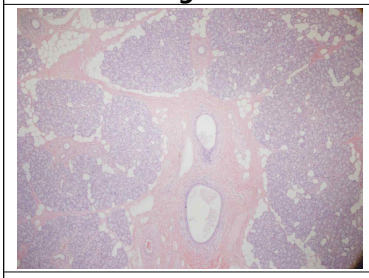
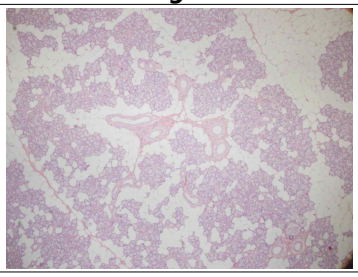
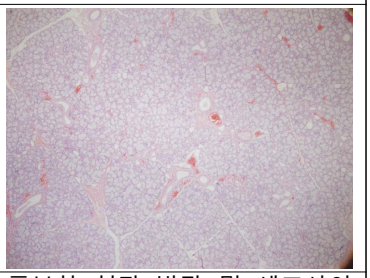
(5) 방광

100ug 접종	200ug 접종	대조군
		
방광 점막이 약간 비후해 지고 점막하층에 약간의 혈관이 발달	방광 점막이 약간 증식했으나 거의 정상적인 구조를 보임	방광점막이 두꺼워졌고 점막하층에 혈관이 풍부하게 발달

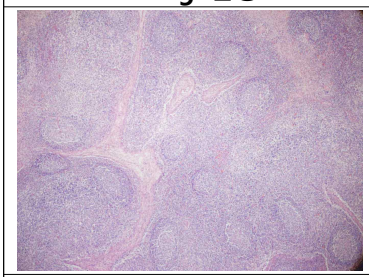
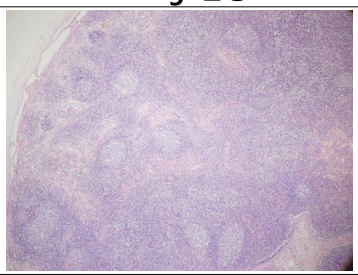
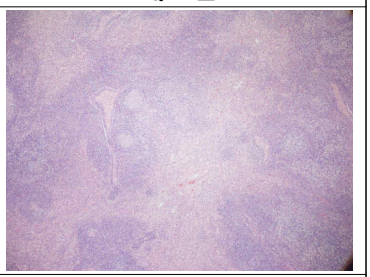
(6) 회장

100ug 접종	200ug 접종	대조군
		
Villi와 crypt가 잘 발달되고 점막하 혈관 발달	점막하층에 풍부한 지방 관찰	점막고유층 세포의 시한 변성과 Peyer Patch 발달,

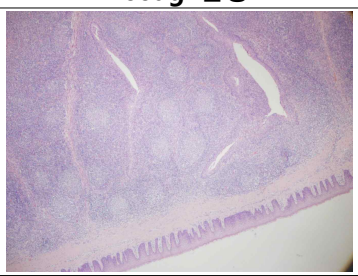
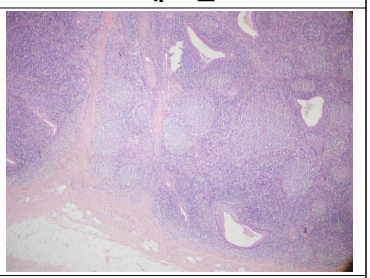
(7) 악하선

100ug 접종	200ug 접종	대조군
		
점액선내 풍부한 혈관 증식	점액선내 지방세포의 발달	풍부한 혈관 발달 및 세포사이 출혈

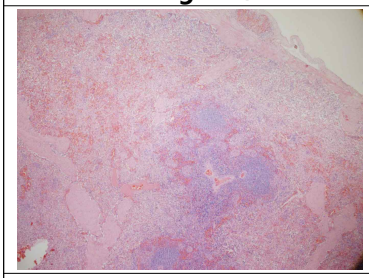
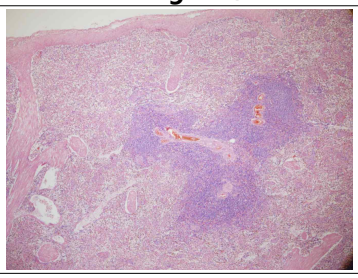
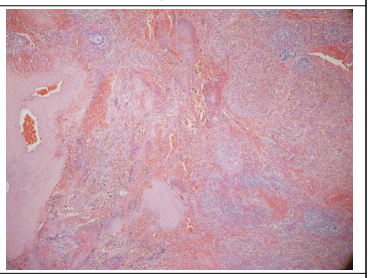
(8) 장간막

100ug 접종	200ug 접종	대조군
		
이차소포가 발달되고 소포내 호산구의 증식을 보임	일차소포와 이차소포가 고르게 발달하고 동이 잘 유지됨	이차소포가 많이 소실되고 세포사이 출혈을 보임

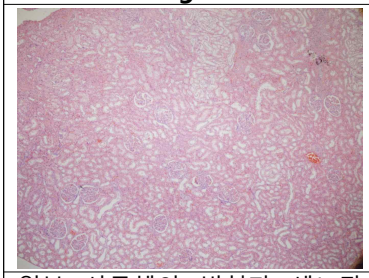
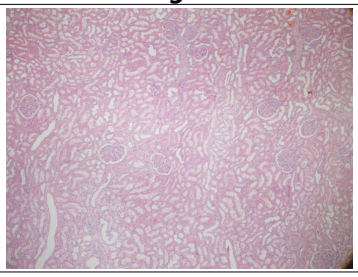
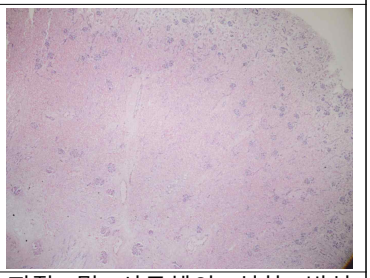
(9) 편도

100ug 접종	200ug 접종	대조군
		
Tosilar crypt와 germinal center 발달과 부분적으로 호산구 침윤	Tosilar crypt와 germinal center 발달	Germinal center의 소실 및cord 발달

(10) 비장

100ug 접종	200ug 접종	대조군
		
백색속질이 많이 소실되고 비장 접단이 발달	적색속질이 발달하고 이차소포내 혈관 증식	백색속질과 적색속질의 구분이 불명확하고 혈관 증식, 자가용해로 인한 부산물 생성

(11) 신장

100ug 접종	200ug 접종	대조군
		
일부 사구체의 변형과 세뇨관 내 출혈	사구체가 잘 유지	피질 및 사구체의 심한 변성 및 세뇨관 소실

마. 결론

- ○ 각 실험 그룹에 따른 장기별 병리조직학적 검사 결과, 장기별로 나타난 병원성이 그룹별로 약간의 차이가 있으나, 다음과 같은 결과가 도출되었음.
- ○ 모든 실험그룹들의 장기들에서 조직병변의 염증이나, 출혈 등의 증상이나 특이적 양상이 나타나긴 하였으나, 대체로 양성대조군 (공격접종만 수행)에 비해 증상이 경미하였음.
- ○ 200ug 접종 그룹의 염증이나, 출혈 및 장기별 특이적 양상 등이 100ug 접종 그룹에 비하여 경미한 것을 확인하였음.
- ○ 전체적으로 모든 실험 그룹이 양성대조군의 심각한 조직 변병 증상에 비하여 경미하였으며, 200ug 접종 그룹이 100ug 접종 그룹에 비하여 비교적 우수한 것을 확인하였음.

5. 식물발현 그린마커 돼지열병백신 비육돈에서 그린백신의 방어능 평가를 위한 실험(현재 부산가톨릭대학교에서 병리조직 샘플 분석이 진행 중이며, 2018년 12월 이전에 일정 완료 예정)

가. 시험목적 : 식물발현 그린마커 돼지열병백신 자돈용 품목허가 진행 중 임상시험에서 출하전 비육돈 방어항체가 유지 및 공격접종을 통한 방어능 조사

나. 접종

- ○ 접종액 : 돼지열병 바이러스 YC11WB 2 x $10^{6.0}$ $TCID_{50}$/두
- ○ 접종두수 : 그린마커백신군 - 4마리, LOM 백신군 - 2마리, 비백신군 (음성 대조) - 2마리
- ○ 접종방법 : 1차접종 (40일령), 2차접종 (60일령), 공격접종 (210일령), 부검 (230일령)

다. 본 과제에서는 해당 실험 군 모돈으로부터 부검, 장기로부터 조직을 채취하였으며, 확보한 검체는 통상적인 조직 병리학적 처리과정을 통해 병리 조직학적 검사를 수행중

라. 검사장기 목록 : 편도, 비장, 심장, 간, 폐, 신장, 림프절 (서혜부), 림프절 (장간막), 회장, 맹장

6. 임신 모돈에서의 그린백신이 긴급백신으로서 평가를 위한 실험에 수행 중에 있음(검역본부 측에서 실험이 진행되어지고 있으며, 2018년 12월 이전에 일정 완료 예정)

그룹	Schedule	두수	실험
G1 (임신중기 모돈의 방어능 조사)		1	* 채혈 – 백신접종 전, 공격접종 전 <공격접종 후> 1. 채혈 및 시료채취 (비즙, 타액, 분변) : 공격접종 후, 3, 7, 10, 14, 17, 21일 2. 백혈구수 측정 3. 체온 측정 4. 임상증상 관찰 5. 혈청 : 항체검사 및 cytokine 측정

가. 시험목적 : 식물발현 그린마커 돼지열병백신을 임신중기 모돈에 접종한 후 야외주에 대한 방어능을 조사실험

나. 실험방법

그룹	두수	1. 돼지열병 항원 항체 음성 확인	2. 종부수행 및 임신 확인	3. 백신 1차 접종 (임신 66일령)	4. 백신 2차 접종 (임신 80일령)	5. 돼지열병야외주 공격접종 (임신94일령)	6. 출산 (임신 114일)	7.부검
A (백신접종군)	5	cELISA 및 중화항체 시험 수행	6마리 모두 종부 및 임신여부 확인	1. 접종량 : 300μg/두 2. 접종방법 : 이근부 근육접종(IM)	1. 접종량 : 300μg/두 2. 접종방법 : 이근부 근육접종(IM)	1. 공격접종 임신일령 : 중기 (94일령*) 2. 야외주 : YC11W8주 3. 접종량 : $1x10^{6}TCID_{50}$(IM) $1x10^{6}TCID_{50}$(IN)	출산시 자돈의 산자수, 폐사수(마이라, 흑자, 벽자 등) 확인 (임신 114일/출산)	임신 모돈 및 자돈 (유산, 사산, 마이라 및 성존)을 부검하여 수직감염 확인 및 항체가 확인
B (음성대조)	1			비접종	비접종			
총두수	6							

다. 모든 예정된 실험이 종료되는 시점에 실험 동물 부검, 장기로부터 조직을 채취 예정, 확보한 검체는 통상적인 조직 병리학적 처리과정을 통해 병리 조직학적 검사를 수행 예정

라. 검사장기 목록 : 편도, 비장, 심장, 간, 폐, 신장, 림프절 (서혜부), 림프절 (장간막), 회장, 맹장

제3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제1절 목표

구분		연구개발의 목표
1차년도	1세부	돼지열병 그린백신 원료 항원 시제품 생산 기술 개발
	1협동	밀폐형 식물공장 이용 형질전환 담배 재배생산 시설 구축 및 환경제어 모니터링 적용기술 개발
	2협동	그린 마커백신의 자돈에서의 방어능 조사
	3협동	돼지열병 마커백신 제품 제작
	4협동	그린 마커백신의 자돈 공격접종 후 병리조직 및 면역조직학적 검사
2차년도	1세부	항원 단백질 분리 공정정제 기술 20kg 적용 및 실증, 항체 지속력 강화 기술 개발
	1협동	형질전환 담배 주년재배를 수경재배기술 및 영양번식 체계 확립
	2협동	그린 마커백신의 임신모돈에서의 방어능 조사
	3협동	돼지열병 마커백신의 실험실 내 검증실험 및 야외 임상시험 계획서 제출
	4협동	그린 마커백신의 모돈 공격접종 후 병리조직 및 면역조직학적 검사
3차년도	1세부	야외 임상 시험을 위한 시제품 생산 및 kvGMP 공장 구축
	1협동	형질전환 담배의 입모율 향상을 위한 채종조건 및 파종 자동와 요소기술 개발
	2협동	그린 마커백신의 임신모돈에서의 방어능 및 모체이행항체가 조사
	3협동	돼지열병 마커백신의 야외 임상시험 및 품목허가서류 제출
	4협동	그린 마커백신의 비육돈 공격접종 후 병리조직 및 면역조직학적 검사
		그린 마커백신의 비육돈 및 임신모돈 공격접종 후 병리조직 및 면역조직학적 검사

제2절 목표 달성여부

구분		연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도 (%)
1차년도	1세부	돼지열병 그린백신 원료 항원 시제품 생산 기술 개발	항원 단백질 분리 정제 제조 시설 10 kg 적용 및 시제품 생산	100%
			경제성 확보를 위한 버퍼 조성 개선 및 운영방식 개선	100%
			식물 생산 돼지열병 백신의 효능의 신속 및 지속형 면역증강제 개발	100%
	1협동	밀폐형 식물공장 이용 형질전환 담배 재배생산 시설 구축 및 환경제어 모니터링 적용기술 개발	발아실 및 육묘시설구축	100%
			순환식 수경재배 시설 구축	100%
			형질전환 식물 연구용 재배시설 신고	100%
			환경제어 모니터링을 통한 밀폐형 재배시스템 점검 및 생산성 조사	100%
	2협동	그린 마커백신의 자돈에서의 방어능 조사	돼지열병 그린 마커백신의 자돈에서 방어능 조사	100%
			그린마커백신의 자돈 공격접종 후 병리조직 및 면역학적 검사	100%
	3협동	돼지열병 마커백신 제품 제작	재조합 항원의 장기 보존성 실험	100%
			백신 항원에 적합한 면역증강제 선정	100%
			백신 1 dose 당 최소 항원 함량 확인	100%
			연속 3 Lot 시제품 제작	100%
	4협동	그린 마커백신의 자돈 공격접종 후 병리조직 및 면역조직학적 검사	자돈 40두에 대해 공격접종 수행 후, 모든 장기별 (뇌를 포함한 15곳 이상, 장기 하나당 조직 슬라이드 5장 이상) 병리 조직 검사	100%
			면역조직화학적 염색법을 통한 CSFV바이러스 확인	100%
			장기별 CSFV바이러스와 조직병리학적 상관관계 분석	100%
			백신 접종 부위에 대한 이상육 관련 염증 반응 병리조직 검사	100%

2차년도	1세부	항원 단백질 분리 공정정제 기술 20kg 적용 및 실증, 항체 지속력 강화 기술 개발	제품화를 위한 항원 단백질 분리 정제 scale 확립 및 SOP 확정	100%
			경제성 확보를 위한 운영 방식 개선	100%
			식물 생산 돼지열병 백신의 효능의 신속 및 지속형 면역증강제 개발	100%
	1협동	형질전환 담배 주년재배를 수경재배기술 및 영양번식 체계 확립	형질전환 *N. benthamiana* 수경재배 생산을 위한 배양액 농도 조절 최적화 구명	100%
			LEDs 이용 적정 광주기 구명	100%
			CO2 적정 공급농도 구명	100%
			형질전환 *N. benthamiana* 삽목번식을 위한 배지 조성 및 발근촉진제 구명	100%
	2협동	그린 마커백신의 임신 모돈에서의 방어능 조사	돼지열병 그린 마커백신의 임신모돈에서의 방어능 조사	70%
			그린마커백신의 임신돈 공격접종 후 병리조직 및 면역조직학적 검사	70%
	3협동	돼지열병 마커백신의 실험실 내 검증실험 및 야외 임상시험 계획서 제출	시제품 3 Lot의 자돈 안전성 확인	100%
			시제품 3 Lot의 자돈 면역원성 확인	100%
			돼지열병 마커백신의 야외 임상시험승인을 위한 임상시험 계획서 제출	100%
	4협동	그린 마커백신의 모돈 공격접종 후 병리조직 및 면역조직학적 검사	모돈 5두에 대해 공격접종 수행 후, 모든 장기별 (뇌를 포함한 10곳 이상, 장기 하나당 조직 슬라이드 5장 이상) 병리 조직 검사	100%
			면역조직화학적 염색법을 통한 CSFV바이러스 확인	100%
			장기별 CSFV바이러스와 조직병리학적 상관관계 분석	100%
			백신 접종 부위에 대한 이상육 관련 염증 반응 병리조직 검사	100%

3차년도	1세부	야외 임상 시험을 위한 시제품 생산 및 kvGMP 공장 구축	자돈용 그린백신(단미) 야외임상 시제품 3 lot 생산 및 공급	100%
			야외농장 임상시험 수행	100%
			돼지열병 그린백신 돈단독 혼합 백신 실험을 위한 시제품 생산 및 공급	100%
			해외 수출을 위한 해외 시장 및 방역 정책 조사	100%
	1협동	형질전환 담배의 입모율 향상을 위한 채종 조건 및 파종 자동화 요소기술 개발	형질전환 *N. benthamiana* 고함량 항원단백질 생산을 위한 적심 효과 구명	100%
			N. benthamiana 종자 저장조건 및 채종 조건 구명	100%
			세립종자 파종 장치 test완료	100%
	2협동	그린 마커백신의 임신 모돈에서의 방어능 및 모체이행항체가 조사	그린마커백신의 임신모돈에서의 방어능 및 모체이행항체가 조사	70%
			그린 마커백신의 임신모돈 출산 후 포유자돈 및 태아에서의 병리조직 및 면역조직학적 검사	70%
	3협동	돼지열병 마커백신의 야외 임상시험 및 품목허가서류 제출	돼지열병 마커백신의 3개 농장 야외 임상시험	100%
			백신의 유효기간 설정을 위한 장기보존성 시험	100%
			돼지열병 마커백신의 제조 및 판매승인을 위한 품목허가서류 신청	100%
	4협동	그린 마커백신의 비육돈 공격접종 후 병리조직 및 면역조직학적 검사	비육돈 8두에 대해 공격접종 수행 후, 모든 장기별 (뇌를 포함한 10곳 이상, 장기 하나당 조직 슬라이드 5장 이상) 병리 조직 검사	80%
			면역조직화학적 염색법을 통한 CSFV바이러스 확인	80%
			장기별 CSFV바이러스와 조직병리학적 상관관계 분석	80%
			백신 접종 부위에 대한 이상육 관련 염증 반응 병리조직 검사	80%
		그린 마커백신의 비육돈 및 임신모돈 공격접종 후 병리조직 및 면역조직학적 검사	비육돈 8두 및 임신모돈 6두에 대해 공격접종 수행 후, 모든 장기별 (뇌를 포함한 10곳 이상, 장기 하나당 조직 슬라이드 5장 이상) 병리 조직 검사	50%
			면역조직화학적 염색법을 통한 CSFV바이러스 확인	50%
			장기별 CSFV바이러스와 조직병리학적 상관관계 분석	50%
			백신 접종 부위에 대한 이상육 관련 염증 반응 병리조직 검사	50%

제3절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

○ 3차년도 과제를 현재 비육돈 6두에 대한 공격접종 수행 후, 모든 장기별 (뇌를 포함한 10곳 이상, 장기 하나당 조직 슬라이드 5장 이상) 병리 조직 검사를 진행 중이며, 임신 모돈 6두는 검역원에서 모든 실험이 완료된 이후에 진행하여 2018년도 12월 안으로 완료 예정

제4장 연구결과의 활용 계획 등

○ 그린 마커백신의 제품화를 위하여, 1차년도에 파일럿 설비를 구축하여 기본 공정을 확립하고 이를 바탕으로 생산(양산)공장을 건립하였음. 본 생산공장 설계에는 그린 마커백신 연중 생산을 위한 설비와 장비들을 반영하였고, 이를 바탕으로 인력을 충원하고 있음. 경제성은 기업의 민감한 부분이지만 최소한 중국의 곤충세포 발현 마커백신 대비 50% 저렴하다고 판단하고 있음

○ 2009년 농식품부에서 돼지열병 청정화 계획을 발표한 후 돼지열병 마커백신에 대한 니즈가 높아졌음. 특히 제주도는 돼지열병 청정국 재인증을 추진하고 있어 바이오앱과 면밀하게 협의 중이고 농식품부 및 한돈협회를 대상으로 기술 및 제품 설명을 적극적으로 해 나갈 예정임

○ 세계 최초 돼지열병 그린마커백신 품목허가서를 제출하고 90일(근무일 기준) 검토 후 보완 과정을 거쳐 2019년 초에 품목허가를 득하고, 제주도 및 경상북도 농가 시범사업을 수행 계획임

○ 제주도청과 3회에 걸친 회의를 통하여 돼지열병 그린마커백신 사용 의지를 확인하였음

○ 경상북도가 농림축산식품부의 “식물백신 기업지원시설 건립사업”에 선정되어 국비 60억에 지방비(경북/포항시) 60억을 투자하는 시점에서 경상북도에서 돼지열병 그린마커백신 실증 시범 사업 의지를 피력함

MK 뉴스 오피니언 프리미엄 연예 스포츠 증권 부동산 교육 비즈&

뉴스홈 전체기사 경제 기업 사회 국제 부동산 증권 정치 IT과학 문화 기획연재 Special Edition 인기뉴스 암호화폐

경기도 인권센터
인권침해 상담·구제
이제 온라인으로 신청 하세요

국내 첫 식물백신지원시설, 경북 포항에 3년뒤 들어선다

우성덕 기자 입력 : 2018.09.11 17:18:20 수정 : 2018.09.11 17:18:39

식물을 배양해 백신을 연구하는 국내 최초 '식물백신 기업지원시설'이 경상북도 포항시에 들어선다.

11일 경북도에 따르면 식물백신 기업지원시설은 올해부터 3년간 총 사업비 135억원을 투입해 포항융합기술산업지구 내 6840㎡ 용지에 지상 3층(연면적 4628㎡) 규모로 건립된다.

식물백신 기업지원시설은 바이오 기업이 식물을 배양해 백신을 개발할 수 있도록 지원하는 국내 최초 시설이다. 이곳에는 식물 재배 시설, 동물용 의약품 백신 생산 시설, 임상 평가용 시설 등이 들어선다.

이 사업은 농림축산식품부의 공모 사업으로 선정돼 국비를 지원받아 추진된다. 식물백신은 기존 백신과 달리 병원체 전파 위험이 없고 대량 생산이 쉬워 질병 확산에 빠르게 대처할 수 있다는 장점이 있다. 한국과학기술기획평가원(KISTEP)은 식물백신을 '10대 미래 유망 기술' 중 하나로 꼽고 있다.

경북도는 식물백신 기업지원시설 구축을 계기로 2025년까지 5개 이상의 바이오 기업을 육성하겠다는 목표다.

당신의 투자가 목적지를 향하도록,
슈로더 멀티에셋 투자 솔루션
자세히 보기
Schroders

현재 식물백신 개발은 미국 일본 유럽 등 선진국에서 활발히 진행되고 있다. 대표적 식물백신으로는 닭 뉴캐슬병 치료제, 개 치주염 치료제, 에볼라 바이러스를 치료하는 지엠 등이 있다. 이 때문에 식물백신 분야는 백신 수입 대체와 국산화를 통해 농업과 바이오 기술이 결합하는 새로운 산업이 될 것으로 기대된다.

○ 돼지열병 백신 시장은 현재 중국, 동남아에 크게 형성이 되어 있어 이미 특허 등록 절차(미국, 중국, 필리핀, 베트남, 태국, 러시아)를 진행 중이고, 코트라를 통한 시장분석에 착수한 상태임

○ 마케팅을 위하여 마케팅 전문가를 영입하였고 시장 조사 등 구체적인 전략을 수립하고 있음

○ 본 과제에서 신규로 개발된 돼지 열병 백신 신규 물질에 관한 추가 연구를 통하여 가격을 혁신적으로 낮추어 세계 시장을 공략할 계획임

붙임. 참고문헌

○ Foyer, C.H., Descourvieres, P., Kunert, K.J., 1994. Photoxidative stress in plants. Physiol. Plant. 92, 696–717.

○ Liu, J., Xie, Z., Du, J., Sun, J., Bai, X., 2008. Effects of simultaneous drought and heat stress on Kentucky bluegrass. Sci. Hort. 115: 190–195.

○ Nam, S.Y., and Kwon, Y.W., 1997. Effect of temperature and light on growth of leaf lettuce in hydroponics. J. Bio. Fac. Enc. 6(4):270-276.

○ Aphalo, P.J. and Sánchez, R.A. 1986. Stomatal Responses to Light and Drought Stress in Variegated Leaves of *Hedera helix*. Plant Physiol. DOI: https://doi.org/10.1104/pp.81.3.768

○ Nautiyal, S., Badola, H.K., Pal, M., Negi, D.S. 1994. Plant responses to water stress: changes in growth, dry matter production, stomatal frequency and leaf anatomy. Biol. Planta. 36(1): 91-97

○ Yun, H.G. 1997. Nutrient composition suitable to lettuce and chinese flat cabbage in hydroponics. J. Agri. Sci. Kangwon Nat. Univ. 8: 17-22.

○ 최영준, 엄선정, 전하준. 2017. Effect of Planting dates, Root Pruning before and Uprooting After Transplanting of Plantlets on Growth, Budding and Yield of Strawberry 'Seolhyang'. 생물환경조절학회 26(2): 49-55.

○ Lincoln Taiz and Edurado Zeiger. 2006. 식물생리학, 라이프사이언스.

○ Jeong, D.C, Jeong, Dong-Chun, Park, Hak-Bong, Jeong, Jong-Seong, Im, Hoi-Chun, Song, Yeong-Ju. 2006. Effects of Pinching Time and Node Position on Growth and Flowering of Gypsophila paniculata on Autumn Cultivation in Subalpine Area. 24(4):491-496

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원 사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원 사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.