

발간 등록 번호
11-1543000-001874-01

오리 간염 및 리메렐라 감염증 백신 산업화 및 적용 모델 개발 최종보고서

(0.1cm)

2017. 10. 27.

주관연구기관 / 전북대학교
협동연구기관 / (주)중앙백신연구소

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “오리 간염 및 리메렐라 감염증 백신 산업화 및 적용 모델 개발”(개발기간 : 2014. 07. ~ 2017. 07.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 10. 27.

주관연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 (대표자) 이철로 (인)

협동연구기관명 : (주)중앙백신연구소 (대표자) 윤인중 (인)

참여기관명 : (주)중앙백신연구소 (대표자) 윤인중 (인)

주관연구책임자 : 차 세 연

협동연구책임자 : 김 은 희

참여기관책임자 : 김 은 희

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	314023-3	해 당 단 계 연구 기 간	2014.07.29.~ 2017.07.28.	단 계 구 분	1/1
연구사업명	중사업명				
	세부사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	오리 간염 및 리메렐라 감염증 백신 산업화 및 적용 모델 개발			
연구책임자	차세연	해당단계 참여 연구원 수	총: 15명 내부: 15명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:300,000천원 민간:100,000천원 계:400,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 51명 내부: 51명 외부: 명	총연구개발비	정부:900,000천원 민간:300,000천원 계:1,200,000천원
연구기관명 및 소속부서명	전북대학교 수의과대학			참여기업명 (주)중앙백신연구소	
위탁연구					
1. 오리간염백신 1형 및 3형 혼합 제조기술 확립 - 국내 유행하는 1형과 3형을 동시에 방어할 수 있는 2중 혼합 동결건조백신을 개발함 - 혼합백신의 항원간 간섭현상을 백신주별 단일백신과 혈청형별 강독주에 대한 방어능을 비교평가하여 항원간 간섭으로 인한 효력저하가 없음을 확인함 - 혼합백신의 접종경로별 방어효능과 경과일령별 방어효능 비교 평가를 통해 단일백신과 유사하거나 높은 수준의 방어효능을 확인함 - 야외임상시험을 통한 현장 평가에서도 안전성과 효능을 입증함 2. 오리간염백신 동결건조 기술 확립 및 안정성 확인을 통한 동결건조백신 제작으로, 기존백신의 질소보관상의 단점을 보완				보고서 면수 99쪽	

하여 현장사용의 활용도를 높임

3. 오리 생산단계별 예방접종 프로그램을 구축하고 종오리 백신 프로그램을 농장에 적용 평가한 결과 모체이행항체에 의한 후대병아리의 방어효능을 확인함
 - 시산전 3회 백신 프로그램을 적용한 결과, 후대병아리 14일령 까지 모체이행항체에 의해 100% 방어가 가능함을 확인함
 - 모체 및 후대병아리의 항체가평가를 통해, 모체이행항체의 전달률은 11%, 후대병아리의 모체이행항체 반감기는 3-4일령임을 확인함
4. 국내 오리리메렐라 유행혈청형 분석 및 병원성 분석
 - 1형 15.6%(21/135), 11형 11.9%(16/135), 2형 8.9%(12/135), 6형 5.2%(7/135), 5형 0.7%(1/135) 및 7형 0.7%(1/135) 순으로 분포 확인
 - 생혼합백신 혈청형 1형과 2형을 선정
5. 오리리메렐라 생백신 후보주 2종 선발
 - In-vitro 생백신 후보주 스크리닝 기법 구축
 - 1형 및 2형에 대한 저병원성 생백신 후보주 2종 선발
 - 1형과 2형에 대해 각각 50%, 100%의 방어효능을 보임
 - 오리에 1, 10, 및 100dose 백신 시에도 안전성 확인
6. 오리리메렐라 혼합 생백신 개발
 - 저병원성 생백신 후보주 2종에 대해 혼합 음수생백신 개발
 - 1형에 대해 60-70%, 2형에 대해 80-100%의 높은 방어효능을 확인
 - 오리에 1, 10, 및 100dose 백신 시에도 폐사, 임상증상, 체중 감소를 일으키지 않는 안전성 확인
7. 오리에서 가장 문제시되는 오리간염 및 오리리메렐라감염증의 유행 유전형 및 혈청형을 방어할 수 있는 혼합생백신을 개발 및 농장 적용 프로그램도 제시함

< 국문요약문 >

	코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<input type="checkbox"/> 오리간염 및 리메렐라 예방을 위한 안전성 높은 생백신 개발 <input type="checkbox"/> 오리 질병관리기술 향상을 위한 최적화된 백신 접종 프로그램 개발 <input type="checkbox"/> 오리간염 및 리메렐라 생백신 실용화 추진	
연구개발성과 (500자 내외)	<p>[제1세부 - 전북대학교]</p> <input type="checkbox"/> 국내 오리리메렐라 유행혈청형 분석 및 병원성 분석 - 1형 15.6%(21/135), 11형 11.9%(16/135), 2형 8.9%(12/135), 6형 5.2%(7/135), 5형 0.7%(1/135) 및 7형 0.7%(1/135) 순으로 분포 확인 - 1, 2, 5, 7형 : 오리에서 100% 폐사를 유발하는 고병원성 혈청형으로 확인 - 6, 11형 : 약 60%의 폐사를 유발하는 중병원성 혈청형 확인 - 고병원성 유행혈청형인 1형 및 2형에 대한 백신개발이 필요함 <input type="checkbox"/> 오리리메렐라 생백신 후보주 2종 선발 - <i>In-vitro</i> 생백신 후보주 스크리닝 기법 구축 - 1형 및 2형에 대한 저병원성 생백신 후보주 2종 선발 - 1형과 2형에 대해 각각 50%, 100%의 방어효능을 보임 - 오리에 1, 10, 및 100dose 백신 시에도 안전성 확인 <input type="checkbox"/> 오리리메렐라 혼합 생백신 개발 - 저병원성 생백신 후보주 2종에 대해 혼합 음수생백신 개발 - 1형에 대해 60-70%, 2형에 대해 80-100%의 높은 방어효능을 확인 - 오리에 1, 10, 및 100dose 백신 시에도 폐사, 임상증상, 체중감소를 일으키지 않는 안전성 확인	
	<p>[제1협동 - 중앙백신연구소]</p> <input type="checkbox"/> 오리간염 및 리메렐라감염증 예방백신 개발 - 각 항원별 최소면역원성을 확인하여 1형의 최소 면역량은 수당 $10^{3.0}EID_{50}$ 이상, 3형의 최소 면역량은 수당 $10^{2.0}EID_{50}$ 이상으로 결정 - 각 항원에 제조공법 개발을 위한 바이러스 증식능 비교결과 - 최종 설정된 방법에 따라 혼합백신의 제작 - 제작된 혼합백신과 단일백신과의 비교, 접종경로별, 접종일령별 효능평가한 결과 혈청형별로 방어능을 확인 <input type="checkbox"/> 개발백신 시제품 효능평가 및 현장평가 - 오리간염 혼합생백신 최종시제품 생산 및 현장평가 <ul style="list-style-type: none"> • 오리간염 혼합생백신 최종시제품 3Lot를 생산하여 일반, 안전 및 효능시험 확인 • 야외임상시험을 위해 임상시험 승인기관인 농림축산 검역본부 승인완료 (2016. 07.04. 승인) • 야외 3농장(이OO농장, 김△△농장, 나□□농장)에서 적용하여 안전성 및 효능확인 - 최종 결정된 리메렐라 후보주 2종에 대하여 리메렐라 생백신 제조공법 개발 - 리메렐라 생백신 최종 시제품 제작 및 일반시험 완료 - 리메렐라 생백신 현장평가 <ul style="list-style-type: none"> • 최종 생산된 시제품에 대하여 야외임상시험을 위해 임상시험승인기관인 농림축산 검역본부에 임상시험계획서 제출 완료 • 검역본부 승인완료 이후 야외임상시험(현장평가) 진행 - 오리 생산단계별 예방접종 프로그램(안) 연구	

	<ul style="list-style-type: none"> • 오리간염백신 야외적용에 따른 프로그램 설정 완료 <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 개발백신 현장검증 및 산업화 <ul style="list-style-type: none"> - 오리간염 혼합생백신 현장검증 및 산업화 완료 - 리메렐라 생백신 현장검증 및 산업화 - 개발백신 현장 활용도 극대화 방안 연구 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 오리간염 및 리메렐라 질병방제를 위한 효과적인 백신 개발 <input type="checkbox"/> 백신적용에 따른 면역기전 및 방어효능 구명으로 기초자료제공 <input type="checkbox"/> 오리간염 및 리메렐라 예방백신 농가적용을 위한 실용화 촉진 <input type="checkbox"/> 질병피해의 최소화 및 오리농가 소득증대로 인한 오리산업의 경쟁력 강화 				
중심어 (5개 이내)	오리	리메렐라	오리간염	백신	산업화

< SUMMARY >

	코드번호	D-02
Purpose& Contents	<input type="checkbox"/> Development of effective live vaccines against duck hepatitis and riemerellosis <input type="checkbox"/> Establishment of optimized duck vaccine programs for the improvement of disease control technology for duck industry <input type="checkbox"/> Industrialization of live vaccines against duck hepatitis and riemerellosis	
Results	<input type="checkbox"/> Investigation of prevalent serotypes for riemerellosis in Korea - Prevalent serotypes : 1(15.6%, 21/135), 11(11.9%, 16/135), 2(8.9%, 12/135), 6(5.2%, 7/135), 5(0.7%, 1/135), 7(0.7%, 1/135) - Highly virulent serotypes : 1, 2, 5, 7 - Moderate virulent serotypes : 6, 11 <input type="checkbox"/> Establishment of live vaccine candidates for serotypes 1 and 2 - Establishment of <i>In-vitro</i> screening method for vaccine candidate - Selection of low virulent vaccine candidate for serotypes 1 and 2 - Vaccine candidate induced protection (50% and 100%) for serotypes 1 and 2 - Safety was confirmed in ducks with 1, 10, and 100doses vaccination <input type="checkbox"/> Development of bivalent live vaccines against riemerellosis - Development of bivalent live vaccines with two vaccine candidates - Bivalent vaccine induced protection (60-70% and 100%) for serotypes 1 and 2 - Safety was confirmed in ducks immunized with 1, 10, and 100doses <input type="checkbox"/> Development of vaccine against duck hepatitis - Minimal concentration for induction of immune response was determined to be at least $10^{3.0}EID_{50}/bird$ in case of type 1 and $10^{2.0}EID_{50}/bird$ in case of type 3 - Perform a comparison of efficacy between multivalent vaccine and single antigen vaccine by inoculation route or administered age and also, confirm protection properties against viruses which belongs to different serotypes <input type="checkbox"/> Efficacy test and field trials of prototype - Manufacture 3 lots of prototype of duck hepatitis live vaccine and perform safety and efficacy test - Approval of clinical field trials from APQA which is the ministry with authority to approve clinical field trials(Jul.4, 2016) - Confirm safety and efficacy in three commercial poultry farms	

	<input type="checkbox"/> Development of vaccine against <i>Riemerella</i> infection - Development of manufacturing process using two selected candidates of <i>Riemerella</i> - Manufacture the prototype of <i>Riemerella</i> live vaccine and perform the general tests to prototype - Field trials of <i>Riemerella</i> live vaccine - Approval of clinical field trials from APQA which is the ministry with authority to approve clinical field trials(2018)				
Expected Contribution	<input type="checkbox"/> Development of safe and effective live vaccines against duck hepatitis and riemerellosis <input type="checkbox"/> Providing evidence regarding protective efficacy and immune response for further research of vaccine development <input type="checkbox"/> Utilization of live vaccines against duck hepatitis and riemerellosis in domestic duck farms <input type="checkbox"/> Improvement of competitiveness by reducing damage and increasing the incomes in domestic duck farms				
Keywords	Duck	<i>Riemerella</i>	Duck hepatitis virus	Vaccine	Industrialization

< Contents >

1. Executive summary	10
2. Present condition of technology development	15
3. Research contents and results	19
4. Achievements and contribution	85
5. Application plan	88
6. Relevant foreign scientific information collation	90
7. Security level of research achievements	91
8. Current situation of research facilities & equipments registered to NTIS	92
9. Performance result for safety measure	93
10. Representative achievement	95
11. Remarks	97
12. References	98

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	10
2. 국내외 기술개발 현황	15
3. 연구수행 내용 및 결과	19
4. 목표달성도 및 관련분야 기여도	85
5. 연구결과의 활용계획 등	88
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	90
7. 연구개발성과의 보안등급	91
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	92
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	93
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	95
11. 기타사항	97
12. 참고문헌	98

〈별첨〉 자체평가의견서

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

1. 최종목표

- 가. 오리(종오리, 육용오리)간염 및 리메렐라감염증 제어를 위한 백신개발 및 산업화
- 나. 오리 질병관리기술 향상을 위한 최적화된 백신 접종 프로그램 개발

2. 연차별 세부목표

가. 1차년도 : 오리간염 및 리메렐라감염증 예방백신 개발

- 1) 오리간염 혼합생백신 제조공법 개발
- 2) 오리간염 혼합생백신 시제품 제작 및 효능평가
- 3) 국내 리메렐라균 역학분석 및 야외균주 확보
- 4) 리메렐라 생백신 후보주 선발

나. 2차년도 : 개발백신 시제품 효능평가 및 현장평가

- 1) 오리간염 혼합생백신 최종시제품 생산 및 현장평가
- 2) 리메렐라 생백신 제조공법 개발
- 3) 리메렐라 생백신 시제품 제작 및 효능평가
- 4) 리메렐라 생백신 시제품 특성연구
- 5) 리메렐라 생백신 시제품 적용법 확립
- 6) 리메렐라 생백신 최종시제품 생산 및 현장평가
- 7) 오리 생산단계별 예방접종 프로그램(안) 연구
- 8) 개발백신 2중 산업화

다. 3차년도 : 개발백신 현장검증 및 산업화

- 1) 오리간염 혼합생백신 현장검증 및 산업화
- 2) 리메렐라 생백신 현장검증 및 산업화
- 3) 개발백신 현장 활용도 극대화 방안 연구

제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

1. 국내외 현황 및 문제점과 전망

가. 국내외 발생현황

최근 건강에 대한 국민의 관심도가 높아지면서 웰빙 육류중에 하나인 오리고기의 소비 및 생산량이 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 오리 소비량의 증가는 오리 사육규모의 증가, 사육농가의 대형화·밀집화로 이어졌고 이에 따라 농장의 질병발생 및 전파 위험도 또한 높아지고 있는 반면, 오리질병에 대한 예방 및 관리체계는 매우 미흡한 실정이다.

우리나라의 오리 사육농가에 주로 문제시 되는 대표적인 질병으로 오리간염과 리메렐라감염증이 있다. 2004년도 농림축산검역본부의 오리 전염성질병 발생현황 조사에 따르면 리메렐라감

염증과 오리간염이 각각 24%, 21%로 전염성 질환의 주된 원인으로 확인되었으며, 오리간염의 경우 2005년 이후 발생이 지속적으로 증가하여 현재까지 꾸준히 발생하고 있으며 리메렐라감염증 또한 오리농장 밀집 지역인 충남·충북 및 전북·전남을 중심으로 꾸준히 발생이 보고되고 있다(농림축산검역본부, 2004; 김 등, 2008; 이 등, 2008).

1) 오리간염

오리간염은 2종 법정 가축전염병으로 주로 3주령 이하의 어린 오리에서 발병하며, 잠복기가 짧고 질병 전파가 매우 빠르며 1주령 이하인 오리들의 경우 95%에 가까운 폐사를 일으키는 질병이다. 국내에서는 1985년 전남 지역에서 오리간염 1형이 처음 분리된 이후, 현재까지 지속적으로 발생되고 있으며 어린 오리의 폐사로 인해 국내 오리농가에 막대한 경제적 피해를 끼치고 있다. 오리 질병 중 가장 높은 발생건수를 나타내고 있으며 농림축산검역본부의 조사에 따르면 2000년대 초반 이후 발생이 꾸준히 증가추세를 보이고 있고 2011년도에는 66건으로 가장 많이 발생한 것으로 확인되었다(농림축산검역본부, 2014). 이 후, 2003년도에 변이주인 3형이 처음 분리되었으며, 1형과 교차방어율이 낮아 백신 접종에도 불구하고 발생이 계속되고 있는 실정임. 또한 2000년대 초, 중반 국내 오리농장에서 오리간염바이러스 47건을 분리동정하였는데 그 중 46건이 3형으로 확인되면서 새로운 혈청형에 대한 대응책의 필요성이 대두되었다(Duck's science, 2009. 5).

최근 3형은 우리나라뿐만 아니라 중국에서도 많이 발생되고 있으며 2001-2007년 28개의 오리간염 분리주중 1형이 13주, 3형이 15주로 3형의 발생비중도 높아졌음이 확인되었다. 또한 중국 광둥지방의 오리간염 발생농장에서 3형이 분리되었고, 여기에 1형의 동시감염이 확인되면서 복합감염의 사례를 보여주었다(Fu et al., Veterinary microbiology, 2008; Tseng et al., Virus Research, 2007).

2) 리메렐라감염증

리메렐라감염증은 3주령 전후로 발생하여 설사, 식욕부진, 발육저하 및 신경증상 등과 함께 10~30%의 폐사를 일으키는 세균성 질병으로, 간염에서 어린 오리의 초기 폐사와는 달리 3주령 전후부터 출하시점까지 지속적으로 영향을 끼치는 소모성 질병이며, 폐사 및 체중저하로 인해 실질적인 경제적 피해를 입히고 있다. 국내에서는 1992년 전남에서 처음 발생하여 현재까지 꾸준히 보고되고 있다. 2008년 천안, 아산 2009년 전북 고창, 2010년 전남 나주 영암 등 오리농장이 밀집해 있는 지역을 중심으로 발생하고 있으며 2009년~2011년도 본 연구진이 수행한 리메렐라 모니터링 조사 결과 총 5개도에서 33.1%(51/154건, 77농가)의 양성률을 확인하였다. 또한, 최근 전남지역에서는 2011년 34건, 2012년 16건, 2013년 6건등 지속적으로 발생해 피해를 주고 있다(김 등, 2008; 이 등, 2008; 전북대학교, 2012; 전남축산위생사업소, 2011~2013).

1932년에 미국에서 처음 발생한 이후, 현재까지 아시아, 북미, 유럽 등 전 세계적으로 보고되고 있으나, 전 세계 오리산업의 70%를 차지하는 중국, 태국, 싱가포르 등 동아시아권을 중심으로 주로 발생하고 있으며 연구 또한 활발하게 이루어지고 있다. 리메렐라감염증은 21종의 다양한 혈청형이 존재하는 것이 특징이며, 1형의 경우 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 유행하는 혈청형이며 오리농장에서 리메렐라 발생의 가장 큰 원인을 차지하는 혈청형으로 알려져 있다. 우리나라는 2000년대 중반 농림축산검역본부의 실태조사에서 1, 4, 7, 16형의 4가지 혈청형을 확인

했으며 그 중 고병원성인 1형과 7형이 대부분을 차지하는 것으로 확인되었다(농림축산검역본부, 2004~2006).

나. 문제점 및 전망

이러한 두 질병을 제어하기 위해 여러 예방책들이 마련되고 있다. 2000년 오리간염 1형 순화생백신이 개발되어 현장에 적용되고 있으나, 백신 적용에도 불구하고 발생이 계속되고 있는 실정이며, 이는 교차방어가 되지 않는 3형 발생이 증가되었기 때문으로 판단된다.

리메렐라감염증의 경우 국내 오리농장 수준에서는 아직 백신보다 항생제의 투여를 우선 선택하고 있는 상황이다. 하지만 부적절한 항생제의 사용은 내성균의 상재화 및 항생물질의 잔류문제를 초래할 수 있을 뿐만 아니라 더욱이 안전한 오리고기에 대한 소비자의 요구가 높아지면서 항생제의 사료첨가 금지 및 수의사 처방제등이 시행되고 있는 상황이며, 이로 인한 치료용 항생제의 사용량 증가, 생산성 감소 및 생산 비용 상승 등 문제점들도 제기되고 있는 실정이다. 따라서 안전한 오리고기에 대한 소비자들의 요구와 2차적인 질병발생률 저하를 동시에 충족시킬 수 있는 보다 근본적인 방법을 모색해야 한다.

항생제에 의존한 질병방제의 대안으로 국내 유행주를 이용한 불활화백신이 개발되어 시판되고 있으나, 접종비용의 부담 등으로 개체접종이 용이하지 않아 효용성이 낮은 실정이다. 따라서 군집단위로 접종이 가능한 분무, 음수 생백신의 개발이 필요하며 1일령에 접종할 수 있는 적용법을 확립함으로써 보다 효율적으로 질병을 관리할 필요성이 있다. 따라서 오리간염의 발생을 최소화하기 위해 기존의 1형뿐만 아니라 새로운 변이주인 3형도 동시 방어 가능한 혼합백신의 개발이 시급하며, 리메렐라감염증의 경우 백신의 효용성을 높이기 위한 생백신의 개발 및 적용이 필요하다. 또한, 백신의 개발뿐만 아니라 질병을 체계적으로 예방할 수 있는 백신프로그램이 마련되어야 하는데 국외 (미국, 캐나다)의 경우 오리간염 및 리메렐라감염증의 생산단계별 예방 백신프로그램을 구축하여 권장하고 있다. 국내에서도 이를 도입해 국내 실정에 맞게 수정·보완하여 종오리 및 육용오리에 적용함으로써 농가의 피해를 최소화시킬 수 있는 방안이 모색되어야 한다.

2. 국내외 연구 현황

가. 국내 연구 현황

1) 오리간염

우리나라에서는 1985년도에 1형 오리간염 바이러스가 전남 지역에서 처음 분리된 이후 지속적으로 발생이 보고되고 있다(박, 1985; Kim et al., Arch Virol, 2007). 오리간염백신 개발을 위해 국내분리주의 계태아를 통한 계대법으로 바이러스를 순화시키는데 성공하여 1형 백신주로서의 가능성을 보였고, 이 후 접종경로별 방어능, 안전성 시험, 야외농장적용 백신효능시험 등을 통해 순화생백신 개발에 성공하였다(성 and 김, 2000; 성 등, 2000). 이 후, 변이주인 3형이 분리되었고, 1형과의 교차방어율이 낮아 백신 접종에도 불구하고 지속적으로 발생이 보고됨에 따라 새로운 백신의 개발이 요구되었다. 이에 국내분리주를 계대하여 만든 3형의 순화생백신을 개발하여 안전성 및 방어효능평가 및 야외효능평가 등을 실시하여 동일 혈청형에 대한 방어효능을 확인하였다(Kim et al., Vaccine, 2009). 또한, 오리간염 순화생백신의 보관 및 운송에 문제점을 해결하기 위해 동결건조 보존제(lyophilization stabilizer)를 개발함으로써 백신의 안정성을 유지하는데 성공하였다(Kang et al., Poultry Science, 2010).

2) 리메렐라감염증

현재까지 국내 리메렐라감염증에 관한 연구는 증례 보고 및 실태조사가 주를 이루고 있으며 불활화백신 개발에 관한 연구도 진행되었다. 우리나라에서는 1993년 전남 육용오리 농장에서 처음 발생이 보고되었고, 이 후 국내 최초로 분리주를 이용한 단일 불활화백신 개발에 성공하였다(최 등, 1993; 김 등, 1993). 이 후, 국내 육용오리 농장을 대상으로 발생 실태조사를 실시하여 1형과 7형이 국내에 주로 발생하는 혈청형임을 확인하였고, 분리주에 대한 유전자 분석 및 항생제 내성 등의 특성연구를 실시하였다(농림축산검역본부, 2004~2006). 지속적인 발생보고가 이루어지고 있는 가운데, 2007년에는 국내 유행 혈청형인 1형과 7형을 혼합한 불활화백신이 개발되어 시판되고 있다(농림축산검역본부, 2004~2006; 김 등, 2008; 이 등, 2008). 꾸준한 발생에도 불구하고 리메렐라감염증에 관한 국내연구는 2008년 이후로 연구된 바가 없으며, 특히 불활화백신 개발에 관한 연구는 진행되었으나 생백신에 대한 연구는 이루어져 있지 않았다.

나. 국외 연구 현황

1) 오리간염

오리간염의 백신관련 연구는 불활화백신과 생백신의 개발뿐만 아니라 종오리의 백신프로그램 적용 등 여러 백신이 개발되고 있으며, 최근에는 DNA 재조합 백신이 개발되는 등 다양한 연구가 이루어지고 있다. 불활화백신과 순화생백신을 이용한 종오리용 백신프로그램을 시험하였고, 2-3일령에 순화생백신 접종 후 22주령에 불활화백신으로 추가접종 시 높은 중화항체가를 보이는 것을 확인하였다(Gough et al., Avian pathology, 1981).

PDEK cell을 이용한 중화항체검사법을 제시하고, 종오리에 1형 순화생백신을 18-21주령 및 22-27주령에 2회 피하접종 후 높은 항체가를 얻을 수 있음을 확인하였다(E.F. KALETA, Avian Pathology, 1988). 1형의 불활화백신과 순화생백신을 이용한 종오리용 백신프로그램을 적용하고, 야외농장실험과 실험실평가로 중화항체검사 및 후대병아리의 공격 접종 시험을 실시하였다. 순화생백신 접종 후 불활화백신 1회 추가접종만으로 우수한 항체가와 후대병아리에 대한 방어효과를 확인할 수 있다(P. R. Woolcock, Avian Pathology, 1991). DNA 재조합 백신 개발을 위해 VP1 유전자를 복제 및 삽입하여 백신주를 제작하였다. 이를 종오리에 2회 근육접종 시 ELISA, 중화항체검사서 높은 항체가를 보였고, 후대병아리에 공격 접종 시 방어에 성공하였다(Fu et al., Veterinary Microbiology, 2012).

2) 리메렐라감염증

오리산염이 발달한 중국 및 동남아시아뿐만 아니라 유럽, 미국 등을 중심으로 역학조사, 항생제 내성률, 병원성 및 면역원성 유전자 연구 및 불활화백신과 생백신의 개발 등 다양한 연구가 활발히 진행되고 있다. 불활화백신은 1979년 미국에서 혈청형 1, 2 및 5형을 혼합한 혼합백신이 개발되었고 이 후 1996년 태국에서 자국 유행주인 1형을 이용하여 6개월간 방어 가능한 불활화백신을 개발하였다. 최근에는 2013년 중국에서 유행주인 1, 2, 10형을 혼합한 불활화백신을 개발하여 70일까지 방어에 성공하였고 세포성 면역(cytokine, MHC)과 체액성 면역(humoral antibody)을 유도하는 것을 확인하였다(T Sandhu, 1979; Pornpen Pathanasophon et al., 1996; Haiwen Liu et al., 2013).

재조합백신으로는 OmpA와 P'45유전자를 이용한 subunit 백신을 제작하여 면역유도를 확인하였으나 방어에는 실패하였다. 또한, 면역 관련 유전자인 GroEL을 이용한 recombinant 백신

도 제작하였고 1, 2, 10형 혈청형에 대한 면역유도를 확인하였으나 방어에는 실패하였다(Bin Huang, et al., 2002; Xianghan Han, et al., 2011).

생백신 개발을 위한 연구도 진행되어 왔는데 1991년 미국에서 병원성이 낮은 1, 2, 5형을 이용한 3형 혼합생백신을 개발하여 각 혈청형에 대한 방어를 성공하였다. 또한, 2000년도 홍콩에서 계대배양과 UV stress로 순화생백신을 개발하여 세포성 면역과 체액성 면역유도를 확인하였다(T Sandhu, 1991; D.A. Higgins et al., 2000).

다. 국내·외 연구 현황 비교 및 필요 연구 분야

오리간염 백신으로 국외에서는 자국 유행주를 이용하여 불활화백신, 순화생백신 및 재조합백신 등 각 나라 상황에 맞는 다양한 대응책이 마련되고 있다. 국내의 경우, 1형과 3형 모두 빈번히 발생하고 있는 상황이며 각각에 대한 단일 백신은 개발되었으나 이를 동시에 방어할 수 있는 2종의 혼합백신이 필요하다.

국내 오리간염 백신으로 1형과 3형이 각각 개발되어 있으나, 2종 모두 빈번히 발생하고 있는 상황에서 이를 동시에 방어할 수 있는 예방백신이 필요함. 또한 국외의 경우 불활화백신, 순화생백신 및 재조합백신 등이 개발되어 다양한 백신관련 연구가 이루어지고 있으며, 국내에서도 새로운 변이주에 대한 대응책으로 1형 및 3형의 혼합백신이 필요하다.

현재 국내에서 판매되고 있는 오리간염의 백신은 1형 단일생백신이며, 그로 인해 발병사례는 주로 3형에 집중되어 있다. 하지만 여전히 차단방역이 원활히 실행되지 않는 오리업계의 특성상 1형의 야외 발생은 존재하며, 국내 가금 전염병 발생의 역학에서 중요한 역할을 하는 중국에서도 역시 1형의 발생과 3형의 발생이 함께 이루어지고 있다. 그리고 본 질병 특성상 아주 어린 일령에 폭발적으로 피해가 발생하기 때문에, 두 혈청형에 대한 동시적 예방이 아주 중요하므로 혼합형태의 백신개발이 요구되는 실정이다.

리메렐라감염증의 경우 국외 (미국, 캐나다)에서 자국 분리주를 이용한 불활화 백신과 생백신 뿐만 아니라 순화생백신 및 재조합 백신 등 다양한 종류의 백신 개발 및 효능평가가 시행되고 있다. 반면, 우리나라는 불활화백신 개발에 머물러 있으며 효용성이 높은 생백신의 개발이 필요하다. 특히 부화장에서 1일령 오리에 접종 가능한 분무·음수 생백신을 개발하여 실제 적용이 용이하도록 해야 할 필요성이 있다. 특히, 국외에서는 백신의 개발과 함께 종오리 및 육용오리에 적용되는 생산단계별 오리간염 및 리메렐라감염증의 예방 백신프로그램을 구축하는 등의 질병관리가 체계적인 반면, 우리나라에서는 예방시스템이 구축되어 있지 않은 실정이다. 따라서 우리나라에도 국내 분리주를 이용한 백신의 개발과 더불어 국내 실정에 맞는 예방 백신프로그램의 구축 및 적용이 필요하다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 특허, 논문, 시장(제품) 분석을 통한 국내외 기술개발 현황

1. 본 연구관련 국내외 기술수준

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 성과수준	비고
		우리나라	연구팀		
오리간염 예방백신 개발	미국, 유럽	60	100	100	종오리 면역법
오리리메펠라감염증 예방백신 개발	미국, 유럽	60	100	100	생백신 개발 및 시판중

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	e-특허나라(patentmap.or.kr), wips, kipris
검색기간	최근 15년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 국내외 기술개발 현황

개발기술명	오리간염 제어를 위한 백신개발 및 산업화		
Keyword	가금+조류(Fowls)*질병(질환, 병, diseases)*백신(예방백신, 약침, vaccine)+오리간염(duck hepatitis)		
검색건수	34		
유효특허건수	5		
핵심특허 및 관련성	특허명	오리 간염 바이러스에 대한 새로운 백신주 (Vaccine strain of duck hepatitis recently isolated in Korea)	국내 분리주를 이용한 오리바이러스성 간염 생독 백신주 및 그의 제조방법
	보유국	대한민국	대한민국
	등록연도	2010	1999
	관련성(%)	60	60
	유사점	오리간염 질병 제어를 위한 백신 개발	오리간염 질병제어를 위한 생백신 개발 및 제조방법
	차이점	오리간염 1, 3형의 제어를 위한 혼합백신 개발 연구	

핵심특허 및 관련성	특허명	오리간염 바이러스 약독화 균주와 오리간염 바이러스의 분리방법 및 그를 이용한 약독화 균주의 제조방법 (Attenuated Duck hepatitis Virus Strains, Method of Separating Duck Hepatitis Virus and Preparing Process using the same)	
	보유국	대한민국	
	등록연도	2007	
	관련성(%)	40	
	유사점	오리간염 질병 제어를 위한 백신 개발	
	차이점	위 특허는 오리간염 질병제어를 위한 백신을 개발하기 위한 중간 단계이며 본 연구는 오리간염의 1형과 3형 제어를 위한 혼합백신 개발 연구임	
개발기술명		오리리메렐라감염증 제어를 위한 백신개발 및 산업화	
Keyword		가금+조류(Fowls)*질병(질환, 병, diseases)*백신(예방백신, 약진, vaccine)+오리리메렐라(duck riemerella)	
검색건수		29	
유효특허건수		4	
핵심특허 및 관련성	특허명	리메렐라감염증 예방용 리메렐라 백신 및 이의 제조 방법 (Riemerella vaccine for preventing Riemerella infection, Vaccine using the same and method for producing the same)	오리 질병에 대한 면역항체가 함유된 난황분말의 생산방법 및 이에 따른 난황분말 (Producing Method For Yolk Powder Having A Immuneantibody Of Duck Disease and Yolk Powder Using The Same)
	보유국	대한민국	대한민국
	등록연도	2008	2011
	관련성(%)	60	30
	유사점	리메렐라감염증 예방용 리메렐라 백신 및 이의 제조방법	오리질병(오리간염, 오리리메렐라감염증, 대장균증 및 살모넬라 감염증)에 대한 면역항체를 함유하는 난황분말을 얻을 수 있으며, 이는 오리의 전염성 질병을 예방할 수 있는 효과를 가짐
차이점	본 특허는 불활성화 리메렐라균 혼합백신이며 연구 개발하고자 하는 리메렐라 생백신 개발에 대한 부분이 아님	오리리메렐라감염증 예방에 대한 생백신 개발에 대한 부분이 아님	

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	KISS(kiss.kstudy.com), NDSL(www.ndsl.kr), 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	최근 15년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 국내외 기술개발 현황

개발기술명		오리간염 제어를 위한 백신 개발 및 사업화	
Keyword		Duck virus hepatitis * vaccine	
검색건수		50	
유효특허건수		11	
핵심논문 및 관련성	논문명	Development of duck hepatitis A virus type 3 vaccine and its use to protect ducklings against infections	Isolation of Duck Hepatitis Virus and Development of its Live Attenuated Vaccine by Duck Embryo Liver Cell Culture
	학술지명	Vaccine	Laboratory animal research
	저자	Min-Chul Kim	Su-Jin Park
	게재년도	2009	2007
	관련성(%)	50	50
	유사점	오리바이러스성간염 제어를 위한 백신 개발	오리바이러스성간염 제어를 위한 생백신 개발
차이점	3형 백신 감염에 대한 백신 개발이며 본 연구는 1형 및 3형에 대한 혼합백신 개발 연구임	위 논문은 생백신 개발에 따른 연구이며 본 연구는 혼합백신에 대한 개발 연구임	
개발기술명		오리리메렐라감염증 제어를 위한 백신 개발 및 사업화	
Keyword		duck * Riemerella * vaccine	
검색건수		16	
유효특허건수		4	
핵심논문 및 관련성	논문명	Development and Evaluation of a Trivalent Riemerella anatipestifer - Inactivated Vaccine	Study on bi-geminal tetravalent inactivated vaccine of Riemerella anatipestifer and Escherichia coli
	학술지명	Clinical and Vaccine Immunology	Acta agriculturae zhejiangensis
	저자	Haiwen Liu	Ji QuanAn
	게재년도	2013	2007
	관련성(%)	70	40
	유사점	리메렐라감염증 제어를 위한 백신 개발에 대한 연구임	
차이점	본 연구는 리메렐라감염증 생백신에 대한 연구임에 반하여 위 연구논문은 불활화 백신 개발을 위한 연구임	본 연구는 리메렐라감염증에 대한 백신 연구 개발임에 반하여 위 연구논문은 리메렐라감염증 및 대장균증을 제어하는 혼합백신 연구임	

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

오리농가에서 사용되는 백신은 녹십자 수의약품의 오리간염백신과 중앙백신연구소의 포울샷 리메렐라의 두 종류가 판매되고 있다. 오리간염백신은 2008년 1700만원, 2009년 1500만원, 2010년 4500만원, 2011년 2900만원이 판매되고 있으며, 포울샷 리메렐라는 2012년 발매되어 2013년까지 3800만원 정도의 판매량을 보이고 있다. 현재 생산 및 판매되고 있는 녹십자 수의약품의 오리간염백신은 1형 혈청형 단독으로 제조된 것으로, 현재 주로 발생하고 있는 3형 오리간염에 대한 방어력이 부족하고, 생동결백신으로 사용 및 관리가 어려워 백신의 사용이 아직 익숙하지 않은 오리농가에서 많은 불편함을 호소하고 있다. 포울샷 리메렐라 역시 기존에 백신을 거의 사용하지 않던 오리업계에서 접종법에 대한 노하우 부족 등으로 인하여 아직 시장에서 활발히 쓰이지 못하고 있다.

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

오리간염에 대한 백신은 1형 혈청형에 대한 백신이 생독 및 불활화백신으로 사용되고 있으며, 리메렐라 역시 생독백신과 불활화백신을 이용한 프로그램을 권장하여 사용하고 있다.

5. 연구결과가 국내외 기술개발에 차지하는 위치 분석

가. 특허 분석

오리간염 백신의 기존 특허는 오리간염 바이러스 분리 방법이나 그를 이용한 약독화 균주 제조방법 또는 오리간염바이러스 1형 및 3형에 대한 각각의 진단방법 및 백신주에 대한 특허만이 진행되어 있는 상황이다. 그러나 오리간염의 경우 1형과 3형에 대한 교차방어율이 낮은 것을 고려하여 본 연구과제에서는 오리간염 백신에 대한 1형과 3형을 동시에 제어할 수 있는 연구를 추진하였고, 그 결과 “오리 간염 A 바이러스 1형과 3형의 생혼합 건조백신”에 대한 특허를 출원하였다.

오리리메렐라감염증 대한 국내 기존 특허는 리메렐라감염증 예방에 대한 불활화백신에 대한 제조방법만이 유일하다. 이에 본 연구과제에서는 오리 간염 A 바이러스 1형과 3형의 생혼합 건조백신(대한민국, 10-2016-0005910)과 오리리메렐라감염증 예방용 백신 조성물(대한민국, 10-2017-0096381)에 대하여 특허를 출원하였다.

나. 논문 분석

기존 논문은 오리간염 및 오리리메렐라 질병에 대한 감염균에 대한 신속검사와 분자 진단 기술 부분 등에 대한 기초연구는 활발하게 진행되고 있으나, 백신개발을 위한 응용개발연구는 상대적으로 미비한 실정이다. 따라서 본 연구팀에서는 연구를 통하여 국내 오리리메렐라의 발생상황을 조사하고, 야외주의 병원성을 평가하였으며 이를 토대로 오리리메렐라 1형 및 2형에 대한 2종 혼합 생백신을 개발하였다. 오리간염은 국내에 유행하는 오리간염 1형과 3형을 동시에 방어하는 혼합생백신을 개발하여 평가하였고, 동결건조공법을 확립하였다. 또한 종오리 백신프로그램의 농장적용으로 모체이행항체에 의한 후대병아리의 방어효능과 항체수준을 확인하였다.

다. 제품 및 시장 분석

국내 시장을 분석한 결과, 오리간염에 대한 백신은 녹십자 수의약품의 오리간염백신이 국내에서 유일하게 허가받은 오리간염 백신이다. 이 백신은 2008년 1700만원, 2009년 1500만원, 2010년 4500만원, 2011년 2900만원이 판매되어, 판매량의 변동 폭은 크지만 시장의 상황을 고려하였을 때 그 수치는 미미한 편이다. 현재 생산 및 판매되고 있는 녹십자 수의약품의 오리간염백신은 1형 혈청형 단독으로 제조된 것으로, 현재 주로 발생하고 있는 3형 오리간염에 대한 방어력이 부족하므로, 1형과 3형을 동시에 방어할 수 있는 백신을 개발하여 판매할 계획이다.

국내 오리간염의 발생건수(발생수수)는 2008년 17건(49,315수), 2009년 39건(203,895수), 2010년 49건(123,637수), 2011년 66건(111,784수), 2012년 45건(122,135수)으로 지속적인 증가를 보이고 있다. 오리 사육농가 또한 우측의 그래프와 같이 지속적인 증가추세를 보이고 있으며, 특히 1만수 이상을 사육하는 농가의 증가폭이 커, 백신에 대한 요구는 충분하다고 생각된다.

오리리메렐라감염증을 일으키는 리메렐라 백신은 국내에 중앙백신연구소의 포울샷 리메렐라가 유일한 불활화 백신이다.

제 3 장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 오리리메렐라감염증 생백신 개발

1. 리메렐라 생백신 후보주 선정

가. 국내 발생상황 분석 및 야외균주 확보

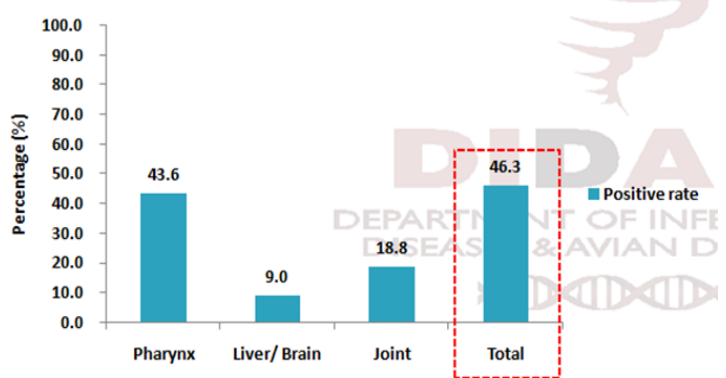
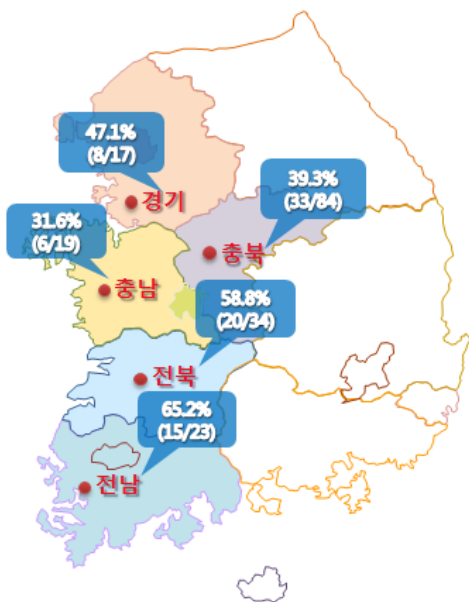
1) 육용오리 및 종오리농장 리메렐라 모니터링

가) 모니터링 계획

- (1) 시기 : 2010~2015년(병성감정 의뢰 및 모니터링)
- (2) 대상 : 육용 및 종오리 농장 177건
- (3) 지역 : 경기, 충북, 충남, 전북 및 전남 주요 5개도
- (4) 검사장기 : 간, 뇌, 인후두, 관절 등

나) 결과

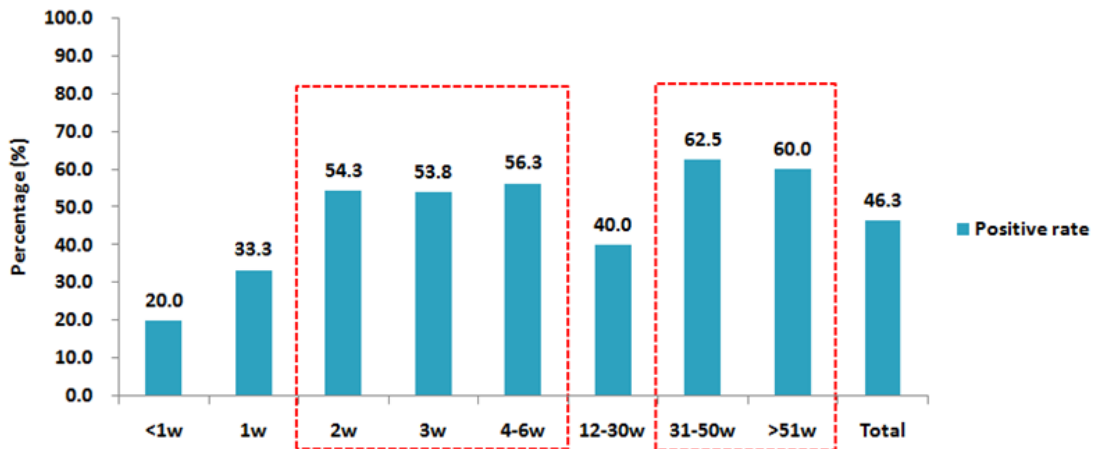
주요 5개도에서 리메렐라 모니터링을 실시한 결과 전체적으로 46.3%(82/177)의 양성률을 보였다. 지역별로는 전남 65.2%(15/23), 전북 58.8%(20/34), 경기 47.1%(8/17), 충북 39.3%(33/84), 충남 31.6%(6/19) 순으로 오리사육이 많은 전남에서 높은 양성률을 보였다. 검사장기별로 인후두 43.6%(68/156), 간 및 뇌 9.0%(16/177), 관절에서 18.8%(3/16)의 양성률을 보였다. 이 중 약 30%는 오리의 간, 뇌, 및 관절에서 분리되어 병원성주 일 것으로 파악되며 고병원성 유행주 파악을 위해 병원성 및 혈청형 분석이 필요하다.



	Pharynx	Liver/ Brain	Joint	Total (%) ^a
No. of examined farms	156	177	16	177
No. of positive farms	68	16	3	82
Positive rate (%)	43.6	9.0	18.8	46.3

a. Farms were considered one positive case if RA was isolated at least among pharynx, liver, brain, or joint.

국내 종오리 및 육용오리농가 리메렐라 지역별 분포현황



	<1w	1w	2w	3w	4-6w	12-30w	31-50w	>51w	Total (%)
No. of examined farms	20	36	35	26	32	10	8	10	177
No. of positive farms	4	12	19	14	18	4	5	6	82
Positive rate (%)	20.0	33.3	54.3	53.8	56.3	40.0	62.5	60.0	46.3

국내 종오리 및 육용오리농가 리메렐라 주령별 분포현황

2) 리메렐라균 야외분리주 확보

2014~2015년도에 조사한 리메렐라 모니터링 결과와 2002~2013년도의 병성감정의뢰건을 통하여 82건의 리메렐라 양성농장에서 총 135주를 확보하였다. 총 135주에 대해 혈청형 동정을 실시하여 리메렐라 유행주를 파악하였다.

나. 리메렐라 생백신 후보주 선발

1) 야외균주 특성분석 및 안전성평가

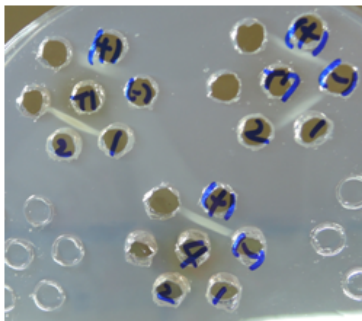
가) 분리주 혈청형 동정

(1) 실험방법

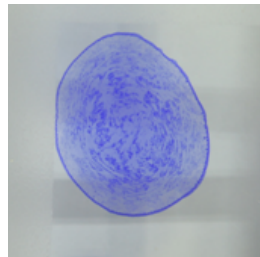
현재까지 알려진 21종의 리메렐라 표준균주 중 16종에 대한 혈청형을 동정하였다. 표준균주는 농림축산검역본부로부터 분양받아 항혈청을 제작하거나 시판하는 항혈청(Biovac)을 이용하였다. 검사방법은 한천겔침강반응(Agar gel precipitin) 및 평판응집반응(Plate agglutination, PA)을 이용하였다.

[리메렐라 혈청형 동정을 위한 표준주 및 방법]

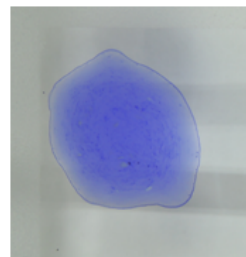
No.	Serotype	Source	Strain	방법
1	S1	검역본부	RAT1	Agar gel precipitin (AGP)
2	S2	야외주	D10-기타-001	
3	S3	검역본부	D-26338	
4	S4	검역본부	H-2565	
5	S5	검역본부	D-24123	
6	S6	검역본부	P-2123	
7	S7	검역본부	RAT7	
8	S11	야외주	D02-기타-001	
9	S13	야외주	D14-RDA-8-15	
10	S14	검역본부	D-664	
11	S17	검역본부	K-1499	
12	S18	검역본부	540/86	
13	S19	검역본부	30/90	
14	S21	검역본부	1062/91	
15	S12	Biovac	<i>Riemerella anatipestifer</i> 10	Slide agglutination (SA)
16	S16	Biovac	<i>Riemerella anatipestifer</i> 10	



리메렐라 한천겔침강반응



양성



음성

리메렐라 평판응집반응

(2) 실험결과

리메렐라 야외분리주 135주에 대해 혈청형동정을 실시하였다. 1형 15.6%(21/135), 11형 11.9%(16/135), 2형 8.9%(12/135), 6형 5.2%(7/135), 5형 0.7%(1/135) 및 7형 0.7%(1/135) 순으로 분포하고 있음을 확인하였다. 1, 2, 5, 6, 7, 및 11형 등 중국, 동남아시아, 북미 및 유럽에서도 병원성이 높은 혈청형에 대해서만 분포율을 분석하였을 때, 1형 36.2%(21/58), 2형 20.7%(12/58), 및 11형 27.6%(16/58)이 높은 비율을 차지하였다. 따라서 중병원성이 11형을 제외하고 고병원성 유행혈청형인 1형과 2형에 대한 백신개발이 필요한 상황이다.

[국내 리메텔라 야외주 혈청형 분포]

Serotype ^{a, b}	No. of isolates	Percentage (%)	Virulence ^c
1	21	15.6	V
2	12	8.9	V
2, 17	2	1.5	AV
2, 4, 17, 18, 21	2	1.5	AV
4, 21	4	3.0	AV
4, 13, 14	3	2.2	AV
4, 13, 21	6	4.4	AV
4, 17, 18, 21	12	8.9	AV
5	1	0.7	V
6	7	5.2	MV
7	1	0.7	V
11	16	11.9	MV
11, 17, 18	1	0.7	AV
13	10	7.4	AV
13, 14	1	0.7	AV
13, 18, 21	1	0.7	AV
14	4	3.0	AV
17	1	0.7	AV
19	5	3.7	AV
Non-typable	25	18.5	AV
Total	135	100.0	AV

- a. 총 16종(1-7, 11-14, 16-19, 21형)의 혈청형에 대해 분석함
 b. 국내에 총 19종(단일 10종, 복합 9종)의 혈청형이 확인됨
 c. V, Virulent; MV, Moderate virulent; AV, Avirulent

[국내 병원성 리메텔라 야외주 혈청형 분포]

Serotype	No. of isolates	Prevalence (%)	China	Thailand& Taiwan	USA& Canada	UK& Denmark	Virulence
1	21	36.2	○	○	○	○	V
2	12	20.7	○	○	○	○	V
5	1	1.7	○	○	○	○	V
6	7	12.1	○	○	○	○	MV
7	1	1.7	○	○	○	○	V
11	16	27.6	○	○	-	-	MV
Total	58	100.0					

나) 병원성 평가를 위한 *In-vitro* 스크리닝

(1) 실험방법

국내 리메렐라 야외주의 혈청형별 병원성을 판별하기 위해 총 135주에 대해 계태아 병원성 판별법인 chicken embryo lethality assay (ELA)를 실시하였다. 생백신 후보주 선발을 위해 1형(21주) 및 2형(12주) 33주에 대해 ELA 실시하여 비(저)병원성주를 선별하였다.



계태아 이용 비(약)병원성주 선발과정(embryo lethality assay; ELA)

(2) 실험결과

혈청형별 병원성을 평가한 결과, 1, 2, 5, 6, 7, 11형이 병원성이 높았으며 그 외 13, 14, 17, 18, 19, 21형은 병원성이 없었다. 따라서 병원성이 높으며 국내 분포율이 가장 높은 1형과 2형 예방을 위한 백신개발을 수행하였다.

No	Isolates	Serotype	ELA (%)	Duck mortality	virulence
1	RAT1	1	60	5/5 (100%)	V
2	2010-기타-1	2	100	5/5 (100%)	V
3	D12-MR-10	5	100	Not done	V
4	D13-KW-2	6	50	3/5 (60%)	MV
5	D13-기타-1	7	53.3	3/5 (60%)	MV
6	2002-기타-1	11	50	Not done	MV
7	D14-JW-8-15	13	20	Not done	AV
8	D14-JW-33-29	14	20	Not done	AV
9	D14-RDA-9-32	17	20	Not done	AV
10	D14-JW-57-1	19	20	Not done	AV

1형과 2형 백신 후보주를 선별하기 위해 33주(1형: 21주, 2형: 12주)에 대해 *In-vitro* 병원성 스크리닝 결과, 1형의 경우 9주, 2형은 4주가 비(저)병원성으로 확인되었다. 1형 및 2형 비(저)병원성주에서 면역원성이 높은 주를 선별하기 위해 면역원성을 간접 평가할 수 있는 serum에 대한 저항성을 평가한 후 목적동물에서 방어효능 예비시험을 실시하였다.

다) 백신 후보주 목적동물 대상 안전성 및 방어효능 예비시험

(1) 실험방법

In-vitro 병원성 스크리닝을 통해 확보된 비(저)병원성주에 대해 방어효능 예비시험을 실시하였다. 백신후보주의 안전성을 동시에 평가하기 위해 1×10^9 으로 음수백신을 실시하고 고병원성주를 공격접종하여 폐사율을 관찰하였다.

[방어효능 예비시험 계획]

G	Vaccination						Challenge				평가항목 ^a
	Isolate	Serotype	Age (d)	No. of ducks	Dose (CFU)	Route	Isolate	Age(d)	Dose (CFU)	Route	
1	Non-vaccinated	D.W	1/7	5~8	-	Oral	1	21	1×10^7	IM	폐사율 임상증상 부검소견 PI(protective index)
2	백신 후보주	1			1×10^9	Oral					
3	Non-vaccinated	D.W			-	Oral	2		1×10^5		
4	백신 후보주	2			1×10^9	Oral					

a. Protective index (PI) = $\frac{(\% \text{ mortality in non-vaccinates} - \% \text{ mortality in vaccinates})}{\% \text{ mortality in non-vaccinates}} \times 100$

(2) 실험결과

방어효능 결과 1형의 경우 음수백신 시 50%의 방어능을 보이는 균주 1종을 확보함. 2형의 경우 100%의 방어효능을 보이는 균주 1종을 확보하였다. 1형과 2형 2종의 백신후보주는 1×10^9 /dose로 2회 음수백신을 했음에도 불구하고 2차 백신 후 14일 동안 임상증상 및 폐사를 나타내지 않았다

[1차 방어효능평가 결과]

- 1형 후보주 선발

No	Strain	ELA ^a	SR	LD ₅₀ (Duck) ^b	Vaccine		Challenge (Mortality)		Protective Index (PI)
					route	CFU/dose	(+) Control	Vaccinated	
1	D13-기타-2	60	0.04	1×10^6	-	-	-	-	-
2	D14-5	60	0	1×10^4	-	-	-	-	-
3	D15-RDA-92	20	2.54	$>1 \times 10^{10}$	oral	1×10^9	8/8 (100)	4/8 (50)	50.0
4	D14-1	20	3.58	$>1 \times 10^{10}$	oral	1×10^9	3/7 (42.8)	0/7 (0)	42.8
5	D15-MR-74-1	10	3.47	$>1 \times 10^{10}$	oral	1×10^9	8/8 (100)	5/8 (62.5)	38.5
6	D12-WB-5	20	2.53	$>1 \times 10^{10}$	oral	1×10^9	4/5 (80)	3/5 (60)	20.0
7	D15-JD-71	20	7.25	$>1 \times 10^{10}$	oral	1×10^9	8/8 (100)	7/8 (87.5)	12.5
8	D15-CFR-17	20	5.17	$>1 \times 10^{10}$	oral	1×10^9	5/6 (83)	7/8 (88)	0
9	D15-MR-94-1	10	6.84	Not done	oral	1×10^9	8/8 (100)	8/8 (100)	0
10	D14-2	20	3.69	Not done	oral	1×10^9	3/7 (42.8)	3/7 (42.8)	0
11	D14-4	20	4.21	Not done	oral	1×10^9	3/7 (42.8)	4/7 (57.1)	0

a. Virulent: >50 , Moderate virulent: $30 \sim 50$, Avirulent: <30

b. Four ducks were inoculated intramuscularly at 3-week-old

- 2형 후보주 선발

No	Strain	ELA ^a	SR	LD ₅₀ (Duck) ^b	Vaccine		Challenge(Mortality)		PI
					route	CFU/dose	(+) Control	Vaccinated	
1	D13-JW-2	60	0.18	1×10 ⁶	-	-	-	-	-
2	D03-기타-1	80	0.16	1×10 ⁴	-	-	-	-	-
3	D10-기타-1	80	0.07	1×10 ⁴	-	-	-	-	-
4	D14-RDA-8	50	0.05	>1×10 ¹⁰	oral	1×10 ⁹	8/8 (100)	0/8 (0)	100
5	D11-WB-226	20	2.45	>1×10 ¹⁰	-	-	-	-	-
6	D11-WB-237-cl	20	8.06	>1×10 ¹⁰	-	-	-	-	-
7	D11-WB-253-cl	10	7.63	>1×10 ¹⁰	-	-	-	-	-

a. Virulent: >50, Moderate virulent: 30~50, Avirulent: <30

b. Four ducks were inoculated intramuscularly at 3-week-old

2) 백신 후보주 목적동물(오리) 대상 방어효능평가 평가

가) 오리에서의 방어효능 평가

방어효능 예비실험을 통해 선발된 1형 및 2형 백신후보주 2종에 대해 접종경로별 방어효능 및 최소유효농도, 교차방어 등 면밀한 방어효능을 평가하기 위해 방어효능 평가체계를 구축하였다.

(1) 오리에서의 방어효능 평가체계 구축

백신 후보주에 대한 방어효능을 평가하기 위해 백신일령, 공격균주 함량선정 등의 평가체계를 구축하였다.

(가) 혈청형별 공격균주 함량 시험

공격균주 함량을 선정하기 위해 3~4주령의 오리에 희석배수별로 근육접종하여 폐사율을 관찰하였다. 공시균주는 1형의 경우 농림축산검역본부에서 분양받아 사용하였으며 2형의 경우 고병원성 야외주를 이용하여 평가하였다.

[1형 공격균주 LD₅₀ 시험(1차)]

G	Isolates	Age (d)	No. of ducks	Route	Dose (DFU)	Mortality (%) ^a
1	RA type 1	21	4	IM	1×10 ⁷	8/8 (100)
2					1×10 ⁶	7/8 (87.5)
3					1×10 ⁵	6/8 (75)
4					1×10 ⁴	3/8 (36.1)

a. No. of death/inoculation

[1형 공격균주 LD₅₀ 시험(2차)]

G	Isolates	Age(d)	No. of ducks	Route	Dose(DFU)	Mortality(%) ^a
1	RA type 1	21	4	IM	1×10 ⁶	10/12 (83.3)
2					1×10 ⁵	6/8 (75)
3					1×10 ⁴	3/8 (36.1)
4					1×10 ³	4/8 (50)

a. No. of death/inoculation

[2형 공격균주 LD₅₀ 시험(1차)]

G	Isolates	Age (d)	No. of ducks	Route	Dose (DFU)	Mortality (%) ^a
1	RA type 2	28	6	IM	1×10 ⁹	4/4 (100)
2					1×10 ⁷	5/6 (83.3)
3					1×10 ⁵	6/6 (100)
4					1×10 ³	3/6 (50)

a. No. of death/inoculation

[2형 공격균주 LD₅₀ 시험(2차)]

G	Isolates	Age (d)	No. of ducks	Route	Dose (DFU)	Mortality (%) ^a
1	RA type 2	28	6	IM	1×10 ⁷	10/10 (100)
2					1×10 ⁶	10/10 (100)
3					1×10 ⁵	9/10 (90)

a. No. of death/inoculation

[2형 공격균주 LD₅₀ 시험(3차)]

G	Isolates	Age (d)	No. of ducks	Route	Dose (DFU)	Mortality (%) ^a
1	RA type 2	28	6	IM	1×10 ⁷	10/10 (100)
2					1×10 ⁶	10/10 (100)
3					1×10 ⁵	10/10 (100)

a. No. of death/inoculation

혈청형별 공격균주 함량선정 시험결과 1형(RA type 1) 및 2형(RA type 2) 모두 80~100% 폐사율을 유발하는 농도(1형 : 1×10⁷CFU/dose; 2형 : 1×10⁵CFU/dose)를 선정하였다. 추후 폐사율과 면역기간을 고려하여 1형에 대한 공격접종 모델을 28일령, 1×10⁶CFU/dose로 수정하였다.

(2) 접종경로별 방어효능평가

(가) 실험방법

G	Vaccination						Challenge				평가항목 ^a
	Isolate	ST	Age (d)	No. of ducks	Dose (CFU)	Route	ST	Age (d)	Dose (CFU)	Route	
1	Non-vaccinated	D.W	2/8	7	-	-	1	28	1×10 ⁵	IM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 폐사율 ▪ 임상증상 ▪ 부검소견 ▪ PI (protective index)
2	D14-RDA-92	1	2/8	7	1×10 ⁸	Aerosol					
3					1×10 ⁸	Oral					
4	Non-vaccinated	D.W	2/8	7	-	-	2	28	1×10 ⁵	IM	
7	D14-RDA-8	2	2/8	7	1×10 ⁷	Aerosol					
8					1×10 ⁷	Oral					

a. Protective index (PI) = $\frac{(\% \text{ mortality in non-vaccinates} - \% \text{ mortality in vaccinates})}{\% \text{ mortality in non-vaccinates}} \times 100$

(나) 실험결과

[1형 접종경로별 방어효능평가 결과]

Group	CFU	Age (days)	Route	Mortality (%)	PI	Pericarditis	Perihepatitis
Non-vaccinated	DW	2/8	-	5/7 (71.4)	-	0/2	0/2
D15-RDA-92	10 ⁸		Aerosol	3/7 (42.8)	40.0	1/4	0/4
D15-RDA-92	10 ⁸		Oral	2/7 (28.5)	60.0	2/5	0/5

[2형 접종경로별 방어효능평가 결과]

Group	CFU	Age (days)	Route	Mortality (%)	PI	Pericarditis	Perihepatitis
Non-vaccinated	DW	2/8	-	7/7 (100)	-	-	-
D14-RDA-8	10 ⁷		Aerosol	4/7 (57.1)	42.8	0/3	0/3
D14-RDA-8	10 ⁷		Oral	7/7 (0)	100	1/7	0/7

접종경로별 방어효능 평가 결과 1형과 2형 모두 음수접종에서 보다 높은 방어효능을 보였다.

(3) 최소유효농도 시험

(가) 실험방법

G	Vaccination						Challenge				평가항목 ^a
	Isolate	ST	Age (d)	No. of ducks	Dose (CFU)	Route	ST	Age(d)	Dose (CFU)	Route	
1	Non-vaccinated	D.W	2/8	7	-	-	1	28	1×10 ⁵	IM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 폐사율 ▪ 임상증상 ▪ 부검소견 ▪ PI (protective index)
2	D15-RDA-92	1	2/8	7	1×10 ⁷	Oral					
3	D15-RDA-92				1×10 ⁸						
4	Non-vaccinated	D.W	2/8	7	-	-	2	28	1×10 ⁵	IM	
5	D14-RDA-8	2	2/8	7	1×10 ⁵	Aerosol /Oral					
6					1×10 ⁶						
7					1×10 ⁷						
8					1×10 ⁸						
9					1×10 ⁹						

a. Protective index (PI) = $\frac{(\% \text{ mortality in non-vaccinates} - \% \text{ mortality in vaccinates})}{\% \text{ mortality in non-vaccinates}} \times 100$

(나) 실험결과

[1형 최소유효농도 시험결과]

Group	CFU	Age (days)	Route	Mortality (%)	PI	Pericarditis	Perihepatitis
Non-vaccinated	DW	2/8	-	5/7 (71.4)	-	0/2	0/2
D15-RDA-92	10 ⁷		Oral	4/7 (57.1)	19.9	0/3	0/3
D15-RDA-92	10 ⁸		Oral	2/7 (28.5)	60.0	2/5	0/5

[2형 최소유효농도 시험결과]

Group	CFU	Age (days)	Route	Mortality (%)	PI	Pericarditis	Perihepatitis
Non-vaccinated	DW	2/8	-	7/7 (100)	-	-	-
D14-RDA-8	1×10 ⁶		Aerosol	4/7	42.8	0/3	0/3
D14-RDA-8	1×10 ⁷			5/7	28.5	0/3	0/3
D14-RDA-8	1×10 ⁸			0/7	100	0/7	0/7
D14-RDA-8	1×10 ⁹			0/7	100	0/7	0/7
D14-RDA-8	1×10 ⁵			Oral	9/12 (75)	18.1	1/3
D14-RDA-8	1×10 ⁶		5/12 (41.6)		54.6	1/7	1/7
D14-RDA-8	1×10 ⁷		0/12 (0)		100	1/12	0/12
D14-RDA-8	1×10 ⁸		0/7 (0)		100	0/7	0/7
D14-RDA-8	1×10 ⁹		0/7 (0)		100	2/7	2/7

최소유효농도 시험결과 1형은 1×10⁸에서 60.0%의 방어효능을 보였다. 2형의 경우 1×10⁷까지 100% 방어효능을 보였어 각각의 농도를 단일백신의 최소유효농도(1dose)로 설정하였다.

(4) 교차방어능 평가

면역원성이 좋은 2형 백신후보주에 대해 1형을 공격집중하여 교차방어효능을 평가하였다.

(가) 실험방법

G	Vaccination						Challenge				평가항목 ^a
	Isolate	ST	Age (d)	No. of ducks	Dose (CFU)	Route	ST	Age (d)	Dose (CFU)	Route	
1	Non-vaccinated	D.W	2/8	12	-	-	2	28	1×10 ⁵	IM	<ul style="list-style-type: none"> 폐사율 임상증상 부검소견 PI (protective index)
2	Non-vaccinated	D.W	2/8	12	-	-	1	28	1×10 ⁶	IM	
3	D14-RDA-8	2	2/8	12	1 x 10 ⁷	Oral	2	28	1×10 ⁵	IM	
4	D14-RDA-8	2	2/8	9	1 x 10 ⁷	Oral	1	28	1×10 ⁶	IM	

a. Protective index (PI) = $\frac{(\% \text{ mortality in non-vaccinates} - \% \text{ mortality in vaccinates})}{\% \text{ mortality in non-vaccinates}} \times 100$

(나) 실험결과

Group	CFU	Route	Challenge	Mortality (%)	PI	Pericarditis	Perihepatitis
Non-vaccinated	DW	Oral	S1	12/12 (100)	-	-	-
D14-RDA-8	10 ⁷			5/9 (55.6)	44.4	3/4	3/4
Non-vaccinated	DW		S2	11/12 (91.6)	-	1/1	1/1
D14-RDA-8	10 ⁷			0/12 (0)	100	2/12	0/12

D14-RDA-8을 1×10⁷으로 백신한 후 1형과 2형을 각각 challenge 한 결과 2형에 대해서는 100%, 1형에 대해서 44.4%의 방어효능을 보여 부분적인 교차방어능을 확인하였다.

3) 백신 후보주 목적동물 대상 안전성평가

가) 목적동물(오리)에서의 안전성평가

(1) 목적동물(오리)에서의 안전성 평가체계 구축

백신 후보주에 대한 안전성을 평가하기 위해 평가기준을 마련하였다.

(가) 실험방법

2종(1, 2형)의 후보주에 대해 음수로 2일령의 오리에 백신을 실시하고 8일령에 booster를 실시하였다. 백신 후 14일간 폐사율, 임상증상을 매일 관찰하고 14일째에 부검을 실시하여 병변(간, 심장의 포막형성, 뇌막염, 비장의 비대 등)을 관찰하고 조직학적 병변을 관찰하였다.

G	Vaccination						평가항목
	Isolate	Serotype	Age (d)	No. of ducks	Dose (CFU)	Route	
1	Non-vaccinated	D.W	2/8	10	-	-	<ul style="list-style-type: none"> 폐사율 임상증상 육안병변 조직병변
2	D15-RDA-92	1			1(1 x 10 ⁸)	Oral	
3	D15-RDA-92				10(1 x 10 ⁹)		
4	D14-RDA-8				1(1 x 10 ⁷)		
5	D14-RDA-8	2			10(1 x 10 ⁸)		
6	D14-RDA-8				100(1 x 10 ⁹)		

(2) 목적동물(오리)에서의 안전성평가 결과

(가) 1형 안전성평가 결과

	CFU (dose)	Clinical signs	Mortality	Body weight (g, 4w)
Non-vaccinated	D.W	0/10	0/10	1967.9±128.9
D15-RDA-92	1 (1×10 ⁸)	0/10	0/10	2015.7±60.9
D15-RDA-92	10 (1×10 ⁹)	0/10	0/10	1976.6±183.2

	CFU (dose)	Gross lesions ^a		Microscopic lesions ^b				
		Heart	Liver	Brain	Heart	Liver	Spleen	BF ^c
Non-vaccinated	D.W	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
D15-RDA-92	1 (1×10 ⁸)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
D15-RDA-92	10 (1×10 ⁹)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

a. Gross lesions; pericarditis, perihepatitis

b. Microscopic lesions; meningitis, pericarditis, perihepatitis, depletion of lymphocyte

c. BF; Bursa of Fabricius

(나) 2형 안전성평가 결과

	CFU (dose)	Clinical signs	Mortality	Body weight (g, 3w)
Non-vaccinated	D.W	0/10	0/10	1449.0±99.6
D14-RDA-8	1 (1×10 ⁷)	0/10	0/10	1489.5±118.1
D14-RDA-8	10 (1×10 ⁸)	0/10	0/10	1459.5±113.6
D14-RDA-8	100 (1×10 ⁹)	0/10	0/10	1515.3±90.6

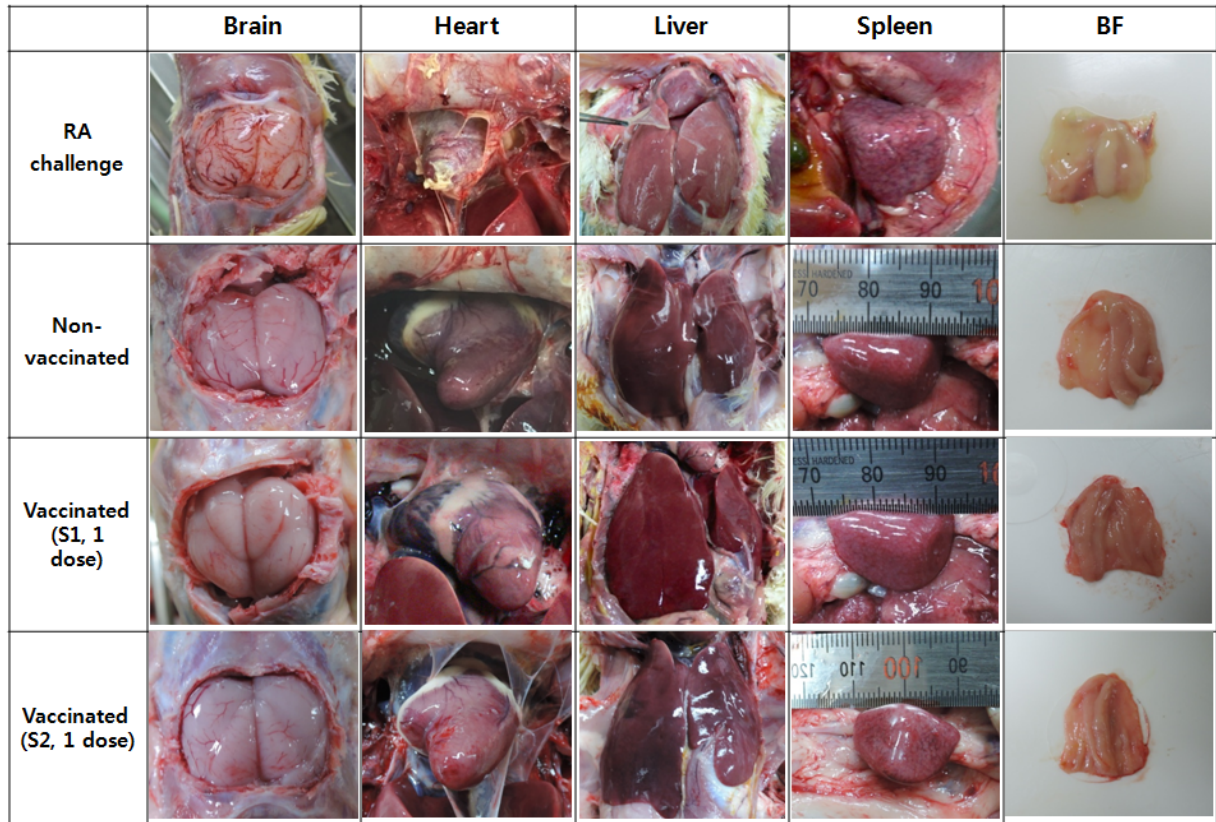
	CFU (dose)	Gross lesions ^a		Microscopic lesions ^b				
		Heart	Liver	Brain	Heart	Liver	Spleen	BF ^c
Non-vaccinated	D.W	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
D14-RDA-8	1 (1×10 ⁷)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
D14-RDA-8	10 (1×10 ⁸)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
D14-RDA-8	100 (1×10 ⁹)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

a. Gross lesions; pericarditis, perihepatitis

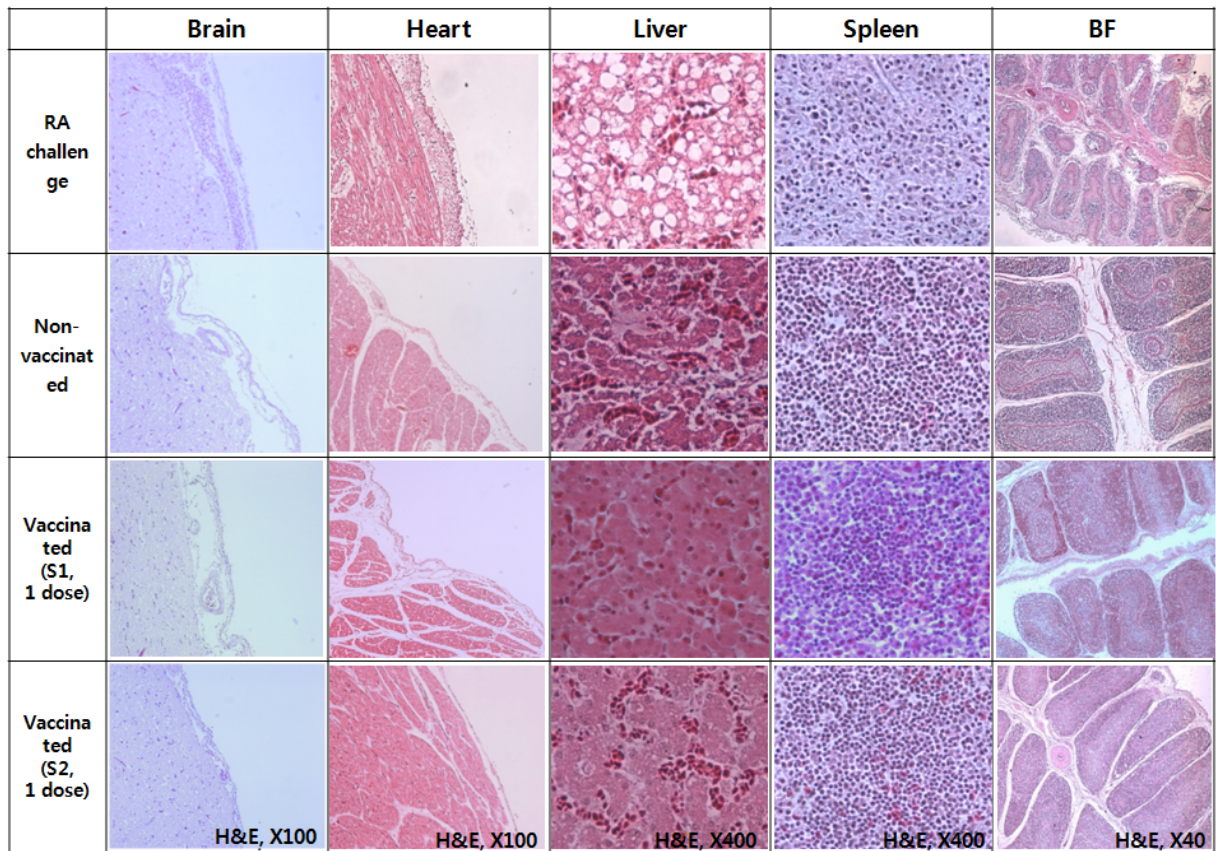
b. Microscopic lesions; meningitis, pericarditis, perihepatitis, depletion of lymphocyte

c. BF; Bursa of Fabricius

1형 및 2형 백신후보주를 2, 8일령 1, 10 및 100 dose로 음수백신하고 14일동안 관찰한 결과 1형 및 2형에서 임상증상과 폐사가 관찰되지 않았다. 1형 및 2형 백신 후 체중측정결과 백신을 하지 않은 그룹과 유의적인 차이가 없었다. 2회 백신을 접종한후 14일 후에 부검하여 육안병변과 조직병변을 확인한 결과 1형과 2형 모두 육안병변 및 조직병변이 확인되지 않았다.



1형 및 2형 안전성 평가 육안병변



1형 및 2형 안전성 평가 조직병변

2. 리메렐라 생백신 시제품 효능평가 및 예방 프로그램 구축

가. 리메렐라 생백신 시제품 효능평가

1) 시제품 목적동물 대상 방어효능평가

1형 및 2형 혼합생백신의 시제품 제작을 위해 백신의 혼합비율별 방어효능을 평가하였다. 2종 백신 후보주의 1 dose(S1 : 1×10^8 , S2 : 1×10^7) 를 기준으로 1:1, 1:5, 5:1, 5:5 비율로 혼합하여 각 그룹에 백신을 실시하고 공격접종하여 혼합백신의 방어효능을 비교하였다.

가) 혼합생백신 비율선정 시험

(1) 실험방법

G	Strain ^a (CFU/dose)		Vaccine			Challenge				
			Age (days)	No	Route	Sero type	Age (days)	CFU /dose	Route	평가항목 ^b
1	Non-vaccinated		2/8	12	Oral (1mL)	S1	29	1×10^6	IM (1ml)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 폐사율 ▪ 임상증상 ▪ 부검소견 ▪ PI (protective index)
2	S1 (1×10^8)									
3	S1 (1×10^8)	S2 (1×10^7)								
4		S2 (5×10^7)								
5	S1 (5×10^8)	S2 (1×10^7)								
6		S2 (5×10^7)								
7	DW									
8	S2 (1×10^7)									
9	S1 (1×10^8)	S2 (1×10^7)				S2	29	1×10^5	IM (1ml)	
10		S2 (5×10^7)								
11	S1 (5×10^8)	S2 (1×10^7)								
12		S2 (5×10^7)								

a. S1 (D15-RDA-92), S2 (D14-RDA-8)

b. PI (protective index)

$$\text{Protective index (PI)} = \frac{(\% \text{ mortality in non-vaccinates} - \% \text{ mortality in vaccinates})}{\% \text{ mortality in non-vaccinates}} \times 100$$

(2) 실험결과

G	Vaccine	Challenge	Mortality (%)	PI (%)	Clinical signs	Pericarditis	Perihepatitis
1	Non-vaccinated	S1	10/12 (83.3)	-	1/2	2/2	0/2
2	S1 (1)		6/12 (50.0)	40.0	0/6	1/6	1/6
3	S1+S2 (1+1)		4/12 (33.3)	60.0	0/8	1/8	1/8
4	S1+S2 (1+5)		3/12 (25.0)	70.0	1/9	3/9	1/9
5	S1+S2 (5+1)		3/12 (25.0)	70.0	1/9	4/9	1/9
6	S1+S2 (5+5)		4/12 (33.3)	60.0	0/8	1/8	1/8
7	Non-vaccinated	S2	12/12 (100)	-	-	-	-
8	S2 (1)		0/12 (0)	100	0/12	0/12	0/12
9	S1+S2 (1+1)		1/12 (8.3)	91.7	0/11	0/11	0/11
10	S1+S2 (1+5)		0/12 (0)	100	0/12	2/12	1/12
11	S1+S2 (5+1)		0/12 (0)	100	0/12	1/12	0/12
12	S1+S2 (5+5)		2/12 (16.6)	83.4	0/10	1/10	0/10

혼합비율 시험결과 1형은 단독이 40%의 방어율인 보인 반면 혼합한 4 그룹 모두에서 60~70%로 방어효능이 증가했음을 확인하였다. 1형 혼합백신 4그룹의 방어율은 오차범위내에서 4그룹 모두 차이가 없었다. 2형의 경우 단독이 100% 방어효능을 보였고 혼합그룹에서는 이와 유사하게 83~100%의 방어수준을 보였다. 혼합백신 그룹간의 유의적인 차이는 없었다. 따라서, 혼합 4그룹 모두 1형에 대해 60~70%, 2형에 대해 83~100% 방어수준을 보여 최소 농도의 균으로 방어효과를 기대할 수 있는 1:1 비율을 혼합백신의 비율로 선정하였다.

나) 시제품 방어효능 평가

(1) 실험방법

G	Strain (CFU/dose)	Vaccine				Challenge				평가항목 ^b
		Sero type	Age (days)	No	Route	Sero type	Age (days)	CFU /dose	Route	
1	Non-vaccinated	S1	2/8	12	Oral (1mL)	S1	29	1×10 ⁶	IM (1ml)	<ul style="list-style-type: none"> 폐사율 임상증상 부검소견 PI (protective index)
2						S2	29	1×10 ⁵		
3	혼합생백신 시제품	S2				S1	29	1×10 ⁶		
4						S2	29	1×10 ⁵		

a. S1 (D15-RDA-92), S2 (D14-RDA-8)

b. PI (protective index)

$$\text{Protective index (PI)} = \frac{(\% \text{ mortality in non-vaccinates} - \% \text{ mortality in vaccinates})}{\% \text{ mortality in non-vaccinates}} \times 100$$

(2) 실험결과

G	Vaccine	Challenge	Mortality (%)	PI (%)	Clinical signs	Pericarditis	Perihepatitis
1	Non-vaccinated	S1					
2	혼합생백신 시제품						
3	Non-vaccinated	S2					
4	혼합생백신 시제품						

2) 시제품 목적동물 대상 안전성 평가

혼합생백신의 시제품에 대해 1, 10, 100dose로 접종한 후 안전성을 평가하였다.

가) 실험방법

G	Dose	CFU	일령	경로	No.	평가항목
N	Negative	DW	2/8	Oral	30	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 폐사율 ▪ 임상증상 ▪ 체중 ▪ 육안병변 ▪ 조직병변
1	1	10^8+10^7				
2	10	10^9+10^8				
3	100	$10^{10}+10^9$				

나) 실험결과

G	CFU (S1+S2)	Clinical signs	Mortality	Body weight (g, 3w)
Non-vaccinated	D.W	0/30	0/30	1484.3±95.3
1	10^8+10^7	0/30	0/30	1493.2±123.5
10	10^9+10^8	0/30	0/30	1467.2±180.3
100	$10^{10}+10^9$	0/30	0/30	1495.5±101.6

G	CFU (S1+S2)	Gross lesions ^a		Microscopic lesions ^b				
		Heart	Liver	Brain	Heart	Liver	Spleen	BF ^c
Non-vaccinated	D.W	0/30	0/30	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
1	10^8+10^7	0/30	0/30	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
10	10^9+10^8	0/30	0/30	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
100	$10^{10}+10^9$	0/30	0/30	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15

a. Gross lesions; pericarditis, perihepatitis

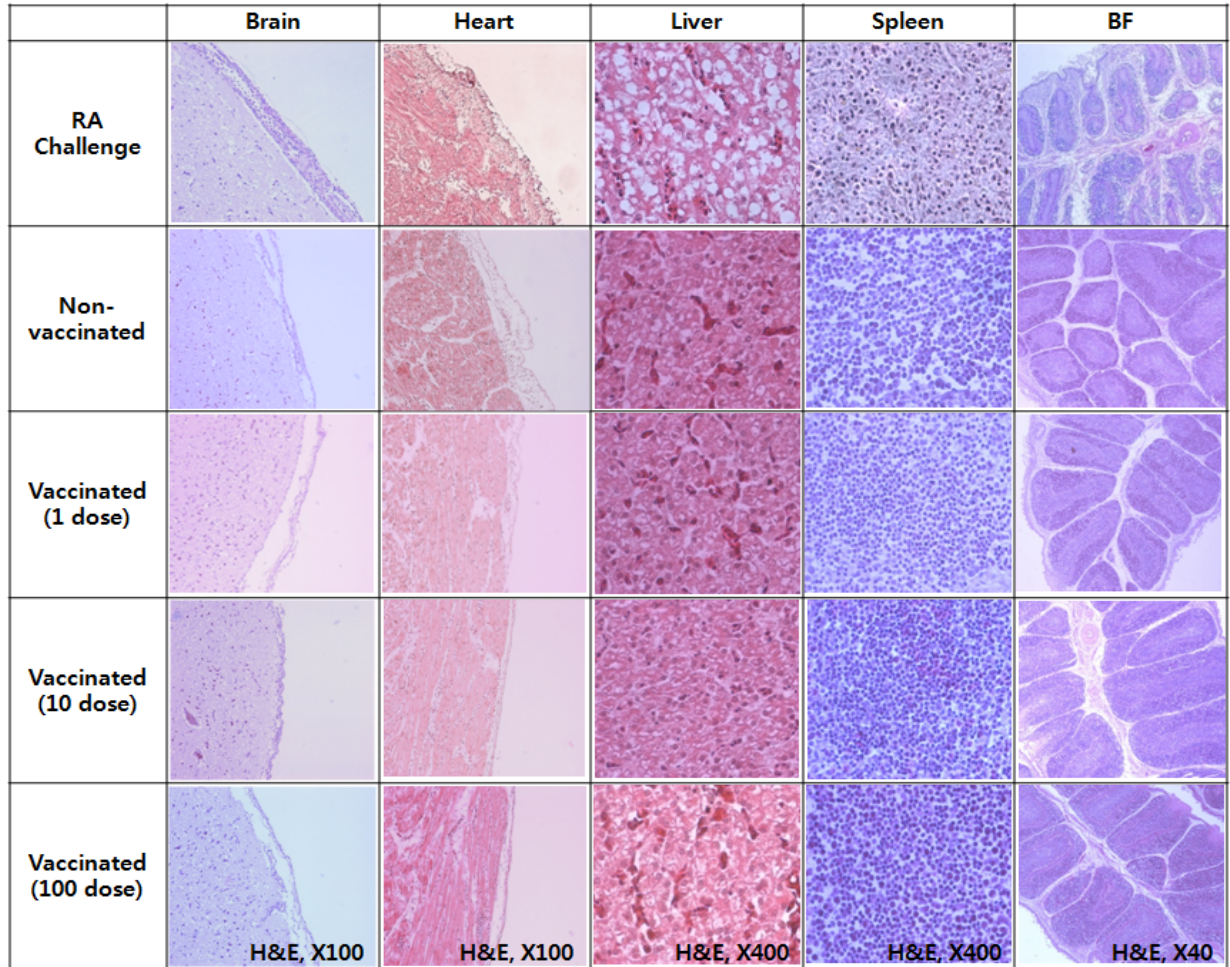
b. Microscopic lesions; meningitis, pericarditis, perihepatitis, depletion of lymphocyte

c. BF; Bursa of Fabricius

혼합 생백신 시제품을 1, 10 및 100 dose로 음수백신하고 14일동안 관찰한 결과 임상증상과 폐사가 관찰되지 않았으며 3주령의 체중측정결과 1, 10 및 100 dose 백신그룹에서 백신을 하지 않은 그룹과 유의적인 차이가 없었다. 2회 백신을 접종한 후 14일 후에 부검하여 육안병변과 조직병변을 확인한 결과 1, 10 및 100 dose백신그룹에서 육안병변 및 조직병변이 확인되지 않았다.



혼합생백신 시제품 안전성 평가 육안병변



혼합생백신 시제품 안전성 평가 조직병변

3) 면역유도능 평가

혼합백신 1dose를 음수백신 한 후 면역유도능 평가를 실시하였다.

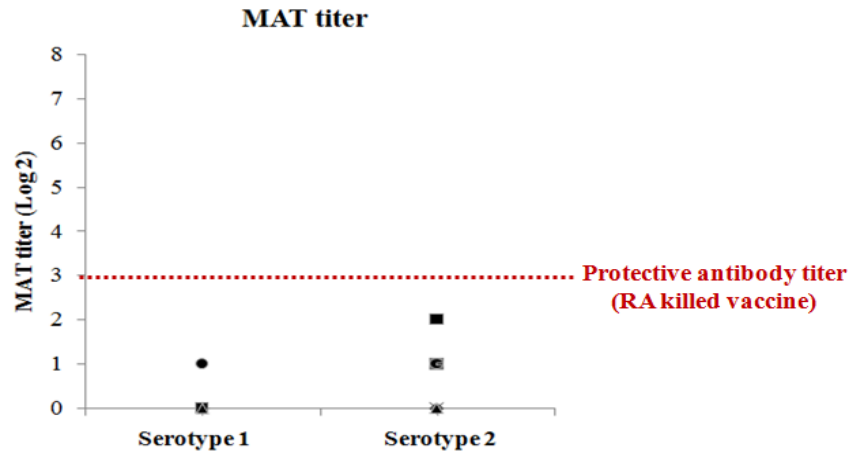
가) 실험방법

G	Strain (CFU/dose)	Vaccine				평가항목
		Sero type	Age (days)	No	Route	
1	Non-vaccinated	S1	2/8	12	Oral (1mL)	serum antibody IgA: trachea, duodenum
2	혼합생백신 시제품	S2				

a. S1(D15-RDA-92), S2(D14-RDA-8)

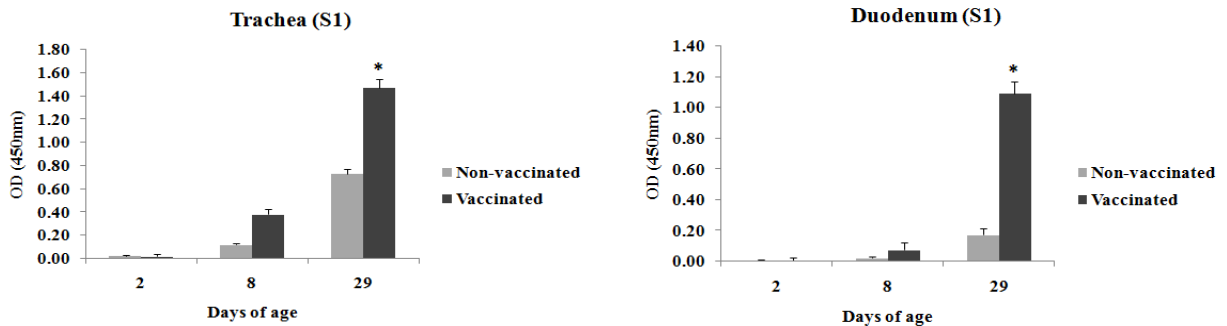
나) 실험결과

(1) serum antibody

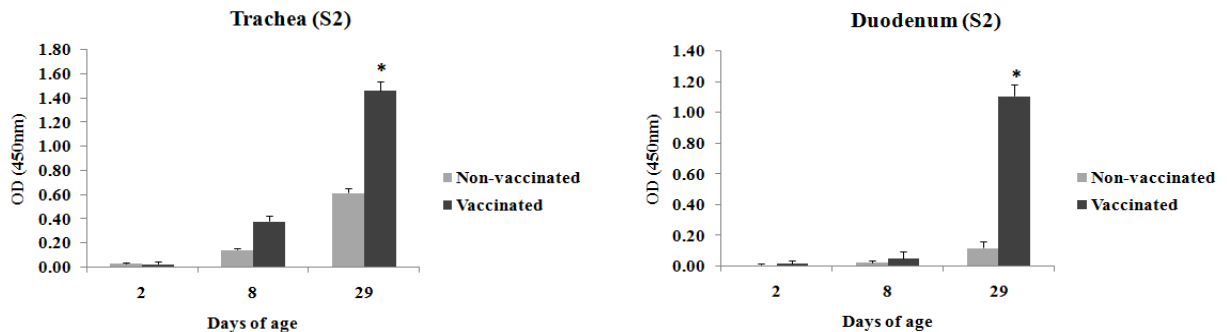


혼합백신 후 serum에서 항체형성능을 평가하기 위해 microplate agglutination test로 혈중항체를 평가한 결과, 80% 이상의 방어율에도 불구하고 2³(불활화 백신 방어역가, protective antibody titer)이하의 역가를 확인하였다. 오리는 체내에서 종종 약한 항체반응을 보이고 리메렐라가 facultative intracellular bacteria인 점을 고려하면 혈중항체반응은 약할 것으로 판단된다. 하지만 음수생백신으로서 점막면역을 유도할 것이라고 판단하고 호흡기 및 소화기 점막의 IgA 수준을 평가하였다.

(2) IgA



혼합백신 1형 면역유도능 평가 (IgA)



혼합백신 2형 면역유도능 평가 (IgA)

혼합백신 후 trachea 및 duodenum에서 mucosal IgA를 측정된 결과 호흡기 및 소화기 점막에서 백신을 하지 않은 그룹에 비해 유의적인 상승을 확인하였다.

나. 리메텔라 생백신 시제품 특성연구

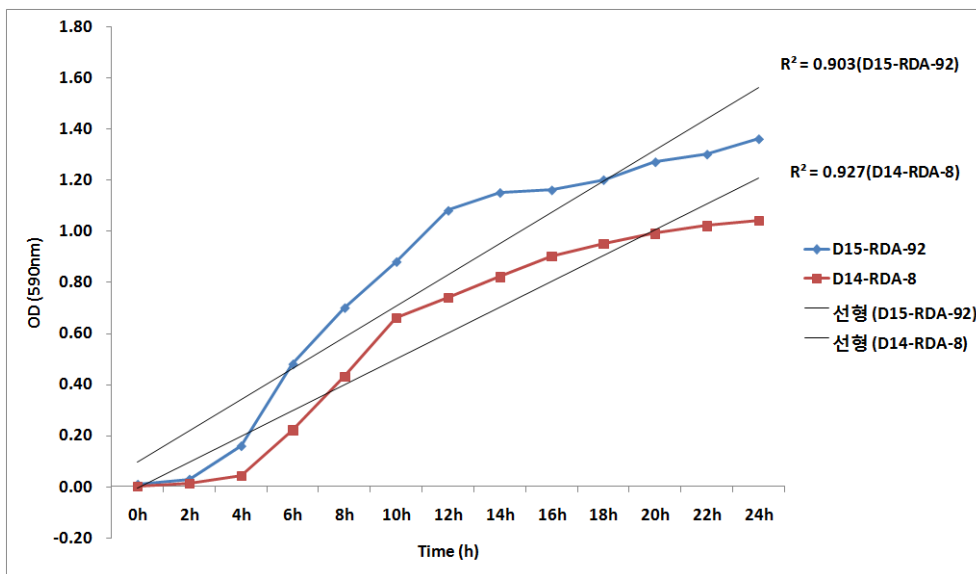
2종의 백신후보주의 특성을 파악하기 위해 성장곡선, 생화학적 특성분석, 항생제내성 평가를 수행하였다.

1) 균 성장곡선 작성

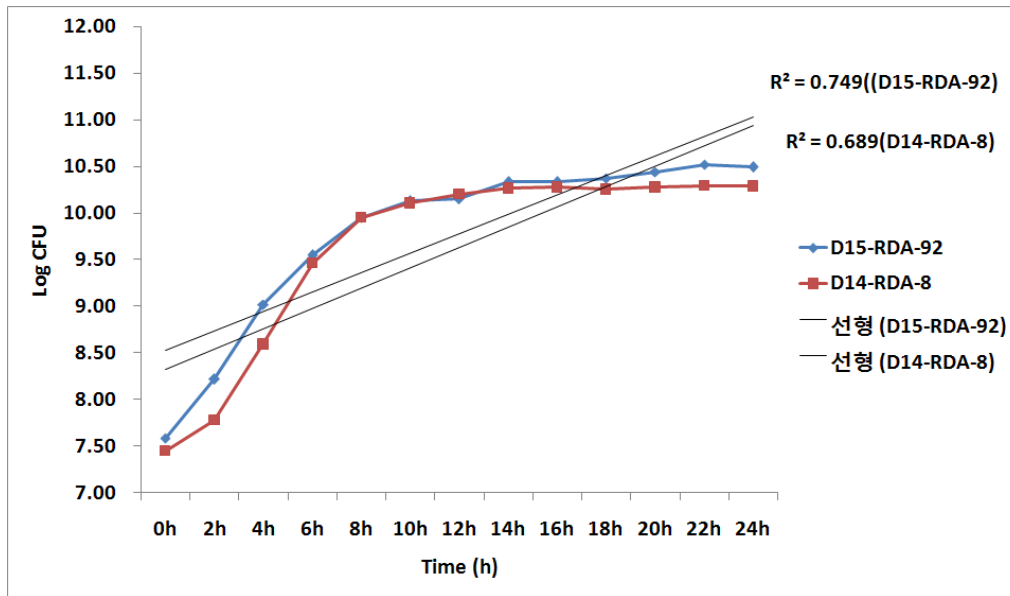
가) 실험방법

glycerol stock을 BAP에 접종하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 36h 배양하였다. 단일콜로니를 채취하여 Tryptic soy broth 7mL에 접종 후 190rpm shaking incubator에서 15h 배양하였다. (OD : 0.4~0.5, CFU : 1×10⁹/mL) Tryptic soy broth 30mL에 OD:0.4의 균 300uL 접종하였다. 37°C, 190rpm, shaking incubator에서 24h 동안 배양하며 2h 마다 OD값, 균수를 측정하였다.

나) 실험결과



Growth curve (OD)



Growth curve (LogCFU/mL)

Time (h)	OD590		CFU/mL	
	D15-RDA-92	D14-RDA-8	D15-RDA-92	D14-RDA-8
0	0.01	0.00	7.59	7.45
2	0.03	0.01	8.22	7.78
4	0.16	0.04	9.02	8.59
6	0.48	0.22	9.55	9.46
8	0.70	0.43	9.95	9.95
10	0.88	0.66	10.13	10.11
12	1.08	0.74	10.15	10.20
14	1.15	0.82	10.33	10.27
16	1.16	0.90	10.33	10.28
18	1.20	0.95	10.37	10.26
20	1.27	0.99	10.44	10.28
22	1.30	1.02	10.52	10.30
24	1.36	1.04	10.49	10.29

2종 백신주에 대해 균성장곡선을 작성한 결과 1형, 2형 모두 10~12h에 배양 peak 농도인 1×10^{10} CFU/mL에 도달하였다.

2) 생화학적 특성 분석

생화학적 특성 분석을 위하여 API 20NE Kit를 이용하여 분석하고 Catalase 및 Oxidase test를 수행하였다.

Isolate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PN PG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CTI	PAC	Oxidase	Catalase	
D15-M R-92-1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D14-R DA-8	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

API 수행결과 1형과 2형 모두 urease, oxidase, catalase에서만 양성을 나타내었다.

3) 항생제내성 평가

2종 백신주에 대해 Sensi-Discs (BD BBL)를 사용하여 항생제 감수성 검사를 실시한 결과 Aminoglycoside계 항생제에 내성이 높아 Gentamicin, Streptomycin에 모두 강한 내성을 보였고 ciprofloxacin에 내성을 보였다. 그 외 항생제는 대부분 감수성이 있었다.

분리 균		D15-RDA-92	판 정	D14-RDA-8	판 정
No.	항생제 종류	억제대(mm)		억제대(mm)	
Aminoglycoside계					
1	Gentamicin (GM)	0	-	0	-
2	Streptomycin (S)	0	-	0	-
Carbapenem계					
3	Imipenem (IPM)	38	+	40	+
Cephalosporin계					
4	Cephalothin (CF)	37	+	35	+
Chloramphenicol 계					
5	Chloramphenicol (C)	25	+	27	+
Macrolide계					
6	Erythromycin (E)	27	+	30	+
Monobactam계					
7	Aztreonam (ATM)	28	+	32	+
Quinolone계					
8	Ciprofloxacin (CIP)	10	-	10	-
Penicillin계					
9	Amoxicillin/ Clavulanic Acid (AmC)	31	+	32	+
Sulfa계					
10	Sulfisoxazole (G)	22	+	23	+
Teracycline계					
11	Doxycycline (D)	21	+	25	+
12	Tetracycline (TE)	16	+	22	+
판정기준					
++: 강한 감수성이 있음(S), +: 중등도의 감수성이 있음(I), -: 저항성이 있음(R), ** : 저항균 산생					

다. 오리 생산단계별 예방접종 프로그램(안) 연구

1) 오리 생산단계별 최적 예방접종 프로그램(안) 구축

가) 리메렐라 백신프로그램 국외 사례분석(미국)

국외 (미국, 캐나다)의 경우 오리리메렐라감염증의 생산단계별 예방 백신프로그램을 구축하여 권장하고 있으며 이를 분석하여 국내 실정에 맞게 수정·보완하여 국내 실정에 맞는 프로그램을 개발하는 것이 필요하다.

[육용오리 백신프로그램]

Vaccination Program for Commercial Ducklings			
Age	Vaccine	Route	Type
1 day old	<i>Riemerella anatipestifer</i>	Aerosol	Live vaccine ^a
10-14 days	<i>R anatipestifer</i>	Drinking water	Live vaccine ^a
3 wk	<i>R anatipestifer</i>	SC	Bacterin ^b

- a. A live, avirulent vaccine consisting of the 3 major serotypes (1, 2, and 5) of *R anatipestifer*
- b. A formalin-inactivated cell suspension of the 3 major serotypes (1, 2, and 5) of *R anatipestifer* is recommended for preventive immunization on farms where the disease is endemic or epidemic. Ducklings should not be vaccinated within 21 days of slaughter

육용오리의 경우 1일령에 처음 생백신을 실시하고 2주령에 boosting을 함으로서 출하시기까지 예방하고 있다. 반복적으로 발생이 일어나는 농장의 경우 3주령에 불활화 백신을 추가함으로서 면역능을 높여준다.

[종오리 백신프로그램]

Vaccination Program for Duck Breeders			
Age	Vaccine	Route	Type
1 day old	<i>Riemerella anatipestifer</i>	Aerosol	Live vaccine ^a
10-14 days	<i>R anatipestifer</i>	Drinking water	Live vaccine ^a
3 wk	<i>R anatipestifer</i>	SC	Bacterin ^b
4 wk	Duck viral hepatitis	SC	Live vaccine ^c (Type 1)
4 wk	Duck viral enteritis	SC	Live vaccinc
10 and 20 wk ^d	<i>R anatipestifer</i>	SC	Bacterin ^b
10 and 20 wk	Duck viral hepatitis	SC	Killed virus vaccine (Type 1)

- a. A live, avirulent vaccine consisting of the 3 major serotypes (1, 2 and 5) of *R anatipestifer*
- b. A formalin-inactivated cell suspension of the 3 major serotypes (1, 2, and 5) of *R anatipestifer*. Bacterins and killed virus vaccines are administered SC in the neck
- c. A modified live virus vaccine of chick embryo origin
- d. White Pekin breeder ducks normally start egg production at 24weeks of age. Egg production can be accelerated or delayed and breeder vaccination should be completed before the onset of egg production to optimize the passage of parental immunity to the progeny

종오리의 경우 1/2주령 생백신으로 종오리의 육성기까지 리메렐라를 예방하고 있으며 발생이 높은 농장은 3주령에 불활화 백신을 추가접종 할 수 있다. 8주령이상의 성오리는 만성감염으로 관절염, 수란관염을 일으킬 수 있기 때문에 이를 예방하기 위해 10, 20주령에 불활화 백신을 실시하고 모든 백신은 산란이 시작되기 전에 종료한다.

나) 국내 육용오리 백신프로그램(안)

2/8일령에 백신을 실시하여 감수성이 높은 시기인 2주령부터 출하 전(6주)까지 예방한다. 모체이행항체가에 따른 백신스케줄을 조정한다. 리메렐라 모체이행항체의 반감기는 약 11일로 모체에 리메렐라 백신을 한 경우 접종시기를 늦추도록 한다(L. Lobbedey, 2003).

모체 백신유무	일령	접종방법	타입
비접종 모계생산	2일령	음수	Live
	8일령	음수	Live
접종 모계생산	10일령	음수	Live
	16일령	음수	Live

다) 국내 종오리 백신프로그램(안)

(1) 종오리 자체면역 유도

2/8일령에 백신을 실시하여 종오리 육성기인 2-8주령까지 예방한다. 8주령 이상에서 관절염 및 수란관염 등 만성적인 감염을 예방하기 위해 10/20주령에 불활화 백신을 실시한다.

(2) 모체이행항체 부여

후대병아리에 모체이행항체의 전달한다. 모체에 백신접종 후 난황의 IgY는 2-3개월 이상 지속됨을 확인한다(L. Lobbedey, 200).

(가) 백신프로그램 예시(1안)

목적	일령	접종방법	타입
종오리 자체면역	2일령	음수	Live
	8일령	음수	Live
	3주령	피하	Killed
모체이행항체부여	10주령	피하	Killed
	20주령	피하	Killed

총 5회 백신으로 2/8일령에 백신을 실시하여 기초면역을 부여하고 이후 3주령, 10주령, 20주령에 불활화 백신하여 오리사육 전기간에 걸쳐 충분한 면역능을 유도할 수 있다.

(나) 백신프로그램 예시(2안)

목적	일령	접종방법	타입
종오리 자체면역	2일령	음수	Live
	8일령	음수	Live
모체이행항체부여	10주령	피하	Killed
	20주령	피하	Killed

총 4회 백신으로 2/8일령에 백신을 실시하여 기초면역을 부여하고 이후 10주령, 20주령에 불활화 백신하여 종오리의 관절염, 수관관염을 예방할 수 있다.

(다) 백신프로그램 예시(3안)

목적	일령	접종방법	타입
종오리 자체면역	2일령	음수	Live
	8일령	음수	Live
모체이행항체부여	12-16주령	피하	Killed

총 3회 백신으로 2/8일령에 백신을 실시하여 기초면역을 부여하고 이후 12-16주령에 불활화 백신하여 최소한의 백신으로 종오리의 리메렐라 만성감염을 예방할 수 있다.

3. 개발백신 현장활용 극대화 방안 연구

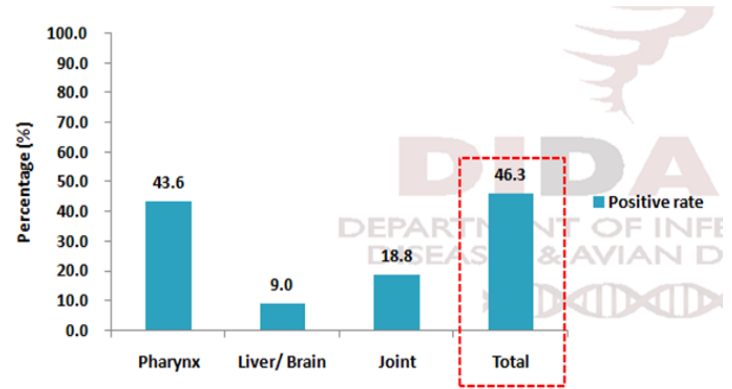
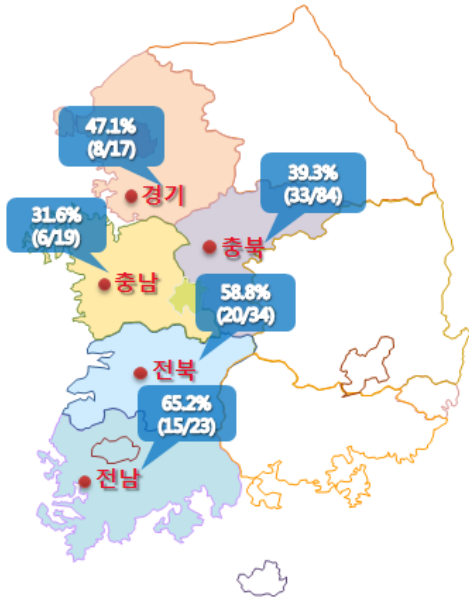
가. 개발 기술의 현장 보급·확산을 위한 방안 연구

1) 현장적용 결과 분석 및 문제점 해소방안 연구

가) 리메렐라 현장 발생상황 분석

(1) 육용오리 농장

오리사육의 80%이상이 이루어지고 있는 주요 5개도에서 평균 46.3%의 리메렐라 양성률을 보였으며 병원성과 관계가 높은 live, brain, joint 분리주도 약 30%를 차지하는 것으로 보아 전국의 리메렐라 감염율은 상당히 높다고 판단된다. 육용오리 농장의 리메렐라에 의한 문제점으로 주로 3주령부터 출하시기인 6주령까지 폐사, 신경증상, 과행, 증체율 감소로 사육후반에 생산성을 크게 감소시키므로써 농가에 경제적 피해를 일으키고 있다.



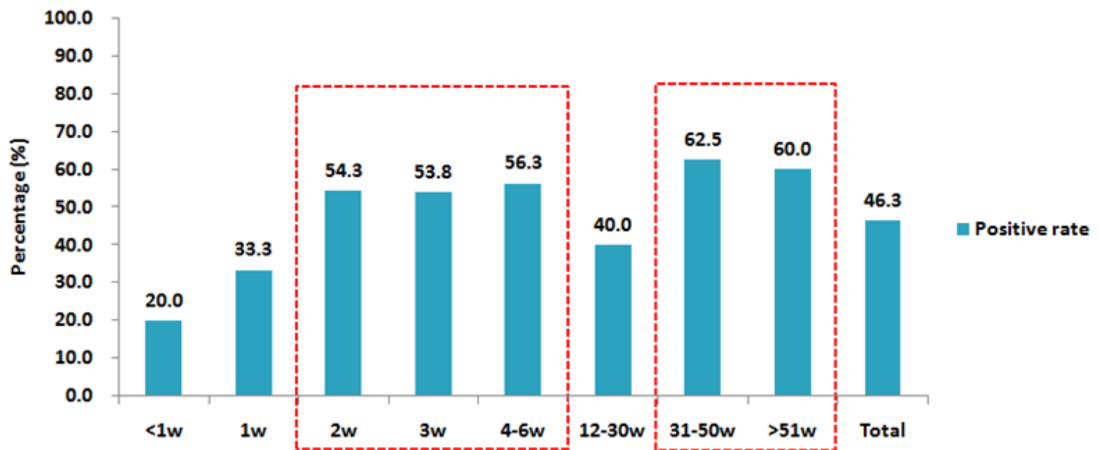
	Pharynx	Liver/Brain	Joint	Total (%) ^a
No. of examined farms	156	177	16	177
No. of positive farms	68	16	3	82
Positive rate (%)	43.6	9.0	18.8	46.3

a. Farms were considered one positive case if RA was isolated at least among pharynx, liver, brain, or joint.

국내 종오리 및 육용오리농가 리메렐라 지역별 분포현황

(2) 종오리 농장

종오리 농장에서 리메렐라 검사결과 12주령 이상에서도 40%이상의 높은 양성률을 보였으며 특히, 리메렐라 만성감염에 의한 관절염 빈번하게 발생하였다. 종오리의 육성기인 2-8주령에 폐사, 신경증상, 파행, 증체율 감소로 발달불량을 일으킬 수 있다. 8-10주령 이상에서는 만성적으로 국소감염을 일으켜 관절염과 수란관염으로 인한 수정율과 산란율을 저하시킨다.



	<1w	1w	2w	3w	4-6w	12-30w	31-50w	>51w	Total (%)
No. of examined farms	20	36	35	26	32	10	8	10	177
No. of positive farms	4	12	19	14	18	4	5	6	82
Positive rate (%)	20.0	33.3	54.3	53.8	56.3	40.0	62.5	60.0	46.3

국내 종오리 및 육용오리농가 리메렐라 주령별 분포현황

[A농장(육용오리)]

- 지역 : 경기도
- 주령 : 3주령
- 검사결과 : 리메렐라 양성
- 주요증상 : 파행, 신경증상, 폐사 등



리메렐라에 의한
신경증상 및 폐사



리메렐라에 의한
간, 심장포막염

[B농장(종오리)]

- 지역 : 전남
- 주령 : 30주령
- 검사결과 : 리메렐라 양성
- 주요증상 : 관절염, 수란관염, 파행, 폐사 등



리메렐라 만성감염에 의한 관절염



나) 문제점 해소 방안

국내 육용오리 및 종오리 농장에서 리메렐라를 예방하기 위해 상기 제시한 생산단계별 백신 프로그램 적용을 적용한다면 생산성을 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다. 상기 제안한 프로그램 중 최소한의 접종법인 아래 프로그램을 적용한다면 육용오리의 기초면역뿐만 아니라 종오리의 만성감염을 예방할 수 있을 것으로 판단된다.

(1) 육용오리 농장

	일령	접종방법	타입
비접종 모계생산	2일령	음수	Live
	8일령	음수	Live

(2) 종오리 농장(3안)

	일령	접종방법	타입
종오리 자체면역	2일령	음수	Live
	8일령	음수	Live
모체이행항체부여	12-16주령	피하	Killed

2) 관련 정책안 제시

가) 백신적용에 따른 오리농장 리메렐라 저감화

국내에는 리메렐라감염증에 대한 생백신이 없으며, 질병의 발생은 계속되고 있다. 질병 발생의 감소와 오리 축산품의 항생제 잔류 등의 안전성을 위하여 리메렐라 생독 백신을 산업화 하

여 두 가지 목적을 모두 달성하고자 한다. 또한 육용오리 뿐만 아니라 종오리의 리메텔라 발생을 고려할 때 종오리까지 확장 적용한다면 경제적 효과는 더욱 늘어날 것으로 예상된다.

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과			500	2,000	3,500	6,000
경제적 파급효과			2,000	5,000	10,000	17,000
부가가치 창출액			2,500	10,000	30,000	42,500
합 계			5,000	17,000	43,500	65,500

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

제 2 절 오리간염 혼합생백신 및 리메렐라 생백신 산업화

1. 오리간염 혼합생백신 제조공법 개발

가. 시험백신주의 유효 항원량 및 방어효능 평가

각 백신주의 등록된 특허(특허등록번호 10-0248910, 10-0959259)에 제시된 결과를 인용하였다.

1) 오리간염 1형 백신주의 최소면역원성

백신의 면역유발 최소량을 알아보기 위하여 백신접종량을 달리하여 음수로 접종하고 오리간염 1형 강독주인 DRL-62주를 음수로 공격접종하여 방어능을 확인하였다.

백신접종량	백신접종일령	공격접종일령	공격접종량	생존수 / 공격접종수	방어율
-	1일령	5일령	$10^{4.3}EID_{50}$	2/25	8%
$10^{1.0}ELD_{50}$				10/15	67%
$10^{2.0}ELD_{50}$				11/15	73%
$10^{3.0}ELD_{50}$				15/15	100%
$10^{4.0}ELD_{50}$				15/15	100%
$10^{5.0}ELD_{50}$				15/15	100%

$10^{3.0}ELD_{50}$ 이상에서는 모두 100% 이상의 방어능이 확인되었으나 $10^{2.0}ELD_{50}$ 이하에서는 방어능이 73% 이하로 감소하는 것으로 나타나 최소면역량은 $10^{3.0}ELD_{50}$ 이었다.

2) 오리간염 3형 백신주의 최소면역원성

백신의 면역유발 최소량을 알아보기 위하여 1일령의 오리에 백신접종량을 달리하여 근육으로 접종하고 오리간염 3형 강독주인 AP04203주를 $10^{4.0}ELD_{50}$ 으로 근육 및 음수로 공격접종일령을 달리하여 공격접종하여 방어능을 확인하였다.

백신접종량	공격접종경로	공격접종일령에 대한 폐사수/공격접종수(방어율)			
		2일령	3일령	4일령	5일령
-	근육	15/15(0%)	12/15(20%)	11/15(27%)	9/15(40%)
	경구	14/15(7%)	13/15(13%)	10/15(33%)	8/15(47%)
$10^{1.0}ELD_{50}$	근육	13/15(13%)	11/15(27%)	6/15(60%)	6/15(60%)
	경구	13/15(13%)	9/15(40%)	4/15(73%)	5/15(67%)
$10^{2.0}ELD_{50}$	근육	12/15(20%)	1/15(93%)	0/15(100%)	0/15(100%)
	경구	13/15(13%)	2/15(87%)	1/15(93%)	0/15(100%)
$10^{3.0}ELD_{50}$	근육	9/15(40%)	0/15(100%)	0/15(100%)	0/15(100%)
	경구	8/15(47%)	0/15(100%)	0/15(100%)	0/15(100%)

대조군과 비교해 볼 때 $10^{1.0}ELD_{50}$ 으로 접종한 그룹에서는 백신의 효과를 관찰할 수 없었으나, 백신의 항원함량이 $10^{2.0}ELD_{50}$ 이상일 때 백신 접종 2일 이후(3일령)부터 오리간염 3형 강독주에 대한 방어능이 관찰되었다.

3) 시험백신주별 생산용 bulk의 최소 바이러스 역가 확립

1)항의 결과에 근거한 오리간염 백신주 1형의 최소 면역량은 수당 $10^{3.0}EID_{50}$ 이상으로, 동결 건조에 의한 바이러스 역가의 감소를 감안하였을 때 동결건조 전 1수분 당 $10^{3.5}EID_{50} \sim 10^{4.0}EID_{50}$ 이상의 항원이 필요하다. 일반적인 가금용 백신의 생산기준인 병(동결건조 전 원료약품 2.5ml)당 1000수분인 동결건조백신을 제조하기 위한 필요 항원량은 병당 $10^{6.5}EID_{50} \sim 10^{7.0}EID_{50}$ 이상이 포함되어야 한다.

2)항의 결과에 근거한 오리간염 백신주 3형의 최소 면역량은 수당 $10^{2.0}EID_{50}$ 이상으로, 동결 건조에 의한 바이러스 역가의 감소를 감안하였을 때 동결건조 전 1수분 당 $10^{2.5}EID_{50} \sim 10^{3.0}EID_{50}$ 이상의 항원이 필요함. 일반적인 가금용 백신의 생산기준인 병(동결건조 전 원료약품 2.5ml)당 1000수분인 동결건조백신을 제조하기 위한 필요 항원량은 병당 $10^{5.5}EID_{50} \sim 10^{6.0}EID_{50}$ 이상이 포함되어야 한다.

나. 기존의 백신주를 이용한 오리간염백신 1형 및 3형 혼합 제조기술 확립

1) 시험백신주별 바이러스 증식능 비교 평가

“가. 시험백신주의 유효 항원량 및 방어효능 평가”내용에 따라 각 혈청형별 효능이 충분히 확인된 수준의 바이러스 역가를 생산하기 위한 기초 실험을 실시하였다.

가) 오리간염 1형 백신주의 종란접종일령별 바이러스 역가 비교 평가

Seed 바이러스의 종란접종일령을 달리하여 바이러스 증식능을 비교하였다. 바이러스 수확방법은 계태아를 유제하여 원심분리 후 상층액을 채취하였다. 바이러스 함량은 8일령의 SPF 종란에 접종하여 7일간 폐사율을 관찰하여 평가하였으며, 접종 24시간 이내에 폐사한 것은 판정에서 제외하였다.

종란접종일령	배양시간	종란접종경로	Seed 접종량	바이러스 함량
8일령	48시간	AC route (0.1ml)	$10^{3.0} ELD_{50}$	$10^{8.1}ELD_{50}/ml$
11일령				$10^{8.5}ELD_{50}/ml$

오리간염 1형 백신주는 8일령의 접종과 11일령의 접종에서 (가) 항목에서 설정한 기준에 대한 충분한 양의 바이러스가 증식됨을 확인하였다. 이 후 생산하는 오리간염 1형 백신주는 본 시험 결과와 후술한 오리간염 3형 백신주 시험결과를 종합하여 8일령의 종란에 AC route로 $10^{3.0}ELD_{50}/0.1ml$ 이상 접종하여 48시간 배양 후 계태아 유제를 통한 바이러스 수확방법을 통해 항원을 생산하는 것으로 설정하였다.

나) 오리간염 3형 백신주의 바이러스 접종량별, 바이러스 수확방법별 바이러스 역가 비교 평가

Seed 바이러스의 접종량을 달리하여 바이러스 증식능을 비교하였다. 바이러스의 수확방법을 달리하여 바이러스 증식능을 비교하였다. 바이러스 함량은 8일령의 SPF 종란에 접종하여 7일간 폐사율을 관찰하여 평가하였으며, 접종 24시간 이내에 폐사한 것은 판정에서 제외하였다.

종란접종일령	배양시간	종란접종경로	Seed 접종량	바이러스 수확방법	바이러스 함량
9일령	48시간	AC route (0.1ml)	$10^{4.3}$ ELD ₅₀	계태아 유제	$10^{5.5}$ ELD ₅₀ /ml
				ACF	$10^{3.7}$ ELD ₅₀ /ml
			$10^{3.3}$ ELD ₅₀	계태아 유제	$10^{5.5}$ ELD ₅₀ /ml
				ACF	$<10^{1.5}$ ELD ₅₀ /ml
			$10^{2.3}$ ELD ₅₀	계태아 유제	$10^{5.7}$ ELD ₅₀ /ml
				ACF	$<10^{1.5}$ ELD ₅₀ /ml
$10^{1.3}$ ELD ₅₀	계태아 유제	$10^{5.7}$ ELD ₅₀ /ml			
	ACF	$<10^{1.5}$ ELD ₅₀ /ml			

Allantoic fluid를 채취하는 방법은 접종한 계태아를 유제하여 원심분리 후 취한 상층액에 비해 전반적으로 낮은 바이러스 함량이 확인되었다. 계태아를 유제하여 원심분리 후 취한 상층액의 경우 seed 바이러스의 접종량이 $10^{1.3}$ ELD₅₀ 이상일 경우 모두 동일한 수준의 결과를 나타내었다. 본 시험의 결과를 바탕으로 오리간염 3형 백신주는 seed 바이러스 접종량을 $10^{2.5}$ ELD₅₀/0.1ml 이상, 계태아 유제를 통한 바이러스 수확방법을 통해 항원을 생산하였다.

다) 오리간염 3형 백신주의 종란접종일령별, 바이러스 접종경로별 바이러스 역가 비교 평가
Seed 바이러스의 종란접종일령을 달리하여 바이러스 증식능을 비교하였다. Seed 바이러스의 종란접종경로를 달리하여 바이러스 증식능을 비교하였다. 바이러스 수확방법은 계태아를 유제하여 원심분리 후 상층액을 채취하였다. 바이러스 함량은 8일령의 SPF 종란에 접종하여 7일간 폐사율을 관찰하여 평가하였으며, 접종 24시간 이내에 폐사한 것은 판정에서 제외하였다.

종란접종일령	배양시간	종란접종경로	Seed 접종량	바이러스 함량
8일령	48시간	AC route	$10^{3.0}$ ELD ₅₀ /0.1ml	$10^{6.5}$ ELD ₅₀ /ml
		Yolk sac route		$10^{5.9}$ ELD ₅₀ /ml
9일령		AC route		$10^{5.9}$ ELD ₅₀ /ml
		Yolk sac route		$10^{5.3}$ ELD ₅₀ /ml

AC route를 통한 종란접종법이 yolk sac route를 통한 종란접종법에 비해 모두 높은 바이러스 역가가 확인되었다. 8일령의 접종이 9일령의 접종에 비해 높은 역가가 확인되었다. 본 시험의 결과를 바탕으로 오리간염 3형 백신주는 9일령 접종보다는 8일령 접종을, 종란접종은 AC route를 통해 항원을 생산하였다.

라) 오리간염 3형 백신주의 바이러스 종란접종일령별, 배양시간별 바이러스 증식능 비교 평가
Seed 바이러스의 종란접종일령을 달리하여 바이러스 증식능을 비교하였다. 종란접종 후 배양 시간을 달리하여 바이러스 증식능을 비교하였다. 바이러스 수확방법은 계태아를 유제하여 원심분리 후 상층액을 채취하였다. 바이러스 함량은 8일령의 SPF 종란에 접종하여 7일간 폐사율을 관찰하여 평가하였으며, 접종 24시간 이내에 폐사한 것은 판정에서 제외하였다.

종란접종일령	종란접종경로	Seed 접종량	배양시간	바이러스 함량	비고
8일령	AC route (0.1ml)	10 ^{3.0} ELD ₅₀	48시간	10 ^{6.5} ELD ₅₀ /ml	계태아 폐사비율: 약 40%
			72시간	10 ^{5.9} ELD ₅₀ /ml	
11일령		10 ^{3.0} ELD ₅₀	48시간	10 ^{5.3} ELD ₅₀ /ml	
			72시간	10 ^{5.1} ELD ₅₀ /ml	
96시간	10 ^{5.7} ELD ₅₀ /ml				
120시간	10 ^{5.3} ELD ₅₀ /ml				

8일령에 접종시에 접종 48시간 후 검란 시 계태아의 폐사율이 높은 편이었으며, 11일령의 접종 시에는 계태아 폐사가 거의 발생하지 않았다. 8일령에 바이러스를 접종하여 48시간 배양하는 것이 가장 높은 바이러스 함량이 확인되었다. 11일령에 바이러스를 접종 시 전반적으로 8일령의 접종에 비해 바이러스가 역가가 낮게 확인되었다. 이 후 생산하는 오리간염 3형 백신주는 ②~④항의 결과를 종합하여 8일령의 종란에 AC route로 10^{2.5}ELD₅₀/0.1ml 이상 접종하여 48시간 배양 후 계태아 유제를 통한 바이러스 수확방법을 통해 항원을 생산하는 것으로 설정하였다.

다. 오리간염 2가 혼합생백신 동결건조 기술 확립 및 안정성평가

1) 동결건조 보호제별 백신 바이러스 역가 평가

가금용 백신의 동결건조 보호제로 주로 사용되는 TPGG(trehalose phosphate glutamate gelatin mixture)와 SorPGG(sorbitol phosphate glutamate gelatin mixture)를 이용해 동결건조하여 제조한 백신을 병(2.5ml)당 1000수분으로 가정 후, 수 당 바이러스 함량을 비교하였다. 바이러스 함량은 8일령의 SPF 종란에 접종하여 7일간 폐사율을 관찰하여 평가하였으며, 접종 24시간 이내에 폐사한 것은 판정에서 제외하였다.

동결보호제	동결건조 전 원료약품별 혼합량 (1000수분, 2.5 ml/병)				동결건조 후 바이러스 함량 (per dose)
	동결보호제	항원별 바이러스 함량(per dose)		인산완충액	
		오리간염 1형	오리간염 3형		
SorPGG	20%	10 ^{5.5} ELD ₅₀	10 ^{3.3} ELD ₅₀	-	10 ^{4.3} ELD ₅₀
	20%	10 ^{5.5} ELD ₅₀	-	40%	>10 ^{4.5} ELD ₅₀
	20%	-	10 ^{3.3} ELD ₅₀	40%	10 ^{2.3} ELD ₅₀
TPGG	20%	10 ^{5.5} ELD ₅₀	10 ^{3.3} ELD ₅₀	-	10 ^{3.1} ELD ₅₀
	20%	10 ^{5.5} ELD ₅₀	-	40%	10 ^{4.5} ELD ₅₀
	20%	-	10 ^{3.3} ELD ₅₀	40%	10 ^{0.9} ELD ₅₀

동결건조 보호제로 TPGG를 사용하여 제조한 백신의 바이러스 함량보다 SorPGG를 사용하여 제조한 백신의 바이러스 함량이 항원의 혼합조건과 관계없이 모두 높으며 각 항원별 최소항원량 이상임을 확인하였다. SorPGG를 동결건조 보호제로 하여 동결건조백신을 제조하였을 때, 바이러스 함량이 동결건조 후 수당 10^{1.0}ELD₅₀정도 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

2) 혼합생백신 동결건조 백신의 안정성평가

항에서 선발한 SorPGG로 제조한 혼합생백신을 2~8℃의 냉암소에 보관하면서, 제조직후, 3개월후, 6개월후, 9개월후, 12개월후, 18개월후까지 백신의 바이러스 함량을 조사하였다. 바이러스 함량은 8일령의 SPF 종란에 접종하여 7일간 폐사율을 관찰하여 평가하였으며, 접종 24시간 이내에 폐사한 것은 판정에서 제외하였다.

	제조 직후	제조 3개월 후	제조 6개월 후	제조 9개월 후	제조 12개월후	제조 18개월후
바이러스 함량 (ELD50/dose)	10 ^{4.3}	10 ^{4.1}	10 ^{4.3}	10 ^{4.3}	10 ^{4.1}	10 ^{3.9}

제조 18개월 후의 동결건조 백신의 바이러스 함량이 제조직후에 비해 일부 감소하나, 검정기준인 이상임을 확인하였다. 오리간염 혼합생백신은 SorPGG를 동결건조 보호제로 하여 백신을 제조하는 것을 확립하였다.

2. 오리간염 혼합생백신 시제품 제작 및 효능평가

가. 오리간염 1형과 3형의 단독백신 및 혼합백신 시제품의 제조

1) 각 항원별 bulk 및 보호제 함량

- 가) 오리간염 1형 바이러스 백신주 : HSB주(제조용 bulk의 바이러스 함량 108.7ELD50/ml)
- 나) 오리간염 3형 바이러스 백신주 : AP04203P100주(제조용 bulk의 바이러스 함량 106.7ELD50/ml)
- 다) 동결건조 보호제 : SorPGG (sorbitol phosphate glutamate gelatin mixture)

2) 항원함량 결정 사유

1병당 1000수분의 백신 제조 시 최소면역량을 만족하기 위한 각 백신주별 항원량은 오리간염 1형이 10^{7.0}ELD₅₀/병, 오리간염 3형이 10^{6.0}ELD₅₀/병이다. 상기 항과 같은 기준으로 1수분당 각 백신주별로 최소면역량 이상(오리간염 1형 : 10^{3.0} ELD₅₀/dose, 오리간염 3형 : 10^{2.0} ELD₅₀/dose)이 될 수 있도록 비율을 조절하여 혼합 후 동결건조하여 병당 1000수분의 시험백신을 제조하였다. 바이러스 함량은 8일령의 SPF 종란에 접종하여 7일간 폐사율을 관찰하여 평가하였으며, 접종 24시간 이내에 폐사한 것은 판정에서 제외하였다.

3) 제조결과

오리간염 1형과 3형의 단독백신 및 혼합백신 모두에서 1수분당 바이러스 함량이 최소면역량 이상으로 확인되었다.

백신	동결건조 전 원료약품별 혼합량 (1000수분, 2.5 ml/병)				동결건조 후 바이러스 함량 (per dose)
	동결보호제	항원별 바이러스 함량(per dose)		인산완충액	
		오리간염 1형	오리간염 3형		
오리간염 1형	20%	10 ^{4.1} ELD ₅₀	-	79%	10 ^{3.5} ELD ₅₀
오리간염 3형	20%	-	10 ^{4.0} ELD ₅₀	-	10 ^{3.1} ELD ₅₀
1, 3형 혼합	20%	10 ^{4.1} ELD ₅₀	10 ^{4.0} ELD ₅₀	-	10 ^{3.1} ELD ₅₀

나. 오리간염 1형과 3형의 혼합생백신 시제품의 방어능 평가

1) 오리간염 1, 3형 혼합백신의 항원간 간섭확인시험

오리간염 혼합백신의 혼합된 항원간의 간섭현상을 백신주별 단독백신과 혈청형별 강독주에 대한 방어능을 비교하였다. “가” 항에서 제조한 백신들의 1수분을 1일령의 오리에 각각 음수로 접종하고 오리간염 1형 강독주(DRL-62)와 오리간염 3형 강독주(AP04203)를 경구로 백신접종 후 5일 후 공격접종하여 방어능을 평가하였다.

접종백신	백신접종법	공격접종주	공격접종량	생존수 /공격접종수	방어율
1형 단독백신	음수	DRL-62 (1형)	$10^{3.2}ELD_{50}$	14/15	93%
3형 단독백신				5/12	42%
1, 3형 혼합백신				14/15	93%
-				1/10	10%
1형 단독백신		AP04203 (3형)	$10^{3.5}ELD_{50}$	9/14	64%
3형 단독백신				11/15	73%
1, 3형 혼합백신				13/15	87%
-				3/10	30%

각 강독주에 대한 방어능은 혼합백신이 각 혈청형별 단독백신 및 대조군에 비하여 방어능이 동일한 수준이거나 그 이상임을 확인하였다. 오리간염 혼합백신을 1일령의 오리에 적용 시 혼합된 항원간의 간섭으로 인한 효력저하가 없음이 확인되었다.

2) 혼합백신의 접종경로별 방어능 비교 평가

오리간염 혼합백신의 접종경로에 따른 혈청형별 강독주에 대한 방어능을 평가하기 위하여 접종경로를 달리하여 방어능을 비교하였다. 오리간염 혼합백신의 1수분을 1일령의 오리에 각각 음수 및 피하로 접종하고 오리간염 1형 강독주(DRL-62)와 오리간염 3형강독주(AP04203)를 경구로 백신접종 후 5일 후 공격접종하여 방어능을 평가하였다.

접종백신	백신접종법	공격접종주	공격접종량	생존수 /공격접종수	방어율
1, 3형 혼합백신	음수	DRL-62 (1형)	$10^{3.2}ELD_{50}$	14/15	93%
	피하			14/15	93%
	-			1/10	10%
1, 3형 혼합백신	음수	AP04203 (3형)	$10^{3.5}ELD_{50}$	13/15	87%
	피하			15/15	100%
	-			3/10	30%

오리간염 혼합백신을 1일령의 오리에 음수 및 피하 접종 시에 각 강독주에 대하여 대조군에 비해 우수한 85% 이상의 방어율을 나타내었다. 백신의 접종방법별 각 강독주에 대한 방어는 피하 접종이 음수 접종에 비하여 동일한 수준이거나 그 이상임을 확인하였다.

3) 혼합백신의 분무접종을 통한 방어능 비교 평가

오리간염 혼합백신의 분무접종에 대한 혈청형별 강독주에 대한 방어능의 평가하였다. 오리간

염 혼합백신의 1수분을 1일령의 오리에 각각 피하 및 분무로 접종하고 오리간염 1형 강독주(DRL-62)와 오리간염 3형 강독주(AP04203)를 경구로 백신접종 후 5일 후 공격접종하여 방어능을 확인하였다. 분무접종은 가금용 동력분무백신기를 이용하여 40~80 μ m 입자로 분무하여 접종하였다.

접종백신	백신접종법	공격접종주	공격접종량	생존수 /공격접종수	방어율
1, 3형 혼합백신	피하	DRL-62 (1형)	$10^{3.2}$ ELD ₅₀	14/15	93%
	분무			10/15	67%
	-			1/10	10%
1, 3형 혼합백신	피하	AP04203 (3형)	$10^{3.5}$ ELD ₅₀	15/15	100%
	분무			9/15	60%
	-			3/10	30%

오리간염 혼합백신을 1일령의 오리에 분무 및 피하 접종 시에 피하접종이 분무접종보다 방어능이 높으나, 각 강독주에 대하여 대조군에 비해 유의적인 차이를 확인하였다. 백신의 접종 방법별 각 강독주에 대한 방어는 피하 접종이 분무 접종에 비하여 그 이상임을 확인하였으나, 분무도 대조군에 비해 60%이상의 방어능을 확인하였다.

4) 혼합백신의 접종 후 경과일령별 방어능 비교 평가

오리간염 혼합백신의 접종 후 경과일령별 혈청형별 강독주에 대한 방어능의 평가가 진행하였다. 오리간염 혼합백신의 1수분을 1일령의 오리에 각각 피하로 접종하고 오리간염 1형 강독주(DRL-62)와 오리간염 3형 강독주(AP04203)를 경구로 백신접종 후 1~5일 후 공격접종하여 방어능을 확인하였다.

접종백신	공격접종일령	공격접종주	공격접종량	생존수 /공격접종수	방어율
1, 3형 혼합백신	2일령	DRL-62 (1형)	$10^{3.2}$ ELD ₅₀	5/15	33%
	3일령			7/15	47%
	4일령			14/15	93%
	5일령			14/15	93%
	6일령			15/15	100%
- (Not-vaccinated control)	2일령	DRL-62 (1형)	$10^{3.2}$ ELD ₅₀	0/15	0%
	3일령			0/15	0%
	4일령			1/15	7%
	5일령			1/15	7%
	6일령			1/15	7%
1, 3형 혼합백신	2일령	AP04203 (3형)	$10^{3.5}$ ELD ₅₀	7/15	47%
	3일령			15/15	100%
	4일령			15/15	100%
	5일령			15/15	100%
	6일령			15/15	100%
- (Not-vaccinated control)	2일령	AP04203 (3형)	$10^{3.5}$ ELD ₅₀	1/15	7%
	3일령			3/15	13%
	4일령			4/15	27%
	5일령			5/15	33%
	6일령			7/15	47%

백신접종그룹의 경우 1형에 대해 일령별 접종시 4일령(백신접종 3일후)부터, 3형에 대하여 3일령(백신접종 2일후)부터 방어효능을 확인하였다. 미백신접종 그룹 (대조군)의 경우 1형 공격접종 시 일령에 관계없이 폐사를 확인하였으며, 3형공격 접종 시 일령이 어릴수록 폐사가 높게 나타남을 확인하였다.

다. 오리간염 1형과 3형의 혼합생백신 시제품의 안전성 평가

오리간염 혼합백신 10수분을 1일령의 오리에 경구와 피하에 대하여 접종하여 안전성을 평가하였다. 백신 10수분을 접종 후 14일간 증체율 및 임상증상, 폐사율을 관찰하여 안전성을 확인하였다.

접종백신	백신접종법	1주 간 증체량	2주 간 증체량	임상증상	폐사율
1, 3형 혼합백신	PO	189.5	593.9	-	0%
	SC	187.8	590.4	-	0%
-	-	184.4	583.2	-	0%

라. 국내외 기존 시판백신과 혼합백신의 1형과 3형에 대한 방어효과 비교 평가

현재 시판되고 있는 녹십자수의약품 사의 ‘오리간염백신’(이하 시판백신, 1형백신)을 본 과제를 통해 개발한 신규 오리간염 혼합생백신을 비교 진행하고자 하였으나, 타회사의 오리간염 백신을 구할 수 없어서 1형과 3형 단일백신을 생산하여 혼합백신과 비교하였다.

1) 단일백신(1형, 3형 단일)과 혼합백신의 항원량 조사

단일백신과 혼합백신의 1수분당 바이러스 함량을 측정하여 비교하였다. 바이러스 함량은 8일령의 SPF 종란에 접종하여 7일간 폐사율을 관찰하였으며, 접종 24시간 이내에 폐사한 것은 판정에서 제외하였다.

	1형 단일백신	3형 단일백신	1형 & 3형 혼합백신
바이러스 함량	$10^{3.5}$ ELD50/dose	$10^{3.1}$ ELD50/dose	$10^{3.1}$ ELD50/dose

2) 단일백신(1형, 3형 단일)과 혼합백신의 오리간염 1형과 3형 강독주에 대한 방어효능 비교 분석

단일백신(1형, 3형 단일)과 혼합백신의 1수분을 1일령의 오리에 각각 음수로 접종하고 오리간염 1형 강독주(DRL-62)와 오리간염 3형강독주(AP04203)를 경구로 백신접종 후 5일 후 공격접종하여 방어능을 비교하였다.

접종백신	백신접종법	공격접종주	공격접종량	생존수 / 공격접종수	방어율
1형 단일백신	음수	DRL-62 (1형)	$10^{3.2} \text{ELD}_{50}$	14/15	93%
3형 단일백신				5/12	42%
1, 3형 혼합백신				14/15	93%
-				1/10	10%
1형 단일백신		AP04203 (3형)	$10^{3.5} \text{ELD}_{50}$	9/14	64%
3형 단일백신				11/15	73%
1, 3형 혼합백신				13/15	87%
-				3/10	30%

3. 오리간염 혼합생백신 최종시제품 생산 및 현장 평가

가. 오리간염 혼합백신 최종시제품 생산

1) 생산 내역

확립한 제조기술로 아래 3Lot에 대해 제조하였다.

Lot No.	Date of production	Contents (per 1 dose)	Production quantity (1,000doses/bottle)
T315DH01	2015. 09. 11.	DHAV-1(HSB주) $10^{3.5} \text{EID}_{50}$ 이상 DHAV-3(AP04203P100주) $10^{2.5} \text{EID}_{50}$ 이상 보호제 정량	511
T315DH02	2015. 09. 18.	DHAV-1(HSB주) $10^{3.5} \text{EID}_{50}$ 이상 DHAV-3(AP04203P100주) $10^{2.5} \text{EID}_{50}$ 이상 보호제 정량	505
T315DH03	2015. 09. 25.	DHAV-1(HSB주) $10^{3.5} \text{EID}_{50}$ 이상 DHAV-3(AP04203P100주) $10^{2.5} \text{EID}_{50}$ 이상 보호제 정량	508

2) 최종시제품의 일반시험

시험백신을 생산한 직후 시험백신 3 Lot에 대하여 일반시험(특성시험, 진공도시험, 수소이온 농도시험, 함습도시험, 무균시험, 마이코플라즈마 부정시험, 세균시험, 미입 바이러스 부정시험)을 실시하였다. 일반시험 실험 결과 3 Lot 모두 특별한 이상을 발견할 수 없었다.

가) 특성시험

(1) 시험 방법

각 백신 별로 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-01에 따라 2개 이상의 백신에 대하여 색조, 혼탁도, 이물, 이취, 내용물의 균일성에 대하여 검사한다. 색조, 혼탁도, 이물시험은 자연광 또는 1,000 룩스 이상의 백색광선 아래에서 실시하며, 현탁 상태를 검사할 때는 가볍게 흔들어서 용해도, 혼탁도, 색조를 검사하였다.

(2) 시험 결과

모든 백신이 고유의 건조상태가 용이하게 현탁되며, 색조나 혼탁도에 이상이 없고, 이물 및 이취가 없이 성상이 균일하였다.

Group	Tests				
	Color	Turbidity	Sediment	Foreign substance	Foreign odor
T315DH01	-*	-	-	-	-
T315DH02	-	-	-	-	-
T315DH03	-	-	-	-	-

*: Normal or negative

나) 진공도시험

(1) 시험 방법

각 백신 별로 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-02에 따라 암실에서 백신으로부터 5mm 떨어진 위치에 테스트코일을 놓고 방전의 유무를 관찰하였다.

(2) 시험 결과

모든 백신에서 방전이 인정되었다.

Group	Vacuum test
T315DH01	-*
T315DH02	-
T315DH03	-

*: Recognized electric discharge

다) 수소이온농도시험

(1) 시험 방법

각 백신 별로 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-03에 따라 pH 측정기를 이용하여 백신의 pH를 측정하였다.

(2) 시험 결과

모든 백신이 pH는 6.0~8.0 범위 이내 임을 확인하였다.

Group	pH
T315DH01	7.34
T315DH02	7.27
T315DH03	7.26

라) 함습도시험

(1) 시험 방법

각 백신 별로 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-04에 따라 Karl-Fischer method로 백신의 함습도를 측정하여 시험한 성적 중 최고치를 결과값으로 인정하였다.

(2) 시험 결과

모든 백신이 함습도가 검정기준인 6% 이하임을 확인하였다.

Group	Moisture content
T315DH01	4.53%
T315DH02	4.76%
T315DH03	5.12%

마) 무균시험

(1) 시험 방법

각 백신 별로 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-06에 따라 3개 이상의 백신에 대하여 nutrient agar(NA), nutrient broth(NB), fluid thioglycollate medium(Thio)에 각각 2개의 시험관에 접종하여 22℃와 37℃에서 7일간 배양하면서 잡균의 혼입여부를 관찰하였다.

(2) 시험 결과

모든 백신에서 어떠한 세균의 발육도 인정되지 않았다.

Group	22℃			37℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
T315DH01	-*	-	-	-	-	-
T315DH02	-	-	-	-	-	-
T315DH03	-	-	-	-	-	-

*: No growth of any bacteria

바) 마이코플라즈마부정시험

(1) 시험 방법

각 백신 별로 동물용의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-07에 따라 PCR 검색법을 이용하여 마이코플라즈마의 오염을 확인하였다.

(2) 시험 결과

모든 백신에서 PCR 검색법에서 464bp에 증폭산물이 관찰되지 않았다.

Group	PCR test
T315DH01	-*
T315DH02	-
T315DH03	-

*: No amplicon was identified at 464bp

사) 세균시험

(1) 시험 방법

각 백신 별로 동물용 의약품 생물학적제제의 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-08에 따라 살모넬라 부정시험과 생균수시험을 실시하였다.

(2) 시험 결과

모든 백신에서 어떠한 세균의 발육도 인정되지 않았다.

Group	Salmonella test	Viable count test
T315DH01	-*	-
T315DH02	-	-
T315DH03	-	-

*: No growth of any bacteria

아) 미립바이러스 부정시험

(1) 시험 방법

각 백신 별로 오리 간염 바이러스의 고도 면역혈청을 사용하여 백신 바이러스를 완전히 중화하고 중화된 백신을 0.2 mL에 10마리분의 바이러스가 함유되도록 희석하여 10개 이상의 9~11일령 발육계란의 장노막상과 장노막강 및 6일령 발육계란의 난황 내에 각각 0.2 mL씩 접종한다. 장노막강 및 장노막상 접종란은 5일간, 난황내 접종란은 8일간 37°C에서 배양한 후 계태아의 병변 및 닭 적혈구 응집성을 조사하였다. 단, 접종 24시간 이내에 폐사한 것은 판정에서 제외하였다.

(2) 시험 결과

모든 백신에서 계태아는 모두 정상 발육하였고 장노막강액의 적혈구 응집성이나 장노막상의 포크형성이 관찰되지 않았다.

Group	Extraneous virus detection		
	Hemagglutination	Gross lesions	
		Embryo	Chorioallantois
T315DH01	-*	-**	-***
T315DH02	-*	-**	-***
T315DH03	-*	-**	-***

*: Hemagglutination was not detected.

** : Embryonic gross lesion was not observed.

***: Pock or other gross lesion was not observed in chorioallantoic membrane.

3) 최종시제품의 안전 및 효능시험

가) 안전시험

(1) 시험 방법

각 백신 별로 오리 바이러스성 간염에 감수성이 있는 1~3일령 오리 40마리를 사용하여 10마리는 근육으로, 10마리는 피하로, 10마리는 음수로 접종하여 시험군으로, 10마리는 무접종 대조군으로 하여, 시험동물에 백신의 10수분을 사용법에 따라 접종하고 대조군과 같이 14일간 시험하였다.

(2) 시험 결과

모든 백신의 접종 후 시험기간 동안 폐사한 개체 없이 모두 건강하였다.

Group	Route of vaccination	Clinical signs
		(No. of birds positive/No. of birds examined)
T315DH01	IM	0/10
	SC	0/10
	DW	0/10
T315DH02	IM	0/10
	SC	0/10
	DW	0/10
T315DH03	IM	0/10
	SC	0/10
	DW	0/10
Control		0/10

IM: intramuscular injection

SC: subcutaneous injection

DW: drinking water

나) 효능시험

(1) 시험 방법

각 3Lot중에 315DH01에 대하여 오리 바이러스성 간염에 감수성이 있는 1~3일령 오리 음수, 피하 및 근육에 각각 1수분을 사용법에 따라 접종하였다. 백신 접종 3일 후에 DHAV 3형의 병원성 국내 분리주(AP04203, $10^{4.0}$ EID₅₀/bird)를 근육으로 공격접종하고, 백신 접종 5일 후에 DHAV 1형의 병원성 표준주(DRL-62, $10^{3.0}$ EID₅₀/bird)를 근육으로 공격접종한다.

(2) 시험 결과

오리간염 혼합백신을 1일령의 오리에 음수, 피하 및 근육 접종 시에 각 강독주에 대하여 대조군에 비해 우수한 90% 이상의 방어율을 보여주었다. 백신의 접종방법별 각 강독주에 대한 방어는 근육 및 피하 접종이 음수 접종에 비하여 동일한 수준이거나 그 이상임을 확인하였다.

Vaccine	Route of vaccination	Challenge			Survival rate	
		Strain	Titer per dose	Day	Survival / total ^A	Percentage
315DH01	DW	DHAV-1 DRL-62	$10^{3.0}$ EID ₅₀	5 dPV	13/15*	87%
	SC				15/15*	100%
	IM				15/15*	100%
Non-vaccinated control					5/15	33.3%
315DH01	DW	DHAV-3 AP04203	$10^{4.0}$ EID ₅₀	3 dPV	14/15*	93.3%
	SC				15/15*	100%
	IM				15/15*	100%
Non-vaccinated control					6/15	40%

DW: drinking water

SC: subcutaneous injection

IM: intramuscular injection

dPV: days post vaccination

^A: No. of birds alive/No. of birds examined

*: $p < 0.05$, by the Fisher's exact test, compared to non-vaccinated control group

나. 오리간염 혼합백신 최종시제품 현장평가

1) 농림축산검역본부의 임상시험 승인

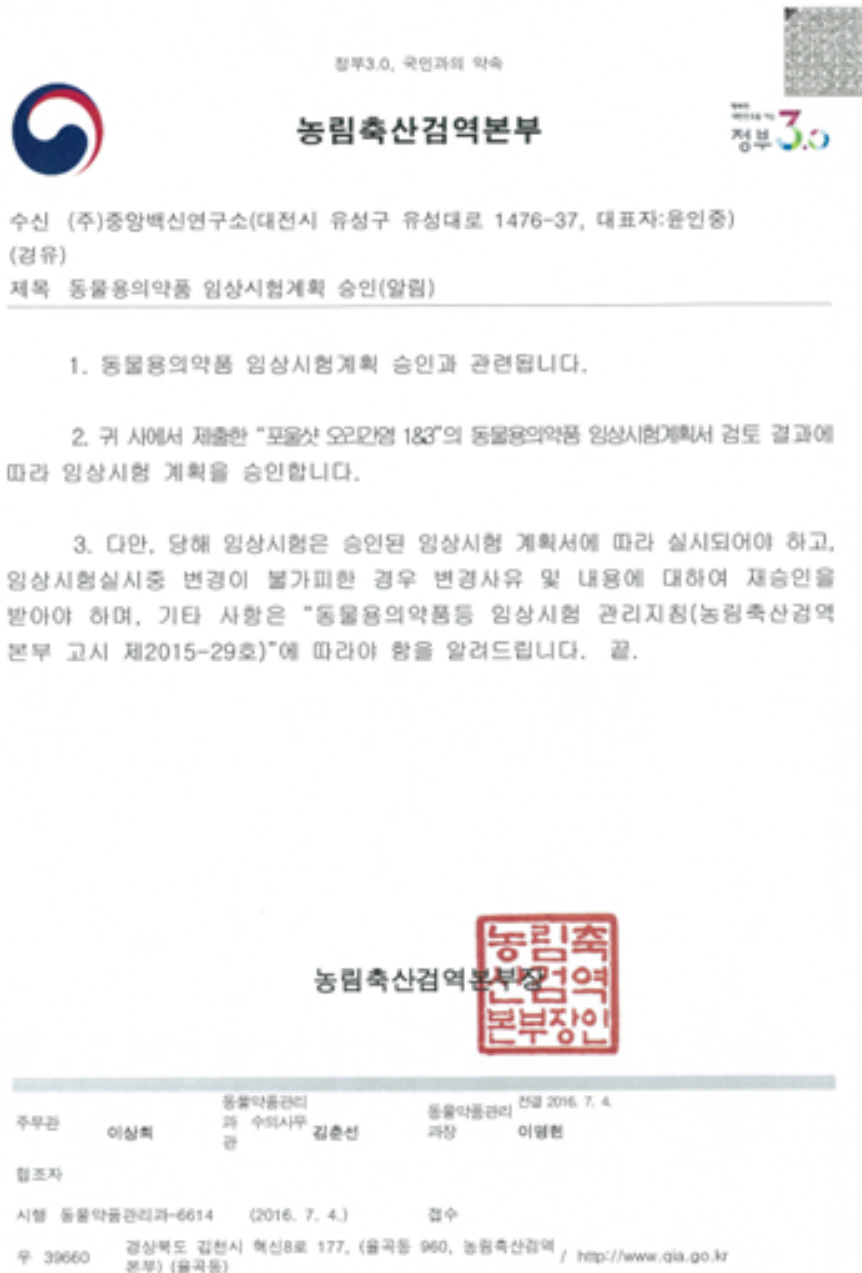
농림축산검역본부 고시 제2015-29, 동물용의약품등 임상시험관리지침에 따라 임상시험(현장평가)를 실시하고자 하는 경우 임상시험계획서를 검역본부장에게 승인을 받아야 한다.

가) 임상시험계획서 제출

농림축산검역본부에 제출하여 검토 후 승인여부 결정

나) 임상시험 승인

제출한 임상시험계획서에 따라 시험 승인(2016.07.04.)



2) 야외임상시험 실시

야외임상시험을 수행하기 위하여 시험농장 3군데(제 1농장, 제 2농장, 제 3농장)을 선정하였으며, “동물약품관리과-6614, 동물용의약품 임상시험계획 승인(2016.07.04.)[근거자료 14.]”에 의거 승인된 계획에 따라 야외임상시험을 실시하였다.

가) 제1농장

(1) 농장개요

농장 정보	농장명	이OO 농장
	농장주	이OO
	연락처	010-8xxx-2xxx
	주소	경상북도 영주시 장수면 호문길 2xx-xx
	사육규모	8,000수
	품종	그리모드
	부화장	모란 부화장
	농장 특이사항	시험백신(T314DH01) 1일령 근육접종
시험백신 관리	Lot No.	T314DH01
	시험수수	8,000수
	백신 사용 후 폐기 방법	백신 공병 및 잔량 백신은 회수 후 산업체 폐기물 처리업자를 통한 폐기
시험오리군에 대한 처리 방법		일반적인 오리 바이러스성 간염 백신의 접종으로 간주하고 정상 출하함

(2) 시험농장의 사전 질병 모니터링

(가) 시험 방법

야외농장실험의 정확성을 보증하기 위하여, 시험실시전에 폐사된 오리의 장기에서에서 오리 간염바이러스(DHAV), Riemerellosis 및 그 밖의 세균에 대하여 3회에 걸쳐서 모니터링을 실시하였다. 오리간염바이러스(DHAV), Riemerellosis은 PCR을 통하여 확인하였으며, 그 밖에 세균을 확인하기 위하여 균분리를 실시하였다.

(나) 시험 결과

시험결과 오리간염바이러스(DHAV), Riemerellosis에 대하여는 음성으로 확인되었으며, 균분리에서는 대장균이 개체별로 확인되었다.

Group	Time	Diseases		
		DHAV	Riemerellosis	Etc.
이OO 농장	20151015	-	-	-
	20160114	-	-	대장균증
	20160414	-	-	-

(3) 시험농장의 안전성 시험

(가) 시험방법

1일령의 오리 8,000수에 시험백신(T314DH01)을 용법 및 용량에 따라서 근육으로 접종하고, 설사, 식욕부진, 접종반응 등 임상증상을 무접종 대조군 100수와 비교하였다.

(나) 시험결과

백신접종후 매일 폐사되는 개체수를 기록하여 확인한 결과 14일까지 입추후 초기에는 정상 폐사 범위에서 폐사가 발생되었으며, 백신접종에 의한 임상증상은 관찰할 수 없었다.

Lot No.	Observation time	Group	Clinical signs(%)*				
			Diarrhea	Anorexia	Hypersensitivity	Death	Vaccination reaction
T314DH01	1 dPV	Vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	0.8%	0.0%
		Non-vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	2.0%	0.0%
	7 dPV	Vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	2.1%	0.0%
		Non-vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	3.0%	0.0%
	14 dPV	Vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	2.4%	0.0%
		Non-vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	4.0%	0.0%

dPV: days post vaccination

*누적 임상증상 발현율

(4) 시험농장의 폐사율

(가) 시험방법

시험백신이 농장의 폐사율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 1일령의 오리에 백신 1수분을 근육접종법으로 접종하고, 주령별로 폐사율을 확인하였다.

(나) 시험결과

출하 전까지의 폐사율을 확인한 결과, 정상 폐사 범위에서 폐사가 발생되었으며, 폐사 원인은 약추, 관절염 급사 등으로 백신접종에 의한 폐사는 관찰할 수 없었다.

Lot No.	Weeks of age	Test group (8000 ducks)	
		No. of dead ducks*	Mortality (%)**
T314DH01	1	168	2.10%
	2	193	2.41%
	3	208	2.60%
	4	219	2.74%
	5	228	2.85%
	Slaughter age	238	2.98%
Total		238	2.98%

*누적 폐사수

**누적 폐사율

(5) 시험농장의 효능시험

(가) 시험방법

시험백신을 접종한 농가의 출하성적을 백신을 실시하지 않은 이전 오리군의 성적과 비교한다.

(나) 시험결과

시험군의 출하일령, 출하시 평균체중, 사료 변환비율, 생존률, 생산지수 등의 모든 출하성적이 이전 계군의 출하성적에 비하여 큰 차이가 없었으며, 정상범위의 출하성적으로 확인되었다.

Group	Slaughter age	Live weight on slaughter age(kg)	FCR	Liveability (%)	Production index
Vaccinated ¹⁾	43	3.6	1.77	97	458.8
Control ²⁾	42	3.4	1.79	94.9	429.2

FCR : feed conversion ratio

Production index : (Livability x Live Weight in kg) x 100/ (Age in Days x FCR)

1) 입추일: 2016.08.25.

2) 입추일: 2016.03.24.

나) 제2농장

(1) 농장개요

농장 정보	농장명	김△△ 농장
	농장주	김△△
	연락처	010-8xxx-3xxx
	주소	전라남도 무안군 현경면 현해로 1xx-xx
	사육규모	30,000수
	품종	체리베리
	부화장	여주 부화장 외
	농장 특이사항	시험백신(T314DH02) 1일령 피하접종
시험백신 관리	Lot No.	T314DH02
	시험수수	12,000수
	백신 사용 후 폐기 방법	백신 공병 및 잔량 백신은 회수 후 산업체 폐기물 처리업자를 통한 폐기
시험오리군에 대한 처리 방법		일반적인 오리 바이러스성 간염 백신의 접종으로 간주하고 정상 출하함

(2) 시험농장의 사전 질병 모니터링

(가) 시험 방법

야외농장실험의 정확성을 보증하기 위하여, 시험실시전에 폐사된 오리의 장기에서에서 오리 간염바이러스(DHAV), Riemerellosis 및 그 밖의 세균에 대하여 3회에 걸쳐서 모니터링을 실시하였다. 오리간염바이러스(DHAV), Riemerellosis은 PCR을 통하여 확인하였으며, 그 밖에 세균을 확인하기 위하여 균분리를 실시하였다.

(나) 시험 결과

시험결과 오리간염바이러스(DHAV), Riemerellosis에 대하여는 음성으로 확인되었으며, 균분리에서는 대장균이 개체별로 확인되었다.

Group	Time	Diseases		
		DHAV	Riemerellosis	Etc.
김△△ 농장	20151112	-	-	대장균증
	20160225	-	-	-
	20160519	-	-	-

(3) 시험농장의 안전성 시험

(가) 시험방법

1일령의 오리 12,000수에 시험백신(T314DH02)을 용법 및 용량에 따라서 피하로 접종하고, 설사, 식욕부진, 접종반응 등 임상증상을 무접종 대조군 100수와 비교하였다.

(나) 시험결과

백신접종 후 매일 폐사되는 개체수를 기록하여 확인한 결과 14일까지 입추 후 초기에는 정상 폐사 범위에서 폐사가 발생되었으며, 백신접종에 의한 임상증상은 관찰할 수 없었다.

Lot No.	Observation time	Group	Clinical signs(%)*				
			Diarrhea	Anorexia	Hypersensitivity	Death	Vaccination reaction
T314DH02	1 dPV	Vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	1.0%	0.0%
		Non-vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	1.0%	0.0%
	7 dPV	Vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	2.6%	0.0%
		Non-vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	2.0%	0.0%
	14 dPV	Vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	3.4%	0.0%
		Non-vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	4.0%	0.0%

dPV: days post vaccination

*누적 임상증상 발현율

(4) 시험농장의 폐사율

(가) 시험방법

시험백신이 농장의 폐사율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 1일령의 오리에 백신 1수분을 피하접종법으로 접종하고, 주령별로 폐사율을 확인한다.

(나) 시험결과

출하 전까지의 폐사율을 확인한 결과, 정상 폐사 범위에서 폐사가 발생되었으며, 폐사 원인은 약추, 관절염 급사 등으로 백신접종에 의한 폐사는 관찰할 수 없었다.

Lot No.	Weeks of age	Test group (12,000 ducks)	
		No. of dead ducks*	Mortality (%)**
T314DH02	1	309	2.58%
	2	413	3.44%
	3	485	4.04%
	4	503	4.19%
	5	523	4.36%
	Slaughter age	538	4.48%
Total		538	4.48%

*누적 폐사수

**누적 폐사율

(5) 시험농장의 효능시험

(가) 시험방법

시험백신을 접종한 농가의 출하성적을 백신을 실시하지 않은 이전 오리군의 성적과 비교한다.

(다) 시험결과

시험군의 출하일령, 출하시 평균체중, 사료 변환비율, 생존률, 생산지수 등의 모든 출하성적이 이전 계군의 출하성적에 비하여 큰 차이가 없었으며, 정상범위의 출하성적으로 확인되었다.

Group	Slaughter age	Live weight on slaughter age(kg)	FCR	Liveability (%)	Production index
Vaccinated ¹⁾	43	3.5	1.76	95.6	442.1
Control ²⁾	41	3.3	1.77	94.7	430.6

FCR : feed conversion ratio

Production index : (Livability x Live Weight in kg) x 100/ (Age in Days x FCR)

1) 입추일 : 2016.09.22.

2) 입추일 : 2016.04.28.

다) 제3농장

(1) 농장개요

농장 정보	농장명	나□□ 농장
	농장주	나□□
	연락처	010-5xxx-1xxx
	주소	전라남도 함평군 대동면 주평길 xx
	사육규모	30,000수
	품종	체리베리
	부화장	여주 부화장 외
	농장 특이사항	시험백신(T314DH03) 1일령 음수접종
시험백신 관리	Lot No.	T314DH03
	시험수수	30,000수
	백신 사용 후 폐기 방법	백신 공병 및 잔량 백신은 회수 후 산업체 폐기물 처리업자를 통한 폐기
시험오리군에 대한 처리 방법		일반적인 오리 바이러스성 간염 백신의 접종으로 간주하고 정상 출하함

(2) 시험농장의 사전질병 모니터링

(가) 시험방법

야외농장실험의 정확성을 보증하기 위하여, 시험실시전에 폐사된 오리의 장기에서에서 오리 간염바이러스(DHAV), Riemerellosis 및 그 밖의 세균에 대하여 3회에 걸쳐서 모니터링을 실시하였다. 오리간염바이러스(DHAV), Riemerellosis은 PCR을 통하여 확인하였으며, 그 밖에 세균을 확인하기 위하여 균분리를 실시하였다.

(나) 시험 결과

시험결과 오리간염바이러스(DHAV), Riemerellosis에 대하여는 음성으로 확인되었으며, 균분리에서는 대장균이 개체별로 확인되었다.

Group	Time	Diseases		
		DHAV	Riemerellosis	Etc.
나□□ 농장	2015108	-	-	대장균증
	20160107	-	-	대장균증
	20160407	-	-	-

(3) 시험농장의 안전성 시험

(가) 시험방법

1일령의 오리 30,000수에 시험백신(T314DH03)을 용법 및 용량에 따라서 음수로 접종하고, 설사, 식욕부진, 접종반응 등 임상증상을 무접종 대조군 100수와 비교하였다.

(나) 시험결과

백신접종후 매일 폐사되는 개체수를 기록하여 확인한 결과 14일까지 입추후 초기에는 정상 폐사 범위에서 폐사가 발생되었으며, 백신접종에 의한 임상증상은 관찰할 수 없었다.

Lot No.	Observation time	Group	Clinical signs(%)*				
			Diarrhea	Anorexia	Hypersensitivity	Death	Vaccination reaction
T314DH03	1 dPV	Vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	1.9%	0.0%
		Non-vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	3.0%	0.0%
	7 dPV	Vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	2.8%	0.0%
		Non-vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	4.0%	0.0%
	14 dPV	Vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	3.5%	0.0%
		Non-vaccinated	0.0%	0.0%	0.0%	5.0%	0.0%

dPV: days post vaccination

*누적 임상증상 발현율

(4) 시험농장의 폐사율

(가) 시험방법

시험백신이 농장의 폐사율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 1일령의 오리에 백신 1수분을 음수접종법으로 접종하고, 주령별로 폐사율을 확인한다.

(나) 시험결과

출하 전까지의 폐사율을 확인한 결과, 정상 폐사 범위에서 폐사가 발생되었으며, 폐사 원인은 약추, 관절염 급사등으로 백신접종에 의한 폐사는 관찰할 수 없었다.

Lot No.	Weeks of age	Test group (30,000 ducks)	
		No. of dead ducks*	Mortality (%)**
T314DH03	1	841	2.80%
	2	1045	3.48%
	3	1166	3.89%
	4	1261	4.20%
	5	1346	4.49%
	Slaughter age	1420	4.73%
Total		1420	4.73%

*누적 폐사수

**누적 폐사율

(5) 시험농장의 효능시험

(가) 시험방법

시험백신을 접종한 농가의 출하성적을 백신을 실시하지 않은 이전 오리군의 성적과 비교한다.

(나) 시험결과

시험군의 출하일령, 출하시 평균체중, 사료 변환비율, 생존률, 생산지수 등의 모든 출하성적이 이전 계군의 출하성적에 비하여 큰 차이가 없었으며, 정상범위의 출하성적으로 확인되었다.

Group	Slaughter age	Live weight on slaughter age(kg)	FCR	Liveability (%)	Production index
Vaccinated ¹⁾	43	3.5	1.78	95.3	435.8
Control ²⁾	43	3.4	1.80	94.2	413.8

FCR : feed conversion ratio

Production index : (Livability x Live Weight in kg) x 100/ (Age in Days x FCR)

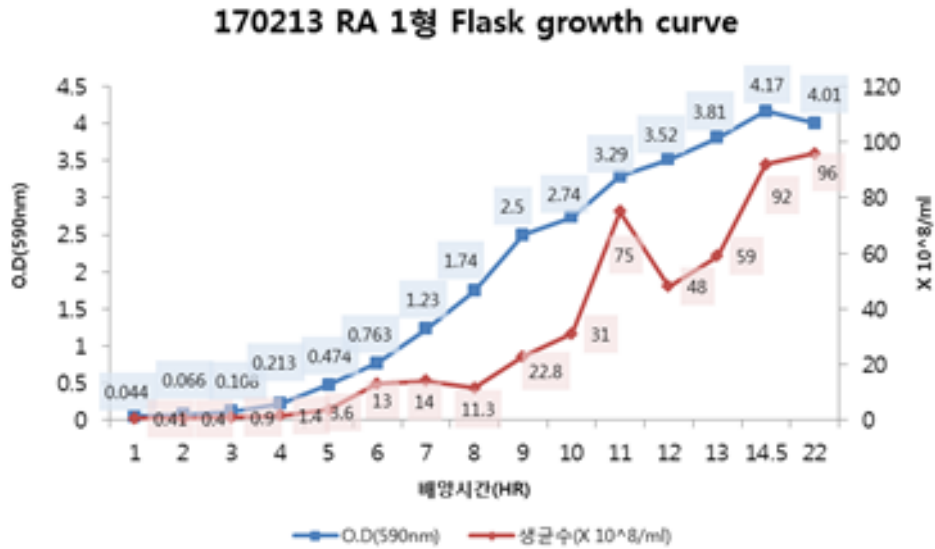
1) 입추일 : 2016.08.18.

2) 입추일 : 2016.03.17.

다. 리메렐라 생백신 시제품 적용법 확립
후보균주에 대한 배양적응능 확인하였음

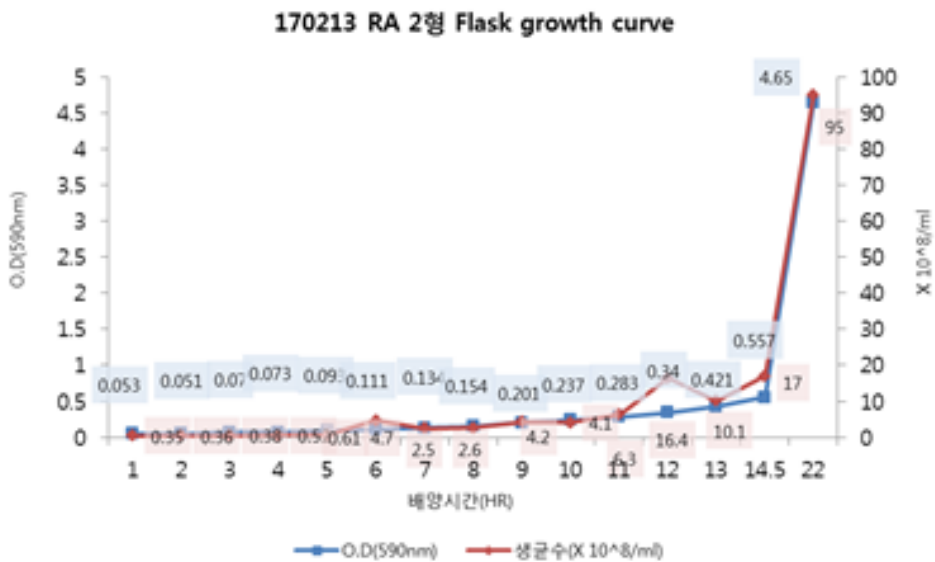
1) 1형 백신주

최종 생균수에 대해 ml당 9.6×10^8 CCU 확인되었다.

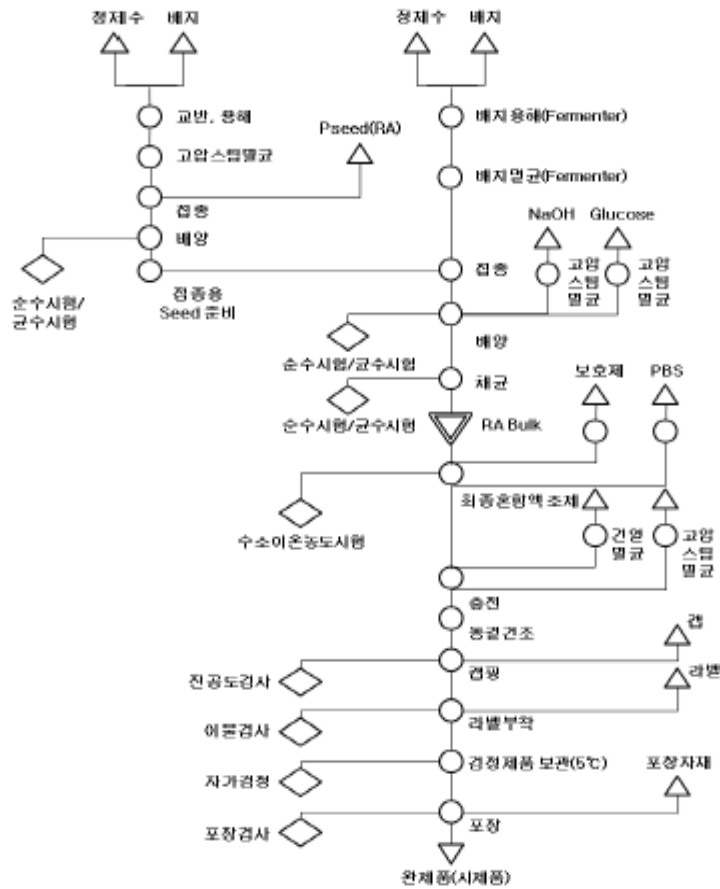


2) 2형 백신주

최종 생균수에 대해 ml당 9.5×10^8 CCU 확인되었다.



3) 생산기술 확립



라. 오리리메렐라 혼합백신 최종시제품 생산 및 현장평가

1) 오리리메렐라 혼합백신 최종시제품 생산

Lot No.	Date of production	Contents (per 1 dose)	Production quantity (200doses/bottle)
T317RAC 03	2017. 08. 18.	RA Type 1(D15-RDA-92) 10 ⁸ CCU 이상 RA Type 2(D14-RDA-8) 10 ⁷ CCU 이상 보호제 정량	221
T317RAC 04	2017. 08. 21.	RA Type 1(D15-RDA-92) 10 ⁸ CCU 이상 RA Type 2(D14-RDA-8) 10 ⁷ CCU 이상 보호제 정량	234
T317RAC 05	2017. 08. 23.	RA Type 1(D15-RDA-92) 10 ⁸ CCU 이상 RA Type 2(D14-RDA-8) 10 ⁷ CCU 이상 보호제 정량	267

2) 농림축산검역본부의 임상시험 승인

농림축산검역본부 고시 제2015-29, 동물용의약품등 임상시험관리지침에 따라 임상시험(현장 평가)를 실시하고자 하는 경우 임상시험계획서를 검역본부장에게 제출해야한다.

가) 임상시험계획서 제출

2017. 09월 임상시험계획서 농림축산검역본부 제출

나) 임상시험 승인

2017년 하반기~2018년 상반기내에 리메렐라 야외임상시험 승인

3) 오리리메렐라 혼합백신의 최종시제품 현장평가

농림축산 검역본부의 야외임상시험 승인 이후에 야외3농장에 대해서 최종 시제품인 3Lot를 현장평가 적용

라. 개발백신 2종 산업화

1) 산업화를 위한 단계 설명

산업화를 위해 임상시험승인 → 허가승인 → 제품출시(국가검정 합격)이라는 3단계로 진행

2) 임상시험 승인

가) 진행단계

임상시험계획서 제출 → 농림축산검역본부 검토(40일) → 기술검토의견 알림 → 임상시험보완계획서 제출 → 농림축산검역본부 검토(40일) → 야외임상시험 승인

나) 진행상황

오리간염 혼합백신은 2016.07.04. 야외임상시험 승인 완료

오리리메렐라 혼합백신은 2017년 하반기~2018년 상반기에 야외임상시험 승인

3) 허가승인

가) 진행단계

승인받은 임상시험계획서에 따라 야외임상시험을 실시한 후 허가서류 제출 → 농림축산검역본부 검토(90일) → 기술검토의견 알림 → 허가보완서류 제출 → 농림축산검역본부 검토(60일) → 허가승인

나) 진행상황

오리간염 혼합백신은 야외임상시험을 실시하여 허가서류 제출 완료(2017.06.16. 제출완료) → 기술검토의견 알림(2017.10.27.)

오리리메렐라 혼합백신은 야외임상승인 이후에 2018년도에 야외임상시험을 실시

4) 제품출시

가) 진행단계

대량생산(2달) → 자가검정 시험(2달) → 국가출하승인 시험(3달) → 제품 출시

나) 진행상황

제품의 허가승인 이후에 진행 예정(2020년 예상)

4. 개발백신 현장검증 및 산업화

가. 오리간염 혼합생백신 현장 검증 및 산업화

1) 오리간염 혼합생백신 현장 검증

가) 오리간염 혼합생백신 최종시제품의 현장평가를 위해 종오리 백신프로그램인 구축 국외(미국, 프랑스)의 경우, 오리간염의 예방을 위해 종오리 백신프로그램을 구축하여 권장하고 있으며, 이를 분석하고 수정·보완하여 국내 실정에 맞는 프로그램을 개발하였다.

[1안]

목적	일령	접종방법	타입
종오리 자체면역	1일령	근육	Live
모체이행항체부여	12주령	음수	
	18주령	음수	

총 3회 백신으로 1일령 근육접종으로 종오리 자체면역을 부여하고, 이후 시산 전 12주령과 18주령에 2회의 음수백신을 실시하여 후대병아리에 모체이행항체에 의한 면역능을 유도할 수 있다.

[2안]

목적	일령	접종방법	타입
종오리 자체면역	1일령	근육	Live
모체이행항체부여	12주령	음수	
	18주령	음수	
	40주령	음수	
	60주령	음수	

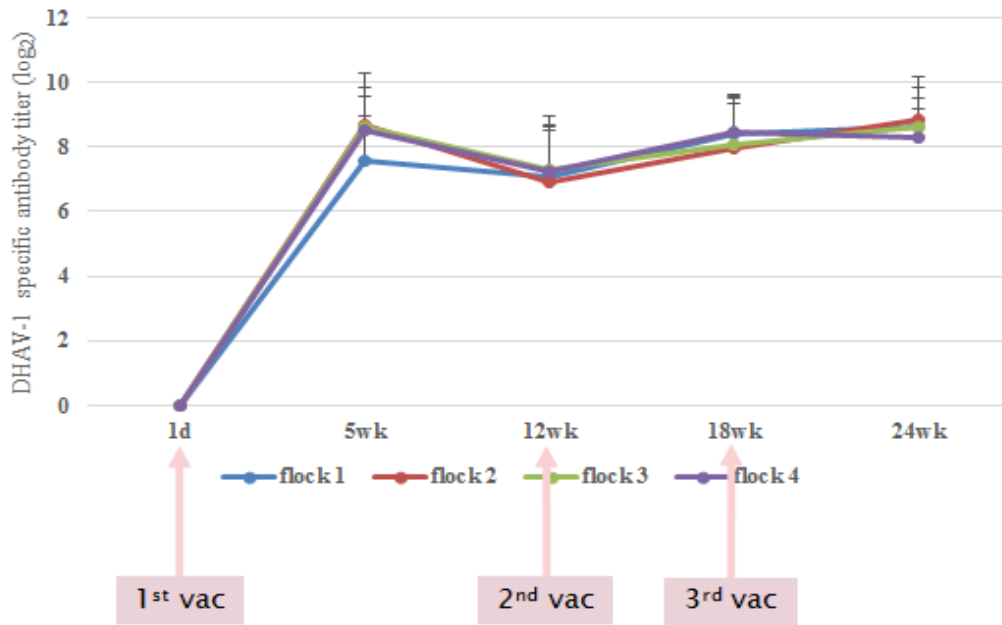
총 5회 백신으로 시산 전 3회 백신은 [1안]과 동일하게 실시하고, 이후 시산 후에 40주령과 60주령에 2회의 음수백신으로 추가적인 면역을 부여하여 후대병아리에 모체이행항체에 의한 면역능을 보다 지속적으로 유도할 수 있다

나) 오리간염 혼합생백신 최종시제품의 현장평가를 위해 종오리 백신프로그램 적용 종오리 백신프로그램의 적용을 위해 총 8,000수, 8개동 종오리 농장의 4개동 약 4000수에 백신을 적용하였다. [1안]의 3회 백신 프로그램을 적용하여, 1일령에 개체별 근육접종을 실시하고 이후 12주령과 18주령에 음수접종을 실시하였다. 모체 및 후대병아리의 혈청을 채취하여 중화항체가 검사로 오리간염 1형의 항체를 평가하였고, 후대병아리의 오리간염 1형 공격접종을 통한 방어효능평가를 실시하였다.

백신동과 비백신동의 증체율 및 산란율 비교평가를 통해 생산성에 차이가 없음을 확인하였

고, 이를 통해 백신프로그램의 적용에 따른 생산성 부분에 영향이 없음을 확인하였다.

(1) 모체의 항체가 평가



모체의 항체가 평가를 위해, 1일령, 5주령, 12주령, 18주령, 24주령에 동별로 20수씩 4개동 총 80수의 혈청을 채취하여, 중화항체시험을 실시하였다. 1일령 근육접종 후 5주령에 평균 약 8 log₂의 항체가를 확인하였고, 이후 12주령에 다소 감소하였으나 12주령 2차접종 후 반등하여 18주령 3차백신 이후 24주령에는 8 log₂ 이상의 항체가를 유지하였다. 이는, 국외의 종오리백신평가 문헌자료(P.R. Woolcock, 1991)에서 확인된 후대병아리의 방어를 위한 최소항체가 6 log₂ 이상의 모체항체수준을 확인한 결과이다. 또한, 4개동의 검사결과에서 같은 시기에 동별로 거의 유사한 모체항체가를 보여, 대규모 백신적용이 고르게 이루어 졌음을 확인할 수 있었다.

(2) 모체에서 후대병아리로의 항체 전달률 평가

Egg collection(w)	VN titer(log ₂)		Transfer percentage(%)
	breeder ducks ^A	Progeny ^B	
24	8.4	5.2	11

A : Number of the breeder ducks is 80

B : Number of the progeny(1d) is 30

모체 24주령 80수와 이 시기에 낳은 알을 부화하여 얻은 후대병아리 30수의 항체가를 측정하여 그 전달률을 수식(Hamal et al., 2006; Gharaibeh et al., 2008)에 따라 계산한 결과, 오리 간염 백신의 모체이행항체 전달률은 11%임을 확인하였다.

(3) 모체이행항체의 반감기 평가

Group ^A	Age(day) / Mean SN antibody titer(log ₂)				
	1	5	10	15	20
Nonvaccinated	0	0	0	0	0
Vaccinated	6.3±1.61 ^B	4.9±2.58	3.4±2.28	2.21±1.81	0

A : Number of sample per group is 38

B : mean±SD

모체이행항체의 반감기를 평가하기 위해, 후대병아리 38수를 유지하여 1일령부터 20일령까지 5일 간격으로 총 5회 혈청을 채취하여 중화항체시험을 실시하였다.

1일령에 평균 6.3 log₂를 나타내고 이후 지속적으로 감소하였다. 반감기 계산을 위해 일령별 항체가를 이용하여 선형의 감소 그래프를 만들고 수식(Dalby et al., 2010; Leerdam and Arts, 2011)에 따라 계산하여, 모체이행항체의 반감기는 3-5일령임을 확인하였다.

(4) 모체이행항체에 의한 후대병아리의 방어효능평가

모체이행항체에 의한 후대병아리의 공격접종 방어효능평가와 방어항체가의 평가를 위해 2회의 시험을 실시하였다. 오리간염 1형으로 각 일령에 공격접종 하였고, 1형에 대한 중화항체가를 평가하였다.

[1차시험]

Parameter	N-con	Challenge at 1d	
		P-con	Vac
Survival rate(%)	20/20	2/20(10)	20/20(100)
Mean SN antibody titer(log ₂) ^A	0	0	5.1

A : Serum antibody titer before challenge

[2차시험]

Parameter	N-con	Age(day) / Challenge					
		1		7		14	
		P-con	Vac	P-con	Vac	P-con	Vac
Survival rate(%)	20/20	2/20(10)	32/32(100)	0/20(0)	28/28(100)	1/10(10)	20/20(100)
Mean SN antibody titer(log ₂) ^A	0	0	7.2	0	4.5	0	2.1

A : Serum antibody titer before challenge

1차시험은 후대병아리 1일령 20수에 공격접종하여 100%방어하였고, 이때의 후대병아리 항체가는 5.1 log₂임을 확인하였다.

2차시험은 후대병아리 1일령, 7일령, 14일령에 각각 32수, 28수, 20수를 공격접종한 결과 1일령에서 14일령까지 100% 방어가 가능함을 확인하여, 백신에 의해 유도된 모체이행항체로 후대병아리 14일령까지 방어가 가능함을 확인하였다. 또한 이때 후대병아리의 방어항체는 각각 평균 $7.2 \log_2$, $4.5 \log_2$, $2.1 \log_2$ 를 나타냈다.

제 3 절 총괄 연구내용 요약 및 종합평가

1. 오리리메렐라감염증 생백신 개발 및 산업화

가. 총 연구내용 및 결과 요약

본 연구는 오리에 치명적인 질병을 일으키는 오리리메렐라감염증 예방을 위한 생백신 개발 연구로 국내의 오리리메렐라 발생현황을 조사하고 야외주의 특성을 분석하여 국내 오리리메렐라 발생상황에 적합한 생백신주를 선발하고 2종 혼합생백신을 개발하였다. 오리리메렐라 생백신 개발을 위해 2010년부터 2015년까지 국내 177개의 육용 및 종오리 농장에서 리메렐라 분포율을 조사한 결과 46.3%의 농장에서 양성을 확인하였다. 야외주 혈청형 분석에서는 19종의 다양한 혈청형이 확인되었으며 그 중 1형과 2형의 빈도가 가장 높았으며 2종 유행 혈청형에 대한 백신개발 등 대응방안이 필요할 것으로 사료된다. 혈청형별 병원성을 알아보기 위해 국내 리메렐라 야외주에 대해 chicken embryo lethality assay 및 오리에 공격접종을 통하여 병원성을 평가하였다. 그 결과 1, 2, 5, 7형 등은 오리에서 100% 폐사를 일으키는 고병원성이었으며 6형 및 11형 은 중병원성으로 확인되었다. 이를 통해 국내 야외주는 1 및 2형이 가장 많이 분포하고 있을 뿐만 아니라 고병원성 혈청형으로 확인되어 1, 2형에 대한 백신개발이 필요할 것으로 판단하였다.

국내 고병원성 유행혈청형인 1형 및 2형에 대한 생백신을 개발하기 위해 1형 및 2형 생백신 후보주를 선발하였다. chicken embryo lethality assay를 이용하여 저병원성주를 선발하였으며 1차 목적동물실험을 통해 방어효능이 있는 후보주를 선발하였다. 1형의 경우 D14-RDA-92 균주가 50%의 방어율을 보였고 2형의 경우 D14-RDA-8 균주가 100%의 방어효능을 보였다. 따라서 각 후보주에 대해 접종경로별로 방어효능을 평가하고 최소유효농도를 평가한 결과 음수로 적용 시 더 좋은 방어효능을 보였다. 1형 후보주는 10^8 CFU/dose, 2형 후보주의 경우 10^7 CFU/dose로 음수접종 시 최소유효농도를 설정하였다. 각 후보주의 안전성을 평가한 결과 1, 10, 100에서 임상증상, 폐사, 육안적 및 조직학적 병변이 확인되지 않았으며 체중측정 결과 생산성에도 영향을 주지 않아 최종 생백신주로 선발하였다.

1형 및 2형 혼합생백신을 개발하기 위해 두 후보주간의 최적 혼합비율 선정과 안전성 평가를 수행하였다. 단일 백신주 1 dose(1형 : 10^8 CFU/dose, 2형 : 10^7 CFU/dose)를 기준으로 1:1, 1:5, 5:1, 5:5로 혼합비율을 설정하여 방어효능을 확인하였다. 그 결과 1형의 경우 혼합비율 4그룹에서 모두 1형 단일백신(PI 50%) 대비 방어효능의 상승효과(PI 60-70%)를 확인하였으며 혼합백신 그룹간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 2형의 경우 단일백신과 유사하게 80% 이상의 높은 방어효능을 확인하였다. 따라서 최소량으로 최선의 방어효능을 낼 수 있는 1:1 (1형 : 10^8 CFU/dose, 2형 : 10^7 CFU/dose) 비율로 혼합백신의 1 dose로 설정하였다. 혼합백신의 1, 10, 100 dose에서 안전성을 평가한 결과 2회 백신 후 14일간 관찰하였을 때 모든 그룹에서 임상증상, 폐사가 나타나지 않았으며 체중에도 영향을 주지 않았다. 14일 후 부검을 실시하여 육안적 및 조직학적 병변을 확인한 결과 모두 정상소견을 나타내었다. 또한, 혼합백신의 면역유도능 평가를 위해 호흡기 및 소화기 점막인 trachea 및 duodenum에서 IgA를 측정한 결과 백신을 하지 않은 그룹에 비해 모두 유의적인 상승을 확인하였다. 결론적으로 본 연구를 통해 국내 오리리메렐라의 유행주 및 병원성을 확인하였으며 이를 토대로 오리리메렐라 2종 혼합 생백신 개발을 수행하여 국내 리메렐라 고병원성 유행혈청형에 대한 대응방안을 마련하였다.

나. 대표적 연구성과

1) 정성적 연구성과

가) 국내 오리리메렐라 유행혈청형 분석

국내 오리리메렐라의 유행혈청형 분석 결과 1형 15.6%(21/135), 11형 11.9%(16/135), 2형 8.9%(12/135), 6형 5.2%(7/135), 5형 0.7%(1/135) 및 7형 0.7%(1/135) 순으로 분포하고 있음을 확인하였다. 병원성 혈청형 중 1형 및 2형은 전세계적으로 고병원성 혈청형으로 국내에서도 가장 많은 분포를 차지하고 있는 유행혈청형으로 확인되었다.

나) 국내 오리리메렐라 병원성 분석

국내에서 확인된 19종(단일 10종 : 1, 2, 5, 6, 7, 11, 13, 14, 17, 19; 복합 9종 : 4, 13, 14 등)의 혈청형별로 병원성을 분석한 결과 1, 2, 5, 7형은 오리에서 100% 폐사를 유발하는 고병원성 혈청형으로 확인되었고 6, 11형은 약 60%의 폐사를 유발하는 중병원성 혈청형으로 확인되었다. 또한 주로 인후두에서 분리된 복합혈청형인 경우 오리에서 임상증상 및 폐사를 유발하지 않는 비병원성주로 확인되어 국내 리메렐라의 혈청형별 병원성을 파악하였다.

다) 오리리메렐라 생백신 후보주 2종 선발

고병원성 유행 혈청형인 1형 및 2형에 대한 저병원성 생백신 후보주를 선발하였다. 1형과 2형 후보주(D15-RDA-92, D14-RDA-8)는 오리에 1, 10, 및 100dose 백신 시에도 임상증상이나 폐사를 일으키지 않는 안전한 생백신 후보주이며 방어율의 경우 각각 50%, 100%의 방어효능을 보이는 후보주를 선발하였다.

라) 오리리메렐라 혼합 생백신 개발

저병원성 생백신 후보주 2종에 대해 혼합 음수생백신을 개발하기 위해 혼합비율별 방어효능을 확인한 결과 1형 10^8 CFU/dose, 2형 10^7 CFU/dose로 혼합 시 각각 60-70%, 80-100%의 높은 방어효능을 확인하였다. 특히 1형의 경우 단독백신일 때보다 방어율이 증가하여 2형에 의한 방어능의 상승효과를 기대할 수 있었다. 또한, 1, 10, 및 100dose에서 안전성을 평가한 결과 임상증상이나 폐사가 나타나지 않고 체중에도 영향을 주지 않으며 육안병변 및 조직학적 병변도 모두 정상으로 확인되었다. 따라서 본 연구를 통해 안전하고 효능이 우수한 혼합백신을 개발하였다.

2) 종합평가 및 향후 발전방향

본 연구에서는 국내에 유행하는 오리리메렐라 고병원성 혈청형을 예방하기 위한 생백신 개발연구로 국내에서는 처음 오리리메렐라에 대한 생백신을 개발하였다. 본 연구를 통해 국내 유행 혈청형에 대한 분석과 병원성을 파악하여 위험성을 분석하였으며 고병원성 1형 및 2형을 예방할 수 있는 생백신 후보주를 2종을 선발하였다. 최종 선정된 리메렐라 백신 후보군주 2개 Type(1형, 2형)을 대량공정이 가능한 수준으로 배양하고, 최종 시제품 3Lot를 생산하였다. 생산한 시제품에 대하여 일반시험, 안전시험, 효능시험을 평가할 예정이다. 내부시험에서 안전, 안정, 효능을 확인한 최종 시제품에 대해 야외임상시험을 통한 현장평가를 수행하고자, 농림축산검역본부에 임상시험계획서를 2017.09월에 제출 예정이며, 승인 이후에 야외임상시험을 진행할 예정이다. 산업화를 위해 야외임상실시 이후 허가서류, 국가검정 합격을 통해 2020년에 산

업화되어 오리농가의 오리리메렐라감염증 예방을 위해 사용이 가능할 것으로 예상된다. 1형 및 2형 혼합 음수생백신을 개발하여 고병원성 유행주에 대한 예방책을 마련했을 뿐 아니라 농장에 적용이 용이한 음수백신으로 실효성이 높은 백신을 개발하였다. 향후 리메렐라 혼합생백신을 산업화하여 농장에 적용한다면 국내 유행하는 고병원성 오리리메렐라로 인한 경제적 피해를 줄일 수 있으며 과도한 항생제 사용을 줄이는데 도움이 될 것으로 판단된다.

3) 시제품 사진



오리리메렐라 1형 단독백신



오리리메렐라 2형 단독백신



오리리메렐라 1&2형 혼합백신

4) 상품화 사진(예시)



2. 오리간염 혼합생백신 및 산업화

가. 총 연구내용 및 결과 요약

1) 오리간염 관련 연구

본 연구는 오리에 폐사, 침울, 신경증상 등을 유발하는 오리간염 예방을 위한 생백신 개발 연구로 농림축산검역본부로부터 분양받은 균주 오리간염 1형(HSB), 오리간염 3형(AP04203P10 0주)을 이용하여 2종 혼합생백신을 개발하였다.

각 항원에 대한 제조공법 개발을 통해 최소면역원량 오리간염 1형 백신주는 1수분당 $10^{3.0}$ ELD₅₀ 이상, 오리간염 3형 백신주는 1수분당 $10^{2.0}$ ELD₅₀ 이상을 충족하기 위하여 종란접종일령, 접종량별, 바이러스 수확방법별 바이러스 증식능력을 비교하여 최적의 배양조건을 확립하였다. 확립된 배양조건을 토대로 동결건조시 바이러스 역가감소를 최소화하기 위한 동결건조제제 비교실험을 실시하여 보호제 SorPGG로 선정하였다.

최종 확립된 제조공법을 이용하여 단일백신과 혼합백신을 생산하여 백신의 안정성 평가를 보관기관별로 바이러스 함량을 확인한 결과, 제조 18개월까지 바이러스 함량을 유지하였다. 각

각의 단일백신을 대조백신으로 혼합백신과의 간섭여부를 확인하고자 혈청혈병 강독주에 대한 방어능을 확인하였다. 확인결과, 각 강독주에 대한 방어능은 혼합백신이 각 혈청형별 단독백신 및 대조군에 비하여 방어능이 동일한 수준이거나 그 이상임을 확인하여, 오리간염 혼합백신을 1일령의 오리에 적용 시 혼합된 항원간의 간섭으로 인한 효력저하가 없음이 확인되었다.

혼합백신에 대한 효능평가를 진행하고자 접종경로(음수, 피하, 분무)별 실시한 결과, 오리간염 혼합백신을 1일령의 오리에 음수 및 피하 접종 시에 혈청형별 강독주에 대하여 대조군에 비해 우수한 85% 이상의 방어율을 보여주었으며, 백신의 접종방법별 혈청형별 강독주에 대한 방어는 피하 접종이 음수 접종에 비하여 동일한 수준이거나 그 이상임을 확인하였다. 그러나 분무접종의 경우 60% 정도 방어능을 보여 피하나 음수에 비해 방어능이 낮음을 확인하였다.

오리 간염은 감염 이후 잠복기는 1일 이내로 빠르며, 감염 후 4일에 걸쳐 집중적으로 폐사가 발생한다. 폐사율은 감염일령에 따라 다양하며, 1주령 이내의 경우 약 95%, 1~3주령에는 50% 내외이며, 4주령 이상에는 폐사가 일어나지 않는다. 이에 따라, 백신 접종 이후 접종일령별 효능평가를 실시한 결과, 백신접종그룹의 경우 1형에 대해 일령별 접종시 4일령(백신접종 3일후)부터, 3형에 대하여 3일령(백신접종 2일후)부터 방어효능을 확인하며, 미백신 접종그룹(대조군)의 경우 1형 공격 접종시 일령에 관계없이 폐사를 확인하였으며, 3형 공격접종 시 일령이 어릴수록 폐사가 높게 나타남을 확인하였다.

오리간염 1, 3형 혼합백신 시제품의 안전성을 확인하기 위하여 혼합백신 10수분을 1일령의 오리에 효능이 입증된 접종법으로 접종하고 2주간 관찰하여, 증체량과 임상증상 및 폐사율의 확인 결과, 대조군과 비교하여 14일간 이상없이 증체되었으며, 임상증상 없이 생존하였다.

내부실험에서 안전, 안정, 효능을 확인한 최종 시제품에 대해 야외임상시험을 통한 현장평가를 수행하고자, 농림축산검역본부에 임상시험계획서를 제출하고 검토 후 2016.07.04. 임상시험 승인을 얻었다. 승인된 계획서에 따라 임상시험을 3농장에서 실시한 결과, 모두 안전하고 효능함을 확인하였다. 산업화를 위해 실시한 임상시험내용을 포함한 허가서류가 농림축산검역본부 검토중이며, 2017.10.27. 검역본부 검토의견을 받을 예정이다. 2018년도에 산업화되어 오리농가의 오리간염예방을 위해 사용이 가능할 것으로 예상된다.

나. 대표적 연구성과

1) 정성적 연구성과

가) 오리간염 혼합생백신 제조공법 개발

오리간염 혼합생백신으로 제조 예정인 2종의 항원에 대하여 등록된 특허자료(특허등록번호 10-0248910, 10-0959259)에 기재된 각 항원별 최소면역원량은 오리간염 1형 백신주는 1수분당 $10^{3.0}ELD_{50}$ 이상, 오리간염 3형 백신주는 1수분당 $10^{2.0}ELD_{50}$ 이상이다. 일반적인 가금용 백신의 생산기준인 병(동결건조 전 원료약품 2.5ml)당 1000수분인 동결건조백신을 제조하기 위한 필요 항원량은 오리간염 1형 백신주는 병당 $10^{6.5}EID_{50} \sim 10^{7.0}EID_{50}$ 이상, 오리간염 3형 백신주는 병당 $10^{5.5}EID_{50} \sim 10^{6.0}EID_{50}$ 이상이 포함되어야한다.

오리간염 혼합생백신을 제조하기 위한 충분한 양의 바이러스를 확보하기 위하여 바이러스의 증식능을 평가하였다. 오리간염 1형 백신주는 등록된 특허에 기재된 결과를 기초로 하여 백신 제조용 bulk를 생산하였을 때 충분한 수준의 바이러스 함량($10^{8.0}ELD_{50}/ml$ 이상)이 확인되었다. 오리간염 3형 백신주는 등록된 특허를 기초로 백신제조용 bulk를 생산하였을 때 $10^{5.0}ELD_{50}/ml \sim 10^{6.0}ELD_{50}/ml$ 의 수준으로 최소면역량을 고려하였을 때, 대량접종용 백신을 제조하기에 충분

치 않아 최대한의 바이러스 역가를 생산할 수 있는 실험을 실시하였고, 상기한 결과를 통해 그 방법을 확립하였다.

동결건조 보호제 2종(TPGG, SorPGG)으로 동결건조 백신을 제조하였고, 동결건조 후에 바이러스 함량을 비교하였다. 그 결과, SorPGG가 TPGG에 비해 2종의 백신주 모두에서 bulk의 바이러스 역가 감소가 적으며 각 항원별 최소면역량 이상으로 확인되었다. SorPGG로 제조한 혼합생백신은 제조 후 18개월 후까지의 바이러스 함량을 확인하였을 때, 제조 직 후와 동일한 수준으로 유지하여 안정성을 있음을 확인하였다.

나) 오리간염 혼합생백신 시제품 제작 및 효능평가

위의 결과를 바탕으로 오리간염 1, 3형 혼합백신 시제품을 제조하였고, 각 혈청형별 단독백신을 대조백신으로 혼합된 항원간의 간섭현상을 혈청형별 강독주에 대한 방어능을 통하여 확인하였다. 각 강독주에 대한 방어능은 혼합백신이 각 혈청형별 단독백신 및 대조군에 비하여 방어능이 동일한 수준이거나 그 이상임을 확인하여, 오리간염 혼합백신을 1일령의 오리에 적용시 혼합된 항원간의 간섭으로 인한 효력저하가 없음이 확인되었다.

오리간염 1, 3형 혼합백신 시제품을 백신의 접종경로에 대한 방어효능평가를 실시하였다. 오리간염 혼합백신을 1일령의 오리에 음수 및 피하 접종 시에 혈청형별 강독주에 대하여 대조군에 비해 우수한 85% 이상의 방어율을 보여주었으며, 백신의 접종방법별 혈청형별 강독주에 대한 방어는 피하 접종이 음수 접종에 비하여 동일한 수준이거나 그 이상임을 확인하였다.

오리간염 1, 3형 혼합백신 시제품의 분무접종에 대한 혈청형별 강독주에 대한 방어능 평가시 피하에 비해 낮은 방어능을 확인하였다.

오리간염 1, 3형 혼합백신 시제품의 접종에 대한 경과일령별 혈청형별 강독주에 대한 방어능 평가결과, 1형에 대해 일령별 접종시 4일령(백신접종 3일후)부터, 3형에 대하여 3일령(백신접종 2일후)부터 방어효능을 확인하며, 미백신 접종그룹(대조군)의 경우 1형 공격 접종시 일령에 관계없이 폐사를 확인하였으며, 3형공격 접종 시 일령이 어릴수록 폐사가 높게 나타남을 확인하였다.

오리간염 1, 3형 혼합백신 시제품의 안전성을 확인하기 위하여 혼합백신 10수분을 1일령의 오리에 효능이 입증된 접종법으로 접종하고 2주간 관찰하여, 증체량과 임상증상 및 폐사율의 결과, 안전함을 확인하였다.

다) 오리간염 혼합생백신 최종시제품 생산 및 현장평가

최종 3Lot에 대하여 생산하여 제조직후 일반시험 및 안전, 효능시험을 진행하여 모두 이상 없음을 확인하였다. 이를 가지고 야외임상시험을 승인받기 위하여 야외임상시험계획서를 제출하여 검역본부 검토를 이후 승인완료 되었으며, 승인받은 계획서에 맞춰서 야외 안전, 효능시험을 완료하였다.

2) 종합평가 및 향후 발전방향

본 연구에서는 국내에 유행하는 오리간염 1형 및 3형을 예방하기 위한 생백신 개발 연구로 2종 혼합백신을 국내 최초로 개발하였다. 본 연구를 통해 제조공법 개발, 시제품 생산, 효능평가, 야외임상시험 승인을 통한 야외현장평가 등을 실시하여 오리농가에 피해를 주는 오리간염 백신 예방 백신을 개발하였다. 향후 오리간염 혼합생백신을 산업화 하여 농장에 적용시 국내

유행하는 오리간염으로 인한 경제적 피해를 줄이며, 과도한 항생제 사용을 줄이는데 도움이 될 것으로 판단된다.

3) 시제품 사진



오리간염 1형 단독백신



오리간염 3형 단독백신



오리간염 1&3형 혼합백신

4) 상품화 사진(예시)



3. 정량적 성과

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Imnact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Tronism 1 and infectivity of duck-derived egg drop syndrome virus in chickens	전북대	공동 저자	PLOS ONE	3.057	2017.05.08	중복사사	SCIE
2	논문	Genetics and biological property analysis of Korea lineage of influenza A H9N2 viruses	전북대	-	Veterinary Microbiology	2.564	2017.05.01	중복사사	SCI
3	논문	Surveillance and characterization of <i>riemerella anatinestifer</i> from wild birds in South Korea	전북대	제1 저자	Journal of Wildlife Diseases	1.355	2015.04.01	중복사사	SCI
4	논문	Dissemination of multidrug-resistant <i>Campylobacter</i> in wild birds from South Korea	전북대	제1 저자	International Journal of Antimicrobial Agents	4.296	2015.02.01	중복사사	SCI

5	특허	오리리메렐라간염증 예방용 백신 조성물	전북대	-	대한민국	-	2017.07.28	중복사사	출원
6	특허	오리 가염 A 바이러스 1형과 3형의 재조합 건조백신	중앙백신연구소	-	대한민국	-	2016.01.18	중복사사	출원
7	기타 (학술 발표)	Serum-resistance is associated with virulence in <i>Riemerella anatipestifer</i>	전북대	-	2016년 대한수의학회 추계학술대회	-	2016.10.28	중복사사	국제 학술대회
8	기타 (학술 발표)	Protective immune responses in ducklings induced by a duck hepatitis A virus type 1 vaccine	전북대	-	2015 한국가금학회 제32차 정기총회 및 학술발표회	-	2015.11.13.	중복사사	국내 학술대회
9	기타 (학술 발표)	Evaluation of virulence of <i>Riemerella anatipestifer</i> isolates and association with serum resistance in ducks	전북대	-	2015년 대한수의학회 추계학술대회	-	2015.10.30.	중복사사	국제 학술대회
10	기타 (학술 발표)	Prevalence and characteristics of <i>Riemerella anatipestifer</i> isolates from ducks in South Korea: Use of polyvalent coagulination reagents for serotyping	전북대	-	The American Association of Avian Pathologists	-	2015.07.13	중복사사	국제 학술대회
11	기타 (학술 발표)	Safety efficacy and immunogenicity of a live <i>riemerella anatipestifer</i> vaccine	전북대	-	2014년 제10회 아시아 태평양 가금학회	-	2014.10.20.	중복사사	국제 학술대회
12	기타 (인력 양성)	Characterization of influenza A virus derived from animals and risk assessment for interspecies transmissibility	전북대	-	-	-	2016.08.22.	-	인력양성 (박사학위)
13	기타 (인력 양성)	Characterization of Korean <i>Riemerella anatipestifer</i> Isolates from Ducks and Its Live Vaccine Development	전북대	-	-	-	2017.02.22.	-	인력양성 (박사학위)
14	기타 (수상)	Protective efficacy and immunogenicity of serotype 2 <i>Riemerella anatipestifer</i> as a live vaccine candidate in Pekin ducks	전북대	-	2015년 대한수의학회 추계학술대회	-	2015.10.30.	중복사사	Excellent Presentation Merit 수상
15	기타 (시제품)	포울샷 DHAV-1	중앙백신연구소	-	-	-	2018년 예정	-	오리가염 1형 백신
16	기타 (시제품)	포울샷 DHAV-3	중앙백신연구소	-	-	-	2018년 예정	-	오리가염 3형 백신
17	기타 (시제품)	푸육샷 오리간염 1&3형	중앙백신연구소	-	-	-	2018년 예정	-	오리가염 1, 3형 혼합백신

18	기타 (시제품)	우리리메렐라 1형 생백신	중앙백신 연구소	-	-	-	2018년 예정	-	우리리메렐라 1형 생백신
19	기타 (시제품)	우리리메렐라 2형 생백신	중앙백신 연구소	-	-	-	2018년 예정	-	우리리메렐라 2형 생백신
20	기타 (시제품)	우리리메렐라 1, 2형 혼합생백신	중앙백신 연구소	-	-	-	2018년 예정	-	우리리메렐라 1, 2형 혼합생백신

4. 사업화 성과 및 매출실적

가. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0억원	
			향후 3년간 매출	5 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0억원	
			향후 3년간 매출	5 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 50% 국외 : %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 50% 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			1위

나. 사업화 계획 및 매출실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	5년			
	소요예산(백만원)	200~300			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		-	5억	10억	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내	-	50%	80%
국외		-	-	-	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	각각의 혼합백신 2종에 대하여 혼합사용 가능여부 확인 필요			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년 후	5년 후	
	수입대체(내수)	-	5억	10억	
	수 출	-	-	-	

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

제 1 절 목표달성도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도(%)	
제세부	1차년도 (2014)	국내 리메렐라균 역학분석	<ul style="list-style-type: none"> 우리농가 리메렐라 모니터링 및 국내 발생상황 분석 	100	
		리메렐라 야외균주 확보	<ul style="list-style-type: none"> 리메렐라 야외균주 100종 분리동정 비벡위성 또는 약병원성 야외 분리주 확보 	100	
		리메렐라 생백신 후보주 2종 선발	<ul style="list-style-type: none"> 리메렐라 야외균주 특성분석 및 In-vitro 스크리닝 리메렐라 백신 후보주 목적동물 대상 안전성평가 리메렐라 백신 후보주 목적동물 대상 방어효능평가 예비시험 	100	
	2차년도 (2015)	리메렐라 생백신 시제품 안전성 및 효능평가	<ul style="list-style-type: none"> 목적동물 대상 안전성평가 목적동물 대상 방어효능평가 교차 방어효능평가 면역유도능 평가 	100	
		리메렐라 생백신 시제품 특성연구	<ul style="list-style-type: none"> 규석장곡선 작성 생화학적 특성분석 항생제내성 분석 	100	
		리메렐라 생백신 시제품 적용법 확립	<ul style="list-style-type: none"> 최종시제품 접종 경로 및 시기별 효능평가를 통한 최적의 백신적용법 확립 	100	
		우리 새사다계별 예방접종 프로그램(안) 연구	<ul style="list-style-type: none"> 국내화정에 적합한 한국형 육육우리 및 죽우리 예방접종 프로그램(안) 1건 구축 	100	
	3차년도 (2016)	개발백신 현장활용 및 극대화 방안 연구	<ul style="list-style-type: none"> 백신의 현장 보급·확산을 위한 관련 정책안 제시 	100	
	제협동	1차년도 (2014)	오리가염 혼합생백신 제조공법 개발	<ul style="list-style-type: none"> 오리가염백신 1형 및 3형 혼합 제조기술 확립 오리가염백신 동결건조 기술 확립 및 안정성 평가 	100
			오리가염 혼합생백신 시제품 제작 및 효능평가	<ul style="list-style-type: none"> 오리가염백신 시제품 목적동물 대상 안전성평가 오리가염백신 시제품 목적동물 대상 방어효능평가 	100
2차년도 (2015)		리메렐라 생백신 제조공법 개발	<ul style="list-style-type: none"> 리메렐라균 제조공법(동결건조 기술) 확립 	100	
		리메렐라 생백신 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> 리메렐라 생백신 시제품 1종 제품화 	100	
		오리가염 혼합생백신 최종시제품 생산 및 현장평가 개발백신 산업화	<ul style="list-style-type: none"> 오리가염백신 최종 시제품 3Lot 생산 최종 시제품에 대한 일반, 안전 및 효능시험 농림축산검역본부의 임상시험계획서 제출 	100	
3차년도 (2016)		오리가염백신의 현장평가	<ul style="list-style-type: none"> 오리가염백신 최종시제품 1종 생산 및 시험 야외농장 적용 후 항병성 및 생산성 영향 평가 	80	
		리메렐라 생백신 및 오리가염 혼합생백신 현장검증 개발백신 2종 산업화	<ul style="list-style-type: none"> 리메렐라감염증 시험백신의 야외 농장에서의 효능평가 		

제 2 절 관련분야의 기여도

1. 오리리메렐라감염증 생백신 개발

오리리메렐라는 육용오리 및 종오리에 폐사, 신경증상, 체중감소, 산란저하 등을 일으키는 치명적인 질병으로 국내에서도 최근까지 지속적으로 발생하고 있음에도 불구하고 이를 예방하기 위한 국내 백신개발연구는 전무한 실정이다. 2006년 불활화 백신이 개발되었지만 최근 유행혈청형에 대한 방어가 어렵고 접종이 용이하지 않아 실효성 또한 매우 낮다. 본 연구를 통해 최근 국내에 유행하는 리메렐라 혈청형을 파악하였으며 혈청형별 병원성을 구명하였다. 또한 고병원성 혈청형에 대한 생백신 후보주를 선발하고 1, 2형 혼합 음수 생백신을 개발하여 실효성을 높였다. 따라서 국내 육용 및 종오리 농장에 본 연구에서 개발한 리메렐라 생백신을 적용한다면 최근 고병원성 유행주에 대해 예방이 가능할 뿐 아니라 예방·치료 목적의 과도한 사용으로 인한 항생제 오남용 문제도 줄일 수 있을 것으로 예상된다.

가. 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치, 우월성 및 기여도 평가

세부연구항목	국내·외 기술개발현황	우월성	기여도
국내 오리리메렐라 유행혈청형 분석	○ 최근 10년동안 국내 오리리메렐라의 유행혈청형 분석이 이루어지지 않음	○ 2012-2015년까지 최근 오리리메렐라 국내 유행혈청형을 조사하였음	○ 국내 유행혈청형에 대한 생백신 개발의 기초자료로 활용됨
국내 오리리메렐라 병원성 분석	○ 국내 오리리메렐라 유행혈청형에 대한 병원성은 알려지지 않음	○ 1, 2, 5, 6, 7, 11형 등 주요 유행혈청형에 대한 병원성을 파악함	○ 유행혈청형의 병원성을 파악하여 고병원성 혈청형인 1형 및 2형에 대한 생백신 개발의 기초자료가 됨
오리리메렐라 생백신 후보주 2종 선발	○ 국내 오리리메렐라 예방을 위한 생백신 개발에 관한 연구는 전무함	○ 고병원성 유행혈청형에 대해 예방가능한 생백신 개발을 위해 1형 및 2형 생백신후보주 2종을 선발함	○ 저병원성 생백신 후보주를 확보하여 혼합 생백신 개발에 활용하였고 리메렐라 생백신주 선발 기법을 확립하여 향후 백신주 선발에 활용가능하도록 함
오리리메렐라 혼합 생백신 개발	○ 오리리메렐라 국내 혼합생백신은 전무하며 개발연구 또한 이루어지지 않음	○ 1형 및 2형을 동시에 예방할 수 있는 혼합생백신을 개발하고 접막면역 유도능을 확인하였음	○ 안전하고 실효성 높은 오리리메렐라 음수 혼합 생백신을 개발하였으며 향후 농가에 적용한다면 생산성 증대에 기여할 수 있음

2. 오리간염 혼합생백신 및 리메렐라 생백신 산업화

오리 간염은 오리 간염 바이러스 1형, 2형 및 3형의 서로 다른 3가지 바이러스에 의해 질병이 유발된다. 오리 간염 바이러스 1형은 출혈 반점을 동반한 간 종대를 일으키는 급성의 질병으로 1945년 미국에서 처음 보고된 이후 세계 각지에서 발생되고 있으며 가까운 중국, 대만 및 일본에서도 발생되었다.

현재 국내에서는 DHAV 1형 생동결백신만이 유일하게 허가받은 오리 바이러스성 간염 백신이다. 이 백신은 2008년부터 2016년도까지 대략 2000만원수준으로 시장의 상황을 고려하였을 때 그 수치는 미미한 편이며, 그에 반해 오리간염의 발생건수(발생수수)는 2008년 17건(49,315수), 2009년 39건(203,895수), 2010년 49건(123,637수), 2011년 66건(111,784수), 2012년 45건(122,135수)으로 지속적인 증가를 보이고 있다(국가동물방역통합시스템 자료).

자사에서는 국내에서 발생하는 DHAV 1형과 3형을 동시에 효과적으로 예방하기 위하여 2종의 혼합백신을 개발하여 오리 간염으로 인한 오리 농가의 막대한 경제적 피해를 줄이고자 한다. 특히 기존 백신이 동결형태이기에 발생하는 운반, 보관, 적용상의 불편함을 최소화하기 위하여 동결건조백신으로 개발하게 되었다.

가. 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치, 우월성 및 기여도 평가

세부연구항목	국내·외 기술개발현황	우월성	기여도
오리간염백신 1형 & 3형 제조공법 개발	○ 1형 단일백신 개발되어 있으며 동결백신으로 운송의 불편함	○ 3형 포함된 혼합백신 ○ 동결건조 백신으로 2~8도 운반 가능	○ 국내 오리간염 백신 개발을 위한 제조공법 확립
오리간염백신 1형 & 3형 생백신 개발	○ 1형 단일백신의 -197도 액체질소통 보관	○ 1형과 3형을 동시에 예방할 수 있는 혼합생백신으로 안전하며 방어능을 확인	○ 안전하고 효능 있는 오리간염 생백신을 개발하였으며 향후 농가의 생산성 증대 기여할 수 있음
리메렐라 혼합생백신 개발	○ 사균백신 적용 어려움	○ 1형과 2형을 동시에 예방할 수 있는 혼합생백신으로 안전하며 방어능을 확인	○ 안전하고 효능 있는 리메렐라 생백신을 개발하였으며 향후 농가의 생산성 증대 기여할 수 있음

제 5 장 연구결과의 활용계획

제 1 절 오리리메렐라감염증 생백신 개발

1. 추가연구의 필요성

오리리메렐라는 혈청형(21종)이 매우 다양한 특징을 가지고 있으며 이러한 특성으로 인해 여러 고병원성 혈청형에 방어 가능한 백신을 개발하는 것이 중요하다. 따라서 병원성 및 면역학적 인자 구명 등 추가연구를 통해 국내 유행하는 다양한 혈청형을 동시에 예방할 수 있는 다가백신 또는 재조합 백신을 개발하는 것이 필요하다.

2. 타 연구의 응용 및 활용방안

본 연구를 통해 확인된 리메렐라 국내 유행혈청형 등 역학자료를 활용하여 추후 불활화백신 및 항생제대체제 개발 연구 등에 활용이 가능하다. 또한, 오리리메렐라 저병원성 생백신주를 이용하여 백신의 병원성 인자 및 면역학적 기전을 구명하는 연구에 응용한다면 향후 추가적인 백신개발 연구에 도움이 될 것으로 사료된다.

구 분	활용제목(가제)
추가연구	오리리메렐라 고병원성 유행혈청형 예방을 위한 다가백신 개발
타 연구의 응용	오리리메렐라 방어면역 기전 구명
논문게재 및 학술발표	오리리메렐라 병원성 인자 구명
기술지도, 홍보	오리리메렐라 백신 백신프로그램 보급
기타	오리리메렐라 생백신 상용화

3. 사업화 추진방안

국내 고병원성 1, 2형 유행주를 예방할 수 있는 안전하고 실효성 높은 오리리메렐라 음수 생백신으로서 국내특허 출원을 신청할 예정이며 중앙백신연구소의 기술이전을 통해 사업화를 추진할 예정이다.

제 2 절 오리간염 혼합생백신 및 리메렐라 생백신 산업화

1. 추가연구의 필요성

오리간염은 매우 어린일령에 치명적인 질병의 특성상 질병예방을 위해서는 조기 면역획득이 중요하다. 따라서 추가적인 종오리 백신프로그램의 평가를 통해 종오리 및 육용오리의 백신프로그램을 확립하고 상용화하는 것이 필요하다.

2. 타 연구의 응용 및 활용방안

본 연구에서 종오리 백신프로그램 적용을 통한 종오리와 후대병아리간의 모체이행항체 전달률 및 항체반감기 등의 자료를 활용하여, 추가적인 백신면역연구 및 백신프로그램 확립에 기초자료가 될 것으로 사료된다. 또한 확보된 혈청시료는 현장 진단용 혈청진단키트 등의 개발에

고역가 혈청자원으로 활용이 가능하다.

구 분	활용제목(가제)
추가연구	오리간염백신 종오리 및 육용오리 백신프로그램 확립
타 연구의 응용	오리간염백신 면역기전 구명
논문게재 및 학술발표	오리간염백신 조기면역 주요인자 구명
기술지도, 홍보	오리간염백신 백신프로그램 보급
기타	오리간염 혼합생백신의 상용화

3. 사업화 추진방안

국내 오리간염 1, 3형을 예방할 수 있는 안전하고 실효성 높은 오리간염 생백신의 산업화를 통하여 농가에 생산성 증대에 기여할 예정이다.

제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 오리리메렐라감염증 생백신 개발

최근 오리리메렐라의 병원성 관련 유전자 연구가 활발히 이루어지고 있는데 Wang et al. 은 nucleoside-diphosphate-sugar epimerase를 코딩하고 있는 AS87_04050 유전자가 LPS를 합성하는데 관여한다는 것을 입증하였으며 이는 리메렐라의 병원성과 관계가 있는 것으로 확인되었다(Wang et al., 2014). 또한, Yu et al.은 *Chryseobacterium koreense*의 LPS 합성 단백질인 RfaS과 염기서열의 상동성이 높은 M949_1360 유전자가 리메렐라의 병원성에 관여한다는 것을 보고하였다(Yu et al., 2016). 오리리메렐라의 Lipoprotein을 코딩하고 있는 M949_1556 유전자 역시 병원성과 관련이 높다는 것이 확인되었고 AS87_01735 유전자도 nicotinamidase enzyme을 코딩하고 있으며 리메렐라의 병원성과 높은 관련성이 있다는 것이 확인되었다(Zou et al., 2015, Wang et al., 2016).

제 2 절 오리간염 혼합생백신 및 리메렐라 생백신 산업화

최근 오리간염의 항체진단을 위한 연구에서 1형의 VP3단백질을 항원으로 코팅하여 1형과 3형을 동시에 검출하는 ELISA를 개발하여 평가하였고, 민감도와 특이도면에서 진단용 ELISA로 활용이 가능함을 확인하였다(Shen et al., 2015). 또한, 종오리 백신프로그램 평가는 1900년대 말에 이루어졌으며, 1981년 연구에서는 2일령에 1회의 생백신접종으로 30주령까지 8 log₂의 항체가를 유지하였고, 1991년 연구에서는 12주령과 20주령 2회의 생백신접종으로 35주령까지 11 log₂의 높은 역가를 유지하여, 모체이행항체에 의한 후대병아리의 방어효능평가에서는 90% 내외의 높은 방어효능을 보고하였다(Gough et al., 1981, P. R. Woolcock, 1991).

제 7 장 연구개발결과의 보안등급

본 백신개발기술은 아직 전 세계 오리질병 분야에서 독보적인 기술이라 할 수 있고, 중국 등 국외시장 진출을 위해 국외특허권이 확보될 때 까지 기술보안이 필요하다고 판단된다.

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

제 1 절 전북대학교

1. 기술적 위험요소 분석

전북대학교의 본 연구실은 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성 가스, 소량의 폐수가 발생하며 균주, 바이러스 등을 활용하는 실험실이다.

2. 안전관리대책

가. 연구실 안전관리 조직

우리 대학에서는 연구실책임자, 안전관리자 지정하여 운영하고 있으며, 조직도를 작성하여 비치하고 있다.

나. 연구실 안전점검(연구실 안전환경 관리규정)

우리 대학에서 정밀안전진단은 2년에 1회 외부 용역기관에 의뢰 실시하고 있고, 안전점검은 1년에 1회 교내 전담부서(시설팀/안전방재실)에서 실시하고 있으며, 일상점검은 1일에 1회 연구실 안전점검 후 일지 작성하고 있다.

다. 연구활동종사자 상해보험 가입

우리 대학에서는 연구활동종사자 대상으로 상해보험에 가입하고 있다.

라. 연구활동종사자 건강검진

우리 대학에서는 연구활동종사자를 대상으로 1년에 1회 실시하고 있다.

마. 연구활동종사자 안전교육

우리 대학에서는 반기별 6시간 이상 온라인교육을 정기적으로 실시하고 있으며, 신규채용에 따라 2시간 이상 집체 또는 온라인교육을 실시하고 있고, 사고발생한 연구실의 연구활동종사자를 대상으로 2시간 이상 특별안전교육을 실시하고 있다.

제 2 절 중앙백신연구소

1. 기술적 위험요소 분석

2. 안전관리대책

가. 연구실 안전관리 조직

우리 회사에서는 연구실책임자와 안전관리 대행업체(대한산업안전협회)를 안전관리자로 지정하여 운영하고 있다.

나. 연구실 안전점검(연구실 안전환경 관리규정)

우리 회사는 산업안전보건법에 따라서 해당 연구실에 작업환경측정을 실시하고 있으며, 안전보건관리 대행 기관 의뢰하여 정기적으로 안전진단 및 점검을 받고 있다. (안전대행업체 월 2회 진단, 보건대행업체 연 6회 진단)

다. 연구활동종사자 상해보험 가입

우리 회사에서는 연구활동종사자에 대해 상해보험 및 산재예방보험에 가입하고 있다.

라. 연구활동종사자 건강검진

우리 회사에서는 연구활동종사자를 대상으로 1년에 1회 건강검진을 실시하고 있다.

마. 연구활동종사자 안전교육

우리 회사는 월 2시간 집체교육을 정기적으로 실시하고 있으며, 신규채용에 따라 8시간 집체교육을 실시하고 있고, 관리대상 유해물질을 취급하는 연구자에 한하여 8시간의 특별안전보건교육을 실시하고 있다.

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	우리 가염 A 바이러스 1형과 3형의 선택혼합 건조백신	중앙백신 연구소	-	대한민국	-	2016.01.18	중복사사	출원
2	특허	우리리메렐라가염증 예방용 백신 조성물	전북대	-	대한민국	-	2017.07.28.	중복사사	출원
3	기타 (사제품)	포울샷 DHAV-1	중앙백신 연구소	-	-	-	2018년 예정	-	우리가염 1형 백신
4	기타 (사제품)	포울샷 DHAV-3	중앙백신 연구소	-	-	-	2018년 예정	-	우리가염 3형 백신
5	기타 (사제품)	포울샷 오리간염 1&3형	중앙백신 연구소	-	-	-	2018년 예정	-	우리가염 1, 3형 혼합백신
6	기타 (사제품)	우리리메렐라 1형 생백신	중앙백신 연구소	-	-	-	2018년 예정	-	우리리메렐라 1형 생백신
7	기타 (사제품)	우리리메렐라 2형 생백신	중앙백신 연구소	-	-	-	2018년 예정	-	우리리메렐라 2형 생백신
8	기타 (사제품)	우리리메렐라 1 2형 혼합생백신	중앙백신 연구소	-	-	-	2018년 예정	-	우리리메렐라 1, 2형 혼합생백신
9	기타 (인력 양성)	Characterization of Korean <i>Riemerella</i> <i>anatinesifer</i> Isolates from Ducks and Its Live Vaccine Development	전북대	-	-	-	2017.02.22.		인력양성 (박사학위)
10	기타 (수상)	Protective efficacy and immunogenicity of serotype 2 <i>Riemerella</i> <i>anatinesifer</i> as a live vaccine candidate in Pekin ducks	전북대	-	2015년 대한수의학회 추계학술대회	-	2015.10.30.	중복사사	Excellent Presentatio n Merit 수상
11	논문	Tronism 1 and infectivity of duck-derived egg dron syndrome virus in chickens	전북대	공동 저자	PLOS ONE	3.057	2017.05.08	중복사사	SCIE

12	논문	Genetics and biological property analysis of Korea lineage of influenza A H9N2 viruses	전북대	-	Veterinary Microbiology	2.564	2017.05.01	중복사사	SCI
13	논문	Surveillance and characterization of <i>riemerella anatinestifer</i> from wild birds in South Korea	전북대	제1저자	Journal of Wildlife Diseases	1.355	2015.04.01	중복사사	SCI
14	논문	Dissemination of multidrug-resistant <i>Campylobacter</i> in wild birds from South Korea	전북대	제1저자	International Journal of Antimicrobial Agents	4.296	2015.02.01	중복사사	SCI
15	기타 (학술 발표)	Serum-resistance is associated with virulence in <i>Riemerella anatipestifer</i>	전북대	-	2016년 대한수의학회 추계학술대회	-	2016.10.28	중복사사	국제 학술대회
16	기타 (학술 발표)	Protective immune responses in ducklings induced by a duck hepatitis A virus type 1 vaccine	전북대	-	2015 한국가금학회 제32차 정기총회 및 학술발표회	-	2015.11.13.	중복사사	국내 학술대회
17	기타 (학술 발표)	Evaluation of virulence of <i>Riemerella anatinestifer</i> isolates and association with serum resistance in ducks	전북대	-	2015년 대한수의학회 추계학술대회	-	2015.10.30.	중복사사	국제 학술대회
18	기타 (학술 발표)	Prevalence and characteristics of <i>Riemerella anatinestifer</i> isolates from ducks in South Korea: Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping	전북대	-	The American Association of Avian Pathologists	-	2015.07.13	중복사사	국제 학술대회
19	기타 (학술 발표)	Safety, efficacy and immunogenicity of a live <i>riemerella anatinestifer</i> vaccine	전북대	-	2014년 제10회 아시아 태평양 가금학회	-	2014.10.20.	중복사사	국제 학술대회
20	기타 (인력 양성)	Characterization of influenza A virus derived from animals and risk assessment for interspecies transmissibility	전북대	-	-	-	2016.08.22.	-	인력양성 (박사학위)

제 11 장 기타사항

해당사항 없음

제 12 장 참고문헌

김수정, 강수정, 육심용. 2008. 충남 천안아산지역에서 사육중인 육용오리의 리메렐라 감염율 조사. 한국가축위생학회지. 31(3) : 339-345.

농림축산검역본부. 2004. 농림축산검역본부 수의과학기술개발연구사업. 어린 오리에서 전염성 질병의 발생 실태조사 및 예방법 연구.

이종진, 김환희, 변철섭, 박재명. 2008. 육용오리에서 *Riemerella anatipestifer* 감염증례. 한국가축위생학회지. 31(1): 37-42.

전북대학교. 2012. 농림축산검역본부 수의과학기술개발 용역연구사업. 국내 오리농장의 방역 위생 실태조사 및 질병 발생동향 분석.

최정옥, 김경년. 1993. 오리의 *Pasteurella anatipestifer* 감염증 발생. 대한수의학회지. 33(1): 93-99.

Bin Huang, Sumathi Subramaniam, Joachim Frey, Hilda Loh, Hai-Meng Tan, Charlene J Fernandez, Jimmy Kwang, Kim-Lee Chua. 2002. Vaccination of ducks with recombinant outer membrane protein (OmpA) and a 41 kDa partial protein (P45N') of *Riemerella anatipestifer*. Veterinary Microbiol. 84(3): 219 - 230.

D.A. Higgins, R.R. Henry, Z.V. Kounev. 2000. Duck immune responses to *Riemerella anatipestifer* vaccines. Dev Comp Immunol. 24: 153-167.

Haiwen Liu, Xiaolan Wang, Chan Ding, Xianghan Han, Anchun Cheng, Shaohui Wang, Shengqing Yu. 2013. Development and Evaluation of a Trivalent *Riemerella anatipestifer*-Inactivated Vaccine. Clin Vaccine Immunol. 20: 691-697.

Kim MC, Kim MJ, Kwon YK, Lindberg AM, Joh SJ, Kwon HM, Lee YJ, Kwon JH. 2009. Development of duck hepatitis A virus type 3 vaccine and its use to protect ducklings against infections. Vaccine. 27: 6688-6694.

L. Lobbedey and B. Schlatterer. 2003. Development and application of an ELISA for the detection of duck antibodies against *Riemerella anatipestifer* antigens in egg yolk of vaccinees and in serum of their offspring. J Vet Med B 50: 81-85.

Pornpen Pathanasophon, Takuo Sawada, Tarika Pramoolsinsap & Tipa Tanticharoenyos. 1996. Immunogenicity of *Riemerella anatipestifer* broth culture bacterin and cell free culture filtrate in ducks. Avian Pathol. 25: 705-719.

P.R. Woolcock. 1991. Duck hepatitis virus type I: studies with inactivated vaccines in breeder ducks. *Avian Pathol.* 20: 509–522.

R.E. Gough and D. Spackman. 1981. Studies with inactivated duck virus hepatitis vaccines in breeder ducks. *Avian Pathol.* 10: 471–479.

Ruiz, J. A., and T. S. Sandhu. 2013. *Riemerella anatipestifer* infection. Pages 823 - 828 In: *Diseases of Poultry*, 13th ed. Swayne, D. E., J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez, and V. Nair, eds. John Wiley and Sons, Inc. Ames, IA.

Sung H, Kim J, Song C, Han M, Lee Y, Mo I, Kim K. 2000. Development of a live vaccine strain of duck viral hepatitis using a Korean isolate. *Korean J of Vet Res.* 40: 110–116.

T Sandhu, 1979. Immunization of White Pekin Ducklings against *Pasteurella anatipestifer* Infection. *Avian Dis.* 23(3): 662–669.

T Sandhu. 1991. Immunogenicity and safety of a live *Pasteurella anatipestifer* vaccine in White Pekin ducklings: laboratory and field trials. *Avian Pathol.* 20: 423–432.

Wang X, Ding C, Wang S, Han X, Hou W, Yue J, Zou J and Yu S. 2014. The AS87_04050 gene is involved in bacterial lipopolysaccharide biosynthesis and pathogenicity of *Riemerella anatipestifer*. *PloS one* 9(10): e109962.

Wang X, Liu B, Dou Y, Fan H, Wang S, Li T, Ding C and Yu S. 2016. The *Riemerella anatipestifer* AS87_01735 Gene Encodes Nicotinamidase PncA, an Important Virulence Factor. *Appl Environ Microbiol* 82(19): 5815–5823.

Xiangan Han, Qinghai Hu, Siyu Ding, Wenjing Chen, Chan Ding, Liang He, Xiaolan Wang, Jiabo Ding, Shengqing Yu. 2011. Identification and immunological characteristics of chaperonin GroEL in *Riemerella anatipestifer*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93(3): 1197 - 1205.

Yu G, Wang X, Dou Y, Wang S, Tian M, Qi J, Li T, Ding C, Wu Y and Yu S. 2016. *Riemerella anatipestifer* M949_1360 Gene Functions on the Lipopolysaccharide Biosynthesis and Bacterial Virulence. *PloS one* 11(8): e0160708.

Zou J, Wang X, Tian M, Cao S, Hou W, Wang S, Han X, Ding C and Yu S. 2015. The M949_1556 gene plays a role on the bacterial antigenicity and pathogenicity of *Riemerella anatipestifer*. *Vet microbiol* 177(1): 193–200.

주 의

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