

119082-01

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
가축질병대응기술개발사업 2020년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003325-01

가금티푸스 및 인수공통 전염 살모넬라식중독 예방 백신 개발

가금티푸스 및 인수공통 전염 살모넬라식중독
예방백신 개발

2020

2020. 12. 18.

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

주관연구기관 / 전북대학교산학협력단
참여기관 / (주)코미팜

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

<제출문>

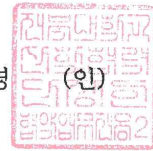
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “가금티푸스 및 인수공통 전염 살모넬라식중독 예방 백신 개발” (개발기간 : 2019. 08. 30 ~ 2020. 08. 29) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 12. 18.

주관연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 (대표자) 조재영



참여기관명 : (주)코미팜 (대표자) 문성철



주관연구책임자 : 허진

참여기관책임자 : 정호경

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	119082-1	해 당 단 계 연 구 기 간	2019. 8. 30 ~ 2020. 08. 30	단 계 구 분	(12개월)/ (12개월)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	가금티푸스 및 인수공통 전염 살모넬라식중독 예방 백신 개발			
	세부 과제명	가금티푸스 및 인수공통 전염 살모넬라식중독 예방 백신 개발			
연구책임자	허진	해당단계 참여연구원 수	총: 16명 내부: 16명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 90,000천원 민간: 30,000천원 계: 120,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 16명 내부: 16명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 90,000천원 민간: 30,000천원 계: 120,000천원
연구기관명 및 소속부서명	전북대학교 수의학과			참여기업명 (주)코미팜	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	1	10-202 0-0015 772	1		1				KCTC 14113 BP		

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) 보고서 면수

1. GI24 및 클로르헥시딘 등과 같은 물질을 이용하여 신규한 *Salmonella* Typhimurium (ST) 및 *Salmonella* Gallinarum (SG) 불활화 사균체 개발을 통한 지적 재산권 확보 및 산업체 기술이전
 - 가. 산업체 기술이전 1건 : 신규한 살모넬라 타이피뮤리움 불활화 사균체를 포함하는 살모넬라증 예방 또는 치료용 백신 조성물
 - 나. 지적 재산권 국내 특허 출원 1건
2. 산업화 가능한 생물 자원 발굴 및 발굴 자원을 활용한 신규한 불활화 사균체 제조 기술 발굴
 - 가. 국내 닭에서 분리한 *Salmonella* Typhimurium을 생물자원으로 등록함과 동시에 발굴 균주를 신규한 불활화 사균체로 제조하여 안전성 및 효능 평가를 수행하여 국내 특허 출원 1건 및 산업체에 기술이전 1건 완료
3. 신규한 ST 및 SG 불활화 사균체 백신 개발
 - 가. 목적 : 가금에서 인수공통감염병 및 가금티푸스 동시 예방 가능한 신규한 ST 및 SG 불활화 사균체 혼합 백신 시제품 제작
4. 신규한 ST 및 SG 불활화 사균체 백신 후보주의 안전성 및 효능 평가를 바탕으로 한 논문 및 학술회의 발표
 - 가. 신개념 ST 불활화 사균체를 제조하여 마우스를 대상으로 가장 효능이 우수한 adjuvant를 위한 실험을 수행하여 국내 학술등재지 (후보지)에 1편 게재함
 - 나. 신개념 SG 불활화 사균체를 제조하여 가금을 대상으로 안전성 및 효능을 평가하여 국내에서 개최한 학술회의에 1편 발표 함.

84

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 제조 <ul style="list-style-type: none"> - 주요 인수공통전염병인 살모넬라 타이피리움을 대량 배양 후 생균 같은 신개념 사균체로 제조 기술 확립 - 생균같은 신개념 사균체 전자현미경을 이용한 확인 - 완전 불활화 여부 확인 방법 확립 (기존 불활화 백신 확인 방법보다 더욱 강화된 확인 방법 구축 및 확립) ○ 가금에서 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 혼합 백신의 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 혼합 예방 백신을 갈색 레그혼종을 대상으로 살모넬라 신개념 사균체 예방 백신의 안정성 평가 - 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 혼합 예방 백신을 갈색 레그혼종을 대상으로 살모넬라 신개념 사균체 예방 백신의 효능 평가 - 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 혼합 예방 백신을 갈색 레그혼종을 대상으로 살모넬라 신개념 사균체 예방 백신의 최적화 ○ 가금을 대상으로 한 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 혼합 백신 시제품의 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 혼합 예방 백신을 갈색 레그혼종을 대상으로 근육 접종 - 혼합 예방 백신 2차 접종 후 3주째에 야외 독성 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 균주를 경구 접종 후 3주간 생존율 및 육안적 평가 - 도전감염 3주 후 살아있는 모든 닭을 희생시켜 육안적 소견 및 조직학적 소견 및 간, 비장 등에서 도전감염 균주의 균 분리 동정을 실시함으로써 효능 평가 ○ 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 혼합 예방 백신 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 혼합 예방 백신 제조 공정 확립 - 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 혼합 예방 백신 시제품 제작
<p>연구개발성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 신규한 <i>Salmonella</i> Typhimurium (ST) 및 <i>Salmonella</i> Gallinarum (SG) 불활화 사균체 개발을 통한 지적 재산권 확보 및 산업체 기술이전 <ul style="list-style-type: none"> 가. 산업체 기술이전 1건 완료 나. 지적 재산권 국내 특허 출원 1건 완료 다. 생물 자원 1건 등록 2. 산업화 가능한 생물 자원 발굴 및 발굴 자원을 활용한 신규한 불활화 사균체 제조 기술 발굴 <ul style="list-style-type: none"> 가. 국내 닭에서 분리한 <i>Salmonella</i> Typhimurium을 생물자원으로 등록. 등록 균주로 신규한 불활화 사균체 국내 특허 출원 1건 및 산업체에 기술 이전 1건 완료

	<p>3. 신규한 ST 및 SG 불활화 사균체 백신 개발 가. 목적 : 가금에서 인수공통감염병 및 가금티푸스 동시 예방 가능한 신규한 ST 및 SG 불활화 사균체 혼합 백신 시제품 제작</p> <p>4. 신규한 ST 및 SG 불활화 사균체 백신 후보주의 안전성 및 효능 평가를 바탕으로 한 논문 및 학술회의 발표 가. 마우스에서의 신개념 ST 불활화 사균체에 최적 adjuvant 선발에 대한 국내 KCI에 1편 게재 나. 가금에서의 신개념 SG 불활화 사균체의 안전성 및 효능을 평가하여 국내에서 개최한 학술회의에 1편 발표.</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 연구개발 결과의 활용계획 <ul style="list-style-type: none"> - 가금에서 인수공통전염병의 원인균인 살모넬라 타이피뮤리움 또는 가금티푸스 원인균인 살모넬라 갈리나룸에 의한 살모넬라증을 예방할 수 있는 제품의 상품화를 통해 국내 및 해외 수출을 통해 산업적 활용도 상승 - 새로운 유형의 백신의 개발로 인한 수입 대체 효과 및 수출 효과 기대 - 효능이 탁월한 생균같은 신개념 사균체의 새로운 유형 백신 개발을 통한 양계 농가의 질병 해소에 따른 양계 농가에 경제적 도움 기대 • 연구개발 결과의 기대효과 <ol style="list-style-type: none"> (1) 기술적 기대성과 <ul style="list-style-type: none"> - 생균같은 신개념의 세균의 사균화를 유도하여 인수공통전염 세균인 살모넬라 타이피뮤리움 또는 가금티푸스 원인균인 살모넬라 갈리나룸 맞춤형 백신개발 가능 - 생균백신 수준의 방어력을 확보한 세포 내 기생 세균에 대한 신개념 사균 백신 개발 기술 확보 - 대량 배양 세균에 대한 직접적인 첨가를 통한 신개념 사균체 제조 기술 구축을 통한 세포 내 기생 세균에 대한 방어력이 탁월한 안전한 신개념 사균 백신의 제조 생산 원가 절감효과 극대화 (2) 경제 산업적 기대효과 <ul style="list-style-type: none"> - 제품의 산업화를 통한 동물의약품의 수출 기대 - 대량 배양된 세균에 대한 직접 첨가를 통한 제조 기술의 확립을 통한 저렴하면서 효능이 탁월한 백신 제조에 따른 국가 경쟁력 향상 - 가금에서 백신에 의한 인수공통 전염병 미연 방지에 따른 인체로의 감염 기회가 축소에 따른 농가피해 및 국민 안전에 기여 효과 - 백신 수입 대체 효과 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>가금</p>	<p>살모넬라 타이피뮤리움 신개념 사균체</p>	<p>살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체</p>	<p>혼합 백신</p>	<p>완전 불활화</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Poultry</p>	<p>Novel inactivated <i>Salmonella</i> Typhimurium</p>	<p>Novel inactivated <i>Salmonella</i> Gallinarum</p>	<p>Mixed vaccine</p>	<p>Complete Inactivation</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

제1장. 연구개발과제의 개요	8
제1절. 연구개발 목적 및 내용	8
제2절. 연구개발의 필요성	8
제3절. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계	12
제2장. 연구수행 내용 및 결과	15
제1절. 1차년도 연구수행 내용 및 결과	15
제2절. 연구 수행 결과 요약 및 평가	47
제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	52
제1절. 연차별 목표 및 내용	52
제2절. 연구개발 평가방법	53
제3절. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	55
제4장. 연구결과의 활용 계획 등	59
제1절. 생균 같은 불활화 사균체 백신 개발	59
제2절. 가금티푸스 및 인수공통전염 살모넬라 식중독 예방 백신 개발	60
제5장. 연구개발성과의 보안등급	61
제1절. 연구개발성과의 보안등급	61
제2절. LMO 연구시설 및 수입신고	61
제6장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	62
제7장. 연구개발과제의 대표적 연구실적	65
제1절. 국내외 논문 게재	65
제2절. 국내 및 국제학술회의 발표	65
제3절. 생명자원(생물자원)/화합물	65
제4절. 지식재산권	65
제5절. 전문연구 인력양성	66
제6절. 기술거래(이전) 등	66
붙임. 참고문헌	67
별첨1. 연구개발보고서 초록	70
별첨2. 자체평가 의견서	72
별첨3. 연구성과 활용계획서	79

제1장. 연구개발과제의 개요

제1절. 연구개발 목적 및 내용

1. 최종 목표

- 가. 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 혼합 백신 제조 공정 확립
- 나. 시제품 제작 및 산란계를 대상으로 이들 혼합 백신의 안전성 및 효능 평가

2. 세부 목표

- 가. 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 제조
- 나. 가금에서 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 혼합 백신 시제품의 안전성 및 효능 평가
- 다. 백신 접종한 가금에서 야외 독성 살모넬라 타이피리움과 살모넬라 갈리나룸 혼합 균주 로 도전 감염한 다음 방어 및 효능 평가
- 라. 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸의 신개념 혼합 예방 백신 제조공정 확립

제2절. 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 개요

- 가. 사람의 세균성 주요 식중독의 원인체 중 하나인 살모넬라균은 지구 환경 거의 모든 동식물에 분포되어 있으며 현재까지 약 2,500여종 이상의 혈청형이 보고되었고 자연계에서 보고된 살모넬라균 중 절반 이상은 조류에서 분리되었음.
- 나. 살모넬라 식중독으로 최근 5년간의 환자 발생을 보면 식중독을 일으키는 주요 원인 식품으로 달걀과 케이크 등 달걀을 원료로 사용한 가공식품이며, 5년간의 전체 환자 수의 65%에 해당하는 3천 287명이 달걀을 원료로 하는 가공품을 먹고 식중독에 걸린 것으로 조사된다.
- 다. 따라서 살모넬라의 보균동물로서 조류의 역할이 주요하다고 할 수 있음. 특히 살모넬라증에서 문제가 되는 혈청형은 나라마다 지역별로 차이가 있으나 국내뿐만 아니라 유럽 미국 등지에서는 주로 살모넬라 타이피리움이 문제 되고 있음.
- 라. 인수공통전염병인 살모넬라 타이피리움에 의한 살모넬라증은 정작 가금에서는 폐사와 같은 증상 없이 산란율 저하와 같은 증상만을 발현할 뿐이어서 불현성 감염으로 보균자로서 사람으로의 감염 기회가 증가할 수 있음
- 마. 최근 기후변화에 의해 하절기 동안 고온 다습한 환경이 장기간 지속됨에 따라 가금에서 이들 살모넬라균주에 불현성 감염되어 계란 등으로 배출되어 사람에서 집단 식중독을 일으키는 일이 빈번히 보고 되고 있음.
- 바. 2018년 전국을 강타하여 2,207명을 감염시켰던 살모넬라 톰슨 (*Salmonella* Thompson)처럼 가금에서는 가금티푸스를 야기 시켜 가금을 폐사에 이르게 하는 원인균인 살모넬라 갈리나룸 (*Salmonella* Gallinarum)을 제외하고는 많은 살모넬라균들이 불현성 감염을 유지한 채 보균체로서 계란 등으로 배출하여 사람에서 식중독을 일으키는 경우가 많음
- 사. 또한 많은 살모넬라균들은 세포 내 기생세균으로 전통적인 불활화 백신 제조 기술을 이용

- 한 사균체 백신으로는 방어 효과가 현저히 떨어지는 세균임
- 아. 국내에서는 가금에서는 가금티푸스에 의한 폐사율이 높아 1960년부터 사용되어 오고 있는 약독화 살모넬라 갈리나룸 약독화 생균 백신을 접종하고 있을 뿐 그 외 살모넬라균에 대한 백신을 접종하지 않고 있음
 - 자. 하지만 일반 산란계 농장에서는 검사를 시행하지 않고 있어 종계보다 광범위하게 가금티푸스가 만연되어있고, 수평전염 및 난계대전염이 모두 가능하고 주로 성계에서의 피해보다 어린 닭 및 병아리에서의 폐사율이 더 높음
 - 차. 현재 국내에서는 유전자 조작 기술을 활용한 살모넬라 갈리나룸 외 살모넬라 타이피리움 약독화 생균 백신과 역시 유전자 조작기술에 바탕으로 한 살모넬라 타이피리움 고스트 백신이 연구 개발되어 있으나 현재 국내에서는 유전자 조작 백신에 대한 인허가 절차가 문제가 되어 있어 현재 상용화되지 못하고 있는 실정임
 - 카. 더불어 고스트 백신 역시 해당 균주를 유전자 조작하여 영양 요구주로 제조 후 E-lysis 유전자가 삽입된 벡터로 형질전환 되어 고스트를 유도하도록 개발되었으나 고스트 유도 후 완전한 불활화가 유도 되지 않음.
 - 타. 현재 상용되고 있는 불활화 사균백신은 가열하거나 약품(포르말린, 페놀류 등)으로 해당 병원체를 사멸시켜 제조하고 있음.
 - 파. 그 과정에서 항원 단백질의 물리,화학적 변화가 일어나 면역 반응이 낮아지거나 제조과정에서 화학약품이 사용되는것에 대한 거부감 등이 단점으로 지적되어 있음
 - 하. 또한 국내에서는 살모넬라 타이피리움 및 살모넬라 갈리나룸에 의한 살모넬라증 예방용 백신이 시판되지 않아 계란 등으로 균이 오염되는 경우가 많아 사람에서 식중독을 야기하는 경우가 종종 발생하지만, 발병 후 항생제 투여로는 치료 시기를 놓치는 경우가 많음. 또한 약제 내성균의 출현도 보고되어 있어 유효한 예방법이나 치료법의 개발이 절실히 요구됨.
 - 거. 본 연구에서는 가금을 대상으로 주요 인수공통전염병 원인균인 살모넬라 타이피리움 및 가금티푸스 원인균인 살모넬라 갈리나룸에 의해 감염되는 살모넬라증을 예방함으로써 감염을 미연에 차단하기 위해 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸을 대상으로 하여 항균 펩타이드 또는 유사 물질 등을 이용하여 이들 균주를 생균 같은 신개념 사균체로 유도한 후 완전 불활화 여부를 확인하여 신개념 사균체 백신 제조 기술을 확립한 후 이들 예방백신을 혼합하여 근육 또는 경구 접종하여 면역 반응 유도 여부 및 야외균주에 대한 방어 여부를 확인하고자 함.

2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

- (가) 가축사료에 항생제 첨가가 금지된 이후 국내 양계장에서 살모넬라 타이피리움 및 살모넬라 갈리나룸에 의한 가금 티푸스 등 살모넬라 감염이 꾸준한 증가로 인해 양계농가의 경제적 피해는 물론 사람에서 이들 오염된 개체로부터의 계란으로 인한 사람에서의 식중독이 최근 증가하고 있는 추세임.
- (나) 하지만 국내 가금에서는 가금 티푸스에 의한 폐사 외에 다른 살모넬라에 감염될 경우에는 불현성 감염이 많아 보균자로서 계란 등에 오염을 유발 가능성 높음. 더불어 이

들 세균은 세포 내 기생 세균으로 전통적인 불활화 백신으로는 이들 질병을 예방 할 수 없으며 약독화 생균 백신이 예방 효과가 높다고 알려져 있음

- (다) 하지만 가금 티푸스 원인균인 살모넬라 갈리나룸 약독화 생균 백신이 1956년에 개발되어 1960대부터 전 세계적으로 사용되고 있을 뿐임. 특히 국내에서는 살모넬라 타이피리움 예방 백신이 전무한 실정임,
- (라) 국내외적으로 유전자 조작을 이용한 약독화 살모넬라 예방 백신 또는 E-lysis 유전자가 삽입된 벡터를 이용한 살모넬라 고스트 백신 개발이 활발히 진행 중에 있음. 하지만 이들 백신은 유전자 조작 백신으로 실험실 수준에서만 연구가 진행 되고 있음.

(2) 시장현황

- (가) 최근 국내에서 가축 사료 첨가제로 항생제 사용을 금지한 이후 그동안 항생제에 의해 그 발현이 억제되어 왔던 각종 세균 의한 질병 특히 가금에서 살모넬라 갈리나룸을 포함하여 살모넬라 타이피리움 등에 의한 인수공통 전염균에 의한 살모넬라 불현성 감염이 증가 하고 있으며 특히 살모넬라 갈리나룸에 의한 가금티푸스는 발병 후 치사율이 높아 양계농가에 경제적으로 막대한 경제적 손실을 야기 하고 있음.
- (나) 하지만 살모넬라 갈리나룸이나 살모넬라 타이피리움 같은 그 외 살모넬라균들에 감염되면 가금은 불현성으로 단지 보균자 역할만 수행하여 계란 등을 오염시켜 사람에게서 식중독을 주로 야기하고 있어 양계 농가에서 예방백신을 구입하지 않고 있으며 현재 국내에서 시판되어 사용되고 있는 예방 백신은 전무한 상태임.
- (다) 하지만 양계 농가에서는 치사율이 높은 가금티푸스 예방 백신을 구입하여 접종하고 있는 상태이며 국내에서만 약 년간 50억 정도의 예방 백신이 소요되고 있음.

(3) 경쟁기관현황

- (가) 현재 국내 많은 연구자들이 살모넬라 약독화 생균 백신 내지는 E-lysis 유전자를 이용한 살모넬라 고스트 백신 개발 등이 진행 되고 있음.
- (나) 살모넬라 약독화 생균 백신은 병원성과 관련된 유전자를 유전공학 방법을 이용하여 제거하는 기술로 이는 유전자 조작 (LMO) 세균으로 현재 시판되지 못하고 연구실 수준에서 연구가 진행되고 있음.
- (다) 또한 E-lysis 유전자를 이용한 살모넬라 고스트 백신은 우선 해당 살모넬라를 영양요구주로 만들어야 하며, E-lysis 유전자가 삽입된 벡터를 영양요구주를 형질전환 시켜 제조하는 기술로 이 또한 LMO 균주로 시판되지 못하고 실험실 수준에서 연구가 진행 되고 있음
- (라) 더불어 E-lysis에 의한 고스트 백신은 완전한 불활화를 유도하지 못해 사균 백신의 기준인 완전한 불활화가 이루어지지 않는 태생적인 문제점을 안고 있음.

(4) 지식재산권현황

- (가) 유전자를 조작하여 약독화 생균 백신으로 제조하는 기술을 이용한 특허나 E-lysis 유전자가 삽입된 벡터로 형질전환 되어 고스트를 유도하는 기술을 이용한 특허 다수 있음. 하지만 이들 균주는 LMO 균주로 상용화 되지 못하고 실험실 수준에서 연구가 진행되고 있음.

(나) 특히 살모넬라 타이피리움과 살모넬라 갈리나룸을 동시에 혼합한 백신에 관한 특허는 전무한 실정이며, 특히 생균과 같은 신개념 불활화 백신 제조 기술에 관한 특허는 전무한 실정임.

(5) 표준화현황

(가) 아직 상용화된 백신이 없어 표준화 현황이 없음

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

(가) 유전자 조작 기술을 이용한 약독화 생균 백신 제조 기술에 관한 연구가 활발히 진행 중에 있음. 하지만 LMO 균주로 상용화까지는 많은 시간이 필요함

(나) 가금 티푸스 원인균인 살모넬라 갈리나룸 약독화 생균 백신이 1956년에 개발되어 1960대부터 전 세계적으로 사용되고 있음. 그러나 인수공통 원인균인 살모넬라 타이피리움에 대한 예방백신은 전무한 실정임.

(2) 시장현황

(가) 가금티푸스는 전 세계적으로 발생하여 양계농가에 심각한 경제적 손실을 입히고 있는 바, 개발도상국이 정확한 집계는 되고 있지 않지만 국내에서만 약 50억원 정도의 백신 비용이 소용되고 있는 점을 감안한다면 약 1조원 이상의 시장이 형성되어 있을 것으로 추정 됨.

(나) 2018년 한국엠에스디동물약품 제조 노빌리스 살렌박-티 (*Salmonella enteritidis* 및 *Salmonella Typhimurium* 포르말린 불활화 사균체 백신) 제품이 살모넬라 톱슨에 의한 식중독 사고 발생으로 인해 7,000여만원 매출이 발생함.

(3) 경쟁기관현황

(가) 많은 다국적 기업은 살모넬라 균주를 포르말린 등으로 불활화 하여 오일 기반 아쥘벤트와 혼합하는 백신 형태를 취하고 있음

(나) 또는 유전자 조작기술에 바탕한 약독화 생균 백신 개발에 집중하고 있는 상태임.

(다) 따라서 다른 다국적 기업보다 먼저 인수공통전염병균이지만 가금에서는 불현성 감염이 많은 살모넬라 타이피리움 생균 같은 신개념 사균체 백신으로 제조하며 가금에서 치사률이 높은 가금티푸스 원인균인 살모넬라 갈리나룸 또한 생균 같은 사균체로 제조하여 두 살모넬라균주가 혼합된 백신을 제조하여 저렴하게 공급하여 양계 농가와 국민 보건 모두에 도움을 줄 수 있는 백신을 개발하고자 하며, 이들 혼합 백신 접종을 통한 백신의 탁월한 효능이 확인된다면 국내뿐 아니라 국외에 수출하여 외화 획득에 좋은 기회가 될 것임.

제3절. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

1. 연구개발의 추진전략·방법

가. 본 과제는 크게 2 부분으로 나누어짐 (그림 1 참조) : 국내 가금에서 분리한 Salmonella Typhimurium 및 Salmonella Gallinarum을 GI24 및 클로르헥시딘 등을 이용하여 신개념 불활화 사균체로 제조하여 가금에서 안정성 및 효능 검증 (1단계 : 제 1세부과제)을 통해 두 불활화 균주가 혼합된 백신의 산업화 수준의 제조공정을 확립하여 시제품을 개발 (2단계 : 제2세부과제). 본 과제의 목표달성을 위하여서는 각 단계별 참여기관과의 협력연구가 필수적임

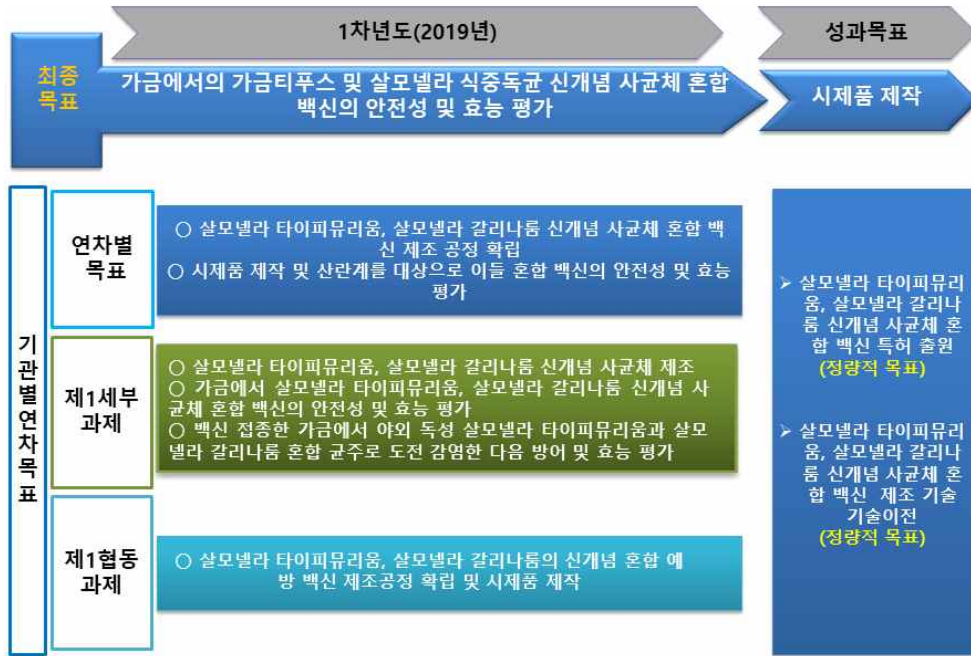


그림 1. 목표 달성을 위한 각 세부 과제별 목표

나. 본 과제의 효율적 추진을 위하여 전문기술 분야별 특성을 가진 2개 연구기관이 각 단계별 협력연구를 통하여 연구개발의 최종목적을 달성할 예정임. 각 기관별 전문성은 아래와 같음 (그림 2 참조)



그림 2. 연구 개발 추진 전략 개요

다. 분기별 화상회의 및 반기별 대면회의를 통한 연구진행 현황의 분석 및 국내외 기술현황의 브리핑 등을 통하여 과제의 방향설정 및 산업화 목표에 대한 지속적인 검토 실시

2. 연구개발 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	가금티푸스 및 인수공통전염 살모넬라 식중독 예방백신 개발	주관연구책임자 (허진)외 총 15명

기관별 참여 현황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
대 기 업		
중견기업		
중소기업	1	4
대 학	1	12
국공립(연)		
출 연 (연)		
기 타		



3. 연구개발 추진일정

1차년도																
일련번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	계획 수립 및 자료 조사	■	■												3,000	허진 (전북대학교산학협력단)
2	살모넬라 타이피무리움, 살모넬라 갈리나룸 배양 후 신개념 사균체 유도 조건 확립		■	■	■										20,000	허진 (전북대학교산학협력단)
3	마우스 및 가금에서 신개념 사균체 예방 백신의 안정성 검사					■	■	■	■						30,000	허진 (전북대학교산학협력단)
4	가금에서 신개념 사균체 예방 백신의 효능 평가								■	■	■	■	■		30,000	허진 (전북대학교산학협력단)
5	살모넬라 타이피무리움, 살모넬라 갈리나룸 배양 후 신개념 사균체 제조 공정 확립												■	■	37,000	정호경 (주)코미팜

제2장. 연구수행 내용 및 결과

제1절. 1차년도 연구 수행 내용 및 결과

1. 주관연구기관

: 인수공통전염 및 가금티푸스 살모넬라 신개념 사균체 최적의 유도 기술 확립

가. 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 배양 후 신개념 사균체 유도 조건 확립

(1) 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 최적의 신개념 사균체 유도 조건 확립

(가) 살모넬라 타이피뮤리움 신개념 사균체 유도 최적 AMP 및 유사 물질 발굴 및 최적 조건 확립

1) 연구수행 내용

㉞ GI-24, PMAP-36, Chlorhexidine 등 여러 물질을 다양한 농도로 반응 시간을 달리하여 살모넬라 타이피뮤리움 (표 1 참조) 불활화를 유도한 후 5% Fetal bovine serum 첨가 LB broth 또는 TSB broth 또는 영양 배지 등 10ml에 불활화 유도 사균체 1ml를 첨가하여 37°C에서 5일간 배양하여 완전 불활화 여부를 확인하였다.

2) 연구 수행 결과

- ① 신개념 *Salmonella* Typhimurium 불활화 사균체 유도 최적 조건을 확립하기 위해 완전 불활화 여부를 확인하여 본 결과 chlorhexidine digluconate solution (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)을 Optical density 600nm (OD₆₀₀)에서 0.9까지 배양한 배양액에 200 μ l 첨가하여 37°C에서 1시간 이상 반응 시킴으로써 완전 불활화가 가능함을 확인하였다. 그 외 성분은 완전 불활화가 이루어지지 않아 신개념 살모넬라 타이피뮤리움 불활화 사균체 제조를 위해서는 chlorhexidine digluconate solution을 OD₆₀₀에서 0.9까지 배양된 *Salmonella* Typhimurium 배양액에 200 μ l 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시키는 것이 최적의 조건임을 확인하였다.
- ① 유도된 사균체를 전자현미경 TEM으로 촬영하여 본 결과 세포질 성분이 빠져 나가고 세포 외형은 그대로 유지하고 있음을 확인 할 수 있었다 (그림 1 참조).

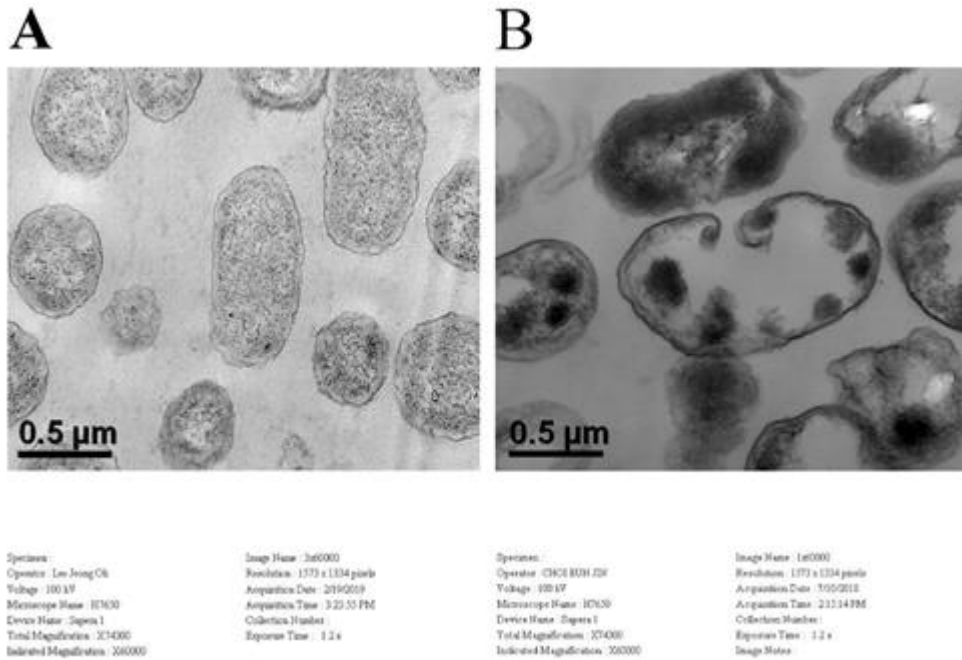


그림 1. 살모넬라 타이피뮤리움을 Chlorhexidine으로 미처리군(A)과 처리군(B)에 대한 TEM 사진.

3) 고찰

Salmonella Typhimurium (ST)의 불활화 사균체 유도 최적 조건을 확립하기 위해 여러 물질을 가지고 다양한 농도와 반응 시간 등으로 완전 불활화 여부를 확인하여 본 결과, ST를 OD₆₀₀ 0.9까지 배양한 후 chlorhexidine digluconate solution을 200 μ l 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킴으로써 완전 불활화가 가능함을 확인하였다. 더불어 유도된 사균체를 전자현미경 TEM으로 촬영하여 본 결과, 세포질 성분이 빠져 나가고 세포 외형은 그대로 유지하고 있음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 요약하여 보면 ST를 신개념 불활화 사균체로 제조하기 위한 최적의 조건은 ST를 OD₆₀₀에서 0.9까지 배양한 후 chlorhexidine digluconate solution을 200 μ l 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시키는 것이었다.

(나) 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 유도 최적 AMP 및 유사 물질 발굴 및 최적 조건 확립

1) 연구수행 내용

- ① GI-24, PMAP-36, Chlorhexidine 등 여러 물질을 다양한 농도와 다양한 반응 시간으로 살모넬라 갈리나룸 (표 1 참조) 불활화를 유도한 후 5% Fetal bovine serum 첨가 LB broth 또는 TSB broth 또는 영양 배지 등 10ml에 불활화 유도 사균체 1ml를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 5일간 배양하여 완전 불활화 여부를 확인하였다.

2) 연구 수행 결과

- ① 신개념 *Salmonella* Gallinarum 불활화 사균체 유도 최적 조건을 확립하기 위해 완전 불활화 여부를 확인하여 본 결과 chlorhexidine digluconate solution (Merck

KGaA, Darmstadt, Germany)을 Optical density 600nm (OD₆₀₀)에서 0.9까지 배양한 배양액에 30 μ l 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분 이상 반응 시킴으로써 완전 불활화가 가능함을 확인하였다. 그 외 성분은 완전 불활화가 이루어지지 않아 신개념 살모넬라 갈리나룸 불활화 사균체 제조를 위해서는 chlorhexidine digluconate solution을 OD₆₀₀에서 0.9까지 배양된 *Salmonella* Gallinarum 배양액에 30 μ l 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시키는 것이 최적의 조건임을 확인하였다.

- ② 유도된 사균체를 전자현미경 TEM으로 촬영하여 본 결과 세포질 성분이 빠져 나가고 세포 외형은 그대로 유지하고 있음을 확인 할 수 있었다 (그림 2 참조).

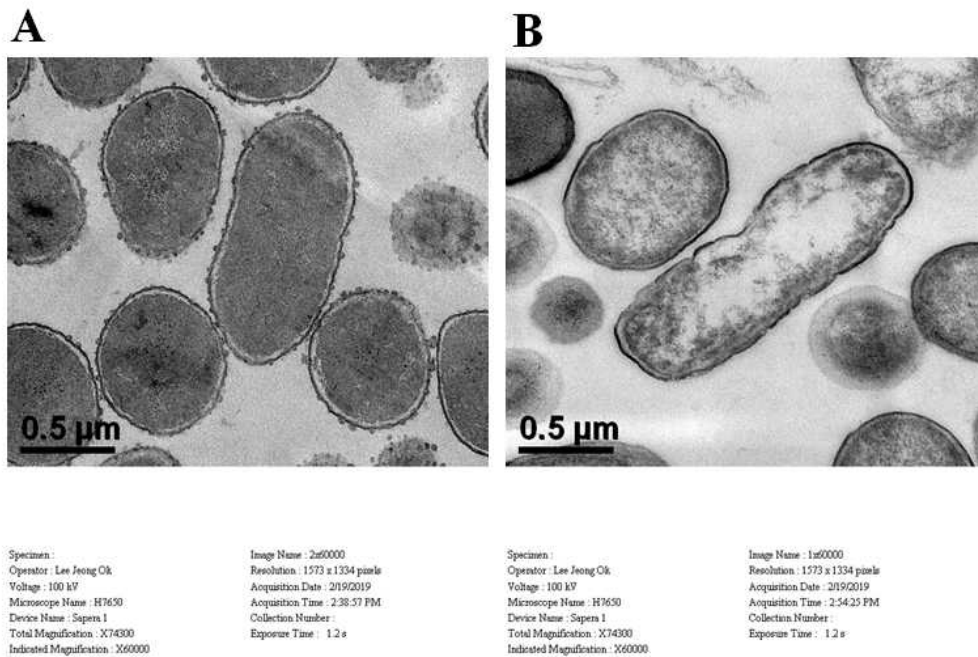


그림 2. 살모넬라 갈리나룸을 Chlorhexidine으로 미처리균(A)과 처리균(B)에 대한 TEM 사진.

표 1. AMP를 사용하여 고스트 불활화 백신 개발에 사용된 균주 목록

Strain	Description	Source
<i>Salmonella</i> Typhimurium	HJL812 Wild type <i>Salmonella</i> Typhimurium	Lab stock
<i>Salmonella</i> Gallinarum	HJL465 Wild type <i>Salmonella</i> Gallinarum	Lab stock

3) 고찰

Salmonella Gallinarum (SG)의 불활화 사균체 유도 최적 조건을 확립하기 위해 여러 물질을 가지고 다양한 농도와 반응 시간 등으로 완전 불활화 여부를 확인하여 본 결과, SG를 OD₆₀₀

0.9까지 배양한 후 chlorhexidine digluconate solution을 30 μ l 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킴으로써 완전 불활화가 가능함을 확인하였다. 더불어 유도된 사균체를 전자현미경 TEM으로 촬영하여 본 결과, 세포질 성분이 빠져 나가고 세포 외형은 그대로 유지하고 있음을 확인 할 수 있었다. 이상의 결과를 요약하여 보면 SG를 신개념 불활화 사균체로 제조하기 위한 최적의 조건은 SG를 OD₆₀₀에서 0.9까지 배양한 후 chlorhexidine digluconate solution을 30 μ l 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시키는 것이었다.

(2) 신개념 사균체로 유도된 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 완전 불활화 확인 조건 확립

1) 연구 수행 내용

(가) GI-24, PMAP-36, Chlorhexidine 등 여러 물질 첨가 후 완전 불활화 여부를 확인하기 위해 5% Fetal bovine serum 첨가 LB broth 또는 TSB broth 또는 nutrient broth 등 10ml에 불활화 유도 사균체 1ml를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 5일간 배양하여 배양 여부로 완전 불활화 여부를 확인 하였다.

(나) 또는 불활화 유도 사균체 부유액 100ul를 혈액배지, 5% Fetal bovine serum 첨가 LB agar 또는 TSB agar 등에 접종하여 5일간 배양하여 배양된 colony의 존재 유무와 배양된 균의 PCR 결과 등을 바탕으로 완전한 신개념 사균체로의 유도 여부 확인 하였다.

2) 연구 수행 결과

(가) 5% Fetal bobine serum (FBS)이 첨가된 LB broth에서는 colony가 보이는 조건에서도 다른 배양액에서는 colony가 관찰되지 않았다.

(나) 이렇게 5% FBS가 첨가된 배양액 말고 다른 배양 조건에서 colony가 관찰되지 않은 조건에서 완전 불활화가 이루어졌다고 판단되어 신개념 *Salmonella* Typhimurium 불활화 사균체를 마우스에 접종하여 4주간 임상 증상 발현 여부를 확인하여 보면, 야외 독성 균주로 도전감염하지 않았음에도 불구하고 백신 접종 3~4 주 후에는 야외 독성 균주로 접종한 것처럼 살모넬라 임상 증상이 관찰되어 폐사에 이르게 되며, spleen 등지에서 백신 균주가 분리되었다. 따라서 완전 불활화를 확인하기 위해서는 LB broth에 FBS를 5% 첨가하여 broth 및 agar 배지를 제조하여 확인이 필요함을 확인하였다.

(다) *Salmonella* Gallinarum의 경우도 *Salmonella* Typhimurium의 경우와 마찬가지로 5% FBS가 첨가된 배양액 말고 다른 배양 조건에서 colony가 관찰되지 않은 조건에서 완전 불활화가 이루어졌다고 판단되어 신개념 *Salmonella* Gallinarum 불활화 사균체를 갈색레그혼 종에 접종하여 6주간 임상 증상 발현 여부를 확인하여 보면, 야외 독성 균주로 도전감염하지 않았음에도 불구하고 백신 접종 5~6 주 후에는 야외 독성 균주로 접종한 것처럼 살모넬라 임상 증상이 관찰되어 폐사에 이르게 되며, spleen, liver 등지에서 백신 균주가 분리되었다. 따라서 완전 불활화를 확인하기 위해서는 LB broth에 FBS를 5% 첨가하여 broth 및 agar 배지를 제조하여 확인이 필요함을 확인되었다.

3) 고찰

Salmonella Typhimurium 및 *Salmonella Gallinarum* (SG)의 완전 불활화 여부를 확인하기 위해 LB broth, 5% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 LB broth, Tryptic soy broth, Nutrient broth 등에 신개념 불활화 사균체 반응액을 접종하여 5일간 배양 하여 균의 성장 여부를 확인하여 본 결과 5% FBS가 함유된 LB broth에서는 균이 배양되어 완전 불활화가 이루어지지 않았음이 확인되었지만 다른 배양액에서는 균이 배양되지 않아 완전 불활화로 오인할 수 있는 소지가 농후하였다. 이러한 결과를 확인하기 위해 5% FBS가 함유된 LB broth에서는 균이 확인되었지만 그 외 배지에서는 균이 자라지 않아 완전 불활화로 인정할 만한 수준에서의 불활화 사균체를 마우스나 갈색레그혼종에 접종하면 균이 서서히 성장하여 도전감염을 하지 않더라도 접종된 마우스와 가금에서 임상증상이 발현되어 폐사에 이르는 수준까지 발생하였다. 이상의 결과를 종합하여 보면, 살모넬라균의 완전 불활화 여부를 확인하기 위해서는 FBS가 함유된 LB broth에서의 균 배양 여부가 최적일 것으로 생각되었다.

(3) 투사전자현미경 등을 이용하여 신개념 사균체 완전 유도 여부 확인

1) 연구 수행 내용

- (가) 유도된 사균체를 ISA70 아주번트와 혼합 전에 하룻밤 2.5% 글루타르 알데히드로 선 고정 후, 박테리아 펠릿을 PBS로 3회 세척하고 2시간 동안 PBS에 1% 사산화오스뮴으로 후 고정하였다. 고정된 박테리아 세포를 PBS로 3회 세척하고 다양한 일련의 에탄올(50%, 70%, 90%, 100%)에 15분 동안 탈수시킴.
- (나) 20 분 동안 무수 아세톤에 배치한 후, 이러한 샘플을 각각 1시간 동안 무수 아세톤 및 에폭시 수지의 1:1 및 1:3 혼합물에 옮기고, 밤새 순수 에폭시 수지에 옮김.
- (다) 울트라마이크로톰(Ultramicrotome)를 이용하여 얻은 초박절편을 우라닐 아세테이트와 리드 시트레이트로 후-염색.
- (라) 표본을 투과전자현미경(Hitachi H-7650, Japan)으로 관찰.
- (마) TEM은 Lv et al (Lv et al. 2014)에 설명된 방식에 따라 촬영.

2) 연구 수행 결과

- (가) TEM으로 촬영하여 본 결과 세포질 성분이 빠져 나가고 세포 외형은 그대로 유지하고 있음을 확인 할 수 있었다. (그림 3 참조)

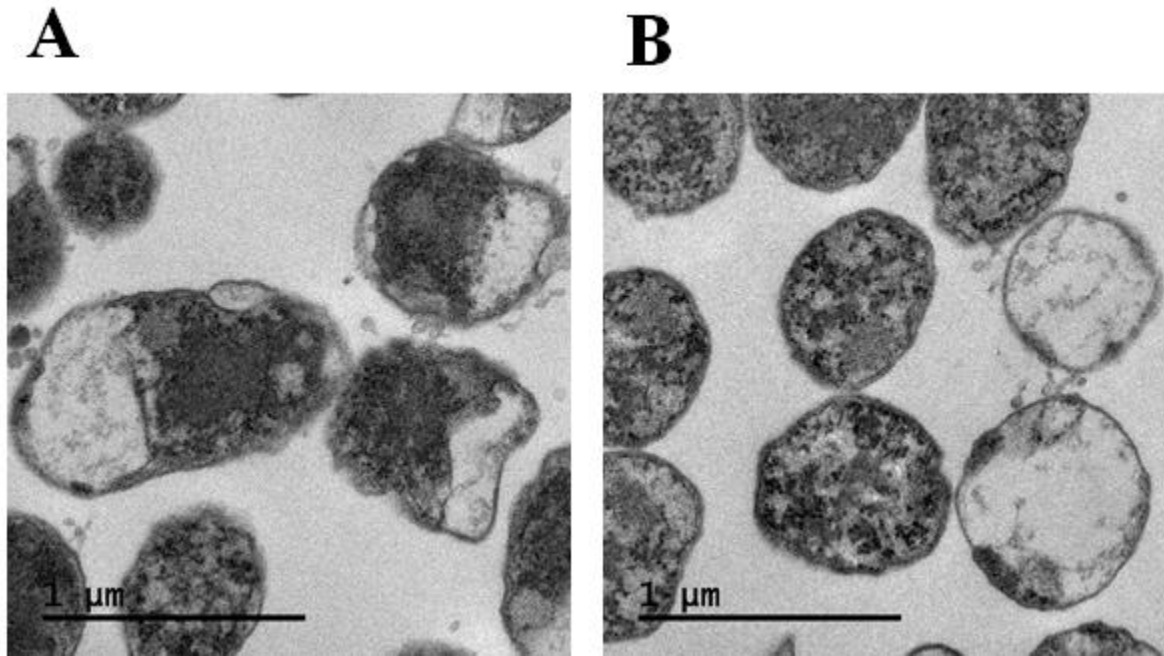


그림 3. Chlorhexidine으로 유도된 사균체 백신에 ISA70 아주번트를 혼합한 살모넬라 타이피뮤리움(A), 살모넬라 갈리나룸(B)에 대한 TEM 사진.

3) 고찰

chlorhexidine digluconate solution을 이용하여 *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Gallinarum (SG)의 완전 불활화 여부가 확인된 후 TEM 사진으로 확인하여 보면, 두 균주 모두 chlorhexidine digluconate solution 처리 전에는 세포질 성분으로 가득찬 세포가 관찰된 반면, chlorhexidine digluconate solution으로 반응 후에는 세포에 한 구멍을 만들고 세포질 성분이 빠져 나가 있는 것이 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 chlorhexidine digluconate solution으로 반응시키면 균에 구멍을 만들고 세포질 성분이 빠져나가 균이 사멸하게 되기 때문에 살아있을 때와 마찬가지로 완벽한 세포벽을 이루고 있을 수 있음이 확인되었다고 생각되었다.

나. 마우스에서 살모넬라 타이피뮤리움 신개념 사균체 예방 백신의 안전성 평가

(1) 연구 수행 내용

1) 완전 불활화 살모넬라 타이피뮤리움 신개념 사균체 예방 백신 마우스에 근육으로 2회 접종하였다.

(가) 실험동물 : 5주령 Balb/C 마우스 60마리를 구입하여 실험에 사용하였다.

(나) 백신 접종 : 1주일간의 순화 기간을 거친 후 채혈하여 살모넬라 타이피뮤리움의 OMPs에 음성인 마우스를 실험에 사용하였다. 6주령이 되었을 때 각 그룹별(각 그룹 당 10마리)로 표 2에 서술되어 있는 그룹별 균수가 되도록 제조하여 0.1ml 씩 1차 접종, 2주 후에 같은 방식으로 근육 내로 2차 접종하였다 (그림 4).

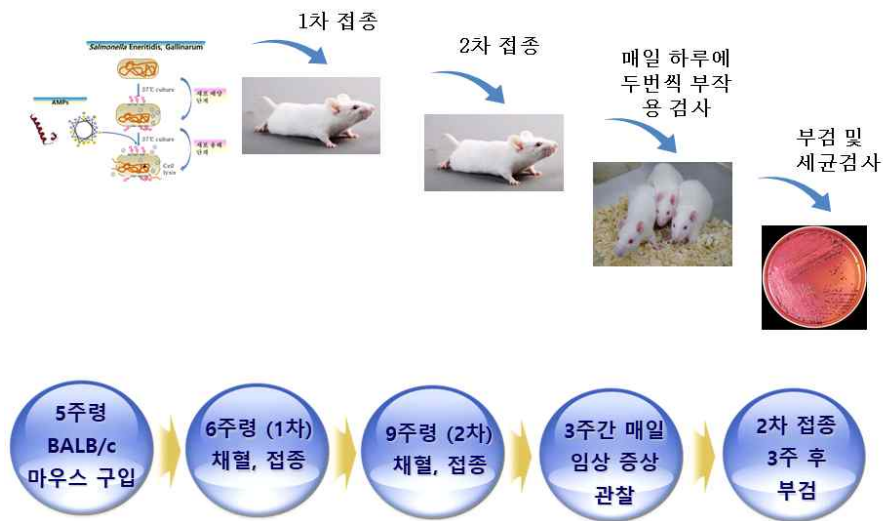


그림 4. 마스우에서 살모넬라 타이피푸리움 사균체 예방백신의 안전성 실험 개요

표 2. Balb/C 마우스를 대상으로 한 인수공통 살모넬라 신개념 사균체 예방 백신의 안전성 평가 시험

그룹	1차 접종 (6주령)	2차 접종 (9주령)	부검 (12주령)
A	-	-	백신 접종 후 3주간 매일 하루에 두 번씩 폐사 여부 확인, 2차 접종 3주 후에 모든 마우스를 대상으로 부검하여 육안적 및 조직학적 증상 및 백신 접종 부위 관찰
B	PBS	PBS	
C	포르말린 불활화 혼합 백신	포르말린 불활화 혼합 백신	
D	신개념 사균체 백신	신개념 사균체 백신	
E	신개념 사균체 백신 2배 용량	신개념 사균체 백신 2배 용량	
F	신개념 사균체 백신 4배 용량	신개념 사균체 백신 4배 용량	

- 2) 정기적으로 채혈하여 살모넬라 타이피푸리움 OMPs를 이용한 ELISA로부터 면역 항체 유도 여부를 확인하였다.
- (가) 1차 접종 전 (0 weeks post prime immunization; WPPI), 2차 접종 전 (2 WPPI), 2차 접종 후 2주 (4 WPPI) 쯤에 각각 모든 마우스로부터 채혈하여 혈청을 분리하였다.
- (나) 살모넬라 타이피푸리움의 OMPs를 대상으로 mouse ELISA kit를 사용하여 serum IgG 역가를 측정하였다.

- 3) 2차 예방접종 후 3주째에 부검을 통해 백신 접종 부위에서의 이상 증상 발현 여부 확인
 (가) 2차 접종 후 3주째에 생존 한 모든 마우스를 희생시켜 백신 접종 부위에서의 염증 반응 및 이상 증상 발현 유무를 육안적 소견 검사를 수행하였다.
 (나) 육안적으로 이상이 발견되면 주위 조직병리학적 소견을 검사하였다.
- 4) 2차 예방접종 후 3주간 폐사 여부 확인 및 생존 마우스로부터 채취한 각 장기 (간, 비장)에서 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 백신 균주 분리 및 동정
 (가) 2차 접종 후 3주째에 모든 마우스를 희생시켜 모든 장기에 대해 육안적 이상 소견 검사를 실시하였다.
 (나) 이상 소견 발견시 조직병리학적 소견 검사를 수행하였다.
 (다) 이상 소견이 발견되지 않아도 간, 비장 등으로부터 인수공통 살모넬라 균 분리 및 동정하였다.
- ① 각 장기를 무균적으로 채취하여 각 조직당 Buffered pepton water로 9배 희석하여 유제함. 유제된 액을 37℃에서 하룻밤 배양
 - ② 하룻밤 배양된 배양액 100ul를 RV broth 10ml에 첨가한 후 42℃에서 24시간 배양
 - ③ 배양액을 BGA agar에 100ul씩 도말하여 37℃에서 24시간 배양
 - ④ 전형적인 살모넬라 균주로 의심되는 colony를 표 3에서 서술한 primer를 이용하여 살모넬라 타이피리움 여부 확인
- 5) 마우스에서의 살모넬라 타이피리움 신개념 사균체 예방 백신 안전성 평가 방법은 (Moon et al. 2017)을 사용하여 진행

표 3. 이 실험에 사용된 각 살모넬라균 확인용 프라이머

살모넬라 혈청형	프라이머	Sequence	크기
<i>Salmonella</i> spp.	OMPCF	ATC GCT GAC TTA TGC AAT CG	204
	OMPCR	CGG GTT GCG TTA TAG GTC TG	
<i>Salmonella</i> Typhimurium	TYPHF	TTG TTC ACT TTT TAC CCC TGA A	401
	TYPHR	CCC TGA CAG CCG TTA GAT ATT	

(2) 연구 수행 결과

1) 면역 항체 유도

- (가) 그림 5에서 보는 바와 같이 포르말린 접종 군뿐만 아니라 신개념 사균체를 접종한 모든 그룹에서 백신 접종 3주 후부터 항체 역가가 증가하기 시작하여 접종 6주 후에는 대조군에 비해 월등한 항체 역가가 증가하였다. 또한 신개념 사균체의 경우 2배 및 4배 접종 그룹에서 원 배수의 접종 그룹에 비해 높은 항체 역가가 관찰되어 많은 항원량을 접종할수록 높은 항체 역가가 유도됨이 확인되었다.

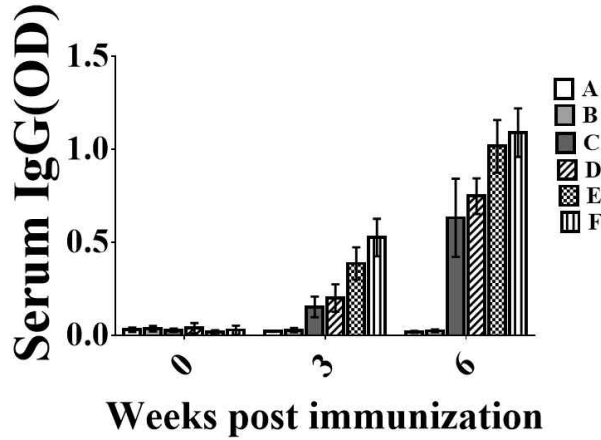


그림 5. 마우스에서의 항-*Salmonella* Typhimurium OMPs 혈청 IgG 역가

2) 백신 접종 부위에서의 이상 증상 발현

(가) 2차 접종 후 3주째에 생존 한 모든 마우스를 희생시켜 백신 접종 부위에서의 염증 반응 및 이상 증상 발현 유무를 육안적 소견을 검사한 결과, 백신 접종한 모든 마우스에서 육안적으로 이상 소견이 관찰되지 않아 신개념 불활화 사균체의 접종 부위에서의 안전성이 확인 되었다.

(나) 2차 접종 후 3주 째에 모든 마우스에 대해 육안적 이상 소견을 관찰한 결과 육안적으로 이상 소견이 관찰되지 않아 백신 주위 조직병리학적 소견을 검사하지 않았다 (그림 6).

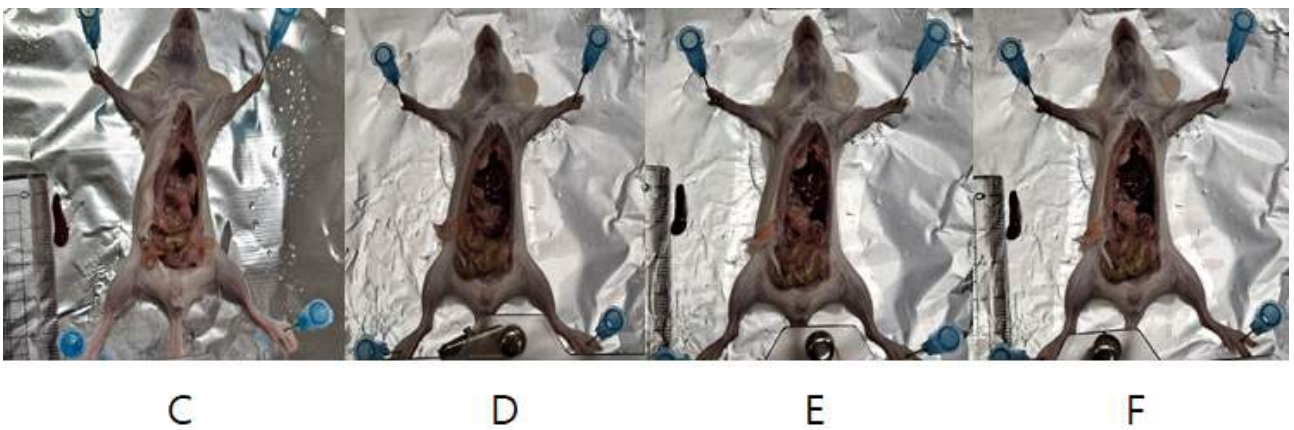


그림 6. 마우스에서 다양한 농도로 백신을 2차 접종 3주 후 부검

3) 백신 접종 후 폐사 및 생존 마우스로부터 채취한 각 장기 (간, 비장)에서 살모넬라 타이피뮤리움 백신 균주 분리

(가) 2차 접종 후 2주째에 생존 한 모든 마우스를 희생시켜 모든 장기에 대한 육안적 소

견을 검사한 결과, 백신 접종한 모든 마우스에서 육안적으로 이상 소견이 관찰되지 않아 신개념 불활화 사균체의 안전성이 확인 되었으며, 육안적 이상 소견이 관찰되지 않아 조직병리학적 소견 검사를 하지 않았다 (그림 7).

(나) 이상 소견이 발견되지 않아도 간, 비장 등으로부터 백신 접종 군에 대한 분리 시도를 하여 보았지만 5% FBS를 첨가한 LB 배지에서 성장하지 않은 완전 불활화 사균 백신을 접종한 모든 접종 그룹의 마우스의 spleen 및 liver에서 백신 접종균이 분리되지 않아 완전 불활화 사균체 백신의 안전성을 입증하였다.

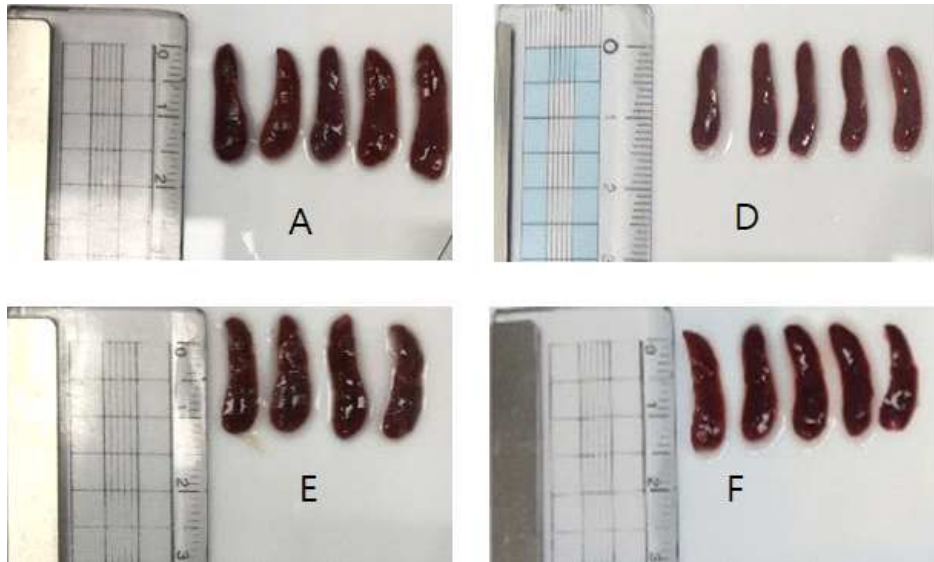


그림 7. 마우스에서 다양한 농도로 백신 접종 2주 후 spleen 비교

(3) 고찰

5% FBS가 첨가된 LB broth에서 완전 불활화 여부가 확인한 신개념 *Salmonella* Typhimurium 불활화 사균체 백신을 이 균주에 가장 민감한 마우스를 대상으로 안전성 평가를 수행하여 보았다. 즉, 접종 균량, 접종 균량의 2배, 4배를 마우스에 각각 접종하여 1차 접종 후 3주간 그리고 2차 접종 후 3주간 발열, 설사, 폐사 등과 같은 부작용 여부를 확인하여 본 결과 아무런 임상 증상이 관찰되지 않았다. 접종전, 1차 접종 후 3주, 2차 접종 후 3주째의 각 혈청을 대상으로 하여 접종에 따른 항체 형성 유무를 확인하여 본 결과, 포르말린으로 불활화 한 사균체, 그리고 개발 백신을 다양한 농도로 접종한 모든 그룹에서 대조군에 비해 월등한 항체 역가가 관찰되었으며 신개념 사균체를 2배 4배로 각각 접종한 그룹에서 접종량으로 접종한 그룹에 비해 증가된 항체역가가 관찰되었다.

마우스에서의 안전성 평가의 일환으로 2차 접종 후 3주째에 모든 마우스를 부검을 통해 안전성으로 확인하였다. 우선 백신 접종 부위인 근육에서의 염증 발생 유무를 확인하여 본 결과 모든 백신 접종 그룹의 마우스에서 염증 및 이상 소견이 관찰되지 않았으며, 모든 장기를 대상으로 한 육안적 소견에서도 종대 및 염증 등 이상 소견이 관찰되지 않았다. 이상소견이 관찰되지 않았지만 완전 불활화 여부를 확인하기 위하여 모든 그룹의 마

우스의 spleen으로부터 백신 균주의 분리를 시도하여 보았지만 접종하지 않은 그룹뿐만 아니라 모든 그룹의 마우스로부터 백신 접종균이 분리되지 않았다. 이상의 결과는 클로르헥시딘으로 제조된 신개념 *Salmonella* Typhimurium 불활화 사균체 백신의 안전성이 확인되었으며 동시에 접종량에 따라 항체 역가가 증가할 수 있음이 확인되었다.

다. 가금에서 신개념 사균체 예방 백신의 안전성 평가

(1) 연구 수행 내용

1) 완전 불활화 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 예방 백신 닭에 근육으로 2회 접종

(가) 실험동물 : 5주령 갈색레그혼종 90수를 구입하여 실험에 사용 하였다.

(나) 백신 접종 : 1주일간의 순화 기간을 거친 후 채혈하여 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸의 각 OMPs에 음성인 닭만을 실험에 사용하였다. 6주령이 되었을 때 각 그룹별 (그룹 당 15수)로 표 4에 서술되어 있는 그룹별 균수가 되도록 제조하여 0.5ml 씩 1차 접종, 3주 후에 같은 방식으로 근육 내로 2차 접종한 후 3주간 가금의 발열, 설사, 폐사, 운동실조, 식욕감퇴 등과 같은 부작용 발생 여부를 확인하였다 (그림 8).

표 4. 갈색레그혼종을 대상으로 한 인수공통 살모넬라 신개념 사균체 예방 백신의 안전성 평가 시험 개요

그룹	1차 접종 (6주령)	2차 접종 (9주령)	부검 (11주령)
A	-	-	백신 접종 후 2주간 매일 하루에 두 번씩 폐사 여부 확인, 2차 접종 2주 후에 모든 가금을 대상으로 부검하여 육안적 및 조직학적 증상 및 백신 접종 부위 병변 확인
B	PBS	PBS	
C	포르말린 불활화 혼합 백신	포르말린 불활화 혼합 백신	
D	신개념 사균체 백신	신개념 사균체 백신	
E	신개념 사균체 백신 2배 용량	신개념 사균체 백신 2배 용량	
F	신개념 사균체 백신 4배 용량	신개념 사균체 백신 4배 용량	

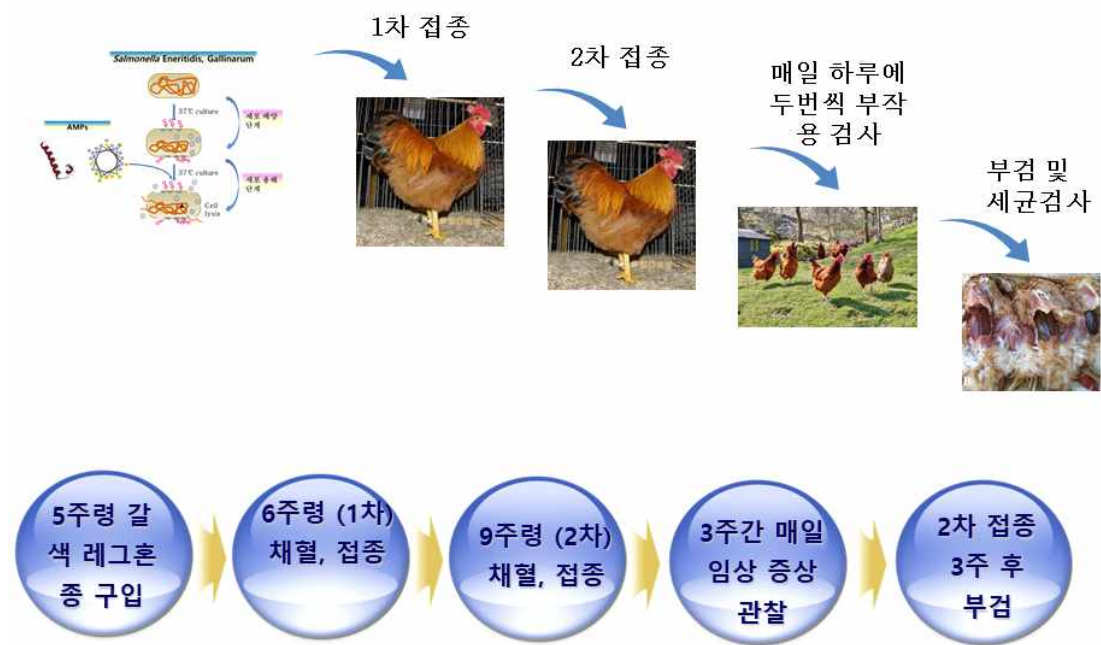


그림 8. 갈색 레그혼종에서 살모넬라 타이피유리움 및 살모넬라 갈리나룸 불활화 사균체 예방백신의 안전성 실험 개요

- 2) 정기적으로 채혈하여 각 살모넬라 OMPs를 이용한 ELISA로부터 면역 항체 유도 여부 확인
 - (가) 1차 접종 전 (0 weeks post prime immunization; WPPI), 2차 접종 전 (3 WPPI), 그리고 부검 전 (6 WPPI)에 각각 모든 가금으로부터 채혈하여 혈청 분리 후 보관하며 실험에 사용하였다.
 - (나) 살모넬라 타이피유리움, 살모넬라 갈리나룸의 각 OMPs를 대상으로 chickem ELISA kit를 사용하여 serum IgG 역가를 측정하였다.

- 3) 2차 예방접종 후 3주간 안전성 평가 및 3주째에 부검을 통해 백신 접종 부위 및 각 장기에서의 이상 증상 발현 여부 확인
 - (가) 2차 예방접종 후 3주간 매일 하루에 두 번씩 닭의 이상 (체온 상승, 침울, 운동 실조, 사료 섭취를 저하, 설사, 폐사 등) 유무를 확인하였다.
 - (나) 2차 예방접종 후 3주째에 생존 한 모든 갈색레그혼종을 희생시켜 백신 접종 부위에서의 염증 반응 및 이상 증상 발현 유무 육안적 소견 검사를 수행하였다.
 - (다) 육안적으로 이상이 발견되면 주위 조직병리학적 소견 검사를 수행하였다.

- 4) 2차 예방접종 후 3주간 폐사 여부 확인 및 생존 닭으로부터 채취한 각 장기(간, 비장, 맹장, 총배설강, 난소, 난관)에서 살모넬라 타이피유리움, 살모넬라 갈리나룸 백신 균주 분리 및 동정

- (가) 2차 예방접종 후 3주째에 모든 갈색레그혼종을 희생시켜 모든 장기에 대해 육안적 이상 소견 검사
- (나) 이상 소견 발견시 조직병리학적 소견 검사
- (다) 이상 소견이 발견되지 않아도 간, 비장 등으로부터 인수공통 살모넬라 균 분리 및 동정을 수행하였다.
- ① 각 장기를 무균적으로 채취하여 각 조직당 Buffered pepton water로 9배 희석하여 유제함. 유제된 액을 37℃에서 하룻밤 배양
 - ② 하룻밤 배양된 배양액 100ul를 RV broth 10ml에 첨가한 후 42℃에서 24시간 배양
 - ③ 배양액을 BGA agar에 100ul씩 도말하여 37℃에서 24시간 배양
 - ④ 전형적인 살모넬라 균주로 의심되는 colony를 표 5에서 서술한 primer를 이용하여 살모넬라 타이피뮤리움 및 살모넬라 갈리나룸 여부를 확인하였다.
- 5) 가금에서의 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 예방 백신 안전성 평가 방법은 (농림축산검역본부고시 제2016-99호, 1-3-02-02 가금티프스 불활화오일백신 검정기준)을 참조하여 진행

표 5. 이 실험에 사용된 각 살모넬라균 확인용 프라이머

살모넬라 혈청형	프라이머	Sequence	크기
<i>Salmonella</i> spp.	OMPCF	ATC GCT GAC TTA TGC AAT CG	204
	OMPCR	CGG GTT GCG TTA TAG GTC TG	
<i>Salmonella</i> Typhimurium	TYPHF	TTG TTC ACT TTT TAC CCC TGA A	401
	TYPHR	CCC TGA CAG CCG TTA GAT ATT	
<i>Salmonella</i> Gallinarum	SGL	GAT CTG CTG CCA GCT CAA	252
	SGR	GCG CCC TTT TCA AAA CAT A	
	SGPL	CGG TGT ACT GCC CGC TAT	174
	SGPR	CTG GGC ATT GAC GCA AA	

(2) 연구 수행 결과

1) 신개념 사균체 예방 백신 닭 근육 접종 후 부작용

(가) 실험동물 : 5주령 갈색레그혼종을 구입하여 실험에 사용 하였다.

(나) 각 그룹별로 표 5에 서술되어 있는 그룹별 균수가 되도록 제조하여 0.5ml 씩 1 차 접종, 3주 후에 같은 방식으로 근육 내로 2차 접종한 후 3주간 가금의 발열, 설사, 폐사, 운동실조, 식욕감퇴 등과 같은 부작용 발생여부를 확인하여 본 결과 1차 접종 후 3주간 그리고 2차 접종 후 3주간 모든 백신 접종 그룹의 모든 닭에서 아무런 임상 증상이 관찰되지 않았다.

2) 각 살모넬라 OMPs에 대한 ELISA 결과

(가) 1차 접종 전(0 weeks post prime immunization; WPPD), 2차 접종 전(3 WPPD), 부검 전 (6 WPPD)에 각각 모든 가금으로부터 채혈하여 혈청 분리 후 보관 하였다.

(나) 살모넬라 갈리나룸의 OMPs를 대상으로 chicken ELISA kit를 사용하여 serum IgG 역가 측정 해본 결과, 그림 9에서 보는 바와 같이 1차 접종 후 3주 째부터 모든 백신 접종 군에서 대조군에 비해 항체 역가 높게 관찰되었으며 2차 접종 후 3주 째에도 1차 접종 후 3주 째보다 약간 증가한 항체 역가가 관찰되었다. 더욱이 정량 접종그룹에 비해 2배 또는 4배의 접종량을 접종한 그룹에서도 별다른 차이가 관찰되지 않았다 (그림 9).

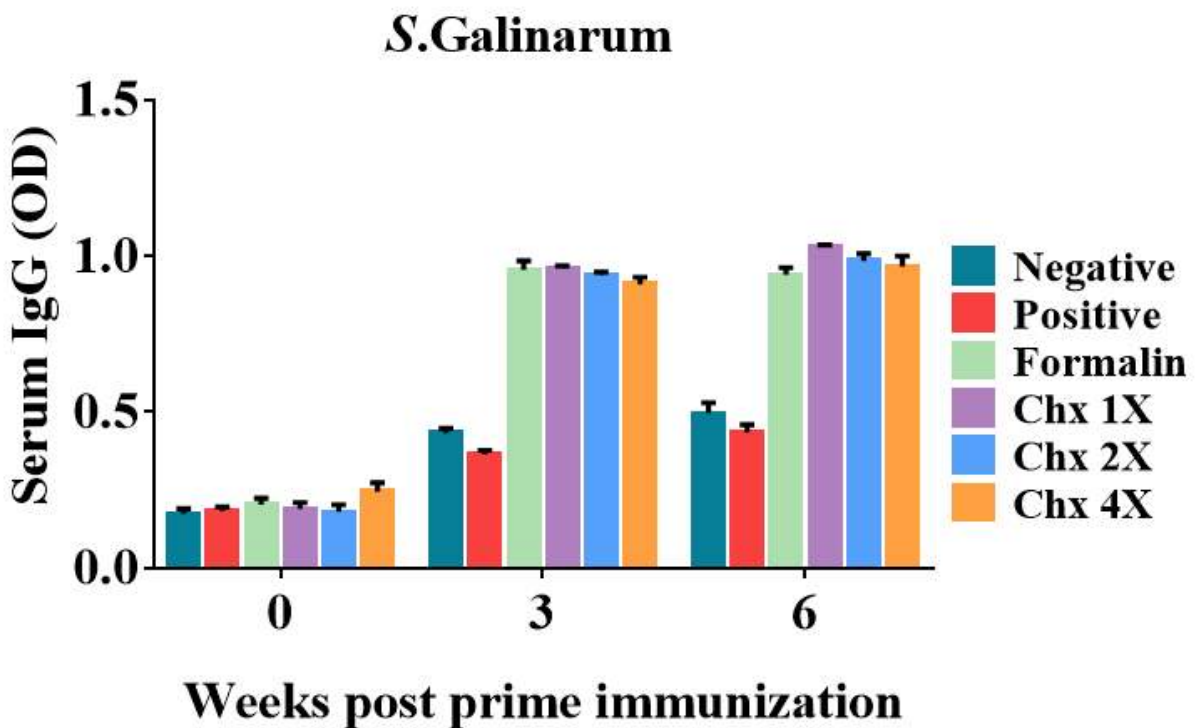


그림 9. 가금에서 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 고스트 사균체 혼합 접종 후 각 그룹별 살모넬라 갈리나룸에 대한 항체 역가

(다) 살모넬라 타이피리움의 OMPs를 대상으로 chickem ELISA kit를 사용하여 serum IgG 역가 측정 해본 결과, 그림 10에서 보는 바와 같이 1차 접종 후 3주 째부터 모든 백신 접종 군에서 대조군에 비해 항체 역가 높게 관찰되었으며 2차 접종 후 3주 째에도 1차 접종 후 3주 째보다 약간 증가한 항체 역가가 관찰되었다. 더욱이 정량 접종그룹에 비해 2배 또는 4배의 접종량을 접종한 그룹에서도 별다른 차이가 관찰 되지 않았다 (그림 10).

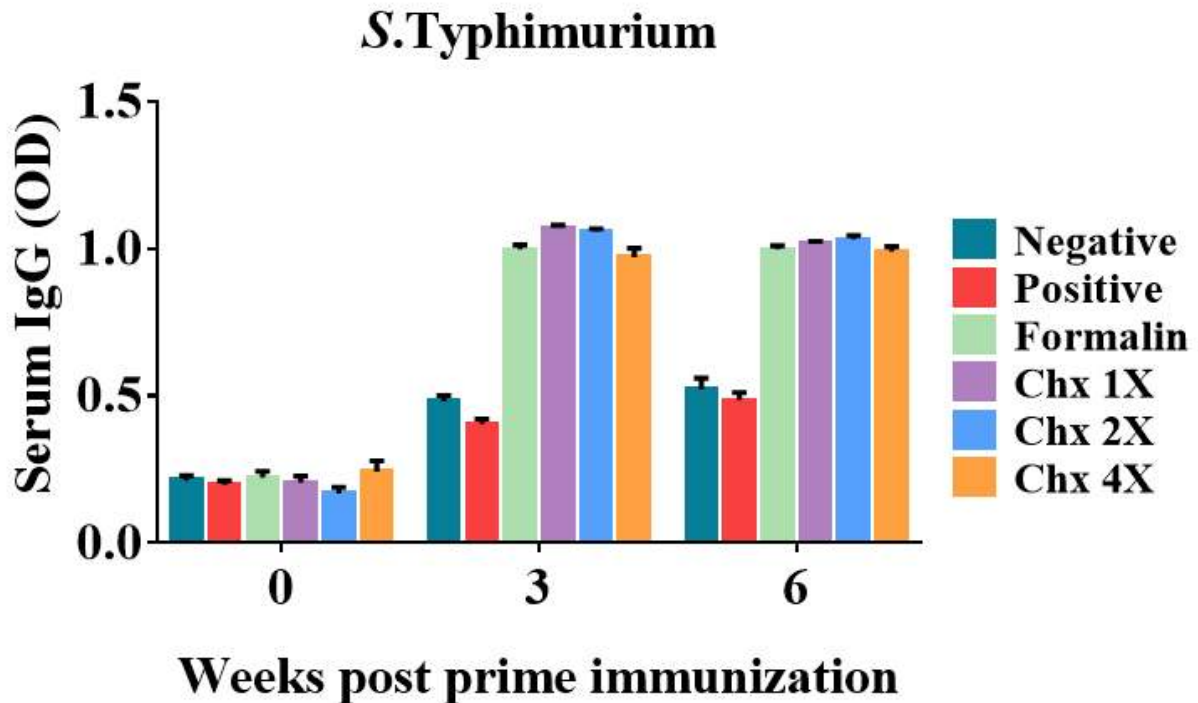


그림 10. 가금에서 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 고스트 사균체 혼합 접종 후 각 그룹별 살모넬라 타이피뮤리움에 대한 항체 역가

3) 부검을 통한 백신 접종 부위 및 각 장기에서의 이상 증상 발현

(가) 2차 예방접종 후 3주째에 생존 한 모든 갈색레그혼종을 희생시켜 백신 접종 부위 및 각 장기에서의 염증 반응 및 이상 증상 발현 유무 육안적 소견 검사를 수행하여 본 결과, 접종 부위 및 각 장기에서의 염증이나 멍 그리고 부종 등과 같은 이상 소견이 관찰되지 않았다 (그림 11, 12).

(나) 접종 부위에서의 육안적 이상이 발견되지 않아 주위 조직 병리학적 소견 검사를 수행하지 않았다.

4) 백신 접종 닭으로부터 채취한 각 장기 (간, 비장, 맹장, 총배설장, 난소, 난관)에서 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 백신 균주 분리

(가) 간, 비장, 맹장, 총배설장, 난소, 난관 등으로부터 인수공통 살모넬라 균 분리 및 동정을 수행하여 본 결과, 그 어떤 장기에서도 백신 접종균이 분리되지 않아 개발백신의 안전성이 확인되었다.



그림 11. 신개념 사균체 백신 2차 접종 3주 후 부검 소견

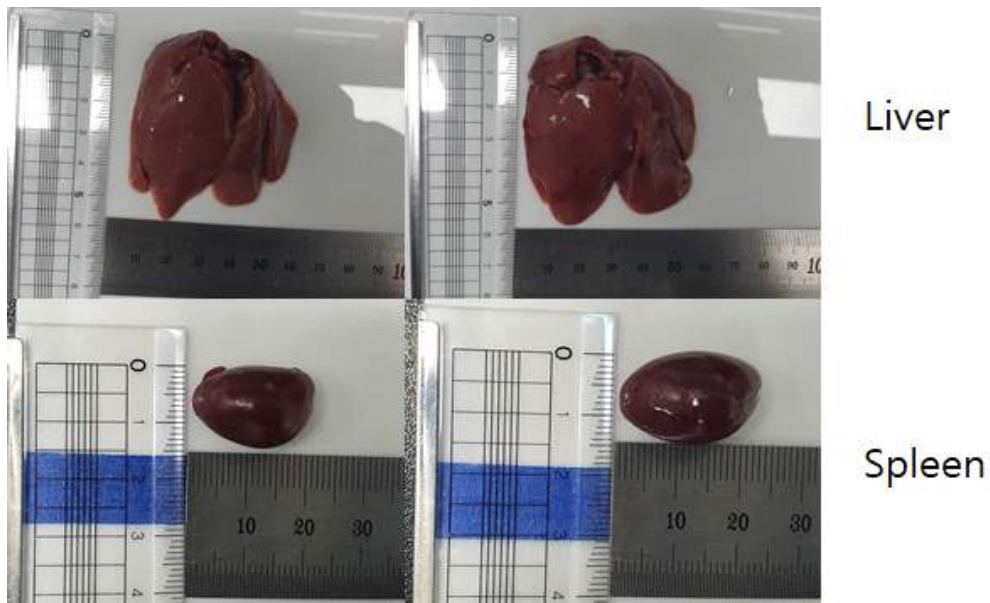


그림 12. 신개념 사균체 백신 2차 접종 3주 후 각 spleen 및 liver

(3) 고찰

클로르헥시딘으로 완전불활화가 유도된 *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Gallinarum 불활화 사균체를 가금티프스에 민감한 갈색레그혼종에 근육으로 3주 간격으로 2회 접종하여 접종 시마다 3주간 매일 하루에 두 번씩 발열, 설사, 폐사, 운동실조, 식욕감퇴 등의 부작용 증상을 관찰하여 본 결과, 이상 증상이 관찰되지 않았다.

접종전, 1차 접종 후 3주, 2차 접종 후 3주째에 각각 채혈하여 백신 접종에 따른 항체 형성 유무를 확인하여 본 결과, 접종 전에 비해 1차 접종 후에 모든 백신 접종 그룹에서 의미있는 증가가 관찰되었다. 하지만 2차 접종 후에는 1차 접종에 비해 크게 증가 하지 않았다. 또한 권장 접종량보다 2배 내지는 4배 많은 접종량으로 접종했음에도 불구하고 권장 접종량에 비해 크게 증가하지 않아 추가적인 확인 실험이 필요하다고 생각되었다.

또한 2차 접종 후 3주째에 모든 백신 접종 그룹의 갈색레그혼종을 부검하여 접종 부위에서의 염증, 멍, 부종 등의 이상 증상을 확인하여 보았지만 염증 등의 소견이 관찰되지 않았다. 이상 소견이 관찰되지 않았지만 각 장기로부터 백신 접종 균의 분리시도를 해보

았다. 하지만 그 언던 장기에서도 백신 접종 균이 분리되지 않았다.

이상의 결과를 요약하여 보면 클로르헥시딘은 *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Gallinarum을 완벽하게 불활화를 유도하였으며 이 불활화가 유도된 *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Gallinarum 불활화 사균체를 갈색 레그혼중에 근육으로 접종 시 면역 반응을 잘 유도하였다. 더불어 국내 가금에서 주로 사용되는 adjuvant인 ISA70과 혼합하여 근육접종하였을 때 접종 부위에 염증 등의 부작용이 발생하지 않았고 각종 장기에 대해서도 이상 소견이 관찰되지 않아 안전하게 백신으로 사용할 수 있음이 확인되었다.

라. 가금에서 신개념 사균체 예방 백신의 효능 평가

(1) 연구 수행 내용

1) 완전 불활화 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 예방 백신 닭에 근육으로 2회 접종

(가) 실험동물 : 5주령 갈색레그혼종을 구입하여 실험에 사용

(나) 백신 접종 : 1주일간의 순화 기간을 거친 후 채혈하여 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸의 각 OMPs에 음성인 닭만을 실험에 사용. 6주령이 되었을 때 각 그룹별로 표 6에 서술되어 있는 대로 근육 내로 9×10^8 cells/ 0.5ml가 되도록 1차 접종, 3주 후에 같은 방식으로 근육 내로 2차 접종하였다 (그림 13)

표 6. 갈색레그혼종을 대상으로 한 인수공통 살모넬라 신개념 사균체 예방 백신의 1회 및 2회 접종 후 효능 평가 시험 개요

그룹	1차 접종 (6주령)	2차 접종 (9주령)	도전감염 (12주령)	부검 (14주령)
A	-	-	-	도전감염 후 2주간 매일 하루에 두 번씩 폐사 여부 확인, 도전감염 2주 후에 모든 가금을 대상으로 부검하여 육안적 및 조직학적 증상 및 각 조직에서의 균 분리
B	PBS	PBS	야외 독성 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 혼합 균주 경구 접종	
C	포르말린 불활화 혼합 백신	포르말린 불활화 혼합 백신		
D	신개념 사균체 백신			
E	신개념 사균체 백신	신개념 사균체 백신		



그림 13. 갈색 레그혼종에서 살모넬라 타이피리움 및 살모넬라 갈리나룸 불활화 사균체 예방백신의 효능 실험 개요

2) 정기적으로 채혈하여 각 살모넬라 OMPs를 이용한 ELISA로부터 면역 항체 유도 여부 확인

(가) 1차 접종 전 (0 weeks post prime immunization; WPPI), 2차 접종 전 (3 WPPI), 도전 감염 전 (6 WPPI)에 각각 모든 가슴으로부터 채혈하여 혈청 분리 후 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

(나) 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸의 각 OMPs를 대상으로 chicken ELISA kit를 사용하여 serum IgG 역가를 측정하였다.

3) 2차 접종 후 10일 째에 비장 세포로부터 분리된 림프구로부터 CD4, CD8 등 측정

(가) 2차 접종 후 10일째에 각 그룹에서 5마리의 닭의 비장을 채취하기 위해 희생시키고, 비장들은 무균적으로 채취하였다.

(나) 비장세포들은 이전의 연구 Hur 등 (Hur et al., 2016)에서 기술된 방법에 따라 준비하였다.

- ① 즉, 각 그룹별로 5마리의 닭을 마지막 예방 접종 후 10일 째에 각각 무균적으로 spleen 을 채취하여 RPMI 1640으로 모았다.
- ② 그다음 0.8% 염화 암모늄 (ammonium chloride) (w/v)를 이용하여 적혈구 용해하였고, 380×g, 4°C 10분간 원심한 후 침전물을 멸균 PBS로 3번 세척하였다..
- ③ 마지막 원심 후 complete medium (100IU/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin 및 10% FCS을 포함하는 RPMI 1640)으로 재 부유하였다.
- ④ 배양을 위한 세포 수를 계산하여 각 살모넬라 OMPs로 48시간 반응시켰다.
- ⑤ 반응액에 형광물질이 부착된 CD3, CD4, CD8 단클론 항체를 이용하여 FACs로

CD3+CD4+ T-cells과 CD3+CD8+ T-cells의 분포를 비교 분석하였다.

4) 도전감염

- (가) 2차 접종 3주 후에 야외 병원성 살모넬라 타이피뮤리움 및 살모넬라 갈리나룸을 각각 1×10^9 CFU 씩 동량 혼합 (총 접종량 1×10^9 CFU/chicken) 하여 경구 접종하였다.
- (나) 도전감염 후 2주간 매일 하루에 두 번씩 폐사 여부를 확인하였으며, 도전감염 후 2주 째에 모든 생존 갈색레그혼종을 희생시켜 spleen과 liver 그리고 cecum에서 도전감염 균주를 분리동정하였다. 이렇게 분리 동정된균주는 표 7에서 기술된 프라이머를 이용하여 도전감염 균주 여부를 확인하였다.

표 7. 이 실험에 사용된 각 살모넬라균 확인용 프라이머

살모넬라 혈청형	프라이머	Sequence	크기
<i>Salmonella</i> spp.	OMPCF	ATC GCT GAC TTA TGC AAT CG	204
	OMPCR	CGG GTT GCG TTA TAG GTC TG	
<i>Salmonella</i> Typhimurium	TYPHF	TTG TTC ACT TTT TAC CCC TGA A	401
	TYPHR	CCC TGA CAG CCG TTA GAT ATT	
<i>Salmonella</i> Gallinarum	SGL	GAT CTG CTG CCA GCT CAA	252
	SGR	GCG CCC TTT TCA AAA CAT A	
	SGPL	CGG TGT ACT GCC CGC TAT	174
	SGPR	CTG GGC ATT GAC GCA AA	

(2) 연구 수행 결과

1) *Salmonella* Typhimurium OMPs 또는 *Salmonella* Gallinarum OMPs에 대한 항체 역가

(가) 1차 접종 전 (0 weeks post prime immunization; WPPI), 2차 접종 전 (3 WPPI), 도전감염 전 (6 WPPI)에 채혈한 혈청을 이용하여 각 *Salmonella* Typhimurium OMPs 또는 *Salmonella* Gaalinarum OMPs에 대한 항체 역가를 측정하여 본 결과는 그림 14와 15에서 보는 바와 같았다.

(나) 즉, *Salmonella* Gaalinarum OMPs에 대한 각 그룹별 항체 역가는 그림 14에서 보는 바와 같이 클로르헥시딘으로 유도된 불활화 사균체 백신을 접종한 그룹을 포함하여 모든 그룹에서 1차 접종 후 3주째부터 대조군에 비해 월등한 항체 역가 관찰되었으며, 2차 접종 후에도 1차 접종 후 3주 째와 비슷한 항체 역가가 관찰되었을 뿐이었다. 또한 클로르헥시딘 유도 불활화 사균체 백신을 2회 접종 한 그룹에서 2차 접종 후 1차 접종 때보다 약간 상승하기는 했으나 눈에 띄는 증가를 나타내지 못하였다. 더불어 1회 접종한 그룹이나 2회 접종한 그룹에서의 항체 역가가 비슷하게 증

가하였다.

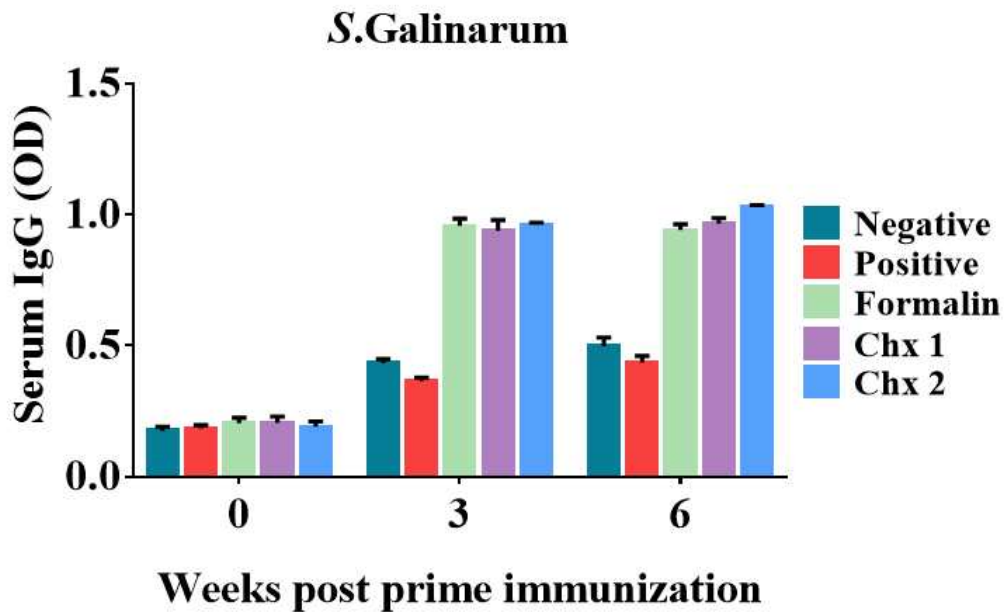


그림 14. 가금에서 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 고스트 사균체 혼합 접종 후 각 그룹별 살모넬라 갈리나룸에 대한 항체 역가

(다) *Salmonella* Typhimurium OMPs에 대한 각 그룹별 항체 역가는 그림 15에서 보는 바와 같이 클로르헥시딘으로 유도된 불활화 사균체 백신을 접종한 그룹을 포함 하여 모든 그룹에서 1차 접종 후 3주째부터 대조군에 비해 월등한 항체 역가 관찰되었으며, 2차 접종 후에도 1차 접종 후 3주 째와 비슷한 항체 역가가 관찰되었을 뿐이었다. 또한 클로르헥시딘 유도 불활화 사균체 백신을 2회 접종 한 그룹에서 2차 접종 후 1차 접종 때보다 오히려 약간 감소한 결과가 관찰되었다. 더불어 1회 접종한 그룹이나 2회 접종한 그룹에서의 항체 역가가 비슷하게 증가하였다.

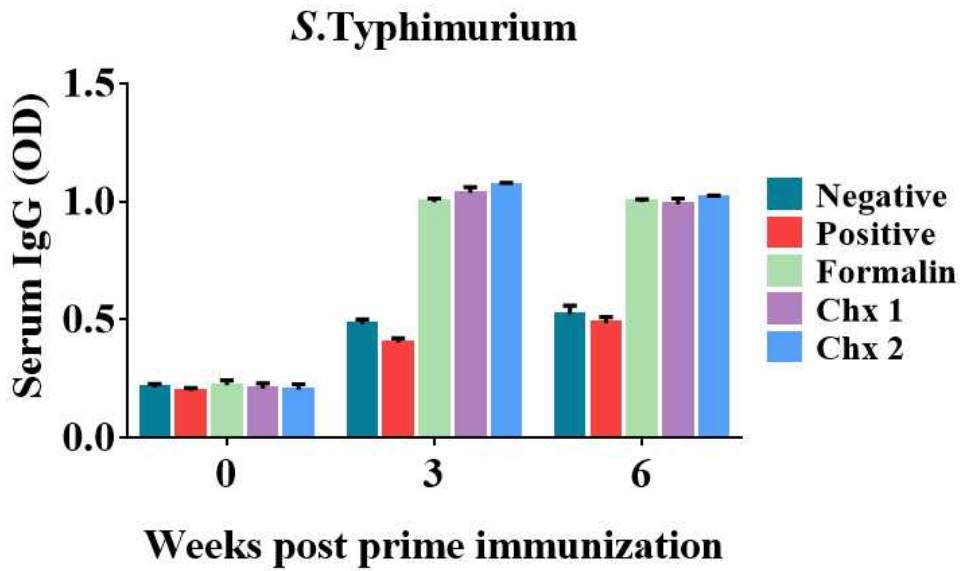


그림 15. 가금에서 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 고스트 사균체 혼합 접종 후 각 그룹별 살모넬라 타이피뮤리움에 대한 항체 역가

3) CD4, CD8 분포율

(가) 2차 접종 후 10일 (단 Chx1 그룹은 1차 접종 후 10일)째에 무균적으로 채취된 spleen 으로부터 CD3+ CD4+ T cells의 비율을 보면 그림 16에서 보는 바와 같이, 포르말린 으로 불활화 한 그룹이나 클로르헥시딘으로 불활화 후 1회 또는 2회 접종한 그룹이 나 모든 그룹에서 대조군에 비해 증가함을 확인할 수 있었다. 더욱이 클로르헥시딘 으로 2회 접종한 그룹이 다른 그룹에 비해 더 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

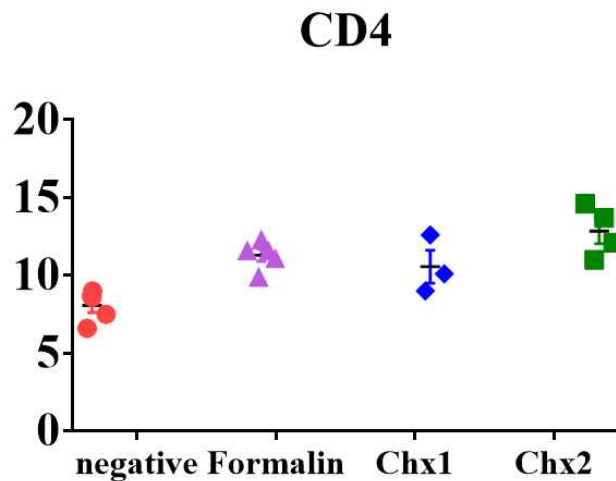


그림 16. 2차 접종 후 10일 째 (단 Chx1 그룹은 1차 접종 후 10일째)에 spleen으로부터의 각 살모넬라 항원으로 재 자극 후 측정된 CD3+ CD4+ 비율

(나) 2차 접종 후 10일 (단 Chx1 그룹은 1차 접종 후 10일)째에 무균적으로 채취된 spleen 으로부터 CD3+ CD8+ T cells의 비율을 살펴 보면 그림 17에서 보는 바와 같이, 클로르헥시딘으로 불활화 후 1회 또는 2회 접종한 그룹이 대조군에 비해 증가함을 확인할 수 있었다. 하지만 포르말린으로 불활화 한 그룹에서는 대조군에 비해 유의있는 증가가 관찰되지 않았다. 더욱이 클로르헥시딘으로 1회 접종한 그룹이 2회 접종한 그룹보다 약간 높게 더 증가하는 것이 확인되었다.

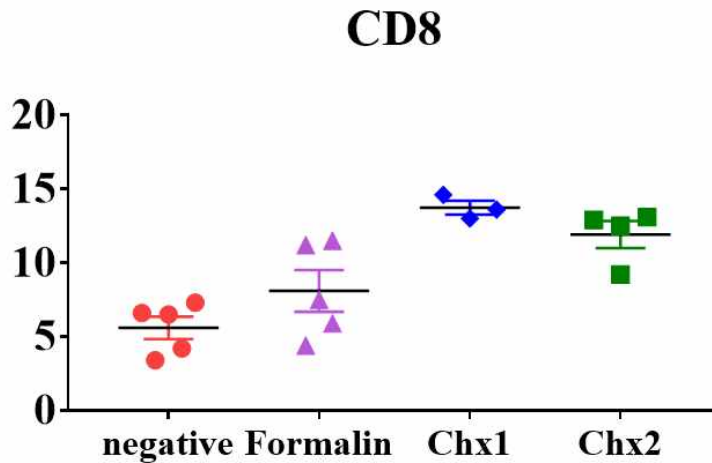


그림 17. 2차 접종 후 10일 째 (단 Chx1 그룹은 1차 접종 후 10일째)에 spleen으로부터의 각 살모넬라 항원으로 재 자극 후 측정된 CD3+ CD4+ 비율

4) 도전감염 후 생존률 및 부검 소견

(가) 2차 접종 후 3주 째 (단 Chx1 그룹은 1차 접종 후 6주 째)에 야외 독성 살모넬라 타이피뮤리움과 살모넬라 갈리나룸을 각각 혼합하여 경구 접종한 후 2주간 매일 하루에 두 번씩 폐사 여부를 확인한 결과는 그림 18에서 보는 바와 같았다.

(나) 멸균 PBS를 접종한 그룹에서는 도전감염 후 5일째부터 폐사하기 시작하여 9일째까지 총 9두가 폐사하여 실험이 끝날때까지 1두만이 생존하였다. 포르말린으로 유도된 불활화 사균백신을 접종한 그룹에서도 도전감염 후 2주 째에 40%만이 생존하였다. 하지만 클로르헥시딘으로 유도된 불활화 사균체로 접종한 그룹에서는 1회 접종의 경우에는 실험이 끝날 때까지 80%의 생존률이 그리고 2회 접종의 경우에는 70%의 생존률이 각각 관찰되었다.

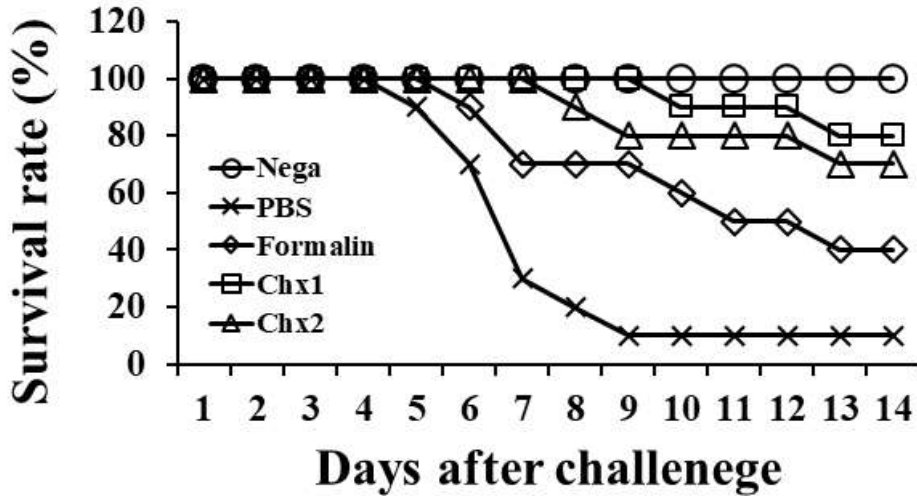






그림 18. 가금에서 백신 접종 후 도전감염 후 생존율

(다) 도전 감염 2주 후에 생존 한 모든 갈색레그혼종을 부검을 하면서 살펴 본 육안적 소견은 표 8에서 보는 바와 같았다. 즉, PBS 접종 그룹인 B 그룹에서는 살모넬라에 감염 된 후 나타나는 전형적인 소견인 검게 변하고 비대해진 spleen이 관찰되었다. 또한 포르말린 유도 불활화 사균체로 접종 된 그룹 (그룹 C)의 닭에서도 색이 변하고 비대해져 있는 spleen 들이 관찰되었다. 하지만 클로르헥시딘으로 유도된 신개념 사균체 백신을 1회 또는 2회 접종 한 그룹에서는 음성 대조군에 비해 약간 종대되었지만 거의 정상에 가깝거나 거의 비슷한 수준의 spleen 들이 대다수 관찰되었다..

표 8. 가금에서 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 고스트 사균체 혼합 접종 후 도전감염 후 육안적 결과

부검	
Group	
A	Negative

B	Positive	
C	Formalin	
D	신개념 사균체 백신 1번 접종	
E	신개념 사균체 백신 2번 접종	

(라) 도전감염 2주 후 생존한 모든 가금을 희생시켜 비장, 간, 맹장 등에서 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸을 분리하여 PCR로 확인하여 본 결과는 표 9에서 기술된 바와 같았다. 즉, 양성 대조군은 생존한 1두의 spleen과 liver 모두에서 균이 분리되었으며, 포르말린 유도 불활화 사균체로 접종한 그룹에서도 높은 수준의 균이 분리되었다. 하지만 클로르헥시딘으로 유도된 불활화 사균체로 접종한 그룹에서는 낮은 수준의 균 분리가 관찰되었다.

표 9. 가금에서 살모넬라 타이피리움, 살모넬라 갈리나룸 고스트 사균체 혼합 접종 후 도전감염 후 PCR 결과

부검 후 균 분리 PCR 확인				
Group		Liver(%)	Spleen	Cecum
A	Negative	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
B	Positive	1/1 (100%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)
C	Formalin	3/4 (75%)	4/4 (100%)	1/4 (25%)
D	신개념 사균체 백신 1번 접종	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)
E	신개념 사균체 백신 2번 접종	1/7 (14.3%)	2/7 (28.6%)	0/7 (0%)

(3) 고찰

클로르헥시딘을 이용하여 *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Gallinarum을 완전 불활화 사균체로 제조하여 가금티푸스에 민감한 갈색 레그혼종에 근육으로 1회 내지는 2회 접종하였다. 대조군으로 멸균 PBS 및 포르말린으로 불활화 된 사균체를 같은 방법으로 갈색레그혼종에 근육 접종하였다. 각 살모넬라 OMPs에 대한 항체역가는 1차 근육 접종 3주 후에 클로르헥시딘 유도 불활화 사균체 및 포르말린 유도 불활화 사균체로 접종한 그룹 모두에서 PBS 접종 군에 비해 월등한 항체 역가가 관찰되었다. 하지만 클로르헥시딘 유도 불활화 사균체를 1회 접종 후 6주 차나 같은 사균체로 2차 접종 후 3주째 항체 역가는 1차 접종 후 3주째에 비해 크게 증가하지 않았다. 포르말린 유도 사균체 접종 군도 마찬가지로의 결과가 관찰되었다. 이와 같은 결과는 1차 접종만으로도 충분한 항체 역가가 유도될 수 있음을 보여주는 결과라 생각된다.

더불어 각 사균체를 1차 접종 후 10일째에 또는 2차 접종 후 10일째에 각각 spleen으로부터 splenocytes를 분리하여 살모넬라 각 OMPs를 혼합하여 재자극한 후 CD3+CD4+ T cells과 CD3+CD8+ T cells의 분포율을 분석하여 본 결과 모든 백신 그룹에서 항체 역가가 비슷하게 증가한 것처럼 CD3+CD4+ t cells은 사균체 접종 모든 그룹에서 대조군에 비해 거의 비슷하게 증가하였다. 하지만 CD3+ CD8+ T cells의 비율을 살펴 보면 클로르헥시딘으로 불활화 후 1회 또는 2회 접종한 그룹이 대조군에 비해 증가함을 확인할 수 있었다. 하지만 포르말린으로 불활화 한 그룹에서는 대조군에 비해 유의있는 증가가 관찰되지 않았다. 더욱이 클로르헥시딘으로 1회 접종한 그룹이 2회 접종한 그룹보다 높은

비율로 존재함이 관찰되었다.

2차 접종 후 3주째 (클로르헥시딘 유도 사균체로 1회 접종한 그룹은 6주째)에 야외 독성 균주인 *Salmonella* Typhimurium과 *Salmonella* Gallinarum을 동량 혼합하여 경구로 도전 감염한 후 2주간 매일 하루에 두 번씩 폐사 여부를 확인하여 본 결과, 멸균 PBS를 접종한 그룹에서는 도전감염 2주째에 90%의 폐사율이 관찰되었고 포르말린 유도 사균체를 접종한 그룹에서는 단지 40%의 생존률만 관찰되었다. 하지만 클로르헥시딘 유도 사균체를 2회 접종한 그룹에서는 도전감염 2주후까지 70%의 생존률이 그리고 1회 접종 그룹에서는 80%의 생존률이 각각 관찰되었다. 더불어 도전감염 2주 후에 생존 갈색레그혼종을 모두 부검을 통해 육안적 소견과 균분리를 통한 도전감염 균주분리를 시도한 결과를 보면, PBS나 포르말린 유도 사균체 접종 그룹 모두의 갈색레그혼종에서는 모두 도전감염 균주가 확인되었다. 하지만 클로르헥시딘 유도 사균체를 2회 접종한 그룹에서는 spleen 마 liver에서만 각각 생존 닭의 약 30%와 약 15%에서 도전감염 균주가 확인되었다. 특히, 클로르헥시딘 유도 사균체를 1회 접종한 그룹의 모든 닭에서는 도전감염 균주가 확인되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 보면 클로르헥시딘으로 유도된 *Salmonella* Gallinarum과 *Salmonella* Typhimurium 불활화 사균체를 혼합하여 근육으로 접종할 경우에는 체액성 및 세포성 면역반응을 유도하여 *Salmonella* Gallinarum과 *Salmonella* Typhimurium 모두를 훌륭하게 방어할 수 있음을 확인할 수 있었다. 특히 클로르헥시딘 유도 불활화 사균체를 1회 접종하는 것이 최적의 면역 항체 유도과 세포성 면역 반응을 유도할 뿐만 아니라 방어에 있어서도 탁월하다는 것을 확인할 수 있었다.

2. 참여기관((주) 코미팜)

: 인수공통전염 및 가금티푸스 살모넬라 신개념 사균체 혼합 예방 백신 제조공정 확립

가. 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 대량 배양 후 신개념 사균체 제조공정 확립

(1) 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 대량 배양 기술 확립

(가) 살모넬라 타이피뮤리움 대량 배양을 위한 최적 배지 및 배양 조건 등 확립

- ① 기존 상업용 배지와 상업용 배지에 기타 다른 성분을 첨가하는 등 살모넬라 타이피뮤리움을 대량 배양할 수 있는 최적의 배지 조성 확립

1) 연구 수행 내용

(가) LB broth, 5% Fetal bovine serum(FBS)를 첨가한 LB broth, TSB, Nutrient broth 등 다양한 배지의 1L, 2L에서 각각 *Salmonella* Typhimurium(ST) 배양 후 OD₆₀₀을 측정하였다.

(나) 연구한 내용을 바탕으로 선택한 배지에서 200L 이상 대량배양을 진행하고 수율을 확인한다.

2) 연구 수행 결과

(가) 배지의 제조와 배양 단계는 일반적으로 사용하는 TSB, Nutrient broth에서 가장 효율적이고 편리하였으며, OD₆₀₀값을 배양된 균수에 비례해서 고려하였을 때 모든 배지에서 ST의 성장에 큰 차이는 없었다.

3) 고찰

Salmonella Typhimurium (ST)를 배양하고 완전 불활화 가능한 최적의 배지 조성을 확립하기 위하여 LB broth, 5% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 LB broth, Tryptic soy broth, Nutrient broth 등에 ST를 배양하고 성장 정도의 차이를 확인하였다. 배지에서 살모넬라균의 성장 정도에는 유의미한 차이가 없었으나, 이후 추가적으로 완전 불활화 정도를 확인하였을 때 5% FBS를 첨가한 LB broth 외의 다른 배지에서는 CHX를 더욱 고농도로 처리하였을 때 불활화가 이루어지는 것으로 보여 균의 배양에 LB broth에 FBS를 5% 첨가하여 broth 및 agar 배지를 제조하여 사용하여야 CHX의 농도를 최소화하여 신개념 불활화 사균체를 제작할 수 있음을 확인하였다.

(나) 살모넬라 갈리나룸 대량 배양을 위한 최적 배지 및 배양 조건 등 확립

- ① 기존 상업용 배지와 여러 배지 성분을 혼합하여 살모넬라 갈리나룸을 대량 배양할 수 있는 최적의 배지 조성 확립

1) 연구 수행 내용

- (가) LB broth, 5% Fetal bovine serum(FBS)를 첨가한 LB broth, TSB, Nutrient broth 등 다양한 배지의 1L, 2L에서 각각 *Salmonella* Gallinarum(SG) 배양 후 OD₆₀₀을 측정하였다.
- (나) 연구한 내용을 바탕으로 선택한 배지에서 200L 이상의 대량배양을 진행하고 수율을 확인한다.

2) 연구 수행 결과

- (가) 배지의 제조와 배양 단계는 일반적으로 사용하는 TSB, Nutrient broth에서 가장 효율적이고 편리하였으며, OD₆₀₀값을 배양된 균수에 비례해서 고려하였을 때 모든 배지에서 SG의 성장에 큰 차이는 없었다.

3) 고찰

Salmonella Gallinarum (SG)를 배양하고 완전 불활화 가능한 최적의 배지 조성을 확립하기 위하여 LB broth, 5% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 LB broth, Tryptic soy broth, Nutrient broth 등에 SG를 배양하고 성장 정도의 차이를 확인하였다. 배지에서 살모넬라균의 성장 정도에는 유의미한 차이가 없었으나, 이후 추가적으로 완전 불활화 정도를 확인하였을 때 5% FBS를 첨가한 LB broth 외의 다른 배지에서는 CHX를 더욱 고농도로 처리하였을 때 불활화가 이루어지는 것으로 보여 균의 배양에 LB broth에 FBS를 5% 첨가하여 broth 및 agar 배지를 제조하여 사용하여야 CHX의 농도를 최소화하여 신개념 불활화 사균체를 제작할 수 있음을 확인하였다.

(2) 대량 배양된 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 완전불활화 최적 조건 확립

1) 연구 수행 내용

- (가) 주관연구기관의 연구 수행 내용을 바탕으로 불활화제로는 Chlorhexidine(CHX)을 선택하였다. 5% Fetal bovine serum(FBS)를 첨가한 LB broth 2L에서 각각 *Salmonella* Typhimurium(ST)와 *Salmonella* Gallinarum(SG)배양 후 OD₆₀₀을 측정하고, CHX를

0.3%, 0.5%, 1% 농도별로 첨가한 후 37°C에서 1시간, 3시간, 6시간, 18시간, 24시간 반응시키며 완전 불활화에 필요한 최소 CHX의 농도와 시간을 비교 확인하였다.

(나) 5% Fetal bovine serum 첨가 LB broth 또는 TSB broth 또는 nutrient broth 등 10ml에 불활화 유도 사균체 1ml를 첨가하여 37°C에서 5일간 배양하여 배양 여부로 완전 불활화 여부를 확인 하였다.

2) 연구 수행 결과

(가) 각각의 배지에서 ST, SG를 배양하고 CHX를 농도별 처리 및 반응 시간에 따라 불활화 정도를 검사하였을 때, 1% 이상 농도에서 18시간 이상 반응시킨 모든 배양액은 5% Fetal bovine serum(FBS)이 첨가된 LB broth에서도 colony가 관찰되지 않았다.

3) 고찰

Salmonella Typhimurium (ST)를 배양하고 완전 불활화 가능한 최적의 배지 조성을 확립하기 위하여 LB broth, 5% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 LB broth, Tryptic soy broth, Nutrient broth 등에 ST를 배양하고 성장 정도의 차이를 확인하였으며, CHX를 농도별로 접종하여 완전히 불활화가 가능한 최저 CHX 농도를 확인하였다. 완전 불활화에 필요한 CHX의 농도는 균수와 배지의 부피, 반응 시간 등에 따라 차이가 나타나기는 하지만, 이후 확인된 균체의 형태에 근거하여 18시간 이내로 불활화를 완료하는 것이 효과적일 것으로 생각된다.

(다) 살모넬라 타이피뮤리움 대량 배양 후 살모넬라 타이피뮤리움 신개념 사균체 완전 불활화 여부 조건 확립

① AMP 및 기타 유사 물질을 다양한 농도와 여러 조건 등으로 첨가하여 신개념 사균체를 유도 후 완전 불활화 여부를 확인하기 위해 5% Fetal bovine serum 첨가 LB broth 또는 TSB broth 또는 영양 배지 등 10ml에 불활화 유도 사균체 10ul를 첨가하여 37°C에서 5일간 배양하여 완전 불활화 여부 확인

1) 연구 수행 내용

(가) 주관연구기관의 연구 수행 내용을 바탕으로 불활화제로는 Chlorhexidine(CHX)을 선택하였다. LB broth, 5% Fetal bovine serum(FBS)를 첨가한 LB broth, TSB, Nutrient broth 등 다양한 배지의 500ml, 1L, 2L volume에서 *Salmonella* Typhimurium(ST) 배양 후 OD₆₀₀을 측정하고, CHX를 0.3%, 0.5%, 1% 농도별로 첨가한 후 37°C에서 1시간, 3시간, 6시간, 18시간, 24시간 반응시키며 완전 불활화에 필요한 최소 CHX의 농도와 시간을 비교 확인하였다.

(나) 완전 불활화 여부를 확인하기 위해 배양한 것과 동일한 배지 10ml에 불활화 유도 사균체 1ml를 첨가하여 37°C에서 5일간 배양하여 배양 여부로 완전 불활화 여부를 확인하였다.

2) 연구 수행 결과

(가) 각각의 배지에서 ST, SG를 배양하고 CHX를 농도별 처리 및 반응 시간에 따라 불활화 정도를 검사하였을 때, 1% 이상 농도에서 18시간 이상 반응시킨 모든 배양액은 완전 불활화 됨을 확인하였다.

(나) 5% FBS가 첨가된 LB broth에서는 colony가 보이는 조건에서도 다른 배양액에서는

colony가 관찰되지 않았다.

3) 고찰

Salmonella Typhimurium (ST)를 배양하고 완전 불활화 여부를 확인하기 위하여 각 배지에서 균 발육 유무를 조사하였다. 5% FBS를 첨가한 LB broth 외의 다른 배지에서는 균이 colony를 형성하지 않아 완전 불활화 된 것으로 생각하였으나, 이후 동물실험에서 불활화 배양액 접종시 4~5주 이후 병원성을 나타내는 감염 증상을 보여 완전한 불활화 확인을 위해서는 LB broth에 FBS를 5% 첨가하여 broth 및 agar 배지를 제조하여 사용하여야 할 것으로 판단되었다.

② 다양한 농도와 조건으로 유도된 사균체를 전자현미경 (TEM 또는 SEM)으로 촬영하여 신 개념 사균체 유도 여부 확인

1) 연구 수행 내용

(가) 주관연구기관의 연구 수행 내용을 바탕으로 불활화제로는 Chlorhexidine(CHX)을 선택하였다. 5% Fetal bovine serum(FBS)를 첨가한 LB broth 1L에 *Salmonella* Typhimurium(ST) 배양 후, CHX를 일정 농도로 첨가한 후 37°C에서 6시간, 18시간 반응시켜 불활화시켰다.

(나) CHX 미처리균, 6시간 처리균, 18시간 처리균의 배양액에서 각각 유도된 사균체의 SEM 촬영을 진행하였다.

2) 연구 수행 결과

(가) CHX 1% 이상의 농도에서 6시간 이상 반응시킨 모든 배양액은 완전 불활화 됨을 확인하였다.

(나) 유도된 사균체를 SEM 촬영하여 CHX 미처리균과 처리균을 비교하였을 때, ST 세포의 외형은 CHX를 처리하고 그 처리시간이 길어질수록 많은 구멍이 생기고 내용물이 빠져나와 수축하여 주름이 생김을 확인할 수 있었다 (그림 19 참조).

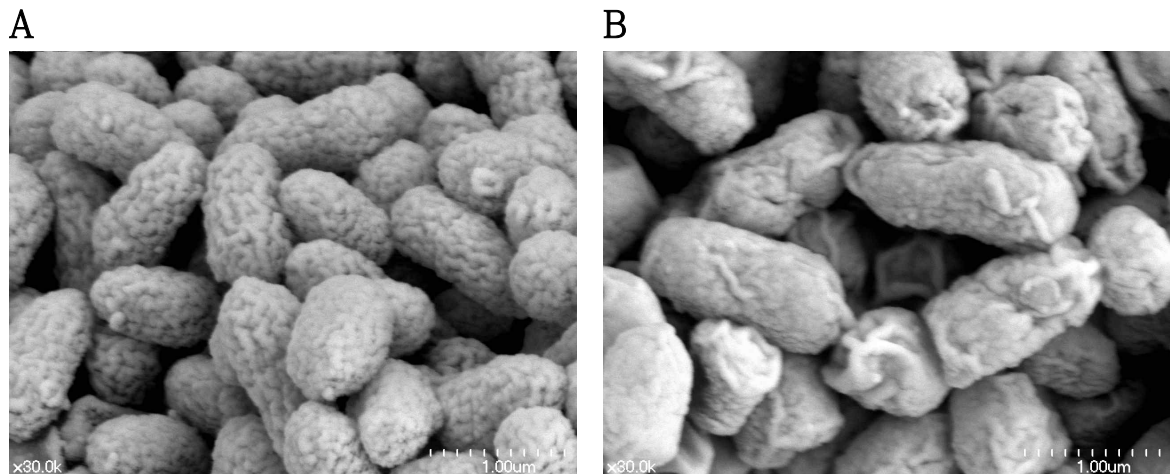


그림 19. 살모넬라 타이피뮤리움의 Chlorhexidine 미처리균(A)과 6시간 처리균(B)에 대한 SEM 사진

- ③ 아가배지 상 및 전자현미경 상에서 확인된 살모넬라 타이피뮤리움 신개념 사균체를 Balb/C 마우스에 접종하여 4주간 폐사 및 이상 유무를 확인하여 최종 완전 불활화 조건 및 완전 불활화 배지 조성 확립

1) 연구 수행 내용

- (가) 불활화 유도 사균체 부유액 100ul를 혈액배지, 5% Fetal bovine serum 첨가 LB agar 또는 TSA 등에 접종하여 5일간 배양하여 배양된 colony의 존재 유무와 배양된 균의 PCR 결과 등을 바탕으로 완전한 신개념 사균체로의 유도 여부 또한 확인하였다.

2) 연구 수행 결과

- (가) 5% FBS가 첨가된 배양액 말고 다른 배양 조건에서 colony가 관찰되지 않은 조건에서 완전 불활화가 이루어졌다고 판단되어 신개념 ST 불활화 사균체를 마우스에 접종하여 4주간 임상 증상 발현 여부를 확인하여 보면, 야외 독성 균주로 도전감염하지 않았음에도 불구하고 백신 접종 3~4 주 후에는 야외 독성 균주로 접종한 것처럼 살모넬라 임상 증상이 관찰되어 폐사에 이르게 되며, spleen 등지에서 백신 균주가 분리되었다. 따라서 완전 불활화를 확인하기 위해서는 LB broth에 FBS를 5% 첨가하여 broth 및 agar 배지를 제조하여 사용하여야 함을 확인하였다.

- (라) 살모넬라 갈리나룸 대량 배양 후 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 완전불활화 최적 조건 확립

- ① AMP 및 기타 유사 물질을 다양한 농도와 여러 조건 등으로 첨가하여 신개념 사균체를 유도 후 완전 불활화 여부를 확인하기 위해 5% Fetal bovine serum 첨가 LB broth 또는 TSB broth 또는 영양 배지 등 10ml에 불활화 유도 사균체 10ul를 첨가하여 37°C에서 5일간 배양하여 완전 불활화 여부 확인

1) 연구 수행 내용

- (가) 주관연구기관의 연구 수행 내용을 바탕으로 불활화제로는 Chlorhexidine(CHX)을 선택하였다. LB broth, 5% Fetal bovine serum(FBS)를 첨가한 LB broth, TSB, Nutrient broth 등 다양한 배지의 500ml, 1L, 2L volume에서 *Salmonella Gallinarum*(SG) 배양 후 OD₆₀₀을 측정하고, CHX를 0.3%, 0.5%, 1% 농도별로 첨가한 후 37°C에서 1시간, 3시간, 6시간, 18시간, 24시간 반응시키며 완전 불활화에 필요한 최소 CHX의 농도와 시간을 비교 확인하였다.

- (나) 완전 불활화 여부를 확인하기 위해 배양한 것과 동일한 배지 10ml에 불활화 유도 사균체 1ml를 첨가하여 37°C에서 5일간 배양하여 배양 여부로 완전 불활화 여부를 확인하였다.

2) 연구 수행 결과

- (가) 각각의 배지에서 ST, SG를 배양하고 CHX를 농도별 처리 및 반응 시간에 따라 불활화 정도를 검사하였을 때, 1% 이상 농도에서 18시간 이상 반응시킨 모든 배양액은 완전 불활화 됨을 확인하였다.

- (나) 5% FBS가 첨가된 LB broth에서는 colony가 보이는 조건에서도 다른 배양액에서는 colony가 관찰되지 않았다.

3) 고찰

Salmonella Gallinarum (SG)를 배양하고 완전 불활화 여부를 확인하기 위하여 각 배지에서 균 발육 유무를 조사하였다. 5% FBS를 첨가한 LB broth 외의 다른 배지에서는 균이 colony를 형성하지 않아 완전 불활화 된 것으로 생각하였으나, 이후 동물실험에서 불활화 배양액 접종시 4~5주 이후 병원성을 나타내는 감염 증상을 보여 완전한 불활화 확인을 위해서는 LB broth에 FBS를 5% 첨가하여 broth 및 agar 배지를 제조하여 사용하여야 할 것으로 판단되었다.

- ② 다양한 농도와 조건으로 유도된 사균체를 전자현미경 (TEM 또는 SEM)으로 촬영하여 신개념 사균체 유도 여부 확인

1) 연구 수행 내용

(가) 주관연구기관의 연구 수행 내용을 바탕으로 불활화제로는 Chlorhexidine(CHX)을 선택하였다. 5% Fetal bovine serum(FBS)를 첨가한 LB broth 1L에 *Salmonella Gallinarum*(SG) 배양 후, CHX를 일정 농도로 첨가한 후 37℃에서 6시간, 18시간 반응시켜 불활화시켰다.

(나) CHX 미처리균, 6시간 처리균, 18시간 처리균의 배양액에서 각각 유도된 사균체의 SEM 촬영을 진행하였다.

2) 연구 수행 결과

(가) CHX 1% 이상의 농도에서 6시간 이상 반응시킨 모든 배양액은 완전 불활화 됨을 확인하였다.

(나) 유도된 사균체를 SEM 촬영하여 CHX 미처리균과 처리균을 비교하였을 때, SG 세포의 외형은 CHX를 처리하고 그 처리시간이 길어질수록 많은 구멍이 생기고 내용물이 빠져나와 수축하여 주름이 생김을 확인할 수 있었다 (그림 20 참조).

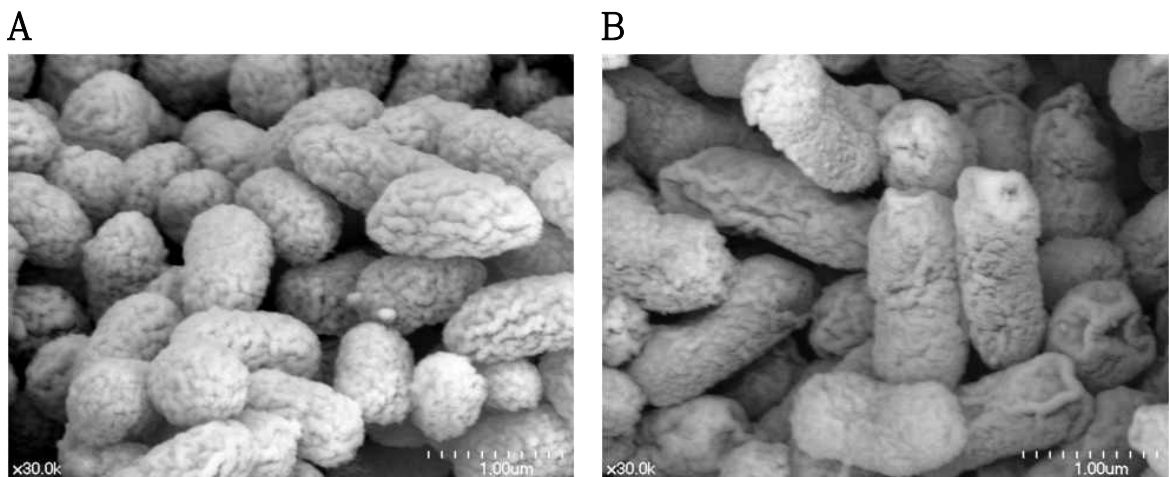


그림 20. 살모넬라 갈리나룸의 Chlorhexidine 미처리균(A)과 6시간 처리균(B)에 대한 SEM 사진

- ③ 아가배지 상 및 전자현미경 상에서 확인된 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체를 갈색레그혼종에 접종하여 4주간 폐사 및 이상 유무를 확인하여 최종 완전 불활화 조건 및 완

전 불활화 배지 조성 확립

1) 연구 수행 내용

(가) 불활화 유도 사균체 부유액 100ul를 혈액배지, 5% Fetal bovine serum 첨가 LB agar 또는 TSA 등에 접종하여 5일간 배양하여 배양된 colony의 존재 유무와 배양된 균의 PCR 결과 등을 바탕으로 완전한 신개념 사균체로의 유도 여부 또한 확인하였다.

2) 연구 수행 결과

(가) 5% FBS가 첨가된 배양액 말고 다른 배양 조건에서 colony가 관찰되지 않은 조건에서 완전 불활화가 이루어졌다고 판단되어 신개념 SG 불활화 사균체를 갈색레그혼종에 접종하여 6주간 임상 증상 발현 여부를 확인하여 보면, 야외 독성 균주로 도전감염하지 않았음에도 불구하고 백신 접종 5~6주 후에는 야외 독성 균주로 접종한 것처럼 살모넬라 임상 증상이 관찰되어 폐사에 이르게 되며, spleen 등지에서 백신 균주가 분리되었다. 따라서 완전 불활화를 확인하기 위해서는 LB broth에 FBS를 5% 첨가하여 broth 및 agar 배지를 제조하여 사용하여야 함을 확인하였다.

(3) 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 예방 혼합 백신 장기 보관 조건 확립 및 혼합 백신 시제품 제작

① 살모넬라 타이피뮤리움 및 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체에 ISA70, 수산화알루미늄 겔 등 안전성 및 효능에 최적 조건으로 확립된 아쥬번트를 혼합한 후 통상 동물용백신 제조에 통용되는 부영제를 섞어 주어 장기간 보존할 수 있는 최적의 조건 결정

1) 연구 수행 내용

(가) LB broth에 ST, SG를 배양하고 CHX를 처리하여 제조한 신개념 사균체에 적합한 Adjuvant를 선정한다.

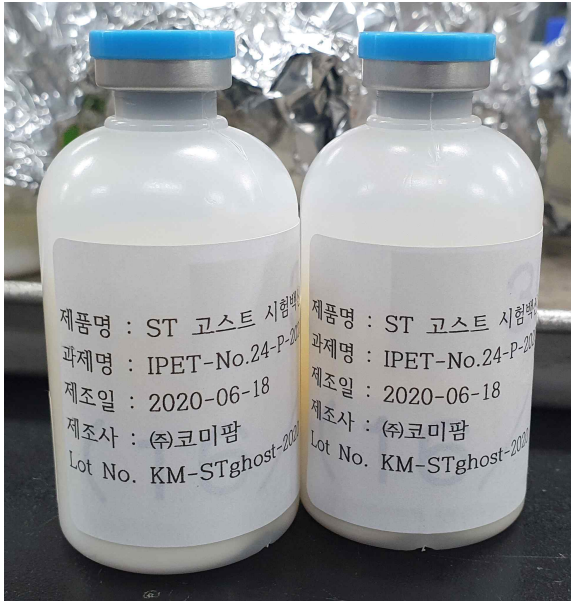
(나) 제조한 시제품을 각각 마우스와 닭에서 안전성 및 유효성 평가를 진행한다. (주관기관 수행결과의 나, 다) 참조)

2) 연구 수행 결과

(가) 주관기관과 참여기관에서 각각 수행한 시험 결과, 불활화 백신에 사용하는 Adjuvant로 ISA70을 선정하였고, 더하여 adjuvant의 농도에 따른 면역원성 시험 결과 70% 함량을 사용하기로 결정하였다.

② 최적의 조건으로 대량 배양 후 완전불활화가 확인된 살모넬라 타이피뮤리움 및 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체를 최적 조건의 adjuvant를 혼합하여 백신 시제품 제작

A



B

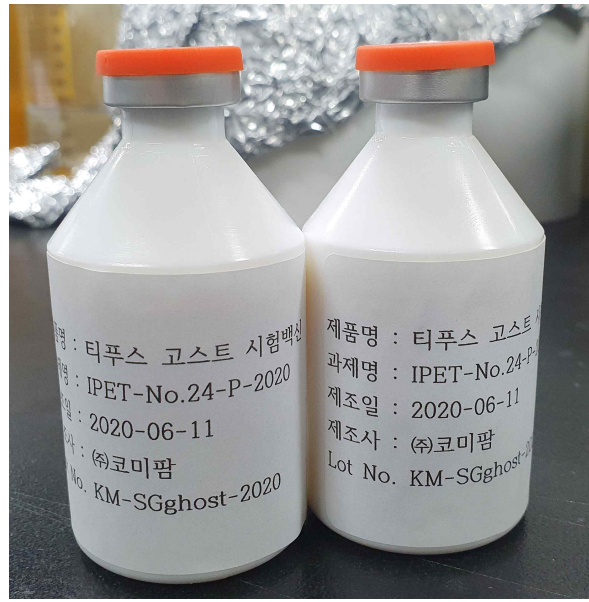


그림 21. 살모넬라 고스트 백신의 시제품 제조. 타이피리움(A), 갈리나룸(B)

- ③ 정기적으로 보관 중인 혼합 백신 시제품을 대상으로 전자현미경 (TEM 또는 SEM)으로 촬영하여 외형의 변화 등 확인
- (1) 제조한 ST, SG 불활화 백신 시제품을 안정한 온도로 예상되는 2~6℃ 사이에 냉장 보관하며 6개월 주기로 전자현미경 촬영을 진행한다.

제2절. 연구 수행 결과 요약 및 평가

1. 인수공통전염 및 가금티푸스 살모넬라 신개념 사균체 최적의 유도 기술 확립 (주관연구기관)

가. 연구수행 내용 요약

- (1) *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Gallinarum을 신개념 완전 불활화 사균체로 유도하기 위한 최적 물질 및 최적 조건 확립
- 1) 여러 종류의 항균펩타이드, 면역누에 추출물, 유산균 추출물, 클로르헥시딘 등 다양한 물질로 불활화 유도 확인.
 - 2) 클로르헥시딘이 가장 효과적으로 살모넬라 두 균주를 완전 불활화 사균체로 유도.
- (2) 안전 불활화 여부 확인 방법 확립
- 1) 기존 방법에 따라 LB broth, TSB broth, Nutrient broth 등에 접종 후 5일간 배양하여 균 성장 여부 확인
 - 2) 5일간 배양하여 균이 자라지 않는 조건으로 불활화 사균체를 제조하여 마우스 (*Salmonella* Typhimurium만 접종) 및 갈색 레그혼종에 접종 (*Salmonella* Gallinarum만 접종) 할 경우, 시일이 다소 소요되기는 하지만 살모넬라 특유의 임상 증상이 발생되며, 부검을 통해 백신 균주가 확인됨.

- 3) 따라서 LB broth에 5% FBS를 첨가하여 5일간 배양하여 균이 자라지 않는 조건으로 불활화 사균체를 제조하여 마우스 (*Salmonella* Typhimurium만 접종) 및 갈색 레그혼종에 접종 (*Salmonella* Galiinarum만 접종) 할 경우, 현재까지 백신 접종 균에서 임상 증상이 발현되거나 부검을 통한 균 분리에서 백신 균주가 분리 동정 되지 않음.
 - 4) 따라서 살모넬라 완전 불활화 확인 조건을 5% FBS가 함유된 LB broth에 접종하여 5일간 배양 후 다시 5% FBS가 함유된 BGA agar에 접종하여 배양 하는 방법으로 살모넬라 완전 불활화 확인방법으로 최종 확립함.
- (3) 클로르헥시딘 유도 *Salmonella* Typhimurium 불활화 사균체를 마우스에 접종하여 안정성 평가
- 1) 클로르헥시딘 유도 *Salmonella* Typhimurium 불활화 사균체를 마우스에 3주 간격으로 2회 근육으로 접종하여 1차 접종 후 3주간 2차 접종 후 3주간 발열, 설사, 폐사, 식욕 절폐 등과 같은 부작용을 조사하였지만 아무런 임상 증상이 발현되지 않음.
 - 2) 접종 전, 1차 접종 후 3주, 2차 접종 후 3주 쯤에 각각 채혈하여 *Salmonella* Typhimurium OMPs에 대한 항혈청 역가를 측정하여 본 결과 1차 접종 후부터 백신 접종 균 모두에서 대조군에 비해 항체 역가가 증가하기 시작하였으며 2차 접종 후 높은 항체 역가가 관찰되었음. 더욱이 접종량이 증가할수록 항체 역가가 높게 증가하는 것이 확인 됨.
 - 3) 2차 접종 후 3주 쯤에 부검을 통한 육안적 검사에서 백신 접종 그룹에서 특이한 증상이 관찰되지 않았고 spleen에서도 백신 접종균주가 분리되지 않음.
 - 4) 따라서 클로르헥시딘 유도 *Salmonella* Typhimurium 불활화 사균체의 안전성을 확인 함 .
- (4) 클로르헥시딘 유도 *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Galiianarum 불활화 사균체를 갈색레그혼종 접종하여 안정성 평가
- 1) 클로르헥시딘 유도 *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Galiianarum 불활화 사균체를 권장 접종량, 2배 용량, 4배 용량을 각각 갈색레그혼종에 근육으로 접종하여 1차 접종 후 3주간, 2차 접종 후 3주간, 발열, 설사, 폐사, 식욕절폐 등과 같은 임상 증상이 발현되지 않음을 확인.
 - 2) 접종 전, 1차 접종 후 3주, 2차 접종 후 3주 쯤에 각각 채혈하여 각 살모넬라의 OMPs에 대한 항체 역가를 측정하여 본 결과 모든 항원을 접종한 그룹에서 1차 접종 후 3주 후부터 높은 항체 역가가 관찰되었으며 2차 접종 후에도 1차 접종 후와 비슷한 수준의 항체 역가가 관찰 됨.
 - 3) 2차 접종 후 3주 쯤에 모든 갈색레그혼종을 부검을 통해 육안적 검사 결과는 모든 백신 접종 그룹에서 임상학적 이상 소견이 관찰되지 않았으며, spleen 및 liver 등지에서 백신 접종 균주가 분리 되지 않음.
 - 4) 이상의 결과를 종합하면, 클로르헥시딘 유도 *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Galiianarum 불활화 사균체를 혼합하여 갈색레그혼종에 근육 접종하였을 경우 항체 역가를 잘 유도 하지만 부작용이 발생하지 않음이 확인되었음.

- (5) 클로르헥시딘 유도 *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Gallianarum 불활화 사균체를 갈색레그혼종에서의 효능 평가
- 1) 클로르헥시딘 유도 *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Gallianarum 불활화 사균체를 혼합하여 갈색레그혼종에 1회 또는 2회 근육 접종하거나 포르말린 유도 *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Gallianarum 불활화 사균체를 혼합하여 근육으로 2회 접종한 후 2차 접종 후 3주째 또는 1회 접종 후 6주째에 각각 야외 독성균주로 도전감염하여 효능 평가 수행.
 - 2) 접종 전, 1차 접종 후 3주, 2차 접종 후 3주 (단 1회 접종 그룹은 1차 접종 후 6주) 째에 각각 채혈하여 항체 역가를 측정하여 보면, 1차 접종 후부터 모든 백신 접종 그룹에서는 높은 항체 역가가 관찰되었으며 2차 접종 후 3주 째(1회 접종 군에서는 6주 째)에도 높은 항체 역가가 유지되었음.
 - 3) 1회 접종 그룹은 1회 접종 후 10일 째에, 2회 접종 그룹에서는 2차 접종 후 10일 째에 각각 spleen을 무균적으로 채취하여 splenocyte로부터 CD3+CD4+ T cells, CD3+CD8+ T cells의 분포를 조사하여 본 결과 CD4+ T cells의 경우 백신 접종 군 모두에서 대조군에 비해 증가함이 확인됨. 하지만 CD8+ T cells의 경우에는 클로르헥시딘 유도 *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Gallianarum 불활화 사균체를 혼합하여 1회 내지는 2회 접종한 그룹 모두에서 대조군에 비해 높은 분포를 관찰되었으며, 2회 접종 군보다는 1회 접종 군에서 약간 더 높게 관찰됨. 하지만 포르말린의 경우에는 대조군과 비슷하거나 약간 높은 수준에 머무름
 - 4) 1회 접종 후 6주, 2회 접종 후 3주 째에 야외 독성 균주로 도전감염에 따른 폐사율은 포르말린 유도 사균체로 접종한 그룹에서는 40%의 방어율이, 클로르헥시딘 유도 사균체로 2회 접종한 그룹에서는 70%의 방어율이 그리고 1회 접종한 그룹에서는 80%의 방어율이 각각 관찰 됨. 더불어 생존한 모든 갈색레그혼종을 대상으로 부검 및 도전감염 균주의 확인을 통해 클로르헥시딘 1회 접종 그룹이 다른 그룹에 비해 월등한 방어력이 관찰 됨
 - 5) 이상의 결과를 종합해 보면 클로르헥시딘으로 불활화를 유도한 사균체를 1회 접종 함으로써 높은 항체 역가가 함께 세포성 및 체액성 관련 면역 반응을 둘 다 유도함을 확인 할 수 있었고 더불어 높은 방어 효과도 함께 관찰되어 산란계에서 살모넬라에 의한 인수공통감염병 및 가금티푸스 동시 예방을 위한 예방 백신으로 상용가능 함이 확인 됨.

나. 대표적 연구성과

(1) 특허, 논문 등록 성과

No	논문명 (특허 제목)	학술지명	저자명	호	국명	발행 기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재 일	등록번 호
1	마우스에서 살모넬라 감염증 예방을 위한 신개념 <i>Salmonella</i> Typhimurium 불활화 사균체	한국가축위생학회지	문자영, Enkhsaikhan Ochirkhuyag,	43(2)	대한민국	한국동물위생학회	비SCI	2020.06.30	

	최적 adjuvant 선택을 위한 효능 비교 시험		김원경, 이준우, 조영규, 곽길한, 박병용, 허진						
2	신규한 살모넬라 타이피리움 불활화 사균체를 포함하는 살모넬라증 예방 또는 치료용 백신 조성물	특허출원	허진, 문성철, 정호경					2020.02.10	10-2020-0015772
3	신규한 살모넬라 타이피리움 불활화 사균체를 포함하는 살모넬라증 예방 또는 치료용 백신 조성물	기술이전			대한민국	(주)코미팜		2020.08.26	

(2) 학술대회 발표 성과

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2020 IPACT conference	허진	2020.06.26	한국과학기술회관	대한민국

포스터 제목: 산란계에서 G124-불활화 *Salmonella Gallinarum* 백신 후보주의 가금 티푸스 예방 효과에 관한 연구

다. 종합평가

제1세부과제에서는 마우스에서 신규한 *Salmonella Typhimurium* 및 *Salmonella Gallinarum* 불활화 사균체에 대한 안정성 평가와 더불어 가금에서의 이들 불활화 사균체 백신의 안전성 및 효능 평가를 수행하여 국내 KCI지에 논문 1편을 게재하였고 코로나19의 상황 속에서도 학회에 참석하여 연구 결과를 발표하였다. 또한 마우스에서의 살모넬라 타이피리움에 대한 안전성 및 효능에 대한 결과를 군주 기탁함과 동시에 특허 출원함과 동시에 이 특허 출원을 바탕으로 (주)코미팜에 기술이전하는 쾌거를 이루었다. 이상의 결과는 연구 계획서에 제시한 정량 평가를 100% 달성한 결과이며 더불어 정량평가에 기재되어 있지 않은 생물자원 1건 확보에 대한 연구 성과도 같이 이루었다.

2. 인수공통전염 및 가금티푸스 살모넬라 신개념 사균체 혼합 예방 백신 제조공정 확립 (참여기관)

가. 연구수행 내용 요약

- (1) *Salmonella Typhimurium* 및 *Salmonella Gallinarum* 대량 배양을 위한 최적 배지 및 배양 조건 확립

- 1) 배양과 불활화 최적 물질을 사용한 완전 불활화를 위해 공통적으로 사용할 수 있는 가장 적합한 조건 확립
- (2) ST, SG의 신개념 사균체 제작을 위한 완전 불활화 여부 조건 확립
 - 1) LB broth, 5% FBS 함유 LB broth, TSB, Nutrient broth 등 각종 배지에서 ST와 SG의 배양과 불활화 여부를 확인한 결과 균의 배양에 유의미한 차이는 없으며 LB broth에 5% FBS를 혼합하여 사용하는 것을 완전 불활화 여부 확인 배지로 선정
 - 2) 균의 완전 불활화와 대량 생산을 위한 CHX의 농도와 반응 시간 결정
- (3) ST, SG 백신의 시제품 제조와 장기 보관 조건 확인 시험 진행

나. 대표적 연구성과

(1) 백신 시제품 제조

백신 시제품명	
ST 고스트 (<i>Salmonella</i> Typhimurium 예방 백신)	티푸스 고스트 (<i>Salmonella</i> Gallinarum 예방 백신)
	

다. 종합평가

참여기관에서는 *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Gallinarum 불활화 사균체를 사용한 백신의 제조공정을 확립함과 동시에 이를 활용한 시험백신을 제조하여 해당 시험백신의 안정성과 안전성 및 효능을 평가하고 있으며, 해당 백신의 산업화 가능성을 정확히 판단하기 위한 추가적인 연구를 진행하고 있다.

제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제1절. 연차별 목표 및 내용

1. 개발 목표 및 내용

(1) 연구개발의 최종목표

1) 최종목표

- (가) 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 혼합 백신 제조 공정 확립
- (나) 시제품 제작 및 산란계를 대상으로 이들 혼합 백신의 안전성 및 효능 평가

2) 세부목표

- (가) 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 제조
- (나) 가금에서 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 혼합 백신 시제품의 안전성 및 효능 평가
- (다) 백신 접종한 가금에서 야외 독성 살모넬라 타이피뮤리움과 살모넬라 갈리나룸 혼합 균주로 도전 감염한 다음 방어 및 효능 평가
- (라) 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸의 신개념 혼합 예방 백신 제조공정 확립

(2) 연차별 개발 목표 및 내용

(가) 연구개발 목표

- 주관연구기관(전북대학교산학협력단) : 인수공통전염 및 가금티푸스 살모넬라 신개념 혼합 사균체 최적의 유도 기술 확립
- 협동연구기관((주) 코미팜) : 인수공통전염 및 가금티푸스 살모넬라 신개념 사균체 혼합 예방 백신 제조공정 확립

나. 1차 년도

1차 년도		
개발 목표	개발 내용	책임자(소속기관)
인수공통전염 및 가금티푸스 살모넬라 신개념 사균체 최적의 유도 기술 확립	계획 수립 및 자료 조사	허진 (전북대학교 산학협력단)
	살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 배양 후 신개념 사균체 유도 조건 확립	
	마우스 및 가금에서 신개념 사균체 예방 백신의 안정성 검사	

	가금에서 신개념 사균체 예방 백신의 효능 평가	
인수공통전염 및 가금티푸스 살모넬라 신개념 사균체 혼합 예방 백신 제조공정 확립	살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 배양 후 신개념 사균체 제조공정 확립	정호경 (주)코미팜

제2절. 연구개발 평가방법

1. 연구개발 성과 목표 핵심사항 요약

- 가. *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Gallinarum 에 최적인 불활화 유도 물질 확보 : 천연물질 및 화학제 등에서 살모넬라 균주에 최적인 신개념 사균화 유도 물질 확보 및 완전 불활화 확인 방법 개선 여부
- 나. 마우스를 대상으로 한 클로르헥시딘 유도 *Salmonella* Typhimurium 불활화 사균체 백신의 안전성 확인 여부
- 다. 갈색레그혼종을 대상으로 한 클로르헥시딘 유도 *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Gallinarum 불활화 사균체 안전성 평가 여부
- 라. 갈색 레그혼종을 대상으로 한 신개념 *Salmonella* Typhimurium 및 *Salmonella* Gallinarum 불활화 사균체 백신의 효능 평가 여부
- 마. 갈색 레그혼종에서 살모넬라성 인수공통 감염병 예방 백신 개발 및 산업체 기술이전 : 기술이전료 확보 1건

2. 연차별 평가방법 세부사항

연구기간 (년차)	평가 항목	평가방법
1차년도 ('19)	살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 배양 후 신개념 사균체 유도 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 살모넬라에 최적인 불활화 유도 물질 확보
	완전 불활화 여부 확인 방법 개선	<ul style="list-style-type: none"> • 완전 불활화 확인 후 마우스 및 가금에서의 in vivo 실험
	마우스에서 신개념 사균체 예방 백신의 안전성 검사	<ul style="list-style-type: none"> • 마우스를 대상으로 한 신개념 <i>Salmonella</i> Typhimurium 불활화 사균체 백신의 안전성 평가
	가금에서 신개념 사균체 예방 백신의 안정성 검사	<ul style="list-style-type: none"> • 갈색레그혼종을 대상으로 한 신개념 <i>Salmonella</i> Gallinarum 및 <i>Salmonella</i> Typhimurium 불활화 사균체 백신의 안전성 평가

	가금에서 신개념 사균체 예방 백신의 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> 갈색레그혼종을 대상으로 한 신개념 <i>Salmonella Gallinarum</i> 및 <i>Salmonella Typhimurium</i> 불활화 사균체 백신의 효능 평가
	살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 배양 후 신개념 사균체 제조공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> 신개념 불활화 사균체에 적합한 adjuvant 및 보존제 확립

3. 사업화 및 연구기반 평가지표

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용홍보		기타(타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	정책활용			홍보전시		
												SCI	비SCI						논문평균IF	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	30			30	30								10							
최종목표	1			1	9							1	1							
1차년도	1			1	9							1	1							
소계	1											1	1							
종료 1차년도		1																		
종료 2차년도																				
종료 3차년도																				
종료 4차년도																				
종료 5차년도																				
소계		1																		
합계	1	1		1	9							1	1							

제3절. 목표 달성도 및 관련분야 기여도

1. 계획대비 달성도

가. 주요 연구성과 목표 대비 달성도

평가 항목	평가 방법 기반 실적	달성도 (%)
살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 배양 후 신개념 사균체 유도 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 살모넬라 균주에 대한 신개념 불활화 사균체 유도 최적 물질 확보 및 사균화 조건 확립 	100
완전 불활화 여부 확인 방법 개선	<ul style="list-style-type: none"> • 완전 불활화 확인 방법 확립 	100
마우스에서 신개념 사균체 예방 백신의 안정성 검사	<ul style="list-style-type: none"> • 마우스를 대상으로 한 신개념 <i>Salmonella</i> Typhimurium 불활화 사균체의 부작용 및 부검을 통한 안전성 확인 	100
가금에서 신개념 사균체 예방 백신의 안정성 검사	<ul style="list-style-type: none"> • 갈색레그혼종을 대상으로 한 <i>Salmonella</i> Typhimurium 과 <i>Salmonella</i> Gallinarum 불활화 사균체 혼합 백신의 안전성 평가 	100
가금에서 신개념 사균체 예방 백신의 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 갈색레그혼종을 대상으로 한 백신 접종 후 체액성 및 세포성 면역 반응 유도와 도전감염을 통한 방어여부로 효능 평가 	100
살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 배양 후 신개념 사균체 제조공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 시제품 제작을 통한 제조공정 확립 	100

나. 세부/협동과제별 목표 대비 달성도

(1) 제1세부 : 전북대학교 산학협력단

년도	연구개발목표	달성내용	달성도 (%)
1차 년도	살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 배양 후 신개념 사균체 유도 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 신 개념 <i>Salmonella</i> Typhimurium 및 <i>Salmonella</i> Gallinarum 불활화 사균화 유도에 최적 물질 선정 - 선정 물질에 대한 신 개념 <i>Salmonella</i> Typhimurium 불활화 사균화 유도 조건 확립 - 선정 물질에 대한 신 개념 <i>Salmonella</i> Gallinarum 불활화 사균화 유도 조건 확립 	100

		<ul style="list-style-type: none"> - 신 개념 <i>Salmonella</i> Typhimurium 및 <i>Salmonella</i> Gallinarum 불활화 사균체 TEM으로 확인 - 완전 살모넬라 불활화 확인 방법 개선 	
	마우스 및 가금에서 신개념 사균체 예방 백신의 안정성 검사	<ul style="list-style-type: none"> - 마우스를 대상으로 신 개념 <i>Salmonella</i> Typhimurium 불활화 사균체 백신 근육 접종 후 부작용 및 부검을 통한 육안적 검사 그리고 spleen에서의 백신 균주 분리 등을 통한 안전성 평가 - 갈색레그혼종을 대상으로 신 개념 <i>Salmonella</i> Typhimurium 및 <i>Salmonella</i> Gallinarum 불활화 사균체 혼합 백신을 접종한 후 부작용 및 부검을 통한 육안적 소견 검사 그리고 각종 장기에서의 백신 균주 분리를 통한 안전성 평가 	100
	가금에서 신개념 사균체 예방 백신의 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 갈색레그혼종을 대상으로 신 개념 <i>Salmonella</i> Typhimurium 및 <i>Salmonella</i> Gallinarum 불활화 사균체를 혼합하여 근육 접종 - 각 살모넬라에 대한 항체 형성 유무 측정 - CD3+ CD4+ T cells, CD3+ CD8+ T cells 측정 - 도전감염 후 방어률을 통한 효능 평가 	100

(2) 제1협동 : (주)코미팜

년도	연구개발목표	달성내용	달성도 (%)
1차 년도	살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 배양 후 신개념 사균체 제조공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 대량 배양 기술 확립 - 대량 배양된 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 완전불활화 최적 조건 확립 - 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 예방 혼합 백신 장기 보관 조건 확립 및 혼합 백신 시제품 제작 	100

다. 사업화 및 연구기반 성과 평가

(단위 : 백만원, 건수, 명)

성과 목표	사업화지표					연구기반지표												
	지식 재산권		기술 실시 (이전)	사업화		기술 인		학술성과	교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용·홍 보	기 타 (타 연						
	특	특	품	건	기	제	매	수	고	투	증	논문	논	학	도	성	정	홍

	허출원	허등록	중등록	수	슬료	품화	출액	출액	용창출	자유치		SCI	비SCI	문평균IF	술발표		책활용	보전시	구활용등)
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건
가중치	30			30	30										10				
최종목표	1			1	9								1		1				
1차연도	목표	1		1	9								1		1				
	실적	1		1	9								1		1		1		
소계	목표	1		1	9								1		1				
	실적	1		1	9								1		1		1		
종료 1차연도		1																	
종료 2차연도																			
종료 3차연도																			
종료 4차연도																			
종료 5차연도																			
소계		1																	
합계	1	1	1	1	9								1		1				

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

(1) 가금티푸스 및 인수공통 전염 살모넬라 식중독 예방 백신의 산업화

(가) 원인

- ① 국내 가금을 통한 인수공통 살모넬라 식중독은 *Salmonella* Typhimurium 뿐만 아니라 *S. Enteritidis* 및 *S. Thompson* 등에 의한. 따라서 이들 균주가 포함된 혼합 백신에 대한 최적화 실험이 필요
- ② 1차연도의 짧은 기간만으로는 이들 균주에 대한 최적 조건 확립과 안전성 효능 평가에 어려움

(나) 차후대책

- ① *S. Enteritidis* 및 *S. Thompson* 등이 포함된 혼합 백신 생산 시스템 구축 추가 시험
- ② 갈색레그혼종을 대상으로 한 혼합 백신의 안전성 및 효능 평가 추가 수행

(2) 정기적으로 보관 중인 혼합 백신 시제품을 대상으로 전자현미경 (TEM 또는 SEM)으로 촬영하여 외형의 변화 등 확인

(가) 원인

① 품목허가 제출시 포함되는 유효기간을 위한 실험을 수행하기에는 연구 기간이 짧음

② 신규 물질의 안전성 평가에 관련이 있는 시험 항목 설정

(나) 차후대책

① 제조된 시제품을 대상으로 장기간의 안정성 검사 시험 추가 수행

② 신규 물질의 추가 요구되는 안전성 추가 시험

2. 관련 분야 기여도 (국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치, 우월성 및 기여도 평가)

가. 가금티푸스 및 인수공통감염 살모넬라 식중독 예방 백신 개발

세부연구 항목	국내·외 기술개발현황	우월성	기여도
신개념 살모넬라 불활화 사균체 혼합 백신 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신개념 사균체 <i>Salmonella</i> Typhimurium 및 <i>Salmonella</i> Gallinarum 불활화 사균체 혼합 백신은 국내외적으로 전무함. ○ 생균처럼 세포성 면역 반응을 유도할 수 있는 신개념 살모넬라균 혼합 불활화 사균체 혼합백신 제조 기술개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 생균처럼 세포성 면역 반응을 유도할 수 있는 신개념 불활화 사균체 제조기술을 살모넬라균에 적용하여 하여 가금티푸스 및 인수공통전염 살모넬라 식중독 예방 살모넬라 사균체 혼합 백신제조 기술 확립 - 갈색레그혼종을 대상으로 안전성 및 효능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 생균같은 신개념 살모넬라 불활화 사균체 제조 기술: 50% - 세포 내 기생 세균에 대한 신개념 불활화 사균체 백신 제조 기술: 50% - 인수공통감염병 예방 백신 제조 기술: 60%
살모넬라 완전 불활화 확인 방법 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 살모넬라균주의 특성상 in vitro 상태에서는 불활화가 유도된 것처럼 보이나 in vivo 상에서 서서히 성장하여 도전감염처럼 민감한 동물을 폐사에 이르게 함. 따라서 완전 불활화 여부를 in vitro 상에서 확인할 수 있는 방법을 국내외적으로 최초로 확립 함. 	<ul style="list-style-type: none"> - 살모넬라균에 대한 완전 불활화 확인 방법 정립 - in vitro 상에서 불활화 유도를 in vivo 상에서 반드시 확인 필요 없는 방법 정립. 	<ul style="list-style-type: none"> - 완전 불활화 확인 방법 정립: 60% - 불활화 사균체 백신의 안전성 분석: 50%

제4장. 연구결과의 활용 계획 등

제1절. 생균 같은 불활화 사균체 백신 개발

1. 추가연구의 필요성

- 가. 1년간의 연구를 통하여 개발기술의 국내 특허 출원 등 살모넬라균에 대한 신개념 사균체 즉, 생균같은 불활화 사균체 제조기술을 고부가가치를 가지는 단계로 발전시킴. 약독화 생균의 경우 국내 산업 동물의 사육 환경과 맞지 않아 사용에 많은 제약 등의 사유로 산업화 보다는 실험실 수준에 수준의 단계에 머무르는 경우가 대부분임. 하지만 본 연구 과제를 통해 개발된 신개념 사균체 혼합 백신은 생균처럼 면역 유도에 탁월하면서 불활화 사균체로서 보다 안전한 백신으로 사용할 수 있다. 그러나 개발기술의 본격적인 산업화를 위해서는 다양한 세균에 대한 사균화 유도 여부 및 안전성에 기반한 제품개발 및 효능검정과 임상실험 단계 등의 추가 연구가 필요함
- 나. 더욱이 세포 내 감염 세균의 완벽한 방어를 위해서는 세포성 면역 반응을 유도할 수 있는 약독화 생균 백신 개발이 필요하나 국내 산업 동물의 사육 환경은 뚜렷한 사계절 및 환절기 최근 무더위진 여름 등으로 인해 세균성 질환 등에 의한 치료 목적의 항생제 사용이 빈번하여 약독화 생균 백신의 사용에 많은 어려움이 존재한다. 하지만 금번 연구를 통해 개발된 신개념 불활화 사균체는 생균처럼 세포성 면역 반응을 유도할 수 있는 현재까지 개발된 가장 우수한 백신 제조 기술 중 하나로 판단됨. 그러나 기술적 향상이 필요한 부분이 또한 존재하여 이에 대한 추가적 연구의 진행을 통한 세계 최고수준의 세포내 기생 세균에 대한 신개념 불활화 사균체 유도 기술의 확보 및 안전성 확보를 위한 추가적 연구가 필요함
- 다. 본연구에서 개발된 완전 불활화 확인 방법을 활용하여 많은 주요 세균들에 대한 신개념 사균체 백신 제작 기술의 확립을 통한 연구성과의 극대화가 필요함

2. 타 연구의 응용 및 활용방안

- 가. 세포 내 기생 세균에 대한 신개념 불활화 사균체 백신 제작 기술은 다양한 세균성 질환 병원체에 대한 생균 같은 안전한 불활화 사균체 백신 제작에 응용 기술에 활용이 가능함
- 나. 또한 신개념 불활화 사균 백신은 경구 접종이 간으 한 것으로 알려져 있기 때문에 주사용 뿐만 아니라 사료첨가제로 사료아 함께 급여를 통한 백신 접종 등 국내 축산 환경에 적합 형태의 백신 개발에 활용될 수 있음
- 다. 더불어 신개념 불활화 사균체는 포르말린 유도 불활화 사균체와 달리 경구 접종이 가능한 것으로 알려져 있어 야생동물에서의 세균성 질병 예방을 위한 경구용 백신 개발에 응용할 수 있을 것으로 기대함.

3. 기업화 추진방안

- 가. 본 과제에서 확립한 신개념 사균체 혼합 백신 제조 기술에 기반한 주요 세균성 질환 병원체에 대한 신개념 불활화 사균체 유도 조건 확립
- 나. 세포의 기생세균에 대한 신개념 사균체 예방 백신 시제품 제작
- 다. 각 동물에 대한 신개념 불활화 사균체 예방 백신 시제품의 안전성 및 효능 평가 수행을 통한 야외 임상실험 신청

제2절. 가금 티푸스 및 인수공통전염 살모넬라 식중독 예방 백신 개발

1. 추가연구의 필요성

가. *Salmonella* Enteritidis, *S. Thompson* 등 주요 세균성 인수공통전염 살모넬라 식중독균에 대한 신개념 불활화 사균체 유도 방법 확립

- (1) 국내 주요 인수공통전염 살모넬라 식중독 원인균인 *Salmonella* Enteritidis 및 *S. Thompson*에 대한 신개념 사균체 유도 최적 물질 및 유도 조건 확립 필요
- (2) 이들 신개념 살모넬라 불활화 사균체 혼합 백신의 시제품 제작에 대한 추가 연구가 필요함
- (3) 갈색레그혼중에서 혼합 백신의 안전성 및 혼수 평가가 필요함
- (4) 동물용 제조회사에서 백신을 상용화 하기 위해서는 야외에서의 임상 시험 계획서를 작성하여 수의검역본부에 제출 후 야외에서의 실험이 필요하면 이 소요 기간은 약 3년이 소요됨
- (5) 더불어 백신을 제조 유통하기 위해서는 안정성 실험은 필수이며 이 실험은 약 2년간의 안전성 및 효능 평가와 같이 수행되어야 함
- (6) 이와 같이 연구 개발에 성공한 연구 결과를 사업화하기 위해서는 약 3년간의 추가 연구가 절대적으로 필요함

2. 타 연구의 응용 및 활용방안

가. 주요 세포성 인수공통 감염병 예방 백신 개발에 기초 정보 제공

- (1) 주요 세균성 인수공통감염병 병원체에 대한 신개념 사균체 유도 물질 탐색 및 유도 기술 확립에 활용 가능
- (2) 우리가 본 연구를 통해 획득한 신개념 사균체에 최적의 보존제 및 adjuvant에 대한 정보를 토대로 각 병원체에 대한 최적의 백신에 적합한 백신 첨가제 발굴에 대한 정보 제공

3. 기업화 추진방안

가. 갈색레그혼중에서의 가금 티푸스 및 인수공통전염 살모넬라 식중독 동시 예방 백신 시제품 제작

- (1) 다양한 살모넬라균 신개념 불활화 사균체 유도 최적 물질 및 조건 확립
- (2) 신개념 살모넬라 불활화 사균체 혼합 백신 시제품 생산
- (3) 제작된 시제품으로 야외 현장 임상실험 및 안정성 실험 수행
- (4) 신개념 살모넬라 불활화 사균체 혼합 백신 생산 및 국내 판매

제5장.연구개발성과의 보안등급 및 LMO 연구시설 및 수입신고

제1절.연구개발성과의 보안등급

보안등급 분류	○ 해당 사항 없음
---------	------------

제2절.LMO 연구시설 및 수입신고

시설번호	제LML09 - 183호	안전관리 등급	2등급
수입신고		해당 사항 없음	

제6장.연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

전북대학교에서는 다음과 같은 연구실 안전관리 프로그램을 운영하고 있으며 본 과제에 참여하는 연구원들 모두 해당 안전관리 프로그램에 성실히 참여함으로써 연구실 안전사고를 사전에 예방하고 위급한 순간에 안전하게 대처할 수 있도록 한다. <해당 연구실의 실정에 맞게 기술>

안전점검 및 정밀안전진단

1. 점검내용 및 실시주기 등

구 분		점 검 내 용	점검주기	점검주체
안전점검	일상점검	다음 각호의 사항을 육안으로 점검 1)기계·기구·전기·가스 등의 실험기자재와 약품·병원체 등 실험재료의 이상유무 2)보호장비의 관리상태를 육안으로 점검	(고위험) 매일 1회 (저위험) 매주 1회	해당 실험실 관계자
	정기점검	다음 각 호의 사항을 장비를 이용하여 점검 1)기계·기구·전기·가스 등의 설비기능의 이상유무 2)보호장비의 관리상태	매년 1회	연구주체의 장
정밀안전진단		외관 육안점검 및 점검장비를 사용하여 연구실 내·외의 안전보건과 관련된 사항을 진단·평가	2년마다 1회	연구주체의 장

연구활동종사자 보험가입

○ 업무개요

연구실안전환경조성에 관한 법률 제14조에(보험가입) 의거 과학기술분야 연구활동종사자의 연구활동 중 안전사고 발생 시 적정보상을 위하여 연구활동종사자를 수익자로 하는 상해보상보험(공제)을 매년 가입

○ '19~'20 보험가입 내용

- 가입대상 : 14,118명(과학기술분야 및 일부예체능 학과의 재학중인 대학(원)생, 수료후논문연구생)

※ 연구원, 연구보조원, 박사후연수연구원(Post-Doc.) 및 연구소(센터) 또는 각종 연구인프라사업단 등에서 연구과제 수행 등을 위하여 자체 채용한 연구(보조)원 등은 「산업재해보상법」에 의거 의무적으로 산재보험에 가입하여야 하므로 가입대상에서 제외하고, 필요시 각 용기관별 예산으로 자체 가입

- 보장한도

구 분	사 망	후유장해	부상/질병
'18년 계약기준	200,000천원	200,000천원	50,000천원

- 보장기간 : '19. 9. 16. 00시 ~ '20. 9. 16. 24시(1년)

- 보상내용 : 연구개발활동중에 발생한 사고로 인한 부상·질병·신체장해·사망 등

연구활동종사자 건강검진

○ 업무개요

「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 시행규칙 제10조(정밀안전진단의 실시)에 의거 유해물질 및 유해인자를 취급하는 연구활동종사자에 대해 안전한 연구활동 보장 및 질병예방을 위하여 일반 및 특수건강검진을 실시

- 검진대상 : 유해물질 및 유해인자를 취급하는 상시 연구활동종사자

· 「산업안전보건법」 시행규칙 별표 12의2에 따른 유해인자(181종) 일정기준 이상 취급자

- 시행주기

· 일반건강검진 : 연1회<직장가입자는 해당검진 년도 제외>

· 특수건강검진 : 유해인자별 검진주기에 따라 수검

- 검진기관 : 「산업안전보건법」에 따른 특수건강진단기관

□ 안전교육

구 분	정기교육			신규교육	
대상	-대학(원)생 2~3학년 -연구(보조)원			-대학(원)생 1학년 -신규채용된 연구(보조)원	
시행시기	상반기	집합	2월	신입생 O.T	2월
		온라인	1~6월	상반기	4월
	하반기	집합	8월	하반기	10월
		온라인	7~12월		
방 법	집합, 온라인			집합	

□ 사전유해인자분석 실시

- 실시근거 : 연구실안전환경 조성에 관한 법률 제5조
- 실시내용 : “사전유해인자위험분석”이란 연구개발활동 시작 전 유해인자를 미리 분석하는것으로 연구실 책임자가 해당 연구실의 유해인자를 발굴하고 사고예방 등을 위하여필요한 대책을 수립하여 실행하는 일련의 과정
- 실시대상 실험실
 - 「화학물질관리법」 제2조제7호에 따른 유해화학물질 취급
 - 「산업안전보건법」 제39조에 따른 유해인자 취급
 - 「고압가스 안전관리법 시행규칙」 제2조제1항제2호에 따른 독성가스 취급
- 실시시기 : 연구실에서 수행하는 연구/프로젝트, 실험, 실습 등 시작 전 사전유해인자분석보고서 작성 제출
- 작성방법 :
 - 연구실 사전유해인자위험분석 실시에 관한 지침[과학기술정보통신부 고시 제2017-7호]에 의거하여
 - www.labs.go.kr 홈페이지에서 제공하는 틀을 이용하거나 수기양식을 이용하여 보고서를 작성하고 포털연구실안전관리시스템에 제출

□ 실험실 안전표식 제작 및 배포

- 근 거 :
 - 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제6조(안전관리규정의 작성 및 준수 등)
 - 전북대학교 연구실 안전관리 규정 제14조(연구실 안전표식의 설치 또는 부착 등)
- 목 적 : 연구실 내 위험요인이 존재하거나 사고 발생 가능성이 있는 지역, 시설 및 물질 등에 대하여 안전표식을 부착함으로써 연구활동종사자가 위험요소에 대하여 식별할 수 있도록 하고자 함.
- 제작 및 배포 방법
 - (본부) 금지, 위험, 경고, GHS, 지시, 안내 등 수요조사 실시후 안전표식 제작 및 배포
 - (자체) <http://labsafety.jbnu.ac.kr> 접속후 정보마당-안전관리자료-정보마당 1번글에서 필요서식 출력 부착

□ 안전시설 유지 및 응급시설 개선

- 목 적 : 가스설비, 환기설비, 전기설비 및 안전장비 정상 가동을 위한 유지관리 및 중대한 결함으로 인한 시설개선 필요시 지체없이 대응하여 위험요인 제거
- 사업 내용
 - 연구실 안전점검(진단)에 따른 전기, 가스, 기계, 소방 등 안전시설 미흡부분 개선시행
 - 가스 감지기의 영점조정과 정상적인 작동상태 유지관리
 - 흡후드용 브로워 정상 작동상태 등 환기설비 확인 점검 수리
 - 누전 및 불완전한 전기설비 시설개선
 - 비상제안기 및 비상샤워기 유지관리 보수
- 추진시기 : 연중 수시 (예산상황을 고려하여 추진)

□ 실험폐액/실험폐기물 처리

- 실험폐액 등의 주기적 위탁처리로 안전하고 쾌적한 연구환경 조성기여
- 종류별 폐기물 처리계획

구 분	처리대상	처리주기	비고
실험폐액	폐유기용제 등	월 2회	
실험폐기물	빈 시약병류 등	월 1회	
장기 미사용 시약	폐화학약품 등	분기 1회	
의료폐기물	조직물류 등	월 2회	자연대/환생대 등

유해인자 노출도 평가 실시

- 실시근거 : 연구실 안전점검 및 정밀안전진단에 관한 지침』 제12조(유해인자별 노출도평가)
- 실시내용 : 연구실에 존재하는 유해인자에 연구활동종사자들이 법적기준이상 노출되어 있는지 여부를 확인하고 그에 따른 대응방안 마련
- 추진시기 : 6~12월중 (희망연구실 조사하여 실시)
- 추진방법 : 작업환경측정 법정지정기관에 위탁하여 실시

기타문의 : 전북대학교 연구실안전관리센터(063-219-5312~5)

제7장.연구개발과제의 대표적 연구실적

제1절. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부(SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	마우스에서 살모넬라 감염증 예방을 위한 <i>Salmonella</i> Typhimurium 불활화 사균체제 adjuvant 선택을 위한 효능 비교 시험	한국가축위생학회지	문자영, Enkhsaikhan Ochirkh-uyag, 김원경, 이준우, 조영규, 광길한, 박병용, 허진	43(2)	한국	한국동물위생학회	비SCI	2020.06.30	doi.org/10.7853/kjvs.2020.43.2.89

제2절. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2020 IPACT conference	문자영, 김선민, 허진	2020.06.26	한국과학기술회관	대한민국

제3절. 생명자원(생물자원)/화합물

No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도
1	<i>Salmonella</i> Typhimurium (HJL812)	KCTC14113BP	한국생명공학연구원	2020

제4절. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품중, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록		
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호

1	신규한 살모넬라 타이피리움 불활화 사균체를 포함하는 살모넬라증 예방 또는 치료용 백신 조성물	대한민국	허진	2020.02.10	10-2020-0015 772			
---	---	------	----	------------	---------------------	--	--	--

제5절. 전문연구 인력양성

No	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	석사졸업	2020		1				1					1	

제6절. 기술거래(이전) 등

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	기술이전	신규한 살모넬라 타이피리움 불활화 사균체를 포함하는 살모넬라증 예방 또는 치료용 백신 조성물	(주)코미팜	2020.08.27.	9,000,000원 (9,000,000원)	1

붙임. 참고문헌

- 문자영, 광길환, Enkhsaikhan Ochirkhuyag, 김선민, 이준우, 조영규, 김원경, 방우영, 배창환, 허진. 2019. 가금티푸스 예방을 위한 adjuvant로서 mastoparan V1을 사용한 포르말린-불활화 *Salmonella* Gallinarum 사균체 백신의 효능 평가. 한국가축위생학회지 42(4): 257-264.
- Abd El Ghany M, Jansen A, Clare S, Hall L, Pickard D, Kingsley RA, Dougan G. 2007. Candidate live, attenuated *Salmonella enterica* serotype Typhimurium vaccines with reduced fecal shedding are immunogenic and effective oral vaccines. *Infect Immun* 75: 1835-42.
- Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, Garaizar J. 2004. Development of a Multiplex PCR Technique for Detection and Epidemiological Typing of *Salmonella* in Human Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 42: 1734-8
- Barbezange C, Ermel G, Ragimbeau C, Humbert F, Salvat G. 2000. Some safety aspects of *Salmonella* vaccines for poultry: in vivo study of the genetic stability of three *Salmonella typhimurium* live vaccines. *FEMS Microbiol Lett* 192: 101-6.
- Berndt A, Methner U. 2001. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella typhimurium* strains. *Vet Immunol Immunopathol* 78:143-61.
- Brumme S, Arnold T, Sigmarsson H, Lehmann J, Scholz HC, Hardt WD, Hensel A, Truyen U, Roesler U. 2007. Impact of *Salmonella* Typhimurium DT104 virulence factors invC and sseD on the onset, clinical course, colonization patterns and immune response of porcine salmonellosis. *Vet Microbiol* 124: 274-85.
- Cheung HY, Wong MNK, Cheung SH, Liang LY, Lam LY, Chiu SK. 2012. Differential actions of chlorhexidine on the cell wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *PLoS One* 7(5): e36659.
- Desin TS, Köster W, Potter AA. 2013. *Salmonella* vaccines in poultry: past, present, and future. *Expert Rev Vaccines* 12: 87-96.
- Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, Kisich KO. 2009. The role of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des* 15: 2377-2392.
- Dupuis L, Ascarateil S, Aucouturier J, Ganne V. 2006. SEPPIC vaccine adjuvants for poultry. *Ann NY Acad Sci* 1081: 202-205.
- Fàbrega A, Vila J. 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev* 26: 308-41.
- Feng P, Wilson QM, Meissler Jr JJ, Adler MW, Eisenstein TK. 2005. Increased sensitivity to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice undergoing withdrawal from morphine is associated with suppression of interleukin-12. *Infect Immun* 73: 7953-9.
- Gazit E, Boman A, Boman HG, Shai Y. 1995. Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry*. 34:11479-11488.
- Hajam IA, Dar PA, Won G, Lee JH. 2017 Bacterial ghosts as adjuvants: Mechanisms and potential. *Vet Res* 48: 37.
- Hensel A, Huter V, Katinger A, Raza P, Strnistschie C, Roesler U, Brand E, Lubitz W. 2000.

- Intramuscular immunization with genetically inactivated (ghosts) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 protects pigs against homologous aerosol challenge and prevents carrier state. *Vaccine* 18: 2945–2955.
- Henzler-Wildman KA, Martinez GV, Brown MF, Ramamoorthy A. 2004 Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. *Biochemistry* 43: 8459–8469.
- Hur J, Kim MY, Lee JH. 2011. Evaluation of efficacy of a new live *Salmonella* Typhimurium vaccine candidate in a murine model. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 34: 171–177.
- Hur J, Lee JH. 2010. Immunization of pregnant sows with a novel virulence gene deleted live *Salmonella* vaccine and protection of their suckling piglets against salmonellosis. *Vet Microbiol* 143: 270-6.
- Hur J, Lee JH. 2011. Enhancement of immune responses by an attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain secreting an *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protein as an adjuvant for a live *Salmonella* vaccine candidate. *Clin Vaccine Immunol* 18: 203-9.
- Ismail NM, El-Deeb AH, Emara MM, Tawfik HI, Wanis NA, Hussein HA. 2018. IMS 1313-nanoparticle mucosal vaccine enhances immunity against avian influenza and Newcastle disease viruses. *Int J Poult Sci* 17: 167-174.
- Jang SI, Lillehoj HS, Lee SH, Lee KW, Lillehoj EP, Bertrand F, Dupuis L, Deville S. 2011. Mucosal immunity against *Eimeria acervulina* infection in broiler chickens following oral immunization with profilin in Montanide™ adjuvants. *Exp Parasitol* 129: 36-41.
- King TP, Jim SY, Wittkowski KM. 2003. Inflammatory role of two venom components of yellow jackets (*Vespula vulgaris*): A mast cell degranulating peptide mastoparan and phospholipase A1. *Int Arch Allergy Immunol* 131: 25–32.
- Kim SJ, Kim JH, Jun SY, Paik HR, Han JH. 2014. Protective effect of bacteriophages against *Salmonella* Typhimurium infection in weaned piglets. *Korean J Vet Serv* 37: 35-43.
- Kim WK, Moon JY, Cho JS, Ochirkhuyag E, Akanda MR, Park BY, Hur J. 2019. Protective efficacy of an inactivated *Brucella abortus* vaccine candidate lysed by GI24 against brucellosis in Korean black goats. *Can J Vet Res* 83: 68-74.
- Kwon AJ, Moon JY, Kim WK, Kim S, Hur J. 2016. Protection efficacy of the *Brucella abortus* ghost vaccine candidate lysed by the N-terminal 24-amino acid fragment (GI24) of the 36-amino acid peptide PMAP-36 (porcine myeloid antimicrobial peptide 36) in murine models. *J Vet Med Sci* 78: 1541–1548.
- Langemann T, Koller VJ, Muhammad A, Kudela P, Mayr UB, Lubit W. 2010. The Bacterial ghost platform system: Production and applications. *Bioeng Bugs* 1: 326–336.
- Liu J, Li Y, Sun Y, Ji X, Zhu L, Guo X, Zhou W, Zhou B, Liu S, Zhang R, Feng S. 2010. Immune responses and protection induced by *Brucella suis* S2 bacterial ghosts in mice. *Vet Immunol Immunopathol* 166: 138–144.
- Lv Y, Wang J, Gao H, Wang Z, Dong N, Ma Q, Shan A. 2014. Antimicrobial properties and membrane-active mechanism of a potential α -helical antimicrobial derived from cathelicidin

PMAP-36. PLoS One 9: e86364.

- Mastroeni P, Chabalgoity JA, Dunstan SJ, Maskell DJ, Dougan G. 2001. *Salmonella*: immune responses and vaccines. Vet J 161: 132–64.
- Medina FA, de Almeida CJ, Dew E, Li J, Bonuccelli G, Williams TM, Cohen AW, Pestell RG, Frank PG, Tanowitz HB, Lisanti MP. 2006. Caveolin-1-deficient mice show defects in innate immunity and inflammatory immune response during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. Infect Immun 74: 6665-74.
- Mittrücker HW, Raupach B, Köhler A, Kaufmann SH. 2000. Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella typhimurium* infection. J Immunol 164: 1648–52.
- Moon JY, Kim SY, Kim WK, et al. Protective efficacy of a *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine candidate constructed with a recombinant lysozyme-PMAP36 fusion protein in a murine model. Can J Vet Res 2017;81:297-303.
- Norimatsu M, Chance V, Dougan G, Howard CJ, Villarreal-Ramos B. 2004. Live *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) elicit dendritic cell responses that differ from those induced by killed *S. Typhimurium*. Vet Immunol Immunopathol 98: 193-201.
- Nagarajan AG, Balasundaram SV, Janice J, Karnam G, Eswarappa SM, Chakravorty D. 2009. sopB of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is a potential DNA vaccine candidate in conjugation with live attenuated bacteria. Vaccine 27: 2804–11.
- Pascual DW, Trunkle T, Sura J. 2002. Fimbriated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium abates initial inflammatory responses by macrophages. Infect Immun 70: 4273-81.
- Pathangey L, Kohler JJ, Isoda R, Brown TA. 2009. Effect of expression level on immune responses to recombinant oral *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccines. Vaccine 27: 2707–11.
- Roesler U, Heller P, Waldmann KH, Truyen U, Hensel A. 2006. Immunization of sows in an integrated pig-breeding herd using a homologous inactivated *Salmonella* vaccine decreases the prevalence of *Salmonella* Typhimurium infection in the offspring. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 53: 224-8.
- Schwartz KJ, Taylor DJ, Straw BE, D’Allaire S, Mengeling WL. 1999. Diseases of swine. Iowa state University. press. Ames, Iowa 535-551.
- Won G, Chaudhari AA, Lee JH. 2016. Protective efficacy and immune responses by homologous prime-booster immunizations of a novel inactivated *Salmonella* Gallinarum vaccine candidate. Clin Exp Vaccine Res 5: 148–158.
- Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. Biophys J 81: 1475–1485.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 가금티푸스 및 인수공통 전염 살모넬라식중독 예방 백신 개발				
	(영문) Development of a novel vaccine to prevent fowl typhus and salmonella food poisoning				
주관연구기관	전북대학교산학협력단	주 관 연	(소속) 전북대학교 수의과대학		
참여기업	(주)코미팜	구	책	(성명) 허 진	
총연구개발비 (120,000 천원)	계	120,000 천원	총 연구 기간	2019. 08. 30 ~ 2020. 08. 29 (1년 월)	
	정부출연 연구개발비	90,000 천원	총 참여 연구 원 수	총 인원	16
	기업 부담 금	30,000 천원		내부인원	16
	연구기관부 담금			외부인원	0
○ 연구개발 목표 및 성과					
1. 연구 개발 목표					
가. 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 제조					
나. 가금에서 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 혼합 백신 시제품의 안전성 및 효능 평가					
다. 백신 접종한 가금에서 야외 독성 살모넬라 타이피뮤리움과 살모넬라 갈리나룸 혼합 균주로 도전 감염한 다음 방어 및 효능 평가					
라. 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸의 신개념 혼합 예방 백신 제조 공정 확립					
2. 연구 개발 성과					
가. 신규한 살모넬라 타이피뮤리움 불활화 사균체를 포함하는 살모넬라증 예방 또는 치료용 백신 개발을 통한 산업체 기술 이전 1건, 지적 재산권 국내 특허 출원 1건, 인력 양성 1건					
나. 마우스에서 살모넬라 감염증 예방을 위한 신개념 <i>Salmonella</i> Typhimurium 불활화 사균체체 최적 adjuvant 선택을 위한 효능 비교 시험을 통한 국내 학회지 게재 1건					
다. 신규한 살모넬라 타이피뮤리움 및 살모넬라 갈리나룸 불활화 사균화 혼합 백신 갈색레그혼종에서의 안정성 평가 기술 확보 및 1종 시제품 제작					

○ 연구내용 및 결과

1. 신규한 *Salmonella* Typhimurium (ST) 및 *Salmonella* Gallinarum (SG) 불활화 사균체 개발을 통한 지적 재산권 확보 및 산업체 기술이전
 - 가. 산업체 기술이전 1건 완료
 - 나. 지적 재산권 국내 특허 출원 1건 완료
 - 다. 생물 자원 1건 등록
2. 산업화 가능한 생물 자원 발굴 및 발굴 자원을 활용한 신규한 불활화 사균체 제조 기술 발굴
 - 가. 국내 닭에서 분리한 *Salmonella* Typhimurium을 생물장원으로 등록. 등록 균주로 신규한 불활화 사균체 국내 특허 출원 1건 및 산업체에 기술 이전 1건 완료
3. 신규한 ST 및 SG 불활화 사균체 백신 개발
 - 가. 목적 : 가금에서 인수공통감염병 및 가금티푸스 동시 예방 가능한 신규한 ST 및 SG 불활화 사균체 혼합 백신 시제품 제작
4. 신규한 ST 및 SG 불활화 사균체 백신 후보주의 안전성 및 효능 평가를 바탕으로 한 논문 및 학술회의 발표
 - 가. 마우스에서의 신개념 ST 불활화 사균체에 최적 adjuvant 선발에 대한 국내 KCI에 1편 게재
 - 나. 가금에서의 신개념 SG 불활화 사균체의 안전성 및 효능을 평가하여 국내에서 개최한 학술회의에 1편 발표.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

1. 생균같은 불활화 사균체 백신개발을 통하여 국내 축산 사육 환경에 접합한 백신 제조 기술 개발을 통한 백신의 국산화 향상
2. 세포 내 기생 세균에 대한 신개념 불활화 사균체 제조 기술을 바탕으로 국내 주요 살모넬라성 식중독 원인균인 *Salmonella* Typhimurium 포함 *S. Enteritidis* 및 *S. Thompson* 등에 대한 동시 예방을 위한 연구과제 수주를 통한 후속 연구 지속
(연구재단 보호연구, 2020. 06. 01. ~ 2025.02.28., 세균성 인수공통 감염병 예방을 위한 산업동물에서의 선제적 대응 시스템 구축 및 기전 연구)
3. 국내 가축사육농가에 개발품 적용을 통한 농가소득 향상
4. 수입대체 및 수출을 통한 국내 동물용 백신 산업의 활성화 및 경제성 창출
5. 신개념 불활화 사균체 유도 기술을 바탕으로 한 동물의 질병 저감 및 항생제 내성 균의 저감을 위한 다양한 천연물질 함유 사료 첨가제의 개발 및 후속 연구 지속
(IPET 가축질병대응기술개발사업, 2020.04.29. ~ 2021.12.31. 항생제 내성 저감물질 및 기술개발)

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		119082-1	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	가금티푸스 및 인수공통 전염 살모넬라식중독 예방 백신 개발			과제유형	개발
연구기관	전북대학교 산학협력단			연구책임자	허진
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2019.08.30.~2020.08.29	90,000,000	30,000,000	120,000,000
	계	2019.08.30.~2020.08.29	90,000,000	30,000,000	120,000,000
참여기업	(주)코미팜				
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020. 8. 28

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
전북대학교 수의과대학	부교수	허진

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	---

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 :(아주우수), 우수, 보통, 미흡, 불량)

Salmonella Typhimurium 및 *Salmonella* Galiinarum을 신개념 불활화 사균체로 유도하는 물질을 선정하고 완전 불활화 연부를 in vitro 및 in vivo로 확인하여 최종 in vitro에서 확인 가능한 방법을 확립한 부분이나, 이렇게 신개념 불활화 사균체로 유도된 두 살모넬라 균주를 마우스 및 갈색레그혼종을 대상으로 안전성 평가를 수행한 부분, 그리고 두 신개념 불활화 사균체 혼합 균주를 백신으로 하여 갈색레그혼종에서의 효능 평가하여 최종 가금 티푸스 및 인수공통전염 살모넬라 식중독 예방 백신 제도 기술 개발은 그 효능이 우수함이 확인되어 국내 특허 출원 및 산업체에 기술 이전을 완료 함

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 :(아주우수), 우수, 보통, 미흡, 불량)

최근 국내 양계 농가의 사육 환경의 변화와 지구 온난화에 따른 이상 기온의 반복에 따라 치료 목적으로 항생제의 사용이 증가하고 있으며 이는 약독화 생균 백신 사용을 제안하게 하는 한 요인이 되거나 또는 약독화 생균 백신의 병원성 복귀 가능성을 높일 수 있는 계기가 될 있음. 국내에서 가금 티푸스를 예방하기 위해 약독화 생균 백신이 주로 쓰이고 있어 이 또한 최근 국내 양돈 농가에서 문제를 야기할 수 있는 기회가 증가하고 있음. 또한 최근 지균 온난화로 인한 긴 여름철은 살모넬라에 의한 식중독 발생 비율을 증가시키고 있음. 따라서 본 연구를 통해 개발된 생균백신처럼 세포성 면역 반응을 유도하면서 불활화 사균 백신처럼 안전한 신개념 불활화 사균체 백신 제조 기술은 다른 많은 유사한 세포 내 기생 세균 백신 제조에 적용이 가능하여 수의학 분야에서 큰 파급효과를 가져 올 것으로 생각 됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 :(아주우수), 우수, 보통, 미흡, 불량)

국내 산업동물 사육 환경은 약독화 생균 백신의 사용에 많은 제약이 있음. 하지만 본 연구를 통해 개발된 생균 같은 불활화 사균 백신은 살모넬라처럼 세포 내 기생 세균의 제거에 필요한 세포성 면역 반응을 유도함이 확인되어 세포 내 기생 세균에 대한 백신 제조에 바로 적용가능 함. 또한 신개념 불활화 사균체 백신은 세포 내 기생 세균뿐만 아니라 세포 외 기생 세균의 경우에도 사용 가능하며 포르말린 유도 불활화 사균체 백신 보다 높은 항체를 유도하며 오래 지속되는 결과를 얻어 세포 내 기생 세균 뿐만 아니라 많은 종류의 세균에 대한 백신 제조에 적용 가능 함. 더불어 완전 불활화 확인 방법의 개선은 불활화 사균 백신의 안전성을 한 차원 높인 결과로 다른 균주에 대한 불활화 여부 확인에 적용이 가능 함.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 :(아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제에의 연구기간은 1년으로 시제품 제작과 목적동물에서의 안전성 및 효능 평가를 수행하기 위해서는 다소 짧은 기간임에도 제품 후보 물질의 발굴부터 시제품 제작을 위한 물질의 대량 생산, 물질과 이를 포함한 제품의 효능 및 안정성 평가에 이르기까지 모든 목표를 성실히 달성하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 :(아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구 기간이 1년으로 다소 짧은 기간임에도 생명 자원 1건 등록, 국내 특허 출원 1건, 이 특허 출원에 기반한 산업체로의 기술이전 1건 등 목표 성과를 초과 달성함

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 배양 후 신개념 사균체 유도 조건 확립	20	100	<ul style="list-style-type: none"> - 살모넬라 타이피뮤리움 및 살모넬라 갈리나룸을 신개념 불활화 사균체 유도 최적 물질 선정 - 완전 불활화 여부 확인 in vitro 및 in vivo 상에서 확인하여 in vitro 상에서 확인 방법 개선 및 확립
마우스 및 가금에서 신개념 사균체 예방 백신의 안정성 검사	30	100	<ul style="list-style-type: none"> - 신개념 살모넬라 타이피뮤리움 불활화 사균체 마우스를 대상으로 한 부작용 확인과 및 부검 및 세균학적으로 안전성 확인 - 신개념 살모넬라 타이피뮤리움 및 살모넬라 갈리나룸 불활화 사균체 혼합 백신을 갈색레그혼종을 대상으로 백신 접종 후 부작용 여부 확인과 부검 및 세균학적으로 안전성 확인
가금에서 신개념 사균체 예방 백신의 효능 평가	30	100	<ul style="list-style-type: none"> - 신개념 살모넬라 타이피뮤리움 및 살모넬라 갈리나룸 불활화 사균체 혼합 백신을 갈색레그혼종에 근육 접종 - 체액성 및 세포성 면역 유도 확인 - 도전감염 후 폐사와 부검 및 균 분리 동정을 통한 효능 확인
살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 배양 후 신개념 사균체 제조공정 확립	20	100	<ul style="list-style-type: none"> - 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 대량 배양 기술 확립 - 대량 배양된 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 완전불활화 최적 조건 확립 - 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 예방 혼합 백신 장기 보관 조건 확립 및 혼합 백신 시제품 제작
합계	100점		

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구 수행 기간은 1년으로 짧은 연구 기간임에도 연구 목표를 초과 달성하였으며, 본 연구를 통하여 개발된 핵심 플랫폼기술은 국내 특허 출원한 국내 최고수준의 기술이며, 활용도가 높은 기술로 판단되며, 향후 다양한 활용법의 개발이 예상됨. 또한, 본 연구를 통하여 개발된 동물 신개념 불활화 사균체 백신 제조기술의 경우 기존의 백신 기술과 비교하여 그 효능이 매우 우수함. 국내 양계 사육 환경은 세포 내 기생 세균을 방어하기 위해 필요한 약독화 생균 백신 접종에 많은 제약이 있음 하지만 본 연구를 통해 개발된 생균 백신처럼 세포내 기생 세균을 예방하는데 있어 반드시 필요한 세포성 면역 반응을 유도할 수 있는 신개념 불활화 사균체 제조 기술로 국내 양계 사육 환경에 최적의 백신 제조 기술이라 생각됨. 이러한 제조 기술은 향후 다양한 세포내 전염성 질환에 대한 백신 개발에 본 연구에서 개발된 기술적용이 가능함. 정량적 성과의 경우 국내 특허출원 1건, 학술대회 발표 1건, 기술이전 1건, 연구 인력양성 1건, 생물정보 등록 1건으로 대부분의 목표 성과를 초과 달성함. 1년간의 연구기간 동안 성실하게 연구를 수행하였으며 본 연구를 통해 얻은 결과를 바탕으로 추가 연구 2건을 수행 중에 있음.

2. 평가 시 고려할 사항 또는 요구사항

1년여의 짧은 연구 기간을 통해 연구를 성실히 수행하여 정량 목표를 추가 달성하였으며, 본 연구를 통해 얻은 결과를 바탕으로 추가 연구를 진행 중에 있음. 1년여의 짧은 연구 기간으로 인해 보다 심도 있는 연구를 수행하지 못해 좀 더 많은 연구 성과를 도출되지 못한 점은 아쉬운 점이라 생각하며, 본 연구를 통해 얻은 연구 결과를 바탕으로 추가 연구를 수행하고 있는 점은 다행이라고 생각함.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 세포 내 기생세균을 예방함에 있어 반드시 필요한 세포성 면역 반응은 약독화 생균 백신이 강력하게 유도하는 것으로 알려져 왔으나 본 연구를 통해 개발된 신개념 사균체 또한 생균처럼 세포성 면역 반응을 유도할 수 있음이 확인되어 앞으로 유사 세포 내 기생세균에 본 신개념 불활화 사균체 제제 기술이 활용될 수 있을 것임.

- 개선된 완전 불활화 여부 확인 방법은 가검물로부터 살모넬라균 분리에 있어 개선된 방법을 제공하여 균 분리율을 높일 수 있어 사람으로의 감염 기회를 조기에 차단할 수 있을 것으로 생각 됨.

- 또한, 본 과제에서 개발된 소재를 이용하여 다른 과제를 통한 다양한 활용법 개발이 이루어질 예정임.

- 본 과제의 목표였던 가금티푸스 및 인수공통 전염 살모넬라식중독 예방 백신의 제품화를 위해서 살모넬라 갈리나룸, 살모넬라 타이피뮤리움 각 1종을 백신 후보주로 선정하였고, 이를 이용한 신개념 사균체 제작방법 확립, 대량 생산공정 확립, 목적동물에 대한 안전성 및

유효성 평가, 백신 시제품 제조 등을 수행한 바 있으며, 상기 자료는 모두 동물약품 인허가 과정에서 전 임상 자료로 활용이 가능합니다. 동물약품 인허가를 본격적으로 추진하기 위하여 산업체인 (주)코미팜에서는 살모넬라 갈리나룸, 살모넬라 타이피뮤리움을 포함하는 2가 복합백신 3 Lot를 조속히 제조하고, 이를 근거로 농림축산검역본부에 임상시험계획서를 제출하도록 하겠습니다. 임상시험계획서 승인 이후 절차는 3개 농장에 대한 야외 임상시험, 백신의 장기보존성 확인, 품목허가서류 제출 및 기술검토 과정이며, 예상되는 허가 승인 시점은 2023년 1/4분기입니다. 또한, 본 과제에서 개발한 살모넬라 갈리나룸, 살모넬라 타이피뮤리움 2가 백신 외에 살모넬라 엔터리티디스를 포함하는 3가 백신에 대한 개발을 후속 과제 등을 통해서 수행하고자 합니다.

-

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	가금티푸스 및 인수공통 전염 살모넬라식중독 예방 백신 개발			
주관연구기관	전북대학교 산학협력단		주관연구책임자	허 진
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	90,000,000	30,000,000	0	120,000,000
연구개발기간	2019.08.30. ~ 2020.08.29.			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용(사유 :)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 배양 후 신개념 사균체 유도 조건 확립	- 살모넬라 타이피뮤리움 및 살모넬라 갈리나룸을 신개념 불활화 사균체 유도 최적 물질 선정 및 각 세균 별 완전 불활화 조건 확립
② 완전 불활화 여부 확인 방법 개선	- 완전 불활화 여부 확인 in vitro 및 in vivo 상에서 확인하여 in vitro 상에서 확인 방법 개선 및 확립
③ 마우스에서 신개념 사균체 예방 백신의 안정성 검사	- 신개념 살모넬라 타이피뮤리움 불활화 사균체 마우스를 대상으로 한 부작용 확인과 및 부검 및 세균학적으로 안전성 확인
④ 가금에서 신개념 사균체 예방 백신의 안정성 검사	- 신개념 살모넬라 타이피뮤리움 및 살모넬라 갈리나룸 불활화 사균체 혼합 백신을 갈색레그혼종을 대상으로 백신 접종 후 부작용 여부 확인과 부검 및 세균학적으로 안전성 확인
⑤ 가금에서 신개념 사균체 예방 백신의 효능 평가	- 신개념 살모넬라 타이피뮤리움 및 살모넬라 갈리나룸 불활화 사균체 혼합 백신을 갈색레그혼종에 근육 접종 - 체액성 및 세포성 면역 유도 확인 - 도전감염 후 폐사와 부검 및 균 분리 동정을 통한 효능 확인
⑥ 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸	- 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸

배양 후 신개념 사균체 제조공정 확립	<p>대량 배양 기술 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 대량 배양된 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 완전불활화 최적 조건 확립 - 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 갈리나룸 신개념 사균체 예방 혼합 백신 장기 보관 조건 확립 및 혼합 백신 시제품 제작
----------------------	---

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과			교육 지 도	인 력 양 성	정책 활용·홍 보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	30			30	30								10						
최종목 표	1			1	9							1	1						
연구기간 내 달성실적	1		1	1	9							1	1		1				
달성율(%)	100			100	100							100	100						

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	살모넬라 타이피리움 또는 살모넬라 갈리나룸을 신개념 불활화 사균체 유도 기술 확립
②	살모넬라 완전 불활화 확인 방법 확립
③	신개념 타이피리움 및 살모넬라 갈리나룸 불활화 사균체 혼합 백신의 개발

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화흡수	외국기술 개선개발	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술	v					v				
②의 기술	v						v			
③의 기술	v					v				

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	- 다른 세포 내 및 세포 외 세균에 대한 신개념 불활화 사균체 제조에 적용 - 병원성 세균 저감 사료 첨가제 개발 등에 활용
②의 기술	불활화 백신 개발에 있어 완전 불활화 여부 확인에 적용
③의 기술	- 가금에서 가금티푸스 및 인수공통 전염 살모넬라 식중독 동시 예방 백신 개발 후속 연구 과제 지속 - 가금에서의 살모넬라성질병 및 식중독 동시 예방 백신의 상용화

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문	학술발표	SCI			비SCI	논문평균 IF	

단위	건	건	건	건	백만 원	건	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명
가중치	30			30	30									1	
최종목표	1			1	9								1	1	
연구기간 내 달성실적	1		1	1	9								1	1	1
연구 종료 후 성과창출 계획		1													

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	신규한 살모넬라 타이피뮤리움 불활화 사균체를 포함하는 살모넬라 증 예방 또는 치료용 백신 조성물		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	9,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 ³⁾	2024. 12. 백신 1종
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	야외 임상 시험 수행		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
 통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료 시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술 개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.