

최 종 보 고 서

| | | |
|---|--|--|
| <p>(뒷면)</p> <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 40px; margin: 20px auto; text-align: center; padding: 5px;"> 주 의 (편집순서 8) </div> <p style="text-align: center;">(15 포인트 고딕계열)</p> <p style="text-align: center;">↑ 6cm ↓</p> | 1 1 1 5 4 1 0 0 0 0 0 0 5 2 5 0 1 바 이 러 스 흡 착 불 활 성 화 필 터 신 소 재 및 응 용 제 품 개 발 농 림 수 산 식 품 부 ↑ 3cm ↓ | <p style="text-align: right;">(앞면)</p> <p>보안과제(), 일반과제(O) 11-1541000-000525-01</p> <p style="text-align: center;">5cm</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">바이러스 흡착 불활성화 필터 신소재 및 응용제품 개발 (18 포인트 고딕계열) (Development of advanced filter material for virus adsorption and inactivation) (17 포인트 명조계열)</p> <p style="text-align: center;">택 산 메 드 테 크 (주) (17 포인트 명조계열)</p> <p style="text-align: center;">↑ 9cm ↓</p> <p style="text-align: center;">농 립 수 산 식 품 부(17포인트 명조계열)</p> <p style="text-align: center;">↑ 4cm ↓</p> |
|---|--|--|

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “ 바이러스 흡착/불활성화 필터 신소재 및 응용제품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 5 월 31 일

주관연구기관명 : 텍산메드테크(주)

주관연구책임자 : 이 수 복

연 구 원 : 김 원 근

연 구 원 : 민 우 기

연 구 원 : 이 범 훈

협동연구기관명 : 전북대학교

협동연구책임자 : 장 형 관

협동연구기관명 : 국립수의과학검역원

협동연구책임자 : 현 방 훈

요 약 문

I. 제 목

-바이러스 흡착/불활성화 필터 신소재 및 응용제품 개발-

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 조류독감, 구제역 바이러스 등에 의한 피해가 꾸준히 발생하고 있으며, 축산농가에 큰 경제적 손실을 끼친은 물론 국가적 비용이 매년 수천억원에 달함
- 변종 바이러스 출현에 따른 인수공통 전염 가능성 및 신종 인플루엔자 등의 창궐로 광범위한 바이러스에 대응할 수 있는 예방책이 절실히 요구됨
- 조류독감을 포함한 광범위 바이러스를 흡착 및 불활성화 할 수 있는 필터용 섬유 신소재 개발
- 섬유 신소재를 활용한 공기중 바이러스 차단용 필터 개발
- 필터 신소재 섬유 대량생산 및 인체보호 마스크, 축사공조 필터 유니트 등 응용제품의 개발

III 연구개발 내용

- 바이러스 흡착효율이 향상된 하이드록시아파타이트 복합섬유 제조기술 개발
- 고농도 하이드록시아파타이트/고분자 균일 블렌딩 기술 개발
- 계란내 난황항체(IgY) 생산기술 확립 및 섬유 담지화 기술 개발
- 바이러스 불활성화 물질 선발 및 필터섬유소재 결합제조 기술 개발
- 조류인플루엔자 등 바이러스 흡착 및 불활성화 효율 분석기술 개발
- 개발 신소재 섬유를 이용한 필터용 부직포 제조기술 개발
- 필터 신소재의 동물감염 억제성 분석기술 개발

IV. 연구개발결과

- 바이러스 흡착성능이 우수한 키토산/하이드록시아파타이트 복합섬유 제조기술 개발 완료
- 바이러스 불활성화 효과가 우수한 유/무기 물질 선발 및 복합섬유 제조기술 개발 완료
- 계란내 난황항체(IgY) 생산기술 확립
- 바이러스 불활성화 물질 선발 및 불활성화 효과 평가 완료
- In-vitro 바이러스 불활성화 평가기술 개발 완료
- 필터용 부직포 제조기술 개발 완료
- 필터 신소재의 바이러스 차단 효율 분석을 위한 동물모델 개발 및 평가 완료
- 인체보호 마스크, 공조필터 유니트 응용시제품 개발 완료

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 바이러스 흡착 섬유제조 기술 특허 출원
- 바이러스 차단 동물모델 시험장치 특허 출원
- 개발 필터소재의 In-vivo 성능 확인 및 학회(수의학회)발표
- 인체 보호용 마스크 시제품 제작 및 판매 (축산농가, 방역담당자, 일반인 보급을 통한 전염차단)
- 공조 필터 성능 평가 완료(양계장, 축사 적용을 통한 조류독감, 구제역 전파 차단 효과 기대)

SUMMARY

(영문요약문)

Development of advanced filter material for virus adsorption and inactivation

The spread of airborne pathogens such as avian influenza, foot-and-mouth disease, severe acute respiratory syndrome(SARS), and new influenza(H1N1) cause damage to stock farmer and people constantly. To protect this airborne virus damage, development of efficient air-filtering material is needed. In this study we developed novel fiber materials which have 'virus-adsorption' and 'virus-inactivation' properties. These fiber materials include chitosan/hydroxapatite composite fiber, halamine fiber, copper/chitosan composite fiber and IgY impregnated fiber respectively. Non-woven filters were manufactured using several these novel fibers and viral protection properties were evaluated by in-vitro and in-vivo method respectively. This novel filter shows 99.99% of virus inactivation rate in *in-vitro* test and excellent airborne virus filtering property in *in-vivo* test(newly designed bio aerosol experiment system). Consequently this novel fiber is expected to be used not only for viral protectors such as mask and gowns but also air-filtering system for farmhouse.

CONTENTS

| | |
|--|-----|
| Chapter I Introduction | 6 |
| 1. Development necessity | 6 |
| 2. Objective and range | 15 |
| Chapter II Development status of technology | 19 |
| Chapter III Research contents and results | 23 |
| 1. Development of virus adsorption/inactivation fiber materials | 23 |
| 2. Production of IgY and evaluating efficiency of filter materials | 68 |
| 3. Development of animal model method for virus-filtering test | 85 |
| 4. Conclusion | 120 |
| Chapter IV Level of achieving objective and contribution | 122 |
| Chapter V Results and planning | 124 |
| Chapter VI Overseas information | 125 |
| Chapter VII References | 126 |
| Appendix | |

목 차

| | | |
|-------|-----------------------------------|-----|
| 제 1 장 | 연구개발과제의 개요 | 6 |
| 제 1 절 | 연구개발의 필요성 | 6 |
| 제 2 절 | 연구개발의 목적 및 범위 | 15 |
| 제 2 장 | 국내외 기술개발 현황 | 19 |
| 제 3 장 | 연구개발수행 내용 및 결과 | 23 |
| 제 1 절 | 바이러스 흡착/불활성화 섬유 신소재 개발 | 23 |
| 제 2 절 | 바이러스 불활화 항체생산 및 필터소재의 효율 분석 | 68 |
| 제 3 절 | 필터 신소재 동물감염 억제성 분석기술 개발 | 85 |
| 제 4 절 | 결론 | 120 |
| 제 4 장 | 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 122 |
| 제 5 장 | 연구개발 성과 및 성과활용 계획 | 124 |
| 제 6 장 | 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 125 |
| 제 7 장 | 참고문헌 | 126 |

부 록

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 배경

조류인플루엔자, 구제역, 신종플루 바이러스 등 동물간전염, 사람간, 또는 인수공통 전염성 바이러스의 피해가 꾸준히 지속되고 있으며, 전염확산 방지를 위한 대량의 동물 살처분 및 예방을 위한 예산으로 해마다 수천억원 이상의 국가적 손실이 발생되고 있다.

이러한 바이러스는 공기중 호흡기 감염이라는 공통점을 가지고 있으며 그에 따른 확산속도가 매우 빠른 것이 특징이다. 특히 국가간 이동이 자유로운 실정상 바이러스의 전염경로를 효과적으로 차단하는 것은 매우 어려운 현실이다. 따라서 공기중으로 감염되는 다양한 종류의 전염성 바이러스를 효과적으로 차단 및 불활성화 하는 필터소재의 개발이 현실적 대안으로 시급히 부상하고 있으며, 그 중 다양한 필터여재로서 적용이 가능한 바이러스 불활성화 섬유의 제조기술이 산업적 측면에서 유망 하다 할 수 있다.

현재까지 국내 축산업에 가장 손실을 많이 끼치는 전염성 바이러스로는 조류독감, 구제역 바이러스를 들 수 있으며, 최근 사회적 큰 파장을 일으킨 신종플루 등을 포함한 전염성 바이러스의 특징은 다음과 같다.

가. 조류인플루엔자 바이러스

(1) 조류인플루엔자 바이러스

조류 인플루엔자(avian influenza, AI)는 AI 바이러스의 감염에 의해 발생하는 조류의 급성 전염병으로 바이러스의 병원성 정도에 따라 비병원성(non-pathogenic), 저병원성(low pathogenic) 및 고병원성(highly pathogenic)으로 분류하고 있다. 이 중 고병원성 조류인플루엔자(highly pathogenic avian influenza, HPAI)는 닭이나 칠면조에서 급성으로 경과하면서 100%에 가까운 높은 폐사율을 나타내기 때문에 국제수역사무국에서 A급 질병으로 관리하고 있으며, 우리나라에서도 제 1종 법정전염병으로 지정하여 관리하고 있다.

AI는 가금류에서 기록상 가장 오래된 질병들 중의 하나로서 최초 발생 예에서 닭에서 급속한 질병 확산과 높은 폐사율을 나타내었기 때문에 가금역병(Fowl Plague)이라 명명되었다. 1901년에 이르러 가금역병의 원인체가 바이러스라는 것이 밝혀졌지만, 당시까지는 바이러스에 대한 정확한 동정이 이루어지지 않았다. 1955년 독일의 샤퍼(Shafer) 박사에 의해 이 바이러스가 사람, 돼지, 말에서 호흡기감염을 일으키는 원인체와 유사한 인플루엔자 바이러스임이 확인되었다. 1960년대 초 칠면조에서 경미한 질병증상과 낮은 폐사율을 나타내는(즉, non-Fowl

Plague syndrome) 다양한 인플루엔자 바이러스들이 분리되었고, 이에 따라 고병원성 외에도 질병의 증상이나 폐사율이 다양한 서로 다른 종류의 AI 바이러스가 자연계에 존재한다는 것이 확인되었다. 이에 따라 1981년에는 가금역병(Fowl Plague)이라는 병명 대신에 더 정확한 용어인 고병원성 조류인플루엔자(highly pathogenic avian influenza)라는 병명으로 대체하여 명명하고 있다.

1980년 세계보건기구(WHO)는 ‘두창이 지구상에서 완전히 사라졌으며, 우두접종도 더 이상 필요 없다’며 전염병과의 전쟁에서 승리를 낙관했지만, 그 이후 새로 발견된 신종전염병의 수는 대략 30종에 이른다. 후천성면역결핍증(AIDS)을 비롯, C형 간염, 에볼라 출혈열, 병원성대장균(O-157균) 등 이전보다 더욱 치명적인 전염병들이 인류의 생명과 건강을 위협하고 있다. 인플루엔자의 위협도 갈수록 만연하고 있다. 거의 해마다 독감이 유행하고 있으며, 독감예방 백신을 맞는 것이 일상적인 일이 돼버렸다. 그러나 더욱 무서운 것은 십 수 년에 한 번 꼴로 부정기적으로 대유행하면서 엄청난 인명피해를 발생시키는 인플루엔자의 대유행(pandemic influenza)이다

1997년 홍콩에서 발병한 이래 동남아시아 지역을 중심으로 빈번하게 발생하고 있는 조류인플루엔자는 조류에서 인체로도 감염되는 이른바 고병원성 인플루엔자이기는 하지만, 현재까지는 사람간 전파를 통해 대량의 인명을 살상하는 대유행 전염병으로까지 변모하지는 않았다. 그러나 발생지역이 동남아시아권을 벗어나기 시작하자 UN과 미국은 바짝 경계의 수위를 높이는 모습이다. 87년 동안이나 냉동 보관돼 오던 스페인 독감 바이러스의 유전자 배열을 분석한 결과 현재의 조류 인플루엔자와 유사한 특성을 보였다는 연구결과가 나왔다. 돼지 같은 중간감염체(숙주) 없이 직접 감염으로 조류를 죽일 수 있으며 인간에게도 감염된다는 점이 거의 흡사하다는 것이다. 여기에 사람 간 전파까지 가능하게 되면 수많은 인명을 살상했던 과거의 대유행이 재연될 가능성은 충분하다. 표 1은 최근 2003년에서 2007년 1월 현재까지의 사람 간 전파 없이 조류 등과의 직접적 접촉에 의해 조류 인플루엔자에 감염된 건수와 인명피해를 보여주는 통계자료이다.

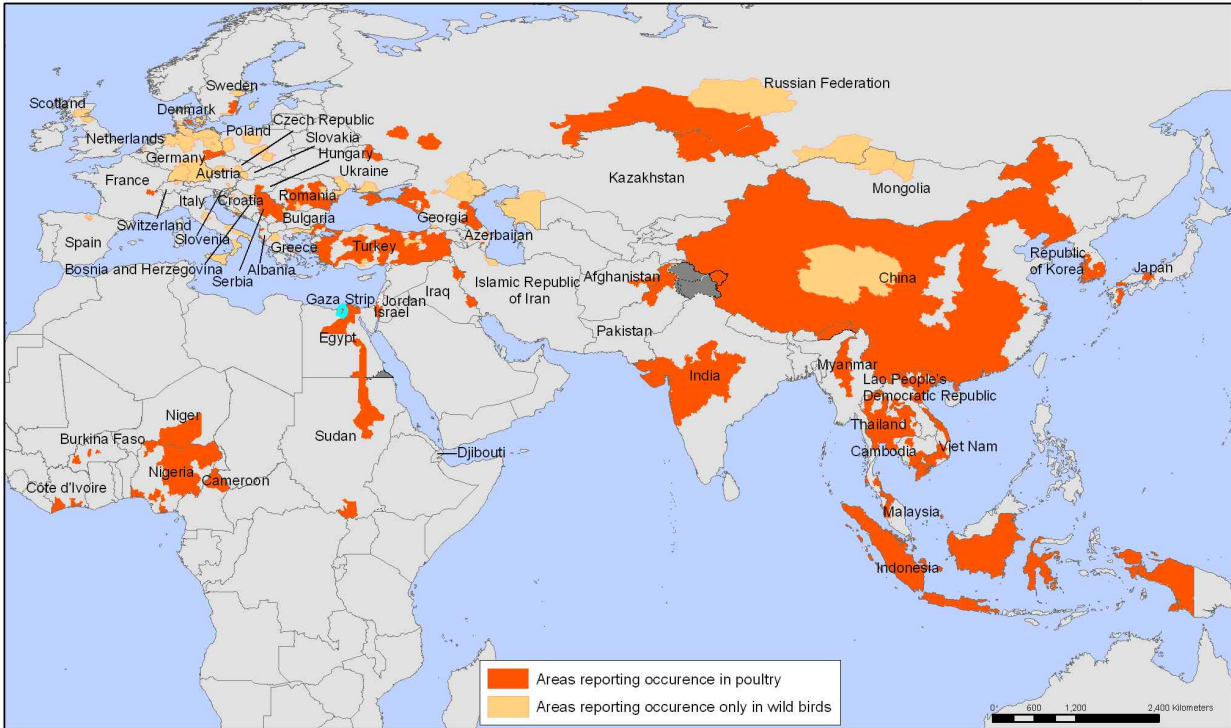
- 우리나라는 표 1에서와 같이 최근 조류 인플루엔자가 다발하는 지역인 아시아 지역에 속해 있고 과거 발병 전력이 있다는 점 이외에도 북한과 인접해 있다는 점에서 우리나라의 조류 인플루엔자 발생 위험성은 매우 높은 것으로 평가된다. 북한은 보건 및 방역 체계가 낙후되어 있을 뿐만 아니라 체제 성격상 관련 정보를 신속하고 정확하게 공개하지 않을 가능성이 높다. 이런 이유로 국제 보건기구 및 금융시장 전문가들은 북한을 중국과 마찬가지로 대규모 발병 및 확산 가능성이 높은 국가로 분류하고 있다.

표 1-1. 조류 인플루엔자에 의한 최근 인명피해 상황(2007.1.22현재, WHO)

| 국가 | 2003 | | 2004 | | 2005 | | 2006 | | 2007 | | 합계 | |
|--------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|
| | Case | Death | Case | Death | Case | Death | Case | Death | Case | Death | Case | Death |
| 아제르바이젠 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 5 | 0 | 0 | 8 | 5 |
| 캄보디아 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 2 | 2 | 0 | 0 | 6 | 6 |
| 중국 | 1 | 1 | 0 | 0 | 8 | 5 | 13 | 8 | 0 | 0 | 22 | 14 |
| 지부티 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 이집트 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 10 | 1 | 1 | 19 | 11 |
| 인도네시아 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 12 | 56 | 46 | 5 | 4 | 80 | 62 |
| 이라크 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 3 | 2 |
| 태국 | 0 | 0 | 17 | 12 | 5 | 2 | 3 | 3 | 0 | 0 | 25 | 17 |
| 터키 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 4 | 0 | 0 | 12 | 4 |
| 베트남 | 3 | 3 | 29 | 20 | 61 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 93 | 42 |
| 합계 | 4 | 4 | 46 | 32 | 97 | 42 | 116 | 80 | 6 | 5 | 269 | 163 |

Areas reporting confirmed occurrence of H5N1 avian influenza in poultry and wild birds since 2003

Status as of 23 January 2007
Latest available update



World Health Organization
© WHO 2007. All rights reserved

The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: World Organisation for Animal Health (OIE) and national governments.
Map Production: Public Health Mapping and GIS
Communicable Diseases (CDS) World Health Organization

그림 1-1. 2003년 ~ 2007. 1. 23 현재 전세계 H5N1형 조류 인플루엔자 발생 현황

(2) 조류인플루엔자 바이러스의 변종 (인수공통 전염가능성)

인플루엔자 바이러스는 오르소믹소비리데(*Orthomyxoviridae*)에 속하는 단일가닥의 negative sense RNA 바이러스로써 2종의 바이러스 내부단백질 즉, nucleoprotein(NP)와 matrix protein(M)의 항원적 차이에 따라 A형, B형 및 C형으로 분류된다. 이 중 B형과 C형 바이러스는 사람에게만 감염되는 반면에 A형 바이러스는 숙주범위가 넓어 사람, 말, 돼지 등 포유동물과 광범위한 종류의 가금 및 야생조류에 감염된다.

A형 인플루엔자 바이러스에는 다양한 아형(subtype)이 존재하며, 바이러스 표면항원인 haemagglutinin(HA)과 neuraminidase(NA)의 항원성에 따라 15개의 HA 아형(H1~H15)과 9개의 NA 아형(N1~N9)들의 조합에 따라 135개(15×9)의 아형이 출현가능하다. 인플루엔자 바이러스에 감수성이 있는 동물이라도 모든 아형에 감염되는 것은 아니며, 특정동물에는 특정 아형이 주로 감염되는 경향을 나타낸다. 반면에 야생물새류(특히 오리류)에서는 인플루엔자 바이러스의 모든 아형들이 발견되고 있다.

가금류에 조류인플루엔자 바이러스가 감염될 경우 다양한 임상증상을 나타내게 되는데 일반적으로 닭에 대한 병원성 시험결과에 따라 저병원성(low pathogenic avian influenza, LPAI)과 고병원성(highly pathogenic avian influenza, HPAI)으로 구분한다. 시험과정은 바이러스를 접종한 계태아의 요막강액을 채취하여 1/10로 희석한 다음, 4~6주령 된 SPF 닭의 정맥내로 접종하였을 때 10일 내에 접종한 닭 8수 중 6수 이상이 죽으면 고병원성, 그 이하가 죽으면 저병원성 또는 비병원성(non-pathogenic)으로 분류한다. 병원성 시험에서 HPAI로 분류된 바이러스는 야외에서 높은 폐사율을 동반하는 심한 질병을 일으킨다. 반면에 LPAI로 분류된 바이러스는 야외에서 매우 다양한 병원성을 나타내는데, 무증상으로 경과하거나 생산성 저하를 동반하는 호흡기 질병을 일으키는 것이 대부분이지만 때로는 높은 폐사율과 이환율을 동반하는 심한 질병으로 경과하기도 한다.

HPAI와 LPAI 바이러스간에 병원성이 달라지는 이유는 바이러스의 증식범위가 HPAI는 전신성인 반면에 LPAI는 국소성이란 것에 있다. 이러한 증식범위의 차이는 각 바이러스의 HA 단백질 절단과정과 연관된다. 인플루엔자 바이러스가 감염되기 위해서는 HA 단백질이 HA1과 HA2 subunits로 절단되어야 하는데, HPAI 바이러스의 HA 단백질은 체내의 모든 세포들에 존재하는 내인성 단백분해효소들에 의해 절단될 수 있는 반면에 LPAI 바이러스의 HA 단백질은 주로 호흡기나 장관에 존재하는 트립신-유사 단백분해효소들에 의해서만 절단될 수 있다. 이러한 증식부위의 차이는 인플루엔자 바이러스의 병원성뿐만 아니라 숙주의 면역반응의 다양성에도 영향을 미치게 된다.

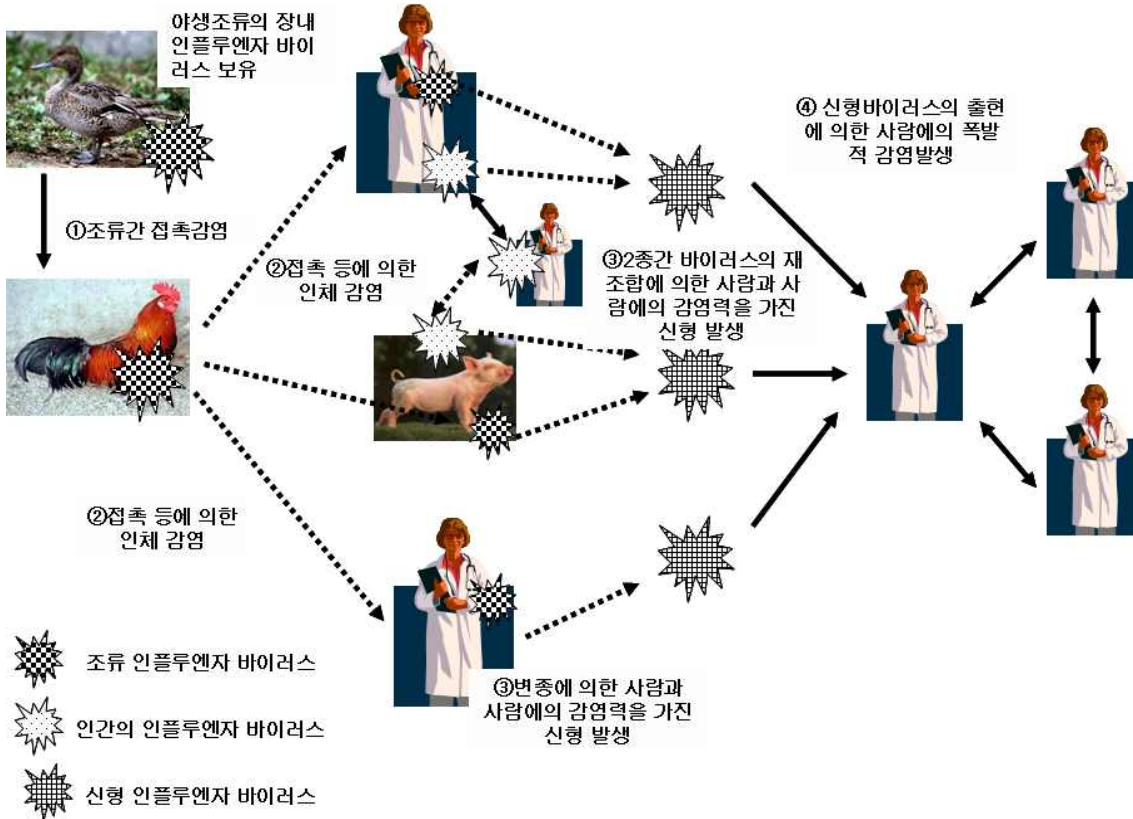


그림 1-2. 조류 인플루엔자 바이러스와 신형 인플루엔자 바이러스의 관계

(3) 조류인플루엔자 확산에 따른 경제적 손실

WHO 이종욱 사무총장은 ‘조류 인플루엔자의 인간 대 인간 감염과 전세계적인 대유행은 시기와 정도가 문제이지 반드시 일어날 것’이라고 예측했다. WHO는 조류 인플루엔자가 확산될 경우의 공식 인명 피해 예상치를 **‘200만명에서 740만명’** 수준으로 발표했지만 그 이전에 WHO의 조류 인플루엔자 방역담당관인 나바로 박사는 **‘적극적으로 대처하지 않을 경우 최대 1억 5천만 명이 사망할 수도 있다’**는 전망을 내놓았다.

WHO는 지난 5월, 조류 인플루엔자의 대유행에 ‘세계 신종인플루엔자 대유행 대비계획 (Global Influenza Preparedness Plan)’의 수정안을 내놓으면서 인플루엔자 대유행의 단계를 재정의했다(표 1 참조). 현 상황을 제4단계(Phase 4)로 규정하면서 바이러스가 인체에 아직 잘 적응하지 못하여 ‘사람간 전파가 소규모로 일어난다’고 명시함으로써 사람간 전파가 발생할 가능성을 배제하지 않고 있다는 사실이다. 따라서 우리나라 보건복지부 산하에 설치된 질병관리본부에서 정하고 있는 ‘대유행의 위험수준별 단계’에서 주의보가 발령될 개연성은 결코 작지 않다고 볼 수 있다.

표 1-2. 조류 인플루엔자 위험수준별 단계 분류

| 단계 | 세계보건기구(WHO)의 분류 | 우리나라 질병관리본부의 분류 | |
|------------------|---|-----------------|---------------------|
| 1단계 (Phase 1) | 인체 감염 바이러스 미발생 인체 감염을 유발할 수 있는 바이러스의 동물 내 존재 가능 존재하더라도 인체 감염 가능성은 상대적으로 낮은 수준 | | |
| 2단계 (Phase 2) | 인체 감염 바이러스 미발생 동물 인플루엔자 바이러스의 확산 인체 감염의 위험성 증가 | | |
| 3단계 (Phase 3) | 변종 바이러스로 인체 감염 발생 그러나 사람간 전파는 미발생 또는 극히 드문 경우에 친밀한 접촉을 통한 사람간 전파 발생 | | |
| 4단계 (Phase 4) | 소규모 사람간 전파 전파는 특정 지역에 국한 바이러스가 아직 충분히 인간에 적응하기 이전 단계 | 주의보단계 | 사람간 전파 사례의 국외 발생 |
| 5단계 (Phase 5) | 상당한 대유행의 위험성 사람간 전파 확산 여전히 지역적으로 국한되어 있고 전파 경로 제한적 바이러스는 보다 인간에 적응하여 변이 | 경보단계 | 사람간 전파 사례의 국내 유입 |
| 6단계 (Phase 6) | 대유행 일반 대중간 지속적 전파 전파 경로 확산 | 비상단계 | 국내 유행 |

우리나라는 지난 2003년 12월과 2004년 2월 사이에 조류 인플루엔자가 발생해, 인체감염자는 생기지 않았지만 닭 500만 마리가 살처분된 바 있다. 지난 2004년 발병해 국지적이긴 하지만 아직까지 피해가 발생하고 있는 베트남의 조류인플루엔자 사례와 유사한 위험도를 가정하고 우리나라에서 예상되는 피해규모를 잠정적으로 추정해 보면 가금류(주로 양계)의 살처분은 대략 820만 마리, 닭 한 마리의 가격을 3천원으로 가정하면 대략 250억 원어치의 폐기처분이 일어날 것으로 예상된다. 좀 더 나아가 세계은행이 제시한 ‘비관적 시나리오’대로, 조류축산농가 활동 6개월분의 손실이 발생한다고 가정하면 GDP 중 닭고기 생산이 차지하는 비중을 기준으로 했을 때 **7천억원이 넘는 부가가치 손실이 발생**한다. 이것은 경제성장률이 대략 0.1%p 낮아지는 것에 해당한다.

조류 인플루엔자가 조류가 아닌 인류에게도 대규모 재앙이 될 것인지의 여부는 ‘사람간 전파’의 여부에 달려 있다고 해도 과언이 아니다. 현재 공식적으로 사람 간 전파가 이루어진 것으로 규명된 사례는 단 한 건도 없지만, 미국 질병통제센터의 자료에 따르면 네덜란드(2003년), 베트남(2005년) 등지에서 사람 간 전파 가능성이 수차례 제기된 바 있다. 그리고 인플루엔자 바이러스가 유전자재조합(reassortment)이나 적응변이(adaptive mutation) 과정을 거쳐 사람 간 전파, 특히 호흡기 감염이 가능한 형질을 획득했을 가능성도 배제할 수 없다. 앞서서도 지적했듯이, WHO를 비롯한 해외 전문가들도 사람 간 전파가 발생할 가능성을 오히려 조심스럽게 열어 두고 있는 상황이다.

조류 인플루엔자의 진원지가 인접한 중국 및 동남아시아 지역이기 때문에 우리나라의 경우 앞에서 설명한 <Ⅰ단계> 및 <Ⅱ단계>로부터 곧바로 <Ⅳ단계>로 진행될 개연성도 크다. <Ⅳ단계>는 해외에서 사람 간 전파가 일어나 지역에 따라 집중적 발병이 일어남과 동시에 국내에서는 사람 간 전파까지는 아니더라도 제한적으로 조류 인플루엔자의 발병이 보고되기 시작하는 단계이다. 이 경우 조류 인플루엔자 만연 국가와의 교역 및 인적 이동이 크게 위축되는 것은 불가피하다. 그 과정에서 무역의 이익이 줄어들고 해당 국가를 상대로 하는 각종 업무도 크게 차질을 빚게 된다.

- 국내에서도 조류 인플루엔자의 사람 간 전파가 발생하고 발병 지역이 확산되는 <Ⅴ단계>의 경우 그 경제적 파급 효과는 양계 및 관광산업 또는 대외거래 등 특정 부문에 국한되지 않고 경제 전반으로 확산된다. 피해가 농촌에서 많은 사람들이 몰려 사는 도시 및 전국적 범위로 확대되면서 서비스산업을 중심으로 민간소비 전반의 위축을 야기한다. 이 경우 우리나라가 받게 될 경제적 영향은 2003년 사스 발병 당시의 홍콩 국내 상황을 통해 추정해 보면, 우선 외국인 방문객이 급감하면서 관광수입 등 서비스산업의 활동이 크게 둔화될 것이다. 2004년 기준으로 우리나라를 찾은 방문객 수는 580여 만명으로 이들이 지출한 금액은 약 57억 달러에 달한다. 홍콩에서 사스가 발병했을 당시와 비슷한 정도로 방문객 수가 감소하는 기간이 6개월 간 지속된다고 가정하면 **20억 달러가 넘는 관광수입이 줄어든다.**

- 민간소비가 국내총생산에서 차지하는 비중이 거의 절반에 육박한다는 사실을 감안하면 서비스업 부문을 중심으로 한 민간소비 둔화는 우리 경제를 또 다른 침체의 구렁텅이로 밀어 넣을 수 있다. 국내에서 사스 발병 당시의 홍콩과 같이 민간소비가 3분기 연속 3~4% 감소한다면 부가가치 기준으로 **8조원 이상의 손실이 발생**하게 된다. 민간소비 둔화뿐만 아니라 대외거래 위축의 효과까지 감안할 경우 경제에 미치는 파급 효과는 더욱 커진다. 2000년대 들어 8~10%의 고도성장을 이어가던 중국은 사스가 확산되면서 2003년 2분기 경제성장률이 7%대로 떨어졌다. 중국 독감이 만연했던 1958년 미국 경제도 이전 10년간의 평균 경제성장률 3.9%에 크게 못 미치는 마이너스 1%의 성장률을 기록했다.

최악의 경우 생산활동 위축, 금융시장 혼란 심화로 인해 경제의 성장 잠재력이 훼손될 우려마저 있다. 감염자가 속출해 대량의 인명 피해가 발생하고 불안 심리가 확산될 경우 외출, 출근, 등교 등 정상적인 사회활동 자체가 어려워진다.

아시아 개발은행의 보고에 따르면 아시아 지역에 고병원성 조류 인플루엔자[H5형]이 유행할 경우 **경제손실액은 약 320조원 규모**가 될 것으로 예측하고 있다.

(4) 조류인플루엔자 바이러스 보호대책

세계보건기구(WHO)에서는 조류 인플루엔자 예방대책으로 N95 규격의 마스크 착용을 권고하고 있다. WHO는 닭과 오리의 사육과 도살작업에 종사하는 사람들이 조류 인플루엔자에 감염할 위험이 크다고 보고 조류 인플루엔자 발생국가들은 이들에 대한 안전조치 기준을 준수할 것을 촉구하고 있다. 조류 인플루엔자의 추가 감염을 막고 인간 독감과 조류 인플루엔자 바이러스가 결합해 발생할 변종 바이러스의 출현 가능성을 차단하려면 조류의 사육이나 도살에 관계하는 사람들에 대한 철저한 주의가 필요하다. 따라서 세계보건기구는 ▲커버롤(위아래가 붙은 작업복) 혹은 외과수술용 가운과 불침투성 에이프런 ▲튼튼한 고무장갑 ▲고글(보호안경) ▲고무와 폴리우레탄 신발 등의 착용을 권고하고 있다. WHO는 또 사스(중증급성호흡기증후군) 발생 당시에 사용됐던 N95 마스크를 우선적으로 착용하되 이를 입수할 수 없을 경우에는 외과수술용 마스크의 착용도 무방하다. N95 마스크는 필터가 달려있어 대화가 용이하며 호흡기 바이러스의 전염원으로 알려진 비말(飛沫 작은 침방울) 등을 막을 수 있게 돼 있다. WHO는 2003년 3~4월 네덜란드에서 조류 인플루엔자가 유행했을 때 N95 마스크와 항바이러스 치료제가 사육농장 노동자를 보호하기 위해 사용됐다면 당시 의사 1명이 조류 인플루엔자로 사망한 원인은 적절한 보호조치가 없었기 때문이라고 지적했다.



그림 3. 시판중인 조류 인플루엔자 차단 마스크

나. 구제역 바이러스

발굽이 2개인 소·돼지 등의 입·발굽 주변에 물집이 생긴 뒤 치사율이 5~55%에 달하는 가축의 제1종 바이러스성 법정전염병이다. 소의 경우 잠복기는 3~8일이며, 초기에 고열(40~41℃)이 있고, 사료를 잘 먹지 않고 거품 섞인 침을 흘린다. 잘 일어서지 못하고 통증을 수반하는 급성구내염과 제관(蹄冠)·지간(趾間)에 수포가 생기면서 앓다가 죽는다.

특별한 치료법은 없고, 만일 이 병이 발생했을 경우에는 검역을 철저히 해야 하며, 감염된 소와 접촉된 모든 소를 소각하거나 매장해야 한다. 구제역이 발생하는 나라에서는 조직배양 백신을 이용한 예방법이 이용되고 있다.

한국에서는 1934년 처음 발생했으며, 이후 66년 만인 2000년 경기도 파주 지역에서 발생해 충청도 지역까지 확산되어 큰 피해를 입혔으며, 2001년에는 영국에서 발생하여 유럽·동남아·남미 등지로 번졌다.

최근 국내에서는 2010년 1월 경기도 포천에서 구제역 A형이 발생하여 총 6천마리를 매장하였고 발생 81일만인 3월 23일, 구제역 종식선언 후에도 4월 6일 강화도 한우농가에서 구제역 O형 발생 이후 30건의 신고와 11건의 발생으로 동물 살처분이 5만마리에 육박하는 등 축산농가에 심각한 피해를 입혔음은 물론 사회적으로도 큰 파장을 불러왔다.

다. 신종플루(사람인플루엔자)바이러스

H1N1 또는 신종플루로 약칭한다. 처음에는 '돼지인플루엔자(돼지플루)' 또는 '돼지독감'이라고 하였으나 돼지와 관련이 있다는 증거가 없어 세계보건기구(WHO)의 공식 명칭으로 사용하는 '신종 인플루엔자A(H1N1)'로 통일되었다. 사람·돼지·조류 인플루엔자 바이러스의 유전물질이 혼합되어 있는 새로운 형태의 바이러스로서 2009년 4월 처음 발견되었다.

바이러스의 전파 경로에 대해서는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았지만, 기존의 계절 인플루엔자 바이러스와 유사하게 비말(飛沫) 감염, 곧 감염된 사람의 기침이나 재채기 등을 통하여 주로 사람 대 사람으로, 감염자와 가까운 접촉자 사이에서 전파되는 것이 일반적인 경우로 알려져 있다. 식품으로는 전파되지 않기 때문에 돼지고기나 돼지고기 가공품을 섭취하는 것만으로는 감염되지 않으며, 70℃ 이상으로 가열 조리하면 바이러스가 사멸된다.

잠복기도 확실하지는 않지만 대략 1~7일 사이로 추정된다. 증상은 확진 환자에게서 발열, 오한, 두통, 기침·인후통·콧물·호흡곤란 등의 상기도증상, 근육통, 관절통, 피로감, 구토 또는 설사 등이 나타난다. 전염기는 보통 증상이 발생하기 하루 전부터 발생 후 7일까지 전염력이 있는 것으로 보고되었으며, 어린이의 경우는 10일 이상으로 길어질 수도 있다.

치료제는 인플루엔자 치료제인 오셀타미비르(Oseltamivir, 상품명 타미플루)와 자나미비르(Zanamivir, 상품명 릴렌자)가 효과가 있는 것으로 보고되었다. 예방 조치로는 손을 자주 씻을 것, 손으로 눈·코·입을 만지지 말 것, 재채기나 기침을 할 경우에는 화장지로 입과 코를 가리고 한 뒤 손을 깨끗이 씻을 것, 발열이나 호흡기 증상 등이 있는 사람과 접촉을 피할 것 등을 권

고한다.

발생 이후 2009년 5월 19일 현재 전 세계 40개국에서 확진환자 9830명이 발생하였으며, 79명이 사망하였다. 발생지로 지목되는 멕시코가 확진환자 3648명에 사망자 72명, 미국이 확진환자 5123명에 사망자 5명으로 가장 많다. 아시아에서는 일본에서 159명, 중국에서 7명이 확진되었고, 한국도 4명이 발생하였다.

한편, 세계보건기구는 2009년 4월 29일 신종 인플루엔자A의 전염병 경보를 5단계로 격상시켰는데, 이는 인간 대 인간의 바이러스 전염이 한 대륙의 최소 2개국에서 발생하여 '대유행이 임박하였음'을 경고하는 것이다.

국내의 경우 2009년 신종플루 대책에 정부예산이 6720억 소모되었으며 2010년에는 이보다 많은 7545억원의 예산을 책정한 상태이다

제 2절. 연구개발의 목적 및 범위

1. 연구개발의 최종 목표

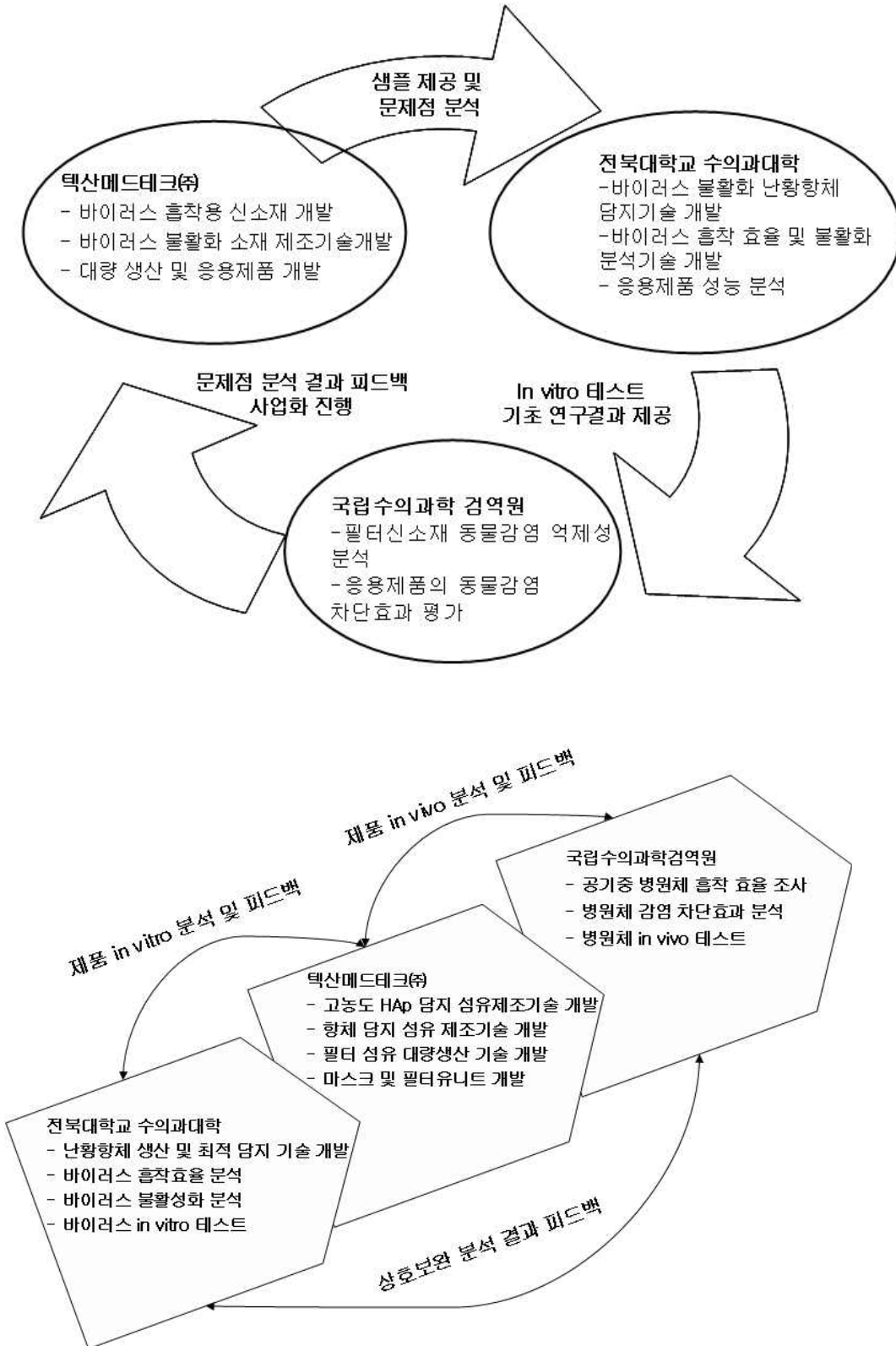
- 바이러스 흡착 및 불활화 필터신소재 개발
 - 바이러스를 흡착, 불활성화할 수 있는 섬유제조 및 이를 이용한 필터제조 기술 개발
- 조류인플루엔자 바이러스 불활화 난황항체 담지기술 개발
 - 개발 섬유 신소재에 AI 불활화 항체의 결합기술 개발
- 필터신소재의 돼지 호흡기 병원체별 흡착효율 및 동물감염 차단 효과 평가
 - 공기전염 바이러스의 동물모델 개발 및 임상적 유효성 평가
- 바이러스 불활화 필터소재 제조기술 개발
- 필터신소재 대량생산 및 마스크, 필터유니트 개발

2. 연구개발의 세부목표 및 내용

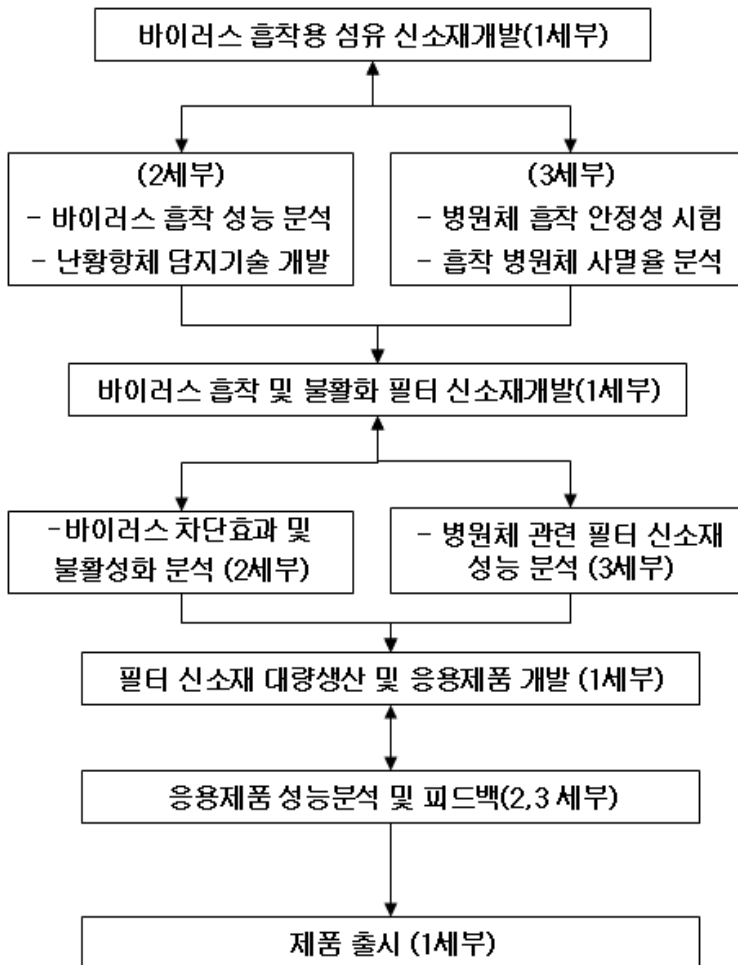
| 구분 | 세부과제별 | 연구개발의 목표 | 연구개발의 내용 |
|------|--------------------|----------------------------------|--|
| 1차년도 | 텍산메드테크 (1세부) | ○바이러스 흡착용 섬유상 신소재 개발 | ○고농도 하이드록시아파타이트 담지 섬유제조 기술 개발 ○정전 필터소재 복합화 기술 개발 ○하이드록시아파타이트 코팅기술 개발 |
| | 전북대학교 (2세부) | ○조류인플루엔자 바이러스 불활화 난황항체 담지기술 개발 | ○계란내 난황항체(IgY) 생산 기술 확립 ○섬유소상에 난황항체 최적 담지 기술 개발 ○조류인플루엔자 바이러스 흡착효율 분석 |
| | 국립수의과학검역원 (3세부) | ○필터신소재의 돼지 호흡기 병원체별 흡착효율 조사 | ○공기 중 돼지 호흡기 병원체(세균, 바이러스) 흡착효율 조사 ○필터 신소재의 병원체 흡착 안정성 시험 ○흡착된 병원체의 사멸율 조사 |
| 2차년도 | 텍산메드테크 (1세부) | ○바이러스 불활화 소재 제조기술 개발 | ○촉매 담지 필터소재 제조기술 개발 ○난황항체 담지 필터소재 제조기술 개발 ○필터 최적 기공도 분석 |
| | 전북대학교 (2세부) | ○조류인플루엔자 바이러스 흡착효율 및 불활화 분석기술 개발 | ○필터 신소재의 조류인플루엔자 바이러스 차단효율 분석 ○항체 촉매 담지 필터의 조류 인플루엔자 불활화 효능 분석 |
| | 국립수의과학검역원 (3세부) | ○필터신소재의 동물감염 억제효능 분석 | ○필터 신소재 병원체 투과성 조사 ○필터를 통한 병원체의 생존력 조사 ○필터신소재를 투과한 병원체 오염공기에 노출된 동물의 감염력 조사 |
| 3차년도 | 텍산메드테크 (1세부) | ○필터신소재 대량생산 및 응용제품 개발 | ○축사 공조용 필터 유니트 개발 ○인체 보호용 마스크 개발 ○응용제품 필터 효율평가 |
| | 전북대학교 (2세부) | ○응용제품 성능분석 | ○공조 필터 유니트 및 마스크의 조류 인플루엔자 바이러스 흡착성능 및 불활화 효능 분석 ○문제점 분석 및 피드백 ○응용제품의 조류인플루엔자 바이러스 차단효율 분석 |
| | 국립수의과학검역원 (3세부) | ○응용제품의 동물감염 차단 효과 평가 | ○ 축사환경에서 필터 신소재의 병원체 동물감염 차단 효과 평가 ○ 축사내 오염된 공기의 병원체 제거효과 조사 |

3. 연구개발 추진체계 및 수행방법

가. 개발 주체별 협력체계



나. 추진체계 흐름도



제 2 장 국내외 기술개발 현황

전염성 바이러스를 예방하는 대책 중 본 수행과제와 연관된 필터 소재 개발은 국내외 적으로 크게 두방향으로 진행되고 있다. 첫째 필터의 기본 기능인 차단특성을 활용한 것으로서 필터여재의 pore size를 극소화 하여 바이러스가 포함된 분진, 비말(침방울)등이 침투되는 확률을 낮추어 감염빈도를 줄이는 방법이다. 이러한 소재에 사용되는 필터로서는 반도체 크린룸등에 사용되는 ULPA, 또는 HEPA급의 필터가 있으며 공기중 미세먼지를 99.999%이상 여과하는 효과가 있다.[1] 또한 최근 개발된 나노섬유(섬유 굵기가 수십나노미터 이하)를 이용한 멤브레인을 사용할 경우 바이러스를 직접 여과할 수 있는 필터를 제조할 수 있다. 이러한 고성능 필터여재의 제조 업체로는 3M(미국)이 대표적이며, 최근 국내 일부 meltblown업체에서도 제조를 하고 있으나 성능 및 시장점유면에서 미흡한 실정이다. 그러나 極微한 pore로 입자를 여과하는 상기 방식은, 수나노~수십나노 미터에 불과한 바이러스를 직접여과하기에는 역부족이며, 여과중 공기의 압손실이 많고, 비교적 고가의 필터 및 부속장치가 필요한 까닭에 본과제가 목표하는 축산농가에 적용키에는 무리가 따를 것으로 판단된다. 두 번째 연구 방향은 필터여재(입자를 여과하는 소재)에 바이러스를 흡착하거나, 접촉된 바이러스를 불활성화 시키는 물질을 도입하여 바이러스 감염빈도를 낮추어 주는 소재의 개발이다.

대표적인 바이러스 흡착소재로는 수산화아파타이트(Hydroxyapatite)가 있으며 그 구조 및 특성은 다음과 같다.

- Hydroxyapatite(이하 HAp)는 인체의 뼈나 치아를 구성하는 주성분과 화학적 구조가 유사하여 많은 학자들의 커다란 관심의 대상이 되고 있으며, 실제로 골 시멘트, 임플란트 코팅제, 유기 고분자의 충전제 등의 생체재료로 성공적으로 사용되고 있다.
- HAp는 단백질의 액체 크로마토그래피 분리용으로 사용되고 있다. 칼슘 이온과 인산기가 고 밀도로 규칙적으로 배열된 구조를 가지고 있는 HAp는 양성이온 교환체로서 정전상호작용으로 흡착능력을 가지고 있고, 단백질, 핵산, 세포 등의 생체관련 물질의 분리용 칼럼, 바이러스 흡착용 필터와 항균제로서 사용되고 있다. HAp 크로마토그래피에 있어 단백질의 등전점과 흡착시간은 비례하며, 산성단백질, 중성단백질, 염기성단백질 순으로 흡착이 잘 된다. HAp는 양이온 교환 칼럼의 기능과 음이온 교환 칼럼의 기능을 동시에 갖는 독특한 흡착특성을 보유한 사실이 확인되었다.

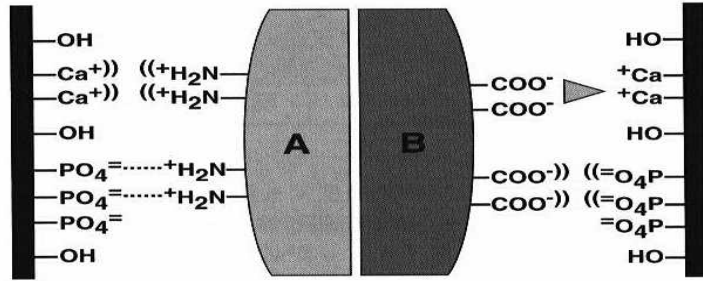


그림 2-1. HAp의 단백질 흡착 메커니즘(A: 양기성 단백질, B: 산성 단백질)

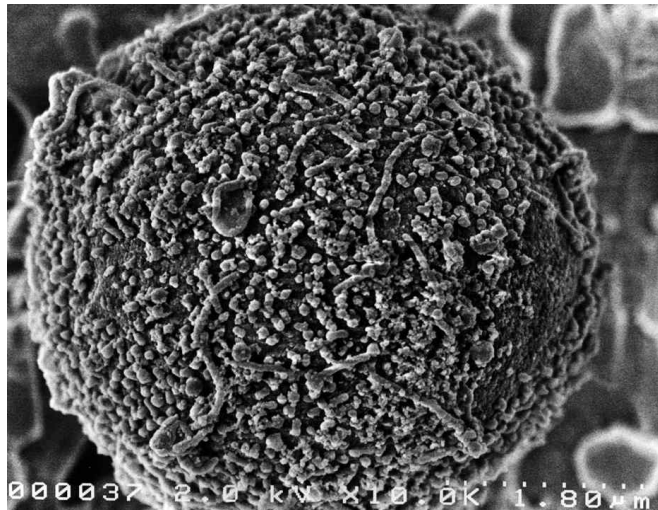


그림 2-2. HAp 입자표면에 인플루엔자 바이러스가 흡착된 사진(PENTAX)

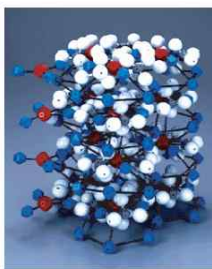


Figure 1: The 3-D Model of Hydroxyapatite

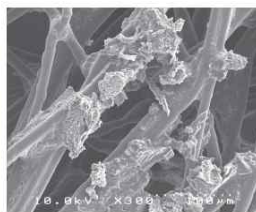


Figure 3: SEM image of Hydroxyapatite coated fabric



Figure 2: Influenza Virus



Figure 4: SEM image of Influenza Virus adsorbed by Hydroxyapatite ceramic surface

Hydroxyapatites (HAP), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, possess Ca^{2+} sites surrounded by PO_4^{3-} tetrahedra parallel to the hexagonal axis and are of considerable interest in many areas because of their ion-exchange ability, adsorption capacity, and acid-base properties.

The Hydroxyapatite ceramic is widely used for filtering the microbacteria and virus. The SEM picture has shown the Influenza virus was adsorbed on Hydroxyapatite Ceramic surface. It is proved that the PENTAX HA-coated fabric filter has its performance of Virus Filtration Efficiency (VFE) more than 99.9%*

For more information, contact your i+CARE VIRUS FILTER sale representative or i+MED Helpline +66-2530-7800 or Email: info@imed.co.th. Visit our website at www.imed.co.th

*The maximum value of the test according to the test method by PENTAX.

PENTAX ceramic filter coated Hydroxyapatite is a product of PENTAX Corp., JAPAN



그림 2-3. HAp 입자를 적용한 인플루엔자 바이러스흡착용 필터 소재

한편 필터여재와 접촉한 바이러스를 불활성화 시키는 대표적 물질로는 무기물로서는 다가의 금속이온, 유기물질로서는 N-halamine등이 있으며, 특정 항원-항체 반응을 이용한 항체를 사용하는 방법 등이 개발되고 있다.

이러한 바이러스불활화 소재개발의 핵심은 바이러스 불활화 효과와 더불어 필터여재와의 내구성있는 결합기술의 개발이 핵심이라 할 수 있다. 최근 필리진트사에서 다가의 금속이온을 결합한 항바이러스 마스크 부직포 제조기술을 6년간 2천만 달러를 투자하여 개발하였으며, 일본의 시키보사에서는 인플루엔자 항체를 결합한 섬유인 'Flutect'를 개발하여 출시하였다.

결론적으로 상업적으로 유용하며 축산농가에 적용이 가능한 바이러스 차단 필터소재 개발을 위해서는 바이러스가 포함된 공기상 분진을 효율적으로 제어함과 동시에 부착된 바이러스를 불활성화시킬 수 있는 상기 두 가지 기술의 효과적인 결합이 필수적이라 할 수 있다.

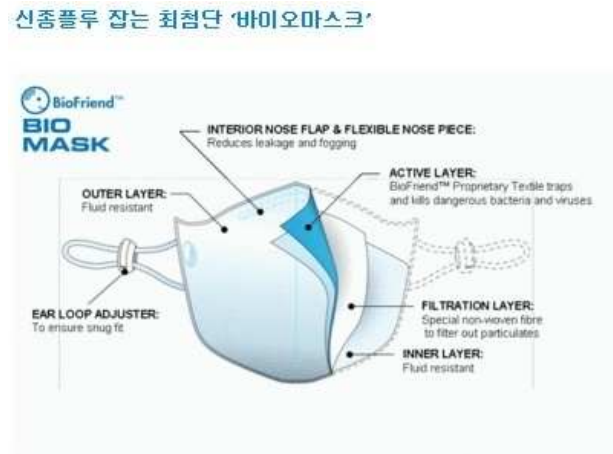


그림 2-4. 필리진트(홍콩)사의 바이러스차단 마스크 'Biomask'



그림 2-5. 시키보(일본)의 항바이러스 섬유 'Flutect'

표 2-1. 국내외 항바이러스 필터소재 개발동향

| 연구수행 기관 | 연구개발의 내용 | 연구개발성과의 활용현황 |
|-------------------------|--------------------------------------|---|
| 와세다대학 (주)Daikin환경연구소 | 바이오항체 필터를 이용한 공기중 인플루엔자 바이러스 불활성화 | 에어콘 필터 등으로 사업화 진행 |
| 펜탁스 | 하이드록시아파타이트를 이용한 바이러스 흡착제 | 마스크 등으로 제품 시판중 |
| (주)Japan Communication | 광촉매 담지 아파타이트 소재 미생물 흡착 제거제 | 세균 및 바이러스 흡착 제거용 스프레이제로 상용화 |
| 동경대학 국제연구센터 | 바이러스 독소 분해 필터소재 세계최초 실용화 기술 개발 | 에어콘 필터 등으로 사업화 진행 |
| 일본 니찌방 | 하이드록시아파타이트 담지 필터를 이용한 바이러스 차단 마스크 개발 | 현재 시판중 |
| 일본 돗토리 대학 | 조류인플루엔자바이러스에 대한 전해수의 감염성 억제 효과 연구 | 연구 진행중 |
| 시키보(일본) | 신종플루 항체를 섬유에 결합 | 'Flutect' 제품 출시 |
| 필리전트(홍콩) | 다가금속이온 안료를 부직포에 코팅 | '바이오마스크' 제품 출시 |
| 지피엔이(한국) | 신합성법에 의한 은콜로이드와 티타니아계 복합 나노물질 | 스프레이, 마스크, 소독 및 방역제, 공기청정기용 필터 및 차량용 에어필터 등의 용도로 제품을 출시 |
| 나눅스(한국) | Xano란 제품명으로 나노활성메탈 입자로 구성된 나노복합제 개발 | 마스크로 상품화 |
| 한국샤프(한국) | 아파타이트 항균필터를 적용한 공기청정기 개발 | 공기청정기 상품화 |
| 새한(한국) | 은나노입자를 섬유에 첨가한 필터 개발 | 조류 인플루엔자 바이러스 및 각종 세균에 항균성을 지닌 섬유로 상품화 |
| 케이피엠테크(한국) | 질산은을 섬유에 결합(도금기술 응용)하는 기술 개발 | 일회용 마스크, 항균의류에 적용 |

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 바이러스흡착/불활성화 섬유 신소재 개발

1. 바이러스 흡착용 섬유상 신소재 개발

가. 이론적 배경

새우나 게의 껍질로부터 제조되는 키틴은 지구상에서 셀룰로오즈 다음으로 많은 천연고분자 재료이며 키토산은 키틴의 디아세틸화(Deacetylation)물의 총칭이다. 키틴은 무척추동물인 게나 새우등의 갑각류를 비롯하여 투구벌레나 귀뚜라미 등의 곤충류와 오징어 등의 연체동물에 대량으로 포함되어 있을 뿐만 아니라 곰팡이, 효모, 버섯 등의 세포에도 많이 포함되어 있다.

키틴·키토산의 원료는 주로 해양에서 얻을 수 있고 그 생산량도 연간 1000억 톤 정도로 무한한 생물자원으로 존재하는 동물성 식이섬유이다. 인체에 무해한 천연물인 고분자로부터 저분자에 이르는 기능성 물질을 얻을 수 있으므로 그 응용범위는 20세기의 석유산업을 능가할 수 있는 가능성을 갖고 있다. 키틴·키토산은 석유산업에서와 같이 수반되는 피해(공해 등)가 없고 그 반대로 안전성과 안정성, 그리고 생분해성 등의 다양한 특성이 있는 매력적인 신소재이다.

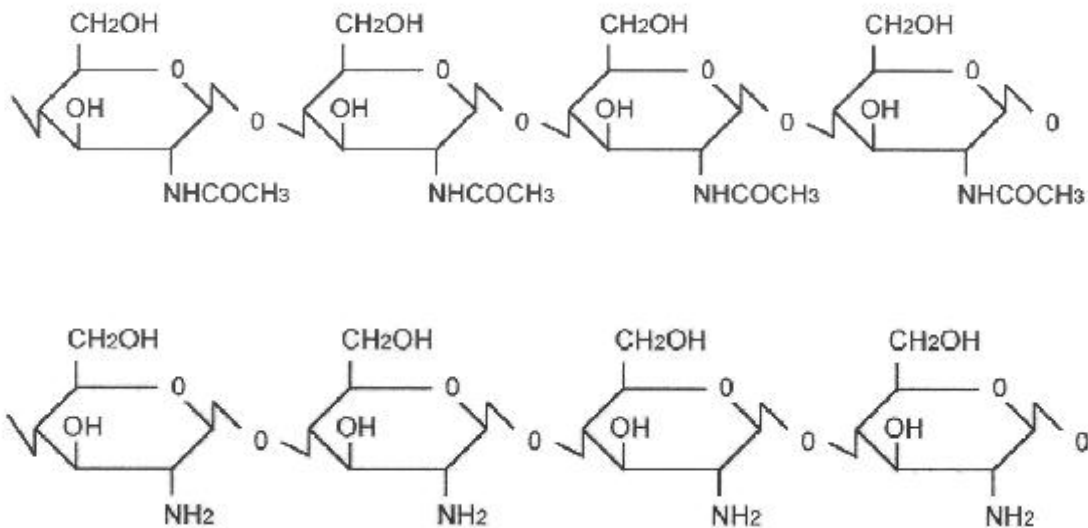


그림 3-1 키틴(상)과 키토산(하)의 화학구조

섬유분야중 키토산을 응용하는 방법으로는 키토산용액을 섬유와 반응시켜 코팅을 하거나 키틴/키토산 분말을 일부 포함시켜 혼합방사한 섬유, 습식방사를 통하여 키토산섬유를 제조하여 면, 레이온 등과 혼방하여 사용하는 방법이 제시되고 있다.

최근에는 키토산 함유가 가지고 있는 인체친화성, 보습성, 항균성 등의 장점에 살균성, 소취성, 항박테리아성, 항바이러스성 등 다양한 기능성을 부가하기 위하여 다양한 유/무기 미립자를 함유한 키토산 복합섬유에 대한 연구가 진행되고 있다.

키토산의 섬유화는 습식방사를 통하여 제조되어지는데 습식방사의 특성상 다양한 유/무기 미립자를 균일하게 분산 또는 혼합하여 복합섬유의 제조가 용이하다는 특징을 가지고 있다.

본 연구에서는 바이러스를 흡착한다고 알려진 HAp를 키토산과 복합화하여 섬유를 제조하고 제조된 섬유의 바이러스흡착성능을 연구하였다.

키토산/HAp 복합섬유를 제조하는 방법으로는 키토산/HAp 복합 미립자를 제조한 후 키토산방사원액에 혼합분산시켜 섬유를 제조하는 방법과 In-situ 방법에 의하여 방사공정 중에 HAp기 섬유상에서 합성시키는 방법으로 제조하였다.

나. 키토산/하이드록시아파타이트(CH/HAp) 미립자 제조

(1) 실험

(가) 재료

탈아세틸화도 89 %, 점도 500 cps(0.5 % solution)의 키토산을 사용하였으며 기타 실험에 사용한 초산, 수산화칼슘, 인산 등은 모두 시약급을 사용하였다.

(나) 실험방법

수산화칼슘 74g(1 mol)을 탈이온수 2220 mL에 분산시킨 후 기계적 교반기를 사용하여 현탁액을 유지하였다. 이 용액에 60mL(0.6 mol)의 인산을 탈이온수 60mL로 희석한 용액을 dropping funnel을 이용하여 1시간 동안 서서히 적하하였다. 30 °C 반응온도를 유지하며 기계적 교반기를 사용하여 12시간동안 지속적으로 교반하여 하이드록시아파타이트(HAp)를 공침법으로 합성하였다. 이후 100g(합성된 HAp와 중량비율로 1:1)의 키토산을 2% 초산용액 2000 mL에 용해시킨 후 HAp 현탁액에 2시간에 걸쳐 적하하였다. 이 때 1N 가성소다를 사용하여 pH 9±0.2가 유지되도록 조정한 후 상온에서 24시간 동안 교반 숙성시켜 키토산/하이드록시아파타이트(CH/HAp)를 복합화 하였다. 생성된 slurry는 탈이온수를 사용하여 수회 수세한 후 아세톤으로 세척하고 동결건조하여 중량비 50/50인 CH/HAp 복합미립자를 합성하였다.

(다) 분석

① XRD 분석

CH/HAp 복합미립자의 성분 분석을 위해 XRD (PW1700, Philips. X-ray Diffractometer)를 사용하여 $\text{CuK}\alpha$ 5° ~ 50°까지 측정하였다.

② SEM(EDS) 분석

CH/HAp 복합미립자의 입자들의 분산상태 및 Ca/P mole비를 확인하기 위해 EDS(Energy dispersive spectroscopy)가 부착된 SEM(Scanning Electron Microscope, JSM-6300, JEOL)을 사용하여 측정하였다.

③ TGA 분석

합성된 중량비 50:50 CH/HAp 복합미립자의 함량비와 열적 성질을 알아보기 위해서 열중량분석(TGA)를 TA Instruments 2050 TGA를 사용하여 질소 기류하에서 승온속도 20 °C/min 으로 30 °C ~1000 °C까지 측정하였다.

(2) 결과

그림 3-3 에는 순수한 HAp, 키토산 분말과 본 과제에서 합성한 CH/HAp 복합미립자의 XRD 패턴을 나타내었다. $2\theta=26^\circ$, 32° 부근에서 순수한 HAp의 (002), (211) 결정 특성 피크와 $2\theta=20^\circ$ 부근에서 순수한 키토산의 (040) 결정 특성 피크가 거의 동일한 위치에서 CH/HAp 복합미립자의 피크가 나타난 것으로 보아 HAp와 키토산과 같은 결정구조를 갖는 물질이 존재함을 확인할 수 있었다.



그림 3-2. 키토산/하이드록시아파타이트 복합화 반응장치

그림 3-4 에는 CH/HAp 복합미립자의 SEM 사진으로 HAp의 결정 표면위에 키토산이 코팅되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 HAp는 Ca/P의 mole 비가 1.67인데 비하여 CH/HAp 복합미립자의 EDS 분석결과 Ca/P의 mole 비가 1.45로 비교적 낮게 나타났다. 이러

한 이유는 공침법으로 진행할 경우 대부분 완전한 반응이 진행되기 어려운 것으로 알려져 있으며 키토산에 의한 Ca 이온의 흡착으로 인하여 당량으로 투입된 Ca 이온이 완전히 반응에 참가하지 않은 결과로 판단된다.

CH/HAp 복합미립자의 열적 성질을 확인하기 위하여 TGA분석한 결과를 그림 3-5 에 나타내었다. 무기물질인 HAp는 1,000 °C의 고온에서도 열분해가 발생하지 않는 것으로 알려져 있으므로 280 °C ~300 °C 부근에서의 열분해에 의한 급격한 중량 감소는 복합화된 키토산에 의한 것으로 판단된다.

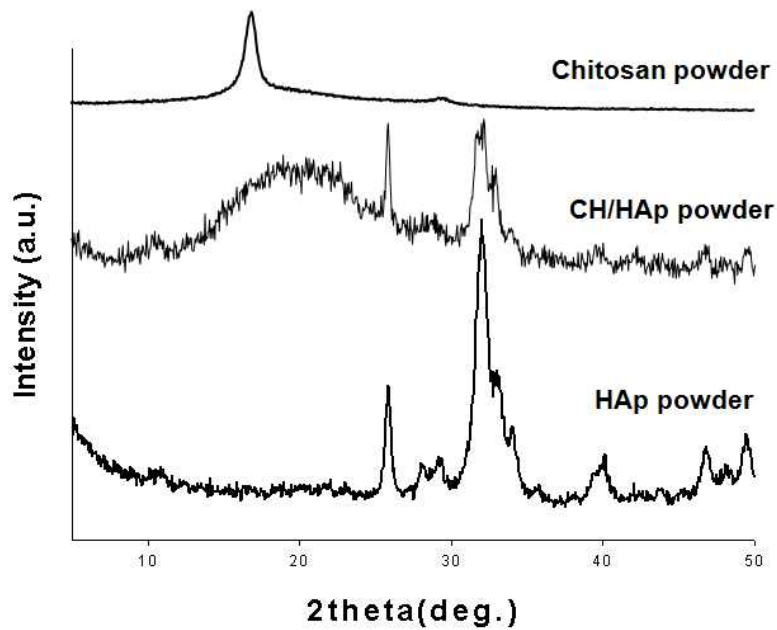


그림 3-3. HAp, Chitosan 및 CH/HAp 복합체의 XRD 곡선

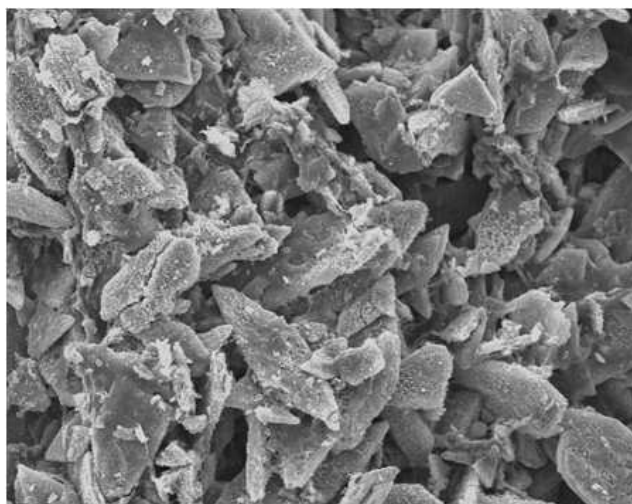


그림 3-4. CH/HAp 복합미립자의 SEM 사진.

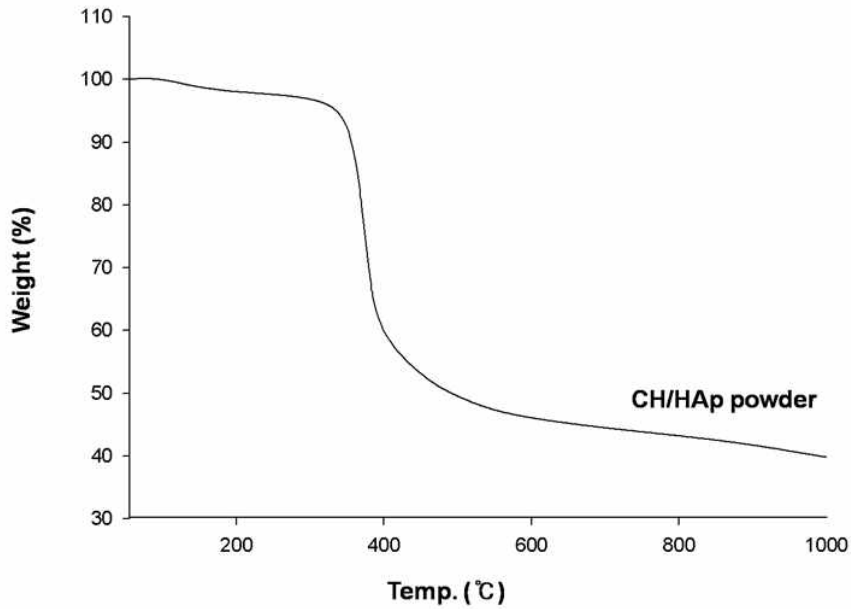


그림 3-5. CH/HAp 복합미립자의 열중량분석 곡선.

다. 키토산/하이드록시아파타이트 복합 섬유 제조

(1) 실험

(가) 재료

키토산/하이드록시아파타이트 복합섬유(CH/HAp fiber)를 제조하기 위하여 사용한 키토산은 중량 평균 분자량 800,000 정도의 고분자량을 사용하였으며 기타 실험에 사용한 초산(CH_3COOH), 가성소다(NaOH), 무수제2인산나트륨(Na_2HPO_4), 초산칼슘($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COOH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 질산칼슘($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 등은 모두 시약급을 정제없이 그대로 사용하였다.

(나) 실험방법

① Lab 방사

키토산/HAp 복합섬유의 방사조건은 다음식에 의하여 설정하였다.

$$c = \frac{d}{9000} \cdot \frac{100}{100 + W} \cdot V \cdot \frac{100 - t}{100} \cdot \frac{100}{sK}$$

d : denier

c : 토출량(g/min)

W: 공정수분율

V: 방사속도(m/min)

t : 사수축률 + 슬립율

s : 비중

K : 방사원액 농도

응고액의 조성비, 연신비, 방사속도, 유제 등을 변화시키며 최적 방사조건을 설정하였다.

키토산 350g을 2% 초산용액 8L에 녹이고 질산칼슘 560g(또는 초산칼슘 410g)을 탈이온수 2L에 완전히 녹인 용액을 앞에서 제조한 키토산 용액에 서서히 첨가하여 방사원액을 제조하였다. 제조한 방사원액을 24시간 방치하여 탈기포한 후 0.1mm × 3,000 홀의 노즐을 통해 응고액 속으로 습식방사하였다. 응고액은 가성소다 5%, 제2인산나트륨 2%의 혼합용액을 사용하였다. 이후 탈이온수로 수세하고 24시간 숙성시킨 후 건조하여 키토산/하이드록시아파타이트 복합섬유(CN-L24, CA-L24)를 제조하였다.

② Pilot 방사

키토산 21 kg을 2% 초산용액 500L에 녹인 후 질산칼슘 34 kg(또는 초산칼슘 25 kg)을 탈이온수 100L에 완전히 녹인 후 키토산 용액에 서서히 첨가하여 방사원액을 제조하였다. 제조한 방사원액을 24시간 방치하여 탈기포한 후 0.1mm × 24,000 홀의 노즐을 통해 응고액 속으로 습식방사하였다. 응고액은 가성소다 5%, 제2인산나트륨 2%의 혼합용액을 사용하였다. 이후 제2인산나트륨 5%, 가성소다 10%로 구성된 연신액속에서 150% 연신한 후 수세하고 24시간 및 48시간 숙성시킨 후 건조하여 키토산/하이드록시아파타이트 복합섬유(CN-P24, CN-P48, CA-P24, CA-P48,)를 제조하였다.

(다) 분석

① 단섬유 강신도

키토산/하이드록시아파타이트 복합섬유(CH/HAp fiber)의 섬도와 강신도는 Vibrodyn(Lenzing AG, Austria)을 이용하여 측정하였다. 이때 사용된 시료는 10mm의 단섬유 형태로 crosshead speed를 20mm/min으로 하여 수행하였으며 Denier 측정시 초하중을 강신도에 그대로 적용하였고, 측정한 20개 이상의 시료에 대한 샘플의 평균값을 취하였다.

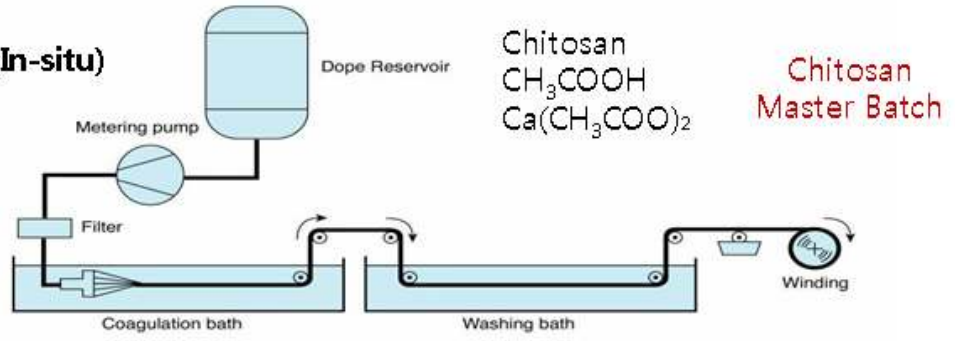
② XRD 분석

CH/HAp fiber에 포함된 HAp와 키토산의 성분 분석을 위해 XRD (PW1700, Philips. X-ray Diffractometer)를 사용하여 $\text{CuK}\alpha$ 5° ~ 60°까지 측정하였다.

③ SEM(EDS) 분석

CH/HAp fiber의 표면과 단면형상 및 Ca/P mole비를 확인하기 위해 EDS(Energy dispersive spectroscopy)가 부착된 SEM(Scanning Electron Microscope, JSM-6300, JEOL)을 사용하여 측정하였다.

1. Wet Spinning(In-situ)



2. Drying



3. Crimp & Cutting

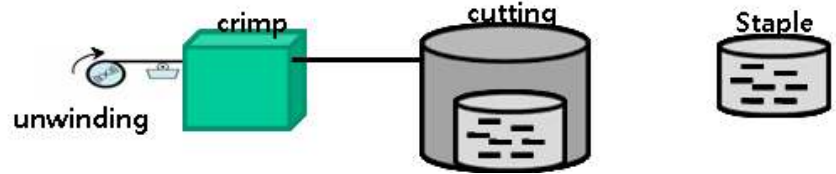


그림 3-6. 키토산/HAp 복합섬유 제조 모식도



그림 3-7. Lab 방사시스템(상) 및 Pilot 방사 시스템(하).

④ TGA 분석

CH/HAp fiber의 열적 성질을 알아보기 위해서 열중량분석(TGA)를 TA Instruments 2050 TGA를 사용하여 질소 기류하에서 승온속도 20 °C/min으로 30 °C ~ 1000 °C까지 측정하였다.

표 3-1. 실험조건

| 구분 | CN-L24 | CN-P24 | CN-P48 | CA-L24 | CA-P24 | CA-P48 |
|-----------|-------------------------------------|--------|--------|---------------------|--------|--------|
| Scale | Lab | Pilot | Pilot | Lab | Pilot | Pilot |
| 숙성시간 | 24hr | 24hr | 48hr | 24hr | 24hr | 48hr |
| 칼슘염 | Calcium nitrate(CN) | | | Calcium acetate(CA) | | |
| 인산염 | Sodium phosphate dibasic, anhydrous | | | | | |
| HAp함량 (%) | 40 | | | | | |

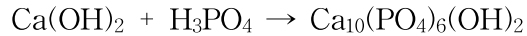
표 3-2. 단섬유의 섬도 및 강신도

| Test Items | Unit | CN-L24 | CN-P24 | CN-P48 | CA-L24 | CA-P24 | CA-P48 |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Elongation | % | 7.9 | 2.7 | 6.8 | 6.1 | 5.6 | 17.5 |
| Tenacity | g/d | 0.9 | 0.9 | 1.8 | 1.1 | 1.0 | 1.2 |
| Linear Density | denier | 4.3 | 2.8 | 2.4 | 4.2 | 3.4 | 3.8 |
| Modulus (0~3%) | g/d | 24.7 | 7.8 | 38.7 | 26.6 | 28.1 | 28.1 |
| Modulus (0~5%) | g/d | 13.7 | 0.7 | 19.9 | 12.8 | 11.9 | 17.7 |

(2) 결과

CH/HAp 복합미립자를 섬유 방사원액에 일정량 첨가하는 기존의 방법으로 진행할 경우 Lab scale에서는 긍정적인 결과를 보였으나 Pilot scale에서는 내부에 첨가된 CH/HAp 복합미립자의 응집에 의하여 노즐이 막히거나 쉽게 사절이 발생하는 등 작업성이 떨어졌으며 이로 인하여 HAp의 함량을 높이는 부분에도 한계를 가지는 것으로 확인되었다. 또한 섬유의 물성에 있어서도 강도와 신도가 낮고 modulus가 높은 강직한 특성을 나타내어 이후 단섬유나 부직포 소재 등으로 용도를 전개하는데 있어 어려움이 있을 것으로 판단되어 본 연구과

제에서는 이러한 단점을 극복하기 위하여 섬유의 제조시 HAp가 형성될 수 있는 신공정을 개발하였다. HAp는 아래의 식에 나타난 것과 같이 칼슘(Ca) 이온과 인(P) 이온의 결합으로 합성되는 것으로 알려져 있으므로 본 연구에서는 방사원액에 질산칼슘, 초산칼슘 등의 칼슘염을 혼합하고 응고액 및 연신액에 과량의 제2인산나트륨을 첨가하여 섬유상에서 HAp를 합성하는 방법으로 연구를 진행하였고 그 방법을 특허 출원하였다.



본 연구에서는 HAp의 함량을 높이기 위하여 키토산과 HAp의 함량비를 60/40(wt/wt)으로 고정하여 진행하였으며 칼슘염의 종류 및 반응(숙성)시간에 따른 영향을 확인하였다. 표 3-1에 실험조건을 나타내었고 그림 3-7에 나타난 Lap spinning machine과 Pilot spinning machine을 사용하여 신공정으로 CH/HAp fiber를 방사한 후 단섬유의 섬도 및 강신도를 표 3-2에 나타내었다.

방사원액에 혼합한 칼슘염의 종류에 관계없이 Lab scale로 방사한 것이 Pilot scale로 방사한 섬유에 비하여 물성적인 면에서 떨어지는 것으로 확인되었으며 별도의 연신 공정이 크게 없는 관계로 강도도 떨어지는 것으로 나타났다. 또한 질산칼슘을 사용한 경우 숙성조건에 따라 강도와 신도가 증가하는 것을 확인할 수 있었으나 초산칼슘에 비하여 다소 떨어지는 것으로 확인되었다. 초산칼슘을 사용한 경우 숙성시간이 길어질 경우 강도와 신도가 모두 개선되었고 섬도도 증가하는 것으로 보아 HAp의 합성이 잘 일어나는 것으로 나타났으며 그 결과는 XRD, SEM, TGA 등을 분석해본 결과 유사한 경향을 보이고 있었다. 또한 질산칼슘을 적용한 경우에는 HAp 반응중 부산물인 질소화합물에 의하여 악취가 발생하는 등의 단점이 나타나 이후 양산실험은 초산칼슘을 사용하여 진행하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

그림 3-8, 9는 각 섬유의 X-ray 회절 곡선을 나타낸 것이다. 칼슘염의 종류, 숙성 시간 및 scale에 따라 피크의 강도 및 위치에 다소 차이를 보였으나 전체적으로 $2\theta=26^\circ$, 32° 부근에서 순수한 HAp의 (002), (211) 결정 특성 피크와 $2\theta=20^\circ$ 부근에서 순수한 키토산의 (040) 결정 특성 피크가 나타난 것으로 보아 HAp와 키토산과 같은 결정구조를 갖는 물질이 존재함을 확인할 수 있었다. 특히 숙성시간이 24시간인 경우에 비하여 48시간인 경우 HAp의 피크의 강도가 크게 올라가는 것을 확인할 수 있었는데 이는 HAp가 숙성시간이 길어짐에 따라 충분히 합성된 것으로 판단된다. 그러나 Lab scale로 방사한 경우 Pilot scale로 방사한 경우에 비하여 같은 숙성시간에 비하여 HAp의 피크의 강도가 높은 것으로 나타났다. 이러한 현상은 대량으로 생산할 경우 반응용액의 침투속도 및 반응에 걸리는 시간이 Lab scale에 비하여 길어짐으로 인해 나타나는 현상으로 판단된다.

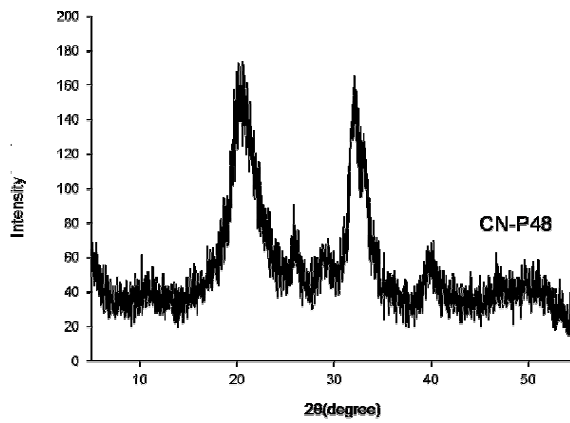
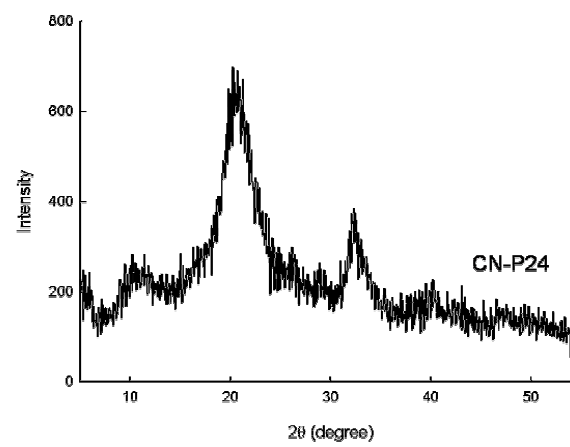
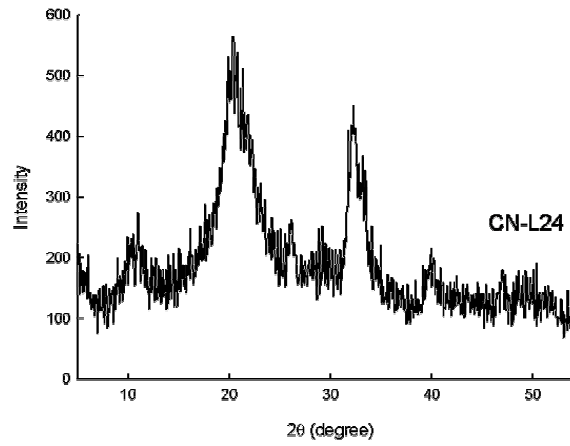


그림 3-8. 질산칼슘을 사용한 섬유용 X-ray 회절 곡선.

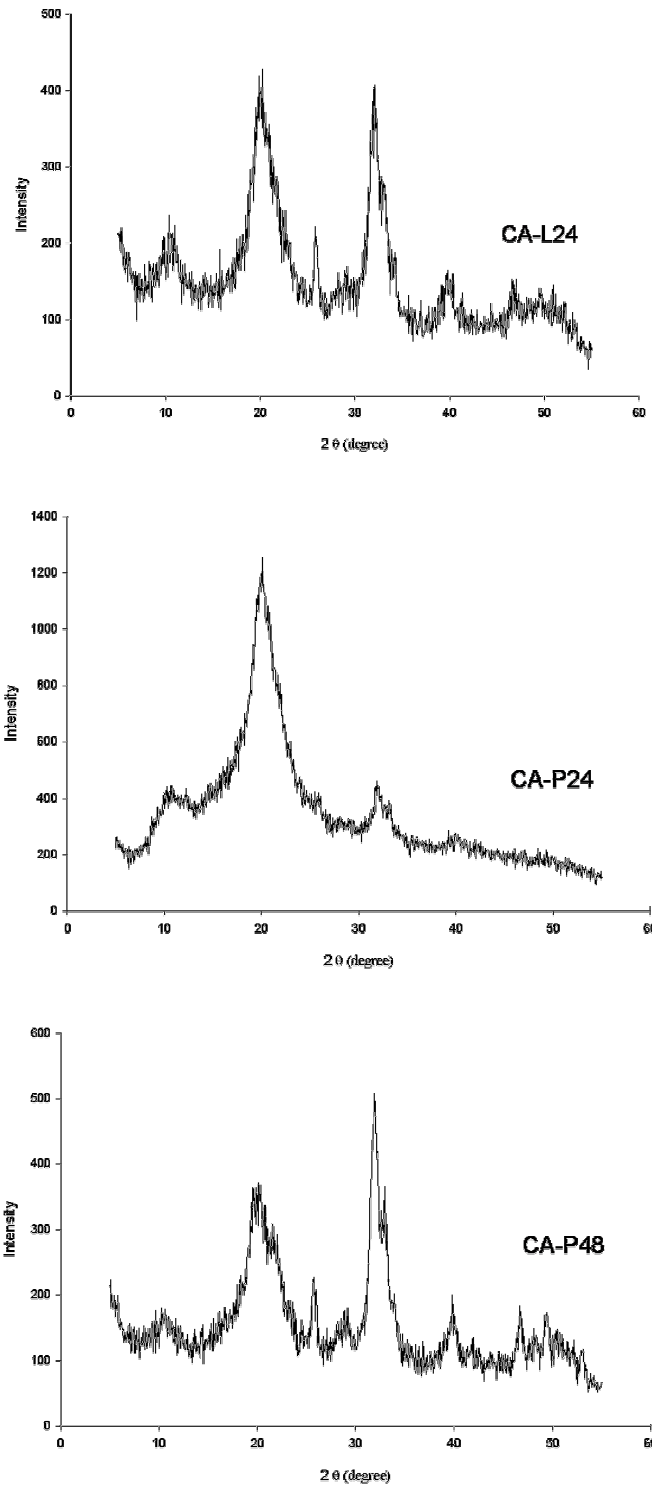


그림 3-9. 초산칼슘을 사용한 섬유용 X-ray 회절 곡선.

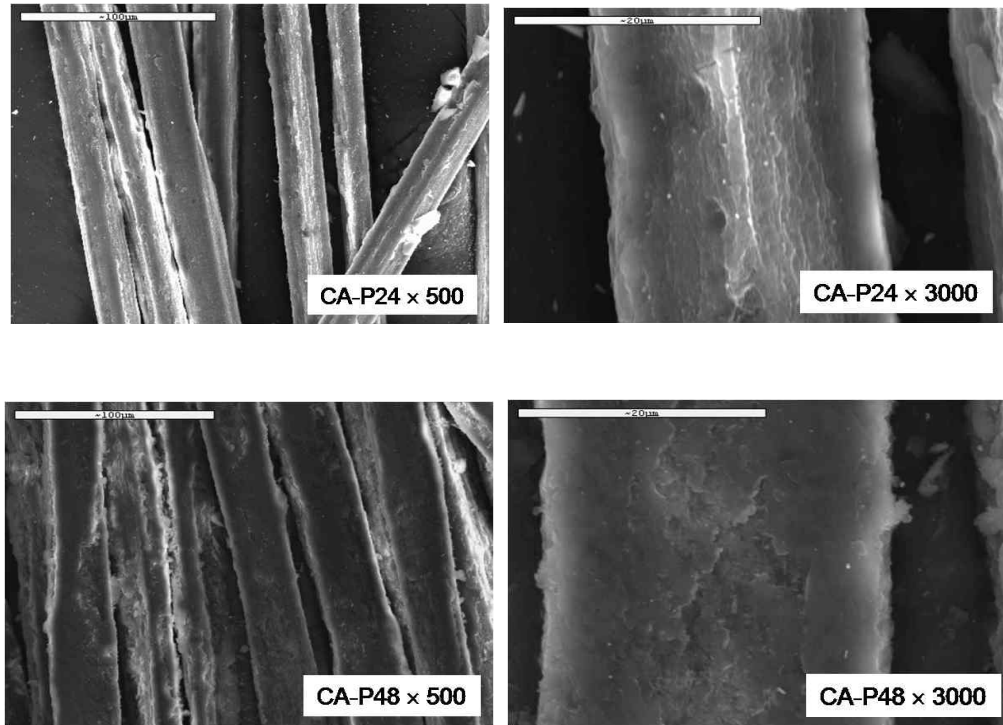


그림 3-10. CA-P24와 CA-P48의 전자현미경 사진

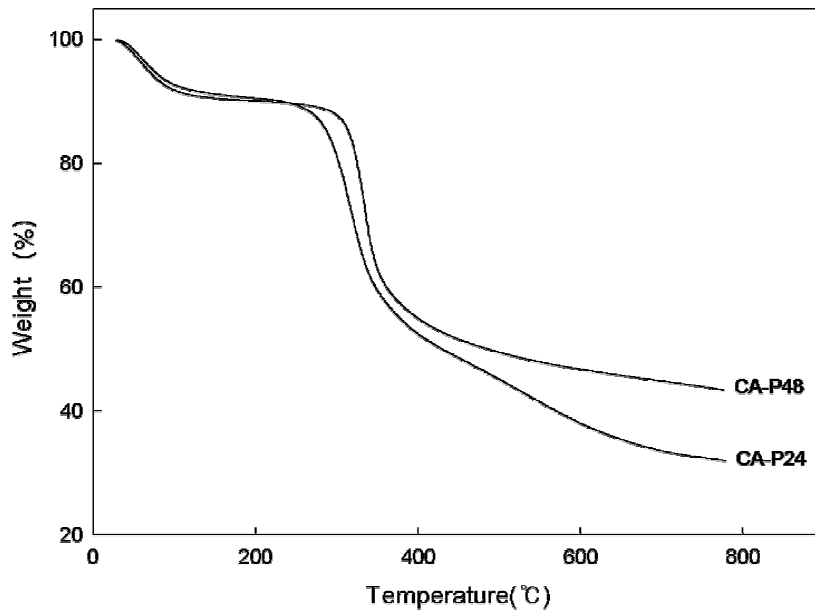


그림 3-11. CA-P24와 CA-P48의 열분해 곡선

그림 3-10과 11은 작업성과 섬유 물성이 우수하게 관찰된 CA-P24, CA-P48의 전자현미경 사진과 열분석 결과이다. 전자현미경 관찰결과 매끄러운 일반 키토산 섬유와 달리 HAp가 합성됨으로 인한 거친 면이 관찰되었고 24시간 숙성한 섬유에 비하여 48시간 숙성한 섬유의

경우 거친 정도가 더 심한 것으로 나타나는 것으로 보아 48시간 숙성한 경우 HAp의 합성이 더 많이 된 것으로 판단된다. 또한 열분석 결과 130 °C 부근까지는 수분 증발에 의한 중량감소가 관찰되고 300~400 °C 부근에서 키토산의 열분해로 인한 급격한 중량감소가 관찰되었다. 600 °C 이후 CA-P24가 CA-P48에 비하여 중량감소가 심하게 나타났는데 이는 전자현미경사진에서 나타난 것과 같이 숙성시간이 HAp의 합성에 크게 관여하는 것으로 보인다.

제조된 키토산/HAp 복합섬유의 바이러스 흡착여부를 SEM으로 관찰하였으며 바이러스가 흡착되었음을 확인하였다.(그림 3-12)

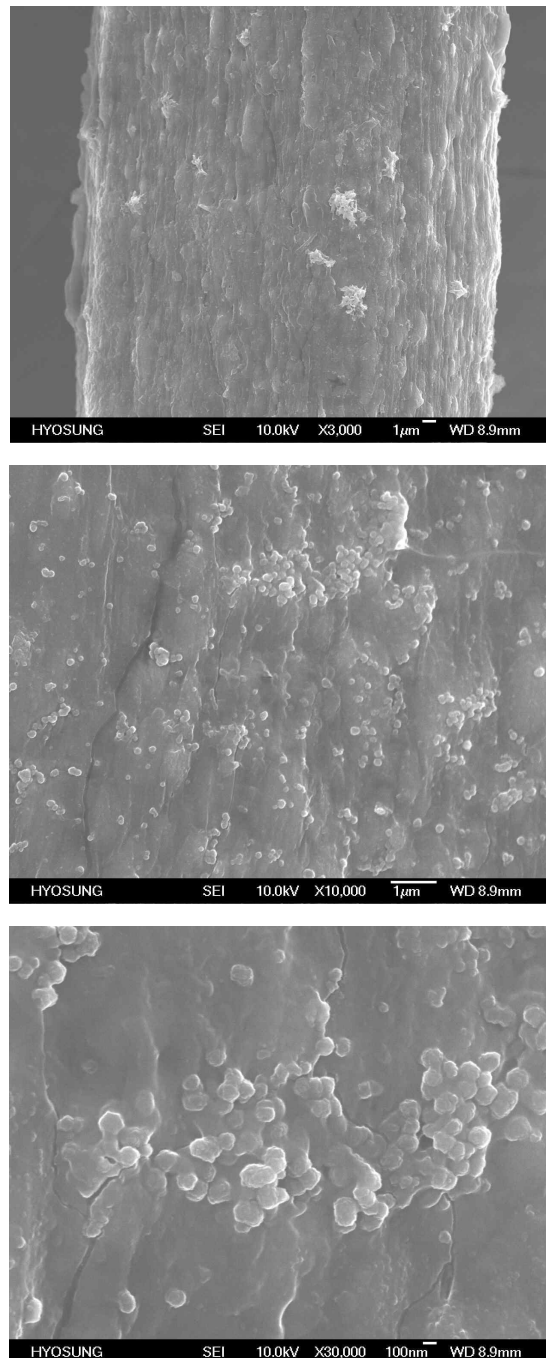


그림 3-12 키토산/HAp 복합섬유의 바이러스 흡착사진

2. 바이러스 불활화 섬유소재 개발

가. N-Halamine 복합섬유 제조

(1) 이론적 배경

(가) N-Halamine의 정의

N-halamine은 이미드, 아마이드, 아민그룹의 할로겐화에 의해서 형성된 물질로 질소와 할로겐의 공유 결합물을 말하며 그림 3-13에서와 같이 평형상태에서 양이온 할로겐을 유리시킬 수 있다. 해리된 양이온 할로겐은 산화제로 작용하여 균을 비활성 시키는데 효과적이고 일반적으로 상수도 소독제로 사용한다. N-halamine에 존재하는 할로겐들은 대부분 염소와 브롬인데 드물게 요오드와도 반응한다. 요오드는 원자 크기가 크고 질소와 전기 구름의 강한 중첩을 형성할 수 없기 때문에 거의 반응을 하지 않는다. 염소와 브롬은 N-halamine 화합물에서 우위를 차지하는 할로겐이지만 브롬보다 염소의 크기가 더 작기 때문에 염소와 halamine의 분드가 더 안정하다.

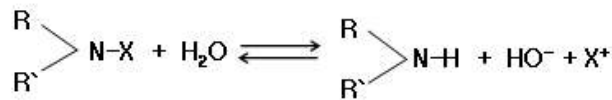


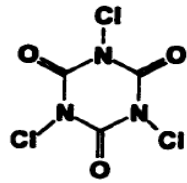
그림 3-13. 평형상태에서의 Halamine의 유리

(나) N-halamine의 항균성 특징

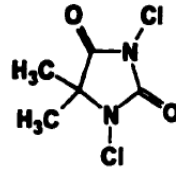
상수도 소독제로서 N-halamine은 유리 염소처럼 행동하지만 물 속의 유기 화합물과 반응하여 CHCl_3 , 발암성 물질을 형성하지 않기 때문에 유리 염소보다 더 안전하다. 또한 halamine은 생물학적 반응 대신 산화 메커니즘에 의한 미생물을 비활성화시키기 때문에 균들이 halamine 구조에 대하여 내성을 갖기는 불가능하다. 따라서 섬유에 halamine을 도입한다는 것은 항생물질에 대한 내성이나 건강 문제, 환경적인 문제를 심각하게 고려하지 않아도 될 듯 하다.

Halamine 화합물은 주로 수영장 소독제로 사용되고, 욕실이나 부엌용 세정제로도 사용된다. N-halamine구조에는 hydantoin, N-chlorosuccinimide, glycoluril, sulfonchloramide, haloaxazolidinone, haloimidazolidinone, cyclic이나 acyclic halamine이 있으며, 항균 효과는 주로 할로겐 해리 평형상수와 pH, 물의 온도에 따라 다르다[2].

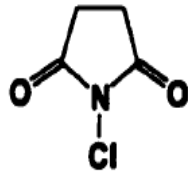
일반적으로 사용되는 N-halamine의 구조를 그림 3-14에 나타냈다. 이 중에서 halogenated-5,5-dimethylhydantoin은 수영장의 소독제로 오랫동안 사용되어 왔으며 1,3-dichloro-5,5-dimethylhydantoin은 화장품, 음식에 사용함으로써 사람의 피부에 안전하고 감염 예방에 효과적임이 증명되었다.



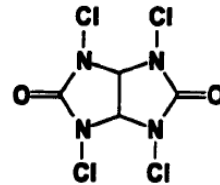
Trichloroisocyaauric Acid



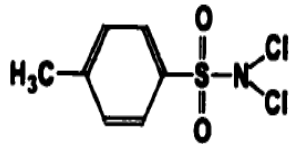
1,3-Dichloro-5,5-dimethylhydantoin



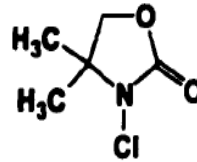
N-chlorosuccinimide



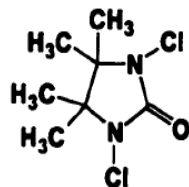
Tetrachloroglycoluril



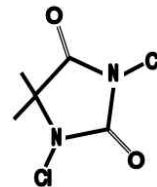
p-Toluenesulfondichloramide



3-Chloro-4,4-dimethyl-2-oxazolidinone



1,3-Dichloro-4,4,5,5-tetramethyl-2-imidaxolidinone



halogenated-5,5-dimethylhydantoin

그림 3-14. N-halamine의 구조

(다) N-halamine의 항균 메커니즘

일반적으로 N-halamine의 항균 메커니즘은 균의 세포막을 변화시켜 중요 효소 시스템을 비활성화시키고 핵산을 방해하여 기질 수송 과정을 억제하는 등 광범하고 다양하게 세균을 공격한다. 그러나 다른 연구에 의하면 세포의 신진대사에 필요한 효소 시스템인 -SH가 염소에 의해 산화된다는 보고가 있으며, 다른 한편으로 염소가 세포막의 세포 성분을 용출시킨다는 보고도 있다. 요약해 보면 N-halamine의 항균 거동에 대한 메커니즘은 항균 구조와 균의 종류에 따라 여러 가지 경로가 혼합된 결과이다.

(라). N-halamine화된 항균섬유

재생 항균섬유는 Galiardi의 재생모델을 시초로 최근에 많은 발전을 해왔다. N-halamine 항균제는 대부분 두 단계를 통해서 형성된다. 첫 번째 단계는 직물이나 원료와 공유결합에 의한 N-halamine 전구체를 도입하고 두 번째 단계는 표백제를 사용해서 간단한 방법으로 N-halamine의 항균성을 부여하는 방법이다[3].

Kou1 등은 면직물과 N-halamine의 전구체인 5-methyl-5-aminomethylhydantoin(AH)을 BTCA (butanetetracarboxylic acid)로 가교시키고 염소계 표백제로 처리함으로써 AH를 N-halamine화시켜 항균성을 부여하고 AH/BTCA의 공유결합에 의한 면의 내세탁성과 재전위성에 대하여 연구했고, LIN 등은 폴리에스터 직물에 heterocyclic을 도입하여 폴리에스터 섬유 표면을 염소화하는 조건을 만들었고 반복적인 염소계 표백제에 의한 재전위성을 갖는 항균 폴리에스터 직물에 대하여 연구했으며, Worley 등은 hydantoin을 가진 반응성 diol을 기능화한 다음 상업용 acrylic polyol과 isocyanate를 공중합하여 항균 폴리우레탄 코팅제를 제조한 다음 간단하게 할로젠 표백제로 처리함으로써 건조 상태나 물 속에서 장기간 내구성있는 항균 폴리우레탄 코팅제에 대하여 연구했다. Luo 등은 Kevlar 직물의 표면에 MAA(methacrylamide)를 코팅하고 PMAA(Polymethacrylamide)에 존재하는 아미노 그룹을 염소계 표백제로 처리하여 acyclic N-halamine으로 유도하는 연구를 했으며, Lee 등은 cellulose와 m-aramid를 이온 용액(1-butyl-3-methylimidazolium chloride)에 용해시킨 후 dry-jet 습식 방사로 방사한 후 염소계 표백제로 처리하여 복합물을 N-halamine화 시켰다. Tan 등은 2단계 그래프트 과정을 통하여 마이크로 다공성 폴리우레탄막 표면에 N-halamine 전구체, 2,2,5,5-tetramethyl-imidozalidin-4-one (TMIO) hydantoin을 그래프트한 후 염소계 표백제로 처리함에 따라 그래프트된 폴리우레탄막의 hydantoin 구조들은 N-halamine으로 전이시키는 연구를 했다. Liang 등은 N-halamine 엑포시 전구체인 3-glycidyl-5,5-dialkylhydantoins (GH's)을 저렴하고 용이한 방법으로 합성하여 셀룰로오스에 처리하고 염소계 표백제로 GH's를 N-halamine화시켜 항균성을 부여하고 내세탁성과 재전위에 대하여 연구했으며, Tan 등은 나일론 6에 항균성을 부여하기 위해 구조적으로 다른 N-halamine 첨가제 chlorinated 5,5-dimethylhydantoin (CDMH), chlorinated 2,2,5,5-tetramethyl-imidozalidin-4-one (CTMIO), chlorinated 3-dodecyl-5,5-dimethylhydantoin (CDDMH) 세 가지를 전기 방사 도프로 사용하여 N-halamine이 합성된 나노전기방사 멤브레인에 대하여 연구했으며, Liang 등은 모노머 3-(3-triethoxysilylpropyl)-7,7,9,9-tetramethyl-1,3,8-triazaspiro-[4.5]decane-2,4-dione를 중합하여 셀룰로오스와 실리카 젤 입자의 표면에 결합시킨 후 염소계 표백제로 N-halamine시켜 항균성과 재전위성에 대하여 연구했고, Chen 등은 알킬체인의 길이가 다른(C-2에서 C-22까지) alkyl bromide와 5,5-dimethylhydantoin과을 반응시켜 일련의 3-alkyl-5,5-dimethylhydantoin 유도체들을 제조한 다음 염소화에 따라 hydantoin 유도체들을 1-chloro-3-alkyl-5,5-dimethylhydantoins 전이시킨 후 항균성에 관하여 연구했다. Lee 등은 셀룰로오스의 N-halamine 전구체로 s-triazine-based N-heterocycle인 dichloro-m-amin

ophenylhydantoinyl-s-triazine (DAPHT)을 사용하여 염소계 표백제로 처리하여 항균성을 부여하는 방법과 항균 가공에 대한 적당한 조건을 연구했고, Sun 등은 polystyrene에 VBDMH (3-(4 ϕ -vinylbenzyl)-5,5-dimethylhydantoin), ADMH(3-allyl-5,5-dimethylhydantoin)를 중합하여 Polystyrene-co-VBDMH (PS-co-VBDMH) Beads와 Polystyrene-co-ADMH (PS-co-ADMH) Beads를 제조한 다음 염소계 표백제로 처리하여 N-halamine화 시킨 후 항균성에 대하여 연구했다.

그러나 위와 같은 N-halamine에 대한 많은 연구에도 불구하고 염소계 표백제에 의한 항균성은 일반적인 소비자들이 위생적인 목적으로만 사용하기에는 종종 불편함을 초래할 수 있어 내세탁성에 대한 내구성을 요구할 필요가 있다. 특히 이미드 할라민은 공명구조로 인하여 이미드에 붙어있는 염소를 쉽게 방출할 수 있기 때문에 수용액에서 항균력이 오랫동안 지속될 필요가 있다.

(마). Halamine 구조의 내구성

Halamine의 내구성은 imide, amide, amine halamine 본드의 구조에 의해 결정된다. 유효 염소는 halamine 본드에서 정전하이고 수용액에서는 음이온 질소와 양전하 염소로 해리되는데, halamine 구조의 내구성에 반영된다. 할라민의 내구성은 amine halamine > amide halamine > imide halamine 순서이고 반대로 halamine의 해리 정도는 imide halamine > amide halamine > amine halamine 순서이다. 이미드 할라민은 쉽게 염소를 방출하는 경향이 있는데, 이는 그림 3-15에서와 같이 음이온인 질소가 공명 효과를 통하여 대체로 안정화되기 때문이고, 이로 인하여 imide halamine은 내세탁성이 좋지 못하다. 반면 가장 견고한 halamine 구조는 amine halamine이고 광전자분광법을 통하여 높은 내구성이 입증되었다. 또한 아민 할라민이 친유성인 균의 세포막을 공격하는데, 피부 소독제로 사용해도 안전하다는 연구가 있으며, imide나 amide halamine보다 내구성이 높고 항균성도 높다[4].

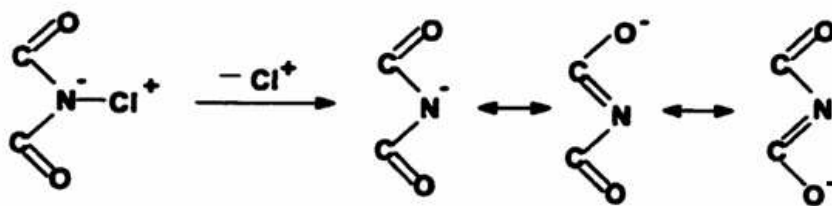
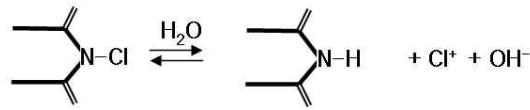
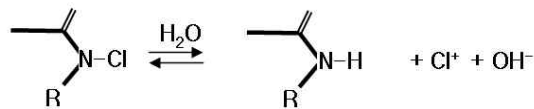


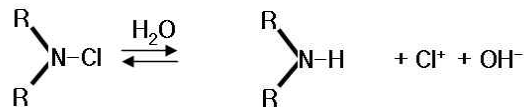
그림 3-15. Resonance effect of imide halamine upon loss of chlorine.



(a) Imide structure



(b) Amide structure



(c) Amine structure

그림 3-16. Dissociation reaction of halamine compounds.

(2) 실험

(가). 시료 및 시약

탈아세틸화도 93%, 점도 270 cps (4% 용액)로 제조한 키토산 섬유를 사용했고, 차염소산 나트륨 수용액(JUNSEI 8%)과 epichlorohydrin, HCl, 요오드칼륨, 티오황산나트륨 등은 정제하지 않고 사용했다.

(나) Epichlorohydrin으로 가교시킨 키토산 섬유의 제조

0.067M의 NaOH 수용액 250 mL에 건조한 키토산 섬유 5 g, 키토산 단위의 몰비로 50% 농도의 epichlorohydrin을 첨가하고 40°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 생성물의 알칼리 상등액을 버린 후 침전물을 여과하여 탈이온수로 중성이 될 때 까지 수세하여 키토산 섬유에 부착되어 있는 미반응 가교제와 알칼리를 완전히 제거한 다음 24시간 동안 자연 건조했다. 또한 키토산 섬유와 epichlorohydrin과의 가교 반응을 그림 3-17 ((a), (b))에 간략하게 나타냈다.

(다) 가교 키토산 섬유의 *N*-halamine화

키토산 섬유의 아미노 그룹에 *N*-halamine을 도입하기 위해, 염산을 이용해서 0.8% NaOCl 수용액의 pH를 2, 5, 7, 9, 12로 조정하여 다음 epichlorohydrin으로 가교시킨 키토산 섬유를 실온에서 2분, 5분, 10분, 20분, 30분 처리하고 0.1, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0% 농도를 가진 NaOCl 수용액을 pH 5로 조정하여 각각의 가교 키토산 섬유의 염소화 정도를 변화시켰다. 염소화된 섬유를 탈이온수로 수세한 후, 자연 건조했다. 또한 염소화된 가교 키토산 섬유의 반응 결과를 그림 3-16의 (c)에 나타냈으며, 키토산 섬유의 제조에서부터 가교 키토산 섬유의 염소화는 그림 3-18에 간략하게 나타냈다.

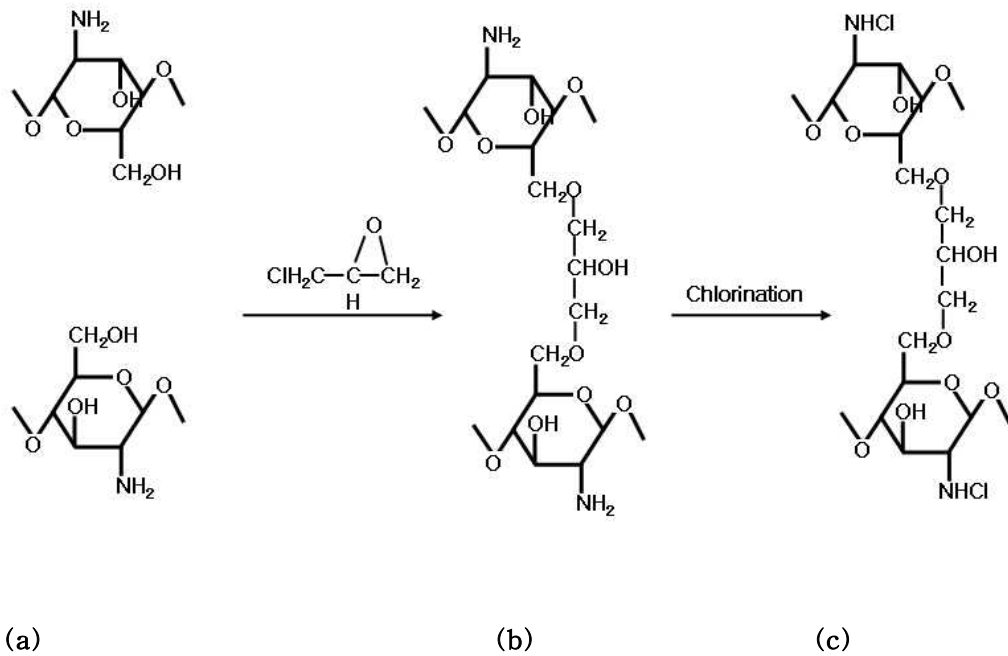


그림 3-17. Reaction scheme for cross-linking chitosan with epichlorohydrin and chlorination.

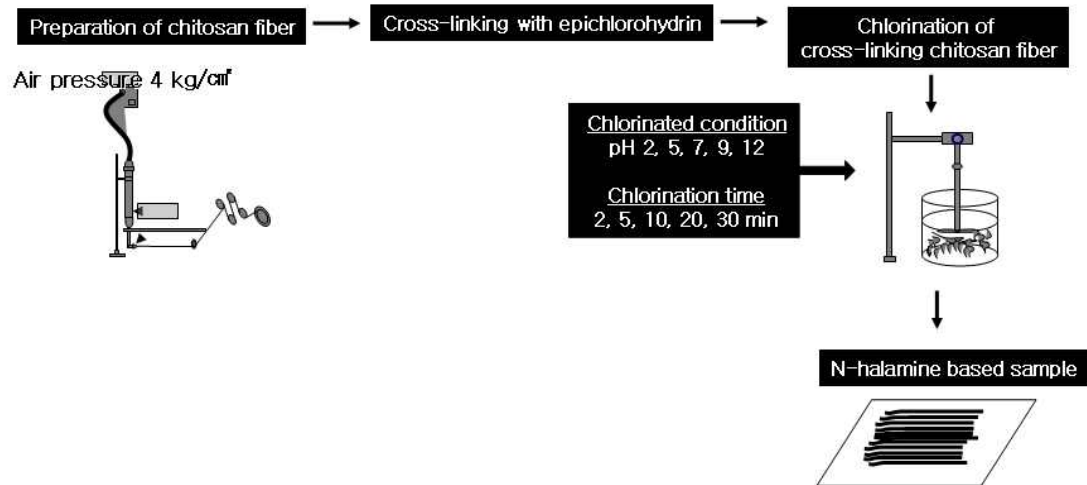


그림 3-18. Schematic representation for preparation of cross-linked and chlorinated chitosan fiber.

(3) 분석

(가) 유효 염소 측정

염소화된 가교 키토산 실의 유효 염소량을 측정하기 위해 요오드 적정법을 이용했다. 염소화된 가교 키토산 섬유 약 0.05 g을 1wt% 아세트산 수용액 40ml에 분산시킨 후 요오드 칼륨 1g을 넣고 실온에서 1시간 동안 교반한 후 0.01 mol/L 표준 티오 황산 나트륨 수용액으로 적정했다.

$$Cl\% = \frac{35.3}{2} \times \frac{(V_d - V_0) \times 10^{-3} \times 0.01}{W_d} \times 100 \dots \dots \dots (2.1)$$

V_{Cl} : 염소화된 샘플에서 소비된 티오황산나트륨의 양

V_0 : 비 염소화된 샘플에서 소비된 티오황산나트륨의 양

W_{Cl} : 염소화된 가교 섬유의 중량

(나) 항균성

염소화된 키토산 섬유와 염소화되지 않은 키토산 실의 항균성 시험을 위하여 그램 음성균 *Escherichia coli* (*E.coli*)와 그램 양성균 *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*)를 사용했고 그림 3-19와 같이 액체 영양배지를 제조하여 2개의 플라스크에 각각 100mL씩 넣어 멸균하고 멸균된 배지에 *E.coli* 와 *S.aureus*(그림 3-20)를 첨가한 후 24시간 배양 했다. 배양된 세균액을 10^5 CFU/mL (CFU: Colony Forming Unit) 이 되도록 멸균 생리 식염수로 희석한 후 고체 영양 배지를 제조하여 희석된 균액을 접종한 다음 염소화하지 않은 키토산 섬유와 염소량을 알고있는

키토산 섬유(1×1cm)를 균이 담겨있는 접시에 놓고 37°C, 12시간동안 배양기에 넣어 N-halamin e화된 키토산 섬유 주위의 생육 저지환을 관찰했다. 또한 그림 3-20에는 *E.coli*와 *S.aureus*에 대한 현미경 사진을 나타냈다.

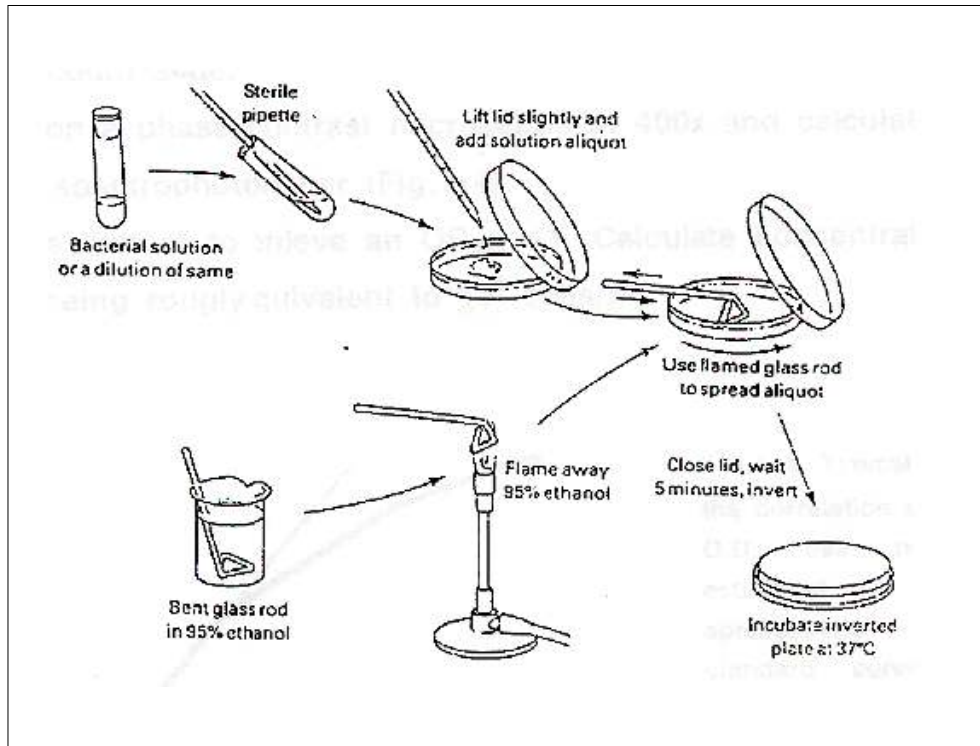


그림 3-19. Isolating single colonies by spreading liquid aliquots of cell culture.

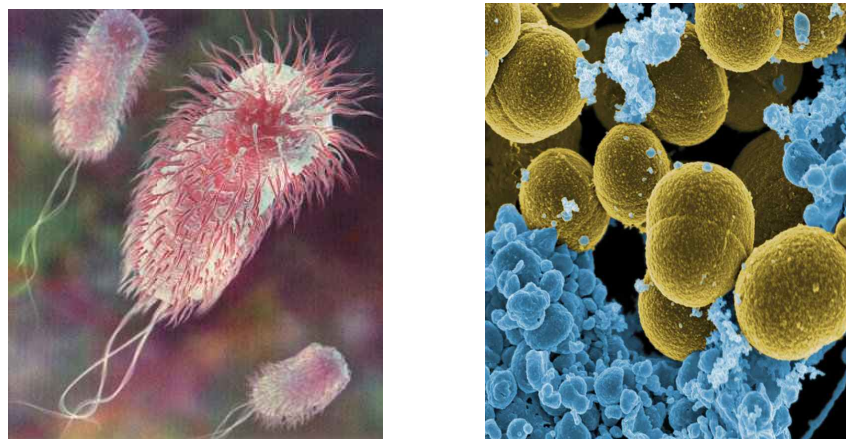


그림 3-20. Microphotographs of gram-positive bacteria(*E.coli*) and gram-negative bacteria(*S.aureus*).

(다) 표면 관찰 및 원소 분석

염소화된 키토산 섬유 표면의 미세 구조와 섬유 상태를 관찰(× 100)하기 위해 SEM (Scanning electron microscope, JSM-6300, JEOL)을 이용했다.

(라) 팽윤도 및 중량 감소

0.8% 차아염소산나트륨 수용액과 증류수를 준비하여 pH 2, 5, 7, 9, 12로 만든 다음 가교 키토산 실과 비가교 키토산 섬유의 일정량을 각각 30분 동안 침지하여 샘플들을 염소화하고 원심분리기를 이용해 2500 rpm, 15분의 조건으로 여분의 용액을 제거한 다음, 수분을 측정기 (HR73 Moisture Analyzer, Meeter Toledo)로 중량을 측정하여 식 (2.2)에 대입 샘플의 팽윤도를, 식 (2.3)에 대입 중량 감소를 계산했다.

$$\text{Swelling ratio}(\%) = \frac{W - W_0}{W} \times 100 \dots\dots\dots (2.2)$$

W₀ : 팽윤 전 중량(g)

W : 팽윤 후 중량(g)

$$\text{weight loss}(\%) = \frac{A - A_0}{A} \times 100 \dots\dots\dots (2.3)$$

A₀ : 키토산 섬유의 건조 중량(g)

A : 염소화 후 샘플의 건조중량(g)

(마) 내구성 및 재전위성

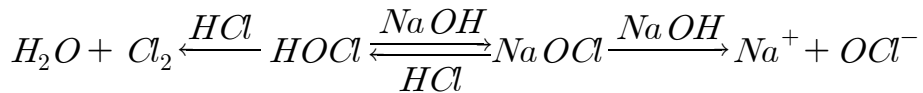
염소화된 가교 키토산 섬유가 시간 경과에 따라 N-Cl 공유결합의 유지 가능성에 대한 내구성을 요오드화법에 의한 유효 염소량으로 측정했으며, 25℃, 65%RH 조건에서 5, 10, 20, 30일 후 감소된 유효 염소량에 의해 평가했다. 또한 30일 후의 염소화된 가교 키토산 섬유는 같은 염소화 조건(0.8% 차아염소산 나트륨 수용액, pH 5)으로 실온에서 30분간 재염소화하여 시료를 재전위 시켰다. 재전위된 가교 키토산 섬유는 요오드적정법을 이용하여 유효 염소량으로 재평가했다.

(4) 결과

(가) 염소화 조건의 영향

① pH와 시간

아래 반응식에서 보는바와 같이 차아염소산 나트륨은 pH에 따라 차아염소산 음이온, 유리 차아염소산, 또는 유리 염소로 존재하기 때문에 키토산을 N-halamine화시킬 때 중요한 역할을 할 수 있다.



요오드 적정법에 의한 유효 염소량 측정을 통하여 차아염소산나트륨 수용액의 pH가 가교 키토산의 염소화에 미치는 영향과 염소화 시간에 따른 가교 키토산 섬유의 N-halamine화 정도를 그림 3-21에 나타냈다. N-halamine화된 가교 키토산 섬유의 유효 염소 함유량을 보면 모든 pH에서 염소화 시간의 경과에 따라 서서히 증가했고, 차아염소산나트륨 수용액의 pH에 따른 키토산 섬유의 N-halamine 전이를 보면 수용액의 pH가 5일 때 염소화된 키토산 섬유의 유효 염소 함유량이 다른 pH 조건보다 6배 이상의 높은 유효 염소량을 나타냈으며 그 다음으로 pH 2일 때 높은 유효 염소량을 나타냈다. 대체로 산으로부터 알칼리 조건이 될수록 유효 염소량은 점점 감소했으며 특히 pH 12인 차아염소산나트륨 수용액에서 염소화시킨 가교 키토산 섬유의 유효 염소 함유량은 극소량을 나타냈다. 따라서 산성 조건에서 염소화시킨 가교 키토산 섬유는 N-halamine으로 전이가 잘 되었고, 중성과 알칼리 조건에서는 염소화 값이 0.5% 이하의 낮은 경향을 나타냈다. 이는 차아염소산 나트륨 수용액은 pH 4 - 5에서 HOCl로 존재하는데 이때 키토산 아민기의 질소와 유효 염소가 가장 광범하게 반응하기 때문이다. 염소화 반응이 알칼리 용액일 때보다는 산성용액에서 더 효과적이라고 보고된 바 있으며 가교 키토산 섬유는 차아염소산 나트륨 수용액의 pH가 5일 때 그리고 염소화 시간이 길어질수록 가교 키토산 섬유의 N-halamine화 전이가 잘 일어나는 경향을 볼 수 있었다.

② 농도

차아염소산 나트륨 수용액의 농도(pH 5)에 따라 염소화시킨 가교 키토산 섬유의 유효 염소 함유량을 그림 3-22에 나타냈다. 차아염소산 나트륨 수용액의 농도 0.1%에서 염소화시킨 가교 키토산 섬유의 유효 염소량은 2.6%를 나타내었으며 수용액의 농도가 0.4% 이상부터는 유효 염소량이 급격하게 증가하여 수용액의 농도가 2%일 때는 염소화된 가교 키토산 섬유의 유효 염소량이 약 10%까지 높아졌다. 이는 차아염소산 나트륨 수용액 pH 5일 때 존재하는 HOCl이 수용액의 농도가 증가함에 따라 HOCl의 양도 증가하여 가교 키토산 섬유의 아민기와 광범하게 잘 반응했고, 따라서 차아염소산 나트륨 수용액의 농도가 증가할수록 유효 염소량도 증가하는 경향을 볼 수 있었다.

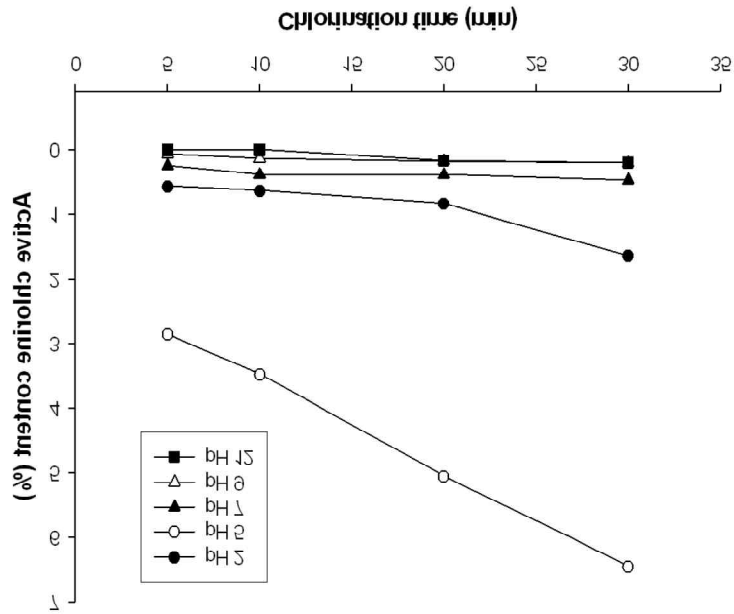


그림 3-21. Effect of chlorination time and pH of on active chlorine content in chitosan fiber(concentration of sodium hypochlorite : 0.8%).

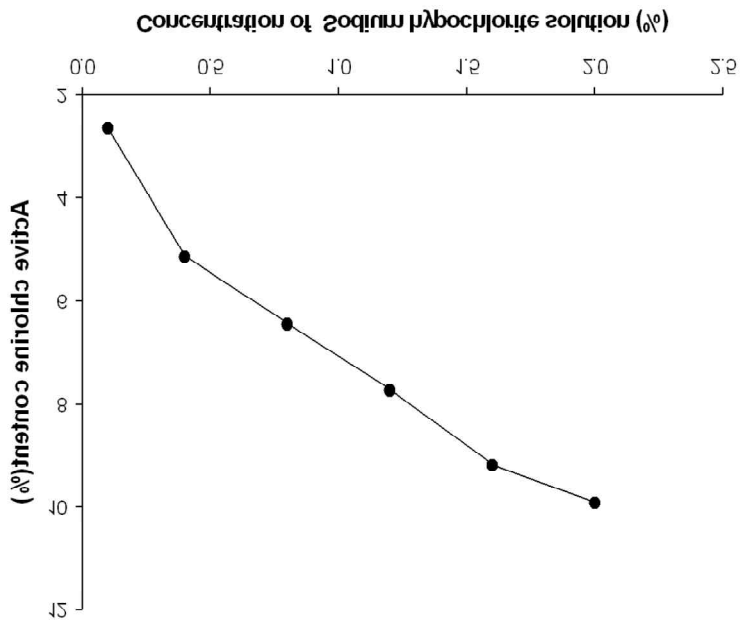


그림 3-22. Effect of concentration of sodium hypochlorite solution on active chlorine content in cross-linked chitosan fiber(pH 5).

(나) 항균성

염소화된 키토산 섬유의 항균성은 균에 대한 생육 저지환으로 평가하였다. 그림 3-23은 그램 음성균 *E.coli*에 대한 샘플의 생육 저지환을 나타낸 것이다. 비염소화된 키토산 섬유는 섬유 주변으로 생육 저지환이 전혀 형성되지 않음을 볼 수 있었다. 그러나 pH 2에서 5분 동안 처리하여 염소화한 키토산 섬유는 생육 저지환이 대략 1.7cm를 형성했다가 10분을 경과하면서 염소화된 키토산 섬유 주변의 균들이 전부 사멸되어 있음을 볼 수 있었다. pH 5에서 염소화된 키토산 섬유는 높은 염소화로 인하여 샘플 모두 균이 사멸되어 있었다. 중성인 pH 7에서 5분 동안 염소화시킨 샘플에서는 약간의 생육 저지환이 형성되었으며 염소화 시간이 경과함에 따라 유효 염소량이 증가하여 생육 저지환도 더 크게 형성되었고 염소화 30분 후에는 1.4 cm의 생육 저지환이 형성되었다. 그러나 pH 9, 12일 때는 낮은 유효염소량에 의해 생육 저지환이 약간 형성되거나 거의 형성되지 않아 항균성이 거의 없는 것으로 나타났다. 그림 3-24은 그램 양성 균 *S.aureus*에 대한 샘플의 생육 저지환에 대한 실험 결과이다. 산성이나 중성 상태에서 염소화시킨 샘플들은 전 그램 음성균처럼 염소화 시간이 길어질수록 생육 저지환이 점점 크게 형성되었다. 특히 pH 5에서는 가교 키토산 섬유의 높은 염소 함유량에 의해 *S.aureus* 전체가 사멸되었음을 볼 수 있었다. 그러나 pH 9, 12에서 염소화시킨 섬유들은 *E.coli*와 마찬가지로 *S.aureus*에 대한 항균성이 거의 없었다. 대부분의 염소화시킨 가교 키토산 섬유의 생육 저지환은 *E.coli*에 대한 결과보다 *S.aureus*가 더 작게 형성되었음을 볼 수 있는데, 대체로 그램 양성 균보다 그램 음성 균이 강한 항균성을 나타냈다.

이 결과를 통하여 약 0.2% 이상의 유효염소를 함유한 키토산 섬유에서 그램 음성 균과 그램 양성 균에 대한 생육 저지환이 형성하기 시작했고 키토산 섬유의 염소함유량이 약 0.64 % 정도일 경우 섬유 주변의 균이 깨끗하게 사멸되어 있음을 볼 수 있었다. *N*-halamine의 항균성에 대한 과거의 연구를 보면 *N*-halamine이 분리되면서 생성된 양전하 염소가 강력한 항균제 역할을 한다고 보고된 바 있다(그림 3-25).

따라서 산성 상태에서 염소화된 키토산 섬유는 그램 음성균과 그램 양성균에 대하여 높은 항균성을 나타내고 있는데 이것은 *N*-halamine으로부터 분리된 유효 염소에 의하여 항균성이 제공되었다고 판단된다. 따라서 유효 염소량이 많을수록 항균성이 더 우수하다고 생각된다.

표 3-3은 그림 3-23, 3-24에서 나타난 그램 음성균과 그램 양성균에 대한 생육저지환의 크기를 정리한 것이다. 강산 상태에서 *N*-halamine화된 키토산 섬유들은 그램 음성균과 그램 양성균에 대하여 강한 항균성을 나타내었고, pH 7일 경우에는 염소화 시간이 30분일 때 항균성을 나타냈다.

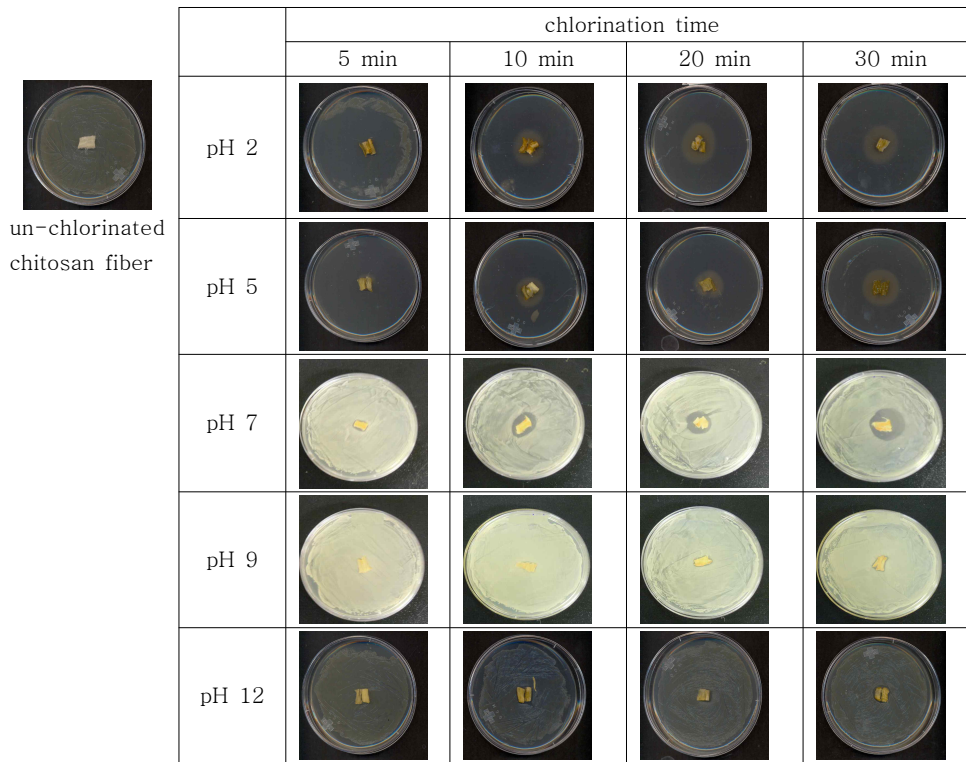


그림 3-23. Antimicrobial properties through growth inhibition zone of chlorinated chitosan fibers according to pH and chlorination time against *E.coli*.

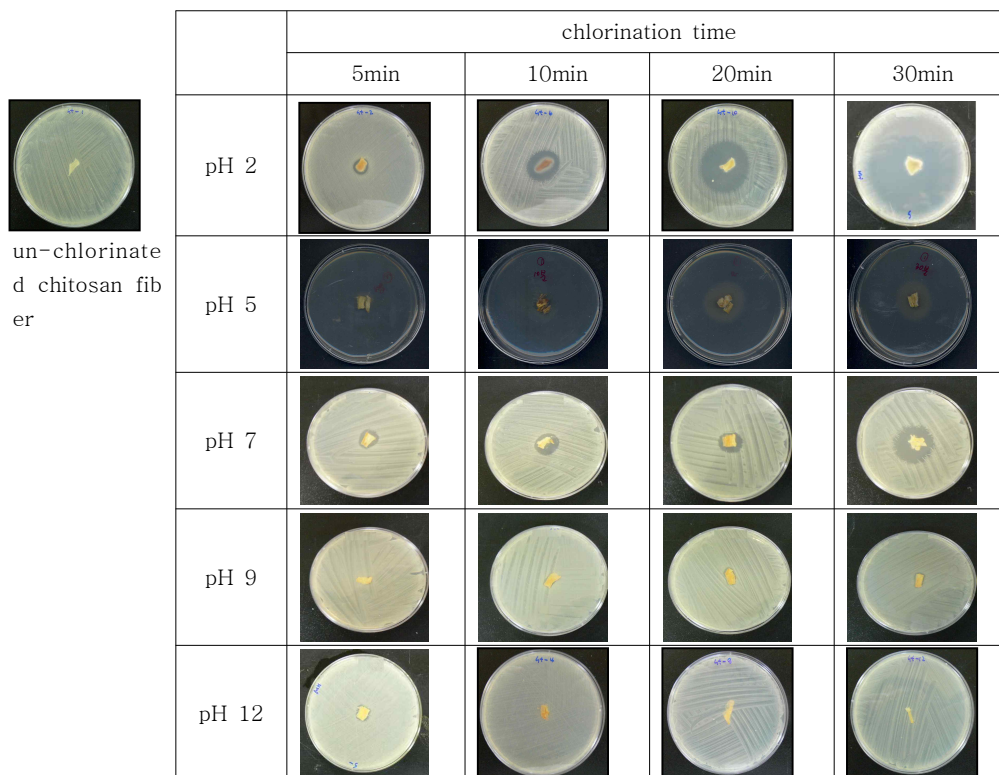


그림 3-24. Antimicrobial properties through growth inhibition of chlorinated chitosan fibers according to pH and chlorination time against *S.aureus*.

Table 3-3. Growth inhibition zone(mm) of *E.coli* and *S.aureus*.

| chlorination time pH | <i>E. coli</i> | | | | <i>S. aureus</i> | | | |
|-------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|
| | 5 | 10 | 20 | 30 | 5 | 10 | 20 | 30 |
| 2 | 68 | Totally killed | Totally killed | Totally killed | 11 | 21 | 36 | 77 |
| 5 | Totally killed | Totally killed | Totally killed | Totally killed | Totally killed | Totally killed | Totally killed | Totally killed |
| 7 | 0 | 15 | 17 | 25 | 15 | 18 | 17 | 30 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

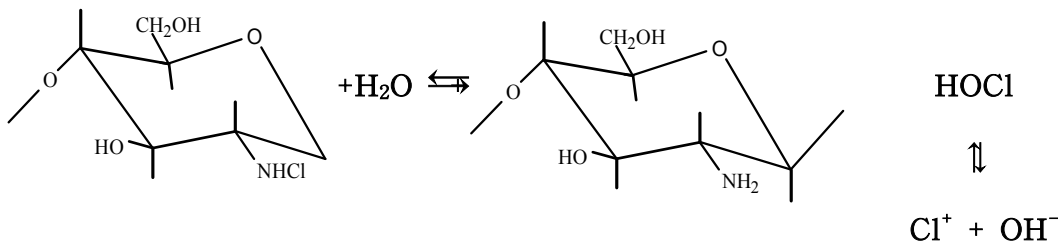


그림 3-25. Dissociation mechanism of N-halamine made from chitosan to produce active chlorine.

(다) 팽윤도 및 중량 감소

키토산은 순수한 물이나 알코올, 알칼리에 용해되지는 않지만, 아세트산, 젖산 등과 같은 유기산과 묽은 염산, 질산과 같은 무기산 등에 용해되는 성질이 있다. 그러나, 강알칼리(pH 12)를 나타내는 차아염소산나트륨 수용액에서는 키토산이 분해되었고, 또 낮은 pH에서는 섬유가 고 팽윤을 보이다가 결국은 용해되었다. 따라서 산성과 알칼리 조건에서 용해되지 않는 구조적인 안정성을 부여하기 위해 epichlorohydrin으로 키토산 실을 가교시켰다. 키토산과 epichlorohydrin 사이의 가교는 키토산의 아미노기나 수산기에서 일어날 수 있는데 키토산 실의 N-halamine화에 있어서 1차 아민기뿐만 아니라 2차 아민기에서도 반응이 일어나기 때문에 epichlorohydrin에 의한 키토산 섬유의 가교 정도는 염소화에 크게 영향을 미치지 않을 것으로 예상된다.

epichlorohydrin으로 가교된 키토산 섬유와 비가교 키토산 섬유가 차아염소산 나트륨 용액의 pH에 따라 팽윤도와 중량 감소에 미치는 효과를 표 3-4에 나타냈다. 염소화된 가교 키토

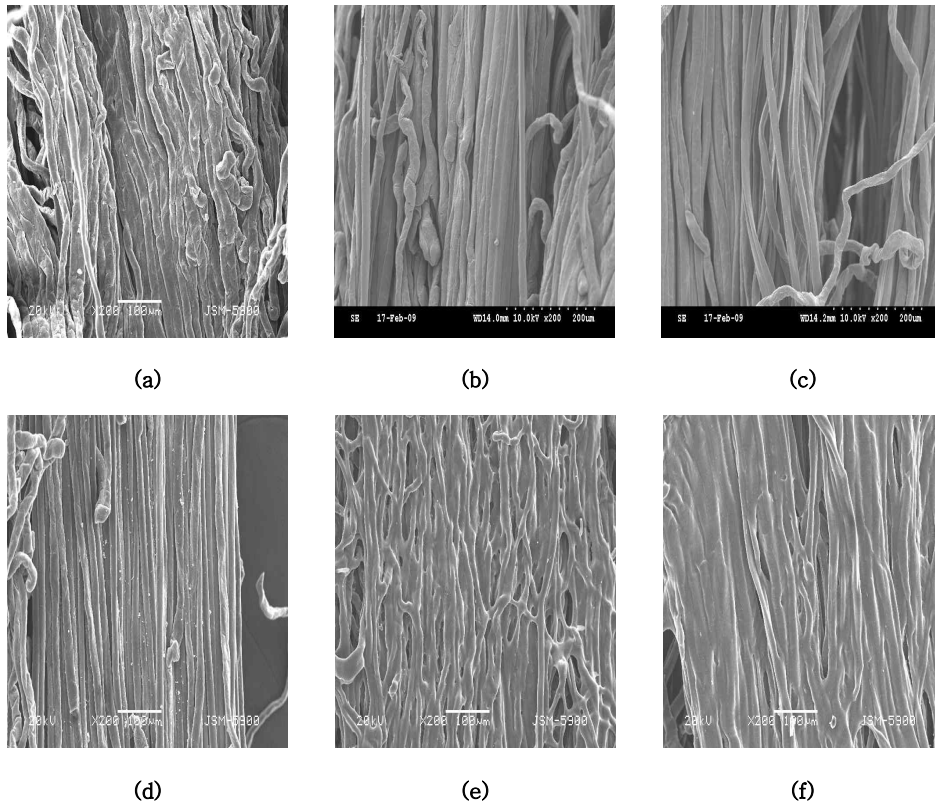
산 섬유와 비가교 키토산 섬유 모두 pH가 높아질수록 팽윤도는 감소하지만 중량 감소가 현저하게 증가했다. 산 조건에서 염소화 시킨 비가교 키토산 섬유는 겔 상태로 인하여 팽윤도가 크게 높았고, pH 7, 9, 12에서 염소화시킨 샘플들은 pH가 높아짐에 따라 중량이 크게 감소하였다. 그러나 산 조건에서 염소화시킨 가교 키토산 섬유는 같은 조건에서 염소화시킨 비가교 키토산 섬유보다 팽윤성과 중량감소가 작았다. 이는 키토산 섬유의 염소화에 있어서 산상태의 수용액에 존재하는 HOCl은 키토산에 함유된 아민기와 활발한 반응을 하게 되는데 물성이 약한 비가교 키토산 섬유는 질소와 유효염소의 높은 반응으로 인하여 부피 팽창이 크게 일어나 겔이 되었으며 건조 시 중량 감소도 높게 나타났지만, epichlorohydrin으로 가교한 키토산 섬유는 3차원 망상 구조를 지니기 때문에 유효 염소에 의한 용해와 팽윤에 대하여 구조적으로 안정성을 부여하게 되어 팽윤과 중량 감소가 적었다고 판단되며, 높은 pH에서 염소화시킨 가교 키토산 섬유는 비가교 섬유에 비하여 가교로 인한 중량 감소는 어느 정도 낮았지만 키토산의 아민기와 유효 염소가 거의 반응을 하지 않고 오히려 유효 염소로 인하여 키토산이 분해되었다고 판단된다.

표 3-4. Effect of pH on swelling ratio and weight loss of various chitosan fibers

| chlorination | | | | |
|----------------|-------------------|----------------|-----------------------------|----------------|
| chitosan fiber | | | cross-linked chitosan fiber | |
| pH | swelling ratio(%) | weight loss(%) | swelling ratio(%) | weight loss(%) |
| 2 | 558.4 | 30.1 | 106.8 | 8.2 |
| 5 | 117.1 | 18.0 | 51.6 | 4.3 |
| 7 | 91.3 | 25.3 | 36.7 | 10.3 |
| 9 | 60.7 | 43.7 | 31.8 | 15.8 |
| 12 | 17.9 | 50.4 | 15.8 | 33.5 |

(라) 표면 관찰

비염소화된 가교 키토산 실과 0.8% 차아염소산 나트륨 수용액의 pH 조건에 따라 염소화시킨 키토산 섬유 SEM 사진을 그림 3-26에 나타냈다. 염소화시키지 않은 미처리 가교 키토산 섬유 (a)에 비하여 산성 조건에서 염소화한 가교 키토산 섬유 (b), (c)는 거의 표면형태 변화가 없었으며 중성의 차아염소산 나트륨 수용액에서 염소화시킨 (d)는 염소화 도중 가교 키토산 섬유가 다소 용해되어 미처리 가교 키토산 섬유나 산성 조건에서 염소화 시킨 키토산 섬유에 비하여 섬유의 지름이 작고 섬유와 섬유가 조금씩 붙어 있는 경향을 보였다. 차아염소산 나트륨 수용액의 염기성 조건에서 염소화시킨 (e)와 (f)는 중량 감소가 높았던 만큼 섬유와 염소가 반응 하기 전 차아염소산 나트륨 수용액에 섬유가 용해되어 pH가 높을수록 건조 후 섬유끼리 용해되다가 서로 엉겨 붙어 있는 현상을 명확하게 확인할 수 있었다.



(a) un-chlorinated chitosan fibers, (b) chlorinated chitosan fibers on pH 2
(c) chlorinated chitosan fibers on pH 5, (d) chlorinated chitosan fibers on pH 7
(e) chlorinated chitosan fibers on pH 9, (f) chlorinated chitosan fibers on pH 12.

그림 3-26. SEM of chitosan fibers.

(마) 내구성과 재전위성

내구성은 *N*-halamine화 키토산에 존재하는 질소와 염소의 공유 결합력이 시간 경과에 따라 25°C, 65% RH 조건 하에서 어느 정도 유지될 수 있는가를 의미하며, 요오드화 법에 의한 유효 염소량 측정값으로 그림 3-27에 나타냈다. 6.45%의 유효 염소량을 함유한 *N*-halamine화된 가교 키토산 섬유는 염소보유시간이 지날수록 크게 감소했고 30일 후의 *N*-halamine화된 가교 키토산 섬유의 염소 함유량은 약 54% 감소한 2.95%를 나타냈지만, 여전히 항균 시험에서 가교 키토산 섬유 주변의 그램 음성 균과 그램 양성 균이 깨끗하게 전부 사멸될 수 있을 정도의 높은 양을 보유했다. *N*-halamine화된 가교 키토산 섬유가 시간이 경과함에 따라 염소 보유력이 크게 감소한 것은 그림 3-25에서와 같이 친수성인 키토산이 공기 중에 존재하는 수분과 반응하여 *N*-halamine의 해리를 촉진시켜 *N*-halamine화된 가교 키토산 섬유의 염소 보유력이 크게 감소했다. 그러나 염소 함유량이 2.95%로 감소된 *N*-halamine화된 키토산 섬유를 같은 조건 하(0.8% 차아염소산 나트륨 수용액, pH 5, 염소화 시간 30분)에서 재 염소화시켰을 때 재염소화된 가교 키토산 섬유의 유효 염소량은 6.9%로 높은 재전위성을 나타냈다.

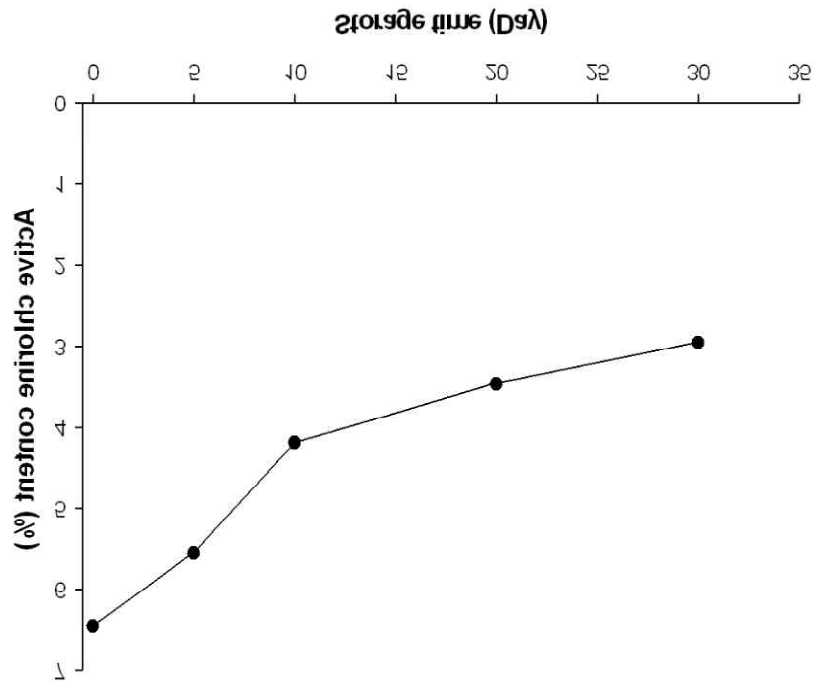


그림 3-27. Active chlorine storage stability of cross-linked and chlorinated chitosan fiber at 25°C and 65% RH

(바) 결론

차아염소산 나트륨 수용액에 용해되는 일반적인 키토산 섬유를 epichlorohydrin으로 가교시킨 후 가교된 키토산 섬유가 수용액으로부터 손상받지 않으면서 염소화시키기 위한 최상의 조건을 얻기 위해 차아 염소산나트륨 수용액의 pH와 시간을 변화시키면서 염소화된 가교 키토산 섬유의 N-halamine화 정도와 그 특성을 분석하고 다음과 같은 결론을 얻었다.

- ① 차아염소산 나트륨 수용액의 pH가 5일 때 염소화시킨 가교 키토산 섬유의 유효 염소량은 다른 pH에서 염소화시킨 시료 보다 현저하게 높다.
- ② 가교 키토산 섬유를 염소화시킬 때 같은 pH 조건이라면 염소화 처리 시간이 증가할수록 높아진다.
- ③ 가교 키토산 섬유는 차아염소산 나트륨 수용액(pH 5)의 농도가 증가할수록 N-halamine으로 전이율도 높아진다.
- ④ 차아염소산 나트륨 수용액의 pH가 5일 때 염소화시킨 가교 키토산 섬유는 높은 유효 염소 함유량으로 인하여 그램 음성 균과 그램 양성 균을 모두 사멸시킨다.
- ⑤ 산성 상태에서 염소화된 가교 키토산 섬유의 표면은 형태에 거의 변화가 없지만 알칼리에서 염소화된 섬유는 용해도가 커질수록 중량 감소도 증가한다.
- ⑥ N-halamine화된 가교 키토산 섬유는 친수성으로 인하여 약 한달 후에는 염소량이 거의 반으로 감소하지만 재 염소화 후에는 초기 염소량과 비슷하게 높은 재진위성을 나타낸다.

나. 금속촉매 담지 복합섬유의 제조기술 개발

(1) 이론적 배경

최근 신종인플루엔자에 의한 인명피해, 조류독감, 구제역등에 의한 가금류 피해가 해마다 반복되고 있으며 변종바이러스의 출현에 따른 기존 항바이러스제 치료효과의 한계가 노출될 것으로 우려됨에 따라 전염성 바이러스에 대한 보호책이 적극적으로 대두되고 있다

바이러스는 박테리아와 같은 미생물과는 근본적으로 다른 유기체로서 유,무성 생식을 통한 자기복제 증식이 아닌 숙주에 기생하여 숙주세포의 유전정보를 이용한 증식만이 가능한 특징을 가지고 있다. 지구상 모든 생명체의 진화사는 바이러스와의 공존 및 투쟁의 역사라 할 만큼 숙주 대 바이러스의 공격과 방어 메커니즘은 수십억 년을 걸쳐 지속되어 오고 있다.

과학발전예 따라 몇 가지 바이러스치료제가 개발되었으나 아직도 근본적으로 광범위한 바이러스에 대응하는 치료제는 개발되지 못하고 있다. 따라서 전염성 바이러스에 효과적으로 대응하는 방법은 바이러스의 전파를 차단하여 예방하는 방법이 최선이라고 할 수 있다

바이러스의 전파 감염은 대표적 전염성 바이러스인 인플루엔자바이러스 등의 경우 감염자로부터 방출된 바이러스를 포함하는 비말(재채기등의 침방울)에 접촉하는 경우 뿐 아니라 감염자가 접촉한 의복,수건,마스크 등에 접촉(간접접촉)함으로써도 발생한다. 대표적인 경우가 마스크로서 장시간 착용함으로써 필터부직포 부분에 바이러스가 농축되고 마스크를 탈착하면서 손에 바이러스가 전이되며, 이 손을 통해 지속적으로 의복,수건 등에 전파되어 타인에게 전염을 발생 시킨다.

섬유류 제품을 통한 바이러스의 전염을 방지하기 위해 최근 많은 연구가 진행되어 오고 있으며 각종 기술이 제공되고 있다.

대표적인 기술로는 항바이러스특성을 갖는 물질을 섬유재료 표면에 코팅하는 방식과 재료에 직접 혼합하여 섬유를 제조하는 방식이 있으며, 바이러스 불활성화 효과를 갖는 물질로는 다가의 금속 또는 금속산화물 및 기타 바이러스 불활성화 효과가 있다고 알려진 합성 또는 천연 추출 물질이 있다.

일반적으로 많이 개발이 이루어지고 있는 금속 또는 금속산화물 항바이러스 섬유에 있어서 금속종은 Cu, CuO, Al, Al₂O₃, Mg, MgO, Ag, Ag₂O 등이 있으며, Cu가 가장 효과적인 것으로 알려져 있다.

이러한 금속 또는 금속산화물을 섬유재료에 결합시키기 위한 종래기술로서는 금속성분을 분말화하여 결합제중에 현탁시킨 후 결합제-금속혼합물을 섬유재료에 적용하여 금속이 아닌 결합제를 섬유재료에 결합시키는 방법, 또는 금속을 분말화한 후 접착제를 섬유재료에 바른 후 위 금속분말을 접착제위에 살포하는 방식이 있다. 그러나 이 두가지 방법은 결합제나 접착제가 금속성분을 완전히 감싸(캡슐화) 바이러스, 미생물등과 접촉이 제한되어 효과를 충분히 나타내지 못하며 접착제 성분등으로 인한 섬유제품의 태(handle)를 저하시켜 제품용도에 제한이 있는 단점이 있다

또 다른 방법으로는 나일론 및 폴리에스터 섬유재료에 플라스틱을 피복하기 위한 표준 전해질 피복공정을 사용하여 금속으로 피복하는 방법과 금속미분말을 나일론, 폴리에스터등의 중합체를 방사할 때 직접 혼입하는 방식등이 있다.[5] 그러나 첫 번째 방법은 촉매 귀금속 핵화 부위를 섬유재료상에 침전시켜 섬유표면을 활성화 시키는 단계 및 활성화된 섬유표면에 근접하여 금속양이온의 환원단계의 다소 복잡한 공정이 요구되는 단점이 있으며 두 번째 방법은 비교적 간단한 방법이나 방사구금이 막히지 않도록 금속을 미분말화 하여야 하며 투입되는 금속의 양에도 한계가 있다 또한 위 방법 모두 합성섬유 소재에 국한되는 방법이다

키토산은 천연의 양이온성 고분자로서 지구상에 셀룰로오스 다음으로 풍부히 존재하는 대표적

천연자원으로서 그 효용가치가 매우 높다. 키토산 고분자를 섬유로 제조함으로써 항균, 소취, 보습, 인체친화성이 높은 섬유제품에 응용이 가능하며 이와 관련된 여러 가지 특허가 국내외에 공개되고 있다, 또한 본 발명자 등은 키토산 고분자 용액내에 은, 금 미립자들을 나노크기 형태로 혼입하여 섬유를 제조함으로써 미생물에 대한 살균력을 증강시킨 섬유제조 방법을 제공한 바 있다(특허 2004-0009504). 그러나 상기의 방법으로는 박테리아 미생물에 대한 효과적인 살균 수단을 제공할 수 있으나 바이러스에 대한 불활성화 효과를 갖지 못하는 단점이 있다. 따라서 본 발명에서는 바이러스 불활성화에 효과적으로 알려져 있는 다가의 금속이온 특히 구리 이온을 키토산 섬유의 제조시 도입함으로써 항균성은 물론 항바이러스 성능이 우수한 인체 친화적 섬유의 제조방법을 제공하고자 한다

(2) 실험

키토산/HAp 복합섬유를 제조하는 공정중에서 Ag, Cu 을 복합화하여 섬유를 제조하였다.

키토산 21 kg을 2% 초산용액 500L에 녹인 후 질산칼슘 34 kg(또는 초산칼슘 25 kg), 나노실버/CuSO₄을 탈이온수 100L에 완전히 녹인 후 키토산 용액에 서서히 첨가하여 방사원액을 제조하였다. 제조한 방사원액을 24시간 방치하여 탈기포한 후 0.1mm × 24,000 홀의 노즐을 통해 응고액 속으로 습식방사하였다. 응고액은 가성소다 5%, 제2인산나트륨 2%의 혼합용액을 사용하였다. 이후 제2인산나트륨 5%, 가성소다 10%로 구성된 연신액속에서 150% 연신한 후 수세하고 건조하여 키토산/HAp/Ag, 키토산/HAp/Cu 복합섬유를 제조하였다.

Ag는 100-1,000ppm, Cu는 1,000-30,000ppm으로 변화시키면서 섬유를 제조하였다

제조된 복합섬유를 SEM-EDS, ICP-OES로 섬유의 표면과 금속이온의 함량을 측정하였으며 인장강도 등 물성을 측정하였다.

(3) 결과

Ag 750ppm 분산시켜 제조된 키토산/HAp/Ag 복합섬유를 SEM-EDS 분석결과 HAp/Ag를 구성하고 있는 Ca, P, Ag 이온이 관찰됨을 확인하였다.

섬유의 물성을 측정한 결과 키토산100%섬유에 비해 강도가 감소한 결과를 나타내었는데 이는 무기질성분인 HAp의 영향으로 생각되며 부직포제조에는 문제가 없는 물성을 나타내었다.

키토산/HAp/Ag 복합섬유의 표면을 SEM으로 관찰한 결과 복합미립자의 영향에 의해 거친 표면을 나타내었다.

제조된 복합섬유의 항균성을 측정한 결과 강한 항균성을 가진 Ag의 영향에 의해 우수한 항균성을 나타내었다.

표 3-5. CH/HAp/Ag composite fiber의 물리적 성질

| Sample | Elongation (%) | Tenacity (g/den) | Linear density (den) | Modulus 0-3% (g/den) | Modulus 0-5% (g/den) |
|-----------------|----------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| CH/HAp/Ag fiber | 12.1 | 1.8 | 2.0 | 35.8 | 24.0 |

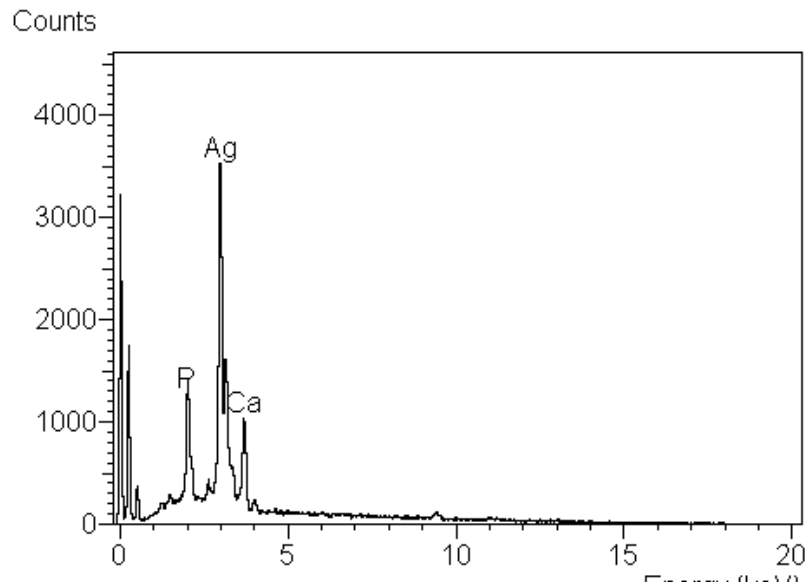


그림 3-28. EDS curve of CH/HAp/Ag composite powder.

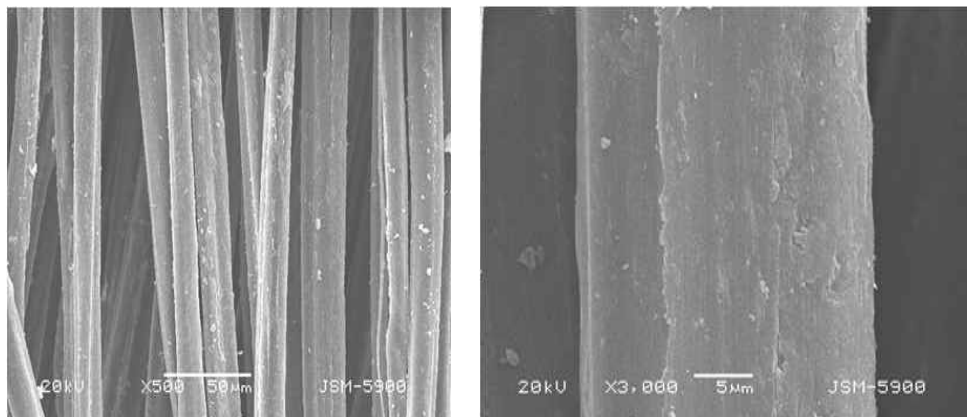


그림 3-29. SEM micrographs of CH/HAp/Ag composite fiber.

표 3-6. 키토산/HAp/Ag 복합섬유의 항균성 테스트 결과

| 균주 | 구분 | 일반면직물 | 키토산/HAp/Ag 복합섬유 |
|---|------------|--------------------|-------------------|
| Staphylococcus aureus (ATCC 6538) | 초기 균수(/g) | 4.5×10^4 | 4.5×10^4 |
| | 18시간 후(/g) | 1.65×10^7 | <10 |
| | 정균감소율(%) | - | 99.9 |
| Klebsiella Pneumoniae (ATCC 4352) | 초기 균수(/g) | 47.5×10^4 | 4.5×10^4 |
| | 18시간 후(/g) | 22.5×10^5 | <10 |
| | 정균감소율(%) | - | 99.9 |

키토산/HAp/Cu 복합섬유의 Cu의 함량을 3,000-30,000ppm을 혼합시키면서 섬유를 제조하였다. 20,000ppm이상에서는 방사원액제조시 균일하게 분산이 되지 않았으며 키토산 또한 용해가 되지 않았다. 이는 Cu가 키토산과 킬레이트를 형성하여 용해를 방해하는 것으로 생각된다. 따라서 3,000, 6,000, 12,000ppm를 첨가하여 섬유를 제조하였다. 그림 3-30과 같이 12,000ppm을 혼합한 복합섬유를 보면 황산구리 특유의 푸른 빛을 나타내어 구리가 함유된 것을 육안으로 확인할 수 있다.



그림 3-30. 키토산/HAp/Cu 복합섬유

ICP-OES에 의해 키토산/HAp/Cu 복합섬유의 구리함량을 측정하였다. 이론치 대비 평균 69.06%의 구리함량을 나타내었는데 이는 방사원액제조시 필터링, 응고공정중의 탈락에 의한 것으로 생각된다.

키토산/HAp/Cu 복합섬유의 항균성을 측정한 결과 만족할 만한 항균성을 나타나지 않아 구리가 항균성을 가지지 않는 것으로 생각된다.

따라서 항균성과 항바이러스성을 동시에 충족하려면 Ag와 Cu가 동시에 들어가야 할 것으로

생각된다.

물성을 측정한 결과 Ag보다 Cu가 약간 높은 강도를 나타내었는데 이는 킬레이트가 형성할 수 있는 Cu의 함량이 높은 것에 기인하는 것으로 생각된다.

표 3-7 ICP-OES에 의한 구리함량의 변화

| | 3,000ppm | 6,000ppm | 12,000ppm |
|-----------|----------|----------|-----------|
| Cu(ppm) | 2,080 | 4,185 | 8,175 |
| 이론치 대비(%) | 69.3 | 69.75 | 68.13 |

표 3-8 키토산/HAp/Cu 복합섬유(3,000ppm)의 항균성 테스트 결과

| 균주 | 구분 | 일반면직물 | 키토산/HAp/Ag 복합섬유 |
|---|------------|-------------------|-------------------|
| Staphylococcus aureus (ATCC 6538) | 초기 균수(/g) | 1.2×10^5 | 1.2×10^5 |
| | 18시간 후(/g) | 5.4×10^6 | 4.0×10^6 |
| | 정균감소율(%) | - | 25.8 |
| Klebsiella Pneumoniae (ATCC 4352) | 초기 균수(/g) | 1.5×10^5 | 1.5×10^5 |
| | 18시간 후(/g) | 8.1×10^6 | 5.0×10^6 |
| | 정균감소율(%) | - | 38.7 |

표 3-9. CH/HAp/Cu composite fiber의 물리적 성질

| Sample | Elongation (%) | Tenacity (g/den) | Linear density (den) | Modulus 0-3% (g/den) | Modulus 0-5% (g/den) |
|-----------------|----------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| CH/HAp/Ag fiber | 15.54 | 2.05 | 2.31 | 44.2 | 29.5 |

3. 필터부직포 및 응용제품 개발

가. 부직포제조

필터 및 마스크 등 응용제품을 개발하기 위해서는 부직포의 제조가 필수적이다.

부직포를 제조하기 위한 방법은 여러 가지가 있다. 원료섬유의 종류에 따라 단섬유부직포와 장섬유 부직포가 있고 웹의 형성방법에 따라 건식/습식 부직포가 있으며 웹의 결합방법에 따라 NP(Needle Punch), CB(Chemical bonding), TB(Thermal Bonding), ST(Stitch bonding), SL(Spunlace), MB(Meltblown), SM(spunbond)등의 다양한 부직포가 있다.

각 부직포제조방법에 따른 제조공법, 특징, 주요용도를 다음 표 3-10에 나타내었다.

표 3-10. 부직포제조방법에 따른 주요특징

| Process | 제조법 | 특징 | 주요용도 |
|------------------|--|-----------------------|------------------------------|
| 습식부직포 | 제지공정인 초지법과 동일한 공정이나 단지 원료가 펄프로 사용되지 않고 각종섬유를 사용하여 제조 | 물성을 매우 자유롭게 변화시킬 수 있음 | Wiper, 타월, 기저귀커버 등 |
| Chemical bonding | 웹(web)결합시 접착제를 섬유상에 침투시켜 건조공정을 거쳐 제조 | 유연성과 통기성이 매우 뛰어나 | 심지 코팅기포 |
| Thermal bonding | 저융점의 가소성 합성섬유를 혼합시켜 열, 압력, 용제 등으로 착화하거나 녹여서 결합하여 제조 | 접착제를 사용하지 않아 위생적임 | 기저귀, 마스크, Filter |
| 에어레이 | 압축공기와 접착제를 동시에 이용하여 제조 | 가로와 세로방향의 인장차이가 없음 | 전지필터, 심지, 카페트기포재, wiper, 스펀지 |
| Spunlace | 고압수류를 이용하여 섬유를 결합하여 제조 | 유연성과 통기성이 우수 | 메디컬용, 심지, 생활용품, wiper |
| Spunbond | 용융섬유를 방사하여 자체접착하여 결합 | 용도에 따른 원단 설계가 용이 | 포장재, 생리용나프킨, 토목건축재, 필터, 심지 |
| Meltblown | 합성고분자를 방사하여 고압열풍에 의해 극세섬유로 되어 균일한 용융 섬유웹으로 결합하여 제조 | 유연성, 비투과성, 절연성이 우수 | 필터, 절연재, 흡수시트, wiper |
| Needle punch | 기계적(특수바늘)으로 웹을 결합하여 제조 | 두께조정이 용이함 | 카페트, 모포, 필터, 심지 |
| Stitch bonding | 형성된 웹을 편침을 사용하여 접착제를 사용하지 않고 실로 누벼서 제조 | 두께는 얇으나 인장강도는 높음 | 심지, 자동차내장재 |

본 연구에서는 니들펀칭, 서멀본딩, 케미컬본딩, 멜트브로운 공법을 사용하여 마스크, 필터 등 용도에 맞는 부직포를 제조하였다.

(1) 니들펀칭에 의한 부직포 제조

제조된 섬유를 당사가 보유한 crimper/cutting MC를 이용하여 12-15crimp/in, 51mm alginate 섬유를 제조한 후 Needle punching 공법을 이용하여 부직포를 개발하였다. 부직포를 제조하기 위해서는 섬유의 섬도, 방사유제, 크림프갯수와 상관관계를 가지는 것을 알 수 있었다. 해섬성과 섬유의 유연성을 높이면 크림프갯수, 크림프강도가 저하되어 부직포작업성이 저하되었다. 따라서 키토산/하이드록시아파타이트 복합섬유를 Opening 후 Doffer 27rpm, cycinder 600rpm, feed 100rpm으로 carding 한 후 traverse width 1150으로 lapping하여 web를 얻었다. 얻어진 web를 Needle-1 600rpm, needle-2, 1,100rpm, 3m/min로 neddling 하여 부직포를 제조한 후 섬유과편율을 줄이고 표면을 깨끗하게 하기 위하여 120도로 calendering을 하여 폭 1m, 140g/m²의 부직포를 제조하였다.

(2) 서멀본딩에 의한 부직포 제조

저융점섬유(LM)를 10-70%까지 다양하게 혼방하여 200도의 열로 용착하여 20gsm 마스크용원단과 150gsm 필터용 부직포를 제조하였다.

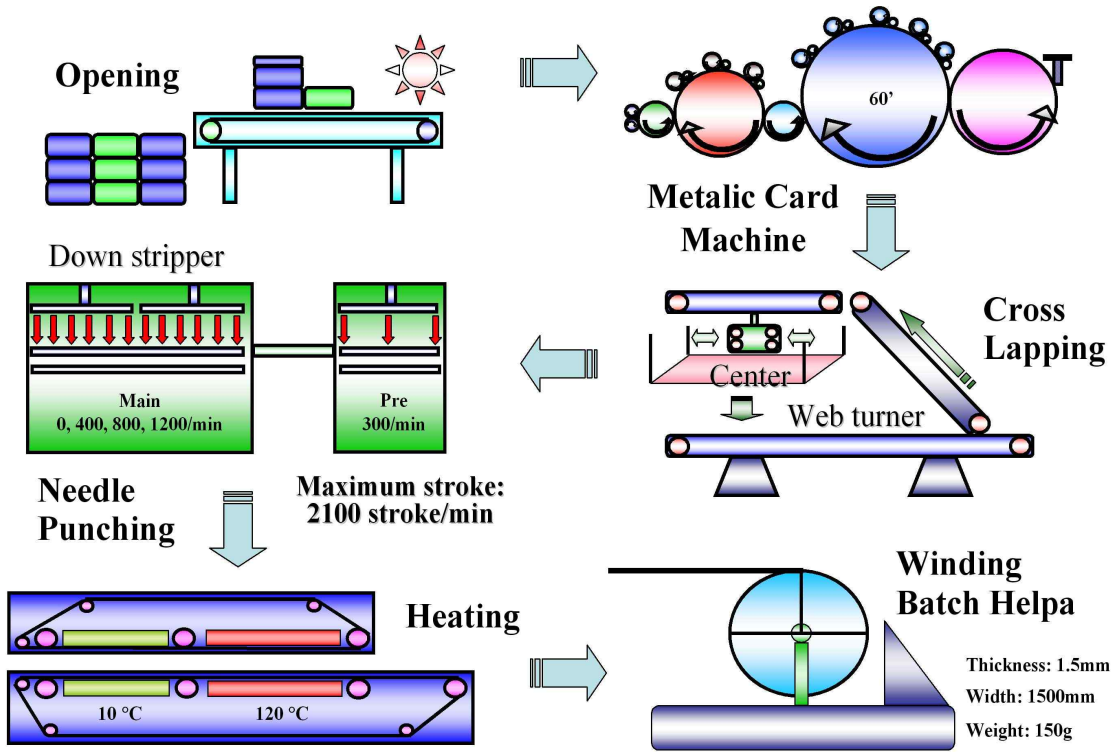
(3) 키토산/하이드록시아파타이트 복합 부직포 제조

부직포 제조 조건에 따른 물성평가를 통하여 키토산/하이드록시아파타이트 니들펀칭 부직포 제조를 위한 최적의 공정을 설정하였으며 여과효율을 높이고 압력손실을 최소화하기 위하여 이종(異種)부직포와의 복합화를 시도하였다. 개발된 부직포가 필터여재로 사용되기 위해서는 미세 기공을 통한 물리적인 여과가 우선 이루어져야 하는데 나노급의 기공도를 가지는 나노섬유를 이용한 부직포의 경우 공정이 복잡하고 경제성 및 물성이 충분하지 못하여 마이크로급 기공도를 갖는 melt blown(MB) 공법으로 제조한 150g/m² 부직포를 CH/HAp/PP 부직포에 Hot Melt로 합지하여 평균 중량 및 두께가 180g/m², 1.0mm가 되도록 복합부직포(CH/HAp/PP/MB)를 제조하였다.



그림 3-31 Melt Blown 부직포 제조 과정

Nonwoven Manufacture Process Diagram



Bonding Method : Laminating, Calender and Hot Air Blowing

| | Opening | Carding | Web Feeding | Needling & Finishing |
|----------------|--|--|--|---|
| 주요 개발 공정 |  |  |  |  |
| 개발 방법 | <ul style="list-style-type: none"> •섬유의 해섬성을 개선하기 위한 섬유 제조 조건 확립 •단섬유 섬유장 51mm | <ul style="list-style-type: none"> •섬유의 물성 개선 및 섬유의 강신도 개선 •crimp 개수(12~15 개/인치) 및 강도 개선 | <ul style="list-style-type: none"> •섬유의 해섬성과 Feeding성의 반비례 관계를 고려한 최적 섬유 제조 조건 확립 •Doffer, cylinder, feeder speed 조절 | <ul style="list-style-type: none"> •섬유의 물성 및 부직포의 물성을 고려한 최적의 공정 확보 •Needling speed, 횡수, calender temp. |

그림 3-32. 부직포 제조 공정도

나. 필터소재의 개발

(1) 필터 소재의 설계

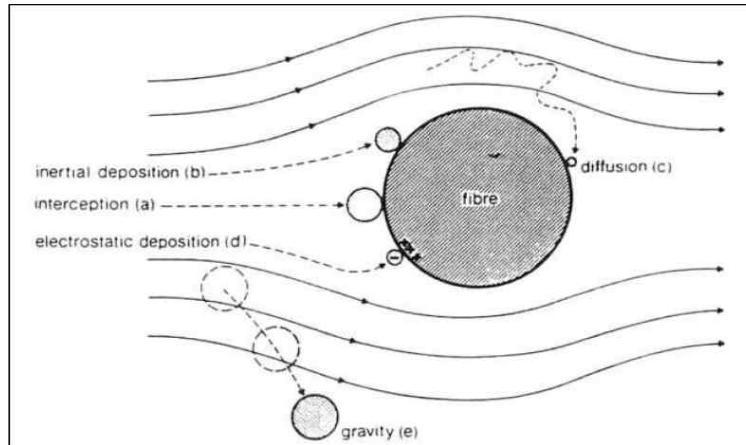


그림 3-33. 에어필터의 포집 메커니즘.

필터가 입자를 여과하는 메커니즘은 크게 다음 5가지 효과에 의해 이루어진다.

① 중력 효과(Gravity effect)

큰 직경을 가진 입자는 이동속도가 느리기 때문에 중력에 의해서 포집된다.

② 관성 효과(Inertial effect)

공기 속을 흐르는 입자의 관성력에 기인하여 무거운 입자는 여재 섬유 주위에서 유선을 따라 굽어 흐르지 않고 직진하려는 경향이 있어 섬유에 직접 충돌하여 포집된다. 이 효과는 유속과 입자의 크기가 증가할수록 그리고 섬유의 직경이 감소할수록 커진다.

③ 차단효과(Interception effect)

작고 가벼운 입자가 유선을 따라서 입자의 반경(r)보다 더 큰 섬유(R) 옆을 지날 때 이 입자는 섬유에 부딪치게 된다. 이 효과는 흐름의 형태가 변하지 않는한 유속의 영향을 받지 않으며 입자의 크기가 증가할수록 또 섬유간의 간격이 감소할수록 증가한다.

④ 확산효과(Diffusion effect)

공기중에 $0.1\mu\text{m}$ 미만의 입자가 분자의 열적 운동인 브라운 운동(Brown motion)을 통하여 임의의 확산을 하게 되는데 이 확산력이 섬유 충돌의 원동력이 된다. 이 효과는 유속, 입자경 및 섬유경이 감소할수록 증가한다.

⑤ 정전기적 인력(Electrostatic forces)

보통 입자들은 비교적 낮은 전하를 띠고 있지만 특별한 조건에서는 평상시 보다 높은 전하를 띠는 경우가 많으며 특히 입경(粒徑)이 $0.1\sim 1\mu\text{m}$ 범위의 입자들은 이 정전기적 인력에 의해 쉽게 여재 섬유에 포집이 된다. 실제로 여과시스템 앞에 정전기장을 발생시켜 분진에 전하를 띠게 하여 여과 효과를 높이는 방법도 활용되고 있다.

이외에 여러 연구자들의 연구결과에 의하면 직물을 통한 여과는 단일 메커니즘에 의해서만 이루어지는 것이 아니고 여러 인자들 즉 입자크기, 직물밀도, 공기투과도, 섬유 fineness, needle의 크기, needle의 투과두께 등 여러 인자들에 의해 복합적으로 영향을 받는다. 먼지가 쌓일수록 여과효율은 좋아지다가 점차 일정해진다.

따라서, 최적의 필터 여재로 사용하기 위해서 그림 3-34와 같이 설계하여 시작품을 제조하였으며 물성과 기공도를 분석한 결과 표 3-12에 나타난 것과 같이 일반 공조용 필터로 사용하기에 적합한 물성을 보였다(표3-12, 그림 3-35).

표 3-11. 에어필터의 종류와 용도

| 필터 성능별 분류 | 형 상 | 소 재 | 대상 분진입경 (μm) | 포 집 효 율 (%) | | | 용 도 | 수요동향 | 기 술 개발동향 |
|-----------|----------------|-----------------|---------------------------|-------------|-------|----------|--|--|--------------------|
| | | | | 중량법 | 비색법 | 계수법 | | | |
| 일반필터 | 조진 권취 roll형 | 부직포 유리매트 | 0.5이상 | 30~98 | 5~20 | - | 기기보호용 (룸에어콘, 팬코일) 일반빌딩공조 산업용 공조 pre-filter | 부직포와 유리매트가 주(主) 약 70%가 부직포 연간성장률 5~10% | 재생비 구성 장수명화 저압손화 |
| | 중진미진 panel형 | 직물 편물 스폰지 | | | | | | | |
| 중고성능필터 | 중성능 여재 절입형 | 부직포 | 1.0이상 | 98이상 | 30~70 | 20~40 | 일반빌딩 공조 산업용 공조 메인필터 HEPA ULPA pre-filter | 빌딩관리 소형청소기에 사용 연간성장률 10~15% | compact화 저압손화 장수명화 |
| | 고성능 포켓형 전기 집진기 | 유리여재 스폰지 | 0.3~1.0 이상 | | | | | | |
| 초고성능필터 | HEPA 여재 절입형 | 유리매트 | 0.3이하 | - | - | 99.97 이상 | 각종클린룸 (반도체, 정밀식품, 제약, 병원수술실) | 반도체와 관계가 많고 병원, 원자력 발전소 등 | 저압손화 다품량화 |
| | ULPA | 유리지 | 0.1이하 | | | | | | |

(2) 필터 최적 기공도 분석

키토산/하이드록시아파타이트/PP 부직포(CH/HAp/PP)의 필터 성능을 향상시키기 위하여 복합화를 시도하였다. 여과효율 및 강도를 향상시키기 위하여 melt blown(MB) 공법으로 제조한 150g/m² 부직포를 CH/HAp/PP 부직포에 Hot Melt로 합지하여 평균 중량 및 두께가 180g/m², 1.0mm가

되도록 복합부직포(CH/HAp/PP/MB)를 제조하였다. 부직포에 대한 강도와 신도는 KS K 0860(컷 스트립법)에 준하여 실험하였고 2500N의 Load Cell을 사용하여 Cross head speed는 100mm/min으로 고정하여 측정하였다. 부직포의 여과효율은 flow rate 32L/min, test filter size 100cm², 0.3 μm NaCl solution 조건으로 TSI 3160 Fractional Efficiency Filter Tester를 사용하여 측정하였다. 부직포의 인장강도 및 신도의 결과를 표 3-12에 나타내었다. 일반적인 니들펀칭 부직포인 경우에 비하여 CH/HAp/PP의 물성이 다소 높게 나타났으며 이는 단순히 니들링에 의한 섬유 물리적 교락과 함께 열에 의한 PP 소재의 열융착에 따른 결과로 판단된다. 또한 MB 부직포를 합지한 경우에는 기포지로 사용한 Spunbond 부직포의 우수한 물성에 기인하여 필터용 소재로 적용하기에 충분한 물성을 갖고 있는 것으로 나타났다. 또한 MB 부직포를 합지한 경우에 압력손실이 4 mmH₂O 이하로 비교적 낮게 나타났고 여과효율도 90%를 상회하는 결과를 나타내었다. 따라서 압력손실이 낮고 여과효율이 높은 필터용 소재로 적합할 것으로 기대된다. 이러한 특성은 그림 3-35에 나타난 기공도의 분석결과와 일치하는 것으로 CH/HAp/PP 부직포의 경우 비교적 기공도가 20~140 μm로 크고 넓게 분포되어 있는 것으로 보이며 CH/HAp/PP/MB의 경우에는 10 μm 내외로 비교적 작고 좁게 분포되어 있는 것으로 나타났다. 따라서 CH/HAp/PP 층이 비교적 크고 다양한 크기의 불순물을 여과시켜주고 MB 층이 나머지를 물리적으로 여과시키고 필터여재에 흡착된 바이러스를 불활화시키는 시스템으로 설계하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

그림 3-36은 필터의 개발시제품이다.

표 3-12. 필터 여재의 종류에 따른 물성

| Sample | | CH/HAp/PP | CH/HAp/PP/MB |
|---------------------------------|----|-----------|--------------|
| Resistance (mmH ₂ O) | | 0.205 | 3.977 |
| Penetration (%) | | 49.19 | 5.58 |
| Fractional Efficiency (%) | | 50.81 | 94.42 |
| Max Force (N) | MD | 102.0 | 60.4 |
| | CD | 30.3 | 35.09 |
| Elongation at Max Force (%) | MD | 297.8 | 24.64 |
| | CD | 259.0 | 25.97 |

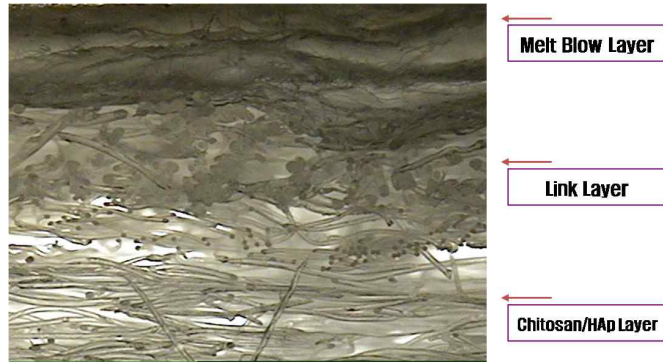
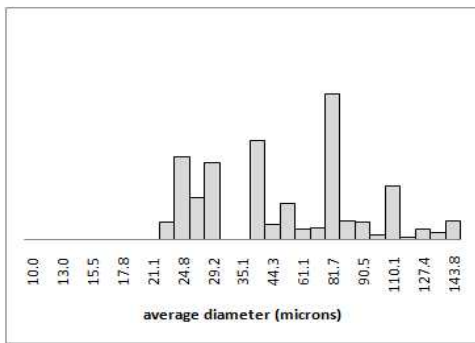


그림 3-34. 최적 필터 여재 시스템

(a) Chitosan/HAp/PP



(b) Chitosan/HAp/PP/MB

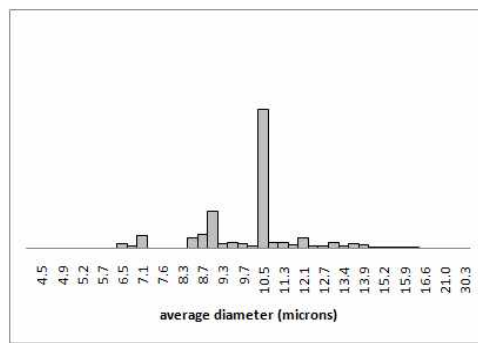


그림 3-35. 필터 종류별 기공도



그림 3-36. 항바이러스 필터 시제품

다. 마스크소재의 개발

(1) 마스크의 종류

마스크의 종류에는 방역용, 보건용, 수술용, 황사마스크로 구분되며 각 마스크의 효능은 다음과 같다

표 3-13. 마스크의 종류

| 마스크 종류 | 효능효과 |
|---------|--------------------------------------|
| 보건용 마스크 | 호흡기 질병의 감염, 악취, 매연 등으로부터 보호할 목적으로 사용 |
| 수술용 마스크 | 진료, 치료, 또는 수술시 감염을 예방할 목적으로 사용 |
| 황사 마스크 | 황사로부터 호흡기를 보호할 목적으로 사용(KF80) |
| 방역용 마스크 | 전염성 질병의 감염으로부터 호흡기를 보호(KF94) |

(2) 마스크의 등급(KF)

KF는 'Korea Filter'의 약어로 분진포집효율, 안면부흡기저항, 누설률의 기준에 따라 KF80, KF94, KF99로 그 등급이 나누어진다.

표 3-14. 마스크의 등급

| 등급 | 기 준 | | | 적용 예 |
|------|-----------------------------|---------------------------|-------|-------|
| | 분진포집효율 | 안면부흡기저항 | 누설률 | |
| KF80 | 80%이상 (염화나트륨 시험) | 6.2mmH ₂ O 이하 | 25%이하 | 황사방지용 |
| KF94 | 94%이상 (염화나트륨 및 파라핀오일 시험) | 7.2mmH ₂ O 이하 | 11%이하 | 방역용 |
| KF99 | 99%이상 (염화나트륨 및 파라핀오일 시험) | 10.3mmH ₂ O 이하 | 5%이하 | |

(3) 마스크시제품

황사용 마스크용으로 그림 3-37과 같이 설계하여 시제품을 제작하였다.

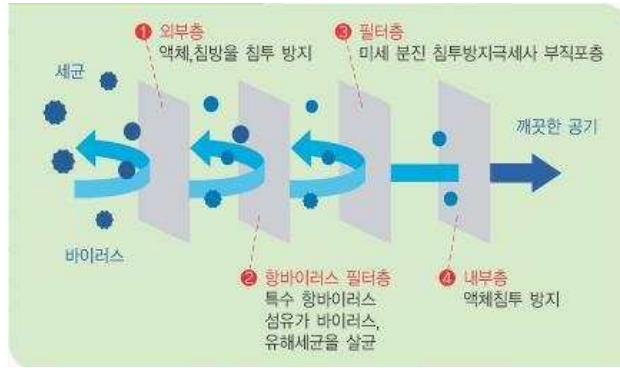


그림 3-37. 황사용 마스크 설계



그림 3-38. 황사용 마스크 시제품

제 2 절. 바이러스 불활화 항체생산 및 필터소재의 효율 분석

1. 조류인플루엔자 바이러스 불활화 난황 항체 담지 기술 개발

가. 인플루엔자 바이러스 불활화 난황 항체 생산 기술 확립

(1) 인플루엔자 바이러스 난황 항체 개발

(가) 인플루엔자 바이러스 난황 항체 개발 장점

인플루엔자바이러스와 결합능이 있는 항체를 대량적으로 생산하기 위해서 계란을 이용한 난황 항체 생산 기술을 적용하여 그림 3-39와 같이 전략을 수립하였다. 계란 1개당 15ml의 난황이 분리되며, 마리 당 연간 IgY 생산량은 30~90g이 된다. 따라서 난황으로부터 생산되는 항체의 생산량은 초유나 혈청의 경우보다 상대적으로 많고, 사양관리와 계란 생산이 용이하기 때문에 난황을 이용한 항체생산은 기술적 및 양적 측면에서 많은 이점을 가지고 있다.[12]



그림 3-39. IgY 항체 대량 생산을 위한 전략 모식도

(2) 조류인플루엔자 IgY 항체 중화능 분석

인플루엔자 항원에 대한 항체 형성 조사는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 법으로 실시하였다. 인플루엔자 바이러스 단백을 5 μ g/ml이 되도록 carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)로 희석하여 microplate에 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 코팅을 하였다. PBST(PBS containing 0.05% Tween-20)으로 3회 세척을 한 후에 3% skim milk 용액으로 2시간 동안 실

온에서 방치를 하였다. 난황에서 얻은 항체를 3% skim milk 용액에 2,000배부터 1,458,000배까지 3배수로 희석한 후 37°C에서 2시간 반응시켰다. 2차 항체는 alkaline phosphate-conjugated affinity pure rabbit anti-chicken IgY(IgG)를 5,000배로 희석하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 기질용액으로 SAT blue 용액을 사용하여 10분간 반응을 시켰다. 반응억제제는 8N H₂SO₄를 사용하였으며 microplate reader를 이용하여 490nm에서 항체가를 측정하였다.

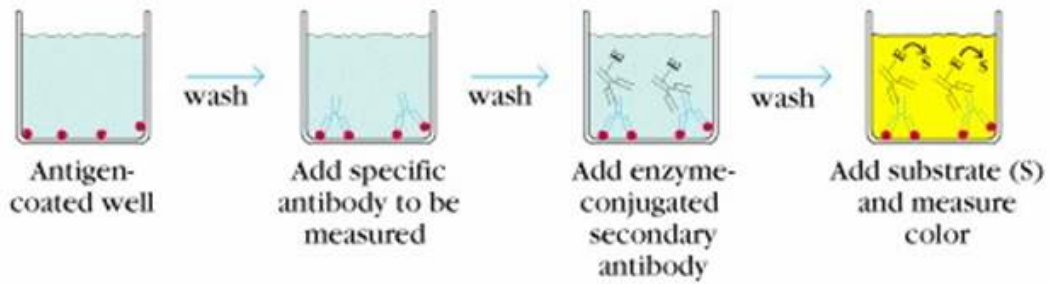


그림3-40. 조류인플루엔자 IgY 항체 중화능 분석을 위한 ELISA법 모식도

(3) 난황항체 최적 담지 기술 개발 체계 확립

하이드록시아파타이트(HAp)/키토산으로 구성된 신소재는 섬유에 코팅되어 있는 HAp의 분자식(Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂)에서도 볼 수 있듯이 극성을 나타낼 수 있는 원소들을 많이 포함하고 있기 때문에 친수성을 나타내어 전기적인 상호작용에 의해 극성을 띄는 분자와 결합하게 된다. 이러한 신소재 섬유에 담지하게 될 난황항체 IgY(IgG)는 아미노산으로 구성되어 있는 단백질로 극성을 띄고 있어 신소재의 표면에 극성공유결합을 통해 매우 안정하게 결합을 형성 할 수 있다. 하지만 항체를 처리하는 담지 기술에 따라 효율이 차이가 있으며, 이에 대한 적절한 평가 방법이 수립되어야 한다. 또한 담지 과정에서 외부 요인에 의해 단백질 변성이 발생하여 바이러스와 결합 활성이 감소하게 될 경우 목적했던 효과를 획득하는데 제한 사항이 발생할 것이기에 최적 담지 기술에 평가 과정에서 이러한 요인을 고려할 수 있도록 계획하였다.

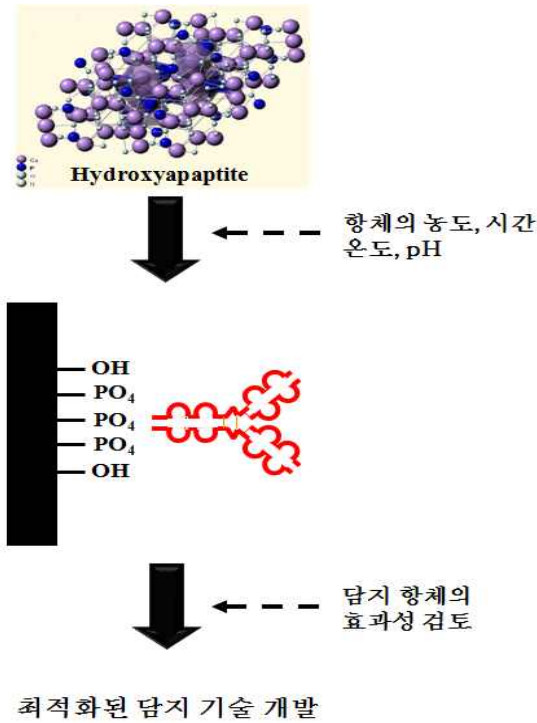


그림 3-41. 난황항체 최적 담지 기술 개발 체계 확립 모식도

최적화된 담지 기술의 평가 방법은 그림 3-41과 같이 전략을 수립하였다. 분리된 난황 항체를 일반적으로 항체를 흡착시켜 활용하는 solid plate를 대상으로 항체를 일정 수준으로 희석한 뒤 담지 시간과 온도 그리고 pH를 변화시켜 최적 조건을 탐색한다. 탐색된 최적 조건은 담지 기술을 달리 적용하게 될 경우 각각의 기술을 평가할 수 있는 표준화된 조건으로 설정하여 담지 효율을 평가한다. 담지의 효율성은 섬유에 항체가 담지되는 것으로만이 아니라 담지 과정에서 항원과 결합하는 활성을 상실하지 않아야 하기 때문에 이에 대한 평가도 요구된다. 담지 효율은 난황 항체를 생산하기 위해 활용한 항원을 항체가 담지 되어 있는 섬유와 일정시간 반응 시킨 뒤 형광물질로 표지되어 있는 항체로 반응 시켜 형광현미경으로 확인함으로써 평가하는 것으로 계획하였다.

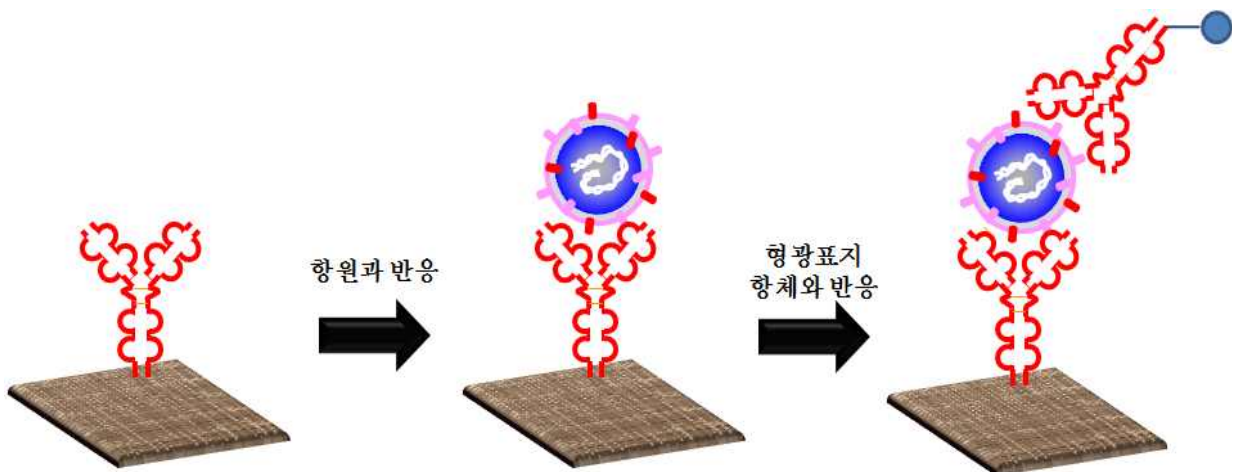


그림 3-42. 최적화된 담지 기술의 평가를 위한 전략 모식도

(4) 연구결과 요약

- ① 필터 신소재 담지용 바이러스 불활화 물질 선발을 위해 조류인플루엔자바이러스(AIV)를 중화하거나 또는 바이러스에 결합능을 가진 난황항체(IgY)의 생산을 위한 전략을 수립하고 이를 완료하였다.

- ② 필터 신소재 담지용 바이러스 불활화 물질 선발을 위해 담지전 바이러스에 대한 조류인플루엔자 난황항체(IgY)의 중화효율 분석을 위해서 ELISA법을 실시하였으며, 완료하였다.

- ③ 조류인플루엔자바이러스(AIV)를 중화하거나 또는 바이러스에 결합능을 가진 난황항체와 신소재간의 결합능을 평가하는데 필요한 분석방법을 선정하고, 평가방법을 설정하였다.

2. 조류인플루엔자 바이러스 흡착효율 및 불활화 분석기술 개발

가. 필터 신소재의 조류인플루엔자 바이러스 차단 효율 분석

(1) 필터 신소재의 조류인플루엔자 바이러스 차단 효율 분석 방법 및 결과

(가) 인플루엔자 바이러스에 대한 FITC-conjugated IgY 제조

정제한 IgY 항체에 fluorescent인 FITC를 1:1,000 (FITC : IgY)의 비율로 1mL 0.1M carbonate -bicarbonate buffer(pH 9.5)에 첨가한 후 실온, 암실 환경에서 2시간 동안 반응을 시켰다. 반응액을 Sephadex G50으로 겔 필터링을 시킨 후, FITC coupling efficiency를 확인하였다. 0.22 μ m 필터링한 후, 4 $^{\circ}$ C 암실조건에서 보관하였다.

(나) 바이러스 분사 및 포집

실험 바이러스주(인플루엔자 바이러스, AI)를 실험군(항체를 담지한 섬유)와 대조군(항체를 담지하지 않은 섬유)를 바이러스 passthrough 장치(자체 고안)에 알맞게 장착한 다음, 실험군과 대조군에 맞는 실험 바이러스주(10^6 TCID₅₀/100ml)와 바이러스 희석액(PBS)을 분사기를 이용하여 흡입부에 분부하고 10분간 충분한 흡착이 이루어지도록 하였다. 음성 대조군을 먼저 수행을 하는 것을 원칙으로 하며, 모든 실험은 각각 3회씩 수행하였다.

(다) 면역형광항체법 수행

바이러스와 바이러스 희석액이 여과된 필터를 3% BSA에 1시간 blocking을 시켰다. 0.2% tween 20으로 3회 세척을 실시한 후에 1:2000으로 3% BSA에 희석한 FITC-conjugated IgY에 37 $^{\circ}$ C에 30분간 반응을 하였다. 0.2% tween 20으로 3회 세척을 실시한 후, fluorescence microscope (Leica, wetzlar, Germany)로 관찰하여 바이러스 유·무를 확인하였다. Fluorescence microscope으로 확인한 결과 실험군(항체를 담지한 섬유)과 대조군(항체를 담지하지 않은 섬유) 간의 유의적인 차이점을 확인할 수 없었으며, 항체를 담지한 섬유의 바이러스 제거율 차이로 유도된 것인지, 바이러스를 확인할 수 있는 방법상의 차이인지를 확인하기 위해 보다 더 정밀한 분석법을 모색하였다.

나. 항체 축매 담지 필터의 조류 인플루엔자 불활화 효능 분석

(1) 항체 축매 담지 필터의 조류 인플루엔자 불활화 효능 분석 방법 및 결과

(가) 바이러스 분사 및 포집

수행 방법은 바이러스 차단 효율 분석 방법과 동일하며, 다음과 같다. 실험 바이러스주(AI)를 실험군(항체를 담지한 섬유)와 대조군(항체를 담지하지 않은 섬유)를 바이러스 passthrough 장치(자체 고안)에 알맞게 장착한 다음, 실험군과 대조군에 맞는 실험 바이러스주와 바이러스

희석액(PBS)을 분사기를 이용하여 흡입부에 분부하고 10분간 충분한 흡착이 이루어지도록 하였다. 본 실험에서는 음성 대조군을 먼저 수행을 하는 것을 원칙으로 하며, 모든 실험은 각각 3회씩 수행하였다.

(나) 바이러스 용출 및 농축

바이러스 분사 실험이 종료 후, 신소재 필터를 Beef extract(pH9.5) 500ml에 담그고, stirrer를 이용하여 10분간 반응을 하여 바이러스가 용출되도록 하였다. 필터를 제거하고 4℃ 조건 속에서 30분간 교반하였다. 교반액을 4℃, 3,500rpm, 15분간 원심분리한 후 상층액을 배양성 바이러스 검출 시험에 사용하였다. 미생물학적인 오염 요인을 제거하기 위해 0.22 μ m에 필터 처리하였다.

(다) 시료 접종

시료를 접종할 때에는 시료군마다 음성·양성 대조군을 함께 실시하였다. MDCK 세포를 T25 flask에 90% 점유율을 보일 때 농축 시료 0.75ml를 접종하였다. 2시간 동안 바이러스를 흡착 시킨 후에 7.5% fetal calf serum(FCS)가 함유된 DMEM 배지 첨가 후, 총 7일간 바이러스의 세포병변효과(cytopathic effect, CPE)를 현미경으로 관찰하였다. 관찰시 75% 이상 세포변성을 보이는 것을 양성으로 판정하였다. 본 실험 수행 결과 실험군(항체를 담지한 섬유)과 대조군(항체를 담지하지 않은 섬유) 간의 유의적인 차이점을 확인할 수 없었으며, 항체 담지 방법 및 바이러스 분사시의 압력에 대한 전반적인 재검토가 필요할 것으로 사료되며, 현재 다양한 조건 설정 속에서 수행 중에 있다. 또한 본 연구목표 달성을 위한 대책으로써 바이러스를 불활화 시킬 수 있는 새로운 방법을 모색하였다.

다. 항세균성·항바이러스성 평가

(1) 항세균성·항바이러스성 평가 방법 및 결과

(가) 시료

주관기관에서 제공한 N-Halamine 부직포를 증류수로 수세 후 자연 건조하여 사용하였다. 음성 대조군으로는 가교 및 할라민 처리하지 않은 키토산/하이드록시아파타이트 부직포를 사용하였다.

(나) N-halamine 부직포의 항세균성 효과 검증시험

합성된 섬유소의 항세균성 효과 검증을 위해 Kirby-Bauer method를 기본으로 하여 실시하였다. 표준 균주로는 그람 음성균의 대표균주인 *Escherichia coli*(ATCC 25922)와 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus subsp.aureus*(ATCC25923)를 사용하였다. NCCLS 디스크확산법을 기본으로 하여 본 연구를 수행하였다. 그람 음성 간균과 그람 양성 간균에서 >100mm이상의

zoon을 형성하여 상당히 강한 항균 효과를 보였다.[13]

(2) Hydroxyapatite/키토산 섬유 부직포의 N-halamine 섬유 항바이러스 효과 검증시험

(가) 실험재료

① 실험 바이러스 I : H9N2형 인플루엔자바이러스

(AIV, stock virus: $10^{7.3}$ EID₅₀/ml)

- 10일령 SPF란에 바이러스를 200ul씩 접종하여 37℃ 부란기에서 2일간 배양 증식 후, chilling 하여 바이러스액을 확보하였다. 확보한 바이러스액을 SPF종란에 십진 희석한 바이러스액을 0.1ml씩 접종하여 EID50를 산정하였다. 수확된 바이러스는 -80도에 보관하였다.

② 실험 바이러스 II : Canine distemper virus

(CDV, stock virus: $10^{5.25}$ TCID₅₀/ml)

- CDV는 family Paramyxoviridae에 속하며, 사람의 Measles 바이러스와 같은 속에 속한다. African green monkey kidney cell(Vero cell)에 바이러스 액 0.5ml를 접종한 후, 5일간 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. Freezing & thawing 과정을 3회 반복한 후, 4℃, 3,000 rpm, 15min 원심 후 상층액을 수확한 후 바이러스 역가를 확인하였다. 수확된 바이러스는 -80도에 보관하였다. [16]

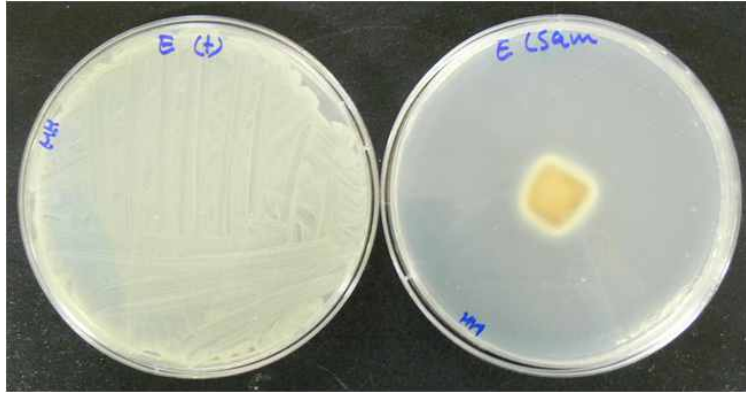


그림 3-43. 그람 음성균 항생제 감수성 검사 결과

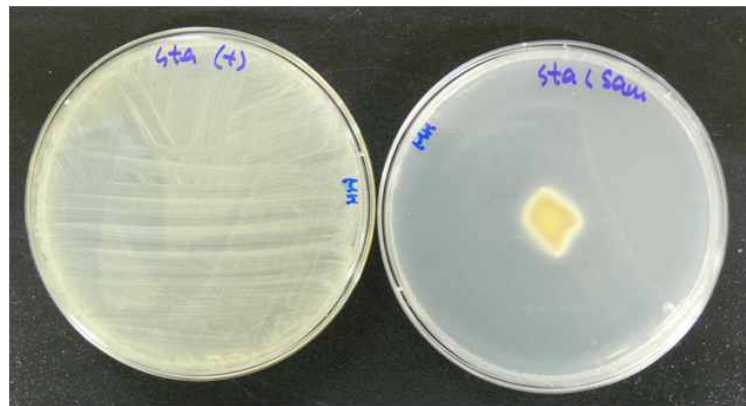


그림 3-44. 그람 양성균 항생제 감수성 검사 결과

(나) 불활성 검사 실험방법(Deactivation Examination)

Hydroxyapatite/키토산 섬유 부직포 N-halamine 섬유의 항바이러스성 효과를 측정하기 위하여 tissue culture infective dose₅₀(TCID₅₀)과 egg infective dose₅₀ (EID₅₀) 방법으로 검증하였다.

① H9N2형 인플루엔자바이러스 (AIV, stock virus: 10^{7.3} EID₅₀/ml)

- 인플루엔자 바이러스는 EID₅₀의 방법으로 산정하였다. 방법은 다음과 같다. 샘플 섬유 (sample fibrous materials), 음성 대조군(blank sample)과 양성 대조군 50ml tube에 10mg/ml로 측정하여 넣고 AIV 45ml의 바이러스 액을 혼합한 후, 25℃ 진탕 혼합 배양기에서 22시간 동안 배양하였다. 배양된 시료 중 5ml를 새로운 tube로 옮긴 후 3,000 rpm 30분간 원심하였다. 상층액을 수확한 후 상층액을 10진 희석하여 준비된 SPF 종란에 0.1ml씩 접종한 후 37℃ 부란기에서 배양하였다. 2일간 관찰 후 chilling하여 요막강액을 수확하여 혈구응집 반응을 실시하였다. 혈구응집반응 (HA, Hemagglutination assay)은 다음과 같다. PBS에서 1/2 단계 희석된 바이러스를 96 well micro plate에 50 µl 씩 분주하고, 1% 닭적혈구를 동량 분주한다. RT에서 40분간 방치한후 결과를 관독하여 HAU (Hemagglutination Unit) 역가를 확인하였다.[11]

② Canine distemper virus (CDV, stock virus: 10^{5.25} TCID₅₀/ml)

- 샘플 섬유(sample fibrous materials), 음성 대조군(blank sample)과 양성 대조군 50ml

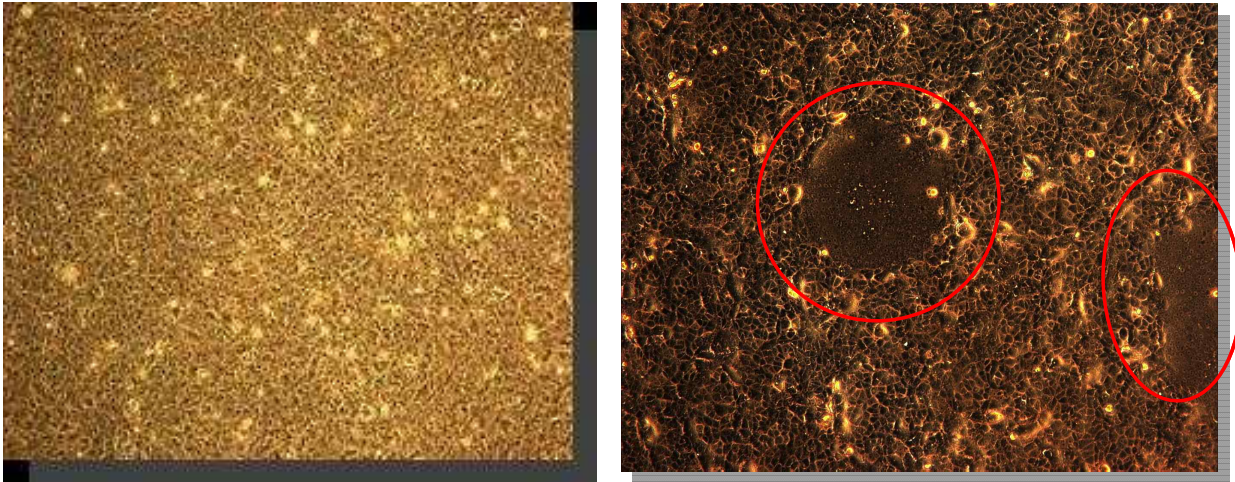
tube에 10mg/ml로 측정하여 넣고 CDV 45ml의 바이러스 액을 혼합한 후, 25℃ 진탕 혼합 배양기에서 22시간 동안 배양하였다. 배양된 시료 중 5ml를 새로운 tube로 옮긴 후 3,000 rpm 30분간 원심하였다. 상층액을 수확한 후 상층액을 10진 희석하여 준비된 96 well African green monkey kidney cell(Vero cell)에 100ul씩 접종하였다. 1시간 동안 감작한 후 2% FBS가 첨가된 DMEM 배지로 교환하였다. 7일간 cytopathic effect(CPE)를 관찰하였다. [9]

(다) 실험결과

CDV 바이러스는 세포내 병변을 관찰하여 TCID50을 측정하였으며, AIV는 혈구응집반응으로 측정하였다.



그림 3-45. AI 바이러스 접종 및 HA test



음성

양성

그림 3-46. CDV CPE 양상

$$\text{Rate of virus deactivation(\%)} = 100 \times \left(\frac{10^{(\text{virus infectivity of blank})} - 10^{(\text{viral infectivity of sample})}}{10^{(\text{viral infectivity of blank})}} \right)$$

불활성된 바이러스는 다음과 같은 식을 기본으로 하여 산정하였다. 실험결과, Hydroxyapatite/키토산 섬유 부직포의 N-halamine 섬유가 두 종의 바이러스(AIV, CDV)에 대해서 100%의 불활성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

표 3-15. 바이러스 종류에 따른 섬유의 바이러스 불활화 효과

| | Fiber concentration (mg/mL) | Deactivation rate (%) |
|-----|-----------------------------|-----------------------|
| AIV | 10 | >99.99 |
| CDV | 10 | >99.99 |

(3) 난황항체 담지 기술 개발

(가) 단백질 마이크로어레이(microarray) 기술 : CM(carboxyl methyl)-dextran

항체는 핵산과 달리 자체의 특징적인 구조에 의해 기능을 나타내는 고분자이다. 때문에 담지를 위한 처리과정에서 구조가 변형되면 항체는 활성을 잃어버리게 된다. 그러므로 섬유 표면에 단백질을 활성을 유지한 채로 효율적으로 고정하는 기술은 담지기술에서 핵심적이라고 할 수 있다. 이와 관련되어 현재 활발히 연구되고 있는 분야는 단백질 마이크로어레이 기술이다. 단백질 마이크로어레이 기술을 활용하여 항체를 담지 시키는 기술은 크게 표면을 개질시킴으로써 변형되지 않은 단백질을 고정하는 방법과 표면에 효율적으로 부착될 수 있도록 표지를

달아 항체를 변형하여 고정하는 방법이 있다. 항체는 단백질로 특징적인 항원-항체 반응을 형성하기 위해서는 자체 구조 유지가 필수적이기 때문에 항체를 변화시키지 않으면서 표면을 개질시키는 가장 일반적인 방법인 CM(carboxyl methyl)-dextran을 이용하여 형성된 자기조립 단분자막(self-assembled monolayer, SAM)을 활용하는 것이 가장 효과적이다.[14]

(나) 자기조립단분자막의 제조

항체를 담지 하고자 하는 소재를 아민기로 종결된 cystamine 수용액(100mM)에 담가 SAM을 제조하였다.

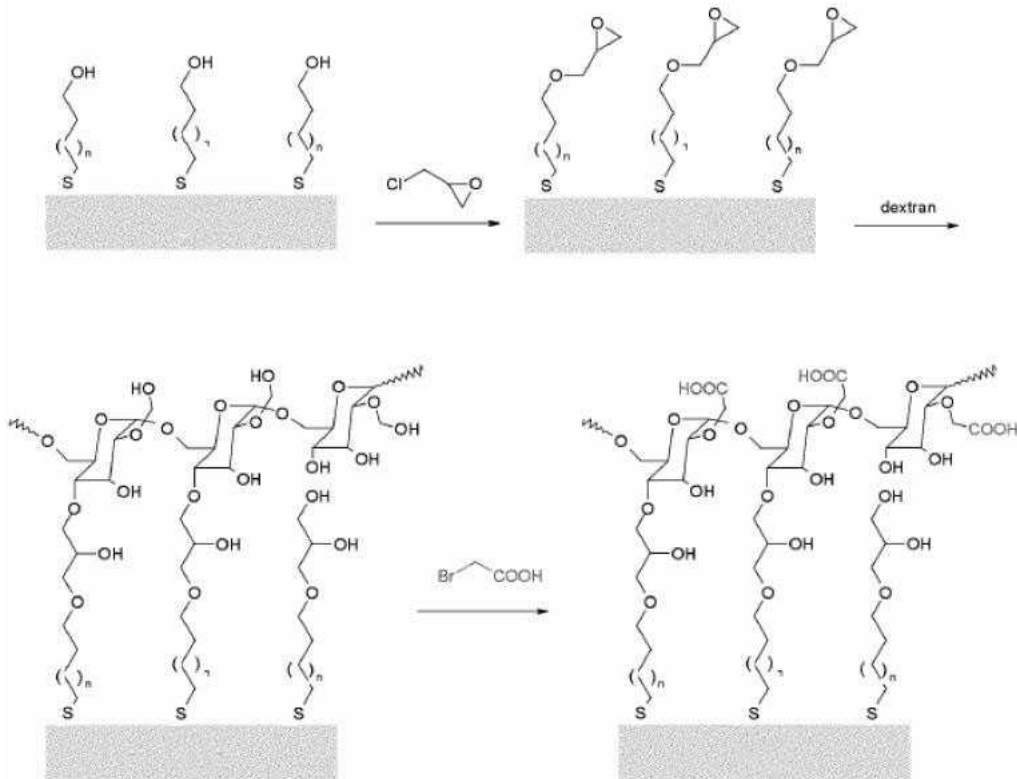


그림 3-47. carboxyl기로 종결된 dextran

(다) 자기조립단분자막을 이용한 항체 monolayer 제조 방법

amine기로 종결된 alkanethiol을 섬유와 반응시켜 자기조립단분자막을 제조하고 항체분자를 공유 결합시켜 monolayer를 형성시켰다. 섬유 표면에서의 단분자막은 주로 amine 또는 imine 결합을 통해 이루어진다.

▷ 항체 분자의 monolayer 제조

항체분자를 분리·정제하여 cystamine SAM을 형성시킨 섬유 표면을 정제된 단백질과 1시간동안 반응시켜 단분자막을 제조하였다.[10]

(라) 단분자막 형성에 따른 결합 항체의 효과성 및 항원 결합능 평가

형광현미경(fluorescence microscopy)를 이용하여 항체의 농도, 시간 및 pH 등의 조건에 따른 섬유상에 결합된 항체의 양을 판단하였다. 이때 사용되는 형광표지인자는 488nm의 파장을 선택적으로 흡수하고 505nm 근처의 긴파장을 방사하는 특성을 지니고 있는 FITC(fluorescein isothiocyanate)로 표지된 2차 항체를 이용하였다.[8]

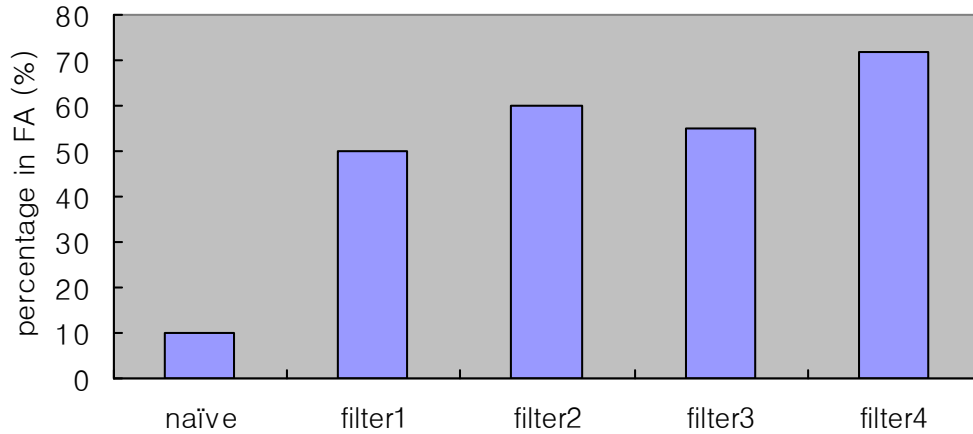


그림 3-48. 결합 항체의 효과성

(마) 단분자막 형성에 따른 결합 항체의 효과성 및 항원 결합능 평가 결과

filter 4 샘플이 가장 최상의 FA 수치를 나타내어 본 시료로 차후 실험을 진행하였다.

3. 필터 신소재의 조류인플루엔자 바이러스 차단효율 분석

가. 필터 신소재의 조류인플루엔자 바이러스 차단효율 분석 및 방법

(1) 필터 신소재의 조류인플루엔자 바이러스 불활성화 평가

(가) 인플루엔자 바이러스 흡착성능 및 불활화 효능 분석

개발된 항바이러스 섬유소재의 항바이러스 효과를 측정하기 위하여 tissue culture infective dose₅₀(TCID₅₀)과 egg infective dose₅₀ (EID₅₀) 방법으로 검증하였다.[7] 샘플 섬유(sample fibrous materials), 음성 대조군(blank sample)과 양성 대조군 50ml tube에 10mg/ml로 측정하여 넣고 인플루엔자 바이러스는 EID₅₀의 방법으로 산정하였다. 방법은 다음과 같다. 샘플 섬유(sample fibrous materials), 음성 대조군(blank sample)과 양성 대조군 50ml tube에 10mg/ml로 측정하여 넣고 AIV 45ml의 바이러스 액을 혼합한 후, 25℃ 진탕 혼합 배양기에서 22시간 동안 배양하였다. 배양된 시료 중 5ml를 새로운 tube로 옮긴 후 3,000 rpm 30분간 원심하였다. 상층액을 수확한 후 상층액을 10진 희석하여 준비된 SPF 종란에 0.1ml씩 접종한 후 37℃ 부란기에서 배양하였다. 2일간 관찰 후 chilling하여 요막강액을 수확하여 혈구응집 반응을 실시하였다. 혈구응집반응 (HA, Hemagglutination assay)은 다음과 같다. PBS에서 1/2 단계 희석된 바이러스를 96 well micro plate에 50 µl 씩 분주하고, 1% 닭적혈구를 동량 분주한다. RT에서 40분간 방치한후 결과를 판독하여 HAU (Hemagglutination Unit) 역가를 확인하였다. [6]

(나) 섬유소재 별 바이러스 불활화 효능 분석

바이러스 흡착 성능이 확인된 키토산/HAp 복합섬유에 항바이러스 특성을 갖는 유/무기 물질을 복합하여 제조한 필터용 섬유소재 별 바이러스 불활성화 효능을 분석하였다.

① N-halamine 성분 도입 섬유소재의 바이러스 불활성화 효능

㉔ N-halamine 성분의 항바이러스 특성 분석(용액상 예비시험)

| 처리 바이러스 | 시험용액 | 희석배율 | 바이러스 불활화율 | 최종희석배수 |
|---------|------------|-----------------------------------|-----------|--------|
| IFV | N-halamine | 원액 | 100% | 1:20 |
| | | 1:10 | 100% | |
| | | 1:20 | 100% | |
| | | 1:50 | 0% | |
| 검사 소견 | | 1: 20 배 희석 농도에서 100% 항바이러스 효과를 보임 | | |

㉔ N-halamine 유효농도별 키토산/HAp 복합섬유의 바이러스 불활성화 효능

- 공시 바이러스

| 구 분 | 균독주명 | 공시 표준주 | 비 고 |
|------------|-----------------------|-----------------|---|
| 인플루엔자 바이러스 | Influenza virus (Flu) | A/NWS/33 (H1N1) | 10 ^{6.0} EID ₅₀ /ml |

- 실험 방법

: 공시된 섬유를 1 cm × 0.5 cm (가로 × 세로)로 멸균된 가위를 이용하여 잘게 잘라 주었다. 섬유 450mg당 바이러스액 45ml (10mg/ml)로 첨가하여 25℃, 225 rpm, 20hr shaking 하였다. 바이러스에 감염된 섬유 tube를 3,000 rpm, 15min, 4℃ 원심분리한 후, 상층액 1ml을 취하여 EID titration을 실시하였다. [15]

- 실험 결과

| 처리구 | Flu 양성수 / 발육란 접종수 | | | | | | log10 (EID ₅₀ /ml) |
|------------------|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------------------|
| | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | |
| 일반필터용 섬유 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 6.5 |
| N-halamine(0.4%) | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 6.5 |
| N-halamine(0.8%) | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 6.5 |
| N-halamine(1.2%) | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 3/5 | 0/5 | 0/5 | 6.1 |
| N-halamine(1.6%) | 5/5 | 5/5 | 4/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 4.5 |
| N-halamine(2.0%) | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0 |
| 검사 소견 | N-halamine 1.2%에서부터 항바이러스 특성을 보이며 2.0%에서 100%의 항바이러스 특성을 보임 | | | | | | |

② 항균성 물질(실버) 도입 섬유소재의 바이러스 불활성화 효능

㉕ 나노실버 성분의 항바이러스성 예비시험(용액상)

| 처리 바이러스 | 시험조건 | 희석배율 | 바이러스 불활화율 | 최종희석 배수 |
|---------|-----------------------------------|-------|-----------|---------|
| IFV | Colloidal nano-silver | 원액 | 100% | 1:50 |
| | | 1:50 | 100% | |
| | | 1:100 | 0% | |
| | | 1:200 | 0% | |
| 검사 소견 | 1: 50 배 희석 농도에서 100% 항바이러스 효과를 보임 | | | |

㉔ 나노실버 키토산/HAp 복합섬유의 바이러스 불활성화 효능

-시험방법 및 공시균주는 상기 동일

-실험 결과

| 처리구 | Flu 양성수 / 발육란 접종수 | | | | | | log10 (EID ₅₀ /ml) |
|------------|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------------------|
| | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | |
| 일반필터용 섬유 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 6.5 |
| 나노실버(0.5%) | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 6.5 |
| 나노실버(1.0%) | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 6.5 |
| 나노실버(2.0%) | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 3/5 | 0/5 | 0/5 | 6.1 |
| 검사 소견 | 나노실버 함량 2%에서 약간의 항바이러스 성을 보이나 전반적으로 효과가 미약함 | | | | | | |

㉕ 구리이온 도입 키토산/HAp 복합섬유의 바이러스 불활성화 효능

㉖ 구리이온 농도별 항바이러스 특성 예비시험(용액상 처리)

| 처리구 | Flu 양성수 / 발육란 접종수 | | | | | | log10 (EID ₅₀ /ml) |
|----------------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------------------|
| | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁸ | |
| 키토산 100% | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 1/4 | 0/4 | 8.75 |
| 황산구리 0.5% 처리 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0 |
| 황산구리 1% 처리 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0 |
| 황산구리 5% 처리 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0 |
| 황산구리 10% 처리 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0 |
| 10% 키토산 섬유 함유 부직포 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0 |
| 5% 키토산 섬유 함유 부직포 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0 |
| 검사 소견 | 대조군(키토산 100%)과 비교하여 황산구리의 함량이 늘어날수록 항바이러스 효과가 증진된다는 사실을 알 수 있었다. 또한 0.5%이상의 농도에서 완벽하게 저해됨을 알 수 있었다. 키토산의 함량을 변화시켜 확인한 결과도 동일하였다. | | | | | | |

㉔ 키토산/HAp 구리복합섬유의 바이러스 불활성화 효능

-시험방법 및 공시균주는 상기 동일

| 처리구 | Flu 양성수 / 발육란 접종수 | | | | | | log10 (EID ₅₀ /ml) |
|------------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------------------|
| | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁸ | |
| 대조섬유 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 2/4 | 1/4 | 0/4 | 7.0 |
| 구리 3,000 ppm | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 1.25 |
| 구리 6,000 ppm | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 1.50 |
| 구리 12,000 ppm | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0 |
| 검사 소견 | 대조군(키토산 100%)과 비교하여 좀더 세밀한 구리 농도에서 실험을 실시한 결과 6,000ppm까지는 대조군과 비교하여 감소되는 양상을 보였지만 완벽한 저해 양상을 볼 수 는 없었지만 12,000ppm에서 부터는 완벽한 억제를 보였다. | | | | | | |

(다) 섬유소재의 항미생물 특성 분석

-바이러스 불활성화 효과와 더불어 개발 섬유소재 별 항미생물성을 그람음성균과 그람양성균에 대하여 각각 평가 하였다

-시험결과

| 시료구분 | 시료명 | | 시험 균주명 (억제대; mm) | |
|----------|--|----------|---------------------|----------------|
| | | | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> |
| 대조군 | 미처리 | | 0 | 0 |
| Halamine | N-Halamine 0.1% | | 0 | 0 |
| | N-Halamine 0.2% | | 26 | 16 |
| | N-Halamine 0.3% | | 47 | 29 |
| | N-Halamine 0.4% | | 69 | 48 |
| | N-Halamine 0.5% | | 78 | 56 |
| Cu | Cu-1% 섬유중량대비 | | 0 | 0 |
| | Cu-2% 섬유중량대비 | | 0 | 0 |
| | Cu-4% 섬유중량대비 | | 0 | 0 |
| | Cu-8% 섬유중량대비 | | 0 | 0 |
| | Cu-16% 섬유중량대비 | | 0 | 0 |
| Ag | 2-1 | Ag-0.25% | 13 | 0 |
| | 2-2 | Ag-0.5% | 15 | 13 |
| | 2-3 | Ag-1% | 12 | 12 |
| | 2-4 | Ag-2% | 14 | 14 |
| | 2-5 | Ag-4% | 11 | 13 |
| 검사 소견 | 대조군과 비교하여 할라민은 함량이 늘어날 수록 그람 양성균과 음성균의 항세균 효과가 증진된다는 사실을 알 수 있었고, 은(Ag)는 함량과 무관하게 항세균 효과가 일정하게 보였다. 그러나 구리(Cu)는 함량과 상관없이 항세균효과를 보이지 않았다. | | | |

(라) 개발 섬유소재의 항바이러스성 평가 결과 고찰

① 섬유소재의 항바이러스 성

-N-halamine의 농도가 증가함에 따라 항바이러스 특성이 증가하였으며 유효농도를 고려하여 복합섬유를 제조한 결과 2.0%에서 완벽한 항바이러스 특성을 보였다. 또한 바이러스 사멸에 소모된 halamine성분을 저렴한 비용에 충전할 수 있는 장점이 있으므로 항바이러스 필터 소재에 적용이 가능할 것으로 판단된다

-강력한 항균제로 알려진 나노실버의 경우 용액농도에서는 1:50배 비율에서 항바이러스 특성을 나타냈으나, 복합섬유로 제조한 경우 만족할 성능을 보이지 못하였다. 이는 복합섬유 제조시 나노입자의 일부 재응집으로 바이러스에 대한 유효 접촉면적이 감소한 것으로 추정되며 비교적 高價인 나노실버의 농도를 제한적으로 사용할 수 밖에 없는 점에 비추어 볼 때 항바이러스 필터용 섬유소재로 적용하기에는 적합지 않은 것으로 판단된다

-구리이온은 낮은농도에서 항바이러스 특성을 나타냈으며 복합섬유로 제조시에도 우수한 항바이러스 특성을 보여 필터 섬유소재로 적용이 가능할 것으로 판단된다. 비용과 안전성 측면을 고려할 때 인체보호용 마스크 필터 보다는 축사용 공조필터 적용이 바람직할 것으로 판단된다

제 3절. 필터신소재 동물감염 억제성 분석기술 개발

1. 조류인플루엔자 바이러스 중화 담지물질 선발 기술 개발

가. 재료 및 방법

(1). 재료

- 조류인플루엔자 바이러스에 대한 단클론 항체 hybridoma 2종: 3B19, 10E21
- 조류인플루엔자 바이러스 중화 Aptamer
- 필터신소재 하이드록시아파타이트(Hydroxyapatite: HAp) 복합섬유
- 저병원성 조류인플루엔자 바이러스(H9N2), 돼지인플루엔자 바이러스(H1N1) 등

(2). 연구전략 및 방법

(가) 필터 신소재 담지용 바이러스불활화 물질 선발

①. 조류인플루엔자 바이러스에 대한 단클론 항체의 scFv 단백질 확보

- 단클론 항체 hybridoma에서 scFv (single chain fragment variable) 유전자 증폭을 위한 전략수립
- 단클론 항체 hybridoma에서 scFv 유전자 증폭을 위한 primer 설계 및 합성
- 조류인플루엔자 바이러스에 대한 단클론 항체 hybridoma에서 scFv VH 및 VL 유전자 증폭
- 증폭된 scFv VH 및 VL 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석
- VH 및 VL 유전자를 이용한 scFv 유전자 작성 및 염기서열 분석 확인
- scFv 단백질의 대장균 또는 Baculovirus 발현 시스템에서의 발현

(나) 조류인플루엔자 바이러스 중화 aptamer의 확보

- 조류인플루엔자 바이러스 중화 aptamer에 대한 정보 수집
- 조류인플루엔자 바이러스 중화 aptamer의 합성

(3). 선발된 담지용 물질의 조류인플루엔자 바이러스 중화효율 조사

(가) 대장균 또는 Baculovirus 발현 시스템에서의 발현된 scFv 단백질의 인플루엔자 바이러스에 대한 중화능 조사

(나) 합성된 조류인플루엔자 바이러스 중화 Aptamer의 인플루엔자 바이러스에 대한 중화능 조사

(4). 선발된 담지용 물질의 특성분석

- 대장균 또는 Baculovirus 발현 시스템에서의 발현된 scFv 단백질의 HAp와의 결합능 조사

나. 연구결과

(1) 필터 담지용 조류인플루엔자 바이러스에 대한 단클론 항체의 scFv 단백질 작성

(가) 단클론 항체 hybridoma에서 scFv 유전자 증폭을 위한 전략 수립

인플루엔자바이러스와 결합능이 있는 단클론항체 선발 및 scFv 발현을 목표로 단클론 항체 선발과 마우스 Fab (fragment antibody) 유전자 클로닝용 primer 제작 및 이를 사용하여 PED 증화항체를 생산하는 교잡세포주로부터 mRNA 추출 및 V_H (variable heavy) 및 V_L (variable light) 유전자 증폭과 이들을 링커로 연결하여 scFv (single chain fragment variable) 유전자 작성하고자 그림 3-49과 같이 전략을 수립 하였다.

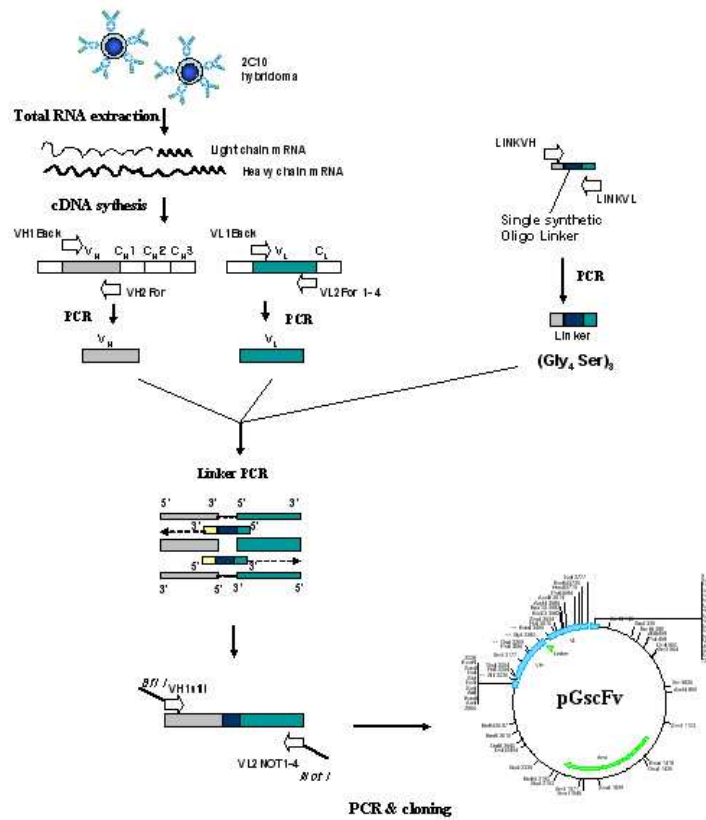


그림 3-49. 항체의 scFv 유전자 클로닝을 위한 전략 모식도

(나) 단클론 항체 hybridoma에서 scFv 유전자 증폭을 위한 primer 설계 및 합성

Total RNA로부터 2C10 VH 및 VL 유전자의 증폭, 클로닝은 Klebber 등(1997)이 보고한 논문 및 Burmester와 Pluckthun (2001, Kontermann과 Dubel [eds], “antibody

Engineering[Springer])의 2장을 참조하여 마우스의 VH 및 VL 유전자를 증폭하기 위한 프라이머를 그림 3-50와 같이 설계하였다. VH 센스 프라이머는 VH 유전자의 일차적 증폭을 위해 “VH1BACK” 프라이머를 설계하였으며 링커 연결 후 발현벡터로의 삽입을 위한 제한 효소 사이트인 SfiI을 5' 말단에 연장시키고 개시코돈을 삽입시킨 “VH1sfiI” 프라이머를 설계하였다. VH 안티센스 프라이머는 cDNA 합성 및 VH 유전자 일차적 증폭을 위해 “VH2FOR” 프라이머를 설계하고 각 프라이머들은 올리고핵산을 주문합성(Bioneer, Korea)하여 사용 하였다.

VL 센스 프라이머는 VL 유전자의 일차적 증폭을 위해 “VL1BACK” 프라이머를 설계하였으며 VL 안티센스 프라이머는 cDNA 합성 및 VH 유전자 일차적 증폭을 위해 VL 유전자 3' 말단의 다양성에 때문에 4종의 프라이머 즉, “VL2FOR1”, “VL2FOR2”, “VL2FOR3” 및 “VL2FOR4” 를 설계하였고 링커 연결 후 발현벡터로의 삽입을 위한 제한효소 사이트인 NotI을 각각의 VL 안티센스 프라이머의 5' 말단에 연장시키고 stop 코돈을 삽입시킨 4종의 “VL2NOT1”, “VL2NOT2”, “VL2NOT3” 및 “VL2NOT4” 프라이머를 설계하였고 올리고핵산을 주문합성(Bioneer, Korea)하여 사용하였다.

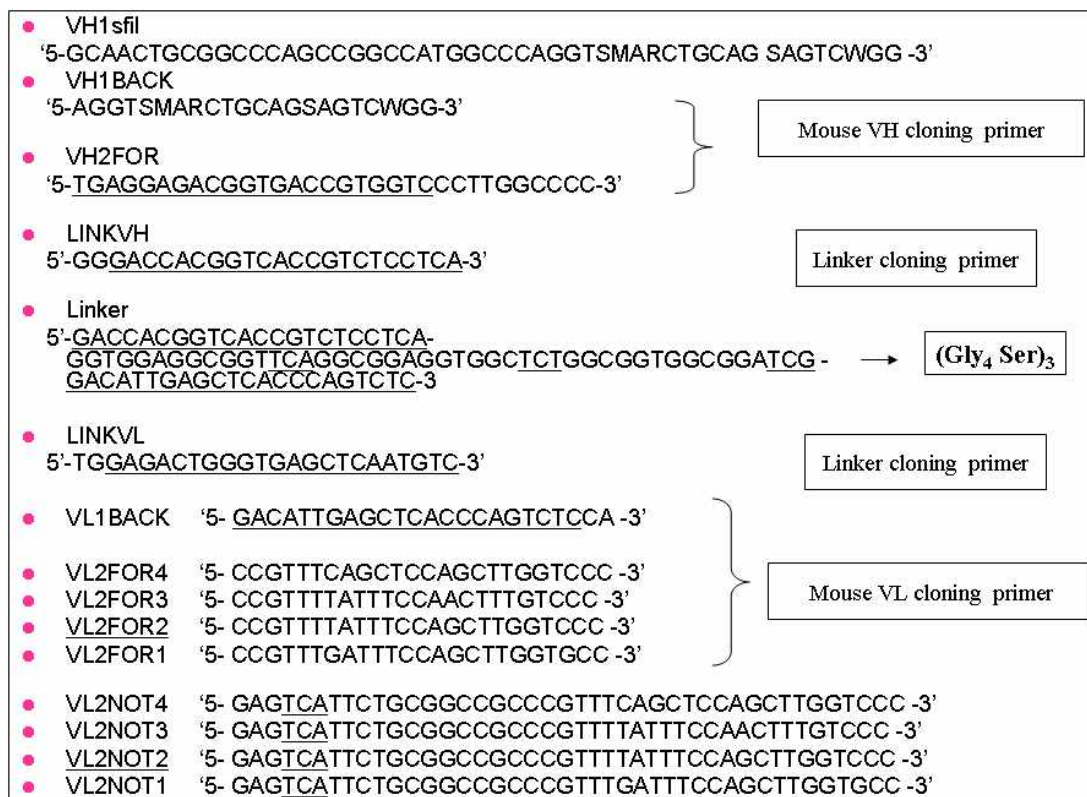


그림 3-50. 항체의 scFv 유전자 클로닝을 위한 primer

(다) 조류인플루엔자 바이러스에 대한 단클론 항체 hybridoma에서 scFv 유전자 증폭

인플루엔자바이러스에 반응하는 마우스 단클론항체 hybridoma 2종(3B19, 10E21)으로부터 scFv 유전자를 클로닝하기 위해 먼저 그림 1과 같이 RT-PCR 방법을 이용하여 VH 및 VL 유전자를 클로닝하고자 hybridoma 세포로부터 total RNA를 분리하여 cDNA를 제작하였다. Total RNA의 추출은 RNeasy mini kit(Qiagen)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 추출하였고 추출한 total RNA는 -70°C 에 보관, 사용하였다.

VH 유전자를 클로닝하기 위해 우선 추출한 total RNA $2\mu\text{g}$ 과 2 pmole의 VH 안티센스 프라이머 "VH2FOR"를 사용하였고, VL 유전자를 클로닝하기 위해서는 상기에서에서 추출한 total RNA $2\mu\text{g}$ 과 VL 안티센스 프라이머 "VL2FOR1", "VL2FOR2", "VL2FOR3" 및 "VL2FOR4" 4종을 각각 0.5 pmole 씩 최종농도가 2 pmole 첨가하여 SuperScript™ II 역전사효소(Invitrogen)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 42°C 에서 50분간 반응하여 VH 및 VL 유전자의 first-strand cDNA를 각각 작성하였다.

VH 유전자 증폭을 위해서는 작성된 VH 유전자의 cDNA $5\mu\text{l}$, 10 pmole / μl 의 "VH1BACK" 및 "VH2FOR" 프라이머 각 $1\mu\text{l}$ 를 사용하였고, VL 유전자 증폭을 위해서는 작성된 VH 유전자의 cDNA $5\mu\text{l}$, 10 pmole / μl 의 "VL1BACK" $1\mu\text{l}$ 및 각 10 pmole / μl 의 "VH2FOR1", "VH2FOR2", "VH2FOR3" 및 "VH2FOR4" 프라이머를 동량으로 혼합한 $1\mu\text{l}$ 를 사용하여 Expand Long Template PCR system (Roche, Germany)으로 제조사의 방법에 따라 PCR을 실시하였다. PCR 반응조건은 94°C 2분 반응 후 94°C 10초, 54°C 30초, 68°C 4분 조건에서 10 cycle 실시 후 94°C 15초, 54°C 30초, 68°C 4분을 시작으로 매 cycle마다 20초를 증가시키는 조건에서 20 cycle을 실시한 후 68°C 에서 8분 연장 (elongation) 반응을 실시하였다. 그림 3-51은 증폭된 3B19, 10E21의 scFv의 VH 및 VL 유전자의 전기영동 사진이다.

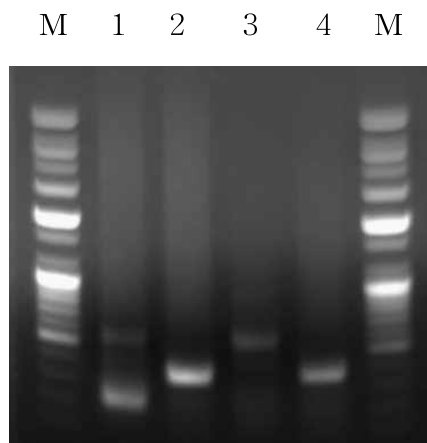


그림 3-51. 3B19, 10E21의 scFv의 VH 및 VL 유전자의 RT-PCR 결과

M: 1kb DNA size marker

- lane 1: 3B19의 VL 유전자
- lane 2: 3B19의 VH 유전자
- lane 3: 10E21의 VL 유전자
- lane 4: 10E21의 VH 유전자

증폭된 유전자의 확인을 위해 3B19, 10E21의 scFv의 VH 및 VL 유전자를 각각 pGemT-easy 벡터에 클로닝하고 염기서열을 분석하였다. 그림 3-52, 그림 3-53 및 그림 3-54는 염기서열 분석한 3B19의 VH 유전자, 3B19의 VL 유전자 및 10E21의 VH 유전자를 기존에 분석된 (PEDV에 대한 단클론항체 2C10 scFv의 VH와 VL) 유전자와 multi-alignment한 자료이다.

```

2C10scFv      30 -----gggtccaactgcagcagctcggagctgagctggttaaggcctggga
071029-R2_B0 457 ttgggagctctcccatatggtcgacctgcaggcggccgcgaattcactagtgtattagggtcaactgcaggagctctggggctgagctggagaagcctgggg
071029-R2_D0 457 ttgggagctctcccatatggtcgacctgcaggcggccgcgaattcactagtgtattagggtgaactgcaggagctcaggggctgagctggagaagcctgggg

2C10scFv      74 cttcagtgaaagtgctcctgcaggctctggatadgccttcacaaattacttgatagagtggaataaagcagagggcctggacaggtccttgagtgattgg
071029-R2_B0 357 cctcagtgaaagtgctcctgcaggcctctggctacatattaccacttacaaatgcaactgggtaaaaacagacacctggacagggcctggaaatgattgg
071029-R2_D0 357 cctcagtgaaagtgctcctgcaggcctctggctacatattaccacttacaaatgcaactgggtaaaaacagacacctggacagggcctggaaatgattgg

2C10scFv      174 agtgattaatcctgggagtggtggtactaacacaatgagaatccaagggcaagggcaaacactgactgcagacaatcctccagcactgcctacatgcag
071029-R2_B0 257 aggtattatccaggaatggtgatacttctacaatcagaagttcaaaagacaagggccacattgactgcagacatatcctccagcagccttatatgcag
071029-R2_D0 257 aggtattatccaggaatggtgatacttctacaatcagaagttcaaaagacaagggccacattgactgcagacatatcctccagcagccttatatgcag

2C10scFv      274 ctcagcagcctgacatctgactctcggctctattctgtgcaaggggttactac-gtgggggttatgctatggactactggggccaagggacc
071029-R2_B0 157 ctcagcagcctgacatctgagggactctcggatctactactgtgcaa----ggggtacgactgctgcctggttgcgct-----tactggggccaagggacc
071029-R2_D0 157 ctcagcagcctgacacctgagggactctcggatctactactgtgcaa----ggggtacgactgctgcctggttgcgct-----tactggggccaagggacc

2C10scFv      373 acggtcacctctcctca-----
071029-R2_B0 67 acggtcacctctcctcaaatcgaattcccgcggccgcagggcggccggagctggatcgcggmnn
071029-R2_D0 67 acggtcacctctcctcaaatcgaattcccgcggccgcagggcggccggagctggatcgcggmnn
  
```

그림 3-52. 3B19 scFv의 VH 유전자의 염기서열 분석 결과

```

2C10VL        1 -gacattgagctcaccagctctccagctcctctatctgcatctgtgggagaactgtcaccatcacatgtcgagcaagtgagaatattacagttattta
071029-R2_M2 265 -gacattgagctcaccagctctcca-----
071029-R2_O2 265 tgacattgagctcaccagctctcca-----
071029-16_A0 265 --aacattgagctcaccagctctcca-----

2C10VL        100 gcatggtatcagcagaaacagggaaaaatctctcagctcctggctctataatggaaaaaccttccggaaagtgtgctcaggtcacttggcagtggtg
071029-R2_M2 241 -----aagctcctgactcacaagtttccaacggattttctgggtccagacaggttcagtggcagtggtg
071029-R2_O2 240 -----aagctcctgactcacaagtttccaacggattttctgggtccagacaggttcagtggcagtggtg
071029-16_A0 242 -----aagctcctgactcacaagtttccaacggattttctgggtccagacaggttcagtggcagtggtg

2C10VL        200 caggcacacagttttctgaaagatcaacagcctgcagcctgaagattttgggagttattactgtcaacatcattatggtagtccgctcagcttgggtgc
071029-R2_M2 174 cagggcacagattacacactcaagatcagcagagtgaggctggaggatctgggagtttattactgtttcaaggttcacatgttccgtacacgttcggag
071029-R2_O2 173 cagggcacagattacacactcaagatcagcagagtgaggctggaggatctgggagtttattactgtttcaaggttcacatgttccgtacacgttcggag-
071029-16_A0 175 cagggcacagattacacactcaagatcagcagagtgaggctggaggatctgggagtttattactgtttcaaggttcacatgttccgtacacgttcggag

2C10VL        300 tgggaccaagctggaataaaaacgg-----ggggccgcagaatgactcagcgg-----
071029-R2_M2 74 ggggaccaagctggaataaaaacgggaatcgaattcccgcggccgcagggcggccggagctggatcgcggmnn-
071029-R2_O2 74 ggggaccaagctggaataaaaacgggaatcgaattcccgcggccgcagggcggccggagctggatcgcggmnn-
071029-16_A0 75 ggggaccaagctggaataaaaacgggaatcgaattcccgcggccgcagggcggccggagctggatcgcggmnnn
  
```

그림 3-53. 3B19 scFv의 VL 유전자의 염기서열 분석 결과


```

2C10scFv      1 -----gcaactgccc--tagcggcc-----atggccc-----aggtccaaactgcagcagctcggagctgagctggttaaggcctggg
071029-R2_L0 1 nnnnccggcgaaccagctccggccgctggcggcc-----gcgggaattcgattagtgaaactgcagcagctcaggcctgagctggtgagggcctggg
071029-R2_N0 1 nnnnccggcgaaccagctccggccgctggcggccgcggaatcgatt-----aggt-cagctgcagcagctcggcctgagctggtgagggcctggg

2C10scFv      73 acttcagtgaaaggttcctgcaaggcttctggatacggcttcacaattacttgatagagtgatgataaagcagagcctggacaggtccttgagtgattg
071029-R2_L0 73 gctcagtgaggtttcctgcaagggttccagctacaacattcactgattatgctgttactgggtgaaagaagagctatgcaagagctctggagtgattg
071029-R2_N0 92 gctcagtgaggtttcctgcaagggttccagctacaacattcactgattatgctgttactgggtgaaagaagagctatgcaagagctctggagtgattg

2C10scFv      173 gagtgatatactctggggagtggtggtactbaactacaatgagaattcaagggcaagggcaaccctgactgcagacaaatcctccagcactgcctacatgca
071029-R2_L0 195 gacttattagtccttactatggttaagtgtttacttcaaccagaagtttaagggcaagggcacaatgactgctagacaagctcctccagcagcctatgga
071029-R2_N0 192 gacttattagtccttactatggttaagtgtttacttcaaccagaagtttaagggcaagggcacaatgactgctagacaagctcctccagcagcctatgga

2C10scFv      273 gctcagcagcctgacatctgtagctctgaggtctatctctgtgcaagaaggggttactacgtggggggg-----tatgctatggactactggggcca
071029-R2_L0 295 acttgccagcttgacatctgaggtattctgccgtctattactgtgcaagatgctctgac-aggctggactggaattactatgctttggactactggggcca
071029-R2_N0 292 acttgccagcttgacatctgaggtattctgccgtctattactgtgcaagatgctctgac-aggctggactggaattactatgctttggactactggggcca

2C10scFv      366 agggaccacggtcaccgtctcctca-----
071029-R2_L0 394 agggaccacggtcaccgtctcctcaaatcactagtgaattcgcggccgctgcaggtcgaccatagggagagctcccacgcgttggatgcatagcttg
071029-R2_N0 391 agggaccacggtcaccgtctcctcaaatcactagtgaattcgcggccgctgcaggtcgaccatagggagagctcccacgcgttggatgcatagcttg

```

그림 3-54. 10E21 scFv의 VH 유전자의 염기서열 분석 결과

(라) 조류인플루엔자 바이러스에 대한 scFv 유전자 작성 및 발현

pGemT-easy 벡터에 클로닝하고 염기서열을 분석 확인된 3B19, 10E21의 scFv의 VH 및 VL 유전자는 그림 3-55와 같이 LINKVH 및 LINKVL과 합성된 single synthetic oligo linker와 PCR하여 작성된 linker와 함께 Linker PCR을 실시하여 scFv 유전자를 각각을 작성하였다.

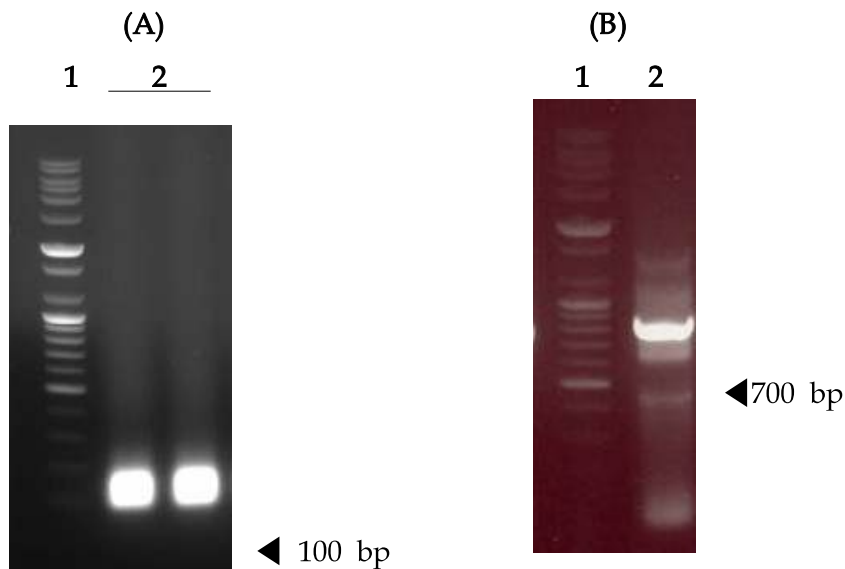


그림 3-55. 3B19 항체의 VH 및 VL 유전자와 링커 유전자를 각각 PCR 증폭하고 전기영동한 사진, A는 링커 유전자를 PCR 증폭 및 확인한 사진으로 lane 1 : 1kb size marker, lane 2 : PCR 증폭한 링커 유전자. B는 VH, VL 및 링커 유전자를 이용하여 scFv 유전자를 PCR 증폭 및 확인한 사진이며 lane 1 : 1kb size marker, lane 2 : PCR 증폭한 scFv 유전자

증폭된 3B19 scFv 유전자는 우선 pGemTeasy(Promega) 플라스미드에 TA 클로닝하여 pG3B19scFv 플라스미드를 작성하고 염기서열 분석하여 확인하였다. VH 및 VL 유전자의 프레임 워크 부위(framework regions; “FRs”)와 상보적 결정부위(complementarity

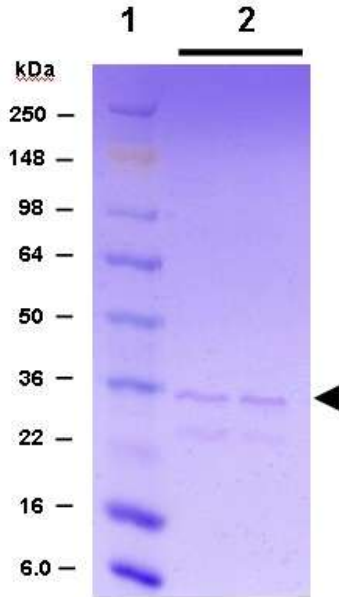


그림 3-57. 대장균에서 발현한 3B19 scFv 단백질을 정제한 후 SDS-PAGE한 사진으로 lane 1은 염색(pre-stained) 단백질 사이즈 마커, lane 2는 정제한 3B19 scFv 재조합단백질

(2). 담지용 조류인플렌자 바이러스 중화 aptamer 작성

(가) 담지용 조류인플렌자 바이러스 중화 aptamer에 대한 정보 수집 및 합성

Aptamer라 함은 *in vitro* 상에서 선발된 특정한 분자에 결합하는 DNA 또는 RNA 올리고 뉴클레오타이드를 말하며 이를 선발하는 과정을 SELEX(selective evolution of ligands by exponential enrichment)라 부른다.

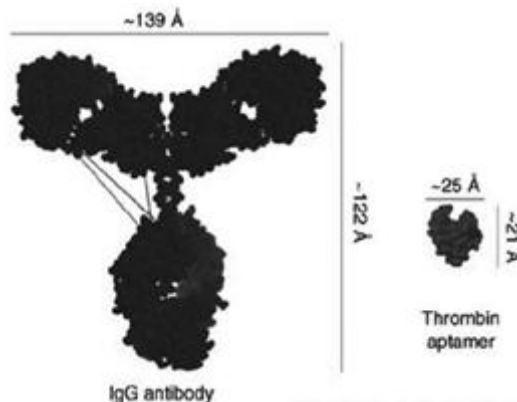


그림 3-58. 항체(좌측 그림)와 비교한 aptamer(우측 그림)의 크기 모식도

Aptamer는 그림 3-58과 같이 약 20옹스트롬 정도의 작은 물질로 염기서열로는 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG- (N)30 ~ (N)100- TATGGTCGAATAAGTTAA-3'의 특징을 갖고 있다. 이와 같이 좌우 말단에 특정한 염기서열을 가지며 중심부에 약 30~100 bp의 random sequence를 갖는 Aptamer library에서 특정한 단백질에 반응하는 aptamer를 screening하기 위해서는 우선 특정한 단백질을 준비되어야한다. 이때 사용되는 단백질은 정제 단백질 또는 발현 단백질이 보통 사용되어지며 그림 3-59와 같은 반복적인 SELEX 과정을 거쳐 단백질과 결합하는 aptamer를 증폭하는 과정을 통하여 선별되게 된다.

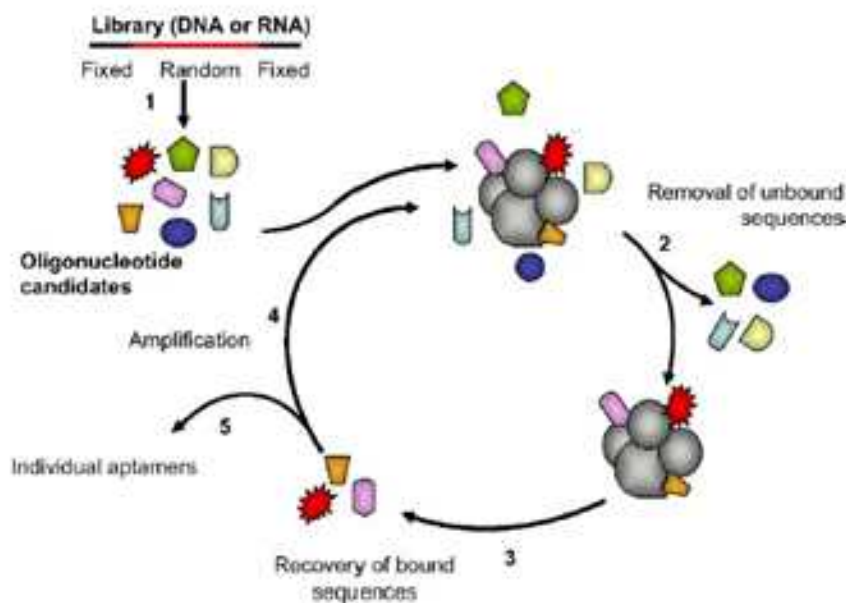


그림 3-59. SELEX 선별과정 모식도

본 연구에서는 생물학적 위험도가 높은 고병원성 조류인플루엔자를 취급하기 어렵고 재조합 단백질을 작성하기 위한 유전정보가 적고 aptamer 선별과정이 어려워 기존에 알려진 aptamer를 활용하고자 하였다.

기존에 보고된 인플루엔자 바이러스에 대한 aptamer로는 Jeon 등(2004)이 인플루엔자 바이러스의 혈구응집소(hemagglutinin)의 수용체 결합 부위를 차단하는 DNA aptamer, Misono 등(2005)이 사람 인플루엔자바이러스의 혈구응집소에 대한 RNA aptamer 그리고 Gopinath 등(2006)이 보고한 혈구응집소 관련 세포막의 융합을 억제하는 RNA aptamer 등에 대한 정보를 수집하였다.

본 연구에서 활용가능한 aptamer의 경우 HAp 복합섬유와 결합 후 안정성이 높은 DNA aptamer를 선정하였다. Jeon 등(2004)이 보고한 반응성이 가장 높은 것으로 확인된 aptamer A22를 합성하였고 A22는 68 nucleotides (5 OD, HPLC)로 구성된 oligonucleotide로서 '5-AATTA ACCCT CACTA AAGGG CTGAG TCTCA AAACC GCAAT ACACT GGTTG

TATGG TCGAA TAAGT TAA -3'의 염기서열로 구성되며 그리고 실험중 aptamer의 반응성 확인을 위해 올리고의 5' 말단에 Biotin을 표지하였다.[18]

(나) 제작된 담지용 인플렌자 바이러스 aptamer의 분석

합성한 aptamer A22의 염기서열을 mfold server(Michael Zuker & Nick Markham, Rensselaer Polytechnic Institute, <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>)에서 DNAdraw 프로그램로 folding 형태를 분석한 결과 Jeon 등(2004)이 보고와 동일한 2차 구조를 $\Delta G^0 = -5.08 \text{ kcal/mol at } 37^\circ \text{ C}$ 에서 그림 3-60과 같이 예측할 수 있었다.

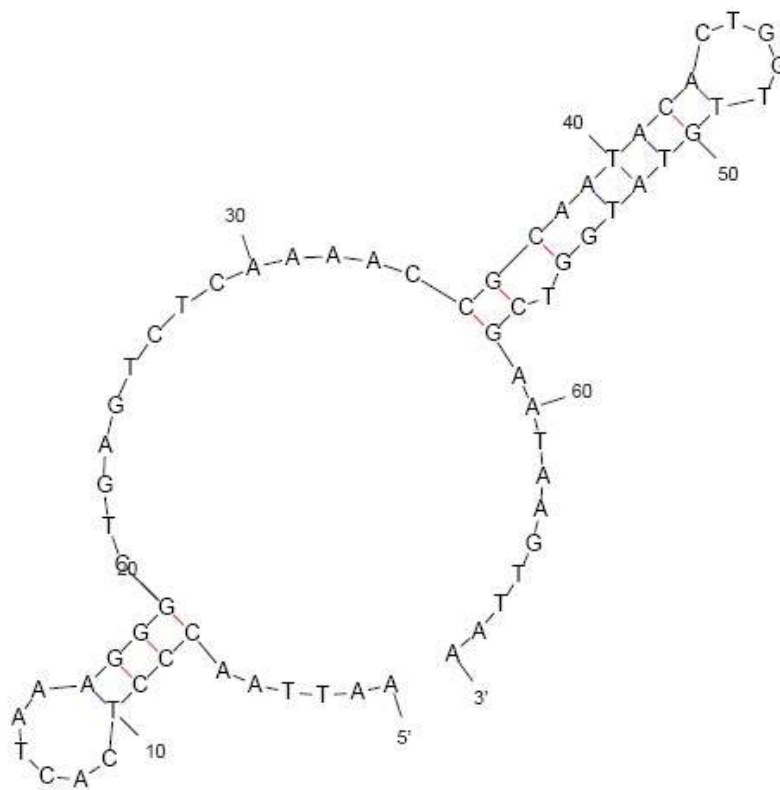


그림 3-60. Aptamer A22의 가상 2차 구조 예측

2. 필터소재의 조류인플루엔자 바이러스 흡착효율 평가기술 개발

가. 필터의 조류 인플루엔자 바이러스 제어효과 시험

흡착효율 기초분석을 위한 표준 바이러스 준비는 작성된 조류인플루엔자바이러스(HIV)를 중화하거나 또는 바이러스에 결합능을 가진 IgY, scFv 단백질 및 aptamer의 효능을 평가하는데 필요한 대상 바이러스의 선발 및 평가방법을 설정하였다. 본 과제의 최종 목표상의 대상 바이러스는 고병원성(highly pathogenic) 조류인플루엔자바이러스(H5N1형)이나 H5N1형의 경우 취급상 biosafety level (BL) 3 이상의 차폐실험실에서 실험이 행해져야하고 바이러스 취급이 극히 위험하여 저병원성(low pathogenic) AI중 유전형 특성이 유사한 H5N3형을 선발하였다.

대부분의 AI의 경우 조직배양상에서 증식이 되지 않는 특징이 있어 본 연구에서도 SPF 달걀 또는 종란에 바이러스를 접종하고 증식시켜 사용하는 종란접종 역가측정법을 사용하고자 하였다, 국립수의과학검역원 조류질병과에서 확보하고 있는 저병원성 AI인 H5N3를 분양받아 10일령의 종란(수정란)에 10진 계단 희석하여 접종하였다. 접종방법의 종란의 기실 부분에 펀치를 이용하여 구멍을 만들고 1ml 주사기로 0.1ml 씩 접종하고 파라핀을 이용하여 구멍을 폐쇄하였다. 37℃의 부화기에서 3-5일 간 배양한 후 채득하였다.

바이러스 준비의 구체적인 과정은 H5N3형 조류인플루엔자바이러스 (AIV, stock virus: 2^{7.0} HAU)의 stock을 10일령 SPF 종란에 바이러스 액을 십진 희석하고 0.1ml씩 접종하여 37℃ 부화기에서 3일간 배양 증식 후, 냉장실에서 2~3시간 동안 chilling한 생존란 에서 요막액을 수확하여, 25000 rpm에서 10분간 원심분리하여 부유물을 제거하고 수확된 바이러스를 10 ml씩 분주하여 -140도에 보관하여 사용하였다.

나. 표준 바이러스를 사용한 흡착효율 기초분석 방법의 설정

표준 바이러스를 사용한 흡착효율 기초분석 방법의 설정은 HAp/키토산 복합섬유의 바이러스 흡착 효율시험에서 흡착 전·후 정량적인 흡착의 정도는 흡착 후 자체 제작한 간이적인 포집기를 사용하여 잔여 바이러스를 포집하여 real-time PCR법으로 바이러스입자의 감염력과는 상관없이 추출된 유전자의 양을 표준곡선과 비교하여 정량화하고자 하였다.

그림 3-62은 자체 제작한 간이포집기의 모식도(A), 및 실제 사진(B 및 C)으로 포집장비(Sartorius MD8 airsacn Air Sampler)에 간이포집기를 연결 설치하여 사용할 수 있도록 하였으며 중간에 필터를 삽입하고 투과된 바이러스는 최종 단계인 젤라틴 필터에 포집되도록 하였다.

다. 설정된 시험 방법

필터 소재 섬유 또는 물질의 바이러스 여과 효과의 측정하기 위하여 아래와 같은 재료와 방법으로 실험을 수행하였다.

(1) 실험재료

(가) 바이러스: H5N3형 조류인플루엔자바이러스 (AIV, stock virus: $2^{7.0}$ HAU)

- 10일령 SPF 종란에 바이러스 액을 십진 희석하고 0.1ml씩 접종하여 37°C 부란기에서 3일간 배양 증식 후, 냉장실에서 2~3시간 동안 chilling한 생존란 에서 요막액을 수확하여, 25000 rpm에서 10분간 원심분리하여 부유물을 제거하고 수확된 바이러스를 10 ml씩 분주하여 -140도에 보관한다.

(나) 혈구응집반응 (HA, Hemagglutination assay): 닭 적혈구 이용 바이러스 역가 측정

- PBS에서 1/2 단계 희석된 바이러스를 96 well micro plate에 50 μ l 씩 분주하고, 0.6% 닭적혈구를 동량 분주한다. RT에서 40분간 방치한후 결과를 판독하여 HAU (Hemagglutination Unit) $2^{7.0}/50 \mu$ l역가를 확인하였다.

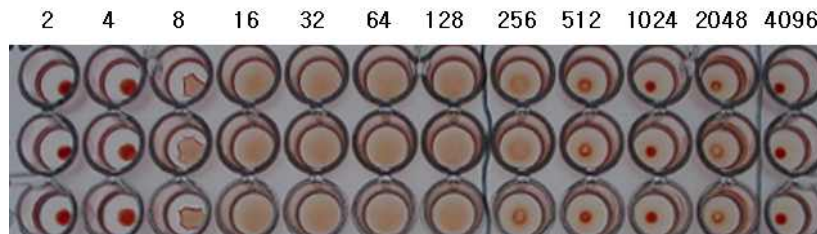


그림 3-61 종란에서 증식시킨 H5N3형 조류인플루엔자바이러스 Hemagglutination assay. 희석 배수 128 ($2^{7.0}$)까지 Hemagglutination 이 나타났다.

(다) Real-time PCR 이용 바이러스의 정량적 측정

(라) Sartorius MD8 airsacn Air Sampler: 바이러스 포집기

(마) Gelatine filter: 바이러스의 최종 포집용 필터

(바) Test filter : A, A-1 (키토산/HAp/N-Halamine 복합섬유 필터부직포)
C, C-1 (키토산/HAp 복합섬유 필터부직포)

(2) 포집기 실험방법

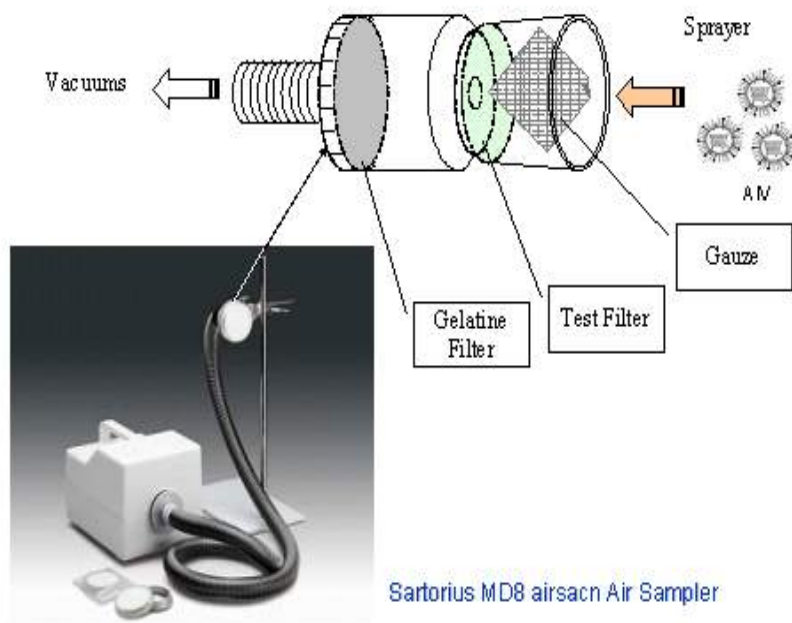
HAp/키토산 복합섬유의 바이러스 흡착 효율시험에서 흡착 전·후 정량적인 흡착의 정도는 흡착 후 자체 제작한 간이적인 포집기를 사용하여 잔여 바이러스를 포집하여 real-time PCR법으로 바이러스입자의 감염력과는 상관없이 추출된 유전자의 양을 표준곡선과 비교하여 정량화하고자 하였다.

그림 3-62는 자체 제작한 간이포집기의 모식도(A), 및 실제 사진(B 및 C)으로 포집장비(Sartorius MD8 airsacn Air Sampler)에 간이포집기를 연결 설치하여 사용할 수 있도록 하였으며 중간에 필터를 삽입하고 투과된 바이러스는 최종 단계인 젤라틴 필터에 포집되도록 하였다.

(가) Sartorius MD8 airsacn Air Sampler (바이러스 포집기)에서 4가지 test filter를 이용한 H5N3 바이러스의 포집

(나) Sartorius MD8 Air Sampler에 그림 3-62와 같이 test filter 및 장치를 설치한다.

A)



B)



그림 3-62. 바이러스 포집기(Sartorius MD8 Air Sampler) 사진 및 제작한 필터 장착 부분 모식도(A)과 실사진 (B)

(다) Sartorius MD8 Air Sampler를 켜고 3m³/hr, 30min으로 설정 후 가동시킨다.

(라) Stock (2⁷ HA titer) H5N3 바이러스를 실험하고자 하는 필터 전방에 위치한 거즈에 4 ml 씩을 sprayer를 이용하여 분사시킨다.

- 이때, 대조군은 필터가 없는 상태에서 분사하여 포집한다.



그림 3-63. 바이러스 포집기(Sartorius MD8 Air Sampler) H5N3 바이러스의 분사 실제 사진

(마) 30분 후 장치를 분리하고 gelatin filter를 회수하여 잘게 자른 후 5 ml의 phosphate 용액(pH 7.2, 항생제 첨가) 및 2.5mm glass bead 40개가 들어있는 200 ml 삼각 플라스크에 넣고 그림 3-64과 같이 37°C 항온수조에서 5분간 녹이고 실온에서 5분간 진탕하여 gelatin filter를 완전히 녹여 바이러스를 용출시킨다.

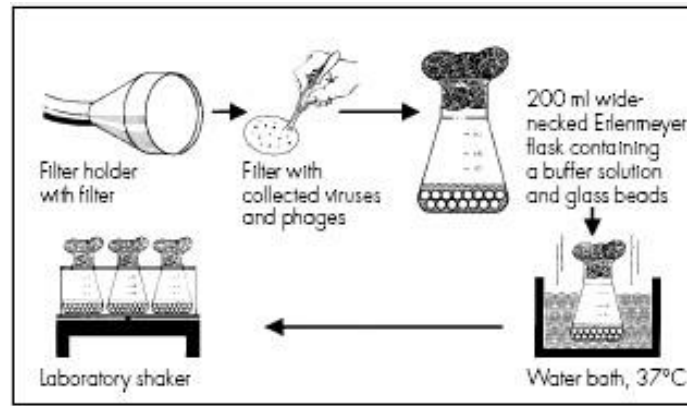


그림 3-64. gelatine filter로부터 바이러스의 수확 순서 모식도

(3) Sybr green real time RT-PCR을 통한 각 filter의 H5N3 바이러스 여과능 측정

(가) H5N3 바이러스의 Sybr green real time RT-PCR standard curve 작성

Stock (2^7 HA titer) H5N3 바이러스를 1/2 단계적으로 희석하여 2^6 , 2^5 , 2^4 , 2^3 , 2^2 , 2^1 HAU 농도의 바이러스에서 Viral Gene-spin™ kit (INTRON)을 이용하여 바이러스의 RNA를 추출하였고, LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Geen I (Roche)을 사용하여 I cycler IQ (Bio-Rad) PCR 기계에서 real time RT-PCR을 수행하였다.

반응에 필요한 혼합액은 LightCycler RT-PCR Enzyme Mix 0.4 μ l, LightCycler RT-PCR recation Mix SYBR Geen I 0.4 μ l, MgCl₂ stock solution 2.4 μ l, viral RNA 2 μ l, 표 3-16의 AIV common primer를 5pm 농도의 forward, reverse primer로 사용하여 각 1 μ l 그리고 멸균된 3차 증류수를 더해 최종 반응액 20 μ l를 구성하였다. 또한 음성 대조군으로 RNA 빼고 멸균된 3차 증류수를 첨가한 반응 혼합액을 제조하여 함께 수행하였다. 반응 과정은 55 °C에서 25분간 reverse transcription 시킨 후, 95 °C에서 30 초간 변성시키고, 다시 95 °C에서 5초, 55 °C 15초, 72 °C 25초를 한 주기로 45 cycle 조건으로 수행하였다. 수행결과 ct값을 기준으로 35 cycle 이상에서 증폭 곡선이 생성되면 음성으로 판단하였다. 바이러스 농도별 나타난 역치 주기 (Ct, threshold cycle)를 이용하여 표준곡선 (standard curve)를 제작하였다. $y = -4.842x + 36.31$ 의 선회회귀 모델로

나타낼 수 있었다(그림 3-65).

표 3-16. AIV 유전자 검출용

| Target gene | Primer | Sequence (5' → 3') | size |
|-------------|--------|--------------------------|----------|
| AIV M gene | M+25 | AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG | 약 100 bp |
| | M-124 | TGCAAAAACATCTTCAAGTCTCTG | |

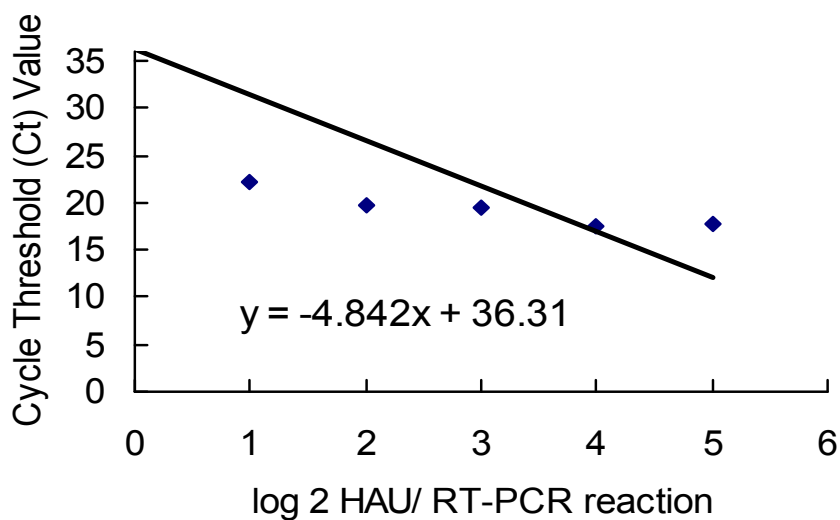


그림 3-65. H5N3바이러스에 대한 real time PCR의 standard curve. standrad curve는 PCR에 사용된 바이러스 수 (2^6 , 2^5 , 2^4 , 2^3 , 2^2 , 2^1 HAU/50 μ l, NTC; non template control)에서 나타난 Ct값을 토대로 생성되었다.

(나) test 필터 장착한 후 필터의 H5N3에 대한 제어 효과를 측정

gelatin filter에서 수확된 바이러스 용출액 300 μ l에서 위와 같은 조건에서 RNA 추출하여 Sybr green real time RT-PCR을 실시하였다.

(다) 실험결과

필터 소재 섬유 또는 물질의 바이러스 여과 효과의 측정하기 위해 filter A, A-1, C, C-1에 의해 바이러스 포집기의 gelatin filter에 도달하는 바이러스량이 얼마인지를 Sybr green real time RT-PCR을 실시 하여 조사하였다. 위에 제시된 방법대로 실험한 결과 아무런 filter가 장착되지 않은 양성 대조군은 가장 먼저 증폭이 시작되어 ct값이 21.96으로 나타났으며, 그다음 filter C가 25.85, filter A-1 31.7, filter C-1 33.12, filter A 33.47 로 나타났다

(그림 3-66). 이러한 ct값을 standard curve의 그래프에 대입해 보면 바이러스 역가 (\log_2 HAU)가 양성 대조군은 3, filter C는 2.2, filter A-1 0.95, filter C-1 0.7, filter A 0.6 로 나타났다. 즉 filter의 여과 능력은 filter A > C-1 > A-1 > C 순으로 나타났다.

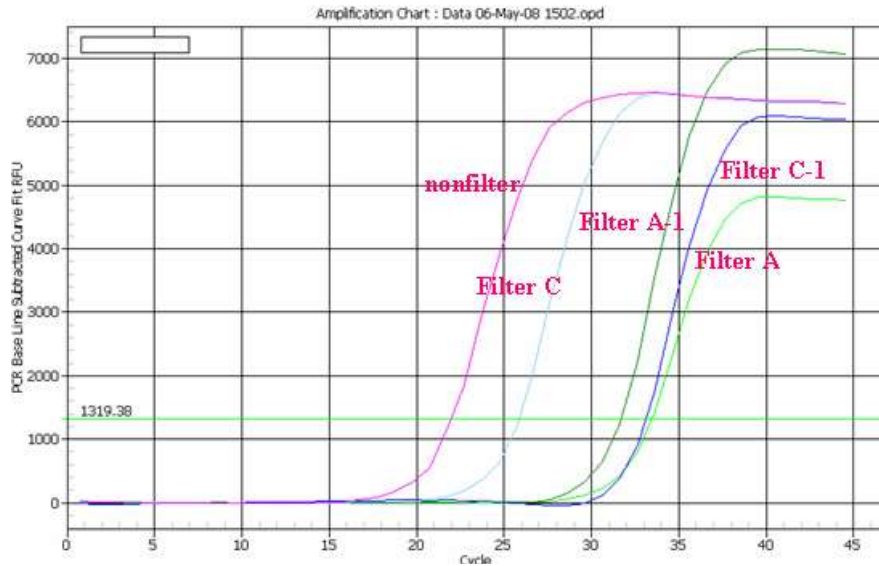


그림 3-66. filter A, A-1, C, C-1에 의한 바이러스 여과 효과 측정을 위한 Sybr green real time RT-PCR.

(라) 실험 요약

filter A, A-1, C, C-1에 의한 바이러스 여과 효과 측정을 위해 본 연구에서는 바이러스 포집기(Sartorius MD8 Air Sampler)에 4가지 filter를 각각 장착한 후 H5N3 바이러스의 여과능을 측정하였다. filter를 통과해 인쪽의 gelatin filter에 도달한 바이러스 양을 측정함으로써 filter A, A-1, C, C-1의 바이러스 여과능을 측정하였다. 이러한 실험과정을 안정화 시키기 위해 위 그림 2와 같은 구조를 계획하였고 그 상태에서 Sartorius MD8 Air Sampler의 조건을 3 m³/hr에서 30min으로 setting 하였다. 그리고 2^{7.0}/50 µl HAU (Hemagglutination Unit) 농도의 stock H5N3 바이러스 4 ml을 sprayer로 분무한 후, gelatin filter에 존재하는 바이러스를 용출하여 그 양을 Sybr green real time RT-PCR 법으로 계산해 본 결과 filter의 여과 능력은 filter A > C-1 > A-1 > C 순으로 나타났다.

(마) 주사전자현미경(SEM)을 이용한 필터의 구조 비교

필터 A, A-1, C, C-1 4종 각각을 주사현미경으로 관찰한 결과 그림 8과 같았고 A, C, A-1, C-1순으로 표면이 균질함을 알 수 있었다.

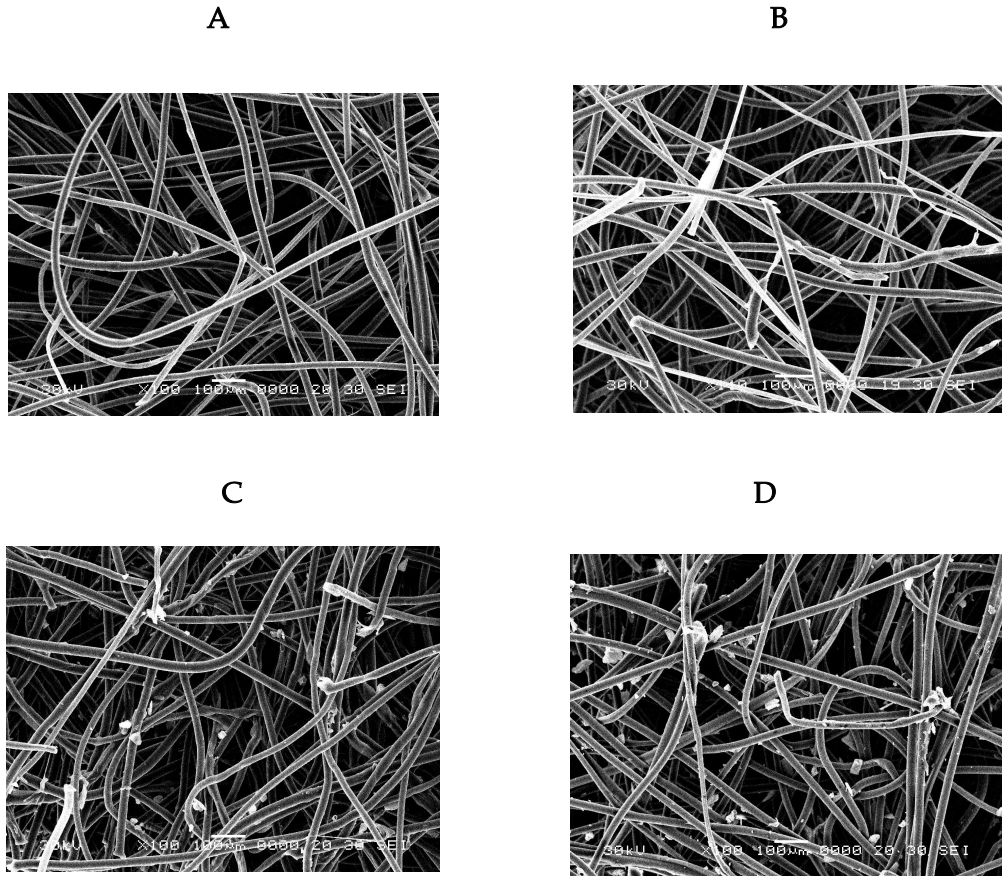


그림 3-67. 필터의 SEM image, A: A filter, B: C filter, C: A-1 filter, D: C-1 filter

3. 조류인플루엔자 바이러스 불활화 분석기술 개발

가. 종란접종 및 혈구응집검사

불활화 여부는 흡착 후 포집된 잔여바이러스를 흡착하지 않은 대조군 바이러스와 살아있는 생체의 하나인 종란에 접종하여 증식되게 함으로써 불활화 정도를 판단하였다. 역가 비교시험을 종란접종법으로 배양 후 배양액을 채득하여 닭 적혈구에 대한 혈구응집 항원검사법을 이용하여 수치화함으로써 불활화 정도 및 여부를 측정하도록 설정하였다.

Sartorius MD8 airsacn Air Sampler (바이러스 포집기)에서 4가지 test filter를 이용하여 포집한 H5N3 바이러스의 불활화 여부를 표준바이러스 준비과정에서 전술한 방법과 동일하게 종란접종법으로 바이러스를 증식시킨 후 그 증식 여부를 혈구응집법(HA)으로 분석한 결과 표 3-17과 같이 A, A-1, C, C-1 4종 필터 모두에서 바이러스가 검출되지 않아 바이러스가 불활화 되었음을 확인할 수 있었다.

real time RT-PCR.에 의한 filter A, A-1, C, C-1에 의한 바이러스 여과후 정량적 효과 측정 결과와 종란접종 후 결과를 비교할 때 차이는 유전자 검출율과 필터 신소재의 병원체 투과성 및 생존력 평가에 있어서 real time RT-PCR 및 종란접종법의 결과를 종합해볼 때 두 결과의 차이는 필터 후 잔존하는 바이러스의 유전자는 real time RT-PCR법이 매우 민감한 방법으로 검출이 가능하였으나 종란 접종법의 경우 일정량 이상의 감염 가능한 바이러스의 존재 시에만 증식되기 때문으로 판단된다. 바이러스가 종란에 감염될 수 있는 최소량의 차이에 기인한 것으로 종란에 최소 감염량은 HA 역가로 약 10^4 배 이상으로 예측할 수 있었다.

표 3-17. 필터 후 종란 접종 및 혈구응집법을 이용한 불활화 측정 결과

| Filter | Dilution of virus extracted from gelatin (-log ₁₀) | | | | | | |
|---------|--|----------------|----------------|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Control | * 2 ⁷ | 2 ⁶ | 2 ⁵ | - | - | - | - |
| A | - | - | - | - | - | - | - |
| A-1 | - | - | - | - | - | - | - |
| C | - | - | - | - | - | - | - |
| C-1 | - | - | - | - | - | - | - |

* HA titer after amplification of influenza virus in eggs

나. 난황항체 담지 및 담지 후 필터의 바이러스 여과 효과 측정

(1). IgY의 필터 담지

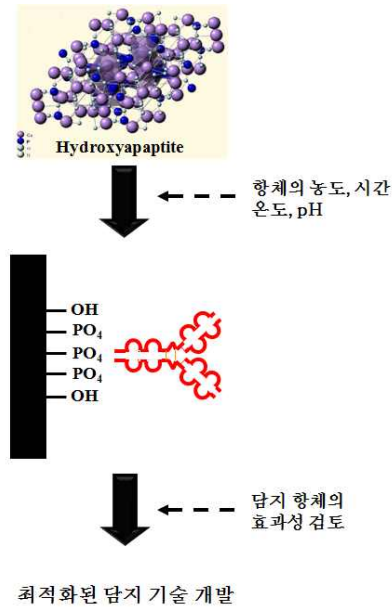


그림 3-68. 난황항체 담지 모식도

(가) 담지 실험재료

- 바이러스: H₅N₃형 조류인플루엔자바이러스 (AIV, stock virus: 2^{7.0} HAU)
 - 10일령 SPF 종란에 바이러스 액을 십진 희석하고 0.1ml씩 접종하여 37℃ 부란기에서 3일간 배양 증식 후, 냉장실에서 2~3시간 동안 chilling한 생존란 에서 요막액을 수확 하여, 25000 rpm에서 10분간 원심분리하여 부유물을 제거하고 수확된 바이러스를 10 ml씩 분주하여 -140도에 보관한다.
- 난황항체: H₅N₃형 조류인플루엔자바이러스에 대한 닭 난황 항체(IgY, stock 농도: 2¹¹ HI unit)

(나) 필터에 IgY 담지 방법

- Filter B (키토산 아파타이트 부직포)에 IgY를 담지하기위하여 음압상태를 이용한 담지와 직접 분사법을 이용한 2가지 방법으로 시도하였다.

① 진공기를 이용한 IgY의 담지 (그림 3-69 A)

- 2¹¹ HI unit 의 IgY를 PBS에 1/5 희석한 후, 페트리 디쉬에 10ml을 분주하고 진공기에

넣는다.

- IgY가 담긴 페트리 디쉬에 IgY가 직접 닿지 않도록 받침대를 설치하고 그 위에 Filter B를 놓는다.
- 펌프를 이용하여 진공기 안을 진공상태로 만들고 2시간동안 방치하여 IgY가 증발되면서 Filter B에 부착되도록 한다.

㉔ 분사기(sprayer)를 이용한 IgY의 침지 (그림 3-69. B)

- 2^{11} HI unit 의 IgY를 PBS에 1/5 희석한 후, sprayer를 이용하여 5ml를 Filter B에 분사한다.
- 젖은 Filter B를 2시간동안 상온 건조 시킨다.

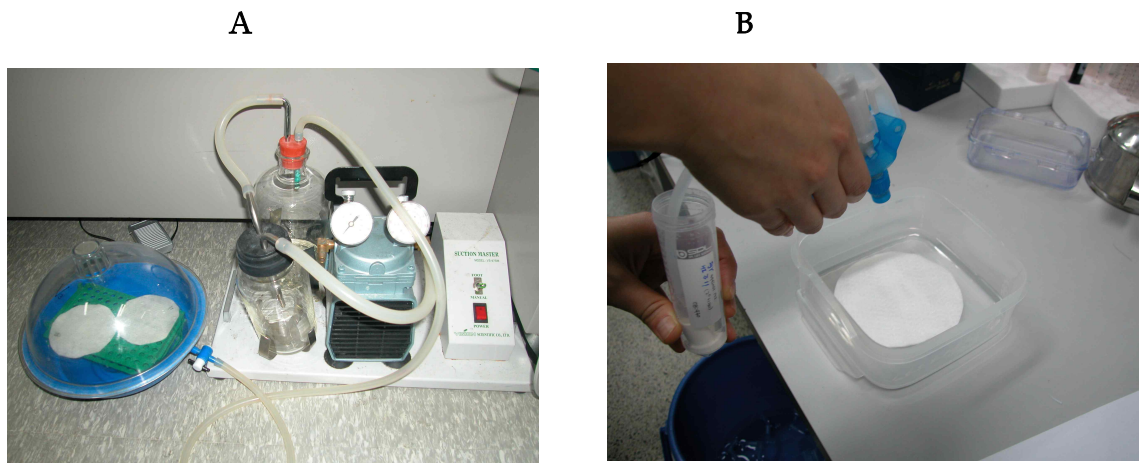


그림 3-69. IgY 담지, A는 음압 이용 담지법 및 B는 분무기 이용 담지법

(다) IgY 담지 필터 필터의 바이러스 여과 효과 측정

바이러스 여과효과 측정은 위의 필터효과 측정방법과 동일하여 Real-time PCR 이용 바이러스를 정량적 측정을 실시하였다. 바이러스의 포집은 Sartorius MD8 airsacn Air Sampler로 실시하였고 Gelatine filter에 최종 포집된 바이러스 Real-time PCR에 공시하였다.

- 테스트 필터 종류: A-일반 부직포, B-키토산 아파타이트 부직포, b 부직포에 음압법 이용 IgY 담지 필터(B-IgY-a) 및 b 부직포에 분무법 이용 IgY 담지 필터 (B-IgY-b) 등 4종

① 바이러스의 포집은 전술한 1)장의 (다) Sartorius MD8 airsacn Air Sampler를 이용한 H5N3 바이러스의 포집 방법과 동일하게 실시하였다.

- Sartorius MD8 Air Sampler를 켜고 $3\text{m}^3/\text{hr}$, 30min으로 설정 후 가동시킨다.
- Stock (2^7 HA titer) H_5N_3 바이러스를 실험하고자 하는 필터 전방에 위치한 거즈에 4 ml

씩을 sprayer를 이용하여 분사시킨다.

- 30분 후 장치를 분리하고 gelatin filter를 회수하여 잘게 자른 후 5 ml의 phosphate 용액 (pH 7.2, 항생제 첨가) 및 2.5mm glass bead 40개가 들어있는 200 ml 삼각 플라스크에 넣고 그림 4와 같이 37℃ 항온수조에서 5분간 녹이고 실온에서 5분간 진탕하여 gelatin filter를 완전히 녹여 바이러스를 용출시킨다.

② Sybr green real time RT-PCR을 통한 각 filter의 H5N3 바이러스 여과능 측정은 전술한 1)장의 다, (3), (다)항의 Sybr green real time RT-PCR을 통한 각 filter의 H5N3 바이러스 여과능 측정 내용과 동일하게 실시하였다.

- 약술하면, Stock (2^7 HA titer) H5N3 바이러스를 1/2 단계적으로 희석하여 2^6 , 2^5 , 2^4 , 2^3 , 2^2 , 2^1 HAU 농도의 바이러스에서 Viral Gene-spin™ kit (INTRON)을 이용하여 바이러스의 RNA를 추출하였고, LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I (Roche)을 사용하여 LightCycler IQ (Bio-Rad) PCR 기계에서 real time RT-PCR을 수행하였다.
- 반응에 필요한 혼합액은 LightCycler RT-PCR Enzyme Mix 0.4 μ l, LightCycler RT-PCR reaction Mix SYBR Green I 0.4 μ l, MgCl₂ stock solution 2.4 μ l, viral RNA 2 μ l, 표1의 AIV common primer를 5pm 농도의 forward, reverse primer로 사용하여 각 1 μ l 그리고 멸균된 3차 증류수를 더해 최종 반응액 20 μ l를 구성하였다. 또한 음성 대조군으로 RNA 빼고 멸균된 3차 증류수를 첨가한 반응 혼합액을 제조하여 함께 수행하였다. 반응 과정은 55℃에서 25분간 reverse transcription 시킨 후, 95℃에서 30초간 변성시키고, 다시 95℃에서 5초, 55℃ 15초, 72℃ 25초를 한 주기로 45 cycle 조건으로 수행하였다. 수행결과 ct값을 기준으로 35 cycle 이상에서 증폭 곡선이 생성되면 음성으로 판단하였다.
- 수행결과 역치 주기 (Ct, threshold cycle) 기준으로 35 cycle 이상에서 증폭 곡선이 생성되면 음성으로 판단하였다. 각 filter 별 ct값을 기준에 작성된 standard curve ($y = -4.842x + 36.31$)에 대입하여 virus의 농도를 추정하였다.

(라) 실험결과

필터 소재 섬유 또는 물질의 바이러스 여과 효과의 측정하기 위해 filter A(일반 부직포), B(키토산 아파타이트 부직포), B-IgY-a(진공기에 의해 침지된 filter), B-IgY-b(sprayer에 의해 침지된 filter)가 부착된 바이러스 포집기의 gelatin filter에 도달하는 바이러스량이 어느 정도 인지를 Sybr green real time RT-PCR을 실시 하여 조사하였다.

위에 제시된 방법대로 실험한 결과 일반 부직포인 Filter A는 가장 먼저 증폭이 시작되어 ct 값이 25.7으로 나타났으며, filter B의 경우 IgY를 침지하지 않은 것이나 침지한 것이나 큰 차이를 보이지 않고 29.5 정도로 나타났다 (그림 3-70). 이러한 ct값을 standard curve ($y =$

-4.842x + 36.31)의 그래프에 대입해 보면 바이러스 역가 (log₂ HAU)가 Filter A는 2.2, Filter B, B-IgY-a, B-IgY-b는 1.4 로 나타났다. 즉 filter의 여과 능력은 Filter B, B-IgY-a, B-IgY-b > A 순으로 나타났다. 그러나 Filter B에 IgY를 침지 한 것과 안 한 것에 큰 차이가 나타나지 않았다.

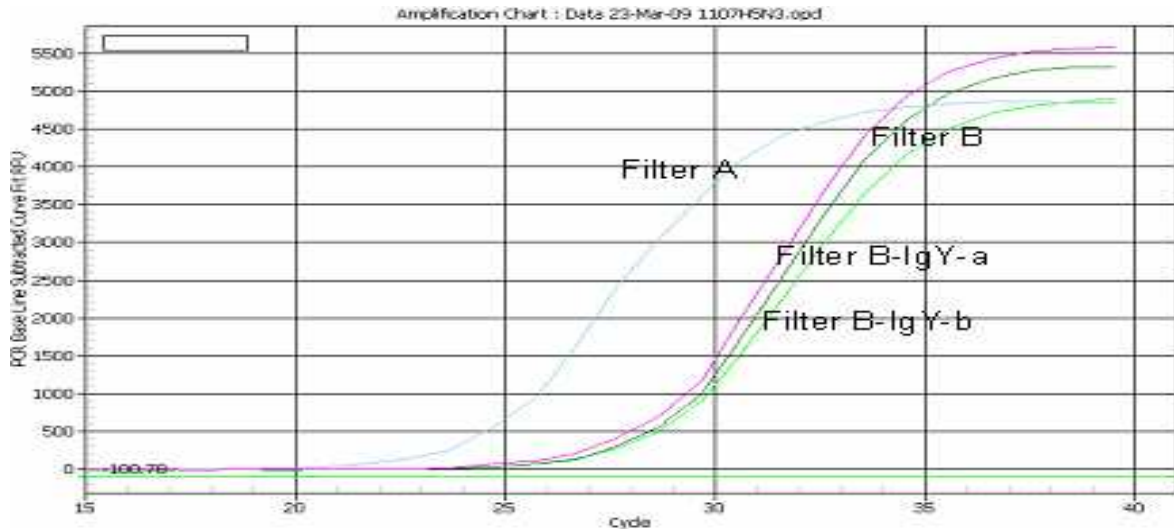


그림 3-70. Filter A, B, B-IgY-a, B-IgY-b에 의한 바이러스 여과 효과 측정을 위한 Sybr green real time RT-PCR.

4. 필터신소재 동물감염 억제성 분석기술 개발

가. 바이러스 필터 효력 평가

실험동물에서의 필터 신소재의 필터효율조사는 매우 까다로운 분석 기술에 해당하며 분석에는 온·습도 조절 및 송풍 기능 등이 가능한 isolator가 필수적이다. 특히 본 과제의 목표로 설정한 고병원성 인플루엔자의 경우 인체에 유해가능성 등으로 직접적인 실험이 불가능하다고 할 수 있다.[17, 19-22]

세계적으로 공인되어 있는 바이러스에 대한 필터의 효력 평가(Virus filtration efficiency : VFE)는 평가 대행기관인 미국의 Nelson사의 경우에도 인체에 유해할 수 있는 조류 인플루엔자, HIV(후천성 면역결핍증바이러스), b형 및 C형 간염바이러스 등 특정한 바이러스에 대한 필터 평가는 불가능하며 미군 VFE 표준절차(Military standard MIL-M-36954) 및 의학용 마스크 제조 관련 검사규정인 ASTM (American society for testing and materials) F2101에 명시된 절차를 따르고 있다.

VFE 검사 방법을 요약하면 직경 약 27nm (0.027 μ)인 가장 작은 바이러스 중의 하나로 외피가 없는 정이십면체인 phiX174 박테리오파지를 필터 효력평가에 사용한다. 박테리오파지 부유액을 일정한 압력 및 유압으로 3.0μ 입자로 분무기(Chicago nebulizer)를 이용하여 약 3.0

μm 입자크기로 분무하고 분당 28.3리터의 유속으로 테스트하는 필터를 거쳐 Andersen sampler로 포집되도록 고안된 장치를 사용한다. VFE 검사는 $21 \pm 5^\circ\text{C}$ 및 상대습도 5%의 조건으로 최소 4시간이상 보관한 필터를 사용하며 VFE 대조군은 평균 2200 ± 500 PFU 이어야 한다. Andersen sampler 에는 *E.coli* C가 배양된 한천배지를 두어 포집 후 37°C 에서 12-24 시간 배양하여 포집된 박테리오파지의 증식에 의한 플라그의 수를 셈으로서 필터효율을 측정한다. 필터의 효율은 %VFE로 나타내며 산출방법은 아래와 같다.

$$\%VFE = \frac{\text{plaque without filter} - \text{plaque with filter}}{\text{plaque without filter}} \times 100$$

기타 관련 검사로는 미국 CDC산하의 NIOSH(National Institute for Occupational Safety and Health)/NPPTL(National Personal Protective Technology Laboratory)의 호흡장치의 투과성 검사를 위한 표준절차가 규정되어 있다.

나. 필터의 바이러스를 이용한 동물감염억제 시험용 Isolator

본 연구에서 목적 원인체인 고병원성 조류인플루엔자(H5N1)를 대신하여 공시한 저병원성 조류인플루엔자인 H5N2 바이러스의 경우에도 실험상에 안전성에 유의해야 할 것으로 판단되며 저병원성 바이러스를 이용한 동물감염억제 시험은 목적에 부합되는 isolator를 제작할 예정이다. 다만 필터신소재용 바이러스불활화 물질을 담지 후의 효력평가는 담지물질 등이 고병원성 인플루엔자(H5N1)에 중화능을 목표로 함으로 시험용 표준주인 저병원성 조류인플루엔자로 판단이 어려울 것으로 사료된다. 따라서 실험동물에서의 필터 신소재의 필터효율조사는 필터신소재에 대한 평가에만 적용하는 것이 합리적일 수 있다.

필터신소재 동물감염 억제성 분석기술 확립을 위한 isolator는 그림 3-71과 같이 본체 및 음압을 유도하는 펌프와 바이러스액을 투입하는 분무기로 크게 구분되어야한다. 또한 본체에는 중간벽으로 두 개실로 나누며 중간벽에는 필터를 장착할 수 있도록 해야하며 향은 향습 조절장치가 필요할 것으로 판단된다. 위쪽에는 실험동물, 사료 및 음수 등을 투입할 수 있는 문이 필요하며 닫았을 때 완전 밀폐가 되어야 한다.

동물 감염 억제 여부 판단을 위한 isolator는 그림 3-71와 같은 실험을 위해 전문 isolater 제조사에 의뢰하여 그림 3-72와 같이 최종 설계가 그림 3-73과 같이 완성되었으며 제작하였다.

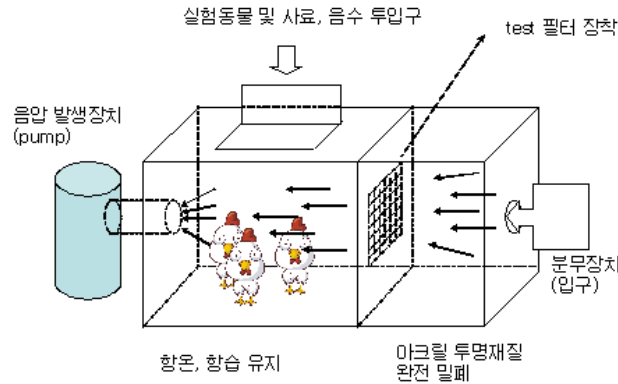


그림 3-71. 필터의 동물 감염 억제성 평가를 위한 Isolator의 모식도

그림 3-72의 설계도를 기준으로 충남 대전시 소재 Three-shine에 Isolator의 제작을 의뢰하였다. 주요 부분으로는 바이러스 분무장치가 설치된 virus generator 부분과 필터를 설치하는 중간의 필터 설치장치와 동물사육 케이지를 설치할 수 있으며 음압을 형성시키는 controller 부분 등으로 이루어진다.

보다 정확하게는 바이러스발생부의 주요구성은 압축기(compressor), 바이러스포집통, 분사 노즐(nozzle) 또는 네블라이저(nebulizer) 등 분무 장치(spray system)와 샘플러 라인으로 구성된다. 네블라이저는 압축기에서 발생한 2.5 kg / cm² 압력을 이용하여 바이러스액을 0.5~5.5 마이크론 크기의 분무상태로 발생시켜준다. 부품으로는 아크릴 재질을 제외하고 압축기는 220V, 1/5 HP의 규격이며 마그네트 swin catch 55×30 6개, hinge 80×30 2개, 테스트 필터 Ø 250, 1차 배출관 ball valve PVC Ø 32 2개, 1차 주름 배출관 및 1차 주름 샘플러관 실리콘 Ø 42×300L 각 1개, 1차 샘플러 sheet 고정장치, PVC Ø 32 1개, 1차 샘플러관 ball valve PVC Ø 32 1개로 구성된다. 참고로, 본 장치는 보건복지부 생물안전법 Isolator(음압형) 적격성 실험에 적합하도록 구성하였다.

무균상부의 주요구성은 무균상과 control box 및 샘플러 라인으로 구성된다. 부품으로는 아크릴 재질을 제외하고 무균상은 마그네트 swin catch 55×30 6개, hinge 80×20 3개, 2차 중간 배출 hepa 필터Ø 250, 2차 배출관 ball valve PVC Ø 32 1개, 2차 주름 배출관 및 2차 주름 샘플러관 실리콘 Ø 42×300L 각 1개, 2차 샘플러 sheet 고정장치 PVC Ø 32 1개, 2차 샘플러관 ball valve PVC Ø 32 1개와 control box는 blower 압력게이지(Presser gauge) 0~25mm H₂O 판넬형)으로 구성하였다.

본 구성은 보건복지부 생물안전법 Isolator(음압형) 적격성 실험에 적합하도록 구성된다. 또한 환기횟수(ACH)와 기류(m/sec)는 실험동물보호법, 실험동물법에 적합하도록 구성하였다.

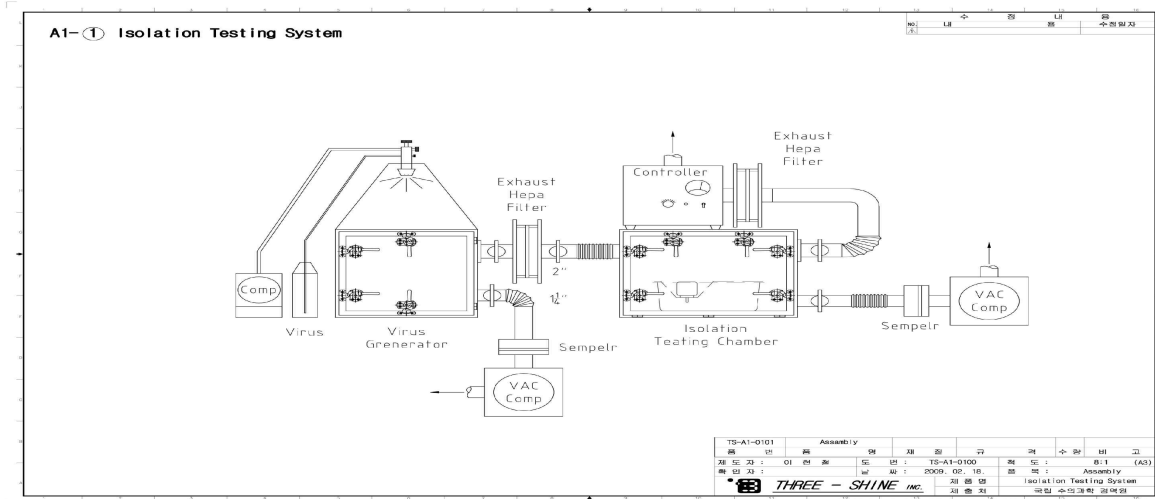


그림 3-72. 동물 실험용 isolator의 최종 설계 도면



그림 3-73. 실제 제작된 동물 실험용 isolator

다. 필터신소재 동물감염 억제성 분석 장치를 이용한 필터효력 측정

(1) 동물 실험용 isolator 적용 filter 효력 시험 (예비시험)

(가) 준비사항

- In vivo에서의 감염효력 억제 평가에서 중요한 선행 조건은 테스트하는 바이러스가 해당 실험동물에 감수성이 있어야 한다는 점이다. 따라서 테스트하는 바이러스 종류에 따라 감수성 있는 품종의 실험동물이 필요하다.

- 일반 ICR 또는 Balb/c 마우스에 감수성이 있는 오제스키병 바이러스 또는 인플루엔자 바이러스중 PR8과 같은 특정 strain 등의 바이러스를 공시할 수 있다. 즉 특정 인플루엔자 strain의 경우는 페렛 등 이에 감수성 있는 동물이 필요하게 된다. 즉 사전에 테스트용 바이러스와 감수성 있는 실험동물에 대한 사전 지식이 필요하며 공시하는 실험동물의 수는 동물복지 등을 위해 통계적으로 유의할 수 있는 최소의 수로 정하여 수행된다.
- 본 실험에서는 실제 실험동물에 대한 필터의 감염억제력 비교 시험의 경우는 먼저 장비에 바이러스 오염이 상대적으로 적은 필터를 장착한 실험을 우선 실시하였고 실험의 결과의 객관성 유지를 위해 예비실험 후 isolation 소독 후 사용한다.

(나) 재료 및 방법

- 시험은 국립수의과학검역원 감염 동물사에 isolator를 설치하여 수행하였으며 시험 전·후 동물사 및 isolator를 훈증 소독하였다.
- 바이러스는 influenza virus H1N1 PR8 strain을 공시하였고 표 3-18과 같이 접종시험을 거쳐 바이러스 함량을 결정하였다.

표 3-18. 필터효력 평가 시험을 위한 인플루엔자 바이러스의 역가별 체중변화

| Inoculum \ Day post infection | Body weight (% of body weight change) | | | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| PBS | 53.8 (100) | 54.8 (101.9) | 55.2 (102.6) | 55.4 (103) | 56.2 (104.5) |
| 5x10 ³ PR8 strain | 53.4 (100) | 55.2 (103.4) | 52 (97.4) | 47.2 (88.4) | 44.2 (82.8) |
| 5x10 ⁴ PR8 strain | 54.2 (100) | 55.8 (103) | 51 (94.1) | 46.8 (100) | 29.2 (53.9) |
| 5x10 ⁵ PR8 strain | 56.4 (100) | 56.2 (99.6) | 51.2 (90.8) | 47.6 (84.4) | 30.9 (54.8) |

- 바이러스 함량: 10^{6.0} TCID₅₀/ml, (4.8 X 10⁶ PFU/ml), 2¹⁰ HA titer
- 바이러스를 10배 희석 하여 사용 10^{5.0} TCID₅₀/ml (20ml + 180ml PBS)
- 돼지인플루엔자바이러스는 5 x 10⁵ PFU /ml 역가의 PR8주를 공시하였으며 바이러스 노출 후 실험 마우스 5두의 일자별 평균 체중의 변화를 비교하였다. 실험동물 보호를 위해 50%이상 체중이 나타난 경우 해당 마우스를 안락사시켰다.
- 분무시간 : 바이러스가 모두 분무될 때까지 지속
- 마우스: Balb/C 6주령 10마리 사용
- 임상관찰기간: 7일간
- 분무시간 15:50부터

- Vaccume 90% 24k pas

(다) 시험 결과

- ① 바이러스 포집기를 이용한 필터 효력 평가 결과 필터효과가 가장 우수한 A필터를 사용하여 우선 isolator를 이용한 감염성억제 시험을 실시한 결과 표 3-18과 같이 마우스 평균체중은 접종일자, 접종1일후, 접종2일 후, 접종3일 후 및 접종4일 후 각각 53.8 g, 54.8g, 55.2 g, 55.4 g, 56.2 g으로 증가한 반면 필터를 하지 않은 마우스의 평균 체중은 56.4 g, 56.2 g, 51.2 g, 47.6 g 및 30.9 g으로 감소하였다.
- ② 이를 접종일자 평균체중을 100으로 일자별 체중을 환산하여 증체율(%)로 나타내면 표 3-19와 같이 필터한 그룹은 100, 101.9, 102.6, 103.0 및 104.5로 증가하였고, 필터를 하지 않은 그룹의 경우는 100, 99.6, 90.8, 84.4 및 54.8로 감소하여 in vivo 상태에서 필터 효력을 평가할 수 있었다.

표 3-19. 필터효력 평가 시험에서의 마우스의 일자별 체중 변화

| Filter or Not | Day post infection | Percentage (%) of body weight change | | | | |
|------------------------------|--------------------|--------------------------------------|-------|-------|------|-------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| PBS | | 100 | 101.9 | 102.6 | 103 | 104.5 |
| 5x10 ³ PR8 strain | | 100 | 99.6 | 90.8 | 84.4 | 54.8 |

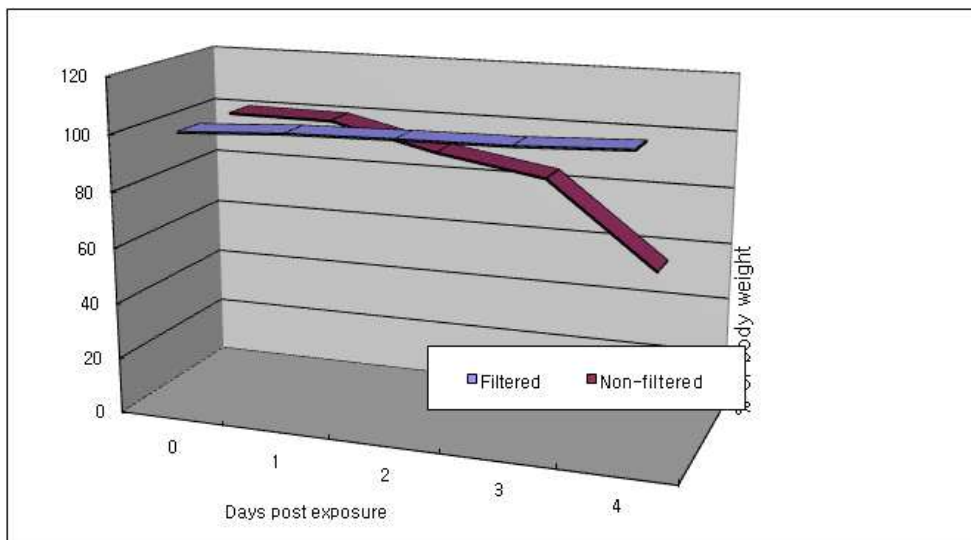


그림 3-74. 필터 효력에 따른 체중변화

(2) 동물 실험용 isolator 적용 filter 효력 시험

(가) 재료 및 방법

- filter: 키토산/HAp/Halamine 복합섬유 filter
- 필터를 제외하고는 실험(1)과 동일
 - 바이러스 함량: 10^{6.0} TCID₅₀/ml, (4.8 X 10⁶ PFU/ml), 2¹⁰ HA titer
 - 바이러스를 10배 희석 하여 사용 10^{5.0} TCID₅₀/ml (20ml + 180ml PBS)
- 임상관찰 및 폐사율 비교

(나) 시험결과

① 일반 필터

| 일자 | 임상증상 | 비고 |
|-----|------------|---------------|
| 1일째 | 정상 | 무게 194g(10마리) |
| 2일째 | 정상 | |
| 3일째 | 활력감소 | |
| 4일째 | 활력감소 폐사 2두 | |
| 5일째 | 폐사 8두 | 무게 184g(10마리) |
| 6일째 | - | |
| 7일째 | - | |

(A)



(B)



(C)



(D)



그림 3-75. 일반 filter 실험장면

A: 분무되는 바이러스액, B: 무균상부의 마우스 케이지,
C: 전체 모습, D, 무균상 및 controller box



그림 3-76. 일반 필터 실험후 마우스 폐사 사진

② 키토산/HAp/Halamine 복합섬유 filter

| 일자 | 임상증상 | 비고 |
|-----|-----------------|---------------|
| 1일째 | 정상 | 무게 191g(10마리) |
| 2일째 | 정상 | |
| 3일째 | 활력감소 | |
| 4일째 | 활력감소 | |
| 5일째 | 활력감소 | 보온갓 추가 설치 |
| 6일째 | 활력감소 | |
| 7일째 | 활력감소(10두 모두 생존) | 무게 145g |



그림 3-77. 키토산/HAp/Halamine filter 실험 장면

③ 비교 실험 결과

인플루엔자바이러스 PR8 바이러스를 이용한 일반 필터 및 키토산/HAp/Halamine 복합섬유 filter 필터 비교 시험 결과 그림 3-78과 같이 일반 필터의 경우 3일째부터 폐사가 발생하여 4일째 20% 폐사 및 5일째 100%가 폐사한 반면 키토산/HAp/Halamine 복합섬유 filter의 경우는 노출 후 7일 동안 폐사없이 전두수가 생존하여 키토산/HAp/Halamine 복합섬유 filter의 바이러스 억제력을 직접적인 동물시험에서도 확인할 수 있었다.

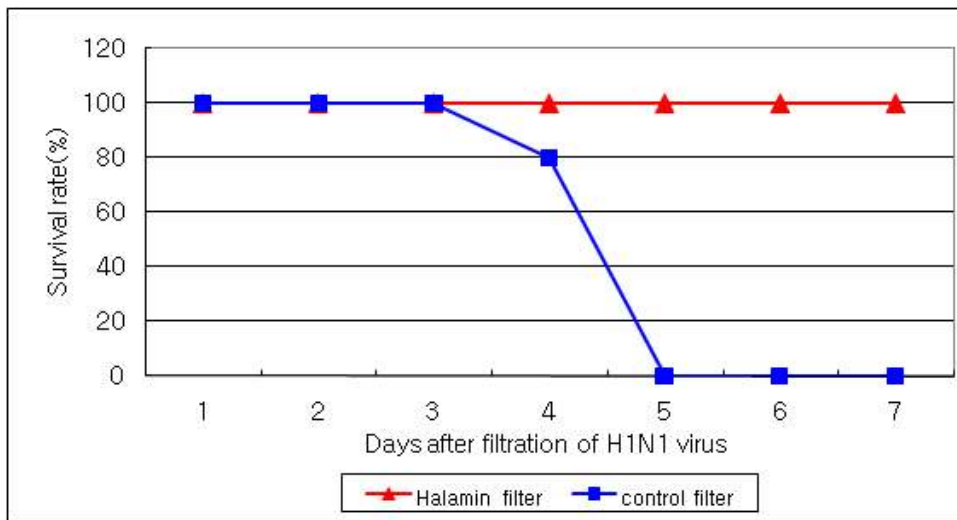


그림 3-78. 일반 필터 및 키토산/HAp/Halamine 복합섬유 filter 사용시 마우스 생존율 비교

(3) 단순 여과 과정을 통한 키토산/HAp/Halamine 복합섬유 filter 효력 시험

(가) 재료 및 방법

① 공시 바이러스

- Rabies virus (RAV)
- Canine parvovirus (CPV)
- Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)
- Transmissible gastroenteritis virus TGEV)
- Japanese encephalitis virus (JEV)
- Bovine coronavirus (BCV)

② 방법

- 배양된 바이러스를 일반용 필터와 키토산/HAp/Halamine 복합섬유 filter에 여과
- 0.45 um의 필터를 사용하여 여과액 중 세균 등 제거
- 여과 전 후의 바이러스 함량을 조직배양 세포에서의 세포변성 효과(CPE) 여부 또는 각 바이러스의 특이항체를 이용한 면역형광항체(IFA) 방법에 의해 확인하였다.

(나) 비교시험 결과

- ① DNA 바이러스인 CPV는 키토산/HAp/Halamine 복합섬유 filter가 가장 낮게 불활화되었다.
- ② 표 3-20와 같이 대부분의 RNA 바이러스(RAV, PEDV, TGEV, JEV, BCV)는 키토산/HAp/Halamine 복합섬유 filter에 여과 후 1000배 이상 불활화 된 것을 확인하였다.

표 3-20. 바이러스별 필터 효력 비교 시험 결과

| 바이러스 (strain) | 바이러스 함량 (TCID ₅₀ /ml) | | | 사용세포 |
|------------------|----------------------------------|-------------------|--|--------------------------------------|
| | 여과전 | 일반필터 여과후 | 키토산/HAp/ Halamine 복합섬 유 filter 여과후 | |
| RAV (ERA) | 10 ^{5.5} | 10 ^{5.0} | 10 ^{0.0} | Vero cell |
| CPV (KV0901) | 10 ^{4.7} | 10 ^{4.6} | 10 ^{3.6} | A72 cell (FAID ₅₀ /ml) |
| PEDV (SM98) | 10 ^{6.0} | 10 ^{5.5} | 10 ^{2.5} | Vero cell |
| TGEV (175L) | 10 ^{5.0} | 10 ^{3.9} | 10 ^{0.0} | STL strain |
| JEV (KV1899) | 10 ^{3.3} | 10 ^{1.2} | 10 ^{0.0} | PK15 cell |
| BCV (BC94) | 10 ^{5.5} | 10 ^{5.0} | 10 ^{1.5} | MDBK cell |

5. 결과 및 고찰

가. 단클론 항체 hybridoma에서 scFv 유전자 증폭 및 단백질 발현

- 필터 신소재 담지용 바이러스불활화 물질 선발 과정으로 조류인플루엔자 바이러스에 대한 단클론 항체의 scFv 단백질 확보하기 위하여 VH 및 VL 유전자를 이용한 scFv 유전자 작성 및 염기서열 분석 확인 확인된 3B191 단클론항체의 scFv 유전자를 대장균 발현 시스템에서 scFv 단백질의 발현하고 SDS-PAGE, Western blot analysis 등을 통하여 확인, 10E2 경우는 VL 유전자의 이상으로 단백질 발현이 불가능 하였음
- 선발된 담지용 물질의 조류인플루엔자 바이러스 반응효율 조사 과정에서는 대장균 발현 시스템에서의 발현된 3B19 단클론항체의 scFv 단백질과 필터와의 담지시험 결과 주성분이 단백질로 필터의 투과력 저해 및 단백질 변성으로 인한 개발 제품의 보존성에 문제점을 발생시킬 수 있음

나. 담지용 조류인플루엔자 바이러스 중화 aptamer 작성

- 기존에 보고된 인플루엔자 바이러스에 대한 aptamer A22를 합성하고 인플루엔자 바이러스에 대한 중화능을 바이러스 중화시험을 통해 분석한 결과 중화능은 확인되지 않았으며 담지시 필터와의 결합능 및 인플루엔자 바이러스에 대한 반응력도 낮은 것으로 조사됨

다. 제1협동과제에서 개발한 IgY를 이용한 바이러스 흡착효율 평가 및 기술 개발

- 테스트용 균주로 저병원성(low pathogenic) A1중 유전형 특성이 고병원성의 H5N1과 유사한 H5N3형을 선발 및 증식 확보
- 흡착 전·후 정량적인 흡착의 정도는 흡착 후 자체 제작한 Sampler (바이러스 포집기) 간이적인 포집기를 사용하여 잔여 바이러스를 포집하여 Sybr green real-time PCR법으로 바이러스입자의 감염력과 상관없이 추출된 유전자의 양을 표준곡선과 비교하여 정량화하는 방법 확립
- 주관기관에서 시험 제조한 4종 시제품 평가결과 filter의 여과 능력은 filter A> C-1> A-1> C 순으로 나타났다.
- 필터 A, A-1, C, C-1 4종 각각을 주사현미경으로 관찰한 결과 A, C, A-1, C-1순으로 표면이 균질함을 알 수 있었다.

라. 조류인플루엔자 바이러스 불활화 분석기술 개발

- 조류인플루엔자 바이러스 불활화 분석기술로서 종란점중법으로 배양 후 배양액을 채득하여 닭 적혈구에 대한 혈구응집 항원검사법을 이용하여 수치화함으로써 불활화 정도 및 여부를 측정하도록 설정하였다. 바이러스 불활화 분석법으로 A, A-1, C, C-1 4종 필터 모두에서 필터 후 바이러스가 검출되지 않아 바이러스가 불활화 되었음을 확인할 수 있었다.
- 제1협동과제에서 개발한 IgY를 이용한 담지 효력 평가에서는 선발된 Filter B (키토산 아파타이트 부직포)에 IgY를 담지하기위하여 음압 상태를 이용한 담지와 직접 분사법을 이용한 2가지 방법으로 시도하였으나 Filter A, B, B-IgY-a, B-IgY-b 등 IgY 담지 후 필터의 바이러스 여과 효과 측정 결과 IgY에 의한 바이러스 투과 억제 효과에 큰 변화가 나타나지 않았다.

마. 필터신소재 동물감염 억제성 분석기술 개발

- 바이러스 필터 효력 평가 기법 조사 및 필터신소재 동물감염 억제성 분석기술 확립을 위한 isolator를 설계 및 제작을 완료
- 2차에 걸친 동물 실험용 isolator 적용 filter 효력 시험을 위한 시험 표준바이러스(인플루엔자 PR8주)를 선발하였고 마우스를 이용한 생체에서의 필터효력 평가에 있어 개발된 isolator는 편리성과 합리성을 인정할 수 있었다.
- 본 과제에서 개발된 필터인 키토산/HAp/Halamine 복합섬유 filter는 인플루엔자바이러스의 동물감염 억제능 및 다른 RAV, PEDV, TGEV, JEV, BCV 등의 바이러스에 대해서도 불활화능이 매우 우수함을 확인할 수 있었다.

제 4 절 결론 및 향후 계획

1. 바이러스 흡착 복합섬유 제조

- 하이드록시아파타이트/키토산(이하 키토산/HAp) 복합섬유를 연속방사 공정을 통해 제조하였으며 바이러스 흡착 효과를 주사전자현미경(SEM)을 통하여 확인하였다.
- 하이드록시아파타이트 함량이 많아질수록 강도 및 신도등 물성이 다소 저하되는 현상이 관찰되었으나 필터용 부직포 제조에 적합한 물성을 유지하였다
- 연속제조 공정을 통한 바이러스 흡착 복합섬유 제조의 대량생산 기술의 국내특허를 출원 하였으며 지속적인 개량기술 개발을 통하여 국제특허를 출원할 예정이다.

2. 난황 항체 생산 및 항체담지 섬유 제조

- 인플루엔자바이러스와 결합능이 있는 IgY항체를 계란을 이용한 난황항체 생산기술을 적용하여 생산하였다 (생산능력: 30~90g/년/마리)
- 항체의 농도,온도,pH 등을 고려 음압담지 및 직접분사 법을 이용하여 항체담지 섬유를 제조하여 바이러스 차단효과를 평가 하였으나 일반 대조군(필터)과 차이를 나타내지 않았다. 이는 섬유와 항체간 결합능력이 부족하고 대기중에 노출된 항체가 급속히 활성을 잃는 것이 원인으로 판단된다.
- 항체, aptamer등 단백질 계열의 바이러스 불활성화 물질의 도입은 보존성 및 cost측면을 고려할 때 보다 경제적인 생산 및 필터소재와의 효율적인 결합 기술 개발이 추가로 요구되며, 따라서 현재의 기술 수준으로는 바이러스 불활성화 유기화합물의 필터소재 적용이 유망할 것으로 판단된다.

3. 바이러스 불활화 유/무기 촉매 복합섬유 제조

- 키토산/HAp 복합섬유에 N-halamine 반응기를 도입하여 섬유를 제조하였으며 일정 이상의 유효 농도(약 2%)에서 우수한 항바이러스 특성을 보였다
- 나노실버 복합 키토산/HAp복합섬유를 제조하였으며 그람 양성 및 음성균에서 우수한 항균성을 보였으나 항바이러스 특성은 미흡하였다
- Copper composite 키토산/HAp 복합섬유를 제조하였으며 섬유중량 대비 1.2% 농도에서 100% 바이러스 불활성화율을 나타냈다
- 항바이러스 및 항균 특성을 모두 갖는 소재는 키토산/HAp/Halamine 섬유였으며 Halamine 성분 재충전 사용의 장점 또한 고려할 때 가장 유망한 항바이러스 필터섬유소재로 판단된다

4. 항바이러스 필터 부직포 및 시제품 제조

- 니들펀칭 , 썬넬본딩 방법으로 필터용 부직포 원단을 제조 하였으며 공조필터의 경우 분진의

여과효율을 높이기 위해 스펀본드와 멜트블로운 부직포를 복합화 하였다

- 인체 보호 일회용 마스크 및 축사공조용 필터 모듈의 시제품을 제작하였다
- 일회용 마스크의 경우 산업화를 위해서 공신력 있는 국내외 기관의 인증이 요구되며, 이를 위해 식품의약품안전청(KFDA)의 일회용 마스크 등급기준에 적합한 시험을 추진 할 예정이며, 필터소재의 경우 미국 Nelson lab에 의뢰하여 바이러스여과효율(VFE)을 측정할 예정이다.

5. 동물시험을 통한 필터신소재의 바이러스 차단효과

- 바이러스 포집기를 사용한 필터소재의 바이러스 차단효과를 RT-PCR법을 이용하여 평가 하였으며 개발 섬유소재를 적용한 필터에서 대조군(일반필터) 대비 유의차이를 보였다
- 축사환경에서의 바이러스차단 효과를 모사하기 위해 동물시험용 아이솔레이터를 특수제작 하였으며 마우스를 이용한 시험에서 개발필터 소재 적용 군에서는 모든 개체가 생존한 반면 대조군에서는 전체 폐사하여 개발소재 필터의 우수한 바이러스 차단효과를 확인할 수 있었다.
- 시험제작된 프리필터 유닛을 이용하여 무창계사 특히 기업형 양계장 등과 협의하여 현장 적용 시험을 추진할 계획이다.
- 타산업 분야 특히 자동차 공기필터 적용을 필터제작 업체와 협의 중이며, 자체 성능 평가가 완료되는 대로 상품화를 추진할 예정이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연차별 연구목표 및 달성도

| 구분 | 세부과제별 | 연구개발의 목표 | 달성도(%) | 연구개발의 내용 |
|------|-----------------|-----------------------------------|--------|---|
| 1차년도 | 텍산메드테크 (1세부) | ○바이러스 흡착용 섬유상 신소재 개발 | 100 | ○고농도 하이드록시아파타이트 복합섬유 제조 기술 개발 (양산화) ○정전 필터소재 복합화 기술 개발 ○하이드록시아파타이트 코팅기술 개발 |
| | 전북대학교 (2세부) | ○조류인플루엔자 바이러스 불활화 난황항체 담지기술 개발 | 80 | ○계란내 난황항체(IgY) 생산 기술 확립 ○섬유소상에 난황항체 최적 담지 기술 개발 ○조류인플루엔자 바이러스 흡착효율 분석 |
| | 국립수의과학검역원 (3세부) | ○필터신소재의 돼지 호흡기 병원체별 흡착효율 조사 | 80 | ○공기 중 돼지 호흡기 병원체(세균, 바이러스) 흡착효율조사 ○필터 신소재의 병원체 흡착 안정성 시험 ○흡착된 병원체의 사멸율 조사 |
| 2차년도 | 텍산메드테크 (1세부) | ○바이러스 불활화 소재 제조 기술 개발 | 90 | ○촉매 담지 필터소재 제조기술 개발 (N-halamine, Copper 복합섬유 제조) ○난황항체 담지 필터소재 제조기술 개발 ○필터 최적 기공도 분석 |
| | 전북대학교 (2세부) | ○조류인플루엔자 바이러스 흡착효율 및 불활화 분석 기술 개발 | 100 | ○필터 신소재의 조류인플루엔자 바이러스 차단효율 분석 ○항체 촉매 담지 필터의 조류 인플루엔자 불활화 효능 분석 |
| | 국립수의과학검역원 (3세부) | ○필터신소재의 동물감염 억제효능 분석 | 100 | ○필터 신소재 병원체 투과성 조사 ○필터를 통한 병원체의 생존력 조사 ○필터신소재를 투과한 병원체 오염공기에 노출된 동물의 감염력 조사 |
| 3차년도 | 텍산메드테크 (1세부) | ○필터신소재 대량생산 및 응용제품 개발 | 100 | ○축사 공조용 필터 유닛 개발 ○인체 보호용 마스크 개발 ○응용제품 필터 효율평가 |
| | 전북대학교 (2세부) | ○응용제품 성능분석 | 100 | ○공조 필터 유닛 및 마스크의 조류 인플루엔자 바이러스 흡착성능 및 불활화 효능 분석 ○문제점 분석 및 피드백 ○응용제품의 조류인플루엔자 바이러스 차단효율 분석 |
| | 국립수의과학검역원 (3세부) | ○응용제품의 동물감염 차단 효과 평가 | 90 | ○ 축사환경에서 필터 신소재의 병원체 동물감염 차단 효과 평가 ○ 축사내 오염된 공기의 병원체 제거효과 조사 |

2. 관련분야에의 기여도

- 가. 동물시험을 통한 개발필터 소재의 항바이러스 성능을 입증하였으며 우선적으로 무창계사 등 축사에 적용시 조류독감 감염율을 낮춰 줄 수 있을 것으로 기대됨
- 나. 인체 보호용 마스크 제품 전개를 통해 최근 수입되고 있는 항바이러스 마스크 제품의 대체가 가능할 것으로 기대됨
- 다. 항바이러스 물질을 섬유와 복합화 하는 원천기술을 개발하여 국내 섬유소재 기술수준의 향상에 기여 하였으며 필터관련 시장에도 파급효과가 기대됨

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화 산업화 계획(기술실시 등)

- 인체 보호 일회용 마스크 시제품을 제작하였으며 매출 발생 (20백만원)
- 공조필터 모듈을 제작하였으며 향후 field test를 통한 사업화 추진 예정

2. 교육,지도,홍보 등 기술확산 계획

- 2009년 11월 KBS,YTN 등 필터소재 개발에 관한 언론 보도

3. 특허,품종,논문 등 지식재산권 확보계획

가. 특허 (2건 출원 : 텍산메드테크(주), 국립수의과학검역원 각 1건)

(1) 텍산메드테크

- 특허명: 부직포용 하이드록시아파타이트/키토산 복합섬유의 제조방법 및 그 제조물
- 출원번호 및 일자: 제10-2008-0050081호, 2008. 05. 29.

(2) 국립수의과학 검역원

- 특허명: 바이러스에 대한 필터의 효력평가장치 및 효력평가 방법
- 출원번호 및 일자: 제10-2010-0016909호, 2010. 02. 25

나. 학술발표 1건(국립수의과학검역원) - 부록 1참조

- 제목: Development of the in vivo bioaerosol experiment system for virus filtration efficiency (VFE) test
- 발표: 2009 대한수의학회 추계국제 학술대회
- 일시: 2009년 10월 16일

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Virus Filtration Efficiency Test (VFE)

가. 세계적으로 공인되어 있는 바이러스에 대한 필터의 감염억제 효력평가(Virus filtration efficiency : VFE)는 관련 근거

- U.S. Department of Defense. 1975. MIL-M36954C. Military Specification Mask, Surgical, Disposable
- Anderson 2000 Inc. 1976. Viable (Microbial) Particle Sizing Samplers Operating Manual. Andersen 2000 Inc., Atlanta, GA

나. VFE 평가 대행기관: 미국의 Nelson사, 미군 VFE 표준절차(Military standard MIL-M-36954) 및 의학용 마스크 제조 관련 검사규정인 ASTM (American society for testing and materials) F2101에 명시된 절차를 따르고 있음

다. VFE 검사 방법

- 직경 약 27nm (0.027 μ)인 외피가 없는 정이십면체인 phiX174 박테리오파지를 필터 효력평가에 사용
- 박테리오파지 부유액을 일정한 압력 및 유압으로 3.0 μ 입자로 분무기(Chicago nebulizer)를 이용하여 약 3.0 μ m 입자크기로 분무하고 분당 28.3리터의 유속으로 테스트하는 필터를 거쳐 Andersen sampler로 포집되도록 고안된 장치를 사용
- VFE 검사는 $21 \pm 5^\circ\text{C}$ 및 상대습도 5%의 조건으로 최소 4시간이상 보관한 필터를 사용하며 VFE 대조군은 평균 2200 ± 500 PFU 이어야 함
- Andersen sampler 에는 *E.coli* C가 배양된 한천배지를 두어 포집 후 37°C 에서 12-24시간 배양하여 포집된 박테리오파지의 증식에 의한 플라그의 수를 셸로서 필터효율을 측정.

라. 기타 관련 검사로는 미국 CDC산하의 NIOSH(National Institute for Occupational Safety and Health)/NPPTL(National Personal Protective Technology Laboratory)의 호흡장치의 투과성 검사를 위한 표준절차가 규정되어 있음

2. 의료용 얼굴마스크(Medical Face Masks) 표준

가. ASTM F 2100, Standard specification for performance of materials used in medical Masks.

나. 5항목 검사

- Bacterial filtration efficiency (BEF); ASTM F 2101에 따라 측정
- Sub-micron particulate filtration efficiency (PEF); ASTM F 2299에 따라 측정
- Differential pressure (Delta P); U.S. Department of Defense. 1975. MIL-M36954C.
- Fluid penetration resistance; ASTM F 1862
- Flammability; US code of federal regulation, 16 CFR Part 1610에 따라 측정

제 7 장 참고문헌

1. “에어필터 제조 및 성능평가”, 한국생산기술연구원, 2005.
2. S. D. Worley and, Sun G. Biocidal polymers. Trends Polym Sci, 1996, 4, 364 - 370.
3. D. D. Gagliardi, "Antibacterial finishes", American Dyestruff Repoter, 1962.
4. T. C. Tsao, D. E. Williams and S. D. Worley, "A new disinfectant compound", Ind. Eng. Chem. Res, 1990, 29, 2161-2163.
5. Encyclopedia of polymer science and engineering, Wiley and Sons, 1987. IX, pp 580-598
6. Fraser C, Donnelly C, Cauchemez S, Hanage W, Van Kerkhove M, Hollingsworth T, Griffin J, Baggaley R, Jenkins H, Lyons E. 2009. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. Science 324: 1557.
7. Hirst G, Pickels E. 1942. A method for the titration of influenza hemagglutinins and influenza antibodies with the aid of a photoelectric densitometer. The Journal of Immunology 45: 273.
8. Macatonia S, Knight S, Edwards A, Griffiths S, Fryer P. 1987. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. Journal of Experimental Medicine 166: 1654.
9. Martella V, Elia G, Buonavoglia C. 2008. Canine distemper virus. The Veterinary clinics of North America. Small animal practice 38: 787.
10. Molinero V, Calvo E. 1998. Electrostatic interactions at self assembled molecular films of charged thiols on gold. Journal of Electroanalytical Chemistry 445: 17-25.
11. Peiris M, Yuen K, Leung C, Chan K, Ip P, Lai R, Orr W, Shortridge K. 1999. Human infection with influenza H9N2. The Lancet 354: 916-917.
12. Polson A, Coetzer T, Kruger J, Von Maltzahn E, Van der Merwe K. 1985. Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. Immunological Investigations 14: 323-327.
13. Sun Y, Sun G. 2001. Novel regenerable N-halamine polymeric biocides. III. Grafting hydantoin-containing monomers onto synthetic fabrics. Journal of Applied Polymer Science 81: 1517-1525.
14. Ulman A. 1996. Formation and structure of self-assembled monolayers. Chem. Rev 96: 1533-1554.
15. Vigneshwaran N, Kumar S, Kathe A, Varadarajan P, Prasad V. 2006. Functional finishing of cotton fabrics using zinc oxide-soluble starch nanocomposites. Nanotechnology 17: 5087-5095.

16. Von Messling V, Zimmer G, Herrler G, Haas L, Cattaneo R. 2001. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *The Journal of Virology* 75: 6418.
17. Burmester, B. R. and Witter, R. L. (1972) Efficiency of commercial air filters against Marek's disease virus. *Applied Microbiology*. 23(3), 505-508
18. Jeon, S. H., Kayhan B., Ben-Yedidia T., Arnon R. (2004) A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin. *J Biol Chem*. 279(46), 48410-48419
19. Kuiper, M., Sanches, R. M., Walford, J. A., Slater, N. K. H. (2002) Purification of a functional gene therapy vector derived from moloney murin leukaemia virus using membrane filtration and ceramic hydroxyapatite chromatography. *Biotechnology and bioengineering*. 80(4), 445-453.
20. Leeming, J. P., Pryce-Roberts, D. M., Kendrick, A. H. and Smith, E.C. (1995) The efficacy of filters used in respiratory function apparatus. *Journal of hospital Infection*, 31, 205-210.
21. Li, H. W., Wu, C. Y., Tepper, F., Lee, J. H., Lee, C. N. (2009) Removal and retention of viral aerosols by a novel alumina nanofiber filter. *Aerosol Science*, 40, 65-71.
22. Roelants P., Boon, B., Lhoest, W. (1968) Evaluation of a commercial air filter for removal of viruses from the air. *Applied Microbiology*. 16(10), 1465-1467

Development of the *in vivo* Bio-aerosol experiment system for virus filtration efficiency (VFE) test

Bang-Hun Hyun¹, Jie-yeun Park¹, Hyun-Mi Pyo¹, Hyung-Kwan Jang², Soo-Dong Cho¹, Dong-Kun Yang¹, Jaejo Kim¹, Seong-In Lim¹, Jae-Young Song¹, Chun-Gui Park³



¹ Virology Division, Department of Veterinary Research, National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang, Republic of Korea

² Department of Infectious Diseases & Avian Diseases, College of Veterinary Medicine and Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju, Republic of Korea

³ THREE-SHINE INC, Yuseng-Gu, Daejeon, Republic of Korea

Corresponding author: Bang-Hun Hyun (E-mail: hyunbh@nvrqs.go.kr)

INTRODUCTION

- ◆ Bio-aerosols are aerosols of biological origins such as viruses, bacteria, fungi, spores, pollen and allergens.
- ◆ The spread of airborne pathogens such as high pathogenic avian influenza (HPAI) and severe acute respiratory syndrome (SARS) as well as new influenza A (H1N1) in 2009 have raised the public's concerns about bio-aerosols and protection measure.
- ◆ Filtration is one of the most commonly applied methods for aerosol removal because it is simple and economical.
- ◆ However, there is no *in vivo* filter testing system directly available on small experimental animals such as mice.
- ◆ In this study, we attempted to construct *in vivo* bio-aerosol experiment system and evaluated the efficiency of test filters.

MATERIALS & METHODS

- ◆ Bio-aerosol experiment system was constructed as small-scale horizontal laminar airflow clean room.
- ◆ This system consisted of virus generator chamber (40 x 40 x 40 cm) connected with compressor and isolation testing chamber (50 x 40 x 40 cm) connected with control box.
- ◆ The bio-aerosol was generated by virus generator and spray hopper in this system.
- ◆ The airflow divided into two parallel streams.
- ✓ One stream passed through the test filter and was collected by second sampler after passing the isolation testing chamber in which a mouse cage was laid while the other was collected by first sampler without passing by the test filter.

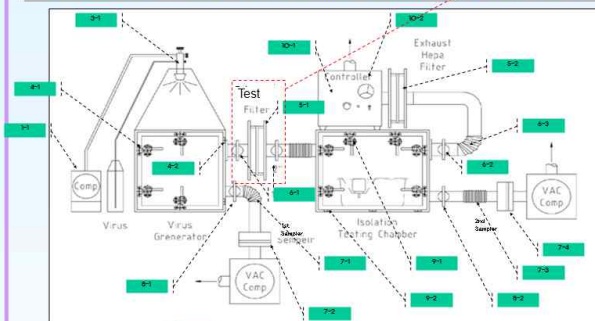


Fig 1. Diagram of the *in vivo* bio-aerosol experiment system showed the composition and accessory 1-1: Compressor 3-1: Spray nozzle, 4-1& 9-1: Magnet swin catch, 4-2 & 9-2: Hinge, 5-1: Test filter, 5-2: Exhaust hepa filter, 6-1: 1st Exhaust line ball valve, 6-2: 2nd Exhaust line ball valve, 6-3: Flexible exhaust line, 7-1 & 7-3: 1st and 2nd flexible sampler line, 7-2 & 7-4: 1st & 2nd Sampler sheet fixing union, 8-1 & 8-2: 1st & 2nd Exhaust line ball valve, 10-1: Blower, 10-2: Presser gauge

- ◆ Chitosan / hydroxyapatite composite fibers (TexsanMedtech, Korea) were used as filter material.
- ◆ PR8, an isolate of influenza virus, was chosen as the biological test agent.
- ◆ In this study, two type of efficiency could be determined: viable removal efficiency (VRE) and survival rate of the mouse.
- ◆ VRE was determined by comparing the filter penetrating viral aerosols in experimental stream and control stream.
- ◆ Virus was quantified a plaque-forming units (PFUs) or Ct values of real-time PCR to the influenza virus.

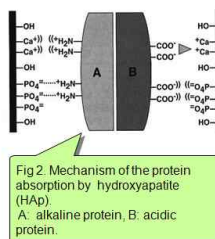


Fig 2. Mechanism of the protein absorption by hydroxyapatite (HAP). A: alkaline protein, B: acidic protein.

| Primer | Sequence(5' to 3') | Size |
|--------|--------------------------|-------|
| M-25 | AGATGAGTCTTCTAACCAGGTCG | 100bp |
| M-124 | TGCAAAAACATCTTCAAGTCTCTG | |

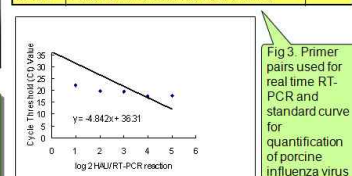


Fig 3. Primer pairs used for real time RT-PCR and standard curve for quantification of porcine influenza virus

RESULTS AND DISCUSSIONS

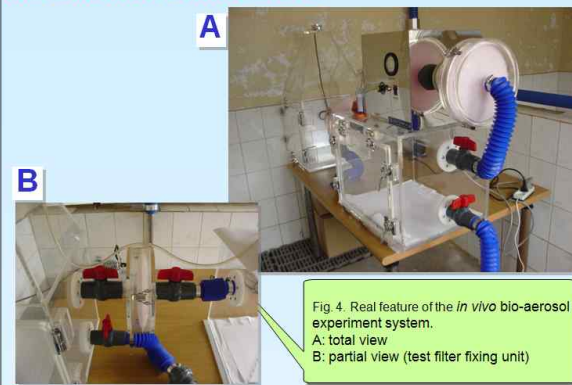


Fig 4. Real feature of the *in vivo* bio-aerosol experiment system. A: total view B: partial view (test filter fixing unit)

- ◆ The chitosan / hydroxyapatite composite fiber filter was efficient more than other filters such as gelatin.
- ◆ Thus, chitosan / hydroxyapatite composite fiber has the potential to pull microorganisms in aerosol (filter A > C-1 > A-1 > C).
- ◆ None of the mice received filtered air stream through the chitosan / hydroxyapatite composite fiber filter showed evidence of infection such as anorexia, weight loss and death.
- ◆ In contrast, all of the mice that received unfiltered air had influenza virus antibody and showed the symptoms by the infection.
- ◆ These different results were originated from the electrostatic attraction of viral particles to filter fiber. Most microorganisms have an electronegative surface due to their carboxyl and phosphate groups.
- ◆ In contrast, surface of the chitosan / hydroxyapatite composite fibers is positive with functional groups of positively charged pairs of calcium ions.

Fig 5. SYBR-Green real-time RT-PCR assay after filtration with various filter different chitosan / hydroxyapatite composition ratio. Ct value of the non filter, filter C, filter A-1, filter C-1 and filter A was 21.96, 25.85, 31.7, 33.12 and 33.47, respectively

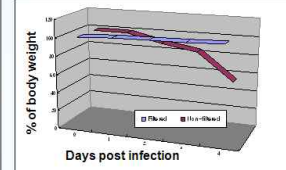
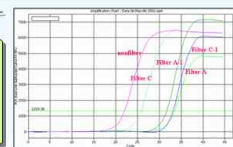


Fig 6. Changes of percentage of body weight after exposure with PR8 strain of porcine influenza virus (5 x 10⁶ PFU/ml) using *in vivo* bio-aerosol experiment system. Each 5 Balb/c mice (female, 6-7 week old) per group was used and average value was calculated. Mice were euthanized body weight loss exceeds 50%.

CONCLUSION

- ◆ This novel *in vivo* bio-aerosol experiment system demonstrated its potential for effective evaluation of the filters.
- ◆ The chitosan / hydroxyapatite composite fiber filter testing in this system presented advantageous potential for retention of viral particle in aerosol.

This system showed sufficient safety and significant simple!

REFERENCES

1. Leeming, J. P., Pryce-Roberts, D. M., Kendrick, A. H. and Smith, E.C. (1995) The efficacy of filters used in respiratory function apparatus. *Journal of Hospital Infection*, 31, 205-210.
2. Li, H. W., Wu, C. Y., Tepper, F., Lee, J. H., Lee, C. N. (2009) Removal and retention of viral aerosols by a novel alumina nanofiber filter. *Aerosol Science*, 40, 65-71.
3. Kulpur, M., Sanches, R. M., Walford, J. A., Slater, N. K. H. (2002) Purification of a functional gene therapy vector derived from moloney murine leukaemia virus using membrane filtration and ceramic hydroxyapatite chromatography. *Biotechnology and bioengineering*, 80(4), 445-453.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.