

GOVP1200815418

최 종
연구보고서

Тоогагги

조류인플루엔자 유전자재조합 백신개발 및
방제연구

Development of recombinant avian
influenza virus vaccine

주관연구기관 : 건국대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “조류인플루엔자 유전자재조합 백신개발 및 방제연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 05월 24일

주관연구기관명 : 건국대학교

총괄연구책임자 : 송 창 선

세부연구책임자 : 이 중 복

세부연구책임자 : 박 승 용

세부연구책임자 : 최 인 수

연 구 원 : 김 용 주

연 구 원 : 이 윤 정

연 구 원 : 권 지 선

연 구 원 : 이 현 정

연 구 원 : 이 동 훈

연 구 원 : 조 수 정

연 구 원 : 정 은 주

연 구 원 : 정 승 환

연 구 원 : 정 현 정

연 구 원 : 유 제 남

연 구 원 : 김 세 라

요 약 문

I. 제 목

조류인플루엔자 유전자재조합 백신개발 및 방제연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 국내 양계농장, 야생 철새류 유래 조류인플루엔자 바이러스의 변이여부와 특성을 파악하고, 저병원성 H9N2 조류인플루엔자 (LPAI)의 병원성증강요인을 면역억제에 초점을 맞추어 면역병리학적으로 해석하고자 하였다. 또한 닭에서 AI 감염 시 LPAI 뿐만 아니라 고병원성 조류인플루엔자 (HPAI)감염으로 유발되는 임상증상을 효과적으로 방어하고 동시에 감염계의 분변으로부터 바이러스의 배출을 최소화할 수 있는 효과적인 DNA 백신을 개발하여 AI의 감염에 의한 손실 및 그에 파급되어 발생하는 산업적인 피해를 최소화 할 수 있는 기반을 확립하고자 연구를 수행하였다. 또한 본 연구를 통하여 개발되는 백신은 야외자연감염과 백신을 접종한 개체의 구별이 용이한 마커백신으로서의 역할도 수행할 수 있으므로 기존의 사독백신 사용 시 발생하는 문제점을 극복할 수 있다는 커다란 장점이 있다. 더 나아가 본 연구를 통하여 확립된 개발백신의 안전성 및 효능은 위급상황 시 사람의 감염을 예방하는데 적용할 수 있는 중요한 자료로서 활용이 가능하기 때문에 앞으로의 발전가능성 및 적용범위가 매우 넓을 것으로 판단된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

기존의 DNA 백신의 효능을 향상시키고자 NDV helper T cell epitope, 사이트카인 또는 CpG adjuvant 등의 면역증강 효능을 확인하였으며, 이를 이용하여 저

병원성 및 고병원성 조류인플루엔자에 효과적인 백신을 개발하고자 혈청형 H5 및 H9 항원을 효과적으로 발현하고 전달하는 DNA 백신의 효능을 시험하였다. 또한 닭의 세포성면역 분석기법을 확립하여 세포성 면역억제질환 감염 시 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 병원성이 증대됨을 확인하여 국내 양계농장에 만연되어 있는 혈청형 H9N2 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 병성기전 및 병원성 증강요인을 규명하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

조류 세포성면역 침단분석기법 개발로 조류인플루엔자와 뉴캐슬병 등 주요 가금질병 방제연구에 기여할 것으로 판단된다. 또한 NDV helper T cell epitope 발현 조류인플루엔자 DNA 백신제조기술을 이용하여 인체에 감염 가능한 변이형 고병원성 조류인플루엔자 발생에 대비한 사람독감백신 개발방안을 제시하고자 한다. 아울러 뉴캐슬병 생독백신 접종농장에 NDV helper T cell epitope 발현 조류인플루엔자 DNA 백신과 기존의 조류인플루엔자 사독오일백신을 병행 사용하는 백신접종 프로그램에 대한 야외임상시험 실시를 건의하며, 궁극적으로는 조류인플루엔자의 확산을 효과적으로 억제할 수 있는 미래의 조류인플루엔자 국가방역 정책 수행에 모델이 될 수 있는 경제적인 조류독감 방제방안 제시하고자 한다.

SUMMARY

(영문요약문)

We surveyed avian influenza (AI) activity in migratory birds in their habitats and in a live bird markets (LBMs) in Korea during winter season in 2003-2007 and September 2006-March 2007, respectively. To identify the possible source of the infection, avian influenza viruses (AIVs) isolated from domestic chicken and duck farms were also genetically characterized. Ninety-five AIVs were isolated from total 7093 fecal specimens of migrating birds, and 28 avian influenza viruses were isolated from total 648 tissues or oropharyngeal swab samples of domestic poultry in LBM during the study. Eleven HA subtypes of AIV (H1 to H12 except H8) were isolated from migratory birds and four HA subtypes of AIV (H9N2, H3N2, H3N8 and H6N2) were isolated from domestic poultry in LBMs. Most recent H9N2 viruses isolated from terrestrial poultry in Korea have low affinity with horse erythrocytes (which exclusively display 2,3-linked SA) and one H9N2 virus isolated from LBMs and the H7N8 virus isolated from migratory birds could replicate in chickens, turkeys as well as BALB/c mice. The isolation of H7N8 from migratory birds raises concern about reservoirs of potentially pathogenic influenza virus for domestic poultry. The low pathogenic H5 viruses of migratory birds clustered separately with highly pathogenic HA genes of H5N1 viruses. The H9N2 AIV isolated from domestic ducks is related to the AIVs isolated from migratory birds. These results suggest that the reassortment events sufficiently occurred not only in migratory birds habitats but also in the LBMs which supplied birds from the chicken and domestic duck farms.

The pathogenesis of and host immune response to H9N2 low pathogenic

avian influenza (LPAI) virus in poultry has not been completely elucidated. Therefore, in present experiment, pathogenesis of and host immune responses to low pathogenic avian influenza H9N2 virus in immunosuppressed chicken model were evaluated by virus shedding, clinical signs, histopathology, FACs analysis and real-time quantitative RT-PCR for cytokine gene expression. We demonstrated that pathogenicity of H9N2 low pathogenic avian influenza (LPAI) virus was more enhanced in cyclosporine A (CsA) treated SPF chickens than cyclophosphamide (CY) - treated or immunocompetent SPF chickens. Furthermore, immune responses to the H9N2 LPAI virus in CsA-treated SPF chickens were determined. The proportion of CD8⁺ T cells and expression of mRNA for IFN- γ dramatically increased in immunocompetent chickens at 5 days post infection. However, those of CsA-treated chickens significantly decreased. CsA treatment induced increased PI value and mortality (1.225 PI value and 25% mortality) as well as significantly increased virus shedding after infection. These results suggest that T cells and T-cell-mediated responses may be important in viral clearance and promoting recovery from H9N2 LPAI virus infection. Our data provide insights into the molecular interaction of this virus, candidate for pandemic influenza, with immunocompromised human by immunosuppressants.

The use of protein or DNA in vaccination process rather than living or attenuated microorganism, aims at the increase of the vaccines safety. However, in these cases, the use of adjuvant is frequently required to improve their immunogenicity. In this study, to enhance immune responses to plasmid-expressed Ag, a plasmid encoding either the H5N2 or H9N2 subtypes of avian influenza virus hemagglutinin or neuraminidase genes fused to chicken helper T-cell (Th-cell) epitope of Newcastle disease virus (pCI-p131HA and pCI-p131NA, respectively) were constructed. One-week-old

SPF chickens were vaccinated with B1, and constructed plasmids were intramuscularly injected 4 weeks later. Chickens were challenged with homologous H9N2 low pathogenic avian influenza (LPAI) viruses at 8 weeks old via intra-ocular route and observed for 15 days. Co-administration of p131-HA and p131-NA in NDV vaccinated group significantly reduced the virus shedding compared with administration of HA and NA in non-NDV vaccinated group. Further, NDV Th-cell epitope fused with H5 subtype AIV DNA vaccine could induced strong boosting effect after H5N2 killed oil vaccination. These results indicate that this strategy activates high levels of T-cell help, the key to induction and maintenance of effective immunity

CONTENTS

Chapter 1	Outline of the research.....	1
Section 1	Research backgrounds.....	1
Section 2	Research purposes and contents.....	7
Section 3	Research strategies.....	12
Chapter 2	Current status on related areas.....	16
Chapter 3	Research contents and results.....	19
Section 1	Development of DNA vaccines encoding low pathogenic..... H9N2 avian influenza virus genes fused with T helper cell epitope of Newcastle disease virus and protective effect in SPF chickens challenged with homologous avian influenza virus	19
Section 2	Development of Cytokine, Cholera toxin, CpG adjuvant for AIV DNA vaccines	26
Section 3	Effects of cyclosporine A on the immune responses to and pathogenesis of a H9N2 low pathogenic avian influenza virus in specific pathogen free (SPF) chickens	33
Section 4	Development of DNA vaccines encoding low pathogenic H5N2 avian influenza virus genes fused with T helper cell epitope of Newcastle disease virus and boosting effect of AIV killed oil vaccines in SPF chickens	52

Chapter 4	Accomplishment and contribution of research results.....	71
Chapter 5	Application plans on research results	72
Chapter 6	Recent updated information from overseas	73
Chapter 7	References	74

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 1 절	연구개발의 필요성	1
제 2 절	연구개발의 목표 및 내용	7
제 3 절	연구개발 방법 및 설계	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황	16
제 1 절	국내·외 관련기술의 현황과 문제점	16
제 2 절	앞으로의 전망	17
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	19
제 1 절	저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 H9 항원을 효과적으로 발현하고 전달하는 재조합 DNA 백신 및 subunit 백신의 개발	19
제 2 절	DNA 백신의 효능을 향상시키는 사이토카인, 콜레라톡신 및 CpG adjuvant의 개발	26
제 3 절	저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 병원성을 증대시키는 cofactor 의 확인을 통한 새로운 질병방제기법의 개발	33
제 4 절	고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 H5 항원을 효과적으로 발현 하고 전달하는 재조합 DNA 백신 및 subunit 백신의 개발	52
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	71
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	72
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	73
제 7 장	참고문헌	74

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 필요성

1. 연구목적

조류독감이라고 불리고 있는 조류인플루엔자 (Avian Influenza : AI)는 닭, 칠면조, 야생조류 등에 감염되며, 주로 닭과 칠면조에 감염 시에는 심한 산란저하, 높은 폐사율 유발 등 많은 경제적 피해를 유발시키나 오리와 야생조류는 대부분 감염되더라도 가벼운 산란저하 이외의 임상증상이 잘 나타나지 않는 특징이 있다. 원인체는 조류에 감염되는 A형 조류인플루엔자 바이러스 (Avian Influenza Virus : AIV)이며, 사람, 돼지, 말에 감염되는 인플루엔자 바이러스와 유사하나 혈청형으로 구분이 가능하다. 조류인플루엔자 바이러스는 병원성에 따라 닭에 감염 시 가벼운 호흡기 증상을 유발하는 비병원성 조류인플루엔자, 1-30% 내외의 폐사와 산란저하를 유발하는 저병원성 조류인플루엔자 그리고 95% 이상의 높은 치사성을 보이는 고병원성 조류인플루엔자 등 크게 3가지 병형으로 구분할 수 있다. 이중 고병원성 조류인플루엔자 (Highly Pathogenic Avian Influenza : HPAI)는 국제수역사무국 (OIE)에서 A 등급으로, 국내에서는 제 1 종 가축전염병으로 분류하고 있다. 고병원성 조류인플루엔자는 발생시 해당국 방역기관 및 OIE 보고를 의무화하고 있으며, 발생국은 해외로 닭, 오리 등 양계산물을 수출할 수 없게 된다. 조류인플루엔자 바이러스는 혈청형이 매우 다양한 것이 특징이며 최대 144종까지 분류가 가능하다. 혈청형은 바이러스 표면의 두 가지 단백질 (Hemagglutinin, Neuraminidase)의 종류에 따라 구분되며 H 혈청형 16종과 N 혈청형 9종으로 구분되고 H5N1, H9N2 등의 방식으로 표기된다. 닭과 칠면조에 치사율이 매우 높은 고병원성 조류인플루엔자는 현재까지 H5와 H7 혈청형에 의해서만 발생되고 있다.

국내의 경우 혈청형 H9N2 저병원성 조류인플루엔자와 혈청형 H5N1 고병원성 조류인플루엔자가 각각 1996년도와 2003년도에 최초 발생되어 문제시되고 있다. 저병원성 조류인플루엔자는 1996년도 3월 국내 경기도 화성군 육용종계농장에서 최초로 발생하였으며, 그 이후 현재까지 산란계와 종계에서 심한 산란저하를 동

반하는 폐사유발로 심각한 경제적인 피해를 유발하고 있다. 중동지역을 비롯한 아시아 여러 지역에서도 저병원성 조류인플루엔자 감염으로 인한 산란저하와 폐사의 피해가 날로 커져가고 있어 파키스탄 등 일부 국가에서는 저병원성 조류인플루엔자 바이러스를 이용한 사독오일백신을 사용하고 있는 실정이다. 저병원성 조류인플루엔자 발생은 OIE 보고의무와 국가간 축산물 교역의 장해요인으로 작용하지는 않더라도 양계집단 사육지역에 발생할 경우 심각한 산란저하 피해와 많게는 30-40%에 육박하는 높은 폐사피해를 유발하기 때문에 문제의 심각성이 더해가고 있는 실정이다.

고병원성 조류인플루엔자는 지난 2003년 12월 충북 음성군 육용중계농장에서 국내 최초로 발생이 확인되었으며, 2006년 11월 22일 전라북도 익산시 함열읍에서 2년여 만에 다시 발생하였다. 분리된 바이러스는 모두 감염된 닭을 90%이상 폐사시키는 고병원성으로 밝혀졌으며, 바이러스의 혈청형을 조사한 결과 H5N1으로 확인되었다. 국내에서 확인된 조류인플루엔자 바이러스의 혈청형이 H5N1 type으로 확인됨에 따라 국내에서도 이 바이러스가 인체에 전염될 가능성에 대한 논란에 관심이 고조되고 있는 실정이다. 과거 1997년도에 홍콩에서 세계 최초로 조류유래 혈청형 H5N1 고병원성 조류인플루엔자 바이러스가 사람에게 감염되어 사망한 사례가 있기 때문이다. 또한 금번 고병원성 조류인플루엔자 발생의 원인으로 추정하고 있는 겨울철 대규모 철새의 이동이 계속되고 있고, 우리나라가 고병원성 조류인플루엔자의 발생이 빈번한 홍콩과 중국의 인접국인 점 그리고 이들 국가와 교류가 빈번한 아시아 국가간 대규모 인적, 물적 교류의 확대 등 고병원성 인플루엔자의 재발 뿐 만 아니라 인체감염이 가능한 변이 바이러스의 출현도 배제할 수 없는 상황이라 할 수 있다.

본 연구에서는 고병원성 및 저병원성 조류인플루엔자를 종합적으로 방제할 수 있는 기술을 개발하여 제시하고자 한다.

국내분리 저병원성 조류인플루엔자 바이러스는 SPF 닭에 접종 시 임상증상이나 폐사를 거의 유발하지 않지만, 야외농장에서 사육하는 산란계와 종계에 감염 시에는 심하면 산란정지와 함께 30-40% 정도의 폐사유발 등의 경제적 피해를 야기하고 있어 야외농장에서 저병원성 조류인플루엔자 바이러스가 병원성이 증

강되는 요인을 확인하여 저병원성 조류인플루엔자 감염피해를 최소화 할 수 있는 방역기술을 개발하고자 한다.

또한 고병원성 조류인플루엔자 발생시 살처분 정책과 병행하여 사용할 수 있는 백신을 개발하고자 한다. 유사시 질병의 확산을 최소화하기 위하여 백신의 사용을 선택할 경우 백신접종계가 야외감염시 바이러스의 배출량을 최소화 할 수 있어야 한다. 약독주를 이용한 생바이러스 백신은 접종이 용이하고 효능이 우수할 것으로 예상되나 인플루엔자 바이러스의 특성상 강독으로 back mutation의 변화 가능성이 높아 시도하기에는 너무 위험성이 매우 높다 할 수 있다. 그러나 사독백신의 경우에는 이탈리아, 홍콩 등 일부 고병원성 조류인플루엔자 발생국에서 사용하여 예방효과를 보고 있는 것으로 알려져 있어 개발 가능성이 매우 크다. 그러나 우리나라를 포함하여 대부분의 국가들이 고병원성 조류인플루엔자 발생시 감염계 또는 감염 의심계를 강제 살처분하는 정책을 사용하고 있으므로 개발백신은 반드시 백신접종에 의한 항체와 야외 자연감염에 의한 항체의 구분이 가능한 마커백신이어야 한다. 조류인플루엔자 바이러스에 대한 중화능이 있는 H (Hemagglutinin) 항원 유전자를 클로닝하고 이를 발현하여 subunit 백신으로 사용한다면 기존의 조류인플루엔자 표준 진단법인 AGP 검사법의 사용하여도 백신 유도 항체와 야외감염에 의한 항체를 쉽게 감별할 수 있기 때문에 효율적인 선택적 살처분 정책의 수행이 가능하게 된다.

그러나 subunit 백신은 항체 및 세포면역능 유발이 약한 단점이 있다. 이러한 점을 보완하기 위하여 전 세계적으로 수많은 연구가 진행되었는데 그 중에서도 괄목할만한 연구는 DNA 자체를 백신으로 사용하는 방법의 고안과 항체생성능을 높이기 위하여 콜레라독신과 세균의 반복된 CpG motif를 백신에 추가하는 기술이다. 또한 백신에 사이토카인을 추가함으로써 백신의 효능을 배가시키는 연구도 진행되고 있다. 그리고 가장 최근의 면역능 배가연구 중의 한 시도는 건국대학교 수의과대학 전염병실험실에서 성공한 실험으로 helper T cell epitope (Th)를 백신에 추가하게 되면 2-3배 이상 항체가 증가됨이 확인되었다. 이에 대한 이론적 배경은 어느 바이러스에나 존재하는 Th epitope를 함유하고 있는 바이러스를 1차적으로 감염시키고 Th epitope가 포함된 어떤 단백질이 fusion 형태로 동일 동물에 추가 접종되면 이미 생성된 helper T cell이 급격히 증가하여 항체 생성을 증대시킨다는 것이다. 조류에서의 응용은 아직 보고 된 바가 없지만 이전의 성공

적인 실험결과를 보아 닭에서도 효과적일 것으로 판단된다. 즉, 국내에서 사육되고 있는 닭들은 모두 부화장에서 1일령 때 뉴캐슬병 생바이러스 백신접종이 의무화되어 있으며 농장에서의 추가백신도 프로그램화되어 있어 뉴캐슬병 바이러스에 존재하는 helper T cell epitope를 클로닝하여 본 연구에서 목적으로 하는 조류인플루엔자의 H 단백질과 fusion하여 백신으로 사용한다면 기존에 보고된 바와 같이 항체 생성율을 2-3배 이상 증가시킬 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 세포성 면역능 유발을 위하여 DNA 백신을 개발하고자 하며, 세포면역능 증가를 위하여 사이토카인을 백신에 함유시키고자 한다. 또한 항체 생성능 증대를 위하여 콜레라독신과 반복된 CpG motif 및 뉴캐슬병 바이러스 helper T cell epitope를 추가한 DNA 백신과 subunit 백신을 개발하고자 한다. 궁극적으로는 고병원성 조류인플루엔자 확산과 재발에 대비하여 감염을 최소화 할 수 있는 면역기능 강화기술을 완성하고 이를 고병원성 조류인플루엔자 마커백신에 도입하여 최종적으로 미래의 조류인플루엔자 국가방역정책 수행에 모델이 될 수 있는 합리적이고도 경제적인 조류독감 방제기술을 개발하여 제시하고자 한다.

2. 연구배경

가. 기술적 측면

고병원성 조류인플루엔자는 미국 (1983년), 호주 (1985, 1992, 1994, 1997년), 멕시코 (1995), 파키스탄 (1995), 홍콩 (1997, 2001, 2003년), 이탈리아 (1999년), 칠레 (2002년), 네덜란드 (2003년), 한국 (2003), 베트남 (2004) 등 전 세계적으로 발생이 확인되고 있다. 고병원성 조류인플루엔자는 1950년도 이후 현재까지 총 24회 발생되었으며, 이중 15건 (63%)은 1990년도 이후에 발생되었고 2001년도부터는 매년 발생되고 양상을 취하고 있어 고병원성 조류인플루엔자를 효과적으로 방제할 수 있는 기술개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 고병원성 조류인플루엔자는 전통적으로 강제 살처분과 보상비 지급 정책으로 일관해 오고 있다. 이러한 살처분 시스템은 신속한 진단, 발생지역과 감염의심지역 설정 및 이동제한, 살처분과 매물의 수순을 밝게 된다. 살처분 시스템은 1983년 미국 펜실베이니아 주에서 혈청형 H5N2 고병원성 조류인플루엔자 발생시 전격적으로 적용되었으며, 이것은 1970년 미국 캘리포니아 주에서 발생한 뉴캐슬병 감염계에 대한 살처분

시 얻게 된 경험을 토대로 한 것으로 볼 수 있다. 살처분 시스템은 1985, 1992, 1994, 1997년도에 호주에서 발생한 고병원성 조류인플루엔자 발생사례에서와 같이 발생지역이 외부지역과 지리적으로 격리되어 있을 경우에는 매우 효과적인 것으로 평가되고 있다. 그러나 닭 사육밀도가 아주 높은 양계집단 사육지역에서 고병원성 조류인플루엔자가 발생하였을 경우에는 발생지역에 대한 차단방역과 신속한 살처분 및 매몰 작업이 인력동원과 매몰지 부족 및 환경오염 등의 문제로 인하여 살처분 정책의 이행이 매우 어렵게 될 가능성도 배제할 수 없게 된다. 1995년 멕시코의 경우 1993년도 후반 혈청형 H5N2 저병원성 조류인플루엔자 발생시 전국으로 확산된 바이러스가 고병원성으로 병원성이 증강되어 결국 살처분 정책을 포기하고 예방백신을 현재까지 사용하고 있는 실정이며 현재 혈청형 H5N2 고병원성 조류인플루엔자 상재국으로 전락하고 말았다. 멕시코의 경우 대규모의 백신투여에도 불구하고 질병이 만연된 이유는 체계적인 국가 차단방역 시스템의 부재와 현재 사용가능한 조류인플루엔자 사독백신은 닭에 접종 시 산란저하나 폐사는 예방되나 감염 자체는 막을 수가 없다는 2가지 이유를 들 수 있으며, 결국 멕시코는 살처분 정책과 백신 정책을 모두 실패한 대표적인 사례로 남게 되었다. 고병원성 조류인플루엔자를 효과적으로 방제하기 위해서는 과학적이고 체계적인 국가 차단방역 시스템 도입, 효율이 높은 선택적 살처분 정책수립, 그리고 감염을 최소화 할 수 있는 신 개념의 예방백신 개발이 요구되고 있다.

나. 경제·산업적 측면

우리나라를 포함하여 현재 대부분의 국가들은 고병원성 조류인플루엔자 발생 시 발생국으로부터 양계산물 수입을 엄격히 제한하고, 감염되었거나 감염이 의심되는 가금류는 모두 강제 살처분하고 보상비를 지급하는 정책을 펴고 있다. 대부분의 국가들이 수입제한조치를 채택하는 이유는 고병원성 조류인플루엔자 발생 시 95%에 이르는 높은 폐사율과 심각한 산란저하를 유발하여 막대한 경제적 피해를 입히게 되며, 국가간 축산물 교역에 장해요인이 되는 등 본 질병이 지닌 위험성 때문이며, 살처분 정책을 선택하는 이유는 조류인플루엔자 바이러스 특성상 혈청형이 다양하고 변이가 쉬워 효과적인 생바이러스 백신개발이 어려울 뿐만 아니라 사독백신접종 시 야외 감염과 감별이 곤란하고 백신접종계는 감염 시 증

상을 보이지 않는 보균계로 남게 되어 질병박멸정책 수행에 많은 어려움을 줄 수 있다는 정책적 판단 때문이다. 그러나 과거 살처분 정책 수행에 따른 고병원성 조류인플루엔자의 발생이 국가 경제에 미치는 피해의 규모는 시사하는 바가 크다. 1983년 미국에서 고병원성 조류인플루엔자 (H5N2) 발생시 살처분 보상비 등 약 4억 9백만 달러 (5,300억원)의 경제적 손실이 발생하였으며, 1999년 이탈리아에서는 고병원성 조류인플루엔자 (H7N1)가 발생하여 1,300만수의 닭이 폐사, 매몰하였다. 2003년 네덜란드에서는 고병원성 조류인플루엔자 (H7N7) 발생으로 네덜란드 내 5,000만수 중 절반인 2,500만수를 폐사 및 예방적 살처분을 하여 막대한 경제적 손실 입었다. 2001년도부터는 전 세계적으로 고병원성 조류인플루엔자 매년 발생되고 있으며, 닭 사육밀도가 아주 높은 양계집단 사육지역에서의 발생도 우려되고 있어 국가 경제적 피해를 최소화 할 수 있는 조류독감 방제기술 개발이 시급한 실정이다. 고병원성 조류인플루엔자 감염을 최소화 할 수 있는 백신이 개발되고 이의 사용을 과학적이고 체계적인 선택적 살처분 정책과 병행할 경우 살처분 정책 수행 시 수반되는 강제살처분 보상비를 비롯하여 양계산물 유통시장 붕괴로 이어지는 물가상승으로 인한 소비자들의 경제적 손실 등 제반경비를 획기적으로 절감할 수 있을 것으로 추정하고 있다. 1999년도 이탈리아 그리고 2003년 홍콩에서는 고병원성 조류인플루엔자 발생이 장기화되고 전국으로 확산되면서 조류인플루엔자 예방백신을 선택적 살처분 정책과 병행하여 고병원성 조류인플루엔자 퇴치의 수단으로 이용하였으며, 현재 이탈리아와 홍콩에서는 조류인플루엔자 예방백신의 사용이 고병원성 조류인플루엔자를 방제하는데 효과적이었다는 긍정적인 평가를 받고 있다.

다. 사회·문화적 측면

조류에서 주로 문제시되고 있는 조류인플루엔자 바이러스 중 일부 혈청형은 사람에게 감염되어 독감증세를 보이거나 사망을 유발하기도 한다. 1996년 영국에서 1명이 혈청형 H7N7 고병원성 조류인플루엔자에 감염된 사실이 최초로 확인되었으며, 1997년 홍콩에서는 18명이 혈청형 H5N1 고병원성 조류인플루엔자에 감염되어 6명이 사망함으로써 조류유래 조류인플루엔자 바이러스가 인체에 감염될 뿐만 아니라 사람을 사망케 할 수도 있음이 최초로 확인되었다. 또한 1999년 홍콩에서 어린이 2명이 혈청형 H9N2 저병원성 조류인플루엔자에 감염된 사실이

확인되면서 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 이외에 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 인체 감염의 가능성이 확인되었고, 2003년도에는 네덜란드에서 의사 1명이 혈청형 N7N7 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 감염되어 사망하여 현재까지 “홍콩조류독감”이라 불리고 있는 혈청형 H5N1을 포함하여 H7N7 그리고 H9N2 등 총 3종의 조류유래 조류인플루엔자 바이러스 중 일부의 변종바이러스들이 인체에 감염될 가능성이 있는 것으로 추정하고 있으며, 이들 3종의 혈청형에서 유래된 변종 바이러스에 대한 연구가 전 세계적으로 진행되고 있는 실정이다. 홍콩은 1997년 이후 거의 매년 혈청형 H5N1 고병원성 조류인플루엔자가 발생하고 있는 실정이며, 이는 홍콩과 마주하고 있는 중국 남부 광둥성에서의 지속적인 고병원성 조류인플루엔자의 발생설과 깊은 관련성이 있다고 추정할 수 있다. 현재 중국정부는 혈청형 H5N1 등 고병원성 조류인플루엔자 발생사실을 부인하고 있지만 중국 내 고병원성 조류인플루엔자의 발생은 최근 여러 경로를 통해서 확인되고 있는 실정이다. 따라서 2003년도 12월 국내 최초 발생된 혈청형 H5N1 고병원성 조류인플루엔자가 현시점에서 종식된다 하더라도 중국에서 날아오는 철새, 중국과 인접해 있는 지리적 조건, 현재 중국과의 인적, 물적 교류량 등을 감안해 본다면 향후 고병원성 조류인플루엔자의 재 발생을 언제까지나 배제할 수 없는 상황이며, 또한 만에 하나라도 인체에 감염 가능한 조류독감 바이러스가 국내에 유입될 가능성에 대비하여 과학적이고도 체계적인 조류독감 방제 기술 개발과 방역시스템 구축이 요구되고 있다.

제2절 연구개발의 목표 및 내용

본 연구를 수행하는 주요목표는 저병원성 조류인플루엔자 뿐만 아니라 고병원성 조류인플루엔자를 효과적으로 예방하는 DNA 백신 및 subunit 백신을 개발함과 동시에 야외농장에서 저병원성 조류인플루엔자의 병원성을 증대시키는 보조인자 (cofactor)를 확인하여 저병원성 조류인플루엔자의 감염에 의한 손실 및 그에 파급되어 발생하는 산업적인 피해를 최소화 할 수 있는 기반을 확립하는데 있다. 또한 본 연구를 통하여 개발되는 백신은 야외자연감염과 백신을 접종한 개체의 구별이 용이한 마커백신으로서의 역할도 수행할 수 있으므로 기존의 사독

백신 사용 시 발생하는 문제점을 극복할 수 있다는 커다란 장점이 있다. 더 나아가 본 연구를 통하여 확립된 개발백신의 안전성 및 효능은 위급상황 시 사람의 감염을 예방하는데 적용할 수 있는 중요한 자료로서 활용이 가능하기 때문에 앞으로의 발전가능성 및 적용범위가 매우 넓을 것으로 판단된다.

특히 최근 H5N1 고병원성 조류 인플루엔자가 전 세계로 빠르게 확산되고 있으며, 빠른 확산의 원인은 겨울철새와 가금류 그리고 사람의 이동이 직접적인 원인으로 지목되고 있다. 최근 두 달 사이에 아시아와 유럽은 물론 아프리카 나이지리아와 독일, 프랑스 등 유럽연합국까지 확산되고 있으며, 사람간의 전파가 가능한 변이형 바이러스 출현의 위험성 또한 배제할 수 없는 실정이다. 특히 우리나라의 인접국인 중국과 북한 그리고 일본에서는 H5 및 H7 형에 속하는 고위험성 조류인플루엔자가 지속 발생됨에 따라, 우리나라를 포함한 아시아 각국들은 고병원성 조류 인플루엔자 감염의 항상 위험 속에 노출되어 있다는 가정하에 고병원성 조류 인플루엔자 방제에 대한 대책을 마련하여야 할 것이다. 저병원성 조류 인플루엔자 또한 지난 동절기 뉴캐슬병과 함께 국내 산란계, 종계 농장에 여전히 막대한 피해를 유발하고 있어 효과적인 백신 개발 등의 노력이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

본 사업에서 개발하고 있는 고병원성 및 저병원성 조류 인플루엔자 예방백신 및 방제기술은 국내외 조류인플루엔자 발생 최소화를 위하여 조속히 연구가 완료되어 실용화가 요구되는 기술로 향후 그 실용가치가 매우 크다 할 수 있다.

1. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구 개발 결과
1차 년도 (2004)	<p>제 1 세부과제: 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 H9 항원을 효과적으로 발현하고 전달하는 재조합 DNA 백신 및 subunit 백신의 개발</p> <p>제 2 세부과제: DNA 백신의 효능을 향상시키는 사이토카인, 콜레라톡신 및 CpG adjuvant의 개발</p> <p>제 3 세부과제: 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 병원성을 증대시키는 cofactor의 확인을 통한 새로운 질병방제기법의 개발</p> <p>제 4 세부과제: 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 H5 항원을 효과적으로 발현하고 전달하는 재조합 DNA 백신 및 subunit 백신의 개발</p>	<p>◆ 저병원성 조류인플루엔자 바이러스에 감염된 개체의 확인 및 가검물로부터 바이러스의 분리</p> <p>◆ H9 바이러스의 RNA 확보, H9 유전자의 클로닝</p> <p>◆ 발현백터를 통한 재조합 단백질의 발현 및 정제</p> <p>◆ 닭의 IL-2, IFN-γ 및 IL-12 유전자 클로닝</p> <p>◆ 조류인플루엔자 바이러스에 감염된 닭의 혈청검사를 통한 Reticuloendotheliosis virus, Reovirus, Adenovirus, Infectious bronchitis virus, Marek's disease virus, Avian pneumovirus 등 감염확인</p> <p>◆ 닭에 대한 T cell 관련 유전자, 특이 항체 (CD3, CD4, CD8, CD45 등) 확보 및 정상 닭을 이용한 검사 프로토콜 확립</p> <p>◆ 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 분리</p>	<p>●저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 확보</p> <p>●H9 유전자의 확보</p> <p>●유전자재조합 H9 단백질의 확보</p> <p>●닭의 cytokine 유전자의 클로닝</p> <p>●저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 병원성 증강에 기여하는 cofactor의 동정</p> <p>●닭의 세포성면역 분석을 위한 재료의 확보</p> <p>●고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 분리</p>

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구 개발 결과
2차 년도 (2005)	<p>제 1 세부과제: 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 H9 항원을 효과적으로 발현하고 전달하는 재조합 DNA 백신 및 subunit 백신의 개발</p> <p>제 2 세부과제: DNA 백신의 효능을 향상시키는 사이토카인, 콜레라독신 및 CpG adjuvant의 개발</p> <p>제 3 세부과제: 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 병원성을 증대시키는 cofactor의 확인을 통한 새로운 질병방제기법의 개발</p> <p>제 4 세부과제: 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 H5 항원을 효과적으로 발현하고 전달하는 재조합 DNA 백신 및 subunit 백신의 개발</p>	<p>◆ 유전자 비교를 통한 ND 바이러스의 T helper cell-epitope의 선정</p> <p>◆ T helper cell epitope의 면역능 증가에 미치는 영향 분석</p> <p>◆ 닭의 IL-2, IFN-γ 및 IL-12의 재조합단백질 발현 및 정제</p> <p>◆ 콜레라독신, CpG motif의 선정 및 adjuvant로서의 영향 평가</p> <p>◆ 닭의 세포성면역 분석기법의 확립 -항원-비특이적 및 특이적 T cell 증식반응 -T cell의 cytokine생성능에 관한 분석 -대식세포의 NO 및 cytokine 분비활성검사 -대식세포의 탐식기능-활성검사</p> <p>◆ H5 바이러스의 RNA 확보,</p> <p>◆ H5 유전자의 클로닝</p> <p>◆ 발현벡터를 통한 재조합 단백질의 발현 및 정제</p>	<p>● 닭의 면역력 강화를 위한 helper T cell epitope의 개발</p> <p>● 닭의 유전자 재조합 cytokine의 확보 및 활용</p> <p>● 콜레라독신, CpG motif의 동정 및 작용기전의 규명</p> <p>● 닭의 세포성면역 분석기법의 확립 및 활용</p> <p>● H5 유전자의 클로닝 및 재조합 단백질의 생산</p>

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구 개발 결과
3차 년도 (2006)	<p>제 1 세부과제: 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 H9 항원을 효과적으로 발현하고 전달하는 재조합 DNA 백신 및 subunit 백신의 개발</p> <p>제 2 세부과제: DNA 백신의 효능을 향상시키는 사이토카인, 콜레라독신 및 CpG adjuvant의 개발</p> <p>제 3 세부과제: 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 병원성을 증대시키는 cofactor의 확인을 통한 새로운 질병방제기법의 개발</p> <p>제 4 세부과제: 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 H5 항원을 효과적으로 발현하고 전달하는 재조합 DNA 백신 및 subunit 백신의 개발</p>	<p>◆ Th-epitope-H9 유전자를 결합시킨 DNA 백신제조</p> <p>◆ H9 항원과 adjuvant와의 교합을 통한 subunit 백신제조</p> <p>◆ 개발된 백신의 야외실험을 통한 효능검정</p> <p>◆ 면역력을 향상시키는 사이토카인, 콜레라독신 및 CpG를 adjuvant로 하는 실험백신의 개발</p> <p>◆ 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 병원성 증강 작용기전 규명 -혼합 감염된 닭의 체액성 및 세포성 면역능 분석 -면역억제질병 감염에 따른 조류인플루엔자의 병원성 변화조사</p> <p>◆ Th-epitope-H5 DNA 백신의 개발</p> <p>◆ 개발된 DNA 백신의 효능평가</p>	<p>●Th-epitope-H9 유전자를 이용한 DNA 백신의 개발 및 효능평가</p> <p>●닭의 면역력을 강화시키는 사이토카인, 콜레라독신 및 CpG motif의 개발</p> <p>●저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 발병기전 규명</p> <p>●Th-epitope-H5 DNA 백신의 개발 및 효능평가</p>

제3절 연구개발 방법 및 설계

본 연구과제는 다음과 같은 4단계의 연구과정을 통하여 완수하였다.

1. 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 H9 항원을 효과적으로 발현하고 전달하는 재조합 DNA 백신 및 subunit 백신의 개발

야외감염 시 양계산업에 피해를 유발하는 조류인플루엔자는 크게 저병원성 및 고병원성 조류인플루엔자 바이러스로 구분할 수 있다. 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 중에서는 혈청형 H9N2 조류인플루엔자 바이러스 그리고 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 중에서는 혈청형 H5N1 및 H7N7 조류인플루엔자 바이러스 등이 인체감염의 가능성과 함께 양계산업에 막대한 경제적 피해를 유발하고 있다. 본 연구과제에서는 국내 양계산업에 많은 경제적 피해를 유발하고 있는 다양한 종류의 저병원성 조류인플루엔자 바이러스를 분리하여 바이러스의 확보 및 바이러스 유전자의 확보를 첫 번째 목표로 삼을 것이다. 두 번째 목표는 분리된 저병원성 바이러스의 유전자를 이용하여 바이러스의 H9 유전자를 클로닝하고 재조합단백질을 발현하는 시스템의 확립에 있다. 세 번째 목표는 뉴캐슬병 바이러스에 존재하는 T helper cell (Th) epitope을 이용하여 보다 효과적으로 조류인플루엔자 바이러스의 H 항원을 전달하는 시스템을 개발하는데 있다. 이와 같은 방법을 적용할 수 있는 근거는 Canine Distemper Virus (CDV)에 Th-epitope이 존재한다는 사실이 이미 보고 되어 있고, CDV가 뉴캐슬병 바이러스와 같은 Paramyxoviridae family에 속하므로 뉴캐슬병 바이러스에도 Th-epitope의 존재 가능성이 높기 때문이다. 뉴캐슬병 바이러스에 Th-epitope이 존재할 경우 국내에서 사육중인 모든 닭은 뉴캐슬병 생바이러스 백신접종이 의무화 되어 있기 때문에 이미 Th-epitope에 반응하는 memory CD4+ T cell이 상당수 존재할 것으로 추정되며, 조류인플루엔자 H 항원을 Th-epitope과 연계하여 제조된 백신 투여 시 조류인플루엔자 H 항원에 대한 면역반응도 매우 강하고 빠르게 유도될 것으로 예상된다. 네 번째 목표는 확인된 뉴캐슬병 바이러스의 Th-epitope과 조류인플루엔자 바이러스의 H9 유전자를 결합시킨 재조합 DNA 백신 및 subunit 백신의 개발에 있다. 다섯 번째 목표는 야외실험의 수행을 통하여 개발된 백신의 효

능을 측정하는 것이다. 뉴캐슬병 바이러스의 Th-epitope을 이용한 조류인플루엔자 H 항원발현 subunit 백신은 기존의 조류인플루엔자 사독백신을 대체할 수 있는 신 개념의 subunit 백신제조에 응용 가능할 것으로 예상하고 있다.

2. DNA 백신의 효능을 향상시키는 사이토카인, 콜레라독신 및 CpG adjuvant의 개발

DNA 백신의 가장 큰 장점은 transfection 된 세포 내에서 발현되는 항원을 major histocompatibility complex (MHC) I 및 II 를 통하여 전달함으로써 CD4+ T helper lymphocyte 및 CD8+ cytotoxic T lymphocyte를 자극하여 항체를 생성하는 체액성 면역반응 (humoral immunity) 및 살해세포 (CTL)를 통한 세포성 면역반응 (cellular immunity)을 동시에 유도시키는데 있다. 이러한 DNA 백신의 효능을 보다 향상시키기 위한 방법으로 이용되는 것이 사이토카인, 콜레라독신 및 CpG motif를 adjuvant로 사용하는 것이다. 본 연구에서는 닭에서 밝혀진 Th1 type의 사이토카인 중에서 IL-2, IFN- γ 및 IL-12의 유전자를 재조합단백질로 발현하고 activity를 확인하는 시스템의 확립을 첫 번째 목표로 삼는다. 두 번째 목표는 발현된 재조합 사이토카인 혹은 사이토카인을 발현하는 plasmid DNA를 조류인플루엔자 DNA 백신과 함께 투여함으로써 백신의 효능을 향상시키는 사이토카인을 밝혀내는 것이다. 세 번째 목표는 콜레라독신과 다양한 CpG motif를 DNA 백신과 함께 투여함으로써 가장 효과적인 면역반응을 유도시키는 콜레라독신 함량과 CpG motif를 밝혀내어 adjuvant로 사용하는 시스템의 확립에 있다. 네 번째 목표는 DNA 백신을 통하여 유도된 항체의 생성 및 세포성 면역반응을 측정하는 방법의 확립에 있다. DNA 백신의 면역능을 향상시키는 기술은 제조가 불가능한 조류인플루엔자 생바이러스 백신을 대체할 수 있는 신 개념의 DNA 백신 제조에 응용 가능할 것으로 예상하고 있다.

3. 병원성 조류인플루엔자 바이러스의 병원성을 증대시키는 cofactor의 확인을 통한 새로운 질병방제기법의 개발

고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 특징은 감염된 닭의 폐사율이 SPF 닭과

야외농장에서 사육되는 닭에서 모두 매우 높다는 점이다. 그러나 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 경우에는 감염된 SPF 닭에서의 폐사율은 매우 낮거나 없으나 야외농장에서 감염이 발생할 경우 폐사율이 많게는 약 30-40%로 매우 높은 특징을 나타낸다. 이러한 사실이 의미하는 바는 야외농장에서 계군이 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 감염 시 혹은 감염 전에 다른 바이러스 혹은 세균과의 혼합감염을 통하여 면역능력이 매우 저하되어 있음으로 인하여 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 병원성이 증강되어 심한 임상증상과 많은 폐사가 유도될 가능성이 매우 높다 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 병원성을 증강시키는데 cofactor로 작용하는 바이러스를 밝혀내는 것을 주요 목표로 삼고 다음과 같은 연구를 수행하고자 한다. 첫 번째 야외에서 저병원성 조류인플루엔자 바이러스에 감염된 계군의 혈청검사를 통하여 다른 바이러스와의 혼합감염 여부를 확인하고 통계적 유의성을 확인하는 것을 목표로 삼는다. 두 번째 목표는 면역억제를 유발하는 바이러스의 감염이 확인된 야외개체 및 면역억제질환과 혼합감염이 유도된 SPF 닭의 T 및 B 림프구의 감소여부 및 면역세포의 활성감소 등을 증명하는 것이다. 세 번째 목표는 면역억제질환과 혼합감염이 유도된 SPF 닭의 proinflammatory 사이토카인의 변화양상을 관찰하고 질병의 정도와 사이토카인의 변화정도와의 연관성을 밝히는 것이다. 네 번째 목표는 본 연구에서 야외 저병원성 조류인플루엔자 감염시 병원성 증강 기전을 밝히고, 야외 면역억제 또는 호흡기 유발 질병을 콘트롤 함으로서 국내 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 감염 피해를 최소화할 수 있는 새로운 저병원성 조류인플루엔자 피해방제 기법을 개발, 제시하는 것이다.

4. 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 H5 항원을 효과적으로 발현하고 전달하는 재조합 DNA 백신 및 subunit 백신의 개발

본 연구과제의 첫 번째 목표는 국내사육 오리, 칠새 및 야생조류 등을 대상으로 혈청형 H5 조류인플루엔자 바이러스의 분리를 통한 바이러스의 확보 및 바이러스 유전자를 확보하는 것이다. 두 번째 목표는 분리된 혈청형 H5 바이러스의 H 유전자의 클로닝 및 재조합 단백질의 발현이다. 세 번째 목표는 제 1 세부과제에서 확인된 뉴캐슬병 바이러스의 T helper cell (Th) epitope과 고병원성 조류

인플루엔자 바이러스의 H5 항원의 유전자를 결합시킨 면역능이 우수한 신 개념의 고병원성 조류인플루엔자 DNA 백신을 개발하는데 있다. 네 번째 목표는 SPF 닭을 대상으로 한 면역실험을 수행하여 개발된 DNA 백신의 효능을 측정하는 것이다.

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내외 관련기술의 현황과 문제점

조류인플루엔자 예방백신 중 생바이러스 백신은 변이가 쉽게 되는 바이러스의 특성상 개발이 거의 불가능한 실정이며, 현재까지 개발된 백신은 크게 사독백신과 유전자재조합 백신으로 구분할 수 있다. 이탈리아 (H7N1)와 홍콩(H5N1)에서 긍정적인 평가를 받은 백신은 모두 사독백신으로 H 혈청형은 동일하나 N 혈청형이 다른 이중 혈청형의 바이러스 (H7N3, H5N2)로 사독백신을 제조하여 항체 검사 시 야외 감염과의 구별을 시도한 경우이다. 그러나 이 사독백신은 기존 A형 조류인플루엔자 표준진단법인 AGP (Agar Gel Precipitation : 한천젤침강법) 검사법으로는 백신항체와 야외감염항체의 구분이 불가능하고 N 혈청형을 감별하는 형광항체법은 대규모의 항체 모니터링 검사에 적합하지 않다는 점이 단점으로 지적되고 있다. 또한 사독백신은 고병원성 조류인플루엔자 감염 시 분변으로 배출되는 바이러스의 양을 줄여줄 수는 있지만 완벽하게 질병의 확산을 막지는 못하는 것으로 평가되고 있다.

멕시코 (H5N2)에서 사용되고 있는 백신은 계두 바이러스 (Fowl Pox Virus)에 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 Hemagglutin 유전자를 삽입하여 백신접종 시 계두와 고병원성 조류인플루엔자를 동시에 예방할 수 있는 유전자재조합 바이러스 벡터백신이나 우리나라를 포함하여 계두 백신을 사용하는 국가에서는 기존의 계두백신 접종으로 유도된 항체의 간섭현상으로 인하여 바이러스 벡터백신의 효과가 반감되는 단점이 있는 것으로 평가되고 있다. 또한 전염성후두기관염 (Infectious Laryngotracheitis Virus : ILT)에 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 Hemagglutin 유전자를 삽입하여 유전자재조합 바이러스 벡터백신이 개발되어 있으나 이것 역시 우리나라를 포함하여 ILT 백신을 사용하는 국가에서는 효과가 반감되며, 사용가능 대상이 닭에만 국한된다는 단점이 있는 것으로 평가되고 있다.

최근 사람 독감 치료제로 개발된 아만타딘 (Amantadin)과 같은 항바이러스제의 사용도 고병원성 조류인플루엔자 확산방지를 목적으로 시험 중이나 감염시

분변으로 바이러스의 배출을 막지 못하며, 이 약제에 내성을 보이는 변이 바이러스의 출현도 인플루엔자 바이러스의 특성상 문제점으로 지목되고 있는 실정이다.

미래 조류독감 방제의 성패는 질병의 조기 색출과 닭 사육밀도가 아주 높은 양계집단 사육지역에서 질병발생 시 질병의 확산을 어떻게 막을 것이냐 하는 문제에 달려 있다고 할 수 있다. 따라서 조류인플루엔자 예방백신을 유사시 선택적 살처분 정책을 용이하게 수행할 수 있도록 기존 예방백신들이 안고 있는 문제점들을 짚어 목표를 설정하여 하나하나 보완해 나아가야 한다. 조류인플루엔자는 닭, 칠면조, 오리, 야생조류, 애완조류 등 감염될 수 있는 숙주의 종류가 매우 다양하기 때문에 새롭게 개발될 백신은 가급적 다양한 조류에 적용이 가능하여야 하며, 백신접종 후 감염시 산란저하와 폐사 예방은 물론 바이러스의 체외 배출을 최소화시킬 수 있어야 한다. 그리고 백신항체와 야외감염항체의 감별이 용이하여야 하며 대규모 항체 모니터링이 가능하도록 가급적 기존의 AGP 검사법을 이용할 수 있거나 AGP 검사법같이 모든 조류에 적용 가능한 간편한 진단법이 병행 개발되어야 한다. 또한 조류인플루엔자는 혈청형이 다양하기 때문에 단기간 내에 새로운 백신을 개발·생산할 수 있는 체계의 확립이 무엇보다 중요하다 할 수 있다.

제2절 앞으로의 전망

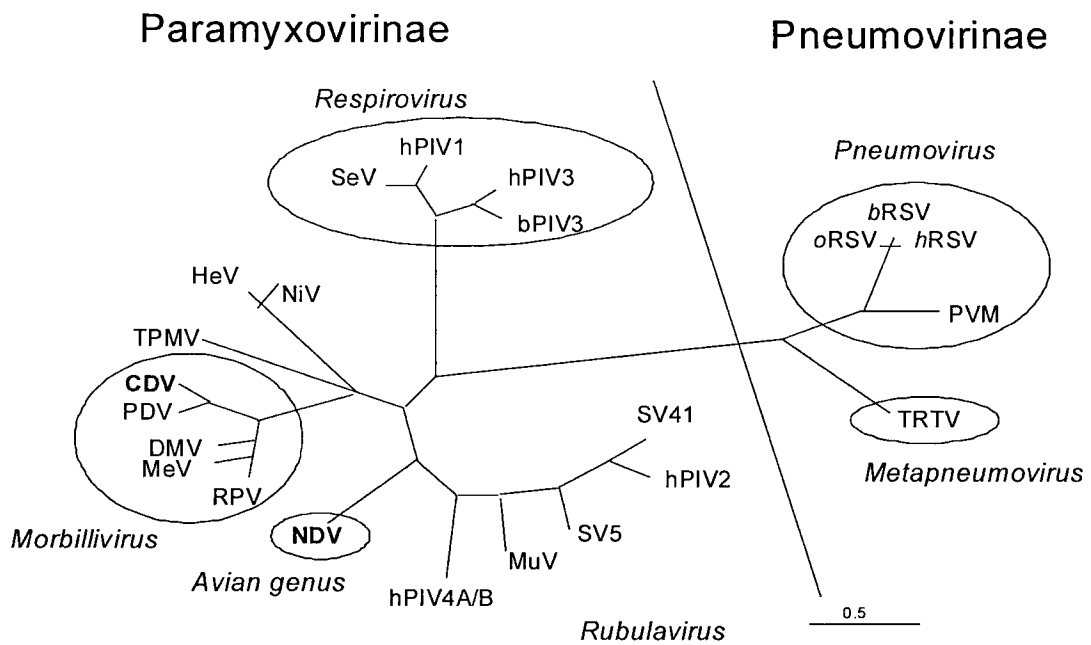
전 세계 양계산업이 고병원성 및 저병원성 조류인플루엔자 감염의 위협 속에 노출되어 있음은 명백한 사실이다. 조류인플루엔자 바이러스의 감염원이 야생조류, 철새, 애완조류, 전문 양계 및 오리농장 이외 지역에서 사육되고 있는 각종 가금류 등 매우 다양하기 때문이다. 또한 변이가 용이하다는 조류인플루엔자 바이러스는 특성을 감안해 볼 때, 특히 사육밀도가 아주 높은 양계집단 사육지역에서는 저병원성 조류인플루엔자 바이러스가 언제든지 고병원성 조류인플루엔자 바이러스로 변이될 가능성이 있음을 염두에 두어야 하며 이러한 점들이 조류독감 방제연구의 중요성을 부각시키고 있다. 앞으로의 고병원성 및 저병원성 조류인플루엔자의 방제노력은 최신 분자생물학적 기법을 이용한 바이러스의 신속한 진단법 개발, 과학적이고 체계적인 국가 차단방역 시스템 구축, 효율적인 선택적 살처분 정책수립, 그리고 감염을 최소화 할 수 있는 신 개념의 마커백신 개발 등

다각도로 추진되어야 할 것이다. 소비자와 생산자의 경제적 피해를 최소화하고, 미래 조류인플루엔자 방역정책 수행에 모델이 될 수 있도록 합리적이고도 경제적인 방역기술의 개발이 요구되고 있다. 저병원성 조류인플루엔자의 감염 시 병원성 증강요인을 밝히고, 고병원성 조류인플루엔자에 대한 면역력을 극대화 시켜 바이러스의 확산을 최소화 할 수 있는 신 개념의 마커백신 개발은 조류인플루엔자 방역을 위한 경제적 모델로서의 역할과 아울러 유사시 고병원성 인플루엔자의 인체감염에 대비한 사람독감백신 개발에 중요한 자료로서 그 활용 가치가 매우 높다고 할 수 있다.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 H9 항원을 효과적으로 발현하고 전달하는 재조합 DNA 백신 및 subunit 백신의 개발

1. Canine distemper virus (CDV)와 Newcastle disease virus (NDV)의 유전적 근연관계도



2. 아미노산 염기서열 비교를 통한 ND 바이러스 (NDV)의 T helper cell epitope의 선정

가. CDV 및 NDV T helper cell epitope의 아미노산 염기서열

CDV F protein Th-epitope : 239a.a-TAAQITAGIALHQSNLN-255a.a
NDV B1 F protein : 131a.a-TAAQITAAAALIQAKQN-147a.a
NDV La Sota F protein : 131a.a-TAAQITAAAALIQAKQN-147a.a
NDV Ulster 2C F protein : 131a.a-TAAQITAAASALIQAKQN-147a.a

나. NDV T helper cell epitope의 유전자 염기서열

NDV B1 F gene :

391b.p-ACTGCCGCACAAATAACAGCGGCCGCAGCTCTGATACAAGCCAAACAAAAT-441b.p

3. NDV T helper cell epitope가 DNA백신의 면역능 증가에 미치는 영향 분석

가. 닭의 NDV Th-epitope와 융합된 H9N2 avian influenza virus DNA vaccine 제작

1) 연구 수행방법

① DNA 백신 제작

: 국내 양계 농장에서 분리된 H9N2 저병원성 조류인플루엔자 바이러스를 SPF 부화란에 접종하여 증식시켜 얻은 후 RNeasy mini kit (QIAGEN)로 ssRNA를 분리하였다. 이렇게 얻은 인플루엔자 바이러스의 RNA를 One-step RT-PCR kit (QIAGEN)를 이용하여 증폭하였다.

i) HA full gene (1.7 Kb) 을 위한 primer sequence

* Bm-HA-1 (Foward primer):

5'-TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG-3'

* Bm-NS-890R (Reverse primer):

5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT-3'

ii) One-step RT-PCR 조건 (50ul reaction)

5X QIAGEN onestep RT-PCR buffer	10ul
dNTP mix (each 2.5 uM)	2ul
Foward primer(20 uM)	1ul
Reverse primer(20uM)	1ul
enzyme mix	2ul
RNasin(40unit/ul)	0.25ul
template RNA(0.5ug/ul)	3ul
RNase-free water	30.75ul

위에 제시한 조성대로 혼합하여 다음의 조건으로 one-step RT-PCR을 수행하였다.

Reverse transcription : 50°C, 30min.

Initial PCR activation step : 95°C, 15min.

30 cycles

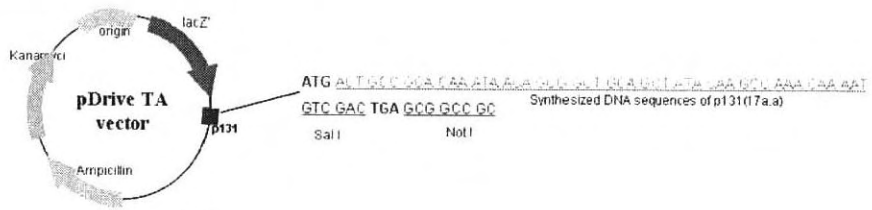
denaturation : 94°C, 30 sec.

annealing : 58°C, 30 sec.

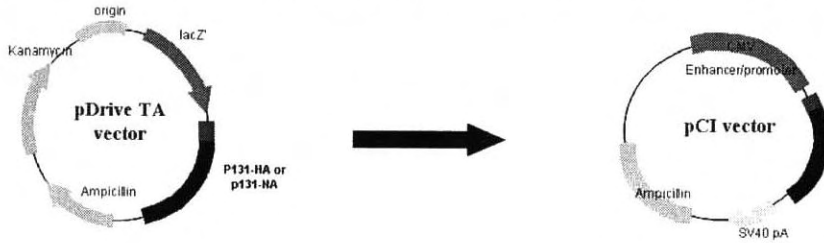
elongation : 72°C, 7min.

iii) 그림 ①과 같이 NDV T helper cell epitope 유전자를 합성하여 pDrive TA vector에 cloning 한 후, AIV HA 또는 NA 유전자를 PCR로 증폭하여 PCR products를 그림 ②와 같이 다시 pDrive TA vector에 cloning 하였다. 그림 ③과 같이 NDV T-helper cell epitope 유전자와 fusion 된 AIV HA 또는 NA 유전자를 pDrive TA vector 절단하여 DNA 단편을 pCI vector (Promega)에 cloning 하였다. 삽입하고자 하는 유전자의 방향성을 제한효소 절단을 통해 확인 후, 유전자 염기서열을 분석하여 NDV Th-cell epitope가 융합된 AIV의 HA 및 NA DNA백신 제작을 완료하였다.

① p131 cloned into TA vector

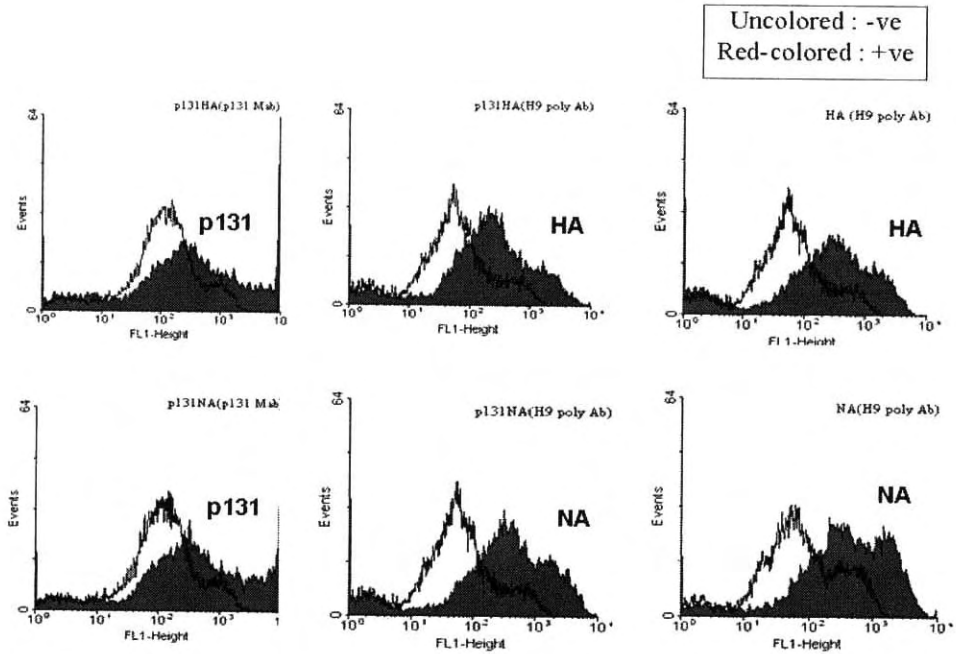


② HA or NA subcloned into pDrive-p131 ③ p131HA or p131NA subcloned into pCI



2) 결과

- ① FACs 분석을 통해 NDV T helper cell epitope 발현 DNA vaccine의 MA104 세포주에서의 재조합 protein 발현 여부를 확인하였다.



- ② FACs 분석 결과 transfection 후 MA104 세포주에서 NDV T helper cell epitope와 AIV HA 및 NA 재조합 protein의 발현이 확인되었다.

다. SPF 병아리에 NDV T helper cell epitope 발현 DNA vaccine 접종 후 백신
접종 그룹별 공격접종 바이러스 체외배출억제 효능시험

1) 연구 수행방법

① 1주령 SPF 병아리에 NDV B1 생독백신을 접종한 후 4주 후 NDV
T helper cell epitope 발현 DNA vaccine을 접종하였다. DNA 백신
접종 3주 후 혈청형 H9N2 AIV를 공격접종 하였으며, 공격접종 3일,
4일, 5일, 6일, 7일 후 DNA 백신접종 그룹별 공격접종 바이러스 체
외배출억제 효능시험을 실시하였다.

Log ₁₀ EID ₅₀ /1.0 ml										
Group	Oropharynx					Cloaca				
	3 ^A	4	5	6	7	3	4	5	6	7
HA	4.1±0.07	3.5±0.23	3.5±0.08	2.7±0.39	1.4±0.22	1.5±1.09	1.6±2.29	1.7±3.12	1.1±3.81	1.6±3.03
HA + NA	3.2±0.83	3.1±0.26	3.1±0.28	2.7±0.33	1.4±0.27	1.2±2.49	1.7±3.81	2.1±4.77	2.0±6.11	2.1±6.64
pCI vector	3.6±0.49	3.5±0.11	3.3±0.21	2.3±0.49	1.4±1.01	1.4±0.06	2.1±3.54	3.4±3.87	2.4±4.42	3.1±5.68
p131HA	3.2±0.25	2.9±0.31*	3.1±0.41	2.5±0.50	1.3±1.10	2.2±3.40	1.9±2.16	2.8±6.24	3.0±4.59	2.5±3.38
p131HA +p131NA	3.3±0.27	2.9±0.40*	2.7±0.21*	2.4±0.44	1.7±0.67	1.2±0.24	0.6±0.96**	1.5±0.84**	1.4±2.23*	1.1±0.96**
Control	3.6±0.38	3.6±0.22	3.3±1.61	2.9±0.53	1.9±1.59	1.9±1.90	2.9±5.26	2.6±8.58	4.0±8.07	3.2±4.06

^A days of post challenge

* P < 0.05 by student's t-test

** P < 0.01 by student's t-test

2) 결과

- NDV T helper cell epitope 가 융합된 AIV HA DNA백신 (p131HA) 과 NDV T helper cell epitope 가 융합된 AIV NA DNA백신 (p131NA)을 혼합 접종한 닭에서의 구강과 분변으로부터의 AIV 체외 배출 효과가 공격접종 4일, 5일 후에 유의성 있게 감소하였다. 또한, NDV T helper cell epitope 가 융합된 AIV HA DNA백신 (p131HA) 을 접종한 닭에서의 AIV 공격접종 4일 후 구강에서의 바이러스 체외 배출량도 감소되었다.

제2절 DNA 백신의 효능을 향상시키는 사이토카인, 콜레라톡신 및 CpG adjuvant의 개발

1. 닭의 IL-2, IFN- γ , IL-12, TGF- β , 및 GM-CSF 단백질발현을 위한 DNA 백신 제작

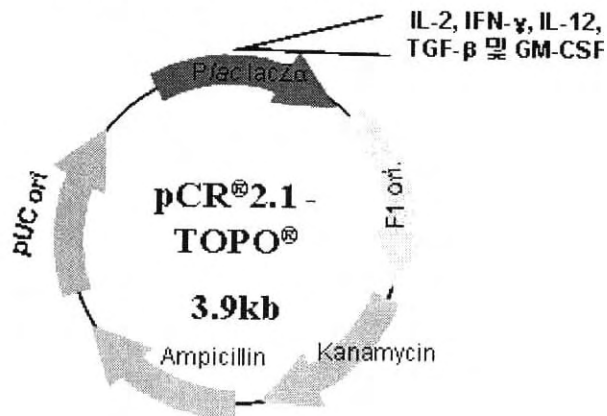
가. 연구수행 방법

닭의 5종 사이토카인의 단백질발현을 위해 아래 표와 같은 염기서열의 primer를 제작하여 아래 그림과 같은 방법으로 pCR2.1-TA cloning vector (Invitrogen)에 삽입한 후 단백질을 발현할 수 있는 pCI vector (Promega)로 다시 클로닝하였다.

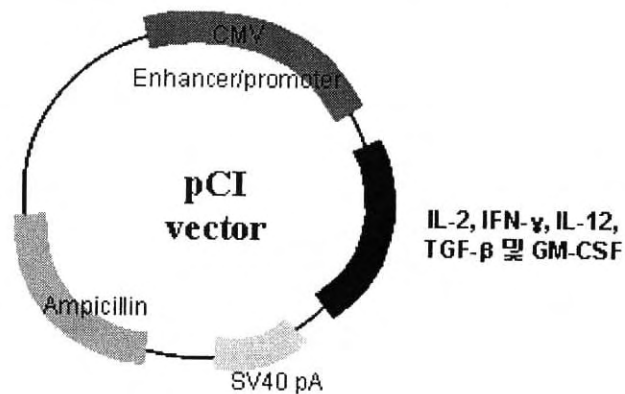
종류	Primer sequence (5' - 3')		Size(b.p.)
IL-2	Foward	GCCATGATGTGCAAAGTA	436
	Reverse	CTTATTTTTGCAGATATC	
IFN- γ	Foward	GTTCTGTCTGTCATCATGATT	468
	Reverse	TTAGCAATTGCATCTCCTCTG	
IL-12	Foward	ATGTCTCACCTGCTATTT	948
	Reverse	TTATCTGCAAAGCGTGGA	
TGF- β	Foward	ATGAAGATGTACGCGCAAAGGG	1239
	Reverse	TCAGCTGCACTTGCAGGAT TTC	
GM-CSF	Foward	ATGCTGGCCCAGCTCACTATTC	435
	Reverse	TTAGATGCAGTCTTTCTCCTCTG	

나. 닭의 사이토카인 단백 발현 DNA vaccine 제작

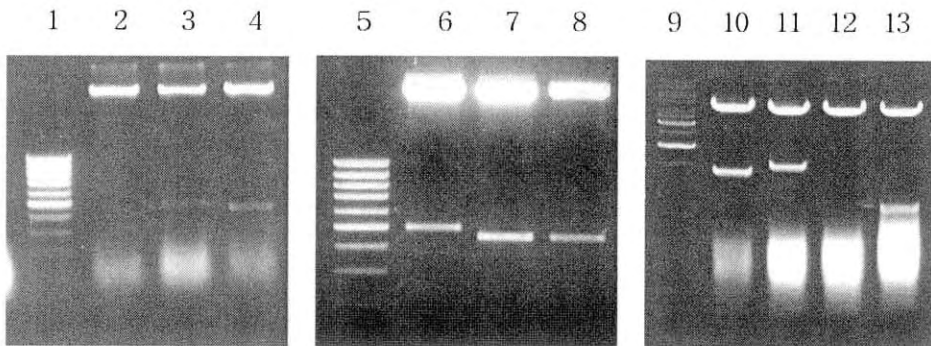
- ① Chicken cytokine each of gene cloned into TA vector



- ② IL-2, IFN- γ , IL-12, TGF- β 및 GM-CSF subcloned into pCI vector

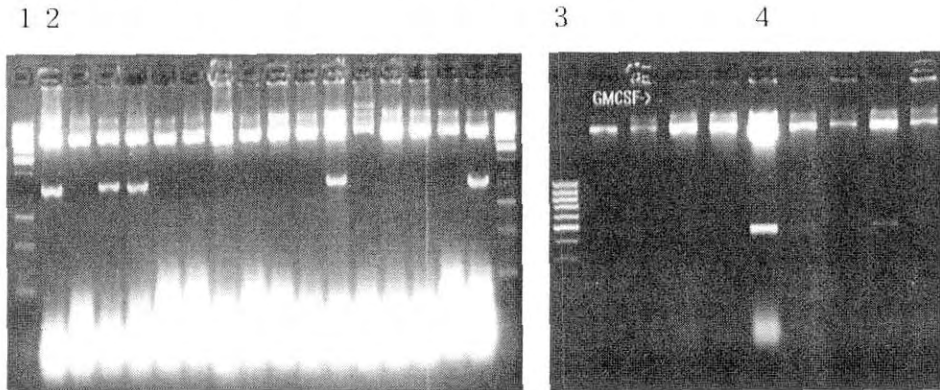


다. 닭의 사이토카인 IL-2, IFN- γ 및 IL-12 유전자 클로닝 결과



- Lane 1 : 100bp ladder marker
- Lane 3 : pCR2.1-IL2 / EcoR I
- Lane 4 : pCR2.1-IL2 / EcoR I
- Lane 5 : 100bp ladder marker
- Lane 8 : pCR2.1-IFN- γ / EcoR I
- Lane 9 : 1kb ladder marker
- Lane13 : pCR2.1-IL12 / EcoR I

라. 닭의 사이토카인 TGF- β , GM-CSF 유전자 클로닝 결과



- Lane 1 : 1kb ladder marker
- Lane 2 : pCI-TGF- β / EcoR I
- Lane 3 : 100bp ladder marker
- Lane 4 : pCI-GM-CSF / EcoR I

- 닭의 IL-2, IFN- γ , IL-12, TGF- β , 및 GM-CSF 사이토카인 유전자를 위의 사진에서와 같이 성공적으로 삽입하였다.

2. CpG motif의 선정 및 adjuvant로서의 영향 평가

가. 닭 마크로파지 라인 세포주를 이용하여 유효 CpG motif 선정

① 연극 수행 방법

닭의 마크로파지 세포에 CpG ODNs를 농도별로 희석하여 접종한 후 MTT를 이용하여 세포 증식성여부를 판단하였고, NO assay를 통하여 CpG ODNs으로 인한 활성정도를 측정하였다.

CpG motif (ODN code)	Sequence (5'-3')
1982	TCCAGGACTTCTCTCAGGTT
1758	TCTCCCAGCGTGCGCCAT
1760	ATAATCGACGTTCAAGCAAG
1841	TCCATAGCGTTCCTAGCGTT
1826	TCCATGACGTTCCCTGACGTT
2006	TCGTTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
1826	TCCATGACGTTCCCTGACGTT

② 연구 결과

CpG ODNs motif 1758을 선발하였다.

나. SPF 병아리에 AIV HA 및 NA 단백 발현 DNA 백신과 콜레라독신, CpG motif DNA, Lipofectamine 및 d-LPS 동시 접종 후 백신접종 그룹별 공격 접종 바이러스 체외배출억제 효능시험

① 연구 수행 방법

DNA vaccine의 adjuvants로 사용될 수 있는 콜레라 독신, CpG ODNs motif 1760, Lipofectamine 및 d-LPS를 제작한 AIV HA 및 NA 단백발현 DNA백신과 함께 접종하고 3주후에 H9N2 LPAI 바이러스로 공격접종 하였다. 공격접종 3일, 4일, 5일, 6일 후에 구강과 분변으로부터 바이러스 체외배출 억제시험을 수행하였다.

Log ₁₀ EID ₅₀ /ml										
Group	Oropharynx					Cloaca				
	3 ^A	4	5	6	7	3	4	5	6	7
HA+NA	2.1±0.2	2.7±0.4	3.2±0.1	2.4±0.6	0.7±0.5	3.1±6.4	4.3±3.2	3.6±3.3	3.4±4.9	2.3±1.3
HA+NA+ Lipofectamine	2.7±0.4	2.4±0.1	3.5±0.1	2.1±0.6	1.0±0.4	1.7±4.3	3.9±2.6	3.2±4.2	3.6±2.4	2.6±1.4
HA+NA + d-LPS	2.5±0.4	2.8±0.4	3.3±0.8	1.8±0.6	1.4±0.6	1.3±2.1	3.3±5.3	3.5±2.8	2.8±2.4	2.9±1.2
HA+NA + CpG ¹⁷⁵⁸	2.4±0.3	2.6±0.4	3.3±0.5	2.4±0.5	0.9±0.3	2.9±3.2	4.0±3.1	3.5±2.9	3.0±3.1	2.5±1.1
HA+NA + 콜레라독신	2.3±0.1	2.5±0.3	3.1±0.3	2.3±0.1	1.0±0.6	2.7±3.6	4.1±3.3	3.2±2.3	3.0±2.4	2.4±2.0

^A days of post challenge

② 연구 결과

DNA vaccine의 면역능을 개선시키고자 adjuvant로 사용한 콜레라 독신, CpG ODNs motif 1760, Lipofectamine 및 d-LPS 등은 AIV HA 및 NA 단백질 발현 DNA백신과 혼합 접종 후 실시한 공격접종 시험에서 공격접종 바이러스의 체외배출을 adjuvant를 첨가하지 않은 대조군에 비하여 유의성 있게 개선시키지 못함을 확인하였다.

제3절 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 병원성을 증대시키는 cofactor의 확인을 통한 새로운 질병방제기법의 개발

1. 닭의 세포성 면역분석 기법의 개발

가. 면역세포염색에 사용된 항체종류

- mouse anti-chicken CD3 - PE
- mouse anti-chicken CD4 - FITC
- mouse anti-chicken CD8a - FITC
- mouse anti-chicken TCR $\gamma\delta$ - FITC
- mouse anti-chicken IgM -FITC

나. 닭의 일령 별 말초혈액내에서의 면역세포의 정상범위

면역세포	3주(21일령)	6주(42일령)	6개월(24주)	20개월	30개월
CD3+ Tcell	76±3	80.5±3.2	80±3	88.5±2.7	90±2
CD4+ Tcell	44±3	48.6±12.3	38±4	66.7±10.7	65±5
CD8a+ Tcell	13±1	13.1±1.4	13±2	6.8±5	5±3
$\gamma\delta$ Tcell	23±3	23±3	50±3	23±3	23±3

2. T cell의 cytokine 생성능에 관한 분석

- 세포성 면역억제제 Cyclosporin A (CsA)와 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 (LPAI)를 접종한 SPF 병아리에서의 병원성 증강 cofactor 조사

<시험 1: 세포성 면역억제제 투여 실험 및 면역능 분석 방법 확립>

가. 세포성 면역억제제 CsA 투여 SPF 병아리에서 H9N2 LPAI 바이러스 공격
접종 후 virus reisolation 결과

Group	처치	바이러스농도 (EID ₅₀ /0.1ml)	기관		맹장편도	
			평판응집 양성개체수	EID ₅₀ /ml	평판응집 양성개체수	EID ₅₀ /ml
G1	H9N2	10 ⁷ /0.1ml	7/8	10 ^{2.375}	7/8	10 ^{4.3}
G2	H9N2	10 ⁶ /0.1ml	2/8	10 ^{0.375}	7/8	10 ^{4.56}
G3	CsA +H9N2	10 ⁷ /0.1ml	4/8	10 ^{1.5}	7/8	10 ^{5.18}
G4	CsA +H9N2	10 ⁶ /0.1ml	1/8	10 ^{0.313}	4/8	10 ^{2.88}

나. Real-time RT-PCR 을 이용한 IFN- γ , IL-2 정량분석용 primers & probe sequences

Target	Probe or primer	Sequence
IFN- γ	Probe	5'-(FAM)-TGGCCAAGCTCCCGATGAACGA-(TAMRA)-3'
	Forward	5'-GTGAAGAAGGTGAAAGATATCATGGA-3'
	Reverse	5'-GCTTTGCGCTGGATTCTCA-3'
IL-2	Probe	5'-(FAM)-ACTGAGACCCAGGAGTGCACCCAGC-(TAMRA)-3'
	Forward	5'-TTGGAAAATATCAAGAACAAGATTCATC-3'
	Reverse	5'-TCCCAGGTAACACTGCAGAGTTT-3'

다. Real-time RT-PCR 조성 및 조건

- 조성 (QuantiTect™ Probe RT-PCR kit (QIAGEN) 사용)

Master mix	12.5 ul
F.P(20 uM)	0.5 ul
R.P(20 uM)	0.5 ul
Probe(10 uM)	0.5 ul
RT-mix	0.25 ul

- 조건 (Smartcycler, Cepheid사 사용)

50°C, 30min.
 95°C, 15min.
 <45 cycles>
 94°C, 15s
 60°C, 60

라. CsA 투여 SPF 병아리에 H9N2 LPAI 바이러스 공격접종 후 접종계의 splenocyte에서의 사이토카인 IFN- γ , IL-2 발현변화 조사

Group	개체번호	Real-time PCR Ct value	
		IFN- γ	IL-2
G2 H9N2 단독 공격접종군	1	-	-
	2	23.27	33.71
	3	27.73	0
	4	25.61	0
	5	27.75	0
	6	28.47	0
G4 CsA 처치 후 H9N2 공격접종군	1	29.30	0
	2	26.25	0
	3	26.44	35.90
	4	24.29	0
	5	25.84	0
	6	26.27	0
G5 CsA 단독 처치군	1	26.56	0
	2	23.54	35.85
	3	25.64	40.77
	4	24.98	0
	5	24.40	0
	6	25.50	0
G6 비접종군	1	23.39	0
	2	24.17	33.86
	3	24.60	0

3. Splenocytes & PBMC에서의 T cell 활성검사

가. CsA 투여 SPF 병아리에 H9N2 LPAI 바이러스 공격접종 후 접종계의 PBMC 와 splenocyte를 이용한 면역세포 활성검사

Group	개체 No.	CD3+CD4		CD3+CD8		gd-T cell		IgM	
		PBMC	Spl.	PBMC	Spl.	PBMC	Spl.	PBMC	Spl.
G2 K5 단독 공격접종군	1	23.24	11.15	23.57	19.87	35.81	20.16	26.21	24.97
	2	25.95	10.98	24.42	26.47	39.77	31.24	16.82	19.61
	3	39.86	9.69	34.67	32.99	26.73	20.11	29.98	39.54
	4	31.49	12.10	14.10	37.09	29.92	29.92	16.10	16.96
	5	36.61	5.93	18.78	37.60	19.40	24.53	3.25	0.16
	6	25.36	17.88	8.63	29.74	26.94	22.81	5.62	18.84
G4 CsA + K5 공격접종군	1	39.74	20.60	22.62	31.92	20.60	18.57	46.37	19.19
	2	32.57	24.81	24.20	56.98	24.81	20.85	-	16.53
	3	25.70	28.48	19.65	37.02	28.42	16.52	20.34	29.36
	4	38.24	26.18	15.36	45.86	13.26	17.19	22.12	19.45
	5	33.44	21.18	22.24	31.37	21.81	11.82	24.24	23.91
	6	-	16.72	-	40.74	-	11.20	-	22.01
G5 CsA 단독 처치군	1	38.34	24.19	19.46	39.53	24.50	21.37	18.19	19.66
	2	35.37	25.10	11.68	44.72	20.91	16.59	26.06	23.77
	3	29.12	20.51	11.86	51.14	41.02	18.52	22.82	18.60
	4	47.05	26.75	12.75	45.47	11.04	15.79	24.62	23.19
	5	31.52	16.47	27.36	56.80	20.73	16.37	13.48	17.96
	6	29.29	16.26	20.43	48.56	27.37	13.82	15.34	11.52
G6 비접종군	1	29.03	17.82	22.97	51.21	35.07	32.49	17.52	-
	2	32.95	20.11	24.76	43.81	29.69	17.32	39.13	17.62
	3	28.06	-	42.18	57.93	21.51	19.09	6.18	22.62

<시험 2: 인플루엔자 감염에 대한 체액성 면역 및 세포성 면역의 영향 평가 시험>

가. 면역 억제제 CsA 및 CY 투여 SPF 병아리에서 H9N2 LPAI 바이러스 공격
접종 후 임상증상 및 폐사율 관찰 결과

그룹	처치	Sick ^A	임상증상			폐사	PI ₁₄ ^B	HI 역가 (log ₂ ±S.D.)
			체중 (g ± S.D.)					
			Days 0	Days 7	Days 14			
G1	CsA	0/8	78.6 ± 4.9	-	212.2±17.5	0	0	0
G2	CsA + H9N2	4/8	84.8 ± 6.6	127.3±15.8	183.8±19.9 ^{*§}	0	0.5	4.8±0.5
G3	CY	1/8	43.2±7.6	114.8±44.1 [†]	161.9±70.0	0	0	0
G4	CY+H9N2	0/8	96.8±29.5	141.3±27.7 [†]	188.6±41.2	0	0.125	0
G5	H9N2	1/8	86.1 ± 7.1	143.5±18.9	221.6±37.0	0	0.125	3.5±0.9
G6	PBS+uninfected	0/8	79.3±15.1	193.0±42	215.3±41.7	0	0	0

^A 안면부종, 침울, 설사 증상 발현 수수/ 총 접종 수수

^B Pathogenicity index : the mean score per bird per observation over a 14 day period when each day, birds are scored 0 if normal, 1 if sick, 2 if dead.

^{*} $P < 0.05$ by student's t-test compared with CsA or CY-treated chickens

[§] $P < 0.05$ by student's t-test compared with H9N2 infected immunocompetent chickens

[†] $P < 0.05$ by student's t-test compared with PBS+uninfected chickens

나. 면역억제제를 투여한 SPF 병아리에서 H9N2 LPAI 바이러스 공격접종 후
일자에 따른 바이러스 체외배출 시험 결과

그룹	처치	공격 접종 후 바이러스 재분리 결과 (바이러스 양성 수수/총 접종 수수)						
		조직	Day 2	Day 3	Day 5	Day 7	Day 10	Day 14
2	CsA +	Oropharynx	8/8 (4.0±1.3) ^A	8/8 (4.5±0.9)	8/8 (3.5±1.0)	4/8 (1.0±1.1)	0/8 (0.0±0.0)	0/8 (0.0±0.0)
		Cloacal	2/8 (0.6±1.2)	4/8 (2.7±3.0)	8/8* (4.8±2.0)**	7/8 (4.4±2.3)	4/8 (1.1±1.3)	0/8 (0.0±0.0)
4	CY +	Oropharynx	7/8 (4.2±1.0)	8/8 (4.6±1.2)	7/8 (3.6±1.6)	3/8 (0.7±1.1)	5/8 (1.0±0.9)	3/8 (0.5±0.6)
		Cloacal	0/8 (0.0±0.0)	2/8 (1.1±2.2)	2/8 (1.2±2.3)	1/8 (0.4±1.1)	3/8 (2.2±2.4)	4/8 (1.6±1.8)
5	H9N2	Oropharynx	8/8 (4.2±1.5)	8/8 (4.1±0.6)	7/8 (3.3±1.7)	1/8 (0.2±0.4)	0/8 (0.0±0.0)	0/8 (0.0±0.0)
		Cloacal	1/8 (0.4±1.1)	1/8 (0.8±2.2)	2/8 (1.3±2.4)	5/8 (2.3±2.4)	2/8 (0.8±1.6)	0/8 (0.0±0.0)

^A Log EID₅₀ ± S.D

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ by Fisher's exact test

다. 면역억제제 (CsA, CY)의 투여가 닭의 면역장기(흉선, F낭, 비장) 무게에 미치는 영향 평가 결과

그룹	처리	체중(g±S.D)	흉선(g±S.D)	F낭(g±S.D)	비장(g±S.D)
G1	CsA	212.2±17.5	50.7±16.5	49.5±23.6	12.5±1.3
G2	CY	161.9±70.0	60.9±19.5	9.8±3.3*	13.4±6.4
G3	CsA + H9N2	183.8±19.9	55.7±13.8	50.4±9.7	15.4±4.0
G4	CY + H9N2	188.6±41.2	54.1±10.1	7.8±1.9*	14.5±6.2
G5	H9N2	221.6±37.0	52.9±9.3	55.4±15.9	15.0±2.4
G6	PBS+uninfected	215.3±41.7	46.1±21.2	52.5±10.1	11.7±1.6

^A (Weight of organ / body weight) X100

* $P < 0.001$ by student's t-test compared with PBS-treated uninfected chickens.

<시험 3: 세포성 면역 억제제 CsA 투여가 H9N2 LPAI의 병원성 증강에 미치는 영향 평가 시험 (본시험)>

가. 3주령 SPF 닭에게 CsA 투여 후 H9N2 LPAI 공격접종에 따른 임상증상 및 폐사율 관찰 시험

Group	처리	임상증상		치사율		PI ₁₄ ^C	HI 역가 (log ₂ ± S.D.)
		Sick	체중 (g ±S.D.) ^A	Dead	MDT (days) ^B		
G1	Non-treated	0/8	687.4±76.2	0/8	-	0	0
G2	CsA	0/8	616.8±4.1	0/8	-	0	0
G3	CsA + H9N2	5/8	486.8±99.7**	2/8	7	1.225	6.3 ± 0.5
G4	H9N2	1/8	557±61.3 [†]	0/7	-	0.125	6.4 ± 0.5

^A Body weight was measured 14 days post infection

^B Mean death time

^C Pathogenicity index : the mean score per bird per observation over a 14 day period when each day, birds are scored 0 if normal, 1 if sick, 2 if dead.

** $P < 0.01$ by Student's t-test compared with CsA-treated uninfected chickens

[†] $P < 0.05$ by Student's t-test compared with non-treated chickens

나. 3주령 SPF 닭에게 CsA 투여 후 H9N2 LPAI 공격접종에 따른 바이러스 체외 바이러스 배출 효능 일자별 평가 시험

Group	처리	바이러스 양성 수수/총 접종 수수 (바이러스 역가, logEID ₅₀ ±S.D.)							
		Oropharynx				Cloaca			
		Days 2	Days 3	Days 5	Days 7	Days 2	Days 3	Days 5	Days 7
G3	CsA + H9N2	8/8 (4.0±1.7) ^A	8/8 (4.1±0.8)	8/8 (3.8±0.7)	1/8 (0.2±0.4)	3/8 (1.0±1.5)	2/8 (1.4±2.7)	6/8 (4.2±2.7)	1/8 (3.2±2.4)
G4	H9N2	7/8 (2.1±1.3)	6/8 (2.3±1.9)	6/8 (2.9±1.8)	0/8 (0±0)	0/8 (0 ±0)	0/8 (0±0)	4/8 (2.5±2.9)	0/8 (2.6±2.5)

^A Log EID₅₀ ± S.D

* $P < 0.05$, * * $P < 0.001$ by Fisher's exact test

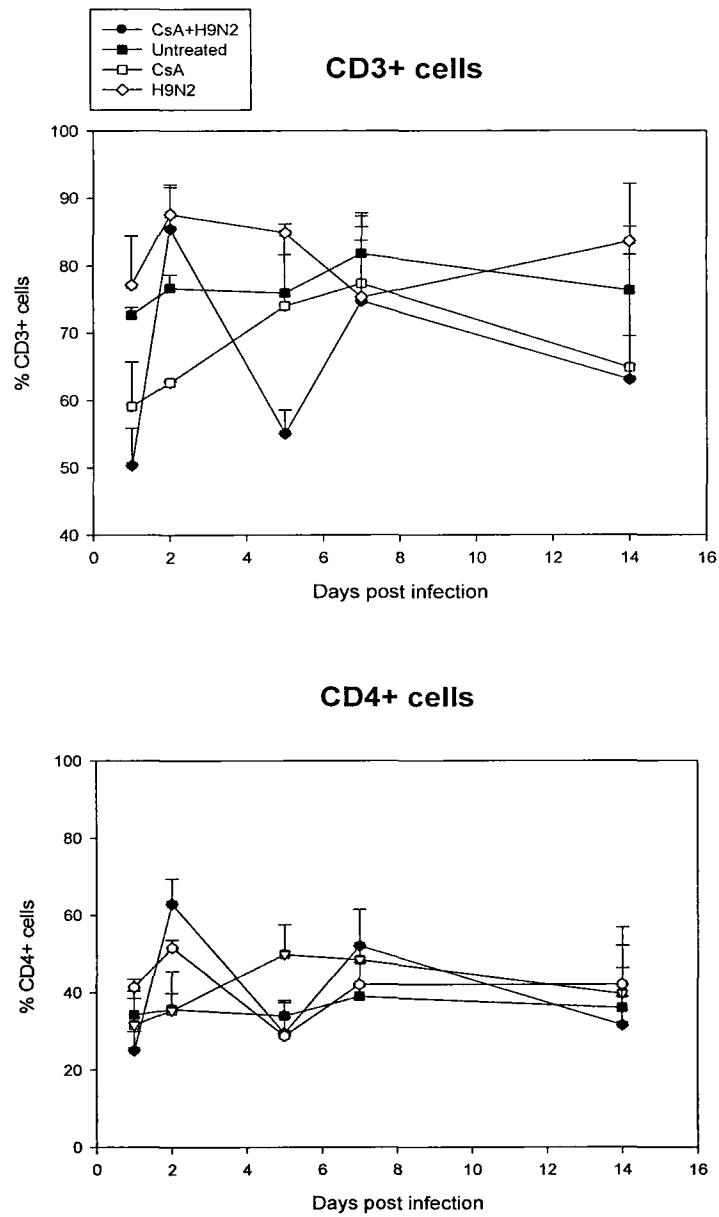
다. 3주령 SPF 닭에게 CsA 투여 후 H9N2 LPAI 공격접종에 따른 장기별 바이러스 재분리율 (공격 접종 5일 후 측정)

그룹	처리	바이러스 재분리수수/총 접종수수 (바이러스 역가, logEID ₅₀ ± S.D)							
		기도	흉선	폐	비장	신장	F낭	PBMC	맹장 편도
G3	CsA + H9N2	6/8 (0.9±0.8) ^A	8/8 (2.6±1.2)	5/8 (1.0±0.9)	3/8 (0.6±0.8)	5/8 (1.8±1.8)	6/8 (3.1±2.0)	3/3** (2.9±0.3)	7/8 (4.2±2.9)
G4	H9N2	7/8 (1.4±0.8)	5/8 (1.3±1.3)	5/8 (0.9±1.0)	3/8 (0.3±0.5)	3/8 (1.1±1.5)	5/8 (1.0±2.1)	0/3 (0.0±0.0)	8/8 (3.7±2.5)

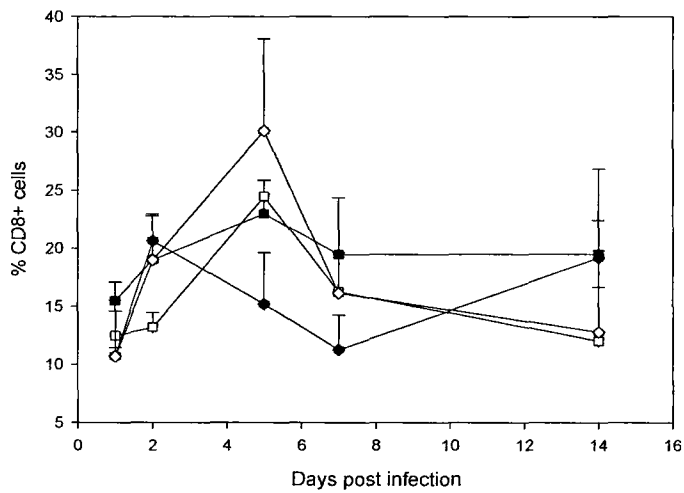
^A LogEID₅₀/g ± S.D

** P<0.001 by Student's t-test

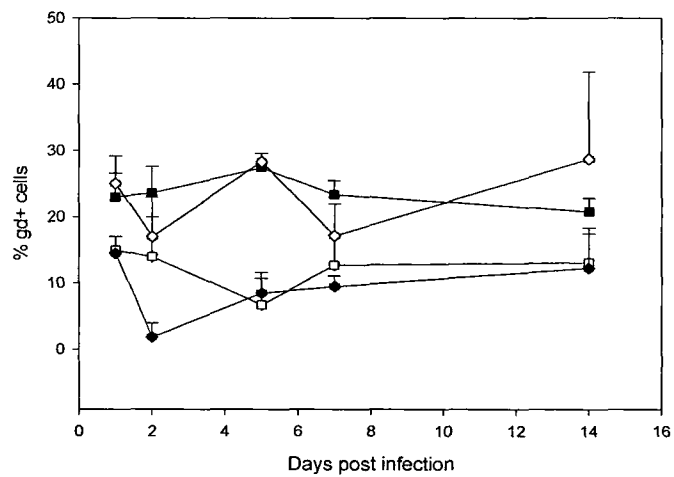
라. CsA 투여 SPF 병아리에 H9N2 LPAI 바이러스 공격접종 후 접종계의 PBMC를 이용한 면역세포 활성검사



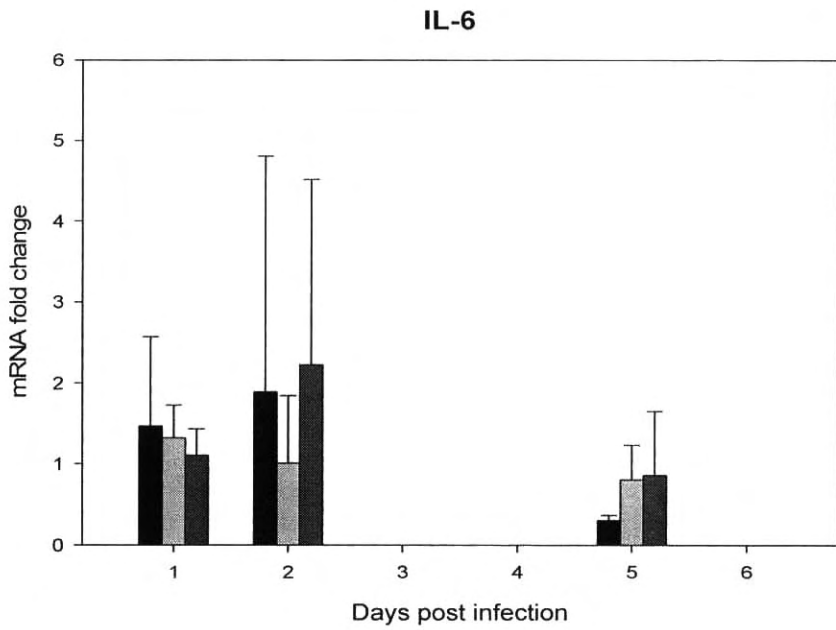
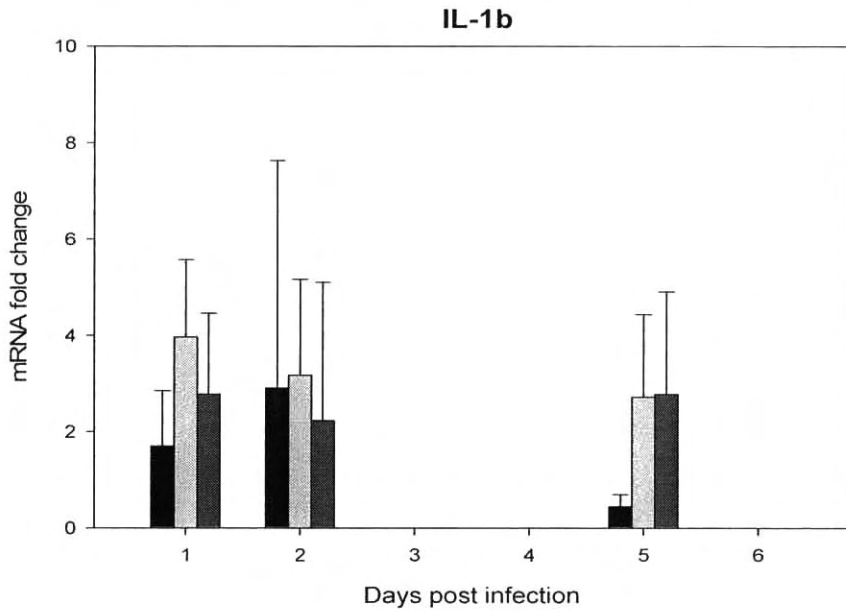
CD8+ cells

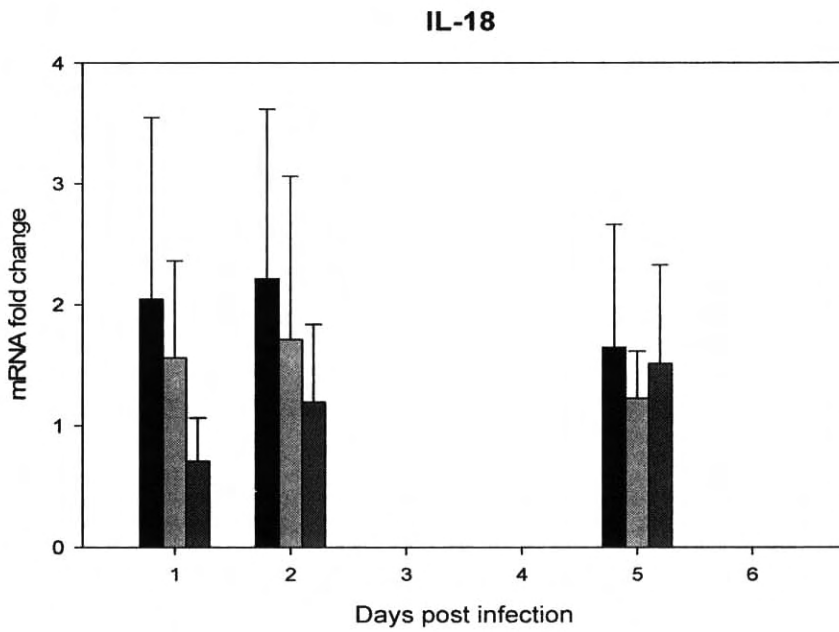
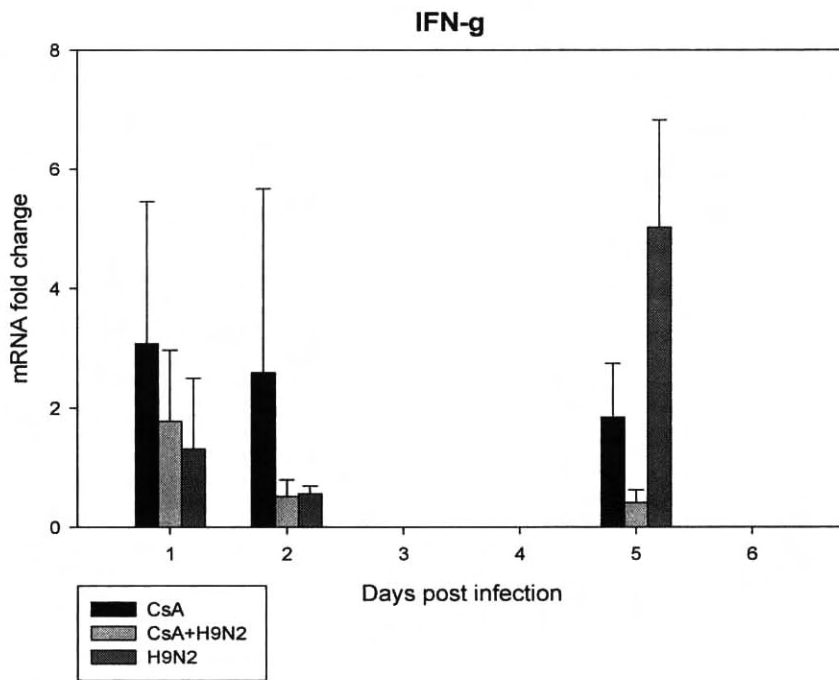


gd+ cells

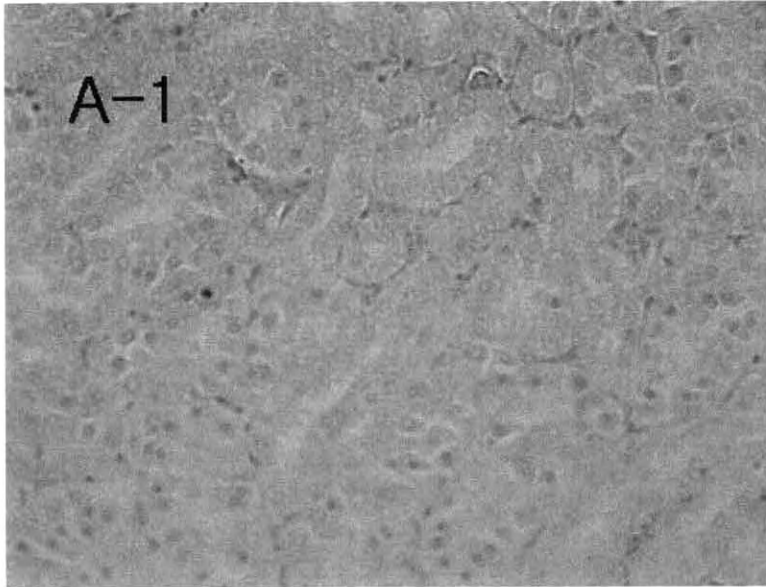


마. CsA 투여 SPF 병아리에 H9N2 LPAI 바이러스 공격접종 후 접종계의 PBMC에서 사이토카인 IFN- γ , IL-18, IL1- β , IL-6 의 발현 변화 조사

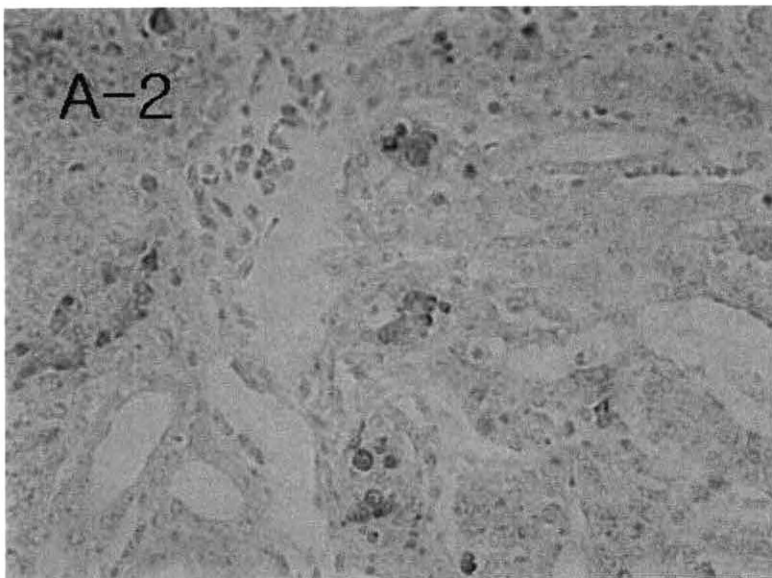




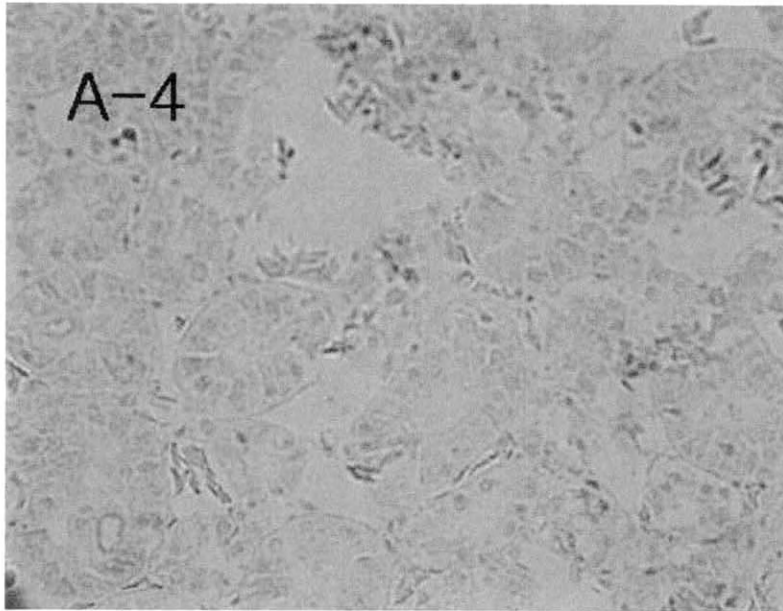
바. CsA 투여 SPF 병아리에 H9N2 LPAI 바이러스 공격집중 후 집중계의 신장에서 면역조직화학염색



A-1, 비처치군

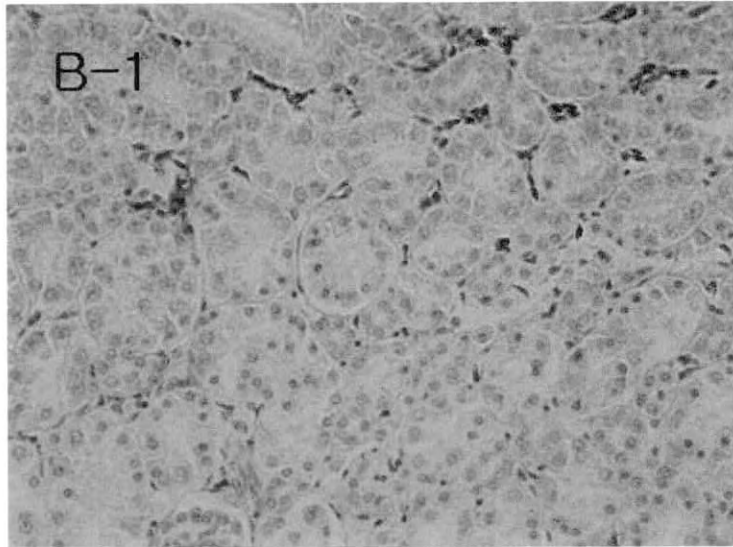


A-2, CsA 처치 후 H9N2 감염군

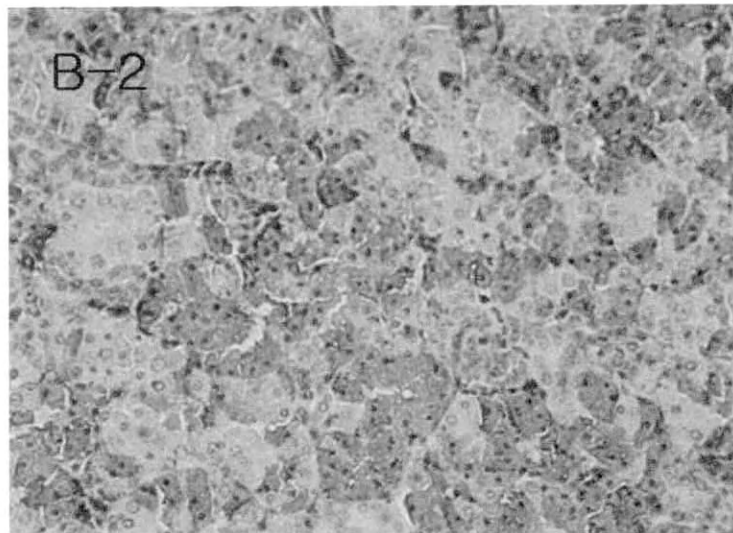


A-4, H9N2 야외 감염계 신장

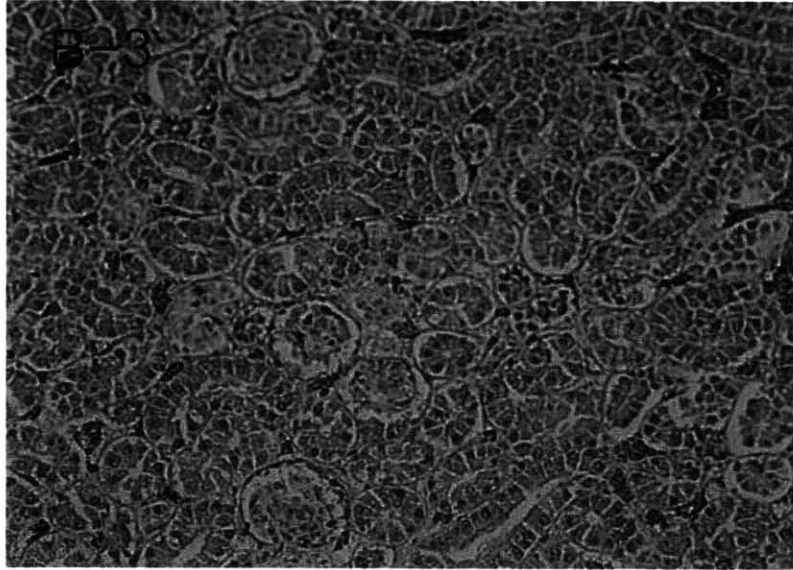
사. CsA 투여 SPF 병아리에 H9N2 LPAI 바이러스 공격접종 후 접종계의 신장에서 TUNEL assay



B-1, 비처치군



B-2, CsA 처치 후 H9N2 감염군



B-3, H5N1 야의 감염계 신장

제4절 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 H5 항원을 효과적으로 발현하고 전달하는 재조합 DNA 백신 및 subunit 백신의 개발

1. 철새 유래 조류인플루엔자 바이러스 모니터링

가. 2004-2007년 국내 철새도래지 채취분변 유래 조류인플루엔자 바이러스 분리 검사 결과 (총계)

철새도래지	검사결과			
	시료채취회수	검사물량(점)	분리건수	바이러스 혈청형 (점)
천수만	10	5043	59	H2(7), H3N8(6), H3(1), H4N2(1), H4N8(2), H4(10), H5N2(6), H5(2), H6N5(4), H6N1(6), H6(4), H9N2(2), H10N4(1), H11(2), H12N5(1), H12(1) 혈청형 미확인(3)
을숙도	1	98	4	H7(4)
철원	1	1,000	0	0
금강	2	940	8	H4(1), H5N2(2), H5(1), H6N1(1), H6(1), H10N2(1), 혈청형 미확인(1)
만경강	1	20	1	H10N4(1)
창녕우포	3	580	22	H1N1(7), H2N8(1), H2(2), H5(1), H11N2(1), 혈청형 미확인(10)
계	18회	7681	94	

* 분리된 바이러스는 모두 저병원성으로 확인 (H5N2형, H7N8형 모두 SPF 종란에 대한 MDT 72시간 이상으로 저병원성으로 확인)

나. 2004년 국내 철새도래지 채취분변 유래 조류인플루엔자 바이러스 분리 검사 결과

철새 도래지	검사결과			
	시료채취 회수	검사물량 (점)	분리건수	바이러스 분리(점)
천수만	4	1,893	20	H2(7), H3N8(4), H3(1), H4(5), H6N5(2), H9N2(1), 혈청형 미확인
계	4회	1,893점		

다. 2005년 국내 철새도래지 채취분변 유래 조류인플루엔자 바이러스 분리 검사 결과

철새 도래지	검사결과			
	시료채취 회수	검사물량 (점)	분리건수	바이러스 분리(점)
천수만	3	1,595	22	H3N8(2), H4N2(1), H4(5), H5N2(1), H5(2), H6N1(1), H6N5(3), H6(5), H10N4(1), 혈청형 미확인(1)
울속도	1	490	4	H7(4)
계	4회	2,085	26	

라. 2006년 국내 철새도래지 채취분변 유래 조류인플루엔자 바이러스 분리 검사 결과

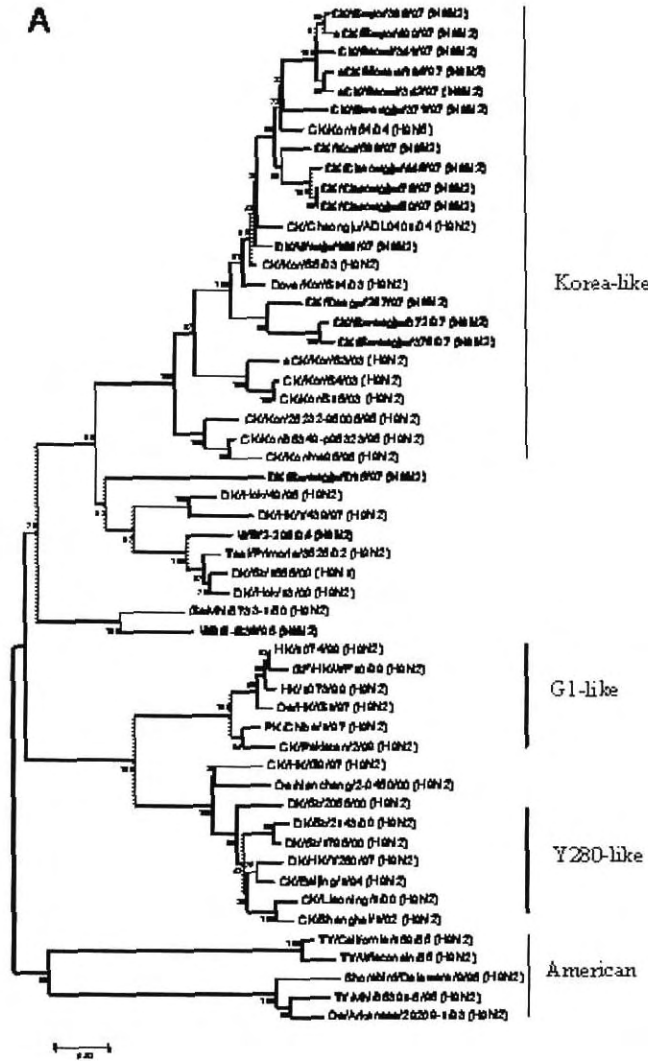
철새도래지	검사결과			
	시료채취회수	검사물량(점)	분리건수	바이러스 분리(점)
천수만	3	500	17	H4N8(2), H5N2(5), H6N1(3), H11(2), H12N5(1), H12(1), 혈청형 미확인(3)
금강	2	940	8	H4(1), H5N2(2), H5(1), H6N1(1), H6(1), H10N2(1), 혈청형 미확인(1)
만경강	1	20	1	H10N4(1)
창녕 우포	1	385	7	H2N8(1), H2(2), H5(1), H11N2(1), 혈청형 미확인(2)
계	7	1,845	33	

마. 2007년 국내 철새도래지 채취분변 유래 조류인플루엔자 바이러스 분리 검사 결과

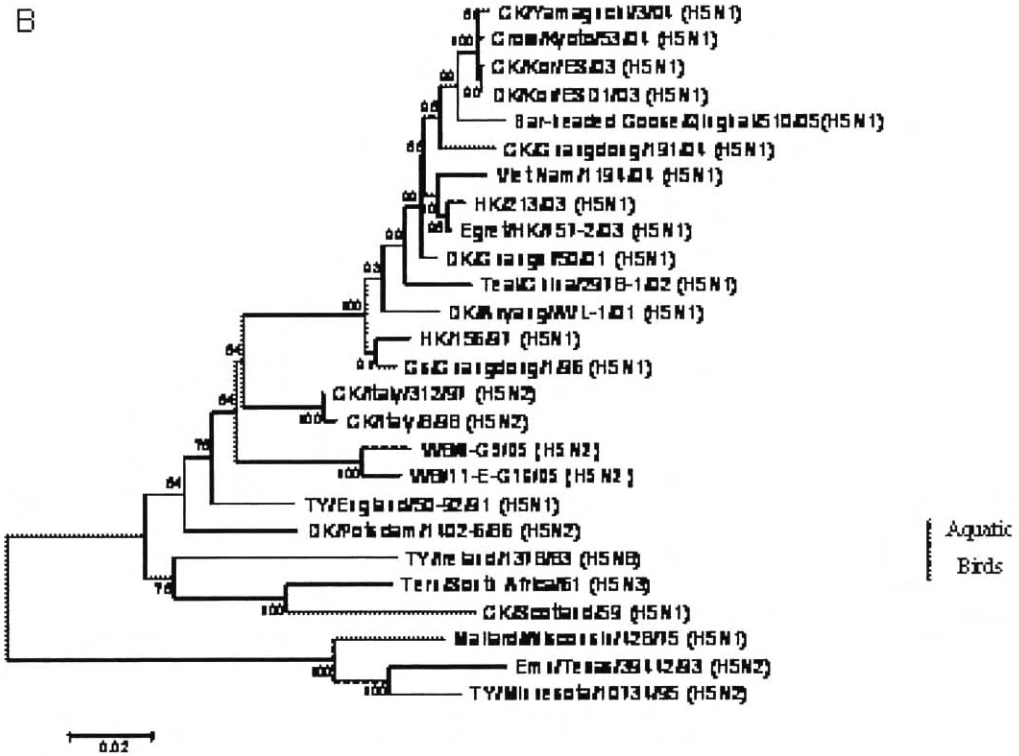
철새도래지	검사결과			
	시료채취회수	검사물량(점)	분리건수	바이러스 분리(점)
창녕 우포	2	195	15	H1N1(7), 혈청형 미확인(8)
계	2	195	15	

2. 철새 유래 조류인플루엔자 바이러스의 계통발생학적 특성

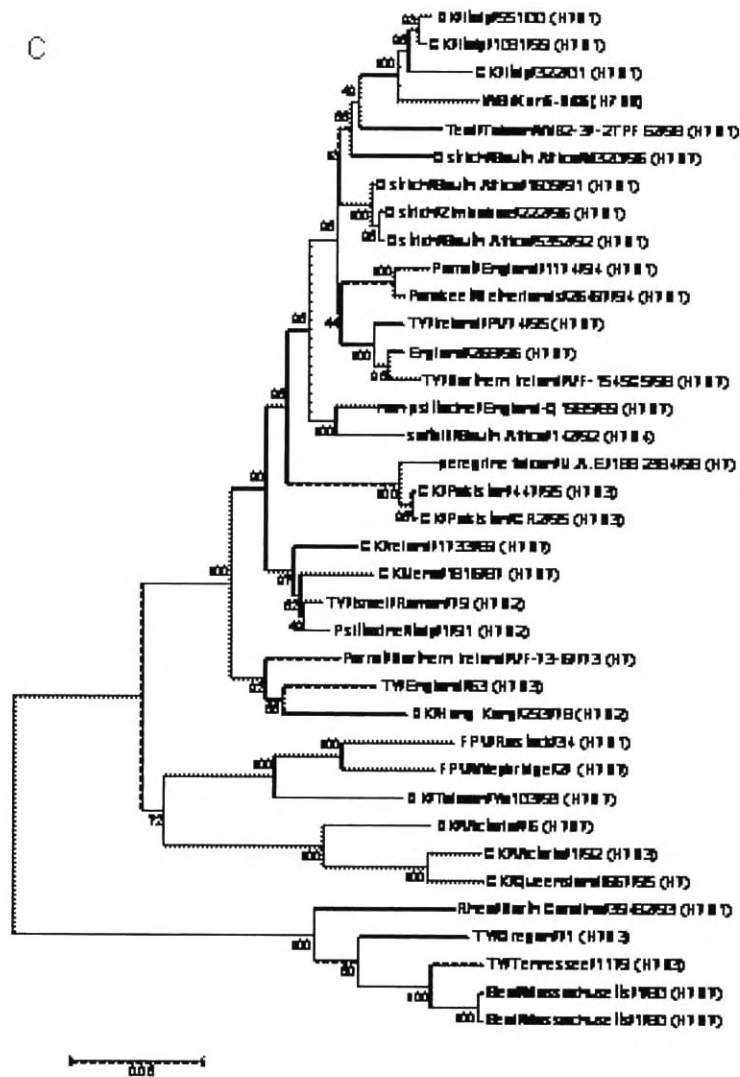
가. 혈청형 H9 조류인플루엔자 바이러스의 HA 유전자의 계통발생학적 특성 (A)



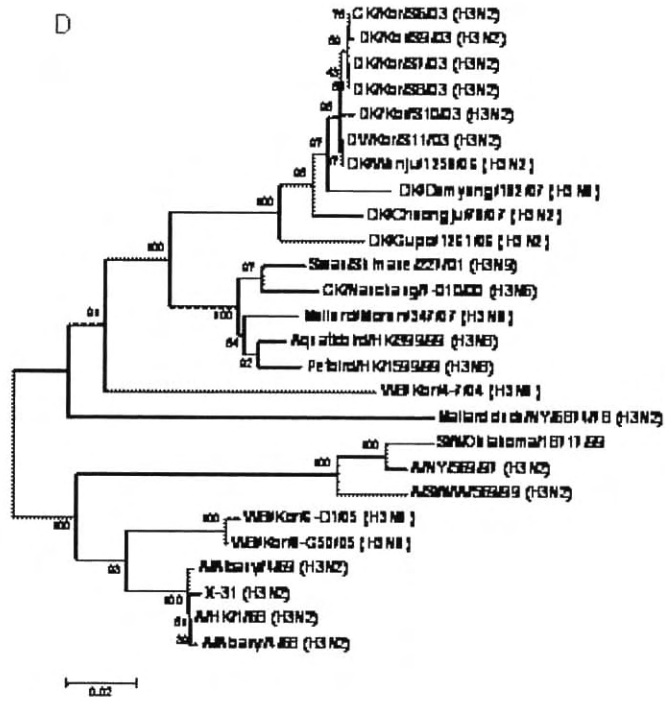
나. 혈청형 H5 조류인플루엔자 바이러스의 HA 유전자의 계통발생학적 특성 (B)



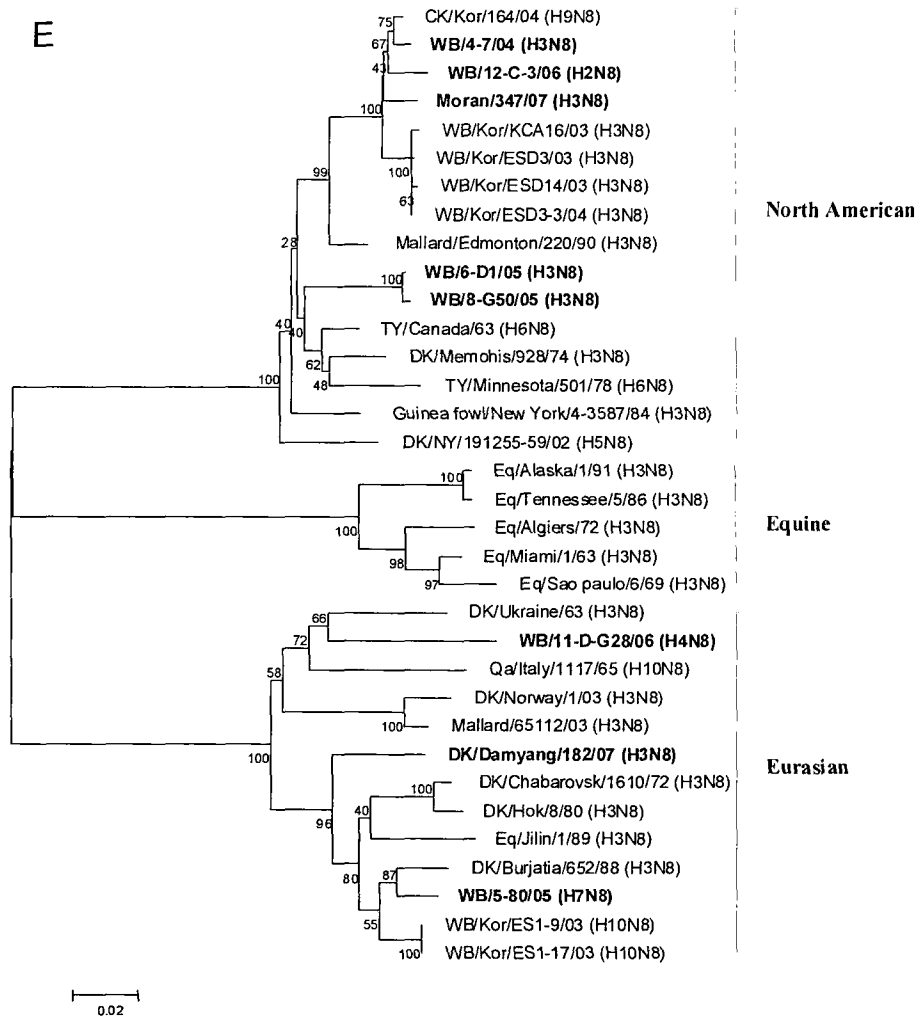
다. 혈청형 H7 조류인플루엔자 바이러스의 HA 유전자의 계통발생학적 특성 (C)



라. 혈청형 H3 조류인플루엔자 바이러스의 HA 유전자의 계통발생학적 특성 (D)



마. 혈청형 조류인플루엔자 바이러스의 NA N8 유전자의 계통발생학적 특성 (E)



3. 철새 유래 조류인플루엔자 바이러스의 분자생물학적 특성과 숙주별 감수성 및 병원성

가. 철새 유래 조류인플루엔자 바이러스 hemagglutinin의 분자생물학적 특성

바이러스	RBC binding activity (HA unit)			Cleavage site 아미노산 서열	아미노산 잔기* (H9)		
	닭	기니피크	말		183	190	226
WB/2-208/04(H9N2)	64	32	32	PAASDR/GL	H	E	Q
WB/8-G39/05(H9N2)	128	64	128	PAASDR/GL	H	E	Q
CK/Kor/96006/96(H9N2)	32	32	16	PAASYR/GL	H	E	Q
WB/8-G9/05(H5N2)	1	1	1	RETR---G			
WB/10-A-G33/05(H5N2)	128	64	128	RETR---G			
WB/11-E-G16/05(H5N2)	256<	256<	256<	RETR---G			
CK/Kor/ES/04(H5N1)	-	-	-	GERRRKKRG			
WB/5-80/05(H7N8)	128	128	64	PEIPKG---RG LF			
WB/6-D1/05(H3N8)	32	64	128	-			
Victoria/4/72(H3N2)	64	64	1>	-			

* Represents the number according to H3 HA. Amino acids at positions H-183, E-190, and Q-226 in the receptor-binding site were considered as conserved at these positions in the avian virus consensus sequence.

나. 철새 유래 조류 인플루엔자 바이러스의 SPF 닭, 메추리, 칠면조 및 BALB/c
 마우스에 대한 숙주 감수성 및 병원성

Name	SPF 닭		메추리		칠면조		마우스	
	기도*	맹장 편도*	기도	맹장 편도	기도	맹장 편도	폐	임상 증상
WB/2-208/04 (H9N2)	1/4	0/4	ND**	ND	1/4	0/4	1/4	-
WB/11-E-16/05 (H5N2)	0/6	0/6	2/6	0/6	ND	ND	ND	-
WB/5-80/05 (H7N8)	4/4	3/4	ND	ND	4/4	3/4	4/4	Sick
WB/12-C-3/06 (H2N8)	0/4	0/4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
WB/6-D1/05 (H3N8)	1/4	0/4	ND	ND	4/4	3/4	4/4	Sick
CK/Kor/ms96/96 (H9N2)	0/4	1/4	ND	ND	ND	ND	0/4	-
Victoria/3/75 (H3N2)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4/4	Sick

* 바이러스 양성 수수/ 총 접종 수수

** ND; Not done.

- No clinical sign

4. H5 바이러스의 RNA 확보, H5 유전자의 클로닝, 발현백터를 통한 제조합 단백질의 발현 및 정제

가. H5 avian influenza virus의 유전자 확보

나. H5 유전자의 염기서열 sequencing 및 alignment

NCBI 제공 Influenza A virus (A/duck/Hokkaido/299/04(H5N3))주의 hemagglutinin (Length=1630)의 유전자를 reference strain으로 하여 염기서열을 비교분석한 결과 H5 AIV로 확인됨. 상동성 = 1595/1624 (98%)

(Query:A/duck/Hokkaido/299/04(H5N3), Sbjct:AIV 분리주)

```
Query 7   AAATAGTACTTCTTTTTGCAATAGTCAGTCTCGTCAAAGTGACCAAATTTGCATTGGTT 66
          |||
Sbjct 8   AAATAGTACTTCTTTTTGCAATAGTCAGTCTCGTCAAAGTGACCAAATTTGCATTGGTT 67

Query 67  ACCATGCAAACAACCTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAATGTTACTGTCA 126
          |||
Sbjct 68  ACCATGCAAACAACCTCGACAGAACAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAATGTTACTGTCA 127

Query 127 CGCATGCCCAAGATATACTGGAAAAGACACACAATGGAAAGCTCTGCAGTCTAAATGGAG 186
          |||
Sbjct 128 CGCATGCCCAAGATATACTGGAAAAGACACACAATGGGAAGCTCTGCAGTCTAAATGGAG 187

Query 187  TTAAGCCTCTCATTTTGAGGGATTGCAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCCATGT 246
          |||
Sbjct 188  TTAACCTCTCATTTTGAGGGATTGCAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCCATGT 247

Query 247  GTGATGAATTCCTCAATGTGCCGGAATGGTCTACATAGTGGAGAAGGACAGCCCAATCA 306
          |||
Sbjct 248  GTGATGAATTCCTCAATGTGCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAAAAGGACAGCCCAATCA 307
```


Query 307 ATGGCCTCTGCTACCCAGGGGATTTCAACGACTATGAAGAGCTGAAACACTTGTTGAGCA 366
 |||
 Sbjct 308 ATGGCCTCTGCTACCCAGGGGATTTCAACGACTATGAAGAGCTGAAACACTTGTTGAGCA 367

Query 367 GTACAAACCATTTTGAGAAAATTCAAATCATCCCAGGAGTTCTTGGTCCAATCATGATG 426
 |||
 Sbjct 368 GTACAAACCATTTTGAGAAAATTCAAATCATCCCAGGAGTTCTTGGTCCAATCATGATG 427

Query 427 CCTCATCAGGAGTGAGCTCCGCATGTCCATATAATGGGAGGTCTCCTTTTTCAGAAATG 486
 |||
 Sbjct 428 CCTCATCAGGAGTGAGCTCCGCATGTCCATATAATGGGAGGTCTCCTTTTTCAGAAATG 487

Query 487 TGGTGTGGCTCATCAAAAAGAACAATGCATACCCAACAATAAAAAGGAGTTACAATAATA 546
 |||
 Sbjct 488 TGGTGTGGCTCATCAAAAAGAACAATGCATACCCAACAATAAAAAGGAGTTACAATAATA 547

Query 547 CTAATCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGATTACCATCCTAATGATGCAGCAGAGC 606
 |||
 Sbjct 548 CTAATCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGATTACCATCCTAATGATGCAGCAGAGC 607

Query 607 AGACAAAGCTCTATCAAACCCAACCACTTACGTTTCTGTTGGGACATCAACACTGAACC 666
 |||
 Sbjct 608 AGACAAAGCTCTATCAAACCCAACCACTTACGTTTCTGTTGGAACATCAACACTTAACC 667

Query 667 AGAGATCGGTCCCAGAAATAGCTACCAGGCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGAAGAATGG 726
 |||
 Sbjct 668 AGAGATCGGTCCCAGAAATAGCTACCAGGCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGAAGAATGG 727

Query 727 AGTTTTTCTGGACAATCTTAAAGCCAAATGATGCTATCAATTCGAGAGTAATGGGAATT 786
 |||
 Sbjct 728 AGTTTTTCTGGACAATCTTAAAGCCAAATGATGCCATCAATTCGAGAGTAATGGGAATT 787

Query 787 TTATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGAGACTCAGCAATCATGAAA 846
 |||

Sbjct 788 TTATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGAAACTCAGCAATCATGAAAA 847
 Query 847 GTGAATTGGAGTATGGTAACTGCAACACCAAGTGCCAAACTTCCAATGGGTGCAATAAAC 906
 |||
 Sbjct 848 GTGAATTGGAGTATGGTAACTGCAACACCAAGTGCCAAAC-TCCAATGGGTGCAATAAAC 906
 Query 907 TCCAGCATGCCATTTCACAAACATACACCCTCTCACCATTGGAGAATGCCCAAATACGTG 966
 |||
 Sbjct 907 TCCAGCATGCCATTTCACAAACATACACCCTCTCACAATTGGGAATGCCCAAATACGTG 966
 Query 967 AAGTCAGATAGATTAGTCCTTGCAACAGGGCTCAGGAATGTCCCTCAAAGAGAAACAAGA 1026
 ||
 Sbjct 967 AAATCAGATAGATTAGTCCTTGCAACAGGGCTCAGGAATGTCCCTCAAAGAGAAACAAGA 1026
 Query 1027 GGAATTTGGGGCCATAGCAGGCTTCATAGAAGGAGGGTGGCAAGGAATGGTAGACGGC 1086
 |||
 Sbjct 1027 GGAATTCGGGGCCATAGCAGGCTTCATAGAAGGAGGGTGGCAAGGAATGGTAGACGGT 1086
 Query 1087 TGGTATGGATACCACCATAGCAACGAGCAAGGGAGTGGATACGCTGCAGACAAAGAATCC 1146
 |||
 Sbjct 1087 TGGTATGGATACCACCATAGCAACGAAACAAGGAAGTGGATACGCTGCAGACAAAGAATCC 1146
 Query 1147 ACCCAAAAGGCAATAGATGGAATCACTAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAAC 1206
 |||
 Sbjct 1147 ACCCAAAAGGCAATAAATGGAATCACTAATAAGGTCTACTCAATCATTGACAAAATGAAC 1206
 Query 1207 ACTCAGTTTGAGGCCGTTGAAAGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGGATAGAGAATTTG 1266
 |||
 Sbjct 1207 ACTCAGTTTGAGGCCGTTGAAAGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGGATAGAGAATTTG 1266
 Query 1267 AACAGAAAATGGAAGACGGTTCCTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTTCTGGTT 1326
 |||
 Sbjct 1267 AACAGAAAATGGAAGACGGATTCTCGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTTCTGGTT 1326

```

Query 1327 CTCATGGAAAATGAAAGAACCCTAGACTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTATGAC 1386
          |||
Sbjct 1327 CTCATGGAAAATGAAAGAACCCTAGACTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGAC 1386

Query 1387 AAGGTTGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAATGGTTGTTTCGAGTTC 1446
          |||
Sbjct 1387 AAGGTTGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAACTGGGTAATGGTTGTTTCGAGTTC 1446

Query 1447 TATCACAAATGTGATGATGAATGTATGGAAAGTGAAGAAACGGAACGTATGACTACCCG 1506
          |||
Sbjct 1447 TATCACAAATGTGATGATGAATGTATGGAAAGTGAAGAAACGGAACGTATGACTACCCG 1506

Query 1507 CAGTATTCAGAAGAGGCAAGATTAACAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTAGAATCA 1566
          |||
Sbjct 1507 CAGTATTCAGAAGAGGCAAGATTAACAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTGGAATCA 1566

Query 1567 ATAGGAACCTACCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCACTGGCA 1626
          |||
Sbjct 1567 ATAGGAACCTACCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCACTGGCA 1626

Query 1627 ATCA 1630
          |||
Sbjct 1627 ATCA 1630

```

다. 철새분리주인 A/WB/11-E-G16/06 (H5N2) influenza virus를 이용한 DNA vaccine제작 및 사독백신 제작

1) 연구 수행방법

① DNA 백신 제작

: 철새 분변으로부터 분리된 H5N2 약병원성 가금 인플루엔자 바이러스를 SPF 부화란에 접종하여 증식시켜 얻은 후 RNeasy mini kit (QIAGEN)으로 ssRNA를 분리하였다. 이렇게 얻은 인플루엔자 바이러스의 RNA를 One-step RT-PCR kit (QIAGEN)를 이용하여 증폭하였다.

i) HA full gene (1.7 Kb) 을 위한 primer sequence

* Bm-HA-1 (Foward primer):

5'-TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG-3'

* Bm-NS-890R (Reverse primer):

5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT-3'

ii) One-step RT-PCR 조건 (50ul reaction)

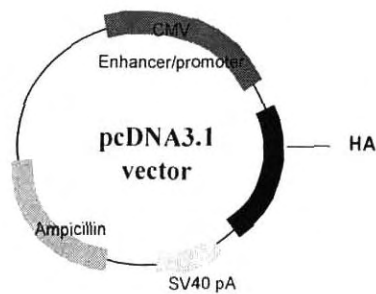
5X QIAGEN onestep RT-PCR buffer	10ul
dNTP mix (each 2.5 uM)	2ul
Foward primer(20 uM)	1ul
Reverse primer(20uM)	1ul
enzyme mix	2ul
RNasin(40unit/ul)	0.25ul
template RNA(0.5ug/ul)	3ul
RNase-free water	30.75ul

위에 제시한 조성대로 혼합하여 다음의 조건으로 one-step RT-PCR을 수행하였다.

Reverse transcription : 50°C, 30min.
Initial PCR activation step : 95°C, 15min.
30 cycles
denaturation : 94°C, 30 sec.
annealing : 58°C, 30 sec.
elongation : 72°C, 7min.

PCR products를 pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen)에 cloning 하였다.
TA expression vector이기 때문에 삽입하고자 하는 유전자가 똑바로 들어
갔는지 제한효소 절단을 통해 방향성을 확인하였다.

HA cloned into pcDNA3.1 vector



② 사독백신제작

철새 분변으로부터 분리된 H5N2 약병원성 가금 인플루엔자 바이러스를 SPF 부화란에 접종하여 증식시켜 얻은 후 formalin을 배양액의 0.1%가 되도록 첨가 후 22°C에서 10시간 불활화 하였다. 불활화한 바이러스는 SPF 종란 접종을 통해 불활화가 확실히 되었는지 확인한 후 ISA25 를 이용하여 oil vaccine으로 제작하였다.

2) 결과

- ① H5 유전자 클로닝 결과 (Lane 1 and 16; 1kb ladder, Lane 9; 100bp ladder, Lane 15; pcDNA3.1-H5)



< Cut by EcoR I and EcoR V >



< Cut by Hind III and EcoR V >

5. SPF 병아리에 AIV H5 단백 발현 DNA vaccine의 SPF 시험계에서의 번역원성 조사

가. SPF 병아리에 AIV H5 단백 발현 DNA vaccine과 Lipofectamine 동시 접종
후 항체가 역가 변화 조사

1) 연구수행 방법

- H5N2 AIV의 H5 유전자가 vector에 올바르게 삽입되었는지 염기서열 분석을
통해 ORF를 확인한 후 QIAGEN plasmid mega kit (QIAGEN) 를 이용하여 H5
유전자가 삽입된 vector를 대량으로 확보하였다.

- AIV 사독백신에 대한 항체형성능에 대한 DNA vaccine의 효능을 평가하기 위
해 2주령 SPF 닭을 아래의 표와 같이 4개 군으로 나누어 실험을 진행하였다.

- 1번은 H5 DNA vaccine 과 lipofectin을 함께 접종한 군으로 우선 lipofectin
20ul를 PBS 100ul에 희석하여 liposome을 만든 후 접종 15분 전에 plasmid DNA
100ug을 liposome과 희석하여 총 400ul가 되도록 하였다.

- 이렇게 준비한 DNA를 수당 DNA100ug/400ul 으로 가슴근육에 두 군테로 나
누어 200ul씩 접종하였다.

- 2번은 DNA 백신 2주후에 제작한 H5N2 사독백신을 접종한 그룹이다. 3번은
사독백신만 접종한 군이며 마지막으로 4번은 PBS만 처치한 대조군으로 지정하
였다.

- 백신접종 2주후에 모든 군의 닭을 채혈하여 AGP 와 HI 를 통해 항체가를 검
사하였다.

2) 시험결과

		1차 접종 2주후 (4주령)		2차 접종 2주후 (6주령)		2차 접종 3주후 (7주령)	
Group	Treatment	HI	AGP	HI	AGP	HI	AGP
1	H5N2 DNA with lipofectin	0		2/10 +ve 1,2 (AV 0.3)	0/10	1/10 +ve 2 (AV 0.2)	0/10
2	H5N2 DNA with lipofectin + killed H5N2	0		10/10 +ve 2,2,2,3,3,3,5,5,6,6 (AV 3.7)	7/10	10/10 +ve 1,4,4,5,5,5,6,6,7,7 (AV 5.0)	2/10
3	killed H5N2	-		5/10 +ve 1,1,1,3,4 (AV 1.0)	7/10	8/10 +ve 2,2,2,2,3,3,4,6 (AV 2.4)	10/10
4	untreated -ve control	-		-			

- DNA백신 단독접종 군에서는 AGP나 HI 검사 시 항체가 검출되지 않았다.

- 그러나 DNA백신으로 priming을 한 후 사독백신으로 boosting을 한 군에서는 2차 접종 2주와 4주후 모두에서 사독백신 단독접종 군에 비해 유의성 있게 높은 항체가가 관찰 되었다 ($p < 0.01$).

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

기술적 측면

- 조류 세포성면역 침단분석기법 개발로 조류인플루엔자와 뉴캐슬병 등 주요 가금질병 방제연구에 크게 기여할 것이다.
- 바이러스 감염억제 침단기술개발로 인체에 감염 가능한 변이형 고병원성 조류인플루엔자 발생에 대비한 사람독감백신 개발방안을 제시할 수 있다.
- 조류인플루엔자 바이러스에 대한 면역능을 극대화하고 감염을 최소화하여 질병의 확산을 효과적으로 억제할 수 있는 신 개념의 마커백신 개발로 미래의 조류인플루엔자 국가방역정책 수행에 모델이 될 수 있는 경제적인 조류 독감 방제방안을 제시할 수 있다.

경제 · 산업적 측면

- 저병원성 조류인플루엔자 야외감염 시 병원성 증대요인 확인으로 국내사육 계군의 면역능 저하 피해 방지와 저병원성 조류인플루엔자 감염 피해 최소화 로 농가 소득 증대에 크게 기여할 것이다.
- 미래의 조류인플루엔자 국가방역정책 수행에 모델이 될 수 있는 경제적인 조류독감 방제방안 제시로 소비자와 생산자의 경제적 피해 최소화를 유도할 수 있을 것이다.
- 고병원성 조류인플루엔자에 대한 효과적인 방제기술 확립으로 국내 양계산업 보호 및 양계산물 수출증대에 크게 기여할 것이다.
- 국내 고병원성 조류인플루엔자 비발생국 지위 유지로 외국산 가금류 수출입 협상에 우위유지에 기여할 것이다.
- 인체에 해가 없는 안전 축산물 생산을 통한 국민보건 향상에 기여할 것이다.

제5장 연구개발결과의 활용계획

- 국내 면역억제질환 모니터링 자료 국내 가금백신 수급 및 국가 질병예찰자료로 활용
- 조류 세포성면역 분석기법 개발 보급으로 국내 조류 기초면역연구 기여
- 조류인플루엔자 마커백신 제조기법 공개 활용 및 유사시 대비 마커백신 생산 비축 정부건의

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

<해당사항 없음>

제7장 참고문헌

1. Alexander, D.J. (2000). A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*, 74, 3-13.
2. Beard, C.W., Schnitzlein, W.M. & Tripathy, D.N. (1991). Protection of chickens against highly pathogenic avian influenza virus (H5N2) by recombinant fowlpox viruses. *Avian Diseases*, 35, 356-359.
3. Capua, I. & Marangon, S. (2003). The use of vaccination as an option for the control of avian influenza. *Avian Pathology*, 32, 335-343.
4. Capua, I., Terregino, C., Cattoli, G., Mutinelli, F & Rodriguez, J.F. (2003). Development of a DIVA-differentiating infected from vaccinated animals-strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathology*, 32, 47-55.
5. Halvorson, D.A. (2002). The control of mildly pathogenic avian influenza: a role for inactivated vaccine. *Avian Pathology*, 31, 5-12.
6. Lee, C.W., Song, C.S., Lee, Y.J., Mo, I.P., Garcia, M., Suarez, D.L. & Kim, S.J. (2000). Sequence analysis of the hemagglutinin gene of H9N2 Korean avian influenza viruses and assessment of the pathogenic potential of one isolate MS96. *Avian Diseases*, 44, 527-535.
7. Luschow, D., Werner, O., Mettenleiter, T.C. & Fuchs, W. (2001). Protection of chickens from lethal avian influenza A virus infection by live-virus vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing the hemagglutinin (H5) gene. *Vaccine*, 19, 4249-4259.

8. Suarez, D.L., Perdue, M.L., Cox, N., Rowe, T., Bender, C., Huang, J. & Swane, D.E. (1998). Comparison of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *Journal of Virology*, 72, 6678-6688.
9. Swayne, D.E., Beck, J.R. & Mickle, T.R. (1997). Efficacy of recombinant fowl poxvirus vaccine in protecting chickens against a highly pathogenic Mexican-origin H5N2 avian influenza virus. *Avian Diseases*, 41, 910-922.
10. Swayne, D.E., Beck, J.R., Garcia, M. & Stone, H.D. (1999). Influence of virus strain and antigen mass on the efficacy of H5 avian influenza inactivated vaccines. *Avian Pathology*, 28, 245-255.
11. Swayne, D.E., Beck, J.R. & Kinney, N. (2000). Failure of a recombinant fowl poxvirus vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chickens preimmunized with a fowl pox vaccine. *Avian Diseases*, 44, 132-137.
12. Webster, R.G., Taylor, J., Pearson, J., Rivera, E. & Paoletti, E. (1996). Immunity to Mexican H5N2 avian influenza viruses induced by a fowl pox-H5 recombinant. *Avian Diseases*, 40, 461-465.