

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001514-01

**양식어류의 바이러스성 출혈성 패혈증(VHS)에 대한  
효과적인 불활화 백신 개발**

Development of effective viral hemorrhagic septicemia(VHS)  
vaccine for olive flounder

녹십자수의약품주식회사

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “양식어류의 바이러스성 출혈성 패혈증(VHS)에 대한 효과적인 불활화 백신 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 6 월 29 일

주관연구기관명 : 녹십자수의약품주식회사

주관연구책임자 : 강보규

연 구 원 : 김종만

연 구 원 : 문형준

연 구 원 : 한상윤

협동연구기관명 : 제주자치도 해양수산연구원

협동연구책임자 : 강봉조

# 요 약 문

## I. 제 목

- 양식어류의 바이러스성 출혈성 패혈증(VHS)에 대한 효과적인 불활화 백신 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

- 저수온기 바이러스성출혈성패혈증(VHS)에 의한 넙치의 폐사 및 피해 증가
- 넙치 바이러스성출혈성패혈증(VHS)에 대한 효과적인 Control 방안 필요성 증대
- 넙치 바이러스성출혈성패혈증(VHS)의 예방을 위한 우수한 백신의 개발, 생산, 및 보급
- 넙치 바이러스성출혈성패혈증(VHS) 예방백신의 야외양식장에 적용기술 확보

## III. 연구개발 내용 및 범위

- 넙치 바이러스성출혈성패혈증(VHS)의 병원체 확보 및 역학과 유형 조사
- 넙치 바이러스성출혈성패혈증(VHS)의 원인체 별 병원체의 백신 후보주 선정 및 확립
- 효과가 우수한 바이러스성출혈성패혈증바이러스(VHSV) 불활화 시험험백신의 개발 및 유효성 평가

## IV. 연구개발결과

- 넙치 바이러스성출혈성패혈증(VHS) 병원체의 분리배양 및 백신제조를 위한 대량생산
- 넙치 바이러스성출혈성패혈증바이러스(VHSV) 분리주를 이용한 불활화백신의 개발 및 제품화

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 넙치 바이러스성출혈성패혈증바이러스(VHSV) 불활화 백신의 상용화
- 넙치 바이러스성출혈성패혈증(VHS) 백신에 대한 국내 및 국제 특허 등록

## SUMMARY

### (영문요약문)

Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) is the most important viral pathogens that infects the olive flounders reared in Korean aquaculture. However, only bacterial vaccine is currently commercially available in the olive flounder. Therefore, to prevent VHS in olive flounder, VHS vaccine strategy is recommended.

In this study, thirty VHSV isolates were identified in farmed olive flounders from 2007 to 2011. The nucleotide sequences of the 30 isolates exhibited very close identity with each other and VHSV genotype IVa strains are widely distributed throughout olive flounder farms in Korea. GCVP-02 strain was exhibited the highest multiplication ( $10^8$ TCID<sub>50</sub>/ml) in EPC cell and high pathogenicity ( $<10^4$ TCID<sub>50</sub>/ml) in olive flounder.

Therefore, GCVP-02 strain was selected as vaccine candidate. VHSV vaccine was inactivated with binary ethylenimine (BEI) and mixed with various adjuvant. We selected effective and safe adjuvant (AJ03+AJ05) in olive flounder. Cumulative mortality of AJ03+AJ05 adjuvanted VHSV vaccine group was 20% lower than non-adjuvanted vaccine group at 21 days after challenge. And RPS value of adjuvanted vaccine group was 76.9% when the mortality of control group was higher than 60%. However, neutralization antibodies of all groups were not detected during the experimental period. Field test of VHSV inactivation vaccine is now under consideration for government approval.

In summary, this study successfully developed VHSV inactivated vaccines for VHS control in olive flounder. The developed vaccines had good safety and efficacy. Furthermore, VHSV vaccine is on developing as well. Therefore, VHS vaccine will be commercialized and be extended for domestic market.

CONTENTS  
(영 문 목 차)

Chapter 1. Outline of the research ..... 7  
    Verse 1. Necessity of the research ..... 7  
    Verse 2. Scope of the research ..... 8

Chapter 2. Situation of the related research ..... 9  
    Verse 1. Domestic situation of the related research ..... 9  
    Verse 2. International situation of the related research ..... 9

Chapter 3. Contents and results of the research ..... 10  
    Verse 1. Collection of VHS virus and characterization of their  
        epidemiological property ..... 10  
    Verse 2. Selection and characterization of pathogens as the vaccine  
        candidate ..... 17  
    Verse 3. Development and evaluation of the experiment VHS vaccine  
        for VHS control ..... 21

Chapter 4. Achievement and contribution of the research ..... 28  
    Verse 1. Annual goals and achievement ..... 28  
    Verse 2. Degree of contribution to the related field ..... 29

Chapter 5. Outcome of the research and its application plan ..... 30  
    Verse 1. Outcome of the research ..... 30  
    Verse 2. Application plan of the research outcome ..... 31

Chapter 6. The acquired scientific knowledge during the study ..... 33

Chapter 7. References ..... 34

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	7
제 1 절	연구개발의 필요성 .....	7
제 2 절	연구개발의 범위 .....	8
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	9
제 1 절	국내 기술 현황 .....	9
제 2 절	국외 기술 현황 .....	9
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	10
제 1 절	바이러스성출혈성패혈증 (VHS)의 병원체 확보 및 역학과 유형 조사 .....	10
제 2 절	백신 후보주의 작출 및 특성연구 .....	17
제 3 절	효과가 우수한 VHS 시험백신 개발 및 시험백신 평가 .....	21
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	28
제 1 절	연차별 목표 및 달성도 .....	28
제 2 절	관련 분야 기여도 .....	29
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	30
제 1 절	연구 개발 성과 .....	30
제 2 절	성과 활용 계획 .....	31
제 6 장	연구 개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	33
제 7 장	참고문헌 .....	34

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

정부의 기르는 어업 육성정책을 지속적으로 추진해온 결과 현재 양식어업에 의한 수산물 생산량은 급속히 증가하게 되었고 양식품종 또한 매우 다양화되고 있다. 그 중 넙치는 활어회로 즐기는 국내 대표 어종으로서, 성장이 빠르고 양식이 매우 활성화되어 현재 어류양식 생산량에 있어서 많은 부분을 차지하고 있고, 선어회를 즐기는 이웃 일본에도 수출되고 있는 어종으로 각광받고 있다. 그러나, 연안수질 환경오염, 양식장의 노화, 과밀사육, 품종 열성화 등으로 양식 어류의 항병력이 저하되어 각종 전염성 질병에 의한 폐사가 증가되고, 이에 따라 양식어가의 생산성이 저하되고 있다. 넙치의 폐사율은 입식량 대비 40% 내외로 상당히 높은 폐사율을 보인다 (표 1).

표 1. 양식넙치의 폐사율 현황 (통계청자료)

	2006년	2007년	2008년	2009년
입식량(천마리)	116,680	124,378	111,044	133,305
폐사량(천마리)	48,493	54,861	45,545	49,298
폐사율(%)	41.6	44.1	41	37

2005년부터 2007년까지 양식넙치를 대상으로 하여 실시한 병원체모니터링 결과를 보면 병원체의 양성률이 각각 기생충 36.7%, 세균 32.8%, 바이러스가 31.4%로 비슷한 비율로 검출되었다 (김 등, 2010). 넙치에서 발생하는 병원체별 주요 전염성 질병으로는 연쇄구균증, 에드워드병, 비브리오팀, 활주세균증 등의 세균성 질병과, 스쿠티카증, 백점충, 트리코디나 감염증 등의 기생충성 질병, 그리고 바이러스성 출혈성패혈증(VHS), 바이러스성 신경괴사증(VNN), 해산 버나바이러스증(MBV), 이리도바이러스증 등의 바이러스성 질병이 있다. 이중 바이러스성 질병은 다른 병원체에 비하여 전파속도가 빠르고, 경우에 따라 대량폐사를 유발하며, 바이러스 자체의 병원성이 약하다 하더라도 숙주인 넙치의 면역상태를 약화시켜 세균이나 기생충과 같은 다른 병원체의 감염기회를 제공하여 그 피해를 더욱 가중시킨다.

국내에서의 바이러스성출혈성패혈증은 양식넙치에서 2001년 처음 분리 보고된 이후 양식넙치 뿐만 아니라 인근해의 다양한 자연산 어류에서도 확인이 되었다. 특히 바이러스성출혈성패혈증(VHS)은 넙치의 입식초기 저수온기에 발생하여 대량폐사를 유발한다. 국내 넙치 생산량 중 절반가량을 생산하는 제주도지역의 경우 2007년부터 2010년까지 질병검사 의뢰시료 중 VHSV의 양성율이 30%로 높게 나타났으며, 그 피해도 증가하고 있는 실정이다. 또한 VHSV는 'OIE notifiable disease'로 규정되어 있어 수산물 유통시 검역대상이 되는 질병으로 넙치의 수출입에 있어서 중요한 질병 요인이기도 하다. 그러나 아직까지 VHS에 대한 뚜렷한 대책은 없는 실정이다. 이에 바이러스성 출혈성패혈증에 의한 양식어가의 경제적 손실을 줄이고 넙치의 원활한 수출 및 유통을 위해 효과적인 VHS백신의 개발이 시급하다.

표2. 제주지역 양식넙치의 VHSV 양성율 (제주도 해양수산연구원 자료)

양성율 (양성수/검사샘플수)				
2007년	2008년	2009년	2010년	합계
30.6% (56/183)	36.2% (83/229)	24.7 (21/85)	20 (9/45)	31.2% (169/542)

## 제 2 절 연구개발의 범위

### ○ 넙치 바이러스성출혈성패혈증(VHS)의 병원체 확보 및 역학과 유형 조사

- 국내 바이러스성출혈성패혈증(VHS)과 관련된 임상증상의 넙치를 대상으로 국내에 분포하는 바이러스성출혈성패혈증 바이러스의 유형과 역학 조사 및 각 유형별 대표주 분리, 확보

### ○ 넙치 바이러스성출혈성패혈증 바이러스 (VHSV)의 백신 후보주 선정 및 확립

- 국내 넙치의 바이러스성출혈성패혈증 바이러스(VHSV)의 역학, 유형 조사를 바탕으로 하여 각 병원체별 백신 후보주 선정
- 선정된 백신 후보주의 대량 배양법 개발을 통한 백신 후보주 확립

### ○ 효과가 우수한 VHSV 불활화 시험백신 개발 및 시험백신 평가

- 바이러스성출혈성패혈증 바이러스(VHSV)의 불활화 시험백신의 개발
- 불활화 시험백신에 대해 목적동물을 대상으로 한 안전성, 면역원성 및 방어효과 시험



## 제 2 장. 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절. 국내 기술개발 현황

국내에서는 2001년 양식넙치에서 처음으로 바이러스성출혈성패혈증이 보고(김 등, 2003) 된 이후 인근해의 다양한 자연산 어류에서 바이러스성출혈성패혈증 바이러스가 보고되었다 (김 등, 2004; 이 등, 2007; 김 등, 2011). 국내에서 분리된 바이러스는 모두 Genotype IVa 에 속하며 일본에서 분리되는 VHSV와 높은 상동성을 보이는 것으로 보고되고 있다(김 등, 2011 ). 그러나 국내에서 VHS 백신에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있었으며 2011년 VHSV의 NV gene을 Knock-out시킨 live attenuated virus를 백신으로 이용한 연구가 유일하다 (Kim et al, 2011). 또한 현재 국내 어류용 백신은 넙치의 세균성 질병 중에서도 제한적으로 몇 가지 질병에 한해서만 개발되어 있는 상황이며 바이러스성 질병을 예방하기 위한 백신은 전무한 상태이다. 그러나 저수온기를 중심으로 한 넙치에서의 VHS의 발병 및 그에 따른 피해는 증가하고 있으며 국내에서 유행하는 분리주를 이용한 백신의 개발 및 보급이 필요한 실정이다.

### 제 2 절. 국외 기술개발 현황

유럽에서 대서양 연어에서 처음 VHSV가 분리, 보고된 이후 다양한 담수 및 해수 어류에서 감염사례가 보고되고 있다 (Dixon *et al.*, 1997; Elsayed *et al.*, 2006; Isshik *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2009; King *et al.*, 2001; Mortensen *et al.*, 1999; Ross *et al.*, 1994; Smail, 2000; Thiery *et al.*, 2002). 현재까지 유럽 및 일본을 중심으로 하여 바이러스성출혈성패혈증을 예방하기 위한 많은 연구가 이루어지고 있으며 최근에는 subunit 백신, genetic 백신을 중심으로 한 연구가 활발하게 이루어지고 있다 (Lorenzen *et al.*, 199;31998;1999;2002; Lecocq-Xhonneux *et al.*, 1994; Heppell *et al.*, 1998, Chico *et al.*, 2009). 그 중에서도 Glycoprotein gene을 이용한 DNA 백신은 넙치에서 상대생존율 90%이상으로 높은 방어효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다 (Byon *et al.*, 2006). 이러한 활발한 연구에도 불구하고 현재 상용화 되어있는 VHS 예방용 백신은 국외에도 없으며 역시 빠른 백신의 개발 및 보급이 필요한 실정이다.

## 제 3 장. 연구개발 수행내용 및 결과

### 제 1 절. 바이러스성출혈성패혈증(VHS)의 병원체 확보 및 역학과 유형조사

#### 1. 국내 VHSV의 분리, 역학 및 유전학적 성상 조사

##### 가. 시험재료 및 방법

##### (1) 샘플

바이러스성 질병의 증상을 보이는 넙치샘플을 가검물로 사용하였으며, 녹십자수의약품 어병진단센터, 녹십자수의약품 수의연구소 및 제주자치도 해양수산연구원에서 샘플 처리 및 병성감정을 실시하였다.

##### (2) RT-PCR

장기의 조직 가검물에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 실시하여 양성유무를 판별한다 (표 1).

표1. VHS 검출을 위한 PCR primer sets 및 product size

Virus	Primer sets	Oligonucleotide sequence (5'-3')	PCR products
VHSV	Forward	GGGGACCCCAGACTGT	811bp
	Reverse	TCTCTGTCACCTTGATCC	

(3) 바이러스의 분리 : RT-PCR에서 양성으로 나타난 장기 조직 가검물에서 Epithelioma Papulosum Cyprini(EPC) cell을 이용하여 바이러스를 분리한다.

(4) 염기서열분석 : RT-PCR산물에서 DNA를 정제하여 Glycoprotein gene 과 Nucleocapsid protein gene의 염기서열분석을 실시한다. 염기서열분석 결과를 이용하여 아미노산 서열의 분석을 실시하고 Phyogenetic analysis(계통수분석)을 통해 분리된 각 바이러스의 유전형질 결정짓는다.

##### 나. 시험결과

##### (1) VHS 유행률, 주요 발생시기 및 발생어체 크기

녹십자수의약품 어병진단센터에서 2010년 1월부터 2011년 12월까지 바이러스성 질병의 증상을 보이는 넙치 샘플들을 대상으로 5가지 바이러스에 대해 RT-PCR (or PCR) 로 병성감정을 실시한 결과 총459건의 가검물 진단건수 중 221건이 양성으로 판정되었으며 그 중 160건 (약

72.4%)이 VHSV 양성으로 아주 높은 비율을 나타내었다 (그림1 및 표 2).

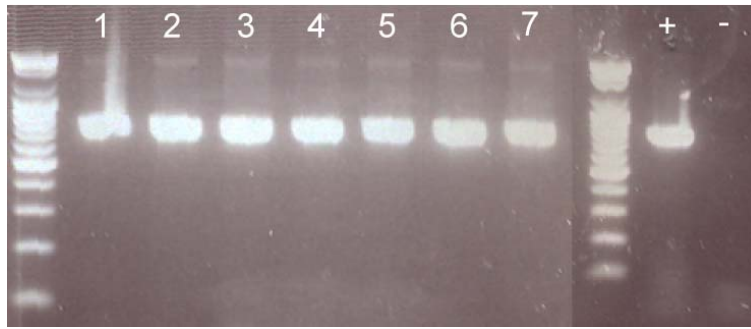


그림 1. 가검물의 VHSV PCR양성사진

표 2. 바이러스별 양성진단 거수

년도	월	검사건수	RNA virus			DNA virus	
			VHSV	MBV	VNN	HRV	Irido
2010년	1월	8	0	0	0	0	0
	2월	22	9	3	0	0	0
	3월	22	11	0	0	0	0
	4월	17	9	0	0	0	0
	5월	25	11	0	0	0	0
	6월	15	5	1	1	0	0
	7월	21	5	2	0	0	0
	8월	16	11	0	0	0	0
	9월	11	0	2	0	0	1
	10월	22	9	3	1	0	0
	11월	36	16	9	0	0	0
	12월	16	7	2	0	0	0
	소계	231	93	22	2	0	1
2011년	1월	26	11	5	0	0	0
	2월	28	16	3	0	0	0
	3월	17	7	1	0	0	0
	4월	26	10	2	0	0	0
	5월	10	3	0	0	0	0
	6월	32	11	4	0	0	0
	7월	16	0	1	0	0	1
	8월	24	1	3	0	0	0
	9월	16	5	2	0	0	5
	10월	6	0	0	0	0	0
	11월	17	3	5	0	0	1
	12월	10	0	2	0	0	1
	소계	228	67	28	0	0	8
합계		459	160	50	2	0	9

넙치에서 VHS의 발생은 15°C 전후의 저수온에서 주로 발생하며 강한 병원성을 나타내는 것으로

로 알려져 있으나 2010년~2011년 본사 어병진단센터에서 제주도지역의 넙치를 대상으로 한 병성감정결과 수온과 큰 연관성 없이 연중 진단되었다. (그림 2 및 그림 3). 그러나 VHSV는 20℃ 이상에서는 병원성을 거의 나타내지 않는 것으로 보고 되어있으며, 실제 양어장에서의 폐사율의 경우도 15℃전후의 저수온 일 때가 20℃ 이상의 고수온 일 때 보다 높은 경향을 보였다.

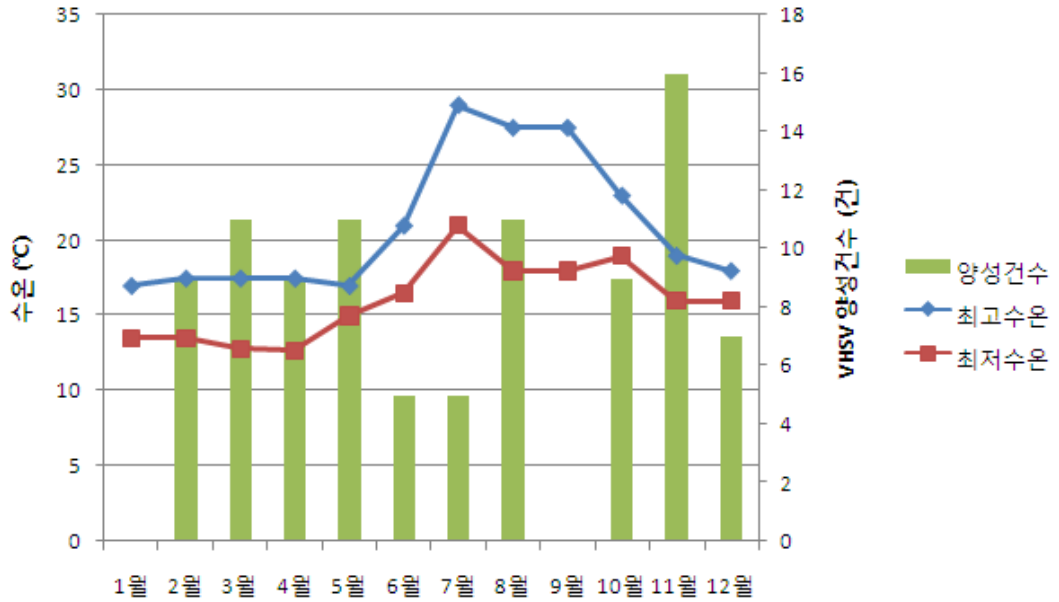


그림 2. 2010년 제주지역 월별 수온 및 VHSV 양성진단건수

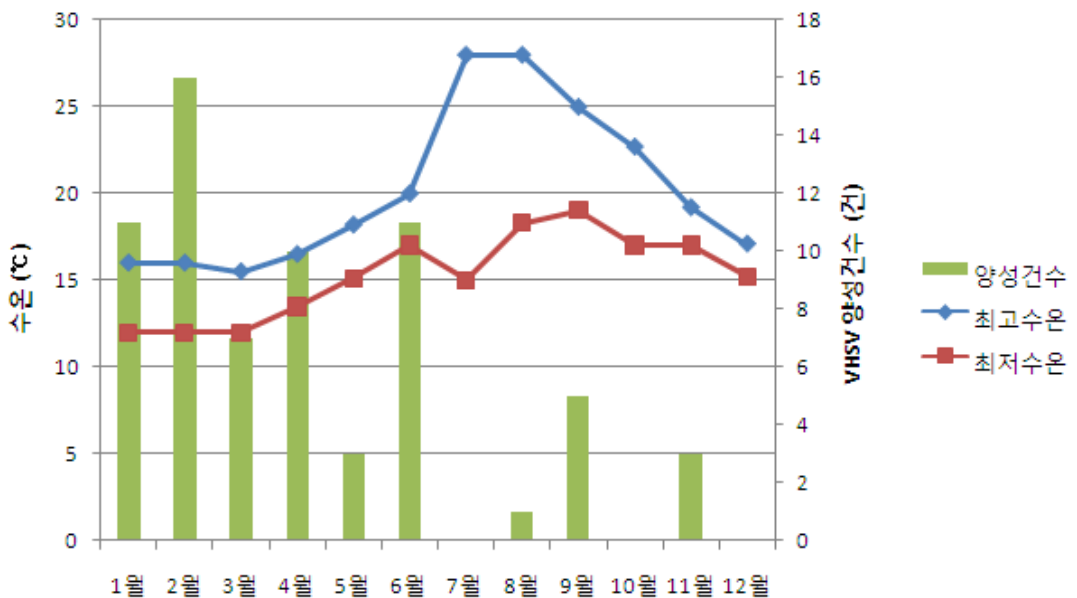


그림 3. 2011년 제주지역 월별 수온 및 VHSV 양성진단건수

또한 VHSV양성으로 진단된 넙치의 어체중은 50g 이하의 치어가 160건중 83건(약 51.9%)으로 가장 높았으며 50~500g의 넙치가 64건(약 40%)으로 그 다음으로 나타났다 (표 3).

표 3. 어체크기별 VHSV 양성건수

어 체 중	발 생 건 수
50g 이하	83
50~500g	64
500~1000g	10
1000g 이상	3
합 계	160

이상의 결과로 볼때 넙치의 주요 바이러스성 질병중 VHS가 가장 높은 발병율(진단율)을 보였으며 현재 수온과 큰 연관성이 없이 연중 발병하나 15℃ 전후의 저수온 일 때 넙치에서 폐사를 일으키는 것으로 보인다. 또한 발병하는 주요 어체의 크기는 성어보다는 500g이하의 치어나 육성어에서 높은 발병율을 나타내는 것으로 판단된다.

(2) 바이러스의 분리

2007년~2011년까지 녹십자수의약품 어병진단센터 및 제주자치도 해양수산연구원에서 병성감정한 VHSV양성 가검물을 이용하여 녹십자수의약품 수의연구소에서 EPC cell 을 이용하여 바이러스를 분리한 결과 총 30개의 분리주를 확보하였다 (그림 4 및 표 4).

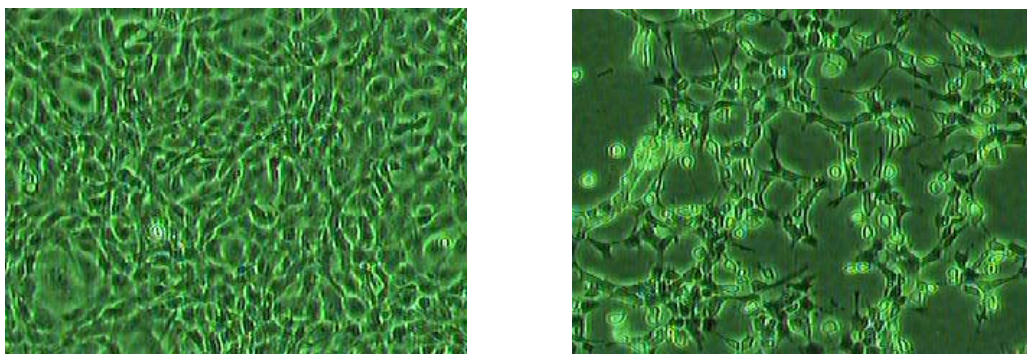


그림 4. EPC cell 에 접종하기 전 cell의 모습(왼쪽)과 VHSV 접종후 CPE 사진(오른쪽)

표 4. VHSV 분리주 정보

Strains	분리지역	분리년도	어체크기 (cm)
GCVP-01		2010	12~12.5
GCVP-02		2010	16
GCVP-03		2010	10.5~11
GCVP-04		2010	7.5~8.5
GCVP-05		2010	9.5~10.5
GCVP-06		2010	8~10
GCVP-07		2010	10~11
GCVP-08		2010	13.5~14.5
GCVP-09		2010	10~12
GCVP-10		2010	
GCVP-11		2010	12~13
GCVP-12		2010	19~21
GCVP-13		2008	
GCVP-14	제주도	2008	10
GCVP-15		2008	8~9
GCVP-16		2009	17
GCVP-17		2009	5.5~6
GCVP-18		2009	6
GCVP-19		2010	13
GCVP-20		2010	14
GCVP-21		2010	13~14
GCVP-22		2010	23.5
GCVP-23		2007	8.5~9
GCVP-24		2008	8
GCVP-25		2008	8.5~10
GCVP-26		2010	22
GCVP-27		2011	40
GCVP-28	완도	2011	24~29
GCVP-29	해남	2011	25~27
GCVP-30	완도	2011	8~10

(3) 국내 VHSV분리주의 유전학적 성상

국내에서 유행하는 VHSV 유전형을 확인하기 위해 30개의 분리주의 Glycoprotein gene(nt 361~720) 과 Nucleocapsid gene(nt 111~421)을 부분적으로 시퀀싱하여 Genebank에 등재된 VHSV의 염기서열과 비교하여 유전형을 확인하였다. 현재 VHSV는 크게 4가지의 Genotype으로 구분되며, 본사에서 분리한 국내 분리주는 모두 Genotype IV(Genotype IVa)에 속하며, 일본 및 북미의 해수어에서 분리되는 분리주와 높은 상동성을 나타내었다 (그림 5 및 그림 6).

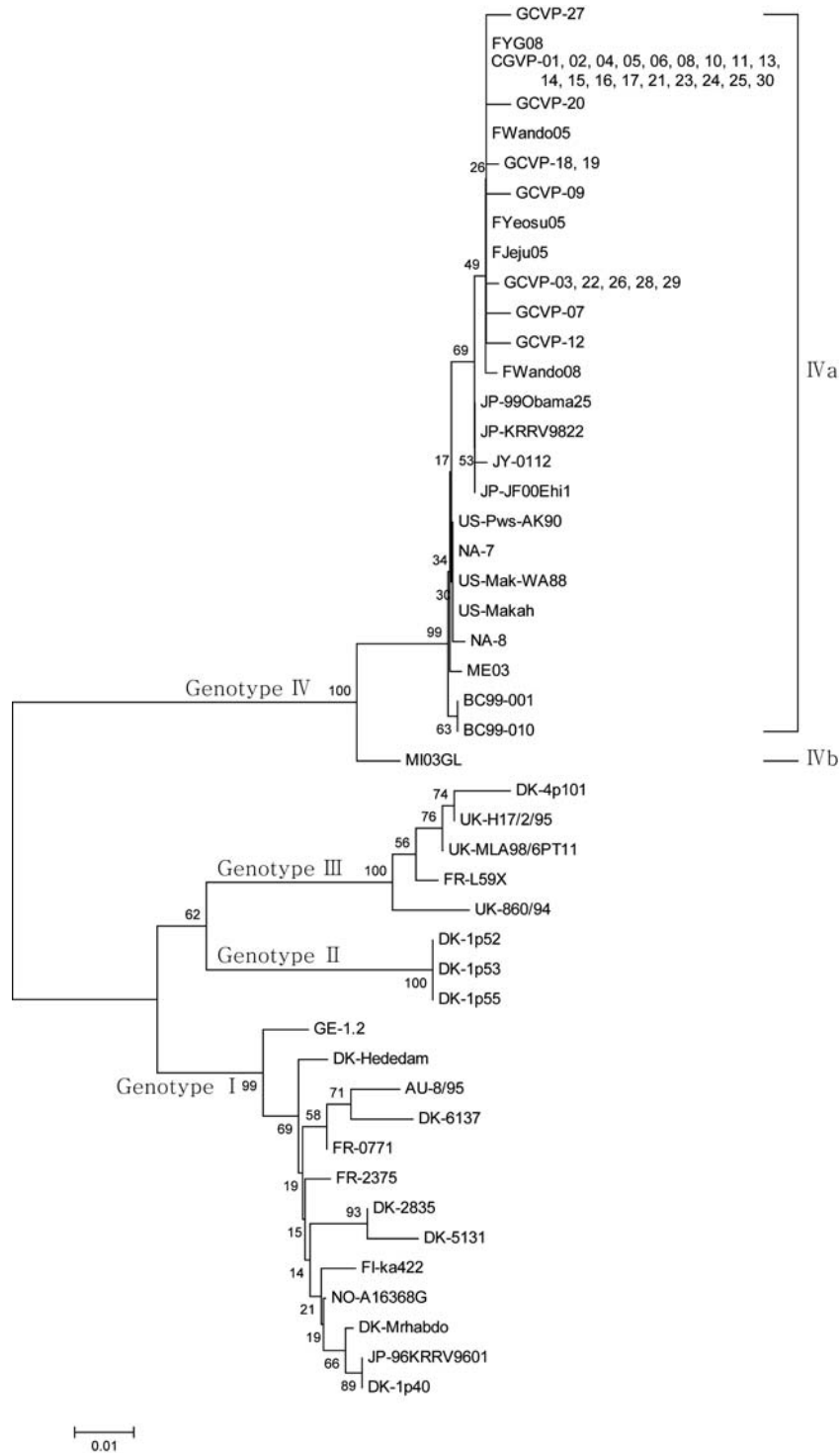


그림 5. 국내 VHSV분리주의 Glycoprotein gene을 이용한 계통수 분석결과

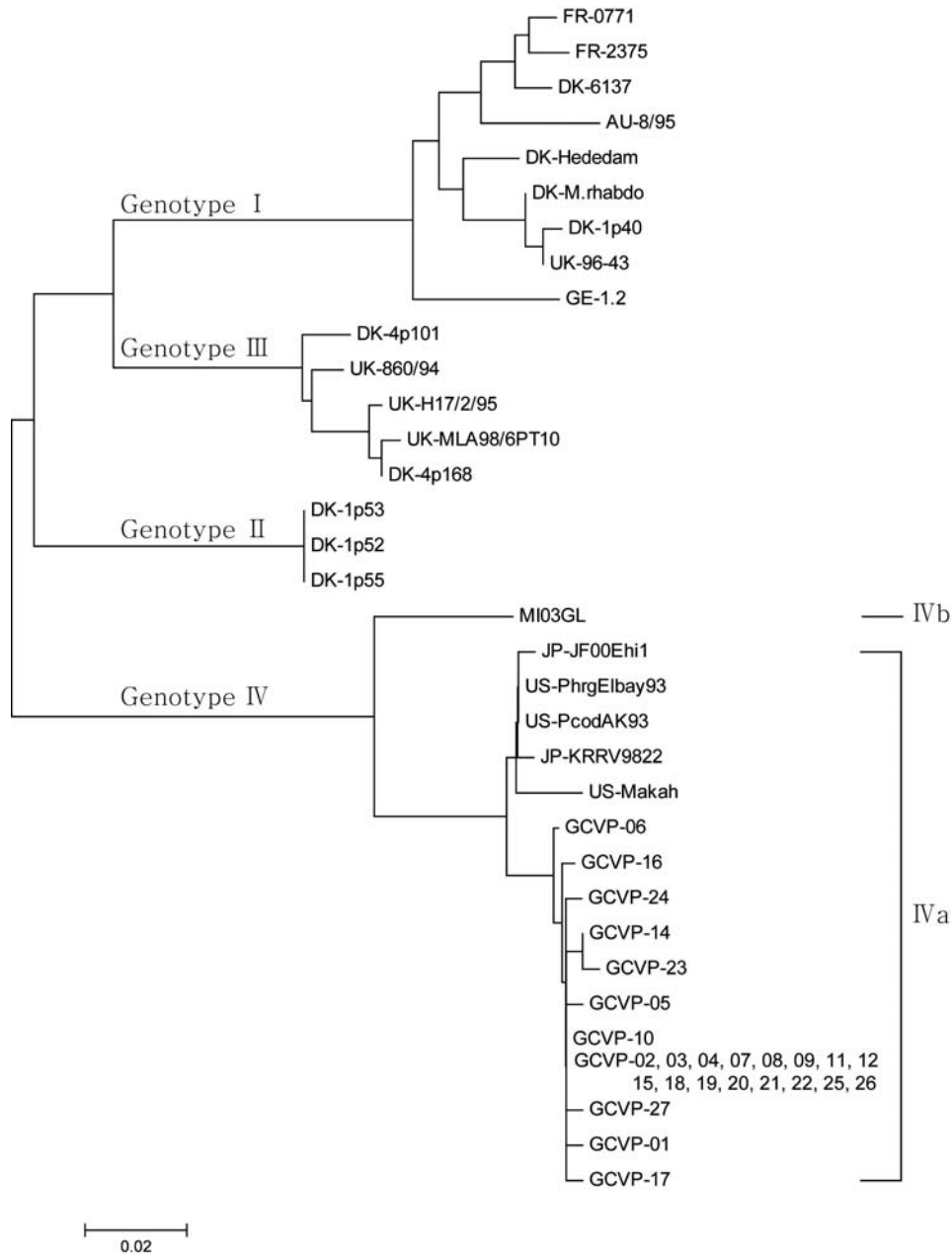


그림 6. 국내 VHSV분리주의 Nucleocapsid gene을 이용한 계통수 분석결과

그러나 국내 분리주들은 Genotype IVa내에서도 일본 및 북미 분리주와는 구분되는 별도의 Subgroup을 형성하는 것으로 나타났다. G gene의 경우 일본 분리주와는 99.1~99.7%, 북미 분리주와는 95.5~99.1%, 유럽 분리주와는 80.5~84.7%의 상동성을 보였고, N gene의 경우 각각 97.7~98.3%, 93.2~98.7% 그리고 80~85.2%의 상동성을 나타내었다. 또한 2007년부터 2011년까지의 분리주들은 98.6~100%의 상동성을 나타내었으며 분리년도에 따른 염기서열의 변화는 거의 확인할 수 없었다 (표 5).



표 5. 2007~2011년 국내 VHSV 분리주들 사이의 상동성

분리년도	2007		2008		2009		2010		2011	
	G gene	N gene	G gene	N gene	G gene	N gene	G gene	N gene	G gene	N gene
2007	100	100	100	98.9~99.6	99.7~100	98.9~99.3	99.4~100	98.6~99.3	99.4~100	98.9
2009	-	-	100	99.3~100	99.7~100	99.3~100	99.4~100	98.9~100	99.4~100	99.3~99.6
2009	-	-	-	-	99.7~100	99.3~99.6	99.1~100	98.9~100	99.1~100	99.3~100
2010	-	-	-	-	-	-	98.8~100	98.9~100	98.8~100	98.9~99.6
2011	-	-	-	-	-	-	-	-	99.1~100	99.3

## 제 2 절. 백신 후보의 작출 및 특성연구

### 1. 바이러스의 역가측정

#### 가. 시험목적

국내 분리주들 중 EPC cell에서 증식성이 높은 바이러스를 선별하는데 목적이 있다.

#### 나. 시험재료

- (1) 바이러스 : 녹십자수의약품 수의연구소에서 분리한 VHSV 국내분리주 30strain
- (2) EPC cell, MEM, 96well cell culture plate, FBS 등

#### 다. 시험방법

EPC cell을 이용하여 50% Tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>)로 분리주의 바이러스 역가를 측정하여 높은 역가의 바이러스를 선별한다. 그 후 cell에서 연속계대배양 하면서 5대마다 바이러스 역가를 측정하여 역가가 높게 나타나는 분리주를 다시 선별한다.

#### 라. 시험결과

30개의 분리주를 이용하여 EPC cell에서의 TCID<sub>50</sub>로 역가를 측정하고 역가가 높은 10개의 분리주를 선택하여 연속계대배양 하였다. 10대마다 역가를 측정하여 역가가 상승하는지 확인하였다(표 6). GCVP-02 strain이 10<sup>7.9~8.1</sup> TCID<sub>50</sub>/ml로 가장높은 바이러스 역가를 나타내었다.

표 6. VHSV 분리주의 TCID<sub>50</sub> 역가

Strain	바이러스 역가 (TCID <sub>50</sub> /ml)					
	P-1	P-10	P-20	P-30	P-40	P-50
GCVP-02	10 <sup>6.5</sup>	10 <sup>6.7</sup>	10 <sup>7.9</sup>	10 <sup>8.1</sup>	10 <sup>7.9</sup>	10 <sup>8.0</sup>
GCVP-03	10 <sup>5.7</sup>	10 <sup>5.9</sup>	10 <sup>6.7</sup>	10 <sup>6.9</sup>	10 <sup>6.7</sup>	10 <sup>6.9</sup>
GCVP-05	10 <sup>6.1</sup>	10 <sup>6.9</sup>	10 <sup>6.9</sup>	10 <sup>7.0</sup>	10 <sup>7.1</sup>	10 <sup>6.9</sup>
GCVP-14	10 <sup>5.1</sup>	10 <sup>6.3</sup>	10 <sup>7.3</sup>	10 <sup>7.0</sup>	10 <sup>7.1</sup>	10 <sup>7.3</sup>
GCVP-18	10 <sup>5.9</sup>	10 <sup>6.9</sup>	10 <sup>6.9</sup>	10 <sup>6.9</sup>	10 <sup>6.9</sup>	10 <sup>6.9</sup>
GCVP-23	10 <sup>6.5</sup>	10 <sup>7.1</sup>	10 <sup>7.0</sup>	10 <sup>7.1</sup>	10 <sup>7.3</sup>	10 <sup>7.1</sup>
GCVP-24	10 <sup>5.3</sup>	10 <sup>6.1</sup>	10 <sup>6.3</sup>	10 <sup>6.5</sup>	10 <sup>6.5</sup>	10 <sup>6.5</sup>
GCVP-25	10 <sup>6.1</sup>	10 <sup>6.5</sup>	10 <sup>7.1</sup>	10 <sup>7.0</sup>	10 <sup>6.9</sup>	10 <sup>6.7</sup>
GCVP-26	10 <sup>5.9</sup>	10 <sup>6.1</sup>	10 <sup>7.0</sup>	10 <sup>7.3</sup>	10 <sup>7.3</sup>	10 <sup>7.5</sup>
GCVP-27	10 <sup>5.5</sup>	10 <sup>5.9</sup>	10 <sup>6.3</sup>	10 <sup>6.9</sup>	10 <sup>6.7</sup>	10 <sup>6.7</sup>

## 2. 분리주의 넙치에서의 병원성시험

### 가. 시험목적

국내 분리주들 중 넙치에서 높은 병원성을 나타내는 분리주를 선별하는데 목적이 있다.

### 나. 시험재료

넙치(10~15cm), 수조, VHSV 분리주, MEM 등

### 다. 시험방법

- (1) 바이러스를 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/ml의 농도로 준비하고 농도별로 넙치(10~15cm) 10미에 100 $\mu$ l복강접종한다. 대조군 10미에는 MEM 100 $\mu$ l를 복강접종한다.
- (2) 접종 후 수온은 15 $^{\circ}$ C로 유지해주고 2주간 누적폐사율을 관찰한다.
- (3) 폐사어는 수거하여 임상증상을 관찰하고 RT-PCR로 VHSV양성여부를 확인한다.
- (4) 병원성은 50% Lethal dose (LD<sub>50</sub>) 값으로 나타낸다.

### 라. 시험결과

#### (1) 누적폐사율 및 LD<sub>50</sub>

ECP cell에서 역가가 높은 10개의 분리주를 사용하여 10cm 내외의 넙치에서 병원성시험을 한 결과 GCVP-14와 GCVP-18을 제외한 나머지 분리주들은 LD<sub>50</sub> 값이 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/ml 이하이거

나  $10^4 \sim 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml로 나타났으나 GCVP-14와 GCVP-18는 LD<sub>50</sub> 값이  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml 으로 다른 분리주에 비해 다소 약한 병원성을 나타내었다 (표 7).

표 7. VHSV 분리주 넘치에서의 병원성 시험

Strain	Challenge virus concentration (TCID <sub>50</sub> /mL)	n	Mortality(fish)														Cumulative mortality(%)	LD <sub>50</sub> (TCID <sub>50</sub> /mL)	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
GCVP-02	10 <sup>4</sup>	10	.	.	.	.	.	2	2	3	3	3	6	6	6	6	60	10 <sup>4</sup>	
	10 <sup>5</sup>	10	.	.	.	.	1	1	3	3	5	6	9	10	10	10	100		
	10 <sup>6</sup>	10	.	.	.	.	.	3	3	5	6	6	9	9	10	10	100		
GCVP-03	10 <sup>4</sup>	10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	2	3	3	30	10 <sup>5</sup>	
	10 <sup>5</sup>	10	.	.	.	1	1	1	3	3	4	7	7	7	8	8	80		
	10 <sup>6</sup>	10	.	.	.	.	.	2	2	3	5	5	10	10	10	10	100		
GCVP-05	10 <sup>4</sup>	10	.	.	.	.	.	.	1	1	2	2	4	4	4	6	60	10 <sup>4</sup>	
	10 <sup>5</sup>	10	.	.	.	.	.	2	2	3	3	6	7	7	7	7	70		
	10 <sup>6</sup>	10	.	.	.	.	.	.	1	4	4	6	9	9	9	9	90		
GCVP-14	10 <sup>4</sup>	10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	2	2	3	4	4	40	10 <sup>6</sup>
	10 <sup>5</sup>	10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	3	3	30		
	10 <sup>6</sup>	10	.	.	.	.	.	.	.	2	3	3	6	7	8	8	80		
GCVP-18	10 <sup>4</sup>	10	.	.	.	.	.	.	1	1	1	1	1	1	2	2	20	10 <sup>6</sup>	
	10 <sup>5</sup>	10	.	.	.	.	1	1	1	2	2	4	4	4	4	4	40		
	10 <sup>6</sup>	10	.	.	.	.	.	.	3	3	4	6	7	8	8	8	80		
GCVP-23	10 <sup>4</sup>	10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	2	2	2	4	40	10 <sup>5</sup>	
	10 <sup>5</sup>	10	.	.	.	2	2	2	3	3	3	4	4	5	6	6	60		
	10 <sup>6</sup>	10	.	.	.	1	1	3	4	4	4	7	7	8	8	8	80		
GCVP-24	10 <sup>4</sup>	10	.	.	.	.	.	2	2	3	3	4	4	7	7	8	80	10 <sup>4</sup>	
	10 <sup>5</sup>	10	.	.	.	.	.	.	1	4	6	6	7	7	9	90			
	10 <sup>6</sup>	10	.	.	.	.	.	.	1	2	4	4	7	7	8	9	90		
GCVP-25	10 <sup>4</sup>	10	.	.	.	.	.	1	2	2	2	3	5	7	7	7	70	10 <sup>4</sup>	
	10 <sup>5</sup>	10	.	.	.	2	3	3	5	8	9	10	10	10	10	10	100		
	10 <sup>6</sup>	10	.	.	.	.	.	2	6	7	7	10	10	10	10	10	100		
GCVP-26	10 <sup>4</sup>	10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	3	3	5	50	10 <sup>4</sup>	
	10 <sup>5</sup>	10	.	.	.	.	.	2	2	3	4	5	7	9	9	9	90		
	10 <sup>6</sup>	10	.	.	.	.	3	3	4	5	7	7	8	10	10	10	100		
GCVP-27	10 <sup>4</sup>	10	.	.	.	.	.	.	1	1	1	1	1	3	4	4	40	10 <sup>5</sup>	
	10 <sup>5</sup>	10	.	.	.	.	.	.	4	4	4	5	7	8	9	90			
	10 <sup>6</sup>	10	.	.	.	.	.	.	1	1	1	3	5	5	7	10	100		
Control	MEM	10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0		

(2) 임상증상

폐사어에서 보이는 임상증상은 복부팽만 및 탈장, 복수, 비장비대, 여러 부분의 출혈증상 등

전형적인 VHS의 임상증상을 나타내었다(그림 7).

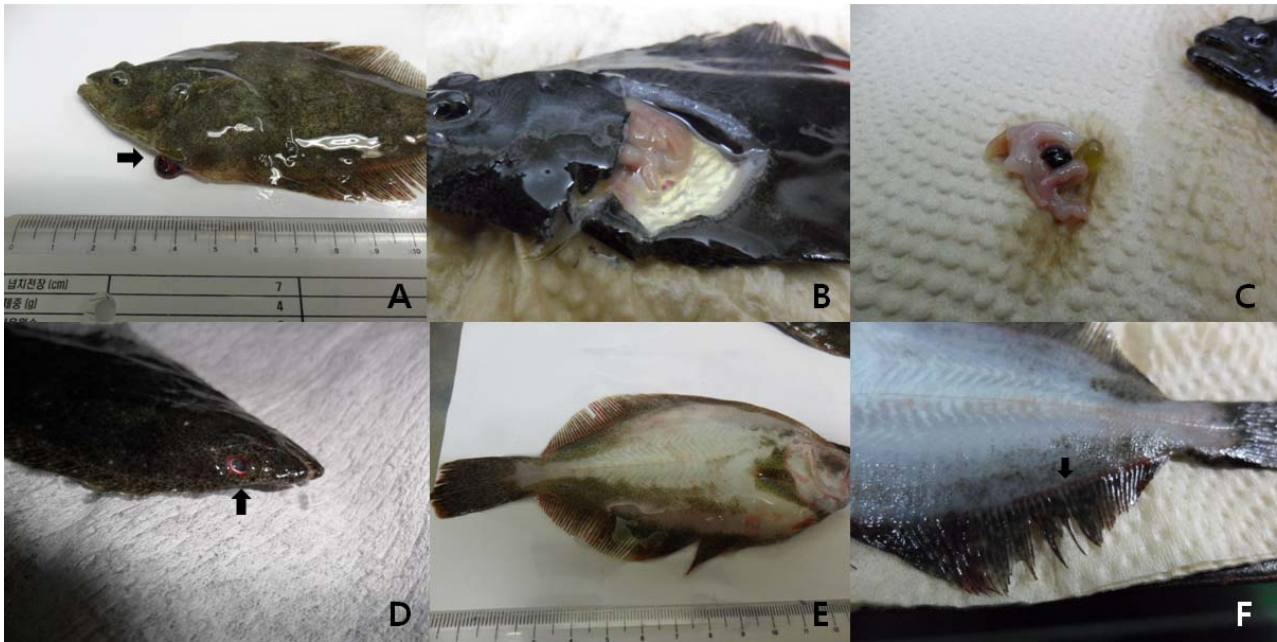


그림 7. VHSV 접종후 폐사어들에서 나타난 임상증상. A, 복부팽만 및 탈장; B, 복수; C, 비장 비대; D, 안구주위 출혈; E, 기저부 출혈; F, 지느러미부 출혈.

(3) 병리 조직학적 소견

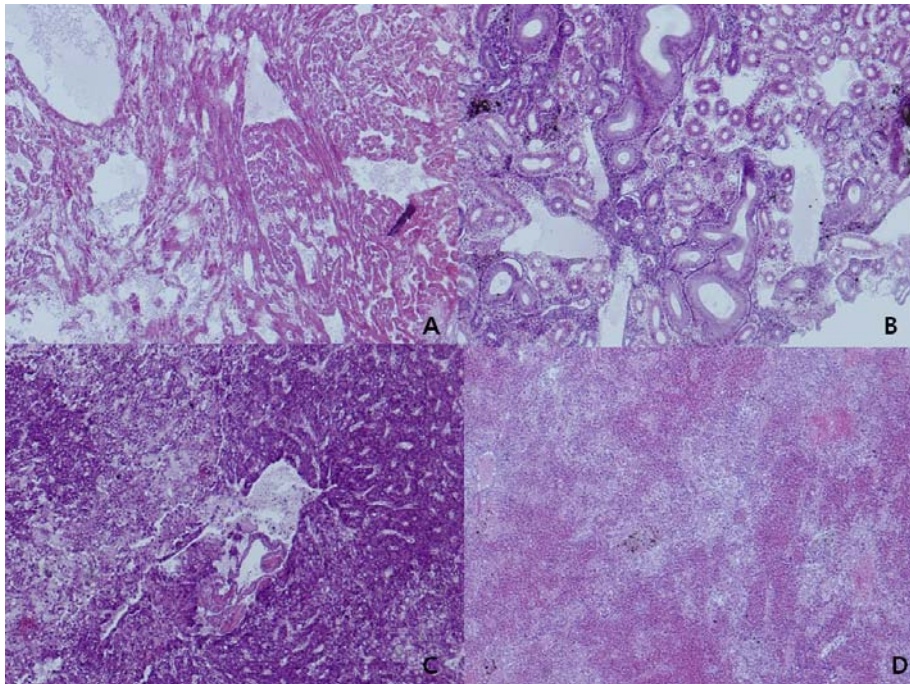


그림 8. VHSV 접종후 폐사어의 병리조직학적 소견. A, 심장(×100); B, 신장(×100); C, 간 (×100); D, 비장(×100).

### 3. 백신주의 작출

VHSV의 역학조사 결과, 공시세포에서 계대 후의 역가, 시퀀싱을 이용하여 유전학적 다양성을 비교하고, 병원성 시험을 통한 고병원성을 가진 백신주를 선발한다. VHSV의 분리주의 시퀀싱 결과 30개의 분리주 모두 같은 유전형에 속하며 높은 상동성을 나타내는 것으로 보아 국내 넙치에서 유행하는 VHSV는 한종류의 유전형인 것으로 보인다. 또한 ECP cell을 이용하여 높은 역가의 바이러스를 선별하여 연속 계대배양하면서 역가의 상승을 확인하였고 넙치에서의 고병원성 분리주들을 확인하여 최종적으로 GCVP-02 strain 을 백신주로 선발하였다 (표 8).

표 8. 백신주 내역

Strain 명	분리년도	분리지역	분리어종	유전형	역가 (TCID <sub>50</sub> /mL)	병원성(LD <sub>50</sub> ) (TCID <sub>50</sub> /mL)
GCVP-02	2010.2	제주도	넙치 (16cm)	Genotype IVa	10 <sup>7.9~8.1</sup>	<10 <sup>4</sup>

## 제 3 절. VHSV 불활화 시험백신의 개발 및 효능평가

### 1. VHSV 불활화 시험백신의 제조

#### 가. 시험재료 및 방법

VHSV(GCVP-02 strain), ECP cell, MEM, FBS, 2-Bromoethylamine hydrobromide(BEA), NaOH, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

#### 나. 시험방법

- (1) 바이러스를 monolayer가 형성된 ECP cell에 접종하고 20℃에서 48~72시간 배양 후 CPE가 80% 이상 형성된 시점에서 바이러스를 채득한다.
- (2) 채득한 바이러스 배양액을 원심분리하여 cell debris를 제거하고 항원 역가측정 후 적정 농도로 항원량을 조정하고 BEI불활화법으로 불활화 한다.
- (3) 불활화가 끝나면 불활화 확인시험 후 적정 adjuvant를 적량 혼합한 후 백신으로 사용한다.

### 2. VHSV 불활화 백신용 adjuvant의 선발

가. 시험목적

백신의 면역원성 및 방어효과를 높이면서 넙치에 안전한 VHSV 불활화백신용 adjuvant를 선발하는데 그 목적이 있다.

나. 시험재료

불활화 바이러스(항원역가 :  $10^8$ TCID<sub>50</sub>/ml), Adjuvant(표 9), 넙치(10~15cm), 수조,

표 9. Adjuvant종류에 따른 시험백신

일련번호	시 험 백 신	Adjuvant type
1	VHSV + AJ01	Water-in-oil
2	VHSV +AJ02	Water-in-polymer
3	VHSV + AJ03	Nanoparticle
4	VHSV + AJ04	Oil-in-water
5	VHSV +AJ03 +AJ05	Nanoparticle + Aluminum hydroxide gel
6	VHSV	-

다. 시험방법

- (1) VHSV 항체 음성 넙치(10~15cm) 400미를 21℃에서 일주일간 순치시킨 후 7그룹으로 나눈다.
- (2) 백신접종군은 위의 표 9의 시험백신을 각각 2주간격으로 2회 100 $\mu$ l 복강접종하고, 대조군은 MEM을 동량 복강접종한다.
- (3) 시험백신을 접종하고 넙치에서의 안전성을 확인한다.
- (4) 시험백신의 면역원성 확인을 위해 접종전, 1차접종 2주후, 2차접종 2주후, 2차접종 4주후에 각 그룹별로 10마리씩 무작위로 선발하여 미부정맥에서 채혈하고, 혈청분리 후 바이러스 중화시험을 통해 중화항체가를 측정한다.
- (5) 각 시험백신의 방어효과를 확인하기 위하여 2차접종 3주후 각 그룹별로 20미에 LD<sub>60</sub>( $10^6$ TCID<sub>50</sub>/ml)의 농도로 바이러스를 복강으로 공격접종하고 3주간 누적폐사율을 관찰한다.
- (6) 대조군의 누적폐사율이 60% 이상일 때 백신군의 상대생존율(RPS)을 산출하여 백신의 효능을 평가한다.

라. 시험결과

(1) 시험백신의 안전성

시험백신을 제조하였을 때 AJ01과 AJ02를 사용한 시험백신의 경우 점도가 다른 시험백신에

비해 매우 높아 사용상 불편함이 있었으며, 넙치에 접종 후에도 접종 스트레스로 인해 사료 급여 시 섭취량이 다른 백신 접종군에 비해 감소하였다. 또한 접종 일주일 전후로 하여 복부팽만, 개복 시 장기의 유착증상 등이 관찰되어 안전성에 문제가 있는 것으로 판단되어 두 시험백신 접종군은 시험에서 제외하였다(그림 9).



그림 9. AJ01과 AJ02를 adjuvant로 사용한 시험백신 접종군에서 접종 후 나타난 장기 유착증상

(2) 면역원성 시험결과

시험기간동안 주기별로 10마리씩 채혈하여 중화항체를 측정된 결과 모두 5배 이하로 중화항체가 측정되지 않았다.

표 10. 시험백신 접종 후 주기별 중화항체가

시험군 (n=10)		접종전	1차접종 2주	2차접종 2주	2차접종 4주
백신군	VHSV+AJ03	<5	<5	<5	<5
	VHSV+AJ04	<5	<5	<5	<5
	VHSV+AJ03+AJ05	<5	<5	<5	<5
	VHSV	<5	<5	<5	<5
대조군		<5	<5	<5	<5

3) 방어효과 시험결과

공격 접종 후 대조군의 폐사율이 60%를 넘었을 때 각 백신군의 상대생존율은 AJ03과 AJ05를 혼합하여 사용한 백신군과 adjuvant를 사용하지 않은 백신군이 76.9%로 동일하게 나타났다(표 11). 그러나 21일간의 폐사율을 관찰한 결과 AJ03과 AJ05를 혼합하여 사용한 시험군이 공격접종 21일 후 15%(3/20)로 가장 낮았으며 대조군은 95% 폐사하였다(그림 10). 이 결과로 볼 때 AJ03과 AJ05를 혼합하여 adjuvant로 사용하였을 때 가장 높은 방어효과가 나타났다.

표 11. 공격접종 후 시험군의 누적폐사율 및 상대생존율

시험군 (n=20)	누적폐사미수	누적폐사율(%)	상대생존율(%)
VHSV+AJ03	4	20	69.2
VHSV+AJ04	14	70	-
VHSV+AJ03+AJ05	3	15	76.9
VHSV	3	15	76.9
대조군	13	65	-

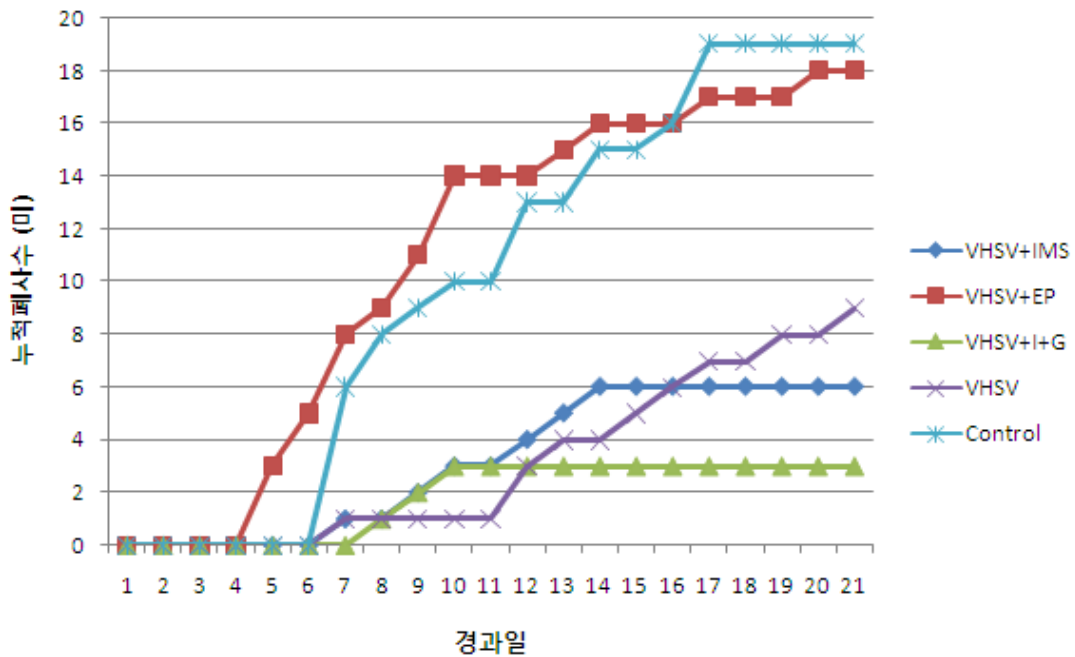


그림 10. 공격접종 후 각 시험군의 누적폐사수



### 3. 백신의 최소 항원농도 및 접종 횟수 설정시험

#### 가. 시험목적

백신으로서 유효한 최소 항원량을 설정하고 1회 접종과 2회 접종의 방어효과를 비교하여 적절한 백신접종법을 설정하는데 그 목적이 있다.

#### 나. 시험재료

시험백신 (항원농도  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml), 넘치, 수조

#### 다. 시험방법

- (1) VHSV 항체 음성 넘치(10~15cm) 175미를 21℃에서 일주일간 순치시킨 후 7그룹으로 나눈다.
- (2)  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml 의 항원농도로 준비된 불활화 바이러스 배양액에 적량의 adjuvant를 첨가하여 시험백신을 만들고, 시험백신을 1회 접종군과 2회 접종군(2주간격)으로 나누어 100 $\mu$ l씩 복강접종한다. 대조군은 MEM을 동량 복강접종한다.
- (3) 각 시험백신의 방어효과를 확인하기 위하여 1차접종 및 2차접종 3주후 각 그룹별로 20미에 LD60의 농도로 바이러스를 복강으로 공격접종하고 3주간 누적폐사율을 관찰한다.
- (4) 대조군의 누적폐사율이 60% 이상일 때 백신군의 상대생존율(RPS)을 산출하여 백신의 효능을 평가한다.

#### 라. 시험결과

시험결과  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml 농도의 시험백신을 2주 간격으로 2회 접종하였을 때 상대생존율이 85.7%로 가장 높게 나타났으며,  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml 2회 접종군과  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml 1회 접종군이 모두 64.3%로 나타났다. 이는 adjuvant가 첨가되기 전의 바이러스 항원농도이며 20% adjuvant 첨가되므로 백신으로서의 적정 항원농도는  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml이상으로 결정하였으며 모든 항원농도에서 2회 접종군이 1회 접종군에 비하여 높은 방어효과를 나타내었다.

표 12. 백신의 항원농도 및 접종횟수별 누적폐사율 및 상대생존율

시험군 (n=20)		누적 폐사미수	누적 폐사율(%)	상대생존율(%)
$10^6$ TCID <sub>50</sub> /ml	1회 접종군	10	50	28.6
	2회 접종군	6	30	57.1
백신접종군 $10^7$ TCID <sub>50</sub> /ml	1회 접종군	9	45	35.7
	2회 접종군	5	25	64.3
$10^8$ TCID <sub>50</sub> /ml	1회 접종군	5	25	64.3
	2회 접종군	2	10	85.7
대조군		14	70	-

#### 4. 야외 임상시험 및 효능평가

##### 가. 시험목적

넙치의 바이러스성 출혈성 패혈증을 예방할 수 있는 불활화 백신을 시험생산하여 임상시험을 통하여 목적동물(넙치)에 적용하였을 때 효능효과 및 안전성을 확인하는데 본 시험의 목적이 있다.

##### 나. 시험재료

시험백신(표 13), 시험 양어장 (표 14)

표13. 임상시험에 공시할 시험백신

제조번호	제조일자	생산병수(50ml/병)
11 포VHS 02	2011. 12. 14	120
12 포VHS 01	2012. 2. 13	110

표14. 시험 양식장 내역

양식장명	대표자	주소	수면적	공시수	연락처
제다양식	신동운	서귀포시 성산읍 신천리 400		10,000	064-787-7850
광우수산	변용하	서귀포시 대정읍 무릉리 4070		8,000	064-792-4070
한바다수산	허경은	서귀포시 성산읍 온평리 1286	4,940	15,000	064-784-0840 011-696-5786

##### 다. 시험방법

###### (1) 백신의 접종

각 양식장별 7cm내외의 넙치에 1회 접종군과 2회접종군으로 나누어 0.1ml씩 복강접종한다.

###### (2) 안전성 확인

백신 접종 후 2주간 접종부위 괴사, 복부팽창, 탈장, 운동성저하, 식욕부진 등의 임상증상 및 폐사를 확인한다.

###### (3) 증체량비교

백신 접종 후 4주 간격으로 16주까지 각 시험군별로 10미씩 무작위로 선발하여 어체중을 측정하여 증체량을 비교한다.

(4) 폐사율 비교

백신 접종 후 16주까지 각 시험군별로 누적 폐사율을 측정하여 비교한다. 폐사가 많이 발생할 시 폐사어를 수거하여 표 15의 병원체에 대해 검사하고 폐사의 원인을 파악한다.

표 15. 폐사어 병성감정 목록

구 분	병성감정 목록	검사방법	
바이러스	DNA	Iridovirus	PCR
	RNA	VHS (Viral hemorrhagic septicemia)	RT-PCR
		MBV (Marine birnavirus)	
		VNN (Viral nervous necrosis)	
		HRV (Hirame rhabdovirus)	
세균	<i>Streptococcus iniae</i>	세균분리배양, PCR	
	<i>Streptococcus parauberis</i>		
	<i>Edwardsiella tarda</i>		
	<i>Vibrio sp.</i>		
	<i>Tenacibaculum maritimum</i>		
기생충	<i>Scutica</i>	현미경 검경	
	<i>Trichodina</i>		
	<i>Ichthyobodo</i>		

(5) 방어효과 시험

16주간 누적폐사율 및 증체량에서 시험군별 유의적 차이가 없을 경우 각 시험군별로 20미씩 공시하여 LD<sub>60</sub>의 농도로 복강으로 공격접종하여 상대생존율을 비교한다.

라. 시험결과

2012년 6월12일 전임상시험결과를 바탕으로 하여 농림수산검역검사본부에 VHSV 불활화 백신(포세이돈-VHS)에 대한 임상시험계획서를 제출하였으며, 승인을 기다리고 있으며 그 결과에 따라 임상시험 가능여부가 정해진다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연차별 목표 및 달성도

#### 1. 1차년도 목표 및 달성도

연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도(%)
-바이러스성 출혈성 패혈증(VHSV)의 병원체 확보	-VHSV의 분리주 확보 및 특성분석	100
-바이러스성출혈성패혈증(VHSV)의 병원체 역학조사	-VHSV의 감염유형 및 분포, 역학조사	100
-바이러스성 출혈성 패혈증(VHSV)병원체의 분리주확립	-VHSV의 대량배양기술 확립	100
-바이러스성 출혈성 패혈증(VHSV)병원체의 백신후보주 선정	-VHSV분리주 중 역학조사결과를 참조로 한 백신 후보주 선발	100

#### 2. 2차년도 목표 및 달성도

연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도(%)
-VHSV시험백신의 생산 및 평가	-확립된 병원체 별 대량생산 기술을 바탕으로 VHSV시험백신 생산	100
	-접종방법별 적합한 Adjuvant선발	70
	-목적동물을 대상으로 한 시험백신의 안전성, 방어효과, 보존성시험	70
-VHSV시험백신의 야외시험	-VHSV시험백신의 양식장의 목적 동물에 대한 야외효과 및 안전성 시험	20

## 제 2 절. 관련분야 기여도

본 과제는 국내 넙치에서 유행하는 VHSV 국내 분리주를 이용하여 불활화 백신을 개발함으로써 국내 넙치양식에서 VHS에 의한 피해를 감소시킬 수 있는 방안을 마련하는데 목적이 있다.

본 연구에서 VHSV의 분리는 EPC 세포주를 이용하여 이루어졌으며, 지속적인 계대 및 배양 방법의 최적화를 이루어 높은 역가의 바이러스를 생산할 수 있는 기반을 마련하였고, 이렇게 높은 역가의 VHSV 생산을 통해 불활화 백신 개발 및 그 효능의 향상에 높은 기여를 할 수 있었다.

현재 국내 VHSV분리주에 대한 보고는 2001년 국내 양식넙치에서 최초로 바이러스를 분리, 보고한 논문을 포함하여 4편의 논문이 전부이며, 국내 분리주에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았다. 이러한 점에서 볼 때 본 과제는 4년 동안 30개의 분리주로, 현재까지의 VHSV 분리주에 관한 보고 중 가장 많은 분리주를 확보하였다. 또한 분리주들의 G 와 N gene의 부분적 염기서열을 분석하여 Genebank에 등재하였으며, 기 보고된 국내 분리주들과 유전학적 성상을 비교하여 국내에서 유행하는 VHSV는 모두 유전학적으로 높은 상동성을 나타내는 동일한 유전형이며 2001년부터 2011년 까지 분리주들은 분리년도에 따른 염기서열의 변화는 거의 없는 것을 확인하였다. 이러한 연구결과는 향후 VHSV를 연구하는데 있어 기초적인 자료로 귀중한 자료가 될 수 있다.

또한 국내에서 VHSV 백신에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있으며, 2011년 VHSV의 NV gene을 Knock-out시킨 live attenuated virus를 백신으로 이용한 연구가 유일하다. 본 연구에서는 제조 및 상용화가 보다 쉬운 불활화 백신의 개발을 목적으로 하여 연구를 진행하였다. 기존의 어류백신에서 일반적인 불활화제로 쓰이던 포르말린이 아닌 불활화 과정에서 바이러스의 항원성을 최대한 보존하기 위해 BEI를 이용하였으며, 백신의 효능 증가시키기 위해 넙치에서 안전하고 효과적인 adjuvant도 선별하여 그 효능을 확인하였다. 현재 상용화되어 시판되고 있는 넙치용 백신은 모두 adjuvant가 첨가되지 않은 백신이며 넙치에서 안전성 및 효능이 검증된 adjuvant는 현재 없는 실정이다. 이 백신이 상용화 될 시 국내 최초로 넙치에서 안전하고 효능이 확인된 adjuvant가 첨가된 백신이라는 점에서 의미가 있으며, 향후 다른 넙치용 백신 및 adjuvant개발에 있어서도 중요한 연구자료가 될 수 있다.

본 과제에서 이루어진 바이러스의 분리배양 접근법 및 분자 역학적 조사 방법 등은 향후, 다른 바이러스 백신 개발에 있어 중요한 연구 자료가 될 수 있으며 본 과제에서 또한 다루어진 시험백신의 제조법 및 In vivo 시험결과 등에 대한 자료는 VHS 관련 역학 및 통제 방안 설립 등에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 연구개발 성과

#### 1. 논문

논문제목	학술지명	저자	국내외 구분
Prevalence and different characteristics of two serotypes of Streptococcus parauberis isolated from the farmed olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> (Temminck & Schlegel), in Korea	Journal of Fish disease 2011, 34, 731-739	한상윤, 강보규 외	국외
Prevalence and phylogenetic analysis of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) isolated from aquafarmed olive flounders ( <i>Paralichthys olivaceus</i> ) in Korea from 2007 to 2011	투고진행중 Fish Pathology	한상윤 강보규 외	국외

#### 2. 학회박표(포스터)

제 목	학 회	저 자
Genetic characteristics of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) isolated from cultured olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> in Jeju island from 2007 to 2010	2010, 한국어병학회	한상윤 외
제주지역 넙치의 VHS 모니터링 (2007~2010)	2011, 한국어병학회	강봉조 외
바이러스성출혈성패혈증(VHS) 유사증상을 보이는 넙치로부터 <i>Pseudomonas anguilliseptica</i> 의 분리	2012, 한국어병학회	강봉조 외

#### 3. 특허 출원 및 등록

구분	특허 제목	출원/등록 번호
국내출원	바이러스성 출혈성 패혈증 불활화 백신 (Inactivated vaccine of Viral hemorrhagic septicemia)	10-2012-0070671

## 제 2 절 성과활용계획

### 1. 논문 및 특허

분리주들의 유전형에 관한 논문은 현재 작성되어 Fish Pathology에 투고진행중이며(그림 11) 백신효능에 관한 논문은 추후 작성하여 투고예정이다. 또한 특허의 경우에는 현재 국내 출원 완료되었다(그림 12).

Dear Dr. Se Chang Park,

Thank you very much for submitting your study titled 'Prevalence and phylogenetic analysis of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) isolated from aquafarmed olive flounders Paralichthys olivaceus in Korea from 2007 to 2011' for publication in Fish Pathology this time.  
We received your manuscript as MS number 1182-S on August 29.

We will start to review the manuscript.  
I will get in contact with you again after our reviewers show their comments for your manuscript.

Sincerely yours,

Osamu KURATA

Osamu Kurata  
The Editorial Office of the Japanese Society of Fish Pathology  
Laboratory of Fish Diseases  
Nippon Veterinary and Life Science University  
1-7-1 Kyonan-cho, Musashino, Tokyo 180-8602, Japan  
Tel: +81-422-31-4151  
Fax: +81-422-31-6796  
Email: fishpathol@nvl.u.ac.jp

### 그림 11. 관련논문 투고진행관련 메일

관인생략

#### 출원번호통지서

출원일자 2012.06.29  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
출원번호 10-2012-0070671 (접수번호 1-1-2012-0521242-70)  
출원인명칭 녹십자수의약품(주)(1-1999-000529-6) 외 1명  
대리인명칭 김순홍(9-2006-000534-4)  
발명자명칭 한상윤 문형은 김종만 박영한 최상림 강봉조 강도규  
발명의명칭 바이러스성 출혈성 패혈증 불활화 백신

#### 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입명세서에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
\* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 경정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
\* 특허료(patent.co.kr) 검색 > 민원서비스안내 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.  
\* 제도안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
\* 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내  
\* 미국특허상표청의 선출원물 기호로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 6개월 이내에 미국특허상표청에 [오자국고원허가서(PTO/SB/99)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 등록서류를 제출하여야 합니다.
5. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
\* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
6. 기타 심사 절차에 관한 사항은 통보된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

### 그림 12. 특허출원 번호 통지서

2. 상품

현재 농림수산물검역검사본부에 임상시험계획서를 2012년 6월 12일 제출하였으며 7월 11일 보완 결정이 나서 현재 보완시험을 진행중에 있습니다. 보완시험이 완료 될 경우 임상시험 승인을 득하여 제주도에 있는 3개의 양어장을 대상으로 하여 시험을 진행할 예정이다. 또한 야의 임상시험으로 넓치에서의 안전성 및 효능이 입증될 경우 품목허가를 취득하여 제품(가칭 : 포세이돈-VHS)으로 생산할 예정이다.

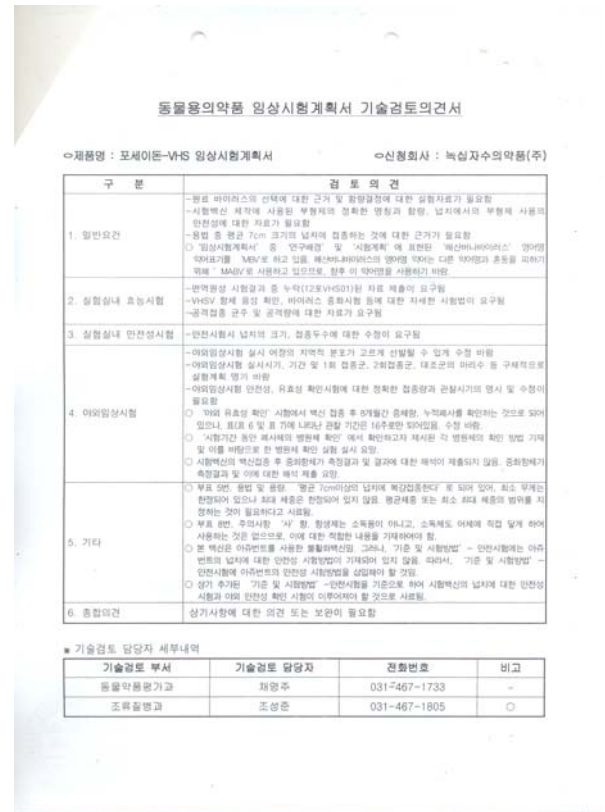


그림 13. 농림수산물검역검사본부에서 받은 임상시험계획서 보완결정 공문



## 제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 해외의 VHSV 백신 연구 동향

#### 1. VHSV의 Glycoprotein gene을 이용한 터봇용 DNA 백신 (스페인)

Glycoprotein gene을 human cytomegalovirus (CMV) promoter가 포함된 plasmid에 삽입하여 DNA vaccine을 제작하였다. 터봇에 백신을 근육으로 접종하고 30일 후 복강으로 공격접종 하였을 때 백신군이 85%이상의 상대생존율을 나타내었고 백신접종 후 특이 증화 항체가 생성되었다.

#### 2. VHS와 IHN의 Glycoprotein gene을 이용한 무지개송어용 혼합 DNA 백신 (덴마크, 이탈리아, 노르웨이, 미국)

VHSV와 IHNV 각각의 glycoprotein gene을 이용하여 DNA백신을 제작하였다. 무지개 송어에 백신을 근육접종하고 80일 후 침지법으로 공격접종하였을때 각각의 바이러스에 대해 80% 이상의 높은 상대생존율을 보였다.

#### 3. 약독화된 VHSV를 이용한 무지개송어용 경구백신 (독일)

Cell에서 약독화된 바이러스를 동결건조하여 PEG와 혼합한 경구용 백신을 만들고 경구투여 하였다. 백신 투여후 면역관련 유전자의 발현이 늘어났으며 특이 항체도 생성되었으며 백신접종 6주후 공격접종시 높은 방어효과를 보였다.

#### 4 . VHSV의 glycoprotein gene을 이용한 recombinant 백신과 DNA 백신의 넵치에서의 효능비교시험 (일본)

glycoprotein gene을 이용하여 대장균에서 발현시킨 recombinant protein 백신과 DNA 백신을 넵치에 근육접종하고 한달 후 공격접종 하였을 때 DNA 백신군은 90%이상의 상대생존율을 보였고, recombinant protein 백신군은 13, 23%로 낮은 상대생존율을 보였다. 그리고 특이 항체는 두 백신군에서 모두 발견되었으나 recombinant protein 백신군은 microarray로 분석시 세포면역과 관련된 유전자가 detection 되지 않았다.

## 제 7 장 참고문헌

김수미, 이재일, 홍미주, 박헌식, 박수일. 우리나라 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*에서 분리된 VHSV(Viral Hemorrhagic septicemia Virus)의 유전학적 검토. 한국어병학회지. 2003; 16(1):1-12

김수미, 박수일. 우리나라 연근해 자연산 해수 어종에서의 Viral Hemorrhagic septicemia Virus (VHSV)의 검출. 한국어병학회지. 2004; 17(1):1-10

이월라, 윤현미, 김석렬, 정성주, 오명주. 남, 서해안과 동중국해 자연산 어류에서 Viral Hemorrhagic septicemia Virus (VHSV)검출. 한국어병학회지. 2007; 20(3): 201-209

Wi Sik Kim, Sung Ju Jung, Jong Oh Kim, Du Woon Kim, Jeong Ho Kim and Myung Joo Oh. Genetic positioning of Korean viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from cultured and wild marine fishes. *Journal of fish pathology*. 2011; 24(1): 1-9

Min Sun Kim, Ki Hong Kim. Protection of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) by immunization with NV gene-knockout recombinant VHSV. *Aquaculture*. 2011; 314: 39 - 43

Min Sun Kim a, Dong Soo Kim b, Ki Hong Kim. Oral immunization of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) with recombinant live viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) induces protection against VHSV infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 2011; 31: 212-216

Lorenzen N, Olesen NJ, Jorgensen PEV, Etzerodt M, Holtet TL, Thogersen HC. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the glycoprotein gene of VHS virus, and immunization of rainbow trout with the recombinant protein. *J Gen Virol* 1993;74:623-30

Lecocq-Xhonneux F, Thiry M, Dheur I, Rossius M, Vanderheijden N, Martial J, et al. A recombinant viral haemorrhagic septicaemia virus glycoprotein expressed in insect cells induces protective immunity in rainbow trout. *J Gen Virol* 1994;75:1579-87.

Heppell J, Lorenzen N, Armstrong MK, Wu T, Lorenzen E, Einer-Jensen K, et al. Development of DNA vaccines for fish: vector design, intra muscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model. *Fish Shellfish Immunol* 1998;8:271-86.

Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, Heppell J, Wu T, Davis HL. Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol* 1998;8:261-70.

Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, Heppell K, Davies HL. Genetic vaccination of rainbow trout against viral haemorrhagic septicaemia virus: small amounts of plasmid DNA protect against a heterologous serotype. *Virus Res* 1999;63:19-25.

Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, LaPatra SE. DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout. *Fish*

Shellfish Immunol 2002;12:439-53.

Chico V, Ortega-Villaizan M, Falco A, Tafalla C, Perez L, Coll J, et al. The immunogenicity of viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV) DNA vaccines can depend on plasmid regulatory sequences. *Vaccine* 2009;27:1948-58.

Katja Einer-Jensen, Lourdes Delgadob, Ellen Lorenzena, Giuseppe Bovob, Øystein Evensenc, Scott LaPatrad, Niels Lorenzena. Dual DNA vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against two different rhabdoviruses, VHSV and IHNV, induces specific divalent protection. *Vaccine*. 2009; 27 1248 - 1253

P. Pereiro, A. Martinez-Lopez, A. Falco, S. Dios, A. Figueras, J.M. Coll, B. Novoa, A. Estepa. Protection and antibody response induced by intramuscular DNA vaccine encoding for viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) G glycoprotein in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish & Shellfish Immunology*. 2012; 32 1088-1094

Malte Adelmanna,, Bernd Köllner, Sven. M. Bergmann, Uwe Fischera, Bodo Langeb, Werner Weitschies, Peter-Joachim Enzmann, Dieter Fichtner. Development of an oral vaccine for immunisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against viral haemorrhagic septicaemia. *Vaccine*. 2008; 26, 837-844

Ju Yong Byon, Tsuyoshi Ohira, Ikuo Hirono, Takashi Aoki. Comparative immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after vaccination with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) recombinant glycoprotein and DNA vaccine using a microarray analysis. *Vaccine* 2006; 24 921-930

Dixon, P. F., Feist, S., Kehoe, E., Parry, L., Stone, D. M. & Way, K. (1997). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from Atlantic herring *Clupea harengus* from the English Channel. *Dis Aquat Org* 30, 81-89.

Elsayed, E., Faisal, M., Thomas, M., Whelan, G., Batts, W. & Winton, J. (2006). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from muskellunge, *Esox masquinongy* (Mitchill), in Lake St Clair, Michigan, USA reveals a new sublineage of the North American genotype. *J Fish Dis* 29, 611-619.

Isshik, T., Nishizawa, T., Kobayashi, T., Nagano, T. & Miyazaki, T. (2001). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis Aquat Organ* 47, 87-99.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림수산식품 연구개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림수산식품 연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.