닭 유래 아데노 바이러스 혈청형 4형(FAdV-4) 사독 오일 백신의 안전성 및 효능 평가

김지예¹ · 김종녀² · 모인필^{1,*}

¹충북대학교 수의과대학, ²축산물위해요소 중점관리기준원

Safety and Efficacy of Fowl Adenovirus Serotype-4 Inactivated Oil Emulsion Vaccine

Ji Ye Kim¹, Jong Nyeo Kim² and In Pil Mo^{1,*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

²Korean Livestock Products HACCP Accreditation Service, Anyang 431-731, Korea

ABSTRACT Inclusion body hepatitis-hydropericardium syndrome (IBH-HPS) is an acute viral disease usually found in broilers aged from 3 to 5 weeks and causes up to 75% mortality. Among the 12 serotypes of fowl adenovirus group 1, serotype-4 (FAdV-4) was identified as a primary agent of IBH-HPS and was usually isolated in IBH-HPS cases in Korea since 2007. To prevent these IBH-HPS outbreaks in Korea, we developed the FAdV-4 inactivated vaccine using Korean isolate (ADL070244) and evaluated the efficacy of this vaccine. For the efficacy test, 2-week-old specific-pathogen-free (SPF) chickens intramuscularly inoculated with 1 or 2 dose of inactivated vaccine were used and challenged with FAdV-4 through either intramuscular or oral route at 2 weeks after vaccination. The vaccine induced good seroconversion which was confirmed by agar gel precipitation (AGP) test. In addition, the vaccine could decrease the FAdV-4 detection rate and histological lesion severity such as lymphocyte infiltration and necrosis in the liver comparing with those of non-vaccination group. Based on the current results, the developed FAdV-4 inactivated vaccine in this study was effective in the terms of reduction of virus detection rate and histological lesions severity. However, it was difficult to confirm the efficacy of the vaccine clearly because of no mortality and clinical signs in the non-vaccinated group after challenge. Therefore, we need further study to develop a standard challenged model system which could clearly evaluate the efficacy of the vaccines for FAdV-4.

(Key words : inclusionbody hepatitis-hydropericardium syndrome, fowl adenovirus serotype-4, inactivate oil emulsion vaccine, SPF chickens)

서 론

봉입체성 간염-심낭수종증(IBH-HPS)은 파키스탄의 Angara Goth 지역에서 1987년 처음 발생하여 ‘Angara disease’라고도 불리는 질병으로(Anjum et al., 1989), 이라크, 칠레, 멕시코, 일본 등 전 세계적으로 발생이 보고되면서, 양계 산업에 경제적 피해를 일으키고 있는 바이러스성 질병이다(Hess 2000; Hess et al., 1999).

IBH-HPS는 주로 3~6주령의 육계에서 발생되는데, 폐사 직전까지 별다른 임상 증상 없이 급사하는 것이 특징이며, 바이러스 주에 따라 폐사율이 다양하나 최고 75%까지 폐사를 일으킬 수 있다(Anjum et al., 1989; Cheema et al., 1989; Khawaja et al., 1988). 주요 부검 소견으로는 심낭 내 황색의

투명한 액체의 저류, 간 종대 및 간의 괴사 또는 출혈 반점, 비장 종대 및 신장에서의 요산 침착이 관찰될 수 있고(Anjum et al., 1989; Khawaja et al., 1988), 조직학적 병변으로는 간세포의 괴사 및 호염기성의 핵내 봉입체가 특징적으로 관찰된다(Anjum et al., 1989; Cheema et al., 1989; Nakamura et al., 1999). IBH-HPS의 원인체는 fowl adenovirus group 1 중 혈청형 4형(FAdV-4)으로 밝혀졌으며, 다른 혈청형과 달리 닭 전염성 빈혈 바이러스, 전염성 F낭병 바이러스 등의 면역 억제 바이러스의 혼합 감염 없이 FAdV-4 단독 감염만으로 질병을 일으킬 수 있다(Cowen et al., 1996; Mazaheri et al., 1998). 최근에는 우리나라에서도 FAdV-4에 의한 IBH-HPS 발병이 보고된 이후(Kim et al., 2007; Kim et al., 2008), 어린 일령의 육계뿐만 아니라 산란계, 종계, 토종닭 및 백세

* To whom correspondence should be addressed : moip@cju.ac.kr

미 등 여러 계종에 걸쳐 발생하며, 1~50%의 다양한 수준의 폐사율을 나타내는 등 국내 양계 산업에 심각한 경제적 피해를 일으키고 있는 실정이다. 육계에서는 어린 일령에서 높은 폐사율을 유발시키는 데에 비해, 성계에서의 감염은 폐사율은 낮으나 특히 종계의 경우 후대 병아리에 난계대 감염을 유발시킴으로써 타 계종에 비해 중요한 의미를 가진다(Pilkington et al., 1997; Toro et al., 2001).

국내에서의 IBH-HPS 감염에 따른 피해를 감소시키기 위해서는 지속적인 모니터링을 통하여 감염계를 도태시키거나, 백신을 이용하여 질병을 예방하는 방법이 있다. 하지만 아데노 바이러스는 건강한 닭에서도 검출되기 때문에 전자의 방법은 현실적으로 실시하기 어려운 점이 있어 후자의 방법인 백신 접종을 통한 예방이 보다 효과적인 것으로 판단된다.

이전 연구들에서는 각 나라에서 분리된 아데노 바이러스를 포르말린으로 불활화시킨 사독 백신을 제조하여 실험실 및 농장에서 백신 효능을 확인한 바 있다(Roy et al., 1999; Alvarado et al., 2007). 또한, 최근에는 메추리 유래인 QT 35 세포주를 이용하여 약독화시킨 생독 백신을 개발하여 효능을 확인한 연구 결과도 발표된 바 있다(Schonewille et al., 2010). 하지만 국내에서의 IBH-HPS 발생 및 그에 따른 경제적 피해가 확인되었음에도 불구하고 우리나라에서 분리된 FAdV-4를 이용한 생독 혹은 사독 백신은 아직 개발되어 있지 않으며, 관련 연구도 부분적으로 이루어지고 있다. 그러므로 이번 연구에서는 국내에서 발생하는 IBH-HPS의 주요 원인이 되는 FAdV-4를 분리하여 포르말린으로 불활화시킨 사독 백신을 제조하여 효능 평가를 실시함으로써, 국내 IBH-HPS에 의한 피해를 감소시키고자 하는 데에 그 목적이 있다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

본 실험은 specific pathogen free (SPF) 계란을 SPAFAS 회사(North Franklin, U.S.A.)에서 구입하여 부화시킨 후 실험에 사용하였다. 부화된 병아리는 닭 무균 사육 장치인 HBC2(Three-shine, Dae-jeon, Korea)에서 처리군 별로 격리 사육하였다.

2. 백신 제조

포르말린 불활화 사독 백신은 이전 Afzal and Ahmed (1990)이 기술한 방법으로 제조하였다. 백신 제조에 사용한 바이러스는 38주령의 국내 육용 종계 농장에서 분리된 아데노 바

이러스(ADL070244)로 유전자 서열 분석 결과, 혈청형 4형(FAdV-4)으로 밝혀졌다(Kim et al., 2008). 감염된 닭의 간 유제액을 15~18일령 SPF 부화란을 이용해 제조한 계태아 간세포에 접종하였는데, 이는 아데노 바이러스를 증폭하는 경우 주로 사용하는 방법이다(Naeem et al., 1995). ADL070244(FAdV-4) 바이러스를 접종시킨 계태아 간세포는 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 세포 변성 효과(cytopathic effect, CPE)가 관찰될 때까지 5일간 배양한 후 plaque assay를 통해 정제하였다. 10^{-10} 희석 배수에서 선택한 바이러스는 SPF 계태아 간세포에서 배양시킨 후, 백신 제조에 필요한 바이러스 역가를 맞추기 위해 초고속 원심분리를 이용하여(Beckman ultracentrifuge, rotor: Type 70 Ti) 농축시켰다. 바이러스 세포 배양액 500 mL를 35,000 g에서 1시간 원심분리한 후 얻은 pellet을 멸균한 인산 완충 식염수(Phosphate Buffered Saline: PBS) 10 mL와 섞음으로써 50배 농축시켰다. 농축시킨 바이러스에 40% 포르말린 용액을 0.1% 용량으로 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 반응시켜 불활화시킨 후, 사독 백신 제조 시 주로 사용되는 ISA70 oil(Montanide, France)를 이용하여 불활화 바이러스 용액과 오일을 3:7 비율로 맞춰 유화시켰다. 백신 1수분 내의 바이러스 역가는 $9 \times 10^{5.5}$ 50% tissue culture infectious dose(TCID₅₀)/1 dose이었다.

3. 공격 접종 바이러스

공격 접종에 사용한 바이러스는 백신 제조에 사용한 바이러스와 동일한 ADL070244(FAdV-4)를 이용하였다. 감염된 닭의 간을 멸균한 PBS로 30% 유제액을 제조한 뒤 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심 상층액을 분리한 후 0.45 µm 필터에 여과하여 항생제를 총량의 1%로 첨가한 후 -70°C에서 냉동 보관하였다. 항생제는 gentamycin, penicillin, polymyxin, streptomycin, nystatin이 혼합된 것이다. 공격 접종 바이러스의 역가는 $7.5 \times 10^{5.5}$ TCID₅₀/mL이었다.

4. 실험 설계 및 시료 채취

실험 계획은 Table 1에 요약하였다. 간략히 설명을 하면 총 120수의 2주령 SPF 닭을 20수씩 6개의 처리 군으로 구분하였으며, 모두 각 군별로 HBC2 무균 사육 장치에서 사육하였고, 이 중 백신 접종군은 A, B, C, D 군으로, 백신 비접종군은 E, F군으로 명명하였다. 2주령에 백신 접종을 실시하였는데 A, B군은 백신 1수분인 0.3 mL, C, D군은 2수분인 0.6 mL를 근육으로 접종하였다. 백신 접종 2주 후인 4주령에 백신 접종군 및 백신 비접종군의 모든 닭에 공격 접종 바이러스를 경구(A, C, E군) 또는 근육(B, D, F군)으로 각각 0.2 mL

Table 1. Summary of the experimental design for evaluation of FAdV-4 (ADL070244) inactivated oil emulsion vaccine efficacy in the SPF chickens

Group	Number of chickens	Vaccination ¹		Challenge route ²
		Age	Dosage	
A	20	2 wk	1	PO
B	20	2 wk	1	IM
C	20	2 wk	2	PO
D	20	2 wk	2	IM
E	20	no	no	PO
F	20	no	no	IM

¹Vaccine was inoculated intramuscularly at 2-week-old SPF chickens. One dose of vaccine contained $9 \times 10^{5.5}$ TCID₅₀/0.3 mL.

²All chickens of different groups were challenged at 4 weeks old of age (2 weeks after vaccination) with FAdV-4 dose of $1.5 \times 10^{5.5}$ TCID₅₀/0.2 mL, PO=per oral, IM=intramuscular.

씩 투여하였다. 접종 후 10일간 매일 임상 증상 및 폐사 여부를 관찰하고, 3, 5, 7, 10일에 각각 5수씩 처리군별로 임의로 선정하여 도태 후 부검을 실시하였다. 부검 시 육안 병변을 관찰하고, 유전자 검사 및 조직 검사를 위한 시료 채취를 실시하였다.

5. 혈청학적 검사

아데노 바이러스 혈청 검사에 주로 사용하는 한천 겔 침강반응(Agar Gel Precipitation: AGP) 시험을 통해 혈청학적 변화를 관찰하였다(Saif et al., 2003). 한천 겔은 1% agarose와 8% sodium chloride 조성을 기본으로 제조하였다. 한천 겔의 각각의 홈 간격은 4 mm로, 항원을 중심 홈에 주입하고 시험 닭에서 채취한 혈청을 주변 홈에 주입하였다. AGP 검사에 사용한 항원은 FAdV-4를 SPF계 태아 간세포에 접종한 뒤 얻은 세포 배양액을 이용하였다. 한천 겔은 습윤을 유지한 박스에 넣어 37℃ 항온기에서 48시간 반응시킨 후 반응 여부를 확인하였다.

6. FAdV-4의 유전학적 검사

FAdV-4 유전자 검사를 위해 polymerase chain reaction(PCR) 검사를 실시하였다. 시료로는 부검 개체에서 채취한 맹장 편도를 유제하여 원심분리 후 상층액을 이용하였고, Viral gene spin[®] (Intron biotechnology, 경기 성남)으로 DNA를 추출한 후

fowl adenovirus의 L1 loop에 특이적인 Hexon A(5'-CAART TCAGRCAGACGGT-3')와 Hexon B(5'-TAGTGATGMCGSGA CATCAT) primer를 이용하여 PCR 검사를 실시하였다(Meulemans et al., 2001).

7. 조직학적 검사

닭을 부검하여 간을 10% 중성 포르말린 용액에 고정시켰다. 고정시킨 조직을 파라핀으로 포매한 후, 4 μ m으로 조직 절편을 자른 뒤 hematoxylin과 eosin(H&E)으로 염색하여 현미경으로 관찰하였다. 조직학적 병변은 간 세포의 괴사 소견 및 림프구 침윤 정도를 관찰하였으며, 그 정도에 따라 4등급으로 구분하였다. 각 등급의 판정의 기준은 Grade 1=normal, Grade 2=focal, Grade 3=multifocal, Grade 4=diffuse로 하였다.

8. 통계 분석

본 실험에서 얻은 결과에 대한 통계 분석은 statistical analysis system(SAS Institute, 1996) 프로그램을 이용하여 GLM 방식으로 분산분석을 실시하였으며, 처리 별 유의성 분석은 Duncan's new multiple range test를 이용하여 5% 수준에서 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 백신 접종 후 안전성 확인

2주령의 SPF 닭에 실험실에서 제조한 FAdV-4 사독 오일 백신을 1수분, 2수분으로 각각 접종한 후 2주간 관찰한 결과, 백신 접종군의 어느 개체에서도 임상 증상 및 폐사가 관찰되지 않았으며, 백신 비접종군과 비교하였을 때 활력에 있어서 차이가 없었으며, 투여 후 남은 물과 사료의 양을 비교하는 과정에서도 차이가 인정되지 않았다.

2. 백신 접종 후 항체 검사

백신 접종하기 전 임의로 추출한 20수의 SPF 닭 혈청 및 백신 접종 2주 후 공격 접종하기 전 모든 그룹에서 채취한 혈청을 대상으로 아데노 바이러스에 대한 항체 존재 유무를 AGP 검사로 실시한 결과는 Table 2와 같다. 백신 접종 전 채취한 모든 혈청에서 FAdV-4에 대한 항체는 모두 음성으로 확인되었다. 백신 접종 2주 후인 4주령에 FAdV-4 바이러스로 공격 접종하기 전 모든 시험 닭의 혈청에 대한 검사 결과, 백신 접종군은 모두 100%의 항체 형성을 나타낸 데에 비해, 백신 비접종군은 모두 음성이었다.

Table 2. Seroconversion, mortality, pathological findings and virus detection rate in the SPF chickens after challenge with FAdV-4

Group	Vaccination	Challenge route ¹	Sero-conversion ²	Mortality	Pathology ³		Virus detection ⁴
					HP	NE	
A	1 dose	PO	20/20 ⁵	0/20	0/20	0/20	8/20
B	1 dose	IM	20/20	0/20	0/20	0/20	3/20
C	2 dose	PO	20/20	0/20	0/20	0/20	6/20
D	2 dose	IM	20/20	0/20	0/20	0/20	6/20
E	no	PO	0/20	0/20	0/20	2/20	10/20
F	no	IM	0/20	0/20	0/20	10/20	12/20

¹PO=per oral, IM=intramuscular.²The seroconversion was evaluated by AGP test.³HP=hydropericardium, NE=necrotic foci in liver.⁴PCR was performed to detect the viral gene in the cecal tonsil.⁵Number of chickens positive / total number of chickens in group.

3. 공격 접종 후 임상 증상 및 폐사율

백신 접종 2주 후인 4주령에 각각 경구 또는 근육으로 공격 접종한 후 10일간 매일 임상 증상 및 폐사를 관찰하여 Table 2에 요약하였다. 백신 접종군 및 백신 비접종군 모두에서 공격 접종 이후 침울함, 구석에서 조는 등의 임상 증상이 관찰되지 않았고, 폐사 개체도 발생하지 않았다.

4. 부검 소견 및 육안 병변

각 처리군별로 공격접종 후 3, 5, 7, 10 일에 각각 5수씩 도태시켜 부검한 후 육안 병변의 결과를 Table 2에 요약하였다. 도태 개체에 대한 부검 결과, 간의 괴사 반점이 백신 비접종군에서 나타난 것에 비해 모든 백신 접종군에서는 관찰 기간 10일 동안 관찰되지 않았다. 심낭 내 수양성 황색 액체는 백신 접종군 및 백신 비접종군 모두에서 관찰되지 않았다. 백신 비접종군에서의 간의 괴사 반점 소견은 공격 접종 경로에 따라 발생 정도의 차이가 나타났는데, 공격 접종 바이러스 경구 투여군에서는 공격 접종 후 3일부터 5일까지, 근육 투여군에서는 3일부터 7일까지 관찰되었다(Fig. 1). 또한, 경구 투여군은 괴사 반점이 10% 비율로 관찰된 것에 비해 근육 투여군에서는 50%의 비율로 높게 확인되었다.

5. FAdV-4 유전자 검색

백신 접종 2주 후인 4주령에 공격 접종을 실시하였다. 공격 접종 후 3, 5, 7, 10 일에 각각의 처리군에서 5수씩 임의로 도태시킨 후 부검한 뒤 각 개체 별로 맹장 편도를 채취하여 PCR 방법으로 유전자를 검색한 결과를 Table 2에 요약하였다.

각각의 공격 접종 경로에 따라 백신 접종군과 백신 비접종군을 비교했을 때 백신 접종군에서 유전자 양성률이 낮게 검색되었다. 백신 접종량에 따른 유전자 검색 양성률의 차이를 비교해 보면 공격 접종 경구 투여군에서는 백신 1수분 접종군은 40%인데 비해 백신 2수분 접종군은 30%로 다소 낮게 검색되었다. 하지만 근육 투여군에서는, 백신 1수분 접종군은 유전자 양성률이 15%인데 비해 2수분 접종군은 30%로 더 높게 검색되었다. 양성률이 나타나는 시기를 비교한 결과, 백신 접종군의 경우 경구 투여군은 접종 후 3일부터 5일까지 바이러스 양성이 검색된 데에 비해, 근육 투여군은 다소 늦은 5일부터 처음으로 검색되기 시작하여 10일까지 지속되었다. 백신 비접종군에서는 경구 투여군은 공격 접종 후 3일부터 7일까지, 근육 투여군은 공격 접종 후 3일부터 10일까지 바이러스 양성이 검색되었다.

6. 조직 병변도

공격 접종 후 3, 5, 7, 10 일에 도태시켜 부검한 개체마다 조직 병변을 점수화하여 각각의 평균을 Table 3에 요약하였다. 간에서의 조직 병변을 관찰한 결과, 간세포의 괴사 및 염증 반응에 의한 림프구 침윤이 주로 관찰되었으며(Fig. 2), 백신 접종군과 백신 비접종군 간에 조직학적 병변의 정도 차이가 통계학적으로 인정이 되었다($P<0.05$). 호염기성 핵내 봉입체는 백신 접종군 및 백신 비접종군 모두에서 관찰되지 않았다.

공격 접종 경로에 따른 조직학적 병변 정도를 비교한 결과, 근육 투여의 경우 백신 접종군과 백신 비접종군 사이의 차이가 관찰 기간 내내 통계학적으로 유의성 있게 관찰되었

Fig 1. Gross changes of the liver in the chickens after challenge.

A : No gross lesion was present in the liver of SPF chickens from vaccinated group (D), B: Multifocal necrosis was present in the liver of SPF chickens from non-vaccinated group (F) (arrow).

다($P<0.05$). 특히, 공격 접종 후 5일에 부검한 개체의 경우, 백신 2수분 접종군이 1수분 접종군에 비해 간 세포 괴사 정도가 월등하게 낮은 것을 확인할 수 있었다. 반면, 경구 투여의 경우 공격 접종 후 7일에 백신 2수분 접종군과 백신 비접종군과의 림프구 침윤 정도의 차이가 유의성 있게 나타난 것 외에는 다른 시료 채취 시기에서는 백신 접종군과 백신 비접종군 사이의 통계학적 차이는 인정되지 않았다.

고 찰

봉입체성 감염-심낭수종증(IBH-HPS)는 주로 3~5주령의

Fig 2. Examples of histological lesion scoring system used in this study. No histologic lesions was scored as 0 (A); focal necrosis and lymphocytic infiltration as 1 (B); multifocal necrosis and lymphocyte infiltration as 2 (C); diffuse necrosis and lymphocyte infiltration as 3 (D); H&E; $\times 40$, E: higher magnification of hepatic necrosis (D); H&E; $\times 400$

Table 3. Comparison of hepatic histological lesion severity in the SPF chickens after challenge with FAdV-4¹

Group	Vaccination	Challenge route	Histological lesion scores ² at days post inoculation							
			3		5		7		10	
			NE ³	Lym ⁴	NE	Lym	NE	Lym	NE	Lym
A	1 dose	PO	0.6 $\pm$ 0.8 ^{*A}	1.2 $\pm$ 0.8 ^A	0.4 $\pm$ 0.5 ^A	0.6 $\pm$ 0.4 ^A	0.2 $\pm$ 0.4 ^A	0.4 $\pm$ 0.4 ^{AB}	0.8 $\pm$ 0.8 ^A	0.8 $\pm$ 0.8 ^A
B	1 dose	IM	0.0 $\pm$ 0.0 ^a	0.4 $\pm$ 0.0 ^a	0.6 $\pm$ 0.5 ^a	0.8 $\pm$ 0.5 ^a	0.0 $\pm$ 0.0 ^a	0.4 $\pm$ 0.4 ^a	0.2 $\pm$ 0.4 ^a	0.6 $\pm$ 0.8 ^a
C	2 dose	PO	0.4 $\pm$ 0.5 ^A	0.8 $\pm$ 0.4 ^A	0.6 $\pm$ 0.5 ^A	1.0 $\pm$ 0.5 ^A	0.0 $\pm$ 0.0 ^A	0.6 $\pm$ 0.0 ^A	0.8 $\pm$ 0.8 ^A	1.0 $\pm$ 0.8 ^A
D	2 dose	IM	0.0 $\pm$ 0.0 ^a	0.2 $\pm$ 0.4 ^a	0.0 $\pm$ 0.0 ^b	0.8 $\pm$ 0.4 ^a	0.2 $\pm$ 0.4 ^a	0.4 $\pm$ 0.4 ^a	0.0 $\pm$ 0.0 ^a	0.2 $\pm$ 0.0 ^a
E	no	PO	0.2 $\pm$ 0.4 ^A	0.8 $\pm$ 0.8 ^A	0.4 $\pm$ 0.4 ^A	1.4 $\pm$ 0.5 ^A	0.8 $\pm$ 0.5 ^A	1.2 $\pm$ 0.5 ^B	0.8 $\pm$ 0.8 ^A	1.2 $\pm$ 0.8 ^A
F	no	IM	3.0 $\pm$ 0.0 ^b	3.0 $\pm$ 0.0 ^b	3.0 $\pm$ 0.0 ^c	3.0 $\pm$ 0.0 ^b	3.0 $\pm$ 0.0 ^b	3.0 $\pm$ 0.0 ^b	2.8 $\pm$ 0.4 ^b	2.8 $\pm$ 0.8 ^b

¹Upper-case letters compare cells in the same column of PO route challenge groups (A, C, E), lower-case letters compare cells in the same column of IM route challenge groups (B, D, F). Cells in the same column with the same letter of the same case are not statistically different ($P<0.05$).

²The histological lesion severity was scored as follows; 0: normal, 1: focal, 2: multifocal, 3: diffuse.

³NE=hepatic necrosis

⁴Lym=lymphocyte infiltration in the liver.

^{*}Means $\pm$ SD.

육계에서 발생하며 최고 75%까지의 폐사율을 일으킬 수 있다(Khawaja et al., 1988). 산란계 및 종계에서도 육계보다는 낮은 수준이지만 폐사를 동반한 임상 증상을 나타내며(Asrani et al., 1997), 특히 종계에서는 난계대 감염으로 인한 피해가 가중될 수 있다(Toro et al., 2001). 국내에서도 IBH-HPS의 발생이 처음 보고된 후 현재까지 지속적으로 보고되고 있으며, 육계뿐만 아니라 종계, 산란계, 토종닭 및 백세미 등 여러 계종에 걸쳐 발생됨으로써 경제적 피해가 꾸준히 증가하고 있는 실정이다(Kim et al., 2007; Kim et al., 2008). 국내 IBH-HPS 발생은 주로 FAdV-4에 의한 것으로(Kim et al., 2008), 다른 혈청형과는 달리 면역 억제 바이러스와의 혼합 감염 없이 단독 감염만으로도 질병을 유발시킬 수 있어 피해가 더욱 우려된다(Cowen et al., 1996; Mazaheri et al., 1998). 따라서 본 실험에서는 국내에서 분리된 FAdV-4를 이용하여 제조한 사독 오일 백신의 효능을 실험 실적으로 평가하여 IBH-HPS에 의한 국내 양계 산업의 경제적인 피해를 줄이고자 하였다.

본 연구에서 백신주로 사용한 아데노 바이러스 혈청형 4형(ADL070244)은 국내 38주령의 육용 종계에서 1.8%의 폐사율과 함께 전형적인 IBH-HPS 임상 증상 및 부검 소견을 보인 계군에서 분리되었으며, 최종적으로 FAdV-4로 혈청형이 확인된 바이러스이다(Kim et al., 2008). 분리된 바이러스를 포르말린으로 불활화시킨 후 오일로 유화시켜 제조한 백신을 2주령의 SPF 닭에 각각 1수분, 2수분으로 근육 접종하고 2주 후 FAdV-4로 공격 접종하여 백신의 안전성 및 효능을 평가하였다.

백신 접종 후 2주간 관찰한 결과, 접종량에 관계없이 폐사를 포함하는 임상 증상 및 부검 소견 상의 병변이 관찰되지 않았으며, 조직학적 소견에서도 백신 비접종군과 비교하였을 때 차이가 인정되지 않는 낮은 수준의 미약한 병변만이 관찰되어 백신의 안전성을 확인할 수 있었다. 추후 실험에서는 10 수분 및 0.1 수분에 대한 검사를 추가하여 다양한 바이러스 함량에서의 안전성을 확인해 볼 필요가 있다.

백신 접종에 의한 항체 형성능을 평가하기 위해 본 실험에서는 AGP 검사를 실시하였으며, 이 방법은 fowl adenovirus 혈청 검사법으로 흔히 사용하는 시험법 중 하나이다(Cook et al., 1972). 다른 혈청 검사법인 중화 시험(Virus neutralization test: VNT) 또는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 검사에 비해 민감도는 낮은 경향이 있지만 VNT의 경우 시간 및 비용이 많이 소요되고, ELISA의 경우 민감성은 좋으나 상판으로 시판되어 있지 않아 자체 제작 시 표준화 및 재현성에 있어서 문제가 발생할 소지가 있어 경제적인 면과 편의성을 고려하여 AGP 검사로 실시하였다. 혈청 검사 결과, 백신 접

종 전 모든 개체가 FAdV-4에 대한 항체 음성이었던 것에 비해, 백신 접종 후 모든 백신 접종군에서 100% 항체 반전이 일어나 백신에 의한 항체 형성이 효과적으로 이루어진 것을 확인하였고, 본 연구에서 사용한 AGP 검사는 항체 형성능을 검사하는 데에 문제가 없다는 결론을 내릴 수 있다.

백신 효능 평가를 위해 본 실험에서 기준으로 삼은 것은 다음의 세 가지로, 첫째는 폐사율을 비롯한 임상 증상, 둘째는 부검 시 육안 병변 및 조직 병변, 셋째는 FAdV-4 유전자 검색 양성률이었다.

첫째로 임상 증상을 비교하여 볼 때, 백신 접종군과 백신 비접종군 모두 폐사 및 임상 증상이 발생하지 않아 백신의 효능을 임상 증상만으로 평가하는 데에는 어려움이 있었다. 백신 비접종군에서도 공격 접종 후 임상 증상이 관찰되지 않은 것은 공격 접종에 사용한 국내 분리주가 1.8%의 폐사율 및 전형적인 IBH-HPS 감염증이 확인되었던 38주령의 종계에서 분리된 것과 모순되는 결과이다. 이와 같은 결과는 이전 여러 연구들에서 언급했던 것과 같이, 농장에서는 폐사를 동반하며 IBH-HPS 증상을 일으켰던 바이러스로 실험실적 재현 실험을 실시하는 경우, 농장에서와 같이 병원성을 유발시키는 것이 어려웠다는 결론과 일치한다(Cowen et al., 1996; Hidalgo et al., 1994; Toro et al., 1999). 재현 실험에 있어서 병원성의 차이는 실험실적 상황과는 달리 실제 농장 상황에서 있을 수 있는 IBDV, CAV와 같은 면역 억제성 질병과의 혼합 감염에 의해 병원성이 증대되었기 때문인 것으로 판단되며(Toro, 2000), 이 밖에 세균성 질병과 같은 기타 면역 억제 요인이 작용했을 가능성도 있을 수 있다(Shivachandra et al., 2003).

위에서 언급한 농장의 질병 관련 및 환경적인 요소 이외에도, 병원성 재현 실험 설정에 있어서 접종 바이러스의 종류 및 양, 접종 일령 또는 경로, 닭의 유전적 형질 등에 의해서도 숙주에서의 병원성 발현의 차이가 발생할 수 있다(Cowen et al., 1996; Mazaheri et al., 1998; Roy et al., 2004). 일반적으로 산란계보다는 육계에서, 일령이 어릴수록, 또는 자연 감염 경로인 경구 투여보다는 비경구적 투여일 경우 더 높은 병원성을 나타낸다고 보고되어 있다(Cowen et al., 1996; Shafique and Shakoori, 1994). 그러므로 본 실험에서 4주령의 실험계에 공격 접종 시 임상 증상이 명확히 발현되지 않은 결과를 참고하여, 폐사를 비롯한 임상 증상 등이 발현되는 접종 일령 및 경로, 바이러스 접종량 및 종류 등의 일정한 조건을 제시할 수 있는 병원성 모델 개발이 필요할 것으로 판단된다.

둘째로 FAdV-4 유전자 검색 양성률을 비교해 보면 백신 비접종군에 비해서 백신 접종군의 양성률이 감소하여 FAdV-

4 유전자 검색율에 있어서 백신이 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 공격 접종 경구 투여군은 2수분 백신 접종군이 1수분 접종군보다 낮은 양성률을 나타냈는데, 이는 백신 바이러스 역가가 높을수록 공격 접종에 대한 방어율이 높다는 연구와 연관되는 결론이다(Ahmad and Hasan, 2004). 근육 투여군에서는 백신 접종량이 높을수록 양성률도 증가하였는데, 이는 앞선 경구 투여군의 결과와 일치하지 않는 결과로, 추후 재검사가 필요할 것으로 판단된다.

마지막으로 조직학적 검사로 간에서의 조직 병변도를 관찰하였는데, 이는 IBH-HPS 감염 시 간에서 가장 주요한 조직학적 병변들이 관찰되기 때문이다(Anjum et al., 1989; Asrani et al., 1997; Cheema et al., 1989; Nakamura et al., 1999). 조직학적 병변은 림프구 침윤 소견 및 간세포의 괴사 정도를 비교하였는데, 백신 비접종군에 비해 백신 접종군에서 현저히 감소되는 것을 확인하였다. 특히 근육 투여군의 경우, 백신 접종군과 비접종군의 차이는 명확히 나타났는데, 림프구 침윤 정도 및 간세포의 괴사 정도 모두 관찰 기간 내내 백신 접종군에서 항상 낮은 수준으로 관찰되었으며, 통계학적으로 유의한 차이가 인정되었다($P<0.05$). 이에 비해, 경구 투여군에서는 접종 후 7일에 관찰한 림프구 침윤 정도가 백신 비접종군에 비해 백신 접종군에서 유의적으로 낮은 수준인 것을 확인하였으나, 그 외의 기간에서의 조직 병변도의 차이는 인정되지 않는 수준이었다. 이는 백신 비접종군에 있어서 경구 투여군에 비해 근육 투여군이 월등히 높은 수준의 조직 병변도를 나타냈기 때문에 백신 접종군과의 차이가 더 명백히 나타나는 것이다. 이처럼 백신 접종군 및 백신 비접종군에 있어서 공격 접종 경로에 따른 조직 병변도의 차이는 실험실적 상황에서 경구감염보다는 비경구적 감염에서 더 높은 병원성을 나타낸다는 이전 연구 결과와 일치한다(Saif et al., 2003). 이와 같은 결과들을 종합하였을 때, 백신 효능 평가에 있어서 조직학적 병변도의 비교가 유용한 기준이 된다는 결론을 내릴 수 있다.

본 실험 결과에 따르면 이번 연구에서 제작한 FAdV-4 사독 오일 백신은 백신 접종에 의한 항체 형성능 및 실험계에서의 안전성이 인정되었다. 공격 접종에 대한 백신의 효능은 조직학적 병변도 및 FAdV-4 유전자 검색율에 있어서는 뚜렷이 확인되었으며, 이는 특히 공격 접종을 근육으로 투여하는 경우에 더 확실히 나타난 것에 비해, 폐사를 포함하는 임상 증상 발현에 있어서는 경구 투여 및 근육 투여군 모두에서 백신의 효능을 확실히 평가하는 데에 어려움이 있었다. 그러므로 추후 연구에서는 명확한 백신 효능 평가를 위해 FAdV-4 접종에 대한 임상 증상이 뚜렷이 발현되는 병원성

모델을 구축하는 실험이 필요할 것으로 판단된다.

적 요

봉입체성 간염-심낭수종증(IBH-HPS)은 주로 육계에서 다 발하며 3~6주령의 육계에서 최고 75%까지의 폐사율을 일으킬 수 있는 질병이다. 주 증상으로는 심낭의 황색 수양성 액체가 저류되는 심낭수종증과 함께 봉입체성 간염이 나타난다. 1987년 파키스탄에서 처음 발생이 보고된 후 여러 나라에서 발병되었으며, 최근 우리나라에서도 질병 발생이 확인된 바 있다. 본 실험에서는 IBH-HPS에 대한 경제적 피해를 감소시키기 위한 목적으로 사독 오일 백신을 제조하여 안전성 및 효능을 평가하였다. 2주령의 SPF 닭에 제조한 사독 백신을 1 또는 2수분으로 근육 접종한 뒤 2주 후인 4주령에 FAdV-4로 공격 접종을 실시하였다. 백신 접종에 의한 임상 증상 발현 및 폐사가 관찰되지 않아 백신의 안전성이 인정되었고, AGP 검사를 통해 FAdV-4에 대한 항체가 100% 형성되었음을 확인하였다. 공격 접종 시 각각 경구 또는 근육으로 접종하였고, 접종 후 10일간 관찰한 결과, 백신 접종군 모두 부검 소견, 바이러스 유전자 검색율 및 조직학적 병변도에 있어서 효능이 인정되었다. 육안 병변의 경우, 백신 비접종군에서는 간의 괴사 반점이 10~50%의 개체에서 발생한 데 비해 백신 접종군에서는 관찰되지 않았다. 바이러스 유전자 검색 양성률 또한 백신 접종군이 백신 비접종군에 비해 낮은 수준으로 나타났으며, 이는 특히 근육 투여군에서 더 명확하게 나타났다. 조직 병변도는 관찰 기간 내내 핵내 봉입체는 관찰되지 않았으나, 림프구 침윤 및 간세포의 괴사 정도가 백신 접종군에서 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 실험에서 제조한 FAdV-4 사독 오일 백신은 실험계에 임상적으로 안전하고 면역원성도 높았으며, 효능에 있어서는 백신 비접종군에서의 임상 증상이 명확하지 않았음에도 불구하고, 육안 병변, 바이러스 검색율 및 조직 병변도에 있어서 공격 접종에 대한 방어가 효과적인 것으로 판단된다.

(색인어: 봉입체성 간염-심낭수종증, fowl adenovirus 혈청형 4형, 사독 오일 백신, SPF 닭)

사 사

이 논문은 2010년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연

구비 지원에 의하여 연구되었다.

인용문헌

- Abdul-Aziz TA, Al-Attar MA 1991 New syndrome in Iraqi chicks. *Vet Rec* 129:272.
- Afzal M, Ahmad I 1990 Efficacy of an inactivated vaccine against hydropericardium syndrome in broilers. *Vet Rec* 126: 59-60.
- Afzal M, Muneer R, Stein G 1991 Studies on the aetiology of hydropericardium syndrome (Angara disease) in broilers. *Vet Rec* 128:591-593.
- Ahmad I, Afzal M, Malik MI, Hussain Z, Hanif W 1989 Disease pattern and aetiology of hydropericardium syndrome (Angara disease) in broiler chickens in Pakistan. *Pakistan J Agril Res* 10:195-199.
- Ahmad K, Hasan S 2004 The efficacy of experimental angara disease vaccines. *Pakistan Vet J* 24:101-103.
- Alverado IR, Villegas P, El-Attrache J, Jensen E, Rosales G, Perozo F, Puvis LB 2007 Genetic characterization, pathogenicity and protection studies with an avian adenovirus isolate associated with inclusion body hepatitis. *Avian Dis* 51: 27-32.
- Anjum AD 1990 Experimental transmission of hydropericardium syndrome and protection against it in commercial broiler chickens. *Avian Pathol* 9:655-660.
- Anjum AD, Sabri MA, Iqbal Z 1989 Hydropericarditis syndrome in broiler chickens in Pakistan. *Vet Rec* 124:247-248.
- Asrani RK, Gupta BK, Sharma SK, Singh SP, Katoch RC 1997 Hydropericardium hepatopathy syndrome in Asian poultry. *Vet Rec* 141:271-273.
- Cheema AH, Afzal M, Ahmad J 1989 An adenovirus infection of poultry in Pakistan. *Rev Sci Tech Hit Epizootics* 8:789-798.
- Cook JKA 1972 Avian adenovirus alone or followed by infectious bronchitis virus in laying hens. *J Comp Pathol* 82: 119-128.
- Cowen BS, Lu H, Weinstock D, Castro AE 1996 Pathogenicity studies of fowl adenoviruses isolated in several regions of the world. In: *Proc. International Symposium on Adenovirus and Reovirus Infections in Poultry*, Rauischholzhausen, Germany pp. 79-88. June 24-27.
- Hess M 2000 Detection and differentiation of avian adenoviruses; a review. *Avian Pathol* 29:195-206.
- Hess M, Raue R, Prusas C 1999 Epidemiological studies on fowl adenoviruses isolated from cases of infectious hydropericardium. *Avian Pathol* 28:433-439.
- Hidalgo H, Sanhueza M, Rosende S, Toro H 1994 Antigenic characterization of four viral isolates obtained from inclusion body hepatitis outbreaks in broiler chickens. *Av Cienc Vet* 9:116-121.
- Khawaja DA, Ahmad S, Rauf MA, Zulfikar MZ, Mahmood SMI, Hassan M 1988 Isolation of adenovirus from hydropericardium syndrome in broiler chicks. *Pakistan J Vet Res* 1:2-17.
- Kim JN, Byun SH, Kim MJ, Kim JJ, Sung HW, Mo IP 2008 Outbreak of hydropericardium syndrome and molecular characterization of Korea fowl adenoviral isolates. *Avian Dis* 52:526-530.
- Kim KS, Ha JS, Kim JH 2007 Occurrence of hydropericardium-hepatitis syndrome in broilers and baeksemis raised in Korea. *Korean J Vet Res* 47:285-290.
- Mazaheri A, Prusas C, Vo M, Hess M 1998 Some strains of serotype 4 fowl adenoviruses cause inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in chickens. *Avian Pathol* 27:269-276.
- McFerran JB 1998 Adenoviruses. In: *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th ed. Swayne DE, John R, Jackwood MW, earson JE and Reed WM, eds. University of Pennsylvania. Kennett Square, PA. pp. 100-105.
- Meulemans G, Boschmans M, Van den Berg TP, Decaesstecker M 2001 Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses. *Avian Pathol* 30:655-660.
- Naeem K, Niazi T, Malik SA, Cheema AH 1995 Immunosuppressive potential and pathogenicity of an avian adenovirus isolate involved in hydropericardium syndrome in broilers. *Avian Dis* 39:723-728.
- Nakamura K, Mase M, Yamaguchi S, Shiobahara T, Yuasa N 1999 Pathologic study of specific pathogen free chicks and hens inoculated with adenovirus isolated from hydropericardium syndrome. *Avian Dis* 43:414-423.

- Pilkington P, Brown T, Villegas P, McMurray B, Page RK, Rowland GN, Thayer SG 1997 Adenovirus-induced inclusion body hepatitis in four-day-old broiler breeders. *Avian Dis* 41:472-474.
- Roy P, Koteeswaran A, Manickam R 1999 Efficacy of an inactivated oil emulsion vaccine against hydropericardium syndrome in broilers. *Vet Rec* 145:458-459.
- Roy P, Muralimanohar B, Koteeswaran A, Omprakash AV 2004 Experimental studies on hydropericardium syndrome in two different synthetic lines of broiler chickens. *Vet Arhiv* 74: 157-164.
- Saif YM, Barnes, HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LA, Swayne DE 2003 *Diseases of poultry*, 11th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa 63-87, 181-202, 213-227.
- Schonewille E, Jaspers R, Poul G, Hess M 2010 Specific-pathogen-free chickens vaccinated with a live FAdV-4 vaccine are fully protected against a severe challenge even in the absence of neutralizing antibodies. *Avian Dis* 54:905-910.
- Shafique M, Shakoori AR 1994 Transmission of hydropericardium syndrome in poultry. *Pakistan J Zoology* 26:145-148.
- Shivachandra SB, Sah RL, Singh SD, Kataria JM, Manimaran K 2003 Immunosuppression in broiler chicks fed aflatoxin and inoculated with fowl adenovirus serotype-4 (FAV-4) associated with hydropericardium syndrome. *Vet Res Comm* 27:39-51.
- Survashe BD, Pandit SV, Ghalsasi GR, Mallikarjun S 1996 Inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome (Leechi heart disease) on India-an overview. In; *Proc. 20th World's Poultry Congress*, New Delhi, India. 375-380.
- Toro H, Gonzalez C, Cerda L, Morales MA, Dooner P, Salameiro M 2002 Prevention of inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome in progeny chicks by vaccination of breeders with fowl adenovirus and chicken anemia virus. *Avian Dis* 46:547-554.
- Toro H, Gonzalez O, Cerda L, Hess M, Reyes E, Geisse C 2000 Chicken anemia virus and fowl adenoviruses: Association to induce the inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome. *Avian Dis* 44:51-58.
- Toro H, Gonzalez O, Escobar C, Cerda L, Morales MA, Gonzales C 2001 Vertical induction of the inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome with fowl adenovirus and chicken anemia virus. *Avian Dis* 45:215-222.
- Toro H, Prusas C, Raue R, Cerda L, Geisse C, Gonzalez C, Hess M 1999 Characterization of fowl adenoviruses from outbreaks of inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome in Chile. *Avian Dis* 43:262-297.
- (접수: 2010. 9. 3, 수정: 2010. 9. 9, 채택: 2010. 9. 13)