

특강 I

국내 분리 닭 전염성 후두기관염 바이러스의

특성과 유전자 재조합 백신

한명국

국립수의과학검역원

I. 국내 분리 ILTV의 분자학적 특성

닭 전염성 후두기관염(infectious laryngotracheitis, ILT)은 기침, 호흡곤란, 개구호흡, 객혈 등의 호흡기 증상과 100%에 육박하는 높은 이병율, 10~40%의 폐사율 그리고 산란저하를 특징으로 하는 닭의 바이러스성 호흡기 질병으로 1925년에 미국에서 처음 보고되었다. 국내에서 ILT는 1982년 2월에 경기도 강화군 불은면 삼송리에 위치한 닭 136,000마리를 사육한 양계단지에서 처음 발생하여 17%의 폐사율과 20%의 산란율 감소를 일으켰다.

ILT는 다른 닭 질병보다 예방법이 일찍부터 개발되어 1930년대부터 생독백신이 사용되었다. 초기의 백신은 병원성이 높은 바이러스를 총배설강으로 접종하였고 비강 또는 음수 접종으로도 면역이 형성되는 것이 보고되었으나 현재는 높은 면역이 형성되는 점안 접종법이 일반적으로 사용되고 있다. 국내에서 ILT 생독백신 사용은 최초발생 이후 긴급방역을 위하여 외국으로부터 백신을 도입하면서 시작되었다.

ILT virus(ILTV)의 특성은 여러 가지 방법으로 조사가 가능하지만 국내 분리주의 특성은 닭에 대한 병원성과 유전자의 제한효소 분절양상으로 비교하였다. 즉 1982년 국내 최초 발생 예에서 분리된 분리주를 포함하여 1998년까지 분리된 분리주를 대상으로 조사한 결과 국내 분리주는 병원성과 유전자의 제한효소 분절양상에 따라 강병원성 분리주와 약병원성 분리주로 대별되었다. 강병원성 분리주는 30~80%의 폐사율과 2.3~2.8의 높은 기관내 병원성 지수 (intratracheal pathogenicity index, ITPI)를 나타내었으나 약병원성 분리주는 백신주 접종군과 같이 약한 임상증상과 비슷한 ITPI를 나타내었다. 약병원성 분리주 3주 중 2주에서는 *Mycoplasma*가 분리되었으며 *Mycoplasma*가 분리되지 않은 약병원성 분리주는 다른 약병원성 분리주에 비하여 높은 기관병변지수 (microscopic lesion score, MLS)을 나타내었다.

이러한 결과는 약병원성 분리주의 야외상황에서 병원성 발현은 세균감염 등과의 복합적인 요인과 바이러스의 병원성 증가에 의한 것으로 분석된다.

ILTV 강병원성 분리주의 DNA를 *Apa* I, *Kpn* I, *Eco*R I 그리고 *Bam*H I 으로 처리한 결과 백신주 및 미국 표준 공격주 NVSL주와는 다른 분절양상을 보였다. 약병원성 분리주의 유전자 분절양상은 강병원성 분리주와는 차이를 보인 반면 백신주와는 동일하였다. 유전자의 제한효소 분석으로 강병원성 분리주는 백신주 및 약병원성 분리주와 구분되었으며 국내 ILT 발생에는 백신 또는 백신주와 유사한 병원성을 가진 바이러스가 관여하여 유전적 요인이 다른 최소한 3가지 형태의 바이러스가 개입된 것으로 추정된다.

II. 국내 분리 ILTV의 TK 및 gG 유전자의 염기서열 분석

ILTV는 herpesviridae의 alphaherpesvirinae에 속하는 double-stranded DNA 바이러스로 genome은 크기가 약 155 kb이며 120 kb의 unique long (UL) region과 17 kb의 unique short (US) region, 그리고 US region 양쪽에 각각 9 kb의 inverted repeated sequence가 위치한 herpesvirus type D arrangement로 구성되어 있다. ILTV의 유전자는 random DNA sequencing을 통하여 21개의 유전자가 동정되었으며 염기서열은 전체 genome중 1/3정도가 보고되어 포유류의 herpesvirus나 마력병 바이러스 등 다른 herpesvirus와 비교할 때 많은 연구가 요구되고 있다.

ILTV 국내 분리주 및 계태아 유래 백신주의 TK 및 gG 유전자의 염기서열을 비교 분석한 결과 국내 분리주 및 백신주의 TK 유전자의 크기는 1,089 bp로 363개의 아미노산을 coding하는 것으로 추정되었다. 또한 아미노산 서열을 비교한 결과 강병원성 분리주는 TK 유전자의 253번 아미노산이 methionine으로 threonine인 백신주와 차이를 보였다. 약병원성 분리주의 TK 유전자 염기서열은 백신주와 높은 상동성을 보였으며 TK 유전자의 253번 아미노산도 백신주와 같았다. 그러나 TK 유전자의 mRNA polyadenylation signal은 강병원성 분리주에서만 존재하였다.

국내 분리주와 백신주의 gG 유전자의 크기는 897 bp로 299개의 아미노산을 coding 하는 것으로 나타났으며 아미노산 서열 분석결과 ILTV 국내 분리주는 병원성에 관계없이 서로 일치된 서열을 나타내었으며 67번과 103번의 아미노산 alanine과 methionine이 백신주에서는 모두 threonine으로 차이를 보였다. 그러나 유전자의 제한효소분석에서 다른 강병원성 분리주와 차이를 보인 강병원성 분리주 N87278은 TK 유전자는 강병원성 분리주와 일치한

반면 gG 유전자는 백신주와 일치하였다.

이러한 결과를 종합해 볼 때 국내 분리주 중에는 백신주의 TK 유전자와 강병원성 분리주의 gG 유전자 염기서열을 가진 분리주 및 강병원성 분리주의 TK 유전자와 백신주의 gG 유전자 염기서열을 가진 강병원성 분리주도 ILT 발병에 관여한 것으로 판단되며 이러한 결과는 recombination에 의하여 새로운 형태의 유전자를 가진 바이러스가 출현한 것으로 보이며 *in vivo* recombination이 ILTV에서 일어난 것을 처음으로 확인하였다.

III. PCR-RFLP에 의한 ILTV의 병원성 감별

ILT 생독백신은 다른 닭 질병 백신보다 일찍 개발되어 사용되고 있으나 계태아 또는 조직배양세포에서 순화된 백신 바이러스들은 병원성이 다양하다. 또한 백신 바이러스는 백신 접종계로부터 배출되어 감수성이 있는 닭에 전파되어 계대되면서 병원성을 회복하여 질병을 유발할 수 있다고 보고되었다. 최근에는 ILT 백신에 의한 질병 발생 가능성이 제기되고 있으므로 ILT 발생예에서 분리된 분리주의 병원성 감별은 ILT 백신과 질병발생과의 관련성을 규명하는데 있어 매우 중요하다. 그러나 ILT 진단에 이용되고 있는 병리조직학적 검사, polymerase chain reaction (PCR) 및 DNA probe 등의 진단법으로는 병원성 분리주와 백신주를 구분할 수 없다. 또한 ILTV의 닭에 대한 병원성은 높은 폐사율과 이병을 보이는 것에서부터 가벼운 호흡기 증상만을 나타내는 것에 이르기까지 다양하지만 하나의 혈청형만이 알려져 있어 ILTV의 병원성을 혈청학적 진단법으로 구분하기도 어렵다. 그리고 발육 계태아에 대한 병원성과 발육 계태아의 장노막 위에 형성된 pock의 크기와 형태도 분리주에 따라 다르나 병원성과의 상관성은 매우 낮다.

ILTV 유전자의 제한효소 분석은 병원성 분리주와 백신주의 구분이 가능한 것으로 보고되었으나 세포배양, 바이러스 증식 및 DNA 추출과정이 복잡하고 시간이 많이 소요되어 많은 분리주를 동시에 비교하여 신속히 병원성 여부를 판단하기는 용이하지 않으며 동일한 분절양상을 보인 분리주도 다른 종류의 제한효소에 의하여 차이를 보일 수 있으므로 여러종류의 제한효소를 이용하여야 하는 어려움이 있다.

Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)은 herpesvirus 분리주의 분자역학 연구에 이용되어 왔으며 병원성 분리주와 백신주의 구분 및 분리지역에 따른 분리주 간의 특성연구에 많이 이용되고 있는 방법이다.

TK 및 gG 유전자에 대한 염기서열 분석을 통하여 이들 유전자의 PCR-RFLP로 국내 분리주의 병원성을 감별한 결과 강병원성 분리주는 백신주와 구분이 가능하였다. 그러나 약병원성 분리주는 강병원성 분리주와는 구분되었으나 백신주와는 동일한 양상을 나타내어 구분되지 않았다. 닭에 대한 병원성 시험결과 강병원성을 나타낸 N87278의 TK 유전자의 RFLP 양상은 강병원성 분리주와 같았으나 gG 유전자의 RFLP 양상은 백신주와 동일하였다. 이러한 결과는 염기서열 결과와 일치하였다.

IV. 기관 및 삼차신경절에서 ILTV 검출

Herpesviridae의 alphaherpesvirinae에 속하는 바이러스는 다양한 종류의 감염숙주, 상대적으로 짧은 증식주기, 세포배양에서의 빠른 전파, 감염세포의 효과적인 파괴, 그리고 중추신경절에서의 잠복감염을 일으키는 특징이 있으나 ILTV는 감수성 동물이 닭과 꿩 등에 한정되어 있고 닭 유래 세포에서만 증식하는 등 좁은 숙주영역을 가지고 있다. 그러나 다른 alphaherpesvirus와 같이 ILTV도 중추신경계의 삼차신경절에서 잠복감염을 일으키는 특징이 있다.

ILTV에 감염되어 회복된 닭은 80% 이상이 보균체가 되며 잠복감염 상태의 바이러스는 새로운 계군의 입추, 사육환경의 변화, 산란개시 등의 스트레스 요인에 의하여 재활성화 된다. 특히 산란은 잠복감염 상태의 바이러스의 재활성에 있어 다른 요소보다 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

잠복감염된 포유류의 herpesvirus는 면역억제제 이외에 스트레스 요인에 의하여 재활성화되어 감수성이 있는 다른 개체로 바이러스가 전파되고 임상 증상을 유발할 수도 있으므로 잠복감염된 바이러스는 역학적으로 매우 중요한 의미를 가진다.

잠복감염된 조직에서 herpesvirus 분리 및 검출에 immuno-blot, *in situ* hybridization, PCR, dexamethasone 처치, thermic shock, 감염조직 배양 등 여러 가지 방법이 보고되어 있으나 잠복감염된 바이러스의 분리는 쉽지 않다. 이와 같이 잠복감염 상태의 바이러스 분리가 용이하지 않으므로 ILTV의 삼차신경절 또는 기관조직에서 중복감염(superinfection) 연구나 백신의 병원성 바이러스의 잠복감염 방어능 조사에 바이러스 분리법은 적용하기가 어렵다.

ILTV를 기관과 눈으로 접종한 다음 기관 및 삼차신경절에서 바이러스 분리와 유전자 검출을 실시한 결과 ILTV는 기관내 접종 후 2일 및 5일에 기

관에서만 분리된 반면 유전자는 접종방법에 관계없이 접종 후 35일까지 기관 및 삼차신경절에서 검출되었다. 이러한 결과로 ILTV의 잠복감염 부위는 삼차신경절 이외에 기관에서도 일어나는 것으로 생각되며 기관에서의 ILTV 잠복감염에 대한 연구는 필요하다.

V. 공격 바이러스 검출에 의한 백신 효능 비교

ILT 생독백신의 면역수준은 바이러스 중화시험과 간접효소면역측정법으로 측정할 수 있으나 ILTV는 다른 alphaherpesvirus와 마찬가지로 체액성 면역보다는 세포성 면역이 방어에 관여하므로 혈중항체 수준과 방어율은 상관성이 낮아 백신의 방어수준을 평가하는데 적합하지 못하다. 또한 강병원성 바이러스로 공격접종한 후 임상증상 방어여부에 의한 방어능 조사로는 백신이 병원성 바이러스의 잠복감염을 방어하는지 알 수 없다. 그러나 PCR-RFLP를 이용한 강병원성 바이러스와 백신 바이러스 감별법으로 백신 접종 후 공격 접종한 강병원성 공격주 유전자를 검출하여 백신이 강병원성 바이러스의 잠복감염 방어 여부를 평가할 수 있다. 이러한 평가는 백신의 효능을 보다 실질적으로 평가할 수 있는 방법이다.

실험적으로 백신 접종 후 병원성 분리주로 공격 접종한 닭의 기관 및 삼차신경절에서 유전자를 PCR로 검출한 다음 산물을 RFLP한 결과 백신에 따라 기관 및 삼차신경절에서 병원성 공격주의 유전자 검출율에 차이가 있어 백신에 따라 병원성 공격주의 잠복감염 방어능에는 차이를 나타내었다.

이와 같은 PCR-RFLP는 병원성 공격주와 백신주의 감별로 백신의 방어능을 병원성 바이러스의 잠복감염 방어수준으로 측정할 수 있어 백신의 효능을 보다 구체적으로 평가할 수 있을 것으로 생각된다.

VI. Thymidine kinase 유전자 결손 전염성 후두기관염 재조합 바이러스의 병원성 및 방어능

특정 유전자를 결손시키거나 다른 병인체의 유전자 또는 표지(marker) 유전자를 삽입한 백신이 herpes simplex virus 등 여러 종류의 바이러스에서 보고되었다. 닭에서도 fowlpox virus, herpesvirus of turkey 그리고 Marek's disease virus에서 특정 유전자의 결손 또는 닭의 주요 질병의 병인체 유전자를 삽입한 재조합 바이러스가 보고되었다. 그러나 ILTV의 재조합 바이러스에 관한 연구는 유전자 염기서열 자료 부족과 재조합 연구에 이용될 세포

추가 없어 지연되어 왔다.

TK 유전자는 UL region에 위치한 유전자로 조식배양에서 바이러스의 증식에 필수적인 유전자는 아니며 TK 유전자결손은 병원성과 잠복감염 상태에서 바이러스의 재활성을 감소시킨다고 보고되었다. TK 유전자의 이러한 특징은 백신개발에 있어 중요한 유전자로 인식되어 재조합 백신개발에 이용되고 있다.

ILT 재조합 바이러스 작성에 이용 가능한 세포에는 닭 신장(chicken kidney, CK) 세포, 계태아 신장세포, 계태아 간세포 등 닭 유래 초대배양 세포가 있으나 이들 세포에서의 marker gene의 발현과 transfection 방법에 관한 보고는 없다. 세포주인 메추리 태아섬유아세포 유래 QT-35에서 ILTV는 접종초기에는 낮은 역가로 증식하지만 연속적으로 계대배양하면 바이러스는 소실된다고 보고되어 ILTV 증식을 유도하지 못한다. 그러나 diethylnitrosamine에 의하여 형성된 닭 간 종양세포에서 유래한 세포주인 LMH는 ILTV의 증식을 유도하며 세포변성효과와 plaque를 형성하는 것이 보고되었다.

ILTV가 증식하는 세포주가 보고된 이후 β -gal 유전자가 삽입된 ILTV recombinant가 보고되었으며 TK 유전자에 β -gal 유전자가 삽입된 ILTV recombinant는 병원성은 감소되고 병원성 바이러스에 대한 방어능이 인정된다고 보고되었다.

재조합 바이러스 작성에 이용되는 reporter gene은 chloramphenicol acetyltransferase(CAT), β -gal 그리고 green fluorescent protein(GFP) 등이 있다. 해파리(*Aequorea victoria*)의 photoprotein인 aequorin에 칼슘이 결합되어 빛을 생성하는 GFP는 유전자 발현과 단백질 분포 모니터링 등 생물학 분야에서 많이 이용되고 있는 유전자이다.

잠복감염된 ILT 생독백신 바이러스는 재활성화되어 닭에 전파되고 연속적으로 계대되면서 병원성을 회복하여 질병을 일으킬 수 있는 위험성을 가지고 있다. 그러므로 닭에 계대되어도 병원성이 회복되지 않으며 표지 유전자가 삽입된 재조합 백신은 다른 질병보다도 ILT 예방에 그 필요성이 요구되고 있다. 재조합 백신은 병원성 ILTV와 구분되어 질병 발생에 백신주의 관련성을 증명하는데 이용될 수 있으며 병원성 관련 유전자가 결손되어 병원성을 회복할 가능성이 감소되어 백신의 안전성을 높일 수 있다. 또한 다른 질병의 유전자를 삽입한 다가백신 개발에 vector로 이용될 수 있다.

국내 분리주로부터 TK 유전자를 결손시키고 그 부위에 GFP 유전자를

marker gene으로 삽입한 recombinant를 작성하여 병원성과 방어능을 조사하였다. 그 결과 작성된 recombinant 10CR91B와 29CR98H 유전자를 DIG-labeled probe를 이용한 southern blot hybridization한 결과 GFP 유전자가 검출되어 ILTV TK 유전자에 GFP 유전자가 삽입된 것을 확인하였다. Recombinant에 삽입된 GFP 유전자는 cytomegalovirus immediate-early promoter하에서 LMH 및 CK 세포에서 발현되어 marker 유전자로 이용 가능하였으며 작성된 transfer vector는 새로 생성된 제한효소 즉 *EcoR* I의 인식부위 존재 유무로 ILTV TK 유전자와 GFP 유전자의 orientation을 용이하게 결정할 수 있었다.

ILTV recombinant는 CK 세포와 CAM에서 ILTV의 전형적인 세포변성효과와 pock를 형성하였으며 형광현미경으로 관찰하였을 때 연초록색의 GFP 특이 형광이 관찰되었다. 또한 GFP 단크론 항체를 이용하여 면역염색한 결과 암갈색으로 염색되는 세포가 관찰되어 GFP 유전자가 CK 세포 및 발육란의 CAM에 발현됨을 확인하였다. Recombinant의 증식성은 접종 후 2일부터 progeny virus가 검출되었으며 접종 후 4일에는 최고 역가에 도달하여 증식성은 parent virus와 차이가 없었다.

병원성도 강병원성 분리주에서 유래한 recombinant 10CR91B 접종군은 50%의 폐사율을 보인 parent virus에 비하여 가벼운 호흡기 증상만 관찰되었으며 병중의 지속기간도 짧았다. 또한 폐사도 없었으며 intratracheal pathogenicity index (ITPI)도 백신 접종군의 ITPI와 비슷하였다. 약병원성 분리주에서 유래한 29CR98H는 백신 접종군보다 낮은 ITPI를 보였다. Recombinant의 기관병변지수는 각각의 parent virus 보다 낮았으며 10CR91B 접종군의 기관병변지수는 기관 중간부의 기관병변지수 수치가 기관 상부의 수치보다 parent virus와 큰 차이를 보였다.

Recombinant의 강병원성 바이러스에 대한 방어능을 조사한 결과 29CR98H를 $10^{1.0}$ 및 $10^{2.0}$ TCID₅₀로 접종한 군은 병원성 공격주로 공격접종하였을 때 각각 40% 및 10%의 폐사율을 보여 방어율은 각각 0% 및 40%로 낮았으나 $10^{3.0}$ TCID₅₀를 점안으로 접종한 군과 $10^{2.0}$ TCID₅₀를 기관내 접종군의 방어율은 100% 였다. 공격접종 후 4일에 접종군별로 5마리 닭의 기관에서 병원성 공격주를 분리한 결과 $10^{1.0}$ 및 $10^{2.0}$ TCID₅₀ 접종군은 공격주가 분리된 반면 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 접종군은 1마리에서만 분리되었다. 그러나 기관내 접종군에서는 공격주는 분리되지 않았다. 상용 백신의 방어율을 동일한 방법으로 조사한 결과 공시한 3종의 백신은 방어율은 100% 였으나 백신에 따라

기관에서의 병원성 공격주의 분리장도는 차이를 보였다.

VI. 결 론

국내 ILT 발생에서 분리된 14주의 분리주는 닭에 대한 병원성에 따라 강병원성 분리주와 약병원성 분리주로 대별되었고 유전자의 제한효소 분석으로 강병원성 분리주는 백신주와 구분되었다. 그러나 약병원성 분리주는 백신주와 동일한 제한효소 분절양상을 보여 구분되지 않았다. TK 및 gG 유전자에 대한 염기서열 분석결과 국내분리주는 3가지 유전자형 즉, 강병원성 분리주의 TK 및 gG 유전자를 가진 강병원성 분리주, 백신주의 TK 유전자와 강병원성 분리주의 gG 유전자를 가진 약병원성 분리주 그리고 강병원성 분리주의 TK 유전자와 백신주의 gG 유전자를 가진 강병원성 분리주로 구분되어 recombination에 의하여 새로운 형태의 유전자를 가진 바이러스가 출현한 것이 확인되었다. 이러한 결과로 국내에서는 최소한 유전적 요인이 다른 3종류 이상의 바이러스가 유행한 것으로 판단되었다.

병원성 관련 유전자인 TK 유전자는 강병원성 분리주와 백신주의 253번 아미노산에서 차이를 보여 병원성을 결정하는 아미노산은 methionine으로 추정되었으며 ILTV는 삼차신경절 이외의 기관에서도 잠복감염이 일어나는 것이 확인되었다.

PCR-RFLP는 강병원성 분리주와 백신주를 감별하여 ILT 발생예에 백신주 또는 백신주와 유사한 병원성을 가진 바이러스의 관련성을 규명하는데 이용 가능할 것으로 생각되었으며 이를 이용하여 백신주의 병원성 바이러스의 잠복감염 방어여부를 평가한 결과 백신에 따라 방어율에는 차이를 나타내었다.

TK 유전자가 결손되고 GFP 유전자가 삽입된 ILTV recombinant는 증식성이 인정되고 CK 세포 및 CAM에서 marker gene이 발현되어 ILTV 분리주 및 백신주와 구별이 용이하며 안전성과 방어능이 인정되어 백신으로 활용이 가능할 것으로 판단되었다.