大韓獸醫學會誌 (1985) 第25卷 第2號
Korean J. Vet. Res., (1985) Vol. 25, No. 2, pp.155~166

Binary Ethylenimine으로 不活化한 Newcastle Disease Virus의 抗原性과 免疫原性에 관한 硏究

朴奉均 · 全允成 · 李榮純 · 李榮玉*
서울大學校 獸醫科大學 · 農振廳家畜衛生硏究所*

(1985. 8. 1 接受)

Studies on the Antigenicity and Immunogenicity of Newcastle Disease Virus Inactivated with Binary Ethylenimine

Bong-kyun Park, Yun-seong Jeon, Young-soon Lee and Young-ok Rhee*
College of Veterinary Medicine, Seoul National University; Veterinary Research Institute, O.R.D.

(Received August 1, 1985)

Abstract: Effects of binary ethylenimine (BEI) treatment on the inactivation of infectivity and hemagglutinin of Newcastle disease virus (NDV) were studied in comparison with those of formalin treatment. Immune responses of chickens vaccinated with BEI-inactivated NDV vaccines were also investigated.

The results were summarized as followings;

1. Complete loss of infectivity of NDV (Bl) was observed at 3, 7, and 24 hours after the treatment at 37°C with BEI concentrations of 0.01M, 0.005M and 0.001M, respectively.

2. The hemagglutinin activity of NDV (Bl) remained constant when treated with 0.01M BEI at 37°C. However, it gradually decreased when treated with 0.1% or 0.2% formalin at 37°C.

3. When 4-week-old chickens were vaccinated with NDV vaccines prepared from Bl or Miyadera strains of NDV, inactivated with 0.01M BEI and adsorbed to aluminium hydroxide gel, favorable immune responses were observed throughout the 8 weeks of observation period.

4. When these chickens were revaccinated at 8 weeks after the first vaccination, strong anamnestic responses were evoked and the immunity maintained for 4 weeks of the observation. Though slightly better immune responses were observed after primary vaccination in chickens vaccinated with Bl vaccine compared with those vaccinated with Miyadera vaccine, the differences were not significant.

5. On the electron microscopy, BEI (0.01M) gave least effect to the envelope as well as capsid of NDV.

서 론

닭에 대한 Newcastle disease virus (NDV)의 불활화 vaccine은 군면역과 경제성 그리고 생력의 관점에서는 단점을 지니고 있으나 안정성과 안전성이 있기 때문에 (Garside, 1962; Allan 등, 1978) 최근에도 우수제품에 관한 연구가 계속되고 있다(Thayer 등 1983).

NDV 불활화 vaccine의 virus 재료로는 1973년 FAO에서 Bl virus 감염 allantoic fluid를 사용할 것을 장려하기 이전까지는 전 계태아 조직을 사용하였다(Grun

과 Hudson, 1966). Bl 감염 allantoic fluid만으로도 만족할만한 면역원성을 발휘할 수 있다는 사실을 미쳐 알지 못하였기 때문에 virus학적으로 불합리한 점이 많은 전계태아 재료를 사용하여 왔다.

근년에 이르러 NDV의 불활화 vaccine에는 몇가지 어려운 문제가 있음을 알게 되었는데 그 중 하나가 닭에 부여하는 면역원성이 낮은 점이다. 즉 면역응답을 방해하는 다른 병원체의 관여도가 높아지므로 해서 NDV 불활화 vaccine의 면역원성은 기대한 효과에 못 미치게 되었으며 이로 인하여 오늘날에도 면역원성을 높히는데 필요한 여러가지 이론과 기술이 동원되고 있다.

본 실험에서는 보다 좋은 NDV 불활화 vaccine을 만들기 위하여 virus 불활화제로서 binary ethylenimine (BEI)을 처음으로 응용하였다. 즉 NDV를 불활화하는데 필요한 BEI의 농도와 반응온도 등에 관하여 formalin과 비교실험하였다. 그리고 불활화할때 NDV의 형태에 미치는 BEI와 formalin의 영향을 전자현미경적으로 비교 관찰하여 BEI에 의한 불활화 과정의 타당성을 아울러 밝히고저 하였다.

재료 및 방법

Newcastle disease virus (NDV)와 vaccine재료 : NDV는 가축위생연구소의 Bl(Hitchner)주와 Miyadera주를 사용하였다. vaccine재료는 NDV를 10일령 부화계란의 allantoic cavity에 접종하였다. Bl NDV 접종란은 37°C에서 5일간을, Miyadera NDV 접종란은 3일간 각각 부란하였다.

부란 24시간내에 죽은 접종란은 버렸다. 접종후 5일경에 죽은 Bl 접종란은 allantoic fluid가 채취될때까지 4°C에서 잠시 보관하였고, 5일째까지 살아있는 접종란은 4°C에서 최소한 4시간 두었다가 allantoic fluid를 채취하였다. 채취한 재료는 4°C, 1,000×g, 20분간 원심분리하여 상층액만을 채취하였다. Miyadera NDV 접종란은 3일까지 죽지 않은 것만을 골라 allantoic fluid를 채취하였으며, 이들 재료는 −70°C에 보관하면서 사용하였다.

Binary ethylenimine (BEI)에 의한 NDV의 불활화 : NDV의 불활화과정은 Bahnemann등(1974)의 방법에 따랐다. 즉 2-bromoethylamine hydrobromide(MW 204.89, NAKARI)를 미리 37°C로 가온한 0.2N NaOH 용액에 0.1M의 농도가 되도록 용해한 후 37°C 수조에서 1시간동안 잘 흔들어 BEI를 만들었다.

vaccine 재료에 일정한 농도가 되도록 BEI 용액을 가한 후 정하여 진 온도에서 잘 흔들어 반응케 하였다. 그리고 나서 9ml씩 채취, 거기에 냉각(4°C)한 20% $Na_2S_2O_3$ 용액을 1ml 가하여 최종농도가 2%가 되도록 하여 BEI의 작용을 정지시켰다.

Formalin에 의한 NDV의 불활화 : NDV 재료에 formalin 농도가 0.1% 또는 0.2%로 되게한 후 온도를 달리하여 잘 흔들어 반응케하고 나서 공시하였다.

NDV의 불활화 확인시험 : 정하여진 시간 동안 불활화한 virus 재료는 생리식염수로 10진 단계 희석하여 각 희석단계마다 2개의 부화란 뇨막강에 0.1ml씩 접종하고 37°C에서 7일간 부란하면서 계태아의 치사상태를 검사하였다. 배양한 후 allantoic fluid의 적혈구 응집여부에 따라 50% embryo infective dose (EID_{50})를 계산하였다(Reed와 Muench, 1938).

적혈구 응집반응 : vaccine 재료를 비롯한 공시 NDV 재료의 적혈구 응집가의 측정은 microtiter system으로 실시하였다. 즉 바이러스 재료를 2배수 계단 희석한 것 0.025ml를 동량의 생리식염수와 잘 혼합한 후 1% 닭 적혈구액 0.025ml를 혼합하였다. 닭 적혈구액은 alsever 용액과 동량의 닭 혈액을 채취하여 혼합한 후 이것을 생리식염수로 3번 씻은 다음 생리식염수에 적혈구 농도가 1%되도록 부유하였다. 반응물은 실온에 정치하여 대조군의 적혈구가 정상적으로 침전되었을 때 실험군의 응집가를 판독하고나서 응집이 일어난 virus의 최고희석배수를 virus의 적혈구 응집가로 하였다.

적혈구 응집억제반응 : Haemagglutination inhibition (HI) 반응은 Allan과 Gough (1974)의 방법에 준하여 microtiter system으로 실시하였다. microtitration multiwell plate (96U shaped wells, 0.25ml capacity, Flow Lab.)에서 diluter (0.025ml capacity, Flow Lab.)로 2배수단계 희석한 후 거기에 4 HA units의 NDV를 동량씩 넣고 잘 섞은 다음 37°C에서 1시간 중화하였다. 반응물에 HA 반응에서 사용한 1% 닭 적혈구액 0.025ml을 넣어 잘 혼합한 후 실온에 정치하여 대조군의 적혈구가 가라앉은 시간에 판독하였다. 모든 HI 역가는 혈청의 최고 희석배수의 역수로 표시하였으며, 실험조건에 따른 HI 역가의 변동가능성을 고려하여 HI 역가 5~6(log_2)의 양성혈청을 매 시험마다 대조로서 사용하였고, 최종적으로 모든 혈청을 동시에 측정하여 HI가를 결정하였다.

시험 vaccine의 제조 : 적혈구 응집역가가 10 log_2인 Bl(Hitchner)과 Miyadera NDV에 0.1M의 BEI를 10%가 되도록 첨가한 후 37°C 수조에서 잘 섞이도록 흔들면서 4시간 반응하였다. 이것을 4°C로 냉각한 20% $Na_2S_2O_3$를 전체반응액의 10%량이 되도록 첨가하고 잘 흔들어 반응을 정지시키고 0.1N HCl로 pH를 7.0으로

보정하였다. 불활화 확인시험과 세균검사를 위한 재료로 소량을 채취한 후 약 40% $Al(OH)_3$ (pH 6.8)을 동량 섞어 시험용 백신으로 공시하였다. vaccine 제조에 사용한 aluminium hydroxide gel은 다음과 같이 만들었다. $AlSO_4$를 증류수에 30~50%가 되도록 녹인 후 ammonia수를 가하여 최고 gel 농도에 이르도록 하였다. 그리고 gel이 수화되어 안정된 다음 유리 SO_4^{+2}와 NH_3가 제거될때까지 수돗물로 씻었다. 이것을 원심하여 gel을 농축하고나서 약 50%량이 되도록 생리식염수에 희석하여 고압멸균 하였다.

면역시험 : 천호부화장으로 부터 분양받은 1일령의 산란계 숫컷을 면역원성 조사에 공시하였다. 매주 모체이행항체가 소실되는 것을 측정하여 3 $\log_2$ 이하가 되는 4주까지 병아리용 사료를 무제한 급식하면서 격리사육 후 백신을 접종하였다. 그 내용은 Table 1과 같다.

Table 1. Experimental Chickens and Vaccination Protocols of Binary Ethylenimine-inactivated Newcastle Disease Virus Vaccines

Vaccine	Age (weeks)	No. of chickens	Dose/ Route	Booster*
Bl NDV	4	35	1ml/I.M.	1ml/I.M.
Miyadera NDV	4	35	1ml/I.M.	1ml/I.M.
Control	4	35	—	—

*8 weeks after the first vaccination.

Vaccine의 면역원성 평가 : vaccine의 면역원성은 공시계의 HI가를 측정하여 결정하였다. 즉 매주마다 실험군별로 공시계 4마리로부터 개별채혈하여 HI가를 측정하는 한편 체중측정을 8주간 하였다. 추가접종은 vaccine 접종계에만 실시하였으며 대조군은 무접종군으로서 HI 및 체중측정은 같은 방법으로 실험하였다. 혈청역가는 세군에 대한 역가의 평균과 체중의 평균을 각각 t검정(student t test)으로 비교하였다.

전자현미경적 관찰 : Newcastle disease virus (Bl)를 불활화제로 처리한 후 virus 입자의 형태학적 변화를 전자현미경(JEM-120CX Ⅱ)으로 관찰하였다.

10일령 부화란의 allantoic cavity에서 증식시킨 virus 재료를 10,000×g에서 30분간 원심하여 침전물을 제거하고 상층액을 100,000×g, 4시간 원심(Beckman L8-70M Ultracentrifuge, SW-41 Ti)하여 얻은 침전물을 상층액의 1/10량되는 생리식염수에 다시 희석하여 0.2% formalin, 0.01M BEI, 대조군으로 나누어 37°C에서 30시간 처리하고 2% phosphotungstic acid(pH 7.2)로 7분간 염색하여 carbon coated copper grid (#300)에 올려 80KV에서 검경하였다.

결 과

NDV(Bl)에 대한 binary ethylenimine (BEI)의 불활화 조건을 formalin의 경우와 비교조사하여 항원의 안정성과 면역형성능을 밝히는 실험을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

BEI에 의한 NDV의 감염력의 불활화 : BEI에 의한 NDV의 감염력의 불활화 kinetics를 규명하기 위하여 NDV(Bl)액에 0.1M의 BEI를 10%, 5%, 1%가 되게 가하고 37°C, 25°C, 4°C에서 작용시켰다. 매시간마다 virus 재료를 채취하여 한 재료당 10개의 10일령계태아에 접종하여 감염역가를 측정한 결과 Fig. 1과 같은 성적을 얻었다.

NDV에 대한 BEI의 불활화능은 반응온도에 따라 많은 차이를 보였다. 즉 25°C, 4°C 처리에서는 24시간까지 처리하여도 완전한 불활화가 되지 않았다. 그러

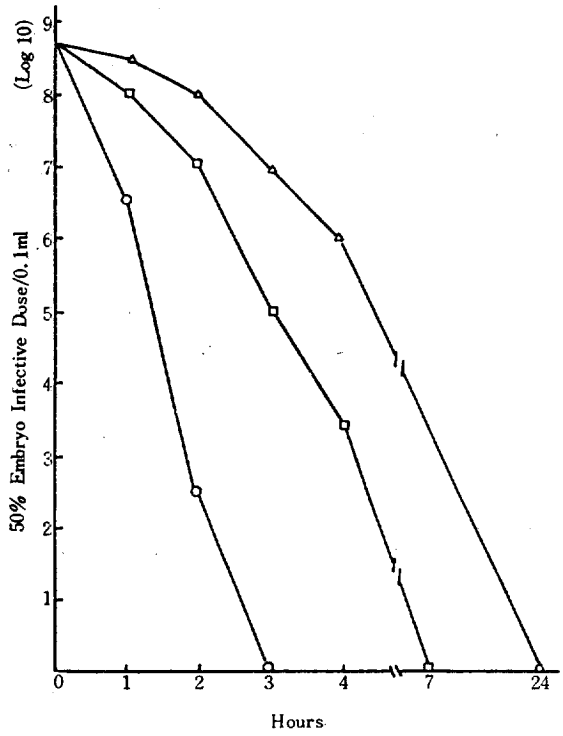


Fig. 1. Inactivation kinetics of Newcastle disease virus(Bl) with binary ethylenimine at 37°C.
○—○=Newcastle disease virus treated with 0.01 M binary ethylenimine; □—□=Newcastle disease virus treated with 0.005M binary ethylenimine; △—△=Newcastle disease virus treated with 0.001 M binary ethylenimine.

나 37°C에서는 BEI의 농도에 비례하여 $\log_{10}$ EID_{50}/0.1ml가 감소하였는데, 0.01M 에서는 3시간만에 6.5, 2.5, 0의 순으로 감소하였고, 0.005M에서는 4시간까지 8.0, 7.0, 5.0, 3.5 순으로 감소하여 7시간 후에는 완전히 불활화 되었다. 0.001M에서는 4시간까지 $\log_{10}$ EID_{50}/0.1ml가 8.5, 8.0, 7.0, 6.0 순으로 감소하여 갔다. 즉 BEI에 의한 NDV의 완전 불활화 시간은 0.01M에서는 3시간 0.005M 에서는 7시간, 0.001M 에서는 24시간이었다.

BEI와 formalin에 의한 NDV의 적혈구 응집력 변화 : NDV의 BEI와 formalin에 의한 HA titer의 변화를 알아보기 위하여 NDV를 0.1% formalin, 0.2% formalin, 0.01M BEI 및 대조군으로 나누어 37°C, 25°C, 4°C에서 작용시킨 후 6시간 간격으로 혈구응집력을 조사해서 다음과 같은 성적을 얻었다(그림 2).

BEI(0.01M)군과 대조군의 NDV 적혈구 응집력은 37°C, 12시간까지는 변화가 없었으나, 18시간 후에는 1 $\log_2$로 한 단계 감소하였다. 0.1% formalin 처리군은 12시간까지 혈구응집력에 변화가 없었으나 18시간 후부터 감소하기 시작하여 24시간 후부터는 현저하게 감소하였다 ($p<0.01$). 0.2% formalin 처리군은 0.1% formalin 보다 급격한 감소가 관찰되었으며 ($p<0.01$), 30시간 후에는 적혈구 응집력이 검출되지 않았다.

반응온도 25°C에서는 12시간까지 모두 역가의 변동이 없다가, 18시간 후에 0.01M BEI와 대조군은 1 $\log_2$로 한 단계가 그리고 0.1% formalin은 2 $\log_2$ 단계가 감소한 후 72시간까지 변동이 없었고, 0.2% formalin은 거의 24시간 간격으로 1 $\log_2$ 단계씩 감소하였으나 회귀직선의 비교에서 0.1%와 0.2% formalin 간에는 유의차가 없었다 ($p>0.05$).

반응온도 4°C에서는 24시간 후에 모두 1 $\log_2$인 1단계가 감소하여 변동이 없었으며, 0.2% formalin만이 72시간에서 1 $\log_2$인 한 단계가 감소하였다. 나머지 처리군과 0.2% formalin 사이의 유의차는 인정되지 않았다 ($p>0.05$).

BEI 불활화 $Al(OH)_3$ gel ND vaccine의 면역원성 : BEI 불활화 $Al(OH)_3$ gel ND vaccine의 면역원성을 4주령의 평균체중 231.6±20.3g 병아리에서 조사하였다. NDV를 0.01M BEI로 37°C에서 불활화한 BI NDV와 Miyadera NDV 재료를 각각 20%의 $Al(OH)_3$ gel에 흡착하여 만든 vaccine을 닭 대퇴부에 1ml씩 접종하고 혈중항체를 측정하였던 바 다음과 같은 성적을 얻었다(Fig. 3).

접종 1주 후에는 두 접종군 모두 모체이행항체의 영

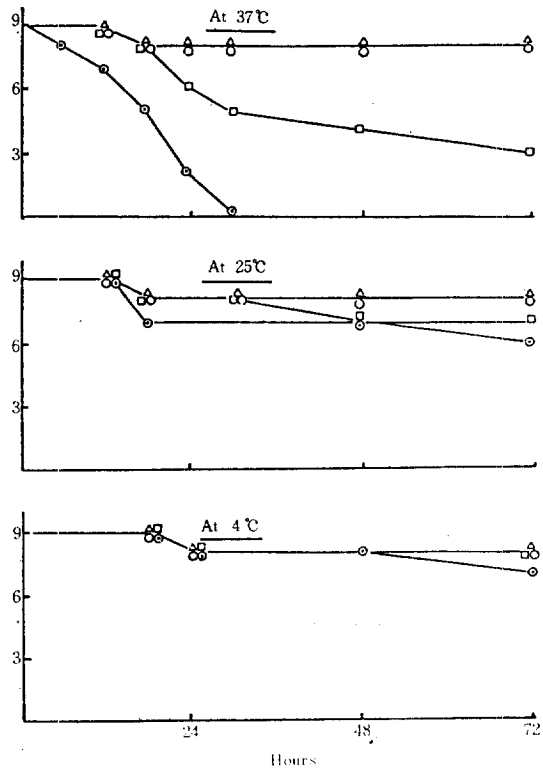


Fig. 2. Inactivation of hemagglutination activity of Newcastle disease virus (BI) with binary ethylenimine or formalin.
□—□=0.1% formalin; ○—○=0.2% formalin;
△—△=0.01M binary ethylenimine;
○—○=untreated control.

향으로 HI가가 낮았으며 2주째부터 상승하여 $\log_2$를 기준으로 Miyadera ND vaccine군은 2주에 5.0±1.41, 3주째 3.75±0.43, 4주째 5.0, 5주째 4.8±0.43, 6주에 3.8±0.43, 7주에 3.8±0.43, 8주에는 2.8±0.43으로 4주까지 상승하다 5주째부터 서서히 떨어져 8주째에는 3 $\log_2$ 이하가 되었다. 한편 BI ND vaccine 접종군은 $\log_2$를 기준으로 2주에 4.0±0.71, 3주째에 6.0±0.71로 최고에 이르렀으며 4주에는 5.5±0.5, 5주째에는 4.5±0.5로 서서히 떨어져 8주에는 3.75±0.83으로 Miyadera ND vaccine 접종군보다 다소 높은 수준으로 8주까지 유지되었다.

Miyadera ND vaccine 접종군과 BI ND vaccine 접종군간에는 접종 후 3주와 6주째에 Miyadera ND vaccine 접종군의 항체가 평균이 BI ND vaccine 접종군보

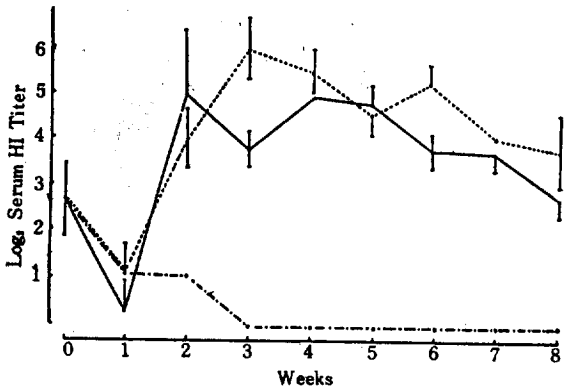


Fig. 3. Immune response induced by binary ethylenimine-inactivated, $Al(OH)_3$-adsorbed Newcastle disease vaccines in 4-week-old chickens.
—=Miyadera Newcastle disease vaccine;
···=Bl Newcastle disease vaccine;
-·-=nonvaccinated control.

다 유의차 있게 낮았으나($p<0.01$), 전 시험기간 동안 두 접종군간의 항체가 평균에 대한 차이는 인정되지 않았다.

대조군은 모체이행항체가 4주에는 2.6±0.8이 되었으나 그 후 12주까지 1.0(log_2) 이하를 유지하였다.

BEI 불활화 $Al(OH)_3$ gel ND vaccine의 추가 접종 효과 : BEI 불활화 $Al(OH)_3$ gel ND vaccine의 추가접종효과를 알아보기 위하여 4주령 병아리에 Miyadera ND vaccine이나 Bl ND vaccine으로 1차 면역시킨 8주 후의 12주령 병아리 왼쪽 대퇴부에 1차 접종시와 같은 ND vaccine을 1 ml씩 추가접종한 다음 HI가를 측정하였다. 양군 모두 잔여항체에 대한 정도에 관계없이 Miyadera ND vaccine 접종군은 16주까지 log_2 기준으로 5.3±1.09, 5.8±0.43, 5.8±0.43, 6.5±1.12로 지속적인 항체의 상승이 관찰되었다. 한편 Bl ND vaccine 접종군은 6.0±0.71, 6.8±0.83, 5.5±0.5, 6.3±0.41로 두 군 모두 추가접종에 대한 면역응답이 현저하였다. Miyadera ND vaccine 접종군과 Bl ND vaccine 접종군 사이의 유의차는 인정되지 않았다 ($p>0.05$).

BEI 및 formalin 불활화 NDV의 전자현미경적 관찰 : Newcastle disease virus를 불활화제로 처리한 다음 virus의 형태학적 변화를 보기 위하여 0.2% formalin, 0.01M BEI, 대조군으로 나누어 37°C, 30시간 처리 후 검경하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

대조군은 120~150nm 크기의 뚜렷한 envelope를 갖춘 virus로 관찰되었으며 열처리에 의하여 피괴되었다고 생각되는 envelope와 filament도 보였다(사진 A).

그러나 0.2% formalin 처리한 virus 재료에서는 완전한 형태의 virus 입자를 관찰할 수 없었고 파괴된 envelope에서는 projection을 관찰할 수 없어 혈구응집능력의 소실과 일치되는 형태적 변화를 볼 수 있었다(사진 B).

한편 0.01M BEI 처리군은 형태의 변화는 있었으나 envelope를 비롯한 capsid를 지니고 있었고, 핵산이 빠져나가 타원형의 길쭉한 envelope를 볼 수 있었다(사진 C, D).

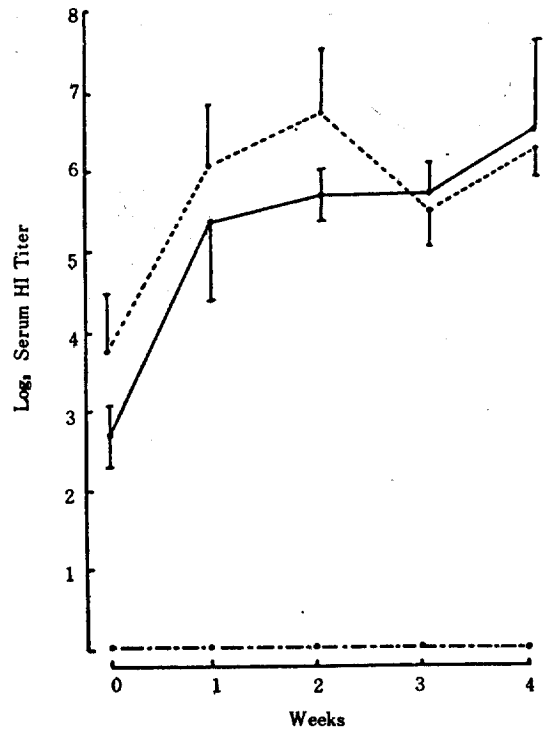


Fig. 4. Ecoster effects of binary ethylenimine-inactivated, $Al(OH)_3$-adsorbed Newcastle disease vaccines ecoster inculated to 12-week-old chickens.
—=Miyadera Newcastle disease vaccine.
···=Bl Newcastle disease vaccine.
-·-=nonvaccinated control.

고 찰

NDV를 불활화하는 물리적인 방법으로는 자외선(Baluda, 1959; Dahlberg와 Simon, 1969), 열처리법이 알려져 있다(Meager와 Burke, 1973). 화학적으로는

formalin(Hofstad, 1953; Dardiri 등 1957; Allan, 1969; Gough와 Allan, 1974; Gough와 Allan, 1975), β-propiolactone (Sullivan 등, 1958; Grun, 1969; Eidson 등 1980; Thayer등, 1983; Russell과 Almeida, 1984)이 가장 흔히 사용되고 있다.

formalin은 불활화시간이 오래 소요되고 높은 농도에서는 면역원성에 손상을 준다. β-propiolactone은 면역원성의 안정성에서는 formalin보다 우수하나 화학제 자체의 안정성을 비롯하여 발암성 그리고 고가이라는 단점이 있어서 새로운 불활화제에 관한 연구가 끊이지 않고 있다.

그 밖에도 NDV의 불활화제로 nitrous acid(Granoff, 1961). nystatin, amphotericin, filipin 같은 polyene 계 항생제 (Ash, 1971), butylated hydroxytoluene이 쓰여진 바 있다.

한편 구제역 virus를 불활화하기 위하여 ethylen imine의 유도체인 N-acethylenimine, N-carbethoxy-ethylenimine, 2-ethylethylenimine, N-acetylpropy-lenimine, N-(2-carbethoxyethylene) ethylenimine, alkoxydiaziridinyphosphine oxide가 이용되었다. (Warrington 등, 1973). 이 제제는 aziridinyl group을 함유하는 mutagen이면서 alkylating agent이다. 이 alkylating agent는 DNA의 guanine N-7 원자에 작용하는 것으로 알려져 있다(Bennett, 1981). 그러나 nucleotropic agent는 핵산의 함유정도에 따라 핵산뿐 아니라 다른 구성분도 손상을 입히는 것으로 알려져 있다(Davis와 Dulbecco, 1980).

binary ethylenimine (BEI) 용액은 쉽게 만들 수 있고 불활화제로서의 BEI의 안전성과 면역원성은 구제역 virus(Bahnemann 등, 1974; Girard 등, 1977)와 돼지 parvovirus (Wrathall 등, 1984)에서 입증된 바 있다. 그리고 BEI는 virus 표면항원 구조에는 최소한의 영향을 주면서 안전하고 고도의 면역을 줄 수 있다. 그러나 NDV의 BEI에 의한 불활화는 시도된 적이 없다.

Bahnemann(1975)의 방법에 따라 만든 0.01M BEI는 본 실험에서 NDV를 37°C에서 3시간 작용으로 불활화하였는데 이는 같은 농도와 조건에서 African swine fever 항원이 3시간 후에 (Scholer, 1982), Bovine viral diarrhea virus가 4시간 후에 (McClurkin과 Coria, 1972), 광견병 virus가 2시간 후에 (Larghi와 Nebel, 1980) 불활화된 것과 시간적으로 유사한 결과를 보였다. 또한 37°C, 0.005M BEI 농도에서는 NDV가 7시간 후에 불활화되었는데 같은 농도, 조건에서 Bahnemann 등(1974)이 구제역 virus 불활화시 9시간 소요되었다고 한 것과 비슷한 반면에 돼지 parvovirus에 대하여 48시간 불활화한 것과는 시간적인 차이가 있었다 (Wrathall 등, 1984). 한편 37°C, 0.001M 농도에서 NDV가 24시간에 불활화된 것은 구제역 virus를 같은 농도와 조건에서 24시간 불활화한 것과 일치하였다. NDV가 25°C와 5°C에서 0.01M, 0.005M, 0.001M, BEI에 대해 거의 반응을 보이지 않았는데, 이런 온도 조건에서 시험한 것이 없는 것으로 보아 이 반응온도는 시간에 우선하는 불활화 조건으로 믿어진다. 한편 BEI를 $Na_2S_2O_3$로 충분히 작용을 정지시킬 수 있었는데 50% embryo infective dose의 측정과정에서 알 수 있었다.

이 실험에서 BEI의 최종농도가 0.01M과 0.005M이 되도록 가한 NDV액을 20% $Na_2S_2O_3$로 최종농도가 2%되게 넣어 반응을 정지시킨 후에도 pH는 각각 9.4±0.1과 9.1±0.1이었는데 이는 NDV가 높은 알카리에서 여러시간 감염력을 유지한다는(Hanson, 1978) 사실로 해서 안정성이나 면역원성에는 별다른 영향을 주지 않거나 또는 그와 같은 virus 재료의 높은 알카리성은 중성이하인 gel에 의하여 보정되는 것으로 믿어진다.

BEI 불활화와 formalin 불활화시에 37°C, 25°C, 4°C에서 여러 농도가 주는 적혈구 응집력의 변화를 시험한 결과 대조군 및 0.01M BEI는 37°C에서 적혈구 응집력의 변화가 거의 없었으나 0.1% formalin은 37°C에서 대조군보다 유의차있게 감소하였으며 ($p<0.01$), 상용농도인 0.2% formalin은 37°C에서 30시간 후에는 적혈구 응집력이 완전히 소실되어 불활화제로서의 formalin은 면역원에 미치는 영향을 암시하여 주었다.

BEI 불활화 $Al(OH)_3$ gel vaccine을 4주령의 병아리에 1차 접종한 면역형성시험에서 Miyadera주 NDV는 log_2를 기준하여 2주와 4주에 HI 최고치인 5.0±1.41에 이르고 7주까지 3이상을 유지하였으며 8주에는 2.8±0.43이었다. B1주 ND vaccine을 접종후 3주에 최고치인 log_2 6±0.71에 이르러 7주까지 4이상을 유지하였으며 8주에는 3.75±0.83이었다. 이 등(1973)은 0.1% formalin으로 37°C, 48시간 불활화한 NDV(교정원) $Al(OH)_3$ gel vaccine 4주령 병아리에 1차 접종하여 1, 2, 4, 6, 8주에 각각 log_2 HI치를 2.2, 5.0, 3.4, 2.4, 0.4로 보고한 것보다는 더 높게 나타난 것으로 보아 BEI로 불활화한 NDV가 formalin으로 불활화한 것보다 hemagglutinin의 부분적인 상실이 적어 좋은 면역을 부여한 것으로 생각된다.

NDV에 대한 HI 역가와 방어능력은 비례함이 알려진 바 있다. 즉 Philips(1973)는 1,042예의 야외혈청에 대한 조사에서 ND로 인한 폐사를 방지하는 데에는

$log_2$5 이상이 요구되며 산란율 감소를 막는데는 $log_2$7 이상의 HI 역가가 필요하다고 지적하였다. 한편 Macpherson과 Feest(1975)는 10,000에 이상의 혈청조사에서 육성기 병아리의 만족할만한 HI 역가는 $log_2$3으로 산란기 닭의 HI 역가는 $log_2$6 이상이어야 한다고 제시하였다. 김 등(1979)은 브로일러 닭에서 $log_2$3 이상일 때 야외상황에서 높은 방어력을 발휘할 것이라 하였다. 이상과 같은 성적으로 미루어 보아 본 실험결과는 접종 후 7주까지인 11주령까지를 육성기로 보고 이 시기까지는 방어능력이상의 항체가 형성 유지된 것으로 볼 수 있다.

1차접종의 시기를 4주령의 병아리로 정한 것은 이 시기에 모체 이행항체가 방어가 이하로 떨어지는 시기이기 때문이다. 그러나 잔여 항체가 병아리에 남아 있을 수 있으며 이 항체가 vaccine 접종 후 첫 주에 역가를 떨어뜨린 것으로 믿어진다.

Miyadera ND vaccine 접종군에서 접종 2주에 3주보다 높게 나타난 것은 개체차에 기인한 것으로 짐작되며 통계학적으로 유의차는 없었지만 Bl NDV vaccine이 Miyadera NDV vaccine 보다 좋게 보인 것은 Bl NDV의 경우 항원성이 Miyadera NDV 보다 좋았기 때문인 것으로 생각된다.

본 실험에서는 adjuvant로서 20% $Al(OH)_3$를 사용하였는데 공시계에 1차적으로 생성된 HI 항체로 미루어 보아 BEI 불활화 ND vaccine용 adjuvant로서 별다른 손색이 없는 것으로 믿어진다. 그러나 2차접종 효과에 대하여는 더 오랜동안 항체가의 유지여부를, 특히 W/O형 백신과 비교해야할 일이 남아 있다.

BEI 불활화 $Al(OH)_3$ gel vaccine을 만들어 1차접종 후 5°C에 8주간 보관후 추가접종하여 얻은 결과는 1차접종에 의한 잔유항체의 정도에 관계없이 Miyadera, Bl NDV vaccine 모두 5 log_2 이상의 높은 항체가를 4주 이상 유지하였고 두 vaccine간의 차이는 없었다. 이와 정(1971)은 1차접종에서 얻은 혈중항체의 잔류는 2차 접종시의 항체가에 큰 영향이 없다고 했으며 Sullivan 등(1958)은 β-propiolactone으로 불활화한 ND vaccine을 3주 후에 추가접종한 실험에서 virus주에 관계없이 항체가 측정과 공격시험에서 차이가 없다고 하였다.

BEI 불활화 $Al(OH)_3$ gel vaccine은 5°C에 보관하여 적어도 시험기간인 8주이상 vaccine이 안정하였는데 이 등 (1965)은 formalin 불활화 $Al(OH)_3$ gel vaccine은 5°C에서 8개월까지는 유효하다 하였으며, 김과 조(1966)는 25개월이상 그 효력이 인정되었다고 했다. 본 시험에 사용한 vaccine의 보존성은 추후 조사되어야 한다고 믿어진다.

시험적으로 제조한 vaccine은 병아리에 쉽게 근육투여할 수 있었고 실험조건하에서 vaccine군과 동거하였던 대조군에서 seroconversion이 없어 NDV가 BEI 처리에 의해 충분히 불활화 될 수 있음을 알 수 있었다. 접종계에서는 BEI에 의한 특이할만한 임상증상이나 체중의 감소, 접종부위에 접종반응이 인정되지 않았다.

이 사실은 Wrathall 등(1984)이 BEI 불활화 oil adjuvant 돼지 parvovirus vaccine을 돼지에 접종하여 안전했다는 성적과 일치하였다.

이 실험에서 BEI 불활화 NDV vaccine에 의한 HI가는 formalin 불활화보다 우수한 것으로 나타났으나 공격시험과 보존시험 등이 수행되어 뒷받침되어야할 것으로 생각된다.

전자현미경적 관찰에 의하여 BEI에 의한 불활화가 formalin에 의한 불활화보다 NDV의 envelope나 capsid에 거의 영향을 주지 않았다. 이것으로 미루어 보아 BEI 불활화 NDV가 formalin으로 불활화된 NDV 보다 항원의 안정성이 우수할 것으로 사료된다.

결 론

Newcastle disease virus를 적합한 온도와 농도, 시간하에서 binary ethylenimine으로 불활화하여 만든 $Al(OH)_3$ 흡착 vaccine을 4주령 병아리에 접종하고 면역 형성을 조사 연구한 실험에 서다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BEI는 37°C의 반응온도에서 NDV를 0.01M은 3시간에 0.005M은 7시간에 그리고 0.001M은 24시간에 불활화 하였다.

2. BEI(0.01M)는 37°C에서 72시간까지 NDV의 적혈구 응집력을 거의 변화시키지 않았으나 0.1% 또는 0.2% formalin은 점진적으로 감소케하여 그 차이를 볼 수 있었다($p<0.01$).

3. BEI(0.01M)로 4시간 불활화하고 $Al(OH)_3$ gel을 첨가한 Bl, Miyadera ND vaccine을 접종받은 두 군의 4주령병아리는 모두 높은 면역원성을 발휘하여 시험기간인 8주간 방어적인 역가를 유지시켰다.

4. BEI(0.01M)로 불활화한 $Al(OH)_3$ gel vaccine을 4주령병아리에 1차 접종한 후 8주에 추가접종하였을 때 booster 효과를 크게 보였다.

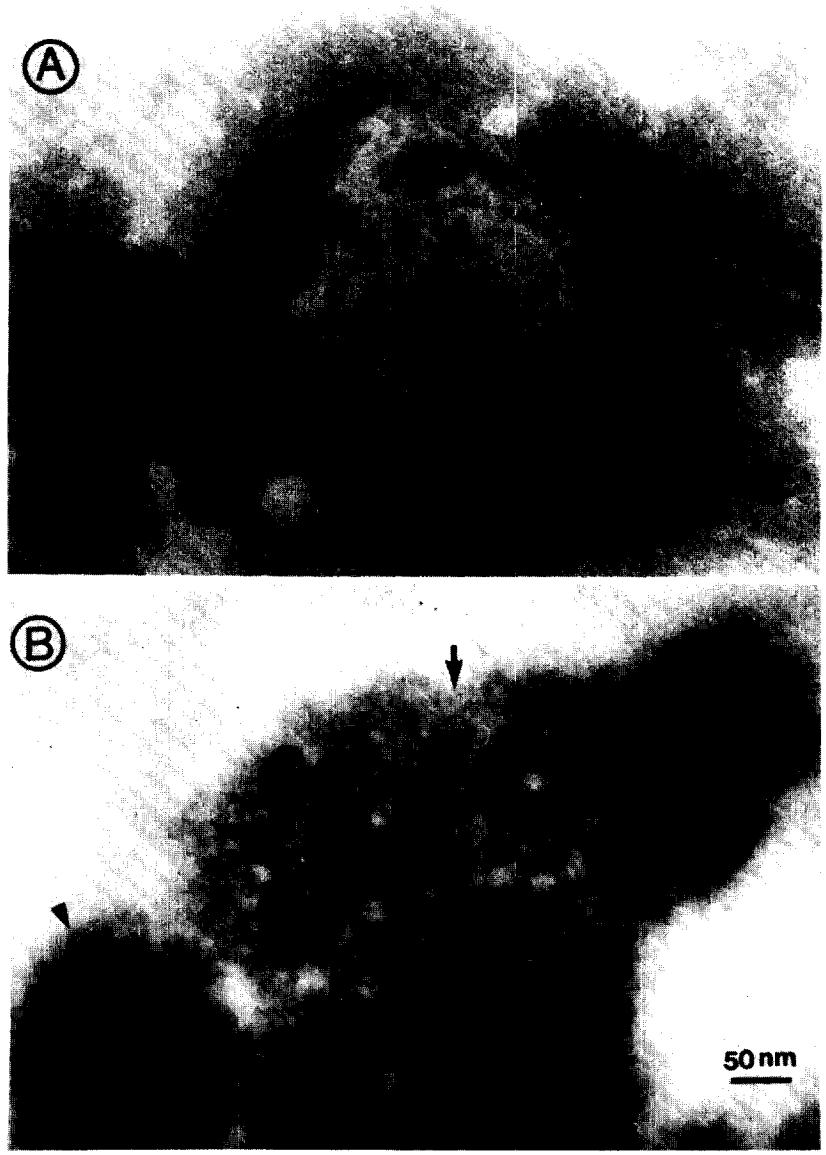
5. BEI (0.01M)와 formalin으로 각각 처리한 NDV를 전자현미경으로 관찰하였던 바 BEI로 처리한 것이 formalin으로 처리한 것보다 envelope와 capsid 등이 현저하게 원형대로 남아 있는 것이 확인되었다.

Legends for figures

Fig. A. Electron micrograph of NDV treated without chemical for 30 hours at 37°C. Note the characteristic nucleocapsid and envelope (arrow).

Fig. B. Electron micrograph of NDV treated with 0.2% formalin for 30 hours at 37°C. Note the aggregate of amorphous NDV particles showing destroyed envelope structure (arrow).

Fig. C, D. Electron micrograph of NDV treated with 0.01M BEI for 30 hours at 37°C. Note the aggregate of NDV particles showing distinct envelope structure (arrow).



참 고 문 헌

1. Allan, W.H.: Response to tissue culture-derived Newcastle disease vaccines in the presence of maternal antibody. Res. Vet. Sci. (1969) 10: 222.
2. Allan, W.H. and Gough, R.E.: A Standard haemagglutination-inhibition test for Newcastle disease. (1) A comparison of macro and micro methods. Vet. Rec. (1974) 95:120.
3. Allan, W.H., Lancaster, J.E. and Toth, B.: Newcastle disease vaccines. FAO Animal Production and Health Series No. 10, FAO, Rome. (1978)
4. Ash, R.J.: Inactivation of Newcastle disease virus by polyenes. Virology. (1971) 43:536.
5. Bahnemann, H.G.: Binary ethylenimine as an inactivant for Foot-and-Mouth disease virus and its application for vaccine production. Arch. Virol. (1975) 47:47.
6. Bahnemann, H.G., Auge de Mello, P., Abaracon, D. and Gomes, I.: Immunogenicity in cattle of Foot-and-Mouth disease vaccines inactivated with binary ethylenimine. Bull. Off. int. Epiz. (1974) 81(11-12):1335.
7. Baluda, M.A.: Loss of viral receptors in homologous interference by ultraviolet-irradiated Newcastle disease virus. Virology. (1959) 7:315.
8. Bennett, L.L. Jr.: Cancer chemotherapy in "The encyclopedia of biochemistry", Willams, R.J., and E.M. Lansford, Jr., Robert E. Krieger Publishing Company, New York. (1981)
9. Dahlberg, J.E. and Simon, E.H.: Physical and genetic studies of Newcastle disease virus: Evidence for multiploid particles. Virology. (1969) 38:666.
10. Dardiri, A.H., Chang, P.W. and Fry, D.E.: Immunity study of three types of Newcastle disease vaccine for broilers and caponettes. Am. J. Vet. Res. (1957) 18:400.
11. Davis, B.D. and Dulbecco, R.: Sterilization and disinfection in "Microbiology" 3rd ed. Davis *et al.* Harper & Row, Publishers, Inc. Maryland. (1980)
12. Eidson, C.S., Villegas, P. and Kleven, S.H.: Field trials with an oil emulsion Newcastle disease vaccine in broiler breeders. Poultry Sci. (1980) 59:702.
13. Garside, J.S.: Newcastle disease vaccination. Vet. Rec. (1962) 74(51):1497.
14. Girard, H.C., Bayramoglu, O., Frol, N. and Burgut, A.: Inactivatilon of O_1 FMD virus by the binary ethylenimine (BEI). Bull. Off. Int. Epiz. (1977) 87 (3-4):201.
15. Gough, R.E., Allan, W.H., Knight, D.J. and Leiper, J.W.G.: The potentiating effect of an interferon inducer (BRL 5907) on oil based inactivated Newcastle disease vaccine. Res. Vet. Sci. (1974) 17:280.
16. Gough, R.E., Allan, W.H., Knight, D.J. and Leiper, J.W.G.: Further studies on the adjuvant effect of an interferon inducer (BRL 5907) on Newcastle disease and avian influenza inactivated vaccines. Res. Vet. Sci. (1975) 19:185.
17. Granoff, A.: Induction of Newcastle disease virus mutants with nitrous acid. Virology. (1961)13:402
18. Grun, J.: Comparison of a beta-propiolactone inactivated four-strain with three single-strain Newcastle disease vaccines. Poultry Sci. (1969) 48(4):1189.
19. Grun, J. and Hudson, G.B.: Comparison of a beta-propiolactone whole embryo Newcastle disease vaccine (one strain) with a beta-propiolactone amnioallantoic Newcastle disease vaccine (four strains). Poultry Sci. (1966) 45:159.
20. Hanson, R.P.: Newcastle disease in "Diseases of Poultry", 7th ed. Hofstad *et al.* Iowa State Univ. Press, Iowa. (1978)
21. Hofstad, M.S.: Immunization of chickens against Newcastle disease by formalin-inactivated vaccine. Am. J. Vet. Res. (1953) 14:586.
22. Macpherson, I. and Feest, A.: Newcastle disease haemagglutnation inhibition titres found on routine sampling of poultry in 1974. Vet. Rec. (1975) 97:169.
23. McClurkin, A.W. and Coria, M.F.: Bovine viral diarrhea virus (BVDV) serotiters stimulated in cattle in isolation and under field conditions by inactivated BVDV vaccine. Proceedings of the United States Animal Health Association.

(1979) 83:223.

24. Meager, A. and Burke, D.C.: Studies on the structural basis of the RNA polymerase activity of Newcastle disease virus particles. J. Gen. Virol. (1973) 18:305.
25. Phillips, J.M.: Vaccination against Newcastle disease an assessment of haemagglutination inhibition titres obtained from field samples. Vet. Rec. (1973) 93(22):577.
26. Reed, L.J. and Muench, J.: A Cimple method of estimating 50 percent end points. Amer. J. Hyg. (1938) 27:493.
27. Russell, P.H. and Almeida, J.D.: A regular subunit pattern seen on non-infectious Newcastle disease virus particles. J. Gen. Virol. (1984) 65:1023.
28. Scholer, G.M.: Kinetics of inactivation of African swine fever antigen with binary ethylenimine. Proceedings of the United States Animal Health Association. (1982) 86:253.
29. Sullivan, J.F., Gill, E. and Somer, A.M.: Immune response of chickens to beta-propiolactone-killed Newcastle disease vaccines. Am. J. Vet. Res. (1958) 19:483.
30. Thayer, S.G., Eidson, C.S. and Kleven, S.H.: Multivalent inactivated virus oil emulsion vaccines in broiler breeder chickens. 1. Newcastle disease virus and infectious bursal disease virus bivalent vaccines. Podultry Sci. (1983) 62:1978.
31. Warrington, E., Cunliffe, H.R. and Bachrach, H.L.: Derivatives of aziridine as inactivants for Foot-and-Mouth disease virus vaccines. Am. J. Vet. Res. (1973) 34(1):1087.
32. Wrathall, A.E., Wells, D.E., Cartwright, S.F. and Frerichs, G.N.: An inactivated, oil-emulsion vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. Res. Vet. Sci. (1984) 36:136.
33. 김덕원, 조태행 : $Al(OH)_3$ gel 첨가 Newcastle disease vaccine의 보존 기간에 관한 시험. 농사시험 연구보고. (1966) 9(3):81.
34. 김선중, 이영옥, 김순재, 전우상, 박근식 : 국내계군의 뉴캣슬병에 대한 면역상황 조사, 시험연구보고서, 가축위생연구소. (1979) (p.243.
35. 이병도, 김덕원, 조태행 : $Al(OH)_3$ gel 첨가 ND vaccine의 검정에 관한 시험. 농사시험 연구보고. (1965) 3(3):101.
36. 이영옥, 안수환, 최대영 : Adjuvant가 닭의 항체형성에 미치는 영향. 농사시험연구보고, 제15집 (가축위생 편) (1973) p.45.
37. 이창구, 정병탁 : 성계에 대한 뉴캣슬병 생독 음수예방약의 면역효력에 관한 시험. 농사시험 연구보고, 제 4집(가축위생 편)(1971) p.5.