

닭의 뉴캐슬·전염성 기관지염 바이러스 혼합 불활화 오일 에멀션 백신의 생산시험

전윤성·김선중·서익수
서울대학교 수의과대학
(1989. 12. 30 접수)

Studies on the combined inactivated oil emulsion vaccine of Newcastle disease and avian infectious bronchitis in chickens

Yun-seong Jeon, Sun-joong Kim, Ik-soo Seo
College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received Dec 30, 1989)

Abstract: A single inoculation of combined vaccines of Newcastle disease and avian infectious bronchitis of chicken, in a form of gel-oil emulsion type (gel-OEV) was tested their immunogenicity in chickens. The results were summarized as follows:

1. Average minimum and maximum ELISA antibody titers of ND were recorded 2407 and 13144 respectively. In the case of IB, 1824 and 4496 were recorded as minimum and maximum titers.

2. The distribution of average proportional groups, in the lowest and the highest, were 1.6 and 7.0 in ND ELISA and 1.4 and 2.8 in IB ELISA antibody titers.

3. ND ELISA antibody titers were significantly increased upto 7th week after the vaccination. On the other hand, IB ELISA antibody titers were raised upto 4th week after the vaccination.

Key words: Newcastle disease, avian infectious bronchitis, combined gel-OEV, immunogenicity.

서 론

닭의 뉴캐슬병(ND)과 전염성기관지염(IB)에 대한 최근의 공동백신법은 다음과 같다. 부화후 1일부터 3주 내외의 초생후에 생바이러스(H120 IBV, B1 NDV) 백신을 1차 접종하고 나서 부화후 8주, 16주 또는 20주경에 2차로 H120이나 M41 IBV와 B1 NDV로 구성된 불활화오일 에멀션 백신(OEV)을 접종한다.^{1,2} 1차 접종경로는 여건에 따라 다르나 피하, 비강적하, 안구적하, 기관내 흡입, 분무 그리고 음수법 등으로 접종하나 피하와 분무법이 선호되고 있다. 예방효과는 모체 이행항체의 수준에 따라 심히 영향을 받는다.^{3,4} 2차 접종은 OEV로 하는데 시기는 부화후 8주, 16주 또는

20주에 근육내에 접종한다. 이와 같은 백신법은 1차 접종으로 생바이러스에 의한 세포성 면역과 체액성 면역이 형성되며 2차 OEV 접종으로 다른 어떤 백신보다 고역가이면서 소장이 오래 지속되는 체액 면역을 유도한다.⁴

그런데 2차접종용 백신인 OEV에 관하여는 제조회사의 노하우에 속하는 것이여서 새 상품을 창출하는데 어려움이 많다. 특히 ND·IB 혼합백신같은 2가 백신의 경우 접종양으로 보아 한가지 면역원이 최소 4배로 희석되는 까닭에 IBV의 면역원성을 발휘 하는데는 어려운점이 있다. 따라서 IB 면역원은 한외여과나 초원심분리 또는 회학적 방법으로 농축해야 하는 등 생산에 부담을 준다.

이 연구에서는 ND·IB 혼합백신을 제조하는데 필요한 보다 효과적인 불활화법, 농축법 그리고 오일 에멀션제를 창출하여 백신의 면역 효과를 높일수 있게 하였다.

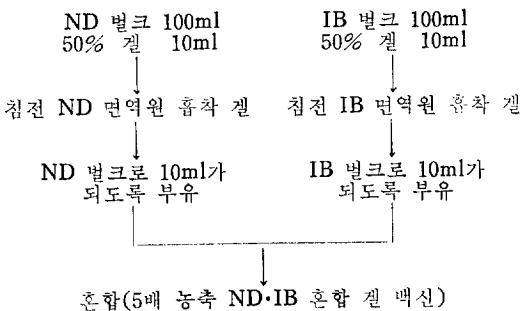
재료 및 방법

바이러스 : IB는 M41주를 그리고 NDV는 B1주 바이러스를 백신 제조에 사용하였고, 모두 계태아에서 증식한 바이러스를 사용하였다.

병아리 : 백신의 면역원성 시험에 주령이 다른 이리군의 병아리를 사용하였다. 병아리는 모체이행항체가 소멸되는 부화후 3 내지 4주가 경과한 것을 공시하였다.

바이러스의 불활화 : 계태아원 NDV와 IBV 재료를 각각 달리 BEI로 불활화 하였다. 0.1M BEA를 0.1N NaOH 용액에 녹이고 37°C에서 1시간에 걸쳐 BEI를 만들었다. BEI 1 : 바이러스 9의 비율로 섞고 37°C에서 NDV는 3시간 IBV는 4시간 불활화 하였다. 불활화한 백신 벌크를 20% Na thiosulfate와 10 : 1의 비율로 섞고 BEI를 중화함으로써 불활화 과정을 끝마쳤다.

수산화알루미늄 흡착 : ND와 IB 백신벌크에 대하여 최종농도가 각각 5%가 되도록 50% 수산화알루미늄겔을 가지고 냉장고에서 12시간 흡착하였다. 이것을 2000 rpm 10분 원심하여 상층을 버리고 침전한 면역원 흡착 겔을 회수하였다. 이 겔을 각각 ND와 IB 벌크로 10배 농축되도록 부유하고 나서 두 벌크를 혼합하여 최종 5배 농축된 혼합 겔백신을 만들었다. 한 벌크를 100ml 기준산아 제조과정을 도해하면 다음과 같다.



겔·오일 에멀션 백신(gel-OEV) : 에멀션 생성 오일로는 파라핀 오일(주 구성 분자의 탄소수 14 내지 17개)를 사용하였고 에멀시파이어로는 Base 5175(HLB 8.5)와 Span 80(HLB 4.3)을 사용하였다. 오일과 에멀시파이어를 일정 비율로 섞은 오일계와 벌크의 비율이 1 : 1이 되게 교반혼입하여 겔·오일 에멀션 백신을

만들었다.

백신접종과 혈청채취 : 모체이행항체가 없고 부화 주령이 다른 여러 시험군의 병아리에 ND·IB gel OEV를 태피부 근육내에 접종하였다. 부화후 1일 전후 병아리에는 0.2ml를 그리고 6주 전후의 것에는 0.5ml를 접종하였다. 가검혈청은 개체당 1회에 한하여 채취하여 냉동보관하면서 ELISA법 항체검정에 사용하였다.

NDV와 IBV의 닭 항체검출 : Agritech system 회사제, Flock Chek Newcastle disease virus antibody test kit와 Flock Chek Infectious bronchitis virus antibody test kit를 사용하는 ELISA법으로 시험계의 해당항체를 측정하였다. 반응술식은 대략 다음과 같다.⁵

1. 가검혈청을 항원흡착 플레이트에 넣고 실온에서 30분 반응케 하였다.
2. 반응물을 버리고 증류수로 3~5회 씻어냈다.
3. 항답 산양혈청-horseradish peroxidase(HRPO)를 분주하고 실온에서 30분간 반응케 하였다.
4. 앞에 적은 2번의 세척과정을 반복하였다.
5. 발색제인 O-phenylenediamine · 2HCl(OPD)액을 첨가하고 실온에서 15분간 반응케 하였다.
6. 1N HCl를 첨가하여 반응을 중지 시켰다.
7. 흡수파장 490nm에서 흡광도를 측정하고 역가를 계산하였다.

결 과

ND·IB 혼합 불활화백신(gel-OEV)을 4주령 병아리에 1회 접종하고 주별 혈청을 채취하여 ELISA법으로 ND와 IB에 대한 항체를 검출하였다. 그러기 위하여 백신 접종군은 70수 이상의 병아리를 두었고, 대조군은 40수 이상을 두고 실험하였다. 접종군은 ND군과 IB군을 매주마다 5수씩을 전체혈하여 거기에서 얻은 혈청을 항체가 측정에 사용하였다. 대조군 역시 매주 5수씩을 전체혈하여 항체 검정에 사용하였다. 이 실험에서 얻은 성적은 Table 1과 2와 같다.

1. ND ELISA 평균항체가는 최저 2407에서 최고 13144에 이르렀고, IB ELISA 평균항체가는 최저 1824에서 최고 4496에 이르렀다.
2. 평균 proportional group은 ND ELISA의 경우 최저 1.6에서 최고 7.0을 기록하였고, IB ELISA군은 최저 1.4에서 최고 2.8의 분포를 보였다.
3. ND ELISA 항체가는 접종후 7주까지 계속 상승하였고 IB ELISA 항체가는 접종후 4주까지 계속 상승하는 경향을 보였다.

Table 1. ELISA antibody titers of ND induced by ND-IB combined vaccine in chickens

Serum sapmle	Chicken No.	Raw OD	S/P ratio	Titers	Proportional group	
1st week	1	0.147	1.82	4402	3	mean: 4.8
	2	0.152	2.08	5081	3	
	3	0.122	0.54	1167	1	
	4	0.303	9.82	27633	12	
	5	0.177	3.36	8582	5	
	Control (mean)	0.086	0.163	329	0.25	
2nd week	1	0.173	3.15	8012	5	mean: 1.6
	2	0.139	1.41	3332	2	
	3	0.118	0.33	692	1	
	4	0.110	-0.08	0	0	
	5	0.098	-0.69	0	0	
	Control (mean)	0.087	0.180	346	0	
3rd week	1	0.125	0.69	1534	1	mean: 2.4
	2	0.169	2.98	7446	4	
	3	0.134	1.15	2678	2	
	4	0.149	1.92	4673	3	
	5	0.139	1.41	3332	2	
	Control (mean)	0.114	0.645	1491	1.25	
4th week	1	0.159	2.44	6046	4	mean: 4.0
	2	0.157	2.33	5769	3	
	3	0.151	2.03	4945	3	
	4	0.172	3.10	7870	4	
	5	0.191	4.08	10599	6	
	Control (mean)	0.097	0.060	104	0	
5th week	1	0.129	0.90	2036	2	mean: 4.8
	2	0.263	7.77	21405	11	
	3	0.185	3.77	9730	5	
	4	0.143	1.62	3864	5	
	5	0.160	2.49	6185	4	
	Control (mean)	0.085	0.140	267	0	
6th week	1	0.187	3.87	10019	6	mean: 7.0
	2	0.173	3.15	8012	5	
	3	0.289	9.10	25438	12	
	4	0.209	5.00	13240	7	
	5	0.180	3.51	9011	5	
	Control (mean)	0.100	0.390	832	1	
7th week	1	0.141	1.51	3597	2	mean: 4.2
	2	0.150	1.97	4809	3	
	3	0.153	2.13	5218	3	
	4	0.264	7.82	21559	11	
	5	0.150	1.97	4809	3	
	Control (mean)	0.138	1.04	2510	1.75	
Zero time (mean)		0.083	1.103	195	0	

Table 2. ELISA antibody titers of IBV induced by ND-IB combined vaccine in chickens

Serum sample	Chicken No.	Raw OD	S/P ratio	Titers	Proportional group	
1st week	1	0.170	1.09	2524	2	mean: 1.4
	2	0.211	1.54	3670	2	
	3	0.097	0.30	606	1	
	4	0.118	0.52	1134	1	
	5	0.120	0.55	1186	1	
	Control (mean)	0.061	-1.02	0	0	
2nd week	1	0.102	0.35	729	1	mean: 2.4
	2	0.382	3.41	8723	5	
	3	0.147	0.84	1898	1	
	4	0.178	1.18	2745	2	
	5	0.236	1.81	4385	3	
	Control (mean)	0.063	-0.93	0	0	
3rd week	1	0.189	1.30	3051	2	mean: 2.1
	2	0.130	0.66	1446	1	
	3	0.253	2.00	4877	3	
	4	0.268	2.16	5314	3	
	5	0.221	1.65	3955	2	
	Control (mean)	0.084	-0.185	138	0	
4th week	1	0.208	1.51	3585	2	mean: 2.8
	2	0.155	0.93	2114	2	
	3	0.285	2.35	5813	3	
	4	0.311	2.63	6583	4	
	5	0.236	1.81	4385	3	
	Control (mean)	0.070	-0.68	0	0	
5th week	1	0.164	1.03	2359	2	mean: 2.0
	2	0.160	0.98	2250	2	
	3	0.170	1.09	2524	2	
	4	0.112	0.46	980	1	
	5	0.223	1.67	4012	3	
	Control (mean)	0.070	-0.668	0	0	
6th week	1	0.149	0.84	1898	1	mean: 1.6
	2	0.210	1.53	3642	2	
	3	0.108	0.42	879	1	
	4	0.220	1.64	3926	2	
	5	0.161	0.99	2277	2	
	Control (mean)	0.067	-0.790	0	0	
7th week	1	0.187	1.28	2995	2	mean: 1.8
	2	0.157	0.90	2033	2	
	3	0.175	1.15	2662	2	
	4	0.110	0.44	930	1	
	5	0.203	1.49	3444	2	
	Control (mean)	0.074	-0.525	0	0	
Zero time (mean)		0.061	-1.00	0	0	

ND·IB 혼합 불활화 OEV를 생산 과정별로 살펴보면 불활화, 농축, oil emulsion의 적응의 세 단계로 대별할 수 있다.

본 연구에서는 NDV와 IBV를 모두 BEI로 불활화하였다. 0.1M BEI는 NDV를 3시간만에 불활화하며 면역원성을 좋게 유지한다.⁶ 그리고 IBV는 4시간에 불활화 하였다. BEI는 바이러스의 핵산에만 작용하고 면역원인 capsid 단백질에는 영향을 주지 않으면서 바이러스를 불활화 한다. B1주 NDV는 포르말린을 비롯한 그 밖의 불활화제에 의한 면역원성유지에 별 문제가 없다. 그러나 IBV는 바이러스 주와 불활화제에 따라 면역원성에 심한 차이를 보인다. IBV는 일반적으로 포르말린⁷과 자외선⁸에 대하여서는 면역원성을 상실하며 BPL⁹ 불활화는 좋은 것으로 알려져 있다. BEI에 대해서는 본 연구에서 처음으로 시도되었다. 그리고 M41 IBV를 백신주로 이용한 이유는 이것으로 만든 BPL 불활화 백신이 널리 이용되고 있으나 BPL 불활화에는 적당치 않은 바이러스로 알려져 있기 때문이다.¹⁰

불활화한 백신 벌크는 이를 농축하지 않고 사용하였을 때 면역원성을 발휘하지 못한다. 이 사실은 NDV보다 IBV에서 더욱 그러하기 때문에 주로 한외여과법으로 IBV벌크를 농축한다. 그러나 본 연구에서는 수산화알루미늄겔법을 이용하는 간편한 방법을 적용하였다. 이 겔의 IE pH는 9.0으로 중성 pH에서 양전하되기 때문에 중성 pH에서 음전하 되어 있는 바이러스를 흡착하기에 좋고 gel-OEV를 만들 수 있는 장점이 있다.¹¹

유상의 선정기준은 에멀시파이어의 HLB가 5 이하인 것과 5 이상인 것을 합제하여 6~8이 되도록 하는 일과, 점조도가 낮은 광물유인 파라핀오일에 두었다.¹² gel-OEV의 수상은 gel과 부유액이 되며 그것을 유상이 써서 W/O형 에멀션으로 만든다. 여기에서 gel외에 유상을 첨가한 까닭은 양자의 면역자극기전이 서로 다르고 유상으로 인하여 합체 생성과 소장이 보다 이상적으로 진행되기 때문이다.

백신 접종제의 면역효과를 살펴보면 ND에 대한 면역이 더 좋은 반면에 IB에 대한 면역은 ND보다 덜 좋았다. 이 이유는 IBV 자체의 낮은 면역원성에도 기인하지만 생바이러스 백신으로 기초 면역한 다음 gel OEV로 2차 또는 booster 면역을 하지 않는 데 그 원인이 있다고 본다. 이와 같은 원인은 높은 합체 역가 형성과 오랜 합체 수준의 지속에 모두 연관 된다고 믿

어진다.⁴

결론

ND·IB의 혼합불활화 백신(gel-OEV)의 생산을 위한 시험과 시험생산한 백신을 병아리에 1회 접종한 다음 주별로 ND와 IB의 합체생성상을 ELISA법으로 검사한 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다. 즉 계태아원 NDV(B1)와 IBV(M41)재료를 BEI로 불활화한 다음 이것을 수산화알루미늄겔에 흡착하여 농축하고 나서 겔벌크를 W/O형 OEV로 만든 혼합백신은 ND와 IB에 대한 합체형성을 가능케 하였다.

참고 문헌

1. Gough RE, Allan WH, Nedelciu D. Immune response to monovalent and bivalent Newcastle disease and infectious bronchitis inactivated vaccine. *Avian pathology* 1974; 6, 131-142.
2. Box PG, Beresford AV, Roberts B. Protection of laying hens against infectious bronchitis with inactivated emulsion vaccines. *Veterinary Record* 1980; 106, 264-267.
3. Raggi LG, Lee GG. Influence of age and congenital immunity upon immunization with avian infectious bronchitis vaccine. *J Immunol* 1958; 81, 155-160.
4. Darbyshire JH, Peters RW. Humoral antibody response and assessment of protection following primary vaccination of chicks with maternally derived antibody against avian infectious bronchitis virus. *Res Vet Sci* 1985; 38, 14-21.
5. *Agritech manual for ELISA test kit*. Portlan: Maine 04101.
6. 박봉균, 전용성, 이영순 등. Binary ethylenimine 으로 불활화한 Newcastle disease virus의 항원성과 면역원성에 관한 연구. *대한수의학회지* 1985; 25, 155-165.
7. Woernle H. Impfuersuche mit Absorbat-vakzine bei Infectiösen Bronchitis des Huhnes. *Mh Tierheilk* 1961; 13, 136-142.
8. Hofstad MS. Infectious bronchitis. *Prog Rpt*, Iowa: Iowa State Univ, 1952.
9. Christian RT, Mack W. An experimental infectious bronchitis virus vaccine inactivated with beta-propiolactone. *Poult Sci* 1957; 36, 1177-1181.

10. Coria MF. Avian infectious bronchitis virus: serologic response of chickens to seven beta-propiolactone-inactivated strains. *Avian Dis* 1972; 16, 1103-1108.
11. Bunn TO Nervic RM, Pemberton JR. Metallic salts as adjuvants for veterinary biologics. In *Advances in carriers and adjuvants for veterinary biologics*. Iowa: Iowa State Univ Press, 1986; 105-113.
12. Becher P. Emulsification. In: Schik MJ, ed. *Nonionic Surfactants*. New York: Marcel Dekker Inc, 1966; 604-625.