

국내 분리주를 이용한 오리 바이러스성 간염 생백신주의 개발

성환우 · 김재홍 · 송창선 · 한명국 · 이운정 · 모인필 · 김기석

국립수의과학검역원
(2000년 2월 16일 접수)

Development of a live vaccine strain of duck viral hepatitis using a Korean isolate

Haan-woo Sung, Jae-hong Kim, Chang-seon Song, Myung-guk Han,
Youn-jeong Lee, In-pil Mo, Ki-seuk Kim

National Veterinary Research and Quarantine Service, Ministry of Agriculture & Forestry
(Received Feb 16, 2000)

Abstract : Duck viral hepatitis is an acutic, highly infectious viral disease of young ducklings. The most practical means for controlling duck viral hepatitis is the vaccination of ducklings or of a breeding stock.

We attempted to develop a vaccine strain of duck hepatitis virus (DHV) using a Korean isolate by serial chicken embryo passages. The propagation of DHV in chicken embryos was carried 140 passages.

After the 50th passage, of which the virus was non-pathogenic for ducklings, approximately every 20th passage of the virus was tested for vaccinal efficacy. Both the 70th and 90th passage of the virus gave good protection against challenge infection to a DHV-DRL reference strain(type 1) and a virulent Korean isolate. The 110th, 125th and 140th passage of the virus were less protective than the 70th and 90th passage, which means that more than 110th passage may lead to over-attenuation of the virus.

Ducklings vaccinated with the chicken-embryo-adapted virus by oral, intramuscular or eye drop administration showed earlier resistance to challenge infection from 3 to 7 days postvaccination. Of the above methods, ducklings vaccinated intramuscularly presented the most rapid resistance against challenge.

The minimum immune dose of the chicken-embryo-adapted virus in ducklings was also studied. Ducklings inoculated with a dose of $10^{2.0}$ ELD₅₀ and below were not fully protected against challenge with a virulent DHV, showing a protection rate of 67% to 73%, but ducklings inoculated with a dose of $10^{3.0}$ ELD₅₀ and over were completely protected.

The virus yield of the chicken-embryo-adapted DHV was examined at 24hrs and 48hrs of the incubation time in the allantoic fluid, embryo head and embryo minus head of the embryonating egg. In all three components, the titer of the virus was higher at 48 hours than that at 24 hours after incubation. And the titer of the virus was higher in the embryo minus head, embryo head and the allantoic fluid, in order.

Field trials for evaluating the efficacy of the attenuated DHV as a live vaccine were done in duck farms with about 25% mortality of flocks resulting from duck viral hepatitis. After the use of the experimental vaccine, the mortality due to duck viral hepatitis was dramatically reduced in the farms.

These results indicated that the attenuated DHV using a Korean isolate could be a good candidate as a live vaccine strain of DHV in Korea.

Key words : duck hepatitis virus, attenuation, vaccine, protection.

서 론

오리 바이러스성 간염은 3주 이하의 어린 오리에서 발생되며 병의 경과가 매우 빠르고 폐사율도 높은 질병으로 성숙한 오리에서도 감염은 되지만 질병으로 인한 피해는 나타나지 않는다^{1,2}.

폐사율은 감염일령에 따라 다양하지만 1주 이내의 어린 오리에 감염될 경우에는 95%까지 나타나기도 한다. 이 질병의 예방은 주로 백신사용에 의존하며 백신접종은 종오리(parent stock)를 고도로 면역시켜 감수성이 있는 어린 일령때 수동면역을 부여하는 종오리 면역법을 이용하거나 혹은 어린 일령때 백신을 접종하는 능동면역법을 이용하고 있다³. 백신은 계태아에서 약독화한 생백신과 불활화 오일백신이 개발되어 있지만 불활화 오일백신은 항체형성능이 생백신보다 좋지 못한 것으로 알려져 있다⁷. 계태아에서 약독화한 생백신은 백신효과가 아주 우수하나 오리에 역계대(back passage)될 경우에는 병원성이 회복되는 단점이 있어 발생이 상재화한 지역에 사용하는 것이 바람직하다^{12,13}.

최근에 국내에서도 이와 오리농장으로부터 오리 간염 바이러스(Duck hepatitis virus : DHV)가 다수 분리되고 있으며 병원성이 매우 높은 것으로 확인되고 있다¹⁴. 또한 국내 분리주는 DHV type 1에 속하며 계태아에서 연속 계대배양한 결과 병원성이 떨어지는 것으로 나타났다¹⁵.

본 실험에서는 병원성이 소실된 이들 약독주중 면역원성이나 방어능이 우수한 생백신주를 선발하고자 시험하였다.

재료 및 방법

백신주 선발 및 표준바이러스 : 백신개발에 사용한 계태아 순응주는 국내에서 분리된 DHV-HSB를 계태아에서 연속 계대배양하여 병원성이 소실된 계대주¹⁵를 사용하였다. 면역원성 시험이나 방어능 시험에 사용한 공격접종용 바이러스는 ATCC로부터 구입한 DRL-62주(VR1313)를 사용하였다.

시험접종용 오리 : 시험에 사용한 오리는 DHV에 대한 항체음성인 일반 실용오리를 구입하여 사용하였다.

계태아 순응주의 계대별 방어능 시험 : 70대에서 140대까지 계태아에 계대된 순응주를 대상으로 1일령 Pekin duck에 마리당 $10^{2.5}$ ~ $10^{4.5}$ EID₅₀씩 경구접종하였다. 5일령때 비접종 대조군과 함께 표준주 DRL-62로 마리당 $10^{4.5}$ EID₅₀씩 구강으로 공격접종한 뒤 2주간 사육하면서 폐사수를 조사하였다.

접종경로별 방어능 : 1일령 Pekin duck에 계태아에서 125대 계대된 순응주를 마리당 $10^{3.0}$ EID₅₀씩 경구접종, 근육접종 및 점안접종으로 각각 접종하였다. 백신접종 1, 3, 5, 7일후 DRL-62 virus로 비백신 대조군과 함께 수당 $10^{4.3}$ EID₅₀씩 구강으로 공격접종한 후 2주간의 생존

수를 조사하였다.

최소면역량 측정 : 1일령 Pekin duck에 100대 계대된 시험백신주를 마리당 $10^{1.0}$ 에서부터 $10^{5.0}$ ELD₅₀로 경구 접종한 후 5일령때 DRL-62 바이러스로 수당 $10^{4.3}$ EID₅₀ 씩 구강으로 공격접종하여 2주간의 방어율을 조사하였다.

안전성 시험 : 1일령 Pekin duck에 100대 계대된 시험백신주를 각각 1수분($10^{3.5}$), 10수분($10^{4.5}$), 100수분($10^{5.5}$ EID₅₀)으로 음수접종한 실험군과 병원성 국내분리주를 접종한 실험군 및 무접종 대조군을 대상으로 10일간의 폐사수를 조사하였다.

야외 농장에서의 백신 효능시험 : 오리 바이러스성 간염이 발생되고 있는 야외 농장에서의 시험백신의 효능을 알아보기 위해 발생농장을 대상으로 백신효능 시험을 수행하였다. 즉, 부화장에서 갓 부화한 1일령 오리에게 자동 주사기를 이용하여 100대 계대된 시험백신주를 $10^{3.5}$ EID₅₀/0.2ml 되게 하여 마리당 0.2ml씩 근육으로 접종하였다. 농장에 이동후 과거의 방법과 동일하게 사육하면서 3주령까지의 폐사수를 비교하였다.

계태아 각 부위별 백신주의 증식능 : 계태아의 각 부위별 DHV 증식을 조사하였다. 즉, 8일령의 SPF 종란의 요막강에 계태아 순응주를 $10^{3.5}$ ~ $10^{5.5}$ EID₅₀/0.2ml 용량으로 종란당 0.2ml씩 접종하여 24시간 및 48시간을 배양한 후 요막액, 계태아 머리, 계태아 몸통을 각각 채취하여 이들에서의 바이러스 역가를 조사하였다.

결과 및 고찰

계태아 순응주의 계대별 방어능 시험 : 70대에서 140대 계대된 순응주를 대상으로 계대별 방어능을 조사한 결과, 90대 이하의 계대주는 접종량에 관계없이 모두 100%의 방어능이 있는 것으로 나타났다. 그러나 110 계대주는 마리당 $10^{3.5}$ EID₅₀ 이상에서는 모두 100% 방어되었으나 $10^{2.5}$ EID₅₀에서는 80%만 방어능이 나타나 낮은 접종량에서는 방어능이 감소하는 것으로 나타났다. 또한 125대나 140대 계대주에서는 마리당 $10^{4.5}$ EID₅₀에서도 100%의 방어능이 나타나지 않아 계대수가 높아질수록 방어능이 감소하는 양상을 보여주었다(Table 1). Woolcock와 Crighton¹²은 계태아에 55대 계대된 기존 백신주 Rispens H55의 안전성을 확보하기 위하여 계태아에 추가로 계대하여 85대주의 바이러스를 작성하였다. 그러나 85대 계

대주는 병원성 회복에 대한 안전성은 있었지만 방어능이 감소한다는 사실을 확인한 바 있다. 또한 Woolcock와 Crighton¹³은 Quodling 주를 계태아에 40, 50, 60, 70, 80, 90대 계대한 결과 80대 이후부터 방어능이 감소하는 것을 확인하여 계대수가 많아지면 over attenuation에 의하여 오히려 방어능이 감소될 수도 있음을 시사하였다. 본 실험에서는 110대 이후 계대된 바이러스는 방어능이 감소하는 양상을 보여 계대수가 많아지면 면역원성이 감소한다는 이들의 결과와 유사하였다. 본 실험에서 90대 계대된 계대주는 바이러스 접종량에 관계없이 모두 100%의 방어능이 있는 것으로 나타났으며 110대 이후 계대주는 면역원성이 감소하는 양상을 보였다. 따라서 방어능이 우수한 백신주는 110대 이전 계대주를 선발하여 사용하는 것이 타당할 것으로 판단되었다.

Table 1. Comparison of protectivity of an attenuated strain of DHV isolate in a day-old Pekin ducklings according to chicken embryo passage levels¹⁾

Passage levels	Vaccination dose (EID ₅₀ /duck)		
	$10^{2.5}$	$10^{3.5}$	$10^{4.5}$
HSB 70th	15/15 ²⁾ (100)	15/15(100)	15/15(100)
HSB 90th	15/15(100)	15/15(100)	15/15(100)
HSB 110th	12/15(80)	15/15(100)	15/15(100)
HSB 125th	12/15(80)	13/15(87)	14/15(93)
HSB 140th	10/15(67)	10/15(67)	12/15(80)
Unvaccinated control		1/2(4)	

¹⁾ Ducklings were inoculated orally at a day-old and challenged orally 5 days later with $10^{4.3}$ EID₅₀ of DHV DRL-62

²⁾ No. of the survived/No. of the challenged(%)

접종경로별 방어능 : 계태아 순응주를 1일령때 각각 경구접종, 근육접종 및 점안접종하고 1, 3, 5, 7일후 공격접종하여 백신접종 경로에 따른 방어능을 조사하였다. 음수접종의 경우 백신접종 3일과 5일후 방어율이 각각 33%와 82%로서 백신접종 3일 후부터 방어능이 나타나기 시작하여 7일 후에는 100% 방어능이 발휘되었다. 반면 근육접종의 경우에는 백신접종 3일후 방어능이 83%로 같은 시기의 음수접종법 방어능보다 높은 것으로 나타났다. 또한 근육접종법은 5일 후에 100% 방어능이 나타나서 방어능 발휘시간에서도 음수접종법보다 빠른 것

Table 2. The protective efficacy of an attenuated strain according to the route of vaccination

Challenge intervals ¹⁾ (DPV)	Nonvaccinated control	Route of vaccination ²⁾		
		Oral	Intramuscular	Eye-drop
1	0/12 ³⁾ (0%)	1/12(8%)	1/12(8%)	0/12(0%)
3	0/12(0%)	4/12(33%)	10/12(83%)	7/12(58%)
5	0/10(0%)	9/11(82%)	11/11(100%)	7/10(70%)
7	0/9(0%)	12/12(100%)	12/12(100%)	9/9(100%)

¹⁾ Challenged orally with $10^{4.3}$ EID₅₀ of DHV DRL-62

²⁾ Ducklings were vaccinated with $10^{3.6}$ EID₅₀ per duck of an attenuated strain (HSE CE125) at a day old.

³⁾ No. of the survived/No. of the challenged.

DPV: days postvaccination.

으로 나타났다(Table 2). 점안접종의 경우에도 방어능 발휘시간에서는 근육접종법보다 늦었지만 7일 후에는 100%의 방어능이 있는 것으로 나타났다. Hwang¹⁾은 81대 계대된 약독주를 이용하여 1일령 오리에 경구접종, 근육접종, 점안접종 및 발바나 접종으로 각각 백신을 접종후 공격접종한 결과 네가지 접종법 모두 3~5일 이내에 방어능이 발휘됨을 확인하였으며 경구접종으로써 근육접종과 동일한 방어능을 확보하기 위해서는 접종량이 10배 더 많아야 됨을 확인한 바 있다. 본 실험에서도 DHV 백신접종법으로는 음수접종, 근육접종, 점안접종법 모두가 가능한 것으로 나타났다. 음수접종법은 근육접종이나 점안접종에 비하여 백신접종이 간편한 장점이 있으므로 일반적으로는 이 방법으로 백신을 접종하면 무난할 것으로 판단된다. 그러나 DHV 발생일령이 매우 빠른 농장의 경우에는 음수접종법이나 점안접종법보다는 방어능 발휘시간이 더 빠른 근육접종법이 더욱 효과적일 것으로 생각되었다.

최소 면역량 : 1일령 Pekin duck에 100대 계대된 백신주를 마리당 $10^{1.0}$ 에서부터 $10^{5.0}$ ELD₅₀로 구강으로 접종한 후 5일령때 DRL-62주로 음수공격접종하여 방어되는 최소 면역량을 조사하였다. 마리당 $10^{1.0}$ ELD₅₀량으로 접종한 경우에는 방어율이 67%이었으며 $10^{2.0}$ ELD₅₀ 접종군에서는 73%가 방어되었다. 그러나 $10^{3.0}$ ELD₅₀ 이상에서는 100% 방어능이 발휘되어 100% 방어능이 발휘되는 최소 면역량은 마리당 $10^{3.0}$ ELD₅₀인 것으로 추정되었다(Table 3).

안전성 시험 : 최소면역량 실험을 참고로 하여 백신 1수분의 용량을 $10^{3.5}$ EID₅₀로 가정하여 안전성 시험을 하

Table 3. Determination of the minimum 100% protective dose of an attenuated strain¹⁾

Dose of inoculation (ELD ₅₀ /duck)	No. survived/No. challenged (%)
Unvaccinated control	2/25(8%)
$10^{1.0}$	10/15(67%)
$10^{2.0}$	11/15(73%)
$10^{3.0}$	5/5(100%)
$10^{4.0}$	5/5(100%)
$10^{5.0}$	5/5(100%)

¹⁾ Ducklings were vaccinated orally with HSB CE100 at a day old and challenged orally with $10^{4.3}$ EID₅₀ of DRL-62 at 5 day old.

였다. 즉, 100대 계대된 백신주를 마리당 각각 1수분($10^{3.5}$ EID₅₀), 10수분($10^{4.5}$ EID₅₀), 100수분($10^{5.5}$ EID₅₀)으로 경구투여한 실험군을 대상으로 10일간의 폐사수를 조사하였다. 병원성 국내 분리주를 접종한 실험군은 27수중 22수(81.5%)가 폐사하였으나 백신을 1수분과 10수분을 각각 접종한 실험군 뿐만 아니라 100수분 접종군에서도 전혀 폐사는 나타나지 않아 안전성이 있는 것으로 판단되었나(Table 4).

다외 농장에서의 백신 효능시험 : 임상조건 및 부검조건 등으로서 오리 바이러스성 간염이 발생하고 있는 것으로 추정된 3개 야의 농장을 대상으로 시험백신의 효능을 조사하였다. KSC 농장의 경우에는 1998년 10월 1일 입추된 2,000수에서 8~10일령에 주로 후궁반정의 임상

Table 4. Safety of an attenuated strain in ducklings

Group	No. of the dead
1 dose ¹⁾	0/30 ²⁾
10 dose	0/30
100 dose	0/30
Uninoculated control	0/30
HSB CE6	22/27

¹⁾A duckling was vaccinated orally with HSB CE100 of a dose of $10^{3.5}$ EID₅₀ (1 dose), $10^{4.5}$ EID₅₀ (10 dose) or $10^{5.5}$ EID₅₀ (100 dose).

²⁾No. of the survived/No. of the inoculated.

증상을 보이면서 폐사가 나타난 농장으로 3주동안 약 550수가 폐사하였다. 이 농장에 10월 15일 입추되는 2,000수를 대상으로 1일령때 근육접종으로 백신을 접종한 결과 폐사가 거의 나타나지 않는 것으로 확인되었다. JHB 농장의 경우에서도 패빈 입추계군에서 지속적으로 오리 바이러스성 간염 증상을 보이면서 8~10일령 사이에 약 25% 전후의 폐사가 있었던 농장이었다. 이 농장에서 11월 4일 입추되는 1,000수를 대상으로 1일령때 근육으로 백신을 접종한 결과 2% 이내의 폐사만 있었으며 이후 계

군에서도 거의 동일한 결과를 얻을 수 있었다. KDI 농장에서도 거의 유사한 결과가 나타났다. 따라서 오리 바이러스성 간염으로 추정되는 3개 농장에서의 시험백신 효능은 매우 우수한 것으로 판단되었다.

계태아의 각 부위별 바이러스 역가 : 계태아의 각 부위별로 계태아 순응주의 증식성을 조사한 결과 요막액보다는 계태아 머리나 계태아 몸통에서의 바이러스 역가가 훨씬 높은 것으로 나타났다(Table 6). 바이러스 배양시간은 24시간 보다 48시간 배양할 경우 더 높은 역가를 얻을 수 있었으나 바이러스 접종량에 따른 차이는 많지 않은 것으로 나타났다. Hwang과 Dougherty¹⁶⁾는 계태아의 각 부위별 바이러스 농도를 조사한 결과 요막액, 양막액, 요막음모막에서보다 계태아 몸통에서의 바이러스 농도가 가장 높음을 확인하여 백신제조시 계태아 몸통을 채취하는 것이 더욱 효과적임을 시사하였다. 본 실험에서도 계태아 몸통에서의 바이러스 역가가 가장 높은 것으로 나타나 이들의 보고와 일치하였다. 따라서 계태아 순응주를 백신생산용으로 대량 증식하고자 할 경우에는 바이러스를 계란당 $10^{3.5}$ ~ $10^{5.5}$ EID₅₀ 용량으로 접종하여 48시간 배양한 뒤 계태아 머리나 계태아 몸통을 채취하여 바이러스를 회수하면 높은 역가의 바이러스를 얻을 수 있을 것으로 생각되었다.

Table 5. Field trials for vaccine efficacy in duck farms suffering from duck viral hepatitis

Farm	Group	Date of birth	Route of vaccination (at day old)	No. of duck	No. of the survived until 3 weeks old (% viability)
KSC	1	98. 10. 1	unvaccinated	2,000	1,450(72.5)
	2	98. 10. 15	i.m.	1,950	1,929(98.9)
	1	98. 10. 22	unvaccinated	800	608(76.0)
	2	98. 10. 29	unvaccinated	800	622(77.8)
JHB	3	98. 11. 4	i.m.	1,000	980(98.0)
	4	98. 11. 11	i.m.	800	785(98.1)
	5	98. 11. 18	i.m.	1,000	975(97.5)
	6	98. 11. 25	orally	800	758(94.8)
KDI	1	98. 11. 25	unvaccinated	1,000	750(75.0)
	2	98. 12. 2	i.m.	1,000	970(97.0)
	3	98. 12. 9	i.m.	1,000	988(98.8)

i.m. : intramuscular injection.

Table 6. Virus titer in the various parts of chicken embryos

Inoculated virus titer	Incubation time(hr)	Virus titer(log ₁₀ ELD ₅₀ /0.2ml)		
		Allantoic fluid	Embryo head	Embryo body without head
10 ^{3.5}	24	2.7	3.8	5.0
	48	5.3	6.5	7.3
10 ^{4.5}	24	3.5	3.7	5.7
	48	5.7	6.5	7.0
10 ^{5.5}	24	4.3	5.0	6.0
	48	6.0	6.5	7.3

결 론

국내 분리 오리 간염 바이러스를 8~10일령의 계태아에서 연속 계태배양하여 병원성이 소실된 순응주를 대상으로 방어능이 우수한 생독백신주 선발을 시도하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 70대에서 140대 계태된 순응주를 대상으로 계태별 방어능을 조사한 결과, 90대 이전 계태주는 접종량에 관계없이 모두 100%의 방어능이 있는 것으로 나타났으나 110대 이상 계태주는 계태수가 많아질수록 방어능이 감소하는 양상을 보여주었다.

2. 계태아 순응주의 백신접종 경로별 방어능을 조사한 결과 근육접종, 경구접종, 점안접종법 모두 방어능이 인정되었으며 방어능 발휘시간에서는 근육접종법이 가장 빨랐다.

3. 선발된 백신주의 최소 면역량을 조사한 결과 100% 방어능이 발휘되는 최소 면역량은 마리당 10^{3.0} ELD₅₀인 것으로 나타났다.

4. 선발된 백신주를 마리당 1수분(10^{3.5} EID₅₀)에서 100수분(10^{6.5} EID₅₀)까지 접종한 결과 100수분 접종군에서도 폐사가 없는 것으로 나타나 안전성이 있는 것으로 확인되었다.

5. 오리 바이러스성 간염 발생으로 25% 전후의 폐사가 있는 야외 발생농장을 대상으로 시험백신을 접종한 결과 백신접종 후의 폐사율이 2% 전후로 크게 감소하였다.

6. 백신주의 계태아 부위별 증식능을 조사한 결과, 계태아 몸통에서 바이러스가 역가가 가장 높았으며 배양

시간은 48시간이 적당하였다.

감사의 글 : 이 논문은 농촌진흥청에서 시행한 대형공동연구사업의 연구결과입니다. 연구비를 지원한 농촌진흥청에 감사를 드립니다

참 고 문 헌

1. Woolcock PR, Fabricant J. Duck hepatitis. In *Disease of poultry*, 10th ed, Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR and Saif YM, eds, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA :661-673, 1997.
2. Asplin FD, McLauchlan. Duck virus hepatitis. *Vet Record*, 66:456-458, 1954.
3. Fabricant J, Rickard CG, Levin PP. The pathology of duck virus hepatitis. *Avian Dis*, 1:256-275, 1957.
4. Asplin. The production of ducklings resistant to virus hepatitis. *Vet Record*, 68:412-413, 1956.
5. Asplin. An attenuated strain of duck hepatitis virus. *Vet Record*, 70:1226-1230, 1958.
6. Crighton GW, Woolcock PR. Active immunization of ducklings against duck virus hepatitis. *Vet Record*, 102:358-361, 1978.
7. Gough RE, Speckman D. Studies with inactivated duck virus hepatitis vaccine in breeder ducks. *Avian Pathol*, 10:471-479, 1981.
8. Hanson LE, Tripathy DN. Oral immunization of ducklings with attenuated duck hepatitis virus. *Developments in Biological Standardization*, 33:357-363, 1976.
9. Hwang J, Devenpeck LA, Dougherty 3rd E. Incidence

- on commercial farms of duck virus hepatitis in white pekin ducklings hatched from immunized and unimmunized dams. *Avian Dis* 7:411-416, 1963.
10. Hwang J. Immunizing breeder ducks with chicken embryo-propagated duck hepatitis virus for production of parental immunity in their progenies. *Am J Vet Res*, 31:805-807, 1970.
 11. Hwang J. Active immunization against duck hepatitis virus. *Am J Vet Res*, 33:2539-2544, 1972
 12. Woolcock PR, Crighton GW. Duck virus hepatitis: Serial passage of attenuated virus in ducklings. *Vet Record*, 105:30-32, 1979.
 13. Woolcock PR, Crighton GW. Duck virus hepatitis: The effect of attenuation on virus stability in ducklings. *Avian Pathol*, 10:113-119, 1981.
 14. '98년 *Annual Report*. 국립수의과학검역원 연보 제2권. 연구사업보고서편, 293-300, 1999.
 15. 성환우, 김재홍. 오리 간염 바이러스의 분리와 국내 분리주의 약독화. *대한수의학회지* 40(1):100-108, 2000.
 16. Hwang J, Dougherty 3rd E. Distribution and concentration of duck hepatitis virus in inoculated ducklings and chicken embryos. *Avian Dis*, 8:264-268, 1964.