

발 간 등 록 번 호

11-1352159-000801-01

학술연구개발용역과제 최종결과보고서

국내 인플루엔자 예방 및 관리 기술 지원을 위한
마우스 병원성 인플루엔자 바이러스주 개발

Development of mouse pathogenic influenza virus for the prevention
and management technical support against influenza infection in Korea

(주)제니아

질병관리본부

학술연구개발용역과제 최종결과보고서

과제번호	2014ER430102		발주부서	바이러스질환연구과
과제명	국문명	국내 인플루엔자 예방 및 관리 기술 지원을 위한 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스주 개발		
	영문명	Development of Mouse Pathogenic Influenza Virus for the Prevention and Management Technical Support against Influenza Infection in Korea		
보안여부	보안(), 일반(○)	결과공개 여부	가(○), 부()	
총 과제기간	2014.04.25. ~ 2017.06.06.	총 연구비	360,000천 원	
(3)차년도 협약기간	2016.06.07. ~ 2017.06.06.	(3)차년도 연구비	120,000천 원	
주관 연구기관	기관명	소재지	대표자명	
	(주)제니아	성남	최 강무	
주관 연구책임자	성명	소속/부서	직위/전공	
	박 완제	연구총괄	연구소장/부사장/생화학	
연구참여자	총 10명 (책임연구원: 1명, 연구원: 9명, 연구보조원: 명 보조원: 명)			
<p>2016도 학술연구개발용역과제의 연구결과최종보고서를 붙임과 같이 제출합니다.</p> <p>붙임 1. 연구결과최종보고서 제본(20부) 2. 연구결과최종보고서 전자파일 제출(HWP, PDF)</p>				
2017년 06월 05일 주관연구책임자 박 완제 (안드레 서명) 주관연구기관장 최 강무 (작인)  질병관리본부장 귀하				

목 차

I. 연구결과 요약문

(한글)	3
(영문)	5

II. 연구용역과제 연구결과

제1장 최종 목표	7
제2장 국내외 기술 현황	18
제3장 최종 연구용역과제 내용 및 방법	19
제4장 최종 연구용역과제 결과	30
제1절 1차년도 연구용역과제 결과	31
제2절 2차년도 연구용역과제 결과	100
제3절 3차년도 연구용역과제 결과	181
제5장 연구결과 고찰 및 결론	243
제6장 연구성과 및 활용계획	252
제7장 연구용역과제 진행과정에서 수집한 해외과학기술정보	254
제8장 기타 중요변경사항	255
제9장 연구비 사용 내역	256
제10장 참고문헌	258
제11장 첨부서류	260
제12장 별첨자료	263

연구결과최종보고서 요약문

과제명	국내 인플루엔자 예방 및 관리 기술 지원을 위한 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스주 개발		
색인어	인플루엔자바이러스, 마우스, 병원성, DNA 서열분석, 바이러스 특성분석		
주관연구기관	(주)제니아	주관연구책임자	박 완 제
연구기간	2014. 04. 25. ~ 2017. 06. 06.		
1) 1 st Year : Development of H3N2 (A/Victoria/361/2011) Influenza Virus Mutant with Mouse Pathogenicity			
<p>Inbred DBA/1J 마우스에 매 2~3일 간격으로 반복적인 lung-cell-lung 및 lung-to-lung passage 방법을 통해 DBA/1J 마우스에서 폐사율의 증가 및 폐사기간 단축에 의미를 갖는 pathogenicity를 확인하였다. 반복적인 확인시험을 통해 pathogenicity를 확인한 후, plaque purification을 통해 P14와 P19의 각 lung homogenate로부터 총 4개의 virus clone을 분리하였으며, 이를 다시 MDCK cell에 감염시켜 얻은 mouse pathogenic virus를 “질병관리본부 인플루엔자 바이러스과”에 제공하였다.</p> <p>DBA/1J mouse pathogenic virus clones을 이용하여 RNA 추출, cDNA 합성을 진행하였으며, 8 gene의 specific primer를 이용하여 PCR product를 만든 후 8개의 유전자에 대한 염기서열 분석을 완료하였다. wild type과 4개의 mutant type의 Influenza virus를 비교하였을 때, 8개의 viral protein에서 11~16개의 아미노산 치환이 일어난 것을 확인할 수 있었다. 아미노산이 치환된 위치는 불규칙하였으나 치환된 개수는 다른 선행연구와 유사함을 알 수 있었으며, 특히 주요한 아미노산 치환은 Influenza virus의 virulence와 host range에 영향을 줄 수 있는 Hemagglutinin(HA)에 발생하였다.</p> <p>MLD₅₀을 측정한 결과, DBA/1J-adapted H3N2 Influenza mutant virus는 wild type과 비교하였을 때, 37~850배 높은 virulence를 나타내었고, MID₅₀의 경우는 70~33,000배 낮은 virus 농도에서도 높은 감염성을 보여주는 것을 확인할 수 있었다. 또한 DBA/1J-adapted H3N2 Influenza mutant virus를 마우스에 감염시켰을 때의 hematological 변화를 관찰하였다. 그 결과, 급성염증 지표인 neutrophil의 유의적인 증가를 확인할 수 있었으며, 혈청 생화학분석을 통해 DBA/1J-adapted H3N2 Influenza mutant virus 감염 후 급격한 체중 감소로 인하여 감염된 마우스의 triglycerides의 총 함량이 급속한 감소를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 바이러스 감염 후 관찰 기간 동안 biomarker로 인정할 만큼 눈에 띄는 변화는 확인할 수 없었다. Histopathology 시험을 통해, 감염 후 2일차 폐와 기관 조직에서 병변이 뚜렷하게 관찰되는 것을 확인하였다.</p> <p>결론적으로 mouse-adapted H3N2 Influenza mutant virus는 마우스에서 lethality와 pathogenicity를 보이는 동시에 mutant 및 wild type을 vaccination하고 mouse-adapted H3N2 Influenza mutant virus를 감염시켰을 때, mutant virus에 대하여 완벽하게 방어하는 것으로 미루어 볼 때, Influenza virus의 치료제와 백신 평가에 대한 좋은 질병모델이 개발되었음을 확인하였다.</p>			
2) 2 nd Year : Development of H3N2 (A/Switzerland/9715293/2013) Influenza Virus Mutant with Mouse Pathogenicity			
<p>Inbred Balb/c와 DBA/1J에 매 2~3일 간격으로 반복적인 lung-cell-lung 및 lung-to-lung passage 방법을 통해 Balb/c 및 DBA/1J 마우스에서 폐사율의 증가 및 폐사기간 단축에 의미를 갖는 pathogenicity를 확인하였다. Passage 6, 8, 9와 passage 5, 9, 11, 12, 13을 각각 Balb/c와 DBA/1J에서 선택하였으며 전체 26개의 clone이 plaque 정제를 통한 각각의 lung homogenate로부터 분리하였다. 그런 후 마우스 병원성 바이러스를 대량 얻기 위하여 MDCK 세포 주에 감염시켰다. Balb/c에 감염된 12개의 바이러스 clone 중에서, 2개의 바이러스 clone(P8_C2, P9_C2)가 반복적인 확인시험 결과 가장 우수한 마우스 병원성을 보여주었고 최종적으로 Balb/c 내에서 추가적인 분석을 위해 선택되었다. 또한, DBA/1J에 감염된 14개의 바이러스 clone 중에서, 3개의 바이러스 clone(P9_C1, P11_C2, P13_C1)이 가장 높은 마우스 병원성을 보여주었고 최종적으로 DBA/1J 내에서 병원성 분석을 위해 최종 선택하였다.</p>			

유전자 서열분석과 병원성 분석을 위해, Balb/c와 DBA/1J 마우스에서 유래한 5개의 mutant virus clone을 선택하여 사용하였다. Balb/c(2 mutants)와 DBA/1J(3 mutants) 마우스 병원성 바이러스 clone으로부터 RNA 분리, cDNA 합성을 진행하고 또한 8개의 gene에 특이적인 primer를 이용하여 PCR 산물을 만들어 냈다. 8개의 gene 단편에 대한 유전자 서열분석을 완료하였다. 5개의 mutant type과 wild type을 비교한 결과, PB1, M 그리고 NS gene을 제외한 5개의 유전자에 해당하는 바이러스 단백질 내에서 7~14개의 아미노산 치환이 일어난 것을 발견하였다. 아미노산의 치환이 일어난 위치는 불규칙했지만 변화한 아미노산의 숫자는 이전의 다른 연구 결과들과 유사했다. Balb/c와 DBA/1J에서 유래한 mutant virus clone을 다른 wild type virus와 아미노산 구성을 비교했을 때, 대부분의 치환은 바이러스 단백질의 HA(4~6), NA(1~2), NP(1~2), PA(3~5), PB2(1~2)에서 발견되었다. 대부분의 주요 아미노산 변화는 특히 인플루엔자 바이러스의 병원성과 숙주 범위에 영향을 주는 Hamagglutinin (HA)와 Nucleoprotein (NP) 부위에서 발생하였다.

MLD₅₀의 측정결과, Balb/c에서 유래한 mutant virus는 wild type과 비교하여 185~240배 이상의 높은 병원성을 보여주었다. 그러나, DBA/1J에서 유래한 mutant virus는 wild type과 비교하여 110~3,090배 높은 병원성을 보였다. MID₅₀의 경우, Balb/c에서 유래한 mutant virus들은 wild type과 비교하여 2,390~5,900배의 낮은 바이러스 농도에서도 더 높은 감염성을 보여주었다. 그러나 DBA/1J에서 유래한 mutant virus들은 wild type과 비교하여 165~422 배의 낮은 바이러스 농도에서 높은 감염성을 보였다. 혈액학적인 변화에서, 급성 염증반응의 마카로一个职业 neutrophil이 Balb/c와 DBA/1J mutant virus 모두 비슷하게 상당히 증가했다. 그리고 생화학 검사 결과를 통해, Balb/c와 DBA/1J-adapted H3N2 인플루엔자 바이러스 마우스 모델에서 전체 중성지방과 콜레스테롤이 심각하게 줄어드는 것을 명확히 보여줬고, 이것은 바이러스 감염 후 분명한 체중감소에 기인한다. 그리고 전체 AST와 ALT의 양이 wild type과 비교하여 Balb/c와 DBA/1J-adapted H3N2 인플루엔자 바이러스 마우스 모델에서 상당히 높게 증가하였다. 조직검사를 통해서, 바이러스 감염 2일 후 폐와 기도 조직에서 병변이 명확하게 관찰되었고 두 조직의 병변 수준은 비슷하였으나 다른 조직들에서는 눈에 띠는 병변이 관찰되지 않았다.

결과적으로, Balb/c와 DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza mutant virus는 마우스에서 lethality와 pathogenicity를 보이는 동시에 wild-와 mutant-H3N2를 백신 접종 후에 mouse-adapted Influenza mutant virus를 공격하였을 때, 성공적으로 mutant virus로부터 감염방어 효과를 확인하였다. 따라서 백신과 치료제를 평가할 수 있는 성공적인 마우스 인플루엔자 감염모델 시스템을 구축하였다.

3) 3rd Year : Development of H3N2 (A/Incheon/1593/2015 and A/Hongkong/7127/2014) Influenza Virus Mutant with Mouse Pathogenicity

3차년도에는 질병관리본부에서 제공한 두 종류의 바이러스[Influenza A virus H3N2 (A/Incheon/1593/2015) 와 Influenza A virus H3N2 (A/Hongkong/7127/2014)]를 가지고 1차년도 및 2차년도에 성공적으로 확보한 다양한 mouse adaptation 기술을 적용하여 mouse pathogenic한 Influenza virus 제조하고자 하였음. 그러나, 연구개발에 사용한 두 종류의 바이러스는 기존 방식과는 달리 ①초기 바이러스 감염원으로 사용하기 대량증식이 필요한데 사용한 MDCK 및 SIAT 세포주에서 바이러스의 증식이 거의 일어나지 않아 고 역가의 바이러스를 확보하기가 어려웠으며 ②또한, lung-cell-lung passage를 위해서 mouse의 lung infection을 통해 얻어진 Influenza virus가 포함된 lung lysate를 MDCK 및 SIAT 세포주에서 감염시켰을 때 immune clearance에 의해 매우 낮은 titer의 virus가 존재하여 세포내 virus 증식이 거의 일어나지 않아서 mouse adaptation을 위한 연속적인 passage 진행에 많은 어려움을 겪었다.

3차년도 실험내용 및 실험결과에서 보듯이 상기에 언급한 두 가지 근본적인 문제점으로 인해 가능한 다양한 접근방법을 사용하여 mouse passage를 진행하였으나 의미있는 임상증상 관찰, 체중감소 현상 및 마우스 병원성 등의 특이적인 증상을 보이지 않아 mouse-adapted Influenza virus를 확보할 수 없었다. 그러나, 본 연구개발을 통해서 향후 효율적인 target cell line의 개발, 기존 세포주 내에서 Influenza virus의 낮은 감염성에 대한 원인 규명이 진행되어야 mouse pathogenic Influenza virus의 개발이 가능할 것으로 판단되었다.

Summary

Title of Project	Development of Mouse Pathogenic Influenza Virus for the Prevention and Management Technical Support against Influenza Infection in Korea					
Key Words	Influenza Virus, Mouse, Pathogenicity, DNA Sequencing, Virus Characterization					
Institute	Genia Inc.	Project Leader	Park Wan Je			
Project Period	2014. 04. 25. ~ 2017. 06. 06.					
1) 1st Year : Development of H3N2 (<u>A/Victoria/361/2011</u>) Influenza Virus Mutant with Mouse Pathogenicity						
<p>Through the combination with lung-cell-lung and lung-to-lung passage to the inbred DBA/1J strain repeatedly for every 2 or 3 days, we were able to identify from DBA/1J with mouse pathogenicity which relates to increase of mortality rate and decrease of mortality period. A total of 4 clones were finally isolated from each lung homogenate of P14 and P19 through plaque purification and showed pathogenicity through the repeated confirmation test in DBA/1J mouse. It was then used to infect MDCK cell to gain mouse pathogenic virus and sent to the Influenza Virus Division at KCDC.</p> <p>With DBA/1J mouse pathogenic virus clones, we have performed the RNA extraction, cDNA synthesis, and also created PCR product with specific primer of 8 genes. It's been completed for gene sequence analysis with 8 genes. 11 to 16 amino acids substitution within 8 viral protein has been observed when compared Influenza virus of wild type with 4 mutant types. The location of amino acids substitution was irregular but numbers of substitution was similar with other previous results. Particularly major amino acids substitution has occurred from hemagglutinin(HA) which have effect on Influenza virus's virulence and host range.</p> <p>As a result of measurement for MLD₅₀, DBA/1J-adapted H3N2 Influenza mutant virus has been showed 37~850 fold higher virulence when comparing to wild type. In case of MID₅₀, DBA/1J-adapted H3N2 Influenza mutant virus has been showed higher infectivity under 70~33,000 fold lower virus concentration when comparing to wild type. Also we have investigated a hematological change in the mouse infected with DBA/1J-adapted H3N2 Influenza virus. As a result, it shows significant increase of neutrophil as a marker of acute inflammation. And through the serum chemistry analysis, it clearly shows that dramatical decrease in the total quantity of triglycerides in the mouse infected with DBA/1J-adapted H3N2 Influenza virus is due to mainly weight loss after virus infection. But, in this study we could not find a remarkable changes which has recognized as biomarkers during the test period after infection with mouse adapted-Influenza virus. Through the histopathology examination study, it has been clearly observed the lesion in lung and tracheal tissues from two days later after viral infection.</p> <p>In conclusion, mouse-adapted H3N2 Influenza mutant virus shows pathogenicity and lethality in mouse. At the same time, when we have challenged mouse-adapted H3N2 Influenza mutant virus after vaccination with wild- and mutant-H3N2, it has been successfully protected from mutant virus. Therefore, we have established a good disease mouse model for the evaluation of vaccine and therapeutic agents.</p>						
2) 2nd Year : Development of H3N2 (<u>A/Switzerland/9715293/2013</u>) Influenza Virus Mutant with Mouse Pathogenicity						
<p>Through the combination with lung-cell-lung and lung-to-lung passage to the inbred Balb/c and DBA/1J strain repeatedly for every 2 or 3 days, we were able to identify from Balb/c and DBA/1J with mouse pathogenicity which relates to increase of mortality rate and decrease of mortality period. Passage 6, 8, 9 and passage 5, 9, 11, 12, 13 were selected from Balb/c and DBA/1J respectively. A total of 26 clones were isolated from each lung homogenate through plaque purification. It was then used to infect MDCK cell strain to gain mouse pathogenic virus. Amongst the 12 virus clones infected in Balb/c, 2 virus clones (P8_C2, P9_C2) showed high mouse pathogenicity as a result of the repeated confirmation test and were finally chosen for further analysis in Balb/c mice. Also, amongst the 14 virus clones infected in DBA/1J, 3 virus clones (P9_C1, P11_C2, P13_C1) also showed high mouse pathogenicity and were finally selected for further analysis in DBA/1J mice.</p>						

For gene sequencing and pathogenic analysis, totally 5 mutant virus clones derived from Balb/c and DBA/1J mice were chosen and used. With Balb/c(2 mutants) and DBA/1J(3 mutants) mouse pathogenic virus clones, we have performed the RNA extraction, cDNA synthesis, and also created PCR product with specific primer of 8 genes. It's been completed for gene sequence analysis with 8 genes.

7 to 14 amino acids substitution within 5 viral protein excluding PB1, M and NS gene has been observed when compared Influenza virus of wild type with 5 mutant types. The location of amino acids substitution was irregular but numbers of substitution was similar with other previous results. When comparing the amino acids substitution of 5 viral proteins from Balb/c and DBA/1J derived mutant virus clones with wild type virus, most of the variations were observed from HA (4~6), NA (1~2), NP(1~2), PA(3~5) and PB2(1~2) of viral protein. Most of amino acids substitution has particularly occurred from Hemagglutinin(HA) and Nucleoprotein(NP) which has an effect on Influenza virus's virulence and host range. The location of amino acids substitution was irregular but numbers of substitution was also similar to other previous results.

By the results of MLD₅₀, Balb/c derived mutant viruses were showed 185~240 fold higher virulence compared to the wild type. But, incase of DBA/1J derived mutant viruses, it showed 110~3090 fold higher virulence compared to the wild type. In case of MID₅₀, Balb/c derived mutant viruses have been showed higher infectivity under 2,390~5,900 fold lower virus concentration when comparing to wild type. However, DBA/1J derived mutant viruses have been showed higher infectivity under 165~422 fold lower virus concentration when comparing to wild type. In hematological change, a significant increase in neutrophil as a marker for acute inflammation showed with similar degree in both Balb/c and DBA/1J mutant viruses. And through the serum chemistry analysis, it clearly shows that dramatical decrease in the total quantity of triglycerides and cholesterol in the mouse infected with Balb/c and DBA/1J-adapted H3N2 Influenza virus is due to mainly weight loss after virus infection. and also dramatical increase in the total quantity of AST and ALT was found in the mouse infected with Balb/c and DBA/1J-adapted H3N2 Influenza virus when comparing than those of wild type Influenza virus. Through the histopathology examination study, it has been clearly observed that the lesion in lung and tracheal tissues 2days after a viral infection and the level of lesion in both tissues were very similar. On the other hand, other tissues to be investigated did not show remarkable lesion.

In conclusion, mouse-adapted H3N2 Influenza mutant virus shows pathogenicity and lethality in mouse. At the same time, when we have challenged mouse-adapted H3N2 Influenza mutant virus after vaccination with wild- and mutant-H3N2, it has been successfully protected from mutant virus. Therefore, we have established a good disease mouse model for the evaluation of vaccine and therapeutic agents.

3) 3rd Year : Development of H3N2 (A/Incheon/1593/2015 and A/Hongkong/7127/2014) Influenza Virus Mutant with Mouse Pathogenicity

By applying various mouse adaptation techniques successfully secured during the 1st and 2nd year, our goal for the 3rd year was to produce mouse pathogenic Influenza virus using Influenza A virus H3N2 (A / Incheon / 1593/2015) and Influenza A virus H3N2 (A/Honkong/7127/2014), provided by the CDC(Centers for Disease Control & Prevention).

There were however obstacles in the process

- ① Mass-proliferation of the 2 viruses are needed to be used as early viral infection source. However proliferation did not take place for MDCK and SIAT cell line and made it difficult to obtain high-activity viruses.
- ② In addition, when lung lysate containing Influenza virus obtained from lung infection of mouse for lung-cell-lung passage was infected in MDCK and SIAT cell line, very low titer virus existed due to immune clearance. Due to this factor virus proliferation was discouraged thus making it difficult to proceed with continuous passage for mouse adaptation

As shown in the experimental details and experimental results of the third year, due to the two fundamental problems mentioned above, the mouse-adapted Influenza virus could not be obtained. Although various possible approaches were used, no noticeable symptoms were observed (significant clinical signs, weight loss, mouse pathogenicity etc.). However, through this research and development, it was confirmed that development of an effective target cell line and identification of the cause of low infectivity of Influenza virus in the existing cell line are required to develop mouse pathogenic Influenza virus.

학술연구개발용역과제 연구결과

제1장 최종 목표

1. 목표

가. 최종 연구 목표와 단계별 연구 목표

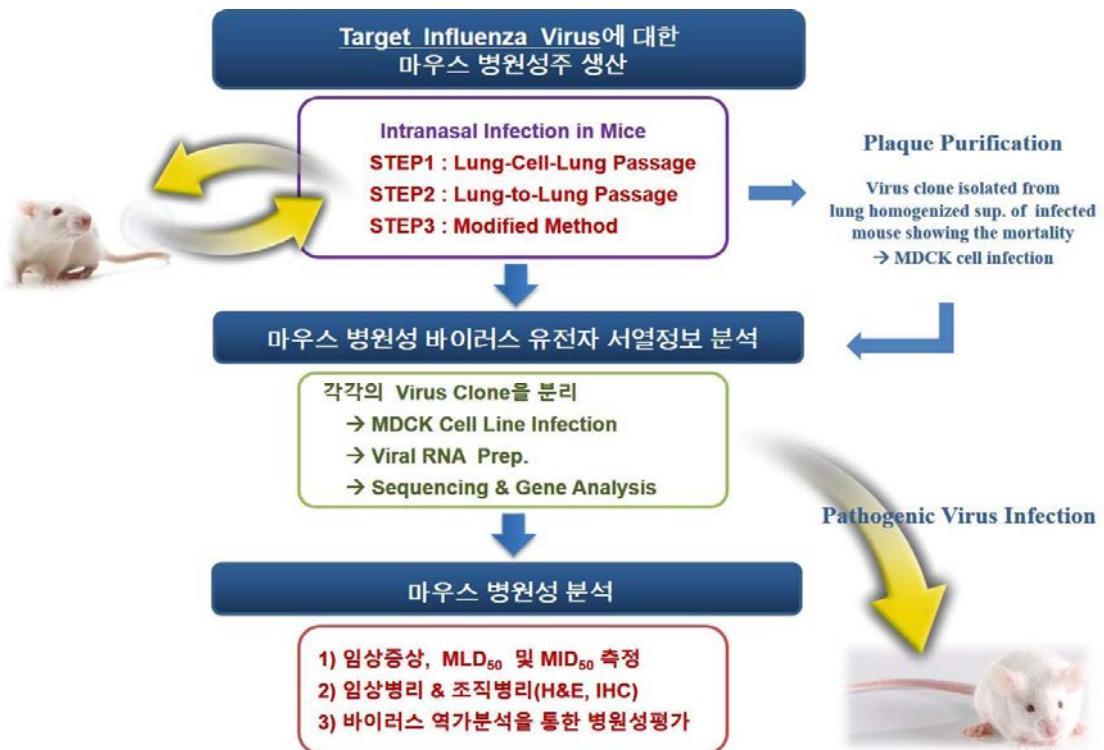
구 분	연 구 목 표
최종 목표	국내 인플루엔자 예방 및 관리 기술 지원을 위한 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스주 개발
1차년도	2012~2013 절기 인플루엔자 백신주 중 A(H3N2)형 바이러스에 대한 마우스 병원성주 개발
2차년도	2013~2014 절기 인플루엔자 백신주 중 A(H3N2)형 바이러스에 대한 마우스 병원성주 개발
3차년도	2014~2015 절기 인플루엔자 백신주 중 A(H3N2)형 바이러스에 대한 마우스 병원성주 개발

(1) 연도별 세부 연구목표 및 핵심 연구 내용

본 학술연구개발용역과제의 수행을 통해서 각 연도별 연구목표, 연구내용 및 최종적으로 도출될 연구결과물의 내용은 다음과 같다.

연구목표	핵심 연구내용	연구 결과물
I) Target [A(H3N2)형] 인플루엔자 바이러스에 대한 마우스 병원성주 생산	♦ 최소 10회 이상 마우스에 감염 계대배양하여 치사력(Lethality) 있는 바이러스주 생산 ♦ Plaque 정제를 통한 바이러스 클론 생산	♦ 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스 3주 이상 확보
II) 마우스 병원성 바이러스 유전자 서열정보 분석	♦ 마우스 계대배양 후 확보된 바이러스에 대한 전체 유전자(8종) 분석 ♦ 유전자 서열분석을 통한 병원성 기여인자 분석	♦ Mutant Type 전체 유전자 (8종) 염기서열 확보
III) 마우스 병원성 분석	♦ 최종 선정된 마우스 병원성 바이러스주에 대한 MLD ₅₀ , MID ₅₀ 측정 ♦ 임상증상, 혈액학, 혈액생화학, 조직병리 ♦ 바이러스 역가분석을 통한 병원성 평가	♦ 병원성 바이러스주에 대한 생물학적 분석자료 확보 ♦ 기초 데이터 확보/제공 ♦ 논문 발표

(2) 연구개발 전략에 대한 모식도



(3) 연구 추진일정

구 분	월별 추진현황												비 고
연구 내용	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
I) A(H3N2)형 인플루엔자 바이러스에 대한 마우스 병원성주(mouse adapted strain) 생산													
1. 최소 10회 이상 마우스에 감염 계대 배양하여 치사력(lethality) 있는 바이러스주 생산													
2. Plaque 정제를 통한 바이러스 클론 생산													
II) 유전자 서열 정보 분석													
1. 마우스 계대 배양 후 확보된 바이러스에 대한 전체 유전자 (8종) 분석													
2. 유전자 서열분석을 통한 병원성 기여인자 분석													
III) 병원성 분석													
1. 임상증상(체중감량), 혈액학 및 혈액생화학 측정													
2. 최종 선정된 마우스 병원성 바이러스주에 대한 MLD ₅₀ MID ₅₀ 측정													
3. 조직병리 (H&E, IHC)													
4. 바이러스 역가분석을 통한 병원성 평가													
추진진도 (%)	5	10	15	20	25	35	45	60	70	80	90	100	

나. 연구배경

(1) 국내외 현황

- 2009년 4월경 이전에는 규명되지 않은 새로운 8개 유전자 집단을 가진 새로운 H1N1 Influenza virus가 사람에게 처음 발견되었음. 새로 출현한 H1N1 Influenza virus는 사람 간의 전염을 통해서 전 세계 214여개 국가에 전파되었으며 WHO는 신속하게 pandemic alert의 가능성은 경고하였음.
- Pandemic 2009년 분리주에서는 조류와 포유동물에서의 높은 pathogenicity와 관련된 marker들이 존재하지 않음이 확인되어 pandemic 2009 Influenza A virus가 사람에게 적응(adaptation)이 되었다는 어떤 분자적 기전도 알려지지 않은 상태임. 따라서 새로운 H1N1 Influenza virus가 사람에게 감염되는 사례는 포유동물에서 host range와 pathogenicity를 결정하기 위한 유전자 기반의 연구가 필요하게 됨.
- 2016년도 WHO의 Influenza Transmission Zone의 현황. 동아시아권에서는 호흡기 검체에 대한 인플루엔자 양성반응이 11~20% 수준이며, subtype은 Influenza A(H3)로 보고됨.

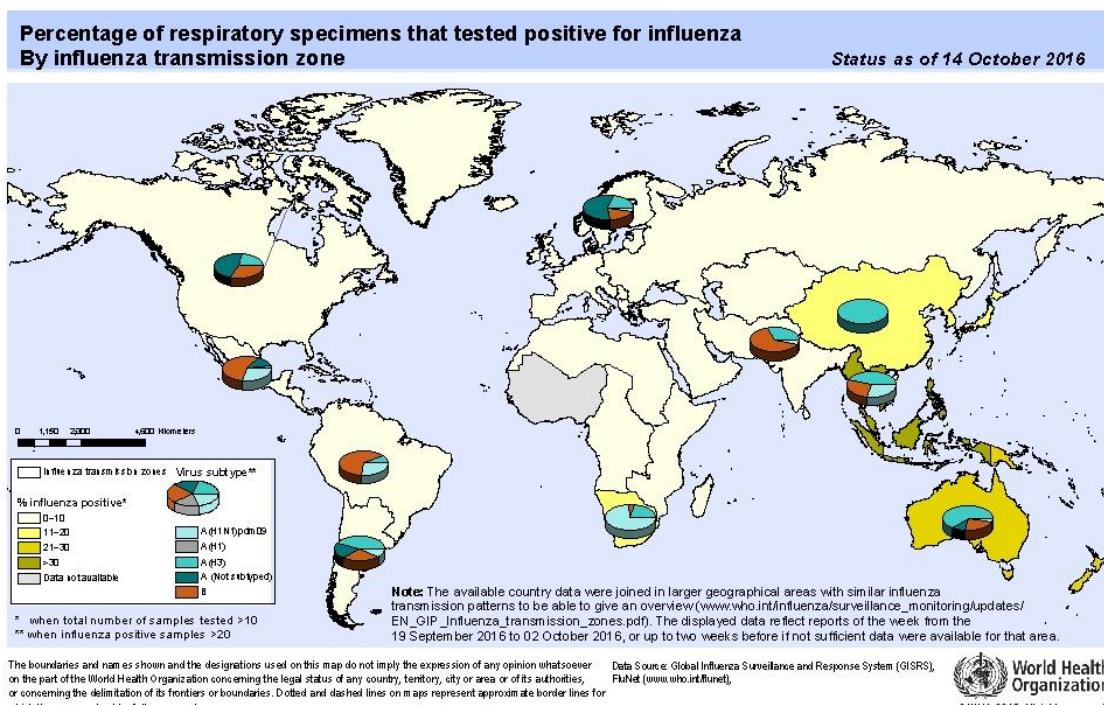


Figure 1. 2016년도 WHO의 Influenza Transmission Zone의 현황

- 주제나아에서는 2012년에 질병관리본부의 학술연구용역사업의 일환으로 ‘마우스 병원성 2009년 H1N1 인플루엔자 바이러스주 개발’ 사업에 참여하여 마우스 병원성을 가지는 2009년 H1N1 인플루엔자 바이러스주를 성공적으로 제조하였으며, 이와 관련된 유전자 서열분석을 통한 wild type과 mutant type의 비교분석, mutant virus의 임상병리, 독성병리, 혈액학, 혈액생화학, virulence 연구 등을 수행하였음.
- 2014년도부터는 3년 연속과제인 ‘국내 인플루엔자 예방 및 관리 기술 지원을 위한 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스주 개발’ 사업에 참여하여 H3N2 인플루엔자 바이러스에 대한 마우스 병원성 바이러스주 제조 중에 있음.
- 마우스는 자연상태 하에서는 사람 또는 다른 동물 유래 Influenza virus에 감염되지 않으나, 일련의 lung-to-lung passage를 통하여 mouse에 virulence하도록 적응시킬 수 있음. Mouse-adapted Influenza virus mutant는 통상적으로 감염된 동물의 bronchi 또는 lung에서 pathology를 야기하는데, mouse-adapted virus에 의해 야기되는 lung pathology는 사람 Influenza pneumonia와 상당히 유사성을 보임. 마우스에서 Influenza virus host range 및 virulence에 영향을 미치는 몇몇 인자들이 규명이 되었으며 이중에서 Hemagglutinin(HA)이 mouse lung virulence의 일차적인 결정인자로 보고됨. 그러나 Influenza virus의 다른 7개 유전자 역시 virulence에 상당히 많은 관여를 하고 있음이 최근 논문을 통해 지속적으로 보고되고 있음.

(2) 국민건강 및 경제에 미치는 영향

전 세계적으로 거의 매년 독감으로 인한 고열 및 호흡기 질환으로 많은 사람들이 병원에 입원하고 있으며, 특히 어린이 및 노인들에게 높은 치사율을 보이고 있다. 뿐만 아니라 다른 기관지 질환들, 예를 들어 폐렴 및 심폐질환 등과의 합병증이 있는 경우에는 치사율은 더욱 높아진다. 이와 같은 국민보건에 미치는 영향 외에도 입원 및 통원 치료 등으로 인한 노동력 손실에 따른 국가전체에 미치는 경제적 약화도 무시할 수 없다.

The Jordan Report에 의하면 매년 독감과 관련된 질병에 의하여 사망하는 사람이 미국에서만 1~2만 명에 이르며 좀 더 심한 독감이 유행한 경우에는 매년 5만 명 정도가 사망한다는 보고가 있다. 독감으로 인한 인명의 손실도 크지만 그보다 더 중요한 것은 환자의 치료에 들어가는 비용과 학업이나 일을 할 수 없게 되어 생기는 경제적인 비용이 매년 수백 억 달러에 이른다는 보고가 있는 만큼 독감을 예방하여 얻을 수 있는 효과는 아주 크다고 할 것이다.

(3) 현재 사용되는 독감백신의 문제점

독감백신은 항원의 변이에 의해 거의 매년 새로이 접종을 받아야 하는 백신이다. 이러한 항원의 변이도 숙주에 대한 감수성이나 감염력 특성이 달라져 때로는 심각한 대재앙을 일으키는 경우가 있다. 1918년~1919년에 일어난 독감의 경우 전 세계적으로 2000만 명에서 4000만 명의 사람이 사망하였으며 미국에서만 1918년 10월 한달 동안 19만 6천명의 사망자가 생겼다는 보고가 있고 1957, 1968, 1977년의 경우도 각각 수십만 명의 사망자가 생기는 대유행이 있었다. 또한 1997년에는 조류독감이 직접 사람으로 발병하는 홍콩조류독감(H5N1)이 처음으로 보고되어 독감의 질병통제가 더 어려워지는 국면에 처해있다. 이와 같이 독감은 오랜 역사에 걸쳐 많은 인명의 손실 및 경제적인 손실이 큼에도 불구하고 효율적으로 병을 억제할 수 있는 방법이 현재로서는 존재하지 않는다.

단지 현재 사용되고 있는 사백신 또는 생백신으로 어느 정도의 예방을 할 수는 있지만 아직은 많은 문제점을 가지고 있어 이의 개선이 필요하다. 1999년에 보고된 NAS Report에 의하면 Influenza virus vaccine은 21세기에 개발되어야 할 백신 중에서 level 1, 즉 가장 가치가 있는 7가지 종류(Cytomegalovirus Vaccine, Influenza Virus Vaccine, Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Therapeutic Vaccine, Multiple Sclerosis Therapeutic Vaccine, Rheumatoid Arthritis Therapeutic Vaccine, Group B Streptococcus Vaccine and Streptococcus Pneumonia Vaccine)의 백신으로 분류되어 있다.

현재 사용되고 있는 사백신은 전체 바이러스를 화학물질로 처리하여 불활화시킨 후 정제하거나 주요 표면항원 단백질만을 분리하여 투여하는 형태이다. 따라서 IgG 등의 순환 항체는 높은 수준으로 생산되나 local immunity를 담당하는 점막분비항체인 IgA의 분비가 적정 수준으로 분비되지 않으며 바이러스에 감염 된 세포를 죽이는 면역을 담당하는 CTL 면역반응의 유도가 잘 되지 못한다. 또한 면역의 지속 기간이 짧고 주사제 형태이므로 기피하는 경향이 있어 이의 개선이 필요하였다. 이러한 기존 사백신의 단점들을 보완하기 위해 현재는 약독화된 생백신이 미국에서 임상실험을 마치고 FDA의 승인을 받아 판매 중에 있으며, 최근에는 보다 안전하고 효능이 우수한 DNA 백신의 연구가 개발 진행 중에 있다.

다. 연구의 필요성

(1) 연구의 목적

- (가) 본 학술연구 개발용역과제의 1차적 목적은 마우스에서 병원성을 보이는 인플루엔자 바이러스주의 개발이며 동시에 마우스 실험동물에서의 감염모델 구축을 통한 기초 및 응용, 더 나아가서 제품화 연구에 활용이 가능하도록 하고자 함.

(나) 인플루엔자 백신 및 치료제 개발에 있어 후보물질의 효능 및 약효평가, 안전성 평가를 위해 마우스 병원성주를 연구자들에게 제공함으로써 국내 인플루엔자 연구의 활성화를 도모하고자 함.

(2) 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스주 개발 필요성

- (가) 인플루엔자 백신 및 치료제 개발에 있어 효능 평가 단계에서 마우스를 이용한 동물실험은 매우 기초적인 연구 단계임.
- (나) 계절 인플루엔자 바이러스주의 경우 마우스에 대한 병원성을 가지고 있지 않은 경우가 있어 마우스 모델에 adaptation 과정이 필요하나, 이는 상당한 시간과 노력뿐만 아니라 전문적인 취급 기술이 요구됨.
- (다) 국내 감염병 연구의 중심기관으로서 질병관리본부(KCDC)가 마우스 병원성주를 개발하여 연구자들에게 제공함으로써 국내 인플루엔자 연구 활성화를 선도하는 것이 필요함.

신규 독감백신을 개발하는 경우에 후보물질의 효능 및 독성평가를 위해서 일반적으로 영장류 (Non-Human Primate) 또는 ferret 실험동물 모델을 주로 사용하여 평가한다. 이러한 실험동물의 사용은 매우 고가로서 최종 후보물질을 도출하기 전까지 지속적으로 사용하기에는 연구자 입장에서 매우 부담스러운 점이 있다.

또한, 효능평가를 위한 target vaccine 또는 치료제 투여 후의 challenge study에서도 NHP 및 ferret에 상당히 높은 농도의 Influenza virus를 투여하여야만 사망률 또는 폐사율을 확인할 수 있어 연구가 용이하지 않으므로 주로 혈액학, 혈액생화학, 조직병리 및 lung에서의 바이러스 검출 여부 등을 통해서 감염증의 완화 내지는 회복 여부로 약물의 효능을 확인하고 있다.

따라서 마우스 병원성을 가지는 인플루엔자 바이러스주를 개발하게 되면 마우스 실험동물 모델을 사용하므로 개발 비용 측면에서 저렴할 뿐만 아니라 빠른 시간 내에 인플루엔자 백신, 치료제 등의 후보물질을 대상으로 사망률 및 폐사율 측정으로 간편하게 효능 평가를 수행할 수 있다.

또한, 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스주의 개발을 통해서 개발 관련 SOP가 확립되면 신종의 인플루엔자 바이러스 출현 시에 빠른 질환모델 구축이 가능하며, 이를 통해서 약효 및 독성평가를 신속하게 수행할 수 있는 장점을 가지고 있다.

2. 목표달성도 및 관련분야에 대한 기여도

가. 목표달성도

(1) 1차년도 목표달성도

최종 연구목표	연구 진행상황 및 최종결과	달성도 (%)
■ 2012~2013년 인플루엔자 백신주 중 A형(H3N2) 바이러스에 대한 병원성주 개발	<ul style="list-style-type: none"> ■ Mouse-adapted H3N2 인플루엔자 바이러스 주의 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스 개발을 위해 기존의 lung-to-lung passage에 의한 방법이 아닌 새로운 2단계 접근방법을 시도하여 개발에 성공하였음(신공정 개발) ■ 개발 공정 <ul style="list-style-type: none"> 1 단계: Lung Infection→Cell Culture of Lung Homogenate →Lung Infection (Lung-Cell-Lung Passage) 2 단계: Lung infection→Lung infection (Lung-to-Lung Passage) ■ 개발 결과 <ul style="list-style-type: none"> - 2종의 inbred mice를 사용하여 상기의 개발 공정을 통해 치사력을 보이는 마우스 병원성 MT 인플루엔자 바이러스 4종 확보 	100%
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Plaque purification을 통한 바이러스 클론 생산 <ul style="list-style-type: none"> 1] Plaque purification을 통한 바이러스 클론 생산 완료 2] DBA/1J에서 4종 생산 완료 <ul style="list-style-type: none"> - DBA/1J_P14_C3, DBA/1J_P14_C4, DBA/1J_P19_C1, DBA/1J_P19_C2 	100%
■ 마우스 병원성 바이러스 유전자 서열정보 분석	<ul style="list-style-type: none"> ■ 마우스 병원성 바이러스 클론에 대한 전체 유전자 분석 <ul style="list-style-type: none"> 1] DBA/1J 유래 마우스 병원성 바이러스 clone 4종 및 주요 passage 별로 선정한 lung homogenate 시료 15종을 포함한 총 19종에 대해 viral RNA 분리/cDNA 합성/8 gene specific primer를 이용한 PCR product 확보/유전자 서열분석 완료 2] 실적 <ul style="list-style-type: none"> - 19개 시료에 대해 PB2, HA 및 NA 유전자의 염기서열의 분석완료 - 4종의 마우스 병원성 바이러스 주에 대한 전 서열 분석 완료 ■ 유전자 서열분석을 통한 병원성 기여 인자 분석 <ul style="list-style-type: none"> 1] Wild type, 각 passage 별 시료 및 4종의 마우스 병원성주 간의 유전자 서열분석 완료 2] 염기서열 분석 외에 해당 단백질 내의 아미노산 서열 분석 및 치환 분석 완료 3] 선행 연구논문을 기초로 병원성 기여 인자에 대한 분석 수행 완료 	100%
■ 마우스 병원성 분석	<ul style="list-style-type: none"> ■ 마우스 병원성 분석을 통한 D/B 구축 <ul style="list-style-type: none"> 1] MLD₅₀, MID₅₀ 측정 완료 2] 임상증상 (체중감량) 관찰 및 측정 완료 3] 혈액학 및 혈액생화학 측정 완료 4] 조직병리 수행 완료 5] 바이러스 역가분석을 통한 병원성 평가 완료 	100%

(2) 2차년도 목표달성도

최종 연구목표	연구 진행상황 및 최종결과	달성도 (%)
■ 2013~2014년 인플루엔자 백신주 중 A형(H3N2) 바이러스에 대한 병원성주 개발	<ul style="list-style-type: none"> ■ Mouse-adapted H3N2 인플루엔자 바이러스 주의 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 1차년도에 개발한 “신공정 방법”을 적용하여 마우스에서 병원성을 보이는 Mutant Type의 인플루엔자 바이러스 개발에 성공하였음 ■ 개발 공정 <ul style="list-style-type: none"> 1 단계: Lung Infection→Cell Culture of Lung Homogenate →Lung Infection (Lung-Cell-Lung Passage) 2 단계: Lung Infection→Lung Infection (Lung-to-Lung Passage) ■ 개발 결과 <ul style="list-style-type: none"> - 2종의 Inbred Mouse를 사용하여 상기의 개발 공정을 통해 치사력을 보이는 마우스 병원성 MT 인플루엔자 바이러스 5종 확보 	100%
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Plaque Purification을 통한 Virus Clone 생산 <ul style="list-style-type: none"> 1] DBA/1J에 병원성을 보이는 <u>3종</u>을 최종 확보 및 대량 생산 완료 <ul style="list-style-type: none"> - DBA/1J_P9_C1, DBA/1J_P11_C2, DBA/1J_P13_C1 2] Balb/c에 병원성을 보이는 <u>2종</u>을 최종 확보 및 대량 생산 완료 <ul style="list-style-type: none"> - Balb/c_P8_C2, Balb/c_P9_C2 	100%
■ 마우스 병원성 바이러스 유전자 서열정보 분석	<ul style="list-style-type: none"> ■ 마우스 병원성 바이러스 클론에 대한 전체 유전자 분석 <ul style="list-style-type: none"> 1] Wild Type 및 DBA/1J, Balb/c 유래 마우스 병원성 Virus Clone 3종에 대해 Viral RNA 분리/cDNA 합성/8 Gene Specific Primer를 이용한 PCR Product 확보/유전자 서열분석 완료 2] 실적 <ul style="list-style-type: none"> - 1종의 Wild Type 바이러스 주에 대한 전 서열 분석 완료 - 5종의 마우스 병원성 바이러스 주에 대한 전 서열 분석 완료 ■ 유전자 서열분석을 통한 병원성 기여 인자 분석 <ul style="list-style-type: none"> 1] Wild- 및 Mutant-Influenza Virus (5종)의 유전자 서열분석 완료 2] 염기서열 분석 외에 해당 단백질 내의 아미노산 서열 분석 및 치환 분석 완료 3] 선행 연구논문을 기초로 병원성 기여 인자에 대한 분석 수행 완료 	100%
■ 마우스 병원성 분석	<ul style="list-style-type: none"> ■ 마우스 병원성 분석을 통한 D/B 구축 <ul style="list-style-type: none"> 1] MLD₅₀, MID₅₀ 측정 완료 2] 임상증상 (체중감량) 관찰 및 측정 완료 3] 혈액학 및 혈액생화학 측정 완료 4] 조직병리(H&E, IHC) 수행 완료 5] 바이러스 역가분석을 통한 병원성 평가 완료 	100%

(3) 3차년도 목표달성도

- 3차년도에는 질병관리본부에서 제공한 두 종류의 바이러스[Influenza A virus H3N2 (A/Incheon/1593/2015)와 Influenza A virus H3N2 (A/Honkong/7127/2014)]를 가지고 1차년도 및 2차년도에 성공적으로 확보한 다양한 mouse adaptation 기술을 적용하여 mouse pathogenic한 Influenza virus 제조하고자 하였다.
- 그러나, 연구개발에 사용한 두 종류의 바이러스는 기존 방식과는 달리 ①초기 바이러스 감염원으로 사용하기 대량증식이 필요한데 사용한 MDCK 및 SIAT 세포주에서 바이러스의 증식이 거의 일어나지 않아 고 역가의 바이러스를 확보하기가 어려웠으며 ②또한, lung-cell-lung passage를 위해서 mouse의 lung infection을 통해 얻어진 Influenza virus가 포함된 lung lysate를 MDCK 및 SIAT 세포주에서 감염시켰을 때 immune clearance에 의해 매우 낮은 titer의 virus가 존재하여 세포내 virus 증식이 거의 일어나지 않아서 mouse adaptation을 위한 연속적인 passage 진행에 많은 어려움을 겪었다.
- 3차년도 실험내용 및 실험결과에서 보듯이 상기에 언급한 두 가지 근본적인 문제점으로 인해 가능한 다양한 접근방법을 사용하여 mouse passage를 진행하였으나 의미있는 임상증상 관찰, 체중감소 현상 및 마우스 병원성 등의 특이적인 증상을 보이지 않아 mouse-adapted Influenza virus를 확보할 수 없었다. 그러나, 본 연구개발을 통해서 향후 효율적인 target cell line의 개발, 기존 세포주 내에서 Influenza virus의 낮은 감염성에 대한 원인 규명이 선행되어야 mouse pathogenic Influenza virus의 개발이 가능함을 확인하였다.

나. 본 연구과제의 기여도

(1) 생물소재 확보: 인플루엔자 백신주 중 A(H3N2)형 바이러스에 대한 마우스 병원성주 개발
2종의 Inbred mouse(Balb/c 및 DBA/1J)를 오리엔트바이오에서 구입하여 non-pathogenic한 Influenza 백신주 중 A(H3N2)형 바이러스에 대해 1차년도에는 DBA/1J mouse에서 pathogenic한 Influenza virus 4종, 2차년도에는 DBA/1J 및 Balb/c mouse에서 pathogenic한 Influenza virus 5종을 제조하는데 성공하였음.

3차년도 실험내용 및 실험결과에서 상기에 언급한 두 가지 근본적인 문제점으로 인해 가능한 다양한 접근방법을 사용하여 mouse passage를 진행하였으나 의미있는 임상증상 관찰, 체중감소 현상 및 마우스 병원성 등의 특이적인 증상을 보이지 않아 mouse-adapted Influenza virus를 확보할 수 없었다. 그러나, 본 연구개발을 통해서 향후 효율적인 target cell line의 개발, 기존 세포주 내에서 Influenza virus의 낮은 감염성에 대한 원인 규명이 선행되어야 mouse pathogenic Influenza virus의 개발이 가능함을 확인함.

(2) Pathogenic Influenza virus의 제조기술 확보

마우스에서 병원성을 보이는 Influenza virus를 개발하기 위해 일반적으로 널리 사용하는 lung-to-lung passage 방법이 아닌 새롭고 차별화된 접근방식을 통해서 마우스에서 pathogenic한 Influenza virus 제조기술 및 표준작업 공정서(SOP)의 확보하였음. 즉, 기존에 보고된 lung-to-lung passage 방법이 아닌 2단계 접근방식인 lung-cell-lung passage 및 lung-to-lung passage를 사용하게 되면 인플루엔자 바이러스가 효과적으로 모든 마우스의 lung에서 passage가 되어 대량 증식을 통해 효과적으로 mutant 인플루엔자 바이러스의 제조가 가능하다는 사실을 밝혀냄.

따라서 마우스에서 pathogenic한 바이러스를 제조하기 어려운 많은 다른 종류의 Influenza virus 및 타 바이러스에 대해서도 본 개발방법을 동일하게 적용하게 되면 이를 통해 빠르고 손쉽게 mouse pathogenic strain을 제조할 수 있는 핵심 기반기술을 확보하였다고 판단됨.

(3) Pathogenic Influenza virus의 유전자 서열규명 및 분석

유전자 전 서열분석을 통해 마우스에 pathogenic virus strain으로 변화하는데 관여하는 주요 유전자 부위를 추정하였으며, 이에 대한 유전자 정보를 활용하면 효과적인 치료제 및 백신 개발에 대한 기초자료 및 정보를 제공할 수 있으므로 향후 이를 통한 의약품 개발의 가속화에도 기여할 수 있음.

(4) 질환모델 기반기술 구축: 마우스 감염모델 구축을 통한 기초연구 인프라 제공

1, 2차년도에 개발한 mouse pathogenic Influenza A virus[A/Victoria/361/2011, H3N2] 주 및 [A/Switzerland/9715293/2013(H3N2)-like virus] 주]의 확보로 향후 바이오 및 제약사에서 개발하는 치료제 및 백신 후보물질의 약효 및 독성평가에 마우스 질환모델을 제작을 통해 직접적으로 활용이 가능하므로 적은 비용으로 신속하게 개발을 가능케 함.

- ① 국내 대학 및 바이오사에서 기초연구 및 제품개발 연구에 직접적으로 활용이 가능함.
- ② 소동물인 마우스를 이용한 효능 및 독성평가 모델로 사용할 수 있는 생물소재의 확보 및 기반기술을 구축하였음.

제2장 국내외 기술 현황

Pandemic Influenza A(H3N2) virus는 사람에게 감염 시에 매우 높은 병원성 및 치사율을 보인다. 이러한 많은 pandemic strain은 transmission을 통한 adaptation 또는 genetic reassortment를 통해서 avian Influenza virus strain으로부터 유래된다. 1997년 이후로 보고되었던 수백만의 조류를 사망시킨 고 병원성 H5N1 virus의 출현은 사람에게 385명의 감염을 일으키고 이중에 243명이 사망하였다. Avian Influenza virus가 사람에게 adaptation 되는 과정에서 병원성을 결정하는데 중요한 mutation의 획득으로 인해 야기된다. 따라서 다른 host species에 인플루엔자 바이러스의 adaptation을 결정하는 인자에 대한 폭 넓은 이해는 효과적인 백신 및 치료제 개발 전략을 수립하는 데에 중요한 정보를 제공해 줄 것이다. 그러나, human Influenza virus가 마우스에 adaptation 되는 경우에 향상된 병원성을 보일지라도 이에 대한 상세한 기전 연구는 아직까지도 불명확하다.

H3N2 Influenza virus가 사람에게 감염되는 사례는 포유동물에서 host range와 pathogenicity를 결정하기 위한 유전자 기반의 연구가 필요하게 되었다. Mouse는 Influenza virus의 pathogenicity와 host range restriction mechanism을 연구하는 데에 있어서 매우 좋은 동물모델임을 보여주고 있다. Mouse는 자연 상태 하에서는 사람 또는 다른 동물 유래 Influenza virus에 감염되지 않으나, 대부분의 바이러스 주는 실험적으로 일련의 반복적인 lung-to-lung passage를 통하여 mouse에서 virulence하도록 적응이 될 수 있다. Mouse adaptation은 virulence에 있어서 매우 중요한 결정인자인 기능들의 획득에 기인하는 것으로 생각되어진다.

Mouse-adapted Influenza virus mutant는 통상적으로 감염된 동물의 bronchi 또는 lung에서 pathology를 야기시킨다. Mouse-adapted Influenza virus에 의해 야기되는 lung pathology는 사람 Influenza pneumonia와 상당한 유사성을 보여주고 있다. 따라서 mouse adaptation 과정에서 virus 내에서 일어나는 유전적 변화는 사람의 lung에 감염되는 과정에 대한 중요 인자들에 대한 정보를 제공하게 된다. Mouse에서 Influenza virus의 host range 및 virulence에 영향을 미치는 몇몇 인자들이 규명이 되었으며 이중에서 Hemagglutinin(HA)이 mouse lung virulence의 일차적인 결정인자로 보고되어 있다. 또한, Influenza virus의 7개 다른 유전자 역시 virulence에 상당히 많은 관여를 하고 있음이 최근 논문을 통해 지속적으로 보고되고 있다.

현재까지 국내에서는 Influenza virus의 mouse adaptation 관련 기초 및 응용연구가 미진한 상태이다. 따라서 본 학술연구 용역사업을 통해 마우스에 감수성이 매우 낮은 H3N2 Influenza virus를 가지고 새로운 개발공정을 도입하여 mouse-adapted Influenza virus mutant를 개발하게 되면 국내 많은 대학, 제약 및 바이오회사에서 개발 중인 Influenza virus 관련 치료제 및 백신 후보물질의 약효 및 독성평가에 커다란 도움이 될 것으로 사료된다.

제3장 최종 연구 내용 및 방법

1. 인플루엔자 백신주 중 A(H3N2)형 바이러스에 대한 마우스 병원성주 개발

가. 인플루엔자 백신주 중 A(H3N2)형 인플루엔자바이러스를 최소 10회 이상 마우스에 감염 계대배양(Lung-to-Lung Passage)하여 치사력(Lethality)을 가지는 바이러스 주 생산

(1) 바이러스 및 세포주 확보

본 연구팀은 마우스 실험동물 감염원으로 사용할 Influenza A virus (H3N2)를 질병관리본부에서 분양받아 wild type 바이러스로 실험에 사용하였다. 인플루엔자 바이러스 감염시험에 필요한 MDCK 세포주는 유상으로 KCLB(Korean Cell Line Bank)에서 분양받았고, MDCK-SIAT 세포주는 질병관리본부로부터 제공받아 사용하였다.

MDCK 및 MDCK-SIAT 세포주 배양은 다음의 방법으로 진행하였다. 먼저 5% CO₂ 배양기에 서 175cm² 세포배양 플라스크를 꺼내어 광학도립 현미경으로 MDCK 세포주가 단층 형성을 확인한 후 PBS, Trypsin-EDTA, 세포배양용 MEM media를 37°C 항온 수조에 약 15~20 분간 담가두었다. 기존의 세포배양액을 제거 한 후 PBS를 10ml 을 넣고 잘 흔들어 준 PBS를 제거하며 이를 2회 반복하였다. Trypsin-EDTA 용액을 2ml 정도 넣고 3~5분간 세포가 떨어질 때까지 반응시키고, 세포가 떨어졌을 때 세포배양용 배지를 약 5ml 정도 넣고 잘 섞어 주고 배양액을 conical tube로 옮기고, 1,000rpm에서 5분간 원심분리 후, 배지를 제거하였다. 세포 수가 2×10^5 cells/ml 정도로 희석되게 세포배양용 배지를 채워서 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 세포가 단층을 형성할 때까지 배양하였다.

(2) Wild Type 바이러스의 동정

바이러스를 대량으로 확보하기 위하여 wild type 바이러스를 MDCK 또는 MDCK-SIAT 세포주에 infection 하고 35~37°C에서 72~96시간 배양을 한 후에 바이러스가 포함된 상층액을 취하여 -70°C 초저온냉동고에 보관하였다. 세포증식을 통해 얻어진 wild type 인플루엔자 바이러스의 titer pfu/mL 을 기준으로 시험을 진행하였고, H3N2 인플루엔자 바이러스를 이용한 in vitro 및 in vivo 관련 모든 시험은 biosafety level 2(BSL-2)의 실험실에서 수행하였다.

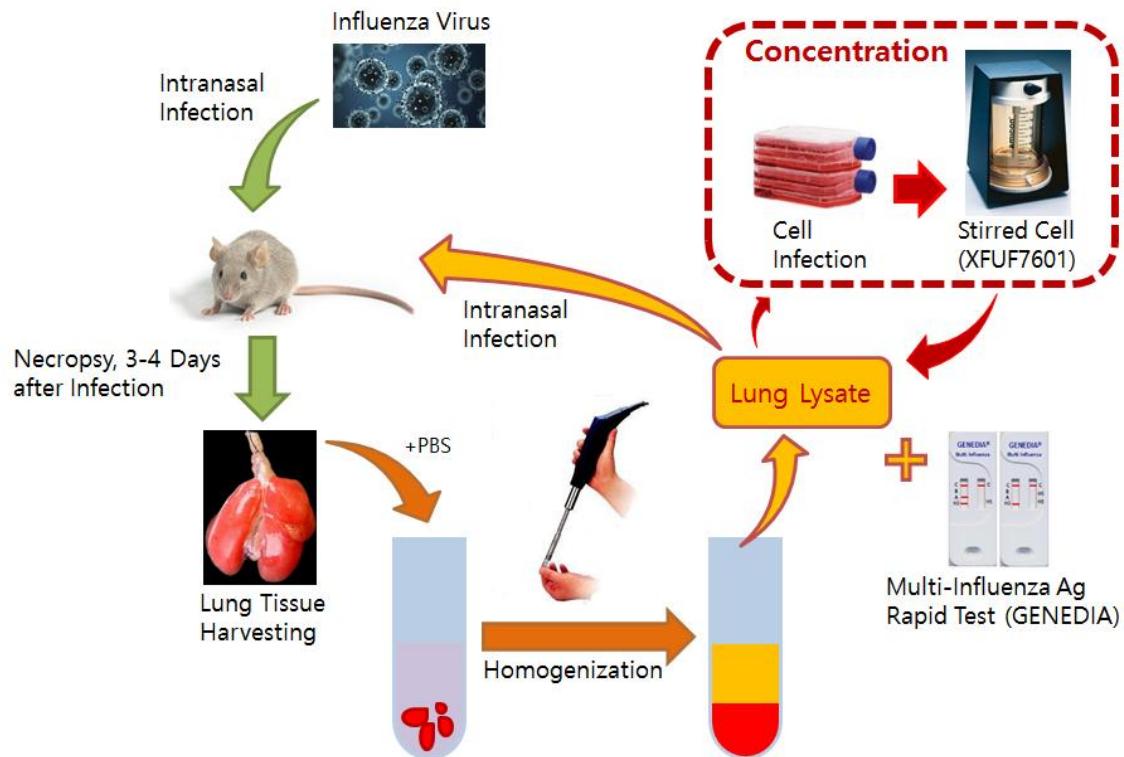
(3) Mouse-adapted 인플루엔자 바이러스의 제조

마우스 병원성 인플루엔자 바이러스를 생산하기 위해 구입한 실험동물은 최소 5일~10일의 순화기간을 거쳤으며, 선행시험을 통해 바이러스에 대한 민감도가 높은 마우스를 선정하고, 이 마우스를 본 시험 및 병원성 분석시험에 적용하였다.

Mouse(주로 Balb/c, DBA/1J)를 (주)오리엔트바이오에서 구입(여유동물로 약 10% 포함)하여 사육실에서 순화기간을 거친 후 감염실로 이동하였고, 감염 전 체중 및 임상관찰을 바탕으로 사용할 동물을 선별하였다. 첫 번째 passage는 세포배양을 통해 확보한 wild type 바이러스 (P0)를 초기 감염 접종균주로 이용하였다. 감염 당일 인플루엔자 바이러스를 PBS로 희석하여 적정 titer(5×10^7 pfu/mL가 적합)로 제조하였고, 마우스에게 마취제(Avertin, 0.2ml/10g B.W.)를 복강 내 투여하여 약간의 마취상태로 만든 다음, 인플루엔자 바이러스 배양액(P0)을 50ul/mouse 용량으로 비강 내에 접종하였다. 비강접종 후 3일 또는 4일 간격으로 passage를 진행하였고, mouse model 10마리 중 5마리 비율로 다음 passage의 접종원과 7 일~10일 동안의 임상증상 관찰개체를 임의로 구분하여 사용하였다. 임상관찰은 최소 1일 1회, 사망여부 및 임상증상을 개체별로 관찰하며 동물의 체중을 확인하였다. 사망개체 발생 시 사망일자 및 체중감소 등을 기록하였고, 관찰기간 동안 감염 직전 체중에서 25% 이상 감소된 개체는 폐사개체로 평가하였다.

바이러스 감염 후 3일 또는 4일 차에 접종원으로 이용되는 마우스는 체중을 측정하고 폐를 적출하였다. 적출된 폐를 균질화한 바이러스 액을 다음 passage의 접종원으로 사용하였다. 기본적으로 적출한 폐에 장기중량 200mg당 1mL의 PBS를 넣고 Homogenizer를 사용하여 균질화한 다음, 그 균질액을 dry ice(in EtOH)와 water bath에서 2~3회 freezing/thawing 과정을 거쳐 조직 내 침투되어있던 바이러스를 최대한 균질 액으로 얻어내도록 하였으며 15,000rpm에서 10분간 원심분리하고 cell debris 제거 및 미생물 오염을 방지하기 위해 0.2um filter를 사용하여 filtering 과정을 수행하였다. 균질 혼탁액은 즉시 -70°C 초저온 냉동고에 보관하였으며, 소분해 놓은 균질 혼탁액을 다음 passage의 접종원으로 사용하였다.

실험동물의 종류에 따라서 최소 10~20회 정도 passage를 수행한 후에 lung homogenate 내에 존재하는 pathogenic 인플루엔자 바이러스는 MDCK 세포주를 이용한 plaque purification 을 통해서 순수한 clone을 분리하였다. 분리한 각 clone들을 가지고 MDCK 세포주에서 증식하였고 동물실험을 통해 pathogenic 인플루엔자 바이러스임이 확인한 다음 차기 실험을 위해서 stock을 제조하고 이를 -70°C 초저온냉동고에 소분하여 보관하였다. 모든 실험동물 구입 및 동물실험은 오리엔트바이오 동물실험윤리위원회의 심의 및 승인을 받아서 수행하였다.



나. Mouse-adapted 인플루엔자 바이러스를 이용한 Virus Plaque Assay 및 Virus Clone 생산

(1) Virus Plaque Assay

MDCK 세포주를 175cm^2 cell culture flask에 배양하여 90% 이상이 자라면 MDCK cell을 counting하고 6-well plate에 well 당 3×10^5 cell이 되도록 seeding하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 하루 동안 plate에 부착시켰다. Plaque assay를 위해 사용할 virus는 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 으로 만들기 위해서 열음에서 녹인 후 배지로 serial dilution 하여 준비해 놓고, 미리 준비한 6-well plate를 꺼내어 PBS를 사용하여 wash하고 serial dilution하여 준비해 둔 virus를 각 well 마다 200ul씩 분주하였다. 6개의 well 중 4개까지 연속적으로 희석한 virus를 넣고 5번째 well에는 인플루엔자 바이러스 positive control, 마지막 well은 negative control로 깨끗한 배지를 넣었다. 6-well plate를 37°C , 5% CO_2 incubator에서 15min 간격으로 tilting하며, 1시간 동안 virus를 cell에 흡착시켰다. Plaque assay media는 L-15 media(40ml)에 1M HEPES(1.6ml), 50mg/mL gentamycin(0.04ml), 7.5% sodium

bicarbonate(0.8ml), 200mM L-Glutamine(0.4ml), 1ug/mL TPCK trypsin(0.16ml)을 넣고 제조하였다. Media와 미리 만들어둔 1.6% Seaplaque agarose(low melting temperature agarose)를 1대 1로 섞고 39~40°C를 유지하여 2ml씩 넣었다. Agarose가 잘 굳도록 3시간 정도 실온에서 굳인 후에 37°C, 5% CO₂ incubator에 넣고 plaque가 보일 때까지 약 3~4일 정도 배양하였다.

Plaque가 눈으로 보이면 plaque를 좀 더 선명히 보기 위해 사전에 제조한 staining buffer (D.W. 300ml + crystal violet 40ml + MeOH 80ml)를 잘 섞은 후 한 well 당 2ml씩 넣고, 3시간 정도 실온에서 염색하였다. Staining한 후 plate는 수돗물에 세척하고, 건조시킨 후 plaque 개수를 세어 PFU/ml 단위로 정량 분석하였다(PFU = average plaques x dilution factor/mL).

(2) Virus Clone 분리

Virus clone 분리시험을 위한 6-well plate는 filter tip을 이용하여 mouse pathogenicity를 보이는 passage에서 각각 4~5 clone을 분리하고 virus diluent media 0.4ml 담긴 E-tube에 담아 vortexing한 후에 centrifuge를 수행하였다. MDCK cell(2×10^5 cell/mL)의 6-well plate에 80% 이상 confluence가 되었을 때, virus clone의 elution된 media 0.4ml과 infection media 4ml을 섞은 후 MDCK 세포주에 감염을 2~3일 동안 유도시켰다.

(3) Virus Clone 분리 후 바이러스 Plaque Assay

분리한 virus clone의 PFU를 확인하기 위해 plaque assay 실험을 진행하였다. MDCK 세포주를 175cm² cell culture flask에 배양하여 90% 이상 자라면 MDCK cell을 counting 하고 6-well plate에 well당 3×10^5 cell이 되도록 seeding 하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하루 동안 plate에 부착시켰다. Virus를 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 으로 만들기 위해서 열음에서 녹인 후 배지로 serial dilution 하고 이 과정은 모두 열음 위에서 진행하였다. 준비해 둔 6-well plate를 꺼내 PBS를 이용하여 조심스럽게 세척하고, serial dilution하여 준비해 둔 virus를 각 well마다 200μl씩 조심스럽게 분주하였다. 6개의 well 중 4개까지 연속적으로 희석한 virus을 넣고 5번째 well에는 인플루엔자 바이러스 positive control, 마지막 well은 negative control로 깨끗한 배지를 넣었다. 6-well plate를 37°C, 5% CO₂ incubator에서 15분 간격으로 tilting하며, 1시간 동안 virus를 cell에 흡착시켰다. Plaque assay media는 L-15 media(40ml)에 1M HEPES(1.6ml), 50mg/mL gentamycin(0.04ml), 7.5% sodium bicarbonate(0.8ml), 200mM L-Glutamine(0.4ml), 1ug/mL TPCK trypsin(0.16ml)을 넣고 제조

하였다. 미리 만들어둔 1.6% Seaplaque agarose(Low melting temperature agarose)를 1대로 섞고 37°C를 유지하여 2ml씩 조심스럽게 넣었다. Agarose가 잘 굳도록 3시간 정도 말린 후 37°C, 5% CO₂ incubator에 넣고 plaque가 보일 때까지 약 2~3일 정도 배양했다. Plaque가 눈으로 보이면 plaque를 좀 더 선명히 보기 위해 사전에 제조한 staining buffer (D.W. 300ml + crystal violet 40ml + MeOH 80ml)를 잘 섞은 후 한 well 당 2ml씩 넣고 3시간 정도 실온에서 염색한 후, plate는 수돗물에 세척하고 건조시킨 다음 plaque 개수를 세어 PFU/ml 단위로 정량 분석하였다(PFU = average plaques x dilution factor/mL).

(4) Virus Clone 확인을 위한 Mortality Test

마우스 병원성 인플루엔자 바이러스의 pathogenicity를 확인하기 위하여 마우스 병원성 바이러스주를 선별한 strain과 동일한 마우스를 구입하여 순화기간을 거치고 접종하여 병원성 분석시험을 수행하였다. 병원성 H3N2 인플루엔자 바이러스 감염 당일에 마우스에게 마취제 (Avertin, 0.2ml/10g B.W.)를 복강 내 투여하여 약간의 마취상태로 만든 다음, 비강 내에 1 x 10⁷ pfu/head 정도의 인플루엔자 바이러스 배양액 50ul 정도를 접종하였다(Clone 당 4~5마리 사용). 감염일(Day 0)부터 7~10일 동안 임상관찰 기간을 갖으며 최소 1일 1회, 임상증상 및 사망여부를 개체별로 관찰하였다.

2. 유전적 서열정보 분석

가. 마우스 계대배양 후 확보된 바이러스에 대한 전체 유전자 (8종) 분석

(1) RNA 추출

마우스 병원성 virus clone을 가지고 QIAGEN社 Viral RNA Mini Kit를 사용하여 RNA을 다음의 과정으로 추출하였다.

Buffer AVL(Carrier RNA포함) 560ul을 1.5ml tube에 먼저 넣었다. 여기에 시료 140ul을 넣고 15초 동안 혼합(pulse-vortex)하여 실온에서 10분 동안 정치한 후 가볍게 spin-down하고 이어서 에탄올(96~100%) 560ul을 넣고 15초 동안 혼합한 후에 spin-down 하였다. 혼합된 시료 630ul을 QIAamp Mini spin column(2ml tube 포함)에 넣어 6,000xg에서 1분 동안 원심분리하고, RNA 흡착단계 필터 된 액과 tube를 베린 후 QIAamp spin column을 새로운 2ml tube에 옮겼다. Buffer AW1 500ul을 QIAamp spin column에 넣고, 6,000xg에서 1분 동안 원심분리한 다음(1번째 wash단계), QIAamp spin column을 새로운 2ml tube에 옮긴 후 Buffer AW2 500ul을 QIAamp spin column에 넣고 20,000xg에서 3분 동안 원심분리 하였다(2번째 wash 단계). 1.5ml tube에 QIAamp spin column을 장착하여, Buffer AVE 약 60ul을 column에 주입하고 1분 동안 방치시킨 다음, 6,000xg에서 1분 동안 원심분리를 수행하였다. 즉시 사용하지 않을 시 -70°C 초저온냉동고에 보관하였다.

(2) cDNA 합성

각각의 마우스 병원성 virus clone의 8개 유전자(PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS)는 질병 관리본부 인플루엔자 바이러스과에서 specific primer forward의 정보를 얻어서 합성을 의뢰하였고 이를 가지고 cDNA를 합성했다. 이에 대한 실험과정은 다음과 같다. 먼저 추출한 RNA specific primer와 SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen 사)를 사용하여 1st cDNA를 합성했다. One step 조성은 primer 0.75ul, dNTP 0.75ul, D.W. 9.75ul, RNA 8.25ul로 total 19.5ul이며 65°C에서 5min 반응을 시키며, two step 조성은 5X First-Strand Buffer 6.5ul, 0.1M DTT 1.5ul, RNase out 1.5ul, SuperScript III RT 1.5ul mixture를 만든 후 one step을 진행한 PCR tube에 각각 10.5ul 씩 분주하여 25°C 5분, 50°C 60분, 72°C 7분 반응하여 cDNA 합성을 진행하였다.

(3) PCR 수행

각 virus clone으로부터 합성된 1st cDNA product을 사용하여 8 gene specific primer (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS)로 PCR을 진행하였다. 이에 대한 실험과정은 다음과 같다. Expand High Fidelity PCR System, dNTPack (Roche) kit로 사용하여 Mix ①과 ②으로 나누어 mixture를 사용하고 먼저 mix ①은 각각 primer(F) 2.5ul, primer(R) 2.5ul, PCR nucleotide 1ul, template 2ul, D.W. 17ul이며, mix ②는 D.W. 19ul, expend high fidelity buffer 10X 5ul, enzyme mix 1ul이며 total 50ul로 PCR 진행하였다.

Table 1. Optimized PCR condition for the identification and characterization of H3N2 Influenza virus

반응 종류	조건	반응 반복수
Initial Denaturation	95°C 3min	1 cycle
Denaturation	95°C 20sec	30 cycles
Annealing	58°C 40sec	
Extension	72°C 3min	
Final Extension	72°C 5min	1 cycle
Cooling	4°C ∞	

(4) 전기영동

증폭된 gene product는 1.5% agarose gel에 3ul를 loading 하여 electrophoresis한 후 각각의 유전자 band를 확인하였다. 각 해당년도에 제공된 H3N2 Influenza virus에 따라 각 8 gene segment의 크기는 다양하며 질병관리본부에서 제공한 wild type의 유전자정보를 이용하였다.

(5) 염기서열 분석

인플루엔자 바이러스의 염기서열 분석은 전기영동 후 PCR 산물을 가지고 수행하였으며, 염기서열 분석을 통해 인플루엔자임을 최종 판정하였다. 염기서열 분석을 위하여 전기영동에서 정제된 DNA 1ul를 주형으로 바이러스 타입 및 진행방향에 따라 forward, reverse primer로 국내 서열 분석 전문업체에 의뢰하여 분석하였다.

3. Mouse-adapted H3N2 Influenza virus의 병원성 분석

최종 선정된 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스주에 대한 MLD₅₀, MID₅₀, 임상증상 관찰, 병리학적 검사(임상병리학적 검사, 조직병리학적 검사) 및 바이러스 역가분석 등을 통한 병원성 평가를 실시하였다.

가. 최종 선정된 병원성 바이러스의 MLD₅₀ (50% Mouse Lethal Dose) 측정

최종 선정된 Mouse-adapted mutant 인플루엔자 바이러스주를 이용하여 병원성 MLD₅₀ 분석 시험에 사용하였다.

- (1) 각각의 바이러스를 10mM PBS를 이용하여 serial dilution 하였다.
- (2) 실험동물을 마취한 다음 mouse-adapted mutant 바이러스를 50ul 씩 비강내로 접종하였다.
- (3) 접종 후 14일 동안의 임상증상, 체중측정 등의 관찰기간을 갖으며, 각 군에서 서로 다른 infection dose로 감염시킨 마우스의 폐사개체 수를 확인하였다.
- (4) 상기에서 얻어진 실험결과를 가지고 Reed-Muench method에 의하여 MLD₅₀를 구하고 PFU로서 표기하였다.
- 1차년도는 감염 전 체중 대비 25% 이상의 체중 감소를 사망한 개체로 data 처리하였으나, 심한 체중감소 이후에 다시 회복하는 경향이 관찰되어 2차년도는 폐사상태로 발견된 개체를 사망으로 기록하였다.

나. 최종 선정된 병원성 바이러스의 MID₅₀ (50% Mouse Infectious Dose) 측정

Mouse-adapted 인플루엔자 바이러스의 제조과정에서 적합한 것으로 선정된 mutant 바이러스를 이용하여 MID₅₀ 분석시험에 사용하였다.

- (1) 각각의 바이러스를 10mM PBS를 이용하여 serial dilution 하였다.
- (2) 마우스를 마취한 후에 mouse-adapted mutant 바이러스를 50ul 씩 비강내로 접종하였다.
- (3) 접종된 바이러스는 체내 증식이 접종 후 3일 째에 최고조에 이르므로, 이때 안락사하여 마우스의 폐를 15mL tube에 담아 장기중량 100mg당 1mL의 PBS를 넣고 Homogenizer를 사용하여 균질화 하였다.
- (4) 균질액을 dry ice(in EtOH)와 water bath에서 2~3회 freezing/thawing 과정을 거쳐 조직 내 침투되어있던 바이러스를 최대한 균질액 내로 빠져나오도록 하며 cell debris를 제거

하기 위한 filtering 과정을 수행하였다.

- (5) 균질 혼탁액은 즉시 상용화된 진단킷트인 “제네디아 Rapid Kit”를 사용하여 virus의 존재를 확인함으로써 lung 세포 내에 인플루엔자 바이러스의 감염 여부를 측정하였다.
- (6) 상기에서 얻어진 실험결과를 가지고 Reed-Muench method에 의하여 MLD₅₀를 구하고 PFU로서 표기하였다.

다. 각 Pathogenicity 분석을 위한 실험 시에 공통 분석항목

(1) 임상증상 관찰

임상증상 관찰은 동물 입수일로부터 시험 종료일까지 모든 시험동물에 대하여 사망여부 및 임상증상을 개체별로 매일 관찰하였다. 관찰항목은 피부 및 털, 눈 및 점막, 호흡계, 순환계, 자율 및 중추신경계, 체위 및 자세, 행동형태의 변화를 포함하였다. 증상을 관찰할 때에는 행동 및 외관의 이상뿐만이 아니라 접촉하거나 자극을 주어 반응을 살펴보았다. 분변과 뇨의 배설상태 또한 중요한 관찰항목 중의 하나이다. 동물을 관찰하는 것 뿐 아니라 동물실의 사육환경과 주변의 기자재까지 고려하면서 관찰하였다. 증상의 발현 및 소실시간은 시계나 타이머를 이용하여 측정하고 기록하며, 수치로 표현할 수 있는 것들은 자로 측정하여 크기를 기록하였다. 동시에 관찰된 증상이 사진으로 보관할 필요가 있는 경우 사진을 촬영하였다. 동물이 계속하여 고통을 느끼거나 다음 관찰 시까지 생존할 가능성이 없다고 판단되면 안락사를 고려해 진행하였다. 시험 중 사망동물이 관찰되면 사체의 상태를 관찰, 기록하고 사체중량을 측정하였다. 관찰일 및 사체의 상태를 고려하여 부검을 수행했다.

(2) 임상병리 및 조직병리학적 검사

인플루엔자 바이러스의 병원성을 평가하기 위하여 임상병리학적 검사를 실시하였고, 검사는 혈액학 검사 및 혈액생화학 검사를 실시하였다. Mouse-adapted 인플루엔자 바이러스의 제조 과정에서 적합한 것으로 선정된 mouse model을 이용하여 분석시험에 사용하였다.

- (가) 정상군, wild type 및 mouse-adapted H3N2 인플루엔자 바이러스를 50ul 씩 비강내로 접종하였다. 접종 후에 계획적으로 마우스를 심마취시키고 복대정맥에서 채혈하였다.
- (나) 채혈한 혈액은 검사에 적합한 채혈 tube에 정량 분주하였다. 혈액학 검사를 위한 혈액은 EDTA tube에 담고 항응고제와 혼합되도록 섞고, 자동혈액학 분석기를 이용하여 다음의 항목에 대해 검사하였다.
 - 혈액학적 검사항목: total leukocyte count, erythrocyte count, differential leukocyte

count, hematocrit, hemoglobin, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, platelet count

(d) 혈액생화학 검사는 혈액을 SST tube에 분주하고 10분 동안 방치한 다음, 10,000rpm으로 5분간 원심분리 후 분리된 혈청으로 자동생화학분석기를 이용하여 다음의 항목을 검사하였다.

- 혈액생화학적 검사항목: aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, blood urea nitrogen, creatinine, total protein, albumin, globulin, albumin/globulin ratio, glucose, triglyceride, total cholesterol, calcium, phosphorus, sodium, potassium, chloride

(e) 조직병리학적 검사

복대정맥에서 채혈하고 방혈시킴으로 안락사를 유도한 후 부검을 실시하였다.

- ① 부검을 실시하는 모든 동물에 대하여 장기 및 조직을 적출하고 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 폐(lung), 기관지(trachea including nose), 간(liver), 심장(heart), 신장(kidney), 비장(spleen), 뇌(brain) 등 총 7개 장기를 적출하였다.
- ② 고정된 조직은 탈수-침투-투명화 과정을 거친 후, paraffin block을 제작하여 4 μm 두께로 조직을 절편하고 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하였다. 염색된 슬라이드는 광학현미경 하에서 검경하여 조직의 이상여부를 관찰하였다.
- ③ 인플루엔자 바이러스에 의한 병원성을 관찰하기 위하여 폐조직에서 H3N2 virus에 대한 면역조직화학염색(immunohistochemistry, IHC)을 실시하였다. 폐조직의 paraffin block을 4 μm 두께로 절편하고 탈파라핀과 함수과정을 거친 후 항원성을 부활시키기 위하여 pH6.0의 10mM sodium citrate buffer에서 100°C로 15분간 끓이고 수세하였다. Peroxidase blocking solution으로 10분간 처리한 후 PBS로 세정하고, protein blocking solution으로 10분간 반응시켰다. H3N2 virus에 대한 일차항체를 조직과 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 세정하고, biotin 표지 이차항체를 실온에서 30분간 반응시킨 다음, avidine-biotin-peroxidase 시약과 1시간 반응시키고 PBS로 세정하였다. 발색물질인 DAB과 10분 반응시킨 후 수세하였다. 대조염색을 위하여 hematoxylin으로 2분간 처리한 다음 탈수과정을 거치고 봉입하였다. 광학현미경 하에서 발현여부와 발현 부위를 관찰하고 Hematoxylin & Eosin 염색 슬라이드의 형태적 소견과 함께 비교 평가하였다.

라. Mouse-adapted Influenza Virus의 역가분석을 통한 병원성 평가

- (1) Mouse를 마취시킨 후에 wild type (live vaccine) 인플루엔자 바이러스를 serial dilution하여 각각 50ul 씩 단회 비강 투여하였다.
- (2) Live vaccine 투여일로부터 4주 경과한 시점에서 mouse-adapted mutant 인플루엔자 바이러스를 공격하고 10일 동안에 각 군에서의 안락사 또는 사망율을 측정하고 이를 통해 ED₅₀를 측정하였다.
- (3) 이를 통하여 향후 치료제 및 백신 후보물질에 대한 효능평가에 있어서 'Mouse를 이용한 약효 및 효능평가 모델의 구축 여부'를 확인할 수 있다.

제4장 최종 연구 결과

1차년도 연구 보고서

2012~2013 절기 인플루엔자 백신주 중 A(H3N2)형 바이러스에 대한 마우스 병원성주 개발

제4장 최종 연구 결과

제1절 2012~2013 절기 인플루엔자 백신주 중 A(H3N2)형 바이러스에 대한 마우스 병원성주 개발 (1차년도)

1. 인플루엔자 A(H3N2)형 바이러스에 대한 마우스 병원성주 개발

가. Wild Type의 Influenza A Virus H3N2 (A/Victoria/361/2011) 대량생산

(1) 세포배양법을 이용한 대량생산

(가) 실험 목적

질병관리본부에서 분양받은 Wild Type(WT)의 Influenza A virus H3N2(A/Victoria/361/2011)를 마우스에 반복적으로 lung-to-lung passage를 통해 마우스 병원성주의 인플루엔자 바이러스를 개발하기 위해서는 높은 농도의 인플루엔자 바이러스가 필요하며, 이를 위해서 세포배양법을 이용하여 바이러스를 대량 생산하고 농축하여 감염 접종원으로 사용하고자 하였다.

(나) 실험 결과

① 4차에 걸쳐 대량 세포배양 실험을 수행하였으며 이에 대한 결과는 다음과 같다.

항 목	1차 생산	2차 생산	3차 생산	4차 생산
배양기간 (3일)	2014/07/15~18	2014/07/18~21	2014/07/25~28	2014/10/07~10
배양 부피 (30ml SFM /T-175 flask)	M1: 90ml, 3 flask	M1: 150ml, 5 flask	M1+M2 Mixture : 420ml, 14 flask	3차배양액 : 240ml, 8 flask
	M2: 90ml, 3 flask	M2: 150ml, 5 flask		
	180ml	300ml	420ml	240ml
바이러스 정량 (PFU/mL)	2.0×10^5	2.13×10^6	3.2×10^6	2.3×10^6
전체 바이러스 함량 (PFU)	3.6×10^7	6.39×10^8	1.34×10^9	5.5×10^8

② 2차, 3차 및 4차 배양액에서는 plaque assay 결과 $2.1\sim3.2 \times 10^6$ PFU/mL로 매우 안정적으로 생산이 되었음을 확인할 수 있었다. 3차로 생산한 배양액을 pooling하여 disposable concentrator(MW100,000)로 최소 10배 이상 농축하여 2.0×10^7 PFU/mL 이상이 되도록

제조하였으며 이를 마우스 감염을 위한 “Wild Type(WT)의 인플루엔자 바이러스주”로 사용하였다.

(2) SPF Egg를 이용한 대량생산

(가) 실험 목적

질병관리본부에서 분양받은 Wild Type(WT)의 Influenza A virus를 마우스에 반복적으로 lung-to-lung passage를 통해 마우스 병원성주의 인플루엔자 바이러스를 개발하기 위해서는 가능한 높은 농도의 인플루엔자 바이러스가 필요하며, 이를 위해서 세포배양보다는 egg를 이용하여 바이러스를 대량 생산하는 것이 보다 효율적인 방법으로 판단되어 예비시험을 수행하였다.

(나) 실험 결과

- ① 수득한 allantoic fluid를 가지고 plaque assay를 통해서 H3N2 Influenza virus의 역가를 분석하였으나 어떤 의미가 있는 결과를 얻을 수가 없었다.
- ② Egg production에 대한 충분한 생산 경험 미흡 및 시설 미 구축으로 인해 약식으로 배양한 결과 바이러스의 성공적인 배양 및 수득을 할 수 없었던 것으로 추정되었으며 더 이상의 진행은 추진하지 않는 것이 좋을 것으로 판단되어 추가 실험을 중지하였다.
- ③ 따라서, 세포배양 방법을 통해 높은 역가의 인플루엔자 바이러스를 대량 수득하였기에 이를 Wild Type(WT) Influenza의 seed virus로 대부분의 연구과정에서 사용하기로 결정하였다.

(3) Virus Plaque Assay 최적 조건 확립

(가) 실험 목적

Wild Type(WT) 또는 마우스에 반복적인 lung-to-lung passage를 통해 만들어지는 Mutant Type(MT)의 Influenza A virus의 역가분석을 위해서 virus plaque assay를 가장 많이 사용한다. 따라서 전 실험과정을 통해서 정확한 역가분석 데이터를 얻기 위해서 다양한 조건 실험을 통해 데이터의 재현성 및 신뢰도이 높은 최적의 분석 조건을 수립하고자 함에 있다.

(나) 실험 방법

Virus plaque assay의 최적화를 위해 다양한 조건하에서 분석을 수행하였다. Virus plaque

assay에 영향을 주는 변수로 생산 batch의 차이, plaque assay media 제조 조건, TPCK의 농도 및 바이러스 희석률질 등을 선정하였고 이에 대한 분석에의 영향 여부를 조사하고 최적의 SOP를 확립하였다(하기 검토 조건 참조).

항 목	1차 Plaque Assay	2차 Plaque Assay
시험 기간	2014/08/09~11	2014/08/10~12
역가분석 물질	3차 H3N2 virus 생산 batch	2차 H3N2 virus 생산 batch
Plaque assay media	당일 제조하여 사용	Stock 제조 후에 0.2um filtering 후 사용
TPCK 처리농도	4개 조건 (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 ug/mL)	3개 조건 (1.0, 2.0, 4.0 ug/mL)
Virus 희석 물질	2개 조건 (MEM w/o FBS, PBS)	2개 조건 (MEM w/o FBS, PBS)
Virus 희석 조건	10^{-3} , 10^{-4} , Control (Duplicate), 200ul	10^{-3} , 10^{-4} , Control (Duplicate), 200ul

(d) 실험 결과

① Virus 희석 물질

- 생산된 H3N2 virus를 가지고 plaque assay를 위해 virus를 희석하는 물질로 2개 조건 (MEM w/o FBS, PBS)을 사용하였으나 두 조건 모두 선명한 plaque이 생성되는 결과를 얻었다. 그러나, 반복적인 시험결과를 보면 재현성, 편의성 측면에서 virus를 PBS로 희석하는 경우에 보다 최적의 plaque 형성을 확인하였다.
- 간혹 plaque의 모양이 선명한 round form이 아니라 길게 끌려서 늘어지는 현상을 관찰하였으나 이는 배양기 내의 culture plate가 기울어져 놓인 경우에 발생하는 현상으로 확인하였다.
- Plaque assay 시에 virus를 PBS로 희석하는 것이 최적의 plaque 형성 조건임을 확인하였으며 향후 모든 plaque assay에서 희석물질로 PBS를 사용하였다.

② TPCK Trypsin 처리조건 (Stock Solution: 1mg/mL)

- Plaque assay media에 4개의 조건(0.5, 1.0, 2.0, 4.0 ug/mL)으로 TPCK Trypsin을 처리한 결과 $1.0\text{ug/mL} > 0.5\text{ug/mL} > 2.0\text{ug/mL}$ 순으로 좋은 결과를 얻어냈다.
- 4.0ug/mL로 처리한 경우는 control에서도 cell이 떨어져 나오는 현상이 관찰되어 TPCK Trypsin의 처리농도가 매우 중요한 것으로 판단된다.
- 최적의 TPCK Trypsin 농도는 1.0ug/mL 을 사용하는 것이 좋은 것으로 확인되었다.

③ Plaque Assay Media 제조

- Stock solution 제조 후에 4°C에서 보관하는 경우에 침전현상이 관찰되었고, 이 solution 을 0.2um filtering 한 후에 TPCK Trypsin을 농도별로 첨가하여 사용하였으나 clear한

plaque을 관찰하기 어려움을 확인하였다.

- 따라서, plaque assay media 제조는 cell에 virus를 infection 시킨 후에 곧바로 제조하여 사용하는 것이 최적의 조건임을 확인하였다.

(참고: Plaque Assay Media 조성표)

Reagent		Stock Solution	Media Prep.	Media Prep.
A	2x L-15 media	Ready to use	20ml	40ml
	HEPES	1M	800ul	1.6ml
	Gentamycin	50mg/mL	20ul	40ul
	Sodium bicarbonate	7.5%	400ul	800ul
	L-Glutamine	200mM	200ul	400ul
	TPCK trypsin	1mg/mL	40ul (21.5ml)	80ul (43ml)
B	Seaplaque agarose	1.6%	(21.5ml)	(43ml)
A : B = 1 : 1			(43ml) / 3 plate	(86ml) / 6 plate

* TPCK trypsin의 Final Concentration: 1.0ug/mL로 고정하여 사용

(4) Mouse 감염을 위한 Influenza A virus (H3N2) 농축 및 역가 분석

(가) 실험 목적

Wild Type(WT)으로 3차 바이러스 배양액을 선정하였고, 배양액의 농축과정을 거쳐 10배 이상의 높은 바이러스 농도를 확보함으로써 이를 사용하여 마우스에 반복적인 lung-to-lung passage를 통해 빠른 시간 내에 Mutant Type(MT)의 Influenza A virus를 얻고자 하는 목적으로 제조하였다.

(나) 실험 방법

① 3차 Virus 배양액 농축

- 3차 바이러스 배양액 120ml(3BT, 40ml/BT)을 4°C에서 15,000rpm, 5분간 고속 원심분리하여 상층액을 분리하였다.
- MW100,000 filter를 이용하여 최종부피가 5.7ml이 되도록 농축하고 이를 소분하여 mouse 감염시험, viral RNA 분리조건 시험 및 농축 virus의 역가분석을 위해 소분하여 -70°C 초저온냉동고에 보관하였다.

② 3차 Virus 배양 농축액의 역가 검증

- 3차 바이러스 배양액 및 3차 바이러스 배양 농축액을 동시에 virus plaque assay를 통

해 비교시험을 진행하였다.

- ‘Virus Plaque Assay 조건’ 을 확립한 후에 최종적으로 각 batch 별로 바이러스의 농도를 측정하여 결정하였다.

(d) 실험 결과

① 농축에 사용한 3차 바이러스 배양액의 역가분석(이론치)

- 사용한 전체 바이러스의 농도 : $3.2 \times 10^6 \text{ PFU/mL} \times 120\text{mL} = 3.8 \times 10^8 \text{ PFU/mL}$
- 농축 후에 바이러스 농도 : $3.8 \times 10^8 \text{ PFU} / 5.7\text{mL} = \underline{6.7 \times 10^7 \text{ PFU/mL}}$

② 3차 바이러스 배양액의 농축액에 대한 실측치 계산

- $2.1 \times 10^7 \text{ PFU/mL}$ (virus plaque assay 결과 참조)
- 여러가지 이유로 이론치보다 실제로는 약 3배 이상으로 적게 얻어졌으나, mouse 당 각 50ul 씩 비강 투여하는 경우의 바이러스 농도는 $1.05 \times 10^6 \text{ PFU}/50\mu\text{L}/\text{mouse}$ 로 마우스 감염실험에 적절한 농도로 판단하였다.

Dilution	Plaque No. (20uL TPCK)	Plaque No. (40uL TPCK)	AVERAGE	#Virus (PFU/mL)
10^{-5}	28	21	24.5	$24.5 \times 5 \times 10^5 = 1.23 \times 10^7$
$10^{-5}/2$	14	16	15	$15 \times 2 \times 5 \times 10^5 = 3.0 \times 10^7$
Average				2.1×10^7

나. 마우스 병원성 Mutant Type의 인플루엔자 바이러스를 얻기 위해 Lung-to-Lung Passage의 최적조건을 확립하기 위한 예비시험 수행

(1) 투여물질 검증시험 (STEP 1.2.1)

(가) 실험 목적

Influenza A virus 이외의 요인에 의하여 마우스에 체중감소를 유발할 수 있는지 확인하기 위하여 본 실험을 계획하였다.

(나) 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	Balb/c 및 DBA/1J를 사용 (1군: strain 당 10수, 2군: strain 당 5수, 3군: strain 당 4수)	
Virus Type	-	
Virus 농도	-	
Virus Challenge	- Intranasal 경로로 50ul/head, 단회투여 - 시험군 1) G1: Avertin 마취제 단독 사용(비강 내 투여 제외) 2) G2: 정상 마우스의 폐에 PBS에 첨가하여 균질화한 lung homogenate를 Avertin 마취 후 비강 내 투여 3) G3: Avertin 마취제 사용 후 PBS를 비강 내 투여	
관찰 항목	투여 그룹에 따라 6~8일간 매일 체중 측정	

(다) 실험 결과 및 고찰

- ① Influenza A virus 이외의 요인, 즉 마우스 비강 내에 인플루엔자 바이러스 투여전의 마취제 사용, 인플루엔자 바이러스가 포함되지 않은 lung homogenate, lung homogenate를 제조하기 위해 사용하는 10mM PBS 사용에 의해 체중감소를 유발하는지에 대하여 조건 시험을 수행한 결과, 상기에 사용한 3 조건 모두에서 사망개체의 발견이나 어떤 의미가 있는 체중감소 현상을 관찰되지 않았다.
- ② 단지, 비강에 10mM PBS, normal lung homogenate를 투여하는 경우에는 사용한 두 종류의 마우스 모두가 stress로 작용하여 투여 1~2일 사이에 다소 체중이 정체되는 현상이 관찰되지만 2일 이후에는 바로 정상으로 복원되는 것을 확인하였다.
- ③ 따라서, 인플루엔자 바이러스가 포함된 lung homogenate를 투여한 후 monitoring 기간 동안에 지속적으로 체중이 감소하는 현상은 의미가 있는 임상증상으로 판단할 수 있는 기준이 될 수 있는 것임을 확인하였다. 따라서 25% 이상의 체중 감소 현상이 일어나는

경우에는 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 폐내 염증반응, 출혈현상, 패혈증 전 단계 등 다양한 원인에 의해 심각한 부작용이 발현되는 것으로 평가할 수 있어 폐사개체로 처리하는 것은 무방할 것으로 판단된다.

Table 1. Body Weight

Strain	Treatment	Day	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Balb/c	Avertin	MEAN	16.25	16.74	17.16	17.25	17.17	17.33	17.34	17.34	-
		SD	0.63	0.87	0.69	0.66	0.73	0.68	0.66	0.62	-
		N	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Gain(%)	0.00	2.97	5.63	6.19	5.69	6.70	6.74	6.78	-
	Avertin + Normal Lung Lysate	MEAN	15.94	15.98	16.35	16.78	17.03	17.32	17.33	-	-
		SD	0.86	0.84	0.59	0.61	0.71	0.70	0.85	-	-
		N	5	5	5	5	5	5	5	-	-
		Gain(%)	0.00	0.24	2.67	5.33	6.90	8.79	8.82	-	-
DBA/1J	Avertin	MEAN	18.05	17.56	17.86	18.18	18.22	18.36	18.27	18.34	18.49
		SD	0.46	0.34	0.38	0.82	0.64	0.59	0.54	0.22	0.26
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		Gain(%)	0.00	-2.69	-1.05	0.70	0.94	1.75	1.25	1.68	2.49
	Avertin + Normal Lung Lysate	MEAN	15.18	15.84	16.55	16.88	17.19	17.01	17.32	17.22	-
		SD	0.63	0.73	0.91	0.97	0.93	0.92	1.14	1.02	-
		N	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Gain(%)	0.00	4.33	9.04	11.16	13.25	12.10	14.10	13.47	-
	Avertin + PBS	MEAN	15.35	15.04	15.71	16.18	16.23	16.53	16.33	-	-
		SD	0.76	0.98	1.02	0.86	0.95	0.84	0.77	-	-
		N	5	5	5	5	5	5	5	-	-
		Gain(%)	0.00	-2.12	2.26	5.37	5.66	7.66	6.39	-	-
	Avertin	MEAN	16.83	16.79	17.13	17.53	17.74	17.79	17.82	17.99	18.38
		SD	0.60	0.51	0.80	0.66	1.01	0.95	1.13	1.19	1.26
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		Gain(%)	0.00	-0.25	1.79	4.17	5.37	5.68	5.81	6.80	9.12

(2) 투여물질 검증시험 (STEP 1.2.2)

(a) 실험 목적

인플루엔자 바이러스의 마우스 감염에 효과적인 투여 경로를 검증하기 위하여 정맥 내 투여와 비강 내 투여, 2가지 투여방법에 대하여 군을 설정하고 시험을 진행하였다.

(b) 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	IV: Balb/c, DBA/1J, NOG. 각 8수. IN: Balb/c, DBA/1J. 각 7수	
Virus Type	“고 농축 바이러스 단회투여 실험”에서 얻어진 P2 lung homogenate 시료	
Virus Challenge	- 마우스 당 50ul 씩 반복 투여를 실시 IV: D0, D1, D2, D6, D8, D14에 정맥 내 투여 (총 6회 투여) IN: D0, D1, D2, D3, D7, D9, D10, D15에 비강 내 투여 (총 8회 투여)	
관찰 항목	매일 사망개체의 확인 및 체중 측정 실시	

(c) 실험 결과 및 고찰

- ① 인플루엔자 바이러스의 마우스 감염에 효과적인 투여 경로를 검증하기 위하여 기존에 통상적으로 사용하는 비강 내 투여방법과 새로이 정맥 내 투여방법을 선정하여 비교실험을 진행한 결과, 비강 및 정맥 내 투여 조건하에서 사망개체는 관찰되지 않았다.
- ② 정맥 내 투여의 경우에는 3종의 마우스(Balb/c, DBA/1J, NOG)를 사용하였고 마우스 종류 별로 각 8수를 사용하여 총 6회에 걸쳐 반복투여를 실시하였다. 하기의 실험결과에서 보여 주듯이 정맥 내 투여의 경우에는 사용한 3종의 마우스 모두 반복투여를 실시하였음에도 불구하고 의미가 있는 체중감소 현상을 관찰할 수 없었다.
- ③ 비강 내 투여의 경우에는 2종의 마우스(Balb/c, DBA/1J)를 사용하였고 마우스 종류별로 각 7수를 사용하여 총 8회에 걸쳐 반복투여를 실시하였다. 하기의 실험결과에서 보여 주듯이 비강 내 투여의 경우, Balb/c 마우스에서는 정맥 내 투여와 마찬가지로 의미가 있는 체중감소 현상을 관찰할 수 없었다. 그러나 DBA/1J의 경우에는 반복적인 투여를 통해서 지속적으로 의미가 있는 체중 감소현상이 관찰되었다. 투여 후 D2일차부터 3.13% 체중감소가 일어나기 시작하였고 시간이 경과함에 따라서 체중감소의 증가현상이 지속되었고 D14일차에는 최대 13.47%의 체중감소가 일어남을 확인하였다. 이는 마우스 병원성 바이러스주 개발에 있어 비강투여가 최적의 투여 경로이며 실험의 성공 가능성을 높여 줄 것으로 판단되었다.

Table 1. Body Weight

Route	Strain	Day	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
I.V.	Balb/c	MEAN	18.61	18.76	18.74	18.77	-	-	18.91	18.68	18.67	18.62	18.54	-
		SD	0.63	0.43	0.62	0.51	-	-	0.63	0.32	0.36	0.25	0.36	-
		N	8	8	8	8	-	-	8	7	7	7	7	-
		Gain(%)	0.00	0.83	0.70	0.85	-	-	1.61	1.37	1.27	1.04	0.59	-
	DBA/1J	MEAN	18.70	18.73	18.78	18.72	-	-	19.18	18.51	18.50	18.36	18.28	-
		SD	1.43	1.30	1.21	1.23	-	-	1.42	1.28	1.36	1.30	1.23	-
		N	8	8	8	8	-	-	8	7	7	7	7	-
		Gain(%)	0.00	0.22	0.51	0.23	-	-	2.63	0.08	-0.01	-0.76	-1.16	-
	NOG	MEAN	22.02	22.38	22.60	22.72	-	-	22.89	22.40	22.50	22.23	22.22	-
		SD	0.00	1.40	2.04	3.38	-	-	3.38	2.96	3.47	3.54	3.47	-
		N	8	8	8	8	-	-	8	7	7	7	7	-
		Gain(%)	0.00	1.74	2.80	3.29	-	-	4.16	2.88	3.30	2.09	2.04	-
I.N.	Balb/c	MEAN	22.62	23.10	22.80	22.81	22.64	22.55	22.48	22.28	22.31	22.53	22.67	22.65
		SD	0.72	0.49	0.75	0.90	0.89	1.08	0.89	0.74	0.65	0.61	0.62	0.70
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
		Gain(%)	0.00	2.14	0.82	0.84	0.10	-0.27	-0.60	-1.45	-1.34	-0.33	0.29	0.19
	DBA/1J	MEAN	24.22	23.44	22.41	22.23	22.17	22.04	21.66	21.37	21.10	21.18	21.32	21.57
		SD	2.52	2.28	2.19	2.09	1.93	2.04	1.70	1.61	1.79	1.60	1.70	1.40
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
		Gain(%)	0.00	-3.14	-7.41	-8.12	-8.32	-8.86	-10.35	-11.55	-12.73	-12.32	-11.78	-10.63
Route	Strain	Day	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
I.V.	Balb/c	MEAN	18.89	18.82	18.74	18.70	19.02	19.12	19.26	18.89	18.90	19.20	19.35	19.40
		SD	0.28	0.38	0.35	0.21	0.36	0.30	0.26	0.26	0.24	0.32	0.45	0.44
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
		Gain(%)	2.50	2.09	1.70	1.46	3.16	3.75	4.52	2.46	2.54	4.17	4.97	5.27
	DBA/1J	MEAN	18.95	18.89	18.40	18.31	18.59	18.61	18.45	18.14	18.47	18.54	18.78	18.92
		SD	1.36	1.28	1.12	1.30	1.14	1.29	1.29	1.34	1.31	1.40	1.35	1.31
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
		Gain(%)	2.41	2.12	-0.52	-1.06	0.54	0.62	-0.28	-1.99	-0.16	0.18	1.46	2.29
	NOG	MEAN	22.65	21.71	21.99	21.93	22.43	22.39	22.50	22.01	22.55	22.71	22.71	22.90
		SD	3.55	2.88	2.70	1.78	2.73	3.44	3.00	2.79	2.88	2.37	2.82	4.01
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
		Gain(%)	4.09	-0.27	1.02	0.77	3.03	2.83	3.35	1.12	3.58	4.33	4.32	5.18
I.N.	Balb/c	MEAN	-	22.58	22.28	22.69	22.25	-	22.05	22.30	-	-	-	-
		SD	-	0.71	0.72	0.65	0.60	-	0.62	0.64	-	-	-	-
		N	-	7	7	7	7	-	7	7	-	-	-	-
		Gain(%)	-	-0.09	-1.42	0.39	-1.53	-	-2.43	-1.33	-	-	-	-
	DBA/1J	MEAN	-	21.11	20.89	21.64	21.09	-	21.12	21.64	-	-	-	-
		SD	-	1.57	1.40	1.38	1.43	-	1.37	1.19	-	-	-	-
		N	-	7	7	7	7	-	7	7	-	-	-	-
		Gain(%)	-	-12.61	-13.47	-10.32	-12.58	-	-12.41	-10.27	-	-	-	-

(3) 계대배양 일정 검증시험 (1) (STEP 1.2.3)

(a) 실험 목적

Influenza A virus(H3N2)에 적합한 lung-to-lung passage의 일정 간격을 확인하고자 본 시험을 계획하였다. 감염 후 시험 일정에 따라 얻은 폐의 homogenate 시료는 질병관리본부 측으로 RT-PCR 분석을 의뢰하였다.

(b) 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	Balb/c 및 DBA/1J, 각 11수씩	
Virus Type	“고 농축 바이러스 단회투여 실험”에서 얻어진 P2 lung homogenate 시료	
Virus 농도	-	
Virus Challenge	- Intranasal 경로로 1회 50ul/head	
관찰 항목	<ul style="list-style-type: none"> - 감염 후 2, 3, 4, 5, 6일차에 strain 당 2수씩 sacrifice 하여 얻은 폐를 Homogenizer로 균질화하여 lung homogenate 시료를 가지고 질병관리본부의 지원을 받아 RT-PCR 분석을 수행 - 매일 임상증상 및 체중 측정 	

(c) 실험 결과 및 고찰

- ① 마우스 lung-to-lung passage를 위한 최적의 일정 간격을 확인하고자 본 시험을 수행하였다. 시험결과, 폐사 개체는 없었으나 감염 후에 6일간의 임상증상 관찰 기간 동안에 사용한 두 종류의 마우스 모두에서 투여 다음날부터 입모 현상이 관찰되었다. Balb/c의 경우 체중 감소현상은 기존의 다른 조건시험 때와 마찬가지로 보이지 않았으나, DBA/1J의 경우에는 바이러스 접종 초기에는 약간의 체중 감소현상을 보였으나 시간이 경과함에 따라 체중의 증가 또는 감소가 일어나지 않고 정체되는 것을 확인하였다.
- ② 인플루엔자 바이러스(H3N2)를 마우스에 감염시키고 감염 후 D2, D3, D4, D5, D6일차에 strain 당 2수씩 sacrifice하여 얻은 폐를 Homogenizer로 균질화하여 lung homogenate 시료를 제조하였다. 제조한 lung homogenate 시료는 질병관리본부의 지원을 받아 RT-PCR 분석을 수행하였다. 분석 결과 모든 시료에서 인플루엔자 바이러스를 검출할 수 없었다. 이는 감염에 사용한 시료가 “고 농축 바이러스 단회투여 실험”에서 얻어진 P2 lung homogenate 시료를 사용하였으므로 이후에 확인된 최초 감염시킨 P1에서 P2로 바이러스가 전달되지 않는다는 사실을 뒷받침하는 결과를 얻어내었다.

Table 1. Body Weight

Strain	Day	0	1	2	3	4	5	6
Balb/c	MEAN	17.99	17.78	17.93	18.50	18.53	18.20	18.93
	SD	0.79	0.87	0.92	0.95	1.05	1.12	0.55
	Number	11	11	11	9	7	5	3
	Gain(%)	0.00	-1.14	-0.34	3.23	3.32	3.16	4.06
DBA/1J	MEAN	16.26	15.52	15.77	16.22	16.59	16.60	16.89
	SD	0.66	0.79	0.76	1.05	0.66	0.69	0.71
	Number	11	10	10	8	6	4	2
	Gain(%)	0.00	-5.05	-3.55	-1.06	-0.02	-0.93	1.03

Table 2. RT-PCR Data

Mice	Day	Name	Real-time RT PCR						
			A	B	H1pdm09	H3	H5	IPC	결과
Balb/C	2일	4번	38.7	-	-	-	-	-	음성
		6번	39.9	-	37.1	37.2	-	-	음성
	3일	No 1	-	-	-	-	-	-	음성
		No 9	-	-	39.2	38.3	-	-	음성
	4일	No 3	-	-	-	-	-	-	음성
		No 10	-	-	-	-	-	-	음성
	5일	No 2	-	-	37.4	-	-	-	음성
		No 8	-	-	39.7	-	-	35.5	음성
	6일	No 5	-	-	-	-	-	-	음성
		No 11	-	-	-	-	-	-	음성
DBA/1J	2일	1번	39.1	-	34.1	32.8	36.9	-	음성
		10번	-	-	-	-	-	-	음성
	3일	No 4	-	-	-	-	-	-	음성
		No 7	-	-	-	-	-	-	음성
	4일	No 3	39.3	-	-	-	-	-	음성
		No 9	39.7	-	-	-	-	-	음성
	5일	No 2	37	-	-	-	-	-	음성
		No 6	-	-	-	-	-	-	음성
	6일	No 5	-	-	38.5	-	-	-	음성
		No 11	-	-	-	-	-	-	음성

(4) 계대배양 일정 검증시험 (2) (STEP 1.2.4)

(가) 실험 목적

Influenza A virus(H3N2)에 적합한 계대배양 일정을 확인하기 위한 추가시험을 진행하였으며, 또한 본 시험으로 Influenza A virus(H3N2) 감염성이 고 주령의 마우스에서도 감염성이 있는지를 확인하고자 하였다.

(나) 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	DBA/1J, 약 7개월령, 각 4수씩/회 x 4수/회 x 2Group	
Virus Type	Group1: DBA/1J_P13_Day8 lung homogenate Group2: DBA/1J_P18_Day4 lung homogenate	
Virus 농도	-	
Virus Challenge	- Intranasal 경로로 1회 50ul/head - lung homogenate: D0(2hr), D2, D4, D6 - 감염 후 2일 간격 4수씩 4회 sacrifice 실시	
관찰 항목	매일 임상증상 및 체중 측정 감염 후 2일 간격 4수씩 4회 sacrifice 하며 폐 무게, 폐 육안사진, 폐의 H&E 슬라이드, 혈액학 측정	

(다) 실험 결과 및 고찰

- ① 인플루엔자 바이러스(H3N2)의 고 주령(7개월령)의 DBA/1J 마우스를 사용하여 lung-to-lung passage를 위한 최적의 일정 간격을 확인 및 6주령 대비 고 주령의 마우스에서도 감염성을 보이는지를 확인하고자 본 시험을 수행하였다. 시험결과, 폐사 개체는 없었으나 감염 후에 6일간의 임상증상 관찰 기간 동안에 사용한 두 종류의 시료(Group1: DBA/1J_P13_Day8 lung homogenate, Group2: DBA/1J_P18_Day4 lung homogenate) 모두에서 투여 다음날부터 입모 현상이 관찰되었다.
- ② DBA/1J의 체중 감소 현상은 DBA/1J_P18_Day4 lung homogenate를 투여한 마우스가 DBA/1J_P13_Day8 lung homogenate를 투여한 마우스보다 상당히 높은 체중감소 현상이 관찰되었다. 결국 lung-to-lung passage 시험을 통하여 감염 후 8일차에는 병원성을 보이는 바이러스가 거의 존재하지 않음을 확인하였다.
- ③ 폐 무게의 경우, Group1(DBA/1J_P13_Day8 lung homogenate)에서 의미있는 폐 무게의 변화가 관찰되지 않았으며, Group2(DBA/1J_P18_Day4 lung homogenate)는 투여 2일차부터 폐 무게가 증가함이 관찰되었고, 투여 6일차에는 약 60%의 평균증량차이가 확인되었다. 다만 투여 4일차가 2일차보다 낮은 폐 무게가 측정되었는데, 이러한 결과는 하기에 보여 주고 있는 혈액학 Data 중 염증 지표인 neutrophil의 변화와도 매우 유사하게 일치하는

현상을 확인하였다.

④ 결론적으로 DBA/1J 마우스에 인플루엔자 바이러스를 감염시킨 후에 D2~D4일차에 바이러스 급격한 증식에 따른 체중 감소, 폐 장기무게 감소, 그리고 혈액학적 수치의 감소 등 매우 유의성이 있는 결과를 얻어내었다. 따라서 lung-to-lung passage를 위한 최적의 일정 간격은 3일 내지는 4일 간격으로 좋을 것으로 판단하였다.

Table 1. Mortality

Virus Source	Period (Day after Infection)	Number of Death								Mortality (%)		
		No. Dead/No. Infected			Days after Infection							
		Total Dead No.	Found Dead No.	Euthanasia No.	0	1	2	3	4			
DBA/1J P13 Day8 lung lysate	Normal	0/4	0/4	0/4	0	0	0	0	0	0		
	Day 0 (2hr)	0/4	0/4	0/4	0	-	-	-	-	0		
	Day 2	0/4	0/4	0/4	0	0	0	-	-	0		
	Day 4	0/4	0/4	0/4	0	0	0	0	-	0		
	Day 6	4/4	0/4	0/4	0	0	0	0	0	0		
DBA/1J P18 Day4 lung lysate	Normal	0/4	0/4	0/4	0	0	0	0	0	0		
	Day 0 (2hr)	0/4	0/4	0/4	0	-	-	-	-	0		
	Day 2	0/4	0/4	0/4	0	0	0	-	-	0		
	Day 4	0/4	0/4	0/4	0	0	0	0	-	0		
	Day 6	0/4	0/4	4/4	0	0	0	0	0	0(100)		

(): Number of Euthanasia

Table 2. Body Weight

Strain	Peroid	Day	0	1	2	3	4	5	6
DBA/1J P13 Day8 lung lysate	Normal	MEAN	23.03	23.03	22.78	22.49	22.13	21.82	21.97
		SD	1.29	1.05	1.31	1.65	1.84	1.87	2.10
		N	4	4	4	4	4	4	4
		Gain(%)	0.00	0.08	-1.08	-2.39	-3.98	-5.36	-4.74
	Day0 (2hr)	MEAN	23.89	-	-	-	-	-	-
		SD	1.46	-	-	-	-	-	-
		N	4	4	4	4	4	4	4
		Gain(%)	0.00	-	-	-	-	-	-
	Day 2	MEAN	24.38	23.38	23.39	-	-	-	-
		SD	0.60	0.72	0.98	-	-	-	-
		N	4	5	6	4	4	4	4
		Gain(%)	0.00	-4.09	-4.06	-	-	-	-
	Day 4	MEAN	23.44	22.28	22.71	22.97	22.62	-	-
		SD	1.08	0.55	0.73	1.24	0.84	-	-

		N	4	5	6	7	8	4	4
		Gain(%)	0.00	-4.88	-3.04	-2.02	-3.46	-	-
Day 6	Day 6	MEAN	25.29	23.37	23.35	23.36	23.24	23.40	23.05
		SD	0.99	0.83	0.82	0.69	0.76	0.72	0.60
		N	4	5	6	7	8	9	10
		Gain(%)	0.00	-7.59	-7.66	-7.57	-8.02	-7.37	-8.74

Virus Source	Period	Day	0	1	2	3	4	5	6
DBA/1J P18 Day4 lung lysate	Normal	MEAN	24.50	24.56	24.43	24.30	24.13	23.88	23.92
		SD	1.44	2.11	1.59	1.30	0.93	1.52	1.35
		N	4	4	4	4	4	4	4
		Gain(%)	0.00	0.12	-0.32	-0.78	-1.42	-2.52	-2.33
	Day0 (2hr)	MEAN	26.18	-	-	-	-	-	-
		SD	1.84	-	-	-	-	-	-
		N	4	4	4	4	4	4	4
		Gain(%)	0.00	-	-	-	-	-	-
	Day 2	MEAN	26.81	24.57	23.46	-	-	-	-
		SD	1.96	1.71	1.63	-	-	-	-
		N	4	4	4	4	4	4	4
		Gain(%)	0.00	-8.34	-12.47	-	-	-	-
	Day 4	MEAN	26.32	24.02	22.49	21.04	20.96	-	-
		SD	2.85	2.74	2.81	2.76	2.64	-	-
		N	4	4	4	4	4	4	4
		Gain(%)	0.00	-8.80	-14.68	-20.20	-20.50	-	-
	Day 6	MEAN	23.59	21.42	19.99	18.98	19.16	18.23	17.25
		SD	1.65	1.60	1.48	1.48	1.30	1.07	0.89
		N	4	4	4	4	4	4	4
		Gain(%)	0.00	-9.21	-15.27	-19.60	-18.78	-22.67	-26.83

Table 3. Lung Weight

Virus Source	Period	Day0 (2hr)	Day 2	Day 4	Day 6
DBA/1J P13_Day8_lung lysate	MEAN	0.1618	0.1452	0.1546	0.1575
	SD	0.0094	0.0094	0.0046	0.0147
	N	4	4	4	4
DBA/1J P18_Day4_lung lysate	MEAN	0.1555	0.1914	0.1799	0.2571
	SD	0.0054	0.0074	0.0074	0.0509
	N	4	4	4	4

Table 4. Hematology Data

Virus Source	Period	Items	WBC	NEU	LYM	MONO	EOS	BASO	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT
		Units	$\times 10^3/\mu\text{l}$	%	%	%	%	$\times 10^6/\mu\text{l}$	g/dl	%	fL	pg	%	$\times 10^3/\mu\text{l}$	
DBA/1J P13 Day8 lung lysate	Day 0 (2hr)	MEAN	3.02	32.6	62.9	3.5	0.95	0.00	10.5	14.5	38.3	36.5	13.8	37.9	545
		SD	1.58	12.4	15.4	3.6	0.49	0.00	1.0	1.5	3.4	0.3	0.1	0.6	224
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Day 2	MEAN	2.28	27.4	44.6	26.5	1.36	0.16	9.0	12.2	33.5	37.3	13.5	36.3	341
		SD	1.09	13.1	12.3	24.1	0.77	0.26	0.8	1.4	2.8	0.4	1.0	2.9	137
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Day 4	MEAN	5.21	27.7	65.4	6.0	0.76	0.11	9.9	13.6	36.7	36.9	13.7	37.2	752
		SD	2.00	5.9	8.9	4.3	1.00	0.20	0.3	0.6	1.4	0.2	0.3	0.6	33
		N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Day 6	MEAN	3.36	36.0	56.1	5.8	1.86	0.25	10.2	14.0	37.4	36.6	13.7	37.4	833
		SD	1.61	14.6	17.7	4.8	1.97	0.44	0.3	0.4	0.9	0.2	0.2	0.4	49
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
DBA/1J P18 Day4 lung lysate	Day 0 (2hr)	MEAN	2.58	45.6	43.5	9.1	1.65	0.20	10.5	14.6	38.4	36.7	13.9	38.0	382
		SD	1.56	10.7	12.7	5.5	0.24	0.35	0.2	0.3	0.8	0.1	0.1	0.2	362
		N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Day 2	MEAN	2.72	82.2	13.2	4.0	0.54	0.01	10.7	14.6	39.0	36.6	13.7	37.4	806
		SD	0.77	5.2	4.4	0.6	0.31	0.02	0.3	0.4	1.0	0.1	0.1	0.2	36
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Day 4	MEAN	2.63	39.8	43.1	16.1	0.95	0.08	11.1	15.2	40.7	36.6	13.7	37.4	703
		SD	1.53	12.5	8.0	5.9	0.84	0.09	0.1	0.2	0.7	0.4	0.1	0.3	69
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Day 6	MEAN	2.06	70.0	19.9	9.2	0.82	0.11	11.1	15.4	40.4	36.4	13.9	38.2	556
		SD	0.71	4.5	3.9	2.1	0.65	0.17	0.9	1.4	2.8	0.6	0.2	1.1	120
		N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

다. 마우스 병원성 Mutant Type의 인플루엔자 바이러스주 개발을 위한 시험 수행

(1) 단순 반복투여 실험 (STEP 1.3.1)

(가) 실험 목적

질병관리본부에서 분양받은 Wild Type(WT)의 Influenza A virus를 마우스에 단순 반복적으로 lung-to-lung passage를 통해 마우스 병원성의 Mutant Type 인플루엔자 바이러스를 개발하기 위한 감염 접종원으로 사용하였다.

(나) 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	Passage 당 5수(P1) 및 10수(P2)의 Balb/c 및 DBA/1J를 사용 (P1: passage 1, P2: passage 2)	
Virus Type	H3N2 Influenza A virus	NCCP No. 42471
Virus 농도	1.0×10^6 PFU/mL	20 vial 구입
Virus Challenge	- Intranasal 경로로 1회 50ul/head - 1일 2회(오전, 오후), 2일간에 걸쳐 총 4회 투여(200ul/head)를 투여하여 가능한 마우스에 Virus의 감염농도를 높이는 방향으로 실험을 설계하였음 - 총 투여용량: 2.0×10^5 PFU/200ul/head	
관찰 항목	매일 임상증상을 관찰하며 1, 2 또는 3일 간격으로 체중 측정	

(다) 실험 결과 및 고찰

- ① Passage 1에서 Day 4까지 관찰 결과, 두 종의 마우스에서 특징적인 체중 감소나 임상증상이 보이지 않았으며 단지 체중 정체와 입모 수준임을 확인하였음.
- ② Day 5에 lung-to-lung passage를 진행하였으며 폐는 500mg당 PBS 1ml 첨가하여 Homogenizer로 균질화하고 15,000rpm으로 5분간 원심분리 후에 상층액을 가지고 마우스 당 50ul를 비강 투여하였음.
- ③ Passage 2에서도 Day 9까지 지속적으로 관찰한 결과, 두 종의 마우스 모두에서 특징적인 체중감소나 임상증상이 보이지 않았으며 passage 1과 유사한 수준의 체중 정체와 입모

수준임을 확인하였음.

④ 기존의 “Influenza A virus(H1N1)를 마우스에 병원성주 개발에 사용한 바이러스 농도”나 문헌에서 제시하고 있는 lung-to-lung passage를 위한 사용하는 1회 예상 적정 투여용량은 1.0×10^6 PFU/50uL/head로 제시하고 있다.

결론적으로 두 종의 마우스에서 특징적인 임상증상이나 체중감소 현상이 관찰되지 않는 주된 이유로는 현재 사용한 인플루엔자 바이러스 용량이 적정 투여용량보다 5배 이하의 낮은 비강투여 용량에 기인하는 것으로 사료된다. 따라서, 적은 투여량으로 인해 마우스 내의 natural immunity에 의해 빠르게 viral clearance가 일어난 것으로 판단된다.

Table 1. Mortality

Treatment	Mouse Strain	Number of Death									Mortality (%)	
		No. Dead/ No. Infected	Day									
			-2	-1	0	1	2	3	4	5		
Repeated Infection	Balb/c	0/5	-	-	0	0	0	0	0	0	0	
	DBA/1J	0/5	-	-	0	0	0	0	0	0	0	

* Day 0, 1 : Virus infection, twice a day

Table 2. Body Weight

Strain	Day	-2	0	2	3	4	5	Gain
Balb/c	MEAN	-	17.85	17.04	17.08	17.18	17.17	-0.68
	SD	-	0.746	0.594	0.558	0.658	0.612	0.392
	Number	-	5	5	5	5	5	5
DBA/1J	MEAN	-	17.62	17.74	17.67	18.28	18.20	0.58
	SD	-	0.449	0.408	0.336	0.358	0.339	0.355
	Number	-	5	5	5	5	5	5

(2) 면역억제제 병용 반복투여 실험 (STEP 1.3.2)

(1) 실험 목적

마우스에서 natural immunity에 의한 빠른 viral clearance를 극복하고자 사전에 다양한 B- 및 T-세포 면역억제제를 투여하여 면역력을 최대로 저하시킨 마우스에 질병관리본부에서 분양받은 Wild Type(WT)의 Influenza A virus를 단순 반복적으로 lung-to-lung passage를 통해 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스를 개발하기 위한 감염 접종원으로 사용하였다.

(2) 실험 방법

① 면역억제제 제품 정보, 조제 및 투여방법(용량, 경로, 일정)

ⓐ 면역억제제 정보 및 투여경로

상품명	성분명	약어	제품함량	투여용량	투여경로
맙테라	리툭시맙	R	100mg/10ml	20mg/kg	IP
프로그램	타크로리무스	T	1mg/Capsule	1mg/kg	PO
마이렙트	미코페놀레이트 모페틸	M	360mg/Tablet	50mg/kg	PO

ⓑ 면역억제제 조제

약어	투여용량	1회 / 10수 투여기준			투여 경로
		용량	조제	투여량	
R	20mg/kg	0.4ml	R 0.4ml + 멸균증류수 0.6ml, Microtube에 1ml씩 2회 분량 조제	0.1ml/head	IP
T	1mg/kg	0.2mg	T 2mg + M 100mg + N/S 10ml, Microtube에 1ml씩 분주(1회)	0.1ml/head	PO
M	50mg/kg	10mg		0.1ml/head	PO

* 마우스 Strain당 1회 투여 필요량(5수)으로 10수 분량씩 조제(마우스 1수 체중은 20g으로 가정)

ⓓ 투여 일정

Day	-1	0	1	2
면역억제제	R T M	R T M	T M	T M
Challenge			C	C

② 면역억제제 병용투여에 의한 실험 Design

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	Passage 당 5수(P1) 및 10수(P2)의 Balb/c 및 DBA/1J를 사용 (P1: passage 1, P2: passage 2)	
Virus Type	H3N2 Influenza A virus	NCCP No. 42471
Virus 농도	1.0×10^6 PFU/ml	20vial 구입
Virus Challenge	- Intranasal 경로로 1회 50ul/head - 1일 1회(오후), 2일간에 걸쳐 총 2회 투여(100ul/head)를 투여 하여 가능한 마우스에 Virus의 감염율을 높이는 방향으로 실험을 설계하였음	
관찰 항목	- 매일 임상증상을 관찰하며 1, 2 또는 3일 간격으로 체중 측정 - Day 4에 체중측정 결과를 바탕으로 passage 진행여부 결정	

(d) 실험 결과 및 고찰

- ① 면역억제제를 투여한 경우에도 passage 1에서 Day 4까지 관찰한 결과, 두 종의 마우스 모두에서 특징적인 체중 감소나 임상증상이 보이지 않았으며 단순히 체중 정체와 입모 수준으로 확인되었음.
- ② Day 5에 lung-to-lung passage를 진행하였으며 폐는 500mg당 PBS 1ml 첨가하여 Homogenizer로 균질화하고 15,000rpm으로 5분간 원심분리 후에 상층액을 가지고 마우스 당 50ul를 비강 투여하였음.
- ③ Passage 2에서도 Day 9까지 지속적으로 관찰한 결과, 두 종의 마우스 모두에서 특징적인 체중감소나 임상증상이 보이지 않았으며 passage 1과 비교 시에 오히려 약간의 체중 증가현상이 관찰되었고 입모 수준임을 확인하였다.

결론적으로 두 종의 마우스에 natural immunity를 최소화하기 위해서 면역억제제를 처리하여 마우스 내의 B- 및 T-세포의 기능을 완전히 억제시켰음에도 불구하고 “**단순 반복투여 실험**” 과 유사하게 특징적인 임상증상이나 체중감소 현상이 관찰되지 않았다. 따라서 본 실험 design은 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스 제조에 적합한 방법이 아닌 것으로 판단되었다.

Table 1. Mortality

Treatment	Mouse Strain	Number of Death									Mortality (%)	
		No. Dead/ No. Infected	Day after Infection									
			-2	-1	0	1	2	3	4	5		
Immunosuppressants	Balb/c	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	DBA/1J	0/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

* Day 0, 1 : Infection, twice a day

Table 2. Body Weight

Strain	Day	-2	0	2	3	4	5	Gain
Balb/c	MEAN	16.59	16.53	16.55	16.68	16.99	16.81	0.22
	SD	0.532	0.518	0.831	0.782	0.661	0.624	0.461
	Number	5	5	5	5	5	5	5
DBA/1J	MEAN	17.14	17.62	17.04	17.10	17.80	17.66	0.59
	SD	0.718	0.724	0.996	0.947	1.225	1.118	0.710
	Number	5	5	4	4	4	4	4

Table 3. Clinical Sign

Strain	Clinical Sign	-2	-1	0	1	2	3	4	5
Balb/c	No Abnormalities Detected	-	-	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Piloerection	-	-	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DBA/1J	No Abnormalities Detected	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Piloerection	0/5	0/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5
	Death	0/5	0/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5

(3) 농축 바이러스 단회투여 실험 (STEP 1.3.3)

(a) 실험 목적

“단순 반복투여 실험”과 “면역억제제 병용 반복투여 실험”을 통해서 의미있는 임상증상이나 체중감소현상을 확인할 수 없었다. 주된 이유로 초기에 접종하는 인플루엔자 바이러스의 농도가 충분하지 않다고 판단하였다.

따라서, 본 연구 초기에 세포배양법을 이용하여 4차에 걸쳐 대량 생산한 인플루엔자 바이러스 batch 중에서 3차 바이러스 배양액을 10배 이상 농축하여 최소 2.0×10^7 PFU/mL(1.0×10^6 PFU/mL/50ul/mouse)^o 되도록 조제하여 마우스에 lung-to-lung passage를 단회투여를 통해 마우스 병원성의 Mutant Type 인플루엔자 바이러스를 개발하기 위한 감염 접종원으로 사용하였다.

(b) 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	Passage 당 각각 10수의 Balb/c 및 DBA/1J를 사용	
Virus Type	세포배양법에 의해 H3N2 Influenza A virus를 대량생산한 batch를 농축하여 접종원으로 사용	3차 배양액
Virus 농도	2.1×10^7 PFU/mL(실측치), 5.3×10^7 PFU/mL(이론치)	
Virus Challenge	<ul style="list-style-type: none"> - Intranasal 경로로 1회 50ul/head - <u>2일 간격으로 5수는 passage를 진행하고 나머지 잔여 5수는 8일차까지 임상증상 관찰함</u> (P0~P2까지는 임상증상 관찰개체를 두지 않았음) - 폐는 200mg당 PBS 1ml 첨가 후 균질화하여 투여. 	
관찰 항목	매일 임상증상을 관찰하며 2일 간격으로 체중 측정	

(c) 실험 결과 및 고찰

- ① 본 실험에서는 제니아에서 확립한 virus plaque assay 방법을 이용하여 각 passage마다 마우스 lung 내에 Influenza virus 존재 유무 확인하였다. 매 passage마다 분석 결과 마우스 lung 내에 의미가 있는 인플루엔자 바이러스의 존재가 확인되지 않아 passage 7에 서 시험을 종료하였다.
- ② 1차 및 2차 passage에서는 10^{-2} 의 낮은 희석 농도에서 plaque assay를 통해 virus 존재를 확인하였으나, 이후로는 체중감소 현상이나 인플루엔자 바이러스가 검출되지 않아 시험 종료하였다.

Table 1. Mortality

Mouse Strain	Passage	No. Dead/ No. Infected	Number of Death									Mortality (%)	
			Day after Infection										
			0	1	2	3	4	5	6	7	8		
Balb/c	0	0/5	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	
	1	0/5	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	
	2	0/5	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	
	3	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0/10	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0	
	6	0/11	0	0	0	0	0	-	-	-	-	0	
	7	0/11	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	
DBA/1J	0	0/5	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	
	1	0/5	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	
	2	0/5	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	
	3	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0/9	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0	
	6	0/11	0	0	0	0	0	-	-	-	-	0	
	7	0/11	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	

Table 2. Body Weight

① Balb/c mice

Passage	Day	0	2	4	6	8	Gain*
0	MEAN	16.70	17.02	-	-	-	0.32
	SD	0.412	0.313	-	-	-	0.58
	Number	5	5	-	-	-	5
1	MEAN	16.67	17.44	-	-	-	0.77
	SD	0.248	0.396	-	-	-	0.460
	Number	5	5	-	-	-	5
2	MEAN	17.15	17.11	-	-	-	-0.04
	SD	0.395	0.362	-	-	-	0.194
	Number	5	5	-	-	-	5
3	MEAN	16.95	16.47	17.14	17.30	17.38	0.42
	SD	0.624	0.592	0.653	0.694	0.783	1.257
	Number	10	10	5	5	5	5
4	MEAN	15.66	16.14	16.86	16.78	17.03	0.95
	SD	0.857	0.718	0.641	0.840	0.833	0.419
	Number	10	10	5	5	5	5
5	MEAN	15.87	16.04	16.80	17.48	-	1.81
	SD	0.477	0.383	0.451	0.594	-	0.575
	Number	10	10	5	5	-	5
6	MEAN	17.59	17.35	17.98	-	-	0.45
	SD	0.328	0.351	0.325	-	-	0.272
	Number	11	11	5	-	-	5
7	MEAN	17.08	17.30	-	-	-	0.22
	SD	0.852	0.812	-	-	-	0.259
	Number	11	11	-	-	-	11

*: shown a gain except to objects of lung passage

② DBA/1J mice

Passage	Day	0	2	4	6	8	Gain*
0	MEAN	15.71	15.64	-	-	-	-0.07
	SD	0.482	0.635	-	-	-	0.234
	Number	5	5	-	-	-	5
1	MEAN	15.96	16.20	-	-	-	0.25
	SD	0.828	0.836	-	-	-	0.166
	Number	5	5	-	-	-	5
2	MEAN	16.72	16.00	-	-	-	-0.72
	SD	0.951	1.109	-	-	-	1.210
	Number	5	5	-	-	-	5
3	MEAN	15.42	14.90	15.25	15.74	16.02	0.65
	SD	0.626	0.658	0.944	1.056	1.068	0.578
	Number	10	10	5	5	5	5
4	MEAN	15.36	14.84	15.85	16.07	16.73	1.13
	SD	0.605	0.744	0.696	0.901	0.967	1.323
	Number	10	10	5	5	5	5
5	MEAN	16.63	15.92	16.97	17.55	-	0.43
	SD	0.830	1.083	0.920	1.084	-	0.795
	Number	10	9	5	5	-	5
6	MEAN	14.85	14.70	15.30	-	-	0.62
	SD	0.957	0.925	0.715	-	-	0.360
	Number	11	11	5	-	-	5
7	MEAN	14.88	14.91	-	-	-	0.02
	SD	1.142	1.140	-	-	-	0.251
	Number	11	11	-	-	-	11

*: shown a gain except to objects of lung passage

(4) 농축 바이러스 반복투여 실험 (STEP 1.3.4)

(1) 실험 목적

“농축 바이러스 단회투여 실험”을 통해서 1차적으로 P0~P2 까지 인플루엔자 바이러스가 lung-to-lung으로 전달되는 것을 확인하였다. 그 이후의 passage에서는 인플루엔자 바이러스가 검출되지 않은 것으로 미루어 마우스 lung에서 생존하면서 증식할 수 있는 바이러스의 양이 점차적으로 감소한데 기인한 것으로 판단하였다.

따라서 본 실험 design에서는 동일한 인플루엔자 바이러스 batch 중에서 3차 바이러스 배양액을 10배 이상 농축하여 최소 2.0×10^7 PFU/mL(1.0×10^6 PFU/mL/50ul/mouse)이 되도록 조제한 시료와 “농축 바이러스 단회투여 실험”에서 보관한 P2 lung lysate를 혼합하여 마우스에 lung-to-lung passage를 반복투여를 통해 마우스 병원성의 Mutant Type 인플루엔자 바이러스를 얻고자 감염 접종원으로 사용하였다.

(2) 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	Passage 당 Balb/c 및 DBA/1J을 각 10수씩 사용	
Virus Type	“농축바이러스 단회 투여실험”에서 확보한 passage 2의 lung lysate 와 3차 배양농축액(10배 농축) 혼합사용	
Virus 농도	2.1×10^7 PFU/mL(실측치), 5.3×10^7 PFU/mL(이론치)	
Virus Challenge	<ul style="list-style-type: none"> - Intranasal 경로로 1회 50ul/head - <u>접종바이러스: 총 4회 투여 (passage 0 단계)</u> 1) Intranasal 경로로 단회 투여 passage 2의 lung homogenate 를 head 당 50ul(총 100ul)로 총 2회 비강 투여 2) 추가로 농축 바이러스를 head 당 50ul(총 100ul)로 총 2회 비강 투여 - <u>2일 간격으로 5수는 passage 진행하고 잔여 5수에 대해서는 8일차까지 임상증상 관찰함</u> 	마우스 폐 5개 (약 500mg) 당 PBS 2.3ml 첨가하여 균질화하여 투여.
관찰 항목	매일 임상증상 관찰, 체중 측정 및 사망개체 확인	
실험 결과	- Passage15까지 진행	

(3) 실험 결과 및 고찰

① 본 실험에서는 passage 0 단계에서 D-4일, D-3일 차에 “농축 바이러스 단회투여 실험” passage 2의 lung homogenate를 하루에 한번씩 head 당 50ul로 총 2회(총 100ul)를 비강 투여하였다. 추가로 D-2일, D-1일 차에는 세포배양에서 얻은 3차 바이러스배양액의 10배 농축한 바이러스를 하루에 한번씩 head 당 40ul로 총 2회(총 80ul) 비강 투여를 실시하고

였다. 감염 종료 후에 4일차에 마우스의 lung을 분리하고 Homogenizer로 균질화한 lung lysate를 lung-to-lung passage에 사용하였다.

총 passage 15 까지 진행하였으나 단지 Balb/c 및 DBA/1J 모두에서 8일 관찰기간 동안 대부분의 마우스가 입모현상이 일어나는 것이 관찰되었으나 마우스 병원성의 특징을 보이는 뚜렷한 임상증상의 발현, 급격한 체중 감소 현상이나 기간은 오래 걸리지만 폐사 및 사망개체를 확인할 수 없었다.

② 본 실험에서도 제니아에서 확립한 virus plaque assay 방법을 이용하여 각 passage마다 마우스 lung 내에 Influenza virus 존재 유무 확인하였으나 매 passage 마다 분석 결과 마우스 lung 내에 의미가 있는 인플루엔자 바이러스의 존재를 확인할 수 없었다.

결론적으로 다양한 형태로 조제한 인플루엔자 바이러스의 감염원이 lung-to-lung passage를 통해서 전달되지 않음을 재차 확인하였다.

Table 1. Mortality

Mouse Strain	Passage	Number of Death										Mortality (%)	
		No. Dead/ No. Infected		Day									
		-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4			
Balb/c	0	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
DBA/1J	0	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Balb/c	Passage	Number of Death										Mortality (%)	
		No. Dead/ No. Infected		Day									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8			
		1	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		3	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		4	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		5	0/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		6	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		7	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		8	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		9	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		10	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		11	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		12	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		13	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		14	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		15	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
DBA/1J	Passage	Number of Death										Mortality (%)	
		No. Dead/ No. Infected		Day									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8			
		1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		3	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		4	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		6	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		7	0/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		8	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		9	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		10	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		11	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		12	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		13	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		14	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		15	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

* Day -4, -3 : Infection with lung homogenate, once a day

* Day -1, 0 : Enriched virus infection, once a day

Table 2. Body Weight

① Balb/c mice

Passage	Day	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	Gain*
0	MEAN	17.53	17.08	16.83	16.90	16.84	17.14	-	17.81	17.25	-0.05
	SD	0.604	0.644	0.625	0.624	0.686	0.786	-	0.848	0.555	0.726
	N	11	10	10	10	10	10	-	5	5	5
Passage	Day	0	1	2	3	4	5	6	7	8	Gain*
1	MEAN	17.57	17.54	17.49	18.08	18.46	18.54	18.49	18.05	-	0.08
	SD	0.505	0.653	0.692	0.240	0.049	0.177	0.219	0.014	-	0.092
	N	7	7	7	2	2	2	2	2	-	2
2	MEAN	17.16	16.81	17.20	17.91	18.12	17.80	18.24	18.06	18.44	0.98
	SD	0.460	0.502	0.552	0.227	0.223	0.220	0.217	0.359	0.600	0.634
	N	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
3	MEAN	17.57	17.05	17.36	17.01	17.57	17.37	17.52	17.57	18.13	0.98
	SD	0.612	0.674	0.525	0.588	0.600	0.582	0.527	0.435	0.544	0.247
	N	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
4	MEAN	17.08	16.39	17.00	17.41	17.51	17.58	17.92	17.23	17.73	0.33
	SD	0.803	0.744	0.834	0.419	0.521	0.542	0.660	0.635	0.754	0.569
	N	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
5	MEAN	17.01	16.67	16.93	17.45	17.90	17.34	17.97	17.80	18.03	0.81
	SD	0.549	0.510	0.532	0.201	0.287	0.377	0.255	0.421	0.400	0.302
	N	9	9	9	4	4	4	4	4	4	4
6	MEAN	17.77	17.21	17.82	18.24	18.48	18.67	18.87	18.99	19.20	1.65
	SD	0.609	0.769	0.774	0.826	0.765	0.948	0.934	1.068	1.103	0.577
	N	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
7	MEAN	17.79	17.82	17.94	18.05	18.24	18.34	18.49	18.59	18.59	1.34
	SD	1.084	1.069	0.937	1.267	1.194	1.140	1.182	1.181	1.305	1.190
	N	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
8	MEAN	18.58	18.04	18.75	19.03	19.26	19.29	19.01	18.98	18.89	0.35
	SD	0.693	0.771	0.768	0.877	0.662	0.778	0.723	0.592	0.656	0.537
	N	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
9	MEAN	16.49	16.48	16.83	17.70	17.94	18.26	18.59	18.77	19.05	2.19
	SD	0.607	0.710	0.932	0.483	0.642	0.851	0.925	0.824	0.823	0.996
	N	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
10	MEAN	18.01	17.33	17.47	17.64	17.90	18.12	18.35	18.56	18.75	0.96
	SD	0.893	0.855	0.753	0.490	0.557	0.542	0.700	0.667	0.598	0.259
	N	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
11	MEAN	17.87	17.21	17.67	18.34	18.77	18.91	19.11	19.07	19.11	1.37
	SD	0.746	0.639	0.736	0.853	0.736	0.809	0.761	0.752	0.779	0.213
	N	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
12	MEAN	16.50	16.15	16.88	17.45	17.69	17.77	18.03	18.04	17.98	1.70
	SD	0.823	0.614	0.597	0.711	0.759	0.731	0.898	0.836	0.986	0.648
	N	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
13	MEAN	16.08	15.85	15.96	16.50	16.91	16.85	17.09	-	17.49	1.13
	SD	0.648	0.603	0.731	0.509	0.487	0.706	0.783	-	0.735	0.466
	N	10	10	10	5	5	5	5	-	5	5
14	MEAN	17.81	17.22	17.36	17.59	17.87	-	18.60	18.76	18.57	0.97
	SD	0.722	0.633	0.635	0.820	0.874	-	0.878	0.782	0.676	0.347
	N	10	10	10	5	5	-	5	5	5	5
15	MEAN	18.09	17.70	17.80	-	18.51	18.66	18.55	18.66	18.85	0.76
	SD	0.816	0.829	0.837	-	0.869	0.882	0.870	0.776	0.877	0.291
	N	10	10	10	-	10	10	10	10	10	10

*: shown a gain except to objects of lung passage

② DBA/1J mice

Passage	Day	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	Gain*
0	MEAN	14.40	14.18	14.01	14.24	14.07	14.18	-	13.98	14.40	-0.05
	SD	0.628	0.733	0.725	0.790	0.743	0.746	-	0.627	0.739	1.276
	Number	11	11	9	10	10	10	-	5	5	5
Passage	Day	0	1	2	3	4	5	6	7	8	Gain*
1	MEAN	15.81	15.67	15.76	18.87	19.20	19.81	19.91	19.69	-	1.78
	SD	1.322	1.384	1.491	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-	0.000
	Number	9	6	6	1	1	1	1	1	-	1
2	MEAN	15.93	15.23	15.73	16.70	16.50	16.47	16.78	16.49	17.00	0.99
	SD	1.154	1.177	1.214	1.105	1.107	1.000	1.010	1.045	1.241	0.295
	Number	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
3	MEAN	16.99	15.84	16.48	16.19	17.22	16.96	17.51	17.77	18.52	1.62
	SD	1.242	1.362	1.335	0.928	1.321	1.361	1.369	1.365	1.477	0.550
	Number	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
4	MEAN	17.01	15.66	16.28	15.93	16.39	16.82	17.63	16.86	17.63	0.85
	SD	0.822	0.762	0.639	0.742	0.860	0.978	1.092	1.082	1.088	0.422
	Number	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
5	MEAN	17.05	15.99	16.47	16.55	17.41	17.09	17.63	17.36	17.83	1.20
	SD	0.767	0.631	0.559	0.730	0.732	0.727	0.902	0.686	0.672	0.256
	Number	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
6	MEAN	14.88	14.55	15.16	15.07	15.65	15.57	16.16	16.31	17.07	1.68
	SD	0.743	0.857	0.870	1.026	1.141	1.008	1.134	1.373	1.522	0.916
	Number	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
7	MEAN	16.24	15.31	15.53	15.51	15.79	16.15	16.85	16.39	16.42	0.34
	SD	1.212	1.042	1.236	1.766	1.860	1.971	1.800	1.828	1.839	0.429
	Number	10	9	9	4	4	4	4	4	4	4
8	MEAN	16.07	14.97	15.16	16.03	16.66	16.59	16.63	16.94	17.09	0.68
	SD	0.861	0.789	0.796	0.837	0.937	0.964	0.945	0.814	0.796	0.562
	Number	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
9	MEAN	15.20	14.84	15.01	15.78	16.26	16.77	17.45	17.88	18.19	2.91
	SD	0.788	0.756	0.840	1.064	1.059	1.131	0.957	1.333	1.244	0.499
	Number	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
10	MEAN	16.48	15.69	15.78	15.43	15.87	16.24	16.57	16.76	17.14	1.07
	SD	0.793	0.708	0.679	0.399	0.454	0.490	0.387	0.373	0.536	0.374
	Number	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
11	MEAN	16.66	15.71	15.90	16.57	16.95	17.39	17.23	17.48	17.54	0.73
	SD	0.751	0.862	0.756	0.621	0.789	0.489	0.809	0.578	0.668	0.356
	Number	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
12	MEAN	14.62	14.41	15.06	15.75	16.16	16.28	16.61	16.90	17.05	2.44
	SD	0.921	1.173	1.072	1.149	1.091	1.185	1.308	1.248	1.268	0.692
	Number	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5
13	MEAN	16.38	15.70	15.96	15.63	16.30	16.31	16.45	-	17.56	1.51
	SD	0.726	0.738	0.711	0.839	0.927	1.047	1.123	-	1.253	0.473
	Number	10	10	10	5	5	5	5	-	5	5
14	MEAN	16.03	15.31	15.82	15.92	16.08	-	17.37	17.46	16.95	1.00
	SD	0.696	0.592	0.564	0.452	0.642	-	0.977	1.182	1.329	1.005
	Number	10	10	10	5	5	-	5	5	5	5
15	MEAN	16.47	15.46	15.66	-	17.03	17.50	16.94	17.25	17.52	1.05
	SD	0.888	0.862	0.849	-	0.974	1.014	1.004	1.102	1.075	0.511
	Number	10	10	10	-	10	10	10	10	10	10

*: shown a gain except to objects of lung passage

(5) 고 농축 바이러스 단회투여 실험 (STEP 1.3.5)

(ⓐ) 실험 목적

본 실험 design은 인플루엔자 바이러스 Batch 중에서 3차 바이러스 배양액을 100배 이상 고농축하여 최소 2.0×10^8 PFU/mL(1.0×10^7 PFU/50uL/mouse)이 되도록 조제한 시료를 접종원으로 Balb/c 및 DBA/1J 각 5수에 감염시키고 3일 간격으로 passage 3까지 lung-to-lung passage를 수행하였다.

P1~P5 까지 lung-to-lung passage를 진행하여 얻어진 lung homogenate를 가지고 인플루엔자 바이러스가 다음 passage로 전달이 일어나는지를 질병관리본부의 지원을 받아 보다 민감하고 정확한 RT-PCR을 수행하여 분석하기 위한 목적으로 수행하였다.

(ⓑ) 실험 방법

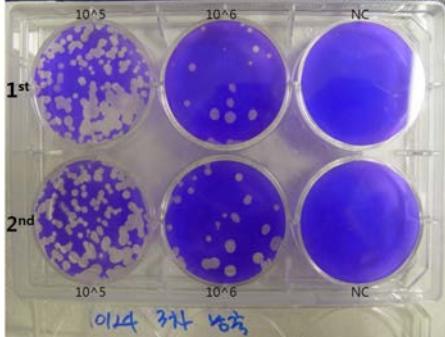
항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	Passage 당 Balb/c 및 DBA/1J을 각 11수씩 사용	
Virus Type	세포배양법에 의해 H3N2 Influenza A virus를 대량생산한 batch(3차배양액)를 100배 고 농축하여 접종원으로 사용	
Virus 농도	약 2.0×10^8 PFU/ml (추정치)	
Virus Challenge	- Intranasal 경로로 1회 50ul/head 투여 - <u>3일 간격으로 passage를 9차(P0~P8)까지 진행하고 각 passage의 lung homogenate를 pooling 하여 -70°C에 보관하고 passage 기간 동안에 잔여 동물에 대해서는 health monitoring을 실시하였음</u>	마우스 폐 5개 (약 700mg) 당 PBS 2.3ml 첨가하여 균질화하여 투여.
관찰 항목	매일 임상증상, 체중 측정 및 사망개체 확인	

(ⓓ) 실험 결과 및 고찰

- ① 본 실험에서 P0~P8 까지 lung-to-lung passage를 통해 얻어진 lung homogenate를 질병관리본부에서 RT-PCR을 수행한 결과, P0에서만 인플루엔자 바이러스가 검출되고 P1~P8 내의 lung homogenate에서는 인플루엔자 바이러스가 검출되지 않는 것으로 확인되었다.
- ② 본 실험을 통해서 passage마다 마우스 lung 내에 Influenza virus 존재 유무를 RT-PCR로 확인하여 어느 정도까지 lung-to-lung passage가 일어나는지를 보고자 하였으나 고농축 인플루엔자바이러스를 초기 감염원으로 사용했음에도 불구하고 P0에만 바이러스가 존재하고 다음 passage로 바이러스가 전달되지 않는다는 사실을 재차 확인하였다.

Table 1. Plaque Assay 결과: 3차 배양액의 100배 농축액

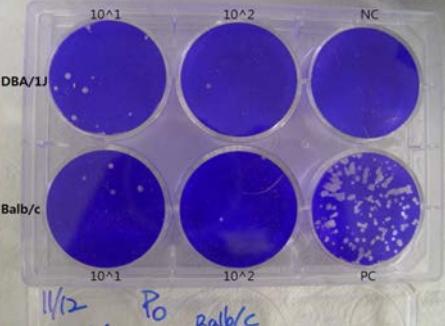
Plaque Assay: 3차 배양액의 100배 농축액		
Dilution	No. of Plaque	Titer (PFU/mL)
10^{-5}	-	-
10^{-6}	24 14	12×10^7 7.0×10^7
AVERAGE		9.5×10^7



014 311 828

Table 2. P0 Lung Lysate의 Plaque Assay 결과

Plaque Assay: P0 Lung Lysate			
Strain	Dilution	No. of Plaque	Titer (PFU/mL)
Balb/c	10^{-1}	4	2.0×10^2
	10^{-2}	2	10×10^2
DBA/1J	10^{-1}	8	4.0×10^2
	10^{-2}	2	10×10^2
AVERAGE		Balb/c DBA/1J	6.0×10^2 7.0×10^2



11/12 P0 Balb/c

Table 3. RT-PCR Data

Strain	Passage	Sample	Real-time RT PCR						
			A	B	H1pdm09	H3	H5	IPC	Result
Balb/c	P0	C3	31.5	-	-	25.8	-	-	A/H3N2
		C4	31.8	-	-	25.2	-	-	A/H3N2
		C6	27.9	-	-	23.3	-	-	A/H3N2
		C8	28.6	-	-	24.7	-	-	A/H3N2
		C10	29.4	-	-	25.3	-	-	A/H3N2
		Pooling(C3-C10)	27.6	-	-	24.5	-	-	A/H3N2
DBA/1J	P0	P0	35.1	-	-	-	-	-	음성
		1	27.2	-	-	25.7	-	-	A/H3N2
		4	35.5	-	-	28.5	-	-	A/H3N2
		5	33.5	-	-	28.4	-	-	A/H3N2
		8	28.5	-	-	23.5	-	-	A/H3N2
		10	34	-	-	29.7	-	-	A/H3N2
		Pooling(1-10)	28.8	-	-	23.8	-	-	A/H3N2
	P1	Pooling	36	-	-	-	-	-	음성

(6) 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스 개발을 위한 새로운 2단계 접근방법 시도 (STEP 1.3.6)

- 1단계: Lung infection→Cell culture of lung homogenate→Lung infection
- 2단계: Lung infection→Lung infection(lung-to-lung infection)

(가) 실험 목적

- ① 마우스 병원성주 H3N2 인플루엔자 바이러스를 개발하기 위해서 다양한 실험방법을 고안하여 수행하였으나 마우스 내에 생존하면서 증식이 거의 안 일어나는 즉 마우스에 감수성이 매우 낮은 바이러스임을 확인할 수 있었다.
- ② 지금까지 수행한 실험결과를 종합하여 분석한 결과, 먼저 최초 감염시킨 P1 마우스에서 다음 passage로 인플루엔자 바이러스가 넘어가지 않는 문제점을 해결해야 만 본 과제를 성공적으로 이끌 수 있다고 판단되었다. 이는 초기에 고 농도의 인플루엔자 바이러스를 감염시켜도 다음 passage에서는 natural immunity 및 기타 보고되지 않은 여러 원인으로 인하여 마우스 내에서 신속하게 viral clearance가 일어나는 사실이 알 수 있었다.
- ③ 새로운 접근방법으로 1단계에서는 각 passage 별로 감염시키는 바이러스의 농도를 높여 주기 위해 일정기간 동안 Lung infection→Cell culture of lung homogenate→Lung infection을 반복적으로 수행하고 감염에 의한 임상증상 발현 및 체중감소 현상이 관찰되는 시점에서 2단계인 Lung infection→Lung infection(lung-to-lung infection)을 수행하여 마우스 병원성주 인플루엔자 바이러스를 개발하고자 하였다.

(나) 실험 방법

- 1단계: Lung infection→Cell culture of lung homogenate→Lung infection

새로운 접근방법으로 P1에서 마우스 lung에 생존하고 증식할 수 있는 인플루엔자 바이러스의 상대적 농도가 매우 낮아 다음 passage에서 자연히 희석되어 없어지거나, 또는 미량으로 인해 생존, 증식 전에 마우스의 natural immunity에 의한 viral clearance가 일어날 것으로 판단된다. 따라서 “**고 농축 바이러스 단회투여 실험**”에서 얻어진 P0 lung homogenate 시료가 질병관리본부에서 RT-PCR 결과 바이러스가 존재하는 것으로 확인되었기에 이 시료를 가지고 MDCK 세포주에 감염을 시켜 대량 증식 후에 MW100,000 membrane concentrator를 사용하여 농축하고 이를 다시 마우스에 감염시켰다. 감염 후에 일정시간 경과 후에 다시 마우스의 lung을 분리하고 Homogenizer를 이용하여 lung homogenate를 얻어서 반복적으로 MDCK 세포주에 재 감염시킨 다음에 대량 증식하여 MW100,000 membrane concentrator를 사용하여 농축하고 이를 다시 마우스에 감염시키는 과정을 Balb/c의 경우는 P6 까지 DBA/1J

의 경우는 P5까지 진행하였다.

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	Passage 당 Balb/c 및 DBA/1J을 각 6수씩 사용	
Virus Type	“고 농축 바이러스 단회투여 실험”에서 얻어진 P0 lung homogenate 시료 [세포배양법에 의해 H3N2 Influenza A virus를 대량생산한 batch(3차배양액)를 100배 고 농축하여 접종한 마우스의 lung homogenate]	
Virus 농도	약 $1.0\sim4.0 \times 10^7$ PFU/ml (Batch 별로 다소 바이러스의 접종량에서 차이를 보이나 일정한 SOP에 따라 세포배양, 농축과정으로 매 Batch 별로 유사한 농도를 보여 주었음)	
Virus Challenge	- Intranasal 경로로 1회 50ul/head 투여 - 1단계: Lung infection → Cell culture of lung homogenate → Lung infection을 반복적으로 수행하였음 - Balb/c의 경우는 P6 까지 진행하였고 DBA/1J의 경우는 P5 까지 진행하였음	마우스 폐 5개 (약 700mg) 당 PBS 2.3ml 첨가하여 균질화하여 투여.
관찰 항목	- 매일 임상증상 관찰, 체중 측정 및 사망개체 확인 - 동물 투여 전에 농축한 배양액 및 감염 후에 얻어진 lung homogenate는 “제네디아 Rapid Kit”를 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인하였음	

■ 2단계: Lung infection→Lung infection (lung-to-lung infection)

1단계에서 Balb/c의 경우는 P6 까지 DBA/1J의 경우는 P5까지 진행하는 동안에 바이러스 감염에 의해 특징적으로 보여주는 임상증상이 관찰되었고 지속적이고 의미가 있는 체중 감소 현상, 그리고 동물 투여 전에 농축한 배양액 및 감염 후에 얻어진 lung homogenate에서 “제네디아 Rapid Kit”를 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인한 결과 매 passage마다 바이러스의 존재를 확인하게 되었다.

따라서 마우스 lung에서 생존 및 증식 가능한 MT의 인플루엔자의 존재하고 있다고 판단되어 다음 passage 부터는 직접적으로 lung-to-lung passage를 수행하면서 임상증상 관찰, 체중측정 및 폐사 및 사망개체 유무를 측정하였다. 동시에 lung homogenate에서 “제네디아 Rapid Kit”를 사용하여 바이러스 존재 유무를 매 passage마다 확인하였다.

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	Passage 당 Balb/c 및 DBA/1J을 각 6수씩 사용	
Virus Type	Balb/c(P6) 및 DBA/1J(P5)에서 얻어진 lung homogenate를 MDCK 세포주에서 대량배양하고 농축하여 제조한 시료사용	
Virus 농도	<u>Balb/c(P7) 및 DBA/1J(P6) 감염농도:</u> $1.0\sim4.0 \times 10^7$ PFU/mL 이후의 Lung-to-lung infection에서는 plaque assay를 수행하지 않고 단지 “제네디아 Rapid Kit”를 사용하여 바이러스 존재 유무만을 확인하였음	
Virus Challenge	- Intranasal 경로로 1회 50ul/head 투여 - 2단계: Lung infection→Lung infection (lung-to-lung infection)을 반복적으로 수행하였음 - <u>Balb/c의 경우는 P7~P20 차 까지 진행하였으며, DBA/1J의 경우는 P6~P19 차 까지 진행하였음</u>	마우스 폐 5개 (약 700mg) 당 PBS 2.3ml 첨 가하여 균질화 하여 투여.
관찰 항목	- 매일 임상증상 관찰, 체중 측정 및 사망개체 확인 - 동물 투여 전에 농축한 배양액 및 감염 후에 얻어진 lung homogenate는 “제네디아 Rapid Kit”를 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인하였음	

(d) 실험 결과 및 고찰

① 질병관리본부로부터 H3N2 Influenza A virus[NCCP No. 42471(A/Victoria/361/2011), 1×10^6 PFU/ml (0.5ml/vial)]를 분양받아 세포배양법에 의해 H3N2 Influenza A virus를 대량생산 한 batch(3차배양액)를 100배 고 농축하여 접종한 마우스의 P0 lung homogenate(“고 농 축 바이러스 단회투여 실험”에서 얻어진 P0 lung homogenate 시료)를 접종원으로 사용하였다.

마우스 병원성 인플루엔자 바이러스를 생산하기 위한 실험동물은 최소 5일~10일의 순화 기간을 가졌으며, 바이러스 감염 시작 당일 inbred mouse 2종(Balb/c, DBA/1J)의 실험동 물에 대해 체중을 확인하였다.

시험 시작 일부터 10일 동안 임상 관찰기간을 가졌으며 투여 개시일(Day 0)부터 Day 10 일까지 최소 1일 1회, 체중측정, 임상증상 및 사망여부를 개체별로 관찰하였다. 사망개체 발생 시 사망일자 및 체중감소 등을 기록하였고 1일 간격으로 동물의 체중을 확인하였다.

또한 관찰 기간 동안 감염 직전 체중의 25% 이상 감소된 개체는 향후 사망개체로 처리하여 data를 분석하였고 바이러스 감염 3~4일 차에 접종원으로 사용되는 마우스는 체중 측정을 실시하고 폐를 적출하였다. 적출된 폐를 개체별로 중량을 확인하여 마우스 종류

별로 장기의 총 중량을 기입하였고 적출된 장기는 장기중량 500mg당 2.3mL의 PBS (10mM Phosphate Buffered Saline)를 넣어 균질화된 바이러스 액을 제조하고 이를 다음 passage의 접종원으로 사용하였다.

- ② Balb/c의 경우 1단계(Lung infection→Cell culture of lung homogenate→Lung infection)에서 P0~P6 까지 반복적으로 수행하였으며 2단계(Lung infection→Lung infection)은 P6~P23 까지 반복적으로 수행하였다. 하기의 실험결과를 보면 1단계 및 2단계의 전 실험과정을 통하여 25% 이상의 체중 감소가 일어나 안락사 처리되는 개체나 사망개체는 발견하지 못했다. 또한, 체중 측정 결과 P16 부터 P19 까지 D0~D6 일까지는 지속적으로 체중 감소 현상이 관찰되어 인플루엔자 바이러스 감염에 기인한 긍정적인 결과가 나타났으나 그 이후에는 시간이 지나면서 다시 체중이 복원되는 현상이 반복적으로 관찰되어 마우스 병원성주를 확보할 수가 없음을 확인하였다.
- ③ DBA/1J의 경우, 1단계(Lung infection→Cell culture of lung homogenate→Lung infection)에서 P0~P5 까지 반복적으로 수행하였으며 2단계(Lung infection→Lung infection)은 P5~P21 까지 반복적으로 수행하였다.
- 하기의 실험결과를 보면 1단계 P5에서부터 의미가 있는 체중감소 현상이 관찰됨을 확인하였고 마우스 lung에 바이러스의 증식이 활발하게 일어나는 것으로 판단되어 2단계 P5-1 부터는 인플루엔자 바이러스 농축을 위한 세포배양 단계를 거치지 않고 곧바로 lung-to-lung passage를 3일에서 4일 간격으로 수행하였다. Lung-to-lung passage를 진행하면서 P12에서 25% 이상의 체중 감소가 일어나 안락사 처리되는 개체가 확인되었고 P14~P20 사이에서는 5일에서 7일 사이에 전 개체 대부분이 안락사 처리되는 심각한 체중 감소현상이 일어났다. P14에서는 최초로 D9 및 D10일차에 각각 1수씩 사망례가 관찰되어 40%의 mortality를 나타내었으며 passage가 진행되면서 상대적으로 높은 폐사율과 폐사기간이 단축되는 현상을 관찰하였으며 대략 80~100%의 mortality를 보여 마우스 병원성주가 만들어졌음을 확인하였다.
- ④ Inbred DBA/1J mice에서 25% 이상의 체중감소 현상, 폐사개체 확인, 빠른 폐사기간, lung 세포의 조직병리 결과 그리고 “제네디아 Rapid Kit”를 사용한 H3 항원의 검출 등으로 미루어 최종적으로 마우스 병원성주가 만들어졌음을 확인하였다.

따라서 처음으로 사망례가 관찰된 DBA/1J_P14 및 급격한 체중감소 및 80% 사망례를 보인 DBA/1J_P19의 lung homogenate를 가지고 plaque assay 및 plaque purification을 통한 virus clone 분리실험에 사용하기로 결정하였다.

Table 1. Mortality (Balb/c)

Mouse Strain	Passage	Number of Death												Mortality (%)	
		No. Dead / No. Infected			Days after Infection										
		Total Dead No.	Found Dead No.	Euthanasia No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Balb/c	0	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0
	1	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0
	2	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0
	3	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0
	4	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0
	5	0/6	0/6	0/6	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	0
	6	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0
Lung-Cell-Lung	6-1	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0
	7	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0
	8	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0
	9	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0
	10	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0
	11	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0
	12	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0
	13	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0
	14	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0
	15	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0
	16	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
	17	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	18	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	19	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	21	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	22	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	23	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(): Number of Euthanasia

* Euthanasia criteria: Weight loss of 25% of mice's pre-experimental body weight

Table 2. Mortality (DBA/1J)

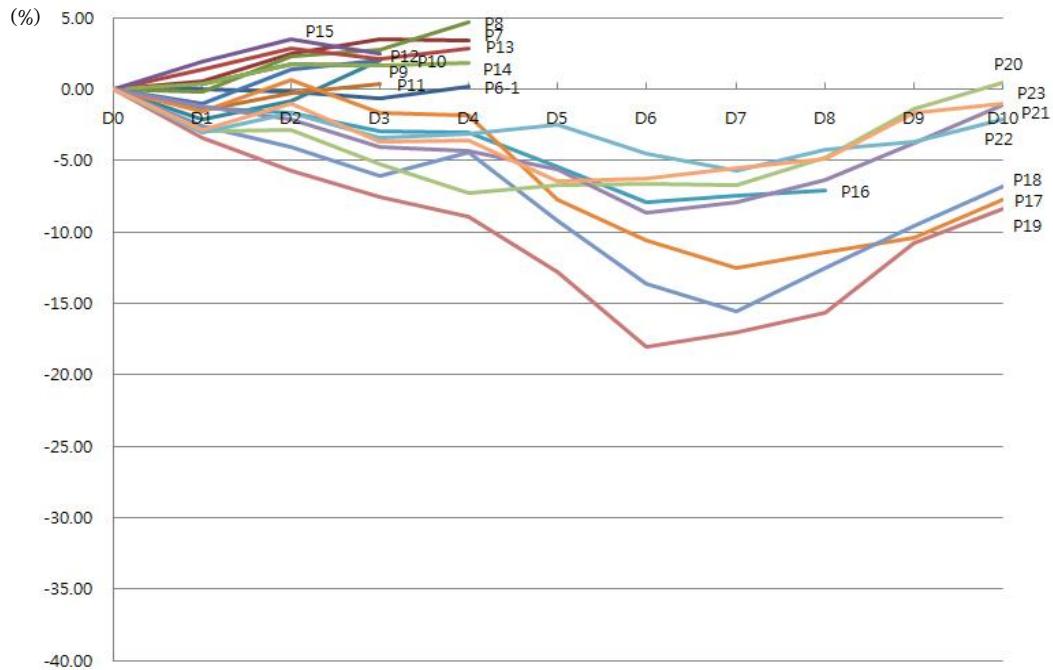
Mouse Strain	Passage	Number of Death												Mortality (%)		
		No. Dead / No. Infected			Days after Infection											
		Total Dead No.	Found Dead No.	Euthanasia No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
DBA/1J Lung-Cell-Lung	0	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	
	1	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	
	2	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	
	3	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	
	4	0/6	0/6	0/6	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	0	
	5	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	
DBA/1J Lung-Lung	5-1	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	
	6	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	
	7	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	
	8	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	
	9	0/4	0/4	0/4	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	
	10	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	
	11	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	
	12	3/4	0/4	3/4	0	0	0	0	0	0	0(3)	0	0	-	0(75)	
	13	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	
	14	5/5	2/5	5/5	0	0	0	0	0	0	0(4)	0(1)	0	1	40(100)	
	15	5/5	2/5	5/5	0	0	0	0	0	0(5)	0	0	0	1	40(100)	
	16	5/5	2/5	5/5	0	0	0	0	0	0	0(4)	0	0	0(1)	2	40(100)
	17	5/5	4/5	5/5	0	0	0	0	0	0(4)	0(1)	0	1	1	2	80(100)
	18	2/2	2/2	2/2	0	0	0	0	0	0(2)	0	0	0	0	2	100(100)
	19	4/5	4/5	4/5	0	0	0	0	0	0(2)	0(2)	0	1	2	1	80(80)
	20	5/5	5/5	5/5	0	0	0	0	0	0(1)	0(4)	1	2	1	1	100(100)
	21	4/4	4/4	4/4	0	0	0	0	0	0(1)	0(3)	0	1	3	0	100(100)

(): Number of Euthanasia

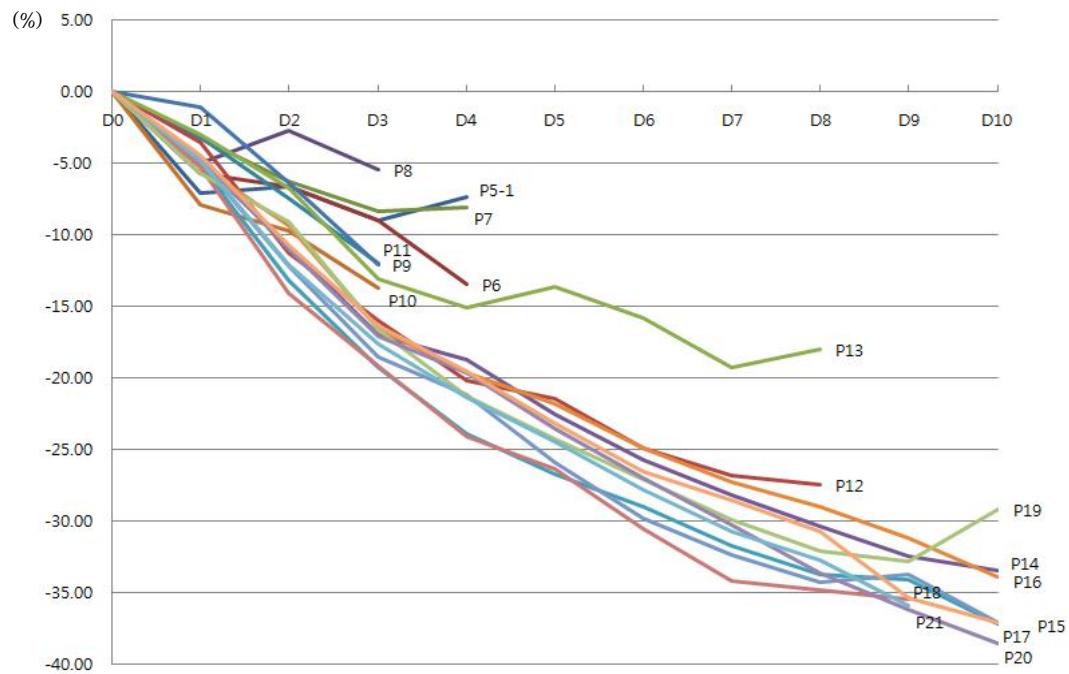
* Euthanasia criteria: Weight loss of 25% of mice's pre-experimental body weight

Figure 1. Ratio of Body Weight Loss

① Balb/c



② DBA/1J



라. Plaque 정제를 통한 Mutant Type(MT) Influenza Virus Clone 생산

(1) Plaque Purification에 의한 MT Influenza Virus Clone 확보

④ DBA/1J_P14로부터 plaque purification을 통한 virus clone 확보

DBA/1J 마우스에서 얻어진 DBA/1J_P14의 lung homogenate로부터 plaque assay 방법을 변형하여 바이러스 클론을 생산하기 위한 실험을 진행하였으며 총 5개의 clone을 확보하였으며 실험결과는 다음과 같다.

- a) 10^{-5} 에서 Clone 2종 분리(DBA/1J_P14_C1, DBA/1J_P14_C2)
- b) 10^{-6} 에서 Clone 1종 분리(DBA/1J_P14_C3)
- c) 10^{-5} 에서 Clone 2종 분리(DBA/1J_P14_C4, DBA/1J_P14_C5)

⑤ DBA/1J_P19로부터 plaque purification을 통한 virus clone 확보

DBA/1J 마우스에서 얻어진 DBA/1J_P19의 lung homogenate로부터 plaque assay 방법을 변형하여 바이러스 클론을 생산하기 위한 실험을 진행하였으며 실험결과는 위와 유사한 방법을 사용하였으며 총 4개의 clone을 확보하였다.

- a) 10^{-5} 에서 Clone 3종 분리(DBA/1J_P19_C1, DBA/1J_P19_C2, DBA/1J_P19_C3)
- b) 10^{-6} 에서 Clone 1종 분리(DBA/1J_P19_C4)

(2) Virus Clone 선별 (STEP 1.4.2)

DBA/1J 14 passage에서 virus clone 5개(DBA/1J_P14_C1, DBA/1J_P14_C2, DBA/1J_P14_C3, DBA/1J_P14_C4, DBA/1J_P14_C5)를 분리하였으며 각각의 virus clone을 MDCK 세포주에 감염시켜 바이러스를 대량 생산한 후에 마우스 감염 실험을 통해 최종적으로 마우스 병원성 바이러스를 선별하였다. 하기의 data에서 보듯이 다른 바이러스 clone에 비해 유의성을 보이는 임상증상, 체중감소 및 mortality가 뚜렷한 DBA/1J_P14_C3, DBA/1J_P14_C4를 최종적으로 선별하였다.

DBA/1J 19 passage에서는 virus clone 4개(DBA/1J_P19_C1, DBA/1J_P19_C2, DBA/1J_P19_C3, DBA/1J_P19_C4)를 분리하였으며 각각의 virus clone을 MDCK 세포주에 감염시켜 바이러스를 대량 생산한 후에 마우스 감염 실험을 통해 최종적으로 마우스 병원성 바이러스를 선별하였다. 하기의 data에서 보듯이 다른 바이러스 clone에 비해 유의성을 보이는 임상증상, 체

중감소 및 mortality가 뚜렷한 DBA/1J_P19_C1, DBA/1J_P19_C2를 최종적으로 선별하였다.

결론적으로 마우스 DBA/1J strain을부터 virus clone을 최종 4주(DBA/1J_P14_C3, DBA/1J_P14_C4, DBA/1J_P19_C1, DBA/1J_P19_C2) 확보하였으며, 4주의 마우스 병원성 바이러스주를 대량 생산 중에 있으며 4월 중에 질병관리본부 인플루엔자 바이러스과에 각 바이러스 clone 당 50vial(최소 1×10^6 PFU/ml 이상, 0.5 ml/vial)을 제공할 예정이다.

Table 1. DBA/1J 14 및 19 passage에서 얻어진 clone에 대한 plaque assay 결과

세포배양을 통해 대량생산된 각 virus clone들의 시료는 마우스 병원성 분석을 위한 시료로 사용하였다.

Virus	Dilution	# of Colony	PFU/mL	Average(PFU/mL)
3차 배양액	10^{-5}	79	4.0×10^7	3.5×10^7
	10^{-6}	6	3.0×10^7	
DBA/1J_P14_C3	10^{-4}	55	2.8×10^6	2.6×10^6
	10^{-5}	5	2.5×10^6	
DBA/1J_P14_C4	10^{-5}	29	1.5×10^7	1.2×10^7
	10^{-6}	2	1.0×10^7	
DBA/1J_P19_C1	10^{-5}	34	1.7×10^7	2.1×10^7
	10^{-6}	5	2.5×10^7	
DBA/1J_P19_C2	10^{-5}	58	2.9×10^7	3.0×10^7
	10^{-6}	6	3.0×10^7	

Table 2. Mortality

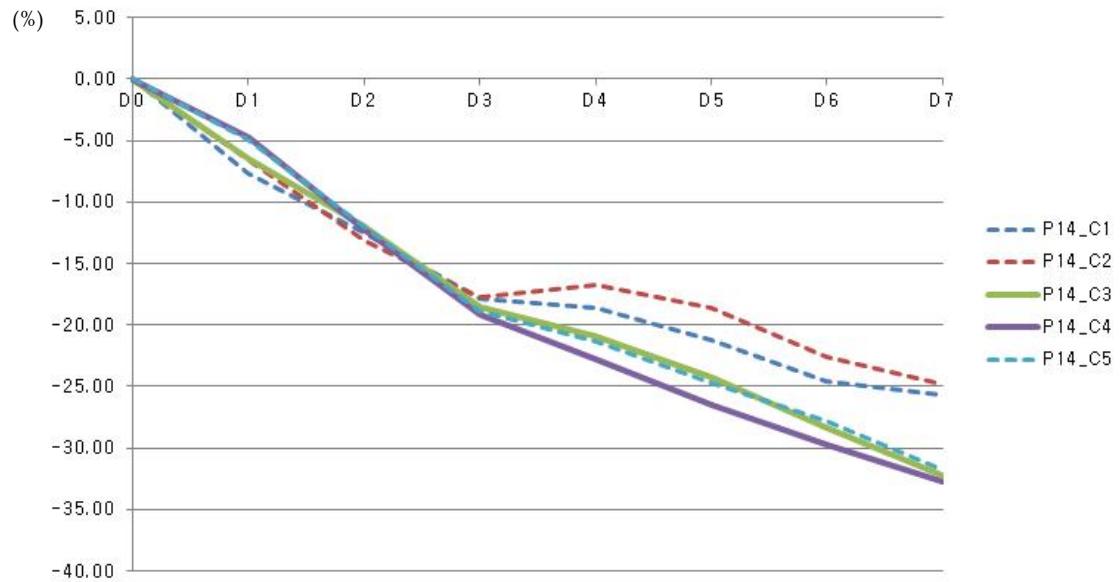
Mouse Strain	Clone	Number of Death									Mortality (%)	
		No. Dead / No. Infected			Days after Infection							
		Total Dead No.	Found Dead No.	Euthanasia No.	0	1	2	3	4	5	6	7
DBA/1J	P14_C1	2/4	0/4	2/4	0	0	0	0	0	0/(2)	0	0(50)
	P14_C2	2/4	0/4	2/4	0	0	0	0	0	0	0	0(50)
	P14_C3	4/4	0/4	4/4	0	0	0	0	0	0/(2)	0/(1)	0/(1) 0(100)
	P14_C4	4/4	0/4	4/4	0	0	0	0	0	0/(2)	0	0(100)
	P14_C5	4/4	0/4	4/4	0	0	0	0	0	0/(2)	0/(1)	0(100)
	P19_C1	5/5	0/5	5/5	0	0	0	0	0	0(1)	0(4)	0(100)
	P19_C2	5/5	0/5	5/5	0	0	0	0	0	0(5)	0	0(100)
	P19_C3	3/5	0/5	3/5	0	0	0	0	0	0(3)	0	0(60)
	P19_C4	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0

(): Number of Euthanasia

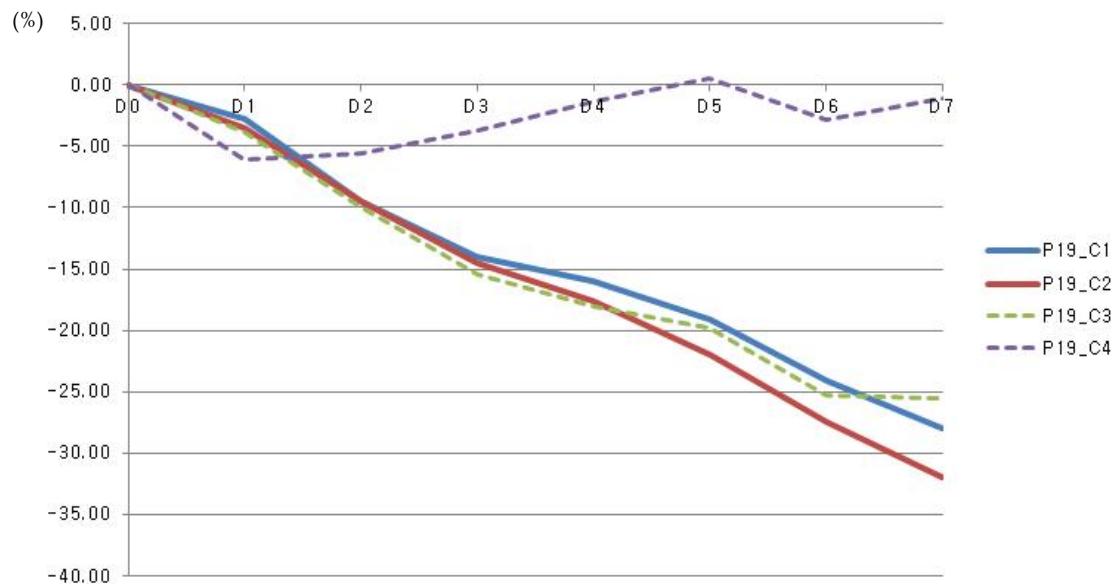
* Euthanasia criteria: Weight loss of 25% of mice's pre-experimental body weight

Figure 1. Ratio of Body Weight Loss

1) DBA/1J_P14



2) DBA/1J_P19



2. 유전자 서열정보 분석

가. 마우스 계대배양 후 확보된 바이러스에 대한 전체 유전자 서열분석

(1) WT H3N2 Influenza A virus에서 Viral RNA 분리 및 보관

ⓐ SOP for the “Isolation of Viral RNA” from H3N2 Influenza Virus

① Important points before starting

- 모든 원심분리 단계는 15~25° C의 실온에서 수행한다.

② Things to do before starting

- 시료는 시험 전에 15~25° C의 실온에 맞춰놓는다.

- Buffer AVE는 STEP11의 elution을 위해서 사전에 실온에 맞춰놓는다.

③ Buffer AW1 그리고 Buffer AW2의 제조(Manual 참조, p17)

Kit cat. No.	No. of Preps	Buffer Type	Each Buffer Concentrate	Ethanol	Final Volume
52904	50	AW1	19ml	25ml	44ml
52904	50	AW2	13ml	30ml	43ml

* Each Buffer is stable for 1 year when stored closed at room temperature, but only until the kit expiration date.

④ Buffer AVE에 reconstituted된 Carrier RNA를 Buffer AVL에 Page15의 지시에 따라서 넣어준다.

ⓐ Add 310ul Buffer AVE to the tube containing 310ug lyophilized carrier RNA to obtain a solution of 1ug/ml.

ⓑ Dissolve the carrier RNA thoroughly, divide it into conveniently sized aliquots and store it at -20° C. Do not freeze-thaw the aliquots of carrier RNA more than 3 times.

ⓒ Volumes of Buffer AVL and carrier RNA-Buffer AVE mix required for the QIAamp Viral RNA Mini procedure.

No. of Samples	Vol. of Buffer AVL(ml)	Vol. of Carrier RNA- AVE(uL)
1	0.56	5.6
5	2.8	28
10	5.6	56

* Sample 수에 비례하여 Buffer AVL 과 Carrier RNA-Buffer AVE mix의 양이 증가한다.

* Viral RNA is stable for up to one year when stored at -20° C or -70° C

⑤ 실험 PROTOCOL(SOP)

STEP	SOP (Standard Operation Procedure)	Notice
1	Carrier RNA를 포함하는 Buffer AVL 560uL를 1.5mL microcentrifuge tube에 넣는다.	
2	Sample(virus를 포함하는 농축 serum free media) 140uL를 첨가하고 15초 동안 pulse-vortexing 해준다.	Sample을 Buffer AVL과 완전히 섞이도록 해준다.
3	15~25° C에서 10분 incubation 시킨다.	10분 이상은 해주지 않는 것이 좋다.
4	뚜껑 안쪽 drops을 제거하기 위해서 tube를 가볍게 centrifuge한다. 모든 centrifugation step은 15~25° C의 실온에서 진행시킨다.	
5	96-100% 에탄올 560uL를 넣고 15초 동안 pulse-vortexing 후 뚜껑 안쪽 drops을 제거하기 위해서 tube를 가볍게 centrifuge한다.	다른 알코올 사용하지 말고 오직 에탄올만 사용한다.
6	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Step 5로부터의 630uL의 용액을 QIAamp Mini Column(2mL collection tube)에 넣는 후에 뚜껑을 닫고 8,000rpm(6,000 x g), 1분 동안 Centrifuge한다. ▶ QIAamp Mini Column을 깨끗한 2mL collection tube에 넣고 Filtrate를 포함한 Tube는 버린다. 	만약 용액이 tube에 남아있다면 용액이 완전히 통과할 때까지 다시 한번 높은 속도로 centrifuge한다.
7	조심스럽게 QIAamp Mini Column을 열고 Step 6를 반복한다. (630uL의 용액 추가 Loading)	
8	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 조심스럽게 QIAamp Mini Column을 열고 Buffer AW1 500uL 을 넣어 주고, 8,000rpm(6,000 x g), 1분 동안 centrifuge한다. ▶ QIAamp Mini Column을 깨끗한 2mL collection tube에 넣고 filtrate를 포함한 tube는 버린다. 	
9	조심스럽게 QIAamp Mini Column을 열고 Buffer AW2 500uL를 넣어 주고, 14,000g(20,000 x g), 3분 동안 centrifuge한다.	
10	QIAamp Mini Column을 새로운 2mL collection tube에 넣고 filtrate를 포함한 tube는 버린다. 최고 속도로 1분 centrifuge한다.	Step10은 생략 가능하다.
11	<ul style="list-style-type: none"> ▶ QIAamp Mini Column을 1.5mL microcentrifuge tube에 넣는다. QIAamp Mini Column을 열고 Buffer AVE 60uL를 넣는다. ▶ 상온에서 1분간 incubation 한 후 8,000rpm(6,000 x g), 1분 동안 centrifuge한다. 	Buffer AVE를 room temperature에 맞춰놓는다.

(4) 실험결과

① 1차 Viral RNA 분리 결과

Virus Source: 3차 인플루엔자 바이러스 대량배양 후에 mouse 감염시험을 위해 농축한 바이러스 액을 사용하여 RNA를 분리하였음.

분리횟수	OD _{260nm}	OD _{280nm}	RNA 정량 (OD260=1, RNA=40ug/ml)	RNA Purity (260/280)
1차	0.027	0.014	$40 \times 0.027 \times 200 = 216\text{ug/ml}$	1.93
2차	0.026	0.013	$40 \times 0.026 \times 200 = 208\text{ug/ml}$	2.0
3차	0.033	0.016	$40 \times 0.033 \times 200 = 264\text{ug/ml}$	2.06

* PBS 1mL에 RNA 5uL를 첨가하여 200배 dilution 후에 흡광도를 측정하였음

* 통상적으로 동물세포에서 RNA 분리 시에 800ug/mL 수준임

② 2차 Viral RNA 분리 결과

Virus Source: 질병관리본부에서 분양을 받은 인플루엔자 바이러스(Original Virus_Wild Type)를 사용하여 RNA를 분리하였음.

분리횟수	OD _{260nm}	OD _{280nm}	RNA 정량 (OD260=1, RNA=40ug/ml)	RNA Purity (260/280)
1차	0.01	0.003	$40 \times 0.01 \times 200 = 80\text{ug/ml}$	3.33
2차	0.007	0.003	$40 \times 0.007 \times 200 = 56\text{ug/ml}$	2.33

* PBS 1mL에 RNA 5uL를 첨가하여 200배 dilution 후에 흡광도를 측정하였음

③ 3차 Viral RNA 분리 결과

Virus Source: 3차 배양액을 가지고 egg에서 인플루엔자 바이러스를 생산하고 이를 농축한 바이러스 액을 사용하여 RNA를 분리하였음.

분리횟수	OD _{260nm}	OD _{280nm}	RNA 정량 (OD260=1, RNA=40ug/ml)	RNA Purity (260/280)
1차	0.007	0.005	$40 \times 0.007 \times 200 = 56\text{ug/ml}$	1.4
2차	0.004	0.003	$40 \times 0.004 \times 200 = 32\text{ug/ml}$	1.38
3차	0.004	0.002	$40 \times 0.004 \times 200 = 32\text{ug/ml}$	2.0
4차	0.005	0.003	$40 \times 0.005 \times 200 = 40\text{ug/ml}$	1.66

* PBS 1mL에 RNA 5uL를 첨가하여 200배 dilution 후에 흡광도를 측정하였음

(5) 실험 결과 및 고찰

① Virus Source로 3차 인플루엔자 바이러스 대량배양 후에 Mouse 감염시험을 위해 농축한

바이러스 액을 사용하여 RNA를 분리하는 경우가 가장 좋은 결과를 얻었으며 현재 Mutant Type이 만들어지면 같이 DNA sequencing을 의뢰하기 위해 -70°C에 보관하였음.

- ② 질병관리본부에서 분양을 받은 인플루엔자 바이러스(Original Virus_Wild Type)를 사용하여 RNA를 분리한 경우에는 plaque assay결과에 소량 존재함을 확인하였으며, egg 농축액도 실험결과로 미루어 viral RNA는 거의 없는 것으로 확인됨.

(4) MT H3N2 Influenza A virus에서 Viral RNA 분리 및 염기서열 분석 (STEP 2)

WT H3N2 인플루엔자 바이러스로부터 viral RNA 분리를 통하여 확립한 SOP에 따라서 마우스 DBA/1J로부터 유래한 다양한 passage의 MT의 인플루엔자 바이러스 유전자형 분석을 위해 QIAGEN社의 Viral RNA Mini Kit를 사용하여 viral RNA를 추출하였다. 추출한 viral RNA를 가지고 cDNA를 합성하였으며 8개의 gene specific primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. 인플루엔자 바이러스의 염기서열 분석은 전기영동 후 PCR 산물을 가지고 수행하며, 염기서열 분석을 통해 H3N2 MT 인플루엔자 바이러스 임을 최종 판정하였다.

Table 1. 염기서열 분석 의뢰 시료 리스트(총 19개 시료 제공)

분류	염기서열 분석 시료의 정보		비고
	번호	내용	
Lung-Cell-Lung Passage	1	DBA/1J_PO	
	2	DBA/1J_P1	
	3	DBA/1J_P3	
	4	DBA/1J_P4	
	5	DBA/1J_P5	
Lung-to-Lung Passage	6	DBA/1J_P5-1	
	7	DBA/1J_P9	
	8	DBA/1J_P12	
	9	DBA/1J_P14	
	10	DBA/1J_P15	
	11	DBA/1J_P16	
	12	DBA/1J_P17	
	13	DBA/1J_P18	
	14	DBA/1J_P19	
	15	DBA/1J_P20	
Virus Clone	16	DBA/1J_P14_C3	Passage 14 Lung homogenate에서 분리
	17	DBA/1J_P14_C4	Passage 14 Lung homogenate에서 분리
	18	DBA/1J_P19_C1	Passage 19 Lung homogenate에서 분리
	19	DBA/1J_P19_C2	Passage 19 Lung homogenate에서 분리

Fig 1. Identification of RNA

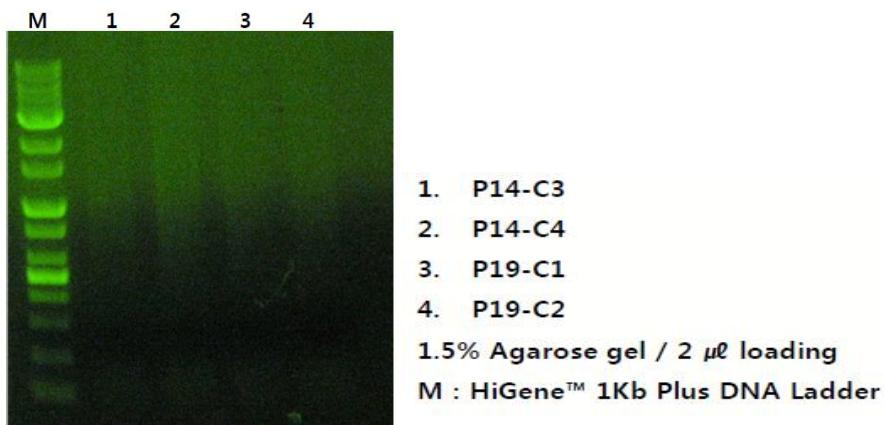


Fig 2. Identification of cDNA

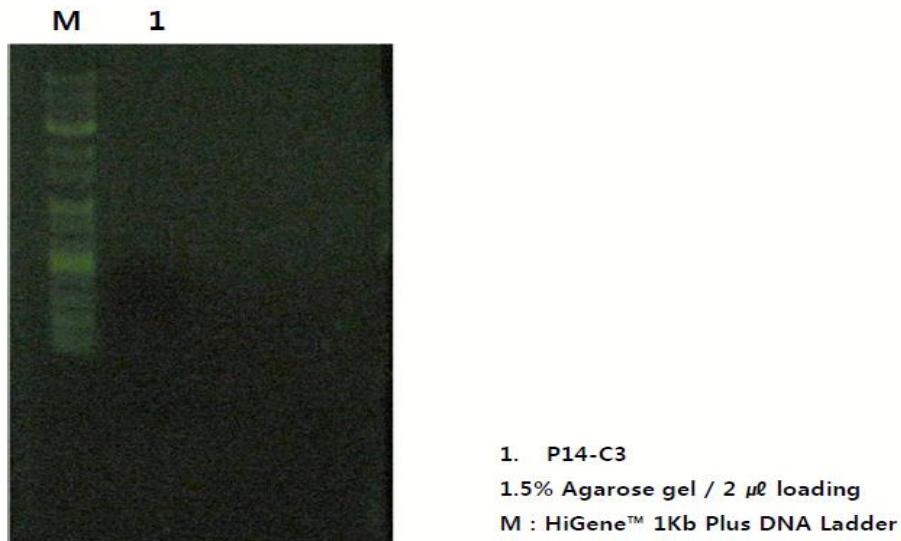
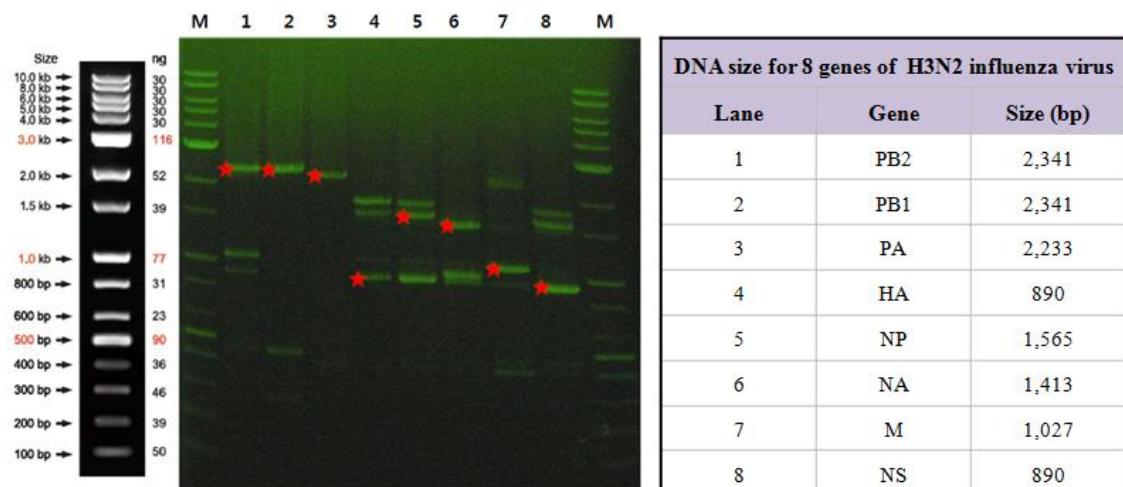


Fig 3. PCR product for 8 genes of mouse-adapted H3N2 Influenza virus (DBA/1J_P14_C3) using a specific primer for each gene



■ 8개 유전자의 약어 설명

PB2, PB1, PA: RNA polymerase [Polymerase complex], HA: Hemagglutinin, NP: Nucleocapsid Protein, NA: Neuraminidase, MP: Matrix Protein, NS: Non-structural protein (NS1 and NS2, Nuclear Export Protein)

■ ★: Target Band

■ Method: RNA Identification \rightarrow PCR \rightarrow PCR Purification \rightarrow Full Sequencing

Table 2. Amino acid sequence of PB2 gene for wild type, 4 mutant Influenza virus clones and viruses selected from each passage

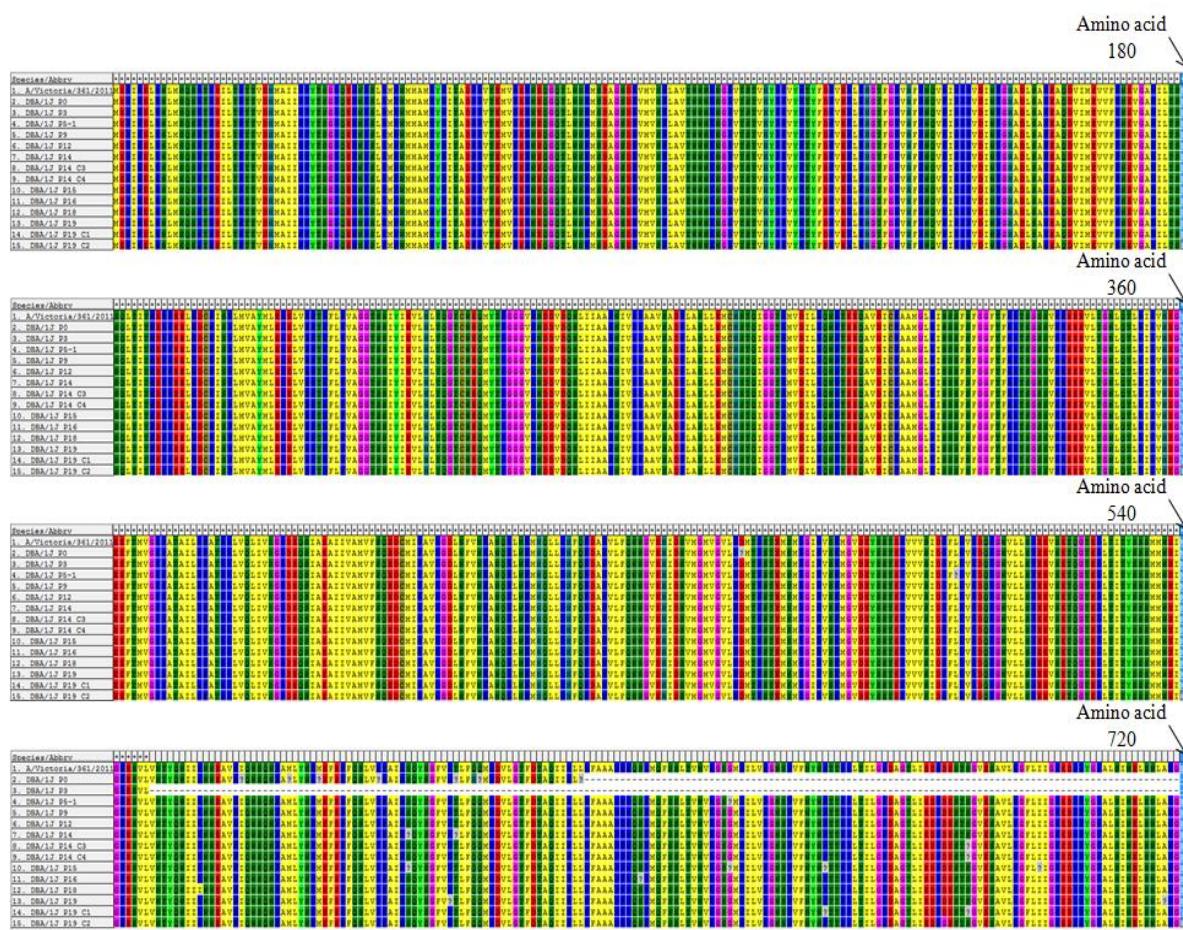


Table 3. Amino acid sequence of HA gene for wild type, 4 mutant Influenza virus clones and viruses selected from each passage

The figure displays a sequence alignment of the SARS-CoV-2 spike protein across 20 different variants. The variants are listed on the left, and the amino acid sequence is shown below them. Above the sequence, five specific mutations are highlighted with red arrows and labels: T183I, I208T, F209S, A228V, and N262H. The mutations are located in the receptor-binding domain of the spike protein.

Table 4. Amino acid sequence of NA gene for wild type, 4 mutant Influenza virus clones and viruses selected from each passage

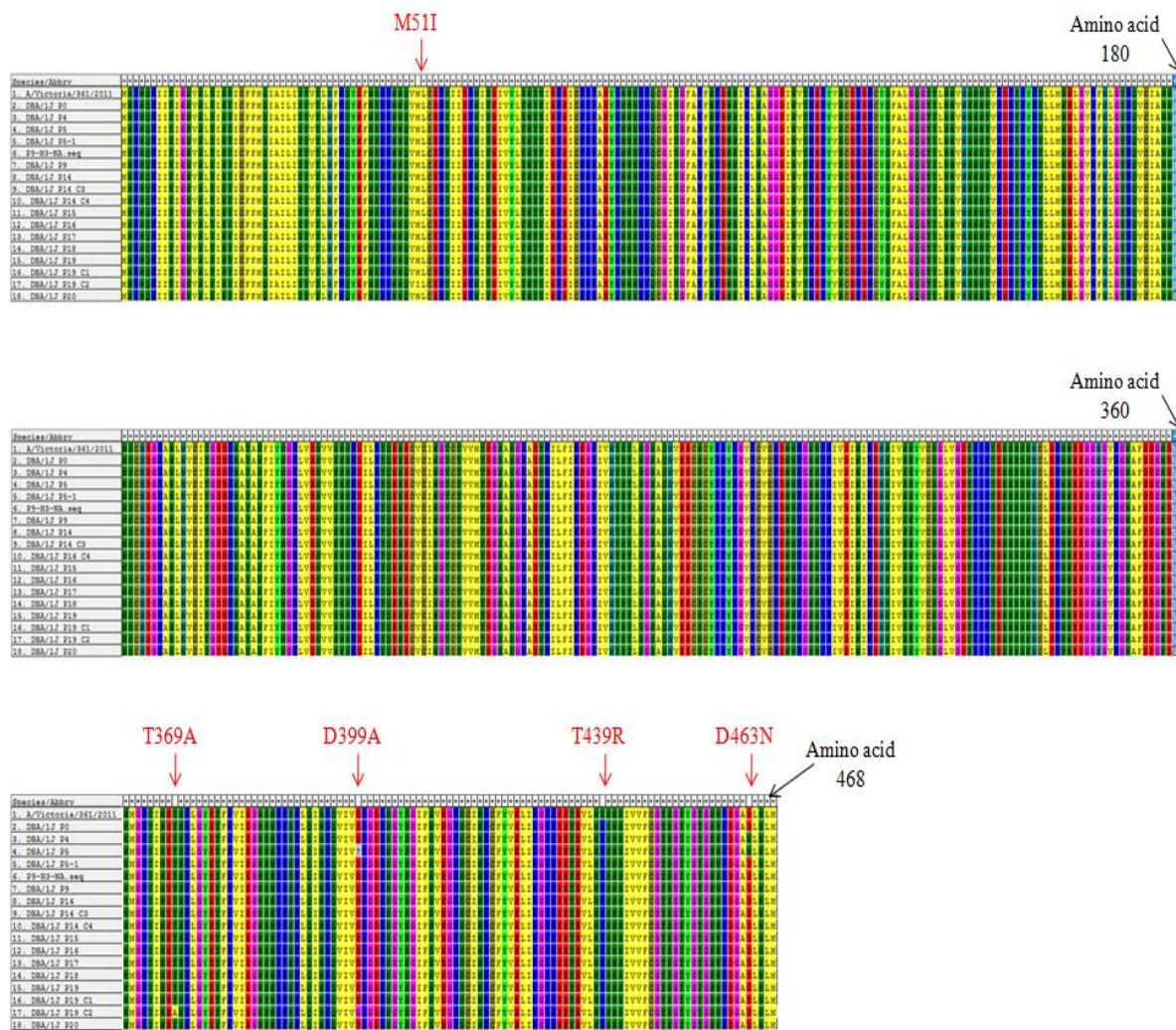


Table 5. Amino acid sequence for DBA/1J mouse-adapted H3N2 mutant Influenza virus
(DBA/1J_P14_C3)

	Amino acid sequence
M	MSLLTEVEVYVLSIVPSGPLKAEIAQRLEDVFVGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTVPSERGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDKAVKLYRKLKREITFHGAKEI ALSAGALASCMGLIYNRMGAVTTEVAFLVCATCEQIADSQHRSRQMVTATTAKAMEQMXSSEQAAEAMEIASQARQMVQAMRAIGTHP SSSTGLRDDLLENLQTYQKRMGVQMQRFK
NP1	DGDRQNATEIRASVGKMDGIGRFYIQMCTELKLDHEGRLIQNSLTIEKMWLSAFDERRNKYLEEHPSAGKDPPKTGGPIYRVDGKWMRELVLYDKDEIRRIWRQANNGE DATSGLTHIMIWHSNLNNDATYQTRALVRTGMDPRMCMSMQGSTLPRRSAAGAAVKIGTMVMEMLRMVKRGINDRNFWRGENGKTRSAYERMNCNLKGKFQTA QRAMV/DQVRESRNPNGNAEIEDLIFLARSALMRGSVAHKSCLPACAYGPASVNG
NP2	VGIDPFKLLQNSQIYSIRPNENPAHKSQLVWMACHSAFEDLRLSFIRGTKVSPRGKLSTRGVQIASNENMDNMGSSTLELRSRWAIITRSGGNTNQQRASAGQTSVQ PTFSVQRNLPFEKSTIMAFTGNTEGRXSDMRAEIIIRMMEGAKPEEXSFRGRGVFELSDEKATNPIVPXFDMSNEGSYXFQGDNAEYD
NS	MDSNTVSSFQVDCFLWHIRKQVVDQEISDAFLDLRDRDQRSLRGRGNTLGLDIKAATHVGKQIVEKILKEESDEALKMTMVSTPASRYITDMTIEELSNWFMLMPKQKV EGPLCIRMDRAIMEKNIMLKANFNVIIFGRLETIVLLRAFTEEGAIVGEISPLPSFGHTIEDVKNAIGVLIGGLEWNNDTWRVSKNLQRFAWSNEDGGPLTPKQKREMART ARSKV
PA	MEDFVRQCFNPMIVELAEKAMKEYGEDLKIETNKFAAICHTLEVCFMYSDFHFINEQGESIVVELDDPNALLKHREIIEGRDRTMAWTVVNSICNTTGAGKPKFLPDLYDYKE NRFIEIGVTRREVHIYILEKANIKKSENTHIIFPSFTGEEMATKADYTLDEESRARIKTRLFTIROQEMANRGLWDSFRQSERGETIEEKFETITGMRRRADQLPNNFSCLENFRAY VDGFEPNGCIEGKLSQMSKEVNAQIEPFLKTPRPPIKLPNGPPCYQRSKFLIMDAKLKQYDSEPELRSLSWMQSEFNKACELTDVSVWELDEIGEDVAPIEHASMRRNYFTAEVSHCRATEYIMK NEEKIPRTKNMKKTSQLKWLGENMAPEKVDENCRDISDLQYDSEPELRSLSWMQSEFNKACELTDVSVWELDEIGEDVAPIEHASMRRNYFTAEVSHCRATEYIMK GVYINTALLNASCAAMDDFLQIPMISKCRTKEGRKTNLYGFIIKGRSHLRNDTDDVNFVSMFSLTDPRLEPHKWEKYCVLEIGDMLLRSAGQISRPMFLYVRTNGTSKV MKWGMEMRRCLLQSLQIESMIEAESSVKEKDMTKEFFENKSEAWPIGESPKGVEEGSIGKVCRTLAKSVFNSLYASPQLEGFSAESRKLLVVQALRDNLEPGFDLGGYE AIEECLINDPWVLLNASWFnSFLTHALK
PB1	MDVNPTLFLKVPQAQNAISTTFPTGDPYSHGTGTGYTMDTVNRTHQYSERGKWTTNTETGAPQLNPIDGPLEDNEPSGYAQTDVCLEAMAFLEESHPGIFENSCLTM EAVQQTRVDKLTQGRQTYDWTLNRRNQPAATALANTIEVFRSNGLTANESGRLLDFLKDVMESEMDEKEEMEITTHFQRKRRVDMNTKKMVTQRTIGKKQRVNKRGYLIRA LTNTMTKDAERGKLKRRRAIATPGMQLRGFVYFETLARSICEKLEQSGLPVGGNEKAKLANVVRKMMNTNSQDTELSFTITGDNTKWNENQNPRMFLAMITYITKNQPEW FRNLSIJAIPMFSNKMARLGKGYMFESKRMKLRQIPIAEMLASIDLKYFNESTRKKIEKIRPLIIDGTAASLSPGMGMMGMFNMLSTVLGVSIILNLGQKTYKTTYWWDGLQSSD DFALIVNAPNHEGIQAGVDRFYRTCKLVGINMSKKSYINKTGFEEFTSFFYRYGVANFSMELPSFGVGSGINESADMISIGVTVIKNMINNDLGPATQMALQLFIKYRT YRCHRGDTQIQTTRSFEIKLWDQTQSRGTLVSDGGPNLYNIRNLHYPEVCLKWELMDENYRGRLCNPLNPVSHKEIESVNNAVMPAHGPAKSMEYDAVATTHSWIP KRNRSLNTSQRGILEDEQMYQKCCNLFEKFFPSSSYRRPIGISSMVEAMVSRARIDARIFESGRRIKEEFSEIMKCSIEELRRQK

나. 유전자 서열분석을 통한 병원성 기여인자 분석

마우스는 다양한 타입의 인플루엔자 바이러스의 병원성 및 숙주범위의 제한이 되는 기전을 연구하는 데에 있어서 좋은 실험동물 모델로 생각된다. 일반적으로 마우스는 자연적으로는 사람 유래 또는 다른 종의 인플루엔자 바이러스에 감염되지 않으나, mouse lung homogenate를 가지고 반복적인 lung-to-lung passage를 통하여 mouse adaptation이 가능하며 이런 반복적인 과정을 통해서 virulence를 가지는 인플루엔자 바이러스를 확보할 수 있다. 따라서 mouse-adapted Influenza virus는 감염시킨 실험동물의 bronchi 와 lung에서 병원성을 야기시키며 이는 사람 인플루엔자 바이러스에 의해 야기되는 병원성과 매우 유사한 증상을 보인다.

현재까지 보고된 바로는 인플루엔자 바이러스의 virulence와 host range에 영향을 미치는 몇몇 요인들이 밝혀져 있으며, 이중에서 인플루엔자 바이러스 Hemagglutinin(HA)이 마우스의 lung virulence를 부여하는 데에 주요한 결정인자로 알려져 있다. 또한, 인플루엔자 바이러스의 7개 다른 유전자들도 lung virulence를 가지는 데에 어느 정도 기여하는 있는 것으로 밝혀지고 있다.

Mouse adaptation 동안에 H3N2 virus에 의해 만들어진 높은 virulence를 문자수준에서 이해하기 위해서 DBA/1J에서 유래한 다양한 passage의 시료 및 병원성을 보이는 clone들을 대상으로 3개의 주요 유전자(PB2, HA 및 NA)에 대해 모두 서열분석을 수행하였다.

또한, Wild Type(WT)의 Influenza A virus H3N2(A/Victoria/361/2011)의 경우는 질병관리본부에서 이미 서열분석이 완료되었으며, 이 유전자 서열정보를 입수하여 각 유전자에 해당하는 단백질의 아미노산에 대해 동시 비교분석을 수행하였다. 또한, 최종 분리된 바이러스 clone 4종에 대해서도 8개 유전자에 대한 서열 분석을 완료하였다.

특히, 본 연구에서는 인플루엔자 바이러스의 virulence와 host range에 주된 영향을 미치는 Hemagglutinin(HA)에서는 7개 위치에서 아미노산의 치환이 일어났음이 확인되었으며, 이중에서도 N149D, A154S, T183I, N262H가 마우스 병원성을 보이는데 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다.

또한, Neuramidase(NA)에서는 5개 위치에서 아미노산 치환이 일어남을 확인하였다. 이중에서도 T439R로의 아미노산 변화가 중요한 역할을 할 것으로 추정되었다.

그러나, PB2 유전자의 경우에는 passage 결과 특별한 mutation이 일어나지 않음을 확인하였으며 현재 포유류의 병원성에 관여하고 있는 것으로 알려진 염기서열 627번째는 동일하게 lysine(K)으로 확인되었다.

Table 1. Amino acid substitutions identified in mouse-adapted H3N2 Influenza virus

Passage	HA							NA				
	Amino acid site							Amino acid site				
	149	154	183	208	209	228	262	51	369	399	439	463
A/Victoria/361/2011	N*	A*	T*	I	F	A	N*	M	T	D	T*	D
DBA/1J_P0	N	A	T	I	F	A	N	M	T	D	R	D
DBA/1J_P1	N	?	T	I	F	A	N					
DBA/1J_P3	N	S	I	I	F	A	N					
DBA/1J_P4	N	S	I	I	F	A	N	M	T	D	R	N
DBA/1J_P5	?	S	I	I	F	A	N	M	T	?	R	N
DBA/1J_P5-1	D	S	I	I	F	A	H	M	T	D	R	D
DBA/1J_P9	D	S	I	I	S	A	H	M	T	D	R	D
DBA/1J_P12	D	S	I	I	S	A	H					
DBA/1J_P14	D	S	I	I	S	A	H	M	T	D	R	D
DBA/1J_P14_C3	D	S	I	I	S	A	H	M	T	D	R	D
DBA/1J_P14_C4	D	S	I	I	S	A	H	M	T	D	R	D
DBA/1J_P15	D	S	I	I	S	A	H	M	T	D	R	D
DBA/1J_P16	D	S	I	I	?	A	H	M	T	D	R	D
DBA/1J_P17	D	S	I	I	?	A	H	M	T	D	R	D
DBA/1J_P18	D	S	I	I	?	A	H	M	T	D	R	D
DBA/1J_P19	D	S	I	I	S	A	H	M	T	D	R	D
DBA/1J_P19_C1	D	S	I	T	F	V	H	M	T	D	R	D
DBA/1J_P19_C2	D	S	I	T	F	V	H	I	A	G	R	D
DBA/1J_P20	D	S	I	I	?	A	H	M	T	D	R	D

최종적으로 4개 바이러스 clone에 대해 8개 gene segment의 전 서열분석을 완료하였고 상기에 언급한 3개 유전자 외의 다른 gene에서도 마우스 병원성에 기여하는 부분을 확인할 수 있었다.

Table 2. Amino acid substitutions identified in mouse-adapted H3N2 Influenza virus for PB1, PA and NS gene

H3N2 virus	PB1			PA		NS
	286	361	379	45	98	121
A/Victoria/361/2011	V	R	K	C	T	Q
DBA/1J_P14_C3	V	K	K	C	T	R
DBA/1J_P14_C4	V	R	K	C	T	R
DBA/1J_P19_C1	V	-	E	G	T	R
DBA/1J_P19_C2	A	R	K	C	I	R

Table 3. Amino acid substitutions identified in mouse-adapted H3N2 Influenza virus for NP and MP gene

H3N2 virus	NP								MP
	36	91	100	101	265	287	290	384	15
A/Victoria/361/2011	I	K	V	G	I	S	D	G	V
DBA/1J_P14_C3	I	K	V	D	M	N	G	R	V
DBA/1J_P14_C4	I	K	V	D	I	N	D	R	I
DBA/1J_P19_C1	F	R	V	D	I	S	D	R	V
DBA/1J_P19_C2	I	K	D	G	I	N	D	R	V

DBA/1J_P14_C3의 경우에는 8개 viral protein에서 총 13개의 아미노산 치환가 일어남을 확인하였으며, 이중에 HA(5개), NA(1개), PB1(1개), NS(1개) 그리고 NP(5개)의 viral protein에서 변이가 관찰되었다.

DBA/1J_P14_C4의 경우에는 8개 viral protein에서 총 11개의 아미노산 치환가 일어남을 확인하였으며, 이중에 HA(5개), NA(1개), NS(1개), NP(3개) 그리고 MP(1개)의 viral protein에서 변이가 관찰되었다.

DBA/1J_P19_C1의 경우에는 8개 viral protein에서 총 14개의 아미노산 치환가 일어남을 확인하였으며, 이중에 HA(6개), NA(1개), PB1(1개), PA(1개), NS(1개) 그리고 NP(4개)의 viral protein에서 변이가 관찰되었다.

DBA/1J_P19_C2의 경우에는 8개 viral protein에서 총 16개의 아미노산 치환가 일어남을 확인하였으며, 이중에 HA(6개), NA(4개), PB1(1개), PA(1개), NS(1개) 그리고 NP(3개)의 viral protein에서 변이가 관찰되었다.

특히, 본 연구에서는 인플루엔자 바이러스의 virulence와 host range에 주된 영향을 미치는 Hemagglutinin (HA)에서 많은 아미노산의 치환이 일어났음이 확인되었으며, 특히적으로 NP 유전자에서 HA 다음으로 많은 부위에서 아미노산 치환이 일어남을 확인하였다.

따라서, 4개의 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스 주에 대해 HA, NA를 제외한 6개의 다른 유전자 부위의 경우에는 공통적으로 아미노산 치환이 일어난 NP 유전자의 G101D, S287N, G384R 와 NS 유전자의 Q121R 부분에서 polar에서 non-polar, non-polar에서 polar로의 급격한 아미노산 변화, 전체 마우스 병원성주에서의 공통적으로 아미노산 변화 등이 관찰되므로 이 부분도 마우스 병원성을 가지는데 어느 정도의 중요한 역할을 할 것으로 생각되어진다.

3. 병원성 분석

가. 마우스 병원성 바이러스주에 대한 MLD₅₀ 측정 (STEP 3.1)

Wild-type과 DBA/1J-adapted H3N2 Influenza viruses에 대한 MLD₅₀을 측정한 결과(Table 1 & Table 2), wild type(G1)의 MLD₅₀은 7.0×10^6 pfu/mL 이상으로 나타났다. DBA/1J-adapted H3N2 Influenza virus의 경우, DBA/1J_P14_C3는 2.3×10^5 pfu/mL, DBA/1J_P14_C4는 5.5×10^6 pfu/mL, DBA/1J_P19_C1의 경우에는 2.3×10^6 pfu/mL, DBA/1J_P19_C2는 6.5×10^5 pfu/mL로 나타났다. 따라서 DBA/1J-adapted H3N2 Influenza virus가 wild type에 비해서 약 1.3~30배 이상의 높은 virulence를 보여주는 것으로 나타났다. 그러나 선행 연구에서 wild type의 경우 $1\sim3 \times 10^8$ pfu/mL을 DBA/1J 마우스에 비강 투여하는 경우에도 안락사 및 폐사례가 없는 것으로 미루어 실제적으로는 평균 37~850배 이상의 높은 virulence를 보여줄 것으로 판단된다.

Table 1. Experimental result for the determination of MLD₅₀ with wild-type and DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza viruses in mice

Group	Titer (pfu/mL)	Number of Death														Mortality (%)		
		No. Dead/ No. Infected	Days after Infection															
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
G1	7.0 x 10 ⁶	0/5(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1.4 x 10 ⁶	0/5(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2.8 x 10 ⁵	0/5(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5.6 x 10 ⁴	0/5(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1.1 x 10 ⁴	0/5(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2	2.6 x 10 ⁶	5/5(5/5)	0	0	0	0	0	0(1)	0(4)	0	0	0	4	1	0	0	0	100(100)
	5.3 x 10 ⁵	0/5(5/5)	0	0	0	0	0	0(3)	0(1)	0	0	0	0(1)	0	0	0	0	0(100)
	1.1 x 10 ⁵	0/5(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.1 x 10 ⁴	0/5(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4.2 x 10 ³	0/5(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G3	1.2 x 10 ⁷	0/5(4/5)	0	0	0	0	0	0(2)	0(2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0(80)
	2.5 x 10 ⁶	0/5(1/5)	0	0	0	0	0	0(1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0(20)
	4.9 x 10 ⁵	0/5(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9.8 x 10 ⁴	0/5(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.0 x 10 ⁴	0/5(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G4	2.1 x 10 ⁷	0/5(5/5)	0	0	0	0	0	0(1)	0(3)	0(1)	0	0	0	0	0	0	0	0(100)
	4.2 x 10 ⁶	0/5(4/5)	0	0	0	0	0	0	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0	0	0	0	0	0(80)
	8.4 x 10 ⁵	0/5(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.7 x 10 ⁵	0/5(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3.4 x 10 ⁴	0/5(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G5	3.0 x 10 ⁷	3/5(5/5)	0	0	0	0	0	0(1)	0(2)	0(1)	0(1)	0	1	0	2	0	1	1 100(100)
	5.9 x 10 ⁶	0/5(5/5)	0	0	0	0	0	0(1)	0(4)	0	0	0	0	0	0	0	1	0 20(100)
	1.2 x 10 ⁶	0/5(4/5)	0	0	0	0	0	0(1)	0	0(3)	0	0	0	0	0	0	0	0(80)
	2.4 x 10 ⁵	0/5(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4.7 x 10 ⁴	0/5(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(): Number of Euthanasia

* Euthanasia criteria: Weight loss of 25% of mice's pre-experimental body weight

G1: Wild Type, G2: DBA/1J_P14_C3, G3: DBA/1J_P14_C4, G4: DBA/1J_P19_C1, G5: DBA/1J_P19_C2

Table 2. Arrangement of data used in computation of MLD₅₀ titre by the method of Reed-Muench

(1) Wild Type

Group	Titer (pfu/mL)	Log titer	No. of Dead	No. of survival	Cumulative			Mortality Ratio	% Mortality	% Survival
					Dead	Survival	Total			
G1	7.0 x 10 ⁶	5.8	0	5	0	5	5	0/5	0	100
	1.4 x 10 ⁶	5.1	0	5	0	10	10	0/10	0	100
	2.8 x 10 ⁵	4.4	0	5	0	15	15	0/15	0	100
	5.6 x 10 ⁴	3.7	0	5	0	20	20	0/20	0	100
	1.1 x 10 ⁴	3.0	0	5	0	25	25	0/25	0	100

LD₅₀ of H3N2 Influenza of Wild Type > 7.0 x 10⁶ pfu/mL

(2) DBA/1J_P14_C3

Group	Titer (pfu/mL)	Log titer	No. of Dead	No. of survival	Cumulative			Mortality Ratio	% Mortality	% Survival
					Dead	Survival	Total			
G2	2.6 x 10 ⁶	6.4	5	0	10	0	10	10/10	100	0
	5.3 x 10 ⁵	5.7	5	0	5	0	5	5/5	100	0
	1.1 x 10 ⁵	5.0	0	5	0	5	5	0/5	0	100
	2.1 x 10 ⁴	4.3	0	5	0	10	10	0/10	0	100
	4.2 x 10 ³	3.6	0	5	0	15	15	0/15	0	100

$$\begin{aligned} \text{Proportionate distance} \\ \text{of the 50\% point} &= \frac{50\% - (\% \text{ mortality at next titer below } 50\%)}{(\% \text{ mortality at next titer above } 50\%) - (\% \text{ mortality at next titer below } 50\%)} \\ &= \frac{50\% - 0\%}{100\% - 0\%} = 0.5 \end{aligned}$$

Logarithm of LD₅₀ titer

Logarithm at next titer above 50% - Logarithm at next titer below 50% x PD

$$= (5.7202 - 5.0212) \times 0.5 = 0.3495$$

$$\text{LD}_{50} = \text{Antilog} (5.0212 + 0.3495) = \text{Antilog} (5.0 + 0.3707) = 2.3478 \times 10^5$$

LD₅₀ of H3N2 Influenza mutant virus derived from DBA/1J_P14_C3 = 2.3 x 10⁵ pfu/mL

(3) DBA/1J_P14_C4

Group	Titer (pfu/mL)	Log titer	No. of Dead	No. of survival	Cumulative			Mortality Ratio	% Mortality	% Survival
					Dead	Survival	Total			
G3	1.2 x 10 ⁷	7.1	4	1	5	1	6	5/6	83.3	16.7
	2.5 x 10 ⁶	6.4	1	4	1	5	6	1/6	16.7	83.3
	4.9 x 10 ⁵	5.7	0	5	0	10	10	0/10	0	100
	9.8 x 10 ⁴	5.0	0	5	0	15	15	0/15	0	100
	2.0 x 10 ⁴	4.3	0	5	0	20	20	0/20	0	100

$$\text{Proportionate distance of the 50\% point} = \frac{50\% - 16.7\%}{83.3\% - 16.7\%} = 0.5$$

Logarithm of LD₅₀ titer

$$= (7.0881 - 6.3892) \times 0.5 = 0.3495$$

$$\text{LD}_{50} = \text{Antilog } (6.3892 + 0.3495) = \text{Antilog } (6.0 + 0.7387) = 5.4784 \times 10^6$$

LD₅₀ of H3N2 Influenza mutant virus derived from DBA/1J_P14_C4 = 5.5 x 10⁶ pfu/mL

(4) DBA/1J_P19_C1

Group	Titer (pfu/mL)	Log titer	No. of Dead	No. of survival	Cumulative			Mortality Ratio	% Mortality	% Survival
					Dead	Survival	Total			
G4	2.1 x 10 ⁷	7.3	5	0	9	0	9	9/9	100	0
	4.2 x 10 ⁶	6.6	4	1	4	1	5	4/5	80	20
	8.4 x 10 ⁵	5.9	0	5	0	6	6	0/6	0	100
	1.7 x 10 ⁵	5.2	0	5	0	11	11	0/11	0	100
	3.4 x 10 ⁴	4.5	0	5	0	16	16	0/16	0	100

$$\text{Proportionate distance of the 50\% point} = \frac{50\% - 0\%}{80\% - 0\%} = 0.625$$

Logarithm of LD₅₀ titer

$$= (6.6 - 5.9) \times 0.625 = 0.4369$$

$$\text{LD}_{50} = \text{Antilog } (5.9243 + 0.4369) = \text{Antilog } (6.0 + 0.3612) = 2.2969 \times 10^6$$

LD₅₀ of H3N2 Influenza mutant virus derived from DBA/1J_P19_C1 = 2.3 x 10⁶ pfu/mL

(5) DBA/1J_P19_C2

Group	Titer (pfu/mL)	Log titer	No. of Dead	No. of survival	Cumulative			Mortality Ratio	% Mortality	% Survival
					Dead	Survival	Total			
G5	3.0×10^7	7.5	5	0	14	0	14	14/14	100	0
	5.9×10^6	6.8	5	0	9	0	9	9/9	100	0
	1.2×10^6	6.1	4	1	4	1	5	4/5	80	20
	2.4×10^5	5.4	0	5	0	6	6	0/6	0	0
	4.7×10^4	4.7	0	5	0	11	11	0/11	0	0

$$\text{Proportionate distance of the 50\% point} = \frac{50\% - 0\%}{80\% - 0\%} = 0.625$$

Logarithm of LD₅₀ titer

$$= (6.0719 - 5.3729) \times 0.625 = 0.4369$$

$$\text{LD}_{50} = \text{Antilog} (5.3729 + 0.4369) = \text{Antilog} (5.0 + 0.8098) = 6.4531 \times 10^5$$

LD₅₀ of H3N2 Influenza mutant virus derived from DBA/1J_P19_C2 = 6.5×10^5 pfu/mL

나. 마우스 병원성 바이러스주에 대한 MID₅₀ 측정 (STEP 3.2)

Wild-type과 DBA/1J-adapted H3N2 Influenza viruses에 대해 MID₅₀을 측정한 결과, wild type의 MID₅₀ 은 1.4×10^6 pfu/mL로 나타났으며 DBA/1J-adapted H3N2 Influenza virus의 경우, DBA/1J_P14_C3는 4.2×10^1 pfu/mL, DBA/1J_P14_C4는 2.0×10^4 pfu/mL 이하, DBA/1J_P19_C1의 경우에는 6.7×10^1 pfu/mL, DBA/1J_P19_C2는 9.4×10^1 pfu/mL로 나타났다. 따라서 DBA/1J-adapted H3N2 Influenza virus가 wild type에 비해서 약 70~33,000배 정도 낮은 농도에서도 lung에 감염성을 보여주는 것으로 확인되었다.

Table 1. Experimental result for the determination of MID₅₀ with wild-type and DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza viruses in mice.

Group	Dose for Infection (PFU/mL)	Number of Death			MID ₅₀	
		Total No. of Mouse	Animal ID			
			1	2		
G1 (Wild Type)	7.0 x 10 ⁶	2	+	+	1.4 x 10 ⁶	
	1.4 x 10 ⁶	2	+	-		
	2.8 x 10 ⁵	2	-	-		
	5.6 x 10 ⁴	2	-	-		
	1.1 x 10 ⁴	2	-	-		
G2 (DBA/1J_P14_C3)	2.6 x 10 ⁶	2	+	+	4.2 x 10 ¹	
	5.3 x 10 ⁵	2	+	+		
	1.1 x 10 ⁵	2	+	+		
	2.1 x 10 ⁴	2	+	+		
	4.2 x 10 ³	2	+	+		
	1.1 x 10 ³	2	+	+		
	2.1 x 10 ²	2	+	+		
	4.2 x 10 ¹	2	-	+		
	8.4 x 10 ⁰	2	-	-		
G3 (DBA/1J_P14_C4)	1.2 x 10 ⁷	2	+	+	< 2.0 x 10 ⁴	
	2.5 x 10 ⁶	2	+	+		
	4.9 x 10 ⁵	2	+	+		
	9.8 x 10 ⁴	2	+	+		
	2.0 x 10 ⁴	2	+	+		
	4.9 x 10 ³	2	-	-		
	9.8 x 10 ²	2	-	-		
	2.0 x 10 ²	2	-	-		
	3.9 x 10 ¹	2	-	-		
G4 (DBA/1J_P19_C1)	2.1 x 10 ⁷	2	+	+	6.7 x 10 ¹	
	4.2 x 10 ⁶	2	+	+		
	8.4 x 10 ⁵	2	+	+		
	1.7 x 10 ⁵	2	+	+		
	3.4 x 10 ⁴	2	+	+		
	8.4 x 10 ³	2	+	+		
	1.7 x 10 ³	2	+	+		
	3.4 x 10 ²	2	-	+		
	6.7 x 10 ¹	2	-	+		
G5 (DBA/1J_P19_C2)	3.0 x 10 ⁷	2	+	+	9.4 x 10 ¹	
	5.9 x 10 ⁶	2	+	+		
	1.2 x 10 ⁶	2	+	+		
	2.4 x 10 ⁵	2	+	+		
	4.7 x 10 ⁴	2	+	+		
	1.2 x 10 ⁴	2	+	+		
	2.4 x 10 ³	2	+	+		
	4.7 x 10 ²	2	-	+		
	9.4 x 10 ¹	2	+	-		

다. 임상증상(체중감량), 혈액학 및 혈액생화학 측정, 조직병리(H&E, IHC) (STEP 3.3)

DBA/1J mice에서 wild-type 및 DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza virus에 의한 병리학적 평가를 위하여 모든 실험동물을 감염시켰고, 감염시점으로부터 0일차(감염 전)에 3수, 3일차와 6일차에 각 군당 6마리씩 부검을 진행하였다. 부검 시 복대정맥에서 채혈하여 각 3수씩 혈액학 및 혈액생화학 검사를 실시하였다. 부검한 6마리 중에서 임의로 3마리에 대해서는 10% 중성 포르말린에 장기를 고정하였고, H&E 염색과 면역조직화학염색을 실시하였다. 적출한 장기는 폐, 기관지, 심장, 간, 신장, 비장, 뇌, GI tract 이다.

감염에 사용된 virus와 titer는 Wild Type의 경우에는 7.0×10^6 pfu/mL, DBA/1J_P14_C3는 2.6×10^6 pfu/mL, DBA/1J_P14_C4는 1.2×10^7 pfu/mL, DBA/1J_P19_C1은 2.1×10^7 pfu/mL 그리고 DBA/1J_P19_C2는 3.0×10^7 pfu/mL 이었다.

감염 2일차에 Wild Type을 제외한 모든 virus에서 입모 및 쇠약증상이 증상이 관찰되었고 (Table 3), 감염 6일차에 또한 Wild Type을 제외한 모든 virus에서 인도적 처리기준에 해당하는 25% 이상의 체중감량이 관찰되었다(Table 1, 2).

혈액학 측정 결과(Table 4), Wild Type은 neutrophil 수치가 정상개체 대비 미약한 증가로 그친 반면, 다른 virus는 3일차와 6일차에서 모두에서 neutrophil 증가가 확인되었고 일부 군에서는 정상개체와의 차이에서 통계학적 유의성도 확인되었다. 또한 혈액생화학 측정 결과 (Table 5), DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza virus에서 Glucose, Cholesterol, Triglyceride 수치의 변화가 관찰되었고, DBA/1J_P14_C3와 C4에서 AST와 ALT 수치의 유의적인 증가가 관찰되었다.

H&E 염색상의 조직학적 검경결과(Figure 1 & 3), DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza virus를 감염시킨 mouse의 폐조직에서 인플루엔자 바이러스 감염 시 lung 및 trachea tissue에서 관찰되는 소견인 염증세포의 증가, 호흡상피세포의 손상 및 괴사, airway 내 삼출물 등이 관찰되었다. 특히 기관지 및 세기관지 주변 또는 혈관주변에서 주되게 염증세포가 관찰되었고, 염증세포의 분포는 모든 폐엽에 고르게 나타나지 않았으며 병변의 정도에서 개체차이가 크게 나타났다. 반면 Wild Type H3N2 virus를 감염시킨 mouse의 폐조직은 기관지 주변에 부분적으로 약하게 병변이 관찰되거나 정상개체의 폐 상태와 유사하였다. Influenza A (H3N2)에 대한 면역조직화학염색에서 DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza virus에 감염된 폐조직에서만 DBA가 발색되었는데, 기관 내에서 관찰되었으며 일부 개체에서는 폐포에서도 확인되었다. Wild Type H3N2 virus를 감염시킨 mouse의 폐조직에서는 면역염색반응이 관찰되지 않았다.

Table 1. Mortality

Day	Virus Type	Number of Death								Mortality (%)		
		No. Dead / No. Infected			Days after Infection							
		Total Dead No.	Found Dead No.	Euthan asia No.	0	1	2	3	4	5	6	
Day 3	WT	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	-	-	-	0
	P14_C3	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	-	-	-	0
	P14_C4	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	-	-	-	0
	P19_C1	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	-	-	-	0
	P19_C2	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	-	-	-	0
Day 6	WT	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	0	0	0	0
	P14_C3	2/6	0/6	2/6	0	0	0	0	0	0	0(2)	0(33)
	P14_C4	1/6	0/6	1/6	0	0	0	0	0	0	0(1)	0(17)
	P19_C1	3/6	0/6	3/6	0	0	0	0	0	0	0(3)	0(50)
	P19_C2	2/6	0/6	2/6	0	0	0	0	0	0	0(2)	0(33)

(): Number of Euthanasia

* Euthanasia criteria: Weight loss of 25% of mice's pre-experimental body weight

Table 2. Body Wight

Virus	Day	0	1	2	3	4	5	6
WT	MEAN	16.79	16.04	15.98	16.23	16.62	16.83	16.76
	SD	0.97	1.08	1.14	1.02	0.93	0.88	0.76
	Number	6	6	6	6	6	6	6
	Gain(%)	0.00	-8.22	-8.52	-7.08	-4.89	-3.64	-4.00
P14_C3	MEAN	16.04	15.38	14.35	13.14	12.66	12.25	11.91
	SD	0.94	0.90	0.81	0.80	0.91	0.96	0.94
	Number	6	6	6	6	6	6	6
	Gain(%)	0.00	-13.18	-19.02	-25.80	-28.52	-30.83	-32.79
P14_C4	MEAN	16.34	16.31	15.65	14.60	13.62	13.34	12.80
	SD	1.08	1.20	1.05	1.01	0.83	0.82	0.75
	Number	6	6	6	6	6	6	6
	Gain(%)	0.00	-12.42	-18.45	-19.04	-25.53	-28.56	-31.00
P19_C1	MEAN	16.97	16.04	14.79	13.86	13.60	13.15	12.41
	SD	1.06	0.92	0.88	1.04	1.22	1.27	1.13
	Number	6	6	6	6	6	6	6
	Gain(%)	0.00	-9.41	-16.47	-16.47	-23.21	-25.72	-29.95
P19_C2	MEAN	16.75	15.99	14.96	14.01	13.26	12.71	12.18
	SD	0.87	1.16	1.18	1.14	1.01	0.89	0.77
	Number	6	6	6	6	6	6	6
	Gain(%)	0.00	-8.08	-14.00	-19.46	-23.79	-26.97	-30.02

Table 3. Clinical Sign

Virus	Day	0	1	2	3	4	5	6
WT	No Abnormalities Detected	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	Piloerection	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	Emaciation	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
P14_C3	No Abnormalities Detected	6/6	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	Piloerection	0/6	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	Emaciation	0/6	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
P14_C4	No Abnormalities Detected	6/6	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	Piloerection	0/6	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	Emaciation	0/6	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
P19_C1	No Abnormalities Detected	6/6	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	Piloerection	0/6	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	Emaciation	0/6	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
P19_C2	No Abnormalities Detected	6/6	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	Piloerection	0/6	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	Emaciation	0/6	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6

Table 4. Summarized hematologic data of DBA/1J mouse infected with wild- and mutant-Influenza virus 3- & 6-day

Group	Item Units	WBC $\times 10^3/\mu\text{L}$	N %	L %	M %	E %	B %	RBC $\times 10^6/\mu\text{L}$	Hb g/dL	Hct %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL (%)	PLT $\times 10^3/\mu\text{L}$
Normal	Mean	3.31	20.0	77.1	2.29	0.582	0.000	9.7	13.8	36.7	37.8	14.2	37.5	679
	SD	1.05	1.9	3.7	2.70	0.405	0.000	0.3	0.61	1.1	0.2	0.4	1.1	14
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D3 Wild Type	Mean	3.12	25.3	70.2	2.55	1.973	0.036	9.6	13.8	36.6	38.1	14.4	37.8	471
	SD	0.53	3.4	2.2	1.55	0.612	0.040	0.0	0.15	0.0	0.2	0.2	0.3	272
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D3 DBA/1J_P14_C3	Mean	0.90 ***	46.1 *	30.5 **	19.8 *	3.283	0.271	11.0	14.5	41.0	37.0	13.1	35.3	707
	SD	0.18	0.6	5.8	4.90	2.041	0.172	0.5	3.07	1.7	0.1	2.3	6.2	63
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D3 DBA/1J_P14_C4	Mean	0.98 ***	54.2 **	30.6 **	12.96	2.220	0.025	8.5	14.5	31.6	37.5	23.8	62.8	279 *
	SD	0.23	3.7	5.3	4.40	1.463	0.043	4.5	1.65	16.5	0.6	18.9	48.8	163
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D3 DBA/1J_P19_C1	Mean	1.32 **	33.3	49.1	16.33	0.952	0.375	8.5	14.4	31.5	37.3	20.2	53.9	438
	SD	0.67	19.5	25.6	7.65	0.512	0.277	4.3	2.52	15.4	1.1	10.2	25.6	345
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D3 DBA/1J_P19_C2	Mean	1.38 **	44.5 *	36.5 **	17.05 **	1.294	0.274	11.4	15.8	41.6	36.5	13.9	38.1	830
	SD	0.52	6.2	15.4	9.86	0.597	0.296	0.4	0.68	1.4	0.4	0.6	2.0	26
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
D6 Wild Type	Mean	3.74	26.0	68.7	1.87	3.393	0.016	9.6	13.7	36.0	37.6	14.3	38.1	549
	SD	1.29	7.5	12.4	2.14	2.814	0.028	0.3	0.46	1.0	0.3	0.2	0.3	222
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D6 DBA/1J_P14_C3	Mean	1.74 *	30.1	41.3 *	26.5 ***	1.343	0.759	11.2	16.0	41.1	36.7	14.3	38.8	694
	SD	0.04	10.3	9.8	3.31	0.346	1.144	0.3	0.55	1.3	0.9	0.2	0.7	129
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D6 DBA/1J_P14_C4	Mean	2.81	30.2	56.3	12.41	0.982	0.099	11.3	15.9	40.5	36.0 **	14.2	39.4	631
	SD	0.49	14.7	12.9	4.69	0.360	0.063	0.2	0.35	0.4	0.4	0.1	0.5	117
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D6 DBA/1J_P19_C1	Mean	2.20	50.9 **	32.5 **	15.86	0.655	0.087	11.6	16.3	41.6	35.7 **	14.0	39.2	688
	SD	0.60	4.5	16.4	12.60	0.177	0.095	0.7	0.87	2.1	0.3	0.1	0.1	40
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D6 DBA/1J_P19_C2	Mean	2.25	53.6 **	38.6 *	7.41	0.305	0.066	12.0	16.9	42.3	35.3 ***	14.1	40.0	741
	SD	0.32	15.9	19.1	3.02	0.199	0.114	0.6	0.82	1.2	1.1	0.3	0.8	48
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Comparisons to control using ANOVA and Dunnett's multiple comparison test
Significant when compared with Normal: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Table 5. Summarized serum chemistry data of DBA/1J mouse infected with wild- and mutant-Influenza virus 3- & 6-day

Group	Item Units	TP g/dL	ALB g/dL	GLU mg/dL	AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	T-BIL mg/dL	BUN mg/dL	CREA mg/dL	CHO mg/dL	TG mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	C1 mEq/L
Normal	Mean	3.6	1.3	196	51	26	140	0.05	21.6	0.28	56	76	151	5.0	116
	SD	0.2	0.1	31	2	2	5	0.01	1.8	0.03	5	14	3	0.8	2
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D3 Wild Type	Mean	4.1	1.4	202	110	31	155	0.11	23.2	0.37	55	51	153	4.6	114
	SD	0.2	0.1	6	34	9	6	0.10	3.8	0.04	2	38	2	0.4	4
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D3 DBA/1J_P14_C3	Mean	4.8 ***	1.6	123 *	422 **	99 *	127	-0.01	23.5	0.38 *	84 *	40 *	154	6.6	115
	SD	0.1	0.1	4	287	61	15	0.03	2.6	0.06	6	9	2	1.6	3
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D3 DBA/1J_P14_C4	Mean	4.5 ***	1.4	129	302 *	60	121	-0.03	22.5	0.30	82 *	53	154	5.8	116
	SD	0.2	0.1	19	117	7	18	0.01	1.8	0.03	10	5	2	1.0	1
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D3 DBA/1J_P19_C1	Mean	4.4 **	1.5	100 **	79	38	122	0.01	19.6	0.31	84 *	43 *	153	5.2	117
	SD	0.2	0.1	24	16	6	13	0.04	3.2	0.03	20	15	1	0.2	2
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D3 DBA/1J_P19_C2	Mean	4.3 **	1.4	146	77	41	107	0.02	20.3	0.29	80 *	37 *	153	5.8	118
	SD	0.2	0.1	17	18	9	11	0.01	2.7	0.01	11	6	1	0.3	2
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D6 Wild Type	Mean	3.8	1.3	185	53	24	133	0.06	21.2	0.28	58	49	152	5.2	118
	SD	0.2	0.1	14	4	6	45	0.03	3.0	0.02	5	5	1	0.3	1
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D6 DBA/1J_P14_C3	Mean	4.2 *	1.4	186	135	68	146	0.01	19.3	0.40 *	69	23 ***	154	6.9	114
	SD	0.2	0.1	2	25	4	27	0.04	2.3	0.05	8	3	0	2.4	1
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D6 DBA/1J_P14_C4	Mean	4.5 ***	1.6 *	129	153	122 **	163	0.16	16.9	0.31	62	26 **	162	5.6	109
	SD	0.4	0.3	43	134	77	16	0.21	3.3	0.02	3	6	15	0.4	8
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D6 DBA/1J_P19_C1	Mean	4.5 ***	1.5	108 **	88	48	156	0.02	20.0	0.32	69	37 *	154	5.1	114
	SD	0.3	0.2	63	7	5	31	0.01	2.7	0.03	11	2	1	0.0	2
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D6 DBA/1J_P19_C2	Mean	4.3 **	1.4	143	95	60	111	0.03	19.1	0.35	76	21 ***	154	5.1	112
	SD	0.2	0.1	25	7	8	11	0.02	2.5	0.09	10	3	3	0.4	3
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Comparisons to control using ANOVA and Dunnett's multiple comparison test

Significant when compared with Normal: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Figure 1. Histopathologic findings on H&E staining with lung tissues of DBA/1J mice infected with H3N2 Influenza virus on 3rd day

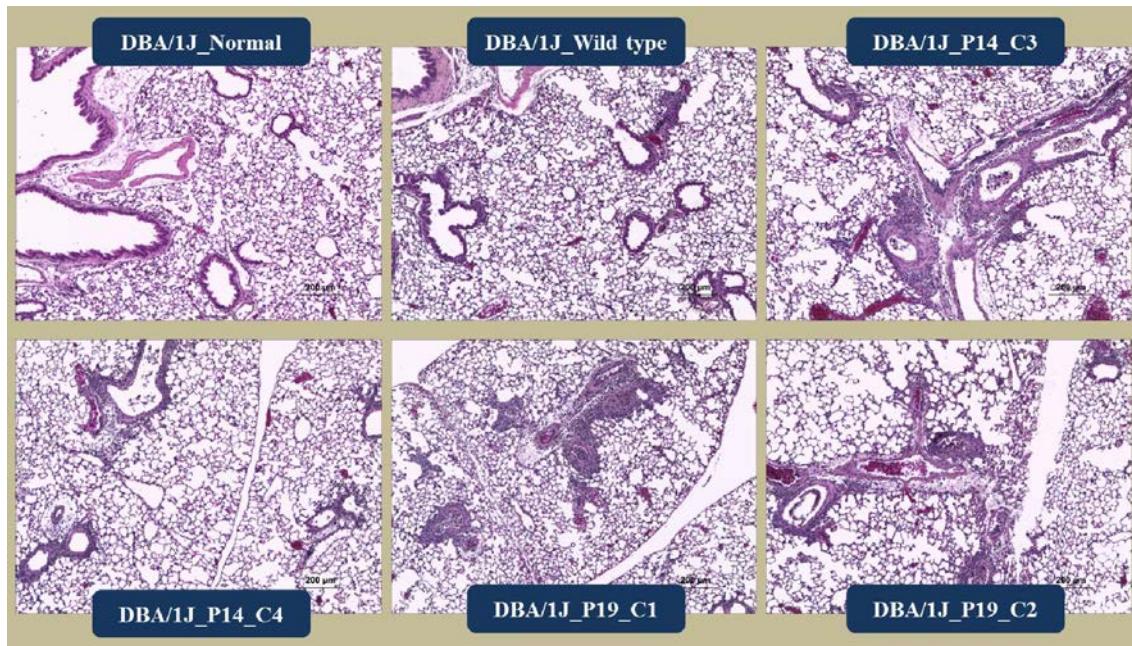


Figure 2. Histopathologic findings on immunohistochemistry staining with lung tissues of DBA/1J mice infected with H3N2 Influenza virus on 3rd day

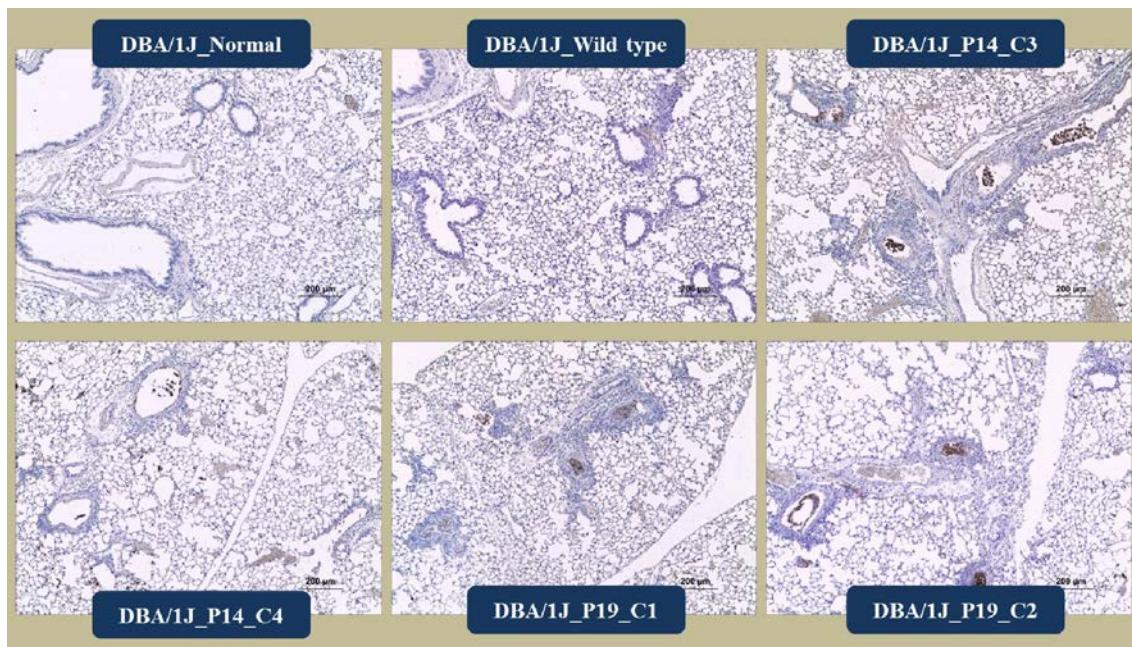


Figure 3. Histopathologic findings on H&E staining with lung tissues of DBA/1J mice infected with H3N2 Influenza virus on 6th day

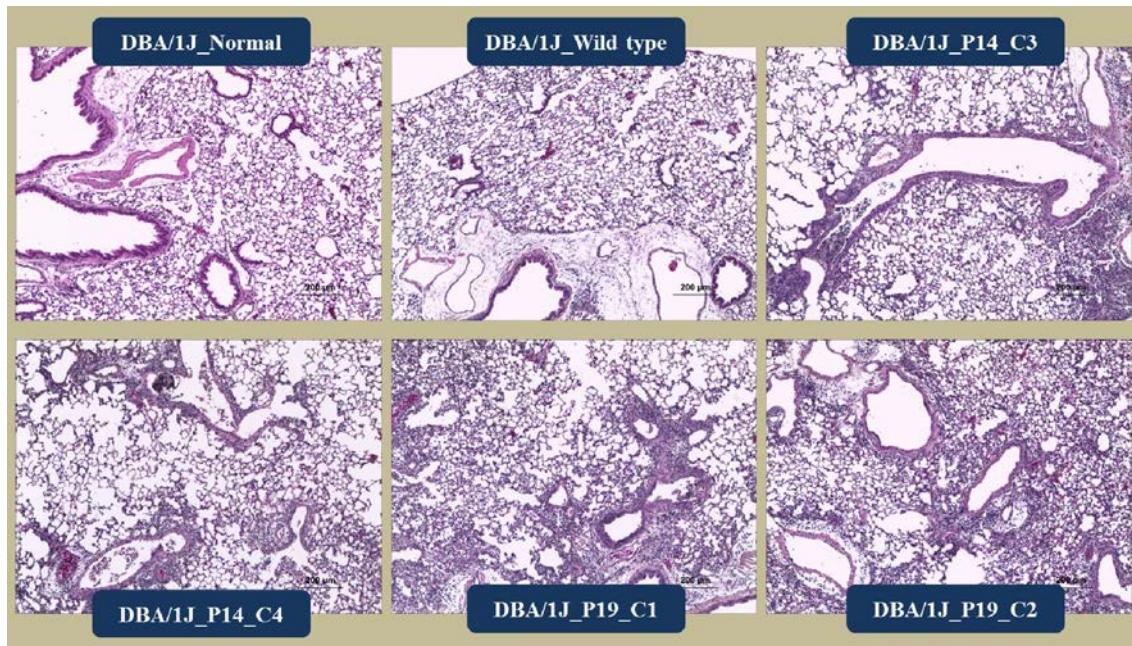
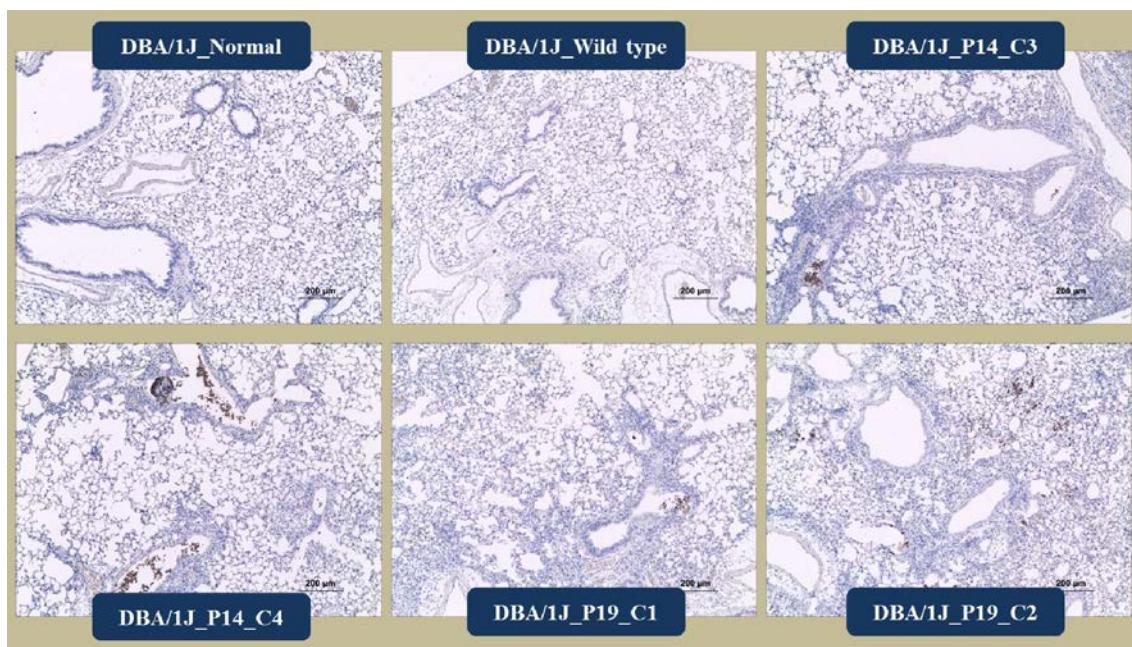


Figure 4. Histopathologic findings on immunohistochemistry staining with lung tissues of DBA/1J mice infected with H3N2 Influenza virus on 6th day



라. 마우스 병원성 분석 (STEP 3.4)

Mouse를 Avertin 으로 마취시킨 후에 wild type(live vaccine) 인플루엔자 바이러스를 죄고농도 3.5×10^7 pfu/mL로 설정하고 각각 5배 계열 희석하여 50ul 씩 단회 비강 투여하였다. Live vaccine 투여일로부터 4주 경과한 시점에서 mouse-adapted mutant 인플루엔자 바이러스(DBA/1J_P14_C3, 6.0×10^8 pfu/mL)의 고 농도를 가지고 공격하였으며 10일 동안에 각 군에서의 안락사 또는 사망율을 측정하였고 이를 통해 ED₅₀를 측정하였다.

Table 1 및 2 에서 보는 봐와 같이 저 농도의 live vaccine을 투여한 그룹(1.1×10^4 pfu/mL 및 5.6×10^4 pfu/mL)에서는 100%의 치사율을 보여주었으며 live vaccine 투여 농도가 증가하면서 용량 의존적으로 사망률도 감소하는 현상을 보여주었다.

50% 방어효과를 보이는 ED₅₀의 측정치는 4.1×10^5 pfu/mL로 나타났으며 향후 mouse를 이용한 H3N2 백신 및 치료제 효능평가 모델로 활용이 가능하다는 사실을 확인하였다.

Table 1. Experimental result for the determination of ED₅₀ with wild-type H3N2 Influenza viruses in mice

Dose for Live Vaccine ¹⁾ (pfu/mL)	Dose for Challenge ²⁾ (pfu/mL)	Number of Death										Mortality (%)	
		No. Dead/ No. Infected	Days after Infection										
6.0 x 10 ⁸	3.5 x 10 ⁷		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	0/2(0/2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0/6(1/6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0(1)	0	
	0/6(3/6)	0	0	0	0	0	0	0(3)	0	0	0	0(50)	
	0/6(3/6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0(2)	0(1)	0	
	0/5(5/5)	0	0	0	0	0	0	0(2)	0(2)	0(1)	0	0(100)	
	0/5(5/5)	0	0	0	0	0	0(4)	0(1)	0	0	0	0(100)	

(): Number of Euthanasia

* Euthanasia criteria: Weight loss of 25% of mice's pre-experimental body weight

1) Live vaccine: Wild type of Influenza A virus H3N2 (A/Victoria/361/2011)

2) Challenging strain: DBA/1J_P14_C3 strain showing a high pathogenicity in mice

Table 2. Arrangement of data used in computation of ED₅₀ titre by the method of Reed-Muench

Titer (pfu/mL)	Log titer	No. of Dead	No. of survival	Cumulative			Survival Ratio	% Mortality	% Survival
				Dead	Survival	Total			
3.5 x 10 ⁷	6.5	0	2	0	13	13	13/13	0	100
7.0 x 10 ⁶	5.8	1	5	1	11	12	11/12	8.3	91.7
1.4 x 10 ⁶	5.1	3	3	4	6	10	6/10	40	60
2.8 x 10 ⁵	4.4	3	3	7	3	10	3/10	70	30
5.6 x 10 ⁴	3.7	5	0	12	0	12	0/12	100	0
1.1 x 10 ⁴	3.0	5	0	17	0	17	0/17	100	0

$$\begin{aligned} \text{Proportionate distance} \\ \text{of the 50\% point} &= \frac{50\% - (\% \text{ survival at next titer below } 50\%)}{(\% \text{ survival at next titer above } 50\%) - (\% \text{ survival at next titer below } 50\%)} \\ &= \frac{50\% - 30\%}{60\% - 30\%} = 0.666667 \end{aligned}$$

Logarithm of ED₅₀ titer

Logarithm at next titer above 50% - Logarithm at next titer below 50% x PD

$$= (5.143015 - 4.444045) \times 0.666667 = 0.46598$$

$$\text{ED}_{50} = \text{Antilog} (5.143015 + 0.46598) = \text{Antilog} (5 + 0.608995) = 4.0643895 \times 10^5$$

$$\text{ED}_{50} \text{ of H3N2 Influenza of Wild Type} = 4.1 \times 10^5 \text{ pfu/mL}$$

4. 최종 결론

가. “마우스 병원성 인플루엔자 바이러스” 4주 기탁 완료

본 학술연구개발용역과제의 개발 성과로 제조한 “마우스 병원성 인플루엔자 바이러스” 4주에 대해서 각각 50vial(1×10^6 pfu/mL 이상, 500ul)씩 제조하여 과제 종료시점 이전에 질병 관리본부에 제공하였음.

나. 각 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스의 4주에 대한 역가분석 결과

DBA/1J Adapted Mutant H3N2 Influenza Virus	Concentration of Stock Solution (PFU/mL)		
	1차 분석결과	2차 분석결과	평균
DBA/1J_P14_C3	1.5×10^8	2.2×10^8	1.8×10^8
DBA/1J_P14_C4	2.6×10^8	4.5×10^8	3.5×10^8
DBA/1J_P19_C1	2.0×10^7	8.3×10^6	1.4×10^7
DBA/1J_P19_C2	1.2×10^7	7.0×10^7	4.1×10^7

제4장 최종 연구 결과

2차년도 연구 보고서

2013~2014 절기 인플루엔자 백신주 중 A(H3N2)형 바이러스에 대
한 마우스 병원성주 개발

제2절 2013~2014 절기 인플루엔자 백신주 중 A(H3N2)형 바이러스 에 대한 마우스 병원성주 개발 (2차년도)

1. 인플루엔자 바이러스 백신 및 치료제 개발을 위한 마우스 병원성 인플루 엔자 바이러스주 개발

가. Wild Type의 Influenza A virus H3N2 (A/Switzerland/9715293/2013) 대량생산

(1) 실험 목적

질병관리본부에서 분양받은 Wild Type(WT)의 Influenza A virus H3N2 [A/Switzerland/9715293/2013(H3N2)-like virus]를 lung-cell-lung passage를 통해 마우스 병원성주의 Influenza virus를 개발하기 위해서는 초기 감염 시에 높은 농도의 Influenza virus가 필요하며, 이를 위해서 세포배양 방법을 이용하여 바이러스를 대량 생산하고 농축하여 감염 접종원으로 사용하였다.

(2) 실험 방법

① Serum Free Media(SFM) 제조

MDCK 세포주 배양에 적합한 액상제품인 OptiPRO™ Serum-Free Medium(Gibco)를 구입하여 사용하였으며, 1.0L의 SFM(Animal-protein Free, without L-Glutamine, Sterile-Filtered)에 200mM의 L-Glutamine(100x) 10mL을 첨가하여 사용하였다.

② Influenza virus의 농도를 최소 1×10^7 pfu/mL 이상으로 높이기 위해서 질병관리본부에서 분양받은 바이러스주[A/Switzerland/9715293/2013(H3N2)-like virus, 1×10^6 pfu/mL (0.5mL/vial)]를 이용하여 대량생산을 수행하였다.

③ 인플루엔자 바이러스 배양

- Influenza virus 배양을 위해 사용한 seed 바이러스는 질병관리본부에서 분양받은 Influenza A virus[A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)-like virus]를 Serum Free Media(SFM) 55mL에 1vial을 희석하여 사전에 80~90% confluent MDCK 세포가 되도록 배양한 11개의

T-175 flask(약 $3\sim6 \times 10^7$ cells/T-flask, NUNC사)에 각각 5mL을 첨가한 다음 1시간 10분 동안 세포 내에 바이러스를 감염시켰다.

- MDCK 세포에 바이러스를 감염시킨 다음, T-175 flask 당 25mL의 SFM를 첨가하고 CO₂ incubator에서 3일간 세포배양을 통해 바이러스를 대량으로 증식시켰다.
- 세포배양이 완료되면 배양액을 무균적으로 회수하여 원심분리 후에 XFUF07601(AMICOM Bioseparation)으로 초기 배양 부피의 10배 이상 농축하였으며 적절히 소분하여 -70°C 초전 온 냉동고에 보관하고 virus plaque assay 및 초기 접종원으로 사용하였다.

(3) 실험 결과

- ① 최종적으로 바이러스 배양액 약 330mL을 XFUF07601(AMICOM Bioseparation)를 이용하여 최종부피가 10mL이 되도록 농축하였으며, 10mL conical tube에 소분하여 -70°C에 보관하였다.
- ② 필요시 Wild Type Influenza virus는 상기의 대량세포 배양방법 protocol을 따라서 생산하고 배양 농축액에 대해 역가 검증 후에 모든 실험에 사용하였다.

나. Virus Plaque Assay 최적 조건 확립

(1) 실험 목적

Wild Type(WT) 또는 마우스에 반복적인 lung-cell-lung passage 또는 lung-to-lung passage를 통해 만들어지는 Mutant Type(MT) Influenza virus의 역가분석을 위해서 virus plaque assay를 가장 널리 사용한다. 따라서 모든 실험과정에서 정확한 역가분석 데이터를 얻기 위해서는 1차년도에 기 확립한 최적의 조건을 적절히 변형하여 사용하였으며 이를 통해서 데이터의 재현성 및 신뢰도를 높이고자 하였다.

(2) 실험 방법

1차년도에 virus plaque assay의 최적화를 위해 다양한 조건하에서 분석을 수행하였으며, virus plaque assay에 영향을 주는 변수로 생산 batch의 차이, plaque assay media 제조 조건, TPCK의 농도 및 바이러스 희석물질 등을 선정하였고 이에 대한 분석에의 영향 여부를 조사하고 최적의 SOP를 확립하였다.

Table 1. Composition of plaque assay media

Reagent		Stock Solution	Media Prep.	Media Prep.
A	2x L-15 Media	Ready to use	20mL	40mL
	HEPES	1M	800uL	1.6mL
	Gentamycin	50mg/mL	20uL	40uL
	Sodium Bicarbonate	7.5%	400uL	800uL
	L-Glutamine	200mM	200uL	400uL
	TPCK Trypsin	1mg/mL	40uL	80uL
			(21.5mL)	(43mL)
B	Seaplaque agarose	1.6%	(21.5mL)	(43mL)
A : B = 1 : 1			(43mL) / 3 Plate	(86mL) / 6 Plate

* TPCK Trypsin의 final concentration: 1.0ug/mL로 고정하여 사용

* Virus 희석 물질 및 조건: PBS 사용, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , negative control (duplicate), 200ul

Table 2. Composition of staining buffer

Reagent	Prep. for Buffer
D.W.	300mL
1% Crystal violet (0.4g + 40mL DW)	40mL
Methanol (MeOH)	80mL
	(420mL)

(3) 실험 결과

① Virus 희석 물질

- 생산된 H3N2 virus를 가지고 plaque assay를 위해 virus를 희석하는 물질로는 PBS를 사용하였다. 반복적인 시험결과를 통해 재현성, 편의성 측면에서 virus를 1X PBS로 희석하는 경우에 보다 최적의 plaque 형성을 확인하였다.

② TPCK Trypsin 처리조건(Stock Solution: 1mg/mL)

- Plaque assay media에 4개의 조건(0.5, 1.0, 2.0, 4.0 ug/mL)으로 TPCK Trypsin을 처리한 결과 $1.0 > 0.5 > 2.0$ ug/mL 순으로 좋은 결과를 얻어내었으며, 최적의 TPCK Trypsin 농도는 1.0ug/mL으로 모든 시험에 사용하였다.

③ Plaque Assay Media 제조

- 모든 plaque assay media 제조는 cell에 virus를 감염시킨 후에 곧바로 제조하여 사용하였다.

다. Mouse 감염을 위한 Influenza A Virus(H3N2) 농축 및 역가 분석

(1) 실험 목적

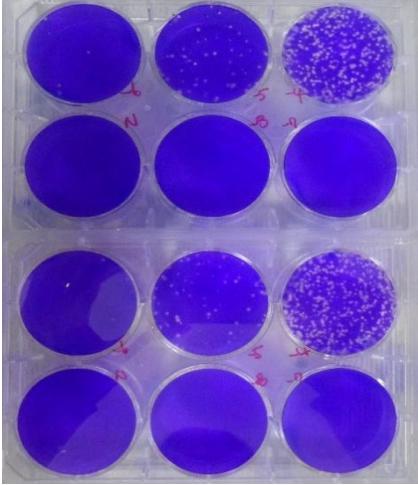
Wild Type(WT) 인플루엔자 바이러스 배양액은 농축과정을 거쳐 최소 10배 이상의 높은 바이러스 농도를 확보함으로써 이를 사용하여 마우스에 반복적인 lung-cell-lung passage를 통해 빠른 시간 내에 Mutant Type의 Influenza A virus를 얻고자 하는 목적으로 XFUF07601(MW100,000 Membrane Filter 사용, AMICOM Bioseparation)를 이용하여 제조하였으며, 바이러스 배양 농축액은 기 확립한 virus plaque assay를 통해 진행하였다.

(2) 실험 결과

바이러스 배양 농축액의 농도: $2.79 \times 10^7 \text{ pfu/mL}$ (Figure 1. 참조)

Figure 1. Result of virus plaque assay for the concentrated culture media including WT-H3N2 virus

		P0 (pfu/mL)		3.33×10^7	2.79×10^7
10^{-5}	1차	2차			
	69	64			
10^{-6}	3.45×10^7	3.2×10^7			
	1차	2차			
	4	5			

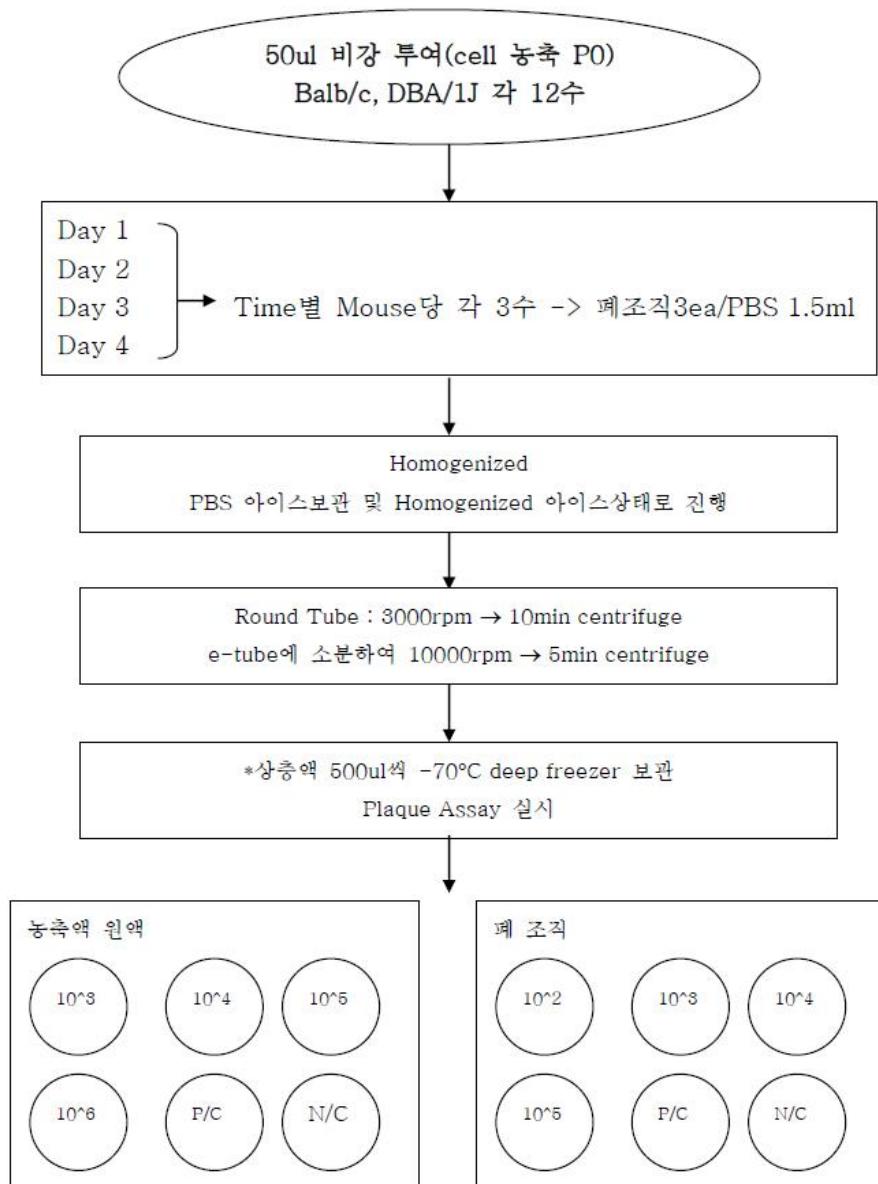


라. Influenza Virus의 Mouse Infection 후의 Lung Cell Lysate 내의 Virus 존재유무 및 역가 측정시험

(1) 실험 목적

Wild Type Influenza virus 배양농축액을 DBA/1J 및 Balb/c 마우스에 비강 감염 시킨 후에 1 일 간격으로 4일간 lung cell lysate를 얻어 Influenza virus의 존재 유무를 확인하여 lung infection 여부 및 최적의 passage 간격을 확인하고자 하였다.

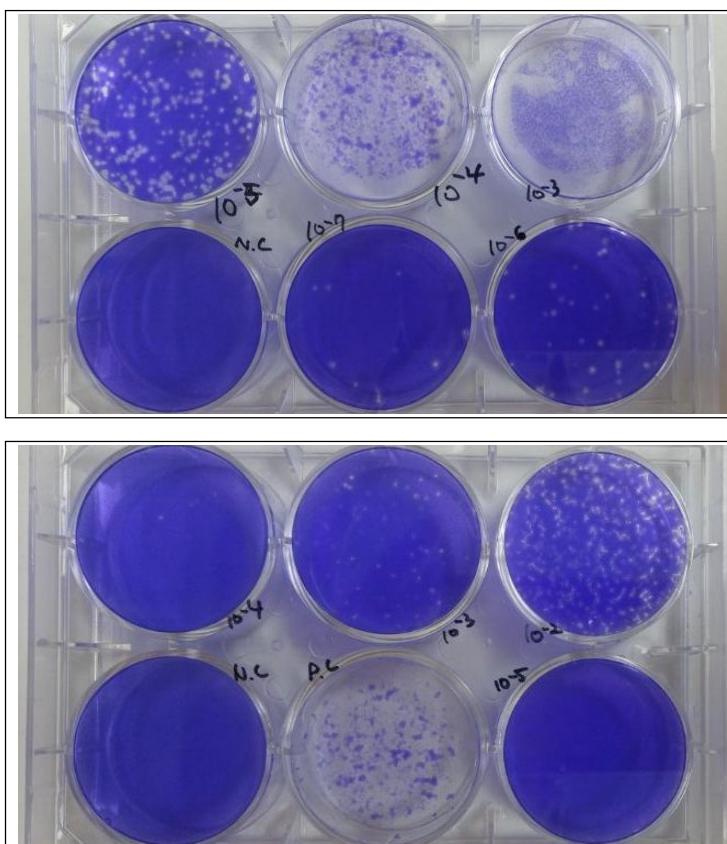
(2) 실험 방법



(3) 실험 결과

- ① 실험에 사용한 Balb/c 및 DBA/1J mouse에 Influenza virus 배양 농축액 50uL를 intranasal infection 후에 일자 별로 마우스 lung을 분리하였으며, Homogenizer를 사용하여 lung homogenate를 만들어서 plaque assay를 수행한 결과, 실험에 사용한 Balb/c 및 DBA/1J mouse 모두에서 intranasal infection 후에 3일 동안 마우스 lung에 Influenza virus가 존재함을 확인하였다. 그러나, DBA/1J mouse와는 달리 Balb/c mouse의 경우에는 4일차에 lung에서 Influenza virus가 검출되지 않았다. 이는 Balb/c mouse가 DBA/1J mouse보다 Influenza virus에 대해 더 강한 저항성을 보이는 것으로 나타났다.
- ② 또한, Balb/c 및 DBA/1J mouse 모두에서 2일째에 가장 높은 virus titer를 보여 주었으며 2일에서 3일 간격으로 lung-cell-lung passage 또는 lung-to-lung passage를 실시하는 것이 최적의 조건임을 확인하였다(Figure 1).

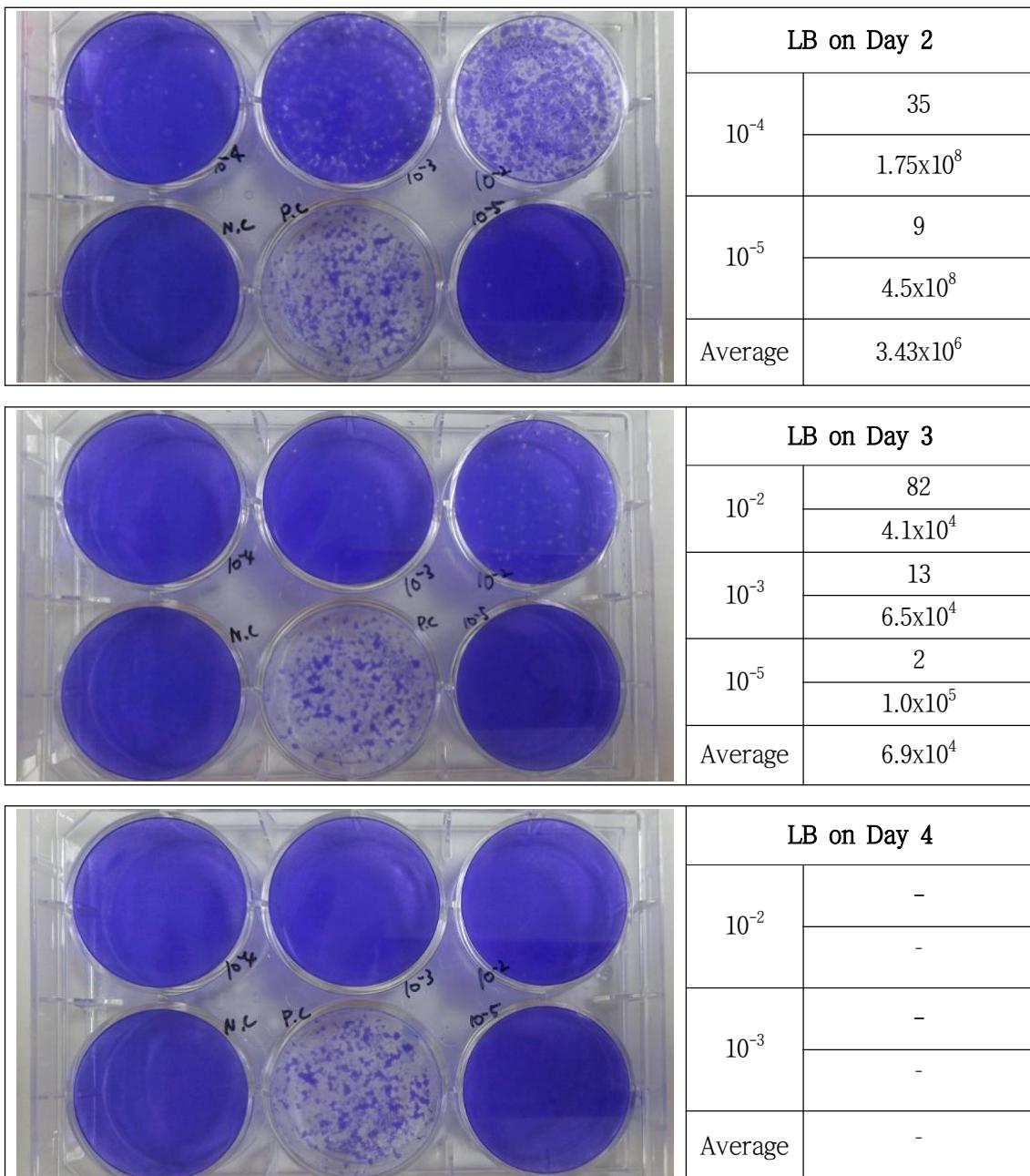
Figure 1. Result of virus plaque assay with lung cell lysate in Balb/c and DBA/1J mouse at interval of one day for four days



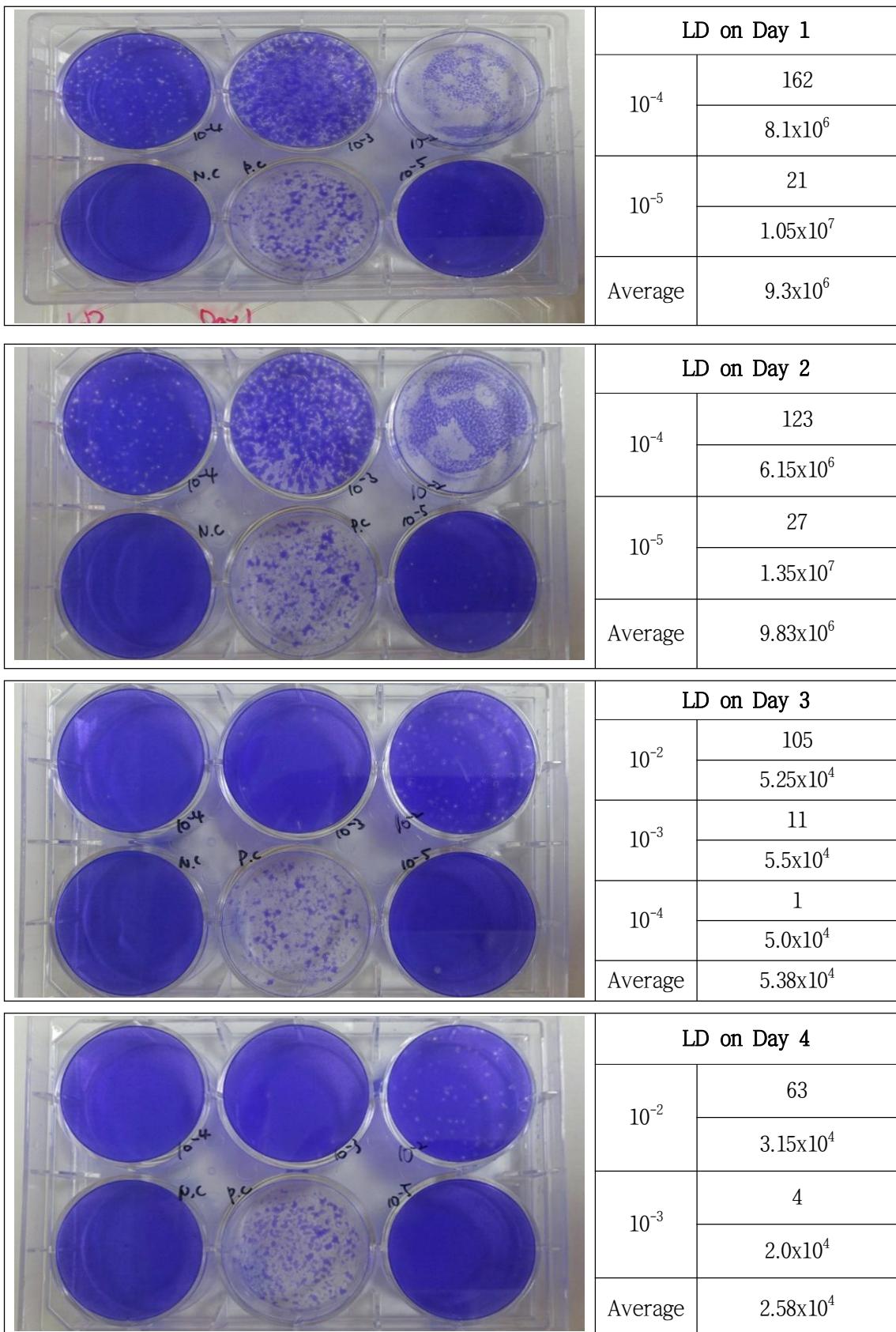
P0 농축액	
10^{-6}	47
	2.35×10^8
10^{-7}	9
	4.5×10^8
Average	3.43×10^8

LB on Day 1	
10^{-3}	72
	3.60×10^5
10^{-4}	5
	2.5×10^5
10^{-5}	3
	1.5×10^6
Average	7.0×10^5

* LB: lung lysate from Balb/c



* LB: lung lysate from Balb/c



* LD: lung lysate from DBA/1J

마. Mouse Adapted Influenza Virus의 제조 (STEP 1.5)

(1) 실험 목적

본 연구에서는 대량 세포배양 방법을 이용하여 생산한 Wild Type Influenza virus 배양 농축액 2.79×10^7 pfu/mL를 마우스 병원성의 Mutant Type 인플루엔자 바이러스를 개발하기 위한 초기 감염 접종원으로 사용하였다.

또한, 초기에는 의미가 있는 임상증상 및 체중감소 현상을 보이는 시점까지는 lung-cell-lung passage를 수행하고 그 이후에는 기존의 lung-to-lung passage를 이용하여 마우스 병원성 Influenza virus를 제조하고자 하였다.

(2) 실험 방법

■ 1단계: Lung Infection → Cell Culture of Lung Homogenate → Lung Infection (Lung-Cell-Lung Passage)

항 목	상 세 내 용	비 고
실험동물	Balb/c 및 DBA/1J	
Virus Type	Wild Type H3N2 배양 농축액을 사용	
Virus 농도	2.79×10^7 pfu/mL	
Virus Challenge	<ul style="list-style-type: none"> - Intranasal 경로로 1회 50uL/Head 투여 - Lung Infection → Cell Culture of Lung Homogenate → Lung Infection을 반복적으로 수행하였음 	마우스 폐 1개 당 PBS 0.5mL 첨가하여 균질화하여 투여
관찰항목	<ul style="list-style-type: none"> - 매일 임상증상 관찰, 체중 측정 및 사망개체 확인 - 동물 투여 전에 농축한 배양액 및 감염 후에 얻어진 lung homogenate는 “제네디아 Rapid Kit”를 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인하였음 	
결과요약	<ul style="list-style-type: none"> - Balb/c의 경우는 P10까지 진행하였으나 임상증상 및 체중감소율이 기대에 미치지 못해 중단하였음 - DBA/1J의 경우는 P3부터 관찰기간 중 폐사개체 관찰되었고 이후 Passage는 2단계(Lung-to-Lung Passage)로 진행 	

■ 2단계: Lung Infection → Lung Infection (Lung-to-Lung Passage)

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	DBA/1J	
Virus Type	DBA/1J(P3)에서 얻어진 lung homogenate를 MDCK 세포주에서 대량배양하고 농축하여 제조한 시료사용	
Virus 농도	- 동물 투여 전에 농축한 배양액 및 감염 후에 얻어진 lung homogenate는 “제네디아 Rapid Kit”를 사용하여 바이러스 존재 유무만 확인하였음	
Virus Challenge	- Intranasal 경로로 1회 50uL/Head 투여 - 2단계: Lung Infection → Lung Infection을 반복적으로 수행하였음	마우스 폐 1개당 PBS 0.5mL 첨가하여 균질화하여 투여
관찰 항목	- 매일 임상증상 관찰, 체중 측정 및 사망개체 확인 - 동물 투여 전에 농축한 배양액 및 감염 후에 얻어진 Lung Homogenate는 “제네디아 Rapid Kit”를 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인하였음	
결과요약	- P9부터 안정적으로 관찰기간 중 전수 폐사함.	

(3) 실험 결과

■ Balb/c Mouse에 병원성을 보이는 인플루엔자 바이러스 제조

- ① Balb/c mouse에 WT-Influenza virus(P0)를 비강 투여 후에 2일에서 4일차에 약간의 체중 감소 현상이 관찰되었으나 그 이후에는 곧바로 정상 체중으로 복원됨을 알 수 있었다.
- ② 처음에 감염시킨 Balb/c 마우스에서 Homogenizer를 사용하여 lung cell lysate를 제조하고 이를 다시 MDCK cell에 감염시켜 대량 증식, 농축을 통해 얻어진 Influenza virus 배양농축액(P1)을 다시 Balb/c mouse에 비강투여 한 결과 P0와 유사한 pattern의 체중감소 현상이 관찰되었으나 5일차부터 정상 체중으로 복원됨을 확인하였다.
- ③ 상기에 기술한 방법(Lung-Cell-Lung Passage)으로 P2~P10을 진행시킨 결과 감염 2~5일 사이에 대략 5~12% 정도의 체중감소 현상이 관찰되었으나 25% 이상의 안락사 개체 또는 사망개체는 관찰되지 않았다.
- ④ 결론적으로 Balb/c mouse에서 특징적인 임상증상, 체중감소 및 사망개체가 관찰되지 않는 주된 이유로는 현재 사용한 WT-Influenza virus가 Balb/c mouse의 lung cell에 감염은 유도되어 passage가 증가하면서 Balb/c mouse의 체중감소 현상은 관찰되었으나 lung cell 내에서 mouse pathogenicity를 보일 수 있을 정도로 충분히 mutation이 일어나지 않은 데

에 기인하는 것으로 사료된다.

■ DBA/1J Mouse에 병원성을 보이는 Influenza Virus 제조

- ① DBA/1J mouse에 WT-Influenza virus(P0)를 비강 투여 후에 2일에서 4일차에 약간의 체중 감소 현상이 관찰되었으나 그 이후에는 곧바로 정상 체중으로 복원됨을 알 수 있었다.
- ② 처음에 감염시킨 DBA/1J 마우스에서 Homogenizer를 사용하여 lung cell lysate를 제조하고 이를 다시 MDCK cell에 감염시켜 대량 증식, 농축을 통해 얻어진 Influenza virus 배양농축액(P1)을 다시 DBA/1J mouse에 비강투여 한 결과 2일에서 4일차에 약 10~15% 이상의 의미가 있는 체중감소 현상이 관찰되었고 5일차부터 정상 체중으로 복원됨을 확인하였다.
- ③ 상기에 기술한 방법(Lung-Cell-Lung Passage)으로 P2, P3를 진행시킨 결과 P2의 경우는 감염 7일 후에 안락사 기준인 25% 이상의 체중감소 현상이 관찰되었으며, P3의 경우에는 감염 5일 후에 25% 이상의 체중감소 현상이 관찰되었으며 동시에 7일 및 8일차에 각 1수씩 폐사개체(40% 사망률)도 확인이 되었다. 따라서, passage 수가 증가함에 따라서 의미가 있는 체중감소 현상이 일어나는 시기가 앞당겨지고 있음을 확인하였다.
- ④ 초기 lung-cell-lung passage(P0~P3)를 통해서 DBA/1J mouse에 Influenza virus가 안정적으로 적응되어 있다고 판단되어 이후에는 lung-to-lung passage 방법을 사용하여 2일내지 3일 간격으로 연속적으로 DBA/1J mouse에 감염시켰다(P4~P13). 그 결과 passage가 증가하면서 25%이상의 안락사 기준 개체 및 사망개체 수가 증가하는 동시에 폐사시기도 앞당겨지고 있음을 확인하였다. 특히 P9부터는 대부분이 3~7일 사이에 안정적으로 전부 폐사가 일어났음을 확인할 수 있었다. 따라서 백신이나 치료제의 효능평가 모델로 사용하기에 매우 적합하게 만들어졌다고 판단되었다.

Table 1. Mortality

1) Balb/c

Type	Passage	Number of Death												Mortality (%)		
		No. Dead / No. Infected			Days after Infection											
		Total Dead No.	Found Dead No.	Euthanasia No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Lung -Cell -Lung	0	0/3	0/3	0/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
	1	0/3	0/3	0/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
	2	0/3	0/3	0/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
	3	0/3	0/3	0/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
	4	0/3	0/3	0/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
	5	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
	6	0/3	0/3	0/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
	7	0/3	0/3	0/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
	8	0/6	0/6	0/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
	9	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
	10	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0

(): Number of Euthanasia

* Euthanasia Criteria: Weight loss of 25% of mice's pre-experimental body weight

2) DBA/1J

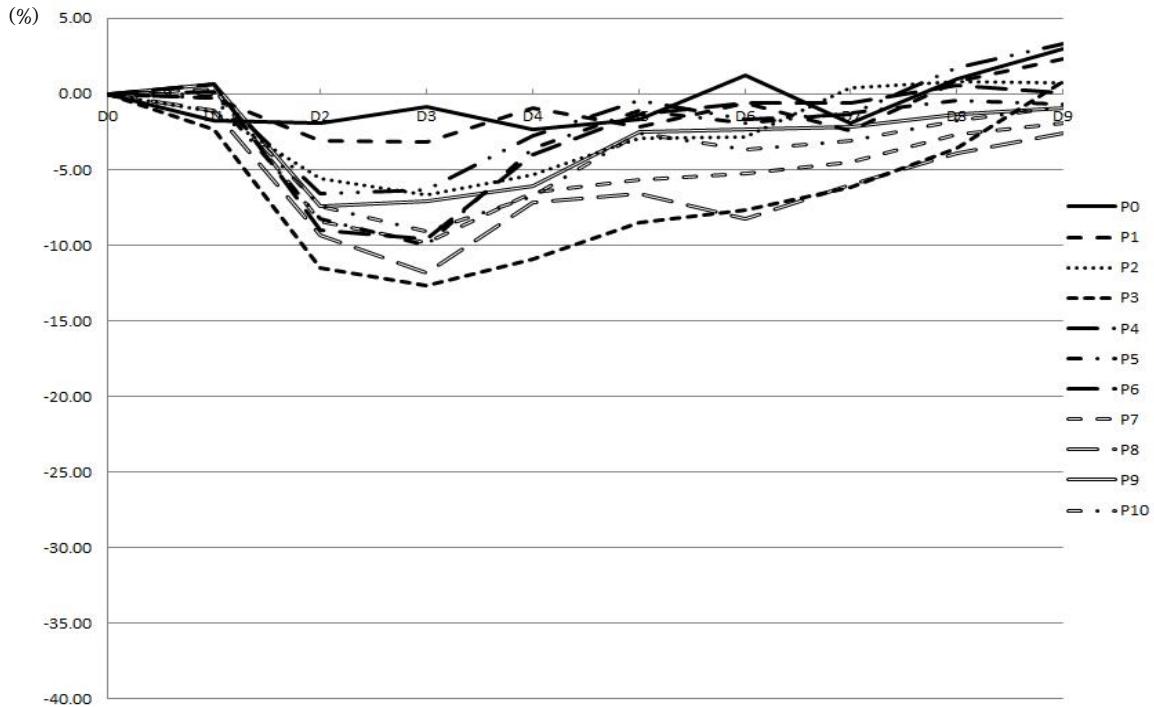
Type	Passage	Number of Death												Mortality (%)		
		No. Dead / No. Infected			Days after Infection											
		Total Dead No.	Found Dead No.	Euthanasia No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Lung -Cell -Lung	0	0/3	0/3	0/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0(0)
	1	0/2	0/2	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0(0)
	2	2/3	0/3	2/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0(2)	0	0	0(66.7)
	3	5/5	2/5	5/5	0	0	0	0	0	0(2)	0(2)	1(1)	1	0	-	40(100)
Lung -to -Lung	4	5/5	2/5	5/5	0	0	0	0	0	0	0(4)	0(1)	1	1	-	40(100)
	5	5/5	5/5	4/5	0	0	0	0	0	0(2)	2(2)	1	2	-	-	100(100)
	6	5/5	2/5	5/5	0	0	0	0	0	0	0(3)	2(2)	0	0	0	40(100)
	7	5/5	2/5	4/5	0	0	0	0	0	0	1	0(2)	0(2)	1	-	40(100)
	8	5/5	4/5	4/5	0	0	0	0	1	0(2)	1(2)	0	0	2	-	80(100)
	9	7/7	7/7	0/7	0	0	0	0	1	5	1	-	-	-	-	100
	10	7/7	7/7	1/7	0	0	0	0	0	2	2(1)	3	-	-	-	100
	11	7/7	7/7	1/7	0	0	0	4	1	1	0(1)	0	1	-	-	100
	12	7/7	7/7	7/7	0	0	0	0	0	0	0(4)	2(3)	5	-	-	100
	13	7/7	7/7	4/7	0	0	0	2	1	1(1)	0(3)	3	-	-	-	100

(): Number of Euthanasia

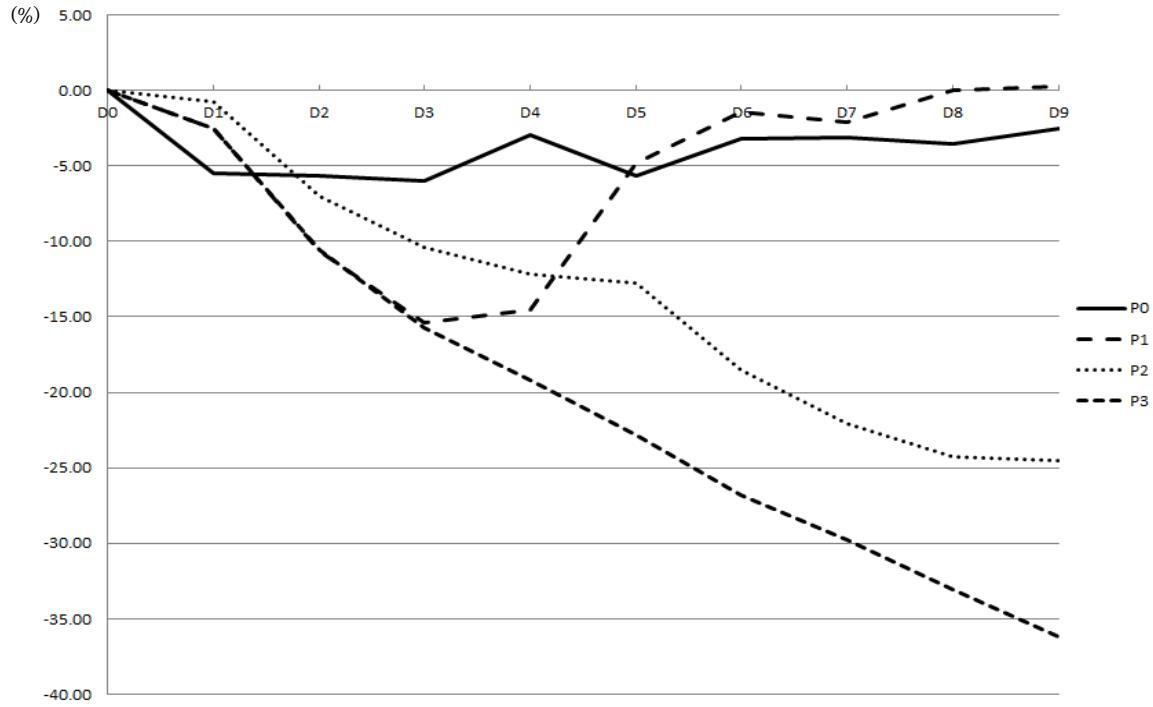
* Euthanasia Criteria: Weight loss of 25% of mice's pre-experimental body weight

Figure 1. Ratio of body weight loss

1) Balb/c (Lung-Cell-Lung)



2-1) DBA/1J (Lung-Cell-Lung)



2-2) DBA/1J (Lung-to-Lung)

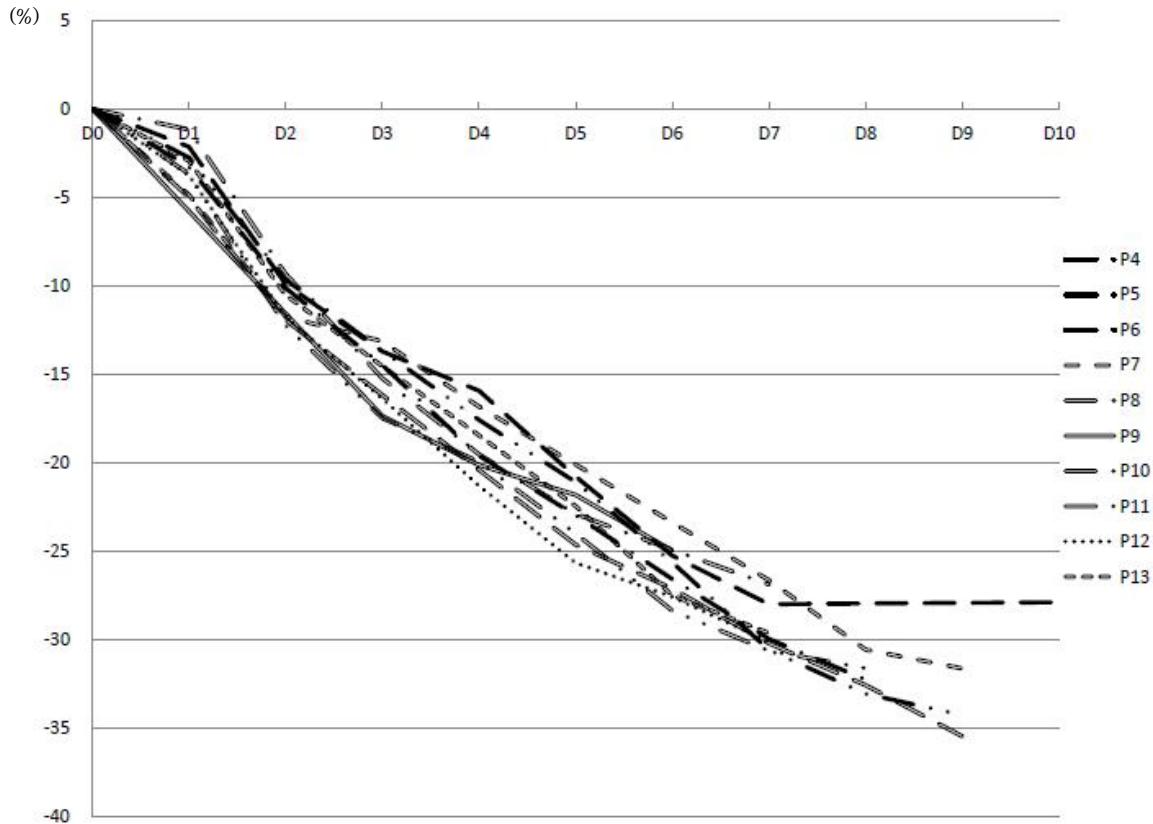


Figure 2. Identification of H3N2 Influenza virus for each passage using H3N2 detection kit (제네디아 Rapid Kit)

1) Balb/c (Lung–Cell–Lung)

Lung to Cell to Lung								
Strain	Passage 0	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5	Passage 6	Passage 7
Balb/c	Multi Influenza C B A H3 C HI	Multi Influenza C B A H3 H1	Multi Influenza C B A H3 H1	Multi Influenza C B A H3 H1	Multi Influenza C B A H3 H1	Multi Influenza C B A H3 H1	Multi Influenza C B A H3 H1	Multi Influenza C B A H3 H1
	LB-P0 2015.06.25	LB-P1 2015.07.02	LB-P2 2015.07.09	LB-P3 (rotavirus) 2015.07.16	LB-P4 2015.07.23	LB-P5 2015.07.30	LB-P6 2015.08.13	LB-P7 2015.08.20

2-1) DBA/1J (Lung–Cell–Lung)

Lung to Cell to Lung							
Strain	Passage 0	Passage 1	Passage 2	Passage 3	-	-	-
DBA/1J	Multi Influenza C B A H3 C HI	Multi Influenza C B A H3 H1	Multi Influenza C B A H3 H1	Multi Influenza C B A H3 H1	-	-	-
	LD-P0 2015.06.25	LD-P1 2015.07.02	LD-P2 2015.07.09	LD-P3 (rotavirus) 2015.07.16	-	-	-

2-2) DBA/1J (Lung-to-Lung)

Lung to Lung								
Strain	Passage 4	Passage 5	Passage 6	Passage 7	Passage 8	Passage 9	Passage 10	Passage 11
DBA/1J	Multi Influenza C B A H3 C HI	Multi Influenza C B A H3 C H2						
	LD-P4(L) 2015.07.29	LD-P5(L) 2015.07.31	LD-P6(L) 2015.08.07	LD-P7(L) 2015.08.07	LD-P8(L) 2015.08.07	LD-P9(L) 2015.08.10	LD-P10(L) 2015.08.12	LD-P11(L) 2015.08.17
DBA/1J	Passage 12	Passage 13	-	-	-	-	-	-
	Multi Influenza C B A H3 C HI	Multi Influenza C B A H3 C HI	-	-	-	-	-	-
	LD-P12(L) 2015.08.19	LD-P13(L) 2015.08.21	-	-	-	-	-	-

바. DBA/1J Adapted Influenza Virus Clone을 이용한 Balb/c Mouse-adapted Influenza Virus의 제조 (STEP 1.6)

(1) 실험 목적

본 연구에서는 DBA/1J mouse-adapted Influenza virus clone을 가지고 Balb/c mouse에 lung-to-lung passage 방법으로 감염시켜 Balb/c mouse-adapted Influenza virus를 제조하고자 시도하였다.

대량 세포배양 방법을 이용하여 생산한 DBA/1J mouse-adapted Influenza virus 중에서 DBA/1J_P12_C1(질병관리본부에 기탁용이 아닌 다른 virus clone 사용)을 선택하여 배양 농축액(3.6×10^7 pfu/mL)을 희석하지 않은 고농도 상태에서 lung-to-lung passage 방법을 사용하여 Balb/c mouse pathogenic한 Mutant Type Influenza virus를 개발하기 위한 초기 감염 접종원으로 사용하였다.

(2) 실험 방법

■ DBA/1J_P11_C2→Balb/c (Lung-to-Lung Passage)

항 목	상 세 내 용	비 고
실험동물	Balb/c	
Virus Type	DBA/1J_P12_C1	
Virus 농도	3.6×10^7 pfu/mL	
Virus Challenge	<ul style="list-style-type: none"> - Intranasal 경로로 1회 50uL/Head 투여 - DBA/1J mouse에 pathogenic한 DBA/1J_P12_C1 virus clone을 가지고 lung-to-lung passage를 반복적으로 수행하였음 	
관찰항목	<ul style="list-style-type: none"> - 매일 임상증상 관찰, 체중 측정 및 사망개체 확인 - 동물 투여 전에 농축한 배양액 및 감염 후에 얻어진 lung homogenate는 “제네디아 Rapid Kit”를 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인하였음 	
결과요약	<ul style="list-style-type: none"> - DBA/1J mouse에 pathogenic한 DBA/1J_P12_C1 virus(P0)를 가지고 P10까지 lung-to-lung passage를 반복적으로 수행한 결과, P5부터 안정적으로 25% 체중감소로 인한 안락사 개체 포함하여 100%의 사망률을 보여주었음 	

(3) 실험 결과

■ Balb/c Mouse에 병원성을 보이는 인플루엔자 바이러스 제조

- ① DBA/1J mouse-adapted Influenza virus 중에서 DBA/1J_P12_C1을 선택하여 MDCK 세포주를 이용하여 대량 배양하고 여기서 얻어진 농축액(3.6×10^7 pfu/mL)을 희석하지 않은 상태에서 lung-to-lung passage 방법으로 Balb/c mouse 병원성의 MT-Influenza virus를 개발하기 위한 초기 감염 접종원으로 사용하였다.
- ② Balb/c mouse에 초기 감염 접종원인 DBA/1J_P12_C1(P0)를 비강 투여 후 2일째부터 체중 감소 현상이 관찰되었으며 시간이 경과함에 따라서 체중 감소는 비례해서 증가하는 것으로 나타났다.
- ③ P0~P10 까지 lung-to-lung passage 결과 급격한 체중감소 현상이 공통적으로 관찰되었으며 25% 체중감소를 기준으로 한 안락사 개체는 대부분의 passage에서 확인되었다. 특히 최대 25~35%의 뚜렷한 체중감소 현상으로 미루어 Balb/c mouse에 pathogenic한 virus가 얻어졌음을 확인할 수 있었다.
- ④ 결론적으로 Balb/c mouse에 Wild Type Influenza virus를 가지고 lung-cell-lung passage를 통해서 Balb/c mouse pathogenic virus를 얻을 수는 없었지만 DBA/1J mouse-adapted Influenza virus를 사용하여 보다 단 시간 내에 Balb/c mouse-adapted Influenza virus를 확보할 수 있었으며 동시에 DBA/1J mouse-adapted Influenza virus 감염에서 보이는 특징적인 임상증상, 체중감소 및 사망개체가 확인되었다. 따라서 DBA/1J mouse-adapted Influenza virus가 Balb/c mouse의 lung cell에 감염과 동시에 passage가 증가하면서 단기간에 mouse pathogenicity를 보일 수 있을 정도로 쉽게 mutation이 일어난 것으로 판단된다.

Table 1. Mortality

Type	Passage	Number of Death											Mortality (%)		
		No. Dead / No. Infected			Days after Infection										
		Total Dead No.	Found Dead No.	Euthanasia No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
DBA/1J_P12_C1 → Balb/c	0	2/5	1/5	2/5	0	0	0	0	0	0	0	0(2)	1	0	20(40)
	1	5/5	4/5	3/5	0	0	0	0	1	1(1)	0(2)	1	0	1	80(100)
	2	4/5	0/5	4/5	0	0	0	0	0	0	0	0(1)	0(3)	0	0(80)
	3	5/5	4/5	5/5	0	0	0	0	0	0(5)	3	1	0	0	80(100)
	4	3/5	0/5	3/5	0	0	0	0	0	0(1)	0(1)	0(1)	0	0	0(60)
	5	5/5	3/5	5/5	0	0	0	0	0	0(5)	0	1	0	2	60(100)
	6	5/5	5/5	1/5	0	0	0	0	2	1(1)	2	-	-	-	100
	7	5/5	1/5	5/5	0	0	0	0	0	0	0(1)	0(4)	1	0	20(100)
	8	5/5	5/5	1/5	0	0	0	0	0(1)	2	2(1)	1	-	-	100
	9	5/5	3/5	5/5	0	0	0	0	0	0	0(2)	2(2)	1(1)	0	60(100)
	10	4/4	0/4	4/4	0	0	0	0	0	0(1)	0(3)	0	0	0	0(100)

(): Number of Euthanasia

* Euthanasia Criteria: Weight loss of 25% of mice's pre-experimental body weight

Figure 1. Ratio of body weight loss

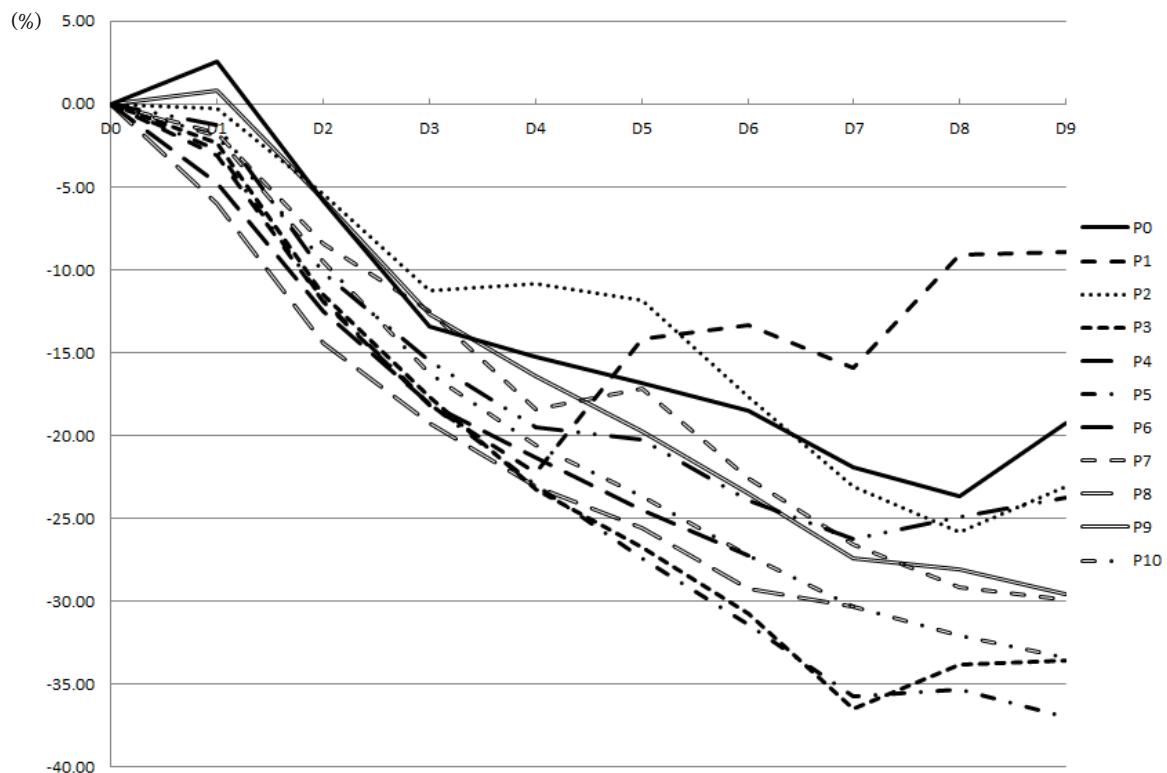


Figure 2. Identification of H3N2 Influenza virus for each passage using H3N2 detection kit (제네디아 Rapid Kit)

DBA/1J_P12_C1 to Balb/c Lung						
Strain	Passage 0	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
	Multi Influenza C B A H3 H1 C D to B P ₀ (DBA P12-C1)	Multi Influenza C B A H3 H1 C D to B P ₁ (DBA P12-C1)	Multi Influenza C B A H3 H1 C D to B P ₂ (DBA P12-C1)	Multi Influenza C B A H3 H1 C D to B P ₃ (DBA P12-C1)	Multi Influenza C B A H3 H1 C D to B P ₄ (DBA P12-C1)	Multi Influenza C B A H3 H1 C D to B P ₅ (DBA P12-C1)
Balb/c	Passage 6	Passage 7	Passage 8	Passage 9	Passage 10	-
	Multi Influenza C B A H3 H1 C D to B P ₆ (DBA P12-C1)	Multi Influenza C B A H3 H1 C D to B P ₇ (DBA P12-C1)	Multi Influenza C B A H3 H1 C D to B P ₈ (DBA P12-C1)	Multi Influenza C B A H3 H1 C D to B P ₉ (DBA P12-C1)	Multi Influenza C B A H3 H1 C D to B P ₁₀ (DBA P12-C1)	-

사. Plaque 정제를 통한 Mutant Type Influenza Virus Clone 생산 (STEP 1.7)

(1) Balb/c Mouse Pathogenic Influenza Virus Clone 확보

Balb/c 유래 P6, P8 및 P9로 부터 plaque purification을 통해 virus clone 12주(Table 1 및 Figure 2)를 확보하였고, 각각의 virus clone을 MDCK 세포주에 감염시켜 바이러스를 대량 생산한 후에 마우스 감염 실험을 통해 최종적으로 마우스 병원성 바이러스를 2주(Table 2, Figure 1 및 Figure 2)를 선별하였다.

최종 선별된 Balb/c mouse pathogenic Influenza virus들은 Balb/c_P8_C2 그리고 Balb/c_P9_C2로 명명하였다.

또한, 최종 선정한 바이러스 2주를 MDCK 세포주에서 상기에 언급한 대량 배양을 통해 다량의 바이러스를 확보하였고, virus plaque assay를 통해서 7.9×10^7 pfu/mL(Balb/c_P8_C2) 그리고 4.8×10^7 pfu/mL(Balb/c_P9_C2)임을 확인하였다(Table 3). 향후 유전자 분석, 병원성 분석 등 모든 연구에 사용하였다.

Table 1. Mortality for virus clones obtained by 1st selection

Mouse Strain	Clone	Number of Death											Mortality (%)	
		No. Dead / No. Infected			Days after Infection-									
		Total Dead No.	Found Dead No.	Euthan asia No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Balb/c	P6_C1	5/5	2/5	5/5	0	0	0	0	0(2)	0(2)	2	0(1)	0	40(100)
	P6_C2	5/5	0/5	5/5	0	0	0	0	0	0(2)	0(2)	0(1)	0	0(100)
	P6_C3	4/5	1/5	4/5	0	0	0	0	0(1)	0(2)	0	1(1)	0	20(80)
	P6_C4	4/5	2/5	4/5	0	0	0	0	0(1)	0(1)	1(1)	1(1)	0	40(80)
	P8_C1	1/5	0/5	1/5	0	0	0	0	0(1)	0	0	0	0	0(20)
	P8_C2	5/5	5/5	1/5	0	0	0	0	0(1)	4	1	0	0	100
	P8_C3	5/5	3/5	5/5	0	0	0	0	0	0(3)	0(2)	1	1	1(100)
	P8_C4	5/5	5/5	2/5	0	0	0	0	0(2)	3	1	1		100
	P9_C1	5/5	2/5	5/5	0	0	0	0	0	0(3)	0(2)	0	1	1(100)
	P9_C2	5/5	5/5	2/5	0	0	0	0	0	0	3(2)	1	0	100
	P9_C3	5/5	3/5	5/5	0	0	0	0	0	0(1)	0(4)	0	1	2(100)
	P9_C4	4/5	0/5	4/5	0	0	0	0	0	0	0(1)	0(2)	0(1)	0(80)

(): Number of Euthanasia

* Euthanasia Criteria: Weight loss of 25% of mice's pre-experimental body weight

Table 2. Mortality for virus clones obtained by 2nd selection

Mouse Strain	Clone	Number of Death											Mortality (%)		
		No. Dead / No. Infected			Days after Infection-										
		Total Dead No.	Found Dead No.	Euthan asia No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Balb/c	P6_C1	2/9	0/9	2/9	0	0	0	0	0	0(1)	0(1)	0	0	0	0(22)
	P8_C2	10/10	10/10	2/10	0	0	0	0	3	5(2)	0	2	-	-	100
	P9_C2	10/10	10/10	2/10	0	0	0	0	2	6(2)	0	2	-	-	100

(): Number of Euthanasia

* Euthanasia Criteria: Weight loss of 25% of mice's pre-experimental body weight

Figure 1. Survival rate for virus clones obtained by 2nd selection

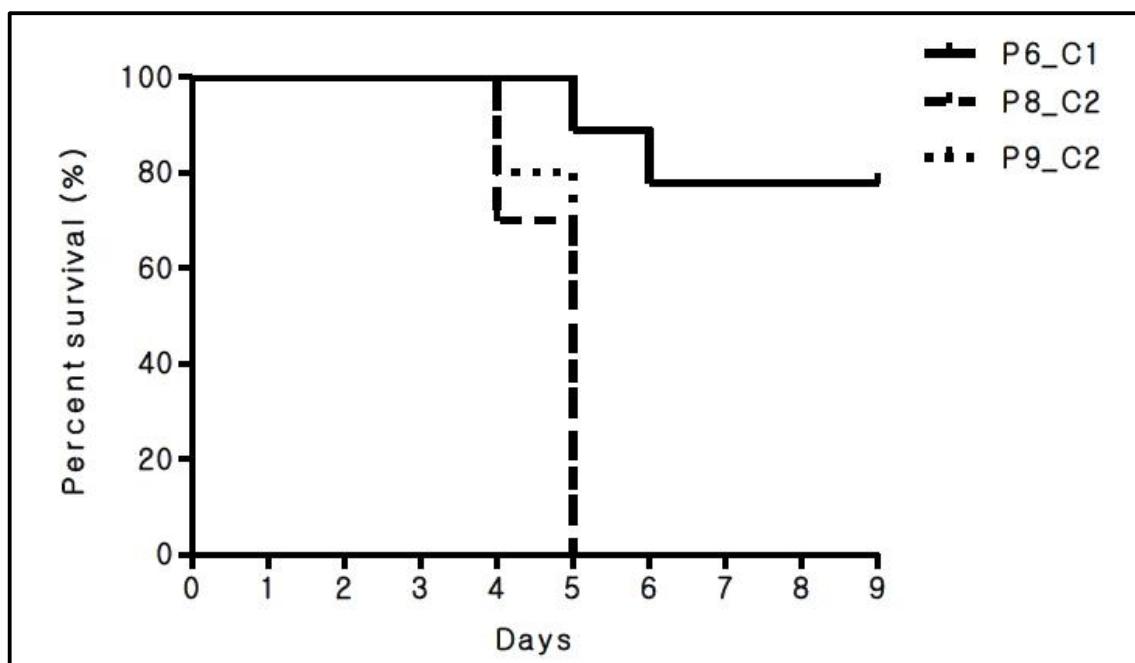
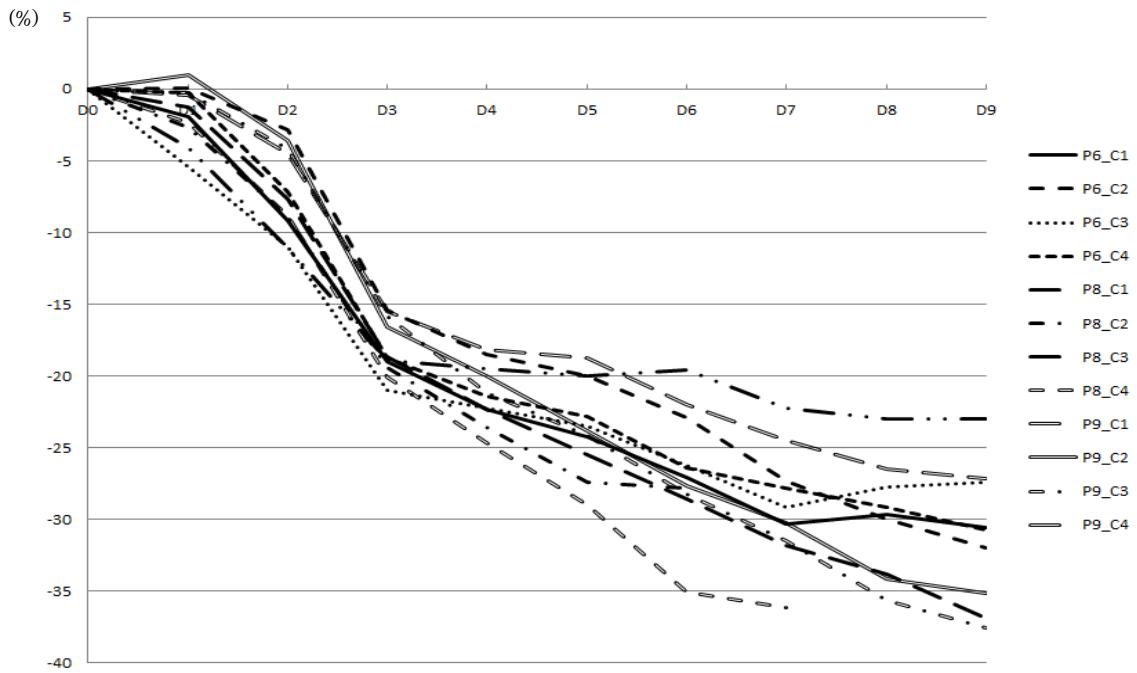


Figure 2. Ratio of body weight loss

1) 1st Selection



2) 2nd Selection

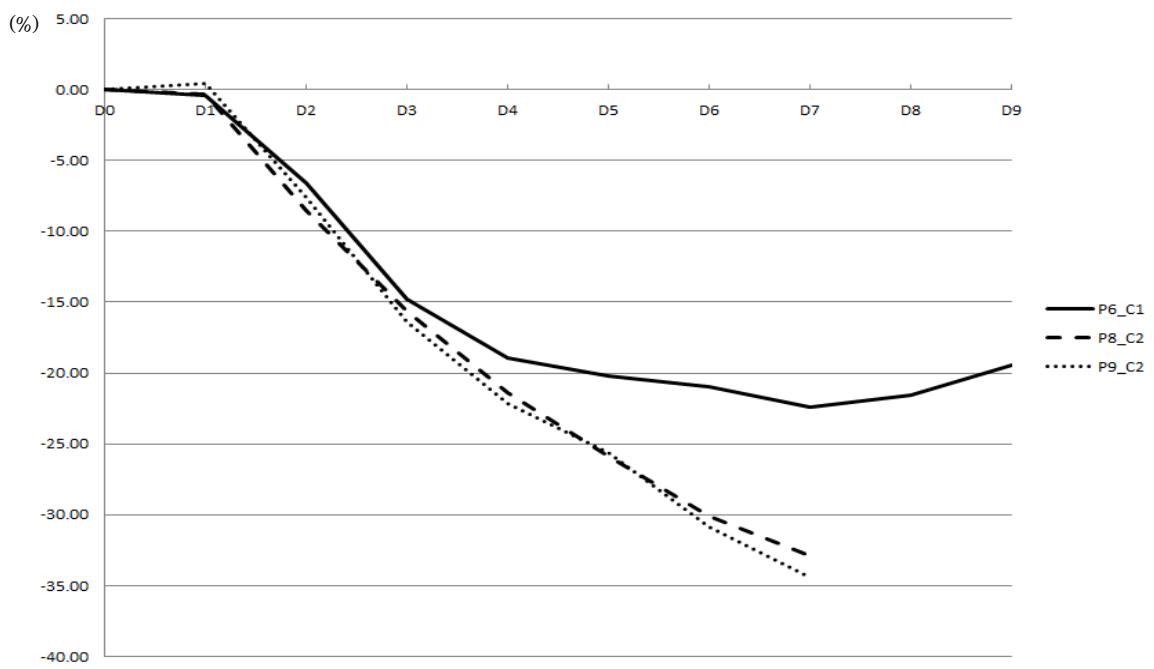


Table 3. Result of virus plaque assay for finally selected virus clone

Balb/c_P8_C2						
		10 ⁻⁵	1차	2차	7.0x10 ⁷	
			148	132		
			7.4x10 ⁷	6.6x10 ⁷		
		10 ⁻⁶	1차	2차	7.88x10 ⁷	
			18	17		
			9.0x10 ⁷	8.5x10 ⁷		

Balb/c_P9_C2						
		10 ⁻⁵	1차	2차	4.35x10 ⁷	
			93	79		
			4.7x10 ⁷	4.0x10 ⁷		
		10 ⁻⁶	1차	2차	4.78x10 ⁷	
			9	12		
			4.5x10 ⁷	6.0x10 ⁷		

(2) DBA/1J Mouse Pathogenic Influenza Virus Clone 확보

DBA/1J_P5, P9, P11, P12, P13 으로부터 plaque purification을 통한 virus clone 14주(Table 1 및 Figure 2)를 확보하였고, 각각의 virus clone을 MDCK 세포주에 감염시켜 바이러스를 대량 생산한 후에 마우스 감염 실험을 통해 최종적으로 마우스 병원성 바이러스를 3주(Table 2, Figure 1 및 Figure 2)를 선별하였다.

최종 선별된 DBA/1J mouse pathogenic Influenza virus들은 DBA/1J_P9_C1, DBA/1J_P11_C2 그리고 DBA/1J_P13_C1으로 명명하였다.

또한, 최종 선정한 바이러스 3주를 MDCK 세포주에서 상기에 언급한 대량 배양을 통해 대량의 바이러스를 확보하였고, virus plaque assay를 통해서 2.08×10^7 pfu/mL(DBA/1J_P9_C1), 3.62×10^7 pfu/mL(DBA/1J_P11_C2) 그리고 3.78×10^7 pfu/mL(DBA/1J_P13_C1) 임을 확인하였다(Table 3). 향후 유전자 분석, 병원성 분석 등 모든 연구에 사용하였다.

Table 1. Mortality for virus clones obtained by 1st selection

Mouse Strain	Clone	Number of Death											Mortality (%)			
		No. Dead / No. Infected			Days after Infection-											
		Total Dead No.	Found Dead No.	Euthan asia No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
DBA/1J	P5_C1	5/5	5/5	4/5	0	0	0	0	0	0(4)	3	2	-	-	100	
	P5_C2	5/5	5/5	4/5	0	0	0	0	0	1(3)	3(1)	1	-	-	100	
	P5_C3	5/5	5/5	3/5	0	0	0	0	0	1(3)	4	-	-	-	100	
	P9_C1	4/4	4/4	0/4	0	0	0	0	4	-	-	-	-	-	100	
	P9_C2	4/4	3/4	4/4	0	0	0	0	0	0	0	0(4)	2	1	75(100)	
	P9_C3	5/5	5/5	0/5	0	0	0	0	0	2	3	-	-	-	100	
	P11_C1	5/5	5/5	0/5	0	0	0	2	3	-	-	-	-	-	100	
	P11_C2	5/5	5/5	0/5	0	0	0	2	3	-	-	-	-	-	100	
	P11_C3	4/4	4/4	2/4	0	0	0	0	0	2	0(2)	2	-	-	100	
	P12_C1	5/5	5/5	1/5	0	0	0	0	0	4(1)	0	1	-	-	100	
	P12_C2	5/5	5/5	5/5	0	0	0	0	0(2)	0(3)	5	-	-	-	100	
	P12_C3	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	P13_C1	5/5	5/5	0/5	0	0	0	3	1	1	-	-	-	-	100	
	P13_C2	5/5	5/5	5/5	0	0	0	0	0	0(5)	3	1	1	-	100	

(): Number of Euthanasia

* Euthanasia Criteria: Weight loss of 25% of mice's pre-experimental body weight

Table 2. Mortality for virus clones obtained by 2nd selection

Mouse Strain	Clone	Number of Death								Mortality (%)		
		No. Dead / No. Infected			Days after Infection							
		Total Dead No.	Found Dead No.	Euthanasia No.	0	1	2	3	4	5	6	
DBA/1J	P9_C1	10/10	10/10	1/10	0	0	0	0	4	3(1)	3	100
	P11_C2	10/10	10/10	0/10	0	0	0	4	3	3	-	100
	P13_C1	10/10	10/10	0/10	0	0	0	5	5	-	-	100

(): Number of Euthanasia

* Euthanasia Criteria: Weight loss of 25% of mice's pre-experimental body weight

Figure 1. Survival rate for virus clones obtained by 2nd selection

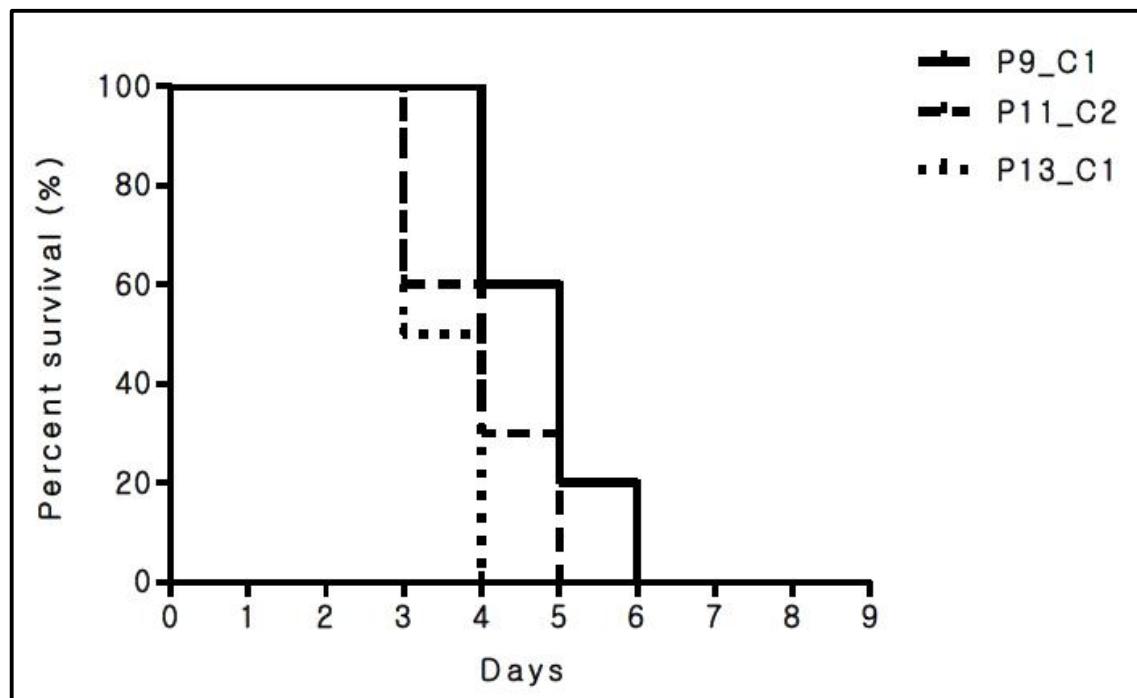
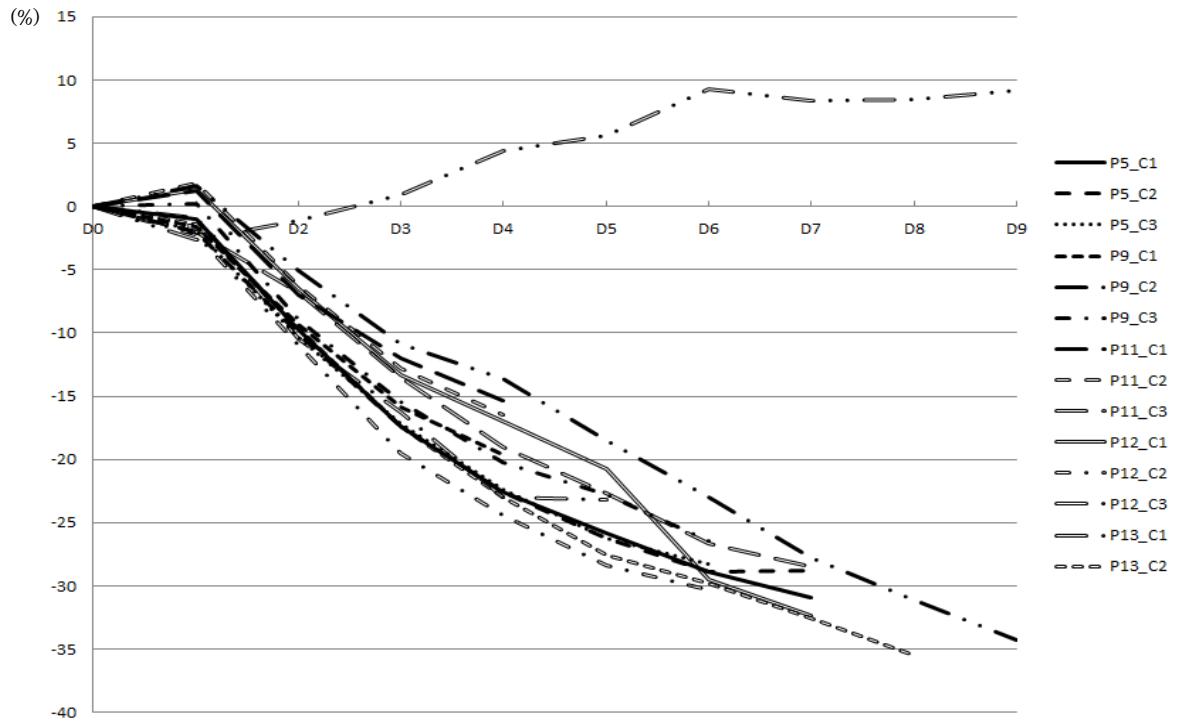


Figure 2. Ratio of body weight loss

1) 1st Selection



2) 2nd Selection

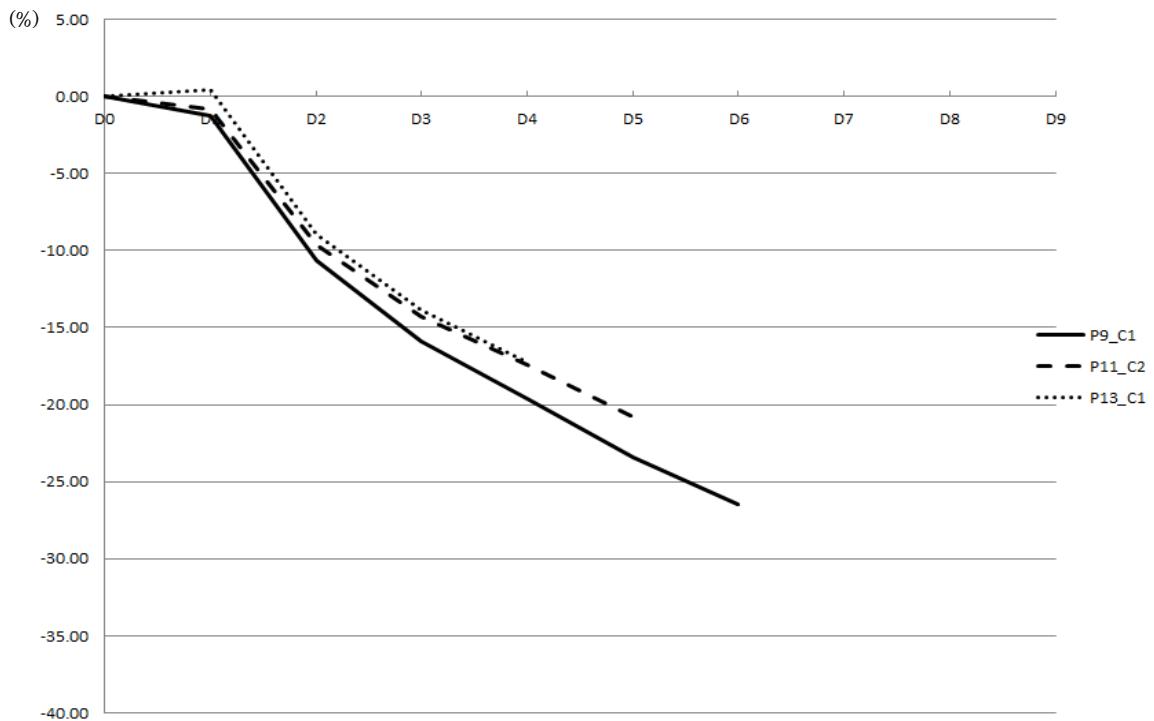


Table 3. Result of virus plaque assay for finally selected virus clones

		DBA/1J_P9_C1				
		1차	2차			
10^{-5}	35	61	2.40×10^7		2.08×10^7	
	1.75×10^7	3.05×10^7				
10^{-6}	1차	2차			1.75×10^7	
	3	4				
	1.5×10^7	2.0×10^7				

		DBA/1J_P11_C2				
		1차	2차			
10^{-5}	71	68	3.48×10^7		3.62×10^7	
	3.55×10^7	3.4×10^7				
10^{-6}	1차	2차			3.75×10^7	
	9	6				
	4.5×10^7	3.0×10^7				

		DBA/1J_P13_C1				
		1차	2차			
10^{-5}	85	97	4.55×10^7		3.78×10^7	
	4.25×10^7	4.85×10^7				
10^{-6}	1차	2차			3.00×10^7	
	7	5				
	3.5×10^7	2.5×10^7				

2. WT- 및 MT-H3N2 Influenza Virus에서 Viral RNA 분리 및 유전자 서열 분석

가. Wild- 및 Mutant Type의 Influenza A Virus (H3N2)에서 Viral RNA 분리

Influenza virus에서 viral RNA를 분리하기 위해서 1차년도와 동일한 QIAamp Viral RNA Mini Kit를 사용하여 순수 분리하였으며 이때 기 확립된 “Isolation of Viral RNA from H3N2 Influenza Virus” SOP에 따라 수행하였다.

나. Wild- 및 Mutant Type의 Influenza A Virus (H3N2)에 대한 유전자 서열분석 (STEP 2.2)

(1) Influenza Virus 유전자 서열분석

Wild Type, DBA/1J mouse로부터 유래한 각 passage의 Mutant Type, 그리고 DBA/1J 및 Balb/c mouse pathogenic Influenza virus clone 5주로부터 당사에서 확립한 SOP에 따라서 QIAGEN社의 Viral RNA Mini Kit를 사용하여 viral RNA를 분리하였다. 분리한 viral RNA를 가지고 cDNA를 합성하였으며 8개의 gene specific primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. 인플루엔자 바이러스의 염기서열 분석은 전기영동 후 PCR 산물을 가지고 수행하였다. Influenza virus의 유전자 서열분석은 유전자 분석 전문업체인 SolGent 사에 의뢰하여 분석을 진행하였다.

(2) DBA/1J Mouse에서 Passage별 Influenza Virus의 주요 유전자 서열분석을 통한 병원성 기여인자 분석

DBA/1J mouse에 lung-cell-lung 및 lung-to-lung passage를 통해서 감염시킨 Influenza virus에 대해서 각 passage 별로 lung lysate에서 viral RNA를 분리하고 이를 cDNA 합성 후에 주요 유전자인 HA, NA 및 PA 유전자를 대상으로 유전자 서열을 분석하였으며 이를 단백질로 변환하여 각 passage 별로 아미노산 변이가 일어난 부위를 조사하였다(Table 1).

감염 초기에는 주로 HA 유전자에서의 아미노산 변이가 관찰되었으며 이는 WT-Influenza virus가 DBA/1J mouse의 target organ인 lung cell에의 adaptation을 위해 구조적 변화가 일어난 것으로 판단되며, 그 이후 passage에서 NA, PA 유전자 내의 아미노산 변이는 mouse pathogenicity에 기여하는 것으로 예측할 수 있다.

Table 1. Amino acid substitutions identified in DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza virus

No	Name	HA					NA	PA		
		144	183	206	241	262		76	86	609
0	A/Switzerland/9715293/2013	A	T	D	N	N	E	M	K	Y
1	DBA/1J_P0	A	T	D	D	X	E	M	K	Y
2	DBA/1J_P1	A	T	D	D	X	E	M	K	Y
3	DBA/1J_P2	AT	AT	D	D	T	E	M	K	Y
4	DBA/1J_P3	AT	AT	D	D	T	E	M	K	Y
5	DBA/1J_P4	T	A	D	D	T	EK	M	K	Y
6	DBA/1J_P5	T	A	D	D	T	EK	M	K	Y
7	DBA/1J_P6	T	A	D	D	T	EK	MI	K	Y
8	DBA/1J_P7	T	A	D	D	T	E	MI	KR	Y
9	DBA/1J_P8	T	A	D	D	T	E	MI	KR	Y
10	DBA/1J_P9	T	A	DE	D	T	E	MI	KR	Y
11	DBA/1J_P10	T	A	DE	D	T	E	MI	KR	YH
12	DBA/1J_P11	T	A	E	D	T	E	MI	KR	YH
13	DBA/1J_P12	T	A	E	D	T	E	MI	R	YH
14	DBA/1J_P13	T	A	E	D	T	E	MI	R	YH

(3) DBA/1J 및 Balb/c Mouse에서 Pathogenicity를 보이는 MT-Influenza Virus의 유전자 전 서열분석을 통한 병원성 기여인자 분석

일반적으로 mouse는 자연적으로는 사람 유래 또는 다른 종의 Influenza virus에 감염되지 않으나, 사람 유래 Influenza virus를 mouse에 반복적으로 lung-cell-lung passage 또는 lung-to-lung passage를 통해서 mouse adaptation이 가능하며 이런 반복적인 과정을 통해서 mouse pathogenicity를 보이는 Mutant Type Influenza virus를 확보할 수 있다. 따라서 mouse-adapted Influenza virus는 감염시킨 실험동물의 bronchi와 lung에서 병원성을 야기시키며 이는 사람 Influenza virus에 의해 야기되는 병원성과 매우 유사한 임상 증상을 보인다.

현재까지 보고된 바로는 인플루엔자 바이러스의 virulence와 host range에 영향을 미치는 주요 요인들이 많이 밝혀져 있으며, 이중에서 인플루엔자 바이러스 Hemagglutinin(HA)이 마우스의 lung virulence를 부여하는 데에 주요한 결정인자로 알려져 있다. 또한, 인플루엔자 바이러스의 7개 다른 유전자들도 lung virulence를 가지는 데에 어느 정도 기여하는 있는 것으로 알려져 있다.

최종적으로 DBA/1J 및 Balb/c mouse에서 pathogenicity를 보이는 5주의 virus clone(DBA/1J 3주, Balb/c 2주)에 대해 8개 gene segment의 전 서열분석을 완료하였다. 특이한 점은 8개 gene segment에 대해 유전자 서열분석을 통해 단백질로 변환시켜 분석한 결과 PB1, M 및 NS 유전자에서는 모두 아미노산 변이가 관찰되지 않았다.

- ① DBA/1J_P9_C1의 경우, 5개 viral protein에서 총 7개의 아미노산 치환이 일어났으며 이 중에 HA(5개), NA(1개) 그리고 PB2(1개)의 viral protein에서 변이가 관찰되었다.
- ② DBA/1J_P11_C2의 경우, 5개 viral protein에서 총 11개의 아미노산 치환이 일어났으며 이 중에 HA(4개), NA(2개), NP(1개), PA(3개) 그리고 PB2 (1개)의 viral protein에서 변이가 관찰되었다.
- ③ DBA/1J_P13_C1의 경우, 5개 viral protein에서 총 12개의 아미노산 치환이 일어났으며 이 중에 HA(4개), NA(1개), NP(2개), PA(3개) 그리고 PB2(2개)의 viral protein에서 변이가 관찰되었다.
- ④ Balb/c_P8_C2의 경우, 5개 viral protein에서 총 13개의 아미노산 치환이 일어났으며 이 중에 HA(6개), NA(1개), NP(1개), PA(4개) 그리고 PB2(1개)의 viral protein에서 변이가 관찰되었다.
- ⑤ Balb/c_P9_C2의 경우, 5개 viral protein에서 총 14개의 아미노산 치환이 일어났으며, 이 중에 HA(6개), NA(1개), NP(1개), PA(5개) 그리고 PB2(1개)의 viral protein에서 변이가 관찰되었다.

특히, 본 연구에서는 인플루엔자 바이러스의 virulence와 host range에 주된 영향을 미치는 Hemagglutinin(HA)에서 많은 아미노산의 치환이 일어났음이 확인되었으며, 특히적으로 PA 유전자에서 HA 다음으로 많은 부위에서 아미노산 치환이 일어남을 확인하였다.

또한, DBA/1J 및 Balb/c mouse에 병원성을 보이는 5주의 Influenza virus에서 HA 유전자의 N160D, N262T 부분, NA 유전자의 S331R, NP 유전자의 G384R, PA 유전자의 E396K 부분에서 주로 polar에서 non-polar, non-polar에서 polar로의 급격한 아미노산 변화, 전체 mouse 병원성주에서의 주요 아미노산 변화 등이 관찰되므로 이 부분이 마우스 병원성을 가지는데 어느 정도의 중요한 역할을 할 것으로 생각되어진다.

Table 2. Amino acid substitutions identified in mouse-adapted H3N2 Influenza virus

	HA							NA			NP			PA				PB2		
	18	144	160	183	209	262	522	331	369	463	34	189	384	86	396	421	609	713	323	355
A/Switzerland/9715293/2013	K	A	N	T	F	N	E	S	T	D	D	M	G	M	E	V	K	Y	F	R
DBA/1J_LP9_C1	K	T	N	A	S	T	D	S	M	D	D	M	G	M	E	V	K	Y	L	R
DBA/1J_LP11_C2	K	T	N	A	S	T	E	S	A	N	D	M	R	I	E	V	R	H	L	R
DBA/1J_LP13_C1	K	T	N	A	S	T	E	S	K	D	D	I	R	I	E	V	R	H	L	K
Balb/c_P8_C2	Q	T	D	A	S	T	E	R	T	D	N	M	G	I	E	F	R	H	L	R
Balb/c_P9_C2	Q	T	D	A	S	T	E	R	T	D	N	M	G	I	K	F	R	H	L	R

* DBA/1J_LP9_C1 (means DBA/1J_P9_C1), DBA/1J_LP11_C2 (means DBA/1J_P11_C2), DBA/1J_LP13_C1 (means DBA/1J_P13_C1)

* K(Lys)→Q(Gln), A(Ala)→T(Thr), **N(Asn)→D(Asp)**, F(Phe)→S(Ser), **N(Asn)→T(Thr)**, E(Glu)→D(Asp), **S(Ser)→R(Arg)**, **G(Gly)→R(Arg)**, M(Met)→I(Ile), **E(Glu)→K(Lys)**, V(Val)→F(Phe), K(Lys)→R(Arg), Y(Try)→H(His), F(Phe)→L(Leu), R(Arg)→K(Lys)

3. 병원성 분석

가. MLD₅₀ 측정

(1) Balb/c Mouse에 Pathogenic Influenza Virus의 MLD₅₀ 측정 (STEP 3.1.1)

Wild Type과 Balb/c mouse-adapted H3N2 Influenza virus에 대한 MLD₅₀을 측정한 결과 (Table 1 및 Table 2), Wild Type의 MLD₅₀은 2.79×10^7 pfu/mL 이상으로 나타났다. Balb/c mouse-adapted H3N2 Influenza virus의 경우, Balb/c_P8_C2는 1.16×10^5 pfu/mL, Balb/c_P9_C2는 1.51×10^5 pfu/mL로 나타났다. 따라서 Balb/c mouse-adapted H3N2 Influenza virus가 Wild Type에 비해서 약 185~240배 이상의 높은 virulence를 보여주는 것으로 나타났다.

또한, Figure 1 은 Wild Type과 Balb/c mouse-adapted H3N2 Influenza virus 투여 후에 일자별 체중변화에 대한 그래프를 보여주고 있다. Wild Type의 경우에는 투여한 Influenza virus의 농도와 무관하게 체중감소 현상이 관찰되지 않았으며 일정한 체중을 유지하고 있음을 확인하였다. 그러나, 2종의 Balb/c mouse-adapted H3N2 Influenza virus는 투여 농도에 의존적으로 체중이 현저하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

Table 1. Experimental result for the determination of MLD₅₀ with wild-type and Balb/c mouse-adapted H3N2 Influenza viruses in mice

Virus Source	Titer (pfu/mL)	Number of Death																Mortality (%)	
		No. Dead / No. Infected			Days after Infection														
		Total Dead N o.	Found Dead N o.	Euthanasia No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Wild Type H3N2	2.79x10 ⁷	0/4	0/4	0/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.79x10 ⁶	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.79x10 ⁵	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.79x10 ⁴	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.79x10 ³	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.79x10 ²	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Balb/c P8_C2	7.88x10 ⁷	5/5	5/5	0/5	0	0	0	0	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	100
	7.88x10 ⁶	5/5	5/5	5/5	0	0	0	0	0	0	0	1	2	-	-	-	-	-	100
	7.88x10 ⁵	5/5	3/5	5/5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	60 (100)
	7.88x10 ⁴	5/5	0/5	5/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (100)
	7.88x10 ³	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7.88x10 ²	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Balb/c P9_C2	4.78x10 ⁷	5/5	5/5	3/5	0	0	0	0	1	1	2	1	-	-	-	-	-	-	100
	4.78x10 ⁶	5/5	5/5	5/5	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	-	-	-	-	100
	4.78x10 ⁵	4/4	4/4	4/4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	-	-	-	-	100
	4.78x10 ⁴	5/5	0/5	4/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (80)
	4.78x10 ³	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4.78x10 ²	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2. Arrangement of data used in computation of MLD₅₀ titre by the method of Reed-Muench

1) Wild Type (MLD₅₀ > 2.79 x 10⁷ pfu/mL)

Titer (pfu/mL)	Log Titer	No. of Dead	No. of Survival	Cumulative			Mortality	% Mortality	% Survival
				Dead	Survival	Total			
2.79x10 ⁷	7.45	0	4	0	4	4	4/4	0	100
2.79x10 ⁶	6.45	0	5	0	9	9	9/9	0	100
2.79x10 ⁵	5.45	0	5	0	14	14	14/14	0	100
2.79x10 ⁴	4.45	0	5	0	19	19	19/19	0	100
2.79x10 ³	3.45	0	5	0	24	24	24/24	0	100
2.79x10 ²	2.45	0	5	0	29	29	29/29	0	100

2) Balb/c_P8_C2 (MLD₅₀ = 1.16 x 10⁵ pfu/mL)

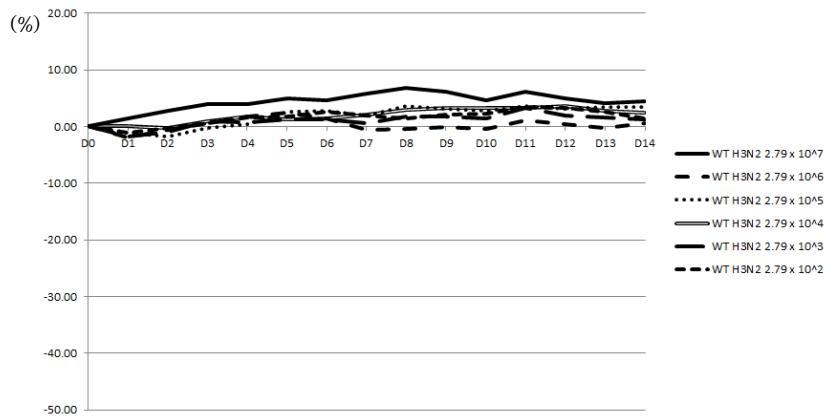
Titer (pfu/mL)	Log Titer	No. of Dead	No. of Survival	Cumulative			Mortality	% Mortality	% Survival
				Dead	Survival	Total			
7.88x10 ⁷	7.90	5	0	13	0	13	13/13	100	0
7.88x10 ⁶	6.90	5	0	8	0	8	8/8	100	0
7.88x10 ⁵	5.90	3	2	3	2	5	3/5	60	40
7.88x10 ⁴	4.90	0	5	0	7	7	0/7	0	100
7.88x10 ³	3.90	0	5	0	12	12	0/12	0	100
7.88x10 ²	2.90	0	5	0	17	17	0/17	0	100

3) Balb/c_P9_C2 (MLD₅₀ = 1.51 x 10⁵ pfu/mL)

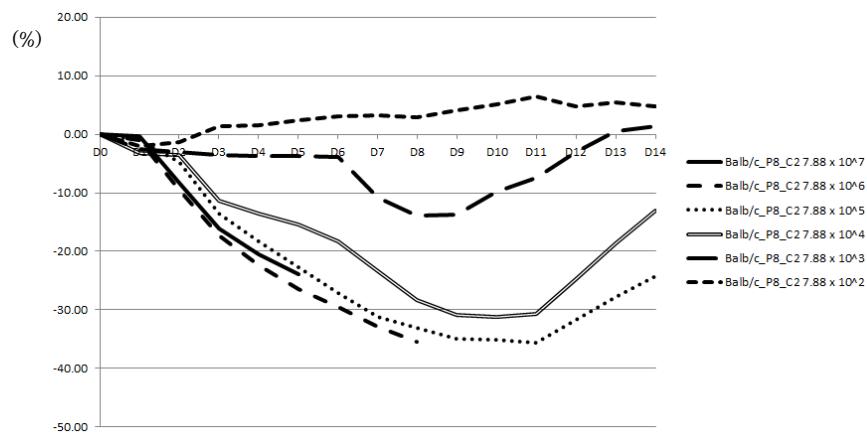
Titer (pfu/mL)	Log Titer	No. of Dead	No. of Survival	Cumulative			Mortality	% Mortality	% Survival
				Dead	Survival	Total			
4.78x10 ⁷	7.68	5	0	14	0	14	14/14	100	0
4.78x10 ⁶	6.68	5	0	9	0	9	9/9	100	0
4.78x10 ⁵	5.68	4	0	4	0	4	4/4	100	0
4.78x10 ⁴	4.68	0	5	0	5	5	0/5	0	100
4.78x10 ³	3.68	0	5	0	10	10	0/10	0	100
4.78x10 ²	2.68	0	5	0	15	15	0/15	0	100

Figure 1. Ratio of body weight loss_Balb/c

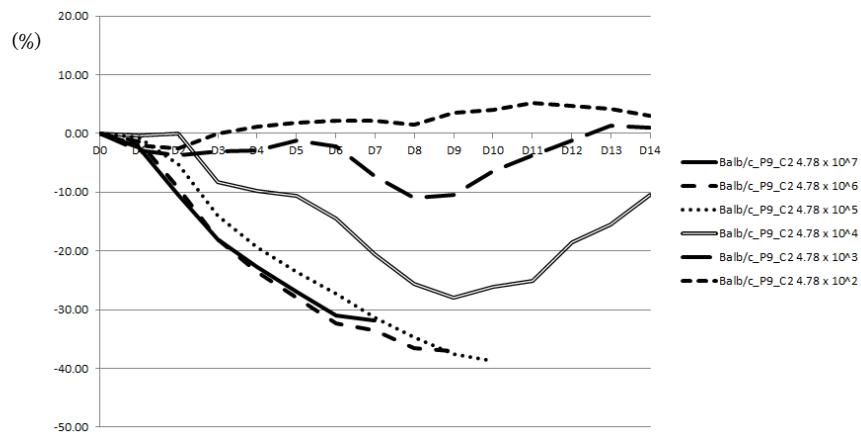
1) Wild Type H3N2



2) Balb/c_P8_C2



3) Balb/c_P9_C2



(2) DBA/1J Mouse에 Pathogenic Influenza Virus의 MLD₅₀ 측정 (STEP 3.1.2)

Wild Type과 DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza virus에 대한 MLD₅₀을 측정한 결과 (Table 3 및 Table 4), Wild Type의 MLD₅₀은 2.79×10^7 pfu/mL 이상으로 나타났다. DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza virus의 경우, DBA/1J_P9_C1는 2.52×10^5 pfu/mL, DBA/1J_P11_C2는 1.15×10^4 pfu/mL, 그리고 DBA/1J_P13_C1는 9.02×10^3 pfu/mL로 나타났다. 따라서 DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza virus가 Wild Type에 비해서 약 110~3,090배 이상의 높은 virulence를 보여주는 것으로 나타났다.

또한, Figure 2 는 Wild Type과 DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza virus 투여 후에 일자별 체중변화에 대한 그래프를 보여주고 있다. Wild Type의 경우에는 투여한 Influenza virus 농도와 무관하게 체중감소 현상이 관찰되지 않았으며 일정한 체중을 유지하고 있음을 확인하였다. 그러나, 3종의 DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza virus는 투여 농도에 의존적으로 체중이 현저하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 Balb/c mouse를 이용한 MLD₅₀ 측정 실험에서 보여주었던 체중변화 pattern과 매우 유사하게 경향을 보여주었다.

Table 3. Experimental result for the determination of MLD₅₀ with wild-type and DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza viruses in mice.

Virus Source	Titer (pfu/mL)	Number of Death														Mortality (%)					
		No. Dead / No. Infected			Days after Infection																
		Total Dead No.	Found Dead No.	Euthanasia No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Wild Type H3N2	2.79x10 ⁷	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2.79x10 ⁶	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2.79x10 ⁵	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2.79x10 ⁴	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2.79x10 ³	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2.79x10 ²	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
DBA/1J_P9_C1	2.08x10 ⁷	5/5	5/5	1/5	0	0	0	0	0	3(1)	1	1	-	-	-	-	-	-	-	100	
	2.08x10 ⁶	5/5	5/5	3/5	0	0	0	0	0	0(3)	3	1	1	-	-	-	-	-	-	100	
	2.08x10 ⁵	5/5	2/5	5/5	0	0	0	0	0	0	0(4)	0(1)	0	0	1	0	0	0	1	40 (100)	
	2.08x10 ⁴	5/5	2/5	5/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0(1)	0(4)	1	0	0	0	1	40 (100)
	2.08x10 ³	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2.08x10 ²	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
DBA/1J_P11_C2	3.62x10 ⁷	5/5	5/5	1/5	0	0	0	0	5(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	
	3.62x10 ⁶	5/5	5/5	3/5	0	0	0	0	1	0(2)	3(1)	1	-	-	-	-	-	-	-	100	
	3.62x10 ⁵	5/5	5/5	5/5	0	0	0	0	0(1)	0(3)	0(1)	0	4	0	1	-	-	-	-	100	
	3.62x10 ⁴	5/5	5/5	5/5	0	0	0	0	0	0	0(4)	0(1)	0	0	1	1	1	1	1	100	
	3.62x10 ³	5/5	0/5	5/5	0	0	0	0	0	0	0	0(1)	0(1)	0(1)	0(2)	0	0	0	0	0	0 (100)
	3.62x10 ²	0/5	0/5	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
DBA/1J_P13_C1	3.78x10 ⁷	5/5	5/5	0/5	0	0	0	1	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	
	3.78x10 ⁶	5/5	5/5	3/5	0	0	0	0	2(2)	0(1)	2	1	-	-	-	-	-	-	-	100	
	3.78x10 ⁵	5/5	5/5	4/5	0	0	0	0	0	0(1)	0(3)	4	1	-	-	-	-	-	-	100	
	3.78x10 ⁴	5/5	5/5	4/5	0	0	0	0	0	0	0(1)	1(3)	0	1	3	-	-	-	-	100	
	3.78x10 ³	5/5	1/5	4/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1(2)	0(2)	0	0	0	0	20 (100)	
	3.78x10 ²	1/5	0/5	1/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0(1)	0	0	0	0	0 (20)	

Table 4. Arrangement of data used in computation of MLD₅₀ titre by the method of Reed-Muench

1) Wild Type (MLD₅₀ > 2.79 x 10⁷ pfu/mL)

Titer (pfu/mL)	Log Titer	No. of Dead	No. of Survival	Cumulative			Mortality	% Mortality	% Survival
				Dead	Survival	Total			
2.79x10 ⁷	7.45	0	5	0	5	5	5/5	0	100
2.79x10 ⁶	6.45	0	5	0	10	10	10/10	0	100
2.79x10 ⁵	5.45	0	5	0	15	15	15/15	0	100
2.79x10 ⁴	4.45	0	5	0	20	20	20/20	0	100
2.79x10 ³	3.45	0	5	0	25	25	25/25	0	100
2.79x10 ²	2.45	0	5	0	30	30	30/30	0	100

2) DBA/1J_P9_C1 (MLD₅₀ = 2.52 x 10⁵ pfu/mL)

Titer (pfu/mL)	Log Titer	No. of Dead	No. of Survival	Cumulative			Mortality	% Mortality	% Survival
				Dead	Survival	Total			
2.08x10 ⁷	7.62	5	0	14	0	14	14/14	100	0
2.08x10 ⁶	6.62	5	0	9	0	9	9/9	100	0
2.08x10 ⁵	5.62	2	3	4	3	7	4/7	57	43
2.08x10 ⁴	4.62	2	3	2	6	8	2/8	25	75
2.08x10 ³	3.62	0	5	0	11	11	0/11	0	100
2.08x10 ²	2.62	0	5	0	16	16	0/16	0	100

3) DBA/1J_P11_C2 (MLD₅₀ = 1.15 x 10⁴ pfu/mL)

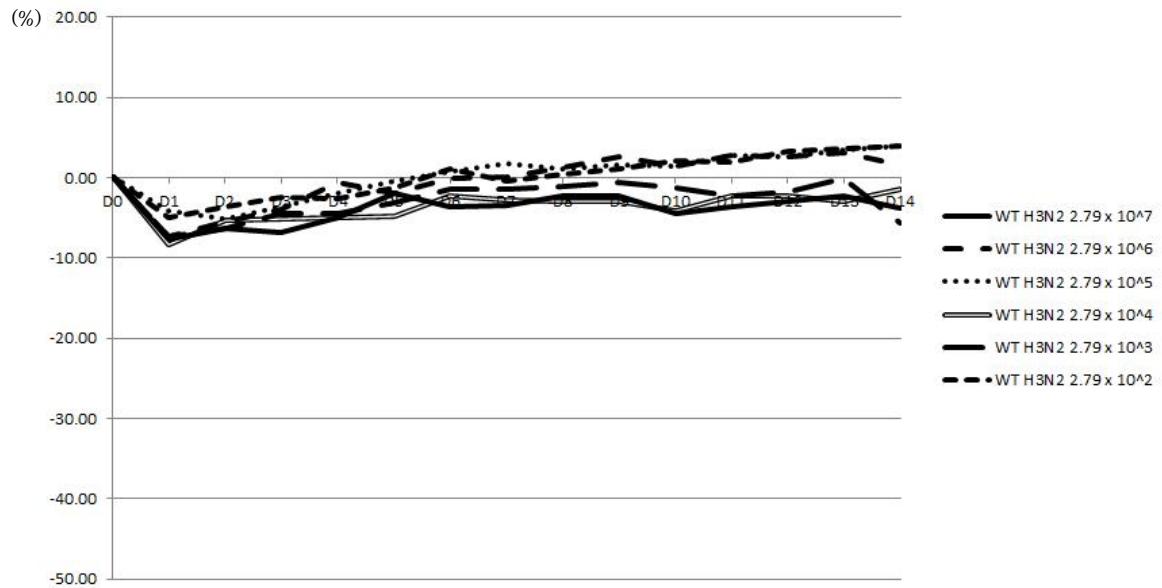
Titer (pfu/mL)	Log Titer	No. of Dead	No. of Survival	Cumulative			Mortality	% Mortality	% Survival
				Dead	Survival	Total			
3.62x10 ⁷	7.56	5	0	20	0	20	20/20	100	0
3.62x10 ⁶	6.56	5	0	15	0	15	15/15	100	0
3.62x10 ⁵	5.56	5	0	10	0	10	10/10	100	0
3.62x10 ⁴	4.56	5	0	5	0	5	5/5	100	0
3.62x10 ³	3.56	0	5	0	5	5	0/5	0	100
3.62x10 ²	2.56	0	5	0	10	10	0/10	0	100

4) DBA/1J_P13_C1 (MLD₅₀ = 9.02 x 10³ pfu/mL)

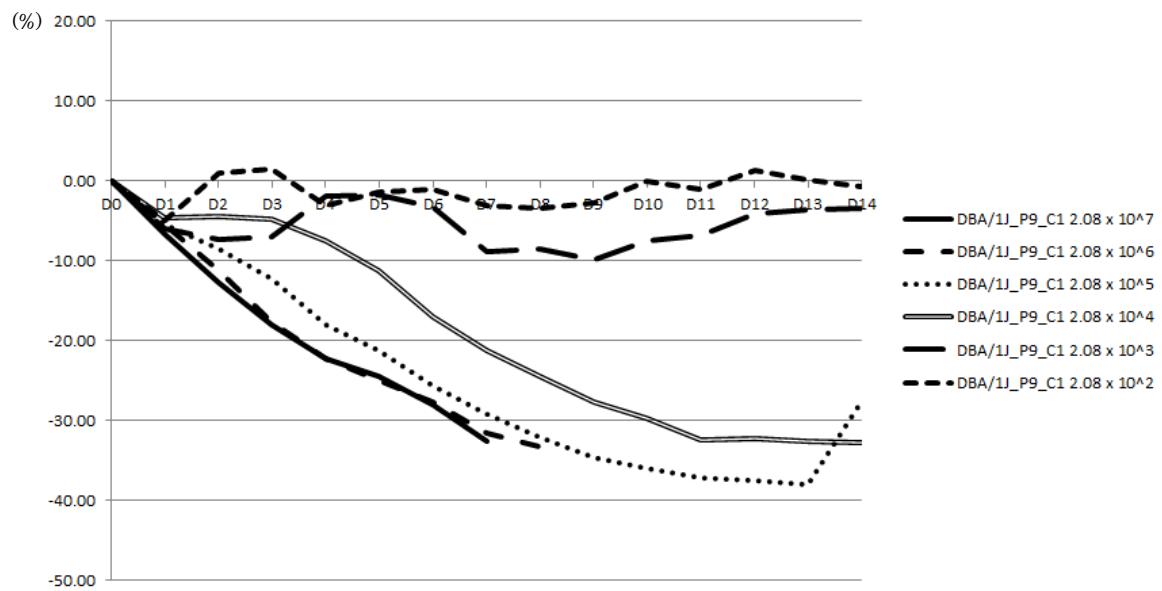
Titer (pfu/mL)	Log Titer	No. of Dead	No. of Survival	Cumulative			Mortality	% Mortality	% Survival
				Dead	Survival	Total			
3.78x10 ⁷	7.58	5	0	21	0	21	21/21	100	0
3.78x10 ⁶	6.58	5	0	16	0	16	16/16	100	0
3.78x10 ⁵	5.58	5	0	11	0	11	11/11	100	0
3.78x10 ⁴	4.58	5	0	6	0	6	6/6	100	0
3.78x10 ³	3.58	1	4	1	4	5	1/5	20	80
3.78x10 ²	2.58	0	5	0	9	9	0/9	0	100

Figure 2. Ratio of body weight loss_DBA/1J

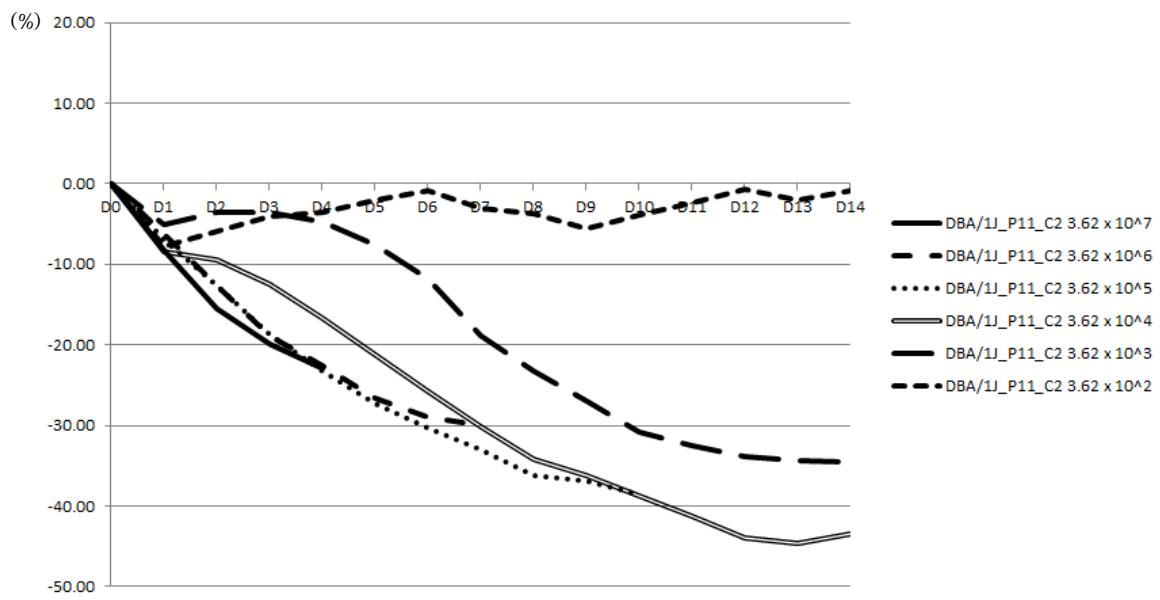
1) Wild Type H3N2



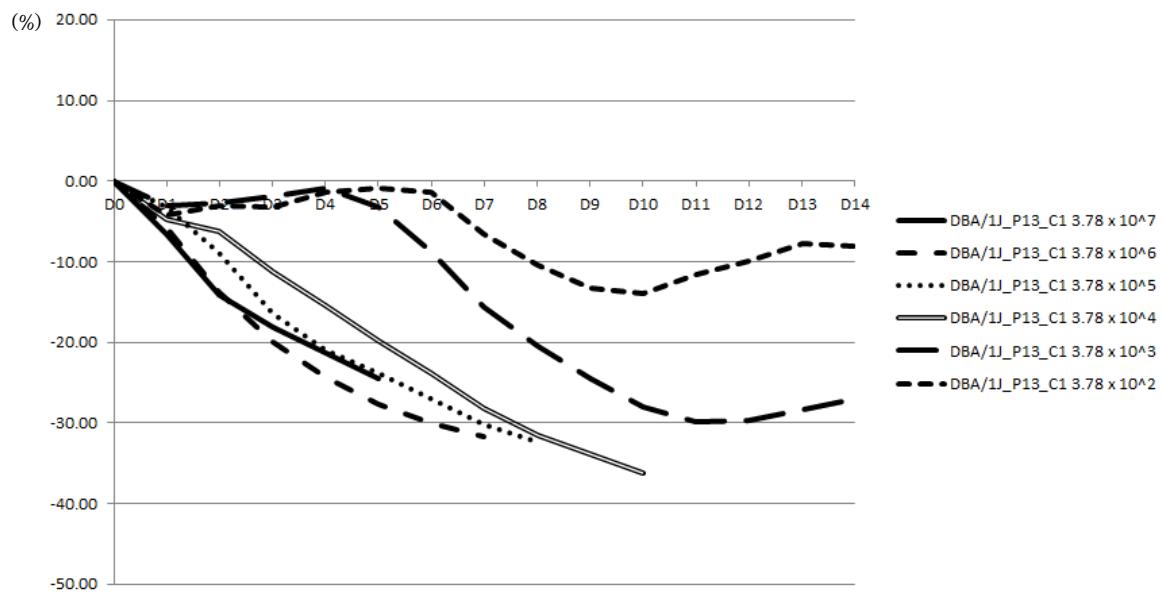
2) DBA/1J P9_C1



3) DBA/1J_P11_C2



4) DBA/1J_P13_C1



나. MID₅₀ 측정 (STEP 3.2)

(1) Balb/c Mouse에 Pathogenic Influenza Virus의 MID₅₀ 측정

Wild Type과 Balb/c mouse-adapted H3N2 Influenza virus에 대한 MID₅₀을 측정한 결과(Table 1 및 Table 2), Wild Type의 MID₅₀은 8.91×10^4 pfu/mL로 나타났다. Balb/c mouse-adapted H3N2 Influenza virus의 경우, Balb/c_P8_C2는 3.72×10 pfu/mL, Balb/c_P9_C2는 1.51×10 pfu/mL로 나타났다. 따라서 Balb/c mouse-adapted H3N2 Influenza virus가 Wild Type에 비해 약 2,390~5,900배 정도의 낮은 농도에서도 lung에 감염성을 보여주는 것으로 확인되었다.

Table 1. Experimental result for the determination of MID₅₀ with wild-type and Balb/c mouse-adapted H3N2 Influenza viruses in mice.

Virus	Challenge (pfu/mL)	ID				MID ₅₀ (pfu/mL)
		1	2	3	4	
Wild Type	2.79×10^7	+	+	+	+	8.91×10^4
	2.79×10^6	+	+	+	+	
	2.79×10^5	+	+	+	+	
	2.79×10^4	-	-	-	-	
	2.79×10^3	-	-	-	-	
	2.79×10^2	-	-	-	-	
Balb/c _P8_C2	7.88×10^5	+	+	+	+	3.72×10
	7.88×10^4	+	+	+	+	
	7.88×10^3	+	+	+	+	
	7.88×10^2	+	+	+	+	
	7.88×10	+	+	-	+	
	7.88	-	-	-	-	
Balb/c _P9_C2	4.78×10^5	+	+	+	+	1.51×10
	4.78×10^4	+	+	+	+	
	4.78×10^3	+	+	+	+	
	4.78×10^2	+	+	+	+	
	4.78×10	+	+	+	+	
	4.78	-	-	-	-	

Table 2. Arrangement of data used in computation of MID₅₀ titre by the method of Reed-Muench

1) Wild Type (MID₅₀ = 8.91 x 10⁴ pfu/mL)

Titer (pfu/mL)	Log Titer	No. of Infection	No. of Normal	Cumulative			Infectious Rate	% Infection	% Normal
				Infection	Normal	Total			
2.79x10 ⁷	7.45	4	0	12	0	12	12/12	100	0
2.79x10 ⁶	6.45	4	0	8	0	8	8/8	100	0
2.79x10 ⁵	5.45	4	0	4	0	4	4/4	100	0
2.79x10 ⁴	4.45	0	4	0	4	4	0/4	0	100
2.79x10 ³	3.45	0	4	0	8	8	0/8	0	100
2.79x10 ²	2.45	0	4	0	12	12	0/12	0	100

2) Balb/c_P8_C2 (MID₅₀ = 3.72 x 10 pfu/mL)

Titer (pfu/mL)	Log Titer	No. of Infection	No. of Normal	Cumulative			Infectious Rate	% Infection	% Normal
				Infection	Normal	Total			
7.88x10 ⁵	5.90	4	0	19	0	19	19/19	100	0
7.88x10 ⁴	4.90	4	0	15	0	15	15/15	100	0
7.88x10 ³	3.90	4	0	11	0	11	11/11	100	0
7.88x10 ²	2.90	4	0	7	0	7	7/7	100	0
7.88x10	1.90	3	1	3	1	4	3/4	75	25
7.88	0.90	0	4	0	5	5	0/5	0	100

3) Balb/c_P9_C2 (MID₅₀ = 1.51 x 10 pfu/mL)

Titer (pfu/ml)	Log Titer	No. of Infection	No. of Normal	Cumulative			Infectious Rate	% Infection	% Normal
				Infection	Normal	Total			
4.78x10 ⁵	5.68	4	0	20	0	20	20/20	100	0
4.78x10 ⁴	4.68	4	0	16	0	16	16/16	100	0
4.78x10 ³	3.68	4	0	12	0	12	12/12	100	0
4.78x10 ²	2.68	4	0	8	0	8	8/8	100	0
4.78x10	1.68	4	0	4	0	4	4/4	100	0
4.78	0.68	0	4	0	4	4	0/4	0	100

(2) DBA/1J Mouse에 Pathogenic Influenza Virus의 MID₅₀ 측정

Wild Type과 DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza virus에 대한 MID₅₀을 측정한 결과 (Table 3 및 Table 4), Wild Type의 MID₅₀ 은 2.79×10^4 pfu/mL로 나타났다. DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza virus의 경우, DBA/1J_P9_C1는 6.61×10 pfu/mL, DBA/1J_P11_C2는 1.69×10^2 pfu/mL, 그리고 DBA/1J_P13_C1는 8.19×10 pfu/mL로 나타났다. 따라서 DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza virus가 Wild Type에 비해서 약 165~422 배 정도의 낮은 농도에서도 lung에 감염성을 보여주는 것으로 확인되었다.

Table 3. Experimental result for the determination of MID₅₀ with wild-type and DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza viruses in mice.

Virus	Challenge (pfu/mL)	ID				MID ₅₀ (pfu/mL)
		1	2	3	4	
Wild Type	2.79×10^7	+	+	+	+	2.79×10^4
	2.79×10^6	+	+	+	+	
	2.79×10^5	+	+	+	+	
	2.79×10^4	+	-	+	-	
	2.79×10^3	-	-	-	-	
	2.79×10^2	-	-	-	-	
DBA/1J P9_C1	2.08×10^4	+	+	+	+	6.61×10
	2.08×10^3	+	+	+	+	
	2.08×10^2	+	+	-	+	
	2.08×10	-	-	-	+	
	2.08	-	-	-	-	
DBA/1J P11_C2	3.62×10^4	+	+	+	+	1.69×10^2
	3.62×10^3	+	+	+	+	
	3.62×10^2	+	-	+	+	
	3.62×10	-	-	-	-	
	3.62	-	-	-	-	
DBA/1J P13_C1	3.78×10^4	+	+	+	+	8.19×10
	3.78×10^3	+	+	+	+	
	3.78×10^2	+	+	+	+	
	3.78×10	+	-	-	-	
	3.78	-	-	-	-	

Table 4. Arrangement of data used in computation of MID₅₀ titre by the method of Reed-Muench

1) Wild Type (MID₅₀ = 2.79 x 10⁴ pfu/mL)

Titer (pfu/mL)	Log Titer	No. of Infection	No. of Normal	Cumulative			Infectious Rate	% Infection	% Normal
				Infection	Normal	Total			
2.79x10 ⁷	7.45	4	0	14	0	14	14/14	100	0
2.79x10 ⁶	6.45	4	0	10	0	10	10/10	100	0
2.79x10 ⁵	5.45	4	0	6	0	6	6/6	100	0
2.79x10 ⁴	4.45	2	2	2	2	4	2/4	50	50
2.79x10 ³	3.45	0	4	0	6	6	0/6	0	100
2.79x10 ²	2.45	0	4	0	10	10	0/10	0	100

2) DBA/1J P9_C1 (MID₅₀ = 6.61 x 10 pfu/mL)

Titer (pfu/mL)	Log Titer	No. of Infection	No. of Normal	Cumulative			Infectious Rate	% Infection	% Normal
				Infection	Normal	Total			
2.08x10 ⁴	4.62	4	0	12	0	12	12/12	100	0
2.08x10 ³	3.62	4	0	8	0	8	8/8	100	0
2.08x10 ²	2.62	3	1	4	1	5	4/5	80	20
2.08x10	1.62	1	3	1	4	5	1/5	20	80
2.08	0.62	0	4	0	8	8	0/8	0	100

3) DBA/1J P11_C2 (MID₅₀ = 1.69 x 10² pfu/mL)

Titer (pfu/mL)	Log Titer	No. of Infection	No. of Normal	Cumulative			Infectious Rate	% Infection	% Normal
				Infection	Normal	Total			
3.62x10 ⁴	4.56	4	0	11	0	11	11/11	100	0
3.62x10 ³	3.56	4	0	7	0	7	7/7	100	0
3.62x10 ²	2.56	3	1	3	1	4	3/4	75	25
3.62x10	1.56	0	4	0	5	5	0/5	0	100
3.62	0.56	0	4	0	9	9	0/9	0	100

4) DBA/1J P13_C1 (MID₅₀ = 8.19 x 10 pfu/mL)

Titer (pfu/mL)	Log Titer	No. of Infection	No. of Normal	Cumulative			Infectious Rate	% Infection	% Normal
				Infection	Normal	Total			
3.78x10 ⁴	4.58	4	0	13	0	13	13/13	100	0
3.78x10 ³	3.58	4	0	9	0	9	9/9	100	0
3.78x10 ²	2.58	4	0	5	0	5	5/5	100	0
3.78x10	1.58	1	3	1	3	4	1/4	25	75
3.78	0.58	0	4	0	7	7	0/7	0	100

다. 혈액학 및 혈액생화학 측정, 조직병리(H&E, IHC) (STEP 3.3)

(1) Balb/c에서 혈액학 및 혈액생화학 측정, 조직병리(H&E, IHC)

Balb/c mice에서 Wild Type 및 Balb/c mouse-adapted H3N2 Influenza virus에 의한 병리학적 평가를 위하여 모든 실험동물을 감염시켰고, 감염시점으로부터 0일차(감염 전), 1, 2, 3, 4일 차에 부검을 진행하였다. 부검 시 복대정맥에서 채혈하여 혈액학 및 혈액생화학 검사를 실시하였고, 주요장기를 적출하여 조직병리학적 검사를 실시하였다. 적출한 장기는 폐, 기관지, 심장, 간, 신장, 비장, 뇌, 췌장, GI Tract이며, 이 중 췌장과 GI Tract을 제외한 나머지 장기는 무게를 측정하였고, 적출한 모든 조직에 대해 Hematoxylin & Eosin 염색을 진행하였으며, 폐와 기관지에 대해서는 면역조직화학염색을 실시하였다. 감염에 사용된 모든 virus titer는 4×10^6 pfu/mL 이었다.

혈액학 측정 결과(Table 1), Wild Type은 neutrophil 수치(%)가 감염 1일차에 다소 상승하였고 이후 관찰기간 동안 정상범위 내로 측정된 반면, Balb/c_P8_C2와 Balb/c_P9_C2는 1일차에 Wild Type과 유사한 수준으로 측정되었다가 2일차에 크게 상승하여 감염 3일차에 평균 60% 이상으로 가장 높게 측정되었다. Balb/c_P8_C2와 Balb/c_P9_C2에서 RBC, Hb 및 Hct 항목의 유의적인 증가는 급격한 체중감소에 따른 상대적인 변화로 판단된다.

생화학 측정결과(Table 2), Balb/c_P8_C2와 Balb/c_P9_C2 감염군에서 감염 4일차에 간에 대한 검사항목인 AST, ALT, ALP가 유의적으로 증가하였고, 체중감소와 연계된 glucose, triglyceride 수치의 변화가 감염 2일차부터 관찰되었다. 또한 심한 체중감소와 동반된 탈수로 인한 상대적인 cholesterol의 변화도 관찰되었다.

절대 장기무게 측정결과(Table 3)에서는 Balb/c_P8_C2와 Balb/c_P9_C2 감염군에서 폐(기관지 포함)가 감염 4일차에 유의적으로 증가하였고, 이외의 장기에서 투여 전 대비 무게가 감소한 현상은 급격한 체중감소에 따른 상대적인 변화로 판단된다. 상대 장기무게 측정결과(Table 4)에서는 Balb/c_P8_C2와 Balb/c_P9_C2 감염군에서 폐무게가 감염 3일차에 유의적으로 증가하였다.

조직병리학적 검사 결과, Hematoxylin & Eosin 염색(Figure 1) 및 Immunohistochemistry data(Figure 2 & 3)에서 보여주고 있다.

H&E 염색상의 조직학적 검경결과(Figure 1), Balb/c mouse-adapted H3N2 Influenza virus를 감염시킨 mouse의 폐 조직에서 Influenza virus 감염 시 lung 및 trachea tissue에서 관찰되는 소견인 염증세포의 증가, 호흡상피세포의 손상 및 괴사, airway 내 삼출물 등이 관찰되었다. 특히 기관지 및 세기관지 주변 또는 혈관주변에서 주되게 염증세포가 관찰되었고, 염증세포의 분포는 모든 폐엽에서 고르게 나타나지 않았으며 병변의 정도에서 개체차이가 크게

나타났다. 반면 Wild Type H3N2 virus를 감염시킨 mouse 의 폐 조직은 기관지 주변에 부분적으로 약하게 병변이 관찰되거나 정상개체의 폐 상태와 유사하였다.

Influenza A(H3N2)에 대한 Immunohistochemistry(Figure 2 & 3)에서 Wild Type H3N2 virus를 감염시킨 mouse의 폐 조직에서는 면역염색반응이 tracheal epithelium에서 관찰되었고, 감염 2일차에서는 부분적으로 관찰되었으나 1일차와 3일차에서는 거의 관찰되지 않았고, 4일차에서는 전혀 관찰되지 않았다. 이는 H&E 염색상에서 관찰된 폐조직의 병변이 유지되어도 virus clearance가 진행됨을 의미한다고 판단된다. 반면 Balb/c mouse-adapted H3N2 Influenza virus에 감염된 폐 조직에서는 감염 1일차부터 DAB 발색이 관찰되었는데, 기관지 내 뿐만 아니라 폐포에서도 관찰되었으며 감염 2일차에서 강하게 관찰되는 면역반응은 감염 4일차까지 유지되었고 일부개체는 더 강한 반응정도가 관찰되었다.

Table 1. Hematology_Balb/c

Virus	Dai	Item	WBC $\times 10^3/\mu\text{L}$	N %	L %	M %	E %	B %	RBC $\times 10^6/\mu\text{L}$	Hb g/dL	Hct %	MCV	MCH fl	MCHC g/dL (%)	PLT $\times 10^3/\mu\text{L}$
Balb/c_WT	D0	Mean	3.27	17.7	77.8	3.00	1.394	0.105	9.6	14.7	38.3	39.9	15.3	38.5	903
		SD	1.07	2.6	2.7	1.35	0.337	0.073	0.2	0.2	0.7	0.1	0.2	0.4	70
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	2.08 *	29.8 **	67.9 *	1.52	0.741	0.069	9.2	14.2	36.9	40.0	15.4	38.6	1054 **
		SD	0.31	8.3	7.9	0.80	0.764	0.076	0.4	0.5	1.3	0.3	0.2	0.3	90
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	3.11	17.5	78.9	2.20	1.377	0.094	9.7	14.8	39.1	40.4	15.3	37.8 *	826
		SD	0.52	2.2	3.3	1.39	0.729	0.121	0.5	0.6	1.7	0.3	0.2	0.3	36
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	2.70	22.0	74.1	3.12	0.752	0.023	9.7	14.7	38.5	39.9	15.2	38.2	853
		SD	0.71	5.9	4.8	0.93	0.647	0.040	0.2	0.3	0.6	0.6	0.1	0.2	54
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	2.44	22.5	74.0	2.27	1.174	0.004	9.6	14.5	38.3	39.8	15.0 *	37.8 **	823
		SD	0.40	5.4	6.9	1.46	0.446	0.009	0.3	0.4	1.0	0.4	0.2	0.3	31
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Balb/c_P8_C2	D0	Mean	2.42	15.6	81.4	2.43	0.489	0.079	9.9	15.1	39.2	39.8	15.4	38.6	941
		SD	0.29	1.6	2.7	1.21	0.213	0.077	0.3	0.5	0.9	0.3	0.1	0.4	52
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	2.14	34.3 **	62.5 *	2.57	0.537	0.041	9.9	15.1	39.6	39.8	15.2	38.2	848
		SD	0.48	13.8	14.2	0.64	0.460	0.033	0.3	0.3	0.9	0.4	0.2	0.3	51
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	3.23	59.3 ***	38.2 ***	2.17	0.300	0.029	10.1	15.4	40.1	39.6	15.2	38.4	896
		SD	0.61	7.2	7.9	0.83	0.219	0.046	0.2	0.3	0.6	0.4	0.1	0.3	75
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	2.02	60.3 ***	38.2 ***	1.25	0.283	0.000 *	10.7 **	16.3 **	42.2 ***	39.4	15.2	38.7	934
		SD	0.58	7.1	7.6	1.13	0.224	0.000	0.5	0.6	1.7	0.3	0.1	0.2	55
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	1.38 **	47.6 ***	47.5 ***	4.61	0.278	0.007	11.1 ***	16.7 ***	43.4 ***	39.2 *	15.0 **	38.3	1011
		SD	0.39	5.9	8.2	3.11	0.091	0.015	0.3	0.5	1.1	0.3	0.2	0.4	104
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Balb/c_P9_C2	D0	Mean	3.21	13.0	84.4	2.00	0.558	0.066	9.6	14.7	38.2	40.0	15.4	38.5	944
		SD	0.31	3.2	3.6	0.75	0.724	0.056	0.4	0.6	1.3	0.3	0.2	0.2	68
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	3.06	29.9 **	67.0 **	2.42	0.655	0.094	9.6	14.8	38.5	40.2	15.5	38.4	860
		SD	0.92	7.1	8.1	1.28	0.301	0.136	0.2	0.2	0.9	0.4	0.2	0.4	52
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	3.06	61.8 ***	35.4 ***	2.34	0.343	0.008	10.5 ***	15.9 ***	41.7 ***	39.6	15.2	38.3	1082 *
		SD	0.58	10.6	10.7	0.58	0.166	0.019	0.3	0.2	0.6	0.6	0.3	0.2	41
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	1.81 **	63.6 ***	35.1 ***	1.07	0.275	0.015	10.6 ***	16.0 ***	41.1 **	38.9 **	15.2	39.1 **	877
		SD	0.43	3.2	2.8	0.69	0.144	0.033	0.5	0.7	1.8	0.5	0.1	0.3	85
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	1.73 ***	59.6 ***	36.8 ***	2.99	0.494	0.041	11.2 ***	16.9 ***	43.6 ***	38.9 **	15.1	38.8	908
		SD	0.18	7.0	8.0	1.12	0.288	0.075	0.1	0.2	0.5	0.3	0.2	0.2	73
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Comparisons to control using ANOVA and Dunnett's multiple comparison test

Significant when compared with D0: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.00

Table 2. Serum chemistry_Balb/c

Virus	Day	Item	TP Units	ALB g/dl	GLB g/dl	A/G Ratio	GLU mg/dl	AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	BUN mg/dl	CREA mg/dl	CHO mg/dl	TG mg/dl	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L
Balb/c_WT	D0	Mean	3.9	3.0	0.9	3.4	205	54	29	84	21.6	0.2	65	41	151	4.2	112
		SD	0.2	0.2	0.1	0.2	21	14	8	9	1.7	0.1	7	14	2	0.3	2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	4.1	3.1	1.0	3.1 **	199	57	27	78	21.2	0.3	71	31	150	4.7	112
		SD	0.1	0.1	0.0	0.1	26	11	2	4	2.0	0.0	6	2	1	0.4	1
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	4.0	3.1	0.8	3.7 ***	181	54	28	77	21.3	0.3	73	47	152	4.5	115 *
		SD	0.1	0.1	0.1	0.2	24	9	4	11	2.5	0.0	2	13	1	0.5	1
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	4.4 ***	1.6 ***	2.8 ***	0.6 ***	162 **	58	31	90	20.1	0.4 ***	69	35	152	4.3	115 *
		SD	0.1	0.1	0.1	0.0	14	4	4	7	3.3	0.0	7	7	1	0.2	1
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	4.3 ***	1.6 ***	2.8 ***	0.6 ***	173	71	41	78	19.9	0.4 *	64	39	152	4.5	114
		SD	0.2	0.1	0.1	0.0	9	15	13	3	1.2	0.1	3	8	1	0.4	2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Balb/c_P8_C2	D0	Mean	4.1	3.1	1.0	3.3	166	47	26	84	20.6	0.3	68	36	152	4.3	113
		SD	0.0	0.1	0.1	0.3	14	2	1	7	4.0	0.0	2	11	1	0.2	2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	3.9 *	3.0	0.9	3.3	189	59	27	73	19.8	0.3	64	24 *	149 **	4.6	112
		SD	0.2	0.1	0.1	0.4	26	12	8	8	1.5	0.0	3	4	0	0.5	1
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	4.4 *	3.2	1.2 **	2.7 **	126 **	67	37	63 **	11.5 ***	0.3	93 ***	14 ***	153	5.1 *	108 ***
		SD	0.2	0.1	0.1	0.2	18	14	6	7	0.4	0.0	4	3	2	0.6	1
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	4.8 ***	1.6 ***	3.2 ***	0.5 ***	136	77	44	80	14.6 ***	0.3	119 ***	25 *	153	4.5	107 ***
		SD	0.1	0.1	0.1	0.0	18	7	14	5	1.1	0.0	10	6	1	0.3	2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	4.7 ***	1.6 ***	3.1 ***	0.5 ***	124 **	96 **	57 **	101 *	15.5 **	0.3	106 ***	13 ***	154	4.9	108 ***
		SD	0.1	0.1	0.1	0.0	12	39	26	16	1.1	0.0	11	3	2	0.5	1
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Balb/c_P9_C2	D0	Mean	3.9	3.0	0.9	3.4	187	53	30	86	21.7	0.3	60	36	151	4.3	112
		SD	0.3	0.2	0.1	0.2	28	6	5	3	3.2	0.0	3	11	1	0.2	2
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D1	Mean	3.9	3.0	0.9	3.2 *	203	66	32	83	24.5	0.2	63	38	150	4.1	113
		SD	0.1	0.1	0.0	0.1	25	23	16	6	5.9	0.0	6	24	1	0.6	1
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D2	Mean	4.4 ***	3.2	1.2 ***	2.6 ***	165	62	37	66 **	11.5 ***	0.3	99 ***	18	153 *	4.8	108
		SD	0.1	0.1	0.1	0.1	25	10	6	5	0.7	0.0	7	4	1	0.4	1
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D3	Mean	5.0 ***	1.7 ***	3.3 ***	0.5 ***	128 ***	76	41	75	13.9 **	0.3	126 ***	28	153 **	4.2	105 **
		SD	0.1	0.0	0.1	0.0	12	5	1	5	0.6	0.0	3	5	1	0.2	3
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D4	Mean	4.8 ***	1.7 ***	3.1 ***	0.5 ***	123 ***	84 **	51 **	117 ***	15.7 *	0.3	114 ***	15	1523 **	4.8	107 *
		SD	0.1	0.0	0.1	0.0	13	17	12	16	2.6	0.0	22	8	1	1.0	5
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Comparisons to control using ANOVA and Dunnett's multiple comparison test

Significant when compared with D0: * p < 0.05 , ** p < 0.01, *** p < 0.00

Table 3. Absolute organ weight_Balb/c

Virus	Item	Body Weight Units	Brain g	Lung g	Heart g	Liver g	Kidney g	Spleen g
Balb/c_WT	D0	Mean	20.58	0.4664	0.1882	0.1310	1.0244	0.2925
		SD	0.61	0.0227	0.0182	0.0151	0.0657	0.0174
		N	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	20.07	0.4513	0.2011	0.1193	1.0069	0.2687
		SD	0.56	0.0107	0.0172	0.0052	0.0674	0.0054
		N	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	20.30	0.4425 *	0.1546 *	0.1012 ***	0.9271	0.2420 ***
		SD	0.44	0.0042	0.0103	0.0041	0.0595	0.0163
		N	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	18.48 **	0.4241 ***	0.1507 **	0.0924 ***	0.8036 ***	0.2088 ***
		SD	1.28	0.0098	0.0124	0.0014	0.0647	0.0121
		N	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	19.02 *	0.4332 **	0.1593 *	0.0997 ***	0.8615 ***	0.2323 ***
		SD	0.95	0.0165	0.0221	0.0117	0.0276	0.0275
		N	5	5	5	5	5	5
Balb/c_P8_C2	D0	Mean	20.23	0.4652	0.1777	0.1170	0.9303	0.2639
		SD	0.64	0.0164	0.0041	0.0146	0.0487	0.0119
		N	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	17.64 ***	0.4473	0.1851	0.1037	0.8116 ***	0.2433
		SD	0.87	0.0128	0.0179	0.0095	0.0406	0.0170
		N	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	16.26 ***	0.4140 ***	0.1649	0.0897 ***	0.7409 ***	0.1914 ***
		SD	0.83	0.0128	0.0108	0.0066	0.0579	0.0120
		N	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	14.35 ***	0.4054 ***	0.1842	0.0864 ***	0.6809 ***	0.1778 ***
		SD	0.56	0.0075	0.0100	0.0080	0.0328	0.0126
		N	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	14.47 ***	0.4245 ***	0.2319 ***	0.0968 *	0.6765 ***	0.2031 ***
		SD	0.59	0.0144	0.0324	0.0098	0.0192	0.0115
		N	5	5	5	5	5	5
Balb/c_P9_C2	D0	Mean	20.00	0.4542	0.1849	0.1103	0.9168	0.2545
		SD	0.67	0.0095	0.0153	0.0025	0.0412	0.0101
		N	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	17.64 ***	0.4525	0.1964	0.1017	0.8655	0.2392
		SD	0.53	0.0198	0.0102	0.0068	0.0788	0.0335
		N	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	16.10 ***	0.4028 ***	0.1604	0.0904 ***	0.7338 ***	0.1856 ***
		SD	0.47	0.0046	0.0086	0.0068	0.0210	0.0105
		N	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	16.13 ***	0.4187 ***	0.1982	0.0949 **	0.7474 ***	0.2053 **
		SD	1.09	0.0086	0.0162	0.0063	0.0454	0.0174
		N	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	14.07 ***	0.4040 ***	0.2440 ***	0.0881 ***	0.6577 ***	0.1904 ***
		SD	0.43	0.0122	0.0387	0.0082	0.0279	0.0117
		N	5	5	5	5	5	5

Comparisons to control using ANOVA and Dunnett's multiple comparison test

Significant when compared with D0: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.00

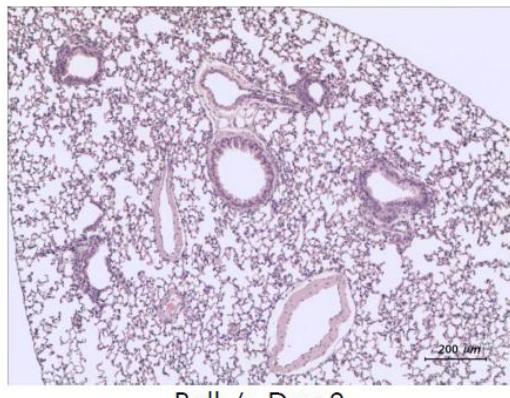
Table 4. Relative organ weight_Balb/c

Virus	Item	Body Weight Units	Brain %	Lung	Heart	Liver	Kidney	Spleen
				%	%	%	%	%
Balb/c_WT	D0	Mean	20.58	2.27	0.91	0.64	4.98	1.42
		SD	0.61	0.13	0.09	0.06	0.31	0.08
		N	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	20.07	2.25	1.00 *	0.59	5.01	1.34
		SD	0.56	0.09	0.07	0.02	0.24	0.05
		N	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	20.30	2.18	0.76	0.50 ***	4.57 *	1.19 ***
		SD	0.44	0.04	0.04	0.02	0.23	0.06
		N	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	18.48	2.30	0.82	0.50 ***	4.35 ***	1.13 ***
		SD	1.28	0.12	0.03	0.03	0.11	0.06
		N	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	19.02	2.28	0.84	0.52 ***	4.53 *	1.22 **
		SD	0.95	0.10	0.12	0.04	0.13	0.04
		N	5	5	5	5	5	5
Balb/c_P8_C2	D0	Mean	20.23	2.30	0.88	0.58	4.60	1.31
		SD	0.64	0.07	0.03	0.06	0.17	0.09
		N	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	17.64	2.54 **	1.05	0.59	4.60	1.38
		SD	0.87	0.07	0.05	0.04	0.16	0.08
		N	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	16.26	2.55 **	1.01	0.55	4.55	1.18
		SD	0.83	0.08	0.06	0.02	0.17	0.02
		N	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	14.35	2.83 ***	1.28 ***	0.60	4.75	1.24
		SD	0.56	0.13	0.08	0.05	0.25	0.10
		N	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	14.47	2.94 ***	1.61 ***	0.67 *	4.68	1.41
		SD	0.59	0.15	0.26	0.07	0.19	0.13
		N	5	5	5	5	5	5
Balb/c_P9_C2	D0	Mean	20.00	2.27	0.92	0.55	4.58	1.27
		SD	0.67	0.08	0.08	0.02	0.15	0.06
		N	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	17.64	2.57 **	1.11	0.58	4.90 *	1.36
		SD	0.53	0.12	0.07	0.04	0.30	0.19
		N	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	16.10	2.50 *	1.00	0.56	4.56	1.15
		SD	0.47	0.05	0.06	0.03	0.12	0.05
		N	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	16.13	2.60 ***	1.23 **	0.59	4.64	1.27
		SD	1.09	0.14	0.07	0.04	0.09	0.03
		N	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	14.07	2.87 ***	1.73 ***	0.63 *	4.67	1.35
		SD	0.43	0.14	0.27	0.05	0.11	0.06
		N	5	5	5	5	5	5

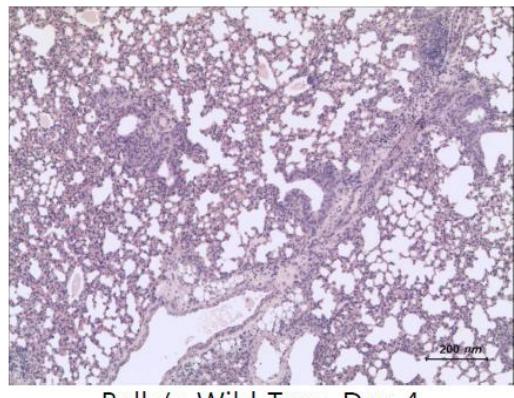
Comparisons to control using ANOVA and Dunnett's multiple comparison test

Significant when compared with D0: * p < 0.05 , ** p < 0.01, *** p < 0.00

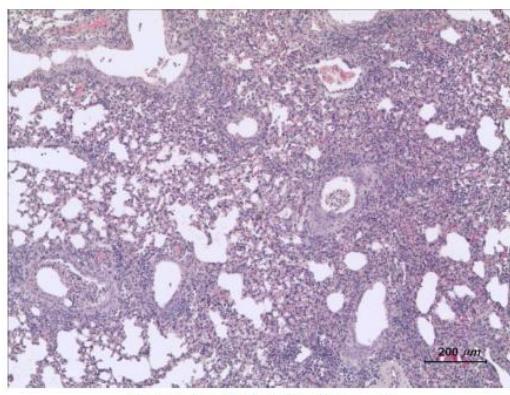
Figure 1. Histopathological findings of lung tissue_Hematoxylin & Eosin



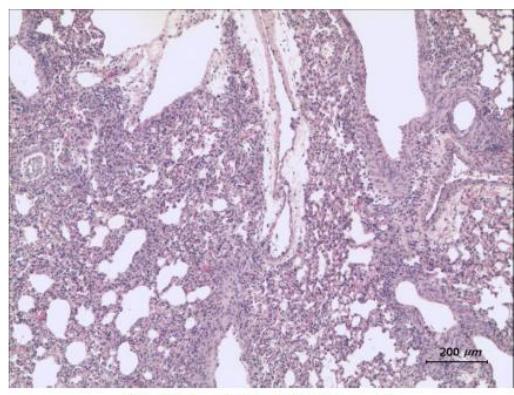
Balb/c Day 0



Balb/c_Wild Type_Day 4



Balb/c_P8_C2_Day 4



Balb/c_P9_C2_Day 4

Figure 2. Histopathological findings of lung tissue_Immunohistochemistry

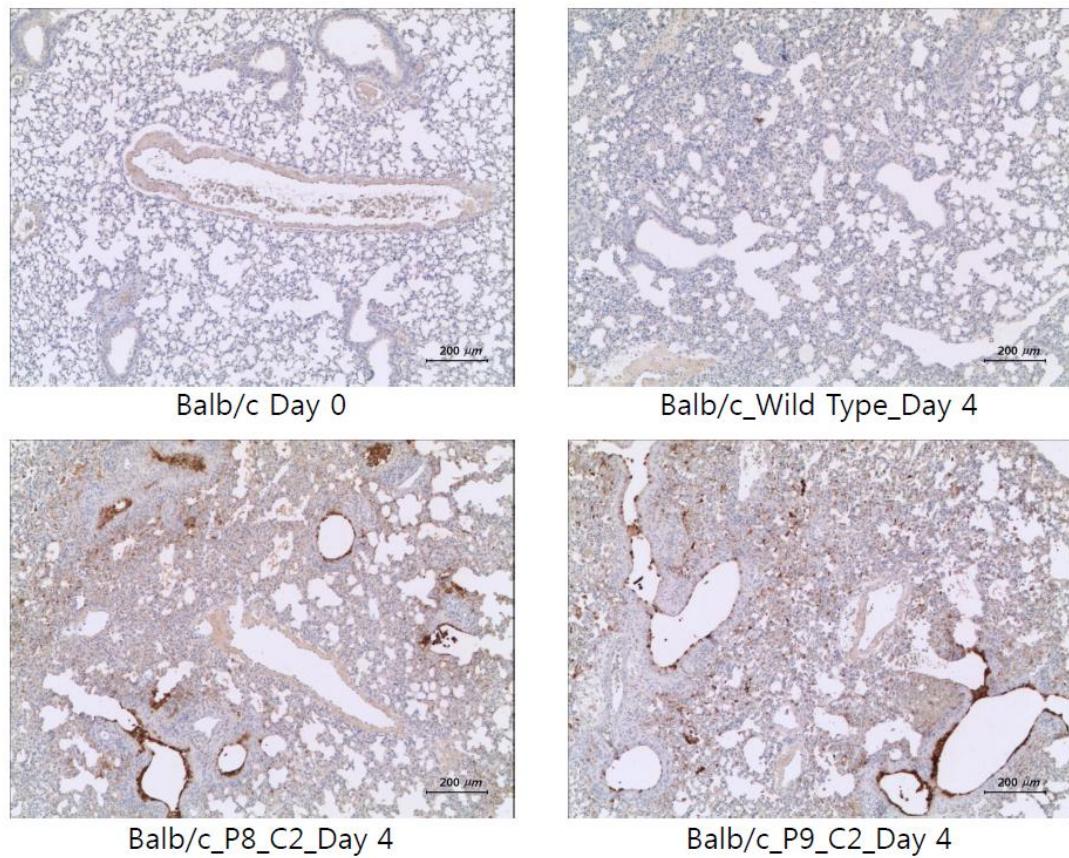
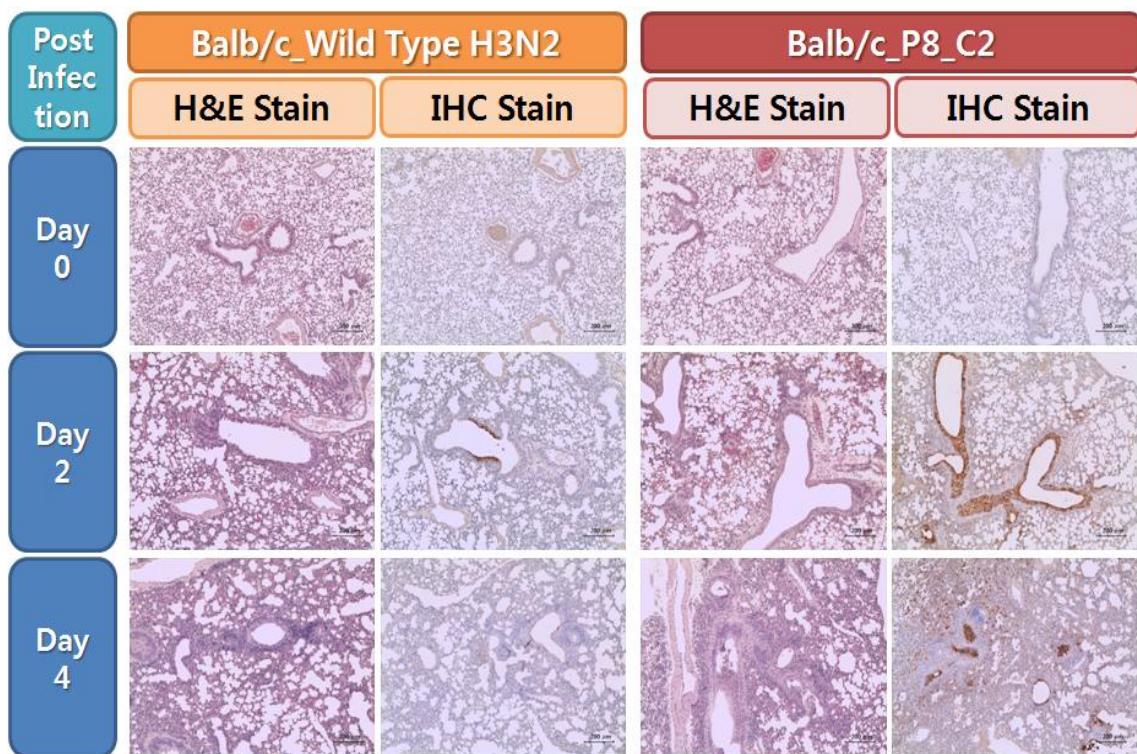


Figure 3. Histopathologic findings on H&E and IHC staining with lung tissues of Balb/c mouse infected with wild- and mutant-Influenza virus for four days



(2) DBA/1J에서 혈액학 및 혈액생화학 측정, 조직병리(H&E, IHC)

DBA/1J mice에서 Wild Type 및 DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza virus에 의한 병리학적 평가를 위하여 모든 실험동물을 감염시켰고, 감염시점으로부터 0일차(감염 전), 1, 2, 3, 4 일차에 부검을 진행하였다. 부검 시 복대정맥에서 채혈하여 혈액학 및 혈액생화학 검사를 실시하였고, 주요장기를 적출하여 조직병리학적 검사를 실시하였다. 적출한 장기는 폐, 기관지, 심장, 간, 신장, 비장, 뇌, 췌장, GI Tract이며, 이 중 췌장과 GI tract을 제외한 나머지 장기는 무게를 측정하였고, 적출한 모든 조직에 대해 Hematoxylin & Eosin 염색을 진행하였으며, 폐와 기관지에 대해서는 면역조직화학염색을 실시하였다. 감염에 사용된 모든 virus Titer는 4×10^6 pfu/mL 이었다.

혈액학 측정 결과(Table 5), Wild Type은 neutrophil 수치가 관찰기간 동안 정상범위 내로 측정된 반면, DBA/1J_P9_C1, DBA/1J_P11_C2 및 DBA/1J_P13_C1은 감염 2일차부터에 크게 증가하여 감염 3일차에 평균 70% 이상으로 가장 높게 측정되어 4일차까지도 유사하게 측정되었다. DBA/1J_P9_C1, DBA/1J_P11_C2 및 DBA/1J_P13_C1에서 Hb 및 Hct 항목의 유의적인 증가는 급격한 체중감소에 따른 상대적인 변화로 판단된다.

생화학 측정결과(Table 6), DBA/1J_P9_C1, DBA/1J_P11_C2 및 DBA/1J_P13_C1 감염군에서 감염 4일차에 간에 대한 검사항목인 AST, ALT가 유의적으로 증가하였고, 체중감소와 연계된 glucose 수치의 변화가 DBA/1J_P9_C1, DBA/1J_P11_C2 및 DBA/1J_P13_C1 감염 3일차부터 관찰되었고, triglyceride의 감소가 DBA/1J_P9_C1 감염군에서 두드러졌다. 또한 심한 체중감소와 동반된 탈수로 인한 상대적인 cholesterol의 변화도 DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza virus 감염군에서 관찰되었다.

절대 장기무게 측정결과(Table 7)에서는 DBA/1J_P9_C1 및 DBA/1J_P13_C1 감염군에서 폐(기관지포함)가 감염 2일차부터, DBA/1J_P11_C2 감염군은 감염 3일차부터 유의적으로 증가하였고, 이외의 장기에서 투여 전 대비 무게가 다소 감소한 현상은 급격한 체중감소에 따른 상대적인 변화로 판단된다. 상대 장기무게 측정결과(Table 8)에서는 DBA/1J_P9_C1, DBA/1J_P11_C2 및 DBA/1J_P13_C1 감염군에서 폐무게가 감염 2일차부터 유의적으로 증가하였다.

조직병리학적 검사 결과, Hematoxylin & Eosin 염색(Figure 4) 및 Immunohistochemistry data(Figure 5 & 6)에서 보여주고 있다.

DBA/1J mouse의 H&E 염색상의 조직학적 검경결과(Figure 4)도 Balb/c와 유사한 경향을 관찰할 수 있었다. DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza virus를 감염시킨 mouse의 폐 조직에서도 염증세포의 증가, 호흡상피세포의 손상 및 괴사, airway 내 삼출물, 기관지 및 세기 관지 주변 또는 혈관주변에서 주되게 염증세포가 관찰되었고, 염증세포의 분포는 모든 폐엽

에서 고르게 나타나지 않았으며 병변의 정도에서 개체차이가 크게 나타났다. 반면 Wild Type H3N2 virus를 감염시킨 mouse 의 폐 조직은 Balb/c mouse와 마찬가지로 기관지 주변에 부분적으로 약하게 병변이 관찰되거나 정상개체의 폐 상태와 유사하였다.

Immunohistochemistry(Figure 5 & 6)에서도 Balb/c-adapted H3N2 Influenza virus에서 관찰된 반응과 유사하게 DBA/1J-adapted H3N2 Influenza virus에 감염된 폐조직에서 DAB가 강하게 발색되었고, 기관과 폐포에서도 관찰되었다. 역시 1일차부터 DAB 발색이 관찰되었으며, 감염 2일차에서 면역반응이 강하게 관찰되었다. 그러나 Wild Type H3N2 virus를 감염시킨 mouse의 폐 조직에서는 면역염색반응이 tracheal epithelium에서 감염 2일차에서만 부분적으로 관찰되었고, 이외의 관찰일에는 거의 나타나지 않았다.

Table 5. Hematology_DBA/1J

Virus	Day	Item	WBC x10 ³ /μl	N %	L %	M %	E %	B %	RBC x10 ⁶ /μl	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl (%)	PLT x10 ³ /μl
DBA/1J_WT	D0	Mean	2.49	25.7	70.2	2.38	1.674	0.015	9.2	12.4	34.6	37.8	13.5	35.8	686
		SD	0.58	9.6	8.7	2.01	0.509	0.021	0.2	0.2	0.5	0.5	0.3	0.6	28
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	3.43	35.2	60.5	3.08	1.218	0.009	10.1 ***	13.8 ***	37.3 ***	36.8 **	13.6	37.0 **	734
		SD	0.63	3.7	3.7	1.75	1.403	0.021	0.5	0.7	1.8	0.4	0.1	0.1	62
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	2.98	28.9	63.7	5.20	2.063	0.030	9.9 **	13.3 **	36.8 **	37.0 *	13.3	36.0	688
		SD	0.71	6.2	4.6	2.11	0.964	0.041	0.3	0.4	0.7	0.5	0.3	0.6	145
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	3.39	24.4	67.0	7.79 ***	0.732	0.121 *	9.8 *	13.4 **	36.5 *	37.4	13.7	36.6 *	818
		SD	0.52	4.6	5.8	2.08	0.777	0.109	0.3	0.3	0.6	0.6	0.2	0.5	91
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	4.39 *	26.0	69.4	3.02	1.491	0.021	9.9 **	13.1 *	36.5 *	37.0 *	13.3	35.9	660
		SD	1.76	5.2	4.9	0.94	0.818	0.029	0.3	0.2	0.5	0.4	0.3	0.5	209
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DBA/1J_P9_C1	D0	Mean	2.14	33.8	62.8	1.89	1.526	0.008	9.4	12.4	35.1	37.3	13.1	35.3	733
		SD	0.42	5.0	4.1	1.01	0.507	0.017	0.4	0.6	1.3	0.3	0.2	0.6	92
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	5.06 ***	21.7	74.8	2.04	1.471	0.026	10.6 ***	14.3 ***	39.1 ***	36.9	13.5 *	36.6 ***	809
		SD	1.30	3.6	4.0	1.03	0.495	0.024	0.4	0.4	0.9	0.5	0.3	0.4	29
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	2.26	73.3 ***	23.2 ***	2.81	0.580	0.046	10.8 ***	14.6 ***	39.3 ***	36.6 *	13.6 **	37.1 ***	842
		SD	0.54	11.6	12.7	1.72	0.343	0.083	0.3	0.4	1.0	0.3	0.1	0.5	90
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	1.83	54.8 ***	33.9 ***	10.07 **	0.756	0.409 *	11.8 ***	16.0 ***	42.7 ***	36.1 ***	13.5 *	37.5 ***	959 **
		SD	1.02	13.9	9.7	3.64	1.066	0.286	0.3	0.3	0.8	0.4	0.1	0.3	55
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	1.55	73.6 ***	11.1 ***	14.36 ***	0.582	0.338	12.5 ***	16.3 ***	44.5 ***	35.8 ***	13.1	36.5 ***	1025 ***
		SD	0.80	10.0	4.1	7.15	0.548	0.354	0.4	0.4	1.2	0.5	0.2	0.4	146
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DBA/1J_P11_C2	D0	Mean	2.35	30.2	66.8	1.16	1.813	0.010	10.0	13.0	37.0	37.1	13.1	35.3	607
		SD	0.80	12.7	13.3	0.38	0.733	0.014	0.3	0.5	1.1	0.3	0.1	0.2	180
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	5.93 ***	33.1	64.1	1.73	1.003	0.035	10.9	14.6	39.6	36.5	13.4 *	36.8 ***	831
		SD	1.66	11.3	10.8	1.50	0.530	0.078	0.6	0.9	2.1	0.3	0.2	0.6	44
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	2.58	78.9 ***	17.2 ***	3.55	0.400 **	0.012	10.5	14.1	38.3	36.6	13.5 **	36.9 ***	830
		SD	0.79	9.0	7.9	1.39	0.212	0.017	0.8	1.1	2.6	0.6	0.1	0.7	26
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	1.71	62.8 **	24.6 ***	11.74	0.559 **	0.346 *	11.3 **	15.3 ***	41.6 **	36.6	13.5 ***	36.9 ***	877
		SD	0.21	14.0	5.6	11.35	0.583	0.342	0.7	0.9	2.5	0.2	0.2	0.5	167
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	1.27	72.5 ***	14.9 ***	11.80	0.661 *	0.098	12.5 ***	16.6 ***	44.7 ***	35.7 ***	13.3	37.3 ***	976 **
		SD	0.34	18.3	7.6	13.65	0.658	0.110	0.5	0.6	1.4	0.4	0.2	0.5	293
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DBA/1J_P13_C1	D0	Mean	2.43	25.2	72.3	1.19	1.227	0.020	10.1	13.1	37.1	36.9	13.1	35.5	627
		SD	0.47	8.2	8.4	0.53	0.293	0.020	0.4	0.6	1.4	0.4	0.4	1.0	231
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	6.46 ***	27.5	68.5	2.70	1.212	0.054	12.3 ***	16.6 ***	44.3 ***	36.1 *	13.5 *	37.5 ***	801
		SD	1.57	6.8	6.6	1.26	0.453	0.069	1.6	2.2	5.1	0.6	0.1	0.8	249
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	3.02	81.0 ***	16.1 ***	2.37	0.511	0.057	11.1	15.1 *	40.5	36.4	13.6 **	37.3 ***	858
		SD	0.49	2.7	3.6	0.98	0.587	0.079	0.3	0.5	1.2	0.2	0.2	0.3	74
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	2.26	71.2 ***	20.3 ***	8.18 *	0.349 *	0.040	11.3	15.1 *	41.2	36.4	13.3	36.6 *	1012 *
		SD	1.37	7.3	6.3	3.62	0.292	0.089	0.3	0.3	0.6	0.6	0.2	0.3	183
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	1.10	65.0 ***	19.6 ***	14.17 ***	1.137	0.124	12.2 ***	16.0 **	43.7 **	35.7 ***	13.1	36.6 *	1057 **
		SD	0.36	12.3	8.9	7.95	0.804	0.181	0.4	0.6	1.3	0.2	0.2	0.6	178
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Comparisons to control using ANOVA and Dunnett's multiple comparison test

Significant when compared with D0: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

Table 6. Serum Chemistry_DBA/1J

Virus	Day	Item	TP Units	ALB g/dl	GLB g/dl	A/G Ratio	GLU mg/dl	AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	BUN mg/dl	CREA mg/dl	CHO mg/dl	TG mg/dl	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L
DBA/1J_WT	D0	Mean	3.9	3.0	1.0	3.1	185	65	29	200	25.9	0.4	59	69	148	4.3	113
		SD	0.1	0.1	0.1	0.3	16	12	6	22	1.0	0.0	2	37	1	0.3	1
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	4.0	3.0	1.0	3.1	186	66	32	157 *	23.8	0.4	80 ***	51	151 **	4.6	113
		SD	0.2	0.1	0.1	0.2	20	7	5	31	3.2	0.0	2	10	2	0.3	2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	3.9	3.0	0.8	3.6 *	182	65	31	153 *	18.6 ***	0.4	72 *	41	150	4.4	110
		SD	0.1	0.1	0.1	0.2	28	7	4	23	1.9	0.0	4	3	1	0.4	2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	3.9	3.0	0.9	3.2	181	66	28	169	24.0	0.4	67	59	148	4.7	110
		SD	0.1	0.1	0.1	0.3	41	5	4	20	2.6	0.0	2	22	1	0.3	2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	3.9	3.0	0.9	3.4	190	77	40	168	28.7	0.4	70	59	149	4.8	112
		SD	0.2	0.1	0.1	0.3	23	22	15	23	3.7	0.0	15	11	1	0.1	2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DBA/1J_P9_C1	D0	Mean	3.9	2.9	1.0	2.9	180	66	29	200	25.8	0.4	58	52	149	4.5	114
		SD	0.1	0.1	0.1	0.1	22	3	2	13	2.6	0.0	2	4	1	0.3	2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	4.0	3.0	1.0	3.0	186	65	29	136 *	21.9	0.3	77 *	38	149	4.8	110 **
		SD	0.1	0.0	0.1	0.2	10	4	5	24	3.9	0.0	5	8	0	0.4	1
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	4.3 **	3.1 *	1.2 *	2.5 *	174	57	37	118 **	18.7 **	0.3	99 ***	54	150	5.0	107 ***
		SD	0.2	0.1	0.1	0.1	41	11	11	12	4.7	0.0	7	12	2	0.3	1
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	4.4 *	3.1	1.3 **	2.4 **	138	78	42	134 *	21.5	0.4	119 ***	34 *	150	5.1 *	107 ***
		SD	0.2	0.1	0.1	0.1	7	9	8	18	1.2	0.0	13	12	1	0.1	2
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D4	Mean	4.1	2.9	1.2 *	2.4 **	122 **	93 **	49 *	199	21.2	0.4	116 ***	28 ***	152 ***	5.0 *	111 **
		SD	0.3	0.1	0.2	0.3	32	23	16	66	0.9	0.1	15	7	1	0.4	1
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DBA/1J_P11_C1	D0	Mean	4.0	3.0	1.0	3.0	176	71	34	198	19.6	0.3	60	47	150	4.5	113
		SD	0.2	0.1	0.1	0.4	22	9	9	18	2.8	0.0	2	13	1	0.0	1
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D1	Mean	4.2	3.1	1.1	2.9	197	60	32	142 **	21.6	0.3	78 *	26 **	149	5.3 **	110 *
		SD	0.3	0.3	0.1	0.2	28	15	15	26	3.8	0.0	10	6	1	0.4	1
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	4.4	3.1	1.3 ***	2.5 *	156	66	43	116 ***	17.9	0.3	107 ***	49	151	4.9	108 ***
		SD	0.1	0.1	0.1	0.1	35	9	8	14	4.6	0.1	8	12	1	0.3	2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	4.2	2.9	1.3 ***	2.2 ***	145	86	48	125 ***	20.1	0.3	122 ***	41	150	5.2 *	109 *
		SD	0.2	0.2	0.1	0.1	16	22	16	23	1.5	0.0	12	6	1	0.1	3
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D4	Mean	4.2	3.0	1.3 ***	2.4 **	131	98 *	62 **	239	21.9	0.4	128 ***	34	152 *	5.4 **	111
		SD	0.1	0.1	0.1	0.2	39	6	8	32	3.0	0.0	11	6	2	0.4	2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DBA/1J_P13_C1	D0	Mean	4.1	3.0	1.1	2.8	217	68	30	203	19.2	0.3	57	48	149	4.5	113
		SD	0.1	0.1	0.1	0.2	27	8	4	18	3.4	0.0	3	10	1	0.2	1
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	4.0	3.0	1.0	2.9	205	62	32	141 **	22.4	0.3	78 ***	28 *	148	5.2	108 ***
		SD	0.2	0.1	0.1	0.2	21	4	4	18	2.0	0.0	4	7	1	0.2	1
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	4.5 *	3.2 *	1.3	2.6	148 ***	68	47	124 **	15.3	0.3	116 ***	52	151	5.1	106 ***
		SD	0.2	0.0	0.1	0.2	22	6	3	19	1.0	0.0	6	13	1	0.4	1
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D3	Mean	4.4	3.0	1.3 **	2.3 **	149 ***	70	41	143 *	21.0	0.3	126 ***	42	150	5.2	109 **
		SD	0.2	0.1	0.1	0.2	15	7	4	24	2.7	0.0	9	11	1	0.2	3
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D4	Mean	4.6 ***	3.3 *	1.3 **	2.5	109 ***	118 **	74 ***	266 **	19.4	0.3	144 ***	34	153 ***	5.6 **	112
		SD	0.2	0.2	0.1	0.2	20	43	23	48	0.8	0.0	10	7	1	1.0	2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Comparisons to control using ANOVA and Dunnett's multiple comparison test

Significant when compared with D0: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.00

Table 7. Absolute organ weight_DBA/1J

Virus	Item	Body Weight Units	Brain g	Lung g	Heart g	Liver g	Kidney g	Spleen g
DBA/1J_WT	D0	Mean	16.37	0.3819	0.1329	0.1155	0.7996	0.2105
		SD	1.00	0.0043	0.0101	0.0179	0.0907	0.0107
		N	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	14.78	0.3750	0.1313	0.0991	0.7037	0.2153
		SD	1.04	0.0144	0.0138	0.0152	0.0763	0.0261
		N	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	14.72	0.3802	0.1303	0.0942	0.7768	0.1984
		SD	1.37	0.0146	0.0091	0.0078	0.0709	0.0114
		N	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	15.94	0.3932	0.1527 *	0.1344	0.9389	0.2107
		SD	1.11	0.0193	0.0067	0.0723	0.1609	0.0186
		N	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	15.40	0.4005	0.1561 **	0.1085	0.9745	0.2442 *
		SD	0.91	0.0140	0.0077	0.0066	0.0979	0.0187
		N	5	5	5	5	5	5
DBA/1J_P9_C1	D0	Mean	17.17	0.3782	0.1289	0.1044	0.7491	0.2163
		SD	0.65	0.0062	0.0065	0.0033	0.0501	0.0168
		N	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	16.05	0.3783	0.1478	0.1178	0.7997	0.2420
		SD	1.03	0.0110	0.0095	0.0161	0.0737	0.0291
		N	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	14.94 **	0.3787	0.1526	0.1056	0.7099	0.2006
		SD	1.69	0.0097	0.0137	0.0163	0.0861	0.0182
		N	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	12.84 ***	0.3954	0.2829 *	0.1035	0.6813	0.2142
		SD	0.48	0.0152	0.1611	0.0173	0.0842	0.0230
		N	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	13.65 ***	0.3845	0.2374	0.1017	0.6506	0.1797 *
		SD	0.58	0.0062	0.0143	0.0085	0.0336	0.0149
		N	5	5	5	5	5	5
DBA/1J_P11_C2	D0	Mean	16.45	0.3802	0.1319	0.1069	0.7307	0.2057
		SD	0.19	0.0139	0.0097	0.0049	0.0501	0.0148
		N	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	15.18	0.3733	0.1368	0.1047	0.7523	0.2283
		SD	1.05	0.0170	0.0153	0.0111	0.0677	0.0182
		N	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	14.40 **	0.3803	0.1658 **	0.1046	0.7019	0.1981
		SD	0.89	0.0135	0.0162	0.0105	0.0789	0.0207
		N	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	13.38 ***	0.3910	0.2215 ***	0.1057	0.7341	0.2335
		SD	0.86	0.0094	0.0082	0.0078	0.0441	0.0201
		N	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	12.94 ***	0.4165 ***	0.2844 ***	0.1046	0.7748	0.2137
		SD	1.01	0.0084	0.0188	0.0098	0.0460	0.0198
		N	5	5	5	5	5	5
DBA/1J_P13_C1	D0	Mean	16.90	0.3998	0.1468	0.1047	0.8001	0.2444
		SD	1.02	0.0157	0.0117	0.0069	0.0399	0.0425
		N	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	16.02	0.3776	0.1412	0.1089	0.6606	0.2252
		SD	0.37	0.0136	0.0111	0.0075	0.3284	0.0204
		N	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	14.18 **	0.3813	0.1608	0.1022	0.6796	0.1773 *
		SD	1.56	0.0283	0.0282	0.0133	0.1001	0.0145
		N	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	13.61 ***	0.3939	0.2122 ***	0.0997	0.7503	0.2500
		SD	1.44	0.0178	0.0218	0.0102	0.0855	0.0491
		N	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	12.22 ***	0.3976	0.2847 ***	0.0976	0.7227	0.1826 *
		SD	0.35	0.0166	0.0307	0.0129	0.0686	0.0197
		N	5	5	5	5	5	5

Comparisons to control using ANOVA and Dunnett's multiple comparison test
Significant when compared with D0: * p < 0.05 , ** p < 0.01, *** p < 0.001

Table 8. Relative organ weight_DBA/1J

Virus	Item	Body Weight Units	Brain %	Lung %	Heart %	Liver %	Kidney %	Spleen %	
DBA/1J_WT	D0	Mean	16.37	2.34	0.81	0.70	4.88	1.29	0.36
		SD	1.00	0.13	0.04	0.08	0.41	0.05	0.02
		N	5	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	14.78	2.55	0.89	0.67	4.79	1.47	0.36
		SD	1.04	0.19	0.12	0.08	0.71	0.25	0.06
		N	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	14.72	2.59	0.89	0.64	5.28	1.35	0.33
		SD	1.37	0.16	0.09	0.02	0.26	0.08	0.03
		N	5	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	15.94	2.47	0.96 *	0.85	5.87 *	1.32	0.33
		SD	1.11	0.14	0.08	0.47	0.68	0.12	0.02
		N	5	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	15.40	2.61	1.02 **	0.71	6.32 ***	1.59 *	0.34
		SD	0.91	0.18	0.09	0.05	0.43	0.13	0.04
		N	5	5	5	5	5	5	5
DBA/1J_P9_C1	D0	Mean	17.17	2.21	0.75	0.61	4.36	1.26	0.33
		SD	0.65	0.09	0.03	0.03	0.22	0.09	0.04
		N	5	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	16.05	2.36	0.92	0.73	4.98	1.50 **	0.36
		SD	1.03	0.09	0.06	0.06	0.36	0.09	0.05
		N	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	14.94	2.55 **	1.02	0.71	4.75	1.35	0.33
		SD	1.69	0.22	0.04	0.07	0.27	0.07	0.05
		N	5	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	12.84	3.08 ***	2.22 **	0.81 **	5.30 **	1.66 ***	0.37
		SD	0.48	0.18	1.31	0.13	0.63	0.13	0.05
		N	5	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	13.65	2.82 ***	1.74 *	0.75 *	4.77	1.32	0.39
		SD	0.58	0.12	0.12	0.08	0.37	0.14	0.05
		N	5	5	5	5	5	5	5
DBA/1J_P11_C2	D0	Mean	16.45	2.31	0.80	0.65	4.44	1.25	0.33
		SD	0.19	0.07	0.05	0.02	0.26	0.08	0.03
		N	5	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	15.18	2.46	0.90	0.69	4.95	1.51 *	0.34
		SD	1.05	0.11	0.04	0.05	0.18	0.10	0.04
		N	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	14.40	2.65 *	1.16 ***	0.73	4.87	1.37	0.33
		SD	0.89	0.12	0.16	0.11	0.44	0.09	0.02
		N	5	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	13.38	2.93 ***	1.66 ***	0.79 **	5.51 ***	1.76 ***	0.40 *
		SD	0.86	0.24	0.17	0.05	0.52	0.26	0.07
		N	5	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	12.94	3.23 ***	2.20 ***	0.81 **	6.00 ***	1.66 ***	0.44 ***
		SD	1.01	0.19	0.09	0.04	0.41	0.16	0.04
		N	5	5	5	5	5	5	5
DBA/1J_P13_C1	D0	Mean	16.90	2.37	0.87	0.62	4.75	1.45	0.35
		SD	1.02	0.19	0.10	0.05	0.33	0.22	0.02
		N	5	5	5	5	5	5	5
	D1	Mean	16.02	2.36	0.88	0.68	4.11	1.40	0.33
		SD	0.37	0.04	0.07	0.04	2.03	0.12	0.02
		N	5	5	5	5	5	5	5
	D2	Mean	14.18	2.70 *	1.13	0.72	4.79	1.25	0.34
		SD	1.56	0.12	0.14	0.05	0.38	0.06	0.05
		N	5	5	5	5	5	5	5
	D3	Mean	13.61	2.91 ***	1.57 ***	0.73	5.52	1.83 **	0.38
		SD	1.44	0.24	0.23	0.05	0.36	0.24	0.03
		N	5	5	5	5	5	5	5
	D4	Mean	12.22	3.25 ***	2.33 ***	0.80 **	5.91	1.49	0.44 ***
		SD	0.35	0.13	0.24	0.12	0.44	0.15	0.04
		N	5	5	5	5	5	5	5

Comparisons to control using ANOVA and Dunnett's multiple comparison test

Significant when compared with D0: * p < 0.05 , ** p < 0.01, *** p < 0.00

Figure 4. Histopathological findings of lung tissue_Hematoxylin & Eosin

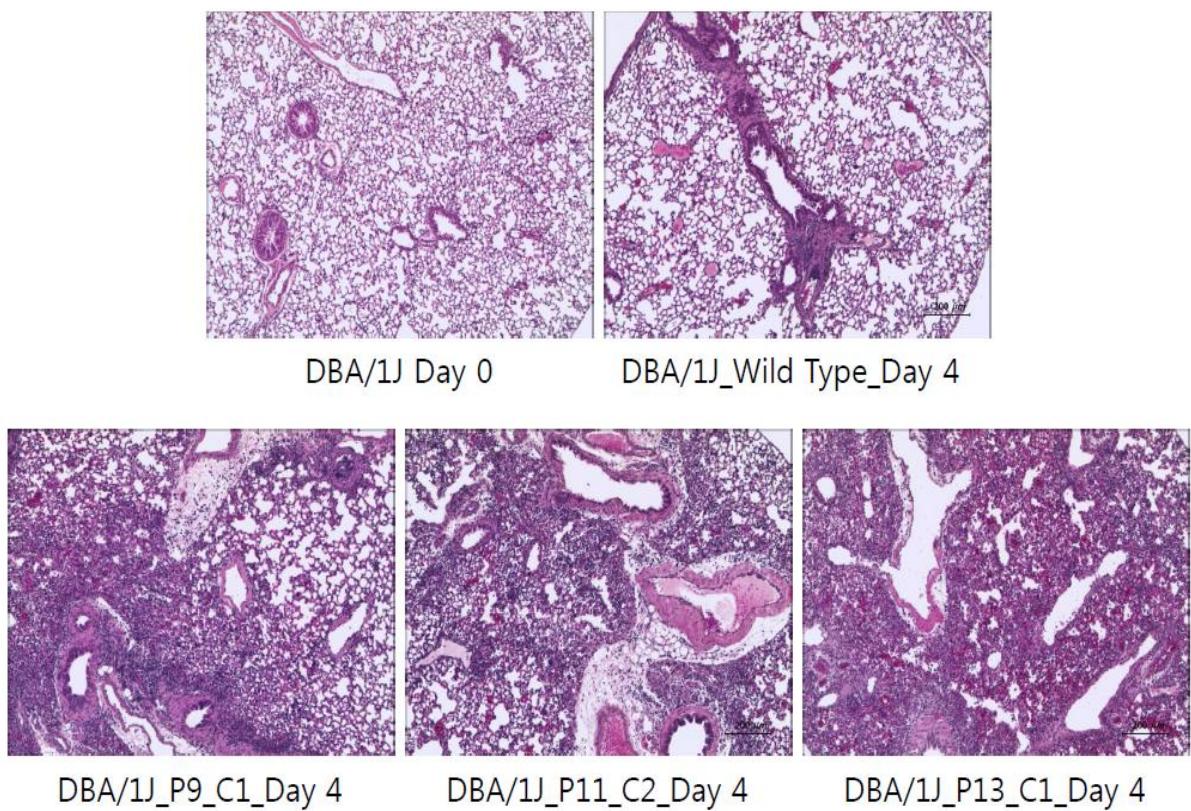


Figure 5. Histopathological findings of lung tissue_Immunohistochemistry

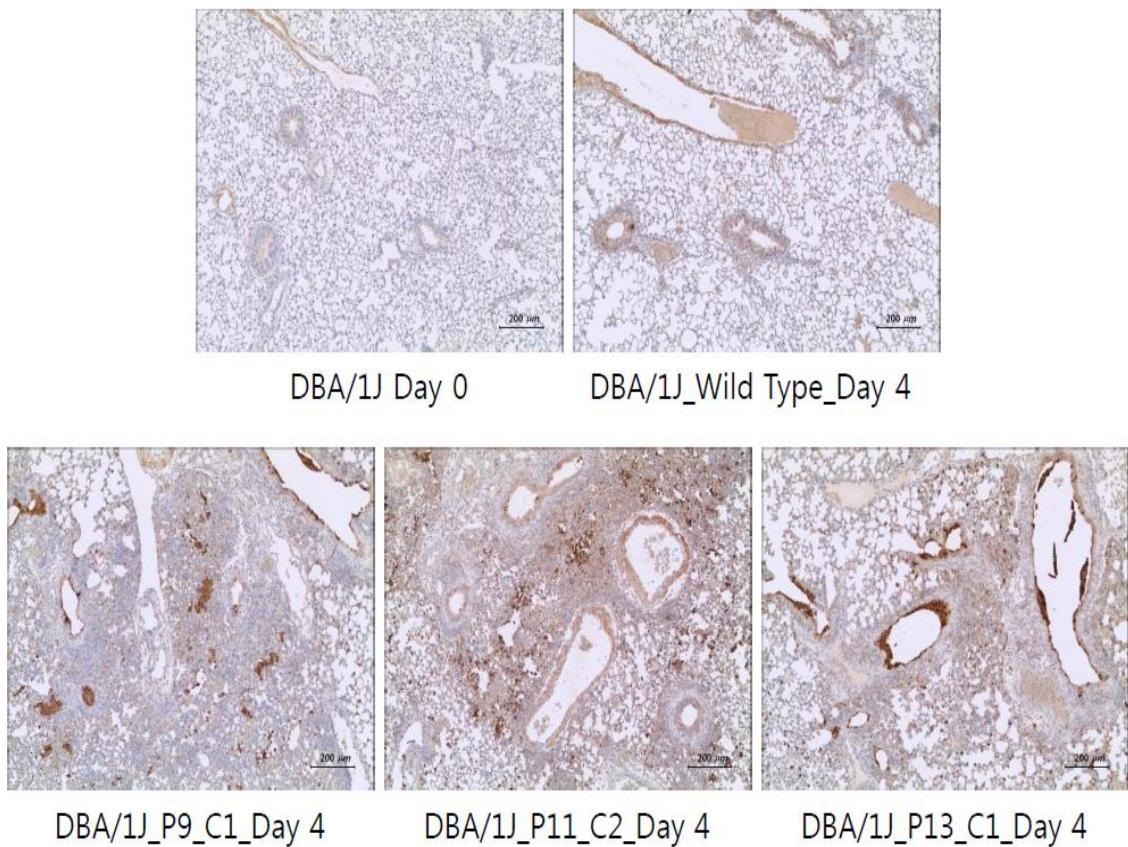
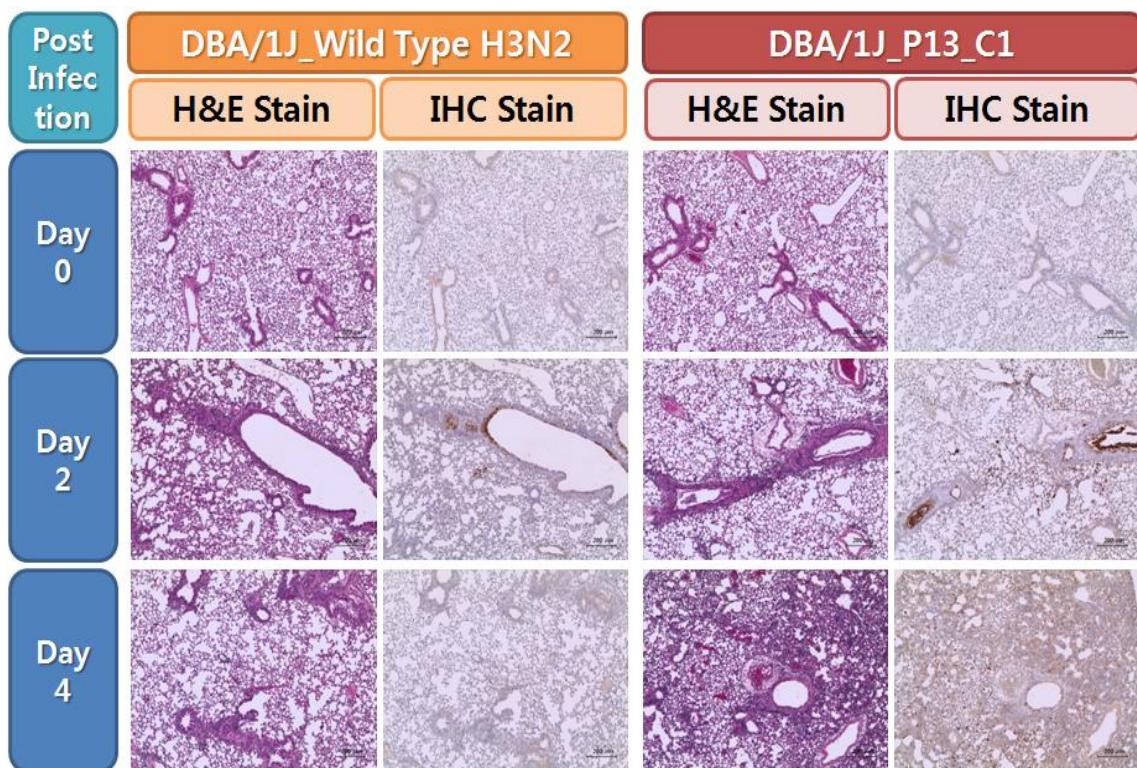


Figure 6. Histopathologic findings on H&E and IHC staining with lung tissues of DBA/1J mouse infected with wild- and mutant-Influenza virus for four days



라. MED₅₀ 측정 (STEP 3.4)

Live vaccine으로서 Wild Type H3N2 Influenza virus를 최고농도 2.79×10^7 pfu/mL에서 10 배 계열회석하여 50uL씩 단회 비강투여 하였다. Live vaccine 투여일로부터 4주 경과한 시점에 mouse-adapted mutant Influenza virus (Balb/c_P9_C2, DBA/1J_P13_C1)를 가지고 고농도로 공격하였으며, 14일 동안 각 군에서 안락사(공격당일 기준 체중의 25% 감소) 또는 사망률을 측정하였고 이를 통해 ED₅₀을 측정하였다.

그 결과(Table 1 및 Figure 1), 고농도의 live vaccine을 투여한 군은 100%의 생존율을 보이다가 중농도 이하에서는 저농도로 갈수록 용량의존적으로 폐사율이 증가하였다. 또한 Figure 2에서 보는 바와 같이 체중측정에서 고농도의 live vaccine을 투여한 마우스는 14일의 관찰기간 동안 안정적으로 유지됨과 저농도 live vaccine 투여군에서 생존개체의 감소된 체중이 다시 회복됨을 확인하였다.

ED₅₀ 측정치는 Balb/c_P9_C2가 6.68×10^3 pfu/mL, DBA/1J_P13_C1가 2.82×10^3 pfu/mL로 나타났다(Table 2).

Table 1. Experimental result for the determination of MED₅₀ with mouse pathogenic Balb/c_P9_C2 and DBA/1J_P13_C1 Influenza virus respectively

Type & Conc. of Challenge Virus	Vaccination with Live Virus (pfu/mL)	Number of Death														Mortality (%)
		No. Dead / No. Infected	Days after Infection													
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14
Balb/c_P9_C2 4.8x10 ⁷ (pfu/ml)	2.79x10 ⁷	0/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.79x10 ⁶	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.79x10 ⁵	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.79x10 ⁴	1/5	0	0	0	0	0	0	0(1)	0	1	0	0	0	0	20
	2.79x10 ³	4/5	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	80
	2.79x10 ²	4/5	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	80
DBA/1J_P13_C1 3.78x10 ⁷ (pfu/ml)	2.79x10 ⁷	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.79x10 ⁶	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.79x10 ⁵	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.79x10 ⁴	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.79x10 ³	3/5	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	60
	2.79x10 ²	4/5	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80

(): Number of Euthanasia

* Euthanasia criteria: Weight loss of 25% of mice's pre-experimental body weight

Table 2. Arrangement of data used in computation of MED₅₀ titre by the method of Reed-Muench

1) Challenge: Balb/c_P9_C2

Boosting Virus (WT) Titer (pfu/mL)	Log Titer	No. of Survival	No. of Dead	Cumulative			Survival	% Survival	% Mortality
				Survival	Dead	Total			
2.79x10 ⁷	7.45	4	0	20	0	20	20/20	100.0	0.0
2.79x10 ⁶	6.45	5	0	16	0	16	16/16	100.0	0.0
2.79x10 ⁵	5.45	5	0	11	0	11	11/11	100.0	0.0
2.79x10 ⁴	4.45	4	1	6	1	7	6/7	85.7	14.3
2.79x10 ³	3.45	1	4	2	5	7	2/7	28.6	71.4
2.79x10 ²	2.45	1	4	1	9	10	1/10	10.0	90.0

MED₅₀ of H3N2 Influenza mutant virus derived from Balb/c_P9_C2 = 6.68 x 10³ pfu/mL

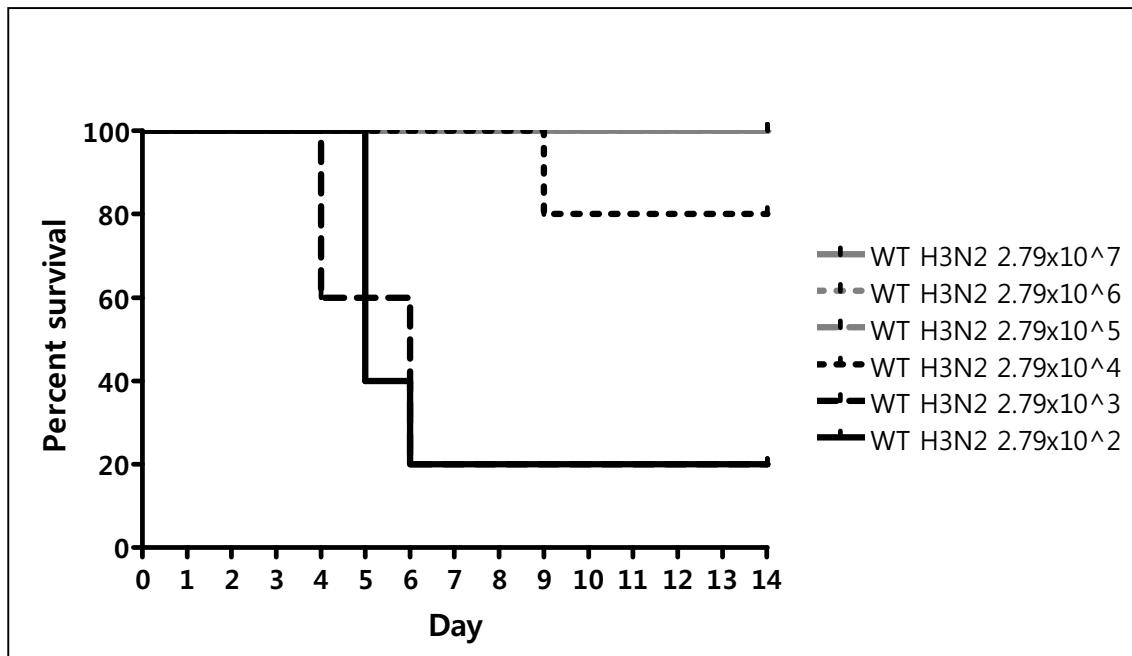
2) Challenge: DBA/1J_P13_C1

Boosting Virus (WT) Titer (pfu/mL)	Log Titer	No. of Survival	No. of Dead	Cumulative			Survival	% Survival	% Mortality
				Survival	Dead	Total			
2.79x10 ⁷	7.45	5	0	23	0	23	23/23	100.0	0.0
2.79x10 ⁶	6.45	5	0	18	0	18	18/18	100.0	0.0
2.79x10 ⁵	5.45	5	0	13	0	13	13/13	100.0	0.0
2.79x10 ⁴	4.45	5	0	8	0	8	8/8	100.0	0.0
2.79x10 ³	3.45	2	3	3	3	6	3/6	50.0	50.0
2.79x10 ²	2.45	1	4	1	7	8	1/8	12.5	87.5

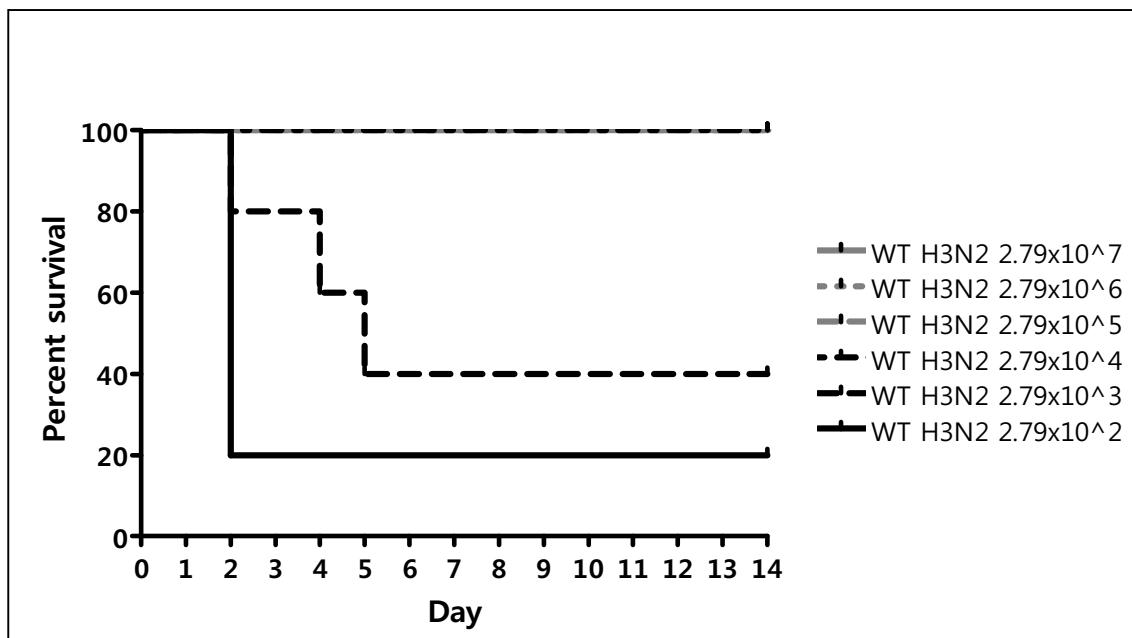
MED₅₀ of H3N2 Influenza mutant virus derived from DBA/1J_P13_C1 = 2.82 x 10³ pfu/mL

Figure 1. Survival rate

1) Challenge: Balb/c_P9_C2 (4.78×10^7 pfu/mL)



2) Challenge: DBA/1J_P13_C1 (3.78×10^7 pfu/mL)



파. Cytokine Profile 분석 (STEP 3.5)

(1) Influenza Virus에 감염된 Balb/c Mouse의 Lung에서 Cytokine Profile 분석

(가) 연구 목적

Balb/c mouse에서 10~15% 이상의 의미있는 체중감소 현상을 보인 passage를 2개(P3 및 P5)를 선별하여 마우스에 비강감염 시킨 후에 체중의 감소와 증가 변화가 나타나는 2일부터 6일까지 lung cell lysate를 얻어 lung infection에 따른 cytokine의 변화를 확인하여 병원성에 따른 주요 cytokine marker를 확인하고자 하였다.

(나) Balb/c Mouse의 Lung에서의 Cytokine Profile 분석

Balb/c mouse로부터 유래한 각 passages 중 P3과 P5의 Mutant Type을 마우스 비강 내 접종 후, 접종 전과 체중감소가 나타나는 2~3일과 다시 체중이 증가하는 5~6일에 각 passage 별로 4수씩 폐를 적출하였다. 적출된 폐는 각각 0.5mL의 PBS에 넣고 Homogenizer를 사용하여 균질화시켰다. 개체별로 수집한 lung cell lysate를 이용하여 mouse의 폐에서 발현되는 pro-inflammatory cytokine(IFN- γ , IL- β , IL-6, TNF- α , IL-2)과 anti-inflammatory cytokine(IL-4, IL-10, IL-13)의 시간별 변화를 통해 Blab/c mouse에서 Influenza virus 감염 후 나타나는 면역체계의 반응을 확인하고자 하였다. Lung cell lysate 내 cytokine 분석은 전문업체인 “고마바이오텍”에 의뢰하여 분석을 진행하였다.

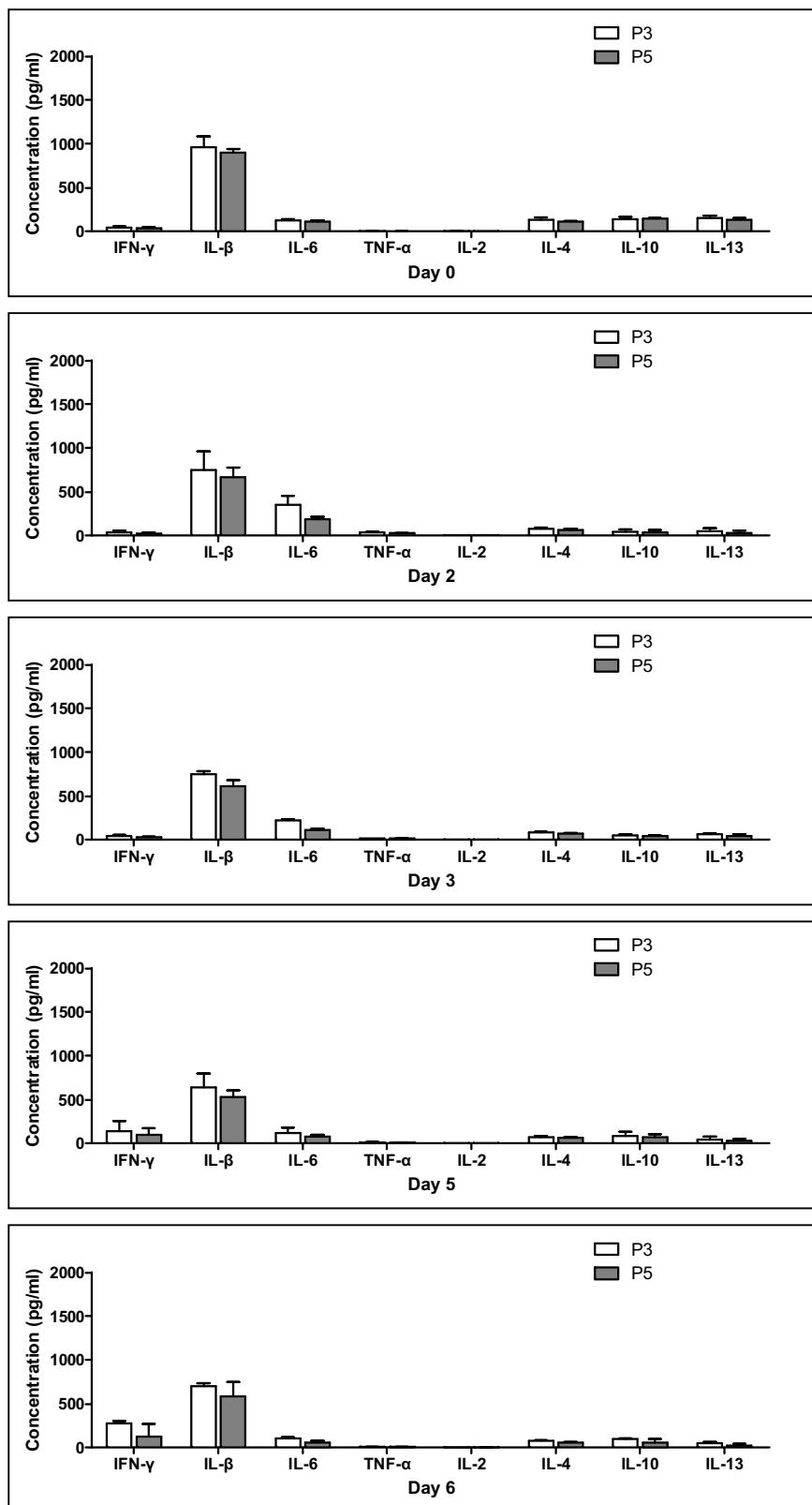
(다) 실험 결과

Balb/c mouse에서 lung cell lysate에 감염 후 나타나는 cytokine의 변화를 통해 면역반응을 확인하고자 각 passage별로 접종 전과 접종 후에 체중의 감소와 증가를 보이는 2, 3, 5, 6일에 마우스의 폐를 적출하여 폐조직 내 cytokine의 변화를 조사하였다.

감염 후 체중이 감소하는 2일차에 pro-inflammatory cytokine인 IL-6가 증가하였으나 3일차부터 다시 감소하였고, IFN- γ 는 5일차부터 증가하기 시작하였다. Anti-inflammatory cytokine의 경우 IL-4, IL-10, IL-13 모두 2일차에 감소하여 6일차까지 유사수준을 유지하였으나 IL-10의 경우, 3일차부터 다시 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 변화는 passage 3과 5 모두 동일하게 나타났으며 passage간의 차이점을 확인할 수 없었다.

Figure 1. Analysis of cytokine profile in Balb/c mouse infected with P3 and P5 lung lysate for six days



(2) Influenza Virus에 감염된 DBA/1J Mouse의 Lung에서 Cytokine Profile 분석

(가) 연구 목적

최종 선정된 DBA/1J 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스주와 병원성이 없는 Wild Type의 바이러스 주를 마우스에 비강감염 시킨 후에 체중의 감소와 증가 변화가 나타나는 2일부터 6일까지 lung cell lysate를 얻어 lung infection에 따른 cytokine의 변화를 확인하여 병원성에 따른 주요한 cytokine marker를 확인하고자 하였다.

(나) DBA/1J Mouse의 Lung에서의 Cytokine Profile 분석

DBA/1J mouse에 pathogenic Influenza virus clone 2주와 Wild Type, DBA/1J에서 처음 유래한 passage의 Mutant Type을 mouse에 접종 후, 접종 전과 체중감소가 나타나는 2일부터 6일까지 각 passage 및 clone별로 4수씩 폐를 적출하였다. 적출된 폐는 각각 0.5mL의 PBS에 넣고 Homogenizer를 사용하여 균질화시켰다. 개체별로 수집한 lung cell lysate를 이용하여 mouse의 lung에서 발현되는 pro-inflammatory cytokine(IFN- γ , IL- β , IL-6, TNF- α , IL-2)과 anti-inflammatory cytokine(IL-4, IL-10, IL-13)의 변화를 통해 DBA/1J mouse에서 pathogenic mutant로 인하여 변화하는 면역체계의 반응을 비교 확인하고자 하였다.

(다) 실험 결과

DBA/1J mouse에 non-pathogenic Wild Type과 pathogenic mutant virus clone을 각각 감염시킨 후 나타나는 cytokine의 변화를 통해 면역체계의 반응을 확인하고자 Wild Type과 passage 1(P1), DBA/1J_P11_C2(P11_Clone), DBA/1J_P13_C1 (P13_Clone)을 각각 접종 전과 접종 후 2, 3, 4, 5, 6일에 mouse의 lung을 적출하여 lung tissue 내의 cytokine의 변화를 조사하였다. P11_Clone과 P13_Clone 접종 mouse의 경우 4, 5일에 조직 적출 전 모두 폐사하여 전제적인 cytokine의 변화를 조사하지는 못했다.

감염 후 2일차에 pro-inflammatory cytokine인 IL-6가 증가하였으며, 3일차부터 mouse pathogenic clone들의 경우에는 IL-6가 계속 높은 수치를 유지하였으나 Wild Type과 P1의 경우, Balb/c mouse의 경우와 유사하게 다시 감소하였다.

IFN- γ 의 경우 mouse pathogenic clone들은 2일차부터 증가하는 경향을 보였으나 Wild Type은 Balb/c mouse와 유사하게 5일차부터 증가하기 시작하였다.

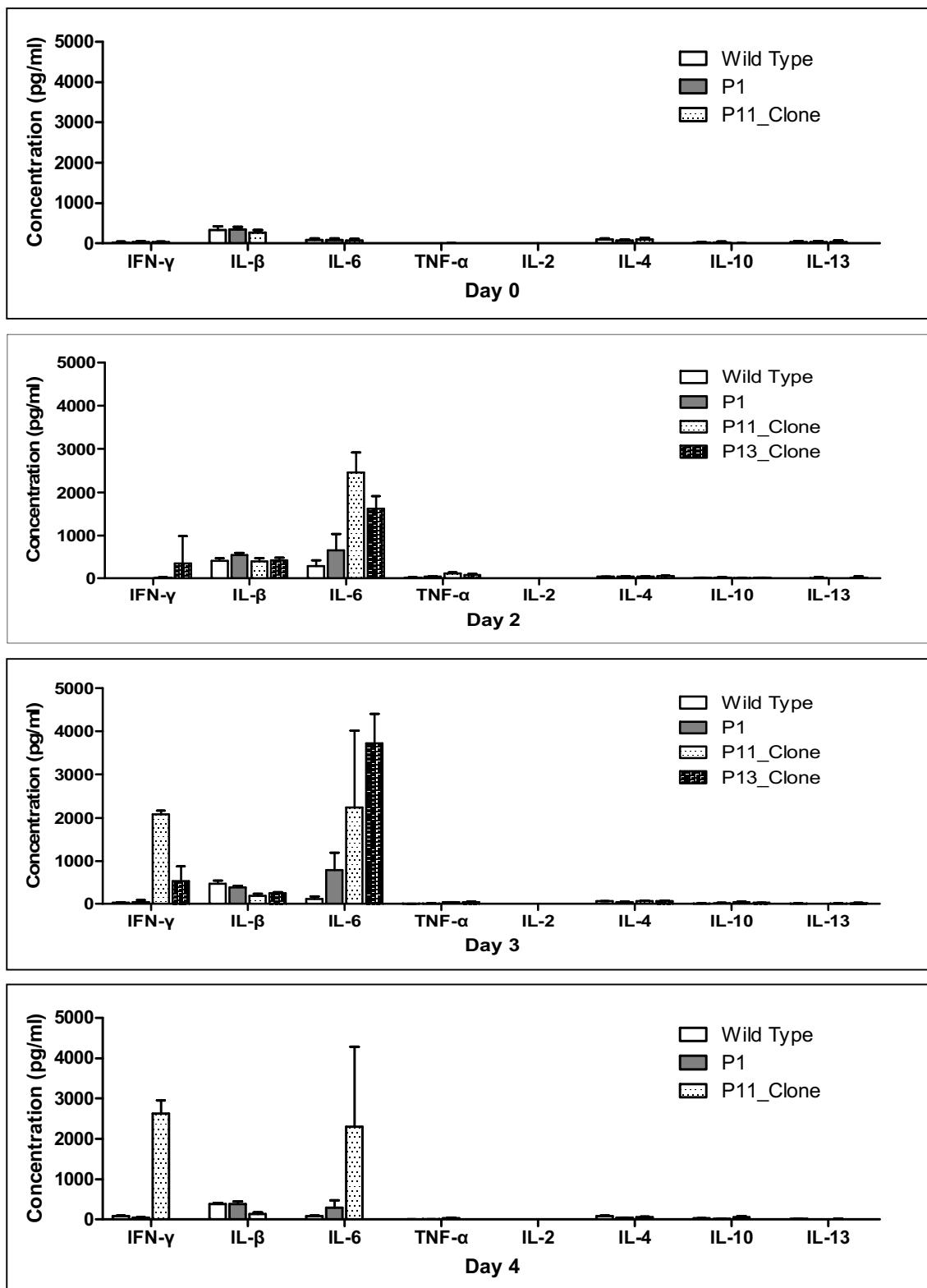
Anti-inflammatory cytokine인 IL-4, IL-13은 Wild Type과 P1의 경우, 2일차에 감소하여 점차 증가하는 경향을 보였으며, IL-10의 경우 P1에서 4일차에 급격하게 다시 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

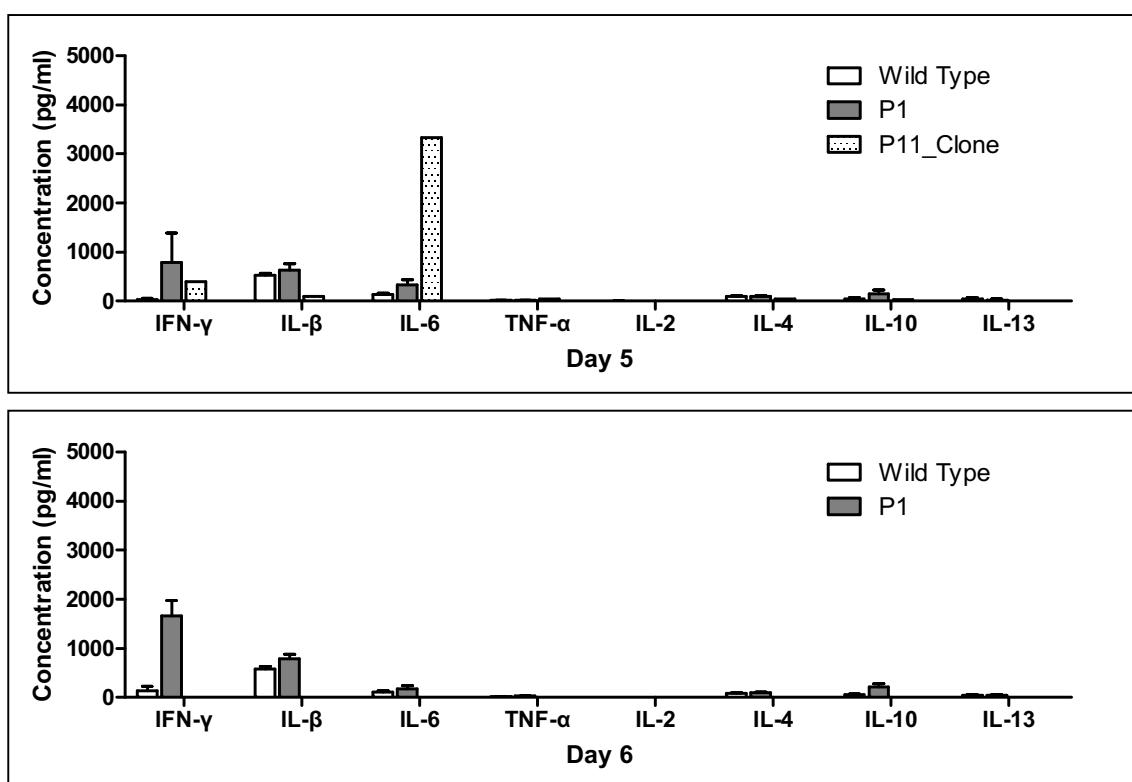
Mouse pathogenic clone들의 경우 IL-4와 IL-10은 역시 2일차에 감소하였다가 증가하는 경향은 Wild Type 및 P1과 유사하였으나 4일차부터 다시 감소하였고, IL-13의 경우 2일차에 감소된 후 다시 증가하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 mouse에 pathogenic한 virus의 경우 감염된 이후 IL-6와 IFN- γ 의 수치를 증가시켜 염증반응을 일으키는 것을 알 수 있었으며, 이러한 변화는 mouse에서의 Influenza infection model 확립 시에 중요한 marker로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

인플루엔자 바이러스의 마우스 감염에 따른 lung에서의 면역반응에 다양한 pro- 및 anti-inflammatory cytokine을 비교 분석하여 의미있는 결과를 도출하였으나 실험 여건상 중요한 제 1형의 IFNs에 대한 lung에서의 발현정도를 측정, 분석하지 못해 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Figure 2. Analysis of cytokine profile in DBA/1J mouse infected with wild type, P1 lung lysate, P11 clone and P13 clone for six days





바. Human Established Cell Line 및 Mouse Primary Lung Cell에서 WT- 및 MT-Influenza Virus의 Infectivity 검증시험

(1) Human Established Cell Line에서 Mouse Pathogenic Mutant Influenza A Virus(H3N2)의 Infectivity 검증

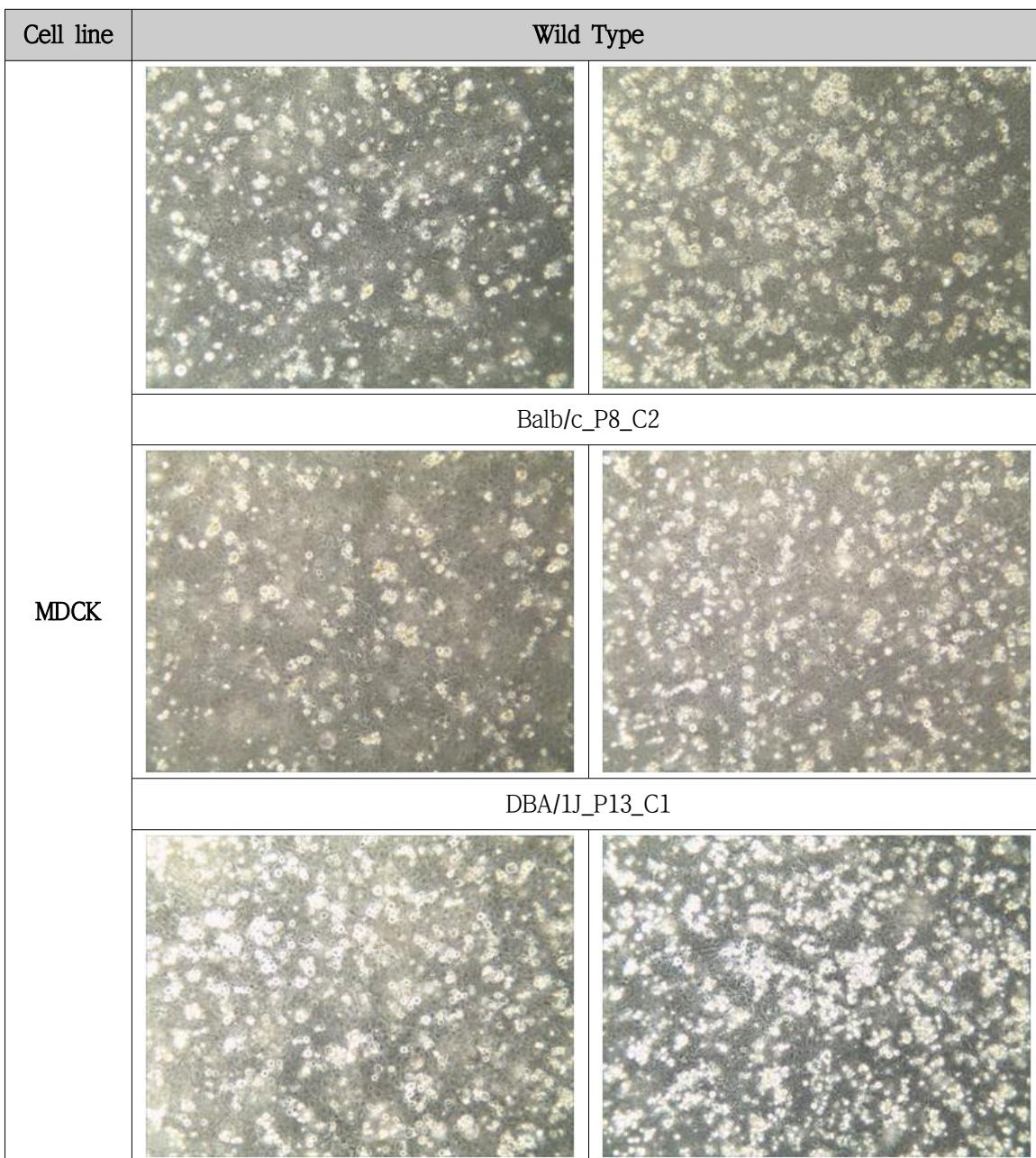
(가) 실험 목적

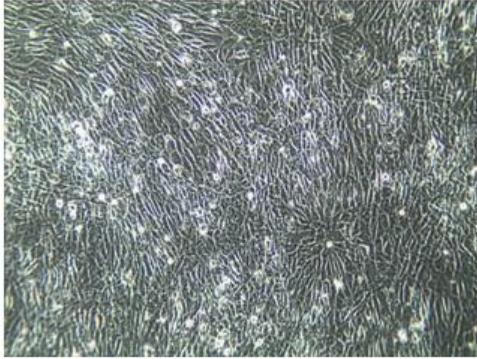
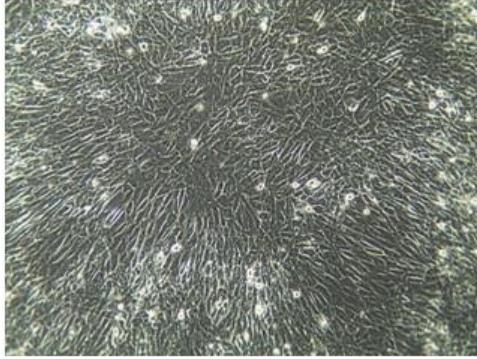
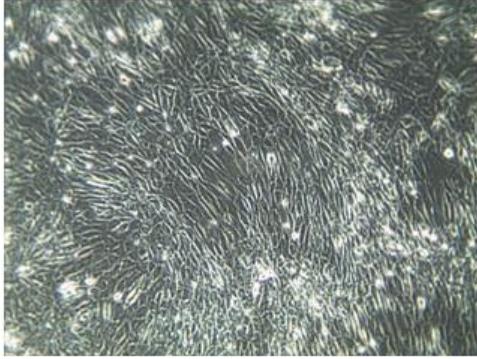
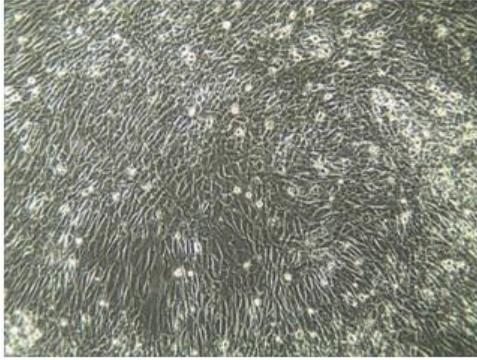
Mouse pathogenic mutant virus clone이 인플루엔자 바이러스 백신 및 치료제 개발을 위한 연구용으로 사용 가능하기 위해서 origin인 human에 감염될 수 있는 mechanism이 변이되지 않았다는 것을 검증하기 위하여 human established cell line 3종[Human Liver Cell(Huh7), Human Lung Cell(WI_38), Human Glioma Cell(HS683)]과 MDCK cell에 Balb/c와 DBA/1J 유래 mouse pathogenic mutant Influenza A virus clone 및 Wild Type virus을 각각 감염시켜서 세포 내 Influenza virus 존재 유무를 확인하였다.

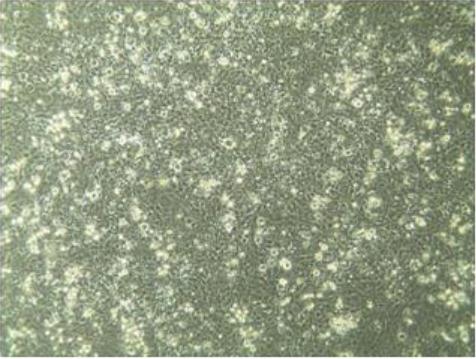
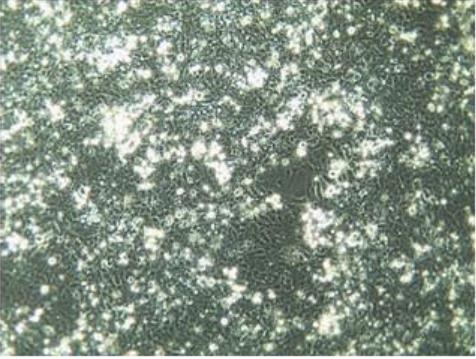
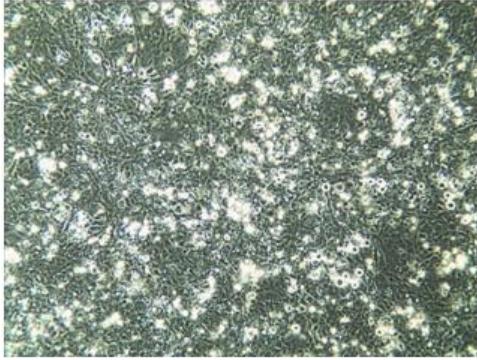
(나) 실험 결과

각 human 유래 세포주와 MDCK 세포주에 Wild Type virus와 각 마우스 유래 별 Mutant Type의 virus clone을 감염시키고 plaque assay를 통해 감염 여부를 검증한 결과, MDCK 세포주와 human glioma cell line인 HS683, human lung cell line인 WI_38에서 Wild Type과 Mutant Type 모두 infectivity를 보였으나, human liver cell line인 Huh7에서는 Mutant Type clone들은 infectivity를 확인할 수 없었다. 따라서 mouse pathogenic mutant virus clone들은 mouse에서 병원성을 나타낼 수 있도록 적절히 mutation이 되었으며 다소 infectivity에 차이는 있으나 human 유래 virus인만큼 human에 대한 감수성 또한 갖고 있는 것으로 확인되어, Influenza virus 백신 및 치료제 개발에 있어 질환모델을 만들기 위한 적합한 재료가 될 것으로 사료된다.

Figure 1. Cell morphology for each target cell lines on 3-day after infecting with wild type, Balb/c_P8_C2 and DBA/1J_P13_C1 respectively



Cell line	Wild Type	
		
		Balb/c_P8_C2
HS683		
	DBA/1J_P13_C1	
		

Cell line	Wild Type	
WI_38		
	Balb/c_P8_C2	
		
DBA/1J_P13_C1		
		

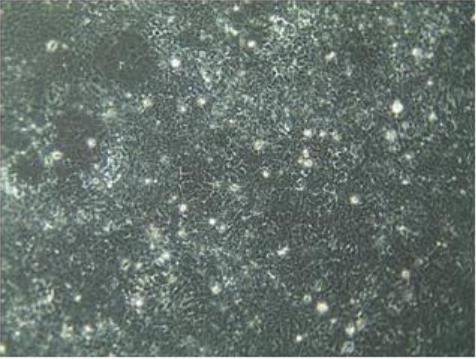
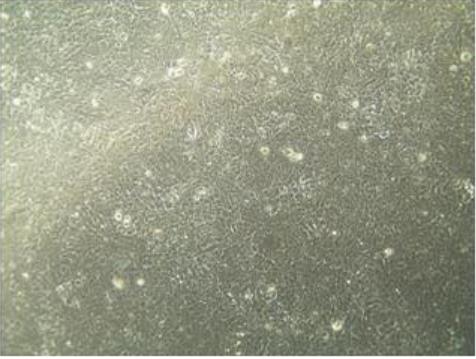
Cell line	Wild Type	
		
		Balb/c_P8_C2
Huh7		
		DBA/1J_P13_C1
		

Table 1. Summarized result of virus plaque assay with culture supernatant obtained from each target cell lines on 3-day after infecting with wild type, Balb/c_P8_C2 and DBA/1J_P13_C1 respectively

Cell Line	Virus Used for Cell Infection	Conc. of Stock Virus (PFU/ml)	Infection Dosage (PFU/ml)	Average No. of Virus Plaque				Infectivity of Mutant Type
				원액	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻⁵	
HS683 (Human Glioma Cell)	Wild Type	2.8x10 ⁷	1.0x10 ⁵	-	17	2		Y
	Balb/c_P8_C2	7.9x10 ⁷		-	7.5	0.5		
	DBA/1J_P13_C1	3.8x10 ⁷		-	13.5	0.5		
WI_38 (Human Lung Cell)	Wild Type	2.8x10 ⁷	1.0x10 ⁵	-	5	0		Y
	Balb/c_P8_C2	7.9x10 ⁷		-	4.5	0		
	DBA/1J_P13_C1	3.8x10 ⁷		6	0	0		
Huh7 (Human Liver Cell)	Wild Type	2.8x10 ⁷	1.0x10 ⁵	10	0	0		N
	Balb/c_P8_C2	7.9x10 ⁷		0	0	0		
	DBA/1J_P13_C1	3.8x10 ⁷		0	0	0		
MDCK (As Positive Control)	Wild Type	2.8x10 ⁷	1.0x10 ⁵	-	-	-	30.5	Y
	Balb/c_P8_C2	7.9x10 ⁷		-	-	-	56.0	
	DBA/1J_P13_C1	3.8x10 ⁷		-	-	-	36.0	

(2) Mouse Primary Cell에서 Mouse Pathogenic Mutant Influenza A Virus(H3N2)의 Infectivity 검증

(가) 실험 목적

Mouse primary cell에서 Wild Type과 Mutant Type의 virus clone을 감염시켜서 in vitro에서 확인이 가능한지에 대한 검증으로 실험을 진행하였다.

(나) 실험 방법

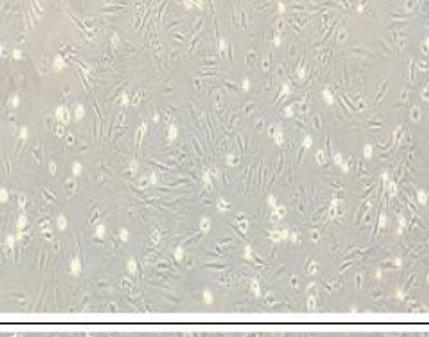
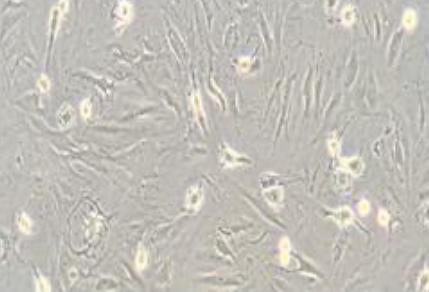
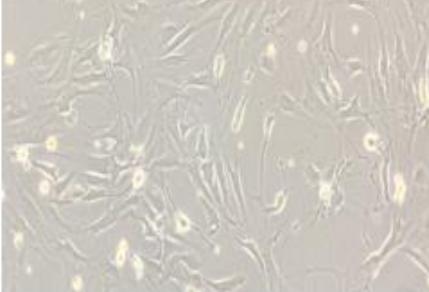
Balb/c와 DBA/1J mouse의 lung tissue를 적출하여 세포를 분리한 후 primary cell culture를 진행하였다.

배양된 mouse lung primary cell에 Wild Type, Balb/c_P8_C2, DBA/1J_P13_C1을 세포주별로 1.0×10^5 pfu/mL로 1시간 10분간 infection한 후에 PBS로 3회 washing 한다. 그 후 SFM (Serum Free Media)를 넣고 3일간 배양한 후, 상층액을 수확하여 시료를 얻었다. 세포주별 감염 여부는 기 확립한 virus plaque assay를 통해 진행하였다.

(다) 실험 결과

현재 Balb/c와 DBA/1J mouse에서 분리한 lung으로부터 최적의 lung primary cell culture 법을 확립하였다. 그러나, mouse primary lung cell에 각 virus를 감염시키고 상층액을 얻어서 MDCK에서 Wild Type, Balb/c_P8_C2, DBA/1J_P13_C1에 대한 감염여부 및 감염정도를 측정하였으나 MDCK 세포내에 감염을 일으키지 않음을 확인하였으며 이는 lung primary cell에 감염이 일어나지 않는다는 것을 보여주었다. 따라서, 실험에 사용한 마우스에서는 감염이 확인되나 primary lung cell에서 감염이 일어나지 않는 이유를 규명할 수 없었다.

Figure 1. Cell morphology for Balb/c and DBA/1J mouse derived primary lung cell respectively

Magnification	Lung Cell from Balb/c Mouse	Lung Cell from DBA/1J Mouse
40x		
100x		
200x		

4. 최종 결론

가. “마우스 병원성 인플루엔자 바이러스” 5주 기탁 완료

본 학술연구개발용역과제의 개발 성과로 제조한 “마우스 병원성 인플루엔자 바이러스” 5 주에 대해서 각각 50 vials(1×10^6 pfu/mL 이상, 0.5mL)씩 제조하여 2차년도 과제 종료시점 이전 (2016년 5월 17일 기탁)에 질병관리본부에 제공하였음.

나. 각 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스의 5주에 대한 역가분석 결과

Mouse used for the preparation of mutant Influenza virus	Name of Mutant Virus	Concentration of Stock Solution (PFU/mL)
DBA/1J	DBA/1J_P9_C1	2.08×10^7
	DBA/1J_P11_C2	3.62×10^7
	DBA/1J_P13_C1	3.78×10^7
Balb/c	Balb/c_P8_C2	7.90×10^7
	Balb/c_P9_C2	4.80×10^7

제4장 최종 연구 결과

3차년도 연구 보고서

2014~2015 절기 인플루엔자 백신주 중 A(H3N2)형 바이러스에 대한 마우스 병원성주 개발

PART I : Influenza A virus H3N2 (A/Incheon/1593/2015)

PART II : Influenza A virus H3N2 (A/Hongkong/7127/2014)

3차년도 연구 보고서

2014~2015 절기 인플루엔자 백신주 중 A(H3N2)형 바이러스에 대한 마우스 병원성주 개발

PART I : Influenza A virus H3N2 (A/Incheon/1593/2015)

가. Wild Type의 Influenza A virus H3N2 (A/Incheon/1593/2015)의 대량생산

(1) 세포배양법을 이용한 바이러스 대량생산

H3N2 Influenza virus의 titer를 높이기 위해서 질병관리본부에서 분양받은 virus를 세포배양으로 대량생산을 수행하였음.

(가) 세포 배양 및 바이러스 생산

① 배양기간: 2016년 07월 실시

② Seed 바이러스: 질병관리본부로부터 제공받은 Influenza A virus H3N2(A/Incheon/1593/2015)를 사용하였음(0.5ml/vial).

③ 세포주에 따른 배양배지 조건

ⓐ 질병관리본부에서 제공받은 MDCK-SIAT 세포주

- DMEM + 10% Heat Inactivated FBS + 10ml(1mg/mL) Geneticin

ⓑ 한국세포주은행에서 분양받은 MDCK 세포주

- MEM + 10% Heat Inactivated FBS + 1% Penicillin/Streptomycin

④ 바이러스 감염용 배양 배지

ⓐ Preparation of Serum Free media

- prepare 500ml of Serum Free Media

: EX-CELL MDCK Serum-Free Medium(Sigma) for MDCK/MDCK-SIAT Cell Culture

: Animal-protein free, without L-glutamine, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture

- Add 5ml of 200mM L-glutamine(100x) into 500ml Serum Free Media

④ 배양액: 30ml serum free media/175cm² T-flask

⑤ Virus 생산 Protocol

ⓐ 세포배양용 175cm² T-flask(NUNC)에서 80~90% confluent MDCK/MDCK-SIAT cell이 되도록 배양한다. (App. 5x10⁷cells/T-flask)

ⓑ Culture media를 제거 후에 PBS로 T-flask를 1~2회 washing 한다.

ⓓ Influenza virus를 약 0.01 moi가 되도록 Serum Free Media에 적절하게 희석(약 5ml)한 seed virus 용액을 넣어 1시간 10분 동안 반응시켜 바이러스가 세포 내로 들어가도록 감염시킨다.

ⓔ 감염 후에 각 175cm² T-flask(NUNC)에 Serum Free Media 30ml을 첨가하고 3~5 일간 세포배양을 통해 바이러스를 증식시킨다.

ⓕ 세포배양이 완료되면 배양액을 무균적으로 회수하여 원심분리 후에 소분해서 -70℃ 초저온 냉동고에 보관하고 virus plaque assay 및 마우스 감염을 위한 바이러스로 사용한다.

④ Protocol of Virus Plaque Assay

① Plaque Assay Media

Reagent		Stock Solution	Media Prep.	Media Prep.
A	2x L-15 media	Ready to use	20ml	40ml
	HEPES	1M	800ul	1.6ml
	Gentamycin	50mg/mL	20ul	40ul
	Sodium bicarbonate	7.5%	400ul	800ul
	L-Glutamine	200mM	200ul	400ul
	TPCK trypsin	1mg/mL	40ul	80ul
			21.5ml	43ml
B	Seaplaque agarose	1.6%	21.5ml	43ml
A : B = 1 : 1		43ml / 3 plate		86ml / 6 plate

* TPCK trypsin의 Final Concentration: 1.0ug/ml로 고정

② Staining Buffer

Reagent	Prep. for Buffer
D.W.	300ml
1% Crystal violet (0.4g + 40ml DW)	40ml
Methanol (MeOH)	80ml
	420ml

③ Protocol

- ⓐ MDCK/MDCK-SIAT 세포주를 175cm² T-flask에 배양하여 90% 이상 자라면 세포를 counting하여 6-well plate에 well당 3 x 10⁵cell이 되도록 seeding하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하루동안 plate에 부착시킨다.
- ⓑ Virus를 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶으로 만들기 위해서 얼음에서 녹인 후 PBS로 serial dilution 진행한다(모두 얼음 위에서 진행).
- ⓒ 6-well plate를 꺼내 PBS를 이용하여 조심스럽게 washing한다(2회 반복).
- ⓓ Serial dilution하여 준비해 둔 virus를 각 well마다 200ul씩 조심스럽게 분주한다.
- ⓔ 6개의 well 중 5개까지 연속적으로 희석한 virus를 넣고 마지막 well은 control로써 배양배지 만을 넣어준다.
- ⓕ 6-well plate를 37°C, 5% CO₂ incubator에서 15분 간격으로 tilting하며, 1시간 10분 동안 virus를 cell에 흡착시킨 다음 상층액을 suction apparatus를 사용하여 제거한다.
- ⓖ Plaque assay media는 L-15 media(40ml)에 1M HEPES(1.6ml), 50mg/mL gentamycin(0.04mL), 7.5% sodium bicarbonate(0.8mL), 200mM L-Glutamine(0.4ml), 1mg/mL TPCK trypsin(80ul)을 넣고 제조한다(상기 Table 참조).
- ⓗ 미리 만들어둔 1.6% Seaplaque agarose(Low melting temperature agarose)를 1대 1로 섞어 2ml씩 조심스럽게 넣어준다. 이때 plaque assay media와 1.6% seaplaque agarose는 사용 직전에 혼합하며 그 온도가 높아 세포에 영향을 주지 않도록 37°C를 유지시킨다.
- ⓘ Agarose가 잘 굳도록 2시간 정도 말린 후 37°C, 5% CO₂ incubator에 넣고 plaque이 보일 때까지 약 2~3일 정도 배양한다(3일이 최적).
- ⓙ Plaque가 눈으로 보이면 plaque를 좀 더 선명히 보기 위해 사전에 제조한 staining buffer(D.W. 300ml + crystal violet 40ml + MeOH 80ml)를 잘 섞은 후 한 well 당 2ml씩 넣고 3시간 정도 실온에서 염색한다.

⑨ 염색한 후 plate는 수돗물에 세척하여, 건조시킨 후 plaque 개수를 세어 pfu/ml 단위로 정량 분석한다(PFU=average plaques x dilution factor/mL).

(d) Mouse 감염을 위한 Influenza A virus (H3N2) 농축 및 역가측정

① Virus 배양액 농축

- ⓐ 바이러스 배양액 385ml(11개 T-flask 사용, 35ml/175cm² T-flask)을 4℃에서 3,000rpm, 10분간 원심분리하여 상층액을 분리한다.
- ⓑ Amicon(MW 100,000 filter)을 사용하여 최종부피가 약 10ml(약 38.5배 농축)이 되도록 농축한 후에 4℃에서 3,000rpm, 10분간 원심분리하여 상층액을 분리한다.
- ⓓ 최종적으로 얻어진 바이러스 농축액은 멸균된 E-tube에 옮겨서 10,000rpm, 5분간 고속 원심분리하여 상층액을 수득한다.
- ⓔ 최종적으로 수득한 바이러스 농축액은 Cryo-vial에 소분하여 -70℃ 초저온냉동고에 보관하였으며 mouse 감염시험, viral RNA 분리, 농축 virus의 역가분석 등을 위해 사용하였다.

② Virus 배양 농축액의 역가 검증

- ⓐ 바이러스 배양 농축액을 virus plaque assay를 통해 역가를 측정하였음.
- ⓑ 바이러스 배양 농축액의 농도: 1.6×10^2 pfu/mL

Figure 1. Result of virus plaque assay on the concentrate of H3N2 Influenza virus culture supernatant using MDCK-SIAT

P0 농축액 (pfu/mL)	
원액	24
	1.2×10^2
10^{-1}	4
	2.0×10^2
Average	1.6×10^2

(2) Mouse Adapted Influenza Virus의 제조

(가) 10배 농축한 Virus 배양액을 이용한 Mice Passage (STEP 1.2.1)

① 실험 목적

대량 세포배양 방법을 이용하여 생산한 Wild Type(WT) Influenza virus 배양 농축액을 마우스 병원성의 Mutant Type(MT) Influenza virus를 개발하기 위한 초기 감염원으로 사용하였다. 또한, 초기에는 의미가 있는 임상증상 및 체중감소 현상을 보이는 시점까지는 “Lung-Cell-Lung Passage“를 수행하고 그 이후에 기존의 “Lung-to-Lung Passage“를 이용하여 마우스 병원성 Influenza virus를 제조하고자 하였다.

② 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험동물	Balb/c 및 DBA/1J	
1 st Infection Source	MDCK-SIAT 세포주에서 배양한 H3N2 농축액(P0)	P0
Virus Challenge	- Intranasal 경로로 1회 50ul/head 투여 - Lung Infection → Cell Culture of Lung Homogenate → Lung Infection을 반복적으로 수행하였음.	마우스 폐 1개 당 PBS 0.5ml 첨가하여 균질화하여 투여
관찰항목	- 매일 임상증상 관찰, 체중 측정 및 사망개체 확인 - 동물 투여 전에 농축한 배양액은 “제네디아 Rapid Kit“를 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인하였음.	
결과요약	- P5까지 진행하였으나 임상증상 및 체중감소율이 기대에 미치지 못하였고, <u>P5의 농축 배양액부터 kit에서 band가 확인되지 않아 중단함.</u>	P0~P5

③ 실험 결과

- Balb/c 마우스를 이용한 passage에서 바이러스 감염 1일차에 체중감소 경향이 다소 관찰되었으나, 이후 체중이 복원되어 관찰기간 동안 정상체중으로 유지되었고, passage 5에서는 이와 같은 체중감소는 관찰되지 않았다.
- DBA/1J에서도 Balb/c와 유사하게 감염 1일차에 체중이 감소하는 경향을 보였고 passage 2에서 좀더 두드러졌으나 체중이 감소된 범위가 10%에 미치지 못하였다. 또한 passage 5는 이와 같은 변화가 관찰되지 않았다.

- 바이러스에 infectivity가 높은 DBA/1J strain에서도 특징적인 임상증상 및 체중감소가 관찰되지 않은 이유는 최초 감염원의 낮은 titer로 인하여 nasal infection 후 lung에서 naturally immune clearance 되는 것으로 판단되며 동시에 H3N2 Influenza virus 특성에 기인하는 것으로 사료된다.
- 따라서 마지막으로 kit에서 band가 관찰되었던 passage 4의 농축 배양액을 이용하여 MDCK-SIAT cell에서 passage를 진행하기로 하였다.

Figure 1. Identification of H3N2 Influenza virus for each passage using rapid kit for H3N2 detection

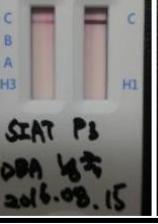
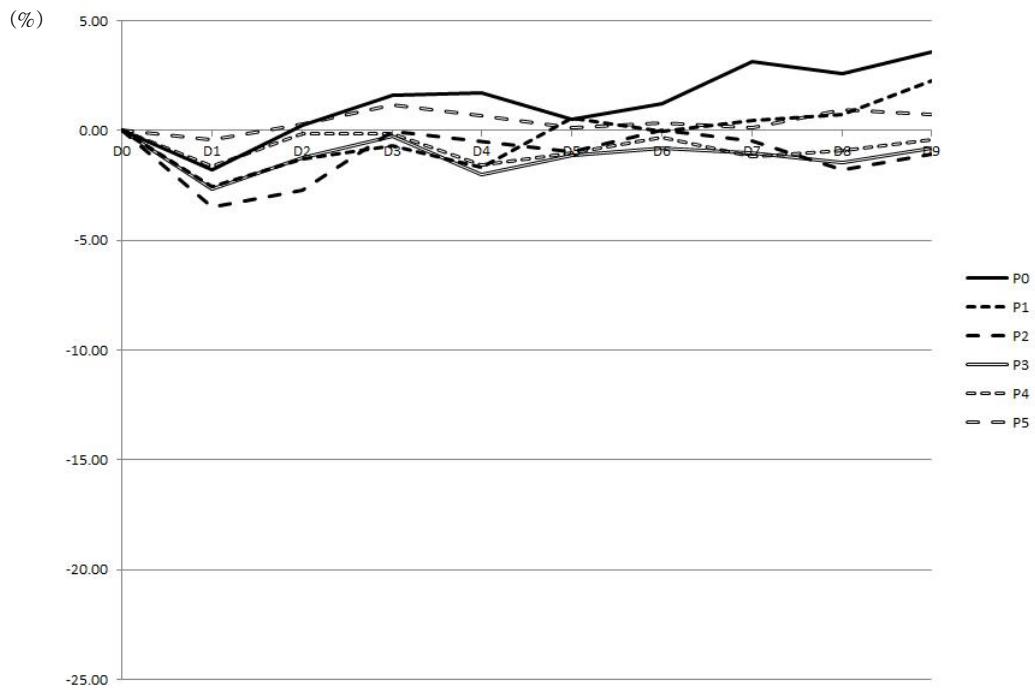
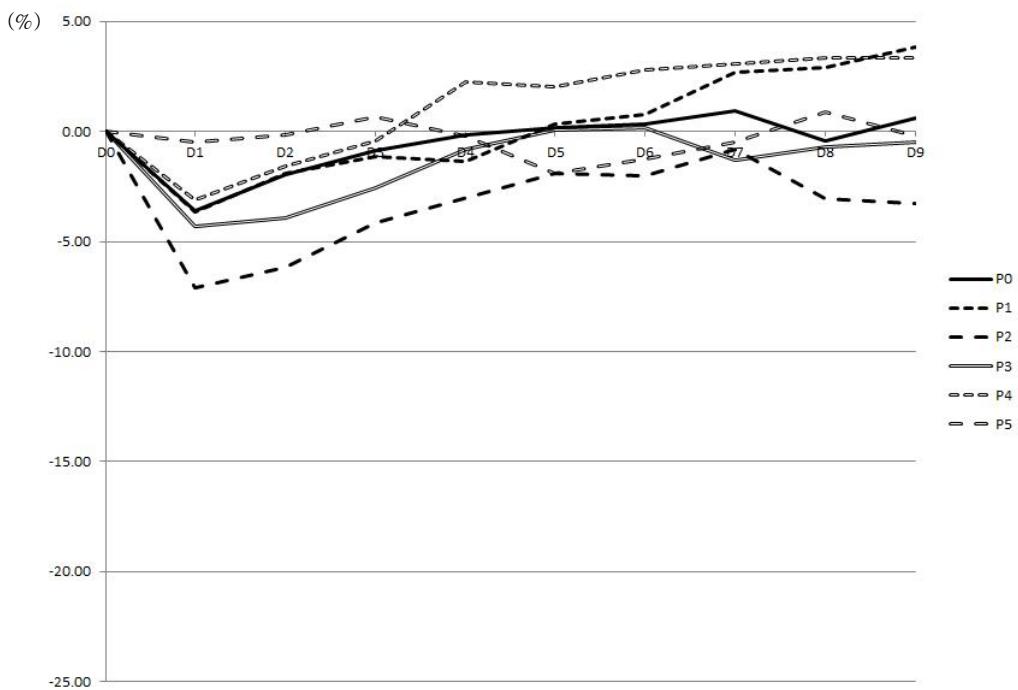
Strain	Passage 0	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
Balb/c						
DBA/1J						

Figure 2. Ratio of body weight loss

1) Balb/c



2) DBA/1J



(4) MDCK-SIAT Cell Passage (STEP 1.2.2)

① 실험 목적

이전 단계에서 획득한 passage 4 lung lysate의 배양농축액을 초기 감염원으로 사용하여 MDCK-SIAT cell에서 passage를 수행함으로써, Influenza virus의 titer를 실험동물에서 passage를 진행할 수 있는 수준으로 높이고자 하였다.

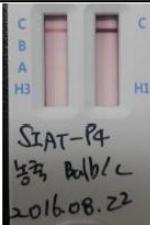
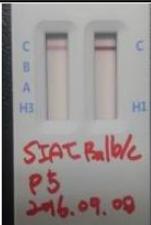
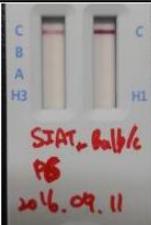
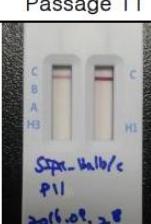
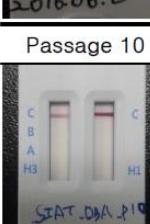
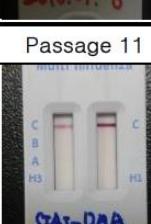
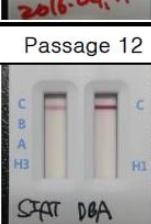
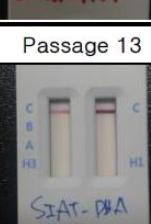
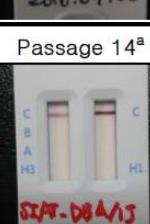
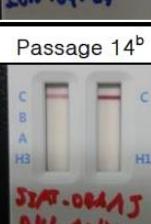
② 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
Host	MDCK-SIAT Cell	
1 st Infection Source	“10배 농축배양액 Passage” 의 P4 Lung Lysate의 배양농축액	P4
Virus Challenge	- 바이러스 배양액의 상층액을 농축 → 새로운 MDCK-SIAT Cell Culture 과정을 반복적으로 수행하였음.	
관찰항목	- Cell Infection 전에 농축한 배양액은 “제네디아 Rapid Kit”를 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인하였음.	
결과요약	- Passage를 진행하는 동안 Kit에서 Band가 매우 희미하게 관찰됨. - <u>P14의 배양액을 40배까지 농축하고 Mice을 이용한 Passage를 진행하기로 함.</u>	P5~P14

③ 실험 결과

- 실험동물 passage 단계에서 최종적으로 band가 확인된 passage 4의 Balb/c와 DBA/1J mouse lung lysate를 이용하여 cell passage를 진행하고 kit로 단계마다 중간점검하여 cell을 통한 mutation과 titer가 높아지기를 기대하였으나, passage 5부터 14까지 수행하는 동안 band의 선명도는 개선되지 않았다.
- Cell passage 만으로 Influenza virus의 유전자 변이를 유도하기 어렵다고 판단되었고 passage 14 농축 배양액을 40배까지 농축하고, mice passage 단계로 진행하기로 하였다.

Figure 1. Identification of H3N2 Influenza virus for each passage using rapid kit for H3N2 detection

Strain	Passage 4	Passage 5	Passage 6	Passage 7	Passage 8	Passage 9
MDCK-SIAT Cell (Balb/c)						
	SIAT-P4 농축 Balb/c 2016.08.22	SIAT-Balb/c P5 2016.09.08	SIAT-Balb/c P6 2016.09.11	SIAT-Balb/c P7 2016.09.11	SIAT-Balb/c P8 2016.09.20	SIAT-Balb/c P9 2016.09.23
	Passage 10	Passage 11	Passage 12	Passage 13	Passage 14 ^a	Passage 14 ^b
						
	SIAT-Balb/c-P10 2016.09.26	SIAT-Balb/c P11 2016.09.28	SIAT-Balb/c P12 2016.10.02	SIAT-Balb/c P13 2016.10.05	SIAT-Balb/c P14 2016 2016.10.14	SIAT-Balb/c P14 40B4 2016.10.14
	Passage 4	Passage 5	Passage 6	Passage 7	Passage 8	Passage 9
MDCK-SIAT Cell (DBA/1J)						
	SIAT-P4 농축 DBA/1J 2016.08.22	SIAT-DBA P5 2016.09.08	SIAT-DBA P6 2016.09.11	SIAT-DBA/0.P7 2016.09.17	SIAT-DBA P8 2016.09.20	SIAT-DBA-P9 2016.09.23
	Passage 10	Passage 11	Passage 12	Passage 13	Passage 14 ^a	Passage 14 ^b
						
	SIAT-DBA-P10 2016.09.26	SIAT-DBA P11 2016.09.28	SIAT-DBA P12 2016.10.02	SIAT-DBA P13 2016.10.05	SIAT-DBA/1J P14 2016 2016.10.17	SIAT-DBA/1J P14 40B4 2016.10.17

a: Enriched at 5%

b: Enriched at 2.5%

(d) 40배 농축된 Virus 배양액을 이용한 Mice Passage (STEP 1.2.3)

① 실험 목적

바이러스 titer를 높이기 위한 cell passage 단계에서 마우스 병원성의 MT Influenza virus 제조단계로 진행하기 위하여, MDCK-SIAT cell passage 단계에서 passage 14의 40배 농축된 배양액을 초기 감염원으로 사용하였고, Balb/c와 DBA/1J line에서 유래한 Influenza virus를 모두 infectivity가 높은 DBA/1J mice strain에 우선적으로 적용하기로 하였다.

② 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험동물	DBA/1J	
1 st Infection Source	Passage 4의 Balb/C, DBA/1J mice의 lung lysate를 이용한 MDCK-SIAT Cell Passage 14의 농축배양액	P0
Virus Challenge	<ul style="list-style-type: none"> - Intranasal 경로로 1회 50ul/head 투여 - Lung Infection → Cell culture of Lung Homogenate → Lung Infection을 반복적으로 수행하였음 - 감염 2~3일차에 <u>체중변화가 가장 큰 Mouse 1수만 선별</u>하여 Passage 진행 	마우스 폐 1개 당 PBS 0.5ml 첨가하여 균질화하여 투여
관찰항목	<ul style="list-style-type: none"> - 매일 임상증상 관찰, 체중 측정 및 사망개체 확인 - 동물 투여 전에 농축한 배양액 및 감염 후에 얻어진 Lung Homogenate는 “제네디아 Rapid Kit”를 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인하였다. 	
결과요약	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Balb/c는 P9, DBA/1J는 P10까지 진행하였으나, 임상증상 및 체중감소율이 기대에 미치지 못하였으며, Balb/c의 P9, DBA/1J의 P10 체중이 2일차를 기점으로 증가하여 중단함.</u> 	P0~P10

③ 실험 결과

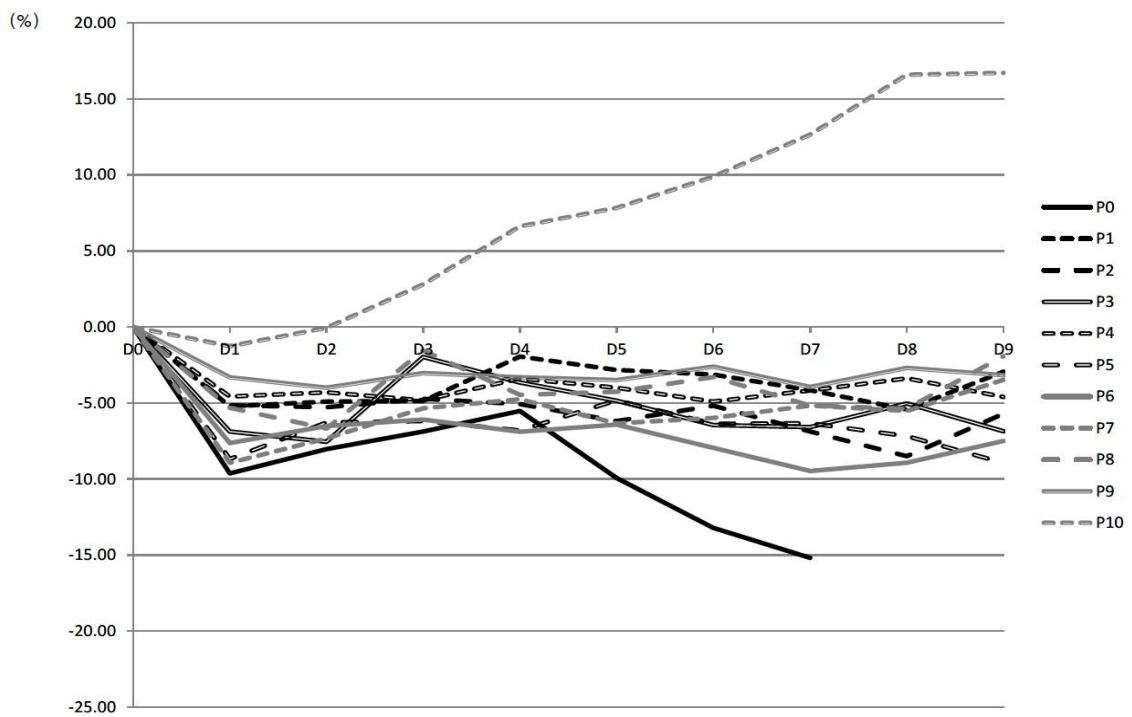
- DBA/1J mice에 Balb/c와 DBA/1J line을 감염시킨 모든 passage에서 투여 1일차에 체중이 감소하는 경향이 관찰되었고, 관찰기간 동안 평균체중이 투여 전보다 낮게 유지되었으며, Balb/c line의 passage와 DBA/1J line의 passage 5와 6은 감염 전 대비 10% 이상의 체중변화가 확인되었다. 그러나 특징적인 임상증상은 관찰되지 않았다.
- 계속 유사한 경향이 관찰되었으나, Balb/c의 passage 9와 DBA/1J의 passage 10 체중변화가 정상수준으로 관찰되어 “Lung-Cell-Lung Passage” 실험을 종료하였다.

Figure 1. Identification of H3N2 Influenza virus for each passage using rapid kit for H3N2 detection

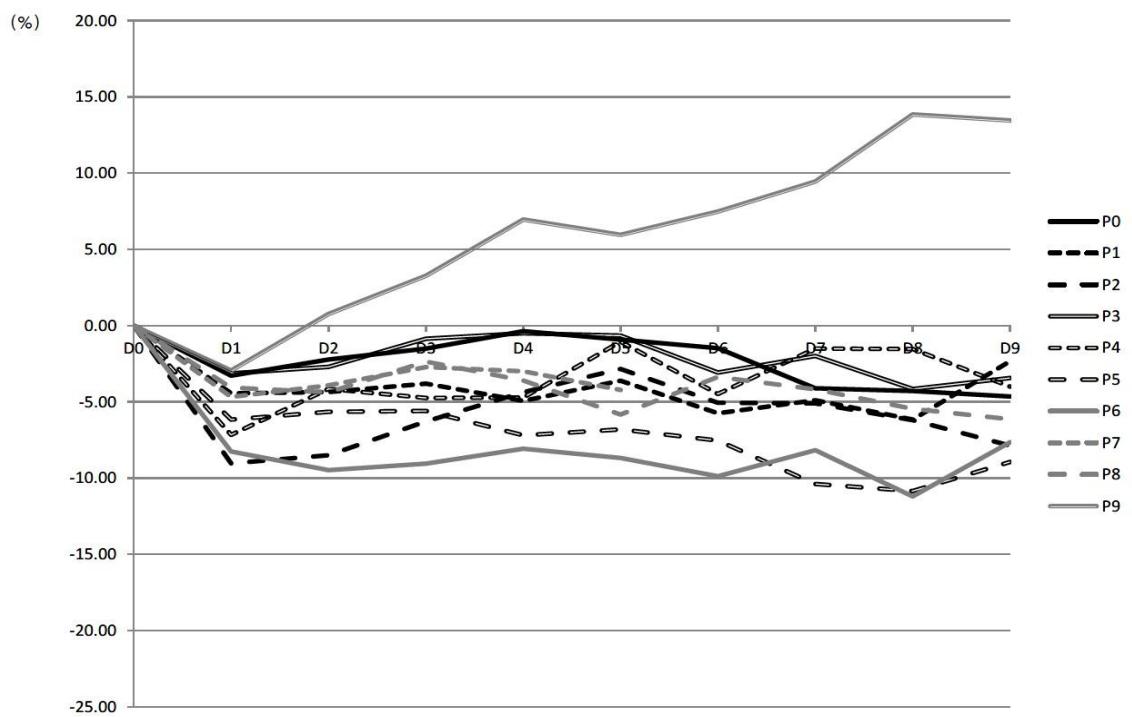
Strain	Infection Source	Passage 0	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4
Balb/c Lung Lysate Concentration → DBA/1J Mice	Multi influenza					
	C B A H3 HS	C	C	C	C	C
	SIAT-Balb/c P15 408M 2016.10.14					
	Balb/c → DNA 2016.10.25					
	B → D P2 2016.10.31					
	B → D P3 2016.11.06					
	B → D P4 2016.11.11					
	Multi influenza					
	C B A H3 HS	C	C	C	C	C
	B-D P5 lung 2016.11.16					
Strain	Infection Source	Passage 0	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4
DBA/1J Lung Lysate Concentration → DBA/1J Mice	Multi influenza					
	C B A H3 HS	C	C	C	C	C
	SIAT-DBA/1J P14 408M 2016.10.17					
	DBA → DBA 2016.10.25					
	D → D P1 2016.10.31					
	D → D P2 2016.11.06					
	D → D P3 2016.11.11					
	D → D P4 lung 2016.11.16					
	Multi influenza					
	C B A H3 HS	C	C	C	C	C
Passage 5	Multi influenza					
	C B A H3 HS	C	C	C	C	C
Passage 6	Multi influenza					
	C B A H3 HS	C	C	C	C	C
Passage 7	Multi influenza					
	C B A H3 HS	C	C	C	C	C
Passage 8	Multi influenza					
	C B A H3 HS	C	C	C	C	C
Passage 9	Multi influenza					
	C B A H3 HS	C	C	C	C	C
Passage 10	Multi influenza					
	C B A H3 HS	C	C	C	C	C
Strain	Infection Source	Passage 0	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4
DBA/1J Lung Lysate Concentration → DBA/1J Mice	Multi influenza					
	C B A H3 HS	C	C	C	C	C
	D → D P5 lung 2016.11.22					
	D → D lung P6 2016.11.28					
	D → D P7 lung 2016.12.04					
	D → D P8 lung 2016.12.10					
	Multi influenza					
	C B A H3 HS	C	C	C	C	C
	D → D P9 lung 2016.12.10					
	D → D P10 lung 2016.12.10					

Figure 2. Ratio of body weight loss

1) Balb/c



2) DBA/1J



(a) MDCK Cell Passage

① 실험 목적

Influenza virus의 titer를 실험동물에서 passage를 진행할 수 있는 수준으로 높이기 위한 목적으로 MDCK-SIAT 세포주 대신에 MDCK 세포주로 변경하여 passage를 수행하였다.

② 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
Host	MDCK Cell	
1 st Infection Source	MDCK-SIAT 세포주에서 배양한 H3N2 농축액	P0
Virus Challenge	- 바이러스 배양액의 상층액을 농축 → 새로운 MDCK Cell Culture 과정을 반복적으로 수행하였다.	
관찰항목	- Cell Infection 전에 농축한 배양액은 “제네디아 Rapid Kit”를 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인하였음.	
결과요약	- P10까지 지속적으로 진행하였으나 <u>Rapid Kit에서 Band 가 확인되지 않아 중단함.</u>	P0~P10

Figure 1. Identification of H3N2 Influenza virus for each passage using rapid kit for H3N2 detection

Strain	Passage 0	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
MDCK Cell						
MDCK Cell	Passage 6	Passage 7	Passage 8	Passage 9	Passage 10	-
						-

■ Summarized Data for Influenza A Virus H3N2 (A/Incheon/1593/2015)

실험	세 부 내 용					결과
	동물/ 세포주	Infection Source	Virus Challenge	Passage	관찰 항목	
1	Balb/c DBA/1J	MDCK-SIAT 유래 배양농축액 (P0)	- IN route - 50ul/head	Lung-Cell-Lung Passage	- 임상증상 관찰 - 체중 측정 - 사망개체 확인 - “제네디아 Rapid Kit”로 바이러스 확인시험	1) P0~P5 시행 2) Lung-to-Lung Passage를 위한 기준치에 미달
2	MDCK- SIAT	“실험1” 의 <u>P4 Lung</u> <u>Lysate</u> 의 배양농축액	- 바이러스 배양액의 농축	Cell-to-Cell Passage (MDCK-SIAT Cell에 반복수행)	- “제네디아 Rapid Kit”로 바이러스 확인시험	1) P5~P14 시행 2) <u>Passage를</u> <u>진행하는 동안</u> <u>Band Intensity가</u> <u>매우 약하게</u> <u>관찰됨</u> 3) P14의 배양액을 40배까지 농축하고 Mice을 이용한 Passage를 진행
3	DBA/1J	“실험2” 의 MDCK-SIAT Cell Passage 14의 배양농축액	- IN route - 50ul/head	Lung-Cell-Lung Passage (<u>체중변화가</u> <u>가장 큰 Mouse</u> <u>1수만 선별</u> 하여 Passage)	- 임상증상 관찰 - 체중 측정 - 사망개체 확인 - “제네디아 Rapid Kit”로 바이러스 확인시험	1) Balb/c는 P9, DBA/1J는 P10까지 진행하였으나, 임상증상 및 체중감소율이 기대에 미치지 못함 2) <u>Balb/c의 P9,</u> <u>DBA/1J의 P10</u> <u>체중이 2일차를</u> <u>기점으로 증가하여</u> <u>중단함</u>
4	MDCK Cell	MDCK-SIAT 유래 배양농축액 (P0)	- 바이러스 배양액의 농축	Cell-to-Cell Passage (MDCK Cell에 반복 수행)	- “제네디아 Rapid Kit”로 바이러스 확인시험	1) P0~P10 수행 2) <u>Rapid Kit에서</u> <u>Band Intensity가</u> <u>증가하지</u> <u>않아 중단함</u>

PART II : Influenza A virus H3N2 (A/Hongkong/7127/2014)

가. Wild Type의 Influenza A virus H3N2 (A/Hongkong/7127/2014) 대량생산

선행실험 결과, 분리주인 A/Incheon/1593/2015는 제공받은 원액의 virus titer가 낮고, 세포배양 방법을 통한 대량생산 및 농축으로 passage를 진행할 수 있는 수준의 virus titer가 만들 어지지 않았으며, 감염시킨 마우스에서 병원성이 확인되지 않았기 때문에 발주부서인 인플루엔자바이러스과와 협의 하에 백신주인 A/Hongkong/7127/2014를 추가적으로 분양받아 과제를 진행하였다.

(1) Influenza A virus H3N2 (A/Hongkong/7127/2014) 확인

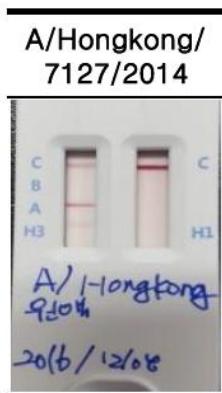
(가) 실험 목적

Passage 진행과정 중 바이러스 존재 유무를 빠르게 확인하기 위한 목적으로 “제네디아 Rapid Kit (Rapid Kit)”를 이용한 점검방법이 적합한지 여부를 확인하기 위하여 질병관리본부로부터 분양받은 인플루엔자 바이러스 A/Hongkong/7127/2014 원액을 가지고 Rapid Kit를 사용하여 분석하였다.

(나) 실험 결과

대조선(C)보다 좀 더 진한 A band를 확인하였으며, H3의 경우에는 미약하게 반응이 일어남을 확인하였다.

Figure 1. Detection of Influenza A virus(A/Hongkong/7127/2014) using rapid kit



(2) 세포배양법을 이용한 대량생산

(1) 실험 목적

질병관리본부에서 분양받은 Wild Type의 Influenza A virus H3N2 (A/Hongkong/7127/2014)으로 마우스 병원성주의 인플루엔자 바이러스를 개발하기 위해서는 높은 농도의 인플루엔자 바이러스가 필요하며, 이를 위해서 세포배양법을 이용하여 바이러스를 대량 생산하고 농축하여 감염 접종원(P0)으로 사용하고자 하였다.

(2) 실험 방법

- ① 1, 2차년도에 사용한 바이러스 대량생산 방법을 동일하게 적용하였으며 실험과정은 다음과 같다. 인플루엔자 바이러스의 배양 및 농축을 위해 Serum Free Media(SFM) 55mL에 바이러스 1vial을 희석하고, 11개의 T-175 flask에 배양하여 준비한 MDCK cell(약 3~6 x 10⁷ cells)에 각각 5mL을 첨가하여 세포 내에 바이러스를 감염시킨 다음, washing 없이 flask 당 25mL의 SFM를 첨가하고 CO₂ incubator에서 3일간 세포배양하여 바이러스를 대량으로 증식시켰다. 세포배양이 완료되면 배양액을 무균적으로 회수하여 원심분리 한 후, XFUF07601(AMICOM Bioseparation)으로 초기 배양 부피의 10배 이상 농축하였으며 적절히 소분하여 -70°C deep freezer에 보관하고 사용하였다.
- ② 3차년도에 분양받은 바이러스(A/Hongkong/7127/2014) 원액의 virus titer가 낮으므로 세포 배양 및 농축조건을 변경하여 적용하였고, 시험진행에 따라 추가적으로 생산하였다.

(3) 실험 결과

- ① 총 5차에 걸쳐 세포배양 실험을 수행하였으며, 이에 대한 결과는 다음과 같다. 바이러스의 titer를 높이기 위해 배양조건 또한 부분적으로 변경하여 수행하였다.

항 목	1차 생산	2차 생산	3차 생산	4차 생산	5차 생산
배양기간	3일 / 4일	3일	4일	4일	4일
배양세포	MDCK-SIAT	MDCK-SIAT	MDCK-SIAT	MDCK-SIAT / WI-38	MDCK-SIAT
배양조건	T-175 flask	T-75 flask	T-75 flask	T-75 flask	T-75 flask
	3 flasks	1 flask	9 flasks	4 flasks	10 flasks
	virus 130ul	virus 100ul	virus 500ul	virus 100ul	virus 400ul
	60ml / 30ml	20ml	200ml	100ml	200ml
농축	3ml / 1.5ml	2ml	5ml	1ml	5ml
	20배	10배	40배	100배	40배
	Centricon	Centricon	Amicon	Centricon	Centricon

② 1차 생산에서 세포배양 3일차(Figure 1)에 10배 농축하여 Rapid Kit로 확인한 결과, A항 원에 대한 band 확인하였으나 대조선(C)보다 band 색이 약하게 반응하였다. 이에 배양기간 확인 목적으로 T-175 flask 2개 분량의 배양액은 3일차, T-175 flask 1개 분량의 배양액은 4일차에 20배 농축하여 Rapid Kit로 확인하고 -70°C deep freezer에 보관하였다. Rapid Kit에서 band 반응정도는 3일차와 4일차의 20배 농축액은 유사하였고, 3일차의 10배 농축보다는 강하게 반응하였다.

Figure 1. Morphology change of MDCK-SIAT cell for 4 days after infection with 1st P0

1 st P0 : P0 Infection to MDCK-SIAT Cell				
Magnification	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3
×100				
×200				

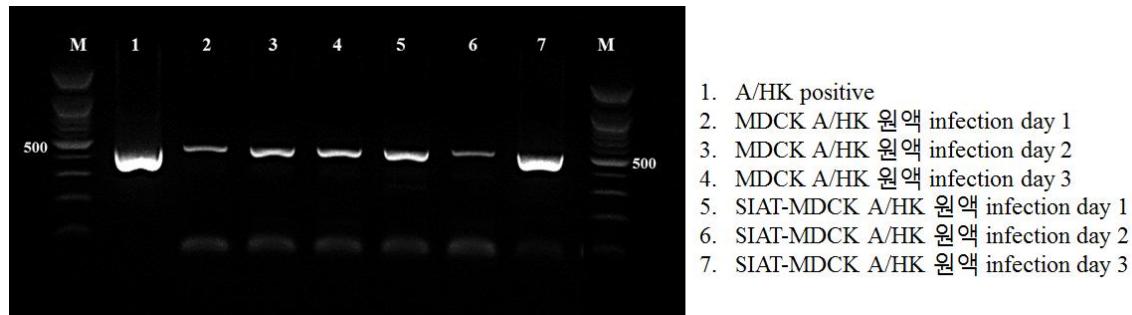
③ 2차 생산에서는 cell당 바이러스 수를 늘리고자 T-175 flask에서 T-75 flask로 바꿔 진행 했으며, 배양과정에서 바이러스에 감염된 세포만으로 배양을 진행하기 위하여 바이러스 감염시킨 후 2회 washing 과정을 실시하고 SFM를 첨가하였다. 세포배양은 MDCK-SIAT 와 MDCK cell을 함께 진행하였으나, MDCK-SIAT cell만 3일차에 농축하였다(Figure 2).

Figure 2. Morphology change of MDCK-SIAT and MDCK cell for 4 days after infection with A/Hongkong/7127/2014

A/Hongkong/7127/2014 Infection (Original Virus) to MDCK Cell and MDCK-SIAT Cell				
Cell	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3
MDCK				
MDCK-SIAT				

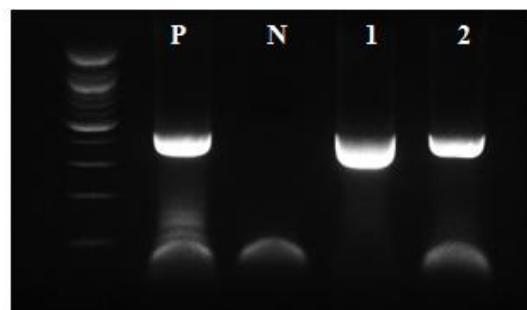
또한, 바이러스 대량생산 세포주로 사용이 되고 있는 MDCK와 MDCK-SIAT cell의 virus infection 효율을 비교하기 위하여 총 3일간의 culture media에서의 virus 유무를 RT-PCR로 확인해본 결과 MDCK보단 MDCK-SIAT가 PCR결과 더욱 강한 밴드가 나오는 것을 확인하였다(Figure 3, lane 2-7).

Figure 3. RT-PCR result for the detection of virus on culture supernatant of MDCK and MDCK-SIAT cell infected with Influenza A virus (A/Hongkong/7127/2014) for 3 days



- ④ 1차 P0를 이용한 *in vitro* 시험 결과에서 3일차와 4일차 배양농축액에 따른 결과의 차이가 관찰되어 3차 생산부터는 세포배양 4일차에 배양액을 회수하여 농축하였다.
- ⑤ 4차는 A/Hongkong/7127/2014에 감염된 MDCK-SIAT, WI-38 cell의 배양액을 100,000g에서 2시간 ultracentrifugation을 통해 100배로 고 농축하였으나, RT-PCR 결과에서 100배 농축배양액과 상층액 모두에서 band가 확인되어 본 조건에서는 고 농축되지 않은 것으로 판단하였다(Figure 4).

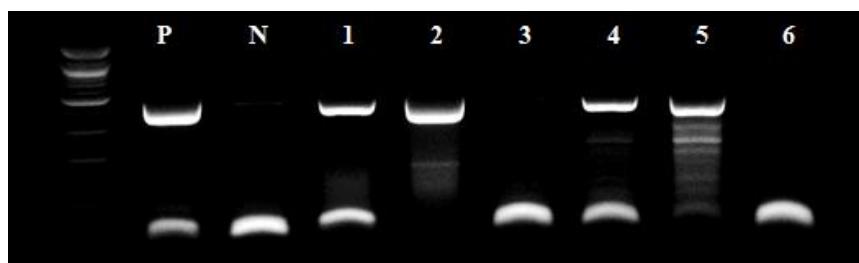
Figure 4. Comparison of Influenza virus quantity between pellet and supernatant separated by ultracentrifugation after infection with A/HK origin virus in MDCK-SIAT cell



- 1.A/HK 원액 infection SIAT-MDCK day 4 ultracentrifuge X100
- 2.A/HK 원액 infection SIAT-MDCK day 4 ultracentrifuge X100 상층액

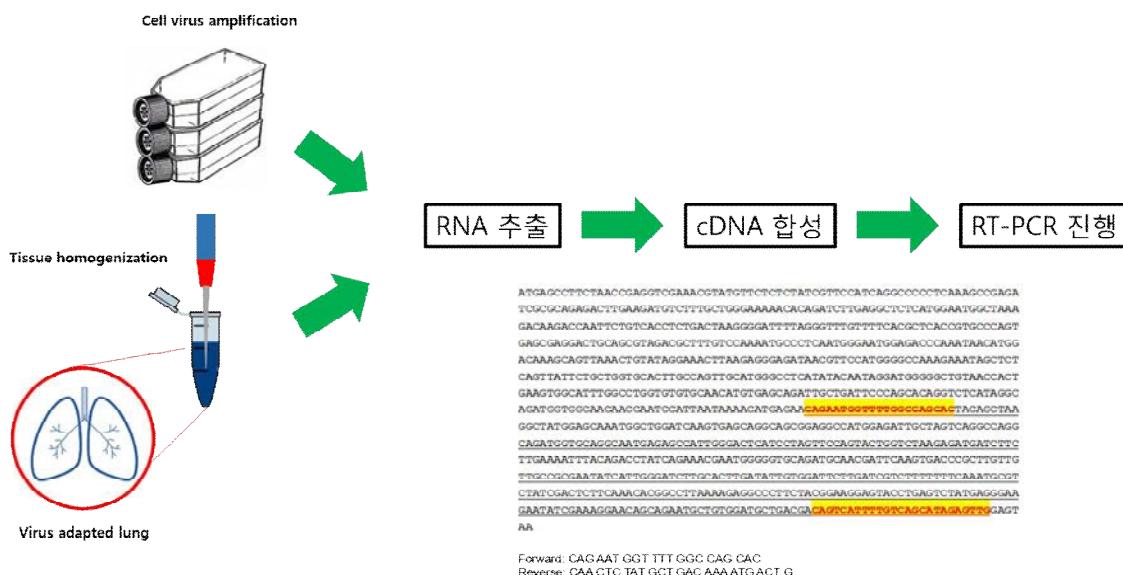
⑥ MDCK-SIAT와 WI-38 cell에 A/HK 원액을 처리하고 4일 후에 배양액을 회수하여 100배 농축을 진행하여 A/HK P0를 확보하였다. Amincon을 사용한 10배 농축과정에서 정상적으로 바이러스 농축이 되지 않는 원인 모를 문제점이 발견되었고 이를 극복하기 위하여 ultracentrifuge를 이용하여 농축을 진행(100,000xg, 2시간)하였지만 바이러스의 농축이 되지 않았다. 그러나 바이러스 농축을 disposable Centricon으로 변경하여 사용하는 경우에는 그 어떤 문제도 발견되지 않고 농축이 잘 되는 것으로 확인되었다(Figure 5).

Figure 5. Comparison of Influenza virus quantity between pellet and supernatant separated by Centricon after infection with A/HK original virus in MDCK-SIAT and WI-38 cell



- 1.A/HK 원액 infection SIAT-MDCK day 4
- 2.A/HK 원액 infection SIAT-MDCK day 4 X 100 농축
- 3.A/HK 원액 infection SIAT-MDCK day 4 X 100 농축 filtrated media
- 4.A/HK 원액 infection WI-38 day 4
- 5.A/HK 원액 infection WI-38 X 100 농축
- 6.A/HK 원액 infection WI-38 X 100 농축 filtrated media

첨부자료: RT-PCR을 이용한 H3N2 Influenza virus의 확인



A. RNA의 추출: Bioneer AccuPrep Viral RNA Extraction Kit

- ① 1.5ml tube에 10ul의 proteinase K(20mg/ml) 10ul를 넣고 200ul의 시료를 넣는다.
- ② 400ul의 binding buffer(poly A 포함)를 넣고 10초 동안 혼합(pulse-vortex)하여 56도에서 10분간 반응시킨다.
- ③ 100ul의 isopropanol을 넣고 10초 동안 혼합(pulse-vortex)하고 spin-down 한다.
- ④ Binding column에 용약을 모두 옮기고 6000g에서 1분간 원심분리 한다.
- ⑤ Binding column을 꺼내어 새로운 collection tube에 끼우고 500ul의 W1 buffer를 넣고 1분간 6000g에서 원심분리 한다(1번째 wash).
- ⑥ Binding column을 꺼내어 폐액을 버리고 500ul의 W2 buffer를 넣고 6000g에서 1분간 원심분리 한다(2번째 wash).
- ⑦ 최대 속도로 1분간 원심분리를 하여 ethanol을 최대한 제거하고, 새로운 1.5ml tube로 옮기고 50ul의 elution buffer를 넣고 5분간 상온에서 반응시킨다.
- ⑧ 6000g에서 1분간 원심분리하고 RT-PCR을 수행하기 전까지 냉동 보관한다.

B. RT-PCR

H3N2 Influenza virus의 확인을 위하여 Influenza A virus의 구조 중 matrix protein 1, matrix protein 2, complete CDs에 해당하는 M1, M2 유전자 서열(Genbank LC032892.1)을 참고하여

primer를 제작하여 분석하였다.

a) primer design

Forward: CAG AAT GGT TTT GGC CAG CAC

Reverse: CAA CTC ATG CTG ACA AAA ATG ACT G

b) RT-PCR 반응: Bioneer AccuPower RT-PCR premix

- ① 추출된 RNA sample 4 ul와 reverse primer (15 pmole)을 섞고 70도에서 5분간 반응시킨다.
- ② 반응이 끝난 시료와 forward primer(15 pmole)를 AccuPower RT-PCR premix tube에 옮기고 최종 부피를 DEPC-DW을 이용하여 20ul로 맞춘다.
- ③ 진조된 pellet을 혼합하고 간단히 spin-down하고 아래의 조건과 같이 one step RT-PCR을 수행한다.

Table 1. Optimized PCR condition for the identification and characterization of H3N2 Influenza virus

반응 종류	조건	반응 반복수
cDNA synthesis	42°C 60min	1 cycle
Initial Denaturation	95°C 10min	
Denaturation	95°C 30sec	35 cycles
Annealing	50°C 30sec	
Extension	72°C 60sec	
Final Extension	72°C 10min	1 cycle
Cooling	4°C ∞	

나. Mouse Adapted Influenza Virus의 제조를 위한 조건시험

(1) 기존 Protocol에 따라 수행한 시험 (STEP 2.2.1)

(가) 실험 목적

A/Hongkong/7127/2014에 대해 20배 배양농축액을 이용하여 마우스 내에서 병원성을 보일 가능성이 있는지를 확인하기 위하여 lung-cell-lung passage를 실시하였다.

(나) 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	DBA/1J 29수	
Virus Type	세포배양 3일차(1 st P0_D3)와 4일차(1 st P0_D4)에 희수한 1차 배양농축액 (Figure 1)	1 st P0
Virus Challenge	<p>STEP 2.2.1.1</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1st P0_D3는 7수, 1st P0_D4는 5수에게 intranasal 경로로 1회 50uL/Head 투여 - 1st P0_D3는 감염 3일차, 1st P0_D4는 감염 4일차에 각 2 수의 폐를 적출하여 균질화 <p>STEP 2.2.1.2</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1st P0_D3는 9수, 1st P0_D4는 8수에게 intranasal 경로로 1회 50uL/Head 투여 - 1st P0_D3: 감염 1, 2, 3일차에 3마리씩 폐를 적출하여 균질화하고, 일차별 lung homogenate는 pooling (Figure 2) - 1st P0_D3의 1, 2, 3일차 lung homogenate는 각각 T-75 flask 2개씩에서 세포배양하고 20배 농축 (Figure 2) - 1st P0_D4: 감염 1, 2, 3, 4일차에 2마리씩 폐를 적출하여 균질화하고, 일차별 lung homogenate는 pooling (Figure 3 & 4) 	마우스 폐 1개 당 PBS 0.5mL 첨가하여 균질화하여 투여
관찰 항목	<ul style="list-style-type: none"> - 매일 임상증상, 체중 측정 및 사망개체 확인(Figure 5) - 감염 후에 얻어진 Lung Homogenate는 ‘제네디아 Rapid Kit’ 와 RT-PCR을 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인 	
결과요약	<ul style="list-style-type: none"> - 1st P0_D3 결과 없어서 종료 - 1st P0_D4는 2 passage(cell)까지 진행 	

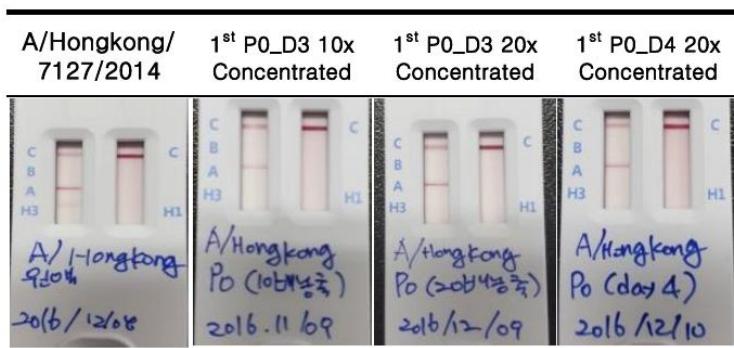
(다) 실험 결과

- 일괄적으로 passage를 진행하는 것이 아니라 체중변화가 가장 크게 관찰되는 1~2마리의 소수로만 다음 passage를 진행함으로써 세포배양내의 고 농도 바이러스 생산 및 mouse 내

에서의 mutant 바이러스의 증식 가능성을 높이고자 함.

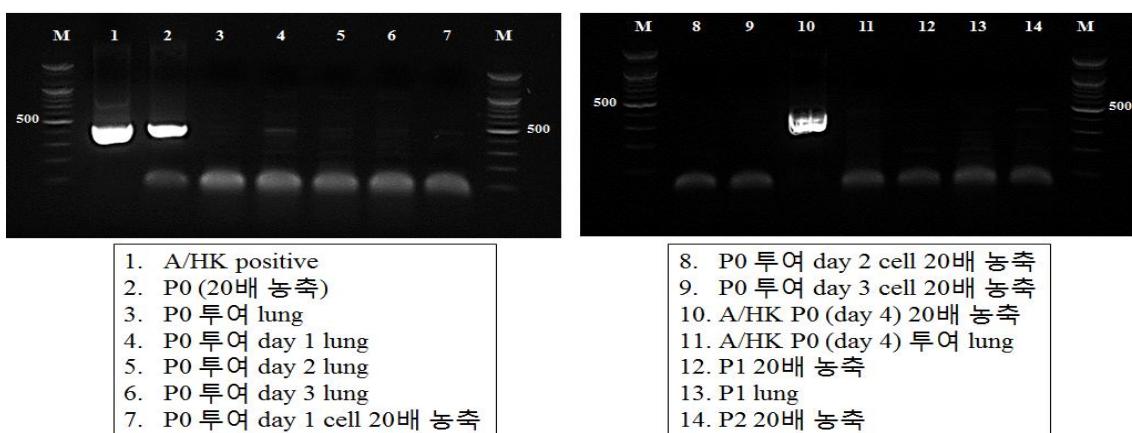
- 세포배양 3일차(1st P0_D3)와 4일차(1st P0_D4)에 회수한 1차 배양농축액(Figure 1)에서 Rapid Kit로 분석한 결과 Influenza virus의 존재를 확인하였다.

Figure 1. Detection of Influenza A virus(A/Hongkong/7127/2014) using rapid kit within MDCK-SIAT cell infected with virus origin and 1st P0 according to sampling time and virus concentrate.



- 1st P0_D3: 감염 1, 2, 3일차에 3마리씩 폐를 적출하여 균질화하고, 일자별로 얻어진 lung homogenate를 pooling하여 RT-PCR을 수행(Figure 2, Lane 4~6) 하였으며 A/HK positive(original) 또는 P0(20배 농축한 positive control) 대비 미약하게 검출되는 것을 확인하였다.
- 1st P0_D3의 1, 2, 3일차 lung homogenate는 각각 T-75 flask에 2개씩 세포배양하고 20배 농축하여 RT-PCR을 수행(Figure 2, Lane 7~9) 하였으나 band intensity가 미약하나마 1일 차를 제외하고는 거의 검출이 되지 않음을 확인하였다.

Figure 2. RT-PCR result for the detection of A/HK virus under the different condition including culture time, passage, culture concentrate



- 1st P0_D4: 감염 1, 2, 3, 4일차에 2마리씩 폐를 적출하여 균질화하고, 일자별로 lung homogenate를 pooling하여 Rapid Kit로 분석한 결과, 감염시킨 다음날부터 바이러스 항원의 검출이 확인되지 않는 것으로 미루어 빠르게 immune clearance가 일어났음을 확인하였다(Figure 3). 그러나 RT-PCR을 수행한 경우에는 3일차에 인플루엔자 바이러스의 검출이 가장 높게 나타났으나 4일차에는 소실됨을 확인하였다(Figure 4). 따라서 RT-PCR에서는 검출되나 Rapid Kit에서 바이러스 항원이 검출되지 않는 것으로 미루어 매우 미량의 바이러스가 존재함을 알 수 있었다. 결론적으로 P0 sample 투여 후에 mouse lung에 남아 있는 미량의 바이러스로는 MDCK-SIAT 세포주 내에 감염이 잘 일어나지 않는 특성을 고려하면 대량 세포배양이나 lung-to-lung infection을 통한 마우스 병원성 바이러스주의 생산에 많은 문제점을 가지고 있다고 판단하였다.

Figure 3. Detection of Influenza A virus(A/Hongkong/7127/2014) within lung homogenate of mice infected with A/HK P0 for 4 days after intranasal infection

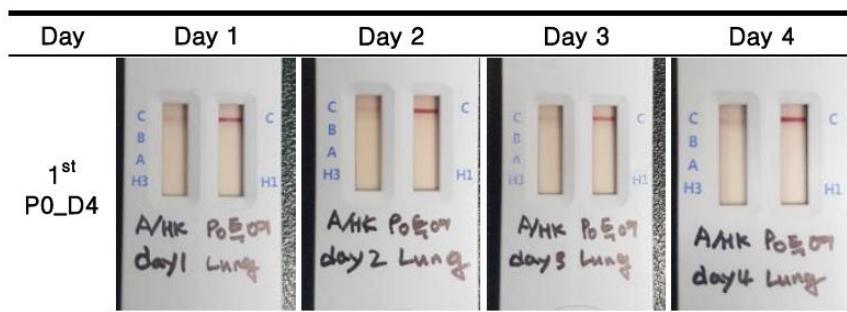
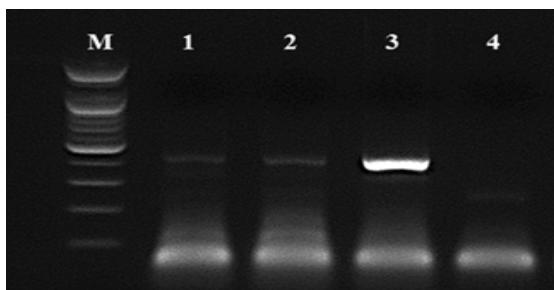


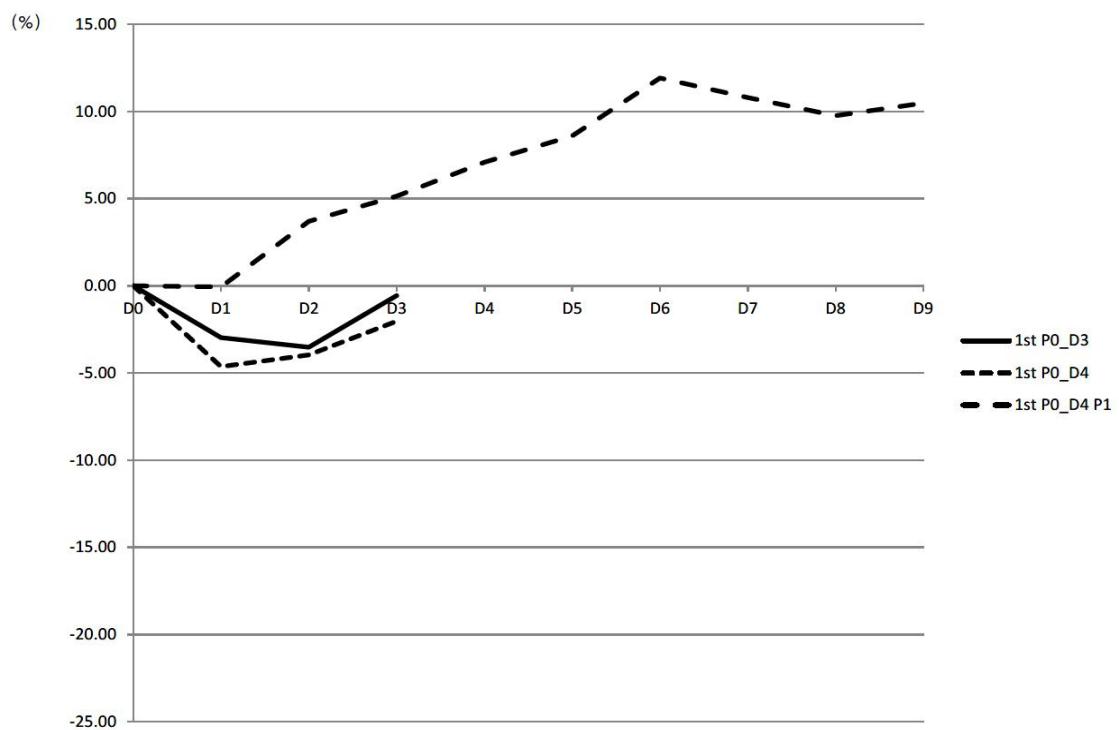
Figure 4. Result of RT-PCR for the detection of A/HK virus in lung lysate for 4 days after A/HK P0 infection.



1. A/HK P0 Lung day 1
2. A/HK P0 Lung day 2
3. A/HK P0 Lung day 3
4. A/HK P0 Lung day 4

- 1st P0_D3 및 1st P0_D4에서 만들어진 배양농축액을 DBA/1J mouse에 감염시킨 결과 초기 바이러스 감염 및 비강투여 stress로 초기 1-2일차에는 5% 내외의 체중 감소현상이 관찰되나 감염 3일차에 체중이 정상으로 회복되는 것을 확인하였다(Figure 5). 또한, 1st P0_D4에서 얻어진 lung lysate를 가지고 P1을 수행한 결과 감염 2일차에 체중이 증가하는 현상을 확인하였고(Figure 5) 이는 Rapid Kit 및 RT-PCR 결과와도 일치함을 알 수 있었다

Figure 5. Ratio of body weight loss



(2) 반복투여 (STEP 2.2.2)

(a) 실험 목적

1회 투여로 체중변화 등 유의미한 임상증상이 잘 관찰되지 않아서 연속적으로 투여를 통해 인플루엔자 바이러스의 양을 증가시켜 마우스의 병원성을 유도해보고자 시도하였음.

(b) 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	DBA/1J 9수	
Virus Type	세포 배양 4일차(1 st P0_D4)에 회수한 1차 농축배양액	1 st P0
Virus Challenge	- Lung-Cell-Lung Passage를 목적으로 실시 - Intranasal 경로로 1일 1회 50uL/Head, 2일 연속투여 - 감염 2, 3, 4일차에 3수씩 폐를 적출하여 균질화 (Figure 3)	마우스 폐 1개 당 PBS 0.5mL 첨가하여 균질화하여 투여
관찰 항목	- 매일 임상증상 관찰, 체중 측정 및 사망개체 확인 (Figure 1) - 감염 후에 얻어진 Lung Homogenate는 “제네디아 Rapid Kit”를 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인	
결과요약	체중변화가 가장 많이 나타난 2수를 감염 2일차에 Rapid Kit로 분석하였으나 밴드가 나오지 않음을 확인하였으며 따라서 3, 4일차는 분석을 수행하지 않았음 (Figure 2)	

(c) 실험 결과

- 매일 임상증상 관찰, 체중 측정 및 사망개체 확인하고 기록하였으나 특이할 만한 임상증상을 관찰할 수 없었음**(Figure 1)**.
- 체중변화가 가장 많이 나타난 2수를 감염 2일차에 Rapid Kit로 분석하였으나 밴드가 나오지 않음을 확인하였으며 따라서 3, 4일차는 분석을 수행하지 않았음**(Figure 2)**.
- DBA/1J mouse에 P0를 투여하였으나, 체중이 감소하지 않아 P0를 재 투여하고 하루 간격으로 lung을 회수하여 RT-PCR을 수행하였으나, 시간이 경과함에 따라 감염된 마우스 lung에서의 인플루엔자 바이러스의 증폭에 따른 band intensity의 증가현상이 관찰되지 않았음**(Figure 3)**.

Figure 1. Ratio of body weight loss

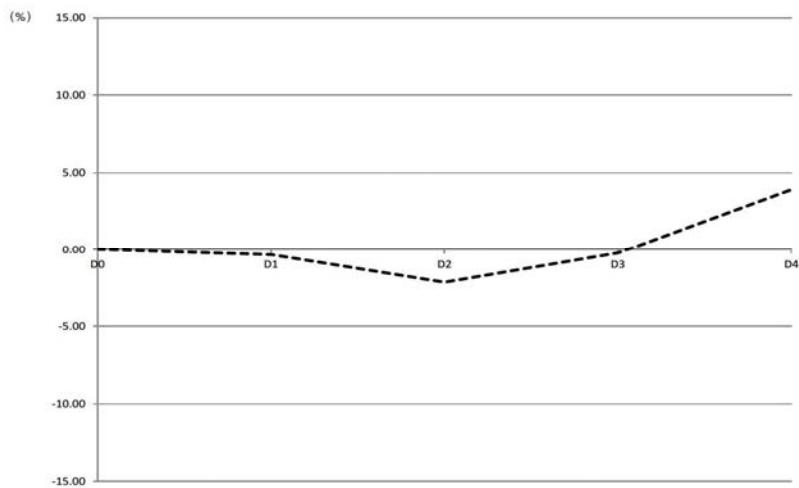


Figure 2. Detection of A/HK virus using rapid kit with lung lysate on the first day after repeated intranasal infection with A/HK 1st P0_D4

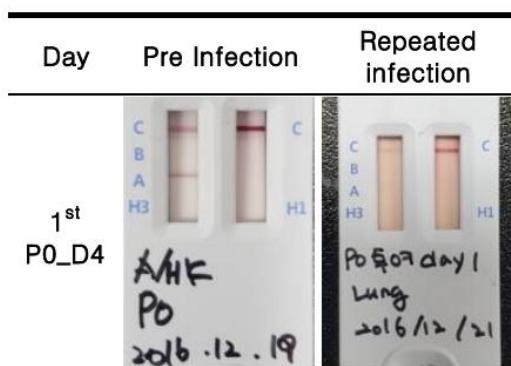
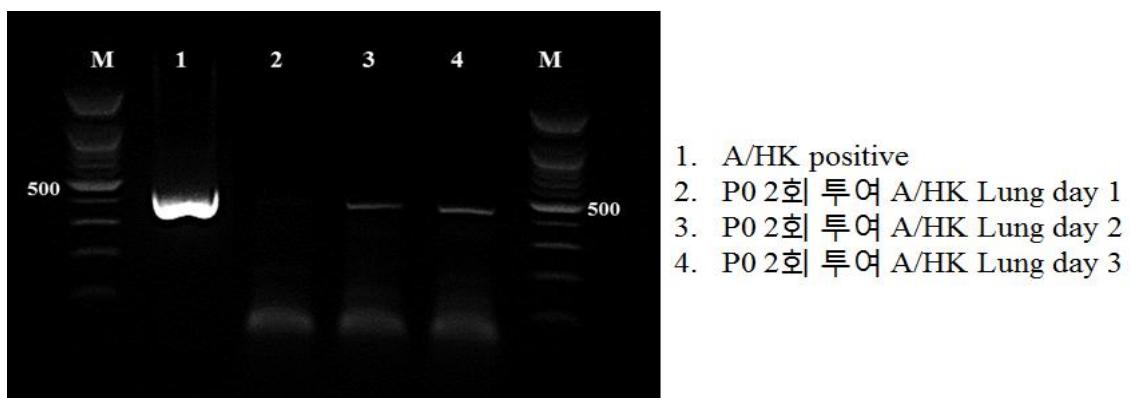


Figure 3. Detection of A/HK using RT-PCR with lung lysate for 3 days after repeated intranasal infection with A/HK P0_D4



(3) Cell Passage 만을 통한 인플루엔자 바이러스 검출시험

(a) 실험 목적

마우스 내의 인플루엔자 바이러스 passage를 통해 유의미한 체중변화가 관찰되지 않았으며 이는 마우스 내에서 모두 viral clearance 일어나는 것으로 판단하여 cell에서만 passage 진행하였음.

(b) 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	MDCK-SIAT cell	
Virus Type	세포배양 4일차(1 st P0_D4)에 회수한 1차 농축배양액과 2차 농축배양액	1 st P0_D4, 2 nd P0_D3
Virus Challenge	<ul style="list-style-type: none"> - Cell passage만 진행 - Passage 1의 감염 1, 2, 3일차에 세포배양액 원액을 분석 (Figure 2, Figure3) - 1st P0를 이용한 passage 1은 감염 3일차, passage 2는 감염 4일차, passage 3은 감염 6일차에 배양액을 회수하고 20배 농축 후 분석 (Figure 4) 	
관찰 항목	<ul style="list-style-type: none"> - Cell morphology 관찰 (Figure 1) - 분석은 “제네디아 Rapid Kit” 와 RT-PCR을 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인(Figure 2, Figure3) 	
결과요약	-	

(c) 실험 결과

- Cell morphology 관찰 결과(Figure 1), 3일차에 인플루엔자 바이러스 감염에 따른 dead cell 들이 관찰되었으나 1차년도 및 2차년도에 보여준 기존의 양상과는 전혀 다르게 세포가 파괴되지 않고 배양액 위에 떠다니는 형태로 존재함을 확인함.
- Passage 1의 감염 1, 2, 3일차에 세포배양액 원액을 제네디아 Rapid Kit와 RT-PCR을 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인한 결과 어떠한 바이러스 항원이나 DNA가 검출되지 않음을 확인하였으며(Figure 2, Figure3).
- 1st P0를 이용한 passage 1은 감염 3일차, passage 2는 감염 4일차, passage 3은 감염 6일 차에 배양액을 회수하고 20배 농축 후 분석하였으나 MDCK-SIAT cell에서 passage를 넘기는 날짜가 점점 늦어져서 P3 단계에서 중단하였음(Figure 4).

Figure 1. Morphology change of MDCK-SIAT cell for 4 days after infection with A/HK 2nd P0_D3

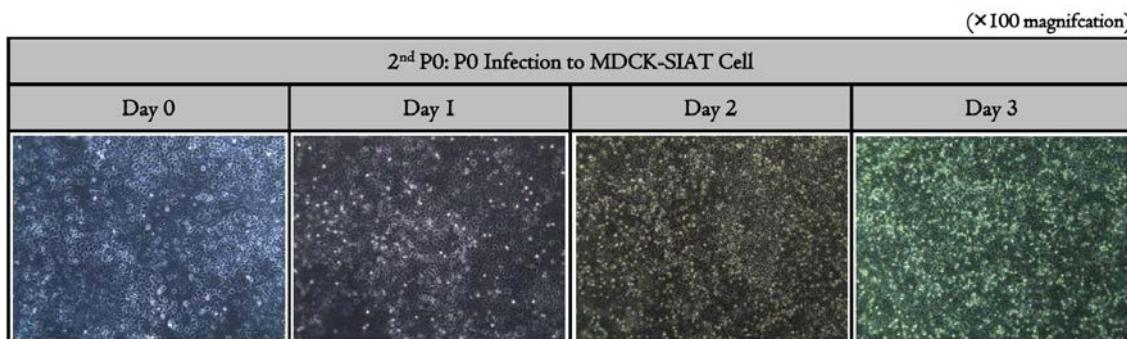


Figure 2. Detection of A/HK virus using Rapid Kit with culture supernatant (P1) for 3 days after infection with A/HK 2nd P0_D3

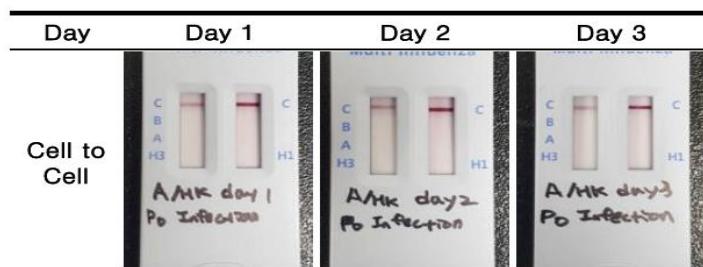


Figure 3. Detection of A/HK virus using RT-PCR with culture supernatant (P1) for 3 days after infection with A/HK 2nd P0_D3

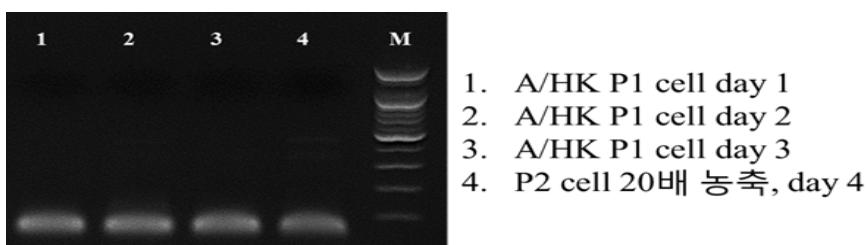
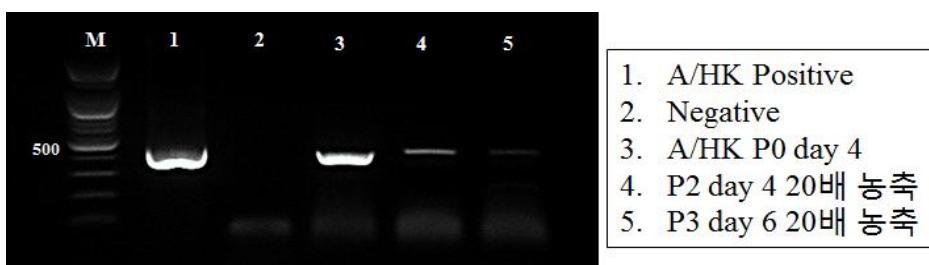


Figure 4. Detection of A/HK virus using RT-PCR with culture supernatant of P1 and P2



(4) 배양액 변경 조건시험

(1) 실험 목적

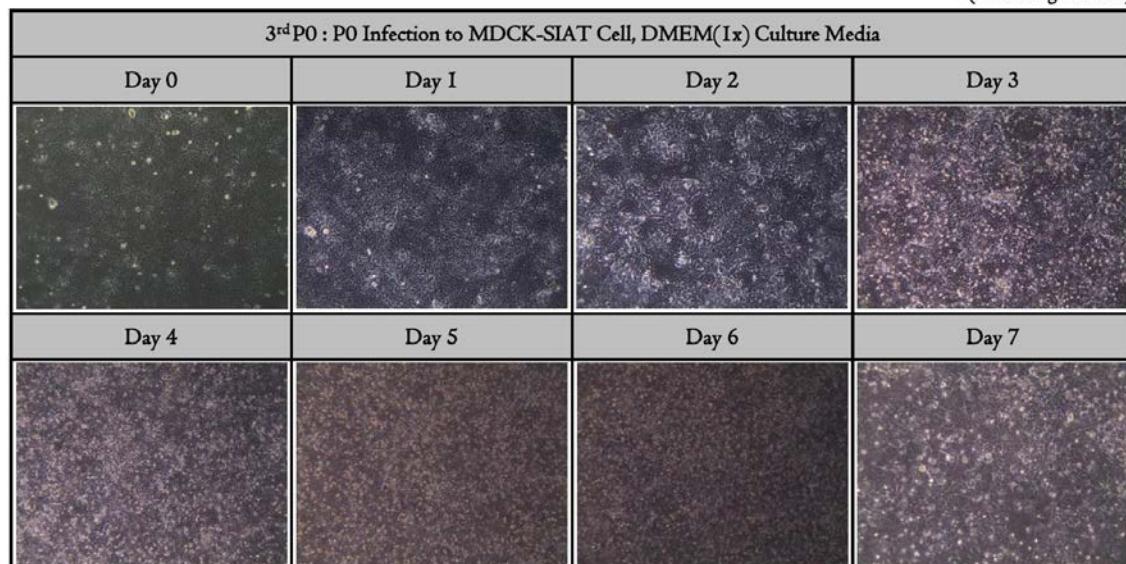
MDCK-SIAT 배양을 위한 세포배양액의 조건을 변경하여 세포의 상태를 확인하기 위해 새로이 사용한 배양액 조성은 DMEM(1x) + 10% FBS + Geneticin (1mg/ml)으로 구성하여 사용함.

(2) 실험 방법 및 실험결과

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	MDCK-SIAT cell	
Virus Type	3차 농축배양액	3 rd P0
Virus Challenge	- 감염 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일차에 배양액 원액을 분석 (Figure 1) - T-75 flask 1개에 3차 P0를 100ul 감염	
관찰 항목	사진 촬영	
결과요약	기존에 MDCK에서 사용하던 배양배지 대비 새로이 적용한 신규 배양배지 조건에서 바이러스 감염에 따른 특별한 morphology가 관찰되지 않음	

Figure 1. Morphology change of MDCK-SIAT cell for 7 days after infection with A/HK 3rd P0

(×100 magnification)



(5) 실험동물에 따른 Influenza Virus의 감염성 시험 (STEP 2.2.5)

(가) 실험 목적

Influenza A virus(A/Hongkong/7127/2014)가 선택한 실험동물에 따라 바이러스 감수성이 다를 수 있다고 판단하여 동물 strain 별로 감수성 시험을 수행하고자 함.

(나) 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	C57BL/6, C3H, BALB/c, DBA/1J, DBA/2N 각 6수	
Virus Type	3차 농축배양액	3 rd P0
Virus Challenge	- Intranasal 경로로 1회 50uL/Head 투여 - 감염 1, 2, 3일차에 2수씩 폐를 적출하여 균질화	마우스 폐 1개 당 PBS 0.5mL 첨가하여 균질화하여 투여
관찰 항목	- 매일 임상증상 관찰, 체중 측정 및 사망개체 확인 (Figure 1) - 감염 후에 얻어진 Lung Homogenate는 “제네디아 Rapid Kit” (Figure 2) 과 RT-PCR (Figure 3)을 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인	
결과요약	-	

Passage는 cell의 상태를 매일 관찰하여 결정.

(다) 실험 결과

- cell에서 passage를 넘기는 날짜가 점점 늦어짐. P3에 중단
- C57BL/6, Balb/c, C3H, DBA/1J, DBA/2 mouse 종에 각각 A/HK P0 시료(DBA/2 만 P1)를 infection시키고 임상증상을 관찰한 결과 의미있는 체중감소 현상은 관찰되지 않았으며 (Figure 1), 일일 간격으로 lung을 회수하여 총 3일간 lung 조직 내의 Influenza A virus의 유무를 Rapid Kit 및 RT-PCR을 통해 확인하였으나 마우스 종에 따른 큰 차이를 보여주지 않았음(Figure 2, Figure 3).
- 마우스 종간에 특별한 차이를 발견하지 못하여 DBA 마우스에 계속해서 A/HK virus를 injection하여 진행하였음. 그 결과 P2 day 4일째 20배 농축과, P3 6일째 20배 농축 샘플에서 밴드가 관찰되긴 하였으나 그 band가 상당히 약하게 관찰되었음.

Figure 1. Ratio of body weight loss

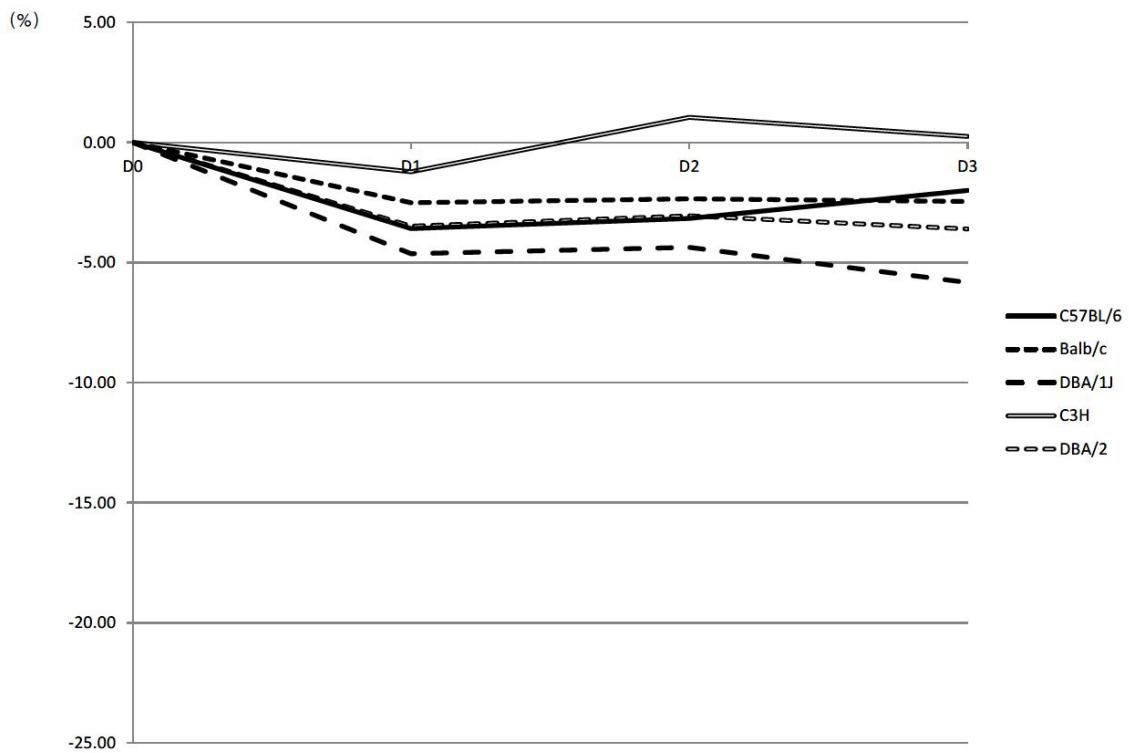
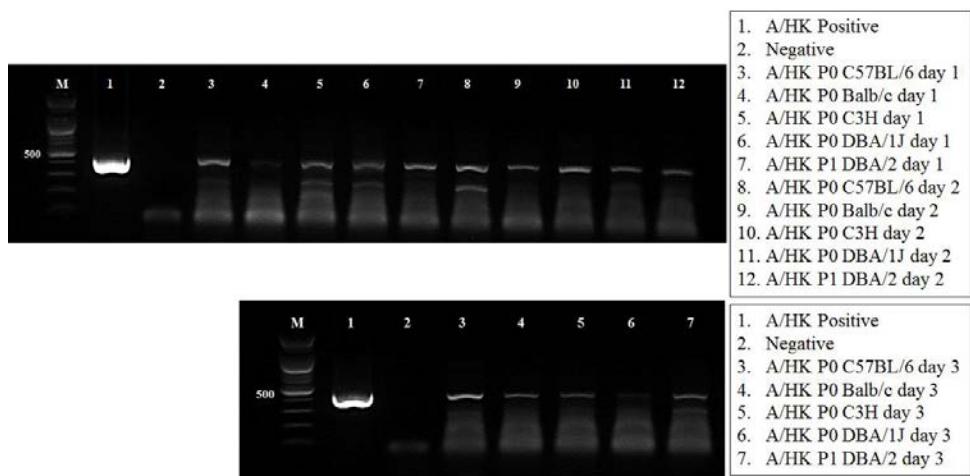


Figure 2. Identification of A/HK virus for each mouse strain using rapid kit

Strain	3 rd P0	C57BL/6	BALB/c	C3H	DBA/1J	DBA/2
Day 0		-	-	-	-	-
Day 1	-					
Day 2	-					
Day 3	-					

Figure 3. Result of RT-PCR after A/HK infection with different mouse strain



(6) 세포주의 종류별 감염성 시험 (I)

(1) 실험 목적

- 인플루엔자 바이러스를 배양하는 세포에 따른 차이의 비교실험
- Influenza A virus 증폭을 위해 사용되었던 MDCK, MDCK-SIAT와 다른 human cell line과의 바이러스 증폭 효율을 비교하고자 WI-38(lung-normal), HS683(brain glioma), Huh7(liver) cell line을 사용하였음. 먼저 MDCK를 WI-38, HS683, Huh7 cell line과 비교하기 위하여 A/HK P0를 처리하여 3~4일 배양 후 RT-PCR을 진행하여 target DNA 뱀드를 비교 관찰하여 위함.

(2) 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 세포	MDCK, MDCK-SIAT, WI-38, HS683, Huh7 (Figure 1)	
Virus Type	3차 농축배양액	3 rd P0
Virus Challenge	<p>① MDCK-SIAT, WI-38, HS683, Huh7 cell의 감염 3, 4일차에 배양액을 회수 (Figure 2)</p> <p>② MDCK, WI-38 cell의 감염 6일차에 배양액을 회수하고, WI-38의 배양액은 다음 cell passage로 넘겨서 감염 6일차에 회수</p> <p>③ MDCK-SIAT, WI-38, HS683, Huh7 cell의 감염 1, 2, 3일 차에 배양액을 회수 (Figure 3)</p> <p>④ MDCK-SIAT, A549 cell의 감염 0, 1, 2, 3, 4일차에 배양액을 회수 (Figure 4)</p> <p>⑤ MDCK, MDCK-SIAT, WI-38, HS683, Huh7, A549 cell의 감염 0, 1, 2, 3, 4일차에 배양액을 회수 (Figure 5)</p> <p>⑥ MDCK-SIAT cell의 감염 0, 1, 2, 3, 4일차에 dish 바닥에 있는 cell을 회수 (Figure 6)</p> <p>⑦ MDCK, WI-38 cell의 감염 3, 4, 5일차에 배양액에 떠 있는 cell을 회수 (Figure 7)</p>	
관찰 항목	<ul style="list-style-type: none"> - 회수한 cell 배양액과 cell은 RT-PCR을 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인하였음 - ④의 cell은 H&E stain - ⑤, ⑥, ⑦의 cell은 IHC stain 	
결과요약	4일째에 MDCK보다 WI-38, HS683 cell line에서 더욱 뱀드가 진하게 나오는 것을 확인하였음.	

(d) 실험 결과

- 3차 농축배양액을 가지고 HS683, Huh7, MDCK 및 WI-38 cell line에 감염시킨 후에 4일차의 세포 morphology를 비교한 결과 WI-38 cell line이 다른 세포주에 비해 보다 많은 세포 변형 현상(**Figure 1**)이 관찰되었으며, RT-PCR 결과 MDCK 대비 다소 많은 인플루엔자 바이러스가 만들어지는 것으로 1차 확인되었음(**Figure 2**). 앞선 결과에서 WI-38이 MDCK cell 보다 강한 PCR 결과를 보였기 때문에 WI-38 cell line 에만 A/HK 원액 처리 후 4일까지 배양하여 MDCK-SIAT와 비교 관찰하였으나 역시 MDCK-SIAT에서 바이러스 증폭이 더 강하게 일어나는 것으로 확인이 되어 WI-38 cell line이 MDCK-SIAT을 대체하는 데에는 큰 잇점이 없는 것으로 확인되었음.
- MDCK-SIAT를 WI-38, HS683, Huh7 cell line과 비교하기 위하여 A/HK P0를 처리하고 총 3 일 동안 매일 일정량의 culture media에서 RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하여 MDCK-SIAT과 다른 human cell line과의 바이러스 증폭 유무를 비교 관찰한 결과, 이전의 결과와는 다르게 다른 human cell line들은 1일차와 2일차에 밴드를 보이지 않았고, 3일차에서도 MDCK-SIAT만 강하게 PCR 밴드가 확인이 되었음(**Figure 3**).
- MDCK, MDCK-SIAT, A549, WI-38, Huh7, HS683 cell line에 A/HK P0를 감염시키고 0, 1, 2, 3, 4일차에 배양액을 회수하여 RT-PCR로 인플루엔자 바이러스의 생성정도를 측정한 결과 MDCK, MDCK-SIAT, WI-38 cell line에서만 3일차에 희미한 DNA band가 관찰되어 MDCK-SIAT를 능가하는 세포주를 찾아내는 데에 실패하였음(**Figure 4, PCR**).
- 결론적으로 A/HK P0를 infection 시켰을 때에는 모든 종류의 세포들에서 바이러스 증폭이 뚜렷하게 일어나지 않는 것으로 확인이 됨. 이는 기존에 가설로 세웠던 증폭된 바이러스가 세포의 CPE 반응 이후, 세포 밖으로 나오는 과정에서 문제가 있는 것으로 판단이 됨 (**Figure 4, MDCK**). 이는 배양조건 또는 어떤 다른 원인에 의해 인플루엔자 바이러스가 완전하게 assembly 되지 않아 세포 밖으로 burst되지 않을지도 모른다는 가설을 세울 수 있을 것으로 사료되며 향후 추가 연구를 통해서 규명할 필요가 있다고 판단됨.

Figure 1. Morphology change of human and MDCK cell for 3 days after infection with 3rd P0
($\times 100$ magnification)

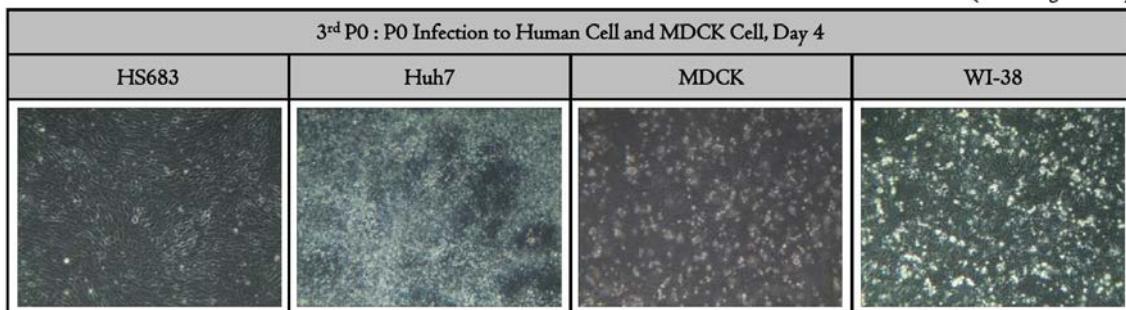


Figure 2. RT-PCR result for comparison of virus quantity between MDCK-SIAT and various human cell lines after infected with A/HK 3rd P0

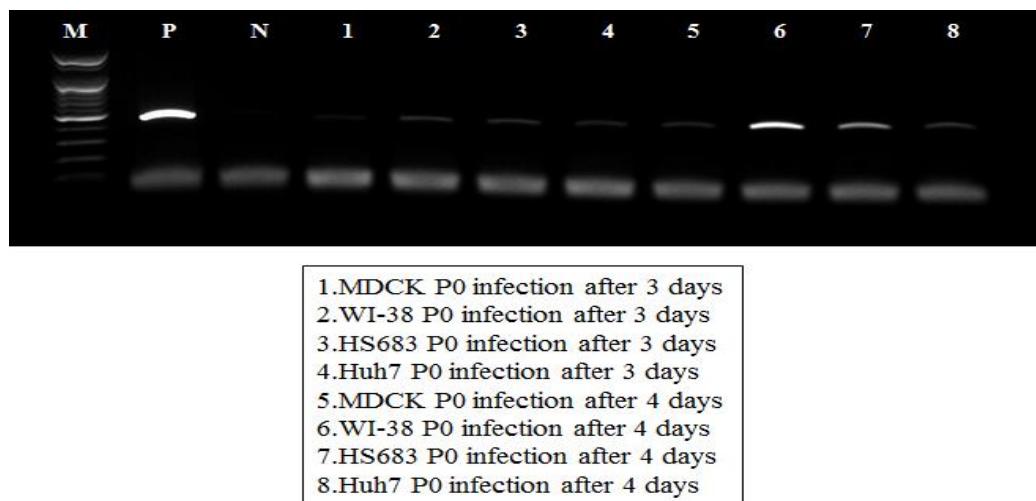


Figure 3. RT-PCR result for comparison of virus quantity between MDCK-SIAT and various human cell lines after infected with A/HK 3rd P0

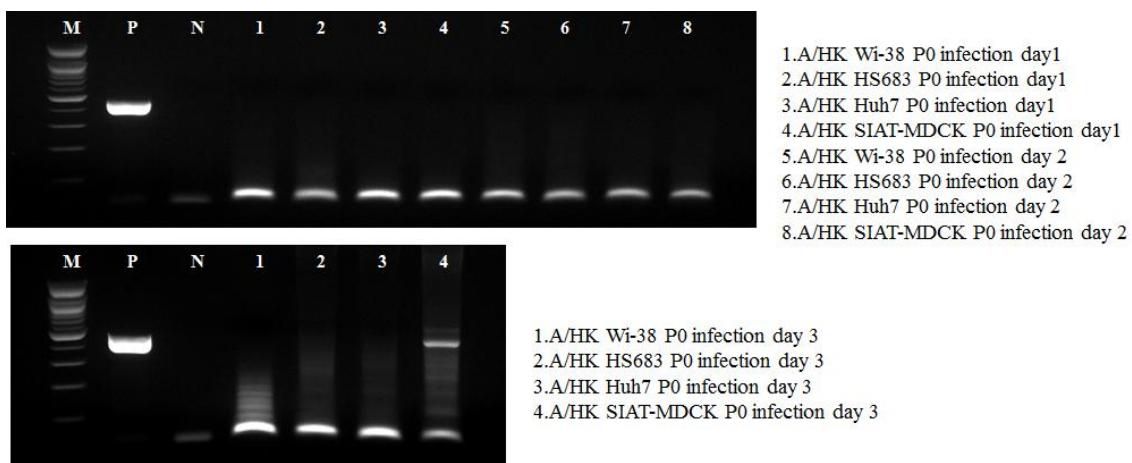
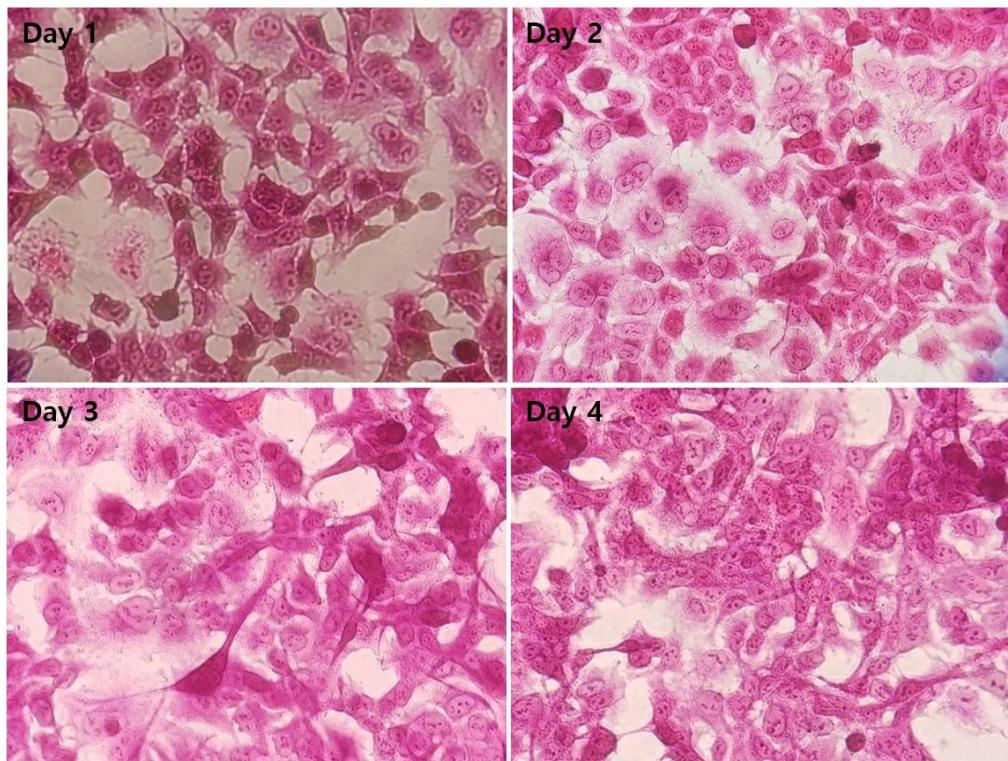


Figure 4. H&E staining on A549 and MDCK-SIAT cell for 4 days after infection with A/HK 3rd P0

a) A549 Cell



b) MDCK-SIAT Cell

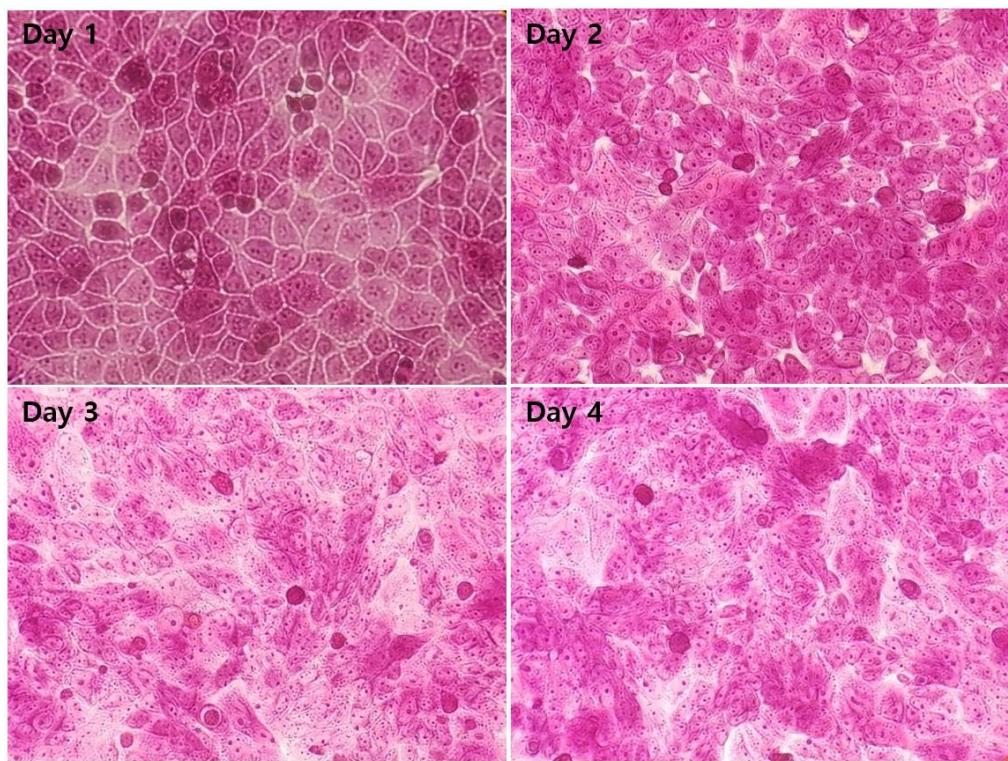
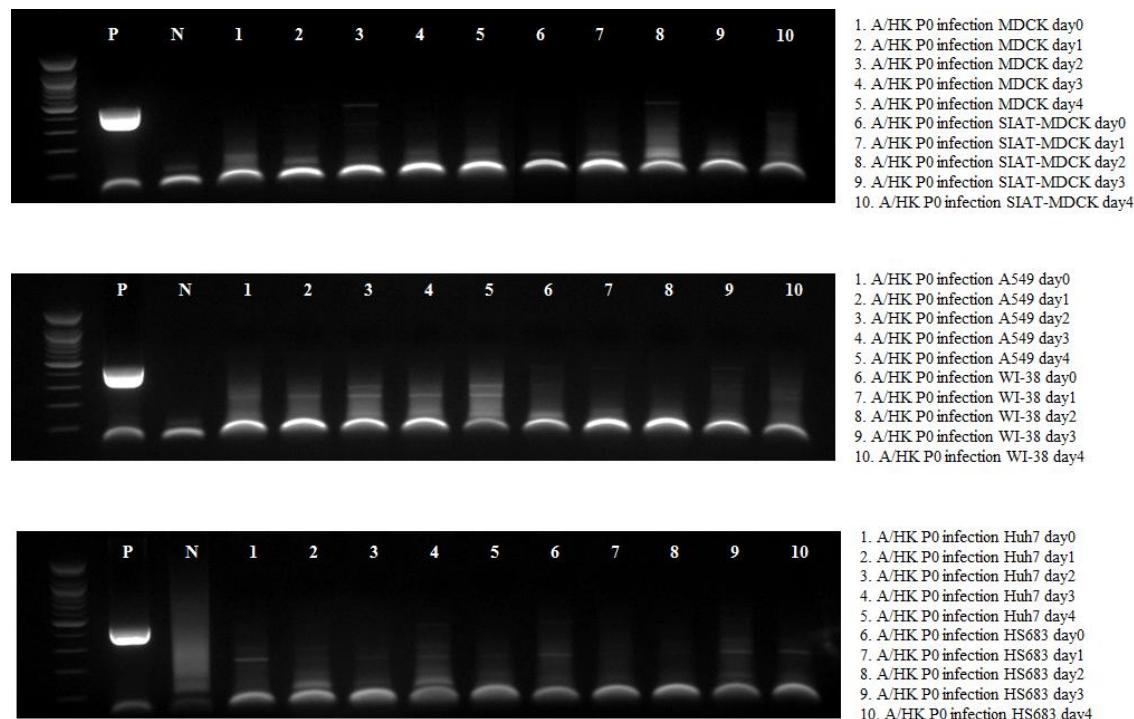
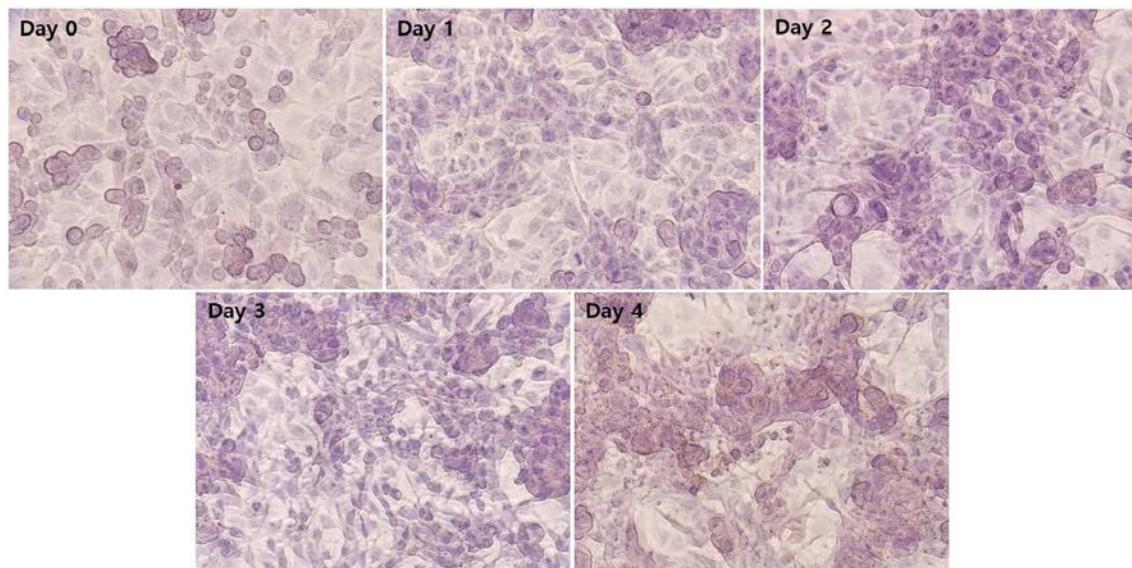


Figure 5. Detection of A/HK virus using culture supernatant of various cell lines after infection with A/HK 3rd P0

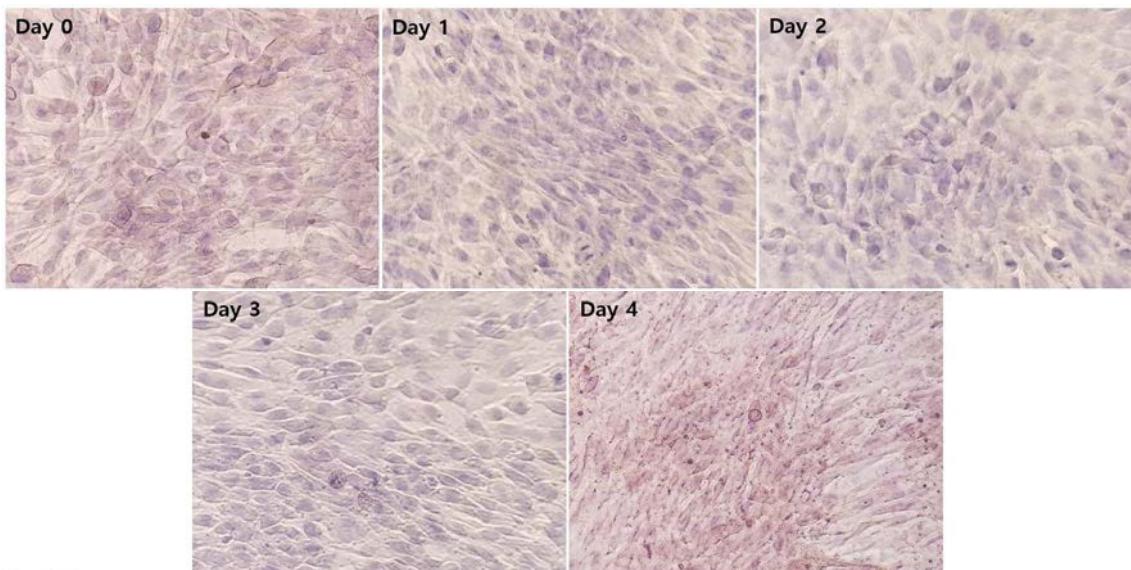
a) RT-PCR result of virus identification in various cells after A/HK P0 infection



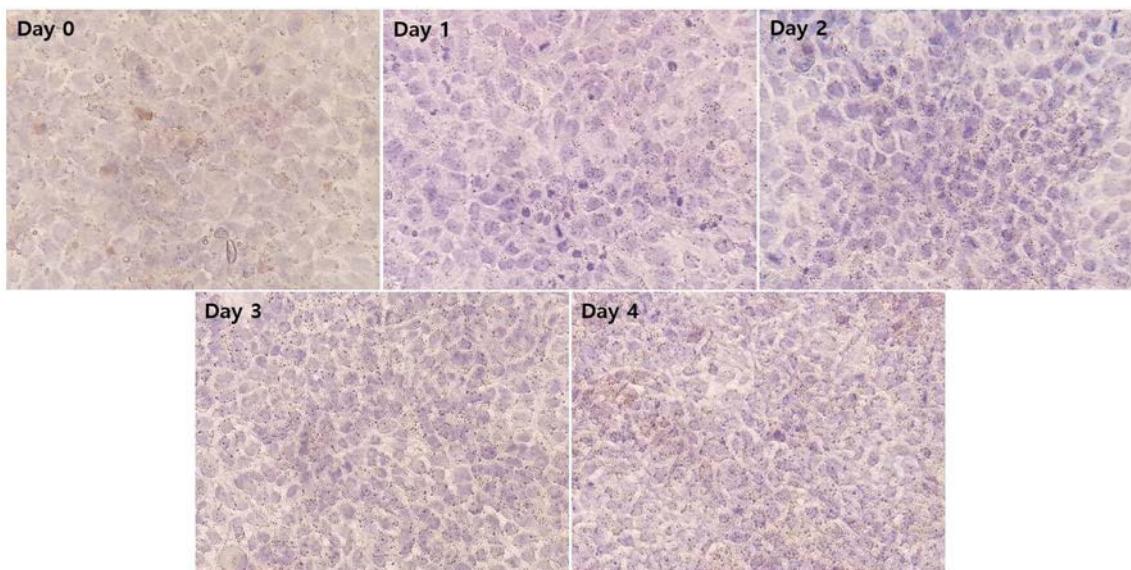
b)-1 Immunohistochemistry_A549 cell



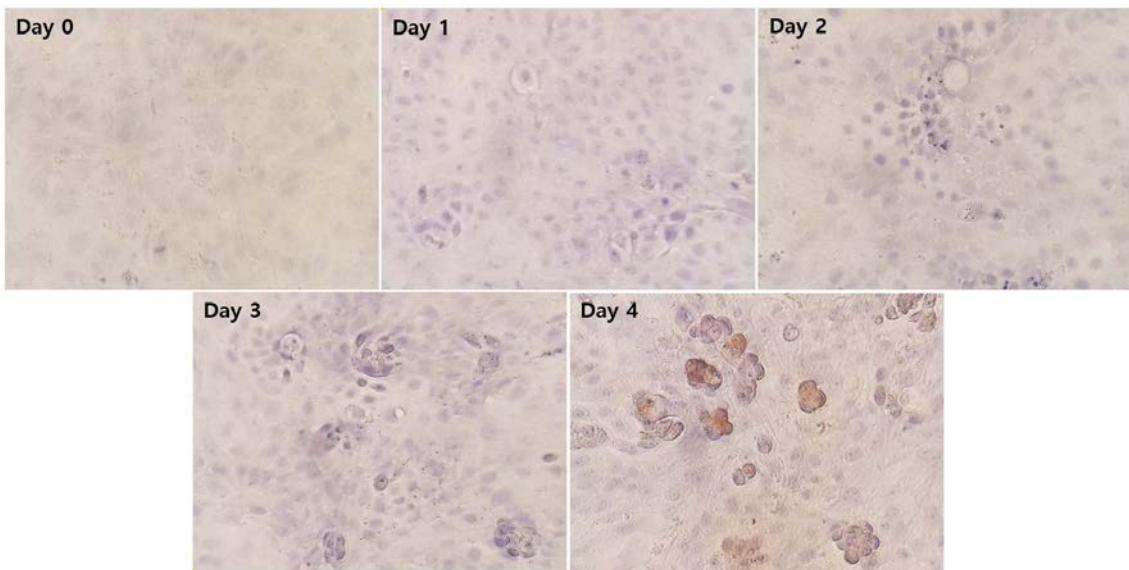
b)-2 Immunohistochemistry_HS683 cell



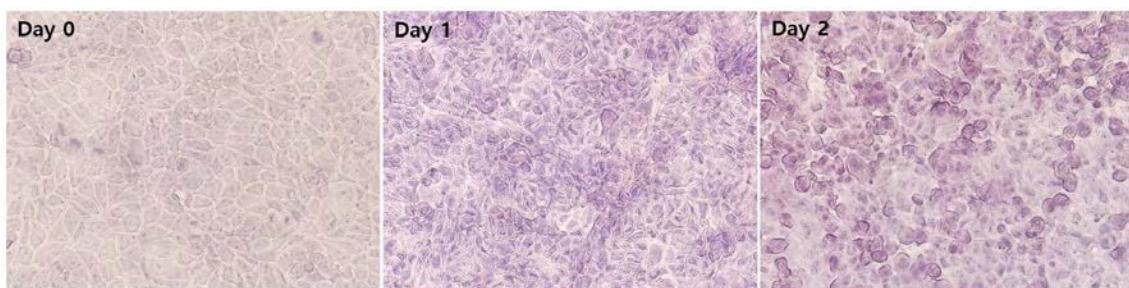
b)-3 Immunohistochemistry_Huh7 cell



b)-4 Immunohistochemistry_MDCK cell



b)-5 Immunohistochemistry_MDCK-SIAT cell



b)-6 Immunohistochemistry_WI38 cell

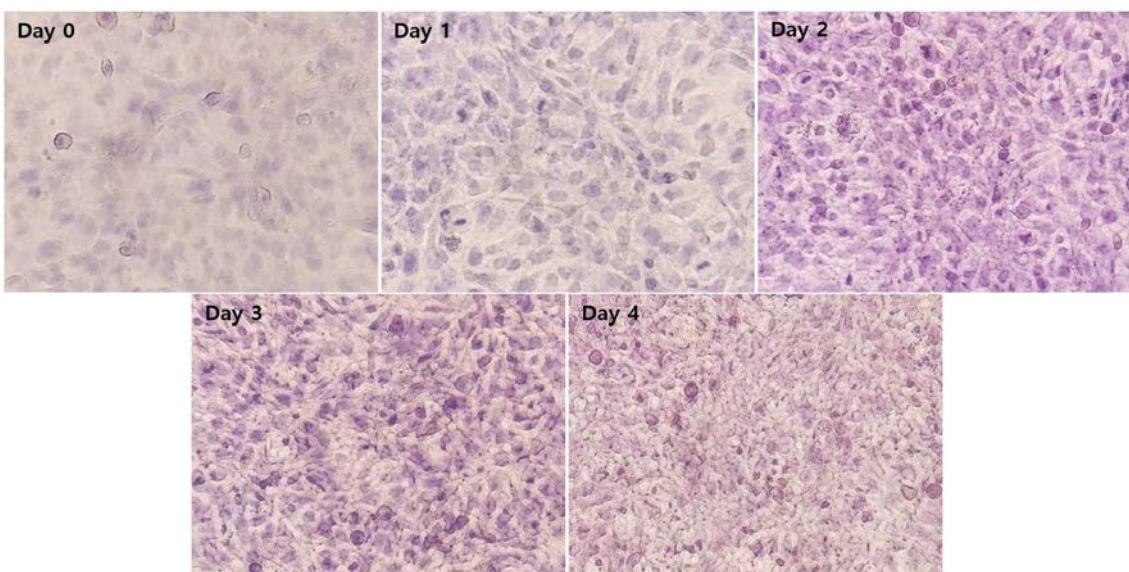


Figure 6. Immunohistochemistry data for MDCK-SIAT cell detached from culture flask by trypsin-EDTA treatment after infection with A/HK 3rd P0

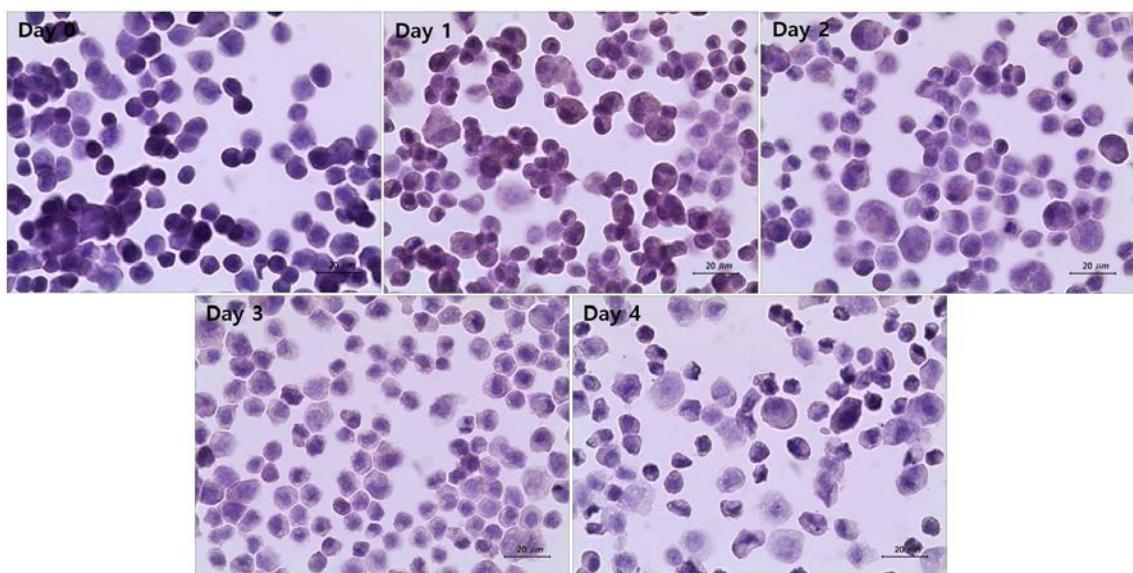
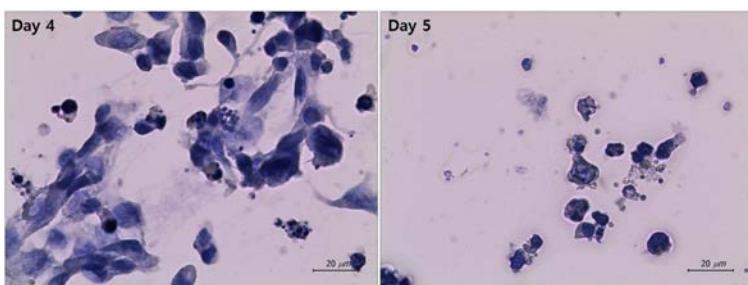
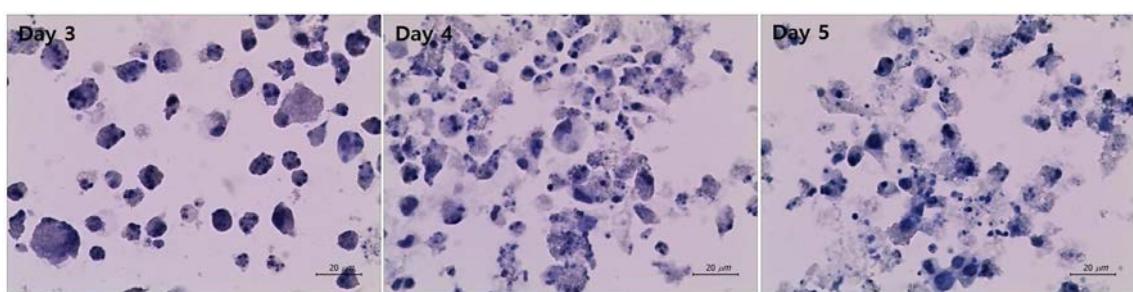


Figure 7. Immunohistochemistry data for MDCK-SIAT cell floated into culture media after infection with A/HK 3rd P0

a) WI-38 Cell



b) MDCK-SIAT Cell



(7) 세포주의 종류별 감염성 시험 (II)

(a) 실험 목적

- 인플루엔자 바이러스를 배양하는 세포에 따른 차이의 비교실험
- Influenza A virus 증폭을 위해 사용되었던 MDCK-SIAT와 WI-38(lung-normal) cell line을 사용하여 A/HK P0를 처리하고 4일 배양 후에 배양농축액을 얻는 모든 step에서 RT-PCR을 진행하여 target DNA band를 비교 관찰하여 위함.

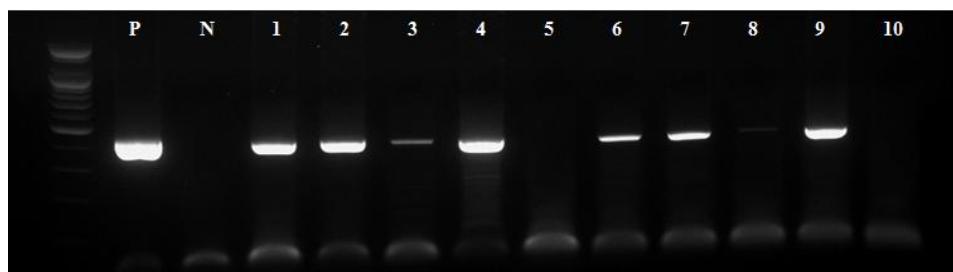
(b) 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 세포	MDCK-SIAT, WI-38	
Virus Type	A/Hongkong/7127/2014	T-75/100ul
Virus Challenge	① WI-38 cell의 감염 4, 5, 6일차 배양액 회수 ② WI-38 cell의 감염 6일차 배양액(pooling), 10배 농축배양액, 10배 농축 후 남은 배양액, 100 농축배양액, 100배 농축 후 남은 배양액 회수 (Figure 1) ③ MDCK-SIAT cell의 감염 4일차 배양액(pooling), 10배 농축배양액, 10배 농축 후 남은 배양액, 100 농축배양액, 100배 농축 후 남은 배양액 회수 (Figure 1)	
관찰 항목	- 모든 시료는 RT-PCR을 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인하였음	
결과요약	-	

(c) 실험 결과

- MDCK-SIAT와 WI-38 cell line에 A/HK 원액을 처리하고 4일 후에 배양액을 회수하여 10배 농축과 100배 농축을 진행하여 A/HK P0를 확보함. 10배 농축은 AMICON concentrator(MW 100,000)를 이용하였으며, 100배 농축은 10배 농축배양액을 disposable Centricon을 이용하여 고속으로 원심분리하여 농축을 진행하였음.
- AMICON concentrator(MW 100,000)를 이용하여 10배 농축을 진행하는 과정에서 기존 1차 및 2차년도와는 달리 정상적으로 농축이 되지 않는 문제점이 발견되었음. 이를 극복하기 위하여 ultracentrifuge를 이용하여 100,000g, 2시간 동안 원심분리하여 농축을 진행하였지만 바이러스의 농축이 되지 않았음. 따라서 바이러스 농축을 위해 Centricon을 이용하여 계속해서 진행하였으며 이때에는 큰 문제는 발견되지 않고 농축이 잘 되는 것으로 확인되었음(Figure 1).

Figure 1. Comparison of virus concentration between MDCK-SIAT and WI-38 cell on each concentration process after infection with A/HK virus



- 1.A/HK 원액 infection SIAT-MDCK day 4
- 2.A/HK 원액 infection SIAT-MDCK day 4 X10 농축
- 3.A/HK 원액 infection SIAT-MDCK day 4 X10 농축 filtrated media
- 4.A/HK 원액 infection SIAT-MDCK day 4 X100 농축
- 5.A/HK 원액 infection SIAT-MDCK day 4 X100 농축 filtrated media
- 6.A/HK 원액 infection WI-38
- 7.A/HK 원액 infection WI-38 X10 농축
- 8.A/HK 원액 infection WI-38 X10 농축 filtrated media
- 9.A/HK 원액 infection WI-38 X100 농축
- 10.A/HK 원액 infection WI-38 X100 농축 filtrated media

(8) Influenza Virus Titer 향상을 위한 UV 처리 조건시험

(1) 실험 목적

MDCK-SIAT cell에 UV를 조사하여 세포의 biological activity을 감소시킴으로서 인플루엔자 바이러스에 대한 감수성을 높여 고 역가의 바이러스를 수득하기 위한 조건시험

(2) 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	MDCK-SIAT	
Virus Type	3차 농축배양액	3 rd P0
Virus Challenge	① UV treatment를 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5min 동안 처리한 후 감염 1, 2, 3일차의 배양액 회수 (Figure 1, 2) ② UV treatment를 0(Control), 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5min 동안 처리한 후 subculture한 cell에서 감염 3, 4일차의 배양 액 회수 (Figure 3, 4) ③ ①과 ②의 1.5min동안 UV treatment한 cell을 3 rd P0로 감염시키고 다시 1, 2, 3, 4min 동안 UV treatment 재처리한 1, 2, 3일차 배양액 회수 (Figure 5) ④ ①과 ②의 1.5min동안 UV treatment한 cell을 3 rd P0로 감염시키고 다시 1, 2min 동안 UV treatment 재처리한 1, 2일차 배양액 회수 (Figure 6)	
관찰 항목	<ul style="list-style-type: none"> - 모든 cell 배양액은 농축하지 않고 RT-PCR을 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인하였음 - ①과 ②의 4일차 cell은 염색 후 사진촬영 	
결과요약	-	

(3) 실험 결과

- 세포의 상태를 인위적으로 약하게 만들어 바이러스를 처리하면 증폭된 바이러스가 쉽게 빠져나오지 않을까하는 가설을 세움. 세포의 상태를 약하게 만들기 위하여 UV를 세포에 30초부터 5분까지 다양하게 처리한 후에 A/HK P0를 처리하고 4일 후에 세포의 상태(Figure 1) 및 바이러스 증폭 여부를 관찰 함.
- UV 1분 30초-2분간 처리한 세포 그룹들에서 A/HK P0 처리 후 하루 만에 밴드가 보이기 시작하는 것을 확인 함(Figure 2).
- A/HK P0를 처리 후 2일째부터는 다른 UV 처리 그룹에서도 밴드가 보이기 시작하며 3일

까지도 밴드가 관찰이 되었음. 바이러스 처리후 시간이 지남에 따라 그 진하기는 조금씩 강하게 나오는 경향을 보이나 전체적으로 밴드가 진하게 보이지 않았음.

- ③은 UV를 1.5분간 처리한 MDCK-SIAT cell을 culture한 후, 다시 UV를 시간별로 처리(1-4분)하여 P0를 infection한 후, 바이러스 증폭 유무를 날짜별로 관찰함

Figure 1. Morphology change of UV treated MDCK-SIAT cell after infection with A/HK 3rd P0

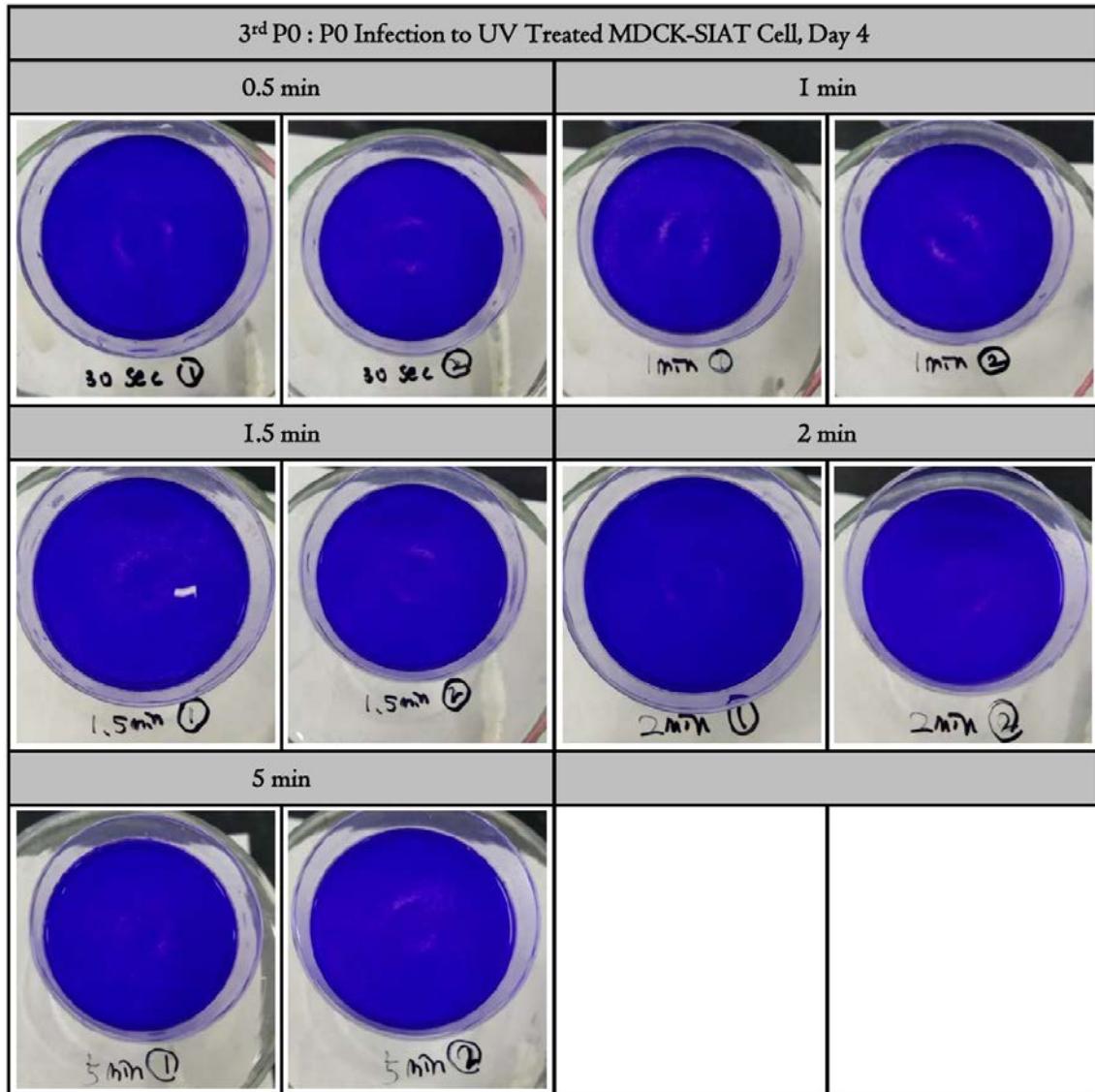


Figure 2. RT-PCR result of MDCK-SIAT cell infected with A/HK 3rd P0 after UV exposure on various time intervals

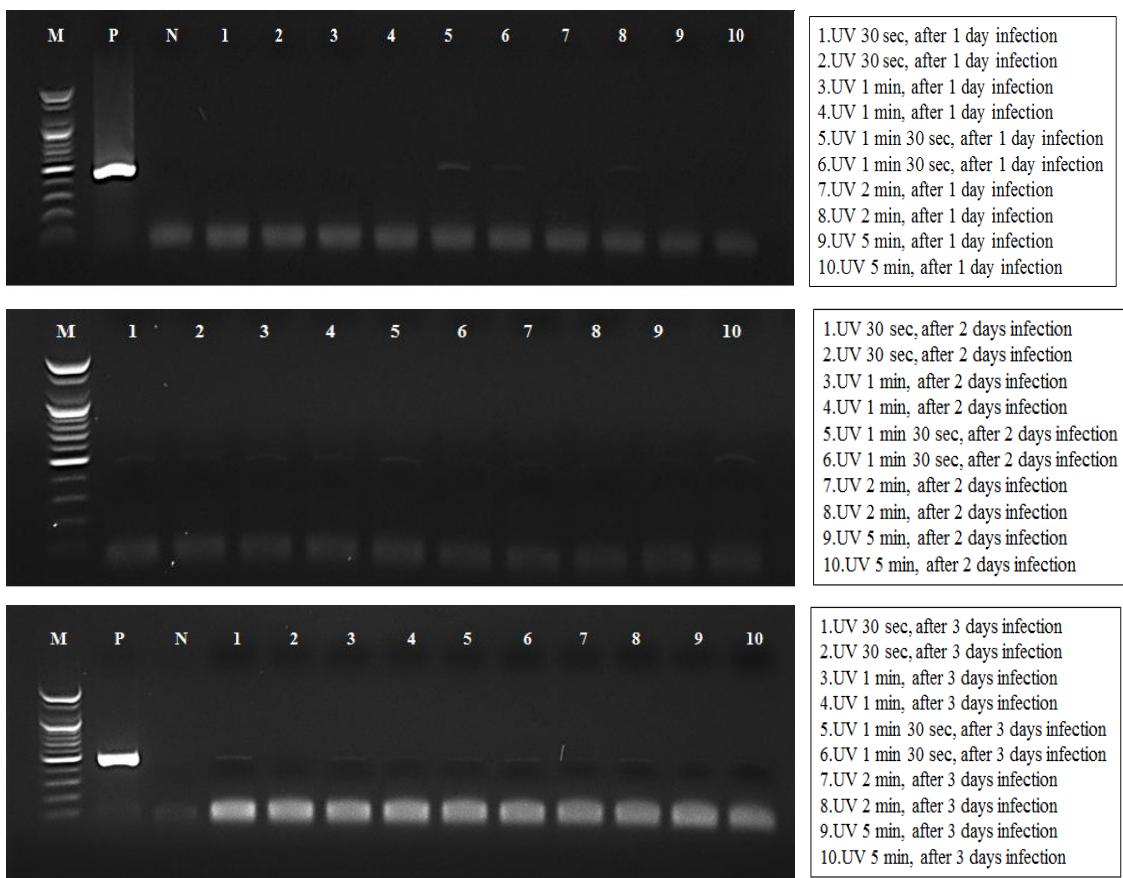


Figure 3. Morphology on UV treatment of MDCK-SIAT cell with various time intervals after infection with 3rd P0

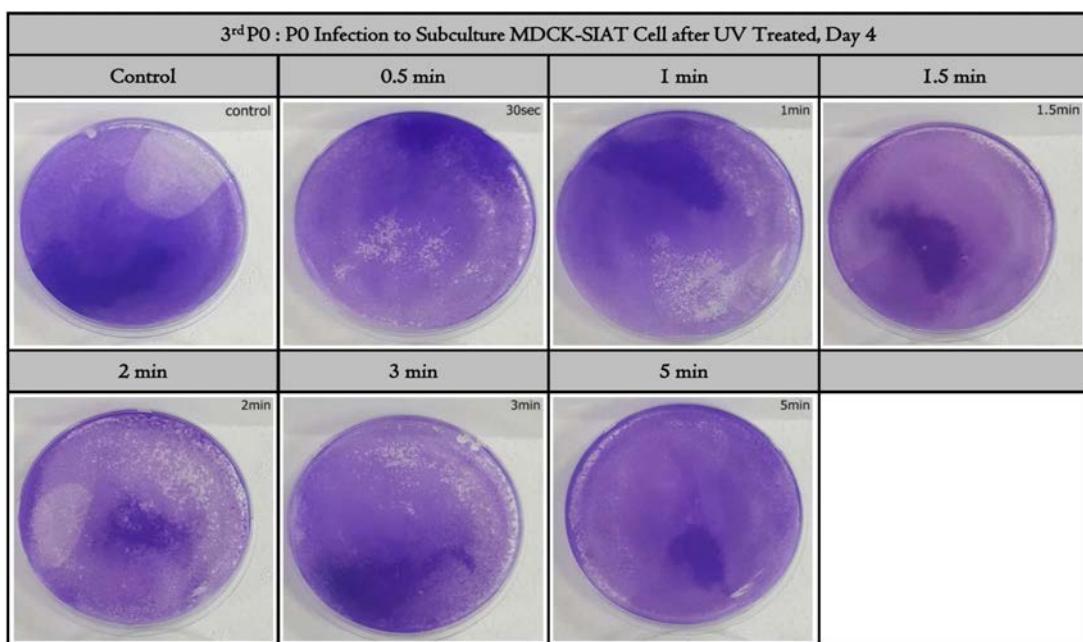


Figure 4. RT-PCR result of MDCK-SIAT cell infected with A/HK 3rd P0 after UV exposure on various time intervals

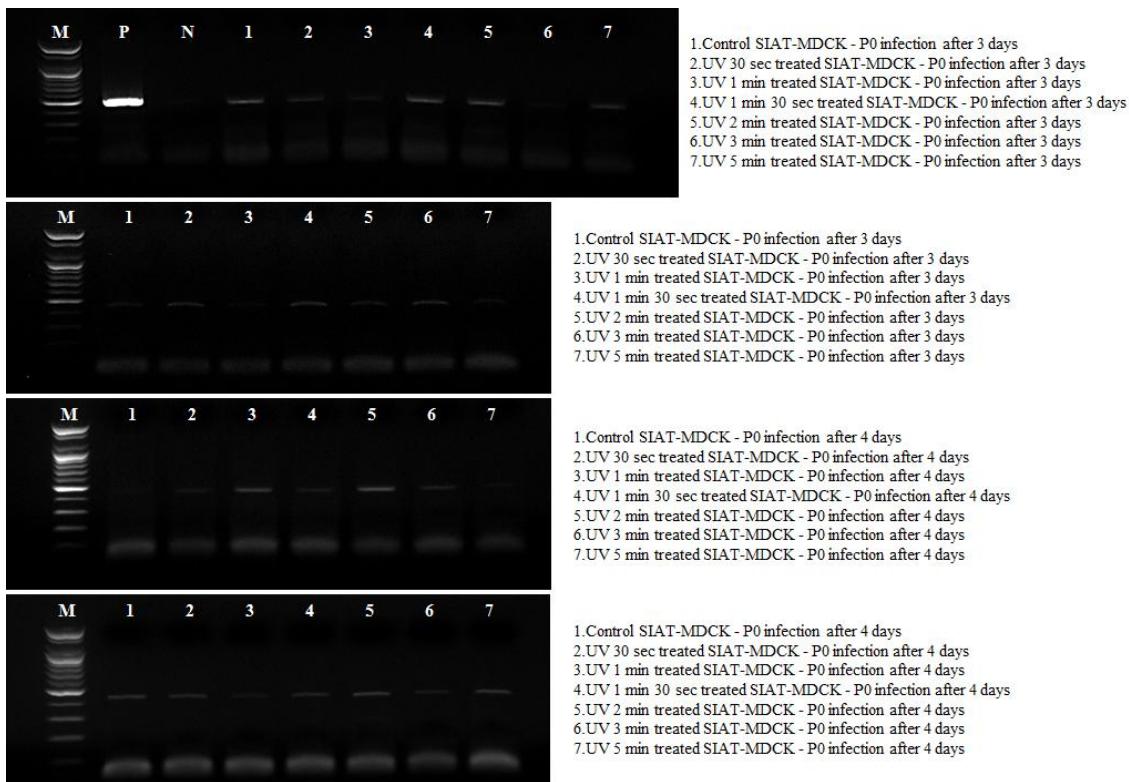


Figure 5. RT-PCR result of MDCK-SIAT cell infected with A/HK 3rd P0 after various UV time exposures

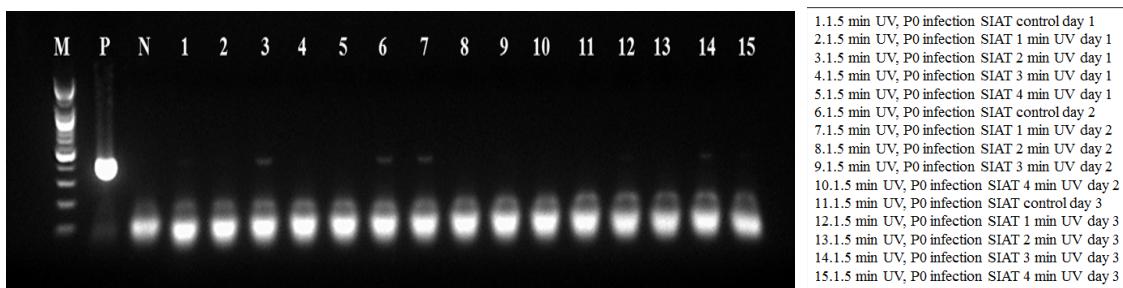


Figure 6. RT-PCR result of MDCK-SIAT cell infected with A/HK P0 after UV exposure on various time intervals



다. Mouse-adapted Influenza Virus의 제조를 위한 Passage

(1) 고농축 배양액을 이용한 Lung-Cell-Lung Passage (STEP 2.3.1)

(가) 실험 목적

바이러스의 titer를 높여 lung-cell-lung passage를 진행하기 위하여 ultracentrifuge를 적용한 고농축 배양액을 이용한 시험

(나) 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	DBA/1J 63수	
Virus Type	3차 농축배양액	3 rd P0
Virus Challenge	<ul style="list-style-type: none"> - 각 passage마다 마우스 7수씩 intranasal 경로로 1회 50uL/Head 투여 - Passage 0, 1, 5, 6, 7, 8은 감염 2일차, passage 2, 3, 4차는 감염 3일차에 3수씩 폐적출 및 균질화 진행 - Lung-Cell-Lung Passage를 실시 (Figure 1-3) - MDCK-SIAT cell 사용 - Passage 1의 감염 3일차 배양액은 ultracentrifuge로 200 배 농축(200ml→1ml)하여 다음 passage로 진행됨 	마우스 폐 1개 당 PBS 0.5mL 첨가하여 균질화하여 투여
관찰 항목	<ul style="list-style-type: none"> - 매일 임상증상 관찰, 체중 측정 및 사망개체 확인 (Figure 4) - Cell 배양액(P1, P2 제외) 및 Cell의 배양농축액, 농축 후 남은 배양액(P1, P2, P3 제외), cell homogenate(P1 제외)에서 RT-PCR을 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인하였음 (Figure 5~11) 	RT-PCR 2번 진행 (재검사)
결과요약	- P8까지 진행.	

- Passage 1의 MDCK-SIAT cell 감염 1, 2, 3일차에 cell 사진을 촬영함.
- Passage 2에서 DBA/1J에 감염시킨 바이러스는 passage 2의 3일차 cell 배양액과 고농축 passage 1에서 배양액을 회수하고 남은 dish에 추가로 SFM을 넣고 배양한 액을 pooling하고 농축(400ml→2.5ml)하여 사용함.
- Passage 3의 cell lysate를 균질화한 후 2~3회 freezing/thawing 과정을 거친 후 RT-PCR 수행.
- Passage 4에서는 pooling한 cell 배양액과 100배 농축배양액, passage 4의 cell lysate를 균질화한 후 2~3회 freezing/thawing 과정을 거친 상충액을 RT-PCR 수행

- Passage 5에서는 pooling한 cell 배양액과 10배 및 100배 농축배양액, 그리고 10배 및 100배 농축 후 걸러진 media에서 RT-PCR 수행함. 또한 일부는 6일차까지 배양하고 RT-PCR 수행 및 cell stain 후 사진촬영함.
- Passage 6~9에서는 pooling한 cell 배양액과 10배 및 100배 농축배양액, 그리고 10배 및 100배 농축 후 걸러진 media에서 RT-PCR 수행함.

(d) 실험 결과

- 세포 사진은 2차 농축 후 투여했던 lung 같아서 SIAT cell에 300ul/T75 10장 infection 후 day 별로 사진 촬영하여 상태 확인함.
- 바이러스 passage를 진행을 하여도 바이러스가 증폭이 되지 않는 문제점이 지속적으로 발견이 되어 그 원인을 찾기 위한 시험을 진행함. 바이러스가 세포 안에서 life cycle 중 마지막 단계인 assembly가 제대로 진행이 되지 않아 증폭된 바이러스가 밖으로 빠져나오지 못할 것이라는 가정을 세우고 A/HK를 처리한 세포를 homogenizer와 freezing/thawing 방법으로 lysis시켜 lysate를 이용하여 virus의 존재 유무를 확인 함. A/HK P3은 100배로 농축하여도 PCR에서 밴드가 강하게 확인이 되지 않았음. 반면에 세포를 lysis시킨 시료에서는 PCR 증폭이 일어나 밴드가 보이는 것을 확인할 수 있었음. 이때의 PCR 밴드는 homogenizer방법 보다는 freezing/thawing 방법이 더욱 좋았고, lysate의 양이 많을수록 증가가 되는 경향을 보였음.
- A/HK P3 샘플에서 100배 농축한 샘플 자체가 바이러스가 약했기 때문에 A/HK P4 샘플에서도 PCR 밴드는 약하게 보이고 Cell lysate와 media 100배 농축 시료에서도 PCR 밴드가 희미하게 보이는 경향을 보임.
- A/HK P4 100배 농축한 시료를 DBA mouse에 injection한 후, 2일 후에 폐를 적출하여 lung lysate를 다시 MDCK-SIAT에 접종하여 4일 뒤에 A/HK P5를 회수함. A/HK P5를 농축하기 전 (pooling)과 10배 농축, 100배 농축을 순서대로 진행하고 그때마다 일정량을 회수하여 샘플링을 진행했음. 또한 일부 A/HK P4를 처리한 MDCK-SIAT 세포는 6일째에 A/HK P5로 회수하여, RT-PCR을 진행하여 4일째 회수 샘플과 비교 관찰하였음. 마찬가지로 A/HK P5를 DBA mouse에 투여하여 2일 뒤에 폐를 적출하여 RT-PCR로 바이러스의 존재를 확인함. 하지만, 그 밴드의 세기가 모두 미미하고 뚜렷하게 증폭되는 양상은 관찰하기 힘들었음.
- A/HK P5 lung lysate를 다시 MDCK-SIAT에 접종하여 4일 뒤에 A/HK P6를 회수함. A/HK P6를 농축하기 전(pooling)과 10배 농축, 100배 농축을 순서대로 진행하고 그때마다 일정량을 회수하여 RNA 샘플링을 진행했음. 마찬가지로 A/HK P6를 DBA mouse에 투여하여 2일

뒤에 폐를 적출하여 RT-PCR로 바이러스의 존재를 확인함. 하지만, 그 밴드의 세기가 모두 미미하고 뚜렷하게 증폭되는 양상은 관찰하기 힘들었음.

- A/HK P6 lung lysate를 다시 MDCK-SIAT에 접종하여 4일 뒤에 A/HK P7를 회수함. A/HK P7를 농축하기 전(pooling)과 10배 농축, 100배 농축을 순서대로 진행하고 그때마다 일정량을 회수하여 RNA 샘플링을 진행했음. 마찬가지로 A/HK P7를 DBA mouse에 투여하여 2일 뒤에 폐를 적출하여 RT-PCR로 바이러스의 존재를 확인함. 하지만, 그 밴드의 세기가 모두 미미하고 뚜렷하게 증폭되는 양상은 관찰하기 힘들었음.

- A/HK P7 lung lysate를 다시 MDCK-SIAT에 접종하여 4일 뒤에 A/HK P8를 회수함. A/HK P8를 농축하기 전(pooling)과 10배 농축, 100배 농축을 순서대로 진행하고 그때마다 일정량을 회수하여 RNA 샘플링을 진행했음. 마찬가지로 A/HK P8를 DBA mouse에 투여하여 2일 뒤에 폐를 적출하여 RT-PCR로 바이러스의 존재를 확인함. 하지만, 그 밴드의 세기가 모두 미미하고 뚜렷하게 증폭되는 양상은 관찰하기 힘들었음.

- A/HK P0부터 P8까지 진행된 샘플을 한번에 비교해보면 A/HK P0는 원액에 비해서 뚜렷한 PCR 결과를 보여주지만, A/HK P1부터 급격하게 PCR 밴드가 약해지는 것을 알 수 있었음. 이는 바이러스 증폭이 생각보다 잘 되지 않거나, mouse 폐에 들어가서 상당부분 바이러스가 소멸되는 결과로 판단됨.

Figure 1. Morphology change of MDCK-SIAT cell for 3 days after infection with A/HK 3rd P0

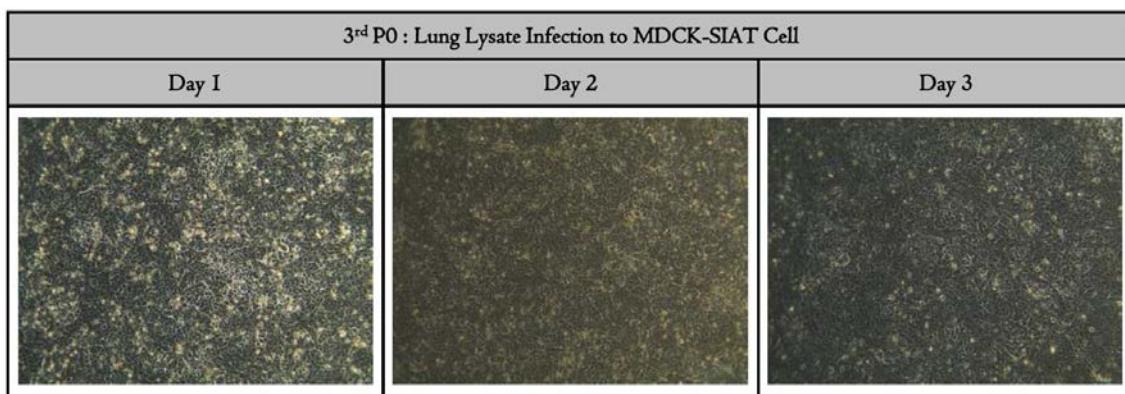


Figure 2. Morphology change of MDCK-SIAT cell in passage 3 after infection with A/HK 3rd P0

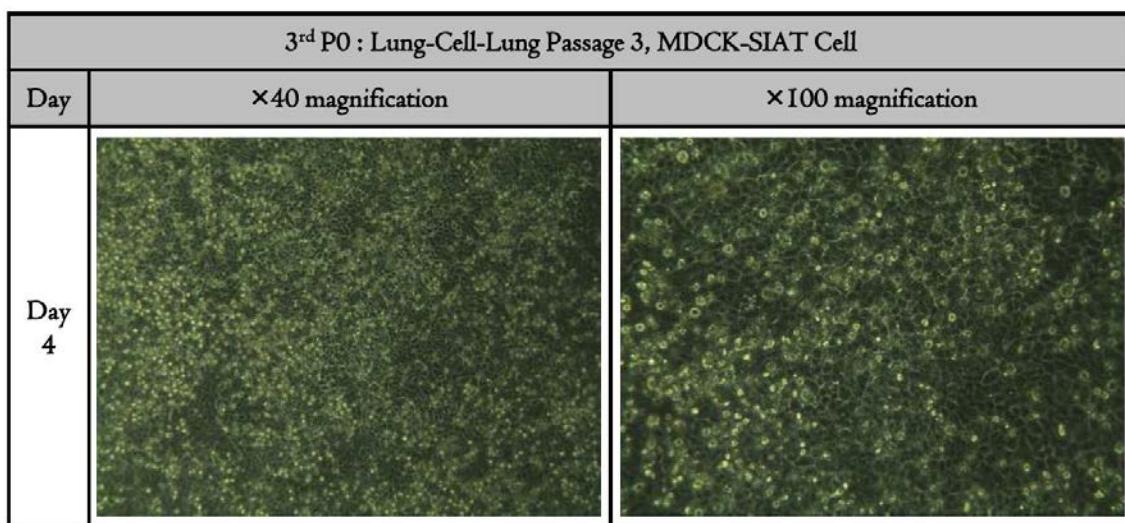


Figure 3. Morphology change of MDCK-SIAT cell in passage 5 after infection with A/HK 3rd P0

(×200 magnification)

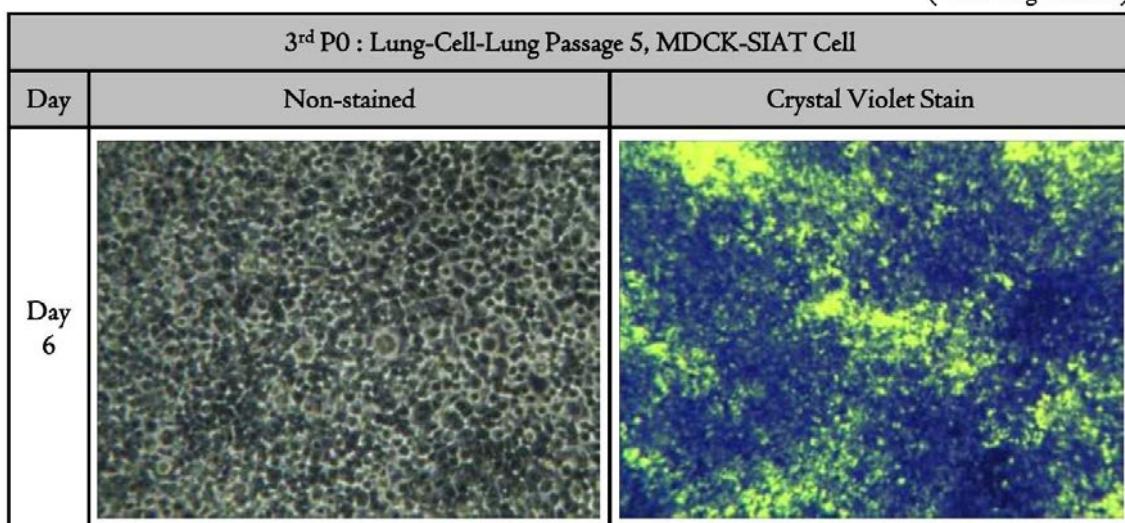


Figure 4. Ratio of body weight loss

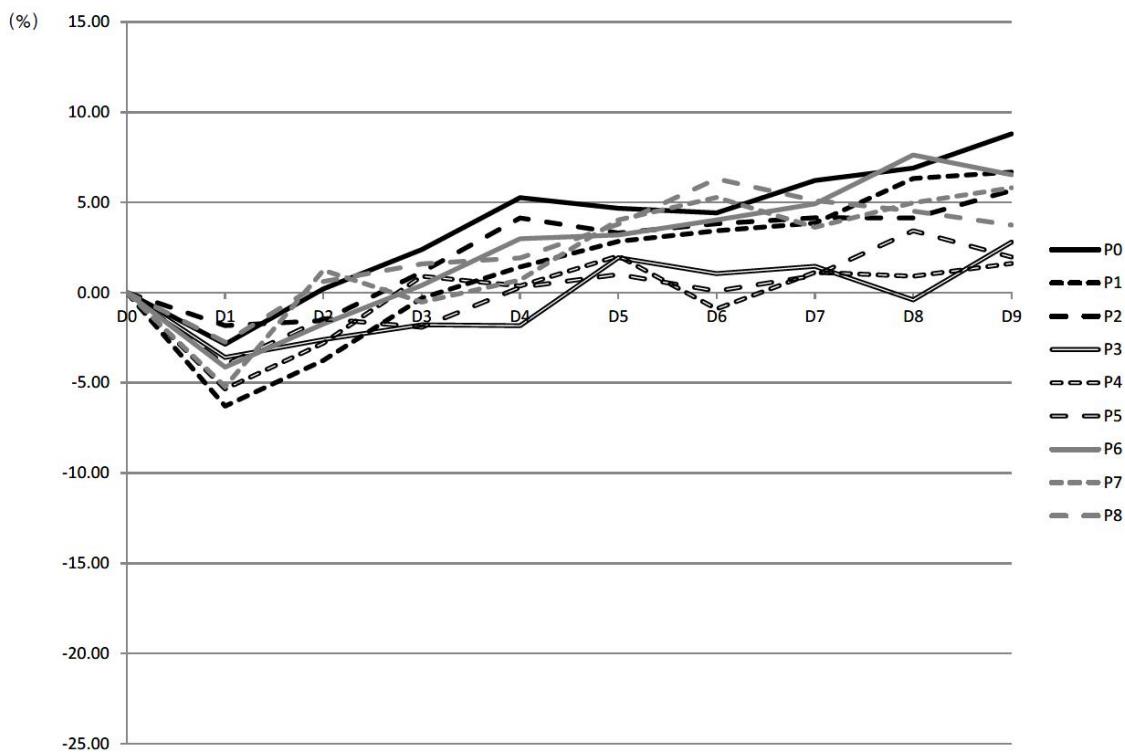


Figure 5. Result of RT-PCR using cell lysate treated with homogenizer and freezing/thawing method

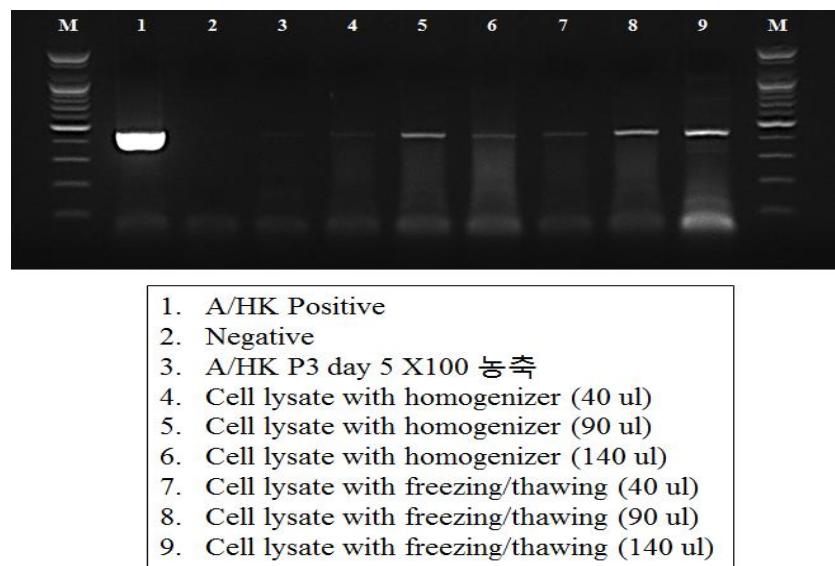


Figure 6. RT-PCR result of A/HK 3rd P0_P4

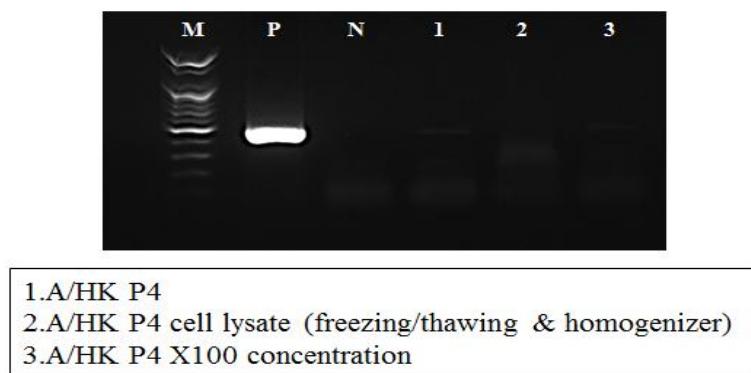


Figure 7. RT-PCR result of A/HK 3rd P0_P5

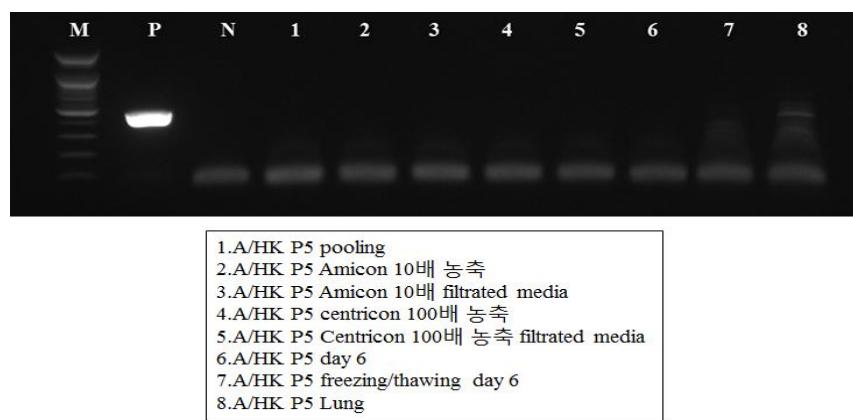


Figure 8. RT-PCR result of A/HK 3rd P0_P6

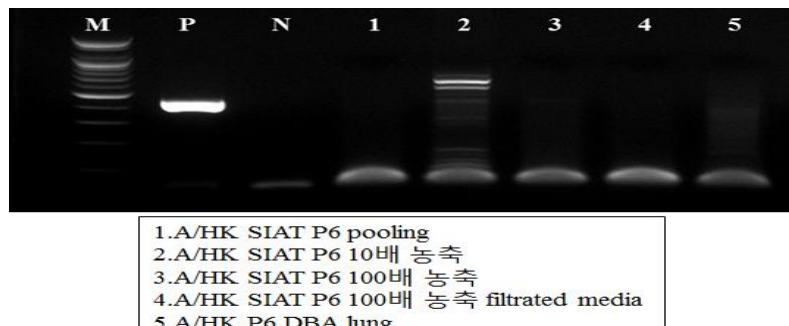


Figure 9. RT-PCR result of A/HK 3rd P0_P7

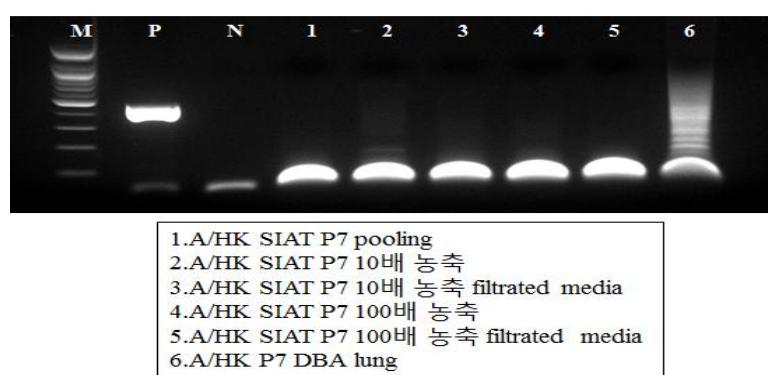


Figure 10. RT-PCR result of A/HK 3rd P0_P8

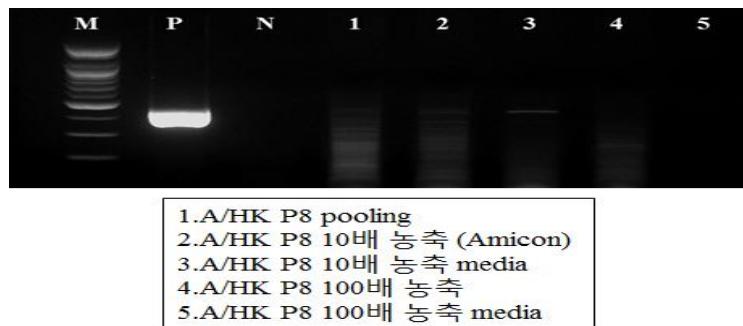
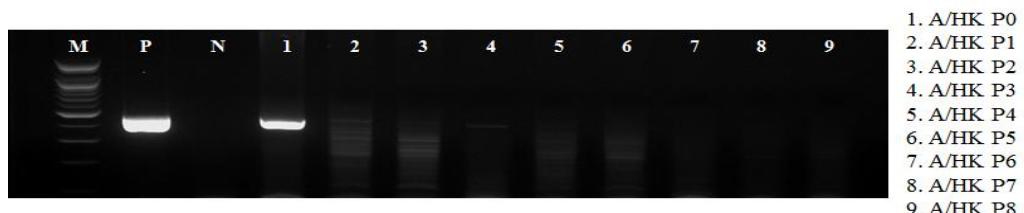


Figure 11. RT-PCR result of P0 to P8 after infection with A/HK 3rd P0



(2) 세포주 line별로 얻은 바이러스 배양액을 이용한 Lung-Cell-Lung Passage 시험 (STEP 2.3.2)

(1) 실험 목적

MDCK-SIAT cell 외에 인플루엔자 바이러스에 감수성이 높은 세포주를 선별하는 조건시험을 통해 WI-38 cell line을 1차로 선별하여 lung-cell-lung passage를 수행하였음.

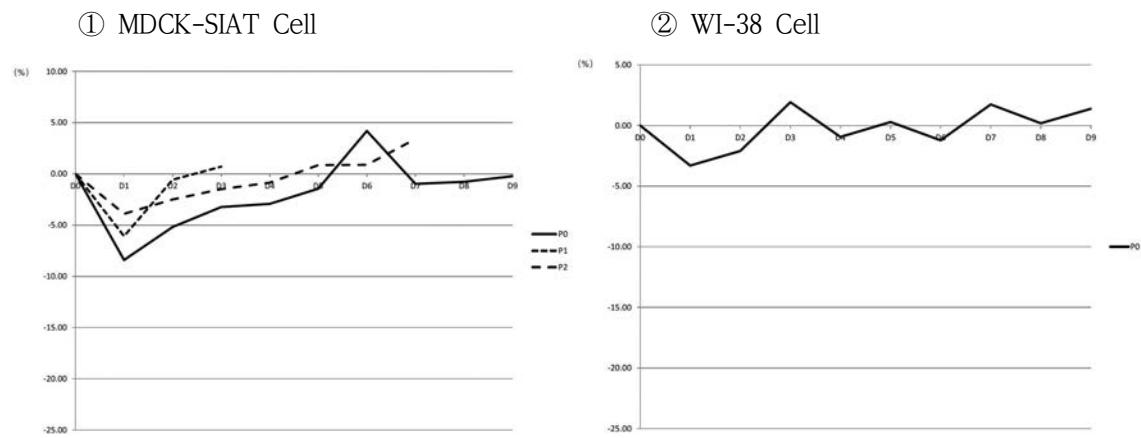
(2) 실험 방법

항 목	상 세 내 용	비 고
실험 동물	DBA/1J	
Virus Type	MDCK-SIAT, WI-38 cell에서의 4차 농축배양액	4 th P0_MS, 4 th P0_WI
Virus Challenge	<ul style="list-style-type: none"> - Lung-Cell-Lung과 Cell-to-Cell passage 동시 진행 - Lung-Cell-Lung passage는 4th P0_MS와 4th P0_WI 모두에서 진행하고, 각 passage마다 마우스 5수씩 intranasal 경로로 1회 50uL/Head 투여 - 감염 2일차에 2수씩 폐적출 및 균질화 진행 - 4th P0_WI는 passage 0에서 중단하였고, 현재 4th P0_MS에서 3 passage 진행 후 종료 - Cell-to-cell passage는 4th P0_MS에서만 진행하며, 현재 3 passage 진행 후 종료 	마우스 폐 1개 당 PBS 0.5mL 첨가하여 균질화하여 투여
관찰 항목	<ul style="list-style-type: none"> - 모든 시료는 RT-PCR을 사용하여 바이러스 존재 유무를 확인 	
결과요약	<ul style="list-style-type: none"> - Lung-Cell-Lung과 Cell-to-Cell passage를 동시에 진행 중에 있으며 현재 passage 3 단계에 있음(Figure 1, ①) - 4th P0_WI의 경우는 passage 0에서 의미있는 임상증상 관찰, 체중 감소 현상이 초기부터 관찰되지 않아 중단하였음(Figure 1, ②). 	

(3) 실험 결과

- 4th P0_MS의 경우는 lung-cell-lung과 cell-to-cell passage를 동시에 진행 중에 있으며 현재 passage 3 단계에 있음(**Figure 1, ①**)
- 4th P0_WI의 경우는 passage 0에서 의미있는 임상증상 관찰, 체중 감소 현상이 초기부터 관찰되지 않아 중단하였음(**Figure 1, ②**).

Figure 1. Ratio of body weight loss



라. 혈액학 및 혈액생화학 측정, 조직병리(H&E, IHC) (STEP 2.4)

DBA/1J Mice에서 A/Hongkong/7127/2014에 의한 병리학적 평가를 위하여 Lung-Cell-Lung passage 6, 7, 8의 실험동물을 임상병리 및 조직병리학적으로 평가하였다. 모든 실험동물은 이전 단계의 lung lysate를 농축한 배양액으로 감염시켰고, 감염시점으로부터 0일차(감염 전), 1, 2, 3일차에 부검을 진행하였다.

부검 시 복대정맥에서 채혈하여 혈액학 및 혈액생화학 검사를 실시하였고, 폐 조직을 적출하여 조직병리학적 검사를 실시하였다. 적출한 모든 조직에 대해 Hematoxylin & Eosin 염색과 H3N2에 대한 면역조직화학염색을 실시하였다(passage 8 data shown).

혈액학 측정 결과(Table 1), passage 6과 7에서는 특이사항이 없었으나, passage 8은 Neutrophil 수치(%)가 감염 1일차에 상승하였고 감염 3일차에 정상범위 내로 측정되었다. 생화학 측정결과(Table 2)에서도 passage 6과 7에서는 특이사항이 없었고, 감염 2일차에 AST, ALT가 다소 높게 관찰되었다.

H&E 염색상의 조직학적 검경결과(Figure 1), 감염 1~3일차에 미약한 수준의 염증세포나 육아종성 염증이 일부 폐 조직에서 관찰되었고, 1, 2차년도 수준의 조직변화는 관찰되지 않았다. 염증이 관찰된 동일부위의 폐조직 슬라이드를 면역조직화학염색 하였을 때 염색반응은 관찰되지 않았다. 특이한 점은 passage 6, 7, 8 모두에서 감염 1일차에 기관지 내 호흡기 내 피세포의 vacuolation이 관찰되었으나 2일차에서는 관찰되지 않았고, 해당부위의 면역조직화학염색 결과에서도 염색반응은 없었다. 이와 같은 vacuolation 현상은 선행시험에서 관찰되지 않았었다.

Table 1. Hematology and serum chemistry**a) Hematology**

Group	Item	WBC Units	N x10 ³ /μl	L %	M %	E %	B %	RBC x10 ⁶ /μl	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl (%)	PLT x10 ³ /μl
SIAT-HK-P8-01-DAY0		2.22	20.5	75.4	3.1	0.56	0.43	9.7	13.3	36.3	37.4	13.7	36.7	794
SIAT-HK-P8-02-DAY0		3.33	10.3	86.1	2.6	0.65	0.33	9.0	12.5	33.9	37.7	14.0	37.0	738
MEAN		2.78	15.4	80.8	2.8	0.61	0.38	9.4	12.9	35.1	37.6	13.9	36.9	766
SIAT-HK-P8-03-DAY1		3.01	46.1	47.8	5.1	1.05	0.04	9.6	13.1	35.6	37.0	13.6	36.8	1031
SIAT-HK-P8-04-DAY1		3.18	34.4	61.7	2.7	1.20	0.03	9.9	13.7	37.1	37.4	13.8	36.8	720
MEAN		3.10	40.3	54.8	3.9	1.13	0.04	9.8	13.4	36.4	37.2	13.7	36.8	876
SIAT-HK-P8-05-DAY2		3.57	25.7	73.0	0.4	0.86	0.00	10.4	14.3	38.6	37.0	13.7	37.1	782
SIAT-HK-P8-06-DAY2		3.64	35.8	61.0	2.7	0.43	0.06	9.7	13.5	36.4	37.5	13.9	37.0	747
SIAT-HK-P8_09-DAY2		2.68	34.1	60.0	4.8	0.94	0.16	10.0	13.7	37.4	37.2	13.6	36.7	829
MEAN		3.30	31.9	64.7	2.6	0.74	0.07	10.0	13.8	37.5	37.2	13.7	36.9	786
SIAT-HK-P8-07-DAY3		4.55	22.2	71.9	4.8	1.04	0.00	10.1	13.8	37.3	37.0	13.7	37.0	925
SIAT-HK-P8-08-DAY3		4.99	16.9	79.2	3.7	0.04	0.27	9.7	13.3	36.0	37.3	13.8	37.0	897
MEAN		4.77	19.6	75.6	4.2	0.54	0.13	9.9	13.6	36.7	37.2	13.8	37.0	911

b) Serum Chemistry

Group	Item	TP Units	ALB g/dl	GLB g/dl	A/G Ratio	GLU mg/dl	AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	BUN mg/dl	CREA mg/dl	T-Bil mg/dl	CHO mg/dl	TG mg/dl	CA mg/dl	P mg/dl	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L
SIAT-HK-P8-01-DAY0		3.9	3.0	0.9	3.3	109	88	38	91	24.4	0.31	0.06	59	34	8.7	10.0	151	5.3	116
SIAT-HK-P8-02-DAY0		3.5	2.7	0.8	3.4	271	57	33	83	22.9	0.25	0.03	55	70	8.4	7.8	147	5.0	113
MEAN		3.7	2.9	0.9	3.4	190	73	36	87	23.7	0.28	0.05	57	52	8.6	8.9	149	5.2	115
SIAT-HK-P8-03-DAY1		3.6	2.6	1.0	2.6	241	152	99	98	15.8	0.38	0.05	103	93	9.2	10.4	148	5.3	109
SIAT-HK-P8-04-DAY1		3.8	3.0	0.8	3.8	243	158	100	140	17.8	0.36	0.02	67	64	8.6	10.2	153	4.5	117
MEAN		3.7	2.8	0.9	3.2	242	155	100	119	16.8	0.37	0.04	85	79	8.9	10.3	150.5	4.9	113
SIAT-HK-P8-05-DAY2		3.9	3.0	0.9	3.3	177	93	48	133	14.7	0.38	0.05	63	26	8.9	11.3	151	5.1	110
SIAT-HK-P8-06-DAY2		3.6	2.7	0.9	3.0	273	79	37	107	17.8	0.28	0.03	58	69	8.8	7.6	147	4.8	112
MEAN		3.8	2.9	0.9	3.2	225	86	43	120	16.3	0.33	0.04	61	48	8.9	9.5	149	5.0	111
SIAT-HK-P8-07-DAY3		3.6	2.8	0.8	3.5	213	54	29	125	21.8	0.40	0.11	56	57	8.7	8.0	149	5.1	111
SIAT-HK-P8-08-DAY3		3.5	2.8	0.7	4.0	233	117	29	159	23.6	0.40	0.02	62	108	9.2	10.9	151	5.4	113
MEAN		3.6	2.8	0.8	3.8	223	86	29	142	22.7	0.40	0.07	59	83	9.0	9.5	150	5.3	112

Figure 1. Histopathological findings of lung tissue (x40 magnification)

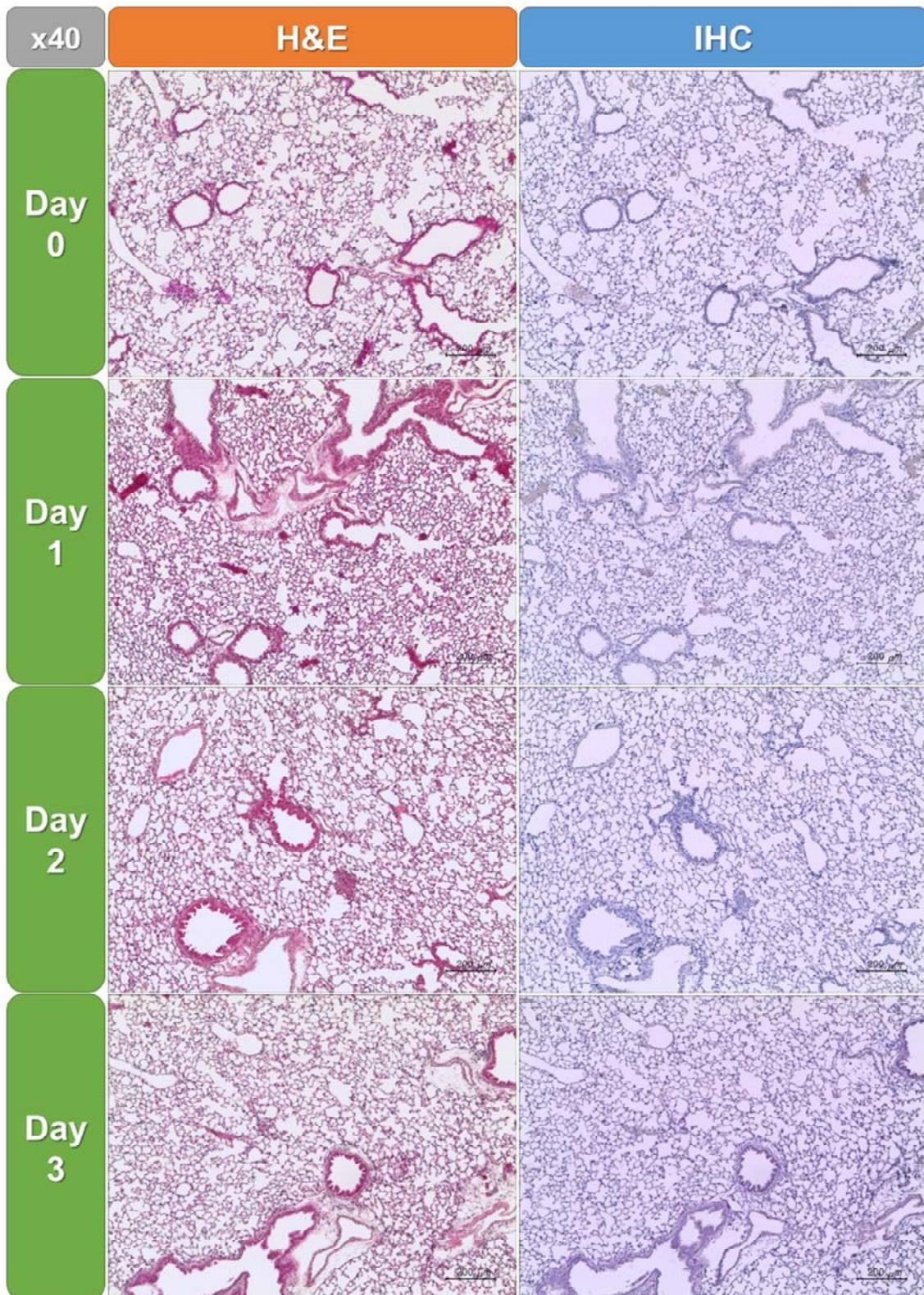
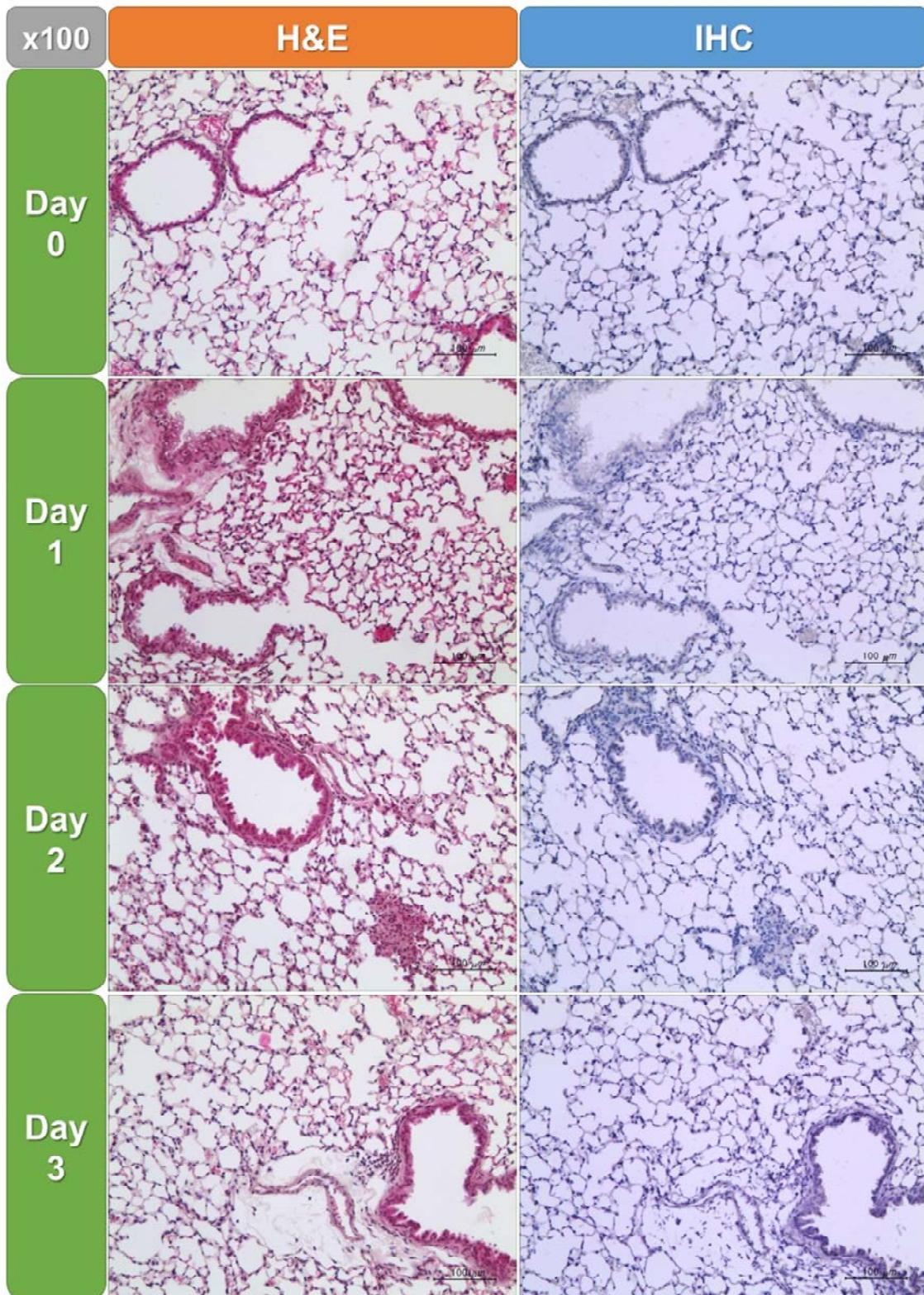


Figure 2. Histopathological findings of lung tissue (x100 magnification)



■ Summarized Data for Influenza A Virus H3N2 (A/Hongkong/7127/2014)

Exp.	Detailed Content				Result
	Lab. Animal / Cell Line	Infection Source	Passage	Monitoring	
1	DBA/1J	MDCK-SIAT 유래 20배 배양농축액 (1st_P0_D3 및 1st_P0_D4)	Lung-Cell-Lung	<ul style="list-style-type: none"> • 임상증상/체중 측정 • 사망개체 확인 • Rapid Kit 및 RT-PCR로 바이러스 확인시험 	1) P0~P1 시행 2) P1부터 바이러스 검출이 안됨 • P1_Lunglysate • P1 & P2 Concentrate
2	DBA/1J	1st_P0_D4의 바이러스 배양농축액	Lung-Cell-Lung (1일 1회, 2일 연속투여)	상동	1) P0 시행 2) 특이한 임상증상이 없음 3) 반복 감염 후에 시간 경과에 따른 Band intensity가 매우 약하게 관찰됨
3	MDCK-SIAT	1st_P0_D4 및 2nd_P0_D3의 바이러스 배양농축액	Cell-to-Cell	<ul style="list-style-type: none"> • Cell Morphology • Rapid Kit 및 RT-PCR로 바이러스 확인시험 	1) Floating cell 이 3일차에 관찰됨 2) RT-PCR에서 희미한 DNA Band 확인됨 3) P2, P3로 진행하면서 Band Intensity가 감소하는 동시에 Floating Cell이 늦게 나타남이 관찰됨
4	5종 Inbred Mice	MDCK-SIAT 유래 배양농축액 (3rd_P0)	Lung Infection	<ul style="list-style-type: none"> • 임상증상/체중 측정 • 사망개체 확인 • Rapid Kit 및 RT-PCR로 바이러스 확인시험 	1) 마우스 종간에 특별한 임상적 차이를 보이지 않음 2) DBA/1J 마우스를 사용
5	5종 Cell Line	MDCK-SIAT 유래 배양농축액(3rd_P0)	Cell Infection	<ul style="list-style-type: none"> • Cell Morphology • RT-PCR로 바이러스 확인시험 • IHC 	1) 5종의 세포주에서 바이러스 생성량에 특별한 차이를 보이지 않음 (WI-38, MDCK-SIAT 유사) 2) MDCK-SIAT를 사용
6-1	DBA/1J	MDCK-SIAT 유래 배양농축액(3rd_P0)	Lung-Cell-Lung	<ul style="list-style-type: none"> • 임상증상 관찰 • 체중 측정 • 사망개체 확인 • RT-PCR로 바이러스 확인시험 	1) P0~P8 수행 2) 임상증상 및 체중감소율이 기대에 미치지 못함
6-2	DBA/1J	MDCK-SIAT (4rd_P0) 및 WI-38 (4rd_P0) 유래배양농축액	상동	상동	1) P0~P5 수행 2) 임상증상 및 체중감소율이 기대에 미치지 못함
7	MDCK-SIAT	MDCK-SIAT 유래 배양농축액(3rd_P0)	감염 후 7일간 Cell Culture	<ul style="list-style-type: none"> • 사진 촬영 	1) 신규 배양배지 적용 2) 바이러스 감염에 따른 특별한 Morphology 변화가 관찰되지 않음
8	MDCK-SIAT	MDCK-SIAT 유래 배양농축액(3rd_P0)	Cell Culture (Time 별 UV 처리, Cell Passage)	<ul style="list-style-type: none"> • Cell Morphology • RT-PCR로 바이러스 확인시험 	1) 세포에 UV 처리/Random Mutation을 통해 바이러스의 증폭을 유도 목적으로 수행 2) 다양한 조건에서 시험을 수행하였으나 유의적 결과를 도출하지 못함

제5장 연구결과 고찰 및 결론

1. 1차년도 : Development of H3N2 (A/Victoria/361/2011) Influenza Virus Mutant with Mouse Pathogenicity

1차년도에는 마우스 병원성 바이러스주의 개발에 가장 널리 사용하는 반복적인 lung-to-lung passage 방법의 한계를 극복하고 자체적으로 개발한 lung-cell-lung passage 방법을 적절히 조합하여 DBA/1J 마우스에서 높은 폐사율 및 폐사기간 단축을 통해 마우스 병원성 mutant Influenza virus clone 4주를 성공적으로 확보하였다.

DBA/1J mouse pathogenic virus clones을 사용하여 8개의 유전자에 대한 염기서열 분석을 완료하는 동시에 Wild Type과 Mutant Type Influenza virus의 8개 viral protein에서 주요 아미노산 치환이 일어난 부분에 대해 비교 분석하였고, 이를 통해 Influenza virus의 virulence 와 host range에 영향을 줄 수 있는 유전자 부위를 확인하였다.

또한, 마우스 병원성 mutant Influenza virus의 MLD₅₀, MID₅₀, hematology 및 serum biochemistry, histopathological 변화를 관찰한 결과, 사람에서 Influenza virus 감염시에 나타나는 주요 임상증상과 혈액 및 조직학적 변화와 매우 유사한 상관관계를 확인할 수 있었다.

2. 2차년도 : Development of H3N2 (A/Switzerland/9715293/2013) Influenza Virus Mutant with Mouse Pathogenicity

2차년도에는 1차년도에 개발한 lung-cell-lung, lung-to-lung 및 modified passage 방법을 검증하고자 1차년도와 다른 H3N2(A/Switzerland/9715293/2013) Influenza virus를 제공받아 마우스 병원성주를 단기간에 제조하였다.

Balb/c에서 2개, DBA/1J에서 3개의 바이러스 clone을 확보하였고, 유전자 서열분석과 병원성 분석을 수행한 결과, PB1, M 그리고 NS gene을 제외한 5개의 유전자에 해당하는 바이러스 단백질 내에서 7~14개의 아미노산 치환이 일어난 것을 확인한 동시에 대부분의 주요 아미노산 변화는 특히 인플루엔자 바이러스의 병원성과 속주 범위에 영향을 주는 Hamagglutinin (HA)와 Nucleoprotein (NP) 부위에서 발생하였다.

또한, 마우스 병원성 mutant Influenza virus의 MLD₅₀, MID₅₀, hematology 및 serum biochemistry, histopathological 변화를 관찰한 결과, 1차년도와 마찬가지로 Influenza virus 감염시에 나타나는 주요 임상증상과 혈액 및 조직학적 변화와 매우 유사한 상관관계를 확인하였다.

결과적으로, Balb/c와 DBA/1J mouse-adapted H3N2 Influenza mutant virus는 마우스에서 lethality와 pathogenicity를 보이는 동시에 wild-와 mutant-H3N2를 백신 접종 후에 mouse-adapted Influenza mutant virus를 공격하였을 때, 성공적으로 mutant virus로부터 감염방어 효과를 확인하였다. 따라서 백신과 치료제를 평가할 수 있는 성공적인 마우스 인플루엔자 감염모델 시스템을 구축하였다.

3. 3차년도 : Development of H3N2 (A/Incheon/1593/2015 and A/Hongkong/7127/2014) Influenza Virus Mutant with Mouse Pathogenicity

3차년도에는 질병관리본부에서 제공한 두 종류의 바이러스[Influenza A virus H3N2 (A/Incheon/1593/2015) 와 Influenza A virus H3N2 (A/Hongkong/7127/2014)]를 가지고 1차년도 및 2차년도에 성공적으로 확보한 다양한 mouse adaptation 기술을 적용하여 mouse pathogenic한 Influenza virus 제조하고자 시도하였다.

그러나, 연구개발에 사용한 두 종류의 바이러스는 세포배양을 통한 바이러스 증식의 어려움이나 낮은 바이러스 접종량으로 인해 감염 초기에 마우스 lung 내에서의 매우 빠른 virus clearance 등 기존 방식과는 전혀 다른 양상을 보여주었다.

① 초기 바이러스 감염원으로 사용하기 위하여 대량 증식이 필요한데 사용한 MDCK 및 MDCK-SIAT 세포주에서 바이러스의 증식이 매우 낮게 일어나는 동시에 농축과정에서도 감염성을 보이는 intact한 바이러스 보다는 partial assembled Influenza virus가 상당량 검출이 되어서 감염성을 지닌 고 역가의 바이러스 만을 확보하기가 매우 어려웠다.

② 또한, lung-cell-lung passage를 위해서 mouse의 lung infection을 통해 얻어진 Influenza virus가 포함된 lung lysate를 MDCK 및 MDCK-SIAT 세포주에서 감염시켰을 때 immune clearance에 의해 매우 낮은 titer의 virus가 존재하여 세포내 virus 증식이 거의 일어나지 않아서 mouse adaptation을 위한 연속적인 passage 진행에 많은 어려움을 겪었다.

일반적으로 Influenza virus의 감염 및 복제는 multi-step process로 진행된다. Influenza virus는 nose, throat, lung 기관내의 epithelial cell 표면에 존재하는 sialic acid sugar에 hemagglutinin이 결합하게 된다. 이때 protease에 의해 hemagglutinin이 끊어지게 되면 endocytosis에 의해 virus를 세포 내로 이동시킨다.

세포 내에서 endosome 내의 acid condition으로 2가지 주요 변화를 유도하게 된다. Hemagglutinin protein의 한 부분이 vacole's membrane을 가지고 있는 viral envelope과 융합하게 되면 M2 ion channel이 proton 들을 viral envelope를 통해서 이동하게 하여 virus의

core를 산성화시키게 된다. 그 결과 core는 해체되어 viral RNA(vRNA) molecules, accessory proteins 그리고 RNA-dependent RNA polymerase를 cytoplasm 내로 내보내게 된다. 이들 core protein들과 vRNA는 nucleus 내로 이동할 수 있는 complex를 형성하며, RNA-dependent RNA polymerase가 complementary positive-sense vRNA를 전사하기 시작한다. vRNA는 cytoplasm 내로 이동하여 해독되거나 또는 nucleus 내에 남아있게 된다. 새로 합성된 viral proteins은 Golgi apparatus를 통해서 cell surface 내에 분비되거나 또는 nucleus로 다시 전달되어 vRNA와 결합하여 새로운 viral genome particles을 형성한다.

Negative-sense vRNA(genomes of future viruses), RNA-dependent RNA polymerase 그리고 다른 viral protein들이 virion 형태로 조립되어진다. Hemagglutinin 과 neuraminidase molecules cluster가 cell membrane에 가득차게 된다. vRNA 와 viral core protein들은 nucleus 내에 남아있고 membrane protrusion을 통해서 들어가게 된다. Mature virus는 숙주 세포의 phospholipid membrane에 hemagglutinin 과 neuraminidase를 포함하는 구형의 형태로 세포로부터 갈라져 나온다. 바이러스가 hemagglutinin을 통해 숙주세포에 달라붙어 있다가 neuraminidase가 숙주세포 내의 sialic acid residues를 끊어내면서 mature viruses는 떨어져 나오게 되면서 새로운 Influenza viruses가 만들어지는 동시에 숙주세포는 죽게 된다.

일반적으로 사람과 조류 Influenza virus는 MDCK 세포주에서 높은 titer를 가지고 얻어질 수 있는데 이는 α -2,6-linked sialic acid receptor (human의 경우) 와 α -2,3-linked sialic acid receptor (avian의 경우)를 동시에 MDCK 세포주 표면에 발현되어 있기 때문이다. 그러나, MDCK 세포주에서 α -2,6-linked sialic acid receptor의 발현 수준이 비교적 낮아 in vitro에서 human respiratory system을 대변하기에는 적절하지 않다.

3차년도에 사용한 MDCK-SIAT 세포주는 사람 2,6-sialtransferase의 cDNA를 MDCK 세포주에 안정적으로 transfection을 시켜서 만들어진 세포주이다. 이 세포주는 기존의 MDCK 세포주 보다 2배 높은 양의 6-linked sialic acid를 발현하는 데 반해 2배 정도 낮은 3-linked sialic acid를 발현하고 있다. 따라서 MDCK-SIAT 세포주는 sialyl- α -2,6-galactose 잔기들의 과량 발현으로 인해 neuraminidase inhibitor(NAI)들에 대한 사람 Influenza virus의 sensitivity를 측정하는 데에 아주 적합한 것으로 알려져 있다. 또한, hemagglutinin gene의 HA-1 domain은 MDCK 세포주 및 embryonated chicken egg passage 보다 MDCK-SIAT 세포주 내에서의 passage가 유전적으로 매우 안정하다는 사실을 보여주었다.(참고문헌: J. Clin. Microbiol. 2008 Jul; 46(7): 2189-2194,

참고문헌 및 자체 실험결과로 미루어 3차년도에 사용한 A/Incheon/1593/2015 및 A/Hongkong/7127/2014는 1차년도 및 2차년도에 사용한 MDCK 세포주보다 MDCK-SIAT에서

보다 효율적으로 감염이 일어나는 것을 실험적으로 확인하였다. 따라서 Influenza virus의 hemagglutinin과 MDCK/ MDCK-SIAT의 세포주의 표면에 존재하는 α -2,6-linked sialic acid receptor (human의 경우)와의 결합을 통한 세포내 이동에는 문제가 없을 것으로 판단된다.

Influenza virus의 hemagglutinin 유전자에 해당하는 아미노산 서열분석을 기준 1차년도 (Victoria/361/2011) 및 2차년도(Switzerland/9715293/2013)의 wild type 그리고 mutant type들을 포함해서 3차년도에 진행한 2종의 wild type virus 인 A/Incheon/1593/2015 와 A/Honkong/7127/2014에 대해서 동시에 분석하였다(Table 1.).

Hemagglutinin 유전자의 HA1 부분에서 대부분의 아미노산 변화가 확인되었으나, A/Incheon/1593/2015 와 A/Honkong/7127/2014 virus의 HA1 부분에서 기존의 1차년도와 2차년도에 사용한 wild 및 mutant type의 아미노산 서열과 대부분 유사하며 receptor binding에 영향을 미칠 수 있는 hemagglutinin 유전자 내의 아미노산의 major change는 확인할 수가 없었다. 따라서 세포주 실험결과나 유전자 분석결과, Influenza virus 의 hemagglutinin과 MDCK/ MDCK-SIAT의 α -2,6-linked sialic acid receptor와의 binding을 통한 세포내 감염에는 문제가 없을 것으로 판단된다.

그러나, 마우스 병원성을 보이기 위해서 hemagglutinin 유전자 내의 major amino acid change를 분석한 결과, A/Switzerland/9715293/2013의 경우에는 두 군데로 K18Q 및 N160D에서 major amino acid change가 확인되었으며, A144T, T183A, F209S, N262T 의 4군데에서 minor amino acid change가 관찰되었다.

A/Incheon/1593/2015 와 A/Honkong/7127/2014의 경우에는 major amino acid change 부분인 두 군데 위치에 18번째 K 및 160번째 S로 wild type이 가지고 있는 아미노산과 동일하거나 minor change 한 상태로 존재하므로 반복적인 lung-cell-lung passage, lung-to-lung passage 등을 통해서 임상증상을 보이는 경우에 이 부분에서의 amino acid change가 일어났는지를 확인하게 되면 마우스 병원주를 생성여부를 확인하는 초기 마커가 될 수 있을 것으로 판단된다.

따라서 Influenza virus가 target cell line에의 감염에는 문제가 없을 것으로 판단되나, 지금 까지는 확인되지 않았지만 어떤 알려지지 않은 원인에 의해 세포주내에서 virus가 충분히 증폭되지 않거나 또는(동시에) intact하게 virus가 assembly 되어 cell 밖으로 burst 되지 않고 leaking 되는 등 기존과는 전혀 다른 현상들을 다양한 실험조건에서 확인하였다(Figure 1~4). 이러한 이유로 높은 titer의 Influenza virus의 확보가 어려웠으며, 바이러스 농축 process를 변경하여(Amicon 및 Centricon 두 개의 농축시스템을 적용) 100배 수준의 고농축을 시도하였으나 마우스 비강투여에 적정한 $1\sim2\times10^6$ cfu/mouse 농도에 도달하지 못하였다. 이로 인해

서 $1\sim2\times10^4$ cfu/mouse 이하의 투여로는 마우스내에서 매우 빠른 virus clearance로 인해 마우스 lung에 생존하는 적정량의 바이러스의 확보가 어려운 관계로 lung lysate의 MDCK/MDCK-SIAT cell에서의 바이러스 증식은 passage를 거듭할수록 배양시간이 길어지는 동시에 virus titer도 점점 감소하여 마우스 병원성주를 얻는데에 어려움이 있음을 확인하였다.

3차년도 실험내용 및 실험결과에서 보듯이 상기에 언급한 두 가지 근본적인 문제점으로 인해 가능한 다양한 접근방법을 사용하여 mouse passage를 진행하였으나 유의성이 있는 임상 증상 관찰, 체중감소 현상 및 마우스 병원성 등의 특이적인 증상을 보이지 않아 mouse-adapted Influenza virus를 확보할 수 없었다.

본 연구개발에서 사용한 두 종류의 바이러스[Influenza A virus H3N2 (A/Incheon/1593/2015) 와 Influenza A virus H3N2 (A/Honkong/7127/2014)]의 경우에는 보다 효율적인 target cell line의 개발 필요성, 기존 세포주 내에서 Influenza virus를 감염시킨 후의 비교적 낮은 효율의 바이러스 수득에 대한 원인 규명 등이 선행되어야 mouse pathogenic Influenza virus의 개발이 가능할 것으로 판단되었다.

그러나 Influenza A virus H3N2(A/Honkong/7127/2014)는 백신주로서 세포배양의 어려움을 극복하는 방안으로 egg culture를 통한 바이러스의 expansion이 가능하다고 사료된다.

결론적으로 3차년도 용역과제를 통해 도출해낸 성과로는 다음과 같다.

- ① MDCK 및 MDCK-SIAT와 동등 이상으로 Influenza virus(A/Incheon/1593/2015, A/Honkong/7127/2014)에 감수성 내지 감염성을 보이는 WI-38 cell line 확인 및 검증.
- ② Lung-Cell-Lung 또는 Lung-to-Lung passage에서 Influenza virus의 mouse infectivity를 높이는 방법으로 “ONE MOUSE” 사용의 유용성을 확인하였음.
- ③ MDCK/MDCK-SIAT/WI-38 세포주 내에서 다양한 실험을 통하여 Influenza virus의 partial assembly에 대한 가능성 확인하였고, 이에 대한 원인을 추정하였으며, 마우스 병원성 바이러스주 개발에 대한 대안을 제시하였음.

Table 1. Identification and analysis of amino acid substitution detected in wild and mutant types of various H3N2 Influenza virus

Balb/c_P8_C2	R I Q D L E K Y V E	D T K I D L W S Y N	A E L L V A L E N Q	H T I D L T D S E M	N K L F E K T K K Q	L R E N A E D M G N
Balb/c_P9_C2	R I Q D L E K Y V E	D T K I D L W S Y N	A E L L V A L E N Q	H T I D L T D S E M	N K L F E K T K K Q	L R E N A E D M G N
A/Incheon/159/2015 421	R I Q D L E K Y V E	D T K I D L W S Y N	A E L L V A L E N Q	H T I D L T D S E M	N K L F E K T K K Q	L R E N A E D M G N
A/HongKong/7127/2014	R I Q D L E K Y V E	D T K I D L W S Y N	A E L L V A L E N Q	H T I D L T D S E M	N K L F E K T K K Q	L R E N A E D M G N
Victoria/361/2011						
P14_C3						
P14_C4						
P19_C1						
P19_C2						
Switzerland/971529/2013 481	G C F K I Y H K C D	N A C I G S I R N G	T Y D H D V Y R D E	A L N N R F Q I K G	V E L K S G Y K D W	I L W I S F A I S C
wild type	G C F K I Y H K C D	N A C I G S I R N G	T Y D H D V Y R D E	A L N N R F Q I K G	V E L K S G Y K D W	I L W I S F A I S C
DBA/U_P11_C1	G C F K I Y H K C D	N A C I G S I R N G	T Y D H D V Y R D E	A L N N R F Q I K G	V E L K S G Y K D W	I L W I S F A I S C
DBA/U_P11_C2	G C F K I Y H K C D	N A C I G S I R N G	T Y D H D V Y R D E	A L N N R F Q I K G	V E L K S G Y K D W	I L W I S F A I S C
DBA/U_P13_C1	G C F K I Y H K C D	N A C I G S I R N G	T Y D H D V Y R D E	A L N N R F Q I K G	V E L K S G Y K D W	I L W I S F A I S C
DBA/U_P13_C2	G C F K I Y H K C D	N A C I G S I R N G	T Y D H D V Y R D E	A L N N R F Q I K G	V E L K S G Y K D W	I L W I S F A I S C
Balb/c_P8_C2	G C F K I Y H K C D	N A C I G S I R N G	T Y D H D V Y R D E	A L N N R F Q I K G	V E L K S G Y K D W	I L W I S F A I S C
Balb/c_P9_C2	G C F K I Y H K C D	N A C I G S I R N G	T Y D H D V Y R D E	A L N N R F Q I K G	V E L K S G Y K D W	I L W I S F A I S C
A/Incheon/159/2015 481	G C F K I Y H K C D	N A C I G S I R N G	T Y D H D V Y R D E	A L N N R F Q I K G	V E L K S G Y K D W	I L W I S F A I S C
A/HongKong/7127/2014	G C F K I Y H K C D	N A C I G S I R N G	T Y D H D V Y R D E	A L N N R F Q I K G	V E L K S G Y K D W	I L W I S F A I S C
Victoria/361/2011						
P14_C3						
P14_C4						
P19_C1						
P19_C2						
Switzerland/971529/2013 541	F L L C V A L L G F	I M W A C Q K G N I	R C N I C I X			
wild type	F L L C V A L L G F	I M W A C Q K G N I	R C N I C I X			
DBA/U_P9_C1	F L L C V A L L G F	I M W A C Q K G N I	R C N I C I X			
DBA/U_P11_C2	F L L C V A L L G F	I M W A C Q K G N I	R C N I C I X			
DBA/U_P13_C1	F L L C V A L L G F	I M W A C Q K G N I	R C N I C I X			
Balb/c_P8_C2	F L L C V A L L G F	I M W A C Q K G N I	R C N I C I X			
Balb/c_P9_C2	F L L C V A L L G F	I M W A C Q K G N I	R C N I C I X			
A/Incheon/159/2015 541	F L L C V A L L G F	I M W A C Q K G N I	R C N I C I X			
A/HongKong/7127/2014	F L L C V A L L G F	I M W A C Q K G N I	R C N I C I X			

Figure 1. Detection of A/HK using RT-PCR with sample of each step after performing 2-step concentration process with each culture supernatant containing A/HK

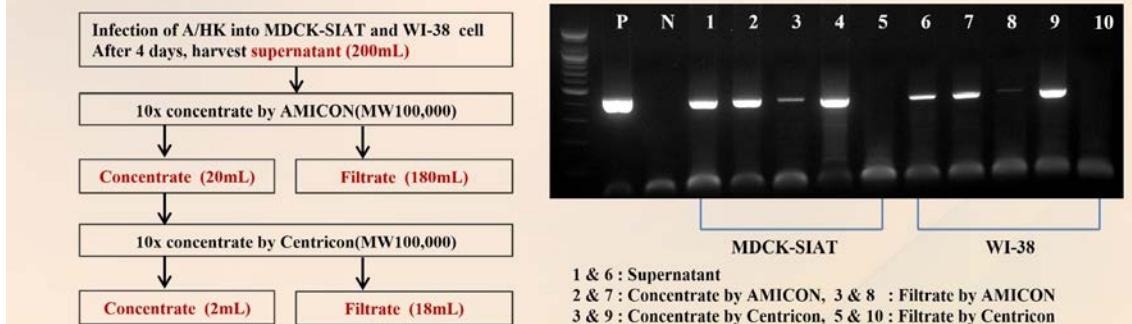


Figure 2. Detection of A/HK using RT-PCR with pellet and supernatant after performing ultracentrifugation with culture supernatant containing A/HK

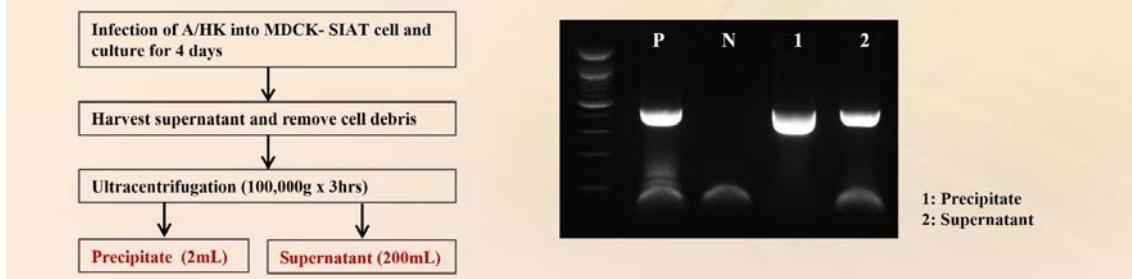


Figure 3-1. Detection of A/HK using IHC (Immunohistochemistry) with MDCK cells for 4 days after infection with A/HK P0

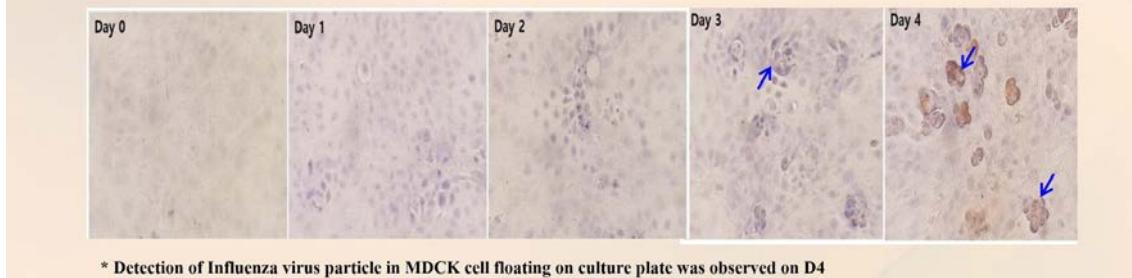


Figure 3-2. Detection of A/HK using IHC (Immunohistochemistry) with Huh7 cells for 4 days after infection with A/HK P0

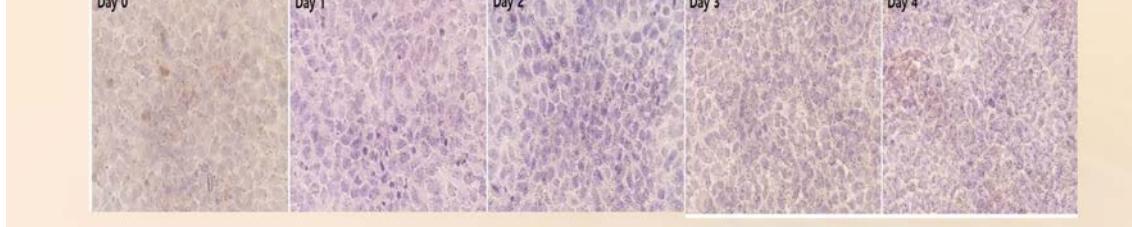
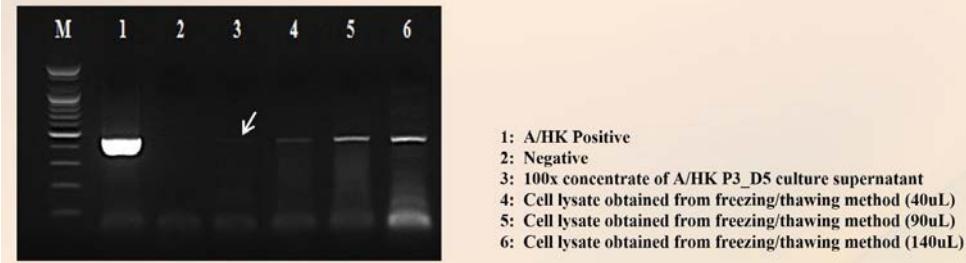


Figure 4. Detection of A/HK using RT-PCR with culture supernatant and cell lysate in the P3 step during lung-cell-lung passage



제6장 연구성과 및 활용계획

6.1 연구성과

과제명	국내 인플루엔자 예방 및 관리 기술 지원을 위한 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스주 개발
주관연구책임자	박완제 / (주)제니아 / 생화학

가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI 여부
1								
2								

나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1							
2							

다. 지적재산권

번호	출원/등록	특허명	출원(등록)인	출원(등록)국	출원(등록)번호	IPC분류
1						
2						

라. 정책활용

* 기타 관련정책에 활용 예를 구체적으로 기술함.

마. 타연구/차기연구에 활용

* 타연구 및 차기연구에 활용된 예를 구체적으로 기술함.

바. 언론홍보 및 대국민교육

* 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

사. 기타

* 임상시험, 관련 DB구축, 워크숍 또는 심포지움 개최 등의 경우 구체적으로 기술함.

6.2 활용계획(과제 종료 후)

과제명	
주관연구책임자	이름 / 소속 / 전공

가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI 여부
1								
2								

나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내 / 국제
1							
2							

다. 지적재산권

번호	출원/등록	특허명	출원(등록)인	출원(등록)국	출원(등록)번호	IPC분류
1						
2						

라. 정책활용

* 기타 관련정책에 활용 예를 구체적으로 기술함.

마. 타연구/차기연구에 활용

* 타연구 및 차기연구에 활용된 예를 구체적으로 기술함.

바. 언론홍보 및 대국민교육

* 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

사. 기타

제7장 연구용역과제 진행과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음

제8장 기타 중요변경사항

1. 3차년도에 질병관리본부로부터 Influenza A virus H3N2 (A/Incheon/1593/2015)를 분양받아 마우스 병원성 인플루엔자바이러스 개발에 사용하였으나, 대량세포배양을 통한 고역가 바이러스 확보의 문제점이 발생하여 개발을 중단하였음.
2. 질병관리본부와 협의를 통하여 대체 바이러스로 Influenza A virus H3N2 (A/Hongkong/7127/2014)Incheon/1593/2015)를 가지고 마우스 병원성 인플루엔자 바이러스주 개발을 추진하였음.

제9장 연구비 사용 내역 및 연구원 분담표

9.1 연구비 사용 내역

<단위: 원>

구 분	비 목	금액	구 성 비	비 고
○ 인 건 비 소 계		2,833,522	2.36%	
책 임 연 구 원 연 구 원 연 구 조 원 보 조 원		2,833,522	2.36%	
○ 경 비 소 계		95,314,988	79.43%	
여 유 인 물 전 산 처 리 시 약 및 연 구 용 재 료 회 임 교 위 탁 정 산 수 수 료	비 비 비 비 비 료 비	295,088 94,639,900 380,000	0.24% 78.87% 0.32%	
연 구 활 동 비 (5.0) %		4,994,497	4.16%	
일 반 관 리 비 (3.9) %		4,094,846	3.41%	
부 가 가 치 세		5,813,680	4.85%	
○ 계		113,051,533	94.21%	

9.2 연구분담표

구분	소속	직위	성명	성별	분담 내용	인건비 지급 여부	참여율 (%)
책임연구원	(주)제니아	부사장	박완제	남	연구총괄	미지급	10
연구원	(주)제니아	과장	이남찬	남	실험계획서, data 검토, 보완	미지급	10
연구원	(주)제니아	과장	조가희	여	임상병리 및 조직병리 총괄	미지급	10
연구원	(주)제니아	과장	박민아	여	시험계획, mutant virus 제작	미지급	10
연구원	(주)제니아	과장	양경희	여	임상병리측정, 조직슬라이드 제작	미지급	10
연구원	(주)제니아	대리	황용화	남	유전자 서열정보 분석	미지급	10
연구원	(주)제니아	주임	박상훈	남	실험동물 관리, 투여	미지급	10
연구원	(주)제니아	주임	이세영	여	세포배양, 바이러스 분석	지급	10
연구원	(주)제니아	사원	문정선	여	임상병리측정, 조직슬라이드 제작	미지급	10
연구원	(주)제니아	사원	심승혜	여	과제 예산관리, 구매업무 등 지원업무	미지급	10
계							100%

제10장 참고문헌

1. **Brown, E. G.** 1990. Increased virulence of a mouse-adapted variant of Influenza A/FM/1/47 virus is controlled by mutations in genome segments 4, 5, 7, and 8. *J. Virol.* **64**:4523-4533.
- 2 **Brown, E. G., and J. E. Bailly.** 1999. Genetic analysis of mouse-adapted Influenza A virus identifies roles for the NA, PB1 and PB2 genes in virulence. *Virus Res.* **61**:63-76
3. **Brown, E. G., H. Liu, L. C. Kit, et al.** 2001. Pattern of mutation in the genome of Influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung: identification of functional themes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:6883-6888.
4. **G. Gabriel, B. Dauber, T. Wolff et al.** 2005. The viral polymerase mediates adaptation of an avian Influenza virus to a mammalian host. *PNAS* **102**:18590-18595.
5. **Garten, R. J., C. T. Davis, C. A. Russell, et al.** 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 (A) H1N1 Influenza viruses circulating in humans. *Science* **325**:197-201.
6. **Hartley, C. A., P. C. Reading, et al.** 1997. Changes in the hemagglutinin molecule of Influenza type A (H3N2) virus associated with increased virulence for mice. *Arch. Virol.* **142**:75-88.
7. **Hayden, F. G., K. M. Cote, and R. G. Douglas.** 1980. Plaque inhibition assay for drug susceptibility testing of Influenza viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **17**:865-870.
8. **Hoffmann, E., J. Stech, Y. Guan, et al.** 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all Influenza A viruses. *Arch. Virol.* **146**:2275-2289.
9. **Jackson, D., M. J. Hossain, et al.** 2008. A new Influenza virus virulence determinants: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:4381-4386.
10. **Jiao, P., G. Tian, Y. Li, et al.** 2008. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian Influenza virus in mice. *J. Virol.* **82**:1146-1154.
11. **Kaverin, N. V., N. N. Finskaya, et al.** 1989. Studies on the genetic basis of

human Influenza A virus adaptation to mice: degrees of virulence of reassortants with defined genetic content. Arch. Virol. **105**:29-37

12. **Kim, M. S. and Nahm, S. S.** 2010. Are mice suitable for studying Influenza virus infection in the central nervous system? J. Biomed. Res. **11(4)**:193-200
13. **Li, Z., H. Chen, P. Jiao, et al.** 2005. Molecular basis of replication of duck H5N1 Influenza viruses in a mammalian mouse model. J. Virol. **79**:12058-12064.
14. **Narasaraju, T., M. K. Sim, et al.** 2009. Adaptation of human Influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model: insights into viral virulence, tissue tropism and host pathogenesis. Microbes Infect. **11**:2-11.
15. **Palmer, D. F., W. R. Dowdle, et al.** 1975. Advanced laboratory techniques for Influenza diagnosis. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, immunology series no. 6. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.
16. **Raut, S., J. Hurd, R. J. Cureton, et al.** 1975. The pathogenesis of infections of the mouse caused by virulent and avirulent variants of an Influenza virus. J. Med. Microbiol. **8**:127-136.
17. **Reed, L. J., and H. Muench.** 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. (Lond.) **27**:493-497
18. **Satoshi, F., and Yoshihiro K.** 2011. The pathogenesis of Influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. Curr. Opin. Immunol. **23**:481-486
19. **Subbarao, E. K., W. London, and B. R. Murphy.** 1993. A single amino acid in the PB2 gene of Influenza A virus is a determinant of host range. J. Virol. **67**:1761-1764.
20. **Ward, A. C.** 1997. Virulence of Influenza A virus for mouse lung. Virus Gence **14**:187-194.

제11장 첨부서류

1. 1차년도 인수기록지

인 수 기 록 지

시험번호 : 2014ER4301	연구책임자 : 박 원 제
의뢰기관 : 질병관리본부 인플루엔자바이러스과	
물질 종류	<input type="checkbox"/> 슬라이드 <input type="checkbox"/> 혈액샘플 <input type="checkbox"/> 혈청샘플 <input type="checkbox"/> 조직블럭 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(바이러스)
세부내역	DBA/1J Adapted Mutant H3N2 Influenza Virus : 총 200 vial (>10 ⁶ pfu/ml, 500ul/vial) - DBA1J_P14_C3 : 50 vial - DBA1J_P14_C4 : 50 vial - DBA1J_P19_C1 : 50 vial - DBA1J_P19_C2 : 50 vial
보관상태	실온보관() 차광() 기밀() 냉장보관() 냉동보관() (-20°C) 냉동보관(V) (-70°C) 기타()
발송방법	우편() 택배() 인편(V) 기타()

* 샘플을 인수 받으신 후 아래 공란을 작성하시고, 이 문서 전체를 FAX를 통해 당사 연구소로 회송해 주시기 바랍니다. FAX 031-730-6770 TEL 031-730-6182

인수장소	충북 청원군 강외면 오송생명 2로 187번지 질병관리본부 국립고건연구원 인플루엔자바이러스과		
인수일	2015년 04월 14일		
인수자 소속	질병관리본부 인플루엔자바이러스과	성명	박 원 제 (인)
인계자 소속	㈜ 제니아	성명	박 원 제 (인)



2. 2차년도 인수기록지(Mutant Type Influenza Virus의 5주에 대해 제공)

인수기록지

시험번호	-	의뢰기관	질병관리본부	인플루엔자과
종류	<input type="checkbox"/> 슬라이드 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(Virus)	<input type="checkbox"/> 혈액샘플 <input type="checkbox"/> 혈장(청)샘플	<input type="checkbox"/> 조직블럭	
동물 종	<input type="checkbox"/> 마우스 <input checked="" type="checkbox"/> 기타()	<input type="checkbox"/> 캣드 <input type="checkbox"/> 기니픽	<input type="checkbox"/> 영장류 <input type="checkbox"/> 비글	
보관조건	<input type="checkbox"/> 실온 <input type="checkbox"/> 내장	<input type="checkbox"/> 내동(-20°C) <input checked="" type="checkbox"/> 내동(-70°C)	<input type="checkbox"/> 차광	
시료취득일자	-	발송방법	<input type="checkbox"/> 택배 <input checked="" type="checkbox"/> 인편	
<ul style="list-style-type: none">- Balb/c_P8_C2, 200ul, 1vial- Balb/c_P9_C2, 200ul, 1vial- DBA/1J_P9_C1, 200ul, 1vial- DBA/1J_P11_C2, 200ul, 1vial- DBA/1J_P13_C1, 200ul, 1vial				
샘플을 인수 받으신 후 인수인에 서명하시고, 이 문서 전체를 FAX(031-730-6770)를 통해 제니아로 회신하여 주시기 바랍니다.				

(주)제니아로부터 상기의 물질 및 관련 자료를 인수합니다.

인계인 소속 : 제니아

성명 : 이세영 2016 / 04 / 26

인수인 소속 : 질병관리본부 인플루엔자과

성명 : 주희 2016. 04. 26



SOP/SGE/260 서식5 (20151109)

3. 2차년도 인수기록지(Mutant Type Influenza virus의 5주에 대해 각각 50 vials 씩
인플루엔자바이러스파에 제공 완료)

인수기록지

과제번호	2014-ER4301-01		발주기관	질병관리본부 인플루엔자바이러스과	
종류	<input type="checkbox"/> 슬라이드 <input type="checkbox"/> 혈액샘플 <input type="checkbox"/> 혈장(청)샘플 <input type="checkbox"/> 조직분체 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(Virus)				
동물 종	<input type="checkbox"/> 마우스 <input type="checkbox"/> 랜드 <input type="checkbox"/> 기니픽 <input type="checkbox"/> 영장류 <input type="checkbox"/> 비글 <input type="checkbox"/> 기타()				
보관조건	<input type="checkbox"/> 실온 <input type="checkbox"/> 냉장 <input type="checkbox"/> 냉동(-20°C) <input checked="" type="checkbox"/> 냉동(-70°C) <input type="checkbox"/> 차광				
시료취득일자	-	발송방법	<input type="checkbox"/> 택배		<input checked="" type="checkbox"/> 인편
<ol style="list-style-type: none">1. Balb/c_P8_C2 (3.95×10^6 pfu/ml), 500μl, 50vials2. Balb/c_P9_C2 (2.40×10^6 pfu/ml), 500μl, 50vials3. DBA/1J_P9_C1 (2.08×10^6 pfu/ml), 500μl, 50vials4. DBA/1J_P11_C2 (3.62×10^6 pfu/ml), 500μl, 50vials5. DBA/1J_P13_C1 (3.78×10^6 pfu/ml), 500μl, 50vials					
샘플을 인수 받으신 후 인수인에 서명하시고, 이 문서 전체를 FAX(031-730-6770)를 통해 ㈜제니아로 회신하여 주시기 바랍니다.					

㈜제니아로부터 상기의 물질 및 관련 자료를 인수합니다.

인계인 소속 : ㈜제니아

성명 : 조가희 2016 / 05 / 17

인수인 소속 :

성명 : 주혁 2016 / 05 / 17



질병관리본부 학술연구개발용역과제 최종결과보고서

2017년 6월 5일

발행처 : 질병관리본부

이 보고서는 질병관리본부 학술연구개발용역과제 최종결과보고서로,
상업적인 목적으로 사용하거나 판매할 수 없습니다.