

최 종
연구보고서

**Aujeszky's disease virus의
잠복상태(latency state)에 대한
분자생물학적 역학조사 및 플라스미드
DNA mucosal vaccine의 최적화 연구**

Study on Optimization of Plasmid DNA
Mucosal Vaccine and Molecular
Epidemiology of Latency State to
Aujeszky's Disease Virus

연구기관

전북대학교 수의과대학

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Aujeszky’s disease virus의 잠복상태(latency state)에 대한 분자생물학적 역학조사 및 플라스미드 DNA mucosal vaccine의 최적화 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 일

주관연구기관명 : 전북대학교

총괄연구책임자 : 송 희 중

세부연구책임자 : 송 희 중

조 정 곤

어 성 국

요 약 문

I. 제 목

Aujeszky's disease virus의 잠복상태(latency state)에 대한 분자생물학적 역학조사 및 플라즈미드 DNA mucosal vaccine의 최적화 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

오제스키바이러스(Aujeszky's disease virus; ADV, pseudorabies virus; PrV)는 돼지에서 일명 Aujeszky's disease(오제스키병)이라 불리는 중추신경 장애를 주 증상으로 하는 급성 전염병을 유발한다. 이와 같은 오제스키병은 전 세계적으로 양돈 산업에 많은 경제적인 손실을 유발하고 국내의 경우도 오제스키병 발생에 의하여 피해를 입고 있다. 오제스키병을 유발하는 오제스키바이러스는 alphaherpesvirus에 속하는 suid alphaherpesvirus I으로 다른 alphaherpesvirus와 같이 급성 감염 후 또는 불현성 감염 후 신경세포 내에 지속적인 잠복 감염을 유발한다는 것이다. 돼지에서 임상증상은 나이, 면역상태 및 바이러스의 병독성 등에 의하여 다양하게 나타나며, 숙주의 신경세포 내 잠복 감염은 면역 저하, 임신 및 각종 스트레스에 의하여 재활성화 되어 비루나 재치기, 기침을 통해 이웃 다른 개체에 전파되고 이와 같은 재활성에 의한 전파는 포유자돈의 경우 치명적인 결과를 초래할뿐더러 불현성 감염에 의하여 아주 먼 거리까지 보균돼지의 이동으로 전파될 수 있다. 따라서, 이와 같은 오제스키바이러스의 불현성 감염에 의한 잠복 감염은 오제스키병을 근절시키는데 고질적인 문제로 여겨져 왔다. 오제스키병의 근절사업은 현재 정기적인 혈청 검사를 통해 양성돈의 선별 도축을 유도하여 발생율을 줄이고 있으나, 이와 같은 혈청검사로는 잠복 감염된 오제스키바이러스를 검출할 수 없고 더욱이 잠복 감염되어 있는 음성돈이 존재함으로써 근절사업에 많은 영향을 미치고 있다. 따라서, 이와 같은 잠복 감염된 오제스키바이러스의 국내 분포에 대한 자료가 필요한 실정이며 오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 체계적인 연구가 필요하다.

국내 양돈 산업은 축산업의 주축이 될 정도로 중요하게 여겨지고 있고, 산업 규모는 생동물을 기준으로 2조 6천억의 규모에 이른다. 따라서, 세계적으로 오제스키병의 발생은 양돈 산업에 고질적으로 막대한 손실을 야기시켜 왔고, 오제스키병의 발생을 줄이기 위하여 백신 접종은 필수불가결하게 여겨지고 있다. 더욱이 오제스키바이러스는 신경 세포내에 잠복 감염을 확립함으로써 이와 같은 잠복 감염을 억제할 수 있는 백신의 연구가 요구된다. 오제스키바이러스에 대한 백신은 유전자 변형 생백신(modified live vaccine; MLV), 불활화 사독 백신(inactivated virus vaccine) 및 유전자 결손 백신(gene-deleted vaccine)등이 이용되어 지고 있다. 약독화 바이러스주를 이용한 생백신은 면역 반응이 오래 지속되고, 임상 증상을 완화시키며 체액성 면역과 세포성 면역을 유도함으로써 바이러스의 배출을 감소시킬 수 있다. 그러나, 유전자 약독화 생백신은 유전자의 불안정성에 의하여 병독성이 강한 바이러스주가 새로이 나타날 염려가 있고, 불활화 또는 subunit 백신의 경우 약독화 생백신과 달리 유전자 불안정성에 의한 새로운 변이주의 출현을 염려할 필요는 없으나 충분한 면역반응을 유도하기 위하여 반복적이고 많은 양의 항원을 주입해야 하는 번거로움이 있다. 더욱이 불활화 백신은 오제스키바이러스 감염에 의한 잠복 감염을 억제할 수 없는 예방접종으로 여겨져 많은 다른 나라들은 새로운 백신에 대한 연구와 더불어 잠복 감염을 억제할 수 있는 예방 접종에 대하여 관심을 갖고 있다. 플라스미드 DNA를 이용한 예방 접종은 많은 측면에서 백신 연구에 많은 영향을 주어 왔다. MLV 또는 불활화 사독 백신과 비교하여 다양한 측면에서 잇점을 갖고 있다. 플라스미드 DNA 백신에 의하여 투여되는 항원은 바이러스가 세포내에 감염된 것과 같이 생합성 됨으로 체액성 면역을 비롯하여 MHC class I과 MHC class II 분자에 모두 제시됨으로써 광범위한 세포성 면역 반응을 유도할 수 있다. 또한, 유도되는 면역 반응은 오랫동안 유지되고 나타나는 반응은 쉽게 조절이 가능하다. 또한 DNA 백신의 자체의 안정성 때문에 백신의 생산과 보관이 용이하고 위험한 세균이나 바이러스를 배양할 필요가 없다는 것이다. 그러나, DNA 백신에 의하여 유도되는 면역 반응이 약하여 일부 감염에 대하여 충분한 방어기구를 형성하지 못함으로써 현장 적용 가능한 DNA 백신에 대한 최적화 연구가 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제의 최종 목표는 오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 진단법을 확립하여 국내 오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 실태를 조사하고 잠복 감염 모델을 확립하여 잠복 감염을 억제시킬 수 있는 방법 및 재 활성화 모델을 확립하여 재 활성을 억제할 수 있는 방법을 찾고자 하였다. 또한, 오제스키바이러스에 대한 플라스미드 DNA 백신의 최적화 연구의 방법으로 유효 항원 유전자를 도출하고 항원에 대한 면역 반응을 증가시켜 현장 적용이 가능 할 수 있는 DNA 백신을 도출하여 최적의 delivery system과 예방접종 프로토콜을 도출하고자 하였다. 따라서, 1차 년도에는 오제스키바이러스의 잠복 감염을 진단하기 위한 진단법 확립, 오제스키 DNA 백신용 항원 유전자를 발굴하여 DNA 백신을 제작하고 DNA 백신 경구 전달체 확보 및 제작하고자 하였다. 2차 년도에는 확립된 오제스키바이러스 잠복 감염 진단법을 이용하여 국내 잠복 감염 실태 조사, 잠복 감염 모델을 확립하여 잠복 감염을 억제하기 위한 방법 모색, 오제스키 DNA 백신의 각 항원 유전자의 면역원성 분석을 통해 유효 항원 유전자를 발굴하며 도출된 항원 유전자의 항원성을 증가시키기 위한 사이토카인 유전자의 이용성을 검토하고자 하였다. 또한, 오제스키 DNA 백신의 경구 전달체 연구로 약독화 *Salmonella typhimurium*의 이용 가능성을 분석하고자 하였다. 3차 년도에는 잠복 감염된 오제스키바이러스의 재 활성화 모델을 확립하여 재 활성을 조절할 수 있는 방법을 모색하고자 하였고, 오제스키 DNA 백신의 현장 적용 가능성을 높여 주기 위하여 오제스키 항원 발현 아데노바이러스를 제작하여 각 항원에 대한 면역원성을 측정하고 유효 항원 발현 아데노바이러스를 이용하여 수종의 프라임-부스트 접종 프로토콜을 작성하여 최대의 면역반응과 방어기구를 형성할 수 있는 프로토콜을 찾고자 하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

돼지의 신경 세포에 잠복 감염되어 있는 오제스키바이러스를 검출하기 위하여 nested PCR과 real-time PCR의 조건을 확립하여 혈청 양성 반응을 나타낸 양

성돈 94두를 수집하여 잠복 감염된 오제스키바이러스의 검출율을 조사하였다. 그 결과 nested PCR에 의하여 95.7%가 잠복 감염되어 있는 것으로 밝혀졌고 real-time PCR에 의하여 $10^{7.1}$ - $10^{0.5}$ copy number의 잠복 감염 바이러스가 존재하는 것을 알 수 있었다. 또한, 혈청 검사를 실시하지 않은 무작위로 추출된 돈두 40개를 수집하여 nested PCR과 real-time PCR에 의하여 잠복 감염된 오제스키 바이러스를 분석한 결과 gB 표적 nested PCR은 거의 모든 신경조직에서 오제스키바이러스의 DNA를 검출하였고, gE 또는 gG 표적 nested PCR은 각각 57.5%와 42.5%의 검출율을 보여 주었다. 더욱이 real-time PCR에 의하여 모든 신경 조직에 오제스키 바이러스가 존재함을 알 수 있었고 $10^{7.2}$ - $10^{0.1}$ copy number의 검출율을 나타내었다. 오제스키 바이러스의 잠복 감염 경로를 알아보기 위하여 실험적으로 돼지에 오제스키 바이러스를 감염시켜 바이러스의 잠복 감염을 추적한 결과 PBMC에서 감염 후 2-5일째에 검출되기 시작하여 20-26일까지 지속됨을 알 수 있었고 다양한 신경 조직에 잠복 감염을 유지하는 것으로 나타났다. 또한, 오제스키바이러스의 잠복 감염 모델을 확립하여 수종의 백신을 사용하여 접종 경로 및 백신 형태에 따라 나타나는 면역 반응의 특성을 분석하고 잠복 감염에 영향을 분석하였다. 그 결과, 약독화 생독 백신(PrV Δ tk β -gal+)을 비강 투여 또는 근육 주사의 경우 오제스키 항원에 대하여 Th1-type의 면역 반응이 유도되었고 이와 같은 반응은 오제스키 바이러스의 잠복 감염에 대하여 억제효과를 나타내었다. 또한 오제스키바이러스에 대한 항혈청을 이용하여 병독성 오제스키바이러스의 잠복 감염을 유도하고 면역 억제제 dexamethasone을 투여함으로써 잠복 감염된 오제스키바이러스의 재활성 모델을 확립하여 각종 스트레스 및 백신의 예방 접종에 의한 잠복 감염된 오제스키바이러스의 재활성에 대한 연구를 수행하였다.

플라스미드 DNA 백신의 후보 항원으로 이용될 수 있는 오제스키바이러스의 항원 유전자(gB, gC, gD, gE 등)를 클로닝하여 DNA 백신용 발현 벡터에서 발현시켜 각 후보 항원들에 의하여 나타나는 면역원성들을 비교 검토하였다. 그 결과, 후보 항원 중 glycoprotein B(gB)가 체액성 면역이나 세포성 면역에서 가장 우수한 결과를 보여 주었고 면역 반응은 IgG2a와 IgG1 isotype 그리고 cytokine IFN- γ 와 IL-4 생산에 의하여 결정되었듯이 Th1-type의 반응을 보여 주었다. 또한 gB 발현 DNA 백신이 다른 후보 항원들과 비교하여 가장 우수하게 병독성 오

제스키바이러스 5LD₅₀ 감염에 대하여 86% 이상의 방어 효과를 보여주는 것으로 나타났다. 또한, 세 가지 후보 항원을 혼합한 cocktail vaccination은 완벽한 방어 효과를 보여 주었다. 이와 같은 후보 항원 중 가장 우수한 면역원성을 보여준 gB 유전자 발현 오제스키 DNA 백신의 면역원성을 보다 증강시킬 수 있는 방법으로 사이토카인 또는 케모카인 유전자 발현 플라스미드 DNA를 이용하여 오제스키 DNA 백신의 최적화 방법을 수행하였다. 첫 번째 최적화 방법에서 인터페론 관련 면역조절제 발현 플라스미드 DNA를 이용한 결과, IL-12와 IL-18은 오히려 오제스키 DNA 백신에 의하여 유도되는 체액성 면역반응을 크게 감소시켰고 병독성 오제스키 바이러스 감염에 대하여 감수성이 증가되었다. 반면에 IP-10은 오제스키 특이 면역반응을 증가시켰고 병독성 바이러스 감염에 대하여 생존기간이 증가되었다. 두 번째 시도된 최적화에서는 GM-CSF 사이토카인을 이용한 결과 오제스키 특이 항체 반응이 2-3배 증가되었고 체액성 반응은 Th2-type의 패턴을 보여준 반면에, 오제스키 특이 세포성 반응은 Th1-type으로 나타났고 병독성 오제스키 바이러스 감염에 대하여 현저하게 저항성이 증가되는 것으로 나타났다. 세 번째로 시도된 케모카인 유전자를 이용한 실험에서는 RANTES와 MIP-2가 오제스키 DNA 백신에 의하여 유도되는 면역반응을 증가시켰고 그 외 MIP-1 α 와 MIP-1 β 는 아무런 변화를 유도하지 못하였다. 또한 RANTES와 MIP-2 케모카인 유전자를 함께 접종한 경우에 병독성 오제스키 바이러스 감염에 대하여 저항성이 증가된 것으로 나타났다. 결론적으로 이용된 사이토카인과 케모카인 중 GM-CSF와 RANTES 및 MIP-2 유전자가 오제스키 DNA 백신에 의하여 나타나는 오제스키 바이러스 감염에 대하여 저항성을 증가시킨 것으로 나타났으며, 특히 GM-CSF는 가장 우수한 결과를 보여주는 것으로 나타났다. 이와 같은 GM-CSF 유전자는 향후 현장에 적용될 수 있는 오제스키 DNA 백신 제작 및 면역원성 증가에 유용하게 이용될 수 있고 다양한 형태의 오제스키 백신에 대한 면역원성을 증강시킬 수 있는 사이토카인으로 여겨지며, 오제스키 DNA 백신 delivery system 개발에 이용될 수 있을 것이다.

약독화 *Salmonella typhimurium* SL7207을 이용하여 오제스키 DNA 백신을 경구 투여한 결과 흥미롭게도 전신 면역을 비롯하여 점막 조직에 모두 오제스키 특이 면역 반응이 유도됨을 확인하였다. 유도된 면역반응은 IgG2a/IgG1 ratio와 사이토카인 생산 양상에 의하여 Th2-type을 보여 주었으며 병독성 오제스키바이

러스 감염에 대하여 보다 오랫동안 감염 동물이 생존함을 확인하였다. 또한, 약독화 *Salmonella typhimurium*을 이용한 오제스키 DNA 백신의 경구 투여에 의하여 유도되는 면역 반응을 추적하기 위하여 간접적인 방법으로 형광 단백질 발현 플라스미드 DNA를 이용하여 flow cytometry 방법에 의하여 분석함으로써 DNA 백신이 *Salmonella* 세균에서 항원제시세포를 이동하여 발현됨을 증명하였다. 따라서, 약독화 *Salmonella typhimurium*은 오제스키 DNA 백신의 경구 전달체로 이용될 수 있음을 의미하고 이와 같은 경구 투여 법은 대량 예방 접종시 유용하게 이용되어 질 수 있을 것이다. DNA 백신의 현장 적용을 높이기 위한 방법으로 DNA 백신을 포함하는 다른 형태의 백신을 이용한 프라임-부스트 예방 접종을 수행하기 위하여 오제스키 항원 발현 아데노바이러스를 제작하여 오제스키 DNA 백신과 프라임-부스트 접종법에 적용하였다. 제작된 오제스키 항원 아데노바이러스는 모두 강력한 면역 반응을 유도하였고, DNA 백신과 달리 Th2-type에 치우친 반응을 보여 주는 것으로 나타났다. 그와 같은 오제스키 항원 발현 아데노바이러스 중 가장 우수한 면역 반응을 나타낸 gB 발현 아데노바이러스를 이용하여 오제스키 항원 gB 발현 DNA 백신과 함께 총 11종의 프라임-부스트 접종 프로토콜을 작성하여 예방 접종을 실시하였다. 그 결과 1회 접종시 오제스키 항원 발현 아데노바이러스를 이용하고 2회 및 3회 접종시 DNA 백신을 이용하는 것이 가장 오랫동안 지속될 수 있는 면역 반응이 유도됨을 알 수 있었다. 또한, 1회 접종시 오제스키 DNA 백신을 적용하면 2회에 항원 발현 아데노바이러스를 접종하는 것만으로도 우수한 면역반응이 유도됨을 알 수 있었다. 이와 같은 면역 반응의 형성은 병독성 오제스키 바이러스를 이용한 공격시험에 의하여 또한 확인 되었다. 따라서, 오제스키 DNA 백신의 현장 적용이 가능하기 위해서는 이와 같은 프라임-부스트 접종을 바탕으로 앞에서 도출되었던 사이토카인 유전자를 접목시키면 보다 정교한 방법에 의하여 충분한 면역 반응이 유도될 수 있을 것이다. 또한, 약독화 세균을 이용한 대량 프라임-부스트 접종법이 확립되면 산업동물에 쉽게 적용될 수 있을 것이다.

2. 활용에 대한 건의

1) 활용 방안

- 가. 오제스키병 발생에 대한 예방대책의 일환으로 활용한다.
- 나. 오제스키바이러스의 잠복 감염 및 재 활성을 막을 수 있는 예방 대책의 일환으로 활용한다.
- 다. 오제스키 DNA 백신의 최적화 결과를 전파하고 오제스키 백신을 평가하는 기술을 기타 연구소에 보급한다.
- 라. 기타 주요 전염병에 대한 DNA 백신 및 상용 백신의 활용도 및 효능을 증강시킬 수 있는 유용한 평가기술 및 방향, 정보 등을 제공한다.

2) 산업화 계획방안

- 가. 새롭고 안전하고 효과적인 플라스미드 DNA 백신의 최적의 경구용 예방약의 모델을 제시함으로써 보다 개선된 경구용 예방약은 향후 가축사료에 첨가하여 편리하게 예방접종을 시도할 수 있는 산업화 연구를 촉진시킬 수 있을 것으로 생각된다.
- 나. 오제스키 DNA 백신을 포함하는 최적의 프라임-부스트 접종법을 이용하여 사용 백신 또는 새로이 개발되는 백신의 이용성을 극대화함으로써 개발 백신의 산업화를 용이하게 한다.

3) 추가 기술개발 방안

- 가. 같은 항원을 갖는 단백질이나 재조합 바이러스 백신을 이용한 프라임-부스트 예방 접종을 시도하여 최적의 전신 면역 및 점막 면역을 유도할 수 있는 연구가 진행될 수 있다.
- 나. 기타 다른 항원이나 사이토카인, 면역증강제를 포함하는 cocktail vaccination에 이용하여 그 이용가치를 더욱 증대시킬 수 있을 것이다.
- 다. 심각하고 고질적인 전염병에 대한 최적의 예방대책을 수립하는데 필요한 기술들을 개발하는데 지대한 공헌을 할 것으로 기대된다.

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Project Title

Study on optimization of plasmid DNA mucosal vaccine and molecular epidemiology of latency state to Aujeszky's disease virus

II. Specific Purpose and Significance

Aujeszky's disease is caused by infection of Aujeszky's disease virus (ADV) which is called pseudorabies virus (PrV) as other name. The International Committee for the Taxonomy of Viruses classified PrV as a member of the subfamily of the alphaherpesvirinae within the family of the herpesviridae. Although pigs represent the natural host, many other animal species can be occasionally infected. In pigs a variety of clinical picture is possible. The clinical outcome is mainly determined by the age and immunological status of the animals on one hand and the virulence of the strain and doses on the other hand. The signs are most severe in a population during its first contact with PrV. Young piglets are most susceptible with mortality rates reaching 100% during the first two weeks and decreasing to 50% during the third and fourth week of age. Thus, PrV is a significant causing agent of economic losses in the swine industry. Similar to a human alphaherpesvirus infection, the PrV establishes a lifelong infection in various nervous tissues of the natural hosts, which can reactivate under various stress, pregnancy, and weaning immunity. Such reactivation of latently infected PrV can occur to release viral particles into environment and transmission to neighbor host. Latent infection and reactivation of PrV have been a major hindrance in the campaign for control and eradication. Eradication program of PrV in Korea is based on serological surveillance testing for prevalence and location of infected herds and of implementing movement controls and cleanup of infected herds. However, latently infected swine, which are presumed to be free of PrV, can be left in herds if

differential ELISA dose not detect the antibody responses to the field. The possible existence of seronegative swine latently infected with PrV has been previously postulated. Moreover, passively acquired antibody may be able to block the induction of a detectable differential antibody response after exposure to low dose of virulent virus without preventing latent infection. Such a case makes an overlooked trouble in campaign of eradication and control of PrV. Several studies have tried to evaluate an adequate procedure for the quick and easy diagnosis of PrV. Unfortunately there is no report to surveillance of latent PrV infection in Korea and to in-depth study for controlling latent infection.

Swine industry in Korea occupies high proportion in livestock industry, whose magnitude reaches ₩2.6 billion based on livestock. Globally many nations believe that prophylactic vaccination is necessary to reduce outbreak of PrV infection. Thus, several studies have tried to develop useful vaccines which can inhibit PrV outbreak as well as establishment of latent infection in nervous tissues. Modified live vaccine (MLV), which are attenuated by several passages in culture or deleted inessential genes for replication, induce long-lasting humoral and cell-mediated immunity. Such MLV shows to reduce virus shedding and clinical signs. Moreover, MLV has been reported to inhibit establishment of latent infection. However, MLV could induce the advent of new virulent strains due to instability of gene. On the other hand, inactivated vaccine made of either killed antigen or subunit protein is genetically stable and safe, but high doses and repeated injection are needed to induce enough immunity. Subsequently inactivated vaccine show no affect to establish latent infection. Therefore, the development of more effective and cheap vaccines for economically important domestic animals is an important task, in order to reduce disease outbreak and latent infection. Plasmid DNA immunization is a new vaccination method, by which DNA constructs encoding a specific immunogen of PrV are delivered into the host cell. It is, as compared to the administration of either MLV or inactivated vaccine, particularly attractive for

several reasons: active *de novo* synthesis of the immunogen in transfected cells is likely to facilitate antigen expression in its native form and antigen presentation by both MHC class I and class II molecule. It is also found to be able to generate long-lasting humoral and cellular immune responses. Moreover, DNA vaccination offers the potential to manipulate the induced immune response through the co-delivery of genetic adjuvants. It also avoids the production and purification of the immunogens. Finally a major advantage of DNA vaccine is that it does not require cultivation of dangerous infectious agents and is inexpensive to produce and store. However, DNA vaccination appears to be inferior immunogens, subsequently requiring to study on enhancement of immunity and optimization for vaccination.

III. Contents and Scope

The ultimate purpose of present project is how we regulate the latent infection of PrV to reduce economic losses caused by outbreak of Aujeszky's disease. Thus, we have plan to survey prevalence of latent PrV infection using diagnostic tools. Moreover, we were trying to study on the ways to inhibit or regulate latent infection and reactivation of PrV using simple infection model of experimental animals. As an optimization of plasmid DNA vaccine against PrV infection, we initially have plan to elicit most effective one of candidate antigens for DNA vaccine. Next, we have tried to optimize DNA vaccine by using genetic adjuvant of cytokines and modification of delivery systems and vaccination schedule. In first year (2002-2003), we have tried to establish condition of diagnostic tools for detecting latent infection and elicit most effective antigen gene for DNA vaccine. In second year (2003-2004), we have performed molecular survey of latent PrV infection in pigs and to establish simple models of latent PrV infection for studying on regulation of latent infection. We have also tried to compare the antigenicity of candidate antigens and search for cytokine adjuvant in order to improve practical usefulness of DNA vaccine. Moreover, we have plan to investigate

the systemic and mucosal immune responses after an oral vaccination with live attenuated *Salmonella typhimurium* harboring the plasmid DNA vaccine. In the last year (2004–2005), we have plan to establish reactivation model of latent PrV infection for modulating reactivation of latent infection depending on vaccinations. To promote the idea of using DNA vaccine as a practical means of vaccination, we made plan to construct other vaccination vehicle which is going to use prime–boost vaccination. In conclusion, we have plan to search for optimal strategies to elicit most effective immunity.

IV. Results of Research, and Recommendations of Use

1. Results of Research

The prevalence and quantity of latent PrV infection in nervous tissues of pigs exposed to field strain in Korea were investigated by nested and real-time PCR. Nervous tissues including trigeminal ganglion (TG), olfactory bulb (OB), and brain stem (BS) were collected from 94 seropositive pigs. Latent infection was detected in 95.7% of screened animals based on results. Furthermore, the examined tissues revealed to harbor broad copy number of latent PrV genome ranging from $10^{7.1}$ to $10^{0.5}$ copies per one microgram of genomic DNA in real-time PCR analysis. We have also investigated the prevalence and quantity of a latent PrV infection in nervous tissues from randomly selected pigs growing in farms. Most of the nervous tissues from the selected 40 pigs showed a positively amplified band in the nested PCR. In particular, the nested PCR targeted to the PrV gB gene was found to positive in all BS sample. Nested PCR for either gE or gG gene produced positive bands in a lower number of nervous tissues (total 57.5% and 42.5% respectively). Moreover, real-time PCR revealed that the examined tissues of randomly selected pigs harbored copy number of latent PrV DNA ranging from $10^{0.1}$ to $10^{7.2}$ copies per 1 μg of genomic DNA. When the persistence/latency of PrV in experimentally infected pigs was investigated,

the PrV genes (gB, gG, and gE) from PBMC were started to detect at 2-5 days post-infection and persisted to 20-26 days post-infection. PrV exhibited the persistence/latent infection in the nervous tissues of all infected pigs. Moreover, we have investigated the influence of vaccine type and administration route on the latency load of PrV using simple infected model of experimental animals. The intranasal vaccination of attenuated live PrV Δ tk Δ -gal⁺ vaccine showed the most potent protection against virulent virus challenge and more reduced latent infection in brain than other vaccination protocols. Furthermore, attenuated live vaccine induced more biased immunity to Th1-type than inactivated vaccine. Thus, these facts imply that the latent infection could be influenced by the nature of immunity induced by vaccine type and administration route. To further study on regulation of reactivation, we have established reactivation model of latent PrV infection using experimental animals with immunosuppressant dexamethasone. Such reactivation model will be useful for studying on influence of several stress and prophylactic vaccination to reactivation.

As an attempt for development of DNA vaccines against PrV infection, the nature of induced immunity was evaluated following immunization with plasmid DNA antigen (gB, gC, gD, and gE, etc.) Plasmid DNA vaccine expressing gB of candidate antigens mounted the immunity biased to the Th1-type patterns determined by the ratio of IgG isotype (IgG2a and IgG1) and cytokine IFN- γ and IL-4 levels produced by CD4⁺ T cells. The immunization of DNA vaccine expressing gB showed stronger protective immunity than other antigen-encoded DNA vaccines (86% survival rate). Moreover, the cocktail vaccination mixed with all three DNA vaccines (gB, gC, and gD) elicited the complete protection against virulent PrV challenge. Consequently gB of PrV could become most effective candidate antigen as an antigen of reliable DNA vaccine against PrV infection. Next, we have tried to practically improve PrV DNA vaccine by using genetic adjuvant of cytokine or chemokine genes. Initially we have tested the use of IFN- γ -associated

cytokine and chemokine as immunological adjuvants, which included IL-12 and IL-18 as a potent inducer of IFN- γ , and IFN- γ -inducible protein (IP-10), the production of which is regulated by IFN- γ . Surprisingly, IL-12 and IL-18 gene highly suppressed the humoral antibody responses, but not IFN- γ production from immune T cells. Such antibody suppression was closely correlated with enhanced susceptibility against virulent virus challenge. Paradoxically, IP-10 showed significantly enhanced immune responses, facilitating prolonged survival against virus challenge. Secondly, we have evaluated the utility of GM-CSF cDNA as DNA vaccine adjuvant. Co-injection of GM-CSF DNA enhanced levels of serum PrV-specific IgG with 2- to 3-fold increase. Moreover, GM-CSF co-injection inhibited the production of IgG2a isotype, but showed enhanced production of IgG1 isotype, resulting in humoral responses biased to Th2-type against PrV. In contrast, GM-CSF enhanced T cell-mediated immunity biased to Th1-type as judged by significantly increased production of cytokine IL-2 and IFN- γ but not IL-4. When challenged with a lethal dose of PrV, GM-CSF enhanced resistance against PrV infection. Thus, co-inoculation with a vector expressing GM-CSF effectively enhanced protective immunity against PrV infection, caused by the induction of increased humoral (Th2) and cellular (Th1) immunity in responses to PrV antigen. Finally we have evaluated the utility of chemokine gene as a genetic adjuvant of PrV DNA vaccine, which included RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , and MIP-2. RANTES and MIP-2 of tested chemokine genes showed enhanced immunity and there is no change in group co-immunized with MIP-1 α and MIP-1 β . Moreover, RANTES and MIP-2 provided more enhanced resistance against virulent virus challenge. In conclusion, GM-CSF, RANTES and MIP-2 appeared to induce enhanced protective immunity against PrV infection. In particular, GM-CSF appeared to be very useful genetic adjuvant for making practical PrV DNA vaccine.

The usefulness of attenuated *Salmonella typhimurium* as oral carrier of PrV DNA vaccine was evaluated. An oral transgene vaccination of PrV DNA

vaccine by using a *Salmonella* carrier produced a broad spectrum of immunity at both the systemic and mucosal sites. Interestingly, the *Salmonella*-mediated oral transgene vaccination of DNA vaccine biased the immune responses to the Th2-type, as determined by the IgG2a/IgG1 ratio and the cytokine production profile. However, oral vaccination mediated by *Salmonella* harboring PrV DNA vaccine showed inferior protection to systemic immunization against virulent PrV infection. Moreover, the *Salmonella* carrier was repeatedly fed in order to induce a detectable humoral immune responses. These facts compel us to explore possible strategies that can improve the immunogenicity by the incorporation of adjuvants, CpG motif, or a heterologous prime-boost vaccination based on the *Salmonella* bacteria containing a DNA vaccine and recombinant vector expressing antigen. We have also investigated the expression of antigen delivered by attenuated *Salmonella* bacteria as DNA vaccine carrier. Indirect evidence of DNA transfer was obtained by confirming the GFP expression of *Salmonella* bacteria carrying plasmid DNA encoding GFP following flow cytometry analysis. The expression of transgene delivered by *Salmonella* bacteria in APCs of both the systemic and mucosal-associated lymphoid tissues was identified. Furthermore, to promote the idea of PrV DNA vaccine as a means of practical vaccination, we have tried to investigate the utility of PrV DNA vaccine in prime-boost vaccination together with adenovirus expressing PrV antigen. Firstly we have constructed adenovirus expressing antigen and evaluated immune response against PrV antigen. The adenovirus expressing gB induced strong immune responses biased to Th2-type. When such an adenovirus expressing gB was applied to heterologous prime-boost vaccination, the protocols which primed with PrV DNA vaccine and boosted with adenovirus expressing gB twice showed the most potent immune responses, subsequently resulting in providing effective resistance against virulent virus challenge. The vaccination primed with PrV DNA vaccine and boosted with adenovirus expressing gB also showed effective immune responses. Thus, we have found optimal prime-boost

vaccination schedule for inducing most effective immune response and protection against PrV infection. In conclusion, in order to make DNA vaccine practically useful, it is necessary to combine the genetic adjuvant of cytokine such as GM-CSF to prime-boost vaccination. Thus, such modified prime-boost vaccination schedule/protocol delivered with attenuated *Salmonella* bacteria for mass vaccination of industrial animals could provide most useful and effective immunity against PrV infection.

2. Recommendations of Use

1) Areas Required for Results

- a. Controlling to outbreak of Aujeszky's disease
- b. Providing useful information to eradication program of Aujeszky's disease
- c. Providing information of optimization strategies and evaluation of vaccines to Aujeszky's disease to related institutes
- d. Providing focused results which improve the development of other vaccines.

2) Potential Plan for Development

- a. To facilitate the practical vaccination through optimal oral delivery of attenuated bacteria.
- b. To maximize the usefulness of other types of vaccine such as subunit vaccine and newly developed vaccine by applying to heterologous prime-boost vaccination.

3) Another Developmental Area Affected by Results

- a. Help to research and development of other vaccines such as protein and recombinant viral vaccine applied to prime-boost vaccination
- b. Improving the usefulness of other antigen vaccine through incorporation of cytokines and immune enhancing additives.
- c. Anticipate the contribution to the development of other vaccine and control of other infectious disease outbreak.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction	23
1. Specific purpose and scope	23
1-1. Specific purpose	23
1-2. Scope	24
2. Background and significance	28
2-1. Technical aspect	28
2-2. Economical and industrial aspect	29
2-3. Social and cultural aspect	30
3. Trends to related topic	31
3-1. In-country level of related area	31
3-2. Foresight of related area	34
Chapter 2. Molecular study on latent infection of	35
Aujeszky's disease virus	
1. Introduction	35
2. Materials and methods	39
2-1. Cells and viruses	39
2-2. Selected pigs and experimental animals	39
2-3. Identification of Aujeszky's disease	40
2-4. Nervous tissues and purification of genomic DNA	40
2-5. Detection of latent infection	42
2-6. Persistent/latent infection of PrV in experimentally infected pigs	45
2-7. Relationship of vaccine type and administration route	47
with latent infection	
2-8. Analysis of reactivation of latent infection using experimental	52
animal model	
3. Results and discussion	55

3-1. Molecular survey of latent PrV infection	55
3-2. Persistent/latent infection of PrV in experimentally infected pigs	68
3-3. Relationship of vaccine type and administration route	70
with latent infection	
3-4. Analysis of reactivation of latent infection using experimental	81
animal model	
4. Summary and conclusion	88

Chapter 3. Optimization of plasmid DNA vaccine to 90
Aujeszky's disease

1. Introduction	90
2. Materials and methods	92
2-1. Cells and viruses	92
2-2. Animals	92
2-3. Molecular techniques for constructing DNA vaccines	93
2-4. Preparation of plasmid DNA vaccines	96
2-5. Immunization and sampling	96
2-6. PrV-specific humoral responses	97
2-7. Profile of cytokine production	98
2-8. Cytotoxic T lymphocyte	100
2-9. Virus challenge	101
3. Results and discussion	103
3-1. Construction of plasmid DNA vaccines to PrV	103
3-2. Comparison of immune responses induced by DNA vaccines	112
3-3. Modulation of immunity induced by DNA vaccine	120
via IFN- γ -associated cytokines	
3-4. Enhancement of PrV-specific immunity via GM-CSF	128
3-5. Modulation of immune responses of PrV DNA vaccine	136
using chemokines	
4. Summary and conclusion	146

Chapter 4. Oral delivery of DNA vaccine with	149
attenuated bacteria and prime-boost vaccination	
1. Introduction	149
2. Materials and methods	151
2-1. Oral somatic vaccination of DNA vaccine with attenuated bacteria	151
2-2. Analysis of DNA vaccine transfer from bacteria to APCs	156
2-3. Construction of adenovirus expressing PrV antigen	157
2-4. Immune responses induced by adenovirus expressing PrV antigen	160
2-5. Heterologous prime-boost vaccination with DNA vaccine	161
and adenovirus expressing PrV antigen	
3. Results and discussion	163
3-1. Oral delivery of DNA vaccine with attenuated	163
live <i>Salmonella</i> bacteria	
3-2. Analysis of DNA vaccine transfer from bacteria to APCs	169
3-3. Construction and immune responses of adenovirus	170
expressing PrV antigen	
3-4. Mucosal immunity induced by replication-defective adenovirus	178
expressing PrV antigen	
3-5. Heterologous prime-boost vaccination with DNA vaccine and	187
adenovirus expressing PrV antigen	
4. Summary and conclusion	195
 Chapter 5. Achievements and contribution	197
to related area	
 Chapter 6. Plan to utilize	202
 Chapter 7. References	204

목 차

제 1 장 서 론	23
제 1 절 연구개발의 목적 및 범위	23
1. 연구개발의 목적	23
2. 연구개발의 내용	24
제 2 절 연구개발 배경	28
1. 기술적 측면	28
2. 경제.산업적 측면	29
3. 사회.문화적 측면	30
제 3 절 국내외 관련 연구 동향	31
1. 국내외 관련 연구의 기술 수준	31
2. 앞으로의 전망	34
제 2 장 오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 분자생물학적 연구	35
제 1 절 서 설	35
제 2 절 재료 및 방법	39
1. 세포 및 바이러스	39
2. 대상 동물 및 실험동물	39
3. 오제스키 감염 여부조사	40
4. 뇌 조직 genomic DNA 및 오제스키 viral DNA의 분리	40
5. 오제스키 잠복 감염 검출	42
6. 실험적으로 오제스키바이러스에 감염된 돼지에서의 잠복상태와 지속감염조사	45
7. 수종의 백신과 투여 경로에 따른 오제스키바이러스에 대한 면역반응과 잠복감염과의 상관관계 분석	47
8. 잠복 감염 재 활성화 모델 확립과 백신 투여와의 상관관계 분석	52
제 3 절 결과 및 고찰	55

1. 오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 분자생물학적 역학조사	55
2. 실험적으로 오제스키바이러스에 감염된 돼지에서의 잠복상태와 지속감염조사	68
3. 수종의 백신과 투여 경로에 따른 오제스키바이러스에 대한	70
면역반응과 잠복감염과의 상관관계 분석	
4. 잠복 감염 재 활성화 모델 확립과 백신 투여와의 상관관계 분석	81
제 4 절 연구의 요약 및 결론	88

제 3 장 오제스키바이러스에 대한 플라스미드 DNA 백신의 .. 90 **최적화 연구**

제 1 절 서 설	90
제 2 절 재료 및 방법	92
1. 세포 및 바이러스	92
2. 실험동물	92
3. 유전자 조작 및 오제스키 항원 발현 플라스미드 DNA 제작	93
4. DNA 백신 준비	96
5. 면역화 및 샘플 준비	96
6. 오제스키바이러스 특이 항체 검출	97
7. 사이토카인 생산 profile분석	98
8. 항원 특이 세포독성시험(CTL assay)	100
9. 공격시험에 의한 방어면역 분석	101
제 3 절 결과 및 고찰	103
1. 플라스미드 DNA백신용 오제스키 항원 유전자 조작	103
2. 항원 유전자 발현 플라스미드 DNA 백신의 면역원성 비교 분석	112
3. 인터페론 관련 사이토카인에 의한 플라스미드 DNA백신의	120
면역원성 조절	
4. GM-CSF 유전자에 의한 플라스미드 DNA 백신의 면역원성 조절	128
5. 케모카인 유전자에 의한 플라스미드 DNA 백신의 면역원성 조절	136
제 4 절 연구의 요약 및 결론	146

제 4 장	약독화 세균을 이용한 DNA 백신의 경구 투여 및 ...	149
	프라임-부스트 예방 접종	
제 1 절	서 설	149
제 2 절	재 료 및 방 법	151
1.	약독화 Salmonella를 이용한 플라스미드 DNA 백신 delivery	151
2.	약독화 세균으로부터 플라스미드 DNA 백신의 항원제시세포로 이동 분석	156
3.	오제스키 항원 발현 아데노바이러스 제작	157
4.	오제스키 항원 발현 아데노바이러스의 면역원성	160
5.	플라스미드 DNA 백신과 아데노바이러스를 이용한 프라임-부스트 접종	161
제 3 절	결 과 및 고 찰	163
1.	약독화 Salmonella를 이용한 플라스미드 DNA 백신 delivery	163
2.	약독화 세균으로부터 플라스미드 DNA 백신의 항원제시세포로 이동 분석	169
3.	오제스키 항원 발현 아데노바이러스의 제작 및 면역원성 분석	170
4.	오제스키항원 발현 아데노바이러스에 의한 점막면역 유도	178
5.	플라스미드 DNA 백신과 아데노바이러스를 이용한 프라임-부스트 접종	187
제 4 절	연 구 의 요 약 및 결 론	195
제 5 장	목표달성도 및 관련분야 에의 기여도	197
제 6 장	연구개발결과의 활용계획	202
제 7 장	참고문헌	204

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적 및 범위

1. 연구개발의 목적

오제스키바이러스(Aujeszký's disease virus; ADV, pseudorabies virus; PrV)¹⁾는 돼지에서 일명 Aujeszký's disease(오제스키병)이라 불리는 중추신경 장애를 주 증상으로 하는 급성 전염병을 유발한다. 이와 같은 오제스키병은 1902년 헝가리의 Aujeszký에 의하여 공식보고 된 후 세계 각국에서 질병의 발생이 확인되고 있고, 전 세계적으로 양돈 산업에 가장 경제적인 손실을 주는 질병으로 여겨지고 있다. 국내에서는 1980년부터 혈청 검사를 시작하였으며 1987년에 경남 양산에서 최초 보고가 있는 후 다른 지역으로 확산되어 전국적인 감염 발생을 유발한다. 이와 같은 지속적인 확산에 의하여 1994년부터 예방 접종 및 광범위한 혈청학적 검사를 통하여 자연 감염 돼지를 도태하는 방향으로 이루어져 제2종 가축전염병으로 지정 관리되어 현재에는 감염율과 발생율이 줄어들고 있다.

그러나, 이와 같은 오제스키병을 유발하는 오제스키바이러스는 alphaherpesvirus에 속하는 suid alphaherpesvirus I으로 다른 alphaherpesvirus와 같이 급성 감염 후 또는 불현성 감염 후 신경세포 내에 지속적인 잠복 감염을 유발한다는 것이다. 오제스키바이러스에 의한 숙주의 신경 세포내 잠복 감염은 면역저하, 임신 및 각종 스트레스에 의하여 재활성화 되어 비루나 재치기, 기침을 통해 이웃 다른 개체에 전파된다. 이와 같은 재 활성화에 의한 전파는 포유자돈의 경우 치명적인 결과를 초래할뿐더러 불현성 전파에 의하여 아주 먼 거리까지 보균돼지의 이동으로 전파될 수 있다는 것이다. 따라서, 이와 같은 오제스키바이러스의 불현성 감염에 의한 잠복 감염은 오제스키병을 근절시키는데 고질적인 문제로 여겨져 왔다. 더욱이 현재 방역 대책으로는 정기적인 혈청학적 검사로 청정상태를 확인하고 있으나 혈청학적 검사로는 잠복 감염되어 있는 개체를 확인할 수 없고 잠복 감염바이러스를 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 진단 방법이 필요하다. 또한 국내의 잠복 감염된 오제스키바이러스의 분포와 상황을 조사함으로써

¹⁾ 본 연구보고서에서는 오제스키바이러스에 대한 약자로서 PrV 또는 ADV를 혼용하여 사용하였다.

오제스키병 발생에 대한 추측의 근거자료를 확보 해둘 필요가 있다. 따라서, 본 연구에서는 이와 같은 오제스키바이러스의 잠복 감염을 측정하기 위한 진단법을 확립하고 국내 잠복 감염 오제스키바이러스의 실태를 조사하고자 한다. 또한, 이와 같은 오제스키 바이러스의 잠복 감염을 줄이고 향후 오제스키바이러스의 내재되어 있는 재 활성을 줄임으로써 근본적인 예방 대책의 일환으로 오제스키바이러스 잠복 감염에 대한 실험적인 모델을 확립하여 기존의 상용화되어 있는 백신을 비롯하여 그 외 다양한 형태의 백신을 다른 접종 경로로 접종 후 오제스키 잠복 감염에 대한 영향을 분석함으로써 현재 시행되고 있는 백신 정책에 도움을 주고자 한다. 이와 같은 잠복 감염에 대한 백신의 영향을 분석함과 아울러 재 활성 모델을 확립하여 잠복 감염되어 있는 오제스키바이러스의 재 활성을 줄일 수 있는 방법을 모색하고자 하였다.

국내 양돈 산업은 축산업의 주축이 될 정도로 중요하게 여겨지고 있다. 더욱이 그와 같은 양돈 산업에서 오제스키병의 발생은 고질적으로 막대한 손실을 야기하고 있다. 그래서 세계적으로 양돈 산업에서 오제스키병의 방역에 백신 접종은 필수불가결하게 여겨지고 있다. 오제스키바이러스에 대한 백신은 유전자 변형 생백신(modified live vaccine; MLV), 불활화 사독 백신(inactivated virus vaccine) 및 유전자 결손 백신 (gene-deleted vaccine) 등이 이용되어 지고 있다. 많은 종류의 약독화 오제스키바이러스가 개발되었고, 바이러스의 약독화 정도는 변이된 부분과 바이러스주에 따라 다양하게 나타난다. 또한, 백신 접종군과 야외 바이러스에 감염군과의 구별을 위한 "marker" 백신의 가치가 증가되고 현장에서 이용되어 지고 있다. 이와 같은 약독화 바이러스주를 이용한 생백신은 일반적으로 면역반응이 오래 지속되고, 다양한 정도로 임상 증상을 완화시키며 체액성 면역과 세포성 면역 반응을 유도시켜 배출되는 바이러스의 양을 감소시키는 것으로 보고되고 있다. 그러나, 유전자 약독화 생백신의 경우 아직 유전자의 불안정성에 의한 보다 병독성이 강한 바이러스주가 나타날 염려가 상존해 있다. 오제스키병 불활화 또는 subunit 백신의 경우 약독화 생백신보다 유전자 불안정성에 의한 새로운 변이주의 출현을 방지할 수 있으나 충분한 면역반응을 유도하기 위해서는 반복적이고 많은 양의 항원을 주입해야 하는 번거로움이 있다. 또한, 이와 같은 불활화 또는 subunit 백신은 오제스키바이러스의 감염에 대하여 잠복 감염을 방지할 수 없어 불활화 백신은 불현성 감염을 유도하면서 잠복 감염을 지나칠 수

있는 과오를 초래할 염려가 있다. 따라서, 기존의 개발된 백신과 다른 형태의 백신에 대한 연구가 요구되고 있는 시점에서 플라스미드 DNA 백신은 그와 같은 안전성과 효능 측면에서 만족시킬 수 있는 점을 구비하고 있다. 그러나, 이와 같은 DNA 백신에 의하여 유도되는 면역 반응이 일부 전염성바이러스 감염에 대하여 충분한 방어기구를 형성하지 못함으로써 현장 적용에의 한계성을 드러내고 있다. 따라서, 많은 연구자들이 DNA 백신의 현장 적용성을 증가시키기 위하여 유도되는 면역 반응의 증가, delivery system의 변화 및 DNA 백신을 포함하는 프라임-부스트 접종에 대한 연구 등 다양한 방법의 연구가 진행되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 오제스키바이러스에 대한 플라스미드 DNA 백신 연구의 일환으로 가장 유효한 항원 유전자를 도출하고 도출된 항원 유전자 발현 DNA 백신을 제작하여 항원에 대한 면역 반응을 증가시키기 위한 최적화 방법을 모색하고자 하였다. 그래서, 최적화 방법으로서 위에서 기술된 사이토카인 유전자에 의한 adjuvant의 효능을 평가하여 가장 유용한 사이토카인을 도출하고 산업 동물에 쉽게 적용될 수 있는 방법으로 대량 예방 접종을 위한 약독화 salmonella bacteria를 이용한 DNA 백신의 delivery system에 대한 효능 시험을 실시하고자 하였다. 마지막으로 현재까지 DNA 백신의 가장 현장 적용가능성을 높여준 DNA 백신을 포함하는 다른 형태의 백신을 이용한 프라임-부스트 접종에 대한 수종의 프로토콜을 작성하여 최대의 면역 반응 및 방어 기구를 형성할 수 있는 프로토콜을 찾고자 하였다.

2. 연구개발의 내용

본 연구의 최종 목표는 오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 진단법을 확립하여 국내 오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 실태를 조사하고 잠복 감염 모델을 확립하여 잠복 감염을 억제시킬 수 있는 방법 및 재 활성화 모델을 확립하여 재 활성을 억제할 수 있는 방법을 찾고자 하였다. 또한, 오제스키바이러스에 대한 플라스미드 DNA 백신의 최적화 연구의 방법으로 유효 항원 유전자를 도출하고 항원에 대한 면역 반응을 증가시켜 현장 적용이 가능 할 수 있는 DNA 백신을 도출하여 최적의 delivery system과 예방접종 프로토콜을 도출하고자 하였다. 따라서, 1차 년도에는 오제스키바이러스의 잠복 감염을 진단하기 위한 진단법 확립,

오제스키 DNA 백신용 항원 유전자를 발굴하여 DNA 백신 제작을 비롯하여 DNA 백신 경구 전달체 확보 및 제작하고자 하였다. 2차 년도에는 확립된 오제스키바이러스 잠복 감염 진단법을 이용하여 국내 잠복 감염 실태 조사, 잠복 감염 모델을 확립하여 잠복 감염을 억제하기 위한 방법 모색, 오제스키 DNA 백신의 각 항원 유전자의 면역원성 분석을 통해 유효 항원 유전자를 발굴하며 도출된 항원 유전자의 항원성을 증가시키기 위한 사이토카인 유전자의 이용성을 검토하고자 하였다. 또한, 오제스키 DNA 백신의 경구 전달체 연구로 약독화 *Salmonella typhimurium*의 이용 가능성을 분석하고자 하였다. 3차 년도에는 잠복 감염된 오제스키바이러스의 재 활성화 모델을 확립하여 재 활성을 조절할 수 있는 방법을 모색하고자 하였고, 오제스키 DNA 백신의 현장 적용 가능성을 높여 주기 위하여 오제스키 항원 발현 아데노바이러스를 제작하여 각 항원에 대한 면역원성을 측정하고 유효 항원 발현 아데노바이러스를 이용하여 수종의 프라임-부스트 접종 프로토콜을 작성하여 최대의 면역반응과 방어기구를 형성할 수 있는 프로토콜을 찾고자 하였다.

Table 1-1. 연차별 연구 내용

구 분	연구 내용
1차 년도 (2002-2003)	<ul style="list-style-type: none"> ● 오제스키바이러스의 잠복 감염 진단 확립 ● 양성돈 오제스키바이러스 잠복 감염 실태조사 ● 오제스키 항원 유전자 확보 및 DNA 백신 제작 ● 오제스키 DNA 백신 경구 전달체 약독화 세균 제작
2차 년도 (2003-2004)	<ul style="list-style-type: none"> ● 오제스키 잠복 감염 실태 조사 ● 오제스키바이러스 잠복 감염 모델 확립 및 백신 영향 분석 ● 오제스키 DNA 백신 면역원성 조사 ● 사이토카인 유전자이용 DNA 백신 최적화 ● 약독화 세균의 DNA 백신 경구 전달체 유용성 검증
3차 년도 (2004-2005)	<ul style="list-style-type: none"> ● 잠복 오제스키바이러스 재활성 모델 확립 및 백신 효과 분석 ● 케모카인 유전자 이용 DNA 백신 최적화 ● 오제스키 항원 발현 아데노바이러스 제작 및 면역원성 분석 ● DNA 백신과 아데노바이러스 이용 최적 프라임-부스트 접종 도출
최종 연구내용	<ul style="list-style-type: none"> ● 오제스키바이러스 잠복 감염 진단 확립 및 국내 실태 조사 ● 오제스키바이러스 잠복 감염 및 재활성 조절 연구 ● 오제스키 DNA 백신 최적화 연구 ● DNA 백신 경구 전달체 연구 ● DNA 백신 이용 프라임-부스트 접종법

제 2 절 연구개발 배경

1. 기술적 측면

축산업에 있어서 전염병에 의한 손실은 이루 말할 수 없이 크다. 특히, 우리나라와 같이 양돈 산업이 축산업의 주축인 경우 오제스키병의 지속적인 발생은 양돈 산업에 막대한 손실을 초래하고 있다. 따라서 오제스키병에 대한 방역대책은 축산업에서 중요한 위치를 차지하고 있다고 할 수 있다. 현재 오제스키병에 대한 방역대책은 발생지역 돼지를 대상으로 양성축의 검색 및 살처분(detect & slaughter)과 새로운 돼지로 충당하는 식(repopulation)으로 이루어지고 있으며, 때로는 재 발생 방지 및 예방을 위해서는 예방접종을 병행하여 시도하고 있다. 오제스키병에 대한 예방접종은 특정 유전자가 제거된 gE or/and gI-deleted modified live vaccine(MLV) 또는 불활화 백신이 사용되고 있으나 모두 두 경우에 있어서 문제점을 안고 있다. 첫 번째는 MLV에 의한 예방 접종은 야외주 바이러스 감염시 바이러스의 유출, 임상증상의 완화 및 잠복 감염을 억제할 수 있으나, 야외주와 백신주와의 gene recombination에 의하여 보다 병독성이 강한 새로운 바이러스주가 출현할 염려가 있고 아무리 유전자 결손 주라고 하더라도 숙주에 완벽한 안전성을 확보하지 못했으며 간혹 부작용을 초래한다는 것이다. 두 번째 불활화백신의 경우 야외주와의 gene recombination에 의하여 병독성 바이러스가 출현할 염려는 없지만 MLV에 의하여 유도되는 면역반응을 얻기 위해서는 반복적이고 고용량의 항원을 주입해야 한다는 번거로움이 있다. 또한, 불활화 백신에 의하여 유도되는 면역 반응은 오제스키바이러스의 잠복 감염에 아무런 억제효과를 발휘하지 못한다는 문제점을 안고 있다. 더욱이, 비록 MLV를 이용하여 예방 접종이 이루어진 경우나 야외주 바이러스 감염에 의하여 확립된 잠복 감염은 각종 스트레스, 면역저하 및 dexamethasone와 같은 약물투여에 의하여 재활성화(reactivation)되고, 재 활성화되어 유출되는 바이러스는 이웃 돼지로 전파될 수 있다는 것이다. 더욱이 이와 같은 오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 국내 조사가 이루어진 적이 없으며 단순히 많은 수의 사육돼지가 오제스키바이러스에 잠복 감염되어 있을 것으로 추정하고 있다. 따라서 잠복 감염된 오제스키바이러스의 국내 상황을 조사함으로써 오제스키병의 방역사업에 귀중한 자료로 쓰여질 수 있을 것이다. 또한, 오제스키바이러스의 잠복 감염을 억제하고 예방 접종에 의

하여 백신주와 야외주와의 gene recombination에 의하여 새로운 바이러스주의 출현을 막을 수 있는 안전하고 새로운 예방접종에 대한 연구가 필요하다. 최근 백신학 분야에서 DNA 백신의 출현은 다양한 분야에서 적용 연구되어 왔다. 마찬가지로 오제스키바이러스에 대한 DNA 백신의 유용성과 효능이 검토되어 왔다. 그러나 이와 같은 DNA 백신이 현장에 적용되기 위해서는 약한 면역반응 유도, 대량 접종 방법을 위한 전달체 개발 등 많은 개선되어야 할 점이 있다. 따라서, 본 연구에서는 오제스키 DNA 백신의 유효 항원 유전자를 찾고 오제스키 DNA 백신의 최적화를 위한 방법을 모색하고자 하였다.

2. 경제.산업적 측면

국내 축산업에서 양돈 산업은 주축을 이루는 한 분야로서 현재 국가 경제에서 차지하는 비중도 낮지 않을 뿐 아니라, 특히 농업분야에서의 비중은 가히 절대적이라고 할 수 있다. 국내 전국의 사육 돼지 수는 1977년 148만두에서 1998년 754만두, 2005년 6월에 879만두로 2010년에는 1,000만두 이상의 사육 두수를 예상하고 있다. 더욱이 육류 소비의 증가와 더불어 돈육 소비는 증가하여 공급이 달리면서 공급가격이 치솟아 산지에서 100 kg인 돼지 한 마리가 30만원을 넘어섰다. 따라서, 2005년 6월 기준으로 양돈 산업의 규모는 생동물만 기준으로 하였을 때 2조 6천 억원에 이른다. 그러나 이와 같은 수치는 투자시설, 부대시설, 인건비, 사료산업, 돈육가공산업, 유통시장 등을 제외한 순수 생동물 기준규모이므로 관련 산업 등을 포함시키면 그 규모는 엄청나다. 따라서, 이와 같은 규모의 양돈 산업이 각종 전염병에 의하여 초래되는 경제적 손실은 추정이 불가능할 정도의 규모가 된다. 특히, 우리나라는 대 일본 돈육 수출량이 꾸준히 증가됨에 따라 양돈 산업의 규모도 계속하여 커지고 있지만, 오제스키, 돼지콜레라, 구제역등과 같은 전염병 발생으로 인하여 돈육 수출에 막대한 영향을 미치고 있는 것이 사실이다. 미국 오제스키병 근절대책의 비용-이익 통계 결과에 의하면, 오제스키바이러스의 감염에 의한 돈육의 손실은 100g당 약 \$6.00로 계산되어 나타났다. 따라서 2002년 이후 대일본 돈육 수출재개가 이루어졌고, 매년 돼지고기 수출이 5만 톤을 상회 할 것으로 예상하고 있는데 이에 대한 오제스키 감염시의 손실을 계산하면 3억 달러의 손실을 추정할 수 있다. 또한, 최근 2002년 2월 이후에 전북 완주군 삼례읍에서 오제스키병의 발생은 결국 발생농가의 양성축 963두 이상의 살

처분 및 예방접종으로 인한 조기 근절대책을 수립하지 못한 결과 주변 농가에 막대한 경제적 손실을 안겨주었다. 따라서 농가에서 전염병에 의한 경제적 손실을 미연에 방지하고 위생적이고 양질의 돈육 수출을 위해 오제스키병을 비롯한 각종 전염병에 대한 재발방지 및 예방을 위하여 효율적인 방역대책과 예방접종이 요구된다.

3. 사회·문화적 측면

농촌사회 안정: 양돈 산업은 우리나라의 정서가 되고 있는 1차 산업인 축산업에서도 중추를 이루는 산업일 뿐 아니라 대 일본 수출을 통해 확대일로 있는 산업으로 고부가가치를 이루고 위생적인 돈육을 생산케 함으로 양돈 산업의 안정과 발전을 더욱 도모할 필요가 있다.

국가사회 안정: 새로운 예방접종을 통해 위생적이고 양질의 돈육을 생산함으로써 농가에 전염병 감염에 의한 경제적 손실을 방지함으로써 크게 국가적으로 경제적 및 정신적 안정을 유도할 수 있을 것이다.

국민보건 향상: 위생적인 돈육을 생산함으로써 국민 보건향상에도 기여할 수 있는 방책이 필요하다.

산·학·관 연구체제의 활성화: 오제스키바이러스에 대한 잠복 감염에 대한 조사 및 연구를 통하여 국내 실태를 알 수 있고 오제스키바이러스에 대한 플라즈미드 DNA 백신의 유효 항원을 도출하고 궁극적으로 최적의 DNA백신을 개발하기 위한 로드-맵을 제시함으로써 기타 다른 전염병에 대한 DNA 백신의 연구에 기초 자료가 되며, 향후 대학을 비롯하여 축산공공연구기관, 산업체에서 유용하게 이용될 수 있는 예방접종에 대한 연구의 기초 자료로 활용할 수 있는 결과가 필요하다.

제 3 절 국내외 관련 연구 동향

1. 국내외 관련 연구의 기술 수준

가. 오제스키 잠복 감염 대한 연구 현황

오제스키 바이러스에 대한 감염 여부의 확인은 백신주와 야외주의 구별을 위하여 differential ELISA 방법에 의하여 확인하는 것을 권장하고 있다. 그 외에 오제스키바이러스를 확인하기 위한 진단법으로는 조직절편을 이용한 형광항체법, immunogold 염색에 의한 항원 검출법, 면역확산법, countercurrent immunoelectrophoresis, 중화시험법 등의 항체검출법에 의하여 이루어지고 있다. 그러나 이와 같은 진단법으로는 오제스키바이러스의 불현성 잠복 감염의 진단에는 어려움이 있다. 따라서, 오제스키바이러스의 불현성 잠복 감염을 확인하기 위한 여러 가지 방법이 시도되어 왔는데, 초기에는 감염 조직의 explantation과 co-cultivation에 기초한 방법들이 시도되었다. 그러나, 이와 같은 방법은 확인하는데 시간이 오래 걸리고 민감도도 상당히 낮은 단점을 갖고 있다. 최근 분자생물학 기술의 발달로 바이러스의 유전자를 쉽게 조작이 가능하면서 분자생물학적 기술에 근거한 기술들이 오제스키 잠복 감염을 확인하기 위하여 개발되었다. DNA 탐색자를 이용한 DNA-DNA hybridization 방법 등의 분자생물학적 방법들이 응용되면서 오제스키바이러스의 잠복 감염의 검출 민감도와 정확도가 증가되었다. 최근에는 primer와 chemiluminescent probe를 함께 증폭시키는 정량 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)이 개발되면서 잠복 감염 바이러스의 정성적 및 정량적 측정이 가능해졌다. 특히, 최근에 도입된 실시간중합효소연쇄반응(real-time PCR)은 다양한 종류의 바이러스에 대하여 감염조직에서 지속적으로 존재하는 감염 바이러스의 양을 검출할 수 있고 그 민감도가 상당히 높은 장점을 갖고 있어 다양한 분야에서 실시간중합효소연쇄반응의 이용이 증가되고 있다.

Hybridization 방법에 의하여 오제스키바이러스의 잠복 감염을 추적한 결과 시험에 사용된 6마리 중 5마리가 검출되었고, 이와 같은 방법은 바이러스 DNA의 1 pg, 즉 10,000 copy number를 검출할 수 있는 기술로 여겨진다. 더욱이 *in situ* hybridization에 의하여 오제스키바이러스는 다양한 신경조직에 잠복 감염을 확립

하고 있는 것으로 여겨져 trigeminal nerve ganglia, olfactory bulb, vagus nerve, maxillary nerve 비롯하여 spinal cord에 형성되는 것으로 나타났다. 이와 같은 오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 연구는 보다 민감도가 뛰어난 PCR 방법의 출현으로 오제스키바이러스의 잠복 감염 연구에 새로운 결과들을 만들어냈다. 그래서, PCR 방법에 의하여 오제스키바이러스의 잠복 감염의 주요 조직은 trigeminal ganglia라 여겨지며 그 외 olfactory bulb 및 brainstem이 관여하는 것으로 나타났다. 이와 같은 조직들은 대부분의 오제스키바이러스 감염에 대하여 잠복 감염된 것으로 나타났고, 신경 조직에 한정해서 잠복 감염이 이루어지는지 아니면 palatine tonsil과 peripheral blood lymphocyte가 잠복 감염에 관여하는지는 불명확하다. 만약 palatine tonsil과 peripheral blood lymphocyte가 오제스키바이러스의 진정한 잠복 감염위치의 하나라면 잠복 감염된 숙주를 쉽게 도출할 수 있을 것으로 여겨진다. 그러나, 일부의 연구에서 tonsil에서 바이러스의 DNA를 검출한 결과 일관성 있는 결과를 얻지 못하는 것으로 보아 오제스키바이러스의 잠복 감염을 검출하기 위한 조직으로 적당하지 못한 것으로 여겨진다.

나. 오제스키병에 대한 백신 연구 현황

오제스키바이러스에 백신은 유전자 변형 생백신(modified live virus vaccine), 불활화 사독 백신 (inactivated virus vaccine) 및 유전자 결손 백신 (gene-deleted vaccine) 등이 이용되어 지고 있다. 약독화 오제스키바이러스는 많은 종류의 바이러스주가 개발되었고, 바이러스의 약독화 정도는 변이된 유전자 부분과 바이러스주에 따라 다양하게 나타났다. 생독 백신주로 이용되는 Bartha 및 Norden 주는 수 많은 배양을 통하여 돼지에서 병원성이 약화된 상태이며 이와 같은 바이러스주는 유전자의 short unique(Us) 부분이 결실되어 있으며 Tk+(thymidine kinase)를 나타낸다. 여기서 thymidine kinase는 바이러스 성장에 필수적인 것은 아니나, 생체내에서 바이러스의 신경 독성이나 잠복 감염을 형성하는데 관여하는 것으로 여겨지고 있다. 그래서, Tk-오제스키바이러스는 Us유전자 결실주와 비교하여 병원성과 잠복 감염의 위험성이 낮고 면역원성 우수하고, 역변이가 쉽게 일어나지 않는 안정된 성상을 갖고 있다. 또한, 백신 접종군에서 야외 바이러스에 감염된 개체를 판별하기 위한 특정 유전자가 결손된 "marker" 백신의 개발이 이루어졌다. 이와 같은 유전자 변형 생백신을 이용하여 임상 증상의 완화, 감염 후 배출되

는 바이러스양의 감소 및 잠복 감염의 감소가 보고되었다. 오제스키바이러스의 불활화 또는 subunit 백신의 경우도 접종 후 야외주에 감염되었을 때 배출되는 바이러스의 양과 배출 기간을 감소시킨다고 보고되었으며, 첨가된 면역 증강제에 의하여 각기 다른 특성의 면역 반응을 나타낸다고 보고되었다. 그러나, 불활화 사독 백신 또는 subunit 백신은 충분한 면역 반응을 유도하기 위해서 반복적이고 많은 항원 양이 요구되며 오제스키 바이러스의 잠복 감염을 막을 수 없는 것으로 알려져 있다. 따라서, 오제스키바이러스의 잠복 감염을 효과적으로 예방하기 위해서 불활화 사독백신 보다 약독화 생백신을 사용하여야 하며 오제스키 근절정책으로 불활화 사독 백신만을 사용하던 국가들이 최근에는 유전자 변형 약독화 생백신의 사용을 권장하고 있다. 그러나, 약독화 생백신의 경우도 약독화에 따른 면역원성의 감소 및 유전자의 불안정성에 의하여 현존하는 백신주보다 유전적으로 안정하고 충분한 면역원성을 갖는 백신주의 개발이 요구되어 지고 있다.

생물학적 불안정성을 최소화하고 충분한 면역원성을 갖는 백신의 대안으로 최근 외래항원을 발현하는 플라스미드 DNA를 이용한 백신에 대한 연구가 한창 진행 중이다. 오제스키바이러스를 대상으로 DNA 백신의 연구가 일부 연구 그룹에서 진행되어 왔다. 오제스키 바이러스의 외피에 숙주세포의 침입과 감염에 중요한 역할을 하는 여러 개의 envelope glycoprotein이 포함되어 있는데, 감염된 숙주에 면역 반응을 유도하는 것으로 알려져 있으며, 그 중에서 gC, gE, gG, gI 및 gM은 nonessential glycoprotein으로 바이러스의 복제에 필수적인 당단백질이 아니다. 반면에 gB, gD, gH, gK 및 gL은 바이러스의 복제에 필수적인 당단백질로 알려져 있으며 gB, gC, 및 gD가 주요 면역원성을 갖는 당단백질로 알려져 있다. 따라서, 이와 같은 항원들에 의하여 중화항체가, 항원 특이 CTL 반응 및 lymphoproliferation assay 등의 방법을 이용하여 특이 면역 반응을 측정할 결과 강력한 Th1-type에 의한 반응이 나타남이 확인되었다. 그 외 오제스키 DNA 백신의 면역원 강화를 위하여 GM-CSF와 같은 genetic adjuvant에 연구가 진행되었으며, 일반적인 DNA 백신의 안전성을 개선하고 면역반응을 증가시키기 위하여 alphavirus-based expression vector가 개발되기도 하였다. 돼지에서 발생하는 오제스키병이 생쥐, 랫트, racoon 및 야생토끼를 포함하는 야생포유류에서 치명적이라는 보고가 있는 후 돼지외의 동물 모델을 이용하여 오제스키바이러스에 대한 연구가 진행되어 왔다. 생쥐에서 사독 백신으로 백신 연구의 가능성을 제시한 이

래로 약독화 생백신, 유전자 변형 생백신 및 DNA 백신을 적용하여 오제스키 백신 연구에 적합한 모델로 제시되어 왔다.

2. 앞으로의 전망

오제스키바이러스의 잠복 감염은 앞서 이야기하였듯이 오제스키병 근절을 위해서 반드시 고려하여야 할 사항으로 국내 실태에 대한 조사가 이루어지고 있지 않다. 더욱이 오제스키바이러스의 잠복 감염은 불활화 사독 백신이나 subunit백신의 접종에 의하여 아무런 영향을 받지 않음으로써 유전자 변형 또는 특정 유전자 결손 바이러스의 생백신을 이용하는 것이 권장된다. 현재 국내에서는 이와 같은 유전자 변형 또는 유전자 결손주를 국내 분리 바이러스 주를 이용하여 개발이 시도되고 있으나 아직 실용화가 이루어져 있지 않은 것으로 보인다. 결국 오제스키병을 근절하기 위해서는 지속적인 혈청학적 검사를 이용한 양성돈 도태 살처분에 기초하면서 잠복 감염의 실태를 조사하여 국내 상황에 대한 자료를 수집하여야 한다. 또한, 오제스키바이러스의 잠복 감염과 재 활성을 억제할 수 있는 체계적인 방법과 백신 개발이 이루어져야 할 것으로 예상된다. 이와 같은 측면에서 오제스키바이러스의 잠복 감염을 억제할 수 있고 안정적인 예방 접종이 이루어질 수 있는 백신 형태는 DNA 백신으로 여겨진다. 아직 DNA 백신에 의하여 유도되는 면역 반응이 약하여 현장 적용이 이루어지기 위해서 개선되어야 할 부분이 있지만, 최근의 연구 결과 특히, 프라임-부스트 접종에 의한 DNA 백신의 이용은 DNA 백신이 현장에 적용될 수 있음을 시사하고 있다. 이와 같은 형태의 예방 접종법은 인의용 경우 이미 임상시험에 착수된 것으로 보여지며, 향후 FDA에서 백신으로 허가가 취득된다면 DNA 백신의 이용은 증폭될 것으로 보여진다. 더불어 DNA 백신을 축산업에 적용하기 위해서는 대량의 산업동물을 대상으로 대량 예방 접종법(mass vaccination)의 개발이 이루어질 것이다. 이와 같은 대량 예방 접종은 DNA 백신의 delivery system 개발에 대한 관심을 불러 일으킬 것으로 보여지고 보다 손쉽게 예방 접종이 가능한 다양한 방법에 대한 연구와 개발이 이루어질 것으로 예상된다.

제 2 장 오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 분자생물학적 연구

제 1 절 서 설

오제스키바이러스는 돼지에서 일명 Aujeszky's disease(오제스키병)라고 불리는 중추신경 장애를 주 증상으로 하는 급성 전염병의 원인체이다. 헤르페스바이러스과 (*Herpesviridae*)의 alphavirus아과(*Alphaherpesvirinae*)에 속하는 Suid alpha herpesvirus I으로 바이러스의 크기는 150-186 nm이며 분자량은 9×10^7 daltons으로 핵산은 150kbp 정도인 double-stranded linear DNA genome으로 구성되어 있고 지금까지 3/4 정도의 염기서열이 밝혀졌으며 55개의 유전자가 확인되었다. 162개의 capsomer(12개의 penton, 150개의 hexon)로 구성된 정이십면체 capsid를 가지며 외피에 둘러싸여져 있다. 이 바이러스의 저항성은 열에 약하여 55-60℃에서 30-50분간 가열, 또는 70℃에서는 10분간 가열에 파괴되고, 5% 석탄산에는 2시간 저항하나 1% 가성소다에 의해서는 즉각 파괴되는 특징을 가지고 있다. 1902년 헝가리의 Aujeszky에 의해 공식보고 된 이후 세계의 각국에서 그 질병의 발생이 확인되고 있고, 전 세계적으로 양돈 산업에 가장 경제적인 손실을 주는 질병으로 여겨지고 있다. 우리나라에서는 1980년 이후 혈청학적 검사를 시작하였고 1987년에 경남 양산에서 최초 발생 보고가 있는 후, 예방 접종을 실시하지 않고 감염축을 살처분하는 방역정책을 실시하였으나 1989년에는 양산, 김해, 용인, 삼척등지에서, 1990년에는 서산에서 발생이 보고되는 등 다른 지역으로 지속적으로 확산됨에 따라 1994년 이후부터는 예방 접종 및 광범위한 혈청학적 검사를 통하여 자연감염 돼지를 도태하는 방향으로 방역정책이 이루어지고 있고, 제 2종 가축전염병으로 지정하여 국가적인 차원에서 방역에 주력하고 있다.

오제스키바이러스는 숙주 영역이 넓어 많은 가축(돼지, 소, 양, 개, 고양이 그리고 조류 등)과 야생동물 및 실험동물(토끼, 밍크, 마우스, 랫트, 기니픽)에 감염된다. 돼지를 제외하고는 소양증 및 신경증상을 주 증상으로 심한 가려움증과 경련, 마비 등 신경증상을 나타낸 후 폐사하기 때문에 개의 광견병과 증상이 유사하여 가성 광견병(pseudorabies)이라고 불리고 있다. 돼지에서는 이 질병에 감염되면 다른 동물에서

특징적으로 나타나는 가려움증은 나타나지 않으나 모든 연령에서 발병하고 임상증상은 감염 돼지의 연령과 면역학적 상태에 따라 달라진다. 포유자돈에서는 고열, 구토, 설사, 신경증상 및 혼수를 나타내며 80-90% 이상의 높은 폐사율을 나타내고, 임신돈에서는 유사산 등의 번식 장애를 나타내지만 성돈에서는 가벼운 호흡기 증상을 보이다 회복되어 불현성 감염을 일으킨다.

돼지는 자연계의 보균동물로서 바이러스 감염에서 회복된 개체는 불현성 잠복 감염 상태로 보균 동물로 남아 있게 되는데, 잠복 감염 개체가 각종 스트레스를 받게 되면 재발되어 비루나 재채기, 기침을 할 때 배출되는 비말을 통해 바이러스를 배출하게 되고, 다른 개체에 전파 시킨다. 뇌 조직에 잠복 감염을 일으키므로 그 제어기가 어려우며 잠복 감염 돼지는 같은 무리의 돼지뿐만 아니라 여러 감수성 있는 동물에 대한 전염원이 되며, 돼지 이외의 감수성 동물에서도 잠복 감염이 성립된다. 이와 같은 오제스키바이러스의 잠복 감염은 방역대책에 많은 어려움을 유발하고, 현재 방역대책으로는 정기적인 혈청학적 검사로 청정상태를 확인하고 있으나 혈청학적 검사로는 잠복 감염되어 있는 개체를 파악할 수 없어 잠복 감염 바이러스를 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 진단방법이 필요하다.

현재 오제스키바이러스의 감염을 확인하기 위한 형광 항체법, immunogold 염색에 의한 항원 검출법, 면역 확산법, countercurrent immunoelectrophoresis, 중화시험법, ELISA 등의 항체 검출법이 애용되고 있으나 이와 같은 진단법으로는 오제스키바이러스의 불현성 잠복 감염을 진단할 수 없다. 따라서, 오제스키바이러스의 불현성 잠복 감염 상태를 조사하기 위하여 여러 가지 방법이 이용되어져 왔는데, 감염조직의 explantation과 co-cultivation에 기초한 방법들은 시간이 오래 걸리고 민감도도 상당히 낮은 반면에, DNA 탐식자를 이용한 DNA-DNA hybridization 방법 등의 분자생물학적인 방법들이 응용되면서 오제스키바이러스의 잠복 감염의 검출 민감도와 정확도가 증가되었다. 최근에는 primer와 chemiluminnescent probe를 함께 증폭시키는 정량 PCR 방법이 많이 이용되어지고 있고, 특히 실시간중합효소연쇄반응(real-time PCR)은 감염조직에서 지속적으로 존재하는 감염 바이러스의 정확한 양을 검출할 수 있고 그 민감도가 상당히 높은 장점을 가지고 있어 그 사용이 계속 증가되고 있다. 많은 연구에서 삼차신경절(trigeminal ganglion; TG), 후구(olfactory bulb; OB), 뇌간(brain stem; BS)과 편도(tonsils) 등의 다양한 신경 조직에서 오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 PCR

방법의 가치가 증명되어져 왔으나, 일반적인 PCR 방법으로는 잠복 감염된 바이러스의 정확한 양을 검출하기가 어렵고 그 민감도도 낮다고 보고되었다.

따라서, 본 연구에서는 혈청 검사에서 오제스키병 양성인 돼지 뇌 조직 genomic DNA를 대상으로 하여 nested PCR과 실시간중합효소연쇄반응을 이용하여 잠복 감염되어 있는 바이러스를 확인하고, 그 분포와 존재하는 양에 대하여 조사하였다. 이는 PCR법을 이용하여 잠복 감염되어 있는 바이러스를 빠르게 진단하여 오제스키병 양성 돼지를 검색하는데 이용할 수 있고, 혈청학적으로 양성인 돼지에서 실제로 바이러스가 잠복 감염되어 있는 개체 분포를 조사하여 잠복 감염되어 있는 바이러스의 실상을 파악하여 오제스키병의 방역에 도움이 되고, 혈청학적으로 음성인 돼지에서 잠복 감염되어 있는 바이러스의 검색에도 이용되어 질 수 있을 것으로 판단된다. 또한, 일반적인 PCR 방법보다 민감도를 높이기 위하여 nested PCR 방법을 이용하였으며, false-negative 반응을 최소화하기 위하여 세 가지 신경조직(BS, OB 및 TG)의 genomic DNA를 서로 다른 오제스키glycoprotein(gB, gG, gE) 유전자를 목표로 하여 nested PCR을 수행하였으며, 바이러스의 정확한 양을 알고자 2가지의 primer와 TaqMan probe를 이용하여 바이러스의 양을 조사하였다. 또한, 이와 같은 검출법을 이용하여 무작위로 추출된 돼지의 뇌 조직에 존재하는 잠복 감염의 실태를 조사하였다.

세계적으로 양돈 산업에서 오제스키 병의 방역에 백신 접종은 필수불가결하게 여겨지고 있다. 오제스키 백신은 유전자 변형 생백신(modified live virus vaccine), 불활화 사독 백신(inactivated virus vaccine) 및 유전자 결손 백신(gene-deleted vaccine)등이 널리 이용되어지고 있다. 약독화 오제스키바이러스는 많은 종류의 바이러스주가 개발되었고, 바이러스의 약독화 정도는 변이된 유전자 부분과 바이러스주에 따라 다양하게 나타난다. 여러 나라에서 생독 백신주로 쓰이고 있는 Bartha 및 Norden strain은 수많은 배양을 통하여 돼지에는 병원성이 약화된 상태이며 이들 바이러스는 genome의 short unique(Us) region이 결실되어 있으며 tk⁺(thymidine kinase)를 나타낸다. 이 효소는 배양세포에서의 바이러스 성장에는 필수적인 것은 아니나, 생체 내에서 바이러스의 neurovirulence나 잠복 감염 형성을 결정짓는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. 반면, tk⁻ 오제스키바이러스는 이들 Us region 결실 변이주에 비하여 병원성이 더 낮고 잠복 감염의 위험성 역시 덜 하며 면역원성이 우수하고, 역변이가 쉽게 일어나지 않는 안정된 성상을 가지고 있다. 약독

화 바이러스를 이용한 백신은 일반적으로 면역반응이 오래 지속되고, 다양한 정도로 임상증상을 완화시키며 체액성 면역반응과 세포성 면역반응을 유도시켜 배출되는 바이러스의 양을 감소시킨 것으로 보고되었다. 또한, 백신 접종 군에서 야외 바이러스에 감염된 개체를 판별하기 위한 'marker' 백신으로서의 가치도 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 유전자 변형 생백신을 이용하여 임상증상의 완화, 배출되는 바이러스의 양 감소 및 성립되는 잠복 감염양도 감소하고, 실험 감염에 대하여 충분한 방어능이 형성된다고 보고되기도 하였다. 오제스키병 불활화 또는 subunit 백신의 경우 약독화 백신보다 백신 접종 후 야외 병원성 바이러스에 감염되었을 때 배출되는 병원성 바이러스의 양과 배출 기간을 효과적으로 감소시킬 수 있으며, 첨가된 adjuvant의 특성에 따라 각기 다른 다양한 면역반응을 나타낸다고 보고되었다. 그러나, 잠복 감염을 효과적으로 예방하기 위해서는 불활화 백신보다는 약독화 생백신을 사용하여야 하며 오제스키병 근절정책으로 불활화 백신만을 사용하던 국가들이 최근에는 유전자 변형 약독화 생백신의 사용을 권장하고 있다. 또한, 불충분한 약독화나 병원성을 약독화 시킬수록 면역원성이 감소하는 불안정의 문제를 가지고 있어, 현존하는 백신 바이러스 후보다 유전적으로 안정하고 충분한 면역원성을 가지는 백신주의 개발이 요구되어 지고 있다. 따라서 본 연구에서는 또한 3가지 형태의 백신(약독화 생백신, 불활화 사독 백신 및 oil-adjuvant가 포함된 gene-deleted subunit 백신)을 사용하여 백신 형태에 따른 백신의 효과를 비교 조사하였으며, 접종 경로(비강 접종 또는 근육 내 접종)에 따른 백신의 효과도 비교 조사하였으며, 국내에서 분리한 tk⁻ 오제스키바이러스 양산주를 약독화 생백신으로 이용하여 실험용 생쥐를 실험 모델로 하여 병원성 오제스키바이러스에 대한 잠복 감염에 대한 방어 여부를 관찰하여 백신주로서의 안정성과 면역원성을 조사하였다. 또한, 병원성 오제스키바이러스 Yangsan주를 불활화시킨 단백질 항원 사독 백신과 oil-adjuvant gene-deleted subunit 백신을 이용하여 약독화 생백신의 면역원성과 방어 면역 능력을 비교 조사하여 백신 형태에 따른 잠복 감염에 대한 영향을 조사하였다. 마지막으로 실험동물 생쥐모델을 이용하여 오제스키바이러스 잠복감염을 확립한 후 면역억제에 의한 재 활성화시킬 수 있는 모델을 확립하여 각종 백신 투여에 의한 잠복 감염된 오제스키바이러스의 재활성에 대한 영향을 조사하였다. 이와 같은 연구는 현재 잠복 감염된 오제스키바이러스에 대한 정보를 주고 잠복 감염을 억제하거나 재 활성을 억제함으로써 오제스키바이러스의 불현성 전파 등을 방지할 수 있는 방법 등에 대한 자료로 소중히 이용될 수 있을

기대된다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 세포 및 바이러스

병원성 오제스키바이러스 양산주(Yangsan strain)(국립수의과학검역원)는 porcine kidney cell line(PK-15 세포)에서 증식시켜 사용하였다. PK-15 세포를 5%의 fetal bovine serum, penicillin-streptomycin ($1\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 DMEM(GIBCO)에 배양하고, 오제스키바이러스 Yangsan주를 흡착시켜 5% CO_2 , 37°C 에서 1시간 감염시키고, 2-3일 정도 경과 후 세포변성(CPE)이 80-90% 정도 확인되면 감염된 세포를 상층액과 함께 수집하였다. 4°C , 2,500 rpm에서 15분간 원심 분리 후, 배양 상층액은 4°C , 18,000 rpm에서 1시간 30분간 고속 원심분리하고, 침전층(감염세포)은 멸균 D-PBS에 재부유하여 드라이아이스에 에탄올을 첨가하여 동결용해과정을 3회 반복하여 세포내에 있는 바이러스를 배출시킨 후 4°C , 2,500 rpm에서 15분간 원심 분리한다. 이와 같은 과정으로 얻은 상층액과 초고속 원심 분리시킨 배양 상층액의 침전층을 D-PBS에 재부유한 후 사용할 때까지 -80°C 에 보관하였다.

2. 대상 동물 및 실험동물

가. 대상 동물 및 조직 채취

오제스키 양성돈으로 확인된 돈두 94개를 완전히 박피한 후, 하악을 분리하고 비 돌출부를 절단하였다. 이어서 두개골을 종단으로 절단하여 뇌의 단면을 노출시키고 뇌간(BS), 후구(OB), 삼차신경절(TG)을 개체별로 채취하여 -80°C 에 보관하였다 (Fig. 2-1).

나. 사용된 실험동물

본 실험에 사용한 실험용 생쥐 BALB/c(H-2^d)와 C57BL/6(H-2^b)는 실험동물 공급업체(주) 다물사이언스(대전, 한국)와 코아텍(서울, 한국)에서 구입하여 본 연구실의 실험 동물실에서 실험 동물 사육 규정에 맞추어 유지하며 실험에 공시하

였다.

3. 오제스키 감염 여부조사

전북 익산 왕궁 양돈단지에서 실시된 혈청학적 검사(gpI antibody test kit)를 통하여 오제스키 양성축의 돈두를 회수하여 실험에 사용하였다. 혈청학적 검사는 gpI antibody test kit(IDEXX HerdCheck anti-gpI, Laboratories Inc., Westbrook, Maine)를 이용하여 혈청내의 항체를 측정하여 오제스키 양성축과 음성축으로 판정한다. 오제스키 항원이 코팅된 plate에 음성 대조군(1:2 희석), 양성 대조군(1:2희석), 2배 희석된 돼지 혈청을 각각 100 μ l씩 분주하고, 4°C에서 하룻밤 방치한 후 세척액으로 5회 세척하였다. 여기에 anti-gpI:horseradish peroxidase 100 μ l를 첨가하였으며, 실온에서 20분간 방치한 후 세척액으로 5회 세척하고 각 well에 TMB 기질용액 100 μ l를 첨가하고 실온에서 15분간 방치한 후 정지액 50 μ l를 첨가하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 제조회사 지시에 따라 sample/negative 비율이 0.6이하인 것을 오제스키바이러스에 감염된 것으로 판정하였다.

4. 뇌 조직 genomic DNA 및 오제스키 viral DNA의 분리

가. 뇌 조직으로부터 DNA 분리

각 개체별로 채취한 대상조직 BS 94 샘플, OB 93 샘플과 TG 94 샘플을 DNAzol(MRC, London, UK)을 이용하여 지시되어 있는 방법에 따라 total DNA를 추출한 후에, RNase A(200 μ g/ml)를 첨가하여 37°C에서 30분간 처리한 후, 동량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)로 1회 추출한 후 chloroform으로 1회 추출하였다. 1/10 volume의 3 M sodium acetate 와 2 volume의 에탄올을 첨가하여 -20°C에서 1시간 이상 방치한 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 DNA를 침전 시킨 후 공기 중에 방치하여 건조한 후 8 mM NaOH로 용해하여 -20°C에 냉동 보관하여 사용하였다. GeneQuant RNA/DNA calculator(Biochem, Cambridge, UK)를 이용하여 genomic DNA 함량을 측정된 후 각 조직 DNA양을 50 ng/ μ l로 일정하게 희석하여 실험에 사용하였다.

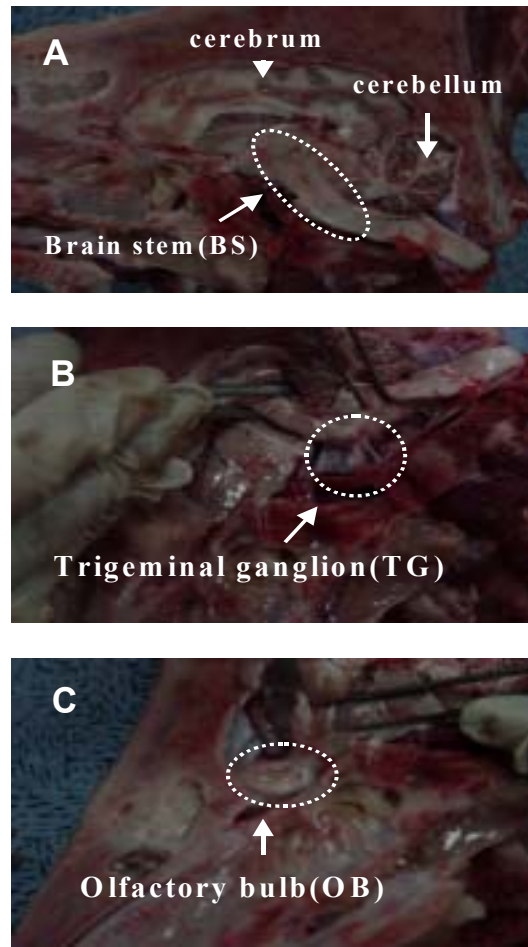


Fig. 2-1. Pictures showing nervous tissues which were selected for detecting the latency state of pseudorabies virus. The circles of dashed line are representing each tissue of (A) brain stem(BS), (B) trigeminal ganglion(TG), and (C) olfactory bulb(OB).

나. 오제스키 바이러스의 DNA 분리

농축된 바이러스를 TBS(10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.4) 완충액에 부유 시킨 후, 0.6% SDS(sodium dodecyl sulfate)와 proteinase K(400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시킨 후 동량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)를 사용하여 단백질을 제거하고 RNase A(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 proteinase K(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 가하고 37°C에서 1시간 처리하여 RNA 성분을 제거하고, 다시 동량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)로 1회 추출하고 chloroform으로 1회 추출한 후, 1/10 volume의 3 M sodium acetate 와 2.5 volume의 에탄올을 첨가하여 -20°C에서 1시간 이상 방치한다. 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 DNA를 침전 시킨 후 공기 중에 건조하여 TAE 완충액(Tris-Acetate-EDTA)에 용해하여 -20°C에 냉동 보관하여 사용하였다.

5. 오제스키 잠복 감염 검출

가. Nested PCR

오제스키바이러스의 잠복감염상태를 확인하기 위하여 양성축의 뇌 조직에서 분리한 총 281개의 DNA 샘플을 조직별로 구분하고 각기 오제스키 glycoprotein 유전자인 gB(gII), gE(gI) 와 gG(gX)를 대상으로 하여 nested PCR을 수행하였다. GeneBank의 EMBL data bank의 염기서열 결과에 기초하여 glycoprotein gB 유전자(accession number M17321), gE 유전자(accession number AF207700)와 gG 유전자 (accession number M10986)를 대상으로 각각의 유전자에 대한 primer를 제작하였고, 각각의 primer에 대한 염기서열은 Table 2-1에 표시하였다. Nested PCR 반응은 PCR cycler (Perkin Elmer GeneAmp PCR system 9600)를 이용하여 반응을 실시하였고, 반응 조건은 nuclease-free water 5.25 μl 에 2.5 μl 의 10 \times reaction buffer, 0.5 μl 의 10 mM dNTPs, 1.5 μl 의 25 mM MgCl₂, 각각 2.5 μl (1 μM) sense primer와 antisense primer, template DNA 10 μl 와 Taq DNA polymerase 0.25 μl (5 U/ μl)를 섞어 총 용량 25 μl 의 반응액을 96°C에서 3분간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 68°C에서 2분 30초 동안 polymerization 반응을 5 cycle 실시하고,

94℃에서 1분간 denaturation, 58℃에서 30초간 annealing, 68℃에서 2분 30초 동안 polymerization 반응을 30 cycle 실시하였다. 최종적으로 72℃에서 10분간 방치하여 polymerization 반응을 종료하고, 생산된 PCR 산물 중 5 μ l를 second round PCR 반응의 template로 사용하였다. Second round PCR 반응조건은 first round와 같으며 PCR 산물은 1.85% agarose gel (Invitrogen, Calsbad, CA)에 전기영동 한 후, ethidium bromide용액에 염색하고 수세하여 탈색한 후 gel documentation (Vilber Lourmat, Torcy, France)상에서 관찰하였다.

나. Nested PCR 산물의 특이성 검사

Nested PCR 산물의 특이성을 확인하기 위하여 제한효소를 이용하여 제한단편길이다형(restriction fragment length polymorphism, RFLP) 분석을 수행하였다. 오제스키바이러스의 gB, gE 그리고 gG 유전자의 nested PCR 최종산물은 SV gel/PCR clean system (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 추출하였다. 간략하면 agarose gel에서 PCR 산물의 위치를 확인한 후 정확한 위치의 gel slice를 잘라서 microcentrifuge tube에 넣은 뒤 무게를 측정하여 1 mg/ μ l가 되게 membrane binding solution을 넣고, 50-65℃ 수조에서 gel 혼합액을 완전히 용해시켰다. 완전히 용해된 gel 혼합액을 collection tube위에 얹혀진 SV minicolumn에 넣고, 상온에서 1분간 방치한 후 10,000×g 에서 1분간 원심 분리하였다. SV minicolumn 밑으로 빠진 내용물은 버리고 collection tube에 SV minicolumn을 다시 넣은 후 membrane 세척액을 700 μ l 첨가하고 10,000×g 에서 1분간 원심 분리하여 세척하였다. 500 μ l 로 다시 세척 후, SV minicolumn을 새로운 tube에 옮기고 nuclease-free water 50 μ l를 첨가한 후 상온에서 1분간 방치하였다. 10,000×g 에서 1분간 원심 분리하여 얻어진 DNA를 4℃나 -20℃에 보관하였다. 이와 같이 추출된 DNA를 제한효소 Hae III(New England Biolab Inc, Beverly, MA, USA)를 이용하여 제한단편을 확인하였다. 또한 일부 PCR product는 pGEM-T easy vector(Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝한 후 염기서열분석을 통하여 PCR 산물의 특이성을 확인하였다.

Table 2-1. Sequences of the primers used in the nested PCRs detecting three glycoprotein gene, gB, gE, and gG.

Target gene	Amplification	Primers	Sequences 5'-3'	Position	Length (bp)*
gB	1st	sense	ATG GCC ATC TCG CGG TGC	2044-2062	334
	2nd	antisense	ACT CGC GGT CCT CCA GCA	2361-2379	
	1st	sense	ACG GCA CGG GCG TGA TC	2159-2176	195
	2nd	antisense	GGT TCA GGG TCA CCC GC	2337-2354	
gE	1st	sense	TCG TGA TGA CGT GCG TCG TCG	1306-1327	377
	2nd	antisense	GGG TCC ATT CGT CAC TTC CGG	1664-1685	
	1st	sense	CCC ACG CAC GAG GAC TAC TAC	1440-1461	211
	2nd	antisense	CGC GGA ACC AGT CGT CGA AGC	1631-1652	
gG	1st	sense	ATG TTG TCG TTT GAT CCC GTC	94-114	327
	2nd	antisense	AGC CGC GAG AGT AGT CCG TCC	399-420	
	1st	sense	GAA TGT GGA CCG TAT AAA ACG GC	149-171	168
	2nd	antisense	TGG CCG TAG CAG AGC TCC	299-316	

*: Product size after amplification

다. 실시간중합효소연쇄반응 (real-time PCR)

돼지의 뇌 조직에서 잠복감염 상태에 있는 오제스키바이러스의 절대 copy 수를 알아보기 위하여 오제스키바이러스 gB 유전자와 gE 유전자를 대상으로 실시간중합효소연쇄반응을 실시하였다. 실시간중합효소연쇄반응은 7700 Sequence Detector(SDS 7700, ABI Prism, Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 실시하였다. 반응시약으로는 TaqMan PCR Master Mix를 사용하였고 TaqMan probe와 primer는 오제스키 gB 유전자와 gE 유전자에서 Primer Express (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, USA) 프로그램을 이용하여 제작하였다. 본 실험에 사용한 primer와 probe의 염기서열은 Table 2-2와 같다. 모든 TaqMan probe는 5' 말단에 reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM)과 3' 말단에 quencher dye 6-carboxy-tetramethyl-rodamine (TAMRA)가 표지되어 있다. TaqMan PCR 반응액(총 50 μ l)은 2 \times TaqMan PCR Master Mix 25 μ l, 각각 900 nM 의 sense와 antisense primer 10 μ l씩, 250 nM의 형광물질이 표지된 probe 5 μ l

와 DNA 10 μ l를 섞어 사용하였으며, 반응조건은 50°C에서 2분(uracil N-deglycosylase digest) 반응시킨 뒤 95°C에서 10분(AmpliTaq Gold preactivation), 95°C에서 20초 그리고 55°C에서 1분으로 하여 총 45 cycle을 반응시켰다. 실시간중합효소연쇄반응의 증폭결과의 분석은 Sequence Detector (Ver. 1.7, ABI, USA) 프로그램을 이용하였다.

Table 2-2. Sequence of primers and probes used in the real-time PCR

Target gene	Name	Sequence 5'-3'	Position	Length (bp) *
gB	Primer gB 05	ACG GCA CGG GCG TGA TC	2159-2176	220
	gB 03	ACT CGC GGT CCT CCA GCA	2361-2379	
	Probe gB probe	CTC GCG CGA CCT CAT CGA GCC CTG CAC		
gE	Primer gE 05	TCG ACT CGC GGT CCT CCA GCA	1306-1327	346
	gE 03	CGC GGA ACC AGT CGT CGA AGC	1631-1652	
	Probe gE probe	CTA CGA GGG GCC GTA CGC GAG CCT GGA		

*: Product size after amplification

6. 실험적으로 오제스키바이러스에 감염된 돼지에서의 잠복상태와 지속감염조사

가. 감염 방법

8-9 주령의 자돈을 바이러스 감염 양에 따라 두 군으로 나누었으며, A군은 자돈 1마리당 2×10^4 pfu, B군에는 2×10^2 pfu를 비강을 통해 접종하였다. 바이러스 접종 후 0, 2, 5, 7, 9, 12, 15, 20, 26, 36, 47, 56일째에 각각 채혈하여 peripheral blood mononuclear cell(PBMC)와 혈장을 분리하였으며, 접종 후 9일째 까지 기록하였다. 접종 후 매일 관찰하여 예후상태를 기록하고 clinical

score와 직장 온도를 9일째까지 기록하였다. Clinical score는 1) 직장 온도가 40-41℃, 2) 호흡기 증상과 함께 41℃ 이상, 3) 운동 실조, 4) 경련, 5) 빈사상태나 폐사상태로 나누었다.

나. PBMC 및 혈장 준비

바이러스를 접종한 실험용 자돈의 경정맥으로부터 acid citrate dextrose solution (ACD)이 들어 있는 주사기를 이용하여 채혈 후, 2,500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 얻은 상층액 혈장은 -80℃에 사용할 때 까지 보관하였다. PBMC는 buffy coat층으로부터 분리하였다. RBC lysis buffer를 1:14 비율로 넣고 균질하게 섞어 5분간 실온에 방치한 후 2,500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 RBC를 제거하였다. 수확한 세포 침전물은 PBS로 두 번 세척하여 두 개의 시험관에 나누어 -80℃에 보관하고, 하나는 바이러스 분리에 이용하고, 다른 하나는 nested PCR 분석에 사용하였다.

다. PBMC로부터 DNA분리

PBMC로부터 DNA의 분리는 뇌 조직으로부터 DNA분리와 같은 방법에 준하여 DNAzol(MRC, USA)를 이용하여 분리하였다.

라. 바이러스 분리

PK-15 세포를 96-well plate에 각 well당 5×10^5 수준으로 분주하고 2일간 배양하였다. 혈청이 첨가되지 않은 DMEM을 40 μ l씩 각 well에 분주하고 희석된 오제스키바이러스와 혈장을 해당 well에 10 μ l씩 접종하여 37℃에서 2시간 동안 흡착하였다. 이어서 5% 혈청이 함유된 DMEM 50 μ l을 첨가하여 배양하였다. 24시간 배양 후 2×MEM (5% 혈청)와 2% low melting agarose(Invitrogen)로 overlay후 배양하였다. 72시간 후 neutral red dye용액으로 염색하여 세포병변 현상을 확인하여 판정하였다.

마. 오제스키 항체 측정

혈장내의 오제스키 특이 항체는 ELISA를 이용하여 결정하였다. ELISA plate를 50 mM sodium bicarbonate buffer (pH 9.5)를 희석액으로 이용하여 준비된

오제스키 항원 (1 $\mu\text{g}/\text{well}$)으로 4°C에서 하룻밤 방치하여 코팅하였다. Standard 에는 goat anti-porcine IgG(Serotec, USA) 100 ng/ml을 이용하여 같은 방법에 의하여 코팅하였다. 코팅된 ELISA plate는 0.05% tween 20-PBS(PBST)를 이용하여 3회 세척하고, 3% non-fat dried milk (200 $\mu\text{l}/\text{well}$)로 37°C에서 2 시간 동안 반응시켜 블로킹하였다. 다시 PBST로 3회 세척하고, 50배 희석된 혈장을 2배씩 계열 희석하여 각 well에 분주하고 37°C에서 1시간 30분 반응시킨 후 PBST로 3회 세척하였다. Peroxidase-labeled anti-swine IgG conjugate(100 ng/ml)을 100 μl 씩 분주하고 37°C에서 1시간 반응 시킨 후 PBST로 다시 3회 세척하였다. 효소 반응은 기질 용액 (11 mg 2,2-azinobis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid in 25 ml of 0.1 M citric acid-25 ml of 0.1 M sodium phosphate-10 μl hydrogen peroxide)을 이용하여 발색시켰으며, 1.5% potassium fluoride-PBS를 이용하여 반응을 정지시켰다. 각 well의 optical density는 ELISA reader (Molecular Device, USA) 로 측정하고 Softmax program에 의하여 혈장내의 오제스키 항체 수준을 계산 후, 혈장 단백질 양을 측정하여 값을 보정하였다.

바. 단백질 정량

단백질 양은 BCA protein assay reagent kit(Pierce, USA)를 이용하여 본 제품의 설명서에 따라 측정하였다.

7. 수종의 백신과 투여 경로에 따른 오제스키바이러스에 대한 면역반응과 잠복감염과의 상관관계 분석

가. 오제스키 항원준비

오제스키 단백질 항원을 만들기 위하여 PK-15 세포에서 증식된 병원성 오제스키바이러스를 농축한 후 0.5% Triton X-100(Sigma, USA)-PBS를 첨가하여 준비하였다. 단백질양은 BCA Protein Assay reagent kit (Pierce Biotechnology Inc, IL, USA)를 이용하여 지시된 방법에 따라 측정하였다.

나. 면역화 방법 및 시료채취

백신 형태와 백신주입 경로에 따른 오제스키바이러스의 잠복감염에 대한 효과적인 백신접종 방법을 알아보기 위하여 3가지 형태의 백신을 적용하여 실험하였다. Attenuated live virus(PrV Δ tk β -gal+ Yangsan strain)를 약독화 생백신으로 이용하였고, Triton X-100 처리 단백질 항원을 불활화 사독 백신으로 이용하였고, oil-adjuvant gene-deleted vaccine(Porcine Aujeszky's Disease subunit vaccine, 중앙연구소, 한국)을 subunit 백신으로 이용하여 비강 또는 근육 내 접종하여 면역시킨 후 병원성 오제스키바이러스의 실험적 호흡기 감염(비강 접종)에 대한 백신 형태와 백신주입 경로에 따라 잠복 감염이 성립되는 정도에 차이가 있는지, 백신 효과와 잠복 감염의 정도에 관계가 있는지 알아보았다. 비강 접종을 하는 실험군은 정확한 용량을 접종하기 위하여 avertin(2% 2,2,2-tribromoethanol, 2% 2-methyl-2-butanol) 200 μ l를 복강 내 주사하여 전신 마취시킨 후 비강 접종하였다.

실험군을 정리하면, 실험군 A는 약독화 생백신을 10^6 pfu/20 μ l 농도로 비강 접종하였고, 실험군 B는 불활화 사독 백신을 100 μ g/20 μ l 농도로 비강접종하였다. 실험군 C는 oil-adjuvant subunit vaccine을 100 μ l 근육내 접종, 실험군 D는 약독화 생백신을 10^6 pfu/100 μ l 농도로 근육 내 접종하였고, 실험군 E는 불활화 사독 백신을 100 μ g/100 μ l 농도로 근육 내 접종하였다.

면역시킨 후 병원성 오제스키바이러스를 비강 접종하기 하루 전에 안와 정맥에서 혈액을 채취하여 오제스키 특이 IgG를 측정하기 위한 혈청을 준비하였다. 채취된 혈액을 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 방치한 후 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 원심 분리하여 혈구 성분을 제외한 상층액을 얻어낸 후, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심 분리하여 상층액만 얻어내어 사용할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관 하였다. 질 내 분비물 샘플은 병원성 바이러스를 접종하기 전 3일 동안 연속하여 샘플을 채취하였다. PBS 100 μ l를 질 내에 삽입한 뒤 질 내 분비물을 회수하여 사용하기 전 까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 오제스키 특이 IgA 측정을 위해 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 이용하였다. 분변 샘플도 병원성 오제스키바이러스를 비강 접종하기 하루 전에 각 개체별로 분변을 회수하여 사용하기 전 까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하고, 오제스키 특이 IgA 측정 시 샘플의 무게를 측정하여 100 mg/ml의 농도로 0.1% sodium azide가 포함된 PBS로 희석하여 잘 섞은 뒤 원심 분리하여 상층액을 이용하였다.

나. 오제스키 특이 IgG 및 IgA 측정

오제스키 항원에 대한 항체 역가는 일반적인 ELISA방법에 의하여 측정하였다. 혈청 오제스키 특이 IgG의 측정은 우선 ELISA plate에 50 mM sodium bicarbonate buffer(pH 9.5)를 희석액으로 오제스키 단백질 항원(inactivated protein Ag)을 1 μ g/well의 농도로 희석하여 각 well당 100 μ l씩 분주하고, standard에는 goat anti-mouse IgG (Southern Biotechnology Associate Inc., Birmingham, Ala) 100 ng/well의 농도로 100 μ l씩 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 방치하여 코팅하였다. 0.05% tween 20-PBS(PBST)를 이용하여 3회 세척하고, 3% 탈지유(200 μ l/well)로 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시켜 블로킹하였다. 다시 PBST로 3회 세척하고, 혈청을 10배 희석되게 각 well에 분주하고 2배 계단희석하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 반응시킨 뒤 PBST로 3회 세척하였다. Goat anti-mouse IgG-conjugated horse radish peroxidase(HRP)(100 ng/well)을 각 well에 100 μ l씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후 PBST로 3회 세척하였다. 효소반응은 앞서 기술한 방법에 준하여 발색하였다.

혈청 오제스키 특이 IgG의 isotype(IgG2a 및 IgG1) 측정을 위한 ELISA는 혈청 오제스키 특이 IgG의 방법과 동일하게 진행하였다. Standard에는 goat anti-mouse IgG2a 또는 IgG1(Southern Biotechnology Associate Inc., Birmingham, Ala)를 100 ng/well의 농도로 코팅하였고, 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG2a-conjugated HRP (IgG2a-HRP) 또는 goat anti-mouse IgG1-conjugated HRP (IgG1-HRP)를 1시간 처리 후 측정하였다.

분변 샘플 및 질 내 분비물 샘플에서의 오제스키 특이 IgA의 측정은 biotinylated goat anti-mouse IgA를 처리한 다음, peroxidase-conjugated streptavidin (Jackson Immuno Research laboratories, West Grove, PA)을 이용하여 측정하였다.

다. 사이토카인 생산 profile

자극된 림프구로부터 생산된 cytokine(IL-2, IL-4 및 IFN- γ)의 양은 배양 상층액을 모아 ELISA방법에 의하여 측정하였다. 각 실험군에서 3마리씩 선발하여 비장을 적출하고 세포를 분리하였다. UV-light로 불활화 시킨 오제스키 단백질 항원으로 3시간 동안 자극시킨 항원제시세포(antigen-presenting cell, APC)를

준비하여 분리한 비장세포와 혼합하여 3일간 배양하였다. 양성 대조군에는 concanavalin A($5 \mu\text{g/ml}$)을 처리하여 준비하였다. ELISA plate는 anti-mouse IL-2, IL-4 및 IFN- γ 항체로 처리하고 4°C 에서 하룻밤 방치하여 코팅하였다. ELISA plate를 PBST로 3회 세척하고 3% 탈지유로 2시간 정도 블로킹 한 후, 다시 PBST로 3회 세척하여 배양 상층액과 standard cytokine protein을 처리하고 2시간 동안 37°C 에서 배양하였다. ELISA plate를 다시 PBST로 3회 세척하고 biotinylated anti-mouse IL-2, IL-4 및 IFN- γ 항체를 처리한 다음 37°C 에서 2시간 배양한 후, peroxidase-conjugated streptavidin를 넣고 1시간 더 배양한 후 기질용액을 이용하여 발색 시켰다. 각 well의 흡광도는 ELISA reader (Molecular Device, USA)로 405 nm에서 측정하였고 Softmax program을 이용하여 세포에서 생산된 cytokine IL-2, IL-4 및 IFN- γ 의 양을 계산하였다.

라. 오제스키 바이러스 공격시험

서로 다른 세 가지 형태의 백신을 비강 접종 또는 근육 내 접종 후 14일째에 모든 군에 avertin을 복강 내 주입하여 전신 마취시킨 후 병원성 오제스키바이러스 10LD_{50} 를 비강 접종하였다. 감염용량을 결정하기 위한 병원성 오제스키바이러스의 lethal dose(LD_{50})의 측정은 병원성 오제스키바이러스를 농도별 (10^1 - 10^6 pfu)로 비강 접종 및 근육 내 접종한 후 각 접종 용량별 실험군의 생존여부를 접종 후 11일 까지 관찰하여 결정하였다.

마. 실험동물 뇌 조직 분리

병원성 오제스키바이러스를 비강으로 감염시킨 28일 후에 각 실험군에서 생존한 실험동물을 희생시켜 뇌 조직을 분리하여 DNA를 추출하였다. 과량의 CO_2 로 질식사 시킨 실험동물의 두피를 제거하고 핀셋을 이용하여 두개골을 절개한 후 전뇌를 회수하였다. 회수한 뇌 조직 일부를 DNazol(MRC, London, UK)을 이용하여 지시되어 있는 방법에 따라 total DNA를 추출하였고 GeneQuant RNA/DNACalculator(Biochem, Cambridge, UK)를 이용하여 $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 으로 정량하여 실험에 사용하였다.

바. Thymidine kinase 유전자 검출 실시간중합효소연쇄반응

서로 다른 세 가지 형태의 백신을 비강 접종 또는 근육 내 접종 하여 면역화 시킨 후 2주일 후 병원성 오제스키바이러스로 감염시키고 각 실험군에서 28일까지 생존하여 남은 실험동물의 뇌를 회수하여 잠복 감염되어 있는 병원성 오제스키바이러스의 양을 알아보기 위하여 오제스키바이러스 thymidine kinase gene(AF 199413)을 대상으로 Primer Express (Applied Biosystems, USA) 프로그램을 이용하여 primer와 probe를 제작하였다. 증폭 산물의 특이성을 위하여 실험동물의 thymidine kinase gene과 비교하여(NCBI blast alignment) 중복되지 않는 염기서열부분을 이용하였다. 본 연구에 이용된 primer의 염기서열은 sense 5' TCT GTT CGA CAC GGA CAC 3'(18 mer, 135-148), antisense 5' GGT CAA AGA CGA CCG TCA 3'(18 mer, 323-341)이다. TaqMan probe의 염기서열은 5' CCC GGA AGC AGA ACG GCA GCC TGA GCG 3'로 5' 말단에 reporter dye 6-carboxy-fluorescein (FAM)과 3' 말단에 quencher dye 6-carboxytetramethyl-rodamine (TAMRA)가 표지되어 있다. 실시간중합효소연쇄반응은 iCycler iQ Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 실시하였다. 반응시약으로는 TaqMan PCR Master Mix를 사용하였다. TaqMan PCR 반응액(총 50 μ l)은 2 \times TaqMan PCR Master Mix 25 μ l, sense와 antisense primer 각각 10 μ l(900 nM) 씩, 형광물질이 표지된 probe 5 μ l(250 nM)와 주형 DNA 10 μ l(1 μ g)를 섞어 사용하였다. 반응은 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 pre-incubation, 95 $^{\circ}$ C에서 15초간 denaturation, 60 $^{\circ}$ C에서 5초간 annealing 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 10초간 amplification하여 60 cycle 반복하였다. 증폭 결과는 iCycler iQ software(Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 오제스키바이러스 thymidine kinase 유전자가 발견되는 플라스미드 DNA를 이용하여 만든 표준곡선에 대비시켜 정량하였다.

사. 수동 면역화에 의한 잠복 감염 분석

비병원성 오제스키 바이러스를 10^6 pfu를 PBS 100 μ l에 희석하여 실험동물의 뒷다리 종아리 근육에 접종하였다. 일주일 간격으로 3회 접종한 후 2주일 후에 안와정맥에서 채혈을 하여 오제스키 바이러스 특이 항체를 준비하였고, 비장에서 T cell을 분리하여 준비하였다. 준비된 혈청 250 μ g과 비장분리 T 세포 1×10^7 을 각 실험군별로 5마리씩 정맥으로 주입하여 수동면역을 시켰다. 대조군

은 PBS를 주입하였다. 수동 면역시킨 다음날 비병원성 오제스키 바이러스를 10^5 PFU의 농도로 PBS 20 μ l에 희석하여 실험 동물의 비강내로 감염시켰다. 감염시킨 28일 후에 실험 동물을 희생하여 뇌조직을 분리하였다. 분리된 뇌조직의 total DNA를 분리한 후 real-time PCR을 수행하여 수동면역이 잠복감염에 미치는 영향을 분석하였다.

8. 잠복 감염 재 활성화 모델 확립과 백신 투여와의 상관관계 분석

가. 오제스키 항혈청 준비

잠복 감염 재 활성화 실험을 위한 항혈청은 rabbit polyclonal antiserum을 준비하여 사용하였다. 약독화 오제스키 바이러스를 PK-15 세포주에 감염시켜 세포 변성이 확인되면 세포와 상층액을 회수하여 12,000 rpm에서 1시간 동안 고속원심분리한 후 freezing-thaw 방법으로 얻은 바이러스 농축액을 0.5% Triton X-100(Sigma, USA)-PBS으로 처리하여 오제스키 단백질 항원을 만들었다. BCA Protein Assay reagent kit (Pierce Biotechnology Inc, IL, USA)를 이용하여 지시된 방법에 따라 단백질 농도를 측정하여 준비하였다. 준비된 단백질 항원과 Complete Freund's adjuvants(CFA)를 동량으로 섞어 총 단백질 항원 500 μ g을 토끼의 등 쪽 피하 여러 군데로 나누어 주입하였다. 일주일 간격으로 3회 주입하였으며, 마지막 주입 일주일 후 귀정맥을 통하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 37 $^{\circ}$ C incubator에 30분간 방치 후 12,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 혈액 응고를 제거하였다. ELISA를 이용하여 항체가를 측정하였다.

나. 잠복 감염의 확립

Rabbit polyclonal antiserum의 주입 농도와 경로에 따라 오제스키 바이러스 감염에 대한 감수성과 잠복감염 성립을 알아보기 위하여 혈청의 항체 수치를 250 μ g/ml 으로 맞춘 후, 혈청을 undilute, 1: 2, 1: 4, 1: 8로 2배씩 계단 희석하였다. 복강으로 250 μ l씩 주입을 한 30분 후, 병원성 오제스키 바이러스를 100LD₅₀를 비강과 복강으로 각각 감염시켰다. 감염 10일 후 까지 관찰하였다.

다. Dexamethasone투여에 의한 재 활성화 유도

병원성 오제스키 바이러스를 감염시킨 28일 후, dexamethasone 0.5mg을 sesame oil 200 μ l에 희석하여 3일간 연속 주입하고, 처음 주입한 6일 후에 마우

스를 희생하여 비강 삼출물과 trigeminal ganglion을 회수하였다.

라. 비강 분비물 및 trigeminal ganglion 분리

Dexamethasone 투여로 바이러스의 재 활성을 유도한 후, 마우스를 이산화탄소 가스로 질식사시켜 희생시킨 후, 비강 삼출물과 trigeminal ganglion(TG) 조직을 회수하여 실험에 사용하였다. 비강 삼출물은 마우스의 코를 가위로 잘라 비강을 크게 노출시킨 후, 멸균된 PBS 100 μ l을 한쪽 비강에 주입하여 다른 쪽 비강과 구강내로 나온 PBS를 다시 회수 하였다. TG은 마우스의 두피 쪽 피부를 분리하고 두개골을 분리하여 뇌를 노출시킨 후, TG을 회수하여 PBS 100 μ l에 넣고, 분쇄기를 이용하여 분쇄하였다. 0.25% trypsin을 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 원심분리하여 침전물을 PBS로 2회 세척하였다.

마. Nested PCR에 의한 바이러스 검출

각 개체별로 채취한 trigeminal ganglia를 DNAzol(MRC, USA)을 이용하여 지시되어 있는 방법에 따라 total DNA를 추출하였고 RNase A(200 μ g/ml)로 처리한 후, 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1)로 1회 추출하고 chloroform으로 1회 추출한다. 1/10 volume의 3M sodium acetate 와 2 volume의 EtOH을 첨가하여 -20°C에서 1시간 이상 방치한 후, 12,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 DNA를 침전시킨 후 air dry하여 8mM NaOH로 용해하여 -20°C에 냉동 보관하여 사용하였다. 조직 DNA 함량은 GeneQuant로 측정된 후 각 조직 DNA양을 일정하게 희석하여 실험에 사용하였다. ADV의 latent state는 nested-PCR에 의하여 확인하였다. 사용된 PCR primer는 gII(gB), gI(gE) gene 증폭을 이용하였고 사용된 primer는 다음과 같다.

First round:

gB(gII) gene (334 bp product)

sense : ATG GGC ATC TCG CGG TGC (18 mer)

antisense : ACT CGC GGT CCT CCA GCA (18 mer)

gE(gI) gene (377 bp rproduct)

sense : TCG TGA TGA CGT GCG TCG TCG (21 mer)

antisense : GGG TCC ATT CGT CAC TTC CGG (21 mer)

Second round:

gB(gII) gene (195 bp product)

sense : ACG GCA CCG GCG TGA TC (17 mer)

antisense : GGT TCA GGG TCA CCC GC (17 mer)

gE(gI) gene (211 bp product)

sense : CCC ACG CAC GAG GAC TAC TAC (21 mer)

antisense : CGC GGA ACC AGT CGT CGA AGC (21 mer)

PCR cycler(Perkin Elmer GeneAmp PCRsystem 9600)를 이용하여 반응을 실시하였고, 반응 조건은 nuclease-free water 10.25 μ l에 2.5 μ l의 10 \times reaction buffer, 0.5 μ l의 10mM dNTPs, 1.5 μ l의 25mM MgCl₂, 각각 2.5 μ l(1 μ M) sense primer와 antisense primer, template DNA 5 μ l와 Taq DNA polymerase 0.25 μ l(5U/ μ l)를 섞어 total volume 25 μ l의 반응액을 96 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 62 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 polymerization 반응을 5 cycle 실시하고, 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 62 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 polymerization 반응을 30 cycle 실시하였다. 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치하여 polymerization 반응을 종료하고, 생산된 PCR 산물중 5 μ l를 second round PCR 반응의 template로 사용하였다. Second round PCR 반응조건은 first round와 같으며 PCR 산물은 1.85% agarose gel(Invitrogen, USA)에 전기 영동한 후, ethidium bromide 용액에 염색하고 흐르는 물에 수세하여 탈색한 후, gel documentation (VILBER LOURMAT)상에서 관찰하였다.

바. 실험관내 오제스키 재활성

비강 삼출물과 TG explants를 PK-15 세포 주에 감염시켜 CPE를 관찰하였다. 재 활성을 돕기 위하여 acetylcholine을 0.1 mM을 첨가한 실험 군과 첨가하지 않은 실험 군으로 나누어 배양하였으며, 배양 5일 후부터 CPE를 관찰하였으며 배양 7일이후 상층액과 세포를 분리하여 새로운 PK-15 세포 주에 계대하였다. 3번의 blind passage 후 CPE를 관찰하여 결과를 산출하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 분자생물학적 역학조사

가. Nested PCR 산물의 특이성 검사 결과

Nested PCR에 사용된 primer의 특이성을 검증하기 위하여 PCR 최종산물을 제한효소로 처리한 후 단편을 분석함으로써 확인하였다. 오제스키 glycoprotein gB, gE와 gG 유전자를 대상으로 하여 작성한 primer를 이용하여 실시한 nested PCR의 각각의 최종산물을 제한효소 Hae III(New England Biolab Inc, Beverly, MA, USA)로 처리하여 확인한 결과, gB 유전자의 최종산물(195 bp)은 173 bp와 22 bp로 2개의 분절이 확인되었다. gE 유전자의 최종산물(211 bp)은 109 bp, 66 bp와 36 bp로 3개의 분절이 확인되었으며, gG 유전자의 최종산물(168 bp)은 112 bp와 22 bp로 2개의 분절이 확인되었다. PCR 최종 산물의 이와 같은 제한 효소 절단 경향은 GeneBank의 염기서열 데이터와 일치하는 것으로 본 실험에 사용한 primer를 이용하여 실시한 nested PCR 산물이 우리가 목표로 하고자 하는 오제스키 glycoprotein 유전자를 선별적으로 증폭시킴을 확인하였다 (Fig. 2-2).

나. 혈청 양성돈에서의 잠복 감염조사

혈청 검사에서 양성을 나타낸 돼지의 뇌 조직에서 바이러스의 잠복 감염 정도를 알아보기 위하여 부위별로 분리하여 채취한 뇌 조직 DNA를 nested PCR을 이용하여 실험하였으며 각 조직 - 뇌간, 후구, 삼차신경절- 에 따른 결과와 각 target 유전자 - PrV glycoprotein gB, gE 와 gG -에 따른 결과가 다양함을 확인할 수 있었다 (Fig. 2-3 and Table 2-3-5).

오제스키 glycoprotein gB 유전자를 목표로 하여 nested PCR 을 실시한 결과, 94개의 뇌간 샘플 중에서는 54개의 샘플에서 195 bp 크기의 산물이 확인되어 57.4%의 뇌 조직에서의 잠복감염이 확인되었으며, 후구에서는 93개의 샘플 중에서 58개, 삼차신경절에서는 94개의 샘플 중에서 42개의 샘플에서 검출 하고자 하는 위치에서 PCR 산물이 확인되어 각각 62.4%와 44.6%의 잠복감염이 확인되었다. 각 조직별로 양성 반응을 나타내는 정도는 후구, 뇌간, 삼차신경절 순

서로 나타났다 (Table 2-3). Glycoprotein gE 유전자를 목표로 하여 nested PCR을 실시한 결과, 94개의 뇌간 샘플 중에서는 22개의 샘플에서 211 bp의 PCR 산물이 확인되어 23.4%, 후구에서는 93개의 샘플 중에서 25개, 삼차신경절에서는 94개의 샘플 중에서 32개의 샘플에서 검출하고자 하는 위치에서 PCR 산물이 확인되어 각각 26.9%와 34%의 잠복감염이 확인되었다. 각 조직별로 양성 반응을 나타내는 정도는 삼차신경절, 후구, 뇌간 순서이었다 (Table 2-4).

또한, glycoprotein gG 유전자를 목표로 하여 nested PCR 을 실시한 결과, 94개의 뇌간 샘플 중에서는 69개의 샘플에서 168 bp의 PCR 산물이 확인되어 73.4%, 후구에서는 93개의 샘플 중에서 66개, 삼차신경절에서는 94개의 샘플 중에서 22개의 샘플에서 검출 하고자 하는 위치에서 PCR 산물이 확인되어 각각 70.9%와 55.3%의 잠복감염이 확인되었다. 각 조직별로 양성 반응을 나타내는 정도는 뇌간, 후구, 삼차신경절 순서로 나타났다 (Table 2-5).

이와 같이 각각의 다른 glycoprotein 유전자를 대상으로 nested PCR을 실시한 바, 각기 유전자에 따라 서로 다른 잠복감염 정도의 순서를 나타내어 조직에 따른 잠복감염 정도의 차이 또는 일정한 경향을 발견하지는 못하였다. 하지만, 뇌 조직의 부위에 따른 종류에는 상관없이 각기 유전자별로는 잠복감염 정도의 검출에 차이를 나타내었는데, gB 유전자를 목표로 한 경우에는 뇌조직의 부위에 상관없이 한 개의 뇌 조직 부위에서라도 양성을 나타내는 샘플은 94개의 샘플 중 84개로 89% 정도로 검출되었고, gG 유전자의 경우에는 85개의 샘플이 양성을 나타내어 91.4% 정도로 높은 검출정도를 나타내었다. 반면에 gE 유전자를 목표로 한 경우에는 45개의 샘플이 양성을 나타내어 47.8%에서 검출되어 gB 유전자와 gG 유전자를 목표로 하여 nested PCR을 실시한 경우보다는 낮게 검출되었다. Glycoprotein gB, gE 와 gG 유전자에 대하여 조직에 관계없이 양성을 나타낸 개체의 수는 94개의 샘플 중 90개로 95.7%의 잠복 감염된 바이러스를 검출할 수 있었다.

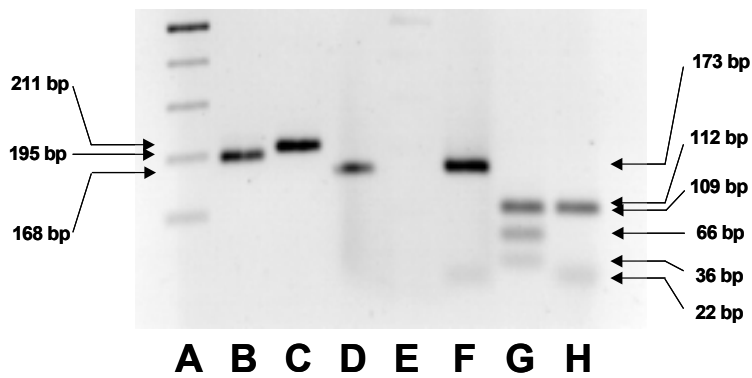


Fig. 2-2. Amplified products of the nested PCR targeted to three PrV genes (gB, gE, and gG) and the digested pattern of the PCR products for testing the specificity of the primers. A, size marker (100 bp DNA ladder) B, 195 bp product of gB gene C, 211 bp product of gE gene D, 168 bp product of gG gene E, negative control; F, Hae III restriction of gB-targeted PCR product (173 and 22 bp); G, Hae III restriction of gE-targeted PCR product (109, 66 and 36 bp); H, Hae III restriction of gG-targeted PCR product (112 and 22 bp). The relative positions in the gel of predicted size are indicated by arrowheads on both sides.

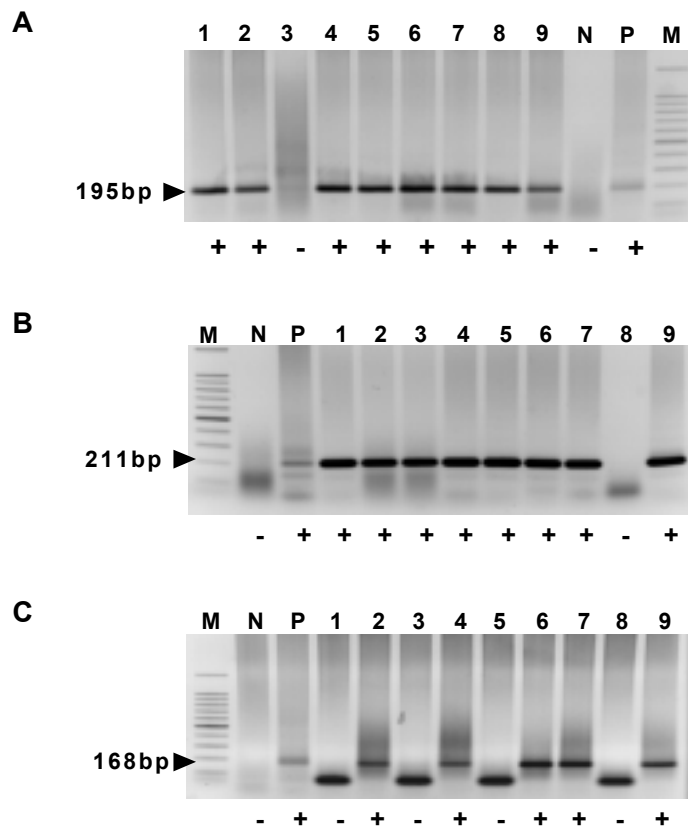


Fig. 2-3. Nested-PCR product of ADV (A) gB, (B) gE, and (C) gG gene for molecular epidemiological survey of latent PrV infection in nervous tissues of sero-positive pigs. M; size marker, N; negative control, P; positive control(PrV DNA), 1-9; observed examples.

Table 2-3. Prevalence of latent PrV infection determined by nested-PCR of gB gene in nervous tissues.

Nervous tissues	No. of positive results /No. of tested pigs	Percentage of positive result(%)
BS	54/94	57.4
OB	58/93	62.4
TG	42/94	44.6

BS; brain stem, OB; olfactory bulb, TG; trigeminal ganglion

Table 2-4. Prevalence of latent PrV infection determined by nested-PCR of gE gene in nervous tissues.

Nervous tissues	No. of positive results /No. of tested pigs	Percentage of positive result(%)
BS	22/94	23.4
OB	25/93	26.9
TG	32/94	34.0

BS; brain stem, OB; olfactory bulb, TG; trigeminal ganglion

Table 2-5. Prevalence of latent PrV infection determined by nested-PCR of gG gene in nervous tissues.

Nervous tissue	No. of positive results /No. of tested pigs	Percentage of positive result(%)
BS	69/94	73.4
OB	66/93	70.9
TG	52/94	55.3

BS; brain stem, OB; olfactory bulb, TG; trigeminal ganglion

다. 실시간중합연쇄반응 확립

Nested PCR에서 양성 결과를 나타낸 뇌 조직 샘플 중에서 잠복감염 상태로 남아있는 바이러스의 양을 측정하기 위하여 gB 유전자와 gE 유전자를 대상으로 실시간중합효소연쇄반응을 수행하였다. gB 또는 gE 유전자가 클로닝 된 플라스미드 DNA를 표준 DNA로 이용하여 표준곡선을 만들어 잠복 감염된 바이러스의 copy 수를 계산하는데 표준 DNA로 이용하였다 (Fig. 2-4 and Fig 2-5). 2가지의 표준 DNA를 대상으로 검출한 결과 10^2 - 10^8 copy 범위에서 증폭 cycle 수와 copy 수와 비례관계에 있음을 알 수 있었다. Nested PCR에서 양성으로 검출된 각각의 뇌 조직 DNA를 대상으로 하여 실시간중합효소연쇄반응을 실시한 결과 genomic DNA 1 μ g 당 $10^{0.5}$ 에서 $10^{7.1}$ copy 까지 검출되었다.

라. 혈청 양성돈에서의 잠복 감염 오제스키바이러스 정량 분석

gB 유전자 대상의 primer와 probe를 이용하여 실시간중합효소연쇄반응을 실시한 결과 BS에서는 54개의 조직 중에서 36개(66.7%)에서 결과를 얻을 수 있었다. OB에서는 58개의 조직 중에서 34개(58.6%)에서, TG의 경우에는 42개의 조직 중에서 21개(50%)에서 검출할 수 있는 threshold line 이상의 형광물질 (reporter dye)을 검출하여 copy 수를 정량 할 수 있었다 (Fig. 2-6). Genomic DNA 1 μ g당 검출된 범위는 최소는 $10^{0.5}$ 에서 최대 $10^{5.5}$ 까지 정량 할 수 있었다.

gE 유전자를 대상으로 하여 뇌 조직에서 잠복 감염 바이러스를 정량한 결과 최소 $10^{7.1}$ 에서 최대 $10^{2.8}$ 까지 검출되어 gB 유전자를 대상으로 한 것보다 좀 더 많은 바이러스의 양을 정량 할 수 있었으며, 표준곡선에서와 마찬가지로 민감도는 좀 더 낮게 나타남을 확인 할 수 있었다 (Fig. 2-7).

마. 무작위 추출 돼지에서의 오제스키 잠복감염 조사

1) Nested PCR결과

(주) 목우촌 도축작업장에서 무작위 선택된 총 40 돈두를 대상으로 오제스키 바이러스의 잠복 감염 상태를 nested PCR에 의하여 조사하였다. gB 유전자를 대상으로 하여 nested PCR를 실시한 결과 BS는 총 돈두 40중 38개가 양성으로 나타나 95%의 양성률을 나타내었으며 OB는 37 돈두가 양성으로 나타나 92.5%, TG는 39개중 19개가 양성으로 47.5% 검출률로 세 개의 조직 중 가장 낮은 검출률을 나타내었다 (Table 2-6). 한편, gE 유전자를 대상으로 수행된 nested PCR은 BS의 경우 총 40개중 16개(40%), OB는 40개중 13개(32.5%), TG는 수행된 조직중 24개(60%)의 검출률을 보여주었다 (Table 2-7). 반면에, gG 유전자를 대상으로 실시된 nested PCR의 결과는 BS 40중 9 (22.5%), OB 5(12.5%), TG 10(25%)의 검출률을 보여주었다 (Table 2-8). 따라서, gB 유전자를 대상으로 실시된 nested PCR이 가장 높은 검출율을 보여주었고 대부분의 돼지에서 하나 이상의 조직에서 보여 현재 사육중인 많은 돼지에도 오제스키바이러스가 잠복 감염되어 있는 것으로 보여 진다.

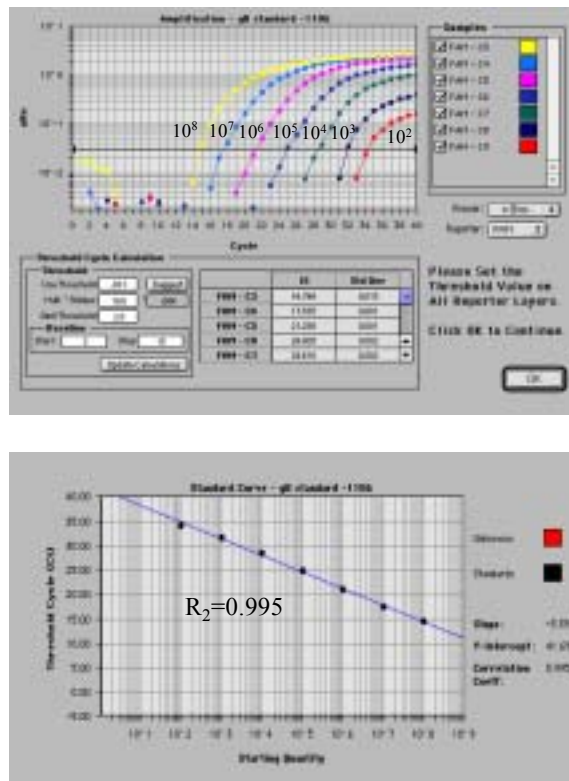


Fig. 2-4. Amplification and standard curve of the real-time PCR specific for gB gene (A) of pseudorabies virus. The left panel demonstrates the amplification curve and the right panel is showing the standard curve. The horizontal bars in left panel indicate the threshold line. The horizontal axis of left panel and vertical axis of right panel represent cycle number and the vertical axis of left panel indicates monitored fluorescence. The horizontal axis of right panel indicates estimated copy number when the fluorescence reached threshold line. The amplification was linear in the range of 10^2 - 10^8 (correlation coefficient = 0.995 for gB gene)

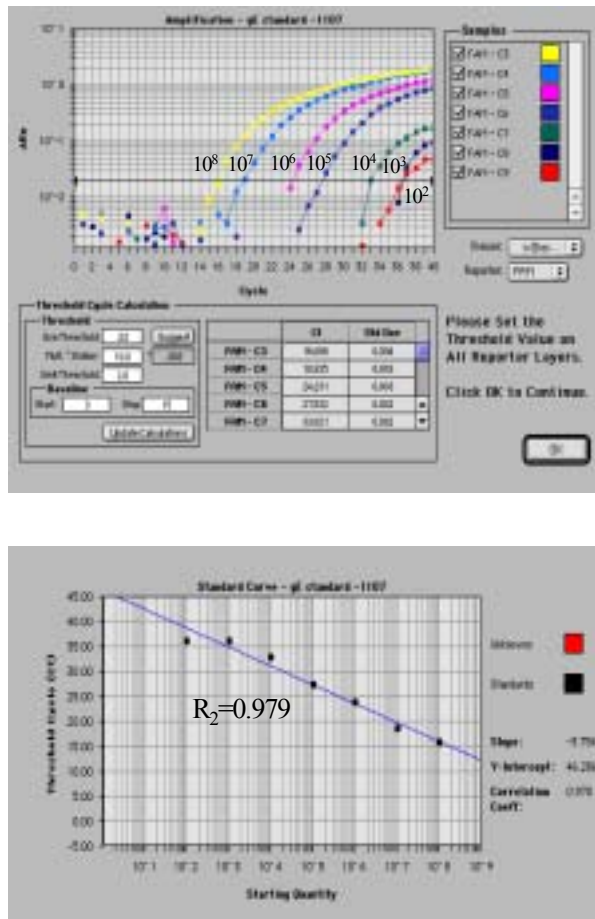


Fig. 2-5. Amplification and standard curve of the real-time PCR specific for gE gene (B) of pseudorabies virus. The left panel demonstrates the amplification curve and the bottom panel is showing the standard curve. The horizontal bars in left panel indicate the threshold line. The horizontal axis of left panel and vertical axis of right panel represent cycle number and the vertical axis of left panel indicates monitored fluorescence. The horizontal axis of right panel indicates estimated copy number when the fluorescence reached threshold line. The amplification was linear in the range of 10^2 - 10^8 (correlation coefficient = 0.979 for gE gene).

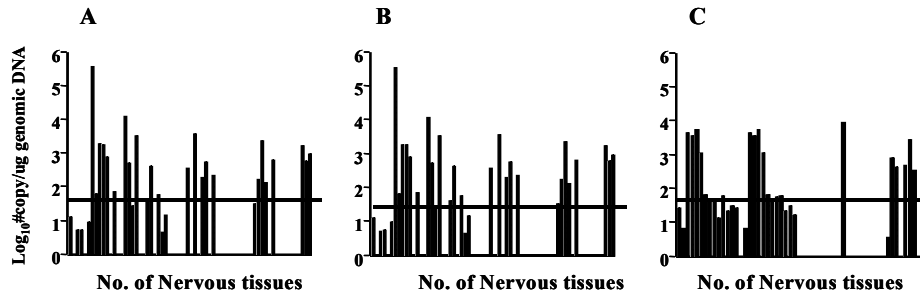


Fig. 2-6. The quantity of latent PrV DNA in nervous tissues of pigs determined by real-time PCR. Real-time PCR was performed by using primers and probe specific for PrV gB in BS (A), OB (B), and TG (C) tissues. The individual bar represents the copy number of target gene per one microgram of genomic DNA in each nervous tissue. The horizontal bar in each graph reveals the average copy number in each of the corresponding tissue (A: $10^{1.50}$, B: $10^{1.17}$, C: $10^{1.33}$).

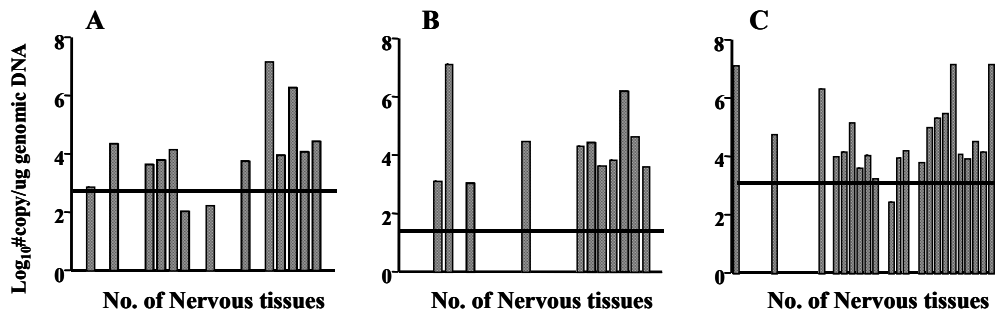


Fig. 2-7. The quantity of latent PrV DNA in nervous tissues of pigs determined by real-time PCR. Real-time PCR was performed by using primers and probe specific for PrV gE in BS (A), OB (B), and TG (C) tissues. The individual bar represents the copy number of target gene per one microgram of genomic DNA in each nervous tissue. The horizontal bar in each graph reveals the average copy number in each of the corresponding tissue (A: $10^{2.51}$, B: $10^{1.91}$, C: $10^{3.13}$).

Table 2-6. Prevalence of latent PrV infection determined by nested-PCR of gB gene in nervous tissues of randomly selected pigs.

Nervous tissues	No. of positive results /No. of tested pigs	Percentage of positive result(%)
BS	38/40	95.0
OB	37/40	92.5
TG	19/39	47.5

BS; brain stem, OB; olfactory bulb, TG; trigeminal ganglion

Table 2-7. Prevalence of latent PrV infection determined by nested-PCR of gE gene in nervous tissues of randomly selected pigs.

Nervous tissues	No. of positive results /No. of tested pigs	Percentage of positive result(%)
BS	16/40	40.0
OB	13/40	32.5
TG	24/40	60.0

BS; brain stem, OB; olfactory bulb, TG; trigeminal ganglion

Table 2-8. Prevalence of latent PrV infection determined by nested-PCR of gG gene in nervous tissues of randomly selected pigs..

Nervous tissue	No. of positive results /No. of tested pigs	Percentage of positive result(%)
BS	9/40	22.5
OB	5/40	12.5
TG	10/40	25.0

BS; brain stem, OB; olfactory bulb, TG; trigeminal ganglion

2) 실시간중합연쇄반응 결과

무작위 추출된 돼지의 신경조직에 존재하는 잠복 감염 오제스키바이러스의 양을 측정하기 위해 실시간중합연쇄반응을 gB 유전자와 gE 유전자를 대상으로 실시하였다. 잠복 감염 오제스키바이러스는 뇌 조직 DNA 1 μg 당 $10^{0.1}$ 에서 $10^{7.2}$ ($1-1.58 \times 10^7$) copy를 보여 주었다. gB 유전자를 대상으로 실시된 실시간중합연쇄반응 결과는 총 40개중 모든 BS에서 잠복 감염 오제스키 바이러스가 검출되었고, 평균적으로 $10^{3.8}$ copy로 나타났다. OB는 추출된 샘플중 27(67%)로 평균 $10^{2.3}$ copy, TG는 26 샘플(74%)이 검출되었으며 $10^{2.6}$ copy보여 주었다 (Fig. 2-8). 한편, gE 유전자를 대상으로 실시된 실시간중합연쇄반응 결과는 gB 유전자와 같이 모든 BS가 양성으로 검출되었고 평균 $10^{5.9}$ copy를 보여 주었다. 그리고 OB는 37개(92%)가 검출로 평균 $10^{4.6}$ copy, TG는 35 샘플 중 30개(85%)가 검출되어 평균 $10^{5.0}$ copy로 나타났다 (Fig. 2-9). 이와 같은 결과는 nested PCR의 결과보다 검출률이 높게 나타난 것으로 거의 모든 돼지들이 오제스키바이러스에 잠복 감염 되어 있음을 의미한다.

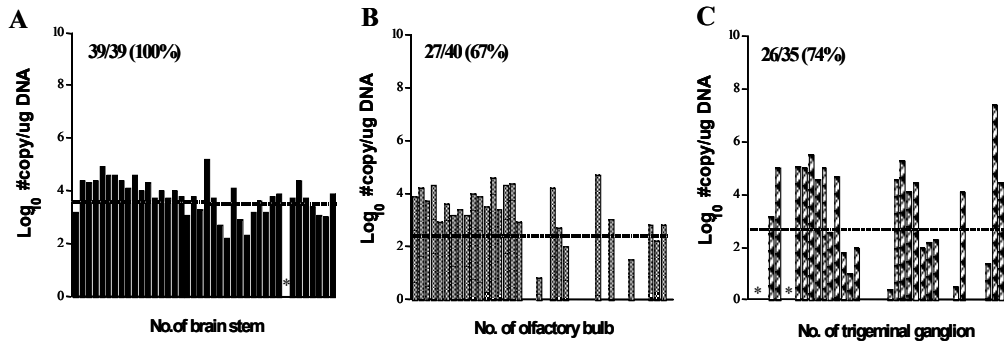


Fig. 2-8. The quantity of latent PrV DNA in the nervous tissues of randomly selected pigs according to real-time PCR. Real-time PCR was performed using the primers and probes specific to the PrV gB genes in BS (A), OB (B), and TG (C) tissues. The individual bar represents the copy number of the target gene per one microgram of genomic DNA in each nervous tissue. The horizontal line in each graph denotes the average copy number in corresponding tissue (A: $10^{3.8}$, B: $10^{2.3}$, C: $10^{2.6}$). The values in the bar charts represent the No. of samples showing the accumulated fluorescence of the reporter dye above threshold line /No. of total tested samples (percentage). *Not determined.

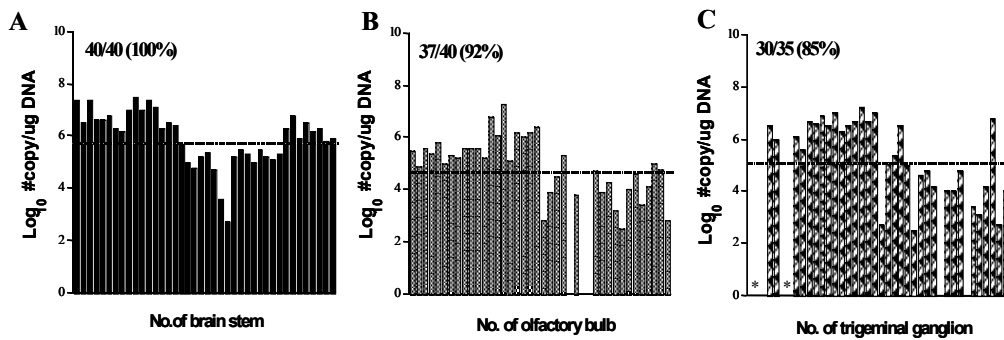


Fig. 2-9. The quantity of latent PrV DNA in the nervous tissues of randomly selected pigs according to real-time PCR. Real-time PCR was performed using the primers and probes specific to the PrV gE genes in BS (A), OB (B), and TG (C) tissues. The individual bar represents the copy number of the target gene per one microgram of genomic DNA in each nervous tissue. The horizontal line in each graph denotesthe average copy number in corresponding tissue (A: $10^{5.9}$, B: $10^{4.6}$, C: $10^{5.0}$). The values in the bar charts represent the No. of samples showing the accumulated fluorescence of the reporter dye above threshold line /No. of total tested samples (percentage).
*Not determined.

2. 실험적으로 오제스키바이러스에 감염된 돼지에서의 잠복상태와 지속감염조사

오제스키 바이러스가 감염되면 어느 조직에서 잠복 감염 상태를 유지하여, 감염 경로를 추적하기 위해 8-9주령 자돈 6마리를 두 군으로 나누어 A군 3마리 (A1, A2, A3)는 2×10^4 pfu, B군 (B1, B2, B3)은 2×10^2 pfu를 비강으로 감염 시킨 후, 일정한 기간별로 채혈하고 체온 및 기타 임상 증상 등을 관찰 하였으며,

감염 후 56일째 6마리 돼지를 안락사 시켜 뇌 조직 중 OB, TG 및 BS를 채취하여 오제스키의 잠복 상태를 nested PCR로 살펴보았다.

가. 임상증상과 부검소견

감염 초기에는 약간의 미열과 식욕부진, 침울, 다량의 유연 증상을 보였다. 감염의 시간이 경과 할수록 체중의 소실이 현저하게 나타났으며 공통적으로 기침, 호흡곤란, 콧물 등 호흡기 증상을 보였다. A3는 감염 초기에 호흡기 증상이 심하였으며 세균성 감염이 복합적으로 이루어져 경부에 종창되어 있는 조직이 생겨났고, A1과 B3는 구토, 설사 등 소화기 증상을 보이며 피부에 발진 현상을 나타내었다. 감염 중반기(15-26일째)에는 어느 정도 안정기를 보이며 다시 식욕을 되찾은 듯이 보였으나 55일째 B3는 전지를 뺀고, 후지의 진진, 경련을 보이며 파행이 심하였으며, 그 다음날 횡와 현상과 함께 혼수상태가 되어 폐사하였다. 살아남은 개체는 56일째 채혈한 후 안락사 시켜 부검하였다. 흉곽을 열었을 때 전복 측의 대부분의 엽에서 심한 충혈, 출혈과 황색 체액이 축적되어 있고 섬유소의 다량 사출로 짙은 적색 빛을 보였다. 흉막 표면에 섬유소의 침착으로 폐가 잘 분리되지 않았다.

나. PBMC에서의 오제스키 바이러스 DNA 검출

오제스키를 실험돼지에 감염시킨 후 0, 2, 5, 7, 9, 12, 15, 20, 26, 36, 47, 56일째 채혈하여 PBMC와 혈장을 각각 분리하고 PBMC내의 오제스키 표적 유전자를 nested PCR로 확인하였다. 그 결과 gB 유전자를 표적유전자로 하여 nested PCR을 수행한 결과 감염 후 2일째부터 검출되기 시작하였으며, B2와 B3를 제외한 나머지 4마리는 모두 56일째까지 PBMC에서 gB 유전자가 지속적으로 검출되었다. 그러나 gE 유전자를 표적 유전자로 하면 gB 유전자보다 민감도에서 떨어지는 경향을 보여 감염 후 5-7일 이후에 PBMC에서 검출되었고 대부분의 경우 20일 이후에는 PBMC로부터 검출이 되지 않았다. 그리고 gG 유전자는 gB 유전자와 마찬가지로 일부 돼지에서 감염 후 2일째부터 검출되는 경우가 있었으며 A1, A2 및 B2는 56일째에도 검출되었다 (Table 2-9). 또한, 분리된 혈장과 PBMC로부터 PK-15세포를 이용하여 바이러스 분리를 시도한 결과 모두 검출되지 않았다 (Table 2-9).

다. 뇌 조직에서의 오제스키 잠복 감염 조사

감염 후 56일째 돼지를 안락사시키고 뇌조직 BS, OB 및 TG를 채취하여 DNA를 추출한 후 nested PCR를 이용하여 오제스키의 잠복 감염을 추적한 결과, gB 유전자는 모든 조직에서 검출되었으며 gE 유전자는 A2의 TG, A3의 OB, B1의 OB 및 B3의 OB를 제외한 다른 모든 조직에서 gE 유전자가 검출되었다 (Fig. 2-10). 또한, gG 유전자는 B1의 OB를 제외한 모든 조직에서 검출되었으며 감염된 오제스키 바이러스는 세 개의 신경 조직, BS, OB 및 TG내로 들어가 잠복 감염을 확립하는 것으로 확인되었다.

라. 오제스키 항체 측정

오제스키 감염 후 채취한 혈장내의 오제스키 항체 수준을 측정한 결과, A1, B1 및 B2가 다른 돼지에 비하여 높은 수준을 보여주었으나 나머지 돼지는 항체 반응의 수준이 약하게 나타났다. 그러나, 오제스키 바이러스의 잠복 감염 확립과 항체 수준은 상관성이 없는 것으로 나타났다 (Fig. 2-11).

3. 수종의 백신과 투여 경로에 따른 오제스키바이러스에 대한 면역반응과 잠복감염과의 상관관계 분석

가. 오제스키바이러스의 50% lethal dose (LD₅₀) 측정

오제스키바이러스를 농도별로 비강 접종 및 근육 내 접종한 후 각 농도별 실험군의 마우스 생존여부를 접종 후 11일 까지 관찰하여 50% lethal dose를 결정하였다 (Table 2-10). 비강으로 접종한 경우 10³ 에서 10⁶ pfu까지 폐사에 이르는 속도는 달랐으나 접종 후 11일 까지 접종 마우스 모두가 폐사하여 생존율 0%를 나타내었고, 10² pfu를 접종한 경우에는 5마리 중 2마리가 폐사하여 60%의 생존율을 나타내었고, 10¹ pfu를 접종한 경우에는 6마리 모두 생존하여 100%의 생존율을 나타내었다. 근육내 접종한 경우에는 10² pfu를 접종한 경우에 7마리 중 2마리가 폐사하여 71%의 생존율을 나타내었고, 10³ pfu를 접종한 경우에는 7마리 중 5마리가 폐사하여 14%의 생존율을 나타내었다. 따라서 Reed and Muench 방식에 의하여 LD₅₀을 계산한 결과 비강 투여는 10^{-1.17}이었고, 근육주사

는 $10^{-2.37}$ 로 나타났다 (Table 2-10).

Table 2-9. Isolation and detection of pseudorabies virus from PBMC and plasma

		Post-infection (Days)											
		0	2	5	7	9	12	15	20	26	36	47	56
Pig A1													
virus isolation from	PBMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Plasma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Detection of viral DNA in PBMC	gB	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+
	gE	-	-	+	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-
	gG	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
Pig A2													
virus isolation from	PBMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Plasma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Detection of viral DNA in PBMC	gB	-	+/-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
	gE	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	gG	-	+/-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
Pig A3													
virus isolation from	PBMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Plasma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Detection of viral DNA in PBMC	gB	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	gE	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	gG	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Pig B1													
virus isolation from	PBMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Plasma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Detection of viral DNA in PBMC	gB	-	+	+	+	+/-	+	+	+	+/-	-	-	+
	gE	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
	gG	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Pig B2													
virus isolation from	PBMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Plasma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Detection of viral DNA in PBMC	gB	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	gE	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	gG	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
Pig B3													
virus isolation from	PBMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D
	Plasma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D
Detection of viral DNA in PBMC	gB	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+/-	D
	gE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D
	gG	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	D

D: death

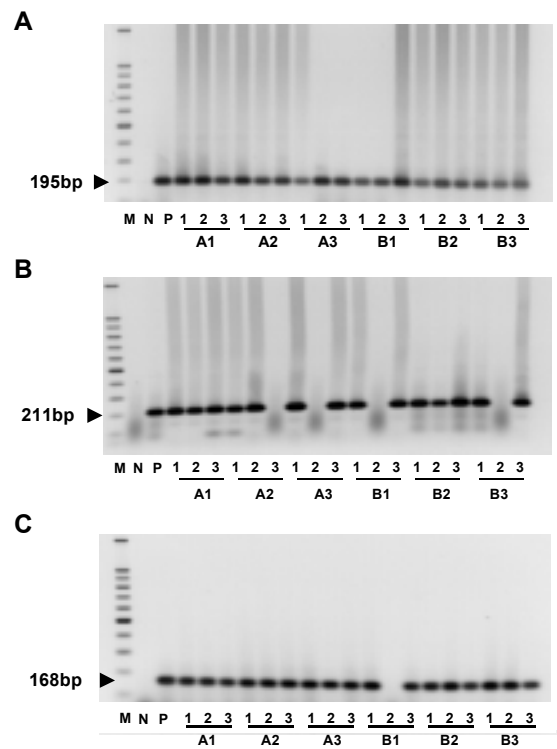


Fig. 2-10. Identification of latent PrV infection in nervous tissues of experimentally infected pigs. Six pigs(8-9 weeks old) were infected with PrV via intranasal route. At 56 days post-infection, PrV latent infection were identified by nested-PCR of PrV (A) gB, (B) gE, and (C) gG gene in DNA isolated from nervous tissues. M; size marker, N; negative control, P; positive control, 1; brain stem(BS), 2; olfactory bulb(OB), 3; trigeminal ganglion(TG).

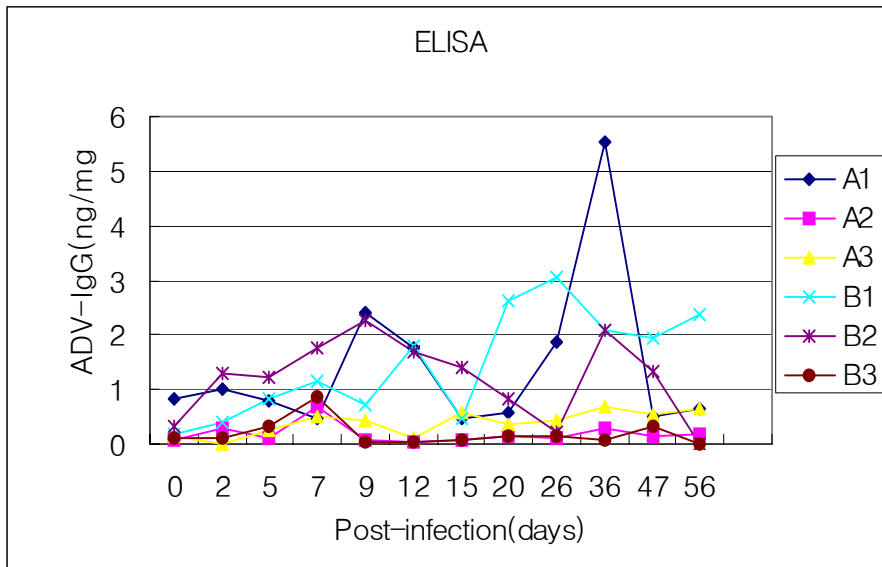


Fig. 2-11. Serum levels of PrV-specific IgG in six experimentally infected pigs. IgG levels were determined by conventional ELISA, and recalculated by adjusting the contents of plasma protein.

Table 2-10. Summary of lethal dose via intranasal or intramuscularly infection with virulent pseudorabies virus Yangsan strain

Route	Dose (PFU/ml)	Days after challenge of PrV										Survival rate (%)	LD ₅₀
		d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d11	100		
I.N ^a	10 ⁻¹	6/6 _c	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	60	10 ^{-1.17}
	10 ⁻²	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	3/5	3/5	3/5	3/5	0		
	10 ⁻³	6/6	6/6	4/6	3/6	2/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0		
	10 ⁻⁴	6/6	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0		
	10 ⁻⁵	5/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0		
	10 ⁻⁶	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0		
I.M ^b	10 ⁻²	7/7	7/7	7/7	7/7	6/7	6/7	5/7	5/7	5/7	71	10 ^{-2.37}	
	10 ⁻³	7/7	7/7	7/7	4/7	4/7	3/7	3/7	2/7	2/7	14		

BALB/c mice were infected with virulent PrV via either intranasal or intramuscularly route. The surviving mice were counted and 11 days following infection.

a. BALB/c mice(5 or 6 mice per group) were infected with virulent PrV via intranasal route after general anesthesia by avertin.

b. BALB/c mice(7 mice per group) were infected with virulent PrV via intramuscular route in both popliteal muscle.

c. No. of survived mice/No. of infected mice

나. 백신형태와 투여 경로에 따른 오제스키 항체반응

ELISA 방법을 이용하여 오제스키 특이 IgG 와 IgA를 측정하였다. 약독화 생 백신을 비강 접종한 실험군 A와 불활화 사독 백신을 비강 접종한 실험군 B의 오제스키 특이 IgG 평균치는 각각 440 ng/ml과 515 ng/ml로 근육 내 접종한 실험군 C(1,018 ng/ml), D(866 ng/ml)와 E(3,326 ng/ml)에 비하여 현저히 낮았다.

불활화 사독 백신을 근육내로 접종한 실험군 E의 IgG는 현저히 높았다. 반면에, 질내 분비물 샘플과 분변 샘플의 오제스키 특이 IgA 수치는 비강 접종한 실험군 A와 B에서 근육 내 접종한 실험군 C, D, E에 비하여 높았다 (Fig. 2-12).

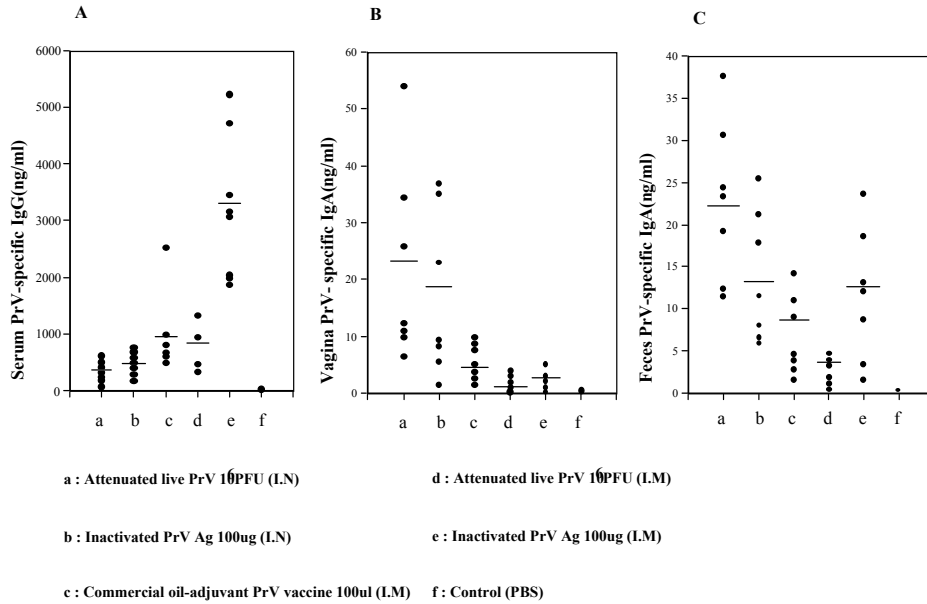


Fig 2-12. PrV-specific antibody levels of BABL/c mice immunized with three types of vaccine via either intranasal or intra-muscular route. Ten days following immunization, serum sample, vaginal lavage fluid and fecal sample were collected and analyzed individually. The levels of PrV-specific antibody were measured conventional ELISA. Vagina IgA responses were measured by pooling samples recovered daily for 3 days. Fecal samples were re-suspended at a concentration of 100 mg/ml in PBS containing 0.1% sodium azide(A), PrV-specific IgG in serum, PrV-specific IgA in vagina lavage (B) and in fecal sample (C).

다. 항체 isotype 분석

혈청내의 오제스키 특이 IgG의 isotype을 ELISA로 측정하여 백신의 형태와 주입 경로에 따라 면역반응에 주로 관계하는 CD4⁺ T 세포가 Th1-type 세포와 Th2-type 세포로 발달하는지 알아보기 위하여 분석한 결과, 백신을 근육내로 접종한 실험군에서 비강으로 접종한 실험군보다 IgG2a/IgG1 ratio가 낮았다. 백신의 형태로 비교하면 비강 접종한 경우에는 불활화 사독 백신(실험군B)을 주입한 경우 보다 약독화 생백신(실험군A)을 주입한 경우에 IgG2a/IgG1 ratio가 더 높았다. 근육내로 접종한 경우 약 독화 생백신(실험군 D) 주입한 실험군에서 IgG2a/IgG1 ratio가 높았다. 백신 주입 경로로는 근육내 접종이, 백신 형태별로는 약 독화 생백신을 주입한 경우가 IgG2a/IgG1 ratio가 높았다 (Fig 2-13).

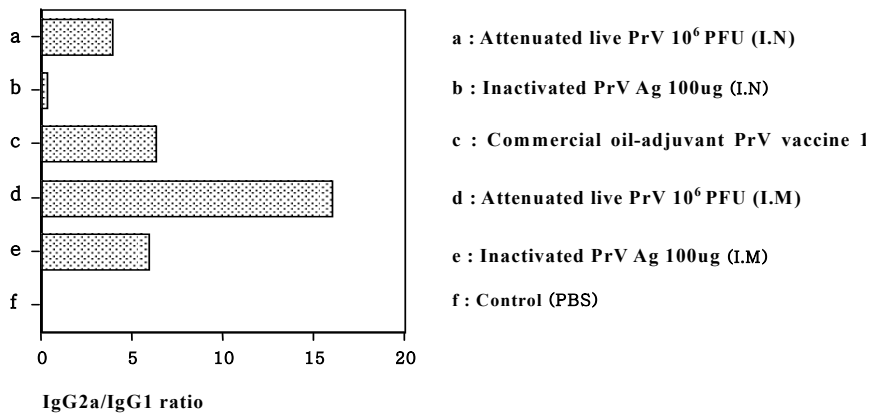


Fig 2-13. IgG2a/IgG1 ratio of PrV-specific IgG in serum. Ratio was calculated on the basis of IgG levels from individual mice in each group.

라. 자극 면역 T 세포부터 사이토카인 생산 profile

Th1-type 세포가 생산하는 cytokine, IL-2와 IFN- γ , Th2-type 세포가 생산하는 IL-4 양을 측정한 결과, 비강으로 접종한 실험군 중에서 약독화 생백신을 주입한 실험군(A)의 IL-2 양이 불활화 사독 백신을 주입한 실험군(B)에 비해 2

배 이상 높았고, IL-4 양은 그 반대로 낮았다. IFN- γ 양은 두 실험군(A 와 B)에
서 비슷하게 검출되었다. 근육내로 접종한 실험군에서는 oil-adjutant subunit 백
신을 주입한 실험군(C)에서 IL-2 양이 가장 높았고, 약독화 생백신(실험군D)와
불활화 사독 백신(실험군E)를 접종한 실험군 순이었다 (Fig 2-14).

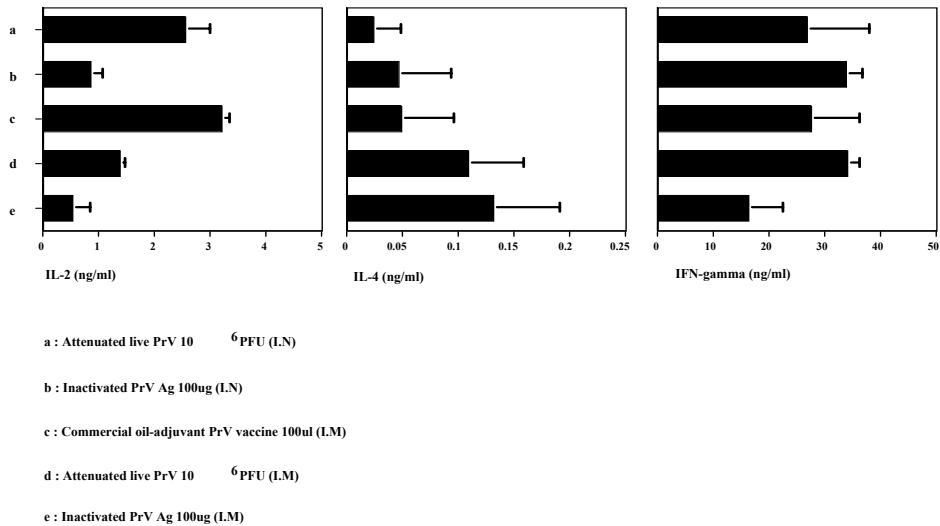


Fig 2-14. Th1- or Th2-type cytokine produced from CD4⁺ T helper cells stimulated with virulent PrV protein Ag inactivated by UV-irradiation. BABL/c mice(seven mice per group) immunized with attenuated live PrV via intranasal route (a), inactivated PrV Ag via intranasal route (b), oil-adjutant vaccine via intramuscular route (c), attenuated live PrV via intramuscular route(d), inactivated PrV Ag via intramuscularly route(e) were sacrificed on day 14 following immunization. Splenic T cells were in vitro stimulated with synergic enriched APC that have been pulsed with inactivated virulent PrV protein Ag and then incubated for 3 days. The responder cells were three mice per experiment. Cytokine levels in the culture supernatant were determined by standard ELISA.

마. 공격시험에 의한 방어면역

세 가지 형태의 백신을 비강 접종하거나 근육내 접종하여 면역시킨 2주일 후, 병원성 오제스키바이러스 Yangsan주를 비강 접종하여 각각의 백신 접종 실험군의 방어면역의 효과를 조사하였다. 병원성 바이러스 접종 후 28일까지 실험군을 관찰하였고, 각 실험군의 동물이 폐사에 이르는 시기는 빠르면 접종 4일째부터 나타났고 늦으면 접종 8일째까지 관찰되었고, 접종 9일째 이후로는 각 실험군에서 폐사하는 동물이 관찰되지 않았다. 약독화 생백신을 비강 접종한 실험군(A)과 불활화 사독 백신을 비강 접종한 실험군(B)는 각각 89%와 83%의 생존율을 나타내어 높은 방어면역 정도를 나타내었다. 약독화 생백신을 근육내 접종한 실험군(D)와 oil-adjutant subunit 백신을 근육내 주입한 실험군(C)에서는 각각 57%, 41%의 생존율을 나타내었다. 불활화 사독 백신을 근육내 접종한 실험군(E)에서는 실험 마우스가 모두 폐사하였다 (Fig. 2-15).

바. 잠복 감염분석

병원성 오제스키바이러스 감염에 대한 방어 면역이 형성되어 생존하여 남은 마우스가 있는 실험군 4개(A, B, C, D)에서 바이러스 접종 28일째에 마우스를 희생시켜 각 실험군별로 방어능력 정도와 잠복감염정도의 관계를 분석하였다. 각 실험군에서 검출된 잠복감염상태에 있는 바이러스의 양은 각 실험군 사이의 방어 능력과는 상관없이 비슷한 정도로 검출되었다 (Fig 2-16). 그러나, 백신을 비강 접종한 실험군(A, B)의 평균수치가 근육내 접종한 실험군(C, D)에 비하여 조금 낮게 검출되었다. Oil-adjutant subunit 백신을 근육내 주입한 실험군(C)은 잠복 감염 바이러스의 검출 평균치($10^{5.8}$ copy)는 가장 높게 검출되었고, 가장 높은 방어능력을 나타낸 약독화 생백신을 비강 주입한 실험군(89%)에서는 실험군들 중에서 유일하게 실험 개체 중 바이러스가 검출되지 않은 개체가 관찰되었다 (Fig 2-16).

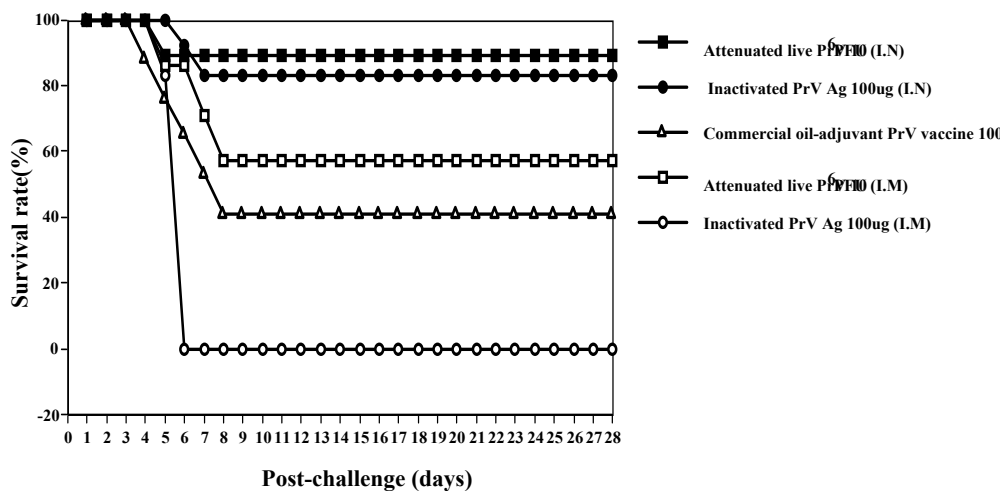


Fig 2-15. Induction of protective immunity against intranasal infection with virulent PrV Yangsan strain. Each group of mice was challenged intranasal route with virulent virus (10LD₅₀) after 2 weeks the immunization. The survived mice were counted 1 and 28 days following intranasal challenge. In case of administration of attenuated live virus via intranasal route(■), survival rate was 89%, inactivated protein Ag via intranasal route(●), 83%, oil-adjuvant vaccine via intramuscular route(△), 57%, attenuated live virus via intramuscular route (□), 41% and inactivated protein Ag via intramuscular route(○), 0%.

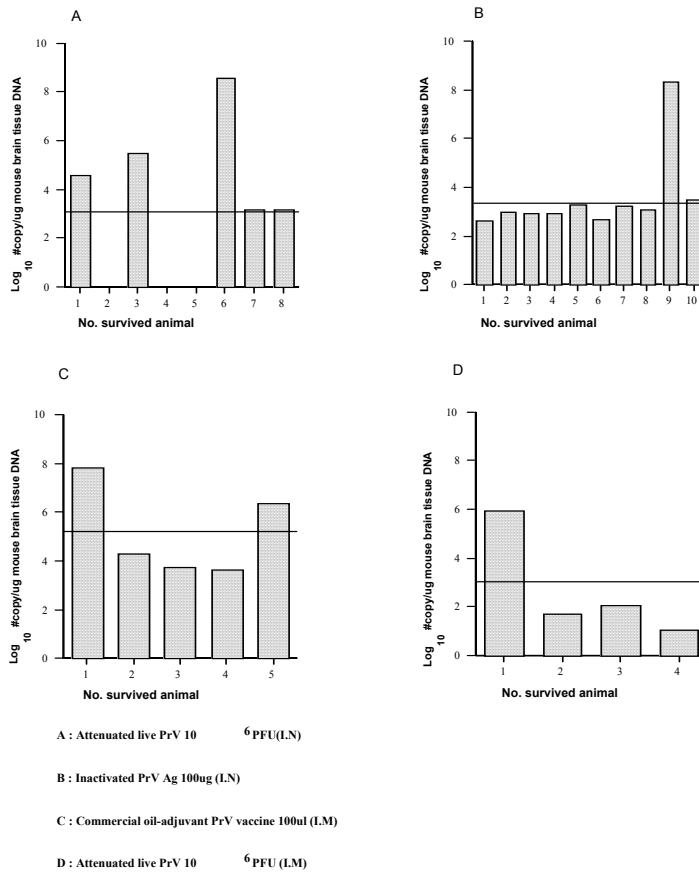


Fig 2-16. The quantity of latent PrV genome in brain tissues of survived mice following intranasal virus challenge. The copy number of latent PrV genome was determined by real-time PCR targeted to PrV thymidine kinase. The individual bar represents the copy number of target gene per one microgram of genomic DNA. The horizontal bar in each graph is showing the average copy number in each treated group.

사. 수동 면역화에 의한 잠복 감염 분석

오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 면역학적 인자들의 영향을 조사하기 위하여 오제스키바이러스로 면역화된 실험동물로부터 항혈청과 면역화된 T 세포를 분리하여 새로운 실험동물에 주입하여 수동 면역화한 다음, 약독화 오제스키바이러스를 감염 후 28일 째에 신경세포 내에 존재하는 잠복 감염 오제스키바이러스의 양을 real-time PCR에 의하여 분석하였다. 그 결과 항혈청을 주사한 경우와 면역화 T 세포를 주입한 경우에 잠복 감염된 오제스키바이러스의 양은 크게 감소되었고, 특히 면역화 T 세포를 이용하여 수동 면역화 시킨 그룹에서 잠복 감염된 오제스키바이러스의 양은 현저하게 대조군과 비교하여 낮게 나타났다. 따라서, 오제스키바이러스의 잠복 감염을 억제하기 위하여 오제스키 특이 T 세포 반응이 중요함을 알 수 있다 (Fig. 2-17).

4. 잠복 감염 재 활성화 모델 확립과 백신 투여와의 상관관계 분석

가. 잠복 감염 모델 확립

Rabbit polyclonal antiserum을 undilute, 1: 2, 1: 4, 1: 8로 2배씩 계단 희석하여 복강으로 250 μ l씩 주입한 30분 후, 병원성 오제스키 바이러스를 100LD₅₀를 비강과 복강으로 각각 감염시켜 감염 10일 후 까지 관찰한 결과, 항체가 250 μ g/ml의 혈청을 희석하지 않고 250 μ l씩 마우스 복강에 주입한 실험 군에서만 80% 이상의 생존율을 나타내었고 다른 실험 군에서는 생존해 있는 마우스가 관찰되지 않았다 (Table 2-11).

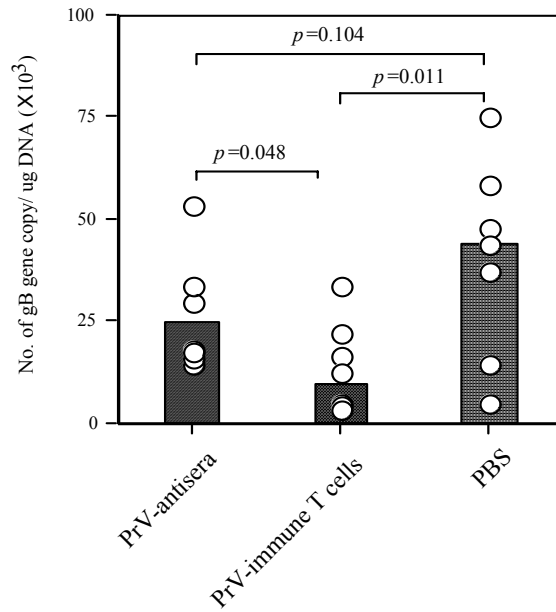


Fig. 2-17. Detection of latent PrV load following passive immunization with either PrV-antiserum or immune T cells. Mice of three groups were passively immunized with PrV-specific IgG 250 μ g, 1×10^7 spleen T cells of PrV-immunized mice and PBS for control, respectively. Next day, recipients were challenged via intranasal with 10^5 PFU of the PrV Δ tk β -gal+ Yangsan strain. 28 days after challenge, brain tissues were collected and detected PrV latency load using gB-specific real-time PCR method.

Table 2-11. Survived mice from challenged with virulence 100LD₅₀ PrV after injected with serial diluted rabbit polyclonal antiserum

Antiserum (250 μ g/ml)	Route of challenge	No. of mice tested	Days after treatment						Survival Rate (%)
			4	5	6	7	8	10	
Undiluted	I.N	5	2	0	0	0	0	0	0
	I.P	5	4	4	4	4	4	4	80
1: 2	I.N	5	2	0	0	0	0	0	0
	I.P	5	3	3	2	1	1	1	20
1: 4	I.N	5	1	0	0	0	0	0	0
	I.P	5	4	1	1	0	0	0	0
1: 8	I.N	5	0	0	0	0	0	0	0
	I.P	5	4	0	0	0	0	0	0

나. 재 활성화 후 비강 분비물내 바이러스 유출

병원성 오제스키바이러스를 오제스키 항혈청을 이용하여 잠복 감염을 유도한 후 28일째에 dexamethasone 0.5 mg을 sesame oil 200 μ l에 섞어 3일간 dsu 속 주입하여 잠복 감염된 오제스키 바이러스의 재활성을 유도하였다. 처음 dexamethasone을 주입한 후 6일째에 실험동물을 희생시켜 비강 분비물을 채취하여 PK-15세포를 이용하여 재활성을 유도하였다. PK-15 세포주에서 2번째 passage한 후 배양 5일째에 세포변성을 관찰하여 관찰된 결과를 산정하였고, 확실하지 않은 것은 3번째 passage 하여 확정하였다. Ach를 첨가하지 않고 배양한 경우에는, dexamethasone을 투여하지 않은 대조군 5 샘플 중에서 2 샘플에서 CPE가 관찰되었고(40%), dexamethasone을 투여한 실험군 15 샘플 중에서 7개의 샘플에서 CPE가 관찰되었다(47%). 반면, Ach를 첨가하여 배양한 경우에는 대조군 5 샘플 중에서 3 샘플에서 CPE가 관찰되었고(60%), dexamethasone을

투여한 실험군 13 샘플 중에서 6개의 샘플에서 CPE가 관찰되었다(63%). Dexamethasone을 투여에 따른 대조군과 실험군 간에 차이는 관찰되지 않았으며, Ach를 첨가하여 배양한 경우 대조군과 실험군 모두 더 많은 샘플에서 CPE가 관찰되었다 (Table 2-12).

Table 2-12. Detection of CPE from nasal swabs of latently infected mice after treatment with dexamethasone or acetylcholine.

Treatment	No. of animal	CPE observation from nasal swabs	
		w/o Ach	w/ Ach
Control*	1	+	-
	2	-	+
	3	-	+
	4	+	-
	5	-	+
Dexamethasone	1	-	-
	2	+	+
	3	-	+
	4	+	+
	5	-	-
	6	+	Not tested
	7	+	-
	8	+	-
	9	-	-
	10	-	Not tested
	11	+	+
	12	-	+
	13	+	-
	14	+	+
	15	-	-

* Injected i.p sesame oil 250 μ l

다. Trigeminal ganglion explant로부터 바이러스 재 활성화

PK-15 세포주에 2번째 passage한 후 배양 5일째에 세포변성을 관찰하여

관찰된 결과를 산정하였고, 확실하지 않은 것은 3번째 passage 하여 확정하였다. Ach를 첨가하지 않고 배양한 경우에는, dexamethasone을 투여하지 않은 대조군 5 샘플 중에서 2 샘플에서 CPE가 관찰되었고(40%), dexamethasone을 투여한 실험군 15 샘플 중에서 7개의 샘플에서 CPE가 관찰되었다(47%). 반면, Ach를 첨가하여 배양한 경우에는 대조군 5 샘플중에서 1 샘플에서 CPE가 관찰되었고(20%), dexamethasone을 투여한 실험군 15 샘플중에서 3개의 샘플에서 CPE가 관찰되었다(20%). Dexamethasone을 투여에 따른 대조군과 실험군 간에 차이는 관찰되지 않았다. Ach를 첨가하여 배양한 경우 대조군과 실험군 모두 더 적은 샘플에서 CPE가 관찰되었고, 이 역시 dexamethasone을 투여에 따른 대조군과 실험군 간에 차이는 관찰되지 않았다 (Table 2-13).

라. Nested PCR에 의한 바이러스 검출

병원성 오제스키바이러스를 오제스키 항혈청을 이용하여 잠복 감염을 유도하고 28일째에 dexamethasone 0.5 mg을 이용해 잠복 감염된 오제스키 바이러스의 재활성을 유도한 다음 비강 분비물과 trigeminal ganglion내의 오제스키바이러스의 존재를 nested PCR에 의하여 확인하였다. 오제스키바이러스의 존재는 DNA를 분리하여 gB 유전자 검출용 primer를 이용하여 확인하였다. 그 결과 dexamethasone을 투여한 경우와 투여하지 않은 경우에 모두의 시료에서 바이러스가 검출되었고 (Fig. 2-18), 또한, trigeminal ganglion로 부터 분리된 DNA도 dexamethasone투여에 상관없이 모두 바이러스가 검출되는 것으로 나타났다 (Fig. 2-19).

Table 2-13. Detection of CPE from TG explants of latently infected mice after treatment with dexamethasone or acetylcholine.

Treatment	No. of animal	CPE observation from TG explants	
		w/o Ach	w/ Ach
Control*	1	+	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	+	+
	5	-	-
Dexamethasone	1	-	-
	2	-	-
	3	+	+
	4	+	+
	5	+	-
	6	-	-
	7	-	-
	8	+	-
	9	-	-
	10	-	-
	11	+	+
	12	+	-
	13	-	-
	14	-	-
	15	+	-

* Injected i.p sesame oil 250 μ l

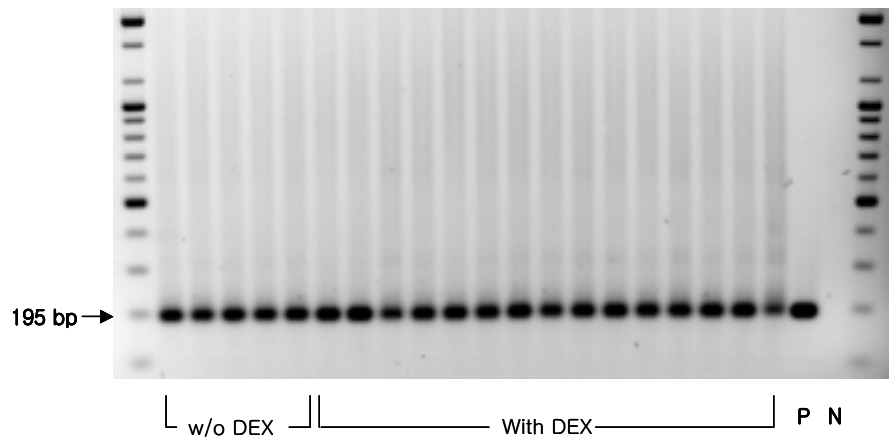


Fig. 2-18. Detection of pseudorabies virus in nasal lavage of animals after reactivation of latent virus with dexamethasone. The existence of virus was identified with nested PCR targeted to gB gene.

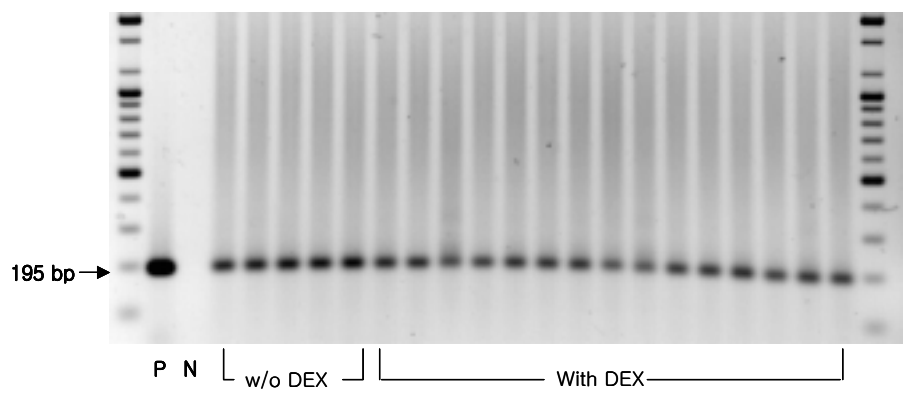


Fig. 2-19. Detection of pseudorabies virus in trigeminal ganglion of animals after reactivation of latent virus with dexamethasone. The existence of virus was identified with nested PCR targeted to gB gene.

제 4 절 연구의 요약 및 결론

오제스키바이러스는 alphaherpesvirus에 속하는 바이러스로서 감염 후 지속적인 신경세포내 잠복 감염을 유발한다는 것이다. 이와 같은 오제스키 바이러스의 신경세포내 잠복 감염은 숙주의 면역저하, 스트레스 및 임신 등의 다양한 조건에서 다시 활성화 되어 이웃 동물로 전파되고 특히 포유자돈의 경우에는 치명적인 결과를 초래함으로써 양돈 농가에 고질적인 문제로 여겨져 왔다. 문제는 이와 같은 오제스키바이러스의 잠복 감염은 혈청 내 오제스키 특이 항체의 존재에도 불구하고 형성됨으로써 잠복 감염을 방지할 수 없다는 점과 또한 비록 오제스키바이러스에 대하여 혈청 음성 반응을 나타내는 돼지의 경우에도 바이러스가 잠복 감염되어 있을 가능성이 상존함으로써 오제스키 근절사업에 고질적인 문제가 되어 왔다. 따라서, 본 연구에서는 이와 같은 오제스키바이러스의 잠복 감염을 검출할 수 있는 방법으로서 nested PCR과 real-time PCR을 확립하였고 잠복 감염 실험동물 모델을 확립하여 잠복 감염을 억제하기 위한 방법 등에 대하여 연구하였다. 첫 번째로 nested PCR과 real-time PCR에 의하여 혈청 양성 반응을 보여준 양성돈 94두를 수집하여 잠복 감염되어 있는 오제스키바이러스의 검출율을 조사하였다. 그 결과 nested PCR에 의하여 95.7%가 잠복 감염되어 있는 상태로 밝혀 졌고 real-time PCR에 의하여 $10^{7.1}-10^{0.5}$ copy number의 잠복 감염 바이러스가 존재하는 것을 알 수 있었다. 또한, 혈청 검사를 실시하지 않은 무작위로 추출된 돈두 40개를 수집하여 nested PCR과 real-time PCR에 의하여 잠복 감염된 오제스키 바이러스를 분석한 결과 nested PCR에서 95% 이상의 검출율을 보여 주었으며, real-time PCR에 의하여 그와 같은 검출율은 더욱 증가되었고 $10^{7.2}-10^{0.1}$ copy number의 검출율을 나타내었다. 오제스키 바이러스의 잠복 감염 경로를 알아보기 위하여 실험적으로 돼지에 오제스키 바이러스를 감염시켜 바이러스의 잠복 감염을 추적한 결과 다양한 신경 조직에 잠복 감염을 유지하는 것으로 보여 졌다.

또한, 오제스키바이러스의 잠복 감염 모델을 확립하여 수종의 백신을 사용하여 접종 경로 및 백신 형태에 따라 나타나는 면역 반응의 특성을 분석하고 잠복 감염에 영향을 분석하였다. 따라서, 약독화 생독 백신을 비강 투여 또는 근육 주사의 경우 오제스키 항원에 대하여 Th1-type의 반응이 유도되었고 이와 같은 반

응은 오제스키 바이러스의 잠복 감염에 대하여 억제효과를 나타내었다. 또한, 오제스키바이러스에 대한 항혈청을 이용하여 병독성 오제스키바이러스의 잠복 감염을 유도한 후 dexamethasone을 이용한 재활성 모델을 확립함으로써 각종 스트레스에 의한 바이러스의 재활성 연구에 이용할 수 있고 재활성에 대한 각종 예방접종의 영향을 분석할 수 있는 모델을 확립하였다.

제 3 장 오제스키바이러스에 대한 플라스미드 DNA 백신의 최적화 연구

제 1 절 서 설

양돈 산업에서 오제스키병에 의한 경제적인 피해를 줄이기 위하여 다양한 시도가 이루어져 왔다. 현재 채혈 검사에 의한 양성돈의 도태를 근간으로 하는 오제스키병 근절대책이 추진 중이다. 이와 더불어 발생 지역의 백신 접종은 포유자돈의 병세를 크게 약화시키고 폐사 동물의 수를 현저히 줄일 수 있을 뿐 만 아니라 바이러스의 전파를 줄일 수 방법으로 이용되고 있다. 오제스키 병에 대한 예방 접종은 특정 유전자가 제거된 gE 또는 gI-deleted modified live vaccine (MLV) 또는 불활화 백신이 사용되고 있으나 모두 두 경우에 있어서 문제점을 안고 있다. MLV는 오래 지속 될 수 있는 방어 면역을 구축할 수 있으나 야생주 감염시 유전자 재조합이 일어나 병독성이 강한 새로운 바이러스주가 나타날 염려와 아직 완전한 안전성을 확보하지 못해 숙주에 부작용을 일으킬 염려가 있다. 반면에 불활화 백신은 유전자 재조합에 의한 새로운 야생주의 출현이 나타날 염려는 없으나 MLV보다 유도하는 면역이 약하여 반복적인 접종이 요구되고 오제스키바이러스의 잠복 감염을 억제할 수 없는 것으로 나타났다. 이와 같은 생물학적인 불안정성을 최소화하고 충분한 면역원성을 가지는 백신의 대안으로 최근에는 외래항원을 발현하는 플라스미드 DNA를 이용한 백신이 많이 개발되어 이용되고 있다. 따라서 오제스키바이러스를 대상으로 플라스미드 DNA 백신의 장점에 대한 연구가 진행되어 왔다. 오제스키바이러스의 외피(envelope)에는 숙주세포에 침입과 감염에 중요한 역할을 하는 여러 envelope glycoprotein이 포함되어 있는데, 감염된 숙주의 면역반응을 유도하는 항원으로서 작용하고 있다. 현재까지 10개의 항원성을 갖는 glycoprotein이 확인되었으며, 그 중에서 gC, gE, gG, gI 및 gM은 nonessential glycoprotein으로 바이러스의 복제에 필수적인 glycoprotein은 아닌 것으로 보여 진다. 반면에 gB, gD, gH, gK 및 gL는 바이러스의 복제에 필수적인 glycoprotein으로 알려져 있다. 특히 오제스키 gB, gC와 gD는 주요 면역원성 단백질로 *in vivo*와 *in vitro*에서 면역반응을 유도하는 항원으로 알려졌다. 서로 다

른 접종 경로와 다양한 용량을 응용한 연구에서 오제스키 gB, gC 및 gD가 돼지에서 방어면역에 관여하는 주 envelope 단백질이고, 중화항체가, CTL, lymphoproliferation assay 등의 방법을 이용하여 특히 면역반응을 확인한 결과 CD4⁺ Th1-type에 의한 면역반응이 강하게 나타남을 확인하였다. 강한 면역반응 유도하기 위하여 GM-CSF와 같은 genetic adjuvant를 이용하여 면역반응을 강화시켰고, 일반적인 DNA 백신의 안전성을 개선하고 면역반응을 증강시키기 위하여 alphavirus-based expression vector를 이용하여 일반적인 플라스미드 DNA 백신과 비교하여 세포성 면역이 증가하고 방어면역능력도 증가하여 백신의 효능이 증가된다고 보고되었다. 또한, 돼지에서 발병하는 오제스키바이러스가 생쥐, 랫트, racoon 및 야생토끼를 포함하는 야생포유류에서 치명적이라는 보고가 있는 후, 돼지외의 동물모델을 이용하여 오제스키바이러스에 대한 연구가 진행되어져 왔다. 생쥐에서 사독백신으로 백신 연구의 가능성을 제시한 이래로 약독화 백신, 유전자 변형 생 백신 및 DNA 백신을 적용하여 오제스키바이러스 백신 연구에 적합한 모델로서 제시되어 왔다.

사이토카인은 병원균에 대한 면역반응을 조절하는 중요한 면역 조절성 단백질이다. 인터페론, tumor necrosis factor- α (TNF- α)는 다양한 바이러스 감염에 대한 효과적인 방어 수단이 되고 interleukin(IL)-12, IL-7, IL-15 등은 직접적인 effector 기능은 없으나 intracellular pathogen에 대한 T 세포 면역 반응을 유도하고 증강시키는데 중요한 조절제로 작용한다. 가장 효과적인 백신을 개발하기 위해서는 감염에 대한 방어 면역을 구축하는데 요구되는 면역반응의 특성을 정확하게 이해하여야 한다. 현재 허가를 획득하여 상용되고 있는 대부분의 백신은 일차적으로 체액성 면역 반응에 기초하여 백신 개발이 이루어진 것이다. 그러나, 각종 바이러스 감염, 특히 세포내 잠복 감염이나 만성질환을 유도하는 바이러스 감염의 경우에는 중화 항체만을 유도하여 바이러스 감염에 대한 방어 면역을 구축하기 어렵다. 그래서, 바이러스 감염에 대한 효과적인 방어 면역을 구축하는데 CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포 반응이 중요하게 작용하고 체액성 면역는 CD4⁺ T helper의 작용에 의존한다. 따라서, 플라스미드 DNA 백신에 의하여 유도되는 면역반응을 효과적으로 유도하기 위하여 최근 이와 같은 면역 조절 물질인 사이토카인의 이용이 증가되고 있다. 본 연구에서는 eukaryotic mammalian vector에 오제스키 후보 항원 유전자 gB, gC, gD를 각각 유전자 조작에 의하여 만든 플라

스미드 DNA 백신 및 이들을 각기 혼합한 cocktail 백신의 면역반응을 생쥐를 실험 모델로 하여 병원성 오제스키바이러스 Yangsan주에 대한 면역반응과 방어면역에 관하여 조사하였으며, 분리된 병원성 오제스키바이러스 Yangsan주에 대한 면역반응을 관찰하여 우리나라에서 플라스미드 DNA 백신의 응용 가능성과 강력한 면역원성을 가지며 방어면역능력을 나타내는 항원으로 작용하는 적합한 glycoprotein에 대하여 조사하였다. 그 결과 glycoprotein B (gB)가 가장 유효한 항원으로 도출되었고, gB 유전자를 발현하는 플라스미드 DNA 백신에 의하여 유도되는 면역 반응을 보다 정교하게 조절하기 위하여 사이토카인 및 케모카인을 발현하는 플라스미드 DNA를 제작하고 오제스키 gB DNA 백신과 병용 접종함으로써 나타나는 면역 반응의 특성을 분석하고 병원성 오제스키바이러스 Yangsan주에 대한 방어 면역을 조사하여 오제스키바이러스 감염에 대한 DNA 백신을 최적화 시키는데 유용하게 이용될 수 있는 사이토카인을 도출하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 세포 및 바이러스

병원성 pseudorabies virus(PrV) Yangsan strain은 porcine kidney cell line(PK-15)세포에 증식 시켜 사용하였다. 5 %의 FBS, penicillin-streptomycin(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 DMEM에 배양하고, 바이러스를 흡착시켜 5% CO₂, 37°C 에서 1 시간 감염시키고, 2-3일 경과된 후 감염 특유의 세포병변현상이 80-90% 정도 확인되면 감염된 세포를 상층액과 함께 모아 바이러스를 회수하였고, plaque assay를 이용하여 바이러스 농도를 측정 하였다. 그 외의 방법은 제2장에 기술된 내용에 준하여 실시되었다.

2. 실험동물

본 실험에 사용한 실험용 생쥐 BALB/c(H-2^d)와 C57BL/6(H-2^b)는 실험동물 공급업체(주) 다물사이언스(대전, 한국)와 코아텍(서울, 한국)에서 구입하여 본 연구실의 실험 동물실에서 실험 동물 사육 규정에 맞추어 유지하며 실험에 공시하였다.

3. 유전자 조작 및 오제스키 항원 발현 플라스미드 DNA 제작

오제스키바이러스의 후보 항원 유전자를 발현하는 eukaryotic expression vector는 PCR 클로닝을 이용하여 제작하였다. 오제스키 항원 유전자 gB(gII), gC(gIII) 및 gD(gp50)을 증폭하기 위하여 다음과 같은 증폭 primer를 이용하였다.

gB(gII) gene (2805bp product)

PrVgBp1: 5'-CTT CAG GTC CGT CTT CCA CTG-3'

PrVgBp2: 5'-GCA TCT TTA TTG TTT CCC GCG-3'

gC(gIII) gene (1561 bp product)

PrVgCp1: 5'-AAA TCC GTT TCC TGA TTC ACG-3'

PrVgCp2: 5'-CGT TTA TTG ATT CGA CGT GGG-3'

gD(gp50) gene (1745 bp product)

PrVgDp1: 5'-TTG AGA CCA TGC GGC CCT TTC-3'

PrCgDp2: 5'-TTA AGC GGG GCG GGA CAT CAA-3'

Taq polymerase는 정확성이 높은 proofreading 3' to 5' exonuclease기능을 갖는 Platinum[®] Pfx DNA polymerase(Invitrogen, USA)를 사용하였다. 반응은 제조회사의 지시에 따라 10× Pfx amplification buffer 5 μ l, 10 mM dNTP mixture 2 μ l, 50 mM MgSO₄ 1 μ l, primer mixture(10 μ M) 1.5 μ l, template DNA 10 μ l, Platinum[®] Pfx DNA polymerase 1 μ l 반응액 총 50 μ l에서 시행하였으며 필요할 경우 10×PCRx enhancer solution을 사용하였다. 반응은 96°C에서 3분간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing하였고, polymerization은 68°C에서 PCR 산물에 따라 gB는 3분 30초, gC와 gD는 2분 동안 5 cycle 실시하고, 다시 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 68°C에서 polymerization 반응을 30 cycle 실시하였다. 최종적으로 72°C에서 10분간 polymerization 반응을 1 cycle 실시한 후 PCR을 종료하고, PCR 반응을 마친 PCR 산물은 1.5% agarose gel(Invitrogen)에 전기 영동한 후, ethidium-bromide 용액에 염색하고 흐르는 물

에 수세하여 탈색한 후, gel documentation(VILBER LOURMAT)상에서 관찰하였다. 얻어진 PCR 산물은 Wizard SV gel/PCR clean-up system kit(Promega, USA)를 이용하여 agarose gel로부터 지시에 따라 DNA를 추출해냈다. 전기영동한 gel상의 원하는 위치의 DNA band 부분을 잘라낸 후 무게를 측정하여 gel 10 mg당 10 μ l의 membran binding 용액을 첨가해 65 $^{\circ}$ C water bath에서 완전히 녹을 때까지 방치해둔다. Binding column에 용해액을 적용하고 상온에서 10분 가량 방치한 후, 10,000 \times g에서 3분간 원심 분리한 후 column 아래로 빠진 내용물을 버리고 column에 membrane wash 용액으로 2회 세척한다. Binding column에 nuclease-free water 50 μ l를 넣고 상온에 10분간 방치하고 10,000 \times g에서 1분간 원심 분리한 후 얻은 DNA 추출물을 사용할 때까지 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 전기영동 gel로부터 얻어진 PCR 산물은 Zero-blunt TOPO PCR cloning kit(Invitrogen, USA)를 이용하여 클로닝하였다. TOPO cloning reaction mixture (PCR product 1 μ l, salt soln 1 μ l, TOPO vector 0.5 μ l, sterile water 3.5 μ l) 6 μ l를 준비해 22 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨다. TOPO cloning reaction mixture 3 μ l를 TOP10 competent cell(Invitrogen, USA)을 이용하여 transformation하였다. 클로닝벡터 pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]에 클로닝된 오제스키 항원 유전자는 제한 효소와 유전자 염기서열 분석에 의하여 확인하여 유전자를 검증하였다. Zero-blunt TOPO PCR 클로닝 벡터에 클로닝된 오제스키 항원 유전자는 EcoRI 제한 효소로 처리한 후 플라스미드 DNA 백신용 eukaryotic expression vector pCI-neo에 클로닝하여 pCI-PrVgB, pCI-PrVgC 및 pCI-PrVgD를 얻었다 (Fig. 3-1). 얻어진 플라스미드 DNA 백신으로 발현되는 항원 유전자의 확인은 Western blot에 의하여 항원 단백질의 발현을 확인하였다.

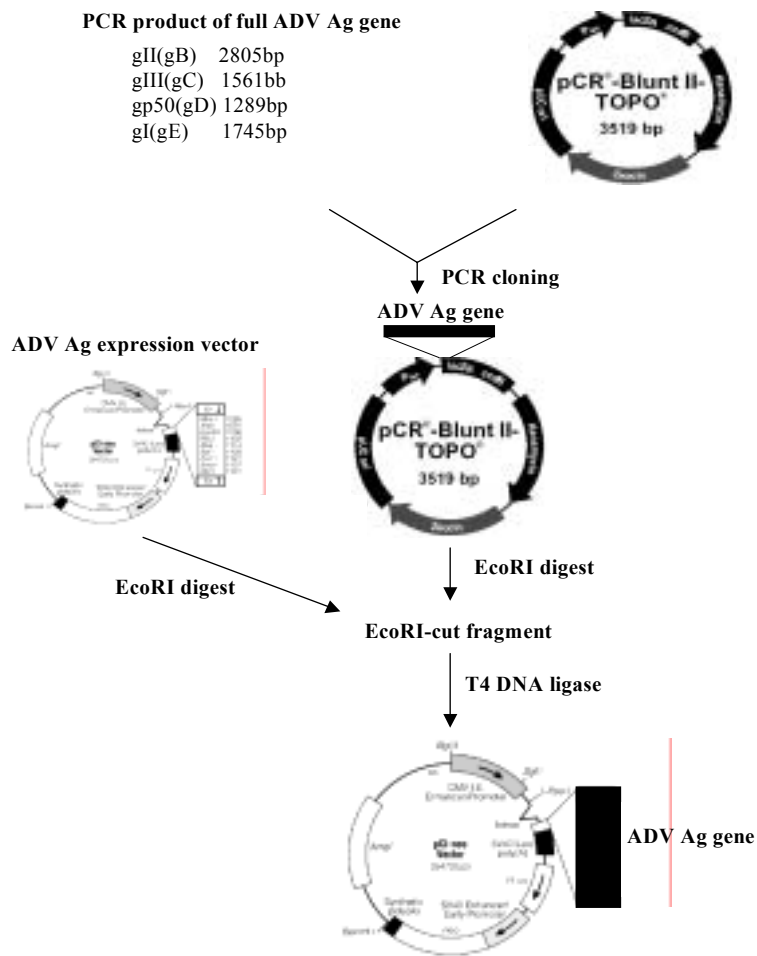


Fig. 3-1. Procedure of PCR cloning for antigen gene gB(gII), gC(gIII), gD(gp50), and gE(gI) of pseudorabies virus

4. DNA 백신 준비

클로닝이 확인된 오제스키 항원 glycoprotein 발현 플라스미드 DNA는 polyethylene glycerol(PEG) 방법에 의하여 분리하였다. 세균 glycerol stock 50 μl 을 LB broth(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin) 10 ml에 24시간 seed culture한 후, LB broth(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin) 1 L에 옮겨 16-18시간 배양시켜 4°C, 7,000 rpm에서 7분간 고속원심 분리하였다. 상층액은 제거하고 침전물을 soln. I(50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA) 20 ml에 완전히 혼합한 후 lysozyme(10 mg/ml in 10mM Tris-HCl pH8.0) 4 ml을 첨가하고 살짝 흔들어 얼음에 10분간 방치하였다. 여기에 soln. II(0.2 N NaOH, 1% SDS) 40 ml을 첨가 하고 부드럽게 섞어준 후 얼음에 10분간 방치하였다. 다시 soln. III 30 ml를 첨가한 후 흔들어 섞어주고, 4°C, 7,000 rpm에서 20분간 고속원심 분리하였다. 상층액을 거즈에 걸러 이물질을 제거하고 0.6 volume의 isopropanol(4°C)를 첨가한 후 -20°C에 3시간 이상 방치하였다. 4°C, 12,000 rpm에서 30분간 고속원심 분리한 후, TE buffer(50 mM Tris-HCl, 10mM EDTA) 10 ml에 침전물을 부유시키고, 동량의 7.5 M ammonium acetate를 첨가한 후 10분간 방치하고, 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 고속원심 분리한다. 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 0.6 volume의 isopropanol(4°C)를 첨가한 후 -20°C에 하룻밤 방치하였다. 4°C, 14,000 rpm에서 30분간 고속원심 분리한 후 상층액을 완전히 제거하였다. TE buffer 750 μl 에 침전물을 재부유 시키고 RNase A(10mg/ml) 50 μl 를 첨가하여 섞어주고 37°C에서 30분간 처리하여 RNA 성분을 제거하였다. 동량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)을 첨가하고 2,500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 회수하여 다시 동량의 chloroform으로 1회 추출한 후, 750 μl 씩 tube에 옮기고 PEG(13% PEG/1.6 M NaCl) 750 μl 를 첨가하고 1분간 vortex하여 섞어준 후 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 4°C, 12,000 rpm에서 30분간 고속원심분리하고 공기 중에 건조하여 상층액을 완전히 제거한 후 nuclease-free 증류수에 희석하였다.

5. 면역화 및 샘플 준비

실험동물을 총 7개의 실험군으로 구분하여 실험에 사용하였다. 오제스키 항원 glycoprotein 발현 플라스미드 DNA pCI-PrVgB, pCI-PrVgC와 pCI-PrVgD를 각각 100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 과 500 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 의 농도로 준비하여 실험동물의 뒷다리 한쪽에 50

μl 씩 총 100 μl 를 근육내 주입하였고, pCI-PrVgB, pCI-PrVgC와 pCI-PrVgD를 혼합하여 각기 100 μg 씩 포함된 cocktail 백신을 제조하여 실험동물의 뒷다리 한 쪽에 50 μl 씩 총 100 μl 를 근육내 주입하였다. 일주일 간격으로 동일 조건 하에 총 3회 반복 주입하였다. 실험군 1은 오제스키 항원 glycoprotein 발현 플라스미드 DNA pCI-PrV gB를 100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 의 농도로 근육 내 접종하였고, 실험군 2는 pCI-PrVgB 500 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, 실험군 3은 pCI-PrVgC 100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, 실험군 4는 pCI-PrVgC 500 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, 실험군 5는 pCI-PrV gD 100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 를 근육 내 접종하였다. 실험군 6은 pCI-PrVgD 500 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, 실험군 7은 pCI-PrVgB/pCI-PrV gC/ pCI-PrVgD를 각각 100 μg 씩 혼합하여 300 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 를 근육내 접종하였다. 1회, 2회 면역과 3회 면역한 후 각기 일주일 뒤에 개체별로 안와정맥에서 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액을 37°C에서 30분간 방치한 후 4°C에서 30분간 원심 분리하여 혈구성분을 제외한 상층액을 얻어낸 후 4°C에서 10분간 다시 원심 분리함으로써 혈청을 분리하여 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다. 그 외 사이토카인 및 케모카인을 이용한 플라스미드 DNA 백신에 의하여 유도되는 면역반응을 분석하기 위하여 이용된 면역화 및 샘플 준비는 위에 기술된 내용에 준하여 실시되었다.

6. 오제스키바이러스 특이 항체 검출

가. 오제스키항원 준비

오제스키바이러스 특이 항체를 검출하기 위한 검출용 오제스키항원은 PK-15 세포에서 배양된 오제스키바이러스를 농축하여 사용하였다. 감염된 PK-15세포 배양액 및 세포를 회수하여 4°C, 1500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 세포배양액과 감염 세포를 분리한다. 세포배양액은 다시 4°C, 15,000 rpm에서 1시간 30분간 원심 분리하여 침전물을 회수하였고, 감염세포는 소량의 PBS에 재현탁한 후 freezing-thawing을 세 번 반복하여 세포내 바이러스를 유리한다. 세포배양액에서 회수된 바이러스와 세포로부터 유리된 바이러스를 합하여 0.5% Triton X-100을 처리하여 바이러스를 불활화시킨다. 다시 4°C, 15,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 얻어 단백질 정량한 후 오제스키바이러스 특이 항체 검출에 이용하였다.

나. 오제스키바이러스 특이 항체 검출

오제스키 항원에 대한 항체가는 ELISA방법에 의하여 측정하였다. 혈청내의 오제스키 특이 IgG의 측정은 ELISA plate에 50 mM sodium bicarbonate buffer(pH 9.5)를 희석액으로 이용하여 준비된 오제스키 항원 단백질을 1 μ g/well의 농도로 희석하여 분주하고, standard에는 goat anti-mouse-IgG (Southern Biotechnology Associate Inc., Birmingham, Ala) 100ng/well을 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 방치하여 코팅하였다. 0.05% Tween 20-PBS(PBST)를 이용하여 3회 세척하고, 3% 탈지유(200 μ l/well)로 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시켜 블로킹하였다. 다시 PBST로 3회 세척하고, 10배 희석된 샘플 혈청을 2배씩 계단희석 하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 반응시킨 뒤 PBST로 3회 세척하였다. Goat anti-mouse IgG-conjugated HRP(100 ng/well)을 100 μ l씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후 PBST로 다시 3회 세척하였다. 효소반응은 기질 용액(11mg of 2,2-azinobis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid in 25mL of 0.1M citric acid-25ml of 0.1M sodium phosphate-10 μ l hydrogen peroxide)을 이용하여 발색시키고 1.5% potassium fluoride-PBS 용액을 이용하여 반응을 정지시켰다. 각 well의 흡광도는 ELISA reader(SPECTRAMax 340, Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA)를 이용하여 405 nm에서 측정하였고 Softmax program으로 혈청내의 오제스키 특이 IgG의 수준을 계산하였다. 혈청 오제스키 특이 IgG isotype(IgG2a 및 IgG1)의 측정을 위해서는 혈청 오제스키 특이 IgG의 방법과 동일하게 진행하였다. 대신 standard에는 goat anti-mouse IgG2a 또는 IgG1(Southern Biotechnology Associate Inc., Birmingham, Ala) 100 ng/well을 이용하였고, 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG2a-conjugated HRP (IgG2a-HRP) 또는 goat anti-mouse IgG1-conjugated HRP(IgG1-HRP)를 이용하였다.

7. 사이토카인 생산 profile분석

가. 비장세포 및 림프구 배양

오제스키 항원 glycoprotein 발현 플라스미드 DNA vaccine을 실험군별로 주입한 2주일 뒤에 각 실험군에서 3마리를 선택하여 cytokine assay와 CTL assay

를 위해 비장과 draining 림프절(popliteal 및 inguinal 림프절)을 분리하여 상용의 방법에 따라 세포를 배양하였다. 먼저 antigen presenting cell(APC)을 준비하기 위하여 항원을 접종하지 않은 실험 동물을 과량의 CO₂로 질식사 시켜 좌측복부를 절개하여 비장을 적출하였다. Mesh를 이용하여 비장을 잘게 부수어 비장세포를 분리한 후, 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지에 부유해 800 rpm에서 8분간 원심 분리시켰다. RBC lysis soln.(NH₄Cl-Tris)을 이용하여 적혈구를 제거하고 10% FBS/RPMI 1640 배지 3 ml에 부유 시켰다. 빛이 차단된 환경에서 metrizamide 2 ml이 담긴 15 ml tube에 비장세포 부유액 1 ml을 조심스럽게 중층하였다. 900 rpm에서 10분간 원심 분리시켜 밀도 구배를 형성한 후 중간층을 회수하여 한 개의 tube로 옮겨 놓은 후, 다량의 10% FBS/RPMI 1640를 이용하여 metrizamide 성분을 세척하였다. 혈청이 포함되어 있지 않는 RPMI 1640에 재부유 시켜 UV-inactivated 오제스키 단백질 항원(cytokine assay) 또는 살아있는 오제스키바이러스(CTL assay)로 자극시킨다. 이때, 항원으로 자극한 세포와 자극하지 않은 세포로 분류하고, 세포를 2 ml씩 나누어 5% CO₂ 배양기에서 1시간 30분 배양하고 10% FBS/RPMI 1640을 2 ml씩 첨가한 후 흔들여 섞고 다시 1시간 30분간 재배양한다. 비장세포를 항원으로 자극한 것과 자극하지 않은 것을 각각 한 tube에 모으고 800 rpm에서 8분간 원심 분리시켰다. 10% FBS/RPMI 1640에 재부유 시키고 naive 세포는 2 μl/ml의 농도, 항원으로 자극시킨 세포는 1 μl/ml의 농도의 mytoycin C를 첨가하고 5% CO₂ 배양기에 7분간 방치하여 T세포의 증식을 억제 시켰다. 800 rpm에서 8분간 원심 분리시킨 후 10% FBS/RPMI 1640배지로 2-3회 세척하고 마지막으로 적당량의 10% FBS/RPMI 1640에 부유 시켜 얼음에 방치하였다. 각 실험군의 실험 동물로부터 같은 방법에 의하여 비장, inguinal 림프절 및 popliteal 림프절을 적출하여 mesh를 이용하여 세포를 분리하였다. RBC lysis soln.(NH₄Cl-Tris)을 이용하여 적혈구를 제거하고 10% FBS/RPMI 1640 배지에 부유하여 세포를 준비하였다. APC와 림프구의 수를 측정하여 APC는 1×10⁶ cells/ml로, 림프구는 5×10⁶ cells/ml로 희석하여 사용하였다.

나. 사이토카인 ELISA

자극된 CD4⁺ T 세포로부터 생산된 IL-2, IL-4 및 IFN-γ의 측정은 비장세포와 림프구를 APC와 혼합 배양시킨 후 그 상층액을 cytokine ELISA방법에 의하

여 측정하였다. 비장세포 및 림프구를 3시간 동안 사독 오제스키바이러스 단백질 항원으로 자극 시킨 APC와 일정비율(5:1, 2.5:1, 1.25:1)로 혼합 하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3일간 배양하였다. 양성 대조군에는 concanavalin A(Con A)을 5 µg/ml로 처리하여 준비하였다. ELISA plate는 anti-mouse IL-2, IL-4 및 IFN-γ 항체로 4°C에서 하룻밤 방치하여 코팅하였다. ELISA plate를 PBST로 3회 세척하고, 3% 탈지유로 처리해 37°C에서 2시간 정도 블로킹하였다. 배양 상층액과 standard cytokine protein을 처리하고 1시간 30분 동안 배양하였다. 다시 PBST로 3회 세척하고 biotinylated anti-mouse IL-2, IL-4 및 IFN-γ 항체를 처리한 다음 4°C에서 하룻밤 방치하였다. ELISA plate를 세척하고 peroxidase-conjugated streptavidin를 첨가하고 1시간 배양한 후 기질용액으로 발색시켰다. 각 well의 흡광도는 ELISA reader (Molecular Device, USA)로 405nm에서 측정하여 비장세포와 림프구에서 생산된 cytokine IL-2, IL-4 및 IFN-γ의 양을 계산하였다.

8. 항원 특이 세포독성시험(CTL assay)

가. 오제스키 항원 발현 세포 주 제작

오제스키 항원 특이 CD8⁺ T 세포 반응을 분석하기 위한 오제스키 항원 발현 세포주 제작은 lentivirus를 이용한 transduction방법에 의하여 제작하였다. 오제스키 항원 발현 eukaryotic expression vector를 제작할 때와 같이 오제스키 항원 유전자를 PCR 클로닝 방법에 의하여 pCR-Blunt II-TOPO vector에 클로닝된 유전자를 recombinant lentivirus 제작용 벡터 pLXSN에 EcoRI site에 클로닝하였다 (pLXSN/gB, pLXSN/gC, pLXSN/gD). 다시 오제스키 항원 유전자를 갖는 pLXSN/gB, pLXSN/gC 및 pLXSN/gD는 retrovirus packaging cell line, RetroPack PT67 세포에 transfection하여 24-48후에 recombinant retrovirus를 포함하고 있는 배양액을 회수하였다. Recombinant retrovirus는 다시 표적 세포로 이용될 EL-4(H-2b) 또는 NIH-3T3(H-2d)에 감염시켜 transduction을 유도하였다. 그 다음 오제스키 항원 유전자를 발현하는 세포주는 geneticin[®]을 이용하여 2-3회에 걸쳐 선택하였다. 오제스키 항원 유전자의 발현은 RT-PCR 또는 western blot에 의하여 확인하였다 (Fig. 3-2).

나. CTL assay

항원 특이 세포 독성을 나타내는 CD8⁺ T 세포의 활성은 CTL assay 방법을 이용하여 측정하였다. 준비된 세포(effector cell)와 살아있는 오제스키바이러스(5 moi)로 3시간 동안 자극시킨 APC를 혼합하여 37°C, 5% CO₂ 에서 5일간 배양하였다. 표적세포(target cell)는 이전에 배양된 EL-4 cell line-EL-4(H-2^b), EL-4-PrVgB, EL-4-PrVgC와 EL-4-PrV-gD을 이용하였다. 세포는 원심 분리하여 각각 10% FBS/RPMI 1640 배지에 재부유 시킨 후 세포수를 측정하여 3×10⁶ cells/100 μl의 농도로 재부유한 다음 200 μCi/ml의 농도로 ⁵¹Cr을 첨가하였다. 두 배씩 계단 희석하여 96 well plate에 준비하여둔 effector cell과 섞고 1,200 rpm에서 3분간 원심 분리한 후 CO₂ 배양기에서 5시간 배양하였다. Plate를 원심 분리한 후 배양상층액을 수거하고 표적세포로부터 유리된 ⁵¹Cr의 양은 γ-counter를 이용하여 측정하였다. Effector cell의 specific lysis는 다음과 같은 식에 의하여 구하였다.

$$\text{Specific lysis(\%)} = \frac{[\text{effector release} - \text{spontaneous release}]}{[\text{Total release} - \text{spontaneous release}]} \times 100$$

9. 공격시험에 의한 방어면역 분석

가. 공격시험

오제스키 항원 glycoprotein 발현 플라스미드 DNA 백신 또는 사이토카인 유전자 발현 플라스미드 DNA로 각 실험군별 일주일 간격으로 3회 면역시킨 후, 14일 이후에 모든 실험군 실험 동물에 avertin을 복강 내 주입하여 전신 마취시킨 다음, 병원성 오제스키바이러스 Yangsan주를 비강 접종하였다. 접종 후 11일까지 마우스의 상태 및 폐사여부를 매일 관찰하였다.

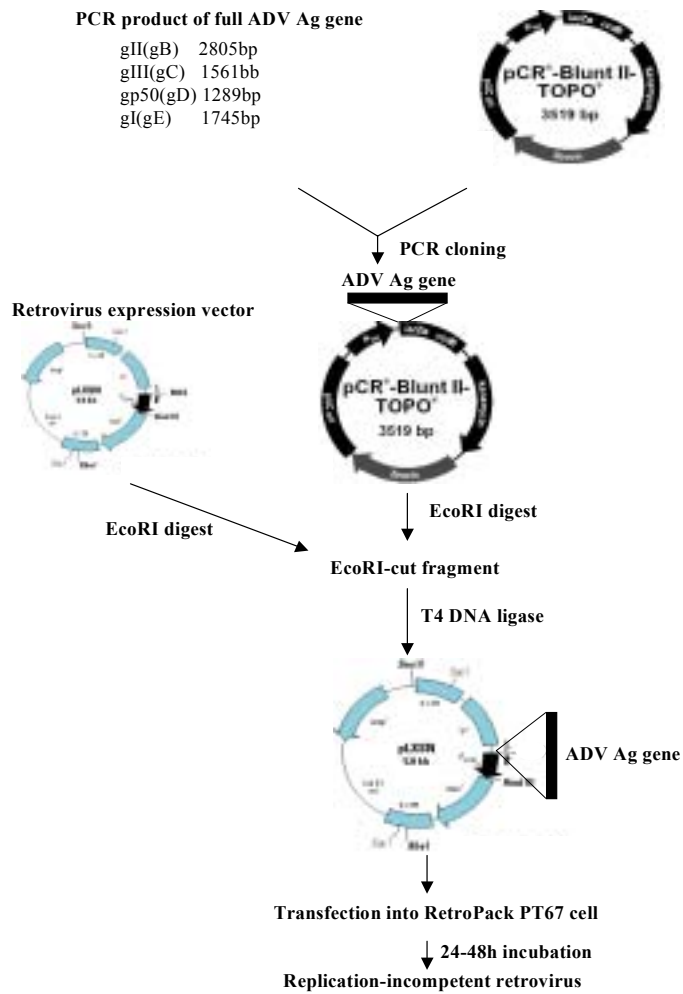


Fig. 3-2. Procedure of construction of cell line expressing pseudorabies virus antigen(gB, gC, and gD).

나. 뇌 조직내 바이러스 검출

오제스키바이러스 감염 후 폐사된 실험동물 또는 아직 살아 있는 동물의 뇌 조직에 존재하는 감염성 바이러스의 양은 plaque assay에 의하여 측정하였다. 오제스키 바이러스 감염 후 12일째 실험동물의 뇌조직을 분리하였다. 분리된 뇌조직은 무게를 측정하여 뇌조직 1 mg/PBS 1 μ l에 넣고 분쇄기를 이용하여 뇌조직 추출물을 제조하였다. 4°C, 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 상층액을 회수한 다음 PK-15 숙주세포를 이용하여 상층액에 존재하는 감염성 바이러스의 양을 plaque assay에 의하여 측정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 플라스미드 DNA백신용 오제스키 항원 유전자 조작

가. 오제스키 항원 유전자 조작 및 DNA 백신 제작

오제스키 바이러스의 항원 유전자를 발현하는 플라스미드 DNA 백신은 PCR 클로닝 방법에 의하여 제작하였다. 이전 오제스키바이러스에 대한 연구 보고에 기초를 두어 항원성을 갖을 것으로 생각되는 후보 항원 유전자, glycoprotein B (gB; gII), gC(gIII) 및 gD(gp50)를 PCR cloning 방법에 의하여 클로닝하고 DNA 백신 벡터로 이용될 pCI-neo로 클로닝하여 발현성을 검증하고 항원성을 추적하였다. 오제스키바이러스의 DNA를 분리하여 항원 유전자의 primer를 이용하여 proofreading 3' to 5' exonuclease기능을 갖는 Platinum[®] Pfx DNA polymerase를 이용하여 PCR를 수행하였다. 그 결과 gB(gII) gene 2805 bp product, gC(gIII) 1561 bp product, gD(gp50) 1289 bp product 및 gE(gI) 1745 bp product를 얻을 수 있었다 (Fig. 3-3). 항원 유전자 PCR 산물은 PCR의 정확성을 확인하기 위하여 sequence와 각 PCR product를 수 개의 제한 효소로 digest하여 확인하였다 (Fig. 3-4).

gB의 경우

SmaI : 76, 14, 1656, 757, 1597, 196 bp,
PstI : 147, 1134, 354, 75, 1095 bp
XhoI : 298, 1174, 687, 486, 102, 58 bp
NotI : 387, 1131, 1287bp
SalI : 2567, 238bp

gC의 경우

SalI : 150, 1171, 240 bp
SmaI : 1007, 554 bp
NotI : 1016, 545 bp
XhoI : 1339, 222 bp

gD의 경우

KpnI : 349, 417, 523 bp
NaeI : 431, 511, 84, 263 bp
SalI : 560, 729 bp

각 항원 유전자의 PCR 산물은 Zero-blunt TOPO cloning vector에 PCR 클로닝하였다. TOPO cloning vector에 클로닝된 항원 유전자는 EcoRI digest하여 각 항원 유전자의 존재를 확인하였다 (Fig. 3-5). TOPO vector내의 항원 유전자는 다시 cytomegalovirus promotor를 갖는 DNA 백신용 벡터 pCI-neo로 클로닝한 후 항원 유전자의 발현을 western blot 및 RT-PCR 방법에 의하여 확인하였다 (Fig. 3-6 and 3-7).

나. 오제스키 항원 유전자 발현 세포 주 제작

오제스키 항원 특이 CD8⁺ T 세포 반응의 표적 세포로 이용될 수 있는 항원 유전자를 안정되게 발현하는 세포주는 retrovirus를 이용한 transduction에 의하여 제작되었다. PCR 클로닝 방법에 의하여 pCR-Blunt II-TOPO 벡터에 클로닝된 오제스키 항원 유전자를 다시 retrovirus expression vector pLXSN의 EcoRI 위치

에 클로닝하였다 (pLXSN/gB, pLXSN/gC, pLXSN/gD). pLXSN 벡터에 클로닝된 오제스키 항원 유전자는 EcoRI digest에 의하여 확인하였다(Fig. 3-8). 항원 유전자를 갖는 pLXSN/gB, pLXSN/gC, pLXSN/gD는 retrovirus packaging cell line, RetroPack PT67 cell에 transfection하여 24-48시간 후에 recombinant retrovirus를 포함하고 있는 culture supernatant를 얻었다. Recombinant retrovirus는 다시 표적세포로 이용될 EL-4(H-2^b) 또는 NIH-3T3(H-2^d)에 감염시켜 transduction을 유도하였다. 오제스키 항원 유전자를 안정되게 발현하는 세포는 geneticin[®] (400 μ g/ml)을 이용하여 2-3회 걸쳐 선택하고 오제스키 항원 유전자의 발현은 RT-PCR과 western blot에 의하여 확인하였다 (Fig. 3-9 and 3-10).

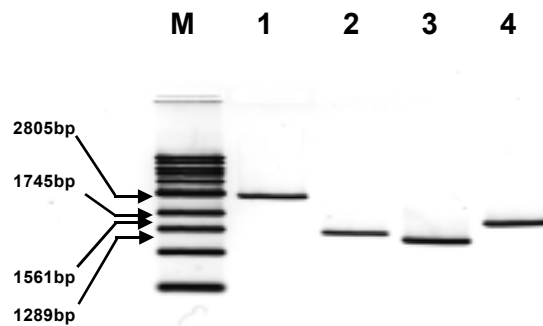


Fig. 3-3. PCR product of pseudorabies virus antigen gB, gC, and gD gene. PCR was performed by using Platinum[®] Pfx polymerase. M; size marker, 1; gB PCR product(2805 bp), 2; gC PCR product(1561bp), 3; gD PCR product(1289bp), 4; gE PCR product(1745bp).

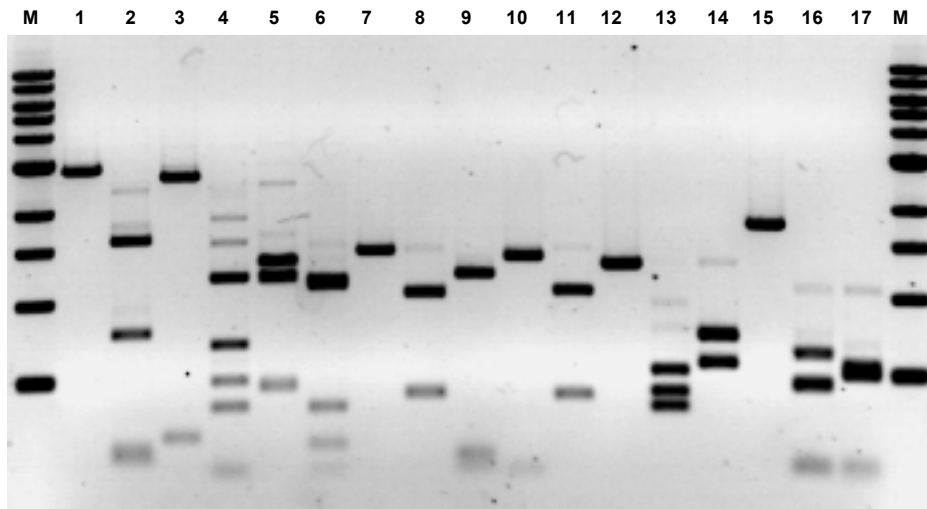


Fig. 3-4. Digestion map of PCR product of pseudorabies virus antigen gB, gC, and gD gene with several restriction enzymes. M; size marker, 1; gB-product uncut, 2; gB-product SmaI cut, 3; gB-product SalI cut, 4; gB-product XhoI cut, 5; gB-product NotI cut, 6; gB-product PstI cut, 7; gC-product uncut, 8; gC-product SmaI cut, 9; gC-product SalI cut, 10; gC-product XhoI cut, 11; gC-product NotI cut, 12; gD-product uncut, 13; gD-product KpnI cut, 14; gD-product SalI cut, 15; gE-product uncut, 16; gE-product SmaI cut, 17; gE-product ApaI cut.



Fig. 3-5. PCR cloning of pseudorabies virus antigen gB, gC, and gD gene into pCR-Blunt II-TOPO vector. PCR products of PrV antigen gene(gB; 2805bp, gC; 1561bp, gD; 1289bp, gE; 1745bp) were PCR-cloned into pCR-Blunt II-TOPO vector (pCRgB, pCRgC, pCRgD, pCRgE) as described in manufacturer's manual. M; size marker, 1; pCRgB uncut, 2; pCRgB EcoRI cut, 3; pCRgC uncut, 4; pCRgC EcoRI cut, 5; pCRgD uncut, 6; pCRgD EcoRI cut, 7; pCRgE uncut, 8; pCRgE EcoRI cut.

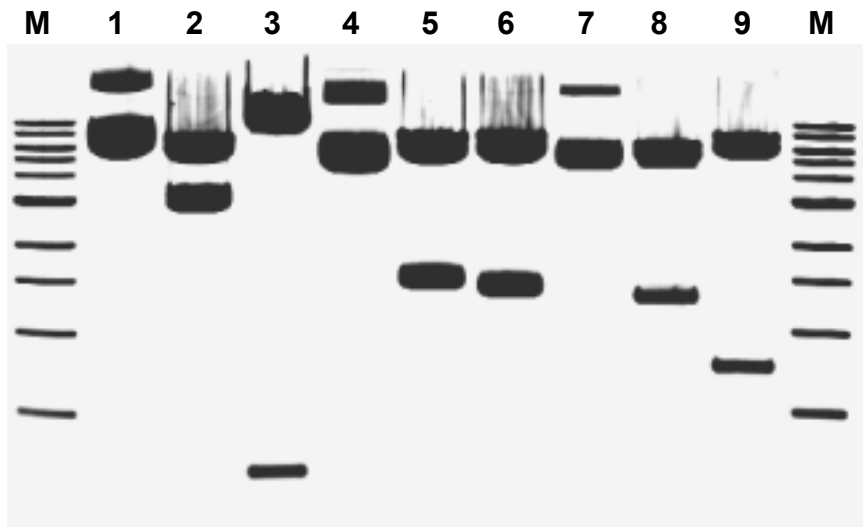


Fig. 3-6. Subcloning of candidate antigen gB, gC, and gD gene of pseudorabies virus into mammalian expression vector, pCI-neo. EcoRI fragments of pCRgB, pCRgC and pCRgD were subcloned into pCI-neo vector(pCIgB, pCIgC, pCIgD). M; size marker, 1; pCIgB uncut, 2; pCIgB EcoRI cut, 3; pCIgB SalI cut, 4; pCIgC uncut, 5; pCIgC EcoRI cut, 6; pCIgC XhoI cut, 7; pCIgD uncut, 8; pCIgD EcoRI cut, 9; pCIgD SalI cut.

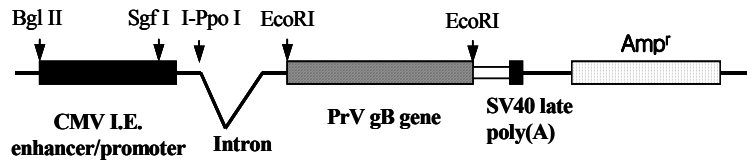
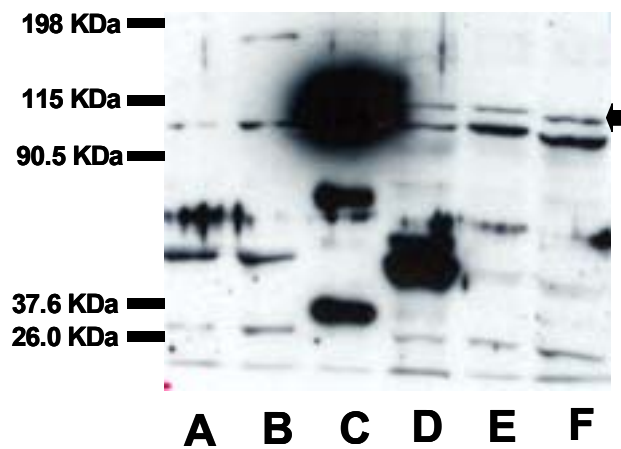
A**B**

Fig. 3-7. (A) Diagram of the mammalian expression vector for gB protein of PrV. (B) Identification of the expression of gB protein. The expression of gB protein (~100 KDa) was identified by western blot using polyclonal antiserum against gB protein, following in vitro transfection into NIH-3T3 cells. Lanes: A, non-transfected; B, control vector-transfected; C, PrV-infected; D, pCI-PrVgB-transfected (24 h); E, pCI-PrVgB-transfected (48 h); F, pCI-PrVgB-transfected (72 h). The relative positions in the gel of predicted size are indicated on left side. CMV, cytomegalovirus; SV40, simian virus 40; I.E., immediate-early; Amp^r ampicillin-resistant.

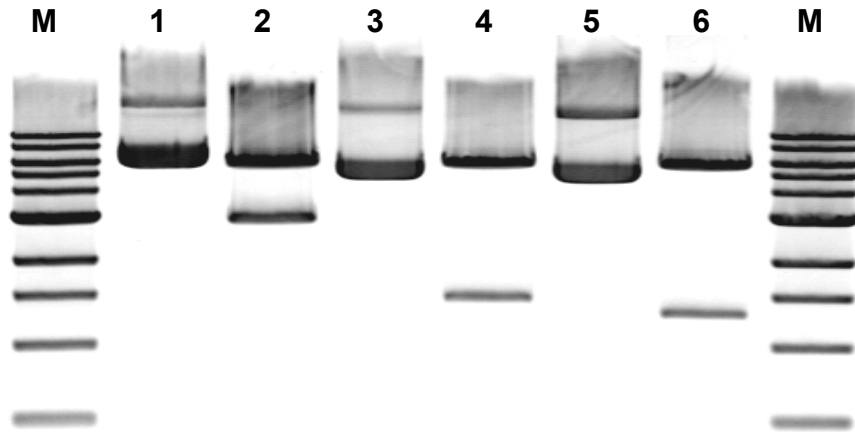


Fig. 3-8. Cloning of pseudorabies virus antigen gB, gC, and gD gene into retrovirus expression vector, pLXSN. EcoRI fragments of pCRgB, pCRgC and pCRgE were subcloned into pLXSN vector(pLXSNgB, pLXSNgC, pLXSNgD). M: size marker, 1; pLXSNgB uncut, 2; pLXSNgB EcoRI cut, 3; pLXSNgC uncut, 4; pLXSNgC EcoRI cut, 5; pLXSNgD uncut, 6; pLXSNgD EcoRI cut.

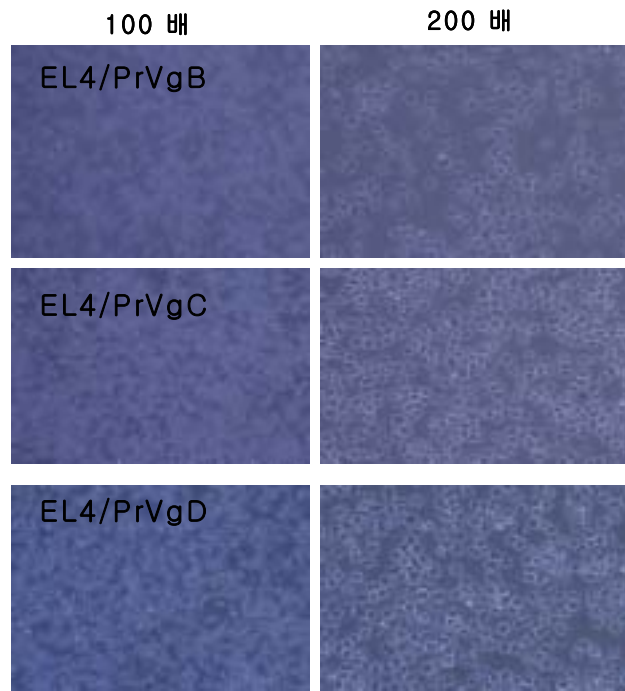


Fig. 3-9. Photograph of EL-4(H-2b) expressing pseudorabies virus antigen gB, gC, and gD.

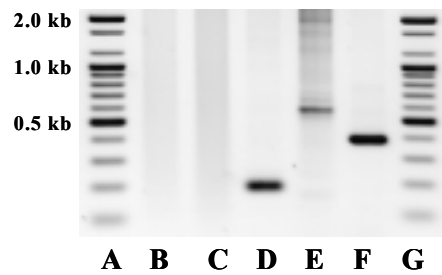


Fig. 3-10. RT-PCR for identifying the expression of pseudorabies virus antigen gB, gC, and gD in constructed EL-4. A and B: size marker, B: PCR negative control, C: EL4 cells, D: EL4/PrVgB (195 bp), E: EL4/PrVgC (585 bp), F: EL4/PrVgD (393 bp).

2. 항원 유전자 발현 플라스미드 DNA 백신의 면역원성 비교 분석

가. 체액성 면역반응

1) 항원 특이 항체 반응

오제스키 항원 유전자를 발현하는 플라스미드 DNA 백신을 투여한 후 나타는 체액성 면역 반응은 혈청 내 오제스키 특이 IgG수준을 측정함으로써 접근하였다. 각각의 오제스키 glycoprotein 발현 플라스미드 DNA로 2차례 또는 3 차례 면역시킨 후의 혈청에서 조사한 오제스키 특이 IgG의 양은 다음과 같았다. 오제스키 glycoprotein 발현 플라스미드 DNA pCI-PrVgB로 면역 시킨 실험군에서는 127 ng/ml로 220 ng/ml가 생산된 cocktail DNA를 주입한 실험군을 제외하고는 가장 높은 수치를 나타내었다. pCI-PrVgC와 pCI-PrVgD를 주입한 실험군에서는 매우 낮게 검출되었고, 주입 용량별(100 μ g과 500 μ g)로는 크게 차이가 나타나지 않았다 (Fig 3-11). 3차례 면역시킨 후 혈청 내 오제스키 특이 IgG는 각 실험군 별로 모두 2차례 면역시킨 후 조사한 양에 비하여 증가되었다. 각각의 플라스미드 DNA를 100 μ g씩 주입한 실험군들 중에서는 pCI-PrVgB의 경우 802 ng/ml로 가장 높게 검출되었고, cocktail DNA의 경우 598 ng/ml로 검출되었다. pCI-PrVgC(15 ng/ml)와 pCI-PrVgD(4 ng/ml)는 낮은 수치로 검출되었다.

2) 항체 isotype 분석

오제스키 특이 IgG의 isotype ratio(IgG2a/IgG1)를 분석한 결과 pCI-PrVgB의 경우에 isotype ratio(IgG2a/IgG1)는 100 μ g에서 43.2, 500 μ g에서 58.2로 각 실험군들 중에서 가장 높았다. pCI-PrVgC와 pCI-PrVgD의 경우 100 μ g과 500 μ g을 주입한 실험군 모두 매우 낮았다. pCI-PrVgC 100 μ g을 주입한 경우, ratio는 2.6이며 500 μ g을 주입한 경우 ratio는 0.08이었다. pCI-PrVgD 100 μ g을 주입한 경우 ratio는 1.1이며 500 μ g을 주입한 경우 ratio는 0.7이었다. cocktail DNA의 경우에는 7.4로 pCI-PrVgC와 pCI-PrVgD를 주입한 경우보다 높았다 (Fig 3-12). 따라서, pCI-PrVgB를 투여한 경우에 Th1-type의 면역 반응을 보여 주는 것으로 나타났다.

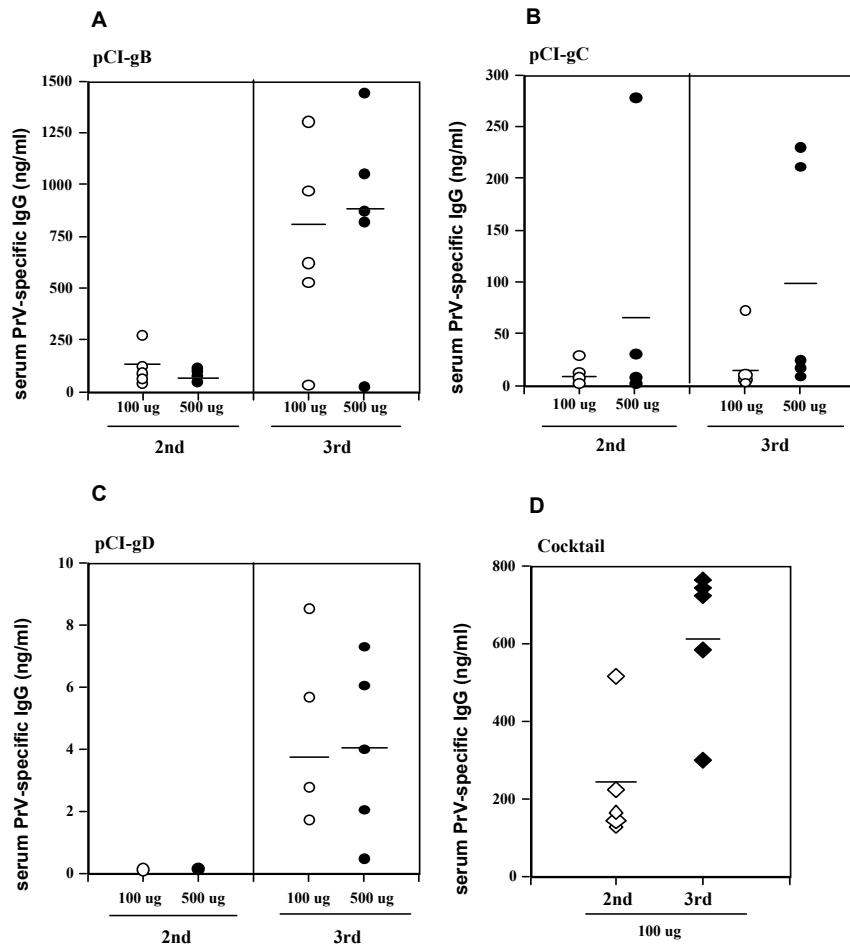


Fig 3-11. PrV-specific IgG levels in serum of C57BL/6 mice immunized with PrV encoded plasmid DNA, pCI-PrVgB(A), pCI-PrVgC(B), pCI-PrVgD(C) and cocktail DNA(D). Mice in each group were immunized with indicated regimens via intramuscular route. Vaccination was performed three times at 7-days interval. Serum IgG levels were determined by conventional ELISA at 7th day following the second and the last immunization. Seven days following 2nd and 3rd immunization, serum sample were collected and analyzed individually. Each IgG level was measured for individual mice (five per group).

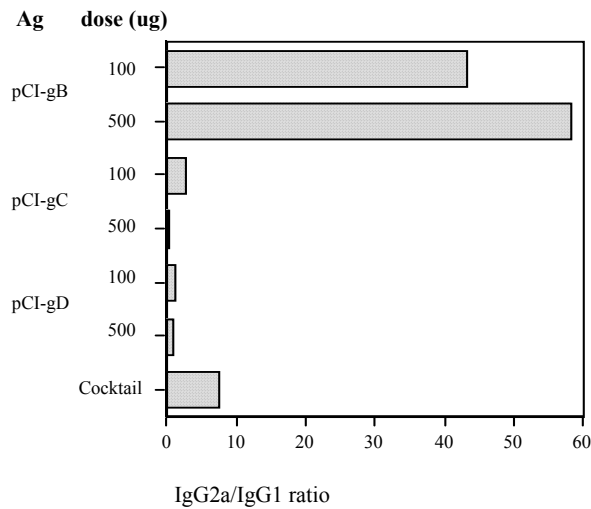


Fig 3-12. IgG2a/IgG1 ratio of PrV-specific IgG in serum. Mice of Groups were immunized with indicated regimens via intramuscular route. Vaccination was performed three times at 7-days intervals. Serum PrV-specific IgG2a and IgG1 were determined by conventional ELISA at 7th day following the last immunization. Ratio was calculated on the basis of IgG levels from individual mice in each group

나. CD4⁺ T 세포 매개 세포성 면역반응 분석

Naive CD4⁺ T 세포가 항원제시세포(APC)에 의해 제시된 서로 다른 항원에 대해 반응하여 두 종류의 T helper 세포인 Th1-type 세포나 Th2-type 세포로 분화하여 적합한 면역반응을 일으키는지 알아보기 위하여 항원에 의하여 자극된 비장과 림프구(popliteal and inguinal 림프절)의 배양 상층액을 회수하여 cytokine ELISA 방법을 이용하여 분석하였다. 그 결과 음성대조군에 비하여 모든 실험군에서 cytokine의 양이 높게 검출되었다 (Fig 3-13). 비장세포에서 생산된 IL-2는, pCI-PrVgC를 주입한 실험군에서 1.13 ng/ml(100 µg)과 2.02 ng/ml(500 µg)으로 모든 실험군 중에서 가장 높았다. Cocktail DNA를 주입한 경우에는 1.3 ng/ml (100 µg)으로 pCI-PrVgB(0.632, 0.768 ng/ml)와 pCI-PrVgD(0.44, 0.815 ng/ml)

의 경우 보다 높았다. 림프구에서도 pCI-PrVgC를 주입한 실험군에서 2.16 ng/ml (500 µg)으로 가장 높았다. 비장 세포에서의 IL-4는 pCI-PrVgB 500 µg을 주입한 실험군에서 0.122 ng/ml이었고, cocktail DNA를 주입한 실험군에서는 0.095 ng/ml (100 µg)이었다. 그 외 나머지 실험군에서는 대조군(0.05 ng/ml)과 비슷하였다. 림프구의 IL-4는 pCI-PrVgB를 주입한 실험군에서 가장 높았다(0.2 ng/ml). Cocktail DNA를 주입한 실험군에서 생산된 cytokine의 양이 비교적 높았으며 특히 IFN- γ 의 양이 높았다(68 ng/ml) (Fig 3-13). 측정된 cytokine중 모든 실험군에서 IFN- γ 의 양이 가장 많이 검출되었다. 비장 세포의 IFN- γ 양은 cocktail DNA를 주입한 실험군에서 65 ng/ml로 가장 높았고, pCI-PrVgD(53.8, 42.6 ng/ml), pCI-PrVgC(31.9, 24.8 ng/ml), pCI-PrVgB(30.6, 35 ng/ml)의 순서로 측정되었다. 림프구의 IFN- γ 양은 cocktail DNA를 주입한 실험군에서 60 ng/ml로 가장 높게 생산되었고 pCI-PrVgB(25, 47 ng/ml), pCI-PrVgC(21, 30.4 ng/ml), PrVgD(10.2, 28 ng/ml)의 순서로 생산되어 비장 세포에서와 마찬가지로 cocktail DNA를 주입한 실험군에서 가장 높았다. 면역반응이 완전히 완료된 후 나타나는 기억 면역세포로터 생산되는 IFN- γ 의 양을 조사한 결과 대조군(4.4 ng/ml)에 비하여 모든 실험군에서 더 높았다. Cocktail DNA를 주입한 실험군에서 비장 세포(61.95 ng/ml)와 림프구(13.75 ng/ml) 모두에서 다른 실험군에 비하여 높았다 (Fig 3-14).

다. CD8⁺ T 세포 매개 세포성 면역반응 분석

CD8⁺ T 세포에서의 specific cytotoxic activity를 조사한 결과 음성 대조군에서는 specific killing 효과를 나타나지 않았으나, EL-4/PrVgB, EL-4/PrVgC 및 EL-4/PrVgD를 표적세포로 사용한 실험군에서는 모두 음성 대조군에 비하여 높은 specific killing 효과를 나타내었다. 각각의 glycoprotein을 발현하는 플라스미드 DNA로 백신을 한 실험군들과 각각의 플라스미드 DNA를 혼합하여 만든 cocktail 백신을 한 경우 모두에서 비장 세포와 림프구에서 EL-4/PrVgC를 표적세포로 한 경우에 specific killing 효과가 가장 높았다. 비장세포에서 effector 세포와 표적세포의 비율을 50:1로 한 경우, EL-4/PrVgC를 표적세포로 한 실험군에서 13%의 specific killing 효과가 나타났고 EL-4/PrVgB를 표적세포로 한 실험군에서는 12%, EL-4/PrVgD를 표적세포로 한 실험군에서는 8.7%의 specific killing 효과를 나타내었다. 또한 림프절 세포에서는 EL-4/PrVgC를 표적세포로 한 실험군

에서 22%의 specific killing 효과가 나타났고, EL-4/PrVgB를 표적세포로 한 실험군에서는 11.5%, EL-4/PrVgD를 표적세포로 한 실험군에서는 8.5%의 specific killing 효과를 나타내어 EL-4/PrVgC를 표적세포로 한 실험군에서 가장 높은 specific killing 효과가 나타났다. Cocktail vaccination의 경우에도 EL-4/PrVgC를 표적세포로 한 경우, 비장세포에서 14.9%, 림프절 세포에서 16.8%의 specific killing 효과를 나타내어 다른 표적세포를 대상으로 한 실험군에 비하여 가장 높았다 (Fig 3-15).

라. 공격시험

오제스키 glycoprotein 발현 플라스미드 DNA를 각 100 μ g씩 일주일 간격으로 3차례 면역시킨 후, 2주째에 5 LD₅₀의 병원성 오제스키바이러스 Yangsan주를 비강으로 감염시켜 형성된 방어면역을 관찰하였다. pCI-PrVgB를 주입한 실험군(86%)과 cocktail DNA를 주입한 실험군(100%)에서 높은 방어 면역 효과를 나타내었다 (Fig 3-16). pCI-PrVgD 실험군에서도 86%의 높은 방어면역 효과가 관찰되었다. pCI-PrVgC 실험군(29%)에서는 음성대조군(29%)과 같은 결과를 나타내었다.

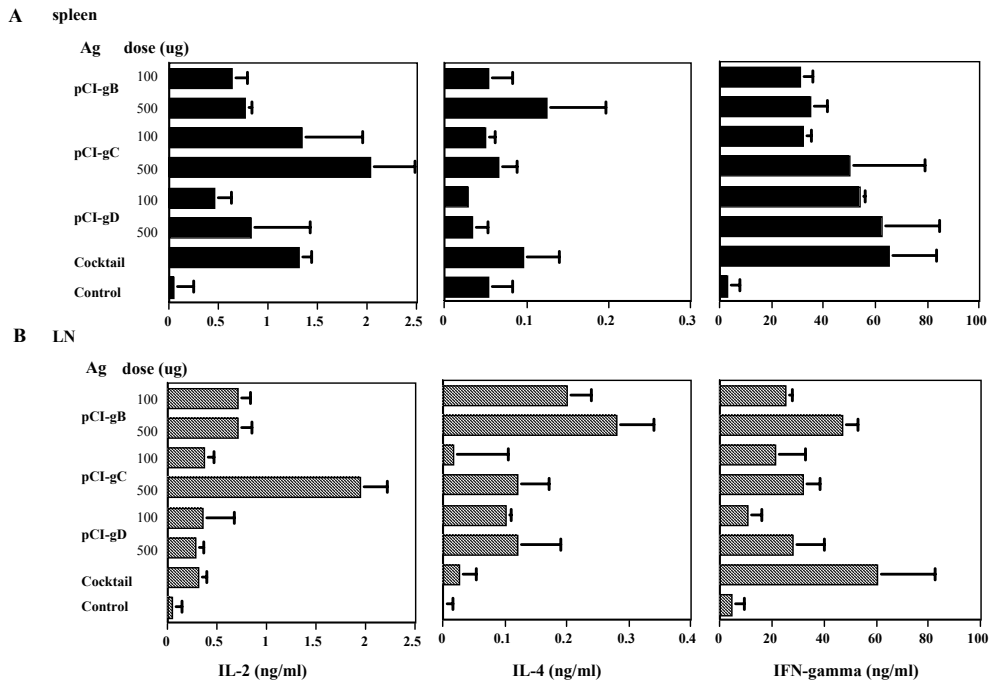


Fig 3-13. Th1- or Th2-type cytokine produced from CD4⁺ T helper cells stimulated with inactivated PrV protein Ag inactivated by UV-irradiation. C57BL/6 mice (five mice per group) immunized with PrV-encoded plasmid DNA via intramuscular route through both triceps muscle were sacrificed on day 14 following the last immunization. Immunization was performed three times at 7-days interval. Splenic T cell and LN lymphocytes (popliteal and inguinal LN) were in vitro stimulated with irradiated synergic enriched APC that have been pulsed with inactivated PrV protein Ag and then incubated for 3 days. The responder cells were three mice per experiment. Cytokine levels in the culture supernatant were determined by standard ELISA.

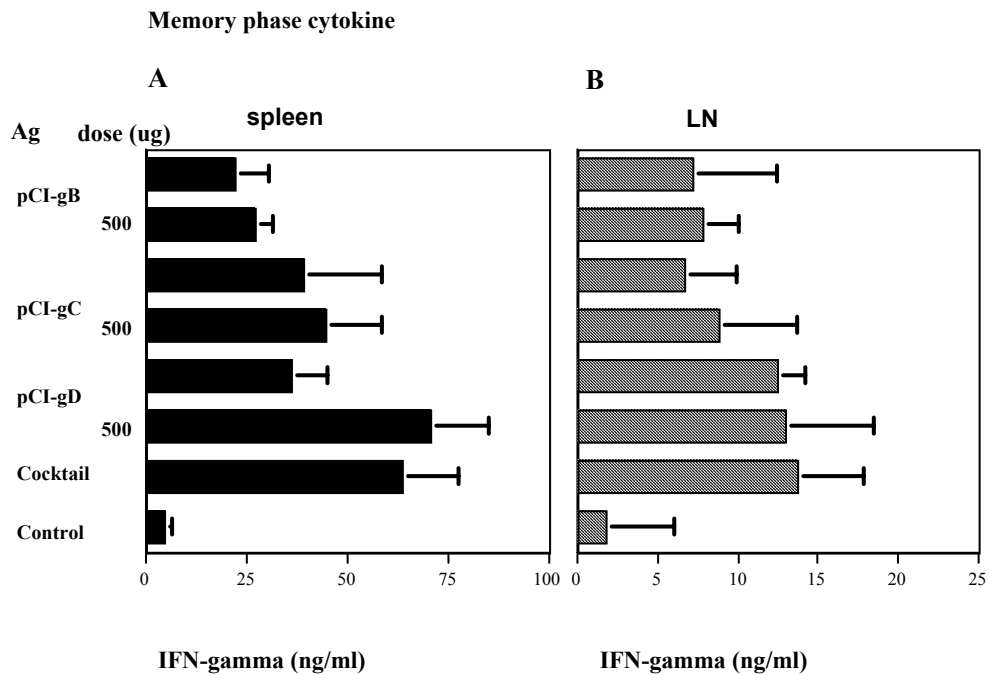


Fig 3-14 . IFN- γ produced from memory CD4⁺ T helper cells stimulated with inactivated PrV protein Ag inactivated by UV-irradiation at memory stage. C57BL/6 (five mice per group) immunized with PrV-encoded plasmid DNA via intramuscular route through both triceps muscle were sacrificed on day 5 weeks following the last immunization. Immunization was performed three times at 7-days interval. Splenic T cell and LN lymphocytes (popliteal and inguinal LN) were in vitro stimulated with irradiated synergic enriched APC that have been pulsed with inactivated PrV protein Ag and then incubated for 3 days. The responder cells were three mice per experiment. Cytokine levels in the culture supernatant were determined by standard ELISA

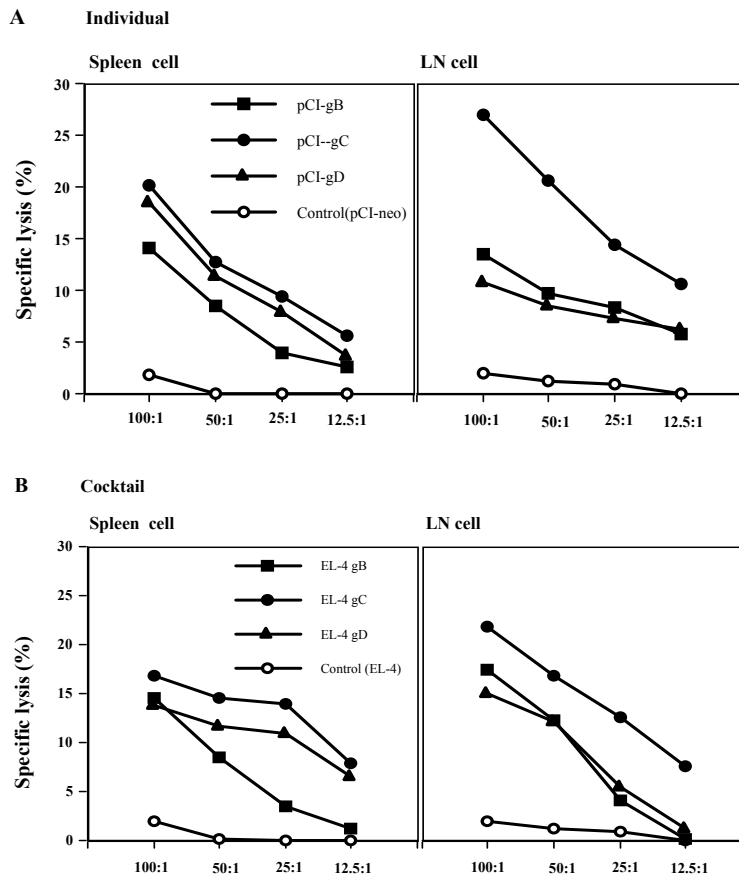


Fig 3-15. CTL activity of CD8⁺ T cell following PrV Ag-encoded plasmid DNA. C57BL/6 mice(seven per group) immunized with PrV Ag-encoded plasmid DNA. Mice in each group were immunized via intramuscular route. Vaccination was performed three times at 7-days interval. Enriched splenic T cell and DLN lymphocytes (popliteal and inguinal LN) pooled from three mice per experiment were in vitro expanded for 5 days with live PrV pulsed synergic enriched APC. At the end of the incubation period they were used as effectors in a 5h, ⁵¹Cr release CTL assay.

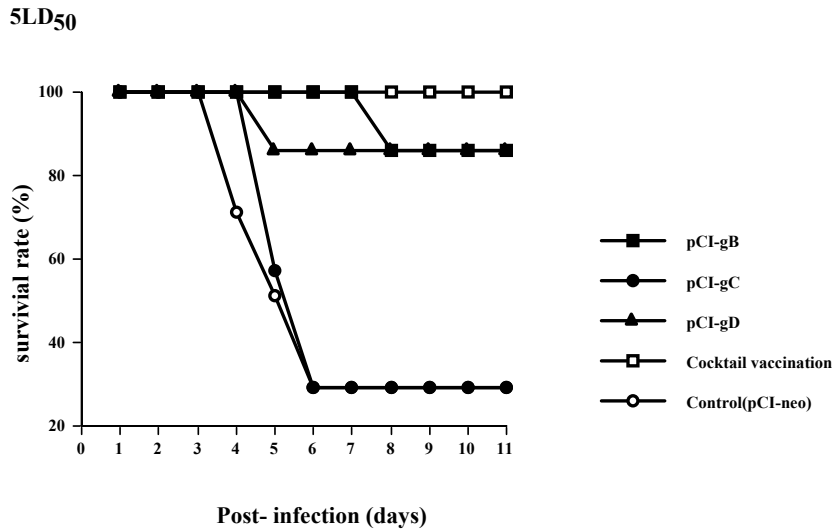


Fig 3-16. Protective immunity induced by plasmid-expressing glycoprotein antigen against intranasal infection of virulent Prv. Each group of mice was intranasally challenged with virulent PrV Yangsan strain (5LD₅₀ dose) two weeks following the last immunization. The survived mice were counted daily following intranasal challenge.

3. 인터페론 관련 사이토카인에 의한 플라스미드 DNA백신의 면역원성 조절

인터페론은 바이러스 감염에 대하여 주요하게 작용하는 항바이러스성 면역조절제이다. 그래서, 인터페론이 생산되지 않는 경우에 바이러스 감염에 대한 감수성이 증가하는 것으로 보고되어 있다. 특히, 인터페론 감마 (IFN- γ)는 CD4+ Th1-type세포로부터 생산되는 면역조절제로서 그들의 생산은 다양한 사이토카인에 의하여 영향 받는다. 그중 강력한 인터페론 감마 생산 유도제로 알려진 interleukine(IL)-12와 IL-18은 강력한 Th1-type inducer로 알려졌으며, 다양한 연구에서 DNA 백신의 강력한 면역증강제로 알려져 왔다. 또한 IFN- γ 에 의하여 생산이 조절되는 IFN- γ -inducible protein (IP)-10은 케모카인으로 알려진 물질로서 일부의 경우 백신에 대한 Th1-type inducer로 이용되어 왔다. 여기서 이와 같은

인터페론 관련 사이토카인 유전자를 이용하여 오제스키 DNA 백신에 의하여 나타나는 면역반응에 대한 영향을 조사하였다.

가. 체액성 면역 반응

1) 항원 특이 항체 검출

인터페론 관련 사이토카인, IL-12, IL-18, IFN- γ 및 IP-10에 의하여 나타나는 오제스키 DNA 백신의 면역원성 조절에 대한 영향을 조사하기 위하여 실험동물을 오제스키 항원 gB를 발현하는 DNA 백신(pCI-PrVgB)와 각 사이토카인을 발현하는 플라스미드 DNA를 세 번에 걸쳐 일주일 간격으로 면역화 하였다. 면역화는 pCI-PrVgB 100 μ g과 사이토카인 발현 DNA 200 μ g을 투여 전에 혼합하여 근육내 주사하였다. IL-12와 IL-18은 오제스키 DNA 백신(pCI-PrVgB)에 의하여 유도되는 오제스키 특이 IgG수준을 5-7배까지 억제하였다. 반대로, 두 번째 투여부터 IP-10은 오제스키 특이 항체의 수준을 나타나는 증강시켰고, IFN- γ 는 아무런 변화를 유도하지 못하였다 (Fig. 3-17).

2) 항체 isotype 분석

오제스키 DNA 백신에 의하여 유도되는 오제스키 특이 항체의 isotype IgG2a와 IgG1을 분석하였다. IgG2a는 Th1-type T 세포에 의하여 생산되는 IFN- γ 에 의하여 유되는 반면에 IgG1 isotype은 Th2-type T 세포에 의하여 생산되는 IL-4가 그의 생산을 돕는 것으로 알려졌다. 그 결과 IL-12는 IgG1의 생산을 급격하게 억제하였고 IL-18은 IgG1의 생산을 증강시켜 주었다. 다른 인터페론 관련 사이토카인은 오제스키 DNA 백신에 의하여 유도되는 IgG1 생산에 비하여 생산량을 억제하였으나 유의성 있게 나타나지 않았다. IgG2a isotype 생산에 대한 인터페론 관련 사이토카인의 영향을 분석한 결과, IL-18만이 오제스키 특이 IgG2a의 생산을 억제하였다. 따라서, IL-12는 IgG1의 생산을 억제함으로써 IgG2a/IgG1의 비율을 증시킨 반면에 IL-18은 IgG1의 생산을 증강시키고 IgG2a의 생산을 억제함으로써 IgG2a/IgG1 비율이 감소하였다. 또한 다른 인터페론 관련 사이토카인의 경우 모두 IgG2a/IgG1 비율이 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 3-18).

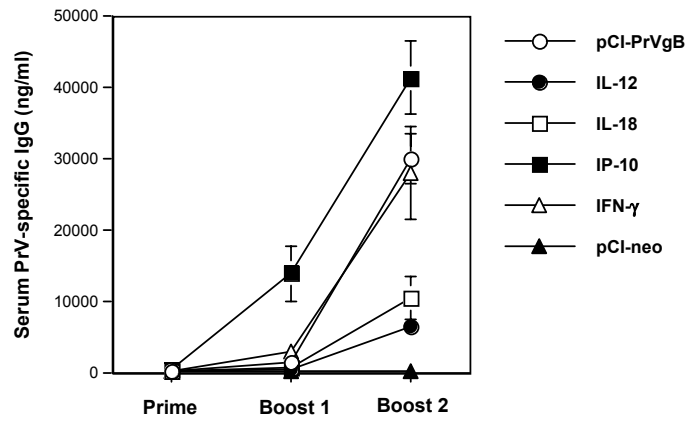


Fig. 3-17. Serum PrV-specific IgG levels of animals administered co-injection of pCI-PrVgB with plasmid DNA expressing IFN- γ -associated cytokines (IL-12, IL-18, IFN- γ , and IP-10). Groups of C57BL/6 (H-2^b) mice were immunized i.m. on three occasions at 7-day intervals. At 7th day following each immunization (Prime, Boost1, and Boost2), PrV-specific IgG levels in sera were determined by ELISA. The graphs represent the average and standard deviation from seven mice per group. *Significantly different from group administered with pCI-PrVgB DNA vaccine alone ($p < 0.05$).

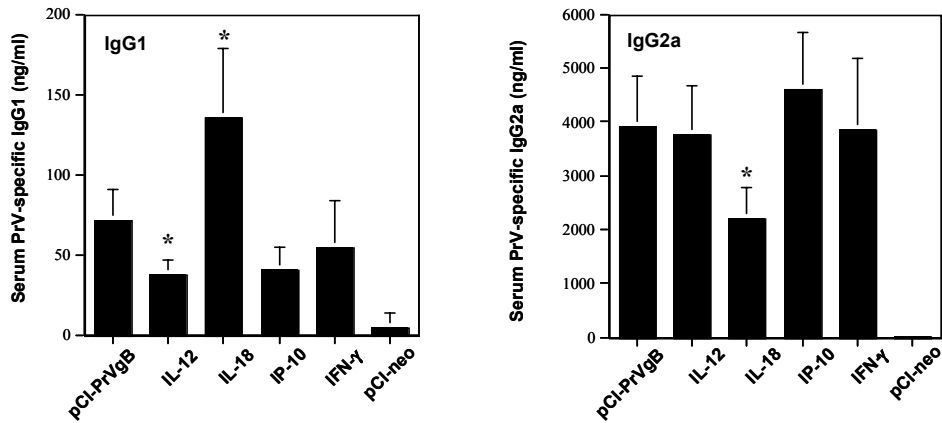


Fig. 3-18. Distribution of serum PrV-specific IgG isotype (IgG1 and IgG2a) of animals administered co-injection of pCI-PrVgB with plasmid DNA expressing IFN- Ψ -associated cytokines (IL-12, IL-18, IFN- Ψ , and IP-10). Groups of C57BL/6 (H-2b) mice were immunized i.m. on three occasions at 7-day intervals. Seven days following last immunization, the levels of PrV-specific IgG isotopes in sera were determined by ELISA. The graphs represent the average and standard deviation from seven mice per group. *Significantly different from group administered with pCI-PrVgB DNA vaccine alone ($p < 0.05$).

나. 사이토카인 생산 profile분석

인터페론 관련 사이토카인을 오제스키 DNA 백신과 함께 접종한 후 나타나는 세포성 면역의 특성을 분석하기 위하여 오제스키 항원으로 자극된 항원제시세포와 접종된 실험동물의 비장세포를 준비하여 혼합함으로써 항원 특이 T 세포를 자극하였다. 그로부터 생산되는 사이토카인의 생산을 분석한 결과, IL-12와 IL-18 및 IP-10은 IFN- γ 의 생산을 유의성 있게 증가시킨 반면에, IFN- γ 는 증강 효과를 보여주지 못하였다. IL-2 생산의 경우에는 IL-12와 IL-18이 생산을 증강시켜 주었고, IP-10과 IFN- γ 는 아무런 영향을 주지 못하였으며, IL-4생산은 인터페론 관련 사이토카인 모두가 아무런 변화를 유도하지 못하였다 (Fig. 3-19).

다. 공격시험

1) Anamnestic IgG 반응

오제스키 DNA 백신과 인터페론 관련 사이토카인 발현 DNA와 함께 세 번 면역화 한 다음, 2주후에 병독성 오제스키바이러스 Yangsan주 5LD₅₀를 비강 투여한 후 나타나는 anamnestic IgG 반응을 감염 후 3일째에 분석하였다. 그 결과 IL-12와 IL-18은 오제스키 DNA 백신과 함께 투여한 후 나타나는 오제스키 특이 항체 수준의 패턴과 같이 anamnestic IgG의 수준이 오제스키 DNA 백신 pCI-PrVgB 투여군보다 1/10 수준까지 낮게 검출되었다. 그러나, IP-10을 함께 투여하면 anamnestic IgG반응은 오제스키 DNA 백신 투여군보다 유의성 있게 증가되어 나타났고 IFN- γ 투여군은 아무런 변화가 검출되지 않았다 (Fig. 3-20).

2) 생존률 결과

오제스키 DNA 백신과 인터페론 관련 사이토카인 유전자를 함께 투여한 후 2주후 병독성 오제스키바이러스 Yangsan주 5LD₅₀를 비강 투여함으로써 공격시험을 수행하였다. 병독성 바이러스를 투여한 후 12일째 까지 실험동물의 폐사율을 측정한 결과 IL-12와 IL-18은 오제스키 DNA 백신 투여군과 비교하여 현저하게 감수성이 증가한 것으로 나타났다. IP-10투여군은 궁극적으로 오제스키 DNA 백신 단독 투여군과 비교하여 폐사율을 같게 나타냈으나 동물의 폐사 속도가 현저하게 늦게 나타남을 보여주었다. 그러나, IFN- γ 는 이와 같은 병독성 바이러스주

에 대한 공격시험에서 아무런 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다 (Fig. 3-21).

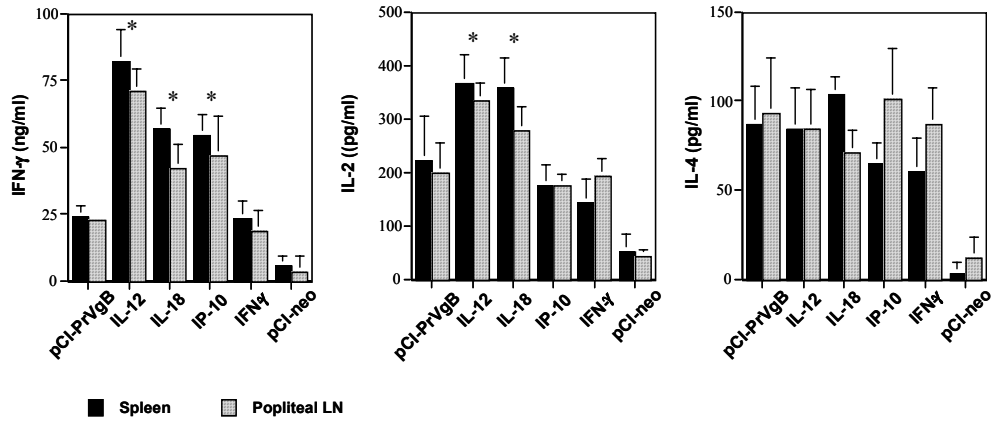


Fig. 3-19. The profile of cytokine production (IFN- γ , IL-2, and IL-4) from splenocytes and popliteal LN cells of co-immunized mice after specific restimulation with inactivated PrV Ag. Two weeks following last immunization, the responder cells (splenocytes and LN cells from immunized mice) were mixed with irradiated syngeneic enriched APCs that had been pulsed with UV-inactivated PrV and then incubated for 3 days. The levels of cytokines in supernatants of stimulated T cells were determined by cytokine ELISA. The test was done in quadruplicate wells. Each bar represents the average and standard deviation from three independent experiments. *Significantly different from group administered with pCI-PrVgB DNA vaccine alone ($p < 0.05$).

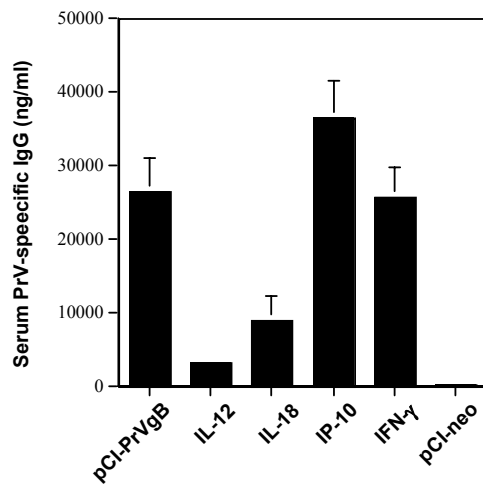


Fig. 3-20. Anamnestic PrV-specific IgG responses determined at 3-days post-challenge with virulent PrV Yangsan strain. Two weeks following last immunization, groups of mice ($n=7$) were challenged i.n. with PrV Yangsan strain ($5LD_{50}$) and then sera were collected at 3-days post-challenge. The levels of PrV-specific IgG in sera were determined by conventional ELISA. Each bar represents the average and standard deviation from seven mice per group. *Significantly different from group administered with pCI-PrVgB DNA vaccine alone ($p<0.05$).

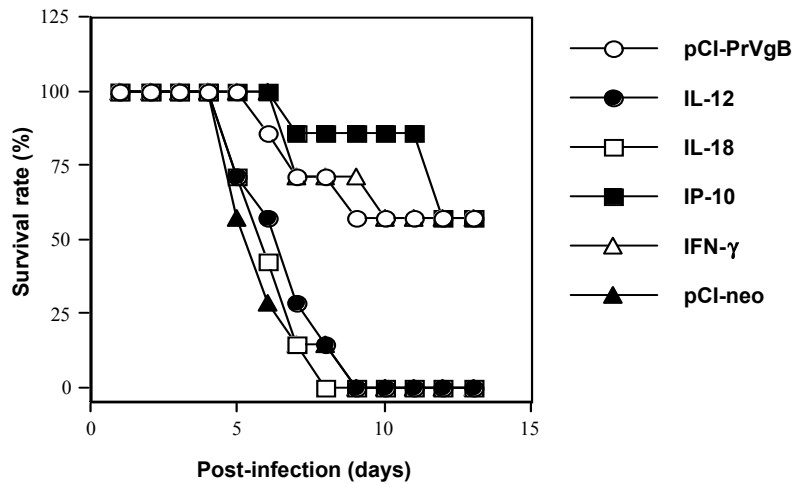


Fig. 3-21. Susceptibility of animals co-immunized with pCI-PrVgB plus plasmid DNA expressing IFN- γ -associated cytokines (IL-12, IL-18, IFN-, and IP-10) against virulent PrV Yangsan strain. Two weeks following last immunization, groups of mice ($n=7$) were challenged i.n. with PrV Yangsan stain ($5LD_{50}$). The challenged mice were examined daily for inflammation, illness, and death till 12-days post-challenge.

3) 뇌 조직내 바이러스 함량

오제스키 DNA 백신과 인터페론 관련 사이토카인 유전자를 함께 투여한 후 2주후 병독성 오제스키바이러스 Yangsan주 $5LD_{50}$ 를 비강투여 후 12일째까지 폐사한 동물 또는 살아있는 동물의 뇌에 존재하는 감염성 바이러스의 양을 plaque assay에 의하여 양을 측정하였다. 그 결과 IL-12와 IL-18을 투여한 그룹에서는 보다 많은 양의 감염성 바이러스가 실험동물의 뇌에서 검출되었으며 IP-10은 오제스키 DNA 백신 단독 투여군보다 낮은 양의 바이러스가 검출되었다. 그러나, IFN- γ 투여군은 이와 같은 뇌내 감염성 바이러스의 양에 아무런 변화를 유도하지 못하였다 (Fig. 3-22).

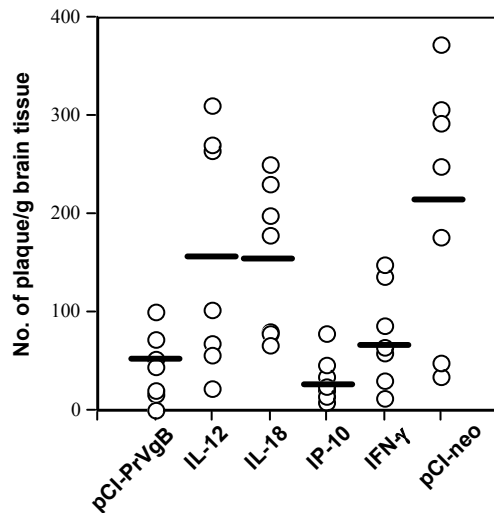


Fig. 3-22. The content of infectious virus in brain tissues of infected animals. Brain tissues were incised from infected mice at 12-days post-challenge. The content of infectious virus was determined by plaque assay after weighing brain tissues and preparing tissue soaps. The open circles represent individual virus titer of mice, and the black lines represent the average virus titer in each group.

4. GM-CSF 유전자에 의한 플라스미드 DNA 백신의 면역원성 조절

DNA 백신에 의하여 발현되는 항원에 대한 면역 반응이 유도될 수 있는 기전은 주입된 DNA 백신을 투여 주위의 항원제시세포, 특히 미분화 수지상 세포 (dendritic cell)가 투여된 DNA 백신을 취한 후 세포 안에서 생산되거나 다른 세포로부터 생산되는 항원을 특이 T 세포에 제시함으로써 유도되는 것으로 믿고 있다. 따라서, 이와 같은 항원제시세포에 보다 많은 항원을 유도하면 보다 효과적인 항원 특이 반응이 유도될 수 있을 것으로 생각된다. 이와 같은 면에서 granulocyte/macrophage colony-stimulatory factor(GM-CSF)는 매우 매력적인 DNA 백신의 면역 증강제로 여겨질 수 있다. GM-CSF는 항원제시세포를 유도하고 미분화 항원제시세포의 분화를 돕는 사이토카인으로 알려져 있다. 그 외 대식

세포의 phagocytosis의 증가, major histocompatibility class II 발현증가 및 항원 제시능의 증가 등의 생물학적 기능을 갖고 있어 DNA 백신에 의하여 유도되는 면역원성을 효과적으로 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서, 이와 같은 GM-CSF의 유전자를 이용하여 오제스키 DNA 백신에 의하여 유도되는 면역원성의 조절 기능에 대하여 조사하여 보았다.

가. 체액성 면역 반응

1) 항원 특이 항체 검출

GM-CSF유전자에 의한 오제스키 DNA 백신의 면역원성 조절에 대하여 조사하기 위하여 오제스키 DNA 백신 pCI-PrVgB와 GM-CSF발현 플라스미드 DNA를 투여 전에 혼합하고 일주일 간격으로 세 번 면역화 하였다. 면역화는 pCI-PrVgB 100 μ g과 GM-CSF 200 μ g을 혼합하여 근육내 주사하였다. 그 결과 대조군인 pCI-neo는 아무런 오제스키 특이 항체의 유도를 보여주지 못하였고, 오제스키 DNA 백신은 두 번째와 세 번째 투여에서 오제스키 항체의 수준이 급격하게 증가되었다. 이와 같은 오제스키 특이 항체의 유도는 GM-CSF유전자를 함께 투여하게 되면 2-3배 까지 증가하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3-23).

2) 항체 isotype 분석

GM-CSF유전자와 오제스키 DNA 백신 pCI-PrVgB를 함께 투여한 후 나타나는 오제스키 특이 항체의 isotype profile을 분석하였다. GM-CSF유전자는 오제스키 특이 IgG2a isotype의 생산량을 감소시킨 반면에 IgG1 isotype의 생산은 증가시켰다. 따라서, 함께 투여한 GM-CSF는 오제스키 DNA 백신에 의하여 유도되는 항체 isotype 비율 (IgG2a/IgG1)을 현저하게 감소시켜 Th2-type을 보여 주는 것으로 나타났다 (Fig. 3-24).

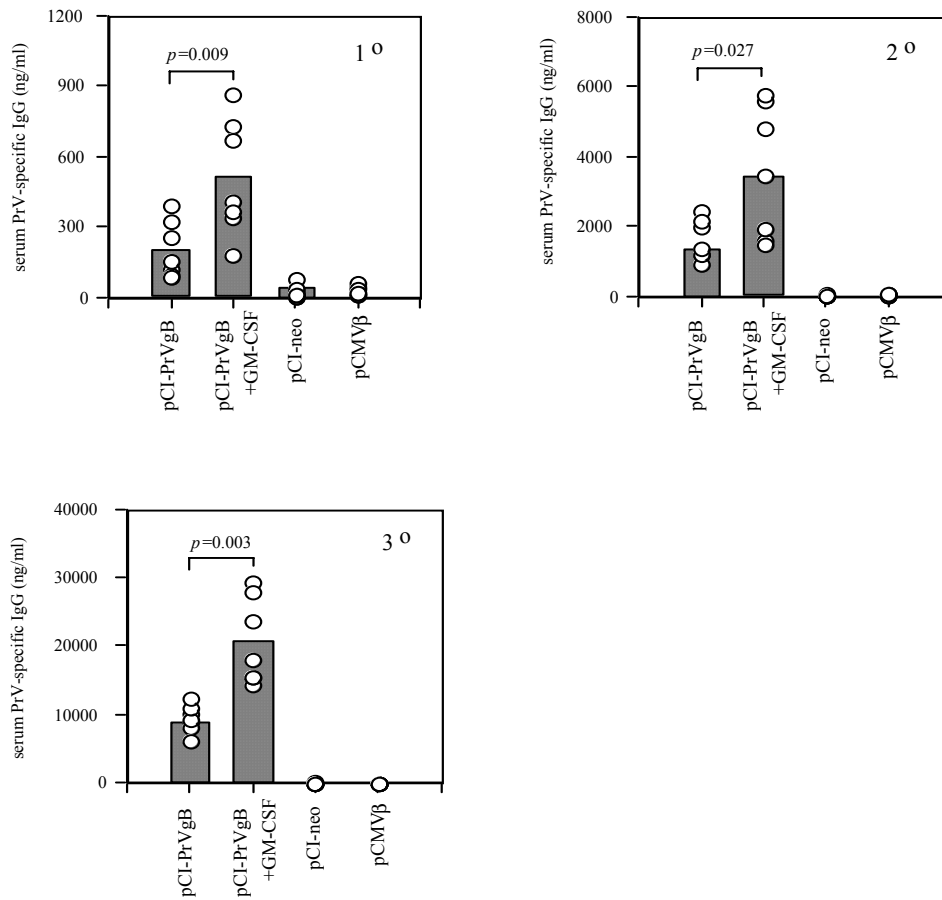


Fig. 3-23. Serum PrV-specific IgG levels of the animals co-injected with pCI-PrVgB and plasmid DNA expressing GM-CSF. Groups of C57BL/6 (H-2^b) mice were immunized i.m. on three occasions at 7-day intervals. On the 7th day after each immunization (1°, 2°, and 3°), the PrV-specific IgG levels in sera were determined by ELISA. The spots on the graph represent the individual serum IgG level and the bars show the average of each group.

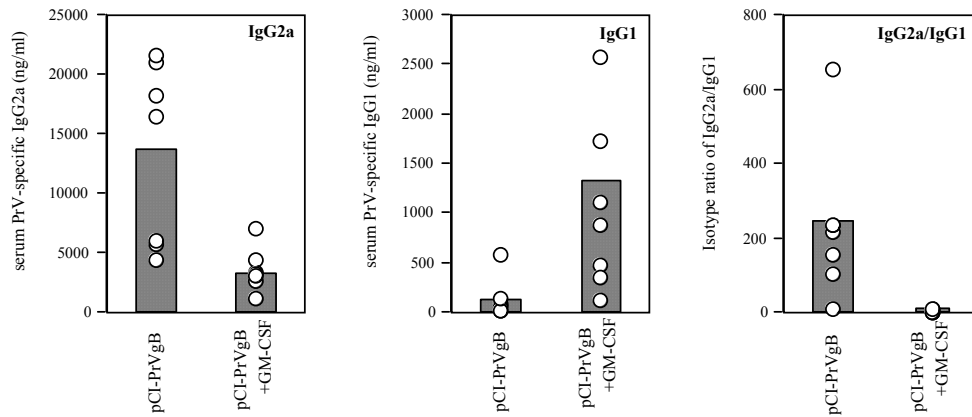


Fig. 3-24. Distribution of the serum PrV-specific IgG isotype (IgG1 and IgG2a) of the animals administered a co-injection of pCI-PrVgB with the plasmid DNA expressing GM-CSF. Groups of C57BL/6 (H-2b) mice were immunized i.m. on three occasions at 7-day intervals. Seven days after the final immunization, the levels of the PrV-specific IgG isotypes, (A) IgG2a, (B) IgG1, and (C) the ratio of IgG2a/IgG1, in sera were determined by ELISA. The spots in graph represent the individual serum IgG level and the bars show the average of each group.

나. 사이토카인 생산 profile분석

GM-CSF 유전자와 오제스키 DNA 백신을 일주일 간격으로 세 번 접종 한 후 이주일 후에 비장세포와 림프절 세포를 얻어 오제스키 항원으로 자극된 항원제시 세포와 혼합하여 오제스키 특이 T세포부터 생산되는 사이토카인의 생성 양상을 분석하였다. 대조군으로 이용된 pCI-neo와 pCMV β (β -galactosidase발현) 접종군은 항원 자극에 의하여 유의성 있게 IL-2, IL-4 및 IFN- γ 가 생산되지 않았고, 오제스키 DNA 백신 접종군은 세가지의 사이토카인 생산이 검출되었다. 그와 같은 오제스키 DNA pCI-PrVgB접종군에서 생산된 사이토카인은 GM-CSF의 혼합투여에 의하여 증가되었다. 특히, IL-2와 IFN- γ 의 생산이 2-3배 까지 증가된 반면에 IL-4는 감소를 보여주었지만 유의성있게 나타나지 않았다. 따라서, GM-CSF

는 Th1-type의 세포성 반응을 유도하는 것으로 보여진다 (Fig. 3-25).

다. 공격시험

1) Anamnestic IgG 반응

오제스키 DNA 백신과 GM-CSF유전자를 함께 일주일 간격으로 세 번 접종하고 이주일후에 병독성 오제스키 바이러스 Yangsan주 10LD₅₀를 비강 투여하여 면역화된 실험동물을 감염시켰다. 그리고, 감염 후 3일째 나타나는 anamnestic IgG 반응을 ELISA에 의하여 분석하였다. 그 결과 GM-CSF를 함께 투여한 접종군에서 2배이상의 높은 anamnestic IgG 반응이 유도됨을 알 수 있었다 (Fig. 3-26).

2) 생존률 결과

오제스키 DNA 백신과 GM-CSF유전자를 일주일 간격으로 세 번 접종하고 이주일 후에 병독성 오제스키 바이러스 Yangsan주 10LD₅₀를 비강으로 감염 후 나타나는 실험동물의 폐사율을 측정하였다. 대조군으로 이용된 pCI-neo와 pCMV β 접종군은 아무런 방어효과를 보여주지 못하고 감염 후 5-6일 사이에 모든 실험동물이 폐사되었다. 반면에 오제스키 DNA 백신 접종군은 11일째까지 14.3%의 생존률을 보여주었고, 그와 같은 생존률은 GM-CSF 접종군에서 57%로 상승되었다. 따라서, GM-CSF유전자는 오제스키 DNA 백신에 의하여 나타나는 방어 면역을 크게 증가시키는 것으로 나타났다 (Fig. 3-27).

3) 뇌 조직내 바이러스 함량

오제스키 DNA 백신과 GM-CSF유전자를 함께 일주일 간격으로 세 번 접종하고 병독성 오제스키 바이러스 Yangsan주 10LD₅₀를 비강 감염한 후 12일째에 살아있는 실험동물 및 폐사된 실험동물의 뇌내에 존재하는 감염성 바이러스의 양을 plaque assay에 의하여 정량하였다. 그 결과 대조군 pCI-neo와 pCMV β 접종군은 다른 그룹에 비교하여 많은 양의 감염성 바이러스가 검출되었고 오제스키 DNA 백신 단독 접종군에서 검출된 바이러스의 함량은 GM-CSF를 함께 투여함으로써 1/2수준이하로 감소되었다 (Fig. 3-28).

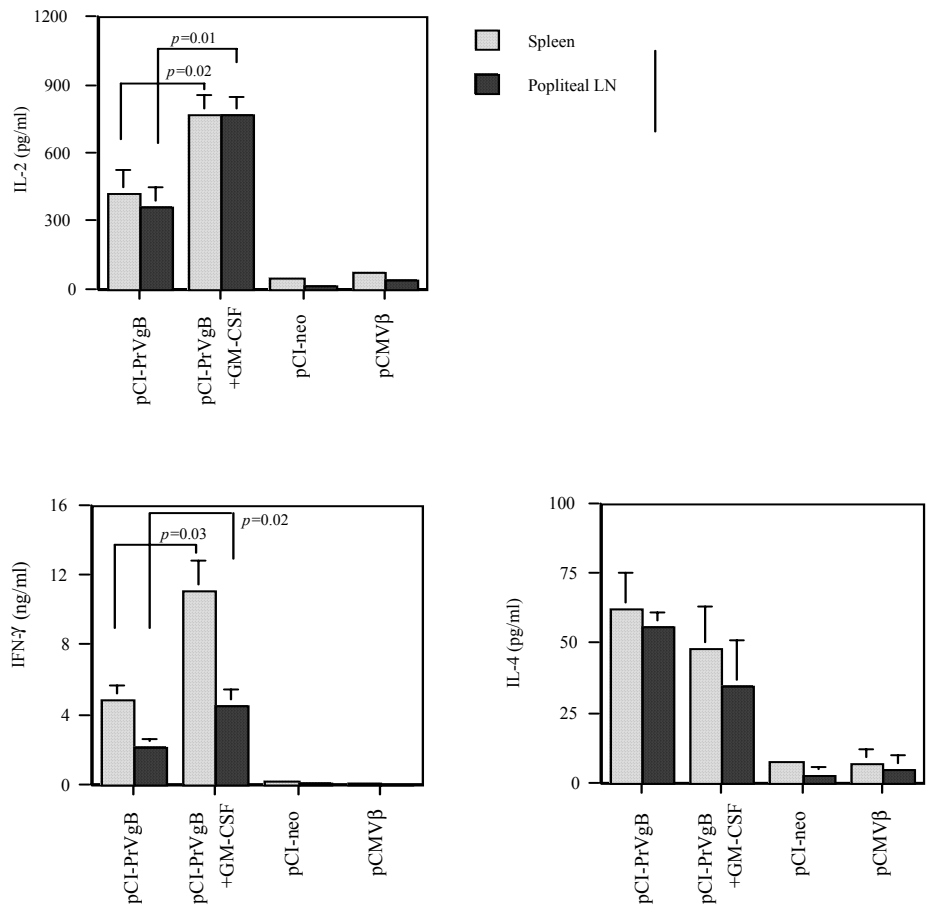


Fig. 3-25. The profile of cytokine production (IFN- γ , IL-2, and IL-4) from the splenocytes and popliteal LN cells of the co-immunized mice after the specific restimulation with the inactivated PrV Ag. Two weeks after the final immunization, the responder cells (splenocytes and LN cells from the immunized mice) were mixed with the irradiated syngeneic enriched APCs that had been pulsed with UV-inactivated PrV and then incubated for 3 days. The levels of cytokines in the supernatants of the stimulated T cells were determined by cytokine ELISA. The test was carried out in quadruplicate wells. Each bar represents the average and standard deviation from three independent experiments.

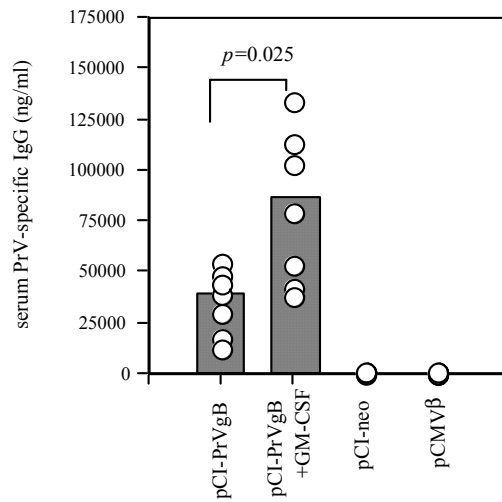


Fig. 3-26. Anamnestic PrV-specific IgG responses determined at 3-days post-challenge with the virulent PrV Yangsan strain. Two weeks after the final immunization, groups of mice ($n=7$) were challenged i.n. with the PrV Yangsan strain ($10LD_{50}$) and the sera were then collected at 3-days post-challenge. Conventional ELISA was used to determine the levels of the PrV-specific IgG in the sera. The spots in graph represent the individual serum IgG level and bars show the average of each group.

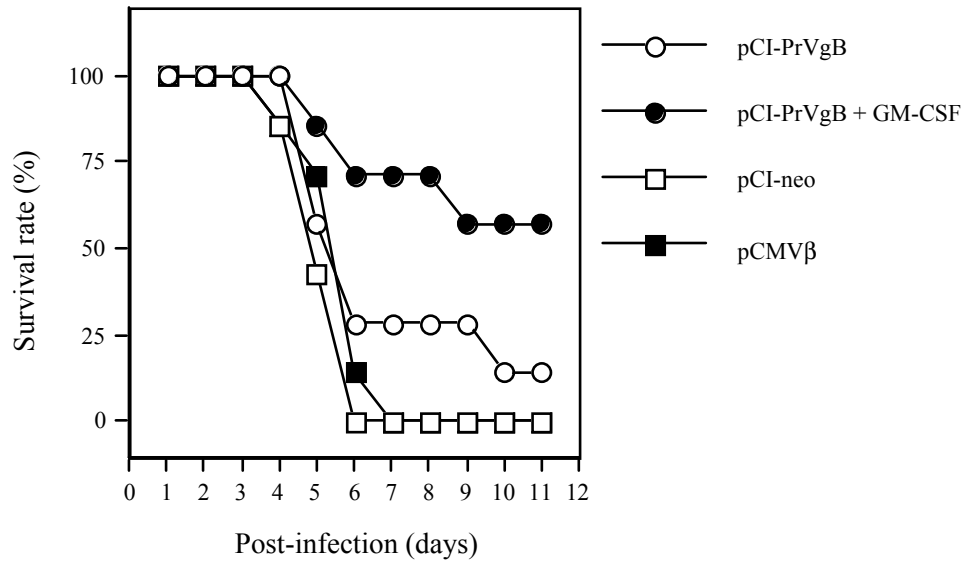


Fig. 3-27. Susceptibility of the animals co-immunized with pCI-PrVgB plus plasmid DNA expressing GM-CSF against the virulent PrV Yangsan strain. Two weeks after the final immunization, groups of mice ($n=7$) were challenged i.n. with the PrV Yangsan strain ($10LD_{50}$). The challenged mice were examined daily for any signs of inflammation, illness, and death until 11-days post-challenge.

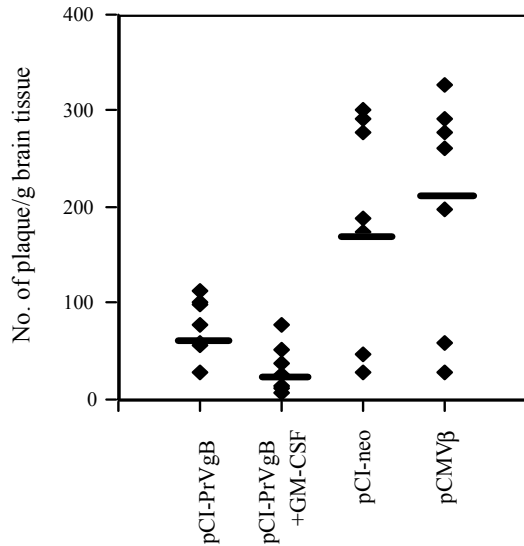


Fig. 3-28. The content of the infectious virus in the brain tissues of the infected animals. The brain tissues were incised from the infected mice at 11-days post-challenge. The content of the infectious virus was determined using a plaque assay after weighing the brain tissues and preparing the tissue soaps. The closed spots represent the individual virus titer of the mice, and the black lines represent the average virus titer in each group.

5. 케모카인 유전자에 의한 플라스미드 DNA 백신의 면역원성 조절

케모카인은 많은 면역 관련 세포들의 이동과 반응을 조절하는 물질로 알려져 있고, 각종 염증 반응에 관여하는 것으로 알려졌다. 케모카인은 N-terminal cysteine의 위치에 따라 크게 세 개의 그룹, CXC(α), CC(β), 및 C(ψ)으로 분류되고 현재까지 50여개 이상의 케모카인 물질이 발견되었다. 실제적으로, 많은 케모카인이 서로간에 중복되는 생물학적 기능을 갖고 있으며 바이러스 감염에 대한 숙주의 방어기구 및 병리기전에 있어서 그들의 정확한 역할이 아직 완벽하게 밝혀져 있지 않다. 최근에 케모카인의 생산에 있어서 CD8+ T세포의 역할이 보고된 바 있고, 많은 선천성 면역에 관여하는 세포들이 이와 같은 다양한 케모카인을 생산하며 생산된 케모카인은 궁극적으로 적응면역의 특성 형성에 영향을 주는 것

으로 의심된다. 따라서, 이와 같은 케모카인의 오제스키 DNA 백신에 의하여 유도되는 면역반응에 대한 영향을 조사하여 오제스키 DNA 백신의 효능을 증가시켜 줄 수 있는가를 분석하였다.

가. 체액성 면역 반응

1) 항원 특이 항체 검출

오제스키 DNA 백신 pCI-PrVgB와 케모카인 발현 플라스미드 DNA, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β 및 MIP-2를 일주일 간격으로 세 번 접종하였다. 면역화는 접종전에 오제스키 DNA 백신 100 μ g과 케모카인 유전자 200 μ g을 섞고 근육내 주사하였다. 1차 접종 후 케모카인 유전자는 오제스키 DNA 백신에 의하여 유도되는 오제스키 특이 IgG의 수준에 아무런 영향을 주지 못하였으나, 2차 접종 후 RANTES와 MIP-2가 유의성 있게 오제스키 특이 항체의 수준을 증가시키는 것을 보여 주었다. 그리고, 그와 같은 증가는 3차 접종 후 더욱 확연하게 나타났는데 RANTES와 MIP-2는 두 배정도 수준까지 오제스키 DNA 백신에 의하여 나타나는 오제스키 특이 IgG의 수준을 증가 시켜 주었다. 그러나, MIP-1 α 는 오히려 유도되는 오제스키 특이 IgG의 수준을 감소시켰고 MIP-1 β 는 아무런 변화를 유도하지 못하는 것으로 나타났다 (Fig. 3-29).

2) 항체 isotype 분석

오제스키 DNA 백신에 의하여 유도되는 오제스키 특이 항체의 isotype 패턴이 케모카인 유전자에 의하여 변화가 유발되는가를 측정하였다. 오제스키 DNA 백신과 케모카인 유전자를 일주일 간격으로 세 번 접종하고 마지막 접종 후 일주일 후에 오제스키 특이 IgG isotype, IgG2a와 IgG1의 분포를 조사하였다. MIP-1 α 는 오제스키 특이 IgG2a의 생산을 현저히 감소시킨 반면에 다른 케모카인 유전자들은 IgG2a의 생산에 아무런 변화를 유도하지 못하였다. 그리고, IgG1 생산에 대한 영향을 분석한 결과 이용된 모든 케모카인 유전자들은 오제스키 IgG1 생산을 억제하였고, 이와 같은 결과를 바탕으로 IgG2a/IgG1 비율을 계산한 결과 사용된 모든 케모카인은 IgG2a/IgG1의 비율을 증가시키는 Th1-type 패턴을 보여주었다 (Fig. 3-30).

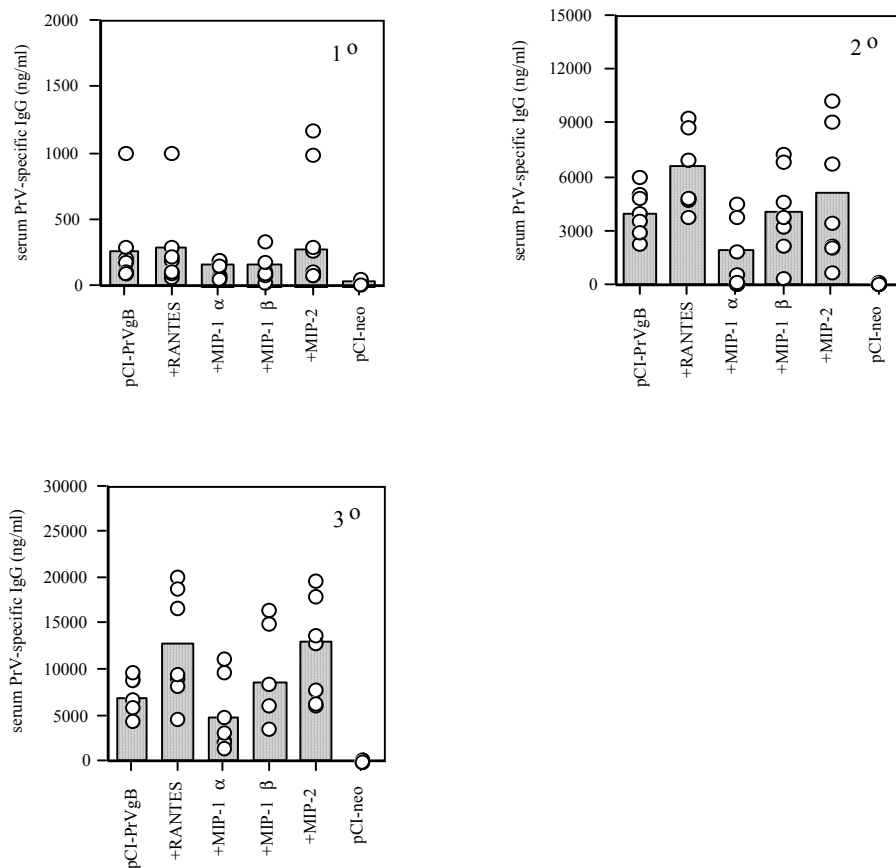


Fig. 3-29. Serum PrV-specific IgG levels of the animals co-injected with pCI-PrVgB and plasmid DNA expressing chemokines. Groups of C57BL/6 (H-2^b) mice were immunized i.m. on three occasions at 7-day intervals. On the 7th day after each immunization (1°, 2°, and 3°), the PrV-specific IgG levels in sera were determined by ELISA. The spots on the graph represent the individual serum IgG level and the bars show the average of each group.

나. 사이토카인 생산 profile분석

오제스키 DNA 백신과 케모카인 유전자를 일주일 간격으로 세 번 근육내 주사한 후 마지막 면역화 후 이주일 후에 비장세포와 림프절 세포를 준비하고 오제스키 항원으로 자극된 항원제시세포와 혼합하여 오제스키 특이 T 세포로부터 생산되는 사이토카인의 생산 패턴을 분석하였다. 사용된 모든 케모카인 유전자는 오제스키 특이 T 세포로부터 생산되는 IL-2의 생산에 아무런 변화를 주지 못했으나, IL-4와 IFN- γ 의 생산에 변화를 유도하였다. IL-4는 MIP-1 α 와 MIP-2에 의하여 오제스키 DNA 백신 단독 투여군보다 증가된 생산을 보여 주었고, RANTES는 IL-4생산을 증가시켰으나 유의성 있게 나타나지 않았으며 MIP-1 β 는 변화를 유도하지 못하였다. IFN- γ 의 생산은 RANTES와 MIP-2에 의하여 크게 증가되었고, MIP-1 α 와 MIP-1 β 는 증가를 유도하였지만 유의성을 보여 주진 못하였다. 따라서, RANTES는 Th1-type 세포성 반응을 유도하고 MIP-1 α 는 Th2-type, MIP-1 β 는 Th1-type 세포성 반응 보이지만 강력하지 않고, MIP-2는 혼합된 형태의 반응 패턴을 보여주는 것으로 나타났다 (Fig. 3-31 and 3-32).

다. 공격시험

1) Anamnestic IgG 반응

오제스키 DNA 백신과 케모카인 유전자를 일주일 간격으로 세 번 근육내 접종함으로써 면역화한 후 이주일후에 병독성 오제스키 바이러스 Yangsan주 10LD₅₀을 비강 감염한 후 3일째에 나타나는 anamnestic IgG 반응을 분석하였다. 케모카인에 의하여 유도되는 오제스키 특이 IgG수준과 같이 감염 후 나타나는 anamnestic IgG 반응은 RANTES와 MIP-2를 함께 투여한 접종군에서 유의성 있게 높게 나타났다. 나머지 MIP-1 α 와 MIP-1 β 는 오제스키 DNA 백신 단독 접종군보다 낮은 수준을 보여 주었으나 유의성 있게 나타나지 않았다 (Fig. 3-33).

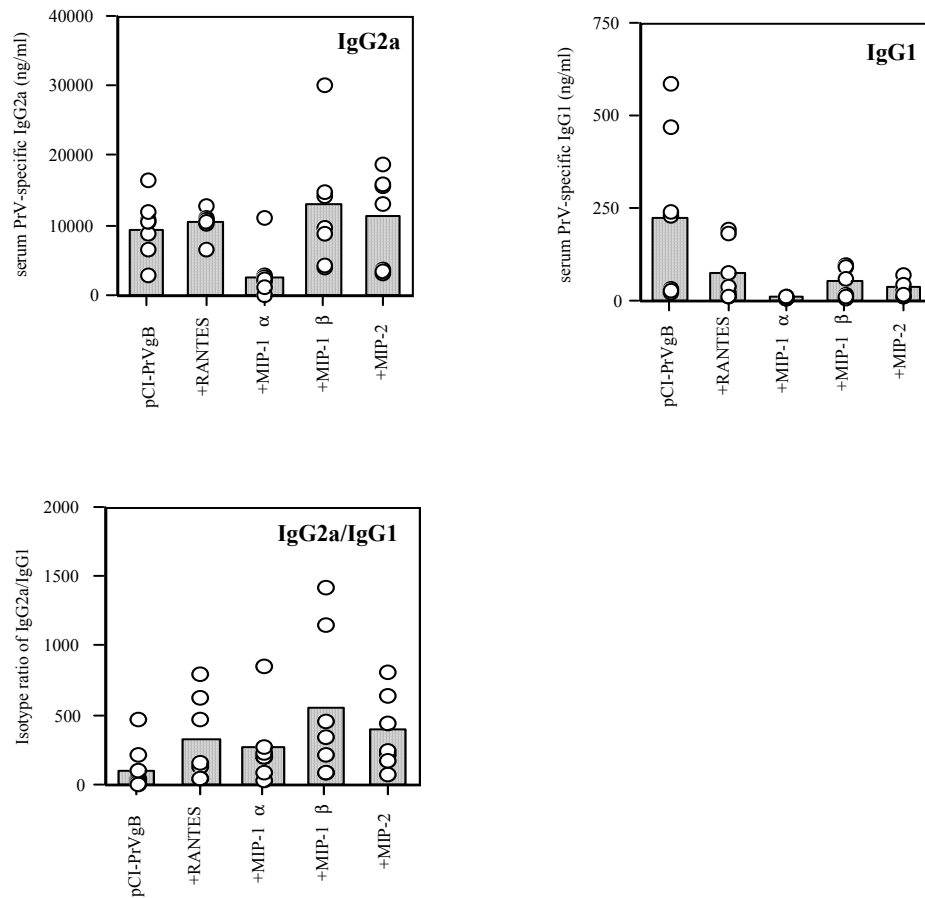


Fig. 3-30. Distribution of the serum PrV-specific IgG isotype (IgG1 and IgG2a) of the animals administered a co-injection of pCI-PrVgB with the plasmid DNA expressing chemokines. Groups of C57BL/6 (H-2b) mice were immunized i.m. on three occasions at 7-day intervals. Seven days after the final immunization, the levels of the PrV-specific IgG isotypes, (A) IgG2a, (B) IgG1, and (C) the ratio of IgG2a/IgG1, in sera were determined by ELISA. The spots in graph represent the individual serum IgG level and the bars show the average of each group.

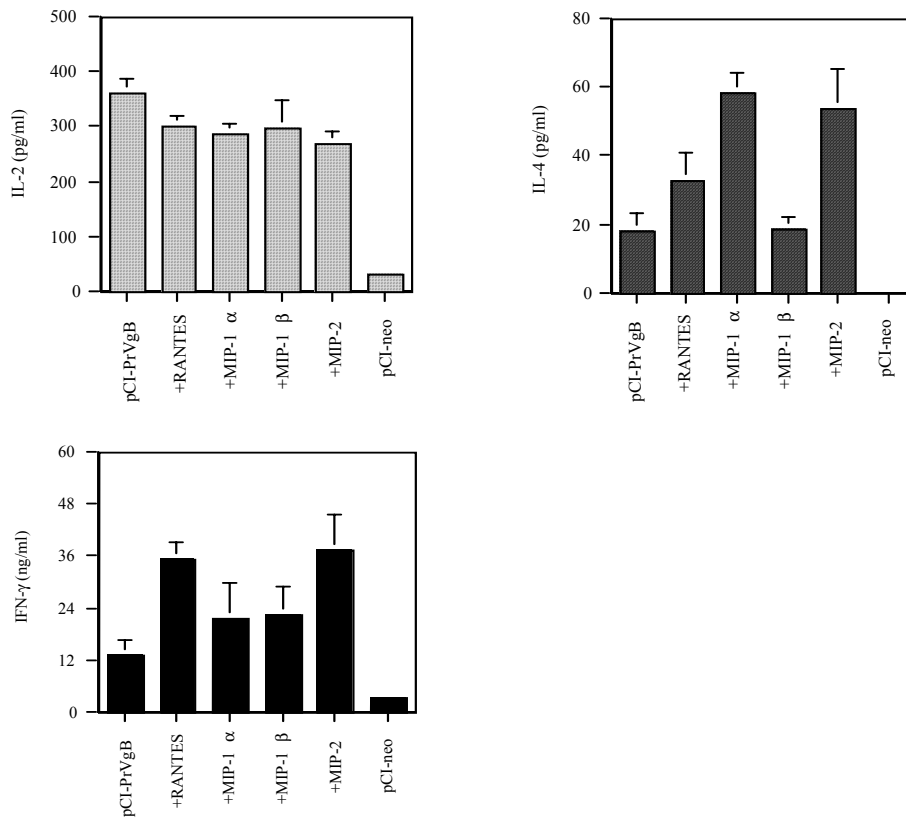


Fig. 3-31. The profile of cytokine production (IFN- γ , IL-2, and IL-4) from the splenocytes of the co-immunized mice after the specific restimulation with the inactivated PrV Ag. Two weeks after the final immunization, the responder cells (splenocytes from the immunized mice) were mixed with the irradiated syngeneic enriched APCs that had been pulsed with UV-inactivated PrV and then incubated for 3 days. The levels of cytokines in the supernatants of the stimulated T cells were determined by cytokine ELISA. The test was carried out in quadruplicate wells. Each bar represents the average and standard deviation from three independent experiments.

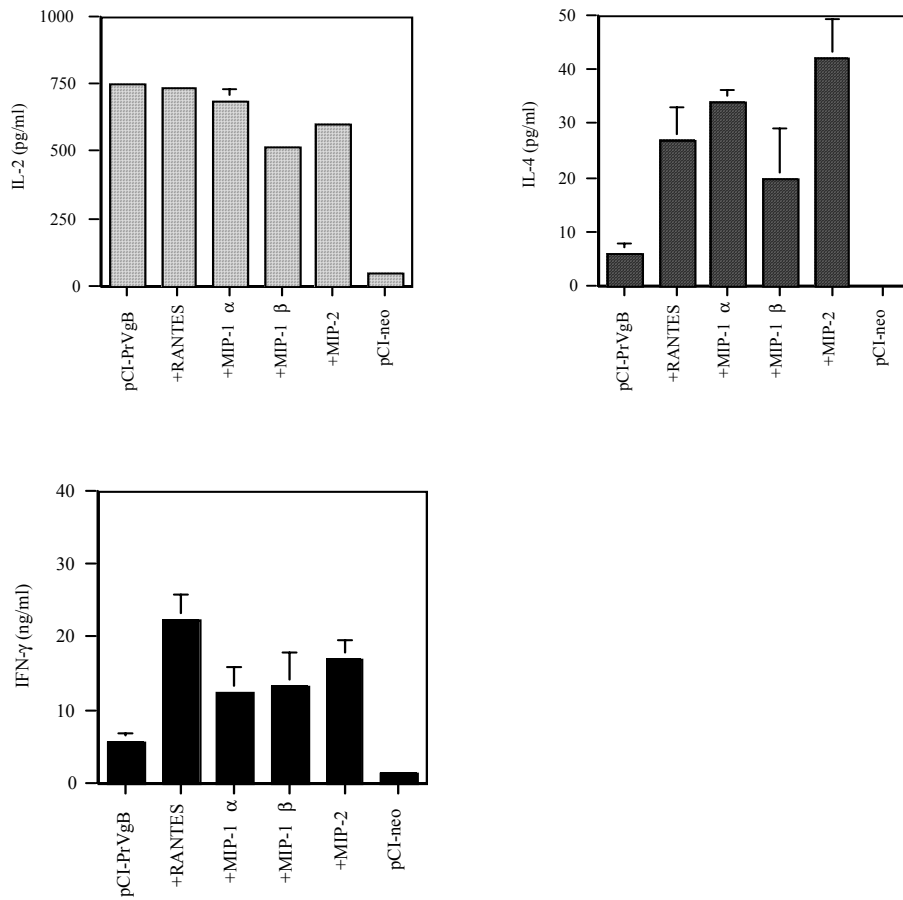


Fig. 3-32. The profile of cytokine production (IFN- γ , IL-2, and IL-4) from popliteal LN cells of the co-immunized mice after the specific restimulation with the inactivated PrV Ag. Two weeks after the final immunization, the responder cells (LN cells from the immunized mice) were mixed with the irradiated syngeneic enriched APCs that had been pulsed with UV-inactivated PrV and then incubated for 3 days. The levels of cytokines in the supernatants of the stimulated T cells were determined by cytokine ELISA. The test was carried out in quadruplicate wells. Each bar represents the average and standard deviation from three independent experiments.

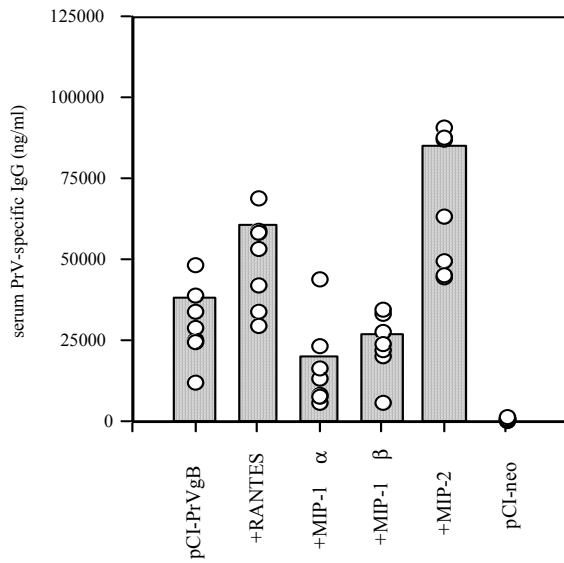


Fig. 3-33. Anamnestic PrV-specific IgG responses determined at 3-days post-challenge with the virulent PrV Yangsan strain. Two weeks after the final immunization, groups of mice ($n=7$) were challenged i.n. with the PrV Yangsan strain ($10LD_{50}$) and the sera were then collected at 3-days post-challenge. Conventional ELISA was used to determine the levels of the PrV-specific IgG in the sera. The spots in graph represent the individual serum IgG level and bars show the average of each group.

2) 생존률 결과

오제스키 DNA 백신과 케모카인 유전자를 이용하여 세 번 면역화한 후 2주일 후에 병독성 오제스키바이러스 Yangsan주 10LD₅₀을 비강 투여하여 감염시켰다. 감염 후 매일 실험동물의 폐사율을 측정하여 케모카인 유전자에 의하여 유도되는 방어면역을 분석하였다. 그 결과 RANTES와 MIP-2가 유의성 있게 오제스키 DNA 백신 단독 접종군보다 증가된 생존율을 보여 주었고 MIP-1 α 와 MIP-1 β 는 아무런 증가 효과를 보여 주지 못하였다. 평균 폐사율 날짜를 측정하여 계산한 결과 마찬가지로 RANTES와 MIP-2가 증가된 숫자를 보여 RANTES와 MIP-2가 감염 동물의 생존 기간을 증가시키는 것으로 나타났다 (Table 3-1).

Table 3-1. Protective immunity induced by genetic co-transfer of chemokines against challenge of pseudorabies virus

Immunization ^a	No. survived/No. challenged at Day post-challenge (%)												Avg. time of death± SD(days)
	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	
pCI-PrVgB	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	5/7(71.4)	3/7(42.8)	2/7(28.6)	2/7(28.6)	2/7(28.6)	1/7(14.3)	1/7(14.3)	7.3±2.7
+RANTES	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	6/7(85.7)	5/7(71.4)	5/7(71.4)	4/7(57.1)	4/7(57.1)	3/7(42.8)	10.7±3.6
+MIP-1 α	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	6/7(85.7)	6/7(85.7)	4/7(57.1)	3/7(42.8)	2/7(28.6)	2/7(28.6)	1/7(14.3)	8.4±2.4
+MIP-1 β	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	4/7(57.1)	4/7(57.1)	4/7(57.1)	3/7(42.8)	3/7(42.8)	3/7(42.8)	1/7(14.3)	8.1±3.2
+MIP-2	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	6/7(85.7)	6/7(85.7)	6/7(85.7)	4/7(57.1)	3/7(42.8)	3/7(42.8)	2/7(28.6)	10.0±3.6
pCI-neo	7/7(100)	7/7(100)	7/7(100)	6/7(85.7)	2/7(28.6)	1/7(14.3)	0/7(0.00)	0/7(0.00)	0/7(0.00)	0/7(0.00)	0/7(0.00)	0/7(0.00)	5.2±0.9

^aTwo weeks after the final immunization, groups of mice ($n=7$) were challenged i.n. with the PrV Yangsan strain (10LD₅₀). The challenged mice were examined daily for any signs of inflammation, illness, and death until 11-days post-challenge.

제 4 절 연구의 요약 및 결론

본 연구의 목적은 오제스키바이러스 감염에 대한 플라스미드 DNA 백신용 후보항원을 도출하고 오제스키 DNA 백신의 면역원성을 증가시켜 현장에 적용될 수 있는 최적의 예방 접종에 대한 기초 자료를 얻음으로써 오제스키 질병 발생 억제에 대한 새로운 예방 접종용 개발에 대한 도움을 주고자 시작되었다. 따라서, 후보 항원으로 이용될 수 있는 항원 유전자를 클로닝하여 DNA 백신용 발현 벡터에서 발현시켜 각 후보 항원들에 의하여 나타나는 면역원성들을 비교 검토하였다. 후보 항원 클로닝과 발현은 western blot과 RT-PCR 방법에 의하여 증명하였다. 각 후보 항원을 발현하는 제작된 오제스키 DNA 백신을 이용하여 면역화하여 나타나는 면역 반응의 특성을 분석한 결과, 사용된 후보 항원 중 glycoprotein B(gB)가 체액성 면역이나 세포성 면역에서 가장 우수한 결과를 보여 주었고 다른 후보 항원들은 각자의 다른 면역원성의 특성을 보여 주었다. 특히 gC는 오제스키 특이 세포독성 T 세포의 활성이 가장 우수하게 나타난 반면에 gD는 오제스키 특이 세포독성 T 세포 반응이 낮게 나타났으나 항체 반응은 우수하게 나타났다. 이와 같은 후보 항원 발현 오제스키 DNA 백신으로 면역화한 후 병원성 오제스키 바이러스를 이용하여 공격 시험을 수행한 결과 오제스키 후보 항원 중 gB 유전자를 발현하는 오제스키 DNA 백신이 가장 우수한 방어효과를 보여 주었고, 특히 세 가지 후보 항원 혼합한 cocktail vaccination은 완벽한 방어 효과를 보여 주었다. 이와 같은 후보 항원 중 가장 우수한 면역원성을 보여준 gB 유전자 발현 오제스키 DNA 백신의 면역원성을 보다 증강시킬 수 있는 방법으로 사이토카인 또는 케모카인 유전자 발현 플라스미드 DNA를 이용하여 오제스키 DNA 백신의 최적화 방법을 수행하였다. 첫 번째 최적화 방법으로 많은 예방 접종에서 면역증강 효과를 보여준 인터페론 관련 면역조절제 발현 플라스미드 DNA를 이용하였다. 이용된 인터페론 관련 사이토카인 중 IL-12와 IL-18은 오히려 오제스키 DNA 백신에 의하여 유도되는 면역원성을 저하시키고 병독성 오제스키 바이러스 감염에 대하여 감수성이 증가되었다. 반면에 IP-10은 오제스키 특이 면역반응이 증가되었고 병독성 바이러스 감염에 대하여 생존기간이 증가되었다. 두 번째 시도된 최적화에서는 GM-CSF 사이토카인을 이용하여 오제스키 특이 항체 반응이 2-3 배 증가되었고 체액성 반응은 Th2-type의 패턴을 보여 주었다, 반대로 GM-CSF를 함께 접종하면 오제스키 특이 세포성 반응은 Th1-type으로 반응이 증가되었

고, 후에 병독성 오제스키 바이러스 감염에 대하여 현저하게 저항성이 증가됨을 보여주었다. 세 번째로 시도된 케모카인 유전자를 이용한 실험에서는 RANTES와 MIP-2가 오제스키 DNA 백신에 의하여 유도되는 면역반응을 증가시켰고 그 외 MIP-1 α 와 MIP-1 β 는 아무런 변화를 유도하지 못하였다. 또한 RANTES와 MIP-2 케모카인 유전자를 함께 접종한 경우에 병독성 오제스키 바이러스 감염에 대하여 저항성이 증가된 것으로 나타났다. 이와 같은 사이토카인 또는 케모카인 유전자를 이용한 오제스키 DNA 백신의 최적화 연구 결과를 정리하면 Table 3-2와 같다. 결론적으로 이용된 사이토카인과 케모카인 중 GM-CSF와 RANTES 및 MIP-2유전자가 오제스키 DNA 백신에 의하여 나타나는 오제스키바이러스 감염에 대하여 저항성을 증가시켜 줄 것으로 보여지며, 특히 GM-CSF는 가장 우수한 결과를 보여주는 것으로 나타났다. 이와 같은 GM-CSF유전자는 향후 현장에 적용될 수 있는 오제스키 DNA 백신 제작 및 면역원성 증가에 유용하게 이용될 수 있고 다양한 형태의 오제스키 백신에 대한 면역원성을 증강시킬 수 있는 사이토카인으로 여겨지며, 오제스키 DNA 백신 delivery system개발에 이용될 수 있을 것이다.

Table 3-2. Summary of genetic co-transfer of cytokines and chemokines on the nature of adaptive immunity against pseudorabies virus

Modulators	Humoral responses			Cellular responses				Protection
	IgG	IgG _{2a} /IgG ₁	Th	IL-2	IL-4	IFN- γ	Th	
Cytokines								
IL-12	↓	↑	Th1	↑	-	↑	Th1	↓
IL-18	↓	↓	Th2	↑	-	↑	Th1	↓
IFN- γ	-	↑	Th1	-	-	-	Th1	-
GM-CSF	↑	↓	Th2	↑	↓	↑	Th1	↑
Chemokines								
RANTES	↑	↑	Th1	-	↑	↑	Th1	↑
MIP-1 α	↓	↑	Th1	-	↑	↑	Th2	-
MIP-1 β	-	↑	Th1	-	-	↑	Th1	-
MIP-2	↑	↑	Th1	-	↑	↑	Th1/2	↑
IP-10	↑	↑	Th1	-	-	↑	Th1	↑

^a -: no effect; ↑: increase; ↑↑: marked increase; ↓: decrease; ↓↓: marked decrease

제 4 장 약독화 세균을 이용한 DNA 백신의 경구 투여 및 프라임-부스트 예방 접종

제 1 절 서 설

항원 유전자를 발현하는 플라스미드 DNA가 예방 및 치료용 백신으로 이용될 수 있다는 사실은 많은 백신 개발 연구에 변화를 유발하였다. 이와 같은 DNA 백신에 대한 연구는 인의용 백신 개발을 주축으로 시작되어 현재는 많은 가축용 백신 개발에 폭넓게 연구가 진행되고 있다. 이와 같은 DNA 백신의 잇점으로 바이러스 감염과 같이 세포내 및 세포외로 분비되는 항원에 의하여 체액성 면역 반응 뿐만 아니라 항원 특이 CD8⁺ T세포 반응 등 폭넓은 항원 특이 반응이 유도될 수 있다는 것이다. 또한 DNA 백신은 물질적으로 안정하여 수송이나 생산 비용이 매우 저렴하고 생독 백신과 비교하여 안전하다는 것이다. 그러나, DNA 백신이 현장에 적용되기에는 아직 유도되는 면역 반응이 약하고 대부분의 연구가 근육주사에 의하여 이루어진다는 것이다. 그러므로 수많은 가축을 대상으로 일시에 예방 접종이 이루어지기 위하여 많은 비용과 시간이 해결되어야 할 뿐 만 아니라 충분하고 안정된 면역반응이 유도되어야 할 것으로 믿어진다. 특히, 가축에 전염되는 많은 바이러스성 질병은 점막조직을 통하여 유입되고 전파 되는데 이러한 점막 조직에 점막 면역을 유도하는 것은 매우 유용한 예방 접종법으로 여겨진다. DNA 백신을 이용한 점막 면역의 유도는 비강 투여나 경구 투여에 의하여 유도될 수 있다고 생각되어지나 근육주사에 비교하여 매우 낮은 수준의 전신 면역(systemic immunity)이 유도되고 점막 면역(mucosal immunity) 또한 병독성 바이러스 감염에 대하여 충분한 방어 기구를 형성하지 못하는 것으로 보고 되고 있다. 따라서, 많은 연구자들이 DNA 백신을 이용한 점막 면역을 유도하기 위한 많은 전달체(delivery system)에 대한 연구가 진행되어 왔다. 더욱이 가축을 대상으로 하는 예방 접종은 보다 손쉬운 방법의 delivery system에 대한 연구가 요구되어 왔다. 최근 약독화된 *Salmonella typhimurium*이 DNA 백신의 경구 전달체로 이용될 수 있다는 사실은 많은 연구자들이 다양한 분야에서 DNA 백신에 대한 연구를 유도하였다. 항원 유전자를 발현하는 mammalian eukaryotic expression 벡터에 클로닝된 플라스미드 DNA를 약독화 salmonella bacteria에 넣고 이를 경

구투여하게 되면 장관계 Peyer's patch에 존재하는 대식 세포를 비롯한 수지상 세포가 투여된 salmonella bacteria를 잡아먹고 그로부터 유리되는 플라스미드 DNA 백신이 항원 제시세포 내에서 작동함으로써 점막 면역뿐만 아니라 salmonella bacteria의 특성에 의하여 전신 면역도 유도될 수 있다. 이와 같은 DNA 백신의 salmonella delivery system은 직접 DNA 백신을 투여하는 것보다 많은 측면에서 잇점을 갖고 있다. Salmonella typhimurium 내에 존재하는 DNA 백신으로 생산되는 항원은 항원제시세포내에서 MHC class I pathway 뿐만 아니라 MHC class II pathway에 의하여 제시됨으로써 광범위 면역반응이 유도되고 세균자체에 존재하는 면역증강제(lipopolysaccharide 등)가 toll-like receptor(TLR)을 통해 면역 반응이 증가될 수 있는 환경을 조성할 수 있다는 것이다. 또한 salmonella bacteria를 손쉽게 배양함으로써 수많은 가축을 대상으로 일시에 대량 예방 접종이 가능하다. 이와 같은 salmonella bacteria의 DNA 백신 전달체 연구와 더불어 그 외 *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi* 및 *Listeria monocytogenes* 등 세균들의 이용성이 검토되어 왔다.

DNA 백신을 현장에 적용하기에는 아직 충분한 방어 면역을 못함으로써 DNA 백신의 면역원성을 증가시키기 위한 다양한 연구가 진행되어 왔다. 따라서, 제3장에서 시도된 것과 같이 각종 면역 조절제를 이용한 최적화 방법이 시도되었고, 위에서 언급하였듯이 다양한 방법의 delivery system에 대한 연구가 진행되어 왔다. 또한 최근 DNA 백신을 이용한 프라임-부스트 예방 접종법은 DNA 백신이 현장에 적용될 수 있는 가능성을 한층 높여 주었다. DNA 백신을 예방 접종시 프라임시 이용하고 부스팅때 다른 형태의 백신, 즉 재조합 바이러스 delivery system이나 서브유닛(subunit) 단백질 백신을 이용하면 유도되는 면역반응의 특성이 정교하게 유도되어 매우 강력한 방어 면역을 구축될 수 있다고 보고 되었다. 이와 같은 DNA 백신과 다른 형태의 백신을 이용한 프라임-부스트 예방 접종은 많은 경우에 근육주사 접종법에 의하여 시도되었고 다양한 바이러스 질병에 대하여 매우 효과적인 접종법으로 여겨지고 있다. 이러한 프라임-부스트 예방 접종을 또한 점막조직에 적용하면 전신 면역 뿐만 아니라 점막면역도 충분히 유도 할 수 있다는 사실은 DNA 백신이 현장에 적용될 수 있는 가능성을 한층 높여 주었다. 따라서 본 연구에서는 오제스키 DNA 백신의 현장 적용 가능성을 높여 주기 위하여 약독화 salmonella bacteria를 이용한 예방 접종을 수행하여 유도

되는 면역 반응의 특성을 분석함으로써 대량 예방 접종법에 대한 자료를 얻고자 하였다. 또한 오제스키 DNA 백신의 현장 가능성을 더욱 높이기 위하여 오제스키 항원 발현 replication-defective adenovirus를 제작하고 면역원성을 분석함과 아울러 오제스키 DNA 백신과 프라임-부스트 예방 접종을 수행하여 나타나는 방어 면역을 분석함으로써 병독성 오제스키바이러스 감염에 대한 최대의 방어 면역을 구축할 수 있는 방법을 도출하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 약독화 *Salmonella*를 이용한 플라스미드 DNA 백신 delivery

가. 바이러스 및 실험동물

병원성 pseudorabies virus(PrV) Yangsan strain은 porcine kidney cell line(PK-15)세포에 증식 시켜 사용하였다. 5 %의 FBS, penicillin-streptomycin(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 DMEM에 배양하고, 바이러스를 흡착시켜 5% CO₂, 37°C 에서 1 시간 감염시키고, 2-3일 경과된 후 감염 특유의 세포병변현상이 80-90% 정도 확인되면 감염된 세포를 상층액과 함께 모아 바이러스를 회수하였고, plaque assay를 이용하여 바이러스 농도를 측정 하였다. 그 외의 방법은 제2장 및 제3장에 기술된 내용에 준하여 실시되었다. 본 실험에 사용한 실험용 생쥐 BALB/c(H-2^d)와 C57BL/6(H-2^b)는 실험동물 공급업체(주) 다물사이언스(대전, 한국)와 코아텍(서울, 한국)에서 구입하여 본 연구실의 실험 동물실에서 실험 동물 사육 규정에 맞추어 유지하며 실험에 공시하였다.

나. 사용균주

오제스키 DNA 백신의 경구 전달체로 이용된 약독화 *Salmonella typhimurium*은 스펀포드 대학의 Barry Stocker 박사로부터 분양된 균주를 이용하였다. 오제스키 DNA 백신 경구 전달체로 이용된 *Salmonella typhimurium*은 auxotrophic *S. typhimurium* AroA- strain (SL7207) (*S. typhimurium* 2337-65 derivative *hisG46*, DEL407[*aroA::Tn10Tc^s*])이었다. 이용되는 약독화 salmonella bacteria는

LB broth 또는 LB agar에서 배양하였으며 필요시 ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 넣어 배양하였다.

다. Electroporation

오제스키 DNA 백신을 보유하고 있는 약독화 *Salmonella typhimurium*을 제작하기 위하여 제작된 오제스키 DNA 백신 pCI-PrVgB를 electroporation방법에 의하여 약독화 salmonella bacteria에 넣었다. Electroporation용 competent bacteria를 준비하기 위하여 약독화 *Salmonella typhimurium* SL7207주를 LB broth 3 ml에 접종하여 mid-log phase에서 회수하였다. 회수된 세균은 멸균된 ice-cold WB(WB= 10% ultra pure glycerol, 90% distilled water, v/v)를 이용하여 두 번 세척하고 농축된 세균을 사용할 때 까지 -70°C 에 보관하였다. 새로이 준비된 competent bacteria (1×10^8)을 오제스키 DNA 백신 pCI-PrVgB 10 pg-0.1 μg 과 0.2 cm cuvette에서 혼합한 후 얼음 위에 방치 하였다. Electroporator(Bio-Rad Pulser)를 이용하여 2.5kV, 25 μF , 200 Ω 에서 전기 자극을 주었다. 약독화 세균을 cuvette으로부터 회수하여 새로운 멸균된 용기로 옮기고 LB broth 1 ml을 넣어 60 분간 37°C 에서 배양하였다. 배양된 약독화 salmonella bacteria는 ampicillin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 첨가된 LB agar에 스프레딩하여 electroporation 방법에 의하여 transformation된 약독화 SL7207/pCI-PrVgB를 선별하였다. 약독화 salmonella bacteria내 오제스키 DNA 백신의 존재는 선별된 transformed salmonella bacteria를 ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 LB broth에서 12-18시간 배양한 후 상용의 방법에 준하여 플라스미드 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA를 제한 효소를 이용하여 오제스키 항원 유전자의 존재를 확인하고 일부는 화학적 방법에 의하여 *E. coli* bacteria에 transformation한 후 다시 플라스미드 DNA를 분리하여 같은 방법에 의하여 오제스키 DNA 백신을 확인하였다. 또한, green fluorescence protein (GFP)를 발현하는 플라스미드 DNA를 갖는 약독화 salmonella bacteria를 제작하기 위하여 같은 방법에 의하여 electroporation하여 GFP 플라스미드 DNA를 갖는 약독화 *Salmonella typhimurium* SL7207/pEGFP.c1과 SL7207/PEGFP를 준비하였다.

라. 면역화 및 샘플채취

약독화 *Salmonella typhimurium*을 이용하여 오제스키 DNA 백신의 경구 예방 접종을 수행하기 위하여 제작된 SL7207/pCI-PrVgB를 ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 LB broth에서 18시간 동안 배양하였다. 배양액의 탁도가 0.5-0.6정도 되면 배양된 약독화 세균을 회수하여 $5-10 \times 10^7$ cfu/100 μl 의 농도로 5% sodium bicarbonate-PBS 용액에 현탁시킨다. 경구 투여에 의한 예방 접종은 2-4시간 전에 실험동물을 금식시키고 flexible cannula를 이용하여 투여한다. 경구 투여는 격일로 세 번에 걸쳐 수행하였으며 이와 같은 경구 투여는 15일 간격으로 네 번에 걸쳐 이루어졌다. 대조군은 대조 플라스미드 pCI-neo를 electroporation방법에 의하여 transformation하여 선별된 SL7207/pCI-neo를 경구 투여 하였다. 경구투여와 근육주사에 의하여 나타나는 면역 반응의 특성을 분석하기 위하여 근육주사는 pCI-PrVgB naked DNA 백신을 100 μg 을 뒷다리 근육에 주사함으로써 수행하였다. 각 경구 투여 및 근육주사 후 일주일 후에 retro-orbital bleeding에 의하여 혈액을 취하고, 점막 조직 IgA를 측정하기 위한 vagina lavage는 100 μl PBS를 이용하여 회수하였으며, 분변 샘플은 변을 모으고 이를 0.1% sodium azide-PBS에 무게를 측정 후 100 mg/ml에 넣고 현탁한 후 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 IgA측정에 사용하였다.

마. 혈청 및 점막 조직내 항체 검출

오제스키 항원에 대한 항체가는 ELISA방법에 의하여 측정되었다. 혈청내의 오제스키 특이 IgG의 측정은 ELISA plate에 50 mM sodium bicarbonate buffer(pH 9.5)를 희석액으로 이용하여 준비된 오제스키 항원 단백질을 1 $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 농도로 희석하여 분주하고, standard에는 goat anti-mouse-IgG (Southern Biotechnology Associate Inc., Birmingham, Ala) 100ng/well을 분주하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 방치하여 코팅하였다. 0.05% Tween 20-PBS(PBST)를 이용하여 3회 세척하고, 3% 탈지유(200 $\mu\text{l}/\text{well}$)로 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 반응시켜 블로킹하였다. 다시 PBST로 3회 세척하고, 10배 희석된 샘플 혈청을 2배씩 계단희석 하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 30분 반응시킨 뒤 PBST로 3회 세척하였다. Goat anti-mouse IgG-conjugated HRP(100 ng/well)을 100 μl 씩 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시킨 후 PBST로 다시 3회 세척하였다. 효소반응은 기질 용액(11mg of 2,2-azinobis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid in 25mL of 0.1M citric acid-25ml of 0.1M sodium phosphate-10 μl

hydrogen peroxide)을 이용하여 발색시키고 1.5% potassium fluoride-PBS 용액을 이용하여 반응을 정지시켰다. 각 well의 흡광도는 ELISA reader(SPECTRAMax 340, Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA)를 이용하여 405 nm에서 측정하였고 Softmax program으로 혈청내의 오제스키 특이 IgG의 수준을 계산하였다. 혈청 오제스키 특이 IgG isotype(IgG2a 및 IgG1)의 측정을 위해서는 혈청 오제스키 특이 IgG의 방법과 동일하게 진행하였다. 대신 standard에는 goat anti-mouse IgG2a 또는 IgG1(Southern Biotechnology Associate Inc., Birmingham, Ala) 100 ng/well을 이용하였고, 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG2a-conjugated HRP(IgG2a-HRP) 또는 goat anti-mouse IgG1-conjugated HRP(IgG1-HRP)를 이용하였다. 점막조직내의 오제스키 특이 IgA는 biotinylated goat-anti-mouse IgA를 넣고 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 다시 PBST로 세 번 세척하고 peroxidase-conjugated streptavidin를 넣어 같은 방법에 의하여 발색시켰다.

바. 자극 면역 T 세포부터 사이토카인 생산 profile

오제스키 특이 항원에 반응하여 T세포로부터 생산되는 사이토카인의 생산 양상을 분석하기 위하여 앞서 기술된 바와 같은 방법에 의하여 오제스키 특이 T세포를 자극하였다. 항원제시세포를 준비하기 위하여 항원을 접종하지 않은 실험 동물을 과량의 CO₂로 질식사 시킨 후 비장을 적출하고 비장세포를 준비하였다. RBC lysis soln.(NH₄Cl-Tris)을 이용하여 적혈구를 제거하고 10% FBS/RPMI 1640 배지 3 ml에 다시 부유 시키고, metrizamide 2 ml이 담긴 15 ml tube에 비장세포 부유액 1 ml을 조심스럽게 중층함으로써 항원제시세포를 준비하였다. 혈청이 포함되어 있지 않는 RPMI 1640에 항원제시세포를 재부유 시켜 UV-inactivated 오제스키 단백질 항원(cytokine assay)으로 3시간 동안 자극시켜 오제스키 항원 발현 항원제시세포를 준비하였다. 반응 세포는 각 실험군의 실험 동물로부터 같은 방법에 의하여 비장 및 림프절을 적출하여 mesh를 이용하여 세포를 분리하였다. RBC lysis soln.(NH₄Cl-Tris)을 이용하여 적혈구를 제거하고 10% FBS/RPMI 1640 배지에 부유하여 세포를 준비하였다. APC와 림프구의 수를 측정하여 APC는 1×10^6 cells/ml로, 림프구는 5×10^6 cells/ml로 희석하여 사용하였다.

준비된 항원제시 세포와 반응용 비장 및 림프절 세포를 일정비율(5:1, 2.5:1, 1.25:1)로 혼합 하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3일간 배양하였다. 양성 대조군에

는 concanavalin A(Con A)을 5 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 준비하였다. 자극된 오제스키 특이 T 세포로부터 생산되는 사이토카인의 양은 ELISA방법에 의하여 측정되었다. ELISA plate는 anti-mouse IL-2, IL-4 및 IFN- γ 항체로 4°C에서 하룻밤 방치하여 코팅하였다. ELISA plate를 PBST로 3회 세척하고, 3% 탈지유로 처리해 37°C에서 2시간 정도 블로킹하였다. 배양 상층액과 standard cytokine protein을 처리하고 1시간 30분 동안 배양하였다. 다시 PBST로 3회 세척하고 biotinylated anti-mouse IL-2, IL-4 및 IFN- γ 항체를 처리한 다음 4°C에서 하룻밤 방치하였다. ELISA plate를 세척하고 peroxidase-conjugated streptavidin를 첨가하고 1시간 배양한 후 기질용액으로 발색시켰다. 각 well의 흡광도는 ELISA reader (Molecular Device, USA)로 405nm에서 측정하여 비장세포와 림프구에서 생산된 cytokine IL-2, IL-4 및 IFN- γ 의 양을 계산하였다.

사. 공격시험

1) 생존율 측정

약독화 *Salmonella typhimurium*을 이용하여 오제스키 DNA 백신을 경구 예방 접종을 수행한 후 병독성 오제스키 바이러스 감염에 대한 방어 면역은 병독성 바이러스주 Yangsan주를 비강 투여 함으로써 접근하였다. 각 실험군별로 면역화된 후 14일째에 모든 실험군 실험 동물에 avertin을 복강 내 주입하여 전신 마취시킨 다음, 병원성 오제스키바이러스 Yangsan주를 비강 접종(5LD₅₀)하였다. 접종 후 11일까지 마우스의 상태 및 폐사여부를 매일 관찰하였다.

2) 뇌 조직내 바이러스 검출

오제스키바이러스 감염 후 폐사된 실험동물 또는 아직 살아 있는 동물의 뇌 조직에 존재하는 감염성 바이러스의 양은 plaque assay에 의하여 측정하였다. 오제스키 바이러스 감염 후 12일째 실험동물의 뇌조직을 분리하였다. 분리된 뇌조직은 무게를 측정하여 뇌조직 1 mg/PBS 1 μl 에 넣고 분쇄기를 이용하여 뇌조직 추출물을 제조하였다. 4°C, 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 상층액을 회수한 후 PK-15 숙주세포를 이용하여 상층액에 존재하는 감염성 바이러스의 양을 plaque assay에 의하여 측정하였다.

2. 약독화 세균으로부터 플라스미드 DNA 백신의 항원제시세포로 이동 분석

가. 복강 대식세포 채취

약독화 *Salmonella typhimurium* SL7207주내에 존재하는 오제스키 DNA 백신이 항원제시세포로 이동하는 것을 증명하기 위하여 복강 내 대식세포를 이용하였다. 복강내 대식세포는 실험동물을 3% (v/v) thioglycollate medium을 복강내 주사하고 48시간 후에 멸균된 RPMI1640 배지를 복강내 주입하여 마사지후에 복강 대식세포를 회수하였다. 회수된 복강 대식세포는 새로운 RPMI1640배지로 세척하고 37°C에서 2시간 동안 배양하여 배양 용기 바닥에 부착할 수 있게 유도하였다. 바닥에 부착되지 않은 세포는 항생제가 들어있지 않은 배지를 이용하여 두 번 세척함으로써 제거하고 복강 대식세포를 준비하였다.

나. 약독화 세균 주 감염 및 DNA 백신 이동 분석

준비된 복강 대식세포는 GFP를 발현하는 플라스미드 DNA를 갖는 salmonella bacteria, SL7207/pEGFP.c1와 SL7207/pEGFP를 각각 20 moi(multiplicity of infection)수준으로 감염시키고 30분간 다시 배양하였다. 감염된 복강 대식세포는 새로운 배지로 두 번 세척하고 세포의 세균을 죽이기 위하여 50 µg/ml gentamycin을 첨가하여 4시간 더 배양하였다. 다시 10 µg/ml tetracyclin을 넣어 세포내 세균 증식을 억제하고 30-48동안 더 배양하여 GFP의 발현을 유도하였다. 배양을 마친 후 배양 배지는 제거하고 새로운 PBS를 이용하여 세 번 세척하고 세포내에서 GFP의 발현은 항체로 염색한 후 유세포분석기(flow cytometer)를 이용하여 분석되었다. 항체 염색은 대식세포의 표면 마커인 anti-CD11b-PE (Pharmingen)를 이용하였다. 회수된 복강 대식세포를 고정액을 이용하여 고정한 후 FACS buffer에 재현탁한 후 anti-CD11b-PE 0.5µl를 넣고 40분간 얼음위에서 정치하였다. 항체의 비특이적 결합을 억제하기 위하여 Fc blocking reagent가 포함된 상태에서 염색되었다. 염색된 세포는 다시 FACS buffer를 이용하여 두 번 세척하고 다시 고정액을 이용하여 고정시킨 후 flow cytometer를 이용하여 세포내 GFP의 발현을 분석하였다.

다. 생체내 DNA 백신 발현 분석

약독화 *Salmonella typhimurium*에 의한 오제스키 DNA 백신의 생체 내 전달을 간접적으로 증명하기 위하여 GFP발현 플라스미드 DNA를 갖는 SL7207/pEGFP.c1을 이용하여 경구 투여 후 생체 내 GFP 발현 세포들을 flow cytometry에 의하여 추적하였다. SL7207/pEGFP.c1을 $5-10 \times 10^7$ cfu를 5% sodium bicarbonate가 포함된 PBS에 현탁시킨 후 cannula를 이용하여 대상 실험동물에 경구투여 하였다. 경구 투여는 2일 간격으로 세 번에 걸쳐 투여하였으며 마지막 투여 후 5일째에 실험동물을 희생시키고 비장세포, Peyer's patch(PP) 및 lamina propria(LP)의 세포를 분리하였다. 비장 세포는 위에서 언급한 방법에 준하여 준비하였고, PP는 소장내 퍼져 있는 돌출된 Peyer's patch를 핀셋을 이용하여 떼어내어 mesh를 이용하여 Peyer's patch로부터 해당 세포들 분리하였다. LP에 존재하는 세포는 가로로 소장을 절개하고 0.5 mM EDTA를 함유하는 HBSS를 이용하여 두 번 세척한 다음 collagenase가 포함된 RPMI1640에 넣어 37°C에서 180 rpm으로 흔들면서 조직을 분쇄하였다. 분쇄된 조직은 거즈를 이용하여 한번 거르고 상온에서 2-3분간 정치한 후 분쇄되지 않은 조직은 제거한 후 상층액을 원심 분리하여 가라앉은 세포를 분리하였다. 이와 같이 준비된 비장세포, PP 및 LP 세포는 고정액을 이용하여 고정 시킨 후 다시 준비된 세포들을 100 μ l FACS buffer에 재 현탁하였다. 주요 항원제시세포인 대식세포와 수지상 세포의 표면 마커 항체 CD11b-PE, CD11c-PE 0.5 μ l를 준비된 세포 현탁액에 넣고 40분간 얼음 위에서 표면을 염색하였다. 항체로 염색된 세포는 다시 FACS buffer를 이용하여 두 번 세척한 다음 다시 고정액을 이용하여 고정시킨 후, 항원제시세포내 GFP의 발현을 flow cytometer를 이용하여 분석하였다.

3. 오제스키 항원 발현 아데노바이러스 제작

가. 유전자 조작

오제스키 항원 발현 증식 결핍성 아데노바이러스(replication-defective adenovirus)를 제작하기 위하여 Gateway cloning 방법에 의하여 제작되었다. 첫 번째 Gateway cloning방법에 의하여 제작하기 위하여 이용되는 entry vector,

pENTR11(Invitrogen)를 이용하여 pCR-Blunt II-TOPO로 분터 EcoRI으로 처리한 후 클로닝하여 pENTR11/PrVgB, pENTR11/PrVgC 및 pENTR11/PrVgD를 제작하였다. 제작된 각 entry vector는 Gateway LR clonase enzyme mixture(Invitrogen)를 이용하여 destination vector pAd/CMV/V5-DEST에 오제스키 항원 유전자를 옮겨 pAd/CMV/V5-DEST/PrVgB, pAd/CMV/V5-DEST/PrVgC 및 pAd/CMV/V5-DEST/PrVgD를 제작하였다. 제작된 각각의 destination vector는 inverted terminal repeat(ITR)를 노출시키기 위하여 PacI 제한 효소로 처리하고 재조합 아데노바이러스를 제작하기 위하여 재조합 아데노바이러스 생산 세포주 293A 세포에 transfection하여 8-10일 후에 세포 병변 현상이 나타나면 재조합 아데노바이러스가 포함된 세포배양액을 회수하였다. 회수된 바이러스 배양액은 다시 새로운 293A세포에 감염시켜 세포병변 현상을 유도한 후 다시 바이러스를 회수함으로써 바이러스의 양을 증가시켰다. 몇 번의 blind passage를 통해 증가된 바이러스를 회수하고 plaque assay에 의하여 포함되어 있는 바이러스의 양을 측정하였다 (Fig. 4-1).

나. 항원 발현 확인

재조합 아데노바이러스에 의하여 발현되는 오제스키 항원의 발현은 western blot과 RT-PCR 방법에 의하여 확인하였다.

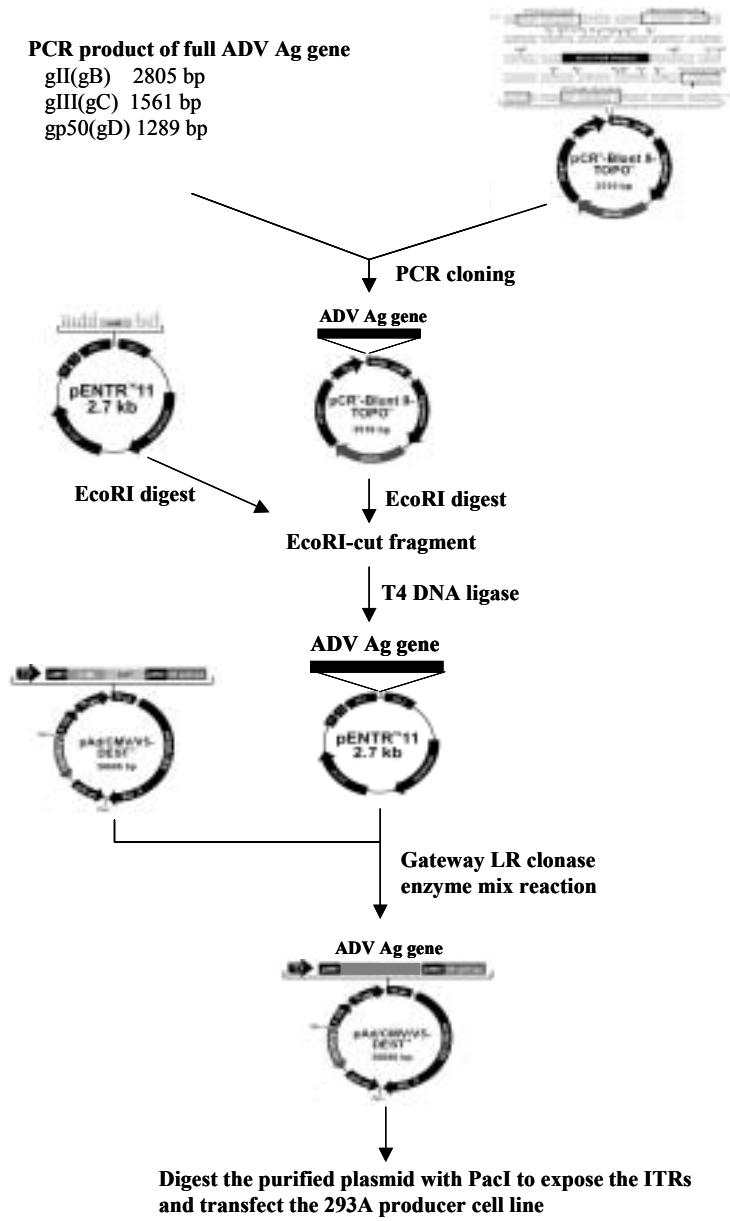


Fig. 4-1. Procedure of construction of replication-defective adenovirus expressing pseudorabies virus antigen (gB, gC, and gD).

4. 오제스키 항원 발현 아데노바이러스의 면역원성

가. 면역화 및 샘플 채취

제작된 재조합 아데노바이러스의 오제스키 특이 면역원성을 분석하기 위하여 준비된 아데노바이러스를 비강 투여 또는 근육주사 방법에 의하여 면역화 하였다. 5×10^5 pfu/100 μ l 되게 바이러스의 양을 조정 한 후 대상 실험동물의 뒷다리 근육 내 각 다리에 50 μ l 씩 주사 하였다. 근육주사는 일주일 간격으로 세 번에 걸쳐 수행되었다. 비강 투여에 의한 예방 접종은 5×10^5 pfu/20 μ l 의 농도가 되도록 종하여 avertin으로 대상 실험동물을 마취시키고 준비된 바이러스를 비강 투여함으로써 면역화 하였다. 근육주사와 같이 일주일 간격으로 세 번에 걸쳐 비강 투여가 실시되었다. 면역화된 실험동물로부터 오제스키 특이 항체를 검출하기 위하여 혈청은 면역화 후 일주일째에 retro-orbital bleeding방법에 의하여 혈액을 채취하였다. 점막 조직 IgA를 측정하기 위한 vagina lavage는 100 μ l PBS를 이용하여 회수하였으며, 분변 샘플은 변을 모으고 이를 0.1% sodium azide-PBS에 무게를 측정한 후 100 mg/ml에 넣고 현탁한 후 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 IgA측정에 사용하였다.

나. 항원 특이 항체 검출

오제스키 특이 항체의 검출은 위에서 기술된 방법에 준하여 실시되었다. 오제스키 특이 혈청 내 항체는 IgG을 기준으로 측정되었으며, 점막 조직에서 유도되는 점막 면역의 척도는 점막 조직으로부터 유리되는 오제스키 특이 IgA의 양을 측정함으로써 접근하였다.

다. 사이토카인 생산 profile

오제스키 특이 T 세포부터 생산되는 사이토카인 생산 양산의 분석은 앞에서 기술된 바와 같이 수행되었다. 오제스키 특이 T 세포를 자극시키기 위한 항원제시세포는 metrizamide를 이용한 농도 구배법에 의하여 준비하고 오제스키 항원으로 처리한 다음 이용하였다. 준비된 항원제시세포를 면역화된 실험동물의 비장 세포 또는 림프절 세포와 일정 비율로 혼합한 후 3일 간 배양한 다음 배양액에

유리되는 사이토카인의 양을 위에서 기술된 방법과 같은 방법에 의하여 측정되었다.

라. 공격시험

오제스키 항원 발현 아데노바이러스에 의하여 유도되는 면역 반응의 방어 효능을 측정하기 위하여 병독성 오제스키 바이러스 Yangsan주 50LD₅₀를 비강 투여함으로써 공격 시험을 수행하였다. 감염 방법과 생존을 측정은 앞서 기술된 방법에 준하여 실시되었다.

5. 플라스미드 DNA 백신과 아데노바이러스를 이용한 프라임-부스트 접종

가. 면역화 및 샘플채취

오제스키 DNA백신과 오제스키 항원 발현 아데노바이러스를 이용한 프라임-부스트 접종은 일주일 간격으로 세 번에 걸쳐 면역화 함으로써 수행되었다. 프라임시 오제스키 DNA백신 또는 재조합 아데노바이러스를 이용하고 다시 부스팅시 다른 형태의 백신을 예방 접종에 이용하였다. 오제스키 DNA 백신을 접종할 때는 100 μ g을 근육 주사하였고, 재조합 아데노바이러스를 접종할 때는 5×10^5 pfu를 근육 내 주사하여 면역화 하였다. 오제스키 DNA 백신과 오제스키 항원 발현 아데노바이러스를 이용한 프라임-부스트 접종은 총 11종류의 면역화 프로토콜을 작성하여 수행되었다. 각 작성된 프라임-부스트 접종 프로토콜은 다음 Table 4-1과 같다.

나. 항원특이 항체 검출

혈청 내 오제스키 특이 IgG의 수준은 일반적인 ELISA 방법에 의하여 측정되었다. 앞에서 기술되었듯이 오제스키 항원은 0.5% Triton X-100으로 처리된 농축 오제스키바이러스를 이용하여 ELISA plate를 코팅하였고, 그 외 사용된 항체들은 goat anti-mouse-IgG와 goat anti-mouse IgG-conjugated HRP를 이용하여 오제스키 특이 항체의 수준을 측정하였다.

Table 4-1. Protocols for prime-boost vaccination using DNA vaccine (pCI-PrVgB) and replication-defective adenovirus (Ad/PrVgB) expressing gB of pseudorabies virus.

No. of protocol	Prime	Boost #1	Boost #2
1	pCI-PrVgB(D)	pCI-PrVgB(D)	No(X)
2	Ad/PrVgB(V)	Ad/PrVgB(V)	No(X)
3	pCI-PrVgB(D)	pCI-PrVgB(D)	pCI-PrVgB(D)
4	pCI-PrVgB(D)	pCI-PrVgB(D)	Ad/PrVgB(V)
5	pCI-PrVgB(D)	Ad/PrVgB(V)	Ad/PrVgB(V)
6	Ad/PrVgB(V)	pCI-PrVgB(D)	pCI-PrVgB(D)
7	Ad/PrVgB(V)	Ad/PrVgB(V)	pCI-PrVgB(D)
8	pCI-PrVgB(D)	Ad/PrVgB(V)	No(X)
9	Ad/PrVgB(V)	pCI-PrVgB(D)	No(X)
10	pCI-neo(C)	pCI-neo(C)	pCI-neo(C)
11	Ad/LacZ(L)	Ad/LacZ(L)	Ad/LacZ(L)

D: pCI-PrVgB

V: Ad/PrVgB

C: pCI-neo-empty control vector

L: Ad/LacZ-recombinant adenovirus expressing β -galactosidase

X: No- not administered

다. 사이토카인 생산 profile

오제스키 특이 T 세포로부터 생산되는 사이토카인의 생산 양산 분석은 앞에서 기술된 방법에 준하여 실시되었다.

라. 공격시험

오제스키 DNA 백신과 오제스키 항원 gB 발현 아데노바이러스를 이용한 프라임-부스트 접종의 방어 효과를 측정하기 위한 공격 시험은 앞에서 기술된 방법과 같이 실시되었다. 단지 병독성 오제스키바이러스 Yangsan주를 10LD₅₀를 비강 투여함으로써 최대의 방어 효과를 나타내는 프라임-부스트 프로토콜을 찾았다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 약독화 *Salmonella*를 이용한 플라스미드 DNA 백신 delivery

가. 혈청 및 점막 조직 내 항원 특이 반응

오제스키 DNA 백신의 경구 전달체로서 약독화 *Salmonella typhimurium* SL7207주의 효능을 평가하기 위하여 제작된 SL7207/pCI-pRVgB,를 이틀 간격으로 세 번에 걸쳐 경구 투여하였다. 이와 같은 경구 투여는 15일 간격으로 네 번에 걸쳐 수행되었다. 각 경구 투여 후 7일째 혈청 내 오제스키 특이 항체의 수준을 측정하였다. 근육 주사에 의한 면역화는 pCI-PrVgB를 뒷다리 근육 내 주사함으로써 수행되었다. 혈청 내 오제스키 특이 항체 IgG는 두 번째 면역화 후부터 검출되기 시작하여 세 번째와 네 번째에서 그와 같은 오제스키 특이 항체의 수준은 증가되었다. 그러나 SL7207/pCI-PrVgB의 경구 투여에 의하여 유도되는 혈청 내 오제스키 특이 IgG의 수준은 근육주사와 비교하여 낮은 수준으로 검출되었다 (Fig. 4-2). 반대로 점막 조직에 분비되는 오제스키 특이 IgA의 수준을 측정한 결과 pCI-PrVgB를 근육주사 한 결과 점막 조직내 오제스키 특이 IgA가 검출되지 않는 반면에, SL7207/pCI-PrVgB를 경구 투여한 그룹에서는 충분한 양의 오제스키 특이 IgA가 검출되었다 (Fig. 4-3). 따라서, 약독화 *Salmonella typhimurium* SL7207을 이용하여 오제스키 DNA 백신을 경구 투여하면 혈청 내 오제스키 특이 IgG 반응 뿐만 아니라 점막 조직 내 오제스키 특이 IgA 반응도 함께 유도될 수 있었다. 그러나, 근육주사는 높은 수준의 혈청 내 오제스키 특이 IgG 반응을 유도할 수 있으나 점막 조직내 오제스키 특이 점막 면역는 유도할 수 없었다.

또한, 혈청 내 오제스키 특이 IgG isotype의 분포를 분석한 결과

SL7207/pCI-PrVgB의 경구 투여는 IgG1의 생산이 IgG2a 생산 보다 높은 반면에, 근육 주사는 반대로 나타났다. 따라서 SL7207/pCI-PrVgB에 의한 경구 투여는 IgG2a/IgG1 비율을 감소되어 나타났으나, 근육 주사는 증가된 형태로 나타났다 (Fig. 4-4).

나. 항원 특이 세포성 면역분석

약독화 *Salmonella typhimurium* SL7207을 이용하여 오제스키 DNA 백신을 경구 투여한 후 나타나는 세포성 면역의 특성은 오제스키 특이 T 세포로부터 분비되는 사이토카인의 생산을 분석함으로써 수행되었다. SL7207/pCI-PrVgB를 경구 투여 하게 되면 오제스키 특이 T 세포로부터 생산되는 사이토카인은 IL-2와 IL-4 생산을 상대적으로 IFN- γ 보다 많이 생산되는 것으로 나타났다. 그러나, 오제스키 DNA 백신의 근육주사에 의하여 생산되는 사이토카인은 상대적으로 IFN- γ 가 높게 측정되었다. 따라서, SL7207/pCI-PrVgB에 의한 경구 투여는 오제스키 특이 반응이 Th2-type 반응으로 유도되는 것으로 보여 진다 (Fig. 4-5).

다. 공격시험

1) 생존률 결과

약독화 *Salmonella typhimurium* SL7207를 이용하여 오제스키 DNA 백신을 경구 투여 후 나타나는 면역 반응이 병독성 오제스키바이러스 감염에 대한 방어 효과를 측정하기 위하여 병독성 오제스키바이러스 5LD₅₀를 마지막 면역화 후 15 일째에 비강 투여 하였다. 오제스키 DNA 백신을 근육 주사한 경우에는 12일째에 62.5%의 생존율을 보여 주었고 SL7207/pCI-PrVgB를 경구 투여한 경우에는 보다 약한 방어 효과 12.5%의 생존율을 보여 주었다 (Table 4-2). 그와 같은 결과는 비록 감염된 실험동물에 대하여 충분한 방어 효과를 부여하지 못하였지만 대조군에 비교하여 보다 증가된 생존률을 보여 주었다.

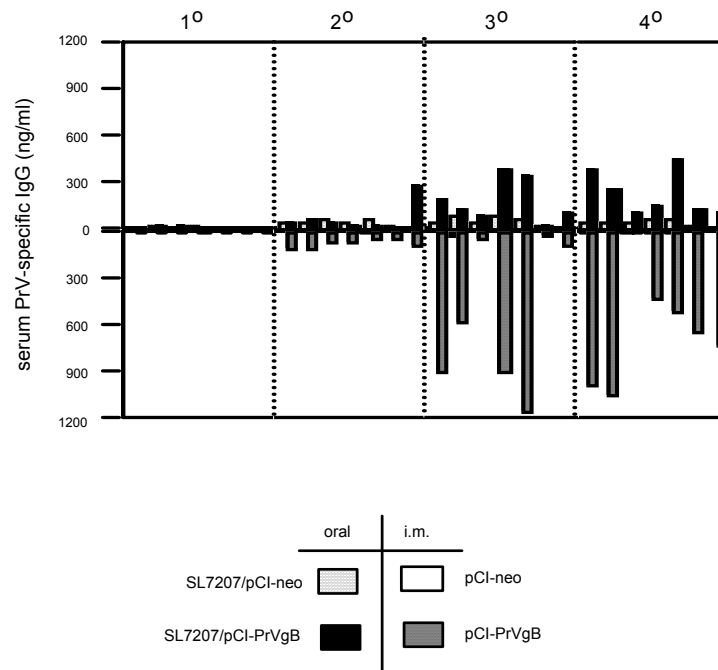


Fig. 4-2. Systemic IgG induced by the oral transgene vaccination with *Salmonella* carrying the PrV DNA vaccine or an intramuscular injection (i.m.) with the naked DNA vaccine. Groups of C57BL/6 mice (n=7) were immunized either mucosally (oral) or systemically (i.m.). Seven days after each immunization (1^o, 2^o, 3^o, and 4^o), the PrV-specific serum IgG were measured by ELISA. The each spot in the graph represents the Abs levels at 7th day following each immunization.

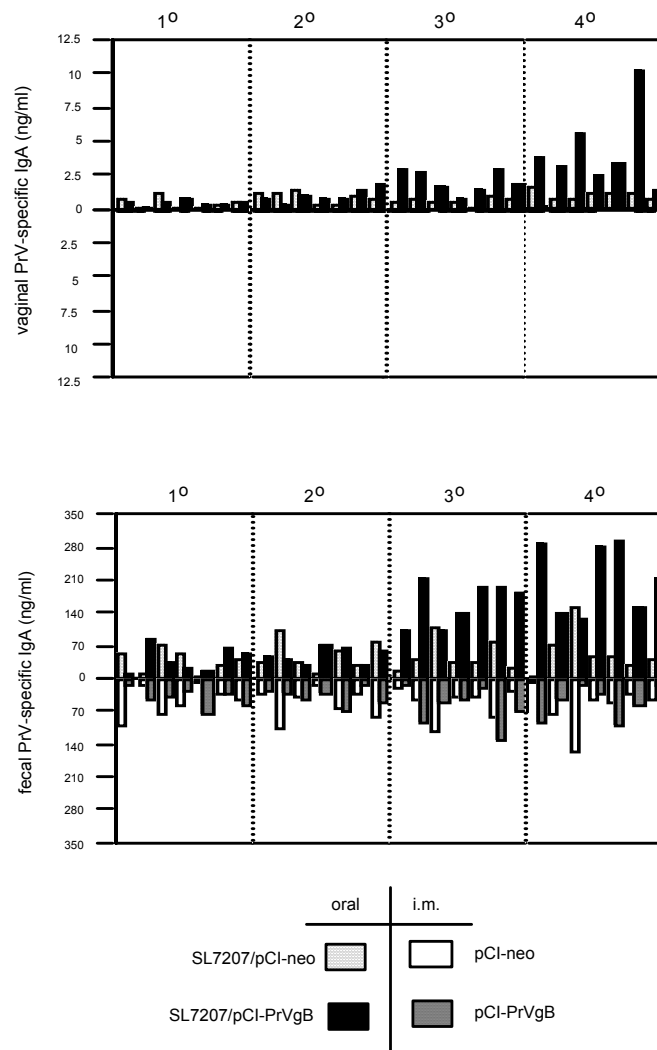


Fig. 4-3. Mucosal IgA responses induced by the oral transgene vaccination with *Salmonella* carrying the PrV DNA vaccine or an intramuscular injection (i.m.) with the naked DNA vaccine. Groups of C57BL/6 mice (n=7) were immunized either mucosally (oral) or systemically (i.m.). Seven days after each immunization (1°, 2°, 3°, and 4°), mucosal IgA in both vaginal tract and fecal samples were measured by ELISA. The each spot in the graph represents the Abs levels at 7th day following each immunization.

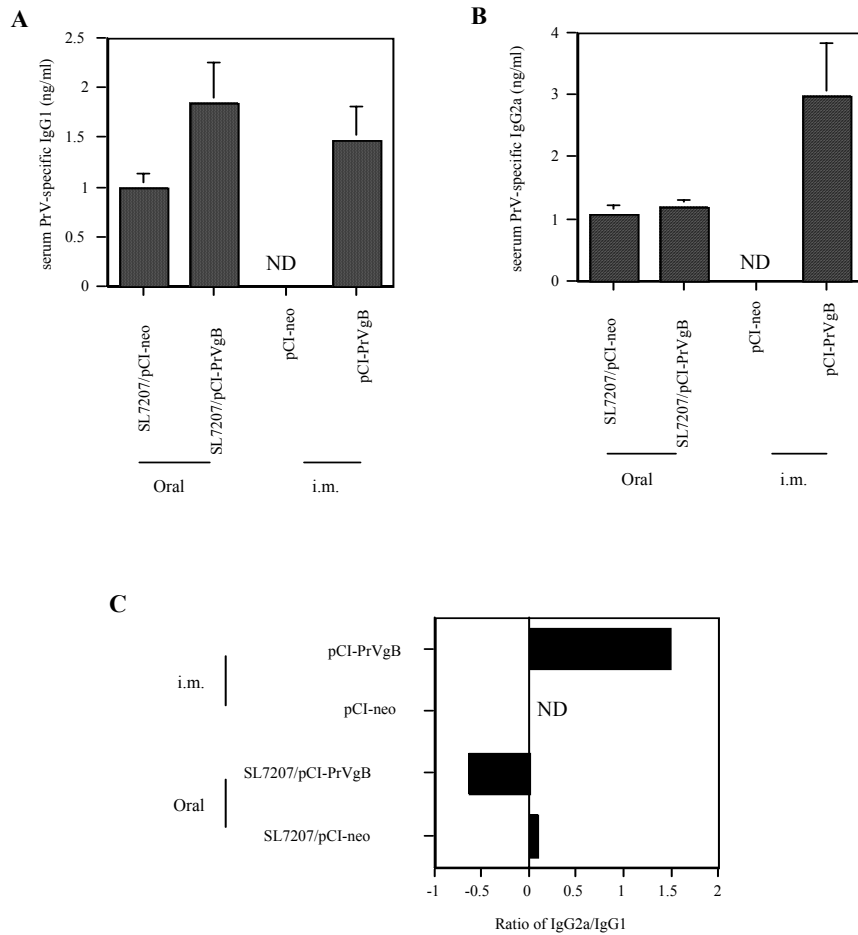


Fig. 4-4. Distribution of systemic IgG isotype induced by the oral transgene vaccination with *Salmonella* carrying the PrV DNA vaccine or an intramuscular injection (i.m.) with the naked DNA vaccine. C57BL/6 mice (seven per group) were immunized mucosally (oral) or systemically (i.m.) with *Salmonella typhimurium* SL7207 harboring PrV DNA vaccine (SL7207/pCI-PrVgB) or naked plasmid DNA vaccine (pCI-PrVgB). Seven days following the last immunization isotype distribution of serum PrV-specific IgG was determined by conventional ELISA. The each bar represents the average S.D. from seven mice per group.

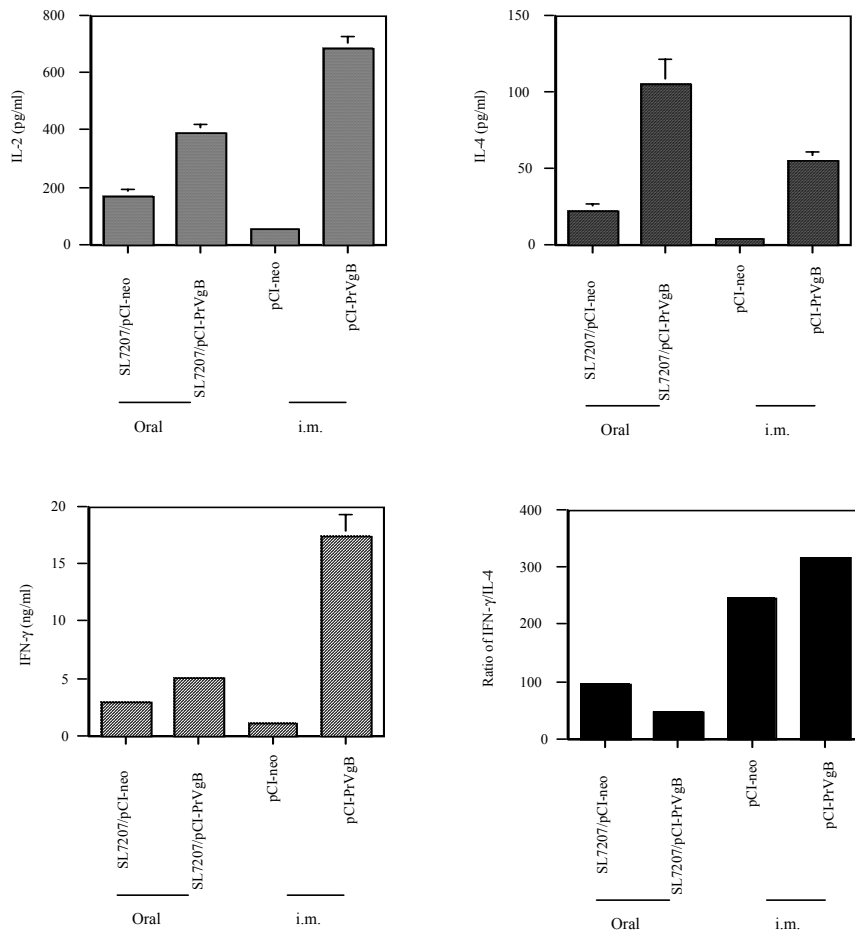


Fig. 4-5. The profile of cytokine production (IFN- γ , IL-2, and IL-4) from splenocytes of animals orally immunized with *Salmonella* carrying the PrV DNA vaccine or an intramuscular injection (i.m.) with the naked DNA vaccine. Two weeks following last immunization, the responder cells from immunized mice) were mixed with irradiated syngeneic enriched APCs that had been pulsed with UV-inactivated PrV and then incubated for 3 days. The levels of cytokines in supernatants of stimulated T cells were determined by cytokine ELISA. The test was done in quadruplicate wells. Each bar represents the average and standard deviation from three independent experiments.

2) 뇌 조직내 바이러스 검출

약독화 *Salmonella typhimurium* SL7207을 이용하여 오제스키 DNA 백신을 경구 투여한 후 병독성 바이러스 감염 후 대상 실험동물의 뇌 내에 존재하는 감염성 바이러스의 양을 측정하였다. 가장 높은 바이러스 함량을 보여준 것은 pCI-neo 대조백터를 근육 주사한 경우에서 나타났으며 그와 같은 감염성 바이러스 함량은 pCI-PrVgB 근육주사에 의하여 유의성 있게 감소되었다. SL7207을 이용하여 오제스키 DNA 백신을 경구 투여한 경우 감염성 바이러스의 함량은 대조백터를 SL7207을 이용하여 경구투여 한 그룹(SL7207/pCI-neo)과 비교하여 감소된 감염성 바이러스 함량을 보여 주었으나 통계처리 결과 유의성을 보여주진 못하였다 (Table 4-2).

2. 약독화 세균으로부터 플라스미드 DNA 백신의 항원제시세포로 이동 분석

가. 복강 대식세포를 이용한 발현 분석

약독화 *Salmonella typhimurium* SL7207을 이용하여 오제스키 DNA 백신을 경구 투여 후 나타나는 면역 반응과 방어 면역이 유도될 수 방법으로 약독화 *Salmonella bacteria*을 이용한 DNA 백신의 경구 투여 후의 DNA 백신의 이동 경로를 및 항원 발현을 간접적으로 green fluorescence protein (GFP) 발현 플라스미드 DNA 갖는 약독화 *Salmonella typhimurium* SL7207을 제작하여 간접적으로 추적하였다. 첫 번째로 복강 대식세포를 분리하여 SL7207/pEGFP.c1 또는 SL7207/pEGFP를 감염 시키고 복강 대식 세포내에서의 GFP 발현을 flow cytometry를 이용하여 분석한 결과 SL7207/pCI-neo를 경구 투여 한 경우와 비교하여 분명하게 SL7207/pEGFP.c1과 pEGFP에서 형광단백질의 발현이 유도되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4-6).

나. 생체 내 점막 조직 내 발현 분석

약독화 *Salmonella typhimurium* SL7207을 이용하여 오제스키 DNA 백신을 경구 투여 한 후 장관계 점막 조직 내 항원제시세포 내에서 항원 발현을 간접적으

로 증명하기 위하여 SL7207/pEGFP.c1을 경구투여한 후 5일째에 비장 세포를 비롯하여 Peyer's patch(PP) 및 lamina propria(LP)에 존재하는 항원제시세포 CD11b+, CD11c+ 세포내에서의 형광단백질의 발현을 flow cytometry에 의하여 분석하였다. CD11b+ 세포와 CD11c+ 세포는 SL7207/pCI-neo를 경구 투여한 경우와 비교하여 SL7207/pCI-PrVgB를 경구 투여하였을 때 보다 증가된 형광 강도를 보여 주었다. 이는 약독화 Salmonella bacteria를 이용하여 경구 투여된 오제스키 DNA 백신이 장관계 및 2차 림프조직의 항원제시세포내로 옮겨져 항원을 발현할 수 있음을 의미 한다 (Fig. 4-7 and 4-8).

3. 오제스키 항원 발현 아데노바이러스의 제작 및 면역원성 분석

가. 항원 발현 아데노바이러스 제작

오제스키 항원 발현 아데노바이러스는 Gateway cloning 방법을 이용하여 제작되었다. Entry vector pENTR11에 오제스키 항원 유전자 gB, gC 및 gD의 유전자를 클로닝하고 이를 destination vector pAd/CMV/V5-DEST에 오제스키 항원 유전자를 옮겨 pAd/CMV/V5-DEST/PrVgB, pAd/CMV/V5-DEST/PrVgC 및 pAd/CMV/V5-DEST/PrVgD를 제작하였다 (Fig. 4-9). 제작된 destination vector는 293A세포에 transfection한 후 replication-defective adenovirus를 회수하였다. 제작된 아데노바이러스에 의하여 오제스키 항원 발현의 증명은 western blot과 RT-PCR 방법에 의하여 확인하였다 (Fig. 4-10).

Table 4-2. Summary of virus challenge in animals immunized with attenuated *Salmonella typhimurium* SL7207 carrying PrV DNA vaccine^a

Immunogens	Route of immunization	No. of mice survived/No. of mice challenge (%)					Avg. time of death±SD	Titer of infectious virus in brain ^b tissues (pfu/g brain tissue)
		d0	d3	d6	d10	d12		
SL7207/pCI-neo	oral	8/8(100)	8/8(100)	4/8(50.0)	1/8(12.5)	0/8(0.00)	6.8 ± 2.5	173 ± 114
SL7207/pCI-PrVgB		8/8(100)	8/8(100)	6/8(75.0)	3/8(37.5)	1/8(12.5)	8.9 ± 3.2 ^c	121 ± 68 ^e
pCI-neo	i.m.	8/8(100)	8/8(100)	5/8(62.5)	0/8(0.00)	0/8(0.00)	6.1 ± 1.8	218 ± 134
pCI-PrVgB		8/8(100)	8/8(100)	7/8(87.5)	5/8(62.5)	5/8(62.5)	12.1± 4.9 ^d	66 ± 30 ^f

^a C57BL/6 mice (eight per group) were immunized mucosally (oral) or systemically (i.m.) with *Salmonella typhimurium* SL7207 harboring PrV DNA vaccine(SL7207/pCI-PrVgB) or naked plasmid DNA vaccine. Fifteen days after the last immunization, animals were challenged i.n. with virulent PrV Yangsan strain (5LD₅₀) and examined for inflammation, illness, and death.

^b Brain tissues were incised from challenged mice after 12-days post-challenge. The titers of infectious virus were determined by plaque assay after weighing brain tissues and preparing tissue soaps.

^c Not significantly different from values obtained from mice immunized orally with SL7207/pCI-neo ($p=0.07$).

^d Significantly different from values obtained from mice immunized i.m. with naked pCI-neo ($p<0.05$).

^e Not significantly different from values obtained from mice immunized orally with SL7207/pCI-neo ($p=0.16$)

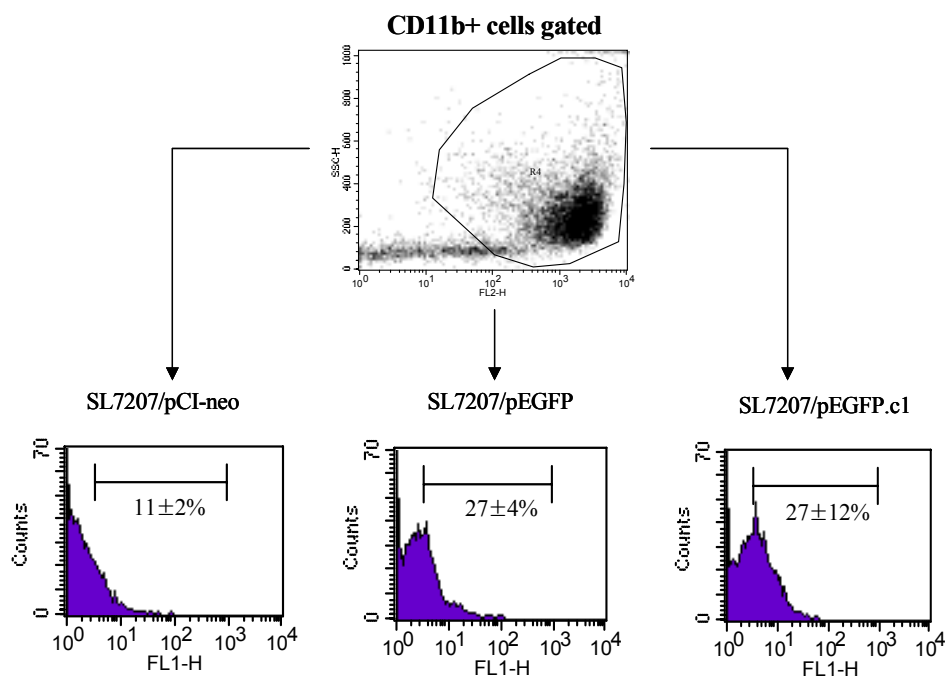


Fig. 4-6. Expression of GFP in peritoneal macrophages (CD11b⁺ cells). Three mice per group were inoculated intraperitoneally with 10⁶-10⁷ *Salmonella typhimurium* SL7207 harboring one of the following plasmids: pCI-neo(SL7207/pCI-neo), pEGFP (SL7207/pEGFP) or pEGFP.c1 (SL7207/pEGFP.c1). 2 days after the inoculation cells were collected from the peritoneal cavity and the expression of GFP was determined by flow cytometric analysis. Characterization of the cell subset expressing GFP was done by two-color fluorometric analysis after staining with PE-CD11b antibody. The histograms display GFP expression by cells gated as positive for CD11b(Mac-1). The figures in graph are average±SD of three mice.

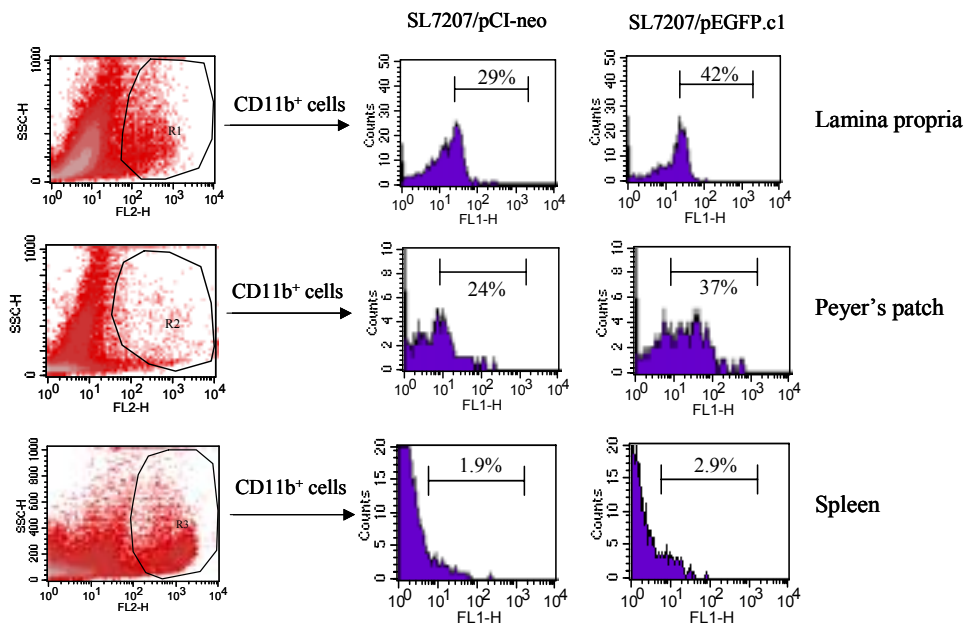


Fig. 4-7. Characterization of *in vivo* *S. typhimurium*-mediated DNA gene transfer to APCs in orally vaccinated animals. Expression of GFP in macrophages (CD11b⁺ cells) was determined by flow cytometry in spleen, Peyer's patch (PP) and lamina propria (LP) of mice receiving the *S. typhimurium* SL7207 strain carrying either control vector pCI-neo or GFP expression vector pEGF.c1. Cell subsets expressing GFP were identified by two-color fluorocytometric analysis after staining with PE-CD11b antibody. The histograms display the representative GFP expression by cells gated as positive for CD11b(Mac-1). The figures in graph are average of three mice.

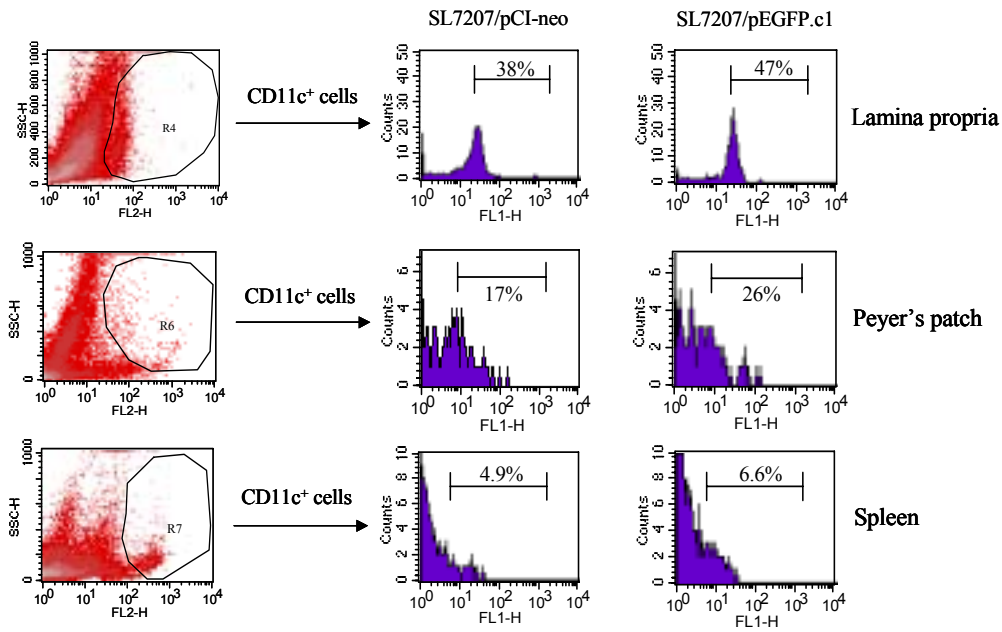


Fig. 4-8. Characterization of *in vivo* *S. typhimurium*-mediated DNA gene transfer to APCs in orally vaccinated animals. Expression of GFP in dendritic cells (CD11c⁺ cells) was determined by flow cytometry in spleen, Peyer's patch (PP) and lamina propria (LP) of mice receiving the *S. typhimurium* SL7207 strain carrying either control vector pCI-neo or GFP expression vector pEGF.c1. Cell subsets expressing GFP were identified by two-color fluorocytometric analysis after staining with PE-CD11c antibody. The histograms display the representative GFP expression by cells gated as positive for CD11c. The figures in graph are average of three mice.

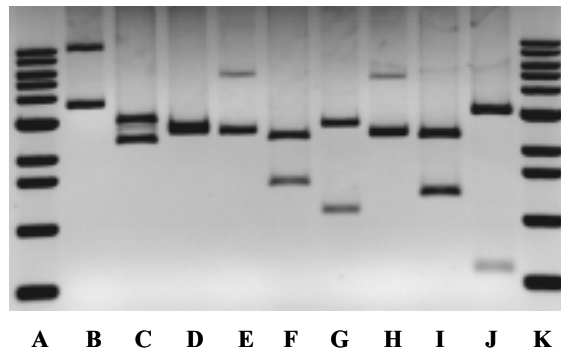


Fig. 4-9. Construction of pseudorabies virus glycoprotein antigen-encoded entry vector for recombinant adenovirus. EcoRI fragments of pCR-Blunt II-TOPO vector encoding PrV antigen(pCRgB, pCRgC, and pCRgE) were subcloned into pENTR11 entry vector which could be used for Gateway cloning technique. A and K; size marker, B; pENTR11/PrVgB uncut, C; pENTR11/PrVgB EcoRI cut(2,805 bp, 2,321 bp), D; pENTR11/PrVgB SalI cut(2,586 bp, 2,40 bp), E; pENTR11/PrVgC uncut, F; pENTR11/PrVgC EcoRI cut(2,321 bp, 1,561 bp), G; pENTR11/PrVgC KpnI cut(1,074 bp, 2,808 bp), H; pENTR11/PrVgD uncut, I; pENTR11/PrVgD EcoRI cut(1,289 bp, 2,321 bp), J; pENTR11/PrVgD SalI cut(579 bp, 3,031 bp).

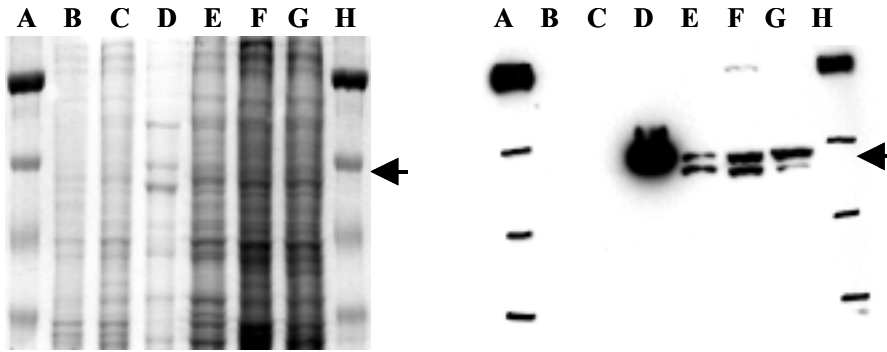


Fig. 4-10. SDS-PAGE and western blot for identification of PrV gB protein expressed by replication-defective adenovirus. The expression of gB (~100 KDa) was identified by western blot using polyclonal antiserum against gB protein, following in vitro infection into NIH-3T3 cells. Lanes: A and H, size marker; B, cell lysate control; C, Ad/LacZ-infected; D, PrV-infected; E, Ad/PrVgB-infected (24 h); F, Ad/PrVgB-infected (48 h); G, Ad/PrVgB-infected (72 h). The relative positions in the gel of predicted size are indicated on left side.

나. 체액성 면역반응

1) 항원 특이 항체 반응

제작된 오제스키 항원 발현 아데노바이러스의 항원성을 검증하기 위하여 5×10^5 pfu를 근육주사한 후 나타나는 오제스키 항원 특이 IgG 반응을 분석하였다. 1차 면역화 후 제작된 세 가지 항원 발현 Ad/PrVgB, Ad/PrVgC 및 Ad/PrVgD 모두 유의성의 있는 항체 반응이 검출되었다. 그와 같은 항원 반응은 2차 및 3차 면역화 후 현저하게 오제스키 특이 항체 반응이 상승하였다 (Fig. 4-11).

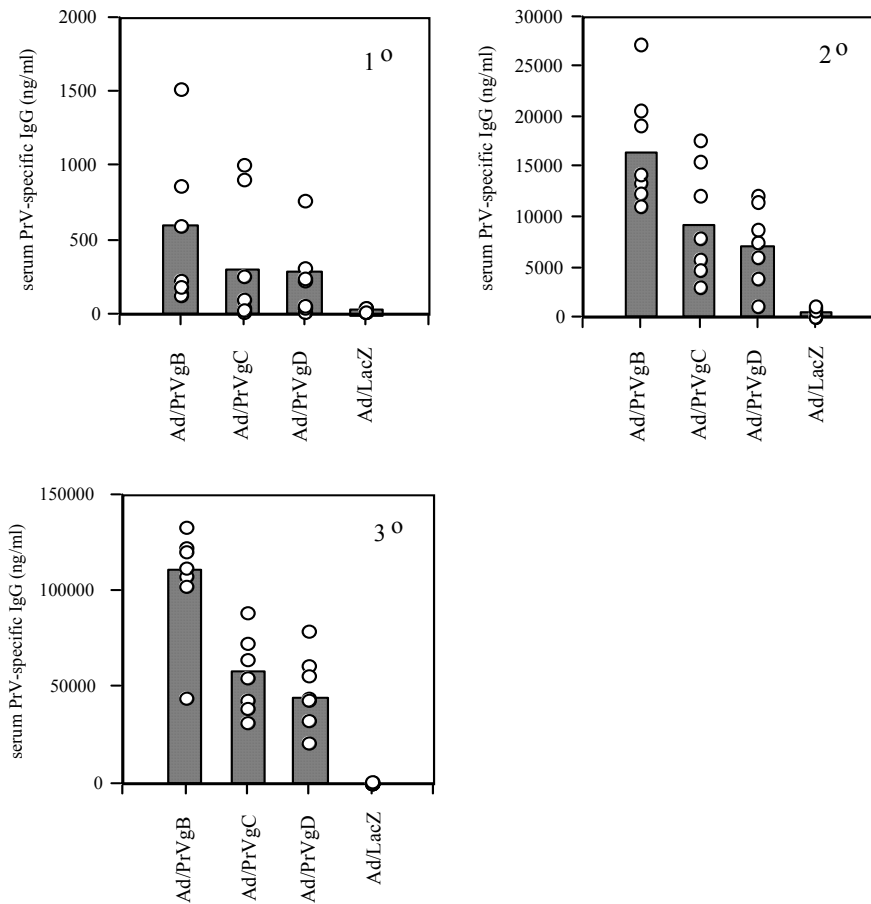


Fig. 4-11. Systemic PrV-specific IgG levels induced by immunization with replication-defective adenovirus expressing gB (Ad/PrVgB), gC (Ad/PrVgC), and gD (Ad/PrVgD). Groups of C57BL/6 mice (n=7) were immunized i.m. with replication-defective adenovirus. Seven days after each immunization (1°, 2°, and 3°), serum PrV-specific IgG levels were measured by ELISA. The each spot in the graph represents the Abs levels at 7th day following each immunization and the each bar shows average of individual group.

2) 항체 isotype 분석

오제스키 항원 발현 아데노바이러스를 이용하여 면역화 한 후 나타나는 오제스키 특이 항체 반응 IgG isotype의 분포를 분석하였다. 그 결과 Ad/PrVgB가 가장 높은 수준의 IgG2a을 생산하였고 IgG1은 Ad/PrVgC에 의하여 가장 높게 유도되었다. 따라서, Ad/PrVgB는 상대적으로 Th1-type의 패턴을 보이는 반면에, Ad/PrVgC는 Th2-type의 반응을 보이는 것으로 나타났다 (Fig. 4-12).

다. 사이토카인 생산 profile

오제스키 항원 발현 아데노바이러스를 이용하여 면역화 한 후 나타나는 세포성 면역을 분석하기 위하여 오제스키 특이 T 세포부터 생산되는 사이토카인의 생산 양상을 분석하였다. 제작된 세 가지 항원 발현 아데노바이러스들은 대조 아데노바이러스 Ad/LacZ와 비교하여 IL-2, IL-4 및 IFN- γ 의 생산을 유도하였다. 특히 Ad/PrVgB가 가장 효과적인 반응을 보여주는 것으로 나타났다 (Fig. 4-13).

4. 오제스키 항원 발현 아데노바이러스에 의한 점막 면역 유도

가. 전신 면역 및 점막 면역 측정

제작된 오제스키 항원 발현 아데노바이러스를 이용하여 접종 경로에 따른 전신 면역 및 점막 면역의 유도를 분석하였다. 오제스키 항원 gB 발현 아데노바이러스 Ad/PrVgB 5×10^5 pfu를 근육 주사 또는 비강 투여 한 후 나타나는 혈청 내 오제스키 특이 IgG의 수준과 점막 조직에서 분비되는 오제스키 특이 IgA의 양을 분석하였다. 그 결과 Ad/PrVgB를 근육 주사하면 1회 접종 후 비강 투여 보다 높은 수준의 오제스키 특이 IgG가 유도되었고 그와 같은 수준은 2회 및 3회 접종에 의하여 현저하게 증가되었다. 그리고 Ad/PrVgB를 비강 투여하면 그와 같은 오제스키 특이 IgG의 반응은 근육 주사와 비교하여 낮은 수준으로 유도되었다 (Fig. 4-14). 또한, 비강 투여 및 근육 주사 후 나타나는 오제스키 특이 IgG isotype을 분석한 결과 근육주사보다 비강 투여한 경우에 보다 낮은 IgG2a/IgG1 ratio를 보여 주었다 (Fig. 4-15).

그러나, 점막 조직으로부터 분비되는 오제스키 특이 IgA의 양을 분석한 결과

Ad/PrVgB를 근육 주사하게 되면 아무런 오제스키 특이 IgA 반응이 유도되지 못하였다. 반대로 Ad/PrVgB를 비강 투여 하게 되면 높은 수준의 오제스키 특이 IgA가 유도되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4-16).

나. 사이토카인 생산 측정

오제스키 항원 gB 발현 아데노바이러스를 근육 주사 또는 비강 투여 한 후 면역화 된 동물의 비장 세포(Fig. 4-17 ABC)와 림프절 세포(Fig. 4-17 DEF)의 오제스키 특이 T 세포로부터 분비되는 사이토카인의 양을 분석하였다. Ad/PrVgB의 근육 주사와 비강 투여는 공히 같은 수준의 오제스키 특이 T 세포로부터 사이토카인의 분비되는 것을 확인할 수 있었다.

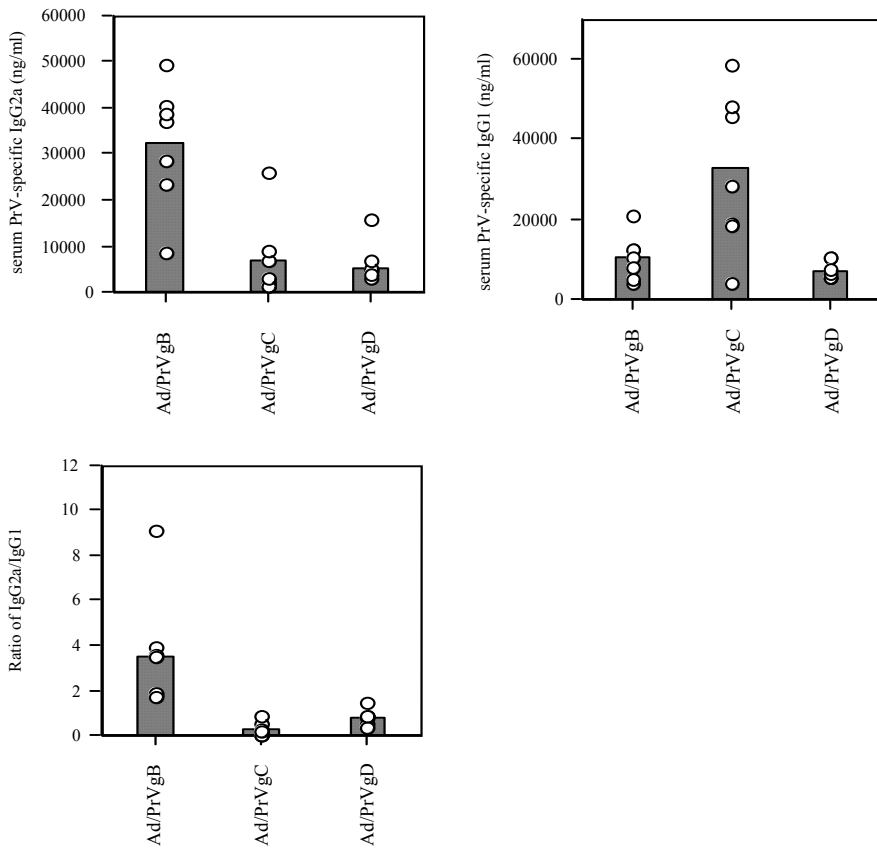


Fig. 4-12. Distribution of serum PrV-specific IgG isotypes induced by immunization with replication-defective adenovirus expressing gB (Ad/PrVgB), gC (Ad/PrVgC), and gD (Ad/PrVgD). Groups of C57BL/6 mice (n=7) were immunized i.m. with replication-defective adenovirus. Seven days after last immunization, serum PrV-specific IgG isotypes (IgG2a and IgG1) were measured by ELISA. The each spot in the graph represents the Abs levels at 7th day following last immunization and the each bar shows average of individual group.

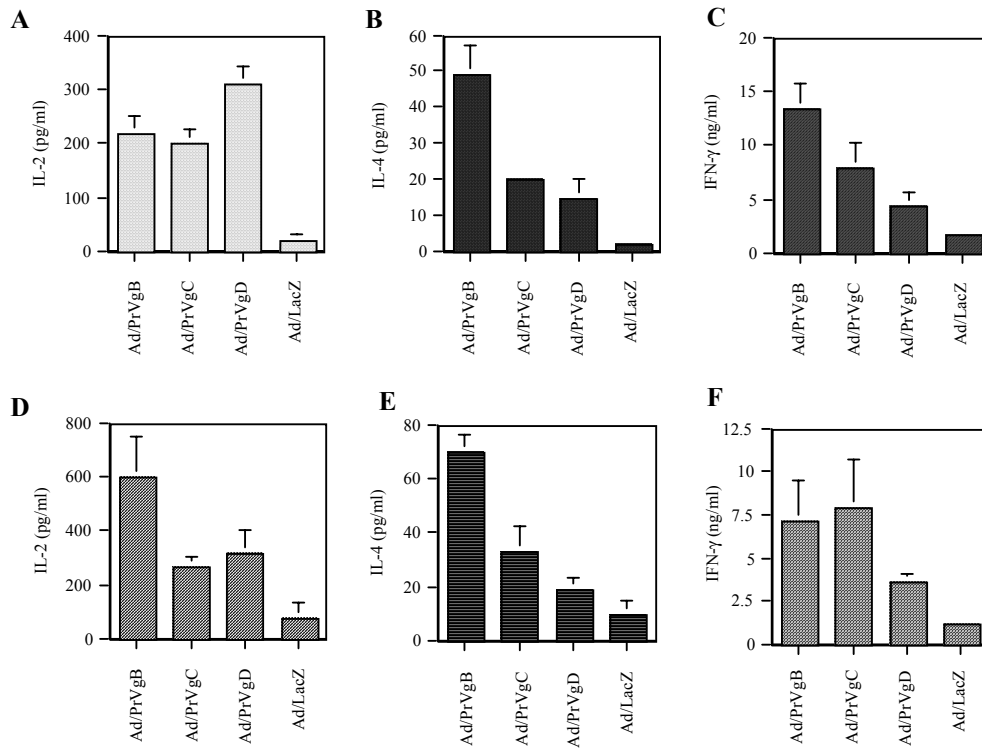


Fig. 4-13. The profile of cytokine production (IFN- γ , IL-2, and IL-4) from splenocytes (ABC) and popliteal LN cells (DEF) of animals immunized with replication-defective adenovirus expressing gB (Ad/PrVgB), gC (Ad/PrVgC), and gD (Ad/PrVgD) of PrV. Two weeks following last immunization, the responder cells from immunized animals were mixed with irradiated syngeneic enriched APCs that had been pulsed with UV-inactivated PrV and then incubated for 3 days. The levels of cytokines in supernatants of stimulated T cells were determined by cytokine ELISA. The test was done in quadruplicate wells. Each bar represents the average and standard deviation from three independent experiments.

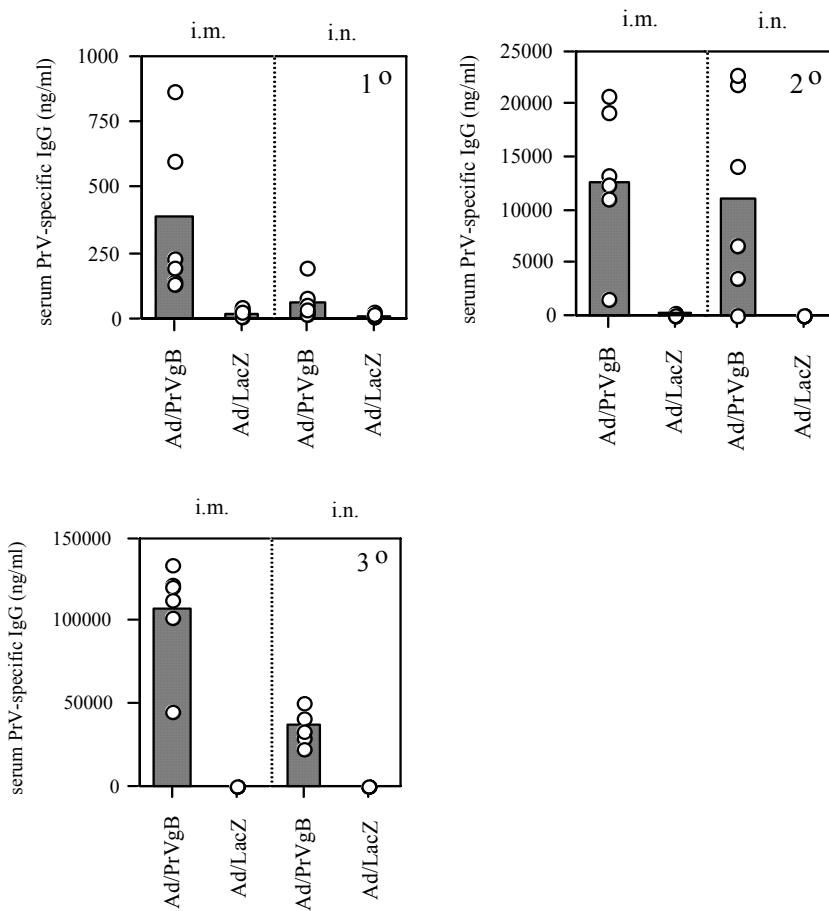


Fig. 4-14. Systemic PrV-specific IgG levels induced by either intramuscular or intranasal immunization with replication-defective adenovirus expressing gB (Ad/PrVgB). Groups of C57BL/6 mice (n=7) were immunized i.m. with replication-defective adenovirus. Seven days after each immunization (1^o, 2^o, and 3^o), serum PrV-specific IgG levels were measured by ELISA. The each spot in the graph represents the Abs levels at 7th day following each immunization and the each bar shows average of individual group.

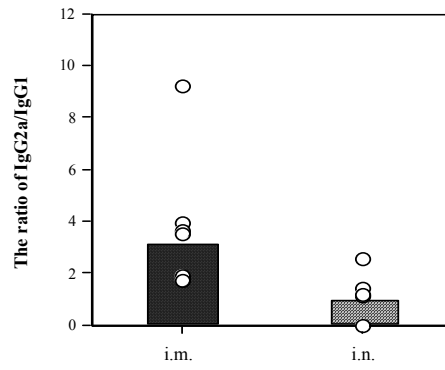


Fig. 4-15. Distribution of serum PrV-specific IgG isotypes induced by immunization with replication-defective adenovirus expressing gB (Ad/PrVgB) via intranasal and intramuscular route. Groups of C57BL/6 mice (n=7) were immunized i.m. with replication-defective adenovirus. Seven days after last immunization, serum PrV-specific IgG isotypes (IgG2a and IgG1) were measured by ELISA. The each spot in the graph represents the Abs levels at 7th day following last immunization and the each bar shows average of individual group.

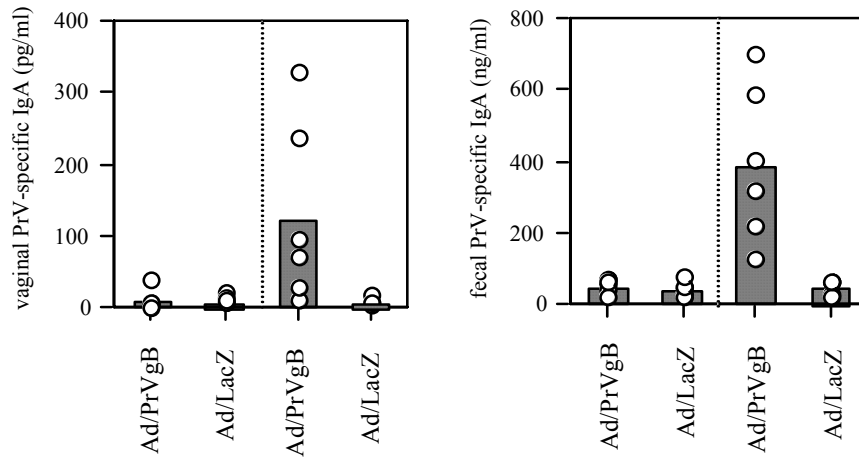


Fig. 4-16. Comparison of mucosal IgA levels induced by either intramuscular or intranasal immunization with replication-defective adenovirus expressing gB (Ad/PrVgB). Groups of C57BL/6 mice (n=7) were immunized with replication-defective adenovirus via either intramuscular or intranasal route. Seven days after last immunization, mucosal PrV-specific IgA levels at both vagina tract and feces were measured by ELISA. The each spot in the graph represents the Abs levels at 7th day following each immunization and the each bar shows average of individual group.

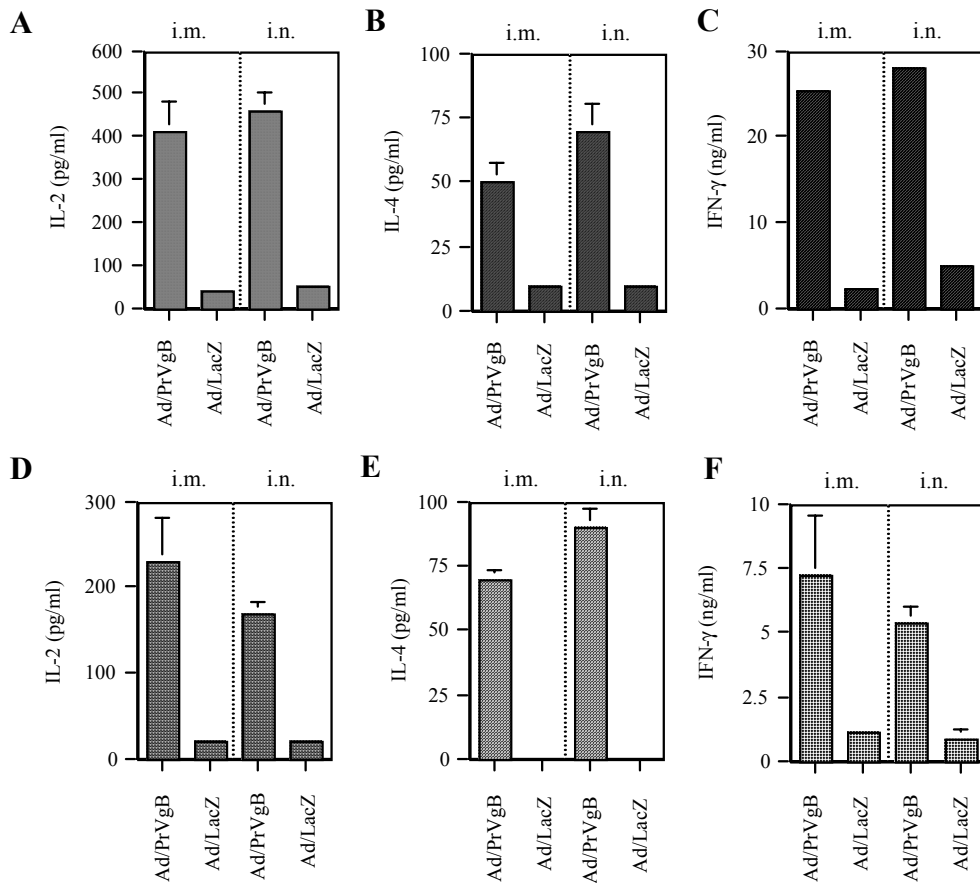


Fig. 4-17. The profile of cytokine production (IFN- γ , IL-2, and IL-4) from splenocytes and regional LN cells of animals immunized with replication-defective adenovirus expressing gB of PrV via either intramuscular or intranasal route. Two weeks following last immunization, the responder cells from immunized animals were mixed with irradiated syngeneic enriched APCs that had been pulsed with UV-inactivated PrV and then incubated for 3 days. The levels of cytokines in supernatants of stimulated T cells were determined by cytokine ELISA. The test was done in quadruplicate wells. Each bar represents the average and standard deviation from three independent experiments.

다. 공격시험

1) Anamnestic IgG 반응

오제스키 항원 gB 발현 아데노바이러스를 이용하여 세 번에 걸쳐 근육주사 및 비강 투여한 후 병독성 오제스키바이러스 10LD₅₀을 비강 투여함으로써 감염시켰다. 감염 후 3일째 나타나는 anamnestic IgG 반응과 점막 조직내의 IgA를 측정 한 결과 오제스키항원 발현 아데노바이러스를 비강 투여한 경우와 근육주사한 경우 모두 상당한 양의 오제스키 특이 IgG가 검출되었다. 또한, 점막 조직내의 오제스키 특이 IgA를 측정하면 아데노바이러스를 비강 투여한 경우에 보다 높은 수준의 IgA를 보여 주었다 (Fig. 4-18)

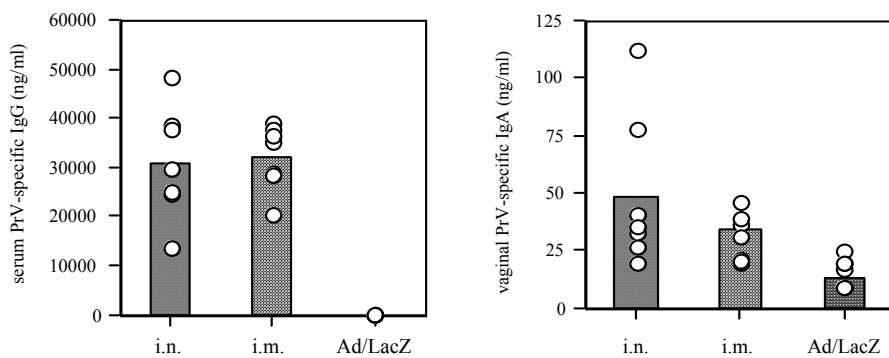


Fig. 4-18. Anamnestic PrV-specific IgG responses determined at 3-days post-challenge with the virulent PrV Yangsan strain. Animals were immunized with replication-defective adenovirus expressing gB via either intranasal or intramuscular route three times at 7-days interval. Two weeks after the final immunization, groups of animals ($n=7$) were challenged i.n. with the PrV Yangsan strain (10LD₅₀) and the sera were then collected at 3-days post-challenge. Conventional ELISA was used to determine the levels of the PrV-specific IgG in the sera. The spots in graph represent the individual serum IgG level and bars show the average of each group.

2) 생존률 결과

오제스키 항원 gB 발현 아데노바이러스를 이용하여 실험동물을 세 번에 걸쳐 면역화한 후 병독성 오제스키바이러스 10LD₅₀을 비강 투여함으로써 감염시킨 후 동물의 폐사율을 관찰하였다. 그 결과 오제스키 항원 gB 발현 아데노바이러스를 비강 또는 근육 주사함으로써 면역화한 동물은 병독성 바이러스 감염에 대하여 높은 저항성을 보여 주었고, 접종 경로에 따라 차이를 보여주지 못하였다 (Fig. 4-19).

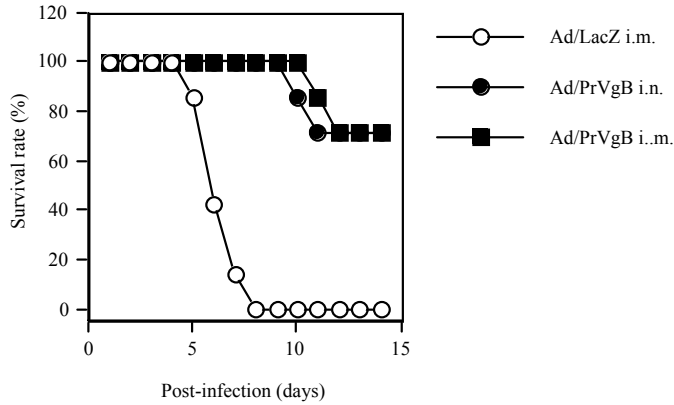


Fig. 4-19. Susceptibility of the animals immunized by replication-defective adenovirus expressing gB via either intranasal or intramuscular route. Two weeks after the final immunization, groups of mice ($n=7$) were challenged i.n. with the PrV Yangsan strain (10LD₅₀). The challenged mice were examined daily for any signs of inflammation, illness, and death until 14-days post-challenge.

5. 플라스미드 DNA 백신과 아데노바이러스를 이용한 프라임-부스트 접종

가. 체액성 면역 반응

1) 항원 특이 항체 검출

오제스키 DNA 백신 pCI-PrVgB와 오제스키 항원 gB 발현 아데노바이러스 Ad/PrVgB를 이용하여 프라임-부스트 프로토콜을 작성한 후 프라임-부스트 접종

을 수행하였다. 프라임-부스트 접종용 프로토콜은 총 11 종의 프로토콜을 작성하여 일부의 경우는 1회 및 2회 접종의 프라임-부스트 접종프로토콜이 작성되었고, 일부는 총 3회의 접종에 의한 프로토콜을 작성하였다 (Table 4-1). 작성된 프라임-부스트 접종 프로토콜에 맞추어 1회, 2회 및 3회 접종한 후 일주일 간격으로 오제스키 특이 IgG의 수준을 9주까지 추적하였다. 그 결과 1회 접종시 오제스키 항원 gB 발현 아데노바이러스를 이용하고 2회와 3회 접종시 오제스키 항원 gB 발현 DNA 백신을 이용하면 가장 우수한 오제스키 특이 IgG 반응이 오랫동안 지속됨을 확인 할 수 있었다 (Fig. 4-20).

2) 항체 isotype 분석

오제스키 DNA 백신 pCI-PrVgB와 오제스키 항원 gB 발현 아데노바이러스 Ad.PrVgB를 이용하여 프라임-부스트 접종 후 나타나는 오제스키 특이 IgG 반응의 isotype을 분석하였다. 3회 모두 DNA 백신만을 이용한 경우에 가장 높은 수준의 IgG2a/IgG1 비율을 보였고, 가장 우수한 오제스키 특이 IgG 반응을 보였던 Ad/PrVgB(V)-pCI-PrVgB(D)-pCI-PrVgB(D) 프로토콜은 상대적으로 낮은 IgG2a/IgG1 비율을 보여 주었다 (Fig. 4-21).

나. 사이토카인 생산 profile분석

오제스키 항원 gB 발현 DNA 백신과 아데노바이러스를 이용하여 프라임-부스트 접종 한 후 10-12 주 사이에 면역화 된 동물을 희생시키고 비장 세포로부터 생산되는 사이토카인 IFN- γ 의 양을 분석하였다. 그 결과 가장 우수한 오제스키 특이 IgG 반응을 보여 주었던 Ad/PrVgB(V)-pCI-PrVgB(D)-pCI-PrVgB(D) 프로토콜과 pCI-PrVgB(D)-Ad/PrVgB(V)-X 프로토콜이 우수한 결과를 나타내었다 (Fig. 4-22). 결국 오제스키 항원 gB 발현 DNA 백신과 아데노바이러스를 이용한 프라임-부스트 접종에서 아데노바이러스를 가정 먼저 접종한 경우에는 뒤에 모두 DNA 백신을 접종하는 것이 우수한 결과를 얻을 수 있을 것이고, 1회 접종을 DNA 백신으로 하면 뒤에 아데노바이러스 1회 접종으로도 우수한 면역반응이 유도됨을 알 수 있었다.

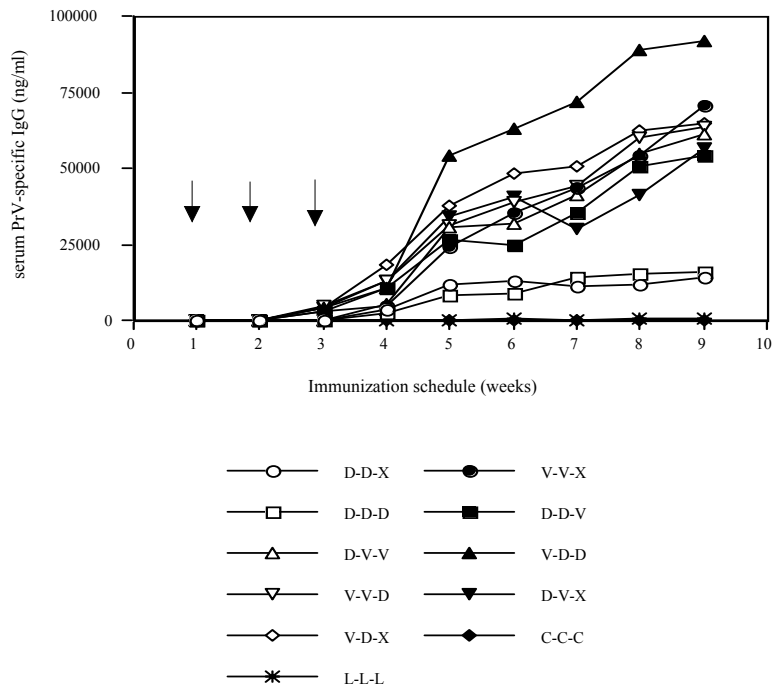


Fig. 4-20. Trends of systemic PrV-specific IgG levels induced by heterologous prime-boost vaccination using both PrV DNA vaccine and replication-defective adenovirus expressing gB. Groups of C57BL/6 mice (n=7) were primarily immunized with either PrV DNA vaccine or replication-defective adenovirus expressing gB and then boosted with alternative vaccine type. Prime-boost vaccination was performed three times at 7-days interval. Serum PrV-specific IgG levels were measured by ELISA till 9 weeks. The each spot in the graph represents the average Ab levels of each group. Arrows show immunization time for prime and boost.

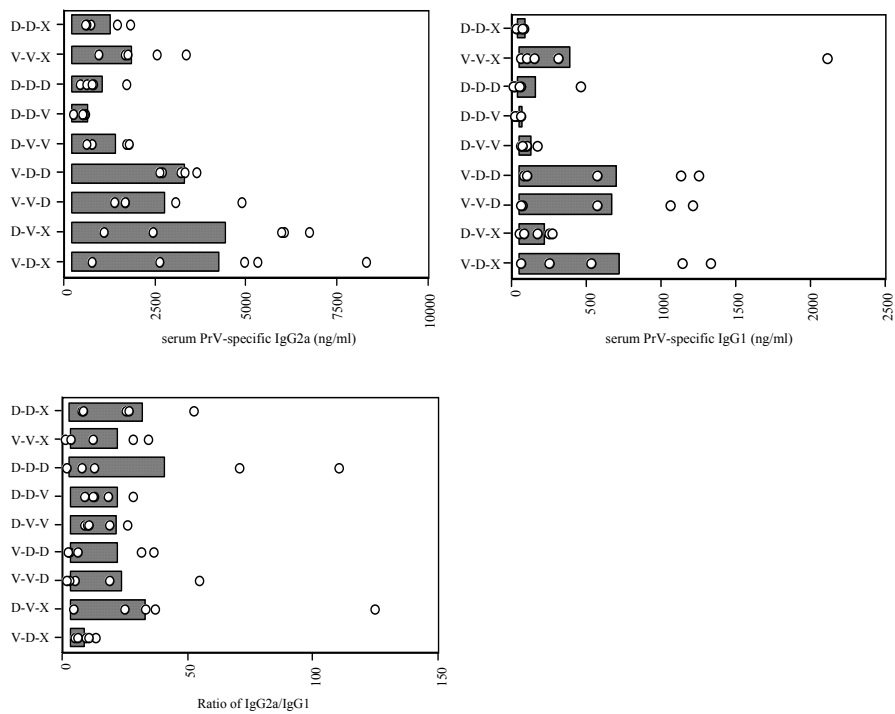


Fig. 4-21. Distribution of serum PrV-specific IgG isotypes induced by heterologous prime-boost vaccination using both PrV DNA vaccine and replication-defective adenovirus expressing gB. Groups of C57BL/6 mice (n=7) were primarily immunized with either PrV DNA vaccine or replication-defective adenovirus expressing gB and then boosted with alternative vaccine type. Prime-boost vaccination was performed three times at 7-days interval. Seven days after last immunization, the levels of serum PrV-specific IgG isotypes were measured by ELISA. The each spot in the graph represents the levels of Ab isotypes and the each bar shows average of individual group.

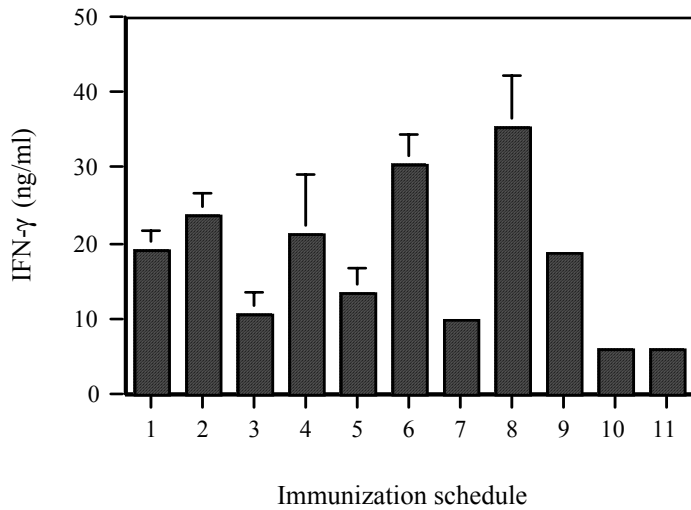
다. 공격시험

1) Anamnestic IgG 반응

오제스키 DNA 백신과 오제스키 항원 발현 아데노바이러스를 이용하여 총 11개의 프라임-부스트 접종 후 4주째에 병독성 오제스키바이러스 Yangsan주 (10LD₅₀)를 비강 접종 한 후 3일째에 혈청중에 존재하는 오제스키 특이 IgG수준을 분석하였다. 그 결과 면역화후 나타난 1차 접종시 아데노바이러스를 dlyd하고 2차와 3차 접종시 DNA 백신을 접종한 그룹과 1차 접종시 DNA 백신을 접종한 그룹과 2차 접종시 아데노바이러스를 접종한 그룹에서 다른 접종과 비교하여 높은 결과를 나타내었다 (Fig. 4-23).

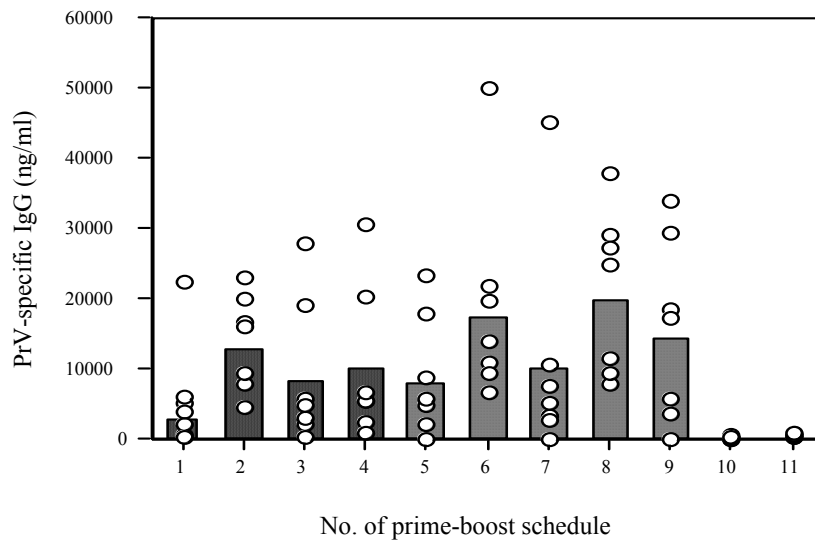
2) 생존률 결과

총 11종의 프라임-부스트 접종법을 작성하여 예방 접종한 후 4주째에 병독성 오제스키바이러스를 비강 감염 후 18일째까지 동물의 폐사율을 측정하였다. 그 결과 위에서 언급한 것과 비슷한 결과로서 1차 접종시 DNA 백신을 이용하고 2차 접종시 아데노바이러스를 이용한 경우 가장 우수한 방어 효과를 보여 주었고 1차 접종시 아데노바이러스를 이용하고 2차와 3차 접종시 DNA 백신을 이용한 경우에도 우수한 방어 효과를 보여주었다 (Fig. 4-24).



1: D-D-X 2: V-V-X 3: D-D-D
 4: D-D-V 5: D-V-V 6: V-D-D
 7: V-V-D 8: D-V-X 9: V-D-X
 10: C-C-C 11: L-L-L

Fig. 4-22. Trends of cytokine IFN- γ production from splenocytes of animals immunized with heterologous prime-boost protocols including PrV DNA vaccine and replication-defective adenovirus expressing gB. Twelve to fourteen weeks following last immunization, the responder cells from immunized animals were mixed with irradiated syngeneic enriched APCs that had been pulsed with UV-inactivated PrV and then incubated for 3 days. The levels of cytokines in supernatants of stimulated T cells were determined by cytokine ELISA. The test was done in quadruplicate wells. Each bar represents the average and standard deviation from three independent experiments.



1: D-D-X 2: V-V-X 3: D-D-D
4: D-D-V 5: D-V-V 6: V-D-D
7: V-V-D 8: D-V-X 9: V-D-X
10: C-C-C 11: L-L-L

Fig. 4-23. Anamnestic PrV-specific IgG responses determined at 3-days post-challenge with the virulent PrV Yangsan strain in animals immunized with heterologous prime-boost protocols. Two weeks after the final immunization, groups of mice ($n=7$) were challenged i.n. with the PrV Yangsan strain ($10LD_{50}$) and the sera were then collected at 3-days post-challenge. Conventional ELISA was used to determine the levels of the PrV-specific IgG in the sera. The spots in graph represent the individual serum IgG level and bars show the average of each group.

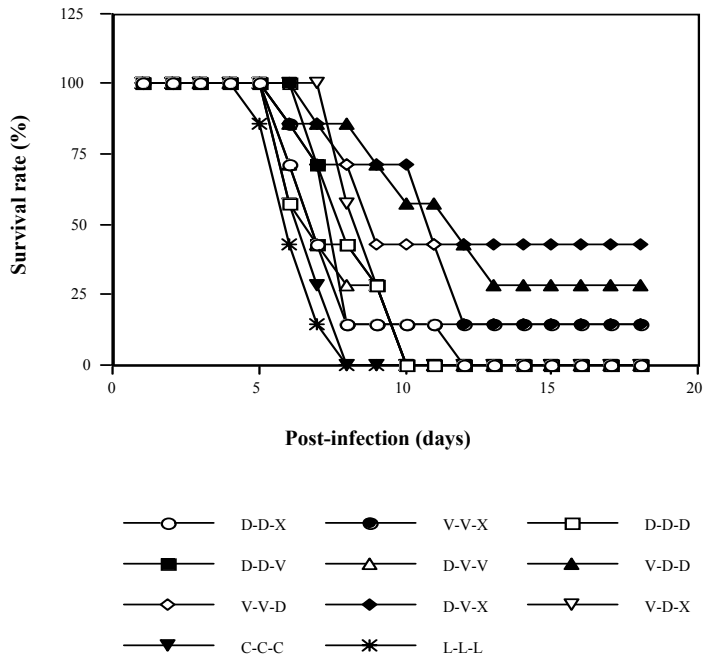


Fig. 4-24. Susceptibility of the animals immunized by heterologous prime-boost vaccination using PrV DNA vaccine and replication-defective adenovirus expressing gB. Four weeks after the final immunization, groups of mice ($n=7$) were challenged i.n. with the PrV Yangsan strain ($10LD_{50}$). The challenged mice were examined daily for any signs of inflammation, illness, and death until 18-days post-challenge.

제 4 절 연구의 요약 및 결론

DNA 백신이 현장에 적용되기 위해서는 해결되어야 할 많은 문제들이 있다. 첫 번째로 일부의 경우에 나타나는 약한 면역 반응에 의하여 충분한 방어 기구를 형성 못하는 점에 있다. 두 번째는 대량 예방 접종이 필요한 경우나 다른 접종 경로에 의한 점막 면역을 유도하는데 효과적이지 못하다는 점이 있다. 마지막 세 번째로는 아직 안전성이 완벽하게 자리 잡지 못하고 있다는 것이다. 마지막 문제는 인의용 백신에 대한 DNA 백신이 허가되면 산업동물 및 애완용 동물에 쉽게 이용될 수 있는 가능성이 열릴 것으로 보여 진다. 따라서, 본 연구에서는 DNA 백신의 현장 적용을 보다 쉽게 할 수 있는 방법으로 약독화 *Salmonella typhimurium*을 이용한 경구 투여방법에 대한 연구와 오제스키 DNA 백신에 의하여 최대의 면역반응을 유도하고 방어 기구를 형성 시킬 수 있는 방법으로 최적의 프라임-부스트 접종법을 찾고자 하였다. 약독화 *Salmonella typhimurium* SL7207에 의한 오제스키 DNA 백신을 경구 투여한 결과 흥미롭게도 전신 면역과 점막 조직에 모두 오제스키 특이 면역 반응이 유도됨을 확인하였다. 그와 같이 유도된 면역 반응은 병독성 오제스키바이러스 Yangsa주에 대하여 충분하지 못하지만 보다 오랫동안 감염 동물이 생존함을 확인하였다. 또한, 약독화 *Salmonella typhimurium*에 의한 오제스키 DNA 백신이 경구 투여에 의하여 면역 반응이 유도되는 간접적인 방법으로 형광 단백질 발현 플라스미드 DNA를 이용하여 증명하였다. 따라서, 약독화 *Salmonella typhimurium*은 오제스키 DNA 백신의 경구 전달체로 이용될 수 있음을 의미하고 이와 같은 경구 투여 법은 대량 예방 접종 시 유용하게 이용되어 질 수 있을 것이다. 그러나, 이와 같은 방법에 의한 DNA 백신의 경구 투여 연구에서도 보여 주었듯이 충분한 방어 기구를 형성 할 수 있는 면역 반응이 유도되지 못함을 알 수 있었고, 반복적인 투여에 의하여 면역 반응이 유도됨으로써 앞으로 개선되어야 할 문제점으로 남아 있다.

DNA 백신의 현장 적용이 현재까지 가장 가깝게 다가선 방법은 DNA 백신을 포함하는 다른 형태의 백신을 이용한 프라임-부스트 예방 접종법이다. 따라서, 본 연구에서도 오제스키 항원 발현 아데노바이러스를 제작하여 제작된 오제스키 DNA 백신과 프라임-부스트 접종법에 적용하여 보았다. 제작된 오제스키 항원 아데노바이러스는 모두 유의성 있는 면역 반응이 유도됨을 알 수 있었고, DNA 백

신과 달리 Th2-type에 치우친 반응을 보여 주는 것으로 나타났다. 그와 같은 오제스키 항원 발현 아데노바이러스 중 가장 우수한 면역 반응을 보이는 것으로 여겨지는 gB 발현 아데노바이러스를 이용하여 오제스키 항원 gB 발현 DNA 백신과 함께 총 11종의 프라임-부스트 접종 프로토콜을 작성하여 예방 접종을 실시하였다. 그 결과 1회 접종시 오제스키 항원 발현 아데노바이러스를 이용하고 2회 및 3회 접종시 DNA 백신을 이용하는 것이 가장 오랫동안 지속될 수 있는 면역 반응이 유도됨을 알 수 있었다. 또한, 1회 접종시 오제스키 DNA 백신을 적용하면 2회에 항원 발현 아데노바이러스를 접종하는 것만으로도 우수한 면역반응이 유도됨을 알 수 있었다. 이와 같은 면역 반응의 형성은 병독성 오제스키 바이러스를 이용한 공격시험에 의하여 또한 확인 되었다. 따라서, 오제스키 DNA 백신의 현장 적용이 가능하기 위해서는 이와 같은 프라임-부스트 접종을 바탕으로 앞에서 도출되었던 사이토카인 유전자를 접목시키면 보다 정교한 방법에 의하여 충분한 면역 반응이 유도될 수 있을 것이다. 또한, 약독화 세균을 이용한 대량 프라임-부스트접종법이 확립되면 산업동물에 쉽게 적용될 수 있을 것이다.

제 5 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구의 최종 목표는 오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 진단법을 확립하여 국내 사육 돼지의 잠복 감염 실태를 조사하며, 오제스키바이러스의 잠복 감염 모델을 확립하여 잠복 감염과 재 활성을 조절할 수 있는 방법을 모색하고자 하였다. 따라서 이와 같은 오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 조절과 오제스키바이러스 발생에 대한 예방 방법의 일환으로 오제스키 DNA 백신의 최적화 및 약독화 salmonella bacteria를 이용한 delivery system에 대한 연구이다. 이와 같은 최종 연구 목표에 맞추어 본 연구가 진행되어 일부의 경우 좀더 수행되어야 할 연구가 있지만 본 연구팀은 전체적으로 90%이상의 달성도를 예상한다. 또한, 본 연구에서 도출되는 결과물들은 오제스키바이러스의 보다 근본적인 근절 및 예방대책을 위한 자료를 제시할 수 있을 것이며, 몇 가지 개선되어야 할 부분이 있지만 오제스키병 발생 및 잠복 감염을 줄일 수 있는 예방 접종의 방법에 대한 연구와 유용한 delivery system 개발에 도움이 될 것이다. 본 연구과제의 보다 구체적인 목표 달성도와 기여를 고려하면 다음과 같다.

1. 오제스키바이러스 잠복 감염에 대한 연구

오제스키병 발생의 고질적인 문제로 여겨지는 오제스키 바이러스의 잠복 감염에 대한 진단 방법으로서 nested PCR과 real-time PCR의 조건을 확립하고, 약 100여두의 양성축의 돈두를 수집하여 주요 잠복 감염 조직으로 예상되는 trigeminal ganglion, olfactory bulb 및 brain stem에 존재하는 잠복 감염 오제스키바이러스를 검출하여 국내 실태를 조사하였다. 이와 같은 조사는 국내에서 처음으로 실시된 것으로 그 의미가 깊다. 또한, 혈청 검사를 실시하지 않은 무작위로 추출된 돈두 40여개를 수집하여 오제스키바이러스의 잠복 감염을 조사한 결과 거의 대부분의 사육돼지가 잠복 감염되어 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 향후 오제스키병 근절사업에 고려되어야 할 것으로 여겨진다. 또한, 실험적으로 오제스키바이러스에 감염된 돼지를 이용하여 오제스키바이러스의 잠복 감염을 추적한 결과 다양한 신경 조직에 불현성 잠복 감염이 확립됨을 확인하여, 야외주에 의하여 백신 접종군 또는 비접종군에 불현성 잠복 감염이 충분히 일어날 수 있음을 확인함으로써 충분히 지금도 오제스키바이러스의 불현성 감염에 의하여 바이

러스가 전파될 수 있음을 시사하였다.

또한, 오제스키바이러스의 실험동물을 이용한 잠복 감염 모델을 확립하여 바이러스의 잠복 감염을 조절할 수 있는 방법을 모색하였다. 첫 번째로 현재 상용되는 백신을 포함하여 수종의 백신을 비강 및 근육 주사 후 오제스키바이러스의 잠복 감염과 백신에 의하여 나타나는 면역 반응 특성과의 상관 관계를 분석하여 오제스키 바이러스의 잠복 감염을 억제할 수 있는 백신의 특성을 도출하였다. 이와 같은 결과는 앞으로 오제스키 예방 접종 정책에 대한 방향을 제시하는 것으로 현재 이용되는 상용 불활화 subunit 백신은 오제스키바이러스의 잠복 감염을 억제하는데 아무런 영향을 주지 않음을 시사한다. 또한, 잠복 감염된 바이러스의 재 활성화 모델을 확립하여 바이러스의 재 활성을 조절하기 위한 방법을 모색하였다. 결국 바이러스의 재 활성화와 잠복 감염의 반복적인 사이클을 끊기 위해서는 현재 시행되고 있는 예방 접종과 관리요령에 변화를 주어야 할 것으로 생각된다. 이러한 결과들은 오제스키병 근절사업에 중요한 자료와 지표가 될 것이다.

2. 오제스키 DNA 백신의 최적화 연구

약독화 생백신은 유전적 불안정 및 안전성 때문에 과감하게 예방 접종으로 이용되지 못하고, 안전한 불활화 사독 백신은 낮은 면역원성과 반복 및 다량의 항원 투입이 필요하므로 새로운 백신에 대한 연구가 필요하였다. 이와 같은 문제의 대안으로 오제스키바이러스에 대한 DNA 백신의 최적화 연구를 수행하였다. DNA 백신을 최적화 하는 방법에는 여러 가지 방법이 있으나 본 연구에서는 사이토카인 및 케모카인 유전자를 이용한 방법을 이용하였다. 첫 번째로 오제스키 바이러스의 DNA 백신으로 이용될 수 있는 후보 항원 유전자를 도출하여 그중 가장 면역원성이 강한 glycoprotein B (gB)임을 확인하였다. 이러한 결과는 앞으로 진행될 DNA 백신을 비롯하여 다른 형태의 백신 개발에 gB가 가장 유효한 항원임을 나타낸다. 가장 강력한 면역원성 및 방어기구를 형성한 오제스키 DNA 백신을 도출하여 사이토카인 유전자, IL-12, IL-18, IFN- γ , GM-CSF을 이용하여 항원에 대한 면역원성 및 방어효과의 변화를 조사하였다. 그 결과 IL-12과 IL-18은 오히려 오제스키바이러스 감염에 대하여 감수성이 증가된 반면에 GM-CSF 만이 감염에 대한 저항성을 증가시켜 줌을 확인하였다. 따라서, DNA 백신의 면역원성을 조절하기 위한 사이토카인의 이용은 신중하게 선택되어야 함을 의미하고 향후

오제스키 DNA 백신의 최적화를 위해서는 GM-CSF 유전자를 이용하는 것이 가장 좋다는 것을 알게 되었다. 케모카인 유전자의 경우는 MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, RANTES 및 IP-10 유전자를 이용한 결과 RANTES와 IP-10이 오제스키 바이러스 감염에 대하여 저항성을 증가시켜 주었다. 따라서, 사이토카인 및 케모카인 유전자를 이용하여 오제스키 DNA 백신의 효능을 증가시켜 주기 위해서는 GM-CSF와 RANTES가 가장 유용한 genetic adjuvant가 될 것이며 향후 오제스키 DNA 백신을 실용화하기 위해서는 이러한 사이토카인 유전자의 도입이 이루어져야 할 것이다.

3. 오제스키 항원 발현 운반체에 대한 연구

DNA 백신의 낮은 면역원성에 의하여 아직 현장 적용이 어렵고 산업동물에 대한 대량 예방 접종을 위해서는 다른 방법의 접종법이 모색되어야 한다. 따라서, 오제스키 DNA 백신의 경구 전달체로서 *Salmonella typhimurium*의 특성을 이용하고자 하였다. *Salmonella bacteria*를 이용하여 오제스키 DNA 백신을 경구 투여한 결과 전신 면역과 점막 면역이 동시에 유도됨을 확인하였고, 오제스키바이러스 감염에 대하여 접종 동물이 오랫동안 생존함을 확인하였다. 또한, *salmonella bacteria*를 이용한 오제스키 DNA 백신의 경구투여에 의하여 유도되는 면역 반응을 추적하여 증명하였다. 이러한 결과들은 *Salmonella bacteria*를 이용하여 오제스키 DNA 백신의 경구 투여가 가능함을 제시하고 대량 예방 접종(mass vaccination)이 가능함을 제시한다. 다만 이러한 *Salmonella typhimurium*을 이용한 오제스키 DNA 백신의 대량 예방 접종은 반복적인 투여가 필요함으로써 좀더 사이토카인 유전자 및 프라임-부스트 접종에 의한 개선이 요구된다. 또한, 오제스키 DNA 백신을 포함하는 프라임-부스트 접종법을 고안하기 위하여 오제스키 항원 발현 아데노바이러스를 제작하고 면역원성을 조사하였다. 제작된 아데노바이러스를 이용하여 오제스키 DNA 백신과 총 11개의 프라임-부스트 접종 프로토콜을 작성하고 최대의 면역 반응과 방어기구를 형성할 수 있는 프로토콜을 제시하였다. 이와 같은 오제스키 DNA를 이용한 프라임-부스트 접종은 처음 조사 평가되는 것으로 향후 오제스키 DNA 백신의 이용성을 증가시킬 것이다. 이러한 결과들은 향후 오제스키 바이러스의 잠복 감염과 재 활성을 억제하며 야외주 감염에 대하여 충분한 방어 기구를 형성할 수 있는 예방 접종을 제안하는 것이며, 또한

현재 이용되고 있는 상용 백신의 이용가치를 더욱 증대시킬 수 있는 방법을 제시한다.

Table 5-1. 연차별 연구 내용 및 목표 달성도

구 분	연구 내용	척 도	목표 달성도
1차 년도 (2002-2003)	● 오제스키바이러스의 잠복 감염 진단 확립	25	25
	● 양성돈 오제스키바이러스 잠복 감염 실태조사	25	25
	● 오제스키 항원 유전자 확보 및 DNA 백신 제작	25	25
	● 오제스키 DNA백신 경구 전달체 약독화 세균 제작	25	25
2차 년도 (2003-2004)	● 오제스키 잠복 감염 실태 조사	20	15
	● 오제스키바이러스 잠복 감염 모델 확립 및 백신 영향 분석	20	20
	● 오제스키 DNA 백신 면역원성 조사	20	20
	● 사이토카인 유전자이용 DNA 백신 최적화	20	20
	● 약독화 세균의 DNA 백신 경구 전달체 유용성 검증	20	20
3차 년도 (2004-2005)	● 잠복 오제스키바이러스 재활성 모델 확립 및 백신 효과 분석	25	20
	● 케모카인 유전자 이용 DNA 백신 최적화	25	25
	● 오제스키 항원 발현 아데노바이러스 제작 및 면역원성 분석	25	25
	● DNA 백신과 아데노바이러스 이용 최적 프라임-부스트 접종 도출	25	25
최종 연구내용	● 오제스키바이러스 잠복 감염 진단 확립 및 국내 실태 조사	20	18
	● 오제스키바이러스 잠복 감염 및 재활성 조절 연구	20	18
	● 오제스키 DNA 백신 최적화 연구	20	20
	● DNA 백신 경구 전달체 연구	20	15
	● DNA 백신 이용 프라임-부스트 접종법	20	20

제 6 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제의 최종 목표와 과정에서 드러난 결과들은 궁극적으로 오제스키 바이러스를 비롯하여 산업동물에 영향을 끼치는 각종 전염성 질병에 대한 예방 접종 및 방역 대책 연구에 크게 기여할 것으로 기대된다. 또한, 궁극적으로 산업동물의 대량 예방 접종에 이용될 수 있는 방법들을 제시함으로써 이러한 결과들이 보다 개선되어 현실화 될 수 있을 것으로 기대된다.

1. 활용분야

- 가. 오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 진단법의 확립과 국내 실태 조사 결과는 오제스키병 발생에 대한 예측과 그에 따른 방역대책에 대한 정책을 수립하는데 이용 가능할 것이다.
- 나. 오제스키바이러스의 잠복 감염에 대한 모델 확립과 조절에 대한 결과와 비롯하여 재활성에 대한 연구는 오제스키바이러스를 근본적으로 억제하는 예방법에 대하여 활용될 수 있다.
- 다. 오제스키 DNA 백신용 항원성 검증 및 최적화 연구 결과는 향후 오제스키병 발생 예방접종을 위하여 긴요하게 활용될 수 있다.
- 라. 오제스키 DNA 백신의 경구 전달체로서 약독화 살모넬라 세균의 이용은 DNA 백신의 대량 예방접종에 대한 방법을 제시하고, 보다 편리한 방법에 의하여 예방 접종이 가능할 것이며 기타 전염병에 대한 예방대책에도 그 방향을 제시하는데 유용하게 이용할 수 있다.
- 마. 오제스키 DNA백신과 항원 발현 아데노바이러스를 이용한 프라임-부스트 접종은 향후 오제스키병 발생을 최소화 시킬 수 있는 예방 접종법에 활용 할 수 있다.

2. 활용방안

- 가. 오제스키병 발생에 대한 예방대책의 일환으로 활용한다.
- 나. 오제스키바이러스의 잠복 감염 및 재활성을 막을 수 있는 예방 대책의 일환으로 활용한다.
- 다. 오제스키 DNA 백신의 최적화 결과를 전파하고 오제스키 백신을 평가하는 기

술을 기타 연구소에 보급한다.

라. 기타 주요 전염병에 대한 DNA 백신 및 상용 백신의 활용도 및 효능을 증강시킬 수 있는 유용한 평가기술 및 방향, 정보 등을 제공한다.

3. 산업화 계획방안

가. 새롭고 안전하고 효과적인 플라스미드 DNA 백신의 최적의 경구용 예방약의 모델을 제시함으로써 보다 개선된 경구용 예방약은 향후 가축사료에 첨가하여 편리하게 예방접종을 시도할 수 있는 산업화 연구를 촉진시킬 수 있을 것으로 생각된다.

나. 오제스키 DNA 백신을 포함하는 최적의 프라임-부스트 접종법을 이용하여 사용 백신 또는 새로이 개발되는 백신의 이용성을 극대화함으로써 개발 백신의 산업화를 용이하게 한다.

4. 추가 기술개발 방안

가. 본 연구에서 도출된 경구용 예방약의 모델은 효과 및 효능을 높이기 위하여 여러 가지 방법으로 시도될 수 있을 것이다.

나. 예를 들면, 같은 항원을 갖는 단백질이나 재조합 바이러스 백신을 이용한 프라임-부스트 예방 접종을 시도하여 최적의 전신 면역 및 점막 면역을 유도할 수 있는 연구가 진행될 수 있고,

다. 기타 다른 항원이나 사이토카인, 면역증강제를 포함하는 cocktail vaccination 에 이용하여 그 이용가치를 더욱 증대시킬 수 있을 것이다.

라. 이와 같은 연구는 결국 심각하고 고질적인 전염병에 대한 최적의 예방대책을 수립하는데 필요한 기술들을 개발하는데 지대한 공헌을 할 것으로 기대된다.

5. 기술이전 방안

가. 오제스키바이러스 잠복 감염의 진단법 및 국내 실태조사에 대한 결과와 기술이전이 가능하다.

나. 오제스키 DNA 백신을 비롯한 기타 전염병에 대한 백신 개발에 있어서 이용되는 평가 방법에 대한 기술들을 국가 축산기관 즉 축산기술연구소, 각종 연구소 및 대학 등에 보급한다.

제 7 장 참고문헌

1. 안수환, 권창희, 이중복, 김용희 : 단크론 항체를 이용한 돼지 가성 광견병 진단법 개발에 관한 연구. 1987. 대한 바이러스 학회지, 17(1):45-50.
2. Aberle, S. W., Puchhammer-Stockl, E., 2002. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J. Clin. Virol.* 25 (1):79-85.
3. Allan, G. M., McNulty, M. S., McCracken, R. M., McFerran, J. B., 1984. Rapid diagnosis of Aujeszky's disease in pigs by immunofluorescence. *Res. Vet. Sci.*36(2):235-239.
4. Banks, M., Cartwright, S., 1983. Comparison and evaluation of four serological tests for detection of antibodies to Aujeszky's disease virus. *Vet. Rec.* 9; 113(2):38-41.
5. Baskerville, A., 1973. The histopathology of experimental pneumonia in pigs produced by Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 14(2):223-228.
6. Berns, A., van den Ouweland, A., Quint, W., van Oirschot, J., Gielkens, A., 1985. Presence of markers for virulence in the unique short region or repeat region or both of pseudorabies hybrid viruses. *J. Virol.* 53(1):89-93.
7. Bianchi, A. T., Moonen-Leusen, H. W., van Milligen, F. J., Savelkoul, H. F., Zwart, R. J., Kimman, T. G., 1998. A mouse model to study immunity against pseudorabies virus infection: significance of CD4⁺ and CD8⁺ cells in protective immunity. *Vaccine.* 16(16):1550-1558.
8. Ben-Porat, T., Rixon, F. J., Blankenship, M. L., 1979. Analysis of the structure of the genome of pseudorabies virus. *Virology.* 95(2):285-294.
9. Beran, G. W., Davies, E. B., Arambulo, P. V. 3rd., Will, L.A., Hill, H.T., Rock, D. L., 1980. Persistence of pseudorabies virus in infected swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 5:176(10 Pt 1): 998-1000.
10. Berglund, P., Smerdou, C., Fleeton, M. N., Tubulekas, I., Liljestrom, P., 1998. Enhancing immune responses using suicidal DNA vaccines. *Nat. Biotechnol.* 16(6):562-565.
11. Chang, S. W., Bu, J., Rompato, G., Garmendia, A. E., 1998. A vector

- DNA vaccine encoding pseudorabies virus immediate early protein demonstrates partial protection in mice against lethal virus challenge. *Viral Immunol.* 11(1):27-36.
12. Denis, M., Soumet, C., Legeay, O., Arnauld, C., Bounaix S., Thiery, R., Jestin, A., 1997. Development of a semiquantitative PCR assay using internal standard and colorimetric detection on microwell plate for pseudorabies virus. *Mol. Cell. Probes.* 11(6):439-448.
 13. Dubensky, T.W. Jr., Driver, D.A., Polo, J.M., Belli, B.A., Latham, E.M., Ibanez, C.E., Chada, S., Brumm, D., Banks, T.A., Mento, S.J., Jolly, D.J., Chang, S.M., 1996. Sindbis virus DNA-based expression vectors: utility for in vitro and in vivo gene transfer. *J. Virol.* 70(1):508-519.
 14. Ducatelle, R., Coussement, W., Hoorens, J., 1984. Demonstration of pseudorabies viral antigen in thick and ultrathin tissue sections of young pigs using an immunogold method. *Am. J. Vet. Res.* 45(10):1913-1917.
 15. Dufour, V., Chevallier, S., Cariolet, R., Somasundaram, S., Lefevre, F., Jestin, A., Albina, E., 2000. Induction of porcine cytokine mRNA expression after DNA immunization and pseudorabies virus infection. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 20(10):889-895.
 16. Dufour, V., De Boisseson, C., 2003. Use of a Sindbis virus DNA-based expression vector for induction of protective immunity against pseudorabies virus in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 20:93(3-4):125-134.
 17. Enquist, L. W., Tomishima, M. J., Gross, S., Smith, G. A., 2002. Directional spread of an alpha-herpesvirus in the nervous system. *Vet. Microbiol.* 86(1-2):5-16.
 18. Field, H. J., Hill, T. J., 1975. The pathogenesis of pseudorabies in mice: virus replication at the inoculation site and axonal uptake. *J. Gen. Virol.* 26(1):145-148.
 19. Fynan, E. F., Robinson, H. L., Webster, R. G., 1993. Use of DNA encoding influenza hemagglutinin as an avian influenza vaccine. *DNA. Cell. Biol.* 12(9):785-789.

20. Garmendia, A. E., Chang, S., Tulman, E. R., Rompato, G., Bu, J. 1998. Immunogenicity of vector DNA vaccine constructs of pseudorabies virus immediate early gene (IE180) in mice and swine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 29;849:485-489.
21. Gerdtts, V., Jons, A., Makoschey, B., Visser, N., Mettenleiter, T.C., 1997. Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *J. Gen. Virol.* 78(Pt 9):2139-2146.
22. Haagmans, B. L., van Rooij, E. M., Dubelaar, M., Kimman, T. G., Horzinek, M. C., Schijns, V. E., Bianchi, A. T., 1999. Vaccination of pigs against pseudorabies virus with plasmid DNA encoding glycoprotein D. *Vaccine.* 5:17(9-10):1264-1271.
23. Hong, W., Xiao, S., Zhou, R., Fang, L., He, Q., Wu, B., Zhou, F., Chen, H., 2002. Protection induced by intramuscular immunization with DNA vaccines of pseudorabies in mice, rabbits and piglets. *Vaccine.* 15:20(7-8):1205-1214.
24. Ho, T. Y., Hsiang, C. Y., Hsiang, C. H., Chang, T. J., 1998. DNA vaccination induces a long-term antibody response and protective immunity against pseudorabies virus in mice. *Arch. Virol.* 143(1):115-125.
25. Hwang, D. Y., Lee, J. B., Kim, T. J., Song, J. Y., Hyun, B. H., Song, C. S., Park, S. Y., 2001. Induction of immune responses to glycoprotein gD of Aujeszky's disease virus with DNA immunization. *J. Vet. Med. Sci.* 63(6):659-662.
26. Jakubik, J., 1977. Comparative susceptibility of rabbits, rats, mice and pigs to infection with Aujeszky diseases virus (ADV) in the development of an efficacy test for ADV vaccines. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 24(9):764-766.
27. Katayama, S., Yoshiki, K., Okada, N., Kokubu, T., Shimizu, Y., 1998. Efficacy of a mixed glycoprotein vaccine against pseudorabies in pregnant sows. *J. Vet. Med. Sci.* 60(1):23-27.
28. Kelling, C. L., Staudinger, W. L., Rhodes, M. B., 1982. Immune response of

- pigs inoculated with virulent pseudorabies virus and pigs inoculated with attenuated or inactivated pseudorabies virus vaccine before and after challenge exposure. *Am. J. Vet. Res.* 43(12):2114-2120.
29. Kimman, T. G., 1992. Acceptability of Aujeszky's disease vaccines. *Dev. Biol. Stand.* 79:129-136.
 30. Kimman, T. G, De Bruin, T. M., Voermans, J. J., Peeters, B. P., Bianchi, A. T., 1995. Development and antigen specificity of the lymphoproliferation responses of pigs to pseudorabies virus: dichotomy between secondary B- and T-cell responses. *Immunology.* 86(3):372-378.
 31. Kirkpatrick, C. M., Kanitz, C. L., McCrocklin, S. M., 1980. Possible role of wild mammals in transmission of pseudorabies to swine. *J. Wildl. Dis.* 16(4):601-614.
 32. Kit, S., Awaya, Y., Otsuka, H., Kit, M., 1990. Blocking ELISA to distinguish pseudorabies virus-infected pigs from those vaccinated with a glycoprotein gIII deletion mutant. *J Vet Diagn Invest.* 2(1):14-23.
 33. Kit, S., Kit, M., Pirtle, E. C., 1985. Attenuated properties of thymidine kinase-negative deletion mutant of pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* 46(6):1359-67.
 34. Kluge, J. P., Beran, G. W., Hill, H. T., Platt, K. B., 1992. Pseudorabies (Aujeszky's Disease). In: Lemann, A.D., Straw, B. E., Mengeling, W. L., D'Aillaire, S., Taylor, D. S.(Eds), *Disease of Swine*, 7th Edn., Iowa State University Press, Ames, IA.
 35. Krumbholz, A., Wurm, R., Scheck, O., Birch-Hirschfeld, E., Egerer, R., Henke, A., Wutzler, P., Zell, R., 2003. Detection of porcine teschoviruses and enteroviruses by LightCycler real-time PCR. *J. Virol. Methods.* 113(1):51-63.
 36. Larder, B. A., Cheng, Y. C., Darby, G., 1983. Characterization of abnormal thymidine kinases induced by drug-resistant strains of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 64(3):523-532.
 37. Lokensgard, J. R., Thawley, D. G., Molitor, T. W., 1990. Pseudorabies virus

- latency: restricted transcription. *Arch. Virol.* 110(1-2):129-136.
38. Lokensgard, J. R., Thawley, D. G., Molitor, T. W., 1991. Enzymatic amplification of latent pseudorabies virus nucleic acid sequences. *J. Virol. Methods.* 34(1):45-55.
 39. Londstrom, K., 2000. Alphavirus vectors: a applications for DNA vaccine production and gene expression. *Intervirology.* 43(4-6):247-257.
 40. Lomniczi, B., Watanabe, S., Ben-Porat, T., Kaplan, A. S., 1984. Genetic basis of the neurovirulence of pseudorabies virus. *J. Virol.* 52(1):198-205.
 41. Maes, R. K., Kanitz, C. L., Gustafson, D. P., 1979. Pseudorabies virus infections in wild and laboratory rats. *Am. J. Vet. Res.* 40(3):393-396.
 42. Maes, R. K., Thacker, B. J., 1988. Efficacy of different tissue explantation method in detecting latent pseudorabies (Aujeszky's disease) virus infection. *Proc. 10th IPVS Congress, Rio de Janeiro, Brazil,* p.165.
 43. Marchioli, C. C., Yancey, R. J. Jr., Petrovskis, E. A., Timmins, J. G., Post, L. E., 1987. Evaluation of pseudorabies virus glycoprotein gp50 as a vaccine for Aujeszky's disease in mice and swine: expression by vaccinia virus and Chinese hamster ovary cells. *J. Virol.* 61(12):3977-3982.
 44. McFarland, M. D., Hill, H. T., 1987. Vaccination of mice and swine with a pseudorabies virus mutant lacking thymidine kinase activity. *Can. J. Vet. Res.* 51(3):340-344.
 45. McFarlane, R. G., Thawley, D. G., Solorzano, R. F., 1986. Detection of latent pseudorabies virus in porcine tissue, using a DNA hybridization dot-blot assay. *Am. J. Vet. Res.* 47(11):2329-2336.
 46. McGinley, M. J., Platt, K. B., 1989. Antibody response of pseudorabies virus subunit-vaccinated pigs to viral nucleocapsid proteins following low-dose virus challenge of immunity. *Am. J. Vet. Res.* 50(8):1290-1293.
 47. McNerney, J., Kooij, D., 1997. Economic analysis of alternative AD control programmes. *Vet. Microbiol.* 55(1-4):113-121.
 48. Mettenleiter, T. C., 1994. Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus: state

- of the art. August 1993. *Acta. Vet. Hung.* 42(2-3):153-177.
49. Mettenleiter, T. C., 1996. Immunobiology of pseudorabies (Aujeszky's disease). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54(1-4):221-229.
 50. Morrison, R.,B., Thawley, D.G., 1989. Serologic status of pseudorabies virus in growing-finishing pigs in quarantined herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1;195(11):1577-1579.
 51. Moynagh, J., 1997. Aujeszky's disease and the European Community. *Vet. Microbiol.* 55(1-4):159-166.
 52. Mumford, R., Skelton, A., Metcalfe, E., Walsh, K., Boonham, N., 2004. The reliable detection of Barley yellow and mild mosaic viruses using real-time PCR (TaqMan((R))). *J. Virol. Methods.* 117(2):153-159.
 53. Neukirch, M., Bauer, K., 1977. Possibilities of vaccination with an inactivated virus via the respiratory tract as studied in the Aujeszky virus]-white mouse system. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 24(1):63-74.
 54. Ozoemena, L. C., Minor, P. D., Afzal, M. A., 2004. Comparative evaluation of measles virus specific TaqMan PCR and conventional PCR using synthetic and natural RNA templates. *J. Med. Virol.* 73(1):79-84.
 55. Pensaert, M., Gielkens, A. L., Lomniczi, B., Kimman, T. G., Vannier, P., Eloit, M., 1992. Round table on control of Aujeszky's disease and vaccine development based on molecular biology. *Vet. Microbiol.* 33(1-4):53-67.
 56. Puentes, E., Eiras, A., Cancio, E., Nores, M. V., Aguilera, A., Seoane, R., Regueiro. B.J., 1993. Comparison of the protective efficacy of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus glycoproteins obtained from different sources. *Vet. Microbiol.* 35(1-2):45-59.
 57. Riviere, M., Tartaglia, J., Perkus, M. E., Norton, E. K., Bongermimo, C. M., Lacoste, F., Duret, C., Desmettre, P., Paoletti, E. J., 1992. Protection of mice and swine from pseudorabies virus conferred by vaccinia virus-based recombinants. *Virol.* 166(6):3424-3434.
 58. Rock, D. L., 1993. The molecular basis of latent infections by alphaherpesvirus. *Seminars in Virology* 4, p157-165.

59. Sabo, A., Rajcani, J., 1976. Latent pseudorabies virus infection in pigs. *Acta. Virol.* 20(3):208-214.
60. Schang, L. M., Kutish, G. F., Osorio, F. A., 1994. Correlation between precolonization of trigeminal ganglia by attenuated strains of pseudorabies virus and resistance to wild-type virus latency. *J. Virol.* 68(12):8470-8476.
61. Schang, L. M., Osorio, F. A., 1994. Quantitation of latency established by attenuated strains of Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus. *J. Virol. Methods.* 50(1-3): 269-280.
62. Somasundaram, C., Takamatsu, H., Andreoni, C., Audonnet, J. C., Fischer, L., Lefevre, F., Charley, B., 1999. Enhanced protective response and immuno-adjuvant effects of porcine GM-CSF on DNA vaccination of pigs against Aujeszky's disease virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 70(3-4):277-287.
63. Stegeman, A., Van Oirschot, J. T., Kimman, T. G., Tielen, M. J., Hunneman, W. A., Berndsen, F. W., 1994. Reduction of the prevalence of pseudorabies virus-infected breeding pigs by use of intensive regional vaccination. *Am. J. Vet. Res.* 55(10):1381-1385.
64. Takada, A., Shimizu, Y., Kida, H., 1994. Protection of mice against Aujeszky's disease virus infection by intranasal vaccination with inactivated virus. *J. Vet. Med. Sci.* 56(4):633-637.
65. Tang, D. C., DeVit, M., Johnston, S. A., 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 12:356 (6365):152-154.
66. Tenser, R. B., Miller, R. L., Rapp, F., 1979. Trigeminal ganglion infection by thymidine kinase-negative mutants of herpes simplex virus. *Science.* 31:205(4409):915-917.
67. Thawley, D. G., Wright, J. C., 1982. Pseudorabies virus infection in raccoons: a review. *J. Wildl. Dis.* 18(1):113-116.
68. Thiery, R., Pannetier, C., Rziha, H. J., Jestin, A., 1996. A fluorescence-based quantitative PCR method for investigation of

- pseudorabies virus latency. *J. Virol. Methods.* 61(1-2):79-87.
69. Ulmer, J. B., Sadoff, J. C., Liu, M. A., 1996. DNA vaccines. *Curr . Opin. Immunol.* 8(4):531-536.
70. van Oirschot, J. T., Gielkens, A. L., 1984. Some characteristics of four attenuated vaccine virus strains and a virulent strain of Aujeszky's disease virus. *Vet. Q.* 6(4):225-229.
71. van Oirschot, J. T., Gielkens, A. L., Moormann, R. J., Berns, A. J., 1990. Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. *Vet. Microbiol.* 23(1-4):85-101.
72. van Rooij, E. M., Haagmans, B. L., de Visser, Y. E., de Bruin, M. G., Boersma, W., Bianchi, A. T., 1998. Effect of vaccination route and composition of DNA vaccine on the induction of protective immunity against pseudorabies infection in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 24:66(2):113-126.
73. van Rooij, E. M., de Bruin, M. G., de Visser, Y. E., Middel, W. G., Boersma, W. J., Bianchi, A. T., 2004. Vaccine-induced T cell-mediated immunity plays a critical role in early protection against pseudorabies virus (suid herpes virus type 1) infection in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 99(1-2):113-125.
74. Vilnis, A., Sussman, M. D., Thacker, B. J., Senn, M., Maes, R. K., 1998. Vaccine genotype and route of administration affect pseudorabies field virus latency load after challenge. *Vet. Microbiol.* 62(2):81-96.
75. Weigel, R. M., Hahn, E. C., Scherba, G., 2003. Survival and immunization of raccoons after exposure to pseudorabies (Aujeszky's disease) virus gene-deleted vaccines. *Vet. Microbiol.* 20:92(1-2):19-24.
76. Wittmann, G., Ohlinger, V., Rziha, H. J., 1983. Occurrence and reactivation of latent Aujeszky's disease virus following challenge in previously vaccinated pigs. *Arch. Virol.* 75(1-2):29-41.
77. Wittmann, G., Rziha, H.J., 1989. Aujeszky's disease(Pseudorabies) in pigs. In: Wittmann, G., (Ed), *Herpesvirus disease of Cattle, Horse and Pigs.*

Kluwer, Boston/Dordrecht/London.

78. Xiao, S., Chen, H., Fang, L., Liu, C., Zhang, H., Jiang, Y., Hong, W., 2004. Comparison of immune responses and protective efficacy of suicidal DNA vaccine and conventional DNA vaccine encoding glycoprotein C of pseudorabies virus in mice. *Vaccine*. 22(3-4):345-351.
79. Zuckermann, F. A., Zsak, L., Mettenleiter, T. C., Ben-Porat, T., 1990. Pseudorabies virus glycoprotein gIII is a major target antigen for murine and swine virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 64(2):802-812.