

발간 등록 번호

11-1541000-001699-01

원천기술 확보를 위한 신개념의 돼지 세균성
질병 예방용 다중점 백신 개발

(Development of Multi-Point Vaccine for
Porcine Bacterial Diseases)

(주) 동 방

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “원천기술 확보를 위한 신개념의 폐지 세균성 질병 예방용 다중점 백신 개발에 관한 연구” 과제(4년차 완결보고서)의 보고서로 제출합니다.

2012 년 12 월 일

주관연구기관명 : (주) 동방

주관연구책임자 : 이 지 훈

세부연구책임자 : 이 지 훈

연 구 원 : 강 익 재

연 구 원 : 최 완 영

연 구 원 : 김 한 진

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 윤 여 성

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 황 철 용

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 류 덕 영

요 약 문

I. 제 목

원천기술 확보를 위한 신개념의 돼지 세균성 질병 예방용 다중점 백신 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

섭유성 또는 화농성 섭유성 다발성 장막염은 양돈 농장에서 중요한 경제적 손실을 야기하는 질병의 원인이다. 대부분의 다발성 장막염은 홍막폐렴균, 연쇄상 구균, 마이코플라즈마에 의하여 야기된다. 국내에서 대부분 글래서씨병으로 추정하고 있는 질병의 정확한 진단은 연쇄상 구균에 의한 전신 장막염이다. 따라서 국내에서는 오진에 의하여 질병의 중요성을 간과하고 있는데, 향후 매우 경제적 피해가 큰 질병으로 사료된다.

최근 양돈 농장에서 문제가 되고 있는 세균성 소모성 질환인 연쇄상 구균증, 홍막폐렴균, 마이코플라즈마에 대한 예방을 함에 있어서, 국내에서 발생하는 세균성 소모성 질병인 연쇄상 구균증에 대한 예방 단일백신은 현재 없기 때문에 질병 예방에 어려움이 있다. 뿐만 아니라 국내에서는 연쇄상 구균에 의한 뇌막염을 예방 할 수 있는 혼합백신만이 판매되고 있어 연쇄상 구균증에 대한 예방 백신은 그 잠재 수요가 매우 높은 백신이다. 또한 대부분의 홍막폐렴과 마이코플라즈마 감염 예방 백신은 수입 백신을 사용하고 있기 때문에 국내 양돈 농가의 의약품 구매 비용이 증가되고 있다. 이러한 문제를 극복하기 위하여 현재 국내에서 세균성 소모성 질환으로 가장 피해가 큰 두 가지 질병 예방에 대한 백신을 개발하고자 한다. 또한 최신 생명공학 적 방법을 이용하여 배양이 어려운 마이코플라즈마균의 경우 중요 유착 유전자를 홍막폐렴균에 삽입하여 잡종 마이코플라즈마-홍막폐렴 세균을 제작하여 다중점 백신을 제작하기로 하였다.

또한, 본 연구를 통하여 국내 혈청형에 적합한 홍막폐렴 백신을 상품화하고자 한다. 본 연구를 통하여 먼저 산업화하려는 이들 2가지 백신은 각각의 장점 때문에 상품화할 때 판매에는 큰 어려움이 없다. 마지막으로 개발하려는 마이코플라즈마-홍막폐렴 다중점 백신의 경우 최근 생물학적 기법을 이용하여 홍막폐렴균이 마이코플라즈마균의 유착단백질을 삽입한 다중점 백신 균주를 제작하여 두 가지 이상의 질병을 예방하는 백신을 제작할 예정이다. 현재 국내 마이코플라즈마 백신 시장이 약 86억원이고, 홍막폐렴 백신 시장이 약45억원(출처; 사단법인 한국동물약품협회)이기 때문에 시장성이 충분히 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 연쇄상 구균증 예방 백신 개발

가. 연쇄상 구균 예방백신 제작용 표준균주 제작

- 1) 국내 분리 연쇄상 구균의 혈청형 분석
 - 재료 : 현재 보유중인 균과 분리중인 70개의 연쇄상 구균 분석
 - 방법 : 응집 반응을 이용한 혈청형 분석
 - 활용 : 본 연구 백신에 함유할 혈청형 확정
- 2) 표준 혈청형 연쇄상 구균의 면역원성 검사
 - 재료 : 선발된 표준 연쇄상 구균 세균
 - 방법 : 토끼를 이용한 면역원성 측정
 - 활용 : 본 연구 백신에 함유할 표준 균주 선발
- 3) 표준 균주 확립 및 계대 방법 확립
 - 재료 : 선발된 표준 연쇄상 구균주
 - 방법 : 다양한 배양 방식을 이용한 최적의 계대 방법 확립
 - 활용 : 백신 제조 할 때 표준주의 보관 및 계대에 활용
- 4) 표준 균주의 대량 배양 방법 확립
 - 재료 : 선발된 표준 연쇄상 구균주
 - 방법 : 다양한 배양 방식을 최대 면역원성을 나타내는 최적의 대량 생산 방법 확립
 - 활용 : 대량 백신 제조
- 5) 표준 균주를 이용한 백신 제조
 - 재료 : 선발된 표준 연쇄상 구균주
 - 방법 : 배양 후 불활화 알루미늄 겔 백신 제작
 - 활용 : 백신 제조 기법에 활용

나. 연쇄상 구균 예방 백신의 면역원성 및 안전성 연구

- 1) 백신의 성분 및 분량 연구
 - 재료 : 개발된 백신
 - 방법 : 다양한 조합을 통한 최적의 시험백신 성분 및 분량 연구
 - 활용 : 상업화 백신을 위한 성분 및 분량 확립
- 2) 백신의 불활화 확인 실험
 - 재료 : 개발된 백신
 - 방법 : 백신의 최적 배양후의 불활화 방법 확립 및 확인
 - 활용 : 상업화 백신 생산 할 때 불활화 방법으로 사용
- 3) 실험동물을 이용한 백신 안전성 연구
 - 재료 : 시험백신
 - 방법 : 국가 검정 동물용 의약품 검정기준에 의한 마우스와 기니피그를 이용한 안전성 연구

- 활용 : 상업화 백신을 위한 안전성 확립
- 4) 자돈을 이용한 백신 안전성 연구
 - 재료 : 개발된 백신
 - 방법 : 국가 검정 동물용 의약품 검정기준에 의한 자돈을 이용한 안전성 연구
 - 활용 : 상업화 백신을 위한 안전성 확립
- 5) 토끼를 이용한 백신 항체가 실험
 - 재료 : 개발된 백신, 토끼
 - 방법 : 토끼에 백신을 2주 간격 2회 접종 후 채혈하여 응집 항체가 측정
 - 활용 : 상업화 백신을 위한 면역원성 확립
- 6) 자돈을 이용한 백신 항체가 실험
 - 재료 : 불활화 시험백신, 토끼
 - 방법 : 자돈에게 시험백신을 2주 간격 2회 접종 후 채혈하여 응집 항체가 측정
 - 활용 : 상업화 백신을 위한 면역원성 확립

다. 연쇄상 구균 예방 백신의 공격접종 시험 및 보존성 시험

- 1) 백신의 특성 시험 및 무균시험
 - 재료 : 개발된 백신
 - 방법 : 백신의 이물질, 이취 및 무균 시험
 - 활용 : 상업화 백신 기술 검토 자료 활용
- 2) 실험동물을 이용한 예방 백신의 공격 접종 실험(3회 반복실험)
 - 재료 : 개발된 백신, 마우스(또는 토끼)
 - 방법 : 백신접종군과 미접종군에서 야외 균주를 이용한 공격접종에서 방어능력 시험
 - 판단기준 : 3회 반복 실험을 통한 임상증상, 병리조직학적 병변의 차이 등을 분석
 - 활용 : 상업화 백신의 공격 접종 효능 자료
- 3) 자돈을 이용한 예방 백신의 공격 접종 실험(3회 반복실험)
 - 재료 : 개발된 백신, 돼지
 - 방법 : 백신접종군과 미접종군에서 야외 균주를 이용한 공격접종에서 방어능력 시험
 - 판단기준 : 임상증상, 병리조직학적 병변의 차이 등을 분석
 - 활용 : 상업화 백신의 공격 접종 효능 자료
- 4) 시험백신 보존성 시험
 - 재료 : 불활화 시험백신, 토끼
 - 방법 : 백신의 유효기간 조사를 하기 위하여 제조시점, 6, 12, 18, 24개월 별 토끼시험
 - 판단기준 : 토끼에 백신을 2주 간격 2회 접종 후 채혈하여 응집 항체가 측정
 - 활용 : 상업화 백신의 보존성 시험 자료

라. 연쇄상 구균 예방 백신의 야외 적용 시험

- 1) 야외 사육 자돈을 이용한 안전성 시험
 - 재료 : 개발된 백신, 농장사육돼지, 양돈장(3개)
 - 방법 : 농장 사육 동물을 이용한 야외 안전성 시험
 - 판단기준 : 3개 농장에서 반복 실험을 통한 부작용 유무 검사

- 활용 : 상업화 백신의 야외 안전성 검사 자료
- 2) 야외 사육 자돈을 이용한 면역원성 시험
 - 재료 : 개발된 백신, 농장사육돼지, 양돈장(3개)
 - 방법 : 야외 사육 자돈에 백신을 2주 간격 2회 접종 후 채혈하여 응집 항체가 측정
 - 활용 : 상업화 백신의 야외 면역원성 자료
- 3) 야외 사육 자돈을 이용한 예방 백신의 효능 시험/ 개발된 백신의 혼합 단위접종에 의한 효과 검증
 - 재료 : 개발된 백신, 농장사육돼지, 양돈장(3개)
 - 방법 : 백신접종군 과 미접종군에서 성장 증체, 임상증상 등의 야외 효능 시험
 - 판단기준 : 3개 농장에서 반복 실험을 통한 임상증상, 성장 증체 등을 분석
 - 활용 : 상업화 백신의 야외 효능 자료

2. 홍막페렴 예방 백신 개발

가. 홍막페렴균 예방백신 제작용 표준균주 제작

- 1) 국내 분리 홍막페렴균의 혈청형 분석
 - 재료 : 현재 보유중인 균과 분리중인 75개의 홍막페렴균 분석
 - 방법 : 응집 반응을 이용한 혈청형 분석
 - 활용 : 본 연구 백신에 함유할 혈청형 확정
- 2) 표준 혈청형 홍막페렴균의 면역원성 검사
 - 재료 : 선발된 표준 홍막페렴균주
 - 방법 : 토끼를 이용한 면역원성 측정
 - 활용 : 본 연구 백신에 함유할 표준 균주 선별
- 3) 표준 균주 확립 및 계대 방법 확립
 - 재료 : 선발된 표준 홍막페렴균주
 - 방법 : 다양한 배양 방식을 이용한 최적의 계대 방법 확립
 - 활용 : 백신 제조 할 때 표준주의 보관 및 계대에 활용
- 4) 표준 균주의 대량 배양 방법 확립
 - 재료 : 선발된 표준 홍막페렴균주
 - 방법 : 다양한 배양 방식을 최대 면역원성을 나타내는 최적의 대량 생산 방법 확립
 - 활용 : 대량 백신 제조
- 5) 표준 균주를 이용한 시험백신 제조
 - 재료 : 선발된 표준 홍막페렴균주
 - 방법 : 배양 후 불활화 알루미늄 겔 백신 제작
 - 활용 : 백신 제조 기법에 활용

나. 홍막페렴균 예방 백신 면역원성 및 안전성 연구

- 1) 백신의 성분 및 분량 연구
 - 재료 : 개발된 백신

- 방법 : 다양한 조합을 통한 최적의 시험백신 성분 및 분량 연구
 - 활용 : 상업화 백신을 위한 성분 및 분량 확립
- 2) 백신의 불활화 확인 실험
 - 재료 : 개발된 백신
 - 방법 : 백신의 최적 배양후의 불활화 방법 확립 및 확인
 - 활용 : 상업화 백신 생산 할 때 불활화 방법으로 사용
 - 3) 실험동물을 이용한 백신 안전성 연구
 - 재료 : 개발된 백신
 - 방법 : 국가 검정 동물용 의약품 검정기준에 의한 마우스와 기니픽을 이용한 안전성 연구
 - 활용 : 상업화 백신을 위한 안전성 확립
 - 4) 자돈을 이용한 백신 안전성 연구
 - 재료 : 개발된 백신
 - 방법 : 국가 검정 동물용 의약품 검정기준에 의한 자돈을 이용한 안전성 연구
 - 활용 : 상업화 백신을 위한 안전성 확립
 - 5) 토끼를 이용한 백신 항체가 실험
 - 재료 : 개발된 백신, 토끼
 - 방법 : 토끼에 백신을 2주 간격 2회 접종 후 채혈하여 응집 항체가 측정
 - 활용 : 상업화 백신을 위한 면역원성 확립
 - 6) 자돈을 이용한 백신 항체가 실험
 - 재료 : 개발된 백신, 토끼
 - 방법 : 자돈에게 백신을 2주 간격 2회 접종 후 채혈하여 응집 항체가 측정
 - 활용 : 상업화 백신을 위한 면역원성 확립

다. 흉막폐렴균 예방 백신의 공격접종 시험 및 보존성 시험

- 1) 백신의 특성 시험 및 무균시험
 - 재료 : 개발된 백신
 - 방법 : 백신의 이물질, 이취 및 무균 시험
 - 활용 : 상업화 백신 기술 검토 자료 활용
- 2) 실험동물을 이용한 예방 백신의 공격 접종 실험(3회 반복실험)
 - 재료 : 개발된 백신, 마우스(또는 토끼)
 - 방법 : 백신접종군과 미접종군에서 야외 균주를 이용한 공격접종에서의 방어능력 시험
 - 판단기준 : 3회 반복 실험을 통한 임상증상, 병리조직학적 병변의 차이 등을 분석
 - 활용 : 상업화 백신의 공격 접종 효능 자료
- 3) 자돈을 이용한 예방 백신의 공격 접종 실험(3회 반복실험)
 - 재료 : 개발된 백신, 돼지
 - 방법 : 백신접종군과 미접종군에서 야외 균주를 이용한 공격접종에서의 방어능력 시험
 - 판단기준 : 임상증상, 병리조직학적 병변의 차이 등을 분석
 - 활용 : 상업화 백신의 공격 접종 효능 자료
- 4) 시험 백신 보존성 시험
 - 재료 : 불활화 백신, 토끼

- 방법 : 백신의 유효기간 조사를 위한 제조시점, 6, 12, 18, 24개월 별 토끼시험
- 판단기준 : 토끼에 백신을 2주 간격 2회 접종 후 채혈하여 응집 항체가 측정
- 활용 : 상업화 백신의 보존성 시험 자료

라. 흉막폐렴균 예방 백신의 야외 적용 시험

1) 야외 사육 자돈을 이용한 안전성 시험

- 재료 : 개발된 백신, 농장사육돼지, 양돈장(3개)
- 방법 : 농장 사육 동물을 이용한 야외 안전성 시험
- 판단기준 : 3개 농장에서 반복 실험을 통한 부작용 유무 검사
- 활용 : 상업화 백신의 야외 안전성 검사 자료

2) 야외 사육 자돈을 이용한 면역원성 시험

- 재료 : 개발된 백신, 농장사육돼지, 양돈장(3개)
- 방법 : 야외 사육 자돈에 백신을 2주 간격 2회 접종 후 채혈하여 응집 항체가 측정
- 활용 : 상업화 백신의 야외 면역원성 자료

3) 야외 사육 자돈을 이용한 예방 백신의 효능 시험

- 재료 : 개발된 백신, 농장사육돼지, 양돈장(3개)
- 방법 : 백신접종군과 미접종군에서 성장 증체, 임상증상 등의 야외 효능 시험
- 판단기준 : 3개 농장에서 반복 실험을 통한 임상증상, 성장 증체 등을 분석
- 활용 : 상업화 백신의 야외 효능 검사 자료

3. 백신면역학적 검사

가. 연쇄상구균증 면역학적 검사 방법 개발 및 검사 실시

- 1) 연쇄상 구균증 시험백신에 대한 혈청학적 검사 방법 개발
 - 재료 : 개발된 백신, 실험동물, 돼지
- 2) 연쇄상 구균증 시험백신에 대한 혈청학적 검사 실시
 - 재료 : 개발된 백신, 실험동물, 돼지

나. 흉막폐렴 면역학적 검사 방법 개발 및 검사 실시

- 1) 흉막폐렴 백신에 대한 혈청학적 검사 방법 개발
 - 재료 : 개발된 백신, 실험동물, 돼지
- 2) 흉막폐렴 백신에 대한 혈청학적 검사 실시
 - 재료 : 개발된 백신, 실험동물, 돼지

다. 마이코플라즈마 혈청검사

- 1) 국내 발병 빈도를 조사하기 위한 마이코플라즈마 ELISA 혈청검사 실시
 - 2) 백신 접종 시기를 결정하기 위한 마이코플라즈마 ELISA 혈청검사 실시
- 재료 : 개발된 백신, 실험동물, 돼지

4. 마이코플라즈마-홍막페렴 다중점 백신 개발

가. 백신주 개발에 이용할 다양한 마이코플라즈마균 유전자 클론 확보

- 백신주 : 백신주는 ATCC에서 판매하는 *Mycoplasma hyopneumoniae*(#25095)와 국내에서 분리할 병원성이 매우 낮은 *Mycoplasma hyopneumoniae*를 사용
- 목적 : 마이코플라즈마균 유전자 중 세포막 존재하는 유전자 클론을 확보
- 개요 : 마이코플라즈마균 세포막 단백질을 추출하여 실험동물에 주사하여 확인
- 방법 : 마이코플라즈마균 세포외막 단백질을 준비하여 동물접종에 의하여 면역원성 확인
- 기대효과 : 마이코플라즈마균 세포막 단백질 중 면역원성이 큰 단백질 유전자 클론 확보

나. 확보된 유전자를 토대로 홍막페렴균 유전자 재조합 벡터 개발

- 개요 : 클론이 확보된 마이코플라즈마균 유전자를 토대로, 기존에 개발되어 있는 홍막페렴균 유전자 조작 벡터 (pBKS-App-Kanr)와의 적합성을 확인 및 변형하여 홍막페렴균 벡터를 완성
- 방법 : 표준적인 클로닝 방법을 사용
- 결과 : 약독화된 홍막페렴균을 변형하여 마이코플라즈마 세포막 단백질 발현을 유발하는 벡터 제작

다. 약독화된 홍막페렴 균주로의 유전자 재조합 실시

- 개요 : 본 실험실에서 확보하고 있는 약독화된 홍막페렴균에, 개발된 재조합 벡터를 electroporator를 이용하여 주입
- 방법 : 홍막페렴균을 log phase 로 성장하는 competent 세포에 electroporator를 사용하여 벡터를 주입
- 결과 : 마이코플라즈마균 세포막 단백질을 발현하는 약독화 홍막페렴균 완성

라. 개발된 균주 내에서의 마이코플라즈마균 단백질 발현 여부 확인

- 방법 : 유전자 재조합이 확인된 홍막페렴균에서 마이코플라즈마균 단백질 발현여부를 western blot으로 확인함

마. 개발된 균주의 실험동물을 이용한 면역원성 및 안전성 확인 분석

- 마우스를 이용한 면역원성 분석 I : 개발된 마이코플라즈마균 단백질을 발현 홍막페렴균을 마우스에 복강 내 투여 후, 마이코플라즈마균을 공격 집중하여 면역형성 여부 결정
- 마우스를 이용한 면역원성 분석 II : 개발된 마이코플라즈마균 단백질을 발현 홍막페렴균을 마우스에 복강 내 투여 후, 홍막페렴균을 공격 집중하여 면역형성 여부 결정
- 마우스를 이용한, 개발된 마이코플라즈마균 단백질 발현 홍막페렴균의 안전성 결정 : 마우스 복강에 재조합으로 개발된 균주와 대조균주를 각각 주입하여 폐사율 (반수치사 용량 LD50)을 토대로 안전성 여부 결정

바. 개발된 균주의 돼지를 이용한 안전성 확인 분석

- 개발된 균주를 돼지에게 직접 접종하여 안전성을 확인

사. 다중점 백신에 대한 백신시기

- 마이코플라즈마의 면역유도: 자돈에게 4주령에서 8주령 사이에 접종
- 홍막페렴 백신 접종 시기: 현재 국내에서 홍막페렴은 5주령과 7주령에 접종
- 다중점백신의 접종 시기: 최근 마이코플라즈마 백신의 면역반응 연구와 홍막페렴 백신 시기 등의 자료를 토대로 본 다중점 백신의 경우에는 마이코플라즈마의 면역반응을 최대한 유도하고, 홍막페렴도 예방할 수 있는 백신 접종 시기 정함

아. 개발된 균주의 돼지에서 면역원성(항원성) 검사

- 개발된 균주를 돼지에 적용하여 마이코플라즈마 면역원성(항원성) 분석 : 개발된 마이코플라즈마균 단백질 발현 홍막페렴균을 돼지에 투여 후, 다중점백신이 제대로 돼지의 면역을 유도하는지 여부를 확인 및 마이코플라즈마균 단백질 발현 홍막페렴균에서 마이코플라즈마에 대한 면역원성(항원성)의 발현 여부를 확인하기 위하여 마이코플라즈마에 대한 ELISA 방법을 이용하거나 세포성 면역의 유도 여부를 확인
- 개발된 균주를 돼지에 적용하여 홍막페렴균 면역원성(항원성) 분석 : 개발된 마이코플라즈마균 단백질 발현 홍막페렴균을 돼지에 투여 후, 다중점백신이 제대로 돼지의 면역을 유도하는지 여부를 확인 및 마이코플라즈마균 단백질 발현 홍막페렴균에서 홍막페렴균에 대한 면역원성(항원성)의 발현 여부를 확인하기 위하여 홍막페렴균에 대한 응집반응(agglutination) 또는 ELISA 방법을 이용하여 면역원성(항원성)을 측정

자. 개발된 균주의 돼지 공격접종을 통한 효능 검사

- 개발된 균주를 돼지에 적용하여 공격접종 실험 I : 개발된 마이코플라즈마균 단백질 발현 홍막페렴균을 돼지에 투여 후, 홍막페렴균을 공격 접종하여 질병 방어 효과 여부 결정
- 개발된 균주를 돼지에 적용하여 공격접종 실험 II : 개발된 마이코플라즈마균 단백질 발현 홍막페렴균을 돼지에 투여 후, 마이코플라즈마균을 공격 접종하여 질병 방어 효과 여부 결정
- 개발된 균주를 돼지에 적용하여 공격접종 실험 III : 개발된 마이코플라즈마균 단백질 발현 홍막페렴균을 돼지에 투여 후, 마이코플라즈마균과 홍막페렴균을 동시에 공격 접종하여 질병 방어 효과 여부 결정

차 개발된 균주의 야외 적용과 산업화 추진

- 임상 예방 효과가 실험실에서 확인되면 실제 야외 농장에서의 사용상의 적응성을 확인하기 위하여 야외 임상실험을 수행
- 진단 서비스를 통한 참여 농장 선정
- 특허 출원 및 최종보고서 작성 제출
- 기대 결과: 개발된 백신 세포주의 현장적용 및 다중점 동시투여 백신의 상품성 확인

IV. 연구개발결과

본 연구과제를 수행한 결과 1차 년도에는 연쇄상 구균증 예방백신 제작용 표준 균주 제작과 홍막페렴 예방백신 제작용 표준 균주를 제작할 수 있었고, 2차 년도에는 연쇄상 구균증 예방백신과 홍막페렴 예방백신의 안전성 및 면역원성 연구에 있어서 백신의 성분 및 분량 연구, 백신의 불활화 확인 실험, 실험동물을 이용한 백신 안전성 연구, 돼지(자돈)를 이용한 시험백신 안전성 연구, 토끼를 이용한 백신 항체가 실험, 돼지(자돈)를 이용하여 백신의 안정성과, 항체가를 확인하였다. 3차 년도에는 연쇄상 구균증 예방백신과 홍막페렴 백신의 공격접종 시험 및 보존성 시험에 있어서, 백신의 특성 시험 및 무균시험, 실험동물을 이용한 백신의 공격접종 실험(3회 반복실험) 및 면역원성 검사, 자돈을 이용한 예방백신의 공격접종 실험(3회 반복실험) 및 면역원성 검사, 시험백신 보존성 시험(24개월까지 보관하면서 시험)을 실시하여, 연쇄상 구균과 홍막페렴의 안전성, 효능, 보존성을 확인하였다. 4차 년도에는 연쇄상 구균증 예방백신과 홍막페렴 예방백신의 야외 적용시험을 시행함에 있어서, 야외 사육 돼지(자돈)에 대한 안전성 시험(3개 농장), 야외 사육 돼지(자돈)에 대한 면역원성 시험(3개 농장), 야외 사육 돼지(자돈)에 대한 효능 시험(3개 농장) 등의 야외 임상실험을 실시하여, 야외 임상에서의 적용 가능성을 확인하였다. 또한, 배양이 어려운 마이코플라즈마균의 경우 중요 유착 유전자를 홍막페렴균에 삽입하여 잡종 마이코플라즈마-홍막페렴 세균을 제작하여 다중점 백신을 제작하였고, 제조합된 홍막페렴 균주내에서 마이코플라즈마균 단백질의 발현 여부를 확인하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구의 방향은 ①효과의 극대성, ②사용의 간편성, ③국내 적합성을 가질 수 있는 백신을 개발하고자 한다. 우선 연쇄상 구균증 예방백신과 홍막페렴 예방백신을 개발하고자 한다. 본 연구를 통하여 먼저 산업화하려는 이들 2가지 백신은 각각의 장점 때문에 상품화할 때 판매에는 큰 어려움이 없다. 또한, 마이코플라즈마-홍막페렴 다중점 백신의 경우 최근 생물학적 기법을 이용하여 홍막페렴균이 마이코플라즈마균의 유착단백질을 삽입한 다중점 백신 균주를 제작하여 두 가지 이상의 질병을 예방하는 백신을 제작할 예정이다.

이번 연구에서 개발하는 백신은 다른 상품과 달리 국내 제품허가의 시일이 많이 소요되고 까다롭기 때문에 대부분의 백신 회사들이 개발을 주저하고 있다. 본 연구에서는 이러한 문제를 극복하기 위하여 연구 초기부터 제품 품목허가를 위한 실험 방법을 집중적으로 개발하고 실시하여, 허가에 필요한 모든 자료를 축적하여 연구 개발이 종료되는 4년차에는 실질적으로 백신의 제품화에 필요한 모든 자료를 취합하여 국가의 품목허가를 신청할 예정이다. 또한 최신 첨단 기법에 의한 마이코플라즈마-홍막페렴 다중점 백신의 경우 개발기간이 많이 소요되는 관계로 본 연구와 동시에 개발한 후 연구 종료 후에 즉시 상품화를 위한 품목허가를 취득하여 즉시 판매할 예정이다.

이러한 판매를 통한 이익 이외에 새로운 백신 개발에 따른 노하우 축적 또한 매우 중요한 부분이다. 특히 다중점 분야는 아직 세계적으로도 개발이 미진하기 때문에 이러한 부분의 개발은

현재 뒤쳐져있는 백신 개발 수준을 획기적으로 선진국 수준으로 끌어 올릴 수 있는 기회이다. 이를 통한 특허 등을 이용하여 창조 할 수 있는 부가가치는 약 100억원으로 예상하고 있다. (출처, 국내 시장을 근거로 함).

SUMMARY

The purpose of this research is the development of multi-point vaccine for *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*-*Actionbacillus pleuropneumoniae* that has recently caused trouble for bacterial wasting disease in Korean pig farms. There is a difficulty for prevention of the disease because there is no preventive monovalent vaccine for bacterial wasting disease by *S. suis* in Korean farms. Also, because most of preventive vaccine for *A. pleuropneumoniae* and *M. hyopneumoniae* are imported and the purchasing cost of medicine in Korean pig farms has been increased. Therefore, we tried to overcome these problems by developing the vaccine for the bacterial wasting disease that cause the biggest trouble in Korean pig farms. In the case of *M. hyopneumoniae*, having difficulty in isolation, we tried to develop the multivalent *M. hyopneumoniae*-*A. pleuropneumoniae* vaccine using the newest biotechnologic method. The main adhesion gene is inserted into *A. pleuropneumoniae* and produces the hybrid bacteria of *M. hyopneumoniae*-*A. pleuropneumoniae*. That is, for periods of up to four years of research we tried to develop the vaccine and vaccination program for *S. suis* and *A. pleuropneumoniae* making a thorough investigation of the serotype of *S. suis* and *A. pleuropneumoniae* with frequency adequate for Korean field conditions. Also, through the newest biotechnologic method of insertion of *M. hyopneumoniae* into *A. pleuropneumoniae* and development of the multi-point vaccine, we placed priority to develop the vaccine strain to prevent pneumonia caused by both *M. hyopneumoniae* and *A. pleuropneumoniae*.

The industrialization way of the vaccine that we tried to develop can be set easily by the domestic and foreign market analysis. The direction of this research is that production of the vaccine necessary for the pig farms and efficacy-maximizing vaccine. And we have to plan the industrialization of the vaccine preventing the bacterial wasting disease by *S. suis* by the end of this research, the feature of the vaccine produced in this research is divided into main two features; prevention of wasting disease and accordance of antigen of the vaccine with the serotype that has occurred in Korean farms. The streptococcal vaccine that has come into the market is the preventive vaccine for neurological signs and symptoms by meningitis looking the efficacy from the side. However, the vaccine that will be produced in this research has the preventive purpose for pericarditis, pleurisy, peritonitis and will protect the pigs from the wasting disease. The vaccine made from this research has outstanding

feature for a field application because it contains the serotype of the bacteria causing the wasting disease in domestic farms looking the ingredients of a product. In case of the *Streptococcus suis* vaccine, we have the plan of vaccination program for both the sows and weaned pigs before the vaccine sale, it can induce the enough demand industrially, considering sow and young pig population.

The features of the vaccine for *A. pleuropneumoniae*, that is made from this research, are divided into three characteristics. It contains maximization of immunity for the antigen, serotype appropriate in domestic issue, and minimization of the side effect. That is, it contains outer membranous proteins of *A. pleuropneumoniae* that have outstanding immunity and distinguish itself than other vaccines. Also, it can protect over 95% of serotypes of *A. pleuropneumoniae* occurred in Korean farms because it contains serotypes 2 and 5 that occurred frequently in domestic farms, and serotype 6 which cause the problem recently, as well. And most of the vaccine for *A. pleuropneumoniae* have the side effect than other vaccines for different infectious agent, but we add a special reinforcing agent and minimize the side effect and avoiding situation in domestic farms.

The vaccine for haemophilus pleuropneumoniae that is produced from this research is scheduled for vaccination twice at the age of fifth week and eighth week. And it has enough market potential because the vaccination target for yearly quantity of pigs are 13 million in domestic farms.

In the case of the preventive multi-point vaccine for *M. hyopneumoniae-A. pleuropneumoniae*, it has two main features that completely differ from the existing vaccine. One is the maximization of efficacy of the vaccine, and the other is reliability and economic feasibility of usage. Currently, even though foreign vaccine companies are selling *M. hyopneumoniae* and *A. pleuropneumoniae* vaccines respectively, the combined vaccine are not sold in the market because there are many problems.

To resolve this problem, we maximized the efficacy of the vaccine by completely combining two kinds of bacteria. In realistic terms, the vaccine that will be produced from this research has two features of reliability and economic feasibility of usage because it has the characteristics of two kinds of vaccines at a time. This will reduce labor in many farms.

The combined vaccine for *M. hyopneumoniae-A. pleuropneumoniae* is targeted for one shot vaccination. It satisfies the efficacy, convenience, economic properties and eventually creates sufficient industrial demands.

Therefore, through this research we developed and merchandised a unique combined *M. hyopneumoniae-A. pleuropneumoniae* in the world, making it possible to hold a large domestic market share, the possibility for overseas market, sales increase of domestic vaccine maker, and the decrease of the economic burden on farmers.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction

Part 1. Objectives and the scope

Chapter 2. Status of domestic and international technology developments

Chapter 3. Development of the preventive vaccine for *Streptococcus suis*

Part 1. Introduction

Part 2. Materials and Methods

1. Production of standard strain of preventive vaccine for *S. suis*
2. Research of safety and immunity of preventive vaccine for *S. suis*
3. Experiment of challenge of *S. suis* vaccine
4. Field application experiment of *S. suis* vaccine

Part 3. Results and Discussion

1. Production of standard strain of preventive vaccine for *S. suis*
2. Research of safety and immunity of *S. suis* vaccine
3. Experiment of challenge of *S. suis* vaccine
4. Field application experiment of *S. suis* vaccine

Chapter 4. Development of the preventive vaccine for *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Part 1. Introduction

Part 2. Materials and Methods

1. Production of standard strain of preventive vaccine for *A. pleuropneumoniae*
2. Safety and immunity of preventive vaccine for *A. pleuropneumoniae*
3. Experiment of challenge of *A. pleuropneumoniae* vaccine
4. Field application experiment of *A. pleuropneumoniae* vaccine

Part 3. Results and Discussion

1. Production of standard strain of *A. pleuropneumoniae* vaccine
2. Safety and immunity of *A. pleuropneumoniae* vaccine
3. Experiment of challenge of *A. pleuropneumoniae* vaccine
4. Field application experiment of *A. pleuropneumoniae* vaccine

Chapter 5. Immunological vaccine investigation

Part 1. Introduction

Part 2. Materials and Methods

1. Development of immunological examination method of *Streptococcus suis* and *A. pleuropneumoniae*
2. Serum test for *Mycoplasma hyopneumoniae*
3. Immunological examination for *S. suis* and *A. pleuropneumoniae*
4. Serum test for *M. hyopneumoniae*

Part 3. Results and Discussion

1. Development of immunological method of *S. suis* and *A. pleuropneumoniae*
2. Serum test for *M. hyopneumoniae*
3. Immunological examination for *S. suis* and *A. pleuropneumoniae*
4. Serum test for *M. hyopneumoniae*

Chapter 6. Multi-point vaccine for *M. hyopneumoniae*-*A. pleuropneumoniae*

Part 1. Introduction

Part 2. Materials and Methods

1. Establishment of various gene clone of *M. hyopneumoniae* for development of vaccine strain
2. Development of gene recombination vector of *A. pleuropneumoniae* on the basis of established genes and implementation of gene recombination into the attenuated strain of *A. pleuropneumoniae*
3. Confirmation of expression of protein of the *M. hyopneumoniae* in the developed strain and analysis of immunity and safety of the developed strain on experimental animal and pig
4. Determination of vaccination time for multi-point vaccine and examination of efficacy for the immunity(antigenicity) in developed strain on pig

Part 3. Results and Discussion

1. Establishment of various gene clone of *M. hyopneumoniae* for development of vaccine strain
2. Development of gene recombination vector of *A. pleuropneumoniae* on the basis of established genes and implementation of gene recombination into the attenuated strain of *A. pleuropneumoniae*
3. Confirmation of expression of protein of the *A. hyopneumoniae* in the developed strain and analysis of immunity and safety of the developed strain on experimental animal and pig
4. Determination of vaccination time for multi-point vaccine and examination of

efficacy for the immunity(antigenicity) in developed strain on pig

Chapter 7. Results of research performance and Plans for application of development

Chapter 8. References

목 차

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연쇄상 구균증 예방 백신 개발

제 1 절 서 설

제 2 절 재료 및 방법

1. 연쇄상 구균 예방백신 제작용 표준균주 제작
2. 연쇄상 구균 예방 백신의 면역원성 및 안전성 연구
3. 연쇄상 구균 예방 백신의 공격접종 시험 및 보존성 시험
4. 연쇄상 구균 예방 백신의 야외 적용 시험

제 3 절 결과와 고찰

1. 연쇄상 구균 예방백신 제작용 표준균주 제작
2. 연쇄상 구균 예방 백신의 면역원성 및 안전성 연구
3. 연쇄상 구균 예방 백신의 공격접종 시험 및 보존성 시험
4. 연쇄상 구균 예방 백신의 야외 적용 시험

제 4 장 흉막폐렴 예방 백신 개발

제 1 절 서 설

제 2 절 재료 및 방법

1. 흉막폐렴균 예방백신 제작용 표준균주 제작
2. 흉막폐렴균 예방 백신 면역원성 및 안전성 연구
3. 흉막폐렴균 예방 백신의 공격접종 시험 및 보존성 시험
4. 흉막폐렴균 예방 백신의 야외 적용 시험

제 3 절 결과와 고찰

1. 흉막폐렴균 예방백신 제작용 표준균주 제작
2. 흉막폐렴균 예방 백신 면역원성 및 안전성 연구
3. 흉막폐렴균 예방 백신의 공격접종 시험 및 보존성 시험
4. 흉막폐렴균 예방 백신의 야외 적용 시험

제 5 장 백신 면역학적 검사

제 1 절 서 설

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 연쇄상구균증 및 홍막페렴 면역학적 검사 방법 개발
2. 마이코플라스마 혈청검사
3. 연쇄상구균증 및 홍막페렴 면역학적 검사
4. 마이코플라스마 혈청검사

제 3 절 결 과와 고 찰

1. 연쇄상구균증 및 홍막페렴 면역학적 검사 방법 개발
2. 마이코플라스마 혈청검사
3. 연쇄상구균증 및 홍막페렴 면역학적 검사
4. 마이코플라스마 혈청검사

제 6 장 마이코플라스마-홍막페렴 다중점 백신 개발

제 1 절 서 설

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 백신주 개발에 이용할 다양한 마이코플라스마균 유전자 클론 확보
2. 확보된 유전자를 토대로 홍막페렴균 유전자 재조합 벡터 개발 및 약독화된 홍막페렴 균주로의 유전자 재조합 실시
3. 개발된 균주 내에서의 마이코플라스마균 단백질 발현 여부 확인 및 개발된 균주의 실험동물과 돼지를 이용한 면역원성 및 안전성 확인 분석
4. 다중점 백신에 대한 백신시기 결정 및 개발된 균주의 돼지에서 면역원성(항원성)과 효능 검사

제 3 절 결 과와 고 찰

1. 백신주 개발에 이용할 다양한 마이코플라스마균 유전자 클론 확보
2. 확보된 유전자를 토대로 홍막페렴균 유전자 재조합 벡터 개발 및 약독화된 홍막페렴 균주로의 유전자 재조합 실시
3. 개발된 균주 내에서의 마이코플라스마균 단백질 발현 여부 확인 및 개발된 균주의 실험동물과 돼지를 이용한 면역원성 및 안전성 확인 분석
4. 다중점 백신에 대한 백신시기 결정 및 개발된 균주의 돼지에서 면역원성(항원성)과 효능 검사

제 7 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 8 장 참고문헌

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

본 연구의 목적은 최근 양돈 농장에서 문제가 되고 있는 세균성 소모성 질환인 연쇄상 구균 증 백신, 홍막페렴 백신, 마이코플라즈마-홍막페렴 다중점 백신을 개발하고자 한다. 국내에서 발생하는 세균성 소모성 질병인 연쇄상 구균증에 대한 예방 단일백신은 현재 없기 때문에 질병 예방에 어려움이 있다. 또한 대부분의 홍막페렴과 마이코플라즈마 감염 예방 백신은 수입 백신을 사용하고 있기 때문에 국내 양돈 농가의 의약품 구매 비용이 증가되고 있다. 이러한 문제를 극복하기 위하여 현재 국내에서 세균성 소모성 질환으로 가장 피해가 큰 두 가지 질병 예방에 대한 백신을 개발하고자 한다. 또한 최신 생명공학적 방법을 이용하여 배양이 어려운 마이코플라즈마균의 경우 중요 유착 유전자를 홍막페렴균에 삽입하여 잡종 마이코플라즈마-홍막페렴 세균을 제작하여 다중점 백신을 제작하고자 하였다. 즉, 4차년도에 이르는 사업과제 기간동안 국내에서 빈번하게 발생하는 연쇄상 구균과 홍막페렴균의 혈청형 분석하여, 국내 실정에 적합한 연쇄상 구균증 예방 백신 개발 및 접종 프로그램을 개발하고, 국내 실정에 적합한 홍막페렴 예방 백신 개발 및 접종 프로그램을 개발하고자 한다. 또한, 첨단 기법을 통해 마이코플라즈마균을 삽입한 홍막페렴균을 이용한 다중점 백신 개발과 이로 인한 돼지 홍막페렴과 마이코플라즈마성 폐렴을 동시에 예방할 수 있는 다중점 백신주를 개발하는데 중점을 두었다.

본 연구를 통하여 개발하는 백신의 산업화 방향은 이미 국내에서의 국내 제품과 국외 제품의 시장 현황을 파악하면 쉽게 알 수 있다. 본 연구의 산업화 방향은 첫째로, 농장에서 필요한 백신 생산, 둘째로, 효과를 극대화 된 백신 생산이라고 할 수 있다.

또한, 연구과제 종료와 함께 소모성 질환을 예방하는 연쇄상구균 단일백신을 산업화 할 계획이며, 본 제품의 특징은 크게 2가지로 소모성 질환 예방과 국내 발병 혈청형과 백신 항원 일치이다. 제품의 효능 측면에서 보면, 현재 시판되고 있는 연쇄상 구균 예방백신의 경우 뇌막염에 의한 신경증상을 예방하는 백신인 반면, 본 연구를 통하여 개발하는 백신의 경우 심외막염, 홍막염, 복막염 등을 예방하여 소모성 질환을 방지하는 백신이다. 제품의 성분 측면에서 보면 국내에서 소모성 질환을 주로 유발하는 혈청형을 함유하고 있기 때문에 국내에서 야의 적용성이 매우 뛰어나다. 소모성 질환을 예방하는 연쇄상 구균 백신의 경우 백신을 모든 과 이용자돈에게 접종하는 프로그램을 설정하여 판매 할 예정이며, 국내 모든 사육두수와 자돈 사육두수를 감안할 때 산업적으로도 충분한 수요를 창출 할 수 있다.

본 연구를 통하여 개발되는 홍막페렴 백신의 특성은 크게 3가지로 항원의 면역원성을 극대화, 국내실정에 적합한 혈청형 함유, 부작용 최소화 백신이다. 첫째, 기술적면에서 다른 백신보다 면역원성이 뛰어난 홍막페렴의 외막 단백질을 많이 함유하고 다른 어떠한 백신보다 항체 형성에서 뛰어나다. 둘째, 국내에서 가장 흔하게 발병하는 혈청형인 2번 과 5번, 뿐만 아니라 최근에 문제가 되는 혈청형 6번을 첨가하여 명실 공히 국내에서 발병하는 홍막페렴 혈청형의 95%를 예방할 수 있는 백신을 개발할 수 있다. 셋째, 홍막페렴 백신은 다른 백신보다 접종 할 때에 부작용이 매우 높는데 특수 면역 보강제를 첨가하여 백신 접종 할 때 부작용을 최소화하여

농장에서 백신 기피현상을 최소화 하는 특징이 있다.

본 연구를 통하여 개발되는 홍막페렘 백신은 이유자돈시기인 5주령 과 8주령에 2회 백신을 접종할 예정이다 따라서 현재 국내에서 접종대상 동물 수는 연간 1,370만두 이기 때문에 충분한 시장 잠재성이 있다.

마이코플라즈마-홍막페렘 예방 다중점 백신의 경우 기존의 백신과 완전히 차원이 다른 백신으로 크게 2가지의 특성이 있는데, 백신 효과의 극대화화 사용의 편리성과 경제성이다. 현재 국외 백신 회사들은 마이코플라즈마 백신과 홍막페렘 백신을 각각 판매하면서도 혼합 백신을 판매하지 않고 있는 것은 여러 문제점이 있기 때문에 혼합백신을 판매하지 않는 것으로 보인다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 2가지 세균의 완전한 화학적 융합을 통하여 백신의 효과를 극대화 하였다. 현실적인 측면에서 개발될 백신은 2가지 백신을 동시에 접종 할 수 있기 때문에 사용의 편리함과 경제성이 그 특징이다. 특히 현실적으로 농장에서 노동력 제한 문제가 대두되는 실정에서 2가지 질병을 하나의 백신으로 예방이 가능하므로 편리성뿐만 아니라 경제성도 가지고 있다.

마이코플라즈마-홍막페렘 다중점 백신은 이유자돈에 1회 접종을 목표로 하여 효능, 편리성, 경제성을 모두 갖춘 백신으로 산업적으로도 충분한 수요를 창출 할 수 있다.

따라서, 본 연구과제를 통하여 세계적으로 유일한 홍막페렘과 마이코플라즈마성 페렘 예방 다중점 백신을 개발 및 상품화 하여 국내 시장 점유 및 해외 시장 진출 기회 획득, 백신 제조회사 매출 증대, 농가 경제적 부담을 경감시킬 수 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 제품생산 및 시장 현황

1. 연쇄상 구균의 단일 백신을 판매하는 회사는 없으며 중앙백신 연구소와 고려비엔피에서 연쇄상구균을 포함한 혼합백신을 2006년부터 판매해서 2006년에는 657,076천원을 판매, 2007년에는 1,590,337천원을 판매하였다.
2. 홍막페렴의 경우 국내 백신회사에서는 단일제품을 판매하고 있지 않으며, 홍막페렴과 파스튜렐라성 페렴 혼합백신의 경우 2006년에 411,973천원 판매하였으며, 2007년에는 844,142천원을 판매하였다. 홍막페렴과 3가지 이상 기타 다른 질병의 혼합백신의 경우 2006년에 769,411천원, 2007년에 643,266천원을 판매하였다. 이러한 판매현황을 분석하면 3가지 이상 질병 혼합백신의 판매는 감소하는 반면, 2가지 질병 혼합백신은 증가하고 있는 것으로 나타나고 있다. 따라서 농장에서는 폐사율이 높아 피해가 큰 질병인 홍막페렴의 경우, 더 효과적이라고 판단되는 단순 혼합백신을 선호하고 있다. 이에 따라 홍막페렴 단일 백신을 판매할 경우 시장에서의 판매는 분명히 증가 될 수 있다.
3. 마이코플라즈마 백신의 경우 국내 백신회사에서는 단일제품과, 3종류의 다른 질병과 혼합되어 있는 마이코플라즈마 혼합백신으로 판매되고 있는데 2006년에 1,345,806천원, 2007년에는 1,558,522천원을 판매하였다. 국내의 연쇄상 구균 백신, 홍막페렴 백신, 마이코플라즈마 백신 생산 및 시장현황에 대한 자료는 사단법인 동물약품 협회의 자료를 근거로 작성하였다.

제 2 절 국외 제품생산 및 시장 현황

1. 연쇄상 구균의 단일 백신 또는 복합백신을 판매하는 국외 제품은 없다.
2. 홍막페렴의 경우 국외 백신회사에서는 단일제품만 판매하고 있으며, 판매액은 2006년에는 2,755,121천원, 2007년에는 2,822,530천원을 판매하여 계속 증가하고 있는 추세이다.
3. 마이코플라즈마 백신의 경우 국외 백신회사에서는 단일제품은 2006년에 5,919,297천원을 판매하였으며, 2007년에는 5,688,276천원을 판매하였다. 또한 혼합백신의 경우 2006년에 2,519,270천원을 2007년에 2,933,840천원을 판매하였다. 국외의 연쇄상 구균 백신, 홍막페렴 백신, 마이코플라즈마 백신 생산 및 시장현황에 대한 자료는 사단법인 동물약품 협회의

자료를 근거로 작성하였다.

제 3 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

본 연구과제의 최종 연구개발 목표기술인 연쇄상 구균중 예방백신 개발, 홍막페렴 예방백신 개발, 홍막페렴과 마이코플라스마성 폐렴 예방 다중점 백신 개발에 대한 국내외의 기술수준은, 첫째, 연쇄상 구균중 예방백신에 대한 관련기술 최고보유국은 캐나다이고, 우리나라는 현재 캐나다에 비해 55-70%의 기술수준을 보유하고 있으며, 90%의 기술개발을 목표로 하였다. 둘째, 홍막페렴 예방백신에 대한 관련기술 최고보유국은 미국이고, 우리나라는 현재 미국에 비해 65-85%의 기술수준을 보유하고 있으며, 연쇄상 구균백신 개발과 마찬가지로 90%의 기술개발을 목표로 하였다. 셋째, 홍막페렴과 마이코플라스마성 폐렴 예방 다중점백신에 대한 국외 관련기술 보유국은 어떠한 국가도 이와 관련된 기술을 보유하고 있지 않으며, 우리나라 역시 아직은 이와 관련된 구체적이고, 진보적인 기술을 보유하고 있지는 않다. 하지만, 당해과제 완료 후 선진국 대비 55% 이상의 성장을 목표로 하였다.

2. 특허분석 및 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

가. 연쇄상 구균 백신과 관련된 특허로는 2007년에 캐나다에서 등록된 *Streptococcus suis* polypeptides and polynucleotides encoding and their use in vaccinal and diagnostic application로 연쇄상 구균의 중요 병원성 인자로 추정되는 단백질을 이용한 백신 연구라는 점이 본 연구와 유사하나, 실제적으로 백신을 제작하여 돼지에서 예방 실험을 실시하지 않았다는 점에서 본 연구와의 차이를 가진다. 또, 2006년도에 네덜란드에서 등록된 *Streptococcus suis* vaccines and diagnostic tests 는 연쇄상 구균의 중요 병원성 인자로 추정되는 단백질의 recombinant를 이용한 백신 제작이라는 점에서 유사점으로 보이나 마찬가지로 실제적으로 백신을 제작하여 돼지에서 예방 실험을 실시하지 않았다는 차이를 가진다. 2003년에 우리나라에서 등록된 돼지 호흡기용 혼합백신은 연쇄상 구균 항원이 포함되어 있다는 점에서 본 연구와의 연관성을 가지지만, 연쇄상 구균 이외에 7개의 균체항원이 함유되어 있어 충분한 항체 형성의 제한된다는 차이점을 보인다.

문헌 조사결과, Li Y et al, 2007에서 밝히는 연쇄상 구균 백신의 개발은 연쇄상 구균을 이용한 subunit 백신을 제작한다는 점에서 본 연구와 연관이 있으며, Fittipaldi N et al, 2007 는 연쇄상 구균을 이용한 백신 제작하여 돼지에서 응용했다는 점에서 본 연구와 연관성을 가진다. 또한, Wisselink HJ et al, 2002 역시 혈청형 2형을 이용한 백신으로 돼지에서 방어실험을 실시하였다는 점이 본 연구와 유사하나, 표면항원만 이용하여 예방 마우스에서만 실험을 했다는 점과, 혈청형 2번만을 가지고 실험을 했다는 점, 생독백신을 사용했다는 점이 본 연구와 차이를 가진다.

나. 홍막폐렴 백신과 관련된 특허로는 2006년에 미국에서 등록된 "Antigens for *Actinobacillus pleuropneumoniae* and method"로 홍막폐렴균의 중요항원을 최대한 발현하는 배양조건을 기술한 점에서 본 연구와 유사한 의미를 가지지만, 면역원성 확보가 확립되지 않은 점을 보인다. 같은 해 미국에서 등록된 Bacterial virulence genes 는 홍막폐렴균의 병원성 유전자의 발현 방법에 대해서 본 연구와 유사점을 가지나, 안전성문제로 인하여 상품화가 제한되었다. 2003년 한국에서 등록된 돼지 호흡기용 혼합백신은 홍막폐렴항원이 포함되어 있다는 점이 본 연구와 유사하나, 홍막폐렴균 이외에 7개의 균체항원이 함유되어 있어 충분한 항체 형성이 제한된다는 약점을 가진다.

Lee KY et al, 2006 에 발표된 문헌에 따르면, 개발한 백신이 홍막폐렴을 예방한다는 점에서 본 연구와의 연관성이 가지지만, 구강으로 투입하는 백신을 개발하여 현실적으로 농장에서는 사용이 제한될 수 밖에 없는 문제를 지닌다. 또한, Maas A et al, 2006 에 발표된 내용은 마찬가지로 개발한 백신이 홍막폐렴을 예방한다는 점에서 본 연구와의 연관성이 가지지만, 생독백신을 이용하여 상업용 백신을 사용하기에 제한이 따른다. Tumamao JQ, et al, 2003년에서 생독백신과 subunit 백신을 이용한 돼지 방어의 내용은 본 연구와 유사성을 지니나, 실험 백신균주의 불안정화로 인한 상업화가 제한되는 약점을 지닌다.

다. 마이코플라스마-홍막폐렴 다중점 백신과 관련된 특허로는 2000년도에 한국에서 등록된 돼지 호흡기용 혼합백신이 있다. 이는 돼지 호흡기용 백신이라는 의미에서 본 연구와 유사점을 가지나, 사균백신을 사용했다는 점에서 차이가 있다. 또, 2007년에 미국에서 등록된 *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin vaccine은 마이코플라스마 백신이 첫 자체로 본 연구와 연관성이 있지만, 역시 사독백신을 처리한 것이었다. 같은 년도에 미국에서 등록된 Inactivated *M. hyopneumoniae* and uses therefor 역시 Thimerosal로 처리한 사균백신인 점이 본 연구와 차이를 보인다. Chen H et al, 2008에서 밝히는 연구내용은 마이코플라스마 단백질을 발현하는 살모넬라균 사용한 것이었고, Krakowka S, 2007의 연구내용 또한, Pfizer Animal Health, New York, New York, USA (PAH); Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, Iowa, USA (FDAH-1); Boehringer Ingelheim Vetmedica, St. Joseph, Missouri, USA (BD); Intervet, Millsboro, Delaware, USA (IV); and Schering-Plough Animal Health, Union, New Jersey, USA (SPAH), Fort Dodge Animal Health (FDAH-2) 의 사균 bacterin백신을 사용했다는 점에서 본 연구와 차이를 보인다. 또한, 2007년에 게재된 Okamba FR et al, 2007의 연구내용은 마이코플라스마 p97 단백질의 c-terminus를 포함하는 아데노바이러스 사용했다는 점이 본 연구와 다른 점이다.

제 3 장 연쇄상 구균증 예방 백신 개발

제 1 절 서 설

돼지에 있어서의 연쇄상 구균 감염증 중 가장 중요한 질병은 그람양성의 구균인 *Streptococcus suis*에 의한 감염이다. 본 질병은 돼지에서 패혈증, 뇌막염, 관절염, 다발성 장막염, 심내막염, 질염, 유산 등을 유발하며(Kataoka, et al. 1991; Reams, et al. 1994), 특히 비육돈에서는 폐렴 등의 호흡기감염으로 심각한 경제적 손실을 야기하며 최근에는 이우자돈에서 급성 패혈증에 대한 사례가 많다. 특히 본 질병은 인공공통 전염병으로서 돈육취급업자, 도축업자, 수의사 등에게 피부의 상처를 통해서 감염된다. 본 질병이 1960년대 초반에 보고된 이후로 지금까지 35여 종의 혈청형이 보고되어 있으며 이것 외에도 혈청형이 동정되지 않은 것이 많아서 앞으로 더욱 많은 혈청형이 보고되리라 본다. 37°C의 인큐베이터에서 하루 정도를 배양하면 혈액배지 상에서 대부분 불완전 용혈성의 직경 1-2mm의 흰색 집락을 보인다. *Streptococcus*속에 해당하는 균들은 종류가 많기 때문에 정확한 동정이 요구된다. 본 질병의 발병기전에 대해 지금까지 밝혀진 바로는 건강돈의 비강이나 편도에 침입하여 정상 세균총으로 존재하다가 호흡기세균이나 바이러스, 먼지 등에 의해 유발된 비강 내 염증반응으로 모여든 탐식세포에 탐식되나 일부 병원성이 강한 균들은 대식 세포 내에서도 살아남아 대식세포를 따라 순환하다가 다양한 증상과 병변을 유발하는 것으로 알려져 있다(Jansen, et al. 1994). 특별한 증상이 없이 폐사를 일으키거나 뇌막염의 증상을 나타낸다. 대부분의 경우 식욕부진, 발열, 마비, 신경증상을 일으킨다. 부검할 때 입과결의 종창과 발적, 다발성 장막염이 나타나며 뇌에 항상 병변이 관찰되는 것은 아니다(Wei, et al. 2009). 국내에서 대부분 글래서씨병으로 추정하고 있는 질병의 정확한 진단은 연쇄상 구균에 의한 전신 장막염이다. 따라서 국내에서는 오진에 의하여 질병의 중요성을 간과하고 있는데, 향후 매우 경제적 피해가 큰 질병으로 사료된다. 뿐만 아니라 국내에서는 연쇄상 구균에 의한 뇌막염을 예방 할 수 있는 혼합백신만이 판매 되고 있어, 그 잠재 수요가 매우 높은 백신이다. 최근 몇몇 국가에서 백신을 제작하여 사용하는 것으로 알려져 있지만, 연쇄상 구균증은 혈청형이 다양할 뿐만 아니라 혈청형간의 교차방어능이 없으므로 백신제조에 앞서 먼저 국내에서 유행하는 혈청형 파악이 선결과제이기도 하다. 따라서, 본 연구과제의 연차별 연구목표 및 내용은 1차 년도에는 연쇄상 구균증 예방백신 제작용 표준 균주 제작함에 있어서, 국내 분리 연쇄상 구균의 혈청형 분석, 표준 혈청형 연쇄상 구균의 면역원성 검사, 표준 균주 확립 및 계대 방법 확립, 표준 균주의 대량 배양 방법 확립, 표준 균주를 이용한 백신을 제조, 2차 년도에는 연쇄상 구균증 예방 백신의 안전성 및 면역원성 연구를 연구함에 있어서 백신의 성분 및 분량 연구, 백신의 불활화 확인 실험, 실험 동물을 이용한 백신 안전성 연구, 돼지(자돈)를 이용한 시험백신 안전성 연구, 토끼를 이용한 백신 항체가 실험, 돼지(자돈)를 이용한 백신 항체가를 실험한다. 3차 년도에는 연쇄상 구균증 예방 백신의 공격접종 시험 및 보존성 시험에 있어서, 백신의 특성 시험 및 무균시험, 실험 동물을 이용한 백신의 공격 접종 실험(3회 반복실험) 및 면역원성 검사, 자돈을 이용한 예방

백신의 공격 집중 실험(3회 반복실험) 및 면역원성 검사, 시험백신 보존성 시험(제조시점, 6, 12, 18, 24개월까지 보관하면서 시험)을 실시하고, 4차 년도에는 연쇄상 구균증 예방 백신 야외 적용시험을 시행함에 있어서, 야외 사육 돼지(자돈)에 대한 안전성 시험(3개 농장), 야외 사육 돼지(자돈)에 대한 면역원성 시험(3개 농장), 야외 사육 돼지(자돈)에 대한 효능 시험(3개 농장) 등의 야외 임상실험을 실시하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 연쇄상 구균(*Streptococcus suis*) 예방백신 제작용 표준균주 제작

가. 국내 돼지에서 연쇄상구균 분리

의뢰된 돼지 중 혐유소성 심외막염, 흉막염 및 복막염이 관찰되는 케이스를 부검 시 장기가 오염되지 않도록 소독한 부검용 칼로 조심스럽게 흉강 및 복강을 개방시키고, 멸균 면봉으로 혐유소성 병변이 관찰되는 부위의 장막을 문질러 혈액 배지에 바른 후, 백금이로 바른(streaking)다. 배지를 37℃의 배양기에 넣고 24시간 동안 호기성 배양을 하여, 연쇄상구균 콜로니(colony)의 형태학적 특징을 갖춘 독립된 콜로니를 골라 trypticase soy 배지(TSA) 또는 혈액 배지에 백금이로 2차 배양을 시킨다. 이 후 증균된 균에서 DNA를 추출하여 돼지 연쇄상구균에 특이적인 프라이머를 사용한 중합효소 연쇄반응을 시행하여 돼지 연쇄상구균을 동정한다.

나. 국내 분리 연쇄상구균 혈청형 분석

국내 양돈장에서 의뢰된 돼지중에서 혐유소성 심외막염과 복막염이 관찰되는 이유자돈에서 총 28개의 연쇄상구균을 분리하였다.

다. 유전자 특성을 이용한 백신 후보 균주의 면역원성 검사

국내에서 분리한 총 28건의 연쇄상구균에 대한 특성을 분석하기 위하여 extracellular factor(EF)와 muramidase-released protein(MRP)라는 단백질에 대한 유전자 유무를 분석하였다. 이들 2가지 균주로 가장 이상적이다. 중합효소연쇄반응을 통하여 2가지 단백질을 암호화하고 있는 EF의 유전자인 epf와 MRP의 유전자인 mrp의 유무를 전체 분리한 28개의 연쇄상구균에서 실험을 실시하였다.

중합효소 연쇄반응을 위한 프라이머는 GenBank: X64450을 이용하여 epf 유전자유전자간의 역할에 대해서는 아직 정확하게 밝혀진 바 없으나, EF는 세포에 침투 후, 세포 내 세균의 생존에 관련된 인자로 추정되며, MRP는 면역성의 측면에서 볼 때 높은 면역원성을 가진 것으로 알려져 있다. 따라서 MRP 유전자를 가지고 있어서 면역원성은 높고, 상대적으로 병원성 기능이 높은 EF의 유전자를 보유하고 있지 않는 균주를 선택하면, 백신 생산을 위해 선택하는 표준의 전방향 프라이머는 GCTACGACGGCCTCAGAAATC (염기 배열 번호 2407-2427)와 역방향 프라이머는 TGGATCAACCACTGGTGTTAC (염기 배열 번호; 3032-3012 or

5400-5380; epf variant gene)으로 하였으며(Wisselink, et al. 1999), mrp 유전자의 전방향 프라이머는 ATTGCTCCACAAGAGGATGG (염기 배열 번호3478-3497)와 역방향 프라이머는 TGAGCTTTACCTGAAGCGGT (염기 배열 번호 3646-3665)로 하였다(Silva, et al. 2006).

중합효소 연쇄반응은 다음과 같이 실시하였다. 연쇄상구균의 epf 유전자에 대한 중합효소 연쇄반응은 50 μ l를 기준으로 하여, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 각각 10nM의 epf forward와 reverse 프라이머, 2U의 TLA polymerase(Bioneer, Daejeon, Korea), 추출한 DNA 5 μ l를 각각 섞은 후, RNase와 DNase를 제거한 증류수를 첨가하여 50 μ l의 양이 되도록 맞춘 후 시행하였다. 연쇄상구균의 mrp 유전자에 대한 중합효소 연쇄반응은 50 μ l를 기준으로, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 각각 10nM의 forward와 reverse 프라이머, 1U의 TLA polymerase, 추출한 DNA 5 μ l를 각각 섞고, RNase와 DNase를 제거한 증류수를 첨가하여 50 μ l의 양이 되도록 맞춘 조성을 사용하였다.

중합효소 연쇄반응은 GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)을 사용하여 시행하였다. 사용된 프로그램은 epf의 경우, 섭씨 95 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 가열 후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 60 $^{\circ}$ C에서 55초, 72 $^{\circ}$ C에서 2분을 반응시키는 과정을 40번 반복하고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 반응하도록 하였으며, mrp의 프로그램은 섭씨 95 $^{\circ}$ C에서 2분 가열한 뒤, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 58 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초를 반응시키는 과정을 40번 반복하고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 2분 동안 반응하도록 하였다. 반응이 끝난 후, 10 μ l를 0.02% ethidium bromide를 첨가한 2% agarose gel에 40분 동안 전기영동 하였다.

라. 실험동물을 이용한 면역원성 검사

국내에서 섬유소성 심외막염과 복막염에서 분리한 연쇄상구균중 발생 빈도가 높고 면역원성을 결정하는데 중요한 인자인 mrp를 보유한 연쇄상구균 3형 4개 (일련번호 1, 4, 5, 12), mrp 유전자 보유 한 4형 1개 (일련번호 18), mrp 유전자를 보유하지 않은 7형 3개 (일련번호 3, 8, 9)를 가지고 백신을 제조하여 토끼에게 2주 간격으로 2회 접종하고 2차접종후 2주간 경과된 시점에서 혈청을 채취하여 응집반응을 통하여 항체 형성 추이를 관찰하였다.

마. 백신 후보 균주 선정

국내에서 섬유소성 심외막염과 복막염에서 분리한 연쇄상구균중 발생 빈도가 높고 면역원성을 결정하는데 중요한 인자인 MRP를 보유하고 토끼를 이용한 항체 형성 능력을 확인하여 연쇄상구균 3형 (일련번호 1), 4형 (일련번호 18), 7형 (일련번호 8) 등 3개의 연쇄상구균을 선별하였다.

바. 연쇄상구균 3형의 염기서열 분석

연쇄상구균 3형의 16s ribosomal RNA의 염기서열을 알아보기 위하여 전방향 (forward) 프라이머는 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'로 제작하였고, 역방향 (reverse) 프라이머는 5'-CGGGATCCCAGGCCCGGAACGTATTCAC-3'로 제작하였다.

유전자 증폭을 위한 중합효소 연쇄반응은 50 μ l를 기준으로 하여, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 각각 10nM의 epf의 전방향과 역방향 프라이머, 1U

의 TLA polymerase(Bioneer, Daejeon, Korea), 추출한 DNA 5μl를 각각 섞은 후, RNase와 DNase를 제거한 증류수를 첨가하여 50μl의 양이 되도록 맞춘 후 시행하였다.

중합효소 연쇄반응은 GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)을 사용하여 시행하였으며, 섭씨 95℃에서 5분 동안 가열 후, 94℃에서 30초, 60℃에서 1분, 72℃에서 1분을 반응시키는 과정을 40번 반복하고, 마지막으로 72℃에서 5분 동안 반응하도록 하였다. 반응이 끝난 후, 10μl를 0.02% ethidium bromide를 첨가한 2% agarose gel에 40분 동안 전기영동 하였다.

국내에서 분리하여 이번에 백신후보균주로 선정된 일련번호 1의 연쇄상구균 3형의 경우 연쇄상구균이 보유하고 있는 16s ribosomal RNA sequence (33-1330 bp)을 증폭하여 유전자 염기서열을 분석하였다.

사. 백신 표준 균주 계대 방법 확립

면양의 혈액(sheep blood)이 5% 첨가된 혈액 배지에 표준 돼지 연쇄상구균을 백금으로 바른 후, 37℃의 배양기에서 24~48시간 동안 호기성 배양한다. 이 후 균의 독립된 콜로니(colony)를 확인한 후, 다시 같은 방법으로 30계대를 연속적으로 시행하였다. 각각의 연속 계대 사이에 중합효소 연쇄반응을 통하여 백신 후보로 선정할 균주에서 mrp 유전자를 보유하는 지를 확인하였다.

2. 연쇄상 구균(*Streptococcus suis*) 예방 백신의 면역원성 및 안전성 연구

가. 연쇄상구균증 백신 함유 혈청형 결정

다발성 장막염이 유발된 가검물에서 분리한 연쇄상구균의 혈청형을 분석해본 검사 결과 국내에서 분리한 연쇄상구균증 혈청형 3형이 28가지 균주 중 7개, 4형이 5개로 가장 흔하게 분리되었으며, 이 2가지 혈청형은 전체의 42.9%를 차지하였다. 이 결과는 2형을 제외한다면 미국, 중국, 일본 등지에서 연구된 3, 4, 7형이 다른 혈청형에 비해 높은 분포를 나타낸다는 결과와 유사하다(Kataoka, et al. 1993; Reams, et al. 1994; Wei, et al. 2007).. 하지만 이들 연구에서 2형이 가장 높은 분포를 나타내는 것과는 상반되는 결과이다. 이는 본 연구가 장막염이 있는 가검물만을 선택하여 검사하였기 때문에 다른 연구들과의 샘플 선택 방법 차이에서 기인한 것으로 생각된다. 국내에서 흔히 글래서씨병으로 추정 또는 오진하는 다발성 장막염을 본 연구실에서 진단한 결과, 연쇄상구균증으로 인한 경우가 글래서씨병이 일으킨 다발성 장막염과 비교하였을 때 유사한 비율을 차지하여 질병의 중요성을 새로이 인식하고, 앞으로도 경제적 피해가 큰 질병으로 생각하였다.

나. 연쇄상구균 2형과 4형의 염기서열 분석

연쇄상구균 2형과 4형의 16s ribosomal RNA의 염기서열을 알아보기 위하여 전방향(forward) 프라이머는 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'로 제작하였고, 역방향(reverse) 프라이머는 5'-CGGGATCCCAGGCCCGGAACGTATTAC-3'로 제작하였다(Ip, et al.

2007). 유전자 증폭을 위한 증합효소 연쇄반응은 50 μ l를 기준으로 하여, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 각각 10nM의 epf의 전방향과 역방향 프라이머, 1U의 TLA polymerase(Bioneer, Daejeon, Korea), 추출한 DNA 5 μ l를 각각 섞은 후, RNase와 DNase를 제거한 증류수를 첨가하여 50 μ l의 양이 되도록 맞춘 후 시행하였다. 증합효소 연쇄반응은 GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)을 사용하여 시행하였으며, 섭씨 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 가열 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 반응시키는 과정을 40번 반복하고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응하도록 하였다. 반응이 끝난 후, 10 μ l를 0.02% ethidium bromide를 첨가한 2% agarose gel에 40분 동안 전기영동 하였다.

다. 부형제 선정과 조합을 통한 백신 개발

부형제(adjuvant)는 백신의 효과와 관련된 성분으로 일반적인 백신들은 모두 부형제가 함유되어 있으며, 이는 백신의 항체 형성 능력과 백신 효과의 지속 시간을 결정하는데 매우 중요한 역할을 한다. 일반적으로 약독화 생균 백신은 균 자체의 감염력과 염증 반응을 이끌어내는 요소를 갖추고 있기 때문에 사독백신에 비해 부형제의 역할이 비교적 작다. 하지만 본 연쇄상구균증 백신은 사독 백신으로 부형제의 역할이 상대적으로 크며, 부형제의 선정이 보다 중요한 의미를 갖는다.

항체 형성 능력이 뛰어난 부형제로 알려져 있는 water-in-oil emulsion 형태인 complete Freund's 부형제는 접종부위의 조직손상을 일으키는 단점이 있어 양돈농가에서 접종을 기피하게 되는 문제점이 있으며, 접종 할 때에도 오일 성분으로 인해 고통을 유발하므로 돼지에게 스트레스를 유발하게 된다. 연쇄상구균증 백신에는 이러한 단점이 없는 부형제인 알루미늄 겔(aluminium hydroxide gel)을 사용하여 실험하였다.

라. 불활화 확인

백신 제조 할 때 불활화 시약이 항원에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 최소량의 포르말린(formaldehyde)으로 완전히 불활화 시키기 위하여 다음과 같이 실험하였다.

포르말린을 각각 0.3%, 0.5%, 0.7%, 1% 씩 넣은 1×10^5 CFU/ml 배양액을 4 $^{\circ}$ C, 150 rpm의 진탕 배양기에서 6, 12, 18, 24 시간동안 혼합시켜 불활화 시킨다. 불활화 시킨 배양액은 포르말린을 제거하기 위하여 6000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 버리고 같은 양의 멸균 PBS에 다시 희석시킨다. 균 희석액을 각각 10배씩 10번을 멸균 PBS에 희석하여 면양의 혈액(sheep blood)이 5% 첨가된 혈액 배지에 10 μ l씩 떨어뜨린 후 넓게 퍼뜨린 다음, 37 $^{\circ}$ C의 배양기에서 24시간 동안 호기성 배양하였다.

마. 실험동물을 이용한 연쇄상구균증 백신 안전성 실험

(1) 마우스를 이용한 연쇄상구균증 백신 안전성 실험

백신 접종 할 때 일어날 수 있는 접종 부위의 병변 또는, 그 외에 생길 수 있는 부작용을 확인하기 위하여 특정 병원체 부재(specific pathogen free) ICR 마우스를 이용하여 안전성 실험

험을 시행하였다. 15-20g의 마우스 15마리에서 5마리씩 각각 0.25, 0.5, 1ml의 연쇄상구균증 백신을 복강에 접종하고, 같은 조건의 마우스 15마리에서 5마리씩 각각 0.25, 0.5, 1ml을 피하에 접종하였다. 이 후, 7일간 증상 및 병변을 관찰하고, 마지막 날 경추탈골방법으로 안락사시켜 부검하여 조직을 중성포르말린으로 고정시켜 HE 염색을 거쳐 조직슬라이드를 만들어 병변을 관찰하였다.

(2) 기니피그를 이용한 연쇄상구균증 백신 안전성 실험

백신 접종 할 때 일어날 수 있는 접종 부위의 병변 또는, 그 외에 생길 수 있는 부작용을 확인하기 위하여 특정 병원체 부재(specific pathogen free) 기니피그를 이용하여 안전성 실험을 시행하였다. 300-400g의 기니피그 6마리에서 2마리씩 각각 0.5, 1, 2ml의 연쇄상구균증 백신을 근육에 접종하고, 같은 조건의 기니피그 6마리에서 2마리씩 각각 0.5, 1, 2ml을 피하에 접종하고, 같은 조건의 기니피그 2마리에 0.1ml을 피내에 접종하여 7일간 주사부위의 화농 및 괴사 없이 생존하는지 관찰하였다.

바. 돼지를 이용한 연쇄상구균증 백신 안전성 실험

(1) 자돈을 이용한 연쇄상구균증 백신 안전성 실험

국가검정동물약품검정기준 (사단법인 한국동물약품협회)에 의하여 백신 접종 할 때 일어날 수 있는 접종 부위의 병변 또는, 그 외에 생길 수 있는 부작용을 확인하기 위하여 자돈을 이용하여 안전성 실험을 시행하였다. 4주령의 자돈 4마리에 백신규정량의 2배인 2ml의 연쇄상구균증 백신을 근육에 접종하여, 1~2시간 내 과민반응의 유무 관찰과 이후 10일간 관찰하여 주사부위에 화농 및 괴사가 없는지 관찰하였다.

사. 실험동물을 이용한 연쇄상구균 백신의 항체가 연구

(1) 토끼를 이용한 연쇄상구균증 백신 항체가 연구

토끼에게 연쇄상구균증 백신을 2주 간격으로 2회 접종하고 2차접종후 2주간 경과된 시점에서 혈청을 채취하여 평판 응집반응(microplate agglutination test)을 실시하였다. 2배 희석한 혈청을 멸균 PBS에 2배씩 10번 희석하여 마지막이 1,024배가 되도록 혈청 희석액을 준비하였다. 그리고 brain heart infusion broth에서 배양한 연쇄상구균을 사독화하여 원심분리한 후, 멸균 PBS로 희석하여 항원 희석액을 준비하였다. 그리고 96 well 플레이트에 준비된 혈청 희석액을 각각 60 μ l씩 넣고, 마지막 2개의 well은 PBS만 60 μ l씩 넣은 후, 항원 희석액을 모든 well에 60 μ l씩 분주하였다. 그리고 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 후 결과를 확인하였다.

아. 돼지를 이용한 연쇄상구균 백신의 항체가 연구

(1) 자돈을 이용한 연쇄상구균증 백신 항체가 연구

5주령의 자돈 5두에 연쇄상구균증 백신을 2주 간격으로 2회 접종하고 2차 접종 후 2주간 경과된 시점에서 혈청을 채취하여 평판 응집반응(microplate agglutination test)을 실시하였다.

2배 희석한 혈청을 멸균 PBS에 2배씩 10번 희석하여 마지막이 1,024배가 되도록 혈청 희석액을 준비하였다. 그리고 brain heart infusion broth에서 배양한 연쇄상구균을 사독화하여 원심분리한 후, 멸균 PBS로 희석하여 항원 희석액을 준비하였다. 그리고 96 well 플레이트에 준비된 혈청 희석액을 각각 60 μ l씩 넣고, 마지막 2개의 well은 PBS만 60 μ l씩 넣은 후, 항원 희석액을 모든 well에 60 μ l씩 분주하였다. 그리고 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 후 결과를 확인하였다.

자. 연쇄상구균에 의한 다발성 장막염 진단법 개발 및 역학 조사

(1) 중합효소 연쇄반응을 이용한 다발성 장막염 감별 진단법 개발

농장에서 의뢰되는 가검물의 경우 부검장기가 냉장 또는 포르말린에 고정이 되어서 의뢰되는 경우가 증가하고 있다. 따라서 고전적인 진단법으로 사용하는 세균분리 검사만을 의존하는 진단 검사 방법을 사용하는데 제한이 있기 때문에 포르말린에 고정된 조직에서부터 다발성 장막염을 유발하는 연쇄상구균(*Streptococcus suis*), 헤모필러스균(*Haemophilus parasuis*), 마이코플라즈마균(*Mycoplasma hyorhinis*)의 유전자 DNA를 포르말린으로 고정하고, 파라핀에 포매된 조직에서부터 유전자를 추출하여 중합효소 연쇄반응을 이용하여 감별 진단법을 개발하고자 하였다.

중합효소 연쇄반응을 위한 프라이머는 연쇄상구균(*Streptococcus suis*)와 헤모필러스균(*Haemophilus parasuis*)의 경우 16S small subunit ribosomal RNA gene를 이용하여 설계하였으며, 마이코플라즈마균(*Mycoplasma hyorhinis*)의 경우 p37, p29와 p69의 유전자를 이용하여 설계하였다. 이들 유전자 정보는 Genbank (<http://www.ncbi.nlm.gov/Genbank/index.html>)에서 얻었으며 프라이머를 설계할 때에는 MegaAlign (DNASTAR Inc., Madison, WI) 와 Oligo(Molecular Biology Insights Inc., Cascade, CO.) 프로그램을 이용하여 제작한 후 NCBI BLAST 2.2.22+ (<http://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>)를 이용하여 다른 세균 또는 바이러스에서 동일한 유전자 존재 여부를 확인하여 어떠한 병원체에서도 본 연구에서 제작한 프라이머와 동일한 유전자 배열순서가 없는 것을 확인하였다.

표. 연쇄상구균(*Streptococcus suis*), 헤모필러스균(*Haemophilus parasuis*), 마이코플라즈마균(*Mycoplasma hyorhinis*)의 프라이머

Bacteria	Primer	Sequences (5'-3')	Location	Size (bp)
<i>H. parausis</i>	outer	F-GTGATGAGGAAGGGTGGTGT	393-412	316
		R-AGCGTCAGTATTTTCCCAAG	689-708	
	inner	F-AGAACATTACATTGACGTTAGTC	419-441	197
		R-TAAAATACTCTAGCAACCCAGTA	592-615	
<i>S. suis</i>	outer	F-AACGCTGAAGTCTGGTGCTT	38-57	228
		R-TGTATCGATGCCTTGGTGAG	246-265	
	inner	F-CTTGCCTAGACGGATGA	55-72	114
		R-TGCGGTAAATACTGTTATGC	149-168	
<i>M. hyorhinis</i>	outer	F-CATATGGCCACTTTTAGGG	1878-1897	366
		R-GGGATTGAAGTGGTTGTCTG	2226-2245	
	inner	F-TGACAATTTCCAAAAAGAGA	1918-1937	236
		R-AAAAAGGATTGTTCTTCAA	2134-2153	

중합효소 연쇄반응을 위하여 포르말린으로 고정하고, 파라핀에 포매 된 조직에서부터 유전자를 추출하고자 장막염이 관찰되는 파라핀 포매 조직을 10µm 두께로 10-15회 절편하여 1.5ml 튜브에 각각 넣어 준비하였다. 이 때 사용된 칼날과 포셉은 각 조직이 서로 섞이지 않도록 교환하여 사용하였다. 다음으로 파라핀 성분을 제거하기 위하여 파라핀 절편이 든 튜브에 자일렌(xylene) 1ml을 넣고 흔들어 40℃에서 10분 동안 녹인 후, 원심 분리하여 상층에 있는 자일렌을 제거하고 다시 한 번 같은 과정을 반복한다. 그리고 100% ethanol 1ml을 사용하여 2회 세척하고 남은 ethanol을 없애기 위해 진공건조를 시행한다. 그 후 digestion buffer 500µl씩 분주하고 proteinase K가 100µg 포함되도록 하여 56℃에서 1시간마다 흔들어주며 8시간 동안 반응시켜 조직을 충분히 분해시키고, 100℃에서 8분 동안 끓인다. 이 후는 Trizol LS(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 시약을 제조사 프로토콜에 따라 사용하여 DNA를 추출하여 0.8mM 수산화나트륨 용액에 DNA를 보관하였다.

연쇄상구균(*Streptococcus suis*), 헤모필러스균(*Haemophilus parausis*), 마이코플라즈마균(*Mycoplasma hyorhinis*)은 3가지 균에 대한 프라이머를 하나의 혼합물(mixture)로 만들어 검사하는 방법인 다중 중합효소 연쇄반응으로 검사하였으며 또한 첫 번째 실험결과물로 다시 한번 실험을 시행하는 이중 중합효소 연쇄반응방법으로 시행하였다. 첫 번째 다중 중합효소 연쇄반응은 50µl를 기준으로 하여, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 각각의 균에 대한 200nM의 전방향(forward)와 역방향(reverse) 프라이머, 2.5U의 TLA polymerase(Bioneer, Daejeon, Korea), 추출한 DNA 5µl를 각각 섞은 후, RNase와 DNase를 제거한 증류수를 첨가하여 50µl의 양이 되도록 맞춘 후 시행하였다. 두 번째 다중 중합효소 연쇄반응은 50µl 기준으로, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 각각 200nM의 전방향와 역방향 프라이머, 2.5U의 TLA polymerase, 그리고 첫 번째 다중 중합효소 연쇄반응의 결과물인 PCR products 10µl를 각각 섞고, RNase와 DNase를 제거한 증류수를 첨가하여 50µl의 양이 되도록 맞춘 조성을 사용하였다.

중합효소 연쇄반응은 GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)을 사용하여 시행하였다. 사용된 프로그램은 첫 번째 다중 중합효소 연쇄반응의 경우, 십

씨 95℃에서 10분 동안 가열 후, 95℃에서 30초, 57℃에서 45초, 68℃에서 30초를 반응시키는 과정을 40번 반복하고, 마지막으로 68℃에서 2분 동안 반응하도록 하였으며, 두 번째 다중 중합효소 연쇄반응의 프로그램은 섭씨 95℃에서 5분 가열한 뒤, 95℃에서 30초, 55℃에서 45초, 68℃에서 30초를 반응시키는 과정을 40번 반복하고, 마지막으로 68℃에서 2분 동안 반응하도록 하였다. 반응이 끝난 후, 10μl를 0.02% ethidium bromide를 첨가한 2% agarose gel에 30분 동안 전기영동 하여 연쇄상구균(*Streptococcus suis*), 헤모필러스균(*Haemophilus parasuis*), 마이코플라즈마균(*Mycoplasma hyorhinis*) 각각의 DNA를 검출하였다.

(2) 조직내 교잡법을 이용한 다발성 장막염 감별 진단법 개발

중합효소 연쇄반응을 이용해서 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매된 조직에서도 연쇄상구균(*Streptococcus suis*), 헤모필러스균(*Haemophilus parasuis*), 마이코플라즈마균(*Mycoplasma hyorhinis*) 세균의 유전자를 검출할 수가 있지만 가끔 이러한 세균이 병변을 유발하지 않음에도 불구하고 중합효소 연쇄반응에서는 유전자가 검출되는 경우가 있으므로 다발성 장막염이 유발된 병변에서 조직내 교잡법(in situ hybridization)을 이용하여 직접 다발성 장막염이 유발된 병변에서부터 이들 연쇄상구균, 헤모필러스균, 마이코플라즈마균을 진단하면 가장 유효한 진단법이 된다. 따라서 본 연구를 통하여 조직내 교잡법을 통하여 이들 세균의 유전자를 검출하고자 하였다(Choi, et al. 1999).

(3) 연쇄상구균에 의한 다발성 장막염 역학 조사

본 연구를 위하여 348마리의 돼지 가검물 중에서 다발성 장막염의 여부를 병리조직학적 검사를 통하여 312마리를 선정하였다. 본 실험에서 선정한 312마리의 연령 분포도를 보면 1주령에서 4주령 사이의 포유자돈이 58두, 5주령에서 10주령 사이의 이유자돈이 169두, 11주령에서 15주령 사이의 육성돈이 85두이었다.

3. 연쇄상 구균(*Streptococcus suis*) 예방 백신의 공격접종 시험 및 보존성 시험

가. 연쇄상구균증 백신의 특성 시험 및 무균시험

(1) 특성시험

3번의 백신 제조를 통해 3개 Lot을 만들어 동물용의약품 생물학제제 일반검정기준에 따라 시험백신에 대한 색, 혼탁도, 침전물의 유무와 색체 이물에 대하여 100 룩스 광도에서 검사하고, 이취에 대해서도 검사한다.

(2) 무균시험

동물용의약품 생물학제제 일반검정기준에 따라 백신 제조 후 9개월이 경과된 시점에서 Nutrient agar(NA), Nutrient broth(NB), Thioglycollate(Thio) 배지에 각각 접종하여 22℃ 및 37℃에서 각각 배양 관찰 하며, 같은 시점에서 Mycoplasma는 PCR을 통해 오염여부를 확인하여 양성이 나타날 경우 배양을 실시한다.

나. 연쇄상구균증 백신의 공격 접종 실험 방어 판정 근거

(1) 임상 증상

연쇄상구균증의 임상증상이 나타날 경우, 증상의 정도에 따라 다음의 표에 기술된 기준에 의거하여 임상점수를 부여하여 평가하였으며, 개체의 총 점수는 4가지 기준에 의거하여 각각 부여된 점수의 총합으로 나타내었다(Jacobs, et al. 1996).

임상점수	임상증상			
	행동 장애	호흡 장애	보행 장애	신경 장애
0	정상	정상	정상	정상
1	반응이 느림	호흡수가 약간 증가	한 개의 다리를 절룩임	-
2	운동을 꺼림	호흡수가 증가	두 개의 다리를 절룩임	-
3	빈사 상태 폐사	빈호흡 폐사	두 개 이상을 절룩임 폐사	경직, 경련, 마비 폐사

(2) 육안 병변

시험종료 시기인 7주령에서 안락사 시킨 후 부검하여 다발성 장막염이 관찰될 경우, 흉강, 심낭, 복강의 3가지 부위에 대하여 정도에 따라 다음의 표에 기술된 기준에 의거하여 점수를 부여하였다. 개체의 총 점수는 각각의 부위에 대해 장막과, 강에 부여한 점수의 총합으로 나타내었다(Blanco, et al. 2008).

(3) 병리조직학적 병변

시험 종료 시기인 7주령에서 안락사 시킨 후 부검하여 폐, 심장, 간, 비장, 장을 샘플링 하였으며, 연쇄상구균 2형 접종군의 경우는 뇌를 포함하였다. 검체는 중성 포르말린으로 고정 후 탈수시켜 파라핀으로 포매한 후에 3µm 두께로 잘라 H&E (hematoxylin & eosin) 염색을 하여 현미경하에서 관찰하고 조직 슬라이드의 번호는 그룹명과 관련성이 없도록 명기한 후 관찰하여, 객관적으로 병변의 유무를 판정할 수 있도록 하였다. 각 장기의 뇌막 또는 장막에서 섬유소성 화농성 장막염이 관찰될 경우, 다발성 장막염에서 개체의 점수는 병변이 관찰된 장기의 종류 합계로 나타내었다.

섬유소성 병변유무	관찰 장기					
	뇌	폐	심장	간	비장	장
0	뇌막 또는 장막에 섬유소성 병변 또는 화농성 병변이 관찰되지 않음					
1	뇌막 또는 장막에 섬유소성 병변 또는 화농성 병변이 관찰됨					

다. 실험동물을 이용한 연쇄상구균증 백신의 단일 혈청형 공격 접종 실험

(1) 실험 디자인

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법
1	5	O	X	X
2	5	O	혈청형 2형	복강내
3	5	X	혈청형 2형	복강내
4	5	O	혈청형 3형	복강내
5	5	X	혈청형 3형	복강내
6	5	O	혈청형 4형	복강내
7	5	X	혈청형 4형	복강내
8	5	X	X	X

15~20g의 BALB/c SPF(specific pathogen free) 마우스 암컷을 40마리를 다음의 표와 같이 5마리씩 8개의 군으로 나눈 후, 그룹 1, 2, 4, 6그룹에 0.2ml의 연쇄상구균증 백신을 복강에 접종한 후, 3주령에 0.2ml의 백신을 복강에 2차 접종하였다. 그리고 공격접종을 시행하기 전에 연쇄상구균 혈청형 2, 3, 4형을 brain heart infusion broth에 horse serum 2%, yeast extract 2%씩 첨가한 배양액을 사용하여 37℃의 진동배양기에서 배양하여, 배양액을 원심분리를 통해 제거하고 멸균 PBS에 희석하여 1×10^7 CFU/ml로 각각 준비하였다. 2차 백신 접종 2주 후에 공격접종을 실시하였으며, 2, 3형과 4형 연쇄상구균을 2~7번 군의 마우스 복강에 1ml씩 접종하였다. 공격접종 후 2주간 1주일에 2회씩 임상증상과 폐사 상황을 관찰하였으며, 폐사 직전이라고 판단될 경우와 실험종료인 공격접종 후 2주 후에 모두 부검을 실시하여 육안 병변 정도와 현미경 상에서의 병변을 관찰하였으며, 각각의 기준에 의하여 점수를 부여하였다. 전체적인 실험의 디자인은 상기의 표와 같으며 이와 같은 공격접종실험을 3번 반복하여 실시하였다.

조직병리학적 병변을 평가하기 위하여, 부검 후 폐, 심장, 간, 비장, 장을 각각 샘플링하였다. 각 조직은 10% 중성 포르말린에서 24시간 동안 고정하여 세척, 탈수 과정을 거쳐 파라핀으로 포매하였으며, 3µm 두께로 잘라 H&E 염색을 하였다. 조직 슬라이드의 번호는 그룹명과 관련성이 없도록 명기 한 후 현미경하에서 관찰하여, 객관적으로 병변의 유무를 판정할 수 있도록 하였다.

혈액 내 항체의 역가를 측정하기 위하여 접종 전과 1차 접종 후 14, 28, 35일 시기에 채혈하였으며, 응집 반응을 통하여 항체의 역가를 측정하였다. 각각의 연쇄상구균 혈청형을 위와 같은 방법으로 배양한 후, 10000g, 15분 동안 원심분리 후, 멸균 PBS로 세척 후 540nm의 흡광도에서 분석할 때 0.33의 O.D 값이 되도록 희석한 후, 방부제인 NaNO_3 를 1:10000으로 희석하여 섞은 후, 4℃에서 보관하였다. 혈청은 멸균 PBS에 2배씩 단계 희석을 하여 준비하여 50µl 씩 혈청 희석액과 항원 희석액을 각각 96 well 플레이트에 분주한 후, 37℃에서 48시간 동안 반응시켜 결과를 확인하였다.

각 그룹간 개체의 응집항체가, 임상증상, 육안병변과 조직병리학적 점수를 통계분석하기 위하

여 Kruskal-Wallis 테스트 후 Mann-Whitney 테스트를 실시하였으며, 폐사율을 분석하기 위하여 Chi-square 테스트를 실시하였다. 모든 통계분석은 P<0.05일 경우 유의한 것으로 판정하였다.



라. 실험동물을 이용한 연쇄상구균증 백신의 복수 혈청형 공격 접종 실험

(1) 실험 디자인

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법
1	5	O	X	X
2	5	O	혈청형 2와 3형	복강내
3	5	X	혈청형 2와 3형	복강내
4	5	O	혈청형 2와 4형	복강내
5	5	X	혈청형 2와 4형	복강내
6	5	O	혈청형 3와 4형	복강내
7	5	X	혈청형 3와 4형	복강내
8	5	O	혈청형 2, 3와 4형	복강내
9	5	X	혈청형 2, 3와 4형	복강내
10	5	X	X	X

15-20g의 BALB/c SPF(specific pathogen free) 마우스 암컷 40마리를 다음의 표와 같이 5 마리씩 10개의 군으로 나눈 후, 그룹 1, 2, 4, 6, 8그룹에 0.2ml의 연쇄상구균증 백신을 복강에 접종한 후, 3주령에 0.2ml의 백신을 복강에 2차 접종하였다. 그리고 공격접종을 시행하기 전에 연쇄상구균 혈청형 2, 3, 4형을 brain heart infusion broth에 horse serum 2%, yeast extract 2%씩 첨가한 배양액을 사용하여 37℃의 진동배양기에서 배양하여, 배양액을 원심분리를 통해 제거하고 멸균 PBS에 희석하여 각각의 혈청형을 조합한 희석액이 1X10⁷ CFU/ml 이 되도록 준비하였다. 2차 백신 접종 2주 후에 공격접종을 실시하였으며, 조합된 연쇄상구균 혈청형을 2~9번 군의 마우스 복강에 1ml씩 접종하였다. 공격접종 후 2주간 1주일에 2회씩 임상증상과 폐사 상황을 관찰하였으며, 폐사 직전이라고 판단될 경우와 실험종료인 공격접종 후에 2주가 경과된 시점에 모두 부검을 실시하여 육안 병변 정도와 현미경 상에서의 병변을 관찰하였으며, 각각의 기준에 의하여 점수를 부여하였다. 전체적인 실험의 디자인은 상기의 표와 같으며 이와 같은 공격접종실험을 3번 반복하여 실시하였다.

조직병리학적 병변을 평가하기 위하여, 부검 후 폐, 심장, 간, 비장, 장을 각각 샘플링하였다. 각 조직은 10% 중성 포르말린에서 24시간 동안 고정하여 세척, 탈수 과정을 거쳐 파라핀으로 포매하였으며, 3 μ m 두께로 잘라 H&E 염색을 하였다. 조직 슬라이드의 번호는 그룹명과 관련성이 없도록 명기한 후 현미경하에서 관찰하여, 객관적으로 병변의 유무를 판정할 수 있도록 하였다.

혈액 내 항체의 역가를 측정하기 위하여 접종 전과 1차 접종 후 14, 28, 35일 시기에 채혈하였으며, 응집 반응을 통하여 항체의 역가를 측정하였다. 각각의 연쇄상구균 혈청형을 위와 같은 방법으로 배양한 후에 15분 동안 원심(10,000g)분리 한후에 멸균 PBS로 세척 후 540nm의 흡광도에서 분석 할 때 0.33의 O.D 값이 되도록 희석한 후, 방부제인 NaN3를 1:10000으로 희석하여 섞은 후, 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 혈청은 멸균 PBS에 2배씩 단계 희석을 하여 준비하여 50 μ l씩 혈청 희석액과 항원 희석액을 각각 96 well 플레이트에 분주한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 반응시켜 결과를 확인하였다.

각 그룹간 개체의 응집항체가, 임상증상, 육안병변과 조직병리학적 점수를 통계분석하기 위하여 Kruskal-Wallis 테스트 후 Mann-Whitney 테스트를 실시하였으며, 폐사율을 분석하기 위하여 Chi-square 테스트를 실시하였다. 모든 통계분석은 P<0.05일 경우 유의한 것으로 판정하였다.



마. 돼지(자돈)을 이용한 연쇄상구균증 백신의 단일 혈청형 공격 접종 실험

(1) 실험 디자인

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법
1	8	O	X	X
2	8	O	혈청형 2형	정맥내
3	8	X	혈청형 2형	정맥내
4	8	O	혈청형 2형	복강내
5	8	X	혈청형 2형	복강내
6	8	O	혈청형 3형	복강내
7	8	X	혈청형 3형	복강내
8	8	O	혈청형 4형	복강내
9	8	X	혈청형 4형	복강내
10	8	X	X	X

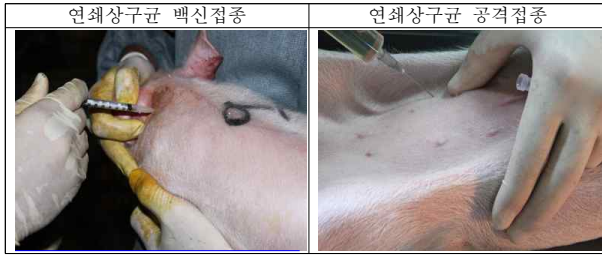
1주령 돼지 80마리를 연쇄상구균증이 진단되지 않은 농장에서 구입하여, 다음의 표와 같이 8마리씩 10개의 군으로 나눈 후, 1주령에 그룹 1, 2, 4, 6, 8그룹에 1ml의 연쇄상구균증 백신을 이근부에 접종한 후, 3주령에 1ml의 백신을 이근부에 2차 접종하였다. 그리고 공격접종 전 연쇄상구균 혈청형 2, 3, 4형을 brain heart infusion broth에 horse serum 2%, yeast extract 2%씩 첨가한 배양액을 사용하여 37℃의 진동배양기에서 배양하여, 배양액을 원심분리를 통해 제거하고 멸균 PBS에 희석하여 1×10^5 CFU/ml로 각각 준비하였다. 2차 백신 접종 2주 후에 공격접종을 실시하였으며, 혈청형 2형은 다른 혈청형에 비하여 신경증상을 자주 일으키기 때문에 뇌의 병변을 유발시키기 위하여 2, 3그룹에는 경정맥에 균액 2ml를 접종하고, 4, 5그룹에는 복강에 4ml를 접종하는 2가지 방식으로 나누어 공격접종 하였고, 3형과 4형은 복강에 4ml 접종을 실시하였다. 공격접종 후 2주간 1주일에 2회씩 임상증상과 폐사 상황을 관찰하였으며, 실험종료인 7주령에서 부검을 실시하여 육안 병변 정도와 현미경 상에서의 병변을 관찰하여, 각각의 기준에 의하여 점수를 부여하였다. 전체적인 실험의 디자인은 상기의 표와 같으며 이와 같은 공격접종실험을 3번 반복하여 실시하였다.

조직병리학적 병변을 평가하기 위하여, 부검 후 뇌, 폐, 심장, 간, 비장, 공장, 회장, 맹장, 결장을 각각 샘플링하였다. 각 조직은 10% 중성 포르말린에서 24시간 동안 고정하여 세척, 탈수 과정을 거쳐 파라핀으로 포매하였으며, 3µm 두께로 잘라 H&E 염색을 실시하였다. 조직 슬라이드의 번호는 그룹명과 관련성이 없도록 명기한 후에 현미경하에서 관찰하여, 객관적으로 병변의 유무를 판정할 수 있도록 하였다.

혈액 내 항체의 역가를 측정하기 위하여 1, 3, 5, 6주령에 채혈하였으며, 응집 반응을 통하여 항체의 역가를 측정하였다. 각각의 연쇄상구균 혈청형을 위와 같은 방법으로 배양한 후, 10000g, 15분 동안 원심분리 후, 멸균 PBS로 세척 후에 540nm의 흡광도에서 분석 할때 0.33의 O.D 값이 되도록 희석한 후에 방부제인 NaN3를 1:10,000으로 희석하여 섞은 후에 4℃에서 보관하였다. 혈청은 멸균 PBS에 2배씩 단계 희석을 하여 준비하여 50µl씩 혈청 희석액과 항원 희석액을 각각 96 well 플레이트에 분주한 후, 37℃에서 48시간 동안 반응시켜 결과를 확인하였다.

각 그룹간 개체의 응집항체가, 임상증상, 육안병변과 조직병리학적 점수를 통계분석하기 위하여 Kruskal-Wallis 테스트 후 Mann-Whitney 테스트를 실시하였으며, 폐사율을 분석하기 위

하여 Chi-square 테스트를 실시하였다. 모든 통계분석은 P<0.05일 경우 유의한 것으로 판정하였다.



마. 돼지(자돈)를 이용한 연쇄상구균증 백신의 복수 혈청형 공격 접종 실험

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법
1	8	O	X	X
2	8	O	혈청형 2와 3형	복강내
3	8	X	혈청형 2와 3형	복강내
4	8	O	혈청형 2와 4형	복강내
5	8	X	혈청형 2와 4형	복강내
6	8	O	혈청형 3와 4형	복강내
7	8	X	혈청형 3와 4형	복강내
8	8	O	혈청형 2, 3와 4형	복강내
9	8	X	혈청형 2, 3와 4형	복강내
10	8	X	X	X

1주령 돼지 80마리를 연쇄상구균증이 진단되지 않은 농장에서 구입하여, 다음의 표와 같이 8마리씩 10개의 군으로 나눈 후, 1주령에 그룹 1, 2, 4, 6, 8그룹에 1ml의 연쇄상구균증 백신을 이근부에 접종한 후, 3주령에 1ml의 백신을 이근부에 2차 접종하였다. 그리고 공격접종 전 연쇄상구균 혈청형 2, 3, 4형을 brain heart infusion broth에 horse serum 2%, yeast extract 2%씩 첨가한 배양액을 사용하여 37℃의 진동배양기에서 배양하여, 배양액을 원심분리를 통해 제거하고 멸균 PBS에 희석하여 1X10⁵ CFU/ml로 각각 준비하였다. 2차 백신 접종 2주 후에 공격접종을 실시하였으며, 혈청형 2형+3형, 2형+4형, 3형+4형, 2형+3형+4형을 조합하여 전체 CFU가 1X10⁵ CFU/ml이 되도록 희석한 후, 복강에 4ml씩 접종을 실시하였다. 공격접종 후 2주간 1주일에 2회씩 임상증상과 폐사 상황을 관찰하였으며, 실험종료인 7주령에서 부검을 실시하여 육안 병변 정도와 현미경 상에서의 병변을 관찰하여, 각각의 기준에 의하여 점수를 부여하였다. 전체적인 실험의 디자인은 상기의 표와 같으며 이와 같은 공격접종실험을 3번 반복하여 실시하였다.

조직병리학적 병변을 평가하기 위하여, 부검 후 뇌, 폐, 심장, 간, 비장, 공장, 회장, 맹장, 결

장을 각각 샘플링하였다. 각 조직은 10% 중성 포르말린에서 24시간 동안 고정하여 세척, 탈수 과정을 거쳐 파라핀으로 포매하였으며, 3µm 두께로 잘라 H&E 염색을 실시하였다. 조직 슬라이드의 번호는 그룹명과 관련성이 없도록 명기한 후 현미경하에서 관찰하여, 객관적으로 병변의 유무를 판정할 수 있도록 하였다.

혈액 내 항체의 역가를 측정하기 위하여 1, 3, 5, 6주령에 채혈하였으며, 응집 반응을 통하여 항체의 역가를 측정하였다. 각각의 연쇄상구균 혈청형을 위와 같은 방법으로 배양한 후, 10000g, 15분 동안 원심분리 후에 멸균 PBS로 세척 후 540nm의 흡광도에서 분석할 때 0.33의 O.D 값이 되도록 희석한 후, 방부제인 NaN3를 1:10,000으로 희석하여 섞은 후, 4℃에서 보관하였다. 혈청은 멸균 PBS에 2배씩 단계 희석을 하여 준비하여 50µl씩 혈청 희석액과 항원 희석액을 각각 96 well 플레이트에 분주한 후, 37℃에서 48시간 동안 반응시켜 결과를 확인하였다.

각 그룹간 개체의 응집항체가, 임상증상, 육안병변과 조직병리학적 점수를 통계분석하기 위하여 Kruskal-Wallis 테스트 후 Mann-Whitney 테스트를 실시하였으며, 폐사율을 분석하기 위하여 Chi-square 테스트를 실시하였다. 모든 통계분석은 P<0.05일 경우 유의한 것으로 판정하였다.



사. 연쇄상구균증 백신 보존성 시험

각각 4℃에서 보관한지 6개월, 12개월, 18개월이 지난 시점의 연쇄상구균증 백신을 2kg의 New Zealand White종 토끼 5마리에게 2주 간격으로 2회 접종하고 2차 접종부터 2주가 경과된 시점에서 혈청을 채취하여 평판 응집반응(microplate agglutination test)을 실시하였다.

2배 희석한 혈청을 멸균 PBS에 2배씩 10번 희석하여 마지막이 1,024배가 되도록 혈청 희석액을 준비하였다. 각각의 연쇄상구균 혈청형을 brain heart infusion broth에서 배양하여, 10000g, 15분 동안 원심분리 후에 멸균 PBS로 세척하였다. 그리고 540nm의 흡광도에서 분석할 때 0.33의 O.D 값이 되도록 희석하고, 방부제인 NaN3를 1:10,000으로 희석하여 섞은 후, 4℃에서 보관하였다. 혈청은 멸균 PBS에 2배씩 단계 희석을 하여 준비하여 50µl씩 혈청 희석액과 항원 희석액을 각각 96 well 플레이트에 분주한 후, 37℃에서 48시간 동안 반응시켜 결과를 확인하였다.

4. 연쇄상 구균(*Streptococcus suis*) 예방 백신의 야외 적용 시험

가. 1차 연쇄상구균증 백신 접종 후 안전성 시험

(1) 1차 백신 접종 후 전제 안전성 시험

안전성 시험은 7일령에 1차 백신 접종 후 30분, 1시간, 4시간 후에 측정하고, 그 후 매일 동일한 시간에 안정성 여부를 확인하였다.

나. 2차 연쇄상구균증 백신 접종 후 안전성 시험

(1) 2차 백신 접종 후 전제 안전성 시험

안전성 시험은 7일령에 1차 백신 접종 후 30분, 1시간, 4시간 후에 측정하고, 그 후 매일 동일한 시간에 안정성 여부를 확인하였다.

임상점수	임상증상			
	행동 장애	호흡 장애	보행 장애	신경 장애
0	정상	정상	정상	정상
1	반응이 느림	호흡수가 약간 증가	한 개의 다리를 절룩임	-
2	운동을 꺼림	호흡수가 증가	두 개의 다리를 절룩임	-
3	빈사 상태 폐사	빈호흡 폐사	두 개 이상을 절룩임 폐사	경직, 경련, 마비 폐사

다. 백신 접종군과 미접종군에서 성장 증체 비교 시험

(1) 3개 농장에서 연쇄상구균에 의한 다발성 장막염 발병 확인

최근 서울대 수의과대학 병리학실에 검체를 의뢰한 농장 중 돼지 연쇄상구균으로 진단된 농장 3개를 선정하여, 신경증상, 위축, 호흡기 증상, 보행의 이상 등 농장 내 자돈의 임상 증상을 직접 확인하고 의심되는 자돈들을 부검한 후, 육안변변 상 다발성 장막염 및 임을 확인하였다. 병변을 swab하여 실험실에서 혈액배지에 바른 후, 37℃의 배양기에 넣고 24시간 동안 호기성 배양을 하여 연쇄상구균 콜로니(colony)의 형태학적 특징을 갖춘 독립된 콜로니를 확인하고 콜로니에서 DNA를 추출하여 돼지 연쇄상구균에 특이적인 프라이머를 사용한 중합효소 연쇄반응을 시행하여 돼지 연쇄상구균을 동정하여 농장에서 연쇄상구균으로 인한 다발성 장막염의 발병을 확인하였다.

(2) 3개농장에서 각각 20두씩 2개 그룹을 선정하여 백신접종군과 미접종군으로 시험 실시

돼지 연쇄상구균으로 인한 다발성 장막염이 확인된 3개 농장에서 1주령 자돈을 암수 관계없

이 각각 25마리씩 무작위로 선별하여 총 50마리를 선별한 후, 1주 후 체중과 활력을 고려하여 1주령의 자돈을 각각 20마리씩 2개군으로 총 40마리를 최종 선별하였다. 선택된 자돈의 임상 증상과 체온을 확인하고 이근부에 폐지 연쇄상구균 백신을 1ml씩 접종한 후, 접종 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간 간격으로 임상증상과 체온을 확인하여 백신의 안전성을 시험하였다. 2주 후 3주령의 자돈에 추가로 1ml씩 2차 접종을 실시하였으며 같은 시간 간격으로 백신의 안전성을 시험하였다. 시험은 16주령에 종료하였으며, 1, 5, 12, 16주에 체중 측정과 채혈을 실시하여 질병예방으로 인한 증체량의 차이와 주령별 응집 항체가의 변화를 확인하였다. 실험이 진행되는 기간 동안 1주 간격으로 임상증상을 확인하여 기록하였으며, 도중에 폐사한 자돈은 부검을 시행하였다.

라. 백신 접종군과 미접종군에서 임상 시험 비교 시험

(1) 백신접종군과 미접종군간의 백신 접종 전 피모, 창백, 호흡수, 활력도, 호흡기, 및 소화기 증상 등의 임상증상을 비교하였다.

(2) 백신 접종군과 미 접종군 간의 백신 접종 후 피모, 창백, 호흡수, 활력도, 호흡기, 및 소화기 증상 등의 임상증상을 비교하였다.

(3) 백신 접종군과 미 접종군 간의 백신 접종 후 1주 간격으로 시험 종료까지 피모, 창백, 호흡수, 활력도, 호흡기, 및 소화기 증상 등의 임상증상을 비교하였다.

제 3 절 결과와 고찰

1. 연쇄상 구균(*Streptococcus suis*) 예방백신 제작용 표준균주 제작

가. 국내 분리 연쇄상구균 혈청형 분석

국내 양돈장에서 의뢰된 돼지중에서 혐유소성 심의막염과 복막염이 관찰되는 이유자돈에서 총 28개의 연쇄상구균을 분리하였고, 분리한 연쇄상구균을 응집반응으로 혈청형을 분석한 결과 아래와 같다.

혈청형	분리 균수
2형	2
3형	7
4형	5
7형	3
8형	2
16형	1
22형	1
33형	2
Non-typable	3
Auto-agglutinant	2
합계	28

검사결과 국내에서 분리한 연쇄상구균중 혈청형 3형(분리균수 7개)이 가장 흔하게 분리되었으며, 4형과 7형 순서로 분리되었다.

나. 유전자 특성을 이용한 백신 후보 균주의 면역원성 검사

중합효소연쇄반응을 통하여 본 연구에서 분리한 28개의 균주에 대한 검사 분석 결과 아래와 같다.

연쇄상구균 일련번호	혈청형	<i>epf</i> 유전자	<i>mrp</i> 유전자
1	3	X	O
2	2	O	O
3	7	X	X
4	3	X	O
5	3	X	O
6	Non-typable	X	X
7	8	X	X
8	7	X	X
9	7	X	X
10	3	X	X
11	22	X	X
12	3	X	O
13	4	X	X
14	Auto-agglutinant	X	X
15	Non-typable	X	X
16	16	X	X
17	4	X	X
18	4	X	O
19	8	X	X
20	33	X	X
21	33	X	X
22	4	X	X
23	Auto-agglutinant	X	X
24	3	X	X
25	2	X	O
26	Non-typable	X	X
27	3	X	X
28	4	X	O

중합효소연쇄반응 검사 결과 혈청형 2형의 연쇄상구균에서만 EF 유전자인 *epf* (그림 1)를 보유하고 있었으며, 8개의 균주에서 MRP 유전자인 *mfp* (그림 2)를 보유하고 있었다.

그림 1. *epf* PCR. PCR product의 크기는 626 base pair이다. M: 100bp ladder; 1: 3형 균주; 2: 양성대조

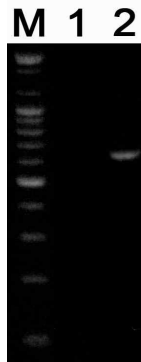
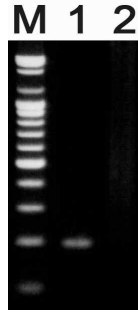


그림 2. mrp PCR 후 전기영동 사진. PCR product의 크기는 188 base pair이다. M: 100bp ladder; 1: 3형 균주; 2: 음성대조



다. 실험동물을 이용한 면역원성 검사

토끼에게 2주 간격으로 2회 접종하고 2차접종후 2주간 경과된 시점에서 혈청을 채취하여 응집반응을 통하여 항체 형성 추이를 관찰한 결과는 다음과 같았다.

연쇄상구균 일련번호	혈청형	항체 형성가
1	3	1:4096
3	7	1:1024
4	3	1:512
5	3	1:2048
8	7	1:2048
9	7	1:1024
12	3	1:1024
18	4	1:2048

라. 연쇄상구균 3형의 염기서열 분석

BLAST 결과, 일본의 1, 1/2, 2형과 덴마크의 25형에서 시퀀스가 동일한 Genbank 자료가 있었으며, 그 외에 캐나다, 영국, 한국의 혈청형을 알 수 없는 연쇄상구균의 염기서열이 동일하였다.

```

33  AGTAGAACGC TGAAGTCTGG TGCTTGCACT AGACGGATGA GTTGCGAACG GGTGAGTAAC
93  GCGTAGGTAA CTGCCTCAT AGCGGGGGAT AACTATTGGA AACGATAGCT AATACCGCAT
153 AACAGTATTT ACCGCATGGT AGATGCTTGA AAGGAGCAAC TGCTTACTA TGAGATGGAC
213 CTGCGTTGTA TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA CGGCTACCA AGGCTTCGAT ACATAGCCGA
273 CCTGAGAGGG TGATCGGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT ACGGGAGGCA
333 GCAGTAGGGA ATCTTCGCA ATGGGGGCAA CCCTGACCGA GCAACGCCG GTGAGTGAAG
393 AAGGTTTTTCG GATCGTAAAG CTCTGTTGTA AGAGAAGAAC TGTGAGAAGA GTGGAAAGTT
453 TCTCACTTGA CGGTATCTTA CCAGAAAGGG ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA
    
```

513 ATACGTAGGT CCCGAGCGTT GTCGGATTT ATTGGGCGTA AAGCGAGCGC AGGCGGTTTG
 573 ATAAGTCTGA AGTAAAAGGC TGTGGCTTAA CCATAGTACG CTTTGGAAC TGTCAAACTT
 633 GAGTGCAGAA GGGGAGAGTG GAATTCATG TGTAGCGGTG AAATGCGTAG ATATATGGAG
 693 GAACACCGGT GGC GAAAGCG GCTCTCTGGT CTGTAAGTGA CGCTGAGGCT CTAAGCGGTG
 753 GGGAGCGAAC AGGATTATAT ACCCTGGTAG TCCACGCCG AAACATATGAG TGCTAGGTGT
 813 TGGGTCCTTT CCGGACTCA GTGCCGAGC TAACGCATTA AGCACTCCG CTGGGGAGTA
 873 CGACCACAAG GTTGAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT
 933 GGTTTAATTC GAAGCAACGC GAAGAACCTT ACCAGGTCTT GACATCCCGA TGACCGCCCT
 993 AGAGATGGGG TTTCTCTCG GAGCATCGGT GACAGGTGGT GCATGGTTGT CGTCAGCTCG
 1053 TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCCTATGTGT AGTTGCCATC
 1113 ATTCAGTTGG GCACTCTAGC GAGACTGCCG GTAATAAAC GGAGGAAGGT GGGGATGACG
 1173 TCAAATCATC ATGCCCTTA TGACCTGGGC TACACACGTG CTACAATGGC TGGTACAACG
 1233 AGTCGCAAGT CGGTGACGGC AAGCTAATCT CTAAAGCCA GTCTCAGTTC GGATTGTAGG
 1293 CTGCAACTCG CCTACATGAA GTCGGAATCG CTAGTAAT

마. 백신 표준 균주 계대 방법 확립

연쇄상구균 3형(일련번호 1)와 4형(일련번호 18)의 경우 면역원성에 중요한 인자인 mrp 유전자를 30 계대 동안 지속적으로 보유하는 지를 확인 하였다. 또한 제1계대후의 균주로 제작한 백신과 연속 30 계대후의 균주로 제작한 백신을 토끼에게 접종한 결과 형성되는 항체수준의 변화의 유무를 확인하였다. 또한 각각의 연속 계대 사이에 중합효소 연쇄반응을 통하여 백신 후보로 선정된 균주인 연쇄상구균 3형(일련번호 1)와 4형(일련번호 18)의 경우 면역원성에 중요한 인자인 mrp 유전자를 30 계대 동안 지속적으로 보유하는 것을 확인하였다. 또한 제1계대후의 균주로 제작한 백신과 연속 30 계대후의 균주로 제작한 백신을 토끼에게 접종한 결과 형성되는 항체수준의 변화가 없는 것을 확인하였다. 이러한 결과 본 연구에서 사용하는 백신주의 계대 방법이 백신 균주의 유전적 또는 면역원성의 변화를 일으키지 않는 매우 안정적인 균주로 확인되었다.

백신 후보 균주	면역원성 변화		mrp 유전자 보유	
	제 1 계대후	제 30 계대후	제 1 계대후	제 30 계대후
3형(일련번호 1)	1:4096	1:4096	보유	보유
4형(일련번호 18)	1:2048	1:2048	보유	보유
7형(일련번호 8)	1:2048	1:2048	미보유	미보유

바. 백신 표준 균주 대량 배양 방법 확립

표준 돼지 연쇄상구균을 냉동보관에서 꺼내어 가능한 빠르게 녹인 후 바로 백금으로 혈액 배지에 바른다. 그 후 약 12시간이 경과된 후, 오염 유무를 확인하고 독립된 콜로니를 멸균 면봉으로 수거하여 다시 혈액 배지 또는 trypticase soy 배지 (TSA) 1개에 바르고, brain heart infusion (BHI) 배양액을 200ml 제조하여 멸균시켜 준비한다. 셋째 날, 클린벤치 안에서 1% horse serum과 1% yeast extract를 멸균시킨 BHI 배양액 200ml에 첨가하고, 그 중 5ml를 뽑아 배양된 세균을 멸균 면봉으로 풀어 부유시킨다. 이를 배양액에 넣은 후 12시간 동안 37℃의 배양기에서 150rpm의 속도로 교반, 증균시킨다. 그리고 증균된 200ml는 일부 뽑아서 다시 오염 유무를 확인한 후, 앞서 기술한 내용과 같은 방법으로 사용하여 대량 배양한다.

사. 백신 표준 균주 이용한 백신 제조

앞서 대량 배양한 돼지 연쇄상구균 배양액을 4℃로 냉장시키기 전 단계적으로 10배 희석시켜 혈액배지에 발라 생성되는 콜로니의 수를 확인하여 1ml 당 105 colony forming unit (CFU) 이상이 되는지 검사한다. 검사를 통과하면 전체 양의 0.7~0.8%만큼의 포르말린을 첨가하고, 4℃의 교반 배양기로 이동시켜 불활화 시킨다. 24시간 이상 교반한 후, 일부 불활화 된 배양액을 뽑아 혈액 배지에 발라서 불활화 되었는지 검사한다. 다음 날 완전히 불활화된 것이 확인되면, 부형제(adjuvant)로서 알루미늄 겔(aluminium hydroxide gel)을 10% 만큼 첨가하고, 12시간 동안 교반시킨다.

2. 연쇄상 구균(*Streptococcus suis*) 예방 백신의 면역원성 및 안전성 연구

가. 연쇄상구균증 백신 함유 혈청형 결정

2000년부터 2008년까지 서울대학교 수의과 대학에 의뢰된 장막염이 관찰됐던 312두의 파라인 포매 조직에서 핵산을 추출해 증합효소연쇄반응법으로 검사한 결과, 특히 포유자돈의 경우 연쇄상구균과 헤모필러스균의 단일 감염 분포가 각각 25두와 21두로 거의 유사한 분포를 보였다. 그러므로 본 백신의 최초 1년차 연구개발계획은 연쇄상구균증으로 인한 다발성 장막염의 예방에 중점을 두어 3형, 4형 및 7형을 포함하는 백신을 개발하는 것이었다. 하지만 현재 연쇄상구균은 자돈에서 신경증상을 동반하는 세균성 뇌막염을 주 병변으로 하는 질병의 원인체로 양돈가에 널리 알려져 있고, 때문에 현재 시중의 연쇄상구균증 백신 또한 그러한 증상의 예방에 초점이 맞춰져있다. 그러므로 본 백신이 뇌막염 예방이 가능한 동시에 국내에서 빈발하는 혈청형을 이용하여 다발성 장막염도 예방 가능하도록 개발된다면 기존 백신보다 더욱 효용 가치가 높을 것이다. 따라서 2년차 연구개발에서는 가장 병원성이 높고 대부분의 연쇄상구균증 뇌막염을 일으키는 것으로 알려진 연쇄상구균 2형을 새로 포함하였고, 3, 4형에 비해 영향이 적은 7형은 배제하였다. 또한 선택된 균주는 최초 1년차 연구와 마찬가지로 높은 면역원성을 가지는 muramidase-released protein (MRP)을 가진 균이며, 특히 새로 추가된 2형은 뇌막염의 발병과 밀접하게 연관되며 면역원성도 갖는 인자인 extracellular factor (EF)를 동시에 가진 균으로 결정하였다.

나. 연쇄상구균 2형과 4형의 염기서열 분석

백신후보균주로 선정된 연쇄상구균 2형의 경우 연쇄상구균이 보유하고 있는 16s ribosomal RNA sequence (10-1325 bp)을 증폭하여 유전자 염기서열을 분석하였다. BLAST 결과, 일본의 2형과 동일한 Genbank 자료가 있었으며, 그 외에 네덜란드, 캐나다, 중국, 한국의 혈청형을 알 수 없는 연쇄상구균의 염기서열이 동일하였다. 연쇄상구균 4형의 경우 연쇄상구균이 보유하고 있는 16s ribosomal RNA sequence (6-1309 bp)을 증폭하여 유전자 염기서열을 분석하였다. BLAST 결과, 네덜란드의 혈청형을 알 수 없는 연쇄상구균의 염기서열만이 동일하였다.

연쇄상구균 2형

10 GCGGGTGCTA TAATGCAGTA GAACGCTGAA GTCTGGTGCT TGCCTAGAC GGATGAGTTG
70 CGAACGGGTG AGTAACGCGT AGGTAACCTG CCTCATAGCG GGGGATAACT ATTGAAACG
130 ATAGCTAATA CCGATAACA GTATTTACCG CATGGTAGAT ATTTGAAAGG AGCAATTGGT
190 TCACTATGAG ATGGACCTGC GTTGTATTAG CTAGTTGGTG AGGTAACGGC TCACCAAGGC
250 TTCGATACAT AGCCGACCTG AGAGGGTGAT CGGCACACTG GGACTGAGAC ACGGCCAGA
310 CTCTACGGGA GGCAGCAGTA GGGAACTTTC GGCAATGGGG GCAACCCTGA CCGAGCAACG
370 CCGCGTGAGT GAAGAAGGTT TTCGGATCGT AAAGCTCTGT TGTAAGAGAA GAACGTGTAG
430 AAGAGTGGAA AGTTTCTCAC TTGACGGTAT CTTACCAGAA AGGGACGGCT AACTACGTGC
490 CAGCAGCCGC GGTAATACGT AGGTCCCAG CGTTGTCCGG ATTTATTGGG CGTAAAGCGA
550 GCGCAGCGCG TTTGATAAGT CTGAAGTAAA AGGCTGTGGC TTAACCATAG TACGCTTTGG
610 AAAGTGTCAA ACTTGAGTGC AGAAGGGGAG AGTGAATTC CATGTGTAGC GGTGAAATGC
670 GTAGATATAT GGAGGAACAC CGGTGGCGAA AGCGGCTCTC TGGTCTGTAA CTGACGCTGA
730 GGCTCGAAAG CGTGGGGAGC GAACAGGATT AGATACCCGT GTAGTCCACG CCGTAAACGA
790 TGAGTGTAG GTGTGGGGT CTTTCCGGGA CTCAGTGCCG CAGCTAACGC ATTAAGCACT
850 CCGCTGGGG AGTACGACC GCAAGTTGAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG GCCCGCACAA
910 GCGGTGGAGC ATGTGGTTTA ATTCGAAGCA ACGCAAGAA CCTTACCAGG TCTTGACATC
970 CCGATGACCG CCCTAGAGAT AGGGTTTCTC TTCGGAGCAT CGGTGACAGG TGGTGCATGG
1030 TTGTCGTCAG CTCGTGTCTG GAGATGTTGG GTTAAAGTCCC GCAACGAGCG CAACCCCTAT
1090 TGTTAGTTGC CATCATTCAG TTGGGCACTC TAGCGAGACT GCCGGTAATA AACC GGAGGA
1150 AGGTGGGGAT GACGTCAAAT CATCATGCCC CTTATGACCT GGGCTACACA CGTGCTACAA
1210 TGCTGTGTAC AACGAGTCCG AAGTCCGGTA CCGCAAGCTA ATCTCTTAAA GCCAGTCTCA
1270 GTTCGGATTG TAGGCTGCAA CTCGCCTACA TGAAGTCGGA ATCGCTAGTA ATCGCG

연쇄상구균 4형

6 GTGCTATAAT GCAGTAGAAC GCTGAAGTCT GGTGCTTGCA CTAGACGGAT GAGTTGCGAA
66 CGGGTGAGTA ACGCGTAGGT AACCTGCCTC ATAGCGGGGG ATAACATTG GAAACGATAG
126 CTAATACCGC ATAACAGTAT TTACCCGATG GTAGATGCTT GAAAGGAGCA ACTGCTTAC
186 TATGAGATGG ACCTGCCTTG TATTAGCTAG TTGTGNGTAA CGGCTCCACC AAGGCTTCGA
246 TACATAGCCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCTA
306 CGGGAGGCG CAGTAGGGAA TCTTCGGCAA TGGGGGCAAC CCTGACCGAG CAACGCCGCG
366 TGAGTGAAGA AGGTTTTCGG ATCGTAAAGC TCTGTTGTAA GAGAAGAACT GTGAGAAGAG
426 TGGAAAGTTT CTCACTTGAC GGTATCTTAC CAGAAAGGGA CGGCTAACTA CGTGCCAGCA
486 GCCGCGGTAA TACGTAGGTC CCGAGCGTTG TCCGGATTTA TTGGGCGTAA AGCGAGCGCA
546 GGCGGTTTGA TAAGTCTGAA GTAAAAGGCT GTGGCTTAAC CATAGTACCG TTTGAAAACCT
606 GTCAAACCTG AGTGCAGAAG GGGAGAGTGG AATTCATGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA
666 TATATGGAGG AACACCGGTG GCGAAAGCGG CTCTCTGGTC TGTAACCTGAC GCTGAGGCTC
726 GAAAGCGTGG GGAGCGAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCACGCCGTA AACGATGAGT
786 GCTAGGTGTT GGGTCTTTC GGGGACTCAG TGCCGCACT AACGCAATTA GCACCTCCGC
826 TGGGGAGTAC GACCGCAAGG TTGAAACTCA AAGGAATTGA CGGGGGCCCC CACAAGCGGT
886 GGAGCATGTG GTTTAATTCG AAGCAACGCG AAGAACCTTA CCAGGTCTTG ACATCCCGAT
946 GACCGCCCTA GAGATGGGGT TTCTCTTCGG AGCATCGGTG ACAGGTGGTG CATGGTTGTC
1006 GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CCTATTGTTA
1066 GTTGCCATCA TTCAGTTGGG CACTCTAGCG AGACTGCCG TAATAAACCG GAGGAAGGTG
1126 GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCAT GACCTGGGCT ACACAGCTGC TACAATGGCT
1186 GGTACAACGA GTCCCAAGTC GGTGACGGCA AGCTAATCTC TTAAGCCAG TCTCAGTTG
1246 GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG TCGGAATCGC TAGTAATCGC GATCAGCACC
1306 CCGC

다. 부형제 선정과 조합을 통한 백신 개발

부형제의 적정함량을 검증하기 위하여 1×10^{10} CFU/ml 의 균 배양액을 불활화하여 알루미늄 겔을 1%, 5%, 10%, 15%, 20% 씩 포함시킨 후, 4°C, 150 rpm의 진탕 배양기에서 24 시간동안 혼합시켜 백신을 제조하였다. 그리고 제조한 5개의 백신을 토끼에게 접종하여 부형제 함량에 따른 부작용을 관찰하였으며, 2주 간격으로 2회 접종하고 2차 접종 후 2주간 경과된 시점에서 혈청을 채취하여 응집반응을 통하여 항체 형성 추이를 관찰한 결과는 아래와 같다. 결론적으로 부형제 함량별 토끼의 부작용 관찰 결과, 특별한 부작용은 관찰되지 않았다.

연쇄상구균증 백신 부형제 함량	형성 항체가
1%	1:256
5%	1:1024
10%	1:2048
15%	1:2048
20%	1:2048

라. 불활화 확인

포르말린 함량	불활화 시간 (hr)	CFU/μl
0.3%	6	6.4×10^4
0.5%	6	2.3×10^4
0.7%	6	3.1×10^3
1%	6	2.0×10^2
0.3%	12	1.7×10^4
0.5%	12	7.7×10^3
0.7%	12	1.8×10^2
1%	12	3.2×10^1
0.3%	18	2.4×10^3
0.5%	18	6.4×10^1
0.7%	18	8.0×10^0
1%	18	0
0.3%	24	9.8×10^1
0.5%	24	2.1×10^1
0.7%	24	0
1%	24	0

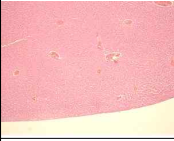
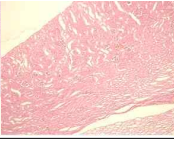
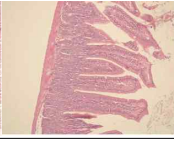
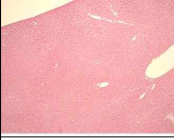
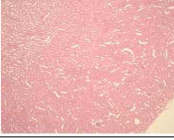

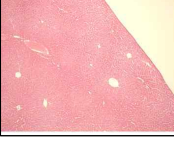
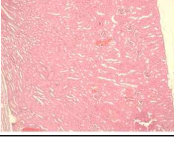
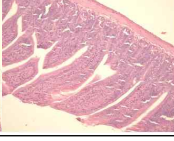
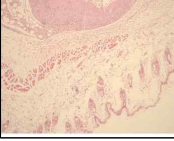
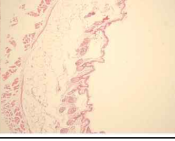
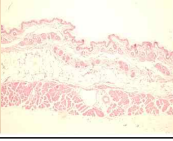
마. 실험동물을 이용한 연쇄상구균증 백신 안전성 실험

(1) 마우스를 이용한 연쇄상구균증 백신 안전성 실험

접종부위	접종량(ml)	개체번호	임상증상	병변
복강	0.25	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	0.5	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	1	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
피하	0.25	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	0.5	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	1	1	무증상	무병변
		2	무증상	접종부위 탈모
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	접종부위 탈모



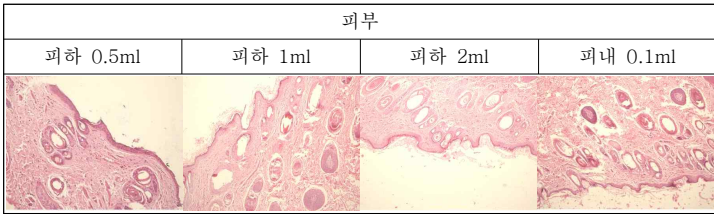
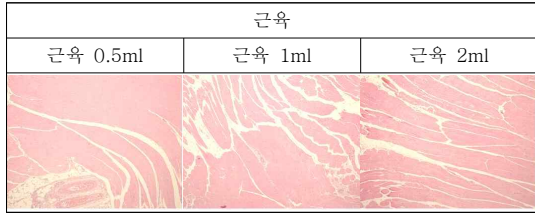
마우스 HE 염색 슬라이드

복강 0.25ml		
간	신장	장
		
복강 0.5ml		
간	신장	장
		
복강 1ml		
간	신장	장
		
피부		
피하 0.25ml	피하 0.5ml	피하 1ml
		

(2) 기니피그를 이용한 연쇄상구균증 백신 안전성 실험

접종부위	접종량(ml)	개체번호	임상증상	병변
근육	0.5	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	1	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	2	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
피하	0.5	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	1	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	2	1	무증상	접종부위 탈모
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	접종부위 탈모
피내	0.1	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변

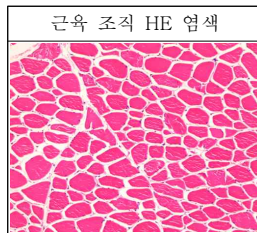




바. 돼지를 이용한 연쇄상구균증 백신 안전성 실험

(1) 자돈을 이용한 연쇄상구균증 백신 안전성 실험

접종부위	접종량(ml)	개체번호	과민반응	병변
근육	2	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변



사. 실험동물을 이용한 연쇄상구균 백신의 항체가 연구

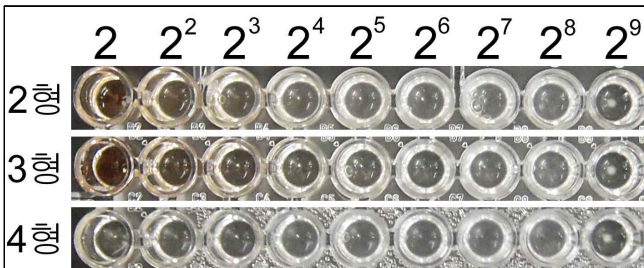
(1) 토끼를 이용한 연쇄상구균증 백신 항체가 연구

실험 동물	2형			3형			4형		
	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi
1	0	64	512	0	32	128	0	64	256
2	0	64	256	0	64	256	0	64	256
3	0	64	256	0	64	256	0	32	128
4	0	32	256	0	64	256	0	64	256
5	0	32	256	0	64	512	0	64	512
6	0	64	512	0	64	256	0	64	256

아. 돼지를 이용한 연쇄상구균 백신의 항체가 연구

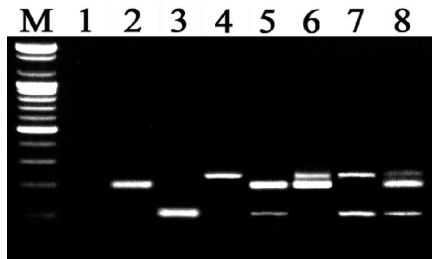
(1) 자돈을 이용한 연쇄상구균 증 백신 항체가 연구

실험 동물	2형			3형			4형		
	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi
1	0	32	256	0	64	256	0	32	256
2	0	32	256	0	64	256	0	64	256
3	0	64	256	0	32	128	0	64	256
4	0	32	128	0	32	128	0	32	128
5	0	32	256	0	64	256	0	64	256



자. 연쇄상구균에 의한 다발성 장막염 진단법 개발 및 역학 조사

(1) 중합효소 연쇄반응을 이용한 다발성 장막염 감별 진단법 개발



※그림 설명 : M; 래더, 1; 음성대조군, 2; 헤모필러스균 단독 감염, 3; 연쇄상구균 단독 감염, 4; 마이코플라즈마균 단독 감염, 5; 연쇄상구균과 헤모필러스균 복합 감염, 6; 헤모필러스균과 마이코플라즈마 복합 감염, 7; 연쇄상구균과 마이코플라즈마 복합감염, 8; 연쇄상구균, 헤모필러스균, 마이코플라즈마균 복합 감염

(2) 조직내 교잡법을 이용한 다발성 장막염 감별 진단법 개발

중합효소 연쇄반응을 이용해서 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매된 조직에서도 연쇄상구균 (*Streptococcus suis*), 헤모필러스균(*Haemophilus parasuis*), 마이코플라즈마균(*Mycoplasma hyorhinis*) 세균의 유전자를 검출할 수가 있지만 가끔 이러한 세균이 병변을 유발하지 않음에도 불구하고 중합효소 연쇄반응에서는 유전자가 검출되는 경우가 있으므로 다발성 장막염이 유발된 병변에서 조직내 교잡법(in situ hybridization)을 이용하여 직접 다발성 장막염이 유발된 병변에서부터 이들 연쇄상구균(*Streptococcus suis*), 헤모필러스균(*Haemophilus parasuis*), 마이코플라즈마균(*Mycoplasma hyorhinis*)를 진단하면 가장 유효한 진단법이 된다. 따라서 본 연구를 통하여 조직내 교잡법을 통하여 이들 세균의 유전자를 검출하고자 하였다.

(3) 연쇄상구균에 의한 다발성 장막염 역학 조사

검사한 312두중에서 224두에서는 최소한 한 개의 세균이 검출되었고, 88두에서는 최소 2개 이상의 세균이 검출되었다. 단일 감염에 의한 다발성 장막염이 있는 돼지 224두에서 연령별(포유자돈, 이유자돈, 육성돈)에서 연쇄상구균(*Streptococcus suis*), 헤모필러스균(*Haemophilus parasuis*), 마이코플라즈마균(*Mycoplasma hyorhinis*)의 분포도를 보면 아래의 표와 같다. 포유자돈의 경우 연쇄상구균과 헤모필러스균의 분포가 가장 흔하며, 이유자돈과 육성돈에서는 헤모필러스균의 감염이 가장 높다.

표. 단일 감염 돼지의 연령별 연쇄상구균(*Streptococcus suis*), 헤모필러스균(*Haemophilus parasuis*), 마이코플라즈마균(*Mycoplasma hyorhinis*)의 분포도

돼지	양성 돼지 숫자	세균 종류		
		<i>H. parasuis</i>	<i>S. suis</i>	<i>M. hyorhinis</i>
포유자돈	46	25	21	0
이유자돈	122	88	34	0
육성돈	56	48	6	2
합계	224	161	61	2

복합 감염에 의한 다발성 장막염이 있는 돼지 88두에서 연령별(포유자돈, 이유자돈, 육성돈)에서 연쇄상구균(*Streptococcus suis*), 헤모필러스균(*Haemophilus parasuis*), 마이코플라즈마균(*Mycoplasma hyorhinis*)의 분포도를 보면 아래의 표와 같다. 포유자돈, 이유자돈 육성돈 모두의 경우 연쇄상구균과 헤모필러스균의 복합감염의 분포가 가장 높다.

표. 복합 감염 돼지의 연령별 연쇄상구균(*Streptococcus suis*), 헤모필러스균(*Haemophilus parasuis*), 마이코플라즈마균(*Mycoplasma hyorhinis*)의 분포도

돼지	양성 돼지 숫자	세균 종류			
		<i>H. parasuis</i> + <i>S. suis</i>	<i>H. parasuis</i> + <i>M. hyorhinis</i>	<i>S. suis</i> + <i>M. hyorhinis</i>	<i>H. parasuis</i> + <i>S. suis</i> + <i>M. hyorhinis</i>
포유자돈	12	10	1	1	0
이유자돈	47	26	14	7	0
육성돈	29	14	10	2	3
합계	88	50	25	10	3

농장에서 다발성 장막염에서 지속적인 연쇄상구균 분리

본 연구의 1년차인 2009년에는 66건의 다발성 장막염이 관찰되는 부검장기 및 사체가 의뢰되었으며 그 중 28건에서 연쇄상구균이 분리 및 동정되었고, 22건에서 헤모필러스균이 분리 및 동정되었다. 주령별로 연쇄상구균은 포유자돈에서 6건, 이유자돈에서 11건, 육성돈 이상에서 11건이 분리되었고, 헤모필러스균은 이유자돈에서 15건, 육성돈 이상에서 7건이 분리되었다. 2년차인 2010년은 9월까지 의뢰된 다발성 장막염 건이 총 30건이며, 이 중 15건에서 연쇄상구균이 분리 및 동정되었고, 8건에서 헤모필러스균이 분리 및 동정되었다. 연령별로 연쇄상구균은 포유자돈에서 2건, 이유자돈에서 9건, 육성돈 이상에서 4건이 분리되었고, 헤모필러스균은 이유자돈에서 5건, 육성돈 이상에서 3건이 분리되었다. 전 해의 종합효소 연쇄반응 결과와 비교하였을 때 상대적으로 헤모필러스균의 분리횟수가 낮은 이유는 연쇄상구균에 비해 균분리 자체가 비교적 까다롭다는 사실에 기인할 것으로 추측된다. 하지만 여전히 높은 연쇄상구균 분리횟수 비율은 국내 양돈농장에서 지속적으로 연쇄상구균증이 문제를 일으키고 있으며, 상당한 경제적 피해를 입히고 있음을 시사한다.

3. 연쇄상 구균(*Streptococcus suis*) 예방 백신의 공격접종 시험 및 보존성 시험

가. 연쇄상구균증 백신의 특성 시험 및 무균시험

(1) 특성시험

Lot No.	결 과
Lot 1	적 합
Lot 2	적 합
Lot 3	적 합

3개 Lot 모두 옅은 황색의 혼탁한 부유액이며, 정치하면 내용물의 침전이 생기나 흔들면 쉽게 균등액이 되며 소분된 내용물의 성상이 균일하고 이물이 존재하지 않는다.

(2) 무균시험


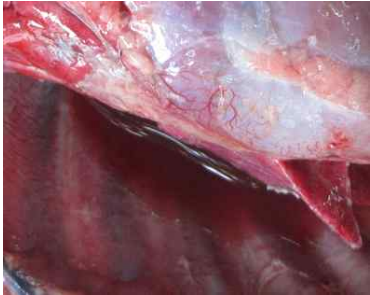



Lot No.	일반 세균			마이코플라즈마 (PCR 결과)
	시험배지	결 과 (7일간)		
		22℃	37℃	
Lot 1	NA	-	-	음 성
	NB	-	-	
	Thio	-	-	
Lot 2	NA	-	-	음 성
	NB	-	-	
	Thio	-	-	
Lot 3	NA	-	-	음 성
	NB	-	-	
	Thio	-	-	

※ - : 세균의 발육이 인정되지 않음

동물용 의약품 생물학제제 일반검정기준에 따른 시험백신의 무균시험 결과 3 Lot 모두 NA, NB, Thio에서 7일간 배양하였을 때 어떠한 세균 및 곰팡이의 발육도 나타나지 않았으며, 마이코플라즈마는 PCR 음성으로 확인되었다.

나. 연쇄상구균증 백신의 공격 접종 실험 방어 판정 근거

(1) 임상 증상 및 육안병변

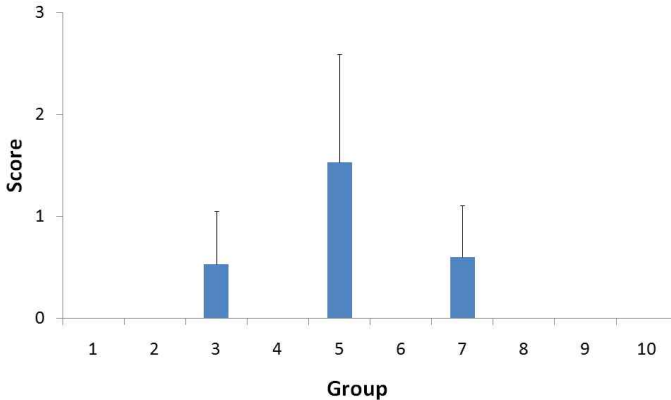
병변 점수	병변	
	장막	강
0	정상	정상
1	 <p>소수의 섬유소 가닥 관찰</p>	 <p>중등도의 삼출액 증가</p>
2	 <p>섬유소로 인해 유착됨</p>	 <p>심한 삼출액의 증가와 색의 변화</p>
3	 <p>섬유소로 막이 형성되며, 화농성 염증 관찰</p>	

다. 실험동물을 이용한 연쇄상구균증 백신의 단일 혈청형 공격 접종 실험

(1) 단일 혈청형 공격 접종 실험 임상 증상 점수 평균

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	5	O	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	5	O	혈청형 2형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
3	5	X	혈청형 2형	복강내	0.4±0.55	0.6±0.55	0.6±0.55
4	5	O	혈청형 3형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
5	5	X	혈청형 3형	복강내	2.2±1.64	1.2±0.45	1.2±0.45
6	5	O	혈청형 4형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
7	5	X	혈청형 4형	복강내	0.6±0.55	0.8±0.45	0.4±0.55
8	5	X	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

임상증상 점수



가장 차이가 컸던 접종 후 7일의 그룹별 임상증상 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 4와 5(P=0.008), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)(P=0.001)에서만 유의하게 차이가 있었으며, 그룹 2와 3(P=0.310), 그룹 6과 7(P=0.151)은 차이가 없었다. 제 2시험의 경우, 그룹 4와 5(P=0.008), 그룹 6과 7(P=0.032), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)(P<0.001)에서만 유의하게 차이가 있었으며, 그룹 2와 3(P=0.151)은 차이가 없었다. 제 3시험의 경우 또한, 그룹 4와 5(P=0.008), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)(P=0.001)에서만 유의하게 차이가 있었으며, 그룹 2와 3(P=0.151), 그룹 6과 7(P=0.310)은 차이가 없었다. 기존의 발표된 논문(Vecht U., et al. 1997. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 for mice and pigs appeared host-specific. *Veterinary Microbiology* 58:53-60)에 따르면, 가장 높은 병원성(EF+MRP+)을 가진 2형도 균주에 따라서 마우스에 대해 전혀 병원성이 없을 수 있거나 약독성인 경우가 있으므로, 이러한 결과의 원인으로서는 공격접종에 사용된 표준 균주가 그에 해당되는 가능성이 있다.

(2) 단일 혈청형 공격 접종 실험 폐사 두수 결과

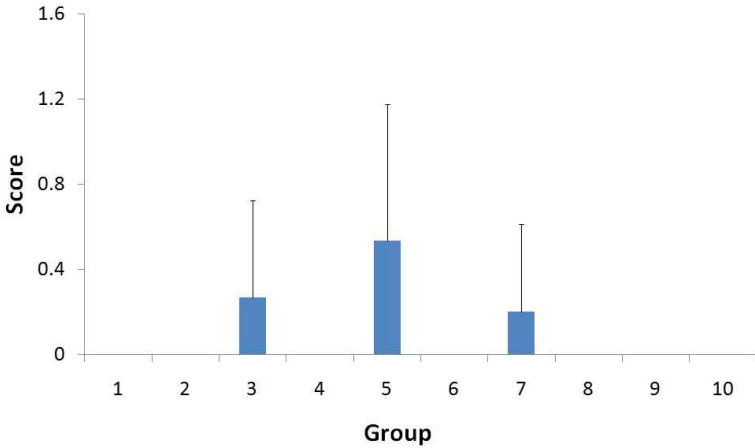
그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	5	O	X	X	0/5	0/5	0/5
2	5	O	혈청형 2형	복강내	0/5	0/5	0/5
3	5	X	혈청형 2형	복강내	0/5	0/5	0/5
4	5	O	혈청형 3형	복강내	0/5	0/5	0/5
5	5	X	혈청형 3형	복강내	1/5	0/5	0/5
6	5	O	혈청형 4형	복강내	0/5	0/5	0/5
7	5	X	혈청형 4형	복강내	0/5	0/5	0/5
8	5	X	X	X	0/5	0/5	0/5

그룹별 폐사율 분석 결과, 백신군과 비백신군 사이는 통계적인 차이가 없다. 이러한 결과의 원인으로서는, 임상증상 결과와 마찬가지로 표준 균주가 마우스에 감수성이 없는 균주일 가능성이 있다.

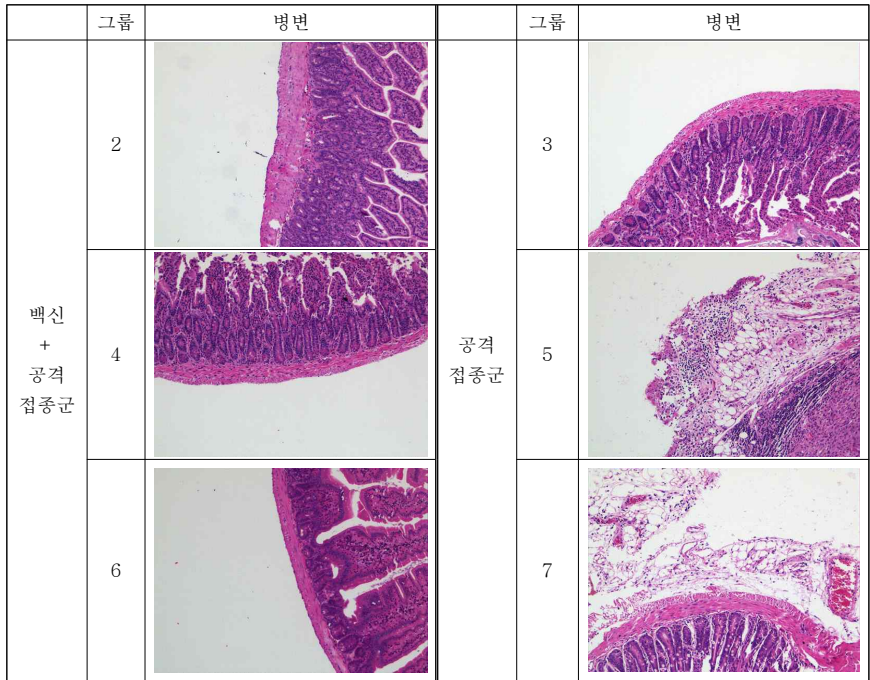
(3) 단일 혈청형 공격 접종 실험 병리조직학적 병변 결과

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	5	O	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	5	O	혈청형 2형	정맥내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
3	5	X	혈청형 2형	정맥내	0.2±0.45	0.4±0.55	0.2±0.45
4	5	O	혈청형 2형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
5	5	X	혈청형 2형	복강내	0.6±0.89	0.4±0.55	0.6±0.55
6	5	O	혈청형 3형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
7	5	X	혈청형 3형	복강내	0.2±0.45	0.2±0.45	0.2±0.45
8	5	O	혈청형 4형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

병리조직학적 병변 점수



그룹별 조직병리학적 병변의 평가 결과, 백신군과 비백신군 사이는 모두 통계적인 차이를 보이지 않는다. 이 중 3형의 경우, 임상증상 결과에서는 통계적인 차이를 보였음에도 병변에서는 그렇지 않았는데 이는 안락사가 필요할 정도의 임상증상은 보이지 않았으며, 접종 후 7일보다 접종 후 14일의 임상증상이 경미하게 나타난 것으로 보아 부검 시점에서는 경미한 병변만이 남은 것으로 생각된다.



(4) 단일 혈청형 공격 접종 실험 응집반응 항체가 결과

그룹	동물수	백신접종	시험횟수		
			1	2	3
1	8	O	104±33.1	152±67.9	136±53.4
2	8	O	120±22.6	128±59.3	100.6±34.2
3	8	X	0±0	0±0	0±0
4	8	O	144±74.6	144±74.6	100.6±34.2
5	8	X	0±0	0±0	0±0
6	8	O	112±29.6	128±59.3	96±34.2
7	8	X	0±0	0±0	0±0
8	8	O	120±63.4	152±67.9	112±29.6

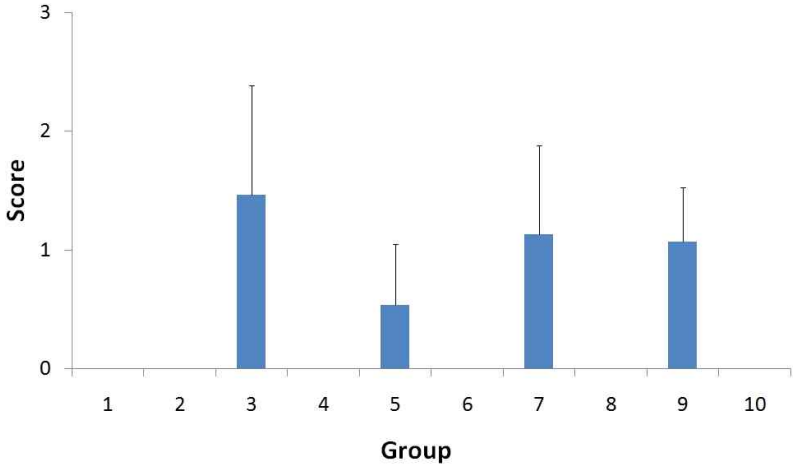
통계 분석 결과 각각의 혈청형에 따른 모든 공격접종군에서 백신군과 비백신군 사이에 차이가 있는 것으로 확인되었다. ($P < 0.001$)

라. 실험동물을 이용한 연쇄상구균증 백신의 복수 혈청형 공격 접종 실험

(1) 복수 혈청형 공격 접종 실험 임상 증상 결과

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	5	O	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	5	O	혈청형 2와 3형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
3	5	X	혈청형 2와 3형	복강내	1.8±1.1	1.2±0.45	1.4±0.89
4	5	O	혈청형 2와 4형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
5	5	X	혈청형 2와 4형	복강내	0.6±0.55	0.6±0.55	0.4±0.55
6	5	O	혈청형 3와 4형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
7	5	X	혈청형 3와 4형	복강내	1.0±0.71	1.4±0.89	1.0±0.71
8	5	O	혈청형 2, 3와 4형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
9	5	X	혈청형 2, 3와 4형	복강내	1.0±0.71	1.0±0.00	1.2±0.45
10	5	X	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

임상증상 점수



그룹별 임상증상 평가 결과, 단일 혈청형 접종실험과 마찬가지로 3형이 포함되지 않은 군은 통계적인 차이를 보이지 않았다. 제 1시험에서 그룹 2와 3($P=0.008$), 그룹 6과 7($P=0.032$), 그룹 8과 9($P=0.032$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 유의하게 차이가 있었으며, 그룹 4와 5($P=0.151$)는 차이를 보이지 않았다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P=0.008$), 그룹 6과 7($P=0.008$), 그룹 8과 9($P=0.008$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 유의하게 차이가 있었으며, 그룹 4와 5($P=0.151$)는 차이를 보이지 않았으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3($P=0.032$), 그룹 6과 7($P=0.032$), 그룹 8과 9($P=0.008$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 유의하게 차이가 있었으며, 그룹 4와 5($P=0.310$)는 차이를 보이지 않았다.

(2) 복수 혈청형 공격 접종 실험 폐사 두수 결과

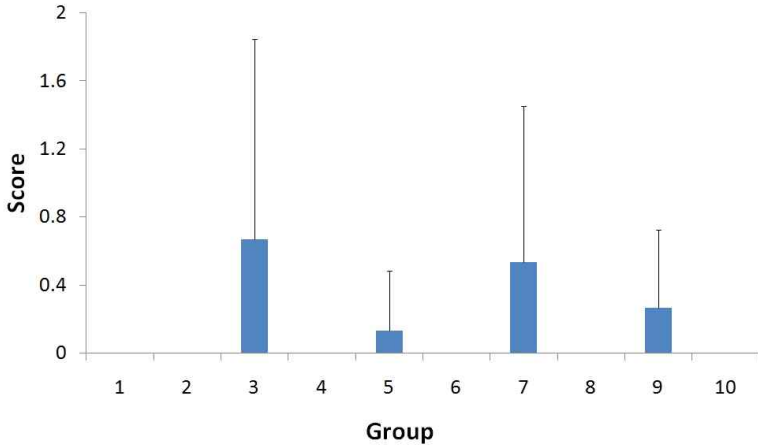
그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	5	O	X	X	0/5	0/5	0/5
2	5	O	혈청형 2와 3형	복강내	0/5	0/5	0/5
3	5	X	혈청형 2와 3형	복강내	0/5	0/5	0/5
4	5	O	혈청형 2와 4형	복강내	0/5	0/5	0/5
5	5	X	혈청형 2와 4형	복강내	0/5	0/5	0/5
6	5	O	혈청형 3와 4형	복강내	0/5	0/5	0/5
7	5	X	혈청형 3와 4형	복강내	0/5	0/5	0/5
8	5	O	혈청형 2, 3와 4형	복강내	0/5	0/5	0/5
9	5	X	혈청형 2, 3와 4형	복강내	0/5	0/5	0/5
10	5	X	X	X	0/5	0/5	0/5

복합 혈청형 공격접종 실험에서는 폐사가 나오지 않았으며, 이는 균주가 마우스에 대하여 약독성 혹은 무독성이기 때문인 것으로 생각된다.

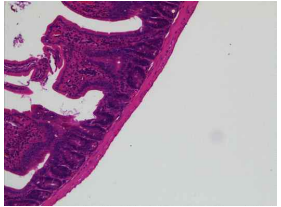
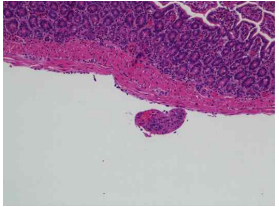

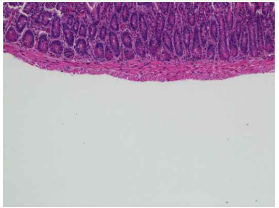

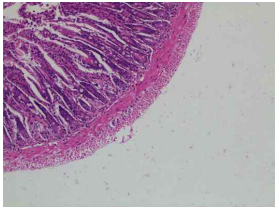
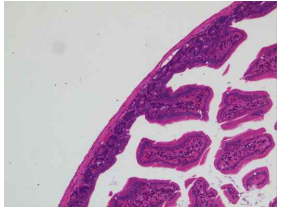
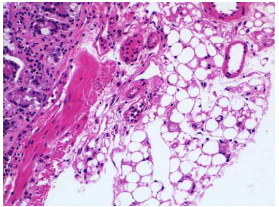
(3) 복수 혈청형 공격 접종 실험 병리조직학적 병변 결과

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	5	O	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	5	O	혈청형 2와 3형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
3	5	X	혈청형 2와 3형	복강내	0.4±0.89	0.4±0.89	0.6±1.34
4	5	O	혈청형 2와 4형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
5	5	X	혈청형 2와 4형	복강내	0.00±0.00	0.2±0.45	0.2±0.45
6	5	O	혈청형 3와 4형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
7	5	X	혈청형 3와 4형	복강내	0.4±0.89	0.4±0.89	0.4±0.89
8	5	O	혈청형 2, 3와 4형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
9	5	X	혈청형 2, 3와 4형	복강내	0.2±0.45	0.2±0.45	0.4±0.55
10	5	X	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

병리조직학적 병변 점수



그룹별 조직병리학적 병변의 평가 결과, 백신군과 비백신군 사이는 모두 통계적인 차이를 보이지 않는다. 이 중 3형의 경우, 임상증상 결과에서는 통계적인 차이를 보였음에도 병변에서는 그렇지 않았는데 이는 안락사가 필요할 정도의 임상증상은 보이지 않았으며, 접종 후 7일보다 접종 후 14일의 임상증상이 경미하게 나타난 것으로 보아 부검 시점에서는 경미한 병변만이 남은 것으로 생각된다.

	그룹	병변		그룹	병변
백신 + 공격 접종군	2		공격 접종군	3	
	4			5	
	6			7	
	8			9	

(4) 복합 혈청형 공격 접종 실험 응집반응 항체가 결과 (2차 백신 접종 2주 후)

그룹	동물수	백신접종	시험횟수		
			1	2	3
1	5	O	136±74.6	128±59.3	128±59.3
2	5	O	96±59.3	104±33.1	112±29.6
3	5	X	0±0	0±0	0±0
4	5	O	92±79.8	128±59.3	136±53.4
5	5	X	0±0	0±0	0±0
6	5	O	92±63.4	104±33.1	104±33.1
7	5	X	0±0	0±0	0±0
8	5	O	96±33.1	112±29.6	120±22.6
9	5	X	0±0	0±0	0±0
10	5	X	0±0	0±0	0±0

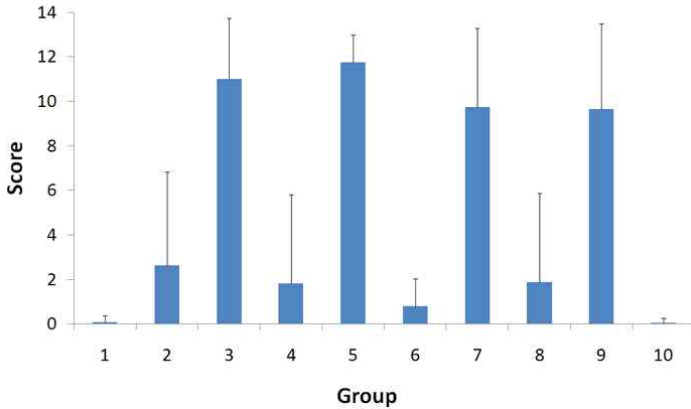
통계 분석 결과 각각의 혈청형에 따른 모든 공격접종군에서 백신군과 비백신군 사이에 차이가 있는 것으로 확인되었다. ($P < 0.001$)

마. 돼지(자돈)을 이용한 연쇄상구균증 백신의 단일 혈청형 공격 접종 실험

(1) 단일 혈청형 공격 접종 실험 임상 증상 점수 평균

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	0.00±0.00	0.13±0.35	0.13±0.35
2	8	O	혈청형 2형	정맥내	0.63±3.11	3.63±5.45	2.63±4.03
3	8	X	혈청형 2형	정맥내	9.17±4.49	11.13±2.47	12.00±0.00
4	8	O	혈청형 2형	복강내	1.75±4.20	1.75±4.20	2.00±4.11
5	8	X	혈청형 2형	복강내	12.0±0.00	11.25±2.12	12.00±0.00
6	8	O	혈청형 3형	복강내	0.88±1.36	0.63±1.19	0.88±1.36
7	8	X	혈청형 3형	복강내	8.00±4.43	10.50±2.98	10.25±3.28
8	8	O	혈청형 4형	복강내	3.13±5.49	0.63±1.41	1.88±4.12
9	8	X	혈청형 4형	복강내	9.00±4.82	9.50±3.46	9.75±4.17
10	8	X	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.13±0.35

임상증상 점수



그룹별 임상증상 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3($P=0.001$), 그룹 4와 5($P=0.002$), 그룹 6과 7($P=0.001$), 그룹 8과 9($P=0.021$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P=0.015$), 그룹 4와 5($P=0.002$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3($P=0.002$), 그룹 4와 5($P=0.002$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P=0.003$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 연쇄상구균 감염시 백신이 병증을 감소시킴을 확인하였다.

단일 혈청형 공격 접종 실험 폐사 두수 결과

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	0/8	0/8	0/8
2	8	O	혈청형 2형	정맥내	1/8	2/8	1/8
3	8	X	혈청형 2형	정맥내	6/8	7/8	6/8
4	8	O	혈청형 2형	복강내	2/8	1/8	1/8
5	8	X	혈청형 2형	복강내	8/8	7/8	8/8
6	8	O	혈청형 3형	복강내	0/8	0/8	0/8
7	8	X	혈청형 3형	복강내	4/8	6/8	6/8
8	8	O	혈청형 4형	복강내	2/8	0/8	1/8
9	8	X	혈청형 4형	복강내	6/8	5/8	6/8
10	8	X	X	X	0/8	0/8	0/8

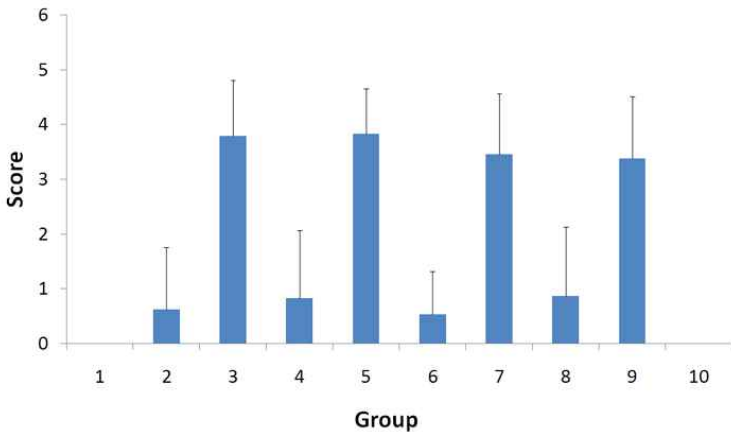
그룹별 폐사율 분석 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3($P=0.041$), 그룹 4와 5($P=0.007$)는 유의

한 차이가 있었으나, 그룹 6과 7($P=0.077$), 그룹 8과 9($P=0.132$)에서는 차이를 보이지 않았다. 하지만 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)의 비교에서는 유의한 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P=0.041$), 그룹 4와 5($P=0.01$), 그룹 6과 7($P=0.007$), 그룹 8과 9($P=0.026$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3($P=0.041$), 그룹 4와 5($P=0.001$), 그룹 6과 7($P=0.007$), 그룹 8과 9($P=0.041$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 연쇄상구균 감염 때에 백신이 폐사율을 감소시킴을 확인하였다.

단일 혈청형 공격 접종 실험 육안 병변 결과

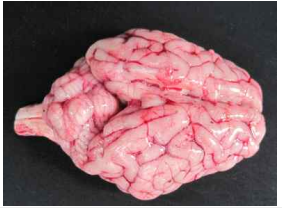
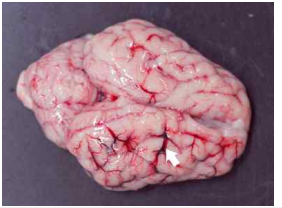




그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	8	O	혈청형 2형	정맥내	0.75±1.04	1.13±1.55	0.00±0.00
3	8	X	혈청형 2형	정맥내	3.63±1.19	3.63±1.19	4.13±0.64
4	8	O	혈청형 2형	복강내	0.75±1.16	0.88±1.36	0.88±1.36
5	8	X	혈청형 2형	복강내	4.00±0.76	3.88±0.83	3.63±0.92
6	8	O	혈청형 3형	복강내	0.38±0.74	0.63±0.74	0.63±0.92
7	8	X	혈청형 3형	복강내	3.38±1.41	3.63±1.06	3.38±0.92
8	8	O	혈청형 4형	복강내	1.13±1.89	0.75±0.71	0.75±1.04
9	8	X	혈청형 4형	복강내	3.38±1.41	3.25±1.16	3.50±0.93
10	8	X	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

육안병변 점수



그룹별 육안병변의 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3($P=0.001$), 그룹 4와 5($P<0.001$), 그룹 6과 7($P=0.001$), 그룹 8과 9($P=0.021$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3,

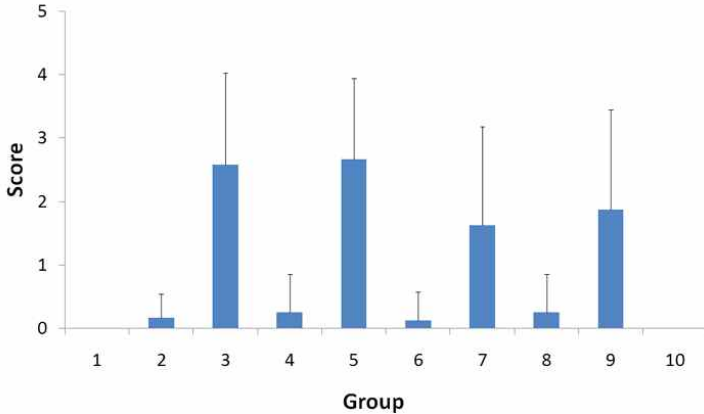
5, 7, 9)($P < 0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P = 0.007$), 그룹 4와 5($P = 0.002$), 그룹 6과 7($P < 0.001$), 그룹 8과 9($P = 0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P < 0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3($P < 0.001$), 그룹 4와 5($P = 0.003$), 그룹 6과 7($P < 0.001$), 그룹 8과 9($P = 0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P < 0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 연쇄상구균 감염할 때 백신이 다발성 장막염을 감소시킴을 확인하였다.

	그룹	병변		그룹	병변
백신 + 공격 접종군	2		공격 접종군	3	
	4			5	
	6			7	

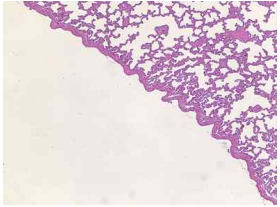
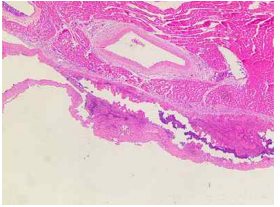
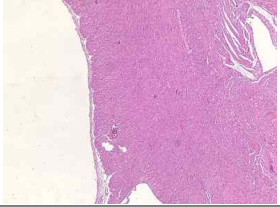
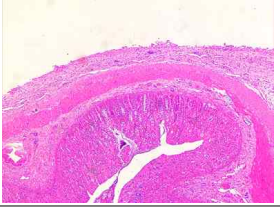
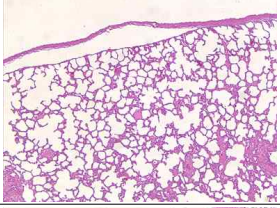
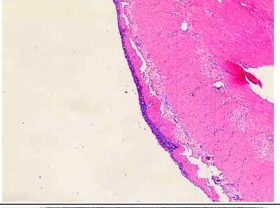
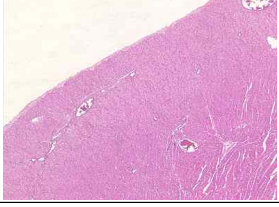
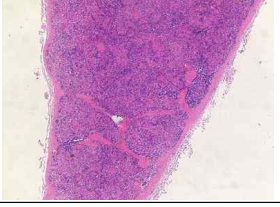
단일 혈청형 공격 접종 실험 병리조직학적 병변 결과

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	8	O	혈청형 2형	정맥내	0.25±0.46	0.25±0.46	0.00±0.00
3	8	X	혈청형 2형	정맥내	2.25±1.91	2.38±1.19	3.13±1.13
4	8	O	혈청형 2형	복강내	0.25±0.46	0.25±0.71	0.25±0.71
5	8	X	혈청형 2형	복강내	2.50±1.07	2.63±0.92	2.88±1.81
6	8	O	혈청형 3형	복강내	0.38±0.74	0.00±0.00	0.00±0.00
7	8	X	혈청형 3형	복강내	1.25±1.49	1.75±1.28	1.88±1.96
8	8	O	혈청형 4형	복강내	0.38±0.74	0.38±0.74	0.00±0.00
9	8	X	혈청형 4형	복강내	1.88±1.73	2.13±1.73	1.63±1.41
10	8	X	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

병리조직학적 병변 점수



그룹별 조직병리학적 병변의 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3(P=0.021), 그룹 4와 5(P<0.001), 그룹 8과 9(P=0.050), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)(P<0.001)에서 유의하게 차이가 있음을 나타내었으나 그룹 6과 7(P=0.195)에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 하지만 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3(P=0.001), 그룹 4와 5(P=0.001), 그룹 6과 7(P<0.01), 그룹 8과 9(P=0.021), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)(P<0.001)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3(P<0.001), 그룹 4와 5(P=0.001), 그룹 6과 7(P<0.01), 그룹 8과 9(P=0.01), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)(P<0.001)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 연쇄상구균 감염할 때 백신이 섬유소성 염증을 감소시킴을 확인하였다.

	그룹	병변		그룹	병변
백신 + 공격 접종군	2		공격 접종군	3	
	4			5	
	6			7	
	8			9	

단일 혈청형 공격 접종 실험 응집반응 항체가 결과 (2차 백신 접종 후 2주 후)

그룹	동물수	백신접종	시험횟수		
			3	5	6
1	8	O	136±53.4	152±67.9	136±53.4
2	8	O	105.1±40.1	128±59.3	100.6±34.2
3	8	X	0±0	0±0	0±0
4	8	O	96±45.3	144±74.6	100.6±34.2
5	8	X	0±0	0±0	0±0
6	8	O	92±39.9	128±59.3	96±34.2
7	8	X	0±0	0±0	0±0
8	8	O	104±33.1	152±67.9	112±29.6
9	8	X	0±0	0±0	0±0
10	8	X	0±0	0±0	0±0

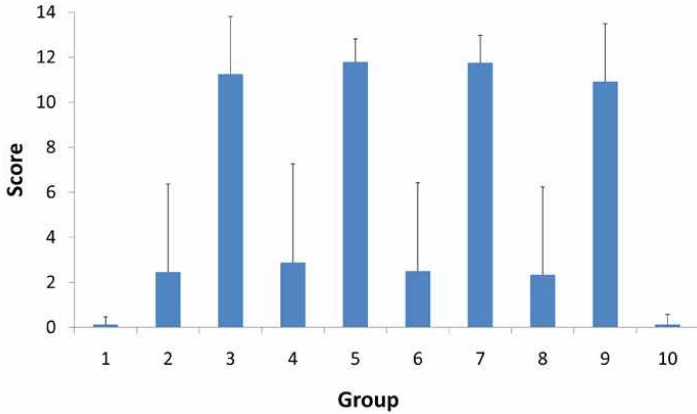
통계 분석 결과 각각의 혈청형에 따른 모든 공격접종군에서 백신군과 비백신군 사이에 차이가 있는 것으로 확인되었다. ($P<0.001$)

바. 돼지(자돈)를 이용한 연쇄상구균증 백신의 복수 혈청형 공격 접종 실험

(1) 복수 혈청형 공격 접종 실험 임상 증상 결과

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	0.13±0.35	0.13±0.35	0.13±0.35
2	8	O	혈청형 2와 3형	복강내	1.25±1.83	2.38±4.07	3.75±5.18
3	8	X	혈청형 2와 3형	복강내	9.75±4.20	12.00±0.00	12.00±0.00
4	8	O	혈청형 2와 4형	복강내	2.13±4.09	4.13±5.17	2.38±4.14
5	8	X	혈청형 2와 4형	복강내	11.38±1.77	12.00±0.00	12.00±0.00
6	8	O	혈청형 3와 4형	복강내	3.75±5.20	2.75±4.27	1.00±0.93
7	8	X	혈청형 3와 4형	복강내	11.25±2.12	12.00±0.00	12.00±0.00
8	8	O	혈청형 2, 3와 4형	복강내	3.63±5.34	2.38±4.07	1.00±1.07
9	8	X	혈청형 2, 3와 4형	복강내	10.50±2.83	11.38±1.77	10.88±3.18
10	8	X	X	X	0.25±0.71	0.00±0.00	0.13±0.35

임상증상 점수



그룹별 임상증상 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3($P=0.001$), 그룹 4와 5($P=0.002$), 그룹 6과 7($P=0.015$), 그룹 8과 9($P=0.021$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P=0.002$), 그룹 4와 5($P=0.01$), 그룹 6과 7($P=0.002$), 그룹 8과 9($P=0.002$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3($P=0.01$), 그룹 4와 5($P=0.002$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 연쇄상구균 감염할 때 백신이 병증을 감소시킴을 확인하였다.

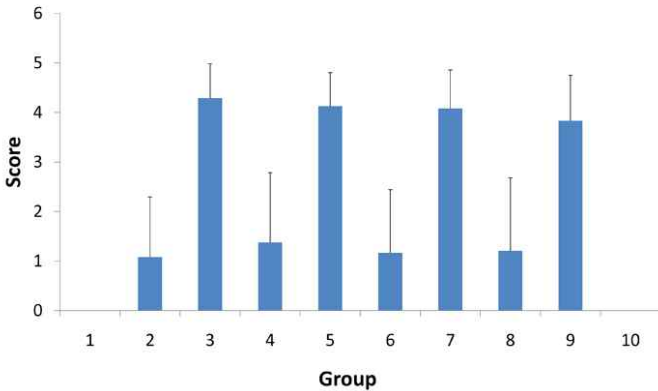
(2) 복수 혈청형 공격 접종 실험 폐사 두수 결과

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	0/8	0/8	0/8
2	8	O	혈청형 2와 3형	복강내	0/8	1/8	1/8
3	8	X	혈청형 2와 3형	복강내	6/8	6/8	7/8
4	8	O	혈청형 2와 4형	복강내	1/8	2/8	1/8
5	8	X	혈청형 2와 4형	복강내	6/8	8/8	5/8
6	8	O	혈청형 3와 4형	복강내	2/8	1/8	0/8
7	8	X	혈청형 3와 4형	복강내	7/8	8/8	8/8
8	8	O	혈청형 2, 3와 4형	복강내	1/8	1/8	0/8
9	8	X	혈청형 2, 3와 4형	복강내	6/8	7/8	6/8
10	8	X	X	X	0/8	0/8	0/8





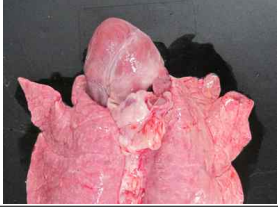
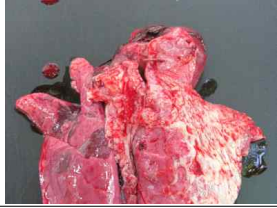
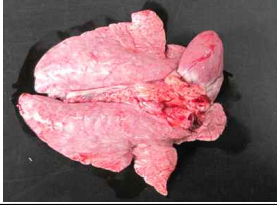
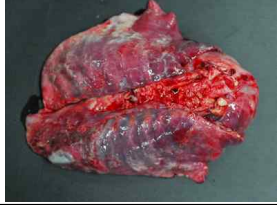
(3) 복수 혈청형 공격 집중 실험 육안 병변 결과

그룹	동물수	백신접종	집중 세균 혈청형	세균 집중 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	8	O	혈청형 2와 3형	복강내	0.75±1.04	1.13±1.36	1.38±1.30
3	8	X	혈청형 2와 3형	복강내	4.13±0.83	4.50±0.53	4.25±0.71
4	8	O	혈청형 2와 4형	복강내	1.25±1.28	1.50±1.69	1.38±1.41
5	8	X	혈청형 2와 4형	복강내	4.00±0.53	4.25±0.71	4.13±0.83
6	8	O	혈청형 3와 4형	복강내	1.38±1.69	1.25±1.28	0.88±0.83
7	8	X	혈청형 3와 4형	복강내	4.00±0.93	4.00±0.76	4.25±0.71
8	8	O	혈청형 2, 3와 4형	복강내	1.50±1.93	1.25±1.39	0.88±1.13
9	8	X	혈청형 2, 3와 4형	복강내	4.13±0.83	4.00±0.76	3.38±1.06
10	8	X	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

육안병변 점수



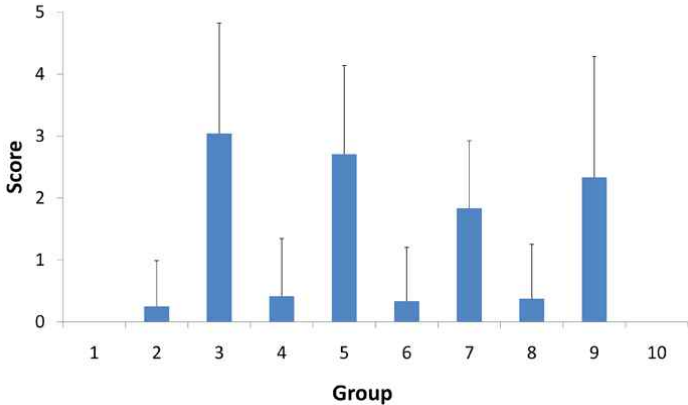
그룹별 육안병변의 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3($P < 0.001$), 그룹 4와 5($P = 0.002$), 그룹 6과 7($P = 0.007$), 그룹 8과 9($P = 0.021$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P < 0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P = 0.001$), 그룹 4와 5($P = 0.005$), 그룹 6과 7($P = 0.002$), 그룹 8과 9($P = 0.002$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P < 0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3($P < 0.001$), 그룹 4와 5($P = 0.002$), 그룹 6과 7($P < 0.001$), 그룹 8과 9($P = 0.002$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P < 0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 연쇄상구균 감염할 때 백신이 다발성 장막염을 감소시킴을 확인하였다.

	그룹	병변		그룹	병변
백신 + 공격 접종군	2		공격 접종군	3	
	4			5	
	6			7	
	8			9	

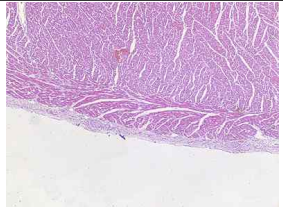
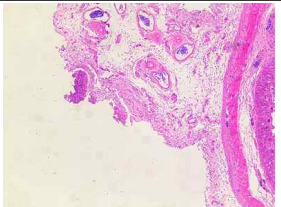
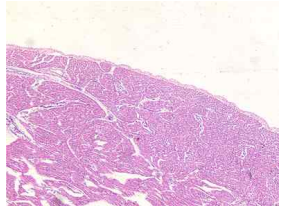
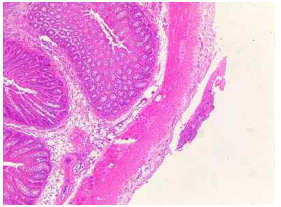
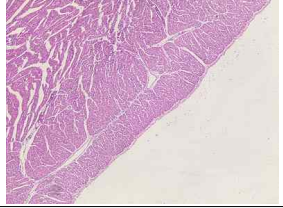
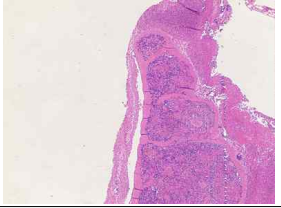
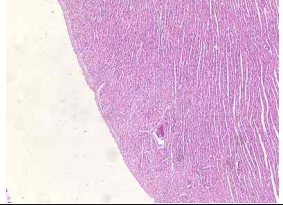
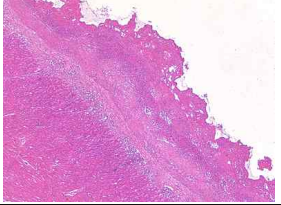
(4) 복수 혈청형 공격 접종 실험 병리조직학적 병변 결과

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	8	O	혈청형 2와 3형	복강내	0.00±0.00	0.38±0.74	0.38±1.06
3	8	X	혈청형 2와 3형	복강내	2.75±1.98	3.00±2.00	3.38±1.51
4	8	O	혈청형 2와 4형	복강내	0.25±0.46	0.25±0.71	0.75±1.39
5	8	X	혈청형 2와 4형	복강내	2.38±0.92	2.38±1.30	3.38±1.85
6	8	O	혈청형 3와 4형	복강내	0.63±1.06	0.38±1.06	0.00±0.00
7	8	X	혈청형 3와 4형	복강내	1.63±1.51	2.00±0.76	1.88±0.99
8	8	O	혈청형 2, 3와 4형	복강내	0.63±1.19	0.25±0.71	0.25±0.71
9	8	X	혈청형 2, 3와 4형	복강내	2.63±2.26	2.38±1.77	2.00±2.00
10	8	X	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

병리조직학적 병변 점수



그룹별 조직병리학적 병변의 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3($P=0.002$), 그룹 4와 5($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 유의하게 차이가 있음을 나타내었으나 그룹 6과 7($P=0.161$), 그리고 그룹 8과 9($P=0.065$)에서는 차이를 보이지 않았다. 하지만 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P=0.002$), 그룹 4와 5($P=0.001$), 그룹 6과 7($P=0.007$), 그룹 8과 9($P=0.007$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우, 그룹 2와 3($P=0.002$), 그룹 4와 5($P=0.01$), 그룹 6과 7($P=0.002$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었고, 제 2 시험과 달리 그룹 8과 9($P=0.065$)에서는 유의한 차이가 있다고 볼 수 없었다. 하지만 제 2 시험의 결과를 토대로 보았을 때, 연쇄상구균 감염할 때 백신이 섬유소성 염증을 감소시킴을 확인하였다.

	그룹	병변		그룹	병변
백신 + 공격 접종군	2		공격 접종군	3	
	4			5	
	6			7	
	8			9	

(5) 복합 혈청형 공격 접종 실험 응집반응 항체가 결과 (2차 백신 접종 후 2주 후)

그룹	동물수	백신접종	시험횟수		
			1	2	3
1	8	O	112±29.6	128±59.3	136±74.6
2	8	O	88±44.4	104±33.1	96±59.3
3	8	X	0±0	0±0	0±0
4	8	O	100±39.9	128±59.3	92±79.8
5	8	X	0±0	0±0	0±0
6	8	O	82.3±31.2	104±33.1	92±63.4
7	8	X	0±0	0±0	0±0
8	8	O	96±34.2	112±29.6	96±33.1
9	8	X	0±0	0±0	0±0
10	8	X	0±0	0±0	0±0

통계 분석 결과 각각의 혈청형에 따른 모든 공격접종군에서 백신군과 비백신군 사이에 차이가 있는 것으로 확인되었다. (P<0.001)

사. 연쇄상구균증 백신 보존성 시험

(1) 제조후 6개월 보존한 연쇄상구균증 백신의 항체 형성 능력 시험

실험 동물	2형			3형			4형		
	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi
1	0	32	128	0	32	256	0	32	128
2	0	16	128	0	16	64	0	32	128
3	0	32	256	0	32	128	0	32	128
4	0	32	128	0	32	128	0	16	64
5	0	32	128	0	32	256	0	16	128

(2) 제조후 12개월 보존한 연쇄상구균증 백신의 항체 형성 능력 시험

실험 동물	2형			3형			4형		
	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi
1	0	16	128	0	16	64	0	16	128
2	0	16	64	0	32	128	0	16	128
3	0	32	128	0	16	128	0	32	128
4	0	16	128	0	32	128	0	16	64
5	0	32	128	0	32	128	0	16	128

(3) 제조후 18개월 보존한 연쇄상구균증 백신의 항체 형성 능력 시험

실험 동물	2형			3형			4형		
	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi
1	0	8	128	0	16	64	0	16	128
2	0	16	64	0	16	128	0	16	64
3	0	32	64	0	16	64	0	32	128
4	0	32	128	0	32	128	0	32	64
5	0	16	128	0	16	128	0	16	128

(4) 제조후 24개월 보존한 연쇄상구균증 백신의 항체 형성 능력 시험

실험 동물	2형			3형			4형		
	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi
1	0	16	128	0	16	64	0	16	128
2	0	16	64	0	16	128	0	16	64
3	0	16	64	0	16	64	0	32	64
4	0	32	64	0	16	64	0	32	64
5	0	16	64	0	16	64	0	16	128

4. 연쇄상 구균(*Streptococcus suis*) 예방 백신의 야외 적용 시험

가. 1차 연쇄상구균증 백신 접종 후 안전성 시험 결과

(1) 1차 백신 접종 후 전체 안전성 시험 결과

안전성 시험 기간동안 3개 시험농장의 20두씩의 자돈에서 어떠한 부작용도 관찰되지 않았다.

(가) 접종 30분 후 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	1주령	0	2	0	1	0	0	0	39.51
농장2	20	1주령	0	2	0	2	0	0	0	39.05
농장3	20	1주령	0	1	0	2	0	0	0	39.76

(나) 접종 1시간 후 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	1주령	0	2	0	1	0	0	0	39.59
농장2	20	1주령	0	1	0	0	0	0	0	39.66
농장3	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	39.83

(다) 접종 2시간 후 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	1주령	0	0	0	1	0	0	0	39.50
농장2	20	1주령	0	0	0	1	0	0	0	39.55
농장3	20	1주령	0	0	0	0	0	0	0	39.68

(라) 접종 4시간 후 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	1주령	0	1	0	1	0	0	0	39.47
농장2	20	1주령	0	0	0	1	0	0	0	39.54
농장3	20	1주령	0	0	0	2	0	0	0	39.65

(마) 접종 1일후부터 14일간 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	기타
농장1	20	1주령	0	4	0	3	0	0	0	0
농장2	20	1주령	0	4	0	4	0	0	0	0
농장3	20	1주령	0	4	0	4	0	0	0	0

※ 관찰일: 접종 후 14일간

나. 2차 연쇄상구균증 백신 접종 후 안전성 시험 결과

(1) 2차 백신 접종 후 전체 안전성 시험 결과

안전성 시험 기관동안 3개 시험농장의 20두씩의 자돈에서 어떠한 부작용도 관찰되지 않았다.

(가) 접종 30분 후 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	3주령	0	0	0	1	0	0	0	39.42
농장2	20	3주령	0	2	0	1	0	0	0	39.51
농장3	20	3주령	0	1	0	1	0	0	0	39.43

(나) 접종 1시간 후 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	3주령	0	0	0	1	0	0	0	39.50
농장2	20	3주령	0	0	0	1	0	0	0	39.51
농장3	20	3주령	0	0	0	1	0	0	0	39.57

(다) 접종 2시간 후 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	39.48
농장2	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	39.47
농장3	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	39.51

(라) 접종 4시간 후 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	3주령	0	0	0	1	0	0	0	39.44
농장2	20	3주령	0	0	0	0	0	0	0	39.40
농장3	20	3주령	0	0	0	1	0	0	0	39.41

(마) 접종 1일후부터 14일간 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	기타
농장1	20	3주령	0	4	0	3	0	0	0	0
농장2	20	3주령	0	4	0	3	0	0	0	0
농장3	20	3주령	0	3	0	4	0	0	0	0

※ 관찰일: 접종 후 14일간

다. 백신 접종군과 미접종군에서 성장 증체 비교 시험

(1) 백신접종군과 미접종군간 백신 1차 접종시(1주령), 2차 접종(3주령) 후 3주 후(6주령), 2차 접종 후 6주 후(12주령), 시험 종료시(16주령)의 체중 비교

(가) 제 1 농장

그룹		주령				증체율 (%)	폐사율 (%)
		1	5	12	16		
백신접종군	공시두수	20	20	19	19		5
	평균	2.64	10.13	28.47	46.31	1754.17	
	표준편차	0.416	0.78	4.69	7.18		
미접종군	공시두수	20	19	19	17		15
	평균	2.61	9.49	25	44.70	1712.64	
	표준편차	0.39	0.87	3.68	6.17		
유의성 (P value)		0.74	0.022	0.017	0.479		

(나) 제 2 농장

그룹		주령				증체율 (%)	폐사율 (%)
		1	5	12	16		
백신접종군	공시두수	20	20	19	17		15
	평균	2.79	10.37	29.79	50.12	1796.42	
	표준편차	0.46	0.96	3.33	5.39		
미접종군	공시두수	20	17	14	14		30
	평균	2.82	9.30	26.88	44.93	1593.26	
	표준편차	0.41	0.61	4.86	6.79		
유의성 (P value)		0.83	0.001	0.044	0.024		

(다) 제 3 농장

그룹		주령				증체율 (%)	폐사율 (%)
		1	5	12	16		
백신접종군	공시두수	20	20	19	19		5
	평균	2.64	10.55	28.74	49.22	1864.39	
	표준편차	0.43	0.90	3.87	5.29		
미접종군	공시두수	20	19	17	16		20
	평균	2.68	9.56	25.76	46.13	1721.27	
	표준편차	0.35	0.42	1.68	5.30		
유의성 (P value)		0.718	0.001	0.006	0.099		

라. 백신 접종군과 미접종군에서 임상 시험 비교 시험

(1) 백신접종군과 미접종군간의 백신 접종 전 피모, 창백, 호흡수, 활력도, 호흡기, 및 소화기 증상 등의 임상증상 비교

(가) 제 1 농장

그룹		1차 접종 전	2차 접종 전
백신 접종군	평균	0.25	0.5
	표준편차	0.64	0.83
미접종군	평균	0.25	1.0
	표준편차	0.64	1.78

(나) 제 2 농장

그룹		1차 접종 전	2차 접종 전
백신 접종군	평균	0.20	0.35
	표준편차	0.41	0.49
미접종군	평균	0.20	0.95
	표준편차	0.41	1.61

(다) 제 3 농장

그룹		1차 접종 전	2차 접종 전
백신 접종군	평균	0.30	0.65
	표준편차	0.47	0.75
미접종군	평균	0.30	1.65
	표준편차	0.47	1.56

(2) 백신접종군과 미접종군간의 백신 접종 후 피모, 창백, 호흡수, 활력도, 호흡기, 및 소화기 증상 등의 임상증상 비교

(가) 제 1 농장

그룹		1차 접종 후	2차 접종 후
백신 접종군	평균	0.30	0.45
	표준편차	0.66	0.76
미접종군	평균	0.25	1.0
	표준편차	0.64	1.78

(나) 제 2 농장

그룹		1차 접종 후	2차 접종 후
백신 접종군	평균	0.25	0.45
	표준편차	0.55	0.60
미접종군	평균	0.20	0.95
	표준편차	0.41	1.61

(다) 제 3 농장

그룹		1차 접종 후	2차 접종 후
백신 접종군	평균	0.25	0.50
	표준편차	0.55	0.69
미접종군	평균	0.30	1.65
	표준편차	0.47	1.56

(3) 백신접종군과 미접종군간의 백신 접종 후 1주 간격으로 시험 종료까지 피모, 창백, 호흡수, 활력도, 호흡기, 및 소화기 증상 등의 임상증상 비교

(가) 제 1 농장

그룹		주령															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
백신 접종군	평균	0.06	0.05	0.13	0.16	0.18	0.28	0.24	0.31	0.22	0.24	0.22	0.18	0.20	0.17	0.13	0.19
	표준편차	0.24	0.22	0.33	0.40	0.44	0.56	0.51	0.69	0.48	0.51	0.51	0.48	0.46	0.44	0.38	0.40
미접종군	평균	0.06	0.18	0.25	0.39	0.46	0.33	0.36	0.44	0.43	0.47	0.40	0.35	0.38	0.22	0.25	0.25
	표준편차	0.24	0.50	0.56	0.79	0.87	0.68	0.76	0.65	0.62	0.73	0.66	0.65	0.72	0.48	0.56	0.58
유의성 (P value)		0.63	0.13	0.02	0.01	0.01	0.78	0.05	0.05	0.15	0.02	0.02	0.03	0.03	0.78	0.35	0.31

(나) 제 2 농장

그룹		주령															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
백신 접종군	평균	0.05	0.08	0.09	0.11	0.13	0.16	0.16	0.19	0.21	0.22	0.24	0.22	0.24	0.25	0.26	0.18
	표준편차	0.22	0.27	0.28	0.32	0.33	0.37	0.43	0.45	0.59	0.51	0.49	0.48	0.54	0.68	0.67	0.49
미접종군	평균	0.05	0.18	0.24	0.43	0.44	0.43	0.33	0.38	0.44	0.44	0.48	0.45	0.38	0.38	0.39	0.39
	표준편차	0.22	0.38	0.53	0.84	0.79	0.76	0.54	0.60	0.64	0.66	0.82	0.81	0.59	0.62	0.62	0.62
유의성 (P value)		0.99	0.06	0.01	0.05	0.05	0.03	0.30	0.28	0.03	0.02	0.32	0.42	0.73	0.85	0.76	0.21

(다) 제 3 농장

그룹		주령															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
백신 접종군	평균	0.08	0.11	0.16	0.18	0.19	0.20	0.21	0.16	0.18	0.20	0.21	0.28	0.33	0.24	0.21	0.21
	표준편차	0.26	0.32	0.40	0.41	0.45	0.49	0.59	0.37	0.42	0.43	0.50	0.60	0.66	0.51	0.44	0.44
미접종군	평균	0.08	0.38	0.41	0.48	0.50	0.54	0.50	0.56	0.50	0.49	0.47	0.43	0.56	0.45	0.47	0.47
	표준편차	0.26	0.54	0.61	0.71	0.70	0.80	0.71	0.80	0.72	0.72	0.74	0.70	0.82	0.69	0.76	0.78
유의성 (P value)		0.99	0.01	0.01	0.02	0.03	0.06	0.13	0.03	0.03	0.07	0.15	0.51	0.34	0.28	0.18	0.17

(4) 백신 접종군과 미접종군에서 임상 시험 비교 시험 최종 결과

백신의 안전성 시험 결과, 백신의 1차 접종 후 자돈에서 발열을 보인 개체는 평균 4두, 식욕 장애는 1두, 그 외 나머지 항목은 관찰되지 않았으며 통계적으로 미접종군과 차이를 나타내지 않았다. 또한, 2차 접종 후 발열을 보인 개체와 식욕저하를 보인 개체수는 평균 1두로 그 외 나머지 항목은 관찰되지 않았으며, 체온도 정상범위 내에 있었으며 통계적으로 백신 접종군과 미접종군은 차이를 나타내지 않았다. 그러므로 본 연쇄상 구균 백신은 1주 및 3주령 자돈에게 안전한 것으로 판단된다.



백신 접종 후 시험기간 동안 임상증상의 관찰 결과, 백신 접종군과 미접종군이 통계적으로 가장 많은 차이를 보인 주령은 3-5주령이며 이는 일반적으로 연쇄상 구균증이 집락화(colonization)하는 시기와 유사한 주령이다. 또한 백신 접종군의 폐사율은 5%, 미접종군의 폐사율은 21.5%로 차이를 보였다 (P=0.012). 이로 미루어 백신은 임상증상의 감소에 효과적인 것으로 판단된다.

백신의 성장증체 비교시험 결과, 백신접종군의 16주령 체중과 미접종군의 16주령 체중을 비교하였을 때, 각각의 증체율은 평균적으로 1804.99%, 1675.72% 이었다. 이것은 백신접종군이 미접종군에 비하여 증체율이 129.26% 더 증가한 결과이며, 이는 통계적으로 유의하였다

(P=0.011).

농장명	백신 접종군	백신 미접종군
농장 1	 A photograph showing several light-colored pigs in a dark, confined space, likely a pen or stall. The pigs appear healthy and are standing or moving around.	 A photograph showing two light-colored pigs in a dark, confined space. One pig is in the foreground, looking towards the camera, while another is partially visible behind it.
농장 2	 A photograph showing a group of light-colored pigs in a dark, confined space. The pigs are clustered together, and some are lying down.	
농장 3		

제 4 장 흉막폐렴 예방 백신 개발

제 1 절 서 설

돼지 흉막폐렴은 *Actinobacillus pleuropneumoniae*라는 세균이 원인체이다(Bertram, et al. 1985; Nielson, et al. 1988). 보통 2-5개월 령의 30-70kg 의 성장상태가 좋은 돼지에서 발생하는 호흡기성 질병이다(Frey, et al. 1994). 동물 중에서 돼지만이 유일하게 흉막 폐렴균의 감염에 감수성이 있다. 심급성형, 급성형 그리고 만성형이 있으며, 심급성으로 진행되었을 때 돼지가 어떤 임상증상도 없이 24-36시간 이내에 갑자기 죽는다. 급사한 돼지의 콧구멍과 입에서는 출혈을 동반한 거품을 관찰할 수 있다. 급성형에서는 구토, 청색증, 고열, 식욕불량, 호흡 곤란, 복식호흡 등이 관찰되며, 추후 코와 입에서 출혈을 일으키며 24시간 내에 급성으로 폐사되거나 회복되어 만성형으로 진행된다(Bertram, et al. 1988). 초기 감염이 만성으로 진행 되었을 시에는 무증상의 보균자가 되어서 지속적으로 흉막폐렴균을 분비하여 돈사 안의 순환 감염을 일으키며, 호흡곤란으로 인한 복식 호흡이 관찰되기도 하고, 앞에서 언급한 급성형으로 발전할 수 있는 가능성이 있다(Bertram, et al. 1986). 성장 상태가 좋은 돼지가 돼지 흉막폐렴 급성형으로 인해 출혈을 동반한 폐사를 겪는 농장의 피해는 양돈 산업의 손실은 물론 사육가의 정신적 피해마저 일으킨다. 흉막 폐렴균은 2개의 생물학적 타입이 존재한다(Frey, et al. 1993). 흉막 폐렴균 배양시 nicotinamide adenine dincleotide (NAD)라는 V factor가 필요 하면 biotype 1 strain, 필요 없으면, biotype 2 strain 이라 한다(Frey, et al. 1988; Fedorka-Cray, et al. 1990; Anderson, et al. 1991). 일반적으로 흉막폐렴의 폐사율은 biotype 1이 biotype 2보다 높다. 흉막폐렴균은 특이적인 고유한 capsular antigen 에 의해서 15개의 혈청형으로 나누어진다. 그중 혈청형 1형과 5형은 다시 A 와 B type 으로 나누어진다. 혈청형의 분류에는 slide agglutination test 와 coagglutination test 가 제일 사용하기도 쉽고, 효과적인 방법으로 이용된다(Komal, et al. 1990). 혈청형과 biotype 의 관계를 보면, 혈청형 1, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 15 형은 biotype 1만 있으며, 혈청형 13, 14형은 biotype 2만 존재한다. 혈청형 2, 4, 7, 9 형은 biotype 1과 2 모두 있다. 혈청형은 지역별로 분포되어 있다. 한국에서는 혈청형 2, 5, 6형이 자주 분리되는 혈청형이다(Min, et al. 1999, Kim, et al. 2001). 미국에서는 혈청형 1, 5, 7형이 자주 분리되며, 유럽에서는 혈청형 1, 2, 5, 7, 9형이 자주 분리되는 혈청형이다. 흉막폐렴균이 분비하는 독소를 특별히 *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX(Apx)이라고 명명했다. Apx의 종류는 Apx I, Apx II, Apx III, Apx IV까지 보고 되었으며(Kamp, et al. 1994; Cho, et al. 2001; Choi, et al. 2001), 혈청형에 따라서 분비하는 Apx toxin의 종류가 다르다. 이 중 Apx I, Apx III의 유전자 배열은 C, A, B, D로 구성되어 있는 전형적인 RTX toxin 구조인 반면, Apx II는 C, A로만 구성되어 있다. Apx toxin 의 생물학적 특징도 활발히 연구되고 있으며, 각각의 특징은 다음과 같다. Apx I은 용혈성과 세포독성이 매우 강한 독소이다. Apx II는 용혈성과 세균독성이 매우 약한 독소이다. Apx III는 용혈성이 거의 없는 반면, 세포 독성은 매우 높다(Chang, et al. 1989, 1993; Frey, et al. 1990). 본 연구에서는 연차별로 1차 년도에는 흉막폐렴 예방백신 제작용 표준 균주를

제작함에 있어서, 국내 분리 흉막 폐렴균의 혈청형 분석, 표준 혈청형 흉막폐렴균의 면역원성 검사, 표준 균주 확립 및 계대 방법 확립, 표준 균주의 대량 배양 방법 확립, 표준 균주를 이용한 백신을 제조하고, 2차 년도에는 흉막폐렴 예방 백신 안전성 및 면역원성 연구에 있어서, 백신의 성분 및 분량 연구, 백신의 불활화 확인 실험, 실험동물을 이용한 백신 안전성 연구, 돼지(자돈)를 이용한 백신 안전성 연구, 토끼를 이용한 백신 항체가 실험, 돼지(자돈)를 이용한 백신 항체가를 실험하였다. 3차 년도에 이르러서는 흉막폐렴 예방 백신의 공격접종 시험 및 보존성 시험을 하는데 있어서, 시험백신의 특성 시험 및 무균시험, 실험동물을 이용한 예방 백신의 공격 접종 실험(3회 반복실험) 및 면역원성 검사, 자돈을 이용한 예방 백신의 공격 접종 실험(3회 반복실험) 및 면역원성 검사, 시험백신 보존성 시험(제조시점, 6, 12, 18, 24개월까지 보관하면서 시험)을 하였고, 마지막 년도에는 흉막폐렴 예방 백신 야외 적용시험에 있어서, 야외 사육 돼지(자돈)에 대한 안전성 시험(3개 농장), 야외 사육 돼지(자돈)에 대한 면역원성 시험(3개 농장), 야외 사육 돼지(자돈)에 대한 효능 시험(3개농장) 등의 야외 임상 실험을 실시하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 흉막폐렴균(*Actinobacillus pleuropneumoniae*) 예방백신 제작용 표준균주 제작

가. 국내 돼지에서 흉막폐렴균 분리

2009년 1월부터 2009년 5월까지 서울대학교 병리학실에 의뢰된 돼지 중에서 폐에서 출혈소와 경화소, 또는 동시에 섬유소성 삼출물로 인한 폐표면의 유착 소견이 관찰되는 케이스를 장기가 오염되지 않도록 소독한 부검용 칼로 흉강을 개방시키고, 병변이 관찰되는 부위를 샘플링(sampling)하였다. 실험실로 이동하여 혈액 배지에 *Staphylococcus aureus*를 가운데 선을 긋듯이 발라 준비한다. 폐표면을 멸균시키고, 멸균 면봉을 조직의 내부에 넣어 문질러 준비된 혈액 배지에 발라둔 *Staphylococcus aureus*의 바로 옆과 멀리 떨어진 반대쪽에 동시에 바른다. 배지를 37℃의 배양기에 넣고 24시간 동안 호기성 배양을 하여, *Staphylococcus aureus*에 의하여 생긴 용혈범위에는 자라고, 반대쪽의 용혈범위가 미치지 않은 부위에는 자라지 않은 흉막폐렴균 콜로니의 형태학적 특징을 갖춘 독립된 콜로니를 골라 1% nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)를 첨가한 Casman 배지에 백금으로 2차 배양을 시킨다. 동시에 trypticase soy 배지(TSA)에서도 배양시켜 분리한 균이 흉막폐렴균임을 다시 한번 확인한다. 이후 증균된 균에서 DNA를 추출하여 흉막폐렴균의 독소인 APX에 특이적인 프라이머를 사용한 중합효소 연쇄반응을 시행하고, 응집반응을 통하여 혈청형을 분석하였다(Kamp, et al. 1991; Rayamajhi, et al. 2005).

나. 흉막폐렴균 혈청형 분석

국내 양돈장에서 의뢰된 돼지 중에서 폐렴이 관찰되는 이우자돈에서 총 25개의 흉막폐렴균을 분리하였다. 분리한 흉막폐렴균을 응집반응을 실시하여 혈청형을 분석하였다. 응집반응은 흉막폐렴에서 분리한 흉막폐렴균을 배양액에서 배양한 후, 1ml을 tube에 넣고 3000rpm에서 5분 동안 원심 분리한다. 원심 분리 후 가라앉은 균을 제외한 배양액을 버리고, PBS에 희석되 너무 희석되지 않고 적당히 탁도를 유지하도록 풀어 끓는 물에서 10분 동안 가열한다. 깨끗이 닦은 슬라이드에 흉막폐렴균 표준 항혈청 10 μ l를 슬라이드 위에 떨어뜨린 후, 준비한 흉막폐렴균 항원을 10 μ l씩 떨어뜨려 섞고, 1~2분 기다린다. 그 후 응집정도를 확인하여 혈청형을 확인한다. 흉막폐렴균의 혈청형 마다 특이적으로 보유한 Apx독소 유전자를 분석하기 위하여 다양한 프라이머를 제작하기 위하여 apxIIICA(Genbank code: X80055.1), apxIIIBD(Genbank code: L121451.1)와 apxICA, apxIBD(Genbank code: X68595.1)에 특이적인 염기서열을 선택하였으며, 10형과 14형을 제외한 모든 혈청형에 공통적으로 존재하는 apxIIICA(Genbank code: M30602.1)에 특이적인 염기서열도 함께 선택하여, computer software(Oligo 4.0 program, National Biosciences, Plymouth, MN, USA)를 이용하여 프라이머를 제작하였다. 유전자 apxIIICA의 전방향 프라이머는 5'-CATGTTCAAGGAGACAAAT-3'(602-621 nucleotides), 역방향 프라이머는 5'-GCTCAGAGGCTAAAGAAACA-3'(1301-1282 nucleotides)가 되도록 제작하였으며, apxIIIBD의 전방향 프라이머는 5'-GGAGAGCTTGGTGCAGGCTT-3'(5752-5771 nucleotides), 역방향 프라이머는 5'-GCTCAGAGGCTAAAGAAACA-3'(6224-6203 nucleotides)가 되도록 제작하였다. apxICA의 전방향 프라이머는 5'-TTGCTCGCTAGTTGCGGAT-3'(440-459 nucleotides), 역방향 프라이머는 5'-TCCCAAGTTCGAATGGGCTT-3'(2860-2841 nucleotides)가 되도록 제작하였으며, apxIBD의 전방향 프라이머는 5'-GCACGCGCTTTGGTGAATA-3'(5745-5763 nucleotides), 역방향 프라이머는 5'-CCTTTTCTCGATCCGGCGTA-3'(6136-6118 nucleotides)가 되도록 제작하였다. apxIIICA의 전방향 프라이머는 5'-CTGCATTAATCGCATCTACA-3'(1694-1713 nucleotides), 역방향 프라이머는 5'-CCCATCTTTGTTGGGTAATA-3'(2196-2215 nucleotides)가 되도록 제작하였다. 중합효소 연쇄반응을 위한 조건은 다음과 같다. 유전자 apxICA를 제외한 모든 apx그룹의 reaction volume은 50 μ l를 기준으로 하여 다음과 같은 조성을 사용하였다. 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 각각 10nM의 apxIIICA, apxIIIBD, apxIBD, apxIIICA의 전방향과 역방향 프라이머, 1U의 TLA polymerase(Bioneer, Daejeon, Korea), 추출한 DNA 5 μ l를 각각 섞은 후, RNase와 DNase를 제거한 증류수를 첨가하여 50 μ l의 양이 되도록 맞춘 후 각각 시행하였다. apxICA의 중합효소 연쇄반응은 10mM Tris-HCl (pH8.3), 40mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 각각 10nM의 apxICA의 전방향과 역방향 프라이머, 2U의 TLA polymerase(Bioneer, Daejeon, Korea), 추출한 DNA 5 μ l를 각각 섞은 후, RNase와 DNase를 제거한 증류수를 첨가하여 50 μ l의 양이 되도록 맞춘 후 시행하였다. 중합효소 연쇄반응은 GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)을 사용하여 시행하였다. 사용된 프로그램은 apxIIICA와 apxIIICA의 경우, 섭씨 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 가열 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초를 반응시키는 과정을 40번 반복하고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분 동안 반응하도록 하였으며, apxIIIBD와 apxIBD의 프로그램은 섭씨 95 $^{\circ}$ C에서 5분 가열한 뒤, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 63 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초를 반응시키

는 과정을 40번 반복하고, 마지막으로 72℃에서 7분 동안 반응하도록 하였다. 유전자 apxICA의 프로그램은 섭씨 95℃에서 5분 가열한 뒤, 94℃에서 1분, 63℃에서 55초, 72℃에서 2분 반응시키는 과정을 40번 반복하고, 마지막으로 72℃에서 10분 동안 반응하도록 하였다. 반응이 끝난 후, 10μl를 0.02% ethidium bromide를 첨가한 2% agarose gel에 40분 동안 전기영동 하였다.

다. 백신 후보 균주의 면역원성 검사

국내에서 홍막페렴에서 분리한 홍막페렴균중 발생 빈도가 높고 병원성 및 면역원성을 결정하는데 중요한 인자인 apx를 보유한 홍막페렴 2형 2개 (일련번호 1, 14), 홍막페렴 5형 2개 (일련번호 20, 21), 6형 1개 (일련번호 24)를 선정하여 백신을 제조하여 토끼에게 2주 간격으로 2회 접종하고 2차접종후 2주간 경과된 시점에서 혈청을 채취하여 응집반응을 통하여 항체 형성 추이를 관찰하였다(Bhatia, et al. 1991; Chiers, et al. 1995; Chiang, et al. 2009).

라. 백신 후보 균주 선정

국내에서 홍막페렴에서 분리한 홍막페렴균중 발생 빈도가 높고 Apx독소 유전자 보유 상태와 토끼를 이용한 항체 형성 능력을 확인하여 홍막페렴균 2형 (일련번호 1), 5형 (일련번호 20), 6형 (일련번호 24) 등 3개의 홍막페렴균을 선별하였다.

2. 홍막페렴균 예방 백신 면역원성 및 안전성 연구

가. 홍막페렴 백신 함유 혈청형 결정

본 연구의 1년차인 2009년에 서울대학교 수의과대학에 의뢰된 홍막페렴이 유발된 가검물에서 홍막페렴균을 분리 동정한 결과 총 25개의 홍막페렴균을 분리하였다. 분리된 홍막페렴균의 혈청형을 항원-항체 응집반응을 통해 분석하였다.

나. 부형제 선정과 조합을 통한 백신 개발

부형제(adjuvant)는 백신의 효능과 관련된 성분으로 일반적인 백신들은 모두 부형제가 함유되어 있으며, 이는 백신의 항체 생성 능력과 백신 효과의 지속 시간을 결정하는데 매우 중요한 역할을 한다. 일반적으로 약독화 생균 백신은 균 자체의 감염력과 염증 반응을 이끌어내는 요소를 갖추고 있기 때문에 사독백신에 비해 부형제의 역할이 비교적 작다. 하지만 본 홍막페렴 백신은 사독 백신으로 부형제의 역할이 상대적으로 크며, 부형제의 선정이 보다 중요한 의미를 갖는다.

항체생성능이 뛰어난 부형제로 알려져 있는 water-in-oil emulsion 형태인 complete Freund's 부형제는 접종부위의 조직손상을 일으키는 단점이 있어 양돈농가에서 기피하게 되는 문제점이 있으며, 접종 시에는 오일 성분으로 인해 고통을 유발하므로 돼지에게 스트레스를 주게 된다. 홍막페렴 백신에는 이러한 단점이 없는 부형제인 알루미늄 겔(aluminium hydroxide gel)을 사용하여 실험하였다.

부형제의 적정함량을 검증하기 위하여 1×10^{10} CFU/ml 의 균 배양액을 불활화하여 알루미늄 겔을 1%, 5%, 10%, 15%, 20% 씩 포함시킨 후, 4℃, 150 rpm의 진탕 배양기에서 24 시간동안 혼합시켜 백신을 제조하였다. 그리고 제조한 5개의 백신을 토끼에게 접종하여 부형제 함량에 따른 부작용을 관찰하였으며, 2주 간격으로 2회 접종하고 2차 접종 후 2주간 경과된 시점에서 혈청을 채취하여 응집반응을 통하여 항체 형성 추이를 관찰하였다.

홍막폐렴 백신 부형제 함량	형성 항체가
1%	1:256
5%	1:1024
10%	1:2048
15%	1:2048
20%	1:2048

다. 불활화 확인

백신 제조 시 불활화 시약이 항원에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 최소량의 포르말린(formaldehyde)으로 완전히 불활화 시키기 위하여 다음과 같이 실험하였다.

포르말린을 각각 0.3%, 0.5%, 0.7%, 1% 씩 넣은 1×10^5 CFU/ml 배양액을 4℃, 150 rpm의 진탕 배양기에서 6, 12, 18, 24 시간동안 혼합시켜 불활화시킨다. 불활화시킨 배양액은 포르말린을 제거하기 위하여 6000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 버리고 같은 양의 멸균 PBS에 다시 희석시킨다. 균 희석액을 각각 10배씩 10번을 멸균 PBS에 희석하여 면양의 혈액(sheep blood)이 5% 첨가된 혈액 배지에 10 μ l씩 떨어뜨린 후 넓게 퍼트린 다음, 37℃의 배양기에서 24시간 동안 호기성 배양하였다. 시간이 지난 후, 배지를 꺼내어 각각의 불활화 배양액에서 균의 CFU(colony forming unit)를 측정하였다(Higgins, et al. 1985; Chier, et al. 1998; Huter, et al. 2000).

라. 실험동물을 이용한 홍막폐렴 백신 안전성 실험

(1) 마우스를 이용한 홍막폐렴 백신 안전성 실험

국가검정동물약품검정기준 (사단법인 한국동물약품협회)에 의거하여 백신 접종 할 때 일어날 수 있는 접종 부위의 병변 또는, 그 외에 생길 수 있는 부작용을 확인하기 위하여 특정 병원체 부재(specific pathogen free) ICR 마우스를 이용하여 안전성 실험을 시행하였다. 15-20g의 마우스 15마리에서 5마리씩 각각 0.25, 0.5, 1ml의 홍막폐렴 백신을 복강에 접종하고, 같은 조건의 마우스 15마리에서 5마리씩 각각 0.25, 0.5, 1ml을 피하에 접종하였다. 이 후, 7일간 증상 및 병변을 관찰하고, 마지막 날 경추탈골방법으로 안락사시켜 부검하여 조직을 중성포르말린으로 고정시켜 HE 염색을 거쳐 조직슬라이드를 만들어 병변을 관찰하였다.

(2) 기니피그를 이용한 홍막폐렴 백신 안전성 실험

국가검정동물약품검정기준 (사단법인 한국동물약품협회)에 의거하여 백신 접종 할 때 일어날 수 있는 접종 부위의 병변 또는, 그 외에 생길 수 있는 부작용을 확인하기 위하여 특정 병원체 부재 (specific pathogen free) 기니피그를 이용하여 안전성 실험을 시행하였다. 300-400g의 기니피그 6마리에서 2마리씩 각각 0.5, 1, 2ml의 홍막페렘 백신을 근육에 접종하고, 같은 조건의 기니피그 6마리에서 2마리씩 각각 0.5, 1, 2ml을 피하에 접종하고, 같은 조건의 기니피그 2마리에 0.1ml을 피내에 접종하여 7일간 주사부위의 화농 및 괴사 없이 생존하는지 관찰하였다.

마. 돼지를 이용한 홍막페렘 백신 안전성 실험

(1) 자돈을 이용한 홍막페렘 백신 안전성 실험

국가검정동물약품검정기준 (사단법인 한국동물약품협회)에 의거하여 백신 접종 할 때 일어날 수 있는 접종 부위의 병변 또는, 그 외에 생길 수 있는 부작용을 확인하기 위하여 자돈을 이용하여 안전성 실험을 시행하였다. 4주령의 자돈 4마리에 백신규정량의 2배인 2ml의 홍막페렘 백신을 근육에 접종하여, 1-2시간 내 과민반응의 유무 관찰과 이후 10일간 관찰하여 주사부위에 화농 및 괴사가 없는지 관찰하였다.

바. 실험동물을 이용한 홍막페렘 백신의 항체가 연구

(1) 토끼를 이용한 홍막페렘 백신 항체가 연구

토끼에게 홍막페렘 백신을 2주 간격으로 2회 접종하고 2차접종후 2주간 경과된 시점에서 혈청을 채취하여 평판 응집반응(microplate agglutination test)을 실시하였다.

4배 희석한 혈청을 멸균 PBS에 2배씩 10번 희석하여 마지막이 2,048배가 되도록 혈청 희석액을 준비하였다. 그리고 brain heart infusion broth에서 배양한 홍막페렘균을 사독화하여 원심분리한 후, 멸균 PBS로 희석하여 항원 희석액을 준비하였다. 그리고 96 well 플레이트에 준비된 혈청 희석액을 각각 60 μ l씩 넣고, 마지막 2개의 well은 PBS만 60 μ l씩 넣은 후, 항원 희석액을 모든 well에 60 μ l씩 분주하였다. 그리고 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 후 결과를 확인하였다.

사. 돼지 (자돈)를 이용한 백신 항체가 실험

(1) 자돈을 이용한 홍막페렘 백신 항체가 연구

5주령의 자돈 5두에 홍막페렘 백신을 2주 간격으로 2회 접종하고 2차 접종 후 2주간 경과된 시점에서 혈청을 채취하여 평판 응집반응(microplate agglutination test)을 실시하였다.

4배 희석한 혈청을 멸균 PBS에 2배씩 10번 희석하여 마지막이 2,048배가 되도록 혈청 희석액을 준비하였다. 그리고 brain heart infusion broth에서 배양한 홍막페렘균을 사독화하여 원심분리한 후, 멸균 PBS로 희석하여 항원 희석액을 준비하였다. 그리고 96 well 플레이트에 준

비된 혈청 희석액을 각각 60μl씩 넣고, 마지막 2개의 well은 PBS만 60μl씩 넣은 후, 항원 희석액을 모든 well에 60μl씩 분주하였다. 그리고 24시간 동안 37℃에서 반응시킨 후 결과를 확인하였다.

(2) 용혈 억제 반응을 통한 Apx 항체의 역가 측정

제3세부과제에서 개발한 용혈 억제 반응을 통한 Apx 항체의 역가 측정 방법을 이용하여 본 연구에서 개발한 백신을 자돈 6두에 접종 한 후에 용혈 억제 능력 항체 수준을 측정하였다. 실험방법은 제3세부과제의 방법을 동일하게 사용하였다. 실험은 동일 혈청을 가지고 3회 반복 실험 하였으며, 역가 측정 결과는 50%의 용혈억제가 관찰되는 희석배수를 측정하였다. 측정 결과, 자돈 1두에서 채취한 혈청의 경우 160배 혈청 희석액까지 완전히 용혈이 억제되었고, 나머지 5두에서 채취한 혈청의 경우 640배 혈청 희석액까지 완전히 용혈이 억제되었다. 이러한 실험 결과 본 연구에서 개발 중인 흉막폐렴 백신이 충분한 Apx독소의 용혈을 억제하는 Apx항체를 형성하는 것을 확인하였다.

(3) 세포 독성 억제 반응을 통한 Apx 항체의 역가 측정

제3세부과제에서 개발한 용혈 억제 반응을 통한 Apx 항체의 역가 측정 방법을 이용하여 본 연구에서 개발한 백신을 자돈 6두에 접종 한 후에 용혈 억제 능력 항체 수준을 측정하였다. 실험방법은 제3세부과제의 방법을 동일하게 사용하였다. 실험은 동일 혈청을 가지고 3회 반복 실험 하였으며, 역가 측정 결과는 50%의 세포 독성 억제가 관찰되는 희석배수를 측정하였다. 측정 결과, 4두의 자돈에서 채취한 4개 혈청에서 160배 혈청 희석액까지 완전히 세포 독성이 억제되었고, 2두의 자돈에서 채취한 2개의 혈청에서는 640배에서도 완전히 세포 독성이 억제되었다. 이러한 실험 결과 본 연구에서 개발 중인 흉막폐렴 백신이 충분한 Apx독소의 세포 독성을 중화하는 Apx항체를 형성하는 것을 확인하였다.

3. 흉막폐렴균(*Actinobacillus pleuropneumoniae*) 예방 백신의 공격집중 시험 및 보존성 시험

가. 흉막폐렴 백신의 특성 시험 및 무균시험

(1) 특성시험

3번의 백신 제조를 통해 3개 Lot을 만들어 동물용의약품 생물학제제 일반검정기준에 따라 시험백신에 대한 색, 혼탁도, 침전물의 유무와 색체 이물에 대하여 100룩스 광도에서 검사하고, 이취에 대해서도 검사한다.

Lot No.	결 과
Lot 1	적 합
Lot 2	적 합
Lot 3	적 합

3개 Lot 모두 옅은 황색의 혼탁한 부유액이며, 정치하면 내용물의 침전이 생기나 흔들면 쉽게 균등액이 되며 소분된 내용물의 성상이 균일하고 이물이 존재하지 않는다.

(2) 무균시험

동물용 의약품 생물학제제 일반검정기준에 따라 백신 제조 후 9개월이 경과된 시점에서 nutrient agar(NA), nutrient broth(NB), thioglycollate(Thio) 배지에 각각 접종하여 22℃ 및 37℃에서 각각 배양 관찰 하며, 같은 시점에서 Mycoplasma는 PCR을 통해 오염여부를 확인 하여 양성이 나타날 경우 배양을 실시한다.

Lot No.	일반 세균			마이코플라즈마 (PCR 결과)
	시험배지	결 과 (7일간)		
		22℃	37℃	
Lot 1	NA	-	-	음 성
	NB	-	-	
	Thio	-	-	
Lot 2	NA	-	-	음 성
	NB	-	-	
	Thio	-	-	
Lot 3	NA	-	-	음 성
	NB	-	-	
	Thio	-	-	

※ - : 세균의 발육이 인정되지 않음

동물용 의약품 생물학제제 일반검정기준에 따른 시험백신의 무균시험 결과 3 Lot 모두 NA, NB, Thio에서 7일간 배양하였을 때 어떠한 세균 및 곰팡이의 발육도 나타나지 않았으며, 마이코플라즈마는 PCR 음성으로 확인되었다.

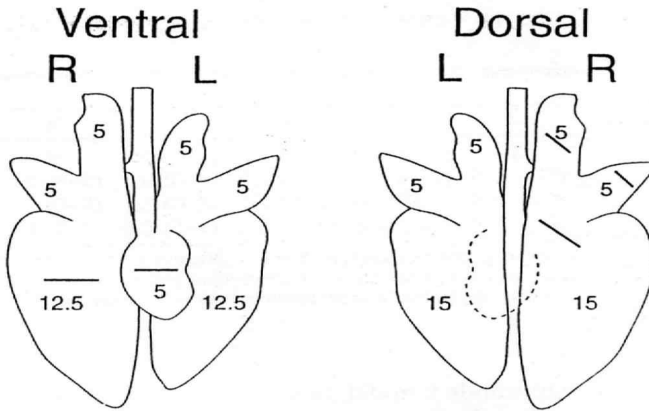
나. 흉막폐렴 백신의 공격 집중 실험 방어 판정 근거

(1) 임상 증상 및 육안변변

공격집중 후, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72시간의 간격으로 3일간 체온측정과 임상 증상 관찰을 시행하였으며, 2명의 실험자가 동시에 평가하였다. 각 그룹의 임상증상 점수는 아래의 기준에 의거하여 총 0~6까지 부여되었으며, 1일 간격으로 평균 점수를 부여하였다. 실험동물의 경우, 행동 항목의 임상증상만을 평가하였다(Rossi-Campos, et al. 1992).

임상점수	임상증상	
	호흡	행동
0	정상	정상
1	호흡수가 약간 증가	반응이 느림
2	호흡수의 뚜렷한 증가	운동을 꺼림
3	빈호흡 폐사	빈사 상태 폐사

폐사 직전의 돼지 또는 폐사한 돼지는 발견된 시점에서 즉시 부검하였으며, 이미 폐사한 자돈을 제외한 나머지 자돈은 시험종료 시기인 접종 후 3일 후 안락사 시킨 후 부검하여 폐의 육안병변을 관찰하였다. 폐 전체를 100점으로 두고 각 폐엽에 존재하는 병변이 차지하는 비율을 측정하여, 전체 폐에 대한 병변의 크기를 점수로 나타내었다. 각 폐엽의 기본 점수는 아래의 그림처럼 우전엽, 좌전엽의 첨부, 좌전엽의 기저부와 우중엽의 경우 10점, 덧엽은 5점, 그리고 우후엽과 좌후엽은 27.5점씩으로 총 100점이 되도록 하였다(Halbur, et al. 1996).



(2) 병리조직학적 병변

폐사한 돼지는 발견된 시점에서 즉시 부검하였으며, 이미 폐사한 자돈을 제외한 나머지 자돈은 시험종료 시기인 접종 후 3일 후 안락사 시킨 후 부검하여 폐엽을 종류별로 샘플링하였다. 검체는 중성 포르말린으로 고정 후 침투과정을 거쳐 파라핀으로 포매한 후에 3 μ m 두께로 잘라 H&E 염색을 실시하여 현미경하에서 관찰하되 조직 슬라이드의 번호는 그룹명과 관련성이 없도록 명기한 후 관찰하여, 객관적으로 병변의 유무를 관찰할 수 있도록 하였다. 점수부여는 1) 괴사, 2) 출혈, 3) 폐포강 내 염증세포의 침윤, 4) 혈전, 5) 흉막염, 이상의 5가지 병변들이 관찰되는 경우 각 1점씩을 부여하여, 개체당 0~5점의 점수를 부여하였다. 실험동물의 경우, 괴사, 출혈 및 염증세포의 침윤의 3개 항목만이 적용되었다.

다. 실험동물을 이용한 흉막폐렴 백신의 단일 혈청형 공격 접종 실험

(1) 실험 디자인

15-20g의 BALB/c SPF(specific pathogen free) 마우스 암컷을 40마리를 다음의 표와 같이 5마리씩 8개의 군으로 나눈 후, 그룹 1, 2, 4, 6그룹에 0.2ml의 흉막폐렴 백신을 복강에 접종한 후, 2주 후에 추가로 0.2ml의 백신을 복강에 2차 접종하였다. 그리고 공격접종하기 전에 흉막폐렴균 혈청형 2, 5, 6형을 brain heart infusion broth에 NAD 1%, yeast extract 1%씩 첨가한 배양액을 사용하여 37℃의 진동배양기에서 배양한 후, 배양액을 원심분리를 통해 제거하고 멸균 PBS에 희석하여 1X10⁸ CFU/ml로 각각 준비하였다. 2차 백신 접종 2주 후에 야외주 흉막폐렴 2, 5, 6형의 공격접종을 실시하였으며, 복강을 통해 5ml씩 각각 접종을 실시하였다(Prudeau, et al. 1998). 공격접종 후 3일간 임상증상과 폐사 상황을 관찰하였으며, 실험종료인 3일 후에 부검을 실시하여 육안 병변 정도와 현미경 상에서의 병변을 관찰하여, 각각의 기준에 의하여 점수를 부여하였다. 전체적인 실험의 디자인은 아래의 표와 같으며 이와 같은 공격접종실험을 3번 반복하여 실시하였다.

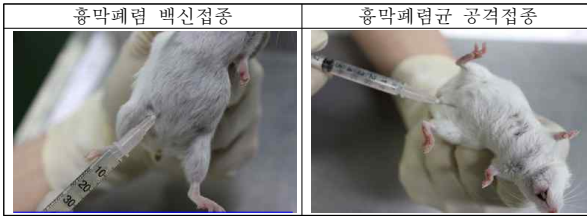
그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법
1	5	O	X	X
2	5	O	혈청형 2형	복강내
3	5	X	혈청형 2형	복강내
4	5	O	혈청형 5형	복강내
5	5	X	혈청형 5형	복강내
6	5	O	혈청형 6형	복강내
7	5	X	혈청형 6형	복강내
8	5	X	X	X

조직병리학적 병변을 평가하기 위하여, 부검하여 폐, 심장, 간, 비장, 신장, 장을 채취하였다. 각 조직은 10% 중성 포르말린에서 24시간 동안 고정하여 세척, 침투 과정을 거쳐 파라핀으로 포매하였으며, 3µm 두께로 파라핀 포매 조직을 슬라이드로 만들어 H&E 염색을 실시하였다. 조직 슬라이드의 번호는 그룹명과 관련성이 없도록 명기한 후 현미경하에서 관찰하여, 객관적으로 병변의 유무를 판정할 수 있도록 하였다.

혈액 내 항체의 역가를 측정하기 위하여 접종 전과 접종 후 14, 28일령에 채혈하였으며, 응집 반응을 통하여 항체의 역가를 측정하였다. 각각의 흉막폐렴균 혈청형을 위와 같은 방법으로 배양한 후에 15분 동안 원심(10,000g)분리 후에 멸균 PBS로 세척 후에 540nm의 흡광도에서 분석할 때 0.33의 O.D 값이 되도록 희석한 후, 방부제인 NaN₃를 1:10,000으로 희석하여 섞은 후, 4℃에서 보관하였다. 혈청은 멸균 PBS에 2배씩 단계 희석을 하여 준비하여 50µl씩 혈청 희석액과 항원 희석액을 각각 96 well 플레이트에 분주한 후, 37℃에서 48시간 동안 반응시켜 결과를 확인하였다.

각 그룹간 개체의 응집항체가, 임상증상, 육안병변과 조직병리학적 점수를 통계분석하기 위하

여 Kruskal-Wallis 테스트 후 Mann-Whitney 테스트를 실시하였으며, 체온을 분석하기 위해서 ANOVA 후, Dunnett's test를 사용하였다. 또한 폐사율을 분석하기 위하여 Chi-square 테스트를 실시하였다. 모든 통계분석은 $P < 0.05$ 일 경우 유의한 것으로 판정하였다.



라. 실험동물을 이용한 홍막페렴 백신의 복수 혈청형 공격 접종 실험

(1) 실험 디자인

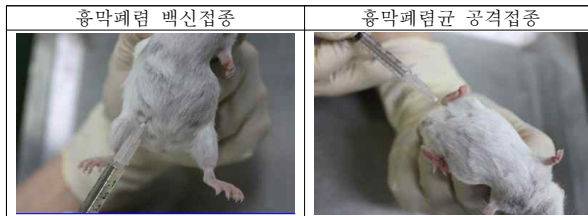
15-20g의 BALB/c SPF(specific pathogen free) 마우스 암컷을 50마리를 다음의 표와 같이 5마리씩 10개의 군으로 나눈 후, 그룹 1, 2, 4, 6, 8그룹에 0.2ml의 홍막페렴 백신을 복강에 접종한 후, 2주 후에 추가로 0.2ml의 백신을 복강에 2차 접종하였다. 그리고 공격접종 전 홍막페렴균 혈청형 2, 5, 6형을 brain heart infusion broth에 NAD 1%, yeast extract 1%씩 첨가한 배양액을 사용하여 37°C의 진동배양기에서 배양한 후, 배양액을 원심분리를 통해 제거하고 멸균 PBS에 희석하여 각각의 조합된 희석액이 1×10^8 CFU/ml가 되도록 준비하였다. 2차 백신 접종 2주 후에 공격접종을 실시하였으며, 복강을 통해 1ml씩 각각 접종을 실시하였다. 공격접종 후 3일간 임상증상과 폐사 상황을 관찰하였으며, 폐사직전이라고 판단되는 경우와 실험종료인 3일 후에 부검을 실시하여 육안 병변 정도와 현미경 상에서의 병변을 관찰하여, 각각의 기준에 의하여 점수를 부여하였다. 전체적인 실험의 디자인은 아래의 표와 같으며 이와 같은 공격접종실험을 3번 반복하여 실시하였다.

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법
1	5	O	X	X
2	5	O	혈청형 2와 5형	복강내
3	5	X	혈청형 2와 5형	복강내
4	5	O	혈청형 2와 6형	복강내
5	5	X	혈청형 2와 6형	복강내
6	5	O	혈청형 5와 6형	복강내
7	5	X	혈청형 5와 6형	복강내
8	5	O	혈청형 2, 5와 6형	복강내
9	5	X	혈청형 2, 5와 6형	복강내
10	5	X	X	X

조직병리학적 병변을 평가하기 위하여, 부검하여 폐, 심장, 비장, 간, 신장, 장을 채취하였다. 각 조직은 10% 중성 포르말린에서 24시간 동안 고정하여 세척, 칩투 과정을 거쳐 파라핀으로 포매하였으며, 3um 두께로 파라핀 포매 조직을 슬라이드로 만들어 H&E 염색을 실시하였다. 조직 슬라이드의 번호는 그룹명과 관련성이 없도록 명기한 후 현미경하에서 관찰하여, 객관적으로 병변의 유무를 판정할 수 있도록 하였다.

혈액 내 항체의 역가를 측정하기 위하여 접종 후 14, 28일에 채혈하였으며, 응집 반응을 통하여 항체의 역가를 측정하였다. 각각의 홍막페렴균 혈청형을 위와 같은 방법으로 배양한 후에 15분 동안 원심(10,000g)분리 후, 멸균 PBS로 세척 후 540nm의 흡광도에서 분석할 때 0.33의 O.D 값이 되도록 희석한 후, 방부제인 NaN_3 를 1:10,000으로 희석하여 섞은 후, 4℃에서 보관하였다. 혈청은 멸균 PBS에 2배씩 단계 희석을 하여 준비하여 50μl씩 혈청 희석액과 항원 희석액을 각각 96 well 플레이트에 분주한 후, 37℃에서 48시간 동안 반응시켜 결과를 확인하였다.

각 그룹간 개체의 응집항체가, 임상증상, 육안병변과 조직병리학적 점수를 통계분석하기 위하여 Kruskal-Wallis 테스트 후 Mann-Whitney 테스트를 실시하였으며, 폐사율을 분석하기 위하여 Chi-square 테스트를 실시하였다. 모든 통계분석은 $P < 0.05$ 일 경우 유의한 것으로 판정하였다.



마. 돼지(자돈)을 이용한 홍막페렴 백신의 단일 혈청형 공격 접종 실험

(1) 실험 디자인

5주령 돼지 64마리를 홍막페렴이 진단되지 않은 농장에서 구입하여, 다음의 표와 같이 8마리씩 8개의 군으로 나눈 후, 5주령에 그룹 1, 2, 4, 6그룹에 1ml의 홍막페렴 백신을 이근부에 접종한 후, 7주령에 1ml의 백신을 이근부에 2차 접종하였다. 그리고 공격접종 전 홍막페렴균 혈청형 2, 5, 6형을 brain heart infusion broth에 NAD 1%, yeast extract 1%씩 첨가한 배양액을 사용하여 37℃의 진동배양기에서 배양한 후, 배양액을 원심분리를 통해 제거하고 멸균 PBS에 희석하여 1×10^8 CFU/ml로 각각 준비하였다. 2차 백신 접종 2주 후에 야외주 홍막페렴균 2, 5, 6형의 공격접종을 실시하였으며, 비강을 통해 5ml씩 각각 접종을 실시하였다. 공격접종 후 3일간 임상증상과 폐사 상황을 관찰하였으며, 실험종료인 3일 후에 부검을 실시하여 육안 병변 정도와 현미경 상에서의 병변을 관찰하여, 각각의 기준에 의하여 점수를 부여하였다. 전체적인 실험의 디자인은 아래의 표와 같으며 이와 같은 공격접종실험을 3번 반복하여 실시하였다.

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법
1	8	O	X	X
2	8	O	혈청형 2형	비강내
3	8	X	혈청형 2형	비강내
4	8	O	혈청형 5형	비강내
5	8	X	혈청형 5형	비강내
6	8	O	혈청형 6형	비강내
7	8	X	혈청형 6형	비강내
8	8	X	X	X

조직병리학적 병변을 평가하기 위하여, 부검하여 각각의 폐엽을 종류별로 채취하였다. 각 조직은 10% 중성 포르말린에서 24시간 동안 고정하여 세척, 침투 과정을 거쳐 파라핀으로 포매하였으며, 3 μ m 두께로 파라핀 포매 조직을 슬라이드로 만들어 H&E 염색을 실시하였다. 조직 슬라이드의 번호는 그룹명과 관련성이 없도록 명기한 후 현미경하에서 관찰하여, 객관적으로 병변의 유무를 판정할 수 있도록 하였다.

혈액 내 항체의 역가를 측정하기 위하여 5, 7, 9주령에 채혈하였으며, 응집 반응을 통하여 항체의 역가를 측정하였다. 각각의 흉막폐렴균 혈청형을 위와 같은 방법으로 배양한 후에 15분 동안 원심(10,000g)분리 후에 멸균 PBS로 세척 후 540nm의 흡광도에서 분석할 때 0.33의 O.D 값이 되도록 희석한 후, 방부제인 NaN₃를 1:10,000으로 희석하여 섞은 후, 4℃에서 보관하였다. 혈청은 멸균 PBS에 2배씩 단계 희석을 하여 준비하여 50 μ l씩 혈청 희석액과 항원 희석액을 각각 96 well 플레이트에 분주한 후, 37℃에서 48시간 동안 반응시켜 결과를 확인하였다.

각 그룹간 개체의 응집항체가, 임상증상, 육안병변과 조직병리학적 점수를 통계분석하기 위하여 Kruskal-Wallis 테스트 후 Mann-Whitney 테스트를 실시하였으며, 체온을 분석하기 위해서 ANOVA 후, Dunnett's test를 사용하였다. 또한 폐사율을 분석하기 위하여 Chi-square 테스트를 실시하였다. 모든 통계분석은 P<0.05일 경우 유의한 것으로 판정하였다.



바. 돼지(자돈)를 이용한 흉막폐렴 백신의 복수 혈청형 공격 접종 실험

(1) 실험 디자인

5주령 돼지 80마리를 흉막폐렴이 진단되지 않은 농장에서 구입하여, 다음의 표와 같이 8마리

씩 10개의 균으로 나눈 후, 5주령에 그룹 1, 2, 4, 6, 8그룹에 1ml의 흉막폐렴 백신을 이근부에 접종한 후, 7주령에 1ml의 백신을 이근부에 2차 접종하였다. 그리고 공격접종 전 흉막폐렴 균 혈청형 2, 5, 6형을 brain heart infusion broth에 NAD 1%, yeast extract 1%씩 첨가한 배양액을 사용하여 37℃의 진동배양기에서 배양한 후, 배양액을 원심분리를 통해 제거하고 멸균 PBS에 희석하여 1×10^8 CFU/ml로 각각 준비하였다. 2차 백신 접종 2주 후에 야외주 흉막폐렴 2, 5, 6형의 공격접종을 실시하였으며, 비강을 통해 5ml씩 각각 접종을 실시하였다. 공격접종 후 3일간 임상증상과 폐사 상황을 관찰하였으며, 실험종료인 3일 후에 부검을 실시하여 육안 병변 정도와 현미경 상에서의 병변을 관찰하여, 각각의 기준에 의하여 점수를 부여하였다. 전체적인 실험의 디자인은 아래의 표와 같으며 이와 같은 공격접종실험을 3번 반복하여 실시하였다.

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법
1	8	O	X	X
2	8	O	혈청형 2와 5형	비강내
3	8	X	혈청형 2와 5형	비강내
4	8	O	혈청형 2와 6형	비강내
5	8	X	혈청형 2와 6형	비강내
6	8	O	혈청형 5와 6형	비강내
7	8	X	혈청형 5와 6형	비강내
8	8	O	혈청형 2, 5와 6형	비강내
9	8	X	혈청형 2, 5와 6형	비강내
10	8	X	X	X

조직병리학적 병변을 평가하기 위하여, 부검하여 각각의 폐를 채취하였다. 각 조직은 10% 중성 포르말린에서 24시간 동안 고정하여 세척, 침투 과정을 거쳐 파라핀으로 포매하였으며, 3um 두께로 파라핀 포매 조직을 슬라이드로 만들어 H&E 염색을 하였다. 조직 슬라이드의 번호는 그룹명과 관련성이 없도록 명기한 후 현미경하에서 관찰하여, 객관적으로 병변의 유무를 판정할 수 있도록 하였다.

혈액 내 항체의 역가를 측정하기 위하여 5, 7, 9주령에 채혈하였으며, 응집 반응을 통하여 항체의 역가를 측정하였다. 각각의 흉막폐렴균 혈청형을 위와 같은 방법으로 배양한 후에 15분 동안 원심(10,000g)분리 후, 멸균 PBS로 세척 후 540nm의 흡광도에서 분석할 때 0.33의 O.D 값이 되도록 희석한 후, 방부제인 NaN3를 1:10,000으로 희석하여 섞은 후, 4℃에서 보관하였다. 혈청은 멸균 PBS에 2배씩 단계 희석을 하여 준비하여 50μl씩 혈청 희석액과 항원 희석액을 각각 96 well 플레이트에 분주한 후, 37℃에서 48시간 동안 반응시켜 결과를 확인하였다.

각 그룹간 개체의 응집항체가, 임상증상, 육안병변과 조직병리학적 점수를 통계분석하기 위하여 Kruskal-Wallis 테스트 후 Mann-Whitney 테스트를 실시하였으며, 폐사율을 분석하기 위하여 Chi-square 테스트를 실시하였다. 모든 통계분석은 $P < 0.05$ 일 경우 유의한 것으로 판정하였다.



4. 홍막페렴균 예방 백신의 야외 적용 시험

가. 1차 홍막페렴 백신 접종 후 안전성 시험

(1) 1차 백신 접종 후 전제 안전성 시험 결과

안전성 시험은 5주령에 1차 백신 접종 후 30분, 1시간, 4시간 후에 측정하고, 그 후 매일 동일한 시간에 안정성 여부를 확인하였다.

나. 2차 홍막페렴 백신 접종 후 안전성 시험

(1) 2차 백신 접종 후 전제 안전성 시험 결과

안전성 시험은 7주령에 1차 백신 접종 후 30분, 1시간, 4시간 후에 측정하고, 그 후 매일 동일한 시간에 안정성 여부를 확인하였다.

다. 백신 접종군과 미접종군에서 성장 증체 비교 시험

(1) 3개 농장에서 홍막페렴 발병 확인

최근 서울대 수의과대학 병리학실에 검체를 의뢰한 농장 중 돼지 홍막페렴증으로 진단된 농장 3개를 선정하여, 홍막페렴증의 일반적인 발생주령과 일치하는 주령의 자돈에서 발열, 호흡기 증상, 급사 등 농장 내 자돈의 임상 증상을 직접 확인하고 의심되는 자돈들을 부검한 후, 육안병변에서 화농 및 출혈성 폐렴, 섬유소성 홍막염을 확인하였다. 병변을 swab하여 실험실에서 Casman agar에 바른 후, 37℃의 배양기에 넣고 24시간 동안 호기성 배양을 하여 홍막페렴균 콜로니(colony)의 형태적 특징을 갖춘 독립된 콜로니를 확인하였다. 이 후 각각의 독립된 균주를 Casman agar와 Trypsin soy agar에 바른 후, Trypsin soy agar에서는 배양되지 않고, Casman agar에서 배양된 균주를 선별한 후, 콜로니에서 DNA를 추출하여 돼지 홍막페렴균의 Apx I 유전자에 특이적인 프라이머를 사용한 중합효소 연쇄반응을 시행하여 돼지 홍막페렴균을 동정하여 선별된 농장에서 홍막페렴의 발병을 확인하였다.

(2) 3개 농장에서 각각 20두씩 2개 그룹을 선정하여 백신접종군과 미접종군으로 시험 실시

돼지 홍막페렴이 확인된 3개 농장에서 4주령 자돈을 암수 관계없이 각각 25마리씩 무작위

로 선별하여 총 50마리를 선별한 후, 1주 후 체중과 활력을 고려하여 5주령의 자돈을 각각 20마리씩 2개군으로 총 40마리를 최종 선별하였다. 선택된 자돈의 임상증상과 체온을 확인하고 이근부에 폐지 흉막폐렴균 백신을 1ml씩 접종한 후, 접종 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간 간격으로 임상증상과 체온을 확인하여 백신의 안전성을 시험하였다. 2주 후 7주령의 자돈에 추가로 1ml씩 2차 접종을 실시하였으며 같은 시간 간격으로 백신의 안전성을 시험하였다. 시험은 25주령에 종료하였으며, 5, 9, 16, 25주에 체중 측정과 채혈을 실시하여 질병예방으로 인한 증체량의 차이와 주령별 응집 항체가의 변화를 확인하였다. 실험이 시행되는 기간 동안 1주 간격으로 임상증상을 확인하여 기록하였으며, 도중에 폐사한 자돈은 부검을 시행하였다. 라. 백신 접종군과 미접종군에서 임상 시험 비교 시험

(1) 백신접종군과 미접종군간의 백신 접종 전, 후와 접종 후 1주 간격으로 시험 종료까지의 피모, 창백, 호흡수, 활력도, 호흡기, 및 소화기 증상 등의 임상증상을 비교하였다.

제 3 절 결과 와 고찰

1. 흉막폐렴균 예방백신 제작용 표준균주 제작

가. 흉막폐렴균 혈청형 분석결과

응집반응 검사결과 국내에서 분리한 흉막폐렴균 중 혈청형 2형(분리균수 11개)이 가장 흔하게 분리되었으며, 5형(분리균수 7개)과 6형(분리균수 3개) 순서로 분리되었다.

혈청형	분리균수
2형	11
5형	7
6형	3
7형	1
Un-typable	3
합계	25

그림 1. 흉막 폐렴균 2형의 응집반응. 순서대로 1형, 2형, 5a형, 5b형, 8형 항혈청에 대한 반응이다.

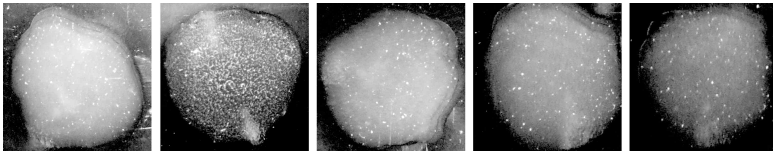
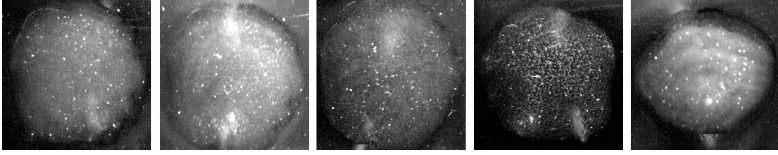


그림 2. 흉막 폐렴균 5형의 응집반응. 순서대로 1형, 2형, 5a형, 5b형, 8형 항혈청에 대한 반

응이다.



나. 유전자 특성을 이용한 백신 후보 균주의 면역원성 검사결과

국내에서 분리한 총 25건의 홍막페렴균에 대한 특성을 분석하기 위하여 홍막페렴균이 분비하는 Apx독소의 유전자인 *apx* 확인을 증합효소 연쇄반응을 이용하여 확인하였다. 현재까지 ApxI, ApxII, ApxIII, ApxIV의 총 4가지 Apx독소가 있는데 이중 병원성과 관련된 기능이 확인된 ApxI, ApxII, ApxIII에 대한 유전자를 확인하기로 하였다. 비록 이들 Apx독소는 병원성과 관련된 독소이지만, 이들 독소는 홍막페렴의 방어에도 중요한 역할을 하는 면역원성이 높은 단백질성분으로 구성되어 있기 때문에 이들 독소의 유전자를 하여 이들 독소를 분비하는 홍막페렴균을 백신 후보로 사용하는 것이 효과적이다. 본 연구에서 검사한 3가지 Apx독소를 분비하는데 관여하는 유전자는 총 5가지 종류로 이들 유전자의 조합에 따라서 혈청형 2형과 6형의 경우 *apxIBD* (그림1), *apxIIICA* (그림 3), *apxIIICA* (그림5), *apxIIIBD* (그림2) 유전자를 보유하여 ApxII와 ApxIII 독소를 분비한다. 또한 혈청형 5형의 경우 *apxICA* (그림3), *apxIBD*, *apxIIICA* 유전자를 보유하여 ApxI와 ApxII 독소를 분비한다.

그림 1. *apxIBD* PCR. PCR product의 크기는 393 base pair이다. M: 100bp ladder; 1: 2형 균주; 2: 5형 균주; 3: 8형 균주; 4: 음성대조

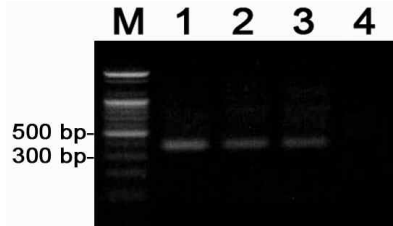


그림 2. *apxIIIBD* PCR. PCR product의 크기는 473 base pair이다. M: 100bp ladder; 1: 2형 균주; 2: 5형 균주; 3: 8형 균주; 4: 음성대조

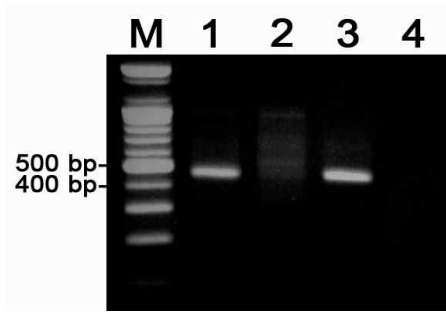


그림 3. apxICA PCR. PCR product의 크기는 2422 base pair이다. M: 100bp ladder; 1: 2형 균주; 2: 5형 균주; 3: 8형 균주; 4: 음성대조

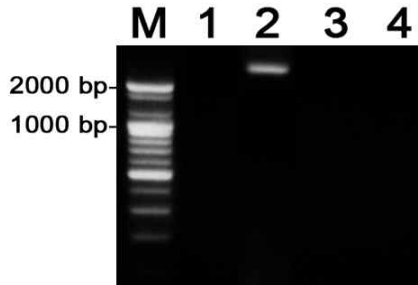


그림 4. apxIIICA PCR. PCR product의 크기는 522 base pair이다. M: 100bp ladder; 1: 2형 균주; 2: 5형 균주; 3: 8형 균주; 4: 음성대조

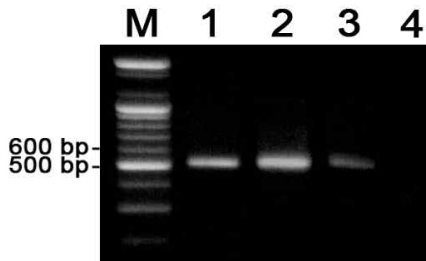
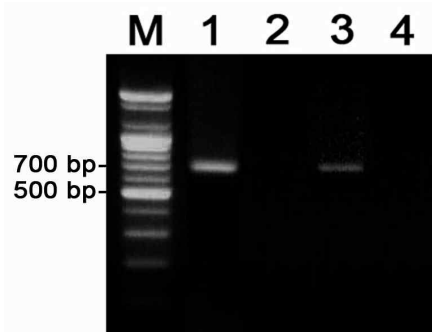


그림 5. apxIIIICA PCR. PCR product의 크기는 700 base pair이다. M: 100bp ladder; 1: 2형 균주; 2: 5형 균주; 3: 8형 균주; 4: 음성대조



일련번호	혈청형	<i>apx</i> 유전자				
		<i>apxICA</i>	<i>apxIICA</i>	<i>apxIIICA</i>	<i>apxIBD</i>	<i>apxIIIBD</i>
1	2형	X	O	O	O	O
2	5형	O	O	X	O	X
3	2형	X	O	O	O	O
4	2형	X	O	X	O	X
5	2형	X	O	O	O	O
6	6형	O	O	O	O	O
7	2형	X	X	O	O	O
8	5형	O	X	X	O	X
9	Un-typable	X	X	O	O	O
10	2형	X	X	O	O	O
11	7형	X	X	X	X	X
12	2형	X	O	O	O	X
13	5형	X	X	X	O	X
14	2형	X	O	O	O	O
15	2형	X	O	O	O	O
16	5형	X	O	X	O	X
17	2형	X	X	O	O	O
18	Un-typable	X	O	O	O	O
19	2형	X	O	X	O	O
20	5형	O	O	X	O	X
21	5형	O	O	X	O	X
22	5형	X	O	X	O	X
23	Un-typable	X	O	X	X	O
24	6형	X	O	O	O	O
25	6형	X	X	O	O	O

다. 백신 후보 균주의 면역원성 검사결과

홍막패렴 일련번호	혈청형	항체 형성가
1	2	1:2048
14	2	1:512
20	5	1:1024
21	5	1:512
24	6	1:512

마. 홍막페렴 혈청형 2형 apxIIICA와 apxIIIBD 유전자 염기배열 확인

총 12쌍의 프라이머를 이용하여 7721bp의 전체 유전자중 7441bp를 증폭하였으며 증폭된 부분은 Genbank에 등록된 apxIIICABD 유전자(등록번호 L12145)의 172-7609부분에 해당하며, 염기서열 비교 시 30개 base pair의 차이를 보인다. 차이를 보이는 염기서열 번호와 염기의 종류는, Genebank code L12145의 염기서열 중 801-802번의 TT가 본 홍막페렴균 2형의 염기서열에서는 630-631번의 CC로, 1398번의 C가 1227번의 T로, 1517-1518번의 CG가 1346-1347번의 GC로, 1531-1532번의 CG가 1361-1362번의 GC로, 1646-1947번의 CG가 1475-1476번의 GC로, 2233번의 T가 2062번의 C로, 2829번의 A가 2658번의 C로 대체되었다. 2933번과 2934번 사이에 2763번의 A가 삽입되었으며, 2935번과 2936번의 사이에 2766번의 T, 2767번의 T가 삽입되었다. 그리고 3505번의 C가 3337번의 A로, 4214번의 T가 4046번의 C로, 4316번의 G가 4148번의 A로, 4318번의 G가 4150번의 A로, 5349-5351번의 TTT가 5181-5183번의 AAA로, 5760-5761번의 TT가 5592-5593번의 AA로, 6219-6220번의 CG가 6051-6052번의 GC로 대체되었다. 6482번의 C는 6313-6414번 사이에서 제거되었고, 6485-6486번 사이에 6317번의 C가 삽입되었으며, 7220번의 G가 7052번의 A로, 7373번의 C가 7205번의 T로 대체되었다. 본 연구에서 분석한 apxIIICABD 유전자의 염기배열 순서는 아래와 같다.

```
ATATAATTAACGGTCTTAAAGTGGATAAATAATAAAAATTATGAGTTATAAAAAATGTTA
AAAATTTAACAGATGATTTTACAACCTTAGGGCATATCGCTTGTTGTGGGCTAATTCT
CCGTTACATAAGGAGTGGTCTATCTCTTTGTTTACTAAGAATATTTTGCCAGCCATTCA
ACATGATCAATATATTTTACTTATGCGAGATGAGTTCCTGTAGCGTTTTGTAGTTGGG
CAAATTTAACGTTAACTAATGAAGTGAAGTATGTACGTGATGTGACGTCATTGACTTTT
GAAGATTGGAATTCAGGAGAACGAAAATGGTTGATCGATTGGATTGCGCCATTTGGGGA
TAACAATACGCTTTATAGATATATGCGTAAAAAATTTCTAATGAAGTATTCGGGCCA
TTCGAGTATATCCTGGTCTACAGAAGCGAAAATCATTGTTCAAGGAGGACAAAAT
AATAAATTTACAGCTAAAAAATTAATACAACAATATCAGGAAGAAGTATTCAAGTTCT
TAACAATCACAAAAAATTTGTAAGAGGATAAAATATGAGTACTTGGTCAAGCATGTTAG
CCGACTTAAAAAAGGGCTGAAGAAGCCAAAAGACAAGCCAAAAAAGGCTACGATGTA
ACTAAAAATGGTTTGAATATGGGGTGAGTCAAGCAAAATTTACAAGCATTAGCAGCTGG
TAAAGCCGTTCAAAAAGTACGGTAATAAATTTAGTTTTAGTTATTCCAAAAGAGTATGACG
GAAGTGTGGTAAACGGTTTCTTTGATTTAGTAAAAGCAGCTGAGGAATTAGGCATTCAA
GTTAAATATGTTAACCGTAATGAATTGGAAGTTGCCATAAAAAGTTTAGGTACCGCAGA
CCAATCTTGGGTTTAAACAGAACGTGGACTTACTTTATTTGCACCGCAACTAGATCAGT
TCTTACAAAAACATTCAAAAATTTCTAACGTAGTGGGCAGTTCTACTGGTGTATGCAGTA
AGTAAACTTGCTAAGAGTCAAACATTATTTTCAGGAATTCATCTGTATTAGGTACTGT
ATTAGCAGGTATTAATCTTAATGAAGCTATTATTAGTGGCGGTTTCAGAGCTCGAATTAG
CTGAAGCTGGTGTCTTTAGCCTCTGAGCTCGTTAGTAATATTGCTAAAGGTACAACA
ACAATAGATGCTTTCACTACACAAATCCAGAAGTGGGAAATTTAGTGGAAAATGCTAA
AGGGTTAGGTGGTGTGGCCGCAATTACAGAATATTTTCAGGTTCTGCATTAAGCAAAA
```

CTGGATTAGGTTTGGATATTATCTCAAGCTTACTTTTCAGGAGTAACTGCAAGTTTTGCT
TTAGCGAATAAGAATGCTTCAACAAGCACTAAAAGTTGCTGCTGGCTTTGAACTCTCAAA
TCAAGTAATTGGTGGTATTACGAAAAGCAGTATCAAGCTATATTCTTGCACAGCGTTTAG
CTGCTGGTTTATCAACGACAGGTCTGCTGCAGCACTAATTGCGTCTAGTATTTCTTTA
GCAATCAGTCCATTGGCGTTTTTACGTGTAGCTGATAATTTAATCGTTCTAAAGAAAT
TGGCGAATTTGCTGAACGTTTTCAAAAAATTGGGCTATGACGGCGATAAACTACTTTTCAG
AGTTTTATCACGAAGCTGGTACTATTGATGCCTCAATTACTACAATTAGTACAGCACTT
TCTGCTATCGCAGCTGGAACGGCCGCCGAGTGCAGGTGCATTAGTTGGCGCACCAAT
TACTTTGTTGGTTACTGGTATCACAGGATTAATTTCTGGTATTTTAGAGTTCTCTAAAC
AACCAATGTTAGATCATGTTGCATCGAAAAATTGGTAACAAAAATTGACGAATGGGAGAAA
AAATACGGTAAAAATTACTTCGAGAATGGCTATGATGCTCGTCATAAAAGCTTTCTTAGA
AGATTCATTCTCATTATTGTCTAGTTTTAATAAAACAATATGAAACTGAAAAGAGCTGTTT
TAATTACACAACAACGTTGGGATGAATATATTGGCGAACTTGCGGGTATTACTGGCAAA
GGTGACAAACTCTCTAGTGGTAAGGCGTATGTAGATTACTTTCAAGAAGGTAAATATT
AGAGAAAAAACCTGATGACTTTAGCAAAGTAGTTTTTCGATCCAACCTAAGGGCGAAATTG
ATATTTCAAATAGCCAAACGTCAACGTTGTTAAAATTTGTTACGCCATTATTAACACCA
GGTACAGAGTCACGTGAAAGAACTCAAACAGGTAAATATGAATATATCACGAAGTTAGT
TGTAAGGTAAGATAAATGGGTTGTTAATGGCGTTAAAGATAAAGGTGCCGTTTATG
ATTATACTAATTTAATTCAACATGCTCATATTAGTTCATCAGTAGCACGTGGTGAAGAA
TACCGTGAAGTTCGTTTGGTATCTCATCTAGGCAATGGTAATGACAAAAGTGTCTTAGC
TGCGGGTCCGCAGAAATTCACGCTGGTGAAGGTGATGATGTGGTTTATTATGATAAAA
CCGATACAGGTCTTTTAGTAATTGATGGAACCAAAGCGACTGAACAAGGGCGTTATTCT
GTTACGCGCAATTGAGTGGTGCTACAAAAATCCTGAGAGAAGTAATAAAAAATCAAAA
ATCTGCTGTTGGTAAACGTGAAGAAACCTTGAATATCGTGATTATGAATTAACGCAAT
CAGGTAATAGTAACCTAAAAGCACATGATGAATTACATTCAGTAGAAGAAATTATTGGA
AGTAATCAGAGAGACGAATTTAAAGGTAGTAAATTCAGAGATATTTCCATGGTGCCGA
TGGTGATGATCTATTAATGGTAATGATGGGGATGATATTCTATACGGTGATAAAGGTA
ACGATGAGTTAAGAGGTGATAACGGTAACGACCAACTTTATGGTGGTGAAGGTGATGAC
AACTATTAGGAGGTAATGGCAATAATTACCTCAGTGGTGGTGTGATGGCAATGATGAGCT
TCAAGTATTAGGCAATGGTTTTAATGTGCTTCGTGGCGGTAAAGGCGATGATAAACTTT
ATGGTAGCTCAGGTTCTGATTTACTTTGATGGTGGAGAAGGTAATGATTATCTAGAAGGA
GGCGATGGTAGCGATTTTTATGTTTATCGTTCCACTTCAGGTAATCATACTATTTATGA
TCAAGGTAAAGCTAGCGATTCAGATAAGCTATATTTGTCAGATCTTTCTTTTGATAATA
TTTTAGTAAAAGGGTTAACGATAACCTTGAGTTTAGAAGCAATAAACAGTAATAGT
GGTGTGCTTACGATCAAGGACTGGTTCAAAGGAGGCAATAGTTACAATCATAAAAATTGA
ACAAATTGTTGATAAAAAATGGTAGAAAAATTGACAGCTGGGAATTTAGGAAATAACTTCC
ATGATACTCAACAAGCTAGTAGTTTACTTAAAAATGTTACACAAGAACAAAATGAAAGC
AATTTATCTTCACTTAAAACCTGAATTAGGTAAAATTTACTAATGCAGGTAATTTTGG
TGTGGCAAAACAAGGTAATACTGGAATCAATACAGCTGCCTTGAACAATGAAGTGAATA
AAATCATTCTTCTGCTAATACCTTTGCTACTTCACAATTGGGTGGCTCAGGGATGGGA

ACATTACCATCAACGAATGTAAATTCAATGATGCTAGGTAACCTAGCTAGAGCAGCTTA
ATCATCTGCAATAATCAATAGCAATCCTATGGTTATTCTAGGATTGCTATTTTTATTTAT
GGAGTCACAAATGCCTTTTAAACGAAAAAATAGATTACGGATTACATGCATTGGTAATTC
TCGCGCAATATCACAATGTTGCCGTAAACCCTGAAGAGGTAAAACATAAAATTTGATCTT
GATGGCAAAGGATTGGATCTTGTGCTTGGTTATTAGCAGCAAAATCATTAGAATTTAAA
AGTCAAACGAGTAAAAAAGAGTATTGAGCGTTTACCATTTATTCATCTTCCCTGCTTTAA
TCTGGCGAGATGATGGTCAACACGTTATTTTGACGAAAAATTGACACCCAAACTAACCGT
TACCTTATTTTTGACTTAGAAGAACGAAACCCTAAAGTACTAAGTGCGGCTGAATTTCA
CGAAATTTTTCAAGGTGATGTGATCTTATTACTTCACGAGCTTCTATTATGGGGCAAT
TGGCGAAGTTTGATTTCACTTGGTTTATCCCCGAGTAATTTAAATACCGTAAAAATTTTT
GTAGAAACTATTATTGTTTTCTATTTTTTTGCAGCTTTTTGCACTAATTACTCCCTTATT
TTTCCAAGTTGTGATGGATAAAAGTTCTTGTCCATCGTGGATTTTCTACACTTAATGTTA
TCACGGTTGCATTATCTGTAGTGGTTATCTTTGAAATTGTATTAAGCGGTCTACGGACT
TATATATTTTCCCATAGCACTAGCCGAATTGATGTAGAACTTGGTGCAAAATTTATTCG
TCACTTGTTAGCGTTACCTATTTCTTATTTTCGAAAATAGACGTGTAGGTGACACAGTTG
CTCGAGTACGAGAATTGGATCAAATACGCAATTTTTTAAACAGGTCAAGGCACTTACCTCT
GTATTAGATCTCTTATTCTCTTTTATTTTCTTTGCAGTGATGTGGTATTACAGCCAAA
ACTAACTATTGTGATTTTACTTTTCAATTACCTTGTATATCGCATGGTCAATATTTATTA
GCCCAATATTACGTCGTCGCTAGATGAAAAATTTGCTCGTAATGCTGATAATCAATCT
TTTTTAGTTGAATCTGTTTCTGCAATAGACACGATCAAGGCTCTTGTGTAAACACCTCA
AATGACAAATATTTGGGATAAACAGTTAGCAAGTTATGTATCAGCAGATTTTAGAGTGA
CAGTATTGGCAACTATTGGACAGCAAGGTGTACAACCTATCCAAAAAACAGTAATGATA
ATTAATTTATGGTTAGGTGCACATTTAGTAATTTTCAAGGGATCTTAGCATTGGACAATT
AATTGCTTTTTAATATGCTTTCAGGACAAGTTATTGCACCTGTAGTTCGTTTAGCACAAT
TGTGGCAAGACTTCAACAAGTAGGAATTTCTATTACACGATTGGGAGATGTCTTAAAT
TCACCTACAGAAAATATCAAGGTAAAGCTTTCCTACTACCAGAAATCAAAGGGGATATCGC
ATTTAAACATATTCGCTTTCGCTATAAGCCCAGTGTCCAATCATTTTAGATGATGTAA
ATTTATCGGTTAAACAGGGGAAGTTATTGGGATAGTAGGACGTTCAAGGTTCAAGGTAAA
AGTACTCTCACTAAATATTACAACGTTTTTATATTCCGGAAAAATGGCCAAGTATTGAT
TGATGGTCACGATCTTGCCTTGTGATCCTAATTGGTTACGTCGTCAAATTTGGTGTG
TTTTACAAGATAATGTGTTATTTAAACCGTAGTATTCGCGATAATATCGCACTCACTGAT
CCAAGCATGTCTATGGAACGTGTTATCTATGCGGCAAAATTAGCAGGGGCACATGATTT
TATTTCTGAATTACGTGAAGGTTACAATACTATTGTAGGAGAGCAAGGTGCAGGCTTAT
CTGGTGGACAACGTCAACGGATTGCTATTGCACGAGCTTTAGTCAATAACCCTAGGATT
TTGATTTTTGATGAGGCGACAAGTGCATTAGATTATGAATCTGAACATATCATTATGCA
AAATATGCAAAAAATCTGCCATGGACGGACAGTAATCATTATTGCCACCCTCTTTCTA
CAGTAAAAAATGCGATCGCATTATTGTTATGGAAAAGGGACATATTGTAGAGCAAGGT
AACATAACCAATTACTGAAAAATGAAAAATGGACTCTATTATTACCTCAACCAACTACA
ATCAAATTAAGGTGAAAACAACATGAAGTTATGGATTCTAGGACTTGGGGAATTTTTTCA
ACGTTATCGTAATATTTGGCGTGAAATATGGAAAAATCCGCAACAATTAGATACCCCGAG

CAAGACAAAAAGATGAAAACGAATTTTTGCGCTGCGCATTTAGAGTTAATTGAGACACCT
ATTTCAAAAAAGCCACGGCTGATCGCTTATTTGATAATGCTATTTTCTATTTTTAGCTAT
TGTAATTTCCATTATTAGTAAAGTAGAAAATTGTTGCTAGTGCTACAGGTAAGTTGGTAT
TTAGTGACATAGTAAAGAAAATAAAGCCTATTGAGAATGCTTTAGTAAAAGACATTTTT
GTTAAAGATGGACAATTTGTTGAAAAAGGACAATTATTATTAATCTCACCCGACTTGG
TGCCGATGCAGACAAAACAAAAAACTAAAGTATCGTTAGGATTGGAAAGATTAGATGGTT
ACCGATATAAGTCATTGTTATATAGCATTGAACACAATAGATTACCTTTATTGGATTTT
AACCAAGCTGATTTTATTCTGTTTCAGGAAGAAGATAAGACTAACGCACGTCATTTAAT
TACCGAACAAATTTGAGACTTGGCAAAAAACAAAAATATCAGAAGGAATTAGCGTATCAAC
GTAAACAAGCTGAAAAACAAACAGTATTAGCAAATATCCGTAATATGAAAGCGCTAGT
CGTATTGAAAAGGAGAAAATTAAGTGATTTAAAAAAATTATATGATGTAAGTCTATTTTC
TAAGCATGAGTTGTTAGCACAAAGAAAATAGATATGTTGAAGCTAGTAATGAATTGTCTG
TTTATCAATCTCATCTCAAAGAAGTAGAAAAGTACTTGCCTAAAGCACAAAGAAATTA
AAGCTTGTACTCAATTATTTAAGAGTGATATTTTGAAAAACTACAGCAAAATATACA
ACGCGAAAAGCAGCTCACTTTAGAACTTGAGAAAAATGAACAACGTCAATTAGCCTCTA
TCATTAGGGCGCCAGTATCAGGCACAGTCCAACAATTAAAAACTCATACTAAAGGTGGC
GTAGTAACTACTGCAGAAACCTTAATGGTCATTGCTCCTGAGGATGACGTGTTGGAAGT
AAGTGCTTTAATTTCAAACAAAGATATTGGTTTTGTTGAAATTGGACAGGAAGCAGTTA
TTAAAGTGAAACTTTTCCCTACACAAGATATGGTTATCTCTATGGAAAAAGTAAAAACT
ATTACTCTTGATGCTATTGAGCACCCCTCAGCTTGGTTTTAGTTTTCAATTCTATTATTGA
GATTAATAAGAAAACATTAACAGATGGTGATAAAAGAAATTCAATTAGGTTCTGGAATGA
GCGTTATTGCAGAAATTA AACAGGAGAACGCAGTGTTATCAGTTTCTACTCAGTCCA
TTAGAAGAATCTATTACTGAAAGTCTAAGAGAACGTTAATTATCTCTTCTAAATTAAGC
AAATATATAACTTTTGTA AAAACGTTATTTAAGGAGAGTTGCTAATAGAAGTTAAAATA
TCTATTA

바. 백신 표준 균주 계대 방법 확립

홍막페렴균 배양 전용 배지인 1% nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)를 첨가한 Casman 배지와 trypticase soy 배지(TSA)에 표준 홍막페렴균주를 백금이로 바른 후, 37℃의 배양기에서 24시간 동안 호기성 배양한다. 이 후 TSA에서 균이 자랐는지 확인하고, 자라지 않았다면 오염되었을 가능성은 매우 희박하므로, 균의 독립된 콜로니를 확인한 후, 다시 같은 방법으로 계대한다. 또한 각각의 연속 계대 사이에 중합효소 연쇄반응을 통하여 백신 후보로 선정된 균주인 홍막페렴균 2형 (일련번호 1), 5형 (일련번호 20), 6형 (일련번호 24) 등 3개의 홍막페렴균에 중요한 인자인 apx 유전자를 30 계대 동안 지속적으로 보유하는 것을 확인하였다. 또한 제1계대후의 균주로 제작한 백신과 연속 30 계대후의 균주로 제작한 백신을 토끼에게 접종한 결과 형성되는 항체수준의 변화가 없는 것을 확인하였다. 이러한 결과 본 연구에서 사용하는 백신주의 계대 방법이 백신 균주의 유전적 또는 면역원성의 변화를 일으키지 않는 매우 안정적인 균주로 확인되었다.

백신 후보균주	면역원성 변화	
	제 1계대후	제 30계대후
2형 (일련번호 1)	1:2048	1:2048
5형 (일련번호 20)	1:1024	1:1024
6형 (일련번호 24)	1:512	1:512

백신 후보균	apx 유전자										
	<i>apxICA</i>		<i>apxIIA</i>		<i>apxIIIA</i>		<i>apxIBD</i>		<i>apxIIIBD</i>		
	1계대	30계대	1계대	30계대	1계대	30계대	1계대	30계대	1계대	30계대	
2형	X	X	O	O	O	O	O	O	O	O	O
5형	X	X	O	O	X	O	O	O	X	X	
6형	X	X	O	O	O	O	O	O	O	O	O

사. 백신 표준 균주 대량 배양 방법 확립

표준 흉막폐렴균을 냉동보관에서 꺼내어 가능한 빠르게 녹인 후 바로 백금으로 1% NAD 첨가 Casman 배지와 trypticase soy agar (TSA)에 각각 바른다. 둘째 날, TSA의 오염 유무를 확인하고 오염이 되지 않았다면 Casman 배지에서 독립된 콜로니를 멸균 면봉으로 수거하여 다시 1% NAD 첨가 Casman 배지 1개에 바르고, brain heart infusion(BHI) 배양액을 200ml 제조하여 멸균시켜 준비한다. 셋째 날, 클린벤치 안에서 1% NAD와 1% yeast extract를 멸균 시킨 BHI 배양액 200ml에 첨가하고, 그 중 5ml을 뽑아 배양된 세균을 멸균 면봉으로 풀어 부유시킨다. 이를 배양액에 넣은 후 toxin의 생성이 최소한으로 억제되도록 최대 8시간이 넘지 않도록 37℃의 배양기에서 150rpm의 속도로 교반, 증균시킨다. 그 후, 500ml의 같은 BHI 배양액에 증균 된 200ml을 넣어 다시 최대 8시간 동안 배양하고 조금 남은 배양액 일부는 백금 이에 묻혀서 다시 오염 유무를 확인한다. 이러한 방법을 반복하여 증균시켜 대량 배양한다.

아. 백신 표준 균주 이용한 백신 제조

앞서 대량 배양한 흉막폐렴균 배양액을 4℃로 냉장시키기 전 TSA에 발라 오염 여부 검사와 함께 단계적으로 10배 희석시켜서 1% NAD 첨가 Casman 배지에 발라 생성되는 콜로니의 수를 확인하여 1ml 당 1×10^5 colony forming unit (CFU) 이상이 되는지 검사한다. 검사를 통과하면 전체 양의 0.7~0.8%만큼의 포르말린을 첨가하고, 4℃의 교반 배양기로 이동시켜 불활화시킨다. 24시간 이상 교반한 후, 일부 불활화된 배양액을 뽑아 1% NAD 첨가 Casman 배지에 발라서 불활화 되었는지 검사한다. 다음 날 완전히 불활화된 것이 확인되면, 부형제(adjutant)로서 알루미늄 겔(aluminium hydroxide gel)을 10% 만큼 첨가하고, 12시간 동안 교반시킨다.

2. 흉막폐렴 예방 백신 면역원성 및 안전성 연구

가. 흉막폐렴 백신 함유 혈청형 결정

혈청형	분리균수
2형	11
5형	7
6형	3
7형	1
Un-typable	3
합계	25

응집반응 검사결과 2009년 국내에서 분리한 흉막폐렴균 중 혈청형 2형이 가장 흔하게 분리되었으며, 5형 과 6형 순서로 분리되었다. 또한 1999년에 국내 흉막폐렴균의 분포를 조사한 논문의 경우 흉막폐렴균주 중에서도 병원성과 밀접하게 연관된 APX 독소를 가진 97개의 흉막폐렴균주 중 2형, 5형, 6형이 각각 56개, 28개, 11개로 전체의 98%를 차지한다고 하며(Min, et al. 1999), 이 사실은 2009년의 결과와 크게 다르지 않다. 이러한 결과를 토대로 흉막폐렴균 혈청형 2, 5, 6형을 백신균주로 선택하여 진행하였다.

나. 부형제 선정과 조합을 통한 백신 개발

부형제 함량별 토끼의 부작용 관찰 결과, 특별한 부작용은 관찰되지 않았다.

흉막폐렴 백신 부형제 함량	형성 항체가
1%	1:256
5%	1:1024
10%	1:2048
15%	1:2048
20%	1:2048

다. 불활화 확인결과

포르말린 함량	불활화 시간 (hr)	CFU/ μ l
0.3%	6	3.2×10^4
0.5%	6	6.5×10^3
0.7%	6	1.8×10^3
1%	6	1.6×10^2
0.3%	12	4.4×10^3
0.5%	12	3.4×10^2
0.7%	12	1.1×10^2
1%	12	2.1×10^1
0.3%	18	2.4×10^2
0.5%	18	6.4×10^1
0.7%	18	0
1%	18	0
0.3%	24	3.8×10^1
0.5%	24	0
0.7%	24	0
1%	24	0

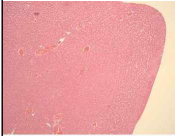
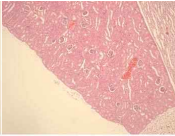
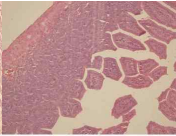
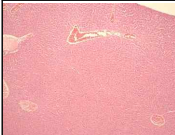
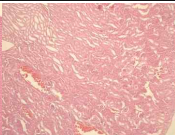
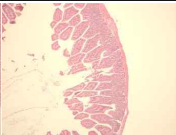
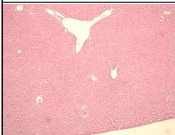
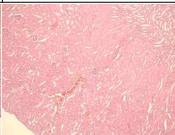

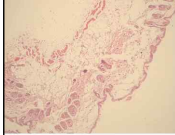
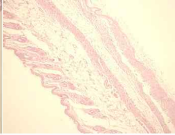
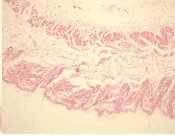
라. 실험동물을 이용한 홍막페렴 백신 안전성 실험

(1) 마우스를 이용한 홍막페렴 백신 안전성 실험결과

접종부위	접종량(ml)	개체번호	임상증상	병변
복강	0.25	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	0.5	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	1	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
피하	0.25	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	0.5	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	1	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변



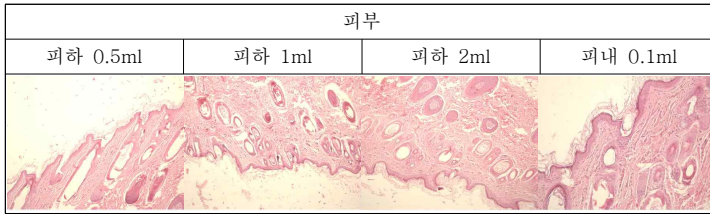
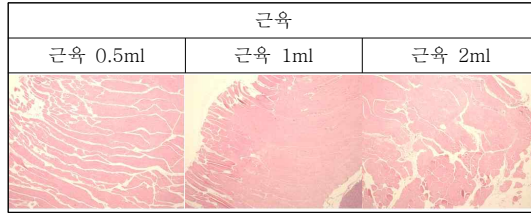
마우스 HE 염색 슬라이드

복강 0.25ml		
간	신장	장
		
복강 0.5ml		
간	신장	장
		
복강 1ml		
간	신장	장
		
피부		
피하 0.25ml	피하 0.5ml	피하 1ml
		

(2) 기니피그를 이용한 홍막페렴 백신 안전성 실험

접종부위	접종량(ml)	개체번호	임상증상	병변
근육	0.5	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	1	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	2	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
피하	0.5	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	1	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
	2	1	무증상	접종부위 탈모
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변
		5	무증상	무병변
피내	0.1	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변

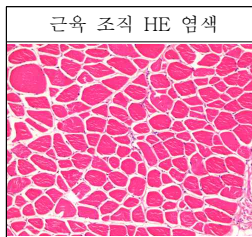




마. 돼지를 이용한 흉막폐렴 백신 안전성 실험결과

(1) 자돈을 이용한 흉막폐렴 백신 안전성 실험결과

접종부위	접종량(ml)	개체번호	과민반응	병변
근육	2	1	무증상	무병변
		2	무증상	무병변
		3	무증상	무병변
		4	무증상	무병변



바. 실험동물을 이용한 흉막폐렴 백신의 항체가 연구결과

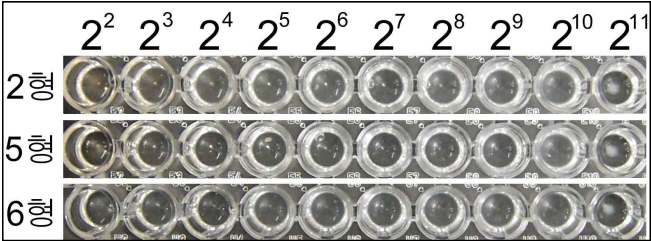
(1) 토끼를 이용한 흉막폐렴 백신 항체가 연구결과

	2형			5형			6형		
	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi
1	0	64	512	0	128	512	0	128	1024
2	0	64	1024	0	256	512	0	256	1024
3	0	64	1024	0	256	1024	0	128	512
4	0	64	512	0	256	1024	0	256	1024
5	0	128	512	0	256	1024	0	64	512
6	0	64	512	0	256	512	0	256	1024

사. 돼지 (자돈)를 이용한 백신 항체가 실험결과

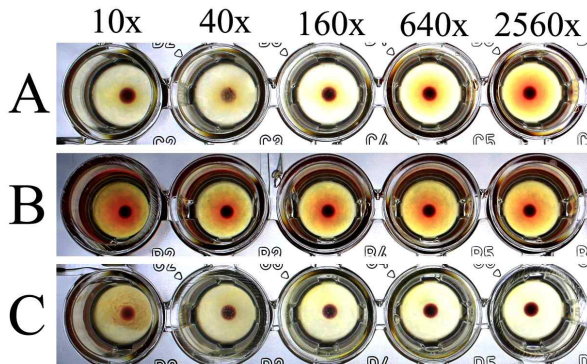
(1) 자돈을 이용한 흉막폐렴 백신 항체가 연구결과

	2형			5형			6형		
	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi
1	0	128	1024	0	128	1024	0	128	1024
2	0	64	1024	0	128	512	0	64	512
3	0	64	512	0	128	1024	0	128	1024
4	0	64	512	0	64	1024	0	128	1024
5	0	128	512	0	128	1024	0	64	512



(2) 용혈 억제 반응을 통한 Apx 항체의 역가 측정결과

혈청 번호	역가 (50% 용혈 억제 희석 배수)
1	640
2	640
3	640
4	160
5	640
6	640



- A : 백신균 배양액과 혈청 희석액이 포함된 용혈 억제 시험군
 B : 백신균 배양액이 포함된 용혈 양성 대조군
 C : 무균 배양액이 포함된 용혈 음성 대조군

(3) 세포 독성 억제 반응을 통한 Apx 항체의 역가 측정결과

형질 번호	역가 (50% 세포독성 억제 희석 배수)
1	160
2	640
3	160
4	160
5	160
6	640

3. 흉막폐렴균 예방 백신의 공격접종 시험 및 보존성 시험

가. 흉막폐렴 백신의 특성 시험 및 무균시험

(1) 특성시험 결과

Lot No.	결 과
Lot 1	적 합
Lot 2	적 합
Lot 3	적 합

3개 Lot 모두 옅은 황색의 혼탁한 부유액이며, 정치하면 내용물의 침전이 생기나 흔들면 쉽게 균등액이 되며 소분된 내용물의 성상이 균일하고 이물이 존재하지 않는다.

(2) 무균시험 결과

Lot No.	일반 세균			마이코플라즈마 (PCR 결과)
	시험배지	결 과 (7일간)		
		22℃	37℃	
Lot 1	NA	-	-	음 성
	NB	-	-	
	Thio	-	-	
Lot 2	NA	-	-	음 성
	NB	-	-	
	Thio	-	-	
Lot 3	NA	-	-	음 성
	NB	-	-	
	Thio	-	-	

※ - : 세균의 발육이 인정되지 않음

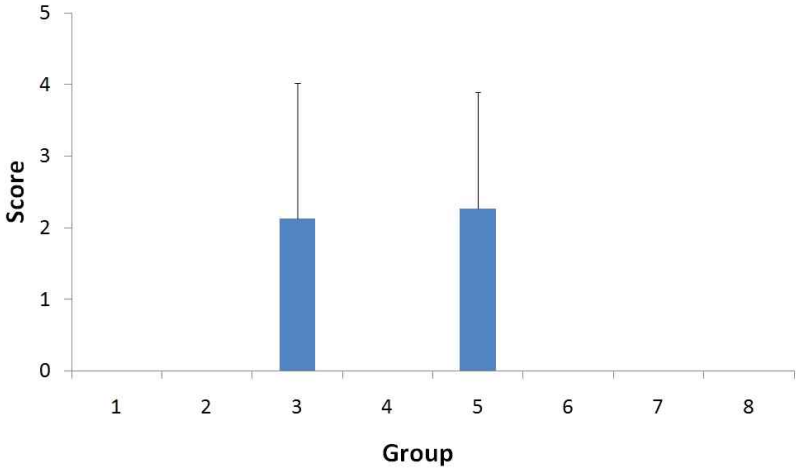
동물용 의약품 생물학제제 일반검정기준에 따른 시험백신의 무균시험 결과 3 Lot 모두 NA, NB, Thio에서 7일간 배양하였을 때 어떠한 세균 및 곰팡이의 발육도 나타나지 않았으며, 마이코플라즈마는 PCR 음성으로 확인되었다.

나. 실험동물을 이용한 흉막페렴 백신의 단일 혈청형 공격 접종 실험결과

(1) 단일 혈청형 공격 접종 실험 임상 증상 결과

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	5	O	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	5	O	혈청형 2형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
3	5	X	혈청형 2형	복강내	2.4±2.19	1.8±2.05	2.2±1.79
4	5	O	혈청형 5형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
5	5	X	혈청형 5형	복강내	2.6±1.67	2.0±1.41	2.2±2.05
6	5	O	혈청형 6형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
7	5	X	혈청형 6형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
8	5	X	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

입상증상



그룹별 입상증상 평가 결과, 모든 시험에서 6형 접종군(그룹 6, 7)은 통계적인 차이를 보이지 않았다. Komal 등의 논문에 따르면 (Komal, et al. 1990), 6형은 마우스에 대하여 병원성이 없는 것으로 나타난다. 제 1 시험에서, 그룹 4와 5($P=0.032$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)($P=0.029$)에서 유의하게 차이가 있었으며 그룹 2와 3($P=0.151$)은 차이를 보이지 않았다. 제 2 시험의 경우는 제 1 시험과 동일한 통계적 결과를 얻었으며, 제 3 시험의 경우, 그룹 2와 3($P=0.032$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)($P=0.029$)에서 유의하게 차이가 있었으며 그룹 4와 5($P=0.151$)은 차이를 보이지 않았다. 2형과 5형의 통계적인 결과가 실험 순번에 따라 다르게 나타나는 것은 각각의 혈청형 접종실험에 한정된 개체수의 영향으로 판단되며, 총 백신군과 비백신군의 통계적인 결과를 보았을 때, 백신이 병증을 감소시킴을 확인하였다.

(2) 단일 혈청형 공격 접종 실험 폐사 두수 결과

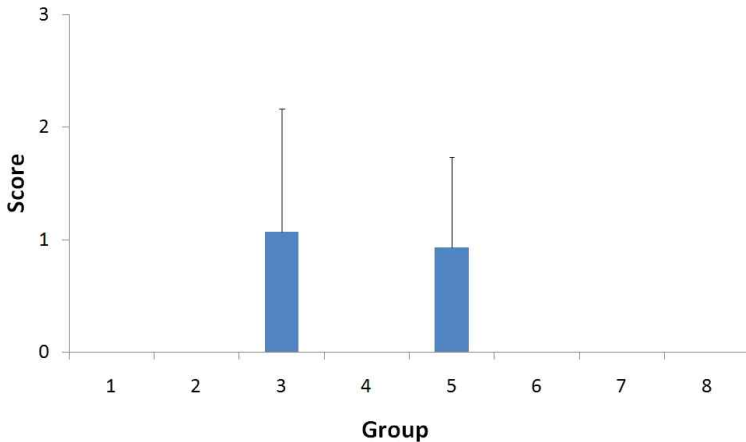
그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	5	O	X	X	0	0	0
2	5	O	혈청형 2형	복강내	0	0	0
3	5	X	혈청형 2형	복강내	3	2	2
4	5	O	혈청형 5형	복강내	0	0	0
5	5	X	혈청형 5형	복강내	1	1	2
6	5	O	혈청형 6형	복강내	0	0	0
7	5	X	혈청형 6형	복강내	0	0	0
8	5	X	X	X	0	0	0

그룹별 폐사율 평가 결과, 2형과 5형에서 일부 폐사가 있었지만 폐사율에서는 통계적인 차이를 나타내지 않았다. Komal 등의 논문에 따르면 (Komal, et al. 1990), 마우스에서 2형과 5형의 폐사율은 일정치 않고, 2형은 최고 33%의 낮은 폐사율을 나타내고 있는데, 본 실험 결과 또한 유사한 폐사율을 보였다.

(3) 단일 혈청형 공격 접종 실험 병리조직학적 병변 결과

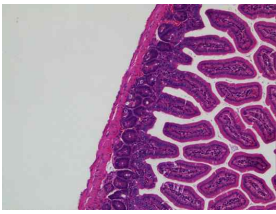
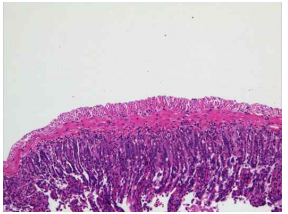
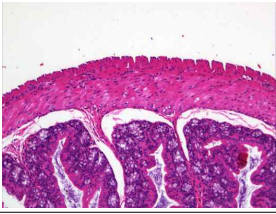
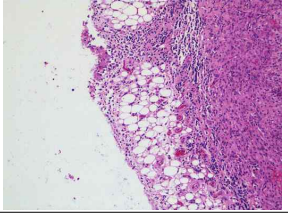

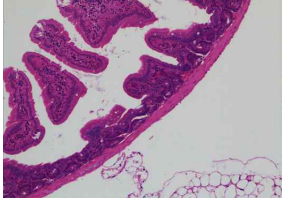
그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	5	O	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	5	O	혈청형 2형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
3	5	X	혈청형 2형	복강내	1.2±1.1	1.0±1.41	1.0±1.00
4	5	O	혈청형 5형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
5	5	X	혈청형 5형	복강내	1.0±0.71	0.8±0.84	1.0±1.00
6	5	O	혈청형 6형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
7	5	X	혈청형 6형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
8	5	X	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

조직병변



그룹별 병리조직학적 병변 평가 결과, 제 1 시험에서, 그룹 4와 5(P=0.032), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)(P=0.029)에서 유의하게 차이가 있었으며 그룹 2와 3(P=0.151)은 차이를 보이지 않았다. 제 2시험의 경우는 제 1시험과 동일한 통계적 결과를 얻었으며, 제 3시험의 경우, 그룹 2와 3(P=0.032), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)(P=0.029)에서 유의하게 차이가 있었으며 그룹 4와 5(P=0.151)은 차이를 보이지 않았다. 2형과 5형의 통계적인 결과가 실험 순번에 따라 다르게 나타나는 것은 각각의 혈청형 접종실험에 한정된 개체수의 영향으로 판단되며, 총 백신군과 비백신군의 통계적인 결과를 보

았을 때, 백신이 병증을 감소시킴을 확인하였다.

		그룹	조직 병변			그룹	조직 병변
백신 + 공격 접종군	2			공격 접종군	3		
	4				5		
	6				7		

2, 5형 접종군은 복강 내 접종시 장막의 염증이 관찰되지만, 6형 접종군은 염증이 관찰되지 않거나 미약하게 관찰되었다.

(4) 단일 혈청형 공격 접종 실험 응집반응 항체가 결과 (2차 백신 접종 후 2주 후)

그룹	동물수	백신접종	시험횟수		
			1	2	3
1	5	O	704±265.0	832±265.0	640±273.0
2	5	O	704±265.0	896±237.0	576±181.0
3	5	X	0±0	0±0	0±0
4	5	O	896±237.0	896±237.0	704±265.0
5	5	X	0±0	0±0	0±0
6	5	O	768±273.7	960±181.0	768±273.7
7	5	X	0±0	0±0	0±0
8	5	O	0±0	0±0	0±0

통계 분석 결과 각각의 혈청형에 따른 모든 공격접종군에서 백신군과 비백신군 사이에 차이가 있는 것으로 확인되었다 (P<0.001).

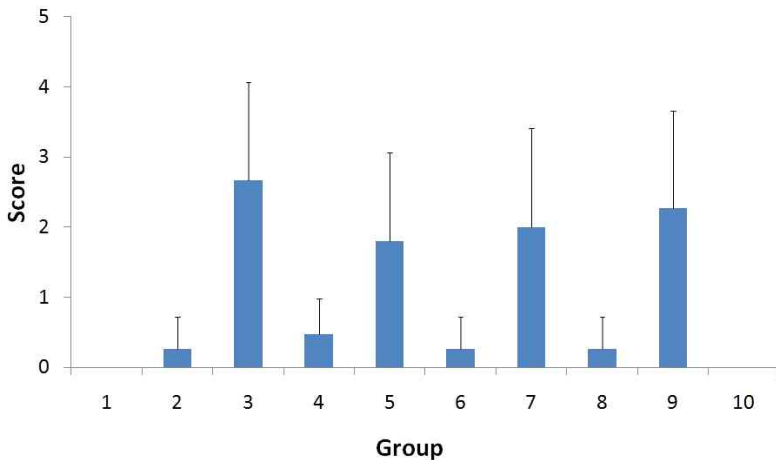
다. 실험동물을 이용한 흉막폐렴 백신의 복수 혈청형 공격 접종 실험결과

(1) 실험 디자인 결과

(가) 복수 혈청형 공격 접종 실험 임상 증상 결과

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	5	O	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	5	O	혈청형 2와 5형	복강내	0.4±0.55	0.2±0.45	0.2±0.45
3	5	X	혈청형 2와 5형	복강내	2.6±1.67	2.2±1.64	3.2±0.84
4	5	O	혈청형 2와 6형	복강내	0.6±0.55	0.4±0.55	0.4±0.55
5	5	X	혈청형 2와 6형	복강내	1.8±1.79	1.6±1.14	2.0±1.00
6	5	O	혈청형 5와 6형	복강내	0.4±0.55	0.2±0.45	0.2±0.45
7	5	X	혈청형 5와 6형	복강내	2.2±1.64	2.4±1.52	1.8±1.30
8	5	O	혈청형 2, 5와 6형	복강내	0.4±0.55	0.2±0.45	0.2±0.45
9	5	X	혈청형 2, 5와 6형	복강내	1.8±1.48	2.8±1.30	2.2±1.64
10	5	X	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

임상증상



그룹별 임상증상 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3(P=0.001), 그룹 4와 5(P=0.003), 그룹 6과 7(P=0.001), 그룹 8과 9(P<0.001), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)(P<0.001)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3(P=0.001), 그룹 4와 5(P<0.001), 그룹 6과 7(P<0.001), 그룹 8과 9(P=0.001), 그리고 백신

군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3($P=0.003$), 그룹 4와 5($P=0.003$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P=0.003$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 흉막폐렴 감염시 백신이 병증을 감소시킴을 확인하였다.

(나) 복수 혈청형 공격 접종 실험 폐사 두수 결과

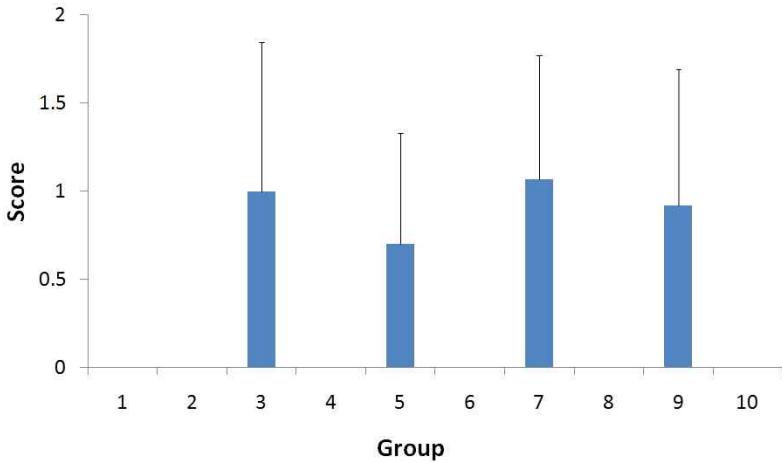
그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	5	O	X	X	0	0	0
2	5	O	혈청형 2와 5형	복강내	0	0	0
3	5	X	혈청형 2와 5형	복강내	2	1	2
4	5	O	혈청형 2와 6형	복강내	0	0	0
5	5	X	혈청형 2와 6형	복강내	1	0	0
6	5	O	혈청형 5와 6형	복강내	0	0	0
7	5	X	혈청형 5와 6형	복강내	1	2	1
8	5	O	혈청형 2, 5와 6형	복강내	0	0	0
9	5	X	혈청형 2, 5와 6형	복강내	1	2	1
10	5	X	X	X	0	0	0

그룹별 폐사율 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3($P=0.007$), 그룹 4와 5($P=0.001$), 그룹 6과 7($P=0.007$), 그룹 8과 9($P=0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P=0.001$), 그룹 4와 5($P=0.001$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P=0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3($P=0.01$), 그룹 4와 5($P=0.01$), 그룹 6과 7($P=0.001$), 그룹 8과 9($P=0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 흉막폐렴 감염할 때 백신이 흉막폐렴으로 인한 폐사를 감소시킴을 확인하였다.

(다) 복수 혈청형 공격 접종 실험 병리조직학적 병변 결과

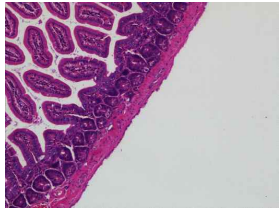
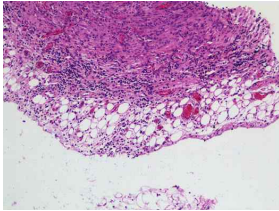
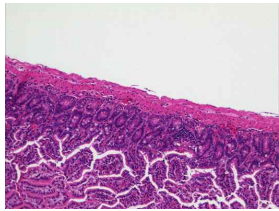
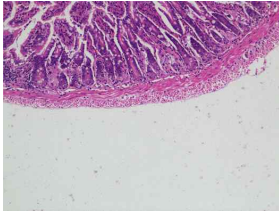
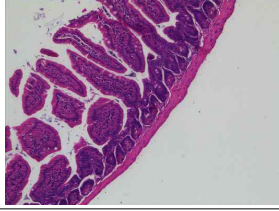
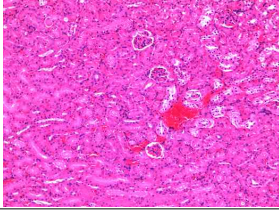

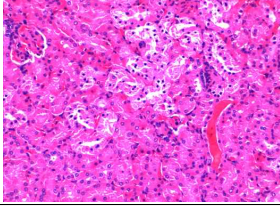
그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	5	O	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	5	O	혈청형 2와 5형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
3	5	X	혈청형 2와 5형	복강내	1.0±1.0	0.8±0.84	1.2±0.84
4	5	O	혈청형 2와 6형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
5	5	X	혈청형 2와 6형	복강내	0.6±0.89	0.4±0.55	0.8±0.45
6	5	O	혈청형 5와 6형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
7	5	X	혈청형 5와 6형	복강내	0.8±0.83	1.4±0.55	1.0±0.71
8	5	O	혈청형 2, 5와 6형	복강내	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
9	5	X	혈청형 2, 5와 6형	복강내	1.25±0.50	0.75±0.96	0.75±0.96
10	5	X	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

조직병변



그룹별 병리조직학적 병변 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3($P=0.001$), 그룹 4와 5($P=0.005$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P=0.001$), 그룹 4와 5($P<0.001$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3($P=0.005$), 그룹 4와 5($P=0.002$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과

대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P < 0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 홍막폐렴 감염 시 백신이 홍막폐렴 병변을 감소시킴을 확인하였다.

	그룹	육안병변		그룹	육안병변
백신 + 공격 접종군	2		공격 접종군	3	
	4			5	
	6			7	
	8			9	

복강내 공격 접종시 3, 5 그룹은 장막에 염증이 있으며, 7, 9 그룹은 신장 내 출혈과 괴사가 관찰되었다.

(라) 복수 혈청형 공격 접종 실험 응집반응 항체가 결과 (2차 백신 접종 2주 후)

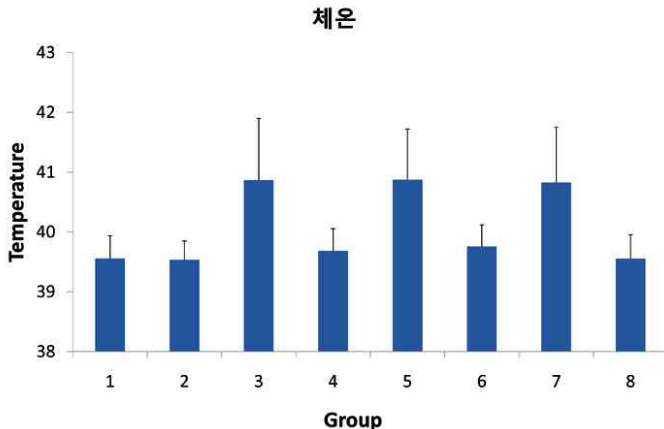
그룹	동물수	백신접종	시험횟수		
			1	2	3
1	5	O	640±237.0	704±265.0	640±237.0
2	5	O	704±265.0	768±273.7	704±265.0
3	5	X	0±0	0±0	0±0
4	5	O	768±273.7	768±273.7	832±265.0
5	5	X	0±0	0±0	0±0
6	5	O	896±237.0	832±265.0	768±273.7
7	5	X	0±0	0±0	0±0
8	5	O	704±265.0	704±265.0	832±265.0
9	5	X	0±0	0±0	0±0
10	5	X	0±0	0±0	0±0

통계 분석 결과 각각의 혈청형에 따른 모든 공격접종군에서 백신군과 비백신군 사이에 차이가 있는 것으로 확인되었다 (P<0.001).

라. 돼지(자돈)을 이용한 홍막페럼 백신의 단일 혈청형 공격 접종 실험결과

(1) 단일 혈청형 공격 접종 실험 임상 증상 결과 (체온)

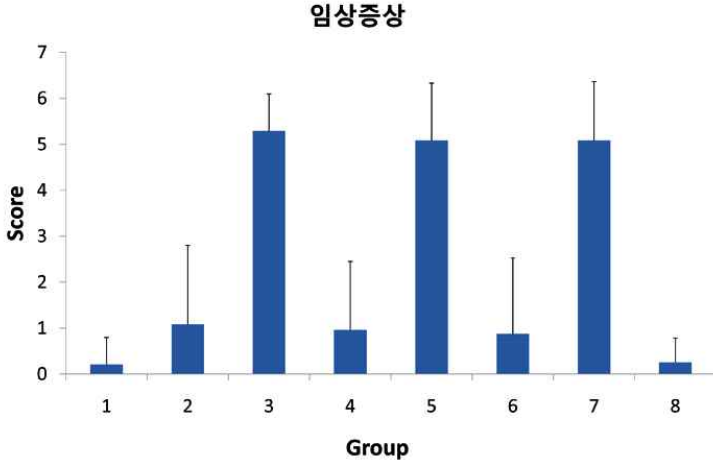
그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	39.6±0.38	39.4±0.32	39.5±0.40
2	8	O	혈청형 2형	비강내	39.5±0.31	39.6±0.41	39.4±0.34
3	8	X	혈청형 2형	비강내	40.9±1.03	41.0±0.94	40.8±0.98
4	8	O	혈청형 5형	비강내	39.7±0.37	39.8±0.37	39.6±0.42
5	8	X	혈청형 5형	비강내	40.9±0.85	40.7±1.08	41.1±1.06
6	8	O	혈청형 6형	비강내	39.8±0.36	39.7±0.40	39.6±0.35
7	8	X	혈청형 6형	비강내	40.8±0.92	40.8±1.18	40.9±0.86
8	8	X	X	X	39.6±0.40	39.5±0.42	39.7±0.37



그룹별 체온 분석 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3($P<0.001$), 그룹 4와 5($P<0.001$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P<0.001$), 그룹 4와 5($P<0.001$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3($P<0.001$), 그룹 4와 5($P<0.001$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 홍막페렴 감염시 백신이 체온의 상승을 감소시킴을 확인하였다.

(2) 임상 증상

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	0.13±0.35	0.00±0.00	0.50±0.93
2	8	O	혈청형 2형	비강내	0.88±1.46	1.13±2.10	1.25±1.75
3	8	X	혈청형 2형	비강내	5.25±0.71	5.50±0.53	5.13±1.13
4	8	O	혈청형 5형	비강내	0.75±1.04	0.75±1.04	1.38±2.20
5	8	X	혈청형 5형	비강내	5.13±1.13	5.25±1.04	4.88±1.64
6	8	O	혈청형 6형	비강내	1.13±1.81	0.50±0.93	1.00±2.14
7	8	X	혈청형 6형	비강내	4.75±1.58	5.00±1.41	5.50±0.76
8	8	X	X	X	0.25±0.46	0.13±0.35	0.38±0.74



그룹별 임상증상 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3($P<0.001$), 그룹 4와 5($P<0.001$), 그룹 6과 7($P=0.002$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P=0.001$), 그룹 4와 5($P<0.001$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3($P=0.001$), 그룹 4와 5($P=0.007$), 그룹 6과 7($P=0.003$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 홍막페렴 감염시 백신이 병증을 감소시킴을 확인하였다.

(3) 단일 혈청형 공격 접종 실험 폐사 두수 결과

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	0	0	0
2	8	O	혈청형 2형	비강내	1	2	1
3	8	X	혈청형 2형	비강내	8	8	7
4	8	O	혈청형 5형	비강내	0	0	1
5	8	X	혈청형 5형	비강내	6	7	6
6	8	O	혈청형 6형	비강내	1	0	1
7	8	X	혈청형 6형	비강내	6	6	7
8	8	X	X	X	0	0	0

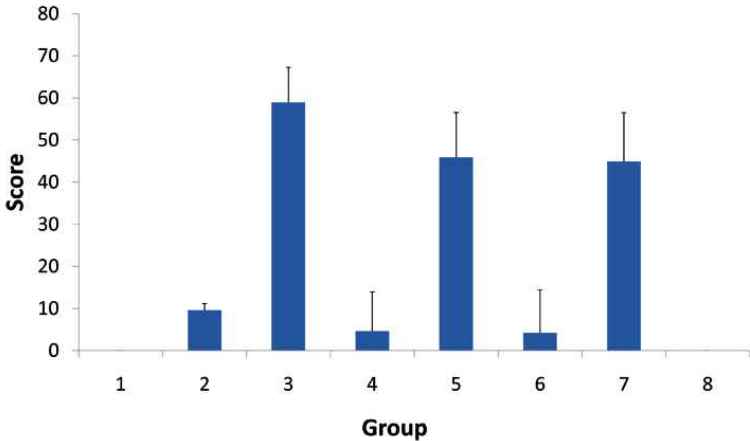
그룹별 폐사율 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3($P=0.001$), 그룹 4와 5($P=0.007$), 그룹 6과 7($P=0.041$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P=0.007$), 그룹 4와

5(P=0.001), 그룹 6과 7(P=0.007), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)(P<0.001)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3(P=0.01), 그룹 4와 5(P=0.041), 그룹 6과 7(P=0.01), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)(P<0.001)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 홍막페렴 감염할 때 백신이 홍막페렴으로 인한 폐사를 감소시키기를 확인하였다.

(4) 단일 혈청형 공격 접종 실험 육안 병변 결과

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
2	8	O	혈청형 2형	비강내	10.3±16.0	10.8±17.0	7.8±12.0
3	8	X	혈청형 2형	비강내	58.1±8.8	57.8±8.3	60.9±8.8
4	8	O	혈청형 5형	비강내	2.8±4.4	2.5±3.8	8.6±14.9
5	8	X	혈청형 5형	비강내	44.5±10.6	45.4±11.6	47.9±10.9
6	8	O	혈청형 6형	비강내	6.13±12.8	0.9±2.5	5.7±12.4
7	8	X	혈청형 6형	비강내	43.8±13.4	44.3±12.2	46.8±10.3
8	8	X	X	X	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

육안병변



그룹별 육안병변 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3(P<0.001), 그룹 4와 5(P<0.001), 그룹 6과 7(P<0.001), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)(P<0.001)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3(P<0.001), 그룹 4와 5(P<0.001), 그룹 6과 7(P=0.001), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)(P<0.001)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3(P=0.001), 그룹 4와 5(P<0.001), 그룹 6과 7(P<0.001), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대

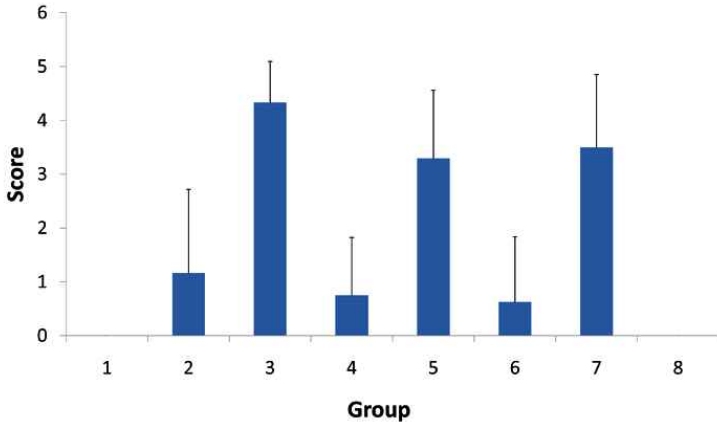
조군(그룹 3, 5, 7)($P < 0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 흉막폐렴 감염시 백신이 흉막폐렴 병변을 감소시킴을 확인하였다.



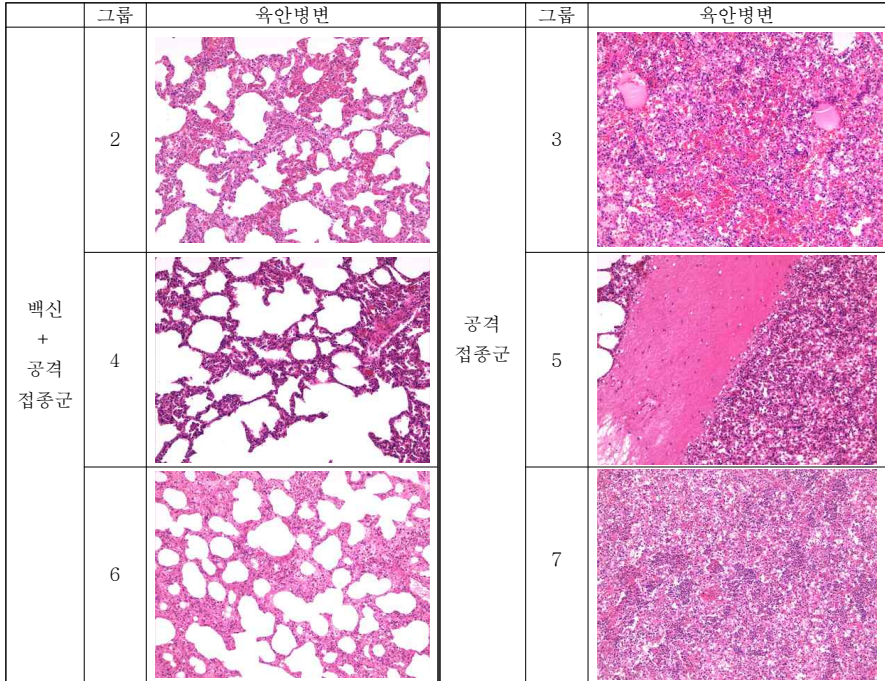
(5) 단일 혈청형 공격 접종 실험 병리조직학적 병변 결과

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	8	O	혈청형 2형	비강내	1.00±1.41	1.38±2.00	1.13±1.36
3	8	X	혈청형 2형	비강내	4.25±0.89	4.38±0.74	4.38±0.74
4	8	O	혈청형 5형	비강내	0.50±0.76	0.63±0.92	1.13±1.46
5	8	X	혈청형 5형	비강내	3.25±1.28	3.50±1.20	3.13±1.46
6	8	O	혈청형 6형	비강내	0.88±1.46	0.38±0.74	0.63±1.41
7	8	X	혈청형 6형	비강내	3.25±1.58	3.38±1.41	3.88±1.13
8	8	X	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

조직병변



그룹별 병리조직학적 병변 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3($P=0.001$), 그룹 4와 5($P=0.01$), 그룹 6과 7($P=0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P=0.001$), 그룹 4와 5($P=0.001$), 그룹 6과 7($P=0.021$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3($P=0.01$), 그룹 4와 5($P=0.001$), 그룹 6과 7($P=0.002$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6)과 대조군(그룹 3, 5, 7)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 홍막폐렴 감염할 때 백신이 홍막폐렴 병변을 감소시킴을 확인하였다.



(6) 단일 혈청형 공격 접종 실험 응집반응 항체가 결과 (2차 백신 접종 2주 후)

그룹	동물수	백신접종	시험횟수		
			1	2	3
1	8	O	704±265.0	832±265.0	640±273.0
2	8	O	704±265.0	896±237.0	576±181.0
3	8	X	0±0	0±0	0±0
4	8	O	896±237.0	896±237.0	704±265.0
5	8	X	0±0	0±0	0±0
6	8	O	768±273.7	960±181.0	768±273.7
7	8	X	0±0	0±0	0±0
8	8	O	0±0	0±0	0±0

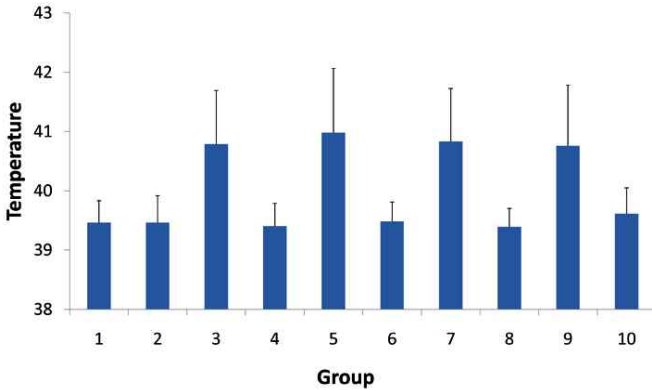
통계 분석 결과 각각의 혈청형에 따른 모든 공격접종군에서 백신군과 비백신군 사이에 차이가 있는 것으로 확인되었다. ($P < 0.001$)

마. 돼지(자돈)를 이용한 흉막폐렴 백신의 복수 혈청형 공격 접종 실험결과

(1) 복수 혈청형 공격 접종 실험 임상 증상 결과(체온)

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	39.5±0.37	39.6±0.35	39.7±0.46
2	8	O	혈청형 2와 5형	비강내	39.5±0.46	39.4±0.44	39.7±0.38
3	8	X	혈청형 2와 5형	비강내	40.8±0.91	40.7±0.94	41.2±1.18
4	8	O	혈청형 2와 6형	비강내	39.4±0.39	39.7±0.36	39.5±0.42
5	8	X	혈청형 2와 6형	비강내	41.0±1.08	40.9±0.88	41.1±1.12
6	8	O	혈청형 5와 6형	비강내	39.5±0.33	39.7±0.41	39.6±0.41
7	8	X	혈청형 5와 6형	비강내	40.8±0.89	41.2±1.08	40.7±0.96
8	8	O	혈청형 2, 5와 6형	비강내	39.4±0.31	39.6±0.36	39.7±0.39
9	8	X	혈청형 2, 5와 6형	비강내	40.8±1.02	40.9±1.03	40.9±0.96
10	8	X	X	X	39.6±0.43	39.4±0.44	39.7±0.40

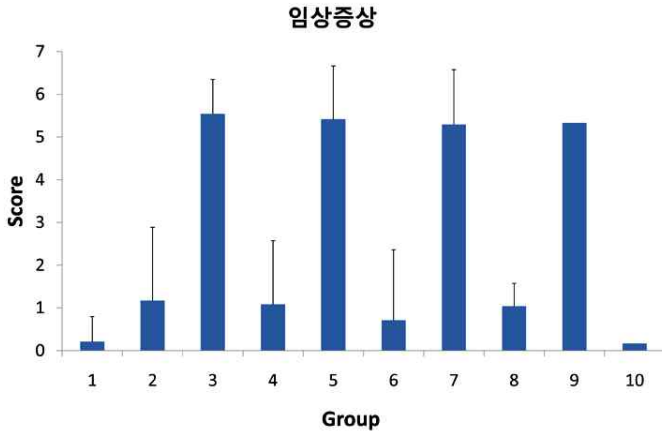
체온



그룹별 체온 분석 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3($P<0.001$), 그룹 4와 5($P<0.001$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9) ($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P<0.001$), 그룹 4와 5($P<0.001$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9) ($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3($P<0.001$), 그룹 4와 5($P<0.001$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7) ($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 홍막패렴 감염시 백신이 체온의 상승을 감소시킴을 확인하였다.

(2) 임상 증상

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	0.25±0.46	0.00±0.00	0.38±0.52
2	8	O	혈청형 2와 5형	비강내	1.38±2.26	1.00±1.77	1.13±2.10
3	8	X	혈청형 2와 5형	비강내	5.75±0.46	5.50±0.53	5.38±0.92
4	8	O	혈청형 2와 6형	비강내	1.13±2.10	0.75±1.16	1.38±2.13
5	8	X	혈청형 2와 6형	비강내	5.63±0.52	5.25±1.49	5.38±1.19
6	8	O	혈청형 5와 6형	비강내	0.88±1.25	0.63±1.19	0.63±1.19
7	8	X	혈청형 5와 6형	비강내	4.88±1.55	5.63±0.52	5.38±0.74
8	8	O	혈청형 2, 5와 6형	비강내	0.63±1.06	1.13±1.89	1.38±2.20
9	8	X	혈청형 2, 5와 6형	비강내	5.00±1.31	5.50±0.76	5.50±0.76
10	8	X	X	X	0.25±0.46	0.25±0.46	0.00±0.00



그룹별 임상증상 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3(P=0.001), 그룹 4와 5(P=0.003), 그룹 6과 7(P=0.001), 그룹 8과 9(P<0.001), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)(P<0.001)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3(P=0.001), 그룹 4와 5(P<0.001), 그룹 6과 7(P<0.001), 그룹 8과 9(P=0.001), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)(P<0.001)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3(P=0.003), 그룹 4와 5(P=0.003), 그룹 6과 7(P<0.001), 그룹 8과 9(P=0.003), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)(P<0.001)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 흉막폐렴 감염할 때 백신이 병증을 감소시킴을 확인하였다.

(3) 복수 혈청형 공격 접종 실험 폐사 두수 결과

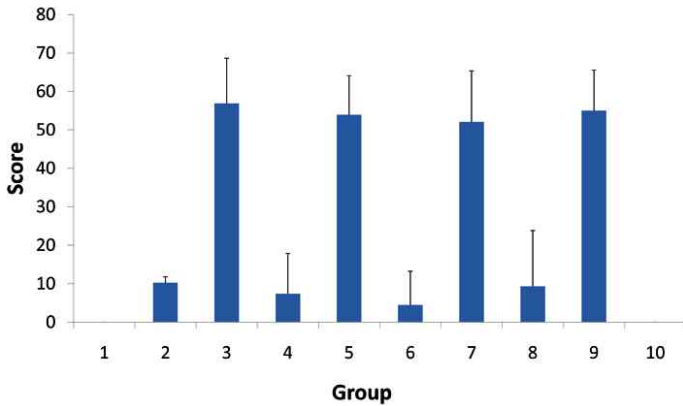
그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	0	0	0
2	8	O	혈청형 2와 5형	비강내	2	1	1
3	8	X	혈청형 2와 5형	비강내	8	8	7
4	8	O	혈청형 2와 6형	비강내	1	0	1
5	8	X	혈청형 2와 6형	비강내	8	7	7
6	8	O	혈청형 5와 6형	비강내	0	0	0
7	8	X	혈청형 5와 6형	비강내	6	8	7
8	8	O	혈청형 2, 5와 6형	비강내	0	1	1
9	8	X	혈청형 2, 5와 6형	비강내	7	8	8
10	8	X	X	X	0	0	0

그룹별 폐사율 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3($P=0.007$), 그룹 4와 5($P=0.001$), 그룹 6과 7($P=0.007$), 그룹 8과 9($P=0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P=0.001$), 그룹 4와 5($P=0.001$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P=0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3($P=0.01$), 그룹 4와 5($P=0.01$), 그룹 6과 7($P=0.001$), 그룹 8과 9($P=0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 흉막폐렴 감염할 때 백신이 흉막폐렴으로 인한 폐사를 감소시킴을 확인하였다.

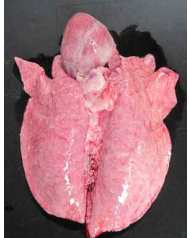

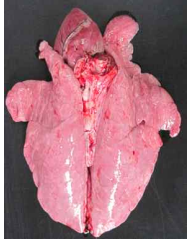

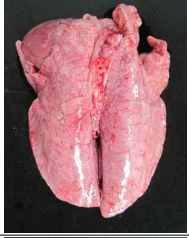

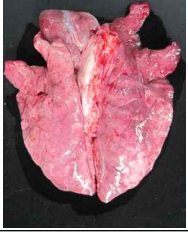
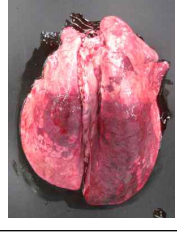
(4) 복수 혈청형 공격 접종 실험 육안 병변 결과

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
2	8	O	혈청형 2와 5형	비강내	13.1±20.1	8.4±12.3	9.3±15.1
3	8	X	혈청형 2와 5형	비강내	60.8±9.8	57.1±9.8	52.8±15.1
4	8	O	혈청형 2와 6형	비강내	9.0±11.3	4.4±5.0	8.8±13.8
5	8	X	혈청형 2와 6형	비강내	57.5±8.5	52.1±11.0	52.1±11.2
6	8	O	혈청형 5와 6형	비강내	4.4±6.8	2.8±5.1	6.3±13.1
7	8	X	혈청형 5와 6형	비강내	50.4±16.5	53.6±7.7	52.3±15.5
8	8	O	혈청형 2, 5와 6형	비강내	3.1±5.3	10.6±16.4	14.1±21.9
9	8	X	혈청형 2, 5와 6형	비강내	54.5±14.0	51.8±7.0	58.8±9.5
10	8	X	X	X	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

육안병변



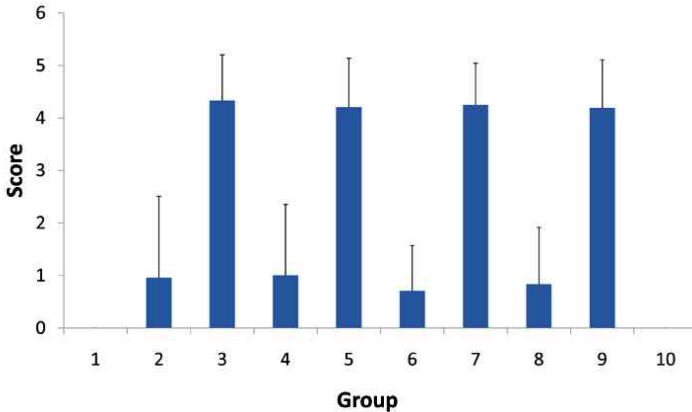
그룹별 육안병변 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3($P<0.001$), 그룹 4와 5($P<0.001$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P<0.001$), 그룹 4와 5($P<0.001$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P=0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3($P=0.001$), 그룹 4와 5($P=0.001$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P=0.003$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 홍막폐렴 감염할 때 백신이 홍막폐렴 병변을 감소 시킴을 확인하였다.

	그룹	육안병변		그룹	육안병변
백신 + 공격 접종군	2		공격 접종군	3	
	4			5	
	6			7	
	8			9	

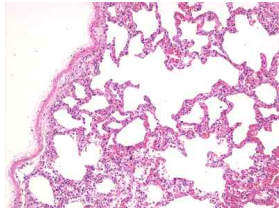
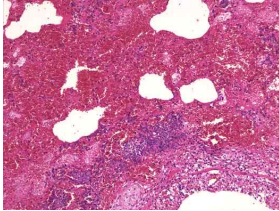
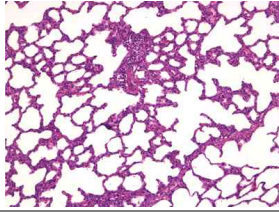
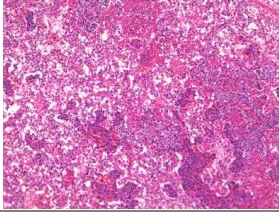
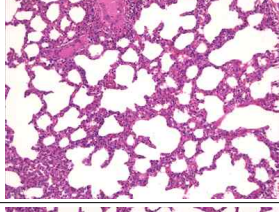
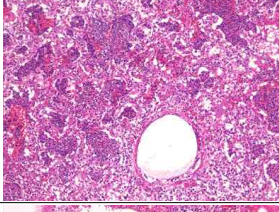
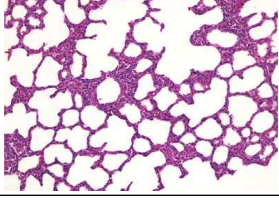
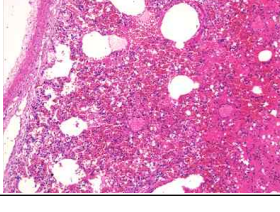
(5) 복수 혈청형 공격 접종 실험 병리조직학적 병변 결과

그룹	동물수	백신접종	접종 세균 혈청형	세균 접종 방법	시험횟수		
					1	2	3
1	8	O	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	8	O	혈청형 2와 5형	비강내	1.13±1.55	0.88±1.46	0.88±1.81
3	8	X	혈청형 2와 5형	비강내	4.5±0.76	4.38±0.92	4.13±0.99
4	8	O	혈청형 2와 6형	비강내	1.13±1.73	0.75±0.89	1.13±1.46
5	8	X	혈청형 2와 6형	비강내	4.38±0.74	4.13±0.99	4.13±1.13
6	8	O	혈청형 5와 6형	비강내	0.75±0.89	0.75±0.89	0.63±0.92
7	8	X	혈청형 5와 6형	비강내	4.13±0.83	4.38±0.74	4.25±0.89
8	8	O	혈청형 2, 5와 6형	비강내	0.50±0.76	1.41±1.41	1.00±1.07
9	8	X	혈청형 2, 5와 6형	비강내	4.00±1.00	4.71±0.49	3.86±0.69
10	8	X	X	X	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

조직병변



그룹별 병리조직학적 병변 평가 결과, 제 1시험에서 그룹 2와 3($P=0.001$), 그룹 4와 5($P=0.005$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내었다. 제 2시험의 경우, 그룹 2와 3($P=0.001$), 그룹 4와 5($P<0.001$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있었으며, 제 3시험의 경우 또한, 그룹 2와 3($P=0.005$), 그룹 4와 5($P=0.002$), 그룹 6과 7($P<0.001$), 그룹 8과 9($P<0.001$), 그리고 백신군(그룹 2, 4, 6, 8)과 대조군(그룹 3, 5, 7, 9)($P<0.001$)에서 모두 유의하게 차이가 있음을 나타내어, 홍막페렴 감염 시 백신이 홍막페렴 병변을 감소시킴을 확인하였다.

	그룹	육안병변		그룹	육안병변
백신 + 공격 접종군	2		공격 접종군	3	
	4			5	
	6			7	
	8			9	

(6) 복수 혈청형 공격 접종 실험 응집반응 항체가 결과 (2차 백신 접종 2주 후)

그룹	동물수	백신접종	시험횟수		
			1	2	3
1	8	O	640±237.0	704±265.0	640±237.0
2	8	O	704±265.0	768±273.7	704±265.0
3	8	X	0±0	0±0	0±0
4	8	O	768±273.7	768±273.7	832±265.0
5	8	X	0±0	0±0	0±0
6	8	O	896±237.0	832±265.0	768±273.7
7	8	X	0±0	0±0	0±0
8	8	O	704±265.0	704±265.0	832±265.0
9	8	X	0±0	0±0	0±0
10	8	X	0±0	0±0	0±0

통계 분석 결과 각각의 혈청형에 따른 모든 공격접종군에서 백신군과 비백신군 사이에 차이가 있는 것으로 확인되었다 (P<0.001).

바. 홍막페럼 백신 보존성 시험결과

(1) 제조 후 6개월 보존한 홍막페럼 백신의 Apx 독소의 용혈능력과 세포독성 억제 능력 항체가 형성 능력 시험결과

(가) Apx 독소의 용혈능 시험결과

실험 동물	용혈능 유지 희석 배수
1	32
2	32
3	16
4	32
5	32

(나) Apx 독소의 세포독성 억제 항체가 형성능 시험

실험 동물	2형			5형			6형		
	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi
1	0	4	16	0	4	8	0	4	16
2	0	4	8	0	4	16	0	4	8
3	0	4	8	0	4	8	0	4	8
4	0	4	8	0	4	16	0	4	8
5	0	4	16	0	4	8	0	4	16

(2) 제조후 12개월 보존한 홍막페럼 백신의 Apx 독소의 용혈능력과 세포독성 억제 능력 항체가 형성 능력 시험결과

(가) Apx 독소의 용혈능 시험결과

실험 동물	용혈능 유지 회석 배수
1	16
2	16
3	16
4	32
5	16

(나) Apx 독소의 세포독성 억제 항체가 형성능 시험결과

실험 동물	2형			5형			6형		
	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi
1	0	8	16	0	8	16	0	4	16
2	0	4	8	0	8	16	0	4	8
3	0	8	16	0	4	8	0	8	16
4	0	4	8	0	4	8	0	4	8
5	0	8	8	0	8	8	0	8	16

(3) 제조 후 18개월 보존한 흉막페렴 백신의 Apx 독소의 용혈능력과 세포독성 억제 능력 항체가 형성 능력 시험

(가) Apx 독소의 용혈능 시험결과

실험 동물	용혈능 유지 회석 배수
1	16
2	8
3	16
4	16
5	16

(나) Apx 독소의 세포독성 억제 항체가 형성능 시험결과

실험 동물	2형			5형			6형		
	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi
1	0	8	8	0	4	8	0	4	8
2	0	4	8	0	8	16	0	4	8
3	0	4	8	0	4	8	0	8	16
4	0	4	8	0	4	8	0	8	8
5	0	8	16	0	8	8	0	8	16

(4) 제조후 24개월 보존한 흉막페렴 백신의 Apx 독소의 용혈능력과 세포독성 억제 능력 항체가 형성 능력 시험

(가) Apx 독소의 용혈능 시험결과

실험 동물	용혈능 유지 회석 배수
1	8
2	8
3	16
4	16
5	16

(나) Apx 독소의 세포독성 억제 항체가 형성능 시험결과

실험 동물	2형			5형			6형		
	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi	0dpi	14dpi	28dpi
1	0	8	8	0	4	8	0	4	8
2	0	4	8	0	4	16	0	4	8
3	0	4	8	0	4	8	0	8	16
4	0	4	8	0	4	8	0	8	8
5	0	8	8	0	8	8	0	8	16

4. 흉막폐렴균 예방 백신의 야외 적용 시험

가. 1차 흉막폐렴 백신 접종 후 안전성 시험결과

(1) 1차 백신 접종 후 전체 안전성 시험 결과

안전성 시험 기관동안 3개 시험농장의 20두씩의 자돈에서 어떠한 부작용도 관찰되지 않았다.

(가) 접종 30분 후 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	5주령	0	0	0	1	0	0	0	40.44
농장2	20	5주령	0	1	0	0	0	0	0	40.42
농장3	20	5주령	0	0	0	0	0	0	0	40.85

(나) 접종 1시간 후 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	5주령	0	0	0	1	0	0	0	40.56
농장2	20	5주령	0	0	0	1	0	0	0	40.5
농장3	20	5주령	0	0	0	1	0	0	0	40.93

(다) 접종 2시간 후 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	5주령	0	0	0	1	0	0	0	40.48
농장2	20	5주령	0	0	0	1	0	0	0	40.39
농장3	20	5주령	0	0	0	1	0	0	0	40.86

(라) 접종 4시간 후 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	5주령	0	0	0	1	0	0	0	40.36
농장2	20	5주령	0	0	0	2	0	0	0	40.26
농장3	20	5주령	0	0	0	1	0	0	0	40.78

(마) 접종 1일후부터 14일간 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	기타
농장1	20	5주령	0	1	0	4	0	0	0	0
농장2	20	5주령	0	1	0	4	0	0	0	0
농장3	20	5주령	0	3	0	4	0	0	0	0

※ 관찰일: 접종 후 14일간

나. 2차 흉막폐렴 백신 접종 후 안전성 시험 결과

(1) 2차 백신 접종 후 전제 안전성 시험 결과

안전성 시험 기관동안 3개 시험농장의 20두씩의 자돈에서 어떠한 부작용도 관찰되지 않았다.

(가) 접종 30분 후 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	7주령	0	0	0	0	0	0	0	40.58
농장2	20	7주령	0	0	0	0	0	0	0	40.56
농장3	20	7주령	0	1	0	1	0	0	0	40.57

(나) 접종 1시간 후 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	7주령	0	0	0	1	0	0	0	40.61
농장2	20	7주령	0	0	0	0	0	0	0	40.64
농장3	20	7주령	0	0	0	2	0	0	0	40.64

(다) 접종 2시간 후 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	7주령	0	0	0	0	0	0	0	40.53
농장2	20	7주령	0	0	0	1	0	0	0	40.46
농장3	20	7주령	0	0	0	2	0	0	0	40.50

(라) 접종 4시간 후 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	체온
농장1	20	7주령	0	0	0	0	0	0	0	40.44
농장2	20	7주령	0	0	0	0	0	0	0	40.38
농장3	20	7주령	0	0	0	0	0	0	0	40.39

(마) 접종 1일후부터 14일간 안전성 실험

농장명	시험 두수	접종 일령	임상 증상 발현 두수							
			쇼크	발열	구토	식욕 저하	화농	위축	폐사	기타
농장1	20	7주령	0	2	0	4	0	0	0	0
농장2	20	7주령	0	1	0	4	0	0	0	0
농장3	20	7주령	0	4	0	4	0	0	0	0

※ 관찰일: 접종 후 14일간

다. 백신 접종군과 미접종군에서 성장 증체 비교 시험결과

(1) 백신접종군과 미접종군간 백신 1차 접종시(5주령), 2차 접종(7주령) 후 2주 후(9주령), 2차 접종 후 9주 후(16주령), 시험 종료시(25주령)의 체중 비교

(가) 제 1 농장

그룹		주령				증체율 (%)	폐사율 (%)
		5	9	16	25		
백신접종군	공시두수	20	20	20	18	/	10
	평균	6.67	25.82	42.06	105.17	1576.76	/
	표준편차	0.87	0.99	4.66	7.57	/	/
미접종군	공시두수	20	20	20	18	/	10
	평균	6.68	24.36	42.95	104.56	1565.27	/
	표준편차	0.64	1.32	3.21	6.55	/	/
유의성 (P value)		0.951	0.001	0.50	0.797		

(나) 제 2 농장

그룹		주령				증체율 (%)	폐사율 (%)
		5	9	16	25		
백신접종군	공시두수	20	20	18	18	/	10
	평균	6.21	26.01	44.68	103.22	1662.16	/
	표준편차	0.49	0.97	4.44	5.37	/	/
미접종군	공시두수	20	20	16	14	/	30
	평균	6.29	24.24	40.44	97.54	1550.72	/
	표준편차	0.44	1.28	6.41	6.98	/	/
유의성 (P value)		0.594	0.001	0.027	0.016		

(다) 제 3 농장

그룹		주령				증체율 (%)	폐사율 (%)
		5	9	16	25		
백신접종군	공시두수	20	20	19	18		10
	평균	6.56	26.13	40.26	104.94	1599.70	
	표준편차	0.45	0.81	3.51	5.13		
미접종군	공시두수	20	20	17	15		25
	평균	6.58	24.15	38	101.73	1546.05	
	표준편차	0.65	1.22	4.15	5.22		
유의성 (P value)		0.933	0.001	0.085	0.085		

라. 백신 접종군과 미접종군에서 임상 시험 비교 시험결과

(1) 백신접종군과 미접종군 간의 백신 접종 전 피모, 창백, 호흡수, 활력도, 호흡기, 및 소화기 증상 등의 임상증상 비교

(가) 제 1 농장

그룹		1차 접종 전	2차 접종 전
백신 접종군	평균	0.10	0.20
	표준편차	0.31	0.52
미접종군	평균	0.10	0.35
	표준편차	0.31	0.93

(나) 제 2 농장

그룹		1차 접종 전	2차 접종 전
백신 접종군	평균	0.11	0.16
	표준편차	0.32	0.37
미접종군	평균	0.10	0.40
	표준편차	0.31	0.60

(다) 제 3 농장

그룹		1차 접종 전	2차 접종 전
백신 접종군	평균	0.05	0.11
	표준편차	0.23	0.32
미접종군	평균	0.05	0.20
	표준편차	0.22	0.41

(2) 백신접종군과 미접종군 간의 백신 접종 후 피모, 창백, 호흡수, 활력도, 호흡기, 및 소화기 증상 등의 임상증상 비교

(가) 제 1 농장

그룹		1차 접종 후	2차 접종 후
백신 접종군	평균	0.25	0.40
	표준편차	0.55	0.60
미접종군	평균	0.10	0.35
	표준편차	0.31	0.93

(나) 제 2 농장

그룹		1차 접종 후	2차 접종 후
백신 접종군	평균	0.25	0.30
	표준편차	0.55	0.57
미접종군	평균	0.10	0.40
	표준편차	0.31	0.60

(다) 제 3 농장

그룹		1차 접종 후	2차 접종 후
백신 접종군	평균	0.10	0.20
	표준편차	0.31	0.41
미접종군	평균	0.05	0.20
	표준편차	0.22	0.41

(3) 백신접종군과 미접종군간의 백신 접종 후 1주 간격으로 시험 종료까지 피모, 창백, 호흡수, 활력도, 호흡기, 및 소화기 증상 등의 임상증상 비교

(가) 제 1 농장

그룹		주령																
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
백신 접종군	평균	0.05	0.08	0.10	0.15	0.20	0.15	0.15	0.33	0.30	0.43	0.39	0.22	0.22	0.19	0.17	0.14	
	표준편차	0.22	0.27	0.30	0.43	0.52	0.36	0.43	0.66	0.65	0.87	0.82	0.54	0.54	0.52	0.45	0.35	
미접종군	평균	0.05	0.13	0.18	0.18	0.25	0.15	0.15	0.25	0.24	0.41	0.50	0.58	0.68	0.53	0.44	0.36	
	표준편차	0.22	0.33	0.50	0.50	0.54	0.48	0.48	0.71	0.43	0.60	0.76	0.83	0.96	0.74	0.73	0.64	
유의성 (P value)		0.99	0.50	0.53	0.03	0.04	0.99	0.71	0.63	0.82	0.61	0.09	0.06	0.01	0.03	0.04	0.05	

(나) 제 2 농장

그룹		주령																
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
백신 접종군	평균	0.05	0.05	0.08	0.10	0.15	0.15	0.15	0.15	0.28	0.29	0.28	0.33	0.12	0.15	0.18	0.15	
	표준편차	0.22	0.22	0.27	0.30	0.36	0.36	0.36	0.36	0.51	0.73	0.61	0.79	0.33	0.36	0.39	0.36	
미접종군	평균	0.05	0.13	0.20	0.20	0.30	0.33	0.35	0.63	0.65	0.66	0.67	0.68	0.66	0.69	0.53	0.46	
	표준편차	0.22	0.33	0.40	0.41	0.46	0.53	0.53	0.67	0.89	0.81	0.96	0.88	0.79	0.93	0.89	0.84	
유의성 (P value)		0.99	0.22	0.12	0.22	0.18	0.10	0.07	0.01	0.04	0.03	0.04	0.02	0.02	0.04	0.18	0.23	

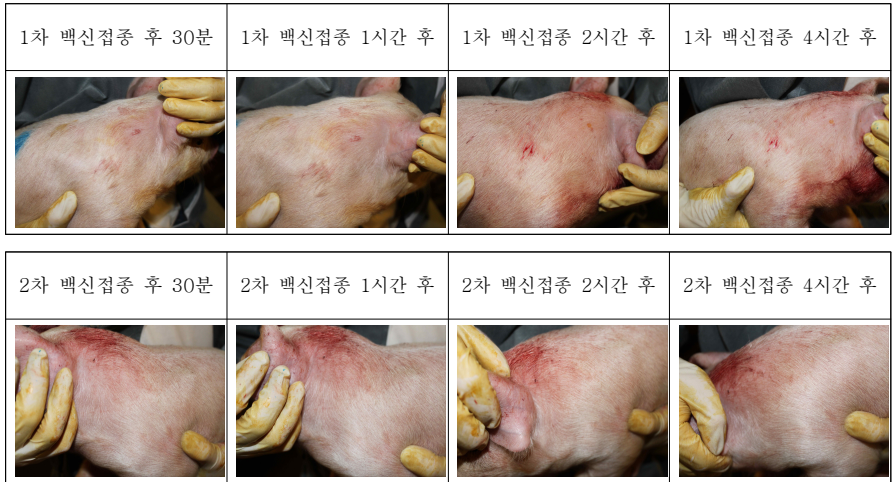
(다) 제 3 농장

그룹		주령																
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
백신 접종군	평균	0.03	0.05	0.05	0.08	0.08	0.13	0.18	0.15	0.20	0.20	0.25	0.13	0.13	0.21	0.21	0.21	
	표준편차	0.19	0.22	0.22	0.27	0.27	0.33	0.45	0.43	0.52	0.56	0.74	0.41	0.41	0.52	0.52	0.52	
미접종군	평균	0.03	0.08	0.10	0.08	0.18	0.20	0.33	0.40	0.50	0.42	0.39	0.38	0.41	0.41	0.56	0.62	
	표준편차	0.16	0.26	0.30	0.27	0.45	0.46	0.61	0.67	0.88	0.83	0.77	0.60	0.61	0.66	0.75	0.92	
유의성 (P value)		0.99	0.64	0.34	0.99	0.25	0.45	0.33	0.01	0.02	0.35	0.04	0.03	0.12	0.35	0.13	0.41	

(4) 백신 접종군과 미접종군에서 임상 시험 비교 시험 최종 결과

백신의 안전성 시험 결과, 백신의 1차 접종 후 자돈에서 호흡수가 증가한 개체는 평균 2두, 행동장애는 1두, 그 외 나머지 항목은 관찰되지 않았으며 통계적으로 미접종군과 차이를 나타내지 않았다. 또한, 2차 접종 후 발열을 보인 개체는 호흡수나 행동장애에 평균 1두로 그외 나

머지 항목은 관찰되지 않았으며 통계적으로 미접종군과 차이를 나타내지 않았다. 그러므로 본 홍막페렴 백신은 5주 및 7주령 자돈에게 안전한 것으로 판단된다.



백신의 성장증체 비교시험 결과, 백신접종군의 20주령 체중과 미접종군의 20주령 체중을 비교하였을 때, 각각의 증체율은 1612.87%, 1554.01% 이었다. 이것은 백신접종군이 미접종군에 비하여 증체율이 58.86% 더 증가한 결과이며, 이는 통계적으로 유의하였다 (P=0.048).

농장명	백신 접종군	백신 미접종군
농장 1		
농장 2		
농장 3		

백신 접종 후 시험기간동안 임상증상의 관찰 결과, 백신 접종군과 미접종군이 통계적으로 차이를 보인 주령은 8-9주령이며 이는 일반적으로 흉막폐렴이 발병하는 시기와 유사한 주령이다. 또한 백신 접종군의 폐사율은 10%, 미접종군의 폐사율은 21.7%로 차이를 보였다.($P=0.021$) 이로 미루어 백신은 임상증상의 감소에 효과적인 것으로 판단된다.

제 5 장 백신 면역학적 검사

제 1 절 서 설

국내에서 지속적으로 연쇄상구균에 의한 다발성 장막염의 발생 빈도를 인식하고 있기 때문에 장차 다발성 장막염 예방에 연쇄상 구균 백신의 필요성이 서서히 대두되고 있는 실정이다. 따라서 국내에서의 연쇄상 구균을 이용한 다발성 장막염 백신 개발의 필요성이 더욱 증가되고 있다. 또한, 최근 양돈협회에서 실시한 설문 조사에서 홍막 폐렴이 가장 경제적 피해를 많이 일으키는 질병 중의 하나라고 답변하였다. 지금까지 홍막 폐렴이 발생하지 않던 농장에서는 홍막 폐렴 증상을 나타내지 않는 보균자 돼지가 새로 농장에 유입되어서 발병되는 예가 많다. 홍막 폐렴균은 돼지와 돼지의 직접접촉이나 공기감염에 의해 전파된다. 스트레스도 홍막 폐렴을 증가시키는 중요한 인자이다. 밀집사육, 환기불량, 수송, 급격한 기온변화 등에 의한 스트레스는 홍막 폐렴의 발생을 증가시킨다. 또한, 계절별 발생양상을 보면, 늦은 가을에서부터 초봄까지에 홍막폐렴이 가장 다발한다. 특히, 우리나라 계절 특성상 초봄에 일교차가 심해서 홍막 폐렴이 다발하고 있다. 홍막폐렴은 사양관리가 열악한 농장에서는 자돈사에 있는 60-70일령의 이유자돈에서부터 발병을 한다. 하지만, 대부분의 농장에서는 자돈사에서 홍막 폐렴이 감염되어서 질병이 진행되다가 비육돈사로 돼지를 옮긴 후에 임상증상을 유발하여 폐사한다. 홍막 폐렴은 60-70일령의 돼지에서부터 감염되기 때문에 임신 모돈에 예방접종을 해서 모체가행 항체를 통해 포유자돈을 예방하는 것은 효과적이지 못하다. 따라서, 5주와 8주령에 2차례 홍막 폐렴 백신을 접종해 이유자돈이 60-70일령에 도달하기 전에 홍막 폐렴에 대한 항체를 보유하는 것이 좋다. 일반적으로는 5주령 돼지에 1차 접종하고, 3주 후인 8주령에 2차 접종을 하는 것이 좋다고 알려져 있다. *Mycoplasma hyopneumoniae*는 돼지 농장에 널리 퍼져있으며, 증체율을 저하시킨다. 마이코플라즈마성 폐렴은 비육돈과 육성돈에서 임상 증상을 일으킨다. 일반적으로 감염된 초산 또는 3산 이하 모돈에서부터 포유자돈으로 전파된다. 포유시기에 감염된 포유자돈은 다른 포유자돈에게 *M. hyopneumoniae*를 전파시킨다. *M. hyopneumoniae*에 감염되면 약 10-16일간의 잠복기를 거치게 되며, 감염된 포유자돈은 이유 후 보통 약 9일 이내에 기침을 한다. 일단, 마이코플라즈마성 폐렴이 농장에 감염되면 모든 돼지를 일시에 전부 출하시킨 후 감염이 안 된 새로운 돼지를 유입시켜야 질병을 막을 수 있지만, 현실적으로는 불가능한 점이 있다. 따라서, 최근 양돈 농장에서 문제가 되고 있는 세균성 소모성 질환인 연쇄상 구균증 백신, 홍막폐렴 백신, 마이코플라즈마-홍막폐렴 다중점 백신을 개발하고자 하였다. 국내에서 발생하는 세균성 소모성 질환인 연쇄상 구균증에 대한 예방 단일백신은 현재 없기 때문에 질병 예방에 어려움이 있다. 또한 대부분의 홍막폐렴과 마이코플라즈마 감염 예방백신은 수입 백신을 사용하고 있기 때문에 국내 양돈 농가의 의약품 구매 비용이 증가되고 있다. 이러한 문제를 극복하기 위하여 현재 국내에서 세균성 소모성 질환으로 가장 피해가 큰 두 가지 질병 예방에 대한 백신을 개발하고자 하였다. 또한 최신 생명공학적인 방법을 이용하여 배양이 어려운 마이코플라즈마균의 경우 중요 유착 유전자를 홍막 폐렴균에 삽입하여 잡종 마이코플라즈마-홍막 폐렴 세균을 제작하여 다중점 백신을 제작하기로 하였다. 본 연구에서는 연

쇄상 구균증의 백신, 홍막 폐렴균의 백신, 마이코플라스마-홍막 폐렴균의 백신을 제작하는 데 있어서 백신면역학적 검사를 통하여 연쇄상 구균증 예방백신의 효과를 측정할 수 있는 면역학적 검사 방법 개발, 홍막폐렴 예방백신의 효과를 측정할 수 있는 면역학적 검사 방법 개발, 홍막폐렴균의 외막에서 유도된 항체 측정용 면역학적 검사방법 개발 등을 수행하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 연쇄상구균증 및 홍막폐렴 면역학적 검사 방법 개발

가. 응집반응을 이용한 연쇄상구균증 백신에 대한 혈청학적 검사 방법 개발

Microplate agglutination test(MAT)를 이용하여 혈청 내 항체의 역가를 판별한다. U자 96 well 플레이트를 준비하여 PBS를 분주하되 가로로 2, 3, 4번째 well에는 240 μ l를 분주하고, 첫 번째 well에는 300 μ l를 분주한다. 그리고 첫 번째 well에 혈청 20 μ l를 분주하여, 혈청을 16배 희석시킨다. 희석한 첫 번째 well에서 희석액 80 μ l를 뽑아 2번째 well에 넣고 섞어 4배 희석시킨 후, 3, 4번째 well까지 단계적으로 4배씩 희석시켜 4번째 well은 1,024배 희석이 되도록 한다. 다음으로 V자 96well 플레이트를 준비하여 앞서 준비한 혈청 희석액을 60 μ l씩 같은 순서로 분주한다. 그리고 각각의 연쇄상구균 혈청형의 항원을 PBS에 같은 탁도로 희석시켜서 60 μ l씩 분주한다. 잘 섞은 후, 증발이 되지 않도록 랩 등으로 잘 밀봉하여 55 $^{\circ}$ C 배양기에 넣고 밤새 반응시킨다. 다음 날, 불빛 아래에서 보았을 때, 응집이 잘 이루어지면 균체, 즉 항원이 항원-항체 교차반응(cross-link)으로 인해 가라앉지 못하고 전 날과 마찬가지로 고르게 부유한 채로 있으므로, 플레이트의 바닥에 확실히 균체가 가라앉아 하얀색 점으로 보이기 시작하는 well의 희석 배수로 항체의 역가를 판별한다. 연쇄상구균 3형, 4형 7형에 대한 항체가를 쉽게 응집반응을 통하여 측정할 수 있다.

나. 응집반응을 이용한 홍막폐렴 백신에 대한 혈청학적 검사 방법 개발

Microplate agglutination test(MAT)를 이용하여 혈청 내 항체의 역가를 판별한다. U자 96 well 플레이트를 준비하여 PBS를 분주하되 가로로 2, 3, 4번째 well에는 240 μ l를 분주하고, 첫 번째 well에는 300 μ l를 분주한다. 그리고 첫 번째 well에 혈청 20 μ l를 분주하여, 혈청을 16배 희석시킨다. 희석한 첫 번째 well에서 희석액 80 μ l를 뽑아 2번째 well에 넣고 섞어 4배 희석시킨 후, 3, 4번째 well까지 단계적으로 4배씩 희석시켜 4번째 well은 1,024배 희석이 되도록 한다. 다음으로 V자 96well 플레이트를 준비하여 앞서 준비한 혈청 희석액을 60 μ l씩 같은 순서로 분주한다. 그리고 각각의 홍막폐렴균 혈청형의 항원을 PBS에 같은 탁도로 희석시켜서 60 μ l씩 분주한다. 잘 섞은 후, 증발이 되지 않도록 랩 등으로 잘 밀봉하여 55 $^{\circ}$ C 배양기에 넣고 밤새 반응시킨다. 다음 날, 불빛 아래에서 보았을 때, 응집이 잘 이루어지면 균체, 즉 항원이 항원-항체 교차반응(cross-link)으로 인해 가라앉지 못하고 전 날과 마찬가지로 고르게

부유한 채로 있으므로, 플레이트의 바닥에 확실히 균체가 가라앉아 하얀색 점으로 보이기 시작하는 well의 희석 배수로 항체의 역가를 판별한다. 흉막폐렴군 2형, 5형 6형에 대한 항체가를 쉽게 응집반응을 통하여 측정할 수 있다.

다. 혈청검사를 통한 마이코플라즈마 폐렴 감염시기 조사

총 13개의 농장에서 의뢰된 가검물을 검사하였다. 각 주령별로 6주령, 10주령, 14주령, 18주령, 22주령의 가검물을 검사하여 국내 양돈장에서 마이코플라즈마가 감염되는 시기를 조사하였다.

2. 마이코플라즈마 혈청검사

가. 연쇄상구균 백신에 대한 혈청학적 검사 방법 실시

(1) 연쇄상구균 백신 항체가 측정을 위한 평판 응집반응 개발

개발할 연쇄상구균 백신의 항체 형성 능력을 측정하기 위하여 평판 응집반응 (microplate agglutination test)을 개발하였다. 개발 한 평판 응집반응의 시행 방법은 크게 측정 할 항체 준비 방법과 항원 준비 방법이 있다. 항체 준비 방법은 2배 희석한 혈청을 멸균 PBS에 2배씩 10번 희석하여 마지막이 1024배가 되도록 혈청 희석액을 준비하였다. 돼지 체내에서 형성된 항체를 측정하기 위한 항원의 준비과정은 먼저 표준주로 사용하는 혈청형 2형, 3형, 4형을 배양한다. 3가지 연쇄상구균을 냉동보관에서 꺼내어 가능한 빠르게 녹인 후 바로 백금으로 혈액 배지에 바른다. 그 후 약 12시간이 경과된 후, 오염 유무를 확인하고 독립된 콜로니를 멸균 면봉으로 수거하여 다시 혈액 배지 또는 trypticase soy 배지 (TSA) 1개에 바르고, brain heart infusion (BHI) 배양액을 200ml 제조하여 멸균시켜 준비한다. 셋째 날, 클린벤치 안에서 1% horse serum과 1% yeast extract를 멸균시킨 BHI 배양액 200ml에 첨가하고, 그 중 5ml을 뽑아 배양된 세균을 멸균 면봉으로 풀어 부유시킨다. 이를 배양액에 넣은 후 12시간 동안 37°C의 배양기에서 150rpm의 속도로 교반, 증균시킨다. 증균된 연쇄상구균은 6000rpm에서 원심분리하여 상층의 배양액을 버리고 균체는 멸균 PBS에 다시 부유시킨다. 부유시킨 균은 다시 stomacher 기기를 이용하여 더욱 고르게 부유시켜준 후, 3회 냉동과 해동을 반복한다. 이렇게 준비된 항원은 2-3배 희석하여 사용한다. 96 well 플레이트에 준비된 혈청 희석액을 각각 60μl씩 넣고, 마지막 2개의 well은 PBS만 60μl씩 넣은 후, 항원 희석액을 모든 well에 60 μl씩 분주한다. 그리고 24시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 결과를 확인한다.

(2) 평판 응집반응을 이용한 연쇄상구균 항체 측정 검사

개발한 평판 응집반응을 이용하여 국내 양돈장 10곳에서 채취한 주령별 혈청을 이용하여 연쇄상구균 2형, 3형, 4형의 항체가를 조사하였다. 주령별 혈청은 크게 1주에서 3주령까지는 포유자돈 혈청, 4주령에서 10주령까지는 이유자돈 혈청, 11주령 이상은 육성비육돈 혈청, 모든

은 산차에 관계없이 모든 혈청으로 분류하여 분석하였다.

나. 홍막페렴 백신에 대한 혈청학적 검사 방법 실시

(1) Apx 독소의 용혈 활성화도 검사 방법 확립

홍막페렴균은 여러 병원성 결정 요소들을 지니고 있지만, 그 중 가장 강력하게 병원성과 관련 있는 요소는 외독소인 Apx 독소이다. Apx 독소는 홍막페렴균에 의하여 유발되는 병변과 직접적으로 연관되어 있으며, 홍막페렴균을 제외한 Apx를 함유한 배양액만으로도 홍막페렴과 유사한 페렴병변을 일으킬 수 있다. 또한 이러한 Apx 독소는 단백질로 구성되어 있기 때문에 강력한 면역 중화 작용을 일으킬 수 있는 항원으로도 알려져 있다. Apx 독소는 4가지로 구분 지을 수 있으며, 첫 번째 ApxI는 강한 용혈작용과 세포독성을 가지며 본 백신의 5형 홍막페렴균이 가지고 있다. 두 번째 ApxII는 약한 용혈작용과 중등도의 세포독성을 가지며 본 백신의 2, 5, 6형 홍막페렴균이 모두 가지고 있다. 세 번째 ApxIII는 강한 세포독성을 가지지만 용혈작용이 없으며, 본 백신의 2형과 6형 홍막페렴균이 가지고 있다. 네 번째 ApxIV는 약한 용혈작용을 일으키나, 생체 내에서만 분비가 되는 것으로 알려져 있으므로 본 백신 검사에서는 제외하였다 (Huang, et al. 2005). 때문에 Apx 독소의 유무를 검사하기 위하여 Apx 독소의 용혈능력을 이용한 역가측정(titration of hemolytic activity)을 실시하였다. 우선 사독화 전의 백신균 배양액을 원심분리기에 넣고 6000rpm에서 10분 동안 균을 가라앉힌 후 상층액을 0.45 μ m 필터에 통과시켜 준비하며, 홍막페렴 혈청 응집반응 검사를 통해 항체역가가 음성인 돼지에서 채혈한 혈액을 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 적혈구만 분리하여 놓는다. 96 well 플레이트에 150 μ l의 필터링한 상층액을 첫 well에 넣은 후 나머지 well에는 150 μ l의 멸균 Tris-buffered 생리식염수(TBS : Tris-HCl 10mM, NaCl 145mM, CaCl₂ 10mM)를 넣은 후, 첫 well에서 50 μ l의 상층액을 뽑아 다음 well에 넣고 섞어 4배씩 단계적으로 희석한다. 마지막은 TBS만 넣어 음성대조군으로 사용한다. 그리고 모든 well의 용액을 100 μ l로 맞춘 후, 멸균 TBS에 2% 만큼 돼지 적혈구를 넣어 섞은 용액을 각 well에 50 μ l씩 첨가하여 섞는다. 이후, 플레이트를 잘 감싼 후 37°C에서 1시간 동안 반응시키고, 다시 4°C에서 15시간 동안 침전시킨다. 역가는 50%의 용혈이 일어나는 희석배수를 측정한다.

(2) 용혈 억제 반응을 통한 Apx 항체의 역가 측정 방법 확립

용혈이 뚜렷하게 유지되는 마지막 희석 농도인 1/16배의 백신균 배양액을 용혈 활성화도 검사의 준비과정과 같은 방법으로 준비하고, 마찬가지로 전과 같은 방법으로 돼지 적혈구를 분리해 둔다. 항혈청은 1차 백신을 접종하고 2주 후에 다시 2차 접종을 한 후, 2주 동안 항체생성을 기다려 채혈한 후 분리한 토끼 혈청을 1번부터 6번까지 준비한다. 96 well 플레이트에 양성대조군은 1/16배의 배양액 희석액을 100 μ l씩 분주하고, 음성대조군은 TBS만 100 μ l씩 분주하였다. 그리고 실험군은 최초에 혈청을 넣을 well에 배양액 희석액을 180 μ l씩 분주하고 나머지 well에는 150 μ l씩 분주한 후, 준비된 혈청을 각각의 줄의 첫 번째 well에 20 μ l씩 분주하여 10배 희석하였다. 이후, 첫 번째 well에서 50 μ l를 뽑아 다음 well에 넣고 단계적으로 4배씩 희석하고, 최종적으로 모든 well에서 100 μ l씩 남기고 나머지는 덜어냈다. 이 플레이트를 잘 감싸

서 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 멸균 TBS에 1% 만큼 돼지 적혈구를 넣어 섞은 용액을 각 well에 50μl씩 첨가하여 섞었다. 이 후, 37°C에서 1시간 동안 두고 다시 4°C에서 15시간 동안 침전시킨다. 역가 결과는 50%의 용혈억제가 관찰되는 희석배수를 측정하였다.

(3) Apx 독소의 세포 독성 시험 검사 방법 확립

세포 독성 시험에 이용되는 돼지 폐장에서 유래한 폐포 대식구(alveolar macrophage)의 분리를 위하여 대상 1주령 자돈의 병원체 감염 유무를 검사하였다. 홍막페렴균, 돼지 썩코바이러스, 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스, 돼지 마이코플라스마성 폐렴에 음성인 1주령의 건강한 포유자돈을 확보하여 폐장으로 부터 폐포 대식구를 채취하기 위하여 부검을 실시하였다. 자돈의 흉부에서 폐에 손상을 입히지 않도록 주의하여 적출한 후, 기관을 통하여 4-6°C의 RPMI(Rosewell Park Memorial Institute) 배지를 주입하되 흉강의 부피와 비교하여 그보다 폐가 커지지 않은 정도까지 주입한다. 손으로 폐를 마사지하고 2-3분을 기다려, 폐에 압력을 주어 주입된 RPMI 배지를 회수한다. 그리고 다시 RPMI 배지를 주입하고 한번 더 과정을 반복한다. 회수된 RPMI 배지는 세척을 위하여 1000rpm에서 10분 원심분리한 후, 상층액을 버리고 가라앉은 세포는 항진균제-항생제 1%, fetal bovine serum(FBS)가 10%만큼 포함된 RPMI 배지에 다시 부유시킨다. 그리고 세척 과정을 한번 더 반복한다. 분리한 폐포 대식구 부유액은 슬라이드에 1μl를 올려 대식구 숫자를 계산하여 최종 50μl당 105개의 대식구가 있도록 희석한다. 그리고 챔버 슬라이드에 각각 50μl의 대식구 부유액을 넣고 5% 이산화탄소, 37°C 환경의 배양기에서 하루 동안 배양하여 슬라이드에 대식구가 유착되도록 한다. 이 후, 용혈 활성도 검사와 동일한 방법으로 준비한 백신균 배양 상층액을 무균 배양액에 4배씩 단계 희석하여 각각을 50μl씩 만들어 대식구가 유착된 챔버 슬라이드에 50μl씩 분주한다. 그리고 5% 이산화탄소, 37°C 환경의 배양기에서 5시간 동안 반응시킨 후, 배지는 모두 버리고 죽은 대식구를 확인하기 위하여 0.2% nigrosin solution으로 염색하고 도립 현미경으로 검정하여 죽은 대식구의 비율을 확인하였다(Furesz, et al. 1997). 역가는 50%의 대식구가 죽은 희석배수를 측정하였다. 실험은 3번 반복하여 실시하였다.

(4) 세포 독성 억제 반응을 통한 Apx 항체의 역가 측정 방법 확립

세포 독성이 뚜렷하게 유지되는 마지막 희석 농도인 1/8배의 백신균 배양액을 용혈 활성도 검사의 준비과정과 같은 방법으로 준비하고, 마찬가지로 세포 독성 시험에서와 같은 방법으로 폐포 대식구를 챔버 슬라이드에 배양해둔다. 항혈청은 1차 백신을 접종하고 2주 후에 다시 2차 접종을 한 후, 2주 동안 항체생성이 된 토끼 혈청을 1번부터 6번까지 준비한다. 96 well 플레이트에 양성대조군은 RPMI에 1/8배로 희석한 배양액 희석액을 50μl씩 분주하고, 음성대조군은 RPMI에 1/8배로 희석한 무균 배양액만 50μl씩 분주하였다. 그리고 실험군은 처음 혈청을 넣을 well에 양성 대조군과 동일한 배양액 희석액을 90μl씩 분주하고 나머지 well에는 75μl씩 분주한 후, 준비된 혈청을 첫 번째 well에 10μl씩 분주하여 10배 희석하였다. 이 후, 첫 번째 well에서 25μl를 뽑아 다음 well에 넣고 단계적으로 4배씩 희석하였다. 이 플레이트를 잘 감싸서 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 꺼내어 각각의 well에서 50μl를 뽑아 대식구가 유착된 챔버 슬라이드에 각각 분주하였다. 이 후, 5% 이산화탄소, 37°C 환경의 배양기에서

5시간 동안 반응시킨 후, 배지는 모두 버리고 죽은 대식구를 확인하기 위하여 0.2% nigrosin solution으로 염색하고 도립 현미경으로 검경하여 죽은 대식구의 비율을 확인하였다.

(5) 용혈 억제 반응을 통한 Apx 항체의 역가 측정

개발한 용혈 억제 반응을 통한 Apx항체의 역가 측정 방법을 이용하여 국내 양돈장 25곳에서 채취한 주령별 혈청을 이용하여 Apx 용혈 억제 항체가를 조사하였다.

(6) 세포 독성 억제 반응을 통한 Apx 항체의 역가 측정

개발한 세포 독성 억제 반응을 통한 Apx항체의 역가 측정 방법을 이용하여 국내 양돈장 25곳에서 채취한 주령별 혈청을 이용하여 Apx 세포 독성 억제 항체가를 조사하였다.

다. 혈청검사를 통한 마이코플라스마성 폐렴 감염 시기 조사

ELISA 검사 방법을 이용하여 국내 양돈장 25곳에서 채취한 주령별 혈청을 이용하여 마이코플라스마 감염 여부를 조사하였다. ELISA 검사의 S/P ratio 값이 0.4를 기준으로 0.4 이상을 양성으로 판단하였다.

3. 연쇄상구균증 및 흉막폐렴 면역학적 검사

가. 혈청학적 검사 방법을 통한 연쇄상구균증 감염 시기 조사

(1) 연쇄상구균증(다발성 장막염)을 유발하는 연쇄상구균 혈청형 2형 감염 시기 조사

항원-항체 응집 검사 방법을 이용하여 각각의 국내 농장으로부터 서울대학교 수의과대학 병리실에 의뢰된 혈청을 이용하여 연쇄상구균 2형의 감염 여부를 조사하였다. 응집반응의 항체가는 4.0 이상일 경우 양성으로 판정하였다.

(2) 연쇄상구균증(다발성 장막염)을 유발하는 연쇄상구균 혈청형 3형 감염 시기 조사

항원-항체 응집 검사 방법을 이용하여 각각의 국내 농장으로부터 서울대학교 수의과대학 병리실에 의뢰된 혈청을 이용하여 연쇄상구균 3형의 감염 여부를 조사하였다. 응집반응의 항체가는 4.0 이상일 경우 양성으로 판정하였다.

(3) 연쇄상구균증(다발성 장막염)을 유발하는 연쇄상구균혈청형 4형 감염 시기 조사

항원-항체 응집 검사 방법을 이용하여 각각의 국내 농장으로부터 서울대학교 수의과대학 병리실에 의뢰된 혈청을 이용하여 연쇄상구균 4형의 감염 여부를 조사하였다. 응집반응의 항체

가는 4.0 이상일 경우 양성으로 판정하였다.

나. 혈청학적 검사 방법을 통한 흉막폐렴균 감염 시기 조사

(1) 흉막폐렴을 유발하는 흉막폐렴균 혈청형 2형 감염 시기 조사

항원-항체 응집 검사 방법을 이용하여 각각의 국내 농장으로부터 서울대학교 수의과대학 병리실에 의뢰된 혈청을 이용하여 흉막폐렴 2형균의 감염 여부를 조사하였다. 응집반응의 항체가는 4.0 이상일 경우 양성으로 판정하였다.

(2) 흉막폐렴을 유발하는 흉막폐렴균 혈청형 5형 감염 시기 조사

항원-항체 응집 검사 방법을 이용하여 각각의 국내 농장으로부터 서울대학교 수의과대학 병리실에 의뢰된 혈청을 이용하여 흉막폐렴 5형균의 감염 여부를 조사하였다. 응집반응의 항체가는 4.0 이상일 경우 양성으로 판정하였다.

(3) 흉막폐렴을 유발하는 흉막폐렴균 혈청형 6형 감염 시기 조사

항원-항체 응집 검사 방법을 이용하여 각각의 국내 농장으로부터 서울대학교 수의과대학 병리실에 의뢰된 혈청을 이용하여 흉막폐렴 6형균의 감염 여부를 조사하였다. 응집반응의 항체가는 4.0 이상일 경우 양성으로 판정하였다.

다. 혈청검사를 통한 마이코플라즈마성 폐렴 감염 시기 조사

(1) 돼지 썬코바이러스 2형 감염 농장에서 마이코플라즈마 감염율 및 감염 시기 실태 조사

ELISA 검사 방법을 이용하여 각각의 국내 농장으로부터 2006년부터 2010년까지 서울대학교 수의과대학 병리실에 의뢰된 혈청을 이용하여 마이코플라즈마 감염 여부를 조사하였다. ELISA 검사의 S/P ratio 값이 0.4를 기준으로 0.4 이상을 양성으로 판정하였다.

(2) 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(PRRSV) 감염 농장에서의 마이코플라즈마 감염율 및 감염 시기 실태 조사

ELISA 검사 방법을 이용하여 각각의 국내 농장으로부터 2006년부터 2010년까지 서울대학교 수의과대학 병리실에 의뢰된 혈청을 이용하여 마이코플라즈마 감염 여부를 조사하였다. ELISA 검사의 S/P ratio 값이 0.4를 기준으로 0.4 이상을 양성으로 판정하였다.

4. 마이코플라즈마 혈청검사

가. 연쇄상구균 백신에 대한 백신 접종군과 미접종군에서 면역형성 능력 비교 시험

- (1) 1차백신 접종후 백신접종군과 미접종군의 혈청형 2형, 3형와 4형 항체 비교
- (2) 2차백신 접종후 백신접종군과 미접종군의 혈청형 2형, 3형와 4형에 대한 항체 형성능력 비교
- (3) 2차백신 접종 3주후 백신접종군과 미접종군의 혈청형 2형, 3형와 4형에 대한 항체 형성능력 비교
- (4) 시험 종료직후 백신접종군과 미접종군의 혈청형 2형, 3형와 4형에 대한 항체 형성 능력 비교

나. 홍막페렴 백신에 대한 대한 백신 접종군과 미접종군에서 면역형성 능력 비교 시험

- (1) 1차백신 접종 후 백신접종군과 미접종군의 혈청형 2형, 5형와 6형 항체 비교
- (2) 1차백신 접종 후 백신접종군과 미접종군의 Apx 독소의 용혈 억제 능력과 세포독성 억제 능력 항체 비교
- (3) 2차백신 접종 후 백신접종군과 미접종군의 혈청형 2형, 5형와 6형에 대한 항체 형성 능력 비교
- (4) 2차백신 접종 후 백신접종군과 미접종군의 Apx 독소의 용혈 억제 능력과 세포독성 억제 능력 항체 형성 능력 비교
- (5) 2차백신 접종 3주 후 백신접종군과 미접종군의 혈청형 2형, 5형와 6형에 대한 항체 형성 능력 비교
- (6) 2차백신 접종 3주 후 백신접종군과 미접종군의 Apx 독소의 용혈 억제 능력과 세포독성 억제 능력 항체 형성 능력 비교
- (7) 시험 종료 직후 백신접종군과 미접종군의 혈청형 2형, 5형와 6형에 대한 항체 형성 능력 비교
- (8) 시험 종료 직후 백신접종군과 미접종군의 Apx 독소의 용혈 억제 능력과 세포독성 억제 능력 항체 형성 능력 비교

다. 혈청검사를 통한 마이코플라즈마성 폐렴 감염 시기 조사

ELISA 검사 방법을 이용하여 국내 양돈장 25곳에서 채취한 주령별 혈청을 이용하여 마이코플라즈마 감염 여부를 조사하였다. 주령별 혈청은 크게 1주에서 3주령까지는 포유자돈 혈청, 4주령에서 10주령까지는 이유자돈 혈청, 11주령 이상은 육성비육돈 혈청, 모돈은 산차에 관계 없이 모든 혈청으로 분류하여 분석하였다.

제 3 절 결과 와 고찰

1. 연쇄상구균증 및 흉막폐렴 면역학적 검사 방법 개발

가. 응집반응을 이용한 연쇄상구균증 백신에 대한 혈청학적 검사 방법 개발

Microplate agglutination test(MAT)를 이용하여 혈청 내 항체의 역가를 판별한다. U자 96 well 플레이트를 준비하여 PBS를 분주하되 가로로 2, 3, 4번째 well에는 240 μ l를 분주하고, 첫 번째 well에는 300 μ l를 분주한다. 그리고 첫 번째 well에 혈청 20 μ l를 분주하여, 혈청을 16배 희석시킨다. 희석한 첫 번째 well에서 희석액 80 μ l를 뽑아 2번째 well에 넣고 섞어 4배 희석시킨 후, 3, 4번째 well까지 단계적으로 4배씩 희석시켜 4번째 well은 1024배 희석이 되도록 한다. 다음으로 V자 96well 플레이트를 준비하여 앞서 준비한 혈청 희석액을 60 μ l씩 같은 순서로 분주한다. 그리고 각각의 연쇄상구균 혈청형의 항원을 PBS에 같은 탁도로 희석시켜서 60 μ l씩 분주한다. 잘 섞은 후, 증발이 되지 않도록 랩 등으로 잘 밀봉하여 55 $^{\circ}$ C 배양기에 넣고 밤새 반응시킨다. 다음 날, 불빛 아래에서 보았을 때, 응집이 잘 이루어지면 균체, 즉 항원이 항원-항체 교차반응(cross-link)으로 인해 가라앉지 못하고 전 날과 마찬가지로 고르게 부유한 채로 있으므로, 플레이트의 바닥에 확실히 균체가 가라앉아 하얀색 점으로 보이기 시작하는 well의 희석 배수로 항체의 역가를 판별한다. 연쇄상구균 3형, 4형 7형에 대한 항체가를 쉽게 응집반응을 통하여 측정할 수 있다.

나. 응집반응을 이용한 흉막폐렴 백신에 대한 혈청학적 검사 방법 개발

Microplate agglutination test(MAT)를 이용하여 혈청 내 항체의 역가를 판별한다. U자 96 well 플레이트를 준비하여 PBS를 분주하되 가로로 2, 3, 4번째 well에는 240 μ l를 분주하고, 첫 번째 well에는 300 μ l를 분주한다. 그리고 첫 번째 well에 혈청 20 μ l를 분주하여, 혈청을 16배 희석시킨다. 희석한 첫 번째 well에서 희석액 80 μ l를 뽑아 2번째 well에 넣고 섞어 4배 희석시킨 후, 3, 4번째 well까지 단계적으로 4배씩 희석시켜 4번째 well은 1024배 희석이 되도록 한다. 다음으로 V자 96well 플레이트를 준비하여 앞서 준비한 혈청 희석액을 60 μ l씩 같은 순서로 분주한다. 그리고 각각의 흉막폐렴균 혈청형의 항원을 PBS에 같은 탁도로 희석시켜서 60 μ l씩 분주한다. 잘 섞은 후, 증발이 되지 않도록 랩 등으로 잘 밀봉하여 55 $^{\circ}$ C 배양기에 넣고 밤새 반응시킨다. 다음 날, 불빛 아래에서 보았을 때, 응집이 잘 이루어지면 균체, 즉 항원이 항원-항체 교차반응(cross-link)으로 인해 가라앉지 못하고 전 날과 마찬가지로 고르게 부유한 채로 있으므로, 플레이트의 바닥에 확실히 균체가 가라앉아 하얀색 점으로 보이기 시작하는 well의 희석 배수로 항체의 역가를 판별한다. 흉막폐렴균 2형, 5형 6형에 대한 항체가를 쉽게 응집반응을 통하여 측정할 수 있다.

다. 혈청검사를 통한 마이코플라즈마 폐렴 감염시기 조사결과

주령별로 각각 5개체씩 의뢰된 자돈 혈청의 마이코플라즈마 ELISA 검사 결과이다. 총 13개

의 농장에서 의뢰되었다. 카이제곱 통계를 통해 모든 농장을 묶어 양성과 음성만을 비교하였을 때 6주령은 14주령과 비교했을 때부터 유의성($p=0.001$)이 있으므로 14주령부터는 6주령에 비해 의미 있게 양성 두수가 많다고 볼 수 있습니다. 6주령과 10주령, 10주령과 14주령은 각각 비교했을 때 유의성이 없었다. 따라서 국내조사를 분석하면 국내 양돈장에서 마이코플라즈마가 감염되는 시기는 6주령에서 10주령 사이로 분석되었다.

농장	양성 두수				
	6주령	10주령	14주령	18주령	22주령
A	0	0	3	2	2
B	0	0	0	1	0
C	0	4	4	4	5
D	0	0	0	1	1
E	3	2	4	4	5
F	2	5	3	4	4
G	1	1	1	3	3
H	2	2	1	4	5
I	1	1	5	3	3*
J	1	1	2	3	3
K	0	3	4	4	4
L	0	1	0	0	5
M	1	0	1	5	5
양성 총두수	11	20	28	38	45
총두수	65	65	65	65	66

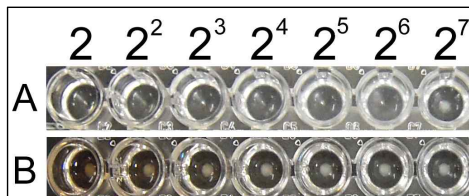
*: 의뢰된 개체수가 6마리이다.

2. 마이코플라즈마 혈청검사

가. 연쇄상구균 백신에 대한 혈청학적 검사 방법 실시

(1) 연쇄상구균 백신 항체가 측정을 위한 평판 응집반응 개발

24시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 확인한 결과는 다음과 같다.



A: 연쇄상구균 항체 양성

B: 연쇄상구균 항체 음성

(2) 평판 응집반응을 이용한 연쇄상구균 항체 측정 검사

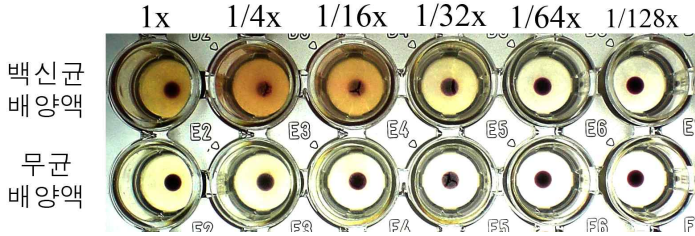
분석 결과, 대부분의 주령 대에서 충분한 방어능력을 가지고 있지 못했으며, 2개 농장만이 2, 3, 4형 3개 혈청형에 대해서 전 주령 대에서 항체가 확인되지 않았다.

혈청형	농장번호	항체가			
		포유자돈	이유자돈	육성돈	모돈
2	1	1:4	1:8	1:32	1:32
	2	1:8	1:32	1:64	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	1:32
	6	-	-	-	-
	7	1:4	1:8	1:32	1:64
	8	1:8	1:16	1:32	1:32
	9	-	1:16	-	1:32
	10	-	-	-	-
3	1	-	-	-	-
	2	1:4	1:8	1:32	1:64
	3	-	1:8	1:32	1:32
	4	-	-	-	-
	5	1:2	1:16	1:32	1:32
	6	1:4	-	1:8	1:32
	7	-	-	-	-
	8	-	-	-	1:16
	9	1:4	1:16	1:16	1:32
	10	-	-	-	-
4	1	-	-	-	1:32
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	1:16	1:16	1:32
	6	-	-	-	-
	7	1:4	1:16	1:64	1:64
	8	-	-	-	-
	9	1:8	1:8	1:32	1:32
	10	-	-	-	-

나. 흉막페렴 백신에 대한 혈청학적 검사 방법 실시

(1) Apx 독소의 용혈 활성도 검사 방법 확립

실험은 3번 반복하였으며 그 결과, 3번 모두 32배 희석량까지 용혈 반응을 나타내었다.



(2) 용혈 억제 반응을 통한 Apx 항체의 역가 측정

용혈 억제 반응을 통한 Apx 항체가의 결과는 아래의 표에 정리되어 있다. 국내 혈청 검사에서는 용혈 억제 항체 수준은 거의 1:8로 낮게 나왔다.

농장번호	모든	후보돈	6주령	10주령	14주령	18주령	22주령
1	-	-	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
2	1:8	-	1:8	1:8	1:8	1:8	-
3	1:8	-	1:8	1:8	1:8	-	-
4	-	-	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
5	1:8	-	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
6	-	-	1:8	1:8	-	-	-
7	-	-	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
8	1:8	-	1:8	1:8	1:8	-	-
9	-	-	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
10	1:8	-	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
11	1:8	-	1:8	1:8	1:8	1:8	-
12	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	-
13	1:8	1:8	-	1:8	1:8	1:8	1:8
14	-	-	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
15	-	-	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
16	-	-	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
17	-	-	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
18	-	-	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
19	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
20	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
21	-	-	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
22	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	-
23	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
24	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	-	-
25	1:8	-	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
검사두수	76	35	120	125	120	105	85
평균 항체가	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8

(3) 세포 독성 억제 반응을 통한 Apx 항체의 역가 측정

Apx 항체의 역가측정의 결과는 아래 표와 같이 모든 및 후보돈의 경우 항체수준이

1:64-1:32 로 높게 나왔고, 주령별 항체역가의 경우, 생후 6주에서 22주까지의 결과는 주령이 늘어감에 따라 항체역가가 올라가는 것을 알 수 있다.

농장번호	모돈	후보돈	6주령	10주령	14주령	18주령	22주령
1	-	-	1:16	1:16	1:32	1:32	1:32
2	1:64	-	1:16	1:16	1:16	1:16	-
3	1:64	-	1:16	1:16	1:32	-	-
4	-	-	1:16	1:16	1:16	1:16	1:32
5	1:32	-	1:32	1:16	1:16	1:16	1:32
6	-	-	1:16	1:16	-	-	-
7	-	-	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16
8	1:32	-	1:16	1:16	1:16	-	-
9	-	-	1:8	1:16	1:16	1:16	1:32
10	1:32	-	1:16	1:16	1:64	1:32	1:16
11	1:64	-	1:8	1:16	1:16	1:16	-
12	1:64	1:64	1:16	1:16	1:32	1:64	-
13	1:64	1:32	-	1:16	1:32	1:16	1:16
14	-	-	1:32	1:16	1:32	1:32	1:32
15	-	-	1:16	1:32	1:32	1:32	1:64
16	-	-	1:16	1:32	1:32	1:64	1:128
17	-	-	1:16	1:32	1:32	1:64	1:64
18	-	-	1:32	1:32	1:16	1:32	1:16
19	1:64	1:64	1:32	1:32	1:64	1:64	1:32
20	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16
21	-	-	1:16	1:16	1:32	1:32	1:64
22	1:32	1:32	1:16	1:16	1:16	1:32	-
23	1:32	1:32	1:16	1:16	1:16	1:32	1:16
24	1:32	1:32	1:16	1:16	1:32	-	-
25	1:64	-	1:32	1:16	1:32	1:32	1:16
검사 혈청수	76	35	120	125	120	105	85
평균 항체가	1:64	1:32	1:16	1:16	1:32	1:32	1:64

다. 혈청검사를 통한 마이코플라즈마성 폐렴 감염 시기 조사

모돈, 후보돈의 경우, 거의 대부분 양성으로 항체를 가지고 있으며, 생후 6주에서 22주까지는 주령이 증가됨에 따라 10주령 이후 급격히 항체가가 높아지는 경향을 보였다.

농장	모돈	후모돈	6주령	10주령	14주령	18주령	22주령
1	-	-	2/5	2/5	2/5	4/5	5/5
2	5/5	-	2/5	1/5	3/5	4/5	-
3	5/5	-	2/5	1/5	4/5	-	-
4	-	-	0/5	2/5	2/5	2/5	5/5
5	5/5	-	5/5	3/5	2/5	3/5	5/5
6	-	-	3/5	1/5	3/5	3/5	5/5
7	-	-	2/5	3/5	0/5	1/5	2/5
8	5/5	-	1/5	1/5	3/5	-	-
9	-	-	2/5	3/5	1/5	1/5	4/5
10	5/5	-	3/5	4/5	5/5	3/5	4/5
11	5/5	-	4/5	1/5	2/5	1/5	-
12	4/4	4/4	4/5	5/5	5/5	4/5	-
13	5/5	6/6	4/5	4/5	5/5	5/5	5/5
14	-	-	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5
15	-	-	3/5	4/5	2/5	1/5	5/5
16	-	-	0/5	1/5	0/5	5/5	5/5
17	-	-	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5
18	-	-	4/5	4/5	3/5	4/5	5/5
19	5/5	5/5	2/5	4/5	5/5	5/5	5/5
20	5/5	3/5	2/5	3/5	3/5	3/5	5/5
21	-	-	2/5	2/5	2/5	5/5	4/5
22	5/5	5/5	2/5	2/5	2/5	3/5	-
23	2/5	1/5	4/5	4/5	3/5	3/5	4/5
24	10/12	5/5	2/5	3/5	4/5	-	-
25	5/5	-	3/5	4/5	5/5	5/5	5/5
감염 합계	71/76	29/35	68/120	72/125	77/120	75/105	83/85
감염률	0.93	0.83	0.57	0.58	0.64	0.71	0.97

3. 연쇄상구균증 및 흉막폐렴 면역학적 검사

가. 혈청학적 검사 방법을 통한 연쇄상구균증 감염 시기 조사결과

(1) 연쇄상구균증(다발성 장막염)을 유발하는 연쇄상구균 혈청형 2형 감염 시기 조사결과 조사 결과, 4주령부터 감염율이 2배 가량 증가함을 확인할 수 있다.

농장	1주령	2주령	3주령	4주령	5주령	6주령	7주령	8주령	9주령	10주령
1	-	1/5	1/5	2/5	-	2/5	3/5	3/5	-	2/5
2	1/5	1/5	-	-	-	-	1/5	2/5	2/5	-
3	-	0/5	0/5	2/5	4/5	3/5	-	-	3/5	3/5
4	1/5	2/5	1/5	3/5	-	3/5	-	4/5	3/5	-
5	2/5	1/5	2/5	-	3/5	2/5	4/5	5/5	4/5	5/5
6	0/5	2/5	3/5	3/5	-	3/5	-	2/5	2/5	3/5
감염합계	4/20	7/30	7/25	10/20	7/10	13/25	8/15	16/25	14/25	13/20
감염율	0.20	0.23	0.28	0.50	0.70	0.52	0.53	0.64	0.56	0.65

(2) 연쇄상구균증(다발성 장막염)을 유발하는 연쇄상구균 혈청형 3형 감염 시기 조사결과 조사 결과, 1주령부터 시작하여 3주령까지 감염율이 점차 증가함을 확인할 수 있다.

농장	1주령	2주령	3주령	4주령	5주령	6주령	7주령	8주령	9주령	10주령
1	-	1/5	2/5	4/5	-	3/5	3/5	4/5	-	3/5
2	2/5	3/5	-	-	-	-	2/5	2/5	3/5	-
3	-	1/5	3/5	3/5	4/5	3/5	-	-	2/5	5/5
4	3/5	2/5	4/5	5/5	-	4/5	-	5/5	4/5	-
5	2/5	3/5	4/5	-	3/5	4/5	3/5	5/5	5/5	3/5
6	0/5	2/5	3/5	3/5	-	5/5	-	3/5	3/5	1/5
감염합계	7/20	12/30	16/25	15/20	7/10	19/25	8/15	19/25	17/25	12/20
감염율	0.35	0.40	0.64	0.75	0.70	0.76	0.53	0.76	0.68	0.60

(3) 연쇄상구균증(다발성 장막염)을 유발하는 연쇄상구균혈청형 4형 감염 시기 조사결과 조사 결과, 3주령부터 감염율이 2배 가량 증가함을 확인할 수 있다.

농장	1주령	2주령	3주령	4주령	5주령	6주령	7주령	8주령	9주령	10주령
1	-	0/5	2/5	1/5	-	2/5	2/5	3/5	-	1/5
2	1/5	2/5	-	-	-	-	3/5	4/5	2/5	-
3	-	1/5	2/5	2/5	1/5	3/5	-	-	3/5	4/5
4	0/5	1/5	1/5	3/5	-	2/5	-	2/5	1/5	-
5	0/5	0/5	1/5	-	2/5	1/5	1/5	2/5	3/5	3/5
6	1/5	1/5	2/5	1/5	-	0/5	-	1/5	0/5	3/5
감염합계	2/20	5/30	8/25	8/20	3/10	8/25	6/15	12/25	9/25	11/20
감염율	0.10	0.16	0.32	0.40	0.30	0.32	0.40	0.48	0.36	0.55

나. 혈청학적 검사 방법을 통한 흉막폐렴균 감염 시기 조사결과

(1) 흉막폐렴을 유발하는 흉막폐렴균 혈청형 2형 감염 시기 조사결과 조사 결과, 주령별로 차이가 보이지 않으며, 이는 농장 내 백신 사용에 의한 영향으로 추측된다.

농장	1주령	2주령	3주령	4주령	5주령	6주령	7주령	8주령	9주령	10주령
1	-	4/5	4/5	3/5	-	3/5	5/5	5/5	-	4/5
2	5/5	5/5	-	-	-	-	5/5	2/5	3/5	-
3	-	5/5	5/5	2/5	5/5	4/5	-	-	5/5	5/5
4	5/5	5/5	5/5	5/5	-	5/5	-	5/5	5/5	-
5	3/5	3/5	4/5	-	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5
6	2/5	2/5	5/5	3/5	-	3/5	-	5/5	5/5	2/5
감염합계	15/20	24/30	23/25	13/20	10/10	20/25	15/15	22/25	22/25	16/20
감염율	0.75	0.80	0.92	0.65	1.00	0.80	1.00	0.88	0.88	0.80

(2) 흉막폐렴을 유발하는 흉막폐렴균 혈청형 5형 감염 시기 조사결과 조사결과 9주령부터 감염율이 2배 가량 증가함을 확인할 수 있다.

농장	1주령	2주령	3주령	4주령	5주령	6주령	7주령	8주령	9주령	10주령
1	-	2/5	0/5	1/5	-	1/5	1/5	0/5	-	3/5
2	5/5	2/5	-	-	-	-	2/5	3/5	2/5	-
3	-	3/5	1/5	1/5	1/5	2/5	-	-	3/5	3/5
4	2/5	1/5	4/5	2/5	-	3/5	-	2/5	4/5	-
5	0/5	0/5	0/5	-	1/5	4/5	0/5	1/5	3/5	2/5
6	0/5	2/5	2/5	2/5	-	1/5	-	2/5	3/5	1/5
감염합계	7/20	10/30	7/25	6/20	2/10	11/25	3/15	8/25	15/25	9/20
감염율	0.35	0.33	0.28	0.30	0.20	0.55	0.20	0.32	0.60	0.45

(3) 흉막폐렴을 유발하는 흉막폐렴균 혈청형 6형 감염 시기 조사결과
조사결과 8주령부터 감염율이 2배 가량 증가함을 확인할 수 있다.

농장	1주령	2주령	3주령	4주령	5주령	6주령	7주령	8주령	9주령	10주령
1	-	0/5	0/5	1/5	-	0/5	1/5	1/5	-	1/5
2	0/5	0/5	-	-	-	-	1/5	3/5	2/5	-
3	-	1/5	1/5	1/5	0/5	2/5	-	-	1/5	2/5
4	1/5	1/5	1/5	0/5	-	0/5	-	2/5	3/5	-
5	0/5	0/5	0/5	-	0/5	1/5	0/5	1/5	3/5	2/5
6	0/5	0/5	0/5	1/5	-	2/5	-	2/5	1/5	3/5
감염합계	1/20	2/30	2/25	3/20	0/10	5/25	2/15	9/25	10/25	8/20
감염율	0.05	0.07	0.08	0.15	0.00	0.20	0.13	0.36	0.40	0.40

다. 혈청검사를 통한 마이코플라즈마성 폐렴 감염 시기 조사 결과

(1) 돼지 썬코바이러스 (PCV2) 감염 농장에서의 마이코플라즈마 감염율 및 감염 시기 실태 조사결과

조사결과 9주령부터 감염율이 2배 가량 증가함을 확인할 수 있다.

농장	1주령	2주령	3주령	4주령	5주령	6주령	7주령	8주령	9주령	10주령
1	0/10	0/6	0/1	0/9	0/3	3/11	2/4	0/3	6/7	8/13
2	-	-	6/20	-	3/16	1/10	0/8	-	4/13	4/10
3	1/5	1/5	1/14	4/5	0/10	2/5	1/9	-	4/9	8/10
4	-	-	3/15	2/5	1/5	1/10	6/10	-	7/11	8/10
5	1/5	0/2	1/13	-	0/5	4/17	0/2	0/3	4/10	6/8
6	-	-	0/15	-	-	4/20	2/5	1/5	5/10	3/5
7	-	0/4	2/9	0/7	-	3/12	1/3	1/3	1/5	6/8
8	-	-	2/16	1/6	-	2/13	0/3	-	2/3	8/16
9	2/8	-	0/8	1/5	2/3	0/5	1/2	3/5	1/2	3/5
10	3/15	-	5/14	6/14	3/5	3/10	2/10	-	4/10	4/15
감염합계	7/45	1/21	20/125	14/51	9/47	23/113	15/56	5/19	38/80	59/100
감염율	0.16	0.05	0.16	0.27	0.19	0.20	0.27	0.26	0.48	0.59

(2) 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(PRRSV) 감염 농장에서의 마이코플라즈마 감염율 및 감염 시기 실태 조사결과

조사결과 7주령부터 감염율이 2배 가량 증가함을 확인할 수 있다.

농장	1주령	2주령	3주령	4주령	5주령	6주령	7주령	8주령	9주령	10주령
1	1/3	0/5	-	2/10	-	2/7	-	1/5	3/3	0/2
2	1/5	-	1/14	0/5	-	2/9	2/5	-	2/4	7/10
3	-	-	3/12	-	1/4	2/8	-	1/3	-	5/12
4	-	2/5	1/9	0/5	-	0/14	-	-	2/10	0/4
5	-	1/7	0/5	1/3	-	6/17	2/2	-	-	17/20
6	-	0/5	0/4	3/10	-	2/9	1/5	-	0/5	6/9
7	0/3	1/3	0/7	0/3	0/7	0/4	5/8	-	3/4	2/4
8	-	-	0/8	-	5/5	2/8	-	2/5	5/5	2/7
9	-	-	2/5	1/5	3/10	6/10	3/5	3/5	5/10	2/5
10	-	-	0/9	0/5	-	0/9	3/6	-	-	12/14
11	1/2	2/2	2/7	0/2	1/7	2/7	1/2	2/2	2/2	2/2
감염합계	3/13	6/27	9/80	7/48	10/33	24/102	17/33	9/20	22/43	55/89
감염율	0.23	0.22	0.11	0.15	0.30	0.24	0.52	0.45	0.51	0.62

4. 마이코플라즈마 혈청검사

가. 연쇄상구균 백신에 대한 백신 접종군과 미접종군에서 면역형성 능력 비교 시험결과

(1) 1차백신 접종후 백신접종군과 미접종군의 혈청형 2형, 3형과 4형 항체 비교시험 결과

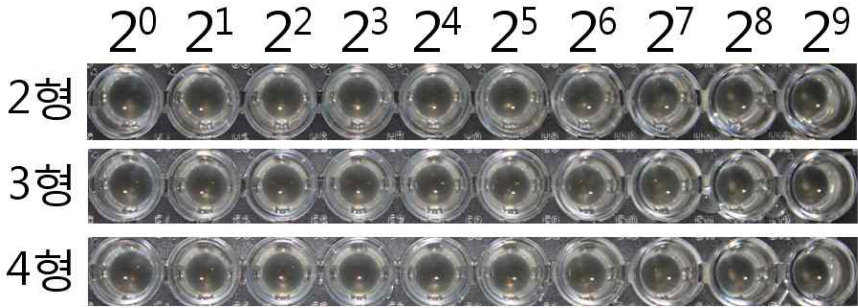
농장		2형		3형		4형	
		백신접종군	미접종군	백신접종군	미접종군	백신접종군	미접종군
1	평균	3.45*	0	3.37	0	3.20	-
	표준편차	2.27	0	2.13	0	2.11	-
2	평균	3.49	0.13	3.20	0.11	3.29	-
	표준편차	2.77	0.27	2.11	0.51	2.13	-
3	평균	3.17	2.80	3.12	-	3.14	0.11
	표준편차	2.16	1.51	2.05	-	2.20	0.13

-제 1농장은 연쇄상 구균 2형과 3형이 존재하는 농장임.

-제 2농장은 연쇄상 구균 2형과 3형이 존재하는 농장임.

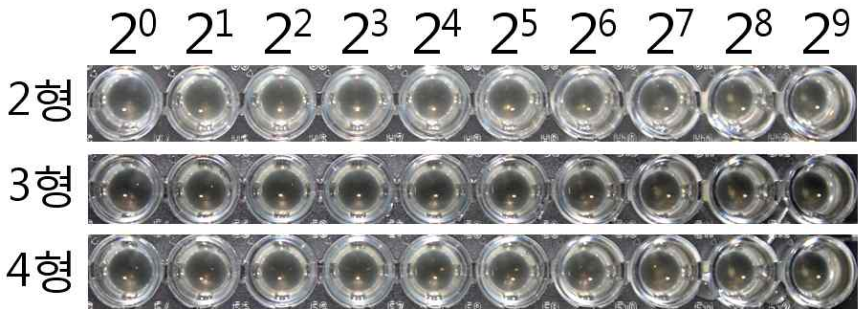
-제 3농장은 연쇄상 구균 2형과 4형이 존재하는 농장임.

*: Log2 지수값으로 나타낸 평균±표준편차.



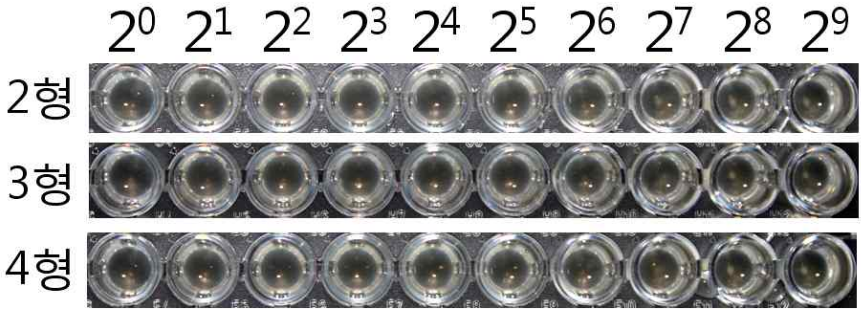
(2) 2차백신 접종후 백신접종군과 미접종군의 혈청형 2형, 3형과 4형에 대한 항체 형성능력 비교시험 결과

농장		2형		3형		4형	
		백신접종군	미접종군	백신접종군	미접종군	백신접종군	미접종군
1	평균	6.74	0.76	6.51	0.13	6.40	-
	표준편차	5.92	0.90	6.00	0.60	5.05	-
2	평균	6.50	1.43	6.40	0.61	6.39	-
	표준편차	6.09	0.99	5.05	0.73	6.05	-
3	평균	6.29	6.01	5.54	-	6.32	0.56
	표준편차	5.13	5.46	4.48	-	5.07	0.68



(3) 2차백신 접종 3주후 백신접종군과 미접종군의 혈청형 2형, 3형과 4형에 대한 항체 형성능력 비교시험 결과

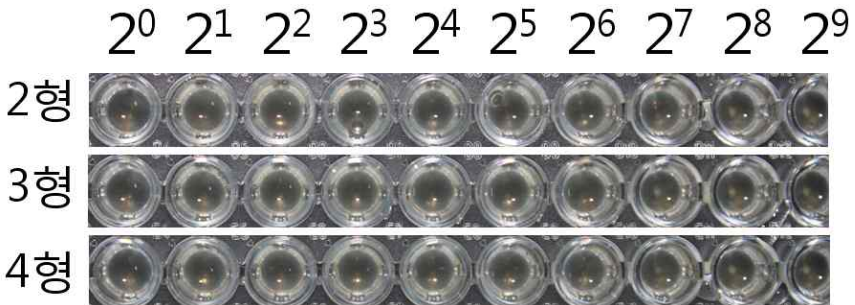
농장		2형		3형		4형	
		백신접종군	미접종군	백신접종군	미접종군	백신접종군	미접종군
1	평균	6.04	3.61	6.29	2.87	6.11	-
	표준편차	4.95	4.02	5.79	3.04	5.27	-
2	평균	6.12	4.16	6.11	2.75	6.28	-
	표준편차	5.28	4.41	5.28	2.79	5.76	-
3	평균	6.05	5.78	5.37	-	6.27	2.77
	표준편차	5.34	5.31	4.71	-	5.87	2.53



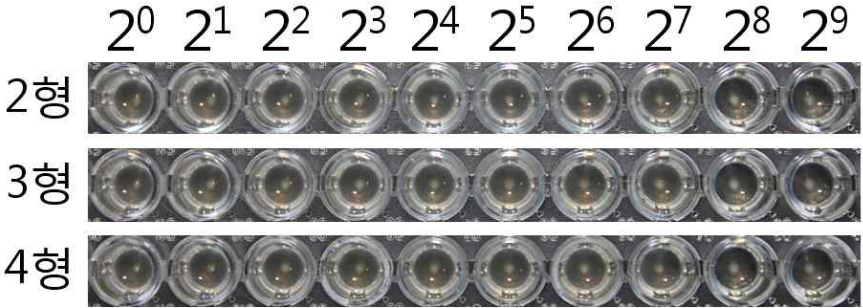
(4) 시험 종료직후 백신접종군과 미접종군의 혈청형 2형, 3형과 4형에 대한 항체 형성 능력 비교시험 결과

농장		2형		3형		4형	
		백신접종군	미접종군	백신접종군	미접종군	백신접종군	미접종군
1	평균	5.88	3.37	5.81	2.71	5.77	-
	표준편차	4.46	3.84	5.16	2.62	4.62	-
2	평균	6.04	3.92	5.81	2.58	5.84	-
	표준편차	5.04	4.12	4.58	2.83	5.21	-
3	평균	5.81	5.37	5.01	-	5.95	2.71
	표준편차	4.62	4.44	4.04	-	4.80	2.38

※ 백신 접종군의 혈청형 2형, 3형, 4형에 대한 항체 형성 능력



※ 백신 미접종군의 혈청형 2형, 3형, 4형에 대한 항체 형성 능력



나. 홍막페렴 백신에 대한 대한 백신 접종군과 미접종군에서 면역형성 능력 비교 시험결과

(1) 1차백신 접종 후 백신접종군과 미접종군의 혈청형 2형, 5형과 6형 항체 비교시험 결과

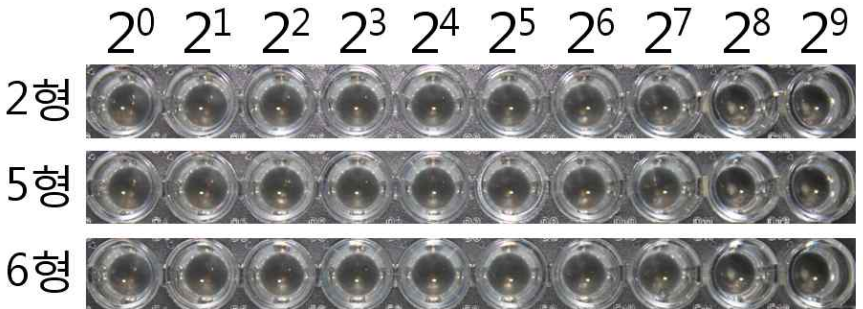
농장		2형		5형		6형	
		백신접종군	미접종군	백신접종군	미접종군	백신접종군	미접종군
1	평균	6.84	4.21	6.21	-	6.56	-
	표준편차	5.83	4.34	5.15	-	5.75	-
2	평균	6.84	-	6.56	4.21	6.21	4.21
	표준편차	5.83	-	5.75	4.34	5.15	4.34
3	평균	6.23	4.51	6.21	-	6.03	-
	표준편차	5.28	4.34	5.74	-	4.97	-

-제 1농장은 홍막페렴 2형이 존재하는 농장임.

-제 2농장은 연쇄상 구균 5형과 6형이 존재하는 농장임.

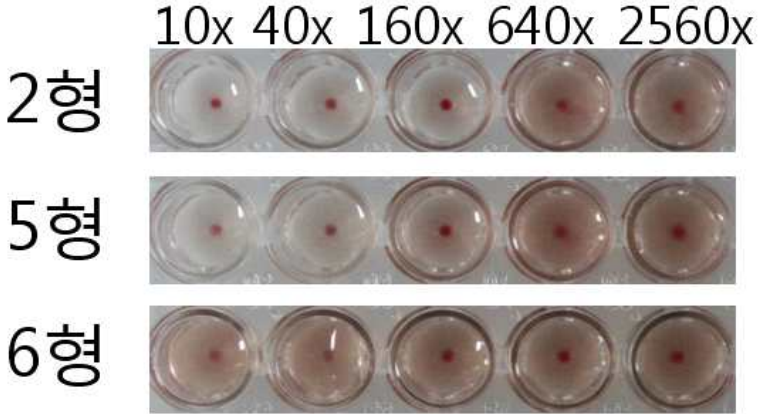
-제 3농장은 연쇄상 구균 2형이 존재하는 농장임.

*: Log2 지수값으로 나타낸 평균±표준편차.



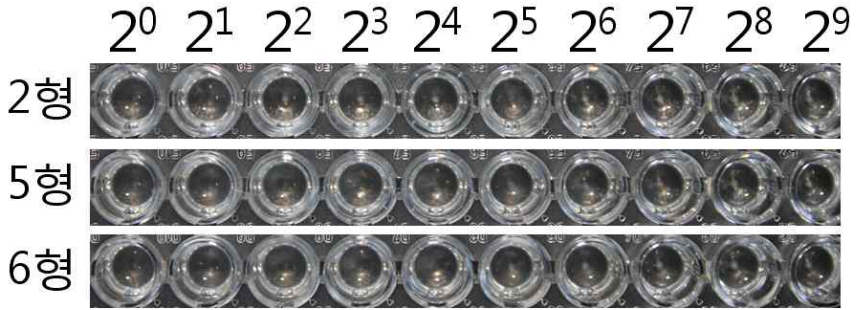
(2) 1차백신 접종 후 백신접종군과 미접종군의 Apx 독소의 용혈 억제 능력과 세포독성 억제 능력 항체 비교시험 결과

농장		Apx 독소 용혈 억제능				세포독성 억제능			
		백신접종군		미접종군		백신접종군		미접종군	
1 (2형)	평균	6.84		4.21		6.85		4.20	
	표준편차	5.83		4.34		5.83		4.32	
2 (5/6형)	평균	6.55	6.15	4.11	4.21	6.98	6.77	4.33	4.41
	표준편차	5.34	5.14	3.90	4.10	5.71	5.89	4.12	4.13
3 (2형)	평균	6.23		4.51		6.23		4.51	
	표준편차	5.28		4.34		5.28		4.34	



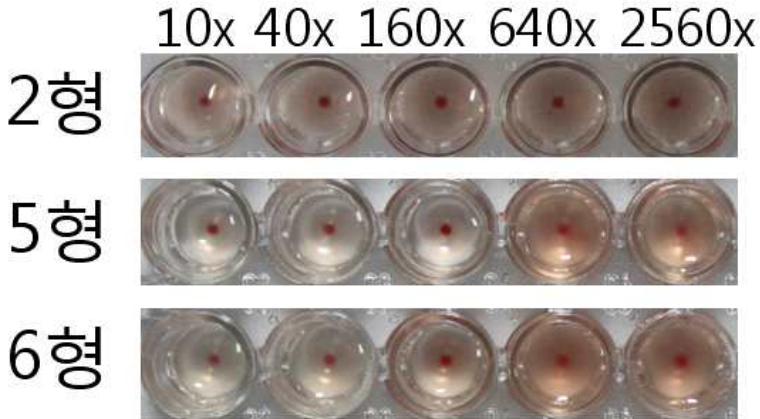
(3) 2차백신 접종 후 백신접종군과 미접종군의 혈청형 2형, 5형와 6형에 대한 항체 형성 능력 비교시험 결과

농장		2형		5형		6형	
		백신접종군	미접종군	백신접종군	미접종군	백신접종군	미접종군
1	평균	9.21	7.21	9.07	-	9.31	-
	표준편차	8.11	7.32	8.14	-	8.12	-
2	평균	9.17	-	9.31	7.21	9.07	7.21
	표준편차	8.16	-	8.12	7.32	8.14	7.32
3	평균	8.98	7.34	9.22	-	8.58	-
	표준편차	8.24	7.45	8.13	-	7.85	-



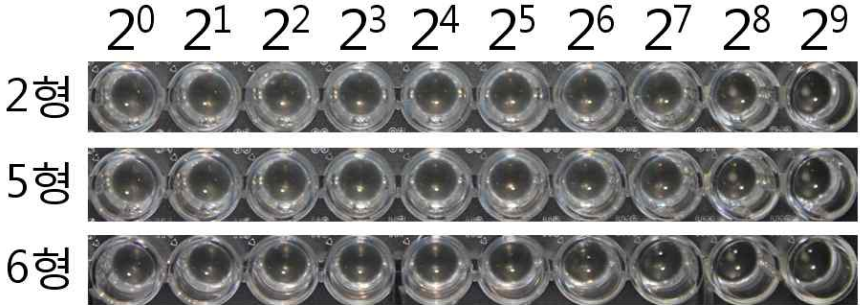
(4) 2차백신 접종 후 백신접종군과 미접종군의 Apx 독소의 용혈 억제 능력과 세포독성 억제 능력 항체 형성 능력 비교시험 결과

농장		Apx 독소 용혈 억제능				세포독성 억제능			
		백신접종군		미접종군		백신접종군		미접종군	
1 (2형)	평균	9.21		7.21		9.34		6.11	
	표준편차	8.11		7.32		8.01		5.43	
2 (5/6형)	평균	9.34	9.14	7.34	7.11	9.56	9.78	6.36	5.13
	표준편차	7.13	7.56	7.11	7.43	8.03	7.31	4.99	5.45
3 (2형)	평균	8.98		7.34		9.12		7.21	
	표준편차	8.23		7.45		7.89		6.14	



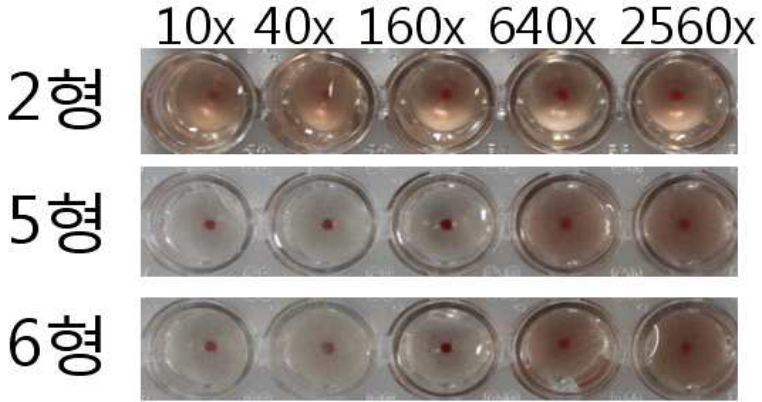
(5) 2차백신 접종 3주 후 백신접종군과 미접종군의 혈청형 2형, 5형와 6형에 대한 항체 형성 능력 비교시험 결과

농장		2형		5형		6형	
		백신접종군	미접종군	백신접종군	미접종군	백신접종군	미접종군
1	평균	9.18	8.57	9.09	-	9.27	-
	표준편차	8.23	8.56	8.18	-	8.31	-
2	평균	9.07	-	9.36	8.51	9.41	8.51
	표준편차	8.13	-	8.41	8.52	8.31	8.52
3	평균	9.31	8.42	9.24	-	9.17	-
	표준편차	8.37	8.26	8.27	-	8.39	-



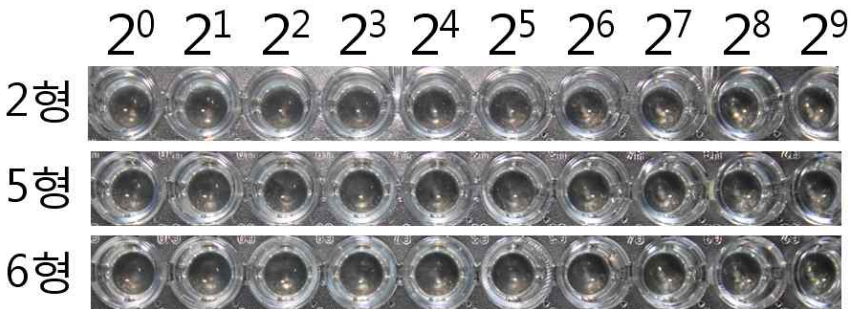
(6) 2차백신 접종 3주 후 백신접종군과 미접종군의 Apx 독소의 용혈 억제 능력과 세포독성 억제 능력 항체 형성 능력 비교시험 결과

농장		Apx 독소 용혈 억제능				세포독성 억제능			
		백신접종군		미접종군		백신접종군		미접종군	
1 (2형)	평균	9.18		8.46		9.33		8.43	
	표준편차	8.23		8.56		8.12		7.25	
2 (5/6형)	평균	9.33	9.46	7.89	7.56	9.89	9.51	8.11	7.79
	표준편차	8.13	8.56	8.30	7.31	8.11	7.48	7.31	6.89
3 (2형)	평균	9.31		8.42		9.44		7.89	
	표준편차	8.37		8.26		8.21		8.11	



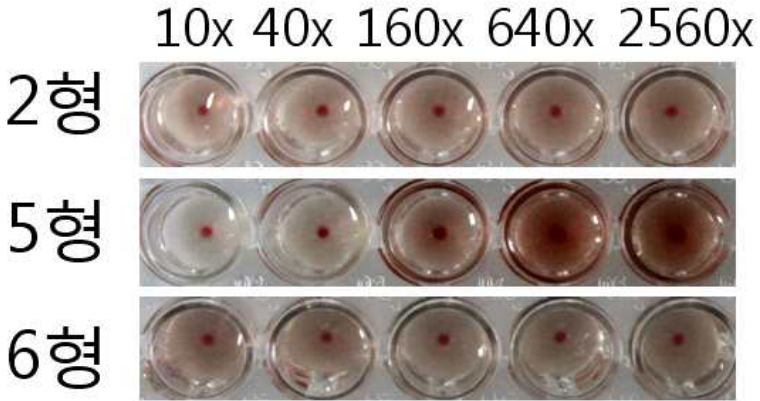
(7) 시험 종료 직후 백신접종군과 미접종군의 혈청형 2형, 5형과 6형에 대한 항체 형성 능력 비교시험 결과

농장		2형		5형		6형	
		백신접종군	미접종군	백신접종군	미접종군	백신접종군	미접종군
1	평균	9.38	9.09	9.56	-	9.27	-
	표준편차	8.25	8.41	8.33	-	8.31	-
2	평균	9.38	-	9.45	9.15	9.45	9.15
	표준편차	8.25	-	8.28	8.44	8.43	8.44
3	평균	9.51	8.61	9.21	-	8.92	-
	표준편차	8.45	8.23	8.23	-	7.84	-



(8) 시험 종료 직후 백신접종군과 미접종군의 Apx 독소의 용혈 억제 능력과 세포독성 억제 능력 항체 형성 능력 비교시험 결과

농장		Apx 독소 용혈 억제능				세포독성 억제능			
		백신접종군		미접종군		백신접종군		미접종군	
1 (2형)	평균	9.38		9.09		9.67		9.11	
	표준편차	8.25		8.40		8.11		7.12	
2 (5/6형)	평균	9.56	9.67	9.11	9.13	9.89	9.31	9.39	9.51
	표준편차	8.11	7.89	8.13	7.55	7.53	6.89	7.31	8.11
3 (2형)	평균	9.51		8.61		9.89		8.15	
	표준편차	8.45		8.23		8.12		8.03	



다. 혈청검사를 통한 마이코플라스마성 폐렴 감염 시기 조사

ELISA 검사 방법을 이용하여 국내 양돈장 25곳에서 채취한 주령별 혈청을 이용하여 마이코플라스마 감염 여부를 조사하였다. ELISA 검사의 S/P ratio 값이 0.4를 기준으로 0.4 이상을 양성으로 판단하였다. 모든, 후보돈의 경우, 거의 대부분 양성으로 항체를 가지고 있으며, 생후 6주에서 22주까지는 주령이 증가됨에 따라 10주령 이후 급격히 항체가가 높아지는 경향을 보였다.

농장	모돈	후보돈	6주령	10주령	14주령	18주령	22주령
1	-	-	2/5	2/5	2/5	4/5	5/5
2	5/5	-	2/5	1/5	3/5	4/5	-
3	5/5	-	2/5	1/5	4/5	-	-
4	-	-	0/5	2/5	2/5	2/5	5/5
5	5/5	-	5/5	3/5	2/5	3/5	5/5
6	-	-	3/5	1/5	3/5	3/5	5/5
7	-	-	2/5	3/5	0/5	1/5	2/5
8	5/5	-	1/5	1/5	3/5	-	-
9	-	-	2/5	3/5	1/5	1/5	4/5
10	5/5	-	3/5	4/5	5/5	3/5	4/5
11	5/5	-	4/5	1/5	2/5	1/5	-
12	4/4	4/4	4/5	5/5	5/5	4/5	-
13	5/5	6/6	4/5	4/5	5/5	5/5	5/5
14	-	-	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5
15	-	-	3/5	4/5	2/5	1/5	5/5
16	-	-	0/5	1/5	0/5	5/5	5/5
17	-	-	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5
18	-	-	4/5	4/5	3/5	4/5	5/5
19	5/5	5/5	2/5	4/5	5/5	5/5	5/5
20	5/5	3/5	2/5	3/5	3/5	3/5	5/5
21	-	-	2/5	2/5	2/5	5/5	4/5
22	5/5	5/5	2/5	2/5	2/5	3/5	-
23	2/5	1/5	4/5	4/5	3/5	3/5	4/5
24	10/12	5/5	2/5	3/5	4/5	-	-
25	5/5	-	3/5	4/5	5/5	5/5	5/5
감염 합계	71/76	29/35	68/120	72/125	77/120	75/105	83/85
감염률	0.93	0.83	0.57	0.58	0.64	0.71	0.97

제 6 장 마이코플라즈마-흉막폐렴 다중점 백신 개발

제 1 절 서 설

돼지의 흉막폐렴(pleuropneumonia)은 *Actinobacillus pleuropneumoniae*에 의해 유발되며 매우 전염성이 높고 모든 연령대의 돼지에서 발병하는 호흡기성 질병이다. 이 질병은 임상증상에 따라 심급성형 (acute), 급성형 (sub-acute) 그리고 만성형 (chronic) 세 가지로 유형으로 나눌 수 있는데 (Nicolet 1992). 원인체 *A. pleuropneumoniae*의 혈청형 (serotype), 숙주인 돼지의 면역상태, 그리고 감염이 폐까지 진행된 상태에 따라서 유형이 구분 된다 (Crujisen et al. 1995; Rogers et al. 1990). 심급성형 (acute)으로 진행 되었을 때는 돼지가 어떠한 임상증상도 없이 24-36시간 이내 돌연사 하고, 코와 입 부위에서 출혈을 동반한 병변을 관찰할 수 있다. 급성형 (sub-acute)에서는 구토, 청색증, 고열, 식욕불량, 호흡곤란 등이 관찰되며, 이 후 코와 입 부위에서 출혈이 발생, 24시간 내에 급성으로 폐사된다. 만약 회복되었다 하더라도 만성형 (chronic)으로 진행된다. 초기 감염이 만성으로 진행되었을 시에는 무증상 보균자 (carrier)가 되어 지속적으로 *A. pleuropneumoniae*를 분비하여 돼지 사육시설안의 순환 감염을 일으키며, 감염 시 호흡곤란 증상으로 인한 복식호흡이 관찰된다 (Dubreuil et al. 2000). *A. pleuropneumoniae*는 용혈성 (hemolytic) 성질과 발효성 (fermentative) 성질을 가지고 있다. 그리고 또한 Pasteurellaceae과의 coccobacillus에 속하는 Gram-negative bacteria로써 산소가 없는 환경 (anaerobic)에서도 생존 할 수 있게 캡슐 (capsule)로 둘러싸여 있다 (Nicolet 1992). *A. pleuropneumoniae*는 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 요구성에 따라 두 가지의 생물형 (biotype)으로 구분된다. 생물1형 (biotype 1)은 NAD 요구성 이며, 생물 2형 (biotype 2)는 NAD를 개체 내에서 합성할 수 있기 때문에 비요구성이다 (Niven and Levesque 1988; Taylor 1999). *A. pleuropneumoniae*은 균체 표면에 특이적으로 존재하는 다당류 항원 (polysaccharide antigen)에 의해 여러 가지 혈청형 (serotype)으로 구분되는데 생물 1형 (biotype 1)은 12개의 혈청형 (serotype)을 포함하며 생물 2형 (biotype 2)는 6개 혈청형 (serotype)을 포함한다 (Perry et al. 1990; Schaller et al. 2001). 이 중 혈청 1형 (serotype 1)과 5형 (serotype 5)은 다시 a와 b 형 (type)로 분류된다. *A. pleuropneumoniae*는 특정지역에 따라 상재하는 혈청형이 서로 다른데, 한국에서는 주로 2 형과 5형이 많이 발견되고 있다 (Jolie et al. 1994; Perry et al. 1990).

양돈 산업에서 *A. pleuropneumoniae*가 미치는 경제적 손실로 인해 *A. pleuropneumoniae*에 대한 백신 연구는 지난 오랜 기간 지속되어 왔다. 따라서 많은 연구들이 발표되었으며 일부 연구는 치료 및 예방용 백신으로 상용화 되었다. 그러나 *A. pleuropneumoniae*에 의한 질병의 예방 측면에 있어 만족할 만한 성과를 얻어 내지는 못하고 있다. *A. pleuropneumoniae*에 대한 백신 개발 연구는 최초로 상용화 된 세균백신 (whole-cell bacterins) 개발 연구를 비롯하여, 현재에는 보다 유망한 백신으로 여겨지고 있는 ‘아단위 백신 (sub-unit vaccine)’과 ‘생백신 (live-attenuated vaccine)’ 연구 개발에 이르기까지 다양하게 진행되어 왔다. 세균백신 (whole-cell bacterins)은 열을 이용해 죽인 박테리아 (heat-killed bacteria) 또는 포르말린을 처리를 통해 죽인 박테

리아 (formalin-treated whole cell)를 이용한 백신이다. 이 백신은 *A. pleuropneumoniae*가 폐지의 기도(respiratory tract)에 집락형성(colonization)하는 것을 방어하는데 효과적이지만 교차 방어 (cross-protection)에 있어 효과가 제한적이고 사망률을 크게 낮추지는 못한다 (Jolie et al. 1995). 다시 말해, *A. pleuropneumoniae*의 동종 (homologous) 혈청형에 대해서는 부분적으로 감염 및 질병예방 가능하지만 이종 (heterologous) 혈청형에 대해서는 방어 효율이 낮다 (Higgins et al. 1985). 따라서 세균백신 (whole-cell bacterins)이 가지고 있는 교차 방어 (cross-protection)의 제한성을 보완하고, 모든 혈청형 (serotype)에 대해서 높은 면역원성을 지닌 항원을 찾기 위한 연구가 진행되었고 그 결과 *A. pleuropneumoniae*에 대한 백신 연구가 아단위백신 (sub-unit vaccine) 과 생백신 (live-attenuated vaccine)개발 연구에 집중되었다. 생백신 (live-attenuated vaccine)은 살아있는 박테리아를 접종하면 교차 방어 (cross-protection)이 가능하다는 장점을 이용하여 개발된 백신이다. 이 백신에 대한 연구는 자연 감염 (natural infection)에서 살아남은 돼지가 동종 혈청형 (homologous serotype)에 의한 감염에 대해서, 또한 부분적으로 이종 혈청형 (heterologous serotype)에 의한 감염에 대해서 면역방어를 보인다는 연구 결과를 토대로 시작 되었고, 1984년 Nielsen과 1995년 Crujisen et al. 과 1996년 Haesebrouck에 의해 연구가 구체화 되었다. 이후 다수의 *A. pleuropneumoniae*의 돌연변이 균주 (mutant strain)가 만들어 졌고 이 균주가 생백신 (live-attenuated vaccine)으로서 생체 내에서 효과적으로 병원체 (pathogen)에 대한 방어력을 형성하는지 여부가 시험되었다. 예를 들면 1997년 Byrd와 Hooke는 온도에 민감한 *A. pleuropneumoniae* 의 혈청1형(serotype 1)을 가지고 돌연변이(mutant)를 만들어 이를 마우스에 비강내 (intranasal)로 접종하여 동종 감염 (homologous infection)에 대한 방어력이 있음을 증명하였고, 2004년 Tumamao et al. 은 항생제 스트렙토마이신 (streptomycin)에 대한 저항력을 지닌 *A. pleuropneumoniae*의 돌연변이균주 (mutant strain)를 만들어 동종 감염 (homologous infection)에 대한 방어력이 있음을 증명하였다. 이외에도 *A. pleuropneumoniae*의 대사 관련 유전자 (metabolic genes)를 변형시킨 돌연변이 균주 (mutant strains)가 만들어져 시험되었는데, 예를 들면 2002년 Ingham et al. 은 aromatic/chorismate 생합성 과정에 관여하는 aroQ 유전자에 대한 대사 관련 유전자 돌연변이(metabolic mutant)를 만들어 *A. pleuropneumoniae*를 약독화 시켰다. 같은 해 Garside et al.은 aromatic 생합성에 필수적인 aroA 유전자를 돌연변이 (mutation)시켜 얻은 약독화 된 *A. pleuropneumoniae*가 폐지의 호흡기질병및폐의손상을일으키지않는다는것을증명하였다. 그러나 일반적으로 효과적인 방어 면역 반응 위해 생백신에 이용되는 박테리아는 면역 반응이 발생하기 까지 충분히 숙주 내에서 살아있어야만 하는데, 대사 관련 유전자 돌연변이 (metabolic mutant)를 이용한 생백신 (live-attenuated vaccine)은 폐지의 호흡기 기관에서 감염 후 오랜 시간 동안 살아있지 못한다는 단점을 가지고 있다. 이 후 생백신 (live-attenuated vaccine) 개발에 표적 (target)으로 사용 가능성이 있는 유전자를 찾는 연구가 계속되었고 좋은 생백신 (live-attenuated vaccine) 개발에 필수적인 몇 가지 요소들에 대한 개념이 확립되었다. 그것은 a) 균주 (strain)는 반드시 높은 면역원성을 지니고 있어야 한다; b) 균주 (strain)는 약독화 되어야 하며 균주 (strain)로 인해 최소한의 감염 및 병변이 발생해야 한다는 것이다. 또한 특정 유전자를 비활성화 시키고자 할 경우 표적 (target)유전자는 반드시 병독성인자 (virulence factor)여야 하고 이 유전자를 변형 시키더라도 박테리아 자체의 생존에 영향을 미쳐서는 안 된다는 것이다. 위의 필수요소를 기초로 하여, 최근 연구가 진행된 *A. pleuropneumoniae* 생백신(live-attenuated

vaccine)은 높은 병독성 인자 (virulence factor)중 하나인 Apx 독소 (toxin)의 유전자를 표적 유전자 (target gene)로 이용한다. 예를 들면 2006년 Xu et al.은 *A. pleuropneumoniae*의 혈청 10형 (serotype 10)이 지닌 apxIA 독소 (toxin)의 c-terminal 부위 유전자에 chloramphenicol을 삽입하여 약독화 된 돌연변이 균주 (mutant strain)를 만들어 돼지에 접종하는 실험을 진행하였고, 백신을 접종 받은 돼지는 동종 감염 (homologous infection)은 물론 부분적으로 *A. pleuropneumoniae*의 혈청 1형과 2형 (serotype 1, 2)에 의한 이종 감염 (heterologous infection)에 대해 방어력이 있음을 증명되었다. Prideaux et al.은 1998년에 *A. pleuropneumoniae*의 Apx 독소 (toxin)를 암호화 (encoding)하는 apx 오페론 (operon) 유전자를 변형 시켜 여러 가지 실험을 하였다. *A. pleuropneumoniae* 혈청 7형 (serotype 7)에 속하는 HS93Tox돌연변이 균주 (HS93Tox-mutant strain)를 이용하여 ApxI 독소 (toxin)를 암호화 (encoding)하는 apxIA와 apxIC 유전자가 파괴되어 비활성화 된 ApxI 독소(toxin)를 생산하는 돌연변이 균주(mutant strain)를 만들었다. 또한 이것을 마우스에 접종하여 돌연변이 균주 (mutant strain)가 약독화 되었음을 확인하였고, Apx에 특이적인 항체가 형성되었음을 확인하였다. 돌연변이 균주 (mutant strain) 백신을 접종한 마우스는 동종 감염(homologous infection)은 물론 *A. pleuropneumoniae*의 혈청 1형 (serotype 1)에 의한 이종 감염에 있어서도 방어력을 보였다. 뿐만 아니라 Prideaux et al.은 이듬해 *A. pleuropneumoniae* 혈청 7형 (serotype 7)을 이용하여, 비활성화된 ApxII 독소 (toxin)를 생산하는 apxIIC 돌연변이 균주 (mutant strain)를 만들어 같은 방법의 백신접종 실험을 하여, 백신을 접종한 마우스가 동종 감염 (homologous infection)은 물론 *A. pleuropneumoniae* 혈청 1형(serotype 1)에 의한 이종 감염 (heterologous infection)에 있어서도 방어력이 있다는 것을 확인하였다. 또한, 2009년 Park et al.은 생백신 (live-attenuated vaccine)개발 연구를 하였는데, *A. pleuropneumoniae* 혈청 2형 (serotype 2)를 이용하여, ApxIII 독소 (toxin)의 분비에 중요한 역할을 담당하는 *A. pleuropneumoniae* 혈청 2형 (serotype 2)의 세포막의 단백질을 encoding하는 apxIIIB와 apxIIID유전자에 항생제 카나마이신(Kanamycin) 유전자를 삽입 하였다. 그 결과 ApxIII 독소(toxin)분비 능력이 저하된 약독화 된 *A. pleuropneumoniae* 혈청 2형 (serotype 2)를 만들 수 있었다. 그리고 이를 마우스 및 돼지에 접종하는 실험을 진행하여 생백신(live-attenuated vaccine)으로서 가능성이 있음을 입증한 바 있다. 돌연변이 균주(mutant strain)를 이용한 생백신 (live-attenuated vaccine)은 *A. pleuropneumoniae* 방어에 있어 효과적이지만 살아있는 세균을 백신으로 사용하므로 그에 따른 부작용이 유발될 수 있는 단점이 있다. 개발되는 생백신 균주는 다양한 조작에 의하여 약독화 된 경우가 많은데, 야생에서 이들 약독화 균이 여러 가지 기전에 의하여 재활성화 될 가능성을 배제할 수 없다. 그리고 돌연변이 균주 (mutant strain)를 만들기 위해 외부의 다른 DNA 또는 항생제 내성 유전자 (antibiotic resistance genes)를 삽입하는 것에 의해 부작용이 발생 할 수 있는데, 예를 들어 돌연변이 균주들 (mutant strains)에 삽입된 항생제 내성 유전자로 인해 발생하는 항생제에 대한 저항력이 다른 병원체로 옮겨 질 수도 있는 위험성이 항상 존재 한다 (Bei et al. 2005; Bei et al. 2007; Lin et al. 2007). *A. pleuropneumoniae*의 생백신 (live-attenuated vaccine) 과 더불어 아단위 백신 (sub-unit vaccine) 개발을 위한 이용한 여러 연구들이 진행되고 있다. *A. pleuropneumoniae*의 아단위 백신(sub-unit vaccine) 개발은 주로 박테리아의 구조를 형성 하는 capsule, lipopoly-saccharides (LPS) 그리고 outer-membrane proteins (OMPs) 에 초점을 두고 진행되고 있다. lipoprotein, iron acquisition system에서 중요한 역할을 하는 여러

수용체 (receptor), [예를 들어 ferrichrome receptor (FhuA), hemoglobin receptor (HgbA)], RTX 독소 (toxin) 등도 아단위백신 개발에 이용되어 왔다 (Goethe R et al. 2000; Mikael et al. 2002; Willson et al. 1995). 그 결과 병독성 인자 (virulence factors)에 토대를 둔 여러 가지 형태의 아단위 백신(sub-unit vaccine)이 개발되어 사용되고 있다. Apx 독소 (toxin)는 박테리아가 분비하는 RTX독소 (RTX-toxin)의 일종으로 용혈능 (hemolytic activity)과 세포독성 (cytotoxicity)을 갖는 단백질이고 직접적 또는 간접적으로 *A. pleuropneumoniae*에 의한 질병의 병리학적 증상 (주로 호중구(neutrophils)를 파괴)에 영향을 미친다. Apx 독소 (toxin)의 종류는 강력한 용혈성 (hemolytic)과 세포독성 (cytotoxic)을 갖는 ApxI, 비교적 약한 용혈성 (hemolytic)과 세포독성 (cytotoxic)을 갖는 ApxII, 그리고 용혈성(hemolytic)은 없지만 강력한 세포독성 (cytotoxic)을 갖는 ApxIII가 가장 대표적이며, 이외에도 최근에 연구 보고된 ApxIV도 Apx 독소 (toxin)에 속한다 (Frey et al. 1993). 대부분의 *A. pleuropneumoniae* 혈청형 (serotype)은 하나 또는 그 이상의 Apx 독소(ApxI, ApxII, ApxIII, ApxIV)을 분비한다고 알려져 있다 (Cho and Chae 2001; Frey 1995; Schaller et al. 1999). 또한 Apx독소는 *A. pleuropneumoniae*의 주요병 독성 인자 (virulence factor)이고 강한 면역원성(immunogenic)을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Devenish et al. 1990; Frey and Nicolet 1991; Inzana et al. 2004). 현재까지 흉막 폐렴 (pleuropneumoniae)의 예방 및 치료를 목적으로 진행되고 있는 돼지의 방어면역 (protective immunity)유도 연구 중 *A. pleuropneumoniae*가 생산하는 Apx독소를 이용한 몇 가지 사례를 들어 보면 다음과 같다. Apx 독소에 의한 면역 세포의 작용을 알아보는 연구를 통해, 세포 내에서 Apx 독소에 대하여 생성된 중화항체 (neutralizing antibody)가 Apx 독소 (toxin)로 인해 호중구 (neutrophils)가 죽는 것을 방어하고 포식작용 역할을 하는 면역세포의 활성을 높인다는 것이 증명되었다. 또한 *A. pleuropneumoniae* 혈청 1형 (serotype 1)의 분무 감염(aerosol challenge) 실험결과, 백신을 접종받은 돼지가 *A. pleuropneumoniae*를 방어 할 수 있는 능력을 지니게 된 것으로 발표된 바 있다 (Crujisen et al. 1992; Furesz et al. 1998; Jansen 1995). 분리 정제된 ApxI과 ApxII로 만든 용혈소 백신 (hemolysin vaccine)으로 *A. pleuropneumoniae* 혈청 1형 (serotype 1)대한 방어 효과를 알아보는 연구에서는 백신을 접종 받은 돼지가 *A. pleuropneumoniae* 혈청 1형 (serotype 1)을 효과적으로 방어 할 수 있었다 (Haga et al. 1997). 또한 N-terminal 부위의 ApxI 독소 (toxin)는 마우스 실험에서 모든 혈청형 (serotype)의 *A. pleuropneumoniae*를 방어 할 수 있었다 (Seah et al. 2002). 그리고 최근 *A. pleuropneumoniae*의 ApxIII독소 (toxin)에서 세포독성 (cytotoxic) 성질의 항원결정인자 (epitope)와 세포 피사를 유도하는 (pro-apoptotic) 성질의 항원결정인자 (epitope)를 갖는 영역(domain)을 결정짓는 연구에서, ApxIII의 N-terminal과 C-terminal 뿐만 아니라 가운데 부위에 존재하는 활성영역 (activation domain)도 세포독소 (cytotoxin)을 중성화시키는 항혈청 (anti-serum)을 만들 수 있는 잠재적인 부위이며 앞으로 백신 개발 연구에 중요한 후보자 (candidate)라 결론을 내린 바 있다 (Seah and Kwang 2004). 따라서 Apx 독소 (toxin)은 *A. pleuropneumoniae*에 의해 감염된 돼지 질병인 흉막 폐렴을 예방 및 방어하기 위한 백신 개발에 중요한 요소로 생각된다. 그리고 현재 생산되고 있는 일부 백신은 비활성 화 시킨 Apx 독소(toxin)을 포함하고 있다.

*Mycoplasma hyopneumoniae*는 돼지 호흡기 질환인 porcine enzootic pneumonia (PEP) 질병을 유발하는 원인체로서, 이 질병으로 인해 돼지에서 만성적인 기침과 성장 속도 저해 현상

그리고 사료 효율 저하가 나타난다 (Goodwin et al. 1967; Mare and Switzer 1965). *M. hyopneumoniae*는 감염초기 폐지의 호흡기의 상피 세포에 유착되어 섬모의 운동을 현저히 저하시켜 ciliostasis를 유발하고 또한 *M. hyopneumoniae*에 감염된 폐지는 다른 균체로부터의 2차 감염에 대한 저항력이 낮아 진다 (DeBey and Ross 1994). 예를 들어, *M. hyopneumoniae*에 감염된 폐지는 번식력이 강한 호흡기 증후군 바이러스 (respiratory syndrome virus)에 쉽게 2차 감염되어 폐렴 (pneumonia)이 발병되고 *A. pleuropneumoniae*에도 2차 감염되기 쉽다고 연구 발표된 사례가 있다 (Thacker et al. 1999). 따라서 *M. hyopneumoniae*의 감염으로 인해 폐지에 질병이 계속 지속되는 현상과 그로 인해 발생하는 심각한 문제는 현재 양돈산업에서 해결되어야 할 중요한 문제로 거론되고 있다. *M. hyopneumoniae*는 세포벽이 없기 때문에 박테리아와 구별 된다 (Dybvig and Voelker 1996). *M. hyopneumoniae*의 또 다른 특징으로 염색체가 작고, DNA의 염기G+C 구성비가 일반적인 세균에 비하여 상대적으로 매우 낮다 (Dybvig and Voelker 1996). 또, 보통 대부분의 생물체에서 TGA codon을 정지 코돈 (translation stop codon)으로 사용하고 있는데 반하여, *M. hyopneumoniae*내에서 트립토판 (tryptophan)을 암호화 (encoding)하는 코돈 (codon)으로 사용 된다 (Dybvig 1990). 이로 인하여, 유전자를 클로닝 (cloning)하여 이종 박테리아 숙주 (heterologous system)에서 단백질을 발현하고자 할 때 문제가 될 수 있다. 예를 들어, 대장균 (*Escherichia coli*)내에서 *M. hyopneumoniae*의 유전자 염기서열 내의 TGA 코돈 (codon)에 의하여 해독과정 (translation)이 조기 종료되는 현상 (premature truncation)이 발생할 수 있다 (Renbaum et al. 1990; Smiley and Minion 1993).

*M. hyopneumoniae*로 인해 발생하는 폐렴을 예방하기 위해 양돈 사육장 내의 위생상태 유지 및 관리와 함께 백신 접종이 가장 보편적인 방법으로 사용되고 있다. 이와 더불어 *M. hyopneumoniae*로부터 폐지를 방어하기 위해, 비활성화 시킨 세균을 이용한 백신 (whole cell bacterins)연구가 일반적으로 많이 이루어져, 현재 상용화되어 사용되고 있다. 그러나 세균 백신 (whole cell bacterins)을 생산하기 위해서는 *M. hyopneumoniae*의 배양에 (in vitro) 배양이 필수적인데, 다른 박테리아와 달리 *M. hyopneumoniae*는 배양을 위해 많은양의 배양 인자가 포함된 배지 (rich medium)가 필요로 할 뿐만 아니라 배양 시간 또한 오래 소요되기 때문에 극히 비효율적이라는 단점이 있다 (Ross 1999). 또한 세균 백신 (whole cell bacterins)은 충분한 면역력을 유발하지 못하는 것으로 알려져 있다. 다시 말해 폐지에 세균 백신 (whole cell bacterins)을 접종을 하여 *M. hyopneumoniae*에 대한 면역 방어 능력을 높여 주었다 할지라도, *M. hyopneumoniae*에 감염될 수 있고, 이미 감염된 폐지의 경우 체내의 *M. hyopneumoniae*를 완벽하게 제거하지 못한다. 그 결과 *M. hyopneumoniae*에 대한 완벽한 면역 방어 능력이 없는 폐지로 인해 병원체 (pathogen)가 다른 폐지로 전염되는 현상이 발생할 수 있다 (Haesebrouck et al. 2004; Maes et al. 2008). 그래서, *M. hyopneumoniae*로부터 폐지를 방어하기 위한 백신 개발은 현재 병원체의 특정 면역 지배적 항원 (immunodominant antigen)을 이용하는 아단위 백신 (subunit vaccine)을 중심으로 이루어지고 있다. 그로 인해 몇 가지 백신개발 후보자 (candidate)로 이용될 수 있는 항원 (antigen)이 밝혀졌는데, 대표적으로 lipoprotein인 P65 단백질, Mhp378단백질, Mhp651단백질 (Kim et al. 1990; Meens et al. 2006)을 비롯하여 cytosolic P36 단백질과 ribonucleoside reductase 그리고 P97 adhesion 단백질 등이 포함된다. 그러나 그 중 ribonucleoside reductase 와 P97단백질만이 폐지에서 아단위 백신 (subunit vaccine)으로 개발될 가능성이 있는 것으로 알려져 있다.

(Fagan et al. 2001; Ogawa et al. 2009; Shimoji et al. 2003). P97 adhesion단백질의 구조 및 기능을 밝히기 위한 많은 연구들이 진행되는데, 그 결과 P97 adhesion 단백질의 C-terminal 부위에 위치한 R1 region (R1 repeat region, AAKPV-E)과 R2 repeat region이 돼지의 섬모 상피조직에 유착하는데 중요한 역할을 하는 것이 알려졌다 (Hsu and Minion 1998; Jenkins et al. 2006; Minion et al. 2000). 관련하여 1998년 Wilton et al. 은 그들의 연구에서 p97 adhesion단백질의 기능을 결여 시킨 *M. hyopneumoniae* 이용하여 섬모유착 능력이 결여된 *M. hyopneumoniae*이 약독화 되었음을 증명 하였다. 또 같은 해 Hsu 와 Minion 은 P97 adhesion단백질 내의 R1 반복서열 (R1 repeat resion)을 인식하는 단일 클론 항체 (monoclonal antibody)를 이용하여 *M. hyopneumoniae*가 돼지의 호흡기 섬모에 유착되는 것을 방해하는데 성공하였다. 이와 같은 P97 adhesion단백질에 대한 연구 결과를 토대로 볼 때 p97 단백질은 *M. hyopneumoniae*에 의해 발생하는 질병의 발생에 중요한 역할을 하며, 그러므로, *M. hyopneumoniae*백신 개발에 있어 중요한 표적 (Target)이 되는 것으로 판단된다. 이와 관련하여 p97 단백질의 C-terminal을 발현하도록 변형된 *Erysipelothrix rhusiopathiae*을 백신 세균주로 사용하려는 시도가 있다 (Ogawa et al. 2009; Shimoji et al. 2003; 일본특허 P2006-311824A). 그러나, 이 연구에서 p97 peptide를 발현하는 매개체 (vector)로 사용된 *Erysipelothrix rhusiopathiae* 균이 약독화 되어 있기는 하나, 병원성 세균이므로 생균 백신이 가지는 위험성을 배제할 수 없다.

동물에 백신을 투여하는 작업은 많은 노동력을 요구될 뿐만 아니라 동물에게도 많은 스트레스를 유발하므로, 최소 횟수의 투여를 통하여 여러 질병에 대한 면역 효과를 얻는 것은 축산 산업의 전반적 효율 측면에서 중요시 되어왔다. 그렇지만 여러 가지 질병에 대한 백신을 단순히 혼합하여 투여하는 것은, 오히려 개체 내 면역 반응 유발에 있어 비효율적인 측면이 있는 것으로 알려져 있다. *A. pleuropneumoniae*와 *M. hyopneumoniae*는 모두 돼지 호흡기 질환을 유발하는 병원체이고 동반 되어 감염이 발생하는 경우가 많다. 한 예로 *M. hyopneumoniae* 감염에 의하여 면역력이 떨어진 돼지에 있어 *A. pleuropneumoniae* 감염이 쉽게 발생하는 것으로 알려져 있다 (Conceicao et al. 2006). 그러므로 하나의 백신 처리에 의하여 두 병원체에 대한 저항력을 모두 가지게 되는 것은 매우 유용하다. 현재 국내에서는 하나의 백신으로 두 질병을 예방할 목적으로 *A. pleuropneumoniae* 독소와 *M. hyopneumoniae*의 사균을 혼합하여 제조한 백신이 수입되어 판매되고 있다. 이러한 상황에서 본 연구 개발에서는 양돈 산업에 큰 피해를 주는 두 호흡기 질환 세균을 동시에 방어하기 위한 재조합 단백질을 개발하였다. 이를 위하여 먼저, 한국에서 주로 발견되는 *A. pleuropneumoniae* 혈청 2형과 혈청 5형에서 생산되는 Apx toxin의 유전자를 재조합 단백질 백신의 타겟 항원으로 선정하였다. Apx toxin중 ApxI과 ApxIII는 Apx toxin CABD 오페론 (operon)에 의해 생산되고 분비 되는 반면 ApxII는 CABD 오페론 (operon)중 CA 유전자만 존재하여 생산은 되지만, 분비가 되지 않는 것으로 알려져 있다 (Frey and Nicolet. 1990; Frey et al. 1992; Kampetai et al. 1991; Rycroft et al. 1991). 따라서 본 연구에서는 분비되는 Apx toxin중 ApxIII toxin을 재조합 단백질 백신 개발의 타겟으로 선정하여 연구를 진행하였다. ApxIII toxin 유전자 (Gene bank Accession No. L12145)를 bioinformatics를 이용한 유전자 분석 및 ApxIII toxin에 대한 사전 연구결과를 토대로 ApxIII toxin 단백질 중 일부 면역원성이 크고 *E. coli* 내 발현이 용이하다고 판단되는 ApxIII toxin 단백질의 N-terminal 일부를 선택하여 재조합 단백질 ApxN을 *E. coli*를 이용하여 발현하였다. 그리고 *M. hyopneumoniae*의 P97 단백질에서 면역

원성이 크다고 판단되는 C-terminal 부위에 해당하는 제조합 단백질 P97C를 유사한 방법으로 발현하였다. 또 두 제조합 단백질의 융합 (fusion) 단백질 Ap97도 발현하였다. 제조합 단백질 P97C와 Ap97제작에 있어서는 P97 유전자 상에 존재하는 stop codon을 제거하고 *E. coli*에서의 발현을 고효율화 할 목적으로 유전자 서열을 최적화하여 사용 하였다. 개발된 제조합 단백질의 면역원성을 확인하기 위하여 각각 단백질을 실험동물 마우스에 투여하여 면역 반응양태를 분석하였다. 또, 형성되는 항혈청이 각각의 해당 미생물 단백질을 인지할 수 있는지 여부를 분석하여, 개발된 제조합 단백질 투여에 의하여 두 가지 돼지호흡기 질병 예방 효과 가능성을 확인하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 백신주 개발에 이용할 다양한 마이코플라스마균 유전자 클론 확보

가. 균주 배양

A. pleuropneumoniae 균주 (strains)는 American Type Culture Collection (ATCC, Virginia, 미국)에서 구입한 serotype 2 (Cat #27089) 를 사용하였다. 배지는 nicotinamidedinucleotide (10 microgram/ml), L-cysteinehydrochloride (260 microgram/ml), L-glutamine (100 microgram/ml), dextrose (1 mg/ml), L-cysteinedihydrochloride (10 microgram/ml) 그리고 Tween80 (0.1%)를 포함하는 pleuropneumonia-like organism (PLO) 배지 (BD Bioscience, Sparks, MD)를 사용하였고, 37°C에서 250 rpm으로 교반하여 배양하였다. Mycoplasma 균주(strains)로는 *Mycoplasma hyopneumoniae* strain J (NCTC10110, ATCC 25934)를 사용하였다. 배양 배지는 30% Heart infusion broth (BD 238400), 4%의 sodium bicarbonate, 10 x Hanks' balanced salt solution, 1%의 0.25% phenol red, 20% porcine serum (heat-inactivated), 10%의 lactalbumin hydrolysate (BD 259962) 그리고 2%의 yeast extract solution (GIBCO18180) 을 함유하고 있으며, pH 7.4 적정 후 autoclave하여 사용하였다. 균주는 37°C에서 250 rpm으로 교반하여 균체의 분화 및 성장이 mid-log phase 단계에 이르기까지 배양하였다.

단백질 발현 및 cloning과정에서 사용된 *Escherichia coli* 균주 (strains)는 각각 BL21(DE3) (Stratagene, 미국)와 DH5a (Intron, 한국)이며 Luria-Bertani (LB)배지에 ampicillin 50 mg/litter와 kanamycin 50 mg/litter을 첨가하여 배양하였다.

나. 단백질 발현 벡터 제작

*A. pleuropneumoniae*에서 추출한 genomic DNA와 ApxN-F/ApxN-R PCR primers 을 이용하여 ApxIIIa 유전자 (GenBank Accession No. L12145)의 N-terminal부위에 위치한 염기 서열을 증폭하였다 (표 1). ApxN-R primer 설계시에 leucine을 발현하는 CTA codon이 *E. coli*내에서 codon usage bias를 제거할 목적으로 CTG codon으로 변환하여 합성하였다 (Burgess-Brown et al. 2008; Sahdev et al. 2008; Sorensen and Mortensen 2005). 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T vector에 삽입하였고, 그 다음 pET28a(+) vector의 BamHI과

XhoI 위치에 이동 삽입하여 *E. coli*내에서 ApxN단백질을 발현하는 데 이용하였다. pET28a(+) vector 염기서열에 따라ApxN 단백질은 N-terminal에 polyhistidine-tag을 포함한다 (그림 1).

*M. hyopneumoniae*의 P97 단백질 상에서 R1과 R2영역을 포함하고 면원성이 높은 것으로 판단되는 C-terminal의 일부를 *E. coli*내에서 발현하기 위하여 P97 유전자 염기서열 (GenBank Accession No. U50901)상의 TGA codon (stop codon)들을 TGG로 변환하였으며, codon usage bias를 최소화하기 위해서 사용률이 낮은 codon들을 사용률이 높은 codon으로 대체하였다. 구체적으로, arginine을 encoding하는 AGG, AGA, CGG와 glycine을 encoding하는 GGA, isoleucine을 encoding하는 AUA, leucine을 encoding하는 CUA, 그리고 proline을 encoding하는 CCC codon 등을 사용성이 높은codon으로 최적화 하였다 (Burgess-Brown et al. 2008; Sahdev et al. 2008; Sorensen and Mortensen 2005). 변환된 염기서열은 BlueHeron Biotechnology (미국)에 의뢰하여 합성하였고, P97C-F/P97C-R primers로 증폭하였다 (표 1). 이후 pGEM-T vector에 삽입하였고, 그 다음 pET28a(+) vector의 BamHI과 XhoI 제한효소 위치에 이동 삽입하여 *E. coli*내에서 P97C 단백질을 발현하기 위하여 사용하였다. pET28a(+) vector 염기서열에 따라 P97C 단백질은 N-terminal에 polyhistidine-tag을 포함한다.

융합 단백질 (fusion protein) Ap97은 ApxIII의 N-terminal 부위와 P97C 의 두 epitopes 를 차례로 포함 한다 (그림 3). 두 epitope의 상호 간섭 (interference)을 최소화하기 위하여, glycine과 serine residue로 구성된 linker로 연결되도록 하였다. *A. pleuropneumoniae*의 genomic DNA를 이용하여 Ap97-F/Ap97-R primers로 ApxIII 유전자의 N-terminal 부위를 증폭하였다 (표 1). Ap97-R primer는 linker sequence를 포함한다. 증폭된 N-terminal 부위와 P97C를 연결하고 pET28a(+) vector의 NdeI과 XhoI 위치에 삽입하여 *E. coli*에서 Ap97 단백질을 발현하기 위하여 사용하였다. pET28a(+) vector 염기서열에 따라 Ap97단백질은 N-terminal에 polyhistidine-tag을 포함한다.

그림 1 재조합 단백질 Ap97구성

Epitope 1은 bioinformatics를 토대로 ApxIII 단백질의 구조를 분석하고 hydrophilicity와 immunogenecity를 고려하여 선정된 부분. Epitope 2는 P97 단백질의 R1과 R2 repeat region을 포함하는 부분. N-terminal의 ApxIII와 C-terminal의 P97 단백질은 Glycine와 Serine기본 구조를 갖는 Linker sequence을 이용하여 연결 하였다.

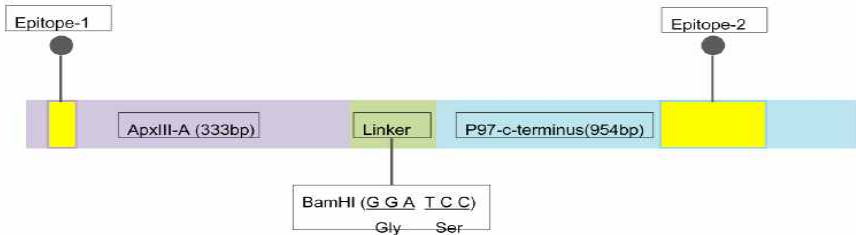


표 1 재조합 단백질 ApxN, P97C, Ap97 발현 벡터 제작에 사용된 PCR primers.

Primer ^{a)}	Sequence (5' to 3') ^{b)}	Accession # ^{c)}	Gene ^{d)}	Length (bp) ^{e)}
ApxN-F ^{a)}	GGGGATCCGGCTACGATGTAACATAAAATGGT ^{b)} BamHI restriction sequence underlined ^{b)}			
ApxN-R ^{a)}	GGCTCGAGTTATTGTAAAGAATGATCCAGTTCGGG ^{b)} XhoI restriction sequence underlined ^{b)}	L12145 ^{c)}	<i>apxIII</i> ^{d)}	315 ^{e)}
P97C-F ^{a)}	CGGGATCCAAACTGGATGACAACCTCCAA ^{b)} BamHI restriction sequence underlined ^{b)}			
P97C-R ^{a)}	GGCTCGAGTTAAGGATCTCCGGATTTGCTGTCGTC ^{b)} XhoI restriction sequence underlined ^{b)}	U50901 ^{c)}	<i>P97</i> ^{d)}	954 ^{e)}
Ap97-F ^{a)}	GGCCATATGCAAGTTAAAAAGGCTACGATGAAC ^{b)} NdeI restriction sequence underlined ^{b)}			
Ap97-R ^{a)}	GGCGGATCCATGTTTTTTGTTAGAAGATGCCAGTTG ^{b)} BamHI restriction sequence underlined ^{b)}	L12145 ^{c)}	<i>apxIII</i> ^{d)}	333 ^{e)}

2. 확보된 유전자를 토대로 홍막폐렴균 유전자 재조합 벡터 개발 및 약독화된 홍막폐렴 균주의 유전자 재조합 실시

가. 단백질 발현

ApxN, P97C와 Ap97을 발현하도록 제작된 pET-ApxN, pET-P97C, 그리고 pET-Ap97 vectors로 *E. coli* strains BL21(DE3)을 transformation하였고, 각각의 단백질은 polyhistidine을 N-terminal을 포함하고 있으므로 이를 이용하여 정제하였다. 구체적으로, 각 plasmid vectors로 transformation된 *E. coli* 를 37°C에서 교반하여 mid-log phase (A600=0.5~0.7)까지 배양된 후, 1 mM 농도의nisopropyl-β-thiogalctopyranoside (IPTG)를 추가한 후, 37°C에서 4시간 동안 추가 배양하였다. 이렇게 배양된 cell을 20분 동안 4,000 x g로 원심분리한 후, 세포 용괴 (cell clump)를 lysis buffer (50 mM sodium phosphate, 300 mM sodium chloride, 10mM imidazole, 1mg/ml lysozyme, pH 8.0)를 사용하여 파괴하였다. 그 다음 10,000 x g속도로 20분간 원심분리하여 얻은 lysate중 상층액에서 6xHis-tag/Ni-nitrilotriacetic acid column (Qiagene, 미국)를 사용하여 단백질을 정제하였다. ApxN의 경우 soluble형태이므로 lysate를 직접 사용하여 정제 하였다. 그러나, Ap97과 P97C 의 경우 inclusion body형태로 발현되므로, cell lysis 후 추가적으로urea buffer (8M urea, 10 mM Tris, 100 mM sodium phosphate, pH 8.0)로 처리하여 cell lysate를 얻었고, 이후 48시간 동안 순차적으로 낮은 농도의 urea와 imidazole이 포함된 buffer를 사용하여 투석(dialysis)을 하였다. Dialysis buffer는 phosphate-buffered saline (PBS; 10 mM sodium phosphate, 150 mM chloride)에 5% glycerol을 첨가하여 사용하였다. 정제된 단백질은 BCA protein assay kit (Intron, 한국)를 이용하여 정량하였다. 정제 과정을 거친 이 세가지 단백질은 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel 전기영동을 통하여 단백질 분자량 및 순도를 확인하였다.

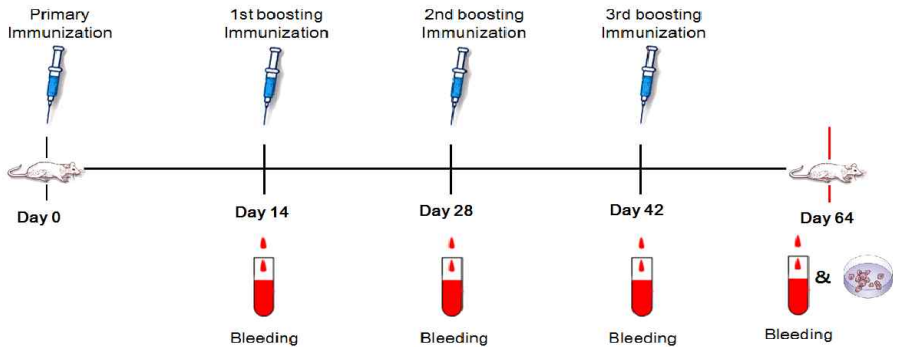
3. 개발된 균주 내에서의 마이코플라스마균 단백질 발현 여부 확인 및 개발된 균주의 실험동물과 폐지를 이용한 면역원성 및 안전성 확인 분석

가. 마우스 면역 실험

6~8주령 암컷 Balb/C 마우스 (중앙실험동물, 한국)에 사료 및 물을 충분히 공급하여 2주간 순화하고, 마우스의 안와정맥총 채혈을 실시하여 면역형성 (immunization) 전의 혈청을 확보하였다. 1주 후 마우스를 무작위로 나누어 각 케이지에 배치한 후, PBS 녹인 25 microgram의 각 항원 단백질을 complete Freund's adjuvant 와 emulsion화 하여 피하(subcutaneous)로 투여하였다. 4개의 집단은 각각 1) PBS 투여 (vehicle control), 2) ApxN 투여, 3) P97C 투여, 4) Ap97 투여집단이다. 최초 투여 후 14일, 28일, 42일 후에 25 microgram의 각 항원 단백질을 incomplete Freund's adjuvant와 혼합하여 투여 (boosting immunization)하였고, 항체 형성을 분석하기 위하여 안와 채혈을 실시하였다. 마지막 boosting immunization후 21일째에, 심장 채혈을 실시하고 비장(spleen)에서 primary splenocyte를 분리하는데 이용하였다.

그림 2 마우스 면역 실험 계획

6~8주령 암컷 Balb/C 마우스를 4개의 집단으로 나누어 각각 1) PBS 투여 (vehicle control), 2) ApxN 투여, 3) P97C 투여, 4) Ap97 투여하였다. 0일, 14일, 28일, 42일에 안와 채혈을 하여 혈청을 확보함과 동시에 항원 투여를 실시하였고, 마지막 boosting immunization 후 21일째에, 심장 채혈을 실시하고 비장(spleen)에서 primary splenocyte를 분리하였다. 확보한 혈청은 항체가 분석(면역글로블린 분석)을 위해 사용되었고 분리한 splenocyte는 cytokine분석을 위해 사용되었다.



4. 다중점 백신에 대한 백신시기 결정 및 개발된 균주의 폐지에서 면역원성(항원성)과 효능 검사

가. 면역글로블린 (immunoglobulin) 분석

각 단백질은 투여한 각 마우스 혈청내 immunoglobulin G (IgG)와 IgG1, IgG2a isotypes의 역치(titer)를 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)방법을 이용하여 측정하였다. 이를 위하여 ApxN 과 P97C단백질을 carbonate buffer (pH 9.6)에 첨가하여 0.5 mg/100 ml 또는 1 mg/100 ml 농도로 희석하고, 각 96-well에 넣어 4°C에서 16시간 동안 각 well을 coating하였다. 그 다음 0.05%의 tween20이 첨가된 PBS (PBS-T) 200ul로 각 well을 세 번 세척하고5%의 skim milk가 첨가된 PBS-T로 37°C에서 2시간 동안 blocking과정을 실행하였다. 이 후 PBS-T로 세 번 반복 세척하고, 희석한 항혈청 샘플 (1: 10부터 1: 1,000,000)을 PBS-T에 녹여 100 microliter씩 항원이 coating되어있는 well에 첨가하였다. 37°C에서 2~3 시간 동안 incubation을 한 후 PBS-T로 다섯 번 세척하고, horseradish peroxidase 결합된 anti-mouse IgG와 IgG1, IgG2a isotype을 1: 1000비율로 희석 후 well에 첨가하여, 37°C에서 1시간 반응과정을 거친 후 PBS-T로 다섯 번 세척하였다. 발색을 위하여 O-phenylenediamine 를 각 well에 100 microliter 첨가하여, 37°C에서 30분간 반응시킨 후 3M HCl로 반응을 정지 시켰다. 그 다음 492nm파장에서 흡광도 (optical density) 측정하여 cut-off 값을 제하였다. Cut-off 은 immunization하지 않은 마우스의 혈청의 A492 값 평균에 표준편차의 3배를 더하여 준 값으로 정하였고, A492가 cut-off 값 이상인 경우에만 positive 결과로 인정하였다.

나. Splenocyte 분리 및 cytokine 분석

마우스에서 spleen을 분리하여 60 x 15 mm petridish에 두고, 3 ml의 complete RPMI-10 배지 (10% heat-inactivated FBS (Gibco BRL life technologies, 미국), 50 microM 2-mercaptoehanol, 10 U/ml penicillin, 100 microgram/ml streptomycin sulfate)를 첨가하여 조직이 배지에 잠기게 하였다. 그 후 10 ml주사기의 plunger를 이용하여 조직을 부수어 single cell suspension을 만든 후 cell strainer으로 이 suspension을 통과시켰다. 그 다음 10분간 400 x g 속도로 원심분리하였고, ACK lysis buffer (0.15 M ammonium chloride, 10 mM potassium bicarbonate, 0.1 mM Na2EDTA, pH 7.4)에 resuspension하여 blood cell을 제거하였다. 이 후 complete RPMI-10 배지로 3번의 wash과정을 거친 후, 2 ml suspension당 3 ml의Ficoll-Paque (GE Healthcare, 미국)를 첨가하고, 30분 동안 400 x g 속도로 원심분리하였다. Complete RPMI-10 배지로 3번 세포를 wash 한 후, flat-bottom plates에 4 x 106/well로 분주하였다. 각 cells에 2.5 microgram의 ApxN, P97C, Ap97와 PBS 를 넣은 후, 37°C, 5% CO2조건하에서 48시간 동안 배양한 후, 배양액을 획득하였다. Procarta cytokine assay kit (Panomics, 미국)을 사용하여 배양액내 interferon gamma (INF- γ)와 interleukin-4 (IL-4) 분석을 실시하였다.

다. Western blotting 분석

M. hyopneumoniae 세포, A. pleuropneumoniae 배양액으로 부터 각각 단백질들을 분리하였다. 또, pET-ApxN, pET-P97C, pET-Ap97 vectors로 transformation된 E. coli 균체 단백질을 분리하였다. 분리된 각 단백질 시료를 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis으로 분리한 후, nitrocellulose membrane으로 이동 (transfer)하였다. 이 후 membrane을 5% skim milk-Tris-buffered saline Tween-20 (TBST)을 사용하여 1시간 동안 상온에서 blocking 하였고, 마우스에서 얻은 anti-ApxN 혈청, anti-P97C 혈청, anti-Ap97 혈청을

TBST로 희석 (1:100)하여 incubation 하였다. 세척과정을 거친 후 horseradish peroxidase 가 부착된 anti-mouse IgG를 2차 항체로 하여 incubation 후, chemiluminescence detection reagent를 이용하여 발색하였다.

라. 돼지 면역 실험

3주령 12마리의 돼지가 본 실험에 사용 되었으며, 4개의 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다. 실험 그룹은 다음과 같다. (A) AP97을 백신접종하고 *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2를 공격접종을 실시한 그룹 (n=3); (B) AP97을 백신접종하고 *Mycoplasma hyopneumoniae*를 공격접종을 실시한 그룹 (n=3); (C) 백신접종을 하지 않고 PBS를 주사하고 *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2를 공격접종을 실시한 그룹 (n=3); (D) 백신접종을 하지 않고 PBS를 주사하고 *Mycoplasma hyopneumoniae*를 공격접종을 실시한 그룹 (n=3).

백신 접종에 사용되는 항원인 재조합 단백질 AP97단백질은 Large scale로 단백질 발현 및 분리 정제하여 4.66 mg/ml 농도로 확보하였으며 돼지에 백신접종 하기 전에 0.2 um syringe filter를 이용하여 멸균하여 준비하였다. 공격 접종에 사용되는 *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2는 single colony를 50 mL의 PPLO broth에 접종, 37°C에서 교반 배양을 하여 OD600값이 0.8이 도달하였을 때 harvest하여 준비하였고, 야생형 *Mycoplasma hyopneumoniae*는 field에서 *Mycoplasma hyopneumoniae* 감염된 돼지로부터 분리 배양 된 균체를 제공 받아 준비하였다. AP97 단백질 항원 700µg을 aluminum hydroxide (Alum) 와 10대 1 비율로 섞어 (Antigen-Alum mixture) 2mL씩 각각의 백신접종 그룹 돼지의 목에 근육주사로 1차 백신 접종을 실시하고 10일 후 동일한 양의 단백질 항원들을 adjuvant와 함께 2차 백신접종을 실시하였다. 공격접종은 2차 백신접종을 실시한 다음 10일 후에 1×10^8 CFU의 *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2를 비강(intranasal route)으로 접종을 실시하였으며 1.5×10^8 CCU의 *Mycoplasma hyopneumoniae*를 기도내 (intratracheal route)로 접종을 실시하였다. 공격접종 실시한 다음 14일 후 임상증상을 확인하고 비강 면봉(nasal swab)을 이용하여 균체를 분리하여 감염여부를 확인하였다. 21일째 되는 날 부검을 실시하였다.

제 3 절 결과와 고찰

1. 백신주 개발에 이용할 다양한 마이코플라스마균 유전자 클론 확보

E. coli strain BL21(DE3)을 단백질 발현 host로사용하여 ApxN, P97C, Ap97 단백질을 각각 발현하고, 각 단백질 N- terminal에 위치한 polyhistidine tag (그림 3, 4, 5)을 이용하여 정제하였다.

2. 확보된 유전자를 토대로 흉막폐렴균 유전자 재조합 벡터 개발 및 약독화된 흉막폐렴 균주

로의 유전자 재조합 실시

12% SDS-PAGE로 분석한 결과 정제한 재조합 단백질 ApxN, P97C, Ap97의 분자량이 각각 약 15 kDa, 45 kDa, 60 kDa 으로 분석되어 (그림 6), 염기서열 (그림 3, 4, 5)에 따른 단백질 분자량과 일치함을 확인하였다.

재조합 단백질 생산량 및 효율은 다음과 같다. ApxN, P97C 그리고 Ap97를 E.coli에 transformation하여 1L로 배양 하였을때 ApxN 단백질은 3.008 mg, P97C 단백질은 3.025 mg 그리고 Ap97 단백질은 3.016 mg을 생산 할 수 있었다. (Table 2)

그림 3

재조합 단백질 ApxN을 encoding하는 염기서열. 회색으로 표기된 1-102까지는 E. coli 발현용 벡터인 pET28a(+)에서 유래되고, polyhistidine tag 염기서열을 포함하고 있음. 103-417까지는 *A. pleuropneumoniae*의 ApxIIIa 유전자 (GenBank Accession No. L12145)의 N-terminal부위에서 유래됨. 단, 염기서열 402 번째 위치의 G는 E. coli의 codon bias를 피하기 위하여 A에서 변환됨 (CTA codon에서 CTG로 변환).

```
1  ATGGGCAGCA GCCATCATCA TCATCATCAC AGCAGCGGCC TGGTGCCGCG CGGCAGCCAT
61  ATGGCTAGCA TGACTGGTGG ACAGCAAATG GGTCGCGGAT CCGGCTACGA TGTAATAAAA
121 AATGGTTTGC AATATGGGGT GAGTCAAGCA AAATTACAAG CATTAGCAGC TGGTAAAGCC
181 GTTCAAAAAGT ACGGTAATAA ATTAGTTTTA GTTATTCCAA AAGAGTATGA CGGAAGTGTT
241 GGTAACGGTT TCTTTGATTT AGTAAAAGCA GCTGAGGAAT TAGGCATTCA AGTTAAATAT
301 GTTAACCGTA ATGAATTGGA AGTTGCCCAT AAAAGTTTAG GTACCGCAGA CCAATTCTTG
361 GGTTTAACAG AACGTGGACT TACTTTATTT GCACCGCAAC TGGATCAGTT CTTACAATAA
```

그림 4

재조합 단백질 P97C를 encoding하는 염기서열. 회색으로 표기된 1-102까지는 E. coli 발현용 벡터인 pET28a(+)에서 유래되었고, polyhistidine tag 염기서열을 포함하고 있음. 103-1056까지는 *M. hyopneumoniae*의 P97 단백질 중의 C-terminal의 일부를 E. coli내에서 고효율로 발현하기 위하여 최적화한 염기서열이다. 즉, p97 염기서열(GenBank Accession No. U50901)을 토대로 codon bias를 제거하여 하고, 마이코플라스마 특이적 stop codon인 TGA 를 TGG로 변환하여 제작함.

```

1 ATGGGACAGCA GCCATCATCA TCATCATCAC AGCAGCGGCC TGGTGCCGCG CGGCAGCCAT
61 ATGGCTAGCA TGACTGGTGG ACAGCAAATG GGTCCGGGAT CCAAACTGGA TGACAACCTC
121 CAATACTCCT TCGAAGCGAT CAAAAAAGGC GAAACCACTA AAGAGGGCAA ACGCGAGGAG
181 GTGGACAAGA AGGTGAAAGA GCTCGACAAC AAAATCAAAG GTATCCTTCC GCAACCGCCG
241 GCGGCGAAAC CTGAGGCGGC AAAGCCGGTC GCCGCCAAAC CAGAAACTAC CAAACCAGTC
301 GCAGCCAAGC CGGAAGCAGC GAAACCAGAG GCCGCGAAAC CCGTCCGCGC AAAGCCGGAA
361 GCAGCCAABC CGGTGGCAGC CAAACCCGAA GCGGCAAAAC CTGTAGCAGC AAAACCAGAA
421 GCGGCAAAAC CTGTGGCCCG CAAGCCAGAA GCAGCCAABC CCGTAGCGAC CAATACAGGC
481 TTCTCATTGA CCAACAAAC AAAAGAAGAC TACTTTCGGA TGGCTTTTAG CTATAAATTA
541 GAATACACAG ACGAGAATAA ACTGTCCCTG AAAACCCCTG AAATTAATGT CTTTCTCGAA
601 CTGGTACATC AAAGTGAATA TGAAGAACAA GAAATCATTA AAGAATTAGA CAAAACCGTA
661 TTAAACTTGC AGTATCAGTT TCAAGAAGTA AAAGTGACGA GCGATCAATA CCAGAAACTG
721 TCCCACCCTA TGATGACAGA AGGCAGCTCA AACCAAGGCA AAAAAAGCGA AGGCACACCG
781 AACCAAGGCA AAAAAGCTGA GGGAGCCCC AACCAAGGTA AGAAGGCCGA AGGCACCCCG
841 AATCAAGGTA AAAAAGCAGA AGGTGCACCC AGCCAGCAGA GCCCAACAAC CGAGCTGACA
901 AACTATTTAC CGGACCTGGG TAAAAAAATT GACGAAATTA TCAAAAAACA GGGCAAAAAC
961 TGGAAAACCG AAGTTGAACT CATCGAAGAC AACATTGCGG GTGATGCTAA ATTATTGTAT
1021 TTCATTCTGC GCGACGACAG CAAATCCGGA GATCCTTAA

```

그림 5

ApxN과 P97C의 epitopes를 모두 포함하는 융합단백질 Ap97를 encoding하는 염기서열. 회색으로 표기된 1-63까지는 *E. coli* 발현용 벡터인 pET28a(+)에서 유래하고, polyhistidine tag 염기서열을 포함하고 있음. 64-396의 염기서열은 ApxIII유전자에서 유래하고, 그 중 76-390는 그림 3의 103-417와 동일함. 403-1359은 그림 4의 103-1059와 동일함. 진하게 표시된 397-402는 ApxN과 P97C epitopes을 연결하는 linker를 encoding함.

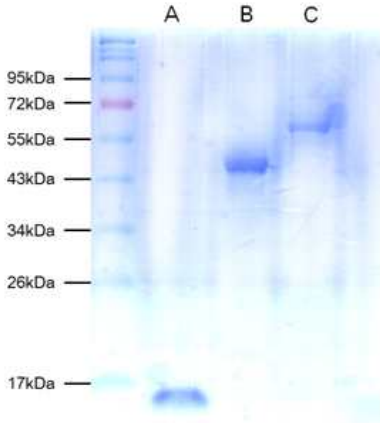
```

1 ATGGGACAGCA GCCATCATCA TCATCATCAC AGCAGCGGCC TGGTGCCGCG CGGCAGCCAT
61 ATGCAAGTTA AAAAAGGCTA CGATGTAAC TAAAATGGTT TGCAATATGG GGTGAGTCAA
121 GCAAAATTAC AAGCATTAGC AGCTGGTAAA GCCGTTCAAA AGTACGGTAA TAAATTAGTT
181 TTAGTTATTC CAAAAGAGTA TGACGGAAAT GTTGGTAAAC GTTCTTTGA TTTAGTAAAA
241 GCAGCTGAGG AATTAGGCAT TCAAGTTAAA TATGTTAAC GTAATGAATT GGAAGTTGCC
301 CATAAAAGTT TAGGTAGCCG AAGCCAATTC TTGGGTTTAA CAGAACGTGG ACTTACTTTA
361 TTTGCACCGC AACTGGATCA GTTCTTACAA AAACATGGAT CCAAACCTGA TGACAACCTC
421 CAATACTCCT TCGAAGCGAT CAAAAAAGGC GAAACCACTA AAGAGGGCAA ACGCGAGGAG
481 GTGGACAAGA AGGTGAAAGA GCTCGACAAC AAAATCAAAG GTATCCTTCC GCAACCGCCG
541 GCGGCGAAAC CTGAGGCGGC AAAGCCGGTC GCCGCCAAAC CAGAAACTAC CAAACCAGTC
601 GCAGCCAAGC CGGAAGCAGC GAAACCAGAG GCCGCGAAAC CCGTCCGCGC AAAGCCGGAA
661 GCAGCCAABC CGGTGGCAGC CAAACCCGAA GCGGCAAAAC CTGTAGCAGC AAAACCAGAA
721 GCGGCAAAAC CTGTGGCCCG CAAGCCAGAA GCAGCCAABC CCGTAGCGAC CAATACAGGC
781 TTCTCATTGA CCAACAAACC AAAAGAAGAC TACTTTCGGA TGGCTTTTAG CTATAAATTA
841 GAATACACAG ACGAGAATAA ACTGTCCCTG AAAACCCCTG AAATTAATGT CTTTCTCGAA
901 CTGGTACATC AAAGTGAATA TGAAGAACAA GAAATCATTA AAGAATTAGA CAAAACCGTA
961 TTAAACTTGC AGTATCAGTT TCAAGAAGTA AAAGTGACGA GCGATCAATA CCAGAAACTG
1021 TCCCACCCTA TGATGACAGA AGGCAGCTCA AACCAAGGCA AAAAAAGCGA AGGCACACCG
1081 AACCAAGGCA AAAAAGCTGA GGGAGCCCC AACCAAGGTA AGAAGGCCGA AGGCACCCCG
1141 AATCAAGGTA AAAAAGCAGA AGGTGCACCC AGCCAGCAGA GCCCAACAAC CGAGCTGACA
1201 AACTATTTAC CGGACCTGGG TAAAAAAATT GACGAAATTA TCAAAAAACA GGGCAAAAAC
1261 TGGAAAACCG AAGTTGAACT CATCGAAGAC AACATTGCGG GTGATGCTAA ATTATTGTAT
1321 TTCATTCTGC GCGACGACAG CAAATCCGGA GATCCTTAA

```

그림 6

E. coli에서 발현되어 분리된 재조합 단백질 ApxN (A), P97C (B), Ap97 (C)의 전기영동 분석 (SDS-PAGE). 각 단백질 분자량은 그림 3, 4, 5의 염기서열을 토대로 예측된 분자량과 일치하고 있음. 좌측 첫째 lane, 단백질 분자량 markers.



3. 개발된 균주 내에서의 마이코플라스마균 단백질 발현 여부 확인 및 개발된 균주의 실험동물과 돼지를 이용한 면역원성 및 안전성 확인 분석

Table 2. 재조합 단백질 농도 및 생산량

Recombinant protein	Concentration of purified protein	Elution volume	Culture volume	Total amount of purified protein
ApxN	300.82 ug/mL	10 mL	1 L	3.008 mg
P97C	302.50 ug/mL			3.025 mg
Ap97	301.64 ug/mL			3.016 mg

가. 마우스 혈청내 IgG 분석

ApxN, P97C, ApxN과 P97C, 그리고 Ap97을 각각 투여한 마우스에서 면역반응 유발 효과를 관찰하기 위하여 각 마우스 혈청내의 ApxN과 P97C에 대한 IgG titer를 분석하였다 (그림 7, 8). ApxN에 대한 혈청 내 IgG titer(Anti-ApxN titer)는 첫 번째 투여 후 14일에 이미 ApxN, Ap97, ApxN와 P97C mixture를 투여한 각각의 마우스에서 PBS만을 투여한 마우스에 비하여 약 100-1,000 배의 유의한 증가를 보였다 (그림 7). Boosting 투여 진행 후 분석한 결과 ApxN, 과Ap97를 투여한 마우스에서 ApxN에 대한 IgG 수준이 증가하여 PBS 만을 투여한 마우스에 비해 1,000-10,000배에 이르고 있었다. Ap97은 ApxN과 P97C의 두 개의

epitope을 포함하고 있는데, 위의 결과는 Ap97투여에 의하여, Ap97 내의 P97C epitope에 의하여 방해받지 않고, ApxN에 대한 IgG 형성이 가능함을 보여 주고 있다. 또한 그림 5와 유사한 방법으로 P97C과 Ap97를 투여한 각각의 마우스 혈청 내 P97C에 대한 IgG 수준을 평가하였다 (그림 8). 그 결과 각 투여군에서 PBS 만을 투여한 마우스에서 보다 약 1000 배 수준의 P97C에 대한 IgG가 존재함을 확인할 수 있었다. 이 결과는 Ap97투여에 의하여, ApxN epitope에 의하여 방해받지 않고, P97C에 대한 IgG 형성이 가능함을 보여 주고 있다. 또한 ApxN과 P97C의 동시 투여에 의해 각 항원에 대한 IgG형성을 상호 교란하지 않음이 확인되었다 (그림 7, 8).

그림 7

ApxN과 Ap97 또는 PBS를 투여한 마우스의 혈청내의 ApxN에 대한 IgG 수준 분석. **, anti-PBS serum 과의 비교 ($p < 0.01$, unpaired t-Test).

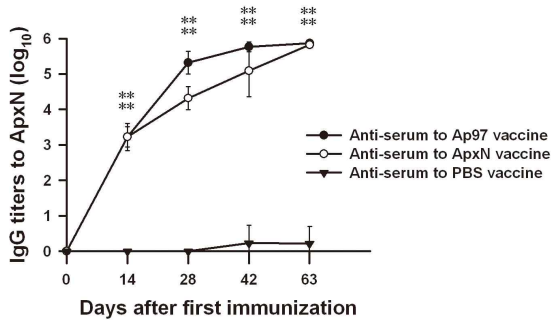
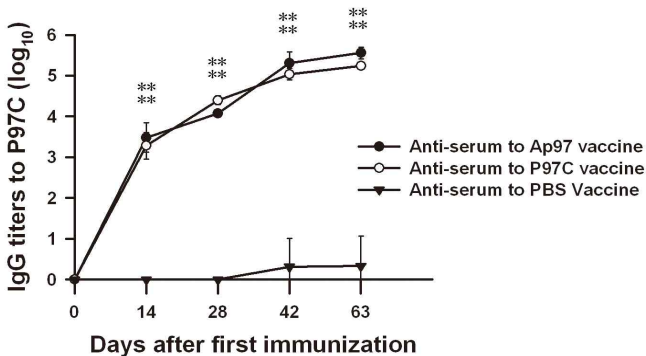


그림 8

P97C과 Ap97 또는 PBS를 투여한 마우스의 혈청내의 P97C에 대한 IgG 수준 분석. **, anti-PBS serum 과의 비교 ($p < 0.01$, unpaired t-Test).



나. 마우스 혈청내 IgG2a 와 IgG1 분석

항원 등에 의하여서는 Th2반응이 주로 유발된다. 반면 adjuvant 등에 의하여서는 Th1 반응이 유발 된다 (Fernando et al. 1998). Th1 type 면역반응은 IFN- γ 와 IL-2 등의 cytokine 분비와 관련이 있고, 반면 Th2 type 면역반응은 IL-4 와 IL-10의 분비와 관련이 있다. Th1 type cytokine 에 의하여서는 IgG2a가 유기 발현되는데, IgG2a는 Th2면역반응과는 관련이 작다. Th2 cytokine은 주로 IgG1을 유기 발현한다. 그림 9 에서 ApxN과 Ap97을 투여한 마우스 혈청에서 ApxN에 대한 IgG2a와 IgG1을 각각 분석하였다. 각 혈청에서 IgG2a와 IgG1 모두 PBS를 투여한 마우스 혈청에서 보다 유의성 있게 높은 수준으로 검출되었다. 그러나 각 혈청 내 IgG2a와 IgG1 수준의 상대 비교에서 IgG2a이 IgG1에 비해 높은 것으로 발견되었다. P97C과 Ap97을 투여한 마우스 혈청 내의 P97C에 대한 IgG2a와 IgG1 수준 분석결과 각 혈청에서 IgG2a와 IgG1 모두 PBS를 투여한 마우스 혈청에서 보다 유의성 있게 높은 수준으로 검출되었다. 그러나 각 혈청내 IgG2a와 IgG1 수준의 상대 비교에서 IgG2a과 IgG1이 비슷한 수준을 나타내었다. (그림 10). ApxN과 Ap97을 투여한 마우스 혈청에서 ApxN에 대한 각 혈청 내 IgG1에 비하여 IgG2a 수준이 상대적으로 높은 것을 토대로 재조합 단백질들에 의하여 Th1 면역반응이 주로 유발되는 것으로 판단되고, P97C과 Ap97을 투여한 마우스 혈청 내의 P97C에 대한 IgG2a와 IgG1 수준 분석결과 비슷한 수준을 나타내는 것을 토대로 Th1과 Th2 면역반응이 동시에 유발되는 것으로 판단될 수 있다.

그림 9

ApxN과 Ap97 또는 PBS를 투여한 마우스의 혈청내의 ApxN에 대한 IgG2a 와 IgG1 수준 분석. **, anti-PBS serum 과의 비교 ($p < 0.01$, unpaired t-Test). *, anti-PBS serum 과의 비교 ($p < 0.05$, unpaired t-Test).

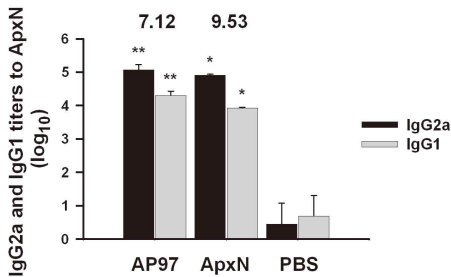
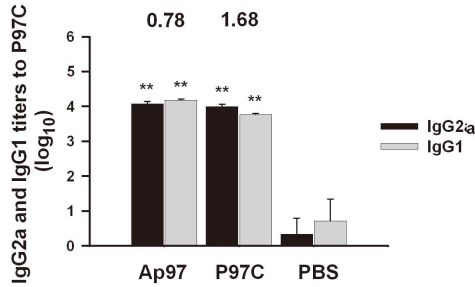


그림 10

P97C와 Ap97 또는 PBS를 투여한 마우스의 혈청내의 P97C에 대한 IgG2a 와 IgG1 수준 분석. **, anti-PBS serum 과의 비교 ($p < 0.01$, unpaired t-Test). *, anti-PBS serum 과의 비교 ($p < 0.05$, unpaired t-Test).

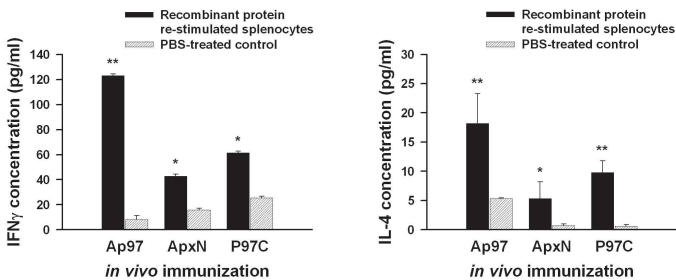


다. 마우스 splenocyte에서 분비된 cytokine 분석

Ap_xN, P97C 그리고 Ap97을 각각 투여한 마우스 비장 내 세포 수준의 면역 반응을 관찰하기 위하여, 각 마우스의 splenocytes를 각각의 면역원으로 노출하여 분비되는 2가지 cytokine 즉 IFN- γ 과 IL-4을 분석하였다 (그림 11). 각 re-stimulants에 노출된 splenocytes에서 분비하는 cytokine IFN- γ 과 IL-4의 수준이 PBS에 의해 re-stimulated된 splenocytes 비하여 cytokines level들이 수배에서 수백배 수준으로 높이 분비되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 각 재조합 단백질에 의하여 세포 수준의 면역 반응이 유발되었음을 시사한다.

그림 11

Ap_xN, P97C 그리고 Ap97을 투여한 마우스에서 분리한 splenocytes를 각각의 단백질 항원으로 또는 PBS로 re-stimulation 처리한 후, 세포 배양액 내의 cytokine 농도를 분석함. 각 데이터는 평균 \pm 표준편차임 (n=4). *, PBS 와의 비교(p<0.05, paired t-Test). **, PBS 와의 비교(p<0.01, paired t-Test).



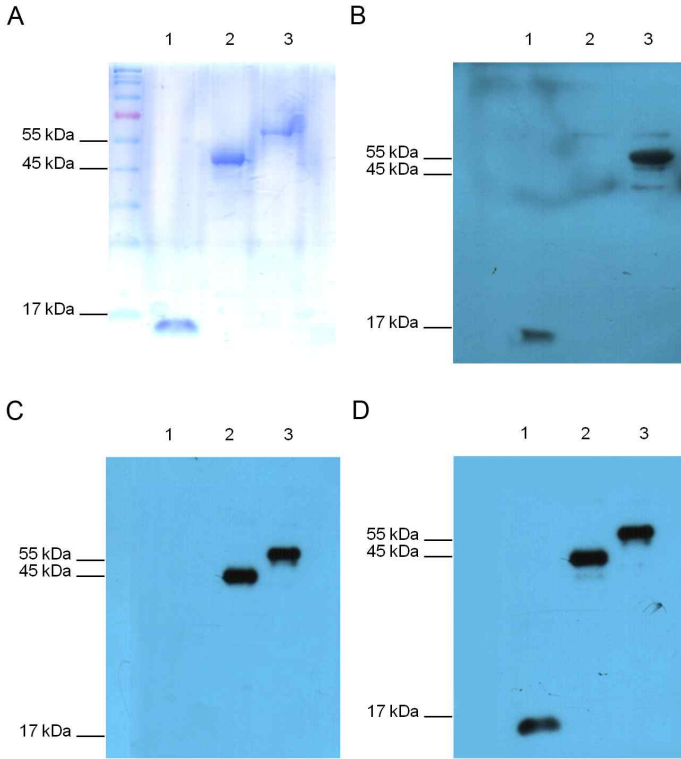
라. 재조합 단백질에 대한 western blot 분석

Ap_xN, P97C 그리고 Ap97을 각각 투여한 마우스의 혈청을 이용하여 각 재조합 단백질에 대한 western blot을 실시하였다. 그림 12에서 Ap_xN 단백질에 대한 혈청 (Anti-Ap_xN serum)

을 이용한 실험에서 ApxN과 Ap97 단백질이 detect되었다. 이 결과는 Ap97중의 ApxN epitope이 ApxN에 대하여 형성된 항체에 의하여 인지될 수 있음을 시사한다. 또, Anti-P97C serum 을 이용한 western blot에서 P97C 은 물론 Ap97이 발색되어 나타났는데, 이는 Ap97 중의 P97C epitope이 P97C에 대하여 형성된 항체에 의하여 인지될 수 있음을 시사한다. Ap97을 투여하여 얻은 항혈청을 이용한 분석에서도 세 개의 단백질이 모두 발색되었는데, 이 결과는 Ap97중의 ApxN 와 P97C epitopes이 ApxN과 P97C 각 단백질에 대한 항체를 형성할 수 있음을 시사한다. 그림 4에서 *E. coli*에서 발견되어 분리된 재조합 단백질 ApxN (A), P97C (B), Ap97 (C)의 전기영동 분석 (SDS-PAGE)에 나타난 단백질 분자량과 western blot 결과 나타난 밴드의 분자량은 일치하고 있다.

그림 12

ApxN, P97C 그리고 Ap97을 각각 투여한 마우스의 혈청을 이용하여 각 재조합 단백질에 대한 western blot을 실시하였다. (A)는 *E. coli*에서 발견되어 분리된 재조합 단백질 ApxN, P97C, Ap97의 전기영동 분석 (SDS-PAGE)결과를 시사함. (B) ApxN 단백질을 마우스에 투여 후 얻은 혈청 (Anti-ApxN serum)을 사용하여 ApxN, P97C, Ap97에 대한 western blot 분석 결과. (C) P97C 단백질을 마우스에 투여 후 얻은 혈청 (Anti-P97C serum)을 사용하여 ApxN, P97C, Ap97에 대한 western blot 분석 결과. (D) Ap97 단백질을 마우스에 투여 후 얻은 혈청 (Anti-Ap97 serum)을 사용하여 ApxN, P97C, Ap97에 대한 western blot 분석 결과.



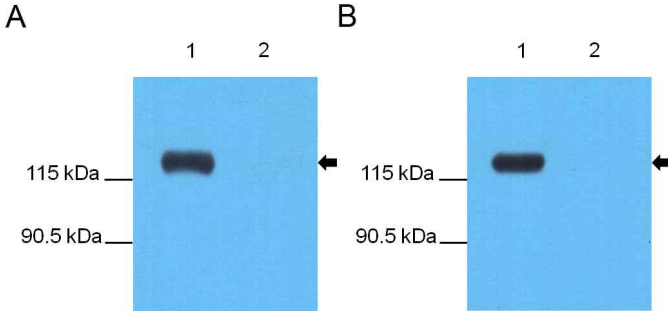
마. 흉막폐렴균 (*A. pleuropneumoniae*) 배양액 단백질에 대한 western blot 분석

ApxIII 독소는 흉막폐렴균 (*A. pleuropneumoniae*)에 의하여 세포 바깥으로 분비되어 폐지 체내에서 다양한 독성을 유발한다. Anti-ApxN serum을 이용하여 흉막폐렴균 배양액 단백질에 대한 western blot을 실시한 결과 세균을 배양하지 않은 배지와는 달리, ApxIII에 해당하는 분자량의 단백질 (120 kD)을 발색하였는데 (Frey et al. 1993), 이는 ApxN이 ApxIII 독소에 대한 항체를 형성할 수 있음을 시사한다 (그림 13A). Ap97에 대한 항혈청도 ApxIII 독소에 해당하는 단백질을 인지하고 있는데, 이는 Ap97내 P97C epitope에 의하여 방해 받지 않고 ApxIII에 대한 면역반응이 형성됨을 시사한다 (그림 13B).

그림 13

A. pleuropneumoniae serotype 2 세균 배양 후 얻은 배지에서 trichloroacetic acid를 사용하여 분리한 단백질에 대한 western blot 분석. ApxN과 Ap97 단백질에 의하여 *A. pleuropneumoniae* serotype 2 가 분비하는 ApxIII 독소 단백질 (GenBank: AAA21924.1)

에 대한 면역반응이 유발됨을 시사함. 각 western blot 분석에서 사용한 항혈청은 다음과 같음. (A) ApxN을 마우스에 투여 후 얻은 혈청 (Anti-ApxN serum). (B) Ap97을 마우스에 투여 후 얻은 혈청 (Anti-Ap97 serum). 각 패널의 1은 *A. pleuropneumoniae* serotype 2 세균 배양 후 얻은 배지에서 trichloroacetic acid를 사용하여 분리한 단백질, 2는 각각 *A. pleuropneumoniae*를 배양하지 않은 배지에 대한 분석 결과.



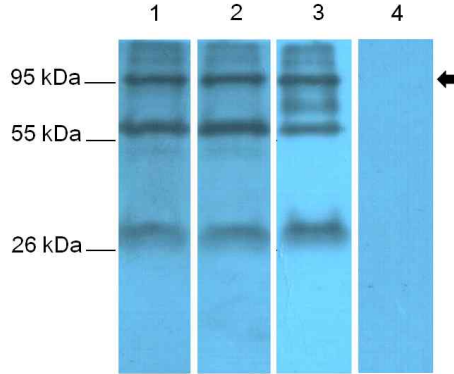
바. 마이코플라즈마 (*M. hyopneumoniae*)세포막 단백질에 대한 western blot 분석

Ap97과 P97C를 각각 투여하여 획득한 항혈청을 이용하여 마이코플라즈마 (*M. hyopneumoniae*)세포막에 대한 western blot을 실시하였다. 그 결과 97 kDa의 단백질 밴드를 모두 얻을 수 있었다. 또, 양성 대조군으로 돼지를 *M. hyopneumoniae*로 인공 감염하여 획득한 항혈청으로 western blot을 실시하여 p97 단백질에 해당하는 밴드를 확인할 수 있었다 (그림 14). 이는 Ap97 내의 P97C epitope이 마이코플라즈마 p97 단백질에 대한 항체 형성을 유발할 수 있음을 시사한다.

그림 14

M. hyopneumoniae J strain 세균 배양 후 osmotic shock와 sonication를 사용하여 추출한 membrane protein에 대한 western blot 분석. Ap97과 P97C 투여에 의하여 *M. hyopneumoniae*의 p97에 대한 면역 반응이 유발됨을 시사함 (화살표).

각 western blot 분석에서 사용한 항혈청은 다음과 같음. (A) Ap97 단백질을 마우스에 투여 후 얻은 혈청 (Anti-Ap97 serum). (B) P97C 단백질을 마우스에 투여 후 얻은 혈청 (Anti-P97C serum). (C) *M. hyopneumoniae* J strain을 인공적으로 감염하여 채취한 9 주령 돼지 혈청. (D) PBS를 마우스에 투여하여 얻은 혈청 (Anti-PBS serum).



4. 다중접 백신에 대한 백신시기 결정 및 개발된 균주의 돼지에서 면역원성(항원성)과 효능 검사

가. 돼지 면역 실험의 임상적 평가 및 병리학적 평가

돼지 면역 실험의 임상적인 평가는 공격접종 이후 14일째 되는 날 실시하였으며, 백신군과 대조군의 비교를 통해 임상적 증상을 평가하였다. 임상적 증상 평가는 기침, 콧물, 호흡장애 발생 유무와 운동성 정도를 중점적으로 평가하였다. 백신접종을 하지 않고 *A. pleuropneumoniae* serotype2 또는 야생형 *M. hyopneumoniae* 공격접종만 실시한 실험군 돼지들은 운동성이 현저히 감소되어 쇠약한 모습이 관찰되었으며 기침, 콧물, 호흡곤란 증세가 심각하게 나타났다. 또한 백신접종을 하지 않고 *A. pleuropneumoniae* serotype2 공격접종만 실시한 실험 군에서는 살이 찌지 않고 발육이 안 된 돼지 1마리가 관찰되었다. AP97 항원을 백신 접종하고 야생형 *M. hyopneumoniae*를 공격 접종한 실험군은 감염에 의해 나타나는 임상적 증상을 전혀 관찰 할 수 없었다. AP97 항원을 백신 접종하고 *A. pleuropneumoniae* serotype2를 공격 접종한 실험군은 돼지 1 마리가 기침과 콧물을 흘리는 감염 증상을 보였지만, 호흡곤란 및 운동성이 현저히 감소되는 모습은 관찰할 수 없었다 (표 2). 위의 임상적 평가 결과를 토대로 융합단백질 백신이 두 가지 감염에 대한 질병 방어에 효과적임을 시사한다.

표 2 돼지 면역 실험의 임상적 평가 및 병리학적 평가

a 측정된 실험 돼지의 최대 체온. -, $\leq 39.5^{\circ}\text{C}$; +, 40 to 42°C , ++, $\geq 42^{\circ}\text{C}$.

b 폐렴 증상이 나타난 정도 (0-100%).

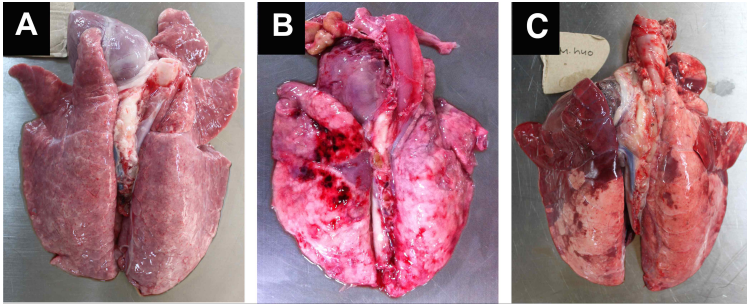
* $p < 0.01$ PBS백신 접종한 실험군과 비교

Immunogen ^{a)}	Challenge ^{b)}	No. of pigs with clinical signs / No. of pigs challenged ^{c)}					Lung lesion score ^{d)} (Mean ± SD) ^{e)}
		Body ^{f)} Temperature ^{g)}	Coughing ^{h)}	Dyspnea ⁱ⁾ (tachypnea) ^{j)}	Depression ^{k)}	Nasal discharge ^{l)}	
Ap97 ^{m)}	<i>A. pleuropneumoniae</i> ⁿ⁾	- ^{o)}	1/3 ^{p)}	0/3 ^{q)}	0/3 ^{r)}	0/3 ^{s)}	4.33 ± 2.08 ^{t)}
PBS ^{u)}		++ ^{v)}	3/3 ^{w)}	3/3 ^{x)}	3/3 ^{y)}	3/3 ^{z)}	67.83 ± 1.89 ^{aa)}
Ap97 ^{ab)}	<i>M. hyopneumoniae</i> ^{ac)}	- ^{ad)}	1/3 ^{ae)}	0/3 ^{af)}	0/3 ^{ag)}	0/3 ^{ah)}	8.67 ± 6.43 ^{ai)}
PBS ^{aj)}		+ ^{ak)}	2/3 ^{al)}	2/3 ^{am)}	2/3 ^{an)}	2/3 ^{ao)}	73.83 ± 9.28 ^{ap)}

백신접종을 하지 않고 *A. pleuropneumoniae* serotype2에 감염된 돼지의 부검 결과 폐가 흉강과 심장에 두꺼운 섬유성 막을 형성하여 유착되어 있었으며 폐 조직에서 출혈이 있었던 흔적이 관찰되는 폐렴 소견을 보이며 림프절이 비대한 모습이 관찰되었다. 백신접종을 하지 않고 *M. hyopneumoniae*에 감염된 돼지의 부검결과 폐가 비대해지며 폐 전엽부 말단이 허탈(collapse)로 인해 암적색으로 변화되어 정상 폐 부위와 경계가 명확하게 이루어져 있으며, 병변이 심한 폐의 경우 폐 전엽부 전체가 허탈로 인해 암적색으로 변화되었고 단단하게 경화된 폐렴 소견을 보였다. 반면, AP97 융합단백질 백신을 접종 후 *A. pleuropneumoniae* serotype 2를 공격접종을 실시한 돼지의 부검결과 정상적인 폐의 모습을 보였다. 그러나 AP97 융합단백질 백신을 접종 후 *M. hyopneumoniae*를 공격 접종을 실시한 돼지의 부검 결과 세 마리 중 한 마리의 돼지에서 폐의 전엽부 말단이 암적색으로 변한 전형적인 *M. hyopneumoniae*의 감염된 폐의 증상을 보였다(그림 15). 실험군에서 나타난 폐의 육안적 병변 유발 (macroscopic lung lesion) 유무는 halbur et al. 1995가 소개한 방법에 의해 scoring되었다. 이 방법은 폐의 각 엽에서 나타나는 폐렴 증상을 퍼센트율로 환산하여 점수를 주는 방식이다. scoring결과, 백신접종을 실시하지 않고 *A. pleuropneumoniae* serotype2를 공격 접종을 실시한 실험군 돼지에서는 67.83%의 폐렴증상을 보인 반면 Ap97 백신접종을 실시하고 *A. pleuropneumoniae* serotype 2를 공격 접종을 실시한 실험군 돼지에서는 4.33%의 폐렴증상을 보였다. 또 백신접종을 실시하지 않고 *M. hyopneumoniae* 공격 접종을 실시한 실험군에서는 78.83%의 폐렴 증상을 보인반면, Ap97 백신접종을 실시하고 *M. hyopneumoniae* 공격 접종을 실시한 실험군에서는 8.67%의 폐렴증상이 나타났다 (표 2).

그림 15

(A) Ap97 융합단백질 백신 접종한 실험군의 돼지의 폐 (B) 백신접종하지 않은 실험군 돼지에 *A. pleuropneumoniae* serotype2를 공격 접종을 실시한 후 돼지의 폐 (C) 백신접종하지 않은 실험군 돼지에 *M. hyopneumoniae*를 공격 접종을 실시한 후 돼지의 폐.



A. *pleuropneumoniae*는 전염성이 매우 높고 모든 연령대의 돼지에 흉막폐렴 (pleuropneumonia)을 발생시켜 위독한 경우 돌연사를 일으키는 원인체이다. 돼지의 A. *pleuropneumoniae*감염은 돼지 사육 시설 내 의무증상보균자 (carrier)에 의한 전염 이외에도 porcine enzootic pneumonia (PEP)질병을 유발하는 원인체인 *M. hyopneumoniae*에 의해 2차 감염에 대한 저항력이 낮아진 돼지에서 쉽게 발생하는 것으로 알려져 있다 (DeBey and Ross 1994; Dubreuil et al. 2000; Thacker et al. 1999). 따라서 *M. hyopneumoniae*의 감염을 방어하고 더 나아가 *M. hyopneumoniae*의 감염으로 인한 A. *pleuropneumoniae*의 2차 감염을 방어하기 위한 효과적인 백신 개발이 현재 양돈산업에서 해결되어야 할 중요한 문제로 거론되고 있다 (Kobisch et al. 1993; Gottschalk and Taylor. 2006). 세균백신 (Whole-cell bacterins)의 단점을 보완하기 위해 이전 연구들을 통해 A. *pleuropneumoniae*와 *M. hyopneumoniae*에 대한 백신개발 후보자 (candidate)로 이용될 수 있는 병원체의 특정 면역 지배적 항원들 (immunodominant antigens)이 밝혀졌고 이들 항원을 이용한 생백신 (live-attenuated vaccine)과 아단위 백신 (sub-unit vaccine)의 연구가 현재까지 진행되어 오고 있다. A. *pleuropneumoniae*의 면역 지배적 항원 중 하나인 APX 독소 (toxin)는 A. *pleuropneumoniae*의 주요 병독성인자 (virulence factor)이고 강한 면역원성 (immunogenic)을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Devenish et al. 1990; Frey and Nicolet 1991; Inzana et al. 2004). 또한 세포 내에서 Apx 독소에 대하여 생성된 중화항체 (neutralizing antibody)가 Apx 독소 (toxin)로 인해 호중구 (neutrophils)가 죽는 것을 방어하고 포식작용 역할을 하는 면역세포의 활성을 높인다는 것이 증명되었다. (Crujisen et al. 1992; Furesz et al. 1998; Jansen 1995). 따라서 현재 Apx 독소를 이용한 단백질 백신 (toxoid vaccine)들이 상용화되어 사용되고 있는데 예를 들어, PORCILIS APP (Intervet, the Netherlands)은 생균 백신 (Whole-cell bacterin)과의 A. *pleuropneumoniae* 방어 비교 연구를 통해 그 성능이 탁월함이 입증된 바가 있다 (Stran et al. 2003).

*M. hyopneumoniae*의 백신개발 후보자 (candidate)로 이용될 수 있는 면역 지배적 항원을 밝히는 이전 연구들을 통해 p97단백질이 돼지에서 아단위 백신 (subunit vaccine)으로 개발될 가능성이 있는 것으로 알려져 있다. (Fagan et al. 2001; Ogawa et al. 2009; Shimoji et al. 2003). P97 adhesion 단백질은 C-terminal 부위에 위치한 R1 region (R1 repeat region, AAKPV-E)과 R2 repeat region이 돼지의 섬모 상피조직에 유착하는데 중요한 역할을 하는

것이 알려졌다 (Hsu and Minion 1998; Jenkins et al. 2006; Minion et al. 2000). 현재 p97 단백질의 C-terminal을 발현하도록 변형된 *Erysipelothrix rhusiopathiae* 을 이용한 생백신이 현재 특허 출원 되어있고 (Ogawa et al. 2009; Shimoji et al. 2003; 일본특허 P2006-311824A), 또한 *M. hyopneumoniae*의 면역방어를 목적으로 사용될 수 있고 세포막에 존재하는 P97단백질을 포함한 다양한 크기의 면역 지배적 항원이 특허 출원 되어 있다 (Minion and Djordjevic. 2004; 미국특허 P2004-0091901A1). 돼지의 *M. hyopneumoniae*의 감염으로 인한 *A. pleuropneumoniae*의 2차 감염으로 발생하는 폐렴 (pneumonia)을 동시에 예방하기 위한 다양한 연구들이 현재까지 진행 되어 오고 있는데 최근 연구를 보면 *A. pleuropneumoniae*의 urease 구조 유전자 부위에 *M. hyopneumoniae*의 L-lactate dehydrogenase 유전자 (p36)를 삽입하여 약독화된 생백신 (live-attenuated vaccine)을 이용하여 두 병원체를 동시에 방어하고자 하는 시도를 하였고 어느 정도 효과를 입증하였다 (Zou et al. 2011). 그러나 두 병원체의 면역 지배적 항원을 동시에 이용하는 아단위백신(sub-unit vaccine)에 대한 연구가 현재까지 진행되지 않았다. 본 연구는 세균 백신 (whole cell bacterin)과 생백신 (live-attenuated vaccine)이 갖는 부작용 및 백신 개발 과정에서 발생하는 높은 경제적 비용을 극복하고자 *A. pleuropneumoniae*와 *M. hyopneumoniae*의 면역 지배적 항원을 이용한 아단위 백신 (sub-unit vaccine)를 진행하였다. 본 연구는 백신 개발에 있어 경제적인 *E. coli*를 이용한 이종 단백질 발현기술 (heterologous protein expression)을 이용하여 한국에서 상재하고 있는 *A. pleuropneumoniae* 2형의 주요 병독성 인자 (virulence factor)이고 면역원성 (immunogenic)이 높은 ApxIII 독소 (toxin)와 *M. hyopneumoniae*에서 돼지의 섬모상피조직에 유착하는데 중요한 역할을 하는 P97 adhesion 단백질에 대한 아단위백신 (sub-unit vaccine)을 개발하였다. 이종 단백질 발현 (heterologous protein expression)과정 중 codon usage bias를 최소화하기 위해 codon optimization을 실시하였다. 특히 *M. hyopneumoniae* 경우 유전자 염기서열 상의 TGA codon은 트립토판 (tryptophan)으로 translation이 되나 이 유전자 염기서열은 *E. coli* 내부에서 translation이 정지가 되는 codon (stop codon)으로 작용하므로 codon optimization은 필수적이었다.

A. pleuropneumoniae 2형의 ApxIII 독소 (toxin) 유전자 염기서열을 이용한 아단위 백신 (sub-unit vaccine)인 ApxN은 항원결정인자 (epitope)를 갖는 N-terminal 영역에 해당하는 315 bp 길이의 유전자 염기서열 부위 이용하여 개발되었고 단백질 크기는 15 kDa이다 (그림 6). P97 adhesion 단백질에 *M. hyopneumoniae*의 P97 adhesion 단백질에 유전자 염기서열을 이용한 아단위백신 (sub-unit vaccine)인 P97C는 돼지의 섬모 상피조직에 유착하는데 중요한 역할을 하는 R1 region (R1 repeat region, AAKPV-E)과 R2 repeat region이라는 항원결정인자(epitope)를 갖는 954 bp 길이의 C-terminal 영역을 이용하여 아단위 백신 (sub-unit vaccine)을 개발하였고 단백질 크기는 45 kDa 이다 (그림 6). 또한 두 병원체의 면역 지배적 항원 결정인자인자 (epitope) 동시에 갖는 아 단위백신 (sub-unit vaccine)인 60 kDa 크기의 AP97융합단백질 백신은 333 bp 길이의 ApxIII 독소 (toxin)의 N-terminal 영역과 954 bp 길이의 P97 adhesion 단백질에 C-terminal 영역을 glycine과 serine을 기본 구조로 한 연결 유전자 (linker)를 이용하여 연결하여 개발하였다 (그림 6). Glycine과 serine을 기본 구조로 한 연결 유전자 (linker)는 융합 단백질 상의 면역 지배적 항원 결정인자 (epitope) 간에 면역 간섭 현상을 최소화 한다고 알려져 있다 (그림 1)(Ebrahimi SM and Tebianian M, 2010; Trinh R et al. 2004).

본 연구에서 유전자 재조합 기술 및 이중 단백질 발현 기술을 통해 개발한 ApxN, P97C 단백질 그리고 Ap97 융합 단백질 백신은 다음과 같은 실험을 통해 *A. pleuropneumoniae*와 *M. hyopneumoniae*의 방어를 위한 백신 개발후보자로서의 면역원성 및 안정성을 검증하였다. 첫 번째로 마우스 면역 유발 실험을 통해 ApxN, P97C 단백질 그리고 Ap97 융합 단백질이 ApxIII 독소 (toxin)와 P97 adhesion단백질에 특이적인 면역반응이 유발 및 항체가 형성되는 지에 대한 여부를 검증하였고 두 번째로 돼지 면역 방어 실험을 통해 *A. pleuropneumoniae* 2형과 야생형 *M. hyopneumoniae*에 효과적인 방어 능력이 유도 되는지에 대한 검증을 하였다.

본 연구에서 실행한 Ap97 단백질을 접종한 마우스 혈청 내 면역 반응효과 실험을 통해 Ap97은 높은 수준의 ApxN과 P97C에 특이적인 IgG 형성을 보였고 각각의 epitope에 의해 면역 간섭이 발생하지 않고 유의적인 IgG 형성의 증가를 보였다. 또한 마우스 혈청내 IgG2a와 IgG1과 같은 동종형 면역글로불린 (immunoglobulin isotype)의 형성 수준과 IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 cytokine 분비 분석을 통해 AP97은 세포 매개성 면역 반응 (cell-mediated immune response)과 체액성 면역반응 (humoral immune response)를 동시에 유발한다는 결과를 얻을 수 있었다. 마우스 혈청내 IgG2a와 IgG1의 형성 수준비교 실험결과 ApxN에 대해서는 IgG2a이 IgG1비해 상대적으로 높은 형성 수준을 나타냈고 P97C에 대해서는 IgG2a와 IgG1이 균형있는 형성 수준을 나타냈다. 이는 AP97가 Th1-Th2 type 면역반응을 동시에 유발하여 세포 매개성 면역 반응 (cell-mediated immune response) 및 체액성 면역반응 (humoral immune response)가 현저하게 유발되었음을 시사한다 (그림 9, 그림 10, 그림 11). 본 연구에서 우리는 AP97 단백질의 항체 형성 유무를 평가하기 위해 western blot 실험을 실행한 결과 AP97단백질에 의해 마우스 혈청 내에서 형성된 항혈청 (anti-AP97 serum)은 ApxN과 P97C epitope 상호간의 면역 간섭 현상이 발생하지 않고 ApxN과 P97C 각 단백질에 대한 항체를 형성할 수 있음을 확인할 수 있었다 (그림 12). 또한 *A. pleuropneumoniae* 2형의 배양액에서 분리하여 확보한 ApxIII 독소 단백질에 대한 western blot결과 AP97에 대한 항혈청 (Anti-AP97 serum)은 ApxIII 단백질을 인지할 수 있었고 (그림 13), *M. hyopneumoniae*의 세포막에 대한 western blot결과 세포막에 존재하는 97kDa의 단백질인 P97 adhesion단백질을 인지 할 수 있었다 (그림 14). 이는 AP97 단백질이 *A. pleuropneumoniae* 2형의 ApxIII 독소 (toxin)와 *M. hyopneumoniae*의 P97 adhesion 단백질에 대한 면역반응을 유도할 수 있는 잠재적인 백신개발 후보자 (candidate)로서의 항원 (antigen)이 될 수 있다는 것을 제시한다.

본 연구는 마우스 실험을 통해 백신개발 후보자 (candidate)로서의 잠재력이 검증된 AP97 단백질 항원의 *A. pleuropneumoniae* 2형과 *M. hyopneumoniae*에 대한 방어 능력을 돼지 면역실험을 통해 평가 하였다. 그 결과 AP97 단백질 백신을 접종한 돼지는 *A. pleuropneumoniae* 2형과 야생형 *M. hyopneumoniae*에 대한 방어 능력에 있어 positive effect를 보였다. 다시 말해 AP97을 접종한 백신군 돼지는 미약하지만 기침, 콧물 등의 임상적 증상을 보였으나 백신 접종하지 않아 기침, 콧물, 심한 호흡 장애 그리고 운동성 저하를 보이는 대조군 돼지에 비해 상대적으로 아주 건강한 임상적 증상을 보였다(표 2). 돼지를 안락사하여 부검한 돼지의 폐의 병리학적 평가 결과 AP97을 접종한 백신군 돼지의 폐에서는 *A. pleuropneumoniae* 감염에 의해 발생하는 폐렴 소견이 전혀 발생하지 않았다. 이는 AP97 단백질이 완벽하게 *A. pleuropneumoniae* 2형을 방어할 수 있는 능력이 있음을 시사한다. 그러

나 AP97을 접종한 백신군의 1 마리 돼지에서 미약하지만 부분적으로 전엽부 말단이 암적색으로 변한 전형적인 *M. hyopneumoniae*의 감염된 폐의 증상을 보였다. 이는 AP97 단백질이 *M. hyopneumoniae*의 방어에 있어 어느 정도 positive effect를 보이고 있다는 것을 시사하며 돼지의 실험군 3 마리 중 1 마리 돼지에서 병변이 발생한 점과 부검 시기로 보았을 때 공격접종 후 3 주이기 때문에 감염 후 회복 중인 폐로 간주 할 수 있다(표2, 그림15).

본 연구를 통해 우리는 AP97 단백질이 *A. pleuropneumoniae* 2형의 ApxIII 독소 (toxin) 과 *M. hyopneumoniae*의 P97 adhesion 단백질에 특이적인 면역반응을 유발하는 AP97내의 항원결정인자 (epitope)가 상호간에 간섭 없이 효과적으로 면역반응을 유도한다는 사실을 마우스와 돼지 면역 실험을 통해 검증하였다. 돼지의 Th1/ Th2 면역 반응이 마우스의 면역 반응과의 유사성 유무는 잘 알려지지 않았지만 (Stevens et al. 1988), 본 연구의 실험 결과 AP97은 높은 수준의 세포 매개성 그리고 체액성 면역을 유도하므로 돼지의 호흡기의 섬모에 유착하여 병변을 유발하는 *A. pleuropneumoniae*와 *M. hyopneumoniae*의 방어를 위한 mucosal 백신으로서 효과가 어느 정도 입증되었다고 본다. 그러나 AP97을 보다 효과적인 아단위 백신 (sub-unit vaccine)으로서 사용하기 위해서는 *A. pleuropneumoniae* 2형에 국한되어 방어 능력을 검증하는 것이 아니라 ApxIII 독소를 분비하는 4형, 6형, 그리고 8형에 대해 교차 방어 능력이 있는지 유무를 평가해야 할 것이라 생각된다. 뿐만 아니라 다양한 *M. hyopneumoniae*의 균주(strain)에 대한 방어 능력 평가도 동반되어야 한다고 생각된다.

제 7 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 산업화 방향

1. 본 연구를 통하여 개발하는 백신의 산업화 방향은 이미 국내에서의 국내 제품과 국외 제품의 시장 현황을 파악하면 쉽게 알 수 있다. 본 연구의 산업화 방향은 ①농장에서 필요한 백신 생산, ②효과 극대화 된 백신 생산이라고 할 수 있다.
2. 연구과제 종료와 함께 소모성 질환을 예방하는 연쇄상구균 단일백신 산업화 할 예정이다. 본 제품의 특징은 크게 2가지로; ①소모성 질환 예방과 ②국내 발병 혈청형과 백신 항원 일치다. 제품의 효능 측면에서 보면, 현재 시판되고 있는 연쇄상 구균 예방백신의 경우 뇌막염에 의한 신경증상을 예방하는 백신인 반면, 본 연구를 통하여 개발하는 백신의 경우 심외막염, 흉막염, 복막염 등을 예방하여 소모성 질환을 방지하는 백신이다. 제품의 성분 측면에서 보면 국내에서 소모성 질환을 주로 유발하는 혈청형을 함유하고 있기 때문에 국내에서 야외 적용성이 매우 뛰어나다.
3. 소모성 질환을 예방하는 연쇄상 구균 백신의 경우 백신을 모든 과 이유자돈에게 접종하는 프로그램을 설정하여 판매 할 예정이다. 현재 국내 사육 모든 두수는 94만두 이며, 생산되는 자돈은 1,370만두(연간)이기 때문에 총 1464만두가 접종대상이 되기 때문에 산업적으로도 충분한 수요를 창출 할 수 있다.
4. 본 연구를 통하여 개발되는 흉막폐렴 백신의 특성은 크게 3가지로; ①항원의 면역원성을 극대화, ②국내실정에 적합한 혈청형 함유, ③부작용 최소화 백신이다. 첫째, 기술적면에서 다른 백신보다 면역원성이 뛰어난 흉막폐렴의 외막 단백질들을 많이 함유하고 다른 어떠한 백신보다 항체 형성에서 뛰어나다. 둘째, 국내에서 가장 흔하게 발병하는 혈청형인 2번 과 5번, 뿐만 아니라 최근에 문제가 되는 혈청형 6번을 첨가하여 본 연구를 통하여 백신을 개발 하였다. 다만 연구과정에서 이미 혈청형(2, 5, 6번)을 결정한 후 국내에서 혈청형 1번이 폭발적으로 발병하여 향후 흉막폐렴 백신을 산업화 하는 과정에서는 흉막폐렴균 혈청형 1번을 포함시켜 명실 공히 국내에서 발병하는 흉막폐렴 혈청형의 95%를 예방할 수 있는 백신을 개발할 예정이다. 셋째, 본 연구에서 개발한 흉막폐렴 백신의 경우 주로 박테린을 이용한 백신으로 흉막폐렴균의 독소는 매우 낮은 농도로 함유되어 있지만, 실험실 공격실험에서는 병리조직학적으로 폐장을 분석하면 독소이드 백신만큼 흉막폐렴균을 효과적으로 예방하는 것으로 확인되었다. 따라서 독소이드 백신의 가장 큰 단점인 백신 부작용 (경련, 침울, 사료섭취 거부) 을 최소화하여 농장에서 흉막폐렴 백신의 기피를 최소화 하였다.
5. 본 연구를 통하여 개발되는 흉막폐렴 백신은 이유자돈시기인 5주령과 8주령에 2회 백신을 접종할 예정이다 따라서 현재 국내에서 접종대상 동물 수는 연간 1,370만두 이기 때문에 충분한 시장 잠재성이 있다.
6. 본 연구를 통하여 개발되는 마이코플라즈마-흉막폐렴 예방 다중점 백신의 경우 기존의 백신과 완전히 차원이 다른 백신으로 크게 2가지의 특성이 있는데, ①백신 효과의 극대화와 ②사용의 편리성과 경제성이다. 현재 국외 백신 회사들은 마이코플라즈마 백신과 흉막폐렴

백신을 각각 판매하면서도 혼합 백신을 판매하지 않고 있는 것은 여러 문제점이 있기 때문에 혼합백신을 판매하지 않는 것 같다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 2가지 세균의 완전한 화학적 융합을 통하여 백신의 효과를 극대화 하였다. 현실적인 측면에서 개발될 백신은 2가지 백신을 동시에 접종 할 수 있기 때문에 사용의 편리함과 경제성이 그 특징이다. 특히 현실적으로 농장에서 노동력 제한 문제가 대두되는 실정에서 2가지 질병을 하나의 백신으로 예방이 가능하므로 편리성뿐만 아니라 경제성도 가지고 있다.

7. 마이코플라스마-홍막페렴 다중점 백신은 이유자돈 6주령에 1회 접종이 계획(향후 결정) 되어 있어 국내에서 사육되는 자돈이 1,370만두(연간)이기 때문에 효능, 편리성, 경제성을 모두 갖춘 백신으로 산업적으로도 충분한 수요를 창출 할 수 있다.
8. 연구과제를 통하여 세계적으로 유일한 홍막페렴과 마이코플라스마성 폐렴 예방 다중점 백신을 개발 및 상품화 하여 국내 시장 점유 및 해외 시장 진출 기회 획득, 백신 제조회사 매출 증대, 농가 경제적 부담을 경감시킬 수 있다.
9. 향후 연구과제를 통하여 개발할 홍막페렴과 마이코플라스마성 폐렴 예방 다중점 백신의 효능을 높이기 위하여 다양한 형태의 백신 부형제의 개발을 필요할 것으로 예상된다.

제 2 절 특허분석 측면

1. 연쇄상구균증 예방 백신의 기존 특허는 연쇄상 구균에서 가장 중요한 병원성 인자를 밝히는데 치중하고 있는데 현재까지 정확한 병원성 인자가 확인되고 있지 않은 실정이다. 또한 연쇄상구균증에서 주로 뇌염 또는 폐렴으로 인한 질병 예방에 치중하고 있지만, 본 연구과제에서는 연쇄상 구균에 의하여 유발되는 소모성 질환 (예를 들면, 장막염, 섬유소성 심외막염 등) 예방에 중점을 두어 소모성 질환을 예방 할 수 있는 백신 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획이다.
2. 홍막페렴균의 기존 특허분석은 홍막페렴이 분비하는 독소인 apx 유전자의 순수정제 및 유전자 조합에 대한 연구를 치중하고 있는데, 아직까지 실험실에서만 시도하고 있으며 상품화에는 어려움이 있다. 반면 본 연구에서는 일단 농장에서 문제되는 질병을 예방 할 수 있는 백신을 개발하고, 그 후에 생명공학 기법을 응용한 잡종 다중점 백신을 개발하고자 한다.
3. 마이코플라스마균의 경우 배양 조건이 너무 까다로워, 배양을 이용한 항원 생산에 많은 연구를 시도하고 있다. 또한 마이코플라스마 유전자에 대한 연구는 유착단백질을 제외하고는 거의 전무한 실정이다. 따라서 배양방법을 개선하는 방법보다는 획기적인 방법을 시도한다. 일단 2가지 질병을 함께 예방하기 위하여 홍막페렴균에 마이코플라스마균의 유착단백질 유전자를 투입하여 다중점 백신 균주를 생산하여 쉽게 배양하는 방법을 시도하고자 한다. 균주는 다른 어떠한 생명공학 방법보다 효과적으로 질병을 예방 할 수 있을 뿐만 아니라, 그

응용이 다양하여 다른 세균성 원인체 예방에도 응용 할 수 있다.

4. 마이코플라즈마 감염예방 관련 기존 특허는 사균 백신분야 개발에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 생균방향으로 연구를 추진하여 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획이다.
5. 마이코플라즈마/홍막폐렴 감염예방 백신 관련 기존 특허는 혼합 백신분야에 치중되어 있다. 단순히 여러 백신을 혼합하는 백신형태이기 때문에 백신으로서의 효율이 저하될 수 있음. 본 연구과제에서는 하나의 균주로서 백신을 개발하여 두 질병을 동시에 예방하는 방향으로 연구를 추진하여 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획이다.

제 3 절 논문분석 측면

1. 기존 논문은 대부분 연쇄상 구균의 부분 단백질을 이용한 생균 생독 백신 또는 subunit 백신에 관한 연구를 시행하고 있으며, 많은 논문은 실험동물을 이용한 수준에 연구 논문으로 농장에서 돼지를 이용한 실험에서의 사용이 제한된 연구 논문들이다. 이에 본 연구는 연쇄상구균증에 의한 소모성 질환에 초점을 두어 농장에서 직접 예방 할 수 있는 백신을 개발하여 “Efficacy of whole inactivated *Streptococcus suis* bacterin to prevent polyserositis in pig” 등의 논문을 Canadian Journal of Veterinary Research 등에 게재할 계획이다.
2. 기존 논문은 대부분 홍막폐렴에서 분비되는 외독소의 변이종을 이용한 생독 약독화 백신제작에 대한 연구가 집중되어 있다. 또한 대부분의 연구가 혈청형 1번에 집중되어 있어서 현실적으로 국내 현실에 적합하지 않다. 외독소를 이용한 생독 약독화 백신 연구 방향은 앞으로 연구해야 될 방향으로 보이지만, 현재 국내에서 다발하고 있는 홍막폐렴을 예방하기 위해서는 일단 국내 실정에 적합한 혈청형을 포함한 백신의 개발이 필요하다. 본 연구는 홍막폐렴의 혈청형 2형, 5형 및 기타 필요한 혈청형 6형을 포함시켜 농장에서 직접 예방 할 수 있는 백신을 개발하여 “Efficacy of whole inactivated *Actinobacillus pleuropneumoniae* bacterin to prevent pleuropneumonia in pig” 등의 논문을 Canadian Journal of Veterinary Research 등에 게재할 계획이다.
3. 본 연구과제에서는 마이코플라즈마균의 면역원성이 큰 단백질을 규명한 후 이를 바탕으로 새로운 개념의 백신을 개발 하는 새로운 시도를 하므로 해외 유수의 학술지에 출판될 것으로 판단된다.
4. 본 연구과제에서는 이중단백질 발현을 토대로 하나의 균주로서 백신을 개발하여 두 질병을

동시에 예방하는 방향으로 연구를 추진하여 “Mycoplasmal-Actinobacillus Multi-Point Vaccine” 등의 논문을 Vaccine, The Veterinary Journal, Infection & Immunity 등에 게재할 계획이다.

제 4 절 제품 및 시장분석 측면

1. 국내 및 국외시장 분석결과 연쇄상구균증 예방 단일백신 제품은 생산 및 판매가 없어서 본 연구에서 이 제품을 개발 및 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임. 현재 연쇄상구균에 의한 소모성 질환은 어린 포유자돈(일령상 21일령 이하) 과 이유자돈 말기에서 육성돈 초기(일령상 65일령에서 100일령)에서 발병하기 때문에 연쇄상구균 예방 단일 백신 제품은 모돈과 이유자돈시기에 백신을 접종하는 프로그램을 설정하여 산업화 할 예정이다.
2. 국내 시장에서 홍막페렴에 관하여 다른 병원균을 포함하여 2종 또는 3종 이상의 혼합백신이 제조되어 판매되고 있으나, 현재 쇠퇴기에 접어들었거나 그 효과가 미진하므로, 본 연구 과제에서는 국내 실정에 적합한 혈청형을 포함시키는 방향으로 연구를 추진하여 국내 제조의 홍막단일 백신제품 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.
3. 홍막페렴 단일 백신의 경우 2007년 국내 판매액이 약 28억 정도인데 전량 수입백신이 사용되고 있어서, 이 부분을 국내제조 백신으로 개발하여 판매 시 농가의 경제적 부담을 경감시키고, 국내 백신제조 회사의 매출은 증대시킴.
4. 국내 및 국외시장 분석결과 홍막페렴균에 마이코플라즈마균의 다중점백신은 생산 및 판매가 없어서 본 연구에서 이 제품을 개발 및 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획이다.
5. 국내에서 시판되는 상당수의 마이코플라즈마와 홍막페렴 감염예방 백신은 해외에서 수입한 것으로, 본 연구가 성공적으로 진행됨에 따라, 외화절약 효과를 거둘 수 있음.
6. 단회 투여로 두 가지 질병의 예방이 가능하므로 축산 산업에서 비용 절감의 효과가 있음.

제 8 장 참 고 문 헌

- Anderson CA, Potter A, Gerlach GF. 1991. Isolation and molecular characterization of spontaneously occurring cytolysin-negative mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7. *Infect Immun* 59:4110-4116.
- Bhatia B, Mittal KR, Frey J. 1991. Factors involved in the immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Vet Microbiol* 28:147-158.
- Bei WC, He QG, Yan L, Fang LR, Tan YD, Xiao SB, et al. 2005. Construction and characterization of a live, attenuated apxIICA inactivation mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lacking a drugresistance marker. *FEMS Microbiol Lett* 243: 21-27.
- Bei WC, He QG, Zhou R, Yan L, Huang HL, Chen HC. 2007. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of *Actinobacillus pleuropneumoniae* HB04C(-) mutant lacking a drug resistance marker in the pigs. *Vet Microbiol* 125: 120-127.
- Bertram TA. 1985. Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet Pathol* 22:598-609.
- Bertram TA. 1986. Intravascular macrophages in lungs of pigs infected with *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet Pathol* 23:681-691.
- Bertram TA. 1988. Pathology of acute pulmonary lesions in swine infected with *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. *Can J Vet Res* 29:574-577.
- Blanco, et al. 2008. Differences in susceptibility to *Haemophilus parasuis* infection in pigs. *Can J Vet Res* 72:228-235.
- Burgess-Brown NA, Sharma S, Sobott F, Loenarz C, Oppermann U, Gileadi O. 2008. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli* :A multi-gene study. *Protein Expres Purif* 59(1): 94-102.
- Byrd W, Hooke AM. 1997. Immunization with temperature-sensitive mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* induces protective hemolysin-neutralizing antibodies in mice. *Curr Microbiol* 34(3): 149-154.

- Chang YF, Young RY, Struck DK. 1989. Cloning and characterization of a hemolysin gene from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. DNA Cell Biol 8:635-647.
- Chang YF, Shi J, Ma DP, Shin SJ, Lein DH. 1993. Molecular analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxin-III gene cluster. DNA Cell Biol 12:351-362.
- Chen H, Liu J, He Q, Xiao S, Chen H. 2003. Cloning and expression of the apx III A gene of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Wei Sheng Wu Xue Bao 43:324-329.
- Chiang CH, Huang WF, Huang LP, Lin SF, Yang WJ. 2009. Immunogenicity and protective efficacy of ApxA and ApxIIA DNA vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* lethal challenge in murine model. Vaccine 27:4565-4570.
- Chiers K, van Overbeke I, De Laender P, Ducatelle R, Carel S, Haesebrouck F. 1998. Effects of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with inactivated vaccines containing the Apx toxins. Vet Q 20:65-69.
- Chiers K, van Overbeke I, De Laender P, Ducatelle R, Carel S, Oishi E, Kitajima T, Ohgitani T, Katayama S, Okabe T. 1995. Protective efficacy of cell-free-antigen of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. J Vet Med Sci. 57:727-731.
- Cho WS, Chae C. 2001. Genotypic prevalence of apxIV in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates. J Vet Diagn Invest 13:175-177.
- Choi C, Kwon D, Min K, Chae C. 1999. In-situ hybridization for the detection of inflammatory cytokines (IL-1, TNF-alpha and IL-6) in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J Comp Pathol 121:349-56.
- Choi C, Kwon D, Min K, Chae C. 2001. Detection and localization of ApxI, -II and -III genes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in natural porcine pleuropneumonia by in situ hybridization. Vet Pathol 38:390-395.
- Conceicao FR, Moreira AN, Dellagostin OA. 2006. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. Vaccine 24: 5734-5743.

- Crujisen T, Vanleengoed LAMG, Hamhoffies M, Verheijden JHM. 1995. Convalescent pigs are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against a heterologous-serotype strain. *Infect Immun* 63: 2341-2343.
- Crujisen TLM, Vanleengoed LAMG, Dekkernooren TCEM, Schoevers EJ, Verheijden JHM. 1992. Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. *Infect Immun* 60: 4867-4871.
- Debey MC, Ross RF. 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect Immun* 62: 5312-5318.
- Devenish J, Rosendal S, Bosse JT. 1990. Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-Kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* 58: 3829-3832.
- Dubreuil JD, Jacques M, Mittal KR, Gottschalk M. 2000. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Anim Health Res Rev* 1: 73-93.
- Dybvig K. 1990. Mycoplasmal genetics. *Annu Rev Microbiol* 44: 81-104.
- Dybvig K, Voelker LL. 1996. Molecular biology of mycoplasmas. *Annu Rev Microbiol* 50: 25-57.
- Ebrahimi SM, Tebianian 2010. Heterologous expression, purification and characterization of the influenza A virus M2e gene fused to Mycobacterium tuberculosis HSP70(359-610) in prokaryotic system as a fusion protein. 37: 2877-2883.
- Fagan PK, Walker MJ, Chin J, Eamens GJ, Djordjevic SP. 2001. Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. *Microb Pathog* 30: 101-110.
- Fedorka-Cray, P. J., M. J. Huether, D. L. Stine, and G. A. Anderson. 1990. Efficacy of

a cell extract from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 1 against disease in swine. *Infect Immun* 58:358-365.

Fernando GJP, Stewart TJ, Tindle RW, Frazer IH. 1998. Vaccine-induced Th1-type responses are dominant over Th2-type responses in the short term whereas pre-existing Th2 responses are dominant in the longer term. *Scand J Immunol* 47: 459-465.

Fittipaldi N, Harel J, D'Amours B, Lacouture S, Kobisch M, Gottschalk M. 2007. Potential use of an unencapsulated and aromatic amino acid-auxotrophic *Streptococcus suis* mutant as a live attenuated vaccine in swine. *Vaccine*. 25:3524-35.

Frey J. 1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol* 3:257-261.

Frey J, Bosse JT, Chang YF, Cullen JM, Fenwick B, Gerlach GF, et al. 1993. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxins: uniform designation of hemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *J Gen Microbiol* 139:1723-1728.

Frey J, Nicolet J. 1988. Regulation of hemolysin expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 by Ca²⁺. *Infect Immun* 56:2570-2575.

Frey J, Nicolet J. 1990. Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Clin Microbiol* 28:232-236.

Frey J, Nicolet J. 1991. Immunological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin I. *Vet Microbiol* 28: 61-73.

Frey J, van den Bosch H, Segers R, Nicolet J. 1992. Identification of a second hemolysin (HlyII) in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 and expression of the gene in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 60:1671-1676.

Frey J, Beck M, Stucki U, Nicolet J. 1993. Analysis of hemolysin operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene* 123:51-58.

Frey J, Beck M, Nicolet J. 1994. RTX-toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, p. 322-332. In J. Freer, R. Aitken, J. E. Alouf, G. Boulnois, P. Falmagne, F. Fehrenbach, C. Montecucco, Y. Piemont, R. Rappuoli, T. Wadstrom, and B. Witholt

- (ed.), Bacterial protein toxins. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Furesz SE, Mallard BA, Bosse' JT, Rosendal S, Wilkie BN, MacInnes JI. 1997. Antibody- and cell-mediated immune responses of *Actinobacillus pleuropneumoniae*-infected and bacterin-vaccinated pigs. *Infect Immun* 65:358-365.
- Furesz SE, Wilkie BN, Mallard BA, Rosendal S, MacInnes JI. 1998. Anti-haemolysin IgG1 to IgG2 ratios correlate with haemolysin neutralization titres and lung lesion scores in *Actinobacillus pleuropneumoniae* infected pigs. *Vaccine* 16: 1971-1975.
- Garside LH, Collins M, Langford PR, Rycroft AN. 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 carrying the defined aroA mutation is fully avirulent in the pig. *Res Vet Sci* 72: 163-167.
- Goethe R, Gonzales OF, Lindner T, Gerlach GF. 2000. A novel strategy for protective *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccines: detergent extraction of cultures induced by iron restriction. *Vaccine* 19):966-975.
- Goodwin RF, Pomeroy AP, Whittlestone P. 1967. Characterization of *Mycoplasma suis pneumoniae*: a mycoplasma causing enzootic pneumonia of pigs. *J Hyg (Lond)* 65:85-96.
- Gottschalk M, Taylor T. 2006. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: *Diseases of Swine*, Part 9th (StrawBE, ed). Blackwell Publishing Ltd: Oxford, 563-576.
- Haesebrouck F, Pasmans F, Chiers K, Maes D, Ducatelle R, Decostere A. 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect ? *Vet Microbiol* 100:255-268.
- Haesebrouck F, VandeKerkhof A, Dom P, Chiers K, Ducatelle R. 1996. Cross-protection between *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotypes-serotypes in pigs. *Vet Microbiol* 52:277-284.
- Haga Y, Ogino S, Ohashi S, Ajito T, Hashimoto K, Sawada T. 1997. Protective efficacy of an affinity-purified hemolysin vaccine against experimental swine pleuropneumonia. *J Vet Med Sci* 59:115-120.
- Halbur PG, et al., 1996. Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old

- cesarean-derived, colostrum-deprived pig model. J Vet Diagn Invest 8:11-20.
- Higgins R, Lariviere S, Mittal KR, Martinaue GP, Rousseau P, Cameron J. 1985. Evaluation of a killed vaccine against porcine pleuropneumonia due to *Haemophilus pleuropneumoniae*. Can Vet J 26:86-89.
- Hsu T, Minion FC. 1998. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. Infect Immun 66: 4762-4766.
- Huang HL, Zhou R, Chen ML, Liu JJ, Xu XJ, Chen HC. 2005. Cloning and expression of the Apx IVA gene of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and development of an indirect ApxIVA-eLISA. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 21:294-299.
- Huter V, Hensel A, Brand E, Lubitz W. 2000. Improved protection against lung colonization by *Actinobacillus pleuropneumoniae* ghosts: characterization of a genetically inactivated vaccine. J Biotechnol 83:161-172.
- Idris, UEA, Harmon BG., Udeze FA, Kadis S. 1993. Pulmonary lesions in mice inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin and lipopolysaccharide. Vet Pathol 30:234-241.
- Ingham A, Zhang YM, Prideaux C. 2002. Attenuation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by inactivation of aroQ. Vet Microbiol 84:263-273.
- Inzana TJ, Glindemann G, Fenwick B, Longstreth J, Ward D. 2004. Risk assessment of transmission of capsule-deficient, recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vet Microbiol 104:63-71.
- Ip M, Fung KS, Chi F, Cheuk ES, Chau SS, Wong BW, Lui S, Hui M, Lai RW, Chan PK. 2007. *Streptococcus suis* in Hong Kong. Diagn Microbiol Infect Dis. 57:15-20.
- Jacobs et al., 1996. Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. Vet Rec 139:225-228.
- Jansen R, Briaire J, van Geel AB, Kamp EM, Gielkens AL, Smits MA. 1994. Genetic map of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin (Apx) operons: characterization of the ApxIII operons. Infect Immun 62:4411-4418.
- Jenkins C, Wilton JL, Minion FC, Falconer L, Walker MJ, Djordjevic SP. 2006. Two

- domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin bind heparin. Infect Immun 74: 481-487.
- Jolie RAV, Mulks MH, Thacker BJ. 1994. Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Vet Microbiol 38: 329-349.
- Jolie RAV, Mulks MH, Thacker BJ. 1995. Cross-protection experiments in pigs vaccinated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* subtypes 1a and 1b. Vet Microbiol 45:383-391.
- Kataoka Y, Sugimoto C, Nakazawa M, Morozumi T, Kashiwazaki M. 1993. The epidemiological studies of *Streptococcus suis* infections in Japan from 1987 to 1991. J Vet Med Sci 55:623-626.
- Kamp EM, Popma JK, Anakotta J, Smits MA. 1991. Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. Infect Immun 59:3079-3085.
- Kamp EM, Vermeulen TM, Smits MA, Haagsma J. 1994. Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. Infect Immun 62:4063-4065.
- Kim MF, Heidari MB, Stull SJ, McIntosh MA, Wise KS. 1990. Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment. Infect Immun 58(8): 2637-2643.
- Min K, Chae C. 1999. Serotype and apx genotype profiles of *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates in Korea. Vet Rec 145:251-254.
- Kim B, Min K, Choi C, Cho WS, Cheon DS, Kwon D, Kim J, Chae C. 2001. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Korea using new standardized procedures. J Vet Med Sci 63:341-342.
- Kobisch M, Labbe A, Morvan P, et al. 1993. Pathologie pulmonaire du porc: un mode'le experimental associant *Mycoplasma hyopneumoniae* et *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Recherche Porcine 25: 339-344.
- Komal JPS, Mittal KR. 1990. Grouping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of

serotypes 1-12 on the basis of their virulence in mice. *Vet Microbiol* 25:229-240.

- Krakowka S, Ellis J, McNeilly F, Waldner C, Rings DM, Allan G. 2007. *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins and porcine circovirus type 2 (PCV2) infection: induction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the gnotobiotic swine model of PCV2-associated disease. *Can Vet J* 8:716-724.
- Lee KY, Kim DH, Kang TJ, Kim J, Chung GH, Yoo HS, Arntzen CJ, Yang MS, Jang YS. 2006. Induction of protective immune responses against the challenge of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by the oral administration of transgenic tobacco plant expressing ApxIIA toxin from the bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* 48:381-389.
- Li Y, Gottschalk M, Esgleas M, Lacouture S, Dubreuil JD, Willson P, Harel J. 2007. Immunization with recombinant Sao protein confers protection against *Streptococcus suis* infection. *Clin Vaccine Immunol* 14:937-943.
- Lin LW, Bei WC, Sha YG, Liu JL, Liu WH, Tu SX, et al. 2007. Construction and immunogenicity of a delta apxIC/ delta apxIIC double mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar1. *FEMS Microbiol Lett* 274: 55-62.
- MacDonald J, Rycroft AN. 1992. Molecular cloning and expression of ptxA, the gene encoding the 120-kilodalton cytotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *Infect Immun* 60:2726-2732.
- Maes D, Segales J, Meyns T, Sibila M, Pieters M, Haesebrouck F. 2008. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol* 26: 297-309.
- Mare CJ, Switzer WP. 1965. New Species: *Mycoplasma hyopneumoniae*; acausative agent of virus pig pneumonia. *Vet Med Small Anim Clin* 60: 841-846.
- Meens J, Selke M, Gerlach GF. 2006. Identification and immunological characterization of conserved *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoproteins Mhp378 and Mhp651. *Vet Microbiol* 116: 85-95.
- Mikael LG, Pawelek PD, Labrie J, Sirois M, Coulton JW, Jacques M. 2002. Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake (fhu) operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiol-Sgm* 148:2869-2882.

- Min K, Chae C. 1998. Detection and distribution of DNA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the lungs of naturally infected pigs by in-situ hybridization. J Comp Pathol 119:169-175.
- Minion FC, Adams C, Hsu T. 2000. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. Infect Immun 68:3056-3060.
- Nicolet J. 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Diseases of swine, Part 7th(LemanAD,ed). Ames, Iowa:Iowa State University Press, 401-408.
- Nielsen R. 1984. *Hemophilus pleuropneumoniae* serotypes-cross protection experiments. Nord Vet Med 36: 221-234.
- Nielson R. 1988. Seroepidemiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Can J Vet Res 29:580-582.
- Niven DF, Levesque M. 1988. V-factor-dependent growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype2 (Bertschinger2008/76). Int J Syst Bacteriol 38: 319-320.
- Ogawa Y, Oishi E, Muneta Y, Sano A, Hikono H, Shibahara T, et al. 2009. Oral vaccination against mycoplasmal pneumonia of swine using a live *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strain as a vector. Vaccine 27:4543-4550.
- Okamba FR, Moreau E, Cheikh Saad Bouh K, Gagnon CA, Massie B, Arella M. 2007. Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal portion of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. Clin Vaccine Immunol 14:767-774.
- Park C, Ha Y, Kim S, Chae C, Ryu DY. 2009. Construction and characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 mutant lacking the Apx toxin secretion protein genes apxIIIB and apxIIID. J Vet Med Sci 71:1317-1323.
- Perry MB, Altman E, Brisson JR, Beynon LM, Richards JC. 1990. Structural Characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains. Serodiag Immun Inf D 4: 299-308.
- Prideaux CT, Lenghaus C, Krywult J, Hodgson ALM. 1999. Vaccination and protection

- of pigs against pleuropneumonia with a vaccine strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* produced by site-specific mutagenesis of the ApxII operon. *Infect Immun* 67: 1962-1966.
- Prideaux CT, Pierce L, Krywult J, Hodgson AL. 1998. Protection of mice against challenge with homologous and heterologous serovars of *Actinobacillus pleuropneumoniae* after live vaccination. *Curr Microbiol* 37:324-332.
- Rayamajhi N, Shin SJ, Kang SG, Lee DY, Ahn JM, Yoo HS. 2005. Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *J Vet Diagn Invest* 17:359-362.
- Reams RY, Glickman LT, Harrington DD, Thacker HL, Bowersock TL. 1994. *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. *J Vet Diagn Invest* 6:326-334.
- Renbaum P, Abrahamove D, Fainsod A, Wilson GG, Rottem S, Razin A. 1990. Cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for the CpG DNA methylase from Spiroplasma strain MQ1(MSssl). *Nucleic Acids Res* 18: 1145-1152.
- Rogers RJ, Eaves LE, Blackall PJ, Truman KF. 1990. The comparative pathogenicity of four serovars of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Aust Vet J* 67: 9-12.
- Ross RF. 1999. Mycoplasmal diseases. In: Diseases of swine, Part 8th (Straw BE, ed). Ames, Iowa: Iowa State University Press, 495-510.
- Rossi-Campos A. et al., 1992. Immunization of pigs against *Actinobacillus pleuropneumoniae* with two recombinant protein preparations. *Vaccine* 10:512-518.
- Sahdev S, Khattar SK, Saini KS. 2008. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem* 307: 249-264.
- Satran P, Nedbalcova K, Kucerova Z. 2003. Comparison of protection efficacy of toxoid and whole-cell vaccines against porcine pleuropneumonia caused by

- endotracheal infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Acta Vet Brno 72: 213-219.
- Schaller A, Djordjevic SP, Eamens GJ, Forbes WA, Kuhn R, Kuhnert P, et al. 2001. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene apxIVA. Vet Microbiol 79:47-62.
- Schaller A, Kuhn R, Kuhnert P, Nicolet J, Anderson TJ, MacInnes JI, et al. 1999. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microbiol-Sgm 145:2105-2116.
- Seah JN, Frey J, Kwang J. 2002. The N-terminal domain of RTX toxin ApxI of *Actinobacillus pleuropneumoniae* elicits protective immunity in mice. Infect Immun 70):6464-6467.
- Seah JN, Kwang J. 2004. Localization of linear cytotoxic and pro-apoptotic epitopes in RTX toxin ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vaccine 22: 1494-1497.
- Shimoji Y, Oishi E, Muneta Y, Nosaka H, Mori Y. 2003. Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. Vaccine 21(5-6): 532-537.
- Silva LM, Baums CG, Rehm T, Wisselink HJ, Goethe R, Valentin-Weigand P, 2006. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. Vet Microbiol 115:117-127.
- Smiley BK, Minion FC. 1993. Enhanced readthrough of opal (UGA) stop codons and production of *Mycoplasma pneumoniae* P1 epitopes in *Escherichia coli*. Gene 134: 33-40.
- Sorensen HP, Mortensen KK. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. J Biotechnol 115: 113-128.
- Taylor DJ. 1999. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Diseases of swine, Part 8th ed. (StrawBE,ed). Oxford:Blackwell Science, 343-354.
- Thacker EL, Halbur PG, Ross RF, Thanawongnuwech R, Thacker BJ. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. J Clin Microbiol 37: 620-627.

- Trinh R, Gurbaxani B, Morrison SL, Seyfzadeh M. 2004. Optimization of codon pair use within the (GGGGS)₃ linker sequence results in enhanced protein expression. *J Biol Chem* 279: 717-722.
- Tumamao JQ, Bowles RE, Van den Bosch H, Klaasen HBLM, Fenwick BW, Storie GJ, et al. 2004. Comparison of the efficacy of a subunit and a live streptomycin-dependent porcine pleuropneumonia vaccine. *Aust Vet J* 82: 370-374.
- Tumamao JQ, Bowles RE, van den Bosch H, Klassen HBLM, Fenwick BW, Blackall PJ. 2003. An evaluation of the role of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 1 and 15 in the protection provided by sub-unit and live streptomycin-dependent pleuropneumonia vaccines. *Austr Vet J* 82:773-780.
- Wei Z, Li R, Zhang A, He H, Hua Y, Xia J, Cai X, Chen H, Jin M. 2009. Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. *Vet Microbiol* 137:196-201.
- Willson PJ, Rossicampos A, Potter AA. 1995. Tissue reaction and immunity in swine immunized with *Actinobacillus pleuroy pneumoniae* vaccines. *Can J Vet Res* 59: 299-305.
- Wilton JL, Scarman AL, Walker MJ, Djordjevic SP. 1998. Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiol-UK* 144:1931-1943.
- Wisselink HJ, Reek FH, Vecht U, Stockhofe-Zurwieden N, Smits MA, Smith HE. 1999. Detection of virulent strains of *Streptococcus suis* type 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* type 1 in tonsillar specimens of pigs by PCR. *Vet Microbiol* 67:143-57.
- Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Hilgers LA, Smith HE. 2002. Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol* 84:155-168.
- Xu FZ, Chen XL, Shi AH, Yang B, Wang JL, Li YQ, et al. 2006. Characterization and immunogenicity of an apxIA mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* 118: 230-239.

Zou HY, Liu XJ, Ma FY, Chen P, Zhou R, He QG. 2011. Attenuated *Actinobacillus pleuropneumoniae* as a bacterial vector for expression of *Mycoplasma hyopneumoniae* P36 gene. J Gene Med 13:221-229.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

