

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001871-01

한국형 사슴결핵 예방백신 개발 및 유효성 평가
(Development and Evaluation of Vaccine
against Deer Tuberculosis in Korea)

최종보고서

2017. 11. 5.

주관연구기관 / 연세대학교 원주산학협력단
협동연구기관 / 충북축산위생연구소 중부지소

농림축산식품부

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “한국형 사슴결핵 예방백신 개발 및 유효성 평가”(개발기간 : 2014. 7.29 ~ 2017. 7.28)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 8. 30.

주관연구기관명 : 연세대학교 원주산학협력단 (인)

협동연구기관명 : 충북축산위생연구소 중부지소 (인)

주관연구책임자 : 전 보 영

협동연구책임자 : 강 신 석

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	314025-3	해당단계 연구기간	2014.07.29. - 2017.07.28	단계구분	3차년도/ 3년
연구사업명	단위사업	식품기술개발사업			
	사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	한국형 사슴결핵 예방백신 개발 및 유효성 평가			
연구책임자	전보영	해당단계 참여 연구원 수	총: 22 명 내부: 8 명 외부: 14 명	해당단계 연구개발비	정부: 300,000천원 민간: 천원 계: 300,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 27 명 내부: 8 명 외부: 19 명	총연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 천원 계: 900,000천원
연구기관명 및 소속부서명	연세대학교 원주산학협력단			참여기업명	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수 108	

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<p><연구개발목표></p> <p>국내에 유행하는 사슴결핵에 효과적인 한국형 예방백신을 개발하고, 사슴결핵 백신을 평가할 수 있는 미생물학적, 병리조직학적 및 면역학적 지표를 이용하여 백신의 효능을 평가한다. 또한 예방백신 접종동물과 결핵감염동물을 감별할 수 있는 감별진단법을 개발하고, 그 유용성을 평가한다.</p> <p><주요 연구내용></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 예방백신 개발 및 후보선정 ○ 예방백신 예방효과 평가 ○ 예방백신 효능 평가지표 발굴 ○ 감별진단 마커 발굴 및 감별진단법 개발 ○ 개발백신 고도화 및 현장 실증 평가 ○ 사슴결핵백신 제조법 및 품질 기준의 표준화 ○ 감별진단법 현장평가 ○ 현장적용을 위한 예방접종 프로그램 개발 ○ 개발백신의 산업화 및 현장 보급 ○ 백신 사용 및 감별진단 매뉴얼 제시 ○ 개발기술의 현장 보급 및 확산을 위한 관련 정책안 제시 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내유행 한국형 사슴결핵균의 특성분석 ○ 국내 사슴결핵균 분자유전학적 특성분석을 통한 방어항원발굴 및 개발 ○ 사슴결핵 방어항원을 발현하는 재조합 BCG 백신 및 약독화백신 개발 ○ 예방백신 접종군과 감염군에 대한 감별진단법 개발 ○ 사슴결핵 감염동물확립 ○ 결핵감염동물모델을 이용한 사슴결핵백신후보 평가 ○ 국내 사슴 유래 결핵균주에서 병원성인자 (RD1)을 제거한 백신균주 개발 ○ 결핵백신균주의 생산을 위한 조건확립 ○ 결핵감염된 사슴의 PBMC를 이용한 IFN-gamma mRNA 검출조건확립 ○ DIVA를 위한 결핵항원 (ESAT6, CFP10, CFP) 선정 ○ BCG백신의 피하 및 근육내 접종 후 사슴결핵균에 대한 예방효과 평가 ○ BCG백신 및 결핵균 감염 사슴의 투베르쿨린 검사의 효용성 평가 ○ RD1 유전자 제거 사슴결핵균 안전성 평가 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 사슴 유래 결핵균주에서 병원성인자 (RD1)을 제거한 백신균주 개발 ○ 결핵백신균주의 생산을 위한 조건확립 ○ 결핵감염된 사슴의 PBMC를 이용한 IFN-gamma mRNA 검출조건확립 ○ DIVA를 위한 결핵항원 (ESAT6, CFP10, CFP) 선정 ○ BCG백신의 피하 및 근육내 접종 후 사슴결핵균에 대한 예방효과 평가 ○ BCG백신 및 결핵균 감염 사슴의 투베르쿨린 검사의 효용성 평가 ○ RD1 유전자 제거 사슴결핵균 안전성 평가 ○ 사슴결핵의 효과적인 퇴치로 사슴농장의 생산성 향상에 기여 ○ 사슴결핵예방백신과 감별진단법의 지식재산권 ○ 향후 사슴이외 국내 젖소 및 한육우의 결핵퇴치를 위한 결핵예방백신 활용 					
중심어 (5개 이내)	사슴	결핵병	예방백신	감별진단	현장보급	

5. 영문 요약문

<SUMMARY>

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<p><Purpose of research project> The purpose of this research project is to development vaccine against deer tuberculosis, and evaluate the protective efficacy of the vaccine candidates using microbiological, histopathological and immunological markers. The additional purpose is development of differential diagnosis between vaccinated and infected animals and evaluation their usefulness.</p> <p><The content of research project></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Development of vaccine candidates ○ Evaluation of protective efficacy of vaccine candidates ○ Discovery of protective markers on the vaccine candidates ○ Discovery of differential diagnostic markers ○ Development of differential diagnostic assay ○ Optimization of deer tuberculosis vaccine and application ○ Standardization of production of TB vaccine ○ Application of differential diagnostic method ○ Development of vaccine program for field application ○ Production of TB vaccine and supply ○ Manual for vaccine and differential diagnosis ○ Suggestion of policy of developed vaccine for application into field 				
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Characterization of M. bovis field isolates form deer in Korea ○ Discovery of protective mycobacterial antigens using molecular epidemiology ○ Development of recombinant BCG vaccine and attenuated TB vaccine ○ Development of differential diagnosis between vaccinated and infected deer ○ Establishment of tuberculosis deer challenge model ○ Evaluation of TB vaccine candidates using Deer TB model ○ Development of RD1-deleted M. bovis using M. bovis field isolate ○ Establishment of condition for production of deer TB vaccine ○ Establishment of IFN-gamma mRNA from PBMC of infected deer ○ Selection of mycobacterial antigens (ESAT-6, CFP10, CFP) for DIVA ○ Evaluation of protective efficacy of BCG vaccine through injection route ○ Evaluation of tuberculin skin test for BCG vaccinated and infected deer ○ Safety testing of RD1-deleted M. bovis vaccine 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of RD1-deleted vaccine strain for deer tuberculosis ○ Optimized condition for production attenuated vaccine candidates ○ Detection of tuberculosis-infected deer using IFN-gamma mRNA ○ Differential diagnosis using mycobacterial antigens, ESAT6, CFP10, CFP ○ Protective BCG vaccine agains deer tuberculosis ○ Tuberculin skin test for differential diagnosis between BCG vaccinated and TB-infected deer ○ Safety of RD1 deleted M. bovis vaccine candidate ○ Contribution of productivity of deer farm through protection of deer using vaccine ○ Intellectual property right for TB vaccine and diagnosis of deer ○ Application of vaccine candidates for dairy and beef cattle 				
Keywords	Deer	Tuberculosis	Vaccine	Differential diagnosis	Field application

6. 영문목차

Chapter 1. Overview of the project	6
Chapter 2. The status of domestic and foreign technical development	24
Chapter 3. Contents of research and result	34
Chapter 4. Purpose attainment and contribution of the project	102
Chapter 5. Achievement of the study and application plan of the results	
Chapter 6. Collected Foreign scientific technological information ---	106
Chapter 7. The safety grade of results of the research	105
Chapter 8. Research facility and equipment registered in National Science and Technology Information System	105
Chapter 9. The performed list for safety in the research	106
Chapter 10. The representative results of the research	106
Chapter 11. Miscellany	107
Chapter 12. References	108

7. 본문목차

< 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의개요	6
제 1 절 연구개발 목적	6
제 2 절 연구개발의 필요성	6
제 3 절 연구개발의 범위	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황	24
제 1 절 사슴결핵 진단 및 감별법 개발 현황	24
제 2 절 사슴결핵 예방백신 개발 현황	26
제 3 장 연구수행 내용 및 결과	34
제 1 절 국내 사슴 유래 우형결핵균의 유전자형 분석과 대표균주 선정	34
제 2 절 국내 유행 한국형 사슴결핵균의 세포내감염·반응의 특성분석	35
제 3 절 국내 유행 사슴결핵균 분리주의 분자유전학적 특성분석을 통한 면역원성 항원 개발	38
제 4 절 백신항원로서의 RpfE 항원의 면역학적 특성 분석	42
제 5 절 발굴된 항원의 <i>in vivo</i> immunization을 통한 항우결핵 백신 후보물질로서의 pre-exposure 백신 모델	49
제 6 절 엘크와 꽃사슴에 대한 감염 및 백신접종에 의한 혈청면역 반응 분석	50
제 7 절 엘크와 꽃사슴에 대한 감염 및 백신접종에 의한 세포면역.....	61
제 8 절 엘크와 꽃사슴에 대한 감염 및 백신접종에 의한 투베르쿨린 검사법.....	73
제 9 절 결핵균 병원성 인자 RD1의 제거를 통한 사슴결핵백신 개발..	80
제 10 절 감염된 및 백신면역 접종 후 감염 사슴의 병리조직 변화....	98
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	102
제 5 장 연구결과의 활용계획 등	104
제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	105
제 7 장 연구개발성과의 보안등급	105
제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	105
제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	106
제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적	106
제 11 장 기타사항	107
제 12 장 참고문헌	108

<별첨> 자체평가의견서

제 1 장 연구개발과제의 개요

코드번호

D-03

제 1절 연구개발 목적

- 국내에서 사슴에서 문제가 되고 있는 결핵병을 예방하기 위하여 국내에서 유행하는 결핵균에 효과적인 한국형 예방백신을 개발하고, 예방백신의 유용성을 미생물학적, 병리조직학적, 면역학적 방어지표를 이용하여 평가함.
- 예방백신 접종 개체와 결핵감염 개체를 감별할 수 있는 마커를 발굴하고 감별진단법을 개발·평가하여 사슴의 결핵병에 대한 예방접종 프로그램을 개발하여 현장적용을 할 수 있도록 관련 정책안을 제시함.

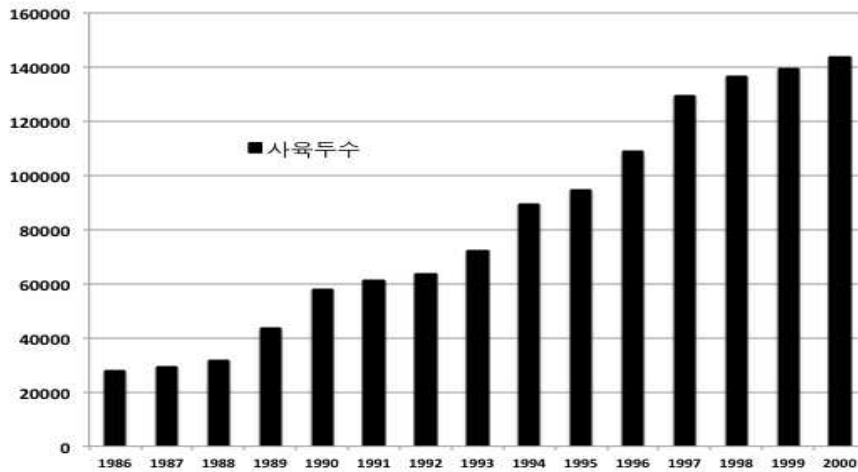
제 2 절 연구개발의 필요성

■ 국내 사슴 현황 및 사슴결핵 발생

1) 국내 사슴 현황

- (1) 한국을 비롯한 동남아시아 국가에서는 주로 녹용을 약제로 이용하기 위하여 사슴을 사육하며, 녹용 채취시 녹혈도 채취하여 강장제로 이용하기도 하지만, 서독을 비롯한 유럽국가에서는 사슴고기를 주로 먹기 위하여 사육함. 따라서 유럽 여러 나라와 뉴질랜드 등지에서는 사슴고기를 생산할 목적으로 사슴을 중·대형 사슴인 레드디어와 엘크 등을 사육하고 있고, 뉴질랜드는 많은 양의 사슴고기를 외국에 수출하고 있음.
- (2) 우리나라의 사슴사육현황을 보면, 1956년경부터 일본, 대만 등으로부터 꽃사슴이 수입되면서 양록의 기반이 잡히기 시작하였고, 1974년경부터는 뉴질랜드에서 레드디어, 북미에서 엘크가 수입되어 사육 증식되어 왔으며, 1992년 사슴 수입개방된 후 14천여두가 수입되었고, 1997년 IMF이후부터 사슴수입은 중단된 상태임.
- (3) 국내에서 사육되는 사슴의 종류는 녹용 생산량이 많은 엘크를 최근에는 주로 사육하며, 꽃사슴 사육농가의 수가 상당히 감소되었음.
- (4) 국내 양록산업 현황을 살펴보면, 사슴 사육두수가 2002년에 168,000두, 2011년에 51,000두이며, 사슴 사육 농가수는 2002년 12,000호, 2011년 4,000호이었음.
- (5) 지역별로는 전국 각지에 고루 분포되어 있으나, 경기지역이 33,049두를 사육하고 있어 전체 사육두수의 22%를 차지하고 있으며, 사육 농가수는 충남이 2,313호로 가장 많고 다음이 경기도, 충북 순임.
- (6) 사육규모별로는 10두 이하가 7,591호에서 33,980두를 사육하고 있어 전체 사육농가수의 63%를 차지하고, 전체 사육두수의 22%를 차지함. 10-49두까지가 4,097호에서 79,606두를 사용하여 전체 농가수의 34%를 차지하나, 사육두수로는 53%를 차지하며, 50두 이상의 농가는 449호로 전체의 0.4%로 전체 사육두수의 25%를 차지함. 50두 미

만의 사육농가수가 전체농가수의 97%를 차지하고 있어 국내 사슴사육현황은 매우 영세한 상황임.



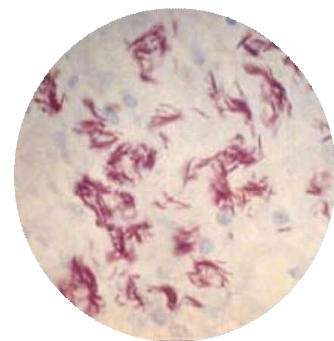
[그림 1] 연도별 사슴사육 두수 (한국양육협회자료)

(7) 사육 형태는 국내에서는 한우와 비슷하게 축사에서 조사료 및 배합사료를 이용하여 주로 사육하고 있으며, 경우에 따라 산의 나무를 제거한 후 경사지에 사슴을 사육하는 경우도 있으며 목초지에 자연방목하여 사육하는 경우는 거의 없음.

2) 사슴 결핵

(1) 원인체

- *Mycobacterium tuberculosis* complex에 속하는 *M. bovis*(이하 결핵균)임.
- 결핵(bovine tuberculosis)은 결핵균에 의한 만성전염성 질환으로 소, 돼지, 사슴, 염소 등의 가축에 결핵을 일으켜 경제적인 피해를 입히고 있으며, 특히 소와 사슴에서 경제적 피해가 큼.
- 결핵균이 동물체에 침입하면 침투부위에 존재하는 대식세포에 의해 심부조직으로 운반되고, 여기서 육아종성과 민반응을 일으킴.
- 많은 종의 반추동물에서도 결핵병을 일으키지만 결핵균(*M. bovis*)이 사슴에 감염될 경우, 아직 야생상태를 벗어나지 못한 사슴이 목장에서 받는 환경적 stress로 인해 이환율이 다른 가축에 비해 높은 것으로 알려져 있음.



[그림 2] 결핵균 염색사진

(2) 결핵 발병상황

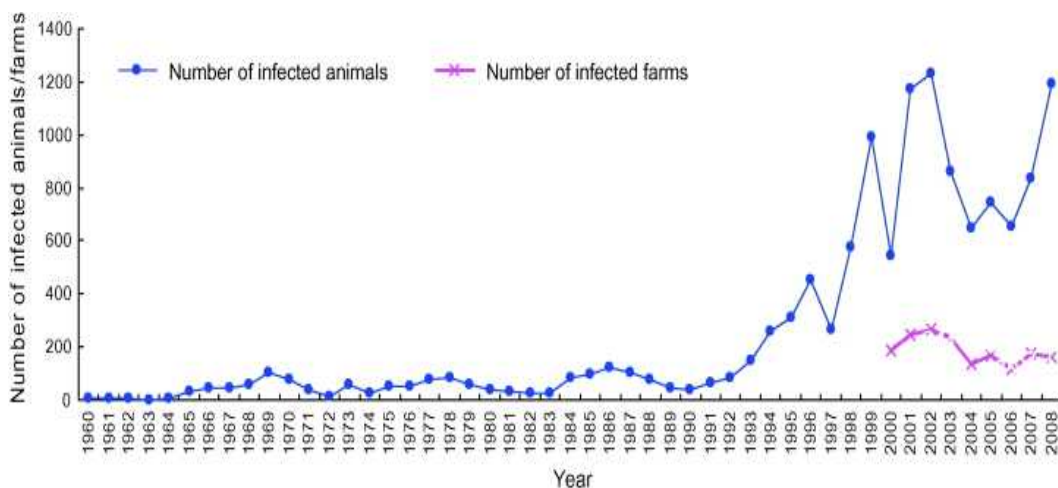
- 결핵균에 의한 사슴을 포함한 가축에서의 결핵의 발생은 국가 간에 정도의 차이가 있으나 전 세계적으로 발생하고 있음.

- 결핵균에 의한 결핵의 발생은 주로 소를 중심으로 보고되고 있으나 주요 선진국인 미국, 캐나다 호주, 유럽국가 등에서는 소 이외의 동물 즉 사슴 (미국, 캐나다)이나 야생 동물인 possum (뉴질랜드), 또는 badger (영국) 등에서 결핵균에 의한 감염이 지속적으로 문제가 되어 왔음.



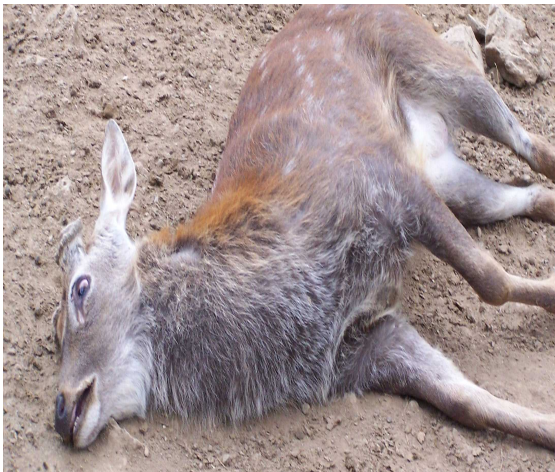
[그림 3] 아시아 지역의 결핵 발생상황

- 우리나라를 비롯한 개발도상국에서는 결핵이 축산산업에 막대한 피해를 주고 있음.
- 사슴에서의 결핵 발병은 2002년에 첫 보고되었고, 2005년도에 22두, 2006년도에 27두, 2007년도에 132두, 2010년도에 2,655두, 2011년도에 980두로 점차 확산되고 있는 추세임.
- 사슴에서의 결핵의 이환율이 빠르게 증가하고 있어 소, 돼지, 염소 등 다른 가축에게로 전염될 뿐 아니라 생혈과 녹용을 섭취하는 우리나라 사람에게 전파될 위험성이 높음.
- 2011년 초까지 사슴에 대한 결핵검사 요청에 따라 결핵검사를 실시하였을 때, 결핵발병률은 목장에 따라 5-37%까지 감염되어 있었음.
- 2011년 이후 구제역 발생으로 인하여 사슴에 대한 결핵검사가 중단되었고, 살처분 보상금이 60%로 하향 조정되면서 최근에는 사슴에 대한 결핵검사가 거의 이루어지고 있지 않음.



[그림 4] 국내 결핵병 발생상황

- 농림축산검역본부의 용역과제로 수행한 “사슴결핵의 분포상황 조사 및 분리균주의 특성 규명”연구에서 결핵균항원을 이용한 혈청진단법을 개발하여 국내 사슴에서 분리한 혈청 검체를 이용하여 검사하여 16.3%의 양성률 (전체 680개체 중 111개체에서 양성반응)을 나타내었고, 대상 40개 목장 중 25개목장에서 양성반응을 나타내는 개체가 있어 62.5%를 나타내어 국내에서 사슴의 결핵균 감염실태가 심각함을 알 수 있었음 (표 1).
- 사슴의 결핵 원인균인 *M. bovis*균을 분리하여 사슴에서 분리되는 *M. bovis*균의 type과 다른 동물에서 분리되는 *M. bovis*균과 비교하기 위하여 살처분 대상인 사슴에서 폐조직을 분리하여 *M. bovis*균 배양을 시도하였을 때 일부 PPD 양성 사슴에서 결핵 특이적인 granuloma형성을 나타내었고, 치즈양 결정도 관찰할 수 있었음.



[그림 5] 국내에서 결핵으로 폐사한 사슴과 결핵병변

- 사슴목장 중 두 목장에서 높은 혈청양성율을 나타내었는데, 한 목장은 8마리중 7마리에서 양성반응을 나타내어 양성율이 87.5%로 가장 높았고, 다른 한 목장은 21마리 중 15마리가 양성반응을 나타내어 71.4%의 양성율을 나타내었음. 전체적으로 40개의 목장 중 25목장에서 양성반응을 나타내어 62.5%를 나타내었음. 이로 보건데 사슴에 대한 결핵 검사가 이전에 이루어지지 않아 높은 양성율을 나타냄.

<표 1> 국내 목장별 개체별 사슴의 결핵항원 양성반응검사

목장	대상 사슴수(마리)	혈청양성반응수(마리)	양성반응비율(%)
1A	21	2	9.5
1B	27	0	0
1C	19	0	0
1D	28	0	0
1E	7	0	0
1F	7	2	28.6
1G	9	9	9
1H	10	1	10
1 I	13	4	30.8
1J	17	5	29.4
1K	6	1	16.7
1L	8	0	0
1M	26	8	30.8
1N	15	3	20
1O	2	0	0
1P	14	1	7.1
1Q	8	7	87.5
1R	21	15	71.4
1S	22	6	27.3
1T	76	14	18.4
1U	54	21	38.9
1V	23	3	13
1W	6	0	0
1X	24	8	33.3
1Y	12	1	8.3
1Z	12	1	8.3
2A	12	1	8.3
2B	10	1	10
2C	12	4	33.3
2D	8	1	12.5
2E	12	2	16.7
2F	10	1	10
2G	12	0	0
2H	11	0	0
2I	10	0	0
2J	9	0	0
2K	11	0	0
2L	50	0	0
2M	12	0	0
계(개체수)	680	111	16.3
계(목장수)	40	25	62.5

(농림축산검역본부 최종보고서자료)

<표 2> 국내 사슴에 대한 투베르쿨린 검사와 병변 결과

번호	축종	경결크기(mm)	PPD 판정	육안병변유무
1	엘크	-	-	-
2	엘크	26.0	양성	+
3	엘크	-	-	-
4	엘크	10.0	양성	-
5	엘크	33.0	양성	+
6	엘크	27.5	양성	-
7	레드디어	25.0	양성	-
8	엘크	-	-	-
9	엘크	23.0	양성	+
10	엘크	12.0	양성	-
11	엘크	30.0	양성	-
12	엘크	28.0	양성	-
13	엘크	-	-	-
14	엘크	170.0	양성	-
15	엘크	19.5	양성	-
16	엘크	45.0	양성	+
17	엘크	11.0	양성	-
18	엘크	-	-	-
19	엘크	-	-	-
20	엘크	-	-	-
21	엘크	28.0	양성	-
22	엘크	-	-	-
23	엘크	18.0	양성	-
24	엘크	-	-	-
25	엘크	32.0	양성	+
26	엘크	-	-	-
27	엘크	20.5	양성	-
양성률			62.9% (17/27)	18.5% (5/27)

(농림축산검역본부 최종보고서자료)

- 사슴에서 분리한 결핵균 34균주와 젓소에서 분리한 59균주 그리고 한우에서 분리한 40 균주를 대상으로 분자지문법의 하나인 MIRU-VNTR 방법으로 분석한 결과 12개의 유전자형으로 분류할 수 있었으며, 사슴에서 분리한 균주 가운데 23주 (68%)는 젓소 및 한우에서 유래한 유전자형과 동일하여 결핵균이 사슴, 젓소, 및 한우 간에 교차전파가 이루어지고 있음을 제시함 (최종보고서).
- 따라서 한우나 사슴이 결핵균 보균동물로 존재하며, 인접한 농장의 젓소에게 전파할 가능성이 높기 때문에 국내 가축의 결핵을 보다 근본적으로 퇴치하기 위해서는 젓소뿐만 아니라 한우와 사슴의 결핵 퇴치정책도 국가방역사업에 포함하는 것이 바람직하다고 판단됨.
- 국내 사슴농장가운데 결핵균 항원에 대한 항체보유율의 높음, 그리고 항체양서 사슴의 비율이 높은 현실을 감안하고, 전 두수 검사에 의한 양성축의 살처분 정책을 대대적으로 도입하기 어려운 현실에서 가장 효율적으로 사슴의 결핵 양성률을 낮추어 젓소에게 결핵균 전파를 최소화하기 위해서는 사슴결핵백신의 개발 및 도입이 필요한 실정임.

제 3 절 연구개발 범위

■ 제 1 세부

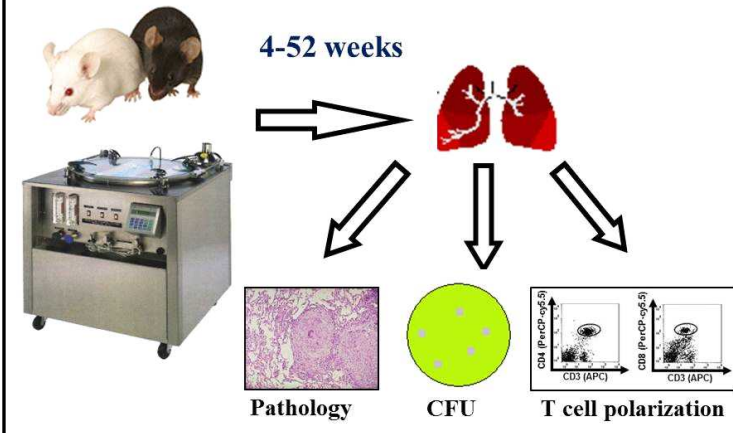
1) 국내유행 한국형 사슴결핵균의 세포내 감염/반응의 특성 분석

- VNTR-MIRU genotyping을 통하여 가장 분리율이 높은 3-5균주를 선정
- 한국형 사슴결핵균의 세포내 특성을 규명하기 위하여 골수유래 수지상세포, 큰포식세포를 이용하여 보조자극인자와 MHC class I, II의 발현 분석, dextran-FITC 탐식능 측정, cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-10, IFN- α , IFN- γ) 측정, intracellular cytokine 분석하여 면역세포의 phenotype과 특징적 profile 확립.
- 특히, 큰포식세포를 이용한 실험에서는 결핵균의 표준균주와 세포내 growth rate, NO 생성, phagosomal escape, Type I interferon 생성, 세포 사멸기전 등 다양한 차이점을 규명함.

2) 병원성과 면역병리학적 특성을 근거로 국내유행 사슴결핵균의 대표균주 선정

- VNTR-MIRU genotyping을 통하여 가장 분리율이 높은 3-5균주를 선정
- 한국형 사슴결핵균의 동물임상모델 확립과 질병진행에 따른 병인기전/면역학적 특성 규명: 사슴결핵의 질병진행에 따른 병원성의 특성과 세포매개면역 반응의 특성 규명
- 결핵의 공기감염모델 확립: 결핵균 감염동물모델을 확립하기 위해서는 감염시켰을 때 동물에서 일어나는 현상이 항상 일정하게 관찰되어야 동물모델로 성립될 수 있음. 또한, 동물의 종류, 성별, 나이, 유전형등에 따라 감염병원균에 대한 감수성, 세포매개 면역반응정도가 다를 수 있음. 따라서 결핵연구에서 가장 보편적으로 사용되고 있는 6-7주령의 암컷 C57BL/6마우스를 이용하여 실험을 진행할 예정임.
- 결핵균 표준균주 AN5, VNTR-MIRU genotyping을 통한 3-5개의 임상분리주의 병인학적, 면역학적 차이점을 비교분석하기 위하여 Inhalation device를 이용하여 마우스당 200-400여개의 결핵균이 폐

Aerosol Challenge



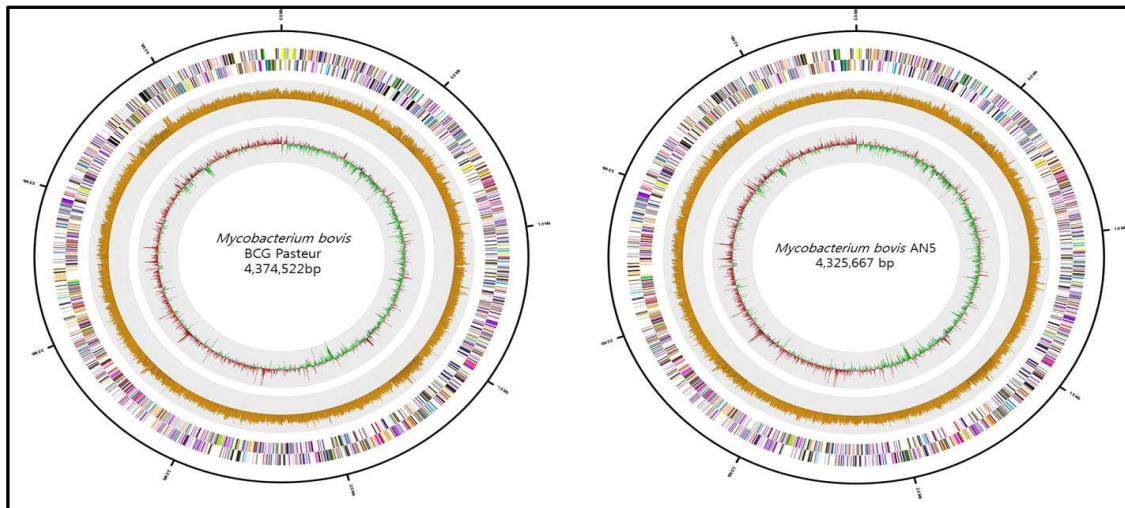
[그림 6] 결핵의 공기감염모델

에 대한 IFN-g 생성능을 분석함.

- 마우스의 비장 또는 폐 조직에서 mRNA를 분리하여 IL-12, IL-10, IFN-g, TNF-a, IL-6, IL-4, TGF-b, IL-1b, IL-2 등 cytokine 발현량을 비교분석함. T cell의 phenotypes (effector, memory)을 CD4, CD8, CD127, CD62L, CD44의 발현을 통하여 naive 마우스 또는 BCG 감염 마우스와 비교분석.
- 최종, 면역학적 특성과 병독성, 병리학적 소견 분석을 통하여 병원성이 가장 높은 2개의 한국형 사슴결핵균 대표균주 선정

3) 국내 유행 사슴결핵균 분리주의 분자유전학적 특성 분석을 통한 면역원성 항원 개발: 특이 항원 및 면역원성 항원 개발

- 국내 유행 사슴결핵균의 대표 균주 선정 및 Whole Genome Sequencing과 comparative genomics를 통한 분자 유전학적 특성 분석: 마우스 감염모델과 VNTR-MIRU genotyping을 통



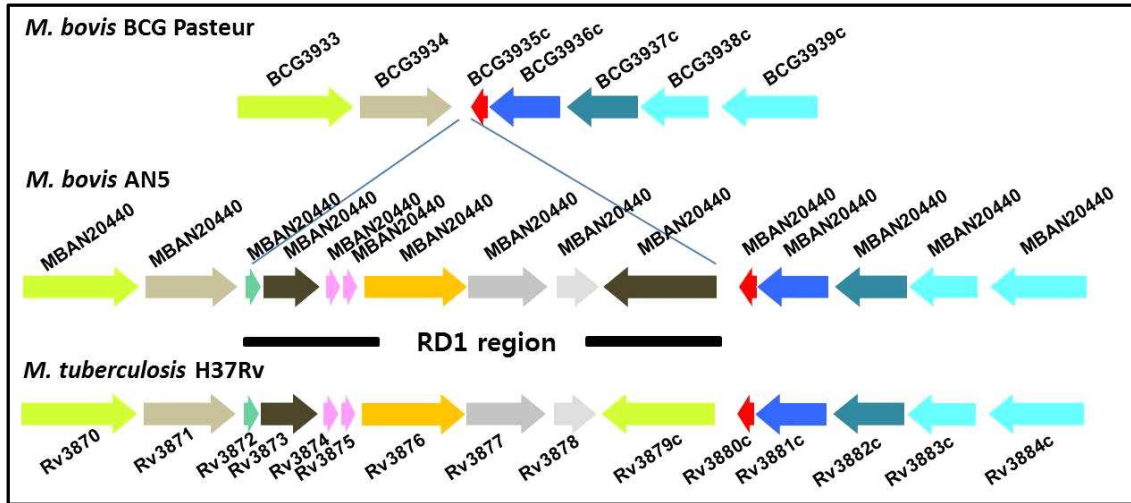
[그림 7] BCG Pasteur strain과 임상 분리균주 AN5 strain의 유전자 지도

하여 선정된 2개의 대표 균주에 대한 비교유전체 분석 실시 (그림 7).

- ORF와 Cluster 분석을 통하여 국내 유행 사슴결핵균에 공통적으로 존재하는 특이적 ORF를 선정하고, *E. coli* vector와 pVV16 항산균 vector를 이용하여 유전자 재조합 단백질을 생산

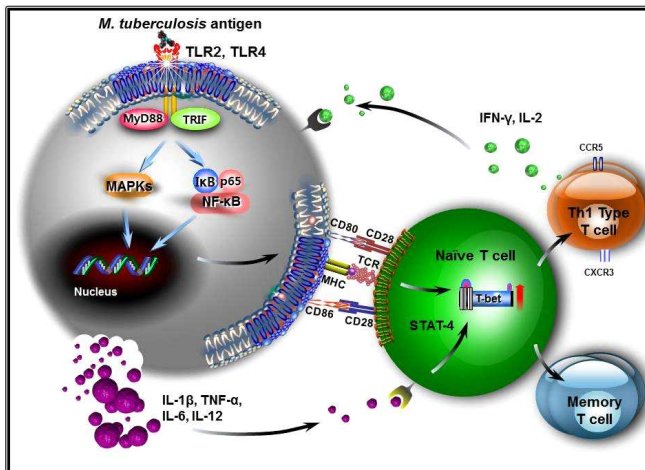
에 감염되도록 시킴 (그림 6).

- 특히, 선천면역과 초기 면역반응의 특성을 규명하기 위하여 감염 후, 2, 5, 10, 14일 째에 결핵균 균주에 따라 특이적으로 감염되는 면역세포의 종류, infiltration되는 면역세포의 종류와 cytokine의 profile, dissemination과 extracellular matrix의 파괴와 관련된 MMPs의 특성을 비교, 분석하고 감염 후, 후천면역이 시작되는 3주째부터는 2주 간격으로 마우스의 폐에 감염된 결핵균의 CFU 측정, 결핵균의 항원 (Ag85A, ESAT-6, CFP-10, HspX) 등



[그림 8] 특이적 병원성 / 면역원성 인자를 포함하는 RD1 region의 비교, 분석

- 특히, 기존의 RD1 cluster의 특성을 통하여 면역원성이 높은 ESAT-6와 CFP-10의 In dels 분석 (그림 8)
- 4) 발굴항원의 면역학적 특성 분석 및 마우스 immunization을 통한 T cell의 활성화 분석을 통한 백신항원으로써의 타당성 검증

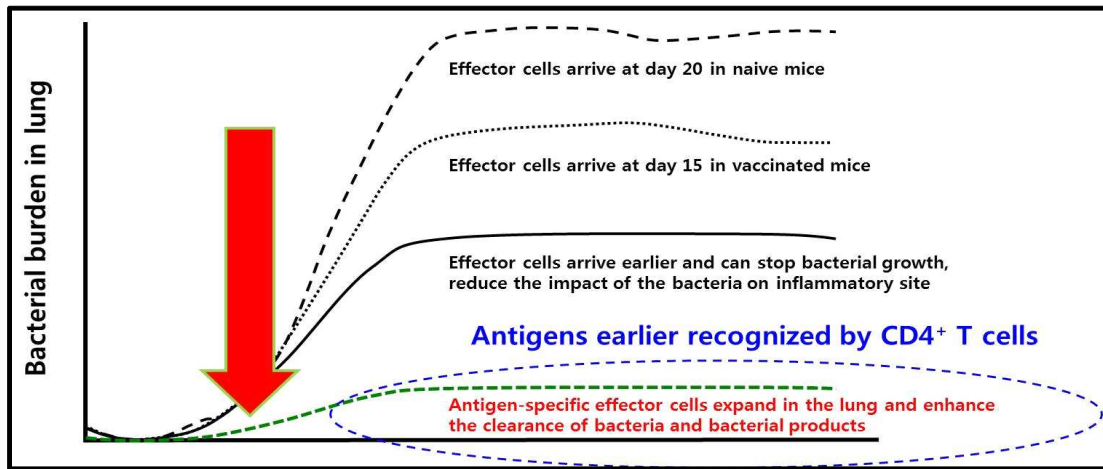


[그림 9] 발굴된 면역원성 항원의 특성 분석

스 immunization을 통한 T cell의 활성화 (Recall response, IFN-g assay, Th1-type T cell immunity)를 유도하는 항원을 종합적으로 평가하여 최적의 방어면역용 항원을 최종 선정함 (그림 10).

- 생산된 유전자 재조합 단백질의 세포학적/면역학적 기능 분석
- 특히, 발굴된 항원 중 in vitro screening을 이용하여 수지상세포를 활성화시키며, 수지상세포 자극을 통하여 Th1-type의 T-cell 면역반응을 유도할 수 있는 항원을 전략적으로 탐색할 예정임 (그림 9)
- 특이적 면역현상 분석 (선천 면역 포함, 질병발달에 따른 Th1/Th2/Th17의 면역균형 분석)을 분석하여 항원의 특성을 규명함.

- 특히, 사슴결핵균 감염 후, 감염 초기 (14 일)에 T cell에 의해 인식되는 항원과 마우스



[그림 10] 사슴결핵을 예방하기 위한 항원의 전략적 탐색 모식도

5) 한국형 사슴결핵 예방백신 개발을 위한 최적의 BCG strain 선정

- 3종류의 BCG strain 선정: BCG Pasteur 1173P2, BCG Danish, BCG Tokyo strain을 mouse 당 1×10^5 CFU 용량으로 subcutaneous injection을 통하여 immunization 시킴.
- Immunization 6주 후, 병원성 비교실험을 통하여 선정된 고병원성 한국형 사슴결핵균을 대상으로, 결핵의 자연적인 감염경로인 공기감염을 위하여 inhalation device를 이용하여 마우스당 200여개의 결핵균이 폐에 감염되도록 시킴.
- 공격감염 후, 4주 8주째에 폐 조직과 비장조직에서 살아있는 결핵균수의 측정과 H&E 염색한 후 폐 조직의 염증수준을 비교분석하여 사슴결핵균의 예방능력이 가장 우수한 BCG strain 선정.
- 가장 예방효과가 우수한 BCG strain을 back-bone으로 하여 국내 유행 사슴결핵균의 특이적 항원을 삽입한 recombinant BCG 개발

6) 국내 유행 사슴결핵균의 특이적 항원을 삽입한 recombinant BCG의 대량 생산

- 생물학적 제제지침에 따른 결핵예방백신의 대량 생산
- 개발백신의 대량 생산기법 확립 및 생물학적 viability 평가: Sauton's broth를 이용한 master seed 및 working seed 개발



[그림 11] 생물학적 제제지침에 따라 시험 생산된 BCG 백신

- Observation Density와 CFU 측정을 통한 상관관계 곡선 생성과 반복실험을 통한 recombinant BCG의 일정한 viability와 안정성 확보
- Master seed로부터 working seed 준비를 위한 배양 protocol 확립
- 생물학적 제제지침의 백신생산 단계:
 - 1단계: 소톤감자배양(Sauton Potato Culture): 소톤감자배지 표면에 띄워서 초대 배양
 - 2단계: 배양된 균막을 배양될 소톤배지 표면에 띄워 7-10일간 배양 -> 배지표면에 발육한 균막만을 여과 등의 방법으로 채취
 - 3단계: 소톤 배양 후 배지에 대한 시험기준: 배양액의 혼탁이 없고, 깨끗하고 투명해야 함. 균막의 표면에 물방울이 없어야 함. 배양액 중에 늘어서거나 떠 다니는 균사가 없어야 함. 발육된 균막은 배양액 바닥에 가라앉지 아니하고 표면에 떠 있어야 함.
 - 4단계: 채균: 무균적으로 채취된 균체량으로부터 일정 농도의 균부유액을 제조
 - 5단계: 최종원액 제조: 1.5% 글루타민산 나트륨으로 균액을 만들고 이를 최종 원액이라 함. 이 최종원액을 분주하여 동결건조함.

7) 고병원성 사슴결핵 분리균주를 대상으로 개발된 recombinant BCG의 예방효과 검증을 위한 지표 자료의 표준화

- 최종 생산된 recombinant BCG의 예방효과를 검증하고 이를 표준화하기 위하여 1차년도 연구결과를 토대로 확립된 결핵 마우스모델을 활용하여 연구를 진행함.
- 최적의 용량 결정: recombinant BCG strain을 mouse당 $1 \times 10^4 - 1 \times 10^7$ CFU 용량으로 subcutaneous injection을 통하여 immunization 시킴. 이 때, 대조군으로는 back-bone strain BCG를 1×10^5 CFU 용량으로 subcutaneous injection을 통하여 immunization 시킨 마우스 그룹을 이용하여 비교, 분석함.
- Immunization 6주 후, 12주에 고병원성 한국형 사슴결핵균을 마우스당 200 CFU로 inhalation device를 이용하여 호흡기로 감염시킴.
- 공격감염 후, 4주 8주째에 폐 조직과 비장조직에서 살아있는 결핵균수의 측정과 H&E 염색한 후 폐 조직의 염증수준을 비교분석하여 최적의 용량, vaccination의 지속성 결정.
- 폐 조직과 비장 조직의 면역세포를 recombinant 항원으로 자극 시킨 후 림프구 증식반응 및 IFN- γ , IL-2, TNF-a를 생산하는 multi-functional T cell의 frequency 측정.

■ 협동

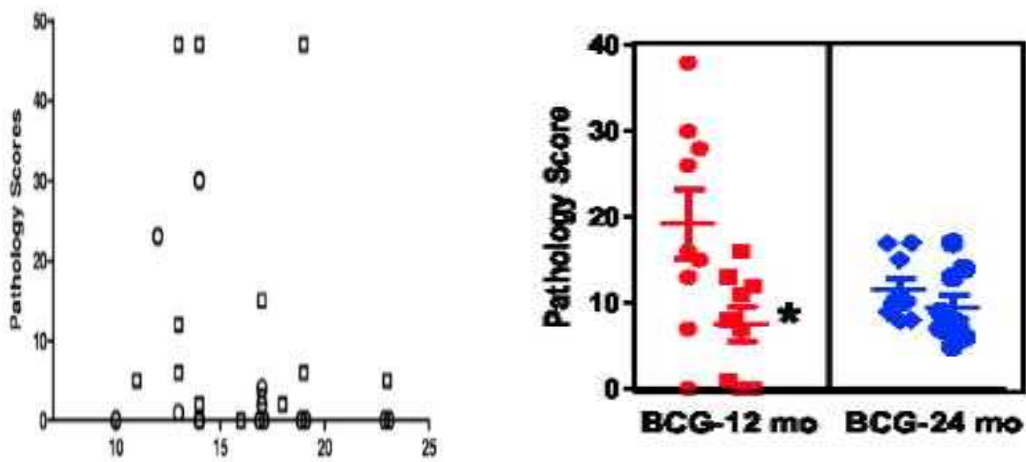
1) 국내유행 사슴결핵균을 이용한 감염모델 확립

- 국내 사슴결핵에서 분리된 병원성이 높은 결핵균을 사슴의 기관지내에 기관지내시경을 이용하여 감염시킴
- 사슴결핵균 감염 후 시기별로 감염된 사슴의 폐병변 및 주변 임파절을 검사하여 병리조직학적 지표와 미생물학적 지표를 따라 평가함.
- 대조군으로 BCG백신을 접종한 예방백신균을 이용하여 결핵균 감염만 시킨 군과 예방백신을 접종한 군과의 병리조직학적 지표 및 미생물학적 지표를 이용하여 백신의 예방효과를 측정할 수 있는 최적의 조건을 확립함.



[그림 12] 결핵감염된 사슴의 폐병변 정도에 따른 분류

- 또한 감염 후 시기별로 혈액 및 조직으로부터 면역세포를 분리하여 결핵균 항원으로 자극하여 방어면역기능을 하는 면역세포의 동정 및 변화 등을 조사하고, 방어면역에 작용하는 cytokine 마커를 발굴할 것임.
- 사슴결핵감염모델을 이용하여 개발될 예방백신을 평가하고, 감별진단법을 이용하여 유용성을 평가할 예정임.



[그림 13] 사슴결핵균 감염 후 병리조직학적 변화와 백신접종군과의 비교

2) 사슴결핵에 대한 개발된 백신의 야외평가

- 사슴결핵에 대한 백신의 야외평가를 위하여 생후 2-6개월 정도의 어린 사슴을 대상으로 투베르쿨린검사를 실시하여 음성인 사슴을 대상으로 함.

- 사슴결핵에 대한 백신의 효능을 평가하기 위하여 예비평가, 본 평가 그리고 야외평가로 나누어 실시함.
- 사슴결핵 예방백신의 예비평가에서는 백신접종군과 비접종군을 각각 6마리 씩 사용하여 예방백신 후보를 선정할 예정이며, 본 평가에서는 백신효능의 단기 및 장기적인 예방효과를 평가하기 위하여 각 시기별로 백신접종군과 비접종군에 6마리씩, 총 [(백신후보종류, $n \times 6 +$ 비접종군, $1 \times 6) \times 2$ 회] 마리를 사용할 예정임. (예, 백신후보가 3종류일 경우, 총 48마리)
- 사슴결핵 백신의 접종량을 최적화하기 위하여 1×10^4 CFU/dose - 1×10^7 CFU/dose의 예방백신을 피하로 접종하여 적합한 예방접종량을 측정할 예정임.
- 사슴결핵 예방백신의 접종횟수에 따른 예방효과를 측정하기 위하여 1회 접종군, 6주 간격 2회 접종군에 대한 예방효과를 측정할 예정임.
- 예방백신으로 면역된 사슴 및 비면역 사슴에 감염모델에서 확립된 결핵균 도스를 기관지내 내시경을 이용하여 감염시킴.

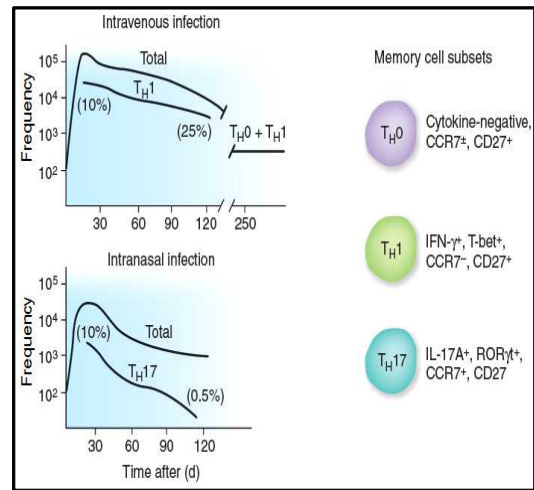
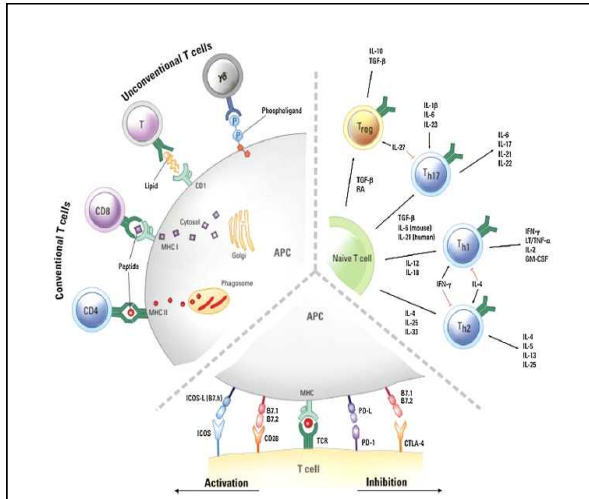
<표 3> 결핵감염 후 폐병변의 등급판별 기준 (Vordermeier HM etal, I&I 2002)

등급	기준	비고
0	no visible lesion	
1	lesions on slicing	
2	<5 gross lesions of <10mm	
3	>6 gross lesions of <10mm, or one gross lesion of >10mm	
4	> 1 gross lesions of >10mm	
5	gross coalescing lesions	

- 결핵균에 감염된 사슴의 미생물학적, 병리학적 지표를 이용한 예방백신의 효과를 평가하기 위하여 감염 후 3개월, 6개월 후에 사슴을 희생하여 부검을 실시 후 평가함
- 사슴결핵에 대한 예방백신의 면역학적 변화를 비교분석하기 위하여 백신 접종 전, 접종 후 1개월, 2개월, 3개월, 그리고 감염 후 1개월, 2개월, 3개월, 그리고 6개월에 혈액을 분리하여 결핵균항원 및 펩타이드를 이용하여 면역세포의 변화를 비교 측정함.
- 사슴결핵에 대한 예방백신의 야외평가를 위하여 예방백신을 접종한 군과 접종하지 않은 군을 주관부서와 협의를 거친 후 약 20마리씩 해당 목장에 분배하여 사육을 실시하면서 자연감염에서의 예방효과를 평가할 예정임.
- 사슴결핵 예방백신을 접종한 사슴의 야외평가를 위한 시험농장은 선정은 농림축산검역본부 과제를 수행하면서 100여개 사슴농장의 감염률을 참고하여 통계전문가의 조언을 따라 주관부서와 상의하여 10-20 개 정도의 목장을 선정할 예정임.
- 사슴결핵 예방백신의 야외평가를 위하여 백신접종군과 백신 비접종군을 동거 시킨 후 매 3개월마다 면역학적 검사와 투베르쿨린 검사를 실시하여 감염 정도를 예상하고, 백신 비접종군에서 10-30%의 감염이 예상되는 시기에 실험동물들을 부검하여 미생물학적 및 병리학적 평가를 실시할 예정임.

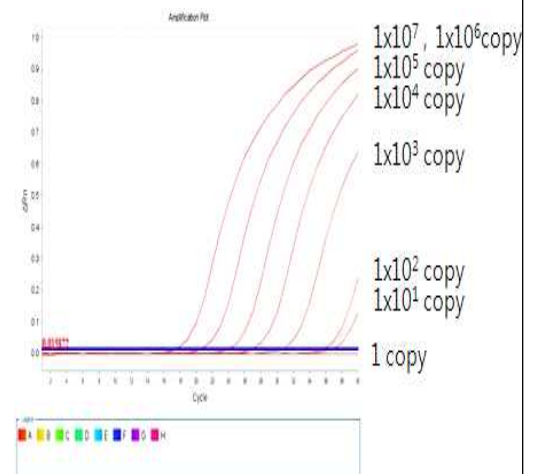
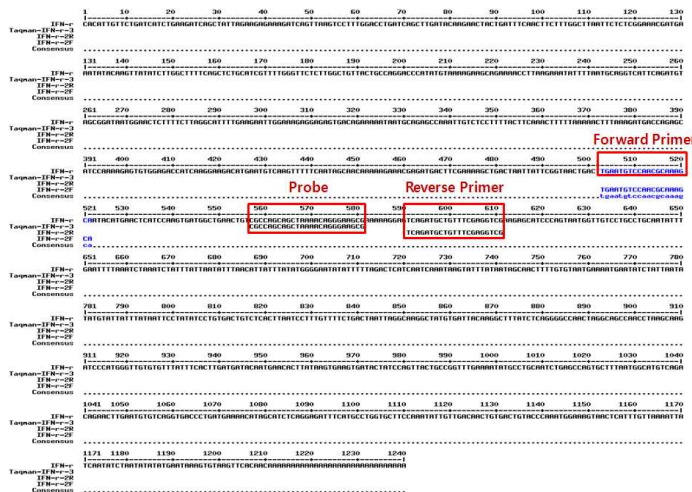
3) 사슴결핵 백신의 효능 평가를 위한 면역학적 지표 개발

- 사슴결핵을 예방하기 위하여 개발된 백신의 효능을 평가하기 위한 면역학적 지표를 개발하는 것은 중요한 의미를 가짐.
- 결핵균과 같은 병원체가 감염되었을 때, T 세포를 포함하여 다양한 면역세포들이 관여하는 데, T 세포에는 CD4 세포와 CD8 세포와 같은 세포들이 병원체의 항원을 인식하여 활성화됨.
- 활성화된 CD4 세포와 CD8 세포는 Treg, Th17, Th1, Th2 등의 세포들로 분화되어 IFN- γ , IP-10, CXCL-9, IL-2, IL-12, TNF-a, TGF-b, IL-6, IL-21, IL-23, GM-CSF 등의 cytokine과 chemokine을 분비함.



[그림 14] 백신의 방어면역관련 세포성 면역세포들과 Cytokine 및 chemokine

- 현재 사슴에 대한 면역반응을 측정할 수 있는 세포표면마커에 대한 단클론항체가 거의 없는 상황 일 뿐만 아니라 IFN- γ 에 대한 항체들은 개발되어 상품화된 적은 있지만 생산가치가 적어 현재 상용화되어 있지 않아 사슴결핵에 대한 면역반응 지표로 사용하기가 어려운 상황임.
- 본 연구책임자는 ELK에 대한 IFN- γ 를 측정할 수 있는 ELISA 키트를 확보하여 면역학적 지표 측정에 사용할 계획임.

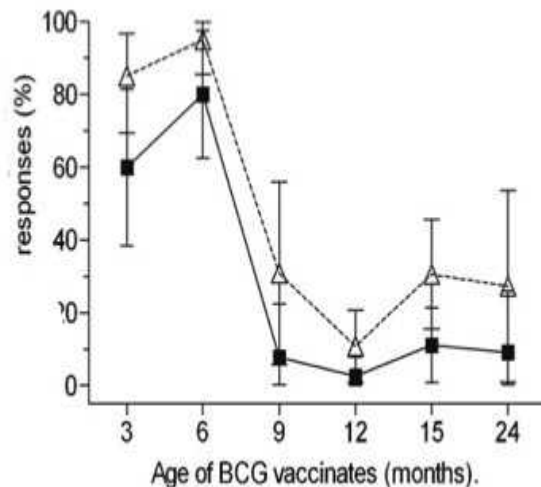


[그림 15] 백신의 세포성 면역에 관여하는 cytokine에 대한 primers와 probe 및 정량

- 사슴의 cytokine 및 chemokine에 대한 유전정보가 어느 정도 밝혀져 있어 이에 대한 probe를 제작하여 백신에 의한 면역반응을 정량적으로 측정할 수 있는 quantitative real-time PCR을 준비하였음.
- Real-time PCR은 자동화가 가능하고 결과도 자체 프로그램을 통하여 비교분석이 가능하여 백신의 면역반응을 정량하기에 좋은 방법으로 평가됨.

4) 투베르쿨린 검사를 이용한 사슴결핵 감별법 개발과 유용성 평가

- 현재 투베르쿨린 검사에 사용되는 결핵균항원은 미근부 피내반응검사를 위하여 bovine PPD를 사용하고 있고, comparative skin test를 위하여 bovine PPD와 avium PPD를 사용하고 있음.
- Bovine PPD에는 약 2,000여개의 단백질항원이 존재하고 있는데, 이 항원들 중에는 BCG백신의 항원과 공유항원이 많아 BCG백신 및 재조합 BCG백신 등을 접종한 동물에서 교차반응이 나타날 수 있어 BCG백신에는 없으면서 결핵균에만 존재하는 항원을 발굴할 필요가 있음.
- 결핵균 고유항원으로 ESAT-6, CFP10, TB7.7 등의 항원이 발굴되어 감별진단에 사용되고 있음.

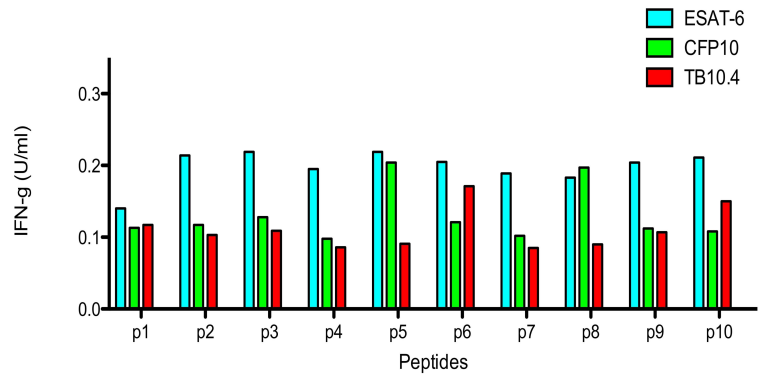
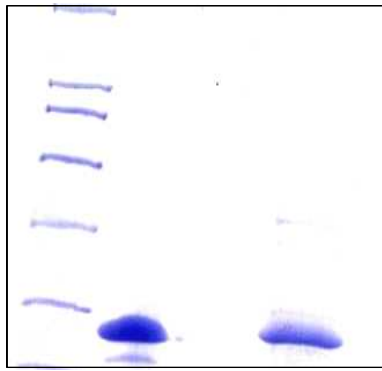


[그림 16] 투베르쿨린 검사용 결핵항원 선별과 사슴에서의 투베르쿨린 반응의 변이

- 결핵균항원으로 면역시킨 동물에 양성 대조군으로 bovin PPD, avium PPD를 사용하고 시험항원으로 ESAT-6, CFP10, TB7.7 등의 재조합항원과 이들 항원들의 에피토프(epitope)을 포함하는 펩타이드 항원을 접종하여 감별할 수 있는 항원을 선별함.
- 동물에서 선별한 항원 및 펩타이드를 결핵균항원을 접종하거나 결핵균에 감염시킨 사슴과 BCG 백신을 접종한 사슴에 투여하여 투베르쿨린 반응 정도를 측정하여 감별진단마커로서의 가치를 평가함.

5) 세포면역반응을 이용한 사슴결핵 감별진단법 개발과 유용성 평가

- **결핵항원 발굴:** 혈액속의 면역세포를 자극하는 항원으로 현재 bovine PPD와 avium PPD를 사용하고 있는데 이들 항원들은 비특이반응을 유도할 수 있음
- PPD대신 **결핵균 특이항원인 ESAT-6, CFP10, TB7.7 등을 항원으로 사용할 예정이며, 또한 결핵에 감염된 사슴에 특이성이 높은 epitope를 조사하여 국내에 최적화된 결핵감별검사법을 개발하고자 함.**



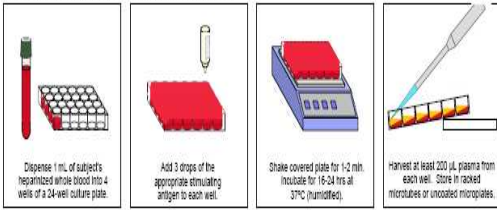
[그림 17] 결핵균 재조합항원과 펩타이드(epitope) screening

<표 4> 결핵 특이항원의 펩타이드 sequence

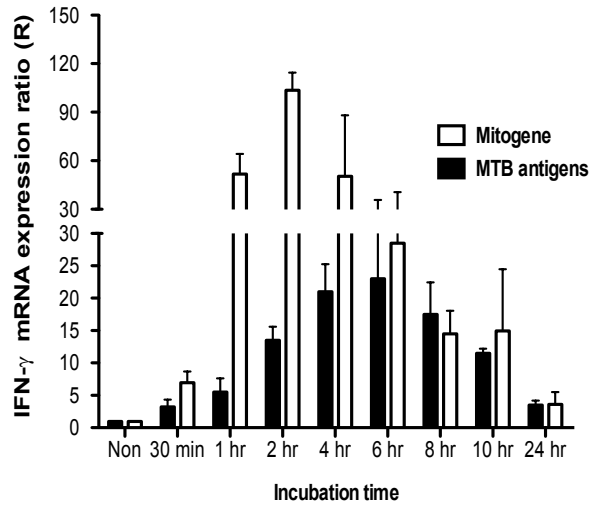
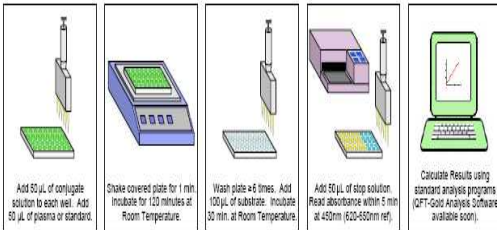
	ESAT-6	CFP10	TB10.4
peptide 1	MTEQQWNFAGIEAAASAI	MAEMKTDAATLAQEAGNFER	MSQIMYNYPAMLGHAGDMA
peptide 2	AGIEAAASAIQGNVTSIHSL	LAQEAGNFERISGDLKTQI	AMLGHAGDMAGYAGTLQSL
peptide 3	IQGNVTSIHSLLEDEGKQSL	RISGDLKTQIDQVESTAGSL	AGYAGTLQSLGAEIA
peptide 4	SLLDEGKQSLTKLAAAW	DQVESTAGSLQGQWRGAA	TLQSLGAEIAVEQAA
peptide 5	KQSLTKLAAAWGGSGSEAY	SLQGQWRGAAGTAAQAAVVR	GAEIAVEQAALQSAW
peptide 6	AWGGSGSEAYQGVQQKWD	GTAAQAAVVRFQEAANKQK	VEQAALQSAWQGDTG
peptide 7	YQGVQQKWDATATELNAL	RFQEAANKQKQELDEISTNI	LQSAWQGDTGITYQAWQAQW
peptide 8	ATATELNALQNLARTISEA	KQELDEISTNIRQAGVQYSR	ITYQAWQAQWNQAMEDLVRA
peptide 9	LQNLARTISEAGQAMASTE	IRQAGVQYSRADEEQQAL	NQAMEDLVRAYHAMSSTHEA
peptide 10	QAMASTEGNVTGMFA	RADEEQQALSSQMGF	YHAMSSTHEANTMAMMAR
peptide 11			EANTMAMMARDTAEAAKWGG

- IFN-gamma 및 cytokines & chemokine) 측정법: 기존의 IFN- γ 를 측정하는 방법은 sandwich ELISA를 사용하여 측정하는 방법을 사용하였음.
- IFN- γ 의 양을 측정하기 위하여 IFN-gamma에 대한 단클론 항체를 이용하여야 하는 데, 각 가축마다 IFN-gamma를 발현시켜 단클론항체를 제작하여야 하며, 경우에 따라서는 같은 종이라도 품종에 따라 IFN-gamma를 인식하는 정도가 다른 경우도 발생하고, 특히 현재 사용되고 있는 IFN-gamma측정 ELISA에는 재조합 IFN-gamma가 사용되고 있지 않아 standard curve를 생성하지도 못함.
- 본 연구에서 개발하고자 하는 cytokine 및 chemokine에 대한 측정방법은 형광 프로브(probe)를 제작하여 real-time PCR을 이용한 cytokine & chemokine 측정법이기에 때문에 정량적으로 측정할 수 있을 뿐 아니라, real-time PCR방법을 이용하므로 자동화된 검사가 가능하고, 결과도 자체프로그램을 통하여 판독할 수 있음.
- 이후에 유의성 있는 Cytokine 및 chemokine에 대한 단클론 항체를 제작하여 ELISA로 검사하는 방법을 개발하는 것도 가능함.

Stage One - Blood Stimulation and Harvesting



Stage Two - Human IFN- γ ELISA



[그림 18] IFN- γ ELISA법과 IFN- γ mRNA 발현량 측정

6) 사슴결핵백신의 현장 보급

- 사슴결핵백신 접종 매뉴얼 작성
- 사슴결핵백신 접종동물과 사슴결핵감염동물에 대한 감별진단 매뉴얼 작성
- 사슴결핵 예방접종 프로그램 개발
- 사슴 결핵에 대한 백신 등록
- 시범농가 대상 예방백신 접종 및 평가
- 사슴결핵 예방백신을 이용한 결핵퇴치에 대한 정책안 제시

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

제 1 절 사슴결핵 진단 및 감별별 개발 현황

1) 투베르쿨린 검사

- (1) 결핵의 진단은 결핵균 배양액에서 준비한 purified protein derivatives (PPD)를 이용한 피내반응검사 (intradermal tuberculin test)에 의존하고 있으며, 우리나라에서도 caudal fold에 PPD를 주사하고 72시간 후에 종창의 크기를 관찰하여 판정하는 피내반응검사를 채택하고 있음.
- (2) 결핵의 발생율이 낮은 경우 결핵균 이외의 항산균 즉 조형결핵균(*M. avium* complex)이나 기타 토양 또는 물에 존재하는 항산균에 감염되어 결핵균 PPD에 비특이반응 빈도가 증가하고 있음.
- (3) 비특이반응에 의한 결핵 양성판정을 최소화 하기 위해 정밀검사의 하나로 우혈결핵균 PPD와 조형결핵균 PPD를 동시에 이용하는 comparative cervical test (CCT)를 채택하는 나라가 증가하고 있으며, 최근에는 IFN- γ test를 보조적인 검사로 채택하거나 도입하려는 연구가 활발히 진행 중에 있음.
- (4) 피내반응검사가 세포매개면역반응을 측정하는 검사이기 때문에 일부 결핵 감염 가축에서 세포매개면역반응이 억제된 경우에는 피내반응 검사에 음성일 수 있으므로 이러한 경우 대부분은 항체반응은 매우 강하기 때문에 항체검사를 결핵의 진단에 보조적으로 이용하려는 연구도 여러 나라에서 진행하고 있음.



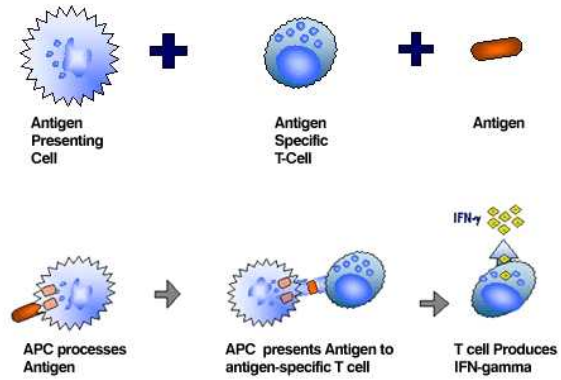
[그림 19] 투베르쿨린 검사

2) IFN- γ 검사법 (CerviGam)

(1) IFN- γ 검사법의 원리

- 결핵에 감염된 가축의 혈액을 채취하여 결핵항원(bPPD, aPPD, ESAT-6, CFP10 등)을 처리하여 혈액내에 존재하고 있는 Antigen presenting cell(APC)이 결핵항원을 인식하여 항원특이 T 세포에 정보를 전달하고 T 세포는 IFN- γ 등의 cytokine이나

chemokine을 분비하고, 분비된 cytokine중 IFN- γ 의 양을 ELISA를 이용하여 측정함.



[그림 20] IFN- γ 검사법의 원리 모식도

(2) 상용화된 IFN- γ 검사법(BoviGam)의 제한점

- 소와 사슴의 IFN- γ 를 측정하여 결핵을 진단할 수 있는 키트를 Cellestis사에서 Bovigam과 Cervigam을 생산하였으나, 현재 Cervigam은 생산중단되어 Bovigam만 구입 가능하며, 비용이 매우 고가이며 전량 수입에만 의존할 수 밖에 없음.
- Bovigam에 사용되고 있는 결핵항원은 결핵균 전체항원을 사용하여 유사 결핵균에 비특이 교차반응을 유도할 수 있고, 결핵균 전체항원을 사용하므로 항원 배치마다의 차이가 있을 수 있음.
- 결핵균항원에 자극받은 면역세포가 생산한 IFN- γ 양을 sandwich ELISA를 이용하여 측정하는 방법을 사용하고 있는 데, 번거롭고 표준 IFN- γ 없이 검사를 실시하여 정량화가 어려움.

3) 결핵감별법

- (1) 가축에서의 결핵병진단은 튜베르쿨린 피내반응검사를 이용하고 있으며, 사슴에서는 결핵균 유래 PPD와 조형결핵균 유래 PPD를 이용한 comparative cervical test (CCT)법이 널리 이용되고 있음.
- (2) BCG백신균주가 결핵균으로부터 유래되었기 때문에 결핵균 PPD를 피내반응검사에 이용할 경우 BCG접종동물에서도 양성반응을 나타낼 수 있음.
- (3) 가축의 전혈을 결핵균항원으로 자극하여 분비되는 IFN- γ 량을 측정하는 IFN- γ 검사법에도 튜베르쿨린검사와 마찬가지로 bPPD와 aPPD를 사용하고 있음.
- (4) 따라서 가축에서 결핵병예방을 위하여 BCG백신을 도입하고자 하는 많은 실험적 연구와 야외시험에도 불구하고 아직까지 방역정책으로 도입하기에 망설이는 큰 이유 가운데 하나는 BCG백신 접종동물과 결핵균에 자연감염된 동물의 감별진단이 어려워 검사에 의한 살처분 정책을 지속적으로 진행하기 어렵기 때문임.
- (5) 튜베르쿨린 검사와 IFN- γ 검사 모두에서 bPPD와 aPPD를 사용하고 있어 *M. avium* complex에 의한 의양성을 감별하는 데는 도움이 되지만, *M. tuberculosis* complex에 속하는 BCG백신을 사용할 경우 BCG백신에는 없고 *M. tuberculosis* complex에만 있는 결핵균 항원인 ESAT-6, CFP10 등의 항원을 사용할 경우 BCG 등의 백신을 사용할 경

우에도 결핵감염동물과 감별을 할 수 있음.

- (6) 소에서는 BoviGam이 결핵에 감염된 동물과 백신접종한 동물에 대한 결핵균 특이 항원을 사용할 경우 IFN- γ 의 분비량을 측정하여 감별이 가능하지만, 사슴의 경우 IFN- γ 을 측정하는 것이 결핵진단에 효율성이 낮아 새로운 면역학적 바이오마커를 발굴하여 감별진단법을 개발할 필요가 있음.
- (7) 따라서 최근에 널리 이용되고 있는 -omics technology와 FACS 또는 Luminex기법을 이용한 multi-cytokine 분석법 등을 포함한 새로운 기법을 적용할 경우 BCG백신 접종동물과 결핵균 감염동물을 감별하는 실험실 진단법의 개발이 가능할 것으로 판단됨.

제 2 절 사슴결핵 예방백신 개발 현황

1) BCG백신의 기원과 substrain

(1) BCG 백신의 기원과 개발

- BCG백신은 프랑스 파스퇴르 연구소의 Calmette와 의사인 Guerin이 *M. bovis*균을 121회 계대배양하여 병원성이 사라진 것을 확인하고 결핵예방백신으로 사용하게 되었음.
- 1920년대 노르웨이에서 간호학과 학생들을 대상으로 한 임상시험에서 효과가 입증되었음.

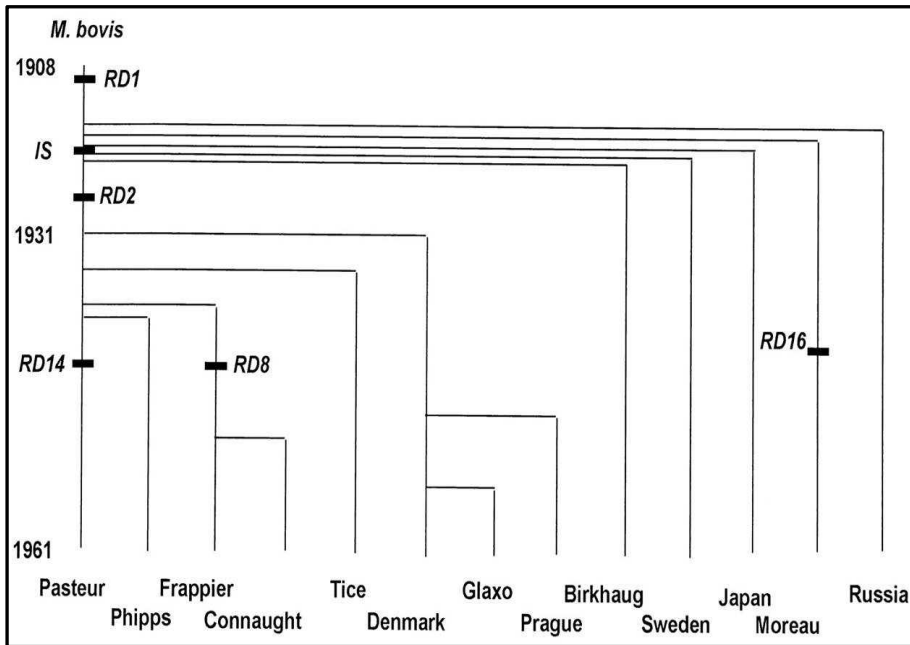


[그림 21] 우형결핵균에서 BCG백신을 개발한 Guerin과 Calmette

- 최초의 공식적인 임상시험은 1930년대에 아메리카인디언을 대상으로 실시되었음.
- 1차 및 2차 대전이후 질병이 확산되자 UNISCEF, Scandinavian Red Cross Societies, WHO의 후원으로 백신접종이 유럽 및 전 세계적으로 확산되었음.
- 초기의 BCG백신은 전 세계적으로 퍼져 다양한 BCG백신 종류를 가지게 되었음.
- 주요 BCG 백신은 Pasteur 1173P2, Danish, Tokyo등이며 남미 등에서는 Moreau BCG 백신균주를 사용하여 결핵예방백신으로 사용하고 있음.

(2) BCG백신의 substrain과 방어능력

- 다양한 BCG vaccine의 substrain이 존재하며 2004년도 사람의 경우, WHO에서는 substrain 간의 결핵 방어효능의 차이가 없다고 공시하였음.
- 하지만 최근 보고에 의하면 BCG vaccine의 효능은 substrain에 따라서 다르며 특히, BCG vaccine의 substrain에 따라서 유도하는 면역반응이 다르다는 보고가 있음.



[그림 22] BCG백신의 계통도와 substrain

- 또한, BCG를 접종하는 route, BCG vaccine을 접종하는 시기, BCG를 배양하는 조건에 따라서도 BCG vaccine의 효능이 달라진다는 보고가 있음.
- 따라서 본 연구에서도 국내 유행 사슴결핵균을 대상으로 어떠한 BCG substrain의 방어 능력이 가장 우수한지를 평가하고 이를 바탕으로 백신을 개발할 필요성이 있음.

Substrain간의 방어면역 유도 차이 (Selected from human study)

No.	Title	Year	Journal
1	The influence of BCG vaccine strain on the immune response against TB	2012	AJRCCM
2	BCG sub-strains induce variable protection against virulent pulmonary <i>M. tb</i> infection, with the capacity to drive Th2 immunity	2011	Vaccine
3	Delaying BCG vaccination from birth to 10 weeks of age may result in an enhanced memory CD4 T cell response	2009	Vaccine
4	The effect of BCG vaccine strain and route of administration on induced Immune responses in vaccinated infants	2006	JID
5	Complications of BCG vaccine SSI® recent story and risk management plan: the French experience	2013	PEDS
6	Non-specific effect BCG vaccine on the immune response to routine immunisations	2013	Vaccine
7	<i>In vitro</i> culture medium influences the vaccine efficacy of <i>M. bovis</i> BCG (Animal study)	2012	Vaccine

➤ 그러나 결론적으로 safety와 efficacy에서 higher priority를 나타내는 BCG는 없음

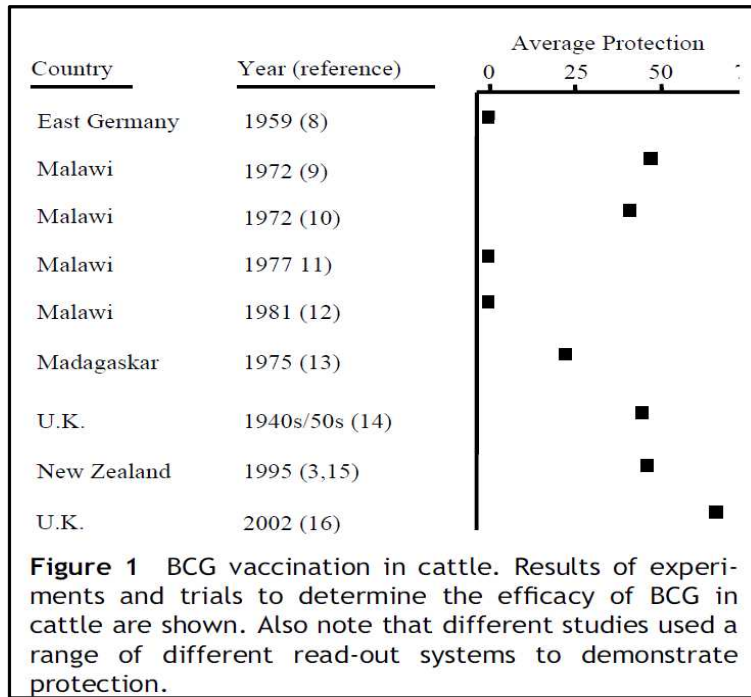
2) 가축결핵에 대한 BCG vaccine의 생산과 예방효과

(1) BCG백신의 생산

- BCG백신은 전 세계적으로 10개 이상의 국가나 회사에서 생산하고 있으며, 대부분 사람에게 사용하는 결핵백신이며, 덴마크의 Statens Serum Institute (SSI)에서 생산하는 BCG 백신 (Danish 균주)이 전 세계시장의 50% 점유하고 있음.
- 가축이나 야생동물에서 결핵병에 대한 예방백신으로 상품화되어 판매되고 있는 BCG백신은 없으나 뉴질랜드의 Immune Solutions Ltd.(Univ. of Otago 창업벤처회사)에서 GMP시설에서 생산하는 Pasteur 균주의 BCG백신을 생산하여 Possum 등에 대한 예방백신개발 연구를 수행하고 있음.
- 소와 사슴 등, 동물에서의 결핵병 예방을 위한 백신연구는 Pasteur 균주나 Danish 균주의 BCG백신을 사용하고 있으며, 예방효과는 대등할 것으로 판단됨.
- 우리나라에서 BCG백신의 생산시설은 (주)녹십자에서 확보하였으나 아직 균주의 선정과정 및 생산과 비임상시험, 임상시험, 식품의약품안전청의 허가 과정에 2-3년정도 소요될 것으로 예상됨.
- 문헌정보에 의하면 BCG Pasteur 균주와 Danish 균주 모두 예방효과를 보이고 있으나, 우리나라에서 향후 BCG 백신 생산균주로 Pasteur 균주가 선정될 개연성이 높기 때문에 본 과제를 통하여 국내유행 사슴결핵균을 대상으로 BCG substrain간의 효능이 대등하다면 향후 국내 개발과 시설에 부합하도록 BCG 1173 P2 균주를 사용하는 것이 타당함. 또한 Prof. Frank Griffin의 자문과 뉴질랜드에서 수행한 사슴결핵백신에서도 Pasteur 균주를 사용하였기 때문임. 본 연구과제에서는 뉴질랜드에서 생산하여 판매하고 있는 BCG Pasteur 백신 (Immune Solutions Ltd.(Univ. of Otago 창업벤처회사))을 수입하여 대조군으로서 사용함으로써 예방효과의 비교시험, BCG백신의 희석시 분산도, 생존균 수의 측정 및 생존균 대비 사멸균의 비율 등 기본적으로 생물학적 지표를 측정하여 향후 국내에서 생산될 사슴결핵용 BCG백신의 생물학적 특성규명에 참고자료를 확보할 예정임.

(2) 소의 결핵에 대한 BCG 백신의 예방효과

- BCG 백신은 사람에서 결핵예방을 위한 백신으로 널리 이용되고 있으나 개발 초기인 1911 최초의 유효성 평가실험은 소에서 진행되었으며, BCG백신을 접종받은 소는 폐사되지는 않았지만 대조군에서는 대부분 폐사되었음 (Waters WR, 2012).
- 1920년대 이후로 실험적 감염모델 또는 야외적용시험에서 BCG를 이용한 결핵 예방시험연구가 활발하게 진행되었으며, 그 일부의 결과는 아래의 그림과 같다. BCG에 의한 평균 방어율은 0%에서 75%까지 다양하였음 (Hewinson RG, 2003).



(Hewinson, RG. Tuberculosis 83:119-130, 2003)

[그림 23] 소의 결핵에 대한 BCG백신의 예방효과

- BCG백신을 접종한 소에서 결핵병에 대한 방어율이 0%인 경우는 접종량이 너무 많았거나, 예방백신 접종전에 감염, 또는 접종전에 자연계의 항산균에 감염된 것으로 추정되고 있음. 따라서 BCG 백신접종 동물과 결핵균에 자연 감염을 감별할 수 없는 진단검사법 등을 감안하여 결핵예방을 위한 BCG 접종정책을 아직 사용하고 있지 못하고 있는 실정임.
- 그러나 최근에 ESAT-6항원과 CFP-10 항원에 기초한 IFN-gamma release assay (IGRA)로 결핵균 자연감염을 BCG 접종동물로부터 감별할 수 있는 방법이 개발됨에 따라 BCG백신을 결핵백신 예방을 위하여 사용하고자 하는 야외시험 연구가 진행되고 있음 (Faye, S. 2011와 Vordermeier, HA. 2002).
- 최근 발표된 문헌에 의하면 에티오피아에서 자연감염상태에서 BCG백신의 결핵 예방효과를 조사한 결과 병변의 정도 기준으로 56%, 결핵균 배양기준으로 61%, 그리고 식육으로 폐기처분 기준으로 할때는 68%의 예방효과를 보였음 (Ameni G, 2010).

(3) 사슴 결핵에 대한 BCG백신의 예방효과

- 사슴에 대한 예방백신 연구는 미국에서는 젓소에 대한 주요 결핵균 감염원으로 야생사슴이기 때문에 젓소에 대한 결핵병퇴치를 효과적으로 달성하기 위하여 야생사슴에 대한 예방백신을 투여하기 위하여 진행되고 있음 (Palmer MV, 2007; Nol P, 2008).
- 한편, 뉴질랜드에서는 사슴이 주요 경제적 동물로 간주되어 사슴농장에서 결핵병퇴치정책의 한 방법으로 사슴결핵백신 연구를 수행하였으나 감염목장의 수가 현저히 적어지고, 비용대비 효과를 고려하여 현재는 예방백신개발 연구는 중단된 상태임 (Griffin JF.

1999)

- 사슴을 대상으로 결핵균 감염에 대한 BCG백신의 예방효과를 가장 체계적으로 수행한 연구결과에 의하면 아래의 표에서 보여주듯이 대조군에서는 90%의 감염률과 70%에서 결핵병으로 판정되었으나 BCG(생존균) 접종군에서는 50%의 감염률과 10%에서만 결핵병으로 판정되어 BCG 백신의 예방효과가 매우 높음을 제시하였음.

<표 5> 사슴결핵에 대한 BCG백신의 예방효과

Table 1. Variables that affect the protective efficacy of BCG in deer challenged experimentally with virulent *Mycobacterium bovis*.

Outcome of challenge	Primary or booster vaccination					Vaccine dose, cfu				
	L-BCG ^a	L-BCG ^b	K-BCG ^c	D-BCG ^d	Control	5 × 10 ⁴	5 × 10 ^{7e}	5 × 10 ^{7f}	5 × 10 ^{8e}	Control
Uninfected	5/10	8/10	1/10	1/10	1/10	4/5	4/5	5/5	2/4	0/5
Infected	5/10	2/10	9/10	9/10	9/10	1/5	1/5	0/5	2/4	5/5
Diseased	1/10	1/10	7/10	7/10	7/10	0/5	0/5	0/5	1/4	3/5

NOTE. Data are no. of deer positive/no. tested.

^a Live freshly cultured BCG, single dose (2 × 10⁶ cfu).

^b Live BCG, 2 doses (2 × 10⁶ cfu).

^c Killed BCG in oil adjuvant, 2 doses (5 × 10⁷ cfu).

^d Dexamethasone treatment before administration of BCG, single dose (2 × 10⁶ cfu).

^e Live BCG.

^f Lyophilized BCG.

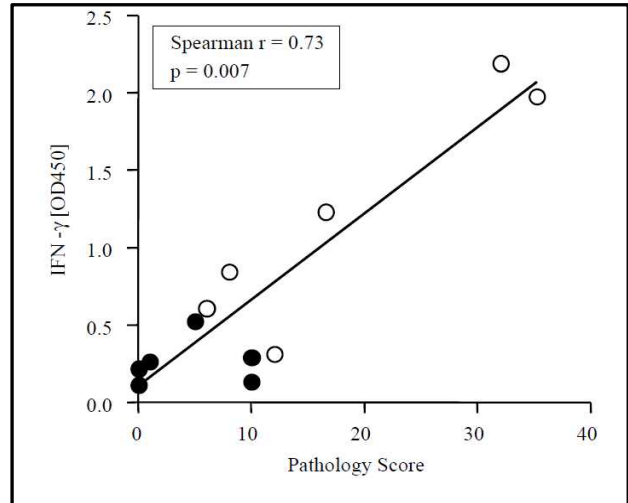
(Griffin, JF. Clin. Infect. Dis. 30 (Suppl 3): S223-8, 2000.)

- 그러나 상기 BCG백신의 사슴결핵 예방효과 검정을 위한 실험적 연구는 뉴질랜드의 꽃사슴 (red deer)를 대상으로 수행되었으며, 우리나라에서 주로 사육하고 있는 엘크를 대상으로 수행한 실험적 연구는 없기 때문에 이에 대한 연구의 필요성이 제기됨.
- 미국의 미시건주에 야생사슴 (white-tailed deer)에 대한 결핵균 전파를 차단하기 위한 BCG백신의 예방효과를 위한 실험적 연구에서 대조군에서는 커다란 병변이 50%에서 보였으나 BCG 접종군에서는 11%에서만 9.1%에만 발견되었음. 또한 미소병변은 대조군에서는 60% 그리고 BCG 접종군에서는 27.3%에서 발견되어 BCG 백신의 예방효과가 높음을 제시함 (Palmer MV, 2007).
- 따라서 사슴에서 결핵균 감염에 대한 BCG백신의 예방효과는 충분히 검증되었다고 판단되나 BCG백신을 사슴결핵 방역정책에 도입하기 이전에 우리나라의 여건에서 엘크를 대상으로 결핵균의 자연감염전파 여건에서 BCG백신의 예방효과를 검정하는 과정이 필요하다고 판단됨.
- 최종적으로 본 연구에서는 동물감염모델을 활용하여 국내 유행 사슴결핵균의 대표균주를 대상으로 BCG substrain간의 백신효능을 평가할 예정임.

3) 국내 사슴결핵에 대한 한국형 예방 백신 개발

(1) 국내 사슴 유래 결핵균의 유전자형과 한국형 백신의 필요성

- 본 연구책임자는 선행연구를 통하여 튜버클린 양성으로 판정받은 사슴의 폐병변에서 분리한 *M. bovis* 34균주에 대해 MIRU-VNTR방법을 이용하여 유전자형을 실시하였음. 각 locus에 대한 repeat unit의 repeat숫자를 이용하여 VNTR profile을 작성하였고 아래 표에 정리하였음.



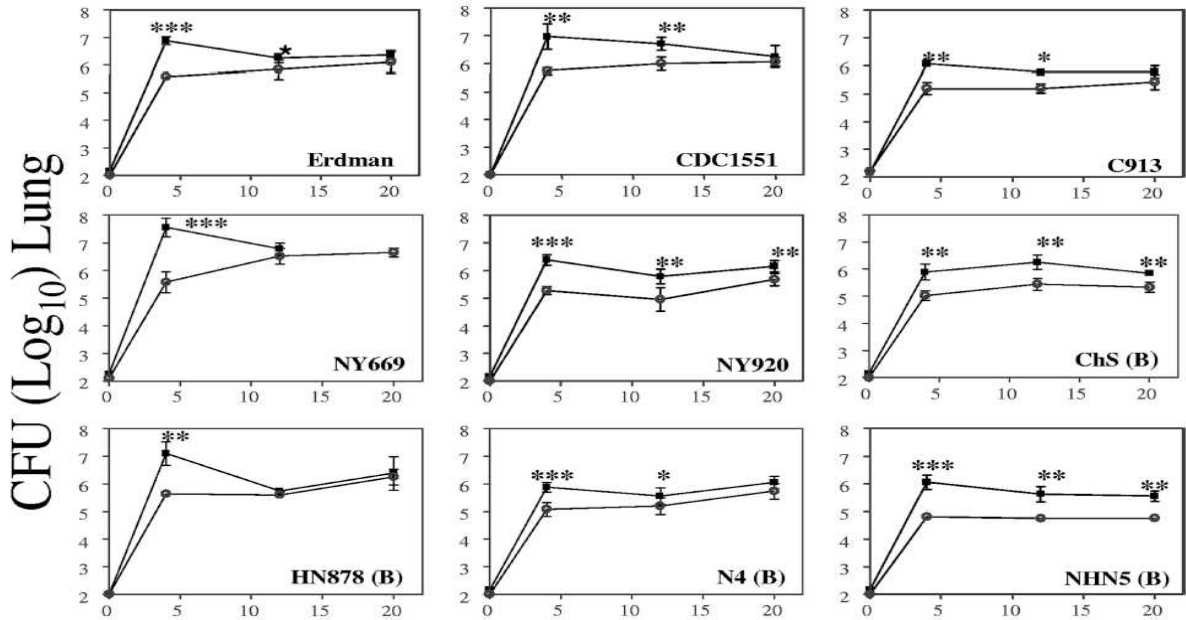
(Vordermeier, HA, IAI, 70:2026-3032, 2002)

[그림 24] 결핵감염에 대한 병리소견과 면역반응

- 기타 사용된 30개의 loci중 MIRU-2, MIRU-10, MIRU-16, MIRU-20, MIRU-23, MIRU-24, MIRU-26, MIRU-39, MIRU-40, ETR-C, QUB-15, QUB-18, VNTR-0424, VNTR-1895, VNTR-1955, VNTR-2347, VNTR-2990, VNTR-3690, VNTR-4156의 사용된 사슴에서 분리된 34개 *M. bovis*균주에 대하여 변이를 나타내지 않았음. MIRU-VNTR의 locus중 MIRU-4, MIRU-26, MIRU-31, ETR-A, ETR-B, QUB11a, QUB26, VNTR0424, VNTR1895, VNTR2401, VNTR3171, VNTR3232, VNTR3336 그리고 VNTR3690의 16 locus에 대하여 repeat unit의 변이가 나타났음.
- MIRU loci중에서 MIRU-31의 allelic diversity가 0.48로 가장 높았고, MIRU-4는 0.19, MIRU-27은 0.18의 allelic diversity를 나타내었음. ETR중에서 ETR-A와 ETR-B가 allelic diversity를 나타내었지만, 각각 0.08과 0.03으로 낮았음.
- 4개의 QUB loci중 QUB-26의 allelic diversity가 0.48로 가장 높았고 QUB-11a는 0.19의 allelic diversity를 나타내었음. 11개의 VNTR loci중 VNTR-3336이 0.50의 allelic diversity를 나타내어 사용된 loci중 가장 높은 수치를 나타내었음. VNTR-2401과 VNTR-3171의 allelic diversity가 0.48로 높게 나타났고, VNTR-3232는 0.03의 낮은 allelic diversity를 나타내었음.
- Allelic diversity가 0.4이상인 것은 MIRU-31, QUB26, VNTR-2401, VNTR-3171, VNTR-3336 loci로 5개가 국내에서 사슴에서 분리된 *M. bovis* 분리균주의 유전자형을 분석하는 데 유용한 것을 판명되었음.
- 한편 국내 사슴에서 분리된 결핵균의 유전자형은 K형이 44.1%, L형이 23.53%를 차지하여 전체 결핵균의 67.63%를 차지하였음.
- 따라서 본 연구에서는 한국 사슴결핵균 분리주에서 우세한 유전자형을 나타낸 K형과 L형에 속하는 균주를 대상으로 세포내 감염반응과 동물모델을 이용한 병독성, 면역병리학적 특성을 근거로 대표균주를 선정하여 실험에 사용하였음.

(2) 차세대 백신의 필요성

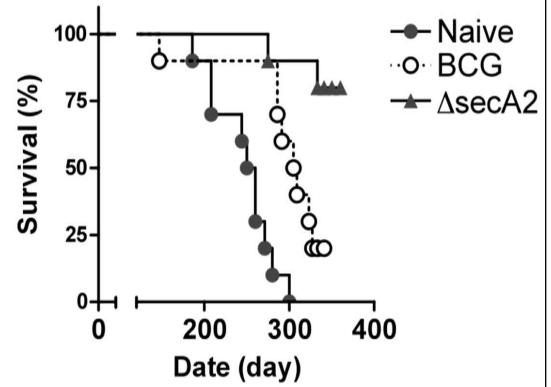
- 예방백신을 다양한 병원성의 결핵균으로 감염시켰을 때, 병원성이 약한 결핵균에는 예방효과가 잘 나타났으나 병원성이 높은 고병원성 결핵균의 감염에 대해서는 초기에는 예방효과가 나타났으나 만성으로 진행되면서 예방효과가 감소하였음.
- 특히 사슴이나 소 같은 대동물의 경우 결핵균감염이후 병변진행이 느린 편이어서 이에 대한 BCG백신 이상의 예방효과를 나타내는 결핵백신의 개발이 필요함.



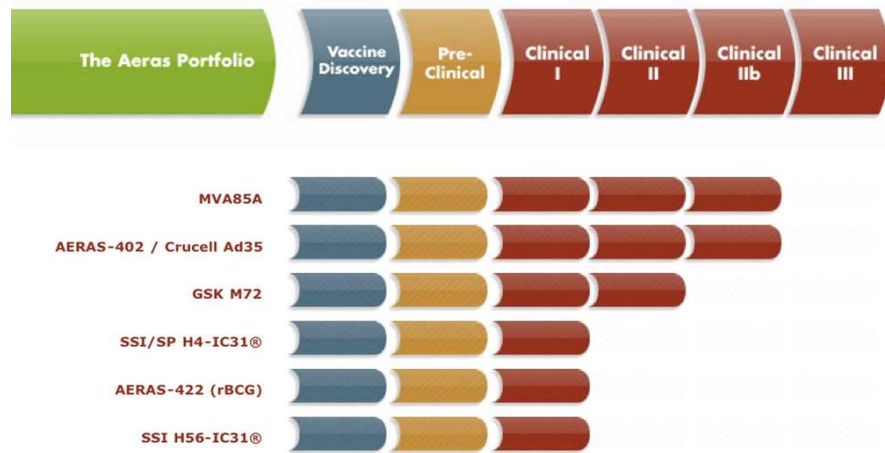
[그림 25] 다양한 결핵감염에 BCG백신의 예방효과의 차이

- 결핵을 예방하기 위하여 전 세계의 학교 및 연구소에서 예방백신을 연구개발하고 있음
- 기존의 BCG백신의 약점을 보완하기 위하여 결핵균 유전자 중 방어효과가 뛰어난 Ag85A, Ag85B, 72F 등의 항원을 발현하는 재조합 BCG백신을 개발하고 있음
- 결핵균에 대한 예방백신으로 사용되고 있는 BCG백신이 *M. bovis* (결핵균)에서 유래되었기 때문에 판단하고, 병원성 결핵균(*M. tuberculosis*)의 병원성 유전자를 제거하여 예방효과가 높으면서 안전성이 높이고자 MTBVAC01, MC²2020, MC²2030, auxotrophic vaccine을 개발하고 있음
- 생백신의 안전성이 문제가 될 수 있기 때문에 결핵균의 방어효과가 뛰어난 항원을 발굴하여 M72, Hybrid 1, HyVac4 등 subunit vaccine을 개발하고 있음
- 안전성이 뛰어나면서 면역원성이 높은 백신을 개발하고자, Adenovirus와 Lentivirus 등의 viral vector를 이용하여 결핵균의 방어항원을 발현시키는 것을 통하여 MVA85A, AERAS-402/CRucellAd35, AdAAg85A 등 예방백신을 개발하고 있음
- 여러 결핵예방백신후보들이 1상 임상시험을 마쳤고, 일부 백신이 2상 임상시험을 거치고 있거나 마친 상태임
- 결핵항원을 이용한 단백질 subunit 백신
- DNA 벡터에 결핵항원 또는 면역조절인자를 발현하는 DNA 백신

- 결핵항원 또는 면역조절인자를 발현하는 바이러스백터 백신
- 결핵균의 병원성 인자를 제거시킨 auxotrophic 결핵균 백신 등
- 그 밖에도 결핵예방백신의 면역원성을 높이기 위하여 결핵균의 방어면역을 유도하는 항원을 포함할 뿐 아니라 면역반응을 조절하는 cytokine인 IL-12, IFN-g 등을 동시에 발현하는 시스템을 활용하여 예방백신을 개발하고 있음. 또한, 면역반응을 조절하는 분자들인 PD-1, GITR, CTLA-4 등의 방어면역에 대한 관여정도를 연구하여 방어면역을 증대시키고자 하는 노력을 기울이고 있음. 또한 Th1 면역반응뿐만 아니라 Th17 등의 면역반응에 대한 연구를 통해 백신효과를 높이고자 노력하고 있음.



[그림 26] 결핵백신안정성 평가



[그림 27] 차세대 백신의 개발 진행상황

- 하지만 이러한 백신은 안정성이 담보된 adjuvant의 확보, 바이러스 백터 사용에 의한 중화항체 형성, 약독화 균주의 병원성 획득 등 많은 문제점이 있어 본 연구에서는 BCG를 기반으로 국내 사슴결핵 예방 백신을 개발하려함.

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

제 1 절

■ 국내 사슴 유래 우형결핵균의 유전자형 분석과 대표균주 선정

- 튜버쿨린 양성으로 판정받은 사슴의 폐병변에서 분리한 *M. bovis* 34균주에 대해 MIRU-VNTR방법을 이용하여 유전자형을 실시하였음.
- 각 locus에 대한 repeat unit의 repeat숫자를 이용하여 VNTR profile을 작성하였고 아래 표1에 정리하였음.
- 기타 사용된 30개의 loci중 MIRU-2, MIRU-10, MIRU-16, MIRU-20, MIRU-23, MIRU-24, MIRU-26, MIRU-39, MIRU-40, ETR-C, QUB-15, QUB-18, VNTR-0424, VNTR-1895, VNTR-1955, VNTR-2347, VNTR-2990, VNTR-3690, VNTR-4156의 사용된 사슴에서 분리된 34개 *M. bovis*균주에 대하여 변이를 나타내지 않았음.
- MIRU-VNTR의 locus중 MIRU-4, MIRU-26, MIRU-31, ETR-A, ETR-B, QUB11a, QUB26, VNTR0424, VNTR1895, VNTR2401, VNTR3171, VNTR3232, VNTR3336 그리고 VNTR3690의 16 locus에 대하여 repeat unit의 변이가 나타났음.
- MIRU loci중에서 MIRU-31의 allelic diversity가 0.48로 가장 높았고, MIRU-4는 0.19, MIRU-27은 0.18의 allelic diversity를 나타내었음. ETR중에서 ETR-A와 ETR-B가 allelic diversity를 나타내었지만, 각각 0.08과 0.03으로 낮았음.
- 4개의 QUB loci중 QUB-26의 allelic diversity가 0.48로 가장 높았고 QUB-11a는 0.19의 allelic diversity를 나타내었음.
- 11개의 VNTR loci중 VNTR-3336이 0.50의 allelic diversity를 나타내어 사용된 loci중 가장 높은 수치를 나타내었음.
- VNTR-2401과 VNTR-3171의 allelic diversity가 0.48로 높게 나타났고, VNTR-3232는 0.03의 낮은 allelic diversity를 나타내었음.
- Allelic diversity가 0.4이상인 것은 MIRU-31, QUB26, VNTR-2401, VNTR-3171, VNTR-3336 loci로 5개가 국내에서 사슴에서 분리된 *M. bovis* 분리균주의 유전자형을 분석하는 데 유용한 것을 판명되었음.
- 한편 국내 사슴에서 분리된 우결핵균의 유전자형은 K형이 44.1%, L형이 23.53%를 차지하여 전체 우결핵균의 67.63%를 차지하였음.
- 총 16균주의 국내 사슴유래의 우형결핵균의 배양을 시도하였고 오염이 없는 7균주를 최종 선별하였음.
- 특이하게도 우형결핵균은 항산균의 배양에 이용되는 7H9-OADC-Glycerol broth에서 잘 성장하지 않고 7H9-OADC-Sodium pyruvate 배지에서 성장함.
- 이를 bulk culture를 통하여 single cell로 만든 후, 실험에 사용하였음.

[Table 6] Genotype prevalence of the *M. bovis* isolates from Korean deer

Designation index	VNTR allele profile	No. of isolates(%) from Deers
J	3 5 3 2 7 5 A 3 4 2 3 4 3 A 3 2	1 (2.94)
K	3 5 3 2 7 5 A 3 4 2 4 4 3 A 3 2	15 (44.12)
L	3 5 3 3 7 5 A 3 3 2 4 5 2 A A 2	8 (23.53)
R	3 5 3 2 7 5 A 3 4 2 4 4 3 D 3 2	1 (2.94)
S	3 5 3 3 7 4 A 3 3 2 4 5 2 A A 2	1 (2.94)
T	3 5 3 3 6 5 A 3 3 2 4 5 2 A A 2	1 (2.94)
U	5 5 2 3 7 5 A 3 3 2 4 5 2 A A 2	2 (5.88)
V	3 5 3 2 7 5 A 3 4 2 4 4 3 A 8 2	1 (2.94)
W	3 5 3 2 7 5 S 3 4 2 4 4 3 A 3 2	1 (2.94)
X	5 5 2 3 7 5 A 3 3 2 4 5 2 A 3 2	1 (2.94)
Y	2 5 2 3 7 4 A 3 3 2 4 5 2 A A 2	1 (2.94)
Z	3 5 3 3 6 5 8 3 3 2 4 5 2 A A 2	1 (2.94)
Total	12	34 (100)

제 2 절

■ 국내유행 한국형 사슴결핵균의 세포내 감염/반응의 특성 분석

- VNTR-MIRU genotyping을 통하여 1차 대표균주 7균주를 선정
- 한국형 사슴결핵균의 세포내 특성을 규명하기 위하여 골수유래 수지상세포, 큰포식세포를 이용하여 보조자극인자와 MHC class I, II의 발현 분석, dextran-FITC 탐식능 측정, cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-10, IFN- α , IFN- γ) 측정, intracellular cytokine 분석하여 면역세포의 phenotype과 특징적 profile 확립하였음.

(1) BMDM 분리

- 골수 유래의 대식세포는 Celada 등에 의해 1984년 제안된 방법을 이용하여 분리함
- 마우스 대퇴골과 경골로부터 골수를 추출하고, 다음 조건의 세포배양액에 5-6일간 배양함
 - 배지 조성: IMDM, 1% P/S, 30% L929 cell-conditioned media, 10% FBS, 1% sodium pyruvate, 1% NEAA
 - 37°C, 5% CO₂ 조건으로 6일간 배양하여 실험에 사용함

(2) *M. bovis*의 7가지 균주의 처치에 따른 cytokine 측정

- BMDM에 *M. bovis*의 7가지 균주를 각각 MOI 10으로 처치 함
- 24 시간 후 세포배양액을 걷고 cytokine (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10) 측정
- R&D Duoset kit 사용

(3) 세포독성 (MTT assay) 측정

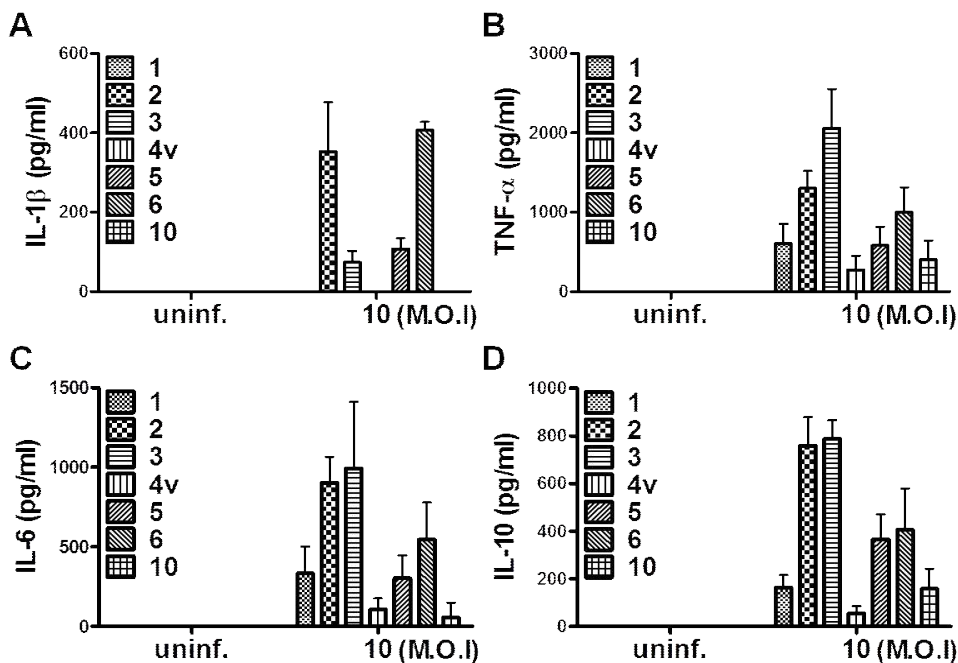
- BMDM에 *M. bovis*의 7가지 균주를 각각 MOI 10으로 처치 함
- 24 시간 후 세포 배양액을 제거하고 MTT solution 넣음
- 4 시간 후 DMSO로 용해 후 570nm에서 흡광도 측정

(4) BMDM의 phagocytosis 와 bacteria killing 측정

- BMDM에 *M. bovis*의 7가지 균주를 각각 MOI 0.5와 MOI 10으로 각각 처치 함
- 1 시간 후 Gentamicin을 처치 30min 후 Triton X-100을 처리하여 세포를 lysis 시킴
- 7H10 agar에 lysis된 세포를 plating 하여 colony counting
- 24, 72 그리고 144 시간 후 Triton X-100을 처리하여 세포를 lysis 시키고 7H10 agar에 plating 하여 colony counting

(5) BMDMs에서 *M. bovis* 야의 분리주들에 의한 cytokines 생성 평가

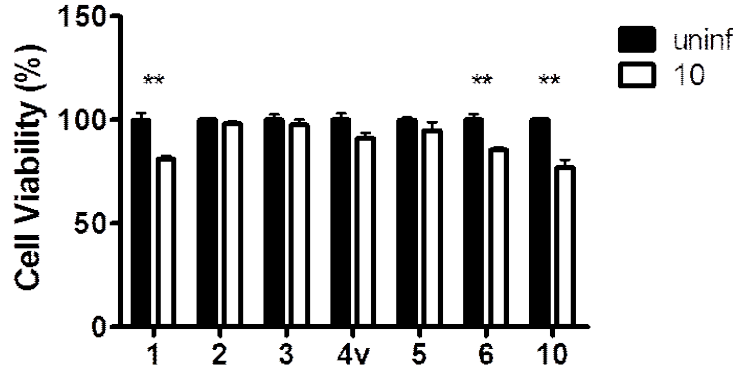
- 7가지의 *M. bovis* 야의 분리 균주들에 의한 macrophages에서의 IL-1 β , TNF- α , IL-6 및 IL-10 생성을 ELISA 법으로 측정하였다. 실험결과 IL-1 β 는 2, 6번 strain이 그리고 나머지 TNF- α , IL-6 및 IL-10은 2, 3, 5, 6번 strain에 의해 다른 균주보다 많이 생성됨을 확인할 수 있었다.



[그림 27] BMDMs에서 *M. bovis* 야의 분리주에 의한 cytokines 생성 평가. BMDMs에 MOI 1/10의 *M. bovis* 야의 분리주를 감염시킨 후, 24시간째에 세포 배양액으로부터 IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C), IL-10 (D)를 ELISA 법으로 측정함

(6) BMDMs에서 *M. bovis* 야의 분리주들에 의한 세포독성 (MTT assay) 측정

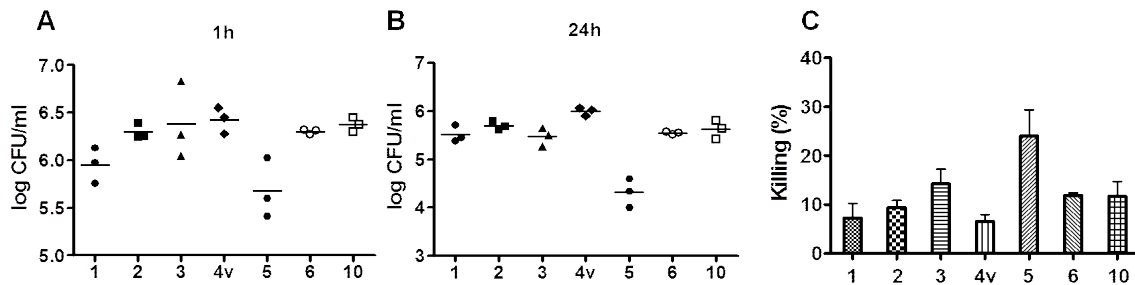
□ *M. bovis* 야의 분리주들의 세포 독성능을 평가하기 위해 MTT assay를 실시하였다. 실험 방법은 1)에서와 동일하게 수행하였다. 실험 결과 1, 6, 10번 균주가 대조군 세포 및 다른 균주에 비해 감염 24시간 만에 유의적인 세포 독성능이 있음을 확인할 수 있었다.



[그림 28] BMDMs에서 *M. bovis* 야의 분리주에 의한 세포 독성능 평가 (MTT assay)

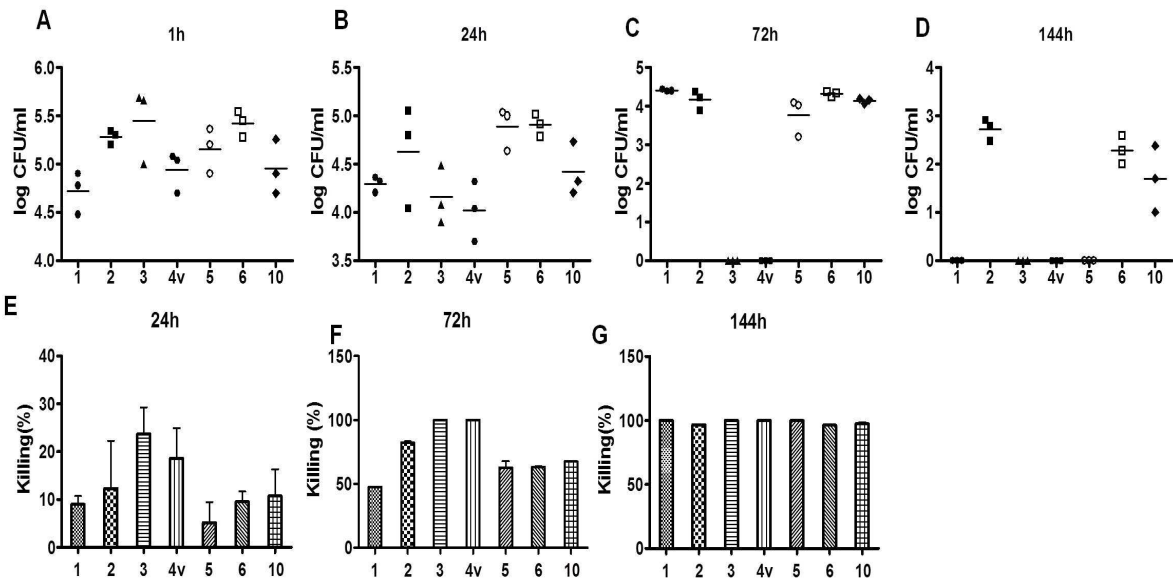
(7) *M. bovis* 야의 분리주들에 대한 macrophages의 phagocytosis와 bacteria killing 능력 측정

□ BMDMs에 분양받은 7 가지의 *M. bovis* 분리주를 MOI 10으로 감염시키고 각 분리주에 대한 macrophages의 phagocytosis 및 killing 능력을 CFU 측정법을 통해 확인하였다. 감염 1시간 후에는 5번 분리주를 제외한 나머지 *M. bovis* 분리주는 비슷한 양상의 phagocytosis 능력을 보이는 것으로 확인되었다 (그림 16A). 감염 24시간 후에 CFU를 다시 측정하였고 (그림 16B), 1시간 쯤의 CFU와 비교하여 killing 능력을 평가하였다. 실험 결과 다른 분리주와 비교하여 5번 분리주에 대한 bacterial killing 능력이 높게 나와서 상대적으로 병원성은 다소 낮은 것으로 판단되었다.



[그림 29] *M. bovis* 분리주들에 대한 macrophages의 phagocytosis와 bacteria killing 능력. BMDMs에 각 분리주를 MOI 10으로 감염시킨 후, 1시간 (A)과 24시간 (B)에 CFU를 측정하였음. 두 시간대의 CFU를 비교하여 bacterial killing 능력을 평가함 (C)

□ 추가적으로 24시간 이후의 long-time에 대한 효과를 확인하기 위해 MOI를 0.5로 낮추고 감염 시간을 72, 144시간까지 연장하여 3)과 동일한 실험을 수행하였다. 실험 결과, 감염 1시간째 2, 3, 5, 6번 분리주에 대한 macrophages의 phagocytosis가 비교적 잘 일어나는 것으로 확인되었고, 24시간에 2, 3, 4번 분리주의 30% 정도가 killing 되는 것을 확인하였으며 72시간에는 90%정도 killing 되며, 144시간에는 7가지 균주 모두 killing 되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 MOI 10에서의 연구 결과와 다소 차이가 있는 것으로 in vitro 실험에서 MOI에 따른 결과의 차이가 있음을 알 수 있었으며 따라서 다양한 조건의 실험 결과의 비교가 필요한 것으로 판단됨.

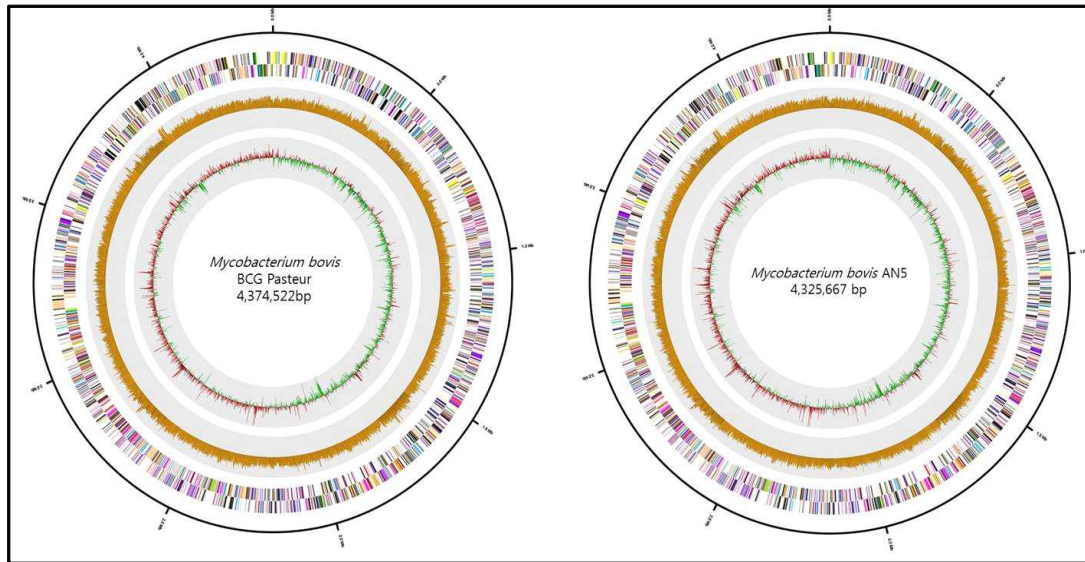


[그림 30] *M. bovis* 분리주들에 대한 macrophages의 phagocytosis와 bacteria killing 능력. BMDMs에 각 분리주를 MOI 0.5로 감염시킨 후, 1 시간 (A), 24 시간 (B, E), 72 시간 (C, F) 그리고 144 시간 (D, G)에 CFU를 측정하였음.

제 3 절

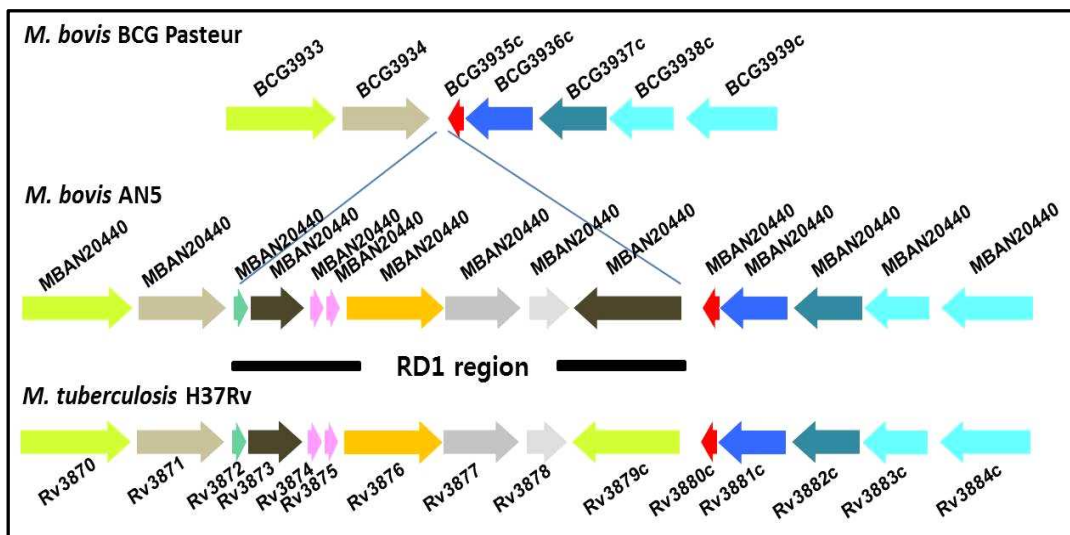
■ 국내 유행 사슴결핵균 분리주의 분자유전학적 특성 분석을 통한 면역원성 항원 개발: 특이 항원 및 면역원성 항원 개발

- 국내 유행 사슴결핵균의 대표 균주 선정 및 Whole Genome Sequencing과 comparative genomics를 통한 분자 유전학적 특성 분석: 마우스 감염모델과 VNTR-MIRU genotyping을 통하여 선정된 2개의 대표 균주에 대한 비교유전체 분석 실시.



[그림 31] BCG Pasteur strain과 임상 분리균주 AN5 strain의 유전자 지도 예시

- ORF와 Cluster 분석을 통하여 국내 유행 사슴결핵균에 공통적으로 존재하는 특이적 ORF를 선정하고, *E. coli* vector와 pVV16 항산균 vector를 이용하여 유전자 재조합 단백질을 생산



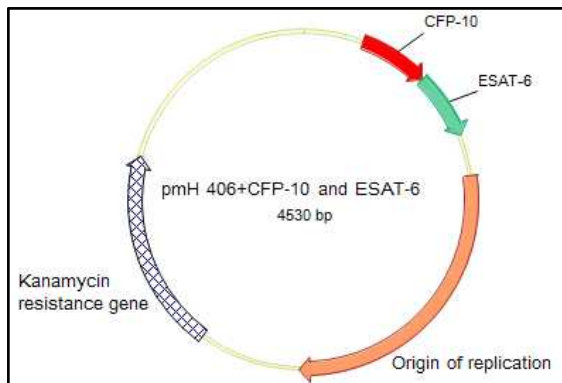
[그림 32] 특이적 병원성 / 면역원성 인자를 포함하는 RD1 region의 비교, 분석

- 결핵은 동물과 사람 사이에 상호 전파 될 수 있는 인수공통전염병으로, 결핵에 감염된 사슴의 녹용 및 녹혈, 고기 섭취를 통해 사람에게 감염되는 사례가 증가하고 있음. 감염 초기에는 특징증상이 없어 발견하기 어렵고 치료가 쉽지 않아 질병에 걸린 가축은 살처

분을 해야 하지만, 이를 진단하는 검사방법이나 체계적인 관리가 미흡함.

- 현재 국내에서 사육되고 있는 사슴의 상당수가 결핵에 감염되어 있으나, 아직까지 이를 검사하는 전형적인 검사방법의 개발 및 새로운 백신개발이 시급함. 따라서 본 연구에서는 항결핵 백신 후보군으로 주요하게 부각되고 있는 ESAT-6, CFP-10, RpfB, RpfE 등을 발현하는 recombinant BCG strain을 제작하여 이를 이용한 새로운 사슴 결핵 백신을 개발하고자 하였음.

(1) 결핵균 특이적 항원을 발현하는 벡터의 제작

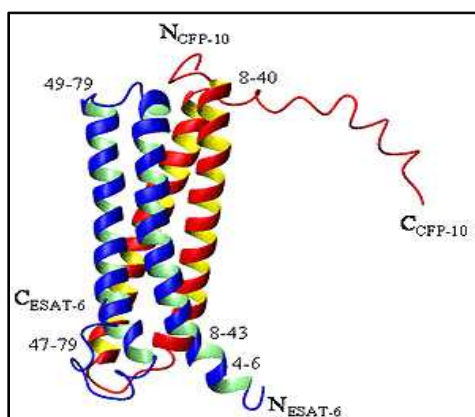


[그림 33] CFP-10과 ESAT-6를 발현하는 벡터의 제작

- 결핵균의 특이적인 항원 중 주로 균의 외부로 분비되는 분비단백질인 ESAT-6와 CFP-10은 복합체를 형성하여 결핵균의 외부로 분비되는 것으로 알려짐.
- 이 복합체는 그림21와 같은 3차구조를 가지며, 분비경로를 통하여 결핵균 외부로 분비되는 것으로 알려져 있음.
- 이러한 항원성을 가지는 ESAT-6, CFP-10 단백질은 결핵균의 genomic DNA의 RD1 region에 존재하며, 이 부분은 유전자들은 결핵균 특이적인 분비 시스템을 구성하고

있으며 이러한 양상은 virulent한 균주들에서만 나타남.

- 결핵균의 RD1 region이 결실된 strain에서는 쥐를 대상으로 실험하였을 때, 결핵균에 의한 독성이 나타나지 않았으며, 영양류를 이용한 다른 실험에서는 영양류의 혈청 항체가 결핵균의 특이적인 ESAT-6와 CFP-10을 인식하는 특이적인 반응을 나타냄.

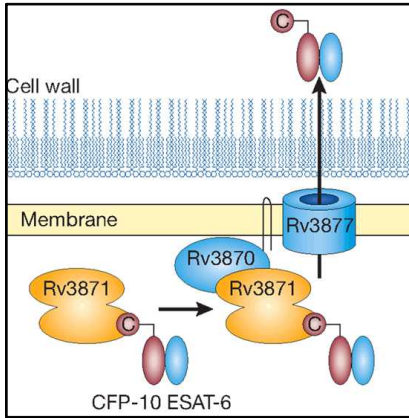


[그림 34] CFP-10과 ESAT-6 복합체의 구조

- 이러한 중요성들 때문에, ESAT-6, CFP-10단백질을 발현하는 expression vector를 제작하였음. ESAT-6, CFP-10의 발현을 위하여 사용된 벡터는 pMH406이며, 이 벡터는 fusion protein을 constitutive하게 발현시켜 주는 것으로 알려져 있음.

- Resuscitation-promoting factor로 알려진 RpfB, RpfE는 본연구진의 의하여 항결핵 효과로서의 우수한 효과가 입증되었으며, 이는 dormancy에 빠져 reactivation 되는 결핵들에 예방하는데 크게 기여할 것으로 사료됨. 따라서 이를 이용한 recombinant BCG 균주를 제작하기 위하여 RpfB,

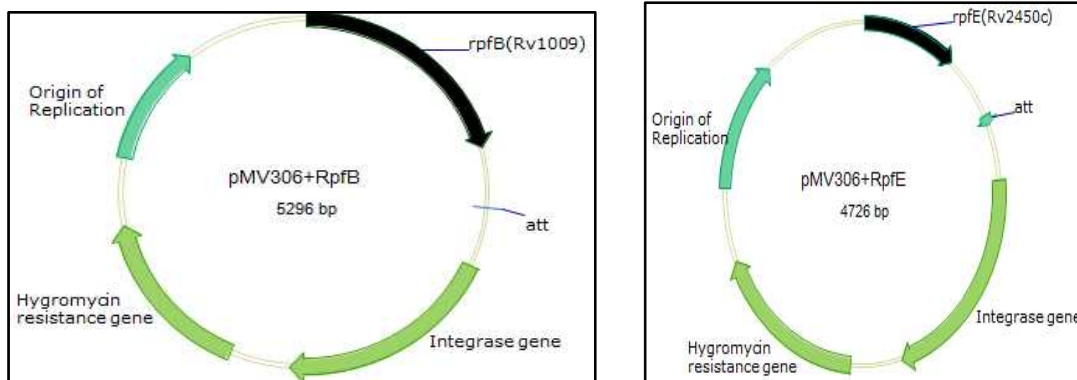
RpfE를 발현하는 벡터를 제작함.



[그림 35] CFP-10과 ESAT-6 복합체의 분비경로

형질전환을 위하여, 0.2 cm의 형질전환용 cuvette에 100 μ l의 competent cell과 300 ng의 DNA를 넣고 2.5 kV/cm, 25 μ F, 1000 Ω 의 조건으로 약 17 msec간 electroporation하였음.

- 형질전환을 수행하기 전 얼음에 10분간 방치하였고, 형질전환 수행 후 얼음에 10분간 방치한 뒤 cuvette당 0.5 ml의 7H9-OADC 배지를 첨가하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였음.
- 그 다음 hygromycin (50 μ g/ml) 또는 kanamycin (50 μ g/ml)이 첨가된 고체 7H10배지에 형질전환 시킨 균주를 도말하였음.



[그림 36] RpFB (왼쪽)와 RpFE (오른쪽)를 발현하는 벡터의 제작

(3) 발굴항원의 면역학적 특성 분석 및 마우스 immunization을 통한 T cell의 활성화 분석을 통한 백신항원으로써의 타당성 검증

- 생산된 유전자 재조합 단백질의 세포학적/면역학적 기능 분석
- 특히, 발굴된 항원 중 in vitro screening을 이용하여 수지상세포를 활성화시키며, 수지상세포 자극을 통하여 Th1-type의 T-cell 면역반응을 유도할 수 있는 항원을 전략적으로 탐색하였음.

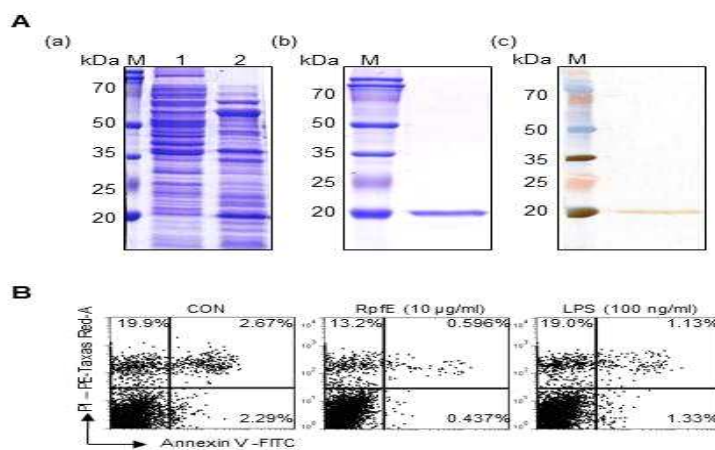
- 특이적 면역현상 분석 (선천 면역 포함, 질병발달에 따른 Th1/Th2/Th17의 면역균형 분석)을 분석하여 항원의 특성을 규명하였음.

제 4 절

■ 백신항원으로써의 RpfE 항원의 면역학적 특성 분석

(1) 결핵균의 잠복 관련 항원의 동정 및 세포 독성 확인

- 결핵의 잠복기에서 유도되는 항원으로 알려진 RpfE는 결핵의 성장 또는 복제 단계에서 높게 발현되는 항원으로 보고됨



[그림 37] RpfB의 정제와 세포독성 확인

- RpfE 단백질을 유전자재조합으로 생산하였음
- 마우스의 골수세포를 분리하여 GM-CSF와 IL-4를 통한 골수 유래 수지상세포 (bone marrow derived dendritic cells) 분화 후 RpfE 자극에 의한 세포독성 여부를 annexin V/PI 염색을 통하여 확인
- 그 결과 RpfE ($\leq 10 \mu\text{g/ml}$)는 수지상세포에서 세포 독성을 보이지 않음.

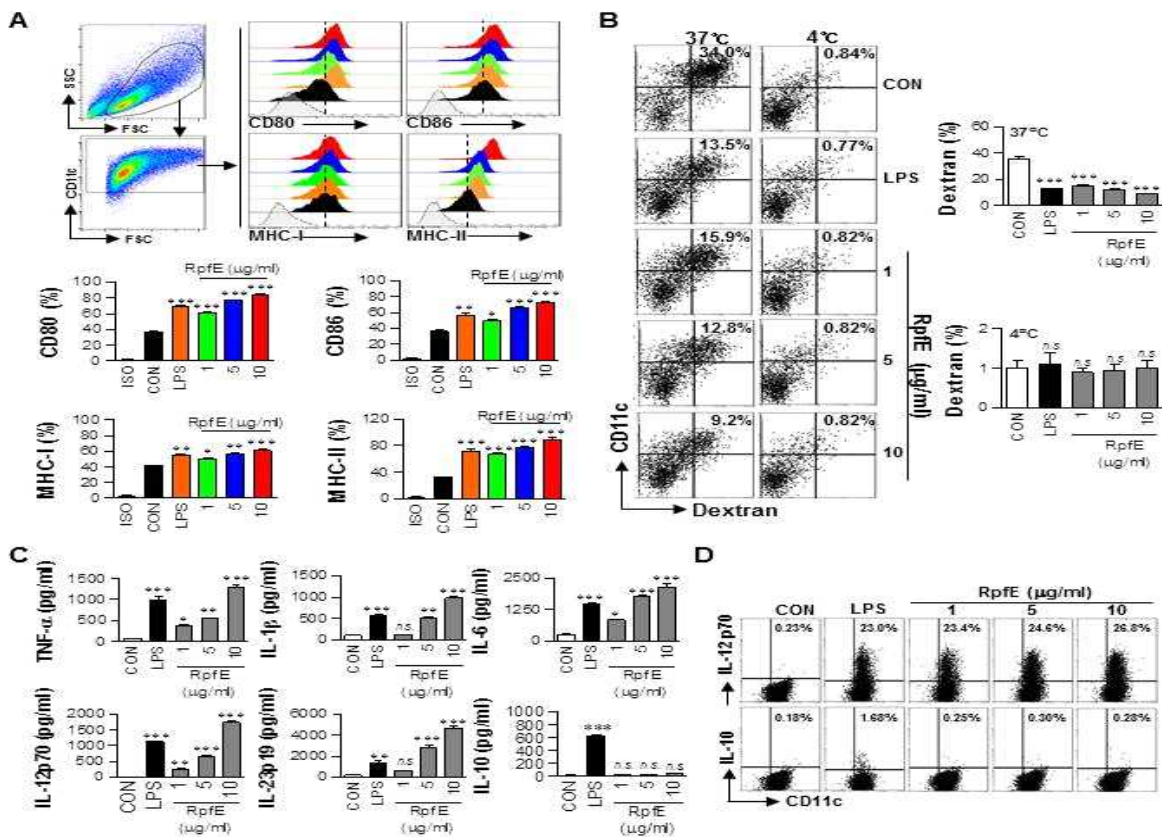
(2) RpfE에 의한 수지상세포의 성숙 및 유도 면역

- 수지상세포 성숙의 특징으로는 다양한 표면분자들의 발현 (costimulatory molecules, MHC calss molecules), antigen uptake의 감소 및 사이토카인의 분비의 증가를 볼 수 있음
- 따라서 RpfE에 의해 자극된 수지상세포의 표면분자, 사이토카인 분비, antigen uptake 능력 등을 확인함
- 그 결과 RpfE 처리에 의해 수지상세포에서 costimulatory molecules (CD80, CD86), 과 MHC calss molecules (MHC I, MHC II) 과 같은 표면 인자들의 발현이 증가하였음
- 수지상세포의 성숙화에 따른 다양한 사이토카인의 발현은 Th1 면역반응을 유도할 수 있는 IL-12p70과, Th17 면역을 유도할 수 있는 IL-23p19와 IL-6의 발현이 유의적으로 증가하

였지만, Th2 면역반응을 유도하는 IL-10의 발현에는 영향을 주지 않았음.

(3) 수지상세포의 RpfE 자극 시 세포 수용체 의존 수지상세포 성숙 유도 분석

- 결핵균은 TLR2와 TLR4를 통하여 항원제시세포(antigen presenting cells, APCs)를 활성화시킬 수 있을 뿐만 아니라 다양한 결핵균 유래 항원들(PE, PPE, lipoproteins, heat shock proteins)도 APCs를 성숙 또는 분화 유도할 수 있다고 보고됨
- 본 연구에서는 FACs에 의한 binding assay, blitz binding assay, Immunoprecipitation (IP), Western blot, Confocal, cytokine 분석을 통하여 RpfE가 어떠한 TLRs 수용체를 통하여 수지상세포를 성숙시키는지 분석하였음
- 위의 모든 분석방법들을 바탕으로 RpfE는 TLR4에 결합하여 수지상세포를 성숙시킨다는 사실을 확인 할 수 있었음.

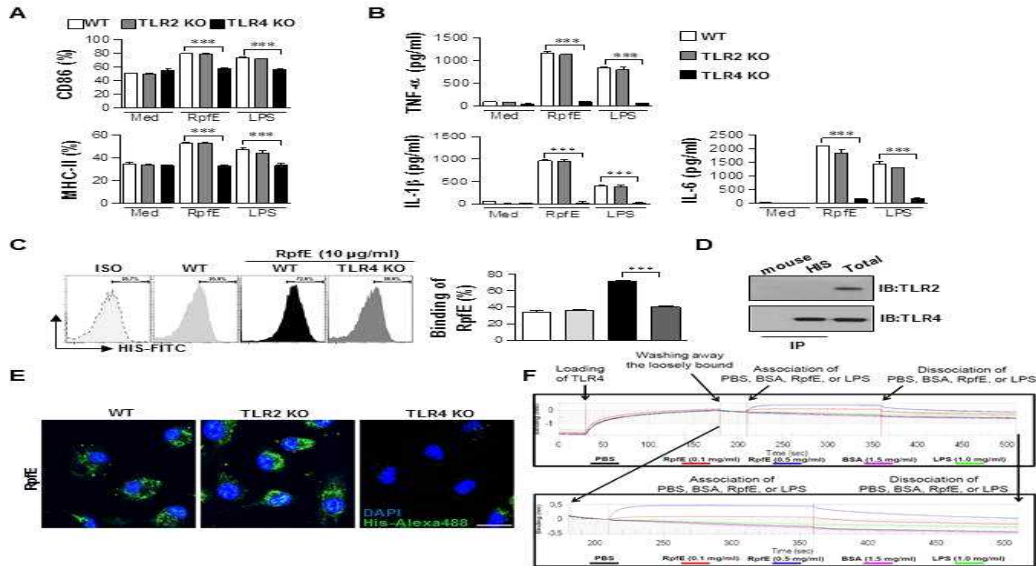


[그림 38] RpfE에 의한 수지상세포의 성숙화분석

(4) RpfE가 수지상 세포의 신호전달계에 미치는 영향 및 성숙과의 연관성 분석

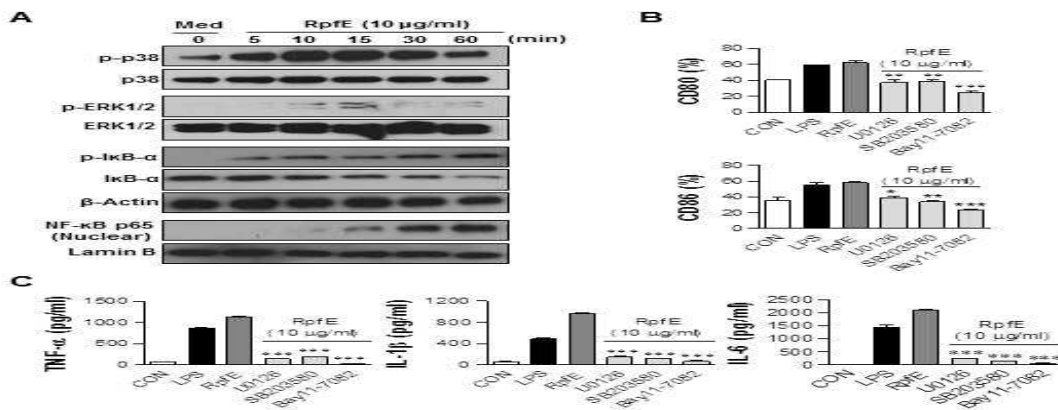
- 수지상세포는 성숙과정 중에 ERK, JNK, p38 등의 MAPK(mitogen-activated protein kinases) 및 NF-κB(nuclear factor-kappa B) 신호전달계가 활성화된다고 알려져 있음
- 본 연구에서는 RpfE를 수지상세포에 자극 시 p-p38, p-ERK, p-JNK, p-IκB-α의 증가 및 IκB-α의 감소를 western blot를 통해 확인하였음

- 그 결과 RpfE는 MAPK 및 NF- κ B와 같은 신호전달계가 활성화시킨다는 것을 확인할 수 있었음
- 또한 이러한 신호전달계에 대한 각각의 inhibitor 처리를 통해 RpfE에 의한 수지상세포 성숙에서 MAPK 및 NF- κ B 신호는 중요한 요인이라는 것을 확인 할 수 있었음.



[그림 39] RpfE에 의한 세포수용체와 수지상세포의 성숙화분석

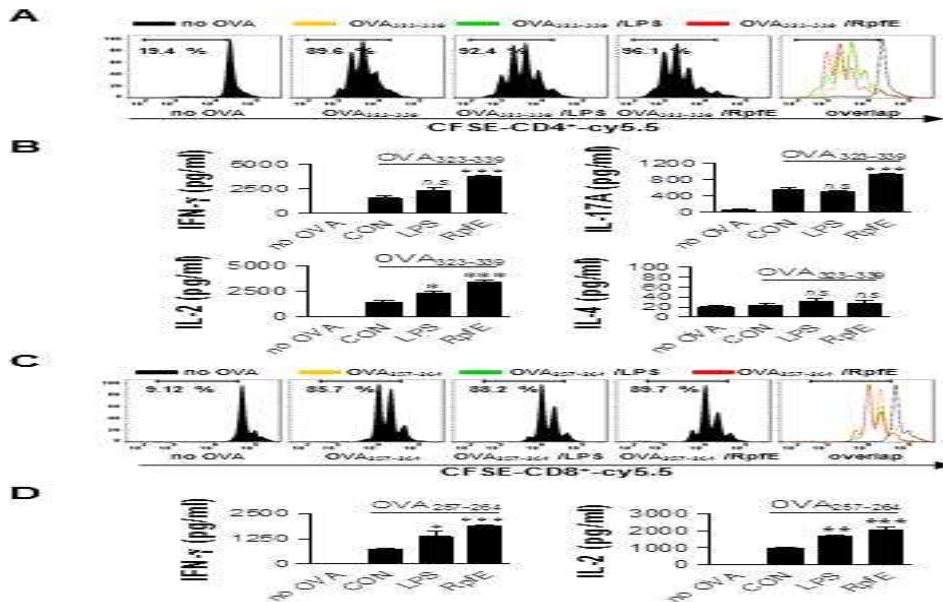
(5) RpfE를 통해 성숙화 된 수지상세포에 의한 Naive T cell의 증식 및 면역 반응 분석



[그림 40] 신호전달체계 분석

- 박테리아, 바이러스, pathogens 유도 항원들에 의해 성숙된 수지상 세포의 생체 내에서의 가장 큰 기능은 CD4 T cell의 증식과 분화를 유도할 수 있고, CD8 T cell (Cytotoxic T cell, CTL)을 활성화 시킬 수 있다는 것임

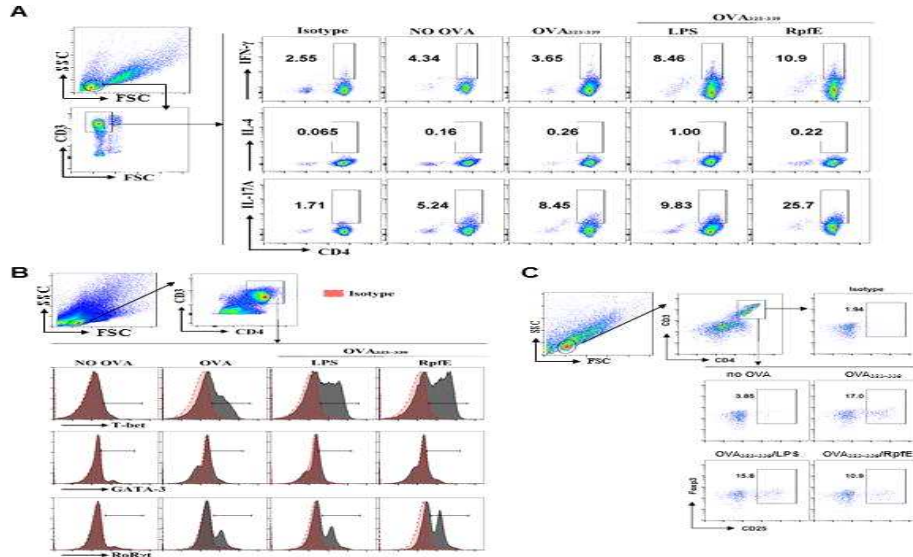
- 앞의 연구에서 RpfE에 의해 성숙화 된 수지상세포는 naive T cell의 증식과 분화에 영향을 미칠 가능성을 보여 줌
- 본 연구에서는 Ovalbumin Transgenic mouse (OT-I, OT-II)의 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포를 분리 후 RpfE로 성숙화된 수지상 세포와 함께 배양한 뒤 유 세포 분석 방법과 ELISA를 이용한 T cell의 증식과 간접적인 T cell type을 확인함
- 그 결과 CD4와 CD8 T cell의 증식을 유도하였고, CD4 T cell에서 Th1 면역반응의 대표적인 사이토카인 IFN- γ 와 T cell 증식에 중요한 IL-2의 생성이 증가되었지만, Th2 면역반응의 사이토카인 IL-4는 증가하지 않음. 또한 CD8 T cell의 활성화에서 유도되는 사이토카인 IFN- γ 와 IL-2가 유도되었음.



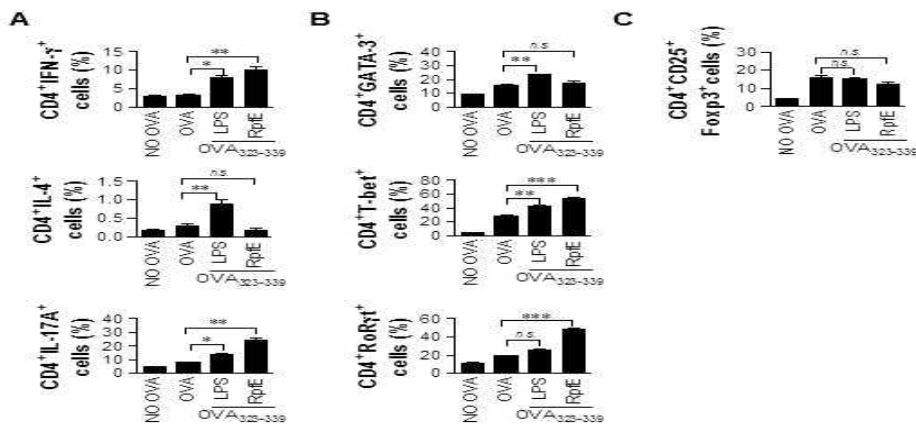
[그림 41] Naive T cell의 활성화분석

(6) RpfE를 통해 성숙화 된 수지상세포에 의한 Naive T cell의 면역 편향화 분석

- 성숙 수지상 세포에서 유도되는 cytokine들은 T cell의 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있어 본 연구에서는 RpfE에 의해 성숙화 된 수지상세포에 의한 CD4 T 세포의 분화 유도되는 types (Th1, Th2, Th17, Treg)을 intracellular staining 후 유 세포 분석기를 통해 분석하였음.
- 그 결과 RpfE에 의해 성숙화 된 수지상세포는 CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ T cell (Th1 cell), CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺ T cell (Th17 cell)을 유도하는 것을 확인 할 수 있었고, CD3⁺CD4⁺IL-4⁺ T cell (Th2 cell)과 CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cell (Treg cell)은 유도하지 않는 것을 확인 할 수 있었음.



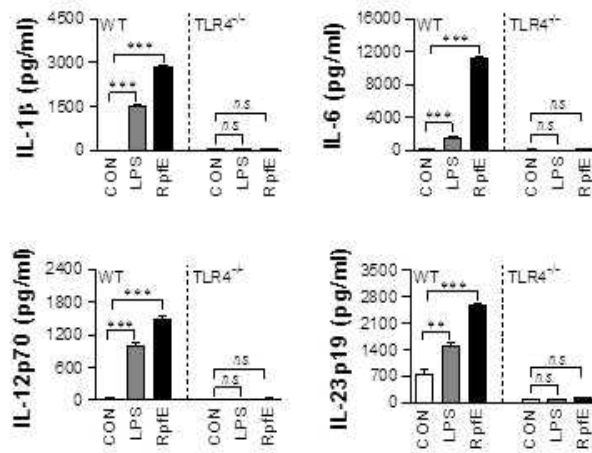
[그림 42] T cell types 분석법



[그림 43] Naive T cell의 면역편향화 분석

(7) RpfE에 의한 성숙 수지상세포에서 TLR4 ligation이 T cell 분화에 미치는 사이토카인 영향 분석

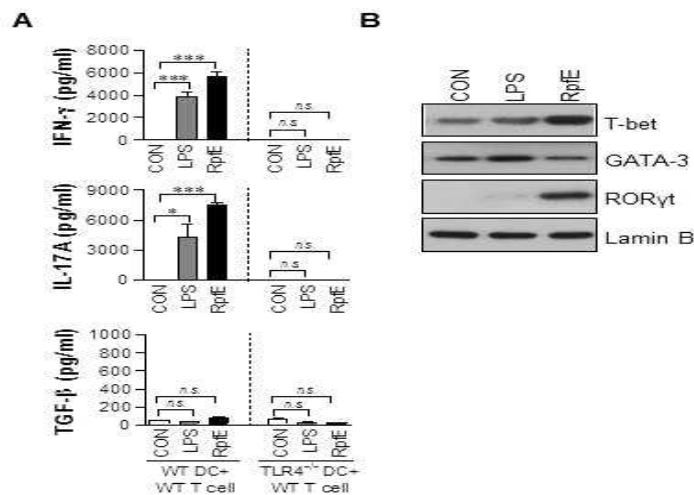
- 다양한 TLR들은 다양한 pathogen들에 의해 유도되는 선천성 및 후천성 면역계에 깊이 관여 하면서 방어 면역시스템이 구축된다고 알려짐
- 따라서 본 연구에서는 RpfE를 통한 성숙 수지상세포로의 유도에서 TLR4가 T cell 분화유도에 관련 된 사이토인에 미치는 영향을 분석
- WT 마우스로부터 분화 유도된 수지상세포에서는 Th1과 Th17을 유도하는 사이토카인들 (IL-1 β , IL-6, IL-12p70, IL-23p19)이 생성됨을 ELISA를 통해 확인하였음
- 반면 TLR4^{-/-} 마우스로부터 분화 유도된 수지상세포에서는 Th1과 Th17 과련 사이토카인들의 유도가 일어나지 않았음.



[그림 44] TLR4에 의한 Th1/Th17-polarizing cytokines 영향분석

(8) RpfE와 TLR4 ligation에 의한 성숙 수지상세포에서 유도되는 Th1과 Th17분화에서의 영향

- Naive 마우스의 비장을 분리해 CD4⁺ T cell을 MACS system으로 분리한 뒤 RpfE로 성숙화된 수지상 세포 (WT, TLR4^{-/-})와 함께 배양한 후 ELISA를 이용한 T cell 유도 사이토카인 분석과 Western blot을 통한 T cell transcription factors (T-bet, GATA-3, RORγt)들의 발현을 분석하였음

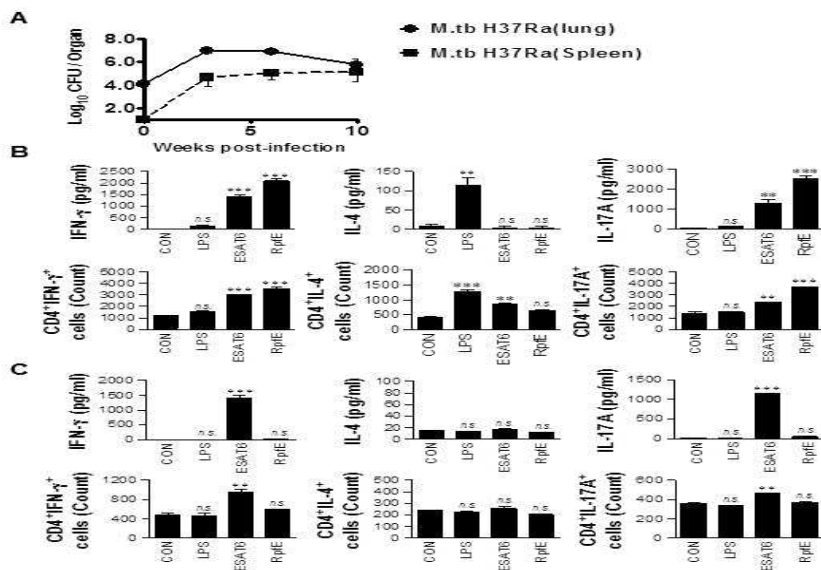


[그림 45] TLR4에 의한 Th1/Th17-polarization 분석

- 그 결과 WT 수지상세포와 상호작용한 T cell들은 Th1 cytokine (IFN-γ)과 Th17 cytokine (IL-17A)을 유도하였고, Treg cytokine (TGF-β)는 유도하지 않음
- 추가적으로 Th1, Th2, Th17분화 시에는 특이적으로 유도되는 Transcription factors들을 분석하였을 때 RpfE는 위의 결과들과 마찬가지로 Th1(T-bet)과 Th17(RORγt) 관련 Transcription factors를 유도하는 것을 확인함

(9) 결핵균 감염 WT과 TLR4^{-/-}마우스의 T cell에서 RpfE 자극을 통해 유도되는 T 세포의 면역분석

- Th1 면역은 결핵균과 같은 intracellular pathogens에 대한 숙주 방어기작으로 널리 알려져 있으며, Th17 면역 또한 현재 결핵균 방어에 효과적이라고 보고되고 있음
- 따라서 결핵균 특이적 Th1 or Th17의 면역을 올려주는 항원을 발굴하는 것은 효과적인 vaccine을 찾는 방안이 될 것임
- WT과 TLR4^{-/-}마우스에 결핵균(Mtb H37Ra)을 Intratracheally 감염 후 (4주) 비장의 T cell들을 분리하여 RpfB의 자극을 통한 항원성과 유도면역을 사이토카인을 통하여 확인하였음
- 그 결과 WT 마우스의 비장으로부터 분리 된 CD4⁺ T cell에 직접적인 RpfB의 자극을 주었을 때 IFN- γ 와 IL-17A과 같은 사이토카인을 유도하였고, CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-17A⁺ T cell들이 증가되는 것을 확인 할 수 있었음

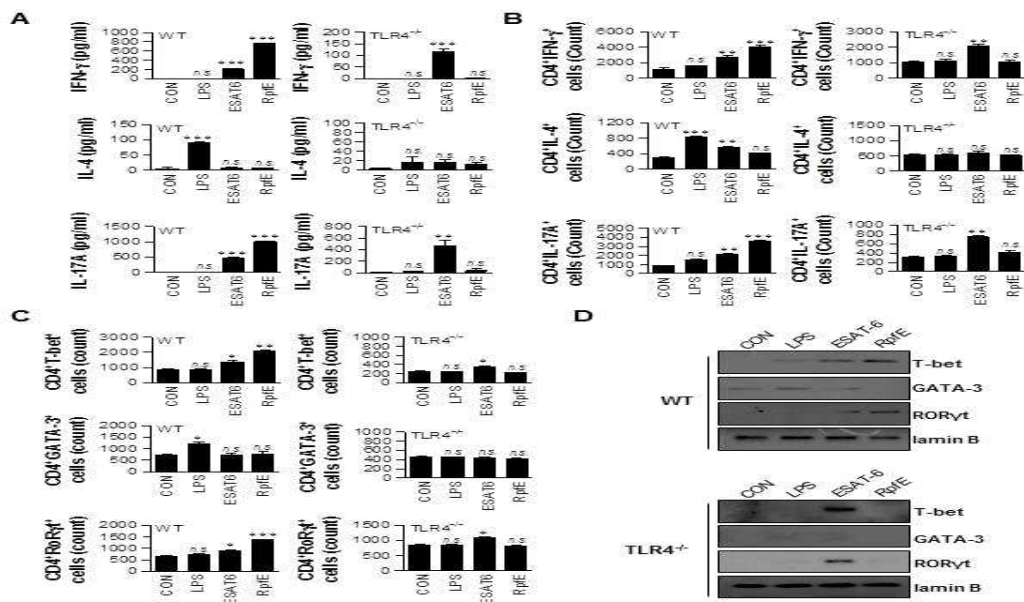


[그림 46] Mtb H37Ra에 대한 항원성 및 유도면역 분석

- 반면 TLR4^{-/-} 마우스의 비장으로부터 분리 된 CD4⁺ T cell에 직접적인 RpfB의 자극에 서는 이러한 반응들이 유도가 되지 않았음.

(10) RpfE 자극 성숙 수지상세포에 의해 유도되는 결핵균 감염 T cell 면역분석

- 마우스에 결핵균(Mtb H37Ra) 감염 8주 뒤 비장과 폐 세포를 분리한 후 RpfE로 성숙화 된 수지상 세포 (WT, TLR4^{-/-})와 같이 배양한 뒤 유도되는 면역과 T cell type을 분석하였음



[그림 47] RpfE를 통한 성숙수지상세포에서 감염 T cell 유도면역

- 그 결과 WT 수지상 세포와 같이 배양된 폐의 T cell들에서는 Th1과 Th17 관련 cytokines (IFN- γ , IL-17A)과 CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-17A⁺, CD4⁺T-bet⁺, CD4⁺RoRyt⁺ cell T cell들이 유도되었음
- 중요하게도 Th2 관련 사이토카인(IL-4)과 CD4⁺IL-4⁺, CD4⁺GATA-3⁺ 세포에서는 아무런 변화가 일어나지 않았음
- 반면 TLR4^{-/-} 수지상 세포와 같이 배양된 T cell들에서는 이러한 면역반응이 유도가 되지 않았음 (그림 33)
- WT, TLR4^{-/-} 수지상세포와 비장의 T cell 반응에서도 폐에서와 같은 반응이 일어났음
- 결과 적으로 TLR4를 통한 RpfE에 대한 수지상세포의 성숙은 naive와 감염 T cell 모두에 의존적이라는 것을 확인할 수 있었음.

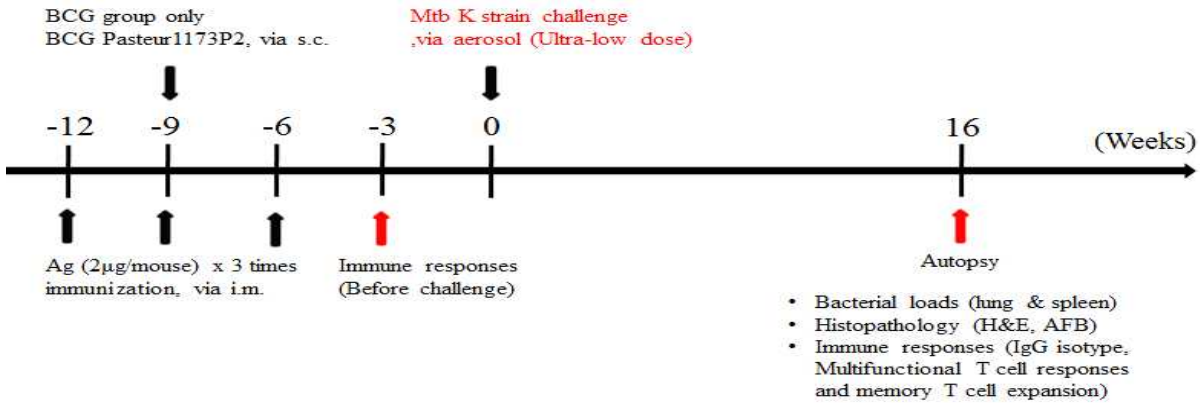
○ 최종적으로 RpfE는 Th1/Th17의 방어면역을 특이적으로 상승시켜 우결핵의 백신항원으로 우수한 효능을 나타낼 것으로 판단하고 향후 실험을 진행함.

제 5 절

■ 발굴된 항원의 *in vivo* immunization을 통한 항우결핵 백신 후보물질로서의 pre-exposure 백신 모델

- 발굴된 항원(Adk, GlcB, RipA, RpfE)을 각각 TLR4 agonist adjuvant인 GLA-SE (glucopyranosyl lipid adjuvant, from IDRI, USA)와 함께 마우스에 3번 immunization 한 후, 실제로 human에서 일어나는 감염을 mimic 하기 위하여 최소한의 균 농도 (ultra-low dose)로 공격접종

- 이들 항원으로 면역된 마우스에서의 long-term protective efficacy를 규명하기 위해 공격접종 16주 후에 부검하여 lung과 spleen에서의 균 수, lung의 조직병리학적 병변 검사를 통하여 분석
- 또한, lung과 spleen에서 recall response, IFN- γ assay, effector/memory T cell의 expansion, Th1-type T cell immunity의 기전규명
- 발굴된 항원의 *in vivo* immunization을 통한 항결핵 백신 후보물질로서의 효능을 평가하기 위한 실험 일정과 분석내용



[그림 48] 항원의 *in vivo* immunization을 통한 백신후보물질로서의 효능평가 실험일정 모식도

제 6 절

■ 엘크와 꽃사슴에 대한 감염 및 백신접종에 의한 혈청면역반응 분석

(1) 엘크와 꽃사슴에 감염 및 면역

- 현재까지 총 3회에 걸쳐 *M. bovis*접종을 하였고, 꽃사슴에 경우 각각 그룹을 나누어 접종 그룹과 BCG백신 접종 그룹으로 나눔
- 모든 엘크에 *M. bovis* (충주30)을 1×10^5 cfu/ml를 접종하였고 꽃사슴은 *M. bovis* (충주30)을 1×10^5 cfu/ml을 접종한 그룹과 BCG백신을 피하와 근육에 접종한 그룹으로 나누어 비교
- 빠른 감염 및 병변형성 위해 접종량을 1×10^6 cfu/m으로 늘림

[Table 7] 사슴에 병원성 결핵균 감염 접종량 및 접종일정

접종일자	이표번호	접종량(cfu/ml) / 접종부위(표식색)	종
2014-12-16	3848	충주30(1X10 ⁶)	ELK
	3850	충주30(1X10 ⁶)	
	3849	충주30(1X10 ⁶)	
	5436	충주30(1X10 ⁶)	
2015-01-14	3848	충주30(1X10 ⁵)	ELK
	3850	충주30(1X10 ⁵)	
	3849	충주30(1X10 ⁵)	
	5436	충주30(1X10 ⁵)	
2015-04-04	3865	피하BCG(빨강)	꽃사슴
	5402	피하BCG(빨강)	
	5406	피하BCG(빨강)	
	5447	피하BCG(빨강)	
	5410	피하BCG(빨강)	
	5407	근육BCG(파랑)	
	5408	근육BCG(파랑)	
	5409	근육BCG(파랑)	
	5449	근육BCG(파랑)	
	3855	충주30(1X10 ⁵)(검정)	
	3856	충주30(1X10 ⁵)(검정)	
	5443	충주30(1X10 ⁵)(검정)	
	5405	충주30(1X10 ⁵)(검정)	
	3866	충주30(1X10 ⁵)(검정)	
3861	충주30(1X10 ⁵)(검정)		
2015-06-06	3848	충주30(1X10 ⁶)	ELK
	3849	충주30(1X10 ⁶)	ELK

(2) 엘크에서의 감염 후 ESR변화

- 총 3회에 걸쳐 M. bovis접종을 하였고, 꽃사슴에 경우 각각 그룹을 나누어 접종 그룹과 BCG백신 접종 그룹으로 나눔
- 약 3주마다 PPD접종 및 확인을 하였고 매월 2~3회 정도 검체(혈액)을 채취 ESR(적혈구 침강 속도), ELISA tset(혈청학적 검사)를 위한 혈청 및 혈장 분리 및 Peripheral Blood Mononuclear Cell(PBMC)를 분리하여 결핵특이항원으로 12~16시간 자극하여 RNA를 추출하여 Real-time PCR로 상대적발현양을 측정

[Table 8] 사슴에 병원성 결핵균 감염 후 ESR 측정치

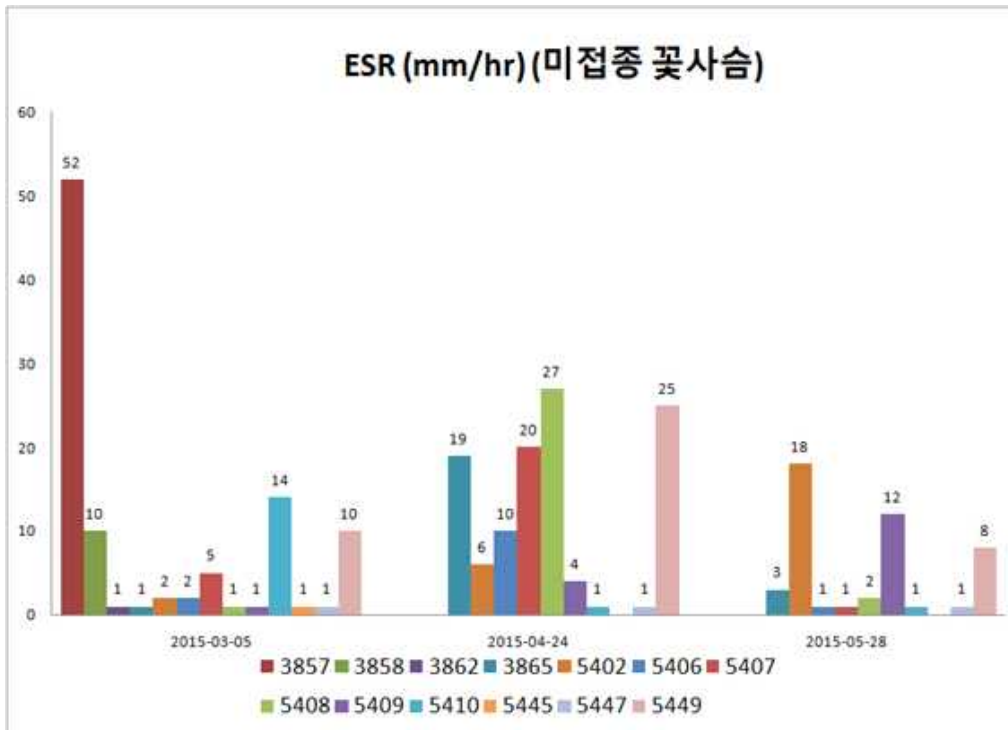
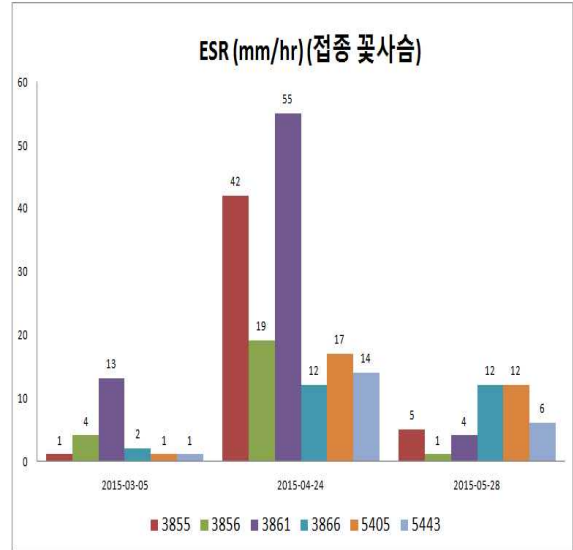
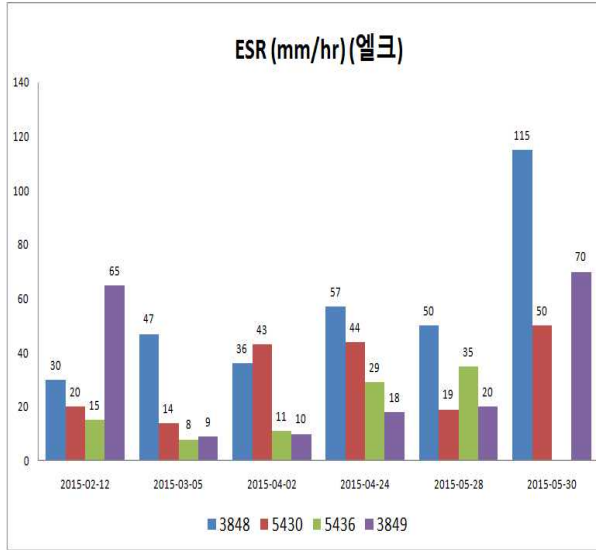
Date	ID (이표번호)	ESR (mm)	학명	비고
2015.02.12	5430	20	Cervus canadensis(Elk)	
2015.02.12	5436	15	Cervus canadensis(Elk)	
2015-02-12	3848	30	Cervus canadensis(Elk)	
2015-02-12	3849	65	Cervus canadensis(Elk)	
2015-03-05	3848	47	Cervus canadensis(Elk)	
2015-03-05	3849	9	Cervus canadensis(Elk)	
2015-03-05	3855	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-05	3856	4	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-05	3857	52	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-05	3858	10	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-05	3861	13	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-05	3862	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-05	5410	14	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-05	5409	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-05	3865	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-05	3866	2	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-05	5436	8	Cervus canadensis(Elk)	
2015-03-05	5430	14	Cervus canadensis(Elk)	
2015-03-19	5447	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-19	5408	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-19	5407	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-19	5449	10	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-19	5445	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-19	5406	2	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-19	5443	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-19	5402	2	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-19	5405	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-03-21	5407	5	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-04-02	3848	36	Cervus canadensis(Elk)	
2015-04-02	3849	10	Cervus canadensis(Elk)	
2015-04-02	5430	43	Cervus canadensis(Elk)	
2015-04-02	5436	11	Cervus canadensis(Elk)	
2015-04-24	5436	29	Cervus canadensis(Elk)	
2015-04-24	5430	44	Cervus canadensis(Elk)	
2015-04-24	3849	18	Cervus canadensis(Elk)	
2015-04-24	3848	57	Cervus canadensis(Elk)	
2015-04-24	3856	19	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	

2015-04-24	5443	14	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-04-24	5402	6	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-04-24	5447	0	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-04-24	5449	25	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-04-24	5406	10	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-04-24	5405	17	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-04-24	3861	55	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-04-24	5410	0	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-04-24	5407	20	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-04-24	3866	12	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-04-24	5408	27	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-04-24	3855	42	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-04-24	5409	4	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-04-24	3865	19	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-05-01	5436	35	Cervus canadensis(Elk)	
2015-05-01	5402	18	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-05-28	5430	19	Cervus canadensis(Elk)	
2015-05-28	3849	20	Cervus canadensis(Elk)	
2015-05-28	3848	50	Cervus canadensis(Elk)	
2015-05-28	3866	12	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-05-28	5449	8	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-05-28	5443	6	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-05-28	3865	3	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-05-28	5409	12	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-05-28	3856	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-05-28	5410	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-05-28	3855	5	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-05-28	5407	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-05-28	5406	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-05-28	5447	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-05-28	5405	12	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-05-28	3861	4	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-05-28	5408	2	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-05-30	5430	50	Cervus canadensis(Elk)	
2015-05-30	3848	115	Cervus canadensis(Elk)	
2015-05-30	3849	70	Cervus canadensis(Elk)	
2015-07-04	5430	72	Cervus canadensis(Elk)	
2015-07-04	3848	78	Cervus canadensis(Elk)	
2015-07-04	3849	82	Cervus canadensis(Elk)	
2015-07-04	5428	60	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-07-04	5449	15	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	

2015-07-04	3865	8	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-07-04	5405	17	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-07-04	5447	5	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-07-04	5421	7	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-07-04	3863	4	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-07-04	5427	9	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-07-04	3861	15	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-07-04	5443	15	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-07-04	3856	8	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-07-04	5403	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-07-15	3660	104	Cervus canadensis(Elk)	
2015-07-15	3656	50	Cervus canadensis(Elk)	
2015-07-15	3657	135	Cervus canadensis(Elk)	
2015-07-15	3658	27	Cervus canadensis(Elk)	
2015-07-15	3651	104	Cervus canadensis(Elk)	
2015-07-15	3659	95	Cervus canadensis(Elk)	
2015-07-15	3647	60	Cervus canadensis(Elk)	
2015-07-15	3666	90	Cervus canadensis(Elk)	
2015-09-03	3653	28	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-09-03	5449	5	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-09-03	3861	33	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-09-03	5447	31	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-09-03	3650	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-09-03	3649	9	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-09-03	5443	30	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-09-03	3865	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-09-03	3648	4	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-09-03	3652	4	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-09-03	3863	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-09-03	3849	54	Cervus canadensis(Elk)	
2015-09-03	3658	44	Cervus canadensis(Elk)	
2015-09-03	3654	93	Cervus canadensis(Elk)	
2015-09-03	5430	93	Cervus canadensis(Elk)	
2015-09-03	3657	60	Cervus canadensis(Elk)	
2015-09-03	3663	89	Cervus canadensis(Elk)	
2015-09-03	3664	150	Cervus canadensis(Elk)	
2015-09-03	3647	80	Cervus canadensis(Elk)	
2015-09-03	3659	127	Cervus canadensis(Elk)	
2015-09-03	3666	93	Cervus canadensis(Elk)	
2015-09-03	3656	46	Cervus canadensis(Elk)	
2015-09-03	3848	130	Cervus canadensis(Elk)	

2015-09-03	3665	131	Cervus canadensis(Elk)	
2015-09-03	3660	60	Cervus canadensis(Elk)	
2015-10-08	5447	14	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-10-08	3653	27	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-10-08	3652	32	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-10-08	3865	40	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-10-08	5443	30	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-11-13	3848	97	Cervus canadensis(Elk)	
2015-11-13	3849	10	Cervus canadensis(Elk)	
2015-11-13	3663	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-11-13	3650	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-11-13	3665	103	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-11-13	5449	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-11-13	3648	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-11-13	3652	19	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-11-13	3649	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-11-13	5447	26	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2015-12-15	3848	135	Cervus canadensis(Elk)	
2015-12-15	3665	144	Cervus canadensis(Elk)	
2015-12-15	3849	15	Cervus canadensis(Elk)	
2015-12-15	3660	26	Cervus canadensis(Elk)	
2015-12-15	5447	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2016-03-09	5447	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2016-03-09	3650	67	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2016-03-09	3848	50	Cervus canadensis(Elk)	
2016-03-09	3863	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2016-03-09	3652	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2016-03-19	3848	110	Cervus canadensis(Elk)	
2016-03-19	3656	34	Cervus canadensis(Elk)	
2016-03-19	3654	25	Cervus canadensis(Elk)	
2016-03-19	3863	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2016-03-19	3666	23	Cervus canadensis(Elk)	
2016-03-19	3660	35	Cervus canadensis(Elk)	
2016-03-19	5447	1	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2016-03-19	3658	1	Cervus canadensis(Elk)	
2016-03-21	3863	5	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2016-03-21	5447	4	Cervus nippon hortulorum(꽃사슴)	
2016-03-21	3848	120	Cervus canadensis(Elk)	
2016-03-21	3654	40	Cervus canadensis(Elk)	
2016-03-21	3656	60	Cervus canadensis(Elk)	
2016-03-21	3658	45	Cervus canadensis(Elk)	

2016-03-21	3660	36	Cervus canadensis(Elk)	
2016-03-21	3666	22	Cervus canadensis(Elk)	



[그림 49] 병원성 우형결핵균 감염후 엘크와 꽃사슴에서의 ESR 변화

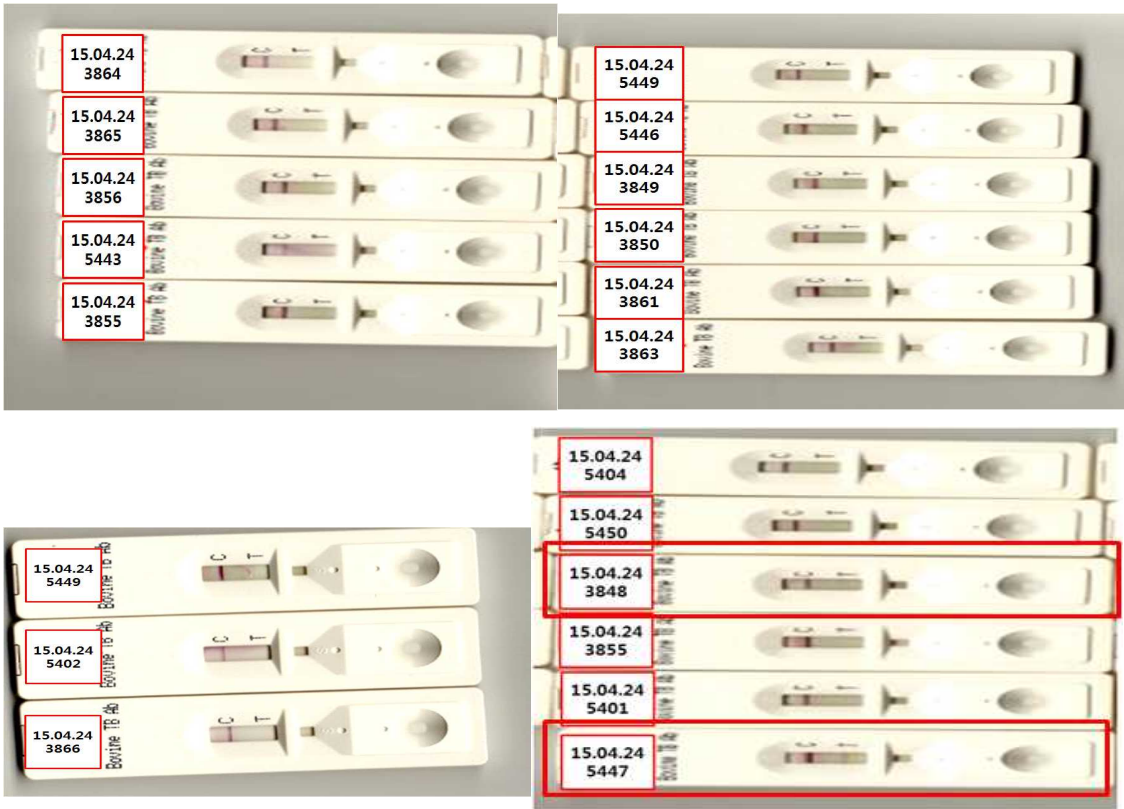
- ESR 결과 엘크에서 *M. bovis* 접종 후 시간이 경과함에 따라 결과가 증가하는 추세를 보였고 꽃사슴 역시 접종한 군에서 증가하는 경향을 보였지만 BCG백신을 접종한 군에서는 정상범위에 속하는 경향을 볼 수 있었음.

(3) 엘크 및 꽃사슴에서의 감염후 항체면역 변화

[Table 9] 우형 결핵균 감염 후 TB Ab Test Kit을 이용한 항체가 변화 측정

I D	TB Ab Test Kit 결과	학 명
3866	Negative	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
5402	Negative	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
5449	Negative	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
5443	Negative	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
3865	Negative	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
3864	Negative	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
3856	Negative	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
5410	Negative	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
3855	Negative	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
5447	Positive	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
5407	Negative	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
5450	Negative	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
3861	Negative	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
5408	Negative	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
5406	Negative	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
5449	Negative	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
3855	Negative	<i>Cervus nippon hortulorum</i> (꽃사슴)
5430	Negative	<i>Cervus canadensis</i> (엘크)
3848	Positive	<i>Cervus canadensis</i> (엘크)
3849	Negative	<i>Cervus canadensis</i> (엘크)

- TB Ab Test Kit는 chromatographic immunoassay법으로 *M. bovis* 항체를 혈장 또는 혈청에서 검출하는 정성방법으로 테스트 결과 5447 꽃사슴과 3848 엘크에서 양성반응을 보였음.



[그림 50] 결핵균에 감염된 사슴의 혈청에서의 TB Ab Test Kit을 이용한 항체 측정

[Table 10] BCG 백신 접종 후 TB Ab Test Kit을 이용한 항체가 변화 측정

Days post-immunization	ID(이표번호)	Bovine TB Ab test Kit
day 0	3866	Negative
	5402	Negative
day 30	5449	Negative
	5443	Negative
	3865	Negative
	3864	Negative
	3856	Negative
	3863	Negative
	3855	Negative
	5447	Positive
day 60	5401	Negative
	5450	Negative
	3861	Negative

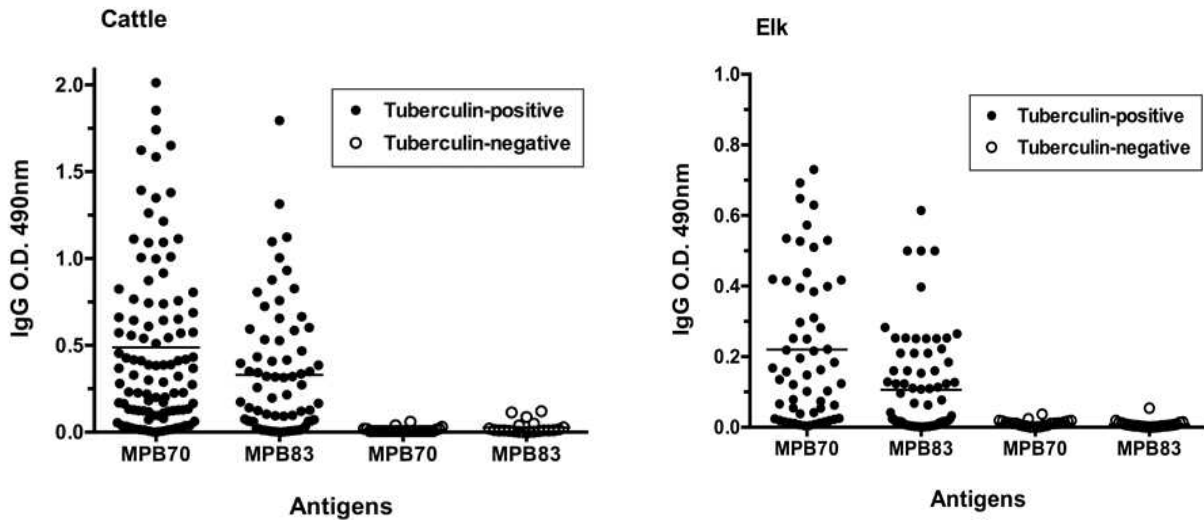
	5446	Negative
	5404	Negative
	5449	Negative
	3855	Negative
	3850	Negative
	3848	Positive
	3849	Negative
day 90	3661	Negative
	3662	Negative
	541	Negative
	546	Negative
	545	Negative
	3665	Negative
day 120	3654	Negative
	3660	Negative
	3656	Negative
	3848	weak

- 8.7ml SST tube를 이용하여 whole blood를 채취하여 serum을 분리하여 분리된 serum에서 bovine TB Ab test kit(rapid kit)를 사용하여 screening 검사를 진행하여 bovine TB에 감염 유무를 파악함.

[그림 51] BCG백신 접종된 사슴의 혈청에서의 TB Ab Test Kit을 이용한 항체 측정



(4) 엘크 및 소의 결핵에 대한 항체가 비교분석



[그림 52] 엘크와 소의 결핵감염 후 재조합 단백질에 대한 혈청반응 비교

- 소 결핵에 대한 혈청학적 진단법에 사용되는 결핵균 항원 MPB70항원과 MPB83항원에 대한 항체반응을 측정하였음
- 결핵균 항원 MPB70항원에 대한 항원반응이 MPB83항원에 비해 다소 높게 나타나는 경향이 소와 사슴 모두에서 있었음
- 투베르쿨린 음성 사슴과 소에서는 MPB70항원과 MPB83항원에 대한 항체반응이 매우 낮게 나타나 결핵균항원을 사용한 결핵진단의 특이성이 높게 나타남
- 결핵균 MPB70항원과 MPB83항원에 대한 혈청반응에 있어 소의 경우 평균 0.5 정도의 흡광도가 나타났으나 사슴의 경우 0.22 정도로 나타나 사슴의 경우 결핵항원에 대한 혈청반응이 소에 비해 다소 낮게 나타남
- 이로 보건대 결핵균 항원에 대한 결핵에 감염된 사슴에서의 항체반응이 약 51%의 민감도를 나타내어, 다른 결핵균항원을 발굴하거나 이에 대한 보완연구가 필요함

제 7 절

■ 엘크와 꽃사슴에 대한 감염 및 백신접종에 의한 세포면역반응 분석

1) 엘크 및 꽃사슴 감염 후 혈구세포 측정

[Table 11] 엘크의 혈구세포 측정

Elk (<i>Cervus canadensis</i>)	Chemical capture (n=23)
Measurement	Mean (SD)
Red blood cells (x 10 ¹² /L)	8.42 (1.81)
Hemoglobin (g/dL)	12.99 (3.04)
MCV (fl)	40.74 (4.14)
MCH (pg)	15.50 (1.71)
MCHC (g/dL)	36.63 (6.11)
White blood cells (x 10 ⁹ /L)	7.51 (3.47)
Lymphocytes (x 10 ⁹ /L)	2.40 (0.80)
Monocytes (x 10 ⁹ /L)	0.41 (0.25)
Neutrophils (x 10 ⁹ /L)	3.88 (2.89)
Eosinophils (x 10 ⁹ /L)	0.39 (0.26)
Basophils (x 10 ⁹ /L)	0.07 (0.04)
Platelets (x 10 ⁹ /L)	200.48 (78.79)

[Table 12] 꽃사슴의 혈구세포 측정

꽃사슴 (<i>Cervus nippon hortulorum</i>)	Chemical capture (n=18)
Measurement	Mean (SD)
Red blood cells (x 10 ¹² /L)	9.79 (1.46)
Hemoglobin (g/dL)	12.57 (1.75)
MCV (fl)	32.50 (2.36)
MCH (pg)	12.29 (0.97)
MCHC (g/dL)	37.87 (2.72)
White blood cells (x 10 ⁹ /L)	5.60 (2.74)
Lymphocytes (x 10 ⁹ /L)	2.44 (0.79)
Monocytes (x 10 ⁹ /L)	0.21 (0.25)
Neutrophils (x 10 ⁹ /L)	2.60 (1.80)
Eosinophils (x 10 ⁹ /L)	0.20 (0.12)
Basophils (x 10 ⁹ /L)	0.03 (0.03)
Platelets (x 10 ⁹ /L)	167.07 (62.94)

3) 엘크 및 꽃사슴 감염 후 PBMC

- 10ml Heparin tube 로 채혈한 whole blood 를 50ml conical tube 로 옮겨서 ficoll 을 사용하여 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)를 분리하여 각각의 sample 의 PBMC 수를 개수하여 24 well plate 에 각각 5×10^6 개/ml 로 맞춰주고 37°C CO2 인큐베이터에서 2 시간, 4 시간, 8 시간, 12 시간, 16 시간, 24 시간, 48 시간동안 media, CFP10, ESAT6, Lectin 으로 항원 자극시켜 배양하여 상층액은 따로 분리하고 pellet 에서 trizol 을 이용하여 RNA 를 추출하고 추출된 RNA 를 transcriptase 를 이용하여 cDNA 로 만들고 real time PCR 로 INF-gamma 의 발현량 측정
- 배양후 분리한 상층액을 이용하여 ID vet kit(bovine TB IFN-gamma) 를 이용하여 IFN-gamma에 발현을 측정함

[Table 13] 결핵균 감염 후 혈액내 PBMC 측정

<1차>

Tube number	이표번호	PBMC
1	3857	12.4×10^7
2	3858	8×10^6
3	3861	1.14×10^7
4	3865	4.12×10^7
5	3855	1.2×10^7
6	3856	2.4×10^7
7	3849	6.2×10^6
8	5436	2.4×10^7
9	3862	1.07×10^7
10	3866	1.84×10^7
11	3864	2×10^7
12	3848	4.18×10^7
13	3863	1.7×10^7
14	3850	2×10^7
1	5447	4.12×10^7
2	5446	6.2×10^7
3	5442	7.5×10^7
4	5449	6.7×10^7
5	5445	4.8×10^7
6	5448	5.4×10^7
7	5443	5.7×10^7
8	5444	1.9×10^7
9	5450	2.3×10^7

<2차>

Tube number	이표번호	PBMC
1	5443	EDTA 1.43X10 ⁷ / Heparin 4.48X10 ⁷
2	5444	2.45X10 ⁷
3	5447	4.36X10 ⁷
4	3865	2.8X10 ⁷
5	5448	2.2X10 ⁷
6	3861	2.0X10 ⁷
7	3866	1.16X10 ⁷
8	5450	6.3X10 ⁷
9	3855	1.9X10 ⁷
10	5449	2.16X10 ⁷
11	3864	4.7X10 ⁷
12	3856	1.56X10 ⁷
13	5446	1.39X10 ⁷
14	5442	3.0X10 ⁷
15	3849	3.0X10 ⁷
16	5436	2.5X10 ⁷
17	3850	2.5X10 ⁷
18	3863	2.6X10 ⁷
19	3848	3.45X10 ⁷

4) 엘크 및 꽃사슴 감염 후 결핵균항원에 의한 PBMC의 IFN-gamma 측정

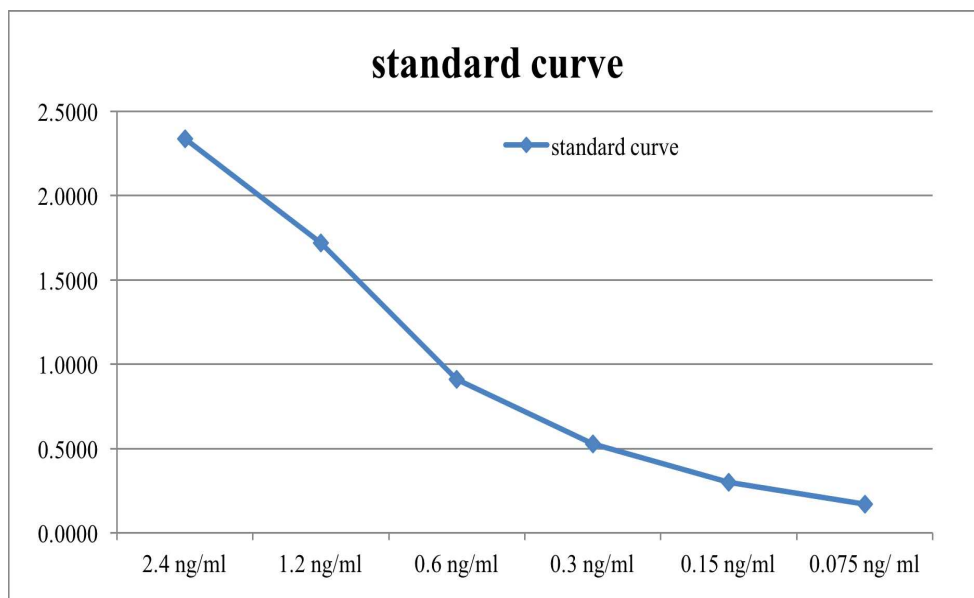
- PBMC 를 결핵항원과 24 이상 배양한 후 상층액을 이용하여 ID vet test 를 진행

[Table 14] 결핵균 감염 후 결핵균항원 자극에 의해 분비된 IFN-gamma 측정

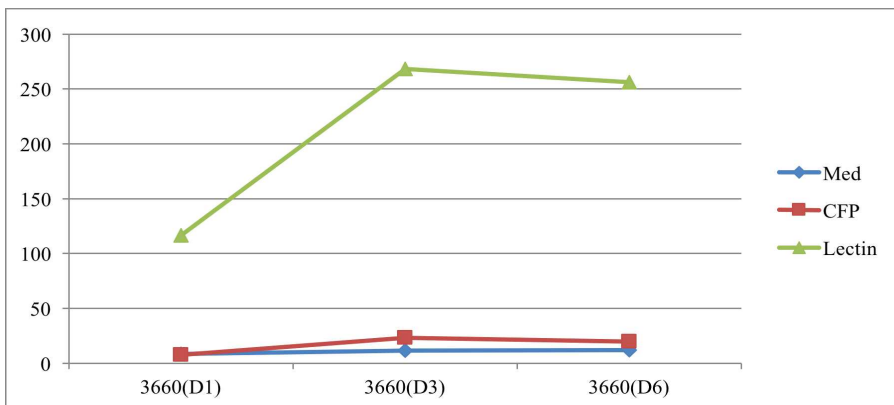
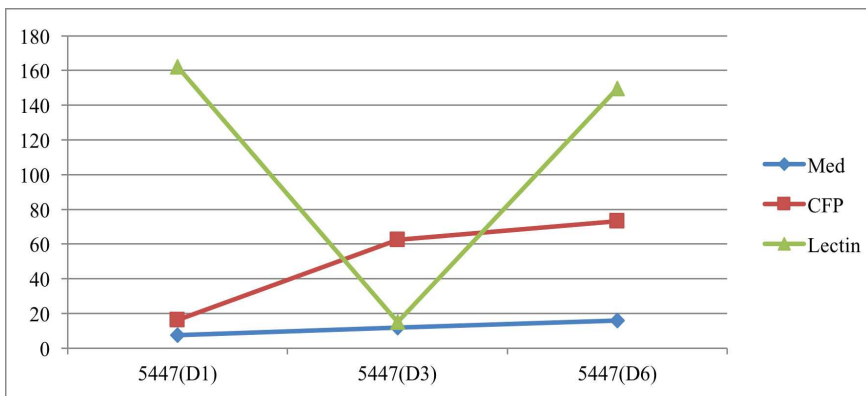
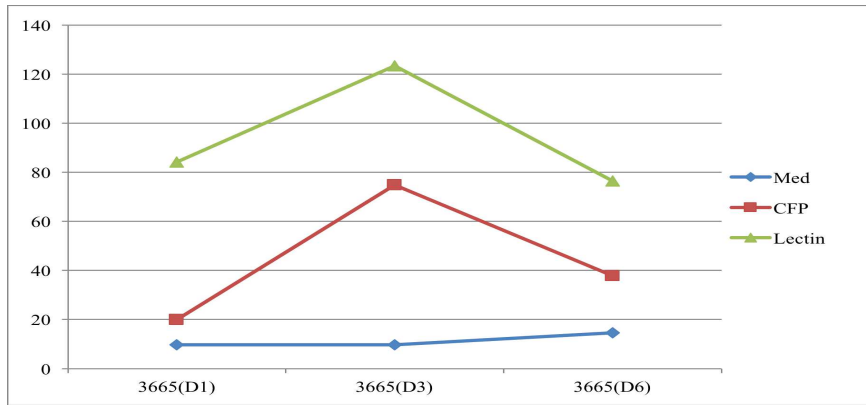
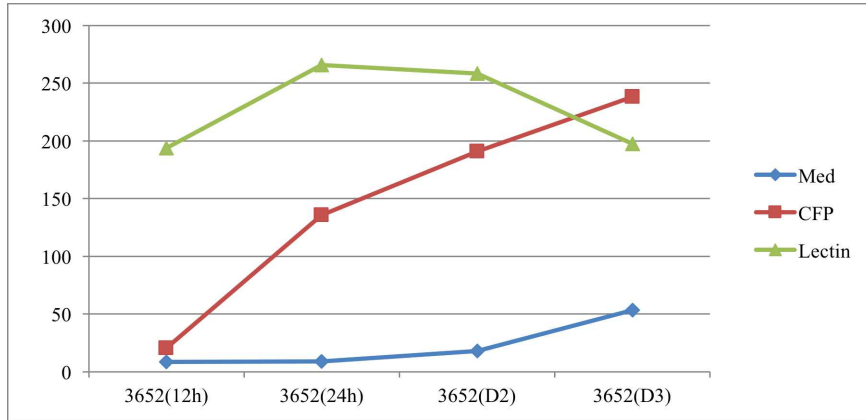
Date	ID	Med	CFP	Lectin	종
2016-03-09	3650	4.32	6.76	48.78	꽃사슴
2016-01-12	3652	4.25	10.24	97.35	꽃사슴
2016-01-12	3652	4.46	68.15	133.52	꽃사슴
2016-01-12	3652	8.92	96.03	129.83	꽃사슴
2016-01-12	3652	26.90	119.65	99.16	꽃사슴
2016-01-12	3848	4.04	33.66	123.34	elk
2016-01-12	3848	7.182706	12.06416	17.36402	elk
2016-01-12	3665	4.111498	20.27875	83.41463	elk
2016-01-12	3665	3.913198	8.039843	34.0804	elk
2016-01-12	3665	3.913198	30.3095	50.01779	elk

2016-01-12	3665	5.905372	15.29705	30.94984	elk
2016-01-12	5447	3.763066	8.15331	81.5331	꽃사슴
2016-01-12	5447	4.838136	25.25792	6.04767	꽃사슴
2016-01-12	5447	6.474564	29.66916	60.619	꽃사슴
2016-01-12	3660	4.250871	3.763066	58.53659	elk
2016-01-12	3660	4.624689	9.391676	108.7869	elk
2016-01-12	3660	4.909285	7.968694	103.7353	elk
2016-04-30	3654	11.22881	258.4746	389.6186	elk
2016-04-30	3654	33.45247	205.4325	197.5697	elk
2016-04-30	3658	11.65254	65.67797	171.3983	elk
2016-04-30	3658	30.30736	38.31308	57.46962	elk
2016-04-30	3660	10.59322	81.35593	215.2542	elk
2016-04-30	3660	10.00715	43.31665	155.3967	elk
2016-04-30	3656	10.80508	381.7797	486.2288	elk
2016-04-30	3656	11.72266	213.4382	283.2023	elk
2016-04-30	3848	15.25424	54.44915	91.31356	elk
2016-04-30	3848	14.7248	24.73195	35.59685	elk
2016-04-30	3666	11.01695	211.2288	194.7034	elk
2016-04-30	3666	10.00715	43.31665	155.3967	elk
2016-04-30	상처	12.28814	12.5	68.4322	꽃사슴
2016-04-30	상처	7.7198	8.577555	17.72695	꽃사슴
2016-04-28	546	8.06962	9.48	56.58228	꽃사슴
2016-04-28	상처(UN)	7.436709	7.9	28.35443	꽃사슴
2016-04-28	3653	7.594937	14.536	148.5443	꽃사슴
2016-04-28	3662	7.594937	11.218	19.3038	꽃사슴
2016-04-28	545	10.28481	11.218	106.7722	꽃사슴
2016-04-28	541	8.227848	9.322	81.77215	꽃사슴
2016-04-28	3665	8.544304	9.164	42.08861	꽃사슴
2016-04-28	3661	9.018987	9.796	14.11392	꽃사슴
2015-11-13	3665	16.30648	20.43222	156.5815	elk
2015-11-13	3849	14.14538	21.80747	266.2083	꽃사슴
2015-11-13	3863	12.18075	38.11395	298.6248	꽃사슴
2015-11-13	3650	12.77014	60.31434	215.9136	꽃사슴
2015-11-13	3652	12.57367	13.16306	141.0609	꽃사슴
2015-11-13	5447	14.93124	29.07662	180.943	꽃사슴
2015-11-13	3649	12.37721	73.47741	0	꽃사슴
2015-11-13	3848	10.8055	25.73674	0	elk
2015-11-13	5449	13.94892	12.18075	131.4342	꽃사슴
2015-11-13	3648	14.53831	18.46758	155.4028	꽃사슴
2015-12-16	5447	11.00196	40.27505	190.7662	꽃사슴
2015-12-16	3665	10.01965	14.34185	122.0039	elk

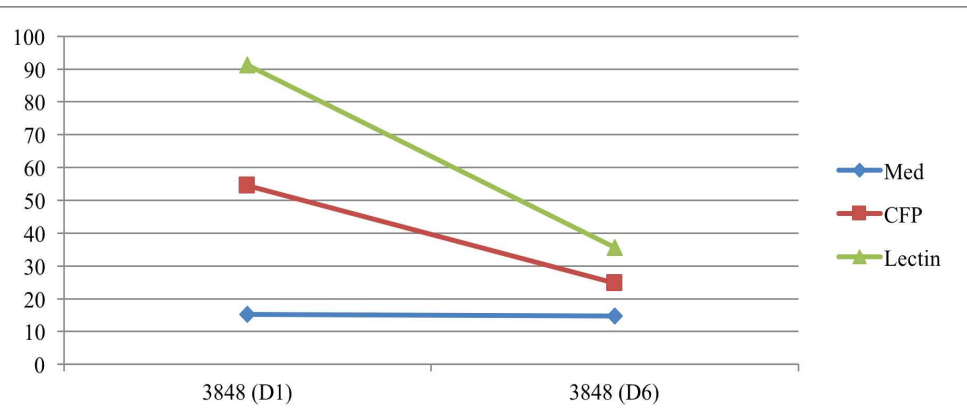
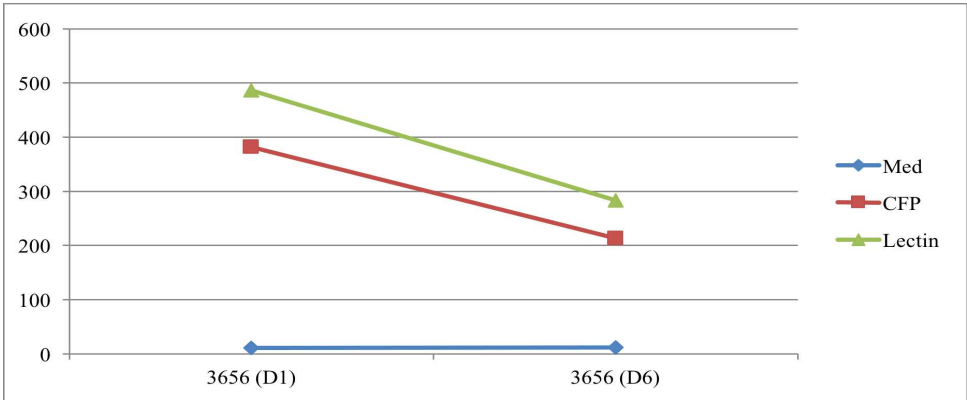
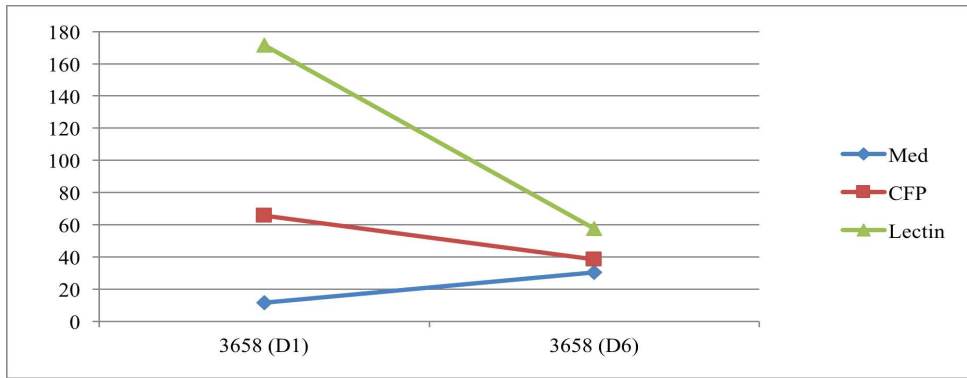
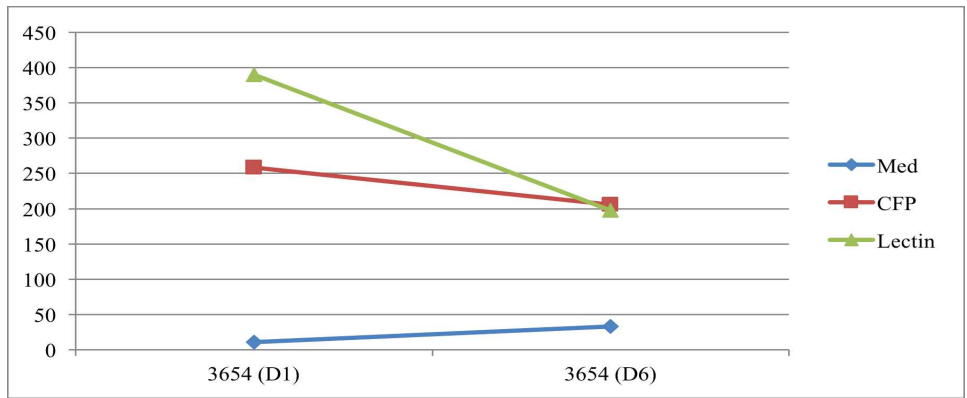
2015-12-16	3849	12.37721	11.98428	126.7191	elk
2015-12-16	3848	10.8055	20.62868	97.05305	elk
2015-12-16	3660	11.19843	12.18075	211.002	elk
2015-12-16	3650	10.21611	63.06483	11.19843	꽃사슴
2015-09-04	3650	87.49	239.88	248.31	꽃사슴
2015-09-04	5447	11.82	161.64	204.15	꽃사슴
2015-09-04	3861	7.53	202.76	239.25	꽃사슴
2015-09-04	3653	4.56	155.29	167.24	꽃사슴
2015-09-04	3849	19.90	139.81	235.52	꽃사슴
2015-09-04	5430	18.18	124.26	173.32	꽃사슴
2015-09-04	3865	3.73	15.69	160.82	꽃사슴
2015-09-04	3863	174.08	237.80	240.57	꽃사슴
2015-09-04	5443	4.08	5.25	55.29	꽃사슴
2015-09-04	3649	4.28	40.22	140.50	꽃사슴
2015-09-04	3848	4.49	25.22	62.89	꽃사슴
2015-09-04	5449	4.42	8.91	51.55	꽃사슴
2015-09-04	3648	13.13	133.10	188.74	꽃사슴
2015-09-04	3652	3.73	5.46	37.32	꽃사슴
2015-10-09	3865	2.83	5.53	60.06	꽃사슴
2015-10-09	3652	3.25	11.68	223.77	꽃사슴
2015-10-09	3653	2.83	18.31	88.39	꽃사슴



[그림 53] ID-Vet IFN-gamma 키트를 이용한 사슴 IFN-gamma에 standard curve



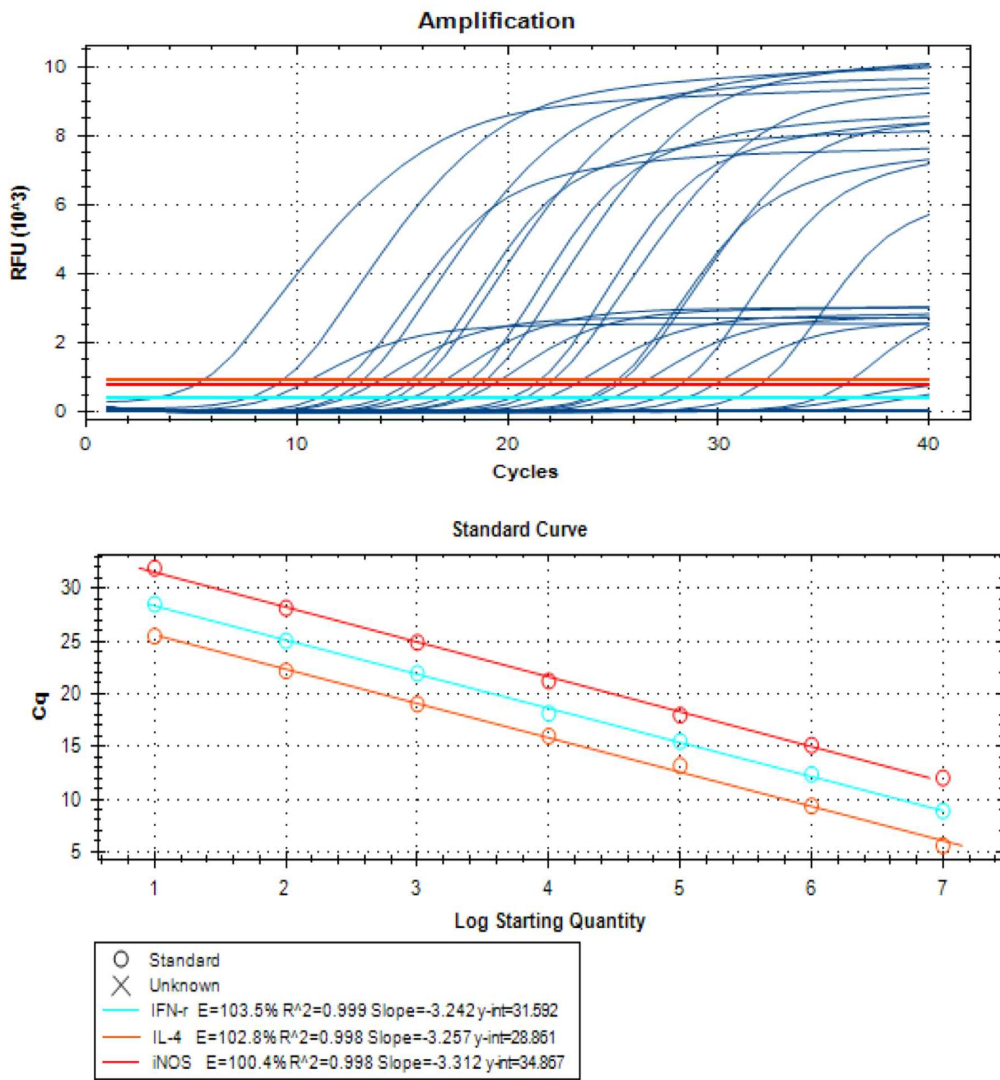
[그림 54] ID-Vet IFN-gamma 키트를 이용한 엘크에 대한 IFN-gamma 측정



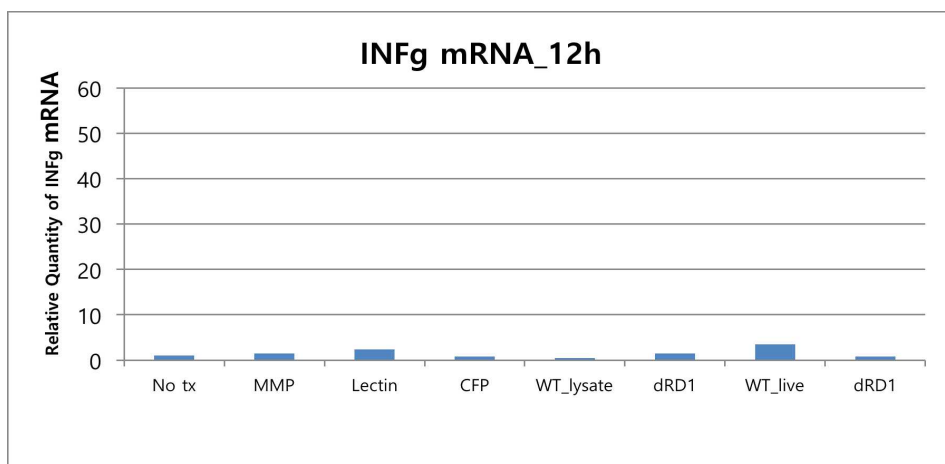
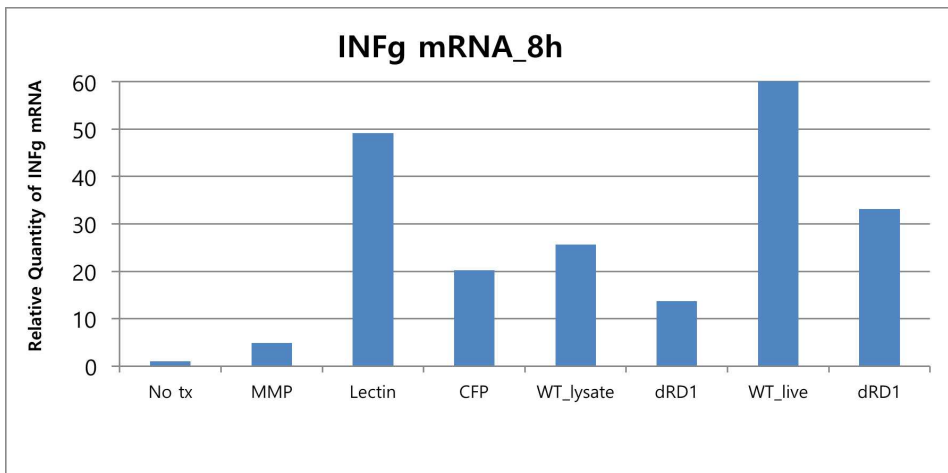
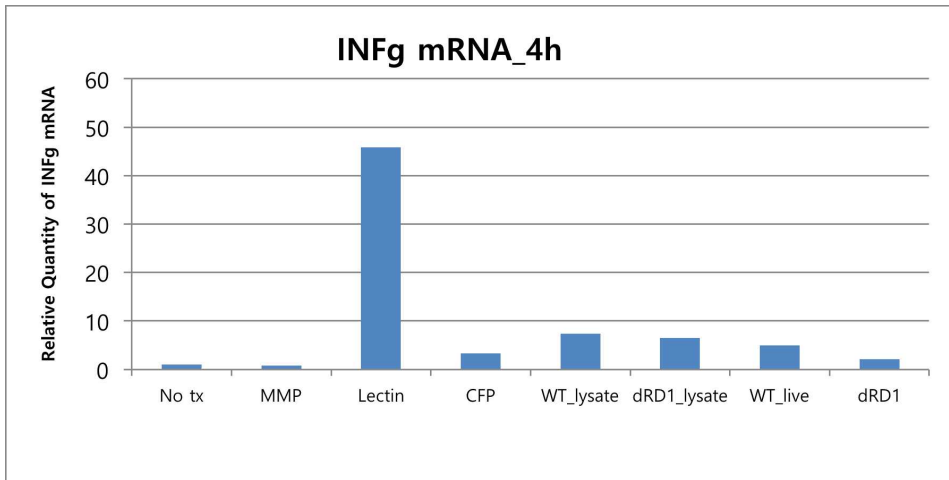
[그림 55] ID-Vet IFN-gamma 키트를 이용한 꽃사슴에 대한 IFN-gamma 측정

5) 엘크 및 꽃사슴 감염 후 결핵균항원에 의한 PBMC에서의 real-time을 이용한 cytokine 측정

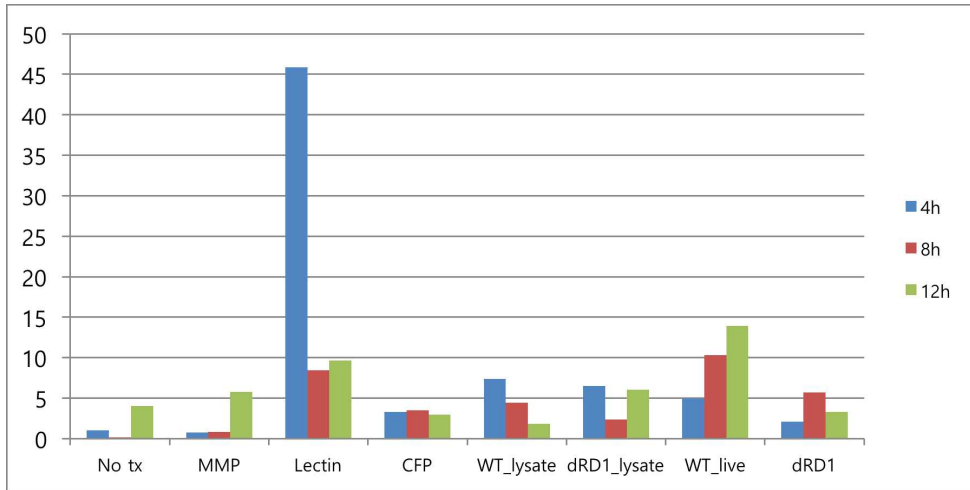
- PBMC 를 결핵항원과 배양한 후 mRNA 을 분리하여 사슴의 TaqMan probe 를 이용한 cytokine 발현량 측정



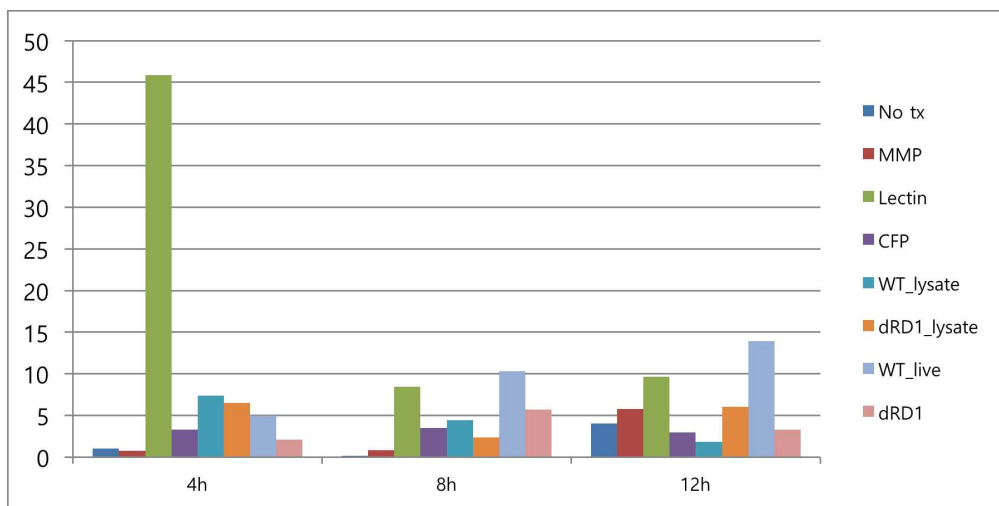
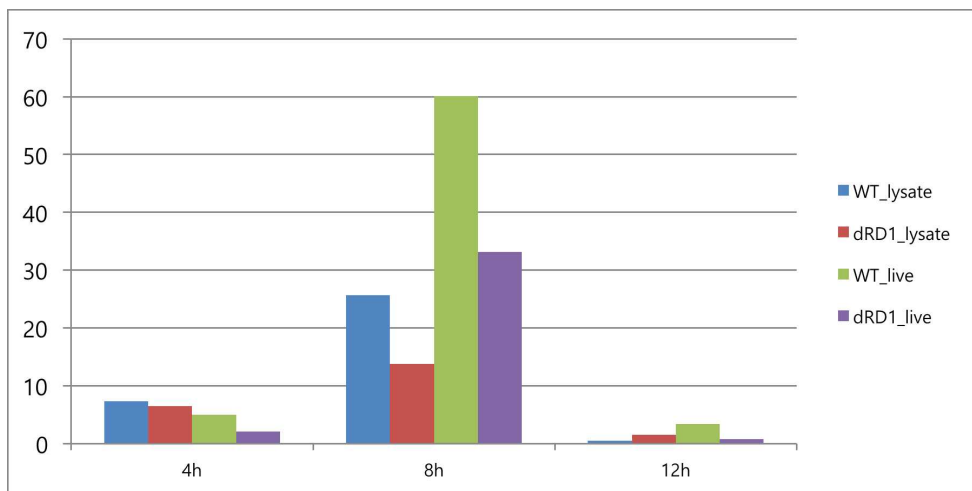
[그림 56] Real-time PCR을 이용한 사슴의 cytokine 발현량 측정을 위한 standard curve



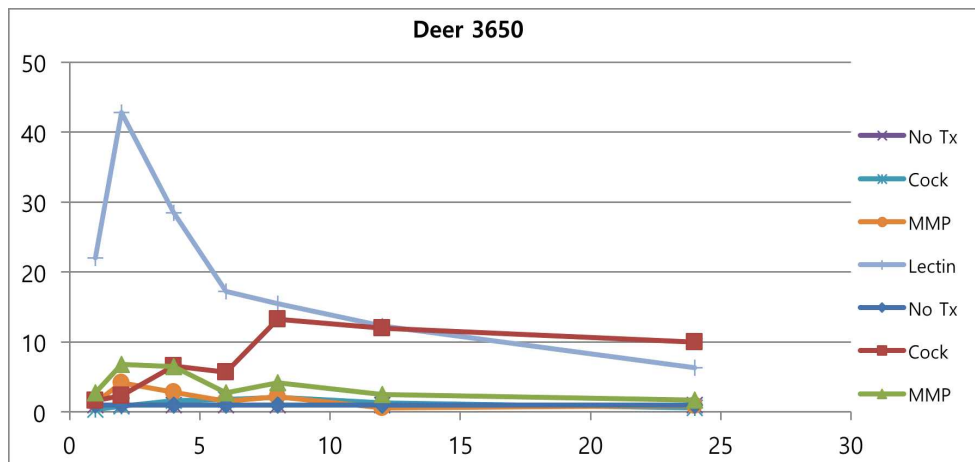
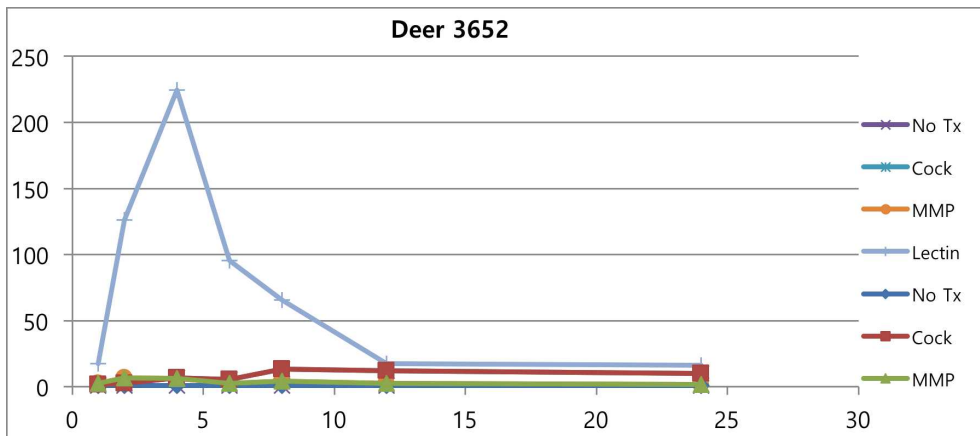
[그림 57] 결핵균 항원 자극 후 시간대별 사슴의 IFN-gamma 발현량 변화



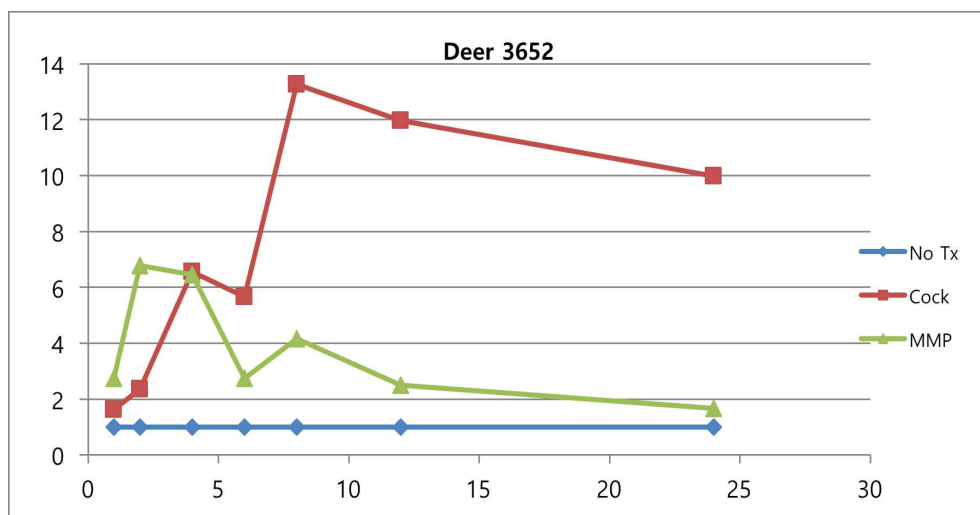
[그림 58] 결핵균 항원의 종류에 따른 사슴의 IFN-gamma 발현량 변화

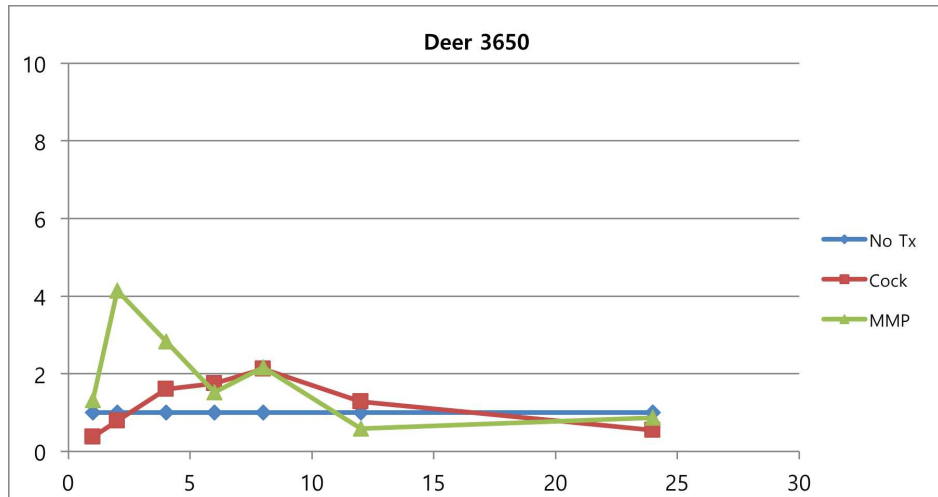


[그림 59] 결핵백신 후보별 시간에 따른 사슴 IFN-gamma 발현량 변화



[그림 60] 백신 접종 후 후 엘크 IFN-gamma 발현량 측정



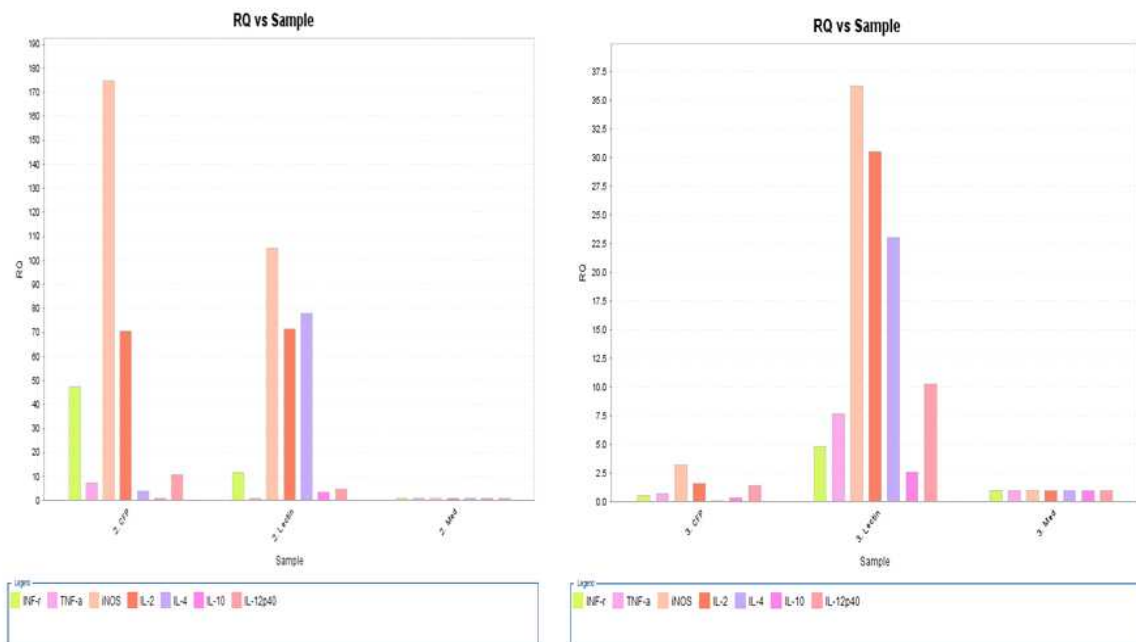


[그림 61] 결핵균 감염 후 엘크의 IFN-gamma 발현량 측정

- 사슴 결핵에 대한 진단법으로 PPD tuberculin의 적용외에는 진단법이 개발되어 있지 않음
- 결핵항원을 이용한 사슴의 결핵특이항체를 검출하는 방법을 적용하여 보았으나, 소에 비하여 민감도가 상당히 낮게 나오는 것을 관찰한 바 있어 사람에서 잠복결핵진단 마커로 사용되고 있는 IFN-gamma를 측정하고자 하였음
- 사슴 IFN-gamma를 이용한 사슴결핵진단키트가 개발되어 상용화가 된 적은 있으나 현재 사용되고 있지 않아 본 연구에서는 mRNA 수준에서의 IFN-gamma를 측정하였음
- *M. bovis*와 환경 Mycobacteria인 *M. avium* complex를 감별하기 위하여 결핵균 항원인 ESAT-6, CFP10, CFP 항원과 *M. avium* complex의 MMP 펩타이드를 사용하였음
- 감염된 사슴의 혈액을 채취하여 Ficoll을 이용하여 PBMC를 분리한 후, 결핵균항원을 자극한 후 시간대 별로 IFN-gamma mRNA 발현량을 측정함
- 결핵균 항원으로 자극한 후 4-8시간 내에 IFN-gamma mRNA 발현량이 상당히 높게 발현되었으며, 이후에는 감소하는 양상을 보였음
- IFN-gamma mRNA 발현이 높게 유지되는 자극 후 6시간대에서의 결핵균 항원별로 조사하였을 때, 결핵균 항원인 CFP에 의한 IFN-gamma mRNA 발현이 높게 나타났고, *M. avium* complex의 항원인 MMP 펩타이드에 대한 IFN-gamma mRNA가 발현되지 않는 것을 확인하였음
- 이로 보건대 감염된 사슴의 혈액을 채취하여 결핵항원을 자극한 후 IFN-gamma mRNA를 측정하는 방법을 통해 결핵에 감염된 사슴을 진단할 뿐 아니라, *M. avium* complex에 의한 감별진단도 가능할 것으로 사료됨.

2번(5436) 사슴 data (PPD Pos.)

3번(3848) 사슴 data (PPD neg.)



[그림 62] BCG 백신 접종 후 투베르쿨린 검사 결과에 따른 여러 가지 cytokine 발현량

- PPD결과와 Real-time PCR에서 상대적 발현량을 측정하여 비교한 결과 PPD 양성인 그룹에서 결핵 특이항원인 Culture Filterate protein(CFP-10)으로 자극하였을 때 Interferon gamma와 inducible Nitric Oxide Synthase, Interleukin-2와 같은 CD4 T cell의 cytokine발현양이 증가됨.

제 8 절

■ 엘크와 꽃사슴에 대한 감염 및 백신접종에 의한 투베르쿨린 검사법

1) 결핵균 감염 및 투베르쿨린 반응 검사

- 재료 및 방법

사용균주 : Mycobacterium bovis (국내 분리균주)

접종량 : 1×10^5 CFU/ml

접종방법 : 기관지내 접종

- 평가

접종개체 대한 PPD 검사결과

[Table 15] 우형 결핵균 감염 초기 투베르쿨린 검사 결과

개체번호	PPD 검사결과			비고
	접종2주차	접종4주차	접종8주차	
3848	음성	음성	양성	양성 기준 종창차 : 5mm 이상
3849	음성	음성	양성	
3850	음성	음성	양성	
5436	음성	음성	양성	



Challenger 2주차



Challenger 4주차



Challenger 8주차

[그림 63] 우형 결핵균 감염 후 투베르쿨린 결과 측정

- 정상적인 개체에서 결핵균에 감염될 경우 최소 감염 8주차 후에 항체 반응이 나타나는 결과를 보이고 있어 백신 접종은 늦어도 생후 2개월 이내에 실시하는 것이 합당한 것으로 나타났음

2) BCG 백신 접종 후 투베르쿨린 반응 검사

- 재료 및 방법

사용백신 : BCG 사람용 백신

접종량 : 1*10⁷(7)/ml

접종방법 : 피하 및 근육주사

- 평가

BCG 접종 후 PPD-avium, PPD-bovine을 경부 피내에 0.1ml 씩 접종하여 알리지 반응을 관찰한바 결과는 다음과 같이 나타남

[Table 16] BCG 백신 접종 방법에 따른 투베르쿨린 검사 결과

이표번호	접종전 상태	종류	접종방법	접종량	PPD 결과	
					PPD-avium	PPD-bovine
3865	양성	BCG	피하	1*10(7)	음성	양성
5444	음성	BCG	피하	1*10(7)	음성	양성
5448	음성	BCG	피하	1*10(7)	음성	양성
5447	음성	BCG	피하	1*10(7)	음성	양성
3863	음성	BCG	피하	1*10(7)	음성	양성
5442	음성	BCG	근육	1*10(7)	음성	음성
5446	음성	BCG	근육	1*10(7)	음성	음성
3864	음성	BCG	근육	1*10(7)	음성	양성
5449	음성	BCG	근육	1*10(7)	음성	음성

- 백신을 접종할 경우 피하주사로 접종하는 것이 보다 반응을 빨리 투베르쿨린 반응을 유도한다는 것을 알 수 있어 차후 백신 접종시 피하주사 방법을 선택하는 것에 대해 고려하여야 함.

[Table 17] Elk에서 BCG 백신 접종 후 투베르쿨린 검사 결과

Date	ID(이표번호)	Avium-PPD(mm)	Bovine-PPD(mm)
12 days	3848	5.85	7.13
	3850	3.03	5.66
	3849	3.46	7.14
	5436	2.87	7.91
28 days	3850	negative	+/-
	5436	6.49	-
	3848	13.06	-
48 days	5436	positive	positive
	3848	positive	negative
	3849	positive	+/-
	3850	+/-	negative
48 days	3848	15.74	20.02
	3849	2.02	8.82
	3850	2.93	21.99
84 days	3848	negative	21.69
	3849	negative	negative
	5430	negative	+/-
	3654	-	negative
	3666	-	negative
	3647	-	4.84
	3659	-	5.06

	3663	negative	negative
	3656	-	17.12
	3665	-	negative
	3657	-	16.04
	3664	-	negative
	3660	-	negative
	3658	-	negative
	3651	-	negative
120 days	3848	Negative	16.88
	3849	Negative	Negative
	5430	Negative	Negative
	3647	Negative	Negative
	3658	Negative	Negative
	3663	Negative	susceptible
	3654	Negative	Negative
	3666	Negative	Negative
	3656	Negative	Negative
	3665	Negative	susceptible
	3657	Negative	Negative
	3664	Negative	Negative
	3660	Negative	susceptible
	3659	Negative	Negative
300 days	3665	Negative	Negative
	3663	Negative	Negative
	3660	Negative	Negative
	3658	+/-	+/-
	3654	Negative	Negative
	3656	Negative	Negative
	3666	+/-	+/-
	3848	Negative	Negative
	3849	Negative	
390 days	3656	Negative	+/-
	3666	Negative	-
	3654	Negative	+/-
	3658	Negative	-
	3848	Negative	+

[Table 18] 꽃사슴에서 BCG 백신 접종 후 투베르쿨린 검사 결과

Days post-immunization	ID(이표번호)	Avium-PPD(mm)	Bovine-PPD(mm)
0 day	3856	-	-
	3856	-	-
	3866	-	-
	3863	-	-
	3861	-	-
	3858	-	-
	3855	-	-
	3857	-	-
	3864	-	-
	3865	-	-
	3862	6.83	-
12 days	5447	-	-
	5446	2.32(avium, 약간 발적)	-
	5401	-	-
	5449	-	-
	5445	-	-
	5404	-	-
	5443	-	-
	5402	-	-
	5405	-	-
48 days	3866	Negative	Negative
	5449	16.51	20.17
	5443	Negative	+/-
	3865	Negative	Negative
	3864	-/+	-/+
	3856	Negative	24.56
	3863	Negative	18.78
	3855	10.03)	16.92
	5401	11.09	11.05
	5402	14.6	30.63
	5404	Negative	Negative
	5447	Positive	Positive
	5405	Negative	13.3
	3861	Negative	Positive
5446	Negative	Negative	
84 days	5449	9.08	21.47
	3855	6.08	23.45
	5447	negative	20.89
	3861	2.42	3.81
	5443	7.08	14.66

	3865	0	22.58
	3866	2.35	2.86
	5409	12.81	27.58
	3856	1.59	3.71
	5405	13.18	23.62
	5407	1.63	2.47
	5406	5.27	18.17
	5410	4.1	22.2
	5408	4.42	19.14
120 days	5408	negative	16.8
	5428	12.24	23.86
	5403	-/+	-/+
	3856	negative	negative
	5449	negative	negative
	3865	positive	negative
	3861	negative	-/+
	5421	negative	negative
	5405	negative	-/+
	3863	negative	15.75
	5427	negative	negative
	5447	negative	13.4
	5443	negative	25.22
	5426	-	-
180 day	3650	Negative	Negative
	5447	25.8	Negative
	3861	Negative	Negative
	3653	Negative	Negative
	3865	Negative	Negative
	3863	Negative	Negative
	5443	Negative	24.85
	3649	Negative	Negative
	5449	Negative	Negative
	3648	Negative	18.38
	3652	Negative	Negative
300 days	5447	Negative	Negative
	3650	Negative	Negative
	3863	Negative	Negative



[그림 64] 엘크에 대한 BCG 백신 접종 및 채혈



[그림 65] BCG 백신 접종 후 투베르쿨린 결과 측정

[Table 19] BCG 백신 접종과 결핵균 감염후 시기별 투베르쿨린 검사 결과

이표번호	2015-03-07	2015-03-19	2015-04-24	2015-05-30
3855	Negative/Negative	-	False positive /Positive	Negative/Positive
3856	Negative/Negative	-	Negative/Positive	Negative/Negative
3857	Negative/Negative		-	-
3858	Negative/Negative		-	-
3861	Negative/Negative	-	Negative/Positive	Negative/Negative
3862	Positive/Positive			
3865	False positive /Negative	-	Negative/Negative	Negative/Positive
3866	Negative/Negative	-	Negative/Negative	Negative/Negative
5402	Negative/Negative	-	Positive/Positive	(부검)
5405	-	Negative /False positive	Negative/Positive	Negative/Positive
5406	-	Negative/Negative	Negative/Negative	Trace/Positive
5407	-	Negative/Negative	Positive/Positive	Negative/Negative
5408	-	Negative/Negative	Negative/Negative	Negative/Positive
5409	Negative/Negative	-	False positive/ False positive	Trace/Positive
5410	Negative/Negative	-	Negative/Positive	Negative/Positive
5443	-	Negative/Negative	Negative/Trace	Positive/Positive
5445	-	Negative/Negative	(부검)	-
5447	-	Negative/Negative	Positive/Positive	Negative/Positive
5449	-	Negative/Negative	Positive/Positive	Positive/Positive

제 9 절

■ 결핵균 병원성 인자 RD1의 제거를 통한 사슴결핵백신 개발

1) pPK1 벡터를 이용한 결핵균 RD1 유전자 제거

(1) 결핵균 RD1 제거 방법 및 과정

(A) 배양

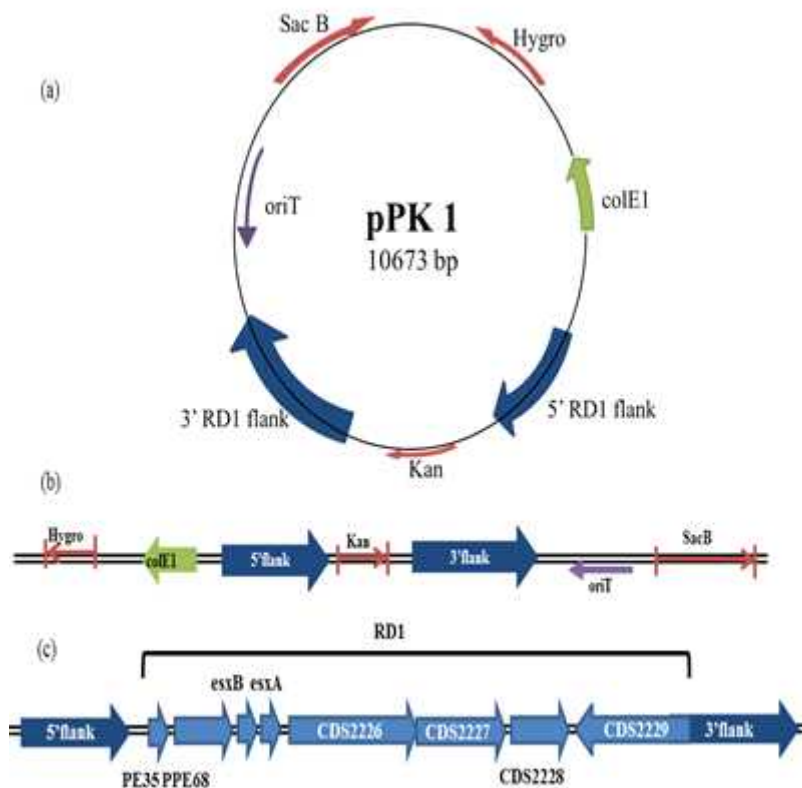
- 사용된 배지는 Middlebrook 7H9 액체배지 (Difco, Le pont de claix, France)에 10% OADC(Oleic acid, Albumin, dextrose, catalase; Difco, Le pont de claix, France)와 40mM sodium pyruvate(Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), glycerol(DAEJUNG chemicals & metals CO., LTD, Siheung, South korea), 0.05% tween 80(Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)을 넣어서 사용함

(B) pPK1 vector: pPK1 vector는 David Sherman박사(Center for Infectious Disease Research, Washington University, Seattle, USA)에게 제공받아 사용하였음

- **Plasmid:** *E. coli*에 들어 있는 plasmid를 얻기 위해서 Luria-Bertani 액체배지(Difco, Le pont de claix, France)와 Bacto™ 고체배지(Difco, Le pont de claix, France)로 LB 고체배지를 만들고, LB 고체배지에는 100µg/ml의 Ampicillin(BIO BASIC CANADA INC, Markham Ontario, Canada)을 넣어 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양하였음. 여기에서 자란 단일 집락을 LB 액체배지(Difco)에 옮겨 진탕배양기에서 37°C, 250 rpm 으로 다시 24시간 배양하고, 그리고, mini-prep kit(LaboPass™ Plasmid Mini, COSMO GENETECH, Seoul, South korea)를 이용하여 pPK1 vector를 분리 정제하였음

(C) pPK1 vector를 이용한 결핵균 형질 전환

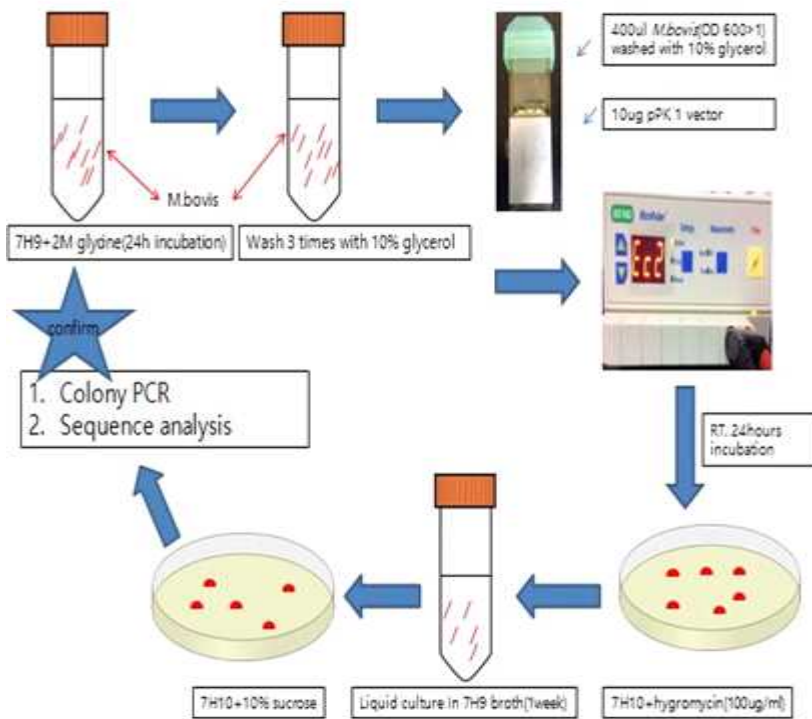
- *M. bovis*을 4주간 배양 후 3,000xg 에서 20분간, 25°C로 원심분리 후 상층액을 제거함
- 7H9 액체배지에 2M glycine (DAEJUNG chemicals & metals CO., LTD, Siheung, South korea)을 넣은 배지에 균을 천천히 잘 풀어서 진탕배양기에서 37°C에서 24시간 동안 배양함
- 24시간 후 3,000xg 에서 20분간, 25°C에서 원심분리 후 상층액을 제거하고, 멸균된 10% glycerol(DAEJUNG chemicals & metals CO., LTD) 로 세 차례 세척하고, 마지막 세척 후에는 10% glycerol(DAEJUNG chemicals & metals CO., LTD) 400µL 에 균을 잘 풀어줌 (600nm, 흡광도 > 1)



[그림 66] Map of the pPK1 vector and RD1 region.

(a) pPK1 vector map; (b) Linear form of pPK1 vector; (c) RD1 region of *M. bovis*

- cuvette(0.2cm Gene pulser, BIO-RAD Laboratories, California, USA)에 만들어진 균 400 μ L 와 pPK1 10 μ g을 넣어 electroporation apparatus (MicroPulser™, BIO-RAD Laboratories, California, USA)에 넣고 작동시킨 후 형질전환 시킨 균을 실온에서 24 시간동안 방치한 후 7H9 액체배지에 1주일 동안 진탕배양기에서 키우고, 그 후에 100 μ g/ml Hygromycin B(sigma-aldrich, 50 mg/ml)를 넣은 7H10 고체배지(Difco, Le pont de claix, France) 에 도말하여 37°C에서 3~4주 배양기에서 배양 후 집락을 확인 함
- 배지에서 자란 각 집락을 7H9 액체배지에 옮겨 심어 1주일 동안 진탕배양기에서 배양 하고, 그 후에 7H10 고체배지에 10% sucrose(BIO BASIC CANADA INC, Markham Ontario, Canada)을 넣은 배지에 균을 도말하여 3~4주 후에 올라온 집락 모두를 colony PCR을 실시함
- RD1 부위가 제거 된 것이 확인된 집락을 7H9 액체배지에 접종하여 진탕배양기에서 2 주일동안 추가 배양한 후, 선택된 균을 RD1부위가 제거되었는지 확인하기 위해genomic DNA를 추출 하여 천랩(ChunLab, Inc., Seoul national university, South korea)에 Whole genome sequencing을 분석함



[그림 67] Experimental scheme for transformation of *M. bovis* using pPK1 vector

(D) Colony PCR을 통한 형질전환된 결핵균 선별

- Colony PCR에서 선택된 균주를 7H9 액체배지에 10% OADC(Oleic acid, Albumin, dextrose, catalase)와 40mM sodium pyruvate(sigma), 0.05% tween 80(sigma)에 배양한 후 야생형 *M. bovis*와 BCG를 이용하여 RD1 부위가 제거 되었는지 PCR을 통해 확인함
- DNA를 추출하기 위해 3,000xg 에서 20분간, 25°C에서 원심분리 하고 상층액을 제거 후 세 차례 saline으로 세척하고, boiling 방법 (heat-killed for 15분, at 95°C)으로 DNA를 추출하여 NanoQuant Reader(Infinite M200 PRO, Tecan Trading AG, Switzerland)로 측정하고, 야생형, RD1 부위가 제거되었다고 예상되는 변이주, BCG의 template를 100 ng/μL로 다중중합효소연쇄 반응을 수행함
- 사용된 primer는 Mycobacteria complex를 감별 가능한 multiplex primer(Kim et al., 2013)을 참고하여 중합효소연쇄반응을 실시하였음. PCR를 위해 Primer 4μL, 2x G-Taq PCR Master-mix(LaBoPass™, Cosmogenetech, CMT7001, Seoul, South Korea) 7.5μL, DNA template 1μL, RNase Free Water(WelGENE Inc., ML 019-01, Gyeongsan, South Korea) 2.5μL를 포함하여 진행함
- pPK1 vector에 의해 RD1의 제거 유무를 확인하기 위해 RD1 부위 외곽에 있는 5' Flank와 3' Flank 부위를 목표로 디자인한 primer를 사용해 다중중합효소연쇄반응을 실시함.

[Table 20] Primer sequences of PCR for discrimination of *Mycobacterium* complex

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Description of target	Annealing temp. (°C)	Estimated size (bp)	Reference
rpoB-F	GCTGGACATCTACCGCAAGCTGC	rpoB	68	518	(Kim et al., 2013)
rpoB-R	CAGCGGGTTGTTCTGGTCCATG				
RD8-F	GTCGAAGCGGGGCGCTCT	RD8 deletion	68	360	
RD8-B-R	GGTTCTTGGCGTCTTGGAAGG				
RD1-F	CGAGGGGAAGCAGTCCCTGA	RD1 (ESAT-6)	68	254	
RD1-R	AGGTCGAACTCGCCCGATCC				
RD8-F	GTCGAAGCGGGGCGCTCT	RD8 present	68	150	
RD8-T-R	GCGCAACGGATTTCATCGT				

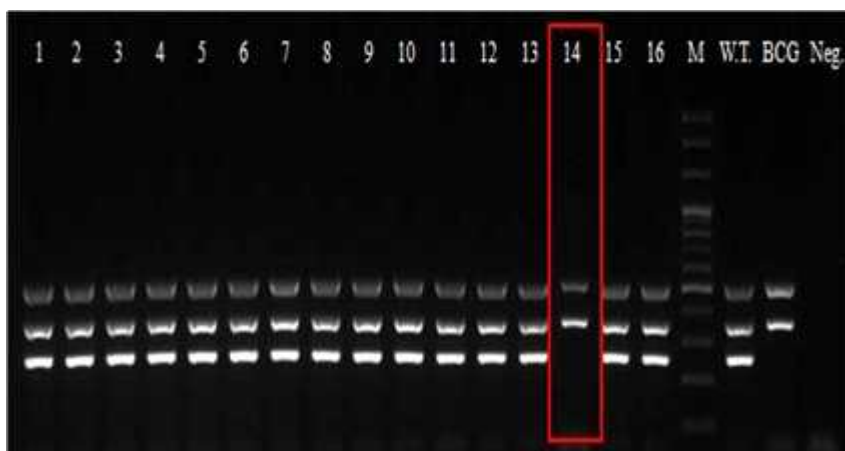
[Table 21] Primer sequences of confirmation of RD1-deleted *M. bovis* mutant

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Description of target	Annealing temp. (°C)	Estimated size (bp)
MTB-RD1-F2	TAG GGT CAT TCT CCA GGA TAT C	Wild type	62	421
MTB-3F-R1	CCG CGA GGC GAT CTG GCG GTT T			
MTB-5F-F3	CTG GCG GTC AAC CTG AAG AAG C	Wild type	62	303
MTB-RD1-R4	TCG CCC GAA AGG AAC ATT GTC G			
MTB-5F-F3	CTG GCG GTC AAC CTG AAG AAG C	Deletion of RD1	62	1,450
MTB-3F-R1	CCG CGA GGC GAT CTG GCG GTT T			
MTB-5F-F3	CTG GCG GTC AAC CTG AAG AAG C	BCG	62	200
MTB-3F-R1	CCG CGA GGC GAT CTG GCG GTT T			

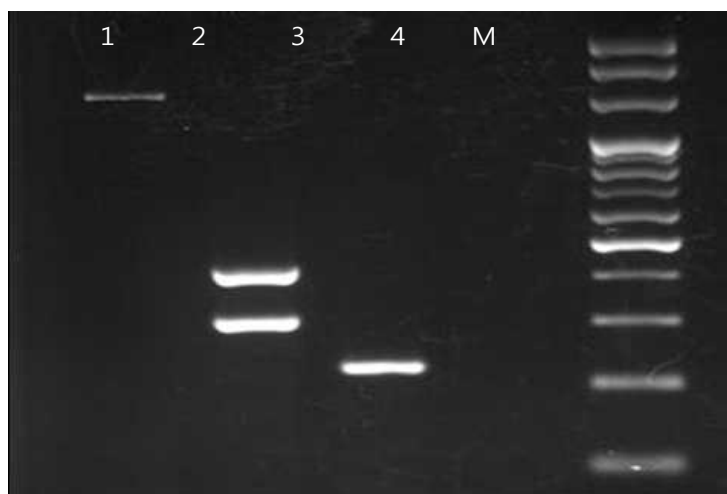
(2) RD1 유전자 결핍 결핵균 선별 및 확인

(A) pPK1 vector를 이용하여 형질전환된 *M.bovis*의 선별

- 형질전환 시킨 후 primary selection(100 μ g/mL Hygromycin이 들어 있는 7H10 고체배지에서 자란 집락)과 secondary selection(10% sucrose가 들어있는 7H10 고체배지에 심어 자란 집락)을 통해 자란 집락을 Mycobacterium complex을 한 번에 확인 가능한 Primer를 이용한 다중중합연쇄반응을 진행하여 결과를 확인 하였음
- 14번을 제외한 모든 밴드는 RD1 부위가 제거되지 않은 야생형과 동일하게 518bp, 360bp, 254bp 이렇게 3 밴드가 나왔고, 결핵균이라면 가지고 있는 rpoB는 518bp에서, Mycobacterium bovis에는 RD8이 없기 때문에 360bp, RD1 부위에 존재하는 ESAT-6는 254bp를 보였음



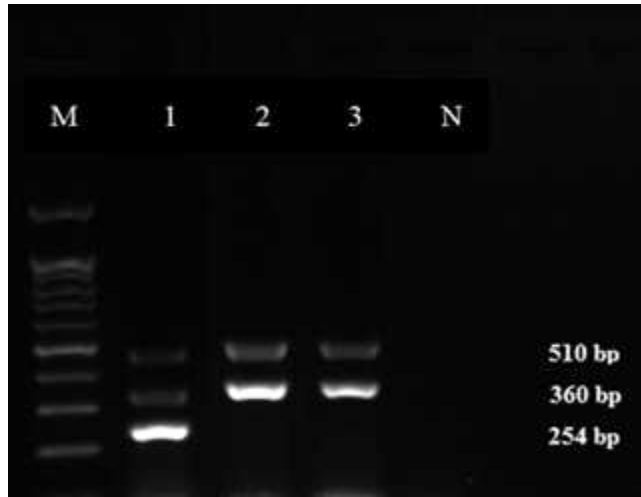
[그림 68] PCR results on the colony obtained from primary, secondary selection



[그림 69] Gel electrophoresis for confirmation of RD1-deleted from *M. bovis*.

Lane 1 : Δ RD 1 mutant; Lane 2 : Wild type; Lane 3 : BCG; Lane 4 : Negative(RNase free water); M : size marker

A



B



[그림 70] Discrimination results of the 3 different bacteria. The results using Kim et al's primers; (b) The results using new designed primers; M : Marker 100 bp; Lane 1: Wild type (*M. bovis*); Lane 2: Δ RD 1 mutant; Lane 3: BCG; N: Negative control

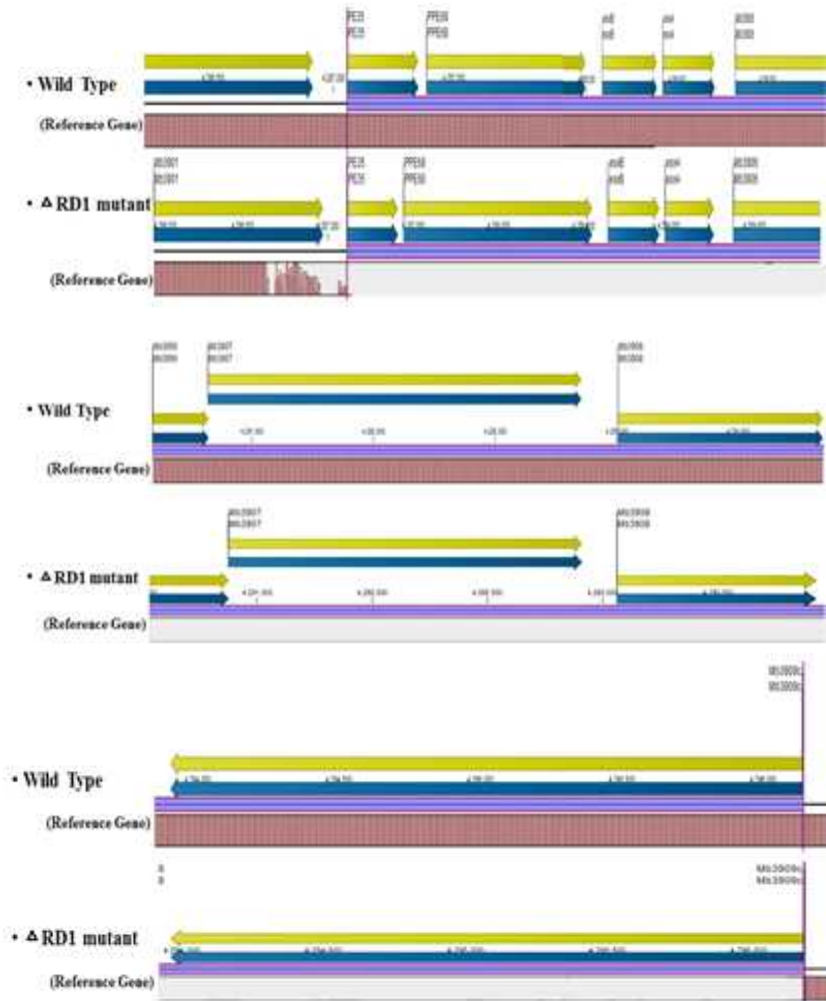
- 반면, 형질전환 후 선별된 집락 중 14번은 RD1 부위가 없는 BCG와는 같은 위치의 밴드인 518bp, 360bp를 확인하였고, 14번 집락을 RD1 부위가 제거된 것으로 예상되는 변이주라 보고, 7H9 액체배지에 키웠음
- 이 RD1 부위가 제거된 것으로 예상되는 변이주와 BCG와의 감별을 위해 RD1 부위 5'Flank, 3'Flank를 target으로 한 primer로 추가적인 PCR를 진행해 본 결과 RD1 부위가 제거된 것으로 예상되는 변이주와 BCG를 감별 할 수 있었음
- *Mycobacterium* complex를 감별할 수 있는 multiplex-PCR(Kim et al., 2013)을 이용하여 야생형, RD1부위 제거 변이주, BCG 감별을 하였을 때, 야생형은 *M.bovis*이기 때

문에 rpoB가 존재하고 RD8은 존재 하지 않으며 그리고 RD1 부위를 가지고 있기 때문에 각각 518bp, 360bp, 254bp 위치에서 밴드를 확인하였음. 즉, 3개의 밴드가 나와서 야생형이 *M.bovis*라는 것을 확인하였음

- 그리고 RD1부위 제거 변이주와 BCG는 *M.bovis*에서 유래되었지만 RD1 부위가 없기 때문에 각각 518bp과 360bp에서 밴드를 확인하였고, RD1 부위가 제거 된 상태인 RD1 부위 제거 변이주와 BCG는 254bp에서 밴드를 확인할 수 없었음. 즉, 형질전환 된 RD1 부위 제거 변이주는 RD1이 없어졌다는 것을 시사함.
- 하지만 RD1부위 제거 변이주와 BCG는(Kim et al., 2013)의 다중중합효소연쇄반응에서는 2 균 종이 구분되지 않았음
- 새로운 5'flank와 3'flank 부위를 이용한 primer를 제작하여 multiplex-PCR을 수행하였음. 야생형은 421bp와 300bp에 2 밴드가 나왔고, RD1부위 제거 변이주는 1.45kbp에 밴드가 나왔고, BCG pasteur는 200bp에서 밴드가 나왔음
- 이로 인해, 야생형, RD1부위 제거 변이주 그리고 BCG의 감별이 가능하였고, 따라서 5'flank와 3'flank 부위를 이용한 primer(MTB RD1-F2, 3F-R1, 5F-F3, RD1-R4 F4)를 사용하면 3 균 종의 감별을 빠르고 간단하게 할 수 있었음

(B) pPK1 vector를 이용하여 형질전환된 *M.bovis*의 sequence 분석

- 야생형과 RD1 부위가 제거된 것으로 예상되는 변이주의 whole genome sequence를 CLC Main workbench 7 software를 사용하여 분석을 하였음
- Sequence 분석을 실시하여 본 결과, 야생형은 Genbank에서 제시하는 reference gene과 RD1 부위가 일치함을 확인할 수 있었고, 그에 반에 RD1 부위가 제거된 것으로 예상되는 변이주는 Genbank에서 제시하는 reference gene과 일치하지 않는다는 것을 확인하였음. 즉, 야생형에서는 RD1 부위가 존재 하는 것에 반에 RD1 부위가 제거된 것으로 예상되는 변이주에서는 RD1 부위가 제거되었다는 것을 확인하여 RD1 부위가 제거(Δ RD1 mutant)된 것을 확인하였음

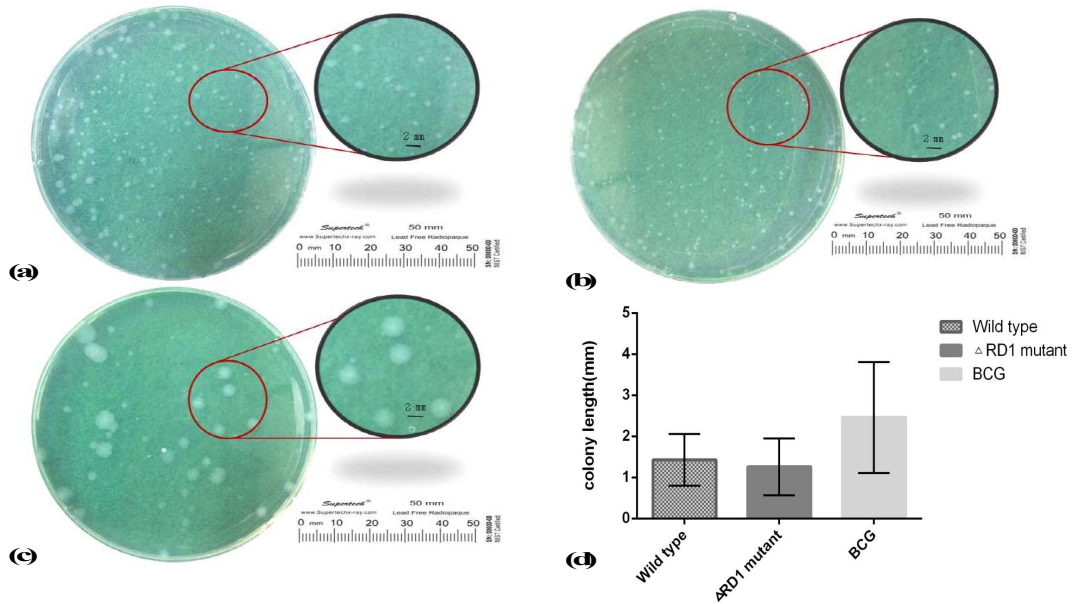


[그림 70] RD1 Sequence analysis of Wild type and Δ RD1 mutant.

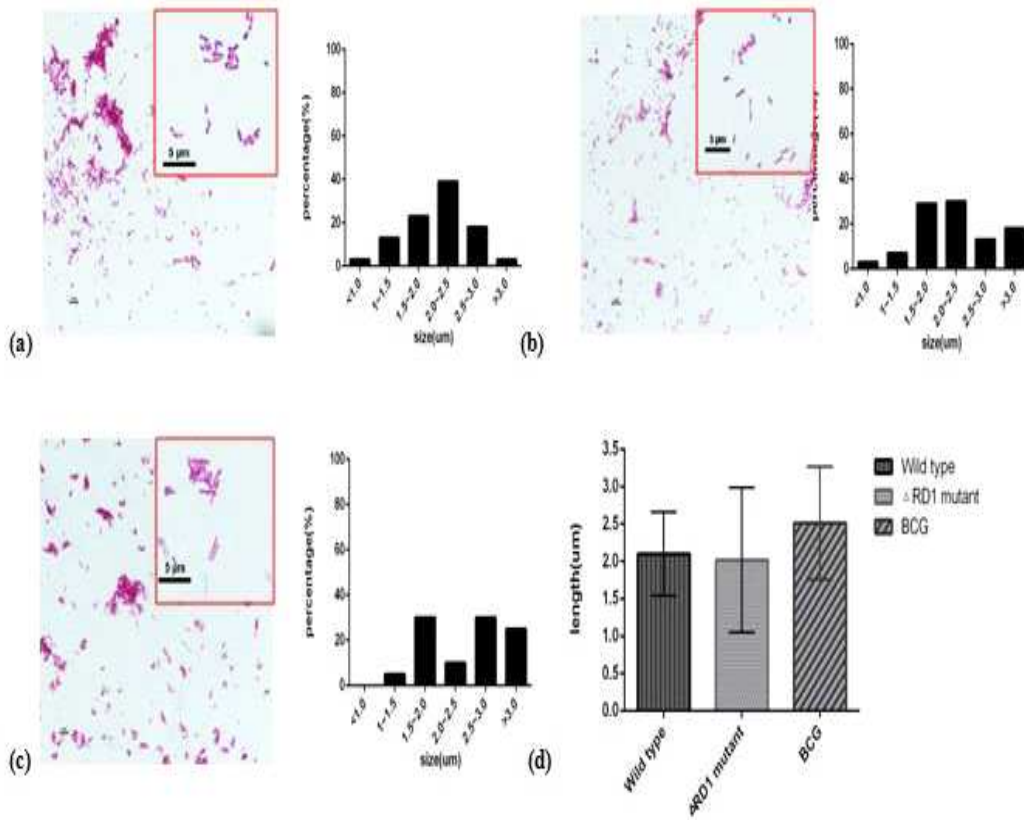
(3) RD1 유전자 결핍 결핵균의 in vitro 특성

(A) pPK1 vector를 이용하여 RD1 유전자가 제거된 M.bovis의 집락특성

- 야생형, RD1 부위 제거 변이주, BCG를 7H10 고체배지에서 집락 형태를 비교해 보면 야생형의 집락은 불규칙하며 주름이 보이지 않는 형태로 $1.43 \pm 0.63\text{mm}$ 의 크기를 보였음
- RD1 부위 제거 변이주의 집락 형태는 야생형과 유사하게 불규칙하고 주름이 보이지 않는 형태로 $1.26 \pm 0.69\text{mm}$ 의 크기를 보였음
- 반면에, BCG의 집락 형태를 보게 되면 건조하고 불규칙적이며 주름진 형태를 띄는 형태로 $2.46 \pm 1.35\text{mm}$ 의 크기를 보였음
- 즉, 야생형과 RD1 부위 제거 변이주는 유사한 집락과 유사한 크기를 보였지만, BCG와는 다른 형태의 집락과 크기를 보였음. 하지만 유의성 있는 집락 크기를 보이지는 않았음(p value = 0.42).



[그림 71] Colony morphology of WT *M.bovis*, BCG & Δ RD1 mutant(a) *M. bovis* (b) Δ RD 1 mutant (c) BCG. (d) Colony size of Wild type, Δ RD1 mutant and BCG

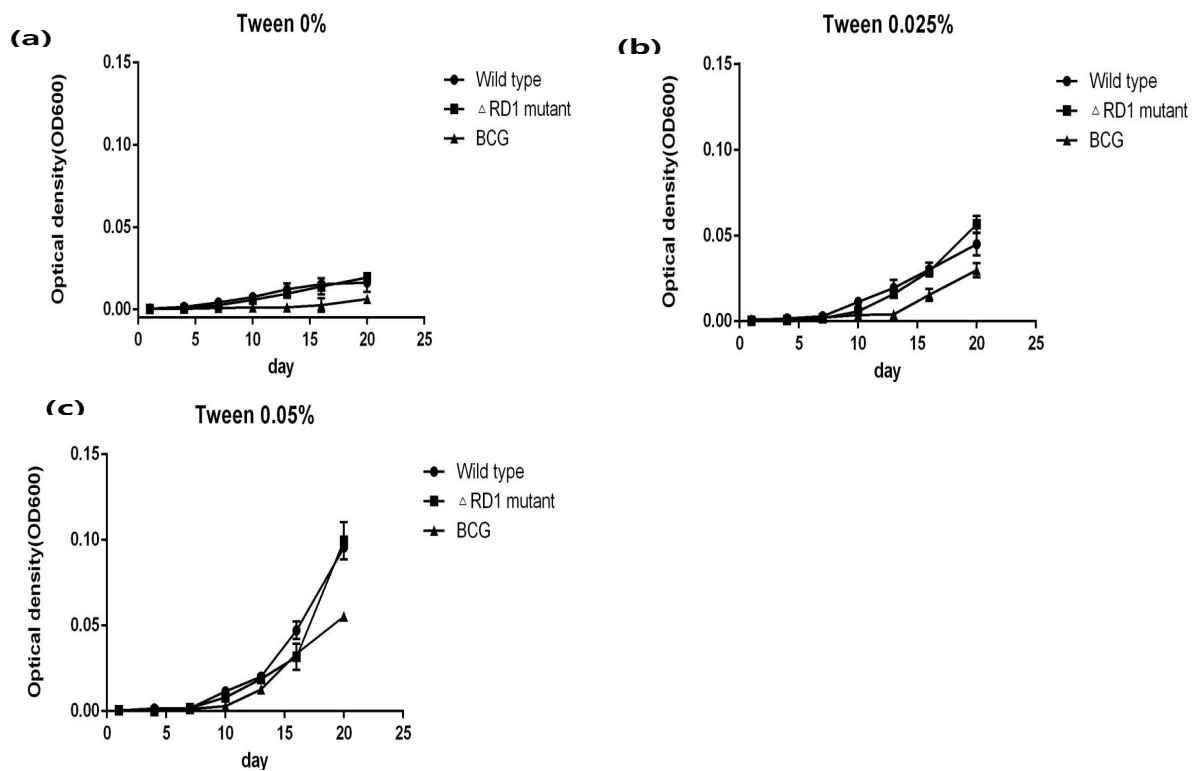


[그림 72] A comparative observation of histogram about bacteria micrographs by Ziehl-Neelsen stain(a) *M. bovis* (b) Δ RD 1 mutant (c) BCG.

- 야생형, RD1 부위 제거 변이주, BCG를 Ziehl-Neelsen stain 하여 광학현미경과 프로그램(Leica LAS X 2D Analysis)을 통해 관찰된 결과, 야생형과 RD1 부위 제거 변이주는 유사한 길이와 유사한 모양을 보이는(Figure 8, a, b, d) 반면에, BCG는 야생형과 RD1 부위 제거 변이주 보다 길이가 길었음
- 프로그램(Leica LAS X 2D Analysis)으로 분석해 본 결과 야생형은 평균 $2.100 \pm 0.561\mu\text{m}$ 의 길이를 보였고, RD1 부위 제거 변이주는 평균 $2.018 \pm 0.970\mu\text{m}$ 의 길이를 보였음. 그리고 BCG는 평균 $2.510 \pm 0.756\mu\text{m}$ 의 길이를 보였음.
- 야생형과 RD1 부위 제거 변이주는 유사한 균 길이를 보였고, BCG는 야생형과 RD1 부위 제거 변이주에 비해 균 길이가 길었음. 뿐만 아니라 균 길이에 대한 표준편차는 야생형이 가장 작고, 그 다음은 BCG, RD1 부위 제거 변이주가 가장 컸음. 하지만 유의성 있는 결과를 보이지는 않았음(p value = 0.94).

(B) pPK1 vector를 이용하여 RD1 유전자가 제거된 M.bovis의 성장 특성

- Tween 80 농도에 따라 야생형, RD1부위 제거 변이주, BCG의 흡광도 증가를 비교해 보았을 때, 세 균 중 모두에서 Tween 80 0.05%에서 흡광도가 가장 많은 증가를 보임



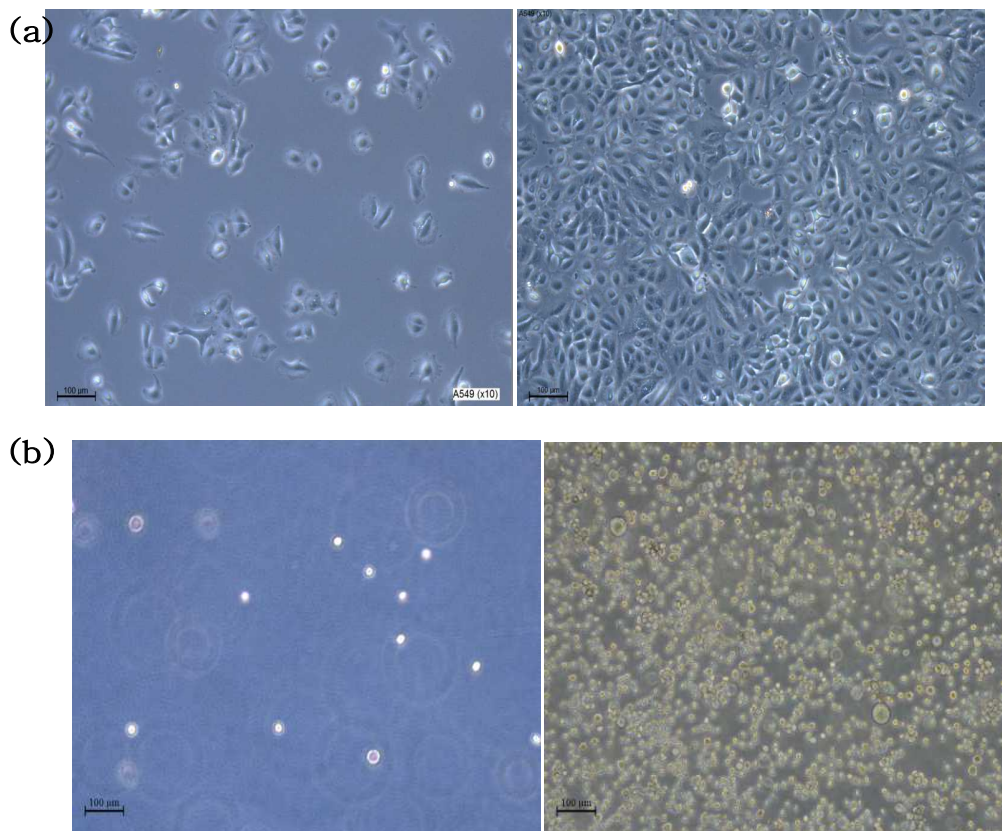
[그림 73] The bacterial growth at different concentration Tween 80.

(a) Tween 80: 0%; (b) Tween 80: 0.025%; (c) Tween 80: 0.05%.

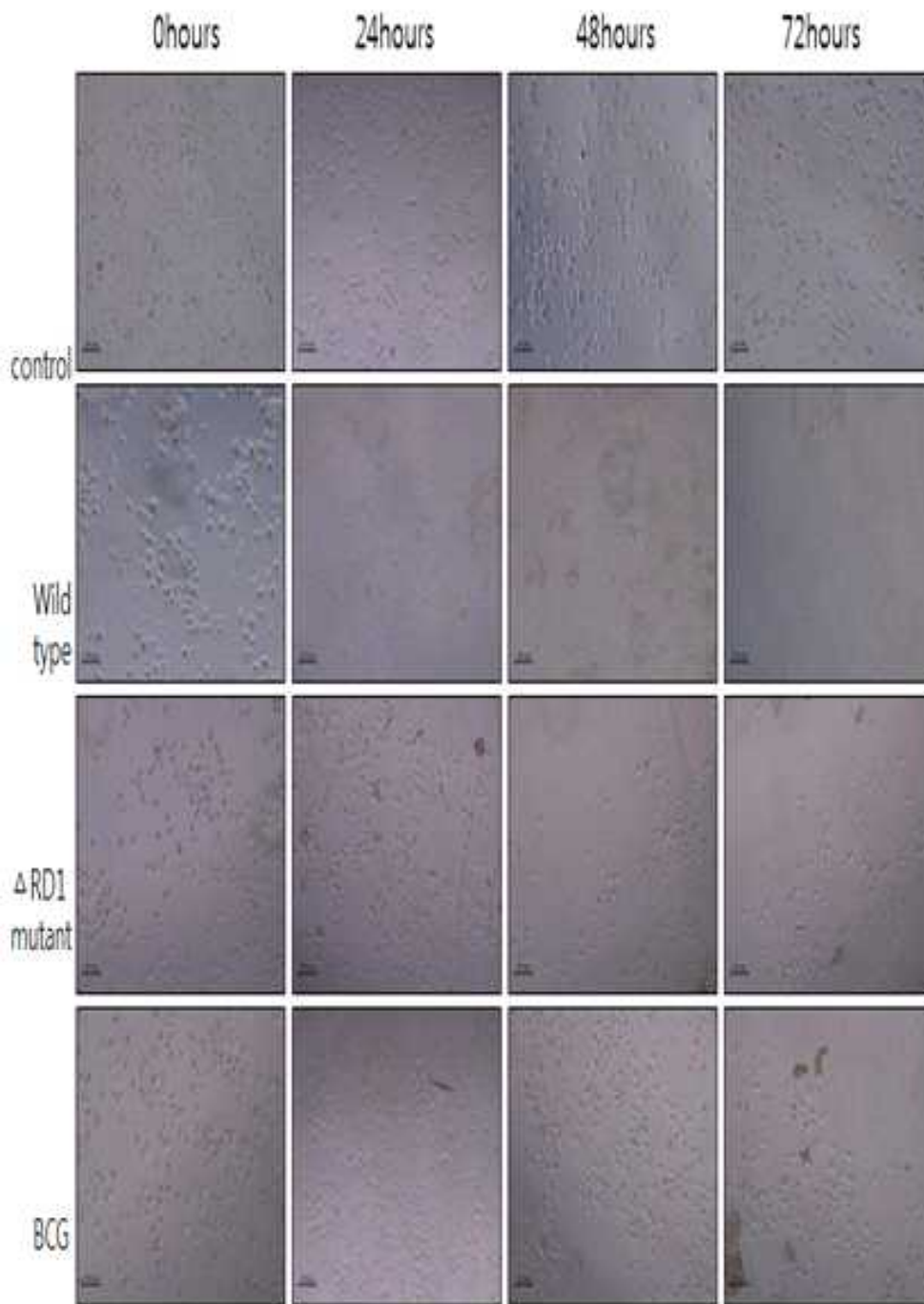
- Tween 0%에서는 야생형과 RD1부위 제거 변이주가 유사한 흡광도 증가를 보였고, BCG는 그보다 낮은 흡광도 증가를 보였음
- 그리고 Tween 80의 농도 0.025%에서도 야생형과 RD1부위 제거 변이주는 유사한 흡광도 증가를 보였고 BCG는 그보다 낮은 흡광도 증가를 보였음
- Tween 80의 농도 0.05%에서는 3 균 중 모두 높은 흡광도 증가를 보였음. 그리고 Tween 80 농도 0.05%에서 BCG는 흡광도가 야생형과 RD1부위 제거 변이주보다 증가가 작았음.
- Tween 80 농도 0.05%에서 가장 큰 흡광도 증가를 보이는 것은 3 균 중 모두에서 같은 현상을 보였음

(4) RD1 유전자 결핍 결핵균의 세포독성 분석

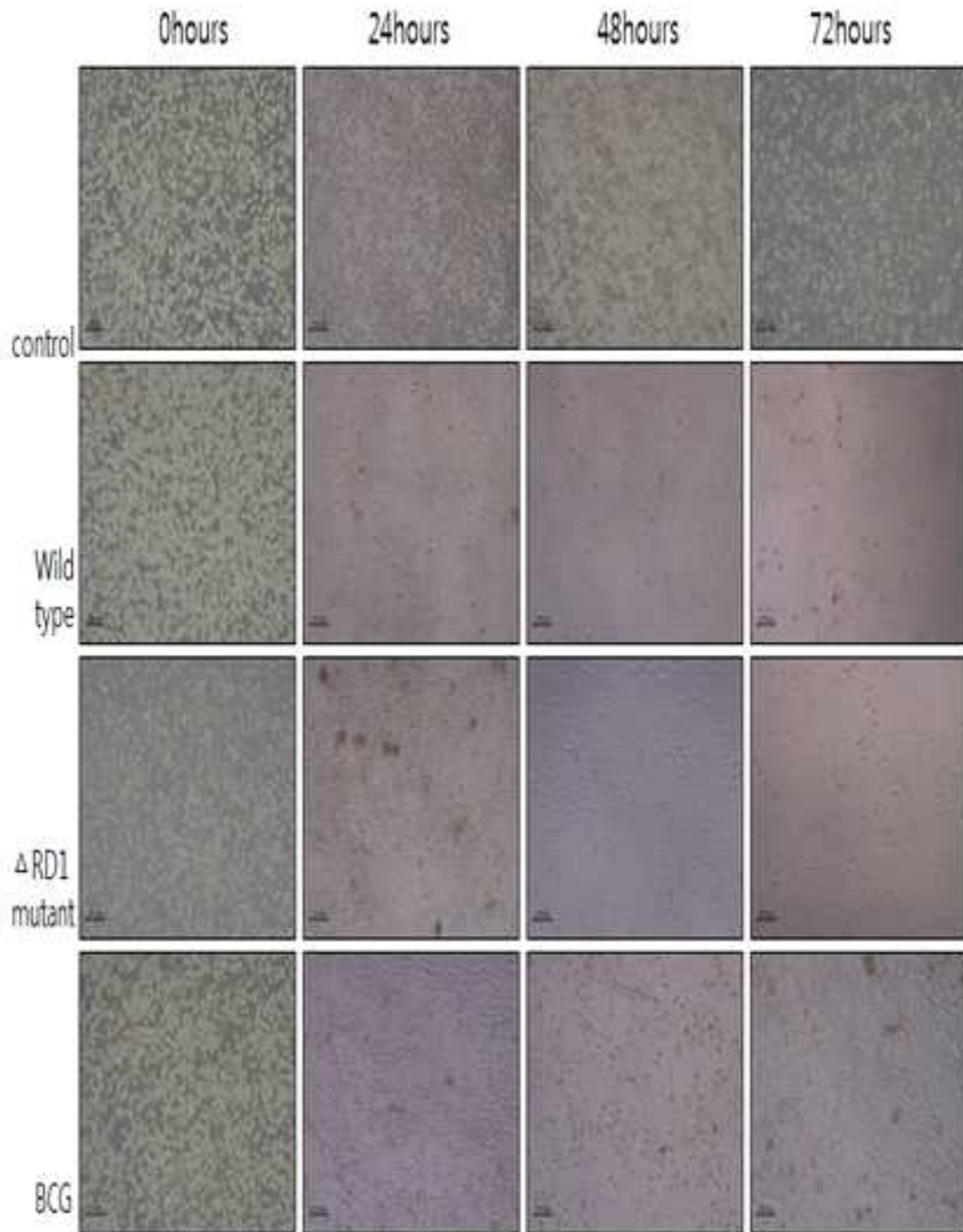
- 사람의 폐 세포에서 유래한 A549 cell line에 야생형, RD1부위 제거 변이주, BCG를 처리했을 때 24시간, 48시간 72시간이 지남에 따라 세포를 보게 되면 균을 처리하지 않은 대조군에서는 시간의 지남에 따라 세포의 변화가 작았음.
- 반면에, 야생형에서는 세포를 확인하기 어려울 정도로 세포를 찾기 어려웠음



[그림 74] A549 cell line and THP-1 cell line morphology. (a) Low density and high density of A 549 cell line; (b) Low density and high density of THP-1 cell line.



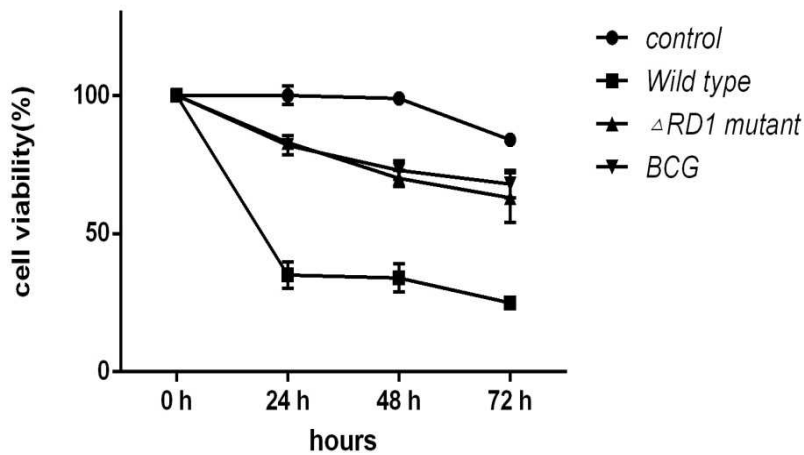
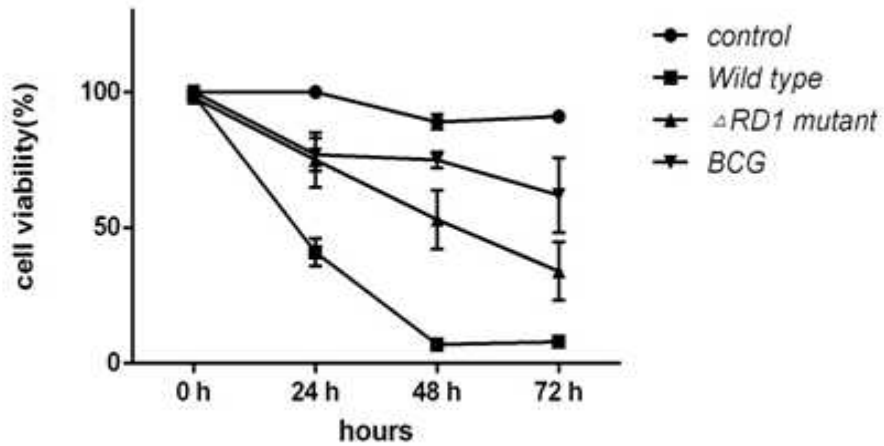
[그림 75] Morphology of A549 cell line after bacterial infection.



[그림 76] Morphology of THP-1 cell line after bacterial infection.

- RD1부위 제거 변이주와 BCG에서는 세포가 줄어들긴 했지만 야생형에 비해 생존한 세포의 수가 많다는 것을 확인 할 수 있었음
- 또한, cell viability를 측정해 봤을 때에도 24시간 때에는 대조군의 세포 생존율이

- 100%, 야생형 35%, RD1부위 제거 변이주 83%, BCG 82%의 세포 생존율을 보였음
- 48시간 때에는 대조군의 세포 생존율이 99%인 것에 비해 야생형 34%, RD1부위 제거 변이주 70%, BCG 73%의 세포 생존율을 보였음
- 72시간 때에는 대조군의 세포 생존율이 84%인 것에 비해 야생형 25%, RD1부위 제거 변이주 63%, BCG 68%의 세포 생존율을 보였음
- MTT assay에서도 야생형에서 cell viability가 가장 많이 줄었고 RD1부위 제거 변이주와 BCG는 유사한 cell viability를 보였음



[그림 77] MTT assay analysis after the Wild type, Δ RD1 mutant and BCG infection.
 (a) MTT assay result in A 549 cell line (b) MTT assay result in THP-1 cell line

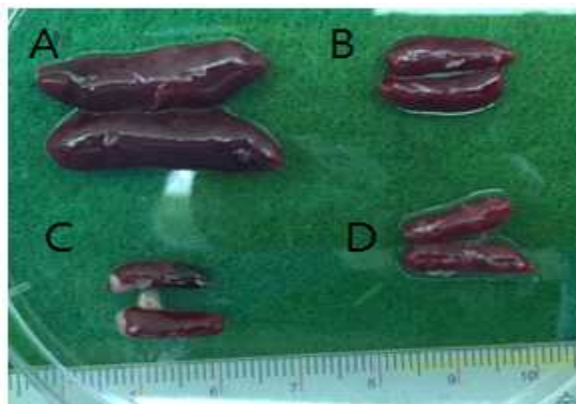
- 사람의 monocyte에서 유래한 THP-1 cell line(Figure 10, b)에 야생형, RD1부위 제거 변이주, BCG를 처리 했을 때 24시간, 48시간 72시간에 따라 세포를 보게 되면, 균을 처리 하지 않은 대조군에서는 시간의 지남에 따라 세포의 변화가 작은 반면에, 야생형

- 에서는 대조군에 비해 세포수가 많이 줄었음
- 하지만, RD1부위 제거 변이주, BCG에서는 세포가 줄어들었지만, 야생형에 비해서는 생존한 세포의 수가 많았음.
 - Cell viability를 측정해 봤을 때, 24시간 때에는 대조군의 세포 생존율이 100%, 야생형 41%, RD1부위 제거 변이주 75%, BCG 77%의 세포 생존율을 보였으며, 48시간 때에는 대조군의 세포 생존율이 89%인 것에 비해 야생형 7%, RD1 부위 제거 변이주 53%, BCG 75%의 세포 생존율을 보였음
 - RD1부위 제거 변이주와 BCG에서는 세포가 줄어들긴 했지만 야생형에 비해 생존한 세포의 수가 많다는 것을 확인 할 수 있었음
 - 또한, cell viability를 측정해 봤을 때에도 24시간 때에는 대조군의 세포 생존율이 100%, 야생형 35%, RD1부위 제거 변이주 83%, BCG 82%의 세포 생존율을 보였음
 - 48시간 때에는 대조군의 세포 생존율이 99%인 것에 비해 야생형 34%, RD1부위 제거 변이주 70%, BCG 73%의 세포 생존율을 보였음
 - 72시간 때에는 대조군의 세포 생존율이 84% 인 것에 비해 야생형 25%, RD1부위 제거 변이주 63%, BCG 68%의 세포 생존율을 보였음
 - MTT assay에서도 야생형에서 cell viability가 가장 많이 줄었고 RD1부위 제거 변이주와 BCG는 유사한 cell viability를 보였음
 - 72시간 때에는 대조군의 세포 생존율이 91% 인 것에 비해 야생형 8%, RD1부위 제거 변이주 34%, BCG 62%의 세포 생존율을 보였음.
 - 즉, MTT assay에서는 야생형에서 cell viability가 가장 많이 감소한 것에 비해, RD1 부위 제거 변이주와 BCG에서는 상대적으로 작게 감소하였음. 하지만 RD1부위 제거 변이주가 BCG 보다는 더 많은 cell viability의 감소를 보였음.

(5) 마우스 실험동물 모델을 이용한 RD1 유전자 결핍 결핵균의 안전성 분석

- Delta RD1 M. bovis 균주의 생체내 안전성을 평가하기 위하여 마우스 감염모델을 사용함

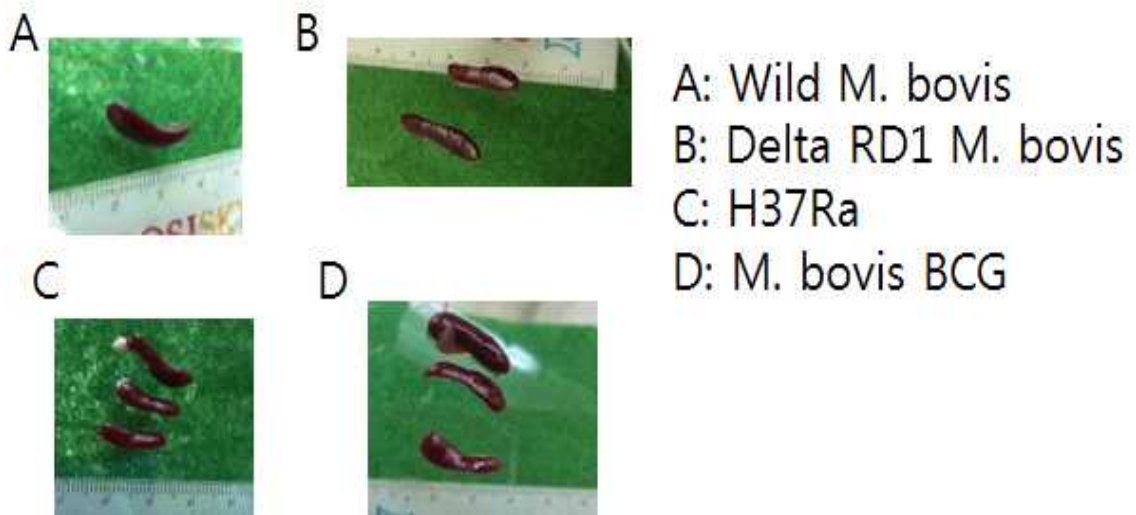
(A) RD1 유전자가 제거된 M.bovis의 마우스 감염 후 비장 크기 비교



A: Wild M. bovis
 B: Delta RD1 M. bovis
 C: H37Ra
 D: M. bovis BCG

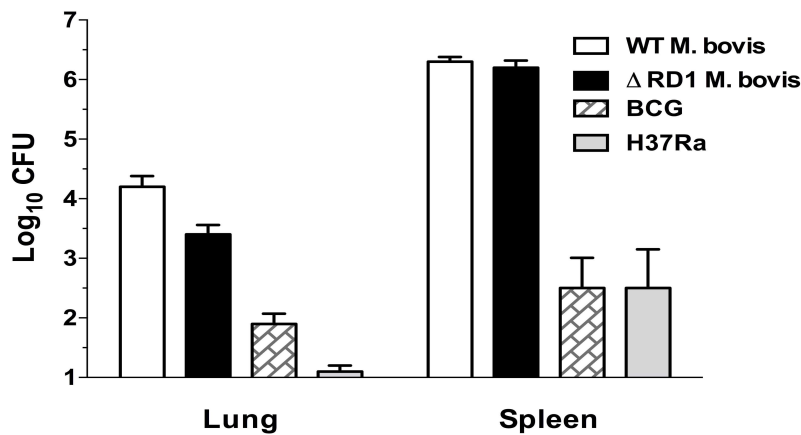
[그림 77] Delta RD1 결핵균의 실험동물 접종 2주 후 비장의 크기비교

- Delta RD1 M. bovis, WT M. bovis, BCG, H37Ra 균주를 C57BL6 마우스에 미정맥을 통하여 접종함
- 균 접종 후 폐, 비장을 제거한 후 조직을 파쇄하여 희석한 후 7H10 agar plate에 배양하여 생균수를 측정함
- 마우스의 미정맥을 통하여 감염후 WT M. bovis의 경우 약 3 cm로 비장이 비대되었음
- Delta RD1 M. bovis는 WT M. bovis에 비해 비장의 크기가 상당히 감소되어 WT M. bovis에 비해 병원성이 약하게 나타난 것을 확인하였음
- Delta RD1 M. bovis의 감염 후 비장 크기가 BCG 접종된 마우스의 비장크기와 유사한 것을 확인하였음



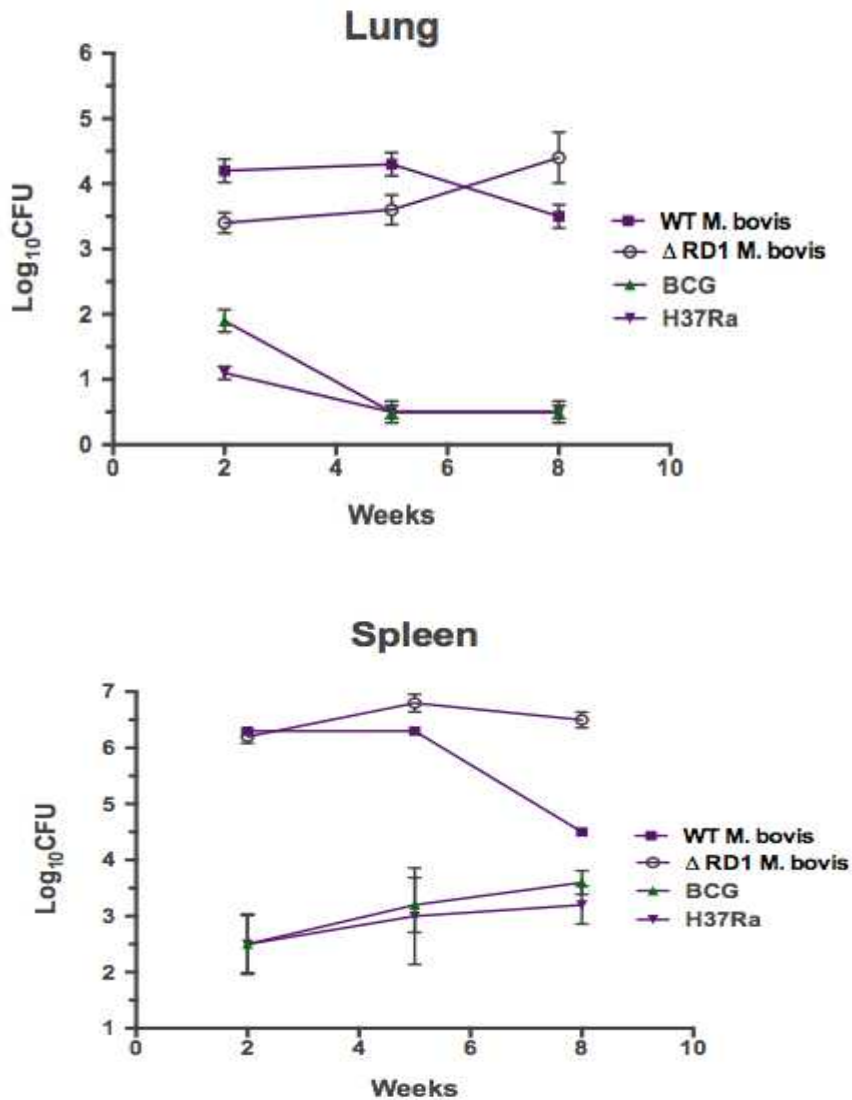
[그림 78] Delta RD1 결핵균의 실험동물 접종 2주 후 비장의 크기비교

(B) RD1 유전자가 제거된 M.bovis의 마우스 감염 후 생균수 비교



<그림 79> Delta RD1 결핵균의 접종 후 생체내 생균수

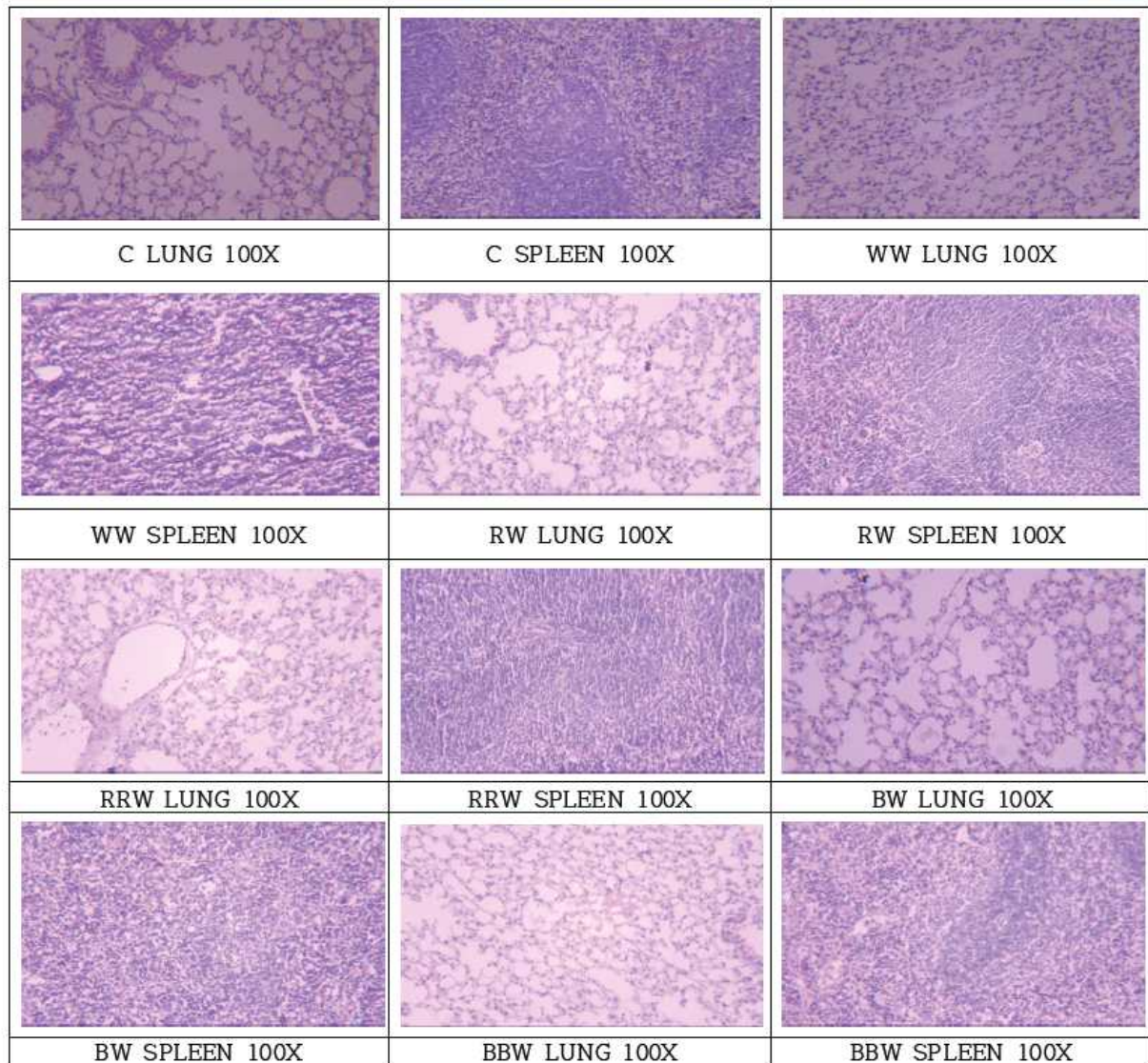
- Delta RD1 *M. bovis*의 생체내 생균수는 폐에서 WT *M. bovis*에 비하여 상당히 감소하여 병원성이 약독화되었음을 확인할 수 있었음.



<그림 80> Delta RD1 결핵균의 접종 후 폐와 비장의 생균수 변화

(B) RD1 유전자가 제거된 *M. bovis*의 마우스 감염 후 폐장의 병리학적 분석

- 접종방법 : 미정맥
- 접종량 : 1×10^6 CFU/ml
- 부검 : 4주 후 부검



<그림 81> Delta RD1 결핵균의 접종 후 폐와 비장의 병리조직학적 분석

C; Control group, WW; *M.bovis* 야외주(충주 30호)를 1차 정맥(미정맥) 접종 후 7일 후 *M.bovis* 야외주(충주 30호) 재접종; RW; RD1 부분을 제거한 *M.bovis*(백신주)를 접종, 14일 후 *M.bovis* 야외주(충주 30호) 접종; RRW; RD1 부분을 제거한 *M.bovis*(백신주)를 접종, 7일 후 RD1 부분 제거한 *M.bovis*(백신주)를 재접종, 14일 후 *M.bovis* 야외주(충주 30호) 접종; BW; BCG(Pasteur)를 접종, 14일 후 *M.bovis* 야외주(충주 30호) 접종; BBW; BCG(Pasteur)를 접종, 7일 후 BCG(Pasteur) 재접종, 14일 후 *M.bovis* 야외주(충주 30호) 접종.

- 폐 : WW에서 혈관주위 및 폐포 사이 약간 염증, RD1, BCG 접종에서는 아주 미세한 염증 소견보임
- 비장 : WW에서 RD1, BCG 접종군 보다 매우 많은 침색세포 침착 및 염증 소견 보임

제 10 절

■ 감염된 및 백신면역 접종 후 감염 사슴의 병리조직 변화

(1) 국내유행 고병원성 사슴결핵균을 이용한 백신의 효능평가

- 국내 사슴결핵에서 분리된 병원성이 높은 결핵균을 사슴의 기관지내에 기관지내시경을 이용하여 감염시킴
- 사슴결핵균 감염 후 시기별로 감염된 사슴의 폐병변 및 주변 임파절을 검사하여 병리조직학적 지표와 미생물학적 지표를 따라 평가함.
- 대조군으로 BCG백신을 접종한 예방백신군을 이용하여 결핵균 감염만 시킨 군과 예방백신을 접종한 군과의 병리조직학적 지표 및 미생물학적 지표를 이용하여 백신의 예방효과를 측정할 수 있는 최적의 조건을 확립함.



<그림 82> 결핵감염된 사슴의 폐병변

- 또한 감염 후 시기별로 혈액 및 조직으로부터 면역세포를 분리하여 결핵균 항원으로 자극하여 방어면역기능을 하는 면역세포의 동정 및 변화 등을 조사하고, 방어면역에 작용하는 cytokine 마커를 발굴함.
- 사슴결핵감염모델을 이용하여 개발될 예방백신을 평가하고, 감별진단법을 이용하여 유용성을 평가함.
- 엘크 및 꽃사슴을 국내 주요 분리균주형인 충주30을 기관지내로 감염시킨 후 각 장기의 병리학적 변화를 살펴보았음.

- 결핵균을 호흡기감염시킨 후 결핵의 주요 타겟 장기인 폐병변을 살펴보았을 때, 폐실질에 염증성 침윤이 있음을 확인할 수 있었음
- 모든 엘크에 *M. bovis* (충주30)을 1×10^5 cfu/ml를 접종하였고 꽃사슴은 *M. bovis* (충주30)을 1×10^5 cfu/ml를 접종한 그룹과 BCG백신을 피하와 근육에 접종한 그룹으로 나누어 비교
- 빠른 감염 및 병변 형성 위해 1×10^6 cfu/ml로 균 접종.

(1) Challenge Elk

Elk	ID(이표번호)	Challenge	CFU/ml
1st challenge	3848	충주 30(<i>M. bovis</i>)	1×10^5
	3849	충주 30(<i>M. bovis</i>)	1×10^5
	5436	충주 30(<i>M. bovis</i>)	1×10^5
	5430	충주 30(<i>M. bovis</i>)	1×10^5
2nd challenge	3848	충주 30(<i>M. bovis</i>)	1×10^5
	3849	충주 30(<i>M. bovis</i>)	1×10^5
	5436	충주 30(<i>M. bovis</i>)	1×10^5
	5430	충주 30(<i>M. bovis</i>)	1×10^5
3rd challenge	3849	충주 30(<i>M. bovis</i>)	1×10^6
	3848	충주 30(<i>M. bovis</i>)	1×10^6

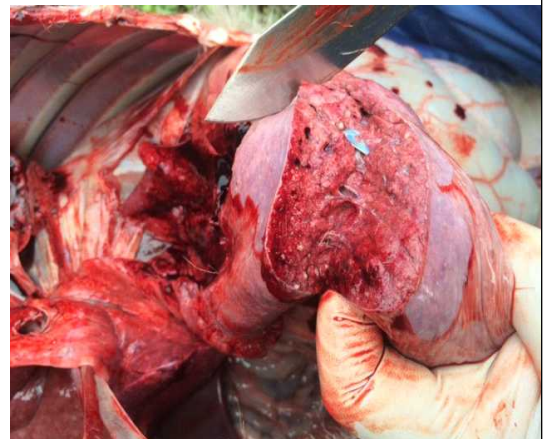
(2) Challenge 꽃사슴 (BCG, *M. bovis*)

꽃사슴	ID(이표번호)	Challenge	CFU/ml
1st	3865	피하 BCG(빨강)	Danish BCG 1×10^6
	5444	피하 BCG(빨강)	Danish BCG 1×10^6
	5448	피하 BCG(빨강)	Danish BCG 1×10^6
	5447	피하 BCG(빨강)	Danish BCG 1×10^6
	3863	피하 BCG(빨강)	Danish BCG 1×10^6
	5442	근육 BCG(파랑)	Danish BCG 1×10^6
	5446	근육 BCG(파랑)	Danish BCG 1×10^6
	3864	근육 BCG(파랑)	Danish BCG 1×10^6
	5449	근육 BCG(파랑)	Danish BCG 1×10^6
	3855	충주 30 <i>M. bovis</i> (검정)	1×10^5
	3856	충주 30 <i>M. bovis</i> (검정)	1×10^5

	5443	충주 30 M. bovis(검정)	1 x 10 ⁵
	5450	충주 30 M. bovis(검정)	1 x 10 ⁵
	3866	충주 30 M. bovis(검정)	1 x 10 ⁵
	3861	충주 30 M. bovis(검정)	1 x 10 ⁵
2nd	3863	피하 BCG(빨강)	Danish BCG 1 x 10 ⁶
	5421	피하 BCG(빨강)	Danish BCG 1 x 10 ⁶
	3652	피하 BCG(빨강)	Danish BCG 1 x 10 ⁶
	3865	피하 BCG(빨강)	Danish BCG 1 x 10 ⁶
	5447	피하 BCG(빨강)	Danish BCG 1 x 10 ⁶
	5427	근육 BCG(파랑)	Danish BCG 1 x 10 ⁶
	5408	근육 BCG(파랑)	Danish BCG 1 x 10 ⁶
	5449	근육 BCG(파랑)	Danish BCG 1 x 10 ⁶
2nd	3652	충주 30 M. bovis(검정)	1 x 10 ⁶
	3650	충주 30 M. bovis(검정)	1 x 10 ⁶
3rd	5447	충주 30 M. bovis(검정)	1 x 10 ⁶
	3863	충주 30 M. bovis(검정)	1 x 10 ⁶

(2) 국내유행 고병원성 사슴결핵균 감염후 조직병변

- 폐병변 뿐만 아니라, 소화기를 살펴보았을 때, 장간막 임파절을 비대가 관찰되었음
- 장간막 임파절을 절개하였을 때, 절개면이 결핵의 전형적인 결핵결절이 관찰되었고, 결핵균에 대한 AFB염색을 실시하였을 때, 가늘고 긴 붉은 색의 결핵균 특이적인 모양이 관찰되었음.
- 병변에서 결핵균을 배양하여 결핵균 항원인 MPT64을 가지고 있었으며, 결핵균 특이 유전자마커인 IS6110도 가지고 있음을 확인하였음.

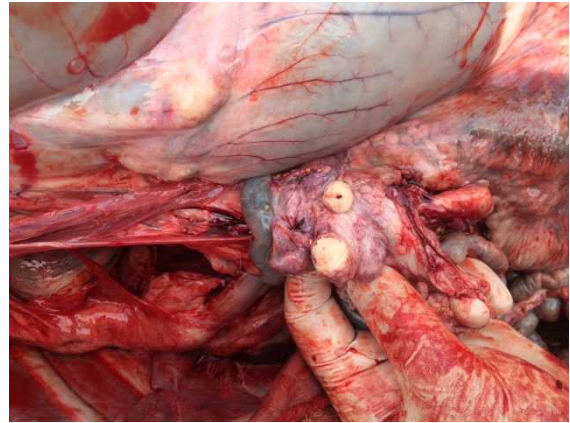


[그림 83] 우결핵균 감염 후 폐 육안병변



[그림 84] 우결핵균 감염 후 장간막 임파절 육안병변

- 이와 같은 발견은 기존의 가설인 폐결핵이 걸린 후 객담을 삼킴으로써 장결핵이 형성된다는 것에 대한 새로운 가설로서 결핵균이 폐병변 없이 장결핵을 형성할 수 있다는 분명한 근거 자료임.
- 이는 사슴같은 초식동물이 육식동물인 사자, 호랑이 등에게 포식되어 육식동물에게로 결핵균이 전파되었음을 시사하는 중요한 자료임



[그림 85] 결핵균 감염 후 절개면 병변

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
<p>4-1. 목표달성도</p> <p>■ 1세부</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 국내유행 한국형 사슴결핵균의 특성분석 <ul style="list-style-type: none"> • 국내유행 한국형 사슴결핵균인 충주30과 중원70의 동물감염후 세포면역반응을 분석함 • C57BL6 마우스에 충주30균주를 공기감염시킨 후 주기적으로 생균수 및 병리학적 변화를 측정 • 국내유행 사슴결핵균 분리균주 중 가장 많은 분포를 나타내는 결핵균주의 하나인 충주30을 대표균주로 선정 ○ 국내 사슴결핵균 분자유전학적 특성분석을 통한 방어항원발굴 및 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 국내 유행 사슴결핵균 분리주의 분자유전학적 특성을 분석한 결과 가장 많은 비율을 차지하는 균주가 K linige인 것을 발견하였고, 대표균주인 충주30 균주에 대한 면역성을 보인 항원을 선별함 • 발굴항원의 면역학적 특성 분석 및 마우스 immunization을 통한 T cell의 활성을 분석함 ○ 사슴결핵 방어항원을 발현하는 재조합 BCG 백신 및 약독화백신 개발 <ul style="list-style-type: none"> • BCG백신균주에 결핵균의 주요 방어항원인 ESAT-6, CFP10의 유전자를 발현하는 재조합 백신을 개발함 • BCG균주의 피하 및 근육내 접종방법에 따른 세포면역반응(cytokines) 분석 • BCG백신균주를 감염시킨 후 병리학적 병변 및 생균수의 변화를 측정 ○ 예방백신 접종군과 감염군에 대한 감별진단법 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 결핵균 특이 항원으로 사용할 결핵균 peptide (ESAT6, CFP10, MPT39) 합성 • 결핵균 특이항원에 반응하는 cytokine profile (IFN-g, IL-2, TNF-a, iNOS, IL-12, IL-4 등) 분석 • 결핵균 특이항원이 유도하는 cytokine의 정량을 위해 realtime PCR법을 개발 ○ BCG 백신 생산기술 확립 <ul style="list-style-type: none"> • 생물학적 제제지침에 따른 제조protocol 확보 • 소톤감자배지(Sauton potato medium)에 초대 배양 • 소톤배지(Sauton medium)에 계대배양 및 채균 ○ 예방백신 접종군과 결핵 감염군에 대한 감별진단법 평가 <ul style="list-style-type: none"> • 결핵균 특이 항원의 발굴 및 항원 생산 • 결핵균 항원 및 펩타이드의 동물을 이용한 특이항원의 선별 • 결핵균 특이항원에 반응하는 cytokine profile 분석 • 결핵균 특이항원 유도 cytokine의 정량을 통한 면역마커 선정 ○ 예방백신 접종군과 결핵 감염군에 대한 IFN-γ를 이용한 감별진단법 현장 평가 <ul style="list-style-type: none"> • 사슴결핵감염에 대한 IFN-γ 및 마커 cytokine를 유도하는 결핵특이항원 및 펩타이드 선별 • 재조합BCG백신접종군과 결핵감염군에 대한 결핵특이항원 및 펩타이드의 특이도 측정 • 결핵감염사슴에 대한 IFN-γ 및 마커 cytokine 이용한 감별진단법의 민감도 측정 ○ 한국형 사슴결핵 예방을 목적으로 개발된 백신의 제조 <ul style="list-style-type: none"> • 생물학적 제제지침에 따른 사슴결핵 예방백신의 대량 제조 	

- 사슴결핵 예방백신의 생산공정 확립

■ 1협동

- 사슴결핵 감염동물확립
 - 사슴결핵균 충주30을 500,000생균을 기관지를 통한 기도내 감염 실시
 - 결핵균 충주30을 100,000생균수와 1000,000생균수를 기관지내 감염 후 사슴에서의 cytokine 발현량, 적혈구침가계수, 병리조직학적 지표 분석함
 - 충주30결핵균을 감염시킨 후 3주간격으로 세포면역반응, bPPD와 aPPD에 투베르쿨린 반응을 측정하였고, 감염후 3개월, 5개월에 부검을 실시하여 병변의 개수, 병변 정도를 측정함
- 결핵감염동물모델을 이용한 사슴결핵백신후보 평가
 - BCG 백신을 피하 및 근육내 감염 후 국내 병원성 사슴결핵균이 충주30을 감염시켜 방어능 평가
 - BCG 백신을 피하 및 근육내 감염 후 국내 병원성 사슴결핵균이 충주30을 감염시켜 방어능 평가
- 사슴결핵 평가지표 발굴
 - 사슴결핵균 충주30을 감염시킨후 평가지표로서, cytokine mRNA 발현양, IFN-g 생성량, 폐 및 임파절의 병리양상, 조직에서의 생균수 등 지표 발굴
- 사슴결핵 재조합BCG 백신의 현장 평가
 - 결핵 재조합BCG백신의 도스별, 종류별 접종
 - 재조합BCG백신에 대한 세포면역반응 유도능 분석
 - 고병원성 국내 유행 사슴결핵균의 감염 후 미생물학적 지표측정
 - 고병원성 국내 유행 사슴결핵균에 대한 병리조직학적 예방효과 분석
- 사슴결핵특이항원을 이용한 투베르쿨린 감별검사법의 현장 평가
 - Bovine PPD와 avium PPD를 양성대조군으로 사용하여 선별된 결핵특이항원 특이성 평가
 - 결핵특이항원을 이용한 결핵감염사슴에 대한 민감도 현장 평가

4-2. 관련분야 기여도

- 국내 사슴에서 분리된 결핵균의 유전학적 방법을 통하여 국내에서 유행하고 있는 분자역학의 특성을 파악하는 데 기여함
- 국내 주요 사슴결핵균의 특성을 통해 국내 대표균주를 선발하여 참고균주로 활용
- 사슴에서 병원성을 나타낸 결핵균의 병원성을 전세계적으로 병원성을 평가하는 모델인 마우스 실험동물모델을 통하여 병원성을 비교평가하는 데 기여함
- 국내 사슴결핵균의 감염 후 항원성 및 면역성을 분석을 통하여 진단면역학적 특성
- 전 세계적으로 사용되고 있는 BCG백신의 사슴에 피하 및 근육내 접종을 통하여 면역성을 비교 분석하여 이후 생백신을 이용하는 데 기초자료로 활용
- 사슴에 대한 세포면역학적 반응을 분석하기 위한 방법으로 cytokine mRNA 발현량을 통하여 측정하는 것을 국내에 처음 시도하여 이후 사슴에 대한 면역반응을 연구하는 데 기여함
- 동물 결핵에 사용하고 있는 IFN-gamma 검사의 경우 젖소 및 비육우에 적용하고 있으나

사슴에 대하여 적용한 적이 없었는데, 본 과제에서 최초로 사슴에 적용하여 사슴에 대한 IFN-gamma 검사의 적용을 가능한 것을 보임

- 사슴 결핵용 BCG 백신 제조방법에 대한 기술을 확립하여 이후 사슴을 포함한 젖소 및 비육우 등의 결핵백신생산에 기여함
- 사슴 결핵균의 엘크 및 꽃사슴에 인공감염 후 시기에 따른 투베르쿨린 검사의 적용성을 파악하는 데 기여함
- 결핵균 감염 후 세포 면역이 유도되는 시기 및 패턴을 파악하여 이후 결핵감염의 기전을 파악하는 데 기여함
- 결핵균 감염 후 결핵균 특이 항체의 생성에 대한 패턴을 파악하여 결핵진단에 활용함
- 결핵균 유전자 제거기술을 통하여 결핵균 뿐만 아니라 세균성 질병에 대한 백신개발 기술에 기여함
- 백신접종균과 결핵균 감염균을 감별하는 진단법을 통하여 DIVA 검사법의 적용을 가능하게 함

5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
○ 국내 유행 사슴결핵균에 대하여 파악한 특성은 이후에 사슴결핵 및 한·육우의 결핵에 대한 진단법을 개발하는 데 활용		
○ 본 연구과제에서 개발한 recombinant BCG백신은 향후 국내에서 생산하여 한·육우 뿐만 아니라 사람의 결핵을 예방하는 데도 활용하고자 함		
○ 사슴결핵 예방백신을 접종한 사슴과 결핵감염된 사슴을 감별할 수 있는 감별진단기술은 향후 사슴결핵백신을 정책으로 도입할 경우 현장에서 활용하고자 함		
○ 사슴결핵 예방백신 및 감별진단법을 개발하고 현장에서 유효성을 평가한 자료를 이용하여 작성한 정책제안은 향후 사슴결핵퇴치를 위해 활용하고자 함		
○ 사슴결핵 예방백신으로 개발된 recombinant BCG백신과 감별진단법은 학술연구자료로 발표될 수 있을 뿐만 아니라 지식재산권으로 등록하여 이후 기술이전 및 생산을 통해 국내 백신산업의 활성화		
○ 추가 연구 및 타연구에 활용: 향후 2-3년가 관련된 후속연구를 계획하고 있음. 이미 효능이 밝혀진 백신후보와 진단법에 대한 마무리 연구와 실용화가 가능하도록 임상연구를 진행시킬 계획임		
○ 본 연구과제를 통해 제작된 결핵균 RD1 유전자 결핍 결핵균변이주를 이용하여 타 병원균에 대한 방어항원을 발현하는 백신균주를 개발하며, 목적동물에서 안전성, 백신효능 실험을 추가 실시할 계획임		

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<ul style="list-style-type: none"> ○ 결핵백신 개발을 위하여 다양한 시도가 이루어지고 있음. 덴마크의 Serum Institute는 결핵균의 잠복감염상태에서 발현되는 유전자를 이용하여 재조합 단백질로 발현시킨 후 면역보조제 (Adjuvants)를 이용하여 백신을 개발하고 있음. 이에 대한 임상연구가 활발한 상태임. ○ 결핵균의 주요 방어항원의 하나인 Ag85B항원을 이용한 바이러스벡터에 삽입한 재조합 바이러스 백신을 이용하여 임상 1상 및 2상A에서 면역원성을 확인하였음. 결핵특이항원에 대한 IFN-gamma test, Flowcytometry, Elispot등을 이용하여 분석한 결과 결핵에 대한 방어면역이 잘 유도되고 있음을 확인하였고, 특히 백신접종 후 3개월까지는 면역원성이 잘 발현되는 것을 확인하였음. 임상2B상에서 결핵균 감염에 대한 분석에서 효과는 있었지만 뚜렷한 방어효과가 나타나지 않아 이에 대한 조사를 하고 있음. ○ AERAS 연구소에서는 빌게이트 체단에서 연구비를 지원받아 다양한 형태의 결핵균백신을 개발하고 임상연구를 진행하고 있음. 특히 재조합 BCG 백신, viral vector 백신, 재조합 단백질 백신 등 다양한 백신후보들을 동물모델을 이용한 전임상연구 뿐만 아니라, 임상연구를 진행하고 있음. 현재 재조합 BCG 백신은 안전성을 우선하여 viral vector 백신과 재조합 단백질 백신을 주된 연구방향으로 진행하고 있음. 이후 협력을 통하여 연구를 진행하게 되면 보다 효과적인 백신을 효율적으로 개발할 수 있을 것을 기대됨. ○ 결핵균에 대한 연구에서 세계적으로 주도해 온 연구팀이 Albert Einstein Medical School에서는 결핵균의 한 유전자인 rv1590을 제거하였을 때 결핵균의 성장 속도가 상당히 의미있게 증가한 것을 확인하였는데, 이를 활용한다면 결핵균 백신을 생산에 있어서 상당히 시간을 줄이는 데 크게 기여할 것을 기대됨 ○ 결핵균은 생백신을 배양을 통해 생산하는 데, 이에 대한 고전적인 표면배양방법에서 fermentor 시스템을 이용한 방법을 확립하여 이에 대한 허가를 AERAS에서 미국 FDA에 진행하고 있는 중임 		

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 일반과제에 해당: 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<ul style="list-style-type: none"> ○ 실험실 점검: 매일 1회 ○ 실험실 점검: 분기 1회 (연구실 실사) ○ 연구실 안전교육: 년 2회, 6시간 ○ 생물안전교육: 년 1회 2시간 		

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Seroprevalence of tuberculosis in domesticated elk (<i>Cervus canadensis</i>) in Korea	연세대학교/충북축산위생연구소	교신저자/제1저자	Research in Veterinary Science	1.30	2016.08.01	중복사사	SCI
2	논문	Investigation of bovine tuberculosis outbreaks using the trace-back system and molecular typing in Korean Hanwoo beef cattle	연세대학교	교신저자	Journal of Veterinary Science	1.16	2017.7.10	중복사사	SCI
3	논문	Mycobacterium bovis infection in a wild sow (<i>Sus scrofa</i>): first case in Korea	연세대학교	교신저자	Journal of Veterinary Science	1.16	2016.9.30	중복사사	SCI
4	논문	Performance of the SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test for quick confirmation of Mycobacterium bovis isolates from animals	연세대학교/충북축산위생연구소	교신저자	Journal of Veterinary Science	1.16	2015.3.30	중복사사	SCI
5	논문	Multiple liver infection by	연세대학교	교신저자	Korean Journal of		2017.3.14	중복사사	학진등재

		Sphingomonas sp. and Bacillus sp. in a wild rodent (Apodemus agrarius): a case report			Veterinary Service			
6	학술 발표	Seroprevalence of tuberculosis in domesticated elk (Cervus canadensis) in Korea	연세대학교/충북축산위생연구소	교신저자/제1저자	The 10 th T A W I R I Biennial Scientific conference	2015.12.2.-4		국제학술대회
7	학술 발표	Serological response in Mycobacterium bovis-infected deer	연세대학교/충북축산위생연구소	교신저자	2015년 대한의생명과학회 국제학술대회	2015.11.5.-6		국제학술대회
8	학술 발표	Development of tuberculosis animal model using Deer, a natural host of tuberculosis	연세대학교/충북축산위생연구소	교신저자	2015년 대한의생명과학회 국제학술대회	2015.11.5.-6		국제학술대회
9	학술 발표	Immunogenicity of recombinant BCG vaccine against Deer tuberculosis	연세대학교/충북축산위생연구소	교신저자	Keystone symposia conference	2016.5.22.-26		국제학술대회
10	학술 발표	Enterolymphopathy of Bovine tuberculosis in Sika Deer (Cervus Nippon)	연세대학교/충북축산위생연구소	교신저자	2017 기초학술대회	2016.6.30		
11	학술 발표	Humoral and Cellular responses in the Mycobacterium bovis-infected Elk	연세대학교/충북축산위생연구소	교신저자	2017 기초학술대회	2016.6.30		

11. 기타사항

	코드번호	D-13
○ 해당사항 없음		

12. 참고문헌

	코드번호	D-14
Ameni G, Aseffa A, Sirak A, Engers H, Young DB, Hewinson RG, Verdermeiser MH, Gordon SV., 2007. Effect of skin testing and segregation on the prevalence of bovine tuberculosis and molecular typing of <i>Mycobacterium bovis</i> in Ethiopia. <i>Veterinary Record</i> 161, 782-786.		
Barron M, Tompkins D, Ramsey D, Bosson M., 2014. The role of multiple wildlife hosts in the persistence and spread of bovine tuberculosis in New Zealand. <i>New Zealand Veterinary Journal</i> J 1-9.		
Bass KE, Nonnecke BJ, Palmer MV, Thacker TC, Hardegger R, Schroeder B, Raeber AJ, Water WR., 2013. Clinical and diagnostic developments of a gamma interferon release assay for use in bovine tuberculosis control programs. <i>Clinical and Vaccine Immunology</i> 20, 1827-1835.		
Cho YS, Lee SE, Ko YJ, Cho D, Lee HS, Hwang I, Nam I, Heo E, Kim JM, Jung S., 2009. Definition of purified enzyme-linked immunosorbent assay antigens from the culture filtrate protein of <i>Mycobacterium bovis</i> by proteomic analysis. <i>Journal of Immunoassay and Immunochemistry</i> 30, 291-304.		
Collins JD., 2006. Tuberculosis in cattle: strategic planning for the future. <i>Veterinary Microbiology</i> 112, 369-381.		
Fifis T, Costopoulos C, Corner LA, Wood PR., 1992. Serological reactivity to <i>Mycobacterium bovis</i> protein antigens in cattle. <i>Veterinary Microbiology</i> 30, 343-354.		
Jeon BY, Kim SC, Je S, Kwak J, Cho JE, Woo JT, Seo S, Shim HS, Park BO, Lee SS, Cho SN., 2010. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using milk samples as a potential screening test of bovine tuberculosis of dairy cows in Korea. <i>Research in Veterinary Science</i> 88, 390-393.		
Kim JH, Sohn HJ, Kang KI, Kim WI, An JS, Jean YH., 2002. <i>Mycobacterium bovis</i> infection in a farmed elk in Korea. <i>Journal of Veterinary Science</i> 3, 163-166.		
Mathews F, Macdonald DW, Taylor GM, Gelling M, Norman RA, Honess PE, Foster R, Gower CM, Varley S, Harris A, Palmer S, Hewinson G, Webster JP., 2006. Bovine tuberculosis (<i>Mycobacterium bovis</i>) in British farmland wildlife: the importance to agriculture. <i>Proceedings of the Royal Society B</i> 273, 357-65.		
Ministry of Agriculture Food and Rural Affairs. 2012. Number of livestock and poultry, and livestock farms. <i>Agriculture, Food and Rural Affairs Statistics Yearbook</i> . 2002-2011.		
Palmer MV., 2013. <i>Mycobacterium bovis</i> : characteristics of wildlife reservoir hosts. <i>Transboundary and Emerging Diseases</i> 60, 1-13.		
Pesciaroli M, Alvarez J, Boniotti MB, Cagiola M, Di Marco V, Marianelli C, Pacciarini M, Pasquali P., 2014. Tuberculosis in domestic animal species.		

Research in Veterinary Science. 97 Suppl:S78-85.

- O'Brien DJ, Schmitt SM, Berry DE, Fitzgerald SD, Lyon TJ, Vanneste JR, Cooley TM, Hogle SA, Fierke JS., 2008. Estimating the true prevalence of *Mycobacterium bovis* in free-ranging elk in Michigan. *The Journal of Wildlife Diseases* 44, 802-810.
- Reviriego Gordejo FJ, Vermeersch JP., 2006. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Veterinary Microbiology* 112, 101-109.
- Surujballi O, Lutze-Wallace C, Turcotte C, Savic M, Stevenson D, Romanowska A, Mongle W, Berlie-Surujballi G, Tangorra E., 2009. Sensitive diagnosis of bovine tuberculosis in a farmed cervid herd with use of an MPB70 protein fluorescence polarization assay. *Canadian Journal Veterinary Research* 73, 161-166.
- USDA, APHIS, 1999. Bovine tuberculosis eradication: uniform methods and rules, Effective January 22, 1999. United States Department of Agriculture. Washinton, DC, 3-10.
- Wee SH, Kim CH, More SJ, Nam HM., 2010. *Mycobacterium bovis* in Korea: an update. *The Veterinary Journal* 185, 347-350.
- Whelan C, Whelan AO, Shuralev E, Kwok HF, Hewinson G, Clarke J, Verdermeier HM., 2010. Performance of the Enferplex TB assay with cattle in Great Britain and assessment of its suitability as a test to distinguish infected and vaccinated animals. *Clinical Vaccine Immunology* 17, 813-817.
- Wiker HG, Lyashchenko KP, Aksoy AM, Lightbody KA, Pollock JM, Komissarenko SV, Bobrovnik SO, Mykhalsky LO, Gennara ML, Harboe M., 1998. Immunochemical characterization of the MPB70/80 and MPB83 proteins of *Mycobacterium bovis*. *Infection and Immunity* 66, 1445-1452.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 한국형 사슴결핵 예방백신 개발 및 유효성 평가				
	(영문) Development and Evaluation of Vaccine against Deer Tuberculosis in Korea				
주관연구기관	연세대학교 원주산학협력단	주 관 연 구	(소속) 보건과학대학		
참 여 기 업		책 임 자	(성명) 전 보 영		
총연구개발비 (900,000천원)	계	900,000천원	총 연구 기간	2014. 7.29 ~ 2017. 7. 28 (3년)	
	정부출연 연구개발비	900,000천원	총 참 여 원 수	총 인원	27 명
	기업부담금			내부인원	8 명
	연구기관부담금			외부인원	19 명
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>연구개발목표: 국내에 유행하는 사슴결핵에 효과적인 한국형 예방백신을 개발하고, 사슴결핵백신을 평가할 수 있는 미생물학적, 병리조직학적 및 면역학적 지표를 이용하여 백신의 효능을 평가한다. 또한 예방백신 접종동물과 결핵감염동물을 감별할 수 있는 감별진단법을 개발하고, 그 유용성을 평가한다.</p> <p>주요 연구성과: • 사슴결핵 예방백신 개발 • 감별진단 마커 발굴 및 감별진단법 개발 • 적용동물을 이용한 효용성 평가 평가 • 사슴결핵백신 제조법 및 품질 기준의 표준화 • 감별진단법 현장평가</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> • 국내유행 한국형 사슴결핵균의 특성분석 • 국내 사슴결핵균 분자유전학적 특성분석을 통한 방어항원발굴 및 개발 • 사슴결핵 방어항원을 발현하는 재조합 BCG 백신 및 약독화백신 개발 • 예방백신 접종군과 감염군에 대한 감별진단법 개발 • 결핵감염동물모델을 이용한 사슴결핵백신후보 평가 • 국내 사슴 유래 결핵균주에서 병원성인자 (RD1)을 제거한 백신균주 개발 • 결핵백신균주의 생산을 위한 조건확립 • 결핵감염된 사슴의 PBMC를 이용한 IFN-gamma mRNA 검출조건확립 • DIVA를 위한 결핵항원 (ESAT6, CFP10, CFP) 선정 • BCG백신 및 결핵균 감염 사슴의 투베르쿨린 검사의 효용성 평가 • RD1 유전자 제거 사슴결핵균 안전성 평가 <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> • 국내 사슴 유래 결핵균주에서 병원성인자 (RD1)을 제거한 백신균주 개발 • 결핵백신균주의 생산을 위한 조건확립 • BCG백신 및 결핵균 감염 사슴의 투베르쿨린 검사의 효용성 평가 • RD1 유전자 제거 사슴결핵균 안전성 평가 • 사슴결핵의 효과적인 퇴치로 사슴농장의 생산성 향상에 기여 • 사슴결핵예방백신과 감별진단법의 지식재산권 • 향후 사슴이외 국내 젓소 및 한육우의 결핵퇴치를 위한 결핵예방백신 활용 					

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

			코드번호	D-15	
			과제번호	314025-3	
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야	농식품기술개발사업		과제구분	단위	
사업명	농생명산업기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	한국형 사슴결핵 예방백신 개발 및 유효성 평가		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	연세대학교 원주산학협력단		연구책임자	전보영	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2014.07.29.-2015.07.28	300,000		300,000
	2차년도	2015.07.29.-2016.07.28	300,000		300,000
	3차년도	2016.07.29.-2017.07.28	300,000		300,000
	4차년도				
	5차년도				
	계		900,000		900,000
참여기업					
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2017. 8.31

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
연세대학교 원주산학협력단	부교수	전보영

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	전보영
----	-----

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구과제를 수행하여 그 결과를 국제적인 SCI학술지에 발표하였으며, 연구수행하는 동안 5편을 발표하였고, 과제가 종료되었지만 과제를 수행하는 동안에 도출된 결과에 대해 2편을 더 추가적으로 투고를 준비하고 있음. 그 외에도 연구한 결과를 국제학술대회에서 여러 회 발표하는 것을 통하여 국내에서 수행한 결과를 국제적으로 알려 그 우수성을 나타내었음
- 본 연구과제의 성과를 지식재산권을 위하여 사슴결핵백신 개발관련 2건을 특허변리사와 진행하여 조만간 특허출원을 할 계획이며 또한 사슴결핵에 효과적인 진단에 대한 성과를 특허출원을 할 예정임
- 본 과제를 수행하는 동안 최신 기술을 도입하여 결핵균의 유전자에 대한 유전자가위기술을 개발하였으며, 이를 통해 사슴결핵백신을 개발할 뿐만 아니라 이를 통해 병인기전 등의 연구에 크게 기여할 것임
- 연구과제를 수행하면서 전문기술인력을 2명의 박사과 3명의 석사급 인력을 양성하여, 이들이 국가의 감염병질환에 대한 예방 및 관리에 기여하는 전문가들이 되었고, 바이오테크놀로지를 이용하여 보건에 크게 기여하고 있음

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구과제에서 병원성 미생물에 대한 약독화 기술을 개발하였던 바, 이를 이용한다면 다른 질병에 대한 백신개발에 크게 기여할 것으로 기대되며, 뿐만 아니라 병원체의 병원성 유전자나 목적 유전자를 매우 효율적으로 제거함을 통하여 병원체의 병독기전을 밝히는 데 크게 기여할 것임
- 결핵균의 병원성 유전자를 제거하여 약독화된 백신은 사슴결핵에 대한 예방을 통하여 현재 위축된 사슴산업에 활력을 불어 넣을 수 있을 것으로 기대되며, 사슴 뿐만 아니라 결핵이 문제가 많이 되고 있는 젖소 및 육우에도 약독화 백신을 통하여 가축의 비육 증대, 폐사율 감소 등을 통하여 축산업에 크게 기여할 것임
- 본 연구과제를 통하여 개발된 백신 뿐만 아니라 진단법은 사슴 및 기타 가축에서 결핵을 효과적으로 진단할 수 있는 진단키트를 수입에 의존하지 않고, 국내에서 생산함을 통하여 국내 산업의 활성화에 기여할 것임
- 본 연구과제를 통하여 결핵뿐만 아니라 사슴의 혈액치 분석을 통하여 사슴의 건강을 모니터링하는 역할을 하고, 이를 측정할 수 있는 키트들을 제작하여 국내 기업에 기여할 것임

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구과제에서 개발된 병원성 미생물의 약독화 기술, 백신후보 스크리닝 기술, 진단마커 스크리닝 기술 등은 사슴에 국한되지 않고, 다른 가축에도 적용될 뿐 아니라 나아가 농림분야와 보건복지분야에도 크게 활용될 수 있을 것임
- 본 연구과제를 통하여 사슴의 생리학적 및 혈액학적 정보들이 많이 수집되었는데, 이를 이용하면 사슴의 주요 산물이 녹용생산의 증대에도 기여할 수 있을 것으로 기대됨
- 본 연구과제에서 개발된 약독화백신과 진단마커를 이용하여 사슴 뿐만 아니라 주요 가축인 젖소 및 비육의 결핵 예방정책에 크게 기여할 것으로 기대됨
- 본 연구과제를 통하여 개발된 백신과 진단법은 사슴 및 기타 가축에서 결핵을 효과적으로 진단할 수 있는 진단키트를 국내에서 생산할 수 있도록 하여 국내 산업에도 기여할 것임

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구과제는 사슴에 대한 결핵백신을 개발하는 과제로 많은 어려움이 있는 과제로 이를 극복하기 위하여 최선을 다해 연구과제를 수행하였음
- 연구과제의 대상 동물인 사슴은 국내에서 사육두수가 많이 감소하여 연구대상의 어린 엘크나 꽃사슴을 구하기가 어려울 뿐만 아니라, 이미 결핵에 감염되어 있는 경우가 많아 폐기하여야 하는 경우도 발생하였음. 대상 동물의 구매가가 연구기간동안 상승하여 엘크의 경우 200 - 400만원정도로 본 연구과제로 실험군으로 사용할 만큼의 수를 구매하여 연구를 수행하기에는 연구비가 부족하여 어려움이 있었음
- 사슴에 대한 연구과제를 수행하기 위하여 마취를 시행하여야 하는 데, 본 연구자는 사슴에 대한 전문적인 기술을 가지고 있어 사슴에 대한 마취를 시행하여, 혈액채취, 백신접종, 투베르쿨린 등의 연구를 시행하였음
- 사슴에 대한 생체기본자료를 조사하였고, 이를 기준으로 결핵에 감염되었을 때의 혈액학적 분석을 실시하였음.
- 국내 결핵균을 이용하여 병원성인자인 RD1유전자를 제거한 백신균주를 제조하여 이에 대한 안전성 및 유효성 평가를 실시하였음
- 결핵감염동물과 백신접종동물을 감별하기 위한 DIVA를 결핵균특이항원과 펩타이드를 이용한 혈청학적 검사법과 세포면역학적 검사인 IFN-gamma 검사법을 개발하였음. 또한 기존의 투베르쿨린 검사법의 유용성도 평가하였음
- 결핵생백신 생산을 위한 배양법을 확립하여 사슴 및 소를 포함한 다른 가축에도 접종할 수 있는 백신 생산법을 확립하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구과제를 수행하는 동안 국제전문학술지에 연구성과를 4편 발표하였고, 학술대회에서 6편을 발표하였으며, 이중 4편은 국제학술대회에서 연구성과를 발표하였음
- 사슴의 결핵에 대한 혈청학적 진단법을 이용하여 조사한 것을 국제적으로 인정받는 Research in Veterinary Science에 발표하였고, 결핵에 대한 분자역학적방법을 이용한 결핵추적기술에 대한 내용을 Journal of Veterinary Science에 최근 2017년에 발표하였음
- 결핵균 항원 중 MPT64항원을 Immunochromatic assay를 이용한 신속진단법에 대한 연구성과를 1차년도에 Journal of veterinary Science에 발표하였음
- 사슴에서 분리된 국내 결핵균에서 병원성 인자의 하나인 RD1 유전자를 제거한 약독화결핵백신을 개발하여 농림축산검역본부에 백신균주를 위탁하였음
- 국내 분리 결핵균에서 RD1유전자를 제거한 약독화 생백신 개발에 대한 특허출원 진행중에 있음
- 결핵균의 RD1유전자의 에피토프 펩타이드를 이용한 혈청진단법과 사슴 IgM 항체를 개발하여 적용한 혈청진단법에 대하여 2건을 특허출원 진행 중임

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○국내유행 한국형 사슴결핵균의 특성분석	10	100	○국내유행 한국형 사슴결핵균 대표균주 선정하여 Whole Genome Sequencing과 Comparative Genomics를 실시하여 항원을 발굴하였음
○국내 사슴결핵균 분자유전학적 특성분석을 통한 방어항원발굴 및 개발	10	100	○발굴된 결핵균항원 ESAT-6, CFP10, Ag85B 등 발굴항원의 면역학적 특성 분석 및 T cell의 활성화 분석을 통한 백신항원으로써의 타당성을 검증하였음
○사슴결핵 병원성 인자를 제거한약독화백신 개발	10	100	○국내 유행 사슴결핵균에서 병원성 인자인 RD1유전자를 제거한 약독화 백신 개발
○BCG 백신 생산기술 확립	10	100	○사슴결핵 예방백신 생산 과정 확립 및 대량 생산 프로토콜 확립
○결핵감염소형동물모델을 이용한 사슴결핵백신후보 평가	10	100	○국내 분리 한국형 사슴결핵균을 이용하여 마우스 결핵감염모델을 이용하여 병원성 및 예방효과 평가를 실시함
○예방백신 접종군과 감염군에 대한 감별진단법 개발	10	100	○사슴결핵 감별진단 항원 및 펩타이드 마커 발굴하였으며 및 세포면역 cytokine 감별마커를 이용한 진단법을 개발하였음
○국내 유래 고병원성 사슴결핵균을 이용한 평가 모델 확립	5	100	○국내 유행 사슴결핵균을 이용한 사슴결핵예방백신 평가를 위한 감염모델 확립하였고, 미생물학적 및 병리조직학적 지표를 이용하여 방어효과를 평가하였음
○사슴결핵백신 평가를 위한 지표 개발	10	100	○예방백신에 방어면역 작용을 하는 세포면역 반응 cytokine 및 chemokine인 IFN-gamma, IL-2, iNOS, CXCL5 등 발굴하여 유용성을 평가하였음
○사슴결핵 약독화백신의 현장 평가	15	90	○사슴결핵 예방백신의 국내유행 결핵균에 대한 방어능을 엘크와 꽃사슴에 대하여 평가를 실시함
○사슴결핵특이항원을 이용한 투베르쿨린 감별검사법의 평가	10	95	○사슴결핵에 대한 결핵예방백신접종에 대한 투베르쿨린검사를 이용한 감별진단법 유용성 평가함
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 본 연구과제에서 국내 사슴결핵의 대표결핵균을 선정하여 whole genome을 분석하여 방어유전자 및 진단마커를 발굴하였고, 마우스모델 및 적용모델인 엘크와 꽃사슴감염모델을 이용하여 조직병리학적 및 면역학적 특성을 분석하였음
- 사슴결핵에 대한 예방백신을 결핵균 병원성 인자인 RD1유전자를 제거한 약독화백신을 개발하였으며, 결핵균 병원성 유전자를 제거하는 CRISP-Cas9기술을 적용하여 이후에 다른 백신을 개발하도록 하였음
- 사슴결핵 약독화백신을 마우스 결핵감염 모델 및 엘크와 꽃사슴을 이용하여 면역원성 및 예방효과를 세포면역학적, 미생물학적 및 조직병리학적 지표를 이용하여 평가하였음
- 사슴결핵백신 접종동물과 결핵감염 동물을 감별하기 위하여 결핵균 특이 항원의 펩타이드를 이용하여 혈청학적 결핵감별법 및 cytokine마커를 이용하여 세포면역 진단법을 개발하여 평가하였고, 기존에 사용하고 있는 투베르쿨린검사의 감별진단법으로서의 유용성을 평가하였음
- 사슴결핵 예방백신을 적용동물인 엘크와 꽃사슴에 적용하여 안전성 평가를 실시하였음
- 사슴결핵 백신의 현장적용을 위하여 약독화생백신 생산 및 대량 생산기술을 확립하였음

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 국내 사슴(엘크, 꽃사슴)의 품귀현상으로 인하여 사슴결핵백신 효능평가용 사슴 구입비용이 약 20% 정도 증가하여 연구사업을 진행함에 있어 어려움이 많았음
- 사슴결핵의 원인체인 결핵균은 배양기간이 약 4-6주로, doubling time이 10분 정도인 대장균에 비하여 20-30배의 시간이 더 소용되어, 결핵균의 배양 및 결핵균 병원성 유전자 제거 등에 있어 상당한 시간이 소용됨에도 불구하고 연구성과를 도출한 것에 대한 평가시 고려 필요함
- 결핵은 만성감염병으로 결핵균을 사슴에 감염시켰을 경우, 결핵특이 병변이 형성될 때까지 약 6-12개월이 소요되어, 연구기간내에 연구결과를 도출하기에 어려움이 많았음에도 불구하고 효과적인 결핵백신을 개발한 것에 대한 평가시 고려 필요함

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 본 연구과제를 수행하면서 개발한 사슴결핵백신을 사슴 뿐만 아니라 결핵이 문제되는 젓소 및 비육우에 대한 결핵예방효과를 평가하여 이후에 결핵백신으로서의 활용할 계획임
- 사슴결핵백신에 대한 허가를 신청하여 국내에서 결핵백신으로 활용될 수 있도록 할 예정임
- 사슴결핵백신을 국내 뿐만 아니라 결핵이 문제되고 있는 개발도상국에서 유용성 평가를 통해 해당 국가에서 백신허가를 신청하여 국내 뿐만 아니라 국제적인 결핵 예방을 통한 결핵퇴치에 기여할 수 있도록 할 예정임
- 사슴결핵백신 접종동물과 결핵감염 동물에 대한 결핵감염진단법을 특허등록 후 기술이전을 통하여 결핵진단 및 감별진단에 사용함으로써 산업체를 통한 경제에 기여할 것으로 기대됨
- 본 연구과제를 통하여 개발된 유전자 조작기술, 펩타이드 선정기술, 사슴에서의 세포면역을 측정할 수 있는 cytokine 및 chemokine 발현 측정 기술을 사슴에 대한 연구에 활용
- 사슴결핵예방백신과 감별진단법의 적용을 통하여 사슴농장의 효과적인 결핵퇴치로 통하여 사슴농장의 생산성 향상에 기여할 수 있도록 활용

IV. 보안성 검토

○ 국가 공익사업이라 보안등급 일반으로 분류

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

○ 국가 공익사업이라 보안등급 일반으로 분류

2. 연구기관 자체의 검토결과

○ 국가 공익사업이라 보안등급 일반으로 분류

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	농생명산업기술개발사업	
연구과제명	한국형 사슴결핵 예방백신 개발 및 유효성 평가			
주관연구기관	연세대학교 원주산학협력단		주관연구책임자	전보영
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	900,000천원			900,000천원
연구개발기간	2014.07.29. - 2017.07.28			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(개발) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①국내유행 한국형 사슴결핵균의 특성분석	○국내유행 한국형 사슴결핵균 대표균주 선정하여 Whole Genome Sequencing과 Comparative Genomics를 실시하여 항원을 발굴하였음
②국내 사슴결핵균 분자유전학적 특성분석을 통한 방어항원발굴 및 개발	○발굴된 결핵균항원 ESAT-6, CFP10, Ag85B 등 발굴항원의 면역학적 특성 분석 및 T cell의 활성화 분석을 통한 백신항원으로써의 타당성을 검증하였음
③사슴결핵 병원성 인자를 제거한약독화백신 및 재조합백신 개발	○국내 유행 사슴결핵균에서 병원성 인자인 RD1유전자를 제거한 약독화 백신 개발
④BCG 백신 생산기술 확립	○사슴결핵 예방백신 생산 과정 확립 및 대량생산 프로토콜 확립
⑤결핵감염소형동물모델을 이용한 사슴결핵 백신후보 평가	○국내 분리 한국형 사슴결핵균을 이용하여 마우스 결핵감염모델을 이용하여 병원성 및 예방효과 평가를 실시함
⑥예방백신 집종균과 감염균에 대한 감별진단법 개발	○사슴결핵 감별진단 항원 및 펩타이드 마커 발굴하였으며 및 세포면역 cytokine 감별마커를 이용한 진단법을 개발하였음
⑦국내 유래 고병원성 사슴결핵균을 이용한 평가 모델 확립	○국내 유행 사슴결핵균을 이용한 사슴결핵예방백신 평가를 위한 감염모델 확립하였고, 미생물학적 및 병리조직학적 지표를 이용하여 방어효과를 평가하였음
⑧사슴결핵백신 평가를 위한 지표 개발	○예방백신에 방어면역 작용을 하는 세포면역반응 cytokine 및 chemokine인 IFN-gamma, IL-2, iNOS, CXCL5 등 발굴하여 유용성을 평가하였음
⑨사슴결핵 약독화백신의 현장 평가	○사슴결핵 예방백신의 국내유행 결핵균에 대한 방어능을 엘크와 꽃사슴에 대하여 평가를 실시함
⑩사슴결핵특이항원을 이용한 투베르쿨린 감별검사법의 평가	○사슴결핵에 대한 결핵예방백신접종에 대한 투베르쿨린 검사를 이용한 감별진단법 유용성 평가함

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	2	1									5	2	5		3					
연구기간 내 달성실적	0	0									4	1	6		5					
달성율 (%)	0	0									80	50	120		167					

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	결핵균(M. bovis)에 대한 박터를 이용한 유전자 제거기술
②	결핵균에 대한 CRISP-Cas9을 이용한 유전자 가위
③	사슴에 대한 결핵균 감염모델
④	사슴의 세포면역반응 측정기술
⑤	in vitro toxicity 측정기술
⑥	사슴에 대한 IgM 항체 측정

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술				v		v				
②의 기술	v					v				
③의 기술				v				v		
④의 기술				v				v		
⑤의 기술			v							v
⑥의 기술	v					v	v			

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	결핵균의 병원성 인자 제거를 통한 백신개발 및 사슴결핵 근절에 기여
②의 기술	결핵균에 대한 유전자가위를 이용한 특이 유전자의 효율적인 제거를 통한 백신개발
③의 기술	사슴에 대한 결핵감염모델을 통하여 사슴결핵의 진단법 및 백신의 효용성 평가
④의 기술	사슴의 세포반응면역 측정을 통해 사슴결핵 IFN-gamma 검사법 개발
⑤의 기술	사슴결핵백신의 독성비교를 통한 안전성 평가
⑥의 기술	사슴에서의 결핵을 포함한 감염질환의 진단법 개발에 활용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	2	1									5	2	5		3				
연구기간내 달성실적	0	0									4	1	6		5				
연구종료후 성과창출 계획		1									1				0				

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

8. 뒷면지

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.