

119058
-02

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
가축질병대응기술개발사업 2021년도 최종 보고서

발간등록번호

11-1543000-003441-01

**주요 인수공통살모넬라감염증
저감대책을 위한 생물학적
면역증강제도입 신개념 사균백신
및 DIVA 가능한 약독화
생백신 개발**

2021. 04. 09

주관연구기관 / 전북대학교

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

주요 인수공통살모넬라감염증 저감대책을 위한
생물학적 면역증강제도입 신개념 사균백신 및
DIVA 가능한 약독화 생백신 개발

2021

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

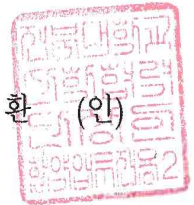
농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “주요 인수공통살모넬라감염증 저감대책을 위한 생물학적 면역증강도입
신개념 사균백신 및 DIVA 가능한 약독화 생백신 개발” (개발기간 : 2019. 05. 27 ~
2020. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021 . 04 . 09 .

주관연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 (대표자)

조기환 (인)



주관연구책임자 : 이 존 화

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	119058-02	해 당 단 계 연 구 기 간	2019. 05.27 ~ 2020. 12. 31	단 계 구 분	2(해당단계)/ 2(총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	주요 인수공통살모넬라 감염증 저감 대책을 위한 생물학적 면역증강제도입 신개념 사균백신 및 DIVA 가능한 약독화 생백신 개발			
연구책임자	이 준 화	해당단계 참여연구원 수	총: 12 명 내부: 11 명 외부: 1 명	해당단계 연구개발비	정부:270,000천원 계:270,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 13 명 내부: 11 명 외부: 2 명	총 연구개발비	정부:450,000천원 계:450,000천원
연구기관명 및 소속부서명	전북대학교 수의과대학			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

- DIVA 감별진단이 가능한 주요 Salmonella증 예방 약독화 생백신 및 면역증강 단백질을 발현하는 신개념 고스트 살모넬라 사균백신 시스템의 구축
- LPS 관련 O-antigen이 결실되어 제작된 살모넬라 ST와 SE 백신균주 (rough salmonella) 및 rfaL 유전자 결실 백신주 제작
- 백신후보주의 투여방법을 달리하여 면역화에 따른 체액성 및 세포성 면역 활성 확인 및 DIVA 가능성 확인
- 림프절에서의 항원제시 여부 확인 및 면역화에 따른 야생균주에 대한 방어 효과 확인
- E-lysis 시스템을 이용한 고스트 사균 백신 벡터 제작
- 면역활성 고스트 사균백신 구축을 위한 생물형 TLR 기반 면역력보강제 도입 및 고스트 사균 백신주에 대한 용해력 확인
- 마우스 모델을 통한 체액성 및 세포성 면역 유도 및 면역화에 따른 T 림프구 분화 정도를 FACS 분석을 통해 확인
- 야생형 균주의 도전감염에 대한 잔여 균주 및 방어력 확인
- 조류 등에서 신개념 Salmonella 생백신 및 고스트 사균백신의 안정성 및 효능 평가
- 개발 생백신 및 사균백신 접종 최적화 실험 및 체액성 세포성 면역원성 확립
- 백신 투여 면역 동물에서 DIVA 감별진단 가능 여부 확인
- 백신접종 조건을 최적화하기 위하여 면역증강분자의 발현량을 다르게 균주를 제작하여, 백신접종경로, 접종량, 접종시기 등의 백신 사용방법을 최적화.
- 최적화된 면역증강 단백질을 발현하는 신개념 생균 및 고스트 사균백신의 구축 및 평가

보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구목적 DIVA 감별진단이 가능한 주요 <i>Salmonella</i>증 예방 약독화 생백신 및 면역증강 단백질을 발현하는 신개념 고스트 살모넬라 사균백신을 구축하여 조류 등에서 신개념 <i>Salmonella</i> 생백신 및 고스트 사균 백신의 안정성 및 효능을 평가 하고자 한다. ○ 연구배경 살모넬라균은 수인성 및 식품매개질환의 대표적인 세균성 병원체로, 전 세계적으로 사람에서 위장관염과 패혈증을 유발하는 것으로 알려져 있다. 미국의 경우 매년 약 400만 명에 달하는 사람들이 살모넬라균에 감염되고 있으며, 이로 인해 매년 100만 명이 사망한다고 보고되어있다. 또한 국내연구진에 의해 축산식품에서 식중독 발생과 가장 밀접하게 연루된 원인균의 대부분이 살모넬라균이라는 사실이 알려져 있다. 다양한 살모넬라의 혈청형 중 살모넬라 타이피리움 (<i>S.Typhimurium</i>, ST) 과 엔테라이티디스 (<i>S.Enteritidis</i>, SE)는 가족에서 질병을 일으킬 뿐 아니라 감염된 육류 가공류 등의 식자재를 통해 사람에게 전파되어 살모넬라 식중독을 일으킬 수 있기에 우리나라 뿐 아니라 전세계대부분의 국가에서 공중보건학적 문제로 여겨지고 있다. 미국에서도 매년 4백만 명 이상이 살모넬라균에 감염되며 유럽의 식중독 감염원 통계에서도 확인된 병원체 중 약 21.8%가 살모넬라로 가장 많이 발생한 것으로 보고되어 있다. ○ 연구내용 <ul style="list-style-type: none"> - 향상된 약독화 살모넬라를 위한 세포독성 및 O-antigen 결실 생백신주 제작과 In vitro 상에서 개발된 백신 균주의 발현여부 확인 그리고 실험동물에서의 안전성, 면역원성 평가와 방어능 확인 - 실험동물에서 개발된 백신 후보 균주로 면역화를 통한 DIVA 감별능 확인 - 면역 유도능 향상을 위한 fliC항원을 발현하면서 용해 유전자에 의해 비활성화된 고스트 사균백신 균주 제작과 In vitro 상에서 개발된 백신 균주의 발현여부 확인 그리고 실험동물 모델 내에서의 안전성평가, 면역원성과 방어능 확인
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 본 결과를 통한 특허 출원과 학술논문 게재 및 국내외 학술대회 참여를 통한 포스터 발표 수행 <ul style="list-style-type: none"> - 해외 학술지 6편 게재 - 국제 학회 3회 및 국내 학회 2회 포스터 발표 - 특허 1건 출원 - 전시회 1회 참여
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>본 연구를 통해 DIVA감별 가능한 향상된 살모넬라 약독화 생균 백신 및 생균백신 수준의 방어력을 확보한 사균백신 개발 기술이 확보됨에 따라 사균백신의 살모넬라 방어효과 극대화 기술 확립 및 이를 통한 방어효과 증명이 가능하며 농장 단계에서 살모넬라증 저감 사양프로그램에의 활용 가능성에 의의를 둘 수 있다. 또한 두 가지 이상의 항원이 발현될 수 있는 유전자 조작 기술을 통한 맞춤형 백신 개발 시스템을 이용하여 다양한 병원체에 대한 백신으로의 응용이 가능하며 공중 보건학적으로 문제가 되고 있는 식품을 매개로 살모넬라증에 대한 인체감염원을 방어 할 수 있는 백신개발로 인한 국민의 불안감 해소가 가능하다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 기술적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 이종 항원 발현 유전자 조작기술을 통한 맞춤형 백신개발 가능 - 살모넬라 생균백신 수준의 극대화된 방어력을 확보한 사균백신 개발 기술 확보 및 방어 효과 증명 가능 ○ 경제적·산업적 측면

	<ul style="list-style-type: none"> - 백신을 통한 돼지, 닭의 살모넬라증에 의한 살처분의 최소화로 인한 경제적 손실예방 및 생산성 증대로 인한 축산 산업의 국제 경쟁력 강화 - 살모넬라 저감 백신 및 항생제 대체 첨가제로 응용으로 수입 대체 절감 효과 및 시장 선점 효과 - 안전한 축산물 생산·공급을 통한 소비자 신뢰 확보 및 소비 증대 <p>○ 사회적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> - 공중보건학적으로 문제가 되고 있는 살모넬라증에 대한 인체감염원을 방어할 수 있는 백신개발로 인한 국민의 불안감 해소 가능 - 안정성이 향상된 생균 백신의 백신개발로 축산 농가의 살모넬라증 예방 수단의 다양화 도모 가능 				
국문핵심어 (5개 이내)	살모넬라	약독화 생백신	사백신	면역증강	DIVA감별진단
영문핵심어 (5개 이내)	Salmonella	live attenuated vaccine	Ghost vaccine	Immunity enhancement	DIVA differential diagnosis

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

제1장 연구개발과제의 개요 1
제2장 연구수행 내용 및 결과 19
제3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 89
제4장 연구결과의 활용 계획 등 91
붙임. 참고 문헌 92

<별첨1> 연구개발 보고서 초록

<별첨2> 주관연구기관의 자체평가의견서

<별첨3> 연구성과활용계획서

<첨부자료> 3등급 연구시설 사용 수료증(2019, 2020년도)

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

살모넬라균은 오염된 식품으로부터 일반적으로 확인되는 수인성 및 식품매개질환의 대표적인 세균성 병원체로, 전 세계적으로 사람에서 위장관염과 패혈증을 유발하는 것으로 알려져 있다. 살모넬라 감염증은 전 세계 대부분 국가에서 공중보건학적 문제로 여겨지고 있으며 미국의 경우 매년 약 400만 명에 달하는 사람들이 살모넬라균에 감염이 추정되고 있으며, 세계적으로 이로 것으로 인해 직간접적으로 매년 100만 명이상이 사망하는 것으로 보고되어 있다. 또한 국내 연구진과 보건당국에 의해 밝혀진바는 축산식품에서 식중독 발생과 가장 밀접하게 연루된 원인균의 대부분이 살모넬라균이라는 사실이 알려져 있다.

다양한 살모넬라의 혈청형 중 살모넬라 타이피뮤리움 (*S. Typhimurium*, ST) 과 엔테라이티디스 (*S. Enteritidis*, SE)는 가축에서 질병을 일으킬 뿐 아니라 감염된 육류 가공품 등의 식자재를 사용한 덜 익힌 음식을 섭취했을 때 사람에게 전파되어 살모넬라 식중독을 일으킬 수 있기에 우리나라 뿐 아니라 전 세계대부분의 국가에서 공중보건학적 문제로 여겨지고 있다. 국내 연구조사 결과에 따르면 식중독에 감염된 사람에서의 분리빈도가 높은 혈청형인 살모넬라 엔테라이티디스(17; 47.2%), 타이피뮤리움 (8; 22.2%) 와 육계에서의 분리빈도가 높은 살모넬라 엔테라이티디스 (14; 21.9%), 타이피뮤리움 (15; 23.4%) 가 일치하는 것으로 확인 된 보고가 있다 (cheong, et al., J Korean Med Sci. 2007). 유럽의 식중독 감염원 통계에서도 확인된 병원체 중 약 21.8%가 살모넬라로 가장 많이 발생한 것으로 보고되어 있다. 살모넬라 감염을 예방하기 위한 수단으로 근래까지 배합사료 내에 항생제를 첨가하는 방법이 주로 이용되어 왔지만 최근 전 세계적으로 항생제 저항 균주의 증가로 인하여 가축사료에 항생제 첨가 감소를 촉진하거나 금지하는 추세이기 때문에 항생제의 사용 없이 세균성 질병을 예방하여야만 하는 상황에 직면해 있다

생균백신은 일반적으로 화학물질이나 항생제, 배양온도조건 등을 이용한 계대배양법 또는 특정유전자 조작법에 의한 변이균주가 이용된다. 생균백신은 부작용이 문제가 되기도 하고, 변이균주(mutant)에 인한 환경오염 및 인체에 대한 악영향이 있는 한편 사균백신이나 subunit 백신의 경우 생균과 같은 안전성 우려가 없지만 방어력이 만족스럽지 못하다. 특히 생균백신보다 인체에 대한 안정성은 높지만 세포내 기생성 병원체에 대한 방어력은 충분치 못한 것으로 알려져 있다. 이러한 살모넬라 감염 예방의 중요성을 감안 시 농장단계에서 살모넬라증의 철저한 예방을 위하여 사균백신과 같은 안전성을 지닌 약독화 생백신의 개발뿐만 아니라, 안전성에 증강된 면역원성을 지닌 사균 백신의 개발이 시급한 실정이다.

본 연구에서는 생균백신과 사균백신의 한계를 극복하고 새로운 개념의 백신을 고안하기 위하여, 안전하고 환경 등 오염의 우려가 작은 생균백신의 개발 및 방어력이 생균백신에 유사한 사균백신을 개발하고자 한다. 연구진은 현재까지 *Salmonella* 생균 및 고스트 사균백신 전달 시스템을 개발하여 균 자체방어나 타 종류 세균 동시 방어 백신을 원시 핵 세포기반 발현시스템으로 개발하여왔다. 이번 사업을 통하여 진보적으로 살모넬라 기반 발현시스템으로 개선하고자, Genetic modification을 이용, 독선관련 유전자 lon 과 cpxR 을 제거하여 세포독성을 현저히 낮추고, LPS O-antigen 합성에 관여하는 rfaL유전자를 결실시켜 DIVA가 가능하게 제작한 새로운 SE 및 ST 균주로 신개념 생균백신을 개발하고자 한다. 또한 박테리오파지 람다에서

유래한 Ghost cassette를 통해 특정 조건에서 자가 용해에 의해 호스트 내에서의 안전함을 개선하고자 한다. 또한, 동시에 점막 면역 및 세포성 면역을 좀 더 강하게 유도하기 위해 단백질성 adjuvant인 LatA와 fliC가 세포벽에 발현되는 고스트 시스템을 개발하고자한다. 최종적으로 가축에서의 살모넬라증 예방 및 저감 뿐 아니라 이중 항원 발현 기법을 이용하여 다른 병원균의 면역원성이 높은 항원을 발현하도록 하여 여러 감염증을 동시에 방어할 수 있는 획기적인 백신 개발 및 백신 연구의 기초 정보를 제공하고자 한다. 또한 농장 단계에서 혈청학적 감별 방법에 의하여 살모넬라 감염 진단을 하는 것을 고려 할 때 백신 접종 군과 감염군의 감별이 가능한 DIVA (differentiating infection in vaccinated animals) 가능 백신 주의 개발은 백신의 현장 적용 시 그 실용성을 현격하게 증가 시킬 수 있다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 항생제의 사용 없이 세균성 질병 예방 가능한 수단의 필요

앞에서도 언급 했듯이 살모넬라 감염을 예방하기 위한 수단으로 근래까지 배합사료 내에 항생제를 첨가하는 방법이 주로 이용되어 왔지만 최근 전 세계적으로 항생제 저항 균주의 증가로 인하여 가축사료에 항생제 첨가 감소를 촉진하거나 금지하는 추세이기 때문에 항생제의 사용 없이 세균성 질병을 예방하여야만 하는 상황에 직면해 있다. 항생제 없이 가축위생을 유지할 수 있는 적합한 백신의 수요가 증가하고 있는 상황이다. 또한, 사료에 항생제의 첨가가 금지된 현재, 백신 없는 예방에 차질이 일어나기 때문에, 우선 해외에서 사균 백신을 수입하여 사용하고 있다. 범용되는 엔테라이티디스 백신을 포함하여, 여러 연구팀에 의한 개발백신에 이르기까지, 모두 동물에서의 감염을 줄일 뿐 아직까지 축산물 오염을 완전히 방어할 수 있는 만족스러운 수준의 백신이 존재하지 않는다. 따라서 축산물 오염을 충분히 방어할 수 있는 타이피리움과 엔테라이티디스 백신을 개발한다면, 상당한 효과와 부가가치를 지닌 국산백신 생산이 가능해질 것이며 이로 인해 상당한 부가가치를 창출할 수 있다.

2. 사균백신과 같은 안전성을 지닌 약독화 생백신의 개발뿐만 아니라, 안전성에 증강된 면역원성을 지닌 사균 백신의 개발

생균백신은 일반적으로 화학물질이나 항생제, 배양온도조건 등을 이용한 계대배양법 또는 특정유전자 조작법에 의한 변이균주가 이용된다. 생균백신은 부작용이 문제가 되기도 하고, 변이균주(mutant)에 인한 환경오염 및 인체에 대한 악영향이 있는 한편 사균백신이나 subunit 백신의 경우 생균과 같은 안전성 우려가 없지만 방어력이 만족스럽지 못하다. 특히 생균백신보다 인체에 대한 안정성은 높지만 세포내 기생성 병원체에 대한 방어력은 충분치 못한 것으로 알려져 있다. 이러한 살모넬라 감염 예방의 중요성을 감안 시 농장단계에서 살모넬라증의 철저한 예방을 위하여 사균백신과 같은 안전성을 지닌 약독화 생백신의 개발뿐만 아니라, 안전성에 증강된 면역원성을 지닌 사균 백신의 개발이 시급한 실정이다.

3. DIVA 가능한 생백신 및 사균백신의 개발

농장 단계에서 혈청학적 감별 방법에 의하여 살모넬라 감염 진단을 하는 것을 고려 할 때

백신 접종 군과 감염군의 감별이 가능한 DIVA (differentiating infection in vaccinated animals) 가능 백신 주의 개발은 백신의 현장 적용 시 그 실용성을 증가 시킬 수 있다.

제 3 절 연구개발 범위

주요 인수공통 살모넬라균인 S.Enteritidis와 Typhimurium을 예방하기 위하여 *asd+* balanced lethal host-vector system을 기본으로 하여 LPS-O antigen합성에 관여하는 *rfaL* 유전자를 결실하여 백신균주와 야외감염 균주의 감별진단, 즉 DIVA 가능한 새로운 살모넬라 약독화 생균 백신균주를 개발하고, 박테리오파지 유래 holin-endolysin 용해 단백질의 발현을 통해 안정적인 자가 용해 시스템에 생물형 면역력보강제 (fliC)를 발현시켜 점막 면역 및 선천 면역체계를 자극하는 사균백신 시스템을 개발하여 농장단계에서의 주요 살모넬라증을 예방하고자 한다.

1. 주요 인수공통살모넬라감염증 저감대책을 위한 생물학적 면역증강제도입 신개념 사균백신 및 DIVA 가능한 약독화 생백신 개발

최종목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ DIVA 감별진단이 가능한 주요 Salmonella증 예방 약독화 생백신 및 면역증강 단백질을 발현하는 신개념 고스트 살모넬라 사균백신 시스템의 구축 ○ 조류 등에서 신개념 Salmonella 생백신 및 고스트 사균백신의 안정성 및 효능 평가
-------------	--

1차년도	2차년도
<ul style="list-style-type: none"> • DIVA 감별진단이 가능한 약독화 살모넬라 생균 백신 개발을 위한 LPS 관련 O-antigen이 결실되어 제작된 살모넬라 ST와 SE 백신균주 (rough salmonella) 제작 • <i>rfaL</i> 유전자 결실 백신주 제작 • 백신후보주의 투여방법(경구 투여 및 근육 주사)을 달리하여 면역화가 이루어진 실험동물에서 체액성 및 세포성 면역 활성 확인 • DIVA 가능성 확인 • 림프절에서의 항원제시 여부 확인 • 면역화에 따른 야생균주에 대한 방어 효과 확인 • E-lysis 시스템을 이용한 고스트 사균백신 벡터 제작 • 면역활성 고스트 사균백신 구축을 위한 생물형 TLR 기반 면역력보강제 도입 	<ul style="list-style-type: none"> • 닭에서 신개념 살모넬라 생균 및 고스트 사균 백신의 안전성 및 효능 평가와 최적화 시험 • 개발 생백신 및 사균백신 접종 최적화 실험 및 체액성 세포성 면역원성 확립 • 백신 투여 면역 동물에서 DIVA 감별진단 가능 여부 확인 • 백신접종 조건을 최적화하기 위하여 면역증강분자의 발현량을 다르게 한 몇 가지 균주를 제작하여, 백신 접종경로, 접종량, 접종시기 등의 백신 사용방법을 최적화. • 본 신개념 생균 및 고스트 사균백신 효능 평가 • 최적화된 면역증강 단백질을 발현하는 신개념 생균 및 고스트 사균백신의 구축

<ul style="list-style-type: none"> ● 고스트 사균 백신주에 대한 용해력 확인 ● 마우스 모델을 통한 체액성 및 세포성 면역 유도 확인 ● 면역화에 따른 T 림프구 분화 정도를 FACS 분석을 통해 확인 ● 야생형 균주의 도전감염에 대한 잔여 균주 및 방어력 확인 	
--	--

DIVA 감별진단이 가능한 약독화 살모넬라 생균 백신 및 생물형 면역력보강제 발현 Ghost cassette를 이용한 살모넬라증 예방용 사균 백신 개발

제 4 절 본 연구팀의 선행기술

1. DIVA (differentiating infection in vaccinated animals) 감별진단이 가능한 약독화 생균 백신 개발을 위한 LPS 관련 O-antigen이 결실되어 제작된 ST 뮤턴트 (Rough *Salmonella* Typhimurium) 제작

방법: 숙주 균주로부터 표적 유전자를 결손 시키기 전, 재조합에 필요한 유도성 red-lambda 구성물을 제공하는 헬퍼 플라스미드 pKD46을 JOL912에 형질전환 시켰고 표적 유전자 rfaL은 pkD3 플라스미드로부터 증폭 된 선형 PCR 산물에 함유 된 catR 유전자로 대체되었다.(그림 1.)

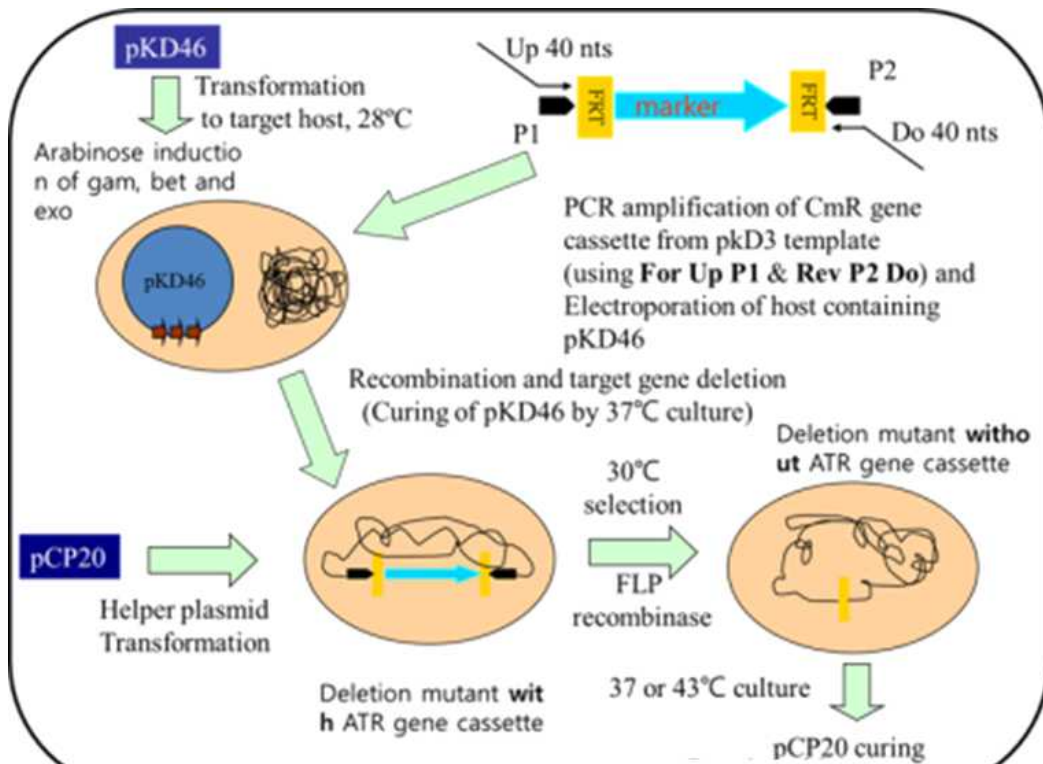


그림 1. Lamda red phage system을 이용한 LPS O antigen 관련 유전자 결실과정

재조합 클론은 25µg/ml의 chloramphenicol을 함유 한 LB broth에서 항생제 저항성을 마커로 이용하여 선택 하였다. LPS 관련 O-antigen이 결실되어 제작된 살모넬라 뮤턴트 (rough salmonella)를 확인하기 위하여 SDS-PAGE와 silver staining 기법이 사용 되었다.(그림 2(A).) positive control로써 LPS를 페놀계 상용 LPS 추출 키트 (iNtRON Biotechnology, South Korea)를 사용하여 추출 하였다.

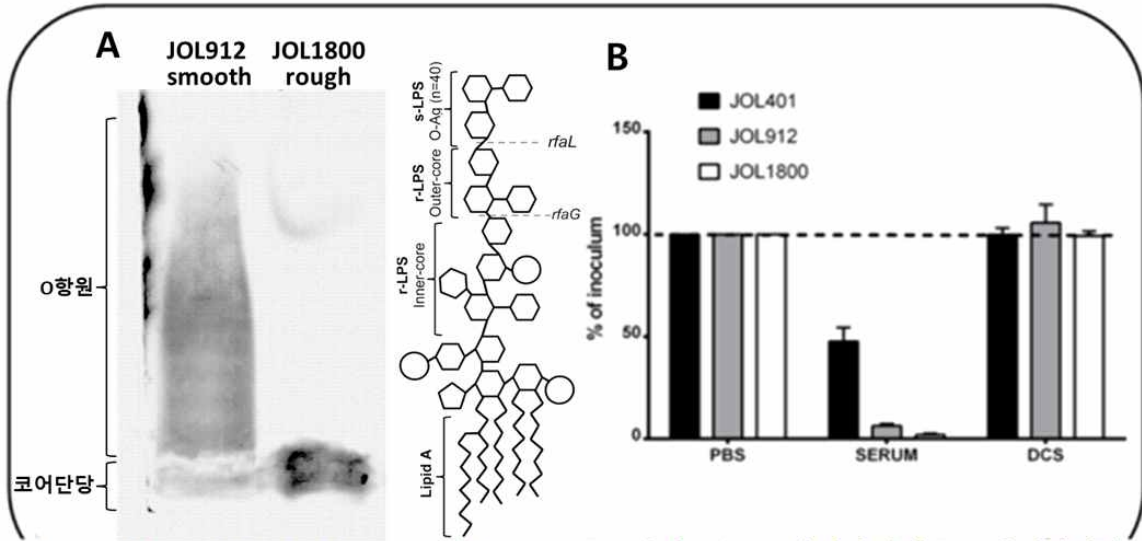


그림 2. (A) *rfaL* 유전자 결실 균주의 Silver staining 분석 (B) *rfaL* 유전자 결실 균주의 항체반응

결과: ① JOL1800 균주의 보체 민감성 및 감염된 대식세포의 특징적 변화 및 JOL1800 균주의 생존력 측정 제작된 균주의 표현형 특성파악을 위해 토끼유래 보체와 함께 각 균주를 37°C에서 1시간 반응한 후 세포 사멸을 관찰한 결과 야생형 균주에 비해 보체에 의한 사멸이 확연히 이루어진 것을 확인할 수 있다.(그림 2(B).) 또한 ST 벡터로 생체 내 집중 후 전달된 항원을 나타내는 마우스 CD11c +DC의 분획을 평가 하였다. 세포 수준에서 항원 제시의 정도를 시각화하기 위해, 마우스 intraperitoneal macrophages는 10MOI 용량의 hemagglutinin (HA) 전달 ST strain에서 체외에서 감염되었다. 감염 16 시간 후, 세포를 고정하고 면역 형광 현미경 분석을 실시하였다. 리소좀 성 분해에 내성이 강한 야생형 JOL401H는 대식세포 내부에서 거의 손상되지 않았으며 최소한의 ST 항원 또는 HA 항원이 관찰되었다. JOL1800H에 감염된 대식세포는 ST 항원과 항원의 최대 수치를 나타내었고 그 다음으로 JOL912H에서의 항원 제시 정도가 증가가 나타났다.(그림 3.) 따라서, 직접적인 시각화는 항원 제시의 정도가 세포 집단뿐만 아니라 개별 세포에서도 증가한다는 것을 밝혀냈다.

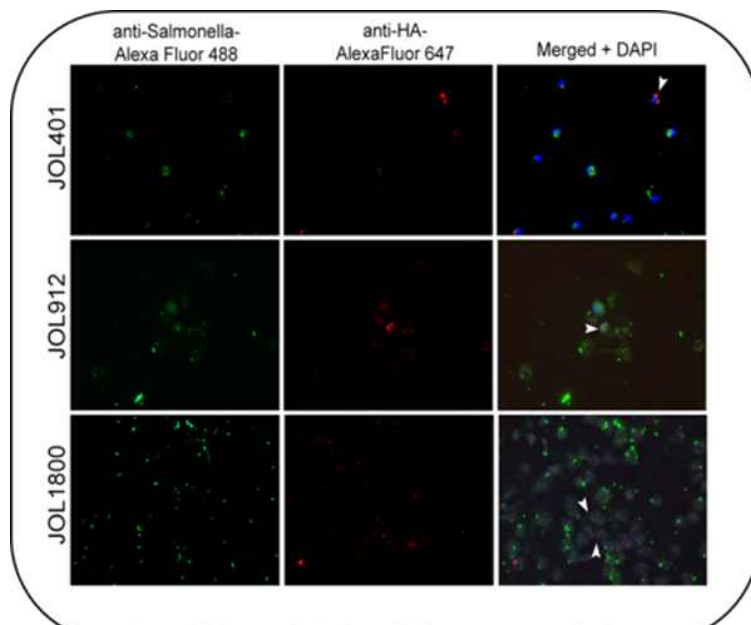


그림 3. 마우스 대식세포에서 JOL1800의 생존능

② 살아있는 ST 벡터는 예방 접종 경로와 상관없이 면역계를 타겟 부위에 전달함으로써 전신적 및 점막 면역을 활성화 시킬 수 있다. 마우스에 LA 및 HA 항원을 각각 발현하는 JOL912 및 JOL1800 균주를 접종 한 후 간접 ELISA를 이용하여 특정 항원에 대한 Murine IgG와 sIgA 항체 생산을 결정 하였다 . 또한 살아있는 ST 전달이 원격으로 전달 된 항원에 대한 체액 반응을 유발할 수 있다는 가설을 검증하기 위해 IM (전신 면역) 접종 후 쥐의 장세척 샘플에서 항 LA와 항 HA 항체를 결정했으며 그 반대의 경우도 전신 혈청 IgG 구강 (점막)경로를 통해 면역화 된 마우스에서 검출된 혈청 항체로도 ELISA를 실시하였다. 흥미롭게도, 전달된 항원에 특이적인 sIgA의 생성은 IM 경로를 통해 면역화 된 그룹의 장세척 샘플에서 검출되었다. 이것은 살아있는 ST 변이체가 전신 면역 후 장 점막 면역 부위에 도달했으며 전신 면역뿐만 아니라 점막 면역을 활성화시킬 수 있음을 나타낸다.(그림 4.)

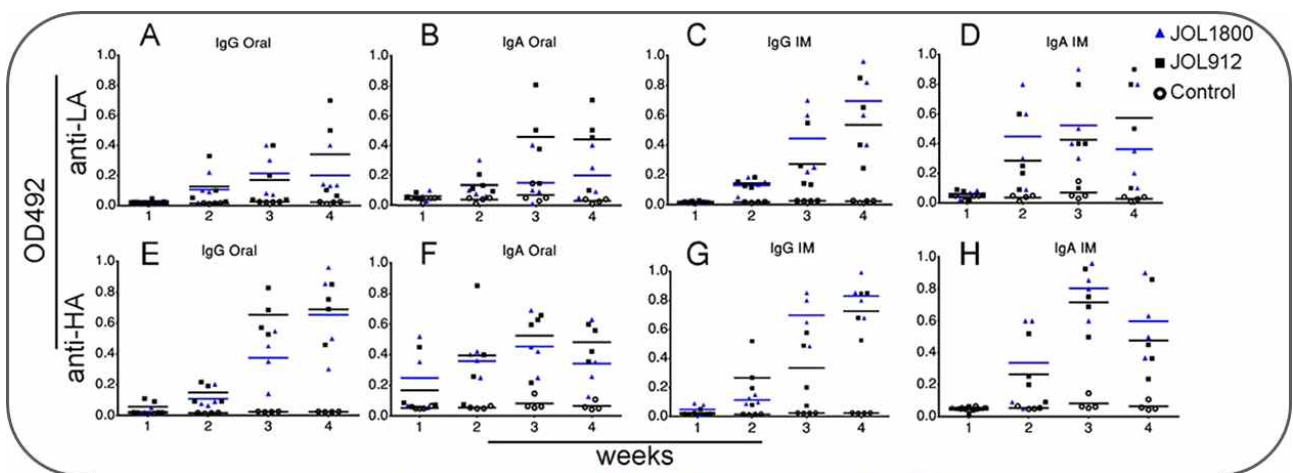


그림 4. JOL1800의 투여 경로에 따른 IgG, sIgA 형성 정도

결론: 본 연구의 결과로 JOL1800 균주는 적절하게 약독화 되었고 이상적인 면역 반응을 달성하기 위해 충분히 숙주 안에서 생존함을 나타낸다. JOL1800 표현형이 향상된 항원 제시와 전달된 항원의 발현에 도움이 된다는 것을 증명했다. 이 균주에서 O-항원을 제거하는 것은 또한 기존에 존재하고 있는 살모넬라 특이 항체에 의해 면역반응이 저해되는 것을 방지하는 효과도 나타났다. 또한 JOL1800은 DIVA를 지원하므로 LPS 기반 살모넬라 타이피유리움 진단 시 오진단율을 낮추는데도 기여할 것이다. 이러한 결과는 본 연구에서 개발된 O-항원 합성 관련 유전자 결실 JOL1800이 안전하고 효율적인 항원 전달에 사용될 수 있음을 시사한다.

2. 약독화 살모넬라 (SE) 균주를 이용한 생균 백신 개발 및 면역원성 최적화 실험

방법: 본 실험에서 제작된 백신의 살모넬라증 예방효과는 (i) 살모넬라 엔테리티디스의 염색체 DNA에서 lon 및 cpxR 유전자를 결실시켜 숙주세포 부착 및 침입에 관련된 특성 등을 조사하는 단계; (ii) 어린 병아리에 다양한 농도로 접종함으로써 약독화 상태와 안전성을 야생균주(wild type)와 비교하는 단계; (iii) 어린 병아리에서 면역 유도력을 야생균주와 비교하는 단계; (iv) 어린 병아리에서 백신접종 후 야생균주를 접종하여 방어력을 측정하는 단계; (v) 접종회수 및 백신프로그램에 따른 면역형성을 측정하는 단계; (vi) 장기적 실험에서 접종경로 및 백신프로그램에 따른 계란오염을 조사하는 단계 (백신 자체에 의한 사람 감염 여부에 관한 안전성 확

인); (vii) 백신접종에 의한 야생균주의 감염으로부터 계란오염 방어력을 측정하는 단계 (사람 식중독 관련 방어력 확인)를 거쳐 확인될 수 있다.

결과: ① 변이균주의 생물형 분석 변이균주의 생물학적 형은, β -갈락토시다아제(-), 아르기닌 디하이드로라아제(+), 리신 디카복실라아제(+), 오르니틴 디카복실라아제(+), 시트르산 활용 (+), 황화수소 생산(+), 요소분해효소(-), 트립토판 디아미나아제(-), 인돌 생산(-), 아세트인 생산 (-), 젤라티나아제(-), 포도당 발효(+), 만니톨 발효(+), 이노시톨 발효(-), 소르비톨 발효(+), 람노오스 발효(+), 수크로오스 발효(-), 멜리비오스 발효(+), 아미그달린 발효(-), 아라비노오스 발효(+)) 로 나타났으며, 변이이전의 야생균주(JOL860)와 완전히 일치함을 확인하였다. 이는 *lon* 및 *cpxR* 유전자를 완전히 결실하여도 살모넬라 엔테리티디스의 생화학적 성질이 변하지 않음을 나타내며, 기본적인 대사능력이 저하되지 않음을 시사한다.

② 변이균주의 협막다당체(Capsular polysaccharide) 생산량 변이균주 JOL919는 야생균주 JOL860의 21.2배($P < 0.01$)의 협막다당체를 생산하고 있음을 알 수 있었다. 이 결과는 본 백신 변이균주가, 야생균주나 기타 다양한 약독화된 균주보다 숙주동물 소화관 점막에 부착하는 능력을 더욱 강하게 지고 있음을 시사하며 숙주동물로의 침입력이 우수하여 강한 면역력이 유도 될 것으로 기대된다.

③ 변이균주(JOL919)의 펴브리아(fimbriae) 발현 펴브리아는 숙주세포 침입 및 항원으로 중요하다. 먼저 *fimA* 유전자를 살모넬라 타이피무리움 야생형 에서 5'-GGATCCGCTGATCC TACTCCGGT GAG-3', 5'-CTCGAGTTCGTATTTTCATGATAAAGG-3'의 프라이머를 이용하여 pET28a에 cloning하고, 과발현된 6XHis-Tag이 부착된 단백질을 Ni-NTA 아가로오스 (Qiagen, CA, USA)를 이용하여 정제(affinity-purification)하였다. 변이균주는 야생균주의 28배 ($P < 0.01$)에 달하는 *fimA*를 발현하고 있음을 알 수 있었다. 이 결과는 본 백신 변이균주 (JOL919)가, 야생균주나 기타 다양한 약독화 된 균주보다 숙주동물 소화관 점막에 침입하는 능력을 더욱 강하게 지니고 있음을 시사한다.

④ 어린 병아리에서 살모넬라 엔테리티디스 변이(백신)균주의 안전성 관찰 실험 표 1에 나타낸 바와 같이, 변이균주 JOL919접종군에서는 1×10^7 cfu과 1×10^{10} cfu 접종군 모두 통계학적으로 매우 약한 병변 밖에 관찰되지 않아 충분히 약독화 되었음을 알 수 있었다.

표 1. 어린 병아리에서 야생균주 및 백신균주 접종 10일 후 내부장기 병변

균주	접종량 (CFU)	n	간	비장	신장	소장	맹장 편도
JOL860	1×10^7	5	2.0 ± 0.6	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.0	0.6 ± 0.5	0.6 ± 0.5
	1×10^{10}	5	3.0 ± 0.6	1.6 ± 0.5	1.0 ± 0.0	0.8 ± 0.4	0.6 ± 0.5
JOL919	1×10^7	5	$0.0 \pm 0.0^*$	$0.0 \pm 0.0^*$	$0.0 \pm 0.0^*$	$0.0 \pm 0.0^*$	$0.0 \pm 0.0^*$
	1×10^{10}	5	$0.0 \pm 0.0^*$	$0.2 \pm 0.4^*$	$0.0 \pm 0.0^*$	$0.0 \pm 0.0^*$	$0.2 \pm 0.4c^*$

표 2에 나타낸 바와 같이, JOL919의 1×10^7 cfu 접종군에서는 비장과 맹장 내 세균수가, 1×10^{10} cfu 접종군에서는 비장 내 세균수가 야생균주 보다 적게 검출되어 *lon/cpxR* 유전자를 결실시킴으로 장기 내 생존능력이 현저히 저하되었음을 알 수 있었다.

표 2. 야생균주 및 백신균주 접종 후 생존능

균주	접종량 (CFU)	n	2주차	3주차	4주차
JOL860	1 × 10 ⁷	5	1.9 ± 1.6	0.3 ± 0.4	0.0 ± 0.0
	1 × 10 ¹⁰	5	1.3 ± 1.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
JOL919	1 × 10 ⁷	5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	1 × 10 ¹⁰	5	2.4 ± 1.3	0.8 ± 1.5	0.0 ± 0.0

표 3에 나타난 바와 같이, 접종 후 분변을 통해 일어날 수 있는 환경오염 여부를 조사하기 위한 분변 내 세균은 1×10¹⁰cfu 접종군에서 접종 후 4주째부터는 배출되지 않아, 통상적으로 접종 후 4주까지 배출되는 야생균주와 비슷함을 인정할 수 있었다. 반면, 1×10⁷cfu(권장접종량) 접종군에서는 2, 3, 4주째부터 모두 배출되지 않은 것으로 확인되어, 야생균주보다 환경오염 위험이 낮은 것으로 확인되었다.

표 3. 야생균주 및 백신균주 접종 후 배출 정도

균주	접종량 (CFU)	n	비장	맹장
JOL860	1 × 10 ⁷	5	4.1 ± 0.6	7.0 ± 0.6
	1 × 10 ¹⁰	5	4.8 ± 0.7	6.9 ± 1.6
JOL919	1 × 10 ⁷	5	0.8 ± 1.2*	2.0 ± 1.7*
	1 × 10 ¹⁰	5	0.6 ± 0.9*	4.5 ± 0.9

⑤ 1일령 병아리에서 방어면역 형성시험 Brown Nick 암컷 1일령 병아리 15마리를 야생균주 JOL860 접종군(n=5), 백신접종군(n=5) 및 비접종대조군(n=5)으로 나누어 접종군은 야생균주 (JOL860) 또는 백신균주(JOL191) 를 1×10⁷cfu씩 경구 투여 하였으며, 비접종대조군은 PBS(Phosphate buffered saline)를 접종하였다. 분비형 IgA(점막면역반응)는 야생균주 접종군에서 PBS투여군(대조군)과 비슷한 반면, 백신접종군에서는 더 강한 반응이 일어난 것으로 알 수 있었다. 체액성 면역은 접종군에서 모두 높은 값을 나타내었다.(그림 5.) 이와 같이, 본 백신균주는 방어면역 유도능이 야생균주(JOL860)보다 강하였으며, 변이균주의 백신으로서의 우수

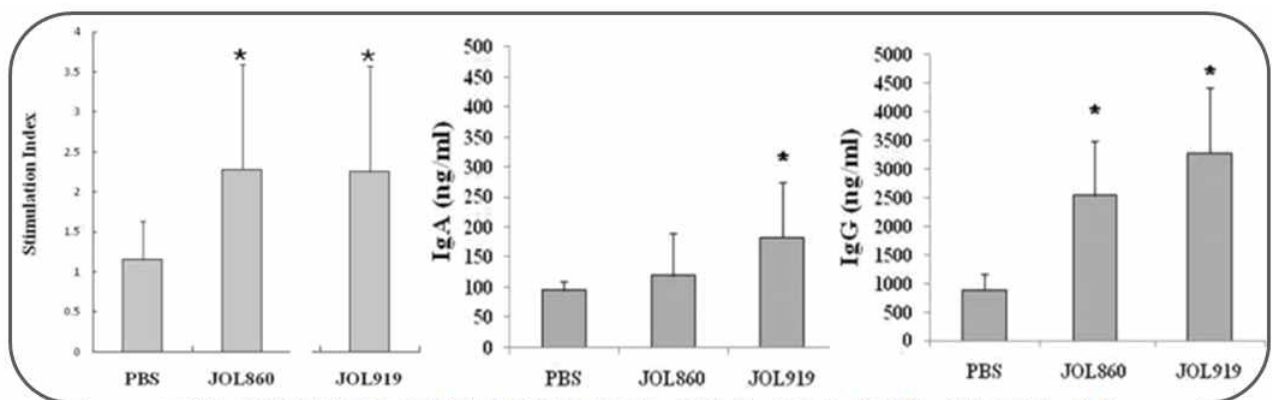


그림5. 1일령 병아리에서 변이균주의 세포성, 점막성 면역 및 체액성 면역유도능 확인

성을 나타내었다.

⑥ **면역 강화균주 (JOL1228)의 제작** 면역강화 균주 (JOL1228)를 얻기 위하여 (i)살모넬라 엔테리티디스의 염색체 DNA에서 *lon*, *cpxR*, *asd* 유전자를 결실시켜 약독화 숙주 균주(JOL1087)를 제작하고, (ii)LTB 유전자를 ETEC 균주에서 외부유전자 유지 및 발현용 벡터(pET28a)에 클로닝하고, (iii)숙주 살모넬라 엔테리티디스 세포외부로 외부유전자를 발현 및 분비하는 분비용 벡터(pJHL165)를 제작하고, (iv)pJHL165에 클로닝된 LTB를 삽입하고 pJHL165-LTB를 얻어 *asd* 결실 균주인 E.coli χ 6212를 형질전환하고, (v)숙주 살모넬라 엔테리티디스 JOL1087를 pJHL165-LTB 벡터로 형질전환하여 면역원성이 강화된 백신균주(JOL1228)를 제작하였다. 이러한 제작과정은 이 분야의 통상의 방법으로 실시하였다.

⑦ **백신접종 산란계에서 백신균주로 인한 계란오염 유무** 2주 동안 매일 계란을 수거하여 백신균주로 인한 계란 오염이 있는지를 검사하였다. 외각을 소독한 후 계란 3-4개의 내용물을 섞어(이하 BATCH라고 함) 계란 1개당 40 mL의 BPW과 혼합하여 37°C, 16시간 배양 후 RV 배양액(Rappaport-Vassiliadis R10 broth)에 1/100(부피) 비율로 접종하여 42°C에서 48시간 배양 후 BGA에서 살모넬라의 유무를 확인하였다. 그 결과, 백신균주가 검출된 계란은 하나도 없었으며 백신균주가 계란오염을 일으키지 않음을 확인할 수 있었다.

⑧ **야생균주(JOL1182)의 도전감염 후 계란 오염 방어 시험** 표 4. 에서 나타난 바와 같이, 1차 및 2차 접종을 면역강화 변이균주를 혼합한 경우에 계란오염을 완전히 방어할 수 있음을 발견할 수 있었다.

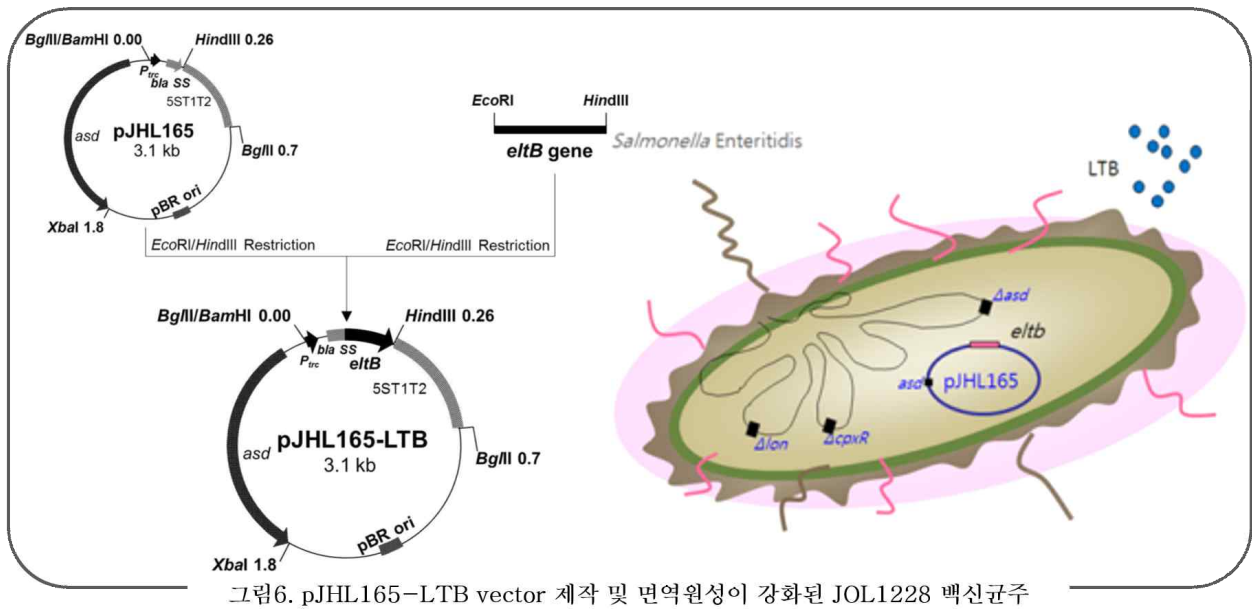
표 4. 면역화 된 산란계에서 도전감염 후 방어능 확인

군	오염이 확인된 BATCH 수				계란오염 방어율 (%)	결과의 해석
	1-3 주	제 1 주	제 2 주	제 3 주		
A	33/74	14/28	11/28	8/28	55	백신접종하지 않고 인공감염 후 계란오염 상황
B	9/74**	4/28**	4/28*	1/28*	88	통계학적으로 높은 효율로 방어
C	9/74**	6/28*	3/28*	0/28**	88	통계학적으로 높은 효율로 방어
D	0/74**	0/28**	0/28**	0/28**	100	계란오염을 완벽하게 방어
E	8/74**	4/28**	4/28*	2/28*	89	통계학적으로 높은 효율로 방어

보통 자연감염에서는 경구적으로 감염되어 계란 오염정도가 결과처럼 높지 않다. 본 연구에서 이미 계란오염을 잘 일으킴을 확인한 균주를 정맥 내 주사의 방법으로 접종하여 더욱 인공적 계란 오염 발생율을 높여 백신 비접종 대조군(A군)에서 55%이었던 점을 감안하면, 본 공격실험에서 100% 방어에 성공한 것은 D군과 같은 백신 프로그램의 계란오염 방어력이 우수함을 알 수 있었다.

결론: 본 실험은 살모넬라 엔테리티디스균의 염색체 DNA에서 *lon* 및 *cpxR* 유전자가 결실된 약독화 변이균주; 살모넬라 엔테리티디스균의 염색체 DNA에서 *lon*, *cpxR* 및 *asd* 유전자가 결실되고, 대장균(*Escherichia coli*)의 LTB(heat-labile toxin subunit B)를 발현하는 면역강화 변

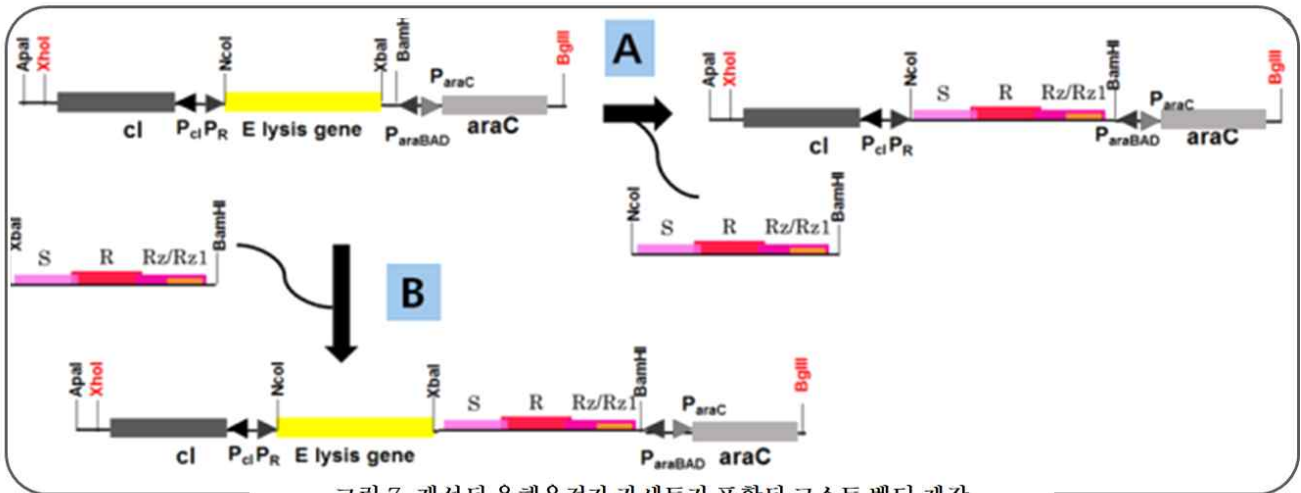
이균주; 또는 이들의 조합을 포함하는, 살모넬라증 예방용 생균 백신을 제작하였다.(그림 6.)



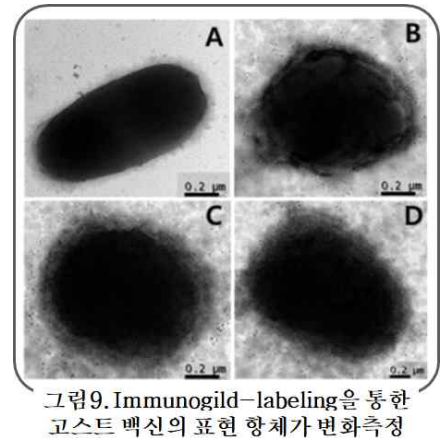
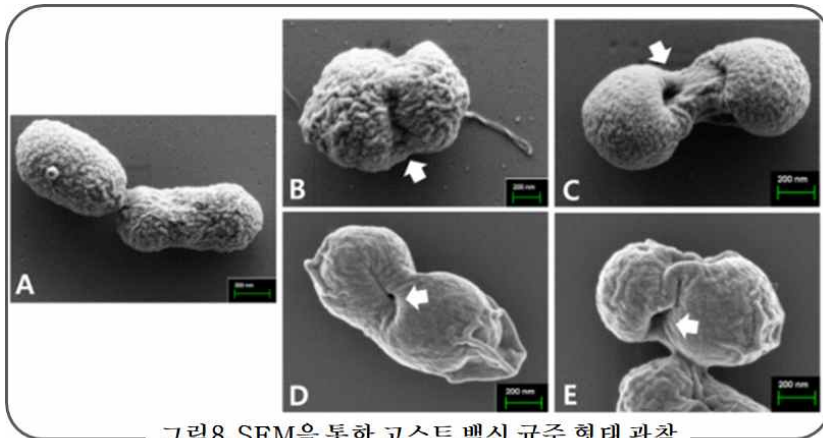
또한 본 연구는 상기 살모넬라 엔테리티디스의 약독화 변이균주; 면역강화 변이균주; 또는 이들의 조합을 조류에 접종하여, 조류에서 살모넬라 엔테리티디스 균의 난계대 오염을 예방할 수 있다. 본 백신제작에 따른 약독화, 면역강화 변이균주는 가금류에 투여 시 편리하게 경구접종이 가능하며, 이 경우 더욱 효과적으로 예방능력을 제공할 수 있고, 유전자 2개가 동시에 결실되어 있어 가금에 투여 시, 병원성 회복의 우려가 낮아 방어력이 우수하면서도 안전하다. 또한, 숙주점막세포 부착력 및 침입력, 면역 유도력이 우수할 뿐만 아니라 백신에 의한 계란오염을 일으키지 않아서 안전하다. 또한, 본 제작에 따른 백신 혼합 접종하면 야생균주로 인한 감염 및 계란오염을 매우 효과적으로 방어할 수 있으므로, 본 연구의 약독화, 면역강화 변이균주는 살모넬라증을 예방하는 생균 백신 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

3. 생균백신의 방어력에 다가간 신개념 사균백신 개발을 위한 Holin-Endolysin system을 응용한 고스트 사균 백신시스템 개발

방법: Holin-Endolysin은 두 개의 각기 다른 단백질로써 Holin이 먼저 발현이 되어 세균의 내막에 축적되고 몇몇의 holin 단백질은 monomer로 세포질에 남아 있게 된다. 충분히 holin이 합성되었을 때 남아있던 holin monomer가 holin raft를 형성 하여 내막에 축적되어 박혀있던 holin 단백질이 내막을 용해시키는 것을 도와 합성되어진 Endolysin이 periplasmic space로 나갈 수 있게 도와준다. 이 과정을 거쳐 발현된 Endolysin은 soluble 세포벽을 구성하는 성분인 peptidoglycan을 분해하는 요소인 soluble transglycosylase를 coding 하여 세포벽을 분해한다. 기존에 고스트화에 사용되었던 phiX174 lysis gene E 유전자는 약 155bp의 작은 크기로 단일 유전자로 구성 되어 있지만 Holin-Endolysin system은 총 4개의 유전자로 이루어진 1.2kb의 유전자 카세트로 holin 단백질을 발현하는 S유전자와 Endolysin을 발현하는 R 유전자와 그 외에 아직 기능이 확실하게 밝혀지지 않은 Rz, Rz1 유전자로 구성 되어있다. 본 연구에서는 R 고스트 카세트를 단독으로 이용한 고스트 백신 균주와 R 고스트 카세트와 E 용해 유전자를 동시에 발현을 유도하는 고스트 백신 균주를 조성 하였다. (그림 7.)



결과: ① 전자현미경을 이용한 *Salmonella Typhimurium* ghosts의 형성 확인 *Salmonella Typhimurium* ghosts의 형성은 SEM 촬영으로 관찰되어진다. 전자 현미경 분석을 통해 (그림 7A상 화살표)상에서 용해 구멍의 형성을 관찰할 수 있었다. gene E 터널 형성으로 인한 구멍은 pole region 또는 central division region에서 관찰이 가능 하다.(그림 8) Immunogold-labeling을 통한 고스트 백신의 표현 항체가 변화를 측정하였다.(그림 9.)



② **In vitro** expression of the lysis genes in *S. Typhimurium* 고스트화 된 균주 각각에서 E 유전자와 R 유전자 각각 혹은 함께 발현 되는 지의 여부를 확인하기 위하여 각각 토끼에서 생성된 E protein 항혈청과 R protein 항혈청을 2차 항체로 사용하여 western blot analysis가 실시되었다.(그림 10.) 고스트화 시키기 전인 control에 비해 고스트화 된 백신 균주에서 R protein(18kDa)의 발현이 관찰되었다. 이는 arabinose가 없는 42도에서의 용해 유전자 발현 조건에서 각각의 promoter가 용해유전자의 발현을 적절히 조절 하고 있음을 나타낸다.

③ **체액성 면역반응** 살모넬라로부터 추출한 OMP 항원 특이 체액성 면역반응은 간접 ELISA로 평가되었다. 전신 IgG와 점막 sIgA 수준은 면역 후 2 주마다 혈장과 질내 세척액 내의 농도로 측정되었다. group B (JOL1954), group C (JOL1962), group D (JOL1754) 의 실험동물들

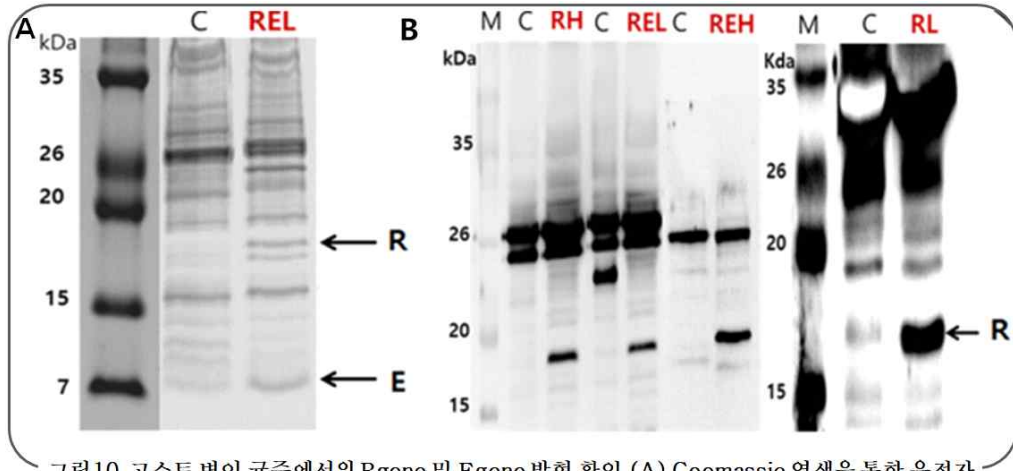


그림10. 고스트 변이 균주에서의 Rgene 및 Egene 발현 확인 (A) Coomassie 염색을 통한 유전자 발현관찰 (B)Western blot을 통한 용해 유전자 발현 관찰

은 group A 대조군에 비해 면역 후 매주 훨씬 더 높은 혈장 IgG 수준을 보였다. IgG isotype 인 IgG1과 IgG2a 도 각각 혈청에서 측정이 되었다. 마지막 백신 후 8주차까지 항체의 역가가 측정이 되었는데 4주차부터 확연한 증가가 두 항체가 모두에서 B, C, D 전 그룹에서 관찰 되었다. 본 항체는 Th-1과 Th-2 세포 반응을 얼마나 유도시키는지 관찰하기 위하여 측정 되었 으며 본 결과는 B, C, D 세 그룹에서 모두 균형 잡힌 Th-1, Th-2 반응이 유도되었음을 시사 한다. 체액성 반응과 세포성 반응이 유도되었음을 알려준다. (그림 11.)

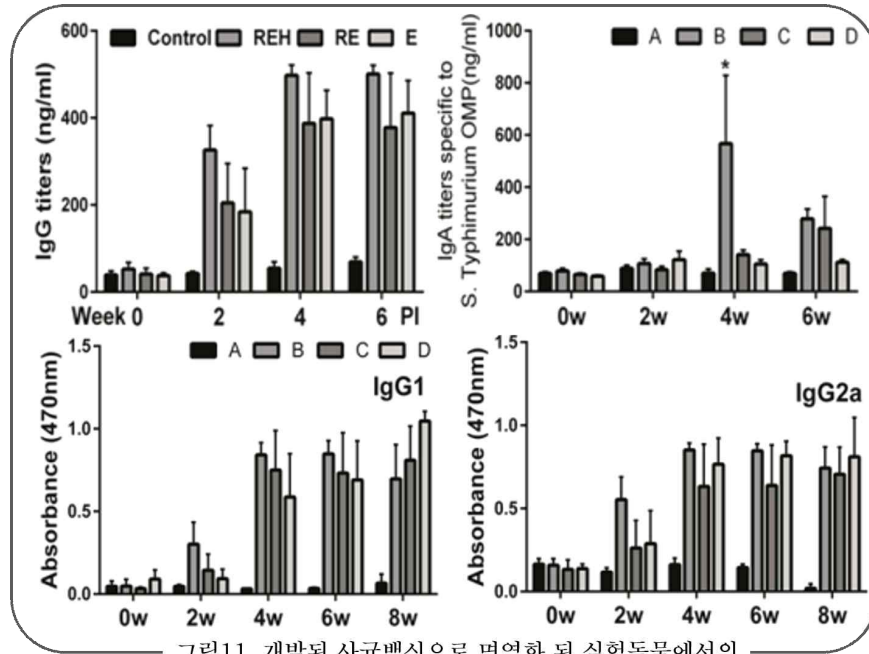


그림11. 개발된 사균백신으로 면역화 된 실험동물에서의 IgG, IgA, IgG1, IgG2a 항체 역가 측정

④ Flow cytometry analysis of CD4⁺and CD8⁺T cells CD4⁺(helperTcells)와 CD8⁺(cytotoxicTcells) Tcell 수치를 면역군으로 부터 CD4⁺,CD8⁺림프구의 상대적인 개수의 변화를 측정 하였다.(그림 12.) 전체 T cell의 수를 의미하는 CD3⁺ 표지를 지닌 T cell의 수는 REH (JOL1954)를 접종한 mice에서 평균 4.5%의 증가가 관찰 되었으며 CD3⁺CD4⁺ T cell과 CD3⁺CD8⁺ T cell 도 각각 3.1%, 2.2% 증가함이 관찰 되었다.

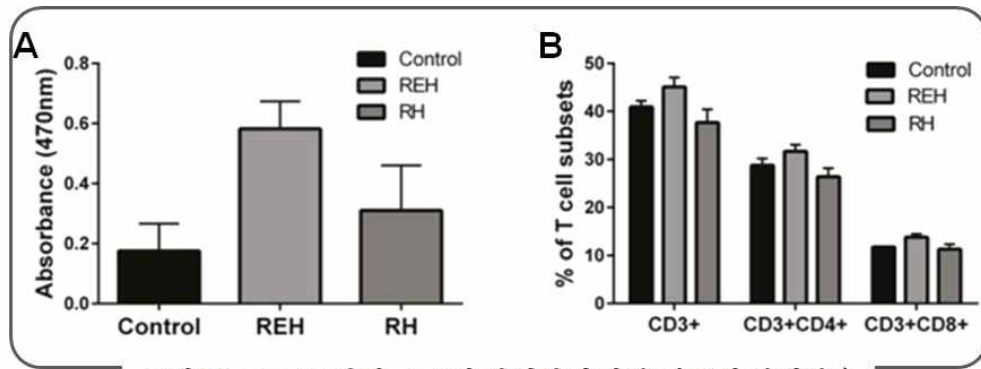


그림 12. 고스트 변이 균주의 면역화에 의한 세포성 면역반응
(A)세포분화능 평가 (B)T세포분화능 평가

⑤ Protective efficacy of bacterial ghosts against virulent challenge in mice 접종 안전 용량 결정을 위한 예비실험에서 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^5 으로 각각 면역된 실험동물에서 모두 100% 치사율을 보였다. 가장 강한 방어능을 보여준 백신 균주는 JOL1954로써 본 균주로 면역한 실험동물은 72%의 생존율을 보였다. 이에 반해 E유전자만 발현 하는 JOL1754 균주로 면역한 실험동물은 접종 9일째 100%의 치사율을 보였다. 이는 E 유전자만 사용 시 면역원성보다 R 유전자를 같이 사용 시에 유도되는 면역원성이 더 높다는 것을 의미한다. 반면에 R 유전자만 사용되어 용해된 살모넬라 균주로 접종된 실험동물은 10일차에 약 43%의 생존율을 보였다. (그림 13.)

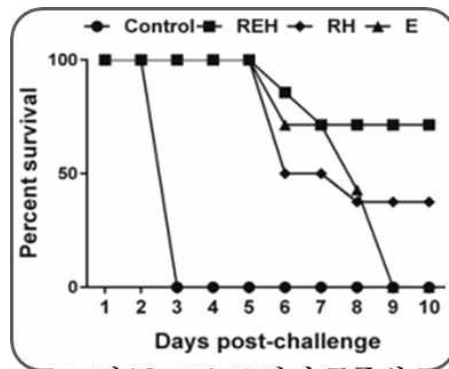


그림 13. 고스트 변이 균주의 면역화에 의한 방어능 평가

결론: R 유전자와 E 유전자를 함께 사용한 JOL1954균주에서 IgG 와 IgA 모두에서 가장 높은 항체 생성량이 관찰됨을 확인 하였다. 세포성 면역 반응도 T cell 반응의 증가의 관찰로 인해 확인이 되었다. 야외균주로 도전감염 시 비접종군과 기존의 E유전자만 발현 하는 JOL1754균주로 면역한 실험동물은 접종 9일째 100%의 치사율을 보였다. 반면에 가장 강한 방어능을 보여준 백신 균주는 JOL1954로써 본 균주로 면역한 실험동물은 72%의 생존율을 보였다. 이는 E 유전자만 사용시 면역원성보다 R 유전자를 같이 사용 시에 유도되는 면역원성이 더 높고, 새로운 고스트 유도 균주로의 가능성을 보여준다.

4. 면역 활성화 물질 발현 고스트 백신 개발: 면역 활성화제 역할을 하는 대장균의 편모 단백질을 발현 하는 재조합 살모넬라 사균 백신의 면역 효과 확인

배경: 편모 관련 유전자 결실 F18+STEC 균주(F18+STEC)는 IPEC-1 돼지 상피 세포로의 접착력 및 침입 능력이 현저히 감소함을 나타낸다. 그들은 또한 정제된 편모와 함께 배양 된 세포에 F18+STEC를 접종시 세균이 세포주에 정착되는 정도가 감소하였음을 밝혀냈다. 이는 편모의 주요 구조성분 인 플라젤린이 F18 +STEC에서 병독성과 관련이 있음을 나타낸다. 박테리아 플라젤린의 구조적 구성 요소는 보존된 플라젤린 도메인이 병원체 관련 분자 패턴 (PAMP)으로 인식되기 때문에 Toll like receptor (TLR) -5와의 결합을 통해 선천성 면역 반응을 활성화시킬 수 있음을 알려준다.

결과: ① **fliC** 단백질을 발현하는 불활성화 된 **Salmonella** 균주의 생산 **fliC** 유전자는 pMMP184의 항원 전달 부위의 대장균 외막 A (ompA) 신호 서열의 하류 프레임에서 서브 클로닝되었다. OmpA와 융합 된 fliC의 성공적인 발현은 항 fliC 과민성 토끼 혈청을 이용한 면역 블롯 분석에 의해 입증되었다. OmpA와 융합 된 fliC의 독특한 면역 반응성 밴드가 JOL1485의 펠릿에서 ~ 70 kDa에서 검출되었다.(그림 14.)

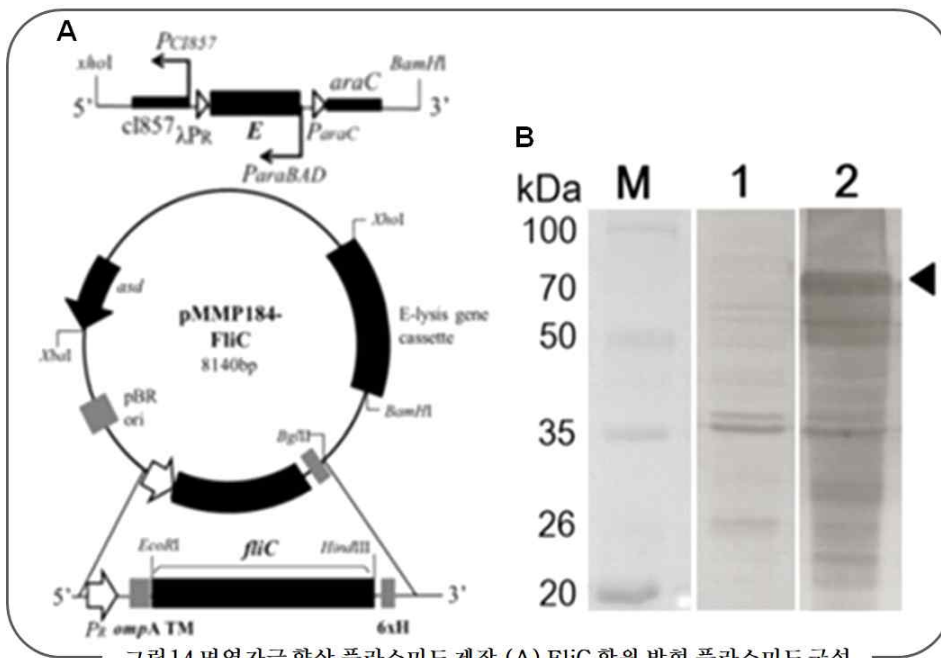


그림14 면역자극 항원 플라스미드 제작 (A) FliC 항원 발현 플라스미드구성 (B) 항원 발현 확인

② 면역화 된 마우스에서 **fliC**에 특이항체 생성 면역화 후 (PI) 4 주 및 6 주에 **fliC**에 특이적인 IgG 및 IgA의 역가가 대조군 A와 비교하여 면역화 된 마우스에서 현저하게 증가되었다. IgG2a의 값은 4 주 및 6 주 (그림 15.)에서 면역화 된 마우스에서 약간의 증가를 보인 반면, IgG1의 값은 유의하게 증가되었다. IgG1 isotypes에 대한 IgG1 isotypes의 비율은 각각 4 주 및 6 주 동안 6.3에서 4.7까지의 범위였고, 이는 Jol1485로 면역화 된 마우스에서 IgG1 이소 타입이 우세하게 방출되었음을 암시 한다.

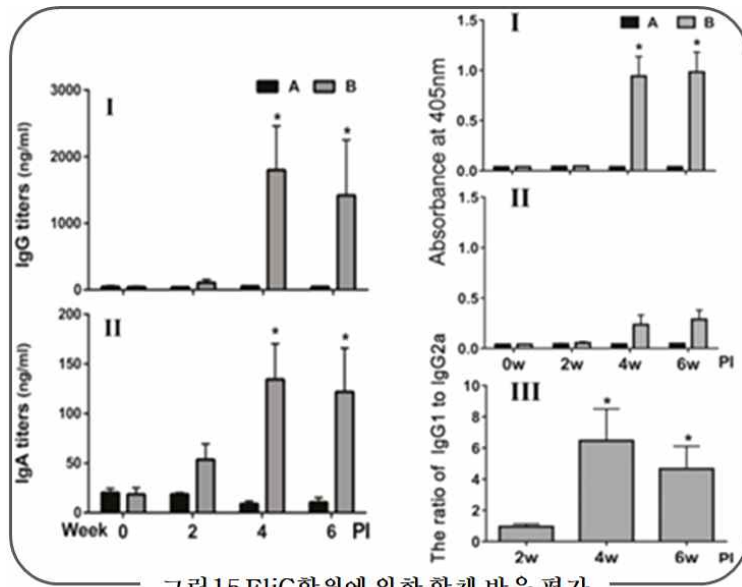


그림 15 FliC항원에 의한 항체 반응 평가

③예방 접종에 의한 사이토카인 분비 생쥐의 면역화에 의해 분비 된 면역 자극성 사이토카인을 평가하기 위해, 시험 관내 자극 된 비장 세포에서 사이토카인 IL-4, IL-8 및 IFN- γ 를 코딩하는 mRNA의 발현의 변화를 역전사PCR (RT-PCR)을 통해 분석 하였다. IL-4, IL-8 및 IFN- γ 의 mRNA는 fliC 항원으로 재조합 된 시험 관내 비장 세포에서 각각 3.5, 8.1 및 6.1 배 증가 하였다.(그림 16.)

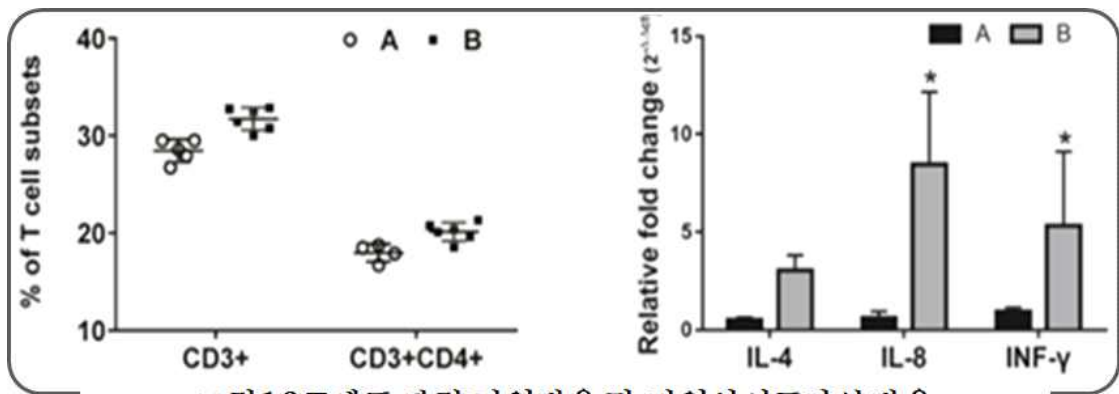


그림 16 T세포 관련 면역반응 및 면역사이토카인 반응

④naive 돼지의 PBMC에서의 사이토카인 mRNA 발현 qRT-PCR을 사용하여 평균 Ct 값과 비교하여 자극된 된 PBMC에서 선택된 사이토 카인 유전자 발현의 상대적인 변화를 측정 하였다. IL-10을 제외한 IL-6, IL-8, IL-17A, IL-21 및 INF- γ 뿐만 아니라 TNF- α 의 상향 조절이 JOL1485로 시험관 내 자극으로 나타났다 (그림 17). 흥미롭게도 TLR-5 경로를 통해 fliC에 의해 유도 된 IL-8의 mRNA 발현 수준은 주로 자극된 형 PBMC에서 증가되어 음성 대조군에 비해 29.35 배 증가했다.

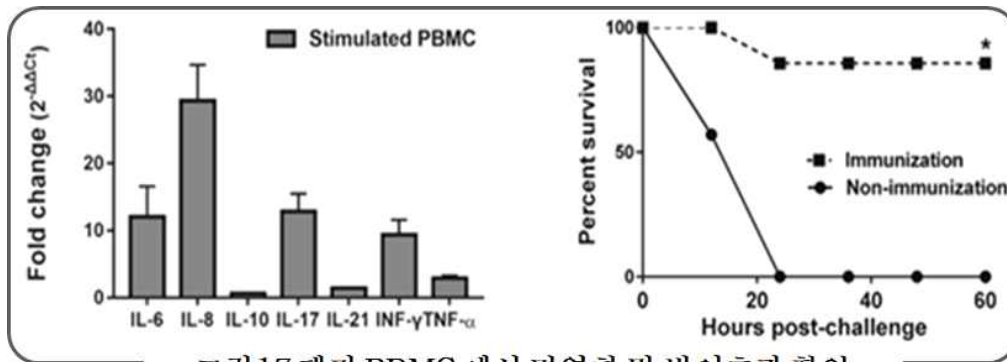


그림17 돼지 PBMC 에서 면역화 및 방어효과 확인
(A) 면역사이토카인 반응 (B) 도전감염 후 생존능 확인

⑤도전감염 독성 시험에 의한 감염에 대한 방어 효과 평가 모든 면역화 및 대조군 마우스에게 복강 내 경로를 통해 2 LD₅₀의 JOL654를 주사 하였다. 도전 후 1 일째, 모든 대조군 마우스 (8/8, 100 %)가 사망하여 JOL1485 (7/8)로 면역화 된 동물의 87.5 %가 치명적인 도전으로부터 보호 받고 3일째 도전 단계가 끝날 때까지 생존했다.

결론: 편모 필라멘트 (flagellar filament flagellin)는 박테리아 운동성에서 중요한 역할을 하며 TLR-5에 의한 인식을 통해 타고난 면역 반응을 유도한다. ED에서의 병원성의 메커니즘에서, F18⁺ STEC로부터의 플라젤린은 장에 대한 부착에 관여하며, 그것의 독성 특성에 기여한다. 박테리아 플라젤린 단량체는 Toll-like receptor (TLR)-5 발현 수지상 세포 (DCs)를 활성화시키고 적응 면역 반응을 일으키는 MyD88 의존 신호 전달 경로를 통해 NF-κB를 상향 조절한다. 전례 사건에 이어, flagellin에 의해 성숙 된 DC는 T-helper cell 의 활성화를 유도하여 면역 반응의 발달을 촉진한다. 현재의 연구에서 면역 반응의 지표 인 fliC 특이적인 IgG1 이소 타입 역가 (titer)는 JOL1485로 면역화 된 마우스에서 현저하게 증가되었다. IgG2a에 대한 IgG1의 비율 또한 4 주 PI에서 면역화 된 마우스에서 6 배 이상 증가한 것으로 나타났다. 동시에, Th2 프라이밍을 시작하는 IL-4 mRNA는 in-vitro에서 fliC로 자극 한 췌장 세포에서 상향 조절되었다. 이러한 결과는 JOL1485에서 분비 된 fliC가 자극 된 TLR-5 경로를 통한 Th2 관련 면역 반응의 유도에 부분적으로 관여 할 수 있음을 시사한다.

제 2 장 연구수행 내용 및 결과

◇ 동물 모델 및 동물윤리

동물 실험 및 동물 보호법 2007:제13조 (동물 실험)에 따라 전북대학교 (CBNU-2018-00264)의 승인을 받아 동물 실험을 수행하였다. 본 연구에 쓰인 닭 모델은 암컷의 brown nick layer으로 1일령 닭을 한국의 합동 부화장에서 구입하여 음식과 물을 자유롭게 공급하는 냉난방 시설의 동물 시설에서 유지 관리하였다. 닭들은 생후 한 달이 되었을 때 면역화 및 도전감염 연구에 사용되었다. 동물의 행동 및 생리적 징후 관찰을 위해 하루에 두 번 모니터링 하였다. 혈액 채취는 날개 정맥을 사용하는 일반적인 절차에 따라 수행되었다. 실험이 후에는 닭들은 클로로포름을 이용하여 안락사 하였다. 동물 실험시 최소한의 고통으로 닭을 인도적으로 취급 할 수 있도록 모든 노력을 기울였다.

◇ 백신 후보 균주의 안전성 평가

본 과제에서 개발된 백신 균주의 안전성은 배설물에서 검출되는 박테리아 수를 측정함으로써 평가하였다. 병원체에 노출되지 않은 생후 한달령의 닭을 그룹으로 나눈 후 각 그룹을 구강 또는 근육 내 경로를 통해 다양한 dose(1×10^7 - 1×10^{10} CFU)의 백신 후보주로 접종하였다. 접종된 닭의 배설물은 1일, 3일, 7일, 14일, 21일 및 28일에 채취 한 후 약 1g의 닭 배설물을 10ml의 완충 된 펩톤 용액에 재현탁하고 3분 동안 중간 속도로 균질화 시켰다. 100ul를 BGA 한천 배지에 도금했다. 추가로 1ml의 균질 물을 Rappaport Vassiliadis(RV) 배양액 에서 농축하고 42°C에서 14시간 동안 배양하고 배양 물을 BGA한천 플레이트에서 도말하여 생성된 박테리아를 확인했다. 또한, 각 플레이트에서 선택된 몇 개의 콜로니를 균주 특이 적 프라이머를 사용하여 PCR로 확인했다. 그리고 1일, 3일, 7일, 14일, 21일 및 28일에 분리한 비장 및 간 조직에서의 세균 집락 수를 평가하여 닭 장기에서 ST 및 SE백신 후보주의 전신 존재를 확인했다.

◇ 백신 후보 균주의 면역화 및 야생형 균주를 이용한 도전감염

1 개월령 닭을 여러 그룹으로 나누어 각 백신 후보 균주와 음성 및 양성 대조군을 경구 및 근육 내(IM) 접종하였다. 면역화는 경구투여시 1×10^8 CFU 및 IM은 1×10^7 CFU의 dose로 수행하였다. 부스터 면역화는 1차 면역화 후 3주에 수행되었고 야생형 ST 및 SE에 대한 도전감염은 부스터 접종 후 2주에 수행되었다. 혈청 채취는 매주 간격으로 수행하였고 PBMC의 수집은 부스터 접종 2주 후 수행되었으며 비장 세포 증식 분석, 유세포 분석(FACS) 및 사이토카인 RT-PCR에 사용되었다. 실험 종료 시점에 나머지 닭들은 내부 장기인 비장과 간에서 잔존하는 박테리아를 계측하고 H&E 염색으로 조직병리학적 분석을 수행하였다. 박테리아 수는 표준 편차(SD)와 함께 logCFU/ml로 표시되었다.

◇ 면역화에 따른 전신 면역반응 평가

혈청에서 anti-Salmonella IgY 항체 반응을 조사하기 위해 채취한 혈청을 이용하여 400ng/well 농도의 살모넬라 외막 단백질(Omp)로 코팅한 후 간접 ELISA를 수행하여 전신 면역 반응 유도 여부를 확인하였다.

◇ 면역화에 따른 세포성 면역반응 평가

항원 특이적 세포 면역 반응은 PBMC에서 세포 증식 반응을 정량화하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 방법을 사용하여 평가하였다. 부스터 면역화 2주 후, Histopaque-1077 (Sigma, Germany)에 의한 밀도 구배 원심 분리를 사용하여 혈액에서 PBMC를 분리했다. 세포를 5% 소 태아 혈청 (FBS)을 포함하는 RPMI에서 1×10^5 cells/well로 96well 플레이트에 분주 하였다.

정제된 살모넬라 외막 단백질 (omp, 40 μ g/mL)로 자극한 후, 세포를 37 $^{\circ}$ C의 5%CO₂ 인큐베이터에서 72시간 동안 배양하고, MTT에 의해 생성된 formazan은 570nm의 흡광도에서 측정 하였다. 추가로 면역화에 의한 T 세포 반응을 분석하기 위해, 1×10^6 cells/well 세포를 Omp(40ng/well)로 72시간 동안 자극하고 anti-chicken CD3a-FITC, anti-chicken CD8-PE 및 anti-chicken CD4-AF-700 항체로 30분 동안 표지했다. 분석은 MacsQuant 소프트웨어 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)에서 각 세포 집단을 게이팅하여 수행했다.

◇ 면역화에 따른 사이토카인 반응 평가

백신 후보 균주의 면역화에 따른 사이토카인 반응은 분리된 PBMC 세포를 24 웰 플레이트에 웰당 1×10^6 수로 분주하여 24시간 동안 Omgs (40 ng / well)로 자극한 후 총 RNA를 추출함으로써 Real-time PCR로 평가하였다. 총 RNA는 RNeasy Plus mini 키트를 사용하여 세포 현탁액에서 추출하고 High Capacity cDNA Reverse Transcription 키트로 RNA를 cDNA로 합성하였다. 사이토카인인 IL-4, IL-6 및 IFN- γ mRNA의 수준은 특이 프라이머를 사용하여 Real-time PCR로 정량 분석 하였다.

◇ DIVA ELISA

ST 및 SE의 야생형 및 백신 후보 균주로 접종된 닭에서의 LPS 특이 항체 생성 여부를 정제된 LPS (Sigma)를 사용하여 간접 ELISA로 평가하였다. 정제된 LPS는 코팅 완충액인 0.5M Na₂CO₃, NaHCO₃를 사용하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 10 μ g/ml 농도로 ELISA 플레이트에 코팅되었다. Blocking은 5% Skim milk가 포함된 PBS로 수행하였으며, 준비된 플레이트에 닭 혈청을 1:100 희석으로 반응시키고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양하였다. 1x PBS로 3회 세척 한 후 2차 항체 anti-chicken HRP-IgY 또는 IgG를 1:3000으로 희석하여 반응 하였다. 2시간 동안 배양한 후, 플레이트를 1xPBS로 3회 세척하고 O-phenylene diamine dihydrochloride(OPD)기질과 반응시켜 발색을 492nm에서 측정하였다.

◇ 통계 분석

모든 데이터는 GraphPad Prism 6.00 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. Tukey의 다중 비교 테스트를 사용한 일원 분산 분석 (ANOVA)을 수행하여 P-value<0.05로 테스트 그룹 간의 통계적 차이를 평가하였다.

제 1 절 1차년도

1. DIVA 감별 진단 가능한 살모넬라 생균 백신 시스템 개발

● 배경

살모넬라증의 주요 혈청형 중 살모넬라 엔테라이티디스(*S. Enteritidis*, SE)와 살모넬라 타이피뮤리움(*S. Typhimurium*, ST)은 가금 농장에서 주로 발생하는 식품 오염 원인으로 알려져 있다. 이 질병은 날달걀이나 덜 익은 달걀과 같은 농산물을 섭취하면 인간에게 쉽게 전염될 수 있으므로 농장 수준에서의 살모넬라균 통제는 질병 통제의 중요한 척도로 간주될 수 있다. 살모넬라증 예방을 위해 사람과 동물에서 사백신, 약독화 생백신 및 서브유닛 백신에 대한 다양한 효과가 보고되어 있다. 살모넬라의 약독화는 유전공학 기술을 통해 주요 병원성 유전자의 제거로 이루어진다. 다양한 수준에서의 방어가 이루어지고 있지만, 생백신 시스템은 잔존하는 살모넬라의 병원성과 전신적으로 이루어지는 병원체의 완전한 제거에 대한 부분 그리고 기존 면역체계에 대한 민감성 문제가 남아있다. 따라서 병독성과 관련된 *lon* 유전자와 세포막에서 스트레스에 관여하는 *cpxR*의 결손을 통해 만들어진 ST 및 SE 변이주는 숙주세포에 대한 유착과 침입을 증가시키면서 세포 내 확산과 균주의 생존력이 감소하기에 전신 감염의 위험 부담을 최소화 할 수 있을 것으로 예상된다. 또한, *rfaL*의 결실로 인한 O-antigen의 결핍 효과가 향상된 살모넬라 균주의 약독화가 유도될 수 있으며 이는 숙주에 대하여 항균 반응을 최소화 하며 높은 양의 백신투여가 가능 하도록 한다.

본 연구에서는 SE 변이주인 JOL2381을 설계하고 이를 BALB/c 마우스 모델에 접종하여 점막과 체내 면역 경로를 통해 백신주에 대한 안전성, 환경오염 및 장기 내에서의 지속성, 면역성, 항원 제시 정도, DIVA 감별 능력 그리고 야생형의 도전감염으로부터 보호를 확인 하였다. 상당히 높은 안전성과 항원제시 정도 그리고 살모넬라 변이주에 의한 방어 효과를 확인함에 따라 살모넬라증에 대한 새로운 백신 개발 플랫폼으로 제시할 수 있을 것이다.

● 세부방법

○ 박테리아 균주, 플라스미드 ,프라이머 및 유전자 변이 정보

본 연구에 사용된 모든 박테리아 균주, 플라스미드 및 프라이머의 정보는 (표 1)에 나열되어 있다. 모든 박테리아 균주를 Lauria Bertani (LB; BD, Sparks, USA) 배지 또는 Brilliant Green Agar (BGA; BD, Sparks, USA)로 37°C에서 배양하였다. SE유전자의 *lon* 및 *cpxR* 유전자의 결실은 기존 연구에 의해 제작되었으며 생성된 균주인 JOL919 ($\Delta lon \Delta cpxR$)를 이용하여 유전자 내 *rfaL*결실을 Lambda Red recombination 방법으로 제작하였다.

살모넬라 *rfaL* 유전자의 상류(*rfaL* FP) 및 하류(*rfaL* RP) 영역에 해당하는 프라이머 서열을 사용하여 FRT의 chloramphenicol 유전자가 증폭되었다. 선형 FRT-CatR-FRT는 pKD3 플라스미드에서 증폭되었고 PCR 산물은 잔류 플라스미드를 제거하기 위해 DpnI로 처리하였다. 정제된 선형 PCR 산물은 1mm규격의 BTX 큐벳 (Harvard Apparatus, MA, USA)을 사용하여 전기천공법 (5 pg-0.5 μ g DNA, 2500 v, 200 Ω -600 Ω , 25 μ f)으로 SE로 형질 전환되었다. 형질 전환된 세포를 CatR LB Agar에서 스크리닝 하였으며 내부 프라이머 (*rfaL* 내부 FP 및 *rfaL* 내부 RP)를 사용하여 *rfaL*유전자의 결실을 확인하였다. 37°C에서 배양하여 pKD46 플라

스미드를 완전히 제거한 후, 생성된 콜로니를 pCP20 플라스미드로 형질 전환하여 숙주로부터 CatR 유전자를 완전히 제거했다. LPS의 결실은 SE Vs (JOL2381) 및 SE (JOL919)로 정제된 LPS를 사용하여 SDS PAGE로 silver nitrate로 염색하여 확인 하였다.

표 1. Bacterial strains, plasmids, and primers used in this study

Strain/Plasmid /Primers	Description	Reference
S.Typhimurium strains		
JOL401	<i>Salmonella</i> Typhimurium wild-type, SPI-1 <i>invAE+</i> <i>hilA+</i> <i>avr+</i> ; SPI-2, aminos acid permease; SPI-3, <i>mgIC+</i> , SPI4, ABC transporter; SPI-5, <i>pipB+</i>	This study
JOL911	<i>Salmonella</i> Typhimurium JOL401 $\Delta lon \Delta cpxR$ CK81	Lab stock
OL2375	<i>Salmonella</i> Typhimurium JOL911 recombined with FRT-Cat-FRT	This study
JOL2376	<i>Salmonella</i> Typhimurium JOL2375 transformed with pCRP20	This study
JOL2377	<i>Salmonella</i> Typhimurium $\Delta lon \Delta cpxR \Delta rfaL$	This study
S.Enteritidis strains		
JOL860	<i>Salmonella</i> Enteritidis challenge strain - wild-type	Lab stock
JOL919	<i>Salmonella</i> Enteritidis mutant- Control for DIVA ($\Delta lon \Delta cpxR$)	Lab stock
JOL2381	<i>Salmonella</i> Enteritidis mutant ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta rfaL$)	This study
Plasmids		
pKD46	Ori101-repA101ts; encodes Lambda red genes (<i>exo</i> , <i>bet</i> , <i>gam</i>); native terminator (tL3); arabinose-inducible for expression (ParaB); <i>bla</i>	
pKD3	oriR6K γ , <i>bla</i> (ampR), <i>rgnB</i> (Ter), catR, FRT	
pCP20	Helper plasmid, contains a temperature-inducible <i>flp</i> gene for removing the FRT flanked chloramphenicol gene	
Primers		
<i>rfaL</i> FP	CCTGATGATGGAAAACGCGCTGATACCGTAATAAGTATCAGCGCGCTTT T GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	This study
<i>rfaL</i> RP	AGATTCATTAAAGAGACTCTGTCTCATCCCAAACCTATTGTGGAGAAA AG ATGGGAATTAGCCATGGTCC	This study
<i>rfaL</i> inner FP	CCATAGCCGTAGCCCTTGAT	This study
<i>rfaL</i> inner RP	GTTTAGGACTTCGCTGCCTTG	This study
<i>rfaL</i> flank FP	GCAGCGTTTCGAGGAACAAA	This study
<i>rfaL</i> flank RP	TCGTATCGGTTGATACCGGC	This study

○ 동물 모델 및 동물 윤리

동물 실험 절차는 한국 동물 관리 협의회 및 동물 보호법 2007 : 제 13 조 (동물 실험)의 지침에 따라 전북 대학교(CBNU-2018-00264)의 승인을 받다. 무균상태의 5주령 BALB/c 마우스 또는 C57BL/6 마우스는 코아텍 (경기도 평택)에서 구입하여 냉난방 시설이 갖추어 진 동물 시설에서 사육하였다. 동물은 행동 및 생리학적 징후를 매일 2 회 모니터링 하였다. 혈액 채취는 안와 정맥을 사용하여 수행하였으며 실험의 완료 또는 종료 시점에서 마우스는 클로로포름을 이용하여 안락사 하였다. 최소한의 고통으로 마우스를 인도적으로 취급 할 수 있도록 모든 노력을 기울였다.

○ SE백신 균주의 안전성 평가

SE 백신 균주의 안전성 평가는 배설물에서 배출되는 박테리아를 측정함으로써 평가하였다. 5 주령의 BALB/c 마우스 (N=48, n=12)를 동일하게 4개의 그룹으로 나누었다. 그룹 A는 1×10^8 CFU의 SE 백신 균주를 경구접종 (Vs), B그룹은 1×10^8 CFU의 SE야생형 균주를 경구접

중, C그룹은 1×10^7 CFU SE 백신 균주를 근육 내 접종 D는 1×10^7 CFU/에서 SE 백신 야생형 균주를 근육 내 접종하였다. SE의 배설물 배출은 2일에 한 번씩 측정하였다. 마우스 배설물을 무균 상태로 수집하고 약 4개의 배설물을 멸균 펩톤완충액으로 균질화하였다. 균질액 100 μ l를 BGA 플레이트에 도말하고 4ml의 Rappaport Vassiliadis Broth (RV; Sigma) 배양액에 접종하여 42도에서 overnight 하여 농축하고 100 μ l의 농축 배양 물을 BGA에 도말하였다. 또한 마우스의 장기에서 SE를 측정하기 위해 접종 1일, 3일, 7일, 14일, 21일 및 28일에 매일 2 마리의 마우스로부터 비장 및 간 조직을 분리한 후 박테리아 수를 측정하였으며 박테리아 균주는 혈청형 특이 프라이머로 확인하였다.

○면역화 및 도전감염

5주령의 암컷 BALB/c 마우스 (N=56, n=8)를 표 1에 표시된 대로 7개의 그룹으로 무작위로 나누었다. 그룹 A : SE 백신 균주 경구 접종, 그룹 B : SE 백신 균주 및 부스터 접종, 그룹 C : SE 백신 균주 근육 내 접종, 그룹 D : SE 백신 균주 IM 및 부스터 접종, 그룹 F : DIVA ELISA에 대한 양성 대조군으로 SE JOL919 균주 IM 및 부스터 접종에서, 그룹 G : naive 대조군으로 접종하였다. 경구 접종은 구강 위관을 통해 마우스당 1×10^8 CFU로 이루어졌으며 IM 접종은 마우스당 100 μ l의 PBS에 현탁된 균주를 1×10^7 CFU로 이루어졌다. 부스터는 1차 접종 후 2주에 수행되었고, 도전감염은 1차 접종 후 2주 (그룹 A 및 C) 또는 야생형 SE 균주인 JOL860을 사용하여 추가 접종 2 주 후에 수행하였다(표 2).

혈청 채취 및 질 세척은 매주 간격으로 수행하였으며 비장 세포 증식 분석 및 유세포 분석 (FACS) 그리고 사이토카인 측정을 위한 비장세포 분리는 부스터 적용 2주후에 수행하였다. 실험 종료 시점에 모든 마우스를 희생하였고 전체 비장 및 간 조직으로부터 조직 균질액을 BGA 플레이트에 도말하여 잔여 박테리아 수를 측정하였다. 박테리아 수는 표준 편차(SD)와 log CFU/ml로 표시하였다. 비장 및 간 조직은 Eosin 과 Hematoxylin(H&E)으로 염색하여 조직 병리학적 검사를 수행하였다.

표2 . Immunization and challenge scheme

Group (N=56, n=8)	Strain	Route	Dosage	Challenge (Oral route)
A (Single inoculation)	SE (Δ lon Δ cpxR Δ rfaL)	Oral	1×10^8 CFU/100 μ l in PBS	JOL860 (WT), 1×10^6 CFU/200 μ l
B (with booster)	SE (Δ lon Δ cpxR Δ rfaL)	Oral	1×10^8 CFU/100 μ l in PBS	JOL860 (WT), 1×10^6 CFU/200 μ l
C (Single inoculation)	SE (Δ lon Δ cpxR Δ rfaL)	IM	1×10^7 CFU/100 μ l in PBS	JOL860 (WT), 1×10^6 CFU/200 μ l
D (With booster)	SE (Δ lon Δ cpxR Δ rfaL)	IM	1×10^7 CFU/100 μ l in PBS	1×10^6 CFU/200 μ l
E (Control)	PBS	Oral	100 μ l of sterile PBS	JOL860 (WT), 1×10^6 CFU/200 μ l
F (Positive control for DIVA)	SE (Δ lon Δ cpxR)	IM	1×10^7 CFU/100 μ l in PBS	1×10^6 CFU/200 μ l
Naïve				

○체액성 면역반응 측정

SE 면역화에 대한 살모넬라에 대항할 수 있는 항체 생산 정도를 측정하지 위해, 혈청 및 질 세척으로 400ng/웰의 SE 정제 된 외막 단백질을 사용하여 전신IgG 및 IgA 항체 생산을 간접 ELISA로 측정했다.

○세포성 면역반응 측정

비장세포에 항원을 이용하여 자극 후 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)를 사용하여 분석 하였다. 최종 면역화 2주 후, 비장 세포를 면역화 된 그룹으로부터 무균적으로 분리하고 세포 현탁액을 5%FBS을 함유하는 RPMI로 96웰 플레이트에 웰당 1×10^5 세포수로 분주하였다. 정제 된 살모넬라유래 외막 단백질(omp, 40 μ g/mL)로 자극 한 후 세포를 37°C의 5 % CO₂인큐베이터에서 72시간 동안 반응한 후 MTT 포르마잔 생성물을 570 nm의 흡광도에서 마이크로 플레이트 리더를 사용하여 측정했다. 또한, 면역화에 의해 유도 된 T세포 분화를 분석하기 위해 96웰 플레이트에 웰당 1×10^5 개의 비장 세포를 분주하고 정제된 외막 단백질(omp) 항원 (40 μ g/mL) 또는 RPMI 배지만으로 72시간 동안 자극하고 백만개의 세포를 anti-mouse CD3a-PE와 anti-mouse CD4-perCP-vio700 항체(Miltenyi Biotec, 독일 Bergisch Gladbach)와 함께 30 분 동안 배양했다. 분석은 FACS Calibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) 기기를 사용하여 수행되었으며 데이터 분석은 FlowJo 소프트웨어 (Tree Star, Ashland, OR)를 사용하였다.

○사이토카인 발현

면역화 후 14일째에 마우스로부터 비장 세포를 분리하고, 24웰 플레이트에 웰당 1×10^6 개의 비장 세포를 37°C의 5%CO₂인큐베이터에서 배양하고 omp 정제 단백질(40 μ g)로 자극한다. 이후 RNeasy Plus 미니 키트(Qiagen, GmbH, Hilden, Germany)를 사용하여 세포 현탁액에서 총 RNA를 추출한 다음 High Capacity cDNA Reverse Transcription 키트를 사용하여 cDNA로 합성하였다. (Applied Biosystems, Foster, USA). 사이토카인 인터루킨(IL) -4, IL-10, IL-12 및 인터페론 (IFN)- γ mRNA 발현의 발현 유도는 real-time RT-PCR로 정량화하였다.

○T세포 증식 평가

SE 면역화시 T 세포 매개 면역 반응은 비장의 T 세포 집단을 분석하여 평가하였다. CD3+CD4+ 및 CD3+CD8+ T세포 집단의 분화는 부스터 적용 후 2주에 분리된 비장 세포를 재자극함으로써 확인하였다. 2×10^5 개의 세포를 omp항원 또는 RPMI 배지만으로 24시간 동안 자극 한 다음 세포를 수확하고 PE 표지 된 CD3e (17A2), PerCPVio700 표지 된 anti-CD4 및 FITC 표지 된 anti CD8a 단일 클론 항체 (Miltenyi Biotec, Germany)로 염색하였다. CD3+T 세포 집단은 백신 접종 및 대조군 마우스 그룹으로부터 수확 된 재자극 된 비장 세포의 CD3+CD4+ 및 CD3+CD8+ 하위 집단을 분석하기 위해 집단화 하였다.

○ DIVA ELISA

SE 백신 균주 (JOL2381) 및 SE DIVA 대조군 (JOL919)으로 마우스 백신 접종하여 LPS 특이 항체 생성을 경구 및 IM 경로를 통해 부스터 면역화 2 주 후에 채취 된 혈청으로 평가 하였다. SE의 정제된 LPS를 구입하고(Sigma) 코팅용액 (0.5M Na₂CO₃, NaHCO₃)에 5 μ g/ml농도로 하여 ELISA 플레이트에 코팅했다. 혈청은 1:100으로 희석되었고 37°C에서 2 시간 동안 배양하였다. 1x PBS로 3회 세척 한 후 anti-mouse HRP-IgG 항체를 1:3000으로 희석하여 사용 하였다. 이후 1x PBS로 3회 세척 한 후 O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) 기질을 첨가하여 발색을 492nm에서 측정하였다.

○ 장간막 림프절 분석

약독 화 된 살모넬라 균주의 효과적인 항원 제시를 위해 림프절까지의 도달을 확인하기 위해 C57Bl/c 마우스(n=6)로 평가하였다. 마우스에 야생형 SE JOL860, SE JOL919 또는 SE 백신 균주인 JOL2381 균주를 접종했다. 단일 그룹은 감염되지 않은 컨트롤로 사용하였다. 마우스당 1×10^8 CFU로 경구 투여하고 72시간 후 모든 마우스로부터 장간막 및 사타구니의 림프절을 분리 했다. 채취된 림프절을 anti-SE rabbit polyclonal 항체 및 HRP-IgG 항체를 사용하여 IHC 염색을 위해 처리하고 림프절 세포 집단에서 CD11c 마커에 대한 FACS 기반 분석을 수행했다.

○ Statistical analysis

모든 데이터는 GraphPad Prism 6.00 프로그램 (미국 캘리포니아 주 샌디에고)을 사용하여 분석하였으며 테스트 그룹 간의 통계적 차이를 확인하기 위해 Tukey의 다중 비교 테스트를 통한 일원 분산 분석 (ANOVA)을 수행했다. P-value<0.05 수치를 유의한 수치로 간주하였다.

● 결과

○ 약독화 살모넬라를 위한 O-antigen 결실 백신주 제작

ST, SE의 lon, cpxR 유전자결실 변이주인 JOL911(Δ lon Δ cpxR,ST)과 JOL919(Δ lon Δ cpxR, SE)를 사용하여 Lambda Red 재조합 방법을 통해 프레임 내에 존재하는 rfaL 유전자를 결실시킴으로써 각 JOL2377(*Salmonella* Typhimurium Δ lon Δ cpxR Δ rfaL), JOL2381(*Salmonella* Enteritidis mutant (Δ lon Δ cpxR Δ rfaL) 변이주를 제작하였다. 또한 rfaL 유전자의 결실은 프라이머(rfaL plank FP & rfaL plank RP)에 의해 확인되었으며(그림 1A). LPS의 결실을 확인하기 위해 SE Vs(JOL2381)와 SE(JOL919)의 정제된 LPS를 이용하여 SDS PAGE로 silver staining을 통해 O항원의 결실을 확인하였다 (그림 1B).

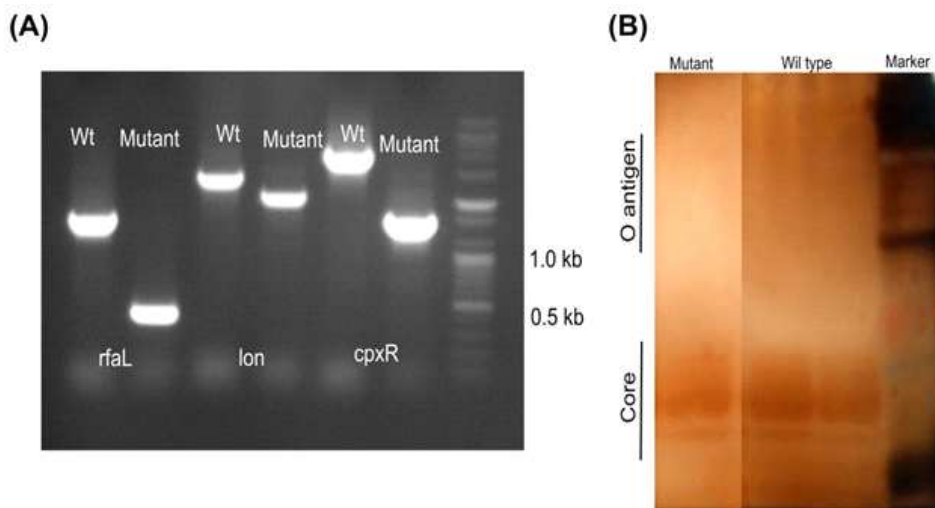


그림1. Confirmation of gene deletion in *Salmonella* Enteritidis vaccine strain and LPS SDS-PAGE. (A) Each mutated gene was verified by PCR reaction using flanking primers. (B) LPS was isolated from the wild-type and vaccine strain of *Salmonella* Enteritidis. Silver staining was conducted. The presence of truncated O-antigen region is demonstrated in the *rfaL* gene deleted SE vaccine strain.

○ 백신 후보 균주에 대한 안정성 평가

약독화 살모넬라 변이주에 대한 안전성 평가는 배설물 내 잔여 살모넬라를 측정함으로써 이루어졌다. 5주령 BALB/c 마우스(N=48, n=12)는 동일하게 4개 그룹으로 나누고 그룹 A는 SE 백신주(Vs)를 1×10^8 CFU로 경구 투여, 그룹B는 야생형 균주(WT)를 1×10^8 CFU로 경구투여, C는 백신 균주를 1×10^7 CFU로 근육접종 그리고 그룹 D는 야생형 균주를 1×10^7 CFU로 근육접종 하였다.(표 2.) 마우스의 배설물을 2일마다 무균적으로 채취하였고 대략 4개의 알갱이를 펩톤이 포함된 멸균 용액에 균질화 하여 100ul를 BGA배지에 직접 도말 하였으며, 100ul를 Rappaport Vassiliadis Broth (RV; Sigma) 배양액 4ml에 접종하여 42도에 overnight 배양 후 BGA 배지에 도말하였다. 각 1일, 3일, 7일, 14일, 21일, 28일에 2마리의 마우스에서 비장과 간 조직을 분리하여 박테리아 수를 측정하였고 박테리아 균주는 각 혈청형에 대한 프라이머를 통해 PCR로 확인하였다. 3주의 검사 기간 동안 구강 투여 및 근육주사를 수행한 그룹에서 야생형 균주가 8 일차 까지 관찰되었으나 백신주에서는 살모넬라가 검출되지 않았다. 또한 야생형 균주가 접종된 마우스의 경우 8일 이내에 사망함을 보였다. 비장 및 간 조직에서는 3주차 까지 야생형 균주가 구강 투여 및 근육주사 된 마우스에서는 모두 살모넬라가 관찰되었다. 그러나 백신주의 경우 5일차 이후에는 관찰되지 않음을 확인할 수 있었다.

○ 면역화에 따른 체액성 및 세포성 면역반응

SE 백신주에 대한 면역화를 알아보기 위하여 체내 IgG 및 IgA 항체 생성 여부를 SE로부터 얻은 외막 단백질 400ng/well을 이용하여 혈청 및 질 세척액에서 각 IgG와 IgA 역가를 간접 ELISA로 측정하였다. 면역화 후 부스팅 접종한 그룹에서는 14일째 까지 IgG와 IgA모두 급진적인 증가를 보였고 1차 접종만 수행한 그룹은 4주가 되서야 항체 농도가 최고조에 달함을 보였다. 5주 후 관찰한 결과 부스팅을 수행한 그룹에서만 유의미한 수치를 보였다.(그림 2.)

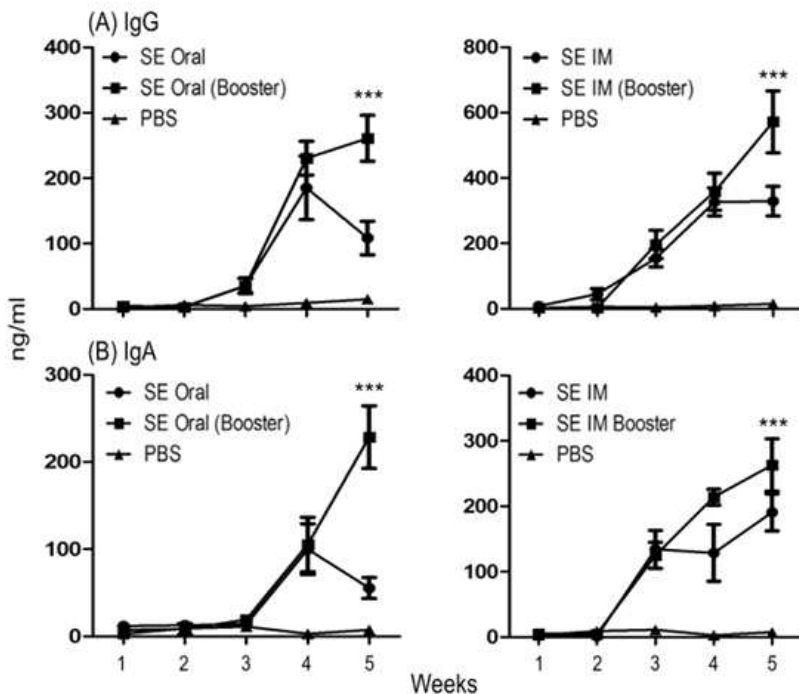


그림 2. Antibody response in immunized mice. (A) IgG response in immunized mice (n=12) upon single and double inoculation. (B) IgA response in vaginal washes of immunized mice upon single and double inoculation. The booster application was given at 3rd-week post-primary immunization. A significant difference at the end of five weeks is demonstrated by ***. P<0.05.

○ 실험동물에서의 면역화에 따른 비장세포의 분열성 증식 관찰

시험관내 항원 자극에 따른 세포의 분열성 증식을 MTT 분석법으로 측정 하였다. 면역화 2 주 후 비장세포를 분리하였고 96well plate에 1×10^5 세포수로 분주하여 정제된 살모넬라 외막 단백질(Omp, $40 \mu\text{g}/\text{mL}$)로 세포를 자극한 후 37°C 에서 72시간 배양하고, 570nm의 파장으로 MTT 포마잔의 생성을 측정하였다. 그 결과 경구투여 그룹 보다($P < 0.05$)보다 근육주사를 통해 접종된 군에서 상당히 높은 증식 반응이 관찰될 수 있었다. 경구접종 마우스군의 경우 PBS 대조군에 비해 구강투여를 통해 부스팅 된 마우스 군에서만 현저하게 높은 증식 반응을 관찰할 수 있었고, PBS와 구강 단일접종 마우스군 간에 유의미한 차이가 없었다.(그림 3.)

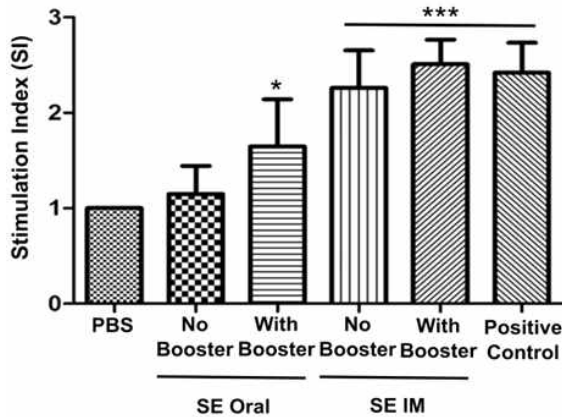


그림 3. Splenocyte proliferation response. Immunized mice were sacrificed at a week after booster application (at 4 weeks post-primary immunization). Splenocytes were harvested and seeded in 96 well plates at 1×10^5 cells/well. After three days of incubation upon stimulation with *Salmonella* Enteritidis outer membrane proteins (500 ng/well), cell proliferative responses were assayed using MTT assay. The significant difference is demonstrated by ***, $P < 0.05$.

○ 실험동물에서의 면역화에 따른 유세포분석기를 통한 세포성 면역반응 측정

약독화 변이주로 인한 면역화에 의해 유도된 T림프구의 분화양상을 분석하기 위해 1×10^5 개의 비장세포를 96well plate에 분주하여 정제된 외막 단백질(omp) 항원($40 \mu\text{g}/\text{mL}$)으로 자극 후 anti-mouse CD3a-PE와 anti-mouse CD4-perCP-vio700 항체로 살모넬라 특이적으로 반응하여 분화가 이루어진 CD3+T 세포를 집단으로 구획을 나누고 특이적으로 분화된 CD4+ T세포와 CD8+T 세포를 분석하였다. 구강투여 그룹보다 근육주사 그룹에서 CD4+, CD8+ 림프구의 분화도가 유의적으로 증가함을 관찰할 수 있다. (그림 4.)

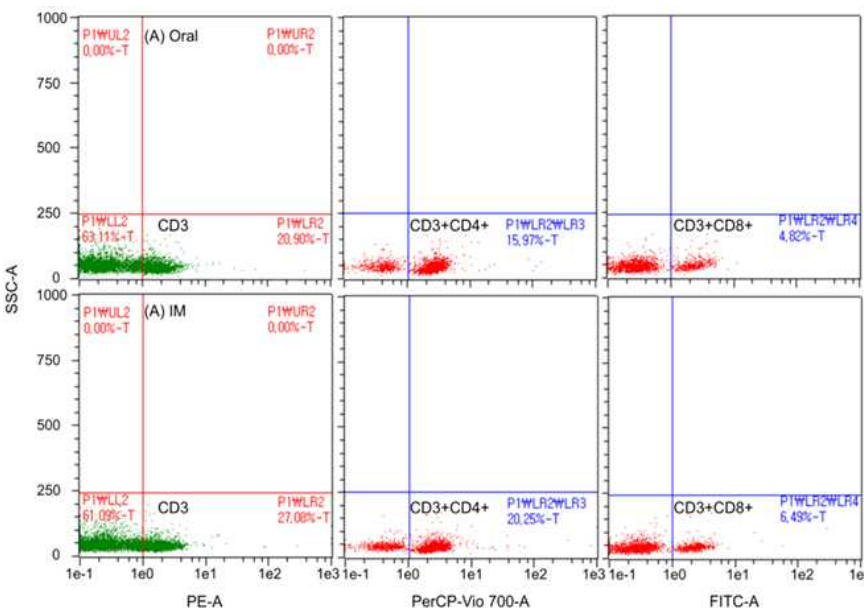


그림 4. Flow cytometry analysis. Immunized mice were sacrificed at a week after booster application (at 4 weeks post-primary immunization). Splenocytes were harvested and seeded in 96 well plates at 1×10^5 cells/well. After three days of incubation upon stimulation with *Salmonella* Enteritidis outer membrane proteins (500 ng/well), expression of CD4+ and CD8+ markers were quantified using flow cytometry analysis. Each population of CD3+, CD3+CD4+ and CD3+CD8+ populations were demonstrated. CD3+: PE, CD3+CD4+: PerCP Vio, CD3+CD8+: FITC were used.

○ 실험동물 모델에서의 면역화에 따른 사이토카인 발현측정

백신주 접종 후 14일 후 생쥐로부터 분리한 비장세포를 1×10^6 개의 세포로 분주 및 배양하여 48시간 동안 omp 단백질($40 \mu\text{g}/\text{mL}$)로 자극하였다. 세포로부터 RNeasy Plus 미니 키트를 사용하여 분리한 총 RNA는 High Capacity cDNA Reverse Transcription 키트를 사용하여 cDNA로 합성하였다. mRNA 수준에서의 IL-4, IL-10, IL-12 및 인터페론(IFN)- γ 발현 정도를 실시간 RT-PCR로 정량화했다. 그 결과 근육주사를 수행한 마우스 그룹에서 I형 사이토카인인 IFN- γ 과 IL-12의 현저한 증가를 관찰할 수 있었으며 구강 투여를 한 마우스 그룹에서는 II형 면역반응에 의한 IL-4와 IL-10의 발현이 상당히 증가한 것을 확인할 수 있다. (그림 5.)

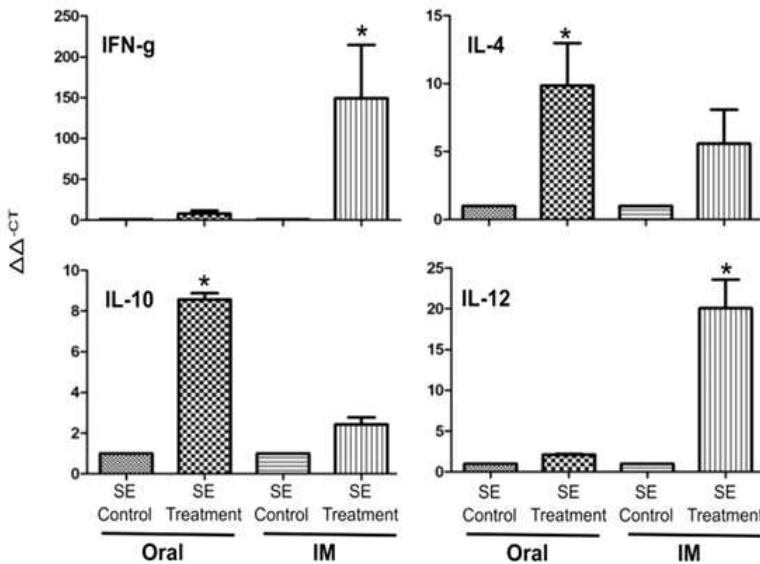


그림 5. **Splenocyte proliferation response.** Immunized mice were sacrificed at a week after booster application (at 4 weeks post-primary immunization). Splenocytes were harvested and seeded in 96 well plates at 1×10^5 cells/well. After a single-day of incubation upon stimulation with *Salmonella* Enteritidis outer membrane proteins (500 ng/well), total RNA was extracted and cDNA was synthesized. RT-PCR was conducted for IFN-g, IL-4, IL-6 and IL-2 cytokines. The $\Delta \Delta\text{-CT}$ values were calculated. Each value was normalized against PBS control. GAPDH was taken as the internal house control. * demonstrate the significant difference at $P < 0.05$ level of significance.

○ 백신주의 면역화에 따른 야생균주 방어효과 확인

SE 약독화 백신주의 면역화에 따른 방어효과 확인은 1차 접종 및 부스팅 접종 2주 후 야생형 균주의 도전감염을 통해 이루어졌다. 야생형 균주인 JOL860을 마우스에 1×10^5 CFU로 도전 감염 하고 2주 후 비장 및 간을 조직을 통해 확인하였다. 조직 내 균주가 존재함을 확인하였으

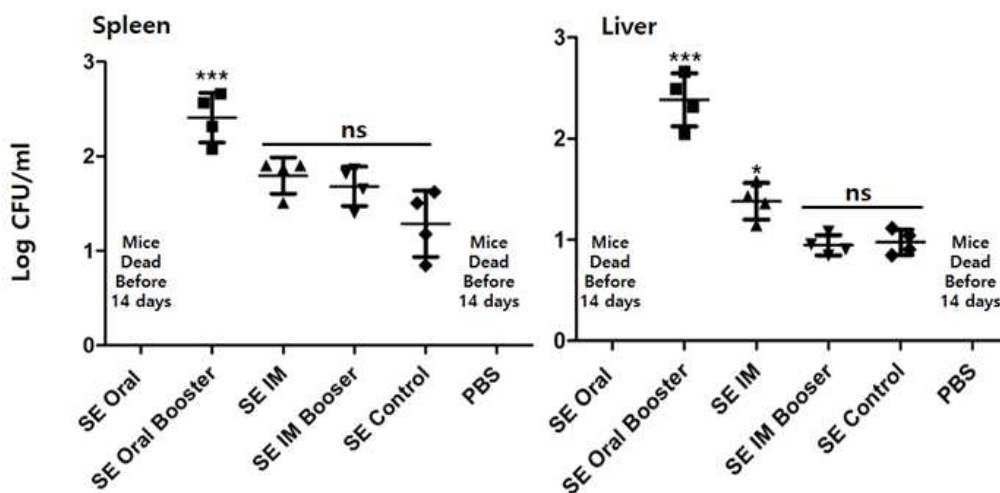


그림 6. **Protection efficacy.** Two weeks after the booster application all mice were sacrificed and splenic and liver bacterial load were enumerated. The level of significance was taken at $P < 0.05$ and demarcated by ***. Mice from Single oral inoculation and PBS control were all dead before the challenge date.

나 단일 구강 접종군 과 대조군에서는 14일 이후 마우스가 모두 죽은 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 야생형 균주에 대한 방어 효과는 근육주사 그룹에서 확인할 수 있었다. 구강투여를 통해 면역화 된 마우스군의 경우 질환이 나타나는 것을 확인할 수 있었으나 8마리 중 6마리에서 약 75%의 방어 효과를 보였다.(그림 6.)

또한 비장과 간의 H&E 염색을 통해 근육주사 된 백신주에 의해 면역화 된 마우스군에서 강력한 방어 효과를 확인할 수 있었다. (그림 7.) 이로써 백신주를 부스팅하여 근육주사를 수행한 마우스군에서 분리된 비장 조직을 통해 감염에 대한 양상 및 면역화에 따른 변화를 확인함으로써 야생형 균주에 대한 효과적인 방어효과를 증명할 수 있다.

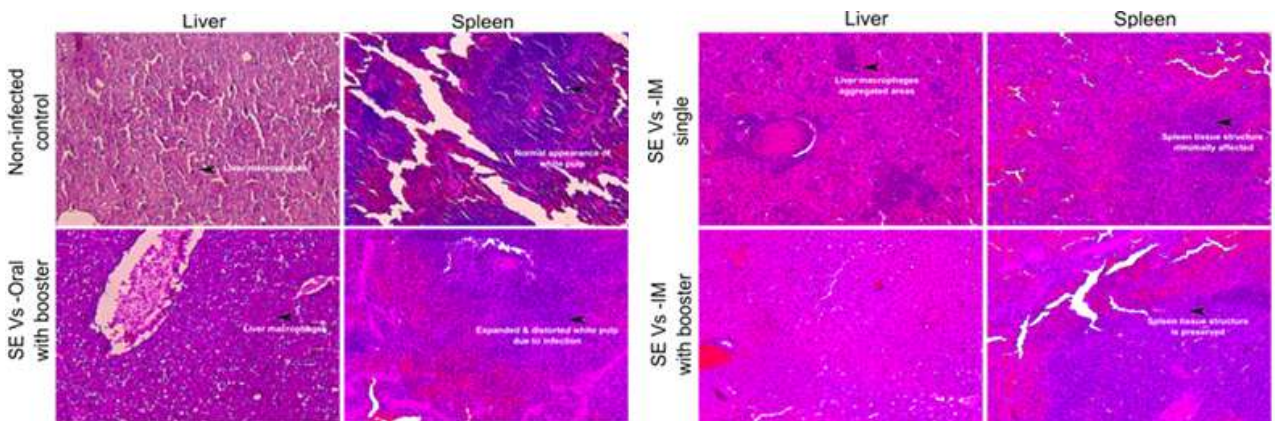


그림 7. Eosin and hematoxylin staining of spleen and liver tissues. Upon challenge of immunized animals, all were sacrificed after two weeks of post challenge. (A) spleen and (B) liver tissues were processed for H & E staining and observed under the microscope. Micrographs were taken at 200 x magnification. 7

○ 효소면역측정법을 통한 DIVA 감별 확인

경구투여 및 근육주사를 통해 SE 백신주와 (JOL2381)와 SE DIVA 대조군(JOL919)을 면역화한 2주 뒤 혈청을 이용하여 LPS 특이 항체의 변화를 확인하였다. SE로 부터 정제된 LPS를 코팅 완충액 (0.5M Na₂CO₃, NaHCO₃)에 5µg/ml 농도로 넣고 ELISA 플레이트에 분주하여 코팅하였다. 혈청은 1:100 희석 시 희석하여 37°C에서 2시간 동안 배양 후 1x PBS로 3회 세척하고 2차 항체인 마우스유래 HRP-IgG를 1:3000 희석 하여 사용하였다. 1x PBS로 3회 세척한 후 O-Phenylenediamine dihydrocolide (OPD)를 이용하여 발색을 492nm에서 측정하였다. 그 결과 구강투여 및 근육주사를 통해 약독화 백신주가 면역화된 마우스는 SE DIVA 대조군 (JOL919)이 접종된 마우스 대비 LPS특이 항체 반응이 현저히 낮게 나타났다.(그림 8.)

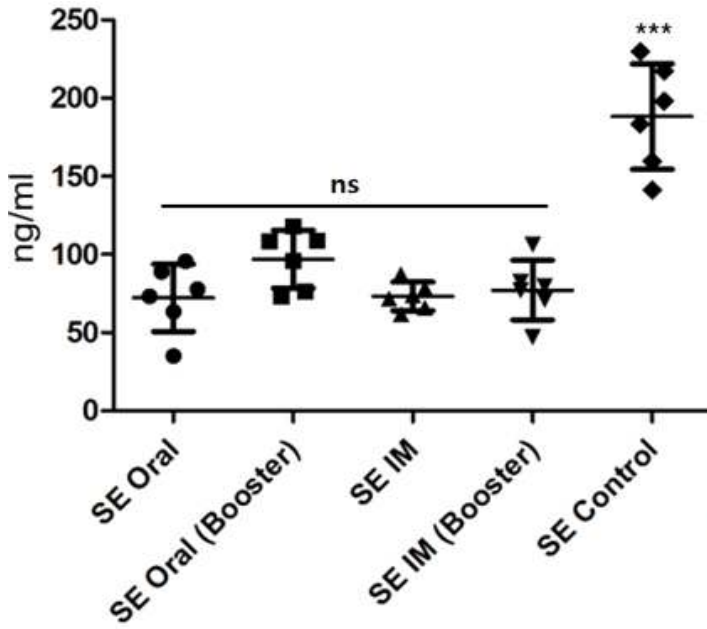


그림 8. DIVA ELISA. Development of *Salmonella* Enteritidis LPS specific antibody response was evaluated after a week of booster application. Purified LPS was coated in ELISA plates at 5 μ g/ml concentration. Mice serum was used at 1:100 dilution as the primary antibody. HRP tagged anti-mice IgG was utilized at 1:3000 dilution. Color development was measured at 492 nm wavelength. Each absorbance value was converted into antibody concentration and demonstrated as ng/ml. *** indicates the significant difference at $P < 0.05$.

○ SE 백신주의 면역화에 따른 림프절 활성 분석

약독화 살모넬라에 대한 효과적인 항원 제시 여부를 마우스의 림프절을 통해 확인하였다. C57Bl/c mice (n=6)를 SE 야생형 JOL860, SE JOL919 및 SE 백신주 JOL2381를 1×10^8 CFU로 접종하여 72시간 후 중뇌와 배아 림프절을 채취했다. 채취된 림프절은 anti-SE 다가 항체와 HRP-IgG를 사용하여 IHC를 수행하였으며 CD11c 마커를 이용하여 림프절 세포집단을 FACS를 통해 분석하였다. SE 백신주의 상당한 약독화에도 불구하고 야생주 감염만큼 장간막 림프절에서도 관찰됨을 알 수 있었다.(그림 9A.). 또한 SE 백신주에 의한 전신감염에 이어 림프절에서의 항원 제시 가능성을 확인한 결과 수지상 세포, 과립구, 단핵구 등의 백혈구의 활성이 증가됨을 확인하였다. (그림 9B.)

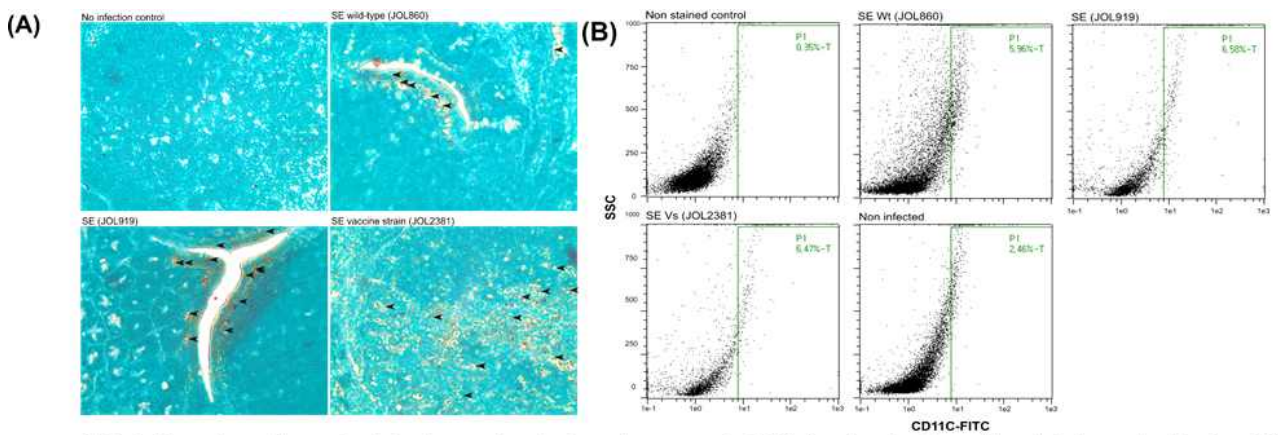


그림 9. Lymph node analysis in immunized mice. A group of C57BL/c mice (n=6) orally administered with 1×10^8 CFU/mice with SE Wt (JOL860) or SE Vs (JOL2381) or PBS. After 72 hrs of infection, all mice were sacrificed and mesenteric and inguinal lymph nodes were harvested and processed for IHC staining using anti-SE rabbit polyclonal antibodies (A). Micrographs were taken at 400x magnification. The presence of bacterium within the lymph node is demonstrated by arrow heads. Lymph tissues were subjected to FACS based analysis for CD11c marker without stimulation (B) demonstrates increased number of cells expressing the surface marker as a result of antigen presentation in the lymph tissues. Despite significant attenuation of the vaccine strain, its antigen presentation and immune stimulation ability was comparable with wild-type strain.

● 결론

본 연구에서는 SE의 약독화 변이균주인 JO2381을 개발하였으며 동물모델에서의 살모넬라증에 대한 방어 효과 및 특성을 규명하였다. 세포 내 스트레스 반응 및 증식반응에 관여하는 *lon*, *cpxR* 그리고 *rfaL* 유전자의 결실로 약독화 변이균주를 제작하였다. 또한 JOL919($\Delta lon \Delta cpxR$)로부터 *rfaL* 유전자 결실은 Lambda-Red 재조합법에 의해 이루어졌으며 PCR 및 SDS-PAGE를 통해 온전한 야생형의 LPS과 달리 제거된 O항원을 확인 하였다. 제작된 백신 균주는 경구접종 및 IM경로를 통한 접종 시 분변을 통해 환경으로 배출 되지 않았으며 접종된 마우스의 비장 및 간 조직에서 5일 동안 관찰된 반면 야생형은 경우 21일 동안 관찰됨에 따라 안전성을 확인 하였다. 또한 면역화 그룹의 도전감염시 IM 접종균의 비장 및 간 조직에서 감염된 박테리아의 수가 적게 관찰되었고 세포 내 병원체 제거에 필수적인 IgG, IgA등 체액성 면역반응과 T 세포의 분화 등 세포성 면역반응을 활성화함으로써 oral 보다는 IM 경로를 통한 면역이 방어 효과가 뛰어남을 알 수 있다. *rfaL* 유전자 결실로 인한 O항원 잔기의 제거는 숙주에서 LPS 특이 항체의 생성을 감소시켜 DIVA 감별이 가능하게 하여 현장에서 응용 가능한 수단이 될 수 있다. 또한 향상된 약독화 SE 백신 균주는 닭 등의 숙주에서 용량 최적화 및 각종 질병에 대한 방어효과 확인을 통해 이중 항원 전달 플랫폼으로 이용 가능하다.

2. 이중 항원 세포벽 발현 벡터를 이용한 면역증강 단백질 발현 살모넬라 고스트 사균화 시스템 구축

● 배경

신개념 사균 백신 개발을 위해 사용한 Holin-Endolysin 시스템은 두 개의 각기 다른 단백질 중 하나인 Holin이 먼저 발현이 되면 세균의 내막에 잔여 monomer가 축적되고 이후 합성된 Endolysin이 periplasmic space로 나가기 용이하게 돕는 역할을 한다. 이렇게 발현된 Endolysin은 soluble 세포벽을 구성하는 성분인 peptidoglycan을 분해하는 요소인 soluble transglycosylase를 coding하여 세포벽을 분해한다. 또한 편모 필라멘트는 박테리아 운동성에서 중요한 역할을 하며 TLR-5에 의한 PAMP인식을 통해 숙주의 면역반응을 유도한다. 본 연구에서는 이러한 용해 단백질을 이용하여 안전성이 보완된 고스트 사균화 백신 시스템을 구성하였으며 편모필라멘트의 유전자 중하나인 *flhC*를 면역증강제 역할을 할 수 있도록 고스트 사균화 백신인 pJHL184에 재조합 하여 시스템을 구축하였다. 이렇게 제작된 벡터시스템을 SE에 형질전환 하고 이를 마우스에 면역화 함으로써 세포 및 체액성 면역에 미치는 영향과 사균 백신에 대해 향상된 안전성을 확인하였다.

● 세부방법

○ 용해 유전자 발현 고스트 백신 균주 제작

본 연구에 사용된 박테리아 균주, 플라스미드, 프라이머에 대한 정보는 (표 1.)에 기재되어 있다. 박테리아 모든 균주는 LB 배지 또는 Brilliant Green Agar를 사용하여 37°C에서 배양되었으며, 고스트 벡터를 가지는 균주에 L-arabinose를 넣어주고 30°C에서 배양함에 따라 고스트화 하였다. 모든 박테리아 균주는 30% glycerol과 함께 -80°C에 보관하였다.

Ⅹ 1. Bacterial strains, plasmids, and primers used in this study

Strain/Plasmid/ Primers	Description	Reference
<i>E. coli</i> strains		
BL21 (DE3)pLysS	<i>E. coli</i> strain F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻ <i>dcm gal</i> (DE3) pLysS Cmr	Promega
JOL232	<i>E. coli</i> X6212 F-λ-phi80 (<i>lacZYA-argF</i>) <i>endA1 hadR17 deoR thi-1 glnV44 gyrA96 relA1 ΔasdA4</i>	Lab stock
<i>S. Typhimurium</i> strains		
JOL401	<i>Salmonella</i> Typhimurium challenge strain - wild-type	Lab stock
JOL912	<i>Salmonella</i> Typhimurium <i>Δlon ΔcpxR Δasd</i>	Lab stock
JOL1400	JOL912 harboring pMMP184 (vector control)	Lab stock
JOL1485	JOL912 harboring pMM184:: <i>fliC</i> (<i>E. coli</i>)	Lab stock
<i>S. Enteritidis</i> strains		
JOL1087	<i>Salmonella</i> Enteritidis mutant (<i>Δlon ΔcpxR Δasd</i>)	This study
JOL860	<i>Salmonella</i> Enteritidis challenge strain - wild-type	Lab stock
JOL2435	<i>Salmonella</i> Enteritidis Ghost184:: <i>fliC</i> (<i>Δlon ΔcpxR Δasd</i>)	This study
JOL2436	<i>Salmonella</i> Enteritidis Ghost184 vector control	This study
JOL1940	<i>E. coli</i> DH5a hosting pET28a:: <i>fliC</i> (<i>Salmonella</i> Typhimurium)	Lab stock
JOL1991	<i>E. coli</i> BL21-DE, expression strain for pET28a:: <i>fliC</i>	Lab stock
Plasmids		
pET28a	IPTG inducible expression vector; Km ^R	Novagen
pJHL184	An <i>asd</i> ⁺ vector, pBR ori plasmid carrying <i>ss ompA/His6</i> , multiple cloning site, nci857/λPR promoter, <i>araC</i> ParaBAD, <i>phiX174</i> lysis gene E	Lab stock
pJHL184:: <i>fliC</i>	pJHL184 harboring <i>E. coli fliC</i>	Lab stock

○ 고스트카세트 및 플라젤린 발현 플라스미드 제작

*fliC*를 발현하는 고스트 플라스미드는 온도에 의해 유도되는 CI857프로모터와 역방향 ParaBAD 프로모터를 갖는 λPR 사이에 E 용해 유전자가 클로닝 되어있다. 또한 면역보조제 역할의 살모넬라 티피무리움유래 *fliC*를 발현하기 위하여 EcoRI 및 HindIII 효소를 이용하여 pMMP-184 플라스미드 벡터에 재조합 하였다. 또한 재조합 플라스미드를 약독화 SE 균주인 JOL912 (*Δlon ΔcpxR Δasd*)로 형질전환하여 제작된 SE 백신 후보 균주를 JOL2435 (*Δlon ΔcpxR Δasd*)라 하고 면역화 연구에 이용하였다. 살모넬라 고스트균주를 제조하기 위해, JOL2435를 30°C 에서 0.2 % L-arabinose와 함께 배양하고 세포를 PBS완충액으로 세척하였다. 이후 L-arabinose없이 42°C 조건에서 24시간 배양함으로써 SE균주를 고스트화 하였다. SE 고스트 균주에서 발현되는 *fliC* 단백질은 *fliC* 특이 토끼유래 다클론 항체를 이용하여 Western blot으로 확인하였다.

○ 용해력 측정

용해 유전자에 의한 용해 효율을 측정하기 위해, JOL2435 균주는 L-arbinose 존재 하에 30°C 조건에서 10mL의 LB배양액에 접종되어 교반하면서 배양되었다. SE 균주의 고스트화는 온도 상승에 의해 생성되며 배양액을 LB플레이트에 2회 도금하여 생존하는 세포 수를 측정하였으며 24시간 및 36시간에 흡광도 값의 감소를 확인 하였다.

○ 동물 모델을 이용한 면역화 및 도전감염

동물 실험은 한국 동물 관리 및 동물 보호법 협회회의 2007년 제13조 (동물 실험)의 지침에 따라 전북 대학교(CBNU-2018-00264)의 승인을 받았다. 5주령의 BALB / c 암컷 마우스(N=32, n=8)를 무작위로 4개의 그룹으로 나누었다. 그룹B 및 C 마우스는 각각 1×10^8 (CFU/100 μ l)의 JOL2436 및 JOL2435로 각각 근육접종을 수행하였다. (표 2).

표 2. Immunization and Challenge scheme

Group (N=32,n=8)	Strain	Route	Dosage 2 times	Challenge(IM)
A	SE::fliC ghosts ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$)	IM	1×10^7 CFU/100 μ l	JOL860 (WT) 1×10^5 CFU/200 μ l
B	SE ghosts vector only	IM	1×10^7 CFU/100 μ l	JOL860 (WT) 1×10^5 CFU/200 μ l
E (Control)	PBS	IM	200 μ l of sterile PBS	JOL860 (WT) 1×10^5 CFU/200 μ l
Naïve				

A 그룹은 음성 대조군으로서 100 μ l의 멸균 PBS를 근육 내 주사 하였다. 그룹 D는 비교 목적으로 naive 대조군으로 이용하였다. 3 주간의 프라이밍 후 1차 면역화와 유사한 방식으로 부스터 접종을 수행 하였다. IgG 및 IgA 항체 농도는 정맥에서 채취한 혈청으로 측정하였으며, 질 세척액은 접종 후 0, 1, 2, 3, 4, 5 주에 채취하였다. 이후 혈청 및 질 세척 샘플을 -80°C에 보관하였다. 부스터 적용 1주 후, 비장 세포 증식 분석 및 FACS (형광 보조 세포 분류) 분석을 수행하기 위해 비장세포를 분리하기 위해 각 그룹으로부터 4마리씩 마우스를 이용하였다. 모든 그룹에서 2주간 부스팅된 마우스에서, 치사량 (2×10^5 CFU)의 SE야생형 균주와 JOL860을 근육 경로를 통해 도전감염 하였다. 모든 마우스의 모든 임상 증상을 관찰하였으며 2주간의 도전감염 후 마우스로부터 간을 무균조건에서 분리한 후 2ml의 펩톤 완충액을 이용하여 균질화한 후 100ul를 BGA배지에 도말하여 생성된 콜로니의 수를 센 후평균값을 log2CFU/ml로 기재하였다.

○ 체액성 면역반응 측정

매주 간격으로 채취된 혈청 및 질 세척액에서의 IgG 및 IgA 반응의 변화를 간접 ELISA 분석으로 측정 하였다. SE의 정제된 외막 단백질을 이용하여 항원으로 코팅하고, 5 %BSA로 1시간 동안 실온에서 blocking을 수행하였다. 이후 플레이트에 혈청을 1:50, 질 세척액을 1:10로 희석하여 37°C에서 2시간 동안 반응하여 1차 항체로 사용한 후, 2차항체인 anti-mouse-IgG 및 anti-mouse-IgA 를 1:1000으로 희석하여 37°C에서 1시간 동안 함께 배양 하였다. 이후 with o-phenylenediamine dihydrochloride substrate (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하여 색의 변화를 및 492 nm에서의 흡광도 값으로 측정한 후 항체의 최종 역가는 정제된 mouse immunoglobulin으로 측정한 표준곡선을 이용하여 결정되었다. fliC 특이 항원에 의한 변화 또

한 정제된 fliC 단백질을 사용하여 측정 하였다.

○ 세포성 면역반응 측정

In-vitro에서 항원에 의해 자극된 비장 세포에 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)를 사용하여 분석 하였다. 부스터 면역화 1주 후, 비장 세포를 면역화 된 그룹으로부터 무균상태에서 분리하고 세포 현탁액을 5% FBS를 함유하는 RPMI로 96 웰 플레이트에 웰당 1×10^5 세포수로 분주 하였다. 정제된 살모넬라 외막 단백질(Omp, $400 \mu\text{g/mL}$)로 자극 한 후 세포를 37°C 의 5% CO_2 인큐베이터에서 72시간 동안 배양한 후 MTT 포르마잔 생성물을 마이크로 플레이트리더를 사용하여 570 nm의 흡광도에서 측정했다. 또한, 면역화에 의해 유도 된 T 세포의 분화를 분석하기 위해 96웰 플레이트에 1×10^5 개의 비장세포를 분주한 후 정제된 외막 단백질(omp) 항원($40 \mu\text{g/mL}$)을 처리한 후 72 시간 동안 자극하고 백만 개의 세포를 with anti-mouse CD3a-PE, CD8-FITC 및 anti-mouse CD4-perCP-vio700 항체 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)와 함께 얼음 위에서 30분 동안 배양했다. 분석은 Macsquant 유세포 분석(FACS) (Miltenyi, Germany) 기기를 사용하였으며 데이터 분석은 Macsquant (Miltenyi, Germany)으로 수행하였다.

○ In-vitro에서 항원 제시 측정

마우스 대식세포 세포주인 RAW 세포를 24웰 플레이트에서 40-50%가 되도록 배양 한 후 fliC를발현하거나 발현하지 않는 SE 박테리아 고스트를 100MOI 및 500MOI로 17시간 동안 반응하였다. 이후 세포를 4% 4% paraformaldehyde로 고정하고 fliC 특이 다클론 항체(1:1000) 및 anti-mouse IgG-FITC (1:3000) 로 반응 시킨 후 세포 표면의 형광 신호 발현은 형광 이미징 시스템 (Leica, Germany)로 측정하였다.

● 결과

○ 고스트 카세트와 편모단백질 이중발현 벡터 시스템 제작

fliC가 발현되는 용해 단백질 발현 고스트 벡터는 λP_R , ParaBAD 와 온도에 의해 조절되는 CI857 프로모터 사이의 용해단백질 유전자가 위치하도록 제작되었다.(그림 1A.) 또한 면역증강 단백질인 fliC 유전자는 PCR로 증폭되어 고스트 184벡터에 재조합 되었다. 이후 ST 백신후보주인 JOL912(*Salmonella* Typhimurium $\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$) 및 SE 백신 후보주인 JOL1087 (*Salmonella* Enteritidis $\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$)에 형질전환하여 고스트 사균 백신에 대한 면역화 연구에 이용하였다. 형질전환 된 균주는 JOL1485(JOL912 harboring pMM184::fliC) 및 JOL2435(JOL1087 harboring184:: fliC)로 명명되었고 고스트화를 위해 L-arabinose를 첨가하여 30°C 에서 mid-log phase까지 배양한다. 이후 균주는 PBS로 세척해주고 LB배지를 넣고 42°C 에서 24시간 배양한다. 불활성화 된 SE 변이주에서의 편모단백질 발현은 특이 토끼 유래 항체와 His 항체를 사용하여 Western blot으로 확인하였다. (그림 1B.)

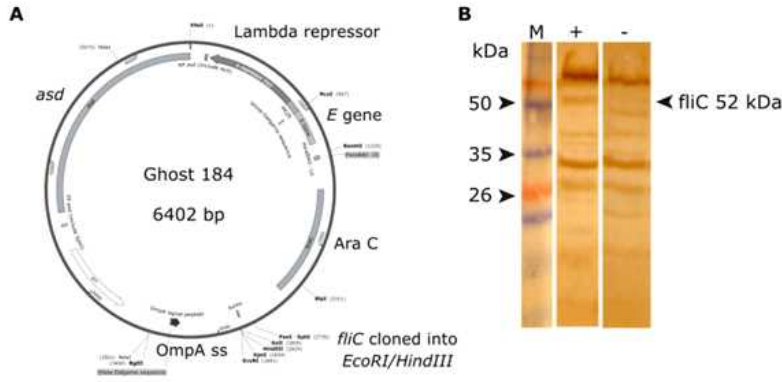


그림 1. Schematic representation of the ghost plasmid and Western blot. (A) Major elements of the ghost 184 vectors are demonstrated. *S. Typhimurium fliC* is cloned in *EcoRI/HindIII* cutting sites. (B) Western blot of FliC. The expression of 52 kDa FliC is demonstrated. M: Marker, +: ghost184::fliC, -: ghost vector control. The ghost generation was achieved by temperature up-shift to 42 °C without adding arabinose.

○ 고스트화 백신 균주의 용해력 측정

용해 유전자에 의한 용해력을 측정하기 위해 JOL2435을 L-arabinose를 첨가하여 30°C에서 배양한 후 42°C로 온도를 증가하여 세포 배양액을 흡광도 측정 및 배지에 도달하여 24시간, 36시간 후 살아있는 균의 수를 측정하였다. 백신균주의 고스트화 36시간 후 세포 수가 87% 감소한 것을 알 수 있다.(그림 2)

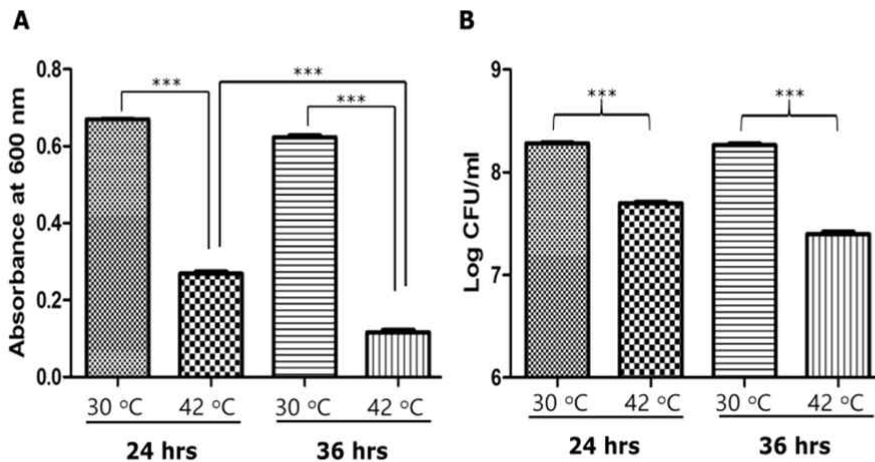


그림 2. Lysis efficacy of ghost plasmid. Bacterial ghosts were allowed to grow at 30 °C with arabinose of 0.6 OD and changed to non-permissive conditions at 42 °C without arabinose. The culture was incubated for three days and OD measurements (A) and log CFU/ml (B) were conducted. *** indicates significant difference. P<0.05.

○ 실험 동물 모델에서 사균백신의 면역화에 의한 체액성 면역반응 확인

SE 고스트 백신 균주에 대한 동물모델에서의 면역화를 알아보기 위하여 체내 IgG 및 IgA 항체 역가를 매주 채취된 혈청 및 질 세척액을 이용하여 간접 ELISA로 측정하였다. 부스팅은 1차 접종 후 3주 뒤에 실시하였다. SE로부터 얻은 외막 단백질 및 항원 500ng을 ELISA 플레이트에 코팅하고 5% BSA로 상온에서 1시간 blocking하였다. IgG를 측정하기 위해 혈청은 1:50으로 희석되었고 IgA를 측정하기 위해 질 분비물은 1:10으로 희석하여 37°C에서 1시간 반응한 후 2차 항체인 anti-mouse IgG and anti-mouse IgA를 1:1000으로 희석하여 동일하게 37°C에서 1시간 반응한 후 o-phenylenediamine (OPD, Sigma-Aldrich, USA)을 사용하여 발색시켜 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 편모단백질이 발현되는 고스트 사균 백신주에 접종된 마우스군에서 5주차에 유의한 IgG 값이 관찰되었고 고스트 사균 백신균주가 접종된 그룹에서는 대조군 대비 증가를 하였지만 3주차 이후 면역증강으로 인해 유의미한 결과를 얻지는 못했다. (그림 3A.) 점막 면역에 의한 IgA 반응은 편모단백질이 발현되는 고스트 사균 백신주를 부스팅한 경우 높은 항체의 값을 나타냈다.(그림 3B.)

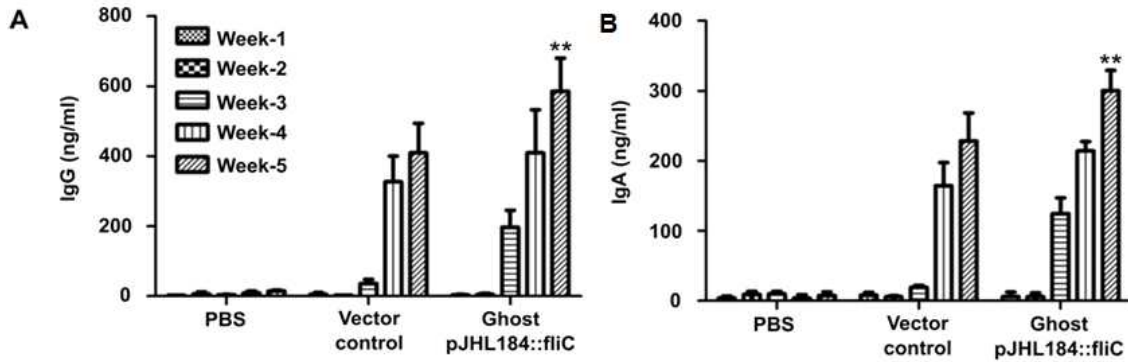


그림 3. Humoral immune responses. Mice (n=8) were immunized with ghost184:: fliC, ghost alone or PBS. Boosting was conducted after two weeks of primary inoculation. Serum and vaginal washes were collected on weekly interval. IgG and IgA antibody concentrations were determined by indirect ELISA using *S. Enteritidis* outer membrane proteins. ** indicates significant difference at P<0.05 level.

○ 실험 동물 모델에서 편모단백질 발현 고스트 사균 백신주의 면역화에 따른 편모 단백질 특이 항체 반응 확인

세포막과 관련된 편모단백질(fliC)이 면역증가제로 작용을 하는지 매주 채취된 혈청을 이용해 간접 ELISA를 통해 확인했다. 살모넬라로부터 분리한 fliC단백질을 ELISA 플레이트에 코팅한 뒤 표면단백질 발현 고스트 박테리아가 발현되는 사균백신주와 편모 단백질이 발현되지 않는 고스트 사균백신주 그리고 대조군이 접종된 마우스에서의 항체 발현 정도를 확인하였다(그림 4). 4주간의 면역화 후 fliC가 발현되는 사균백신주를 접종한 마우스군에서 5주째 가장 높은 수치를 나타냈으며 혈청 내 fliC 특이항원양의 변화가 IgG, IgA 반응 결과와 유사한 함을 보였다.

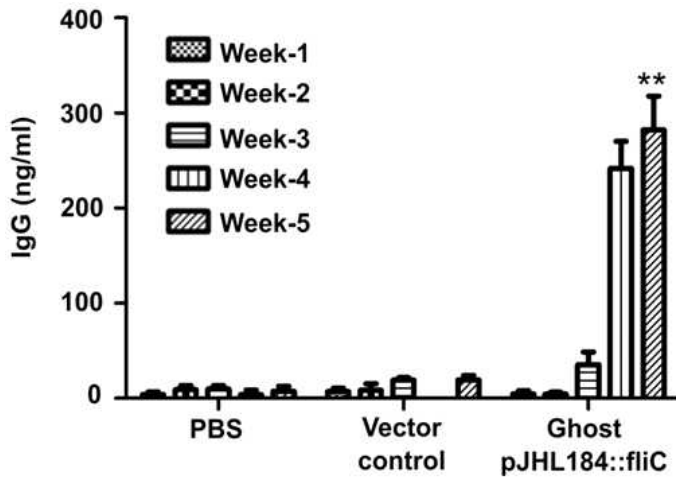


그림 4. Development of FliC specific antibodies. Mice (n=8) were immunized with ghost184:: fliC, ghost alone or PBS. Boosting was conducted after two weeks of primary inoculation. The serum was collected on weekly interval. FliC specific antibody titer was determined using fliC purified protein. ** indicates significant difference at P<0.05.

○ 실험 동물 모델에서 사균백신의 면역화에 의한 세포성 면역반응 확인

항원 자극에 따른 비장세포의 증식을 확인하기 위해 MTT법을 수행하였다. 면역화 1주가 지난 마우스로부터 비장세포를 분리한 후 1×10^5 cells/well로 96well 플레이트에 분주하였다. 살모넬라로부터 분리한 외막단백질 (Omp)을 이용하여 자극하고 72시간 후 MTT formazan의 변화를 570nm의 파장을 통해 측정한다(그림 5).

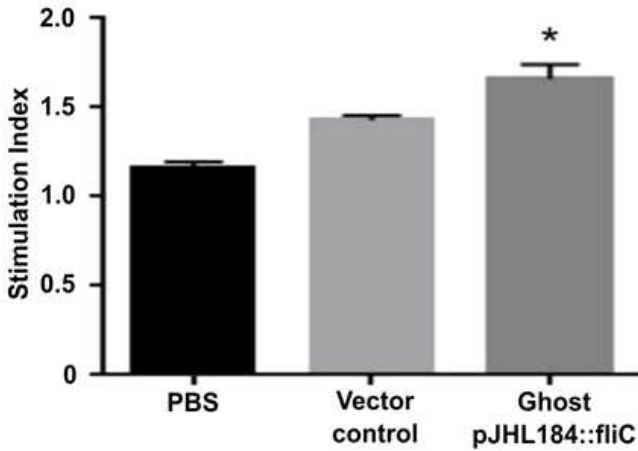


그림 5. Splenocyte proliferation assay. Mice (n=4) were sacrificed one week after the booster vaccination. Harvested splenocytes were seeded in 96 well plates at 1×10^5 CFU/well and stimulated with *S. Enteritidis* outer membrane proteins. After three days of incubation, cell proliferative response was determined by MTT assay. * indicates the significant difference with the PBS control. $P < 0.05$.

또한 면역화에 따른 T림프구의 분화를 관찰하기 위해 동일한 방법으로 세포에 자극을 준 후 phycoerythrin (PE)-CD3e, PerCPVio700-anti-CD4, fluorescein isothiocyanate(FITC)-CD8a의 단일 항체로 염색하고 FACS를 통해 CD3+T 세포 집단으로 구획을 나누고 특이적으로 분화된 CD4+T세포와 CD8+T세포를 분석하였다. 고스트 백신군주에 의해 면역화에 의해 CD4+ T세포의 분화는 증가했지만 CD8+T 세포의 분화 정도는 차이를 보이지 않았다. (그림 6.)

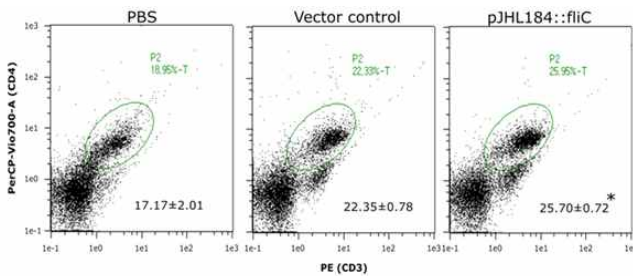


그림 6. Flow cytometry. Splenocyte proliferation assay. Mice (n=4) were sacrificed one week after the booster vaccination. Harvested splenocytes were seeded in 96 well plates at 1×10^5 CFU/well and stimulated with *S. Enteritidis* outer membrane proteins. After three days of incubation, maturation of T-cell markers was evaluated by FACS analysis. CD3+: PE, CD4+: PerCPVio 700, CD8+: FITC were used for cell labeling. A significant difference could be observed in CD4+ population upon ghost immunization than the PBS control. * indicates a significant difference compared to the PBS control. $P < 0.05$.

○ 고스트 사균 백신의 면역화에 따른 방어효과 확인

SE 고스트 사균 백신주의 면역화에 따른 방어효과 확인은 면역화 후 야생형 균주의 도전감염을 하여 비장과 간 조직 내 잔여 병원성을 측정함으로써 확인하였다. 대조군 대비 편모항원 발현 고스트 사균 백신주 및 고스트 백신주로 면역화된 마우스군에서 현저히 낮은 수의 잔여 야생형 균주가 관찰되었다. 또한 고스트백터 비교군 보다 편모항원 발현 고스트 사균 백신주가 접종된 마우스군의 비장 및 간 조직에서 야생형 균주의 명확한 감소가 확인되었다.(그림 7.)

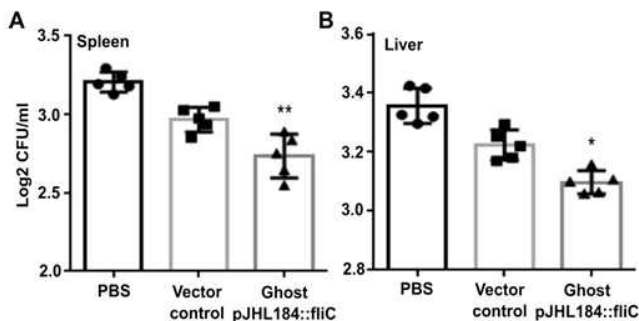


그림 7. Protection efficacy. Two weeks after booster immunization, all mice (n=4) were sacrificed and splenic, and liver challenged bacterial loads were determined. Values were converted to log₂ CFU/ml. ** indicates a significant difference compared to the PBS control. $P < 0.05$.

○ 시험관내 항원제시 정도 측정

박테리아 고스트 사균 백신 시스템에 의한 항원 제시 정도를 관찰하기 위해서 마우스의 대식세포인 RAW세포를 24well 플레이트에 분주 한 후 fliC가 발현되는 SE 고스트 사균화 백신 균주 및 발현되지 않는 백신균주를 각 100, 500MOI 로 처리하여 17시간 배양한다. 4% PFA로 세포를 고정 한 후 fliC 특이 항체를 부착한 후 IgG-FITC를 반응 시켜 세포 표면에서 관찰되는 녹색 형광의 발색을 측정한 결과 두 MOI간의 유의한 차이는 보이지 않았다. 이로써 박테리아 고스트 시스템은 대식세포에 효과적으로 포식이 되며 효과적인 면역반응을 위한 항원제시에 관여 한다는 것을 알 수 있다.(그림 8.)

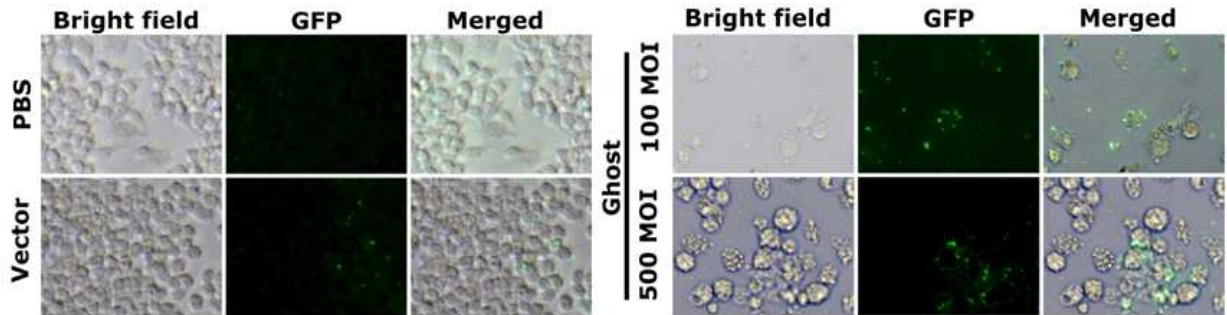


그림 8. Bacterial ghosts in vitro antigen presentation. The mice macrophage RAW cells were grown in 24 well plates and interacted with SE bacterial ghosts with (MOI 100 & 500) and without FliC (MOI 100) expressed on the surface. After 17 hrs of incubation, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and treated with FliC specific polyclonal antibody. The expression of surface fluorescence was observed by labeling with rabbit anti-mouse IgG-FITC. Cells were observed under fluorescent microscope. Images represent at 400X magnification. 12

● 결론

본 연구에서는 막 표면에 fliC를 발현하는 살모넬라 엔테리디티스 고스트 백신 후보주의 살모넬라증에 대하여 향상된 면역원성과 방어효과를 마우스 모델로 확인하였다.

살모넬라 고스트 균주의 막에 발현되는 fliC는 TLR-5의 antagonist로써 백신 후보 조건에서 필수적인 면역 유도 향상을 위한 보조제 역할을 할 수 있다. 기존 연구진에 의해 제작된 고스트 플라스미드인 pJHL184는 용해 유전자인 E유전자와 표적 항원인 fliC의 온도 의존적 유도를 동시에 갖는 이중 프로모터 시스템으로 arabinose와 30°C미만의 온도 조건 하에서 용해 유전자의 발현을 억제한다. 그러나 arabinose없이 42°C로 온도상승 시 SE의 용해를 관찰하였고 36시간 후에 초기 세포수의 13% 미만으로 이루어지는 것을 확인 하였다. 또한 SE 고스트 균주를 IM으로 면역화 한 마우스에서 fliC발현에 의한 체액성 IgG및 IgA반응 그리고 세포 매개 면역 반응 및 비장세포에서 CD4+T세포 분화의 효과적인 상승효과를 확인함으로써 숙주 면역계에 미치는 영향을 확인하였다. 또한, In-vitro상에서 항원의 흡수 및 제시 여부를 마우스 대식세포 표면에서 효과적으로 발현되는 항원을 통해 증명 하였다. 이는 면역 자극을 효과적으로 할 수 있는 요인임을 나타낸다. fliC를 발현하는 박테리아 고스트에 면역화된 마우스로 도전감염 한 비장 및 간에서 잔존하는 야생형 박테리아의 수가 현저히 감소함을 알 수 있었다. 결과적으로 면역 보조제로의 fliC와 SE 고스트 균주를 사용하여 살모넬라증으로부터 표적 동물을 보호할 수 있는 안전하고 효과적인 전략으로 제시할 수 있다. 더 나아가 닭과 같은 대표적인 살모넬라의 숙주인 닭 모델을 통한 방어효과를 증명해야 할 필요성이 있다.

제 2 절 2차년도

1. TLR-5 매개 활성화를 향상을 통한 향상된 면역화로 살모넬라 감염으로부터 방어 가능한 flagellin 발현 살모넬라 타이피뮤리움 고스트 시스템

○ 배경

살모넬라증은 전 세계적으로 식품을 매개로 하는 가장 흔한 질병 중 하나이며 주요 공중 보건학적 문제를 야기한다. 주로 가금류를 통해 사람이 살모넬라에 감염하게 되고 다양한 병원성 살모넬라의 혈청형 중에서 *Salmonella* Typhimurium은 장 감염의 주요 원인 중 하나이다. 동물의 예방 접종은 가금류 산업에서 살모넬라증 감염을 통제하기 위한 가장 효과적인 예방 방법이며 살모넬라에 대한 닭의 저항력을 높이고 식량 생산 흐름을 통해 인간 사회에 병원균이 확산되는 것을 방지 하고자 한다. 닭의 비 장티푸스 살모넬라증에 대한 백신을 만들려면 백신 후보가 안전하며 고도로 약화되고 면역원성을 가져야 한다. 불활성화 백신은 생물학적 과정 중 열이나 화학적 처리가 필요하지 않다는 몇 가지 장점이 강조 될 수 있으며 높은 면역원성의 항원은 고스트 표면에 제시되어 보조제의 기능을 수행 할 수 있으며 이 과정은 박테리오파지 Phi X174 E 용해 유전자의 발현 제어를 통해 유전적 불활성화를 유도할 수 있으므로 기존의 불활성화 백신에 대하여 진보된 대안 방법으로 제안할 수 있다. 용해 유전자 E의 발현은 숙주 살모넬라 균주에서 갑작스러운 붕괴를 유도하여 성장기 동안 비효율적인 증식을 유도한다. 이러한 고스트 플라스미드 pJHL184의 한계를 극복하기 위해, 플라스미드 구조에 설치된 안티센스 RNA 기술에 의해 누출 발현이 최소화 될 수 있다. 면역증강을 위한 유전자를 ST고스트 박테리아에 추가하기 위해 본 연구에서는 대장균 *fliC* 항원을 표면에 제시하기 위하여 사용했다. 따라서 대장균의 외막 단백질 A에서 유래된 유전자 서열로 인해, 면역증강제가 외피 표면에 제시 될 수 있으며 이로써 숙주의 면역 체계에 손쉽게 접근 할 수 있다. 고스트화를 위한 본 접근 방식은 부작용이 없으며 값 비싼 화학 물질 (예: inducer)을 필요로 하지 않는 간단한 메커니즘을 가능하게 한다. 기존 연구에 의해 박테리아 고스트 시스템이 안전하며 강력한 세포성 매개 면역 반응을 유도 할 수 있으며 체액성 면역 반응으로 살모넬라증에 대한 필수적인 면역을 유도한다고 알려져 있다. 표면에 제시된 *fliC*는 숙주 면역 체계에 의해 쉽게 인식 될 수 있으며 염증 반응을 유도하고 세균 감염을 제거하기 위해 숙주 면역 체계를 자극하는 TLR-5 매개 신호 전달 경로를 활성화 할 수 있다. 세균성 편모가 세포 부착에 관여하기 때문에, 세포 표면에 편모가 존재하며 항원 흡수와 항원 제시 세포로의 제시가 촉진되어 강력한 면역 반응을 촉진한다.

본 연구의 목표는 ST ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$) 박테리아 고스트를 구축하는 것으로, 이 고스트 시스템은 면역 증강을 위한 보조 인자로 박테리아 세포 외피의 표면에 *E. coli*의 *fliC*을 제시할 수 있도록 한다. JOL2454 (*fliC*를 발현하는 ST 유령)를 사용하여 근육 내 접종을 통해 유도된 면역 반응을 벡터 대조군 (JOL2455) 및 비 면역 대조군과 비교 하였다. 여기서 제작된 ST 고스트는 강력한 면역 반응을 유도하고 망상 장기, 비장 및 간에서 박테리아 농도가 감소됨으로써 치명적인 공격 접종 시 살모넬라증으로부터 닭을 보호할 수 있음이 확인됨에 따라 가금류 산업 및 인간 사이에서 살모넬라증을 예방하는 안전하고 효과적인 전략으로 제시 할 수 있다.

● 세부방법

○ 균주, 플라스미드 및 프라이머 정보

본 연구에 사용된 균주, 플라스미드 및 프라이머는 (표 1)에 명시되어 있다. 모든 균주는 Lauria Bertani (LB; BD, Sparks, USA) 배지 또는 Brilliant Green Agar (BGA; BD, Sparks, USA)를 이용하여 배양하였다. 달리 명시되지 않는 한 37°C에서, 고스트 플라스미드를 운반하는 균주는 20 Mm의 L-arabinose가 있는 배양액을 이용하여 30°C에서 배양하였다. 이후, 모든 박테리아 균주는 30% glycerol로 풀어준 후 -80°C 보관하였다.

표 1. Bacterial strains, plasmids, and primers used in the study

Strains/Plasmids/Primers	Description	Reference
<i>E.coli</i> strains		
X232	<i>E.coli</i> Δ <i>asd</i> strain for cloning activities using <i>asd</i> ⁺ plasmids	Lab stock
<i>Salmonella</i> strains		
JOL409	<i>Salmonella</i> Typhimurium wild-type strain for the challenge	Lab stock
JOL2454	JOL912 strain harboring pJHL184:: <i>fliC</i> gene (<i>E.coli</i>)	This study
JOL2455	JOL912 strain harboring pJHL184 vector alone	This study
Plasmids		
pJHL184	An <i>asd</i> ⁺ vector, pBR ori plasmid carrying ss OmpA/His6, multiple cloning site, cI857/λPR promoter, araC ParaBAD promoter, phiX174 lysis gene	Lab stock
pJHL184:: <i>fliC</i>	pJHL184 plasmid harboring <i>E.coli</i> flagellin gene	
Primers		
TLR5 F	ACACGGCAATAGTAGCAACACATAT	Slawinska et al.
TLR5 R	ACACCTGGAAGCTTGGAAAAGAACAT	
IFN-γ F	TGAGCCAGATTGTTTCGATG	Nang et al.
IFN-γ R	CTTGGCCAGGTCCATGATA	
IL-4 F	GGAGAGCATCCGGATAGTGA	Nang et al.
IL-4 R	TGACGCATGTTGAGGAAGAG	
ACTB F	CCCCGAGGCCCTCTTC	Slawinska et al.
ACTB R	GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCATGGA	

플라스미드 벡터는 높은 수의 복제가 가능한 pBR origin를 가지며 *asd* 유전자를 추가함으로써 항생제 마커 없이 안정적으로 ST의 발현이 가능하다. 외래 항원 *fliC* 발현 카세트는 λPR 프로모터에 의해 조절됩니다. 파지 Phi X174 용해 유전자 E는 서로 직면해 있는 sense λPR와 anti-sense ParaBAD 프로모터 사이에 존재한다. E 유전자의 발현은 허용되지 않는 온도인 30°C 이하 및 L-arabinose의 존재하에 억제된다. *fliC* 유전자는 고온에서 cI857억제기의 비활성화 됨으로써 온도가 42°C로 올려주면 발현이 된다. ST 고스트 생성을 위해, 20mM L-arabinose와 30°C에서 mid-log 로 박테리아를 배양한 후 arabinose없이 42°C로 온도를 올려주었다. *fliC* 유전자의 발현은 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되었다.

○ E용해 유전자발현 고스트 벡터 제작

막고정 *fliC*를 발현하는 E 용해 고스트 벡터의 구성은 기존 연구에 의해 알려져 있다 [20]. E lysis 유전자는 온도 유도성 프로모터인 CI857를 가지는 sense λP_R 와 anti-sense ParaBAD 프로모터가 사이에 존재함으로써 고스트 벡터는 수렴 프로모터 구조를 가지고 있다.

보조 단백질인 E.coli유래 *fliC*는 중합 효소 연쇄 반응에 의해 증폭되고 EcoRI 및 HindIII 제한 효소 부위를 사용하여 고스트 184 플라스미드 벡터의 다중 클로닝 부위에 서브 클로닝 되었다. 제작된 플라스미드를 ST 균주인 JOL912 ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$)로 형질 전환한 균주를 JOL 2454로 명명 하였으며 이를 면역연구에 사용하였다.

살모넬라 고스트 균주를 제작 하기 위해 JOL2454는 30°C에서 20mM의 arabinose가 함유된 배양액으로 배양하였다. 600nm 파장 (OD600) 값이 약 0.4-0.6에 도달하면 세포를 원심 분리로 하여 PBS로 세척 한 후 다음 42 °C로 온도를 올린 후 24시간 동안 arabinose 없는 LB 배지에서 배양했다. ST 고스트 균주에서 *fliC* 단백질의 발현은 *fliC*-토끼-다클론 혈청 및 anti-his에 tagging된 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 통해 수행하였다.

○ 용해능 측정

고스트화에 따른 효과는 JOL2454와 arabinose 없이 42°C에서 배양된 야생형 균주를 통해 비교 평가 하였다. 24시간 배양 후, 원심 분리에 의해 세포를 모은 후 Brilliant Green Agar (BGA)에 도말하여 생균수의 급속한 감소를 야생형 균주와 비교 하였다.

○ 동물모델을 이용한 면역화 및 도전감염

동물 실험 및 동물 보호법 2007: 제13조 (동물 실험)의 지침에 따라 전북 대학교 (CBNU-2018-00264)의 승인을 받아 진행하였다. Nick layer hens 닭(N=60, n=15)은 한국의 조인 부화장을 통해 구입하여 생후 1개월이 될 때까지 식량과 물을 공급 하였다. 닭을 4개의 그룹으로 나누고 A : JOL912 pJHL184::*fliC* ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$), B : JOL912 pJHL184 고스트 벡터 단독, C : PBS 대조군 및 D : 음성 대조군 으로하여 1×10^8 CFU(표2)으로 면역화 했다.

표 2. Immunization scheme

Group (n=15)	Strain	Route	Dosage	2 times	Challenge (Oral route)
A	ST:: <i>fliC</i> ghosts ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$)	IM		1×10^8 CFU/200 μ l	JOL409 (WT) 1x10 ⁸ CFU/200 μ l
B	ST ghosts vector control	IM		1×10^8 CFU/200 μ l	JOL409 (WT) 1x10 ⁸ CFU/200 μ l
C (Control)	PBS	IM		200 μ l of sterile PBS	JOL409 (WT) 1x10 ⁸ CFU/200 μ l
Naïve					

모든 동물은 1차 접종 3주 후에 추가 접종 하였다. 닭 혈액에서 IgY 반응을 측정하기 위해 1차 접종 7일, 14일 및 35일에 혈액 및 혈청을 획득하였다. 부스팅 1주 후, PBMC 증식 분석 및 FACS (형광유세포 분석)를 위해 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 분리하였다. 2주간의 부스팅 후, 모든 그룹은 마리당 ST WT JOL409 2×10^5 CFU로 근육 내 접종하여 매일 임상 증상을

관찰하였다. 또한 병원체의 도전감염 2주 후에 닭은 모두 희생하여 비장 및 간을 무균상태로 모으고 2ml의 펩톤 용액으로 균질화하였다. 100 μ l의 균질액을 BGA에 도말하여 생성된 콜로니의 수를 측정하고 평균 log₁₀CFU/ml로 표시했다. 감염된 닭에서 채취 한 조직 표본은 H&E로 염색으로 조직 병리학적 검사를 수행하였다.

○ 체액성 면역반응 측정

면역화 후 7일 14일 및 35일에 수집된 혈청에서 전신성 IgY 반응을 측정하기 위해 간접 ELISA 분석을 수행하였다. 반응은 ST의 정제된 외막 단백질을 이용하여 측정하였고 ELISA 플레이트를 각 항원으로 밤새 (4°C) 코팅 (500g)하고 실온에서 1시간 동안 5% BSA으로 blocking하였다. 혈청을 1:50 희석하여 분주 후 플레이트를 37°C에서 2시간 동안 1차 항체와 함께 배양했다. 이후, 1시간 동안 37°C에서 1:3000비율로 희석된 2 차 ant- chicken IgY와 함께 배양하고 색의 변화는 o-phenylenediamine dihydrochloride기질 (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하여 측정하였다. 최종 항체 역가는 492nm에서 표준과 흡광도 값 사이의 연관성을 나타내는 정제된 닭 면역 글로불린 (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA)으로 만든 표준 곡선을 사용하여 측정하였다. fliC 특이적 항원 개발은 동일한 방법으로 정제된 fliC 단백질을 사용하여 측정하였다.

○ 세포성 면역반응 측정

항원 재 자극 후 면역화 된 닭으로부터 PBMC의 증식 반응은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)를 사용하여 측정되었다. 부스팅 1주 후, 면역화 된 그룹 (n=5)으로부터 수집 한 전혈로부터 PBMC를 분리하고, 5% FBS가 함유된 RPMI로 세포 현탁액을 만든 후 well당 1x 10⁵세포수로 분주하였다. 정제된 살모넬라 외막 단백질 (Omp, 400 μ g/mL)로 자극한 후, 세포를 5% CO₂배양기에서 72시간 동안 37°C로 배양했다. MTT formazan은 570 nm의 흡광도에서 마이크로 플레이트 리더를 사용하여 측정되었다. 또한, 면역화 시 T세포 집단 반응의 변화는 96well 플레이트에 1x10⁵로 분주된 PBMC를 사용하여 분석하였다. 그 후 세포를 정제 된 외막 단백질(Omps)항원 (40 μ g/mL) 또는 RPMI 배지만으로 72시간 동안 자극하고 세포를 ice위에서 30분 동안 FITC-anti-chicken-CD3, AF-700-anti-chicken-CD4 PE-anti-chicken-PE CD8 항체 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)로 염색하였다. Macsquant 형광 유세포 분석 시스템 (FACS) (Miltenyi, Germany) 기기를 사용하여 결과를 분석하였다.

○ TLR5 반응 유도 측정

플라젤린은 진핵세포의 TLR5 수용체에 대한 직접적인 작용제로 박테리아 고스트와 상호 작용시 TLR5 발현 수준을 평가하기 위해, JOL2454 및 JOL2455(백터 단독)와 반응 후 닭 PBMC 및 인간 결장암 세포 HT29로 연구를 수행했다. PBMC는 Histopaque 밀도구배를 사용하여 분리 및 수확하고 10% FBS가 함유된 RPMI 배지에 1x10⁶Cells/well 이 되도록 24well 플레이트에 배양 하였다. PBMC는 100MOI로 4시간 동안 박테리아 고스트와 반응하였다. Total RNA GenAll R (HybriR, GenAll, Songpa-gu, Seoul, Korea) RNA 키트로 분리 한 후 Toyobo cDNA 합성 키트를 사용하여 total RNA를 cDNA로 합성하였다. TLR5 mRNA의 발현량은 qRT-PCR (Applied Biosystems) Real-Time PCR을 사용하여 정량

하였다. 또한, HT29 인간 결장암 세포는 DMEM에서 70%가 되도록 배양 후 10% FBS 및 박테리아 고스트 처리를 추가한 후 CO₂ 조건에서 37°C, 시간 동안 배양했다. 4시간 후, 세포를 수확하고 PBS(2x)로 세척하고 ice (8 µg/ml)에서 30분 동안 human TLR5-PE (19D759.2; Novus Biologicals, ON, Canada) 항체로 표지했다. TLR5 양성 세포의 비율은 Macsquant-Miltenyi 유세포 분석 시스템 (Bergisch Gladbach, Germany)을 이용하여 세포 집단으로 정량화했다.

● **결과**

○ Salmonella Typhimurium의 E용해 유전자 발현 고스트 플라스미드 제작 및 특성

Salmonella Typhimurium 고스트는 (표 1)에 명시된 균주, 플라스미드 및 프라이머를 이용하여 pJHL184고스트 플라스미드에 제작되었다. (그림 1A). fliC 유전자의 발현은 웨스턴 블롯(그림 1B) 분석에 의해 확인되었다. ghost 184::fliC 펠렛에서 52kDa의 밴드를 관찰될 수 있었지만 ghost 184백터 단독 배양에서는 관찰되지 않았다. 생존 세포 수의 감소는 O.D(OD₆₀₀)측정으로 확인하고 배양액을 도말하여 생존 세포 수의 감소를 관찰하였으며 세포 수의 현저한 감소는 고스트화를 위해 24시간의 배양 시간 동안 관찰되었다.

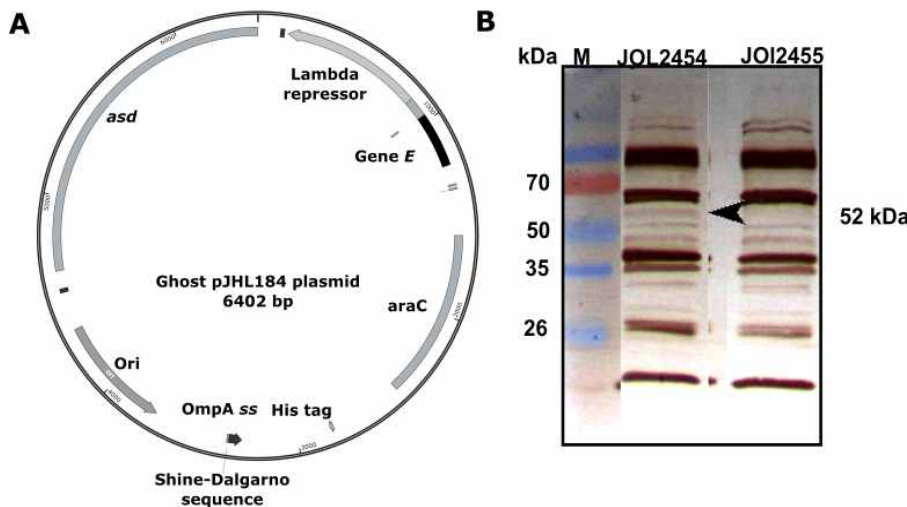


그림 1. Schematic representation of the ghost plasmid and Western blot. (A) Major elements of the ghost 184 vectors are demonstrated. *E. coli fliC* is cloned in EcoRI/HindIII cutting sites. (B) Western blot of FliC. The expression of 52 kDa FliC is demonstrated. M: Marker, +: ghost184::fliC, -: ghost vector control. The ghost generation was achieved by temperature up-shift to 42 °C without adding arabinose.

○ 면역화된 닭에서의 IgY반응

면역화 후 7일 14일 및 35일에 수집된 혈청에서 전신 IgY 반응을 측정하기 위해 간접 ELISA 분석을 수행하였다. 반응은 ST의 정제된 외막 단백질을 이용하여 측정하였고 ELISA 플레이트를 각 항원으로 밤새 (4°C) 코팅 (500µg)하고 실온에서 1시간 동안 5% BSA으로 blocking하였다. 혈청을 1:50 희석하여 분주 후 플레이트를 37°C에서 2시간 동안 1차 항체와 함께 배양했다. 이후, 1시간 동안 37°C에서 1:3000비율로 희석된 2차 ant- chicken IgY와 함께 배양하고 색의 변화는 o-phenylenediamine dihydrochloride 기질 (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하여 측정하였다. 최종 항체 역가는 492nm에서 표준과 흡광도 값 사이의 연관성을 나타내는 정제된 닭 면역 글로불린 (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA)으로 만든 표준 곡선을 사용하여 측정하였다..fliC 특이적 항원 개발은 동일한 방법으로 정제된 fliC 단백질을 사용하여 측정하였다. ST 고스트 면역화에 의해 유도된 전신 IgY 항체 반응은 매주 닭으로 관

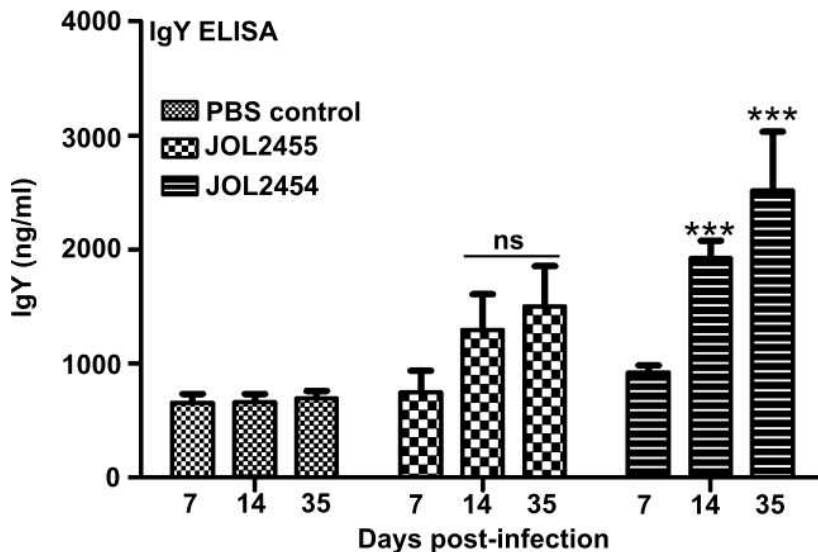


그림 2. Humoral immune responses. One-month-old chicken (n=15) was immunized with ghost184:: fliC, ghost vector alone, or PBS. Boosting was conducted after three weeks of primary inoculation. Serum samples were collected on a weekly interval. The IgY antibody concentrations were determined against ST outer membrane proteins by indirect ELISA. ** indicates significant difference at P<0.05 level.

찰되었으며 부스팅 적용은 1차 접종 후 3주에 수행하였고, JOL2454(ST:: pJHL184::fliC)로 면역화 된 닭에서 5주차에 IgY 반응이 유의한 정도로 생성되었다. 고스트 군주에 면역화된 닭은 1차 면역화 후 2주차까지 PBS 대조군보다 높은 반응을 보였다. 그러나 간접 ELISA 반응의 경우 14일에서 35일 사이에 유의한 증가가 관찰되지 않았다 (그림 2).

○ fliC 특이 항체 반응

E.coli fliC 항원은 강력한 면역 증강제로 막 고정 fliC 항원에 의한 보조제 효과는 1차 면역화 7일, 14일 및 35일에 채취 된 혈청으로 측정하였다. 1차 접종 후 3주에 부스팅 후 정제 된 ST fliC 단백질을 ELISA 플레이트에 코팅함으로써 혈청 항체 반응을 측정하였으며 ELISA 결과는 fliC 특이 항원 반응이 점진적으로 증가됨을 이는 면역화 14일째 JOL2454 면역화 된 닭에서 유의하게 더 높았다. 부스터 예방 접종 후에도 반응이 크게 증가하였다 (그림. 3).

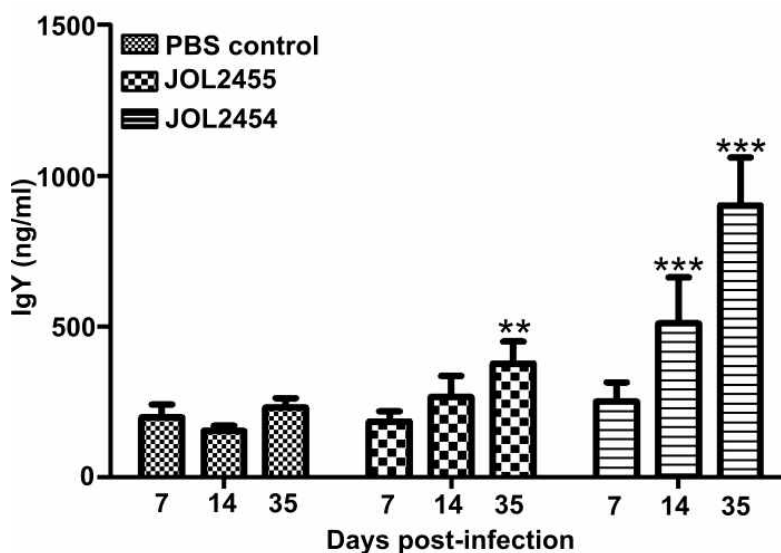


그림 3. Development of FliC specific antibodies. One-month-old chicken (n=15) were immunized with ghost184:: fliC, ghost alone, or PBS. Boosting was conducted after two weeks of primary inoculation. The serum was collected on a weekly interval. FliC specific antibody titer was determined against fliC purified protein in indirect ELISA. ** indicates significant difference at P<0.05.

○ 비장세포 증식 분석

부스터 면역 후 1주일 후 마우스에서 채취한 비장세포를 표적 단백질로 재자극하여 각 그룹의 비장세포 증식 반응을 비교 하였다. 비장 세포를 96well 플레이트에 1×10^5 CFU/well로 배양하고 SE 외막 단백질로 자극한 후 3일 동안 배양하였다. 이후, MTT 분석을 사용하여 세포 증

식 반응을 측정 한 결과 음성 대조군과 비교하여 JOL2454에 면역화 된 마우스 그룹 (그림. 4A)에서 비장세포 증식 반응의 유의한 차이를 보였으며 대조군 고스트 벡터와 fliC를 발현하는 고스트 간의 증식 반응의 차이는 박테리아 고스트 표면에 제시된 fliC의 면역 증강 효과 때문 일 수 있다.

○ T세포 집단의 유세포 분석.

fliC발현 고스트벡터를 가지는 ST, 벡터 대조군 또는 PBS로 부스터 면역화 일주일 후 확보 한 닭의 말초 혈액에서의 PBMC를 분리하여 T세포 집단에서의 반응을 확인 하였다. 분리한 PBMC를 ST 외막 단백질로 3일 동안 자극하고 T-세포 반응을 유세포 분석으로 평가 하였다. CD3+CD4+ 및 CD3+CD8+ T 세포 집단의 현저한 증가는 JOL2454 및 JOL2455 벡터 단독 박테리아 고스트로 면역화 된 닭에서 관찰 되었고 JOL2454로 면역화 된 그룹에서는 특히 CD8+ T 세포의 현저한 증가도 함께 보였다 (P<0.05) (그림. 4B, 4C).

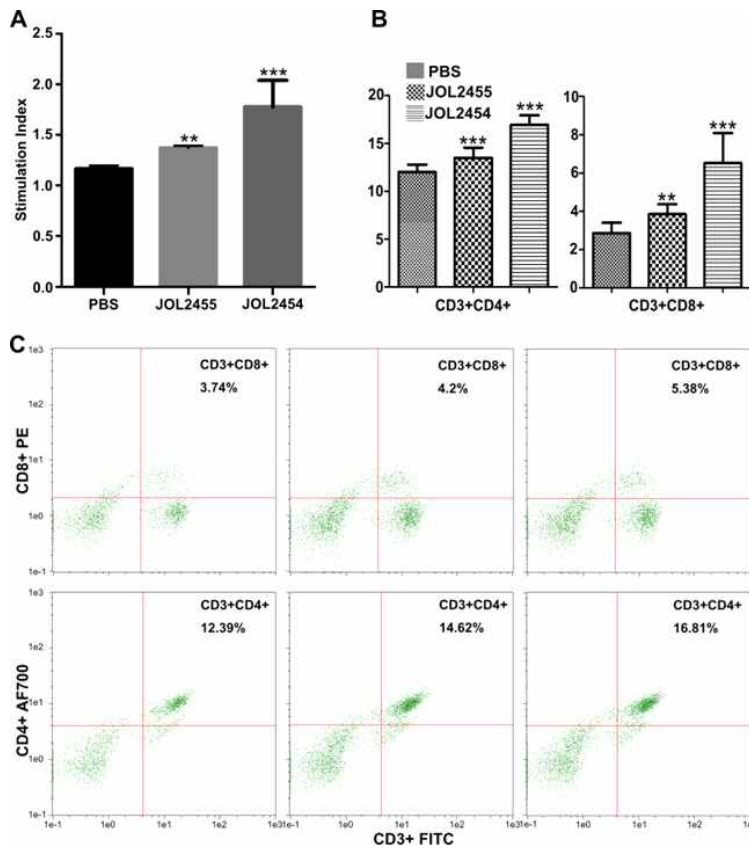
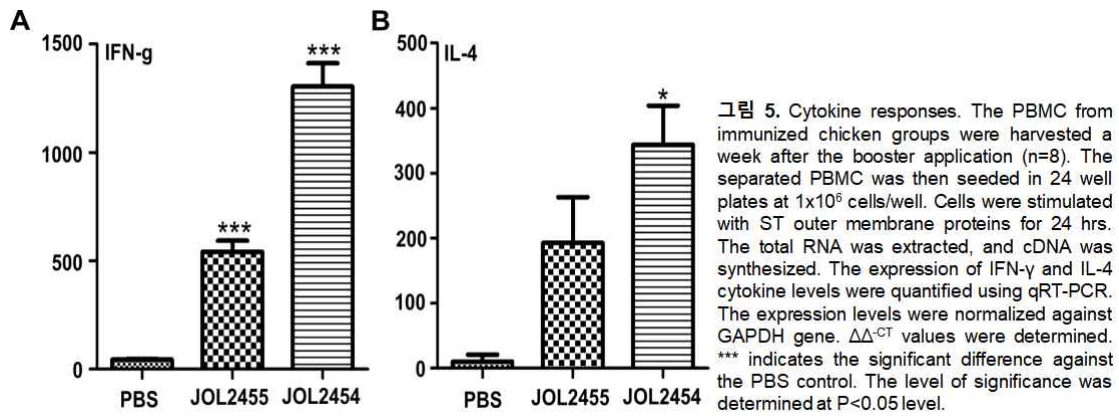


그림 4. Cell-mediated immune responses and assay for T-cell populations. (A) PBMC proliferation assay. Blood serum from immunized birds was collected a week after the booster immunization (n=5). The PBMC was separated using Histopaque density separation method. Harvested cells were seeded in 96 well plates at 1×10^5 CFU/well and stimulated with *S. Typhimurium* outer membrane proteins. After three days of incubation, cell proliferative response was determined by MTT assay. * indicates the significant difference with the PBS control. P<0.05. (B) Flow cytometry analysis of CD4+ and CD8+ T-cell populations. The PBMC collected on post booster application was seeded and stimulated, as mentioned (n=5). After three days of stimulation, cells were labeled with CD3+: FITC, CD4+: AF 700, CD8+: PE antibodies. Each cell population was quantified using MacsQuant flow cytometer system. *** indicates a significant increase compared to the PBS control. The level of significance was determined at P<0.05 level. (C) Representative images of flow cytometry analysis of each T-cell subset.

○ 사이토카인 유도 반응

면역 조절 사이토카인의 유도는 면역화에 의해 유도되는 면역 반응의 종류와 견고성을 결정 한다. 고스트 면역에 관여하는 I형 및 II형 면역 반응의 정도를 평가하기 위해 표적 단백질로 자극된 닭의 PBMC를 사용하여 mRNA 수준에서 IFN- γ 및 IL-4의 발현 정도를 정량 했다. 면역자극 24시가 후, mRNA 수준에서의 유전자 발현을 qRT-PCR로 평가하여, PBS로 면역화 된 닭과 비교하여 fliC 항원을 발현 고스트 균주로 면역화 했을 때 IFN- γ 유도 및 높은 IL-4 유도로 상당한 참여를 나타내었다. 또한 ST 벡터로 단독 면역화 된 그룹은 PBS 그룹에 비해 상

당히 높은 IFN- γ 반응을 보였다. 결과적으로 JOL2454에 의한 면역화로 각 유형 면역에 대한 마커인 사이토카인의 변화를 관찰하였으며 I형 및 II형 면역 반응을 모두 활성화한다는 것을 알 수 있었다. (그림5A, 5B)



○ 고스트에 의한 TLR5반응 유도

플라젤린은 진핵 세포의 TLR5 수용체에 대한 직접적인 작용제로 박테리아 유령 상호 작용 시 TLR5 발현 수준을 평가하기 위해, JOL2454 및 JOL2455 (백터 단독)와 상호 작용 한 후 닭 PBMC 및 인간 결장암 세포 HT29를 사용하였다. 박테리아 고스트로 자극 한 후, TLR5의 발

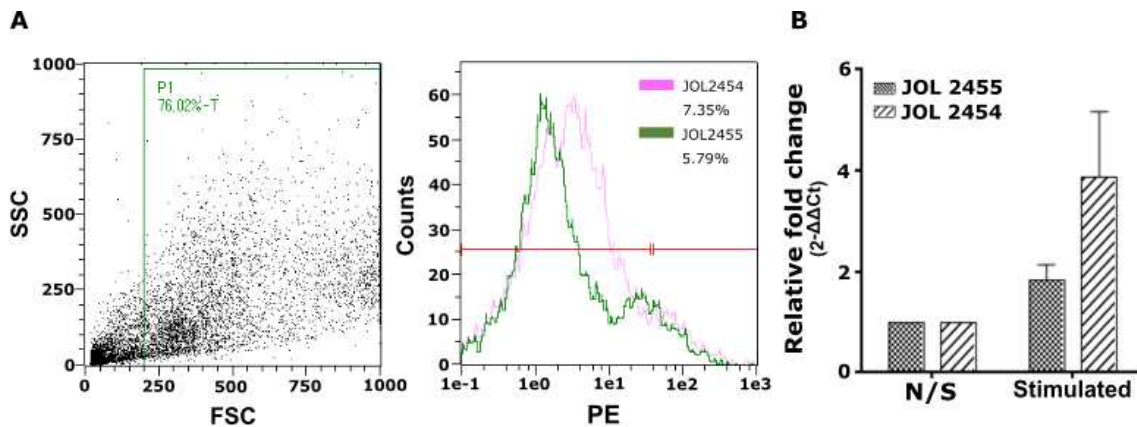


그림.6 Assessment of TLR5 expression. (A) Human colon cancer HT19 cells were grown to 70% confluence and incubated with JOL2454 or JOL2455 ghosts at 100 MOI. After 4 hrs cells were harvested by tryprnization and processed for FACS analysis using human TLR5-PE antibody. TLR5 expressed cell population was quantified using Macsqunt flow cytometer. (B)The PBMC from two months old chicken were harvested (n=8). The separated PBMC was then seeded in 24 well plates at 1x10⁶ cells/well. Cells were stimulated with ST::pJHL184::*fliC* ghosts, vector alone ghosts, or PBS for four hours. The total RNA was extracted, and cDNA was synthesized. The expression of TLR-5 levels was quantified using qRT-PCR. The expression levels were normalized against GAPDH gene. $\Delta\Delta^{CT}$ values were determined. *** indicates the significant difference against the PBS control. The level of significance was determined at P<0.05 level.

현 수준은 PBMC를 사용하여 mRNA 수준에서 평가하였고 인간 결장암 세포주인 HT29를 사용하여 표면 발현을 평가하였다. 고스트 백터 단독과 *fliC*를 발현하는 고스트 백터 모두 관찰한 결과 *fliC* 항원을 발현하는 고스트로 처리 된 세포에서 TLR5 발현이 높은 수준으로 활성화하는 것을 관찰했다 (그림 6A, 6B).

○ 고스트에 의한 방어효과 확인

면역화에 의한 방어 효과는 박테리아 야생형 균주의 도전감염 후 비장 및 간 조직에서 균주의 농도를 이용하여 측정하였다. 도전감염 후 고스트 벡터 대조군인 JOL2455 및 ST::pJHL184::fliC인 JOL 2454에 면역화된 그룹에서 PBS 대조군 보다 훨씬 적은 수의 잔여 박테리아가 존재하였다. 본 연구진은 JOL2454으로 면역화 된 닭의 비장 및 간 조직 모두에서 벡터 대조군 대비 잔여 세균의 농도가 감소하는 것을 확인 하였다 (표.2).

표 2. Challenged bacterial recovery

Group	Bacterial Recovery					
	Liver			Spleen		
	Log	CFU/g	Positives	Log	CFU/g	Positives
A.PBS-IM	4.35 ± 0.04		7/12	3.29 ± 0.02		8/12
1. Vector control JOL2455	2.27 ± 0.03***		6/12	1.17 ± 0.05***		6/12
2. JOL2454 (fliC ghosts)	1.19 ± 0.04***		2/12	1.10 ± 0.06***		3/12

병원체에 의한 염증 반응은 H&E에 염색된 조직 절편을 통해서 평가하였다. 감소된 염증반응에 의한 방어 효과는 벡터 또는 PBS 대조군 보다 JOL2454에 고스트 균주로 면역화된닭에서 분리된 간 조직에서 관찰 할 수 있었다. 비장에서는 벡터 대조군과 ST 고스트 균주 면역화 그룹보다 PBS그룹에서 적색 속질 영역의 확장과 대식세포의 심한 침윤이 관찰 되었다.(그림 7.)

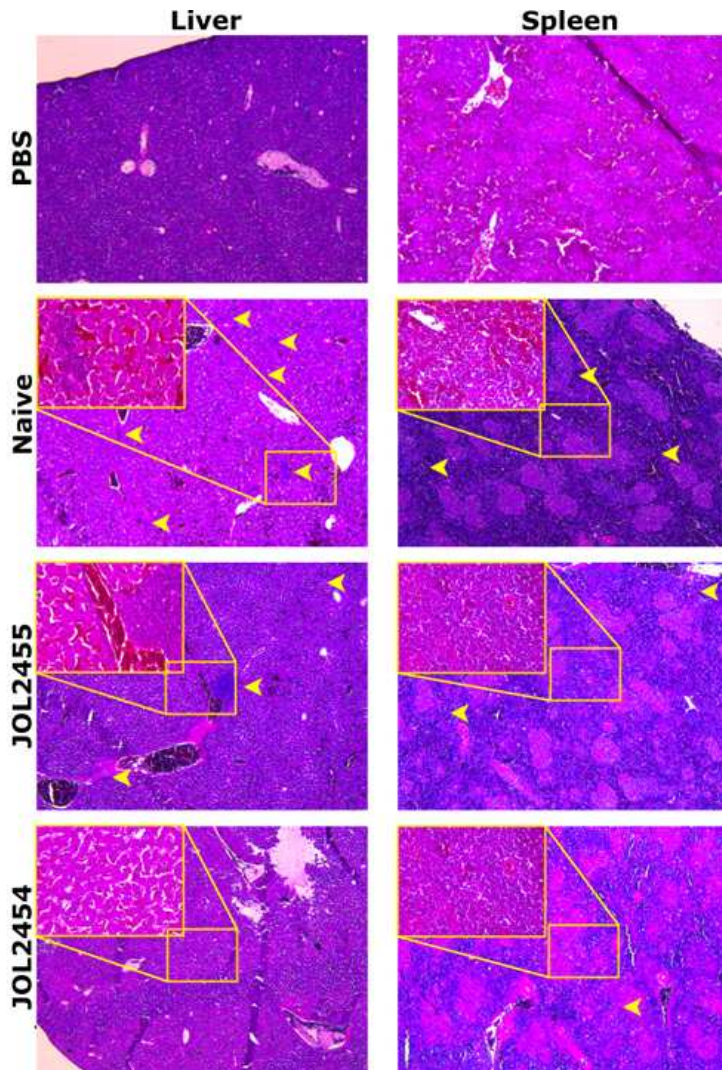


그림 7. Histopathological examination. Spleen and liver specimens were collected from chicken two weeks after the ST wild type challenge. Tissue specimens were fixed in 10% formaldehyde and processed for paraffin embedding and sectioning (5 µm thick sections). Specimens were stained with eosin and hematoxylin and observed for pathological alterations observing under the bright field of a microscope (Leica, Germany). The yellow arrow indicates the areas of profound inflammation marked with heavy macrophage infiltration. In spleen sections, expanded and diffused red pulp also visible compared to the PBS control group.

● 결론

본 연구는 *fliC*가 표면에 발현되는 *Salmonella Typhimurium* 고스트 사균 백신의 조류 살모넬라증에 대한 면역원성 및 방어 효과를 답을 통하여 연구하였다. 세포막에 고정된 *fliC*는 TLR-5의 작용제로 면역활성을 유도할 수 있으므로 고스트 사균 후보백신의 효과적인 면역증진제로 이용이 가능하다. 고스트 사균 벡터인 pJHL184은 세포용해 유전자인 E유전자와 타겟 항원인 *fliC*의 발현이 동시에 온도 의존적으로 유도될 수 있는 이중 프로모터를 가지고 있다. 허용 가능한 온도 범위 내에서 20mM L-arabinose를 함유하며 30°C이하 일 경우 용해 유전자의 발현은 억제 된다. arabinose 없이 42°C로 온도를 올려주는 경우 ST는 사균화 되어 내용물이 세포질 내로 방출이 된다. 면역증강제로의 FliC로 인해 IgY 반응과 세포 매개 면역 반응, 조절 사이토카인 유도가 크게 향상 되었으며 이후 살모넬라 공격접종에 대하여 강화된 방어 효과를 보였다. 또한, *fliC*를 발현하는 ST사균화 백신을 근육접종 한 경우 높은 CD8+ 의 증가를 보여 I형 면역 반응이 유도됨을 알 수 있다. 그리고 대조군인 PBS그룹과 비교하였을 때 CD4+와 CD8+T세포가 증가함으로써 이는 살모넬라 제거에 있어 필수적인 세포성 및 체액성 매개 면역반응에 모두 관여함을 알 수 있다. 병원체의 도전감염시 면역증강제로의 *fliC*가 표면에 발현되는 ST사균화 백신에 면역화된 마우스의 비장과 간 조직에서의 박테리아 농도가 현저히 감소하였다. 본 연구에서 조류 살모넬라증에 대하여 *fliC*가 발현되는 ST사균화 백신이 높은 면역원성의 활성을 유도하며 조류 살모넬라증에 대하여 안전하고 효과적인 예방 전략 수단으로 이용될 수 있음을 제안한다.

2. O 항원 결핍 약독화 살모넬라 티피무리움 생백신 시스템

● 배경

Salmonella 다양한 숙주를 감염 시키며 인간과 농장 동물 사이에서 가장 흔한 식중독 원인 중 하나이다. 인간이 살모넬라에 감염하는 주된 원인은 가금류와 같은 오염된 농산물을 통해서이다. 살모넬라는 인간 사회 내에서 상당한 유행률을 보이며 이로 인해 생산성 및 공중 보건 비용 측면에서 막대한 경제적 손실을 초래한다. 감염된 동물, 특히 암탉은 수직 및 수평 질병 전이를 위한 저장소 역할을 한다. 살모넬라 감염 위험을 줄이기 위해 많은 농장에서 일상적인 화학적 오염 제거, 사료 및 식수에 유기산 추가, 프로바이오틱스 사용 및 동물 백신 접종을 시행하고 있다. 많은 국가에서 암탉의 예방 접종으로 인간에서의 살모넬라 감염이 감소하였으며 이는 질병 예방에 있어서 예방 접종의 중요성을 시사한다. 그러나 안전성 및 면역학적 요인을 가진 이상적인 백신 후보를 발굴하는 것은 어려운 작업이다. 이상적인 환경에서 후보 균주는 배설물을 통해 환경으로 분비되지 않고 고도로 약화되고 세포 독성 및 세포 사멸을 유발하지 않으며 침입한 병원체를 제거할 수 있는 주요한 염증 유발 반응을 유도해야 한다. 현재 살모넬라증을 예방하기 위해 사백신, 서브 유닛 백신 및 약독화 생백신을 사용하며, 각각 장단점이 있지만 약독화 생백신은 면역화 된 숙주에서 체액성 및 세포 매개 보호 면역 반응을 강력하게 유도하는 것으로 알려져 있다. 살모넬라를 면역 제제로 사용하려면 면역화 된 숙주에서 질병이 발생하지 않아야 하며 대식세포와 같은 숙주 면역 세포에서 지속성이 없도록 하기 위해 상당히 약독화 되어야 한다. 본 연구에서 *Salmonella Typhimurium* (ST) 균주는 세 가지 주요 독성 유전자인 *lon*, *cpxR* 및 *rfbL*을 제거하여 약독화 하였다. 살모넬라의 Lon protease는 독성 관련된 여러 유전자 (SPI-1 유전자)의

조절에 참여하며, 이 유전자의 제거는 손상된 세포 내에서 살아 갈 수 있도록 한다. 그람 음성 박테리아의 CpxA/CpxR2 시스템은 스트레스 적응 및 섬유질 발현을 담당하는 수많은 유전자를 조절하며, *cpxR* 유전자의 결실은 ST 균주를 약화시킬 뿐만 아니라 세포 표면에서 섬유질 발현을 향상시킨다. 개발된 새로운 돌연변이 균주는 전신 감염을 일으킬 수 없었지만 수지상 세포 및 대식세포와 같은 항원 제시 세포에 의한 효율적인 접착 및 흡수를 유지하였다. 백신 ST 균주는 O 항원 발현을 담당하는 *rfaL* 유전자의 결실에 의해 추가로 약화되었다.

또한 *rfaL* 유전자의 제거는 보체 매개 사멸에 대한 민감성을 증가시키며 O 항원이 약화된 살모넬라 균주는 수지상 세포 (DC)에 의한 흡수 증가, intracellular processing 및 분해가 증가함을 나타냈다. 종합적으로, *lon*, *cpxR* 및 *rfaL*의 결실은 보호 면역 반응 유도에 필수적인 항원의 효율적인 제시를 유지하면서 세포 내 증식의 위험을 줄여 상당한 약독화가 가능하도록 한다. 또한 다양한 보고에 의해 *rfaL* 결실은 돌연변이 균주에 의해 소장 감염시 Payer 패치 결핍을 유발하며 전신 감염의 결핍 및 비효율적인 항원 제시로 이어지는 것으로 알려져있다. 따라서 점막 및 비경구 경로를 통한 접종시 닭 림프 기관을 관찰한 결과 약독화 된 돌연변이의 상당한 감쇠를 관찰했으며 본 변이 균주는 야생형 균주에 비해 유의한 세포 독성 없이 배양된 골수 유래 대식세포에서 현저한 안전성을 입증 한 반면, 전 염증 반응은 야생형 균주보다 유의하게 높았다. 이러한 결과로 본 변이 균주는 백신 후보에 이상적이며 백신 균주의 O 항원 성분을 제거함으로써 O 항원 특이적 항체 생성이 크게 감소함을 관찰함으로써 이러한 제거는 박테리아가 O 항원 매개 보체 활성을 피할 수 있도록 하면서 O 항원 특이적 혈청 진단 항체를 기반으로 한 혈청 진단 접근법에 대해 DIVA (감염된 동물과 백신 접종 된 동물의 차별화)가 가능하도록 함을 알 수 있다. 이러한 이점을 고려하여, 본 연구에서는 세 가지 주요 독성 유전자인 *lon*, *cpxR* 및 *rfaL*을 삭제하여 약독화되고 거친 *S.Typhimurium* 균주를 구축하고 닭 모델에서 야생형 ST 도진감염에 대한 방어효능을 조사했다. 또한 안전성, 환경 유출, 대식세포 흡수 및 지속성, 장기 지속성, 면역원성, DIVA 능력, 점막 및 전신 경로를 사용한 야생형 도진감염에 대한 보호 효과를 광범위하게 조사했다. 결과적으로 새로운 ST 균주에 의해 확인된 환경 안전 및 인간 살모넬라증 예방에 대하여 매우 개선된 안전성 및 보호 효능으로 살모넬라에 대한 백신 접종을 위한 새로운 플랫폼으로 제시할 수 있다.

● 세부방법

○ 균주, 플라스미드, 프라이머, 유전자 변이 정보

연구에 사용된 모든 박테리아 균주, 플라스미드 및 프라이머 정보는 (표 1)에 나열되어 있다. 모든 박테리아 균주를 Lauria Bertani (LB; BD, Sparks, USA) 배지 또는 Brilliant Green Agar (BGA; BD, Sparks, USA)에서 37°C에서 교반하여 배양하였다.

rfaL 유전자의 프레임 내 결실은 Lambda Red 재조합을 변형하여 수행하였다. FRT 측면 chloramphenicol (Cat) 유전자는 살모넬라 *rfaL* 유전자의 상부 (*rfaL* FP) 및 하부 (*rfaL* RP) 영역에 해당하는 프라이머 서열을 사용하여 증폭되었다. 선형 FRT-CatR-FRT는 pKD3 플라스미드에서 증폭되었고, PCR 산물은 잔류 플라스미드를 제거하기 위해 DpnI로 처리되었다. 정제된 선형 PCR 산물은 1mm BTX 큐벳 (Harvard Apparatus, MA, USA)으로 형질전환 하였으며 세포를 CatR LB Agar에서 스크리닝 하였다. 내부 프라이머 (*rfaL* 내부 FP 및 *rfaL* 내부 RP)를 사용하여 *rfaL* 유전자의 결실 균주를 선별하였다. 37°C에서 배양하여 pKD46 플라스미

드를 완전히 제거한 후, 생성된 콜로니를 pCP20 플라스미드로 형질 전환하여 숙주로부터 CatR 유전자를 완전히 제거했다. 완전한 결실은 rfaL 유전자 측면 프라이머에 의해 확인되었다. 정제된 LPS의 O항원 성분의 절단은 SDS PAGE 및 silver 염색으로 분석되었으며 제작된 백신 균주는 JOL2377라 하였다.

○ 동물모델 및 동물윤리

동물 실험 절차는 한국 동물 관리 협의회 및 동물 보호법 2007 : 제 13 조 (동물 실험)의 지침에 따라 전북 대학교 (CBNU-2018-00264)의 승인을 받았다. 1일령 brown nick layer 닭은 한국 합동 부화장에서 구입하여 식량과 물을 공급하는 냉난방 시설의 동물 시설에서 관리했다. 한달 후 균주 접종을 수행하였다. 동물의 행동 및 생리적 징후에 관찰을 위해 매일 2회 모니터링 하였다.

○ ST 백신 균주의 안전성 평가

ST 백신 균주의 안전성은 1 개월령의 닭을 4개 그룹 (n=12)으로 나누고 그룹 A는 ST 백신 균주 (Vs)를 1×10^8 CFU로, B는 ST 야생형 균주 경구를 1×10^8 CFU로 경구 접종하고 C는 ST 백신 균주를 1×10^7 CFU로 IM접종, 그룹 D는 ST 야생형 균주를 IM으로 1×10^7 CFU로 접종 하였다. 닭에서 ST 균주의 배설물은 접종 후 1일, 3일, 7일, 14일 및 21일에 분변 배출을 통해 평가했다. 닭 배설물을 무균으로 수집하고 혼합된 배설물 1g을 펩톤 용액 10ml에 현탁시켰다. 100ul의 균질액을 BGA 플레이트에 직접 도금했다. 농축을 위해 1ml의 균질 물을 9ml의 Rappaport Vassiliadis (RV; Sigma) 배양액에 접종하고 밤새 42 °C에서 배양하고, 농축된 배양액 100ul를 BGA에 플레이트에 도말 했다. 닭 기관에서 존재하는 ST를 확인하기 위해, 접종 후 1일, 3일, 7일, 14일, 21일 및 28일에 각각 2 마리의 닭으로부터 비장 및 간 조직을 분리한 후 잔존하는 박테리아를 혈청형 특이 프라이머로 확인하였다

○ 대식세포 생존, 세포 독성 및 사이토카인 유도능 평가

대식세포 내 생존 및 세포 독성 분석은 닭의 대식세포를 사용하여 수행되었다. 골수 세포는 2개월령 닭에서 채취하고 50ng/ml의 GM-CSF(과립구-대식세포 콜로니 자극 인자)처리로 분화다 세포는 7일 동안 5 % CO₂, 37°C에서 배양되었다. 부착된 세포 (대식세포)를 계대 배양하여 실험에 사용 하였다. ST 변이균주 JOL2377 및 야생형 JOL409 균주를 사용하여 배양된 세포에 100 및 10 MOI로 2시간 동안 감염시켰다. 감염되지 않은 세포는 Gentamycin(100μg/ml)으로 2시간 동안 처리하여 제거하였다. 대식세포 내 세균의 생존은 CFU계수로 평가하고, ST 유도 세포 독성은 2ng/ml(Essen Bioscience, MI, USA)에서 Cytotox green 시약을 사용하여 20시간 동안 IncuCyte 라이브 이미징 시스템으로 평가했다. 방어를 위한 염증성 사이토카인 반응의 유도는 100 MOI 수준에서 감염시 3일에 걸쳐 평가되었다. 사이토카인 반응을 beta-actin으로 표준화 하고 평균 배수의 변화를 계산하고 PBS, ST 돌연변이 및 ST 야생형 접종 대조군과 비교했다

○ 면역 접종 및 도전 감염

1개월령, 암컷, Brown nick layer종의 닭은 (N=72, n=12)를 표 2에 나타낸 바와 같이 무작위로 12마리씩, 6개의 그룹으로 나누었다. 그룹 A는 ST 백신 균주 (Vs)를 1×10^8 CFU로 단일 경

구 접종하고 B는 부스터 접종과 함께 경구로 접종하고 C는 ST 백신 균주를 1×10^7 CFU로 근육접종 하고 D는 부스터 접종을 하였다. 부스팅은 1차 접종 후 3주에 수행하였고 혈청을 매주 간격으로 채취하였으며 도전감염은 야생형 ST균주인 JOL409로 부스터 접종 후 2후에 수행하였다. 말초혈액 단핵세포(PBMC)는 부스터 접종 2주 후에 수행하였으며 세포증식 분석, 유세포 분석 (FACS) 및 사이토카인 활성 측정에 사용되었다. 또한, 실험 종료시점에 닭으로부터 비장, 간 조직을 분리하여 BGA플레이트에 도말하여 잔여 균주를 측정하였으며 H&E 염색으로 조직 병리학적 검사를 수행하였다.

표2. Immunization scheme for chicken with *Salmonella* Typhimurium vaccine strain in oral and intramuscular routes

Group (n=12)	Strain	Route	Dosage	Challenge (Oral route)
A	ST ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta rfaL$)	Oral	1×10^8 CFU/200 μ l	JOL409(WT), 1×10^8 CFU/200 μ l
B (with booster)	ST ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta rfaL$)	Oral	1×10^8 CFU/200 μ l	JOL409(WT), 1×10^8 CFU/200 μ l
C	ST ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta rfaL$)	IM	1×10^7 CFU/200 μ l	JOL409(WT), 1×10^8 CFU/200 μ l
D (with booster)	ST ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta rfaL$)	IM	1×10^7 CFU/200 μ l	JOL409(WT), 1×10^8 CFU/200 μ l
E (Control)	PBS	Oral	200 μ l of sterile PBS	JOL409(WT), 1×10^8 CFU/200 μ l
Naïve				

○ 체액성 면역반응

간접 ELISA는 면역화 된 닭에서 항 살모넬라 IgY 항체 생산 정도를 측정했다. IgY항체 반응은 400ng/well을 사용하여 정제 된 ST 외막 단백질에 대해 평가되었다.

○ 세포성 면역반응

항원 자극 후 PBMC의 증식 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT)를 사용하여 분석되었다. 부스터 면역화 2주 후, PBMC는 Histopaque 밀도구배 원심 분리 (Histopaque -1077, Sigma, Germany)를 사용하여 혈액에서 무균적으로 분리되었다. 세포를 5 %FPC를 함유하는 RPMI으로 1×10^5 세포수로 분주되었다. 정제 된 살모넬라 외막 단백질 (omp, 40 μ g/mL)로 자극 한 후, 세포를 37°C의 5 % CO₂인큐베이터에서 72시간 동안 배양하고 MTT 포르마잔 생산을 마이크로 플레이트 리더를 사용하여 570 nm의 흡광도에서 측정했다. 또한, 면역화에 의해 유도 된 T세포 집단의 분화를 분석하기 위해 1×10^5 개의 비장 세포를 96 웰 플레이트에 분주한 후 정제 된 omp 항원 (40 μ g/mL) 또는 RPMI 배지만으로 72시간 동안 자극하고 100만 개의 세포를 자극했다. with anti-chicken CD3a-FITC (Cat # 8200-02), anti-chicken CD8-PE (Cat # 8220-09) and anti-chicken CD4-AF-700 (Cat # 8210-27) 항체 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 로 30 분 동안반응 후 분석은 MacsQuant 소프트웨어를 사용하여 수행되었다.

○ 사이토카인 발현 측정

PBMC는 부스터 면역화 2 주 후 분리되었으며, 웰당 1×10^6 세포를 정제된 omp 단백질($40 \mu\text{g}/\text{mL}$)과 함께 48시간 동안 37°C , 5% CO_2 에서 배양했다. 총 RNA는 RNeasy Plus mini 키트 (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany)를 사용하여 세포 현탁액에서 추출한 다음 High Capacity cDNA Reverse Transcription 키트 (Applied Biosystems, Foster, USA)를 사용하여 cDNA로 합성했다. 사이토카인 인터루킨 (IL)-4 및 인터페론(IFN)- γ mRNA의 수준은 real-time RT-PCR로 정량화되었다.

○ DIVA ELISA

ST 돌연변이 (JOL2377) 및 ST DIVA 대조군 (JOL911)으로 백신 접종시 LPS 특이적 항체 생성을 IM 경로를 통해 부스터 면역화 2주 후 수집한 혈청에서 평가했다. ST에서 정제된 LPS(Sigma)를 구입하고 코팅 완충액 ($0.5\text{M Na}_2\text{CO}_3$, NaHCO_3)에서 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 ELISA 플레이트에 37°C 에서 2시간 동안 코팅했다. 5% Skimmilk가 함유된 PBS는 blocking 목적으로 사용되었다. 혈청을 1:100으로 희석하고 37°C 에서 2시간 동안 ELISA 플레이트에서 배양하였다. 1xPBS로 3회 세척 후 anti-mouse-HRP-IgG의 2차 항체를 1:3000 희석하여 사용하였다. 1xPBS로 3회 세척한 후 O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) 기질을 첨가하여 생성된 최종 발색은 492nm 에서 측정하였다.

○ 통계분석

모든 데이터는 GraphPad Prism 6.00 소프트웨어 (San Diego, CA, USA)를 사용하여 분석되었다. Tukey의 다중 비교 테스트를 통한 일원 분산 분석 (ANOVA)을 수행하여 $P\text{-value} < 0.05$ 로 테스트 그룹 간의 통계적으로 유의한 차이를 평가했다.

● 결과

○ *rfaL* 유전자 결실 *Salmonella* Typhimurium 균주 제작 및 특성

ST JOL911($\Delta lon \Delta cpxR$) 이중 돌연변이에서 *rfaL* 유전자의 결실은 *Lambda Red* 재조합 방법으로 제작하였다. 유전자 변이는 플랭 프라이머를 사용하여 3개의 유전자에 대한 PCR로 확인하였다(그림 1A). 또한, *rfaL* 유전자의 결실은 O항원 구성 요소의 제거로 결과적으로 LPS의 절단을 유도하였으며 이는 ST 변이주의 정제된 LPS를 이용하여 SDS PAGE와 silver staining으로 확인되었다.(그림 1B)

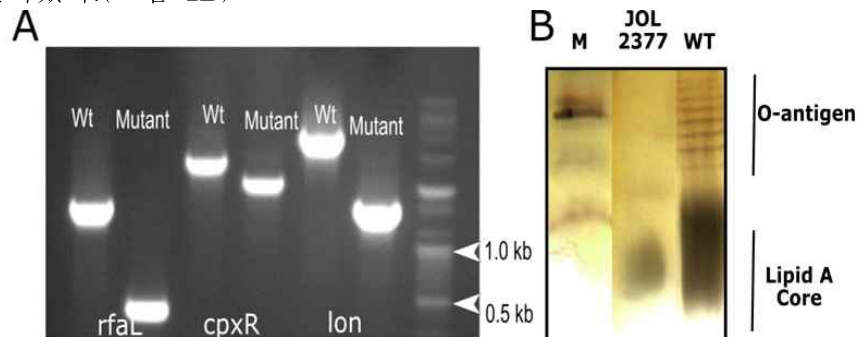


그림 1. Confirmation of mutants. Mutant ST VS strain was confirmed by (A) PCR using flanking primers for each gene and (B) by SDS PAGE for purified LPS. The primers used are listed in Table 1, and the visualization of LPS was conducted by standard silver staining procedure.

○ 약독화 *Salmonella* Typhimurium 변이 균주의 안전성 평가

1개월령, 암컷, Brown nick layer종의 닭은 (N = 72, n = 12)를 표 2에 나타낸 바와 같이 무작위로 그룹 당 12마리씩, 6 개의 그룹으로 나누었다. 그룹 A는 ST 백신 균주 (Vs)를 1×10^8 CFU로 단일 경구 접종하고 B는 부스터 접종과 함께 경구로 접종하고 C는 ST 백신 균주를 1×10^7 CFU로 근육접종 하고 D는 부스터 접종을 하여 1일, 3일, 7일, 14일 그리고 21일에 각각 닭 그룹으로부터 분변 샘플을 수집 하였다. 닭 배설물을 균질화하여 BGA 플레이트에 직접 도금하거나 농축 후 ST 변이 균주 또는 ST 야생형 균주의 오염도를 확인하였다. 따라서 ST 변이균주의 안전성은 닭으로의 경구 및 IM 경로를 통한 접종 시 ST 야생형 균주의 결과와 비교하여 평가 되었다. (n =12). ST 변이균주는 접종 후 수집 된 샘플에서 검출되지 않았지만 ST 야생형 균주는 접종 후 1 주일 동안 경구 접종 후 채취된 샘플에서 검출되었다.(7/12 마리). IM 접종 된 닭의 대변에는 ST 변이균주 나 야생형 균주에 대한 오염이 발견되지 않았으며 균주의 검출 여부는 혈청형 특이 프라이머를 사용하여 PCR로 확인했다 (표 1). 닭에서 ST 변이 균주 및 야생형균주의 회복은 ST 변이균주가 숙주 조직에서 1주일 내에 쉽게 제거되는 반면 야생형 균주는 21일 동안 지속됨을 보였다 (표 3).

표 3. Organ recovery of *Salmonella* Typhimurium the vaccine strain and the wild-type strain (n=2)

Treatment	Day 3		Day 7		Day 14		Day 21	
	Spleen	Liver	Spleen	Liver	Spleen	Liver	Spleen	Liver
ST VS O	2.728±0.017	2.985±0.051	2.626±0.065	2.894±0.019	-	-	-	-
ST VS IM	2.588±0.118	2.919±0.088	2.442±0.088	2.917±0.157	-	-	-	-
ST WT O	2.911±0.018	3.003±0.042	2.835±0.031	3.037±0.103	2.786±0.099	3.002±0.021	2.668±0.078	2.788±0.024
ST WT IM	2.984±0.063	3.217±0.096	2.803±0.032	3.048±0.032	2.702±0.042	2.849±0.060	2.413±0.129	2.757±0.020

또한, 본 연구에서는 백신 후보주 또는 야생형 균주 접종에 따른 설사와 사료 섭취 감소 또는 체중 감소 같은 감염 징후를 보이는 개체는 발견되지 않았다. 백신 후보 균주의 약독화 수준은 100MOI에서 감염 후 닭의 대식세포에서 관찰하였다. 20시간에 걸친 세포 내 생존과 대식세포에 대한 독성을 측정 하였으며 CFU 계수는 변이 균주인 JOL2377 (39.85%±1.09생존)에 비해 야생형ST인 JOL409 (62.6%±3.7생존)에서 상당히 높은 생존을 나타냈다. 게다가, 야생형 ST에서 나타나는 세포 독성은 감염 후 12 시간에 심각할 정도로 관찰된 반면, 변이 균주는 매우 적은 정도의 세포 독성을 나타냈다 (그림 2A, 2B).

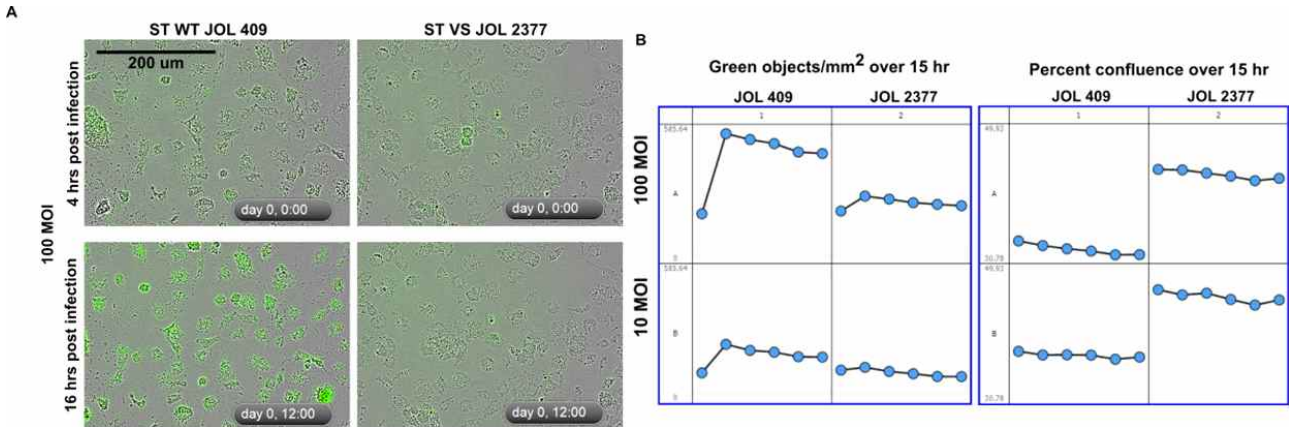


그림 2. Macrophage survival and cytotoxicity assay. (A) The level of attenuation and the persistence of ST VS JOL2377 was tested by macrophage survival assay. Chicken bone marrow-derived macrophage cells were infected at 10 and 100 MOI using ST VS and ST WT strain. The persistence of cells within macrophages was quantified after 24 hrs of post-infection. The cytotoxicity was enumerated using Cytotox green reagent by real-time observation in IncuCyte live imaging system. Micrographs depict images captured after 4hr and 16hrs post-infection. Scale bar represents 200 μm. (B) The increase in green objects per mm² and percent confluence were depicted.

이러한 결과로 ST 변이 균주인 JOL2377이 대식세포와 같은 항원 제시 세포에서 유의한 정도의 독성을 유발하지 않았으며 야생형 균주처럼 오랫동안 지속되지 않았음을 알 수 있다. 그러나, 균주에 감염된 대식세포에 의해 유도된 면역 조절 사이토카인은 야생형인 JOL409 균주보다 변이 균주인 JOL2377에서 더 높게 나타났는데, 이는 살모넬라 균주의 약독화로 인해 숙주의 면역 반응을 균주가 억제 할 수 없기 때문이다. (그림 3.)

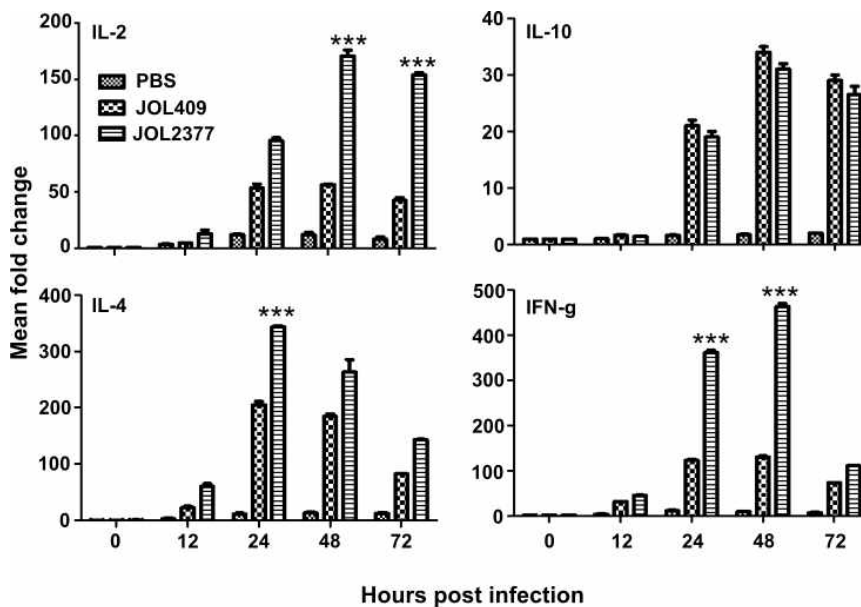


그림 3. Inflammatory cytokine induction. Induction of cytokines in bone marrow-derived macrophages was investigated, assessing for IL-2, IL-10, IL-4, and IFN-γ expression. Macrophage cells were seeded in 24 well plates and grown to the confluence and inoculated with ST wild type, ST mutant, and PBS. The expression profiles were investigated over three days. The $\Delta \Delta^{CT}$ values were calculated. Each value was normalized against PBS control. GAPDH was taken as the internal house control. *, demonstrate the significant difference at P<0.05 level of significance.

○ 림프조직에서 colonization 관찰

조류에서만 발견되는 Fabricius의 림프기관 율활낭은 B 세포 성숙과 항체 생산에 관여한다. ST 변이균주와 야생형 균주의 colonization능을 비교하기 위해, 닭(N=24, n=4)에 경구 및 근육 내 경로를 통해 각 균주를 접종 하였다. 감염 3일 후, 각 새의 Fabricius 림프기관 율활낭을 분리한 후 조직 병리학적 검사를 위해 토끼유래 살모넬라 특이 다중항체를 이용하여 면역 조직 화학 라벨링 한 후 HRP-Ab와 methyl green 대조 염색으로 검출하였다. 림프기관에서의 변이

균주와 야생형 살모넬라 균주를 비교 한 결과, 상당한 약독화에도 불구하고 변이균주와 야생형 균주가 림프 조직에 유사하게 존재한다는 것이 확인되었다. 차이는 크지 않았지만 근육 내 면역보다 경구 접종한 Fabricius의 bursa에서 ST 집락이 더 많이 관찰 되었다 (그림 4).

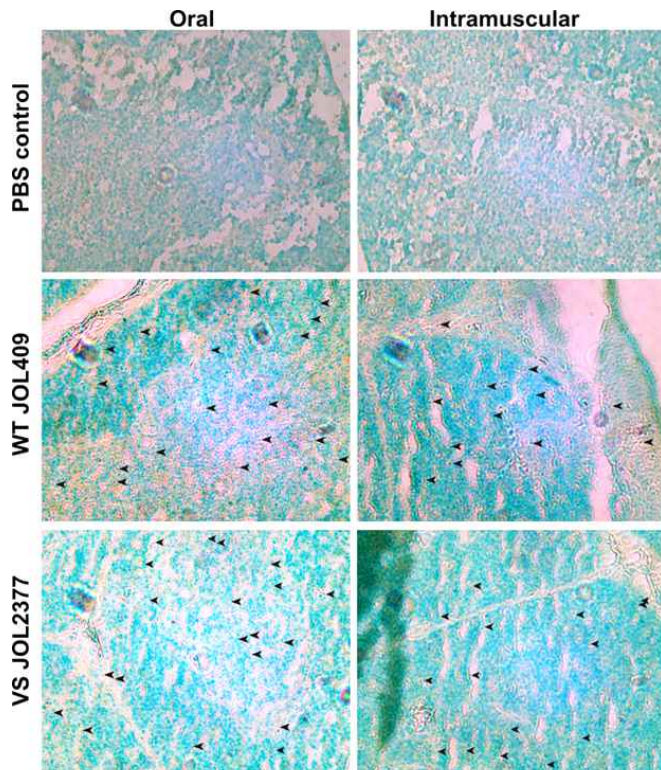


그림 4. Immunohistochemical observation of bursa of Fabricius. The arrival of ST VS (JOL2377) and ST WT (JOL409) strain into chicken lymphoid tissue bursa of Fabricius was investigated by using specific detection of ST within the tissue. *Salmonella* Typhimurium specific rabbit polyclonal antibodies were used as the primary antibody for IHC labeling, and the color development was achieved using HRP tagged IgG antibody.

○ 약독화 균주에 의한 전신성 및 체액성 면역반응 평가

경구 및 IM 경로를 통해 ST 변이균주 또는 야생형 균주로 면역화 된 닭에서 조류 항체의 아형링 IgY의 반응을 평가하였다. 경구 및 IM 경로로 접종된 그룹 모두에서 1차 면역화 2주후 ST 특이 IgY 반응의 현저한 증가를 보였다. 또한, IM 경로를 통한 추가 면역 후 경구면역화 그룹보다 ST 특이 IgY 반응이 더 높은 수준에서 증가함을 알 수 있다. ($P < 0.05$) (그림 5A).

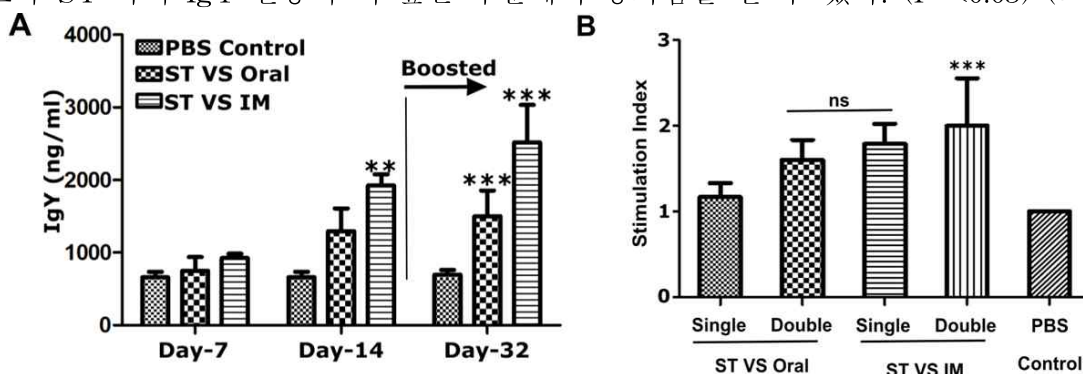


그림 5. Humoral and cellular immune responses (A) Humoral immune responses. The chicken was immunized with ST VS JOL2377 via oral or intramuscular routes at 1×10^8 CFU/bird and 1×10^7 CFU/bird, respectively ($n=12$). Booster immunizations were carried out at three weeks post-primary immunization. Blood serum was collected once a weeks. The development of IgY antibody responses was evaluated in indirect ELISA. *** indicates a significant difference against the PBS control group. The level of significance was determined at $P < 0.05$. (B) Peripheral blood mononuclear cell proliferation response. The chicken was immunized with ST VS JOL2377 via oral or intramuscular routes at 1×10^8 CFU/bird and 1×10^7 CFU/bird, respectively ($n=12$). Booster immunizations were carried out at three weeks post-primary immunization. A week after the booster immunization, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were harvested from immunized birds using the wing vein. Blood was collected into 1% EDTA anticoagulant containing vials. The PBMC was harvested following the standard Histopaque density separation procedure. Harvested cells were seeded at 1×10^5 cells/well in 96 well plates. After three days of incubation upon stimulation with *Salmonella* Typhimurium outer membrane proteins (500 ng/well), cell proliferative responses were assayed using MTT assay. *** demonstrates a significant difference. $P < 0.05$.

○ 말초혈액의 단핵 세포 증식 반응 평가

경구 및 IM 경로로 면역화 된 각 닭 그룹의 부스터 적용 후 PBMC를 2 주 동안 샘플링 하였다. 획득한 세포를 ST 외막 단백질로 다시 자극한 후 3 일 동안 배양 하여 MTT 기반 분석으로 세포 증식 반응을 평가 하였다. 경구 면역된 그룹보다 IM 접종 된 그룹에서 상당히 높은 증식 반응이 관찰되었다 ($P < 0.05$). 또한 IM으로 면역화 된 닭에서 부스터 적용 시 증식 반응이 특히 증가함을 알 수 있었지만 경구로 부스팅 된 닭에서는 관찰되지 않았다 (그림 5B). 모든 면역화 된 조류에서의 MTT 반응은 PBS 대조군보다 유의하게 높았다 ($P < 0.05$).

○ 약독화 균주에 의한 세포성 면역반응 평가

면역화에 의해 유도 된 T림프구 분화의 변화를 분석하기 위해 PBMC에서 T세포 마커인 CD3+CD4+ 및 CD3+CD8+에 대한 유세포 분석을 통해 조사하였다. 면역화후 부스팅한 닭으로부터 14일에 PBMC를 수확 하여 96웰 플레이트에 1×10^5 세포를 분주 한 후 3일 동안 ST omp 단백질로 재자극 하여 배양하였다. CD3+CD4+ 및 CD3+CD8+ 마커로 집단을 나누고 각 집단의 비율을 비교 평가 하였다 (그림 6A). PBS 대조군과 비교한 결과 경구 및 IM 접종군 모두에서 상당히 높은 CD4+ 및 CD8+ 의 분화가 관찰되었다($P < 0.05$). 또한 IM으로 면역화 된 그룹에서 구강으로 면역화 된 그룹에 비해 CD8+ 반응이 더 두드러지게 관찰되었다.

ST 특이적 사이토카인 활성 또한 IFN- γ 및 IL-4의 항원 특이 유도를 qRT-PCR을 사용하여 mRNA 레벨을 통해 확인하였다. 부스터 면역화 2주 후, PBMC를 각 닭 그룹에서 채취하고 ST의 omp로 자극 하였다. 24시간 배양 후 총 RNA를 추출하고 동일한 농도의 RNA를 사용하여 cDNA를 합성 하였다. 사이토카인 프로파일에서 IM으로 접종 된 닭 그룹에서 I형 사이토카

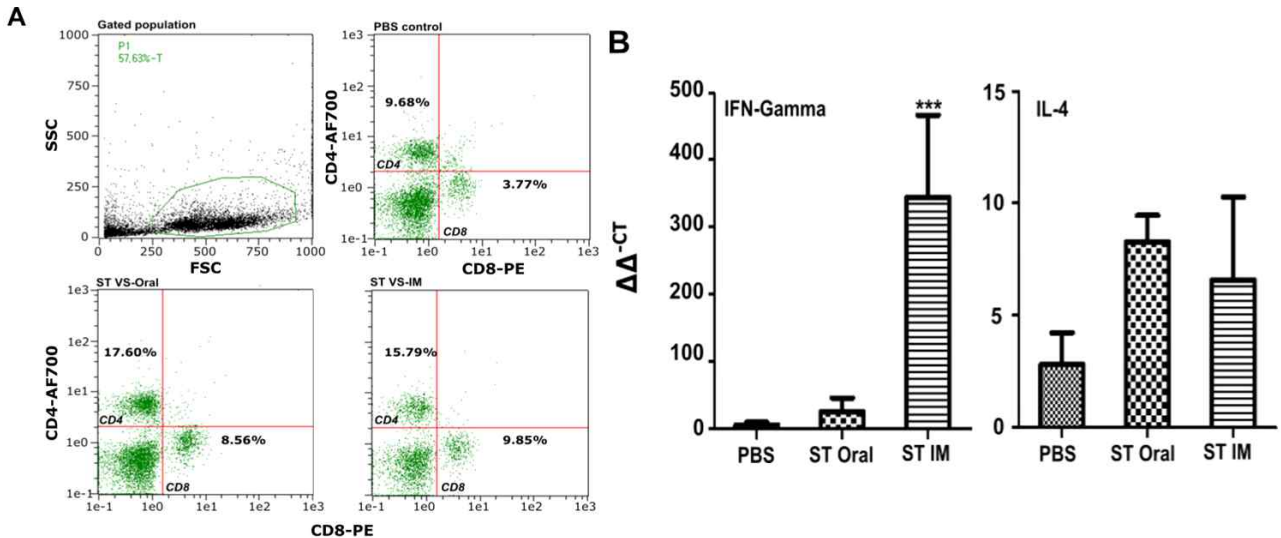


그림 6. T-cell and cytokine responses (A) Flow cytometry analysis of PBMC derived T-cells. The chicken was immunized with ST VS JOL2377 via oral or intramuscular routes at 1×10^8 CFU/bird and 1×10^7 CFU/bird, respectively ($n=12$). Booster immunizations were carried out at three weeks post-primary immunization. A week after the booster immunization, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were harvested from immunized birds using the wing vein ($n=5$). Blood was collected into 1% EDTA anticoagulant containing vials. The PBMC was harvested following the standard Histopaque density separation procedure. Harvested cells were seeded at 1×10^5 cells/well in 96 well plates. After three days of incubation upon stimulation with Salmonella Typhimurium outer membrane proteins (500 ng/well), cells expressing CD4+ and CD8+ were quantified using a flow cytometer. Each population of CD3+, CD3+CD4+ and CD3+CD8+ populations were determined. CD3+: FITC, CD4+: AF700, CD8+: PE antibodies were used. (B) Cytokine response. The chicken was immunized with ST VS JOL2377 via oral or intramuscular routes at 1×10^8 CFU/bird and 1×10^7 CFU/bird, respectively ($n=12$). Booster immunizations were carried out at three weeks post-primary immunization. A week after the booster immunization, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were harvested from immunized birds using the wing vein. Blood was collected into 1% EDTA anticoagulant containing vials. The PBMC was harvested following the standard Histopaque density separation procedure. Harvested cells were seeded at 1×10^6 cells/well in 24 well plates. After a day of incubation upon stimulation with Salmonella Typhimurium outer membrane proteins (500 ng/well), the total RNA was extracted, and cDNA was synthesized. RT-PCR was conducted to determine IFN- γ and IL-4 cytokine levels. The $\Delta\Delta^{-CT}$ values were calculated. Each value was normalized against PBS control. GAPDH was taken as the internal house control. *, demonstrate the significant difference at $P < 0.05$ level of significance.

인 IFN- γ 의 현저한 유도와 경구 및 IM 접종 그룹 모두에서 IL-4 사이토카인의 증가를 관찰하였다 (그림 6B).

○ 방어능 평가

ST 면역화에 따른 방어 효능은 변이 균주의 1차 접종 2주 후 그리고 부스터 접종 후 2주에 야생형 ST 균주인 JOL409로 도전감염접종 된 각 닭 그룹을 통해 확인하였다. 면역화 된 닭은 1×10^8 CFU의 JOL409를 경구 투여로 도전감염 하였다. 비장 및 간 조직에서의 잔여 야생형 박테리아를 확인 하였으며 가장 낮은 전신 감염은 부스터 적용 유무에 관계없이 IM 경로를 통해 면역화 된 그룹에서 관찰되어 그 효능에 있어서는 통계적으로 유의미한 차이를 보이지 않았다(그림 7A, 7B).

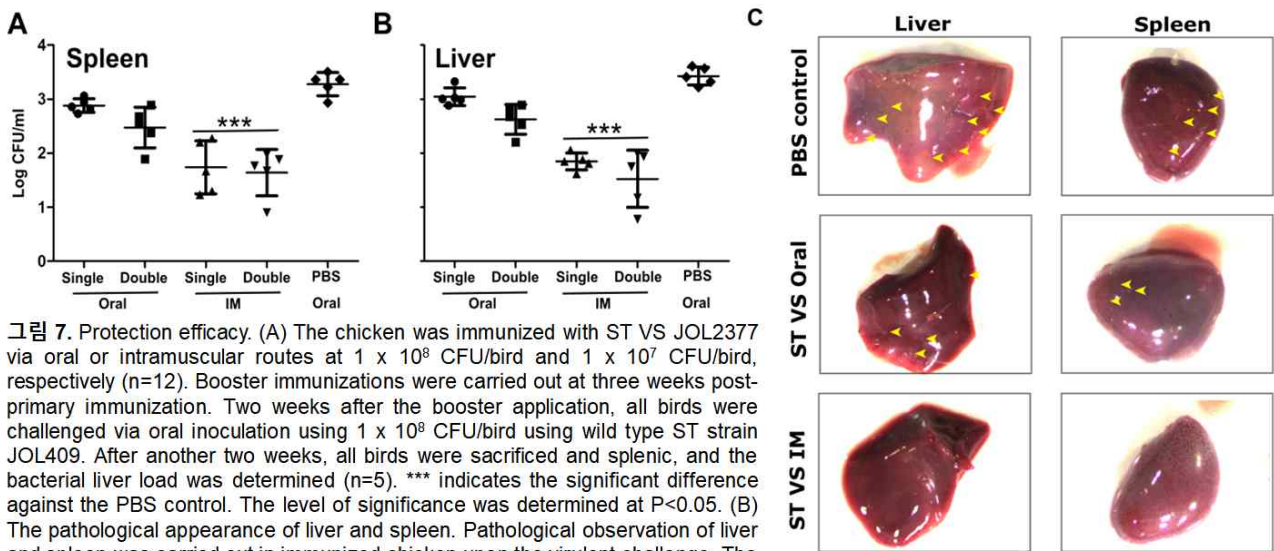


그림 7. Protection efficacy. (A) The chicken was immunized with ST VS JOL2377 via oral or intramuscular routes at 1×10^8 CFU/bird and 1×10^7 CFU/bird, respectively (n=12). Booster immunizations were carried out at three weeks post-primary immunization. Two weeks after the booster application, all birds were challenged via oral inoculation using 1×10^8 CFU/bird using wild type ST strain JOL409. After another two weeks, all birds were sacrificed and splenic, and the bacterial liver load was determined (n=5). *** indicates the significant difference against the PBS control. The level of significance was determined at $P < 0.05$. (B) The pathological appearance of liver and spleen. Pathological observation of liver and spleen was carried out in immunized chicken upon the virulent challenge. The yellow arrow indicates white color lesions resulting due to *Salmonella* infection. ST VS IM immunized group demonstrates significant protection against the oral challenge. The figure depicts representative images of the liver and spleen collected from the challenged chicken after sacrifice.

또한 야생형의 ST 감염으로 인한 닭의 사망은 발생하지 않았다. 또한, 비장 및 간 조직의 H&E 염색은 야생형 ST 도전감염 시 구강 면역화 된 닭에 비해 ST 돌연변이 IM 면역화 된 닭에서 향상된 방어 효과를 나타냈다(그림 8). ST에 의한 병변의 증감은 비장 및 간에서 병리학적으로 알 수 있으며 특히 IM으로 면역화 된 닭 그룹에서 백색 병변의 관찰결과 현저한 감소를 확인할 수 있다(그림 7C).

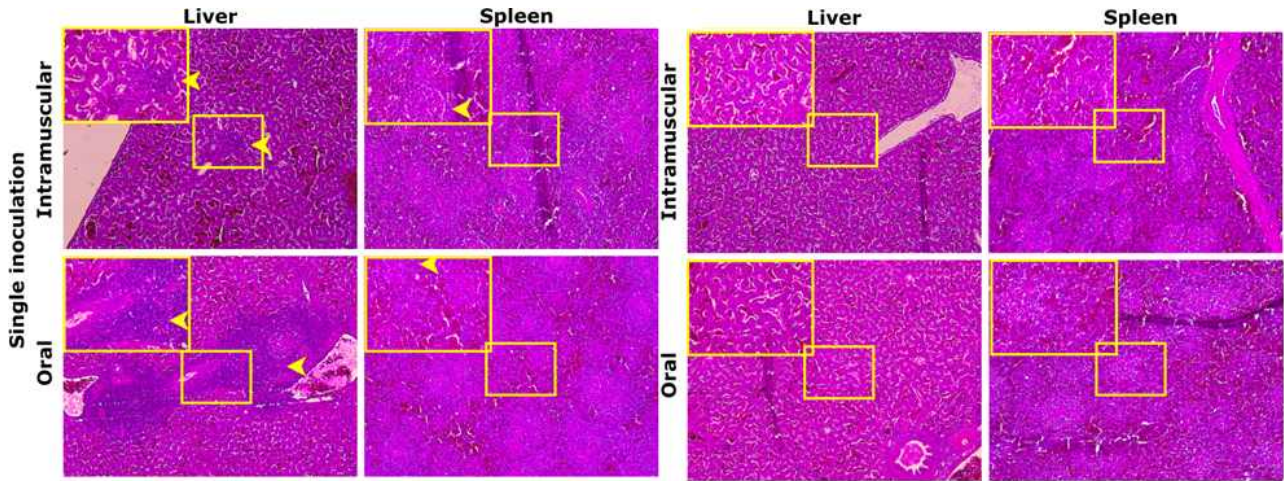


그림 8. Eosin and hematoxylin staining of spleen and liver tissues. Upon challenge of immunized chicken, all were sacrificed after two weeks of the challenge. Spleen and liver specimens were processed for H & E staining. Microscopic observation was conducted, and the images were taken at 100 x and subsectors at 400 x magnification under the bright field. The yellow arrow indicates the sites of profound inflammation

○ DIVA 감별 능력 평가

본 연구에서 개발된 ST 변이 균주인 JOL2377의 DIVA 감별 능력을 조사하기 위해 면역화된 닭 혈청에서 간접 ELISA를 사용하여 정제된 ST의 LPS로 재반응성을 확인하였다. ST 변이균주로 면역화했을 때 LPS 특이 항체에 대한 반응을 완전한 LPS 구조를 가지는 ST 야생형 균주이며 DIVA 대조균인 JOL911과 비교했다. LPS 특이 항체 반응은 부스터 적용 7일 후 채취된 혈청에서 측정하였으며, 경구 및 IM 경로를 통해 ST 변이균주를 접종 한 모든 닭 그룹에서 JOL911 균주를 IM으로 접종 한 그룹보다 현저히 낮은 LPS 특이 항체 반응을 나타냈다 (그림 9).

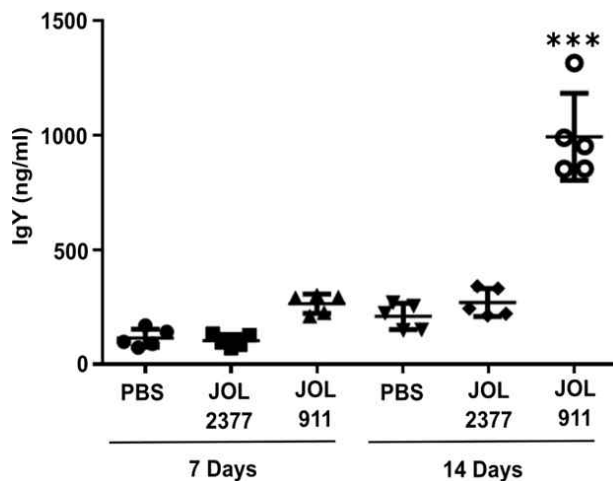


그림 9. DIVA ELISA. Development of *Salmonella* Typhimurium LPS specific antibody response was evaluated a week after the booster application. Purified LPS from ST VS JOL2377 and ST WT JOL409 was carried out and coated in ELISA plates at five $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration. Chicken serum was diluted at 1:50 and used as the primary antibody. HRP tagged anti-chicken IgG was utilized at 1:3000 dilution as the secondary antibody. Color development was achieved by adding OPD and observed at 492 nm wavelength. Each absorbance value was converted into antibody concentration and demonstrated as ng/ml. *** indicates the significant difference at $P < 0.05$.

● 결론

본 연구에서는 O-항원이 결핍된 약독화 *Salmonella* Typhimurium (ST) 균주 (JOL2377)를 개발하고 이에 대하여 안전성, 대식세포에서의 독성, 림프 조직으로의 침입성, 면역원성 및 면

역화된 닭에서 살모넬라 감염에 대한 방어효과를 평가했다. JOL237은 대식세포에 의해 탐식되었을 때 야생형 균주 보다 현저히 낮은 세포 독성과 높은 염증성 사이토카인 IL-2, IL-10, IL-4 및 IFN- γ 의 반응을 유도했다. 또한 대식세포나 닭의 장기에서는 지속적으로 관찰되지 않았으며 전신 감염 없이 빠르게 제거되었으며 살모넬라를 대변을 통해 외부 환경으로 분비하지 않는 것을 확인하였다. 그리고 JOL2377은 비장 및 간 도달하여 효율적인 항원 제시 및 면역유도를 자극하여 점막 및 비경구 면역을 통해 비면역 대조군 보다 말초혈액의 단핵 세포 증식, 사이토 카인 유도, T 세포 반응 등의 항원 특이 체액성(IgY) 및 세포성 면역을 유의한 수준으로 유도하였다. 더욱이, JOL2377은 LPS 구조로부터 면역 원성 O-항원 성분이 억제 되었기 때문에 야생형 균주에 비해 LPS 특이적 항체를 생성하지 않았다. 도전 감염시, 경로에 따른 효능의 차이는 야생형 균주의 비장 및 간에서 콜로니화 감소에 따라 근육 내 경로 투여시 효과적인 방어가 이루어짐을 보였다. 따라서 병원성 살모넬라에 대항하여 낮은 세포 독성, 우수한 면역원성 그리고 체액성 및 IFN- γ 매개 CMI 반응 모두에 효과적으로 관여함에 따라 숙주 면역 조절에 이상적인 수단임을 제시할 수 있다.

3. TLR-5 유래 면역 반응을 활성화 하는 flagellin이 발현되는 살모넬라증 방어 가능한 살모넬라 엔테리티디스 고스트 시스템

● 배경

비위생적 환경과 의료 시설의 개선에도 불구하고 살모넬라증은 전 세계적으로 인간과 동물에게 가장 흔한 식중독 질병 중 하나로 남아 있다. 전 세계적으로 알려진 다양한 오염 경로 중 에서 살모넬라의 인간 획득 주요 원인으로 가금류가 여전히 상위 후보인 이유는 육류 산업 때문이다. 여기에서 살모넬라 엔테리티디스(SE)는 인간에 감염시 질병을 일으키는 두 가지 주요 원인 중 하나이다. 가금류와 같은 동물로부터 살모넬라 오염의 노출을 보호하기 위해 동물 예방 접종은 가장 신뢰할 수 있는 예방 수단이다. 살모넬라 감염에 대한 면역력을 높이고 식량 생산 흐름을 통해 병원체가 인간 사회로 더 확산되는 것을 방지 할 것으로 예상된다. 다양한 예방접종 전략 중 하나인 불활화 백신 개발 전략은 숙주에서 성공적인 면역 활성을 위해 고스트 시스템으로 다양한 항원을 전달할 수 있다. 이는 살아있지 않은 세포이기에 생백신 보다 훨씬 안전하다는 이점이 있다. 또한 고스트 백신시스템의 효과를 증가 시킬 수 있도록 표면에 fliC를 표시함으로써 숙주 면역계에 의해 쉽게 인식 될 수 있으며 전 염증 반응을 유도하고 숙주 면역계를 자극하여 세균 감염을 제거하는 TLR-5 매개 신호 전달 경로를 활성화 할 수 있다. 박테리아 편모가 세포 부착에 관여하기 때문에, 세포 표면에 편모가 존재하면 항원 흡수와 항원 제시 세포로의 제시가 촉진되어 강력한 면역 반응을 촉진한다. 따라서 pJHL184고스트 플라스미드에 λ Pr 온도 민감성 프로모터를 설치하여 온도에 따른 유전자 발현 조절이 가능하게 한다. Salmonella Typhimurium의 fliC를 λ Pr 온도 유도성 프로모터의 하류에 배치하여 42 °C로 온도를 상승시켜 용해 E유전자와 면역보조제로써의 fliC가 동시에 발현할 수 있도록 한다. 표면에 표시된 fliC는 숙주 면역계에 의해 쉽게 인식 될 수 있으며 전 염증 반응을 유도하고 숙주 면역계를 자극하여 세균 감염을 제거하는 TLR-5 매개 신호 전달 경로를 활성화 할 수 있다. 또한 박테리아 편모가 세포 부착에 관여하기 때문에 세포 표면에 편모가 존재하면 항원 흡수와 항원 제시 세포로의 제시가 촉진되어 강력한 면역 반응을 촉진한다.

● 세부방법

○ 박테리아 균주, 프라이머 및 플라스미드 정보

본 연구에 사용된 박테리아 균주, 플라스미드 및 프라이머는 (표 1)에 나열되어 있다. 모든 박테리아 균주는 Lauria Bertani (LB; BD, Sparks, USA) 배지 또는 또는 Brilliant Green Agar (BGA; BD, BD, USA, Sparks)배지를 이용하여 배양하였다. 일반적으로 37°C 조건에서 교반 하였으며 고스트 플라스미드를 보유하는 균주는 L-arabinose 존재하에 30°C 조건에서 배양하였다. 제작된 모든 박테리아는 장기간 보관하기 위해 30% 글리세롤을 첨가한 후 -80°C에 보관 하였다.

표 1. Bacterial strains, plasmids, and primers used in this study

Strain/Plasmid	Description	Reference
/Primers		
Strains		
X232	<i>E. coli</i> Δasd mutant strain	Lab stock
JOL1087	<i>Salmonella</i> Enteritidis mutant ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$)	This study
JOL860	<i>Salmonella</i> Enteritidis challenge strain - wild-type	Lab stock
JOL2435	<i>Salmonella</i> Enteritidis Ghost184:: <i>fliC</i> ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$)	This study
JOL2436	<i>Salmonella</i> Enteritidis Ghost184 vector control	This study
JOL1940	<i>E. coli</i> DH5a hosting pET28a:: <i>fliC</i> (<i>Salmonella</i> Typhimurium)	Lab stock
JOL1991	<i>E. coli</i> BL21-DE, expression strain for pET28a:: <i>fliC</i>	Lab stock
Plasmids		
pJHL184	An <i>asd</i> ⁺ vector, pBR ori plasmid carrying <i>ss ompA/His6</i> , multiple cloning site, <i>ncI857/λPR</i> promoter, <i>araC ParaBAD</i> , <i>phiX174</i> lysis gene E	Lab stock
pJHL184:: <i>fliC</i>	pJHL814 harboring <i>S. Typhimurium fliC</i>	Lab stock

○ E용해 유전자 발현 고스트 벡터 제작

고스트 플라스미드는 수렴 프로모터 구조를 가지고 있으며, E lysis 유전자는 온도에 의해 유도되는 CI857프로모터와 역방향 ParaBAD 프로모터를 갖는 λPR 사이에 위치한다.

면역 보조 단백질인 *Salmonella Typhimurium fliC*는 PCR로 증폭되고 EcoRI 및 HindIII 제한 효소 부위를 사용하여 pJHL184 플라스미드 벡터의 다중 클로닝 부위 (MCS)로 서브 클로닝 되었다. 플라스미드 구축물은 이후 SE 변이 균주인 JOL1087 ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$)로 형질 전환 되었고 새로운 균주는 JOL2435로 명명되어 본 연구에 사용되었다.

살모넬라 고스트화를 위해 JOL2435는 30°C에서 20mM arabinose 존재 하에 배양되었다. 600nm파장 (OD600)에서 광학 밀도가 약 0.4-0.6에 도달하면 세포를 원심 분리하고 세포를 PBS로 세척 한 다음 LB배지에 접종하여 42°C에서 24시간 동안 arabinose없이 배양하였다. SE 고스트에서 *fliC* 단백질의 발현은 *fliC* 특이 토끼유래 다중항체를 사용하여 western blot분석으로 확인하였다.

○ 용해능 평가

살모넬라 용해작용으로 고스트 용해능을 평가하기 위해 고스트 균주 JOL2435 및 고스트 플라스미드가 없는 야생형 균주를 20mM L-arabinose 첨가 후 30°C에서 배양하였다. OD600 값이 0.6이 되면 원심 분리로 세포를 모으고 PBS로 두 번 세척 한 다음 LB 배지에 재현탁하고

42°C에서 배양하였다. 이후, Brilliant Green Agar (BGA)에 도말하여 살아있는 세포 수의 감소를 평가했다.

○ 동물모델을 이용한 면역화 및 도전감염

1일령 nick layer hens 암탉(N=60, n=15)은 한국 공동 부화장에서 구입하여 생후 1개월이 될 때까지 식량과 물을 자유롭게 공급 하였다. 동물 실험 및 동물 보호법 2007: 제13조(동물 실험)의 지침에 따라 전북 대학교 (CBNU-2018-00264)의 승인을 받았다 닭을 4개의 그룹으로 나누고 A:JOL2435(pJHL184::fliC), B:JOL2436 (pJHL184 벡터 단독), C:PBS 대조군 및 D:naïve 대조군으로 마리당 1×10^8 CFU로 근육 내 면역화 했다.(표 2.)

표 2. Protection efficacy of SE ghost immunization

Group	Spleen		Liver		Spleen		Liver	
	Positive	No.	Positive	No.	Log	CFU/g	Log	CFU/g
SE ghost fliC	0/8		0/8		-		-	
SE ghost vector	2/8		1/8		2.49±0.2		3.04	
PBS	4/8		1/8		2.65±0.1		2.45	
Naïve	0/8		0/8		-		-	

1차 접종 후 3주에 부스터 면역화를 수행 하였다. 혈청 내 IgY 반응을 측정하기 위해 1차 접종 7일, 14일 및 35일에 혈액 및 혈청을 채취 및 분리하였다. 부스터 적용 일주일 후, PBMC 증식 분석 및 FACS (형광 보조 세포 분류) 분석을 위해 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 분리 했다. 2주간의 부스팅 후, 모든 그룹은 SE 야생형인 JOL860 을 2×10^6 CFU로 근육 내 주사로 도전감염 하였다. 모든 닭들은 질병의 증상을 관찰하기 위해 지속적으로 모니터링 하였다. 또한 도전감염 2주 후 비장 및 간 샘플을 무균으로 수집하고 3ml의 펩톤용액으로 균질화 시켰다. 100µl의 균질액을 BGA에 도말하였다. 생성된 콜로니의 수를 계수하고 평균 \log_{10} CFU/ml로 표시했다. 동시에, 농축을 위해 1ml의 균질액을 9ml의 RV(Rappaport Vassiliadis) 배양액에 접종하였다. 감염된 닭에서 채취 한 조직 표본은 H&E염색을 통해 조직 병리학적 검사를 수행하였다.

○ 체액성 면역반응

면역화 된 닭의 체액성 면역 반응 평가는 면역 후 7일, 14일 및 35일에 혈청 IgY 반응을 측정하여 평가 하였다. SE의 정제된 외막 단백질(Omps)에 대한 항체 반응성을 측정 하였다. ELISA 플레이트를 0.5M Na₂CO₃/NaHCO₃ 코팅 완충액에 포함된 500ng의 Omps로 4°C에서 코팅했다. 플레이트를 1xPBS로 3회 세척하고 실온에서 1시간 동안 5% Bovine Serum Albumin으로 blocking했다. 혈청 샘플을 1:50 비율로 희석하고 37°C에서 2시간 동안 반응했다. 플레이트를 다시 1xPBS로 3회 세척하고 1시간 동안 1:3000 희석배율로 anti-chicken IgY 항체와 함께 배양 하였다. 색의 변화를 o-phenylenediamine dihydrochloride 기질을 사용하여 최종 항체 역가는 492nm에서 흡광도 측정으로 정제된 마우스 면역 글로불린의 표준 곡선을 사용하여 결정되었다. fliC 특이 항체 반응 또한 정제 된 fliC 단백질 및 토끼유래 다클론 항체를 사용하여 평가되었다.

○ 세포성 면역반응

항원 자극에 대한 CMI 반응은 PBMC 증식으로 평가되었다. 세포 수의 증가는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 분석으로 정량하였다. 부스터 면역화 1주 후, PBMC를 전혈에서 분리하고 5%FBS를 함유하는 RPMI로 1×10^5 세포수로 96 플레이트에 배양하였다. 정제된 살모넬라 외막 단백질 (Omp, $400 \mu\text{g}/\text{mL}$)로 자극 한 후, 세포를 5% CO_2 배양기에서 72시간 동안 37°C 에서 배양했다. 생성된 포르마잔 산물은 570nm 에서 흡광도를 측정하여 측정하였다. 또한, T세포 집단의 분화는 anti-mouse CD3a-PE, CD8-FITC, and anti-mouse CD4-perCP-vio700 antibodies 항체(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 얼음에서 30분 동안 염색한다. 분석은 MacsQuant 소프트웨어를 사용하여 CD3+와 CD3+CD4+ 및 CD3+CD8+ 집단을 게이팅하여 수행하였다.

○ TLR5 유도반응

fliC항원은 진핵세포에서 TLR5 신호 전달의 작용제로 역할을 한다. fliC를 발현하는 SE고스트 균주에 의해 닭 PBMC에서 TLR5 발현이 유도될 수 있는지 조사하기 위해, 세포를 JOL2435(184::fliC고스트) 및 JOL2436(184고스트 벡터 단독)로 반응하였다. PBMC를 Histopaque 밀도 구배 원심 분리에 의해 분리하고 10%FBS가 첨가된 RPMI 배지로 웰당 1×10^6 세포 수로 분주했다. PBMC는 100 MOI로 4시간 동안 박테리아 고스트 균주와 반응시켰다. Total RNA는 GenAll R (HybriR, GenAll, Songpa-gu, Seoul, Korea) RNA 분리 키트를 사용하여 분리하였다. 분리 직후 Toyobo cDNA 합성 키트를 사용하여 총 RNA를 cDNA로 합성하였고 mRNA 수준에서 TLR5의 발현을 qRT-PCR (Applied Biosystems)로 정량화하였다.

● 결과

○ E용해 유전자 발현 고스트 플라스미드제작 및 *Salmonella* Enteritidis 균주에서의 특성 확인

제작된 플라스미드가 형질전환 된 숙주박테리아에서 일어나는 온도 의존적 용해는 L-arabinose의 존재 유무하에 유전자 E의 안티센스 mRNA를 코딩하는 cI857 억제유전자 및 paraBAD-araC 요소를 사용하여 효과적으로 조절할 수 있다. 따라서 42°C 에서 36시간 배양한 후, 세포의 완전한 용해를 관찰 할 수 있고 fliC 항원의 동시 발현은 웨스턴 블롯 분석을 통해 52kDa 밴드로 확인할 수 있다(그림 1).

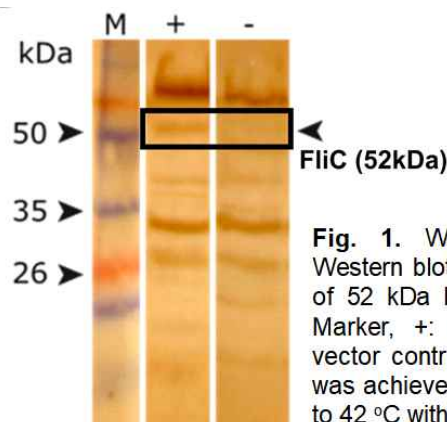


Fig. 1. Western blot assay (A) Western blot of FliC. The expression of 52 kDa FliC is demonstrated. M: Marker, +: ghost184::fliC, -: ghost vector control. The ghost generation was achieved by temperature up-shift to 42°C without adding arabinose.

○ 면역화 닭에서의 IgY항체 반응 평가

fliC발현 고스트 백신 균주로 면역화 된 닭에서의 전신 항체 반응은 1차 면역 후 7일, 14일 및 35일에 채취 된 혈청으로 평가하였다. 1차 접종 3주 후에 부스팅을 하였다. IgY 항체 반응은 JOL2435 고스트 균주(pJHL184::fliC)로 1차 면역화 5 주에 최고조에 달했다. 또한 고스트 균주만 면역화 된 닭은 프라이밍 둘째 주까지 PBS 대조군보다 상당히 높은 IgY 반응을 나타냈다. 그러나 이 반응은 2주 후에 정제되었으며 1차 면역 후 35일차 혈청에서의 IgY 반응에서는 유의한 증가가 관찰되지 않았다 (그림 2A).

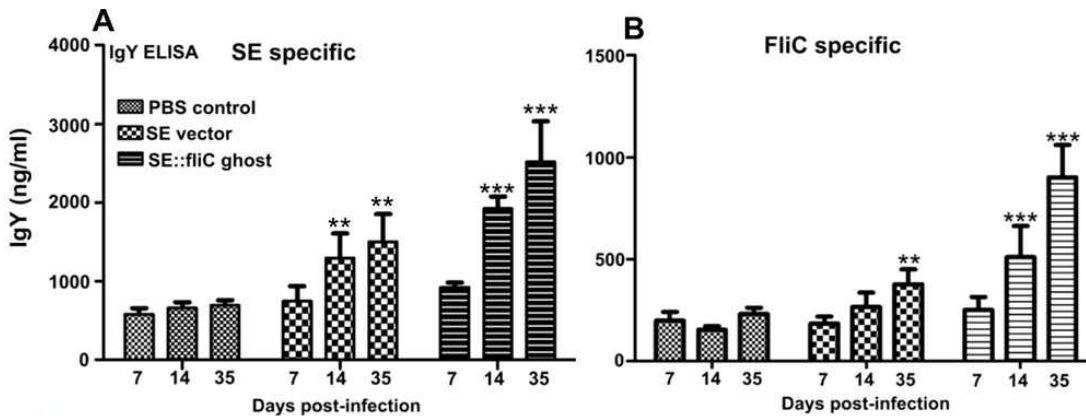


그림. 2. Humoral immune responses. (A) One-month-old chicken (n=15) was immunized with ghost184:: fliC, ghost vector alone, or PBS. Boosting was conducted after three weeks of primary inoculation. Serum samples were collected on a weekly interval. The IgY antibody concentrations were determined against ST outer membrane proteins by indirect ELISA. ** indicates a significant difference at P<0.05 level. (B) Development of FliC specific antibodies. One-month-old chicken (n=15) were immunized with ghost184:: fliC, ghost alone, or PBS. Boosting was conducted after two weeks of primary inoculation. The serum was collected on a weekly interval. FliC specific antibody titer was determined against fliC purified protein in indirect ELISA. ** indicates a significant difference at P<0.05.

○ 면역화 닭에서의 IgY항체 반응 평가

막 고정 된 ST fliC 항원에 의해 발휘되는 면역 증강 보조 효과는 1차 면역 후 7일, 14일 및 35일에 채취 된 혈청으로 IgY 항체 반응 활성을 통해 확인하였다. 부스팅은 1차 접종 후 3주에 수행하였다. 혈청 항체 반응성은 ELISA 플레이트에 코팅된 정제된 ST fliC 단백질에 대해 측정하였으며 결과적으로 1차 면역화 14일째에 벡터 단독 그룹 (JOL2436)보다 JOL2435로 면역화 된 닭에서 fliC 특이 항체 반응이 점진적으로 증가했음을 확인할 수 있다. 또한 증가된 IgY항체의 최고점은 부스터 면역 후 관찰 된다(그림 2B).

○ 비장세포 분화능 측정

항원 특이 세포 증식 반응은 각 그룹 채취된 PBMC로 확인하였으며 이는 SE 항원으로 재자극 하였다. PBMC를 96웰 플레이트에 1×10^5 CFU로 분주하고 72시간 동안 SE 외막 단백질로 자극 하였다. 배양 후, MTT분석을 사용하여 세포 증식 반응을 측정 하였다. 그 결과, 벡터 단독 대조군과 비교하여 JOL2435로 면역화 된 닭의 PBMC에서 항원 재자극에 따른 유의한 수준의 증식반응을 보였다 (그림 3A).

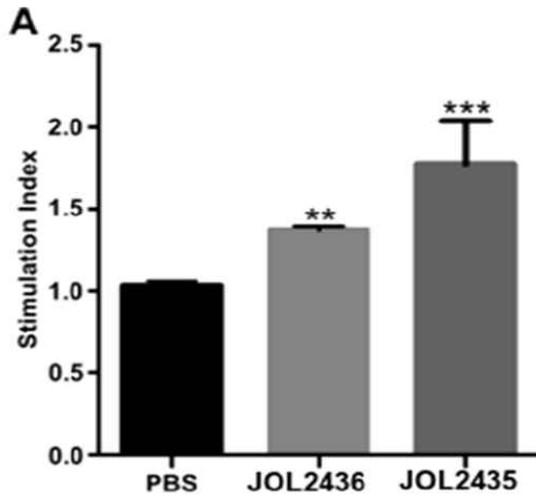


그림 3. Cell-mediated immune responses and assay for T-cell populations. (A) PBMC proliferation assay. Blood serum from immunized birds was collected a week after the booster immunization (n=5). The PBMC was separated using the Histopaque density separation method. Harvested cells were seeded in 96 well plates at 1×10^5 CFU/well and stimulated with *S. Typhimurium* outer membrane proteins. After three days of incubation, cell proliferative response was determined by MTT assay. * indicates the significant difference with the PBS control. $P < 0.05$.

○ 면역화에 따른 세포성 면역 반응 평가

고스트 백신 균주의 면역화에 의해 유도된 T세포 반응은 추가 면역화 일주일 후 채취된 PBMC를 통해 관찰하였다. PBMC를 SE 외막 단백질로 72시간 동안 자극하고 T세포 반응의 변화를 유세포 분석으로 평가 하였다. CD3+CD4+ 및 CD3+CD8+ T세포 집단의 유의한 증가는 JOL2435 및 JOL2436 백신 단독 박테리아 고스트으로 면역화 된 그룹에서 관찰되었지만, JOL2435에 면역화 된 그룹에서 CD8+ T세포의 현저한 증가를 확인할 수 있다($P < 0.05$) (그림 3B).

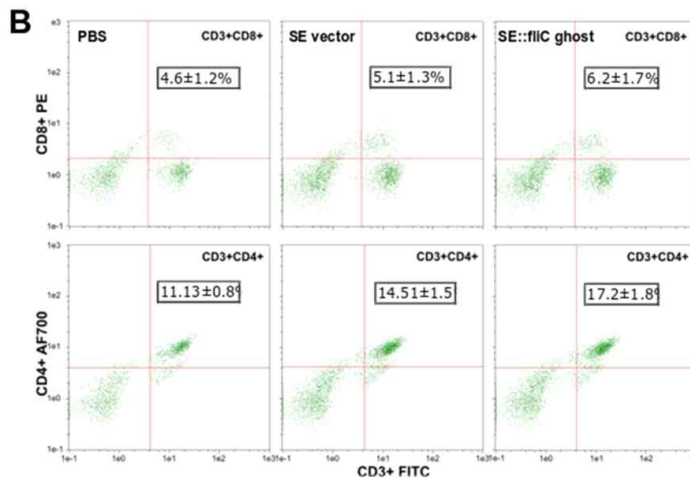


그림 3. Cell-mediated immune responses and assay for T-cell populations. (B) Flow cytometry analysis of CD4+ and CD8+ T-cell populations. The PBMC collected on post booster application was seeded and stimulated, as mentioned (n=5). After three days of stimulation, cells were labeled with CD3+: FITC, CD4+: AF 700, CD8+: PE antibodies. Each cell population was quantified using the MacsQuant flow cytometer system. *** indicates a significant increase compared to the PBS control. The level of significance was determined at $P < 0.05$ level.

○ 면역화에 따른 사이토카인 유도 평가

닭에서 고스트 백신의 면역화에 관여하는 I형 및 II형 면역 반응의 정도를 평가하고자 특이 항원 단백질로 자극된 닭 PBMC를 사용하여 IFN- γ 및 IL-4 수준의 발현 수준을 평가하였다. 분리된 PBMC에 항원 재자극후, mRNA 유전자 발현을 qRT-PCR로 확인한 결과, PBS로 면역화 된 닭과 비교하여 고스트 백신 균주로 면역화 했을 때 IFN- γ 의 유도 및 약간 높은 IL-4 유도가 유의하게 나타난 것을 알 수 있다. 또한 SR 백신 단독 그룹은 PBS 그룹에 비해 상당히 높은 IFN- γ 반응을 유도한다. 따라서 JOL2435를 사용한 면역화에 따른 사이토카인의 활성이 유도됨에 I형 및 II형 면역 반응을 모두 활성화한다는 것을 나타낸다 (그림 4A).

○ 고스트화에 따른 TLR5 반응 유도 확인

flagellin은 진핵 세포에서 TLR5 수용체의 잠재적인 작용제 역할을 한다. 박테리아고스트 균주와의 상호 작용에 따른 TLR5 발현 수준을 평가하기 위해, JOL2435 및 JOL2436 (벡터 단독) 과의 상호 작용 후 닭 PBMC 및 인간 결장암 세포 HT29를 연구했다. 면역화 된 닭으로부터 얻은 PBMC를 사용하여 박테리아 고스트로 자극 한 후, TLR5의 발현 수준을 mRNA 수준에서 평가하였고 인간 결장암 세포주인 HT29를 사용하여 표면상 발현을 측정하였다. 그 결과 fliC 항원을 발현하는 고스트 균주로 처리된 세포에서 눈에 띄게 높은 수준의 반응으로 TLR5 발현을 활성화하는 것을 관찰했다 (그림 4B).

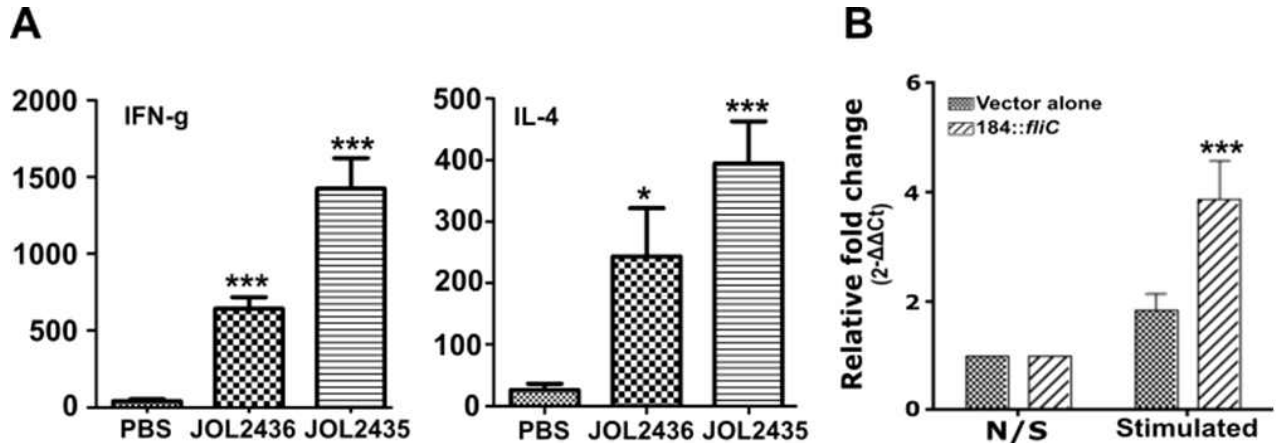


그림. 4. Cytokine responses. The PBMC from immunized chicken groups were harvested a week after the booster application (n=8). The separated PBMC was then seeded in 24 well plates at 1×10^6 cells/well. Cells were stimulated with SE outer membrane proteins for 24 hrs. The total RNA was extracted, and cDNA was synthesized. (A) The expression of IFN- γ and IL-4 cytokine levels were quantified using qRT-PCR. The expression levels were normalized against the GAPDH gene. $\Delta\Delta^{-CT}$ values were determined. *** indicates the significant difference against the PBS control. The level of significance was determined at $P < 0.05$ level. (B) The PBMC from two months old chicken were harvested (n=8). The separated PBMC was then seeded in 24 well plates at 1×10^6 cells/well. Cells were stimulated with SE::pJHL184:: fliC ghosts, vector alone ghosts, or PBS for four hours. The total RNA was extracted, and cDNA was synthesized. The expression of TLR-5 levels was quantified using qRT-PCR. The expression levels were normalized against the GAPDH gene. $\Delta\Delta^{-CT}$ values were determined. *** indicates the significant difference against the PBS control. The level of significance was determined at $P < 0.05$ level.

○ 면역화에 따른 방어능 확인

면역화 된 닭에서의 방어능은 도전감염 된 닭의 생존 수와 비장과 간에 잔존하는 세균수를 측정함으로써 평가하였다. 닭 중 어느 것도 JOL2435 fliC 발현 고스트 박테리아로 면역화 된 닭에서는 야생형의 박테리아가 관찰되지 않은 반면, 벡터 대조군 일부에서는 야생형의 균주가 간과 비장 내에서 존재함을 알 수 있다.(표 2). H&E 염색으로 도전감염에 의한 간과 비장 조직절편에서 염증 반응 정도의 차이를 평가한 결과 고스트 벡터 또는 PBS 대조군 보다 JOL2435로 면역화 된 닭에서 분리한 간 조직에서 강력한 방어 효과를 관찰 할 수 있었다.비장에서는 벡터 대조군 및 SE 고스트 균주로 면역화한 그룹보다 PBS 접종 그룹에서 적색 펄프 영역의 상당한 확장과 대식세포의 심한 침윤을 관찰 할 수 있었다 (그림 5).

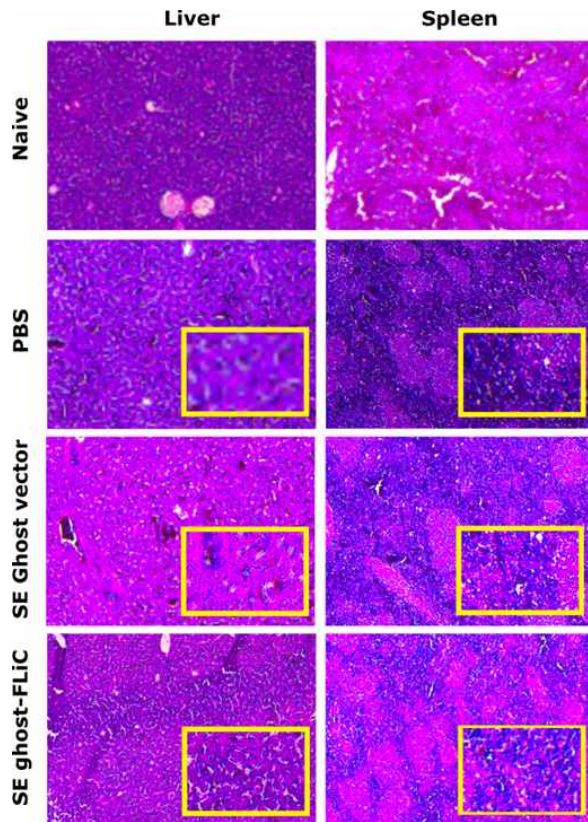


그림. 5. Histopathological examination. Spleen and liver specimens were collected from chicken two weeks after the SE wild type challenge. Tissue specimens were fixed in 10% formaldehyde and processed for paraffin embedding and sectioning (5 μ m thick sections). Specimens were stained with eosin and hematoxylin and observed for pathological alterations observing under the bright field of a microscope (Leica, Germany). The yellow arrow indicates the areas of profound inflammation marked with heavy macrophage infiltration. In spleen sections, expanded and diffused red pulp also visible compared to the PBS control group.

● 결론

본 연구는 닭 살모넬라증에 대하여 표면에 fliC가 제시된 Salmonella Enteritidis 고스트 균주의 향상된 면역원성과 방어 효능을 조사하였다. 살모넬라 막에 고정된 fliC는 TLR-5의 작용제로 고스트 백신 후보에 필수적인 면역 보조제 역할을 한다. 본 연구에서 사용된 고스트 플라스미드 pJHL184는 파지 용해 유전자 E와 표적 항원인 fliC의 온도 의존적 유도가 동시에 가능하도록 이중 프로모터 시스템으로 구성되어 있다. fliC를 발현하는 SE 고스트 백신 균주를 1개월령 닭에 근육 접종을 통해 면역화를 관찰했을 때 음성 대조군 대비 상당히 높은 IgY 항체 및 세포 매개 면역 반응을 유도했으며 특히 높은 CD8+반응을 보였다. 또한, 말초 혈액에서 유래된 CD3+CD4+ 및 CD3+CD8+T 세포 집단은 PBS 대조군 대비 유의한 증가를 보였다. 도전 감염시, 고스트 백신주로 면역화 된 닭이 도전감염 2주 후 비장과 간에서 병변을 보이지 않아 SE 야생형 감염으로의 방어 효과를 보였다. 결과적으로, SE 유령에서 편모의 발현이 항원 특이적 체액성 및 세포 매개 면역 반응을 향상시키고, 면역화 된 닭에서 야생형 SE의 공격에 대한 방어 효능을 향상시켜 가금류 산업에서 살모넬라증의 제어를 위한 SE 고스트 백신 후보로의 가능성을 입증할 수 있다.

4. 닭의 살모넬라증 방어를 위해 *rfaL* 제거된 살모넬라 엔테리티디스 약독화 생백신 시스템

○ 배경

세균성 병원균인 살모넬라 엔테리카는 전 세계적으로 위장 질환과 관련이 있으며 매년 약 9380만 건 발생한다. 이러한 감염 중 전체의 약 86%가 식인성 질환으로 인한 것이며 인간 감염되어 가장 널리 퍼진 살모넬라 혈청형은 *Salmonella* Typhimurium(ST)과 *Salmonella* Enteritidis(SE)이다. 감염을 예방하기 위한 수단 중 하나인 약독화 생백신은 살모넬라 감염을 제거하는데 필수적인 체액성 및 세포 매개성 면역 반응을 모두 자극하는 이점이 있다. 살모넬라 균주의 약독화는 화학적 돌연변이 유발, 대사 드리프트 돌연변이 또는 독성 유전자를 제거하는 유전 조작 기술을 통해 이루어진다. 다양한 수준의 약독화에도 불구하고 생백신은 여전히 잔존하는 독성과 선재성 면역 등에 의해 제거될 수 있는 문제가 남아있다. 따라서 효과적인 약독화 생백신을 위해 선택된 균주는 고도로 약독화 되면서 효율적인 항원 제시를 위한 침습작용이 완전히 이루어져야 한다. 본 연구에서 사용된 SE 균주는 3개의 독성 관련 유전자인 *lon*, *cpxR* 및 *rfaL*의 결실을 통해 약독화가 이루어진다. 박테리아의 *cpxA/cpxR*은 주변 세포질 스트레스, 단백질 이상, 내부막 파괴 및 과도한 삼투압을 조절하는 시스템이며 *cpxA*는 자가 산화를 통해 *cpxR* 유전자를 활성화 한다. 이러한 *cpxR*은 외피 스트레스 반응 시스템, pore 조립, III형 분비 시스템 등을 조절한다. 또한 LPS의 생합성에 관여하는 *rfaL*을 SE의 *lon*, *cpxR*와 함께 삭제함으로써 SE 표면에서 1차 항원으로 작용하는 O항원을 제거함에 따라 보체 매개 사멸에 대한 민감성이 가속화되며 박테리아의 약독화가 가능해진다. 그리고 O 항원 결핍 살모넬라 균주에 대한 수지상 세포(DC) 발현이 증가하고 이로 인해 빠른 제거가 이루어질 수 있다. 본 연구를 통해 가장 적합한 모델인 닭을 이용하여 환경 및 숙주에서의 안전성, 점막 및 비경구 경로투여 시 의존성 면역원성 및 보호 효능을 연구 하였다.

● 세부방법

○ 박테리아 균주, 플라스미드 프라이머 그리고 유전자 변이 정보

실험에 사용된 박테리아 균주, 플라스미드 및 프라이머는 (표1)에 나열되어 있다. 모든 박테리아 균주는 Lauria Bertani (LB; BD, Sparks, USA) 배지 또는 Brilliant Green Agar (BGA : BD, Sparks, USA)로 배양하였다. 숙주 염색체에서 *lon* 및 *cpxR* 유전자를 삭제하기 위해 allelic exchange 기법을 사용하였다. *rfaL* 유전자의 프레임 내 변형된 Lambda Red 재조합으로 수행하였다. PCR로 pKD3 플라스미드를 사용하여 FRT 측면 chloramphenicol 유전자를 증폭시켰다. *rfaL* FP 및 *rfaL* RP의 측면 영역에 대해 설계된 프라이머를 사용하여 FRT-CatR-FRT 선형 DNA 카세트를 증폭하고 SE 표적 균주에 1-mm-gap BTX cuvette cuvette (Harvard Apparatus, MA, USA)을 사용하여 (5 pg-0.5 µg DNA, 2500 v, 200 1Ω-600 Ω, 25 µf)조건으로 형질전환 하였다. 형질전환 된 세포를 CatR LB Agar에서 스크리닝 하였다. 내부 프라이머 (*rfaL* 내부 FP 및 *rfaL* 내부 RP)를 사용하여 *rfaL* 유전자의 결실이 완성된 균주를 확인하였다. 생성된 콜로니를 pCP20으로 형질 chloramphenicol 내성 유전자를 flippase 효소로 제거하고 생성된 백신 균주는 JOL2381로 명시하였다.

표 1. Bacterial strains, plasmids, and primers used in this study

Strain/Plasmid/Primers	Description	Reference
Strains		
JOL2381	<i>Salmonella</i> Enteritidis mutant ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta rfaL$)	This study
JOL860	<i>Salmonella</i> Enteritidis challenge strain - wild-type	Lab stock
JOL919	<i>Salmonella</i> Enteritidis mutant- Control for DIVA ($\Delta lon \Delta cpxR$)	Lab stock
Plasmids		
pKD46	Ori101-repA101ts; encodes Lambda red genes (<i>exo</i> , <i>bet</i> , <i>gam</i>); native terminator (tL3); arabinose-inducible for expression (ParaB); <i>bla</i>	
pKD3	oriR6K gamma, <i>bla</i> (ampR), <i>rgnB</i> (Ter), catR, FRT	
pCP20	Helper plasmid, contains a temperature-inducible <i>flp</i> gene for removing the FRT flanked chloramphenicol gene	
Primers		
rfaL FP	CCTGATGATGGAAAACGCGCTGATACCGTAATAA GTATCAGCGCGCTTTTGTGTAGGCTGGAGCTGC TTC	This study
rfaL RP	AGATTCATTAAGAGACTCTGTCTCATCCCAAAC CTATTGTGGAGAAAAGATGGGAATTAGCCATGG TCC	This study
rfaL flank FP	GCAGCGTTTCGAGGAACAAA	This study
rfaL flank RP	TCGTATCGGTTGATACCGGC	This study

○ 동물모델 및 동물윤리

동물 실험 및 동물 보호법 2007:제13조 (동물 실험)의 요령에 따라 전북 대학교 (CBNU-2018-00264)의 승인을 받았다. 1일령 brown nick layer 암컷 닭은 한국의 합동 부화장에서 구입하여 음식과 물을 자유롭게 공급하는 냉난방 시설의 동물 시설에서 사육되었다. 닭들은 생후 한 달이 되었을 때 면역화 및 도전감염 연구에 사용되었다. 이후 행동 및 생리적 징후 관찰을 위해 하루에 두 번 모니터링 하였다. 혈액 채취는 일반적으로 쓰이는 날개 정맥을 사용하여 수행하였다. 실험이 종료시점에, 닭들은 클로로포름을 이용하여 안락사 하였다.

○ SE 백신 균주의 안전성 평가

SE 백신 균주의 안전성은 배설물에서 배출되는 박테리아를 측정함으로써 평가되었다. 하루 된 암컷 닭은 음식과 물을 자유롭게 공급하면서 한 달 동안 사육되었다. 이후, 닭을 무작위로 8 개 그룹으로 나눴다(n=8). 각 그룹은 구강 또는 근육 내 경로 (IM)를 통해 1×10^7 - 1×10^{10} CFU로 접종하였다. SE의 배설물은 1일, 3일, 7일, 14일, 21일 및 28일에 채취되었다. 약 1g의 닭 배설물을 10ml의 펩톤 완충액에 재현탁하고 균질화 하였다. 균질액 100ul를 BGA 배지에 도금하고 추가로 1ml의 균질 물을 Rappaport Vassiliadis RV 배양액에서 농축하고 42°C에서 14시간 동안 배양하고 배양물을 BGA 배지에 도말하였다. 각 플레이트에서 콜로니를 균주 특이 프라이머를 사용하여 PCR로 확인하였다. 또한 1일, 3일, 7일, 14일, 21일 및 28일에 채취된 비장 및 간 검체의 세균 집락수를 평가하여 닭 장기에서 SE의 전신 존재 여부를 확인했다.

○ 면역화 및 도전감염

1개월령, 암컷, nick layer 닭(N=72, n=12)를 (표 1)에 명시된 바와 같이 6개의 그룹으로 나누었다. 그룹 A, SE 백신 균주 단일 경구 접종; 그룹 B, SE 백신 균주를 경구로 이중 접종하고; 그룹 C, SE 백신 균주 단일 근육 내 (IM) 접종; 그룹D, SE 백신 균주를 IM으로 이중 접종; 그룹 E, 균주에 대한 양성 대조군으로 DIVA ELISA를 위한 SE JOL911 IM으로 이중접종; 그룹 F, PBS 대조군; 그룹 G (추가 8 마리의 닭)는 naïve 대조군으로 접종 하였다.(표 2.)

표2. Post-challenge bacterial recovery

Group	Spleen	Liver	Spleen	Liver
	Positive No.	Positive No.	Log CFU/g	Log CFU/g
SE VS oral single	2/8	3/8	2.2±0.2	2.1±0.24
SE VS oral double	1/8	0/8	1.3	0
SE VS IM single	0/8	0/8	0	0
SE VS IM double	0/8	0/8	0	0
PBS	3/8	4/8	2.8±0.2	2.6±0.1

면역화는 마리당 경구는 1×10^8 CFU 및 IM은 1×10^7 CFU로 수행되었다. 부스터 면역화는 1차 면역화 후 3주에 수행되었고 야생형 SE (JOL860)에 대한 도전감염은 부스터 후 2주에 수행하였다. 혈청 채취는 매주 간격으로 수행되었으며 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 분리는 부스터 접종 2주 후 하였다. 또한 비장 세포 증식 분석, 유세포 분석(FACS) 및 사이토카인 유도 분석에 사용되었다. 실험 종료 후 닭의 비장과 간에서 잔존하는 박테리아를 확인하고 조직은 H&E 염색하여 조직병리학적 분석을 수행하였다. 박테리아 수는 표준 편차 (SD)와 함께 \log_{10} CFU/ml로 표시하였다.

○ 체액성 면역반응

혈청에서 anti-Salmonella IgY 항체 반응을 조사하기 위해 400ng/well의 농도로 SE 외막 단백질(Omp)을 사용하여 간접 ELISA를 수행하였다.

○ 세포성 면역반응

항원 특이 세포 면역 반응은 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 세포 증식 반응을 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 방법을 사용하여 평가하였다. 부스터 면역화 2주 후, Histopaque-1077(Sigma, Germany)으로 밀도 구배 원심 분리를 사용하여 혈액에서 PBMC를 분리했다. 세포를 5%FBS가 함유된 RPMI으로 96웰 플레이트에 웰 당 1×10^5 의 세포수로 분주하였다. 정제된 살모넬라 외막 단백질(omp, 40µg/mL)로 자극한 후, 세포를 37°C에서 5 % CO₂ 인큐베이터로 72시간 동안 배양하고 생성된 포르마잔은 570nm의 흡광도에서 마이크로 플레이트 리더를 사용하여 측정하였다. 추가로 면역화로 위한 T 세포 분화 반응을 분석하기 위해, 웰 당 백만 개의 세포를 Omp(40ng/well)로 72시간 동안 자극하고 anti-chicken CD3a-FITC(Cat#8200-02), anti-chicken CD8-PE(Cat#8220-09) 및 anti-chicken CD4-AF-700 (Cat#8210-27) 항체 (Miltenyi Biotec, 독일, Bergisch Gladbach)로 30분 동안 염

색하였다. 분석은 MacsQuant 소프트웨어 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)에서 각 세포 집단을 게이팅하여 수행했다.

○ 사이토카인 발현 측정

사이토카인 반응은 PBMC를 24웰 플레이트에 1×10^6 세포수로 분주한 후 24시간 동안 Omgs (40ng/well)로 자극하고 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA는 RNeasy Plus mini kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany)를 사용하여 추출하고 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster, USA)를 사용하여 cDNA로 합성하였다. 사이토카인 인터루킨(IL)-4 및 인터페론(IFN)- γ mRNA를 실시간 RT-PCR로 정량화하였다.

○ DIVA ELISA

SE 백신 균주 및 JOL919로 면역화된 조류에서의 LPS 특이 항체 발현은 SE의 LPS (Sigma)를 사용하여 간접 ELISA로 평가하였다. 정제된 LPS는 코팅 완충액, 0.5 M Na₂CO₃, NaHCO₃를 사용하여 37°C에서 2시간 동안 10 μ g/ml 농도로 ELISA 플레이트에 코팅하였다. 5% skim milk로 blocking하였고 닭 혈청을 1:100으로 희석하여 반응시키고 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 1xPBS로 3회 세척 한 후 2차 항체인 anti-chicken HRP-IgY를 1: 3000으로 희석하여 사용 하였다. 2시간 동안 반응 한 후, 플레이트를 1x PBS로 3회 세척하고 O-phenylenediamine dihydrochloride(OPD) 기질과 반응하여 반응된 발색 정도를 492nm에서 측정하였다.

○ 통계분석

모든 데이터는 GraphPad Prism 6.00 소프트웨어 (미국 캘리포니아 주 샌디에고)를 사용하여 분석하였다. Tukey의 다중 비교 테스트를 사용한 일원 분산 분석(ANOVA)을 수행하여 P-value<0.05로 테스트 그룹 간의 통계적 유의한 차이를 평가했다.

● 결과

○ *Salmonella* Enteritidis 백신 균주의 특성 및 안정성 평가

모 변이주로부터 (표 1)에 나열된 균주, 벡터 및 프라이머를 이용하여 *rfaL*를 결실 후 각 유전자의 프라이머를 사용하여 PCR로 *lon*, *cpxR* 및 *rfaL*의 결실을 확인함으로써 JOL919 변이 균주를 확립하였다. 또한 *rfaL* 유전자의 결실이 이루어진 변이 균주를 이용하여 정제된 LPS로 야생형 LPS와 비교하여 구조상 O항원이 없음을 관찰했다 (그림 1).

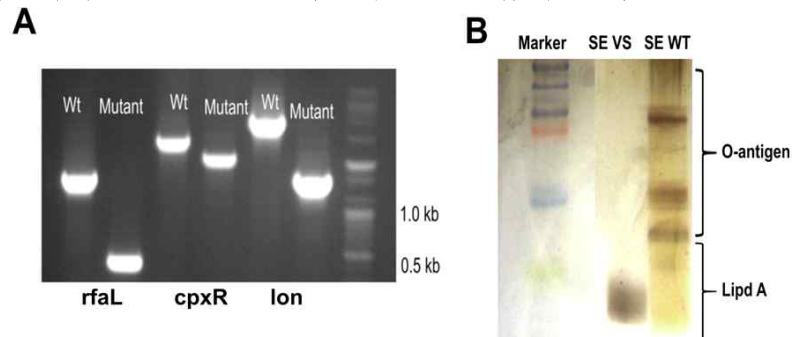


그림 1. Characterization of SE VS mutant. (A) PCR confirmation of deletion of virulence-related genes using flanking primers for each gene. (B) LPS SDS PAGE to confirm the truncation of LPS component due to *rfaL* gene deletion.

SE 백신 균주의 환경 안전성은 닭에 경구 및 IM 경로를 통해 다양한 농도 ($10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}$ CFU)로 면역화하여 야생형 균주와 비교했다. 모두 동일한 조건하에서 SE 백신 균주는 대변에서 검출되지 않았고 야생형 균주는 경구 경로를 통해 10^9 CFU의 농도로 접종된 그룹에서 2주 동안 대변에서 존재함을 확인할 수 있다. IM 경로로 접종된 SE 야생형 균주는 첫 주에만 박테리아를 감지 할 수 있다. 내부 장기인 비장 및 간에서 잔존하는 박테리아 측정시 SE 약독화 백신 균주를 경구 및 IM으로 면역화한 그룹에서 7~10일 동안 검출 되었지만 야생형 균주가 접종된 그룹은 21일 동안 지속적으로 검출되는 것을 관찰함으로써 SE 약독화 백신 균주에 대한 높은 수준의 안정성을 확인할 수 있었다 (표 2).

표 2. Safety assessment of the *Salmonella* Enteritidis vaccine strain via oral and intramuscular routes

Route	Strain	Dose	Fecal shedding (DPI)					Splenic presence (DPI)					Visual symptoms		
			1	3	7	14	21	28	1	3	7	14		21	28
Oral	SE VS	10^7	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	c
		10^8	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	c
		10^9	x	x	x	x	x	x	o	o	x	x	x	x	c
		10^{10}	x	o	x	x	x	x	o	o	x	x	x	x	c
IM	SE WT	10^9	x	o	o	x	x	x	o	o	o	o	o	o	a,b,c
		10^8	x	o	o	x	x	x	o	o	o	o	o	o	c
	SE VS	10^7	x	x	x	x	x	x	o	o	x	x	x	x	c
		10^8	x	x	x	x	x	x	o	o	x	x	x	x	c
		10^9	x	x	x	x	x	x	o	o	x	x	x	x	c
		10^{10}	x	x	x	x	x	x	o	o	o	x	x	x	c
SE WT	10^8	x	o	x	x	x	x	o	o	o	x	x	x	c	
PBS	100 μ l	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	

X: No bacteria recovered after enrichment, O: Bacteria recovered after enrichment.

a: Anorexia, b: Less feed intake, c: Splenomegaly, DPI: Days post-inoculation.

○ 전신성 면역반응 평가

전신 IgY 반응은 닭에 경구 및 IM 경로를 통해 SE 면역화 하여 매주 간격으로 채취된 혈청에서 평가되었다. 경구 및 IM 경로로 면역화 된 그룹 모두에서 점진적으로 증가하던 IgY의 반응이 면역화 2주차에 정점에 도달했으며 부스터 접종 후 2주 후에 부스팅 된 닭의 항체 반응은 단일 접종 된 닭보다 훨씬 높았다. 항체 농도의 증가 수준은 IM 그룹보다 경구 그룹에서 더 높았으며, 이를 통해 현재 SE 변이 백신주의 경구 투여에 대한 부스팅의 필요성을 알 수 있다 (그림 2).

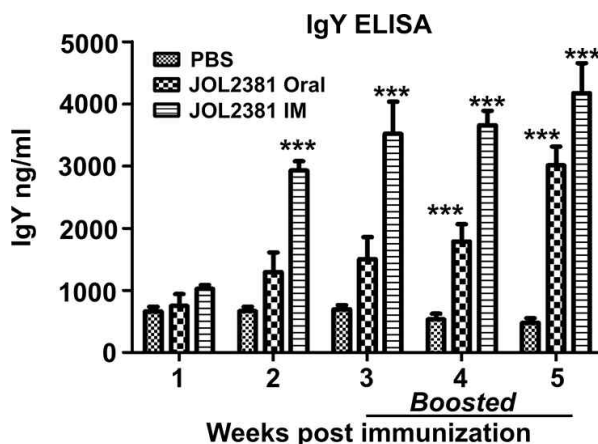


그림 2. Humoral immunresponses on one-month-old layer chickens (n=12) were either immunized with SE VS JOL2381 via oral or intramuscular routes at 1×10^9 CFU/bird/200 μ l of PBS and 1×10^7 CFU/bird/ 100 μ l of PBS respectively. To conduct DIVA ELISA another group was intramuscularly inoculated with JOL919 strain. The PBS and naive control groups were considered as negative controls. Boosting was done at three week post-primary inoculation. Blood serum was collected by wing vein in weekly intervals. The IgY responses were assayed in indirect ELISA using SE outer membrane proteins as the coating antigen. Color development was achieved by anti-chicken HRP antibody. *** indicates significant difference against the PBS control. The level of significance was determined at $P < 0.05$.

○ PBMC의 분화반응 평가

2 주간의 부스터 면역화 후 각 그룹으로부터 PBMC를 분리 하였다. PBMC는 SE 외막 단백 질로 재자극 하였고, 증식 반응은 배양 3일 후 MTT 기반 분석으로 측정되었다. 세포 증식 반응은 경구 투여 그룹 보다 IM으로 면역화 된 그룹의 PBMC에서 유의하게 높은 반응을 나타내 어 현재 백신 균주에 대한 IM경로를 이용한 면역의 우월성을 확인했다. 또한 대조군 PBS 그 룹보다 경구 및 IM 면역화 그룹 모두에서 상당히 높은 반응을 보였으며 결과적으로 접종 경로 에 따른 면역 반응의 차이를 확인할 수 있다 (그림 3).

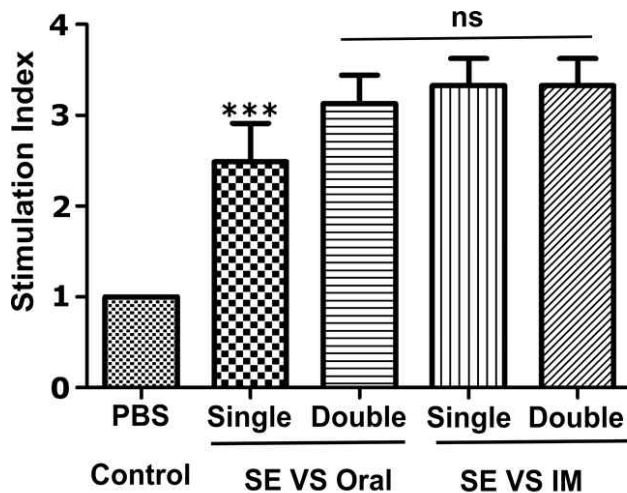


그림 3. Peripheral blood mononuclear cell proliferation assay. Peripheral blood mononuclear cells were harvested from immunized chicken (n=8) a week after the booster immunization. The PBMCs were separated from blood using Histopaque density gradient centrifugation. Harvested cells were seeded at 1×10^5 cells/well in 96 well plates. After three days of incubation upon stimulation with SE outer membrane proteins (500 ng/well), cell proliferative responses were assayed using MTT assay*** demonstrates the significant difference**. P<0.05.

○ 면역화에 따른 세포성 면역반응 평가

PBMC에서 T세포 집단의 변화는 FACS 분석을 통해 평가되었다. 각 닭 그룹의 PBMC는 부 스터 적용 후 2주 뒤에 분리 하였다. 세포를 96웰 플레이트에 웰당 1×10^5 로 분주 하여 SE 외 막 단백질로 3일 동안 재자극 하였다. 분화에 따른 CD3+CD4+ 및 CD3+ CD8+ 마커의 활성화는 CD3+세포 집단으로부터 각 하위 집단을 게이팅 함으로써 측정 하였다. IM 접종 군은 경구 접

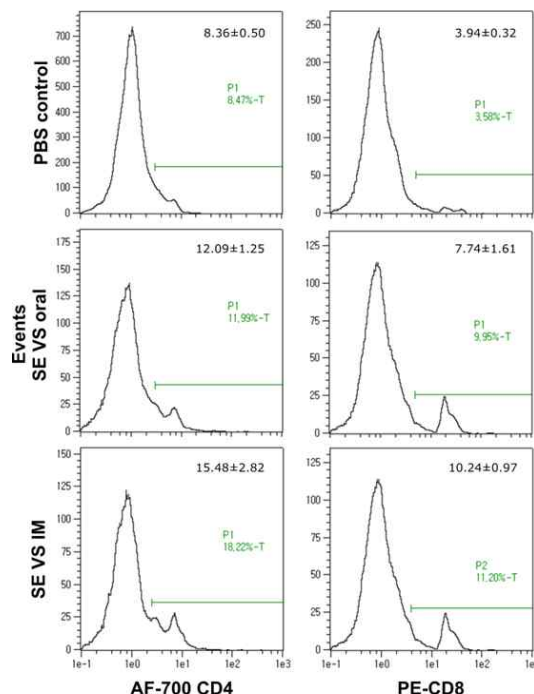


그림 4. Flow cytometry analysis of PBMC derived T-cells. Peripheral blood mononuclear cells were harvested from immunized chicken (n=8) a week after the booster immunization. The PBMCs were separated from blood using Histopaque density gradient centrifugation. Harvested cells were seeded at 1×10^5 cells/well in 96 well plates. After three days of incubation upon stimulation with SE outer membrane proteins (500 ng/well), cells expressing CD4+ and CD8+ were quantified using a flow cytometer. Each population of CD3+, CD3+CD4+ and CD3+CD8+ populations were determined. CD3+: FITC, CD4+: AF-700, CD8+: PE antibodies were used.

중 군에 비해 CD4⁺ 및 CD8⁺ 마커 성숙도가 현저히 높았으며 (P < 0.05), PBS와 경구 접종 그룹 간에는 미미한 증가를 관찰할 수 있었다 (그림 4).

○ 면역화에 따른 사이토카인 활성 평가

SE백신 균주에 의한 사이토카인 IFN- γ 및 IL-4의 항원 특이 적 유도는 Real-Time PCR을 사용하여 mRNA 수준에서 관찰하였다. 부스터 면역화 2주 후, PBMC를 각 닭 그룹에서 분리하고 SE 외막 단백질로 재자극 하였다. 24시간 배양 후 전체 RNA를 추출하고 그룹의 샘플 모두 동일한 농도의 RNA를 사용하여 cDNA를 합성 하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 Real-time PCR을 이용하여 사이토카인의 mRNA 수준에서 활성 유도를 분석한 결과 IM으로 접종된 그룹에서 I형 사이토카인인 IFN- γ 의 현저한 유도와 경구 및 IM 그룹 모두에서 IL-4 사이토카인의 증가를 나타냈다 (그림 5A, B). 두 사이토카인에 대한 반응은 PBS 대조군보다 면역화 된 그룹에서 유의하게 높았다.

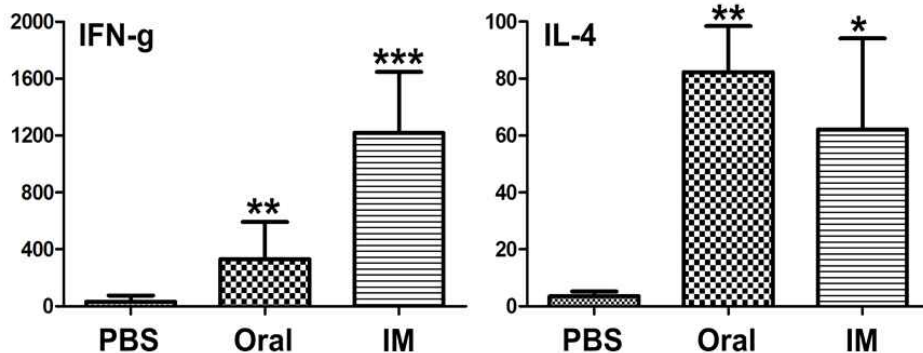


그림 5. Cytokine expression. Peripheral blood mononuclear cells were harvested from immunized chicken (n=8) a week after the booster immunization. The PBMCs were separated from blood using Histopaque density gradient centrifugation. Harvested cells were seeded at 1×10^6 cells/well in 24 well plates. After 24 hrs of incubation upon stimulation with SE outer membrane proteins (500 ng/well). The total RNA was extracted and cDNA was synthesized. RT-PCR was conducted to determine IFN- γ and IL-4 cytokine levels. The $\Delta \Delta^{-CT}$ values were calculated. Each value was normalized against PBS control. GAPDH was taken as the internal house control., * demonstrate the significant difference at P<0.05 level of significance

○ 면역화에 따른 방어능 평가

SE의 도전감염으로 인해 사망 한 개체는 보이지 않았으며 비장 및 간 조직의 H&E 염색 결과 도전감염시 경구 면역화 된 닭 그룹보다 SE 변이 균주로 IM 면역화 된 닭의 그룹에서 향상된 방어 수준을 보였다. 비장 및 간에서의 병리학적 관찰 결과 SE 병변의 변화는 관찰 되지 않았으며, IM으로 면역화 된 그룹에서 SE 야생형에 의한 백색 병변의 현저한 감소를 알 수 있었다 (그림 6).

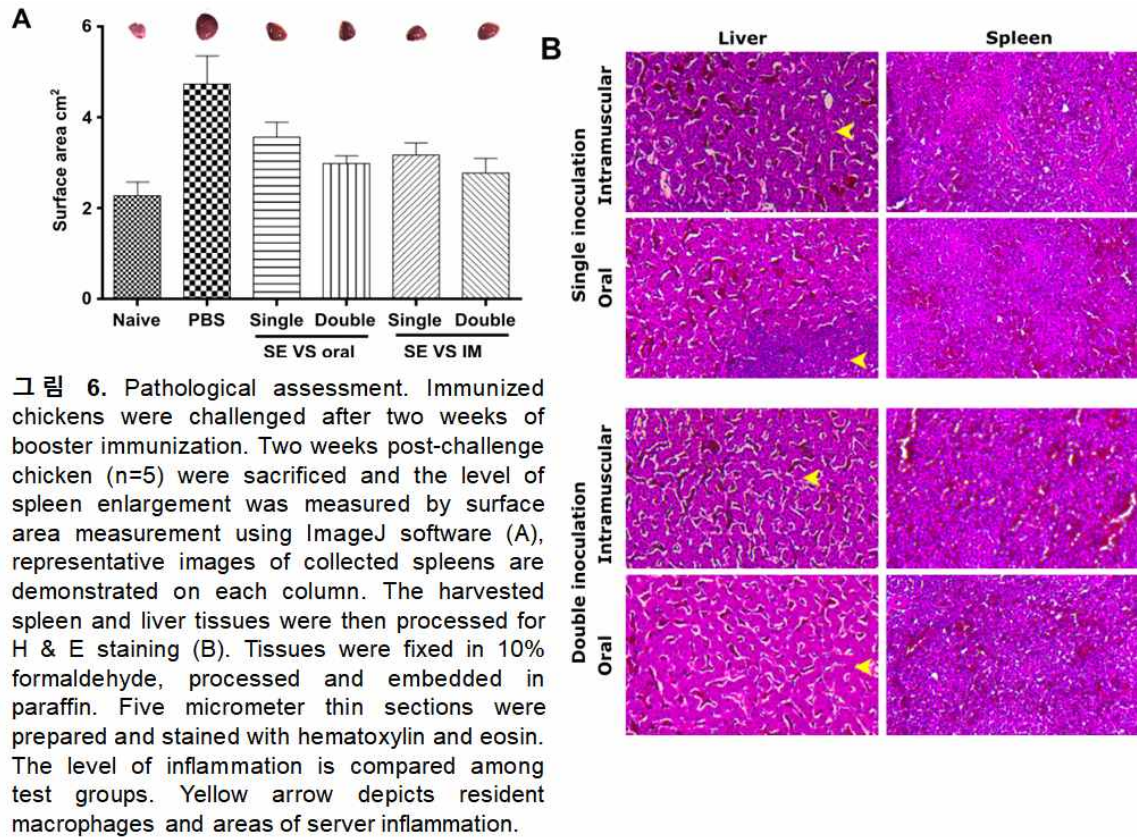


그림 6. Pathological assessment. Immunized chickens were challenged after two weeks of booster immunization. Two weeks post-challenge chicken (n=5) were sacrificed and the level of spleen enlargement was measured by surface area measurement using ImageJ software (A), representative images of collected spleens are demonstrated on each column. The harvested spleen and liver tissues were then processed for H & E staining (B). Tissues were fixed in 10% formaldehyde, processed and embedded in paraffin. Five micrometer thin sections were prepared and stained with hematoxylin and eosin. The level of inflammation is compared among test groups. Yellow arrow depicts resident macrophages and areas of server inflammation.

○ DIVA 감별능 평가

온전한 LPS 를 가지는 야생형의 SE JOL919 균주로 면역화 한 그룹과 SE 변이 백신 균주로 면역화한 그룹에서 LPS 특이 항체 반응을 비교 하였다. LPS 특이 항체 반응은 부스터 적용 일주일 후 채취된 혈청에서 정량화 하였다. SE 백신 균주로 경구 및 IM 경로로 접종된 모든 닭 그룹에서 JOL919 균주를 IM 접종한 그룹 보다 LPS 특이 항체 반응이 현저히 낮게 관찰되었다 (그림 7).

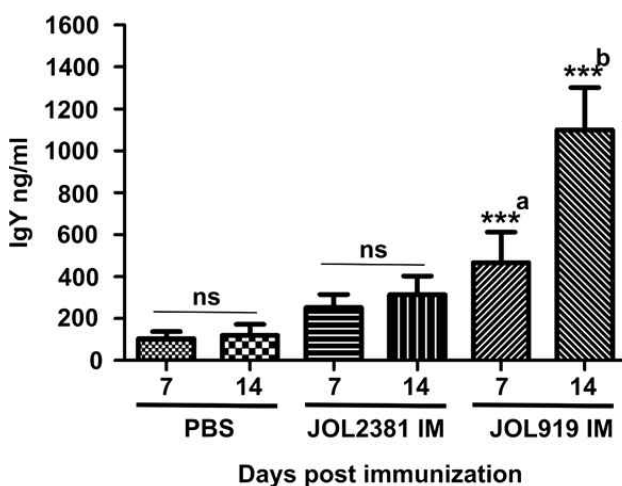


Fig. 7. DIVA ELISA. Development of SE-LPS specific antibody response was evaluated a week after the booster application. Purified LPS from SE VS JOL2381 and ST WT JOL860 was carried out and coated in ELISA plates at 10 µg/ml concentration. Chicken serum was diluted at 1:50 and used as the primary antibody. HRP-tagged anti-chicken IgY was utilized at 1:3000 dilution as the secondary antibody. Color development was achieved by adding OPD and observed at 492 nm wavelength. Each absorbance value was converted into antibody concentration and demonstrated as ng/ml. *** indicates the significant difference at P<0.05.

● 결론

본 연구에서는 닭의 살모넬라증 예방을 위한 개선된 약독화 살모넬라 엔테리티디스 균주 JOL2381 (SE VS)의 개발 및 특성을 확인하였다. lon, cpxR 및 rfaL 유전자의 결실 돌연변이를 통해 손상된 세포 내 증식 및 스트레스 반응으로 살모넬라 균주는 고도로 약독화될 수 있다. rfaL 유전자는 Lambda-Red 재조합 과정을 통하여 JOL919 ($\Delta lon \Delta cpxR$) 돌연변이에서 결실되었으며 PCR 및 SDS PAGE를 통하여 LPS의 rfaL의 결실을 확인했다. 약독화 백신 균주는 경구 및 IM 경로를 통해 투여 후 대변을 통해 환경으로 배출되지 않았으며 접종 후 7일간 백신 균주가 닭의 비장 및 간에서 검출됨에 따라 전신적으로 존재함을 알 수 있었으나 야생형의 경우 10일간 검출되어 약독화 백신 균주의 안전성을 확인 하였다. 경로에 따른 효과를 비교하였을 때 경구 경로보다 IM 경로에서 효과적인 항원 특이 면역 반응 및 방어효과를 보임을 확인하였다. 또한 경구 경로를 통한 효과적인 방어 효과를 위해서는 한 번 이상의 재접종이 필요함을 알 수 있다. IM경로를 통해 SE 백신 균주로 면역화한 그룹은 PBS 그룹과 비교하여, 현저하게 높은 IgY 체액 반응, 세포 매개 면역 반응 및 T 세포의 분화를 보였으며 이는 병원체 제거를 위한 기본이 갖추어짐을 알 수 있다. 또한, rfaL 유전자 결실로 인한 O항원 구성분의 제거는 숙주에서 LPS 특이 항체의 생성을 크게 감소시켜 DIVA 감별이 가능하므로 현장에서의 응용이 가능하다. 따라서 현재 개발된 SE 약독화 균주는 닭의 살모넬라증에 대한 효과적인 방어능과 상당한 약독화 그리고 환경에서의 안전성을 보임으로써 실제 가금류 산업에 적용하기 적합한 백신 후보주로 제안할 수 있다.

5. PhiX174 용해 유전자 E와 람다파지 유래 홀린-엔도리신 단백질을 R용해 유전자 카세트로 구성한 살모넬라 고스트 백신 시스템

○ 배경

식품 매개 동물성 병원체로 *Salmonella Enterica*의 혈청형 중 하나인 *Salmonella Enteritidis* (SE)는 식중독을 유발하는 감염원이며 대부분 계란 등의 소비를 통해 전파되어 지난 20년 동안 상당한 공중 보건 문제를 야기해 왔다. SE는 일반적으로 닭에서 식별 할 수 있는 전신 감염 증상을 유발하지 않지만, 공정 과정 중 사람의 먹이 사슬로 쉽게 침투할 수 있다. 특히 날 달걀 또는 덜 익힌 달걀의 소비로 SE에 의한 식중독 발생이 현저히 증가 했다. 달걀에서 난소와 껍질을 통과하여 수직, 수평적 경로를 통해 오염될 수 있으며 병원체의 제거 보다는 암탉 무리에서 병원체 농도 감소에 직접적으로 영향을 줄 수 있는 백신 접종과 같은 예방 전략이 요구된다. SE 감염에 대한 안전하고 효과적인 백신 후보를 개발하기 위한 여러 시도가 있었다. 또한, 가금류 예방 접종을 위해 승인받은 Layer AviPro® *Salmonella* VacE(Lohmann Animal Health, Cuxhaven, Germany), Salmovac SE® (IDT Biologika, GmbH, Germany)와 같은 약독화 생균주를 기반으로 하는 상용 백신이 현재 이용 가능하다. 그러나, 약독화 생균백신은 잔존하는 병원성에 대한 안전 문제와 위험성을 가지고 있다. 따라서 여전히 안전성과 면역원성을 모두 만족할 수 있는 새로운 백신 플랫폼이 필요하다. 박테리아 고스트 시스템은 PhiX174 용해성 박테리오파지의 용해유전자인 E유전자의 발현에 의해 유전적으로 새롭게 비활성화 된 백신 플랫폼이다. 용해유전자에 의해 생성된 박테리아의 비어있는 외피는 면역 유도를 자극할

수 있는 항원 특성을 가지고 있다.

따라서 본 연구는 이중항원인 HA의 구상 머리 부분 (아미노산 잔기 63-286)을 박테리아 표면에 표지하는 약독화된 살모넬라 엔테리티디스 고스트 균주인 JOL2114($\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$)의 특성을 파악하며 두 질환의 감염체인 닭 모델에서의 살모넬라증 및 H1N1바이러스의 감염에 대한 동시 방어 효능을 조사하였다.

● 세부방법

○ 박테리아 균주, 플라스미드 및 배양조건

본 연구에 사용된 박테리아, 바이러스 균주 및 플라스미드는 (표 1)에 명시되어 있다. 본 연구에서는 발육관에서 배양된 Influenza A/Puerto Rico/8/34 (PR8) H1N1바이러스를 도전감염에 사용했다. Reed and Muench 방법을 사용하여 H1N1의 EID50을 결정했다. $\Delta asd \Delta lon \Delta cpxR$ SE 돌연변이 균주는 Luria-Bertani(LB) 배양액 또는 50 μ g/ml의 diaminopimelic acid(DAP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)가 함유된 LB배지로 37 $^{\circ}$ C 조건에서 배양되었다.

○ 플라스미드 제작

약독화 된 S. Enteritidis의 변이균주인 JOL1087은 인플루엔자 A 바이러스 HA1 단백질의 전달을 위한 수단으로 사용되었다.(표 1.)

표 1. Bacterial strains and plasmids

Strain/plasmids	Description	References
<i>E. coli</i>		
DH5a	fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	Lab stock
BL21(DE3)	139(<i>ara-leu</i>)769 galU galK rpsL (Str ^r)endA1 nupG F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ mB ⁻)dcm gal λ (DE3) pLysS Cmr	Lab stock
χ 6212	F-k-u80 Δ (lacZYA-argF) endA1 recA1 hadR17 deoR thi-1 glnV44 gyrA96 relA1 Δ asdA4	Lab stock
<i>Salmonella Enteritidis</i>		
JOL1182	Wild type isolate from chicken, challenge strain	Lab stock
JOL1087	$\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$, used as base vaccine strain	Lab stock
JOL2110	JOL1087 harboring pJHL420, a vector control	This study
JOL2114	JOL1087 harboring pJHL420-HA1	This study
Plasmids		
pJHL420	asd ⁺ vector, pBR ori plasmid harboring cI857/kPR promoter, araC ParaBAD, phiX174 lysis gene E, the R ghost cassette composed of S, R and R1/Rz genes	{ J a w a l e , Chetan V, 2014}
pJHL420-HA1	pJHL420 harboring HA1 gene originated from A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) (PR8) influenza virus	This study

JOL1087은 야생형 SE JOL394에서 lon, cpxR 및 asd 유전자를 제거하여 구축되었다. asd⁺ 고스트 플라스미드인 pJHL420은 박테리오파지 Φ X174의 E유전자, holin-endolysin, pBR origin, MCS, C 말단부위의 His으로 구성된 용해 유전자 카세트를 가진다. 인플루엔자A바이러스의 아형인 H1N1의 HA1 유전자를 합성하였고(Bioneer), 유전자 단편은 고스트 벡터인 pJHL420의

ompA 신호 서열의 TMD 하류에 클로닝되었다. 제작된 플라스미드는 전기천공법으로 JOL1087에 형질도입 하였으며, 이는 JOL2114로 명시하여 백신후보로 사용되었다. pJHL420을 가지는 Δ asd Δ lon Δ cpxR SE 균주인 JOL1087을 벡터 대조균으로 사용 하였다. 불활성화 된 고스트 백신 후보의 제조를 위해, JOL2114 균주는 로그 단계에 도달 할 때까지 28°C 에서 0.2 % L-arabinose가 첨가된 LB 배양에서 배양되었다. 배양액을 원심 분리 한 후 LB 배양액에 재현탁하여 남아있는 arabinose를 제거했다. 고스트 벡터에서 용해 유전자 카세트를 활성화하기 위해 배양 물을 42°C 에서 200rpm으로 교반하여 48시간 동안 배양했다. JOL2114 고스트의 용해 효율을 평가하기 위해 용해 과정이 끝날 때 100 μ l의 배양액을 LB배지에 도말 하였다. 24시간 배양 후, 콜로니수를 측정하여 CFU로 표현한 후 세포 생존능을 측정 하였다. 합성된 HA1 유전자 단편도 단백질 발현 벡터인 pET28a(+) 플라스미드에 클로닝 후 BL21 세포로 형질 전환 하였다. 정제된 재조합 HA1 단백질은 SDS-PAGE 분석으로 확인하였고 Bradford 분석을 사용하여 정량하였다. 고스트 균주에서 HA1의 발현은 western blot으로 확인하였고, 용해 유전자 발현에 의해 유도된 형태학적 변화는 24시간 동안 용해 유전자를 활성화 후 주사 전자 현미경 (SEM)을 통해 관찰하였다.

○ 동물실험

모든 동물 실험은 전북 대학교 동물 윤리위원회 (CBNU2015-00085)의 승인을 받았으며 2007년 제13조 (동물 실험) 한국 동물 보호 협의회 및 동물 보호법 지침에 따라 수행되었다. 암컷의 1 일령 Brown Nick layer(n=40)에 항생제가 없는 음식과 물을 자유롭게 제공했으며 무작위로 4개의 그룹으로 나뉘었다. 그룹 A와 B는 각각 근육 내 및 경구 경로를 통해 JOL2114 고스트 균주로 면역화하였다. 근육 내 경로를 통해 벡터 대조균을 이용한 백신 접종은 그룹 C의 닭에서 수행되었다. 그룹 D의 닭은 100 μ l의 멸균 PBS만 접종하고 대조균으로 사용되었다. 닭은 생후 1주에 프라이밍 된 후 3주령에 부스팅 되었다. 혈청 및 장 세척액은 표적 단백질 특이 항체의 역가를 조사하기 위해 2주 간격으로 채취하였다.

○ 간접 효소 면역 분석법(ELISA)

면역 글로불린(Ig)-G 및 분비된 IgA의 역가는 간접 효소 결합 면역 분석법(ELISA)을 사용하여 면역화 된 닭 및 대조군 그룹으로 분석하였다. ELISA 플레이트를 코팅하기 위해 정제된 HA1 항원 (0.5 μ g/ml) 또는 SE 외부 막 단백질 (OMP)을 사용하여 항원 특이 항체의 생성을 확인하였다. OMP 단백질은 야생형 SE인 JOL1182에서 추출되었다. 항체의 역가는 470nm의 흡광도에서 측정되었다.

○ 면역화로 인한 T세포 분석

말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)에 항원의 자극 후 증식을 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석을 수행하여 평가했다. 면역화 후(PI) 2주차에 그룹 A 및 D의 각 5 마리 닭의 2ml 혈액 샘플로부터 PBMC는 Histopaque-1077®용액 (Sigma, St. Louis, MO)을 사용한 밀도 구배 원심 분리에 의해 분리되었다. 분리 된 PBMC는 10% FBS, 5%FBS를 포함하는 RPMI에서 37°C, 5 % CO₂배양기로 배양되었다. 1x10⁶개로 플레이트에 분주된 세포에 JOL2114를 10MOI로 처리한 후 48시간 동안 37°C에서 배양 하여 자극된 세포에서 생성된 Formazan의 발색을 측정함으로써 림프구의 증식을 분석하였다. 또한 유세포 분

석기(FACS)를 이용하여 PBMC에서 T세포 집단의 분화 정도를 평가하였다. 세포는 with anti-CD3-PE antibodies and CD4-perCP-vio700항체(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)로 염색되었으며, T세포 집단의 비율은 MACSQuant® 분석기(Miltenyi Biotec, Bergisch)를 사용하여 측정하였다.

○ 수지상 세포 분석

닭 골수 유래 수지상 세포(chBMDC)는 6 주령 닭의 대퇴골 및 경골로부터 분리하였다. 무균 상태로 분리된 골수를 PBS에 현탁하고, Histopaque-111(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 30분 동안 400 x g에서 원심 분리 한 후, 밀도 구배로 분리 된 총 골수 유래 단핵 세포를 50ng/mL 과립구-대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF; Kingfisher Biotech, Inc, Saint Paul, MN, USA) 및 25ng/mL 재조합 chicken IL-4(Kingfisher Biotech), 10% chicken serum (Sigma-Aldrich) penicillin(10 units/ml), streptomycin(10µg/ml)가 첨가된 RPMI에서 37°C, 5% CO₂조건으로 배양했다. 배양 7일 후, 플레이트에 부착 된 분화 된 chBMDC를 모으고 RPMI로 재현탁한 다음 6웰 플레이트에 분주하였다. 이후, 백신 후보 균주로 감염하기 위해, JOL2114 고스트 균주를 10MOI로 세포에 24시간 처리 하였다. LPS(500ng/ml, 혈청 형 O127 : B8, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 및 PBS로 처리 된 세포를 각각 양성 및 음성 대조군으로 사용했다. qRT-PCR을 사용하여 chBMDC에서 TLR 및 면역 조절 사이토카인의 발현을 평가 하였다.

○ 방어 효과 확인

이중항원에 발현에 따른 방어효능을 측정하기 위하여 avian influenza A/Puerto Rico/8/34 (PR8) H1N1 바이러스를 도전감염 바이러스로 이용하고 각 그룹에서 5마리의 닭은 면역화 6주 후 H1N1 바이러스(1×10^3 , EID₅₀)의 용량으로 비강 내로 도전감염 하였다. 이후, 1, 3, 5, 7, 9 및 11일에 감염된 닭의 항문에서 면봉을 이용해 채취했다. 도전감염 된 바이러스는 HA 유전자에 대한 qRT PCR 분석을 사용하여 RNA 수준에서 바이러스 복제수를 확인함으로써 평가되었다. 동시에, 각 그룹의 남은 닭(n=5)는 면역화 5주차에 야생형 SE 균주인 JOL1182를 1×10^9 로 경구경로를 통해 도전감염 하고 7일 후에 닭을 안락사 하였다. 대변에서 배출되는 세균수를 측정 하기 위해 샘플의 무게를 재고 2mL 펩톤완충액으로 균질화했다. 균질액을 BGA에 도말하고 37°C에서 배양한 후 측정된 박테리아의 콜로니 수는 평균 log₁₀CFU/g으로 측정 하였다.

○ 통계분석

데이터는 평균±표준편차(SD)로 표시되었다. 쌍체 t 검정 분석을 사용하여 면역화 된 그룹과 비 면역화 된 그룹 간의 면역 반응에서의 유의한 차이를 평가했다. 통계적 차이는 P-value <0.05 일 때 유의한 것으로 판단하였다.

● 결과

○ 이중항원 HA1을 발현하는 이중 용해 유전자에 의해 비활성화 된 SE 균주의 구축

본 연구에 사용 된 고스트 플라스미드 pJHL420::HA1은 박테리오파지 PhiX174 용해 유전자 E와 람다파지 유래 홀린-엔도리신 단백질을 암호화하는 R용해 유전자 카세트에 구성된다. R

lysis 유전자 카세트는 pJHL420 플라스미드 구성에서 E유전자 및 λ pR-CI857 프로모터의 5'상류의 안티센스 ParaBAD 프로모터와 3'하류 사이에 위치한다. R유전자의 발현은 아라비노스가 없을 때 열 유도 메커니즘에 의해 E유전자와 동시에 발생한다. 이중 항원으로 이용된 HA1의 효율적인 표면 제시 위해 E.coli의 OmpA 분비 신호와 함께 플라스미드로 클로닝 하였다. 본 연구에서 개발된 고스트 균주인 JOL2114는 유전자 E 및 홀린-엔도리신 유전자 카세트의 누출 발현을 방지하는 0.2% L-arabinose 존재 하에 28°C의 허용 온도에서 배양하였다. 유전자 E를 생성하고 홀린-엔도리신 유도 살모넬라 고스트 세포를 모으고 배지로 세척하여 잔류 L-arabinose를 제거하였다. 이후, 세포는 유전자의 cI857 억제를 해제함으로써 용해 유전자의 발현을 허용하기 위해 42°C에서 48 시간 동안 배양 하였다.고스트 생성의 효능은 48시간의 유도 기간이 끝날 때 살아있는 세포 수를 평가하여 생존 세포가 99% 이상 감소하는 결과로 평가하였다. 또한 용해의 완전성을 확인하기 위해 주사 전 현미경(SEM)을 수행 하였다(그림 1a.). 이 이미지는 박테리아 세포질이 완전히 제거되어 세포의 외피를 그대로 유지하는 것을 보여준다. 또한, 이중 HA1 항원 발현은 열 유도성 λ PR 프로모터에 의해 조절된다. 따라서 HA1 항원은 용해 유전자와 공동 발현 된다. HA1 표면 제시 항원의 발현은 웨스턴블롯 분석에 의해 31kDa위치에서 확인되었다(그림 1b.). 또한, asd 로 보완된 pJHL420 플라스미드는 asd 유전자에 의해 균형 잡힌 숙주-백터 시스템으로 인해 살모넬라에서 안정적으로 유지될 수 있다.

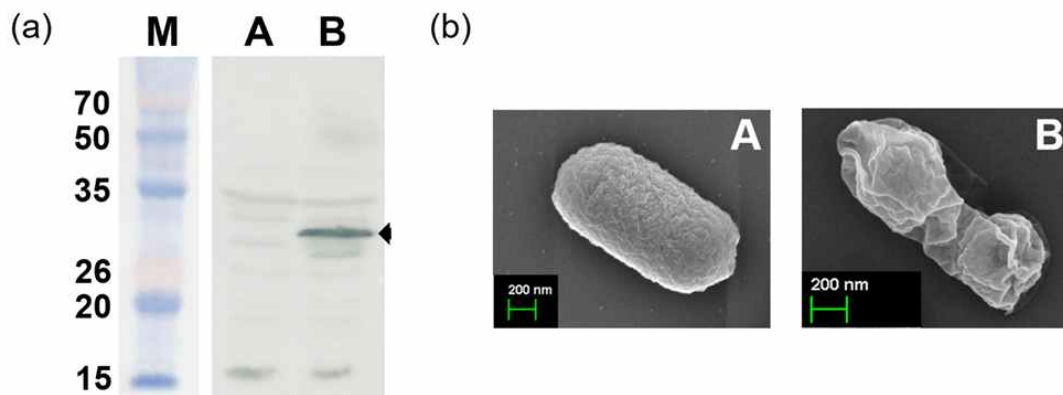


그림 1. Characterization of JOL2114, *S. Enteritidis* ghost cells expressing HA1 gene. (a) HA1 protein expressed in JOL2114 validated by western blot analysis. The arrow showed ~31kDa, the expected size of the target protein fused with OmpA. Lane M, size marker; lane A, a pellet of JOL2110 as vector control; lane B, a pellet of JOL2114. (b) Electron microscopy observation on morphology of the ghost cells following the activation of the lysis gene cassette. Arrowheads indicate the transmembrane lysis tunnels. A, Intact *S. Enteritidis* before lysis; B, JOL2114 ghost cells after 24hr of the lysis.

○ 면역화 된 닭에서의 SE OMP 와 HA1 특이 항체 생산

JOL2114 박테리아 고스트 사용한 닭의 면역화는 면역화 된 숙주에서 SE 특이 및 HA1 특이 항체를 생성 할 것으로 예상된다. 항체 반응은 각 그룹에서 채취 한 혈청으로 측정하였다. SE 특이 항체 반응을 평가하기 위해 닭의 IgG 농도를 정량화하고 백신 균주, IM 면역화 그룹과 음성 대조군 그룹을 비교다. IM 면역화 그룹에서 SE 특이 항체의 발현 수준은 음성 대조군보다 유의하게 높았으며, 1차 면역화 4주 후 혈청에서 최고 반응을 보였다(그림 2a). HA1 특이 항체 반응은 IM 그리고 경구 면역화 그룹과 음성대조군 그룹에서 비교하였다. HA1 특이 IgG 항체의 발현은 IM 또는 경구 경로를 통해 JOL2114로 면역화 된 닭에서만 면역화 4주 후 샘플에

서 가장 높은 발현치가 관찰되었다. 면역 유도 반응은 구강 경로에 비해 IM 경로에서 더 높았으며, 고스트 백신 균주를 IM 경로를 접종하는 것에 대한 이점을 확인할 수 있었다. (그림 2b).

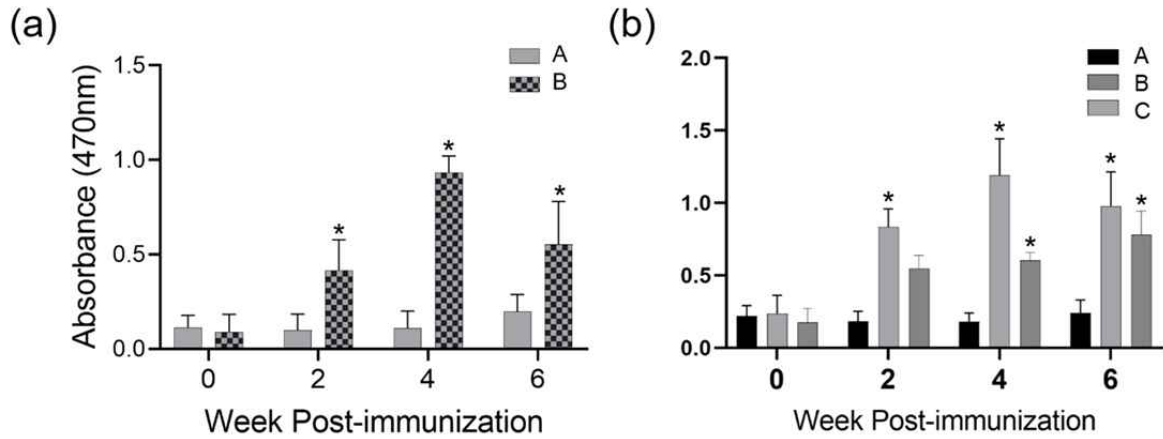


그림 2. Humoral immune responses specific to either HA1 or S. Enteritidis (SE) elicited by immunization with JOL2114 in the chicken. The titers of serum IgG against (a) SE OMP or (b) HA1-antigen in the immunized chicken by ELISA analysis. Group A, negative controls; group B, the chicken immunized with JOL2114 ghost cells via an intramuscular route; group C, the chicken immunized with JOL2114 ghost cells via an oral route. Bars indicate the mean of all chicken (n=10) in each group and the vertical lines show the standard deviation (s.d.). PI; post-immunization, * P < 0.05, (vs. control group A).

○ 면역화에 의해 유도된 T 세포 관련 면역 반응

세포 매개 면역 반응을 평가하기 위해, 백신 균주로 면역화 된(그룹 A) 및 비면역 된 그룹(그룹 D)으로부터 면역화 2주 후 수집된 PBMC를 사용하여 림프구 증식 여부를 확인 하였다. 분리된 세포가 HA1 정제된 항원에 다시 자극되어 MTT 분석에 의해 상당히 높은 세포 증식을 관찰할 수 있다(그림 3). 이것은 SE 표면에 제시된 HA1 항원이 백신 균주에 면역화 된 닭에서 CMI 반응을 효과적으로 유도함을 입증한다.

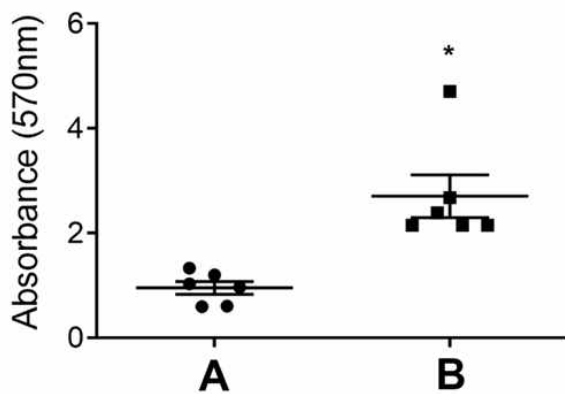


그림 3. Lymphocyte proliferative responses against JOL2114 ghost cells. MTT assay was performed in the PBMC isolated of non-immunized (group D, n=5) and immunized (group A = 5) chicken at week 2 PI. The bars indicated the mean absorbance values in each group. Error bars show s.d. * P < 0.05 (vs. control group D)

추가로 T 세포에서 CD3+ CD4+ 및 CD3+ CD8+의 변화를 평가하기 위해 T세포 집단은 비면역 그룹(그룹 D), IM 면역 그룹(그룹 A) 및 경구 면역 그룹(그룹 B)에서 비장세포로부터 분리한 T 세포를 이용하여 비교하여 평가하였다. 분리된 세포를 정제된 HA1 항원으로 재 자극하고 표면에 발현되는 CD4+ 및 CD8+ 마커를 FACS 분석에 의해 평가 하였다. 그 결과 JOL2114 고스트 균주로 면역화 된 닭과 면역화 되지 않은 대조군과 비교하였을 때 면역화 된

그룹에서 CD4⁺ 및 CD8⁺ T세포 집단이 모두 유의하게 유도되는 것으로 나타났다. 그러나 IM과 경구 면역 경로 사이에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다(그림 4).

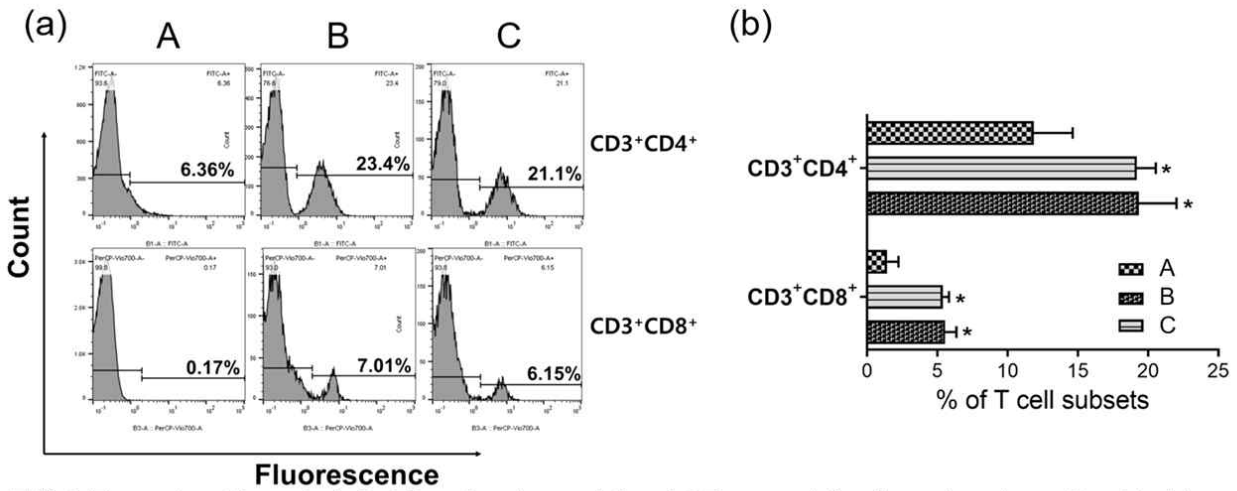


그림 4. Flow cytometric analysis for T lymphocyte population. (a) Representative flow cytometry scatter dot plots for CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ T cell populations isolated from chPBMC. (b) The subpopulations are expressed as a percentage of the gated cells. Group A, negative controls (n=5); group B, the chicken immunized with JOL2114 ghost cells via an intramuscular route (n=5); group C, the chicken immunized with JOL2114 ghost cells via an oral route (n=5). The data was presented as the means \pm s.d. *P < 0.05 when the values were compared with the negative control group.

○ 프라이밍된 PBMC에서 TLR 및 면역 조절 사이토 카인 발현

면역 조절 사이토카인 반응의 발현은 IM과 경구 경로로 면역화 된 닭 그룹 사이에서 평가되었다. Th2유형 사이토카인 IL-6 및 IL-10은 PBMC에서 평가되었다 (그림 5).

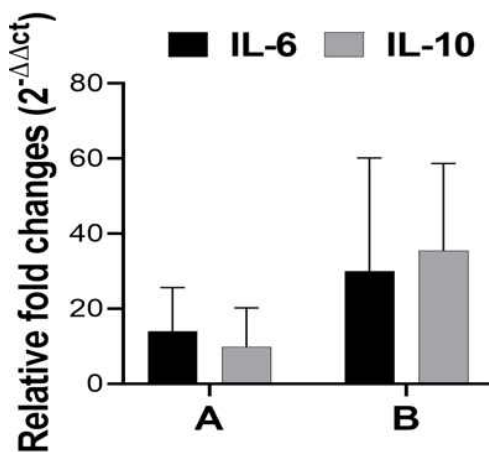
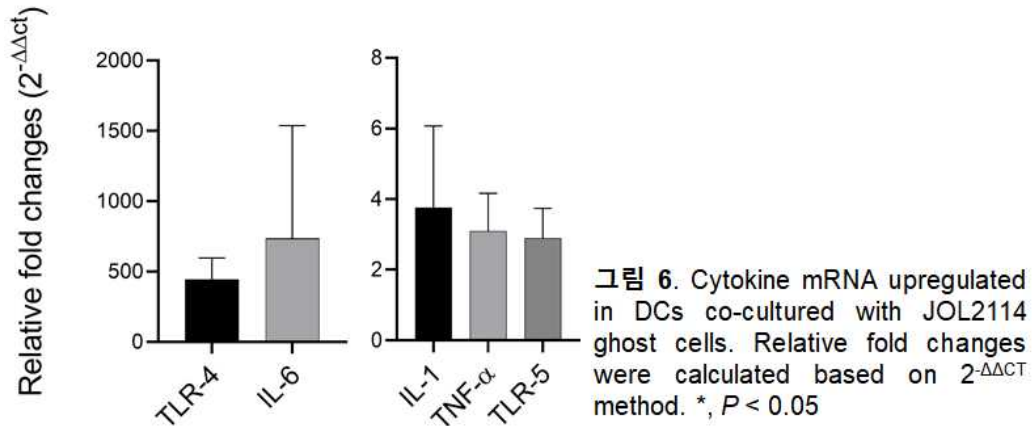


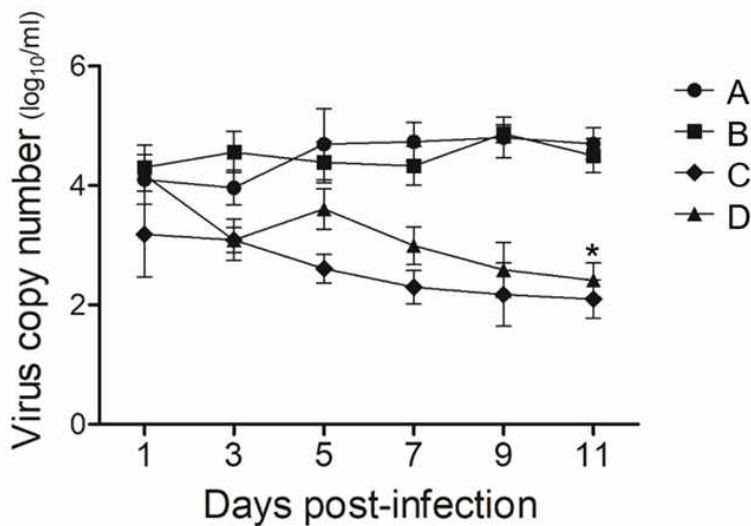
그림 5. The cytokine mRNA transcript level in *in vitro* stimulated PBMC isolated from the chickens in the control group, and the immunized group via (A) an IM route or (B) oral route measured by qRT PCR. The mRNA transcript level of cytokines was assessed with gene specific primers, and a relative fold change was determined by $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Each fold change value represents the mean \pm s.d. of five individual values. *P < 0.05 when the values were compared with the non-immunized chicken.

게다가, 닭의 수지상 세포를 자극하고 박테리아 고스트 균주로 면역화한 골수 유래 수지상 세포에서 TLR-4 및 TLR-5 반응에 대해 테스트했다. 그 결과 PBMC에서 면역 조절 사이토카인 반응을 유도하며 수지상 세포에서 TLR-4 및 TLR-5 활성화에 관여함을 보여 주었다(그림 6).



○ SE 야생형 균주를 이용한 도전감염

야생형 SE 균주의 도전감염에 대한 닭에서의 방어 효능을 조사하기 위해, IM 또는 경구 경로를 통해 면역화 된 닭 그룹을 면역화 후 6 주에 야생형 SE 균주로 도전감염 하였다. 방어 효과는 도전감염 후 1일, 5일 및 11일에 배설물에 잔존하는 야생형 SE를 정량화하여 평가했다. JOL2114을 IM 및 경구경로 면역화한 그룹 모두 비 면역그룹 보다 배설물에서의 세균 배출이 현저히 감소함을 관찰 할 수 있다(그림 7).



○ 바이러스를 이용한 도전감염

JOL2114 면역 유도에 의한 조류 인플루엔자 바이러스인 H1N1의 방어 효과는 1차 면역화 6 주 후 도전감염 하여 확인하였다. Real-Time PCR 기반 방법으로 바이러스 복제수를 결정하여 대변에서 유출된 바이러스를 확인했다. IM 또는 경구 경로를 통해 JOL2114 박테리아 고스트 백신으로 면역화 된 닭은 비면역 및 벡터 대조군 그룹과 비교하여 바이러스 감염 후 5일과 11일 바이러스 복제수가 현저하게 감소한 것을 알 수 있다. 이로써 고스트 백신균주에 의한 방어

효과를 증명할 수 있다 (그림 8).

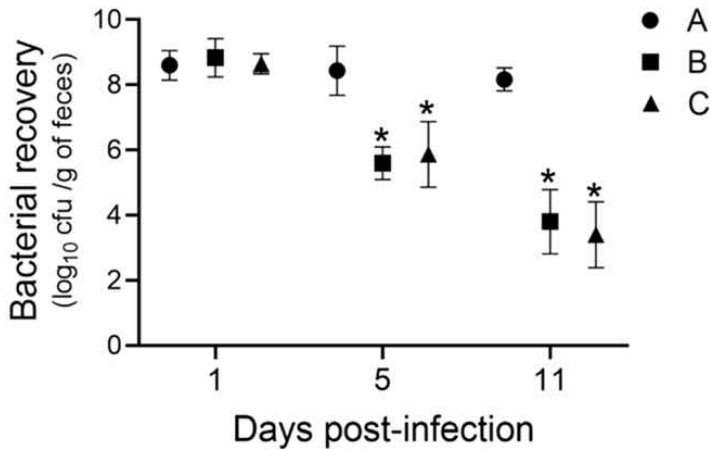


그림 8. Post sub-lethal challenge H1N1 virus copy number in feces of the chickens. Group A, negative controls; group B, the chicken immunized with a vector control, JOL2110 ghost cells via an intramuscular route; group C, the chicken immunized with JOL2114 ghost cells via an IM route; group D, the chicken immunized with JOL2114 ghost cells via an IM route. The feces were collected from each group (n = 3) at day 1, 3, 5, 7, 9 and 11 post H1N1 sub-lethal challenge, and viral titers were determined by Reed and Muench method. The H1N1 viral copy number was also determined at RNA level by qRT-PCR assay. The experiments were performed in duplicate and the results are present as mean \pm SD. *P < 0.05.

● 결론

본 연구를 통해 개발된 고스트 백신 시스템의 방어능에 대한 증명을 위해 인플루엔자 바이러스 hemagglutinin globular의 상부인 이중항원의 HA를 박테리아 표면에 제시하도록 제작하였고 약독화 살모넬라 엔테리티디스 고스트 균주 JOL2114(Δ lon Δ cpxR Δ asd) 백신 후보주로 닭 모델을 통해 살모넬라증 및 바이러스 감염에 대한 교차 방어 효과를 확인하고자 하였다

본 연구에서 사용된 고스트 시스템은 박테리오파지의 E용해 유전자와 hollin-endolysin 유전자에 박테리오파지 Lambda의 보조 용해 관련 단백질인 Rz/Rz1로 보완하여 용해 과정을 향상시켜 완전한 용해가 이루어짐으로써 고스트화를 진행하고자 했다. 용해 기작은 성장기 동안 차단되어 있던 용해 유전자 발현이 antisense inducer인 L- arabinose 없이 42°C에서 24시간 동안 배양될 경우 약독화 SE 균주의 완전한 용해가 이루어지도록 하였다. SE 고스트 JOL2114의 표면에 발현되는 이중항원 단백질은 western-blot 분석으로 31kDa 위치에 있음을 확인하였고, 경구 및 IM 경로를 통한 닭의 면역화로 SE 및 이중항원 특이 면역 반응 효과적으로 유도됨을 확인하였다. 또한 체액성 및 세포성 면역 반응으로 살모넬라증과 인플루엔자 감염에 대하여 방어 가능한 면역 반응을 효과적으로 유도했다.

결과적으로 표면에 제시된 항원의 구조를 보존할 수 있는 SE 고스트의 생물학적 생성을 위해 이중 파지 용해 시스템을 사용할 수 있는 효율적인 전략을 제시할 수 있으며 살모넬라와 인플루엔자 감염을 예방하는 효과적이며 신속한 백신 시스템을 개발 및 검증 하였다.

◆ 부가적 실험수행모습

: ST, SE 동물 백신 동물 실험 사진



그림 1. Grouping of mice for *S. Enteritidis* study . The inoculation dose was compared against the wild type strain.

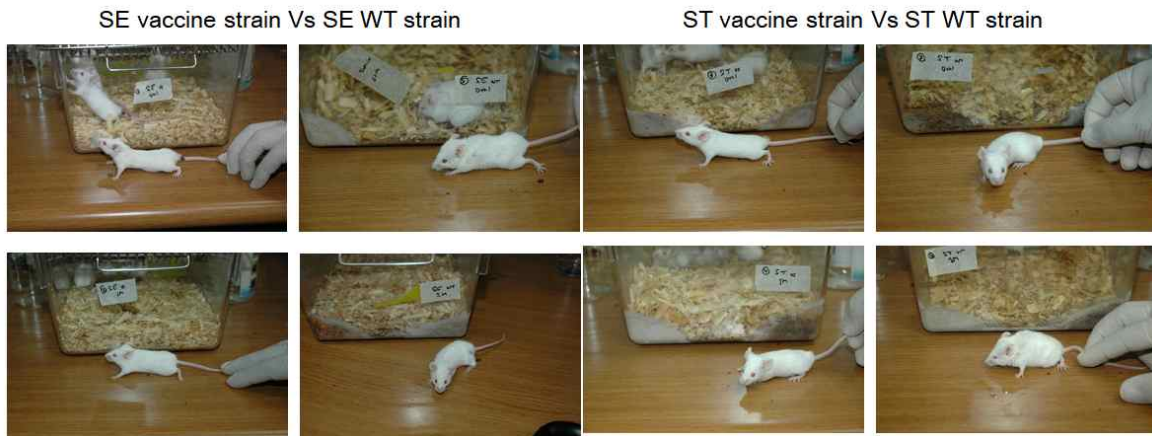


그림 2. Visual images showing the safety of SE and ST vaccine strains against the SE and ST wild type strains. The mice were observed after 5 days of immunization. Both SE and ST vaccine strains demonstrate significant attenuation compared to the wild type strains. Ruffled fur is very much evident in wild type strains inoculated mice.



그림 3. Grouping of mice for *S. Enteritidis* study for Immunization via oral and IM routes.



그림 4. Visual demonstration of the safety of SE vaccine strain. The attenuated *S. Enteritidis* vaccine strain was completely safe with no signs of server infection. Mice were active without indication of ruffled fur at seven days post inoculation.



그림 5. Aseptic collection of mice feces. To study environmental shedding of the vaccine strain, mice feces was collected periodically. Five to six pellets were aseptically collected into eppendorf tubes containing 1 ml buffered peptone water



그림 6. Inoculation route dependent signs of infection. *S. Enteritidis* vaccine strain was compared against the wild type strain upon oral and IM inoculation. The SE vaccine strain was significantly attenuated than the wild type SE, and mice demonstrated with good health in both oral and IM routes



그림 7. Visual demonstration of splens harvested from mice. Harvested spleen after challenge was subjected to bacterial enumeration and histopathological assessment.



그림 8. Visual appearance of SE ghost treated mice after challenge. Comparison of SE::*fliC* ghost with the control after wild type SE challenge. The immunization of SE ghost resulted in a significant tolerance against the wild type challenge compared to the PBS alone group.



그림 9. Enumeration of tissue recovered bacteria. Selective enrichment of *Salmonella* in RV broth and direct plating on BGA plates were conducted during bacterial challenge studies, fecal recovery and dose optimization studies. Subsequently, selected colonies were confirmed by strain specific PCR.

Processing of chicken feces for RV enrichment



Aseptic recovery of organ specimens from chicken for pathological assessments and histopathological preparation



Body weight measurement of chicken



그림 10. Collection and processing of fecal samples, organs samples and body weight measurements were done periodically using the safe and sterile facilities in the laboratory.



그림 11. Collection of tissue specimens from chicken. Upon challenge, spleen, liver and intestine tissue specimens were aseptically harvested for bacterial enumeration and histopathological investigations.

제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절 목표

1. 1차 연도 연구목표 및 연구내용 (표 1)

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2019)	<ul style="list-style-type: none"> ○ LPS O-antigen 합성에 관여하는 rfaL 유전자를 결실을 통한 DIVA 감별진단이 가능한 살모넬라 생균 백신 시스템 제작 	100	<ul style="list-style-type: none"> - DIVA 감별진단이 가능한 약독화 살모넬라 생균 백신 개발을 위한 LPS 관련 O-antigen이 결실되어 제작된 살모넬라 ST와 SE 백신균주 (rough salmonella) 제작 - rfaL 유전자 결실 백신주 제작 - 백신후보주의 투여방법(경구 투여 및 근육주사)을 달리하여 면역화가 이루어진 실험동물에서 체액성 및 세포성 면역 활성화 확인 - DIVA 가능성 확인 - 림프절에서의 항원제시 여부 확인 - 면역화에 따른 야생균주에 대한 방어 효과 확인
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 면역증강 단백질 발현 신개념 살모넬라 고스트 사균백신 개발을 위해 이중 항원 세포벽 발현 벡터를 이용 면역증강 단백질 발현 살모넬라 고스트 사균화 구축 	100	<ul style="list-style-type: none"> - E-lysis 시스템을 이용한 고스트 사균 백신 벡터 제작 - 면역활성 고스트 사균백신 구축을 위한 생물형 TLR 기반 면역력보강제 도입 - 고스트 사균 백신주에 대한 용해력 확인 - 마우스 모델을 통한 체액성 및 세포성 면역 유도 확인 - 면역화에 따른 T 림프구 분화 정도를 FACS 분석을 통해 확인 - 야생형 균주의 도전감염에 대한 잔여 균주 및 방어력 확인

2. 2차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2020)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 실험동물에서 항원을 전달하는 백신 균주에 대한 안전성 및 면역유도실험 	100	<ul style="list-style-type: none"> - 산란계에 HA항원을 발현하는 백신 후보 균주로 면역화진행 - 백신 접종 후 산란계에서 면역화에 따른 폐사 여부 등 부작용 조사 - 면역화에 따른 HA항원에 대한 면역 반응

			측정
	○ 실험동물에서 항원을 전달하는 백신 균주의 조합에 따른 안전성 및 면역유도 실험	100	- 산란계에서 HA항원을 발현 면역원성을 유도하는 백신 후보균주의 조합으로 면역화 진행 - 백신 접종 후 산란계에서 면역화에 따른 폐사 여부 등 부작용 조사 - 면역화에 따른 HA항원에 대한 면역 반응 측정
	○ 백신 후보 균주로 면역화가 진행된 실험동물에 HA항원에 대한 방어능 확인	100	- 단일 백신 후보 균주 또는 조합으로 면역화가 이루어진 각각의 실험동물 그룹에 야생형 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 방어능 확인

3-2. 목표 달성여부

최종 목표인 DIVA 감별진단이 가능한 주요 Salmonella증 예방 약독화 생백신 및 면역증강 단백질을 발현하는 신개념 고스트 살모넬라 사균백신의 구축과 조류 등에서 신개념 Salmonella 생백신 및 고스트 사균백신의 안정성 및 효능 평가 그리고 신개념 Salmonella 생백신 및 고스트 사균 백신의 기존 제품과의 효능 비교 평가를 모두 수행하여 100%의 달성도를 보인다.

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 목표 달성 수행함. 해당 없음.

제 4 장 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 활용계획

- 돼지, 닭, 오리의 살모넬라 저감화 사균백신 및 사료첨가제로의 응용이 가능
 - 연구 종료 시점에 개발된 사균백신 시스템을 이용한 저감 사균백신의 산업화 및 사료 첨가제의 개발이 가능
 - 돼지, 닭, 오리 살모넬라 동시 저감 백신을 통한 경제적 부가가치 창출
- 살모넬라 저감 사균백신 및 사료첨가제의 농장적용을 통한 질병의 초기 예방 및 사양관리 강화
- 돼지, 닭, 오리에서 살모넬라 동시 저감을 통해, 살모넬라 인체 전파 및 감염의 방지
- 두 가지 이상의 항원이 발현될 수 있는 시스템을 이용하여 다양한 병원체에 대한 백신으로의 응용이 가능

4-2. 사업화를 위한 향후계획

- 본 과제를 통해 확보된 기술과 결과를 통해 사업화 일환으로 ‘2020년 농식품 R&D 유망 기술 발표회’에 선정되어 개발 기술에 대한 발표를 수행하여 홍보한 바 있으며 지속적인 홍보를 진행하여 관심이 있는 회사와 접촉을 통해 사업화를 이루고자 함.



2020년 농식품 R&D 유망기술 발표회

기술상담 신청

발표기술

* 또는 기술명, 발표자를 클릭하시면 해당 기술 상담신청이 가능합니다.

No	출발기관	기술명	발표영상
7	전북대학교	신개념의 안전성 강화 및 DIVA 감별 가능한 생백신 및 면역원성 향상 사백신 개발	
8	네오바이오㈜	안심 계란을 위한 종합방재전략(IPM)	
9	건국대학교	우수한 항균활성을 가지는 부추 사료 첨가제	

<농식품 R&D 유망기술 발표회 참여>

- 또한 지속적으로 CTC bio, 코미팜, 우진B&G, 중앙백신 등 백신산업체와의 개별적인 교류를 통해 사업화 추진을 목적으로 본 과제를 통해 확보된 기술과 결과를 후속 사업화 연구과제를 공동으로 수행하고자 함.

붙임. 참고문헌

1. Hoelzer K, Moreno Switt AI, Wiedmann M (2011) Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Vet Res* 42:34
2. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SLV (2011) Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17:7 - 15
3. Vugia DJ, Samuel M, Farley MM, Marcus R, Shiferaw B, Shallow S, Smith K, Angulo FJ, Group EIPFW (2004) Invasive Salmonella infections in the United States, FoodNet, 1996 - 1999: incidence, serotype distribution, and outcome. *Clin Infect Dis* 38:S149 - S156
4. Humphrey T (2004) Salmonella, stress responses and food safety. *Nat Rev Microbiol* 2:504 - 509
5. Fluit AC (2005) Towards more virulent and antibiotic-resistant Salmonella? *FEMS Immunol Med Microbiol* 43:1 - 11
6. Besser T, Goldoft M, Pritchett L, Khakhria R, Hancock D, Rice D, Gay J, Johnson W, Gay C (2000) Multiresistant Salmonella Typhimurium DT104 infections of humans and domestic animals in the Pacific Northwest of the United States. *Epidemiol Infect* 124:193 - 200
7. Denagamage TN, O'Connor AM, Sargeant JM, Rajić A, McKean JD (2007) Efficacy of vaccination to reduce Salmonella prevalence in live and slaughtered swine: a systematic review of literature from 1979 to 2007. *Foodborne Pathog Dis* 4:539 - 549

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 주요 인수공통살모넬라감염증 저감대책을 위한 생물학적 면역증강제도입 신개념 사균백신 및 DIVA 가능한 약독화 생백신 개발 (영문)Development of DIVA-capable novel attenuated live vaccine and inactivated vaccine system employing biological adjuvants, fliC and dmLT against <i>Salmonella</i> infection				
주관연구기관	전북대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 전북대학교	
참 여 기 업				(성명) 이준화	
총연구개발비 (천원)	계	450.000	총 연구 기간	2019. 05. 01 - 2020. 12. 31(1년8개월)	
	정부출연 연구개발비	450.000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	13명
	기업부담금			내부인원	11명
	연구기관부담금			외부인원	2명
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>살모넬라 감염 예방의 중요성을 감안 시 농장단계에서 살모넬라증의 철저한 예방을 위하여 사균백신과 같은 안전성을 지닌 약독화 생백신의 개발뿐만 아니라, 안전성에 증강된 면역원성을 지닌 사균 백신의 개발이 시급한 실정이다. 또한 농장 단계에서 혈청학적 감별 방법에 의하여 살모넬라 감염 진단을 하는 것을 고려 할 때 백신 접종 군과 감염군의 감별이 가능한 DIVA (differentiating infection in vaccinated animals) 가능 백신 주의 개발은 백신의 현장 적용 시 그 실용성을 증가 시킬 수 있다.</p> <p>따라서 DIVA 감별진단이 가능한 주요 <i>Salmonella</i>증 예방 약독화 생백신 및 면역증강 단백질을 발현하는 신개념 고스트 살모넬라 사균백신을 구축하여 조류 등에서 신개념 <i>Salmonella</i> 생백신 및 고스트 사균 백신의 안정성 및 효능을 평가 하고자 한다.</p> <p>본 연구 결과를 토대로 1건의 특허 등록 및 출원과 6편의 해외 학술논문 게재 그리고 국외 학술대회 3회, 국내 학술대회 2회 참여 및 포스터 발표를 수행하는 성과를 거뒀다.</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>1. 향상된 약독화 살모넬라를 위한 세포독성 및 O-antigen 결실 생백신주 제작</p> <ul style="list-style-type: none"> - 목적 결실 유전자 : <i>lon</i>, <i>cpxR</i>, <i>rfaL</i> - Lambda Red 재조합 방법으로 ST 변이주인 JOL911($\Delta lon \Delta cpxR$)과 SE변이주인 JOL919($\Delta lon \Delta cpxR$)를 사용하여 프레임 내에 존재하는 <i>rfaL</i> 유전자를 결실시킴으로써 각 JOL2377(<i>Salmonella</i> Typhimurium $\Delta lon \Delta cpxR \Delta rfaL$), JOL2381(<i>Salmonella</i> Enteritidis mutant ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta rfaL$)) 변이주를 제작하였다. <p>2. 면역 유도능 향상을 위한 fliC발현 고스트 사균백신균주 제작</p>					

- 살모넬라 표면 발현 단백질: fliC
- 해당 항원과 함께 발현하여 숙주동물로 하여금 항원에 대한 면역반응의 효과를 높여 줄 수 있는 생물학적 면역 활성 보조제인 fliC를 pMM184 및 pJHLP420에 클로닝 후 발현여부를 western blot 을 통하여 확인하였다.

3. In vitro 상에서 개발된 백신 균주의 발현여부 확인

- 개발 백신 균주의 해당 유전자 도입과 결실 및 항원을 발현하는지 확인하기 위하여 배양이 이루어진 백신 후보 균주를 SDS-PAGE한 다음 Western Blotting을 통해 각 항원의 Size를 확인하여 해당 항원의 발현이 약독화 살모넬라 균주에서 발현 여부를 확인하였고, O 항원의 결실은 silver staining을 통해 확인하였다.

4. 항원을 발현하는 이중 용해 유전자에 의해 비활성화 된 SE 고스트 균주 구축

- 후보항원: HA1
- HA1항원을 pJHL420에 클로닝 후 이를 약독화가 이루어진 SE로 도입하여 해당 항원의 발현 여부를 western blotting로 확인하였으며 고스트화 여부 및 크기를 주사전자현미경으로 관찰하였다.

5. 실험동물에서의 개발된 생백신 및 고스트 사균백신 후보 균주의 안전성 평가

- 접종량 최적화를 위하여 다양한 농도 (마리당 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} CFU)의 백신 후보 균주를 경구 및 IM 접종하여 면역화가 진행된 실험동물을 대상으로 다음과 같이 안전성을 확인하였다. 실험동물의 비장 및 간에 잔존하는 박테리아 및 분변을 통해 배출되는 박테리아를 BGA플레이트에 도말하여 측정하였으며 혈청형 특이 프라이머를 사용하여 PCR로 확인하였다. 또한 설사와 사료 섭취 감소 또는 체중 감소 같은 감염 징후를 관찰하였다.

6. 약독화 균주에 의한 전신성 면역반응 평가

- 전신성 면역 활성은 IgG 및 IgY에 대한 항체 역가로 측정하였다. IgG 및 IgY는 백신후보 균주의 경구 및 IM으로 면역화가 이루어진 실험동물에 있어서 전신 면역반응이 유도되는 것을 확인할 수 있는 지표이므로 실험동물로부터 채취한 혈청으로 ELISA를 통해 측정하였다.

7. 약독화 균주에 의한 세포성 면역반응 평가

- 세포성 면역 활성은 PBMC 및 비장세포 분리를 통해 항원 단백질로 재자극 후 분화된 CD4+ 및 CD8+ T cell을 FACS를 통해 분석하였다. 또한 IFN- γ 및 IL-4 그리고 IL6, IL10, TNF-a 등의 백신 균주 특이 사이토카인의 항원 특이 유도를 qRT-PCR을 사용하여 mRNA 레벨을 통해 확인하였다. 또한 MTT를 이용하여 항원 재자극에 대한 증식 반응을 측정 하였다.

8. 실험동물에서 백신 후보 균주로 면역화를 통한 향상된 면역반응에 의한 야생형의 ST 및 SE 도전감염에 따른 방어능 확인

1) 향상된 ST, SE 생백신 및 고스트 백신 후보 균주로 면역화

- 실험동물인 닭 및 마우스에 본 연구에서 개발된 생백신 및 고스트 백신 후보 균주를 경구 및 IM 접종을 통한 면역화 진행

2) 백신후보 균주로 면역화가 진행된 실험동물의 공격 접종

- 백신 후보균주로 면역화가 이루어진 닭 및 마우스에 야생형의 박테리아로 도전 감염을 진행 하여 잔존하는 박테리아 및 감염된 각 그룹의 실험동물로부터 분비되는 박테리아 수를 분변 및 조직 내에서 측정하여 방어능을 확인 하였다. 또한 조직 절편을 이용하여 병원체에 의해 유도되는 염증 반응의 변화를 확인 하였다.

9. 실험동물에서 백신 후보 균주로 면역화를 통한 향상된 면역반응에 의한 야생형의 ST, SE 도전감염에 따른 방어능 확인

1) SE 고스트 백신 후보 균주로 면역화

- 실험동물인 닭 및 마우스에 본 연구에서 개발된 SE 고스트 백신 후보 균주를 경구 및 IM 접종을 통한 면역화 진행

2) 백신후보 균주로 면역화가 진행된 실험동물의 공격 접종

- SE 고스트 백신 후보균주로 면역화가 이루어진 닭에 바이러스로 도전 감염을 진행 하여 바이러스 RNA의 복제수를 Real-time PCR로 확인함으로써 면역화에 따른 H1N1바이러스에 대한 방어 효과를 확인 하였다.

10. 실험동물에서 백신 후보 균주로 면역화를 통한 DIVA감별능 확인

- 온전한 형태의 LPS를 가지는 야생형 균주와 백신 후보주로 면역화 한 그룹에서의 LPS특이항체 반응을 ELISA로 측정함으로써 DIVA 감별능을 확인하였다.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

1. 본 연구에서 제작된 닭, 오리의 살모넬라 저감화 사균백신 및 사료첨가제로의 응용이 가능하다. 또한 사균백신 시스템을 이용한 저감 사균백신의 산업화로 살모넬라증에 의해 약 1조 2천억 원에 달하는 매년 지출 의료비용과 가축의 경제적 손실비용 등을 사전에 예방함으로써 축산농가의 생산성 증대 효과로 인해 경제적 부가가치 창출이 가능하다. 그리고 살모넬라의 인체 전파 및 감염 방지가 가능함으로써 질병의 초기 예방 및 사양관리를 강화할 수 있다.

2. 살모넬라 생균백신 수준의 방어력을 확보한 사균백신 개발 기술이 확보됨에 따라 사균백신의 살모넬라 방어효과 극대화 기술 확립 및 이를 통한 방어효과 증명이 가능하며 농장단계에서 살모넬라증 저감 사양프로그램에의 활용이 가능하다. 두 가지 이상의 항원이 발현될 수 있는 유전자 조작 기술을 통한 맞춤형 백신 개발 시스템을 이용하여 다양한 병원체에 대한 백신으로의 응용이 가능하며 공중 보건학적으로 문제가 되고 있는 식품을 매개로 살모넬라증에 대한 인체감염원을 방어할 수 있는 백신개발로 인한 국민의 불안감 해소가 가능하다.

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		119058-02	
사업구분	기축질병대응기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	기축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	주요 인수공통살모넬라감염증 저감대책을 위한 생물학적 면역증강제 도입 신개념 사균백신 및 DIVA 가능한 약독화 생백신 개발			과제유형	개발
연구기관	전북대학교 산학협력단			연구책임자	이존화
연구기간	연차	기간	정부	민간	계
연구비 (천원)	1차연도	180,000			180,000
	2차연도	270,000			270,000
	계	450,000			450,000
참여기업					
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 21. 02. 24 (수)

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
전북대학교	교수	이존화

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	이존화
----	-----

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (우수)

주요 살모넬라증을 유발하는 ST 및 SE 유래 살모넬라증을 저감화하기 위해서는 생균백신을 이용하는 것이 가장 적합하지만, 생균 백신은 동물에 접종 시 병원성 균주로의 복귀 가능성이 높고, 국내 양계 및 양돈장 등에서 생균 백신에 대한 거부감이 존재하고 있다. 따라서 시장성을 고려하여, 생균 백신의 장점과 사균 백신의 장점을 모두 갖춘 신개념 사균백신의 개발이 절대적으로 필요하다. 특히 기존의 사균백신의 자가용해 불안정성을 극복하기 위하여 새로운 과지유전자 카제트(holin-endolysin) 도입 및 면역원성을 높이기 위한 생물학적 면역 증강제를 도입하여 안전성과 효율 증가를 확인하였고 LPS-O 항원의 결실을 이용한 DIVA감별 진단 가능한 살모넬라 약독화는 생균백신에서 외래항원의 효율적인 발현을 향상 하였으며 이로써, 신개념의 안전성 및 전달 효율을 개선한 우수한 백신이 될 가능성이 있다고 평가됨.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

본 연구에서 개발한 살모넬라 생균백신 및 사균백신을 이용하여 다른 동물유래 질환의 예방을 위한 이중 항원 발현 유전자 조작기술을 통한 맞춤형 백신개발 가능 하며 살모넬라 생균백신 수준의 극대화 된 방어력을 확보한 사균백신 개발 기술 확보 및 방어 효과 증명이 가능함. 또한 개발 백신을 통한 돼지, 닭의 살모넬라증에 의한 살처분의 최소화로 인한 경제적 손실 예방 및 생산성 증대로 인한 축산 산업의 국제 경쟁력 강화될 수 있음, 또한 공중보건학적으로 문제가 되고 있는 살모넬라증에 대한 인체감염원을 방어 할 수 있는 백신개발로 인한 국민의 불안감 해소 및 안정성이 향상된 생균 백신의 백신개발로 축산 농가의 살모넬라증 예방 수단 다양화 도모 가능함.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

개발된 사균 백신은 돼지, 닭, 오리의 살모넬라 저감화 사균백신 및 사료첨가제로의 응용이 가능하며 이로 인한 경제적 부가가치 창출이 가능함. 또한, 살모넬라 저감 사균백신 및 사료첨가제의 농장적용을 통한 질병의 초기 예방 및 사양관리 강화가 가능해질 수 있음. 돼지, 닭, 오리에서 살모넬라 동시저감을 통해, 살모넬라 인체 전파 및 감염의 방지하며 기존 방식보다 쉽게 생산이 가능하다는 강점을 가짐에 따라 경제적으로 현장에서 실용적인 적용이 가능할 것임.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

총 20개월의 연구기간 동안 목표하고자 한 생물학적 면역증강제도입 신개념 사균백신 및 DIVA 가능한 약독화 생백신 개발과 이를 이용한 면역 활성화 및 방어효능 그리고 DIVA감별진단 등을 증명 하였으며 실제 현장에서 적용 가능한 수준의 면역원성 및 안전성을 증명하는 등의 성과를 보임.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수)

본 연구 결과를 통하여 확인한 개선된 개발 백신의 효능을 증명함에 따라 해외 학술지 6편 게재, 국제 학회 3회 및 국내 학회 2회 포스터 발표를 수행하였으며 특허 출원 및 등록 1건과 농식품 R&D 유망기술발표회 1회 전시하는 등의 성과를 달성함.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
LPS O-antigen 합성에 관여하는 rfaL 유전자를 결실을 통한 DIVA 감별진단이 가능한 살모넬라 생균 백신 시스템 제작	20	100	<ul style="list-style-type: none"> - DIVA 감별진단이 가능한 LPS 관련 O-antigen이 결실 살모넬라 ST와 SE 백신균주 제작 및 rfaL 유전자 결실 백신주 제작 - 백신후보주의 투여방법(경구 투여 및 근육주사)을 달리하여 면역화가 이루어진 실험동물에서 체액성 및 세포성 면역 활성과 DIVA 가능성 과 야생균주에 대한 방어 효과 확인 - 림프절에서의 항원제시 여부 확인
면역증강 단백질 발현 신개념 살모넬라 고스트 사균백신 개발을 위해 이중 항원 세포벽 발현 벡터를 이용 면역증강 단백질 발현 살모넬라 고스트 사균화 구축	20	100	<ul style="list-style-type: none"> - E-lysis 시스템을 이용한 고스트 사균 백신 벡터 제작 및 면역활성 위한 생물형 TLR 기반 면역력보강제 도입 및 용해력 확인 - 마우스 모델을 통한 체액성 및 세포성 면역 유도 확인 - 면역화에 따른 T 림프구 분화 정도를 FACS 분석을 통해 확인 - 야생형 균주의 도전감염에 대한 잔여 균주 및 방어력 확인
실험동물에서 항원을 전달하는 백신 균주에 대한 안전성 및 면역유도 실험	20	100	<ul style="list-style-type: none"> - 산란계에 항원을 발현하는 백신 후보균주로 면역화 진행 - 백신 접종 후 산란계에서 면역화에 따른 폐사 여부 등 부작용 조사 - 면역화에 따른 HA항원에 대한 면역 반응 측정
실험동물에서 항원을 전달하는 백신 균주의 조합에 따른 안전성 및 면역유도 실험	20	100	<ul style="list-style-type: none"> - 산란계에서 항원을 발현 면역원성을 유도하는 백신 후보균주의 조합으로 면역화 진행 - 백신 접종 후 산란계에서 면역화에 따른 폐사 여부 등 부작용 조사 - 면역화에 따른 HA항원에 대한 면역 반응 측정

백신 후보 균주로 면역화가 진행된 실험동물에 HA 항원에 대한 방어능 확인	20	100	단일 백신 후보 균주 또는 조합으로 면역화가 이루어진 각각의 실험동물 그룹에 야생형 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 방어능 확인
합계	100점	100	생물학적 면역증강제 도입 신개념 사균백신 및 DIVA 가능한 약독화 생백신 개발과 이에 따른 백신 효과를 검증함.

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구의 최종 목표는 DIVA 감별진단이 가능한 주요 *Salmonella* 증 예방 약독화 생백신 및 면역증강 단백질 발현하는 신개념 고스트 살모넬라 사균백신을 구축하여 조류 등에서 신개념 *Salmonella* 생백신 및 고스트 사균 백신의 안정성 및 효능을 평가함. 다양한 살모넬라의 혈청형 중 살모넬라 타이피뮤리움 (*S.Typhimurium*, ST) 과 엔테라이티디스 (*S.Enteritidis*, SE)는 가축에서 질병을 일으킬 뿐 아니라 감염된 육류 가공류 등의 식자재를 통해 사람에게 전파되어 살모넬라 식중독을 일으킬 수 있기에 우리나라 뿐 아니라 전 세계대부분의 국가에서 공중보건학적 문제로 여겨지고 있음. 또한, 미국에서도 매년 4백만 명 이상이 살모넬라균에 감염되며 유럽의 식중독 감염원 통계에서도 확인된 병원체 중 약 21.8%가 살모넬라로 가장 많이 발생한 것으로 보고되어 있음. 현재 이용되는 생균백신은 부작용이 문제가 되기도 하고, 변이균주(mutant)에 의한 환경오염 및 인체에 대한 악영향이 있는 한편 사균백신이나 subunit 백신의 경우 생균과 같은 안전성 우려가 없지만 방어력이 만족스럽지 못함. 본 연구에서는 생균백신과 사균백신의 한계를 극복하고 새로운 개념의 백신을 고안하여, 안전하고 환경 등 오염의 우려가 작은 생균백신의 개발 및 방어력이 생균백신에 유사한 사균백신을 개발하였으며 이는 검증된 면역원성 및 안전성으로 효과적인 살모넬라증 예방을 위한 백신이 될 수 있을 것이며 쉽고 빠른 생산 방식으로 효율적이며 경제적인 백신 후보가 될 수 있음을 본 연구 성과로 입증할 수 있었음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

해당없음

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

생균백신과 사균백신의 장점을 살리고 단점을 보완할 수 있는 단순한 원리로, 생균자체에 어떠한 화학적 처리를 하지 않고 균 자체를 백신으로 이용할 수 있는 고스트백신은 그 활용이 이상적인 것으로 판단됨. 또한, 백신의 생산 비용 또한 중요한 인자로서 고스트백신의 생산은 파지의 용해유전자를 이용하여 기존 방식보다 쉽게 생산 가능함을 고려시 경제적으로 현장에서 효과적으로 적용 가능할 것이라 평가됨.

IV. 보안성 검토

1. 연구책임자의 의견

해당없음.

2. 연구기관 자체의 검토결과

해당없음.

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	주요 인수공통살모넬라감염증 저감대책을 위한 생물학적 면역증강제도입 신개념 사균백신 및 DIVA 가능한 약독화 생백신 개발			
주관연구기관	전북대학교 산학협력단		주관연구책임자	이존화
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	450,000,000			450,000,000
연구개발기간	2019. 05. 01 - 2020. 12. 31 (20개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①LPS O-antigen 합성에 관여하는 rfaL유전자를 결실을 통한 DIVA 감별진단이 가능한 살모넬라 생균 백신 시스템 제작	<i>lon</i> , <i>cpxR</i> , <i>rfaL</i> 유전자를 결실하여 JOL2377(<i>Salmonella</i> Typhimurium) JOL2381(<i>Salmonella</i> Enteritidis) 변이주를 제작
②면역증강 단백질 발현 신개념 살모넬라 고스트 사균백신 개발을 위해 이중 항원 세포벽 발현 벡터를 이용 면역증강 단백질 발현 살모넬라 고스트 사균화 구축	용해 유전자를 발현하는 플라스미드에 <i>fliC</i> 를 재조합하여 해당 항원과 함께 발현하여 숙주 동물로 하여금 항원에 대한 면역반응의 효과를 높여 줄 수 있는 사균화 백신 균주를 제작
③동물 모델에서 신개념 살모넬라 생균 및 고스트 사균 백신의 안전성 및 효능 평가와 최적화 확립	-마우스와 닭에서 접종량 최적화와 장기 및 분변에서의 안전성 확인 -백신 후보 균주의 효능 평가를 통해 향상된 면역반응에 야생형 ST, SE 도전감염에 대한 방어능 확인
④ LPS-O antigen 결실 약독화 생백신의 목적 동물 적용 시 야외균주 감염 동물과 DIVA 감별진단 가능 여부 확인	마우스와 닭에서 온전한 형태의 LPS를 가지는 야생형 균주와 백신 후보주로 면역화 한 그룹에서의 LPS특이항체 반응을 ELISA로 측정함으로써 DIVA 감별능을 확인

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	기 술 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						
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	30												20		20				
최종목표	1										1			2		3			
연구기간내 달성실적	1	1									6			5		3			
달성율(%)	100	100									600			250		100			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	DIVA 감별진단이 가능한 주요 Salmonella증 예방 약독화 생백신
②	면역증강 단백질을 발현하는 신개념 고스트 살모넬라 사균백신

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)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술					√					
②의 기술					√	√				

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	-개발 백신의 산업화로 살모넬라증에 의해 약 1조 2천억 원에 달하는 매년 지출 의료비용과 가축의 경제적 손실비용 등을 사전에 예방함으로써 축산농가의 생산성 증대 효과로 인해 경제적 부가가치 창출이 가능 -식품을 매개로 살모넬라증에 대한 인체감염원을 방어 할 수 있는 백신개발로 인한 국민의 불안감 해소가 가능 - 살모넬라의 인체 전파 및 감염 방지가 가능함으로써 질병의 초기 예방 및 사양관리 강화 가능
②의 기술	-살모넬라 생균백신 수준의 방어력을 확보한 사균백신 개발 기술이 확보됨에 따라 사균백신의 살모넬라 방어효과 극대화 기술 확립 및 이를 통한 방어효과 증명이 가능 -농장단계에서 살모넬라증 저감 사양프로그램에의 활용이 가능 -두 가지 이상의 항원이 발현될 수 있는 유전자 조작 기술을 통한 맞춤형 백신 개발 시스템을 이용하여 다양한 병원체에 대한 백신으로의 응용이 가능

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전 시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표		1									1								
연구기간내 달성실적		1									1								
연구종료 후 성과창출 계획																			

◇ 첨부자료

1. 3등급 시설 사용 수료증, 2019년도, 2020년도



2. 동물실험 계획 승인서- 마우스, 닭

성장을 넘어 **성숙으로** 전북대학교

동물실험계획 승인서

1. 연구책임자

성명	소속	직급	연락처	교육이수내용
이준화	전북대학교	교수		CBNU-2019-00284

2. 동물실험계획서

접수번호	2019-88
과제명	주요 인수공통살모넬라감염증 저감대책을 위한 생물학적 면역증강제 도입 신개념 사균백신 및 DIVA 가능한 약독화 생백신 개발
실험기간	위원회 승인 일 이후 - 2020 년 11 월 01 일 (총 12개월)
사용동물종 및 마리수	Balb/c, C57BL/6 4주령 알컷 30마리

3. 승인 사항

심의일자	2019. 11. 07.
승인일자	2019. 11. 07.
승인번호	CBNU 2019-085

전북대학교 동물실험윤리위원회에서는 상기의 동물실험계획을 승인합니다.

2019. 11. 07.

전북대학교 동물실험윤리위원회 위원장 강형섭
Homepage: <http://lac.honamlife.com>
TEL: 82-63-900-4059

성장을 넘어 **성숙으로** 전북대학교

동물실험계획 승인서

1. 연구책임자

성명	소속	직급	연락처	교육이수내용
이준화	전북대학교	교수		CBNU-2019-00284

2. 동물실험계획서

접수번호	2019-87
과제명	주요 인수공통살모넬라감염증 저감 대책을 위한 생물학적 면역 증강제 도입 신개념 사균 백신 및 DIVA 가능한 약독화 생백신 개발
실험기간	위원회 승인 일 이후 - 2020 년 11 월 01 일 (총 12개월)
사용동물종 및 마리수	산란계 7 주령 알컷 30마리

3. 승인 사항

심의일자	2019. 11. 07.
승인일자	2019. 11. 07.
승인번호	CBNU 2019-098

전북대학교 동물실험윤리위원회에서는 상기의 동물실험계획을 승인합니다.

2019. 11. 07.

전북대학교 동물실험윤리위원회 위원장 강형섭
Homepage: <http://lac.honamlife.com>
TEL: 82-63-900-4059

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술 개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.