

GOVP1200609802

최 종
연구보고서

점막점착성 키토산 나노입자를 이용한 돼지
위축성비염예방을 위한 점막면역유도체 개발

Development of Immune Adjuvant Using
Mucoadhesive Chitosan Nanoparticles for
Prevent Swine Atrophic Rhinitis Disease

연구기관
서울대학교

농림부

T08/189A

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “점막점착성 키토산 나노입자를 이용한 돼지 위축성 비염예방을 위한 점막면역유도체 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11월 12일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 조종수

제1세부연구책임자 : 조종수

연 구 원 : 강호림

연 구 원 : 박인규

연 구 원 :곽정정

제2세부연구책임자 : 유한상

연 구 원 : 강미란

연 구 원 : 신나리

연 구 원 : 강상균

요 약 문

I. 제 목

“점막점착성 키토산 나노입자를 이용한 돼지 위축성 비염예방을 위한 점막면역유도체 개발”

II. 연구개발의 목적 및 필요성

돼지에서 많은 문제를 야기하며 막대한 경제적 피해를 주는 호흡기 질병을 효율적으로 예방하기 위하여 백신접종을 실시하는데 백신은 단백질로서 반감기가 짧고, 외부의 온도, 습도, pH나 생체 내의 효소에 의하여 분해되기 쉬운 단점과 일반적인 근육주사나 경구접종으로는 충분하게 면역형성이 되지 않는 문제점을 극복하고자 하는 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 돼지 위축성비염 주요병원성인자 분석 및 항원준비

1) B. Bronchiseptica (BB) Pasteurella multocida type D (PMTD)의 분리

위축성비염 의심 환축으로부터 분리동정후에 dermonecrotic toxin (DNT) 유전자를 확인하였더니 BB에서는 643bp 그리고 PMTD에서는 1080bp 크기를 확인하였다.

2) 단백질의 확인

확인추출한 단백질을 SDS-PAGE로 확인하였더니 OMP는 BB에서는 약 40KDa 그리고 PMTD에서는 약 140KDa 크기의 단백질이 확인되었다.

2. BBD가 담지된 키토산미립자에서의 in vitro에서의 면역활성연구

1) 키토산미립자의 제조

키토산을 식초산에 녹인 용액에 tripolyphosphate (TPP)를 첨가하여 이온화결합작용에 의하여 키토산미립자를 제조하였다.

2) 키토산미립자에 Bordetella Bronchiseptica Dermonecrototoxin (BBD)의 담지

BBD용액에 키토산미립자를 혼합하여 37°C의 incubator에서 100rpm으로 교반하면서

24시간 BBD를 담지시켰다. 담지된 BBD양은 BCA 방법으로 측정하였더니 65에서 75wt-%였다.

3) 키토산미립자의 형태관찰

키토산미립자는 SEM으로 관찰하였더니 구형을 나타냈다.

4) 키토산미립자의 크기측정

키토산과 BBD가 담지된 키토산미립자의 크기는 DLS로 측정하였더니 키토산은 1.94 μm 였고 BBD가 담지된 키토산미립자는 4.39 μm 였다.

5) BBD가 담지된 키토산미립자에서의 *in vitro* 에서의 BBD의 방출

BBD가 담지된 키토산미립자에서의 *in vitro* 에서의 BBD의 방출실험을 한 결과 키토산분자량이 클수록 pH가 작을수록 BBD의 방출량은 작아졌다.

6) BBD가 담지된 키토산미립자를 이용한 RAW264.7세포에서의 면역활성

BBD가 담지된 키토산미립자를 이용하여 RAW264.7세포에서의 면역활성을 보기 위하여 tumor necrosis factor- α (TNF α)와 nitric oxide (NO)의 분비를 측정하였더니 대조구인 LPS보다 많은 양이 분비되었다.

3. BBD가 담지된 폐길화된 키토산미립자에서의 *in vitro*에서의 면역활성연구

1) 키토산의 폐길화

키토산의 아미노기와 카르복실기를 갖춘 폴리에틸렌글리콜과 EDC/NHS를 사용하여 4°C에서 48시간 반응시켜 폐길화한 키토산을 제조하였다.

2) 폐길화된 키토산미립자의 제조

폐길화된 키토산을 식초산에 녹인 용액에 TPP를 첨가하여 이온화결합작용에 의하여 폐길화된 키토산미립자를 제조하였다.

3) 폐길화된 키토산미립자에 *Bordetella Bronchiseptica* Dermonecrototoxin (BBD)의 담지
BBD용액에 폐길화된 키토산미립자를 혼합하여 37°C의 incubator에서 100rpm으로 교반하면서 24시간 BBD를 담지시켰다. 담지된 BBD양은 BCA 방법으로 측정하였더니 65에서 75wt-%였다.

4) 폐길화된 키토산미립자의 형태관찰

폐길화된 키토산미립자는 SEM으로 관찰하였더니 구형을 나타냈다.

5) 폐길화된 키토산미립자의 크기측정

폐길화된 키토산과 BBD가 담지된 폐길화된 키토산미립자의 크기는 DLS로 측정하였더니 폐길화된 키토산은 2.71 μm 였고 BBD가 담지된 폐길화된 키토산미립자는 5.47 μm 였다.

6) BBD가 담지된 폐길화된 키토산미립자에서의 in vitro 에서의 BBD의 방출
BBD가 담지된 폐길화된 키토산미립자에서의 in vitro 에서의 BBD의 방출실험을 한 결과 폴리에틸렌글리콜의 친수성의 영향으로 키토산미립자보다 방출속도가 더 빨랐다.

7) BBD가 담지된 폐길화된 키토산미립자를 이용한 RAW264.7세포에서의 면역활성
BBD가 담지된 폐길화된 키토산미립자를 이용하여 RAW264.7세포에서의 면역활성을 보기 위하여 tumor necrosis factor- α (TNF α)와 nitric oxide (NO)의 분비를 측정하였더니 대조구인 LPS보다 많은 양이 분비되었다.

4. 안정화제로 수식된 키토산미립자에서의 in vitro에서의 면역활성연구

1) F127존재하에서 만든 키토산미립자의 제조

F127존재하에서 키토산을 식초산에 녹인 용액에 TPP를 첨가하여 이온화결합작용에 의하여 키토산미립자를 제조하였다.

2) F127존재하에서 만든 키토산미립자에 Bordetella Bronchiseptica Dermonecrotxin (BBD)의 담지

BBD용액에 F127존재하에서 만든 키토산미립자를 혼합하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 incubator에서 100rpm으로 교반하면서 24시간 BBD를 담지시켰다. 담지된 BBD양은 BCA 방법으로 측정하였더니 65에서 75wt-%였다.

3) F127존재하에서 만든 키토산미립자의 형태관찰

F127존재하에서 만든 키토산미립자는 SEM으로 관찰하였더니 구형을 나타냈다.

4) F127존재하에서 만든 키토산미립자의 크기측정

키토산과 BBD가 담지된 키토산미립자의 크기는 DLS로 측정하였더니 키토산은 3.42 μm 였고 BBD가 담지된 키토산미립자는 5.21 μm 였다.

5) F127존재하에서 만든 키토산미립자에서의 in vitro 에서의 BBD의 방출

F127존재하에서 만든 키토산미립자에서의 in vitro 에서의 BBD의 방출실험을 한 결과 F127의 친수성의 영향으로 BBD가 빨리 방출되었다.

- 6) F127존재하에서 만든 키토산미립자에 BBD를 담지후 RAW264.7세포에서의 면역활성 F127존재하에서 만든 키토산미립자에 BBD를 담지후 RAW264.7세포에서의 면역활성을 보기 위하여 tumor necrosis factor- α (TNF α)와 nitric oxide (NO)의 분비를 측정하였더니 대조구인 LPS보다 많은 양이 분비되었다.
5. 마우스에서 키토산 미립자에 담지시킨 *Bordetella bronchiseptica* DNT 의 면역반응 BBD가 담지된 키토산미립자의 실험동물인 쥐의 비강내로 접종하여 ELISA방법으로 유도된 면역반응을 확인하였더니 IgA는 접종양과 접종시간에 비례하여 증가되었다. 혈청내의 IgA나 IgG 항체는 확인되었으나 침내에서는 항체유도가 확인되지 못했다.
6. 만노스와 결합시킨 키토산미립자와 F127존재하에서 만든 키토산미립자에 백신 BBD를 담지한후, BBD/키토산미립자의 면역반응 비교
- 1) 만노스기의 키토산에 결합
키토산의 아미노기와 이소티오시안네이트를 갖는 만노스를 반응시켜 만노스화키토산을 제조하였다.
 - 2) 만노스화키토산미립자의 제조
만노스화키토산을 식초산에 녹인 용액에 TPP를 첨가하여 이온화결합작용에 의하여 만노스화 키토산미립자를 제조하였다.
 - 3) F127존재하에서 만든 키토산미립자와 만노스화 키토산미립자에 BBD를 담지시킨후 실험동물 쥐에서의 면역반응
F127존재하에서 만든 키토산미립자와 만노스화 키토산미립자에 BBD를 담지시킨후 실험동물 쥐에서의 면역반응실험을 비교한 결과 F127존재하에서 만든 키토산에 BBD를 담지한 경우 IgA 항체가가 가장 높았고 생존율은 제일 높았다. 그러나 IgG항체가는 비슷하였다.
7. 돼지에서 키토산 미립자에 담지시킨 *Bordetella bronchiseptica* DNT의 면역반응
- 1) BBD가 담지된 키토산미립자의 목적동물 돼지에서의 면역반응
BBD가 담지된 키토산미립자의 목적동물 돼지에서의 면역반응은 돼지의 비강내로 접종하여 10일이후, 유도된 비강세척액내의 항체가 및 혈청내 IgG 항체가 음성대조군에 비하여 면역화이후, 꾸준히 증가하였고 특히 40일후에는 5배정도의 차이를 보였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

돼지 위축성 비염예방을 위하여 점막면역유도를 위하여 점막점착성 키토산 나노입자를 만들어 BBD를 담지시켜 in vitro에서의 방출조건을 확립하였고 면역세포에서의 면역능력을 물론 실험동물인 쥐나 목적동물인 돼지에서의 면역이 유도되는것이 확인되었기에 돼지 위축성비염예방에 키토산미립자가 BBD 항원의 훌륭한 전달체로서의 상품의 가치가 크리라 알고 이미 2건의 국내특허 출원중에 있고 기업화할 기업체를 모색중에 있다. 따라서 활용에 대한 건의로서 우리 농업의 경쟁력을 높이기 위하여 본 과제와 같은 BT와 NT의 첨단기법이 농업에서도 접목이 될 수 있기를 건의한다.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Development of immune adjuvant using mucoadhesive chitosan nanoparticles for prevent swine atrophic rhinitis disease

II. The Purpose of the Research

The purpose of this research is to prepare atrophic rhinitis (AR) vaccine-loaded mucoadhesive chitosan nanoparticles for prevention of swine atrophic rhinitis disease because the disease have induced severe economic losses in the swine industry.

III. Results and Discussion

1. Confirmation of infectious disease of swine and preparation of antigen

1) Extraction of *Bordetella bronchiseptica* (BB) and *Pasteurella multocida* type D (PMTD)

From the extraction and confirmation of infectious disease of swine, dermonecrosis toxin (DNT) gene detected by PCR amplification showed that BB had 643bp and PMTD had 1080bp.

2) Confirmation of protein

From analysis by SDS-PAGE and Western blot, BB showed about 40KDa protein and PMTD showed about 140KDa one.

2. In vitro study of the immune stimulation activity of BBD-loaded chitosan microspheres

1) Preparation of chitosan microspheres (CMs)

CMs were prepared based on the ionotropic gelation of chitosan dissolved in acetic acid with sodium tripolyphosphate (TPP).

2) Loading of BBD into CMs

BBD dispersed in PBS containing CMs were kept at 37°C for 24h under shaking. The loading content of BBD determined by BCA method was 65-75 wt-%.

3) Observation of CMs

The morphology of CMs by SEM was observed as spherical shapes although

BBD-loaded CMs became bigger.

4) Measurement of particle sizes of CMs

Particle size distribution of CMs and BBD-loaded CMs measured by DLS was 1.94 ± 0.72 and 4.39 ± 0.68 μm , respectively.

5) Release of BBD from BBD-loaded CMs in vitro

More BBD was released with a decrease of molecular weight of chitosan and with an increase of medium pH.

6) Immune stimulating activity of RAW264.7 cells production of tumor necrosis factor- α (TNF α) and nitric oxide (NO) from RAW 264.7 cells was increased in a time-dependent manner similar to LPS as a control.

3. In vitro study of the immune stimulation activity of BBD-loaded pegylated chitosan microspheres

1) Pegylation of chitosan

Chitosan was reacted with poly(ethylene glycol) (PEG) using EDC/NHS as activating agents at 4°C for 48h.

2) Preparation of pegylated microspheres (PCMs)

PCMs were prepared based on the ionotropic gelation of pegylated chitosan dissolved in acetic acid with TPP.

3) Loading of BBD into PCMs

BBD dispersed in PBS containing PCMs were kept at 37°C for 24h under shaking. The loading content of BBD determined by BCA method was 65-75 wt-%.

4) Observation of PCMs

The morphology of PCMs by SEM was observed as spherical shapes although BBD-loaded PCMs became bigger.

5) Measurement of particle sizes of PCMs

Particle size distribution of PCMs and BBD-loaded PCMs measured by DLS was 2.71 ± 0.75 and 5.47 ± 2.35 μm , respectively.

6) Release of BBD from BBD-loaded PCMs in vitro

More BBD was released from PCMs than CMs due to hydrophilic property of PEG.

7) Immune stimulating activity of RAW264.7 cells production of tumor necrosis factor- α (TNF α) and nitric oxide (NO) from RAW 264.7 cells was increased in a time-dependent manner similar to LPS as a control.

4. In vitro study of the immune stimulation activity of BBD-loaded chitosan

microspheres prepared in the presence of F127 as a stabilizer

1) CMs were prepared in the presence of F127 as a stabilizer, based on the ionotropic gelation of chitosan dissolved in acetic acid with TPP.

2) Loading of BBD into CMs

BBD dispersed in PBS containing F127-CMs were kept at 37°C for 24h under shaking. The loading content of BBD determined by BCA method was 65-75 wt-%.

3) Observation of F127-CMs

The morphology of F127-CMs by SEM was observed as spherical shapes although BBD-loaded F127-CMs became bigger.

4) Measurement of particle sizes of F127-CMs

Particle size distribution of F127-CMs and BBD-loaded F127-CMs measured by DLS was 3.42 ± 0.62 and 5.21 ± 1.04 μm , respectively.

5) Release of BBD from BBD-loaded F127-CMs in vitro

More BBD was released from F127-CMs than CMs owing to hydrophilic property of F127.

6) Immune stimulating activity of RAW264.7 cells production of tumor necrosis factor- α (TNF α) and nitric oxide (NO) from RAW 264.7 cells was increased in a time-dependent manner similar to LPS as a control.

5. In vivo study of the immune stimulation activity of BBD-loaded chitosan microspheres

1) Immune stimulating activity of mouse associated to BBD-loaded CMs

IgA from the mouse associated to BBD-loaded CMs after nasal washing was increased with an increase of time and concentration whereas IgA and IgG were only detected in the mouse blood.

6. Comparison of immune stimulating activity of mouse between CMs prepared in the presence of F127 and mannosylated CMs (MCMs)

1) Mannosylation of chitosan

Chitosan was reacted with mannose having isothiocyanate.

2) Preparation of MCMs

MCMs prepared based on the ionotropic gelation of mannosylated chitosan dissolved in acetic acid with TPP.

3) Immune stimulating activity of mouse associated to BBD-loaded CMs prepared in the presence of F127 and BBD-loaded MCMs

The highest immune stimulating activity of mouse associated to BBD-loaded CMs prepared in the presence of F127 was obtained owing to synergistic effect of F127 to immune stimulating activity.

7. In vivo study of the immune stimulation activity of swine associated with BBD-loaded chitosan microspheres

1) Immune stimulating activity of swine associated to BBD-loaded CMs

IgA from the swine associated to BBD-loaded CMs after nasal washing was increased after 10 days and especially 5 times after 40 days.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Summary of research project	15
1-1. Purpose of research project.....	15
1-2. Significance of research project.....	15
1-3. Scope of research project.....	16
Chapter 2. Status of research project in the domestic and foreign countries	18
2-1. Domestic country.....	18
2-2. Foreign country.....	18
2-3. Future prospects.....	18
2-4. Suitability of technology introduction.....	19
Chapter 3. Methods and results of the research project	21
3-1. Confirmation of infectious disease of swine and preparation of antigen.....	21
3-2. In vitro study of the immune stimulating activity of BBD-loaded chitosan microspheres.....	32
3-3. In vitro study of the immune stimulating activity of BBD-loaded pegylated chitosan microspheres.....	43
3-4. In vitro study of the immune stimulating activity of BBD-loaded chitosan microspheres prepared in the presence of F127 as a stabilizer.....	57
3-5. In vivo study of the immune stimulation activity of mouse associated with BBD-loaded chitosan microspheres.....	66
3-6. Comparison of immune stimulating activity of mouse between CMs prepared in the presence of F127 and mannosylated CMs (MCMs).....	80

3-7. In vivo study of the immune stimulation activity of swine associated with BBD-loaded chitosan microspheres 92

Chapter 4. Accomplishment to the goal and contribution to the related fields 112

4-1. The first project 112

4-2. The second project 113

Chapter 5. Performance plan of the research results 114

5-1. Expected research results after 2 years of the research finish 114

5-2. Performance plan of the research results 114

Chapter 6. Information of foreign science and technology during performing research project 115

6-1. Application of mucoadhesive property of chitosan 115

6-2. Information of efficient vaccine delivery 115

6-3. Information of DNA vaccine delivery 115

Chapter 7. References 115

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	15
1절 연구개발의 목적.....	15
2절 연구개발의 필요성.....	15
3절 연구개발의 범위.....	16
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	18
1절 국내.....	18
2절 국외.....	18
3절 앞으로의 전망.....	18
4절 기술도입의 타당성.....	19
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	21
1절 돼지 위축성비염 주요병원성인자 분석 및 항원 준비.....	21
2절 BBD가 담지된 키토산미립자에서의 in vitro에서의 면역활성연구.....	32
3절 BBD가 담지된 폐길화된키토산미립자에서의 in vitro에서의 면역활성연구.....	43
4절 안정화제로서 프트로닉 F127를 사용하여 키토산미립자를 제조하고 이들의 미립자에 BBD를 담지한후 in vitro에서의 면역활성연구.....	57
5절 마우스에서 키토산 미립자에 담지시킨 <i>Bordetella bronchiseptica</i> DNT 의 면역반응.....	66
6절 폴리에칠렌글리콜, 만노스와 결합시킨 BBDNT/키토산미립자의 면역반응 비교.....	80
7절 돼지에서 키토산 미립자에 담지시킨 <i>Bordetella bronchiseptica</i> DNT의 면역반응.....	92
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	112
1절 제1세부과제.....	112

2절 제2세부과제	113
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	114
1절 연구종료2년후 예상연구성과	114
2절 연구결과의 활용계획	114
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	115
1절 키토산미립자의 점막점착성에의 응용	115
2절 효과적인 항원전달에 관한 정보	115
3절 DNA 항원전달에 관한 정보	115
제 7 장 참고문헌	116

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발의 목적 :

돼지에서 많은 문제를 야기하며 막대한 경제적 피해를 주는 호흡기 질병을 효율적으로 예방하기 위하여 백신접종을 실시하는데 백신은 단백질로서 반감기가 짧고, 외부의 온도, 습도, pH나 생체 내의 효소에 의하여 분해되기 쉬운 단점과 일반적인 근육주사나 경구접종으로는 충분하게 면역형성이 되지 않는 문제점을 극복하고자 하는 것이다.

2절 연구개발의 필요성 :

가. 기술적 측면

- 돼지에서 많은 문제를 야기하여 축산농가에 막대한 경제적 피해를 주는 호흡기 질병을 효율적으로 예방하기 위하여 백신접종을 실시하는데 백신은 단백질로서 반감기가 짧고, 외부의 온도, 습도, pH나 생체내의 효소에 의하여 분해되기 쉬운 단점과 일반적인 근육주사나 경구접종으로는 충분하게 면역형성이 되지 않기 때문에 이러한 문제점을 극복하기 위하여 백신의 전달체가 필요하다.
- 백신이 점막에서 면역을 유발하는 것으로 알려져 있고, 생체고분자인 키토산은 독성이 없고, 생체적합성이 좋고, 가격이 저렴하면서 점막점착성을 가지고 있고, 손쉽게 나노입자화 할 수 있기 때문에 병원균이 주요항원을 키토산 나노입자에 담지시켜 호흡기계로 투여하여 점막면역을 효율적으로 형성하고자 한다.
- 나노입자는 표면적이 넓고, 살균이 용이하고, 5 μm 이하의 크기가 점막면역을 형성하기 쉽기 때문에 키토산 나노입자는 돼지에로의 새로운 백신전달체로서의 개발이 가능하다.
- 키토산은 아민기를 가지고 있기 때문에 나노입자의 *in vitro*와 *in vivo*에서의 안정성을 높이기 위하여 독성이 없고 생체적합성이 우수한 폴리에틸렌글리콜을 키토산의 일부에 결합시킬 수 있다.
- 키토산 나노입자가 장점막의 Peyer's patch와의 상호작용을 증대시키기 위하여 키토산의 아민기에 렉틴(lectin)이나 만노스(mannose)기를 결합시킨다.

나. 경제·산업적 측면

- 국내의 돼지의 호흡기질병 발병비율이 36%로서 많은 비중을 차지한다.
 - 동물 질병 예방을 위한 동물 백신은 사람의 백신과는 달리 가능한 동물에 예방주사로 인한 stress을 줄이고, 백신접종에 따른 노동력 감소하는 효율적인 백신 delivery system의 개발이 중요하고 또한 점막 면역계를 효과적으로 유도할 수 있는 물질의 선발이 중요하기 때문에 본 기술은 동물 백신(또는 DNA 백신) 개발에서 중요한 delivery system 중의 하나로 농촌경제에 있어서 중요한 기술의 기반이다.
 - 우리나라의 기후는 돼지사육하기에는 매우 어렵고 양돈농가의 돈사시설의 노후로 외부환경의 변화에 돼지가 매우 취약하기 때문에 돼지의 호흡기 질병을 예방하기 위한 백신 delivery system 개발이 중요하다.
 - 국내수요와 외국의 수출로 양돈산업이 급격히 발전하였기 때문에 소화기 및 호흡기 질병이 발생시에는 농민에게 많은 경제적 피해를 야기시킨다.
 - 국내·외에서 소화기 및 호흡기계질병의 질병예방은 주로 백신 예방접종에 의한다.
 - 국내에서 주로 사용되는 백신은 외국에서 수입하여 사용되고 있고 새로이 백신을 개발하는 것은 많은 비용과 시간이 소요된다. 따라서 기존의 백신이 안정되고 백신효과를 최대한으로 발휘하기 위해서는 백신전달체의 개발이 이루어져야 한다.
 - 본 기술은 키토산을 수식하여 점막점착성 고분자 나노입자를 만들어 주요항원(또는 DNA 백신)을 담지시켰기 때문에 기존의 백신보다 효과적이고 많은 비용이 들지 않고 국내의 양돈농가의 농촌경제력을 증대시킬 수 있고 외국에 수출상품으로서의 가능성이 크리라 기대된다.
- 다. 사회·문화적 측면
- 국내 양돈산업에서 질병에 의한 경제적인 피해액은 연간 약 2000억 정도로 되기 때문에 키토산 나노입자에 의한 백신전달체의 개발은 양돈산업의 안정화에 기여한다.

3절 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 백신이 점막에서 면역을 유발하는 것으로 알려져 있고, 생체고분자인 키토산은 독성이 없고, 생체적합성이 좋고, 가격이 저렴하면서, 점막점착성을 가지고 있고 손쉽게 나노입자화 할 수 있기 때문에 병원균의 주요항원을 키토산의 나노입자에 담지시켜 점막에 투여하여 점막 면역계에 효율적으로 도달할 수 있도록 하고 점막 면역계 자극에 의한 항체형성으로 돼지에서 발생하는 호흡기(국내발병비율 36%, 수의과학기술개발사업 2000년 연구보고서) 질병을 효율적으로 예방하고자 하는 기술이다. 본 기술은 나노테크(NT)와 바이오테크(BT)를 융합한 기술로서 돼지 질병을 예방할 뿐만 아

니라 이를 바탕으로 사람을 포함한 타동물에도 적용할 수 있는 기술이 될 수 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절 국내

- 2000년과 2001년의 국내에서의 돼지의 소화기 및 호흡기의 질병을 예방하기 위하여 사용한 백신의 수량과 금액은 각각 약 108,000건 약 256억원과 약 131,000건 약 293억에 이른다 (동물약품협회 자료).
- 위와 같은 막대한 백신사용건수와 금액에도 불구하고 국내에서는 대부분의 백신이 aluminum hydroxide나 oil만을 adjuvant로 사용하여 주사투여하는 방법이다.
- 동물백신이 아닌 사람간염백신 개발의 한 방향으로 비병원성화된 장내 세균 중의 하나인 *Salmonella* 속균을 이용하여 백신 전달체에 대한 연구가 최근에 시도되고 있다 [Nature Biotechnology, 18, 645 (2000)].
- 그러나 국내에서 점막점착성 고분자 나노입자를 이용한 동물백신 전달체를 개발하고자 하는 시도는 처음이다.

2절 국외

- 동물 백신이 아닌 사람 백신 전달체로서 키토산을 이용하여 점막투여로 백신전달체의 가능성 연구가 최근에 진행되었다 [Advanced Drug Delivery Reviews, 52, 139 (2001)].
- 사람의 인플루엔자 백신 전달체로서 점막점착성이 있는 히알론산 미립자를 사용한 백신 전달체로서의 가능성을 시도하였다 [J. Controlled Rel., 70, 267 (2001)].
- poly(lactide-co-glycolide)로 된 미립자에 DNA 백신을 담지시키면 DNA 단독 투여보다는 항체형성이 효과적이라는 연구가 보고되었다 [PNAS, 97, 811 (2000)].
- 동물백신의 전달체로서 비병원성화된 장내세균, 유산균 등의 미생물체를 이용하는 방법은 미국, 유럽 등의 여러 연구팀에서 이루어지고 있고, 캐나다 Guelph 대학의 연구팀은 소의 호흡기 질병 예방을 위하여 식물체를 이용하는 기초연구가 진행되었다 [Infection and Immunity 69, 5786 (2001)].
- 국외에서도 점막점착성 나노입자를 이용하여 동물백신(또는 DNA 백신) 전달체에 대한 연구는 거의 없고 사람의 백신 전달체인 키토산 나노입자 전달체에서도 본 연구에서와 같이 여러 가지 화학적으로 수식한 키토산 나노입자에 대한 연구는 없다.

3절 앞으로의 전망

- 국내 양돈 산업에서 질병에 의한 경제적인 피해액은 연간 약 2,000억 정도로 추산되나(수의과학기술개발사업 2000년 연구보고서) 최근 5년간 이 기술분야에 대

한 국내 연구 개발 투자는 미미한편이고 향후 5년간 동물백신의 개량에 약 10억 정도의 투자가 이루어질 전망이다. 또한 국외적으로는 축산업의 현재 여러 가지 상황에 비추어 볼때에 질병 예방을 위하여 주사제가 아닌 경구나 스프레이 투여 방식에 의한 예방약 개발을 위하여는 막대한 양의 연구비가 투자될 것으로 생각된다.

- 2001년도의 돼지의 소화기와 호흡기 질병 예방을 위하여 주사투여로 사용한 백신 건수는 약 131,000건에 약 293억원의 비용이 소요되었다 (한국동물약품협회 제공). 그러나 대부분의 백신이 주사제로의 접종방식을 채택함으로써 동물의 피해가 막대함으로 새로운 백신 전달체의 개발에 대한 필요성이 절실하다.
- 국외에서 동물 vaccine 개발에 있어서 주사제를 대체할수 있는 방법으로는 경구적인 투여방법을 개발하고 있음. 최근 대체법으로는 사료작물등 식물을 이용한 경구 vaccine 개발에 초기 단계에서 기초 연구를 진행중임으로(Infecion and Immunity 69(9), 5786, 2001) 만약 국내 연구팀이 식물보다는 점막점착성 고분자 나노입자를 이용한 방법을 개발한다면 향후 5년내에 백신 및 백신 delivery system 개발등의 측면에서 기술 경쟁력을 확보할수 있을 것으로 생각됨.
- 본 기술은 점막점착성 고분자 나노입자가 동물백신 전달체 역할 뿐만 아니라 사람 백신 또는 DNA 백신까지도 전달할 수 있는 NT와 BT가 융합된 새로운 기술로서 국내외적으로 동물약품은 물론 사람백신 전달체의 개발로서도 5년후에는 선진국과 대등한 수준에 이를 수 있다고 생각됨.

4절 기술도입의 타당성

- 최근 나노기술의 발달로 각종의 나노입자가 개발되고 있고 그중 본 연구팀에서 개발하고자 하는 백신전달용 점막점착성 고분자나노입자는 사람 의약품 및 동물 의약품 개발에 밀접하게 연관되어 있으나 아직 경구나 코점막 투여로 동물질병 백신을 개발하여 생산판매하는 업체는 국내·외적으로 없는 실정이다. 다만 국내 연간 매출 300억원 규모를 보이고 있는 백신의 경우 바이엘 코리아, 대성미생물연구소, 중앙가축전염병연구소, 녹십자수의약품, 한국미생물연구소, 베링거 인겔하임 등 업체에서 주로 제조 또는 수입하여 판매하고 있는데 이것은 기존의 aluminum hydroxide 또는 oil을 delivery system 및 adjuvant로 이용한 주사방식이 대부분을 차지하고 있어 본 연구팀에서 개발하고자 하는 백신전달용 점막점착성 고분자 나노입자가 성공한다면 상기의 업체에서 제조한 동물백신 뿐만 아니라 LG나 녹십자 수의약품에서 유전공학기법으로 개발한 동물질병치료용 DNA 백신 전달체로서도 성공되어 많은 기술수요가 있으리라 기대된다. 또한 동물백신용 전달체가 성공한다면 이것은 바로 사람백신 전달체로서도 연결이 되기 때문에 동아제약, 유한양행, 종근당, 영진약품 등의 국내 제약회사로의 파급효과가 크리라 믿는다.

- 동물백신의 신약개발에는 인체용 약품과 마찬가지로 많은 투자가 필요하기 때문에 대기업의 보다 적극적인 연구개발이 없으면 신약개발이 어렵지만 본 연구팀에서 개발한 새로운 drug delivery system 기술을 이용한다면 아직 백신 생산실적이 없는 많은 중소기업체도 짧은 시간과 적은 비용으로 새로운 동물백신전달용 고분자나노입자의 개발을 통해 많은 기술수요에 부응하리라 기대된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절 돼지 위축성비염 주요병원성인자 분석 및 항원 준비

1. 요약

본 실험은 돼지위축성비염의 효과적인 백신개발을 위해 원인균으로부터 병원성 인자를 분리 추출하여 특성을 분석하고 in vitro에서 면역유도효과를 측정하는데 목적이 있다. 이를 위해 우선 돼지위축성비염의 원인체인 *B. bronchiseptica*와 *Pasteurella multocida* type D를 위축성비염 의심 환축으로부터 분리 동정하였다. 이 원인균으로부터 피부괴사독소를 생성하는 DNT (dermonecrotic toxin) 유전자의 유무를 PCR 기법을 이용하여 확인, 추출한 후 다시 SDS-PAGE로 단백질을 확인하였다. 추출한 DNT를 이용하여 Chitosan에 담지된 DNT가 면역을 유도하는 양상을 분석하기 위하여 세포주인 murine macrophage cell line 인 RAW264.7를 사용하였으며, 다양한 chitosan 유도체에 항원 DNT를 담지하여 면역유도능을 측정하였다. 증폭된 DNT 유전자를 확인한 결과 *B. bronchiseptica*에서는 643bp 크기와 *P. multocida* type D에서는 1,080bp 크기의 유전자를 확인하였다. SDS-PAGE를 실시하여 분석한 결과 OMP는 *B. bronchiseptica*에서는 약 40kDa 크기를, *P. multocida*에서는 35와 41kDa의 주요단백질을 확인하였고, *B. bronchiseptica* 및 *P. multocida* 140kDa에서는 약 140kDa 크기의 DNT 단백질이 확인되었다. 세포주를 이용한 면역유도능 분석에서는 모든 처리군에 있어서 시간에 따른 면역 매개 물질 분비유도 패턴은 유사하였으며, *B. bronchiseptica* DNT는 그 자체만으로 보다 chitosan과 결합한 경우 더욱 효과적으로 면역체계를 활성화시킬 수 있는 것으로 나타났다. 또한 chitosan 복합체의 종류에 따라서 다양한 면역 유도능을 나타내었다.

2. 서론

호흡기 질병은 양돈산업에서 직·간접적으로 많은 피해를 주는 질병으로 경제적, 임상학적으로 중요한 질병이다. 이러한 주요 질병으로는 돼지위축성 비염, 흉막폐렴, 파스튜렐라성 폐렴이 있으며, 이들 질병의 예방 및 치료를 위하여 많은 연구가 진행되었고, 또한 진행중이다. 그러나 기존의 방법들은 bacterin을 이용한 백신접종에 따른 부작용, 항생제 투여에 의한 내성균 출현등과 같은 여러 가지 문제점을 유발하고 있어서 이들 질병에 대한 새로운 방제법들의 강구가 요구되어 왔다. 이러한 돼지 호흡기 질병 중에

서 돼지위축성비염의 특징적인 병변은 비갑개의 위축이며, 그 정도에 따라서 소위 코비틀림, 안면이상, 비 출혈 등으로 나타난다. 폐사율은 낮지만 전염율이 높아 발육이 지연되고 사료효율이 저하되어 경제적 손실이 큰 질병이다.

사람 및 동물의 질병을 유발하는 세균성 원인체들은 원인체의 종류에 따라서 각기 다른 병원성 인자를 보유할 수 있기 때문에 질병 예방을 위한 백신을 제조하기 위해서는 각 질병에서 중요하게 작용하는 병원성 인자들을 분석하여 이들을 항원으로 사용하는 것이 매우 중요하다. 돼지위축성비염은 *Bordetella bronchiseptica*와, *Pasteurella multocida* type D가 원인체로, 이들이 생성하는 약 143kDa의 DNT가 진행성 위축성비염에 대한 필수적인 병원성인자로 작용하고 또한 세균의 외부 부착소들은 점막에 부착하는데 매우 중요한 역할을 하여 이들이 비갑개굴 위축에 의한 본 질병 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다. 이처럼 피부괴사독소인 DNT는 돼지위축성비염의 가장 큰 원인체라 할 수 있지만, 일반 bacterin 백신에는 포함되어 있지 않으므로 효과적인 백신을 개발하기 위해서 원인균에서의 DNT 분리가 필요하다.

그러므로 본 실험에서는 돼지위축성비염 의심 환축으로부터 *Bordetella bronchiseptica* 및 *Pasteurella multocida* type D를 동정한 후 이들 균으로부터 DNT를 추출하여 특성을 분석하여보고자 하였다. 또한 면역증강제(adjuvant)로서의 효과가 여러 실험에서 입증된 바 있는 chitosan, poloxamer 등에 DNT를 담지하여 in vitro상에서 실제 면역유도효과를 측정해보고자 하였다.

3. 돼지 위축성 비염 원인체의 분리동정 및 특성분석

가. 원인체의 분리 및 특성조사

1) 실험방법

국내 돼지 농장 및 도축장에서 위축성 비염 의심 환축 및 위축성 비염의 뚜렷한 임상 증상을 보이는 돼지로부터 가검물을 채취한 후, blood agar를 이용하여 37℃에서 24 시간 균을 배양하였다. 24 시간 배양후 *Bordetella bronchiseptica* *Pasteurella multocida* type D의 특징적인 집락을 선별하여 2차 선택배지에서의 선별 및 생화학적 검사를 실시하였다.

혈액배지에서 자란 특징적인 균집락을 순수 분리하여 catalase test, oxidase test 등의 생화학적 시험, 균의 morphology, G20G에서의 성장유무 및 혈청학적 시험을 이용하여 돼지 위축성 비염의 원인체인 *B. bronchiseptica* 혹은 *P. multocida* type D로 의심

되는 균집락을 선택한 후, 미생물 자동 동정기인 Vitek을 이용하여 균을 동정하였다. 혈청형은 표준혈청을 이용하여 동정하였다.

2) 실험결과

돼지의 가검물로부터 분리, 동정한 *B. bronchiseptica* 는 31주였고, *P. multocida* type D는 43주였으며, 분리된 균의 생화학적, 형태학적인 특성은 표1과 같다.

나. PCR을 이용한 dermonecrotin (DNT) 유전자검색

돼지 가검물로부터 분리된 야외균주 및 표준균주에서 피부괴사독소를 생성하는 DNT (dermonecrotic toxin) 유전자의 유무는 PCR 기법을 이용하여 확인하였으며, 그 PCR법에 적용된 primer 및 PCR 조건은 아래와 같다.

1) 실험방법

위의 primer 및 PCR 조건에 따라서 증폭된 PCR 증폭산물은 1.0 % agarose gel에서 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색하여 UV illuminator를 이용하여 확인하였다

2) 실험결과

위의 조건에 따라서 증폭된 PCR 증폭산물은 전기영동 후 EtBr 염색을 통하여 증폭된 DNT 유전자를 확인한 결과 *B. bronchiseptica* 에서는 643bp 크기와 *P. multocida* type D에서는 1,080bp 크기의 유전자를 확인하였다 (그림 1). 야외분리균주 중 *B. bronchiseptica*는 24주, *P. multocida* type D 는 33주가 DNT 유전자를 보유하고 있었다.

4. *B. bronchiseptica* 및 *P. multocida* 로부터 OMP 및 DNT 추출 및 분석

가. *B. bronchiseptica* 및 *P. multocida*로부터의 OMP 및 DNT 추출

1) 실험방법

B. bronchiseptica 및 *P. multocida* type D 의 두 균주를 각각 1ℓ의 tryptic soy broth (TSB)에 접종하여 37℃에서 shaking 상태로 24시간 배양한 후, 배양한 균주를 8,000rpm에서 30분간 원심분리하여 집균하였다. 원심분리하여 집균한 균은 phosphate buffer solution (PBS, pH 7.0)으로 2회 washing한 후, OMP 추출을 위해서 HEPES buffer 10 ml에 부유하여 sonicator를 이용하여 30분간 균을 파쇄하고 8,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 회수하였고, 회수한 상층액을 20,000rpm에서 1시간 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물은 0.5% sodium N-lauryl sarcosine in 0.01M Tris buffer에 혼합하여 실온에서 1시간 방치한 후 20,000rpm에서 1시간 원심분리하여 침전물을 회수하였고, 증류수 1ml에 재부유시켰다. 재부유액을 OMP로 사용하였다. DNT 생산을 위해서 TSB에서 24시간 동안 37℃에서 진탕배양한 후, 8,000rpm으로

<i>Bordetella bronchiseptica</i>			
Beta-haemolysis (Blood agar)	(+)	Growth on MacConkey agar	-
6.5% NaCl	+	Malonate	+
Growth on SS agar	-	Citrate	+
Motility	+	Glycolate	-
Nitrate reduction	+	Acetamide	-
Urea	++	Oxidase	+

<i>Pasteurella multocida</i>			
Hemolysis	-	Glycolate	+
Oxidase	+	Maltonate	-
Catalase	+	L-arabinose	-
Indole	+	Sorbitol	+
Urease	-	Dulcitol	-
Ornithine decarboxylase	+	Growth on MacConkey agar	-

(+) = most positive, +/- = positive and negative strain, ++ = strong positive

표 1. 분리주의 생화학적 형태학적 특성

Bacterial Strain	Primers	Oligonucleotide Sequence
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Forward	5' -ATTTCGGCATTGCGGCAACTT-3'
	Reverse	5' -TGTCCGGCGGTATCCAGACT-3'
<i>Pasteurella multocida</i> 4D	Forward	5' -CTTAGATGAGCGACAAGG-3'
	Reverse	5' -GAATGCCACACCTCTATAG-3'

표 2. DNT 유전자검색을 위해 특이적으로 제작된 primer의 sequences

Initial Denaturation	94°C, 5min	
Denaturation	94°C, 30sec	} 40 cycles
Annealing	55°C, 30sec	
Extension	72°C, 30sec	
Final Extension	72°C, 5min	

표 3. DNT 유전자 검출을 위한 PCR 조건

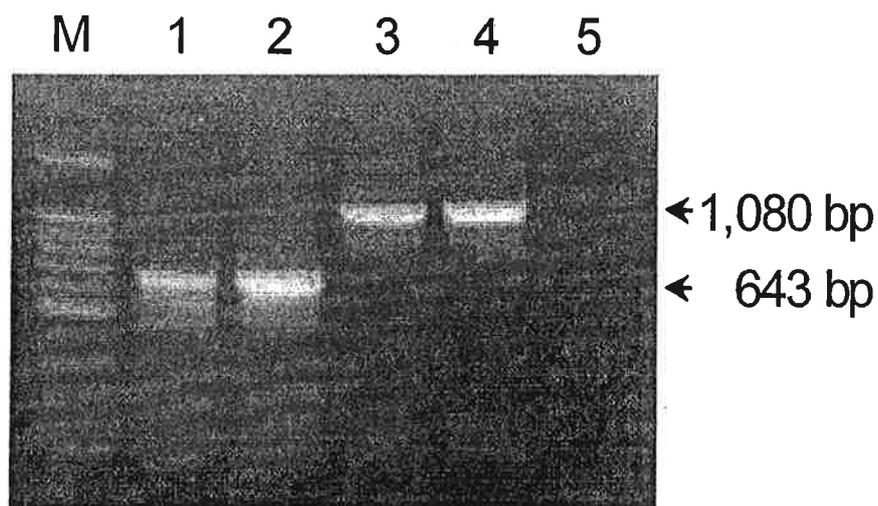


그림 1. *B. bronchiseptica*와 *P. multocida* 4D의 PCR 증폭산물 전기영동상.

Lane M : 100bp ladder marker, lanes 1 and 2: DNT gene amplified from *B. bronchiseptica*, lanes 3 and 4 : DNT gene amplified from *P. multocida* type D and lane 5 : negative control (no template).

30분간 원심분리하여 수확한 균을 PBS에 부유하여 sonicator로 30분간 파쇄한 후 20,000rpm에서 1시간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 추출한 OMP와 DNT는 0.45 μ m filter로 여과하여 멸균한 후, BCA protein assay kit를 이용하여 단백질농도를 측정하였다. 추출한 항원은 사용시까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 균체로부터 분리한 OMP 및 DNT를 12% SDS-PAGE gel에 well당 10 μ g을 loading 한 후, 80V에서 2시간동안 전기영동을 실시하였다. 추출 분리한 단백질은 Coomassie blue R-250으로 염색하여 확인하였다.

2) 실험결과

가) 추출한 DNT의 SDS-PAGE 및 Western blot에 의한 분석

(1) SDS-PAGE

SDS-PAGE를 실시하여 분석한 결과 OMP는 *B. bronchiseptica*에서는 약 40kDa 크기를, *P. multocida*에서는 35와 41kDa의 주요단백질을 확인하였고, *B. bronchiseptica* 및 *P. multocida* 140kDa에서는 약 140kDa 크기의 DNT protein과 그 외 다양한 크기의 단백질을 확인하였다. (그림 2)

(2) Western-blot

추출한 DNT의 특이성을 확인하기 위하여 정제한 DNT를 SDS-PAGE로 전개한 다음 nitrocellulose membrane으로 전사하고, 1차 항체로 닭에서 생산한 난황항체와 반응 시켰다. 2차 항체로 horseradish peroxidase-conjugated IgY antibody와 반응 시킨후, 발색하여 특이 밴드를 확인하였다. Western blot을 이용하여 추출한 DNT의 특이성을 조사한 결과, 1년차와 같이 특이성 높은 DNT로 확인되었다 (그림 3).

5. Chitosan 복합체 형성을 위한 *B. bronchiseptica* DNT의 대량생산

가. 실험방법

B. bronchiseptica DNT 생산을 위하여 확립된 기법을 이용하여 대량 생산을 실시하였다. 1 회의 대량 생산을 위하여 TSB 3L에 균을 접종한 후 shaking 상태에서 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하였다. 배양한 균은 위에서 서술한 대로 집균 후 DNT를 추출하고 SDS-PAGE 및 Western blot 분석을 통하여 확인한 후, 실험에 사용하였다. 이러한 대량배양은 전 실험 과정을 통하여 20여 회 실시하였다.

나. 실험결과

대량배양 기법에 의하여 1회에 생산된 *B. bronchiseptica* DNT는 약 350-400mg 정도였으며 본 연구기간을 통하여 총 생산량은 약 7500mg 이었다. 이렇게 생산된 *B. bronchiseptica* DNT는 SDS-PAGE를 이용한 분석과 Western blot을 이용한 분석기법

을 통하여 확인 후 chitosan 복합체 형성을 위한 실험에 사용하였다.

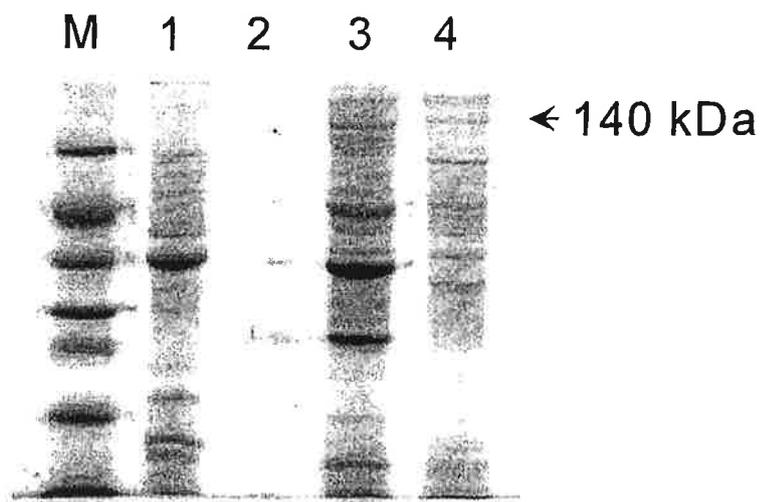


그림 2. *B. bronchiseptica* 및 *P. multocida* 4D의 OMP 및 DNT 독소의 SDS-PAGE 전기영동상.

lane M: Molecular weight Marker (broad-range protein marker, Sigma)

lane 1: outer membrane proteins (OMP) extracted from *B. bronchiseptica*

lane 2: dermonecrotxin (DNT) extracted from *P. multocida*

lane 3: OMP extracted from *P. multocida*

lane 4: DNT extracted from *B. bronchiseptica*

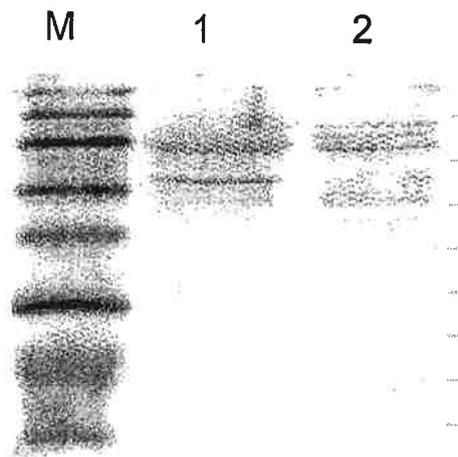


그림 3. IgY 항체를 이용한 *B. bronchiseptica* 및 *P. multocida* 4D DNT에 대한 Western blot 결과.

lane M: molecular marker

lane 1: *B. bronchiseptica* DNT

lane 2: *P. multocida* 4D DNT

제2절 BBD가 담지된 키토산미립자에서의 in vitro에서의 면역활성연구

1. 요약:

키토산미립자들은 tripolyphosphate (TPP)와 이온화 결합작용에 의해 준비되었으며 그 미립자에 위축성비염의 백신물질인 *Bordetella Bronchiseptica* Dermonecrototoxin (BBD)를 담지시켰다. BBD가 담지된 키토산미립자들은 구형의 형태를 가지는 것을 관찰하였고 평균 크기가 3.91 μ m임을 관찰하였다. 그리고 백신 BBD가 미립자로부터의 방출을 관찰하였는데 분자량이 클수록, pH값이 작을수록 키토산미립자와 백신 BBD의 상호작용이 더 강해지며 그 방출도 점점 더 적어지는 것을 관찰하였다. RAW264.7 세포주에서 tumor necrosis factor- α (TNF α)와 nitric oxide (NO)의 분비에 대해 관찰하였는데 백신 BBD가 담지된 키토산미립자에서 방출되는 BBD는 위축성비염에 대한 면역활성을 자극하는 것을 알 수 있었다.

2. 서론:

현재 미립자들은 정맥주사, 경구, 또는 점막투여에 의한 펩티드, 항원, 올리고뉴클레오타이드와 유전자의 전달체로 각광을 받고 있다. 몇가지의 미립자들은 이미 점막백신으로 처리한 후 현저한 체액성면역반응과 점막면역반응을 일으킨다고 보고 되었다. 점막으로 전달된 항원들은 보통 그 면역원성이 현저히 떨어지기에 항원을 보조제들과 함께 전달하여 면역반응을 강화하는 방법이 필요하다. 마이크로캡슐화 하거나 혹은 미립자화 하는 방법은 백신전달에서 흔히 사용되는 방법이다. 이런 방법으로는 한번의 투여로 장시간동안 그리고 감염 혹은 생체에 대하여 효과적인 면역반응을 일으킬 수 있다.

키토산은 자체의 생체적합성 (biocompatibility), 생분해성 (biodegradability), 독성이 없고 값이 싸며 세포사이의 tight junction을 열 수 있는 특성으로 점막약물전달시스템에 있어서 아주 효과적인 생체재료이다. 키토산은 분자량, 탈아세틸화도에 따라 그 성질이 차이가 있는데 고분자 키토산은 여러 가지 복합체가 점막벽 (mucosal barrier)을 지나는 것을 촉진한다고 보고가 되어있다. 흔히, 키토산-항원 백신을 비강투여 후 비강에서 강한 혈청IgG 반응과 IgA 분비를 유도한다. 키토산은 박테리아, 비루스, 종양에서 넓은 범위의 항원반응을 일으킨다고 알려졌다. 또한 키토산미립자는 하나의 수용액에서 혼합되어 만들어지기에 유기용매가 필요없다. 이러한 원인으로 키토산은 점막백신을 위

한 면역보조제 혹은 백신전달체로 사용되었다.

돼지의 호흡기질병은 양돈산업에서 아주 큰 경제적 피해를 야기한다. Atrophic rhinitis (AR)은 돼지에서 흔히 일어나는 감염성질병이다. AR은 보통 8-12주 동안 지속되며 성장기동안에 걸쳐 발병한다. 가장 치명적인 피해로는 이탈 혹은 비강단축에 의한 비강 갑개골의 위축이다. *Bordetella Bronchiseptica* (BB)의 독소적인 strain은 AR의 발생을 감소시키는데 사용되는 백신이다.

본 연구에서 키토산미립자들이 AR 백신항원의 방출을 조절하기 위해서 사용되었다. *Bordetella Bronchiseptica Dermonecrototoxin* (BBD)가 담지된 키토산미립자에서의 BBD는 in vitro에서 방출되었다. 그리고 BBD가 담지된 키토산미립자에서 AR 백신의 면역자극활성도 in vitro에서 조사되었다.

3. 재료와 방법:

가. 재료

키토산은 분자량 10K, 100K, 300K (자광, 한국), 탈아세틸화도는 91%를 사용하였다. Sodium tripolyphosphate (TPP)는 Sigma (St Louis, MO, USA)에서 제공받았다. 다른 시약들도 시약등급에 의하여 사용되었다.

나. AR 백신

1). Bacterial strain

*Bordetella bronchiseptica*는 여기에서 AR 유발시약으로 사용되었다. 이 strain은 특정배지, G20G로 돼지허파에서 떼어낸 것이며 colony morphology, 생화학적, 혈청학적시험 그리고 자동동정검측기 (automatic bacteria identification system), Vitek (Hazelwood, MD, USA)에 의해 검증되었다.

2) 격리된 bacterial strain에서 Dermonecristoxin (DNT)유전자의 감지

DNT유전자는 Shin 등이 서술한바와 같이 PCR 증폭에 의하여 감지되었다.

3). B. bronchiseptica로부터 DNT의 준비

DNT는 Shin등이 서술한 방법에 따라 추출되었다. Bacterial 세포들은 37°C의 tryptic soy broth (TSB, Difco Co.)에서 overnight shaking하면서 배양되었다. Bacteria는 pH 7.4인 phosphate-buffered saline (PBS)로 두 번 washing하였다. ultrasonic homogenizer로 1분동안 sonication한후, 4°C의 원심분리기로 20,000rpm에서 1 h 원심분

리시켰다. 상층액은 SDS-PAGE에 의해 검출되었다.

다. 키토산미립자의 준비

키토산을 2% (v/v)의 acetic acid에 용해시켜 0.25 wt-%의 키토산용액을 제조하였다. 5ml의 TPP용액을 magnetic 교반하면서 25ml의 위에서 만든 키토산용액에 떨어뜨렸는데 이때 sonication을 동반하였다. 제조된 키토산미립자들은 4°C, 3000rpm에서 15분간 원심다운시켰다. 상층액을 버리고 5ml의 멸균된 물로 suspension시킨후, 1ml씩 취하여 1.5ml의 microtube에 넣어 4°C, 2500rpm으로 원심분리시켜 키토산미립자를 얻었다.

라. AR백신의 담지

0.5ml의 BBD를 위에서 만든 키토산미립자 (약 20mg)에 넣어 키토산미립자가 잘 분포되도록 suspension시킨후 담지가 잘 되도록 37°C의 incubator에서 24 h 동안 shaking한다. 다음 현탁액을 4°C, 2500rpm 원심분리하며 unloaded BBD를 제거한다. 키토산미립자에 담지된 BBD의 양은 Lowry protein assay method에 의하여 분석되었다. 담지량은 다음의 공식에 의하여 계산되었다.

$$\text{Loading content (\%)} = \frac{\text{total amount BBD} - \text{free BBD}}{\text{total BBD}} * 100$$

마. Scanning electron microscopy (SEM)에 의한 키토산미립자의 관찰

키토산미립자들은 코팅 chamber (CT 1500HF, Oxford Instruments, Oxfordshire, UK)에서 금막코팅되었다. 코팅된 sample은 JSM 5410LV field emission SEM (Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

바. Dynamic light scattering (DLS)의 측정

DLS는 DLS-7000 (Otsuka Electronics, Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였는데 아르곤 laser beam으로 조여줌으로써 20°C, 파장 488nm에서 측정하였다. 값은 평균분자량으로 나타냈으며 scattering 각도는 90°를 사용하였다.

사. in vitro에서 키토산미립자에서의 BBD의 방출

키토산미립자에서의 BBD의 in vitro 방출은 BBD가 담지된 키토산미립자를 1.5ml의 microtube에 넣고 1ml, pH 7.4인 PBS를 넣고 37°C의 water bath에서 shaking하였다.

시간에 따라 PBS를 바꾸어주었는데 매번의 용액을 Lowry protein assay방법으로 측정하여 최종 방출량을 구하였다.

아. Tumor necrosis factor- α (TNF α)의 분비량의 측정

RAW264.7세포에서 분비된 TNF α 는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Endigen co.)로 분석되었다. 여기서 lipopolysaccharide (LPS)는 positive control로 사용되었다.

자. 분비된 nitric oxide (NO) 농도의 측정

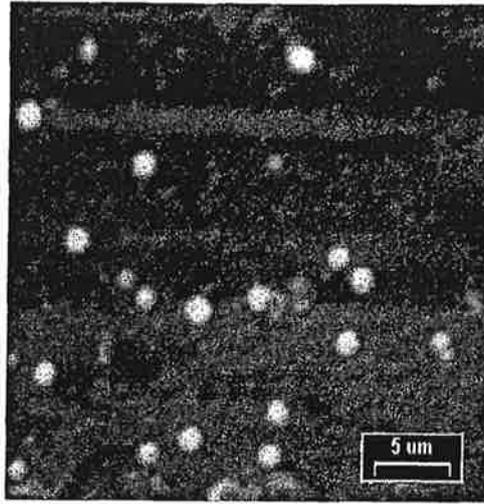
배양배지에서의 NO의 생성은 그리스시약과 질산염축적측정기 (measuring nitrite accumulation)로 측정하였다. 100 μ l의 배양상층액은 1%의 sulfanilamide와 0.1%의 naphthylethyl enediamine dihydrochloride (Sigma)를 상온에서 2.5%의 phosphoric acid에 용해시켜 만든 용액을 같은 양으로 배양시킨것인데 흡광도는 spectrometer를 이용하여 540nm에서 측정하였으며 질산염 농도는 sodium nitrite로 측정한 표준곡선에 의해 계산되었다.

4. 결과 및 고찰:

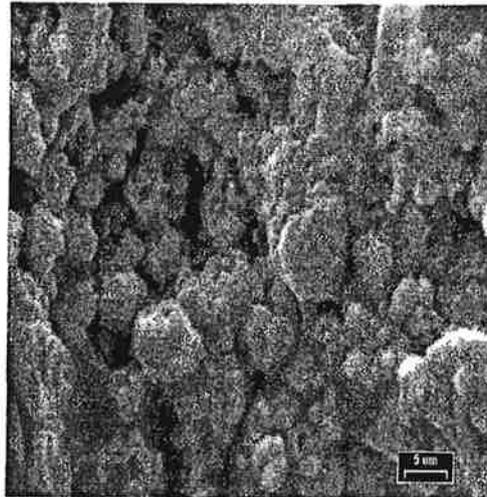
가. 키토산미립자의 특성

그림 4은 키토산미립자(a)와 백신 BBD가 담지된 키토산미립자(b)의 SEM 사진이다. 그림에서 알 수 있듯이 키토산미립자와 BBD가 담지된 키토산미립자는 모두 구형임을 관찰하였다.

키토산미립자(a)와 BBD가 담지된 키토산미립자(b)의 입자크기분포는 그림 5에 나타낸것처럼 DLS로 측정하였는데 키토산자체와 백신이 담지된 키토산미립자의 평균크기가 각각 483nm와 3907nm임을 확인하였고 백신의 담지로 하여 입자의 크기가 훨씬 커지는 것을 관찰하였다. 이미 보고 된바와 같이 점막백신전달을 위한 미립자를 투여할 때 미립자의 크기는 장 또는 호흡기계의 점막접착임파조직 [mucosal associated lymphoid tissues (MALT)]에 효과적으로 작용하는 아주 중요한 인소이다. 미립자의 크기가 10 μ m보다 작아야하며 또 너무 작으면 직접 폐로 들어갈 우려가 있기 때문이다. 따라서 본 연구실에서 제조한 백신 BBD가 담지된 키토산미립자는 호흡기계의 MALT

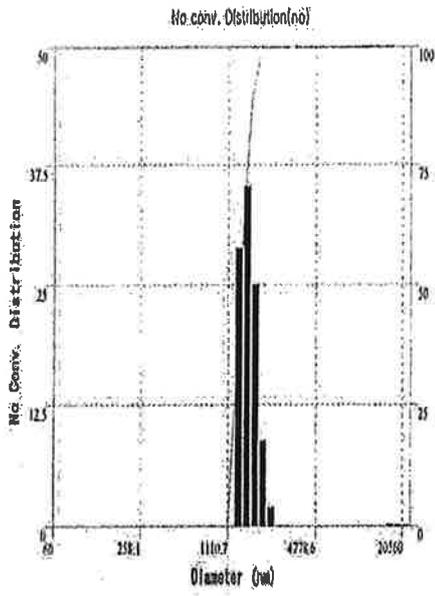


(a)

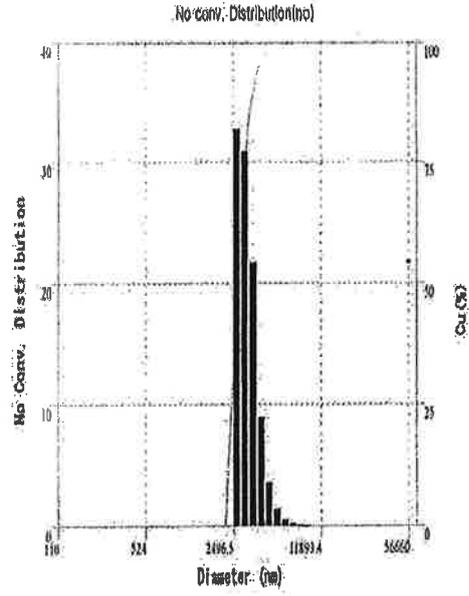


(b)

그림 4. 키토산미립자(a)와 백신이 담지된 키토산미립자(b)의 형태 (SEM)



(a)



(b)

그림 5. 키토산미립자(a)와 백신이 담지된 키토산미립자(b)의 크기분포

에 대하여 효과적인 백신전달을 할 수 있다.

나. 백신 BBD가 담지된 키토산미립자로부터의 BBD의 *in vitro* 방출실험

그림 6은 37°C, pH가 7.4인 PBS에서의 키토산분자량에 따른 백신BBD의 방출을 나타낸다. 백신의 담지량은 거의 비슷하지만 (88%~95%) 키토산의 분자량이 작을수록 더 많은 BBD가 방출되었다. 이것은 키토산의 분자량이 클수록 백신 BBD와의 분자간 상호작용이 더 강하기 때문이다. 그림에서 분자량이 큰 키토산미립자(100K, 300K)의 경우 백신방출이 아주 적음을 알 수 있다.

그림 7는 37°C에서 PBS의 pH값에 따른 BBD의 방출경향을 나타낸다. pH값이 낮아질수록 백신 BBD의 방출이 적어지는 것으로 나타났다. 이것은 키토산의 pKa값이 약 6.5이기에 pH가 낮아질수록 키토산의 “+”전하가 강해지므로 백신과의 상호작용 (백신은 “-”전하를 띠)이 더 강해지기 때문에 키토산미립자로부터 백신의 방출이 억제되기 때문이다. 이는 키토산과 백신과의 결합이 물리적인 침투뿐만 아니라 상대적으로 더 강한 이온결합, 수소결합 등 화학결합에 의존함으로써 키토산미립자로부터 오랜 시간동안 원하는 양만큼의 백신방출이 가능함을 제시해준다.

다. RAW264.7세포주로부터 TNF α 와 NO의 분비양 측정실험

염증조절인자인 TNF α 와 NO의 분비는 각각 그림 8와 그림 9에 나타내었다. 백신 BBD가 담지된 키토산미립자, BBD백신단독, LPS로 자극한 RAW264.7세포주에서의 TNF α 와 NO의 생성은 시간이 지날수록 더 많은 양이 분비되었다. TNF α 분비실험에서 72시간 후부터 positive control인 LPS의 분비양은 점차 감소하였지만 BBD가 담지된 키토산미립자와 BBD단독백신은 80시간까지 지속적으로 분비되었다. 이것은 백신 BBD가 담지된 키토산미립자는 능히 면역촉진효과를 지속시킬 수 있다는 것을 암시한다. BBD가 담지된 키토산미립자에서의 분비는 BBD백신단독보다 차이가 크지 않으나 *in vivo*실험에서는 그 차이가 클것으로 짐작한다. 본 연구의 이 같은 결과는 백신 BBD가 담지된 키토산미립자는 돼지 호흡기질병예방을 위한 호흡기백신전달의 강력한 새로운 입후보자로 될 것이라는 것을 암시한다.

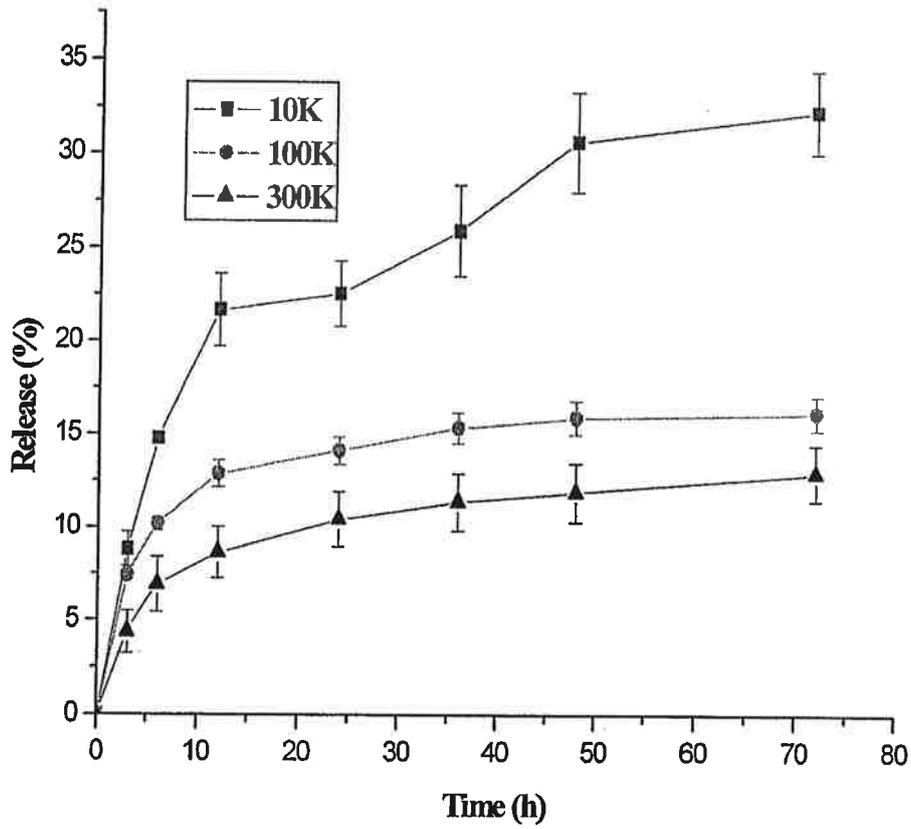


그림 6. 키토산의 분자량에 따른 백신의 방출실험

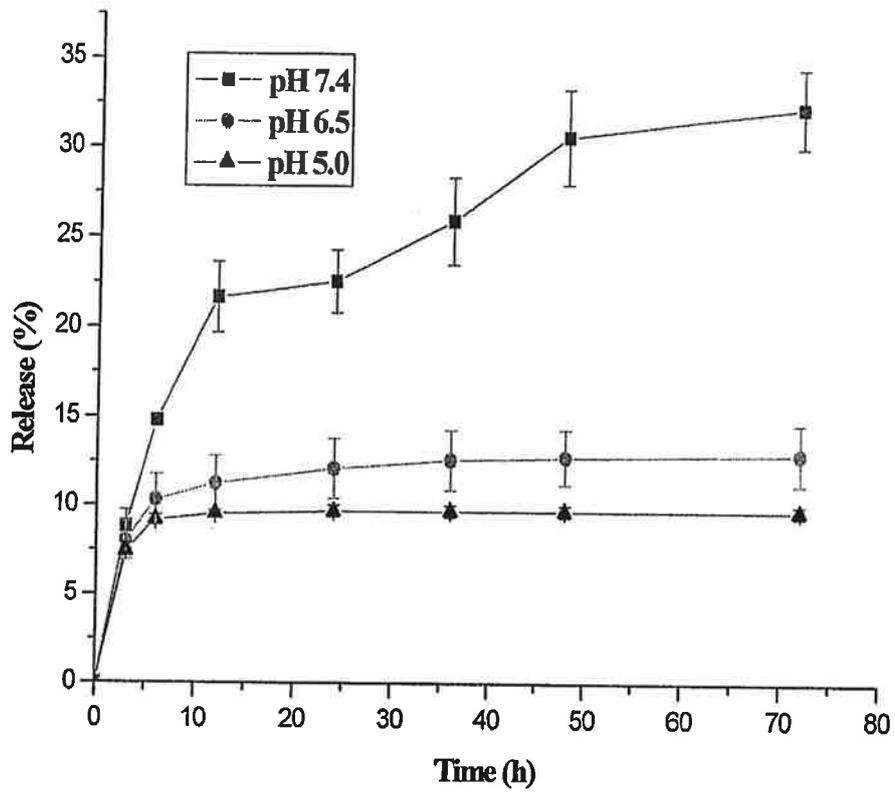


그림 7. 부동한 pH에서의 백신의 방출실험

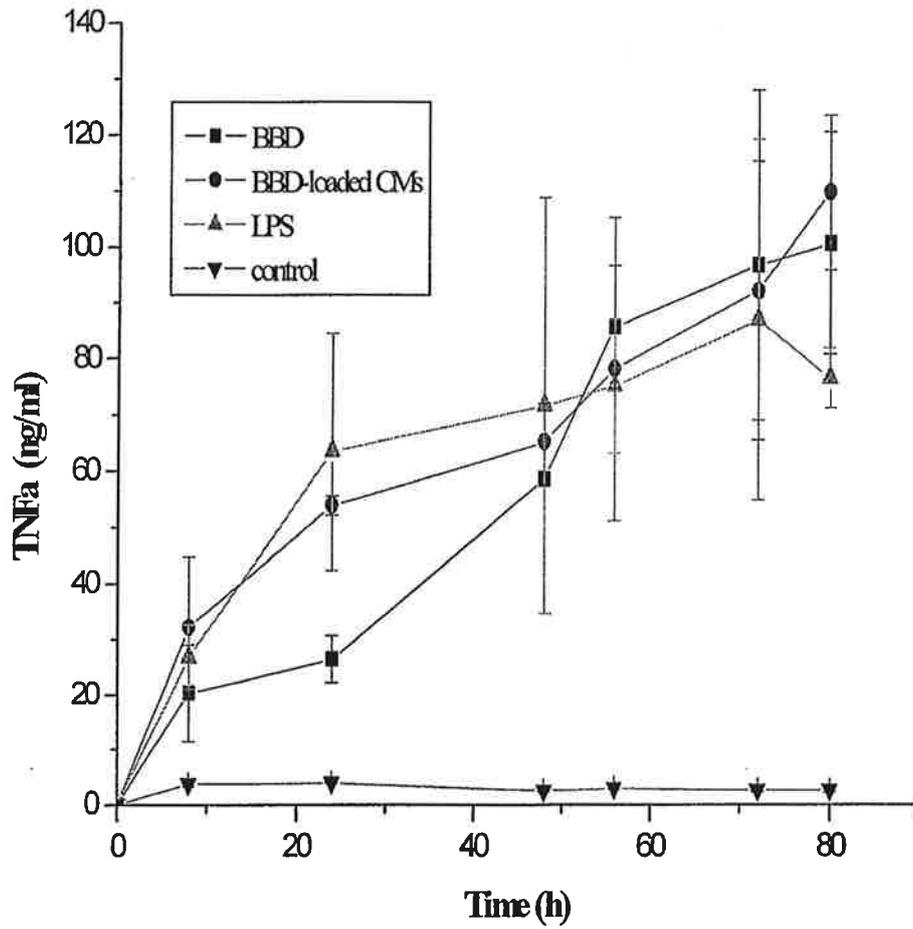


그림 8. 키토산미립자에서 방출된 백신으로 RAW264.7 면역세포를 자극시킨후, 면역세포에서의 종양괴사인자의 분비

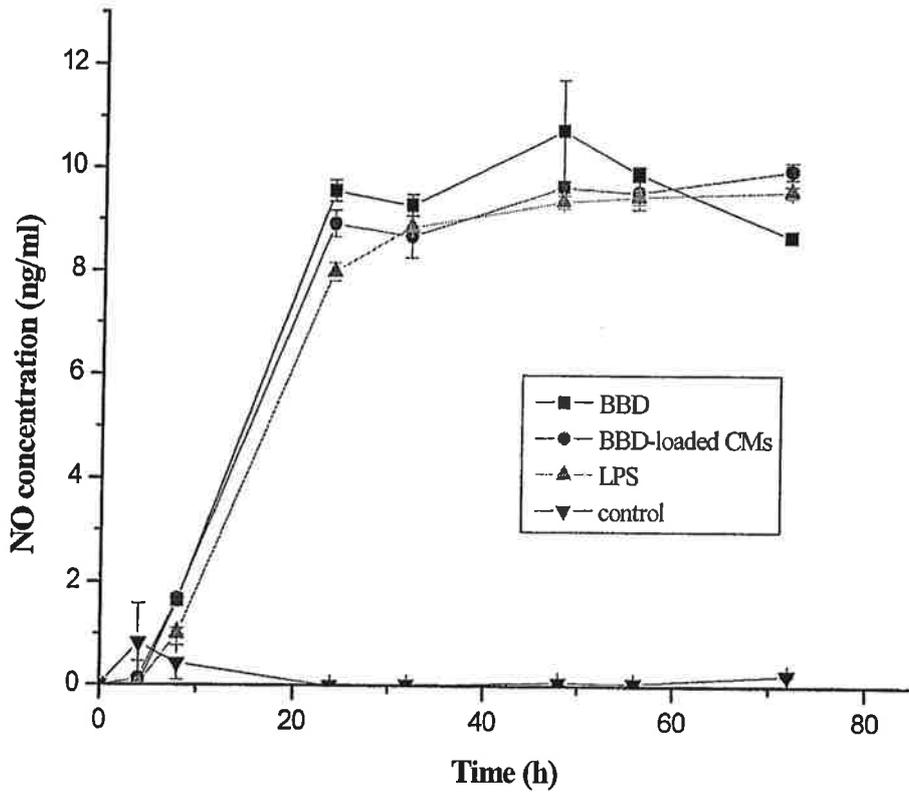


그림 9. 키토산미립자에서 방출된 백신으로 RAW264.7 면역세포를 자극시킨후, 면역세포에서의 산화질소의 분비

제3절 BBD가 담지된 폐길화된키토산미립자에서의 in vitro에서의 면역활성연구

1. 요약:

본 실험에서는 키토산미립자의 안정성과 미립자에서의 백신방출속도를 가속화하기 위하여 키토산에 생체적합성이 뛰어나고 친수성인 폴리에틸렌글리콜을 키토산에 결합하였다. 키토산미립자와 폐길화한 키토산미립자는 tripolyphosphate (TPP)와 이온화 결합작용에 의해 준비되었으며 준비된 미립자에 위축성비염의 백신물질인 *Bordetella Bronchiseptica* Dermonecrototoxin (BBD)를 담지시켰다. BBD가 담지된 키토산미립자와 BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자들은 구형의 형태를 가지는 것을 관찰하였고 평균 크기는 각각 4.39와 5.47 μ m임을 관찰하였다. 백신 BBD가 미립자로부터의 방출을 관찰하였는데 폐길화한 키토산미립자에서 키토산미립자보다 더 많은 양의 백신이 방출되는 것을 관찰하였다. RAW264.7 세포주에서 종양괴사인자- α (TNF α)와 나이트릭 옥사이드 (NO)의 분비에 대해 관찰하였는데 백신 BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자에서 키토산미립자에서보다 더 많은 백신 BBD가 방출되었으며 미립자들로부터 지속적으로 방출되는 BBD는 위축성비염에 대한 면역활성을 자극함을 관찰하였다.

2. 서론:

마이크로캡슐화하거나 미립자화하는 방법은 백신전달에서 흔히 사용되는 방법이다. 이런 방법으로는 생체에 대한 한번의 투여로 장시간동안 그리고 효과적인 면역반응을 일으킬 수 있다. 미립자화하는것은 점막면역투여 후 높은 시스템과 국부적인 점막면역을 유도한다고 보고가 되었다. 점막면역은 투여가 쉽고 값이 싸며 개체가 받아들이기 쉽고 점막면역뿐만이 아니라 시스템적인 면역반응도 유도한다는 장점이 있다. 게다가 한곳의 점막부위에 투여된 후 충분히 말단의 여러 점막부위에서도 강한 면역반응을 유도할 수 있다. 그러나 단백질 혹은 펩타이드의 등 점막백신의 투여는 거대분자들이 점막장벽 (mucosal barrier)을 통과하기 어렵고 투여된 항원이 빨리 제거되며 비강분비물중 효소에 의해 변성이 되는 여러 가지 제한점이 있다. 키토산 [폴리(β -(1 \rightarrow 4)-2-아미노-2-데옥시-D-글루코스)]은 폴리다당류로서 자연계에 풍부한 키틴으로부터 가공된 것으로 자체의 생체적합성 (biocompatibility), 생분해성 (biodegradability), 독성이 없고 값이 싸며 세포사이의 tight junction을 열 수 있는 특성으로 점막약물전달시스템에 있

어서 아주 효과적인 생체재료이다. 또한 키토산은 강한 점막점착성을 갖고 있으며 키토산-항원 백신은 비강투여 후 비강에서 강한 혈청IgG 반응과 IgA 분비를 유도한다. 이러한 원인으로 키토산은 점막백신을 위한 면역보조제 혹은 백신전달체로서의 사용이 적합하다. 예전의 연구에서 우리는 키토산미립자와 백신이 담지된 키토산미립자가 쉽게 뭉치는 것을 발견하였다. 백신이 담지된 미립자가 뭉치면 담지된 미립자로부터의 백신 방출이 멈추면서 면역자극능력이 떨어진다. 따라서 효과적인 백신방출을 위해서는 좀 더 안정된 미립자가 필요하다. 폴리에틸렌글리콜(PEG)은 물에 용해하는 양성 폴리머로서 독성이 적고 생체적합성이 뛰어나다. Aiba 등은 키토산의 아민그룹과 시아누릴 스트리클로라이드로써 활성화된 모노메톡시폴리에틸렌글리콜 혹은 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-석신이미딜 석신에트를 결합시켜 폐길화한 키토산을 제조하였다. Saito 등도 메톡시-PEG-나이트로페닐 칼보네이트로 PEG가 결합된 폐길화한 키토산을 합성하였다. 폐길화한 미립자들은 안정성 그리고 캡슐화한 약물의 방출에 대한 통제 등 면에서 다른 시스템보다 더 뛰어나다. 그리고 PEG는 면역적 활성을 갖는 단백질의 생물학적인 특성을 유지시켜주거나 소혈청알부민인 BSA의 방출을 촉진시켜준다. 돼지의 호흡기질병은 양돈산업에서 아주 큰 경제적 피해를 야기한다. Atrophic rhinitis (AR)은 돼지에서 흔히 일어나는 감염성질병이다. AR은 보통 8-12주 동안 지속되며 성장기동안에 걸쳐 발병한다. 가장 치명적인 피해로는 이탈 혹은 비강단축에 의한 비강 갑개골의 위축이다. *Bordetella Bronchiseptica* (BB)의 독소적인 strain은 AR의 발생을 감소시키는데 사용되는 백신이다. 위의 정보를 토대로 본 연구에서는 돼지 위축성비염을 치료하기 위한 키토산미립자와 폐길화한 키토산미립자가 제조되었고 백신항원의 방출을 조절하기 위해서 사용되었다. 백신 *Bordetella Bronchiseptica* *Dermonecrotoxin* (BBD)가 담지된 키토산미립자와 폐길화한 키토산미립자로부터 백신 BBD의 방출을 조사하였고 BBD가 담지된 키토산미립자와 폐길화한 키토산미립자에서 위축성 비염백신의 면역자극활성도 in vitro에서 조사되었다.

3. 재료와 방법:

가. 재료

메톡시폴리에틸렌글리콜 (5K)는 산바이오(Sunbio, 안양, 한국)에서 구입하였다. 키토산은 분자량 10K (탈아세틸화도는 80.4%, 자광, 한국)을 사용하였다. Sodium

tripolyphosphate (TPP)는 Sigma (St Louis, MO, USA)에서 제공받았다. 다른 시약들도 시약등급에 의하여 사용되었다.

나. 키토산의 폐길화

키토산의 폐길화는 Chitosan (2 wt-%)를 5ml의 morpholinoethanesulfonic acid (0.1M, pH 5.0)에 녹인후 NHS/EDC시스템에서 메톡시폴리에틸렌글리콜과 4°C에서 24시간, 실온에서 24시간 반응시켰다. 반응식은 그림 10에 나타났다. 최종 산물인 폐길화한 키토산은 ¹H-NMR로서 정량을 하였고 그림 11에 나타났다.

다. 키토산미립자와 폐길화한 키토산미립자의 준비

키토산과 폐길화한 키토산을 2% (v/v)의 acetic acid에 용해시켜 0.25 wt-%의 키토산 (혹은 폐길화한 키토산)용액을 제조하였다. 5ml의 TPP용액을 magnetic 교반하면서 25ml의 키토산 (혹은 폐길화한 키토산)용액에 떨어뜨렸는데 이때 sonication을 동반하였다. 제조된 키토산미립자 (폐길화한 키토산미립자)들은 4°C, 3000rpm에서 15분간 원심다운시켰다. 산물은 멸균된 물로 세 번 씻어주었다.

라. AR백신의 담지

0.5ml의 BBD를 위에서 만든 키토산 (혹은 폐길화한 키토산)미립자에 넣어 키토산 (혹은 폐길화한 키토산)미립자가 잘 분포되도록 suspension시킨 후 담지가 잘 되도록 37°C의 incubator에서 24 h 동안 shaking한다. 다음 현탁액을 4°C, 2500rpm 원심분리하며 unloaded BBD를 제거한다. 키토산미립자에 담지된 BBD의 양은 Micro BCA protein assay method에 의하여 분석되었다.

마. Scanning electron microscopy (SEM)에 의한 키토산 (혹은 폐길화한 키토산)미립자의 관찰

키토산 (혹은 폐길화한 키토산)미립자들은 코팅chamber (CT 1500HF, Oxford Instruments, Oxfordshire, UK)에서 금막코팅되었다. 코팅된 sample은 JSM 5410LV field emission SEM (Tokyo, Japan)으로 관찰되었다.

바. Dynamic light scattering (DLS)의 측정

DLS는 DLS-8000 (Otsuka Electronics, Ltd., Osaka, Japan)을 사용하였는데 He-Ne laser beam으로 쪼여줌으로써 20°C, 파장 488nm에서 측정하였다. Scattering 각도는 90°를 사용하였다.

사. In vitro에서 키토산 (혹은 폐길화한 키토산)미립자에서의 BBD의 방출

키토산 (혹은 폐길화한 키토산)미립자에서의 BBD의 in vitro 방출은 BBD가 담지된 키토산미립자(20mg)를 1.5ml의 microtube에 넣고 1ml, pH 7.4인 PBS를 넣고 37°C의 water bath에서 shaking하였다. 시간에 따라 PBS를 바꾸어주었는데 매번의 용액을 Micro BCA protein assay방법으로 측정하여 최종 방출량을 구하였다.

아. Tumor necrosis factor- α (TNF α)와 nitric oxide (NO) 분비량의 측정

TNF α 와 NO는 염증반응에서 흔히 사용되는 지시제이다. 마우스 마크로파아지 세포주인 RAW264.7세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에서 5%의 fetal bovine serum (FBS)로 37°C에서 배양되었다. 60mm의 배양접시에 30.5×10^5 세포를 분주한 후, 배지에 백신이 담지된 미립자를 넣어 세포에 처리하였다. 분비된 TNF α 는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Endigen co.)로 분석되었다. 여기서 lipopolysaccharide (LPS)는 positive control로 사용되었고 배지만으로 처리한 것은 negative control로 사용되었다. 배양배지에서의 NO의 생성은 그리스시약과 질산염측정 측정기 (measuring nitrite accumulation)로 측정하였다. $100 \mu\text{l}$ 의 배양상층액은 2.5%의 phosphoric acid에 1%의 sulfanilamide와 0.1%의 naphthlethyl enediamine dihydrochloride (Sigma)를 상온에서 같은 양으로 용해시켜 만들었고 흡광도는 spectrometer를 이용하여 540nm에서 측정되었으며 질산염 농도는 sodium nitrite로 측정한 표준곡선에 의해 계산되었다.

자. 통계분석

모든 샘플은 비슷한 조건에서 세 번 반복으로 수집되었고 처리되었다. 샘플농도의 기하평균은 계산되었고 그룹사이의 차이는 t-시험으로 정량되었다. $P < 0.05$ 는 차이가 큼을 의미한다.

4. 결과 및 고찰:

가. 키토산미립자의 특성

키토산 [폴리(β -(1 \rightarrow 4)-2-아미노-2-데옥시-D-글루코스)]는 2번 탄소에 아민 그룹이 있어 카르복실기 그룹을 갖고 있는 재료들과 아마이드결합을 이룬다. 폐길화한 키토산의 반응은 그림 10에 나타냈다. 이 반응에서 EDC와 NHS는 반응촉매물질로 사용되었다. EDC는 카르복실그룹을 활성화시켜 아미노그룹과 반응하게 한다. 따라서 활성화된

PEG와 키토산을 EDC/NHS 반응촉매물질로 결합시켰다. 최종 폐길화도 (3-8mol%)는 $^1\text{H-NMR}$ 로서 정량하였고 그림 11에 나타냈다.

나. 키토산미립자, BBD가 담지된 키토산 미립자와 폐길화한 키토산미립자, BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자의 특성조사

키토산미립자, BBD가 담지된 키토산미립자와 폐길화한 키토산미립자, BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자는 SEM으로 관찰되었다 (그림 12). 키토산미립자, BBD가 담지된 키토산미립자와 폐길화한 키토산미립자, BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자는 모두 구형임을 관찰하였다.

키토산미립자, BBD가 담지된 키토산미립자와 폐길화한 키토산미립자, BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자의 입자크기분포는 DLS로 측정하였는데 (그림 13) 키토산미립자, BBD가 담지된 키토산미립자와 폐길화한 키토산미립자, BBD가 담지된 키토산미립자의 크기는 각각 1.94 ± 0.72 , 4.39 ± 0.68 , 2.71 ± 0.75 와 5.47 ± 2.35 μm 임을 확인하였고 백신의 담지로 하여 입자의 크기가 훨씬 커지는 것을 관찰하였다. 이것은 키토산미립자와 폐길화한 키토산미립자들은 pH 7.4에서 양전하를 띠고 백신은 음전하를 띠기에 이온결합과 반데르발스 작용력에 의해 백신 BBD가 미립자의 내부뿐만이 아니라 미립자표면에도 부착되기 때문이다. 이미 보고 된바와 같이 점막백신전달을 위한 미립자를 투여할 때 미립자의 크기는 장 또는 호흡기계의 점막접착임파조직 [mucosal associated lymphoid tissues (MALT)]에 효과적으로 작용하는 아주 중요한 인소이다. 미립자의 크기가 $10\mu\text{m}$ 보다 작아야 하며 또 너무 작으면 직접 폐로 들어갈 우려가 있기 때문이다. 따라서 본 연구실에서 제조한 백신 BBD가 담지된 키토산미립자와 BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자는 호흡기계의 MALT에 대하여 효과적인 백신전달을 할 수 있다.

다. 백신 BBD가 담지된 키토산미립자와 BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자로부터의 BBD의 *in vitro* 방출실험

그림 14과 같이 백신 BBD가 담지된 키토산미립자와 BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자에서 지속적인 방출경향을 나타낸다. BBD의 방출은 모두 세가지 경향으로 분석된다. 첫 번째는 초기의 빠른 방출이다. 처음 세시간만에 백신은 백신 BBD가 담지된 키토산미립자와 BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자로부터 각각 12와 22 wt-%가 방출되었다. 이는 초기에 미립자표면에 붙어있던 백신이 방출되기 때문이다. 두 번째는 그

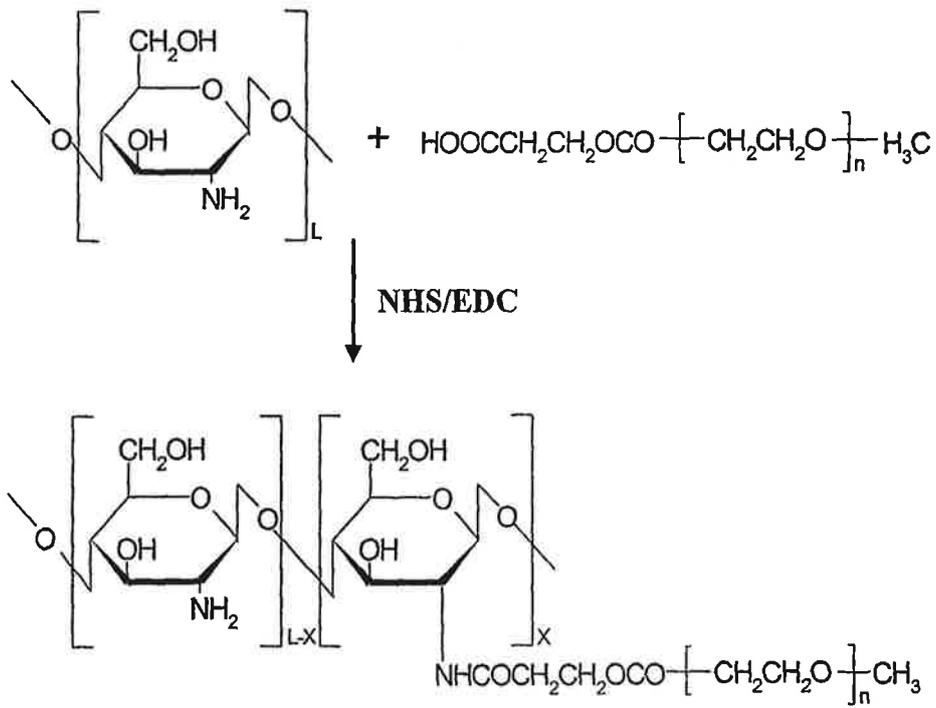


그림 10. 키토산의 페길화 반응식

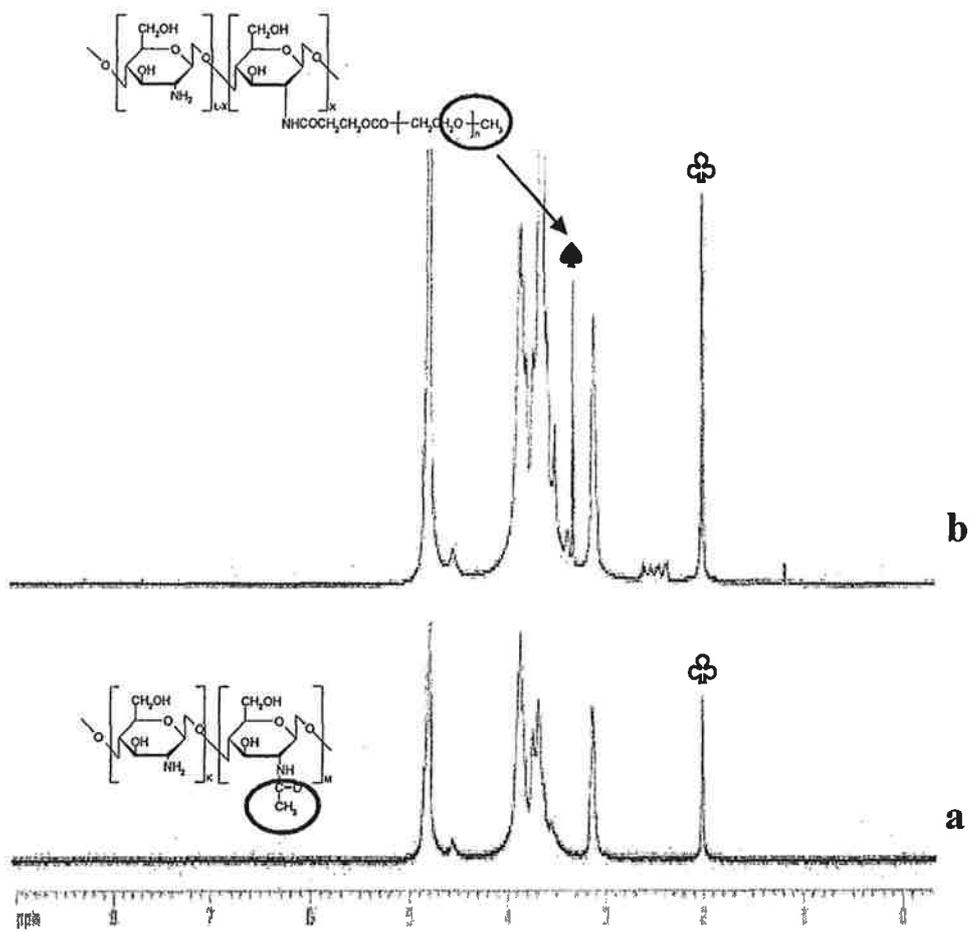


그림 11. 키토산(a)과 아세틸화한 키토산(b)의 NMR 스펙트럼

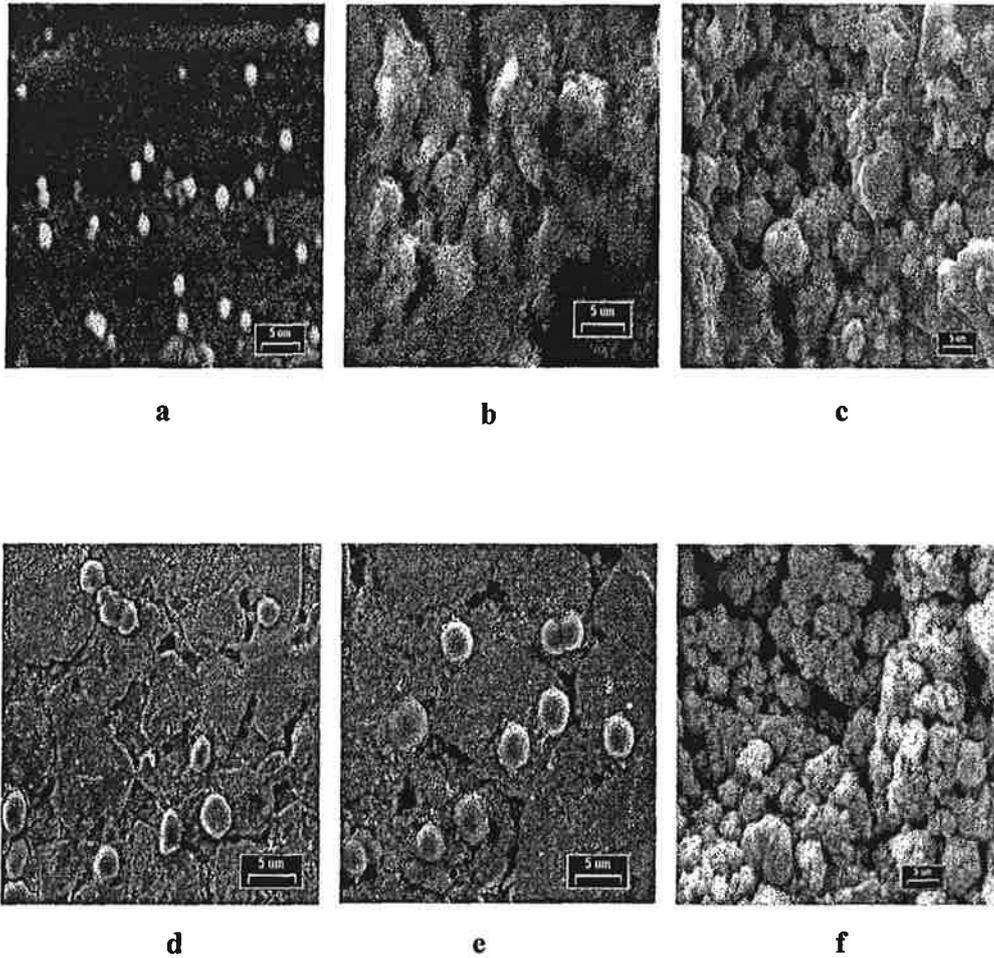
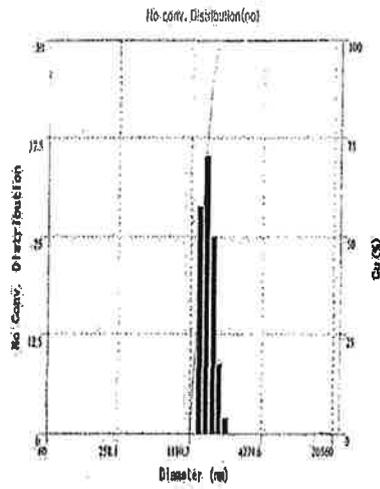
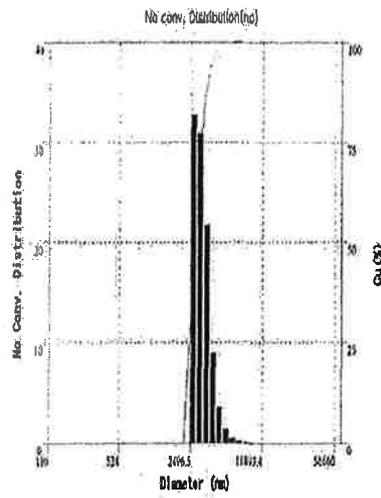


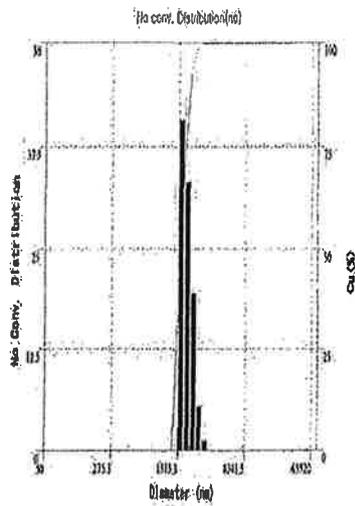
그림 12. 키토산미립자(a), 폐길화한 키토산미립자(d), 백신이 담지된 키토산미립자(b), 백신이 담지된 폐길화한 키토산미립자(e), 2주보관된 백신이 담지된 키토산미립자(c)와 2주보관된 백신이 담지된 폐길화한 키토산미립자(f)의 형태



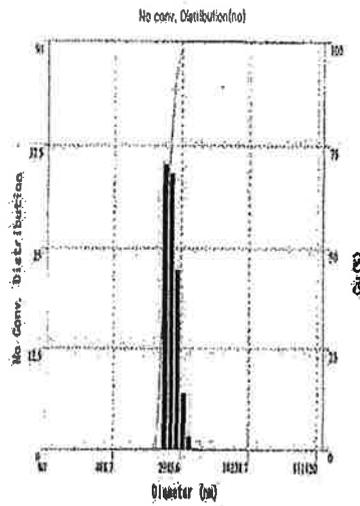
a



b



c



d

그림 13. 키토산미립자(a), 백신이 담지된 키토산미립자(b), 폐길화한 키토산미립자 (c)와 백신이 담지된 폐길화한 키토산미립자의 크기분포

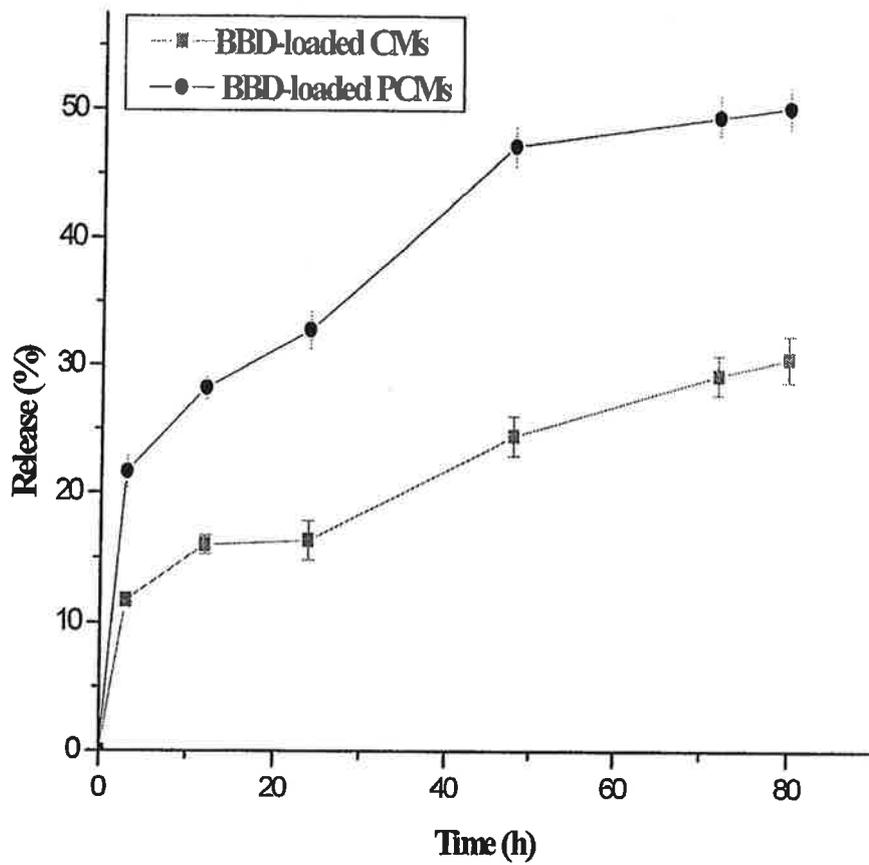


그림 14. 백신이 담지된 키토산미립자와 폐길화한 키토산미립자에서의 백신의 방출 경향

후 24시간사이다. 보고된바와 같이 키토산미립자에서 이 시간에서는 고분자와 백신의 이온교환, 고분자와 TPP와의 이온교환, 고분자의 생분해 등으로 BBD는 서서히 방출되었다. 이와 반대로 폐길화한 키토산미립자에서는 12시간부터 24시간까지 지속적인 방출 경향을 나타내었다. Xu 등은 키토산과 BSA에서 키토산분자를 감싼 PEG 사슬이 미립자에 영향을 주어서 높은 BSA 방출을 얻을 수 있다고 보고하였다. 따라서, 우리는 친수성인 PEG가 BBD의 재흡착을 막아 주어 BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자에서 BBD의 지속적인 방출을 유도했다고 생각한다. 세 번째는 나머지 기간동안의 비교적 느린 방출경향이다. 이 기간에서 우리는 BBD가 담지된 키토산미립자와 BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자에서 느린 백신의 방출경향을 관찰하였다. 최종적으로 백신 BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자에서 BBD가 담지된 키토산미립자에서보다 많은 백신의 방출을 관찰하였다. 이것은 BSA가 담지된 키토산나노입자에서 PEG가 BSA의 방출을 촉진한다는 결과와 일치한다.

라. RAW264.7세포주로부터 TNF α 와 NO의 분비양 측정실험

활성화된 마크로파아지는 MHC class II 분자와 co-stimulatory B7 family의 발현이 증대되도록 유도한다. 면역반응발생에서 중요한 단백질은 보통 활성화된 마크로파아지에 의해 분비된다. 사이토카인인 TNF α 와 IL-1, IL-6는 염증반응을 촉진한다. 본 실험의 목표는 코점막투여를 위한 백신전달체로서의 키토산미립자와 폐길화한 키토산미립자의 면역유도능을 조사하는것이다. 따라서, 백신 BBD를 모델백신으로 마크로파아지 세포주에서의 TNF α 의 분비를 관찰하였다. 그림 15은 TNF α 의 분비경향을 나타낸다.

키토산미립자, 백신 BBD가 담지된 키토산미립자, 폐길화한 키토산미립자, BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자, BBD백신단독, LPS로 자극한 RAW264.7세포주에서의 TNF α 의 생성은 시간이 지날수록 더 많은 양이 분비되었다. TNF α 분비실험에서 48시간 후부터 positive control인 LPS의 분비양은 점차 감소하였지만 BBD가 담지된 키토산미립자와 BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자에서는 80시간까지 지속적으로 분비되었고 BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자에서는 LPS보다 더 많은 양의 TNF α 가 분비되었다. 이것은 백신 BBD가 담지된 키토산미립자와 BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자는 충분히 면역촉진효과를 지속시킬 수 있으며 BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자가 보다 더 효율적이라는 것을 암시한다. NO는 antimicrobial activity가 있으며 과

산화이온과 결합하여 더 강한 antimicrobial을 산생한다. 현재 박테리아 (bacteria), 균류 (fungi), 기생충 (parasitic worms), 원생동물 (protozoa)등에 대한 마크로파아지의 antimicrobial 능력은 마크로파아지로부터 방출되는 NO등 물질에 의해 좌우된다고 여겨지고 있다. Jeong 등은 RAW264.7마크로파아지세포주에서 IFN- γ 로부터 생성되는 NO에 대한 키토산의 능력은 키토산과 TNF α 가 nuclear factor- κ B의 생화학적 신호전달경로를 통하여 분비한 결과이라고 보고하였다. 본 연구에서도 RAW264.7세포주에서 NO가 48시간까지 시간에 따라 증가하는것을 관찰하였다 (그림 16).

본 연구의 이 같은 결과는 백신 BBD가 담지된 폐길화한 키토산미립자는 돼지 호흡기질병예방을 위한 호흡기백신전달의 효율적이고 강력한 새로운 입후보자로 될 것이라는 것을 암시한다.

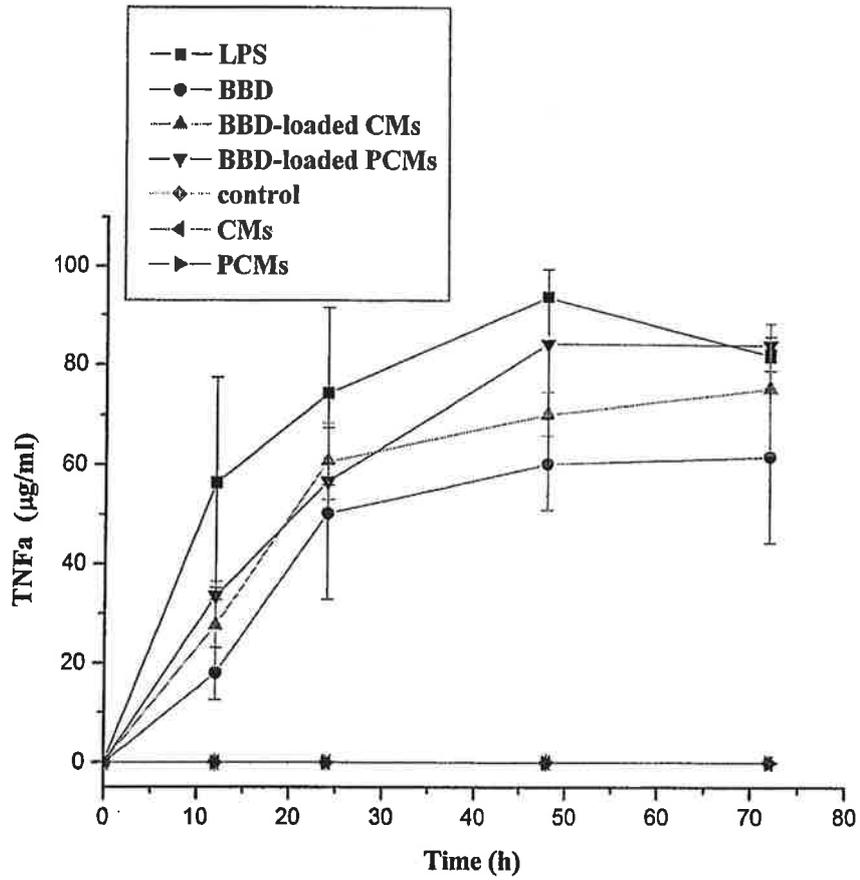


그림 15. 폐길화한 키토산미립자에서 방출된 백신으로 RAW264.7 면역세포를 자극시킨후, 면역세포에서의 종양괴사인자의 분비

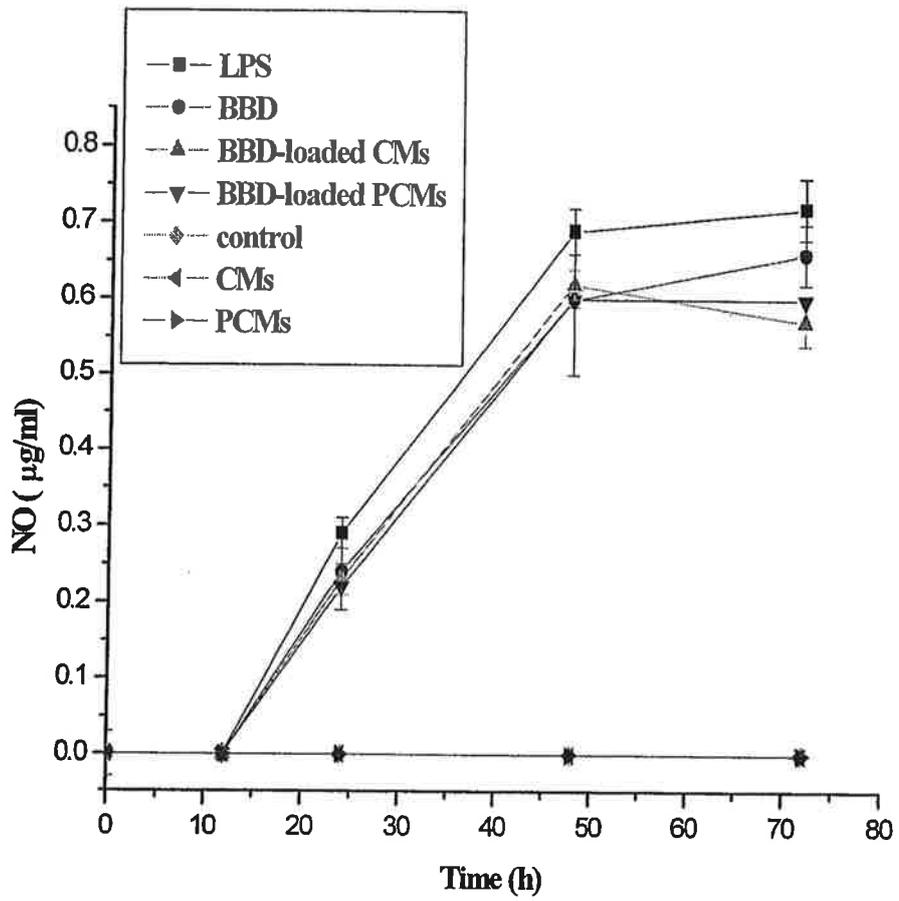


그림 16. 키토산미립자에서 방출된 백신으로 RAW264.7 면역세포를 자극시킨후, 면역세포에서의 산화질소의 분비

제4절 안정화제로서 프르로닉 F 127를 사용하여 키토산미립자를 제조하고 이들의 미립자에 BBD를 담지한후 in vitro에서의 면역활성연구

1. 요약:

시스템과 국부적 면역반응의 잠재력은 점막시스템이 면역을 위한 하나의 매력적인 장소임을 암시한다. 그러나 점막에 투여된 단백질 혹은 펩타이드는 보통 그 면역성이 떨어진다. 따라서 성공적인 점막면역을 위해서는 효과적인 보조제가 필요하다. 키토산 미립자는 백신전달체로서 잠재력이 있지만 물리적특성에 의해 쉽게 몽치기에 오랫동안 보존에서 문제점이 된다. 이런 문제점을 극복하기 위하여 본 실험에서는 폴루로닉 F127을 사용하였다. F127로 처리된 F127키토산미립자는 tripolyphosphate (TPP)와 이온화 결합 작용에 의해 준비되었으며 준비된 미립자에 위축성비염의 백신물질인 *Bordetella Bronchiseptica Dermonecrototoxin* (BBD)를 담지시켰고 위축성비염에 대한 면역활성을 관찰하였다.

2. 서론:

백신의 점막부위의 투여는 주사투여보다 많은 장점이 있다. 코점막 또는 구강투여는 백신의 투여가 용이하고 여러 가지 부작용을 줄이며 특히 발전도상의 제3국가에서 주사기의 오염에 의한 감염의 위험성도 줄인다. 그러나 단백질 혹은 펩타이드의 등 점막백신의 투여는 거대분자들이 점막장벽 (mucosal barrier)을 통과하기 어렵고 투여된 항원이 빨리 제거되며 비강분비물중 효소에 의해 변성이 되는 여러 가지 제한점이 있다. 따라서 성공적인 점막면역을 위해서는 점막보조제의 개발이 불가피하다.

키토산 [폴리(β -(1 \rightarrow 4)-2-아미노-2-데옥시-D-글루코스)]은 폴리다당류로서 자연계에 풍부한 키토산으로부터 가공된 것으로 자체의 생체적합성 (biocompatibility), 생분해성 (biodegradability), 독성이 없고 값이 싸며 세포사이의 tight junction을 열 수 있는 특성으로 점막약물전달시스템에 있어서 아주 효과적인 생체재료이다. 또한 백신전달체로서 키토산은 강한 점막점착성을 갖고 있으며 키토산-항원 백신은 비강투여 후 비강에서 강한 혈청IgG 반응과 IgA 분비를 유도한다. 이러한 원인으로 키토산은 점막백신을 위한 면역보조제 혹은 백신전달체로서의 사용이 적합하다. 예전의 연구에서 우리는 백신이 담지된 키토산미립자가 면역활성이 있는것을 생체외실험을 통해 관찰하였지만 백

신이 담지된 키토산미립자들이 쉽게 뭉치는 것을 발견하였다. 백신이 담지된 미립자가 뭉치면 담지된 미립자로부터의 백신방출이 멈추면서 면역자극능력이 떨어진다. 따라서 효과적인 백신방출을 위해서는 좀 더 안정된 미립자가 필요하다. 하여 용해성이 좋은 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 키토산과 아마이드결합을 시킴으로써 우수한 shelf-stability를 얻었다. 이러한 미립자표면에 붙은 PEG의 양은 입체적인 저항에 있어서 중요한 역할을 한다. 이러한 폐길화한 키토산미립자시스템은 백신전달에 있어서 큰 잠재력이 있지만 PEG의 값이 비싸서 실제생산에 적용은 한계가 있다. 하여 본 실험에서는 폴리에틸렌을 대체할 수 있는 플루로닉 F127 (F127)을 도입하였다.

F127은 폴리에틸렌옥사이드/폴리프로필렌옥사이드/폴리에틸렌옥사이드 (PEO/PPO/PEO)의 triblock copolymer로서 분자량은 12,600, 70%의 친수성 에틸렌옥사이드units와 30%의 소수성 프로필렌옥사이드units를 포함하며 계면활성능력과 stabilizing 능력 때문에 제약분야에서 많이 사용되어져 왔으며 또한 우수한 용해성과 약물방출능력때문에 약물전달시스템으로도 많이 사용되어져 왔다. 본 연구는 F127을 stabilizer로서 결합시킨 키토산미립자에 백신을 담지하여 비강점막투여를 위한 생체의실험을 실시하였다.

3. 재료와 방법:

가. 재료

키토산은 분자량 10K (탈아세틸화도는 80.4%, 자광, 한국)을 사용하였다. 플루로닉 F127과 sodium tripolyphosphate (TPP)는 Sigma (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 돼지 호흡기계 위축성비염백신인 보테텔라 브론키셉티카 네크로톡신 (BBD)는 공동연구자인 수의대 유한상교수연구실에서 제공받았다. 다른 시약들도 시약등급에 의하여 사용되었다.

나. F127/키토산미립자의 제조

키토산은 acetic acid (2%)에 용해시켜 최종농도가 0.25 wt-%의 키토산용액을 제조하였고 여기에 F127 (1.25 wt-%)를 첨가하였다. 1ml의 TPP용액을 magnetic 교반하면서 25ml의 F127/키토산용액에 sonication (5W, 15분)을 동반하면서 떨어뜨렸다. 제조된 F127/키토산미립자는 4°C, 3000rpm에서 15분간 원심다운시켰다. 산물은 멸균된 물로 세번 씻어주었다.

다. AR백신의 담지

백신의 담지는 예전에 발표된 논문을 참조하였다. BBD (12mg/ml)를 20mg의 F127/키토산미립자가 들어있는 0.5ml의 PBS용액에 분산시킨 후, 37°C에서 shaking 상태에서 12시간정도 담지시킨다. 다음 현탁용액을 4°C, 2500rpm 원심분리하며 unloaded BBD를 제거한다. F127/키토산미립자에 담지된 BBD의 양은 Micro BCA protein assay method에 의하여 분석되었다.

라. Scanning electron microscopy (SEM)에 의한 키토산 (혹은 폐길화한 키토산)미립자의 관찰

F127/키토산미립자들은 코팅chamber (CT 1500HF, Oxford Instruments, Oxfordshire, UK)에서 금막코팅 되었다. 코팅된 sample은 JSM 5410LV field emission SEM (Tokyo, Japan)으로 관찰되었다.

바. Dynamic light scattering (DLS)의 측정

DLS는 DLS-8000 (Otsuka Electronics. Ltd., Osaka, Japan)을 사용하였는데 He-Ne laser beam으로 쬐어줌으로써 20°C, 파장 488nm에서 측정하였다. Scattering 각도는 90°를 사용하였다.

마. In vitro에서 F127/키토산미립자에서의 BBD의 방출

F127/키토산미립자에서의 BBD의 in vitro 방출은 BBD가 담지된 F127/키토산미립자 (20mg)를 1.5ml의 microtube에 넣고 1ml, pH 7.4인 PBS를 넣고 37°C의 water bath에서 shaking하였다. 시간에 따라 PBS를 바꾸어주었는데 매번의 용액을 Micro BCA protein assay방법으로 측정하여 최종 방출량을 구하였다.

바. Tumor necrosis factor- α (TNF α) 분비량의 측정

TNF α 는 염증반응에서 흔히 사용되는 지시제이다. 마우스 마크로파아지 세포주인 RAW264.7세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에서 5%의 fetal bovine serum (FBS)로 37°C에서 배양되었다. 60mm의 배양접시에 3×10^6 세포를 분주한 후, 배지에 백신이 담지된 미립자를 넣어 세포에 처리하였다. 분비된 TNF α 는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Endigen co.)로 분석하였다.

사. 통계분석

모든 샘플은 비슷한 조건에서 세 번 반복으로 수집되었고 처리되었다. 샘플농도의 기하평균은 계산되었고 그룹사이의 차이는 t-시험으로 정량되었다. $P < 0.05$ 는 차이가 큼을

의미한다.

4. 결과 및 고찰:

가. F127/키토산미립자와 백신이 담지된 F127/키토산미립자의 특성

그림 17은 키토산미립자, 백신이 담지된 키토산미립자, F127/키토산미립자 그리고 백신이 담지된 F127/키토산미립자의 형태를 보여준다 (그림 17. a과 d). 키토산미립자와 F127/키토산미립자는 제조된 초기에는 구형을 나타내지만 2주후에는 키토산미립자는 많이 뭉쳐져 있지만 (그림 17. b) F127/키토산미립자는 여전히 원래의 모습을 유지하는 것을 관찰하였다 (그림 17. e). F127/키토산은 F127을 도입한 후에도 미립자형성이 가능하며 F127이 미립자가 뭉치는 현상을 방지하는 것을 나타내었다. 이런 현상은 폐결핵환 키토산미립자에서 나타난 현상과 비슷하다. F127의 소수성 그룹인 PEO그룹이 미립자들이 서로 뭉치는것을 방지해주기 때문이다(그림 17. g와 h). 그러나 백신 BBD를 담지하면 미립자들은 다시 뭉쳤다 (그림 17. c, f 그리고 i).

미립자들의 평균크기는 Table 4과 그림 18에 나타냈다. 백신이 담지된 F127/키토산미립자는 F127/키토산미립자보다 크기가 더 커졌다. 이것은 백신이 미립자내부에 들어갈 뿐만 아니라 미립자표면에도 담지되는 것을 알려준다. 키토산미립자와 F127/키토산미립자는 양전하를 띠고 (zeta potential) 백신은 음전하를 띠기 때문에 백신 BBD는 정전기적 작용과 반데르발스힘에 의해 쉽게 미립자표면에 담지될 수 있다. 그리고 키토산미립자의 크기는 보관 2주후 훨씬 커졌지만 F127/키토산미립자의 크기는 변화가 크지 않았다 (Table 4). 이것은 F127이 우수한 storage stability를 갖고 있음을 암시한다. 백신이 담지된 F127/키토산미립자들의 크기는 10 μm 보다 작기에 mucosal-associated lymphoid tissue (MALT)에 쉽게 uptake될 수 있다.

나. 백신 BBD가 담지된 키토산미립자와 BBD가 담지된 F127/키토산미립자로부터의 BBD의 in vitro 방출실험

그림 19과 같이 백신 BBD가 담지된 키토산미립자와 BBD가 담지된 F127/키토산미립자에서 지속적인 방출경향을 나타냈고 F127/키토산미립자에서 키토산미립자보다 더 많은 백신이 방출되었다. 이것은 폴록사머의 친수성기인 PEO의 특성과 그로 인한 공간구조적인 변화가 생겼기 때문이다. Xu 등은 키토산분자와 뒤엀킨 PEG사슬이 키토산과

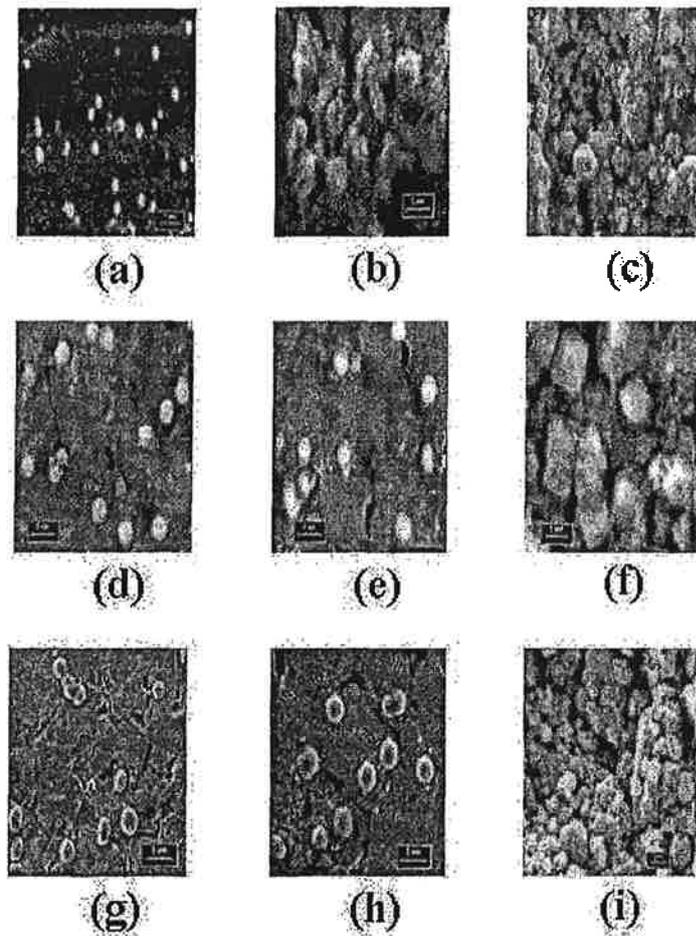
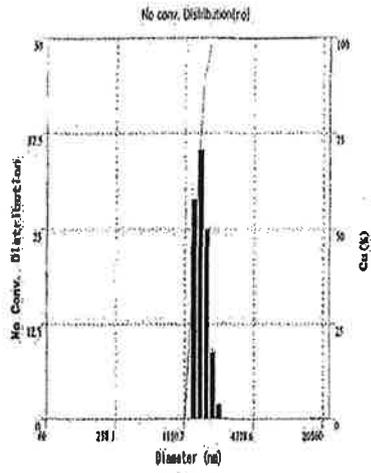


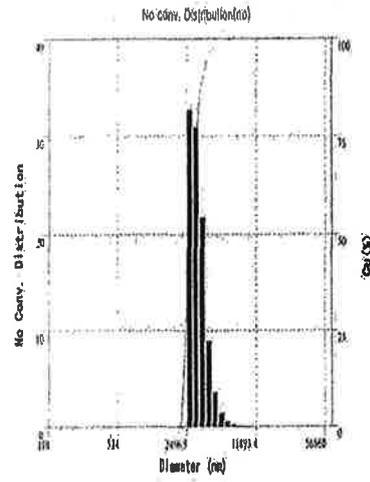
그림 17. 키토산미립자(a), F127-키토산미립자(d), 폐길화한 키토산미립자(g), 백신이 담지된 키토산미립자(b), 백신이 담지된 F127-키토산미립자(e), 백신이 담지된 폐길화한 키토산미립자(h), 2주보관된 백신이 담지된 키토산미립자(c), 2주보관된 F127-키토산미립자(f)와 2주보관된 백신이 담지된 폐길화한 키토산미립자(i)의 형태

	1 day	2 weeks
CMs	1.94±0.72	4.97±2.27
F127/CMs	2.71±0.75	3.02±0.41
BBD-loaded CMs	4.39±0.68	5.23±1.46
BBD-loaded F127/CMs	5.47±2.35	5.19±0.53

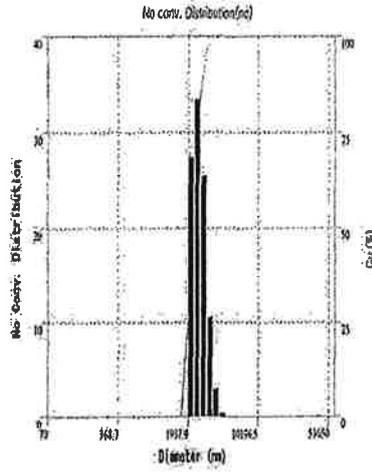
표 4. 키토산미립자, F127-키토산미립자, 백신이 담지된 키토산미립자와 백신이 담지된 F127-키토산미립자의 보관에 따른 크기변화 (μm)



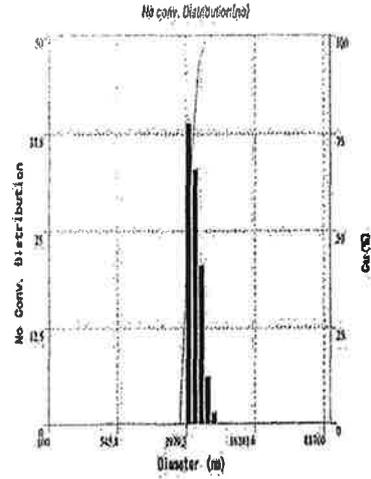
a



b



c



d

그림 18. 키토산미립자(a), 백신이 담지된 키토산미립자(b), F127-키토산미립자(c)와 백신이 담지된 F127-키토산미립자의 크기분포

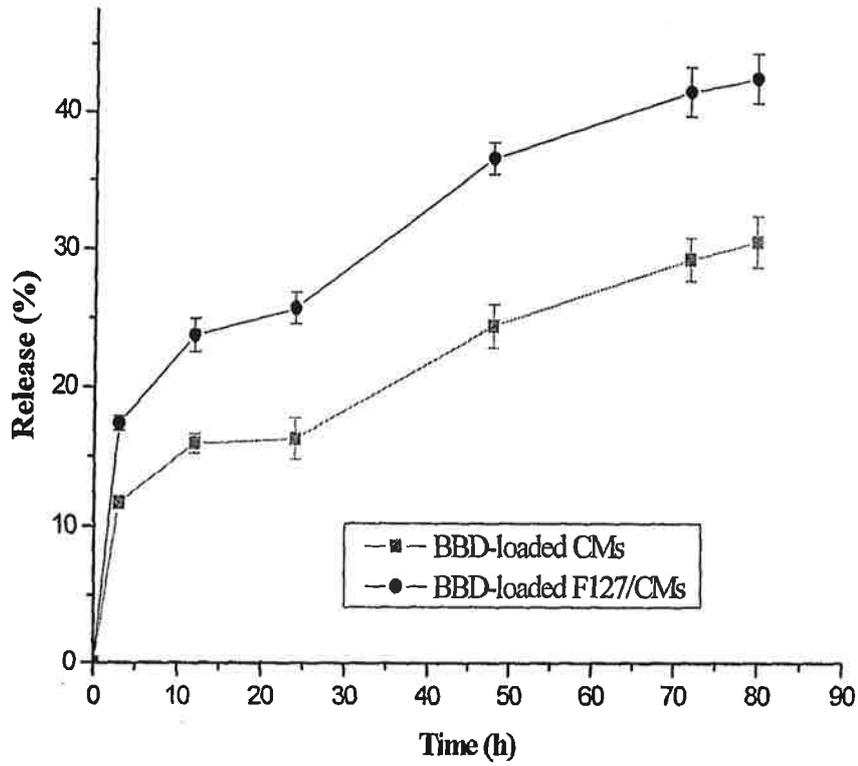


그림 19. 키토산미립자와 F127-키토산미립자에서의 백신의 방출경향

BSA의 결합을 성기게 하여 상대적으로 더 많은 BSA가 PEG를 포함하는 나노입자로부터 방출되게 한다고 보고하였다. 본 연구에서 발견한 결과도 친수성이 있는 PEO 사슬이 백신 BBD의 재흡착을 방해하여 BBD가 F127/키토산미립자로부터의 방출을 촉진하였음을 나타낸다.

다. RAW264.7세포주로부터 TNF α 의 분비양 측정실험

활성화된 마크로파아지는 MHC class II 분자와 co-stimulatory B7 family의 발현이 증대되도록 유도한다. 면역반응발생에서 중요한 단백질은 보통 활성화된 마크로파아지에 의해 분비된다.

본 연구의 주요목적은 비강투여를 위한 F127/키토산미립자의 면역활성을 동정하는 것이다. 백신 BBD를 모델백신으로 우리는 마크로파지 면역세포에서 TNF α 의 분비양 측정실험을 행하였다. TNF α 의 분비양상은 그림 20에 나타냈다. BBD, BBD-loaded 키토산미립자, BBD-loaded F127/키토산미립자로 처리한 마크로파지 면역세포에서 분비된 TNF α 는 시간에 dependent하는 양상을 보였으며 BBD-loaded F127/키토산미립자에서 가장 많은 TNF α 의 분비를 보여주었다 (BBD-loaded 키토산미립자에서 $P>0.05$, BBD에서 $P<0.05$). 그리고 LPS의 처리구에서는 48시간이후로 TNF α 양이 점차 줄어들었지만 백신이 담지된 키토산미립자와 F127/키토산미립자에서는 80시간까지도 TNF α 양이 지속적으로 분비되는것을 관찰하였다. 이것은 백신이 F127/키토산미립자에서 지속적으로 방출되어 마크로파지를 자극하였기 때문이다. 본 연구의 이 같은 결과는 백신 BBD가 담지된 F127/키토산미립자는 돼지 호흡기질병예방을 위한 호흡기백신전달의 경제적이고 효율적인 강력한 새로운 입후보자임을 암시한다.

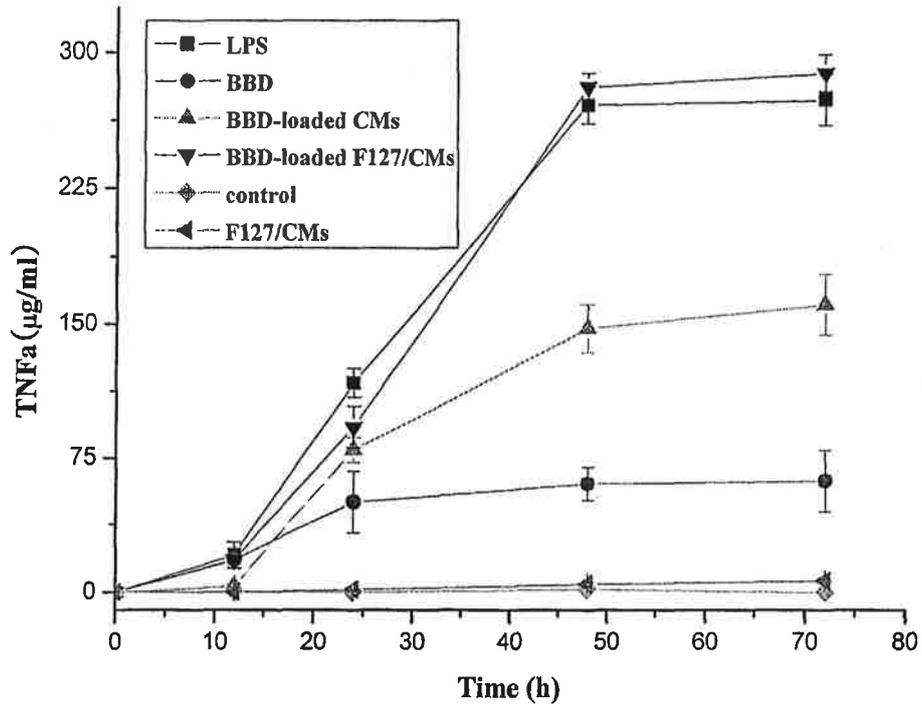


그림 20. F127-키토산미립자에서 방출된 백신으로 RAW264.7 면역세포를 자극시킨 후, 면역세포에서의 종양괴사인자의 분비

제5절 마우스에서 키토산 나노입자에 담지시킨 *Bordetella bronchiseptica* DNT 의 면역반응

1. 요약

위의 2절에서 키토산 나노입자에 담지시킨 *B. bronchiseptica* DNT(BBD-CMs)에 의한 면역유도반응을 마우스의 alveolar macrophage cell line인 RAW264.7 세포주를 통하여 알아보았다. 본 절에서는 BBDNT-CMs을 실험동물인 마우스의 비강내로 직접 접종하여 in vivo 상에서의 면역유도반응을 확인해 보고자하였다. 마우스의 면역화 이후 유도된 면역반응을 ELISA 실험을 통해 혈청, 비강세척액, 침에서 각각 BBD 특이 IgA, IgG 항체가 측정으로 알아보았다. 비강세척액 내의 BBD 특이 IgA는 접종량과 접종시간에 비례하여 증가되었으며 비슷한 현상이 혈청내의 IgA, IgG 항체가 검사에서도 확인되었다. 그러나 침 내에서는 항체 유도가 확인되지 않았다. 이러한 결과는 키토산 나노입자가 돼지 위축성비염 백신의 효과적인 보조제임을 보여준다.

2. 서론

*B. bronchiseptica*은 돼지 비강내의 감염으로 돼지 호흡기 질병의 하나인 위축성비염을 유발하는 세균이다. 돼지 위축성비염은 전 세계적으로 막대한 경제적 손실을 야기하지만, 이 질병을 통제하기 위해 개발된 기존의 방법들이 아직까지도 많은 문제점을 안고 있다. 그 하나의 예로 현재 시중에 판매되고 있는 상용백신이 비강 내 점막면역반응을 유도하는데 있어 효율이 매우 낮다는 점을 들 수 있다. Dermonecrotin은 위축성비염의 가장 중요한 병원성인자이며 위축성비염의 주요 병변을 유발하는 것으로 알려져 있다.

신체의 국소적인 또는 전체적인 면역반응을 유도하는데 있어 점막은 유용한 면역계이다. 그러나 점막으로 들어간 항원은 빠르게 제거될 수 있으며 분자의 크기가 클수록 점막의 경계를 통과하기가 어렵다. 이러한 이유로 인해 항원을 접종 시 점막 내에서 효과적인 면역반응을 유도할 수가 없다. 그러므로 점막내의 면역반응을 향상시키는데 있어서 안전하고 효과적인 점막 면역 보조제의 개발은 중요하다 하겠다.

키토산은 생체 내에서의 점착성을 갖고 있으며 다양한 합성물의 점막 내 흡수를 향상시키는 것으로 알려져 있다. 또한 키토산은 비강 내 투여로 점막 면역 반응을 유도하는데 있어서 보조제 역할을 한다는 것이 이미 몇몇의 논문을 통해 검증되었다.

점막 면역계는 국소 면역으로써 T 세포 의존적인 세포성 면역과 IgA 항체 분비를 포함한다. 호흡기 점막에서 생성, 분비된 IgA는 균의 집락화와 병변유발로부터 숙주를 보호한다. 또한 분비된 IgA는 점막 상피세포에서 병원균과 그들이 생산한 독소의 흡수를 막는 역할을 한다.

위와 같은 정보를 기반으로 마우스 비강으로의 BBD-CMs 투여에 따른 비강 점막 내

IgA 생성으로 돼지 위축성비염백신에서 키토산의 면역보조제로써의 역할을 규명해 보고자 한다.

3. 실험방법 및 결과

가. 실험방법

1) 키토산 미립자에 담지시킨 항원의 마우스 접종

키토산 미립자와 결합된 *Bordetella bronchiseptica* DNT를 접종 농도가 각각 1 μ g, 10 μ g, 30 μ g이 되도록 PBS에 희석한 후, 마이크로 피펫을 이용하여 6주령 암컷 BALB/c 마우스의 비강 내로 직접 접종하였다. Negative control로 동일하게 희석된 chitosan 나노입자를 마우스 비강 내로 단독으로 투여하고, 기존의 백신효과와 비교하기 위하여 상용백신인 ARPH (혼합백신: 돼지의 위축성 비염, 파스튜렐라성 폐렴 및 홍막폐렴)을 0.1 ml씩 근육 주사하였다. 마우스는 22수씩 6개 군으로 실험군을 편성하고, 1회 접종량을 20 μ l을 격주 간격으로 4회 접종하였다.

2) 시료 채취

면역반응으로 유도된 *Bordetella bronchiseptica* DNT 특이 IgA 및 IgG 항체가 변화를 검사하기 위하여 Saliva, Nasal Wash, Serum 시료를 다음의 방법으로 채취하였다.

가) Saliva : Pilocarpine을 0.5mg/ml 로 PBS에 희석한 후 마우스의 복강으로 100 μ l 주사한다. 5분 후, 마우스타액을 채취한다.

나) Nasal wash : Ketamin 의 과 투여로 안락사 시킨 마우스의 하악을 절개 후, 비강 내로 마이크로 피펫을 이용하여 50 μ l 씩 2번 PBS을 흘려보낸 후 채취한다.

다) Serum : heparin으로 coating된 capillary tube를 이용하여 마우스의 안와정맥으로부터 채취한 후 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 보관 후 원심분리하여 상층액을 취한다.

3) 방어능 평가

B. bronchiseptica 균주의 최소 치사 농도 (minimal lethal dose, MLD)를 구한 후 배양 희석하여 직접 마우스의 복강에 공격접종하였다. 72시간까지의 폐사율을 조사하여 방어능을 평가하였다. 폐사체로부터 원인균을 회수 분리하기 위하여, 각 그룹에서 사망한 한 개체로부터 가검물을 채취하여 공격 접종에 사용하였던 *B. bronchiseptica*를 재 분리하는 실험을 실시하였다.

가) Minimal Lethal Dose (MLD)

*B. bronchiseptica*를 Tryptic soy broth에서 배양한 후 일정배율로 단계 희석하고 원액과 단계 희석액들의 OD값을 각각 측정 후 Tryptic soy agar 배지에 도말하여 배양한다. 배양된 집락의 개수의 센 후 OD값에 대입하여 colony 측정을 위한 식을 유도한다 (유도식).

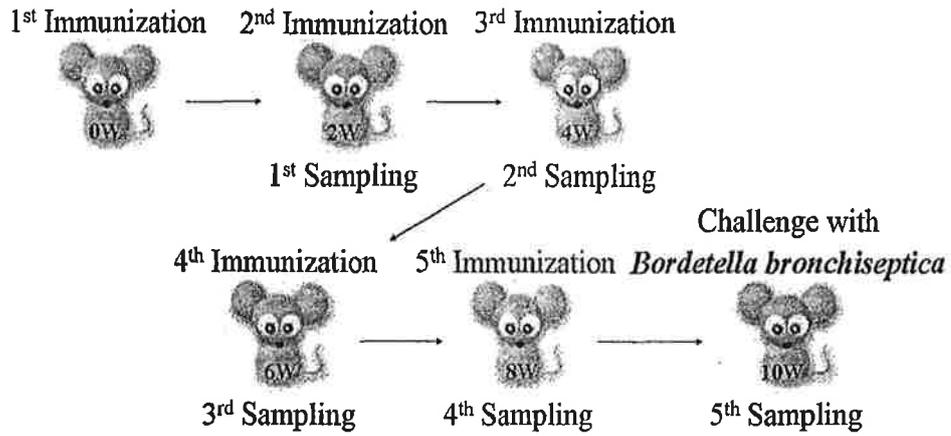


그림 21. 면역화 및 시료채취 스케줄

실험군	투여 항원 및 투여량	투여 방법	마우스수
1	ARPH 혼합백신, 0.1ml	근육주사	22
2	Chitosan Microsphere	비강접종	22
3	Chitosan Microsphere /BBDNT (1ug)	비강접종	22
4	Chitosan Microsphere /BBDNT (10ug)	비강접종	22
5	Chitosan Microsphere /BBDNT (30ug)	비강접종	22
6	No Treatment	-	20

표 5. 실험군 편성표



그림 22. Nasal wash 방법

O.D ₆₀₀	Colony number (CFU/ml)
0.792	3×10^8
0.084	3×10^7
0.008	3×10^6
0.0	3×10^5

유도식 :

$$Y = 4 \times 10^8 X - 482386$$

Y : colony number

X : O.D

TSB배지에 배양한 *B. bronchiseptica*를 O.D값 측정 후 위의 식에 대입하여 일정량의 집락수로 단계희석하고 마우스 각 그룹(각 4수)에 복강주사 후 72시간 이내 사망한 개체의 비율로 폐사율을 조사한다 (표6).

위의 실험에서 잡힌 MLD 6.0×10^5 CFU/ml 의 농도로 마지막 면역화 2주후 각 실험군 마우스의 복강에 주사하여 폐사율을 통해 방어능을 평가하였다.

나) 원인균의 분리동정

각 실험군 폐사체로부터 가검물을 채취한 후, Blood agar를 이용하여 37°C에서 균을 배양하였다. 배지에서 자란 균집락을 순수 분리한 후 Vitek을 이용하여 균을 동정하여 확인하였다.

4) BBDNT-CMs 특이 항체가 검사

투여한 vaccine의 면역유도 효과를 검정하기 위하여, 채취된 시료 내 BBDNT 특이 IgA, IgG 항체를 ELISA 검사법으로 측정하였다. 방법은 다음과 같다.

가) Coating buffer (14.2 mM Na₂CO₃, 34.9 mM NaHCO₃, 3.1 mM NaN₃, pH 9) 100 μ l에 BBDNT 항원이 10 ng 되도록 희석한후 ELISA 검사를 위한 microplate 에 100 μ l 분주한 후 4°C에서 overnight 보관하였다.

나) Microplate를 PBST buffer(PBS-TritonX 100)로 세 번 세척 후 PBST buffer 에 1% BSA(bovine serum albumin)을 첨가하여 microplate 에 분주하고 37°C에서 1시간 처리한다.

다) Microplate를 PBST buffer 로 세 번 세척 후 일차항원으로 채취된 시료인 sera, nasal wash, saliva를 분주하고 37°C에서 1시간 처리한다.

라) Microplate 를 PBST buffer 로 세 번 세척 후 이차항원으로 0.1 μ l 의 anti-mouse IgG 또는 anti-mouse IgA를 분주하고 37°C에서 1시간 처리한다.

마) Microplate 를 PBST buffer로 세 번 세척 후 발색제(peroxidase conjugated, Sigma) 100 μ l 분주, 실온에서 일정시간 방치하고 ELISA reader기를 이용하여 O.D값을 측정한다.

나. 실험결과

ELISA test를 통해 비강 세척액내의 *B. bronchiseptica* DNT 특이 IgA를 측정하여 키토산 나노입자에 담지시킨 BBDNT 30 μ g를 마우스 비강내로 접종한 실험군에서 가장 효과적임을 관찰하였다. 2차 접종 이후로 항체가가 유의성 있게 증가하였으며, 마지막 백신접종 이후로 항체가가 아무것도 처리하지 않은 음성대조군, 상용백신 처리군에 비하여 약 10배 정도에 달하였다. BBDNT 10 μ g, 1 μ g을 각각 접종한 실험군에서도 항체가가 차례로 올라간 것으로 보아 접종량에 비례하여 항체가 형성되었음을 알 수 있었다. (그림 23) 반면 돼지 호흡기 질환 혼합백신인 상용백신그룹 ARPH군은 음성대조군과

Colony number (CFU/ml)	15hr	21hr	39hr	64hr	72hr
6.0×10^7	1/4	0/4			
6.0×10^6	3/4	1/4	0/4		
6.0×10^5	4/4	4/4	4/4	2/4	2/4

표 6

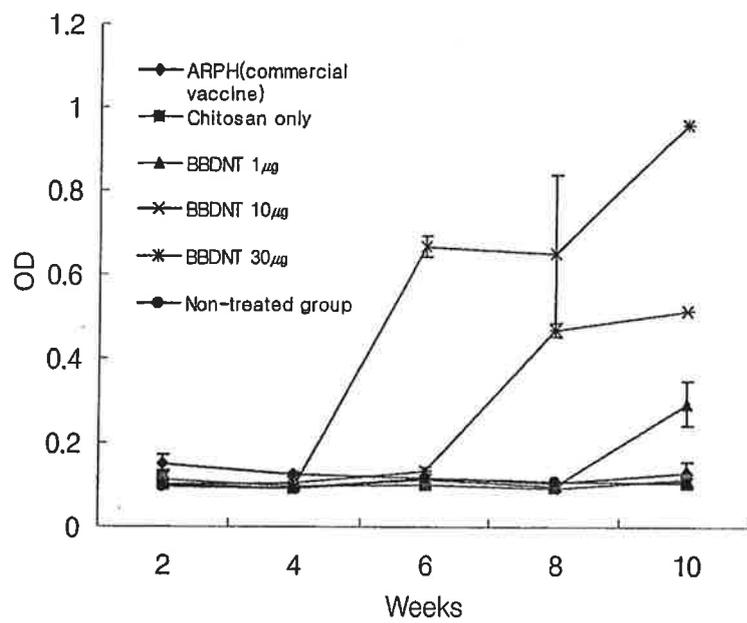


그림 23.

마찬가지로 항체가가 전혀 올라가지 않아서 비강 점막 내 IgA 유도에 효과가 없음을 알 수 있었다.

ELISA test를 통해 혈청 내 *B. bronchiseptica* 특이 IgG를 측정하였다. 돼지호흡기질환 혼합백신 ARPH를 접종한 군에서 가장 많은 양의 혈청 IgG가 유도 됐으며, 세 번째 접종 이후 일정량을 유지하였다. 키토산 나노입자에 담지한 BBDNT 백신군에서는 접종의 백신양에 비례하여 30 μ g을 접종한 군에서 가장 많은 IgG가 검출되었다. 마지막 면역화 이후 키토산만을 접종시킨 그룹에서 음성대조군에 비해 2배 가량의 IgG가 형성된 것으로 보아 키토산만으로도 어느 정도 면역반응을 유도할 수 있는 것으로 보인다. (그림 24)

ELISA test를 통해 혈청 내 *B. bronchiseptica* 특이 IgA를 측정하였다. BBDNT 30 μ g을 접종한 군에서 네 번째 면역화 이후부터 음성대조군과 비교하여 약 4배 가량의 IgA가 유도되었다. 또한 상용백신군인 ARPH군에 비하여 10주차엔 3배 정도의 면역반응이 유도된 것으로 보인다. 하지만 비강세척액 내에서 유도된 IgA보다는 양적으로 작았으며 네 번째 백신 접종 이후에야 특이 항체가 유도된 것으로 보아 혈청 내 IgA유도 반응이 약하다는 것을 알 수 있었다. (그림 25)

마지막 vaccination 2주 뒤 각 그룹의 마우스 복강 내로 *B. bronchiseptica* (MLD 6.0×10^5 CFU/ml)를 공격접종한 후 시간에 따른 폐사율로 방어능력을 평가하였다. 아무 것도 처리하지않은 음성대조군은 72시간 이내에 모두 폐사하여 폐사율 100%였으며, 키토산만을 투여한 그룹은 그보다 더 일찍 60시간 이내에 모두 폐사하였다. 반면 백신그룹 중 BBDNT 30 μ g, 10 μ g을 접종한 그룹에서는 각각 78, 72시간이후 20%의 생존률을 유지하였다. 상용백신그룹인 ARPH군은 생존률이 100%로 복강 내로 감염시킨 *B. bronchiseptica*에 대한 방어능력이 가장 높았다. (그림 26)

이상의 결과로 보아 키토산미립자에 담지한 BBDNT를 마우스 비강 내로 투여하였을 때, 비강 점막 내에서 BBD 특이 IgA가 효과적으로 유도된다는 것이 확인되었다. 유도된 면역 반응은 투여량에 비례하였으며, 음성대조군뿐만 아니라 현재 판매되고 있는 상용백신군과 비교하였을 때 매우 좋은 결과를 보여주었다. 이는 키토산 미립자에 담지시킨 BBDNT가 돼지 위축성 비염의 표적 기관인 비강 내에서 효과적으로 면역반응을 유도할 수 있음을 추측하게 해준다. 또한 키토산이 돼지 호흡기 질병의 백신 전달시스템에서 면역 보조제로써 효과적인 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

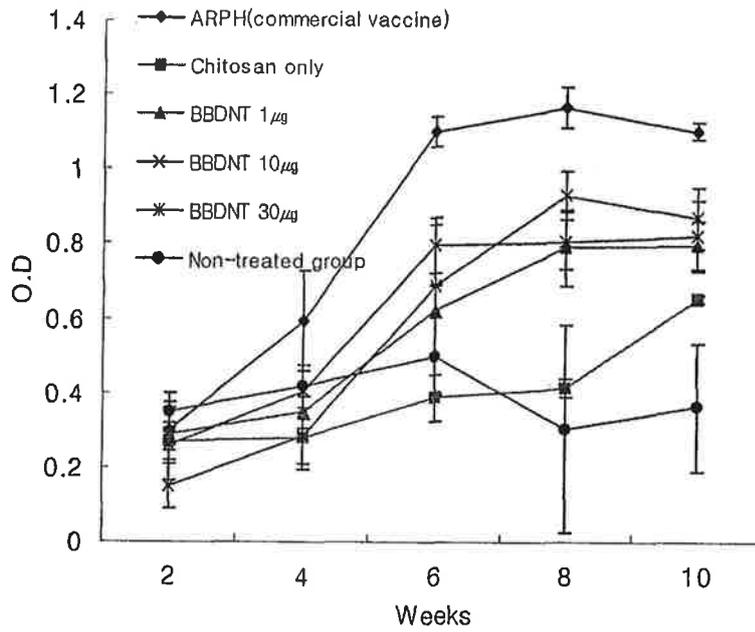


그림 24. 혈청내의 BBDNT 특이 IgG titer

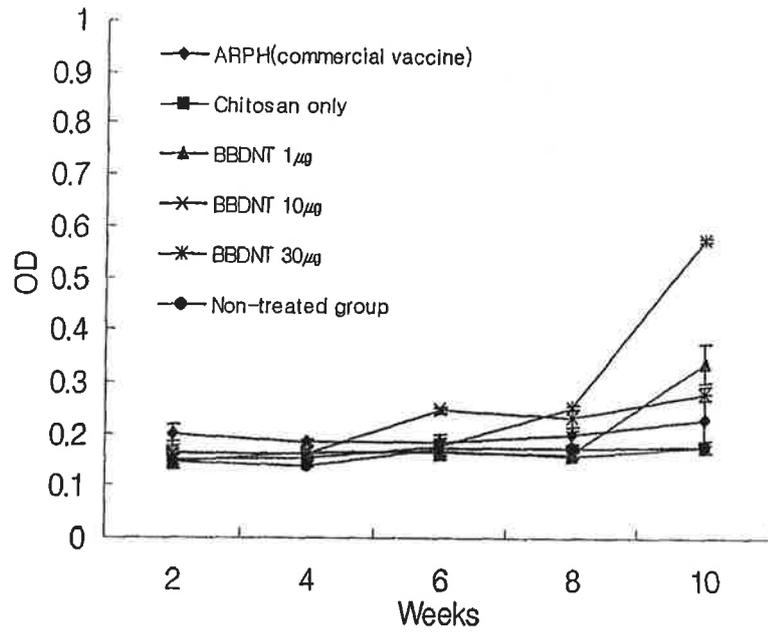


그림 25. 혈청내의 BBDNT 특이 IgA titer

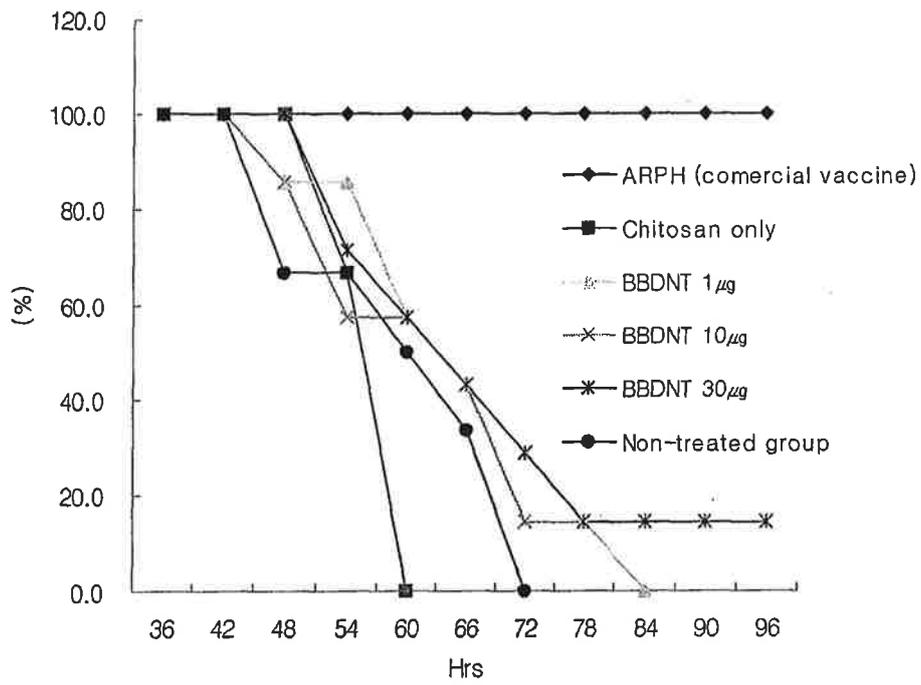


그림 26. *B. bronchiseptica*에 대한 방어능력 평가

제6절 F127 존재하 또는 만노스와 결합시킨 BBDNT/키토산 미립자의 면역반응 비교

1. 요약

본 실험에서는 F127 존재하 또는 만노스를 키토산과 각각 합성하여 이 물질들이 키토산의 백신 방출 시 안정적으로 가속화 할 수 있는지를 유도된 면역반응을 통해 비교하고자 한다. 키토산 미립자와 F127 존재하 또는 만노스를 각각 합성한 후 BBDNT를 불활화시켜 여기에 담지시켰다. 준비된 백신을 각각 BBD-F127/CMs (F127존재하에서 만든 키토산미립자에 BBDNT를 담지시킨 백신), BBD-MCMs (만노스와 키토산 합성물에 BBDNT를 담지시킨 백신)로 명명하고, 마우스 비강 내로 직접 접종하였다. 면역화 스케줄이 끝난 후 *B. bronchiseptica*를 비강 내로 공격 접종하여 방어능력을 평가하였으며, 채취된 시료(혈액, 비강세척액, 침)에서 BBD 특이 면역반응(IgA, IgG 항체가)을 ELISA 실험을 통하여 측정하였다. BBD-F127/CMs을 투여한 그룹이 다른 그룹에 비하여 모든 채취된 시료 내 BBD 특이 IgA 항체가가 가장 높았다. 또한 이 그룹은 비강 내 공격접종에 대하여 가장 높은 생존율을 보여주었다. 그러나 혈청 내 BBD 특이 IgG 항체가는 백신 접종군 모두에서 비슷한 경향을 나타내었다. 이러한 결과로볼 때 F127이 마우스에서 BBDNT에 대한 점막 면역반응 유도 시 키토산과 함께 효과적인 면역 보조제 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

2. 서론

키토산은 생체 내에서 점착성을 갖고 있으며, 이미 다수의 논문을 통해 다양한 합성물의 점막 내 흡수를 향상시킨다는 것이 알려져 있다. F127은 생체 적합성이 뛰어나 의약품으로써 현재 다양한 방면에서 널리 이용되고 있으며, 점막 면역 보조제로써 효과가 입증되고 있다. 그람음성세균의 세포막 표면에 있는 만노스 분자는 생체 내 Mannose binding lectin(MBL)과 결합하여 선천성 면역반응의 보체계를 활성화하며, 대식세포에 의한 항원의 생체 내 흡수에 효과적으로 반응하게 한다. 위와 같은 정보를 바탕으로 본 실험에서는 키토산의 백신 방출 효과 및 면역 반응 보조제로써의 역할을 좀 더 보강하기 위해 F127 또는 만노스를 각각 키토산과 합성한 후 마우스 비강 점막으로 투여하여 유도된 면역반응을 비교해보고자 한다.

3. 실험방법

가. 항원의 마우스 접종

키토산 미립자에 각각 F127과 만노스를 결합시킨 후 여기에 BBDNT 항원을 담지시켰다. 준비된 백신을 접종 농도가 각각 30 μ g이 되도록 PBS에 희석한 후, 마이크로 피펫을 이용하여 6주령 ICR 마우스의 비강 내로 접종하였다. 음성대조군으로 동일하게 희석

된 키토산 나노입자를 단독으로 투여하고, 기존의 백신효과와 비교하기 위하여 상용백신인 ARPH (혼합백신: 돼지의 위축성 비염, 파스튜렐라성 폐렴 및 홍막폐렴)을 0.1ml씩 근육 주사하였다. 마우스는 28수씩 6개 군으로 실험군을 편성하고, 1회 접종량 20 μ l을 격주 간격으로 5회 접종하였다.

나. 시료 채취

면역반응으로 유도된 BBDNT 특이 IgG, IgA를 검사하기 위하여 비강세척액, 침, 혈청 샘플을 각각 채취하였다. 채취 방법은 제 3절의 실험과 동일하게 실시하였다.

다. 방어능 조사

마지막 백신 접종 2주 후 *B. bronchiseptica*를 MLD 6.0 \times 10⁵ CFU/ml 농도로 비강내로 접종하여 폐사율을 기준으로 방어능력을 조사하였다. 백신 접종으로 형성된 항체에 의한 각 그룹별 방어능력의 차이를 평가하였다. 각 실험군의 폐사체로부터 가검물을 채취한 후, Blood agar를 이용하여 37 $^{\circ}$ C에서 균을 배양하고, 배지에서 자란 균 집락을 순수 분리한 후 Vitek을 이용하여 균을 동정하여 확인하였다.

라. BBDNT-CMs 특이 항체가 검사

면역반응으로 유도된 BBDNT 특이 IgG, IgA를 채취된 시료별로 ELISA 검사법을 통하여 조사하였으며 실험 방법은 제 3절과 동일하며, 희석배수만 차이를 두었다.

가) Coating buffer (14.2 mM Na₂CO₃, 34.9 mM NaHCO₃, 3.1 mM NaN₃, pH 9) 100 μ l에 BBDNT 항원이 10 ng 되도록 희석한후 ELISA 검사를 위한 microplate 에 100 μ l 분주한 후 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 보관하였다.

나) Microplate를 PBST buffer(PBS-TritonX 100)로 세 번 세척 후 PBST buffer 에 1% BSA(bovine serum albumin)을 첨가하여 microplate 에 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 처리한다.

다) Microplate를 PBST buffer 로 세 번 세척 후 일차항원으로 채취된 시료인 sera, nasal wash, saliva를 각각의 희석배수로 희석한 다음 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 처리한다.

라) Microplate 를 PBST buffer 로 세 번 세척 후 이차항원으로 0.1 μ l 의 anti-mouse IgG 또는 anti-mouse IgA를 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 처리한다.

마) Microplate 를 PBST buffer 로 세 번 세척 후 발색제(alkaline phosphatase conjugated, Sigma) 100 μ l 분주, 실온에서 일정시간 방치하고 ELISA reader기를 이용하여 O.D값을 측정한다.

2. 실험결과

ELISA test를 통해 비강세척액 내의 BBDNT 특이 IgA를 측정하였다. 폴리에틸렌글리콜과 키토산 미립자의 결합체에 담지시켜 만든 BBD-F127/CMs백신군에서 4주 이후

실험군	투여 항원 및 투여량	투여 방법	마우스 수
1	ARPH 혼합백신, 0.1ml	근육주사	28
2	Chitosan Microsphere	비강접종	28
3	BBDNT/Chitosan microsphere 30 μ g (BBDNT-CM)	비강접종	28
4	BBDNT/Chitosan microsphere+Poloxamer 30 μ g (BBDNT-PCM)	비강접종	28
5	BBDNT/Chitosan microsphere+mannose 30 μ g (BBDNT-MCM)	비강접종	28
6	No Treatment	-	28

표7. 실험군편성표

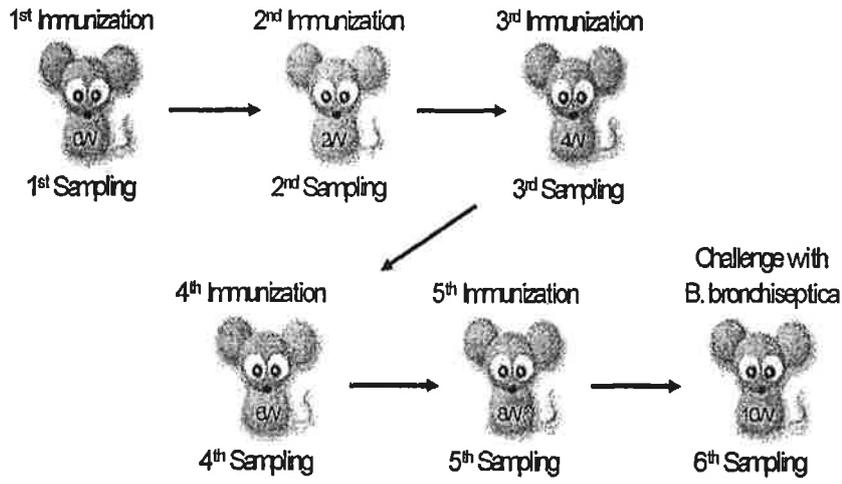


그림 27. 면역화 및 시료채취 스케줄

장 효과적으로 IgA가 유도된 것으로 보인다. 키토산과 만노스를 합성한 후 BBDNT를 담지 시킨 BBD-MCMs 그룹은 키토산만으로 백신을 담지시킨 BBD-CMs 그룹보다도 효과가 떨어지는 것으로 보인다. 또한 10주 이후에는 BBD-F127/CMs 그룹이 BBD-MCMs 그룹보다 1.5배정도 항체가가 높아짐을 알 수 있었다. 제 3절의 실험결과와 마찬가지로 상용백신균인 ARPH균은 비강 점막 내 BBD 특이 항체가가 전혀 확인이 되지 않았으며, 아무것도 처리하지 않은 음성대조군과 비슷한 양상을 나타내었다. 또한 음성대조군, 상용백신균 등과 비교하여 볼 때 백신군들은 유도된 항체가가 8배에서 10 배에 달하였다. 같은 농도의 키토산만을 투여한 그룹에서도 마찬가지로 BBD 특이 IgA가 유도되지 않았다.

ELISA test를 통해 침 내의 BBDNT 특이 IgA를 측정하였다. 폴리에틸렌글리콜과 키토산 미립자의 결합체에 담지시켜 만든 BBD-F127/CMs 백신군에서 첫 번째 백신 접종 이후부터 효과적으로 IgA가 유도된 것으로 보인다. 이 그룹은 2주 이후 음성대조군 및 상용백신균 등과 비교하여 4배 정도 높은 BBD 특이 항체가를 유지하였다. 만노스와 키토산 미립자의 결합체에 담지시켜 만든 BBD-MCMs 백신군은 8주 이후 항체가가 눈에 띄게 증가하였다. 하지만 8주 이전까지는 다른 백신군, 특히 키토산만으로 담지시킨 BBD-CMs군에 비하여서도 항체가가 낮았으며 BBD-F127/CMs 군과는 항체가 차이가 2배 이상 벌어졌다. 같은 농도의 키토산만을 투여한 실험군에서는 2주 이후부터 항체가가 오르면서 유지되었지만, 양적으로는 반응이 작은 것으로 보인다. 상용백신균은 비강 내 BBD 특이 IgA 결과와 마찬가지로 음성대조군과 비슷한 양상을 나타내면서 구강 점막 내에서도 특이 면역 반응을 유도하지 못한다는 것을 보여주었다. 침 내에서 검출한 BBD 특이 IgA 항체가는 양적인 면에서 전체적으로 비강 내에서 유도된 항체가보다 약했지만, 비강 내 항체는 4주 이후 유도된 것에 반해서 초기 면역화 이후부터 눈에 띄게 증가하였음을 알 수 있었다.

ELISA test를 통해 혈청 내의 BBDNT 특이 IgA를 측정하였다. 다른 실험군과 비교하여 폴리에틸렌글리콜과 키토산 미립자의 결합체에 담지시켜 만든 BBD-F127/CMs 백신군에서 4주 이후부터 효과적으로 IgA가 유도된 것으로 보인다. 이에 반해 키토산, 만노스 결합체에 백신을 담지시켜 만든 BBD-MCMs 실험군은 4주 이후 항체가가 증가하긴 하였으나 BBD-F127/CMs 그룹에 비하여 반응이 느려서 10주에 이르러서야 같은 정도의 항체가를 나타내었다. 또한 이 실험군은 키토산만으로 백신을 담지한 BBD-CMs 실험군과 항체가의 증가 양상도 비슷하고 양적으로도 차이를 보이지 않아 혈청 내 IgA 유도에 큰 효과가 없는 것으로 보인다.

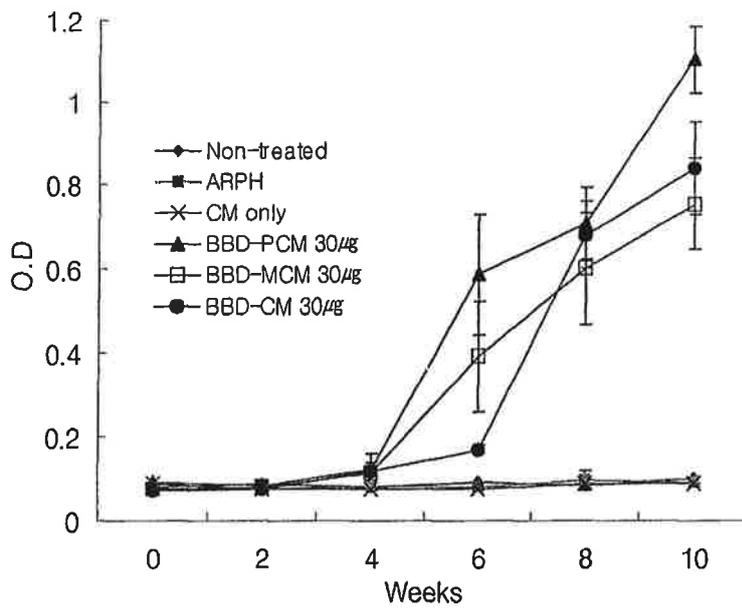


그림 28. 비강세척액 내의 BBDNT 특이 IgA

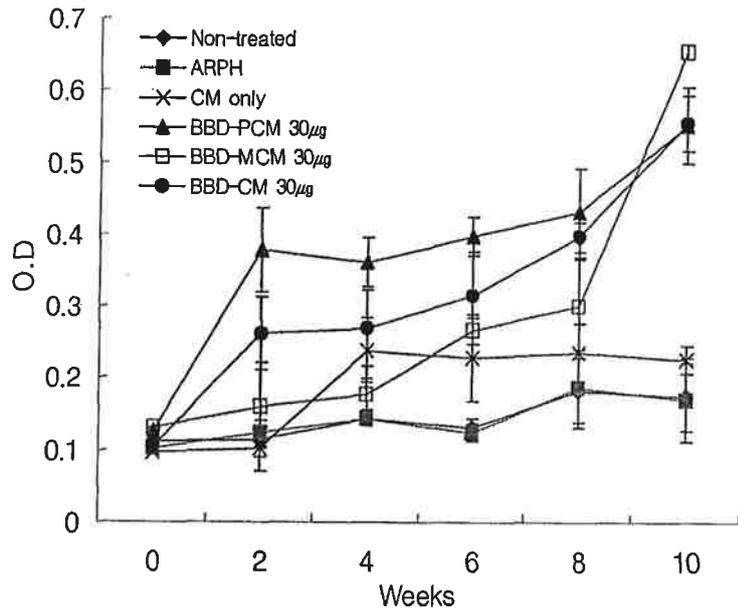


그림 29. 침 내의 BBDNT 특이 IgA

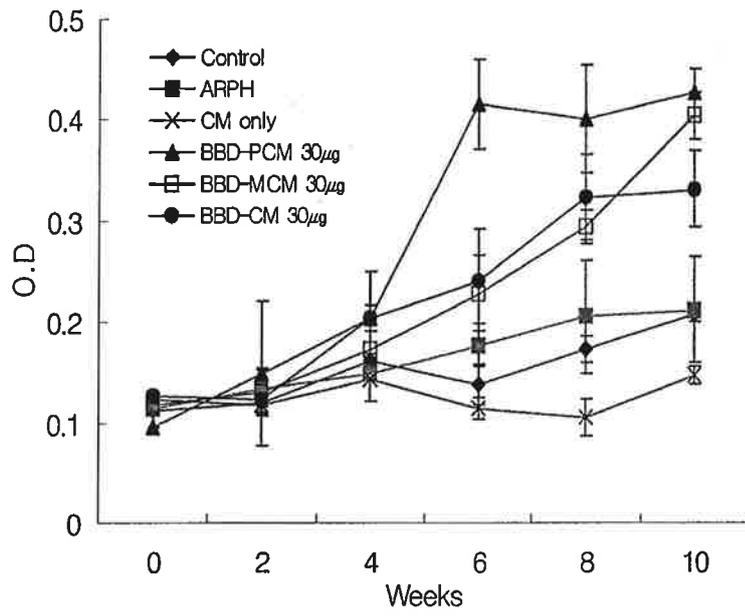


그림 30. 혈청 내의 BBDNT 특이 IgA

ELISA test를 통해 BBDNT 특이 IgG를 측정하였다. 상용백신군인 ARPH 그룹에서 2주 이후부터 다량의 IgG가 유도되었으며, BBDNT 백신군에서는 4주 이후 비슷한 양상으로 혈청 내 IgG가 유도되었다 (그림 31). 백신군 중에서는 BBD-F127/CMs 실험군이 다른 백신군에 비하여 8주 이후 양적으로 좀 더 많은 혈청 IgG가 유도된 것으로 보인다.

B. bronchiseptica (균수 6.0×10^5)을 마지막 백신 접종 2주 후 실험군의 비강내로 공격접종한 후 생존률을 조사하였다. 폴리에칠렌글리콜과 키토산 미립자의 결합체에 담지시켜 만든 BBD-F127/CMs 실험군에서 감염균에 대한 방어능력이 가장 높은 것으로 나타났다. 이 그룹은 공격접종 72시간 이후 80%의 생존률을 보였으며, 다른 백신군들은 70%를 나타내었다. 이는 상용백신군인 ARPH 그룹의 60%보다도 높은 수치로 비강 내로 침입한 *B. bronchiseptica*에 대하여 백신 접종으로 유도된 비강 점막 내 IgA에 의한 높은 방어율을 보여준다. 아무것도 처리하지 않은 음성대조군은 75시간 이후 매우 낮은 20%의 생존률을 보였으며, 키토산 미립자만을 투여한 실험군은 40%의 생존률을 나타내었다.

폴리에칠렌글리콜로 폐길화시킨 키토산에 담지한 BBDNT를 마우스 비강 내로 투여하였을 때, 가장 효과적으로 비강 점막 내 BBD 특이 IgA가 유도된다는 것이 확인되었다(그림 28). 또한 이 실험군은 침 내의 BBD 특이 IgA 항체가 검사에서도 첫 번째 면역화 이후부터 눈에 띄게 항체가가 증가함으로써, 초기 면역 반응에서 구강 점막 내 IgA 유도가 효과적임을 추측할 수 있었다. 면역화 스케줄 이후 *B. bronchiseptica*를 비강 내로 공격접종 하였을 때에도, BBD-F127/CMs 그룹은 가장 높은 80%의 생존률을 보임으로써 생성된 항체에 의한 방어능력도 뛰어난 것으로 확인되었다. 하지만 만노스와 키토산 합성체로 BBD를 담지시킨 백신인 BBD-MCMs을 접종했을 때, 구강 점막 내 BBD 특이 IgA 항체가는 키토산만으로 담지시켜서 만든 BBD-CMs 그룹보다도 낮은 것으로 나타났다 (그림 29). 또한 이 그룹은 비강 및 혈청 내 BBD 특이 IgA 검사에서도 BBD-CMs 그룹과 비교하였을 때, 큰 차이를 보이지 않거나 오히려 항체가가 조금 낮아보였다. 이는 만노스와 키토산을 합성하여 면역반응보조제로 사용하였을 때 키토산의 백신 방출 효율이 오히려 낮아지거나 만노스의 보조제 효과가 없기 때문인 것으로 추측된다. 현재 양돈산업에서 사용하는 방법인 근육주사 방법으로 상용백신인 ARPH를 접종하였을 때, 비강과 구강 점막 내 IgA뿐만 아니라 혈청 내 IgA 유도에서도 효과가 없음을 다시 한번 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 볼 때, 마우스의 BBDNT 특이 면역반응 유도 시 폴리에칠렌글리콜로 폐길화한 키토산에 BBDNT 항원을 담지하여 사용하면 마우스의 비강 및 구강 점막 내에서 효과적으로 면역반응을 유도

할 수 있는 것으로 보인다. 이는 폴리에틸렌글리콜이 마우스에서 BBDNT에 대한 점막 면역반응 유도 시 키토산과 함께 효과적인 면역 보조제 역할을 할 수 있을 것으로 추측된다.

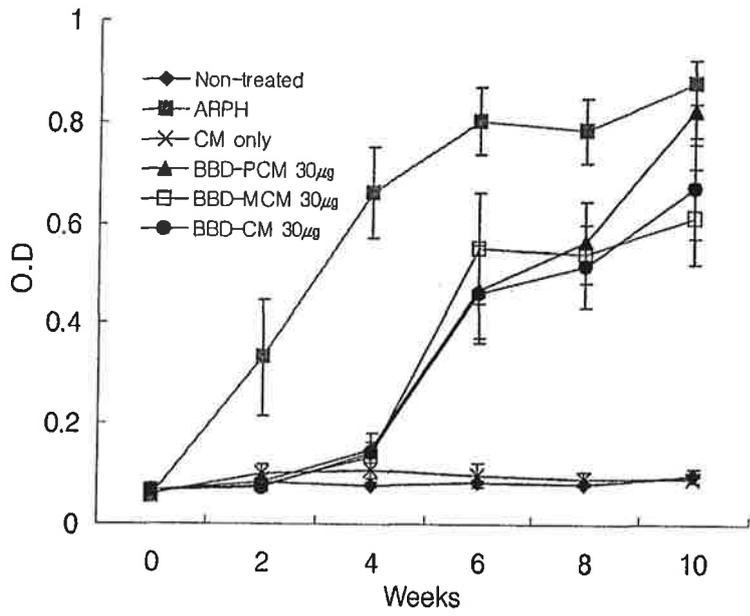


그림 31. 혈청 내의 BBDNT 특이 IgG

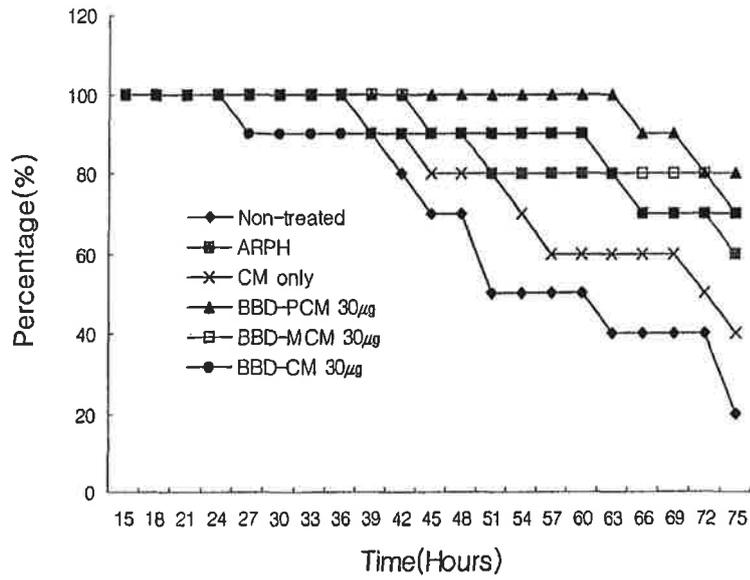


그림 32. *B. bronchiseptica* 에 대한 방어능력 평가

제7절 돼지에서 키토산 미립자에 담지시킨 *Bordetella bronchiseptica* DNT의 면역반응

1. 요약

실험동물인 마우스에서 키토산 미립자에 담지시킨 *B. bronchiseptica* DNT의 비강 내 점막 면역 유도 효과를 확인한 본 실험진은 마지막으로 최종 목적동물인 돼지에서 효과를 검증해보고자 하였다. 실험의 정확성을 높이기 위하여 초유 급역을 막아 *B. bronchiseptica* DNT에 대한 모체이항 항체가 없는 돼지를 사용하였으며, 실험 시작 전 ELISA 검사로 확인 시 일반 음성혈청과 비슷하거나 오히려 더 낮은 항체를 나타내었다. 실험시설 역시 SPF 시설 기준에 맞추려 노력하였고, 실험진행 시 실험기구 및 실험원의 소독을 철저히 하였다. 면역화 이후 비강세척액, 침, 혈청 시료를 각각 채취하여 ELISA 검사를 통해 BBD 특이 면역반응(IgA, IgG 항체)을 검사하였다. 마지막 백신 접종 10일 이후 *B. bronchiseptica*를 비강을 통해 공격접종하고, 각 그룹별로 임상증상을 비교하여 방어능력을 평가하였다. 공격접종 일주일 후 생존 돼지를 안락사 시킨 후, 부검을 통하여 비강 및 폐 등의 병변을 관찰하였다. ELISA 결과 백신접종군의 비강세척액 내의 BBD 특이 IgA 항체가 및 혈청 내 BBD 특이 IgG 항체가 아무것도 처리하지 않은 음성대조군에 비하여 면역화 이후 꾸준히 증가함을 확인하였으며, 40일 경과 후 5배 정도의 차이를 보였다. 침 내의 BBD 특이 IgA 항체가 검사에서도 비슷한 경향을 나타내었지만, 양적으로는 작았으며 개체간의 편차가 컸다. 공격접종 이후에는 두 그룹이 뚜렷한 임상증상 차이를 보였는데, 음성대조군의 경우 대부분의 돼지에서 사료섭취가 감소하고 운동장애를 나타낸 반면 백신접종군은 활발한 활동을 보였다. 부검 시에도 음성대조군의 비강에서 초기 위축 증상이 관찰되었으나, 백신접종군은 정상 비강의 모양을 나타내었다. 위와 같은 결과로, *B. bronchiseptica* DNT를 키토산 미립자에 담지하여 돼지 비강내로 접종하였을 때 효과적으로 특이 면역반응을 유도할 수 있다는 것을 확인하였으며, BBD-CMs 백신을 통한 면역화 이후 비강으로 *B. bronchiseptica* DNT의 침입 시 효과적으로 방어할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

2. 서론

돼지 위축성비염은 대부분의 양돈장에 상재하는 돼지의 만성호흡기 질환으로 비강에 침입한 병원체에 의해 비강점막의 염증을 일으키고, 점점 병세가 진행될수록 비갑개골

과 상악골의 위축이 되고, 좀 더 지나면 코가 비뚤어지는 특성을 가진 질병으로 어린 일령의 자돈에 감염이 쉽게 일어나고 본 병이 감염되면 사료효율과 증체율도 떨어지며 양돈산업에 많은 경제적 손실을 주는 호흡기 질병이다 *Bordetella bronchiseptica*이 주요 병원체이며 *Pasteurella multocida* typeD이 2차적으로 감염시 증상이 심해진다. 감염돈에 의해 일단 전과되면 비강점막에 강하게 부착되어 독소(dermonecrotxin: DNT)를 분비하여 비강점막을 손상시키며 조직을 괴사시키고 비감개의 위축을 가져와 코가 비뚤어지는 증상을 나타낸다. 돈사의 위생, 환기상태불량, 유독가스(암모니아 가스)의 체류 등은 위축성비염 전과를 빠르게 하고 증상을 악화시킨다. 만성경과 돼지는 사료효율과 증체량이 보통 20%씩 떨어진다. 현재 농장에서 사용하고 있는 상용백신은 대부분이 파스튜렐라성 폐렴 및 흉막폐렴의 혼합백신으로 근육주사방법으로 백신을 접종하고 있다. 하지만 이러한 방법으로 백신 투여하면, 전신면역반응 유도에는 효과가 있지만 돼지 위축성비염의 표적기관인 비강 점막 내 특이 면역반응은 유도하지 못한다.

외부 병원체 공격에 대한 일차적인 방어는 광대한 표면적을 갖는 점막세포이다. 중요한 점막 조직으로는 장관(GALT), 비강(NALT) 등의 호흡기관, 비뇨생식관이 있다. 백신투여경로에 있어서 점막 경로(예; 경구투여, 비강투여 등)는 가장 보편적인 경로인 주사경로에 비해 간단하고 저렴한 방법이다. 점막에서의 면역 반응은 점막으로부터 직접 가해지는 복잡한 항원 자극의 영향을 받고 분비성 면역글로블린이 존재한다는 것과 점막을 중심으로 면역세포들의 이동이 일어난다는 점이 전신 면역 반응과 다르다. 그러나 점막면역유도 시 단백질 혹은 펩타이드등의 점막백신의 투여는 거대분자들이 점막장벽을 통과하기 어렵고, 투여된 항원이 빨리 제거되는 등의 한계를 갖고 있다. 따라서 면역반응유도에 있어서 효율적인 점막면역의 단점을 보완하고, 점막면역을 증강시킬 수 있는 면역증강제(adjuvant)를 개발한다는 것은 매우 큰 의미가 있다.

키토산은 게나 가재, 새우 껍데기에 들어 있는 키틴을 탈아세틸화하여 얻어낸 물질을 말한다. 1811년 프랑스의 자연사학자 브라코노가 버섯에 포함되어 있는 미지의 성분, 즉 키틴을 발견한 것이 시초이다. 그 후 1859년 화학자 루게가 키틴을 아세틸화하여 새로운 물질을 얻어냈으며, 1894년에 과학자 후페 자이라가 이를 키토산이라 명명하였다. 특성은 노폐해진 세포를 활성화하여 노화를 억제하고, 생체의 자연적인 치유 능력을 활성화하는 기능과 함께 생체리듬을 조절해주는 것으로 알려져 있다. 이러한 키토산이 면역

증강제로 각광을 받는 이유는 키토산이 신체기능을 원활하게 하는 생리활성물질로서 체 내에 흡수되어 면역체계를 활성화시켜 신체의 면역력을 증강시키기 때문이다. 또한 키토산은 화학적으로 글루코사민이라는 다당체의 물질로 결합돼 있는 구조로 이 분자구조가 우리 인체 조직과 매우 유사한 구조를 이루고 있어 생체 내에서 친화성이 좋고 점막에 대한 접착성이 뛰어나다. 이러한 원인으로 키토산이 점막백신을 위한 면역보조제 혹은 백신전달체로서의 효과가 여러 논문을 통해 밝혀진 바 있다.

이상의 정보를 바탕으로, 본 실험에서는 돼지 위축성 비염 예방을 위해 원인균의 표적기관인 비강 점막 내에서 효과적으로 특이 면역반응을 유도하고자 기존의 주사법이 아닌 비강 내로의 직접 투여를 위해 스프레이법을 사용하였다. 또한 점막면역의 단점을 보완하기 위한 면역증강제로 키토산을 사용하여 비강 내 점막면역의 효율을 높이고자 하였다.

3. 실험방법

가. 항원의 돼지 접종

키토산 미립자에 담지시킨 *B. bronchiseptica* DNT를 PBS를 이용해 4mg이 되도록 희석하였다. 준비된 항원을 모유를 먹이지 않은 3주령 자돈의 비강을 통해 접종하였다. 모유를 먹이지 않은 자돈이므로 초기 모체이항 항체가가 검출되지 않았으며, 음성대조군으로 아무것도 처리하지 않은 실험군을 편성하였다. 돼지는 7수씩 두 그룹으로 배치하였으며, 10일 간격으로 스프레이를 이용하여 비강을 통해 직접 접종하였다 (그림33, 34). 돼지에 무리가 가지 않도록 접종량은 1ml이 넘지 않도록 하였다.

나. 돈사 대기의 미생물 모니터링 검사

실험장소인 (주)엑스피바이오의 안성일축 농장 내 돈사의 대기환경을 모니터링 하여, 호흡기 질병을 일으킬 수 있는 원인균이 있는지 조사하였다. 일반적인 배지인 Blood agar, TSA (tryptic soy agar)에 균을 강제포집 및 자연 낙하 방법으로 포집한 후 배양, 동정하여 대기환경 내 세균의 종류를 알아보았다.

1) 포집방법

가) 강제 포집 : air-sampler를 이용하여 20ℓ/분의 속도로 지상으로부터 1.5m상의 위치에서 강제로 공기를 흡입한 후 준비된 배지에 포집하였다. 20ℓ와 100ℓ의 공기를 포집하기 위하여 1분과 5분 동안 공기를 포집하였다.

나) 자연 낙하 : 준비된 배지를 돈사 중앙에서 배지 면이 위로 향하게 개방한 후 30분



그림 33. 비강을 통한 백신 접종

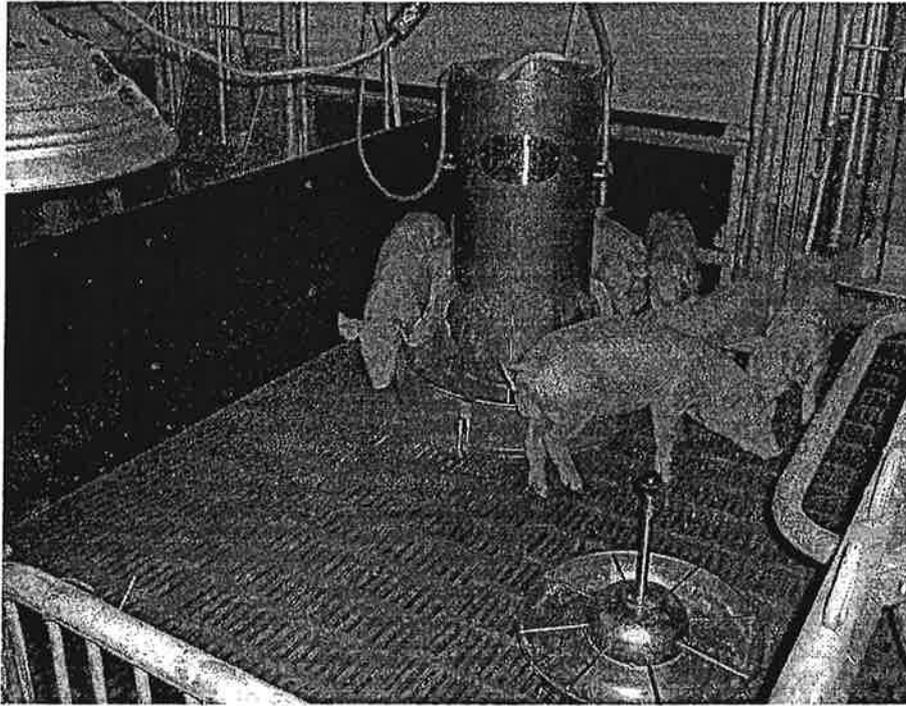


그림 34. 돈사 내부 환경

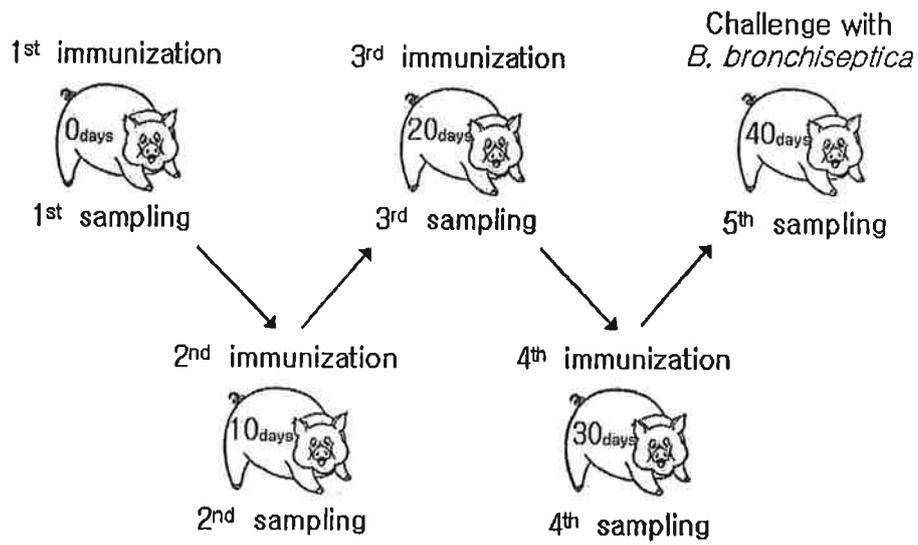


그림 35. 면역화 및 시료채취 스케줄

실험군	투여항원 및 투여량	투여방법	돼지수
1	Chitosan microsphere +BBDNT (3mg)	비강접종	7
2	No treatment	-	7

표 8. 실험군편성표

간 방치하여 낙하하는 세균을 포집하였다.

2) 배양 및 동정

공기를 포집한 배지를 37℃ 배양기에서 24시간동안 배양 한 후 각 배지의 colony수를 세었다. 또한 Blood agar상에서 특징적인 colony를 선별하여 계대배양 후 자동 동정 장치 (Vitek system, automatic Bacterial Identification System)를 이용하여 동정하였다.

다. 항체가 검사를 위한 시료채취

항원의 비강접종으로 유도된 BBDNT 특이 IgA, IgG 항체가 검사를 위해 nasal wash, saliva, serum 시료를 다음의 방법으로 채취하였다.

1) Nasal wash : 항생제를 처리한 PBS 5ml을 돼지 머리를 뒤로 젖힌 상태에서 비강을 통해 집어넣은 후 수 초간 유지했다가 멸균된 스피시멘접을 이용해 채취하였다.

2) Saliva : 멸균된 swab을 돼지 입안에 넣고 수 초간 유지 후 1ml PBS에 잘 풀고, 4℃에서 원심분리하여 상층액을 사용한다.

3) Serum : 주사기를 이용하여 돼지의 경정맥으로부터 채취하고 4℃에서 24시간 보관 후 원심분리하여 상층액을 취한다.

라. BBDNT 특이 항체가 검사

Nasal delivery 방법에 의해서 투여한 vaccine의 면역유도 효과를 검정하기 위하여, 채취된 시료 내 BBDNT 특이 IgA, IgG 항체를 ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assay) 검사법으로 측정하였다. 방법은 다음과 같다.

1) Coating buffer (14.2 mM Na₂CO₃, 34.9 mM NaHCO₃, 3.1 mM NaN₃, pH 9) 100 μ l에 BBDNT 항원이 20ng 되도록 희석한후 ELISA 검사를 위한 microplate 에 분주한 후 4℃에서 overnight 보관한다.

2) microplate 를 PBST buffer 로 세 번 세척 후 PBST 버퍼에 1% BSA (bovine serum albumin)을 첨가하여 microplate 에 분주하고 37℃에서 1시간 처리한다.

3) microplate 를 PBST buffer 로 세 번 세척 후 일차항원으로 채취된 시료인 sera, nasal wash, saliva를 분주하고 37℃에서 1시간 처리한다.

4) microplate 를 PBST buffer 로 세 번 세척 후 이차항원으로 0.1 μ l 의 anti-pig IgG 또는 anti-pig IgA를 분주하고 37℃에서 1시간 처리한다.

5) microplate 를 PBST buffer 로 세 번 세척 후 발색제(peroxidase conjugated, Sigma) 100 μ l 분주, 실온에서 일정시간 방치하고 ELISA reader기를 이용하여 O.D값을 측정한다.

마. 건강상태 검사

공격접종 직전 각 실험군 개체들의 건강상태를 확인하기 위해 혈액샘플을 이용하여 전혈검사(CBC:complete blood count)를 실시하였다.

- 1) 슬라이드 한쪽 끝에서 1~2cm 떨어진 곳에 직경 2mm 정도의 혈액 한 방울을 놓고 미는 슬라이드를 약 25°각도로 세워 다른 쪽 끝에서부터 혈액이 있는 쪽으로 접근시켜 살짝 닿게 한다.
- 2) 혈액이 미는 슬라이드 끝을 따라 80%정도 퍼지면 거침없이 반대방향으로 민다.
- 3) 각도를 조절하여 도말이 반대편 끝에서 1~2cm 되는 곳에서 끝나게 밀어야 한다.
- 4) 공기 중에서 흔들어 말린다.
- 5) 현미경과 CBC기계를 이용해 각 cell을 count 한다.

바. 방어능 평가

마지막 백신 접종 2주 후 *B. bronchiseptica*를 MLD 1.5×10^9 CFU/ml 농도로 돼지 비강 내로 접종하여 방어능을 조사하였다. 백신 접종으로 형성된 항체에 의한 방어능의 차이를 생존률, 병변, 운동성, 사료섭취 등의 항목으로 그룹별로 비교 평가하였다. 관찰 주기는 24시간에 한번씩 1주일동안 관찰하였다.

2. 실험결과

실험장소인 돈사 대기 환경의 미생물 모니터링 결과 동정된 균이 모두 *Staphylococcus* 및 *Streptococcus* 계열이다. *Staphylococcus*는 일반적으로 호염성 균으로서 사람이나 동물에서 발생하며, *Staphylococcus* 속에도 다양한 종이 있다. 또한 *S. aureus*는 인축 병원균으로 종기, 식중독, 비뇨기 감염증 등의 병과 관련되어 있다. *Streptococcus agalactiae*(group B streptococcus)는 사람에서 신생아의 폐렴, 패혈증, 관절염을 일으키며, 면역력이 약한 성인에서는 심각한 감염성 질병인 뇌막염, 수막염 등을 일으킨다. 이상의 균들은 돼지 위축성비염의 원인균이 아니며, 실험을 위한 돈사 내 대기환경에서 실험에 영향을 미칠만한 미생물이 없음을 알 수 있었다. (표 10)

키토산 미립자에 담지시킨 BBDNT에 의해 유도된 비강 내 BBDNT 특이 IgA를 ELISA 방법을 통해 측정하였다. 백신처리군에서 3번째 백신접종이후 항체가가 꾸준히 증가하였으며, 마지막 시료 채취 시점인 40일의 항체가 증가량은 아무것도 처리하지 않은 음성대조군과 비교하여 5배 이상의 차이를 보였다. (그림 37)

키토산 미립자에 담지시킨 BBDNT에 의해 유도된 혈청 내 BBDNT 특이 IgG를 ELISA 방법을 통해 측정하였다. 첫 번째 백신 접종이후 점차적으로 항체가가 증가하여



그림 36. 비강 내로의 *B. bronchiseptica* 접종

평가기준	점수환산	비고
생존률	사망개체 당 -1점	관찰 주기 이후 사망한 개체 수를 세어 사망개체 당 점수를 -1점씩 감한다.
병변	병변개체 당 -1점	수양성 콧물, 코의 점액성 농, 눈의 충혈, 눈물, 눈가에 부착된 먼지로 인한 검은 반점, 코의 출혈, 재채기, 피부의 홍반 또는 흑반 등의 병변을 관찰하여 병변을 나타내는 개체 당 점수를 -1점씩 감한다.
운동성	운동장애 개체 당 -1점	정상적으로 움직이지 못하며, 다리를 절거나 끌면서 걷고 운동기피를 보이는 개체가 있을 시 개체 당 점수를 -1점씩 감한다.
사료섭취	섭취효율 감소 개체 당 -1점	사료제공 시 사료를 섭취하지 않는 개체 당 점수를 -1점씩 감한다.

표 9. 방어능 평가 기준 및 점수 환산법

돈사	포집 방법	균수(CFU)		균 동정 결과	비고	
		Blood	TSA			
돈사 (백신실험 장소)	돈방	강제포집	20 ℓ	18	8	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> (G-B)
			100 ℓ	31	46	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> (G-B) Unknown β-hemolytic organism
		자연낙하	30분	19	11	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> (G-B)
	복도	미 실시	-	-	미 실시	
실외	돈사 앞	강제포집	20 ℓ	0	5	-
			100 ℓ	14	4	<i>Staphylococcus aureus</i> Unknown β-hemolytic organism
		자연낙하	30분	-	-	미 실시

표10. 돈사 내 미생물 모니터링 검사 결과

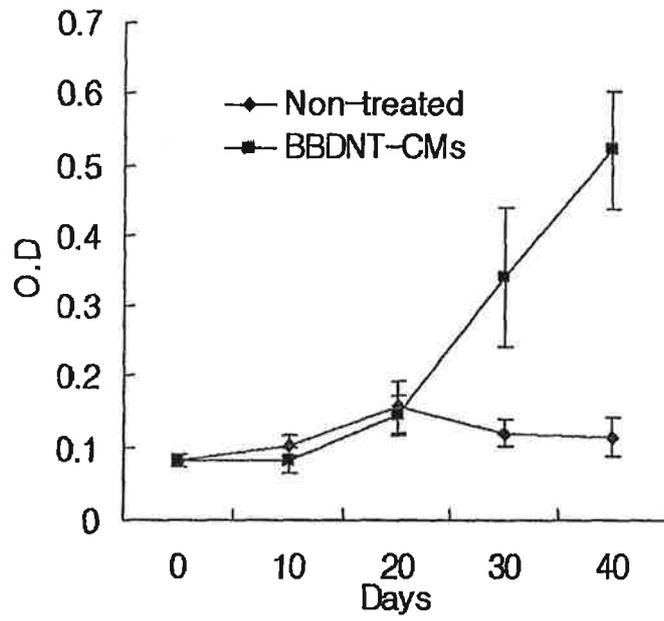


그림 37. 비강세척액 내의 BBDNT 특이 IgA

마지막으로 채취한 혈청 항체가 음성대조군에 비하여 3배 정도의 IgG가 형성되었음을 알 수 있었으며, 양상은 비강 세척액내의 IgA 생성패턴과 비슷하였다. (그림 38)

키토산 미립자에 담지시킨 BBDNT에 의해 유도된 구강 내 BBDNT 특이 IgA를 ELISA 방법을 통해 측정하였다. 백신처리군에서 3번째 백신접종이후 항체가 증가하였으나, 증가량은 아무것도 처리하지 않은 음성대조군과 비교하여 약 3배 정도로 비강 내에서 유도된 IgA에 비하여 양적으로 적은 것으로 보인다. 또한 침 내의 특이 항체가 생성 시 백신접종군 각 개체간의 항체가 편차가 큰 것으로 나타났다. (그림 39)

공격접종 직전 각 실험군 개체들의 건강상태를 확인하고자 혈액샘플을 이용해 differential count를 실시하였다. 결과는 표 4과 같다. 백신처리군의 3번 돼지가 약간의 빈혈을 보였으나 다른 돼지들의 건강상태는 양호한 것으로 보인다. (표 11)

면역화 10일 후 돼지 비강 내로 *B. bronchiseptica*를 접종한 이후 다음의 항목별로 방어능을 비교하였다. 표 4에서 보는 바와 같이 두 실험군 모두 생존률은 100%를 나타내었다. 하지만 아무것도 처리하지 않은 음성대조군에서 공격접종 2일 이후부터 안면 피부의 흑변, 침흘림, 눈물, 눈가에 부착된 먼지로 인한 검은 반점 등의 병변을 관찰할 수 있었다. 백신처리군에서는 공격접종 3일 이후 한 마리 개체에서 침흘림을 나타내었다. 비운동성 항목을 보면 공격접종 초기부터 음성대조군에서 두 마리가 정상적으로 움직이지 못하며, 다리를 절거나 끝면서 걷는 등 운동장애를 나타내었다. 반면 백신처리군은 공격접종 4일 이후 한 마리 개체에서 침흘림을 보이며 운동기피현상을 관찰할 수 있었다. 사료섭취 항목을 보면 공격접종 이후 사료제공 시 백신처리군의 개체들은 활발히 사료를 섭취하는 모습을 볼 수 있었으며, 특히 백신처리군 중 운동기피현상을 나타내던 개체도 사료를 제공하자 의욕적으로 사료를 섭취하려는 움직임을 나타내었다. 반면 음성대조군 개체들은 운동장애를 나타내며 사료를 섭취하려 하지 않았으며, 운동장애를 보이지 않는 한 마리만 활발히 사료를 섭취했다.

공격접종 직전과 공격접종 5일 이후 각 그룹별로 돼지를 해부하여 비강에서 병리 해부학적인 병변을 비교하였다. 백신접종군에서는 정상적인 모습을 보였으나 음성대조군에서 비강 위축의 초기와 비슷한 모양을 관찰할 수 있었다 (그림 40).

이상의 결과로 보아 키토산미립자에 담지한 BBDNT를 돼지 비강 내로 투여하였을 때, 비강 점막 내에서 BBD 특이 IgA가 효과적으로 유도된다는 것이 확인되었다. 또한 혈청 내에서 유도된 IgG 검사에서도 음성대조군에 비하여 효과적으로 BBD 특이 IgG가 유도됨을 관찰할 수 있었다. 공격접종에 따른 방어능력 비교에서도 BBDNT 백신접종은 공격접종 이후에도 정상적으로 활발한 활동을 보였으며, 반면 아무것도 처리하지 않은 음성대조군은 운동실조현상을 나타내며 방어능력이 현저히 떨어짐을 알 수 있었다. 이

는 키토산 미립자에 담지시킨 BBDNT가 돼지 위축성 비염의 표적 기관인 비강 내에서 효과적으로 면역반응을 유도할 수 있을 뿐만 아니라 전신면역 유도에도 효과가 있음을 추측하게 해준다. 또한 키토산이 돼지 호흡기 질병의 백신 전달시스템에서 면역 보조제로써 효과적인 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

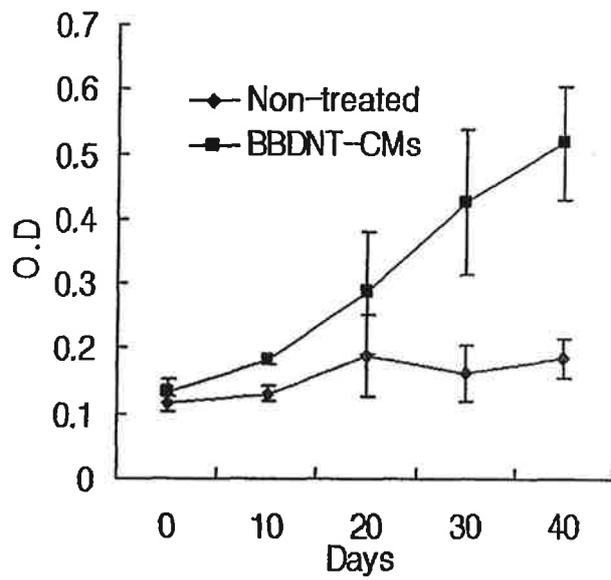


그림 38. 혈청 내의 BBDNT 특이 IgG

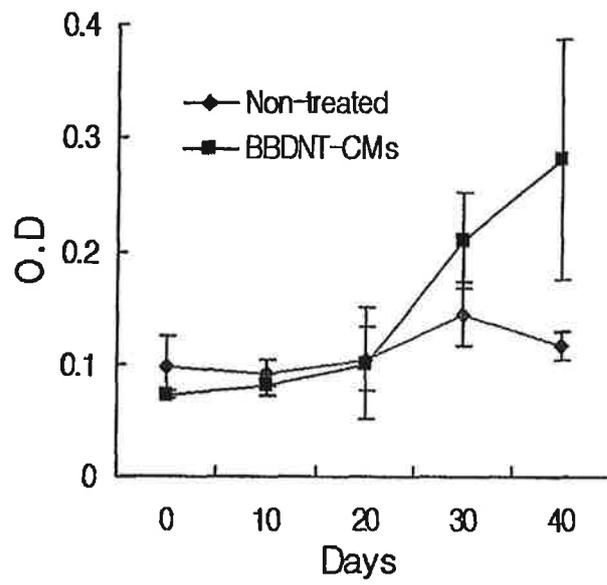


그림 39. 침 내의 BBDNT 특이 IgA

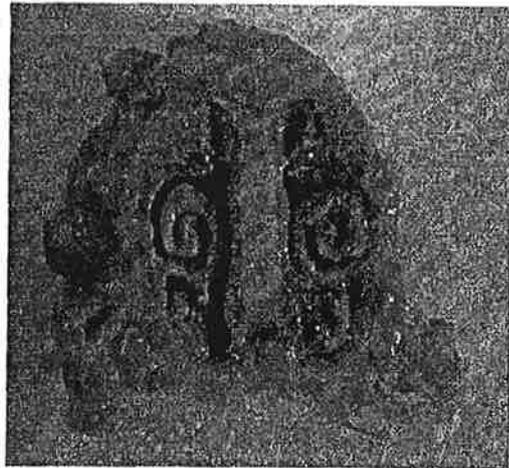
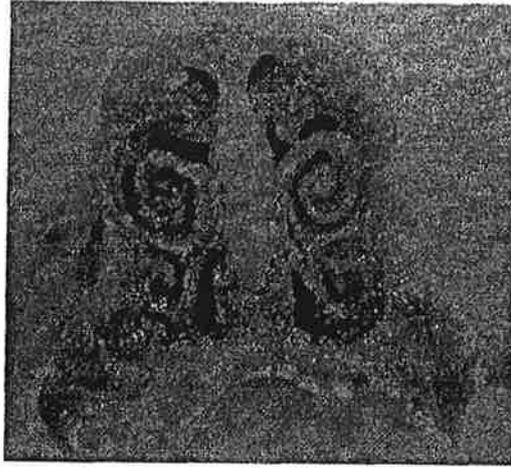
	No.	RBC($\times 10^6$)	WBC($\times 10^6$)	PCV(%))	HGB	MCV	mono.	Lympho.	Seg. Netrophil.	Stab. Netrophil.	Eosinophil
음 성 대 조 균	1	6.4	31.1	28.9	11.4	45	7	24	37	32	
	2	6.23	21.1	30.3	12.5	48	8	39	38	12	3
	3	6.55	16.7	30.5	12.1	46	2	54	31	13	
	4	6.25	5.6	27.9	11.2	44	2	76	9	13	
	5	6.27	17.9	30.5	12	48	5	47	34	14	
	6	6.42	15.6	31.8	12.4	49	1	45	44	10	
	7	6.77	18.1	33.1	12.7	48	0	35	61	4	
백 신 처 리 균	1	7.48	17.5	35.3	12.9	47	4	54	35	7	
	2	5.46	8.3	26.3	9.7	48	12	50	29	9	
	3	4.3	10.4	19.5	7.3	45	8	55	16	20	1
	4	미 실시					18	54	27	1	
	5	5.45	7.2	25.8	9.2	47	14	51	31	3	1
	6	7.09	29.1	35.1	12.5	49	12	39	38	10	1
	7	6.68	14.5	33.5	11.8	50	6	42	39	13	

(RBC: red blood cell, WBC: white blood cell, PCV(%): packed cell volume, MCV: mean cell volume, mono.: monocytoenes, lympho.: lymphocytes, seg. neutrophil.: segmented neutrophil, stab. neutrophil: stabilized neutrophil)

표 11. CBC (Complete Blood Count) Data

군 항목	음성대조군					백신처리군				
	24h	48h	72h	96h	120h	24h	48h	72h	96h	120h
사망	0/3 (-0)									
병변	0/3 (-0)	2/3 (-2)	2/3 (-2)	2/3 (-2)	2/3 (-2)	0/3 (-0)	0/3 (-0)	1/3 (-1)	1/3 (-1)	1/3 (-1)
비운동성	2/3 (-2)	2/3 (-2)	2/3 (-2)	2/3 (-2)	2/3 (-2)	0/3 (-0)	0/3 (-0)	0/3 (-0)	1/3 (-1)	1/3 (-1)
비사료섭취	1/3 (-1)	2/3 (-2)	2/3 (-2)	2/3 (-2)	2/3 (-2)	0/3 (-0)	0/3 (-0)	0/3 (-0)	0/3 (-0)	0/3 (-0)
시간별합계	-3	-6	-6	-6	-6	-0	-0	-1	-2	-2
총합계	-27					-5				

표 12. 방어능 비교



공격접종 이후 백신접종군- 비강 1

공격접종 이후 백신접종군- 비강 2



공격접종 이후 음성대조군- 비강 1

공격접종 이후 음성대조군-비강 2

그림 40. 공격접종 후 각 그룹별 병리 해부학적 비교 - 비강

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 제1세부과제

연구목표	평가의 착안점	목표달성도 및 관련분야에의 기여도
<p>키토산미립자제조, 확인 및 담지된 백신의 방출</p>	<p>키토산미립자를 제조하고 제조된 미립자의 특성조사 가. SS나 TPP를 이용하여 미립자제조 나. 미립자 형태관찰 다. 미립자 크기측정 라. 백신을 담지하여in vitro 방출조건확립</p>	<p>1. 키토산미립자를 제조하고 제조된 미립자의 특성조사와 in vitro에서의 방출조건확립완료 (100%) 2. 농업분야에 첨단분야인 NT도입성공 3. 관련기업체 탐색중</p>
<p>키토산에 PEG 및 mannose를 결합한 후 미립자를 제조하고 담지된 백신의 방출</p>	<p>1. Pegylated 키토산미립자를 제조하고 제조된 미립자의 특성조사 가. 키토산의 pegylation 및 확인 나. pegylated 키토산미립자 제조 다. 미립자 형태관찰 라. 미립자 크기측정 마. 미립자 안정성조사 바. 백신을 담지하여in vitro 방출조건확립 2. 키토산에 만노스를 도입하고 확인 및 미립자 제조 가. 키토산에 만노스를 도입하고 확인 나. 만노스화키토산의 미립자제조</p>	<p>1. 키토산미립자의 물리적 안정성이 증가되었고 방출속도도 조정되었다. (100%) 2. 면역세포로의 특이성을 높은 만노스화 키토산미립자가 제조되었다. (100%)</p>
<p>F127존재하에서 키토산미립자를제조하고 담지된 백신의 방출</p>	<p>F127존재하에서 키토산미립자를 제조하고 제조된 미립자의 특성조사 가. F127존재하에서 키토산미립자제조 나. 미립자의 형태관찰 다. 미립자의 크기측정 라. 백신을 담지하여in vitro 방출조건확립</p>	<p>최적의 키토산미립자 제조조건을 확립 (100%)</p>

제2절 제2세부과제

연구목표	평가의 착안점	목표달성도 및 관련분야에의 기여도
돼지 위축성비염병원성인자분석항원준비 및 in vitro에서의 면역활성확인	<p>1. 돼지 위축성비염원인체의 분리 가. 원인체의 분리 나. PCR 기법에 의한 유전자 확인 다. SDS-PAGE에 의한 단백질 확인</p> <p>2. 준비된 BBD항원을 키토산미립자에 담지후, in vitro에서의 면역활성측정 가. TNF-α 측정 나. IFN-γ 측정 다. NO 측정</p>	<p>1. 돼지 위축성비염원인체의 분리에 성공 (100%)</p> <p>2. 제조된 키토산미립자에 BBD항원을 담지후에 in vitro에서의 면역세포에서 면역활성을 측정결과 시판되는 대조군보다 훨씬 효과적 (100%)</p>
실험동물 쥐에서의 면역활성확인	<p>실험동물 쥐의 비강내로 BBD가 담지된 키토산미립자, F127존재하에서 만든 키토산미립자, 만노스화미립자에 대한 면역활성측정 가. 비강내의 IgA 측정 나. 혈액에서의 IgA 측정 다. 침에서의 IgA 측정</p>	<p>1. 비강내에서 IgA 항체가 가장 높았는데 키토산의 점막점착성의 효과에 성공. (100%)</p> <p>2. F127 존재하에서 만든 키토산미립자가 IgA 항체가 가장 높은 것은 F127의 면역보조제역활이 크다.</p>
목적동물 돼지에서의 면역활성확인	<p>목적동물인 돼지의 비강을 통해 접종후에 면역활성측정 가. 비강내의 IgA 측정 나. 비강내의 IgG 측정 다. 혈청내의 IgA 측정 라. 침에서의 IgA 측정</p>	<p>1. 비강내에서 10일후에 IgA 항체가 꾸준히 음성대조군에 비하여 증가되었다.</p> <p>2. 40일이후에 IgA 항체는 5배정도의 증가를 보였다. (100%)</p>

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제1절 연구종료 2년후 예상연구성과

구분	건수	비고
학술지논문거제	3	
산업재산권등록	2	
기타	-	

제2절 연구종료 2년후 예상연구성과

1. 점막점착성이 있는 키토산미립자에 BBD 항원을 담지시켜 in vitro, 실험동물 및 목적동물에 대한 면역활성을 측정한 결과 면역확성이 대조군에 비하여 우수한 결과를 얻었기에 국내양돈농가의 돼지 위축성비염예방에 크기 기여하리라 생각된다.
2. 국내에서는 그동안 대부분의 백신이 aluminum hydroxide나 oil만을 보조제로 하여 주사투여했으나 비효율적이었으나 이번에 개발한 키토산미립자는 spray방법으로 투여하면 경제적이고 효율적인 투여방법이 될것이다.
3. 돼지의 위축성비염예방뿐만 아니라 소나 조류의 항원전달체로서도 활용가능하리라 믿는다.
4. 그동안의 기초연구를 바탕으로 관련기업체와 접촉후 산업화를 추진할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제1절 키토산미립자의 점막점착성의 응용

1. 오스트리아의 Bernkop-Schnurch 교수팀은 키토산에 티올기를 도입함으로써 점막점착성이 증가하기 때문에 단백질의 장에서의 흡수가 촉진된다고 보고하였다. (J. Controlled Rel., 2003)
2. 네덜란드의 Junginger 교수팀은 키토산 나노입자에 항원을 담지시킨 후에 알긴산으로 코팅함으로써 장에서의 방출속도를 조절할 수 있다고 보고하였다. (I. J. Pharm., 2005)

제2절 효율적인 항원전달에 관한 정보

Rxkinetix 회사의 Coeshott 박사팀은 키토산과 F127을 혼합하여 항원을 담지하면 각각 단독보다 면역유도능력이 뛰어나다고 보고하였다. (Vaccine, 2004)

제3절 DNA 항원전달에 관한 정보

MIT의 Langer 교수팀은 항원의 단백질을 전달하는 대신 DNA 항원을 고분자 미립자에 생분해성이면서 엔도솜에서 프로톤스폰지 역할을 하는 폴리베타아미노에스터와 혼합하여 넣으면 세포의 핵안에 잘 침투하기 때문에 새로운 DNA 항원전달체로서의 가능성을 제시하였다. (I. J. Pharm., 2005)

제 7 장 참 고 문 헌

- 1). J. Kohn, S.M. Niemi, E.C. Albert, J.C. Murphy, R. Langer, J.F. Fox, Single-step immunization using a controlled release, biodegradable polymer with sustained adjuvant activity, J. Immunol. Metho. 95 (1986) 31-38.
- 2). J.H. Eldridge, J.K. Staas, J.A. Meulbroek, J.R. McGhee, T.R. Tice, R.M. Gilley, Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system, Molecular. Immunol. 28 (1991) 287-294.
- 3). J.H. Eldridge, J.K. Staas, J.A. Meulbroek, T.R. Tice, R.M. Gilley, Biodegradable and biocompatible poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies, Infec. Immun. 59 (1991) 2978-2986.
- 4). F.L. Mi, S.S. Shyu, C.T. Chen, J.Y. Schoung, Porous chitosan microsphere for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microsphere and *in vitro* release, Biomaterials 20 (1999) 1603-1612.
- 5). M. Igartua, R.M. Hernandez, A. Esquisabel, A.R. Gascon, M.B. Calvo, J.L. Pedraz, Enhanced immune response after subcutaneous and oral immunization with biodegradable PLGA microspheres, J. Control. Rel. 56 (1998) 63-73.
- 6). C.J. Miller, M. McChesney, P.F. Moore, Langerhans cells, macrophages and lymphocyte subsets in the cervix and vagina of rhesus macaques, Lab. Invest. 67 (1992) 628-634.
- 7). J. Mestecky, The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions, J. Clin. Immunol. 7 (1987) 265-276.
- 8). C. Czerkinsky, F. Anjuere, J.R. McGhee, A. George-Chandy, J. Holmgren, M.P.

- Kieny, Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development, *Immunol. Rev.* 170 (1999) 197-222.
- 9). J. Holmgren, C. Czerkinsky, N. Lycke, A.M. Svennerholm, Mucosal immunity: implications for vaccine development, *Immunobio.* 184 (1992) 157-179.
 - 10). M.D. Donovan, G.L. Flynn, G.L. Amidon, Absorption of polyethylene glycols 600 through 2000: the molecular weight dependence of gastrointestinal and nasal absorption, *Pharm. Res.* 7 (1990) 863-868.
 - 11). N.G. Schipper, J.C. Verhoef, F.W. Merkus, The nasal mucociliary clearance: relevance to nasal drug delivery, *Pharm. Res.* 8 (1991) 807-814.
 - 12). M.A. Sarkar, Drug metabolism in the nasal mucosa, *Pharm. Res.* 9 (1992) 1-9.
 - 13). O.S. Lee, B.J. Ha, S.N. Park, Y.S. Lee, Studies on the pH-dependent swelling properties and morphologies of chitosan/calcium-alginate complexed beads, *Macromol. Chem. Phys.* 198 (1997) 2971-2976.
 - 14). M.N.V. Ravi Kumar, A review of chitin and chitosan applications, *React. Funct. Polym.* 46 (2001) 1-27.
 - 15). P. Artursson, T. Lindmark, S.S. Davis, L. Illum, Effect of chitosan on permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2), *Pharm. Res.* 11 (1994) 1358-1361.
 - 16). K. Suzuki, Y. Ogawa, K. Hashimoto, S. Suzuki, M. Suzuki, Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis, *Microbiol. Immunol.* 28 (1984) 903-904.
 - 17). P. He, S.S. Davis, L. Illum, In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres, *Int. J. Pharm.* 166 (1998) 75-88.
 - 18). L. Illum, I. Jabbal-Gill, M. Hinchcliffe, A.N. Fisher, S.S. Davis, Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 51 (2001) 81-96.
 - 19). O. Tatsuhiro, N. Hidetoshi, O. Yuichi, Aggregation phenomenon of PEG-grafted chitosan in aqueous solution, *Polymer* 39 (1998) 5171-5175.

- 20). C. Thomas, L. M. Daniel, H.R.R. Gundu, Chitosan/polyethylene glycol-alginate microcapsules for oral delivery of hirudin, *J. Appl. Poly. Sci.* 70 (1998) 2143-2153.
- 21). S. Aiba, Reactivity of partially N-acetylated chitosan in aqueous media, *Macromolecular Chem.* 194 (1993) 65-75.
- 22). Czerkinsky C., Anjuere F., McGhee J. R., George-Chandy A., Holmgren J., Kiney M. P., Fujiyashi K., Mestecky J. F., Pierrefite-Carle V., Rask C., Sun J. B., Mucosal immunity and tolerance ; relevance to vaccine development, *Immunol. Rev.* 170 (1999) 197-222.
- 23). H. Saito, X. Wu, J.M. Harriis, A.S. Hoffman, Graft copolymers of poly(ethylene glycol) (PEG) and chitosan, *Macro. Rapid Comm.* 18 (1997) 547-550.
- 24). R. Gref, Y. Minamitake, M.T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer, Biodegradable long-circulating nanospheres, *Science* 263 (1994) 1600-1603.
- 25). D. Bazile, C. Prud'homme, M.T. Bassoullet, M. Marlard, G. Spenlehauer, M. Veillard, Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocyte system, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 493-498.
- 26). D.K. Han, S.V. Jeong, Y.H. Kim, *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomat.* 23 (1989).
- 27). R. Tu, C.L. Lu, K. Thyagarajan, E. Wang, H. Nguyen, S. Shen, C. Hata, and R.C. Quijano, *J. Biomed. Res.* 27 (1993).
- 28). V. Ana, S. Alejandro, P. Celso, J.A. Maria, PLA-PEG Nanospheres: New carriers for transmucosal delivery of proteins and plasmid DNA, *Polym. Adv. Thchnol.* 13 (2002) 851-858.
- 29). Y.M. Xu, Y. Du. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 250 (2003) 215-226.
- 30). H. Hasebe, Occurrence and epizootiological surveys of infectious atrophic rhinitis in swine, *Nippon Vet Zootech Col Bull.* 19 (1971) 92-102.

- 31). N.R. Shin, I.S. Choi, J.M. Kim, W. Hur and H.S. Yoo, Effective methods for the production of immunoglobulin Y using immunogens of *Brodetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*, J. Vet. Sci. 3 (2002) 47-57.
- 32). L.H.H. Olde Damink, P.J. Dijkstra, M.J.A. van Luyn, P.B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide, Biomaterials, 17 (1996) 765-773.
- 33). P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fukimoto, N.M. Geoke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, Anal. Biochem. 150 (1985) 76-85.
- 34). L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids, Anal. Biochem. 126 (1992) 131-138.
- 35). T.W. Chung, J. Yang, T. Akaike, K.Y. Cho, J.W. Nah, S.I. Kim, C.S. Cho, Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment, Biomaterials 23 (2002) 2827-2834.
- 36). J.H. Eldridge, C.J. Hammond, J.A. Meulbrock, J.K. Staas, R.M. Gilley, T.R. Rice, Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the peyer's patches, J. Control. Rel. 11 (1990) 205-214.
- 37). P. Lydyard, C. Grossi, The lymphoid system, Immunology 5 (1998) 31-42.
- 38). A. Lamprecht, N. Ubrich, M.H. Perez, C.M. Lehr, M. Hoffman, P. Maincent, Influence of process parameters on nanoparticles preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique, Int. J. Pharm. 196 (2000) 177-182.
- 39). Y.M. Xu, Y.M. Du, R.H. Huang, L.P. Gao Preparation and modification of N-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride nanoparticle as a protein carrier, Biomaterials 24 (2003) 5015-5022.

- 40). P. Bouillot, N. Ubrich, F. Sommer, T.M.Duc, J.P. Loef.er, E.Dellacherie, Protein encapsulation in biodegradable amphiphilic microspheres, *Int. J. Pharm.* 181 (1999) 159-172.
- 41). A.G. Richard, J.K. Thomas, A.O. Barbara, K. Janis, *Immunology* (5th edition) (2002) pp: 40-41.
- 42). H.J. Jeong, H.N. Koo, E.Y. Oh, H.J. Chae, H.R. Kim, S.B. Suh, C.H. Kim, K.H. Cho, B.R. Park, S.T. Park, Nitric oxide production by high molecular weight water-soluble chitosan via nuclear factor- κ B activation, *Int. J. immunopharm.* 22 (2000) 923-933.
- 43) J.M. Rutter,, L.M.A. Francis, B.F. Sansom, Virulence of *Bordetella bronchiseptica* from pigs with or without atrophic rhinitis, *J. Med. Microbiol.* 15 (1982) 105-116.
- 44). W.J. Robert, D.C.T. Hamilton, C.M. Hayes, D. Patel, P.H. Jones, J.M. Roe, N.A. Williams, Modulation of the humoral immune response of swine and mice mediated by toxigenic *Pasteurella multocida*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 39 (2003) 51-59.
- 45). Rutter, J. M, and Mackenzie A., Pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs: a new perspective, *Vet. Rec.* 114 (1984) 89-90.
- 46). J. Holmgren, C. Czerkinsky, N. Lycke, A.M. Svennerholm, Mucosal immunity: implications for vaccine development, *Immunology* 184 (1992) 157-179.
- 47). M.D. Donovan, G.L. Flynn, G.L. Amidon, Absorption of polyethylene glycols 600 through 2000: the molecular weight dependence of gastrointestinal and nasal absorption, *Pharm Res.* 7 (1990) 863-868.
- 48). N.G. Schipper, J.C. Verhoef, F.W. Merkus, The nasal mucociliary clearance : relevance to nasal drug delivery, *Pharm. Res.* 8 (1991) 807-814.
- 49). P. Artursson, T. Lindmark, S. Davis, LS. Illum, Effect of chitosan on permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2), *Pharm. Res.* 11 (1994) 1358-1361.

- 50). L. Illum, N.F. Farraj, S.S.Davis, Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs, *Pharm. Res.* 11 (1994) 1186-1189.
- 51). I. Jabbal-Gill, A.N. Fisher, R. Rappuoli, S.S.Davis, L. Illum, Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin and recombinant pertussis toxin after nasal administration with chitosan in mice, *Vaccine.* 20 (1998) 2039-2046.
- 52). M.A. Westerink, S.L.Smithson, N. Srivastava, J. Blonder, C. Coeshott, G.J. Rosenthal, ProJuvant (Pluronic F127/chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxoid, *Vaccine.* 20 (2001) 711-723.
- 53). C.B. Baudner, M.M. Giuliani, J. Coos Verhoef, R. Rappuoli, H.E. Junginger, G.D. Giudice, The concomitant use of the LTK63 Mucosal adjuvant and of chitosan-based delivery system enhances the immunogenicity and efficacy of intranasally administered vaccines, *Vaccine* 21 (2003) 3837-3844.
- 54). T.J. Aspden, J.D. Mason, N.S. Jones, J. Lowe, O. Skaugrud, L. Illum, Chitosan as a nasal delivery system: the effect of chitosan solutions on in vitro and in vivo mucocilliary transport rates in human turbinates and volunteers, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 509-513.
- 55). A. Hensel, L.A. Van Leengoed, M. Szostak, H. Windt, H. Weissenbock, N. Stockhofe-Zurwieden, A. Katinger, M. Stadler, M. Ganter, S. Bunka, R. Pabst, W. Lubitz, Induction of protective immunity by aerosol or oral application of candidate vaccines in a dose-controlled pig aerosol infection model, *J. Biotechnol.* 44 (1996) 171-181.
- 56). G. Dietrich, M. Griot-Wenk, I.C. Metcalfe, A.B. Lang J.F. Viret, Experience with registered mucosal vaccines, *Vaccine* 21 (2003) 678-683.
- 57). M.W. Russell, M.H. Martin, H.Y. Wu, S.K. Hollingshead, Z. Moldoveanu, J. Mestecky, Strategies of immunization against mucosal infection, *Vaccine.* 19 (2000) S122-S127.
- 58). P.N. Boyaka, A. Tafaro, R. Fischer, K. Fujihashi, E. Jirillo, J.R. McGhee,

Effective mucosal immunity to anthrax: neutralizing antibodies and Th cell responses following nasal immunization with protective antigen. *J. Immunol.* 170 (2003) 5636-5643.

- 59). L. BenMohamed, Y. Belkaid, E. Loing, K. Brahimi, H. Gras-Masse, P. Druilhe, Systemic immune responses induced by mucosal administration of lipopeptides without adjuvant, *Eur. J. Immunol.* 32 (2002) 2274-2281.
- 60). Y. Cong, T. Weaver, C.O. Elson, The mucosal adjuvanticity of cholera toxin involves enhancement of costimulatory activity by selective up-regulation of B7.2 expression, *J. Immunol.* 159 (1997) 5301-5308.
- 61). M. Gagliardi, F. Sallusto, M. Marinaro, S. Vendetti, A. Riccomi, M.D.M. Magistis, Effects of the adjuvant cholera toxin on dendritic cells: stimulatory and inhibitory signals that result in the amplification of immune responses, *Int. J. Med. Microbiol.* 291 (2002) 571-575.
- 62). F. Ellouz, A. Adam, R. Ciobaru, E. Lederer, Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59 (1974) 1317-1325.
- 63). A. Fukushima, Y.C. Yoo, K. Yoshimatsu, K. Matsuzawa, M. Tamura, S. Tono-oka, K. Taniguchi, S. Urasawa, J. Arikawa, I. Azuma, Effect of MDP-Lys(L18) as a mucosal immunoadjuvant on protection of mucosal infections by Sendai virus and rotavirus, *Vaccine* 14 (1996) 485-491.
- 64). J. Holmgren, C. Czerkinsky, K. Eriksson, A. Mharandi, Mucosal immunization and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges, *Vaccine* 21 (2003) S89-S95.
- 65). A. Podda, G. Del Giudice, MF59-adjuvanted vaccine: increased immunogenicity with an optimal safety profile. *Expert Rev., Vaccine* 2 (2003) 197-203.
- 66). P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines, *Pharm. Res.* 14 (1997) 1431-1436.

- 67). J. Kohn, S.M. Niemi, E.C. Albert, J.C. Murphy, R. Langer, J.F. Fox, Single-step immunization using a controlled release, biodegradable polymer with sustained adjuvant activity, *J. Immunol. Methods* 95 (1986) 31-38.
- 68). J.H. Eldridge, J.K. Staas, J.A. Meulbroek, T.R. Tice, B.M. Gilley, Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Molecular Immunol.* 28 (1991) 287-294.
- 69). J.H. Eldridge, J.K. Staas, J.M. Meulbroek, T.R. Tice, R.M. Gilley, Biodegradable and biocompatible poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies, *Infect. Immun.* 59 (1991) 2978-2986.
- 70). P. Lydyard, C. Grossi, The lymphoid system, *Immunology* 5 (1998) 31-42.
- 71). J.R. McGhee, J. Mestecky, M.T. Dertzbaugh, J.H. Eldridge, M. Hirasawa, H. Kiyono, The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development, *Vaccine* 10 (1992) 75-88.
- 72). H.Y. Wu., E.B. Nikolova, K.W. Beagley, M.W. Russell, Induction of antibody-secreting cells and T-helper and memory cells in murine nasal lymphoid tissue, *Immunology* 88 (1996) 493-500.
- 73). H. Asanuma, K. Hirokawa, M. Uchiyama, Y. Suzuki, C. Aizawa, T. Kurata, T. Sata, S. Tamura, Immune responses and protection in different strains of aged mice immunized intranasally with an adjuvant-combined influenza vaccine, *Vaccine* 19 (2001) 3981-3989.
- 74). Y. Hou, T. Hirano, X.X. Gu, A new intra-NALT route elicits mucosal and systemic immunity against *Moraxella catarrhalis* in a mouse challenge model, *Vaccine* 20 (2002) 2375-2381.
- 75). J.A. Ellis, G.S. Krakowka, A.D. Dayton, C. Konoby, Comparative efficacy of an injectable vaccine and an intranasal vaccine in stimulating *Bordetella bronchiseptica*-reactive antibody responses in seropositive dogs, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220 (2002) 43-48.

- 76). M.F. de Jong, Prevention of atrophic rhinitis in piglets by means of intranasal administration of a live non-AR-pathogenic *Bordetella bronchiseptica* vaccine, Vet. Q. 9 (1987) 123-133.
- 77). R.F. Bey, F.J. Shade, R.A. Goodnow, R.C. Johnson, Intranasal vaccination of dogs with liver avirulent *Bordetella bronchiseptica*: correlation of serum agglutination titer and the formation of secretory IgA with protection against experimentally induced infectious tracheobronchitis, Am. J. Vet. Res. 42 (1981) 1130-1132.
- 78). S.L. Brockmeier, K.B. Register, T. Magyar, A.J. Lax, G.D. Pullinger, A.K. Robert, Role of dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* in the pathogenesis of respiratory disease in swine, Infect. Immun. 70 (2002) 481-490.