

발간등록번호
11-1543000-001247-01

**돼지에서 위축성 비염과 흉막 폐렴 예방용
생균 백신 개발을 통한 고부가치화**

(Development of live vaccine for protection
against progressive atrophic rhinitis and
pleuropneumonia in pigs)

전북대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “돼지에서 주요 세균성 호흡기 질병 예방을 위한 delivery system을 이용한 생균 백신 개발을 통한 고부가치화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2016년 02월 15일

주관연구기관명 : 전북대학교

주관연구책임자 : 허 진

1세부연구책임자 : 허 진

2세부연구책임자 : 이준화

협동연구기관명 : (주)코미팜

협동연구책임자 : 정호경

요 약 문

I. 제 목

돼지에서 주요 세균성 호흡기 질병 예방을 위한 delivery system을 이용한 생균 백신 개발을 통한 고부가치화.

II. 연구개발의 목적

돼지에서 호흡기 질병에 의한 양돈가에서 경제적인 손실은 막대하다. 다양한 분야에서 최첨단 유전공학 기법에 기초한 점막면역 활성 delivery system을 이용한 다가 백신 개발에 관한 연구가 활발히 수행되고 있다. 본 연구의 목표는 국내에서 분리한 균주를 대상으로 최신 기법에 기초한 생균 delivery system을 이용하여 돼지에서 호흡기 질병 예방 백신을 개발하는 것이다. 또한 이들 생균 백신을 실험동물인 마우스 및 목적동물인 돼지에서 호흡기 백신의 효능과 안전성 그리고 백신의 부작용에 관한 연구를 수행하여 현장에서 적용할 수 있는 최첨단 백신을 개발하고자 한다.

산업 동물에 있어서 육성시기에 증체율 감소의 중요한 원인 중 하나가 바로 호흡기 질환이다. 이처럼 양돈 산업에 심각한 경제적 손실을 초래하는 세균성 호흡기 질환을 예방하기 위하여 전 세계적으로 효과적인 예방백신을 개발하고자 많은 심혈을 기울이고 있다. 호흡기 점막은 대다수의 호흡기 질환 유발 병원균과 처음으로 접하는 장소임과 동시에 이들 세균의 감염을 방어하는 최전방으로서 매우 중요한 곳이다. 하지만 기존 상용화 백신의 대부분은 주로 호흡기 질환 세균을 포르말린 등으로 불활화 시킨 사균백신을 오일이나 겔 등과 같이 적합한 면역증강제와 혼합한 형태이다. 이런 종류의 백신은 주로 근육으로 접종하기 때문에 점막에서의 방어보다는 systemic immunization에 중점을 두고 있다. 이런 systemic vaccine은 systemic 면역 유도는 높지만 점막에서의 항체 유도에는 별다른 영향을 주지 못해 점막에서의 항체 역가는 매우 낮아 병원균 방어에 실패하는 경우가 종종 발생하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 미국을 비롯한 선진국에서는 점막면역을 유도할 수 있는 백신 및 면역증강제 개발에 많은 연구가 진행 중에 있다. 하지만 아직까지 이는 사람의 질병 및 실험동물인 마우스를 대상으로 한 기초 연구가 주종을 이루고 있다.

본 발명은 우선 돼지에서 위축성 비염 병원체인 *Pasteurella multocida* type D와 *Bordetella bronchiseptica*의 주요 병원성 인자 (부착인자와 독소)와 파스튜렐라 폐렴 병원체인 *P. multocida* type A의 주요 병원성 인자 (부착인자) 그리고 흉막폐렴 원인체 중 국내에서 주로 분리되는 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 type 2와 5의 주요 병원성 인자를 SecA, SecB 그리고 LepB system을 이용하여 발현되는 항원의 분비를 증가시키도록 개발된 대장균 및 살모넬라균 shuttle vector인 pJOL44에 각각 삽입한다. 그 다음 이들 삽입된 각각의 plasmide를 약독화 *Salmonella* Typhimurium을 형질전환 시켜 live 백신으로 개발한다. 이들

형질 전환된 약독화 *S. Typhimurium* (살모넬라균)은 각 병원성 인자를 안정적으로 발현하여 돼지의 점막으로 분비시킴으로써 분비된 이들 항원에 대한 점막 및 전신 면역을 유도하여 위축성 비염과 파스튜렐라 및 흉막폐렴을 예방할 수 있도록 개발된 예방백신이다.

더욱이 본 연구에서 백신 항원을 돼지의 점막으로 전달하도록 고안된 (delivery system) 약독화 살모넬라균은 *lon*과 *cpxR* 그리고 *asd* 세 유전자를 인위적으로 결실시킨 약독화 변이 균주이다. *lon* 유전자에 의해 발현되는 Lon protein은 많은 다른 protein들의 조절인자로서 이 유전자를 결실시키면 이 변이 균주는 숙주 세포내에서 장기간 생존이 힘들며 더불어 과산화수소 및 산성 환경에 대해 대단히 민감해지는 것으로 알려져 있다. 그리고 *cpxR* 유전자에 의해 발현되는 CpxR이 과발현 되면 상피세포로의 부착과 침입이 증가하게 된다. 따라서 이들 두 유전자가 결실된 변이 균주는 점막 상피 세포로의 부착과 침입력은 증가하지만 숙주 세포에서의 증식은 감소하게 되어 결국은 면역원성은 높아지지만 병원성은 약해진 새로운 약독화 살모넬라균이 되어 백신으로서의 활용이 가능하게 된다. 또한 이 약독화 살모넬라균은 하나가 아닌 두 개의 유전자를 결실시키기 때문에 병원성 균주로 전환될 수 있는 기회는 매우 희박하다. 게다가 peptidoglycan 합성에 필요한 aspartate β -semialdehyde dehydrogenase (Asd)의 유전자가 결여된 살모넬라균은 diaminopimelic acid (DAP) 요구주로서 증식을 위해서는 배지에 DAP의 첨가나 이 유전자를 가진 plasmid의 형질전환이 필요하다. 그래서 *asd* 유전자를 갖고 있는 plasmid에 원하는 항원 유전자를 cloning한 후 이 변이 균주로의 형질전환은 항생제 선택 marker를 사용하지 않고도 외래 단백질을 발현할 수 있는 전달계 (delivery system)로서 이용이 가능하다.

호흡기 질환은 양돈 산업에 막대한 경제적 피해를 초래하는 중요한 질병이다. 예전에는 돼지 주요 호흡기 질병 발생에 대해 하나의 감염균에 관심을 가졌었다. 하지만 최근에는 하나 이상의 감염균이 복합 작용하여 발생하고 있다. 하나의 병원균에 단독으로 감염된 경우에는 병의 경과가 농장 전체 경영에 큰 영향을 미칠 만큼 심각한 수준으로까지는 발전하지 않지만 복합 감염의 경우에는 그 증상과 경제적 피해 정도는 심각한 수준으로까지 발전하는 경향이 많다. 그중에서도 특히 돼지 호흡기 복합 감염증 (porcine respiratory disease complex; PRDC)은 최근 전 세계적으로 양돈 산업에서 있어 주요 관심사로 많은 연구가 진행 중에 있다. 이 PRDC는 세균, 바이러스, 불량한 사육 환경, 부적절한 관리, 스트레스, 면역력 감소 등의 원인이 상호 복합적으로 작용하여 발생하는 호흡기 질병으로 성장기 자돈에서 흔히 발생하여 이 질병으로 인해 폐사하거나 또는 성장 지연 및 사료효율 저하 등으로 인한 출하시기를 늦추는 등 경제적으로 막대한 손실을 초래하고 있다. PRDC와 관련된 주요 세균성 원인균으로는 유행성 폐렴 (*Mycoplasma hyopneumoniae*), 돼지 흉막 폐렴 (*Actinobacillus pleuropneumonica*), 글래씨병 (*Haemophilus parasuis*), 위축성 비염 (*Bordetella bronchiseptica*), 파스튜렐라 폐렴 (*Pasturella multocida*) 등이 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이들 세균의 복합감염으로 인해 이 질병의 통제를 위한 분만사 관리 등에는 한계가 있으며 치료에 사용될 수 있는 항생제는 내성균 출현 등 부작용을 안고 있다. 따라서 이에 대한 효과적인 대안책으로 백신 개발 연구가 활발히 진행되고 있다.

이번 연구에서는 국내 돼지에서 발생하는 주요 세균성 호흡기 질병의 원인균의 분포와 유전적 특징을 조사할 것이다. 더불어 대다수의 병원균은 부착인자 (adhesins)를 이용하여 점막에 부착하여 독소를 분비함으로써 질병 유발이 시작되기 때문에 이들 부착인자와 독소는 면역원성이 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 국내 분리주를 대상으로 각 호흡기 관련 병원균에서

의 부착 인자와 독소에 대한 분포를 조사하여 백신 개발을 위한 항원으로 발굴하여 이들 항원 확보를 위한 cloning과 약독화 살모넬라균을 delivery system을 이용하여 돼지 호흡기 질병 예방 백신을 개발하고자 한다. 이렇게 개발된 백신을 우선 실험동물인 마우스를 대상으로 백신 효능에 대한 기초 실험을 수행하여 획득한 정보를 활용하여 목적동물인 후보돈과 비육 말기 자돈에서 백신 효능에 대한 실험을 수행하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발의 필요성 및 중요성

1. 연구의 필요성

1.1. 호흡기 질병 예방용 mucosal vaccine 및 경구 접종 용 adjuvant 개발이 절실히 요구된다.

동물에 있어 출하 지연 및 증체율 감소는 주로 호흡기 질환에 의해 기인한다. 특히 육성돈에서의 호흡기질환으로 인한 식욕감퇴 및 증체율 저하는 양돈 산업에 막대한 경제적 손실을 초래하는 중요한 질병이다. 본 질병을 예방하기 위해서는 예방 백신의 접종 과 더불어 철저한 위생관리에 힘써야 한다. 물론 백신 접종이 질병을 100% 차단하지는 못하지만 백신을 접종 할 경우 접종하지 않은 경우에 비해 발병율이 현저하게 감소하고 병소의 크기나 정도를 약화시키며 치료시에도 효율을 증진시킬 뿐만 아니라 성장지연의 예방과 더불어 폐사율도 낮출 수 있기 때문에 예방접종은 반드시 실시해야 한다. 이처럼 산업 동물에 심각한 경제적 손실을 초래하는 세균성 호흡기 질환을 예방하기 위하여 전 세계적으로 효과적인 예방백신을 개발하고자 많은 심혈을 기울이고 있다. 호흡기 점막은 대다수의 호흡기 질환 유발 병원균과 처음으로 접하는 장소임과 동시에 이들 세균의 감염을 방어하는 최전방 방어 line으로서 매우 중요한 곳이다. 하지만 기존 상용화 백신의 대부분은 주로 병원성 대장균을 포르말린으로 불활화 시킨 사균백신 이거나 유전자 조작 기술을 이용하여 항원성이 높은 항원을 순수하게 정제한 항원을 오일이나 껌 등 적합한 면역증강제와 혼합한 형태이다. 이런 종류의 백신은 근육으로 접종하기 때문에 점막에서의 방어보다는 systemic immunization에 중점을 두고 있다. 이런 systemic vaccine은 systemic 면역 유도는 높지만 점막에서의 항체 유도에는 별다른 영향을 주지 못해 점막에서의 항체 역가는 매우 낮아 병원균 방어에 실패하는 경우가 종종 발생하는 것으로 보고되고 있다.

1.2. 현장에서 활용 가능한 점막면역반응 delivery system을 이용한 다가백신 개발이 필요하다.

유럽 및 미국을 비롯한 선진국에서는 점막면역을 유도할 수 있는 백신 및 면역 증강제 개발에 많은 연구가 진행 중에 있다. 하지만 아직까지 이는 사람의 질병 및 실험동물인 마우스를 대상으로 기초 연구가 주종을 이루고 있다. 최근에는 수의학분야에서도 일부의 질병에 대해서 특히, 조류 및 돼지를 대상으로 점막면역에 대한 연구가 수행 중에 있다. 그렇지만 아직 국내 외적으로 연구실 수준의 연구가 진행 되고 있을 뿐 현장에서는 아직 활용되지 못하고 있다.

1.3. 사용이 간편한 경구투여용 다가 백신 개발이 필요하다.

위축성 비염 및 파스튜렐라성 폐렴 그리고 흉막폐렴은 돼지에서 주로 급성 폐사 및 만성

질환 등 다양한 감염을 일으키는 병원체로서 이들은 주로 독소에 의해 폐포 대식구 및 호중구를 파괴하여 질병을 악화시킨다. 독소와 더불어 세균이 숙주 세포에 부착하는데 사용하는 모든 인자를 adhesin이라하며 이는 세균의 fimbria와 같은 세포 표면 단백질이 포함되어 있다. 세균은 이들 adhesin을 이용하여 숙주의 점막 세포 표면에 안정적으로 부착하여 증식을 시작하면서 질병을 일으킨다. 따라서 이들 병원성 세균의 adhesin 및 독소에 대한 면역반응이 유도된다면 세균에 감염되었을 경우 유도 항체가 이들 adhesin 및 독소와 결합하여 세균이 숙주의 점막 표면에 부착하여 증식할 수 있는 기회를 미연에 차단함과 동시에 독소에 대식구와 호중구의 파괴를 미연에 방지함으로써 병원성 세균에 의한 호흡기 질병 발생을 예방할 수 있을 것이다.

2. 연구의 중요성

2.1 세균성 호흡기 질병 예방을 위한 점막면역반응 유도를 위한 생균 백신 및 점막면역용 adjuvant 개발이 필요하다.

산업 동물에 있어서 육성시기에 증체율 감소의 중요한 원인 중 하나가 바로 호흡기 질환이다. 이처럼 양돈 산업에 심각한 경제적 손실을 초래하는 세균성 호흡기 질환을 예방하기 위하여 전 세계적으로 효과적인 예방백신을 개발하고자 많은 심혈을 기울이고 있다. 호흡기 점막은 대다수의 호흡기 질환 유발 병원균과 처음으로 접하는 장소임과 동시에 이들 세균의 감염을 방어하는 최전방으로서 매우 중요한 곳이다. 하지만 기존 상용화 백신의 대부분은 주로 호흡기 질환 세균을 포르말린 등으로 불활화 시킨 사균백신을 오일이나 겔 등과 같이 적합한 면역증강제와 혼합한 형태이다. 이런 종류의 백신은 주로 근육으로 접종하기 때문에 점막에서의 방어보다는 systemic immunization에 중점을 두고 있다. 이런 systemic vaccine은 systemic 면역 유도는 높지만 점막에서의 항체 유도에는 별다른 영향을 주지 못해 점막에서의 항체 역가는 매우 낮아 병원균 방어에 실패하는 경우가 종종 발생하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 미국을 비롯한 선진국에서는 점막면역을 유도할 수 있는 백신 및 면역증강제 개발에 많은 연구가 진행 중에 있다. 하지만 아직까지 이는 사람의 질병 및 실험동물인 마우스를 대상으로 한 기초 연구가 주종을 이루고 있다. 최근에는 수의학분야에서도 일부의 질병에 대해서 특히, 조류 및 돼지를 대상으로 점막면역에 대한 연구가 수행 중에 있다. 그렇지만 아직 국내외적으로 연구실 수준의 연구가 진행 되고 있을 뿐 현장에서는 아직 활용되지 못하고 있는 실정이다.

2.2 현장에 적용 가능한 점막면역 백신 delivery system을 이용한 다가 백신 개발이 요구된다.

점막 면역 반응을 유도하기 위해서는 점막에서 면역 반응을 직접 유도할 수 있는 생균 백신의 개발이 필요하다는 것은 주지의 사실이다. 따라서 국내에서 분리된 살모넬라균주를 이용하여 주요 병원성 인자를 최첨단 유전 공학 기법을 이용하여 제거시킴으로써 약독화 시킨 후 주요 세균성 호흡기 질병 유발 세균의 주요 독소 및 부착인자를 발현 하도록 하여 호흡기 점막에서 이들 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 백신을 개발하고자 한다.

2.3. 사용이 간편한 경구 투여용 다가 백신 개발이 필요하다.

현재 시판되고 있는 대다수의 백신은 근육 접종을 실시함으로써 전신 면역반응을 유도하는 백신 체계를 유지하고 있다. 하지만 근육 접종을 실시할 경우에는 수의사와 같은 전문 인력내지는 숙련된 노동자와 보정인력 등 많은 노동력이 필요하다. 또한 돼지 등 그 대상동물은 근육 접종에 따른 고통 및 비숙련가에 의한 잘못된 접종으로 인한 부종, 발열, 다른 세균의 오염 등과 같은 부작용이 나타나기도 한다. 따라서 숙련가가 필요하지 않은 경구접종으로의 백신 접종 개발은 양돈가 뿐만 아니라 축산 농가 모두의 바램이다. 따라서 약독화 살모넬라에 의한 생균 백신은 경구 접종이 가능하도록 디자인되어 있어 경구접종에 따른 노동력 감소를 통해 양돈가의 국제 경쟁력을 높일 수 있다.

IV. 연구개발 내용 및 범위

1. 위축성 비염과 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신 개발을 위한 주요 병원성 인자 항원 발굴 및 유전자 확보

백신 개발을 위한 면역원성이 우수한 항원을 발굴하고 그 항원 유전자를 확보하였다.

2. 특정 유전자가 제거된 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 동시 예방 생균 다가 백신 개발

특정 병원성 유전자가 제거된 점막면역 활성 delivery system 및 vector를 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방을 위한 생균 다가 백신을 개발하였다.

3. 백신의 효능을 향상시킬 점막 면역에 효과적인 adjuvant 개발

점막면역에 효과적인 djuvant를 개발하여 백신의 경구 또는 비강과 같은 점막 접종 시 백신의 효능을 증강시킨다.

4. 해당 단백 항원 확보

위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴과 관련된 면역원성이 우수한 각 해당 항원에 대한 단백 항원을 발현하고 정제하였다.

5. In vitro 상에서 개발된 백신 균주의 발현여부 확인

Western blot을 이용하여 각 형질전환 된 백신 후보균주로부터 각 항원이 host 세포 밖으로의 분비여부 확인하였다.

6. 실험동물에서의 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 각각의 생균 백신 후보균주의 안전성 및 면역 유도 실험

실험동물을 이용하여 각 백신 후보균주의 면역 유도 및 부작용 검사를 실시하여 백신의 안전성 여부를 확인하였다.

7. 실험동물에서 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신후보균주의 혼합 접종 실험

실험동물을 이용하여 백신 후보균주를 혼합 접종 하였을 경우 각 백신 후보균주에 대한 면역 유도 여부 및 백신의 최적화 실험을 수행하였다.

8. 실험동물을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신의 최적화 실험

실험동물을 이용하여 백신 후보균주를 혼합 접종 하였을 경우 각 백신 후보균주에 대한 면역 유도 여부 및 백신의 최적화 실험을 수행하였다.

9. 국내 주요 호흡기 질병 원인균 분리 및 동정, 양돈장에서 분리된 병독성 호흡기 질병 원인균 병독성 시험

- 1) 목적동물인 돼지에서의 호흡기 원인균 분리 및 동정
- 2) 항생제 감수성 검사
- 3) 마우스를 대상으로 한 병원성 실험.
- 4) 돼지를 대상으로 한 병원성 실험.

10. 목적 동물에서의 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신 예비 실험

목적동물인 모돈에 예방백신을 근육 또는 경구 접종한 후 출생한 자돈에 도전감염시켜 최적의 접종경로를 결정하였다.

11. 모돈에서 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신의 효능 및 백신의 안전성 실험

모돈에 위축성 비염과 파스튜렐라성 폐렴 예방 생균 다가 백신을 접종 한 후 혈청에서의 IgG 및 모유에서의 IgA 그리고 포유 자돈을 대상으로 한 도전감염을 통한 생균 다가 백신의 효능과 안전성을 평가하였다.

12. 자돈에서 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방

생균 다가 백신의 효능 및 안전성 실험

모든 및 자돈에 각각 백신을 경구 또는 근육 접종 한 후 도전감염 균주에 대한 방어여부를 확인하며 자돈에서의 백신의 안전성 여부를 조사한다.

13. 흉막 폐렴 예방 생균 백신 개발을 위한 주요 병원성 인자 항원 발굴 및 항원 유전자 확보

흉막폐렴 예방을 위해 흉막폐렴과 관련된 병원성 인자 중에서 면역원성은 높으면서 병원성이 없는 항원에 대한 유전자를 확보하였다.

14. 흉막폐렴 주요 병원성 인자에 대한 각 단백 항원 확보

각 해당 항원을 발현/분비하는 백신 균주로 접종한 후 유도된 각 항원에 대한 항체 역가를 측정하기 위해 ELISA 항원을 시판되는 발현 벡터와 균주를 활용하여 발현 및 정제하여 실험에 사용하였다.

15. 병원성 유전자가 제거된 점막면역 활성 delivery system을 이용한 흉막 폐렴 예방 생균 백신 개발

APP의 주요 병원성 인자인 Apx IA, Apx IIA, ApxIIIA, OmpA를 발현 /분비 벡터인 pBP244에 cloning한 후 병원성 유전자가 제거된 *Salmonella* Typhimurium을 형질전환시켜 Western blot을 이용하여 개발된 백신의 세포 밖으로의 발현 여부를 확인하였다.

16. 흉막 폐렴 예방 생균백신 생체 내에서의 병원성 획득 실험

점막면역에 효과적인 adjuvant를 개발하여 백신의 경구 또는 비강과 같은 점막 접종 시 백신의 효능을 증강시킨다.

17. 마우스를 이용한 흉막 폐렴 예방 백신의 안전성 실험

각 해당 항원 발현 백신균주들을 혼합한 후 비강내로 1회 및 2회 접종한 다음 백신 접종에 따른 부작용 (설사, 침울, 체중감소)과 실질 장기 (간, 비장, 폐, 창자)에서의 백신균주의 잔존 여부 및 잔존 기간 그리고 분변으로의 배출 여부 등을 확인하여 백신의 안전성을 확인하고자 하였다.

18. 마우스를 이용한 흉막 폐렴 예방 백신의 효능 실험

각 해당 항원 유전자가 삽입된 약독화 살모넬라 티피무리움 백신균주를 혼합한 후 비강내로 접종한 다음 각 개별 항원에 대한 면역반응 유도 여부와 야외분리주로 도전감염에 대한 방어여부를 통해 백신 가능성 여부를 결정하였다.

19. 실험동물을 이용한 백신의 최적화 실험

각 해당 항원 발현 백신균주들의 혼합 후 비강내로 1회, 2회 및 3회 접종한 다음 유도된 면역반응과 도전감염에 대한 방어 여부를 통해 접종 횟수를 결정하였다.

20. 임신 모돈에서 흉막 폐렴 백신의 안전성 실험

마우스에서 결정된 투여 방법 및 접종량을 토대로 임신 모돈에 예방접종 한 다음 각 항원에 대한 면역 유도 여부와 방어 여부 조사하였다.

21. 목적동물에서 흉막폐렴 예방 생균 백신의 효능실험

목적동물인 비육돈에서의 백신 효능 실험을 수행하였다.

22. 돼지에서 백신의 효능을 향상시킬 점막 면역에 효과적인 adjuvant 개선 및 백신의 최적화

백신과 마우스 실험에서 선택한 점막면역용 adjuvant를 이용한 목적동물에서의 백신의 최적화 실험 하였다.

23. 현장에서 위축성 비염, 파스튜렐라 폐렴, 흉막폐렴, 예방 생균 백신과 다른 상업용 백신과의 단순 효능 비교 실험

현장에서 현재 상용화 되어 판매되고 있는 상업용 백신을 구입하여 생균 다가 백신과 단순히 방어여부만을 비교하였다.

24. 각 호흡기 질병이 유행하는 양돈장에서의 생균백신의 적용 실험

세균성 호흡기 질병이 만연하는 농장에서의 다가 백신의 효능 실험 하였다.

25. 백신의 안정성 확인 시험

백신의 상용화 이후 유효기간 설정에 필요한 안정성 데이터 확보 하였다

26. 백신의 제품화를 위한 전략수립

생물학적제제의 일반적인 품목허가 절차에 근거하여 연구 과제 수행결과가 제품의 품목허가 절차와 연관성을 가질 수 있도록 최종 제품화를 위한 전략수립을 하였다.

V. 연구개발결과

1. 위축성 비염과 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신 개발을 위한 주요 병원성 인자 항원 발굴 및 유전자 확보

1) 위축성 비염 유발 병원균 (*Pasteurella multocida* type D, *Bordetella bronchiseptica*) 및 파스튜렐라 폐렴 (*Pasteurella multocida* type A)

▶ 돼지에서 위축성 비염은 대부분의 양돈장에 상재하는 돼지의 만성 호흡기 질환으로 비강에 침입한 *Bordetella bronchiseptica*와 *Pasteurella multocida* type D에 의해 비강 점막에 염증을 일으키고 비갑개골과 상악골이 위축되고 코가 비뚤어지는 질병으로 어린 일령의 자돈이 쉽게 감염된다. 파스튜렐라 폐렴은 *P. multocida* type A에 의해 감염되어 장거리 수송, 심한 온도 변화, 스트레스 등 저항성이 감소되면 심한 폐렴 증상을 나타낸다. 이 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴을 유발하는 병원균의 adhesin 및 독소가 면역원성과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 이들 adhesin 및 독소를 중심으로 그 유전자를 확보하였다.

▶ 면역원성과 관련된 주요 adhesin 및 독소들

1) *Pasteurella multocida* type A 및 D와 관련된 면역원성 인자

CP39, FimA, PtfA, Pm1665, ToxA

2) *Bordetella bronchiseptica*와 관련된 면역원성 인자

F1, P2

2. 특정 유전자가 제거된 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 동시 예방 생균 다가 백신 개발

특정 병원성 유전자가 제거된 점막면역 활성 delivery system 및 vector를 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방을 위한 생균 다가 백신을 개발하였다.

1). *lon* 유전자 및 *cpxR* 유전자가 결실되어 약독화된 살모넬라 티피무리움

(*Salmonella typhimurium*) 제조.

살모넬라 티피무리움 야외균주 JOL401의 염색체 DNA를 주형으로 하여, *lon* 유전자의 5' 말단과 3' 말단 부분을 각각 *lon*-F-XbaI와 *lon*-R-XhoI 및 *lon*-F-XhoI과 *lon*-R-XbaI를 프라이머로하여 PCR법으로 증폭시켜 *lon* 유전자를 제외한 이들 유전자의 5' 말단 및 3' 말단에 연결된 DNA를 증폭하였다. 상기 PCR 반응으로 증폭된 유전자 단편을 각각 클로닝 한 뒤 제한효소 XhoI로 절단하고 라이게이션하여 *lon* 유전자가 결실된 유전자서열을 얻은 후, 자살 벡터(suicide vector) pMEG375에 클로닝하여 pBP295를 얻었다.

2). 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 동시 예방 생균 다가 백신 개발

후보항원 : PM1665, CP39, PtfA, FimA, ToxA, F1-P2

각 후보 항원 (PM1665, CP39, PtfA, FimA, ToxA, F1-P2)을 pBP244를 이용하여, 살

모델라 티피무리움 전달 시스템에 클로닝한 후 항원의 발현 및 분비 여부를 웨스턴 블롯으로 확인하여 각 정제 플라스미드를 전기청공법에 의하여 JOL912에 형질전환시켜 PM1665, CP39, fimA, ptfA, toxA, F1-P2를 발현하는 균주를 얻었다.

3. 백신의 효능을 향상시킬 점막 면역에 효과적인 adjuvant 개발

점막면역을 강화할 수 있는 adjuvant를 개발하여 그대로 백신과 혼합하여 사용하여 마지막 백신 접종 후 3주 후에 야외분리주를 challeng 한 후 폐사 여부 및 호흡기 질병 발생 유무로 adjuvant의 효능을 최종적으로 결정하였다.

4. 해당 단백 항원 확보

1) 돼지에서 위축성비염과 파스튜렐라 폐렴 원인균인 *Pasteurella multocida* type A 및 D와 관련된 면역원상 인자 CP39, FimA, PtfA, Pm1665, ToxA 그리고 *Bordetella bronchiseptica* 와 관련된 면역원성 인자 F1, P2를 대상으로 하여 cloning을 수행하였다.

2) 각 해당 단백 항원 확보

시판되는 발현용 vector (pQE series와 pET28a)와 host (*E. coli* TOP10과 *E. coli* BL21)를 이용하여 각 해당 유전자를 발현용 vector에 삽입한 후 해당 host에 transformation 시켜 단백 항원 발현 균주를 확보하였다.

3) 각 해당 항원에 대한 항혈청 확보

1주일 정도의 적응 기간을 거친 약 2Kg 정도의 암컷 New Zealand white rabbit에 위에서 준비된 각 adhesin 항원이 200 μ g이 되도록 멸균 PBS로 희석 한 후 Freund's complete adjuvant와 동량 혼합하여 피하 접종하였다. 1차 접종 14일 후에 동량의 항원을 Freund's incomplete adjuvant와 같은 방법으로 혼합하여 피하 접종하여 boosting 하였다. 2차 접종 후 14일째에 채혈하여 혈청을 분리한 다음 -70 $^{\circ}$ C에 보관하며 각 adhesin 항혈청으로 사용하였다.

5. In vitro 상에서 개발된 백신 균주의 발현여부 확인

제작된 백신 균주가 해당 fimbriae을 세포 밖 Outer membrane protein; OMP으로 발현하는지를 확인하기 위하여 SDS-PAGE한 다음 WEST-oneTM Western Blotting System (Intron Biotechnology, Korea)으로 발색하여 각 항원의 Size(CP39는 39kDa, fimA는 36kDa, ptfA는 18 kDa, toxA은 22kDa 그리고 F1P2는 27kDa)를 보아 (CP39, fimA, ptfA, toxA, F1P2)항원 발현 Salmonella delivery bacterial ghost 백신의 세포 외막에서의 발현 여부를 확인하였다.

6. 실험동물에서의 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 각각의 생균 백신 후보균주의 안전성 및 면역 유도 실험

경구접종과 비강접종을 비교하기 위하여, 각각 2회 접종 후 정기적으로 각 항원에 대한 면역반응을 혈청, 질 분비물을 대상으로 IgG 및 sIgA에 대한 항체 역가를 측정하였다. IgG는 마우스에 경구 및 비강접종 후에 각 항원에 대해 형성된 항체의 역가를 측정하기 위한 목적으로 마우스 혈청에서 측정이 되었으며 ELISA로 IgG의 역가를 측정하였다. sIgA는 마우스에 접종한 후에 형성된 mucosal 및 systemic immune response 중 mucosal immune response를 확인하기 위한 실험으로 질 세척액을 대상으로 하여 ELISA로 sIgA의 역가를 측정하였다.

7. 실험동물에서 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신후보균주의 혼합 접종 실험

백신접종 경로로 비강접종을 선택한 뒤 개별 항원 유전자가 각각 삽입된 약독화 *Salmonella* Typhimurium 백신 균주의 combination 접종에 따른 각 항원에 대한 면역반응 유도 및 접종 후 폐에서의 회복 여부를 조직학적으로 확인하여 보았다. 먼저 개별항원에 대한 면역반응으로는 각 항원의 혼합 접종 시 IgG의 경우 모든 항원 즉, CP39, ToxA, PtfA, FimA, F1P2에 대한 IgG는 백신접종 후 2주차부터 8주차까지 항체역가가 유지가 되었으며 sIgA의 경우에는 백신 접종군에서 ToxA, PtfA 항원은 접종 후 2주차에 증가되어 4주차에 가장 높게 증가되어 6주차까지 유지하였다. 항원 CP39, FimA에서는 2주차에 증가하여 4주차에 가장 높게 증가되었다가 항체역가가 떨어졌으며 항원F1P2의 경우 4주차에 증가하여 6주차에 항체역가가 떨어짐이 관찰되었다. 이 결과로 각 백신균주 항원을 종합하여 접종 하였을 경우에도 각 항원에 대해 점막면역반응이 유도됨을 확인할 수 있었다. 각 항원의 유전자가 삽입된 약독화된 살모넬라의 백신후보주와 대조군에서 백신접종 뒤 면역유도와 밀접하게 관련된 면역 세포와 세포매개성면역과 체액성면역을 측정하기 위하여 세포성 면역반응 및 유세포 분석 그리고 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 측정하였다. SPA의 경우 백신접종군은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의있게 증가 하여 세포매개성 면역반응에 관하여 효과적임이 확인되었다. 비장세포에서의 세포매개성 면역에 관련된 T lymphocyte의 CD3⁺ CD4⁺와 CD3⁺ CD8⁺비율과 B lymphocyte CD45R의 비율을 측정하기 위하여 유세포분석을 시행하여 본 결과, CP39, ToxA, FimA, ToxA, F1P2,으로 자극시킨 T cell subset의 CD3⁺CD4⁺와 CD3⁺CD8⁺의 백분위는 백신접종군이 대조군의 비해 통계학적으로 유의있게 증가되었으며 B cell subunit CD45R에서도 같은 결과를 얻었다. 또한 백신접종 후 각 세포 매개성 면역반응과 체액성 면역반응에 관련있는 사이토카인을 splenocyte에 각 해당 항원을 자극시킨 후 Real time PCR로 측정하여 본 결과, 백신접종군은 대조군에 비하여 모두 높게 나왔으나 INF-r만이 통계학적으로 유의가 있는 값을 나타내었다. IL-4의 분비는 대조군의 비하여 높게나왔으나 통계학적으로 유의있는 값을 나타내진 못하였다. 이는 약독화된 살모넬라의 전달계시스템을 이용함으로써 INF-r의 분비가 자극됨으로써 길항작용으로 IL-4의 분비는 보다 낮게 측정됨을 관찰할 수 있었다. 비강으로 백신접종을 실시할 때 폐조직에서의 염증반응이 일어났다가 회복이 되는 시기를 판단하기 위하여 백신군과 대조군의 폐를 백신 후 3일차와 4주차에 분리하여 조직학 사진으로 관찰한 결과 4주가 되는 시기에 폐조직이 회복되어 최적화실험에서의 2차 접종 및 3차 접종시기를 3주로 결정하였다.

8. 실험동물을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신의 최적화 실험

백신접종 후 각 1회 2회 3회 접종군에서의 세포 매개성 면역반응과 체액성 면역반응에 관여하는 사이토카인을 splenocyte에 각 해당 항원을 자극시킨 후 Real time PCR로 측정하였다. 앞서 혼합접종시에 측정된 사이토카인을 선택하고 각 그룹 별 선택된 항원; ptfA, F1-P2으로 자극시킨 뒤 분비되는 사이토카인을 측정하였을 시 Th1을 자극 하는 INF- γ 를 의 경우 1차, 2차, 3차 접종군에서 대조군의 비해 통계학적으로 유의가 있는 수치가 관찰되었으며 Th2을 자극 하고 점막면역에 관여하는 sIgA를 유도시키는 IL-4의 경우 1차접종의 경우 유의 있는 값은 아니지만 증가가 되었으며 2차 3차접종군에서는 INF- γ 의 길항작용으로 상대적으로는 낮지만 대조군의 비하여 통계학적으로 유의 있는 값이 측정되었다. 이는 1차 접종을 시행 할 때 보다 booster를 통하여 점막면역 및 기억세포를 통한 방어 효과가 뛰어나는 확인되었다. 공격시험 후 대조군의 상태가 악화되어 폐사직전의 시기를 선택하여 백신 접종 군과 대조군의 폐 조직을 분리하여 관찰하였다. 사진에서 보는 것과 같이 3차접종군의 경우 접종을 여러 번 실시하여 조직의 염증감염에 관여된 대식세포의 분비가 많이 분비되어 조직전체에 염증이 생기고 대조군과 차이가 거의 없음이 관찰되었다. 1차 접종군의 경우역시 대식세포의 분비가 전체적으로 많이 진행된 상태를 관찰할 수 있었다. 그러나 2차 접종의 경우 다른 그룹 군과 다르게 폐 조직이 회복되는 단계이며 이는 한번 booster할시 기억세포에서 항원을 보다 빠르게 분비시키고 접종횟수를 낮춤으로써 폐조직의 손상이 3차 접종에 비하여 낮다고 판단되었다.

결론적으로 백신균주의 개별항원 접종 시와 백신균주의 개별항원을 혼합하여 접종했을 시 혼합하여 접종하였을 때 개별 항원에 대한 면역반응 이 효과적으로 유도됨이 관찰됨으로써 백신 균주의 개별항원을 혼합으로 접종을 시행하고 사이토카인의 역가가 높게 측정되는 booster를 시행해야함이 판단되었고 공격시험 후 조직학사진을 통하여 폐 조직손상도가 낮고 빠르게 회복이 되는 2차 백신접종이 안정하고 효과적이라는 결론이 나왔다.

9. 국내 주요 호흡기 질병 원인균 분리 및 동정, 양돈장에서 분리된 병독성 호흡기 질병 원인균 병독성 시험

1) 목적동물인 돼지에서의 호흡기 원인균 분리 및 동정

총 23주가 분리되었으며 그 중 APP 12주, *S. suis* 5주 및 PM 6주가 각각 분리 동정되었다.

2) 항생제 감수성 검사

분리된 APP 12주에 대한 항균제 감수성 시험결과는 표 8에서와 같았다. 돼지 유래균주의 항균제 내성률은 oxytetracycline (91.7%), sulfametho/trimethoprim (75.0%), florfenicol과 kanamycin (66.7%) 및 Penicillin (50.0%) 순이었으며 amoxicillin/clavulanic acid (83.3%)에 대해서는 비교적 높은 감수성을 보였다.

3) 마우스를 대상으로 한 병원성 실험.

분리된 세균들에서 마우스 병원성을 확인하기 위해 각각 균주의 배양액을 농축하여 PBS로 washing하고 생균수를 측정 한 다음 PBS로 10진 희석하여 농도별로 마우스에 접종하여 생존 여부를 관찰하였다.

4) 돼지를 대상으로 한 병원성 실험.

3주령 자돈에 *Pasteurella multocida*를 접종 후 14일이 경과한 시점에 모든 돼지를 안락사 시킨 다음 비갑개를 절개하여 위축성 비염 발병 유무를 비교 (그림 21과 22)하여 본 결과는 표 14에서 보는 바와 같았다. 즉, 2×10^7 CFU/ml를 5ml 접종한 그룹은 1마리에서, 2×10^7 CFU/ml를 5ml 접종 그룹에서는 3마리에서 2×10^7 CFU/ml를 5ml를 접종한 그룹에서는 5마리에서 각각 전형적인 비갑개 이상 자돈이 관찰되었다

10. 목적 동물에서의 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신 예비 실험

목적동물인 모돈에 예방백신을 근육 또는 경구 접종한 후 출생한 자돈에 도전감염시켜 최적의 접종경로를 결정하였다.

11. 모돈에서 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신의 효능 및 백신의 안전성 실험

임신 모돈에 백신을 과용량 또는 반복적으로 경구 접종하여 발열, 균 배출 및 유사산 등과 같은 임상 증상이 관찰되지 않았을 뿐만 아니라 혈액학적 및 혈액 생화학적으로 부작용 여부를 관찰하여 본 결과 부작용이 관찰되지 않았다. 이는 백신 접종에 있어 실수로 과용량 또는 반복 투여에 의한 부작용 없이 백신을 투여 할 수 있음을 보여 주는 결과라 할 수 있다. 또한 모돈에 백신을 경구 접종 한 후 유도되는 항체 역가를 측정하여 본 결과 모든 항원에 대해 접종 후 3주 쯤부터 증가하기 시작하여 모돈이 분만하는 시기인 백신 8주 쯤에 모든 항원에 대해 유의성 있는 결과가 관찰되었으며 더불어 초유에서도 모든 항원에 대해 IgA 및 IgG가 유의성 있는 증가가 관찰되어 모돈에 경구 접종하였을 경우에도 안정적으로 면역 반응을 유도함을 확인할 수 있었다. 또한 백신 접종 된 임신 모돈에서 출생한 자돈이 3주령이 되었을 때 전북대학교에 설치된 자돈사로 운송하여 일주일간의 적응 기간을 거친 후 *Pasteurella multocida* serotype A와 D로 도전 감염 시켜 비강에서의 정상 유무로 방어 여부를 확인하여 본 결과, 백신 접종 군에서는 80%가 정상으로 그리고 대조군에서는 40%만이 정상의 비강 상태가 관찰되어 모돈에서 유도된 항체가 포유 자돈에 이행 되어 위축성 비염을 성공적으로 방어 하는 것을 확인할 수 있었다. 이의 결과는 위축성 비염을 예방하기 위해서 필요한 점막면역이 포유자돈에 이행되었음을 간접적으로 확인해 주는 결과라 할 수 있다.

이와 같은 결과를 종합하여 보면 모돈에 백신을 과용량 또는 반복적인 투여에 의해서도 백신 부작용은 관찰되지 않았으며, 모돈에 경구 접종 하여 자돈이 제대로 포유를 한다면 위축성 비염을 예방하는데 필요한 점막면역 항체를 이행 받아 위축성 비염을 예방 할 수 있을 것으로 생각되었다. 더불어 개발 백신은 경구 접종이 가능하기 때문에 양돈농가에서 접종 방법에 있어 보다 간편하고 손 쉽게 백신 접종을 할 수 있을 것으로 생각되었다.

12. 자돈에서 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신의 효능 및 안전성 실험

모든 및 자돈에 각각 백신을 경구 또는 근육 접종 한 후 도전감염 균주에 대한 방어여부를 확인하며 자돈에서의 백신의 안전성 여부를 조사한다.

13. 흉막 폐렴 예방 생균 백신 개발을 위한 주요 병원성 인자 항원 발굴 및 항원 유전자 확보

백신 후보균주를 혼합하여 마우스에 접종 횟수를 달리하여 사료 섭취량, 체중 변화 및 분변에서의 균 배출 여부 그리고 폐 등에서의 임상 변화와 같은 부작용을 관찰하여 본 결과 접종 횟수와 상관없이 부작용이 관찰되지 않아 안전하면서 효과적으로 면역 반응을 유도함이 확인되었다.

14. 흉막폐렴 주요 병원성 인자에 대한 각 단백질 항원 확보

1) 원인균 : *Actinobacillus pleuropneumoniae* 2형과 5형

국내 돼지에서 흉막 폐렴은 현재 전 세계적으로 발생하는 질병으로 국내에서도 최근 전국적으로 발생하고 있으며, 기후의 급변, 수송 또는 밀집사육 등에 의한 스트레스와 밀접한 관계를 가진다. 발병은 모든 연령의 돼지에서 감수성이 있으나 후보돈과 비육 말기돈에서 폭발적으로 발병한다. 특히 흉막 폐렴은 급성형에 의한 폐사율의 증가와 만성형에서 사료효율 감소, 성장 지연 등에 의한 경제적 손실이 막대하다. 흉막폐렴을 유발하는 병원균의 부착인자와 독소가 면역원성과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 면역원성과 관련된 부착인자와 독소를 중심으로 그 유전자를 특이 primer 를 이용하여 증폭시켜 확보하였다.

2) 면역원성과 관련된 주요 부착인자와 독소들

OmpA, Apx IA, Apx IIA, ApX IIIA

15. 병원성 유전자가 제거된 점막면역 활성 delivery system을 이용한 흉막 폐렴 예방 생균 백신 개발

APP의 병원성 인자인 Apx IA, Apx IIA, Apx IIIA를 발현/분비 벡터인 pBP244에 클로닝한 후 이를 약독화 살모넬라에 형질전환하여 Western blot으로 발현 및 분비여부를 확인해 본 결과 모든 항원에 대해 발현 및 분비가 잘 이루어 지고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 이들 항원을 분비하는 각 약독화 살모넬라 균주를 생균 백신 균주로 사용하였다.

16. 흉막 폐렴 예방 생균백신 생체 내에서의 병원성 획득 실험

BALB/c micedp 병원성 회복을 위해 접종 및 균 분리를 반복하여 마우스에 5×10^7 CFU/20 μ l 비강 접종시에 LD₅₀이 확립되었으며 앞으로 이 균수로 도전감염 최종 균수로 확정하였다.

17. 마우스를 이용한 흉막 폐렴 예방 백신의 안전성 실험

각 항원을 발현하는 백신 후보균주를 혼합하여 마우스에 접종한 후 각 항원에 대한 Serum IgG 및 fecal IgA를 측정하여 본 결과 각 항원에 대해 모두 면역 반응이 유도됨을 확인할 수 있었다. 또한 splenocytes를 분리하여 각 항원으로 자극한 후 CD4, CD8, CD45R를 측정하여 본 결과 각 항원에 대해 증가되었음을 또한 확인할 수 있었다. 더불어 백신 접종 균의 splenocytes에서 각 항원에 대한 IL-4의 농도는 대조군에 비해 상대적으로 적게 증가하였지만 IL-6와 IL-12의 농도는 대조군에 비해 월등하게 증가하여 delivery strain에 의해 전달된 항원은 한 번의 비강 접종에 의해 Th1 type의 면역 반응을 강하게 유도함을 확인할 수 있었다. 물론 돼지에서 흉막 폐렴을 방어하기 위해서는 Th2 type의 면역 반응에 의한 면역 유도가 필요하기 때문에 비강 접종의 접종 횟수에 대한 또다른 실험이 필요하다는 것을 반증하는 실험 결과이기도 하다. 비강 접종 후 도전감염에 따른 폐사율을 조사하여 본 결과 백신 접종 군에서는 70%가 생존한 반면, 대조군에서는 60%가 폐사하였기 때문에 혼합 백신을 비강 접종함으로써 Th1 type과 관련된 mucosal IgA 및 serum IgG를 강하게 유도하며 흉막폐렴을 충분히 방어할 수 있음을 확인할 수 있었다.

18. 마우스를 이용한 흉막 폐렴 예방 백신의 효능 실험

접종 횟수에 따른 항체 유도여부를 확인하여 본 결과 접종 횟수에 상관없이 serum IgG의 경우 모두 대조군에 비해 유의성 있는 증가가 관찰되었다. 하지만 2회 및 3회 접종한 그룹에서 1회 접종한 그룹보다 높은 혈청 IgG가 관찰되었다. 분변 IgA의 경우에는 2회 접종한 그룹에서 1회 및 3회 접종한 그룹보다 더 유의성 있는 항체 역가과 관찰되었다. 또한 splenocytes를 각 항원으로 자극한 후 실시간 PCR을 이용하여 접종 횟수에 따른 IFN- γ 와 IL-4의 발현을 대조군과 비교해 본 결과 IFN- γ 의 경우에는 1회 접종 때에 최고의 발현율을 보이다 접종 횟수가 증가함에 따라 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었지만 IL-4의 경우에는 접종 횟수가 증가함에 따라 그 발현율도 증가하였다. 하지만, Apx I A 및 Apx III A 두 항원의 경우에는 3회 접종시에 IL-4의 수치가 낮게 확인되었는데, 이는 3회 접종시에 항원 자극에 대해 반응이 빨리 시작되어 IL-4를 빨리 생산하고 사라진 것으로 추측되었다. 또한 도전감염에 대한 방어율을 보면 2회 접종한 그룹이 가장 탁월한 방어효과가 관찰되어 돼지에서 흉막 폐렴을 예방하기 위해서는 2회 접종이 가장 탁월한 예방 효과를 나타 낼 것으로 확인되었다.

19. 실험동물을 이용한 백신의 최적화 실험

각 해당 항원 발현 백신균주들의 혼합 후 비강내로 1회, 2회 및 3회 접종한 다음 유도된 면역반응과 도전감염에 대한 방어 여부를 통해 접종 횟수를 결정하였다.

20. 임신 모돈에서 흉막 폐렴 백신의 안전성 실험

분만 예정 8 ~ 9주 전인 모돈 중에서 살모넬라균 및 흉막폐렴에 감염된 병력이 없는 모돈과 흉막폐렴에 대한 예방접종이 실시되지 않았던 모돈에 경구 접종한 후 임신 기간 동안 유사산 및 발열, 백신 균주의 분변으로의 배출여부 그리고 이상 행동 여부에 대한 조사를 실시하여 본 결과, 백신 접종 후 모돈에서 유사산이 발생하지 않았으며, 살모넬라 백신 균주를

분변으로 배출하지도 않았다. 또한 백신 접종 후 발열과 같은 이상 증세가 나타나지 않았으며 출생한 자돈 모두 기형 없이 출생하였으며 백신을 접종하지 않은 군과 별 차이가 관찰되지 않아 백신으로 인한 부작용은 없는 것으로 생각되었다.

21. 목적동물에서 흉막폐렴 예방 생균 백신의 효능실험

이후 자돈 중에서 살모넬라균 및 흉막폐렴에 감염된 병력이 없고 흉막폐렴에 대한 예방접종이 실시되지 않았던 4주령 자돈에 2회 경구 접종한 후 각 항원에 대한 Serum IgG를 측정하여 본 결과 1차 접종 2주 후부터 혈청 IgG의 역가가 증가함을 확인할 수 있었다. 도전감염 후 흉막폐렴 방어여부를 확인하여 본 결과, 대조군에 비해 방어 효과가 우수함이 관찰되었다.

22. 돼지에서 백신의 효능을 향상시킬 점막 면역에 효과적인 adjuvant 개선 및 백신의 최적화

개발백신의 효능을 증가 시키기 위해 백신을 adjuvant 인 Montanide IMS 1313 VG (Seppic 사 제품)와 혼합하여 경구 접종하여, 백신의 효능을 비교하여 보았다. 그 결과, 생균 백신만을 접종할 때보다 Montanide IMS 1313 VG를 adjuvant로 사용하였을 때 보다 높은 항체 역가가 관찰되었다.

23. 현장에서 위축성 비염, 파스튜렐라 폐렴, 흉막폐렴, 예방 생균 백신과 다른 상업용 백신과의 단순 효능 비교 실험

현장에서 현재 상용화 되어 판매되고 있는 상업용 백신을 구입하여 생균 다가 백신과 단순히 방어효과만을 비교분석하여 본 결과, 시판되는 상업용 백신보다 도전감염군주에 대한 방어 효과가 우수하였다.

24. 각 호흡기 질병이 유행하는 양돈장에서의 생균백신의 적용 실험

세균성 호흡기 질병이 만연하는 농장에서 개발된 생균 백신을 접종한 후 접종하지 않은 그룹과 비교하여 본 결과 백신을 접종한 그룹에서 접종하지 않은 그룹보다 호흡기 질병이 적게 발생하는 것이 관찰되었다.

25. 백신의 안정성 확인 시험

백신을 멸균 생리식염수로 10진 희석한 후 DAP가 함유된 LB배지에 10진균수시험 결과, 8개의 시험백신 모두 9개월경과 시점까지 백신 1두 분 중 균수가 10^9 CFU 이상으로 확인되었다. 희석액 1 ml를 접종하고 37°C에서 48시간 배양하여 평판법으로 균수를 측정하였다.

26. 백신의 제품화를 위한 전략수립

코미팜에서는 2016년부터 백신의 품목허가를 위한 본격적인 절차에 돌입할 예정이며, 지금까지의 연구 결과를 바탕으로 백신의 임상시험 실시를 위한 임상시험 계획서를 농림축산검역본부에 제출하고자 한다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 본 연구에서 제작된 생균 다가 백신은 기존의 시판 백신에 비해 방어력에 있어 우수함을 나타내었으며, 위축성 비염과 파스츄렐라성 폐렴 그리고 홍막폐렴 등 돼지에서 주로 유행하는 호흡기 질병을 동시에 예방할 수 있는 장점을 지니고 있으며, 또한 기존 시판 백신과 달리 경구로 접종이 가능하기 때문에 본 연구에서 개발된 백신은 상당한 가치가 있다. 더불어 현재 개발 백신은 실용화를 위한 준비 단계에 있다.
2. 생균 백신은 경구 접종이 가능하기 때문에 농장의 백신 프로그램에 제한받지 않고 특히 구제역과 같이 추가 백신 접종에 의한 백신 프로그램에 제한 받지 않고 농장 현실에 맞는 접종 시기를 선택할 수 있는 장점이 있다.

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Tittle

Development of live vaccine for protection against progressive atrophic rhinitis and pleuropneumonia in pigs

II. Summary

An expression/secretion plasmid containing genes encoding the FimA, CP39, PtfA, ToxA and F1P2 antigens associated with porcine pneumonic pasteurellosis and progressive atrophic rhinitis (PAR) was constructed and harbored in an attenuated *Salmonella* Typhimurium, which was used as the vaccine candidate. The immune responses induced by this delivery strain were investigated in a murine model. Each antigen secreted from the delivery strain was confirmed by Western blot analysis. Thirty BALB/c mice were divided equally into two groups; group A were intranasally inoculated with the mixture of the five delivery strains, and group B were inoculated with sterile PBS. In group A, all antigen-specific serum IgG were significantly increased compared to those of group B from the 2nd week post-inoculation (WPI) till the 8th WPI. All antigen-specific mucosal IgA in group A were also significantly greater than those of group B. In addition, the significant splenic lymphocyte proliferative responses, the elevations of CD3(+)CD4(+), CD3(+)CD8(+) and B-cell populations, and the induction of IFN- γ expression in group A were observed. In conclusion, the mixture of five delivery strains expressing specific antigen for these diseases was found to be capable of inducing significant humoral and cellular immune responses.

Mice were intranasally inoculated at various times to optimize the vaccination strategy with a new live candidate vaccine expressing the antigens CP39, FimA, PtfA, and ToxA of *Pasteurella multocida* and F1P2 of *Bordetella bronchiseptica* in an attenuated live *Salmonella* system to protect against progressive atrophic rhinitis (PAR). Sixty BALB/c mice were divided equally into 4 groups. The group A mice were vaccinated only at 12 wk of age, the group B mice received a primary vaccination at 9 wk of age and a booster at 12 wk of age, the group C mice received a primary vaccination at 6 wk of age and boosters at 9 and 12 wk of age, and the group D mice were inoculated intranasally with sterile phosphate-buffered saline as a control. The humoral and mucosal immune responses of groups A, B, and C increased significantly compared with those of the control group. Expression of the cytokines interleukin-4 and interferon- γ in splenocytes also increased significantly. In addition, the group B mice exhibited significantly fewer gross lesions in lung tissue compared with the other vaccinated groups after challenge with a virulent *P. multocida* strain. These results indicate that a strategy of double intranasal vaccination can optimize protection against PAR.

In this study, the *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigens ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA and OmpA were expressed in an attenuated strain of *Salmonella* ($\Delta lon\Delta cpxR\Delta asd$) for prevention of porcine pleuropneumonia. In order to evaluate the immunization strategy of the construct, a total 60 BALB/c mice were equally divided into four groups (n = 15). Group A mice were intranasally immunized only at 6-weeks-of-age, while group B mice were intranasally primed and boosted at 6- and 9-weeks-of-age, respectively, and group C mice were intranasally primed at 6-weeks-of-age and subsequently boosted twice at 9- and 12-weeks-of-age. Group D mice were used as a control, which were inoculated with sterile PBS. Groups A, B, and C showed significantly higher serum IgG and fecal IgA immune responses than those of the control group. After virulent challenge with a wild type *A. pleuropneumoniae*, the immunized groups A, B and C showed 33.3 %, 13.3 % and 26.7 % mortality as the control group showed 60 % mortality. These results showed that the protection against porcine pleuropneumonia using the construct can be optimized by a double intranasal vaccination.

Salmonella Typhimurium strain expressing the *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigens, ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA and OmpA, was previously constructed as a vaccine candidate for porcine pleuropneumonia. This strain was a live attenuated ($\Delta lon\Delta cpxR\Delta asd$) *Salmonella* as a delivery host and contained a vector containing *asd*. An immunological study of lymphocyte proliferation, T-lymphocyte subsets and cytokines in the splenocytes of a mouse model was carried out after stimulation with the candidate *Salmonella* Typhimurium by intranasal inoculation. The splenic lymphocyte proliferation and the levels of IL-4, IL-6 and IL-12 of the inoculated mice were significantly increased, and the T- and B-cell populations were also elevated. Collectively, the candidate may efficiently induce the Th1- and Th2-type immune responses.

An expression/secretion plasmid containing genes encoding the FimA, CP39, PtfA and ToxA antigens associated with porcine progressive atrophic rhinitis (PAR) was constructed and harbored in an attenuated *Salmonella* Typhimurium as the vaccine candidate. The immune responses induced by this delivery strain were investigated in pigs. A total of 6 pregnant sows were divided equally into 2 groups; group A were inoculated with sterile PBS as control, group B sows were orally inoculated with the mixture of the four delivery strains. In group B, all antigen-specific serum IgG were significantly increased compared to those of group A at the 8th week post-inoculation(WPI). Colostrum IgA and IgA against antigen-specific in group B were also significantly greater than those of group A. Among 10 piglets from group A sows, PAR signs were observed in 8 piglets after challenge with *Pasteurella multocida* type D in their offsprings, while PAR signs were showed in only 6 of 10 piglets from group B sows. In conclusion, the mixture of 4 delivery strains expressing specific antigen for these diseases was found to be capable of inducing effectively protective immune responses.

In order to determine optimal vaccine strategy in piglets, 6 pregnant sows and their

offsprings were used for this study. A total of 6 pregnant sows were divided equally into 2 groups; group A were inoculated with sterile PBS as control, group B sows were orally inoculated with the mixture of the four delivery strains. The offsprings of group B sows were intramuscularly immunized with the mixture of the four delivery strains at the 2nd weeks of age. The humoral and mucosal immune responses of groups A, B, and C increased significantly compared with those of the control group. All the vaccinated groups of sows and piglets exhibited significantly increased antibody levels relative to specific antigens when compared with those in the unimmunized control. The experimental piglets with the vaccine candidate did not experience PAR following challenge with the virulent *Pasteurella multocida* type D strains. However, PAR signs were observed in 60.0% of the control group after challenge with the challenge strains. These findings indicate that immunization of sows and their offsprings with the candidate vaccine may be optimal vaccine strategy for effective protection their young pigs against PAR.

Actinobacillus pleuropneumoniae causes porcine pleuropneumonia (PP), a highly contagious endemic disease that results in significant global livestock loss. The prevalence of serotypes and antimicrobial resistance patterns in recently isolated *A. pleuropneumoniae* strains from pigs with PP in South Korea were examined. A total of 65 *A. pleuropneumoniae* isolates were collected throughout Korea and were genetically serotyped using standard and multiplex PCR methods. Antimicrobial susceptibilities for all isolates were tested using the standardized disk-agar method. PCR was used to detect β -lactam, gentamicin and tetracycline-resistance genes. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns of the isolates were also determined by PCR. Of the 15 possible serotypes, South Korean pigs predominantly carried *A. pleuropneumoniae* serotypes 1 and 5. Among a total of 65 isolates, one isolate was sensitive to all 12 antimicrobials tested in this study. A total of 62 isolates was resistant to tetracycline and 53 of these isolates carried one or five tetracycline genes including the *tet*(B), *tet*(A), *tet*(H), *tet*(M), *tet*(C), *tet*(G) and/or *tet*(L)-1 markers. Among the 64 strains susceptible to a subset of all the tested antimicrobials, 26.6% were resistant to three or more antimicrobials, and Thirteen different antimicrobial resistance patterns were observed in the isolates and RAPD analysis revealed a separation of the isolates into two clusters: cluster II (6 strains resistant to 10 antimicrobials) and cluster I (the other 59 strains). These results show that serotype prevalence is somewhat different in South Korea relative to other parts of the world and multi-drug resistant strains are prevalent. RAPD analysis demonstrated that the six isolates resistant to 10 antimicrobials belonged to the same cluster.

Recombinant ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA, ApfA and OmlA protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) antigens were expressed from an attenuated *Salmonella* ($\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$) mutant. Twenty Large Yorkshire piglets were divided equally into 2 groups (n=10). Group A piglets were orally inoculated with sterile phosphate buffered saline as a control at 4 weeks of age [0 week post inoculation (WPI)] and group B piglets were orally immunized with the mixture of the five delivery strains. The individual antigen-specific

IgG concentrations in serum samples were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. All piglets were challenged with the mixture of wild type APP serotypes 1, 2 and 5 at 4 WPI. All antigen-specific serum IgG concentrations were significantly higher in group B piglets than in control group from 2 WPI until 4 WPPI. A total of 80% of group B piglets were protected against the challenge strain, while only 40% of group A piglets were protected. Overall, oral inoculation with our novel vaccine candidate can be considered an efficient protective immunization procedure against APP infection.

In this study, the efficacy of the combination of formalin-inactivated *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) and the individual B-subunit proteins of ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA of APP were evaluated in piglets. Twenty Large Yorkshire piglets were divided equally into 2 groups (n=10). All piglets were intramuscularly primed at 4 weeks of age [0 week post prime inoculation (WPPI)] and were orally boosted at 6 weeks of age (2WPPI). Group A piglets were inoculated with sterile phosphate buffered saline as a control and group B piglets were inoculated with the combination vaccine. The serotypes 2- and 5-specific IgG concentrations were determined in serum samples by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). All piglets were challenged with the mixture of wild type APP serotypes 2 and 5 at 4 WPPI. Each serotype-specific serum IgG concentrations were significantly higher in group B piglets than in control group from 2 WPPI until the end of this study. No clinical signs were observed from group B piglets after the challenge, while only 60% of group B piglets were protected against APP infections. Overall, intramuscular inoculation with our novel vaccine candidate can be considered an efficient protective immunization procedure against APP infection.

The efficacy of the combination vaccine of formalin-inactivated *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), and the individual T- and/or C-terminal fragments of ApxIA, ApxIIA and ApxIIIA were evaluated in piglets. Fifty piglets were divided equally into 5 groups (n=10). All piglets were intramuscularly primed at 4 week-of-age [0 week post prime inoculation (WPPI)] and were intramuscularly boosted at 6 week-of-age (2 WPPI). Group A piglets were inoculated with sterile PBS and group B piglets were inoculated with formalin-inactivated APP only. Groups C, D and E piglets were inoculated with formalin-inactivated APP bacterins with the individual N-terminal fragments, the individual C-terminal fragments, and the individual N- and C-terminal fragments of ApxIA, ApxIIA and ApxIIIA, respectively. All proteins-specific IgG concentrations or titers by ELISA were significantly higher in groups C-E than group A from 2 WPPI until the end of this study. Clinical signs were observed from only 10% of groups C-E piglets after the challenge with the mixture of APP serotypes 1, 2 and 5 at 8 week-of-age (4 WPPI), while only 50% of groups A and B piglets were protected against APP infections. Overall, intramuscular inoculation with the combination of the bacterins and the recombinant fragments irrespective of the recombinant N- and/or C-terminal fragments of ApxIA, ApxIIA and ApxIIIA can efficiently protect piglets against APP infections.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Application -----	i
Summary in Korean -----	ii
Summary in English -----	xix
Contents in English -----	xxiii
Contents in Korean -----	xxv
Chapter 1. Introduction -----	1
1. Purpose of research -----	1
2. Necessity of research -----	3
3. Contents of research -----	5
Chapter 2. Present state of the technical development -----	8
1. International stage of the technical development -----	8
2. Technical level of the research team -----	9
Chapter 3. Contents of research and result -----	16
1. Annual plan of research -----	16
1) The first year -----	16
2) The second year -----	17
3) The third year -----	18
2. Methods and result -----	19
1) Preparation of progressive atrophic rhinitis-related genes -----	19
2) Construction of live vaccine for progressive atrophic rhinitis -----	21
3) Development of adjuvant for improved mucosal immune responses --	23
4) Preparation of each recombinant antigen -----	23
5) Confirmation of expressed each antigen from novel vaccine strains -	25
6) Vaccination condition of the new vaccine in mice -----	26
7) Vaccination with the mixture of the new vaccines in mice -----	36
8) Optimization of the new vaccine in mice -----	43
9) Virulence tests of bacteria isolates associated with respiratory diseases in Korean -----	49
10) Preliminary experiments for vaccine-challenge experiments -----	58

11) Assesment of safety and protection efficacy of live vaccine for progressive atrophic rhinitis in pregnant sows -----	60
12) Assesment of safety and protection efficacy of live vaccine for progressive atrophic rhinitis in piglets -----	69
13) Preparation of porcine pleuropneumonia-related genes -----	77
14) Preparation of recombinant Apx IA, Apx IIA, ApX IIIA, OmpA antigens of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> -----	77
15) Construction of live vaccine for porcine pleuropneumonia -----	79
16) Passage of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> isolate in mice -----	85
17) Assesment of safety of novel live vaccine for porcine pleuropneumonia in mice -----	86
18) Assesment of protection efficacy of live vaccine for porcine pleuropneumonia in mice -----	90
19) Optimization of the vaccine for porcine pleuropneumonia using mice -	97
20) Assesment of safety of novel live vaccine for porcine pleuropneumonia in pregnant sows -----	101
21) Assesment of protection efficacy of live vaccine for porcine pleuropneumonia in piglets -----	103
22) Optimization of the vaccine for porcine pleuropneumonia using pigs -	110
23) Comparative study between commercial vaccine and our vaccines -	114
24) Evaluation of safety in a farm -----	116
25) Assesment of safety of produced trial vaccine -----	118
26) Preparation of the commercialization of vaccine -----	122
 Chapter 4. Contribution to related field -----	 125
 Chapter 5. Achievement and plan for practical use -----	 128
 Chapter 6. Scientific information obtained -----	 132
 Chapter 7. Status of research facilities and equipment -----	 133
 Chapter 8. Lab safety management implementation performance -----	 134
 Chapter 9. Reference -----	 138

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	1
	제 1 절 연구개발의 목적 -----	1
	제 2 절 연구개발의 필요성 -----	3
	제 3 절 연구개발의 범위 -----	5
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	8
	제 1 절 국내외 기술개발 현황 -----	8
	제 2 절 본 연구팀의 선행기술 수준 -----	9
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	16
	제 1 절 연차별 세부과제별 연구개발의 목표 및 개요 -----	16
	1. 1차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 -----	16
	2. 2차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 -----	17
	3. 3차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 -----	18
	제 2 절 연구개발 수행방법 및 결과 -----	19
	1. 위축성 비염과 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신 개발을 위한 주요 병원성 인자 항원 발굴 및 유전자 확보 -----	19
	2. 특정 유전자가 제거된 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 동시 예방 생균 다가 백신 개발 -----	21
	3. 점막 면역 활성 adjuvant 개발 -----	23
	4. 해당 단백질 항원 확보 -----	23
	5. In vitro 상에서 개발된 백신 균주의 발현여부 확인 -----	25
	6. 실험동물에서의 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 각각의 생균 백신 후보균주의 안전성 및 면역 유도 실험 -----	26
	7. 실험동물에서의 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신 후보균주의 혼합접종 실험 -----	36
	8. 실험동물을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신의 최적화 실험 -----	43
	9. 국내 주요 호흡기 질병 원인균 분리 및 동정, 양돈장에서 분리된 병독성 호흡기 질병 원인균 병독성 시험 -----	49
	10. 목적 동물에서의 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신 예비 실험 -----	58
	11. 모돈에서 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신의 효능 및 백신의 안전성 실험 -----	60
	12. 자돈에서 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신의 효능 및 안전성 실험 -----	69

13. 홍막페렴 예방 생균 백신 개발을 위한 주요 병원성 인자 항원 발굴 및 유전자 확보 -----	77
14. 홍막페렴 주요 병원성 인자에 대한 각 단백질 항원 확보 -----	77
15. 병원성 유전자가 제거된 점막면역 활성 delivery system을 이용한 홍막페렴 예방 생균 백신 개발 -----	79
16. 홍막 페렴 예방 생균백신 생체 내에서의 병원성 획득 실험 -----	85
17. 마우스를 이용한 홍막 페렴 예방 생균백신의 안전성 실험 -----	86
18. 마우스를 이용한 홍막 페렴 예방 생균백신의 효능실험 -----	90
19. 실험동물을 이용한 백신의 최적화 실험 -----	97
20. 임신 모돈에서 홍막 페렴 백신의 안전성 실험 -----	101
21. 목적동물에서 홍막페렴 예방 생균 백신의 효능실험 -----	103
22. 돼지에서 백신의 효능을 향상시킬 점막 면역에 효과적인 adjuvant 개선 및 백신의 최적화 -----	110
23. 현장에서 위축성 비염, 파스튜렐라 페렴, 홍막페렴, 예방 생균 백신과 다른 상업용 백신과의 단순 효능 비교 실험 -----	114
24. 각 호흡기 질병이 유행하는 양돈장에서의 생균백신의 적용 -----	116
25. 백신의 안정성 확인 시험 -----	118
26. 백신의 제품화를 위한 전략수립 -----	122
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	125
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	128
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	132
제 7 장 연구시설·장비 현황 -----	133
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적 -----	134
제 9 장 참고문헌 -----	138

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구의 최종목표는 돼지에서 호흡기 질병에 의한 양돈가에서 경제적인 손실은 막대하다. 다양한 분야에서 최첨단 유전공학 기법에 기초한 점막면역 활성 delivery system을 이용한 다가 백신 개발에 관한 연구가 활발히 수행되고 있다. 본 연구의 목표는 국내에서 분리한 균주를 대상으로 최신 기법에 기초한 생균 delivery system을 이용하여 돼지에서 호흡기 질병 예방 백신을 개발하는 것이다. 또한 이들 생균 백신을 실험동물인 마우스 및 목적동물인 돼지에서 호흡기 백신의 효능과 안전성 그리고 백신의 부작용에 관한 연구를 수행하여 현장에서 적용할 수 있는 최첨단 백신을 개발하고자 한다.

산업 동물에 있어서 육성시기에 증체율 감소의 중요한 원인 중 하나가 바로 호흡기 질환이다. 이처럼 양돈 산업에 심각한 경제적 손실을 초래하는 세균성 호흡기 질환을 예방하기 위하여 전 세계적으로 효과적인 예방백신을 개발하고자 많은 심혈을 기울이고 있다. 호흡기 점막은 대다수의 호흡기 질환 유발 병원균과 처음으로 접하는 장소임과 동시에 이들 세균의 감염을 방어하는 최전방으로서 매우 중요한 곳이다. 하지만 기존 상용화 백신의 대부분은 주로 호흡기 질환 세균을 포르말린 등으로 불활화 시킨 사균백신을 오일이나 겔 등과 같이 적합한 면역증강제와 혼합한 형태이다. 이런 종류의 백신은 주로 근육으로 접종하기 때문에 점막에서의 방어보다는 systemic immunization에 중점을 두고 있다. 이런 systemic vaccine는 systemic 면역 유도는 높지만 점막에서의 항체 유도에는 별다른 영향을 주지 못해 점막에서의 항체 역가는 매우 낮아 병원균 방어에 실패하는 경우가 종종 발생하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 미국을 비롯한 선진국에서는 점막면역을 유도할 수 있는 백신 및 면역증강제 개발에 많은 연구가 진행 중에 있다. 하지만 아직까지 이는 사람의 질병 및 실험동물인 마우스를 대상으로 한 기초 연구가 주종을 이루고 있다.

본 발명은 우선 돼지에서 위축성 비염 병원체인 *Pasteurella multocida* type D와 *Bordetella bronchiseptica*의 주요 병원성 인자 (부착인자와 독소)와 파스튜렐라 페럼 병원체인 *P. multocida* type A의 주요 병원성 인자 (부착인자) 그리고 흉막페럼 원인체 중 국내에서 주로 분리되는 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 type 2와 5의 주요 병원성 인자를 SecA, SecB 그리고 LepB system을 이용하여 발현되는 항원의 분비를 증가시키도록 개발된 대장균 및 살모넬라균 shuttle vector인 pJOL44에 각각 삽입한다. 그 다음 이들 삽입된 각각의 plasmide를 약독화 *Salmonella* Typhimurium을 형질전환 시켜 live 백신으로 개발한다. 이들 형질 전환된 약독화 *S. Typhimurium* (살모넬라균)은 각 병원성 인자를 안정적으로 발현하여 돼지의 점막으로 분비시킴으로써 분비된 이들 항원에 대한 점막 및 전신 면역을 유도하여 위축성 비염과 파스튜렐라 및 흉막페럼을 예방할 수 있도록 개발된 예방백신이다.

더욱이 본 연구에서 백신 항원을 돼지의 점막으로 전달하도록 고안된 (delivery system) 약독화 살모넬라균은 *lon*과 *cpxR* 그리고 *asd* 세 유전자를 인위적으로 결실시킨 약독화 변이 균주이다. *lon* 유전자에 의해 발현되는 Lon protein은 많은 다른 protein들의 조절인자로서 이 유전자를 결실시키면 이 변이 균주는 숙주 세포내에서 장기간 생존이 힘들며 더불어

과산화수소 및 산성 환경에 대해 대단히 민감해지는 것으로 알려져 있다. 그리고 *cpxR* 유전자에 의해 발현되는 CpxR이 과발현 되면 상피세포로의 부착과 침입이 증가하게 된다. 따라서 이들 두 유전자가 결실된 변이 균주는 점막 상피 세포로의 부착과 침입력은 증가하지만 숙주세포에서의 증식은 감소하게 되어 결국은 면역원성은 높아지지만 병원성은 약해진 새로운 약독화 살모넬라균이 되어 백신으로서의 활용이 가능하게 된다. 또한 이 약독화 살모넬라균은 하나가 아닌 두 개의 유전자를 결실시키기 때문에 병원성 균주로 전환될 수 있는 기회는 매우 희박하다. 게다가 peptidoglycan 합성에 필요한 aspartate β -semialdehyde dehydrogenase (Asd)의 유전자가 결여된 살모넬라균은 diaminopimelic acid (DAP) 요구주로서 증식을 위해서는 배지에 DAP의 첨가나 이 유전자를 가진 plasmid의 형질전환이 필요하다. 그래서 *asd* 유전자를 갖고 있는 plasmid에 원하는 항원 유전자를 cloning한 후 이 변이 균주의 형질전환은 항생제 선택 marker를 사용하지 않고도 외래 단백질을 발현할 수 있는 전달계 (delivery system)로서 이용이 가능하다.

호흡기 질환은 양돈 산업에 막대한 경제적 피해를 초래하는 중요한 질병이다. 예전에는 돼지 주요 호흡기 질병 발생에 대해 하나의 감염균에 관심을 가졌었다. 하지만 최근에는 하나 이상의 감염균이 복합 작용하여 발생하고 있다. 하나의 병원균에 단독으로 감염된 경우에는 병의 경과가 농장 전체 경영에 큰 영향을 미칠 만큼 심각한 수준으로까지는 발전하지 않지만 복합 감염의 경우에는 그 증상과 경제적 피해 정도는 심각한 수준으로까지 발전하는 경향이 많다. 그중에서도 특히 돼지 호흡기 복합 감염증 (porcine respiratory disease complex; PRDC)은 최근 전 세계적으로 양돈 산업에서 있어 주요 관심사로 많은 연구가 진행 중에 있다. 이 PRDC는 세균, 바이러스, 불량한 사육 환경, 부적절한 관리, 스트레스, 면역력 감소 등의 원인이 상호 복합적으로 작용하여 발생하는 호흡기 질병으로 성장기 자돈에서 흔히 발생하여 이 질병으로 인해 폐사하거나 또는 성장 지연 및 사료효율 저하 등으로 인한 출하시기를 늦추는 등 경제적으로 막대한 손실을 초래하고 있다. PRDC와 관련된 주요 세균성 원인균으로는 유행성 폐렴 (*Mycoplasma hyopneumoniae*), 돼지 흉막 폐렴 (*Actinobacillus pleuropneumonica*), 글래씨병 (*Haemophilus parasuis*), 위축성 비염 (*Bordetella bronchiseptica*), 파스튜렐라 폐렴 (*Pasturella multocida*) 등이 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이들 세균의 복합감염으로 인해 이 질병의 통제를 위한 분만사 관리 등에는 한계가 있으며 치료에 사용될 수 있는 항생제는 내성균 출현 등 부작용을 안고 있다. 따라서 이에 대한 효과적인 대안 책으로 백신 개발 연구가 활발히 진행되고 있다.

이번 연구에서는 국내 돼지에서 발생하는 주요 세균성 호흡기 질병의 원인균의 분포와 유전적 특징을 조사할 것이다. 더불어 대다수의 병원균은 부착인자 (adhesins)를 이용하여 점막에 부착하여 독소를 분비함으로써 질병 유발이 시작되기 때문에 이들 부착인자와 독소는 면역원성이 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 국내 분리주를 대상으로 각 호흡기 관련 병원균에서의 부착 인자와 독소에 대한 분포를 조사하여 백신 개발을 위한 항원으로 발굴하여 이들 항원 확보를 위한 cloning과 약독화 살모넬라균을 delivery system을 이용하여 돼지 호흡기 질병 예방 백신을 개발하고자 한다. 이렇게 개발된 백신을 우선 실험동물인 마우스를 대상으로 백신 효능에 대한 기초 실험을 수행하여 획득한 정보를 활용하여 목적동물인 후보돈과 비육 말기 자돈에서 백신 효능에 대한 실험을 수행하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성 및 중요성

1. 연구개발의 필요성

가. 호흡기 질병 예방용 mucosal vaccine 및 경구 접종 용 adjuvant 개발.

동물에 있어 출하 지연 및 증체율 감소는 주로 호흡기 질환에 의해 기인한다. 특히 육성돈에서의 호흡기질환으로 인한 식욕감퇴 및 증체율 저하는 양돈 산업에 막대한 경제적 손실을 초래하는 중요한 질병이다. 본 질병을 예방하기 위해서는 예방 백신의 접종 과 더불어 철저한 위생관리에 힘써야 한다. 물론 백신 접종이 질병을 100% 차단하지는 못하지만 백신을 접종 할 경우 접종하지 않은 경우에 비해 발병율이 현저하게 감소하고 병소의 크기나 정도를 약화시키며 치료시에도 효율을 증진시킬 뿐만 아니라 성장지연의 예방과 더불어 폐사율도 낮출 수 있기 때문에 예방접종은 반드시 실시해야 한다. 이처럼 산업 동물에 심각한 경제적 손실을 초래하는 세균성 호흡기 질환을 예방하기 위하여 전 세계적으로 효과적인 예방백신을 개발하고자 많은 심혈을 기울이고 있다. 호흡기 점막은 대다수의 호흡기 질환 유발 병원균과 처음으로 접하는 장소임과 동시에 이들 세균의 감염을 방어하는 최전방 방어 line으로서 매우 중요한 곳이다. 하지만 기존 상용화 백신의 대부분은 주로 병원성 대장균을 포르말린으로 불활화 시킨 사균백신 이거나 유전자 조작 기술을 이용하여 항원성이 높은 항원을 순수하게 정제한 항원을 오일이나 껌 등 적합한 면역증강제와 혼합한 형태이다. 이런 종류의 백신은 근육으로 접종하기 때문에 점막에서의 방어보다는 systemic immunization에 중점을 두고 있다. 이런 systemic vaccine은 systemic 면역 유도는 높지만 점막에서의 항체 유도에는 별다른 영향을 주지 못해 점막에서의 항체 역가는 매우 낮아 병원균 방어에 실패하는 경우가 종종 발생하는 것으로 보고되고 있다.

나. 현장에서 활용 가능한 점막면역반응 delivery system을 이용한 다가백신 개발.

유럽 및 미국을 비롯한 선진국에서는 점막면역을 유도할 수 있는 백신 및 면역 증강제 개발에 많은 연구가 진행 중에 있다. 하지만 아직까지 이는 사람의 질병 및 실험동물인 마우스를 대상으로 기초 연구가 주종을 이루고 있다. 최근에는 수의학분야에서도 일부의 질병에 대해서 특히, 조류 및 돼지를 대상으로 점막면역에 대한 연구가 수행 중에 있다. 그렇지만 아직 국내 외적으로 연구실 수준의 연구가 진행 되고 있을 뿐 현장에서는 아직 활용되지 못하고 있다.

다. 사용이 간편한 경구투여용 다가 백신 개발.

위축성 비염 및 파스튜렐라성 폐렴 그리고 흉막폐렴은 돼지에서 주로 급성 폐사 및 만성 질환 등 다양한 감염을 일으키는 병원체로서 이들은 주로 독소에 의해 폐포 대식구 및 호중구를 파괴하여 질병을 악화시킨다. 독소와 다름이 세균이 숙주 세포에 부착하는데 사용하는 모든 인자를 adhesin이라하며 이에 세균의 fimbria와 같은 세포 표면 단백질이 포함되어 있다. 세균은 이들 adhesin을 이용하여 숙주의 점막 세포 표면에 안정적으로 부착하여 증식을 시작하면서 질병을 일으킨다. 따라서 이들 병원성 세균의 adhesin 및 독소에 대한 면역반응이 유도 된다면 세균에 감염되었을 경우 유도 항체가 이들 adhesin 및 독소와 결합하여 세균이 숙주의 점막 표면에 부착하여 증식할 수 있는 기회를 미연에 차단함과 동시에 독소에 대식구와

호흡기의 파괴를 미연에 방지함으로써 병원성 세균에 의한 호흡기 질병 발생을 예방할 수 있을 것이다.

2. 연구의 중요성

가. 세균성 호흡기 질병 예방을 위한 점막면역반응 유도를 위한 생균 백신 및 점막면역용 adjuvant 개발.

산업 동물에 있어서 육성시기에 증체율 감소의 중요한 원인 중 하나가 바로 호흡기 질환이다. 이처럼 양돈 산업에 심각한 경제적 손실을 초래하는 세균성 호흡기 질환을 예방하기 위하여 전 세계적으로 효과적인 예방백신을 개발하고자 많은 심혈을 기울이고 있다. 호흡기 점막은 대다수의 호흡기 질환 유발 병원균과 처음으로 접하는 장소임과 동시에 이들 세균의 감염을 방어하는 최전방으로서 매우 중요한 곳이다. 하지만 기존 상용화 백신의 대부분은 주로 호흡기 질환 세균을 포르말린 등으로 불활화 시킨 사균백신을 오일이나 겔 등과 같이 적합한 면역증강제와 혼합한 형태이다. 이런 종류의 백신은 주로 근육으로 접종하기 때문에 점막에서의 방어보다는 systemic immunization에 중점을 두고 있다. 이런 systemic vaccine은 systemic 면역 유도는 높지만 점막에서의 항체 유도에는 별다른 영향을 주지 못해 점막에서의 항체 역가는 매우 낮아 병원균 방어에 실패하는 경우가 종종 발생하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 미국을 비롯한 선진국에서는 점막면역을 유도할 수 있는 백신 및 면역증강제 개발에 많은 연구가 진행 중에 있다. 하지만 아직까지 이는 사람의 질병 및 실험동물인 마우스를 대상으로 한 기초 연구가 주종을 이루고 있다. 최근에는 수의학분야에서도 일부의 질병에 대해서 특히, 조류 및 돼지를 대상으로 점막면역에 대한 연구가 수행 중에 있다. 그렇지만 아직 국내외적으로 연구실 수준의 연구가 진행 되고 있을 뿐 현장에서는 아직 활용되지 못하고 있는 실정이다.

나. 현장에 적용 가능한 점막면역 백신 delivery system을 이용한 다가 백신 개발.

점막 면역 반응을 유도하기 위해서는 점막에서 면역 반응을 직접 유도할 수 있는 생균 백신의 개발이 필요하다는 것은 주지의 사실이다. 따라서 국내에서 분리된 살모넬라균주를 이용하여 주요 병원성 인자를 최첨단 유전 공학 기법을 이용하여 제거시킴으로써 약독화 시킨 후 주요 세균성 호흡기 질병 유발 세균의 주요 독소 및 부작용인자를 발현 하도록 하여 호흡기 점막에서 이들 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 백신을 개발하고자 한다.

다. 사용이 간편한 경구투여용 다가 백신 개발.

현재 시판되고 있는 대다수의 백신은 근육 접종을 실시함으로써 전신 면역반응을 유도하는 백신 체계를 유지하고 있다. 하지만 근육 접종을 실시할 경우에는 수의사와 같은 전문 인력내지는 숙련된 노동자와 보정인력 등 많은 노동력이 필요하다. 또한 돼지 등 그 대상동물은 근육 접종에 따른 고통 및 비숙련가에 의한 잘못된 접종으로 인한 부종, 발열, 다른 세균의 오염 등과 같은 부작용이 나타나기도 한다. 따라서 숙련가가 필요하지 않은 경구접종으로의 백신 접종 개발은 양돈가 뿐만 아니라 축산 농가 모두의 바램이다. 따라서 약독화 살모넬라에 의한 생균 백신은 경구 접종이 가능하도록 디자인되어 있어 경구접종에 따른 노동력 감소를 통해 양돈가의 국제 경쟁력을 높일 수 있다.

제 3 절 연구개발의 범위

돼지에서 주요 호흡기 질병인 위축성 폐렴, 파스튜렐라 폐렴 및 흉막 폐렴을 예방하기 위해 최첨단 유전 공학 기법에 기초한 delivery system을 이용하여 이들 질병을 유발하는 병원체를 동시에 예방할 수 있는 백신을 개발하여 실험동물 및 목적동물에서의 백신의 안전성과 효능에 관한 실험을 수행하여 현장에서 적용 가능한 접종경로와 제조방법을 최적화 하고자 한다. 세부과제별 연구범위는 아래와 같았다.

[제1세부과제] : 돼지에서 유전공학 기법을 이용한 주요 세균성 호흡기 질병 예방 생균 백신 개발

최종목표	돼지에서 유전공학 기법을 이용한 주요 세균성 호흡기 질병 예방 생균 백신 개발
------	---

1차년도	2차년도	3차년도
<ul style="list-style-type: none"> 특정유전자가 제거된 점막면역 활성화 delivery system을 이용한 위축성 비염과 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신 개발 Western blot을 이용한 발현 항원의 확인 상업용 vector 및 host를 이용하여 해당 병원성 단백 항원 확보를 위한 cloning 및 형질전환 	<ul style="list-style-type: none"> 모든에서 점막면역 활성화 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신의 안전성 실험 모든에서의 점막면역 활성화 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신의 예방 효능 실험 병원성 유전자가 제거된 점막면역 활성화 delivery system을 이용한 흉막 폐렴 예방 생균 백신 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 모든에서 delivery system을 이용한 흉막 폐렴 예방 생균 백신의 효능 및 백신의 안전성 시험 위축성 비염, 파스튜렐라 폐렴, 흉막폐렴 예방 생균 다가 백신의 현장에서의 다른 상업용 백신과의 비교실험

돼지에서의 주요 세균성 호흡기 질병 예방 생균 다가 백신의 개발과 백신의 안전성 및 효능 시험

[제2세부과제] : 실험동물에서 주요 호흡기 질병 예방을 위한 생균 백신의 안전성 및 효능 시험과 최적화

최종목표	실험동물에서 주요 호흡기 질병 예방을 위한 생균 백신의 안전성 및 효능 시험과 최적화
------	---

1차년도	2차년도	3차년도
<ul style="list-style-type: none"> • 국내 주요 호흡기 질병 원인균 확보 • 점막면역 활성 adjuvant 개발 • 실험동물에서의 위축성 비염과 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신의 안전성 및 효능 시험 	<ul style="list-style-type: none"> • 홍막폐렴 예방 생균 백신 개발을 위한 주요 병원성 인자 항원 발굴 및 유전자 확보, 단백질 발현 및 정제 • 마우스를 이용한 홍막폐렴 예방 생균 백신의 안전성 및 효능시험 • 실험동물에서의 홍막 폐렴 예방 생균 다가 백신의 최적화 시험 	<ul style="list-style-type: none"> • 돼지 실험을 통한 점막면역 활성 adjuvant 개선 • 돼지에서 호흡기 생균 다가백신의 최적화

실험동물에서 주요 호흡기 질병 예방을 위한 생균 백신의 효능 시험 및 최적화를 통한 목적동물에서의 활용 정보 제공

[제1협동과제] : 점막면역 활성 delivery system을 이용한 주요 세균성 호흡기 질병 예방을 위한 다가 백신의 현장 적용

최종목표	점막면역 활성 delivery system을 이용한 주요 세균성 호흡기 질병 예방을 위한 다가 백신의 현장 적용
------	--

1차년도	2차년도	3차년도
<ul style="list-style-type: none"> • 국내 주요 호흡기 질병 원인균 분리 및 동정 • 양돈장에서 분리된 병독성 호흡기 질병 원인균의 돼지에서 LD₅₀ 량 결정 실험 • 위축성 비염과 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신 개발을 위한 면역원성이 우수한 항원 발굴 및 유전자 확보 • 면역 반응 측정을 위한 단백 항원 발현 및 정제 	<ul style="list-style-type: none"> • 후보돈에서의 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신의 예비실험 • 자돈에서의 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위축성 비염과 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신의 효능 실험 및 백신의 안전성 실험 	<ul style="list-style-type: none"> • 자돈에서의 점막면역 활성 delivery system을 이용한 흉막폐렴 예방 생균 다가 백신의 효능 및 백신의 안전성 실험 • 생균 호흡기 백신의 현장 적용 실험

돼지에서 점막면역 활성 delivery system에 기초한 호흡기 질병 예방 백신의 산업화

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황

1. 돼지에서 위축성 비염, 파스튜렐라 폐렴, 흉막폐렴을 예방하기 위해서 재조합 subunits 백신과 불활화 균체를 이용한 백신 개발 및 실용화에 대한 연구

최근 주요백신 연구 및 제품화 현황			
연구기관, 국가	내용	결과	제품화 현황
Faculty of Veterinary Medicine, University of Gent, Belgium	재조합 Apx II, TbpB, CysL, OmlA (1), OmlA (2) subunit 백신 (Van Overbeke et al., 2001)	도전감염 후 부분 방어가 인정	Novartis Animal Health사 제출
Faculty of Veterinary Medicine, University of Gent, Belgium	추출된 Apx I, Apx II, Apx III 그리고 outer membrane proteins (Chiers et al., 1998)	도전감염 후 부분 방어가 인정	Intervet 사 제품
Tokai University School of Medicine, Japan	swine leukocyte antigen (SLA) and Toll-like receptor (TLR)을 돼지 흉막 폐렴 예방 백신 개발에 이용 (Shinkai et al., 2012)	돼지에서 백신 개발에 효과적인 면역증강제로 활용 가능성 시사	연구 진행 중
University of Veterinary Medicine Hannover, Germany	Apx II toxin을 이용한 DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) 백신 (Maas et al., 2006)	도전 감염 후 부분 방어 인정	연구실 수준에서 진행
Chonnam National University, Republic of Korea	독소의 N-터미널 부분을 발현하는 약독화 파스튜렐라균을 이용한 생균 백신 (Seo et al., 2010)	강력한 면역 반응과 도전 감염 균에 대해서 효과적으로 방어 효과가 인정	실험실 수준에서 연구 수행
National Chung Hsing University, Taiwan	파스튜렐라의 재조합 subunit 독소 항원과 불활화 균체를 함유한 백신 (Hsuan et al., 2009)	백신접종 후 유효한 항체 역가 증가	도전감염 없이 필드 실험 수행
National Chung Hsing University, Taiwan	재조합 subunit 파스튜렐라 독소를 함유한 백신 (Liao et al., 2006)	위축성 비염을 예방을 위한 subunit 백신 개발에 정보 제공	실험실 수준에 연구 진행

2. 국내의 연구 현황

- 성균관대학교 생명공학연구소 이정민 교수 연구팀에서는 위축성 비염의 한 원인체인 *Pasteurella multocida* type D를 대상으로 돼지 위축성 비염 단위 백신을 개발하기 위해 재조합 파스튜렐라 독소 단백질의 면역원성을 마우스를 이용하여 검증하였다.
- 서울대학교 수의과대학 유한상 교수팀에서 최근에 흉막 폐렴 병원체의 주요 병원성 인자 중에서 병원성과 밀접하게 관련이 있는 독소 (Apx IA, Apx IIA, Apx IIIA)를 과발현시켜 이의 정제 항원을 백신으로 이용하고자 과발현에 대한 연구를 수행하였다. 더불어 돼지에서 호흡기 질병을 동시에 예방하기 위해 난황항체에서의 면역 반응 유도 여부와 항

체 역가의 변화를 관찰하였다.

- 전남대학교 수의과대학 이재일 교수팀에서 최근 대장균에서의 흉막폐렴균 독소 Apx I과 Apx II의 대량 발현에 관한 연구를 수행하였다.

제 2 절 본 연구팀의 선행기술 수준

1. 선행 주요 연구 내용

가. 돼지에서 위축성 비염 및 파스튜렐라 성 폐렴 유발 국내 분리주를 대상으로 주요 병원성 인자 유전자 확보

나. 실험에 사용된 균주와 플라스미드

이 실험에서 사용된 *Escherichia coli* Top10, *E. coli* BL21, *E. coli* χ 232는 재조합된 adhesin antigen들을 발현시키기 위하여 사용되었다. 약독화된 *S. Typhimurium*, JOL912는 wild type *S. Typhimurium*, JOL401로부터 *lon*, *cpxR*, *asd*가 제거되었으며 제조방법은 이전 실험에 기술되어있다. 플라스미드 pQE31, pET28a는 개별 항원들의 adhesin antigen들을 발현시키기 위해 사용되었으며 pBP244는 살모넬라 내 발현된 heterologous antigens의 분비향상을 위하여 *lepB*, *secA*, *secB*의 결합을 통한 Asd⁺ plasmid pYA3493으로부터 제조되었다. pMMP65는 항원의 발현 확인을 위한 플라스미드로 사용되었다. 모든 실험에 사용된 균주와 플라스미드는 37°C Luria-Bertani broth (LB; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, U.S.A.) 또는 LB agar에서 배양되었으며 JOL912와 같은 JOL912로 형질 전환된 각 항원의 백신균주의 경우 적절한 시기에 Asd-negative bacteria의 배양을 위해 Diaminopimelic acid (DAP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.)을 첨가하였다. 도전 감염을 위해 사용된 야외 균주 JOL976, JOL977, JOL978은 수의과학검역원에서 받아 보관하여 실험에 사용되었다.

다. 실험에 사용하기 위한 단백질 준비

시판되는 발현용 vector (pQE31와 pET28a)와 host (*E. coli* TOP10과 *E. coli* BL21)를 이용하여 각 해당 유전자를 발현용 vector에 삽입한 후 해당 host에 transformation 시켜 단백질 발현 균주를 확보하였다. 각 colony를 각 발현 vector에 맞는 항생제가 첨가된 LB broth 5ml에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 배양된 균액 중 1ml를 LB broth 200ml에 접종하여 30°C에서 150rpm의 속도로 흔들어 주면서 하룻밤 배양하였다. 이 배양액에 IPTG의 최종농도가 1mM이 되도록 첨가하여 같은 조건으로 4시간 재배양하였다. 이 배양액을 8,000rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 침전물은 phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)가 1mM이 되도록 첨가된 10ml의 멸균 PBS로 재부유시킨 다음 -70°C에서 냉동하였다. 냉동된 부유액을 다시 37°C water bath내에서 해동한 다음 -70°C에서 냉동하기를 2 ~ 3회 반복하였다. 마지막으로 해동한 후 부유액을 초음파처리하여 cell들을 분쇄한 다음 15,000rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액을 멸균 관에 옮겼다. 발현 단백질이 가용성일 경우에는 Buffer B (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 8.0) 4ml를 상층액과 혼합하였고 불용성일 경우에는 6ml의 Buffer B로 침전물을 재부유시킨 후 실온에서 1시간 동안

교반하면서 반응시켰다. 이 반응액을 15,000rpm, 4°C에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 resin이 들어 있는 관으로 옮겨 단백질이 resin과 결합하도록 30분간 교반하였다. 이 반응액을 준비된 column에 충전시키고 천천히 흘려보냈다. 흘려보낸 이 액으로 column을 재충전한 다음 다시 천천히 흘려보냈다. 반응액을 흘려보낸 다음 Buffer C (100mM NaH_2PO_4 , 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 6.3) 6ml로 column을 3회 세정하여 resin과 결합하지 않은 기타 불필요한 단백질을 제거하였다. Elution buffer (100mM NaH_2PO_4 , 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 4.5) 2ml로 column을 충전시킨 후 20분간 반응시켜 발현 단백질을 resin으로부터 분리시킨 다음 elution buffer를 1ml씩 첨가하여 단백질을 회수하였다.

라. 항원 발현용 균주 제작

제작된 백신 균주가 해당 adhesin 및 toxin을 발현하여 세포 밖으로 분비하는지를 확인하기 위하여 각 백신 후보균주(CP39, PtfA, FimA, ToxA)를 100ml LB broth에 하룻밤 배양 한 후 7,000 rpm에서 원심분리하여 상청액과 침전물 sample을 준비하였다. 상청액은 ice-cold 10% trichloroacetic acid (TCA)로 처리하여 세포 밖으로 분비된 발현항원을 검출하였다. 각 sample은 94°C에서 5분간 boiling 한 후 SDS-PAGE한 다음 PVDF membrane으로 옮겨 blocking buffer (3% skim milk in PBS containing 0.1% Tween-20)로 하룻밤 반응시켰다. 다음 날 준비한 각 adhesin에 대한 항혈청을 1:500내지는 1:1,000으로 희석하여 1시간 반응시킨 후 1:40,000으로 희석된 2차 항체 (goat anti-mouse IgG(H+L) HRP)로 1시간 반응시켰다. WEST-one™ Western Blotting System (Intron Biotechnology, Korea)으로 발색하여 발현을 확인하였다.

마. 백신 접종용 균주 제작

각 후보 항원인 CP39, ptfA, fimA, toxA, F1-P2을 pBP244와 pMMP65를 국내 분리주인 *S. Typhimurium*으로부터 개발된 약독화 *S. Typhimurium* delivery system에 클로닝한 후 항원의 발현 및 분비 여부를 Western blot 방법으로 확인하였다. 발현이 확인된 각 vector와 pBP244를에서 제시한 제한효소로 절단한 후 agarose gel에서 전기영동하였다. AccuPrep gel purification kit를 이용하여 agarose gel로 부터 절단된 adhesin과 pBP244 절편을 정제하고 T4 DNA ligase를 이용하여 4°C에서 하룻밤 ligation하였다. 이 ligation 된 반응액으로 *E. coli* Top10을 형질전환시켜 DAP을 첨가하지 않은 LB agar에 골고루 퍼서 말린 다음 하룻밤 배양하여 pBP244에 의하여 형질전환 된 균주를 선택하였다. 각 adhesin의 확인은 *E. coli* Top10으로부터 plasmid를 분리하여 각 adhesin에 해당하는 제한 효소로 절단한 후 agarose gel에서 전기 영동하여 최종 확인하였다. 위에서 최종 확인된 각 정제 plasmid를 electroporation방법에 의하여 JOL912에 형질전환시켜 PM1665, CP39, fimA, ptfA, toxA, F1-P2를 얻었다. 즉, JOL912를 DAP (50µg/ml)이 포함된 LB broth에서 mid-log phase까지 배양한 후 멸균된 ice-cold 10% glycerol 함유 증류수로 두 번 세척하였다. 준비된 JOL912를 0.2 cm cuvette에 넣고 플라스미드 0.1 µg과 섞은 후 Bio-Rad MicroPulser (Bio-Rad, USA)의 Pre-Programmed Settings 중 Ec2에 따라 전기충격을 가하였다. 반응 된 균을 cuvette에서 회수한 다음 DAP을 넣지 않은 LB broth 1ml를 첨가하여 1시간 동안 37°C에서 배양하였다. 형질전환 된 살모넬라 균을 선별하기 위해 배양된 균액 100µl를 다시 DAP을 첨가하지 않은 LB agar에 골고루 퍼서 말린 다음 37°C에서 하룻밤 배양한 후 형성된 균주를 선별하였다.

바. Western blot에 의한 목적 항원 발현 확인

각 제조된 백신 후보균주를 LB broth에 overnight culture 한 후 원심 분리하여 supernatant와 pellet sample을 준비한다. supernatant는 10% trichloroacetic acid로 얼음 위에서 하룻밤 반응시켜 SDS-PAGE sample buffer로 부유시켜 94°C에서 5분간 boiling 한 후 SDS-PAGE한 다음 PVDF membrane에 transfer한 후 blocking buffer (3% skim milk in PBST)로 overnight 반응 시킨 다음 각 항원에 대한 토끼의 polyclonal 항체를 1:500으로 희석하여 1시간 반응 시킨다. 2차 항체 (goat anti-rabbit IgG(H+L) HRP)를 1:40,000으로 희석하여 1시간 반응시킨 후 develop 하여 발현을 확인하였다.

Western blot으로 발현이 확인된 JOL1300, JOL1301, JOL1302, JOL1303, JOL1304 5 균주를 백신 후보 균주로 사용하였다.

사. 경구 접종용 생균백신 준비

각 adhesin의 발현이 확인된 약독화 살모넬라균을 LB Broth에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후 새로운 LB Broth에 1:20의 배율로 첨가되어 37°C에서 optical density (OD)600가 0.8이 될 때까지 배양되었다. 배양된 균주들은 4,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였으며, 침전된 균주들은 멸균 phosphate-buffered saline (PBS)로 재부유되어 같은 조건으로 재 원심분리 하였다. 침전된 균주는 sucrose가 20%가 되도록 첨가된 PBS (PBS-sucrose)로 각 항원을 발현하는 균주들은 2.0×10^9 colony-forming units (CFU)/ml가 되도록 재 부유시켰다. 생균이 제조된 당일에 마우스는 구강으로 접종되었다.

아. 백신접종

5주령의 BALB/c female mice를 각 Group별로 5마리씩 구입하여 약 1주일 동안 사육 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다.(Daofeng et al., 2008; Arvindhan et al., 2009). 실험 군은 크게 경구 접종군과 비강 접종군으로 나누어져 있으며 각 군은 개별 항원 별로 경구 접종 및 비강 접종하였다. 경구 접종 마우스는 각 항원 별로 15마리와 대조군 15마리가 실험에 사용하였으며 이들은 개별접종을 시행하였다. 1차 접종 시에는 LTB 발현 CK110(JOL906) 과 함께 접종하였다. 즉, PBS-sucrose $20\mu\text{l}$ 에 JOL906 균수가 4×10^8 CFU이 되게 그리고 각 항원 발현 백신 균주의 수가 16×10^8 CFU가 되도록 혼합하여 제조 당일에 접종하였고 2차 접종 시에는 LTB 발현 균주를 제외한 각 항원 발현 균주만 접종 하였다. 비강 접종 마우스는 각 항원 별로 10마리와 대조군10마리가 실험에 사용되어졌으며 항원당 개별 접종을 시행하였다. 1차 접종 시 개체 당 멸균 된 PBS로 부유시킨 생균백신 $7\mu\text{l}$ 와 점막면역 adjuvant(LTB) $3\mu\text{l}$ 의 혼합액 총 $10\mu\text{l}$ 내 1×10^5 CFU접종하였고, 2차 접종 시엔 점막면역 adjuvant(LTB)를 제외한 멸균 된 PBS 부유 시킨 생균 백신만을 비강 접종하였다. 비강 접종시 경구접종과 마찬가지로 1차 접종 시에는 LTB 발현 CK110 와 같이 접종 하였다. 즉, PBS $1\mu\text{l}$ 에 JOL906(JOL906) 균수가 2×10^4 CFU,그리고 각 항원 발현 백신 균주의 수가 8×10^4 CFU이 되도록 혼합하여 제조 당일에 접종하였으며 2차 접종 시에는 LTB 발현 균주를 제외한 각 항원 발현 균주만 접종하였다. 이때 비강접종 시 접종의 정확도와 실험동물의 안전을 위해 마취한 뒤에 접종을 시행하였다.

자. 분변 채취

접종 전, 1차 접종 후 3주와 2차 접종 후 3주, 6주 쯤에 각각 그룹별로 분변을 모아 무게를 잰 후 sodium azide가 0.1% 함유된 PBS로 100mg/ml이 되도록 부유시킨 후 -80°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

차. 질 분비물 채취

위와 같은 시기에 멸균 PBS (pH7.2) 100 μ l를 질내로 투입 후 micropipet을 사용하여 회수하여 -80°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

카. 채혈

위와 같은 시기에 각각 채혈하여 혈청을 분리 -80°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

타. 효소면역측정법을 통한 면역반응 측정

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)는 혈청, 분변, 질분비물을 대상으로 IgG 및 sIgA에 대한 항체 역가를 측정하였다. (Eo et al. 2005, Chen and Schifferli 2000). IgG는 마우스에 oral 및 intranasal immunization(IN) 후에 각 항원에 대해 형성된 항체의 역가를 측정하기 위한 목적으로 마우스 혈청에서 측정이 되었으며 ELISA로 IgG의 역가를 측정하였다. sIgA는 마우스에 immunization 후에 형성된 mucosal 및 systemic immune response 중 mucosal immune response를 확인하기 위한 실험으로 대상은 분변 및 질 세척액을 대상으로 하여 ELISA로 sIgA의 역가를 측정하였다. 백신 접종 후 형성된 면역 반응을 측정하기 위한 ELISA 항원은 정제를 하여 농도 측정을 한 뒤 -70°C에 보관하며 실험에 사용하였다. mouse IgG 또는 IgA ELISA Quantitation kit (Bethyl Lab Inc, Montgomery, TX, USA)를 사용하여 제조회사의 사용설명서에 따라 표준 ELISA)를 수행하여 혈청에서 IgG를, 분변과 질분비물에서 secretory IgA (sIgA)를 측정하였다. IgG와 IgA를 측정하기 위해 혈청은 1:200으로 희석되었고 sIgA를 측정하기 위해 분변과 질 분비물에서 1:3으로 희석되었다. 그리고 o-phenylenediamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 발색 시킨 후 492nm에서 흡광도가 측정되었다.

2. 선행 연구 결과

가. 돼지에서 위축성 비염은 주로 *Bordetella bronchiseptica*와 *Pasteurella multocida* serotype D에 의해 유발되며 파스튜렐라 폐렴은 *Pasteurella multocida* serotype A에 의해 주로 야기된다. 따라서 *Pasteurella multocida* serotypes의 주요 공동 부착인자와 위축성 비염 또는 파스튜렐라 유발과 밀접한 관련이 있는 독소 등 주요 병원성 인자인 PtfA, FimA, CP39 그리고 ToxA 유전자를 국내에서 분리된 균주로부터 확보하였다.

나. Transformation된 균주 중 Western blot에 의해 supernatant에서 항원 발현이 확인된 총 5균주를 백신 후보주로 결정하였다. Western blot에 의한 백신 후보 균주들로부터 위축성 비염과 파스튜렐라 폐렴에 관련된 CP39, fimA, ptfA, toxA 발현 및 분비를 확인 하였다. (그림 1) 백신 후보 균주들로부터 CP39, fimA, ptfA, toxA, F1-P2 adhesin 항원의 분비를 확인하기 위

해 TCA-침전법을 이용한 Western blot 방법이 수행되었다. CP39는 39kDa, fimA는 36kDa, ptfA는 18 kDa 그리고 toxA은 22kDa에서 각각 관찰되었다.

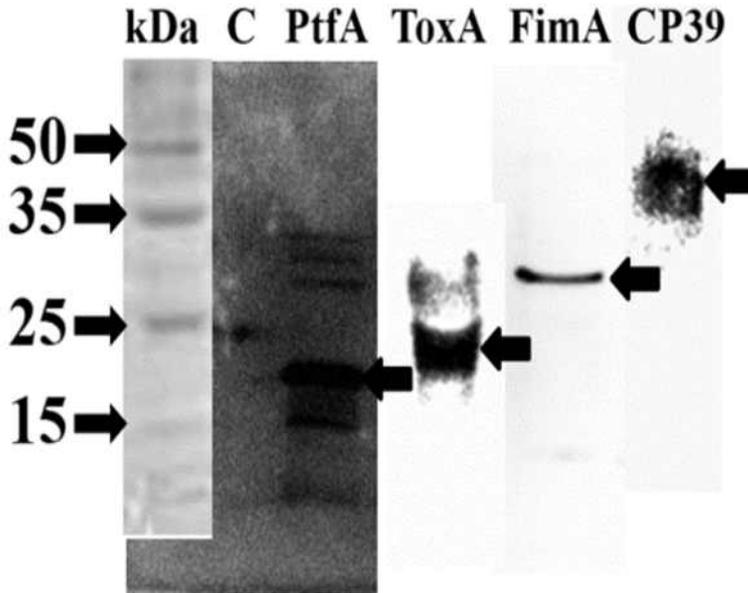


그림 1. Identification of secreted recombinant FimA, PtfA, ToxA and CP39 antigens using Western blot analysis. Each recombinant FimA, PtfA, ToxA and CP39 antigens expressed and secreted by each JOL912 was detected via Western blot using the appropriate antigen-specific antibodies.

다. 경구접종에서 IgG의 경우 각 CP39, PtfA, FimA, F1-P2 항원에서의 백신 접종군의 IgG는 백신접종 후 1차 접종 후 3주, 2차 접종 후 3주와 6주차에서도 대조군에 비해 최소 1.5배 이상의 항체 역가가 유지되는 것을 관찰되었다. 그리고 ToxA 항원에서는 1차 접종 한 후 3주차, 2차 접종 후 3주차에서만 항체역가가 유지되는 것이 관찰되었다 (그림 2).

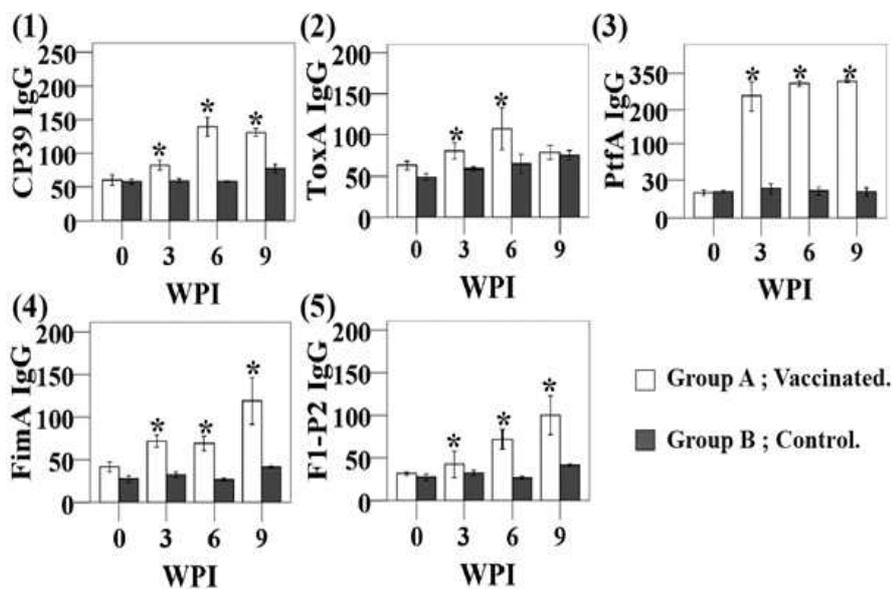


그림 2. Serum IgG (ug/ml) titers against CP39, ToxA, PtfA, FimA and F1-P2 fimbrial antigens in mice orally immunized with the vaccine candidates. (1) CP39-specific IgG; (2) ToxA-specific IgG; (3) PtfA-specific IgG; (4) FimA-specific IgG; (5) F1-P2-specific IgG. Data are the means of all mice in each group; error bars show the standard deviations (SD). Asterisks indicate a significant difference between the values of the groups immunized with the vaccine candidate ($*P \leq 0.05$) and those of the control group. Serum IgG titers to CP39 fimbrial antigen showed similar patterns PtfA, FimA and F1-P2 fimbrial antigens. ToxA fimbrial antigen showed difference pattern.

sIgA의 경우에는 백신 접종 군에서 PtfA 항원은 1차 접종 후 3주차 2차 접종 후 3주에 증가되어 6주차에 유지하여 대조군에 비해 최소 1.5배 이상의 항체 역가가 관찰되었다. 항원 FimA와 F1-P2에서는 2차 접종 후 3주차에 증가되어 6주차에 유지되며 대조군보다 최소 1.5배 이상의 항체역가가 관찰되었다. 항원 CP39의 경우 1차 접종 후 3주차에 증가되어 항체역가가 떨어지는 것이 관찰되었으며, 항원 ToxA의 경우엔 2차 접종 후 6주차에 증가되어 항체역가가 떨어지는 것이 관찰되었다. 이는 대조군에 비해 최소 1.5배 이상의 항체 역가가 관찰되었다. 1차와 2차 모두 경구로 접종한 백신 접종 군에서 전신 및 점막에서의 항체 역가가 대조군에서의 항체 역가 보다 높거나 같은 수준으로 관찰되었다 ($P < 0.05$) (그림 3).

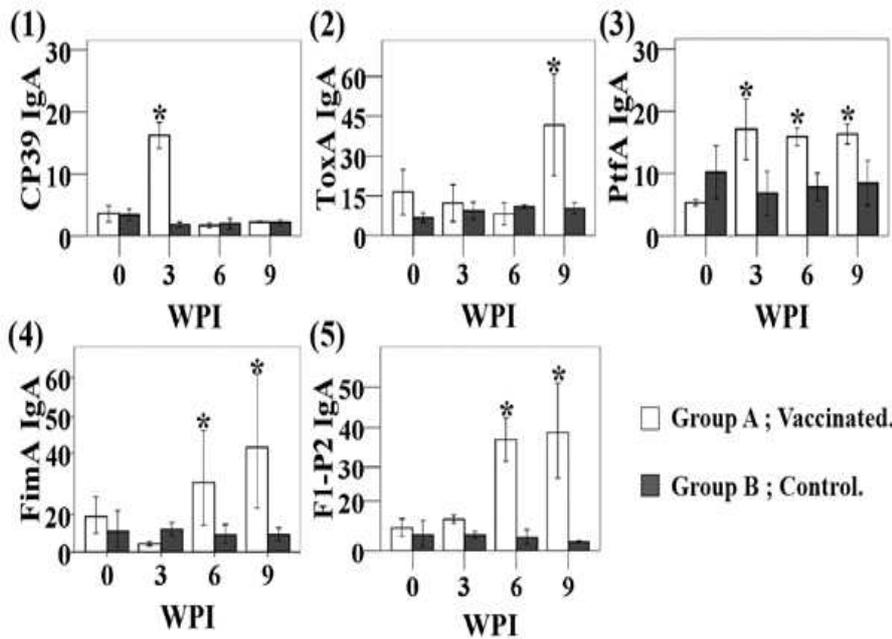


그림 3. Secretory IgA (ug/ml) titers against CP39, ToxA, PtfA, FimA and F1-P2 fimbrial antigens in mice orally immunized with the vaccine candidates. (1) CP39-specific IgA; (2) ToxA-specific IgA; (3) PtfA-specific IgA; (4) FimA-specific IgA; (5) F1-P2-specific IgA. Data are the means of all mice in each group; error bars show the standard deviations (SD). Asterisks indicate a significant difference between the values of the groups immunized with the vaccine candidate ($*P \leq 0.05$) and those of the control

group. Secretory IgA titers to FimA fimbrial antigen showed similar patterns F1-P2 fimbrial antigens. CP39, ToxA, F1-P2 fimbrial antigens showed difference patterns.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연차별 세부과제별 연구개발의 목표 및 개요

1. 1차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 (표 1)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012)	돼지에서 유전공학 기법을 이용한 주요 세균성 호흡기 질병 예방 생균 백신 개발	특정 유전자가 제거된 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 동시 예방 생균 다가 백신 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 위축성 비염과 파스튜렐라 폐렴과 관련된 주요 병원성 인자의 유전자 확보 - 확보된 각 병원성 인자의 유전자를 delivery vector에 cloning - 각 유전자가 삽입된 plasmid를 약독화된 delivery host로 형질전환하여 백신 제조
		In vitro 상에서 개발된 백신 균주의 발현여부 확인	- Western blot을 이용하여 각 형질전환 된 백신 후보균주로부터 각 항원이 host 세포 밖으로의 분비여부 확인
	실험동물에서 주요 호흡기 질병 예방을 위한 생균 백신의 안전성 및 효능 시험과 최적화	점막면역 활성 adjuvant 개발	-생균 Delivery system을 이용한 점막에서 면역을 활성화 시킬 adjuvant 개발
		실험동물에서의 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 각각의 생균 백신 후보균주의 안전성 및 면역 유도 실험	<ul style="list-style-type: none"> - BALB/c mice에서 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 각 항원발현 백신 후보주를 접종 경로별로 다양한 접종량으로 접종 - 백신 접종 후 마우스에서 접종경로별 접종량에 따른 폐사 여부 등 부작용 조사 - 접종경로별 접종량에 따른 면역 반응 측정
		실험동물에서 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신후보균주의 혼합 접종 실험	- 마우스에서 백신 후보균주의 혼합 접종 후 각각의 항원에 대한 면역 유도 측정
		실험동물을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신의 최적화 실험	<ul style="list-style-type: none"> - 접종 횟수에 따른 면역 반응 측정 - Real-Time PCR을 이용한 IL-4, IFN-γ 측정 - 도전 감염 균주에 대한 방어 여부 확인 실험
	실험동물에서 주요 호흡기 질병 예방을 위한 생균 백신의 안전성 및 효능 시험과 최적화	위축성 비염과 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신 개발을 위한 주요 병원성 인자 항원 발굴 및 유전자 확보	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Pasteurella multocida</i> type A 및 type D에서 위축성 비염 및 폐렴과 관련된 주요 병원성 인자 중 면역원성이 우수한 항원 발굴 및 유전자 확보 - <i>Bordetella bronchiseptica</i>의 주요 병원성 인자 중 면역원성이 우수한 항원 발굴 및 유전자 확보
		해당 단백 항원 확보	<ul style="list-style-type: none"> - 항원 단백 확보를 위한 cloning - 각 해당 항원에 대한 단백 항원 발현 및 정제
		국내 주요 호흡기 질병 원인균 분리 및 동정, 양돈장에서 분리된 병독성 호흡기 질병 원인균 병독성 시험	<ul style="list-style-type: none"> - 주요 호흡기 질병 분포를 조사 (전국을 대상으로) - 분리균 항생제 검사 - 야외 균주에 대한 돼지에서의 LD₅₀ 량 결정 실험 (3처리구 × 2반복 × 15시료)

2. 2차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 (표 2)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
2차 년도 (2012)	돼지에서 유전공학 기법을 이용한 주요 세균성 호흡기 질병 예방 생균 백신 개발	모돈에서 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위 성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 방 생균 다가 백신의 효능 및 백신의 안전성 실험	- 임신 모돈에 다양한 경로로 백신접종 - 백신접종 후 발열, 설사, 유사산 등의 부 작용 및 폐사 여부 관찰 - 백신접종 후 정기적으로 면역 반응 측정 - 포유자돈을 대상으로 야외 균주에 대한 방어 여부 확인
		병원성 유전자가 제거된 점막면 역 활성 delivery system을 이 용한 흉막폐렴 예방 생균 백신 개발	- 확보된 각 병원성 인자의 유전자를 이용 하여 흉막폐렴을 예방할 수 있는 생균 백신 개발 - Western blot을 이용하여 각 항원이 host 세포 밖으로 분비하는지의 여부 확인
		흉막 폐렴 예방 생균백신 생체 내에서의 병원성 획득 실험	- BALB/c mice에 접종 후 spleen 등에서 백신 균주 분리 - 분리된 백신 균주 병원성 획득 여부 확인 - 분리 균주로 다시 마우스에 재접종 - spleen 등에서 균 분리 및 병원성 획득 여 부 확인 (이상의 방법을 6회 실시)
	실험동물에서 주요 호흡기 질병 예방을 위한 생균 백신의 안전성 및 효능 시험과 최적화	흉막폐렴 예방 생균 백신 개발 을 위한 주요 병원성 인자 항원 발굴 및 유전자 확보	- <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 2형과 5형 중에서 흉막 폐렴과 관련된 주요 병원 성 인자 중 항원성이 우수한 항원 발굴 및 항원 유전자 확보
		흉막폐렴 주요 병원성 인자에 대한 각 단백질 항원 확보	- 항원 단백질 확보를 위한 cloning - 시판되고 있는 kit를 사용하여 각 해당 항원에 대한 단백질 항원 발현 및 정제
		마우스를 이용한 흉막 폐렴 예 방 생균백신의 안전성 실험	- BALB/c mice를 대상으로 접종경로별로 각 항원발현 백신 후보균주의 접종량을 달 리하여 접종 - 마우스에서 각 백신 후보 균주의 접종경 로 별 접종량에 따른 폐사 등 부작용 여부 관찰
		마우스를 이용한 흉막 폐렴 예 방 생균백신의 효능실험	- 마우스에서 백신 후보균주의 혼합 접종 후 각 항원에 대한 면역 반응 측정 - 야외분리 독성 분리주로 도전감염 후 방 어여부 관찰
		실험동물을 이용한 백신의 최적 화 실험	- 접종 횟수에 따른 면역 반응 측정 - 접종 횟수에 따른 cytokines 측정 - 접종 횟수 별로 도전 감염 균주에 대한 방어 여부 관찰
	실험동물에서 주요 호흡기 질병 예방을 위한 생균 백신의 안전성 및 효능 시험과 최적화	목적 동물에서의 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신 예비 실험	- 비육돈에 백신 경구 및 비강 접종 - 면역 반응 조사 - 야외 균주에 대한 방어 시험
		자돈에서 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위 성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예 방 생균 다가 백신의 효능 및 안전성 실험	- 임신 모돈에 백신접종 - 백신 접종군 및 비 접종군에서 출생한 자돈에 백신접종 - 자돈에서 백신 접종 후 발열, 설사, 폐사 와 같은 부작용 여부 관찰 - 백신 접종 전·후 채취된 혈청에서의 IgG 측정 - 야외균주에 대한 방어 여부 확인

3. 3차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 (표 3)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	연구개발 수행내용
3차 년도 (2015)	[제1세부] 돼지에서 유전공학 기법을 이용한 주요 세균성 호흡기 질병 예방 생균 백신 개발	모돈에서 홍막폐렴 예방 생균 백신의 안전성 실험	<ul style="list-style-type: none"> - 임신 모돈에 다양한 경로로 백신 접종 - 백신 접종 후 발열, 설사, 유사산 등의 부작용 여부 관찰 - 정기적인 serum IgG, 초유에서의 IgG 및 IgA 등 조사 - 자돈에서의 야외 균주에 대한 방어 여부 조사
		현장에서 위축성 비염, 파스튜렐라 폐렴, 홍막폐렴 예방 생균 백신과 다른 상업용 백신과의 단순 효능 비교실험	<ul style="list-style-type: none"> - 현재 상용화되어 있는 각 호흡기 질병 백신을 구입하여 각 생균 백신을 대상 목적 동물에 각각 접종 - 정기적으로 각 그룹별로 채혈하여 면역 반응 측정 - 야외분리 독성 균주로 도전감염 시킨 후 상용화된 백신과 개발 생균 백신에서의 단순히 방어 여부만을 비교
	[제2세부] 실험동물에서 주요 호흡기 질병 예방을 위한 생균 백신의 안전성 및 효능 시험과 최적화	돼지에서 백신의 효능을 향상시킬 점막 면역에 효과적인 adjuvant 개선 및 백신의 최적화	<ul style="list-style-type: none"> - adjuvant를 혼합한 또는 혼합하지 않고 돼지에 접종 후 면역 유도 반응 측정하여 효과적인 adjuvant 선택 및 백신의 최적화 (백신, 1, 2, 3회 접종 후 IgG 및 방어여부로 결정)
	[제1협동] 실험동물에서 주요 호흡기 질병 예방을 위한 생균 백신의 안전성 및 효능 시험과 최적화	목적동물에서 홍막폐렴 예방 생균백신의 효능실험	<ul style="list-style-type: none"> - 비육돈에 다양한 경로로 백신접종 - 정기적으로 serum IgG 측정 - 야외독성 분리주로 도전감염 후 방어 여부 확인
		각 호흡기 질병이 유행하는 양돈장에서의 생균 백신의 적용실험	<ul style="list-style-type: none"> - 각 호흡기 질병이 유행하고 있는 양돈장에서 대상 목적동물에 백신 접종 - 백신 접종 후 부작용 여부 관찰 - 백신을 접종하지 않은 대조군과 호흡기 질병 발생 비율 및 호흡기 치료를 위한 항생제 치료 사용 빈도 등 측정
		백신의 안정성 확인 시험	<ul style="list-style-type: none"> - 시험백신을 냉암소에 보관하면서 시험에 사용 - 제조직후, 3개월, 6개월, 9개월 쯤에 특성, 진공도, 수소이온농도, 함습도, 마이코플라즈마 부정시험, 순수시험, 균수 시험, 안전 시험, 등 시행

제 2 절 연구개발 수행방법 및 결과

[1차년도]

[1] 위축성 비염과 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신 개발을 위한 주요 병원성 인자 항원 발굴 및 유전자 확보

1. 주요 세균성 호흡기 질병

동물의 출하 지연의 대부분이 주로 성장기에 발생하는 호흡기 관련 질병과 연관이 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 돼지의 경우, 육성 및 비육기에 성장 및 발육을 저하시키는 질병인 위축성 비염 및 파스튜렐라성 폐렴은 주로 *Pasteurella multocida* 및 *Bodetella bronchiseptica*가 일으키는 것으로 알려져 있다. *Pasteurella multocida*는 가끔 콜레라, 소와 버팔로에서 출혈성 패혈증을 일으키며, 특히 돼지에서 위축성 비염과 파스튜렐라 폐렴 발생에 중요한 영향을 미치는 가축성 병원균이다. 한국, 중국, 베트남, 캐나다, 미국을 비롯한 집단적으로 대규모 사육하는 환경에 의하여 연속적으로 발병되며, 특히 한국을 비롯한 전 세계적으로 대규모 축산 농가에 상당한 손실을 입히고 있으며, 1959년 이후로 *pastuellosis*는 가장 중요한 동물원성 감염증으로 판명되었다. *P. multocida*의 균주는 다섯 개의 캡슐의 혈청 타입 (capsular serotypes; serogroups A, B, D, E, F)으로 구성되어 있는데, 이 중에서 혈청형 A와 B, D만이 돼지에서 발견된다. 이 중 *P. multocida* 혈청형 A와 D는 *Bodetella bronchiseptica*와 함께 위축성 비염을 발생시키고 혈청형 A와 D의 독성이 존재하는 균주 및 독성이 존재하지 않는 균주 모두 파스튜렐라 폐렴 (*pneumonic pastuellosis*)을 발생시킨다. *P. multocida*는 그람음성 세균에 속하고 단독으로 병을 일으키지 않고 유행성 폐렴, 위축성 비염 등 경미한 호흡기 질병에 합병하여 증세를 악화시킨다. 주로 호흡기도를 통하여 전염되는데, 호흡기도를 통해 침입한 균은 상부 호흡기도의 점막에 정착하여 증식하고 있다가 스트레스와 사육환경, 폐충이나 회충 등의 유충이 이동함으로써 병은 악화된다. 파스튜렐라 폐렴 균에서는 주로 A형이 많이 분리가 되고, B형은 2차 감염시 급성 출혈성 폐렴을 일으키고, D형은 *B. bronchiseptica*와 복합 감염으로 위축성 비염을 악화시키거나 단독으로 비갑개골을 위축시킨다. 특히, *P. multocida*는 돼지의 호흡기 계통에 침입하여 폐렴을 일으키는 가장 중요한 균주 중의 하나이다.

한편, 파스튜렐라성 폐렴은 세계적으로 양돈농가에서 발생하고 있으며 폐사율은 낮지만 이혼율은 높은 질병으로 대개 만성 및 소모성 질병이기 때문에 돼지의 체중저하, 사료 효율의 저하로 간접 손실이 크다. 돼지의 상부기도 점막에 공생하고 있는 경우가 많고, 구강이나 비강, 편도선 등에서 서식하고 있는 비율은 다른 동물에 비해 높은 편이다. 감염이 되었을 경우엔 급성형과 만성형의 증상을 보이게 되는데 가장 일반적인 증상은 급성 기관지 폐렴으로 기관지에 거품이 차기 때문에 호흡이 곤란해지게 된다. 고열과 패혈증 증상이 나타나며 치료를 하지 않으면 폐사 하게 된다. 가장 일반적인 증상으로는 마이코플라즈마성 폐렴의 합병증으로 나타나는 기관지 폐렴이다. 이에 따라 흉막폐렴 및 심낭염이 유발될 수 있다. 그 다음으로 위축성 비염은 *P. multocida* 혈청 타입 D와 *B. bronchiseptica*가 복합감염이 되어 보통 어린 자돈의 코 속에 침입하여 증식하며 괴사 독소를 분비하여 코뼈를 만드는 골아세포를 파괴함으로써 비갑개라는 코뼈를 정상적으로 자라지 못하도록 만든다. 따라서, 비갑개골의 위축과 비중격

이 찌그러지게 되어 코가 빼틀어지게 된다. 이런 비갑개골의 변형으로 인해 세균 침입을 용이하게 하여 폐렴을 발생시키는데 이는 위축성 비염이 발생하는 농가에서는 폐렴이 번지는 주요 요인이 될 수 있다. 또한 상기 질병의 발병은 감염연령과 관련이 깊은데 어린 자돈일수록 쉽게 발병되며, 증상과 병변도 심하게 나타나는 것이 특징이다. 보통 모돈이 감염원이 되는데 모돈의 경우엔 대부분 발병은 하지 않고 균을 배설하지만 이는 보균돈으로 되어 자돈의 생후 1주일 이내에 감염이 시작된다. *P. multocida*에 의한 감염은 동물에게 물림으로써 사람에게도 나타날 수 있는데, 이는 관절염, 수막염, 심막내막염, 폐렴 및 패혈증을 일으킬 수 있다. 모든 박테리아로 인한 감염은 군체 형성의 과정으로부터 시작된다. 상기 군체 형성은 *P. multocida*가 숙주 세포와 조직에 부착이 되는지를 결정하는데 중요하다. 광범위한 숙주 종에 발병이 되는 *P. multocida*은 군체 형성을 가능하게 하기 위해 모든 필수적인 부착인자(adhesin)를 가지고 있다는 것을 의미한다. 그러나 지금까지는 오직 소수의 부착인자만이 발견되었다.

한편, *B. bronchiseptica*는 포유동물 내에서 넓은 숙주범위를 가지며 높게 나타는 호흡기성 감염 질병을 일으킨다. 또한, *B. bronchiseptica*는 어린돼지의 호흡기 질병을 복잡하게 만드는 중개자 역할을 하며 다양한 요소로 되는 병의 상태가 되어 양돈산업에서 문제가 증가하고 있다.

"부착인자"는 세균이 숙주 세포에 부착하는데 사용하는 모든 인자를 지칭한다. 이는 세균의 섬모와 같은 세포 표면 단백질을 포함한다. 세균은 이들 부착인자를 이용하여 숙주의 장관 세포 표면에 안정적으로 부착하여 증식을 시작하고 독소 등을 분비하면서 질병을 일으킨다. 현재까지 알려진 이들 병원균의 주요 부착인자는 CP39, PtfA, FimA, F1-P2가 있으며, 독소인자로는 ToxA가 있다.

2. 위축성 비염 유발 병원균 (*Pasteurella multocida* type D, *Bordetella bronchiseptica*) 및 파스튜렐라 폐렴 (*Pasteurella multocida* type A)

▶ 돼지에서 위축성 비염은 대부분의 양돈장에 상재하는 돼지의 만성 호흡기 질환으로 비강에 침입한 *Bordetella bronchiseptica*와 *Pasteurella multocida* type D에 의해 비강 점막에 염증을 일으키고 비갑개골과 상악골이 위축되고 코가 비뚤어지는 질병으로 어린 일령의 자돈이 쉽게 감염된다. 파스튜렐라 폐렴은 *P. multocida* type A에 의해 감염되어 장거리 수송, 심한 온도 변화, 스트레스 등 저항성이 감소되면 심한 폐렴 증상을 나타낸다. 이 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴을 유발하는 병원균의 adhesin 및 독소가 면역원성과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 이들 adhesin 및 독소를 중심으로 그 유전자를 확보하였다.

▶ 면역원성과 관련된 주요 adhesin 및 독소들

- 1) *Pasteurella multocida* type A 및 D와 관련된 면역원성 인자
CP39, FimA, PtfA, Pm1665, ToxA
- 2) *Bordetella bronchiseptica*와 관련된 면역원성 인자
F1, P2

[2] 특정 유전자가 제거된 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 동시 예방 생균 다가 백신 개발

1] *lon* 유전자 및 *cpxR* 유전자가 결실되어 약독화된 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*) 제조.

살모넬라 티피무리움 야외균주 JOL401의 염색체 DNA를 주형으로 하여, *lon* 유전자의 5' 말단과 3' 말단 부분을 각각 *lon*-F-XbaI와 *lon*-R-XhoI 및 *lon*-F-XhoI과 *lon*-R-XbaI를 프라이머로하여 PCR법으로 증폭시켜 *lon* 유전자를 제외한 이들 유전자의 5' 말단 및 3' 말단에 연결된 DNA를 증폭하였다. 상기 PCR 반응으로 증폭된 유전자 단편을 각각 클로닝 한 뒤 제한효소 XhoI로 절단하고 라이게이션하여 *lon* 유전자가 결실된 유전자서열을 얻은 후, 자살 벡터(suicide vector) pMEG375에 클로닝하여 pBP295를 얻었다.

또한, 상기와 같은 방법으로 *cpxR* 유전자가 결실된 서열을 가진 자살 벡터 pBP210을 얻고 *E. coli* χ 7213(DAP 요구주이고 R6K 플라스미드 복제 개시 인자 π -단백질을 유지하기 때문에 R6K 복제 개시점을 갖고 있는 상기 벡터를 안정하게 유지하게 함)에 상기 pBP295 및 pBP210을 각각 형질전환하여 *E. coli* χ 7213은 50ng/ml의 DL - α,ϵ -디아미노피델리카시드(DAP, Sigma)를 첨가한 LB broth에서 배양하였다. 살모넬라 티피무리움 JOL401에서 *lon* 유전자를 결실시키기 위하여 pBP295를 지닌 *E. coli*를 접합의 방법으로 LB-DAP 아가에서 JOL401에 도입(상기 균주는 π -단백질을 공급할 수 없어 pBP295가 염색체에 도입되지 않은 경우, 복제를 못해 유지되지 않고 자연적으로 소멸)하였으며, pBP295가 도입된 세균만이 항생제 내성을 나타내는 것을 이용하여 50 μ g/ μ l의 암피실린을 첨가한 LB 아가에서 내성균을 선택하였다. pBP295의 DNA에 수크로오스-감수성 유전자인 *sacB*가 존재하기 때문에 플라스미드를 갖는 숙주는 사멸하고 플라스미드가 결실된 숙주만 생존이 가능하게 된다. 선별된 집락은 다시 LB/수크로오스 아가와 LB/암피실린 아가에 각각 tooth-picking하여 배양하고, LB/수크로오스 아가에서 성장하고, LB/암피실린 아가에서는 성장하지 못하는 집락을 돌연변이된 균주로 선별하였다.

또한, 상기의 방법으로 살모넬라 티피무리움 균주에 pBP210을 도입하여 살모넬라 티피무리움 Δ *cpxR*를 제조하였고, 상기 균주를 살모넬라 티피무리움 JOL910 (*S. Typhimurim* Δ *cpxR*; JOL910)으로 명명하였다. 이 후, 상기 JOL910 균주에 pBP295를 도입하여 살모넬라 티피무리움 JOL911(*S. Typhimurim* Δ *lon* Δ *cpxR*)를 제조하였다. 더불어 *asd* 유전자를 제거하여 JOL912를 제작하여 이존항원을 발현하기 위한 host로 사용하였다 (표 4).

표 4. 이 실험에 사용된 균주와 플라스미드

Strain/plasmid	Description	Source
Strains		
<i>E. coli</i>		
Top10	F-mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galUgalKrrpsL (Str ^R)endA1nupG	Lab stock
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ ,ompT, hsdS _B (r _B ⁻ ,m _B ⁻),dcm, gal, λ (DE3), pLysS, Cm ^r	Lab stock
JOL1136	BL21 with pET-CP39	This study
JOL1234	BL21 with pET-FimA	This study
JOL1214	Top10 with pQE-PtfA	This study
JOL1135	BL21 with pET-ToxA	This study

JOL991	BL21 with pET-F1P2	This study
S. Typhimurium		
JOL401	<i>Salmonella</i> Typhimurium wild type	Lab stock
JOL912	<i>S. Typhimurium</i> JOL911 derivative Δ asd	Lab stock
JOL1240	JOL912 with pBP244-CP39	This study
JOL1251	JOL912 with pBP244-FimA	This study
JOL1247	JOL912 with pBP244-PtfA	This study
JOL1244	JOL912 with pBP244-ToxA	This study
JOL1074	JOL912 with pBP244-F1P2	This study
P. multocida		
JOL976	<i>Pasteurella multocida</i> sero type A wild type (PmA037)	Lab stock
JOL977	<i>P. multocida</i> (PDNT)sero type D wild type	Lab stock
B. bronchiseptica		
JOL978	<i>Bordetella bronchiseptica</i> wild type	Lab stock
Plasmids		
pQE31	IPTG-inducible expression vector; Am ^r	Qiagen
pET28a	IPTG-inducible expression vector; Km ^r	Novagen
pBP244	pYA3493 derivative containing <i>lepB</i> , <i>secA</i> and <i>secB</i> genes	Lab stock

2] 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 동시 예방 생균 다가 백신 개발

각 후보 항원 (PM1665, CP39, PtfA, FimA, ToxA, F1-P2)을 pBP244를 이용하여, 살모넬라 티피무리움 전달 시스템에 클로닝한 후 항원의 발현 및 분비 여부를 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 즉, 발현이 확인된 각 벡터와 pBP244를 제시한 제한효소로 절단한 후 아가로오스 젤에서 전기영동하였다. AccuPrep 젤 추출 키트(purification kit)를 이용하여 아가로오스 젤로부터 절단된 부착인자와 pBP244 절편을 정제하고 T4 DNA 리가아제를 이용하여 4°C에서 하룻밤 라이게이션 하였다. 상기 라이게이션 된 반응액으로 *E. coli* χ 6212를 형질전환시켜 DAP를 첨가하지 않은 LB 아가에 골고루 퍼서 말린 다음 하룻밤 배양하여 pBP244에 의하여 형질전환된 균주를 선택하였다. 각 부착인자의 확인은 *E. coli* χ 6212로부터 플라스미드를 분리하여 각 부착인자에 해당하는 제한 효소로 절단한 후 아가로오스 젤에서 전기영동하여 최종 확인하였다.

상기 최종 확인된 각 정제 플라스미드를 전기청공법에 의하여 JOL912에 형질전환시켜 PM1665, CP39, fimA, ptfA, toxA, F1-P2를 발현하는 균주를 얻었다. 즉, JOL912를 DAP (50 μ g/ml)이 포함된 LB broth에서 균주의 성장 중간 단계(mid-log phase)까지 배양한 후, 멸균된 균주를 얼려진 10%의 글리세롤(ice-cold 10% glycerol) 함유 증류수로 두 번 세척하였다. 이후, JOL912를 0.2cm 큐벳에 넣고 플라스미드 0.1 μ g과 섞은 후 Bio-Rad MicroPulser (Bio-Rad, USA)의 사전에 프로그램된 세팅 중 Ec2에 따라 전기충격을 가하였다. 반응된 균을 큐벳에서 회수한 후, DAP를 넣지 않은 LB broth 1ml를 첨가하여 1시간 동안 37°C에서 배양하였다. 형질전환된 살모넬라균을 선별하기 위해 배양된 균액 100 μ l를 다시 DAP를 첨가하지 않은 LB 아가에 골고루 퍼서 말린 다음 37°C에서 하룻밤 배양한 후 형성된 균주를 선별하였다.

[3] 점막 면역 활성 adjuvant 개발

1. Cloning of the *eltB* gene

eltB 유전자는 *eltB*-F (5'-CCGCGAATTCGCTCCCCAGTCTATTACAG-3')와 *eltB*-R (5'-CCGCAAGCTTCTAGTTTTCCATACTGATTG-3') primer를 이용하여 PCR을 통해 증폭되었다. 이 PCR 증폭산물은 시판되는 발현용 플라스미드인 pET28a (표 4)에 cloning 되어 pET28a-LTB로 제조되었다. 이 제조된 플라스미드는 *E. coli* BL21(DE3)pLysS에 형질전환되었고 LTB 단백질을 정제하였다. 또한 *eltB* 유전자는 pBP244에 삽입되어 pBP244-LTB가 제조되었고 이 플라스미드는 JOL912에 형질전환시켜 JOL906을 제조하였다. 이 JOL906을 LTB adjuvant 균주로 사용하였다.

2. 점막면역을 강화할 수 있는 adjuvant를 발굴하여 개발하여 그대로 백신과 혼합하여 사용하였다.

3. 마지막 백신 접종 후 3주 후에 야외분리주를 challenge 한 후 폐사 여부 및 호흡기 질병 발생 유무로 adjuvant의 효능을 최종적으로 결정하였다.

[4] 해당 단백질 항원 확보

1. 단백질 항원 확보

(1) Cloning

1) 돼지에서 위축성비염과 파스튜렐라 폐렴 원인균인 *Pasteurella multocida* type A 및 D와 관련된 면역원성 인자 CP39, FimA, PtfA, Pm1665, ToxA 그리고 *Bordetella bronchiseptica*와 관련된 면역원성 인자 F1, P2를 대상으로 하여 cloning을 수행하였다.

각 해당 항원의 총 DNA 추출은 전통적인 방법에 따라 준비하였다. 즉, -70°C에 보관 중인 *Pasteurella multocida* type A 및 D 그리고 *Bordetella bronchiseptica* 균주를 chocolate agar에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 배양된 colony들 중에서 한 colony를 선택하여 0.5M NaCl에서 lysis 시킨 후 중화시킨 다음 멸균 증류수 400 μ l를 첨가한 후 원심분리하여 상층액 300 μ l를 새로운 멸균 튜브에 옮겨 각 세균의 총 DNA로 추출하였다.

각 adhesin 및 독소 유전자는 제한효소 절단 부위를 가진 특이 primer (표 5)를 이용하여 PCR 기법으로 증폭되었다. 증폭된 각 adhesin 유전자는 agarose gel을 이용하여 해당 크기를 확인한 다음 AccuPrep gel purification kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 정제되었다.

표 5. 실험에 사용된 primer sets

Primer	Sequence	Size (bp)
Pm1665	1665-F CCGCGAATTCTTGTGCAGTTCCGCAAATAA	273
	1665-R CCGCAAGCTTTTCACCTGCAACAGCAAGAC	
CP39	CP39-F CCGCGAATTTCGCAACAGTTTACAATCAAGACC	1001
	CP39-R CCGCGTTCGACTTAGAAGTGTACGCGTAAACC	
fimA	FimA-F CCGCGAATTTCGATGGGGTAACAGGCACT	954
	FimA-R CCGCGTTCGACTTACTTGCTTAAGCAAGC	
toxA	toxA-F CCGCGGATCCAAACATTTTTTTAACTCAGAT	591
	toxA-R CCGCAAGCTTATAAAGCTGAGCATATTTTT	
ptfA	ptfA-F CCGCGAATTTCGCCATTTTCTTTTCGATTAA	425
	ptfA-R CCGCAAGCTTTTATGCGCAAATCCTGCTGG	
F1	F1-F TTTAAGAATTCTGACTGCCCTGGACAAT	465
	F1-R TTTAAGTCGACTCGCAGATCCGCGGCAAA	
P2	P2-F TAATTGTCGACAACACCATGCTGCTGGTG	279
	P2-R TTTAAAAGCTTGGCGGACAACTCCCTGCC	

Underlines indicate the sites of restriction enzymes, such as BamHI, EcoRI, Sall and HindIII.

(2) 각 해당 단백 항원 확보

시판되는 발현용 vector (pQE series와 pET28a)와 host (*E. coli* TOP10과 *E. coli* BL21)를 이용하여 각 해당 유전자를 발현용 vector에 삽입한 후 해당 host에 transformation 시켜 단백 항원 발현 균주를 확보하였다.

정제된 PCR 증폭산물과 pQE9, 10 또는 pET28a vector를 표 5에서 기술된 제한 효소로 각각 절단한 후 agrose gel에서 전기영동하였다. 절단된 각 절편을 AccuPrep gel purification kit를 이용하여 정제한 다음 T4 DNA ligase (Takara, Japan)로 두 산물을 ligation 한 후 *E. coli* TOP10 또는 *E. coli* BL21으로 형질전환되었다. 이들 형질전환 균주를 ampicillin (pQE series을 발현 vector로 사용하였을 경우) 또는 kanamycin (pET28a를 발현 vector로 사용하였을 경우)이 각각 첨가된 LB agar에 골고루 퍼서 말린 다음 37°C에서 하룻밤 배양하여 발현 vector로 형질전환 된 *E. coli* TOP10 또는 *E. coli* BL21을 선택하였다

각 adhesin유전자가 삽입된 vector는 *E. coli* TOP10 또는 *E. coli* BL21으로부터 AccuPrep plasmid extraction kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 plasmid를 분리하여 Table 2에 제시된 바와 같이 제한 효소로 절단하여 agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. 그리고 이렇게 확인된 colony를 각 발현 vector에 맞는 항생제가 첨가된 LB broth 5ml에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 배양된 균액 중 1ml를 LB broth 200에 접종하여 30°C에서 150rpm의 속도로 흔들어 주면서 하룻밤 배양하였다. 이 배양액에 IPTG의 최종농도가 1mM이 되도록 첨가하여 같은 조건으로 4시간 재배양하였다. 이 배양액을 8,000rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 침전물은 phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)가 1mM이 되도록 첨가된 10ml의 멸균 PBS로 재부유시킨 다음 -70°C에서 냉동하였다. 냉동된 부유액을 다시 37°C water bath내에서 해동한 다음 -70°C에서 냉동하기를 2 ~ 3회 반복하였다. 마지막으로 해동한 후 부유액을 초음파처리하여 cell들을 분쇄한 다음 15,000rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액을 멸균 관에 옮겼다. 발현 단백질이 가용성일 경우에는 Buffer B (100mM Nah2PO4,

10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 8.0) 4ml를 상층액과 혼합하였고 불용성일 경우에는 6ml의 Buffer B로 침전물을 재부유시킨 후 실온에서 1시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 이 반응액을 15,000rpm, 4°C에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 resin이 들어 있는 관으로 옮겨 단백질이 resin과 결합하도록 30분간 교반하였다. 이 반응액을 준비된 column에 충전시키고 천천히 흘려보냈다. 흘려보낸 이 액으로 column을 재충전한 다음 다시 천천히 흘려보냈다. 반응액을 흘려보낸 다음 Buffer C (100mM Nah₂PO₄, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 6.3) 6ml로 column을 3회 세정하여 resin과 결합하지 않은 기타 불필요한 단백질을 제거하였다. Elution buffer (100mM Nah₂PO₄, 10mM Tris · Cl, 8M urea, pH 4.5) 2ml로 column을 충전시킨 후 20분간 반응시켜 발현 단백질을 resin으로부터 분리시킨 다음 elution buffer를 1ml씩 첨가하여 단백질을 회수하였다. 회수된 단백질을 SDS-PAGE에서 전기영동하여 발현 단백질을 확인하였으며 정량한 후 -70°C에 보관하며 ELISA, SPA, FACS 그리고 Real time PCR 항원으로 사용하였다.

2. 각 해당 항원에 대한 항혈청 확보

1주일 정도의 적응 기간을 거친 약 2Kg 정도의 암컷 New Zealand white rabbit에 위에서 준비된 각 adhesin 항원이 200µg이 되도록 멸균 PBS로 희석 한 후 Freund's complete adjuvant와 동량 혼합하여 피하 접종하였다. 1차 접종 14일 후에 동량의 항원을 Freund's incomplete adjuvant와 같은 방법으로 혼합하여 피하 접종하여 boosting 하였다. 2차 접종 후 14일째에 채혈하여 혈청을 분리한 다음 -70°C에 보관하며 각 adhesin 항혈청으로 사용하였다.

[5] In vitro 상에서 개발된 백신 균주의 발현여부 확인

1. 백신용 살모넬라 변이주의 항원 발현 확인

제작된 백신 균주가 해당 fimbriae을 세포 밖으로 발현하는지를 확인하기 위하여 각 백신 후보균주를 100ml의 LB broth에 하룻밤 배양한 후, 4,000 rpm에서 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액과 침전물을 시료로 준비하였다. 상층액은 얼려진 10%의 트리클로로아세트산 (trichloroacetic acid)으로 처리하여 세포 밖으로 분비된 발현 항원을 검출하였다. 각 시료는 94°C에서 5분간 끓인 후 SDS-PAGE 전기영동 후, PVDF 막으로 옮겨 블로킹 완충액(bolocking buffer; 3% skim milk in PBST)에서 하룻밤 반응시켰다. 다음날 준비한 각 항원에 대한 항혈청을 1:500 내지는 1:1,000으로 희석하여 1시간 반응시킨 후, 1:40,000로 희석된 2차 항체(goat anti-rabbit IgG(H+L) HRP)로 1시간 반응시켰다. WEST-one™ Western Blotting System (Intron Biotechnology, Korea)으로 발색하여 발현을 확인하였다.

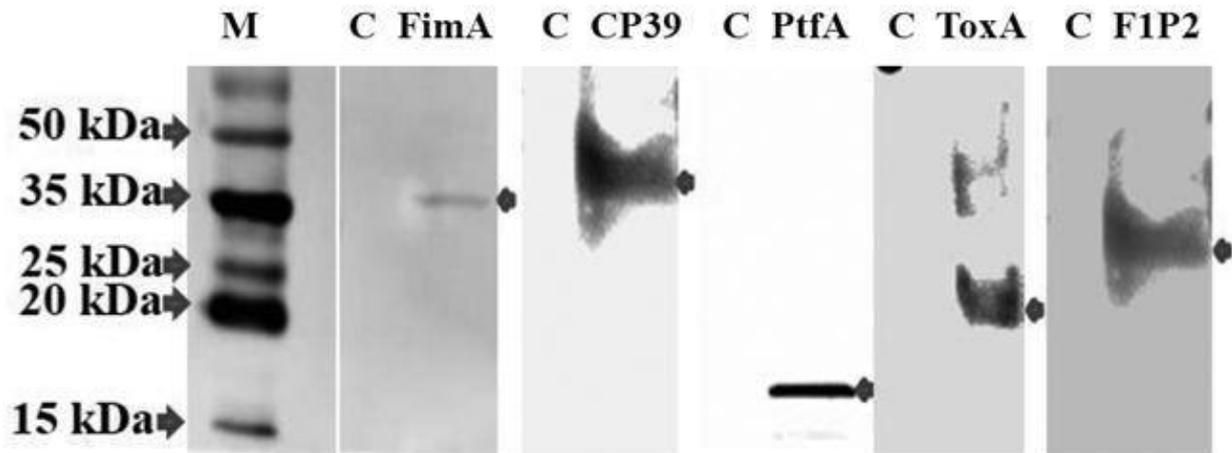


그림 4. Identification of secreted recombinant FimA, CP39, PtfA, ToxA, and F1P2 adhesin antigens using western blot analysis. Recombinant FimA, CP39, PtfA, ToxA, and F1P2 adhesin antigens expressed and secreted by JOL912 were detected via western blot using the appropriate antigen-specific antibodies. Lanes: C, control; FimA, recombinant FimA adhesin antigen secreted by JOL1251; CP39, recombinant CP39 adhesin antigen secreted by JOL1240; PtfA, recombinant PtfA adhesin antigen secreted by JOL1247; ToxA, recombinant ToxA toxin antigen secreted by JOL1244; F1P2, recombinant F1P2 adhesin antigen secreted by JOL1074.

그림 4에 나타낸 바와 같이, transformation된 균주 중 Western blot에 의해 supernatant에서 항원 발현이 확인된 총 5균주를 백신 후보주로 결정하였다. Western blot에 의한 백신 후보 균주들로부터 위축성 비염과 파스튜렐라 폐렴에 관련된 CP39, fimA, ptfA, toxA 발현 및 분비를 확인 하였다 (그림 4). 백신 후보 균주들로부터 CP39, fimA, ptfA, toxA, F1P2 부착인자 항원의 분비를 확인하기 위해 TCA-침전법을 이용한 Western blot 방법이 수행되었다. CP39는 39kDa, fimA는 36kDa, ptfA는 18 kDa, toxA은 22kDa 그리고 F1P2는 27kDa에서 각각 관찰되었다.

[6] 실험동물에서의 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 각각의 생균 백신 후보균주의 안전성 및 면역 유도 실험

1] 실험에 사용된 균주와 플라스미드

이 실험에서 사용된 모든 균주와 플라스미드는 표 6에 서술되어져 있다. *E. coli* Top10, BL21은 재조합된 부착인자 항원들을 발현시키기 위하여 사용되었다. 약독화된 *S. Typhimurium*, JOL912는 wild type *S. Typhimurium*, JOL401로부터 *cpxR*, *lon*, *asd*를 제거하여 제작되었다. 플라스미드 pQE31, pET28a는 개별 항원들의 부착인자 항원들을 발현시키기 위해 사용되었으며 pBP244는 살모넬라 내 발현된 heterologous antigens의 분비향상을 위하여 *lepB*, *secA*, *secB*의 결함을 통한 Asd⁺ plasmid pYA3493으로부터 제조되었다. pMMP65는 항원의 발현 확인을 위한 플라스미드로 사용되었다. 모든 실험에 사용된 균주와 플라스미드는 37°C Luria-Bertani broth (LB; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, U.S.A.) 또는

LB agar에서 배양되었으며 JOL912와 같은 Asd-negative bacteria의 배양을 위해 Diaminopimelic acid (DAP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.)을 첨가하였다. 도전 감염을 위해 사용된 야외균주 JOL976, JOL977, JOL978은 수의과학검역원에서 받아 보관하여 공격 시험 시 사용되었다.

표 6. 이 실험에 사용된 균주와 플라스미드

Strain/plasmid	Description	Source
Strains		
<i>E. coli</i>		
Top10	F-mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galUgalKrrpsL (Str ^R)endAInupG	L a b stock
BL21(DE3)pLys S	F ⁻ ,ompT, hsdS _B (r _B ⁻ ,m _B ⁻),dcm, gal, λ(DE3), pLysS, Cm ^r	L a b stock
JOL1136	BL21 with pET-CP39	T h i s study
JOL1234	BL21 with pET-FimA	T h i s study
JOL1214	Top10 with pQE-PtfA	T h i s study
JOL1135	BL21 with pET-ToxA	T h i s study
JOL991	BL21 with pET-F1P2	T h i s study
<i>S. Typhimurium</i>		
JOL401	<i>Salmonella</i> Typhimurium wild type	L a b stock
JOL912	<i>S. Typhimurium</i> JOL911 derivativeΔ <i>asd</i>	L a b stock
JOL1240	JOL912 with pBP244-CP39	T h i s study
JOL1251	JOL912 with pBP244-FimA	T h i s study
JOL1247	JOL912 with pBP244-PtfA	T h i s study
JOL1244	JOL912 with pBP244-ToxA	T h i s study
JOL1074	JOL912 with pBP244-F1P2	T h i s study
<i>P. multocida</i>		
JOL976	<i>Pasteurella multocida</i> sero type A wild type (PmA037)	L a b stock
JOL977	<i>P. multocida</i> (PDNT)sero type D wild type	L a b stock
<i>B. bronchiseptica</i>		
JOL978	<i>Bordetella bronchiseptica</i> wild type	L a b stock
Plasmids		
pQE31	IPTG-inducible expression vector; Am ^r	Qiagen
pET28a	IPTG-inducible expression vector; Km ^r	Novagen
pBP244	pYA3493 derivative containing <i>lepB</i> , <i>secA</i> and <i>secB</i> genes	L a b stock

2] 백신 제조

1. 백신 접종용 균주 제작

각 후보 항원인 CP39, PtfA, FimA, ToxA, F1P2를 pBP244와 pMMP65를 국내 분리주인 *S. Typhimurium*으로부터 개발된 약독화 *S. Typhimurium* 전달계에 클로닝한 후 항원의 발현 및 분비 여부를 Western blot 방법으로 확인하였다. 발현이 확인된 각 vector와 pBP244를 표 5에서 제시한 제한효소로 절단한 후 agarose gel에서 전기영동하였다. AccuPrep gel purification kit를 이용하여 agarose gel로 부터 절단된 부착인자와 pBP244 절편을 정제하고 T4 DNA ligase를 이용하여 4°C에서 하룻밤 ligation하였다. 이 ligation 된 반응액으로 *E. coli* Top10을 형질전환시켜 DAP을 첨가하지 않은 LB agar에 골고루 퍼서 말린 다음 하룻밤 배양하여 pBP244에 의하여 형질전환 된 균주를 선택하였다. 각 부착인자의 확인은 *E. coli* Top10으로부터 plasmid를 분리하여 각 부착인자에 해당하는 제한 효소로 절단한 후 agarose gel에서 전기 영동하여 최종 확인하였다. 위에서 최종 확인된 각 정제 plasmid를 electroporation방법에 의하여 JOL912에 형질전환시켜 PM1665, CP39, fimA, ptfA, toxA, F1-P2를 얻었다. 즉, JOL912를 DAP (50 µg/ml)이 포함된 LB broth에서 mid-log phase까지 배양한 후 멸균된 ice-cold 10% glycerol 함유 증류수로 두 번 세척하였다. 준비된 JOL912를 0.2 cm cuvette에 넣고 플라스미드 0.1 µg과 섞은 후 Bio-Rad MicroPulser (Bio-Rad, USA)의 Pre-Programmed Settings 중 Ec2에 따라 전기충격을 가하였다. 반응 된 균을 cuvette에서 회수한 다음 DAP을 넣지 않은 LB broth 1 ml를 첨가하여 1시간 동안 37°C에서 배양하였다. 형질전환 된 살모넬라 균을 선별하기 위해 배양된 균액 100 µl를 다시 DAP을 첨가하지 않은 LB agar에 골고루 퍼서 말린 다음 37°C에서 하룻밤 배양한 후 형성된 균주를 선별하였다.

2. 경구 접종용 생균백신 준비

각 부착인자의 발현이 확인된 약독화 살모넬라균을 LB broth에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후 새로운 LB broth에 1:20의 비율로 첨가되어 37°C에서 optical density (OD)₆₀₀가 0.8이 될 때까지 배양되었다. 배양된 균주들은 4,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였으며, 침전된 균주들은 멸균 phosphate-buffered saline (PBS)로 재부유되어 같은 조건으로 재 원심분리하였다. 침전된 균주는 sucrose가 20%가 되도록 첨가된 PBS (PBS-sucrose)로 각 항원을 발현하는 균주들은 2.0X10⁹CFU colony-formingunits (CFU)/ml가 되도록 재 부유시켰다. 생균이 제조된 당일에 마우스는 구강으로 접종하였다.

3. 비강 접종용 생균백신 준비

경구접종과 마찬가지로 생균 백신 준비를 위해서는 각 adhesin의 발현이 확인된 약독화 살모넬라균을 LB Broth에 접종하여 37°C에서 200rpm의 속도로 16시간 배양한 배양액을 1/20 (volume)의 비율로 LB Broth에 첨가하여 같은 조건에서 OD₆₀₀값이 0.8 ~ 0.9가 될 때까지 2 ~ 4시간 동안 배양하였다. 이 배양액을 4°C에서 4,000 rpm으로 10분 내지는 20분 동안 원심분리하여 멸균PBS로 3번 세척한 후 멸균 PBS로 부유시켜 총 균수가 1.0X10⁵ CFU/µl가 되도록 혼합하여 생균 백신으로 제조된 당일에 마우스는 비강으로 접종하였다.

4. 도전 감염용 야외균주 준비

6주령 BALB/c female mice 18마리를 사용하여 2마리씩 9개 군으로 나눠 3가지 균주를 다양한 농도로 비강접종을 시행하였다. 접종 후 매일 임상증상을 확인 하여 임상증상이 사라지기 전이나 50%의 폐사률이 확인되는 시기에 마우스를 희생 시켜 폐를 분리하여 Brain Heart Infusion Broth에 담은 뒤 조직을 분쇄하고 100 μl 를 Chocolate Agar에 spreading 하여 밤새 배양하였다. 배지위에 생긴 colonies를 PCR로 확인 하고 이를 공격시험 균주로 사용하였다. 최종 야외균주의 접종균수는 *P. multocida* typeA는 1.0×10^8 CFU/ μl , *P. multocida* typeD는 1.0×10^8 CFU/ μl , *B. bronchiseptica*는 1.0×10^8 CFU/ μl 으로 최종 결정이 되었다.

3] 실험내용

1. 경구 및 비강으로 백신접종

5주령의 BALB/c female mice를 각 Group별로 5마리씩 구입하여 약 1주일 동안 사육 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다 (표 7, 8). 실험 군은 크게 경구 접종군과 비강 접종군으로 나누어져 있으며 각 군은 개별 항원 별로 경구 접종 및 비강 접종하였다.



그림 5. 실험용 마우스

2. 경구접종

5주령의 BALB/c 암컷 마우스를 각 그룹별로 5마리씩 구입하여 약 1주일 동안 사육 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다 (표 7). 마우스에 1차 접종 시에는 LTB 발현 CK110 (JOL906)균주와 함께 접종하였다. PBS-수크로오스 20 μl 에 JOL906 균수가 4×10^8 CFU 및 표 7의 각각의 항원을 발현 백신 균주의 수가 16×10^8 CFU가 되도록 혼합하여 제조 당일에 접종하였고, 2차 접종 시에는 LTB 발현 균주를 제외한 각 항원 발현 균주만 접종하였다.



그림 6. 마우스에서 경구 접종

표 7. 마우스에서 백신 경구접종 실험개요

그룹	NO	항원이 유래한 균	항원
1	5	<i>P. multocida</i>	PM1665
2	5	<i>P. multocida</i>	CP39
3	5	<i>P. multocida</i>	PtfA
4	5	<i>P. multocida</i>	ToxA
5	5	<i>P. multocida</i>	FimA
6	5	<i>P. multocida</i>	control
7	5	<i>B. bronchseptica</i>	F1P2
8	5	<i>B. bronchseptica</i>	control

3. 비강접종

비강 접종 마우스는 각 항원 별로 5마리와 대조군 5마리가 실험에 사용되어졌으며 (표 8), 항원당 개별 접종을 시행하였다. 1차 접종 시 개체 당 멸균 된 PBS로 부유시킨 생균백신 7 μ l와 점막면역 adjuvant (LTB) 3 μ l의 혼합액 총 10 μ l내 1×10^5 CFU로 접종하였고, 2차 접종 시엔 점막면역 adjuvant (LTB)를 제외한 멸균 된 PBS 부유 시킨 생균 백신만을 비강 접종하였다. 비강 접종시 경구접종과 마찬가지로 1차 접종 시에는 LTB 발현 CK110 와 같이 접종 하였다. 즉, PBS 1 μ l에 JOL906 (JOL906) 균수가 2×10^4 CFU,그리고 각 항원 발현 백신 균주의 수가 8×10^4 CFU이 되도록 혼합하여 제조 당일에 접종하였으며 2차 접종 시에는 LTB 발현 균주를 제외한 각 항원 발현 균주만 접종하였다. 이때 비강접종 시 접종의 정확도와 실험동물의 안전을 위해 마취한 뒤에 접종을 시행하였다. 마취약의 제조는 Zoletil과 Rompun을 각 각 생리 식염수로 1 : 20으로 희석한 후, 상기 희석액을 Zoletil과 Rompun의 비율을 8:2로 섞은 뒤 100 μ l를 근육주사로 마취시켰다.



그림 7. 마우스에서의 비강접종

표 8. 마우스에서 비강접종 실험개요

그룹	NO	항원이 유래한 균	항원
1	5	<i>P. multocida</i>	PM1665
2	5	<i>P. multocida</i>	CP39
3	5	<i>P. multocida</i>	ptfA
4	5	<i>P. multocida</i>	toxA
5	5	<i>P. multocida</i>	fimA
6	5	<i>P. multocida</i>	control
7	5	<i>B. bronchseptica</i>	F1-P2
8	5	<i>B. bronchseptica</i>	control

4. 가검물 채취

(1) 질 분비물 채취

접종 전, 1차 접종 후 3주와 2차 접종 후 3주, 6주 째에 각각의 마우스를 대상으로 멸균 PBS (pH7.2) 100 μ l를 질내로 투입 후 micropipet을 사용하여 회수하여 -80°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

(2) 채혈

위와 같은 시기에 각각 채혈하여 혈청을 분리 -80°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

(3) 효소면역측정법을 통한 면역반응 측정

효소면역측정법을 통한 면역반응 측정은 혈청, 질분비물을 대상으로 IgG 및 sIgA에 대한 항체 역가를 측정하였다. IgG는 마우스에 경구 및 비강접종 후에 각 항원에 대해 형성된 항체의 역가를 측정하기 위한 목적으로 마우스 혈청에서 측정이 되었으며 ELISA로 IgG의 역가를 측정하였다. sIgA는 마우스에 접종한 후에 형성된 mucosal 및 systemic immune response 중 mucosal immune response를 확인하기 위한 실험으로 질 세척액을 대상으로 하여 ELISA로 sIgA의 역가를 측정하였다. 백신 접종 후 형성된 면역 반응을 측정하기 위한 ELISA 항원은 정제를 하여 농도 측정을 한 뒤 -70°C에 보관하며 실험에 사용하였다. mouse IgG 또는 IgA ELISA Quantitation kit (Bethyl Lab Inc, Montgomery, TX, USA)를 사용하여 제조회사의 사용설명서에 따라 표준 ELISA를 수행하여 혈청에서 IgG를, 질분비물에서 secretory IgA (sIgA)를 측정하였다. IgG와 IgA를 측정하기 위해 혈청은 1:200으로 희석되었고 sIgA를 측정하기 위해 질 분비물에서 1:3으로 희석되었다. 그리고 *o*-phenylenediamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 발색 시킨 후 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4] 실험결과

1. 각각의 항원을 발현하는 균주를 이용한 백신을 경구 접종 후, 혈청 (Serum) IgG 및 질 분비물(mucosal)의 sIgA 역가

혈청, 질 분비물에 대하여 ELISA Quantitation kit (Bethyl Lab Inc, Montgomery, TX,

USA)를 제조회사의 사용설명서에 따라 ELISA를 수행하였고, *o*-페닐렌디아민(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 발색시킨 후 492nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈청의 IgG의 역가를 측정한 결과는 그림 4에 나타내었고, 질 분비물의 sIgA 역가를 측정한 결과를 그림 5에 나타내었다.

경구접종에서 IgG의 경우 각 CP39, PtfA, FimA, F1-P2 항원에서의 백신 접종군의 IgG는 백신접종 후 1차 접종 후 3주, 2차 접종 후 3주와 6주차에서도 대조군에 비해 최소 1.5배 이상의 항체 역가가 유지되는 것이 관찰되었다. 그리고 ToxA 항원에서는 1차 접종 한 후 3주차, 2차 접종 후 3주차에서만 항체역가가 유지되는 것이 관찰되었다 (그림 8).

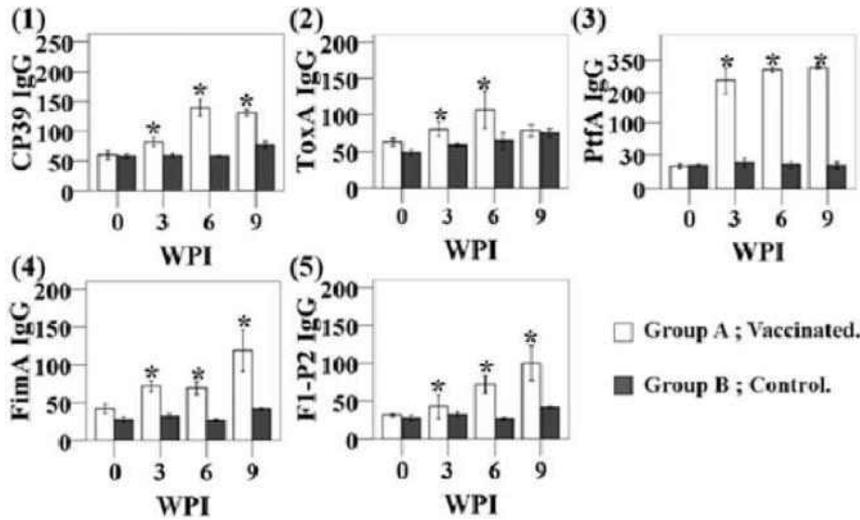


그림 8. Serum IgG ($\mu\text{g/mL}$) titres against CP39, ToxA, PtfA, FimA and F1P2 antigens in mice orally immunised with each vaccine candidate. (1) CP39-specific IgG; (2) ToxA-specific IgG; (3) PtfA-specific IgG; (4) FimA-specific IgG; (5) F1P2-specific IgG; A, immunised group; B, control group. WPI: Weeks Post-Immunisation. Data shown are the means of all mice in each group and error bars show the standard deviations (SD). Asterisks indicate a significant difference between the values of the group immunised with the vaccine candidate ($*P \leq 0.05$) and those of the control group.

sIgA의 경우에는 백신 접종 군에서 PtfA항원은 1차 접종 후 3주차 2차 접종 후 3주에 증가되어 6주차에 유지하여 대조군에 비해 최소 1.5배 이상의 항체 역가가 관찰되었다. 항원 FimA와 F1P2에서는 2차 접종 후 3주차에 증가되어 6주차에 유지되며 대조군보다 최소 1.5배 이상의 항체역가가 관찰되었다. 항원 CP39의 경우 1차 접종 후 3주차에 증가되어 항체역가가 떨어지는 것이 관찰되었으며, 항원 ToxA의 경우엔 2차 접종 후 6주차에 증가되어 항체역가가 떨어지는 것이 관찰되었다. 이는 대조군에 비해 최소 1.5배 이상의 항체 역가가 관찰되었다. 1차와 2차 모두 경구로 접종한 백신 접종 군에서 전신 및 점막에서의 항체 역가가 대조군에서의 항체 역가 보다 높거나 같은 수준으로 관찰되었다 ($*P < 0.05$) (그림 9).

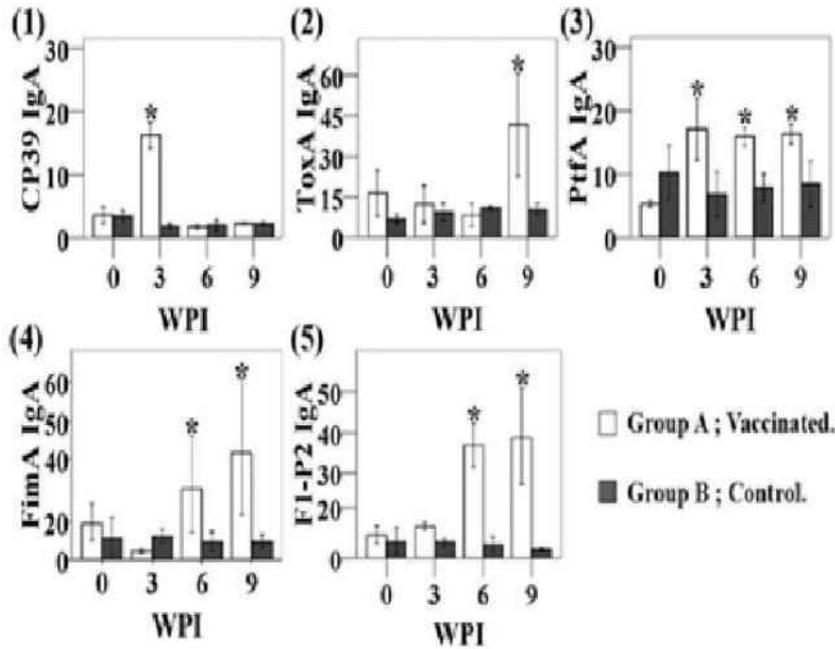


그림 9. Secretory IgA (ug/ml) titers against CP39, ToxA, PtfA, FimA and F1P2 fimbrial antigens in mice orally immunized with each vaccine candidate. (1) CP39-specific IgA; (2) ToxA-specific IgA; (3) PtfA-specific IgA; (4) FimA-specific IgA; (5) F1P2-specific IgA. Data are the means of all mice in each group; error bars show the standard deviations (SD). Asterisks indicate a significant difference between the values of the groups immunized with the vaccine candidate ($*P \leq 0.05$) and those of the control group.

2. 각각의 항원을 발현하는 균주를 이용한 백신을 비강 접종 후, 혈청(Serum) IgG 및 질 분비물(mucosal)의 sIgA 역가

비강접종에서 IgG의 경우 모든 항원 (CP39, PtfA, FimA, ToxA, F1P2)에서의 백신 접종군의 IgG는 백신접종 후 1차 접종 후 3주, 2차 접종 후 3주와 6주차에서도 대조군에 비해 최소 1.5배 이상의 항체 역가가 유지되는 것을 관찰되었다 ($*P < 0.05$) (그림 10).

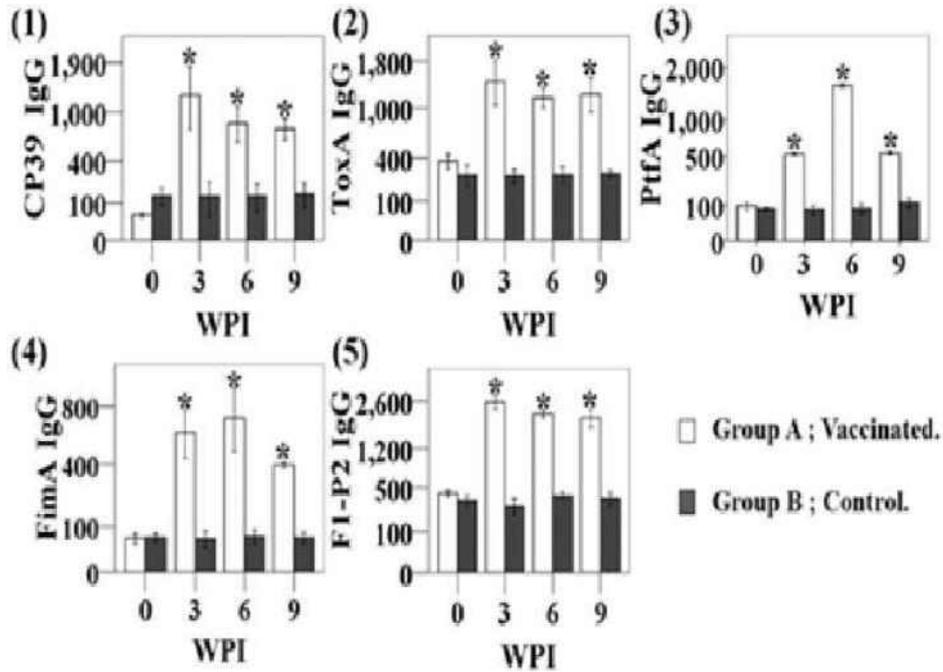


그림 10. Serum IgG ($\mu\text{g/mL}$) titres against CP39, ToxA, PtfA, FimA and F1P2 antigens in mice intranasally immunised with each vaccine candidate. (1) CP39-specific IgG; (2) ToxA-specific IgG; (3) PtfA-specific IgG; (4) FimA-specific IgG; (5) F1P2-specific IgG; A, immunised group; B, control group. WPI: Weeks Post-Immunisation. Data shown are the means of all mice in each group and error bars show the standard deviations (SD). Asterisks indicate a significant difference between the values of the group immunised with the vaccine candidate ($*P \leq 0.05$) and those of the control group.

sIgA의 경우에는 백신 접종 군에서 ToxA, PtfA, FimA, F1P2 항원은 1차 접종 후 3주차 2차 접종 후 3주에 6주차에 유지하여 대조군에 비해 최소 1.5배 이상의 항체 역가가 관찰되었다. 항원 CP39에서는 2차 접종 후 3주차에 증가되어 대조군보다 최소 1.5배 이상의 항체 역가가 관찰되었다. 항체 역가가 관찰되었다. 특히 1차와 2차 모두 비강으로 접종한 백신 접종 군에서 전신 및 점막에서의 항체 역가가 대조군에서의 항체 역가 보다 높고 유지가 되는 것이 관찰되어 경구접종군보다 효과가 좋은 것으로 판단되어 비강접종으로 선택하게 되었다 ($*P < 0.05$) (그림 11).

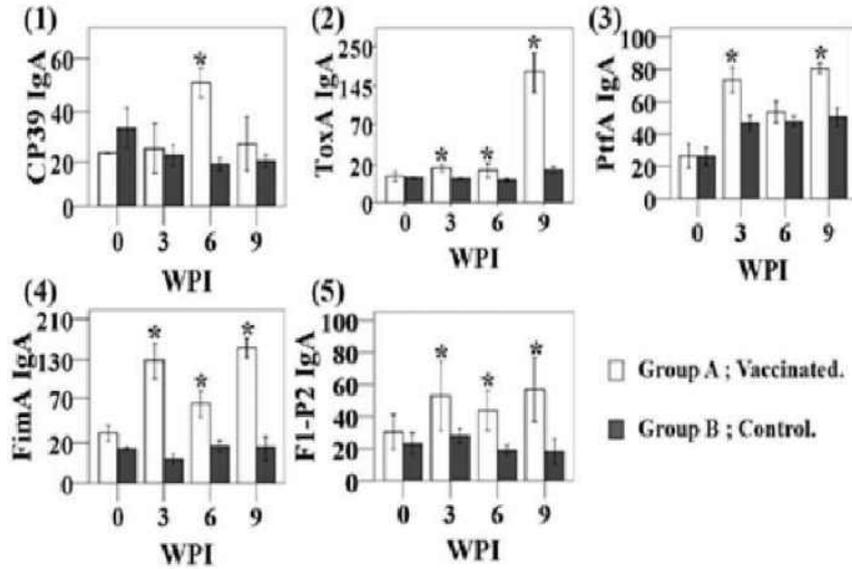


그림 11. Secretory IgA (ug/ml) titers against CP39, ToxA, PtfA, FimA and F1P2 fimbrial antigens in mice intranasally immunized with each vaccine candidate. (1) CP39-specific IgA; (2) ToxA-specific IgA; (3) PtfA-specific IgA; (4) FimA-specific IgA; (5) F1P2-specific IgA. Data are the means of all mice in each group; error bars show the standard deviations (SD). Asterisks indicate a significant difference between the values of the groups immunized with the vaccine candidate ($*P \leq 0.05$) and those of the control group.

5] 결론

적합한 접종 경로를 결정하기 위하여 선택된 개별 항원 유전자가 각각 삽입된 약독화 *Salmonella* Typhimurium 백신 균주의 접종경로별 효과를 비교하기 위해 각 해당 항원 유전자가 삽입된 약독화 *Salmonella* Typhimurium을 경구와 비강으로 접종한 후 면역반응 유도 여부를 통해 적합한 접종경로를 결정하였다. 실험결과 경구접종에서 IgG의 경우 각 CP39, PtfA, FimA, F1P2 항원에서의 백신 접종군의 IgG는 백신접종 후 1차 접종 후 3주, 2차 접종 후 3주와 6주차에서 항체 역가가 유지되었고 ToxA의 경우 1차 접종 한 후 3주차, 2차 접종 후 3주차에서만 항체역가가 유지되는 것이 관찰되었다. 하지만 비강접종 시 IgG의 경우 모든 항원이 백신접종 후 1차 접종 후 3주, 2차 접종 후 3주와 6주차에서도 항체 역가가 유지되는 것을 관찰되었다. 또한 점막면역 유도반응에서 중요한 sIgA의 경우에는 경구백신 접종 군에서 PtfA 항원은 1차 접종 후 3주차 2차 접종 후 3주에 증가되어 6주차에 유지하였고 항원 FimA와 F1P2에서는 2차 접종 후 3주차에 증가되어 6주차에 유지되었다. 하지만 항원 CP39의 경우 1차 접종 후 3주차에 증가되어 항체역가가 떨어지는 것이 관찰되었으며, 항원 ToxA의 경우엔 2차 접종 후 6주차에 증가되어 항체역가가 떨어지는 것이 관찰되었다. 그렇지만 비강백신 접종 sIgA의 경우에는 백신 접종 군에서 ToxA, PtfA, FimA, F1P2항원은 1차 접종 후 3주차 2차 접종 후 3주에 6주차까지 유지 하였으나 항원 CP39에서는 2차 접종 후 3주차에 증가되어 감소 되는 것이 확인되었다. 위 결과를 바탕으로 실험에서 중요한 점막면역이 오랫동안 유지되는 비강을 이 백신 후보균주의 예방 접종 경로로 선택하였다.

[7] 실험동물에서의 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신 후보균주의 혼합접종 실험

1] 실험 내용

1. 백신접종

위 실험에서 결정된 비강접종으로 protection이 좋지 못한 항원(PM1665)을 제외한 나머지 항원들을 가지고 혼합하여 접종을 시행하였다. 경로접종 결정 실험과 마찬가지로 5주령의 BALB/c female mice를 각 항원 별로 면역 반응 유도 여부를 측정하기 위해 30마리씩 총 60마리를 구입하여 약 1주일 동안 사육 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였고 이 실험 군은 접종경로 결정실험에서 결정된 항원들로 각 항원을 발현하는 균주를 혼합한 후 비강으로 접종량이 10 μ l 내 1×10^6 CFU가 되도록 멸균된 PBS로 희석한 뒤 각 균주들을 혼합하여 접종하였다. 실험 군 마우스는 하룻밤 동안 절식시킨 후 접종 경로 결정 실험에서 비강 접종 군 마취약을 제조한 뒤 개체 당 비강에 5 μ l씩, 총 접종량이 10 μ l가 되도록 비강 접종 하며 대조군은 각각 멸균 PBS로 비강 접종 하였다.

2. 가검물 채취

접종 전, 1차 접종 후 2주, 4주, 6주, 8주째에 각각 그룹별로 질 분비물 및 채혈을 수행하였다.

3. 효소면역측정법을 통한 면역반응 측정(ELISA)

백신 후보균주를 혼합하여 비강으로 접종 한 후 각 항원에 대해 형성된 항체의 역가를 측정하기 위해혈청을 대상으로 각 항원에 대해 ELISA로 IgG 역가를 측정하고 질 분비물을 대상으로 sIgA 역가를 위에서 서술된 방법에 준하여 측정하였다.

4. 비장세포에서의 세포성 면역반응 (Splenocyte proliferation assay; SPA)

마우스에 백신 균주를 비강으로 투여한 후 각 그룹별로 5마리의 마우스를 접종 후 4주째에 무균 적으로 spleen을 채취하여 ice에 보관중인 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml의 페니실린, 50 μ g/ml의 스트렙토마이신과 2 μ g/ml의 fungizone이 포함된 RPMI 1640용액에 넣어서 분쇄한 후 cell strainer (ϕ 70, SPL)에 여과시켰다. 이를 0.8% ammonium chloride (w/v)를 이용하여 erythrocytes를 용해하여 380 \times g, 4 $^{\circ}$ C 10분간 원심한 후 침전물을 멸균 PBS로 3번 세척하고 마지막 원심 후 complete medium (RPMI 1640 supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin and 10% FCS)으로 재 부유시킨 뒤 cell 수를 계산하고 5×10^6 cells/ml 100 μ l씩 분주한 다음 각 항원이 10~15 ug/ml in 100 ul로 희석한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 48시간 반응 후 ViaLight[®] Plus Kit (Lonza Rockland, ME, USA)를 매뉴얼에 따라 Splenocyte proliferation assay (SPA)를 luminometer (TriStarLB941, Berthold technologies GmbH&Co., Germany)를 사용하여 측정하였다.

5. 유세포 분석 (Flow cytometry)

백신 접종 후 면역유도와 밀접하게 관련된 면역 세포를 관찰하기 위한 목적으로 1차

접종 후 각 그룹별로 5마리의 마우스를 1차 접종 후 4주째에 무균적으로 spleen을 채취하여 RPMI 1640에 모은 뒤 0.8% ammonium chloride (w/v)를 이용하여 erythrocytes를 용해하여 380×g, 4°C 10분간 원심한 후 침전물을 멸균 PBS로 3번 세척하였다. 마지막 원심 후 complete medium (RPMI 1640 supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin and 10% FCS)으로 재 부유시키고 cell 수를 계산한 뒤 선택된 각 항원 CP39, PtfA, ToxA, FimA, F1P2으로 12시간 반응 시킨 후 CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ (T cell) 및 CD45R (B cell)을 측정하였다. 3-color immunostain을 위해 splenocytes (2 × 10⁶/100 μl) 3가지 종류의 분류된 antibodies를 혼합하여 얼음 위에서 45분 동안 반응시켰다. 즉, FITC-labeled anti-mouse CD4 antibody, PE-labeled anti-mouse CD8 antibody, PE-Cy5-labeled anti-mouse CD3 antibody, APC-labeled anti-mouse CD45R antibody (Beckman Coulter, CA, USA)으로 각각 반응시켰다. 유세포분석 (Flow cytometry analysis)은 FACs CaliburTM (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA)로 측정되었으며 데이터 분석은 FlowJo software (Treestar, Inc., San Carlos, CA)를 사용하였다.

6. 실시간 역전사 중합효소 연쇄 (quantification real-time PCR)

백신 접종 후 분비되는 cytokines IL-4, IL-6, IFN- γ 를 측정하기 위하여 위 4와 같은 방법에 준하여 마우스의 spleen을 분리한 뒤 cell 수를 5×10⁶cells/ ml으로 맞추어 대표 항원인 CP39, PtfA와 F1-P2로 72시간 반응 시킨 후 RNeasy[®] Plus mini kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 수확된 세포를 가지고 사용설명서에 기재된 방법에 준하여 total RNA를 추출하였다. 마우스 싸이토카인 IL-4, IL-6, INF- γ 의 발현확인을 위해 QuantiTect[®], SYBR[®] Green RT-PCR Kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany)와 각 해당 싸이토카인의 primers를 사용하였다. 해당 싸이토카인의 확인과 증폭은 Real-time PCR장치(Applied Biosystems, CA, USA)를 이용하여 측정하였으며 정확도를 높이기 위하여 한 sample당 triplicate하였으며 temperature-time profile은 아래에 준하여 시행하였다: Initial temperature at 95°C for 15min, followed by 94°C for 15s, 55°C for 30s, and 72°C for 30s for 40 cycles. 각 해당된 싸이토카인의 상대적인 수치를 정규화하기 위해 일반적으로 사용되는 GAPDH를 참조하는 방법을 사용하였고 결과는 2^(-ΔΔCT)를 통해 측정하였다.

7. 백신 접종 후 조직학적 검사 (Histology)

백신 후 폐 조직분리는 마우스 백신 후 8일 차, 4주 차, 대조군에 해당하는 군의 폐를 분리하여 고정액에 넣어 고정시키고 hematoxylin-eosin stain하였다. 백신 접종 후 8일 차와 4주차에 대조군과 백신군의 마우스의 폐를 분리한 뒤 포르말린 고정액에 보관하여 파라핀으로 조직을 고정하고 H-E stain을 통하여 백신접종 후 폐를 육안으로 관찰하였다. 고정액에 들어 있던 조직을 카세트에 넣어 하룻밤 방치하여 고정액을 수세한 뒤 알코올에서 탈수시킨 뒤 조직을 soft parafin에서 한 시간 반, hard parafin에서 한 시간 반을 포매 시키고 조직을 절편 한 뒤 하룻밤 방치시킨 조직절편을 말린다. 말린 조직은 자일렌을 이용한 탈파리핀과 수세를 시킨 뒤에 헤마톡신린으로 염색한 뒤 다시 수세한 뒤 아세트산으로 분별, 암모니아수로 중화시킨다. 그리고 흐르는 물에서 빛깔을 내고 에오진액으로 염색한 뒤 알코올로 분별탈수하고 봉입을 하여 조직을 관찰하였다.

2) 실험결과

1. 면역반응 역가

각각의 항원을 종합적으로 백신을 접종한 마우스에 면역유도 반응을 확인하기 위하여, 백신 후보 균주를 혼합하여 접종 후, 0주, 2주, 4주, 6주, 8주째에 ELISA를 이용하여 혈청에서는 IgG를 질 세척액에서는 sIgA의 면역유도 반응을 관찰하였다. 이의 결과를 그림 12와 13에 나타내었다.

각 항원의 혼합 접종 시 IgG의 경우 모든 항원 (CP39, ToxA, PtfA, FimA, F1-P2) 에서의 백신 접종군의 IgG는 백신접종 후 1차 접종 후 2주차부터 8주차까지 항체역가가 유지되었으며 모든 그룹은 대조군에 비해 최소 1.5배 이상의 항체 역가가 유지되는 것을 관찰되었다 (그림 12).

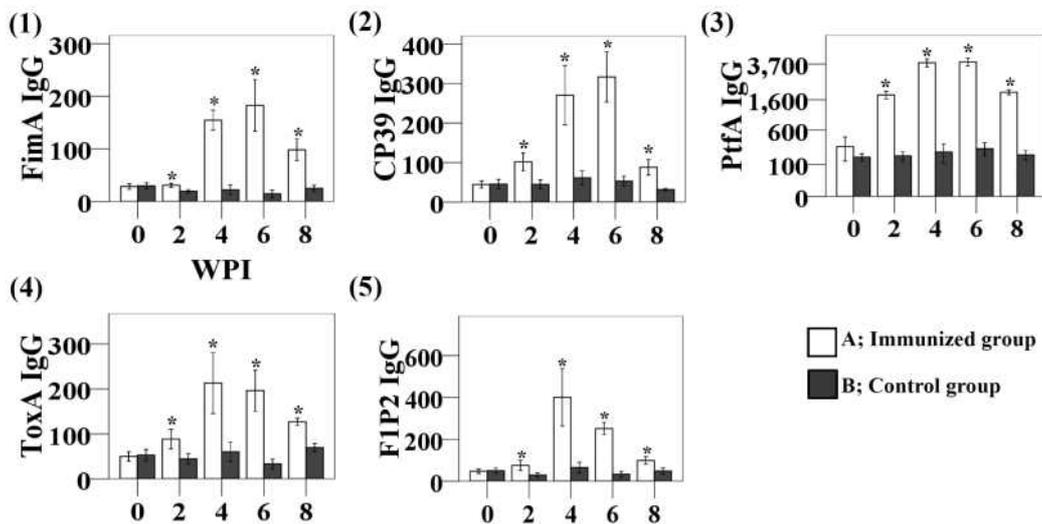


그림 12. Serum IgG ($\mu\text{g}/\text{mL}$) titres against FimA, CP39, PtfA, ToxA, and F1-P2 antigens in mice intranasally immunised with the vaccine candidates. (1) FimA-specific IgG; (2) CP39-specific IgG; (3) PtfA-specific IgG; (4) ToxA-specific IgG; (5) F1P2-specific IgG; A, immunised group; B, control group. WPI: Weeks Post-Immunisation. Data shown are the means of all mice in each group and error bars show the standard deviations (SD). Asterisks indicate a significant difference between the values of the group immunised with the vaccine candidate ($*P \leq 0.05$) and those of the control group.

sIgA의 경우에는 백신 접종군에서 ToxA, PtfA 항원은 접종 후 2주차에 증가되어 4주차에 가장 높게 증가되어 6주차까지 유지하였으며 항원 CP39, FimA에서 2주차에 증가하여 4주차에 가장 높게 증가되었다가 항체역가가 떨어졌으며 항원F1P2의 경우 4주차에 증가하여 6주차에 항체역가가 떨어짐이 관찰되었고 백신 접종군은 대조군에 비해 최소 1.5배 이상의 항체 역가를 관찰하였다. 혼합 접종 시에 백신 접종군에서 전신 및 점막에서의 항체 역가가 몇 개의 항원별 발현속도가 다름이 관찰되었으나 대조군에서의 항체 역가 보다 높고 유지가 되는 것이 관찰되었고 혼합접종을 하여 접종 횟수를 결정하는 실험을 결정하였다 ($*P < 0.05$) (그림 13).

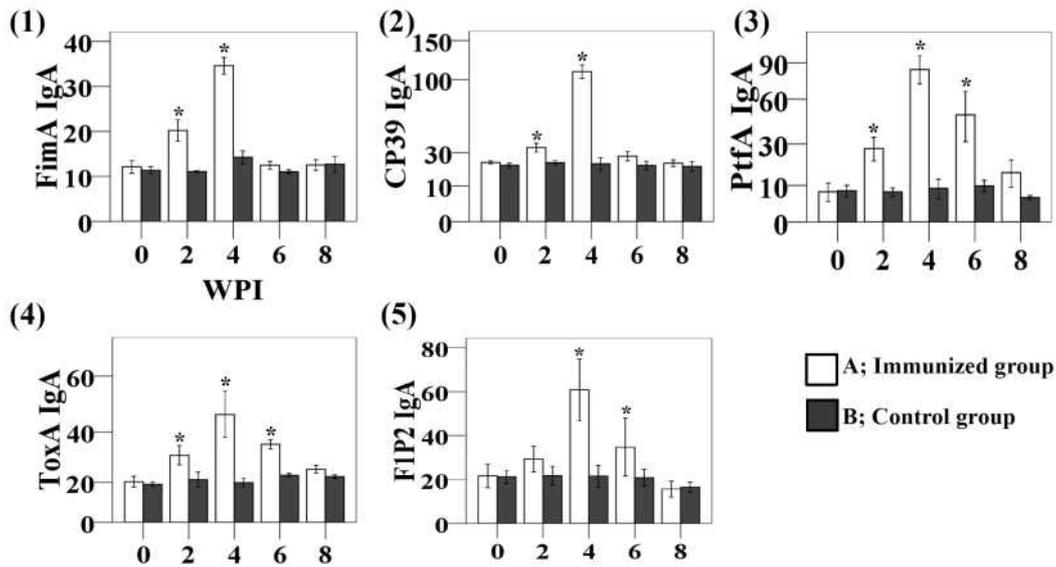


그림 13. Secretory IgA ($\mu\text{g}/\text{mL}$) titres against FimA, CP39, PtfA, ToxA, and F1P2 antigens in mice intranasally immunised with a mixture of the vaccine candidates. (1) FimA-specific IgA; (2) CP39-specific IgA; (3) PtfA-specific IgA; (4) ToxA-specific IgA; (5) F1P2-specific IgA; A, immunised group; B, control group. WPI: Weeks Post-Immunisation. Data shown are the means of all mice in each group and error bars show the standard deviations (SD). Asterisks indicate a significant difference between the values of the group immunised with the vaccine candidate ($*P \leq 0.05$) and those of the control group.

2. 비장세포에서의 세포성 면역반응

세포성 면역반응을 측정하기 위해 백신접종 후 4주차에 마우스의 비장에서 분리된 비장세포를 정제된 CP39, PtfA, F1P2 항원들로 자극을 시켜 실험을 수행하였다. 모든 백신 접종군은 대조군의 비해 1.5배 이상 증가 되었으며 이는 통계학적으로 의의가 있음이 관찰되었다 ($*P < 0.05$). 면역반응의 간접적으로 나타내는 자극지수 (stimulation index)는 백신 접종군에서 비장세포를 각 항원들로 자극시켰을 시 0.99 ± 0.01 , 1.37 ± 0.15 , 2.34 ± 0.35 으로 각각 관찰된 반면, 대조군에서 CP39, PtfA, F1P2에 대한 각 항원별 자극지수는 0.67 ± 0.06 , 0.95 ± 0.05 , 0.65 ± 0.10 으로 각각 관찰되었다 (그림 14).

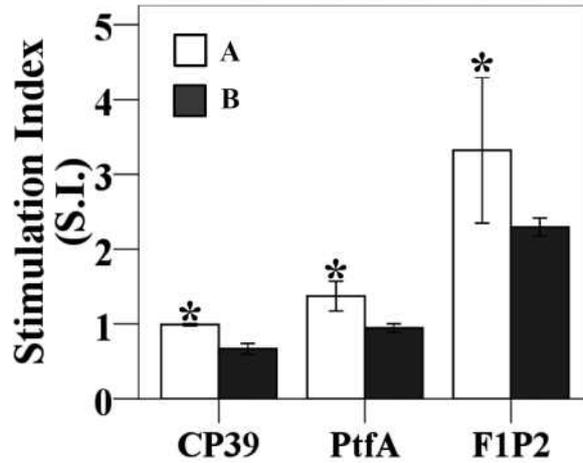


그림 14. Splenocyte proliferative responses against CP39, PtfA, and F1P2 antigens in immunised and nonimmunised mice at week 4 post-immunisation. The antigen-specific splenocyte proliferative response is expressed as the stimulation index (SI); A, immunised group; B, control group. Data shown are the means of all mice in each group and error bars show SD. Asterisks indicate significant differences between the values of the immunised and control groups (* $P \leq 0.05$).

3. 유세포 분석

세포성 및 체액성 면역을 측정하기 위해 백신접종 후 4주차에 백신 접종군과 대조군의 마우스 비장을 적출하여 비장세포를 분리하고 T 림프구와 B 림프구의 구성을 검사하기 위해 유세포 분석을 시행하였다. 각 실험군의 샘플은 T 세포는 anti-mouse CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺의 형광물질이 부착되었으며 T 세포의 CD4⁺와 CD8⁺의 부분집단의 백분위를 측정하였다. 실험에 사용한 백신접종군의 선택된 항원 CP39, FimA, ToxA, F1P2의 CD4와 CD8의 백분율은 대조군에 비해 1.5배 이상 증가가 되었다. B 세포는 anti-mouse CD45R을 사용하여 선택된 항원 CP39, PtfA, FimA, F1P2의 백분위를 측정하였을 때 대조군의 비해 1.5배 이상이 증가되었으며 T세포와 B세포 모두 백신군이 대조군에 비해 통계학적으로 유의적인 증가를 나타내었다 (* $P < 0.05$) (그림 15).

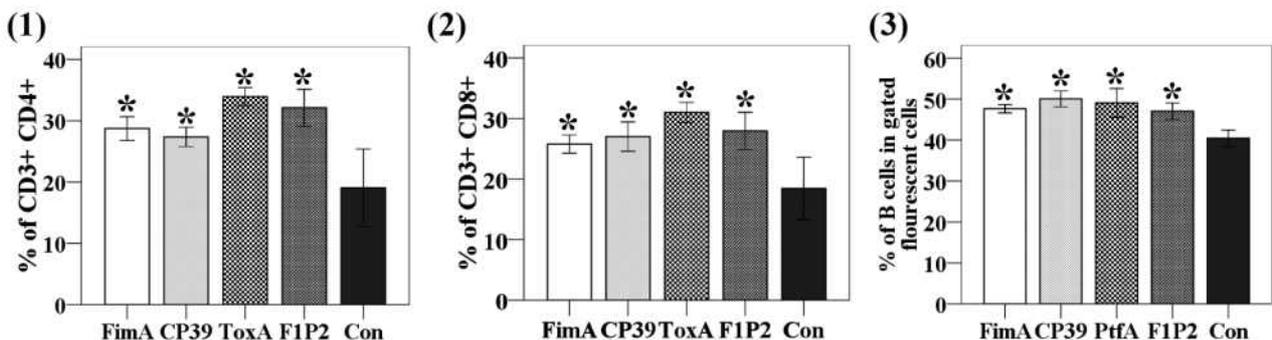


그림 15. Flow cytometric analysis of T-lymphocyte and B-lymphocyte subpopulations in spleen at week 4 post-immunisation; (1) Bar-graphs represent CD3⁺CD4⁺, (2) CD3⁺CD8⁺, and (3) CD3⁺CD45R⁺ splenocyte subpopulations in the immunised mice. All values of bar-graphs are shown as means \pm SD. Asterisks indicate significant differences

between the values of the immunised and control groups ($*P \leq 0.05$).

4. 실시간 역전사 중합효소 연쇄

세포성 및 체액성 면역에 관여하는 싸이토카인인 interleukine-4 (IL-4)와 interferon-gamma (INF-r)의 분비를 측정하기 위해 백신접종 후 4주차에 무균적으로 접종군과 대조군의 마우스의 비장을 분리하여 항체역가가 높은 대표 항원인 CP39, PtfA, F1P2로 비장세포에 자극을 시키고 cDNA을 합성한 뒤 해당 싸이토카인으로 자극을 시킨 뒤 실시간 역전사 중합효소 연쇄를 통해 측정되었다. 이때 백신군은 Th1에 관여하는 INF-r만이 대조군에 비해 유의적인 증가를 나타내었다 ($*P < 0.05$). Th2에 관여하는 싸이토카인 IL-4의 경우 대조군의 비해 증가는 하였으나 통계학적 유의가 관찰되지 않았다 (그림 16).

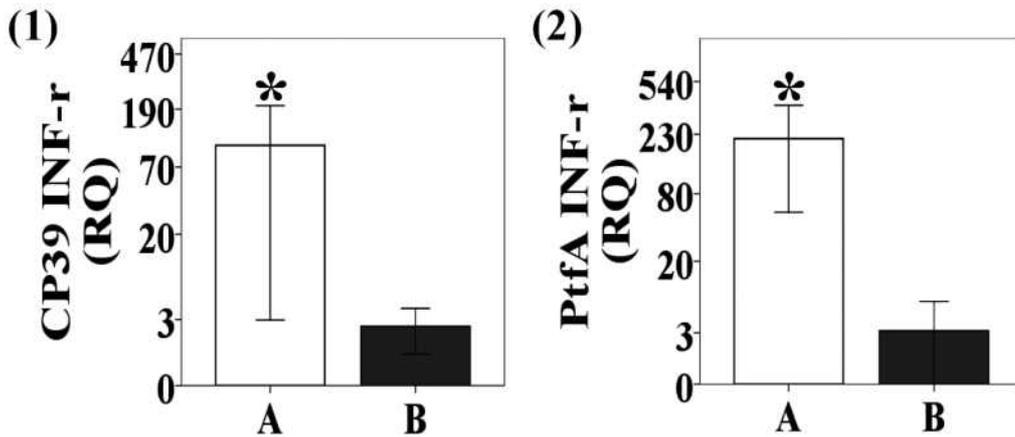


그림 16. Relative quantification (RQ) of interferon-gamma (IFN- γ) expression in mice splenocytes using real-time PCR. Bar-graphs represent IFN- γ stimulated with (1) CP39 antigen or (2) PtfA antigen in splenocyte of immunised mice; A, immunised group; B, control group. Data shown are the means of all mice in each group and error bars show SD. Asterisks indicate significant differences between the values of the immunised and control groups ($*P \leq 0.05$).

5. 백신 접종 후 조직학적 검사

비강으로 백신을 접종한 후 폐에서 회복이 되는 시기를 판단하기 위하여 접종 후 3일차와 4주차에 무균적으로 마우스의 폐를 분리하였다. 조직학 검사를 시행한 결과 그림 17-(2)의 3일차 백신 접종군에서는 폐조직에 대식세포가 많이 생성되어 대조군과 비교하여 관찰할시 염증반응이 일어나는 것을 판단할 수 있었다. 하지만 4주차 그림 17-(4)에는 대조군[그림 17-(3)]과 차이가 없을 정도의 회복을 보여 회복이 완전히 이루어 졌음이 관찰되었다 (그림 17).

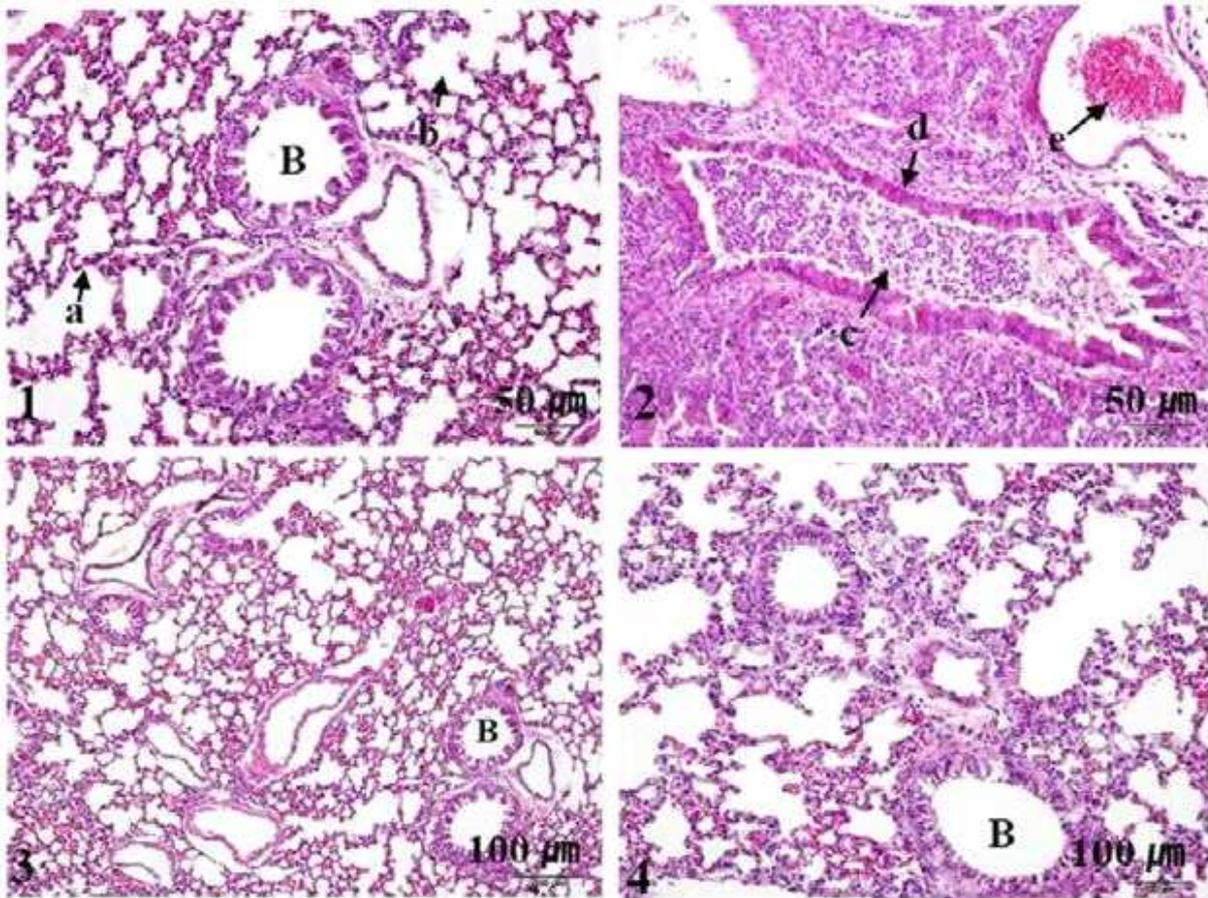


그림 17. Histological observations of lungs from the control group mice (1) and the immunised group mice (2) at day 3 post-immunisation, the control group mice (3) and the immunised group mice (4) at week 4 post-immunisation. Fewer or no histopathological changes were found in the lungs of mice in the immunised group than in those of the control group.

3] 결론

적합한 백신접종 경로로 비강접종을 선택한 뒤 개별 항원 유전자가 각각 삽입된 약독화 *Salmonella* Typhimurium 백신 균주의 combination 접종에 따른 각 항원에 대한 면역반응 유도 및 접종 후 폐에서의 회복 여부를 조직학적으로 확인하여 보았다. 먼저 개별항원에 대한 면역반응으로는 각 항원의 혼합 접종 시 IgG의 경우 모든 항원 즉, CP39, ToxA, PtfA, FimA, F1P2에 대한 IgG는 백신접종 후 2주차부터 8주차까지 항체역가가 유지가 되었으며 sIgA의 경우에는 백신 접종군에서 ToxA, PtfA 항원은 접종 후 2주차에 증가되어 4주차에 가장 높게 증가되어 6주차까지 유지하였다. 항원 CP39, FimA에서는 2주차에 증가하여 4주차에 가장 높게 증가되었다가 항체역가가 떨어졌으며 항원F1P2의 경우 4주차에 증가하여 6주차에 항체역가가 떨어짐이 관찰되었다. 이 결과로 각 백신균주 항원을 종합하여 접종 하였을 경우에도 각 항원에 대해 점막면역반응이 유도됨을 확인할 수 있었다. 각 항원의 유전자가 삽입된 약독화된 살모넬라의 백신후보주와 대조군에서 백신접종 뒤 면역유도와 밀접하게 관련된 면역 세포와 세포매개성면역과 체액성면역을 측정하기 위하여 세포성 면역반응 및 유세포 분석 그리고 실시

간 역전사 중합효소 연쇄반응을 측정하였다. SPA의 경우 백신접종군은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의있게 증가 하여 세포매개성 면역반응에 관하여 효과적임이 확인되었다. 비장세포에서의 세포매개성 면역에 관련된 T lymphocyte의 CD3⁺CD4⁺와 CD3⁺CD8⁺비율과 B lymphocyte CD45R의 비율을 측정하기 위하여 유세포분석을 시행하여 본 결과, CP39, ToxA, FimA, ToxA, F1P2,으로 자극시킨 T cell subset의 CD3⁺CD4⁺와 CD3⁺CD8⁺의 백분위는 백신접종군이 대조군의 비해 통계학적으로 유의있게 증가되었으며 B cell subunit CD45R에서도 같은 결과를 얻었다. 또한 백신접종 후 각 세포 매개성 면역반응과 체액성 면역반응에 관련있는 사이토카인을 splenocyte에 각 해당 항원을 자극시킨 후 Real time PCR로 측정하여 본 결과, 백신접종군은 대조군에 비하여 모두 높게 나왔으나 INF- γ 만이 통계학적으로 유의가 있는 값을 나타내었다. IL-4의 분비는 대조군의 비하여 높게나왔으나 통계학적으로 유의있는 값을 나타내진 못하였다. 이는 약독화된 살모넬라의 전달계시스템을 이용함으로써 INF- γ 의 분비가 자극됨으로써 길항작용으로 IL-4의 분비는 보다 낮게 측정됨을 관찰할 수 있었다. 비강으로 백신접종을 실시할 때 폐조직에서의 염증반응이 일어났다가 회복이 되는 시기를 판단하기 위하여 백신군과 대조군의 폐를 백신 후 3일차와 4주차에 분리하여 조직학 사진으로 관찰한 결과 4주가 되는 시기에 폐조직이 회복되어 최적화실험에서의 2차 접종 및 3차 접종시기를 3주로 결정하였다.

[8] 실험동물을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신의 최적화 실험

1] 실험 내용

1. 백신접종

5주령의 BALB/c female mice를 각 그룹별로 15마리씩 구입하여 약 1주일 동안 사육 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 실험군은 그룹 1차 접종 군, 2차 접종 군, 3차 접종 군 그리고 대조군으로 구성되어 있으며 모든 마우스는 개체 당 접종 시 생균 백신을 1×10^6 CFU/10 μ l으로 접종하였다. 비강 당 5 μ l씩 총 10 μ l씩으로 비강접종 되었으며 공격시험의 연령대를 맞추기 위하여 3차 접종 군부터 1차 접종을 시작으로 3주 뒤 3차 접종 군 2차 접종과 2차 접종 군에서 1차 접종을 하였다. 2번째 접종 뒤 3주 차(1차 접종 뒤 6주 차)에 3차 접종 군 3차 접종, 2차 접종 군 2차 접종, 1차 접종 군 1차 접종 하였다. 대조군은 2차 실험과 마찬가지로 실험군과 같이 멸균 PBS를 비강 접종하였다 (표 9).

표 9. 마우스에서 백신 최적화 실험 개요.

그룹	두수	항원명	접종군수			도전감염
			1차	2차	3차	
A	15	CP39, PtfA, ToxA, FimA, F1P2			1×10^6 CFU /10 μ l	<i>P. multocida</i> Type D
B	15	CP39, PtfA, ToxA, FimA, F1P2		1×10^6 CFU /10 μ l	1×10^6 CFU /10 μ l	<i>P. multocida</i> Type D
C	15	CP39, PtfA, ToxA, FimA, F1P2	1×10^6 CFU /10 μ l	1×10^6 CFU /10 μ l	1×10^6 CFU /10 μ l	<i>P. multocida</i> Type D
D	15	멸균 PBS	-	-	-	<i>P. multocida</i> Type D

2. 가검물 채취

접종 전, 1차 접종 후 2주, 4주, 6주, 8주, 10주 쯤에 각각 그룹별로 각각의 마우스를 대상으로 멸균 PBS (pH7.2) 100 μ l를 질내로 투입 후 micropipet을 사용하여 회수하여 -80°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 또한 같은 시기에 채혈하여 혈청을 분리한 후 -80°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

3. 효소면역측정법을 통한 면역반응 측정

항원을 종합으로 합쳐서 비강접종 한 후 1차 백신 접종군, 2차 백신 접종군, 3차 백신 접종군과 대조군에 각 항원에 대해 형성된 항체의 역가를 측정하기 위한 목적으로 혈청을 대상으로 하여 ELISA로 IgG 역가를 측정하고 질 분비물을 대상으로 sIgA 역가를 연구목표 위에서 설명한 방법에 따라 측정하였다.

4. 실시간 역전사 중합효소 연쇄

백신 접종 후 분비되는 cytokines IL-4, IL-6, IFN- γ 를 측정하기 위하여 위 4와 같은 방법에 준하여 마우스의 spleen을 분리한 뒤 cell 수를 5×10^6 cells/ml로 맞추어 대표 항원인 CP39, PtfA와 F1-P2로 72시간 반응 시킨 후 RNeasy[®] Plus mini kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 수확된 세포를 가지고 사용설명서에 기재된 방법에 준하여 total RNA를 추출하였다. 마우스 싸이토카인 IL-4, IL-6, INF- γ 의 발현확인을 위해 QuantiTect[®], SYBR[®] Green RT-PCR Kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany)와 각 해당 싸이토카인의 primers를 사용하였다. 해당 싸이토카인의 확인과 증폭은 Real-time PCR장치(Applied Biosystems, CA, USA)를 이용하여 측정하였으며 정확도를 높이기 위하여 한 sample당 triplicate하였으며 temperature-time profile은 아래에 준하여 시행하였다: Initial temperature at 95°C for 15min, followed by 94°C for 15s, 55°C for 30s, and 72°C for 30s for 40 cycles. 각 해당된 싸이토카인의 상대적인 수치를 정규화하기 위해 일반적으로 사용되는 GAPDH를 참조하는 방법을 사용하였고 결과는 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 를 통해 측정하였다.

5. 공격시험

P. multocida Type D의 colony를 chocolate agar에 접종하여 37°C에서 16시간 배양한 후 OD₆₀₀ 값이 0.8 - 0.9가 될 때까지 멸균 PBS로 회수하였다. 도전접종 군에 해당하는 각 마우스는 하루 밤 동안 절식시킨 후 한 마리당 20 μ l에 5×10^7 CFU가 되도록 조정하여 비강접종 (그림 18)하며 폐사여부를 확인하였다.



그림 15. 마우스 비강으로 도전감염

6. 공격시험 후 조직학적 검사

공격시험 후 상태가 가장 안 좋은 시기인 2일차에 1차, 2차, 3차 접종군과 대조군의 마우스의 폐를 분리한 뒤 포르말린 고정액에 보관하여 파라핀으로 조직을 고정하고 H-E strain을 통하여 백신접종 후 폐를 육안으로 관찰하였다. 고정액에 들어 있던 조직을 카세트에 넣어 하룻밤 방치하여 고정액을 수세한 뒤 알코올에서 탈수시킨 뒤 조직을 soft parafin에서 한 시간 반, hard parafin에서 한 시간 반을 포매 시키고 조직을 절편 한 뒤 하룻밤 방치시킨 조직 절편을 말린다. 말린 조직은 자일렌을 이용한 탈파리핀과 수세를 시킨 뒤에 헤마톡신린으로 염색한 뒤 다시 수세한 뒤 아세트산으로 분별, 암모니아수로 중화시킨다. 그리고 흐르는 물에서 빛깔을 내고 에오진액으로 염색한 뒤 알코올로 분별탈수하고 봉입을 하여 조직을 관찰하였다.

2] 실험 결과

1. 면역항체 역가

백신 접종 후 백신접종 군과 대조군의 혈청과 질 분비물에서 각 항원에 대한 항체역가를 2주 간격으로 측정하였다. 실험에 사용된 마우스는 5주령의 마우스를 1주일의 적응시간을 마치고 6주령에서 백신접종을 시행하였으며 공격시험의 시기를 맞추기 위해 3회 접종을 하는 백신군 (Group C)을 먼저 6주령 마우스에 접종하였다. 3주 뒤 3회 접종군의 2회 접종과 2회 접종군 (Group B)의 1회 접종을 시행하였으며 3주 뒤에 1회 접종군 (Group A)의 1회 접종, 2회 접종군 (Group B)의 2차 접종, 3회 접종군 (Group C)의 3회 접종을 시행하였다. 마지막 접종 후 2주, 4주의 가검물을 채취한 뒤 공격시험을 시행하였다. 그림 19-I에서 보는 바와 같이 group B와 C 마우스의 경우 각 부착인자 항원에 대한 serum IgG 역가는 group D의 항체역가와 비교했을 때 접종 4주 후부터 (group C에서 2회 접종을 끝낸 마우스의 연령, group B에서 1회 접종을 끝낸 마우스 연령) 실험이 끝날 때까지 증가하였다 (* $P < 0.05$). Group A의 경우 group D와 비교했을 때 1회 접종 후부터 (12주령) 실험이 끝날 때까지 항체 역가가 증가하였다.

더불어 마우스의 질 분비물 sIgA 항체 역가는 각 부착인자 항원에 따라 분비양상이 다르게 관찰되었다 (그림 19-II). 먼저 항원 CP39의 경우 group B와 C의 마우스에서 1회 접종과 2회 접종 뒤 1주 후에 증가하였고 booster를 하고 4주 후 group C는 감소하였으나 group B는 실험이 끝날 때까지 group D 마우스의 항체 역가 보다 통계학적으로 유의 있게 증가하였다 (* $P < 0.05$). Group A의 경우에는 group D와 비교 했을 때 단지 접종 후 2주째에만 통계학적으로 유의 있는 증가가 관찰되었다. 항원 ToxA의 경우 group C의 마우스에서 2회 접종 뒤 1주 후에 증가 하였고 3회 접종 이후에 항체역가를 group D보다 통계학적으로 유의 있게 증가하였다. Group B는 2차 접종 후, group A는 1회 접종 후 2주째에 증가하여 실험이 끝날 때까지 group D의 항체 역가 보다 통계학적으로 유의 있게 증가하였다 (* $P < 0.05$). 항원 FimA의 경우 group B의 항체역가는 2회 접종 후부터 실험이 끝날 때까지 group D 마우스의 항체 역가 보다 통계학적으로 유의 있게 증가하였으며 (* $P < 0.05$) group C는 2회 접종 뒤 증가한 뒤에 3회 접종 시 감소하였다가 실험이 끝날 때 증가 하였다. Group A의 경우에는 group D와 비교 했을 때 단지 접종 후 2주째에만 통계학적으로 유의 있는 증가가 관찰되었다. 항원 PtfA의 경우 group C의 마우스의 항체역가는 1회 접종 후 2주 짜부터 3회 접종 한 뒤 4주째 까지 group D 마우스의 항체 역가 보다 통계학적으로 유의 있게 증가하였다 (* $P < 0.05$). Group B는 1회 접종 뒤 1주차부터 2회 접종 뒤 실험이 끝날 때 까지 group D에 비해 유의 있게 증가 하였으며 group A의 경우에는 group D와 비교 했을 때 단지 접종 후 2주째에만 유의 있는 증가가 관찰되었다. 항원 F1P2의 경우 group C의 마우스의 항체역가는 2회 접종 후 2주 짜부터 3회 접종 한 뒤 4주째 까지 group D 마우스의 항체 역가 보다 통계학적으로 유의 있게 증가하였다 (* $P < 0.05$). Group B는 2회 접종 뒤 실험이 끝날 때 까지 group A의 경우에는 실험이 끝날 때 까지 group D에 비해 유의 있게 증가가 관찰되었다 (* $P < 0.05$).

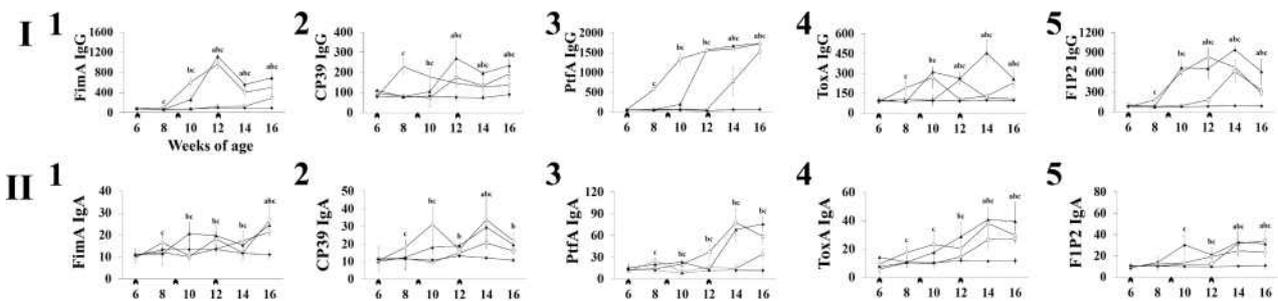


그림 19. Immune response against CP39, ToxA, PtfA, FimA, and F1P2 antigens in mice intranasally immunized with the vaccine candidates: (I) serum IgG ($\mu\text{g/ml}$) titers and (II) fecal IgA ($\mu\text{g/ml}$) titers. (1) FimA-specific antibodies; (2) CP39-specific antibodies; (3) PtfA-specific antibodies; (4) ToxA-specific antibodies; (5) F1P2-specific antibodies. Group A, single immunization; group B, double immunization; group C, triple immunization; and group D were inoculated with PBS as a control. Data are the means of all mice in each group and error bars show the standard deviations (SD). Arrows (▲) indicate primary, first booster, and second booster immunizations at 6-, 9- and 12-weeks-of-age, respectively. Lower case letters indicate a significant difference (* $P \leq 0.05$) between the

immunized and control groups (a: group A, b: group B, c: group C, d: group D).

2. 실시간 역전사 중합효소 연쇄

각 접종 횟수에 따른 세포성 및 체액성 면역에 관여하는 사이토카인인 interleukin-4 (IL-4)와 interferon-gamma(INF- γ)의 분비를 측정하기 위해 백신접종 후 4주차에 무균적으로 접종군과 대조군의 마우스의 비장을 분리하여 항체역가가 높은 대표 항원인 PtfA, F1-P2를 비장세포에 자극을 시키고 mRNA를 해당kit를 사용하여 추출한 뒤 해당 사이토카인으로 자극을 시킨 뒤 실시간 역전사 중합효소 연쇄를 통해 측정한 결과 2회 백신접종 군과 3회 백신접종 군에서 Th1에 관여하는 사이토카인 INF- γ 과 Th2에 관여하는 사이토카인 IL-4의 경우 대조군에 비해 통계학적으로 유의적인 증가를 나타내었다 (* $P < 0.05$) (그림 20).

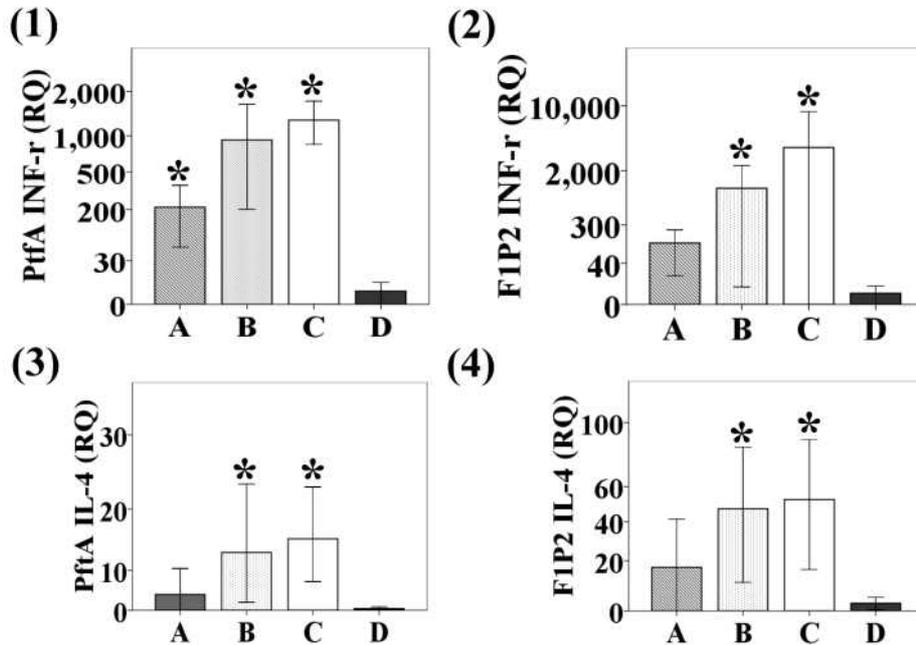


그림 20. Relative quantification of interferon-gamma (INF- γ), interleukin-4 (IL-4) expression in mice splenocytes using the real-time polymerase chain reaction. (1) Bar graphs represent INF- γ stimulated with PtfA antigen, and (2) with F1P2 antigen in immunized mice splenocytes. (3) Bar graphs represent IL-4 stimulated with PtfA antigen, and (4) with F1P2 antigen in immunized mice splenocytes. Refer to Fig. 1 for the specific immunization conditions of groups A - D. Asterisks indicate a significant difference between the immunized and control groups (* $P < 0.05$).

3. 공격시험 후 조직학적 검사

공격시험 후 대조군을 기준으로 폐사직전의 마우스의 폐를 분리하여 조직학검사를 시행한 결과 그림 21에서 보는 바와 같이, 야외 독성균주가 접종됨으로써 전체적으로 대식세포가 많이 분비 되어 각 접종군의 조직에서 염증반응이 일어남이 관찰되었다. 2차 접종시 경우 가장 정상조직에 가까운 폐 조직형태가 나타났으며(2), 1차접종시 대식세포가 2차 접종 군보다 과분비된 상태지만 회복되는 과정이 관찰되었고(1), 3차접종시(3)와 대조군(4)은 차이가 거의 없을

정도로 폐 조직전체에 과염증반응과 육안상 폐조직의 섬유화가 일어나고 있음이 관찰되었다 (그림 21).

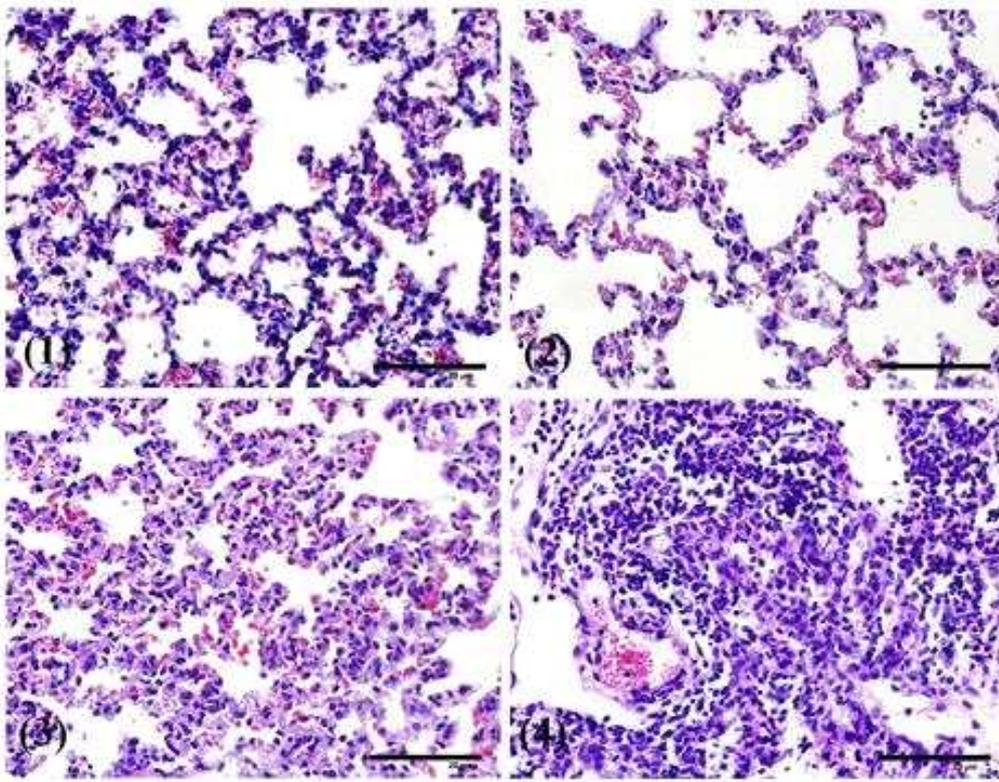


그림 21. Representative histology of infected tissues from immunized and non-immunized mice after a wild-type *Pasteurella multocida* challenge. Refer to Fig. 15 for the specific immunization conditions of groups A - D. All tissues were formalin fixed, embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Photomicrographs were taken at $\times 200$ magnification using a light microscope.

3] 고찰

백신접종 후 각 1회 2회 3회 접종군에서의 세포 매개성 면역반응과 체액성 면역반응에 관여하는 사이토카인을 splenocyte에 각 해당 항원을 자극시킨 후 Real time PCR로 측정하였다. 앞서 혼합접종시에 측정된 사이토카인을 선택하고 각 그룹 별 선택된 항원; ptfA, F1-P2으로 자극시킨 뒤 분비되는 사이토카인을 측정하였을 시 Th1을 자극 하는 INF-r를 의 경우1차, 2차, 3차 접종군에서 대조군의 비해 통계학적으로 유의가 있는 수치가 관찰되었으며 Th2을 자극 하고 점막면역에 관여하는 sIgA를 유도시키는 IL-4의 경우 1차접종의 경우 유의 있는 값은 아니지만 증가가 되었으며 2차 3차접종군에서는 INF-r의 길항작용으로 상대적으로는 낮지만 대조군의 비하여 통계학적으로 유의 있는 값이 측정되었다. 이는 1차 접종을 시행 할 때 보다 booster를 통하여 점막면역 및 기억세포를 통한 방어 효과가 뛰어남이 확인되었다. 공격시험 후 대조군의 상태가 악화되어 폐사직전의 시기를 선택하여 백신 접종 군과 대조군의 폐 조직을 분리하여 관찰하였다. 사진에서 보는 것과 같이 3차접종군의 경우 접종을 여러 번 실시하여 조직의 염증감염에 관여된 대식세포의 분비가 많이 분비되어 조직전체에 염증이 생기고 대조군과 차이가 거의 없음이 관찰되었다. 1차 접종군의 경우역시 대식세포의 분비가 전체적으로

많이 진행된 상태를 관찰할 수 있었다. 그러나 2차 접종 시 다른 그룹 군과 다르게 폐 조직이 회복되는 단계이며 이는 한번 booster할 시 기억세포에서 항원을 보다 빠르게 분비시키고 접종횟수를 낮춤으로써 폐조직의 손상이 3차 접종에 비하여 낮다고 판단되었다.

결론적으로 백신균주의 개별항원 접종 시와 백신균주의 개별항원을 혼합하여 접종했을 시 혼합하여 접종하였을 때 개별 항원에 대한 면역반응 이 효과적으로 유도됨이 관찰됨으로써 백신 균주의 개별항원을 혼합으로 접종을 시행하고 싸이토카인의 역가가 높게 측정되는 booster를 시행해야함이 판단되었고 공격시험 후 조직학사진을 통하여 폐 조직손상도가 낮고 빠르게 회복이 되는 2차 백신접종이 안정하고 효과적이라는 결론이 나왔다.

[9] 국내 주요 호흡기 질병 원인균 분리 및 동정, 양돈장에서 분리된 병독성 호흡기 질병 원인균 병독성 시험

1] 목적동물인 돼지에서의 호흡기 원인균 분리 및 동정

1. 세균의 분리

2012년 12월부터 2013년 9월까지 코미팜 병성감정실에 의뢰된 호흡기 질병과 관련된 양돈 가검물에서 균분리를 실시하였다. 균분리를 위한 시료의 채취는 병변부의 경계면을 중심으로 폐 표면을 무균적으로 처리한 후, 일부를 절개하여 백금으로 균을 채취한 후 blood agar, chocolate agar 및 MacConkey agar에서 배양한 후 균을 분리하였다. 각 배지에 생성된 집락들 중 *Streptococcus suis* (*S. suis*), *Haemophilus parasuis* (HPS), *Pasteurella multocida* (PM) 및 *Actinobacillus pleuropneumonia* (APP)로 의심되는 단일 집락을 선택하여 액체배지에 증균한 후 용혈성 관찰, hippurate test, esculin test, lactose, trehalose 및 starch 분해능 등의 생화학적 성상검사 수행하였다.

2. 균주의 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 통한 동정

이들 균주를 동정하기 위한 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 수행하였다.

(1) DNAzol® Reagent을 이용한 DNA 추출법

멸균한 tube에 DNAzol 800 μ l를 넣고 세균 배양액 100 μ l를 첨가하여 잘 혼합하고, 10,000 rpm에서 10분간 원심 한다. 새 tube에 100% cold 에탄올 500 μ l를 첨가하고 추출된 상층액 800 μ l를 옮겨 담고 실온에 2분 정도 정치한 후 6,500 rpm에서 2분간 원심 분리한다. 상층액을 조심히 제거한 후, 75% cold 에탄올 1 ml을 첨가하고 tapping 한 후 6,300 rpm에서 2분간 원심하고 이 과정을 2회 반복한다. 상층액을 제거 한 후, 내벽에 묻은 용액을 가라앉혀 뽑아내고, 5~15분간 완전히 건조한 후 8 mM NaOH 용액 20 μ l를 이용하여 elution 한다.

(2) 유전자검사를 통한 세균 동정

균을 동정하기 위한 DNA 추출 후 PCR을 실시하였다. 모든 PCR은 GoTag GreenMaster Mix, 2×(Promega, U.S.A) 12.5 µl, upstream 및 downstream primer (Genotec, Korea)를 각 1 µl, DNAtemplate 2 µl를 포함하여 최종량이 25 µl이 되게 nuclease-free water를 첨가하였다. PCR은 표 10과 같은 조건으로 수행하였으며, thermal cycler (Bio-rad, USA)를 이용하였다.

표 10. 중합효소 연쇄반응에 사용된 프라이머들

	Gene	Size (bp)	Primer (5' to 3')	Annealing Temp.(°C)	Reference
APP	<i>apxIVA</i>	422	F : TGG CAC TGA CGG TGA TGA R : GGG GAC CGA CTC AAC CAT	52	Schaller et al (2001)
HPS	16s rRNA	821	F : GTG ATG AGG AAG GGT GGT GT R : GGC TTC GTC ACC CTC TGT	59	Oliveira S et al (2001)
<i>S. suis</i>	<i>gdh</i>	688	JP4 : GCA GCG TAT TCT GTC AAA CG JP5 : CCA TGG ACA GAT AAA GAT GG	55	Okwunabua et al (2003)
PM	<i>KMT1</i>	460	F : ATC CGC TAT TTA CCC AGT GG R : GCT GTA AAC GAA CTC GCC AC	55	Townsend et al (2001)

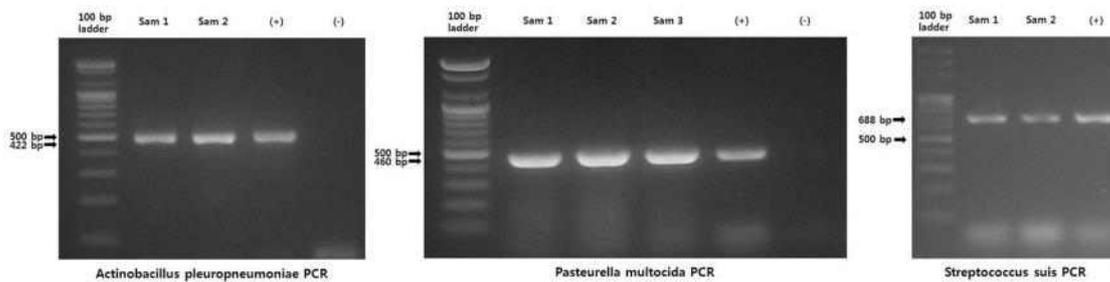


그림 21. 분리된 균주의 PCR 검사 결과 사진

(3) 분리된 균주

표 11. 분리된 균주

	APP	<i>S. suis</i>	PM	HPS	Toal
No. of isolates	12	5	6	0	23

총 23주가 분리되었으며 그 중 APP 12주, *S. suis* 5주 및 PM 6주가 각각 분리 동정되었다.

2. 항생제 감수성 검사

분리된 균주들을 대상으로 하여 항생제 감수성 검사를 실시하였다.

(1) 항생제 감수성 검사 방법

분리균에 대한 항균제 감수성 시험은 Bauer (1966)와 Bryant (1972)의 방법을 참고로 하여 Sensi disc (BBL, USA and Oxoid, UK)를 이용한 disc 확산법으로 실시하였다. Disc는 gentamicin (GM 10 µg)등 14종을 사용하였으며 (표 12), 균주는 Mueller-Hinton broth (Difco, USA)에 접종하여 37 °C에서 2~6시간 동안 배양하여 균 농도를 McFarland No. 0.5 탁도로 조정 한 후, 멸균면봉을 이용하여 Mueller-Hinton agar 평판배지를 60°로 회전하면서 3회 도포 하였다. 평판을 3~5분간 말리고 15분 이내에 항균제 disc를 dispenser로 접종하였다. 37 °C에서 16~18시간 배양 후 균 억제대의 크기를 관찰하여 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2008)의 기준에 따라 내성 여부를 판정하였다. 항균제 감수성 시험의 표준 균 주로는 *E. coli* ATCC 25922를 사용하였다.

표 12. 항생제 감수성 검사에 사용된 disk

P (Penicillin 10 U)	ENR (Enrofloxacin 10 µg)
AM (Ampicillin 10 µg)	SXT (Sulfametho/Trimethoprim 1.25 µg)
AMC (Amoxicillin/Clavulanic acid 20/10 µg)	CL (Colistin 10 µg)
N (Neomycin 30 µg)	OTC (Oxytetracycline 30 µg)
AN (Amikacin 30 µg)	FF (Florfenicol 20 µg)
GM (Gentamicin 10 µg)	CEF (Ceftiofur 30 µg)
K (Kanamycin 30 µg)	M (Marbofloxacin 5µg)

(2) 항생제 감수성 테스트 결과

1) APP 균주에 대한 항생제 감수성 test 결과

표 13. APP 균주에 대한 항생제 감수성 결과

Antimicrobial agent	No. of isolates (%)		
	APP (n=12)		
	S	I	R
P	2 (16.7)	4 (33.3)	6 (50.0)
AM	3 (25.0)	5 (41.7)	4 (33.3)
AMC	10 (83.3)	2 (16.7)	0 (0.0)
N	3 (25.0)	4 (33.3)	5 (41.7)
AN	2 (16.7)	3 (25.0)	7 (58.3)
GM	5 (41.7)	6 (50.0)	1 (8.3)
K	2 (16.7)	2 (16.7)	8 (66.7)
ENR	8 (66.7)	4 (33.3)	0 (0.0)
SXT	1 (8.3)	2 (16.7)	9 (75.0)
Cl	5 (41.7)	4 (33.3)	3 (25.0)
OTC	1 (8.3)	0 (0.0)	11 (91.7)
FF	3 (25.0)	1 (8.3)	8 (66.7)
Cef	7 (58.3)	2 (16.7)	3 (25.0)
Marbo	7 (58.3)	4 (33.3)	1 (8.3)

분리된 APP 12주에 대한 항균제 감수성 시험결과는 표 13에서와 같았다. 돼지 유래균주의 항균제 내성률은 oxytetracycline (91.7%), sulfametho/trimethoprim (75.0%), florfenicol과 kanamycin (66.7%) 및 Penicillin (50.0%) 순이었으며 amoxicillin/clavulanic acid (83.3%)에 대해서는 비교적 높은 감수성을 보였다.

2) *S. suis* 균주에 대한 항생제 감수성 test 결과

표 14. *S. suis*에 대한 항생제 감수성 결과

Antimicrobial agent	No. of isolates (%)		
	<i>S. suis</i> (n=5)		
	S	I	R
P	0 (0.0)	4 (80.0)	1 (20.0)
AM	3 (60.0)	1 (20.0)	1 (20.0)
AMC	4 (80.0)	1 (20.0)	0 (0.0)
N	0 (0.0)	1 (20.0)	4 (80.0)
AN	0 (0.0)	1 (20.0)	4 (80.0)
GM	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (100.0)
K	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (100.0)
ENR	4 (80.0)	1 (20.0)	0 (0.0)
SXT	3 (60.0)	1 (20.0)	1 (20.0)
CI	1 (20.0)	0 (0.0)	4 (80.0)
OTC	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (100.0)
FF	1 (20.0)	3 (60.0)	1 (20.0)
Cef	3 (60.0)	2 (40.0)	0 (0.0)
Marbo	2 (40.0)	2 (40.0)	1 (20.0)

분리된 *S. suis* 균 5주에 대한 항균제 감수성 시험결과는 표 14에서 보는 바와 같았다. 돼지 유래균주의 항균제 내성률은 gentamicin (100%), kanamycin (100%), oxytetracycline (100%)에 대해서는 약제 내성 양상을 나타내었고, neomycin (80.0%), amikacin (80.0%) 및 colistin (80.0%)의 약제에 대해서도 비교적 높은 약제 내성 양상을 나타내었다. 반면 amoxicillin/clavulanic (80.0%)과 enrofloxacin (80.0%)에 대해서는 비교적 높은 감수성을 보였다.

3) PM 균주에 대한 항생제 감수성 test 결과

표 15. *Pasteurella multocida*에 대한 항생제 감수성 결과

Antimicrobial agent	No. of isolates (%)		
	PM (n=6)		
	S	I	R
P	1 (16.7)	0 (0.0)	5 (83.3)
AM	1 (16.7)	0 (0.0)	5 (83.3)
AMC	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (100.0)
N	1 (16.7)	1 (16.7)	4 (66.7)
AN	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (100.0)
GM	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (100.0)
K	1 (16.7)	1 (16.7)	4 (66.7)
ENR	6 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
SXT	0 (0.0)	1 (16.7)	5 (83.3)
CI	0 (0.0)	1 (16.7)	5 (83.3)
OTC	3 (50.0)	1 (16.7)	2 (33.3)
FF	3 (50.0)	1 (16.7)	2 (33.3)
Cef	3 (50.0)	1 (16.7)	2 (33.3)
Ma rbo	3 (50.0)	3 (50.0)	0 (0.0)

분리된 PM 균 6주에 대한 항균제 감수성 시험결과는 표 15에서와 같았다. 돼지 유래 균주의 항균제 내성률은 amoxicillin/clavulanic (100%), amikacin (100%) 및 gentamicin (100%)에 대해서는 약제 내성 양상을 나타내었고, penicillin (83.3%), ampicillin (83.3%), sulfametho/trimethoprim (83.3%) 및 colistin (83.3%)의 약제에 대해서도 비교적 높은 약제 내성 양상을 나타내었다. enrofloxacin (0.0%)에 대해서는 내성을 나타낸 균주가 없었다.

3. 마우스를 대상으로 한 병원성 시험

분리된 세균들에서 마우스 병원성을 확인하기 위해 각각 균주의 배양액을 농축하여 PBS로 washing하고 생균수를 측정 한 다음 PBS로 10진 희석하여 농도별로 마우스에 접종하여 생존 여부를 관찰하였다.

(1) 공격접종용 균주의 준비

공격접종을 실시하기 위해 2012년 2월부터 2013년 9월까지 분리된 균주들 중 APP 2주 S.suis 2주 및 PM 2주를 선정하여 각 균주에 알맞게 broth에 배양한다. 배양 시 OD (600 nm)를 측정하여 1×10^9 CFU/mL로 희석한다.

(2) LD 50 값의 측정

균주별로 각 희석 농도 당 마우스 10마리를 공시하고 실험을 실시하였다. 약 20g의 마우스 1마리당 1 x 10⁹CFU/ML의 농도의 균주를 0.5 ml 씩 복강에 접종하고 2주간 관찰하였다. 2주간 관찰 후 Spearman-Kärber method에 의해 LD50 값을 측정하였다.

Calculation of LD ₅₀ = Log LD ₅₀ = Log X100 - Log Fd (St-n/2)

LD50 = the 50% lethal dose

log X100 = log dose giving 100% deaths and having 100% deaths for all higher doses

log Fd = the log dose interval is constant

n = number of mice used at each dose level

t = number of mice dying at each dose level

S = summation over all dose between and including X₁₀₀ and X₀ (X₀ being defined as the log dose giving 0 deaths and having 0 deaths for all lower doses)

(3) APP 균주에 대한 LD₅₀ 값 측정

Dilution factor	10
Number of mice	10
Volume injection (ml)	0.5

표 16. 마우스에서 APP 균주에 LD₅₀을 결정을 위한 실험결과

CFU/ml	CFU/mouse	No.			Deaths (%)	CFU/ml	CFU/mouse	No.			Deaths (%)
		D	L	T				D	L	T	
APP 12-472						APP 13-130					
1 x 10 ⁹	5 x 10 ⁸	10	0	10	100	1 x 10 ⁹	5 x 10 ⁸	10	0	10	100
1 x 10 ⁸	5 x 10 ⁷	10	0	10	100	1 x 10 ⁸	5 x 10 ⁷	10	0	10	100
1 x 10 ⁷	5 x 10 ⁶	6	4	10	60	1 x 10 ⁷	5 x 10 ⁶	5	5	10	50
1 x 10 ⁶	5 x 10 ⁵	2	8	10	20	1 x 10 ⁶	5 x 10 ⁵	2	8	10	20
1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁴	0	10	10	0	1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁴	0	10	10	0

D ; Died, L ; Lived, T ; total number of mouse

측정 결과 APP 12-473균주는 2505936.17 CFU/20g의 LD50값이 나타났으며 이를 Kg 당 균수로 환산하면 125296808.41 CFU/Kg이 된다. APP 13-130의 경우 마우스 당 3154786.72 CFU/20g의 LD50값이 나타났으며 157739336.12 CFU/Kg으로 환산되었다.

(4) PM 균주에 대한 LD₅₀ 값 측정

Dilution factor	10
Number of mice	10
Volume injection (ml)	0.5

표 17. 마우스에서 *Pasteurella multocida*에 대한 LD₅₀ 측정을 위한 실험결과

CFU/ml PM 13-110	CFU/mouse	No.			Deaths (%)	CFU/ml PM 13-129	CFU/mouse	No.			Deaths (%)
		D	L	T				D	L	T	
1 x 10 ⁹	5 x 10 ⁸	10	0	10	100%	1 x 10 ⁹	5 x 10 ⁸	10	0	10	100%
1 x 10 ⁸	5 x 10 ⁷	6	4	10	60%	1 x 10 ⁸	5 x 10 ⁷	8	2	10	80%
1 x 10 ⁷	5 x 10 ⁶	4	6	10	40%	1 x 10 ⁷	5 x 10 ⁶	4	6	10	40%
1 x 10 ⁶	5 x 10 ⁵	0	10	10	0%	1 x 10 ⁶	5 x 10 ⁵	2	8	10	20%
1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁴	0	10	10	0%	1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁴	0	0	10	0%

D ; Died, L ; Lived, T ; total number of mouse

측정 결과 PM 13-110균주는 15811388.30 CFU/20g의 LD₅₀값이 나타났으며 이를 Kg 당 균수로 환산하면 790569415.04 CFU/Kg이 된다. PM 13-129의 경우 마우스 당 6294627.06 CFU/20g의 LD₅₀값이 나타났으며 314731352.95 CFU/Kg으로 환산되었다.

4. 돼지를 대상으로 한 병원성 실험

3주령의 자돈을 대상으로 호흡기 질병의 증상이 심한 돼지에서 분리한 위축성 비염과 파스튜렐라 폐렴을 유발하는 분리균주를 다양한 접종량으로 비강으로 접종한 후 코에서의 이상 유무 및 폐사 여부를 확인하여 접종 돼지의 50%에서 이상을 보이는 접종량을 선택하였다.

(1) 실험동물 및 사육환경

*Pasteurella multocida*에 감염되지 않았으며 청결한 환경에서 사육된 돼지 (약 3주령)를 구입 후 실험구역에서 1주일간 적응시켰다. 실험에 사용하는 돼지는 사전에 *P. multocida*에 대한 백신접종을 받지 않았으며 시험 전 혈액검사를 통해 *P. multocida* 항체가 없는 돼지를 사용하였다.

표 18. 돼지를 대상으로 한 *Pasteurella multocida*에 대한 실험 개요

Group	접종 균주	Dosage	접종경로	No.	Remarks
A	-	대조군 (음성)	-	6	
B	<i>Pasteurella multocida</i>	2 × 10 ⁷ CFU/ml	+	6	
C	<i>Pasteurella multocida</i>	2 × 10 ⁸ CFU/ml	+	6	
D	<i>Pasteurella multocida</i>	2 × 10 ⁹ CFU/ml	-	6	

(2) 실험방법

1) 돼지를 전신 마취후 비강 (그림 22)으로 표 18에서 제시한 균수로 각각 희석된 *P. multocida* 균액 5ml를 서서히 주입하였다.



그림 22. 3주령 자돈을 대상으로 전신마취 후 비강으로 *Pasteurella multocida* 접종

2) 14일이 경과 후 자돈을 안락사 시킨 후 비갑개를 절개하여 비강의 형태로 감염 여부를 결정하였다.

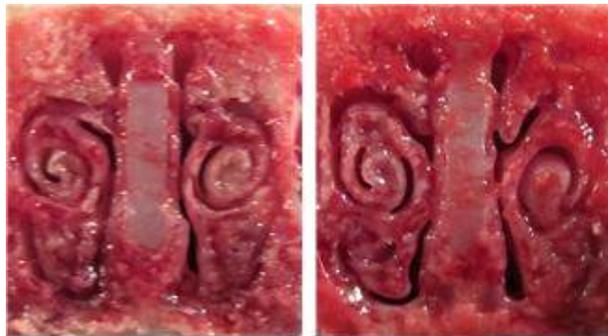


그림 23. 감염전 또는 정상적인 비갑개 절단면

(3) 실험 결과

3주령 자돈에 *Pasteurella multocida*를 접종 후 14일이 경과한 시점에 모든 돼지를 안락사 시킨 다음 비갑개를 절개하여 위축성 비염 발병 유무를 비교 (그림 23과 24)하여 본 결과는 표 19에서 보는 바와 같았다. 그림 23은 정상적인 상태의 비갑개 상태를 그림 24는 비정상적인 비갑개 상태를 보여주고 있다. 즉, 2×10^7 CFU/ml를 5ml 접종한 그룹은 1마리에서, 2×10^7 CFU/ml를 5ml 접종 그룹에서는 3마리에서 2×10^7 CFU/ml를 5ml를 접종한 그룹에서는 5마리에서 각각 전형적인 비갑개 이상 자돈이 관찰되었다.

표 19. *Pasteurella multocida* 접종 후 14일째에 안락사 후 비갑개 절개 후 임상 증상 결과

그룹	접종 두수	정상두수	임상 증상 발현 두수	비고
A	6	6	0	
B	6	5	1	
C	6	3	3	
D	6	1	5	

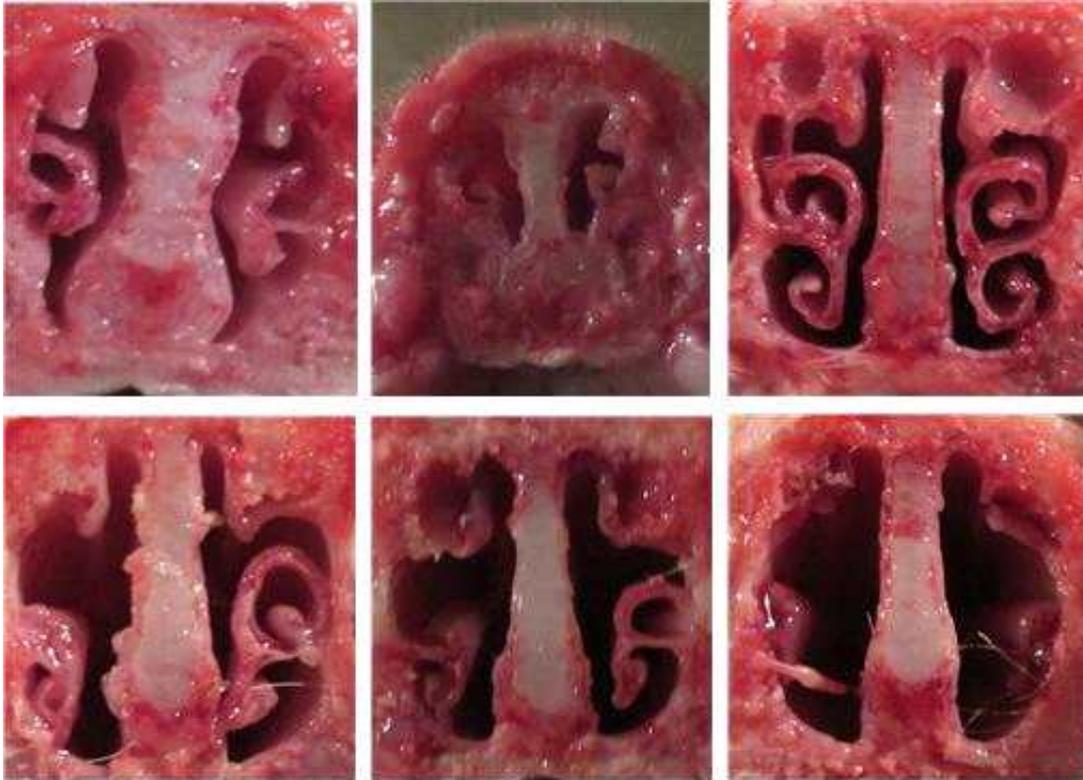


그림 24. 위축성 비염 감염균에 감염되어 비전형적인 비갑개 형성 자돈

[2차년도]

[10] 목적 동물에서의 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신 예비 실험

1] 실험방법

1. 실험동물 및 접종

(1) 실험동물

분만 예정 8 ~ 9 주 전인 모돈 중에서 살모넬라균 및 위축성 비염 그리고 파스츄렐라성 폐렴에 감염된 병력이 없는 모돈에 대한 예방접종이 실시되지 않았던 모돈과 그 모돈에서 출생한 자돈을 실험에 사용하였다.

(2) 백신준비

경구접종용 백신 준비를 위해서는 각 항원의 발현이 확인된 약독화 살모넬라균을 LB Broth에 접종하여 37°C에서 200 rpm의 속도로 16시간 배양한 배양액을 1/20 (volume)의 비율로 LB broth에 첨가하여 같은 조건에서 OD₆₀₀ 값이 0.8 ~ 1.0이 될 때까지 2 ~ 4 시간 동안 배양하였다. 이 배양액을 4°C에서 4,000 rpm으로 10분 내지는 20분간 원심분리하여 멸균 PBS로 3번 세척한 후 sucrose가 20% 함유된 멸균 PBS (PBS-sucrose)로 표 20에서 같은 균수가 되도록 부유시켜 총 균수가 2.0×10^{11} cfu/10ml가 되도록 혼합하여 생균백신으로 준비하였다.

단 근육접종용 백신 준비는 상기와 같은 방법으로 약독화 살모넬라균을 준비하고 세척하였다. 마지막 세척 후 침전물을 멸균 PBS로 10^9 cfu/ml가 되도록 희석하여 포르말린의 최종 농도가 1%가 되도록 첨가하였다. 실온에서 24시간 동안 반응시켜 불활화시킨 다음 멸균 PBS로 3번 세척하였다. 이 부유액 100 μ l를 Tryptic Soy Agar에 접종한 후 37°C에서 하룻밤 배양하여 균의 사멸 여부를 확인하였다. 백신균주의 불활화 여부를 확인한 후 각 약독화 살모넬라균이 2×10^{10} cell 되도록 수산화 알루미늄겔 10mg/ml에 혼합하여 사균 백신으로 준비한 다음 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

1) Oral administration : 2.0×10^{11} CFU in 10ml PBS-sucrose

2) Intramuscular immunization : 2.0×10^{10} cells in 1,000 μ l PBS

① 균 배양 : 각 호흡기 질병 관련 항원을 발현하는 약독화 *Salmonella* Typhimurium 한 colony를 LB broth에 접종하여 37°C에서 200rpm으로 흔들며 주면서 하룻밤 배양하였다.

② 접종 : 실험 군 각 모돈은 한 마리당 10ml에 2×10^{11} CFU가 되도록 조정하여 경구 접종하거나 1,000 μ l에 2.5×10^{10} CFU가 되도록 조정하여 근육 접종하며 대조군은 각각 멸균 PBS로 경구 접종 또는 근육으로 접종 하였다. 같은 균수와 같은 방법으로 접종 후 21일째에 한 번 더 추가 접종하였다 (표 20).

표 20. 실험 계획

그룹 두수	항원명	접종 대상		Challenge (자돈)
		모돈 1차 (임신 8주)	모돈 2차 (임신 11주)	
A 3	멸균 PBS	근육	근육	<i>Pasteurella multocida</i> type D
B 3	CP39, FimA, PtfA, ToxA	근육 (2×10^{10} cells)	근육 (2×10^{10} cells)	//
C 3	CP39, FimA, PtfA, ToxA	경구 (2×10^{11} CFU)	경구 (2×10^{11} CFU)	//

2. 도전감염

- 1) 균 배양 : 도전 균주의 한 colony를 chocolate agar에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다.
- 2) 자돈이 3주령이 되었을 때 위에서 준비한 독성 야외균주를 비강으로 접종하였다.
- 3) 도전감염 시킨 2주 후에 자돈을 안락사 시켜 비강의 상태를 확인하여 방어 여부를 결정하였다.

2] 결과

1. 자돈에서의 방어효과

그림 25에서 보는 바와 같이 대조군은 5마리 모두 비정상의 비강 상태를 보였으며 근육 접종한 모돈에서 출생한 자돈 (그룹 B)은 6마리 중에서 2두만이 정상의 비강 상태가 관찰되었다. 하지만 경구접종한 모돈에서 출생한 자돈은 5마리 중 3두가 정상적인 비강의 상태가 관찰되었다.

그룹	A1	A2	A3	A4	A5	
A						
번호	B1	B2	B3	B4	B5	B6
B						
번호	C1	C2	C3	C4	C5	
C						

그림 25. 자돈에서의 비강의 상태.

그룹 A : 대조군. 5마리 모두 비정상적인 비강개 상태를 보여주고 있음.

그룹 B : 근육 접종된 모돈에서 출생한 자돈. B2와 B4만이 정상적인 상태를 보임 줌.

그룹 C : 경구 접종된 모돈에서 출생한 자돈. (C1, C2, C4에서 정상적인 비강 상태가 관찰 됨).

3] 결론

목적동물인 자돈에서의 위축성 비염 개발 백신의 효능 여부를 확인하기 위해 임신 모돈에 백신을 근육 또는 경구로 각각 2회 접종 한 후 각 모돈에서 출생한 건강한 자돈을 선별하여 위축성 비염을 일으키는 *Pasteurella multocida* type D 균주를 배양하여 자돈에 비강 접종하여 도전감염 시켰다. 대조군은 100% 방어에 실패하였으며 근육 접한 모돈에서 출생한 자돈 역시 67% 정도가 방어에 실패한 반면, 경구 접종한 모돈에서 출생한 자돈은 60%가 방어에 성공해 이번의 예비 실험 결과를 토대로 임신 모돈에 경구 접종이 최적의 접종 방법임을 확인하였다.

[11] 모돈에서 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신의 효능 및 백신의 안전성 실험

1] 실험 방법

1. 실험동물 및 백신준비

1) 실험동물 : 분만 예정 8 ~ 9 주 전인 모돈 중에서 살모넬라균 및 위축성 비염 그리고 파

스츄렐라성 폐렴에 감염된 병력이 없는 모돈에 대한 예방접종이 실시되지 않았던 모돈을 실험에 사용하였다.

2) 백신준비 : 경구접종용 백신 준비를 위해서는 각 항원의 발현이 확인된 약독화 살모넬라균을 LB Broth에 접종하여 37°C에서 200 rpm의 속도로 16시간 배양한 배양액을 1/20 (volume)의 비율로 LB broth에 첨가하여 같은 조건에서 OD₆₀₀ 값이 0.8 ~ 1.0이 될 때까지 2 ~ 4 시간 동안 배양한다. 이 배양액을 4°C에서 4,000 rpm으로 10분 내지는 20분간 원심분리하여 멸균 PBS로 3번 세척한 후 sucrose가 20% 함유된 멸균 PBS (PBS-sucrose)로 총 균수가 2.0×10^{10} cfu/10ml가 되도록 혼합하여 생균백신으로 준비하였다.

2. 안전성 지표

1) 일회성 과량 투여 및 반복투여

결정된 용량의 10배와 100배의 균수를 접종 시기에 모돈에 각각 경구 접종하였다. 또한 반복투여에 의한 부작용 등을 알아보기 위해 결정된 용량을 하루에 2번 반복 투여, 결정된 용량을 이틀 연속 반복 투여 및 결정된 용량을 삼일 연속 반복 투여하였다.

2) 분변채취

접종 전, 접종 후 1주, 분만 후 1주, 2주, 3주째에 그룹별로 직장에서 swap하여 백신 접종 후 분변으로의 shedding 여부를 확인하였다.

3) 혈액생화학적 검사

마지막 백신 접종 후 14 일째에 돼지의 경정맥을 통하여 채혈하였다. 전혈을 자연 응고시킨 뒤 원심분리 (2000 rpm, 10분)하여 혈청성분만을 취하여 혈액 생화학 수치를 측정하였다. 혈액생화학수치는 cobas c 111 analyzer (Roche)를 이용하여 분석하였다.

4) 체온측정

백신 접종 후 매일 일정한 시간에 체온을 측정하였다.

5) 임상증상

임상증상의 변화 정도는 표 21에서 제시된 지표들을 참조하여 선정하였다.

표 21. 증상별 임상지수

	임상증상	임상지수
피모/외모상태	정상	0
	조강	1
	등뼈노출	2
행동이상	정상	0
	침울	1
	횡와자세	2
발 열	정상	0

	가벼운 발열	1
	오한/청색증	2
호흡곤란	정상	0
	호흡증가	1
	개구호흡	2
기 침	정상	0
	간헐 기침	1
	심한 기침	2
보행이상	정상	0
	가벼운 파행/관절 종창	1
	심한 파행/관절 종창	2
폐사	폐사	20

3. 효능평가

1) 실험동물

분만 예정 8 주 전인 모든 중에서 살모넬라균 및 위축성 비염 그리고 파스튜렐라성 폐렴에 감염된 병력이 없는 모든에 대한 예방접종이 실시되지 않았던 모든과 그 모든에서 출생한 자돈을 실험에 사용하였다. 총 사용 두수는 임신 모든 6두와 젓먹이 새끼 돼지 20두였다. 예상 분만 약 14 일 전에, 임신 모든은 분만 검사 및 그들의 자돈에 사용할 수 있는 가열 램프와 추가 상자가 있는 개별 검사로 옮겨졌다. 출생 후 모든 신생 자돈은 28일까지 그들에 대한 각각의 모든유로 육성하였다. 모든은 *Pasteurella multocida* 백신을 제외하고 돼지 농장의 백신 접종 프로그램에 따라 예방 접종을 받았다. 모든 돼지는 두 그룹으로 나누어 실험에 사용되었다. 동물 실험은 동물 관리에 한국어위원회 (CBU 2012-0017)의 지침에 따라 전북 대학교 동물 윤리위원회의 승인 하에 실시하였다.

2) 실험에 사용된 균주, 플라스미드 및 배양 조건

이 실험에서 사용된 모든 균주와 플라스미드는 표 22에 서술되어져 있다. *E. coli* Top10, BL21은 재조합된 부착인자 항원들을 발현시키기 위하여 사용되었다. 약독화된 *S. Typhimurium*, JOL912는 wild type *S. Typhimurium*, JOL401로부터 *cpxR*, *lon*, *asd*를 제거하여 제작되었다. 플라스미드 pQE31, pET28a는 개별 항원들의 부착인자 항원들을 발현시키기 위해 사용되었으며 pBP244는 살모넬라 내 발현된 heterologous antigens의 분비향상을 위하여 *lepB*, *secA*, *secB*의 결합을 통한 Asd⁺ plasmid pYA3493으로부터 제조되었다. pMMP65는 항원의 발현 확인을 위한 플라스미드로 사용되었다. 모든 실험에 사용된 균주와 플라스미드는 37°C Luria-Bertani broth (LB; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, U.S.A.) 또는 LB agar에서 배양되었으며 JOL912와 같은 Asd⁻negative bacteria의 배양을 위해 Diaminopimelic acid (DAP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.)을 첨가하였다. 도전 감염을 위해 사용된 야외균주 JOL976, JOL977은 수의과학검역원에서 받아 보관하여 공격시험 시 사용되었다.

표 22. 본 실험에 사용된 균주 및 플라스미드 정보

Strain/plasmid	Description	Source
Strains		
<i>E. coli</i>		
Top10	F-mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galUgalKrpsL (Str ^R)endAInupG	Lab stock
BL21(DE3)pLys S	F ⁻ ,ompT, hsdS _B (r _B ⁻ ,m _B ⁻),dcm, gal, λ(DE3), pLysS, Cm ^r	Lab stock
JOL1136	BL21 with pET-CP39	This study
JOL1234	BL21 with pET-FimA	This study
JOL1214	Top10 with pQE-PtfA	This study
JOL1135	BL21 with pET-ToxA	This study
<i>S. Typhimurium</i>		
JOL401	<i>Salmonella</i> Typhimurium wild type	Lab stock
JOL912	<i>S. Typhimurium</i> JOL911 derivativeΔ <i>asd</i>	Lab stock
JOL1240	JOL912 with pBP244-CP39	This study
JOL1251	JOL912 with pBP244-FimA	This study
JOL1247	JOL912 with pBP244-PtfA	This study
JOL1244	JOL912 with pBP244-ToxA	This study
<i>P. multocida</i>		
JOL976	<i>Pasteurella multocida</i> sero type A wild type (PmA037)	Lab stock
JOL977	<i>P. multocida</i> (PDNT)sero type D wild type	Lab stock
Plasmids		
pQE31	IPTG-inducible expression vector; Am ^r	Qiagen
pET28a	IPTG-inducible expression vector; Km ^r	Novagen
pBP244	pYA3493 derivative containing <i>lepB</i> , <i>secA</i> and <i>secB</i> genes	Lab stock

3) 경구 접종용 생균백신 준비

각 부착인자의 발현이 확인된 약독화 살모넬라균을 LB broth에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후 새로운 LB broth에 1:20의 배율로 첨가되어 37°C에서 optical density (OD)₆₀₀가 0.8이 될 때까지 배양되었다. 배양된 균주들은 4,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였으며, 침전된 균주들은 멸균 phosphate-buffered saline (PBS)로 재부유되어 같은 조건으로 재 원심분리하였다. 침전된 균주는 sucrose가 20%가 되도록 첨가된 PBS (PBS-sucrose)로 각 항원을 발현하는 균주들은 2.0X10¹⁰CFU colony-formingunits (CFU)/ml가 되도록 재 부유시켰다. 생균이 제조된 당일에 경구로 접종하였다.

4) 백신 접종 및 가검물 채취

임신 모든 6 두를 두 그룹으로 나누어 그룹 A는 임신 8주에 1차 경구 접종을, 임신 11주에 2차 경구 접종 하였다. 그룹 B는 대조군으로 멸균 PBS로 같은 시기에 경구 접종 되었다. 백신 접종 후 유도된 항체 역가를 측정하기 위해 1차 접종 전 (0주), 2차 접종 전 (3주), 분만 시기 (8주)에 각각 채혈하여 혈청을 분리하였으며 -20°C에 보관하며 실험에

사용하였다. 초유에서의 IgA 및 IgG를 측정하기 위해 분만시에 채취하여 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

5) 항원 준비

CP39, ToxA, FimA 그리고 PtfA 단백질은 JOL1136, JOL1135, JOL1234 그리고 JOL1214로부터 각각 발현 정제되었다 (표 22). 즉, 발현된 단백질은 Ni²⁺-nitrilotriacetic acid-agarose support (Qiagen 사)와 친화성 정제 방법에 의해 정제하였다. 단백질 농도는 키트 (Bio-Rad)를 사용하여 브래드포드법에 의해 측정하였다. 단백질 샘플은 ELISA coating 항원으로 사용하기 전까지 -70°C에서 보관하였다.

6) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용한 면역반응 측정

효소면역측정법을 통한 면역반응 측정은 제조회사의 사용설명서 (Bethyl Lab Inc., Montgomery, TX, USA)에 따라 수행하여 돼지의 혈청에서 혈청 IgG를, 모든 초유에서 secretory IgA(sIgA) 및 IgG를 측정하였다. 임신 모돈과 자돈 모두에서 혈청 샘플은 IgG측정을 위해 1:100으로 희석하였고, 모든 초유는 sIgA의 측정을 위해 1:9로 희석하였다. 효소반응은 *o*-phenylenediamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 492nm-620nm의 (Thermo Scientific Multiskan GO)에서 측정하였다. 흡광도 값과 농도 사이의 표준관계를 나타내는 표준곡선에 따라 각 샘플에 대한 항체의 농도는 (µg/ml)로 측정하였다.

7) 도전감염

Pasteurella multocida 야외균주인 JOL976, JOL977의 도전 균주 한 colony를 chocolate agar에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 배양된 colony를 멸균 PBS에 무균적으로 부유시켜 2 × 10⁹ CFU/ml이 되었고 희석하였다. 자돈이 3주령이 되었을 때 돼지를 출레틸과 럼푼을 동일한 양으로 혼합하여 근육 주사하여 전신 마취시킨 뒤, 기관지경을 삽입하여 기관지내로 균액 (*P. multocida*: 2 × 10⁹ CFU/ml) 5 ml을 서서히 주입하였다. 모든 새끼 돼지는 도전감염 후 14일까지 설사, 혼란, 그리고 비정상적인 행동에 대해 매일 모니터링 하였다. 시험이 종료되는 14일 째에 모든 자돈을 희생시켜 비강 상태를 확인하여 방어여부를 결정하였다.

2] 결과

1. 과용량 투여시의 안전성 결과

과용량 단일 투여의 경우, 결정된 용량의 10배와 100배의 균수를 접종 시기에 모돈에 각각 투여하여 diarrhea와 mortality 및 유사산 등 이상 증상 여부를 확인하여 본 결과 부작용이 관찰되지 않았다.

2. 반복 투여에 의한 안전성 결과

결정된 용량을 하루에 2번 반복 투여, 결정된 용량을 이틀 연속 반복 투여 및 결정된 용량을 삼일 연속 반복 투여 한 후 diarrhoea와 mortality 및 이상 증상 여부, tolerance 등의 여부 확인하여 본 결과 부작용이 관찰되지 않아 개발된 생균 백신의 과복용 및 반복 투여에 의한 어떤 부작용도 관찰되지 않아 안심하고 사용할 수 있음이 확인되었다.

3. 분변에서의 백신 균주 분리 및 동정

백신을 과용량 또는 반복투여 후 분변으로 백신 균주의 배출 여부를 확인하기 위해 분변을 정기적으로 채취하여 백신 균주를 분리하여 본 결과, 모든 백신 균주에서 백신 균주가 분리되지 않았다.

4. 혈액생화학적 검사

적정 용량의 10배 및 100배의 시험물질을 경구 접종한 돼지에 대한 부작용 유발여부를 알아보기 위해 혈액 생화학적 검사를 실시하였으며 그 결과는 표 23에 제시하였다. 백신을 10배 또는 100배를 경구 접종한 처치군의 모든 수치가 정상치의 범위내로 기록되었으며 이를 통해 돼지의 영향상태 및 간, 신장, 췌장 등 주요대사를 담당하는 장기 기능에 백신이 영향을 미치지 않은 것으로 생각되었다.

표 23. 혈액생화학치

(평균 ± 표준편차, n=5)

검사항목	단위	10배 처치군	100배 처치군	정상범위
ALB	g/dL	3.67 ± 0.25	3.74 ± 0.11	1.9 - 3.9
ALP	U/L	150.50 ± 47.61	149.25 ± 50.21	41 - 176
ALT	U/L	42.75 ± 4.97	44.25 ± 5.97	22 - 47
AST	U/L	49.75 ± 8.15	50.00 ± 10.34	15 - 55
CA	mg/dL	9.68 ± 0.57	10.45 ± 1.54	9.3 - 11.5
CHO	mg/dL	112.75 ± 10.71	119.00 ± 21.55	81 - 134
CRE	mg/dL	1.09 ± 0.17	0.95 ± 0.18	0.8 - 2.3
GGST	U/L	49.23 ± 13.38	47.40 ± 11.36	31 - 52
GLU	mg/dL	128.55 ± 13.19	132.25 ± 12.29	84.68 - 149.55
PHOS	mg/dL	9.75 ± 0.44	9.18 ± 1.73	4.52 - 10.68
URE	mg/dL	14.75 ± 1.17	13.25 ± 1.29	8.12 - 24.9
TP	g/dL	6.2 ± 0.18	5.7 ± 0.25	4.4 - 7.4
BIL	mg/dL	0.11 ± 0.12	0.18 ± 0.28	0.05 - 0.5

ALB: albumin, ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, CA: calcium, CHO: total cholesterol, CRE: creatinine, GGST: gamma glutamyl transferase, GLU: glucose, PHO: phosphate, URE: urea, TP: total protein, BIL: total bilirubin,

5. 체온

백신을 과용량 또는 반복투여에 의한 체온의 변화를 알아보기 위해 백신 접종 후 매일 2주일간 측정하여 본 결과 체온의 변화가 관찰되지 않았다.

6. 면역 반응

각 항원에 대한 혈청 IgG는 그림 26에서 보는 바와 같이 접종 후 8주 후에 모든 항원에 대해 대조군에 비해 유의성 있는 항체 역가가 관찰되었다.

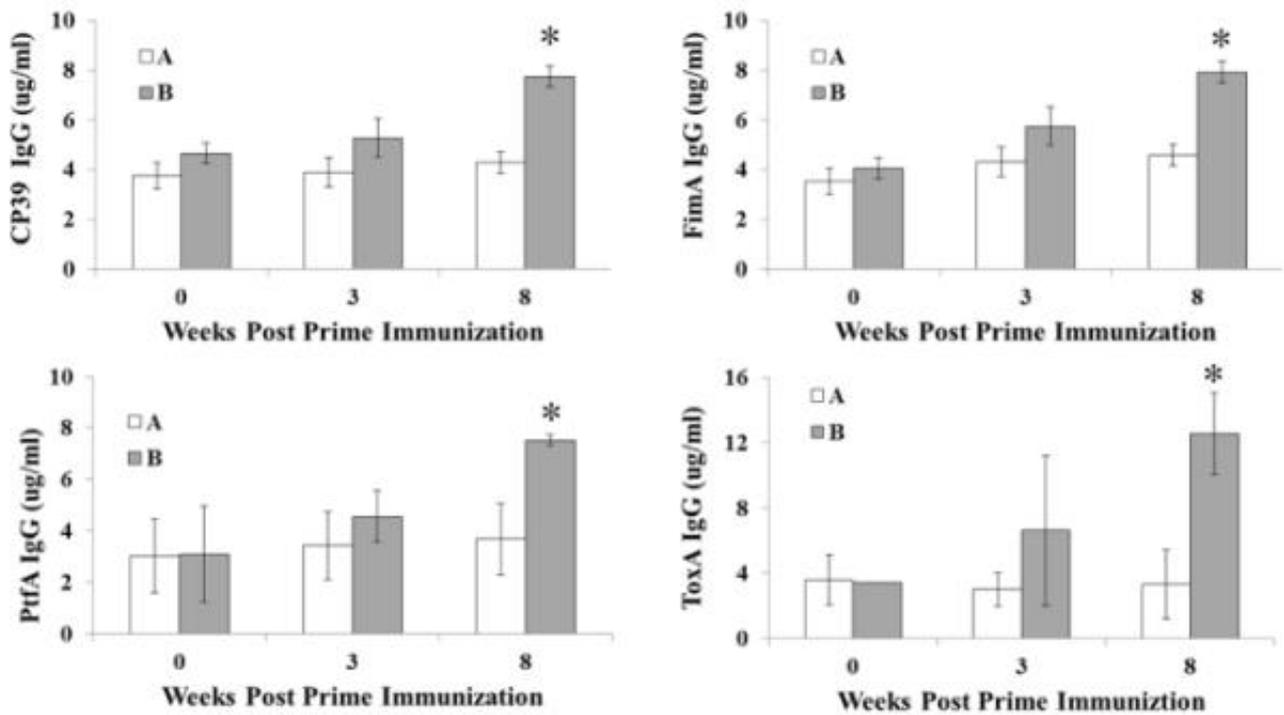


그림 26. 모돈에서의 serum IgG titers. A; 대조군, B; 백신 접종군.

초유에서의 IgA 및 IgG는 그림 27에서 보는 바와 같이 모든 항원에 대해 대조군보다 유의성 있는 증가가 관찰되었다.

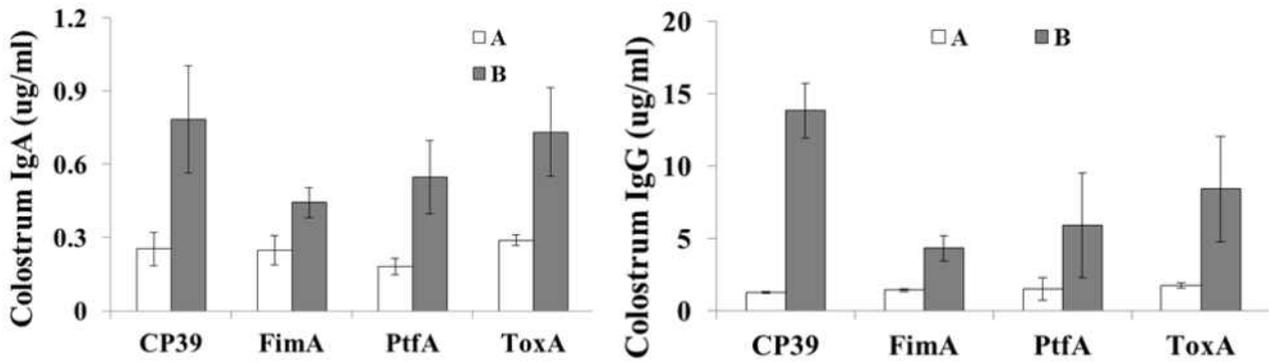
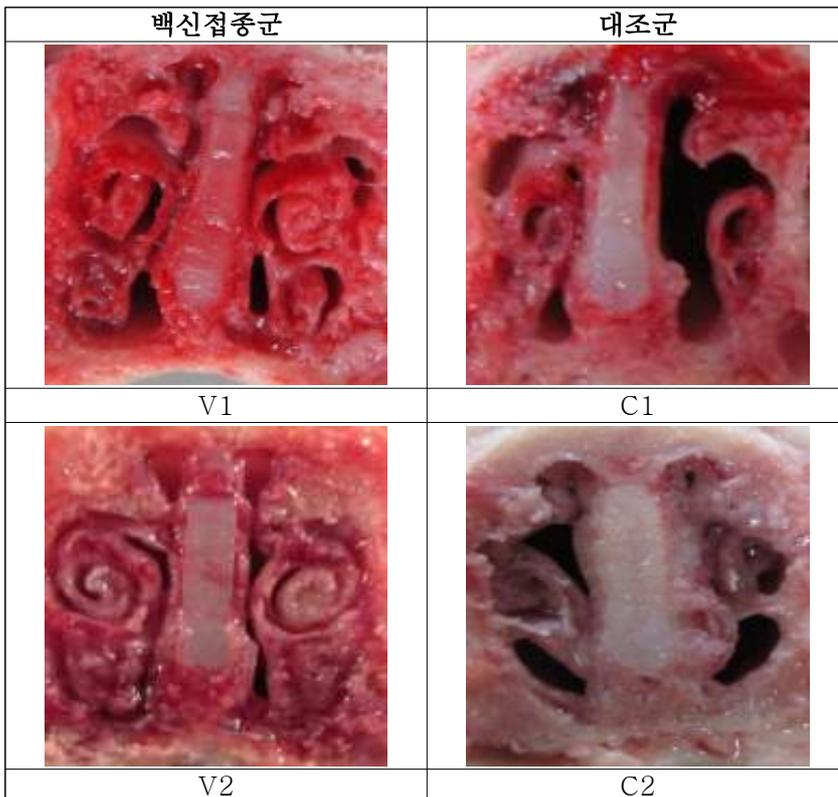


그림 27. 초유에서의 IgA 및 IgG 항체 역가.

※ ahems 항원에 대해 백신 접종 군 (■)이 대조군 (□)에 비해 유의성이 인정되어 “*” 표시를 하지 않음

7. 방어여부

그림 28에서 보는 바와 같이 백신 접종 군에서는 5두 중 4두(V2, V3, V4, V5)에서 정상적인 비강 상태가 관찰 반면 대조군에서는 5두 중 3두(C1, C2, C4)에서 비정상적인 비강 상태가 관찰 되었다.



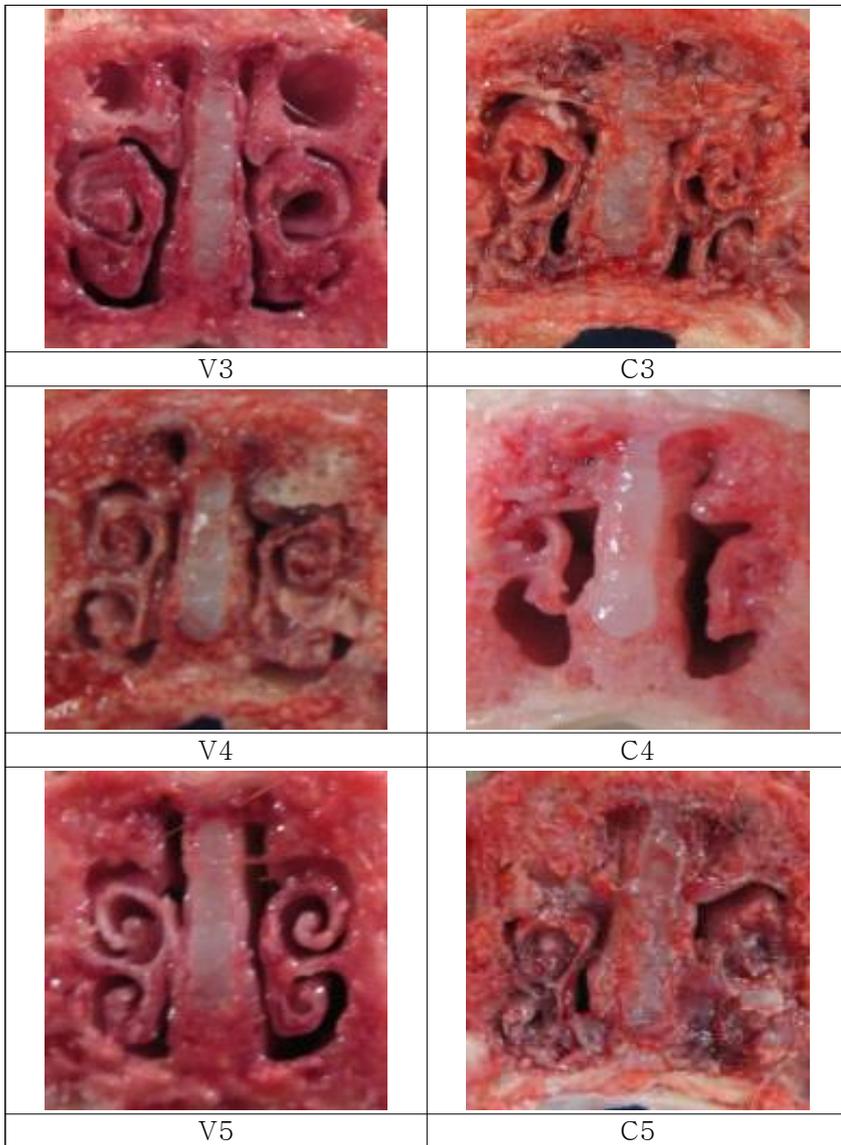


그림 28. 포유자돈에서의 방어 효과

3] 결론

임신 모돈에 백신을 과용량 또는 반복적으로 경구 접종하여 발열, 균 배출 및 유사산 등과 같은 임상 증상이 관찰되지 않았을 뿐만 아니라 혈액학적 및 혈액 생화학적으로 부작용 여부를 관찰하여 본 결과 부작용이 관찰되지 않았다. 이는 백신 접종에 있어 실수로 과용량 또는 반복 투여에 의한 부작용 없이 백신을 투여 할 수 있음을 보여 주는 결과라 할 수 있다. 또한 모돈에 백신을 경구 접종 한 후 유도되는 항체 역가를 측정하여 본 결과 모든 항원에 대해 접종 후 3주 쯤부터 증가하기 시작하여 모돈이 분만하는 시기인 백신 8주 쯤에 모든 항원에 대해 유의성 있는 결과가 관찰되었으며 더불어 초유에서도 모든 항원에 대해 IgA 및 IgG가 유의성 있는 증가가 관찰되어 모돈에 경구 접종하였을 경우에도 안정적으로 면역 반응을 유도함을 확인할 수 있었다. 또한 백신 접종 된 임신 모돈에서 출생한 자돈이 3주령이 되었을 때 전북대학교에 설치된 자돈사로 운송하여 일주일간의 적응 기간을 거친 후 *Pasteurella multocida* serotype A와 D로 도전 감염 시켜 비강에서의 정상 유무로 방어 여부를 확인하여 본 결과, 백신 접종 군에서는 80%가 정상으로 그리고 대조군에서는 40%만이 정상의 비강 상태가

관찰되어 모돈에서 유도된 항체가 포유 자돈에 이행 되어 위축성 비염을 성공적으로 방어 하는 것을 확인할 수 있었다. 이의 결과는 위축성 비염을 예방하기 위해서 필요한 점막면역이 포유자돈에 이행되었음을 간접적으로 확인해 주는 결과라 할 수 있다.

이와 같은 결과를 종합하여 보면 모돈에 백신을 과용량 또는 반복적인 투여에 의해서도 백신 부작용은 관찰되지 않았으며, 모돈에 경구 접종 하여 자돈이 제대로 포유를 한다면 위축성 비염을 예방하는데 필요한 점막면역 항체를 이행 받아 위축성 비염을 예방 할 수 있을 것으로 생각되었다. 더불어 개발 백신은 경구 접종이 가능하기 때문에 양돈농가에서 접종 방법에 있어 보다 간편하고 손 쉽게 백신 접종을 할 수 있을 것으로 생각되었다.

[12] 자돈에서 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신의 효능 및 안전성 실험

1] 실험 방법

1. 자돈에서의 백신의 안전성 평가

(1) 실험동물

살모넬라균 및 위축성 비염 그리고 파스츄렐라성 폐렴에 감염된 병력이 없으며 더불어 이들에 대한 예방접종이 실시되지 않았던 모돈에서 출생한 3 주령의 돼지를 구입하여 실험구역에서 1 주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

(2) 백신 준비 및 접종

경구접종용 백신 준비를 위해서는 각 항원의 발현이 확인된 약독화 살모넬라균을 LB Broth에 접종하여 37°C에서 200 rpm의 속도로 16시간 배양한 배양액을 1/20 (volume)의 비율로 LB broth에 첨가하여 같은 조건에서 OD₆₀₀ 값이 0.8 ~ 1.0이 될 때까지 2 ~ 4 시간 동안 배양하였다. 이 배양액을 4°C에서 4,000 rpm으로 10분 내지는 20분간 원심분리하여 멸균 PBS로 3번 세척한 후 sucrose가 20% 함유된 멸균 PBS (PBS-sucrose)로 총 균수가 2.0×10^{10} cfu/10ml가 되도록 혼합하여 생균백신으로 준비하였다.

실험군은 두개 군으로 나누었으며 각 군당 5마리의 돼지를 사용하였다. 그룹 A는 대조군으로 멸균 PBS를 경구 접종하였으며, 그룹 B는 백신 접종군으로 위에서 준비한 백신을 경구 접종하였다.

(3) 안전성 지표

1) 체중측정

백신 접종 후 3일 간격으로 체중을 측정하여 증체량의 변화를 조사하였다. 일일증체량은 측정체중에서 개시체중 (실험을 개시할 시점의 체중)을 제한 값에 실험일수를 나눈 값으로 결정하였다.

2) 혈액생화학적 검사

백신 접종 후 14 일째에 돼지의 경정맥을 통하여 채혈하였다. 전혈을 자연 응고시킨 뒤 원심분리 (2000 rpm, 10분)하여 혈청성분만을 취하여 혈액 생화학 수치를 측정하였다. 혈액

생화학수치는 cobas c 111 analyzer (Roche)를 이용하여 분석하였다.

3) 혈액학적 검사

백신 접종 14 일째에 돼지의 경정맥에서 헤파린이 함유된 진공채혈관 (녹십자)을 통해 채혈한 전혈을 대상으로 하여 혈액학적 검사를 수행하였다. 혈액학적 검사는 hematology analyzer (DRI-CHEM 3500i, FuJIFILM)을 이용하여 분석하였다.

4) 안락사 및 부검

백신 접종 후 14일째에 돼지를 안락사 시킨 뒤 부검을 실시하였다. 안락사는 전살 방법을 취하였다.

5) 임상증상

임상증상의 변화 정도는 표 24에서 제시된 지표들을 참조하여 선정하였다.

표 24. 증상별 임상지수

임상증상		임상지수
피모/외모상태	정상	0
	조강	1
	등뼈노출	2
행동이상	정상	0
	침울	1
	횡와자세	2
발 열	정상	0
	가벼운 발열	1
	오한/청색증	2
호흡곤란	정상	0
	호흡증가	1
	개구호흡	2
기 침	정상	0
	간헐 기침	1
	심한 기침	2
보행이상	정상	0
	가벼운 파행/관절 종창	1
	심한 파행/관절 종창	2
폐사	폐사	20

2. 자돈에서의 백신의 효능 평가

(1) 실험동물

위축성 비염에 감염된 적이 없으며 위축성 비염 백신을 접종하지 않은 모돈을 선별하여 모돈에서 출생한 모돈에서 3 주령의 돼지를 구입하여 실험구역에서 1 주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 시험 전 혈액 검사를 통해 *P. multocida*에 대한 항체가 없는 돼지임을 확인하였다. 항체의 존재여부는 VPro[®] Respi-titer ELISA kit (JENO Biotech Inc)를 이용하여 측정하였다.

(2) 백신 접종 및 가검물 채취

경구접종용 백신 준비를 위해서는 각 항원의 발현이 확인된 약독화 살모넬라균을 LB Broth에 접종하여 37°C에서 200 rpm의 속도로 16시간 배양한 배양액을 1/20 (volume)의 비율로 LB broth에 첨가하여 같은 조건에서 OD₆₀₀ 값이 0.8 ~ 1.0이 될 때까지 2 ~ 4 시간 동안 배양하였다. 이 배양액을 4°C에서 4,000 rpm으로 10분 내지는 20분간 원심분리하여 멸균 PBS로 3번 세척한 후 sucrose가 20% 함유된 멸균 PBS (PBS-sucrose)로 총 균수가 2.0 × 10¹¹ cfu/10ml가 되도록 혼합하여 생균백신으로 준비하였다.

단 근육접종용 백신 준비는 상기와 같은 방법으로 약독화 살모넬라균을 준비하고 세척하였다. 마지막 세척 후 침전물을 멸균 PBS로 10⁹ cfu/ml가 되도록 희석하여 포르말린의 최종 농도가 1%가 되도록 첨가하였다. 실온에서 24시간 동안 반응시켜 불활화시킨 다음 멸균 PBS로 3번 세척하였다. 이 부유액 100μl를 Tryptic Soy Agar에 접종한 후 37°C에서 하룻밤 배양하여 균의 사멸 여부를 확인하였다. 백신균주의 불활화 여부를 확인한 후 각 약독화 살모넬라균이 2 × 10⁹ cell 되도록 수산화 알루미늄겔 10mg/ml에 혼합하여 사균 백신으로 준비한 다음 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

- 1) Oral administration : 2.0×10¹¹ CFU in 10ml PBS-sucrose
- 2) Intramuscular immunization : 2.0×10⁹ cells in 1,000μl PBS

실험군은 두개 군으로 나누었으며 각 군당 5마리의 돼지를 사용하였다. 그룹 A는 대조군으로 멸균 PBS로 모돈 및 자돈을 각각 접종하였다. 그룹 B는 모돈은 생균으로 경구 접종하였으며 이 문헌에서 출생한 자돈은 불활화 백신으로 근육 접종 되었다 (표 25). 모든 자돈은 도전 감염 전에 면역 항체 유도 여부를 확인하기 위해 채혈을 수행하여 항체를 분리 하여 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

표 25. 실험 개요

그룹	두수	항원명	접종 대상			Challenge (자돈)
			모돈 1차 (임신 8주)	모돈 2차 (임신 11주)	자돈 (2주령)	
A	3	멸균 PBS	경구	경구	근육	<i>Pasteurella multocida</i> type D
B	3	CP39, FimA, PtfA, ToxA	경구 (2×10 ¹¹ CFU)	경구 (2×10 ¹¹ CFU)	근육 (2×10 ¹¹ cells)	//

(3) ELISA 측정

효소면역측정법을 통한 면역반응 측정은 제조회사의 사용설명서 (Bethyl Lab Inc., Montgomery, TX, USA)에 따라 수행하여 자돈 혈청에서 돼지의 IgG를 측정하였다. 즉, 자돈 혈청 샘플을 1:100으로 희석하였고, 효소반응은 o-phenylenediamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 492nm-620nm의 (Thermo Scientific Multiskan GO)에서 측정하였다. 흡광

도 값과 농도 사이의 표준관계를 나타내는 표준곡선에 따라 각 샘플에 대한 항체의 농도는 (μ g/ml)로 측정하였다.

(4) 도전감염

돼지를 졸레틸과 럼폰을 동일한 량으로 혼합하여 근육 주사하여 전신 마취시킨 뒤, 기관지경을 삽입하여 기관지내로 균액 (*P. multocida*: 2×10^9 CFU/ml) 5 ml을 서서히 주입하였다. 기관지내로 균을 접종하였다.

(5) 효능 평가

위축성 비염에 대한 백신의 효능 평가를 위해 전살 시킨 후 방혈한 다음 비강을 절개하여 위축성 비염에 대한 자돈에서의 백신의 효능을 평가하였다.

2] 결과

1. 안전성 평가

(1) 체중의 변화

자돈에 생균백신을 경구 접종한 후 자돈에서의 부작용 유발여부를 알아보기 위해 체중의 변화 및 일일증체량을 측정하였다. 실험개시 당시의 백신 접종군 자돈의 체중은 7.3 ± 0.8 Kg (평균 \pm 표준편차)였다. 일일증체량은 사료 공급 후 3일, 7일, 10일, 14 일째에 각각 측정하였는데, 그림 29에서 보는 바와 같이 3일째까지의 일일증체량은 대조군, 처치군, 각각 0.342 Kg, 0.653 Kg이었으며 5일째는 0.575 Kg, 0.75 Kg이었고 10일째는 1.025 Kg, 1.44 Kg 이었으며, 14일째까지의 일일증체량은 대조군, 처치군, 각각 0.944 Kg, 1.5 Kg이었다. 14 일째의 최종 체중은 각각 10.75 Kg, 13.34 Kg이었다.

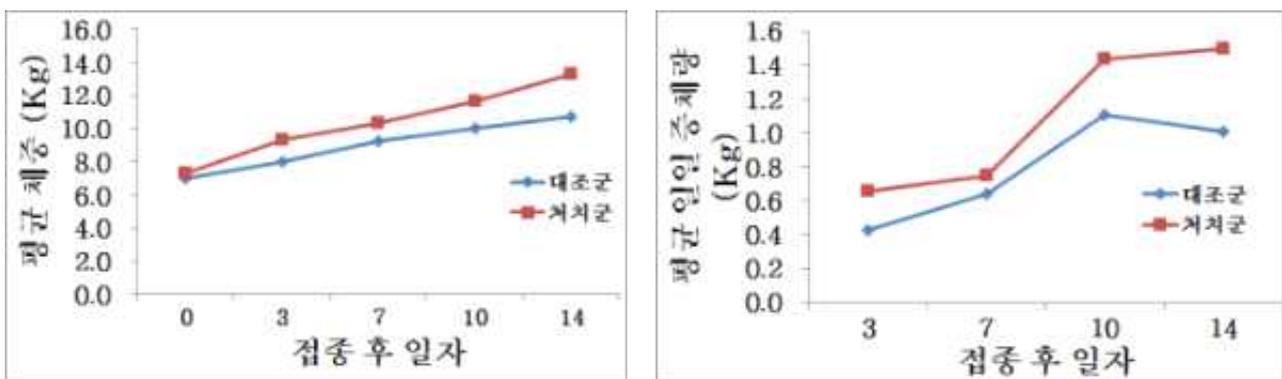


그림 29. 체중 및 일일증체량의 변화

(2) 임상증상의 변화

생균 백신을 경구 접종 한 후 자돈에서의 부작용 유발여부를 알아보기 위해 시험물질 공급 후 매일 각 동물에 대한 임상증상을 표 23을 기준으로 하여 매일 관찰하였다. 실험기간 동안 대조군 및 처치군 자돈 중 일부에서 행동이상 (침울) 등이 관찰되었으나 일시적인 경과에 불과하였으며 이 역시 대조군과 처치군에서 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다.

(3) 혈액생화학적 검사.

백신 접종 된 자돈에서의 부작용 유발여부를 알아보기 위해 혈액 생화학적 검사를 실시하였으며 그 결과는 표 26에 제시하였다. 대조군과 백신 접종군의 모든 수치가 정상치의 범위내로 기록되었다.

표 26. 혈액생화학치

검사항목	단위	대조군	처치군	정상범위
ALB	g/dL	3.80 ± 0.25	3.85 ± 0.11	1.9 - 3.9
ALP	U/L	155.50 ± 47.61	157.25 ± 50.21	41 - 176
ALT	U/L	41.25 ± 4.97	44.75 ± 5.97	22 - 47
AST	U/L	49.75 ± 8.15	51.00 ± 10.34	15 - 55
CA	mg/dL	9.45 ± 0.57	10.90 ± 1.54	9.3 - 11.5
CHO	mg/dL	110.75 ± 10.71	109.00 ± 21.55	81 - 134
CRE	mg/dL	1.08 ± 0.15	0.95 ± 0.09	0.8 - 2.3
GGST	U/L	48.18 ± 13.38	45.40 ± 11.36	31 - 52
GLU	mg/dL	126.25 ± 13.19	129.75 ± 10.29	84.68 - 149.55
PHOS	mg/dL	9.75 ± 0.44	10.18 ± 1.93	4.52 - 10.68
URE	mg/dL	9.75 ± 1.17	11.25 ± 1.29	8.12 - 24.9
TP	g/dL	5.5 ± 0.18	5.60 ± 0.25	4.4 - 7.4
BIL	mg/dL	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.05 - 0.5

(평균 ± 표준편차, n=5)

ALB: albumin, ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, CA: calcium, CHO: total cholesterol, CRE: creatinine, GGST: gamma glutamyl transferase, GLU: glucose, PHO: phosphate, URE: urea, TP: total protein, BIL: total bilirubin,

(4) 부검 후 육안적 소견

안락사를 시킨 동물을 부검하여 심장, 폐, 간, 위, 신장, 소장, 대장 등 실질 장기들에 대한 육안적인 관찰을 수행하였으며, 대조군 및 접종군 모두에서 특별히 장기의 육안적 병변이 관찰된 동물은 없었다 (그림 30).



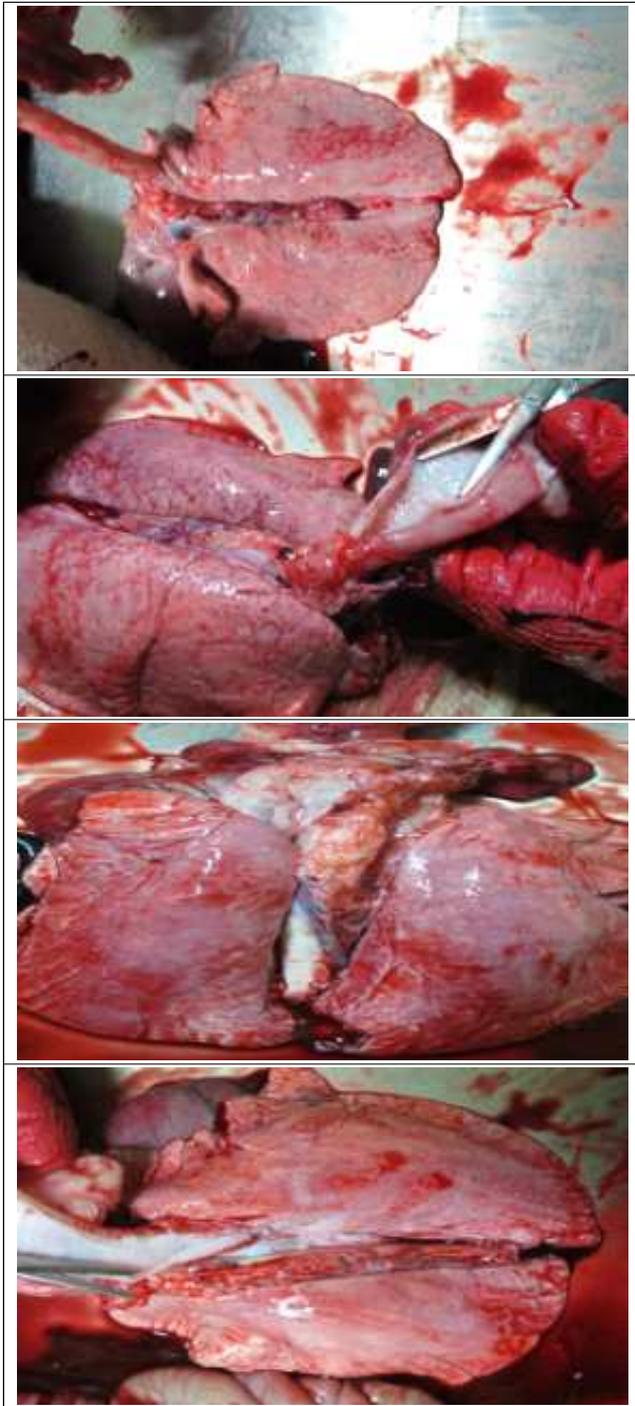


그림 30. 부검에 의한 실질 장기 관찰. 백신 접종에 따른 백신의 안전성을 확인해 보기 위한 실험으로 백신 접종 후 부검하여 육안적 소견을 관찰하여 본 결과 폐렴 및 섬유소화과 같은 이상 소견이 관찰되지 않음.

2. 자돈에서의 효능 평가

(1) 면역 반응

모든 및 자돈에 백신 접종 한 후 유도된 항체 역가를 측정 한 결과는 그림 31에 나타내었다. 즉, 대조군에 비해 모든 항원에 대해 유의성 있는 항체 역가가 관찰되었다.

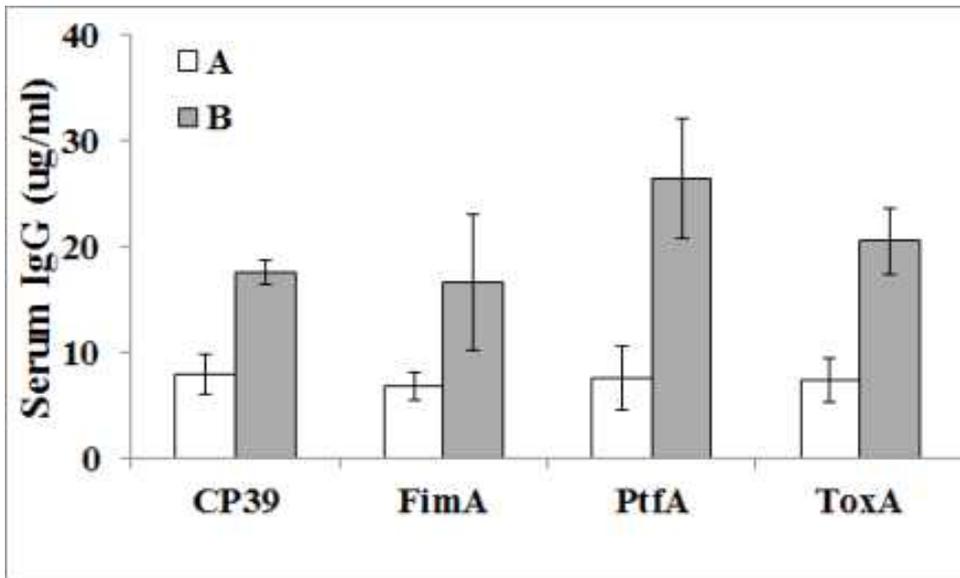
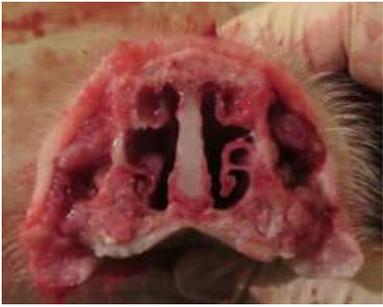


그림 31. 자돈에서의 혈청 IgG 역가

(2) 도전감염 균주에 대한 방어

자돈에서 백신 접종 후 백신의 효능을 측정하기 위해 위축성 비염 유발 균주로 도전 감염 시킨 후 자돈을 안락사 시켜 코를 절개 한 후 비강의 상태를 확인하여 보았다. 그 결과 그림 32에서 보는 바와 같이 대조군은 5두 중에서 3두(C2, C3, C5)에서 비정상적인 비강 상태가 확인되었고 백신 접종군은 모든 자돈(V1, V2, V3, V4, V5)이 정상적인 비강 상태가 관찰되었다.

대조군	백신 접종군
C1	V1
	
C2	V2
	

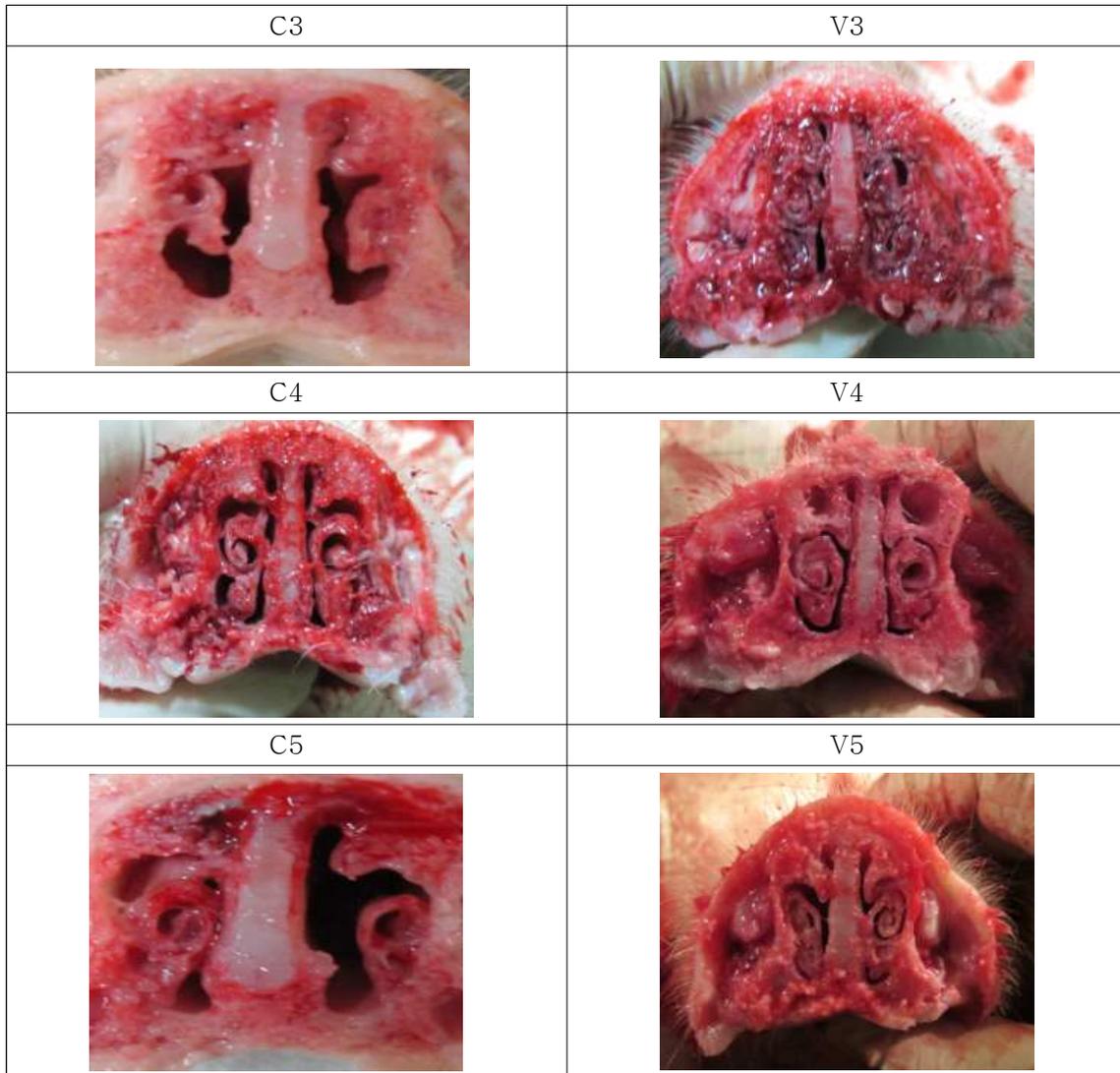


그림 32. 모돈 및 자돈에 백신 접종 후 도전감염 균주에 대한 방어

3] 결론

동물의 건강에 이상이 유발되면 식욕이 감소하거나, 체내 대사의 불균형에 의해 체중이 감소하게 된다. 자돈에 생균백신을 경구 접종한 후 부작용 유발여부를 알아보기 위해 체중의 변화 및 일일증체량을 측정하여 본 결과 일일증체량으로 보았을 때 백신을 접종한 그룹에서 대조군에 비해 20% 이상 상승하였다. 결론적으로 백신을 자돈에 경구 접종 한다고 하더라도 대조군에 비해 체중감소는 관찰되지 않았으며 오히려 체중이 증가하여 사료효율이 높아졌음을 알 수 있었기에 우려할 만한 부작용은 없는 것으로 생각되었다.

모돈에는 생균 백신을 경구 접종하였고 그 모돈에서 출생한 자돈에는 불활화 백신을 근육으로 접종한 후 *Pasteurella multocida* typeD로 도전감염시켜 비갑개의 상태로 방어 여부를 확인하여 본 결과, 대조군은 단지 40% 만이 방어에 성공한 반면, 백신 접종군은 100% 방어에 성공하여 모돈 및 자돈에서의 백신 접종이 가장 이상적인 백신 조합임을 확인할 수 있었다.

[13] 흉막폐렴 예방 생균 백신 개발을 위한 주요 병원성 인자 항원 발굴 및 유전자 확보

• 원인균 : *Actinobacillus pleuropneumoniae* 2형과 5형

▶ 국내 돼지에서 흉막 폐렴은 현재 전 세계적으로 발생하는 질병으로 국내에서도 최근 전 국적으로 발생하고 있으며, 기후의 급변, 수송 또는 밀집사육 등에 의한 스트레스와 밀접한 관계를 가진다. 발병은 모든 연령의 돼지에서 감수성이 있으나 **후보돈과 비육 말기돈에서** 폭발적으로 발병한다. 특히 흉막 폐렴은 급성형에 의한 폐사율의 증가와 만성형에서 사료효율 감소, 성장 지연 등에 의한 경제적 손실이 막대하다. **흉막폐렴을 유발하는 병원균의 부착인자와 독소가 면역원성과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.** 따라서 면역원성과 관련된 부착인자와 독소를 중심으로 그 유전자를 특이 primer (표 27)를 이용하여 증폭시켜 확보하였다.

▶ 면역원성과 관련된 주요 부착인자와 독소들

Apx IA, Apx IIA, Apx IIIA, OmpA

표 27. PCR primers used in this study and their product sizes.

Name	Sequence(5' →3')	Size (bp)	Accession number	Reference
ApxIA-F	CCGCGAATTCTCTCAGCTCGATAGAGTCAAA	3,060	GQ369732	This study
ApxIA-R	CCGCAAGCTTAAGCAGATTGTGTTAAATA			
ApxIIA-F	CCGCGAATTCTCAAAAATCACTTTGTCATCA	2,870	AY736188	This study
ApxIIA-R	CCGCGTCGACTTAAGCGGCTCTAGCTAAT			
ApxIIIA-F	CCGCGAATTTCAGTACTTGGTCAAGCATG	3,156	X68815	This study
ApxIIIA-R	CCGCGTCGACTTAAGCTGCTCTAGCTAGG			
OmpA-F	CCGCGAATTCCCACAACAAAATACTTTCTACG	1,050	CP001091.1	This study
OmpA-R	CCGCGTCGACTTACATAGCTACGTTTTTAGCACC			

Underlines indicate the sites of restriction enzymes, such as BamHI, EcoRI, Sall and HindIII.

[14] 흉막폐렴 주요 병원성 인자에 대한 각 단백 항원 확보

1] 실험내용

1. 단백질항원 확보를 위한 클로닝 및 단백질항원 준비

시판되는 발현용 벡터 (pQE9와 pET28a)와 숙주세포 (*E. coli* DH5α와 *E. coli* BL21)를 이용하여 각 해당 유전자 (Apx IA, Apx IIA, Apx IIIA 및 OmpA)를 발현용 벡터에 삽입한 후 해당 숙주세포에 형질전환시켜 단백질항원 발현 균주를 확보하였다. 정제된 PCR 증폭산물과 pQE31과 pET28a 벡터를 제한 효소로 각각 절단한 후 아가로스 겔에서 전기영동하였다. 절단된 각 절편을 AccuPrep gel purification kit (Bioneer, 한국)를 이용하여 정제한 다음 T4 DNA ligase (Takara, 일본)로 두 산물을 라이게이션한 후 *E. coli* DH5α또는 *E. coli* BL21으로 형질전환하였다. 이들 형질전환 균주를 암피실린 (pQE31을 발현 벡터로 사용하였을 경우) 또

는 카나마이신 (pET28a를 발현 벡터로 사용하였을 경우)이 각각 첨가된 LB 아가 플레이트에 골고루 퍼서 말린 다음 37°C에서 하룻밤 배양하여 항생제 내성을 나타내는 형질전환된 *E. coli* DH5a 또는 *E. coli* BL21을 선택하였다. 각 단백 항원 유전자가 삽입된 벡터는 *E. coli* DH5a 또는 *E. coli* BL21으로부터 AccuPrep plasmid extraction kit (Bioneer, 한국)를 이용하여 각 유전자가 삽입된 플라스미드를 추출하여 제한 효소로 절단하여 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인하였다. 그리고 이렇게 확인된 콜로니를 각 발현 벡터에 맞는 항생제가 첨가된 LB 액체배지 5ml에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 배양된 균액 중 1ml를 LB 액체배지 200ml에 접종하여 30°C에서 150rpm의 속도로 흔들어 주면서 하룻밤 배양하였다. 이 배양액에 IPTG의 최종농도가 1mM이 되도록 첨가하여 같은 조건으로 4시간 재배양하였다.

이 배양액을 8,000rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 침전물은 PMSF(phenylmethanesulfonyl fluoride)가 1mM이 되도록 첨가된 10ml의 멸균 PBS로 재부유시킨 다음 -70°C에서 냉동하였다. 냉동된 부유액을 다시 37°C 항온수조 내에서 해동한 다음 -70°C에서 냉동하기를 2~3회 반복하였다. 마지막으로 해동한 후 부유액을 초음파처리하여 세포들을 분쇄한 다음 15,000rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액을 멸균 관에 옮겼다. 발현 단백질이 가용성일 경우에는 버퍼 B (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 8.0) 4ml를 상층액과 혼합하였고 불용성일 경우에는 6ml의 버퍼 B로 침전물을 재부유시킨 후 실온에서 1시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 이 반응액을 15,000rpm, 4°C에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 레진이 들어 있는 관으로 옮겨 단백질이 레진과 결합하도록 30분간 교반하였다. 이 반응액을 준비된 컬럼에 충전시키고 천천히 흘려보냈다. 흘려보낸 이 액으로 컬럼을 재충전한 다음 다시 천천히 흘려보냈다. 반응액을 흘려보낸 다음 버퍼 C (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 6.3) 6ml로 컬럼을 3회 세정하여 레진과 결합하지 않은 기타 불필요한 단백질을 제거하였다. 용출 버퍼 (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 4.5) 2ml로 컬럼을 충전시킨 후 20분간 반응시켜 발현 단백질을 레진으로부터 분리시킨 다음 용출 버퍼를 1ml씩 첨가하여 단백질을 회수하였다. 회수된 단백질을 SDS-PAGE에서 전기영동하여 발현 단백질을 확인하였으며 정량한 후 -70°C에 보관하였고, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), SPA (spenocyte proliferation assay), FACS (flow cytometry) 및 실시간 PCR 분석을 위한 항원으로 사용하였다.

2) 결과 및 결론

1. 정제 단백 항원 SDS-PAGE 확인

모든 항원에 대해 SDS-PAGE로 발현을 확인한 후 ELISA용 항원 및 SPA FACS 그리고 RT-PCR을 위한 실험에 사용하였다.

[15] 병원성 유전자가 제거된 점막면역 활성 delivery system을 이용한 홍막폐렴 예방 생균 백신 개발

15-1] 백신 개발 및 발현/분비 확인

1] 실험방법

1. 약독화 살모넬라를 이용한 백신균주의 제조

실험에 사용한 균주와 플라스미드의 특징은 하기 표 28에 나타내었다. 목적 항원 (Apx I A, Apx II A, Apx III A 및 OmpA) 각각의 유전자를 각 해당 primer (표 29)를 이용하여 PCR로 증폭시킨 다음, 발현 단백질의 분비를 향상시킨 벡터인 pBP244에 클로닝한 후, pYA232(*lacI^q*가 삽입)를 가지고 있는 *E. coli* χ 6212 균주에 형질전환하였다. 이 *E. coli* 균주에서 벡터를 추출하여 전기천공법 (electroporation)으로 약독화 살모넬라 균주 (JOL912)에 각각 형질전환하여 백신 후보 균주들을 제작하였다.

표 28. 본 발명에 사용된 균주 및 플라스미드 정보

균주/플라스미드	설명	출처
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F' ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15(<i>lacZYA-argF</i>)U169 deoR <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i>	실험실 보유
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hscS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3), pLysS, Cm ^r	실험실 보유
JOL1076	BL21 with pET28a-Apx I A gene	
JOL1000	BL21 with pET28a-Apx II A gene	
JOL1007	DH5 α with pQE31-Apx III A gene	
JOL997	BL21 with pET28a-OMPA gene	
χ 6212	F ⁻ λ ⁻ ϕ 80 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>endA1 recA1 hadR17 deoR thi-1 glnV44 gyrA96 relA1 ΔasdA4</i>	
<i>Samonella</i> Typhimurium		
JOL401	<i>S. Typhimurium</i> wild type	실험실 보유
JOL912	<i>S. Typhimurium</i> JOL401 derivative $\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$	실험실 보유
JOL1300	JOL912 with pBP244-Apx I A	
JOL1301	JOL912 with pBP244-Apx II A	
JOL1302	JOL912 with pBP244-Apx III A	
JOL1303	JOL912 with pBP244-OmpA	
JOL1075	JOL912 with pBP244	
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>		
JOL981	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 2	실험실 보유
JOL982	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 5	실험실 보유
플라스미드		
pET28a	IPTG-inducible expression vector; Am ^r	Qiagen
pQE31	IPTG-inducible expression vector; Km ^r	Novagen
pBP244	pYA3493 derivative containing <i>lepB</i> , <i>secA</i> and <i>secB</i> genes	실험실 보유
pMMP65	Asd ⁺ vector, pBRori, β -lactamase signal sequence-based periplasmic secretion plasmid, 6xHis	실험실 보유

표 29. PCR primers used in this study and their product sizes.

Name	Sequence(5' → 3')	Size (bp)	Accession number	Reference
ApxIA-F	CCGCGAATTCTCTCAGCTCGATAGAGTCAAA	3,060	GQ369732	This study
ApxIA-R	CCGCAAGCTTAAGCAGATTGTGTTAAATA			
ApxIIA-F	CCGCGAATTCTCAAAAATCACTTTGTCATCA	2,870	AY736188	This study
ApxIIA-R	CCGCGTCGACTTAAGCGGCTCTAGCTAAT			
ApxIIIA-F	CCGCGAATTCAGTACTTGGTCAAGCATG	3,156	X68815	This study
ApxIIIA-R	CCGCGTCGACTTAAGCTGCTCTAGCTAGG			
OmpA-F	CCGCGAATTCACACAACAAAATACTTTCTACG	1,050	CP001091.1	This study
OmpA-R	CCGCGTCGACTTACATAGCTACGTTTTTAGCACC			

Underlines indicate the sites of restriction enzymes, such as BamHI, EcoRI, Sall and HindIII.

2. 웨스턴 블랏을 통한 목적 항원 발현 확인

각 제조된 백신 후보균주를 LB 액체배지에 밤새 배양한 후 원심 분리하여 상층액과 펠렛 시료를 준비한다. 상층액은 10% TCA (trichloroacetic acid)로 얼음 위에서 밤새 반응시켜 SDS-PAGE 샘플 버퍼로 부유시켜 94°C에서 5분간 끓인 후 SDS-PAGE한 다음 PVDF 멤브레인에 옮긴 후 블로킹 버퍼 (1% bovine serum albumin in PBST)로 밤새 반응시킨 다음 각 항원에 대한 토끼의 다클론 (polyclonal) 항체를 1:500으로 희석하여 1시간 반응시킨다. 2차 항체 (goat anti-rabbit IgG(H+L) HRP)를 1:40,000으로 희석하여 1시간 반응시킨 후 발색시켜 목적 항원 단백질의 발현을 확인하였다.

웨스턴 블랏으로 목적 항원의 발현이 확인된 JOL1300, JOL1301, JOL1302 및 JOL1303의 4개 균주를 백신 후보 균주로 사용하였다.

2] 결과

1. Western blot을 통한 각 항원 발현/분비 확인

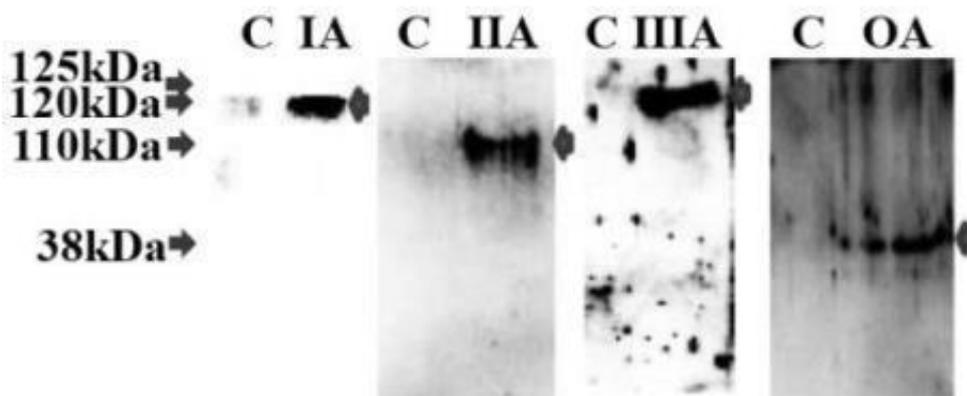


그림 33. Identification of secreted recombinant ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA and OmpA antigens using Western blot analysis. Lanes: C, control for each recombinant antigen; IA, recombinant ApxIA antigen secreted by JOL1300; IIA, recombinant ApxIIA antigen secreted by JOL1301; IIIA, recombinant ApxIIIA antigen secreted by JOL1302; and OA, recombinant OmpA antigen secreted by JOL1303.

그림 33에 나타난 바와 같이, transformation된 균주 중 Western blot에 의해 supernatant에서 항원 발현이 확인된 총 4균주를 백신 후보주로 결정하였다. Western blot에 의한 백신 후보 균주들로부터 돼지 흉막 폐렴과 관련된 ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA 그리고 OmpA의 발현 및 분비를 확인 하였다 (그림 33). 백신 후보 균주들로부터 ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA 그리고 OmpA 항원의 분비를 확인하기 위해 TCA-침전법을 이용한 Western blot 방법이 수행되었다. ApxIA는 120kDa, ApxIIA는 110kDa, ApxIIIA는 125kDa 그리고 OmpA는 38kDa에서 각각 관찰되었다.

3] 고찰

APP의 병원성 인자인 Apx IA, Apx IIA, Apx IIIA를 발현/분비 벡터인 pBP244에 클로닝한 후 이를 약독화 살모넬라에 형질전화하여 Western blot으로 발현 및 분비여부를 확인해 본 결과 모든 항원에 대해 발현 및 분비가 잘 이루어 지고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 이들 항원을 분비하는 각 약독화 살모넬라 균주를 생균 백신 균주로 사용하였다.

15-2] 각 발현/분비 개발 백신 각각 접종 경로별 면역 유도 시험

1] 실험방법

1. 생균 백신 준비 및 접종

1-1. 경구 접종용 생균 백신 준비

각 항원 단백질의 발현이 확인된 약독화 살모넬라균을 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후 새로운 LB 액체배지에 1:20의 비율로 첨가하여 37°C에서 광학밀도 OD₆₀₀이 0.8이 될 때까지 배양하였다. 배양된 균주들은 4,000rpm에서 20분간 원심분리 하였으며, 침전된 균주들은 멸균 PBS로 재부유시켜 같은 조건으로 다시 원심분리하였다. 침전된 균주는 수크로스가 20%가 되도록 첨가된 PBS (PBS-sucrose)로 각 항원을 발현하는 균주들은 2.0x10⁹ CFU(colony-forming units)/ml가 되도록 재부유시켰다. 실험동물은 생균이 제조된 당일에 구강으로 접종되었다.

1-2. 비강내 접종용 생균 백신 준비

경구 접종과 마찬가지로 생균 백신 준비를 위해서는 각 항원 단백질의 발현이 확인된 약독화 살모넬라균을 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 200rpm의 속도로 16시간 배양한 배양액을 1/20 (volume)의 비율로 LB 액체배지에 첨가하여 같은 조건에서 OD₆₀₀ 값이 0.8이 될 때까지 4시간 정도 배양하였다. 이 배양액을 4°C에서 4,000rpm으로 20분 동안 원심분리하여 멸균 PBS로 3번 세척한 후 다시 멸균 PBS로 부유시켜 총 균수가 1.0x10⁵ CFU/ml가 되도록 혼합하여 생균 백신으로 제조된 당일에 비강으로 접종되었다.

2. 백신접종

실험군별 각 마우스는 하루밤 동안 절식시킨 후 한 마리당 20μl에 2x10⁹ CFU가 되도록

록 조정하여 구강접종하거나 $10\mu\text{l}$ 에 1×10^5 CFU가 되도록 조정하여 비강내로 접종하며 대조군은 멸균 PBS-sucrose와 PBS로 각각 구강 접종 또는 비강내로 접종한 다음 추가 30분간 더 절식시켰다 (표 30 및 표 31). 같은 균수와 같은 방법으로 접종 후 21일째에 한 번 더 추가 접종하였다 (표 32).

표 30. 구강 접종 실험 계획

그룹	두수	균주	항원명	접종균수	도전감염
1	15	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Apx I A	1차- 2×10^9 CFU/ $20\mu\text{l}$ 2차- 2×10^9 CFU/ $20\mu\text{l}$	AP 타입 2와 AP 타입 5를 동량 혼합하여 도전감염
2	15	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Apx II A	1차- 2×10^9 CFU/ $20\mu\text{l}$ 2차- 2×10^9 CFU/ $20\mu\text{l}$	
3	15	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Apx III A	1차- 2×10^9 CFU/ $20\mu\text{l}$ 2차- 2×10^9 CFU/ $20\mu\text{l}$	
4	15	<i>Salmonella</i> Typhimurium	OmpA	1차- 2×10^9 CFU/ $20\mu\text{l}$ 2차- 2×10^9 CFU/ $20\mu\text{l}$	
5	15		Control	멸균 PBS-sucrose	

표 31. 비강내 접종 실험 계획

그룹	두수	균주	항원명	접종균수	도전감염
1	10	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Apx I A	1차- 1×10^5 CFU/ $10\mu\text{l}$ 2차- 1×10^5 CFU/ $10\mu\text{l}$	AP 타입 2와 AP 타입 5를 동량 혼합하여 도전감염
2	10	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Apx II A	1차- 1×10^5 CFU/ $10\mu\text{l}$ 2차- 1×10^5 CFU/ $10\mu\text{l}$	
3	10	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Apx III A	1차- 1×10^5 CFU/ $10\mu\text{l}$ 2차- 1×10^5 CFU/ $10\mu\text{l}$	
4	10	<i>Salmonella</i> Typhimurium	OMPA	1차- 1×10^5 CFU/ $10\mu\text{l}$ 2차- 1×10^5 CFU/ $10\mu\text{l}$	
5	10		Control	멸균 PBS	

표 32. 실험 개요

0주	3주	6주	9주	10주
1차 접종	2차 접종		도전감염	부검
접종 전 채혈	접종 전 채혈	2차 접종 후 3주 채혈	표3 및 표 4 참고	도전감염 후 생존한 마우스 대상
가검물 채취	가검물 채취	가검물 채취	가검물 채취	균 분리 (폐)

3. 가검물 채취

1차 접종 전, 2차 접종 전 및 도전감염 전에 각각 채혈하여 혈청을 분리 -80°C 에 보관하며 실험에 사용하였다.

4. ELISA를 통한 항체 역가 측정

마우스에 구강 및 비강내 접종 후, 각 항원에 대해 형성된 항체의 역가를 측정하기 위해 접종 전, 1차 접종 후 3주, 2차 접종 후 3주와 6주에 각각 채취한 혈청을 대상으로 하여 IgG에 대한 항체 역가를 ELISA를 통해 측정하였다.

5. 도전감염

실험군별 각 마우스는 하루밤 동안 절식시킨 후 한 마리당 $20\mu\text{l}$ 에 5×10^7 CFU가 되도록 야외분리주를 조정하여 비강내로 접종하며 폐사여부를 확인하였다.

2] 실험결과

1. ELISA에 의한 혈청 IgG 항체 역가 분석

구강 또는 비강내 접종 경로와 상관없이 각 단백질 항원에 대해 단백질 항원 발현 백신군 주 1차 접종 이후 3주 후부터 혈청 IgG의 역가가 증가함을 확인할 수 있었다 (그림 34).

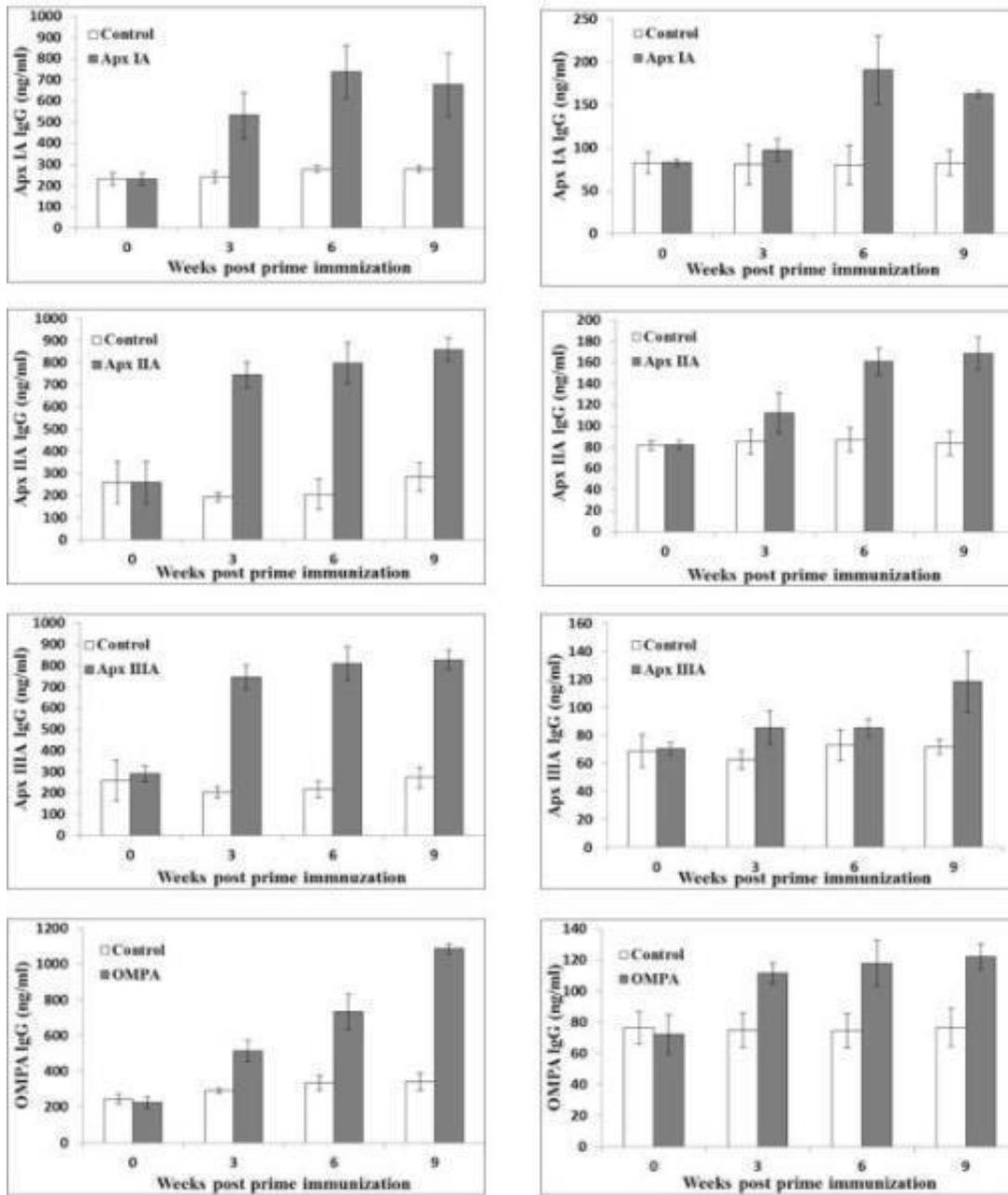


그림 34. 단백질 항원을 발현하는 각각의 살모넬라 변이주를 경구 및 비강내 접종 후 유도된 각 항원에 대한 혈청 IgG 항체 역가.

2. 도전감염 후 폐사 여부

구강 또는 비강내 접종 경로별로 각 단백질 항원 발현 백신균주의 접종군에서 도전감염 후 폐사 여부를 확인하였는데, 그 결과는 하기 표 33과 같았다.

표 33. 도전감염 후 각 접종 경로별 폐사 두수

접종 경로	Apx I A	Apx II A	Apx III A	OMPA	Control
경구 투여	2 ^a /6 ^b	1/6	3/6	3/6	3/6
비강내 투여	1/9	1/9	0/9	1/9	3/8

^a폐사 두수/^b접종 두수

3] 결론

혈청검사 결과 경구 접종보다는 비강내 접종에서 보다 높은 항체 역가가 유도되는 것이 확인되었으며, 도전감염 후 실험동물의 방어여부를 종합하여 본 결과 경구 접종 보다는 비강내 접종의 경우에서 방어 효과가 우수함이 관찰되었다.

[16] 흉막 폐렴 예방 생균백신 생체 내에서의 병원성 획득 실험

1] 실험 방법

1. 실험동물

5주령의 BALB/c 마우스를 구입(한일실험동물센터, 한국)하여 1주령의 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

2. 접종

APP 2형과 5형 균주를 각각 chocolate agar에 접종하여 하룻밤 배양 한 후 5×10^7 CFU/20 μ l이 되도록 멸균 PBS에 희석한 후 각각의 비강에 10 μ l씩 총 20 μ l를 마우스에 비강 접종하였다.

3. 균분리

임상 증상이 관찰되는 마우스를 대상으로 spleen을 무균적으로 채취하여 파쇄한 후 chocolate agar에 접종한 후 37°C에서 배양하여 균을 분리하였으며, APP 특이 primer를 이용하여 APP 균주를 확인하였다 (표 34).

표 34. *Actinobacillus pleuropneumoniae* 특이 primers

Name	Sequence (5' → 3')	크기 (bp)	확인 가능 혈청형
APP-F	AAG GTT GAT ATG TCC GCA CC	950	A. pleuropneumoniae serotypes 1 to 15
APP-R	CAC CGA TTA CGC CTT GCC A		
Ap2F	ACT ATG GCA ATC AGT CGA TTC AT	500	A. pleuropneumoniae serotype 2
Ap2R	CCT AAT CGG AAA CGC CAT TCT G		
Ap5Ab	TTT ATC ACT ATC ACC GTC CAC ACC T	1,100	A. pleuropneumoniae serotype 5
Ap5Bb	CAT TCG GGT CTT GTG GCT ACT AA		

4. 반복접종 및 균 분리

야외 분리 APP 균주의 병원성을 높이기 위해 BALB/c micel에 비강 접종 후 임상증상을 보이는 mice의 spleen에서 APP 균주를 분리한 후 APP 특이 primer를 이용하여 확인한 다음 동량의 균주를 다시 마우스에 접종 후 폐사 및 임상 증상의 발현 정도에 따라 병원성 회복 여부를 확인하였으며 처음 접종 균량보다 적은 수의 균량에서도 임상 증상을 발현할 때까지 병원성을 회복을 위해 위와 같은 실험을 반복하였다.

2] 결과 및 고찰

BALB/c micedp 병원성 회복을 위해 접종 및 균 분리를 반복하여 마우스에 5×10^7 CFU/20 μ l 비강 접종시에 LD₅₀이 확립되었으며 앞으로 이 균수로 도전감염 최종 균수로 확정하였다.

[17] 마우스를 이용한 흉막 폐렴 예방 생균백신의 안전성 실험

1] 실험 내용

1. 백신 접종

6주령의 마우스에 각 항원을 발현하는 균주를 1×10^5 CFU/10 μ l(in PBS)이 되도록 혼합하여 비강내로 1회 및 2회 접종하였다 (표 35).

표 35. 실험개요

그룹	두수	접종균수		부검
		1차	2차	
A	12		1×10^5 CFU/10 μ l ^a	접종 후 1일, 1주, 2주, 3주
B	12	1×10^5 CFU/10 μ l	1×10^5 CFU/10 μ l	접종 후 1일, 1주, 2주, 3주
C	12	멸균 PBS	멸균 PBS	접종 후 1일, 1주, 2주, 3주

[※ 콧구멍 한쪽에 5 μ l씩 접종.

※ ^a PBS 10 μ l에 각 항원 발현 백신균주의 수가 1×10^5 CFU이 되도록 제조하여 각 균주를 2.5 μ l씩 혼합하여 제조 당일에 접종.]

2. 임상증상 관찰

1) 백신 접종 후 설사, 발열 및 침울, 의기소침, 식욕감퇴 등의 임상 증상을 매일 하루에 두 번 (아침, 저녁) 관찰하였다.

- 하루에 일정량의 사료를 대조군과 동일량 공급하여 사료 소비량으로 판단하였다.
- 분변 채취시 설사 유무를 확인하였다.
- 백신 접종 후 1주일 동안 매일 정해진 시간에 체온을 측정하였다.

2) 무게 측정 : 백신 접종 전, 접종 후 1주, 2주, 3주째에 모든 그룹의 마우스 무게를 측정하여 기록하였다.

3. 가검물 채취

백신 접종 전, 1차 접종 후 1일, 2일, 3일, 1주, 2주, 3주째에 그룹별로 무작위로 선택된 5마리의 마우스 분변을 모아 무게를 잰 후 멸균 BPW (Buffered Pepton Water)로 100mg/ml이 되도록 부유시킨 후 부유액 100 μ l를 BGA 한천 플레이트와 LB 한천 플레이트에 직접 도말하여 백신균주를 분리한 후 PCR을 통해 백신균주의 배출 여부를 확인하였다. 또한 나머지 부유액은 하룻밤 배양한 후 100 μ l를 10ml의 RV 액체배지에 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양액 100 μ l를 BGA 한천 플레이트에 도말접종하여 백신균주를 분리한 후 PCR을 통해 백신균주의 배출 여부를 최종 확인하였다.

4. 부검(sacrifice) 후 실질 장기에서의 백신균주 분리 및 폐 세척액 준비

1) 시기 : 비강 내 접종 후 1일, 1주, 2주, 3주에 마취제를 투여하여 죽이고 부검하였다.

2) 대상 장기 : 폐, 간 및 비장.

3) 폐 세척액 준비 : 폐 전체를 절개하여 멸균 PBS 2ml에 넣어 파쇄하였다. 이 파쇄액을 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 보관한 후 4 $^{\circ}$ C, 12,000xg에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 회수하여 1ml은 protein assay kit (BIO-RAD, 미국)를 사용하여 단백질 농도를 측정하여 1mg/ml으로 조정한 후 -20 $^{\circ}$ C에 보관하며 실험에 사용하였고, 나머지 1ml은 폐에서의 백신균주 분리를 위해 사용하였다.

4) 백신균주 분리 : BPW가 들어있는 50ml 시험 튜브에 상기의 조직을 하나씩 넣어 얼음에 보관하였고, 각 장기가 들어 있는 튜브의 무게를 달아 각 실질 장기의 실제 무게를 기록하였다. 멸균 일회용 페트리디쉬와 주사기를 이용하여 각 장기를 잘게 파쇄한 후 다시 50ml 시험 튜브에 옮기고, 이 용액 100 μ l를 BGA 한천 플레이트와 LB 한천 플레이트에 직접 도말하여 백신균주를 분리한 후 PCR을 통해 백신균주의 배출 여부를 확인하였다. 또한 나머지 부유액은 하룻밤 배양 후 100 μ l를 10ml의 RV 액체배지에 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양액 100 μ l를 BGA 한천배지에 도말하여 백신균주를 분리한 후 PCR을 통해 백신균주의 배출 여부를 최종 확인하였다.

5. 면역 반응 측정

ELISA 키트를 이용하여 준비된 기관지 폐 세척액에서 각 항원에 대한 sIgA를 측정하였다.

2] 결과

1. 백신 접종 후 임상 증상 관찰

백신 접종 후 3주 동안 매일 설사, 발열을 하루에 한번 확인하여 본 결과 백신을 접종한 마우스 모두에서 설사 및 발열은 확인되지 않았다. 또한, 백신 접종 후 식욕감퇴 여부를 확인하기 위해 하루에 일정량의 사료를 공급하여 남은 양을 조사해 본 결과 (그림 34)에서 보는

바와 같이, 백신 1회 접종(그룹 A)의 경우는 백신 접종 이후 3일째까지 사료 섭취량이 감소하였으나, 이후 서서히 증가하여 백신 접종 이후 9일째 부터는 정상의 사료 섭취 수준을 나타내었다. 그리고 백신 2회 접종(그룹 B)의 경우는 1회 접종(그룹 A)의 경우보다 빨리 회복되어 백신 접종 3일 후부터 정상의 사료를 섭취하여 4일 후부터는 정상의 사료 섭취 수준이 확인되었다. 또한 실험 동물의 무게를 분석한 결과, 백신 1회 접종군에서만 접종 1주 후에 약간의 몸무게 감소를 보였다가 이후 다시 회복되는 것으로 관찰되었으며, 백신 2회 및 3회 접종군에서는 체중의 변화가 관찰되지 않았다 (그림 35).

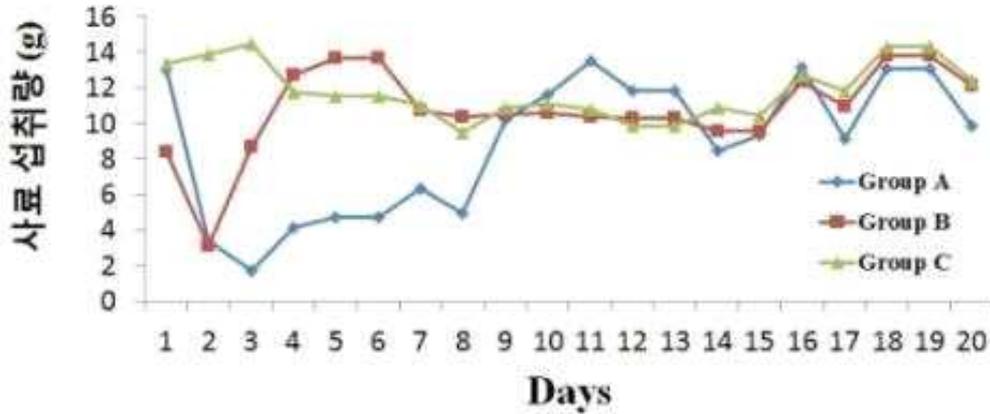


그림 34. 접종 횟수에 따른 백신 접종 후 사료 섭취량

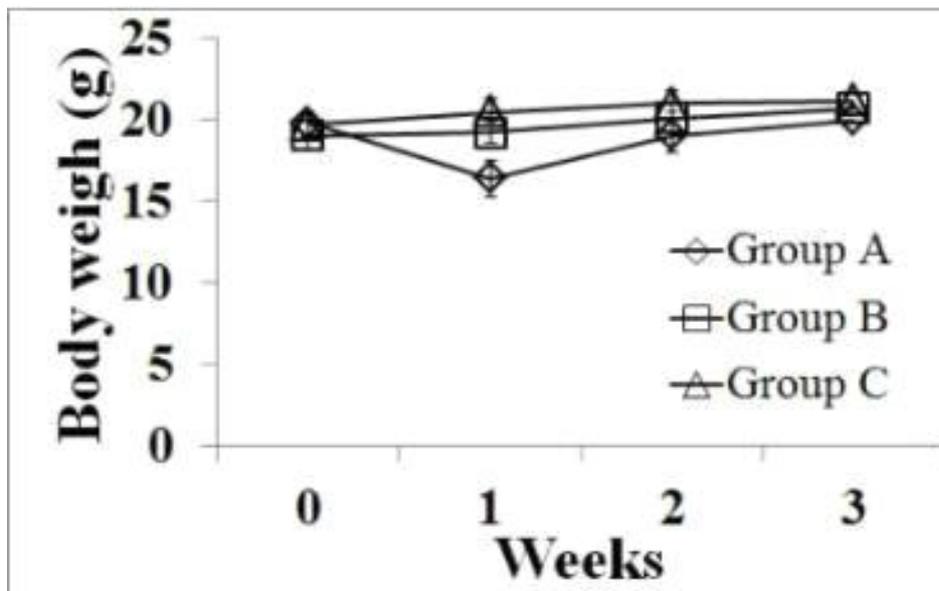


그림 35. 접종 횟수에 따른 백신 접종 후 체중 변화

2. 분변으로의 백신균주의 배출 여부

생균 백신의 비강내 접종 후 분변으로부터 백신균주의 배출 여부를 확인하여 본 결과

를 하기 표 36에 나타내었다. 백신 접종 1주 후부터는 백신 접종 횟수에 상관없이 분변에서 백신균주의 배출이 확인되지 않았다.

표 36. 백신 접종 후 분변에서의 쉐딩(shedding) 여부 결과

그룹	1일		2일		3일		1주		2주		3주	
	Direct	Enrichment	Direct	Enrichment	Direct	Enrichment	Direct	Enrichment	Direct	Enrichment	Direct	Enrichment
1회 접종	4 ^a /5 ^b	1/1	0/5	0/5	1/5	1/4	0/5	4/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2회 접종	1/3	0/2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
대조군	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

[^a분변에서 백신균주 확인된 두수/^b총 접종 두수]

3. 백신 접종 후 실질 장기에서의 백신균주 검출 여부 확인

생균 백신의 비장내 접종 후 주요 실질 장기에서 백신균주의 분리 여부를 확인하였다. 그 결과 하기 표 37과 같이 1회 접종군에서는 백신 접종 3주 후까지 주요장기에서 백신균주가 분리되었으나 2회 접종군에서는 접종 3주 후부터는 백신균주가 분리되지 않았다.

표 37. 백신 접종 후 주요 실질 장기에서의 백신균주 분리 여부 결과

그룹	1일		1주		2주		3주		
	Direct	Enrichment	Direct	Enrichment	Direct	Enrichment	Direct	Enrichment	
1회 접종	폐	0/3	2/3	0/3	1/3	0/3	1/3	0/3	0/3
	간	0/3	1/3	0/3	1/3	0/3	3/3	0/3	1/3
	비장	0/3	2/3	0/3	2/3	1/3	2/2	1/3	2/2
	창자	0/3	2/3	0/3	1/3	0/3	1/3	0/3	0/3
	분변	4/5	0/1	0/5	4/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2회 접종	폐	0/3	2/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	간	1/3	0/2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	비장	0/3	3/3	0/3	1/3	0/3	1/3	0/3	0/3
	창자	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	분변	1/3	0/2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/3	0/5
대조군	폐	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/5	0/3
	간	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	비장	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	창자	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	분변	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

4. 폐 세척액에서의 점막의 IgA 측정

폐 세척액에서의 IgA 항체 역가를 확인한 결과, 단백 항원마다 다소의 차이는 있으나 1회 접종(그룹 A)보다는 2회 접종(그룹 B)시에 항체 역가가 높게 관찰되었다 (그림 36). 이 결과는 1회 접종보다는 2회 접종의 경우가 감염 방어에 있어 매우 중요한 폐에서의 IgA를 보다 잘 유도함을 의미하였다.

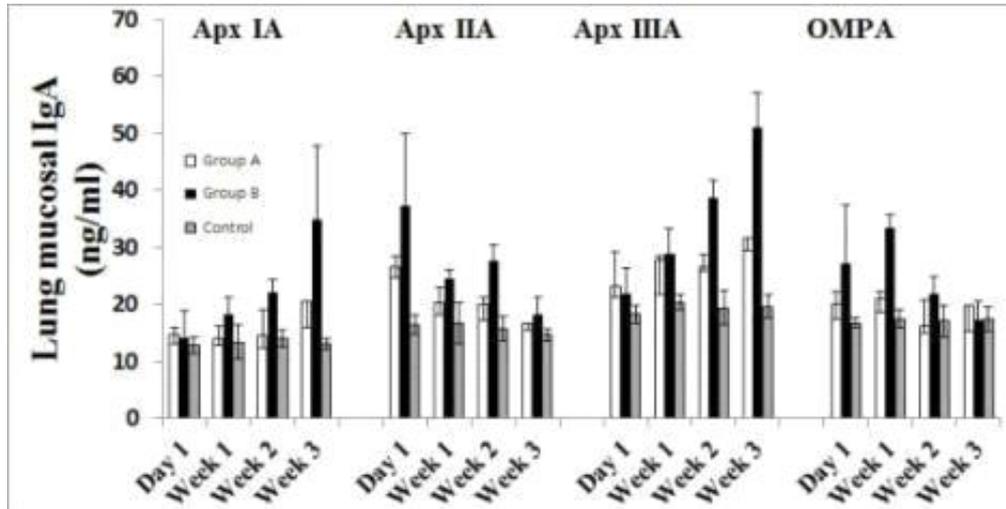


그림 36. 각 항원에 대한 접종 횟수에 따른 폐에서의 sIgA 결과

3] 결론

백신 후보균주를 혼합하여 마우스에 접종 횟수를 달리하여 사료 섭취량, 체중 변화 및 분변에서의 균 배출 여부 그리고 폐 등에서의 임상 변화와 같은 부작용을 관찰하여 본 결과 접종 횟수와 상관없이 부작용이 관찰되지 않아 안전하면서 효과적으로 면역 반응을 유도함이 확인되었다.

[18] 마우스를 이용한 흉막 폐렴 예방 생균백신의 효능실험

1] 실험 내용

1. 실험동물 및 접종

1) 실험동물 : 5주령의 BALB/c 마우스를 구입하여 1주령의 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

2) 접종 : 실험군별 각 마우스는 하루밤 동안 절식시킨 후 한 마리당 $10\mu\text{l}$ 에 총 균수가 1×10^5 CFU가 되도록 조정하여 비강내로 접종하며 대조군은 각각 멸균 PBS로 비강내로 접종 하였다 (표 38 및 표 39).

표 38. 혼합 백신균주 비강 내 접종 실험 계획

그룹	두수	항원명	접종균수	경로	도전감염
A	30	Apx I A, Apx II A, Apx IIIA, OMPA	1x10 ⁵ CFU/10 μ l 멸균 PBS	비강내 접종	AP 타입 2
					AP 타입 5
B	30	멸균 PBS		비강내 접종	AP 타입 2
					AP 타입 5

[※ 콧구멍 한쪽에 5 μ l씩 접종.]

※ PBS 10 μ l에 각 항원 발현 백신균주의 수가 1x10⁵ CFU이 되도록 제조하고, 각 균주별로 2.5 μ l씩 혼합하여 제조 당일에 접종.]

표 39. 혼합 백신균주 비강내 접종 실험 개요

0주	2주	4주	4주	6주	8주	9주
1차 접종			1차 부검		도전감염	2차 부검
접종 전 채혈	IgG, sIgA	IgG, sIgA	LPA, FACs, cytokine 측정	IgG, sIgA	IgG, sIgA	도전감염 후 생존한 마우스 대상
가검물 채취	가검물 채취	가검물 채취	CD3, CD4, CD8, B 세포 측정을 위해 가검물 채취 (그룹 별 5마리)	가검물 채취	가검물 채취	균 분리 (폐)
			비장세포 분리			

2. 가검물 채취

1) 분변 채취 : 접종 전, 1차 접종 후 2주, 4주, 6주, 8주째에 그룹별로 분변을 모아 무게를 잰 후 소듐 아자이드 (sodium azide)가 0.1% 함유된 PBS로 100mg/ml이 되도록 부유시킨 후 -80 $^{\circ}$ C에 보관하며 실험에 사용하였다.

2) 질 세척액 채취 : 상기 분변 채취와 같은 시기에 멸균 PBS (pH 7.2) 100 μ l를 질내로 투입한 후 마이크로피펫을 사용하여 회수하여 -80 $^{\circ}$ C에 보관하며 실험에 사용하였다.

3) 채혈 : 상기 분변 및 질 세척액 채취와 같은 시기에 각각 채혈하여 혈청을 분리하여 -80 $^{\circ}$ C에 보관하며 실험에 사용하였다.

4) 비장세포 (splenocyte) 분리 (SLP 용) : 각 그룹별로 5마리의 마우스를 접종 후 4주째에 무균적으로 비장 (spleen)을 채취하여 RPMI 1640에 모았다. 0.8% 염화암모늄 (ammonium chloride, w/v)을 이용하여 적혈구를 용해한 후, 380xg, 4 $^{\circ}$ C, 10분간 원심분리한 후 침전물을 멸균 PBS로 3번 세척하였다. 마지막 원심분리 후 complete medium (RPMI 1640 supplemented with 100IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 10% FCS)으로 재부유시

켰다. 세포수를 계산하여 5×10^6 cells/100 μ l씩 분주한 다음 각 항원이 100 μ l에 10~15 μ g/ml의 농도가 되도록 희석하여 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 48시간 반응시킨 후 ViaLight Plus Kit (LONZA, 스위스)를 이용하여 비장세포 세포증식을 측정하였다.

5) 비장세포 분리 (FACS 및 ELISA 용) : 각 그룹별로 5마리의 마우스를 1차 접종 후 4주째에 무균적으로 비장을 채취하여 RPMI 1640에 모은다. 0.8% 염화암모늄 (w/v)을 이용하여 적혈구를 용해한 후, 380xg, 4 $^{\circ}$ C, 10분간 원심분리한 후 침전물을 멸균 PBS로 3번 세척하였다. 마지막 원심분리 후 complete medium으로 재부유시켰다. 세포수를 계산하여 각 항원으로 12시간 반응시킨 후 CD3, CD4, CD8 및 B 세포를 측정하였다. 또한 세포수를 계산하여 각 항원으로 48시간 반응시킨 후 380xg, 4 $^{\circ}$ C, 10분간 원심분리한 후 얻어진 펠렛을 이용하여 세포로부터 mRNA를 분리하고 cDNA를 제작하여 실시간 PCR로 IL-6를 측정하였다.

3. 항체 역가 측정

1) IgG : 마우스에 백신균주를 비강내로 접종한 후, 각 항원에 대해 형성된 항체의 역가를 측정하기 위해 접종 전 그리고 1차 접종 후 2주, 4주, 6주, 8주째에 각각 채취한 혈청을 대상으로 하여 ELISA로 IgG의 역가를 측정하였다.

2) sIgA : 마우스에 백신균주 접종 후에 형성된 점막 및 전신성 면역반응 (systemic immune response) 중 체액성 면역반응 (mucosal immune response)을 확인하기 위해, 접종 전 그리고 1차 접종 후 2주, 4주, 6주, 8주째에 분변 및 질 세척액을 대상으로 하여 ELISA로 sIgA의 역가를 측정하였다.

4. Spenocyte proliferation assay

마우스에 백신 균주를 비강으로 투여한 후 각 그룹별로 5마리의 마우스를 접종 후 4주째에 무균 적으로 spleen을 채취하여 ice에 보관중인 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml의 페니실린, 50 μ g/ml의 스트렙토마이신과 2 μ g/ml의 fungizone이 포함된 RPMI 1640용액에 넣어서 분쇄한 후 cell strainer (ϕ 70, SPL)에 여과시켰다. 이를 0.8% ammonium chloride (w/v)를 이용하여 erythrocytes를 용해하여 380 \times g, 4 $^{\circ}$ C 10분간 원심한 후 침전물을 멸균 PBS로 3번 세척하고 마지막 원심 후 complete medium (RPMI 1640 supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycine and 10% FCS)으로 재 부유시킨 뒤 cell 수를 계산하고 5×10^6 cells/ml 100 μ l씩 분주한 다음 각 항원이 10~15 μ g/ml in 100 μ l로 희석한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 48시간 반응 후 ViaLight[®] Plus Kit (Lonza Rockland, ME, USA)를 매뉴얼에 따라 Spenocyte proliferation assay (SPA)를 luminometer (TriStarLB941, Berthold technologies GmbH&Co., Germany)를 사용하여 측정하였다.

5. Flow cytometry

백신 접종 후 면역유도와 밀접하게 관련된 면역 세포를 관찰하기 위한 목적으로 1차 접종 후 각 그룹별로 5마리의 마우스를 1차 접종 후 4주째에 무균적으로 spleen을 채취하여 RPMI 1640에 모은 뒤 0.8% ammonium chloride (w/v)를 이용하여 erythrocytes를 용해하여 380 \times g, 4 $^{\circ}$ C 10분간 원심한 후 침전물을 멸균 PBS로 3번 세척하였다. 마지막 원심 후 complete

medium (RPMI 1640 supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin and 10% FCS)으로 재 부유시키고 cell 수를 계산한 뒤 선택된 각 항원 Apx IA, Apx IIA, Apx IIIA와 OmpA로 12시간 반응 시킨 후 CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ (T cell) 및 CD45R (B cell)을 측정하였다. 3-color immunostain을 위해 splenocytes ($2 \times 10^6/100 \mu\text{l}$) 3가지 종류의 분류된 antibodies를 혼합하여 얼음 위에서 45분 동안 반응시켰다. 즉, FITC-labeled anti-mouse CD4 antibody, PE-labeled anti-mouse CD8 antibody, PE-Cy5-labeled anti-mouse CD3 antibody, APC-labeled anti-mouse CD45R antibody (Beckman Coulter, CA, USA)으로 각각 반응시켰다. 유세포분석 (Flow cytometry analysis)은 FACs CaliburTM (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA)로 측정되었으며 데이터 분석은 FlowJo software (Treestar, Inc., San Carlos, CA)를 사용하였다.

6. 사이토카인 IL-4, IL-6 및 IFN- γ 측정

백신 접종 후 분비되는 cytokines IL-4, IL-6, IFN- γ 를 측정하기 위하여 위 5와 같은 방법에 준하여 마우스의 spleen을 분리한 뒤 cell 수를 $5 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 으로 맞추어 4 $\mu\text{g/ml}$ 의 각 Apx IA, Apx IIA, Apx IIIA와 OmpA로 72시간 반응 시킨 후 1,500 rpm으로 5분간 원심분리하여 상청액을 대상으로 ELISA로 cytokines 농도를 측정하였다. 즉, eBioscience 사의 mouse cytokine ELISA Ready-SET-GO reagent set을 구입하여 제조사의 설명서에 따라 IL-4, IL-6 그리고 IL-12를 측정하였다.

7. 도전감염

실험군별 각 마우스는 하루밤 동안 절식시킨 후 한 마리당 야외분리주를 20 μl 에 5×10^7 CFU가 되도록 조정하여 비강내로 접종하며 폐사여부를 확인하였다.

2] 결과

1. ELISA에 의한 각 항원에 대한 항체 역가 측정

1) 혈청 IgG

각 단백 항원 발현 백신균주를 혼합하여 비강내로 접종한 후에 각 항원에 대해 혈청 내 항체 유도 여부를 ELISA로 측정하여 본 결과, 상기의 각 단백 항원 발현 백신균주를 단독 투여했을 경우에서와 같이, 백신균주를 혼합하여 접종하였을 경우에도 각 단백 항원에 대해 1차 접종 이후 2주 후부터 각 항원에 대한 혈청 IgG가 대조군에 비해 현저히 증가하고 있음이 확인되었다 (그림 37-A).

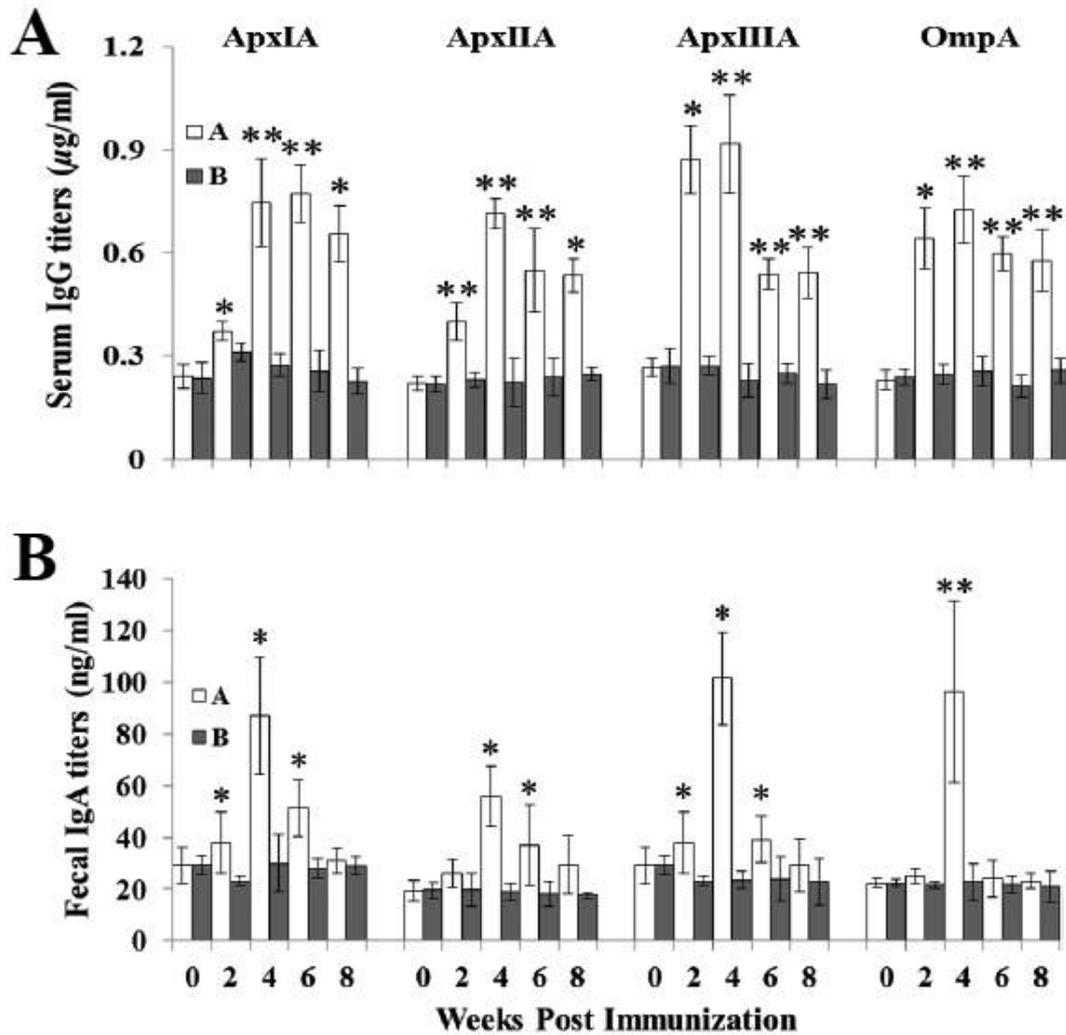


그림 37. Serum IgG (ug/ml) and fecal IgA (ng/ml) titers against the individual antigen in mice intranasally inoculated with the delivery strain. WPI: weeks post inoculation. Data are presented as the mean of all mice in each group and error bars show the standard deviation (SD). Asterisks indicate significant differences between the values of the inoculated group A and those of the control group B (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$).

2) 점막의 IgA

각 단백 항원 발현 백신균주를 혼합하여 비강내로 접종한 후에 각 항원에 대한 분변 (fecal sample)의 IgA 및 질 세척액(vaginal washing)에서의 IgA 항체 유도 여부를 ELISA로 측정하여 본 결과, 각 단백 항원에 대해 백신균주를 1차 접종한 이후 2주 후부터 각 항원에 대한 점막의 IgA가 대조군에 비해 현저히 증가하고 있음이 확인되었으며, 모든 항원에 대해 백신균주 접종 후 4주 째에 최고의 항체 역가를 보이다 점차 감소하는 결과를 보여주었다 (그림 37-B).

2. Splenocyte proliferation assay

접종 후 4주 째에 SPA를 측정을 위해 Apx IA, APx IIA, Apx IIIA 그리고 OmpA 항원이 사용되었다. 각 항원에 대한 SPA는 백신 접종 군은 대조군에 비해 SI 값이 유의있게 증가하였다. 백신 접종 군(그룹 A)에서의 Apx IA, APx IIA, Apx IIIA 그리고 OmpA 항원에 대한 SI 값은 각각 1.36 ± 0.17 , 1.42 ± 0.19 , 1.48 ± 0.10 and 1.45 ± 0.10 였고, 대조군 (그룹 B)에서의 각 항원에 대한 SI 값은 각각 1.01 ± 0.03 , 1.02 ± 0.05 , 1.08 ± 0.11 and 1.11 ± 0.13 이었다 ($P < 0.05$) (그림 38).

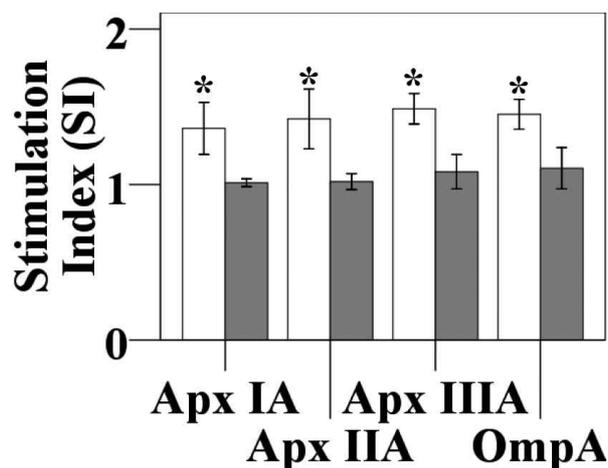


그림 38. Splenocyte proliferative responses against ApxIA, ApxIIA, ApxIIA and OmpA proteins inoculated group A and control group B mice at 4 WPI. Group A, (□); group B, (■). The antigen-specific splenocyte proliferative response is expressed as the stimulation index (SI). Data are the means of all mice in each group and error bars show SD. Asterisks indicate significant differences between the values of the immunized and control groups ($*P \leq 0.05$).

3. Flow cytometry

세포성 및 체액성 면역반응을 측정하기 위해 백신균주 접종 후 4주차에 마우스 비장을 적출하여 비장세포를 분리하고 T 림프구와 B 림프구의 구성을 검사하기 위해 Flow cytometry를 이용하여 CD4+와 CD8+ 그리고 CD45R+(B cells)의 백분율을 조사하였다. 그 결과 각 항원에 대한 CD4+, CD8+, B cells 모두 대조군에 비해 증가함이 관찰되었다 (그림 39).

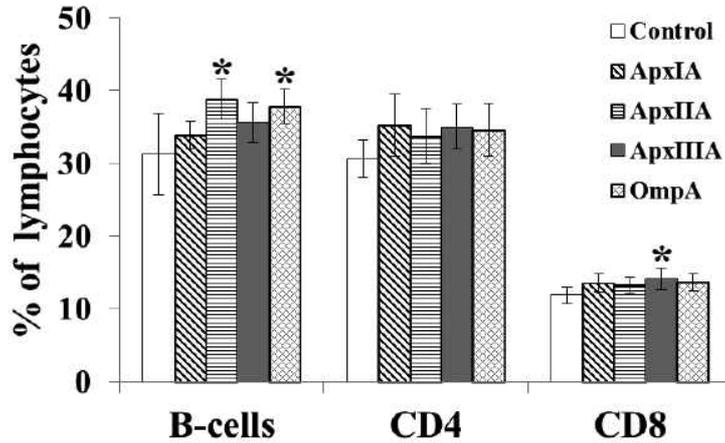


그림 39. Flow cytometric analysis of T-lymphocyte and B-lymphocyte subpopulations in the spleen at 4 WPI. Bar graphs represent (1) CD3+CD4+, (2) CD3+CD8+, and (3) B-cell splenocyte subpopulations in the inoculated mice. All values of bar graphs are presented as the mean \pm SD. Asterisks indicate significant differences between the values of the inoculated and control groups (* $P < 0.05$).

4. 실시간 PCR

그림 40에서 보는 바와 같이 비록 IL-4 농도가 대조군에 비해 유의 있게 높았다고는 하지만 ($P < 0.05$) splenocytes로부터 Apx IA, Apx IIA, Apx IIIA 그리고 OmpA에 대한 IL-4의 평균 농도는 단지 10 pg/ml 이하였다. 하지만 IL-6와 IL-12의 농도는 대조군에 비해 유의성 있는 수준의 증가가 관찰되었다.

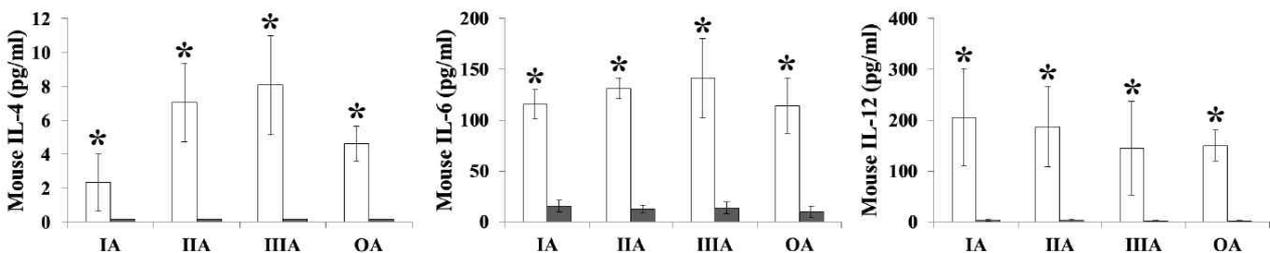


그림 40. Cytokine titers in the splenocytes at 4 WPI with the delivery. Group A, (\square); group B, (\blacksquare). Data are the mean of all mice in each group; error bars show SD. Asterisks indicate a significant difference between the values of group A mice (* $P < 0.05$) and those of the control group mice.

5. 도전감염 후 폐사 여부

백신 접종군에서는 실험동물 10마리 중 3마리가 폐사하여 30%의 폐사율이 관찰된 반면, 대조군에서는 10마리 중 6마리가 폐사하여 60%의 폐사율이 관찰되었고, 이를 통해 백신 접종에 의해 감염에 대한 방어가 이루어졌음이 확인되었다.

3] 결론

각 항원을 발현하는 백신 후보균주를 혼합하여 마우스에 접종한 후 각 항원에 대한 Serum IgG 및 fecal IgA를 측정하여 본 결과 각 항원에 대해 모두 면역 반응이 유도됨을 확인할 수 있었다. 또한 splenocytes를 분리하여 각 항원으로 자극한 후 CD4, CD8, CD45R를 측정하여 본 결과 각 항원에 대해 증가되었음을 또한 확인할 수 있었다. 더불어 백신 접종 균의 splenocytes에서 각 항원에 대한 IL-4의 농도는 대조군에 비해 상대적으로 적게 증가하였지만 IL-6와 IL-12의 농도는 대조군에 비해 월등하게 증가하여 delivery strain에 의해 전달된 항원은 한 번의 비강 접종에 의해 Th1 type의 면역 반응을 강하게 유도함을 확인할 수 있었다. 물론 돼지에서 흉막 폐렴을 방어하기 위해서는 Th2 type의 면역 반응에 의한 면역 유도가 필요하기 때문에 비강 접종의 접종 횟수에 대한 또다른 실험이 필요하다는 것을 반증하는 실험 결과이기도 하다. 비강 접종 후 도진감염에 따른 폐사율을 조사하여 본 결과 백신 접종 군에서는 70%가 생존한 반면, 대조군에서는 60%가 폐사하였기 때문에 혼합 백신을 비강 접종함으로써 Th1 type과 관련된 mucosal IgA 및 serum IgG를 강하게 유도하며 흉막폐렴을 충분히 방어할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[19] 실험동물을 이용한 백신의 최적화 실험

1] 실험 방법

1. 백신 접종

6주령의 마우스에 각 항원을 발현하는 균주를 혼합한 후 비강내로 1회, 2회 및 3회 접종하였다. 상세하게는 실험군별 각 마우스는 하루밤 동안 절식시킨 후 한 마리당 10 μ l에 총 균수가 1x10⁵ CFU가 되도록 조정하여 비강내로 접종하며 대조군은 각각 멸균 PBS로 접종하였다 (표 40 및 표 41).

표 40. 부스터를 통한 최적화 실험 계획

그룹	두수	항원명	접종균수			도진감염
			1차	2차	3차	
A	15	Apx I A, Apx II A, Apx IIIA, OMPA	1x10 ⁵ CFU/10 μ l			AP 타입 5
B	15	Apx I A, Apx II A, Apx IIIA, OMPA	1x10 ⁵ CFU/10 μ l	1x10 ⁵ CFU/10 μ l		AP 타입 5
C	15	Apx I A, Apx II A, Apx IIIA, OMPA	1x10 ⁵ CFU/10 μ l	1x10 ⁵ CFU/10 μ l	1x10 ⁵ CFU/10 μ l	AP 타입 5
D	15	멸균 PBS	-	-	-	AP 타입 5

[※ 콧구멍 한쪽에 5 μ l씩 접종.]

※ PBS 10 μ l에 각 항원 발현 백신균주의 수가 1x10⁵ CFU이 되도록 제조하여 각 균주를 2.5 μ l씩 혼합하여 제조 당일에 접종.]

표 41. 부스터를 통한 최적화 실험 개요

0주	2주	3주	4주	6주	7주	8,10,12,14주	10주	16-17주
1차 접종		2차 접종	1차 부검	3차 접종	2차 부검		3차 부검	도전감염
접종 전 채혈	접종 후 2주 차 채혈		SLA, 실시간 PCR, FACS, 접종 후 4주 차 채혈	접종 후 6주 차 채혈	SLA, 실시간 PCR, FACS	채혈	SLA, 실시간 PCR, FACS	도전감염 전 채혈 및 가검물 채취
가검물 채취	가검물 채취		비장, 가검물 채취	가검물 채취	비장 적출		가검물 채취	비장 적출
			비장세포 분리		비장세포 분리		비장세포 분리	폐사율 및 임상 소견 관찰

2. 가검물 채취

1) 분변 채취 : 접종 전, 1차 접종 후 2주, 4주, 6주, 8주, 10주째에 그룹별로 분변을 모아 무게를 잰 후 소듐 아자이드가 0.1% 함유된 PBS로 100mg/ml이 되도록 부유시킨 후 -80℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

2) 채혈 : 위와 같은 시기에 각각 채혈하여 혈청을 분리 -80℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

3) 비장세포 분리 : 각 그룹별로 5마리의 마우스를 마지막 접종 후 4주째에 각각 무균적으로 비장을 채취하여 RPMI 1640에 모았다. 0.8% 염화암모늄 (w/v)을 이용하여 적혈구를 용해한 후, 380xg, 4℃, 10분간 원심분리한 후 침전물을 멸균 PBS로 3번 세척하였다. 마지막 원심분리 후 complete medium으로 재부유시켰다. 세포수를 계산한 후, 각 항원으로 72시간동안 반응시키고 380xg, 4℃, 10분간 원심분리한 후 상층액을 -80℃에 보관하며 ELISA를 통해 비장세포로부터 분리된 사이토카인을 측정하였다. 그리고 펠렛은 재부유시킨 후 키트를 이용하여 mRNA를 분리한 다음 cDNA를 제작하여 실시간 PCR로 IL-4 및 IFN- γ 의 유전자 발현 수준을 측정하였다.

3. 항체 역가 및 사이토카인 측정

혈청, 분변을 대상으로 IgG 및 IgA에 대한 항체가를 ELISA를 통해 측정하였고, 백신 접종 후 4주째에 무균적으로 분리된 비장세포에 각 해당 항원을 자극시킨 후 원심분리하여 펠렛으로부터 분리된 mRNA를 대상으로 실시간 PCR로 IL-4 및 IFN- γ 의 유전자 발현 수준을 측정하였다.

4. 도전감염

실험군별 각 마우스는 하루밤 동안 절식시킨 후 한 마리당 야외분리주를 20 μ l에 5x10⁷ CFU가 되도록 조정하여 비강내로 접종하며 폐사여부를 확인하였다.

2) 결과

1. 백신 접종 후 유도된 면역반응

1) 혈청 IgG

상기 표 40에서와 같이 각 단백 항원 발현 백신균주들을 혼합한 후 비강내로 1회, 2회 또는 3회 접종한 다음 유도된 면역반응을 알아보기 위해, 각 항원에 대한 혈청 내 항체 역가를 ELISA로 측정하였다. 그 결과, 접종에 관계없이 접종 2주 후부터 대조군에 비해 유의성 있는 증가가 관찰되었다. 하지만 부스터를 통해 한번 접종한 경우보다 높은 항체 역가가 관찰됨을 확인할 수 있었다 (그림 41).

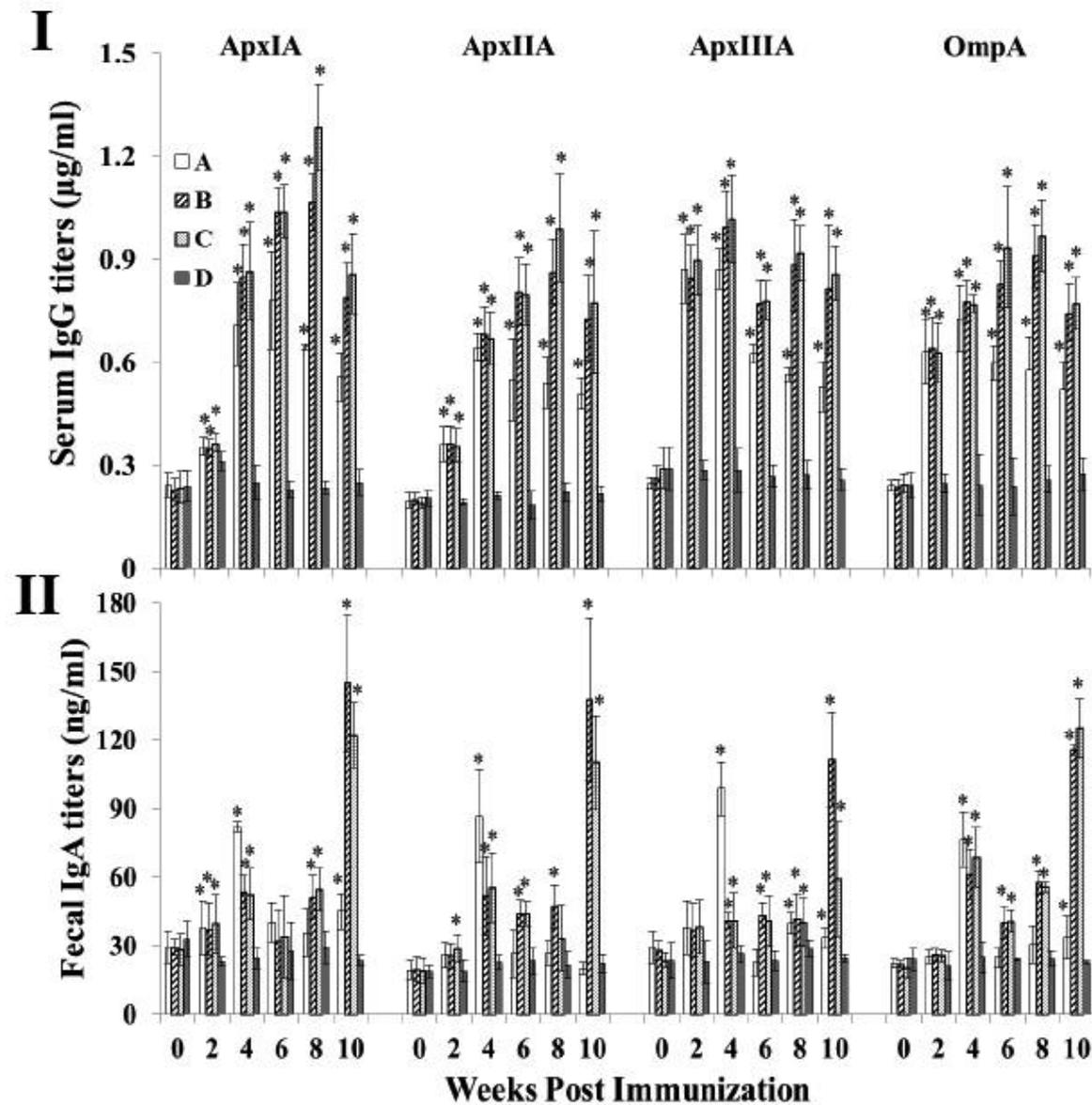


그림 41. Immune response against ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA and OmpA antigens in mice intranasally immunized with the vaccine candidates: (I) serum IgG ($\mu\text{g/ml}$) titers and (II) fecal IgA ($\mu\text{g/ml}$) titers. Group A, single immunization; group B, double immunization;

group C, triple immunization; and group D were inoculated with PBS as a control. Data are the means of all mice in each group and error bars show the standard deviations (SD). Asterisks indicate a significant difference between the values of the immunized groups with the vaccine candidate and those of the control group ($*p < 0.05$).

2) 점막의 IgA

그림 41-II에서 보는 바와 같이, 총 2회 접종한 그룹 B의 분변 IgA 항체 역가는 8주 및 10주째에 대조군에 비해 유의성 있는 항체 역가의 증가가 관찰된 반면, 3회 접종한 군에서는 10주째에 대조군에 비해 유의성 있는 증가가 관찰되었다. 이와 결과는 2회 백신 접종이 점막의 IgA 유도에 보다 효과적임을 알 수 있었다.

2. 사이토카인 분석

실시간 PCR을 이용하여 접종 횟수에 따른 IFN- γ 와 IL-4의 발현을 대조군과 비교해 본 결과 하기 표 42 및 43에서 보는 바와 같이, Th1 타입 면역반응 유도과 밀접한 관련이 있는 IFN- γ 의 경우에는 1회 접종 때에 최고의 발현율을 보이다 접종 횟수가 증가함에 따라 점차 감소하였다. 하지만 이와는 반대로 Th2 타입 면역반응 유도과 밀접한 관련이 있는 IL-4의 경우에는 접종 횟수가 증가함에 따라 그 발현율도 증가하였다. 하지만, Apx I A 및 Apx IIIA 두 항원의 경우에는 3회 접종시에 IL-4의 수치가 낮게 확인되었다.

표 42. IFN- γ : 대조군에 비해 증가 배율

항원명	1회 접종	2회 접종	3회 접종
Apx I A	약 320배	약 38배	약 18배
Apx II A	약 210배	약 49배	약 5배
Apx III A	약 320배	약 65배	약 14배
OMPA	약 180배	약 51배	약 20배

표 43. IL-4 : 대조군에 비해 증가 배율

항원명	1회 접종	2회 접종	3회 접종
Apx I A	약 11배	약 13배	약 18배
Apx II A	약 24배	약 76배	약 100배
Apx III A	약 15배	약 53배	약 18배
OMPA	약 31배	약 51배	약 150배

3. 도전감염 후 폐사 여부

표 44에서 보는 바와 같이 부스터를 통한 백신 효과는 1회 접종(그룹 A) 및 3회 접종(그룹 C)의 경우 보다 2회 접종(그룹 B)시에 방어 효과가 더 우수한 것으로 확인되었다.

표 44. 도전감염 후 폐사 여부

그룹	총 접종 두수	폐사 두수	폐사율(%)
Control	15	9	60.0
A	14	5	35.7
B	6	1	16.7
C	6	2	33.3

3] 결론

접종 횟수에 따른 항체 유도여부를 확인하여 본 결과 접종 횟수에 상관없이 serum IgG의 경우 모두 대조군에 비해 유의성 있는 증가가 관찰되었다. 하지만 2회 및 3회 접종한 그룹에서 1회 접종한 그룹보다 높은 혈청 IgG가 관찰되었다. 분변 IgA의 경우에는 2회 접종한 그룹에서 1회 및 3회 접종한 그룹보다 더 유의성 있는 항체 역가과 관찰되었다. 또한 splenocytes를 각 항원으로 자극한 후 실시간 PCR을 이용하여 접종 횟수에 따른 IFN- γ 와 IL-4의 발현을 대조군과 비교해 본 결과 IFN- γ 의 경우에는 1회 접종 때에 최고의 발현율을 보이다 접종 횟수가 증가함에 따라 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었지만 IL-4의 경우에는 접종 횟수가 증가함에 따라 그 발현율도 증가하였다. 하지만, Apx IA 및 Apx IIIA 두 항원의 경우에는 3회 접종시에 IL-4의 수치가 낮게 확인되었는데, 이는 3회 접종시에 항원 자극에 대해 반응이 빨리 시작되어 IL-4를 빨리 생산하고 사라진 것으로 추측되었다. 또한 도전감염에 대한 방어율을 보면 2회 접종한 그룹이 가장 탁월한 방어효과가 관찰되어 돼지에서 흉막 폐렴을 예방하기 위해서는 2회 접종이 가장 탁월한 예방 효과를 나타 낼 것으로 확인되었다.

[3차년도]

[20] 임신 모돈에서 흉막 폐렴 백신의 안전성 실험

1] 실험 내용

1. 실험동물 및 접종

1) 실험동물 : 분만 예정 8 ~ 9주 전인 모돈 중에서 살모넬라균 및 흉막폐렴에 감염된 병력이 없고 흉막폐렴에 대한 예방접종이 실시되지 않았던 모돈

2) 접종 : 실험군별 돼지(모돈) 한 마리당 10ml에 2×10^{10} CFU가 되도록 조정하여 구강접종하거나 $700 \mu\text{l}$ 에 1×10^7 CFU가 되도록 조정하여 비강내로 접종하며 대조군은 멸균 PBS-수크로스 와 PBS로 각각 구강 접종 (표 45). 같은 균수와 같은 방법으로 접종 후 21일째에 한 번 더 추가 접종하였다 (표 46).

표 45. 각 그룹별 접종 량 및 접종 경로

그룹	두수	균주	항원명	접종균수	
				모돈 1차 (임신 8주)	모돈 2차 (임신 11주)
A	3	-	Control	멸균 PBS (비강)	멸균 PBS (비강)
B	3	<i>Samonella</i> Typhimurium	Apx I A, Apx II A, Apx IIIA, OMLA, ApfA	1x10 ⁷ CFU/700 μ l (비강)	1x10 ⁷ CFU/700 μ l (비강)
C	3	-	Control	멸균 PBS-sucrose (경구)	멸균 PBS-sucrose (경구)
D	3	<i>Samonella</i> Typhimurium	Apx I A, Apx II A, Apx IIIA, OMLA, ApfA	2x10 ¹⁰ CFU/10ml (경구)	2x10 ¹⁰ CFU/10ml (경구)

표 46. 실험개요

모돈			자돈
분만 8주전	분만 5주전	분만	4주
1차 접종	2차 접종	-	-
접종 전 분변 채취	접종 전 채혈	분변 채취	1주 간격으로 분변 채취
이상 여부 확인	유산 여부 확인	유사산 및 기형아 출생 확인	위축돈 확인

2. 모돈에서의 임상 증상 관찰

백신 접종 후 유사산 여부 및 기형 자돈 출산 여부, 분변으로의 백신 균주 배출 여부를 확인하였다.

3. 자돈에서의 임상증상

자돈에서 설사, 식욕감퇴, 급사여부 등의 임상 증상을 매일 하루에 두 번(아침, 저녁) 관찰하였다.

- 1) 하루에 일정량의 사료를 대조군과 동일량 공급하여 사료 소비량으로 판단하였다.
- 2) 축사 내 분변을 육안으로 관찰하여 확인하였다.
- 3) 하루에 두 번 관찰시 폐사여부를 확인 하였다.

4. 분변으로부터 백신균주 분리

- 1) 시기 : 백신 접종 전, 2차 접종 전, 분만 시점, 그리고 출산 후 1주 간격으로 분변을 채취
- 2) 균분리 : 분변으로부터 살모넬라 균주를 분리한 후 백신 균주여부를 확인하였다.

2] 결과

1. 과용량 투여시의 안전성 결과

과용량 단일 투여의 경우, 결정된 용량의 10배와 100배의 균수를 접종 시기에 모든에 각각 투여하여 설사 유무 및 유사산 등 이상 증상 여부를 확인하여 본 결과 부작용이 관찰되지 않았다.

2. 반복 투여에 의한 안전성 결과

결정된 용량을 하루에 2번 반복 투여, 결정된 용량을 이틀 연속 반복 투여 및 결정된 용량을 삼일 연속 반복 투여 한 후 설사 및 이상 증상 여부 발열 등과 같은 이상 유무를 확인하여 본 결과 부작용이 관찰되지 않아 개발된 생균 백신의 과복용 및 반복 투여에 의한 어떤 부작용도 관찰되지 않아 안심하고 사용할 수 있음이 확인되었다.

3. 분변에서의 백신 균주 분리 및 동정

백신을 과용량 또는 반복투여 후 분변으로 백신 균주의 배출 여부를 확인하기 위해 분변을 정기적으로 채취하여 백신 균주를 분리하여 본 결과, 모든 백신 접종 군에서 백신 균주가 분리되지 않았다.

4. 혈액생화학적 검사

적정 용량의 10배 및 100배의 시험물질을 경구 접종한 돼지에 대한 부작용 유발여부를 알아보기 위해 혈액 생화학적 검사를 실시하여 본 결과, 백신을 과용량 경구 접종한 처치군의 모든 수치가 정상치의 범위내로 기록되었으며 이를 통해 돼지의 영양상태 및 간, 신장, 췌장 등 주요대사를 담당하는 장기 기능에 백신이 영향을 미치지 않은 것으로 생각되었다.

5. 체온

백신을 과용량 또는 반복투여에 의한 체온의 변화를 알아보기 위해 백신 접종 후 매일 2주일간 측정하여 본 결과 체온의 변화가 관찰되지 않았다.

3] 결론

임신 모든에 백신을 과용량 또는 반복적으로 경구 접종하여 발열, 균 배출 및 유사산 등과 같은 임상 증상이 관찰되지 않았을 뿐만 아니라 혈액학적 및 혈액 생화학적으로 부작용 여부를 관찰하여 본 결과 부작용이 관찰되지 않았다. 이는 백신 접종에 있어 실수로 과용량 또는 반복 투여에 의한 부작용 없이 백신을 투여 할 수 있음을 보여 주는 결과라 할 수 있다.

[21] 목적동물에서 흉막폐렴 예방 생균 백신의 효능실험

1] 서론

APP균은 캡슐로 싸여있는 돼지호흡기 병원균이며, 돼지흉막폐렴 (PP)의 원인체이기도 하다. 이 질병은 세계전역의 돼지산업에 있어서 커다란 경제적인 문제를 야기한다. APP균에게 중요한 병독성인자들이 있다. 이를테면, repeats-in-toxins exotoxins (RTX toxin)의 repetitive

glycine-rich sequence 라던가 outer membrane protein이라던가, fimbriae가 있겠다. 여러 병독성 exotoxin들 사이에서, Apx proteins (RTX toxins)는 APP의 발병에 있어서 중요한 역할을 차지하는 major한 병독성인자로서 인식된다. 돼지홍막폐렴 (PP)에 대한 방어면역에 있어서 Apx toxin의 중요성은 수많은 연구에서 증명되어왔다. 최근에, Type IV fimbrial subunit protein ApfA는 이러한 모든 strain들 사이에서 존재하였다. 중요하게도, ApfA는 모든 serotype들 사이에서 잘 보존되어졌다. 더욱이, fimbriae들은 대개 매우 높은 면역원성을 가진다. Fimbria를 가진 항원들은 bacterial pathogen에 대한 서브유닛백신 candidates로써 훌륭하게 사용되어지고 있다. OmlA protein은 APP의 병독성 인자이며, transferrin에 결합하여 숙주로부터 철 획득을 가능하게 하는데 중요한 역할을 수행한다.

돼지홍막폐렴 (PP)를 컨트롤하기 위하여, 백신은 중요하다. 그러나, 많은 APP의 serotype들에게 효과적인 백신은 만드는 것은 어려웠다. 다양한 연구들이 효과적인 교차방어에 대한 vaccine candidates를 확인해보기 위해 수행되어왔다. 예를 들어 연구해본 vaccine candidates가 killed bacterin vaccine, 서브유닛백신이다. 이러한 vaccine candidate들은 콜로니화 되는 것을 막지 못하는 뿐더러 교차방어가 넓게 적용되지 않는다. 그러므로, 효과적인 vaccine의 발달을 위하여 더 많은 노력이 요구된다.

몇가지 실험적인 모델 중에서, 세균의 다양성은 vaccine delivery system으로서 훌륭하게 사용되어지고 있다. 그들 사이에서, 약독화 살모넬라균은 동물과 사람사이의 heterologous antigen (이종항원)에 대한 방어면역을 유도하기 위해 delivery system으로서 널리 사용되어지고 있다. 살모넬라 system에 대한 경구접종은 혈청과 mucosal site 모두에게 항체반응을 유도하는데 특히나 효과적이었다. 이전 연구에서, ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA, ompA 항원을 발현하는 novel Salmonella-based vaccine candidates를 시험해보았다. 돼지홍막폐렴 (PP)에 대한 방어를 목적으로하는 이 vaccine candidates의 효능은 마우스모델에서 조사되어졌다. 이 실험의 목적은 재조합 ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA, omlA항원을 발현하는 live attenuated *Salmonella* strains이 새끼자돈들의 돼지 홍막폐렴 (PP) 방어에 대한 효능을 평가해보는 데에 있다.

2] 실험방법

1. 실험에 사용된 세균 strain과 plasmid 그리고 성장조건

야생형 APP, HJL6은 ApfA, OmlA protein을 encoding하는 유전자를 증폭하기 위하여 사용되었다. 야생형 APP 분리주들, serotype 1, HJL6, serotype 2, HJL67, serotype 5, HJL263은 virulent challenge strain로서 사용되었다. 이 strain들은 초콜렛 아가에서 37°C에서 성장되었다. 이 약독화 *Salmonella* Typhimurium 변이주, JOL912는 각각의 항원들의 delivery host로서 사용되었다. pMMP65 plasmid들은 delivery host에서 heterologous antigen을 분비하는 vector로서 사용되었다 (표 47).

표 47. Bacterial strains and plasmids used for this study.

Strain/plasmid	Description	Source of reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
Top10	F ⁻ mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galUgalKrrpsL (Str ^R)endA1nupG	Lab stock
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ ,ompT, hsdS _B (r _B ⁻ ,m _B ⁻),dcm, pLysS, Cm ^r gal, λ(DE3),	Lab stock
HJL112	<i>E. coli</i> BL21 with pET28a-ApxIA	This study
HJL190	<i>E. coli</i> BL21 with pET28a-ApxIIA	This study
HJL119	<i>E. coli</i> BL21 with pET28a-ApxIII A	This study
HJL69	<i>E. coli</i> BL21 with pET28a-ApfA	
HJL192	<i>E. coli</i> BL21 with pET28a-OmlA	This study
<i>S. Typhimurium</i>		
JOL401	<i>S. Typhimurium</i> wild type	Lab stock
JOL912	<i>S. Typhimurium</i> JOL401 derivative $\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$	Lab stock
JOL1300	JOL912 with pBP244-ApxIA	Hur & Lee, 2014
JOL1301	JOL912 with pBP244-ApxIIA	Hur & Lee, 2014
JOL1302	JOL912 with pBP244-ApxIII A	Hur & Lee, 2014
HJL72	JOL912 with pBP244-ApfA	This study
HJL114	JOL912 with pBP244-OmlA	This study
<i>A. pleuropneumoniae</i>		
HJL6	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 1	Lab stock
HJL67	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 2	Lab stock
HJL263	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 5	Lab stock
Plasmids		
pET28a	IPTG-inducible expression vector; Km ^r	Novagen
pMMP65	Asd ⁺ ,pBRori, β-lactamase signal sequence-based periplasmic secretion plasmid, 6 × His tag	Hur & Lee, 2011

2. 각각의 재조합 항원의 준비

재조합 ApxIA, ApxIIA, ApXIII A 단백질들은 이전 연구에서 사용했던 strain들로부터 준비하였다 (Hur and Lee 2014; Hur et al. 2015). 추가적으로, ApfA와 관련된 재조합 HJL69와 OmlA와 관련된 재조합 HJL192를 발현하는 *E. coli* strain들은 이전 연구에서 사용하던 방식 그대로 특정 primer set로 구성하여 (표 48), 준비하였다.

표 48. PCR primers used in this study and their product sizes.

Name	Sequence(5' → 3')	Size (bp)	Accession number	Reference
ApfA-F	CCGCGAATTC AAC GCG TTT ACT TTA ATT G	420	AY235718.1	This study
ApfA-R	CCGCAAGCTTGAAAAATTTAATTTGATGC			
OmlA-F	CCGCGAATTC GGC TCA TCG GGT TCA TCG TC	1038	AB007573.1	This study
OmlA-R	CCGCAAGCTTTTATTTTTTATCTTCTTTTGTTG			
HPF	AAG GTT GAT ATG TCC GCA CC	956	AB007587.1	Jessing et al., 2003
HPR	CAC CGA TTA CGC CTT GCC A			
Ap1F	GGG CAA GCC TCT GCT CGT AA	754	AF518558.1	Jessing et al., 2008
Ap1R	GAA AGA ACC AAG CTC CTG CAA T			
Ap2F	ACT ATG GCA ATC AGT CGA TTC AT	482	AY357726.1	Jessing et al., 2003
Ap2R	CCT AAT CGG AAA CGC CAT TCT G			
Ap5F	TTT ATC ACT ATC ACC GTC CAC ACC T	1107	AF053723.1	Jessing et al., 2003
Ap5R	CAT TCG GGT CTT GTG GCT ACT AA			

Note: Underlines indicate the sites of restriction enzymes, such as EcoRI and HindIII.

3. 항원에 대한 항혈청 준비

각각의 항원들에 대한 특정 항체들은 이전에 기술했던 대로 준비하였다(Hur and Lee 2011).

4. ApfA and OmlA 항원 발현 약독화 살모넬라 백신 균주 제작

ApfA와 OmlA 단백질을 발현하는 delivery strain은 이전에 기술했던 대로 HJL69와 HJL192로부터 digestion을 통해 준비하였다 (Hur and Lee 2014). 즉, 이 strain들은 ApfA와 관련된 HJL72와 OmlA와 관련된 HJL114로 designate하였다.

5. Western blot으로 발현 확인

웨스턴블롯 분석은 이전에 기술했던 것처럼, 각각 HJL72로부터 재조합 ApfA 단백질이, HJL114로부터는 재조합 OmlA 단백질이 분비되는지 검사하기 위해 수행되었다. (Hur and Lee 2011).

6. 생균 백신 준비

이 Delivery Strain들은 이전에 기술했던 방법으로 준비하였다(Hur and Lee 2014). Cell pellet은 멸균 PBS에서 2×10^9 colony-forming units(CFU)/mL 으로 resuspend하였다. 백신은 준비 한 날 경구적으로 백신 접종하였다.

7. 백신 접종 및 가검물 채취

20마리의 Large 요크셔 새끼자돈들은 동일하게 2개의 그룹으로 나누었다. 모든 새끼자돈들은 4주령에 경구접종하였다 (0 WPI). 그룹 A의 새끼자돈은 control집단으로 사용하기 위해서, 10ml의 멸균 PBS를 접종하였다. 그룹 B의 새끼자돈은 5개의 delivery strain (각 strain은 10ml일 때, 대략 4×10^9 CFU으로 구성되어있다). 이 균일한 용량으로 혼합된 10ml, 대략 2×10^{10} CFU를 경구적으로 백신투여를 하였다. 혈액 샘플들은 0, 2, 4 WPI때 면역반응 평가

를 위해 채혈되었다. 이 실험에서 언급된 동물실험들은 국립 전북대학교 동물실험윤리위원회의 윤리적인 승인 아래 동물보호에 대한 국회의 가이드라인에 따라 (CBU 2011-0017) 수행된 것이다.

8. ELISA를 이용한 면역 측정

약간 변형된 ELISA는 혈청에 있는 개별적인 단백질-특이 IgG를 검출하는데 쓰이는데, 이전의 연구 (Hur and Lee 2014)에도 쓰였던 ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA, ApfA 그리고 OmlA 단백질 재조합 항원을 이용하였다.

9. 도전감염

도전감염 실험을 할 때 그 균주로는 HJL6, HJL67 그리고 HJL263가 쓰였으며 비강으로 접종하였다. 즉, 이 균들은 37°C 초콜릿아가에서 18시간동안 배양하였고 멸균 PBS 1ml에 대략 6×10^8 CFU 정도로 재 부유되었다. 모든 자돈은 1차 접종 후 4주차에 도전감염 균주의 mixture를 2ml 비강 접종하였다. 모든 감염 자돈은 접종 후 7일 동안 폐사 및 이상 행동을 하는지 모니터링 되었다. 도전감염 7일 후에 모든 자돈은 안락사 되었고 키우는 중에 이상함이 관찰된 자돈의 폐에서 swab하여 챌린지 균주를 검출하였다. 스왑한 샘플을 초콜릿 아가에 streak하여 37°C에서 24시간동안 배양하였다. 챌린지 균주는 APP-, type 1-, type 2- and type 5-specific primers (Jessing et al. 2003, 2008)를 사용한 PCR (표 48)로 확인하였다. 이전의 연구 (Jessing et al. 2003, 2008)에 따르면 만약 스왑한 것에서 분리된 균이 적어도 serotype-specific 프라이머 (표 48) 중에 하나인 PCR amplicon products를 가지고 있다면, 그 폐의 병증은 챌린지에 의한 결과라고 해석하였다.

10. 통계처리

모든 자료는 평균 \pm standard deviation (SD)로 표시하였으며, 통계처리는 SPSS 1.6으로 수행하였다 (SPSS, Chicago, IL). 개별적인 샘플 t-test는 백신 그룹과 백신을 하지 않은 control 그룹 사이의 면역 반응 차이를 통계적으로 분석하였다.

3] 결과

1. 백신균주로부터 발현되는 ApfA 및 OmlA 확인

항원 ApfA와 OmlA 분비를 측정하기 위하여, the culture supernatants of the delivery strains을 사용한 Western blot 분석법이 수행되었다. 예상되는 항원 ApfA와 OmlA의 크기는 각각 15와 38kDa이고, 이 크기의 밴드가 모두 확인되었다 (그림 42).

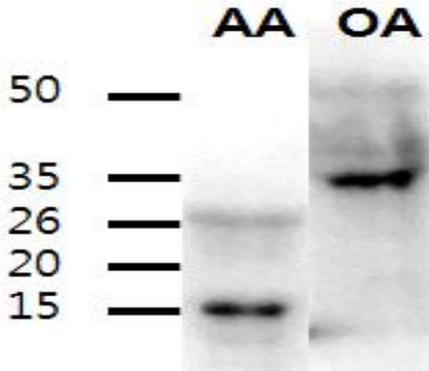


그림 42. Identification of secreted recombinant ApfA and OmlA antigens using Western blot analysis. Lanes: ApfA, recombinant ApfA antigen secreted by HJL72; and OmlA recombinant OmlA antigen secreted by HJL114.

2. 유도된 면역 반응

그림 43에서 보는 바와 같이 모든 자돈에서 얻어낸 혈청 항원에 대한 항체 반응을 보여준다. 2주차부터 실험 이 끝날 때까지, 그룹 B에 있는 각각의 항원에 대한 serum IgG 농도는 그룹 A와 비교하여 상당히 늘어났다 ($P < 0.05$) (그림 43).

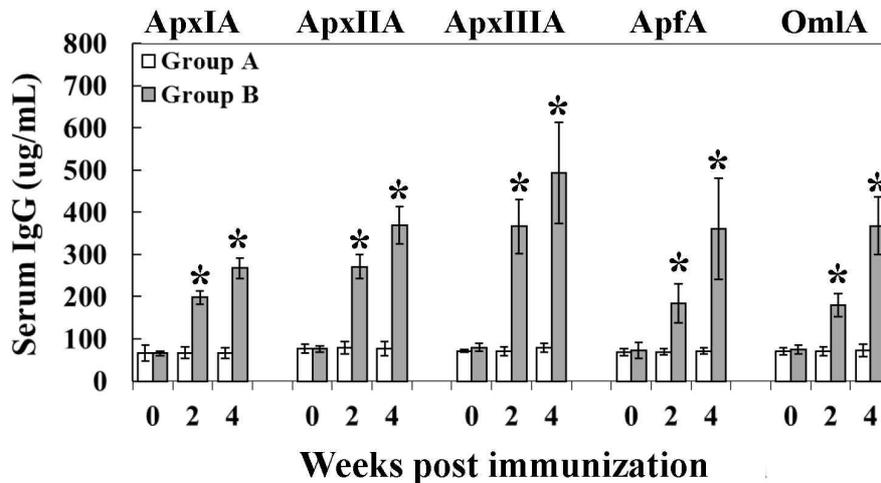


그림 43, Serum IgG (ug/mL) concentrations against the individual antigen in piglets inoculated orally with the delivery strain. WPI: weeks post inoculation. Data are presented as the mean of all piglets in each group and error bars show the standard deviation (SD). Asterisks indicate significant differences between the values of the inoculated group B and those of the control group A ($*P < 0.05$).

3. 도전균주에 대한 방어 효과

그룹 A의 10두의 자돈 중, 2두는 도전감염 후 7일 안에 죽었고 도전감염 균주는 폐렴증상이 관찰된 4마리 자돈에서 폐 스왑을 통해 분리되었다. 하지만 그룹 B의 10두의 자돈

중 2두에서만 폐렴 증상이 발견되었다.

4) 결론

Multiple serotype의 다른 병원성 세균에 대해 말해보자면, PP을 예방하는 가장 주된 일은 conserved 항원이나 면역반응을 일으키는 단백질을 확인하는 것인데, 이것은 APP serotypes를 구별할 수 있는 cross-protection을 제공한다 (Haesebrouck et al. 2004; Chen et al. 2012). Apx 외독소 (ApxI, ApxII and ApxIII)는 병독성 요인이며 APP 발병에 가장 큰 원인이다. 각각의 Apx 외독소는 PP에 대해서 부분적인 protection만 일으키며 Apx 외독소의 분포는 serotypes마다 여러 가지로 다양하기 때문에 백신 constructs에 세 가지 Apx 외독소를 섞어 쓰는 것이 넓은 범위의 PP를 막는데 필수적이다. 게다가 fimbriae는 보통 높은 면역반응을 유도하기 때문에 (Yang et al. 2011), fimbrial 항원은 박테리아 병원성에 대해 subunit vaccine candidates 로서 성공적으로 사용된다.

이전의 실험에서 (Hur and Lee 2014) ApxIA, ApxIIA and ApxIIIA을 발현하는 약독화된 *S. Typhimurium* 돌연변이 균주에서 얻어진 각각의 항원은 Western blot 분석법을 통하여 확인되었다. 최근 실험에서 항원 ApfA와 OmlA를 발현하는 *Salmonella*-based delivery strains은 delivery system에 사용하기 위해 constructed 되었다. delivery strains에서의 각각의 항원의 분비는 Western blot 분석으로 알 수 있었다. 이 분석의 결과는 항원 ApfA와 OmlA 유전자를 가지고 있는 플라스미드가 안정적으로 constructs에 남아있다는 것을 말하며, 발현되는 각각의 항원이 효과적으로 분비된다고 할 수 있다.

폐의 박테리아 감염에 대한 방어기작은 호흡기에 있는 병원균의 clearance에 좌우되며, IgA 생산에 의한 점막 면역은 PP에 효과적으로 대항하는 백신에 필수적인 요소이다 (Haesebrouck et al. 2004). 근육주사나 피하주사를 통한 systemic immunization은 보통 mucosal IgA 반응을 유도하지 않으며 (Haesebrouck et al. 2004; Seo et al. 2013), 이러한 점은 이전의 많은 보고서에서도 기술되어있는 점이다. 하지만 IgA 생산과 systemic 면역 반응을 유도하는 mucosal immunization은 결과적으로 PP를 막는 이상적인 백신전략이라고 할 수 있다 (Seo et al., 2013). 더욱 중요하게 생각해야 하는 점으로, 환축의 APP 감염 단계에서 박테리아가 편도에 위치하는 것은 박테리아가 숙주의 면역 감시 체계로부터 도망갈 수 있게 하며 임상적으로 건 강한 carrier animals를 만들 수 있다는 것이다 (Chiers et al. 2010). 이로서 미루어 볼 때, 약독화 생백신을 경구 접종하여 면역 반응을 유도하는 것은 IgA 생산을 유도할 수 있으며, 또한 질병의 발생과 박테리아가 편도에 부착되는 것을 막으므로 하여 무증상 carrier로 되는 것을 예방한다 (Haesebrouck et al. 2004; Ramjeet et al. 2008). 이 연구에서 경구 접종을 하는 것이 항원 특이 면역반응을 효과적으로 유도하는 것을 확인하였다. 다음으로 비강 접종에서 자돈의 생존율을 조사하였고, 백신 접종한 자돈 중 80%에서 병원성 APP에 대해 방어에 성공하였다. 반면, 백신 접종하지 않은 자돈의 40%만이 방어에 성공하였다. 이 결과로 볼 때, 경구 접종한 delivery strains이 챌린지 strains를 방어한다.

결론지어 말하면, *Salmonella*-based vaccine candidate를 경구 접종하는 것으로 전신적 면역 반응이 효과적으로 유도되었다고 나타난다고 할 수 있다. 경구 백신을 투여한 자돈에 병원성 APP를 도전 감염한 후 전체의 20%에서만 임상적 증상을 보였다. 하지만 대조군에서는 전체의 60%에서 임상 증상이 나타났다. 그러므로 우리의 *Salmonella*-based novel vaccine candidate를 이용한 경구 접종은 APP에 의한 자돈의 PP를 효과적으로 방어할 수 있다.

[22] 돼지에서 백신의 효능을 향상시킬 점막 면역에 효과적인 adjuvant 개선 및 백신의 최적화

1] 실험방법

1. 실험에 사용된 세균, plasmid 및 성장조건

야생형 APP, HJL6은 ApfA, OmlA protein을 encoding하는 유전자를 증폭하기 위하여 사용되었다. 야생형 APP 분리주들, serotype 1, HJL6, serotype 2, HJL67, serotype 5, HJL263은 virulent challenge strain로서 사용되었다. 이 strain들은 초콜렛 아가에서 37도에서 성장되었다. 이 약독화 *Salmonella* Typhimurium 변이주, JOL912는 각각의 항원들의 delivery host로서 사용되었다(Hur and Lee 2014). pMMP65 plasmid들은 delivery host에서 heterologous antigen을 분비하는 vector로서 사용되었다 (표 49).

표 49. Bacterial strains and plasmids used for this study.

Strain/plasmid	Description	Source of reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
Top10	F ⁻ mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galUgalKrrpsL (Str ^R)endA1nupG	Lab stock
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ ,ompT, hsdS _B (r _B ⁻ ,m _B ⁻),dcm, pLysS, Cm ^r gal, λ(DE3),	Lab stock
HJL112	<i>E. coli</i> BL21 with pET28a-ApxIA	This study
HJL190	<i>E. coli</i> BL21 with pET28a-ApxIIA	This study
HJL119	<i>E. coli</i> BL21 with pET28a-ApxIIIa	This study
HJL69	<i>E. coli</i> BL21 with pET28a-ApfA	
HJL192	<i>E. coli</i> BL21 with pET28a-OmlA	This study
<i>S. Typhimurium</i>		
JOL401	<i>S. Typhimurium</i> wild type	Lab stock
JOL912	<i>S. Typhimurium</i> JOL401 derivative $\Delta lon \Delta cpxR \Delta asd$	Lab stock
JOL1300	JOL912 with pBP244-ApxIA	Hur & Lee, 2014
JOL1301	JOL912 with pBP244-ApxIIA	Hur & Lee, 2014
JOL1302	JOL912 with pBP244-ApxIIIa	Hur & Lee, 2014
HJL72	JOL912 with pBP244-ApfA	This study
HJL114	JOL912 with pBP244-OmlA	This study
<i>A. pleuropneumoniae</i>		
HJL6	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 1	Lab stock
HJL67	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 2	Lab stock
HJL263	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 5	Lab stock
Plasmids		
pET28a	IPTG-inducible expression vector; Km ^r	Novagen
pMMP65	Asd ⁺ ,pBRori, β-lactamase signal sequence-based periplasmic secretion plasmid, 6 × His tag	Hur & Lee, 2011

2. 백신 준비

이 Delivery Strain들은 이전에 기술했던 방법으로 준비하였다(Hur and Lee 2014). Cell pellet은 멸균 PBS에서 2×10^9 colony-forming units (CFU)/mL 으로 resuspend하였다. 백신이 준비되는 날 백신 접종을 수행하였다.

3. 백신 접종

4마리의 임신 모돈과 각 모돈에서 출생한 각 그룹당 5마리의 Large 요크셔 새끼자돈들이 실험에 사용되었다. 모돈과 자돈은 표 50에서 설명한 대로 각 그룹별로 접종되었다. 그룹 D의 경우에는 control 그룹으로 사용하기 위해서, 모돈 및 자돈에 10ml의 멸균 PBS를 접종하였다. 이 실험에서 언급된 동물실험들은 국립 전북대학교 동물실험윤리위원회의 윤리적인 승인 아래 동물보호에 대한 국회의 가이드라인에 따라 (CBU 2011-0017) 수행되었다.

표 50. 실험개요

그룹	항원명	접종균수			자돈		
		두수	모든 1차 (임신 8주)	모든 2차 (임신 11주)	두수	4주령	도전감염 (8주령)
A	Apx I A, Apx II A, Apx III A, OmlA, ApfA	1	-	-	5	2x10 ¹⁰ CFU/10ml	AP 타입 2와 AP 타입 5를 동량 혼합하여 도전감염
B	Apx I A, Apx II A, Apx III A, OmlA, ApfA	1	2x10 ¹⁰ CFU/10ml (경구)	2x10 ¹⁰ CFU/10ml (경구)	5	2x10 ¹⁰ CFU/10ml	
C	Apx I A, Apx II A, Apx III A, OmlA, ApfA	1	2x10 ⁶ CFU/2ml (비강)	2x10 ⁶ CFU/2ml (비강)	5	2x10 ¹⁰ CFU/10ml	
D	-	1	-	-	5	-	

5. 도전감염

도전감염 실험을 수행할 때 그 균주로는 HJL6, HJL67 그리고 HJL263가 쓰였으며 비강으로 접종하였다. 간략히 말해, 이 균들은 37°C 초콜릿아가에서 18시간동안 배양하였고 멸균 PBS 1ml에 대략 6 × 10⁸CFU 정도를 부유되었다. 모든 자돈은 접종 후 4주차에 도전감염 균주의 mixture를 2ml 비강 접종하였다. 모든 감염 자돈은 접종 후 7일 동안 폐사 및 이상 행동 유무가 관찰되었다. 도전감염 7일 후에 모든 자돈은 안락사 되었고 육안적으로 폐의 이상 유무와 더불어 모든 자돈의 폐로부터 swab 샘플을 채취하였다. 채취된 샘플은 초콜릿 아가에 streak 하여 37°C에서 24시간동안 배양하였다. 도전균주 APP-, type 1-, type 2- and type 5-specific primers (Jessing et al. 2003, 2008)를 사용한 PCR (표 51)로 확인하였다. 만약 채취한 가검물로부터 분리된 균이 적어도 serotype-specific 프라이머 (표 51) 중에 하나인 PCR amplicon products를 가지고 있다면, 그 폐의 병증은 도전감염에 의한 결과라고 해석하였다.

표 51. PCR primers used in this study and their product sizes.

Name	Sequence(5' →3')	Size (bp)	Accession number	Reference
HPF	AAG GTT GAT ATG TCC GCA CC	956	AB007587.1	Jessing et al., 2003
HPR	CAC CGA TTA CGC CTT GCC A			
Ap1F	GGG CAA GCC TCT GCT CGT AA	754	AF518558.1	Jessing et al., 2008
Ap1R	GAA AGA ACC AAG CTC CTG CAA T			
Ap2F	ACT ATG GCA ATC AGT CGA TTC AT	482	AY357726.1	Jessing et al., 2003
Ap2R	CCT AAT CGG AAA CGC CAT TCT G			
Ap5F	TTT ATC ACT ATC ACC GTC CAC ACC T	1107	AF053723.1	Jessing et al., 2003
Ap5R	CAT TCG GGT CTT GTG GCT ACT AA			

2] 결과

1. 도전균주에 대한 방어 효과

그림 44에서 보는 바와 같이 그룹 A의 5두 중 3마리(A1, A3, A4)에서, 그룹 B의 5마리 중 2마리(B1, B4)에서, 그룹 C의 5두 중 3마리(C1, C2, C3)에서 흉막폐렴이 관찰되었고 또한 도전감염 균주도 분리되었다. 그러나 대조군에서는 도전감염 후 4두가 급사로 폐사하였고 나머지 1두 (D1)에서도 흉막폐렴 증상이 관찰되었다 (그림 44).

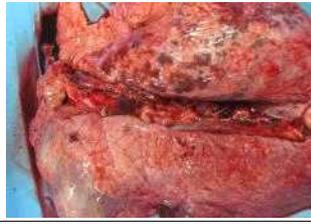
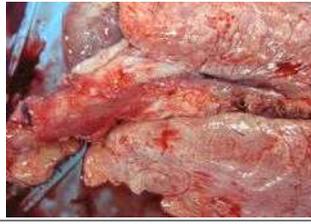
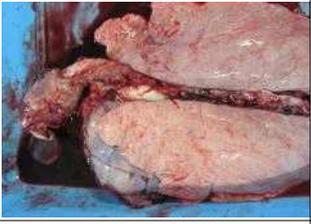
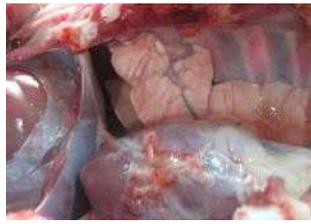
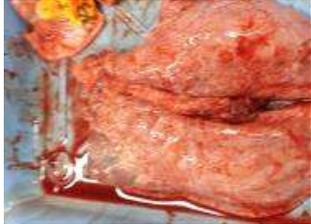
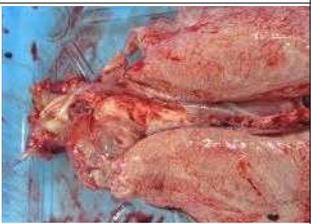
그룹 A 모돈(control), 자돈 vaccine 1번접종	그룹 B 모돈(Oral), 자돈 vaccine 1번접종	그룹 C 모돈(nasal), 자돈 vaccine 1번접종	그룹 D 모돈(control), 자돈 control
			
A1	B1	C1	D1
			폐사
A2	B2	C2	D2
			폐사
A3	B3	C3	D3
			폐사
A4	B4	C4	D4
			폐사
A5	B5	C5	D5

그림 44. 자돈에서 각 그룹별 도전감염 균주에 대한 방어 효과

4] 결론

돼지에서 백신의 효능을 향상시키기 위해 Montanide IMS 1313 VG (Seppic 사 제품)을 경구 접종할 때 백신과 혼합하여 사용하였다. 그 결과 백신만 접종 하였을 경우보다 혼합하여 사용했을 때 사용하지 않은 경우보다 높은 항체 역가가 관찰되었다.

더불어 개발백신의 최적 조건을 찾기 위해 다양한 접종 경로와 방법으로 접종 한 후 도전감염 후 도전감염 균주에 대한 방어여부로 백신의 최적화를 결정하였다. 즉, 모돈에 접종 하지 않고 자돈에만 접종하는 경우에는 60%의 흉막폐렴이 관찰되었고, 모돈에 경구로 그리고 자돈에 접종 되었을 경우에는 5두 중 40%에서, 그리고 모돈에 비강으로 접종하고 자돈에 접종 되었을 경우에는 접종 5두 중에서 60%가 흉막폐렴에 감염되었다. 대조군의 경우에는 5두 중에서 무려 4두가 폐사하였고 남은 1두에서도 흉막폐렴의 증상이 관찰되었다. 이상의 결과를 종합 해 보면 모돈에 경구 접종하고 자돈에 백신 접종 하는 경우 돼지에서 흉막폐렴을 효율적으로 방어 할 수 있음이 확인되었다.

[23] 현장에서 위축성 비염, 파스튜렐라 폐렴, 흉막폐렴, 예방 생균 백신과 다른 상업용 백신과의 단순 효능 비교 실험

1] 실험 내용

1. 실험동물 및 접종

1) 실험동물

분만 예정 8~9주 전인 임신 모돈 중에서 살모넬라균 및 흉막폐렴에 감염된 병력이 없고 흉막폐렴에 대한 예방접종이 실시되지 않았던 모돈을 대상으로 실험을 수행하였다.

2) 접종 : 그룹 A 돼지(모돈) 한 마리당 10ml에 2×10^{10} CFU가 되도록 조정하여 구강접종하였고, 그룹 B 모돈은 상업용 백신 제조회사에서 추천하는 방법에 따라 모돈에 2회 접종 하였다. 대조군 (그룹 C)은 멸균 PBS-수크로스로 각각 구강 접종 (표 52). 같은 균수와 같은 방법으로 접종 후 21일째에 한 번 더 추가 접종하였다 (표 53).

표 52. 임신 모돈에 백신 접종 및 자돈에서의 도전감염

그룹	두수	균주	항원명	접종균수		도전감염(자돈)
				모돈 1차 (임신 8주)	모돈 2차 (임신 11주)	
A	3	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Apx I A, Apx II A, Apx III A, OmlA, ApfA	2×10^{10} CFU/10ml	2×10^{10} CFU/10ml	AP 타입 2와 AP 타입 5를 동량 혼합하여 도전감염
B	3	<i>Actinobacillus</i> <i>pleuropneumo-</i> <i>-niae</i> 2형과 5형 사균	톡소이드 함유	임신 11주	임신 13주	
C	3		Control	멸균 PBS-sucrose	멸균 PBS-sucrose	

표 53. 자돈에서 도전감염 및 실험에 대한 간략한 설명

자돈	
5주	6주
도전감염	부검
	도전감염 후 생존한 폐지 대상
	균 분리 (폐)

2. 임상증상

자돈에 도전감염 후 급사여부 등의 임상 증상을 매일 하루에 두 번(아침, 저녁) 관찰하였다.

- a. 하루에 일정량의 사료를 대조군과 동일량 공급하여 사료 소비량으로 판단하였다.
- b. 하루에 두 번 관찰시 폐사여부를 확인 하였다.

3. 도전감염

각 그룹별로 모든 당 자돈 5마리를 선별하여 전북대학교 중동물사육사로 옮긴 후 1주일간의 적응 기간을 거친 다음 모든 자돈 한 마리당 2×10^7 CFU가 되도록 야외분리주를 조정하여 비강내로 접종하며 폐사여부를 확인하였다.

※ 콧구멍 한쪽에 $500 \mu\text{l}$ 씩 두 번 접종.

※ PBS 1ml에 App 2형, 5형 균주의 수가 1×10^7 CFU이 되도록 제조하고, 각 균주별로 1ml씩 혼합하여 제조 당일에 접종.

4. 부검(sacrifice) 후 실질 장기에서의 백신균주 분리

- 1) 시기 : 도전감염 후 1주 뒤에 부검
- 2) 실질 장기의 임상 소견
: 부검 할 당시에 폐의 육안적 소견을 관찰 하고, 사진을 찍어 기록하였다.
- 3) 대상 장기 : 폐.
- 4) 백신균주 분리 : 병변이 있는 폐에 압출봉으로 압출하여 초콜렛 아가 (chocolate agar)에 그어 각각의 colony별로 PCR을 통해 확인하였다.

2] 결과

1. 도전감염 후 폐사 여부

백신 접종 군과 상업용 백신 그리고 대조군에서 도전감염 후 폐사 여부를 확인하였는데, 그 결과는 하기 표 54와 같았다.

표 54. 도전감염 후 각 접종 경로별 폐사 두수

그룹	접종 두수	폐사 두수	생존 두수
A	15	1	14
B	15	3	12
C	15	4	11

2. 부검 후 흉막폐렴 확인

백신 접종 군과 상업용 백신 그리고 대조군에서 도전감염 후 생존한 자돈을 대상으로 부검을 실시하여 흉막폐렴 여부를 확인하였는데, 그 결과는 하기 표 55와 같았다.

표 55. 도전감염 후 부검 결과

그룹	접종 두수	생존두수	부검 후 흉막폐렴 관찰 두수	총 흉막폐렴 감염 두수
A	15	14	3	4
B	15	12	4	7
C	15	11	4	8

3] 결론

백신 접종 군(그룹 A)과 상업용 백신 접종 군 (그룹 B) 그리고 대조군 (그룹 C)으로 나누어 모든에 각각 예방 접종한 후 그 모돈으로부터 태어난 자돈을 대상으로 도전감염을 하였다. 도전감염 한 후 1주일 이내 흉막폐렴으로 폐사한 자돈은 대조군에서 4마리였으며 상업용 백신을 접종한 군에서는 3마리 그리고 개발 백신을 접종한 군에서는 1마리가 각각 흉막폐렴으로 급사하였다. 또한 도전감염 한 1주일 후에 생존 자돈을 모두 부검하여 흉막폐렴의 증상을 육안적으로 확인하여 본 결과 대조군에서는 생존 두수 11마리 중 4마리에서 그리고 상업용 백신을 접종한 군에서는 생존두수 12두 중 4마리에서 그리고 백신 접종 군에서는 생존 두수 14 중 2마리에서 각각 증상이 관찰되어 대조군에서는 총 15마리 중 8마리로 53.3%에서 발병율이 관찰되었다. 그리고 상업용 백신은 15마리 중 총 7마리로 46.7%, 그리고 개발 백신은 15마리 중 4마리로 26.6%가 흉막폐렴으로 각각 관찰되어 상업용 백신 보다 월등한 방어 효과가 관찰되었다.

[24] 각 호흡기 질병이 유행하는 양돈장에서의 생균백신의 적용 실험

1] 실험 내용

1-1. 실험동물 및 접종

1) 실험동물

호흡기 증상이 만연되어 있는 양돈장에서 모돈 중 분만 예정 8~9주 전인 임신 모돈 20두를 선별하여 임신 모돈을 두 그룹으로 나누어 한 그룹에는 백신을 접종하고 다른 그룹에는 백신을 접종하지 않았다.

2) 접종 : 그룹 A 돼지(모돈) 한 마리당 10ml에 5×10^{10} CFU가 되도록 조정하여 경구 접종하였고, 대조군 (그룹 B)은 아무 것도 접종하지 않았다. 두 그룹 모두 위축성 비염, 파스츄레라성 폐렴 그리고 흉막폐렴 예방 접종을 제외한 양돈장에서 운영하는 예방백신 프로그램에 따라 모든 백신을 접종하였다. 같은 군수와 같은 방법으로 접종 후 21일째에 한 번 더 추가 접종하였다 (표 56).

표 56. 호흡기가 만연하는 양돈장에서의 실험 개요

그룹	두수	균주	항원명	접종균수		자돈	
				모돈 1차 (임신 8주)	모돈 2차 (임신 11주)	4주령	6주령
A	10	<i>Samonella</i> Typhimurium	Apx I A, Apx II A, Apx IIIA, OmlA, ApfA, CP39, FimA, PtfA, F1-P2, ToxA	5x10 ¹⁰ CFU/10ml	5x10 ¹⁰ CFU/10ml	5x10 ¹⁰ CFU/10ml	5x10 ¹⁰ CFU/10ml
B	10	-	-	-	-	-	-

2. 임상증상

자돈에서 생후 12주령이 될 때까지 호흡기 증상의 발현 유무 및 호흡기 증상의 치료를 위해 사용한 항생제 사용 빈도 등을 매일 하루에 두 번(아침, 저녁) 관찰하였다.

- 하루에 두 번 관찰시 호흡기 증상 발현 여부를 확인 하였다.
- 호흡기 증상의 치료를 위한 항생제 사용량과 빈도 등을 확인하였다.

2] 결과

1. 출생 후 12주령 까지 호흡기 증상 발생 현황

백신 접종 군과 대조군에서 호흡기 증상으로 인한 폐사 여부 및 호흡기 증상 발현 현황 그리고 항생제 상용량 등을 비교분석하여 본 결과 백신 접종 군 자돈은 백신 접종하지 않은 그룹의 자돈에 비해 현저히 낮은 호흡기 증상이 관찰되었다 (표 57).

표 57. 각 그룹별 호흡기 증상 발생 두수

그룹	출생 자돈두수	포유 중 호흡기 질병 외로 폐사 두수	이유 후 생존 두수	호흡기 발생 두수	호흡기 질병으로 인한 폐사
A	98	8	90	23	5
B	102	14	88	65	12

2. 질병 치료를 위한 항생제 사용 빈도 및 사용량

백신 접종 군에 비해 대조군에서 호흡기 질병 치료를 위해 사용한 항생제의 사용 빈도와 사용량이 현저히 많았다.

3] 결론

호흡기 질병이 만연되어 있는 한 양돈장을 선택하여 위축성 비염과 파스츄렐라성 폐렴 그리고 흉막폐렴 예방 백신을 혼합하여 경구로 모든 및 자돈에 각각 2회씩 접종한 후 주기적으로 호흡기 증상 발현 여부를 확인하여 본 결과, 백신 접종 군에서 백신 접종하지 않은 군보다 현저히 낮은 호흡기 증상이 관찰되었지만 여전히 높은 비율의 호흡기 증상이 관찰되는 것으로 보아 이들 호흡기 증상 발현 세균 외에 다른 호흡기 세균 들이 만연 되어 있음을 확인할 수 있었다. 하지만 대조군에 비해 현저히 낮은 호흡기 질병이 관찰되었으며 호흡기 질환으로 인한 폐사 수도 현저히 낮은 것을 확인할 수 있었다.

[25] 백신의 안정성 확인 시험

돼지의 위축성 비염, 파스츄렐라 폐렴을 예방하기 위해서는 비병원성 살모넬라 vector에 CP39, FimA, PtfA, ToxA를 각각 발현한 4가지의 생백신 균주가 필요하며, 돼지의 흉막폐렴을 효과적으로 예방하기 위해서는 Apx I, Apx II, Apx III, OmpA를 각각 발현한 4가지의 생백신 균주가 추가로 필요하다.

비병원성 살모넬라 vector를 이용한 생백신의 품목허가가 아직까지 국내에 없기 때문에 이들 백신에 대한 명확한 검정기준 또한 정해져 있지 않다. 다만, 돼지의 세균성 질병을 예방하기 위한 다양한 생백신들의 품목허가가 이미 나 있고, 이들 백신에 공통으로 적용되는 평가 기준이 있기 때문에 이를 근거로 각각의 생백신에 대한 안정성 확인 시험을 실시하였다.

총 8가지 동결건조 생백신에 대하여 9개월 동안 진공도 시험, 수소이온농도시험, 합습도 시험, 마이코플라즈마 부정시험, 균수시험을 실시하였고, 그 결과 8개의 동결건조 생백신 모두 백신으로써의 특성을 잘 유지하고 있는 것으로 확인되었다.

표 57. 시험백신의 제조

제조번호	조성 (1두 분 당)	제조수량	제조일시
15-STCP	CP39 항원 발현 <i>S.typhimurium</i> 균 ----- 10 ⁹ CFU 이상	10두 분 × 100 vial	2015.01.07
15-STFA	FimA 항원 발현 <i>S.typhimurium</i> 균 ----- 10 ⁹ CFU 이상	10두 분 × 100 vial	2015.01.07
15-STPA	PtfA 항원 발현 <i>S.typhimurium</i> 균 ----- 10 ⁹ CFU 이상	10두 분 × 100 vial	2015.01.07
15-STTO	ToxA 항원 발현 <i>S.typhimurium</i> 균 ----- 10 ⁹ CFU 이상	10두 분 × 100 vial	2015.01.07
15-STAI	Apx I 항원 발현 <i>S.typhimurium</i> 균 ----- 10 ⁹ CFU 이상	10두 분 × 100 vial	2015.01.07
15-STAI	Apx II 항원 발현 <i>S.typhimurium</i> 균 ----- 10 ⁹ CFU 이상	10두 분 × 100 vial	2015.01.07
15-STAI	Apx III 항원 발현 <i>S.typhimurium</i> 균 ----- 10 ⁹ CFU 이상	10두 분 × 100 vial	2015.01.07
15-STOA	OmpA 항원 발현 <i>S.typhimurium</i> 균 ----- 10 ⁹ CFU 이상	10두 분 × 100 vial	2015.01.07

1] 시험방법 및 결과

1. 진공도 시험

동물용의약품 생물학적제제 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-02에 따라 시험백신 8종에 대하여 제조직후부터 9개월경과 시점까지 진공도시험을 실시하였다.

(1) 시험방법

암실에서 백신으로부터 5mm 떨어진 위치에 테스터코일을 놓고 방전의 유무를 관찰하였다.

(2) 시험결과

제조번호	제조직후	3개월	6개월	9개월
15-STCP	적 합	적 합	적 합	적 합
15-STFA	적 합	적 합	적 합	적 합
15-STPA	적 합	적 합	적 합	적 합
15-STTO	적 합	적 합	적 합	적 합
15-STAI	적 합	적 합	적 합	적 합
15-STAI	적 합	적 합	적 합	적 합
15-STAI	적 합	적 합	적 합	적 합
15-STAI	적 합	적 합	적 합	적 합
15-STOA	적 합	적 합	적 합	적 합

진공도시험 결과, 8개의 시험백신 모두 9개월 경과시점까지 진공도에 문제가 없음이 확인되었다.

2. 수소이온농도 시험

동물용의약품 생물학적제제 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-03에 따라, 제조직후부터 9개월경과 시점까지 수소이온농도시험을 실시하였다.

(1) 시험방법

각 시험백신에 대한 수소이온농도를 pH 표준액을 pH의 기준으로 사용하여 적절한 조

작법에 따라 pH를 측정하고 각각의 값을 검사하였다.

(2) 시험결과

제조번호	제조직후	3개월	6개월	9개월
15-STCP	6.89	6.92	6.86	6.95
15-STFA	6.94	7.02	6.96	6.99
15-STPA	6.85	6.93	7.05	7.11
15-STTO	6.92	7.13	7.06	7.09
15-STAI	7.02	7.10	7.13	7.08
15-STAI	6.45	6.55	6.74	6.69
15-STAI	6.74	6.83	6.93	6.85
15-STOA	6.85	7.01	6.93	7.05

수소이온농도시험 결과, 8개의 시험백신 모두 9개월 경과시점까지 수소이온농도가 pH 6.0 ~ 8.0으로 문제가 없음이 확인되었다.

3. 함습도 시험

동물용의약품 생물학적제제 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-04에 따라, 제조직후부터 9개월경과 시점까지 시험백신에 대한 함습도시험을 실시하였다.

(1) 시험방법

백신 내용을 신속히 분쇄하여 입자의 직경을 2mm이하로 한 후, 칼피쉬 (Karl Fisher) 수분측정기를 사용하여 측정한다.

(2) 시험결과

제조번호	제조직후	3개월	6개월	9개월
15-STCP	3.74	3.82	3.99	4.12
15-STFA	3.85	3.88	4.05	4.11
15-STPA	4.12	4.21	4.25	4.36
15-STTO	3.59	3.65	3.84	3.96

15-STAI	3.15	3.26	3.29	3.41
15-STAI	4.06	4.12	4.23	4.29
15-STAI	3.26	3.36	3.41	3.55
15-STOA	3.64	3.75	3.79	3.92

합습도시험 결과, 8개의 시험백신 모두 9개월경과 시점까지 칼피쉬 측정법으로 검사 시 합습도가 6% 이하로 합습도에 문제가 없음을 확인하였다.

4. 마이코플라즈마 부정시험

동물용의약품 생물학적제제 국가검정기준의 일반시험법 1-11-20-07에 따라, 제조직후 부터 9개월경과 시점까지 시험백신에 대한 마이코플라즈마 부정시험을 실시하였다.

(1) 시험방법

PCR 기법을 이용하여 마이코플라즈마를 검색하고, PCR 기법에서 양성인 시험품에 대하여 최종 확인 검사법으로 마이코플라즈마 증균 배지를 사용하여 분리하였다.

(2) 시험결과

제조번호	제조직후	3개월	6개월	9개월
15-STCP	적합	적합	적합	적합
15-STFA	적합	적합	적합	적합
15-STPA	적합	적합	적합	적합
15-STTO	적합	적합	적합	적합
15-STAI	적합	적합	적합	적합
15-STAI	적합	적합	적합	적합
15-STAI	적합	적합	적합	적합
15-STOA	적합	적합	적합	적합

마이코플라즈마 부정시험 결과, 8개의 시험백신 모두 9개월경과 시점까지 마이코플라즈마에 대한 미입은 확인되지 않았다. PCR 검사 결과 모두 음성으로 확인되었기 때문에 마이코플라즈마 증균 배지를 통한 발육시험은 실시하지 않았다.

5. 균수시험

(1) 시험방법

백신을 멸균 생리식염수로 10진 희석한 후 DAP가 함유된 LB배지에 10진 희석액 1 ml를 접종하고 37℃에서 48시간 배양하여 평판법으로 균수를 측정하였다.

(2) 시험결과

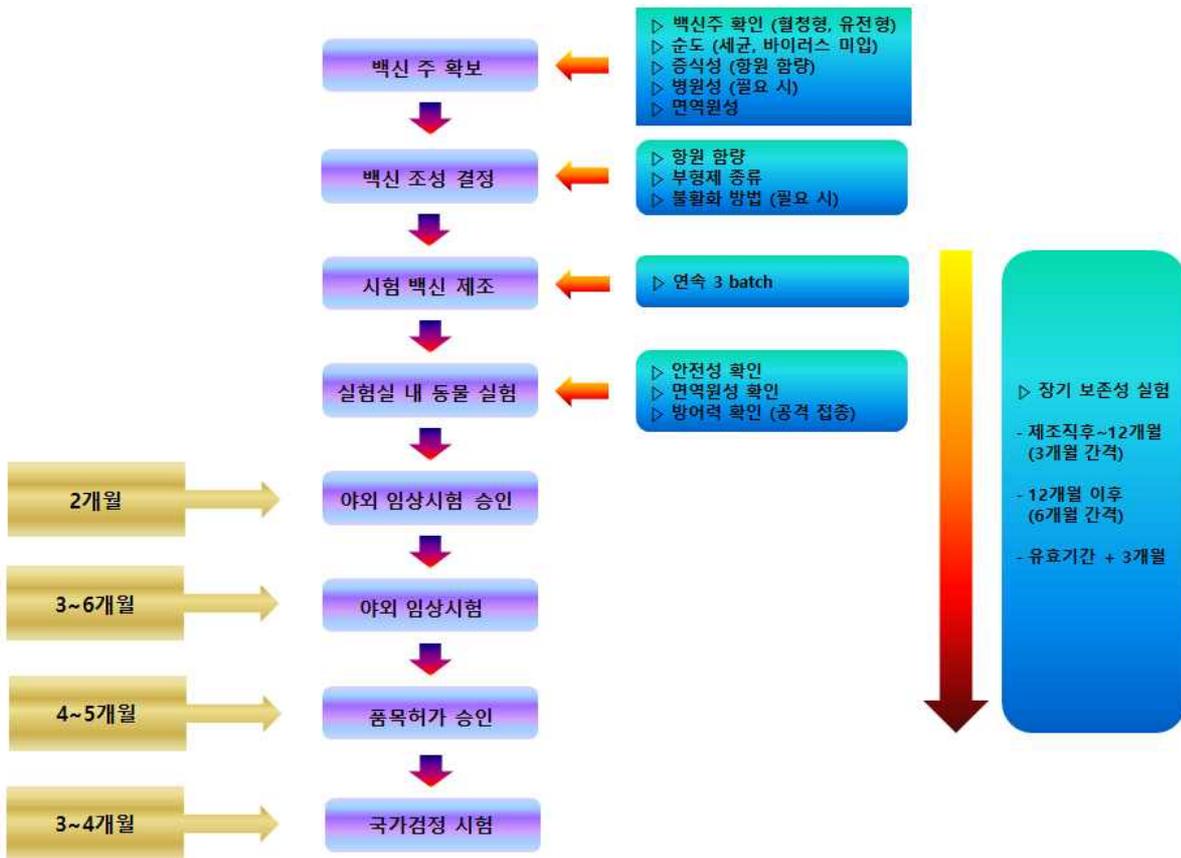
제조번호	제조직후	3개월	6개월	9개월
15-STCP	5×10 ⁹ CFU/두	5×10 ⁹ CFU/두	5×10 ⁹ CFU/두	4×10 ⁹ CFU/두
15-STFA	4×10 ⁹ CFU/두	4×10 ⁹ CFU/두	3×10 ⁹ CFU/두	4×10 ⁹ CFU/두
15-STPA	5×10 ⁹ CFU/두	5×10 ⁹ CFU/두	4×10 ⁹ CFU/두	4×10 ⁹ CFU/두
15-STTO	6×10 ⁹ CFU/두	6×10 ⁹ CFU/두	6×10 ⁹ CFU/두	5×10 ⁹ CFU/두
15-STAI	5×10 ⁹ CFU/두	5×10 ⁹ CFU/두	3×10 ⁹ CFU/두	3×10 ⁹ CFU/두
15-STAI	4×10 ⁹ CFU/두	4×10 ⁹ CFU/두	4×10 ⁹ CFU/두	4×10 ⁹ CFU/두
15-STAI	6×10 ⁹ CFU/두	6×10 ⁹ CFU/두	4×10 ⁹ CFU/두	5×10 ⁹ CFU/두
15-STOA	5×10 ⁹ CFU/두	5×10 ⁹ CFU/두	4×10 ⁹ CFU/두	4×10 ⁹ CFU/두

균수시험 결과, 8개의 시험백신 모두 9개월경과 시점까지 백신 1두 분 중 균수가 10⁹CFU 이상으로 확인되었다.

[26] 백신의 제품화를 위한 전략수립

생물학적 제제의 품목허가 과정은 아래 도표와 같은 순서로 진행된다. 이를 간략히 요약하자면, 백신 개발을 위한 사전 조사를 거쳐 백신으로 개발하고자 하는 질병명이 정해지며, 이를 예방하기 위하여 백신으로써 유효한 백신 주 선발이 선행된다. 선발된 백신 주는 전 임상 시험을 통해 백신의 조성 결정 (항원 함량, 면역증강제 종류 등) 과 실험동물 및 목적동물 안전성, 효력시험을 수행하게 되고, 이들 결과를 바탕으로 임상시험을 위한 계획서를 승인받게 된다. 임상시험 승인을 받으면, 미리 시제조한 3 Lot의 시험백신을 이용하여 야외 농장 시험을 실시하는 한편, 백신의 유효기간을 설정하기 위한 안정성 실험을 동시에 실시한다. 이러한 과정을 통해서 백신의 생산 및 판매를 위한 모든 실험이 종료되고, 이들 결과를 취합하여 동물용 의약품의 허가를 주관하는 농림축산검역본부의 제조품목허가를 취득함으로써 백신의 개발이 마무리된다.

그림 45. 생물학적 제제의 품목허가 흐름도



이러한 개발과정에 비춰볼 때, 본 과제를 통해서 향후 얻을 수 있는 궁극적인 백신 제품은 돼지의 위축성비염, 파스튜렐라 폐렴, 흉막폐렴을 동시에 예방할 수 있는 다가 생백신이 될 것이다. 제 1세부, 제 2세부, 제 1협동의 3년에 걸친 연구개발 결과물을 통해서 비병원성 살모넬라 vector system을 기반으로 한 재조합 생백신들이 돼지에서 위축성비염, 파스튜렐라 폐렴, 흉막폐렴을 예방할 수 있는 백신으로써 적용 가능성을 확인할 수 있었고, 이를 하나의 완전한 제품으로 상용화시키기 위해서는 각각의 백신 주에 대한 안정성 측면에 대한 연구가 좀 더 수행될 필요가 있을 것으로 판단되며, 품목허가를 진행하는 과정에서도 이러한 측면이 주요 check point가 될 것으로 예상된다.

본 연구 과제를 통해서 다양한 질병을 동시에 예방할 수 있는 다가 백신의 개발을 추진하다보니, 3년이라는 기간 동안 백신의 상업화까지 연결시키기에는 다소 무리가 있었고, 이러한 이유로 계획상에도 실질적인 백신의 품목허가 절차에 들어갈 수 있도록 전 임상 시험을 성공적으로 마무리 짓는데 까지를 목표로 설정한 바 있다. 이러한 측면에서 지난 3년간의 연구 개발 성과물들을 평가해보면 충분히 목표를 달성했다고 볼 수 있다.

코미팜에서는 2016년부터 백신의 품목허가를 위한 본격적인 절차에 돌입할 예정이며, 지금까지의 연구 결과를 바탕으로 백신의 임상시험 실시를 위한 임상시험 계획서를 농림축산검역본부에 제출하고자 한다. 생물학적 제제의 허가 기준에 따라 3개 농장을 선정하여 임상시

험을 실시할 것이며, 일반적인 행정절차상 약 2개월 이상의 기간이 소요될 것으로 예상된다. 약의 임상시험 기간은 백신의 종류나 축종에 따라서 그 기준이 달라지는데, 돼지를 목적동물로 한 백신의 경우 최소 5개월의 시간이 소요되며, 최근 필드의 백신 사용 경향성이나, 품목허가 취득상의 유리함을 고려해볼 때 임신모돈을 제외한 자돈만을 대상으로 한 백신 개발이 보다 실용적으로 판단되며, 이를 통해 백신의 품목허가에 소요되는 기간을 최소한으로 하고자 한다. 약의 임상시험이 마무리되는 시점에서 백신의 품목허가 승인을 위한 기술검토 서류를 농림축산검역본부에 제출할 것이며, 통상 4~5개월의 검토 기간을 걸쳐 적합 여부가 결정되게 되며, 실제로 제품이 판매되기 위해서는 3개월 동안의 국가검정시험 기간을 걸쳐서 최종 합격 판정을 받아야 한다.

현 시점에서 품목허가 취득 및 제품 판매까지 소요될 수 있는 시간을 계산해보면 15개월 정도이며, 늦어도 2018년도에는 신제품의 판매 수익이 발생할 수 있으리라 기대된다. 신제품의 품목허가를 추진하는 15개월 정도의 기간 동안 백신주의 안정성 등 신제품의 기술검토 과정에서 발생할 수 있는 다양한 문제들에 대한 보완 및 개선작업을 동시에 수행하여 허가에 걸리는 기간을 최대한 단축시키려 노력할 것이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012)	돼지에서 유전공학 기법을 이용한 주요 세균성 호흡기 질병 예방 생균 백신 개발	특정 유전자가 제거된 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 동시 예방 생균 다가 백신 개발	100	- 위축성 비염과 파스튜렐라 폐렴과 관련된 주요 병원성 인자의 유전자 확보 - 확보된 각 병원성 인자의 유전자를 delivery vector에 cloning - 각 유전자가 삽입된 plasmid를 약독화된 delivery host로 형질전환하여 백신 제조
		In vitro 상에서 개발된 백신 균주의 발현여부 확인	100	- Western blot을 이용하여 각 형질전환된 백신 후보균주로부터 각 항원이 host 세포 밖으로의 분비여부 확인
	실험동물에서 주요 호흡기 질병 예방을 위한 생균 백신의 안전성 및 효능 시험과 최적화	점막면역 활성 adjuvant 개발	100	- 생균 Delivery system을 이용한 점막에서 면역을 활성화 시킬 adjuvant 개발
		실험동물에서의 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 각각의 생균 백신 후보균주의 안전성 및 면역 유도 실험	100	- BALB/c mice에서 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 각 항원발현 백신 후보주를 접종 경로별로 다양한 접종량으로 접종 - 백신 접종 후 마우스에서 접종경로별 접종량에 따른 폐사 여부 등 부작용 조사 - 접종경로별 접종량에 따른 면역 반응 측정
		실험동물에서 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신후보균주의 혼합 접종 실험	100	- 마우스에서 백신 후보균주의 혼합 접종 후 각각의 항원에 대한 면역 유도 측정
		실험동물을 이용한 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신의 최적화 실험	100	- 접종 횟수에 따른 면역 반응 측정 - Real-Time PCR을 이용한 IL-4, IFN- γ 측정 - 도전 감염 균주에 대한 방어 여부 확인 실험
	점막면역 활성 delivery system을 이용한 주요 세균성 호흡기 질병 예방을 위한 다가 백신의 현장 적용	위축성 비염과 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신 개발을 위한 주요 병원성 인자 항원 발굴 및 유전자 확보	100	- <i>Pasteurella multocida</i> type A 및 type D에서 위축성 비염 및 폐렴과 관련된 주요 병원성 인자 중 면역원성이 우수한 항원 발굴 및 유전자 확보 - <i>Bordetella bronchiseptica</i> 의 주요 병원성 인자 중 면역원성이 우수한 항원 발굴 및 유전자 확보
		해당 단백질 항원 확보	100	- 항원 단백질 확보를 위한 cloning - 각 해당 항원에 대한 단백질 항원 발현 및 정제
		국내 주요 호흡기 질병 원인균 분리 및 동정, 양돈장에서 분리된 병독성 호흡기 질병 원인균 병독성 시험	100	- 주요 호흡기 질병 분포를 조사 (전국을 대상으로) - 분리균 항생제 검사 - 야외 균주에 대한 돼지에서의 LD ₅₀ 량 결정 실험 (3처리군 × 2반복 × 15시료)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2013)	돼지에서 유전공학 기법을 이용한 주요 세균성 호흡기 질병 예방 생균 백신 개발	모돈에서 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위 성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 다가 백신의 효능 및 백신의 안전성 실험	100	- 임신 모돈에 다양한 경로로 백신 접종 - 백신접종 후 발열, 설사, 유사산 등의 부작용 및 폐사 여부 관찰 - 백신접종 후 정기적으로 면역 반 응 측정 - 포유자들을 대상으로 야외 균주 에 대한 방어 여부 확인
		병원성 유전자가 제거된 점막면 역 활성 delivery system을 이 용한 흉막폐렴 예방 생균 백신 개발	100	- 확보된 각 병원성 인자의 유전자 를 이용하여 흉막폐렴을 예방할 수 있는 생균 백신 개발 - Western blot을 이용하여 각 항 원이 host 세포 밖으로 분비하는지 의 여부 확인
		흉막 폐렴 예방 생균백신 생체 내에서의 병원성 획득 실험	100	- BALB/c mice에 접종 후 spleen 등에서 백신 균주 분리 - 분리된 백신 균주 병원성 획득 여부 확인 - 분리 균주로 다시 마우스에 재접 종 - spleen 등에서 균 분리 및 병원 성 획득 여부 확인 (이상의 방법 을 6회 실시)
	실험동물에서 주요 호흡기 질병 예방을 위한 생균 백신의 안전성 및 효능 시험과 최적화	흉막폐렴 예방 생균 백신 개발 을 위한 주요 병원성 인자 항원 발굴 및 유전자 확보	100	- <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 2형과 5형 중 에서 흉막 폐렴과 관련된 주요 병원 성 인자 중 항원성이 우수한 항원 발굴 및 항원 유전자 확보
		흉막폐렴 주요 병원성 인자에 대한 각 단백질 항원 확보	100	- 항원 단백 확보를 위한 cloning - 시판되고 있는 kit를 사용하여 각 해당 항원에 대한 단백질 항원 발 현 및 정제
		마우스를 이용한 흉막 폐렴 예 방 생균백신의 안전성 실험	100	- BALB/c mice를 대상으로 접종 경로별로 각 항원발현 백신 후보균 주의 접종량을 달리하여 접종 - 마우스에서 각 백신 후보 균주의 접종경로 별 접종량에 따른 폐사 등 부작용 여부 관찰
		마우스를 이용한 흉막 폐렴 예 방 생균백신의 효능실험	100	- 마우스에서 백신 후보균주의 혼 합 접종 후 각 항원에 대한 면역 반응 측정 - 야외분리 독성 분리주로 도전감 염 후 방어여부 관찰
		실험동물을 이용한 백신의 최적 화 실험	100	- 접종 횟수에 따른 면역 반응 측정 - 접종 횟수에 따른 cytokines 측 정 - 접종 횟수 별로 도전 감염 균주 에 대한 방어 여부 관찰
	점막면역 활성 delivery system을 이용한 주요 세균성 호흡기 질병 예방을 위한 다가 백신의 현장 적용	목적 동물에서의 위축성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예방 생균 백신 예비 실험	100	- 비육돈에 백신 경구 및 비강 접 종 - 면역 반응 조사 - 야외 균주에 대한 방어 시험
		자돈에서 점막면역 활성 delivery system을 이용한 위 성 비염 및 파스튜렐라 폐렴 예 방 생균 다가 백신의 효능 및 안전성 실험	100	- 임신 모돈에 백신접종 - 백신 접종군 및 비 접종군에서 출생한 자돈에 백신접종 - 자돈에서 백신 접종 후 발열, 설 사, 폐사와 같은 부작용 여부 관찰 - 백신 접종 전·후 채취된 혈청에 서의 IgG 측정 - 야외균주에 대한 방어 여부 확인

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2014)	돼지에서 유전공학 기법을 이용한 주요 세균성 호흡기 질병 예방 생균 백신 개발	모돈에서 홍막폐렴 예방 생균 백신의 안전성 실험	100	- 임신 모돈에 다양한 경로로 백신 접종 - 백신 접종 후 발열, 설사, 유사산 등의 부작용 여부 관찰 - 정기적인 serum IgG, 초유에서 의 IgG 및 IgA 등 조사 - 자돈에서의 야외 균주에 대한 방 어 여부 조사
		현장에서 위축성 비염, 파스투 렐라 폐렴, 홍막폐렴 예방 생균 백신과 다른 상업용 백신과의 단순 효능 비교실험	100	- 현재 상용화되어 있는 각 호흡기 질병 백신을 구입하여 각 생균 백 신을 대상 목적 동물에 각각 접종 - 정기적으로 각 그룹별로 채혈하 여 면역 반응 측정 - 야외분리 독성 균주로 도전감염 시킨 후 상용화된 백신과 개발 생 균 백신에서의 단순히 방어 여부만 을 비교
	실험동물에서 주요 호흡기 질병 예방을 위한 생균 백신의 안전성 및 효능 시험과 최적화	돼지에서 백신의 효능을 향상시 킬 점막 면역에 효과적인 adjuvant 개선 및 백신의 최적 화	100	- adjuvant를 혼합한 또는 혼합 하지 않고 돼지에 접종 후 면역 유 도 반응 측정하여 효과적인 adjuvant 선택 및 백신의 최적화 (백신, 1, 2, 3회 접종 후 IgG 및 방어여부로 결정)
	점막면역 활성화 delivery system을 이용한 주요 세균성 호흡기 질병 예방을 위한 다가 백신의 현장 적용	목적동물에서 홍막폐렴 예방 생 균백신의 효능실험	100	- 비육돈에 다양한 경로로 백신접 종 - 정기적으로 serum IgG 측정 - 야외독성 분리주로 도전감염 후 방어 여부 확인
		각 호흡기 질병이 유행하는 양 돈장에서의 생균 백신의 적용실 험	100	- 각 호흡기 질병이 유행하고 있는 양돈장에서 대상 목적동물에 백신 접종 - 백신 접종 후 부작용 여부 관찰 - 백신을 접종하지 않은 대조군과 호흡기 질병 발생 비율 및 호흡기 치료를 위한 항생제 치료 사용 빈 도 등 측정
		백신의 안정성 확인 시험	100	- 시험백신을 냉암소에 보관하면서 시험에 사용 - 제조직후, 3개월, 6개월, 9개월 째에 특성, 진공도, 수소이온농 도, 함습도, 마이코플라즈마 부정 시험, 순수시험, 균수 시험, 안전 시험, 등 시행

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

본 연구를 통해 제작된 위축성 비염과 파스츄렐라성 폐렴 동시 예방 생균 백신과 돼지 흉막폐렴 예방 생균 백신은 안전하면서 방어력이 탁월하였으며 근육뿐만 아니라 경구 및 비강으로 접종이 가능하기 때문에 양돈가의 실정에 맞는 접종 방법을 선택할 수 있는 우수한 백신으로 야외농장에서의 임상시험 허가를 받게 되면 복수의 양돈장에서 안전성 및 효능을 평가한 후에 실용화를 목표로 하고 있다.

또한 이들 모든 생균 다가 백신은 경구접종으로도 탁월한 방어면역을 유도할 뿐만 아니라 방어에 있어서도 우수하였기 때문에 더욱 편리하게 음수 등의 방법으로 접종이 가능하여 실용화가 가능할 것으로 생각된다.

이러한 제시된 목표를 조기에 달성하고자 2013년 8월 1일자에 “약독화 살모넬라 변이주를 유효성분으로 포함하는 위축성 비염 및 파스츄렐라성 폐렴의 동시 예방 생균 백신 조성물, 특허출원번호 : 10-2013-0049560” 기술을 (주) 코미팜에 기술이전을 실시하였으며,

또한 2015년 8월 12일에 “약독화 살모넬라 변이주를 유효성분으로 포함하는 돼지 흉막폐렴의 예방 또는 치료용 백신 조성물, 특허출원번호 : 10-2015-0075260” 기술을 (주) 코미팜에 기술이전을 실시하였고 이의 결과를 2016년 1월 25일에 보고하였다.

2. 교육지도 홍보 등 기술 확산 계획 등

본 연구를 통하여 개발된 위축성 비염과 파스츄렐라성 폐렴 동시 예방 생균 백신과 돼지 흉막폐렴 예방 생균 백신은 백신 접종 경로와 다양성 및 도전감염에 따른 우수한 백신 효능은 현재 시판되고 있는 포르말린 불활화 백신 및 subunit 백신의 근육 접종에 따른 부작용을 이해하는데 도움을 줄 수 있을 것이며 또한 돼지에서 살모넬라 근절과 주요 세균성 호흡기 질병에 의한 포유 및 이류 자돈에서의 호흡기 질병의 조기 진압이 가능하여 양돈가에 경제적 손실을 최소화 하는데 작으나마 기여할 수 있을 것이다. 향후 적극적인 교육과 지도 및 홍보 활동을 통해 본 연구를 통해 획득한 정보와 기술을 널리 알림으로서 가축 질병을 예방하는데 이바지하고자 한다.

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보 계획 등

가. 특허출원

발명의 명칭	출원번호 (등록번호)	출원일자 (등록일자)	비고
약독화된 살모넬라 변이주를 유효성분으로 포함하는 위축	10-2013-0049560	2013. 05. 02	기술이전 완료

성 비염 및 파스츄렐라성 폐렴의 동시 예방용 생균 백신 조성물			
약독화된 살모넬라 변이주를 포함하는 돼지 흉막폐렴의 예방 또는 치료용 백신 조성물	10-2014-0064860	2014. 05. 29	
약독화된 살모넬라 변이주를 포함하는 돼지 흉막폐렴의 예방 또는 치료용 백신 조성물	10-2015-0075260	2015. 05. 28	기술이전

나. 균주기탁

KCTC번호	Specification	기탁기관	Strian
1240BP	생균 백신 균주	전북대학교	ST-AR-PASTEU (Mixture)

다. 학술논문

본 연구개발 사업을 수행한 결과물로 현재까지 다음 편이 SCI급 국제학술논문 및 국내 저널에 게재되었다.

Title	Journal	Year	Vol, page	Authors (특기사항)
Optimization of immune strategy for a construct of <i>Salmonella</i> -delivered ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA and OmpA antigens of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> for prevention of porcine pleuropneumonia using a murine model.	Veterinary Research Communications	2014	38, 87-91	SCI
Generation of an attenuated <i>Salmonella</i> -delivery strains expressing adhesin and toxin antigens for progressive atrophic rhinitis, and evaluation of its immune responses in a murine model.	Vaccine	2014	32, 5057-5064	SCI
Immunologic study and optimization of <i>Salmonella</i> delivery strains expressing adhesin and toxin antigens for protection against progressive atrophic rhinitis in a murine model.	Canadian Journal of Veterinary Research	2014	78, 297-303	SCI
Immunological study of an attenuated <i>Salmonella</i> Typhimurium expressing ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA and OmpA of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> in a mouse model.	The Journal of Veterinary Medical Science	2015	77, 1693-1696	SCI
Efficacy of two virulence gene-deleted <i>Salmonella</i> Typhimurium vaccine candidate for <i>Salmonella</i> infections in weaning piglets	Journal of Preventive Veterinary Medicine	2013	37, 177-180	학술등재 후보지

Molecular serotyping and antimicrobial resistance profiles of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> isolated from pigs in South Korea	Veterinary Quarterly		In Press	SCI
Evaluation of efficacy of the combination vaccine of formalin-inactivated <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> bacterins, and the recombinant individual N- and/or C-terminal fragments of ApxIA, ApxIIA and ApxIIIA in piglets	Veterinary Microbiology		In Response	SCI
Evaluation of efficacy of the combination vaccine of recombinant C-terminal fragments of ApxIA, ApxIIA and ApxIIIA in piglets	S a i n s Malaysiana		In Review	SCI
닭과 돼지에서 분리된 <i>Salmonella</i> Typhimurium의 항생제 특성 비교 분석	한 국 위 생 학회지		3월 게재	학술등재시

4. 추가연구, 타 연구에 활용 계획

연구를 수행하면서 획득한 백신 제조 접근방법 및 안정성 그리고 생균백신의 안전성과 효능평가 측정 방법 그리고 관찰된 결과 분석을 기반으로 더욱 향상된 백신조성물을 연구해 나갈 것이다. 또한 살모넬라균주 뿐만 아니라 타 균주에 대한 전달시스템 개발에 관한 연구를 수행하고자 한다. 특히 본 연구개발 사업을 진행함에 있어 백신 조성물에 있어 독소 성분의 중요성을 절실히 알았기 때문에 새로운 형태의 백신 개발을 위한 좋은 아이디어를 도출할 수 있는 기회가 되기도 하였다. 더불어 다수의 양돈장에서의 임상시험 허가를 받아 시제품 및 산업화가 가능할 수 있도록 더욱 연구를 진행해 나갈 것이다. 독소를 발현 분비할 수 있는 시스템을 더욱 발전시켜 독자적인 발현 시스템을 개발 하여 생균 백신에 이어 더욱 새로워진 독소 혼합 사균 백신을 개발할 수 있는 새로운 토대를 마련할 수 있는 기회가 되었다. 또한 생균 백신의 다양한 접종 경로를 통한 우수한 예방 효과는 최근 발생한 구제역 등으로 인해 추가된 백신 프로그램으로 인해 더욱 혼란스러운 백신 프로그램에 선택의 장을 열어 줄 수 있는 계기를 제공할 것이다. 생균 백신의 다양한 접종 경로의 선택과 독소를 안전하고 다량 발현 정제할 수 있는 시스템을 개발한다면 포르말린으로 제작하는 국내 백신 개발의 한계를 한 단계 도약할 수 있을 것이며, 그동안 포르말린을 통한 불활화 백신 아주번트와 함께 혼합하여 근육 접종하여 발생하는 부작용과 함께 점막면역을 유도할 수 없는 소화기 질병 예방백신의 한계를 극복할 수 있는 발판을 마련하였다고 생각한다. 따라서 본 연구를 통해 얻은 생균백신과 항원 발현 및 분비 시스템을 이용한 백신의 제조 기술을 다른 호흡기 및 소화기 질병 유발 원인균에 적용하여 특별한 아주번트와의 혼용 없이 점막 면역을 유도하여 이들 병원균을 효과적으로 예방할 수 있는 생균 및 독소 혼합 신개념 사균 백신을 개발할 수 있을 것이다. 또한 우리가 개발한 발현 시스템은 항원을 효과적으로 세포 밖으로 분비하기 때문에 배양하기 힘들어 백신

제조에 어려움이 있었던 원인균의 항원을 발현 및 분비시켜 저렴하면서도 안전하게 이들 질병을 예방하는 백신을 개발하고자 한다.

현재 HACCP에 의하면 모든 가축은 도축시에 살모넬라균 분리 및 가금에서는 *Salmonella* Gallinarum 및 Pullorum에 대한 혈청 검사가 실시되고 있어 아직 백신 접종 개체와 자연감염 개체와의 감별진단이 어려운 점이 있어 추후 돼지 및 닭에서 이 질병을 예방하고자 백신을 접종할 경우 감별에 어려운 점이 있다. 따라서 추가적으로 살모넬라 개발백신 접종 개체와 자연감염 개체의 감별을 위한 DIVA를 위해 우리는 rfa 유전자를 제거하여 LPS가 결합된 약독화 살모넬라 전달시스템을 개발하고자 계획 중에 있으며 만약 IPET에서 추가적인 연구를 더 진행할 수 있다면 LPS가 결합된 살모넬라 전달시스템을 개발하여 돼지에서의 전달 항원에 대한 효능 평가와 더불어 자연감염 개체와의 감별 진단 여부에 대한 연구를 진행하고자 한다.

또한 본 개발 백신의 산업화를 위해서는 반드시 filed trial이 필요하기 때문에 전국에 있는 양돈장에서 호흡기 질병이 만연되어 있는 양돈장을 여러 곳 선택하여 개발 백신을 접종한 군과 접종하지 않은 군으로 나누어 현장에서의 백신의 효능에 대한 연구를 추가적으로 실시하여야 할 것이다. 더불어 현장에서 여러 환경에 놓인 돼지를 대상으로 약독화 살모넬라 생균 백신의 안전성 실험도 병행되어야 할 것이다. 제품 대량생산을 위해 국가검정기관에서 필요로 하는 안정성 및 제조기술에 맞는 실험을 추가적으로 수행하여 본 연구를 통해 개발된 백신이 조속히 산업화 될 수 있도록 추가적인 연구가 필요하다.

양계분야에서 살모넬라 특히 *Salmonella* Gallinarum 및 Pullorum에 의한 피해는 양계농가에 경제적으로 많은 부담을 주고 있다. 따라서 이 연구 결과를 토대로 *Salmonella* Gallinarum을 약독화 시켜 전달시스템으로 개발 후 Pullorum의 특이 항원을 발현하도록 훈련한다면 두 균주를 동시에 예방할 수 있는 백신이 개발되어 양계에서 이 균주에 대한 안전성 및 효능에 대한 연구를 수행한다면 양계에서도 방어능이 우수한 위한 생균 백신이 될 것이라 생각되어 추가적인 연구 지원이 필요하다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
해당사항 없음

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술
해당사항 없음

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

* 연구수행 기간 중 소속 기관의 연구실 안전관리 관련 규정에 따른 이행실적(자체양식)

연구실 안전관리 현황

□ 안전점검 및 정밀안전진단

1. 점검내용 및 실시주기 등

구 분		점 검 내 용	점검주기	점검주체
안전점검	일상점검	다음 각호의 사항을 육안으로 점검 1)기계·기구·전기·가스 등의 실험기자재와 약품·병원체 등 실험재료의 이상유무 2)보호장비의 관리상태를 육안으로 점검	매일 1회	연구실 책임자
	정기점검	다음 각 호의 사항을 장비를 이용하여 점검 1)기계·기구·전기·가스 등의 설비기능의 이상유무 2)보호장비의 관리상태	매년 1회	연구주체의 장
정밀안전진단		외관 육안점검 및 점검장비를 사용하여 연구실 내·외의 안전보건과 관련된 사항을 진단·평가	2년마다 1회	연구주체의 장

2. 2014년 추진 실적

- 점 검 명 : 2014년 전북대학교 연구실 정밀안전진단
- 점검기간 : 2014. 9. 22. ~ 10. 07.
- 점검기관 : 주식회사 선진기술
- 점검대상 : 공과대학 등 총 554개 실험실
- 점검내용 : 일반안전, 기계·전기안전, 산업위생 안전, 화공안전 및 소방안전
- 점검결과

구 분	1등급	2등급	3등급	4등급	5등급
실험실 수	118	360	76	0	0

3. 점검(진단) 결과에 따른 개선

- 가. 관리주체별로 다음과 같이 개선 시행

구 분	개 선 내 용	개선주체
시설·설비측면	가스누설경보기 설치 가스용기 전도방지장치 설치 흡후드 등 배기장치 보수 세안/샤워설비 설치 LP가스용기 옥외보관소 개선 등	대학본부
유지관리 측면	안전수칙 미게시, 소화기 위치표시 미비 일상점검 미 실시, 정리정돈 불량 등 구급용구 미비치, 가스용기 충전기한 경과 난방용 전열기 사용 안전보호구 관리 미흡 등	학장 해당 실험실

나. 2014년 대학본부 주요 개선사항

구분	사 업 명	개 요	금액(천원)
보수	실험실 가스누설경보기 설치	가연성 가스 누출경보기 설치 18개소	14,861
보수	실험실 포털 안전관리시스템 운영	안전관리 통합 시스템 도입 운영	16,000
보수	실험실 흡후드 설치 및 보수	흡후드 1대, 9대 보수	12,397
보수	가스 역화방지기 및 전도방지장치 설치	역화방지기 19, 전도방지장치 108	14,973
점검	가스누출감지경보기 검교정	총 134개소 검교정	18,490
점검	가스사용 실험실 정기안전점검	총 261개 실험실 점검	14,500
보수	밀폐형 환기식 시약장 구매	총 29대 구매설치	136,923
보수	노후 가스경보기 교체	총 19개소 노후교체	13,000
보수	실험실 긴급세척시설 설치	비상샤워기 6개, 비상세안기 19개소	15,530
보수	실험실 노후 전기시설 보수	총 25개 실험실 보수	15,000
보수	실험실 안전설비 설치	낙하방지대 및 방호장치 설치	16,720
			288,394

□ 보험가입 등

1. 가입내용

연구활동종사자의 상해·사망에 대비하여 연구활동종사자를 피보험자 및 수익자로 하는 보험에 가입하고 있음

2. 가입현황

- 공과대학 외 8개 기관, 총 13,545명(대학생 10,833명, 대학원생 등 2,712명)
- 가입기간 : 2014. 9. 16. ~ 2015. 9. 16.

3. 보장 내역 및 한도

구 분	지 급 사 유	보장한도
사 망	사망·질병 사망·치료 중 사망	1억원
후유장해	미래창조과학부장관이 최근 고시한 『연구실사고에 대한 보상기준』 이상 지급	1억원
부 상	미래창조과학부장관이 최근 고시한 『연구실사고에 대한 보상기준』 이상 지급	1천만원

4. 보장내역별 보상내용

- 1) 생명/상해/장해 보장 보험(공제)금

- 타 제도에 의한 보상과 관계없이 중복 보상
 - 부상이 원인이 되어 사고일로부터 1년 이내에 사망한 경우에도 보상
 - 부상이 원인이 되어 후유장애가 발생하여 장애보상을 받은 후에 사망한 경우에는 보장금액에서 후유장애로 인하여 지급한 보상금을 제외한 금액을 보상
- 2) 후유장애 보장
- 부상이 원인이 되어 신체장애가 발생한 때에 장애등급별로 보상
- 3) 의료비 보장
- 의료실비 보상
 - 국민건강보험에서 제외되는 본인 부담금 및 모든 비급여 보상
 - 아래 각호에 해당하는 경우에는 보상하지 아니한다.
 - 한약재 등 보신용 투약비용
 - 병실료 차액 (2등실 이상). 다만, 의사가 치료 상 인정하는 경우에는 예외로 함
 - 진료와 무관한 제비용(TV시청료, 전화료, 증명료 등) 및 상당한 사유가 없는 고단위 영양제 투여비용, 의사의 임상적 소견과 관련이 없는 검사비용
- 4) 지급제한
- 계약자나 피보험(공제)자의 고의, 다만 계약자가 피보험(공제)자의 교육·연구활동목적상 의도적인 활동으로 발생하는 손해는 보상
 - 피보험(공제)자의 자해, 자살, 자살미수, 형법상의 범죄행위 또는 폭력행위(다만 형법상 정당방위, 긴급피난 및 정당행위로 인정되는 경우에는 보상)
 - 피보험(공제)자의 질병. 다만 보장하는 손해가 원인이 되어 질병에 걸렸을 경우에는 보상
 - 피보험(공제)자의 임신, 출산(제왕절개 포함), 유산 또는 외과적 수술, 그 밖의 의료처치, 다만, 보장하는 손해로 인한 경우에는 보상

□ 안전교육 등

구 분	실시주체	실시시기	교육내용
집체교육	연구실 책임자	매월 1시간 이상	연구실 안전환경 법령에 관한 사항 연구실 내 유해·위험요인에 관한 사항
	대학본부	연 2회	
온라인 교육	대학본부	연 6회	안전분야별 총 23차시

□ 2015년 추가 이행 계획

구 분	내 용	세부내용
시설 및 설비개선	흡후드 등 환기시설 개선	노후 흡후드 교체 및 환기시설 개선 등
	가스누설경보기 등 설치	경보기 및 전도방지장치 등 설치
	비상세안기 설치	화학약품 취급시 긴급 대처 설비 설치
	긴급 샤워시설 설치	화학약품 취급시 긴급 대처 설비 설치
	밀폐시약장 설치	휘발성 화학약품 보관용
보호장비구매	안전보호장비 구매	보안면, 보안경, 방독면, 보호장갑 등 안전장비 구매
연구실 유해 폐기물 처리	폐수위탁처리	실험(연구)실 실험폐수 적법 위탁처리
	지정폐기물 처리	실험(연구)실 폐화학약품 등 유독물 적법 처리
안전장비 구매	실험폐수 수거용기 구매	실험폐수 수거용기(HDPE)재질 구매

제 9 장 참고문헌

* 보고서 작성 시 인용된 모든 참고문헌을 열거

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

- Baltes N, Hennig-Pauka I, Gerlach GF. 2002. Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. FEMS Microbiol Lett. 209:283-287.
- Bossé JT, Janson H, Sheehan BJ, Beddek AJ, Rycroft AN, Kroll JS, Langford PR, 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. Microbes Infect. 4:225-235.
- Chen X, Xu Z, Li L, Chen H, Zhou R. 2012. Identification of conserved surface proteins as novel antigenic vaccine candidates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J Microbiol. 50:978-986.
- Chiers K, De Waele T, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F. 2010. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. Vet Res. 41: 65.
- Fenwick B, Henry S. 1994. Porcine pleuropneumoniae. J Am Vet Med Assoc. 204:1334-1340.
- Haesebrouck F, Chiers K, Van Overbeke I, Ducatelle R, 1997. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. Vet Microbiol. 58:239-249.
- Haesebrouck F, Pasmans F, Chiers K, Maes D, Ducatelle R, Decostere A. 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? Vet Microbiol. 100:255-268.
- Hur J, Eo SK, Park SY, Choi Y, Lee JH. 2015. Immunological study of an attenuated *Salmonella* Typhimurium expressing ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA and OmpA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in a mouse model. J Vet Med Sci. <http://doi.org/10.1292/jvms.14-0428>
- Hur J, Lee JH. 2011. Enhancement of immune responses by an attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain secreting an *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protein as an adjuvant for a live *Salmonella* vaccine candidate. Clin Vaccine Immunol. 18(2):203-209.
- Hur J, Lee JH. 2014. Optimization of immune strategy for a construct of

- Salmonella*-delivered ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA and OmpA antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for prevention of porcine pleuropneumonia using a murine model. *Vet Res Commun.* 38:87–91.
- Jessing SG, Ahrens P, Inzana TJ, Angen Ø. 2008. The genetic organisation isolation of the capsule biosynthesis region of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 6, 7 and 12. *Vet Microbiol* 129:350–359.
- Jessing SG, Angen Ø, Inzana TJ. 2003. Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 41:4095–4100.
- Ramjeet M, Deslandes V, Goure J, Jacques M, 2008. *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines: from bacterins to new insights into vaccination strategies. *Anim Health Res Rev.* 9:25–45.
- Roche JK, Rojo AL, Costa LB, Smeltz R, Manque P, Woehlbier U, Bartelt L, Galen J, Buck G, Guerrant RL. 2013. Intranasal vaccination in mice with an attenuated *Salmonella enterica* Serovar 908htr A expressing Cp15 of *Cryptosporidium*: impact of malnutrition with preservation of cytokine secretion. *Vaccine.* 31:912–918.
- Seo KW, Kim SH, Park J, Son Y, Yoo HS, Lee KY, Jang YS. 2013. Nasal immunization with major epitope containing ApxIIA toxin fragment induces protective immunity against challenge infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in a murine model. *Vet Immunol Immunopathol.* 151:102–112.
- Shope RE. 1964. Porcine contagious pleuropneumoniae. I. Experimental transmission, etiology, and pathology. *J Exp Med.* 119:357–368.
- Sirard JC, Niedergang F, Kraehenbuhl JP. 1999. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunol Rev.* 171:5–26.
- Tumamao JQ, Bowles RE, van den Bosch H, Klaasen HL, Fenwick BW, Blackall PJ. 2004. An evaluation of the role of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 1 and 15 in the protection provided by sub-unit and live streptomycin-dependent pleuropneumonia vaccines. *Aust Vet J.* 82:773–780.
- Yang X, Thornburg T, Holderness K, Suo Z, Cao L, Lim T, Avci R, Pascual DW. 2011. Serum antibodies protect against intraperitoneal challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Biomed Biotechnol.* 2011:632396.
- Zhou Y, Li L, Chen Z, Yuan H, Chen H, Zhou R. 2013. Adhesion protein ApfA of

Actinobacillus pleuropneumoniae is required for pathogenesis and is a potential target for vaccine development. Clin Vaccine Immunol. 20:287-294.

주 의

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