

109026-3

첨단

유전공학기법을

이용한

안전하고

효과적인

가금티푸스

예방백신개발

농림수산식품부

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001358-01

첨단 유전공학기법을 이용한 안전하고 효과적인 가금티푸스 예방백신개발

(Development of safe and effective fowl typhoid
vaccine using high-tech genetic engineering)

전북대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “첨단 유전공학기법을 이용한 안전하고 효과적인 가금티푸스 예방백신개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 4 월 9 일

주관연구기관명 : 전북대학교

주관연구책임자 : 이 존 화

세부연구책임자 : 이 존 화

협동연구기관명 : (주)중앙백신연구소

협동연구책임자 : 유 성 식

요 약 문

I. 제 목

첨단 유전공학기법을 이용한 안전하고 효과적인 가금티푸스 예방백신개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

가금티푸스는 가금류에서 패혈증을 일으키는 전염병으로서 *Salmonella Gallinarum*를 원인체로 하고 병아리뿐만 아니라 성계에서도 급속도로 전염되고 폐사율이 높다. 1900년대 초기에 추백리(Pullorum disease)와 함께 높은 치사율을 동반한 전세계적인 발생으로 인해 발생한 각국의 양계 산업에 심각한 위협을 초래하였으며, 1950년대 미국과 영국을 비롯한 북미지역과 여러 유럽국가들에서 국가적인 차원에서 강력한 방역프로그램을 실시하여 성공적으로 근절하였고 이들 국가에서는 1980년대 이 후로 발생이 거의 보고되지 않고 있다. 그러나 아시아와 남미 등지에서는 지속적 발생으로 양계산업에 큰 경제적 손실을 초래하고 있다. 한국에서는 1992년에 공식적으로 발생이 보고되었고 1994년 이후 전국적으로 발병하여 현재까지 지속적으로 막대한 경제적 손실 유발하고 있다. 가금티푸스의 원인 균은 세포 내 기생세균으로 대식세포(macrophage) 내에서도 증식하기 때문에 항생제치료가 불가능하며, 가금티푸스 방어는 현재로서는 백신에 의존할 수밖에 없다.

현재까지 양한 생균 및 사균 백신이 판매되고 있지만, 실험실내 계대배양으로 lipopolisaccharide (LPS)의 O-specific chains에 변이가 생긴 semi-rough type 균주인 해외제품인 SG9R이 50여년 전 부터 널리 사용되고 있으며, 어느 정도 생균백신인 만큼 어느 정도 방어효과도 인정되고 있다. 그러나 smooth-rough (S-R) variation으로 만들어진 만큼 SG9R은 유전적 특성이 분명하지 않고 무엇보다 생체에 투여 시 병원성이 복귀될 가능성이 있으며, 부작용이 적지 않다는 지적을 받아온 역사가 있다. 이 SG9R의 단점 때문에 유전자의 인위적 결실로 변이균주를 제작하여 가금티푸스를 좀 더 안정적으로 안전하게 방어하려는 연구가 계속 이어져 왔지만 아직 아주 성공적으로 제작된 적은 없다. 이는 주로 가금티푸스의 원인균이 강독성이며 이를 약독화하기 위하여 어떤 생존필수 유전자를 결실시키면 약독화는 되지만 면역유도력도 함께 감소되기 때문인 것으로 생각할 수 있다.

이러한 가운데 본 연구에서는 병원균에서 숙주-미생물 상호작용에 관련되는 유전자, 또는 숙주내 침입과 증식에 관여된 유전자를 결실시켜 약독화와 면역원성 유지를 동시에 이루려고 하였다. 구체적으로 본 연구는 *lon* 및 *cpxR* 유전자를 *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* 에서 인위적으로 결실시켜서 가금티푸스 방어용 생백신을 제작하려고 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 유전자 결실로 백신후보균주의 제작

국내에서 분리된 가금티푸스 원인균인 *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* (JOL394)에서 lon 및 cpxR 유전자를 결실시켜, JOL914 (lon 결실), JOL915 (cpxR 결실), JOL916 (lon 및 cpxR 결실)의 3개 변이균주를 유전공학 기술에 의하여 제작하였다. 이는 PCR 법과 제한효소 절단 및 연결로 해당 유전자를 결실한 염기서열을 삽입한 자살백터 pMEG375 를 JOL394 등에 감염시켜 얻었다.

2. 영양요구성을 이용한 숙주체내 사멸백신 제작

가금티푸스 원인균의 병원성을 고려하여 또한 SG9R의 적용주령 하한(6-8 주령)을 극복하는 매우 안전한 생균백신을 제작하여 어린 병아리에서 그 실용성을 평가하였다. 본 균주들 (JOL969, JOL971)은 JOL394에서 asd 유전자를 결실시켜 asd 유전자 및 arabinose 의존성 promoter를 지닌 plasmid (두 가지 균주는 각각 p15A 또는 pBR 유래 origin을 지님)로 형질전환하여 얻었다. 따라서 본 균주들은 L-arabinose 존재하에서만 생존이 가능하며, 닭을 포함한 동물체내에서 생존할 수 없는, 이론적으로 가장 안전한 생균백신후보라 할 수 있다.

3. 유전자 결실의 효과 및 JOL916의 적합성 평가

JOL394, JOL914, JOL915, JOL916의 생물학적 및 생화학적 성상을 비교하였다. 또한 약독화 정도, 숙주체내 침입성, 병원성(임상소견, 병리소견, 내부장기 생균수)과 면역유도력을 평가하였다.

4. 백신후보균주 JOL916의 적용방법 탐색

JOL916의 적용형태로서 사균백신과 생균백신을 생산하여 접종하여 효능을 비교하였다. 또한, 접종경로로서 경구접종과 비경구접종을 비교하였다. 부작용, 면역반응, 도전 후 방어력을 관찰하였다.

5. 백신후보균주의 안전성 및 방어력 평가

백신접종 후 정기적으로 해부검사함으로 백신의 안전성을 병리소견과 미생물학적 검사를 근거로 평가하였다. 또한 백신접종 후 체중증가량과 임상소견도 관찰하여 평가 자료로 삼았다. 방어력은 면역반응 측정과 더불어 야외균주 도전실험으로 임상소견, 체중증가, 10-12일 후 해부검사에서 병리소견과 미생물학적 검사를 바탕으로 평가하였다. 실험마다 양성대조군, 음성대조군, 기존백신 접종군 등을 두고 비교하였다.

6. JOL969, JOL971를 포함한 균주를 이용한 어린 병아리 시험

0주령에서 4주령의 어린 병아리를 대상으로 백신후보균주를 접종하여, 안전성과 방어력을 관찰하였다. 여기서는 영양요구성 균주를 사용하여 그 실용화 가능성을 모색하였다.

7. 시험백신 제조 및 일반 시험과 안전성, 안정성 시험

백신제품 생산시설(제2세부과제, 중앙백신 연구소)에서 “시험백신”을 제조하여 일반검사와 안전성 검사 등 허가를 받기 위하여 필수적인 항목을 포함하여 백신균주로서 기본적인 성질을 검사하였다.

8. 시험백신의 효능 평가

시험백신의 면역원성과 야외균주 도전에 대한 방어력을 기존제품과 비교 평가하였다. 시험백신 JOL916, PoulShot SG9R (39SG9R01), Nobilis SG9R의 3종을 접종하여 효능을 접종-도전 후 생존율 및 면역원성을 관찰함으로써 비교하였다. 면역원성 시험은 SG9R 항원을 이용한 microplate agglutination test를 실시하였다.

9. 시험백신으로 야외시험농장에서 장기적 시험

시험농장에서 병아리부터 산란기에 이르는 40주간의 장기적 접종-공격 시험을 실시하였다. 여기서는 성장률 및 폐사수를 기초로 한 안전성 평가, 계란생산성 평가, 계란오염 검사, 2차 접종 시기 검토를 실시하였다.

10. 생균형 면역강화균주 제작

SG9R를 비롯해 가금티푸스 백신은 경구접종의 경우 비경구접종보다 방어력이 상당히 저하된다는 사실이 점점 지적되지만, JOL916의 경우도 이와 동일한 경향을 나타내었다. 여기서는 간편하게 경구접종이 가능하도록 JOL916을 더욱 발전적으로 변이시킨 균주를 제작하였다. 이는 Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC)의 heat-labile toxin subunit B (LTB)를 지속적으로 생산하여 세포외부로 분비하는 약독화 Salmonella Gallinarum 이며, LTB의 작용으로 점막면역이 활성화되고 경구접종에 유리할 뿐만 아니라 면역강화 adjuvant효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 얻은 균주는 JOL1229로 명명되었다.

11. 면역강화균주 (JOL1229)의 접종조건 모색

JOL1229의 접종량을 JOL916과의 혼합비율, 1차 접종 및 2차 접종시 혼합 조건, 총접종량 결정을 6주령 병아리 및 1주령 병아리에서 검토하였다. 최적화를 위하여 안전성, 면역반응, 도전감염 방어 효과를 관찰하였다.

12. JOL1229를 이용한 백신의 장기적 시험

백신접종 후 임상증상, 체중증가, 면역유지, 산란율, 백신균주로 인한 계란오염을 관찰

하였다.

IV. 연구개발결과

1. 유전자 결실로 백신후보균주의 제작

성공적으로 결실균주를 선택하였으며, 결실여부는 간단하게 PCR로 확인가능하기 때문에, 본 백신균주 사용 시 야외균주나 기타 백신 균주와 간편하게 구별할 수 있다.

2. 영양요구성을 이용한 숙주체내 사멸백신 제작

성공적으로 제작하였다.

3. 유전자 결실의 효과 및 JOL916의 적합성 평가

lon 유전자 결실은 mucoidal character 형성, fimbriae 증가, 대식세포 침입성 향상, 약간의 약독화와 관련이 있었으며, cpxR 유전자 결실은 fimbriae 증가, 약간의 약독화와 관련이 있었다. 두 유전자를 동시에 결실시킨 경우 대식세포 침입성이 야외균주보다 약간 상승하였으며, mucoidal character를 보이기 쉽고, fimbriae도 증가하였었다. JOL916는 충분한 약독화와 우수한 침입성 및 소수의 세균에 의한 숙주세포내 장기간 생존이라는 특성을 지니고 있었다. 이는 JOL394, JOL914, JOL915에 비교하여 우수한 면역반응을 나타낸 결과와 맥락이 일치된다.

4. 백신후보균주 JOL916의 적용방법 탐색

JOL916은 생균으로 접종하는 경우에 방어력이 우수하고, 경구접종 보다 근육접종 또는 피하접종과 같은 parenteral route에서 방어력이 우수함을 확인하였으며, 경구접종이라도 충분한 방어를 나타낸 것으로 접종의 편이성 때문에 경구접종의 가능성도 동시에 연구할 필요가 있다고 판단되었다.

또한 건강상태가 불량한 개체에서 폐사 등의 부작용이 나타날 수 있음을 일부 실험에서 관찰하였기 때문에, 방어력을 더욱 향상시킴으로 접종량을 줄이는 등의 방법으로 부작용을 줄이는 개발노력이 필요하다고 생각하였다.

5. 백신후보균주의 안전성 및 방어력 평가

백신접종 후 건강한 닭에서 임상증상이 나타나지 않다. 한편 육안적으로 변별 가능한 병리소견은 나타나지만 매우 경미한 수준이다. 면역반응이 경미한 수준의 조직변화로 나타난 것으로 생각된다. 백신후보균주는 접종 직 후 간장보다 주로 비장에 침입이 잘 되고 생존하지만 2주째부터 상당수가 살아지고 생존하고 있더라도 매우 적은 수에 불과하다.

JOL916 백신후보 균주를 2×10^6 CFU/bird 씩 근육접종 함으로 효과적으로 방어면역을

유도하고 야외균주 도전을 거의 완벽하게 방어하였다. 야외균주 접종 후 급성기(4-7 일 후)에 약간의 증상이 나타날 수 있으나 얼마 안 되어서 일반건강상태와 체중증가가 회복됨을 관찰하였다. 사후 부검 및 미생물검사에서도 백신후보균주의 2×10^6 CFU의 근육접종이 도전감염에서 병아리를 방어하였음을 볼 수 있었다.

SG9R과 비교한 결과 본 백신후보균주는 SG9R와 안전성이 비슷하지만 방어력에 있어 우수함을 야외균주 접종 후 병리소견 및 세균분리시험 성적에서 알 수 있었다.

6. 영양요구성 균주를 포함한 균주를 이용한 어린 병아리 시험

0주령에 백신접종 하여도 효과가 없으며, JOL971는 어린 병아리에서 독성이 없지만 효과도 없어 생균을 그대로 경구접종하는 현 상태로서 실용성이 없음을 알 수 있었다. 또한, JOL916은 1주령에 2×10^7 CFU를 경구접종함으로 방어효과를 기대할 수 있음을 알 수 있었으며, 이런 경우 약간의 병리소견이 나타났으나 성장억제, 임상소견, 백신 후 부검에 있어 부작용이 관찰되지 않았다. JOL916을 경구적으로 접종함에 있어서는 병아리의 주령에 따라 접종량을 가감하여야 하며, 1주령은 2×10^7 CFU를, 2주령은 2×10^8 CFU를, 3주령이상은 2×10^8 CFU이상을 접종하여야 방어력을 기대할 수 있을 것으로 판단되었다. 그러나 접종량을 높이면 부작용이 나타나기 쉬우므로, 어린 병아리와 경구접종까지 시야에 둔 더욱 안전성이 높은 균주를 발전적으로 개발해나가야 할 것으로 생각한다.

7. 시험백신 제조 및 일반 시험과 안전성, 안정성 시험

성공적으로 제조되었으며, 허가를 받는 데 적합한 시험결과를 얻었다. 향후 효능시험의 기초 데이터가 되었다.

8. 시험백신의 효능 평가

시험백신 JOL916, PoulShot SG9R (39SG9R01), Nobilis SG9R의 3종을 접종하여 3주후에 공격 접종한 결과, 모두 만족할 만한 결과를 얻었다. SG9R 항원을 이용한 검사에서 JOL916은 비슷한 면역원성을 나타내었다.

9. 시험백신으로 야외시험농장에서 장기적 시험

백신접종 후 임상증상과 증체곡선, 폐사수, 산란율을 근거로 아무 부작용이 나타나지 않았다. 난각은 백신균주로 오염되지 않았다. 도전 야외균주로 인한 계란 오염(난각)은 나타나지 않았다. 7주령에 1차 접종 후 16주령경부터 항체가가 감소하기 시작하였기 때문에 19주령에 2차접종을 실시하였으며, 20주령에 항체가가 상당히 감소한 후에 다시 상승하여 32주령에는 20주령 수준으로 감소하였다.

10. 생균형 면역강화균주 제작

성공적으로 제작되었다 (JOL1229).

11. 면역강화균주 (JOL1229)의 접종조건 모색

1주령 산란계 병아리에서 백신균주 JOL916과 면역강화균주 JOL1229를 4:1의 비율로 혼합하여, 총량 1×10^7 cfu을 경구적으로 접종하면 최상의 효과를 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 또한 이어서 6주령에 2차 접종을 실시하는 경우 2차 접종에서는 JOL1229를 혼합하지 않고 JOL916만 접종하는 것이 면역 유도 성적이 우수하다. 이러한 접종 program은 부작용이 없고 방어력도 우수하였다.

6주령 산란계 병아리에 접종하는 경우 백신균주 JOL916과 면역강화균주 JOL1229를 4:1의 비율로 혼합하여 총량 1×10^8 cfu을 경구적으로 접종하면 된다. 이어서 16주령에 2차 접종을 실시하는 경우 동일한 비율과 생균수로 JOL916에 JOL1229를 혼합하여 접종하는 것이 면역 유도 및 유지에 있어 성적이 우수하다.

12. JOL1229를 이용한 백신의 장기적 시험

본 실험은 실제 농장에 적용할 수 있게 하기 위해 실시한 장기 임상 실험으로서 6주령과 16주령에 백신접종을 2회 실시하여 산란개시 후 4주째까지 실험을 진행하였으며, 면역반응 측정과 백신 접종 후 임상증상 관찰 및 체중을 측정하였다. 또한 실제 농장에서 중요시되는 산란을 평가와 함께 공중보건학적으로 중요하게 여겨지는 백신 균주의 계란 오염 검사를 실시하여 산란시기까지의 JOL1229 백신 접종에 안전성을 평가 하였다. 6주령과 16주령에 각각 백신균주 JOL916에 면역강화균주 JOL1229를 혼합하여 경구 접종한 군에서 JOL916 단독 또는 SG9R을 접종한 군보다 우수한 세포성 면역 반응 및 점막면역 반응을 나타내었다. 또한 모든 개체가 산란을 시작한 후 산란율은 모든 실험군에서 대조군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았으며, 산란 개시 후 4주동안 JOL1229 균주의 계란 오염 검사에서는 모두 음성을 나타내었다. 따라서 본 JOL1229와 JOL916의 혼합물은 경구용 가금티푸스로 안전하고 효과적으로 사용할 수 있는 백신 후보임을 알 수 있다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 본 연구에서 제작된 JOL916은 SG9R과 비교하여 산란계에 있어서 안전성은 비슷하지만 방어력에 있어 우수함을 나타내었으며, 유전적 배경이 불분명하여 독성복귀가 일어날 수 있는 돌연변이균주보다 JOL916이 특정한 두 유전자의 완전결실로 제작되어 유전학적으로 안정되어 있다는 장점을 감안하면 JOL916은 상당한 가치가 있다. 향후 실용화를 준비한다.

2. JOL969 및 JOL971은 방어력이 완전하지 않지만 그 유전적 특성상 생균백신으로서 가장 안

전한 system을 지니고 있어, 더욱 안전한 백신균주를 필요로 하는 경우에 적용이 가능하다.

3. JOL1229는 1주령 또는 6주령부터 경구적으로 적용이 가능하며, SG9R이나 JOL916에서 경구 접종 시 근육접종보다 조금 방어력이 감소되기 때문에 생기는 접종법의 한계를 극복할 수 있는 생균백신균주이다. 경구접종의 방법은 음수 혼합 등을 생각할 수 있으며, 백신 형태나 접종 방법은 따로 연구 할 필요가 있다.

SUMMARY

I. Title

Development of safe and effective fowl typhoid vaccine using high-tech genetic engineering

II. Purpose and Necessity of This Study

Fowl typhoid (FT) is an acute disease causing septicemia in poultry; it is caused by *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* biovar *Gallinarum* (SG). Even though the causative agent has adapted to its avian host and rarely induces food poisoning in humans, vigilant control of the poultry industry has been instituted worldwide to prevent economic losses due to FT outbreaks. In Australia and most European and North American countries, FT has almost disappeared as a result of improved surveillance and slaughter practices, including an effective control policy such as the National Poultry Improvement Plan of the United States. In Korea, after the first case of FT in the field in 1992, it has easily spread throughout the country because most of the layer population consisted of brown layers, which are more susceptible to FT. After experiencing severe damage from the disease, Korea decided to introduce a nationwide vaccination program with a live attenuated strain (SG 9R) for commercial layer chickens in 2001 instead of an eradication policy to minimize the economic loss from the FT. Vaccination is the only way to control FT, caused by an intra-cellular micro-organism at this moment together with test and slaughter strategy.

The 9R vaccine strain developed in the 1950s has a semi-rough lipopolysaccharide structure, but the nature of its attenuation is not known (Gordon and Luke, 1959; Silva et al., 1981). Although highly attenuated compared with its parental strain *Salmonella Gallinarum* 9, the 9R vaccine strain may still result in systemic disease with liver and spleen pathology and bacterial persistence for several weeks in these organs in young chickens. Because of the known pathogenicity and imperfect protection, alternative vaccine strategies including a number of live vaccine candidates have been investigated during the last two decades. In contrast to the genetically undefined 9R strain, genetically defined mutant strains of genes encoding metabolic pathways have been studied, and a degree of attenuation of virulence and protection against FT has been reported, although none of the new mutant was demonstrated better than SG9R. The difficulty to develop a new safety and efficient vaccine candidate is likely to be related to relatively unknown pathogenic

mechanism of the etiological agent compared to other serotypes of *Salmonella enterica*.

In this study genes that are included in the host-pathogen relationship or in invasion and proliferation in the host cells were deleted for better performance of attenuation and immunogenicity at the same time. We deleted *lon* and *cpxR* genes from the genomic DNA of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum wild isolate to construct a potent vaccine candidate for protection of Fowl Typhoid.

III. Contents of this study

1. Construction of a vaccine candidate by deletion of genes

Lon and/or *cpxR* genes were deleted from the chromosomal DNA from a domestic wild isolate of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum (JOL394) to obtain JOL914(Δlon), JOL915($\Delta cpxR$) and JOL916($\Delta lon\Delta cpxR$). The wild-type SG JOL394 chromosomal DNA was used as a template when the left and right arms of the *lon* and *cpxR* genes were amplified by the polymerase chain reactions (PCR). Construction of deletion mutants was performed by the allelic exchange method using the suicide vector pMEG-375.

2. Construction of auxotrophic mutant as vaccine candidates that are lethal in hosts

As *Salmonella Gallinarum* strains are usually, at least, pathogenic including attenuated mutants such as SG9R, young chickens under 6-8 week of ages cannot be vaccinated with live vaccine strains. To construct one of the most safe live vaccine candidate, conditional lethal strains with arabinose-dependent promoter systems with origins of p15A or pBR were constructed and named JOL969 and JOL971. These candidates grow only in the environment that contains L-arabinoes but cannot grow in animal hosts including chickens.

3. Effect of gene deletion and suitability of JOL916 as a candidate

Biological and biochemical characteristics of JOL394, JOL914, JOL915, and JOL916 were compared. Attenuation of the virulence, invasion in host, pathogenicity (clinical sign, gross lesion, bacterial recovery from internal organs), and immunogenicity were examined and compared.

4. Determination of application condition of JOL916

Killed vaccine and live vaccine were prepared for experimental vaccination to compare efficacy of the candidate. Oral and parenteral routes of inoculation were performed

and the efficacy was compared. Side-effect, immune-response, protection after challenge inoculation were observed for the comparison.

5. Safety and protection efficacy of JOL916 as a vaccine candidate

For safety evaluation, weekly autopsy after vaccination was performed to monitor gross lesion and bacterial recovery. Body weight increase and clinical signs were also observed. For protection evaluation, immune-responses were observed with post-challenge observation of clinical sign, bodyweight increase, gross lesion and bacterial recovery on the 10-12st day post challenges. For comparative evaluation, vaccinated group was compared to positive control and/or negative control groups.

6. Vaccination possibility in younf chicks with candidates including JOL969 and JOL971

Chicks from 0 to 4 week of age were tested for vaccine-challenge experiments. Safety and protection efficacy were evaluated. Auxotrophic strains were included.

7. Production of trial vaccine products and general and safety assay

In the manufactural equipment for vaccine products (CAVR), trial products were produced. Officially required tests for permission and numerous tests necessarily for practical use were performed.

8. Efficacy of the trial vaccine

Immunogenicity and protection against wild type challenge inoculation offered by trial vaccine products were monitored. Three vaccines including JOL916, PoulShot SG9R (39SG9R01), and Nobilis SG9R were compared for immunogenicity after vaccination and mortality after challenge inoculation.

9. Long term experiment with the trial vaccine in a farm

In a experimental farm, hens were kept over 40 weeks for long term vaccine-challenge experiment. Safety evaluation based on body weight, mortality, egg production rate, and egg contamination test was performed. Long term monitoring of reciprocal titer was conducted.

10. Construction of live adjuvant strain

Live fowl typhoid vaccines have been pointed out of their considerably lower protection rate after oral inoculation of the vaccine including SG9R and JOL916. A mutant

of Salmonella Gallinarum that secretes LTb, heat-labile toxin subunit B (LTb) of Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) was constructed for better protection after vaccination via the oral route. The strain was named JOL1229.

11. Application condition of JOL1229

For 6 and 1 week of age of hens, mix ratio of JOL1229 with JOL916, mix ratio at the primary and booster vaccination, and appropriate doses were determined. Safety, immunogenicity, and protection after challenge were monitored.

12. Long term experiment of JOL1229

Clinical sign, body weight increase, egg production rate, and egg contamination with vaccine strain, were observed.

IV. Result and conclusions

1. Construction of a vaccine candidate by deletion of genes

Gene-deleted mutants were successfully constructed and the deletions are confirmed by PCR; JOL916 vaccine is differentiated from wild type strains.

2. Construction of auxotrophic mutant as vaccine candidates that are lethal in hosts

Successfully constructed.

3. Effect of gene deletion and suitability of JOL916 as a candidate

Deletion of lon resulted in mucoidal character and increase of fimbriae, increased invasiveness, and a little attenuation. Deletion of cpxR resulted in increase of fimbriae and a little attenuation of pathogenicity. Deletion of both genes resulted in increased invasiveness in phagocytes, mucoidal character, and increase of fimbriae. JOL916 was attenuated enough and better invasiveness in macrophage and longer duration of survival of the strain without significant pathogenicity. JOL916 appeared to be a potent candidate for a vaccine strain compared to JOL394, JOL914, or JOL915.

4. Determination of application condition of JOL916

Killed vaccine and live vaccine were prepared for experimental vaccination to compare efficacy of the candidate. Oral and parenteral routes of inoculation were performed

and the efficacy was compared. Side-effect, immune-response, protection after challenge inoculation were observed for the comparison. Live vaccination with JOL916 offered better protection compared to formalin-killed bacteria. Vaccination with JOL916 via the parenteral route offered better protection compared to the vaccination via the oral route. However, as vaccination with live cells via the oral route also offered reasonable protection, further research for oral application should be continued in the future.

Moderate to severe side effect including death was also observed in diseased or non healthy chickens in some experiment. Elevation of protection efficiency will be connected to reduction of vaccination dose, therefore, safety; continuous effort for development of safety vaccine candidate is required.

5. Safety and protection efficacy of JOL916 as a vaccine candidate

After vaccination no detectable clinical signs are found in healthy chickens. Detectable level of slight gross lesions are found or not found on the livers and spleens of vaccinated chickens, although the lesions are not likely to be related to side effect but likely to be included in immune responses. Vaccine candidate JOL916 invaded and proliferated at high efficiency to the spleen rather than the liver, diminish after the second week post vaccination; the number of recovered bacteriae from the internal organs were neglectable after that.

Vaccination with 2×10^6 cfu per chicken via the parenteral route (intra muscular) induced significant levels of antigen specific immune responses and offered perfect protection against wild type challenge. Only a part of the vaccinated chickens showed slight and temporal clinical signs as an acute response (4th to 7th day post challenge) and demonstrated rapid recovery of general condition and body weight increase. Postmortem examination also demonstrated considerable protection offered by vaccination with 2×10^6 cfu per chicken via the intramuscular route.

Vaccine candidate JOL916 showed similar result compared to SG9R in the safety assay when inoculated with 2×10^6 cfu per chicken via the intramuscular route. However, better protection was offered by JOL916 based on the postmortem examination result such as gross lesion score and bacterial recovery.

6. Vaccination possibility in young chicks with candidates including JOL969 and JOL971

No live vaccine strain tested offered protection when vaccinated on the first day of birth. An auxotrophic strain JOL971 (high copy ori) did not offer reasonable protection even though it was safe after oral inoculation of live vaccine. Instead, oral inoculation of

chicken with 2×10^7 cfu of JOL916 via the oral route showed a good efficacy; no significant side effect such as reduced bodyweight increase, clinical sign, or significant gross lesions. For oral inoculation of young chicks with JOL916, required doses for reasonable protection were 2×10^7 cfu for the first week of age, 2×10^8 cfu for the second week of age, and more than 2×10^8 cfu for over the age. However, elevated dose is often related to side effect; safety vaccine strain should be developed for better application for young chicken via the oral route.

7. Production of trial vaccine products and general and safety assay

Trial vaccine strain was successfully produced and submitted to general laboratory test and safety test.

8. Efficacy of the trial vaccine

Immunogenicity and protection against wild type challenge inoculation offered by trial vaccine products were monitored. Three vaccines including JOL916, PoulShot SG9R (39SG9R01), and Nobilis SG9R demonstrated reasonable immunogenicity even though SG9R antigen was used for the immunological test.

9. Long term experiment with the trial vaccine in a farm

No clinical sign was detected; bodyweight increase, death rate, egg production rate were maintained at the level of normal and health model flock. Egg shell was not contaminated with the vaccine strain (JOL916). When the prime vaccination was performed on the 7 week of age, the reciprocal titer demonstrated to decrease since the 16 week of age. Therefore, the booster was inoculated on the 19 week of age that resulted in the elevation of the titer until 32 week of age, after the minimum level at 20 week of age.

10. Construction of live adjuvant strain

Successfully constructed and named JOL1229.

11. Application condition of JOL1229

For oral application of JOL1229 in a week age of chicken, JOL916 and JOL1229 should be mixed at rate of 4:1 on the basis of cell number, at a total cell number of 1×10^7 cfu; this condition offers the best immune response and protection. However, for booster inoculation at 6 week of age via the oral route, JOL1229 should not be mixed; inoculation with only JOL916 offers better protection. This prime-booster vaccine program

is safe and offer good protection.

For oral inoculation at both 6 week of age prime vaccination and booster at 16 week of age, 1×10^8 cfu of mixture at 4:1 for JOL916 and JOL1229 can be applied. This prime-booster vaccine program is also safe and offer good protection.

12. Long term experiment of JOL1229

Clinical sign, bodyweight increase, egg production rate, and egg contamination with vaccine strain, and immune responses were observed during and after prime vaccination at 6 week of age and booster at 16 week of age. Mixed vaccination of JOL916 and JOL1229 (totally 1×10^8 cfu, via the oral route) showed better cellular and mucosal immune responses compared to other vaccinated groups with JOL916 or SG9R. No significant differences were observed in egg production rates between all vaccinated (JOL1229+JOL916, JOL916, SG9R) and unvaccinated control group. No contamination with vaccine strains were observed in egg contents for 4 weeks after egg production after vaccination. The mixture of JOL1229 and JOL916 is suitable for oral vaccination. This mixture is a potent vaccine candidate for oral application to chickens.

V. Product of this study and possible application in the future

1. The vaccine candidate JOL916 showed similar safety compared to the known product SG9R. However, as JOL916 offered better protection compared to SG9R. JOL916 also has a value compared to SG9R, that the mutated genes are clearly known and the mutation are more steadily maintained than SG9R or other mutants that are obtained through methods including passages. JOL916 is suitable for wide use in the poultry industry.

2. JOL969 and JOL971, auxotrophic strains were not perfect in protection but theoretically one of the best in safety. Under some epidemiological condition, these vaccine strains may be one of the choices.

3. JOL1229 is suitable for effective oral vaccination at 1 week or 6 week of age as an appropriate mixture with JOL916. As JOL916 and SG9R offer best protection after vaccination via the parenteral routes, the value of JOL1229 is found in the oral route that offer good protection.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Application	1
Summary in Korean	2
Summary in English	9
Contents in English	16
Contents in Korean	18
Chapter 1. Introduction	20
1. Purpose of research	20
2. Necessity of research	20
3. Contents of research	22
Chapter 2. Present state of the technical development	24
1. International stage of the technical development	24
2. Technical level of the research team	26
Chapter 3. Contents of research and result	27
1. Annual plan of research	27
1) The first year	27
2) The second year	29
3) The third year	31
2. Methods and result	34

1) Deletion of pathogenicity-related genes -----	34
2) Construction of auxotrophic mutants -----	42
3) Assesment of gene-deleted mutants as vaccine strains -----	47
4) Preliminary experiments for vaccine-challenge experiments -----	56
5) Development of vaccination condition with JOL916 -----	61
6) Assesment of safety and protection efficacy of JOL916 -----	79
7) Comparative study between JOL916 and SG9R -----	87
8) Vaccination condition of JOL916 in young chicks -----	92
9) Production of trial vaccine -----	97
10) Protection efficacy of trial vaccine product -----	100
11) Immunogenicity of trial vaccine product -----	103
12) Evaluation of safety in a farm -----	104
13) Construction of LTB excretion strain -----	113
14) Contents of JOL1229 for vaccination in young chicks -----	117
15) Vaccine program with JOL1229 in young chicks -----	125
16) Contents of JOL1229 for vaccination in young-adult chicks -----	132
17) Vaccine program with JOL1229 in young-adult chicks -----	141
18) Long term safety assesment of vaccine program with JOL1229-----	148
 Chapter 4. Contribution to related field -----	 154
 Chapter 5. Achievement and plan for practical use -----	 156
 Chapter 6. Scientific information obtained -----	 159
 Chapter 7. Reference -----	 160

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	20
	제 1 절 연구개발의 목적 -----	20
	제 2 절 연구개발의 필요성 -----	20
	제 3 절 연구개발의 범위 -----	22
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	24
	제 1 절 국내외 기술개발 현황 -----	24
	제 2 절 본 연구팀의 선행기술 수준 -----	26
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	27
	제 1 절 연차별 세부과제별 연구개발의 목표 및 개요 -----	27
	1. 1차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 -----	27
	2. 2차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 -----	29
	3. 3차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 -----	31
	제 2 절 연구개발 수행방법 및 결과 -----	34
	1. 병원성 관련 유전자 결실균주 작성 -----	34
	2. 영양요구성 변이균주 작성 -----	42
	3. 변이균주의 백신후보균주로서 가능성 시험 -----	47
	4. 백신-도전 실험을 위한 예비실험 -----	56
	5. 백신후보균주 JOL916의 접종형태 및 경로 모색 실험 -----	61
	6. 백신후보균주 JOL916의 안전성 및 방어력 평가 실험 -----	79
	7. 백신후보균주 JOL916와 SG9R균주의 비교 실험 -----	87

8. 어린 병아리에서 JOL916의 접종 조건 탐색 -----	92
9. 시험백신의 생산 및 일반, 안전 시험 -----	97
10. 시험 백신 효능성 평가 -----	100
11. 시험백신의 면역원성 시험 -----	103
12. 야외농장에서의 안전시험 -----	104
13. 면역증강 LTB 균주 JOL1229 제작 -----	113
14. 1주령 병아리에서 JOL1229의 혼합비율 결정 및 안전성 평가 -----	117
15. 1주령 병아리에서 JOL1229를 이용한 백신 program시험 -----	125
16. 6주령 산란계에서 JOL1229의 혼합비율 결정 및 안전성 평가 -----	132
17. 6주령 산란계에서 JOL1229를 이용한 백신 program 실험 -----	141
18. JOL1229를 이용한 백신의 장기적 실험 -----	148
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	154
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	156
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	159
제 7 장 참고문헌 -----	160

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구의 최종목표는 경제적 타격이 큰 가금티푸스에 대한 예방백신을 유전공학기법을 이용하여 안전성과 방어력이 우수하고 안정된 생물형을 가진 국산 백신을 개발하는 데 있다. 이로써 기존 백신의 부작용문제, 낮은 방어력문제 및 생물학적 불안정성문제를 극복하는 국산 백신균주를 개발 및 확보하여 국내외에 공급하려고 하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 가금티푸스의 중요성

가금티푸스는 가금류에서 패혈증을 일으키는 전염병으로서 *Salmonella Gallinarum*를 원인체로 하고 병아리뿐만 아니라 성계에서도 급속도로 전염되고 폐사율이 높다. 1900년대 초기에 추백리(Pullorum disease)와 함께 높은 치사율을 동반한 전세계적인 발생으로 인해 발생한 각국의 양계 산업에 심각한 위협을 초래하였으며, 1950년대 미국과 영국을 비롯한 북미지역과 여러 유럽국가들에서 국가적인 차원에서 강력한 방역프로그램을 실시하여 성공적으로 근절하였고 이들 국가에서는 1980년대 이 후로 발생이 거의 보고되지 않고 있다. 그러나 아시아와 남미 등지에서는 지속적 발생으로 양계산업에 큰 경제적 손실을 초래하고 있다. 한국에서는 1992년에 공식적으로 발생이 보고되었고 1994년 이후 전국적으로 발병하여 현재까지 지속적으로 막대한 경제적 손실 유발하고 있다. 가금티푸스의 원인 균은 세포 내 기생세균으로 대식세포(macrophage) 내에서도 증식하기 때문에 항생제치료가 불가능하며, 가금티푸스 방어는 현재로서는 백신에 의존할 수밖에 없다.

2. 가금티푸스 백신시장 현황

통계청 자료에 의하면 2008년 4/4기 양계가구수는 종계가 241가구(7.5%), 산란계가 1,711가구(53.5%), 육계가 1,255가구(39.3%)의 총3,196가구이며, 사육마리수로 종계 6,136,533마리(5.1%), 산란계 59,167,945마리(49.4%), 육계 54,479,465마리(45.5%)로 총 119,783,973마리에 이른다. 산란계를 대상으로 2번씩 백신접종하는 것으로 사려되고 이들 대상 동물에 대하여 국내에서 판매하는 다음 표와 같은 다양한 사균 및 생균백신이 판매되고 있다. 실체는 방어효과가 있는 생균백신이 대부분이 이용되고 있으며 가금티푸스 백신의 연간매출액은 모두 30에서 40억원 정도다 (한국동물약품협회). 특히 최근에 들어 C사, D사에서 새로 생균백신 SG9R시장에 참여하게 되어 있어 앞으로 A, C, D사의 생균백신간의 시장경쟁이 시작할 것으로 보인다 (표 1). 해외에서도 Nobilis SG9R (Intervet 사)이 사균백신을 제외하고는 유일한 유통제품이며 그

밖에 *S. Enteritidis*에 대한 백신(AviPro SALMONELLA VAC E, Intervet 사)을 *S. Gallinarum* 예방백신겸용으로 추천 및 판매하고 있다.

표 1. 국내 가금티푸스 백신제품 현황

제품명	판매원	분류	시장규모
가금 티푸스 생균 건조 백신	A사	생균	연간 판매액 30-40억원
닭티푸스 불활화백신		사균	
닭티푸스 불활화오일백신		사균	
닭 티푸스오일백신	B사	사균	
닭ND.티푸스 불활화혼합겔백신		사균혼합	
포울샷 티푸스 겔	C사	사균	
포울샷 티푸스 오일백신		사균	
포울샷 S/9R		생균	
노빌리스SG9R	D사	생균	

이처럼 다양한 생균 및 사균 백신이 판매되고 있으며, 현재까지 실험실내 계대배양으로 lipopolisaccharide (LPS)의 O-specific chains에 변이가 생긴 rough type 균주인 해외 I 사의 SG9R을 비롯하여 생균 및 사균 백신들이 사용되고 있으며, 이중 생균백신은 어느 정도 방어효과도 인정되고 있다. 국내에서도 실질적으로 SG9R을 공급하고 있다. 그러나 smooth-rough (S-R) variation으로 만들어진 만큼 SG9R은 유전적 특성이 분명하지 않고 무엇보다 생체에 투여 시 병원성이 복귀될 가능성이 있으며, 부작용이 적지 않다는 지적을 받아온 역사가 있다.

3. 본 연구팀의 전략

본 연구는 *lon* 및 *cpxR* 유전자를 *Salmonella Gallinarum* 에서 인위적으로 결실시켜서 가금티푸스 방어용 생백신을 제작하려고 하였다. 본 생백신균주가 SG9R과 차별화되는 기본 원리는 다음과 같다. 먼저 Lon은 ATP-dependent protease의 하나로서 *Salmonella enterica*의 숙주 감염기전을 조절하는 protease이다. Lon은 먼저 감염초기 장점막세포 침입에 관여하는 유전자군 SPI1 (salmonella pathogenicity islands)에 대하여 invasion genes의 발현을 억제하는 효과를 가지고 있다. 이어서 type III secretion system을 자극시켜 macrophage 내 생존 및 증식을 통해 결국 systemic infection과 organ colonization에 이르게 하는 감염단계에 관여하는 유전자군 SPI2에 대하여는 이를 촉진하는 효과를 가지고 있다는 연구결과가 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium)에서 in vitro 및 in vivo (mice)에서 보고되어 있다 (Takaya *et al.* Infection and Immunity, 2003). *Salmonella enterica* serovar Gallinarum (*Salmonella* Gallinarum)에 대하여 본 유전자의 역할이 보고된 것이 없으나 *lon* 유전자를 결손시킴으로 invasion은 야외균주보다 잘되지만 체내에서 생존 증식하는 능력이 약화

되어 면역형성 및 안전성에 있어 이상적인 생백신 균주를 얻을 수 있을 것이다. 또한 CpxA/CpxR은 세균들의 자율신경과 같은 역할을 하는데, 외부환경변화를 감지하고 반응하는데 생물계에 널리 존재하는 것으로 알려져 있는 two-component regulator system이며 그람 음성세균의 병원성에 관여하는 것으로 생각되고 있다. 각각의 역할을 보면 CpxA가 sensor이며, cpxR이 activator이다. CpxR이 인산화(활성화)되면 envelope stress response system, pilus assembly, type III secretion, motility, chemotaxis, adherence, biofilm development 등 광범위한 반응을 조절하는데 관여한다. *Salmonella Typhimurium*에서 *cpxA*가 결손된 경우 macrophage에 대한 부착능력이 약화되지만 *cpxR*의 결손은 그렇지 않고, *cpxA*나 *cpxR*이 결손되도 macrophage내 생존 증식에는 영향이 없는 것으로 보고되어 있으며, *cpxR*이 결손되어도 mice에서 감염시 체내분포에 영향이 없는 것으로 보고가 있다 (Sue Humphreys *et al.*, *Infection and Immunity*, 2004). 따라서 *cpxR* 결손은 병원성에 영향을 주지만 면역형성을 저해하지 않은 것으로 기대된다.

또한 인위적으로 한가지의 유전자를 결실시켜 작성된 균주가 다시 완전히 회복되는 확률은 매우 적지만 결실된 두 가지의 유전자가 모두 완전히 회복되어 그 기능을 발휘할 수 있는 가능성은 거의 기대할 수 없어 공장에서 제조 및 공급되는 생백신으로서 유전적 안정성이 S-R variation에 의해 제작된 균주보다 훨씬 우수하다. 본 연구에서는 기존백신 중 가장 널리 사용되고 있는 SG9R보다 유전학적 생물학적 안정성이 우수하면서 안전성과 방어력이 우수한 국산 가금티푸스 백신을 개발하려고 하였다.

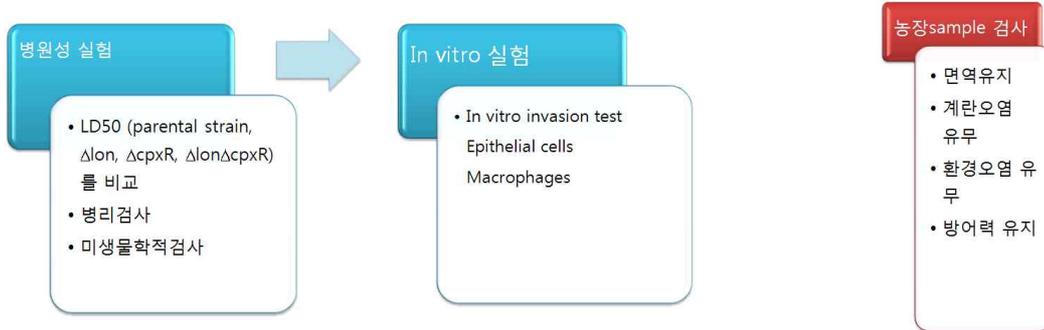
제 3 절 연구개발의 범위

*Salmonella Gallinarum*에 대하여 *lon* 및 *cpxR* 유전자들의 역할이 보고된 것이 없으나, *Salmonella Typhimurium*에서 시행한 선행연구의 결과를 바탕으로 *Salmonella Gallinarum* 야외균주에서 *lon* 및 *cpxR* 유전자를 결손시킴으로 가금티푸스 예방백신 후보균주를 제작하여, 생화학적 변화와 숙주침입성 변화를 관찰하였다. 또한 유전자 결실이 약독화와 면역원성에 어떠한 효과가 있는지 조사함으로써 백신후보균주로서의 가능성을 타진하였다. 이어서 백신후보균주에 의한 특이면역 관찰과 야외균주 도전시험을 반복하여 접종조건을 결정하였으며, SG9R과 효능비교실험, 시험농장에서의 장기실험을 시행하여 백신후보균주의 백신적합성 조사 및 최적화연구를 실시하였다. 다음 도표에 세부과제별 연구범위를 간략하게 제시하였다 (그림 1).

세부과제 1



협동연구과제 1



협동연구과제 2



그림 2 세부과제별 연구 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황

1. Salmonella Gallinarum 에서 Target 유전자 결실 변이균주 백신화 연구

1980년대 이후 SG9R이 보편적으로 이용되고 있으나 그 유전학적 배경이 불분명하고 약독화의 정도도 다양하게 나타나는 약점 때문에 과거 20년 넘게 특정의 target 유전자를 결실시켜서 가금티푸스 예방백신 후보균주들이 제작되어왔다 (표 2). 초기에 이루어진 Virulence plasmid결실 균주 연구를 제외하고 모두 metabolic pathway에 관련된 유전자를 결실시키고 있다는 공통점이 있다.

표 2 Salmonella Gallinarum 에서 target 유전자 결실 균주의 백신화 연구 현황

결실 대상 유전자	주요 논문	실용화 여부
Virulence plasmid	Barrow, P.A. Immunity to experimental fowl typhoid in chickens induced by a virulence plasmid-cured derivative of Salmonella gallinarum. Infect. Immun. 58:2283-2288.1990.	안 됨; 실용화를 위한 후속 연구 없음
<i>nuoG</i> (encodes NADH dehydrogenase I)	Zhang-Barber, L., A.K. Turner, G. Dougan, and P.A. Barrow. Protection of chickens against experimental fowl typhoid using a <i>nuoG</i> mutant of Salmonella serotype Gallinarum. Vaccine 16:899-903. 1998.	안 됨; 실용화를 위한 후속 연구 없음
<i>aroA</i> (encodes an enzyme involved in aromatic amino acid biosynthesis)	Griffin H.G. and P.A. Barrow. Construction of an <i>aroA</i> mutant of Salmonella serotype Gallinarum: its effectiveness in immunization against experimental fowl typhoid. Vaccine. 11:457-462. 1993.	S. Typhimurium에서는 실용화되었으나 S. Gallinarum에서는 안됨; 실용화를 위한 후속 연구 없음
<i>crp</i> (encodes a cAMP receptor protein that regulates transcription of a number of operons involved in sugar and catabolic functions)	Rosu, V., M.S. Chadfield, A. Santona, J.P. Christensen, L.E. Thomsen, S. Rubino, and J.E. Olsen. Effects of <i>crp</i> deletion in Salmonella enterica serotype Gallinarum. Acta. Vet. Scand. 49:14. 2007.	S. Typhimurium에서 <i>cya/crp</i> deletion이 실용화되었으나 S. Gallinarum에서 안됨; 실용화를 위한 후속 연구 없음

<i>metC</i> (encodes cystathionine β lyase, which is involved in sulfur metabolism)	Shah, D.H., S. Shringi, A.R. Desai, E.J. Heo, J.H. Park, and J.S. Chae. Effect of <i>metC</i> mutation on <i>Salmonella Gallinarum</i> virulence and invasiveness in 1-day-old White Leghorn chickens. <i>Vet. Microbiol.</i> 119:352-357. 2007.	안 됨; 실용화를 위한 후속 연구 없음
<i>cobS</i> and <i>cbiA</i> (both involved in the cyanocobalamin biosynthetic pathway)	Penha Filho R.A., J.B. de Paiva, M.D. da Silva, A.M. de Almeida, and A.Jr. Berchieri. Control of <i>Salmonella Enteritidis</i> and <i>Salmonella Gallinarum</i> in birds by using live vaccine candidate containing attenuated <i>Salmonella Gallinarum</i> mutant strain. <i>Vaccine.</i> 28:2853-2859.2010.	안 됨; 최근에 발표됨

2. 기타의 *Salmonella Gallinarum* 변이균주 백신화 연구 현황

특정유전자 결실이 아닌 방법으로 약독화를 실현하여 백신화에 이룬 연구들이 있다 (표 2). 이들 제품군에 공통적인 문제는 약독화의 유전학적 배경이 불분명하기 때문에 약독화의 수준이 안정적이지 않다는 것이다. 또한 변이과정 후에 약독화가 우수한 colony 집락을 선별하는 과정이 있는 경우 독성복귀 형상이 언제든지 일어날 수 있다는 문제점도 있다. 이런 이유로 metabolic drift mutant로 화학적으로 만들어진 변이균주도 고병원성인 *Salmonella Gallinarum* 을 변이시키지 않고 저병원성인 *Salmonella Enteritidis*를 변이시킨 균주를 사용할 수 밖에 없는 것으로 풀이된다. 물론 *Salmonella Enteritidis*를 백신균주로 이용하는 경우 상당한 가금티푸스 방어를 이룰 수 있지만 *Salmonella Gallinarum*을 이용하는 경우보다 방어력이 약하다. 따라서 *Salmonella Vac E*의 경우 식중독 예방을 위하여 가금에서 *Salmonella Enteritidis*를 방어하는 데 초점을 둔 정책에 있어서 발생율이 비교적 높지 않은 가금티푸스를 동시에 예방하고자 하는 경우에 적절한 선택이 된다.

표 3 기타의 *Salmonella Gallinarum* 변이균주 백신화 연구 현황

변이 수단	주요 논문 또는 자료	실용화 여부
실험실 내 계대배양으로 LPS부분 변이 (S-R variation)	Smith, H.W. The use of live vaccines in experimental <i>Salmonella gallinarum</i> infection in chickens with observation on their interference effect. <i>J. Hygiene</i> 54:419-432. 1956.	SG9R
Metabolic drift mutantation	Chacana PA, Terzolo HR. 2006. Protection conferred by a live <i>Salmonella Enteritidis</i> vaccine against	Avipro <i>Salmonella Vac E: Salmonella Enteritidis</i> 예방용

	fowl typhoid in laying hens. Avian Dis. 2006. 50:280-283.	생백신 균주를 가금티푸스 예방용으로 겸용함
LPS 결실균주 가운데 약독화정도가 높은 균주 선택	살모넬라 갈리나룸 약독주 및 이를 포함하는 가금티푸스예방용 백신 조성물, 등록특허 10-0436740, 등록일자 2004년06월09일	대성 SR2 치큰백

제 2 절 본 연구팀의 선행기술 수준

제1절에서 살핀 것과 같이, 특정유전자를 결실시킴으로 유전학적으로 안정된 백신균주를 제작하려는 노력은 합리적이다. 그러나 특정유전자를 결실시킴으로 충분한 약독화와 면역원성 유지를 동시에 이룰 수 있는 방법도 아직 발견되지 못하였다. 이는 Salmonella Gallinarum의 병원성이 높다는 사실과 또한 Salmonella Gallinarum 감염기전이 Typhi, Typhimurium, Enteritidis 등 다른 혈청형에 비해 아직 잘 해명되어 있지 않기 때문일 것이다.

본 연구팀은 Salmonella Typhimurium에서 확인된 두 가지 유전자 결실을 Salmonella Gallinarum에 적용하여 백신화 연구를 수행하였다. Lon 및 cpxR를 결실시켜 얻어지는 Salmonella Typhimurium 변이균주에 관한 연구 (Kim SW et al., 2009. Changes of physiological and biochemical properties of Salmonella enterica serovar Typhimurium by deletion of cpxR and lon genes using allelic exchange method. J Microbiol Methods. 79(3):314-20.)는 병원성에 관련된 유전자를 결실시키는 점이 metabolic 관련 유전자를 결실시킨 기존방법과 차별화된다. 즉, 병원성미생물이 숙주 체내에 침입하여 적응하는 데 관여하는 유전자를 결실시켜 그 약독화와 면역원성을 조사하였다. 따라서 본 연구 팀의 고병원성 혈청형인 Salmonella gallinarum에서 본 유전자들을 결실시키는 연구 수준은 학술적으로도 높아 매우 유용한 결과물을 얻을 수 있었다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연차별 세부과제별 연구개발의 목표 및 개요

1. 1차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 (표 4)

세부과제명	연구목표	연구개발 수행내용
유전자결실균주 작성	유전자결실균주 작성	야외균주에서 <i>lon</i> 및 <i>cpxR</i> 유전자를 결실시켜 성공적으로 변이균주가 작성된 것을 PCR 로 확인
	유전자결실균주 미생물학적 특성 확인	Colony 형태 및 성장곡선 확인, API, fimA, SEM, lectin
Auxotrophic mutant strains 제작	유전자결실균주 작성	asd 유전자 결실
	vector 조합	arabinose-dependent promotor 로 asd expression 되는 plasmid 제작
	유전자결실균주 미생물학적 특성 확인	arabinose 첨가 및 미첨가 배지에서 성장유무 관찰
Adjuvant strain 제작	cloning	LTB 유전자를 최종적으로 세포외 분비형 plasmid 에 cloning
	asd deleted host strain 제작 및 형질전환	숙주세포 준비 및 Transformation
3 가지 혈청형 유전자 결실균주 적합성 실험	부작용 유무 가능성 확인	접종후 건강상태 관찰
	환경오염 가능성 확인	접종 후 변이균주의 분변배출유무 관찰
	방어력 관찰	야외균주 접종 후 임상증상 관찰 및 해부검사 실시

가급티푸스 야외균주 접종실험	고병원성 균주 선택	몇 가지 야외균주를 접종하여 임상증상 및 폐사수 관찰
	접종 경로 별 병원성 비교	경구, 피하, 근육접종 후 임상증상 및 폐사수 관찰
JOL916 생균 및 사균 접종 실험	부작용 유무 관찰	백신균주 접종 후 야외균주를 접종하여 건강상태 관찰
	환경오염 가능성 관찰	접종 후 변이균주의 분변배출량 및 기간 조사
	면역유도 관찰	접종 후 면역반응 조사
	방어력 관찰	야외균주 접종하여 임상증상, 폐사수 관찰, 및 해부병리 및 미생물검사 실시
4 가지 변이균주의 병원성 평가	LD ₅₀ 결정	관련균주들을 여러 농도로 접종하여 폐사수 관찰
	병리소견 비교	일정농도에서 관련균주 접종 후 병리소견 관찰
4 가지 변이균주의 면역형성 평가	특이면역 형성력 비교	일정농도에서 관련균주 접종 후 세포성면역, 체액성면역, 점막면역을 측정
시험백신의 생산	시험백신 생산	시험백신을 제조하고 동결건조 전후 생존율을 비교
일반시험	특성시험	Lot 별로 sample 을 취하여 색, 혼탁도, 이물 또는 이취에 대하여 검사
	진공도 시험	Lot 별로 sample 을 취하여 테스트코일을 5mm 이내의 위치에 놓고 방전의 유무를 관찰
	함습도 시험	Lot 별로 sample 을 취하여 동물용 생물학적제제 일반검정기준에 의하여

		칼-피셔법(Karl-Fischer method)으로 함습도를 측정
	순수시험	그람 및 일반세균염색을 하여 현미경 검사 및 Nutrient agar(NA), Nutrient broth(NB), Fluid thioglycollate medium(Thio)에 각각 접종하여 22℃와 37℃에서 7일간 배양하면서 잡균의 존재 여부를 관찰, 유전자결실을 PCR로 확인
	균수시험	10진 희석한 후 면양혈액한천배지에 접종하고 37℃에서 48시간 배양하여 평판법으로 균수를 측정하여 균수측정
효능시험 1차	안전성시험	급속혈청평판응집 반응법과 효소면역법(ELISA) 검사방법으로 S. gallinarum에 대한 항체음성인 생후 6~8주령의 갈색닭 40마리를 선정하여 10마리에 1수분(0.2 ml)씩 피하로 백신접종 후 대조군 10마리와 같이 21일간 안전성을 확인
	면역원성시험	안전성 시험에 사용된 닭을 채혈하여 9R strain을 이용한 MAT(Microplate Agglutination Test) 방법으로 면역성을 측정하며, 백신접종전과 백신접종 3주후 채혈하여 MAT titer을 측정하고 기하평균으로 대조군과의 역가를 비교한다.
	방어능확인시험	제조직후, 24, 27개월 제품으로 면역후 경구로 1ml(100LD50) 공격접종한 후 14일간 관찰하고, 공격균주의 재분리는 시험용 닭의 간과 비장을 유제하고 미생물검사 실시

2. 2차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 (표 5)

세부과제명	연구목표	연구개발 수행내용
4가지 변이균주의 숙주 침입력 평가	대식세포 침입력 비교	대식세포 초대배양에 대한 관련균주의 일정시간에서 침입수 조사
	소장조직 침입력 비교	일정크기의 소장조직에 대한 관련균주의 침입수 조사

JOL916 경구접종 과 근육접종의 비교	부작용 관찰	접종 후 임상증상 관찰
	면역유도 관찰	접종후 점막면역, 체액성면역, 세포성면역의 상승을 비교
	방어력 관찰	백신균주 접종 후 야외균주를 접종하여 건강상태 비교하고 해부검사로 병리소견 및 미생물검사 실시
면역증강 균주 변용 시험	부작용 관찰	여러 농도로 접종 후 체중증가 및 임상증상 관찰
	면역형성 확인	접종후 점막면역, 체액성면역, 세포성면역의 상승을 비교
	방어력 확인	백신균주 접종 후 야외균주를 접종하여 건강상태 비교
면역증강 LTB 균주 JOL1229 제작	항원보강제 발현 vector 조합	항원보강제로서의 LTB 를 발현하는 plasmid 제작
	면역강화 균주 제작	기존 유전자결실균주에 LTB 를 발현하는 plasmid 를 도입
	항원보강 단백질의 발현 유무 확인	in vitro 에서 항원보강 단백질 LTB 의 발현을 확인
JOL916+JOL1229 접종 용량 결정 및 면역반응 및 방어력조사	부작용 관찰	접종 후 임상증상 관찰 및 해부검사로 병리소견과 미생물검사
	면역형성 확인	접종 후 체액성면역, 점막면역 및 세포매개 면역반응을 비교
	방어력 확인	백신균주 접종 후 야외균주를 접종하여 사망률과 건강상태 비교
JOL1229 를 이용한 백신의 최적화 실험	부작용 관찰	접종 후 임상증상 관찰
	면역형성 관찰	접종 후 체액성면역, 세포성면역의 상승을 비교
	방어력 관찰	백신균주 접종 후 야외균주를 접종하여 사망률과 건강상태 비교
시험백신 생산	3 lot 시험백신 생산	보호제 선정 및 동결건조
일반시험	특성시험	동물용 생물학적제제 일반시험법
	수소이온농도 시험	동물용 생물학적제제 일반시험법

	진공도 시험	동물용 생물학적제제 일반검정기준
	함습도 시험	동물용 생물학적제제 일반검정기준
안전성 시험	마이크플라스마 부정시험	동물용 생물학적제제 일반검정기준
	순수시험	동물용 생물학적제제 일반검정기준
	균수시험	동물용 생물학적제제 일반검정기준
	목적동물 안전시험	동물용 생물학적제제 일반검정기준
	시험백신 효능시험	동물용 생물학적제제 일반검정기준
	시험백신 안정성 시험	동물용 생물학적제제 일반검정기준
	시험백신 면역원성 시험	동물용 생물학적제제 일반검정기준

3. 3차 연도 세부과제별 연구목표 및 연구내용 (표 6)

세부과제명	연구목표	연구개발 수행내용
JOL916 과 기존백신 비교	병원성 비교	접종 후 체중증가 및 임상증상 관찰
	면역유도 비교	접종후 점막면역, 체액성면역, 세포성면역의 상승을 비교
	방어력 비교	백신균주 접종 후 야외균주를 접종하여 건강상태 비교하고 해부검사로 병리소견 및 미생물검사 실시
Auxotrophic mutant strains 적합성 실험	부작용 유무 관찰	백신균주 접종 후 건강상태 관찰
	면역유도 관찰	접종 후 면역반응 조사

	방어력 관찰	야외균주 접종하여 임상증상, 폐사수 관찰, 및 해부병리 및 미생물검사 실시
Auxotrophic strain 을 포함한 백신균주와 시판품의 안전성 및 면역유도 비교	안전성 비교	근육접종 후 매주 병리소견 비교 평가
	면역유도 비교	근육접종 후 매주 면역반응 평가
어린 병아리에서 auxotrophic strains 이용 가능성 실험	안전성 평가	1 주령에 접종 후 임상증상 관찰
	면역유도 평가	1 주령에 접종 후 임상증상 및 접종후 면역반응 관찰
	방어력 평가	1 주령에서 접종 후 임상증상 및 접종후 야외균주를 접종하여 방어력 관찰
4 주령 이하 병아리에서 유전자결실균주 적합성 실험	안전성 평가	여러 주령에서 접종 후 임상증상 및 병리소견 관찰
	면역유도 평가	여러 주령에서 접종 후 임상증상 및 면역반응 관찰
	방어력 평가	여러 주령에서 접종 후 임상증상 및 접종후 야외균주를 접종하여 방어력 관찰
목적동물에서 장기적 안전성 시험	체중 측정, 폐사율	백신 접종 후 20 주령까지 4 주 간격으로 체중 측정, 매주 폐사율 기록
	산란 능력	산란개시 시기를 기록하여 비교 및 매주 산란율 확인
환경 및 사람에 대한 안전성 시험	환경오염	산란개시 후 4 주 동안 매주 분변 중 백신 균주의 유무를 조사
	난각 오염	계란 표면 swab 을 채취 백신균주의 오염을 검사
	계란 내용물 오염	계란 1 개 내용물의 백신균주의 유무를 확인

방어력 평가	야외 균주 접종	병원성 야외균주 공격접종실험을 통해 생존율 확인
	임상증상 평가	임상증상 평가 (및 증체곡선 작성-삭제)
	해부 검사	병리소견 평가
백신 안정성 시험	안정성(유효기간) 평가	매 3 개월 단위로 안전, 효능성 평가
장기면역 유지 및	정기적 면역 측정	백신 접종 후 20 주령까지 4 주간격으로 항체역가 측정
2 차접종시기 조사	정기적 방어력 시험	백신 접종 후 20 주령까지 4 주간격으로 공격접종시험
JOL1229 산란계에서 LTB 효과 검토 및 안전성 평가	부작용 관찰	접종 후 임상증상 관찰
	면역형성 관찰	접종 후 체액성면역, 세포성면역의 상승을 비교
	방어력 관찰	백신균주 접종 후 야외균주를 접종하여 사망률과 건강상태 비교
16 주령 이하에서 JOL1229 를 이용한 백신의 최적화 실험	부작용 관찰	접종 후 임상증상 관찰
	면역형성 관찰	접종 후 체액성면역, 세포성면역의 상승을 비교
	방어력 관찰	백신균주 접종 후 야외균주를 접종하여 사망률과 건강상태 비교
JOL1229 를 이용한 백신의 장기 임상실험	성장율	임상증상, 체중
	면역유도 관찰	접종 후 체액성면역, 세포성면역의 상승을 비교
	산란 능력	산란개시, 산란수

제 2 절 연구개발 수행방법 및 결과

1. 병원성 관련 유전자 결실균주 작성

가. 병원성 관련 유전자 결실균주 (백신후보균주) 제작

(1) 유전자결실균주 제작

Salmonella enterica serotype Gallinarum 야외균주 JOL394 (표 7)를 주형으로 하여 *lon* gene의 5' 말단과 3'말단부분을 각각 lon-F-XbaI과 lon-R-XhoI, lon-F-XhoI과 lon-R-XbaI를 primer로 하여 PCR법으로 증폭시켜 pGEM[®]-TVector (PromegaCo., WI, USA)에 cloning하였다(표 8). 이어서 제한효소 XhoI로 절단한 뒤 ligation하여 *lon* gene이 결실된 유전자서열을 얻었다. 이 서열을 XbaI로 절단하고 suicide vector pMEG375 (donated by Dr.CurtissR.III. Dozoisetal. 2003, 그림 2)에 cloning하여 pBP295를 얻었다. 동일한 방법으로 *cpxR* gene이 결실된 서열을 가진 suicide vector pBP210를 얻는다. *E.coli* χ 7213를 pBP295과 pBP211로 각각 형질전환하였다. *E.coli* χ 7213는 50ng/ml의 DL- α,ϵ -Diaminopimelicacid (DAP,Sigma)를 첨가한 LB broth로 배양하였다. *S. Gallinarum* JOL394에서 *lon* gene을 결실시키기 위하여 pBP294를 지닌 *E. coli* 를 접합의 방법으로 LB-DAP agar에서 JOL394에 도입하였다. JOL394는 π -protein을 공급할 수 없으므로 연색체에 도입되지 않은 경우 pBP295는 복제를 못해 유지되지 않고 자연적으로 소멸한다. 동시에 pBP295가 도입된 세균만이 항생제 내성을 나타내는 것을 이용하여 50 μ g/ml ampicillin을 첨가한 LB agar에서 내성균을 선택한다. 이들 선택된 집락을 항생제가 포함되지 않은 LB 액체 배지에서 600 nm에서 흡광도가 0.5-1.0이 되도록 배양한 후, 적절하게 희석하여 LB에 sucrose가 포함된 배지에서 선별하였다. pBP295의 DNA에 sucrose-sensitive gene인 *sacB*가 존재하기 때문에 계속 이 유전자를 유지하는 (plasmid를 가지는) 숙주는 사멸하고 이 유전자가 결손된(plasmid가 결실된) 숙주만이 생존이 가능하게 된다. 선별된 집락은 다시 LB/sucrose agar와 LB/ampicillin agar에 각각 tooth-picking하여 배양하고, LB/sucrose agar에서 성장하고 LB/ampicillin agar에서는 성장하지 못하는 집락을 돌연변이된 균주로 선별하여, *S. Gallinarum* Δlon (JOL914)으로 하였다. 선별된 균주는 PCR을 통해 돌연변이를 확인한다. 다음으로 *S. Gallinarum* Δlon 균주에 동일한 접합법과 선택법으로 $\Delta cpxR$ 를 도입하여 *S. Gallinarum* $\Delta cpxR$ (JOL915)으로 하였다. 동일한 방법으로 JOL914에 $\Delta cpxR$ 를 도입하여 *S. Gallinarum* $\Delta lon\Delta cpxR$ (JOL916, vaccine strain)를 얻었다.

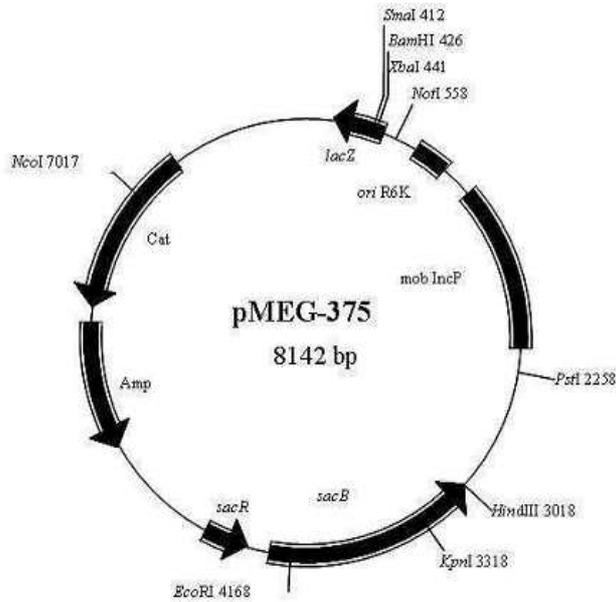


그림 3. 본 연구에 사용된 pMEG375

표 7. Bacterial strains and plasmids

Strain	Relevant characteristics	Source or reference
<i>S. Gallinarum</i>		
JOL394	Wild type, Nal ^R	This study
JOL420	Wild type, used for antigen preparation	
JOL422	Wild type, highly virulent	This study
JOL914	JOL394 ^Δ lon	This study
JOL915	JOL394 ^Δ cpxR	This study
JOL916	JOL394 ^Δ lon ^Δ cpxR	This study
<i>E. coli</i>		
χ7213	Thi-1 thr-1 leuB6 fhuA21 lacY1 glnV44.asdA4 recA1 RP4 2-Tc::Mu[λpir];Km ^R	Edwards et al. (1998)
Plasmids		
pMEG375	sacRB mobRP4 oriR6K. Cm ^R ,Ap ^R	Dozois et al. (2003)
pBP211	pMEG375 ^Δ cpxR	This study
pBP295	pMEG375 ^Δ lon	This study

Nal: nalidixic acid, Cm: Chloramphenicol, Ap: ampicillin

표 8 Primers used for construction of mutant strains

Primer	Sequence (5'-3')	Sequence number ^a
lon-F-XbaI	<u>TCT AGA</u> CAG GAG TTC TTA CAG GTA GA	502616 - 502635
lon-R-XhoI	<u>CTC GAG</u> TCA ATG CGT TCA GAA CGC TC	503386 - 503405
lon-F-XhoI	<u>CTC GAG</u> GGA ATG CAG GTT GTA ACC GC	505705 - 505724
lon-R-XbaI	<u>TCT AGA</u> CCA CAC TCC GCT GTA GGT GA	506475 - 506495
cpxR-F-XbaI	<u>TCT AGA</u> CAT CAT CTG CGG GTT GCA GC	3514975 - 3514994
cpxR-R-XhoI	<u>CTC GAG</u> CTC GGT CAT CAT CAA CTA AC	3515995 - 3516014
cpxR-F-XhoI	<u>CTC GAG</u> GTG GTC GCG GCT ATC TGA TG	3516645 - 3516664
cpxR-R-XbaI	<u>TCT AGA</u> GAT AAT TTA CCG TTA ACG AC	3517665 - 3517684

^a Sequence number of gene NC_011274 as the accession number of GenBank.

(2) 유전자결실균주를 PCR로 확인

lon 및 cpxR 유전자가 완전히 결실된 것을 확인하기 위하여 JOL394, JOL914, JOL915, JOL916의 각각에서 genome을 추출하여 다음 표 9에 제시한 primer들을 이용하여 PCR을 실시하였다. 본 PCR법은 동물에서 분리된 야외균주를 백신균주와 구별하기 위하여도 사용할 수 있다.

먼저 각 균주를 LB broth에 접종하여 37°C 150 rpm에서 overnight culture하고 Exgene cell SV Cell DNA isolation mini kit (GeneAll Biotechnology co., LTD, Seoul, Korea)를 이용하여 제품설명서를 따라 whole DNA를 추출하여 template DNA로 사용하였다. PCR reaction을 위해 PCR buffer에 primer(각각 0.2 µM), dNTPs(200 µM), *Taq* polymerase(0.5 U, e-*Taq* DNA Polymerase, SolGent Co., Ltd., Daejeon, Korea), template DNA(0.5 µl)를 함유하는 20µl의 reaction mixture를 준비하였으며, 94°C에서 1 min, 54°C에서 4 min 72°C에서 2 min을 1 cycle로 한 반응을 30 cycle 반응시켜, 1x TAE buffer로 0.6% agarose gel을 제작하여 50V에서 60min 전기영동하였다. 전기영동시 1Kbp plus 100 bp marker (Elpis-biotech Inc., Daejeon, Korea)를 사용하였으며, 결과를 Figure 2에 제시하였다. lon gene은 wild type의 경우 3880 bp, deletion된 경우 1541 bp의, cpxR은 wild type의 경우 2710 bp, deletion된 경우 2040 bp의 PCR products를 얻는 것으로 기대되는데 (표 10), JOL394는 모두 wild type, JOL914는 lon-deleted이며 cpxR-wild type, JOL915는 lon-wild type이며 cpxR-deleted, JOL916은 모두 deleted type으로 확인되었다 (그림 3).

표 9. Primers used for confirmation and differentiation of mutants from wild type strains

Primer	Sequence (5'-3')	Sequence number ^a
detect lon-F	CAG GAG TTC TTA CAG GTA GA	502616 - 502635
detect lon-R	CCA CAC TCC GCT GTA GGT GA	506475 - 506495
detect cpxR-F	CAT CAT CTG CGG GTT GCA GC	3514975 - 3514994
detect cpxR-R	GAT AAT TTA CCG TTA ACG AC	3517665 - 3517684

^a Sequence number of gene NC_011274 as the accession number of GenBank.

표 10. Expected sized of PCR products

Gene	Primer sets	Genotype	Product size (bp)
<i>Lon</i>	detect lon-F, detect lon-R	wild type	3880
		deleted	1541
<i>CpxR</i>	detect cpxR-F, detect cpxR-R	wild type	2710
		deleted	2040

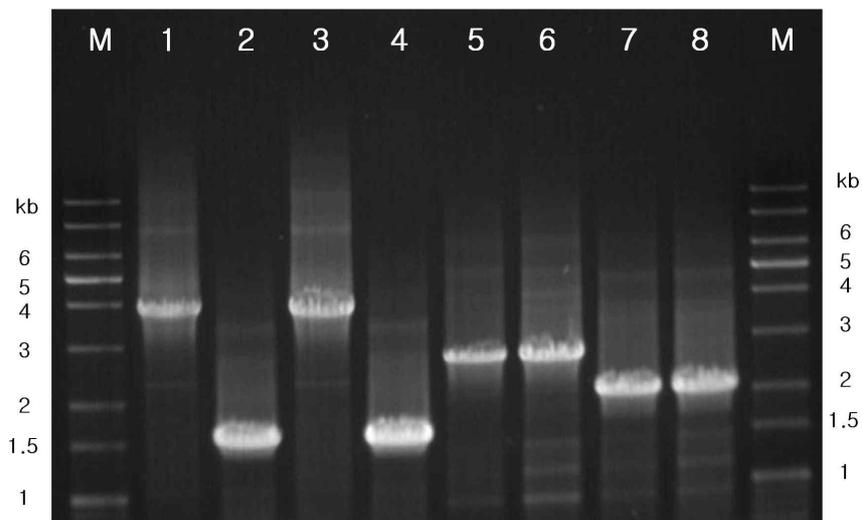


그림 4. 야외균주 및 변이균주에서 유전자결실확인 PCR

M: Size marker

Lane 1, 5: JOL394

Lane 2, 6: JOL914

Lane 3, 7: JOL915

Lane 4, 8: JOL916

Lane 1, 2, 3, 4: lon type 확인

Lane 5, 6, 7, 8: cpxR type 확인

(3) 변이균주의 유지 및 보관

JOL394 및 변이균주 JOL914, JOL915, JOL916는 LB agar에서 유지하였으며 장기보관을 위하여 LB broth에서의 late log phase culture를 30% glycerol과 혼합하여 -80°C에서 보관하였으며, 실험에 사용시 본 stock culture에서 LB agar에 streaking 하여 S-form colony 형태를 확인 후 사용하였다.

나. 백신후보균주의 특성 관찰

(1) 성장곡선 작성

JOL394, JOL914, JOL915, JOL916 을 LB broth에서 OD₆₀₀ = 1.2-1.5정도가 될 때 까지 37°C shaking incubator에서 배양 후 배양액을 1:100의 비율로 37°C의 200 ml LB broth 에 첨가하여 250 rpm로 배양하였다. 첨가후 0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 9 시간에 sample을 채취하여 OD₆₀₀ 값을 측정하였다. 그 결과를 그림 4 에 제시한다. 본 배양조건에서 JOL915 가 약간 성장이 느리지만 JOL916의 성장은 야외균주 JOL394와 비슷한 것을 알 수 있었다.

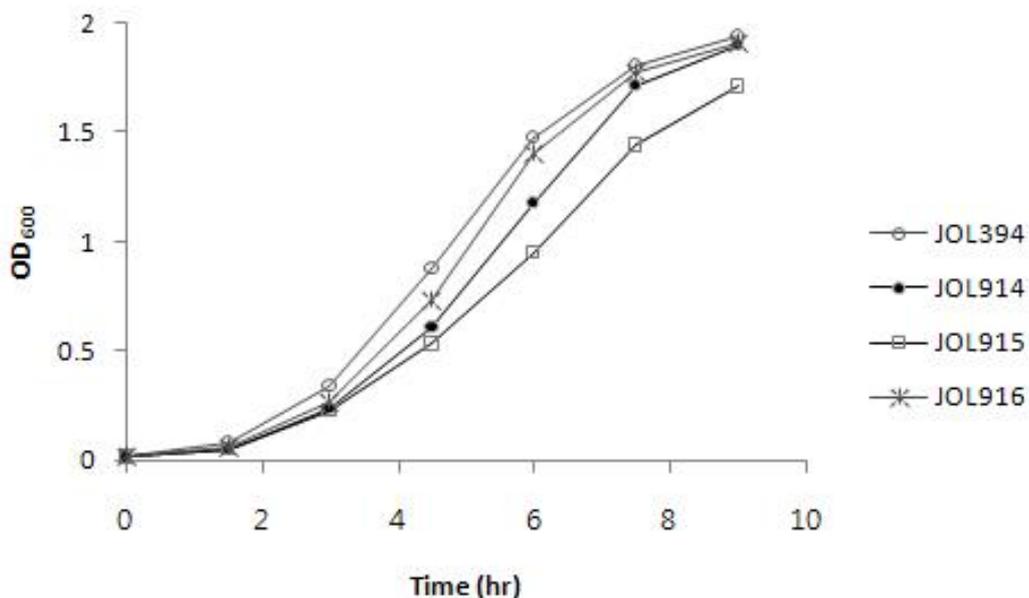


그림 5. 야외균주 및 변이균주의 성장곡선

(2) 집락의 형태

JOL914 및 JOL916은 점액성 물질이 때로 매우 많아지는 경향이 있었다.

(3) 생화학적 형질 조사

API 20E system (bioMérieux, Rhône, France)을 사용하여 변이균주의 biotype를 결정하였다. JOL394, JOL914, JOL915, JOL916 를 LB agar 에서 24 h at 37 °C 배양하고 0.85% sodium chloride solution 에 재부유 시킨 후 사용설명서의 지시를 따라 실시하였다. 그 결과 모두 같은 형질을 나타내었으며, 유전자 결실로 인한 생화학적 특성은 본 실험을 통하여 관찰하는 한 동일하다고 판단되었다 (표 11).

표 11. 변이균주의 각종 생화학적 특성

검사항목	JOL394	JOL914	JOL915	JOL916
Beta-galactosidase	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-
Citrate utilization	-	-	-	-
H ₂ Sproduction	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-
Acetoin production	-	-	-	-
gelatinase	-	-	-	-
Glucose fermentation	+	+	+	+
Mannitol fermentation	+	+	+	+
Inositol fermentation	-	-	-	-
Sorbitol fermentation	-	-	-	-
Rhamnose fermentation	-	-	-	-
Sucrose fermentation	-	-	-	-
Melibiose fermentation	-	-	-	-
Amygdalin fermentation	-	-	-	-
Arabinose fermentation	-	-	-	-

(4) 전자현미경 관찰

Colonies of mutant strains were observed by scanning electron microscope (SEM) with minor modification [Hayat, 1978, Matsuguchi, 1977]. Briefly, colonies grown on LB agar for 24 h at 37 °C were gently excised from agar plate and fixed in 2.5% glutaraldehyde in PBS (pH 7.4), followed by postfixation in 1% aqueous osmium tetroxide and then serial dehydration in acetone. Samples were critical point dried and coated with gold-palladium alloy for subsequent observation by SEM (JSM-6400, JEOL, Japan).

그 결과 변이균주에서 fimbriae양의 외부 부착물과 균 전체를 덮는 외각물질이 관찰되었다 (그림 5).

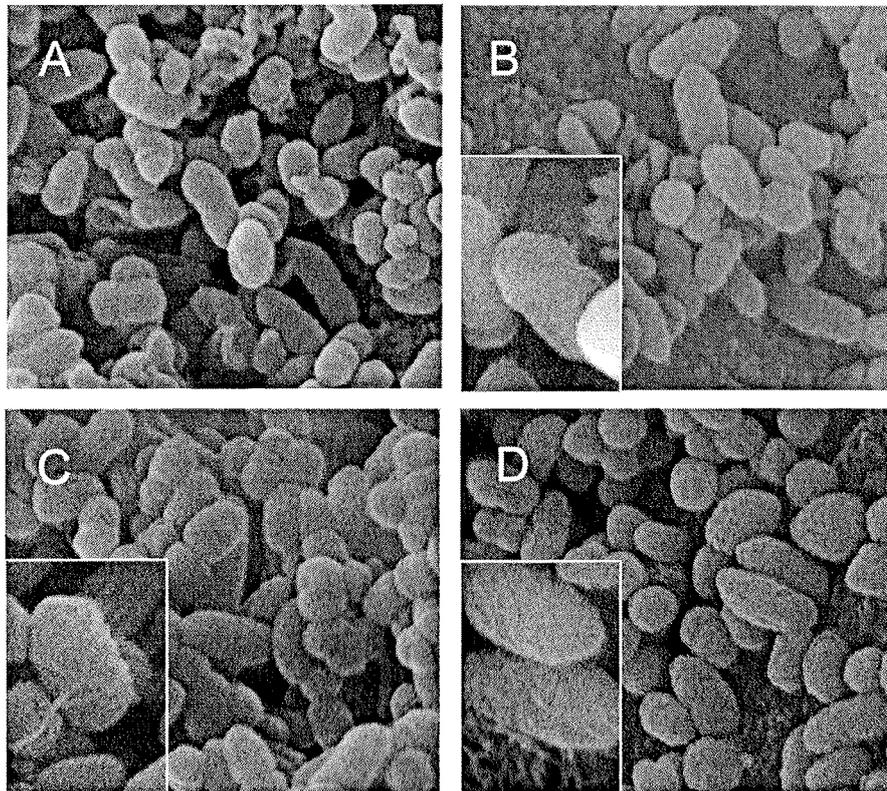


그림 5. Observation by scanning electron microscope.

A: JOL394, B: JOL914, C: JOL915, D: JOL916

Magnification x 10 k; insert x 20 k

(5) Fimbriae expression level

FimA gene을 Salmonella Typhimurium wild type에서 5'-GGA TC CGC TGA TCC TAC TCC GGT GAG-3', 5'-CTC GAG TTC GTA TTT CAT GAT AAA GG-3'의 primer를 이용하여 pET28a에 cloning하고 over-expressed 6XHis-tag

attached protein을 Ni-NTA agarose (Qiagen,CA,USA)을 이용하여 affinity-purification하였다. 이 단백질을 토끼에 접종하여 anti-FimA sera를 얻었다. 혈청은 -80도에서 보관하였다.

JOL394, JOL914, JOL915, JOL916의 colony를 LB agar에서 24시간 37C 에서 배양함으로써 얻었으며, 이를 PBS에 부유시켰다. OD600값을 기초로 농도를 조절한 후 2×10^5 CFU/30 ul을 Towbins transfer buffer (25mM Tris, 192mM glycine, 20% methanol)에 담근 Protran[®] nitrocellulose membrane (0.2 μ m, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)에 96-well Bio-DotTM apparatus (Bio-Rad) 을 이용하여 blot하였다. Vacuum을 가함으로 membrane을 건조시킨 후 membrane을 장치에서 탈착하여 Tris-buffered saline (TBS, 10mM Tris, 0.9% sodium chloride, pH7.4) containing 5% skim milk (TBS-SM) 로 1시간 blocking하였다. TBS로 3번 washing한 후 rabbit anti-FimA sera를 TBS-SM에 1:1000배 희석하여 1시간 반응시켰다. 3번 washing한 후 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) (Pierce Biotechnology, IL, USA)를 TBS-SM에 1:20,000배 희석하여 1시간 반응시켜 3번 washing한 후 West-oneTM western blot detection system (Intron Biotechnology, Kyongi, Korea)으로 발광반응을 일으키고 Kodak Image Station 4000MM (Carestream Health, NY, USA)로 발광강도를 측정하였다. 실제 세균수를 colony count method로 구하여 최종적으로 보정하였다.

그 결과 다음 표 12 와 같이 fimbriae (FimA)의 발현이 유전자결실균주에서 상승되어 있음을 알 수 있었다.

표 12. Relative fimA expression level of mutants

Strain	Genotype	Relative FimA expression
JOL394	SG wild type	1
JOL914	SG Δlon	6.77
JOL915	SG $\Delta cpxR$	2.33
JOL916	SG $\Delta lon \Delta cpxR$	3.90

(6) Capsular polysaccharide secretion level

Capsular polysaccharide의 양을 concanavalin A-binding 법으로 Fluorometric quantification 하였다 (Robitaille et al., 2006). 각 균주를 LB gar에 inoculation하여 37도에서 24시간 배양한 후 OD600 값이 1.0가 되게 농도를 조절하였다. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated concanavalin A (Sigma-Aldrich, MO, USA) 를 최종농도가 4 μ g/mL가 되게 첨가한 후 실온에서 30분동안 반응시켰다. PBS로 2번 washing한 후 250 μ l 씩 96-well microplate (Berthold technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany)에 옮겨 TriStarLB941 (Berthold thechnologies)를 이용하여,

excitation 및 emission 파장 각각 485 및 530 nm에서 fluorescence intensity를 측정하였다. 실제 세균수를 colony count법으로 구하여 결과를 보정하였다. 그 결과 JOL914 및 JOL916에서 현저히 상승되어 있음을 말 수 있었다 (표 13).

표 13. Relative capsular polysaccharide expression of mutants

Strain	Genotype	Capsular polysaccharide
JOL394	SG wild type	1
JOL914	SG Δlon	30.6
JOL915	SG $\Delta cpxR$	1.28
JOL916	SG $\Delta lon\Delta cpxR$	46.2

2. 영양요구성 변이균주 작성

가. 대사 관련 유전자 결실균주 (백신후보균주) 제작

(1) 대사관련 유전자 선택

병원성이 최소화된 백신균주를 실험하기 위하여 인공배지에서는 성장하나 동물체내에서는 생존이 불가능한 균주를 제작하였다. 이를 위하여 균주의 생장에 필수적인 유전자를 결실시켜 대신 결핍된 유전자를 영양요구성 재조합벡터에서 제공받도록 하였다. 이는 일방적 생균백신처럼 생산 및 관리가 편리하여 동물체내에서는 병원성이 소멸되고 항원성만 있을 것으로 기대된다. 균주에 생장에 필수적인 유전자로 aspartate kinase, aspartate semialdehyde dehydrogenase (asd), dihydrodipicolinate synthase, dihydrodipicolinate reductase, tetrahydrodipicolinate reductase, glutamate:succinyl-diaminopimelate aminotransferase, 및 succinyldiaminopimelate desuccinylase등을 생각할 수 있다. 본 연구에서 영양요구성 재조합벡터로 arabinose 유전자의 발현을 엄격하게 조절하는 것을 가능하게 하는 프로모터를 포함하는 pMMP55, pMMP69를 이용하였다.

(2) 영양요구성 plasmid의 제작

먼저 *Salmonella Gallinarum* JOL394로부터 *araC::ParaBAD* (*araC*의 전체유전자와 *araBAD* 유전자의 promoter 영역)를 PCR로 증폭하고, T-vector (Promega)로 클로닝하였다 (그림 6. pMMP55, 69 제작과정). PCR을 위해 사용된 primer 서열을 표 14에 나

타내었다.

Plasmid의 복제 개시점을 pYA3332 (p15A origin; 중간 copy 수, Roy Curtiss Lab, Arizona University; 그림 7. genetic map)와 pYA3342 (pBR origin; 높은 copy 수, Infection and Immunity, 70(4), 1739-1749, 2002)로부터 각각 제한효소 *NcoI*-*PstI*으로 절단하여 (각각 1.4와 1.7 kb DNA 단편) 동일한 효소로 절단된 pMMP44 (1.6 kb DNA 단편)에 클로닝하였다 (pMMP51, pMMP52).

한편 항생물질을 사용하지 않고 선별하기 위한 체계로서 *S. Gallinarum* JOL394의 세포벽 합성 성분을 생산하는 *asd* 유전자를 사용하였다. 그를 위하여 *asd* 유전자를 *S. Gallinarum* JOL394로부터 PCR에 의해 증폭하고, T-vector에 클로닝하였다 (pMMP45). PCR을 위해 사용된 primer를 표 15에 나타내었다.

마지막으로 pMMP45로부터 PCR 산물을 제한효소 *BspHI*-*XbaI*으로 절단하여 얻은 1.3 kb DNA 단편은 제한효소 *NcoI*-*XbaI*으로 절단한 pMMP51과 pMMP52에 클로닝하여 pMMP55 (그림 8)와 pMMP69 (그림 9)를 구축하였다. 여기에서 *BspHI*와 *NcoI*은 comparative end이기 때문에 서로 ligation하는 것이 가능하다.

제작된 plasmid는 aspartate semi-aldehyde dehydrogenase 유전자 (*asd*), *asd* 유전자 발현용 arabinose promotor (*ParaBAD*), *ParaBAD*의 up-stream에 반대 방향으로 위치한 *araC* 유전자, *araC* 유전자의 down-stream에 위치한 전사종결서열 및 복제 개시점을 포함하도록 하였는데, 이는 *asd* 유전자가 *araC* 전사 조절자와 *ParaBAD* (promoter)의 조절하에 있도록 *ParaBAD*의 하류에 위치하도록 배치한 것이다 (그림 8, 9). 이 plasmid 들은 arabinose를 함유하는 환경에서 promoter가 작동되어 aspartate semi-aldehyde dehydrogenase를 발현하게 하는 arabinose-dependent plasmid이며, 이런 경우 *asd* 유전자가 결손된 장내세균에서 서식이 가능하다. 또한 pMMP55는 중간 copy 수를 가지는 복제 개시점을 소유하는 반면에 pMMP69는 높은 copy 수를 가지는 복제 개시점을 보유한다.

(3) *Asd* 유전자 결실균주 제작 및 transformation

인공배지에서는 성장하나 동물체내에서 사멸하는 *S. Gallinarum* JOL394 $\Delta lon \Delta cpxR \Delta asdA16$ 을 JOL916 제작과 같은 allelic replacement 방법으로 제작하여, JOL967로 명명하였다. *Asd* 유전자는 세포벽 합성에 있어서 peptideglycan의 크로스 연결에 관여하는 DAP (diaminopimelic acid) 합성의 개시지점에 관련된 효소이다. 따라서, JOL967는 DAP가 첨가되지 않은 환경에서 세포벽을 정상적으로 합성하지 못해 사멸하게 된다 (그림 10). 본 JOL967를 plectrophoration에 의하여 MMP55와 pMMP69로 형질전환을 수행하여 JOL969 (middle copy) 및 JOL971 (high copy)를 얻었다.

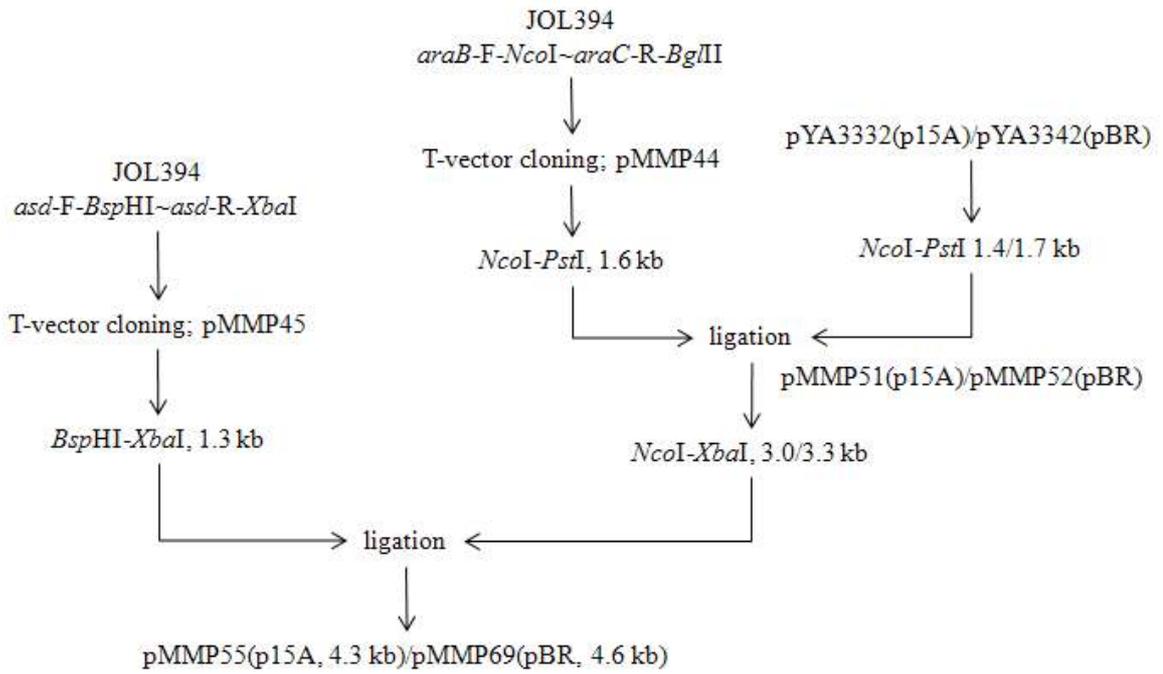


그림 6. pMMP55, pMMP69의 제작 과정

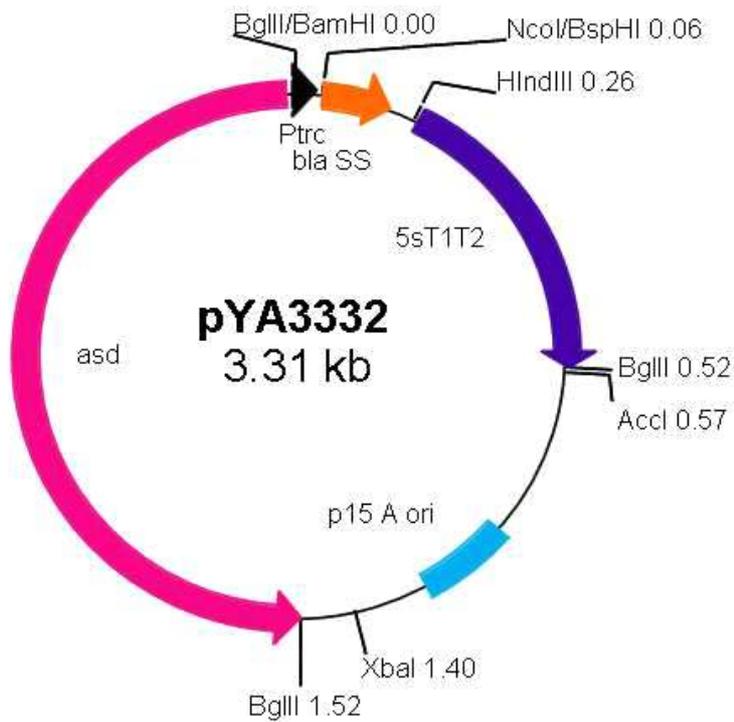


그림 7. Map of pYA3332

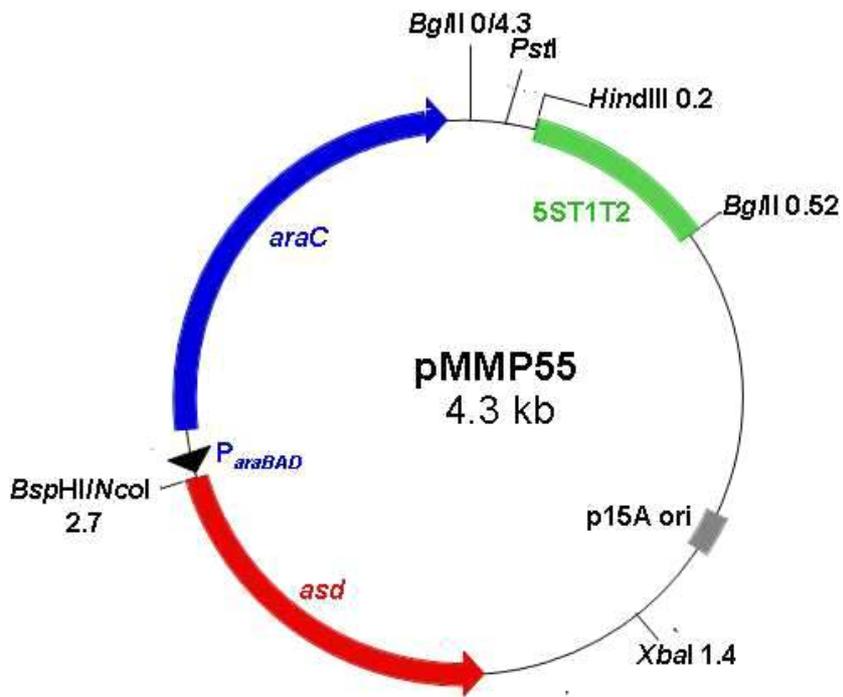


그림 8. Map of pMMP55

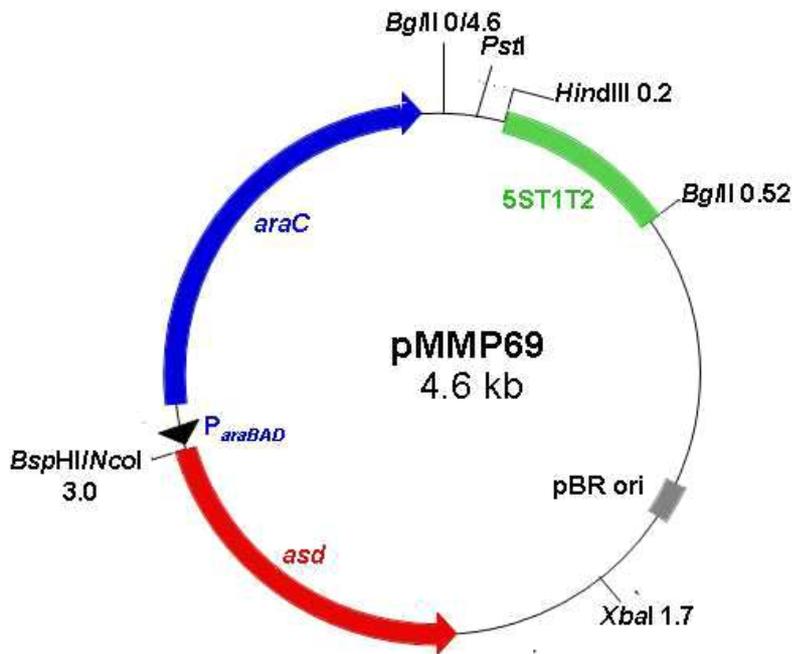


그림 9. Map of pMMP69

표 14. Primers used for amplification of *araC::P_{araBAD}*

Primer	Sequence (5'-3')
araB-F-NcoI	AATTG <u>CC</u> ATGGTCTTACTCCA
araC-R-BglII	AGATCTGCCACCCAGCCAGAACGAA

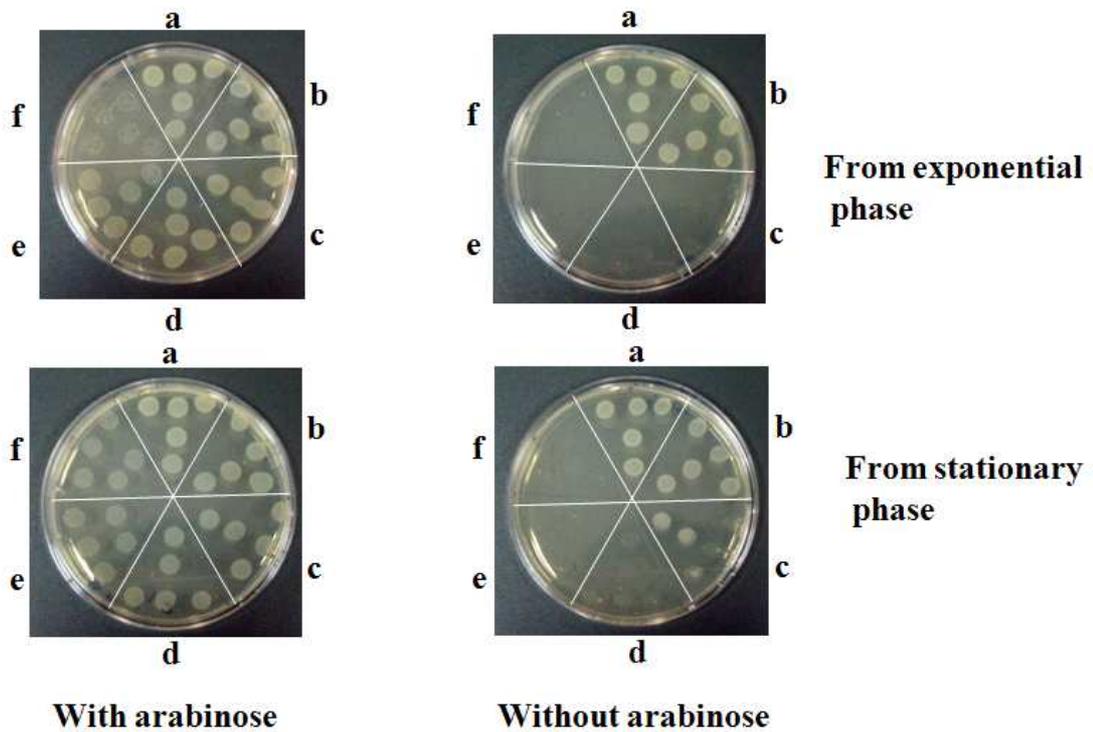
Product: 1539 bp

표 15. Primers used for amplification of *asd* gene

Primer	Sequence (5'-3')
asd-F-BspHI	TCATGAAAAATGTTGGTTTTATCG
asd-R-XbaI	TCTAGAGGTTAGGCTTAATACCCGTG

Product: 1328 bp

Subcultural results for pMMP55



Exponential phase was grown at A600 0.8 and stationary phase upto 3.0. a, 2×10^{-2} diluted; b, 2×10^{-3} diluted; c, 2×10^{-4} diluted; d, 2×10^{-5} diluted; e, 2×10^{-6} diluted f, 2×10^{-7} diluted. File names; 080307 0924 -0931.

그림 10. pMMP55의 특성

3. 변이균주의 백신후보균주로서 가능성 시험

가. 4가지 균주의 병원성 비교실험(약독화 시험)

(1) 실험동물

1주령 산란계 (Brown Nick) 병아리 30마리를 사용하였다. 항생제가 첨가되지 않은 사료와 물을 자유섭취하게 하였다.

(2) 균주

JOL394, JOL914, JOL915, JOL916을 각각을 shaking incubator (37도, 150 rpm)에서 16시간 배양 후 OD₆₀₀ 값을 근거로 농도를 구하여 접종하였다. 실제 생균수를 알기 위해 LB agar에서 colony count를 실시하여, LD50 값 산출을 위해 생균수를 적용하였다.

(3) 실험design

다음 표 16과 같이 10 또는 20마리씩 균으로 나눠 다양한 양의 생균을 접종하였다. 표에서 Dose은 log10으로 환산하여 제시하였다. 각 균주를 여러 농도로 10-20마리씩 경구접종하여, 임상증상이 나타나고 패혈증이 없는 것이 확인되는 시기까지의 폐사수를 계수하였다. 폐사의 경우 BGA에 내부장기를 직접 도말하여 폐사원인을 확인하였으며, 접종균으로 인하여 50%가 폐사하는 농도를 구하여 비교함으로써 병원성이 얼마나 하감되었는지 조사하였다.

(4) 폐사수 및 임상조건

접종 후 3주 동안 폐사 유무를 관찰하였다. JOL394, JOL914, JOL915 접종군에서는 접종 4일 후부터 침울 증상이 나타나 5-6일 후부터 폐사하기 시작하였다(표 16). JOL916균은 증상을 나타내지 않고 폐사도 없었다.

표 16. 반치사랑 결정시험에서 접종 후 폐사 수(마리)

Strain	Dose	n	Days post inoculation																				
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
JOL394	9	20						4	13	2													
	8	20						1	8	1	2												
	7	20								3	1		1										
	6	20																					
	5	20																					
JOL914	10	10										1	1		1				2	1			
	9	10							1	1	2	1											
	8	10										1	1		1	1							
	7	10										1											
JOL915	10	10								7	2												
	9	10							2	4	2												
	8	10								3	2								2				
	7	10								2		1			1								
JOL916	10	20																					
	9	20																					
	8	20																					
	7	20																					
	6	20																					

(5) 반치사랑

LD₅₀ 값은 Reed and Muench (1938)의 방법을 따라 산출하였다 (표 17). Lon gene 또는 cpxR gene만의 결실로 병원성이 매우 달라지지 않지만 두 가지를 결실함으로 병원성이 탁월하게 감소되는 것을 확인 할 수 있었다.

표 17. 1주령 산란계 병아리에서 경구접종 시 반치사랑

Strain	Relevant genotype of strain	LD ₅₀ (CFU)
JOL394	wild type, lon+, cpxR+	3.0X10 ⁷
JOL914	Δlon,cpxR+	2.3X10 ⁸
JOL915	lon+, ΔcpxR	2.1X10 ⁸
JOL916	lon,ΔcpxR	>2.8X10 ¹⁰

나. 병리소견 비교

(1) 균주

JOL394, JOL914, JOL915, JOL916을 각각을 shaking incubator (37도, 150 rpm)에서 16시간 배양 후 OD₆₀₀ 값을 근거로 농도를 구하여 접종하였다.

(2) 실험동물 및 실험 design

1주령 산란계 (Brown Nick) 병아리 90 마리를 사용하였다. 항생제가 첨가되지 않은 사료와 물을 자유섭취하게 하였다. 1주령 병아리 18마리씩 5개 군으로 나눠, 4가지 균주를 2 x 10⁷ CFU씩 경구투여 하였다. 임상증상 및 폐사수를 매일 관찰하였으며 2주후에 각 군에서 5마리씩 안락사 하였다. 안락사 후 병리소견을 관찰하였으며, 장기내 세균 유무를 조사하였다.

표 18. 실험 개요

Strain	n	Inoculation			Gross lesion	
		Dose	Route	Age(Week)	n	
JOL394	18	2 x 10 ⁷	PO	1	5	
JOL914	18	2 x 10 ⁷	PO	1	5	Sacrifice _{nd} on the 2 nd week post vaccination
JOL915	18	2 x 10 ⁷	PO	1	5	
JOL916	18	2 x 10 ⁷	PO	1	5	
Uninoculated	18	PBS	PO	1	5	

(3) 임상증상 관찰 및 폐사확인

백신접종 2주동안 병아리의 임상증상 및 폐사유무를 관찰하였다. 폐사를 발견한 경우 BGA에 간을 direct stamp하여 접종균에 의한 폐사임을 확인하여 폐사로 인정하였으며, 그 외 폐사는 사고사로 처리하였다. 폐사수를 표 19에 나타내었다. JOL394 접종군은 3 일째부터 침울을 나타내다가 4일째부터 폐사하기 시작하여 10마리가 폐사하였다. JOL914접종군은 7일째까지 아무 증상을 보이지 않았으나 뒤늦게 증상을 보여 3마리가 폐사하였다. JOL915접종군은 4일째부터 증상을 나타내다가 10일까지에 4마리가 폐사하여 그 후에는 빠르게 회복하였다. JOL916접종군은 8일령부터 3마리가 증상을 보였으나 결국 폐사를 보이지 않았다. 폐사율을 비교하면 JOL394 > JOL915 > JOL914 >> JOL916의 순으로 반치사량 시험 결과와 대략 일치된다 (표 20).

표 19. 병리소견 비교실험 폐사수

Strain	n	Days post inoculation													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
JOL394	18				1	2	1	2	2	1			1		
JOL914	18									1	1			1	
JOL915	18						2			1	1				
JOL916	18														
Uninoculated	18														

표 20. 변이균주 폐사율 비교

Strain	n	Mortality	Death rate (%)	95% CI
JOL394	18	10	55.6	32.5-78.5
JOL914	18	3	16.7	0-33.9
JOL915	18	4	22.2	3.0-41.4
JOL916	18	0	0	0
Uninoculated	18	0	0	0

(4) 병리소견 평가

백신접종 2주 후 병아리를 안락사한 다음 해부검사하여 주요 장기에 대하여 병리소견을 평가하였다. Liver의 병변으로 enlargement, bronze color, white spot의 정도를, spleen의 병변으로 enlargement, white spot의 정도를 각각 관찰하고 장기별로 0점(정상)부터 3점(심각)까지 동물마다 점수화하였다. 병리소견 점수를 표 21에 요약하였다. 본 실험에서 폐사를 보인 JOL394, JOL914, JOL915접종군은 spleen에서 낮은 점수(경미한 병리소견)를 보였다. JOL916 접종군은 폐사하지 않았으나 본 접종량으로 접종 2주후에 병리소견이 관찰되었다.

표 21. 접종 2주 후 병리소견 (Mean ± SD)

Strain	n	Gross lesion ^a	
		Liver	Spleen
JOL394	5	1.40 ± 0.80 ^b	0.80 ± 0.40
JOL914	5	1.20 ± 0.40	1.00 ± 0.63
JOL915	5	1.20 ± 0.00	0.60 ± 0.49 ^c
JOL916	5	1.00 ± 0.89 ^c	0.40 ± 0.20 ^c
Non	5	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c

(5) 미생물학적 검사

각 백신균주가 접종 2주후 병아리 안에 생존하고 있는지 관찰하기 위하여 간장 및 비장을 Buffered peptone water (BPW, Becton, Dickinson and Company, France)에서 분쇄하고 상층액을 Brilliant Green Agar (BGA, Becton, Dickinson and Company, France)에 접종하여 colony 출현 유무를 검사하였으며, negative인 경우 enrichment culture를 BPW에서 37도 16시간 배양 후 Rappaport-Vassiliadis R10 broth (Becton, Dickinson and Company, France)에 1/100 volume 접종하여 42도에서 48시간 배양후 BGA에서 Salmonella의 유무를 확인하였다. 그 결과 JOL916이 가장 높은 비율로 장기내에 생존하고 있는 것이 확인이 되었다 (Table 9).

표 22. 접종 2주 후 각 장기 및 내용물에서 균주 회수

Strain	n	Bacterial recovery							
		Liver		Spleen		Ileum		Ceca ^a	
		Count ^b	No positive ^c	Count	No positive	Count	No positive	Count	No positive
JOL394	5	< 1	0	< 1	0	< 1	0	< 1	0
JOL914	5	< 1	0	< 1	0	< 1	0	< 1	0
JOL915	5	< 1	0	< 1	1	< 1	0	< 1	0
JOL916	5	1.03 ± 0.92	3	2.14 ± 1.75	3	< 1	1	< 1	1
Non	5	< 1	0	< 1	0	< 1	0	< 1	0

^a Cecum wall and cecal content.

^b Mean ± SEM Log₁₀cfu/g.

^c Number of positive sample after enrichment culture.

다. 4가지 균주의 대식세포 침입성 비교 시험

(1) 균주

Salmonella enterica serotype Gallinarum 야외균주 JOL394 및 변이균주 JOL914, JOL915, JOL916을 각각 -80도 freezing culture에서 LB broth에 접종하여 37도 shaking incubator (80 rpm) 에서 16시간 배양하여 다음 실험에 사용하였다.

(2) Chicken abdominal macrophage culture (AEC)

25주령 산란계 (Brown Nick) 복강에서 macrophage를 회수하기 40시간 전 3% Sephadex (Sigma G5050)를 복강에 주입한다. 안락사 후 혈액이 섞이지 않도록 조심하여 무균적으로 0.5 U/ml heparin-PBS로 복강을 세척한다. 세척액을 원심튜브에 모아

어름에 10분이상 세워놓는다. 상층액을 회수하여 8°C에서 300 x g 15분 원심분리하여 pellet을 complete RPMI 1640 media에 부유시킨다. Trypan blue 로 mononuclear cell의 생세포수를 계수하여 1 x 10⁵ 에서 1 x 10⁶ CFU/ml 정도로 조절하여바로 24 well culture plate에 0.5 ml 씩 분주하여 (duplicate), 40°C에서 2시간만 5% CO₂ 를 함유하는 대기압에서 배양하여 plate에 부착시킨다. PBS로 3번 세척 후 RPMI를 부어 일주야 배양하고 침입성 실험에 사용하였다 (Higgins et al. 2007).

(3) Invasion test

각 well을 PBS로 3번 세척한 다음 시험균주를 10 MOI (10 bacteria/cell)가 되게 RPMI-1640로 적절하게 희석하여 배양세포에 첨가한다. 60분 동안 배양 후 gentamicin 을 100 µg/ml 가 되게 첨가하여 1시간 배양함으로 세포외 세균을 사멸시킨다. PBS로 3번 세척하여 100 ul 1%(v/v) Triton X-100 로 10분동안 반응시켜 세포를 용해시킨다. 적절하게 희석한 다음 BGA 에 spreading하였다. BGA plate는 37도에서 24시간 배양 후 colony 를 계수하였다.

그 결과 lon 유전자 결실로 침입성이 향상되지만 cpxR결실로 향상되지 않고, en 유전자를 모두 결실한 경우에 침입성이 향상되어 있음을 알 수 있었다 (표 23).

표 25 유전자 결실이 대식세포 침입에 주는 영향

Strain	Genotype	Internalization (Log ₁₀ cfu/mL) ^a
JOL394	Wild type	3.32 ± 0.03
JOL914	Δlon	4.05 ± 0.02 ^b
JOL915	ΔcpxR	3.07 ± 0.09 ^c
JOL916	ΔlonΔcpxR	3.81 ± 0.03 ^b

^a Number of intracellular bacteria in chicken abdominal macrophage after exposure with m.o.i. of 10 for 60 min and killing of extracellular bacteria by gentamicin for 30 min (Mean ± SEM).

^b Significant difference between JOL394 ($p < 0.001$).

^c Not significant difference between JOL394 ($p = 0.057$).

라. 4가지 균주의 면역원성 비교시험

(1) 균주

JOL394, JOL914, JOL915, JOL916을 각각을 shaking incubator (37도, 150 rpm)에서 16시간 배양 후 OD₆₀₀ 값을 근거로 농도를 구하여 접종하였다.

(2) 실험동물 및 실험 design

1주령 산란계 (Brown Nick) 병아리 25 마리를 사용하였다. 항생제가 첨가되지 않은 사료와 물을 자유섭취하게 하였다. 군당 5마리로 구성하여 JOL394, JOL914, JOL915, JOL916을 1주령에 2×10^7 CFU씩 경구접종 하는 군 및 미접종대조군의 5개 군으로 나왔다. 접종 2주후 면역측정을 실시하였다 (표 3).

표 26 실험 design

Strain	<i>n</i>	Dose (DFU)	Route	Plan
JOL394	5	2×10^7	PO	2주후 샘플채취 및 면역측정 (안락사 전 후에 채취)
JOL914	5	2×10^7	PO	
JOL915	5	2×10^7	PO	
JOL916	5	2×10^7	PO	
Uninoculated	5	PBS	PO	

(3) 샘플채취

Heparin을 첨가한 추사기로 말초혈액 0.8 ml를 채혈 후 원심분리 (40 rpm, 15 min, 실온) 하여 얻은 림프구는 세포성면역측정시험에 사용하였고, 혈장은 냉장보관(4C) 하여 혈장 IgG 측정에 사용하였다. 분비형 IgA측정의 목적으로 동물을 안락사 시킨 다음 Meckel's diverticulum을 가운데 포함하는 부위를 10 cm 길이로 절제하여 1 ml의 PBS로 세척하여 세척액을 원심분리 (13,000 rpm, 2 min, 4°C)하고 투명한 상층액을 얻었다. 상층액에 100mM PMSF, 1% Sodium azide, 5% BSA(bovine serum albumin)를 각각 1 ml당 10 μ l씩 첨가하고 4°C에 보관하여 익일 ELISA의 sample로 사용하였다.

(4) Enzyme-linked immunosorbent assay

특이면역 정량을 위해 outer membrane fraction (omp fraction)을 야외균주 JOL420에서 정제하였다. Omp fraction은 modified lysozyme-osmotic shock method에 의하여 얻는다. 즉, 150 ml의 배양액을 원심분리(7000 g, 10 min, 4C)하여 Pellet 을 얻는다. 800 μ l의 100mM Tris-HCl (500mM sucrose, 0.5mM EDTA, pH8.6)에 재부유시켜 lysozyme을 첨가한다 (400 μ l of 4 mg/ml). 그 즉시 3.2 ml의 50mM Tris-HCl (250mM sucrose, 0.25mM EDTA, 2.5mM MgCl₂, pH8.6) 를 첨가하여 ice 위에서 15 min incubation 한다. 이를 원심분리 (7000 g, 6 min)하여 pellet을 얻는다. Pellet을 4 ml의 20 mM Tris-HCl (pH8.6)에 재부유시켜 sonication후 원심분리 (7000 x g, 6 min, 4C)하여 상층액을 얻는다. 상층액을 초고속원심분리기로 원심(132,000 g, 4C, 1 hr)하여 pellet을 얻는다. Pellet (cell envelopes)을 4 ml의 20mM Tris-HCl containing 1% Sarkosyl (pH8.6)에 재부유시켜 평상에서 30min 동안 incubation하고 다시 초고속원심분리기로 원심(132,000 g, 4C, 1 hr)하여 상층액을 얻는다. 항원을 flat-bottom 96 well high binding

ELISA plate (Greiner, Germany)에 흡착시켜서 chicken IgG (또는 IgA) ELISA quantitation kit (Bethyl, Tx, USA)를 사용하여 사용설명서를 따라서 실시하였다. 즉, 1%BSA (bovine serum albumin)이 첨가된 50 mM Tris-NaCl buffer (pH 8.0) 로 비특이반응을 blocking한 다음 sample을 적절하게 희석하여 반응시키고 HRP (horse radish peroxidase)로 label된 2차항체를 결합시키는 indirect ELISA를 실시하였다. JOL916이 월등히 우수한 체액성면역을 유도하였으며, 다른 균주로는 좋은 반응을 보이지 않았다 (그림 10). 점막면역에 해당되는 분비형 IgA의 측정 결과 JOL916이 JOL394(야외균주)보다 우수하지는 않지만 특이면역을 잘 유도하고 있는 것으로 확인되었다 (그림 11).

Plasma IgG levels at 2nd weeks post inoculation

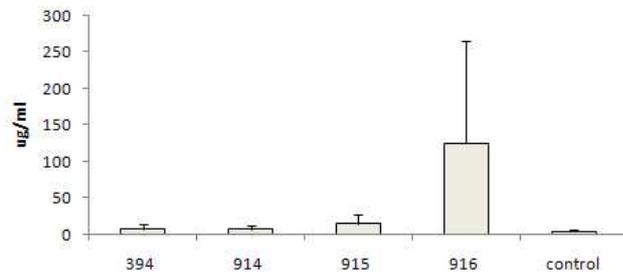


그림 11 항원특이적 혈장 IgG

Intestine IgA levels at 2nd weeks post inoculation

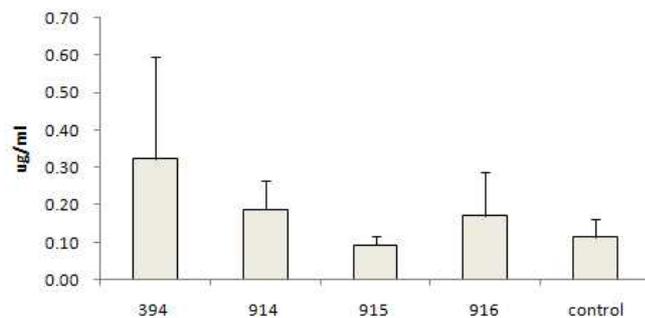


그림 12 항원특이적 분비성 IgA

(5) 세포성면역 측정

세포성면역 측정을 위해 말초림프구를 이용한 lymphocytes proliferation assay 를 실시하였다. 원심분리하여 얻은 림프구를 Trypan blue exclusion test로 생세포수를 계수한 다음 RPMI 1640 complete medium (송아지 혈청 및 항균항진균제 포함) 에 부유시

켜 1×10^4 cfu/100 μ l/well가 되게 96-well plate 에 분주하였고, *S. Gallinarum* soluble antigen과 함께 72시간 배양하였다. Soluble antigen은 다음 방법으로 얻었다. 즉, 200 ml의 배양액을 원심분리하여 pellet 을 얻는다. PBS로 2회 세척 후 40 ml 의 PBS에 재부유시켜 freeze-thaw를 3 번 반복한다. 이 용액을 sonication후 4,250 x g, 4 $^{\circ}$ C에서 20 분 동안 원심분리하여 얻은 상층액을 또 다시 30,000 x g, 4 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 회수하여 농도를 결정한다. 72시간 배양 후 도립현미경으로 관찰 후 Lonza사의 ViaLight[®] Plus Kit 를 사용하여 Luminescence assay를 실시하였다. Stimulation Index (SI)를 다음과 같이 산출하여 백신접종군에서 세포성면역이 유도되어 있는지를 확인하였다. 그 결과 JOL916이 세포성면역 유도력이 우수한 것으로 확인되었다 (그림 12).

식) $SI = (\text{항원첨가된 well에서 측정된 발광량}) / (\text{항원을 첨가하지 않은 well에서 발광량})$

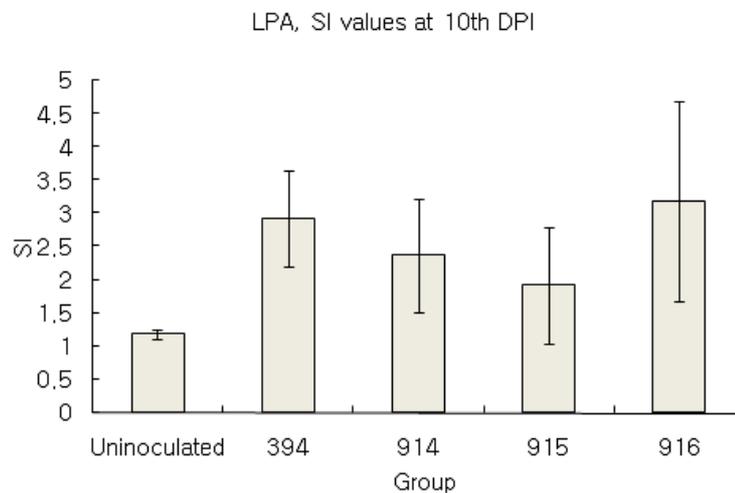


그림 13 항원특이적 세포성면역

(6) 결론

JOL916은 parental strain인 JOL394등과 비교하였을 때 면역유도력이 우수함을 나타내었다.

마. 결론

이상의 변이균주간 비교실험을 통하여 lon 및 cpxR을 결실시킨 경우 나타나는 약독화 수준이나 병원성은 *Salmonella Typhimurium* 의 경우와 상이하지만, 두 유전자를 모두 결실시킨 경우 (JOL916), 충분한 약독화와 면역원성을 얻을 수 있어 백신후보균주로 적합하다고 판단되었다.

4. 백신-도전 실험을 위한 예비실험

JOL916의 백신접종-도전 실험을 design하기 위하여 먼저 닭에서 중요한 3가지 혈청형 (Salmonella Gallinarum, Enteritidis, Typhimurium)의 변이균주 및 야외균주를 접종 관찰하는 실험 및 백신-도전 실험에 사용할 Salmonella Gallinarum 야외균주의 선택을 위한 실험을 실시하였다.

가. 3가지 백신후보균주를 경구투여 하는 실험

(1) 실험동물

일반 농장에서 구입한 4주령 토종닭(Korean) 15마리, 3주령 육계 10마리를 5마리씩 사육하고 항생제가 함유되지 않은 사료와 수돗물을 자유 섭취시켜 사육하였다. 실험 시작시에 모두 5주령이었다.

(2) 실험design

아래 표 25와 같이 5개 군으로 나누어서 5주령에 백신후보균주를, 5주후(5 week post vaccination: wpv; 10주령)에 각각 해당되는 야외강독균주로 challenge inoculation하였다. 투여량은 백신후보균주 하나당 5×10^8 cfu/200 μ l/bird를, 야외균주는 5×10^7 cfu/200 μ l/bird를 경구투여 (PO)하되, 야외균주를 3가지 혼합하는 경우 각각 5×10^6 cfu을 200 μ l에 혼합시켜 투여하였다.

표 25. 예비실험의 개요

group	animal	number	vaccination (5 week)	challenge (5 wpv)
A	Korean	5	STM/PO	STW/PO
B	Korean	5	SGM/PO	SGW/PO
C	Korean	5	SEM/PO	SEW/PO
D	Broiler	5	STM+SGM+SEM/PO	STW+SGW+SEW/PO
E	Broiler	5	PBS/PO	SGW/PO

(3) 균주

여기서 사용한 균주는 백신후보균주 3가지 및 야외균주 3가지이며 다음과 같다 (표 26). 균주는 glycerol-TSB freezing culture (-80C)에서 TSA에 streaking하여 overnight culture (37C)후 one colony를 다시 TSA에 streaking하여 overnight culture (37C)하여 얻은 one colony를 TSB에 overnight culture (37C, 200 rpm, 17~18 hours)하고 PBS로 3번 세척한 후 적당한 농도로 20%-sucrose PBS에 재부유시켜 투여하였다.

표 26. 예비실험에 사용한 균주

Strain	Specification	Purpose
JOL911	<i>S. Typhimurium</i> ($\Delta lon\Delta cpxR$)	Vaccination
JOL389	<i>S. Typhimurium</i> wild type	Challenge
JOL916	<i>S. Gallinarum</i> ($\Delta lon\Delta cpxR$)	Vaccination
JOL420	<i>S. Gallinarum</i> wild type	Challenge
JOL919	<i>S. Enteritidis</i> ($\Delta lon\Delta cpxR$)	Vaccination
JOL860	<i>S. Enteritidis</i> wild type	Challenge

(4) 임상증상 관찰

백신후보균주 접종후 및 야외균주 접종 후 anorexia, depression, diarrhea를 매일 0(healthy)~3(severe)로 개체별로 평가하여 점수화 하였고, mortality도 확인하였다.

3가지 혈청형의 백신균주 접종 후 anorexia 및 depression은 특별히 관찰되지 않았다. Diarrhea는 12일까지 관찰하였고 균평균 0~1.8 정도이었는데, 이는 기생충 등 다른 원인으로 추정되어 백신후보균주 접종의 영향으로 생각할 만하지 않고 접종의 영향이 있었다고 해도 매우 경미한 것으로 생각한다. (본 실험에서 diarrhea score 3은 본 연구 기타 실험에서 score 1.5 정도임)

야외균주 challenge접종후 D군(3종혼합)과 E(control)군에서 각각 2마리씩 폐사하였고 나머지 백신후보균주 접종군에서는 폐사를 보이지 않았다. Anorexia와 diarrhea를 7일간의 score를 군별로 합계하여 다음 그래프에 표시하였다. 백신접종하지 않은 control(E)군에서 건강상태가 악화되어 식욕감퇴와 설사를 보였다.

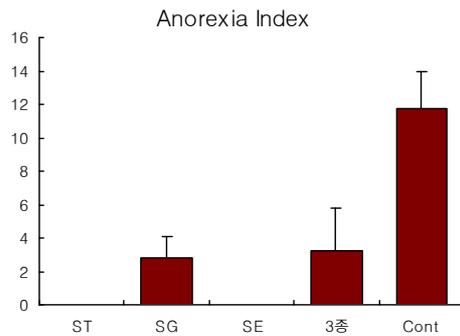


그림 13. 식욕감퇴지수; 7일간의 군별 합계를 나타냈다.

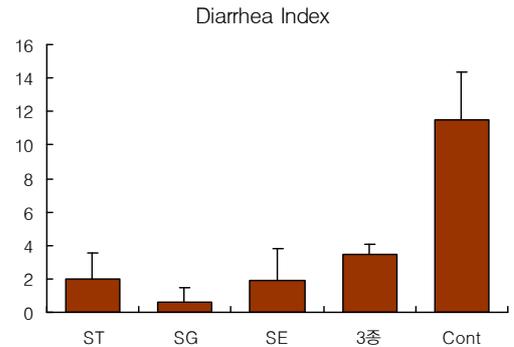


그림 14. 설사지수를 7일간의 합계로 나타냈다.

(5) Fecal shedding 조사

1, 4, 7, 12, 21 dpv에 각 개체별로 0.5 ml의 분변을 채취하여 4.5 ml의 BPW(buffered peptone water)에 부유시킨 다음(10배 희석) PBS로 100배, 1,000배, 10,000배로 희석하여 100 μ l씩 BGA(brilliant green agar) plate에 spreading 하여 24~48시간 37C에서 배양하여 특이적 colony를 count하여 분변 1ml당 Salmonella수를 계수하였다.

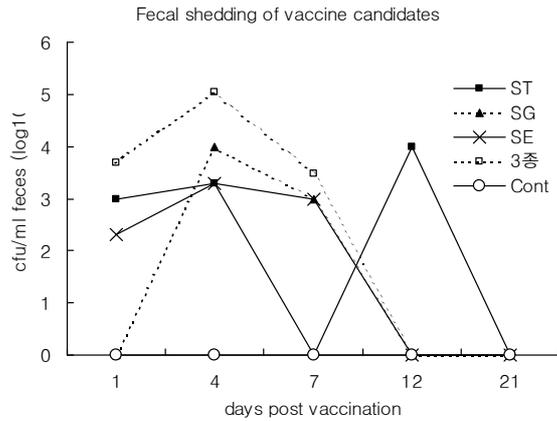


그림 15. Challenge 후 fecal shedding. 분변 1ml당 검출수를 log(10) scale로 표기하였다.

(6) 병리소견 관찰

부검 후 liver, spleen, genital organ, small intestine을 관찰하여 변병을 평가, 0(normal)~3(severe)로 점수화하였다. S. Gallinarum 백신 후보균주의 방어효과가 어느 정도 있는 것으로 확인되었다.

(7) 야외균주의 내부장기 잔존수 조사

부검 후 liver, spleen, genital organ (발달된 경우)을 BPW에 채취하여 파쇄한 다음 PBS로 적절하게 희석하고 BGA에 spreading하여 Salmonella 양 세균을 검출하였다. 장기내 세균분포는 보다 상세한 실험이 요구되는 것으로 확인되었다.

표 27. 병리소견 및 장기에서 세균분리

group	gross legion index (average) ¹			Recovery ² (number of positive/total birds)			
	intestine	liver	spleen	liver	spleen	genital organ	any of one organ
	petechia	enlargement white spot	enlargement white spot				
A	2.4	0	0	1/5	2/5	-	2/5
B	4.7	2.0	0	4/5	4/5	1/2	5/5
C	5.0	0.2	0	2/5	2/5	2/2	4/5
D	6.2	0.3	0.6	3/3	3/3	1/2	3/3
E	5.0	3.8	0.7	3/4	4/4	2/3	4/4

1) 소장(상부, 중부, 하부의 합계score), liver, spleen의 평균값을 나타냈다.

2) 각 장기에서 Salmonella가 검출이 된 동물의 수를 군별로 총수와 함께 표시하였다.

(8) 결 론

후보균주를 경구투여한 경우의 생체반응을 어느 정도 파악할 수 있었다. 앞으로 S. Gallinarum mutant strain부터 그 백신균주로서의 적합성을 평가할 계획이나 이번 실험에서는 control군에서 겨우 2/5마리의 폐사를 보인뿐이어서 향후 challenge의 방법을 검토할 필요가 있음을 알 수 있었다.

나. S. Gallinarum 백신후보균주 평가를 위한 야외균주 및 경로 선정 실험

(1) 개요

S. Gallinarum mutant strain (JOL916)의 백신으로서의 유용성을 조사하기 위해 병원성이 강력하며 병원성과 백신에 의한 방어효과가 동시에 쉽게 관찰될 필요가 있다. 위 실험에서는 이전에 어느 정도의 사망률을 보인 야외균주 JOL420을 5×10^6 cfu/200 μ l/bird씩 경구투여하였으나 백신후보 균주 JOL916를 접종하지 않은 군에서 1마리/5마리의 폐사를 보인 뿐이었다. 따라서 본 실험에서는 JOL916주의 방어력을 측정하는데 적합한 야외균주 및 투여경로를 알아보기 위해 출처와 배경등을 비교적 잘 알수 있는 4개 균주를 선택하여 그 중 한균주는 3가지 경로로 투여하여 폐사수를 관찰함으로써 병원성을 비교하는 시험을 실시하고자 한다.

(2) 실험동물

15일령 육계병아리 30주를 일반농장에서 구입하여 6개 군으로 나누어 실험에 사용하였다. 항생제를 함유하지 않은 사료를 급여하였다.

(3) 실험 design 및 균주

아래 표에 나타낸 바와 같이 JOL419, 420, 421, 422의 각 야외균주를 5×10^6 cfu/200 μ l/bird씩 경구투여(PO), 피하접종(SC), 또는 근육접종(IM)하였으며 매일 폐사수를 관찰하였다. 폐사한 경우 해부하여 간과 비장에서 무균조작을 통해 각 야외균주를 분리하여 freezing culture를 작성하여 향후실험에 사용하였다.

표 28. 병아리에서 Salmonella serovar Gallinarum의 4가지 야외균주 및 3가지 접종경로의 병원성발휘정도를 비교하는 시험의 개요

Group	Number	Strain(JOL)	Routes	Dose
A	5	419	PO	5×10^6 cfu/200 μ l
B	5	420	PO	
C	5	421	PO	
D	5	422	PO	
E	5	420	SC	
F	5	420	IM	

(4) 폐사수 관찰

10 dpi 까지 관찰한 결과 다음과 같이 20%~100%의 폐사률을 보였다. 4가지 야외 균주 가운데 JOL422가 가장 병원성이 강함을 알 수 있었다 (그림 16). 또한 3가지 접종경로 중에서는 IM과 SC가 PO보다 훨씬 강함을 확인할 수 있었다.

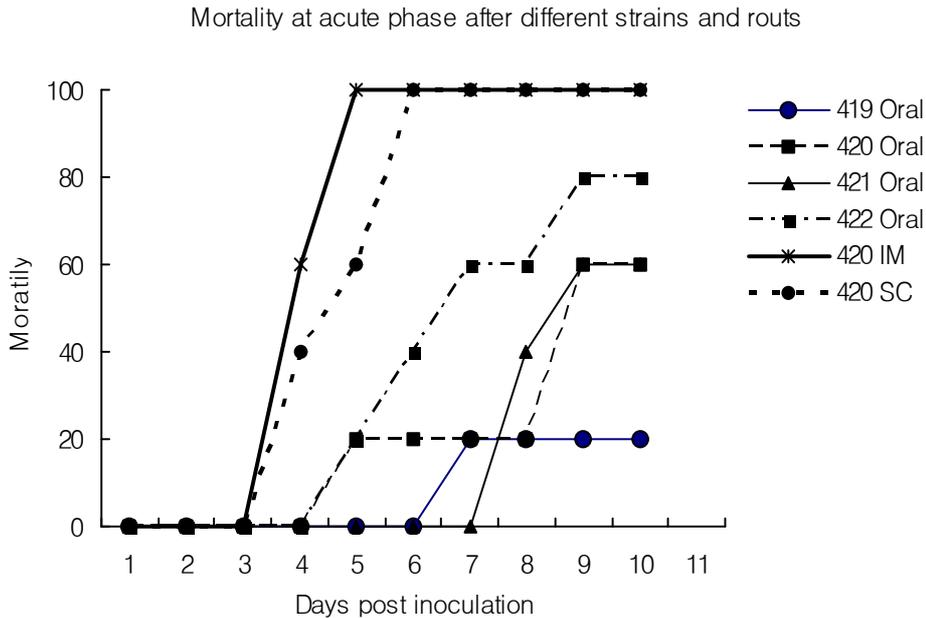


그림 16. 병아리에서 Salmonella serovar Gallinarum 야외균주의 병원성비교실험 결과. Oral(경구투여) group에서 JOL422주가 가장 높은 폐사률을 보였고 JOL420의 3가지 경로를 비교할 때 IM(근육접종)와 SC(피하접종)에서 높은 폐사률을 보였다.

(5) 결론

근육접종이 피하접종보다 투여가 용이한 점과 병원성도 약간 빠르게 나타난 것을 보아 JOL916방어력실험에 사용할 challenge strain으로서 JOL422를 근육접종으로 투여하는 것이 가장 강력한 도전을 줄 수 있다. 또한 자연감염에서는 경구적으로 감염 될 것으로 생각되어 있어, 실험의 목적에 따라 본 균주의 도전감염을 위하여 접종경로를 선택하면 됨을 알 수 있다.

5. 백신후보균주 JOL916의 접종형태 및 경로 모색 실험

가. S. Gallinarum mutant strain 생균/사균 및 경로에 따른 면역반응과 방어력 평가실험

(1) 개요

S. Gallinarum mutant strain (JOL916)의 백신으로서의 유용성을 조사하기 위해 현재 시판되어 있는 SG9R과 같은 투여시기 (6주 및 12주령)에 충분한 양의 백신후보균주를 다양한 경로로 투여하여 면역반응과 challenge에 대한 방어효과 및 부작용 유무를 관찰하였다.

(2) 실험동물

전북 고창에 위치한 산란계 병아리 사육농장에서 5주령 하이라인 62주를 분양받아 12개 cage에서 사육하였다. 항생제를 함유하지 않은 사료를 급여하였다. 10주령직전에 산란계용 계단식계사로 이동하였다. 실험 시작 직전에 분변검사로 Salmonella type colony가 확인된 개체 2마리를 면역반응 측정군에서 배제하였다. 실험 기간에 3~4마리에서 흑색설사가 계속되었는데, 회충감염이 확인되어 전체에 기생충약을 투여하였다.

(3) 실험design

1차접종은 6주령, 2차접종은 12주령 (6wpv), challenge는 17주령(11wpv)에 실시하였다. 각 군 5마리를 면역반응측정용으로 관리하였다.

표 31 실험 design

Group	Number	1st(6week)	2nd(12week)	Chal(17week)
A	10	live/oral	live/oral	
B	10	live/oral	killed/im	
C	10	live/sc	live/im	JOL422
D	10	live/sc	killed/im	5×10^7 cfu/200 μ l
E	10	live/oral	-	IM
F	10	-	-	

(4) 균주

JOL916은 freezing culture (-80C)에서 TSA(Tryptic soy agar) 에 2번 streaking 하여 각각 37C over night incubation하여 얻은 colony를 TSB(Tryptic soy broth)에 접종하여 200rpm, 37C shaking incubator에서 배양하여 centrifuge (13,000 rpm, 1.5 min)하여 얻은 pellet을 멸균PBS로 3번 washing하여 1.45×10^8 cfu/200 μ l/bird (1차 접종) 또는 5×10^8 cfu/200 μ l/bird (2차 접종)의 농도로, oral inoculation을 위해서는 20% sucrose in PBS에, SC(피하) 및 IM(근육) inoculation을 위해서는 PBS에 각각 희석하여 투여 또는 접종하였다. 피하접종은 neck에 하였으며 익일 변병의 유무를 확인하였으나 염증반응을 포함하여 아무 변화도 없었다.

Challenge inoculation을 위해 병아리에 감염시켜 얻은 JOL422주를 freezing culture 상태로 보관해놓은 것을 JOL916과 동일한 방법으로 제조하여 5×10^7 cfu/200 μ l/bird (IM) 접종하였다.

(5) 백신접종 후 임상증상 평가

Anorexia, depression, diarrhea를 매일 관찰하여 0(normal)~3(severe)로 점수화하였다.

Anorexia 및 depression은 1차 2차 모두 백신후보군주 접종후 모두 정상으로 접종 전후에 변화가 없었다. 각 투여군별로 평균값 (+SD)을 graph로 나타냈다 (그림 17). SC group에서 1dpv에 매우 경미한 설사를 보였으나 3dpv이후에는 control군과 같은 수준으로 돌아갔다. 2차 접종후 설사는 관찰되지 않았다.

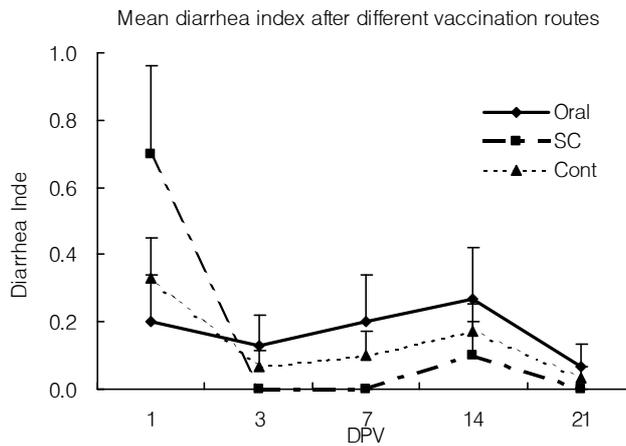


그림 18 JOL916주 접종후 diarrhea index의 변화.

(6) Fecal shedding 조사

1, 3, 7, 14, 21 dpv에 각 개체별로 100 μ l의 분변을 채취하여 900 μ l의 BPW(Buffered peptone water)에 녹인 다음(10배 희석) PBS로 100배, 1,000배, 10,000 배로 희석하여 100 μ l씩 BGA(Brilliant green agar) plate에 spreading 하여 24~48시간 37C에서 배양하여 특이적 colony를 count하여 분변 1ml당 Salmonella수를 계수하였다. 음성인 경우 preenrichment culture (BPW, 37 $^{\circ}$ C, 20hrs)후 selective enrichment culture (Rappaport-vassiliadis R10 Broth, 41.5 $^{\circ}$ C, 48hrs)하여 BGA에서 확인하였다.

1차 접종후 결과를 그림2에 나타낸바와 같이 3dpv에 peak를 보이고 21dpv까지 소멸되었다 (그림 18). 2차 접종후 enrichment culture 검사에서도 salmonella가 전혀 관찰되지 않았다.

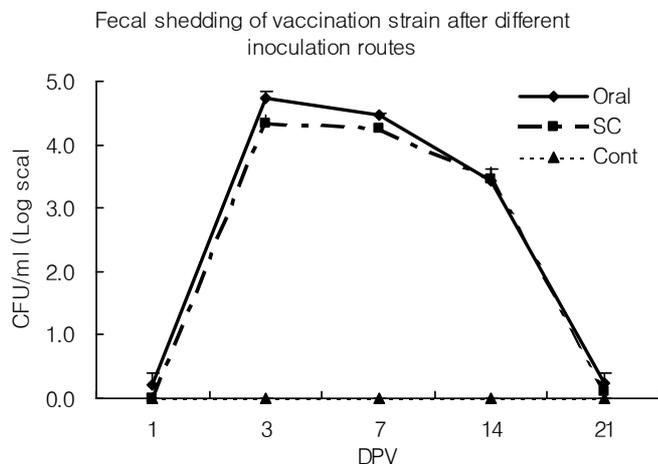


그림 19 JOL916주 접종후 분변에 함유되는 접종균주수

(7) 항원제조

LPS는 LPS extraction kit (Intron Biotechnology, Korea)를 사용하여 추출한다.

Soluble antigen 은 200 ml의 배양액을 원심분리하여 pellet 을 얻는다. PBS로 2회 세척 후 40 ml 의 PBS에 재부유시켜 freeze-thaw를 3 번 반복한다. 이 용액을 sonication후 4,250 x g, 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 얻은 상층액을 또 다시 30,000 x g, 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 회수하여 농도를 결정한다.

(8) plasma IgG 측정

S. Gallinarum mutant strain에서 LPS를 추출하여 indirect ELISA를 실시하였다. 항원을 flat-bottom 96 well high binding ELISA plate (Greiner, Germany)에 흡착시켜서 chicken IgG (또는 IgA) ELISA quantitation kit (Bethyl, Tx, USA)를 사용하여 일반적인 방법으로 indirect ELISA를 실시한다. 즉, 항원 및 sample의 최적농도를 결정하기 위하여 cross titration test를 실시하여 결정된 농도에 따라 항원 coating, blocking, primary antibody reaction, secondary antibody reaction, HRP-substrate colorization, reaction stop 후 492 nm에서 OD value를 결정한다.

1차 접종 후 일단 상승하였으며 2차 접종후 매우 강한 booster효과를 관찰하였다 (그림 19).

Plasma IgG variation

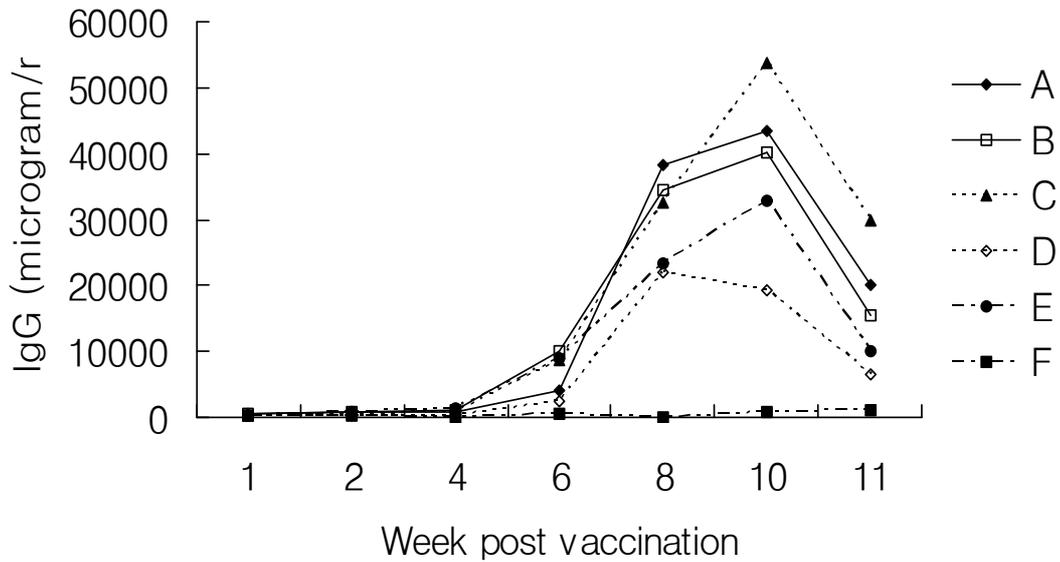


그림 20 혈장 IgG 반응

(9) intestinal mucosal IgA 측정

Intestinal lavage로 얻은 sample를 사용하여 LPS를 항원으로 한 indirect ELISA를 실시하였다. 동물을 희생시키지 않고 소화관 세척액을 얻기 위하여 다음과 같은 방법을 실시한다(Berthelot-Herault et al., Vet Immunol Immunopathol, 2003). 즉, Lavage solution (48.5 mM PEG [polyethylene glycol 3350], 40mM Na₂SO₄, 20mM NaHCO₃, 10mM KCl, 25 mM NaCl)을 경구적으로 12 ml/kgBW(body weight)씩 투여하고 30분 후 pilocarpine을 13mg/kgBW (BW<300 g의 경우 20mg/kgBW)의 용량으로 근육 주사한다. 병아리를 한 마리씩 깨끗한 용기에 수용하고 용기에는 STI/EDTA solution (0.1 mg soybean trypsin inhibitor in 50 mM EDTA, pH 8.0)을 5 ml 씩 넣고 배출물과 잘 혼합하도록 한다. 30분 후 배출물을 회수하고 100mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)를 1ml당 10 μ l씩 첨가한 다음 원심분리기 (13,000 rpm, 2 min, 4 $^{\circ}$ C)로 투명한 상층액을 얻는다. 상층액에 다시 100mM PMSF, 1% Sodium azide, 5% BSA(bovine serum albumin)를 각각 1ml당 10 μ l씩 첨가하고 4 $^{\circ}$ C에 보관하여 익일 ELISA의 sample로 사용한다. 1차 접종후 2~4주사이에 상승하였다가 4주전에 감소하며 2차 접종후 다시 상승하다가 감소하는 것으로 보인다 (그림 20).

Intestinal mucosal IgA variation

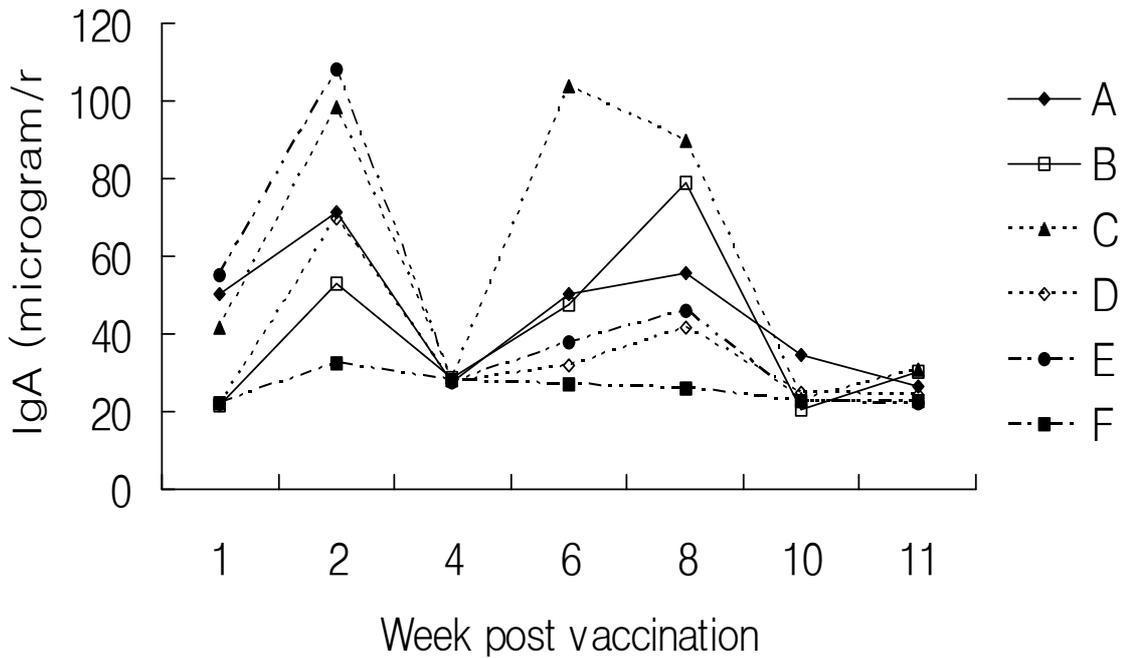


그림 21 소장에서 분비형 IgA 변화

(10) challenge 후 임상증상 관찰

Diarrhea, anorexia, depression 상태 및 mortality를 매일 관찰 평가하였다 (그림 21, 22, 23). E, F군에서 2 dpc (days post inoculation) *S. Gallinarum*에 특이적인 초록색 분변이 나오기 시작하였고 모든 군에서 식욕의 감퇴를 보였다. Depression은 3 dpc 부터 시작되고 4~6dpc에 폐사하는 닭들이 많이 보였으나 이 시기를 살아남은 것들은 7 dpc 부터 회복하기 시작하였다. 회복된 닭의 분변에서 *Salmonella* 양의 세균이 검출되지 않았다. 폐사수를 관찰한 결과 F군(control)에서는 5dpc까지 100%가 폐사하였으나 C, D군은 30%, E군은 50%, A, B군은 60%에 그쳐 백신후보군주의 예방효과가 확인되었다.

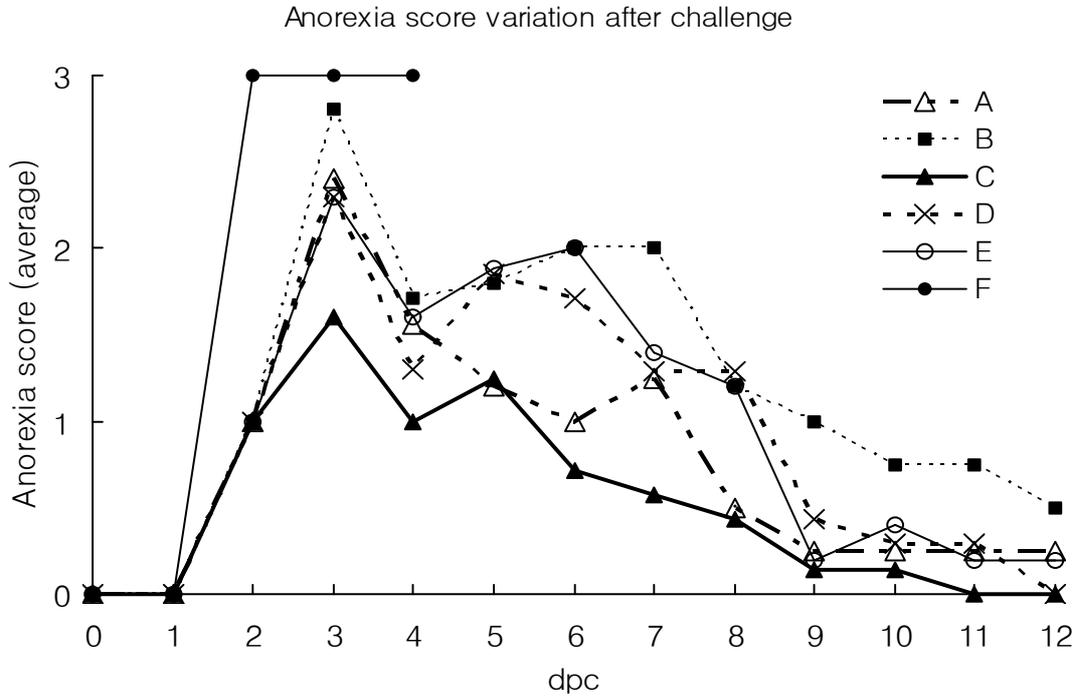


그림 22 식욕은 폐사하지 않던 동물에서는 7dpc이후 회복이 눈에 났었다. 백신후보군 접종군에서는 B군에서 가장 회복이 늦어졌다.

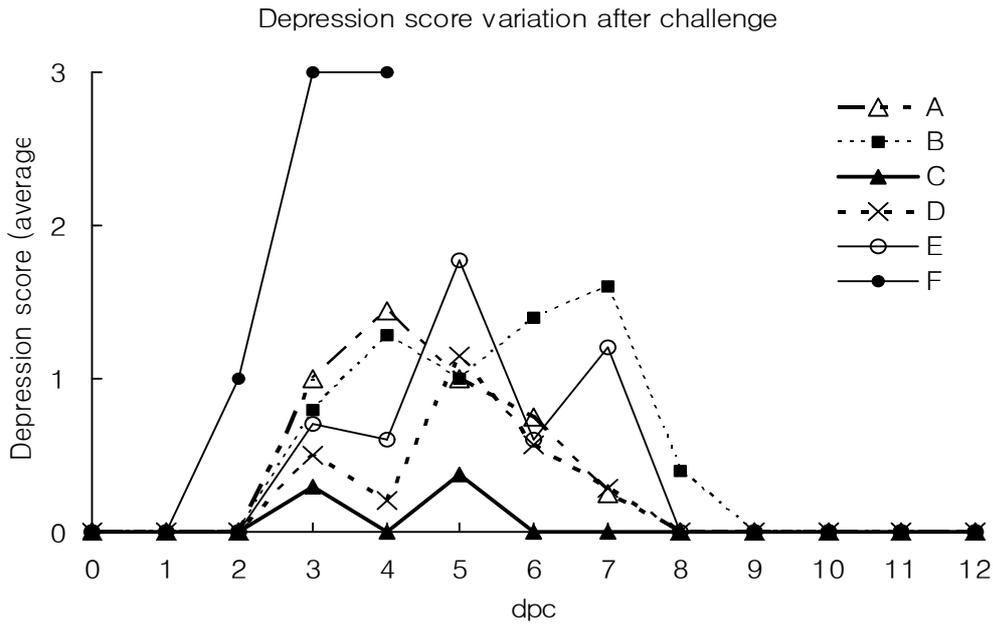


그림 23 원기는 C군에서 가장 상태가 좋았다. F군은 4일까지에 모두 폐사하였다.

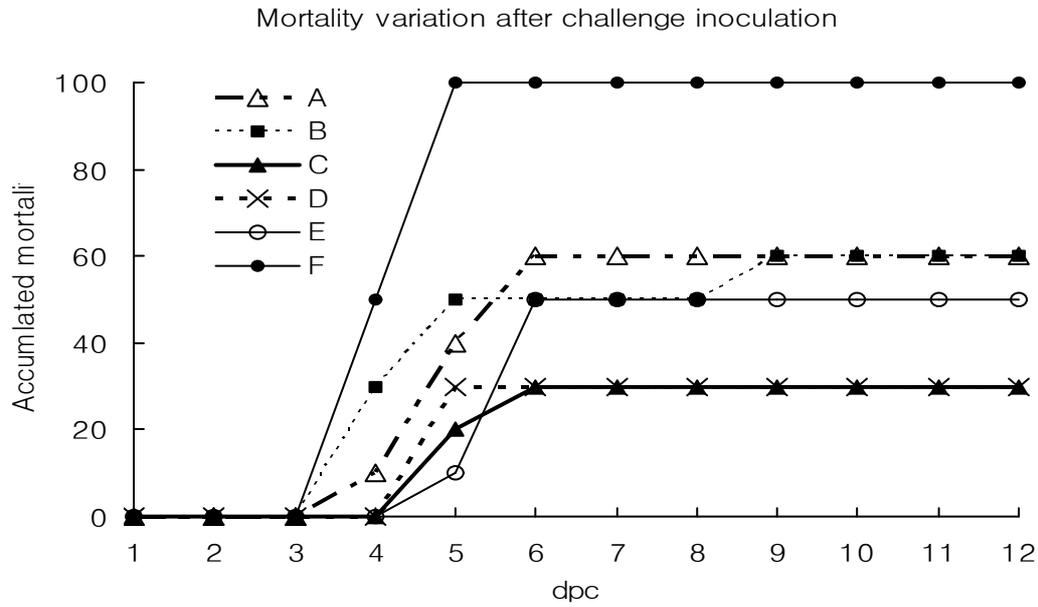


그림 24 F군(control)에서는 5dpc까지에 100%가 폐사하였으나 C, D군은 30%, E군은 50%, A, B군은 60%에 그쳐 백신후보군주의 예방효과가 확인되었다.

(11) 병리소견 관찰

부검 후 liver, spleen, genital organ, small intestine을 관찰하여 병변을 평가, 0(normal)~3(severe)로 점수화하였다 (그림 24, 25). 폐사계는 모두 심한 병변이 관찰되었다. 생존한 동물에서 병변은 백신접종군이 양호하였다.

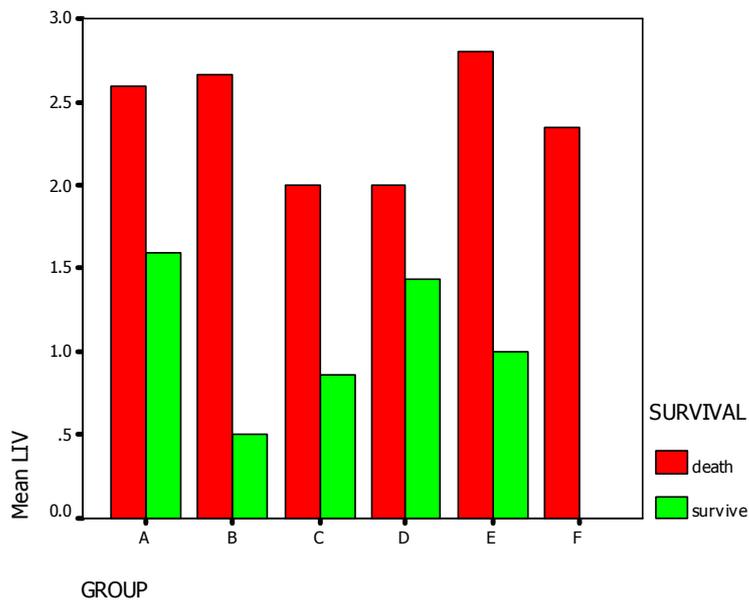


그림 25 Liver병변(평균score)의 폐사동물과 생존동물 비교. 생존동물에서 B군이 가장 병변이 적다. F군은 모두 폐사.

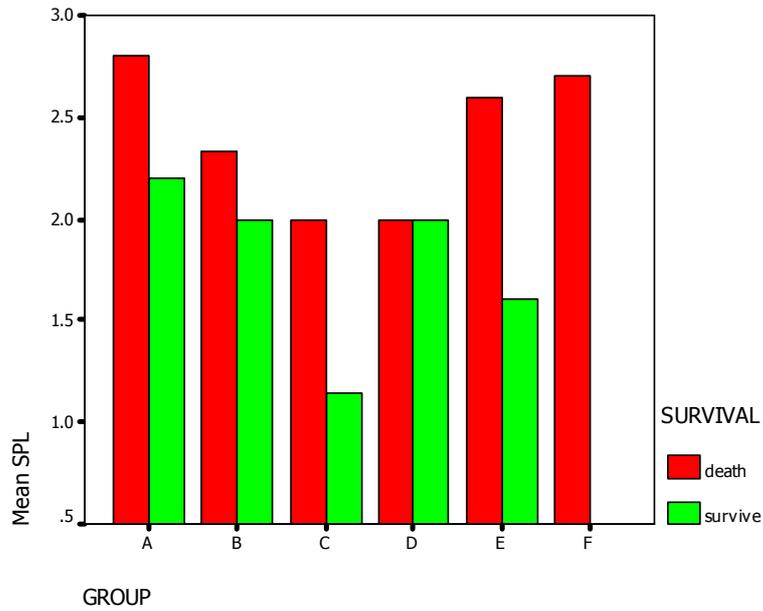


그림 26 Spleen병변(평균score)의 폐사동물과 생존동물 비교. 생존동물에서 C군이 가장 병변이 적다. F군은 모두 폐사.

(12) challenge 균주의 내부장기내 잔존수 조사

부검 후 liver, spleen, genital organ (발달된 경우)을 BPW에 채취하여 파쇄한 다음 PBS로 적절하게 희석하고 BGA에 spreading하여 장기 1g당 세균수를 계수하였다. 생존한 동물에서 주로 비장에 세균이 남아 있었으며, 폐사한 동물은 모두 심한 패혈증을 나타내었다 (그림 26 27, 28).

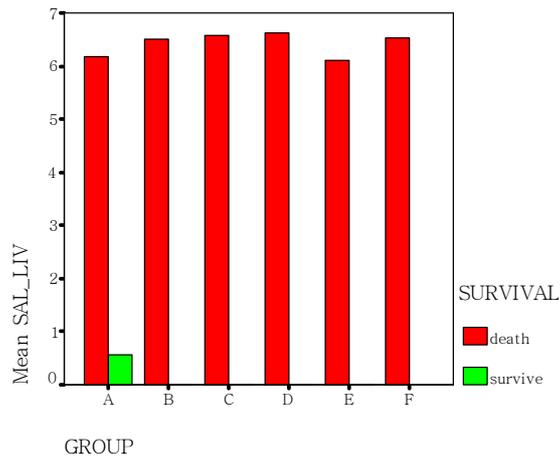


그림 27 Liver 1 gram당 challenge균주 균수 (log10). 생존동물에서 거의 검출되지 않고 회복이 잘 이루어진 것을 알 수 있다. F는 모두 폐사.

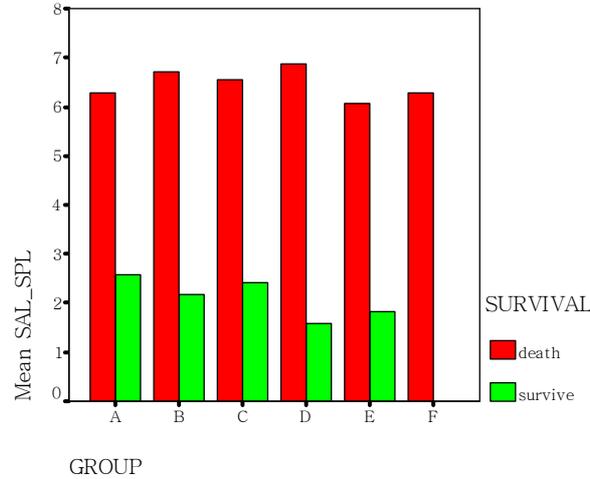


그림 28 Spleen 1 gram당 challenge균주 균수 (log10). 생존동물에서 $10^{2.3}$ cfu 만 검출되어 회복이 이루어지고 있음을 알 수 있다. F는 모두 폐사.

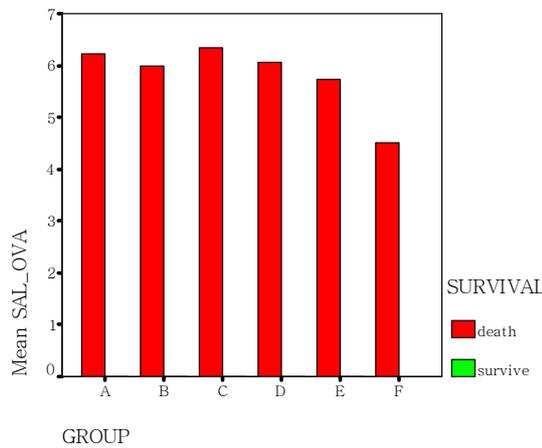


그림 29 Ovary 1 gram당 challenge균주 균수 (log10). 생존동물에서 검출되지 않고 회복이 잘 이루어진 것을 알 수 있다. F는 모두 폐사.

(13) 결론

부백신후보균주 접종시 plasma IgG는 1차접종후 상승하다가 2차 접종후 대단히 상승하여 booster효과를 잘 나타내는 양식을 취하지만 mucosal IgA는 1차 접종후 3~4주 및 2차 접종후 2.5주에 최고치를 보이다가 감소하는 것으로 확인되었다. 따라서 다음 실험은 1차접종후 4주에 2차를 접종하고 6.5주 (2차 후 2.5주)에 challenge하는 것이 본 후보균주 방어효과를 일단 평가하는 데 도움이 될 것으로 생각되었다.

백신후보균주의 다양한 접종경로에 따른 방어효과는 다음과 같다.

- ① 폐사수 결과에서 생균/IM > 생균/PO
- ② General condition결과에서 생균/IM > 사균/IM

- ③ 폐사수 결과에서 생균/PO +생균/PO = 생균/PO +사균/IM = 생균/PO 한번만접종
- ④ General condition결과에서 생균/PO+생균/PO > 생균/PO+사균/IM

따라서 다음에는 사균을 사용하지 않고 생균으로 실시하기로 한다. IM과 PO는 IM이 더 효과가 좋았지만 같은 농도를 접종하였기 때문에 단순히 비교할 수 없다. 또한 현장작업의 비용을 생각할 때 PO도 계속 검토할 만하다고 생각한다.

나. JOL916의 경구접종과 근육접종 경로 비교

(1) 균주

백신균주로 JOL916을, 야외도전균주로 JOL422를 사용하였으며 freezing culture (-80°C)에서 TSB agar에 streaking하여 37°C에서 배양하고 S-type colony를 확인하여 TSB broth에 접종, 37°C shaking incubator (150 rpm)에서 overnight culture한 것을 phosphate buffered saline (PBS)로 3번 세정한 다음 OD₆₀₀값을 근거로 적절하게 희석하여 실험에 사용하였다.

(2) 동물 및 실험 design

산란계 병아리 사육농장에서 4주령 하이라인 60마리를 분양받아 10마리씩 6개 군으로 나눠서 실험에 사용하였다. 항생제가 함유되지 않은 사료와 수돗물을 자유섭취 시켰다.

실험design을 Table 4에 제시하였다. 모두 생균으로 접종하였으며, 백신균주JOL916은 근육접종의 경우 2×10⁸ CFU/100μl/bird를, 경구접종의 경우 2×10⁹ CFU/100μl/bird 야외도전균주 JOL422는 2×10⁶ CFU/100μl/bird를 각각 접종하였다.

표 30. 산란계 접종시험

Group	n	1차 접종 (5 주령)	2차 접종 (9 주령)	야외균주 접종 (12 주령)
A	10	IM	IM	
B	10	PO	IM	
C	10	PO	PO	JOL422
D	10	-	IM	IM
E	10	-	PO	
F	10	-	-	

PO: 경구접종, IM: 근육접종

(3) 백신접종 후 임상증상 (부작용 유무 관찰)

1차 및 2차 접종 후 모두 기생충성으로 생각되는 약한 설사가 산발적으로 보였으나 가금티푸스에 특징적인 황색 또는 녹색 설사는 대부분 관찰되지 않았다. 그러나 예외적으로 D군에서 백신접종 전 건강상태가 좋지 않았던 3마리 개체 (사료섭취 감소)에서 가

금티푸스 전형적인 증세를 보이다가 1마리가 폐사하였다. 남은 2마리는 경미한 증세를 보인 후 회복되었다. 2×10^8 CFU의 접종량은 비교적 많은 양이지만 실용화를 위하여 부작용에 대한 더 자세한 관찰이 필요한 것으로 판단되었다.

(4) 면역측정

(가) 샘플채취

Heparin을 첨가한 추사기로 말초혈액 0.8 ml를 채혈 후 원심분리 (40 rpm, 15 min, 실온) 하여 얻은 림프구는 세포성면역측정시험에 사용하였고, 혈장은 냉장보관(4C) 하여 혈장 IgG 측정에 사용하였다. 분비형 IgA측정의 목적으로 다음과 같은 방법으로 소화관 세척액을 얻었다 (Berthelot-Herault et al., Vet Immunol Immunopathol, 2003). 즉, Lavage solution (48.5 mM PEG [polyethylene glycol 3350], 40mM Na_2SO_4 , 20mM NaHCO_3 , 10mM KCl, 25 mM NaCl)을 경구적으로 12 ml/kgBW(body weight)씩 투여하고 30분 후 pilocarpine을 13mg/kgBW (BW<300 g의 경우 20mg/kgBW) 의 용량으로 근육 주사한다. 병아리를 한 마리씩 깨끗한 용기에 수용하고 용기에는 STI/EDTA solution (0.1 mg soybean trypsin inhibitor in 50 mM EDTA, pH 8.0) 을 5 ml 씩 넣고 배출물과 잘 혼합하도록 하였다. 30분 후 배출물을 회수하고 100mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)를 1ml당 10 μ l씩 첨가한 다음 원심분리기(13,000 rpm, 2 min, 4 $^\circ$ C)로 투명한 상층액을 얻었다. 상층액에 다시 100mM PMSF, 1% Sodium azide, 5% BSA(bovine serum albumin)를 각각 1ml당 10 μ l씩 첨가하고 4 $^\circ$ C에 보관하여 익일 ELISA의 sample로 사용하였다.

(5) Enzyme-linked immunosorbent assay

항원은 LPS을 phenol-chloroform method에 따라 추출하였다. 항원을 flat-bottom 96 well high binding ELISA plate (Greiner, Germany)에 흡착시켜서 chicken IgG (또는 IgA) ELISA quantitation kit (Bethyl, Tx, USA)를 사용하여 사용설명서를 따라서 실시하였다. 즉, 1%BSA (bovine serum albumin)이 첨가된 50 mM Tris-NaCl buffer (pH 8.0) 로 비특이반응을 blocking한 다음 sample을 적절하게 희석하여 반응시키고 HRP (horse radish peroxidase)로 label된 2차항체를 결합시키는 indirect ELISA를 실시하였다.

혈장 IgG는 적어도 한번을 근육접종하는 군이 높은 항체가를 보였으며, 한번만 접종하는 경우에도 근육주사하는 군에서 강한 반응을 나타내었다 (Figure 5). 소화기 분비성 IgA의 경우 대체로 경구접종한 군에서도 강한 반응을 나타내었는데, 경구접종 한번만 접종한 군과 근육접종을 두번 한 경우에는 약간의 반응이 덜 하였다 (Figures 6, 7).

Plasma IgG levels at 2 weeks post 2nd vaccination
by indirect ELISA with LPS

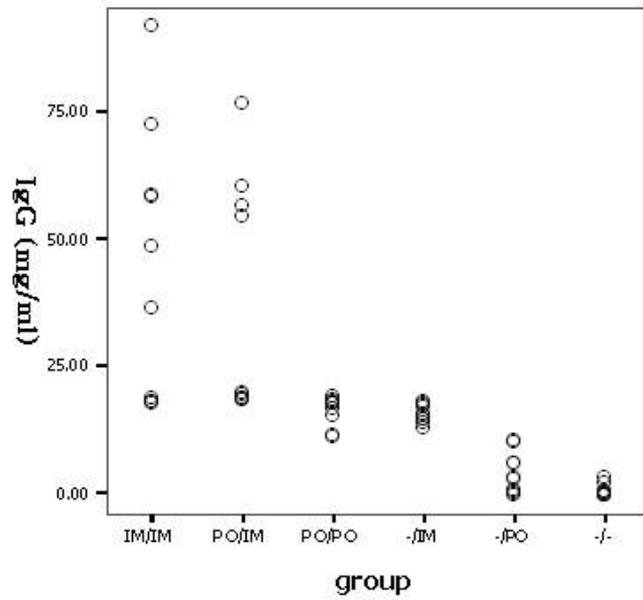


그림 30 2차 접종 후 체액성 면역 반응

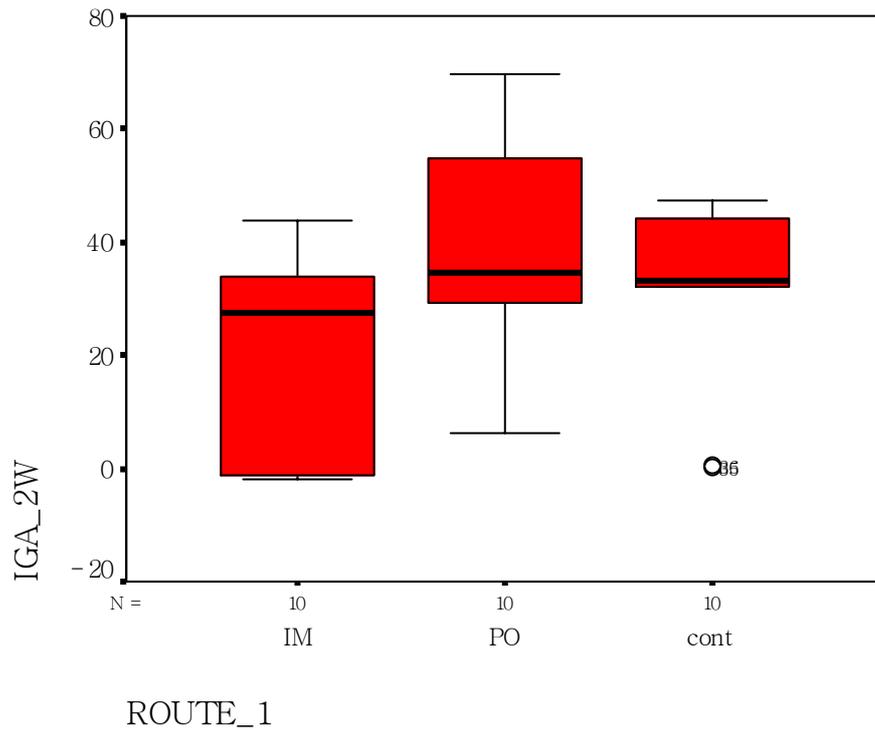


그림 30. 1차접종후 IgA 반응

Intestinal S-IgA levels at 2 weeks post 2nd vaccination
by indirect ELISA with LPS

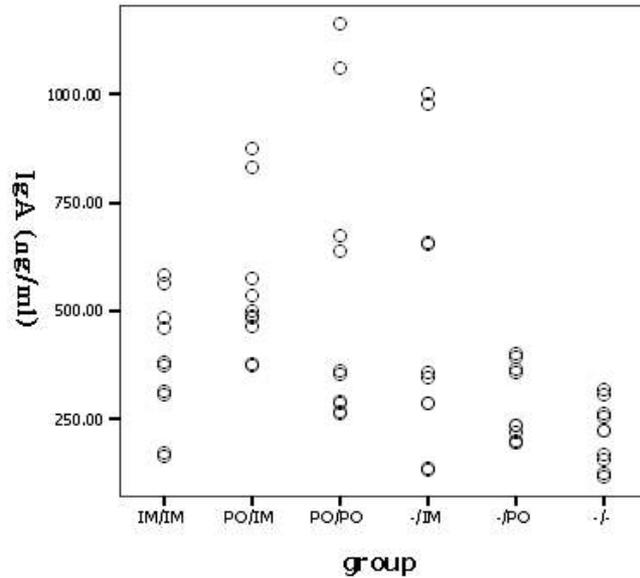


그림 31. 2차접종후 IgA 반응

(6) 세포성면역 측정

2차 접종 후 5주에 세포성면역 측정을 위해 말초림프구를 이용한 lymphocytes proliferation assay 를 실시하였다. 원심분리하여 얻은 림프구를 Trypan blue exclusion test로 생세포수를 계수한 다음 RPMI 1640 complete medium (송아지 혈청 및 항균항진균제 포함) 에 부유시켜 1×10^4 cfu/100 μ l/well 가 되게 96-well plate 에 분주하였고, *S. Gallinarum* soluble antigen과 함께 72시간 배양하였다. Soluble antigen은 다음 방법으로 얻었다. 즉, 200 ml의 배양액을 원심분리하여 pellet 을 얻는다. PBS로 2회 세척 후 40 ml 의 PBS에 재부유시켜 freeze-thaw를 3 번 반복한다. 이 용액을 sonication후 4,250 x g, 4 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 원심분리하여 얻은 상층액을 또 다시 30,000 x g, 4 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 회수하여 농도를 결정한다. 72시간 배양 후 도립현미경으로 관찰 후 Lonza사의 ViaLight[®] Plus Kit 를 사용하여 Luminescence assay를 실시하였다. Stimulation Index (SI)를 다음과 같이 산출하여 백신접종군에서 세포성면역이 유도되어 있는지를 확인하였다. 1차 접종 후 1주에 근육접종으로 강한 반응을 보였으며, 경구접종으로도 세포성면역이 유도되어 있는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 8, 9).

식) $SI = (\text{항원첨가된 well에서 측정된 발광량}) / (\text{항원을 첨가하지 않은 well에서 발광량})$

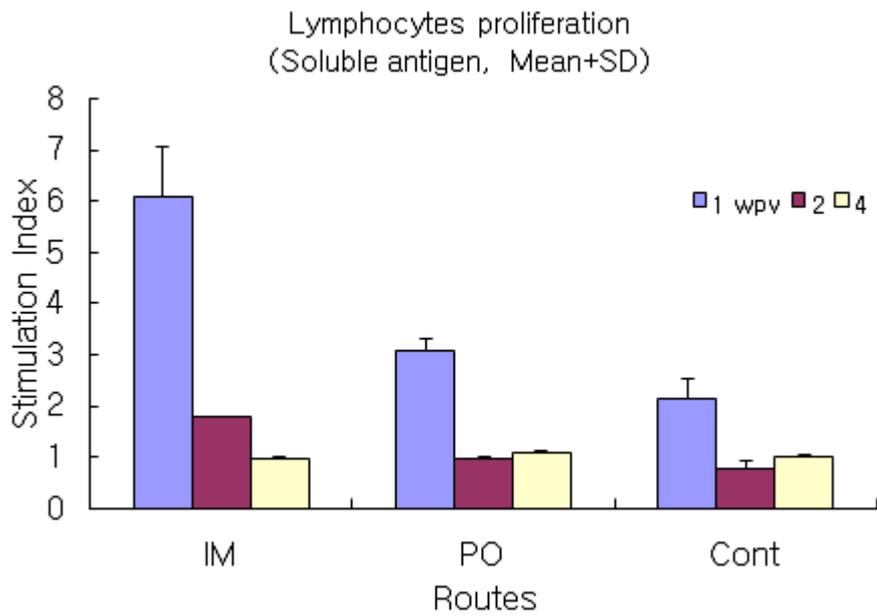


그림 32. 1차접종 1주째 세포성면역 반응

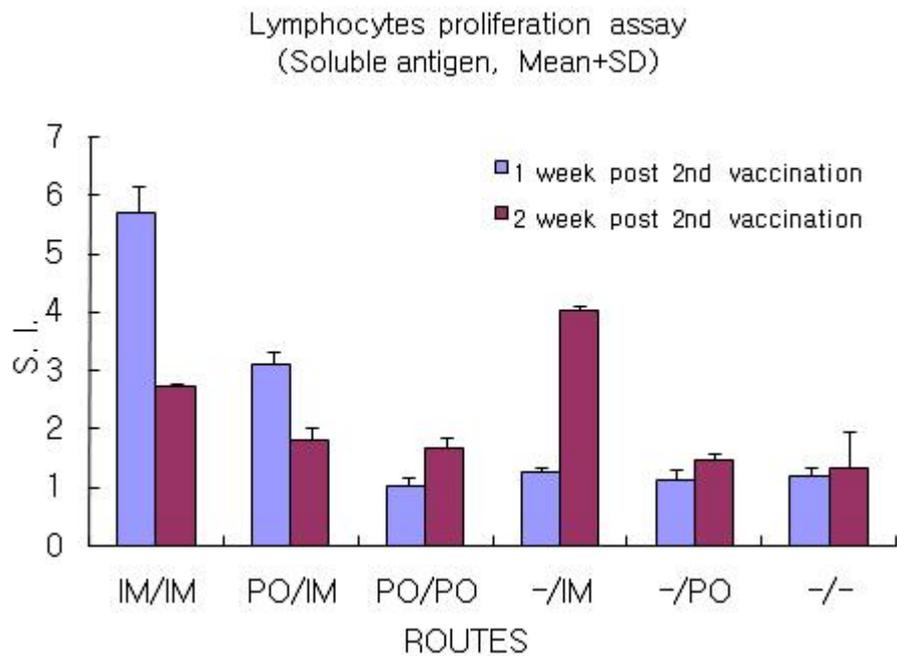


그림 33. 2차 접종 후 세포성면역

(7) 방어력 유무 확인

(가) 폐사수

야외균주 접종 후 매일 폐사수를 확인하였다. 그 결과를 표 31에 제시하였다.

표 31. 야외강독주 접종 후 폐사수

Group	n	Days post challenge										Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
IM/IM	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PO/IM	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PO/PO	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-/IM	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-/PO	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-/-	10	0	0	0	0	2	4	0	0	1	0	7

(나) 임상증상

야외균주 접종 후 매일 개체별로 건강상태를 평가하였다. 백신접종군은 건강한 모습을 보였지만 백신미접종 대조군은 심각한 침울을 보였다 (그림 34, 35). 생존중인 동물을 대상으로 식욕 및 침울상태를 0점 (정상), 1, 2, 3점(매우 심각)으로 평가하여 평균값을 나타내었다 (표 32, 33).



그림 34. 야외균주 접종 후 5일째 백신미접종군에서 보인 depression



그림 35. 야외균주 접종 후 5일째 건강한 모습의 백신접종군

표 32. 야외균주 접종 후 식욕감퇴

Group	Days post challenge									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IM/IM	0	0	0	0.1	0.2	0	0	0	0	0
PO/IM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PO/PO	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0	0
-/IM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-/PO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-/-	0	1	1.7	2.3	2.5	2.5	2.25	2	1.3	0.6

표 33. 야외균주 접종 후 친율

Group	Days post challenge									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IM/IM	0	0	0	0.1	0.1	0	0	0	0	0
PO/IM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PO/PO	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0	0
-/IM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-/PO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-/-	0	0.4	1.4	2.2	2.5	2.5	2.25	2	1.3	0.6

(다) 병리소견

야외균주 접종 후 10일째 모든 생존동물을 희생하여 육안적 병리소견을 관찰하였다. Liver는 enlargement, bronze colour, white spot를 관찰하고 0점(정상)에서 3점(심각)까지 개체별로 종합적으로 평가하였으며, spleen에서는 enlargement 및 white spot을 동일하게 관찰하여 점수화하여 평균값 및 standard error of mean 을 산출하여 그림 36에 나타내었다.

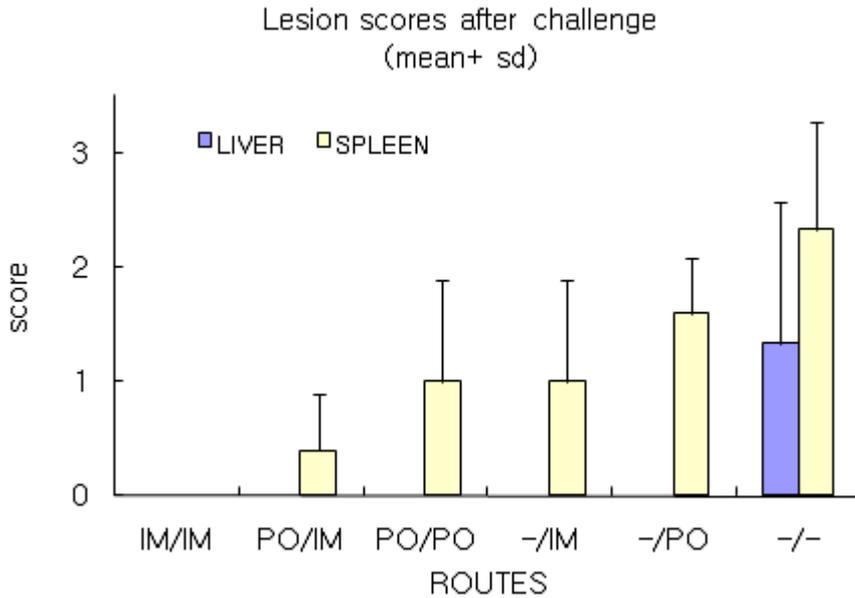


그림 36. 야외균주 접종 후 생존동물의 병리소견

(라) 미생물학적 검사

야외균주가 얼마나 병아리 안에 생존하고 있는지 비교하기 위하여 간장 및 비장을 Buffered peptone water (BPW, Becton, Dickinson and Company, France)에서 분쇄하고 상층액을 Brilliant Green Agar (BGA, Becton, Dickinson and Company, France)에 접종하여 colony count를 실시하며 negative인 경우 enrichment culture를 BPW에서 37도 16시간 배양 후 Rappaport-Vassiliadis R10 broth (Becton, Dickinson and Company, France)에 1/100 volume 접종하여 42도에서 48시간 배양후 BGA에서 Salmonella의 유무를 확인하였다. Colony수는 장기 1 gram당의 세균수를 산출하여 log₁₀ 값으로 환산하여 균간 비교를 실시하였다 (그림 37).

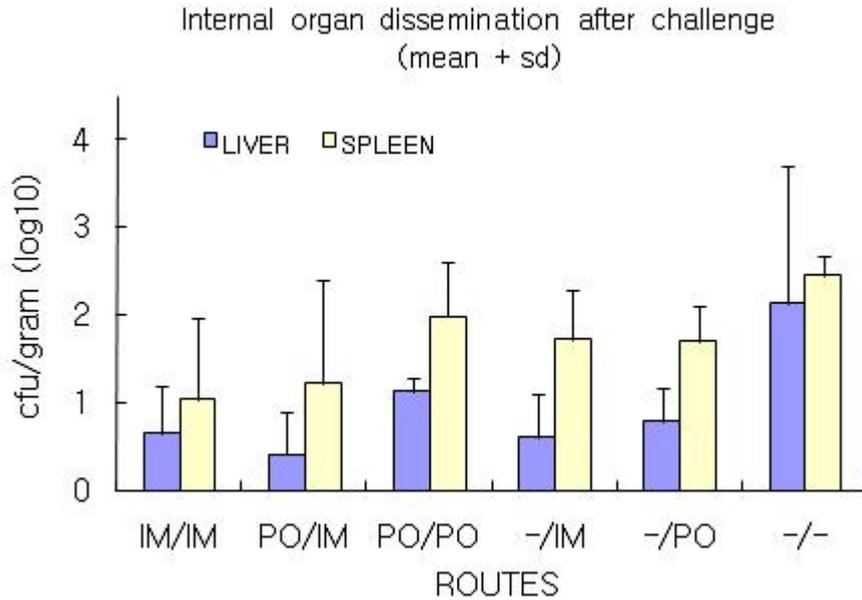


그림 37. 야외균주 접종후 생존동물 내부장기에서 세균분리

(8) 결 론

근육접종 또는 경구접종을 한 번 또는 두 번 실시함으로 우수한 방어력을 나타내는 것으로 관찰되었다. 면역반응 및 야외균주 접종 후 병리소견 결과 근육접종이 더 방어력이 우수할 것으로 기대되었다. 다만 본 실험에서 비교적 높은 접종량인 2×10^8 CFU/bird를 근육접종함으로 백신균주로 인한 부작용이 일부 건강상태가 좋지 않을 것으로 사료된 개체에서 나타났음으로 접종량을 조절하기 위한 연구가 수행되어야 하겠다.

다. 결론

JOL916은 생균으로 접종하는 경우에 방어력이 우수하고, 경구접종 보다 근육접종 또는 피하접종과 같은 parenteral route에서 방어력이 우수함을 확인하였으며, 경구접종이라도 충분한 방어를 나타낸 것으로 접종의 편이성 때문에 경구접종의 가능성도 동시에 연구할 필요가 있다고 판단되었다.

또한 건강상태가 불량한 개체에서 폐사 등의 부작용이 나타날 수 있음을 관찰하였기 때문에, 방어력을 더욱 향상시킴으로 접종량을 줄이는 등의 방법으로 부작용을 줄이는 개발노력이 필요하다고 생각하였다.

따라서 이하에 먼저 JOL916의 근육접종시 안전성 평가실험 및 방어력 실험에 대하여 기술하고, 본 장 마지막에 면역력을 증강시키려는 연구개발에 대하여 기술한다.

6. 백신후보균주 JOL916의 안전성 및 방어력 평가 실험

가. 안전성 실험

(1) 균주

백신균주로 JOL916을 사용하였으며 freezing culture (-80°C)에서 TSB agar에 streaking하여 37°C에서 배양하고 S-type colony를 확인하여 TSB broth에 접종, 37°C shaking incubator (150 rpm)에서 overnight culture한 것을 phosphate buffered saline (PBS)로 3번 세정한 다음 OD₆₀₀값을 근거로 적절하게 희석하여 실험에 사용하였다.

(2) 동물 및 실험 design

산란계 병아리 사육농장에서 5주령 하이라인 40마리를 분양받아 20마리씩 2개 군으로 나눠서 실험에 사용하였다. 항생제가 함유되지 않은 사료와 수돗물을 자유섭취 시켰다.

백신균주 접종군은 모두 백신균주 JOL916을 2×10^7 CFU/100 μ l/bird씩 근육접종 하였으며, 대조군은 동량의 PBS를 근육접종하였다. 접종 후 매일 건강상태를 관찰하였으며, 매주 각 군에서 5마리씩 안락사하여 내부장기의 육안적 병변과, 장기내 접종세균수를 계수하였다.

(3) 임상증상

백신균주 접종 후 매일 개체별로 건강상태를 평가하였다. 식욕, 침울상태, 설사증상의 강도를 0점(정상), 1, 2, 3점(매우 심각)으로 평가하여 기록하였다.

백신균주 접종 후 식욕감퇴, 침울, 설사의 증상을 보인 개체가 전혀 없었다.

(4) 병리소견

백신균주 접종 후 4주 동안 매주 5마리씩 안락사하여 육안적 병리소견을 관찰하였다. Liver 및 spleen에서 enlargement, necrotic foci를 관찰하고 0점(정상)에서 3점(심각)까지 개체별로 종합적으로 평가하였다.

아래 표 34에 제시한 것과 같이 대조군에서 아무 병변이 관찰되지 않아 모두 점수가 0점인데 비해 백신접종군에서는 약간의 병변을 관찰하였으나, 모두 매우 경미한 병변이며 통계학적으로 대조군과 차이를 인정할 수 없었다.

표 34. Gross lesion of the chickens vaccinated with JOL916

Group	Gross lesion		Week post vaccination			
	Organ	Finding	1	2	3	4
Vaccinated	Liver	Enlargement	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
		Necrotic foci	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Spleen	Enlargement	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0
		Necrotic foci	0.4 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4
Control	Liver	Enlargement	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
		Necrotic foci	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Spleen	Enlargement	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
		Necrotic foci	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Values represent the means ± SEM.

Significant difference of the vaccinated group was examined by Mann-Whitney U test compared to the control group; no difference was observed for all lesions.

(5) 미생물학적 검사

백신균주가 얼마나 병아리 안에 생존하고 있는지 비교하기 위하여 간장 및 비장을 Buffered peptone water (BPW, Becton, Dickinson and Company, France)에서 분쇄하고 상층액을 Brilliant Green Agar (BGA, Becton, Dickinson and Company, France)에 접종하여 colony count를 실시하며 negative인 경우 enrichment culture를 BPW에서 37도 16시간 배양 후 Rappaport-Vassiliadis R10 broth (Becton, Dickinson and Company, France)에 1/100 volume 접종하여 42도에서 48시간 배양후 BGA에서 Salmonella의 유무를 확인하였다. Colony수는 장기 1 gram당의 세균수를 산출하여 log₁₀ 값으로 환산하여 군간 비교를 실시하였다. 그 결과 비장에서 초기에 상당한 세균수를 보이지만 2주 후부터 현저히 감소하여 매우 소수의 세균이 지속적으로 존재할 수 있음을 알 수 있었다 (표 35).

표 35. Bacterial recovery of *Salmonella* from the chickens vaccinated with JOL916

Group	Organ	Weeks post vaccination							
		1		2		3		4	
		Number positive ^a	Count ^b	Number positive	Count	Number positive	Count	Number positive	Count
Vaccinated	Liver	1/5	0.33 ± 0.65	2/5	0.72 ± 0.89	0/5	0.00 ± 0.00	0/5	0.00 ± 0.00
	Spleen	5/5*	2.79 ± 0.21*	1/5	0.35 ± 0.69	0/5	0.00 ± 0.00	1/5	0.42 ± 0.85
Control	Liver	0/5	0.00 ± 0.00	0/5	0.00 ± 0.00	0/5	0.00 ± 0.00	0/5	0.00 ± 0.00
	Spleen	0/5	0.00 ± 0.00	0/5	0.00 ± 0.00	0/5	0.00 ± 0.00	0/5	0.00 ± 0.00

^a Number of positive sample after enrichment culture.

^b Values represent the means ± SEM Log₁₀cfu/g.

* Significant difference compared to the control group.

(6) 결론

백신접종 후 건강한 닭에서 임상증상이 나타나지 않다. 한편 육안적으로 변별 가능한 병리소견은 나타나지만 매우 경미한 수준이다. 면역반응이 경미한 수준의 조직변화로 나타난 것으로 생각된다. 백신후보균주는 접종 직 후 주로 비장에 침입이 잘 되고 생존하지만 2주째부터 상당수가 살아지고 생존하고 있더라도 매우 적은 수에 불과하다.

나. 방어력 평가 실험

(1) 균주

백신균주로 JOL916을 사용하였으며 freezing culture (-80°C)에서 TSB agar에 streaking하여 37°C에서 배양하고 S-type colony를 확인하여 TSB broth에 접종, 37°C shaking incubator (150 rpm)에서 overnight culture한 것을 phosphate buffered saline (PBS)로 3번 세정한 다음 OD₆₀₀값을 근거로 적절하게 희석하여 실험에 사용하였다. 도전실험을 위하여 JOL422를 동일하게 준비하였다.

(2) 동물 및 실험 design

산란계 병아리 사육농장에서 5주령 하이라인 48마리를 분양받아 16마리씩 3개 군으로 나눠서 실험에 사용하였다. 항생제가 함유되지 않은 사료와 수돗물을 자유섭취 시켰다.

백신접종은 모두 백신균주JOL916을 2×10⁶ CFU/100μl/bird씩 근육접종 하였으며, 대조군은 동량의 PBS를 근육접종하였다. 접종 후 매주 면역반응을 관찰하였으며, 4주후에 야외균주 JOL422를 2×10⁶ CFU/100μl/bird씩 근육접종 하여 방어력을 관찰하였다. 다음 표 36 에 실험 design을 제시한다.

표 36. 실험 design

Group	n	Vaccination (5 week of age)	Challenge (9 week of age)
Vaccinated	16	JOL916, 2×10 ⁶ CFU	JOL422, 2×10 ⁶ CFU
Negative control	16	PBS	PBS
Positive control	16	PBS	JOL422, 2×10 ⁶ CFU

(4) 면역측정

(가) 샘플채취

Heparin을 첨가한 추사기로 말초혈액 0.8 ml를 채혈 후 원임분리 (40 rpm, 15 min, 실온) 하여 얻은 림프구는 세포성면역측정시험에 사용하였고, 혈장은 냉장보관(4C) 하여 혈장 IgG 측정에 사용하였다. 분비형 IgA측정의 목적으로 다음과 같은 방법으로 소화관 세척액을 얻었다 (Berthelot-Herault et al., Vet Immunol Immunopathol, 2003). 즉, Lavage solution (48.5 mM PEG [polyethylene glycol 3350], 40mM Na₂SO₄, 20mM

NaHCO₃, 10mM KCl, 25 mM NaCl)을 경구적으로 12 ml/kgBW(body weight)씩 투여하고 30분 후 pilocarpine을 13mg/kgBW (BW<300 g의 경우 20mg/kgBW) 의 용량으로 근육 주사한다. 병아리를 한 마리씩 깨끗한 용기에 수용하고 용기에는 STI/EDTA solution (0.1 mg soybean trypsin inhibitor in 50 mM EDTA, pH 8.0) 을 5 ml 씩 넣고 배출물과 잘 혼합하도록 하였다. 30분 후 배출물을 회수하고 100mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)를 1ml당 10 μ l씩 첨가한 다음 원심분리기(13,000 rpm, 2 min, 4 $^{\circ}$ C)로 투명한 상층액을 얻었다. 상층액에 다시 100mM PMSF, 1% Sodium azide, 5% BSA(bovine serum albumin)를 각각 1ml당 10 μ l씩 첨가하고 4 $^{\circ}$ C에 보관하여 익일 ELISA의 sample로 사용하였다.

(나) 세포성면역 측정

접종 전 및 접종 후 3주까지 매주 세포성면역 측정을 위해 말초림프구를 이용한 lymphocytes proliferation assay 를 실시하였다. 원심분리하여 얻은 림프구를 Trypan blue exclusion test로 생세포수를 계수한 다음 RPMI 1640 complete medium (송아지 혈청 및 항균항진균제 포함) 에 부유시켜 1 \times 10⁴ cfu/100 μ l/well 가 되게 96-well plate 에 분주하였고, *S. Gallinarum* soluble antigen과 함께 72시간 배양하였다. 배양 후 도립 현미경으로 관찰 후 Lonza사의 ViaLight[®] Plus Kit 를 사용하여 Luminescence assay를 실시하였다. Stimulation Index (SI)를 다음과 같이 산출하여 백신접종군에서 세포성면역이 유도되어 있는지를 확인하였다.

식) SI = (항원첨가된 well에서 측정된 발광량)/(항원을 첨가하지 않은 well에서 발광량)

그림 38 (A)에 나타낸 것과 같이 접종 후 1 및 2주째에 세포성 면역반응을 나타내었다.

(다) Enzyme-linked immunosorbent assay

특이면역 정량을 위해 outer membrane fraction (omp fraction)을 야외균주 JOL420에서 정제하였다. 항원을 flat-bottom 96 well high binding ELISA plate (Greiner, Germany)에 흡착시켜서 chicken IgG (또는 IgA) ELISA quantitation kit (Bethyl, Tx, USA)를 사용하여 사용설명서를 따라서 실시하였다. 즉, 1%BSA (bovine serum albumin)이 첨가된 50 mM Tris-NaCl buffer (pH 8.0) 로 비특이반응을 blocking한 다음 sample을 적절하게 희석하여 반응시키고 HRP (horse radish peroxidase)로 label된 2 차항체를 결합시키는 indirect ELISA를 실시하였다.

혈장 IgG는 접종 1주 후부터 약하지만 통계학적으로 분별할 수 있는 정도의 반응이 검출되기 시작하였으며, 2주후부터는 매우 강한 반응을 볼 수 있었다(그림 38 B). 소화기 분비성 IgA의 경우 통계학적 차이를 인정할 수 있는 반응을 볼 수 없었으나, 농도 상승의 경향을 검출할 수 있었다 (그림 38 C).

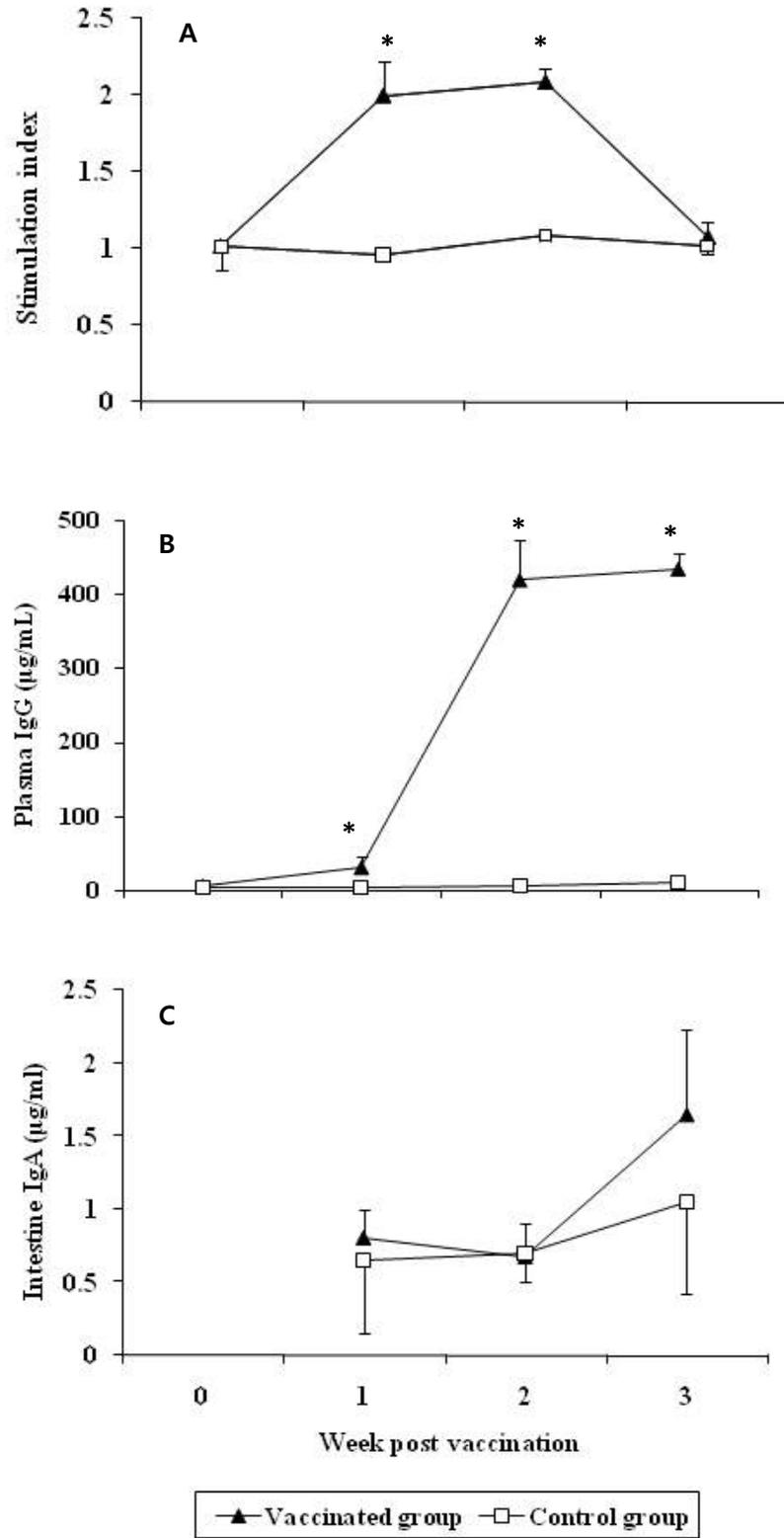


그림 38. 백신접종 후 면역반응. A: 세포성 면역; B: 혈장 IgG; C: 소장에서 분비형 IgA 반응.

(5) 방어력 평가

(가) 임상증상

야외균주 접종 후 매일 개체별로 건강상태를 평가하였다. 생존중인 동물을 대상으로 식욕감퇴, 침울상태, 설사소견을 0점 (정상), 1, 2, 3점(매우 심각)으로 평가하여 평균값을 나타내었다 (그림 39, A, B, C). Negative control군은 건강한 모습을 보였지만 백신미접종 대조군에 야외균주를 접종한 경우 (positive control)는 심각한 임상증상을 보였다. 백신접종군은 일시적으로 매우 경미한 임상증상을 일주 동물에서 보였지만 바로 회복되었다.

(나) 폐사수

야외균주 접종 후 매일 폐사수를 확인하였다. 그림 39D에 나타난 대로 백신접종군은 negative control군과 동일하게 폐사수 0였지만 positive control군은 야외균주 도전 후 7일까지 모두 폐사하였다 (100%).

(다) 체중증가

임상증상 관찰로 변별할 수 없는 변화를 관찰하기 위하여 야외균주 접종 후 1-3일 (기간: Moment I), 4-6일(II), 7-10일(III)의 기간별로 1일 당 평균 체중증가량을 측정하였다. 그 결과 그림 39에 나타난 대로 백신접종군은 negative control군에 비교하여 4-6일 (기간 II)에서 체중증가량이 현저히 감소되었다가 바로 회복되어가는 모습을 확인 할 수 있었다 (그림 40).

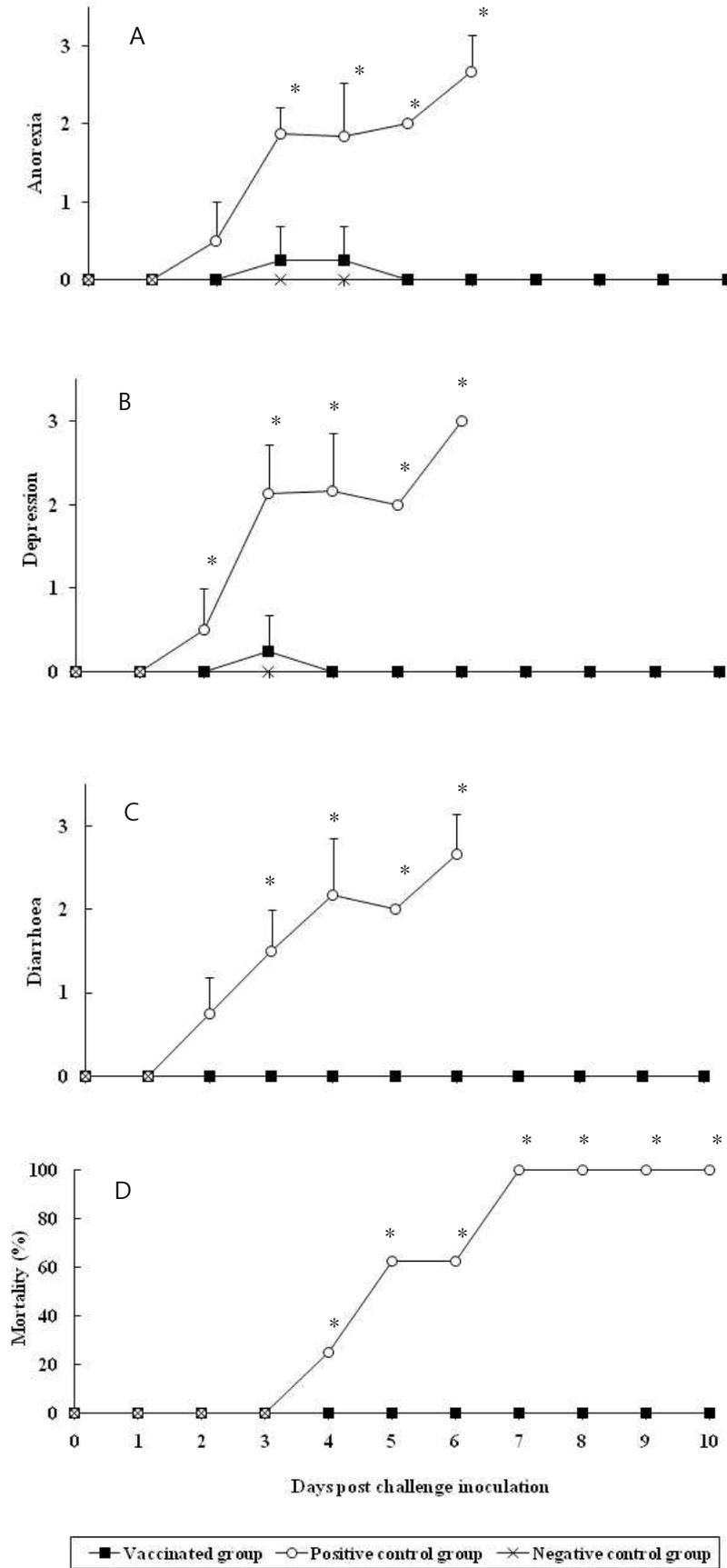


그림 39. 야외균주 도전 접종 후 임상증상 및 폐사수. A: 식욕감퇴; B: 침울; C: 설사; D: 폐사수.

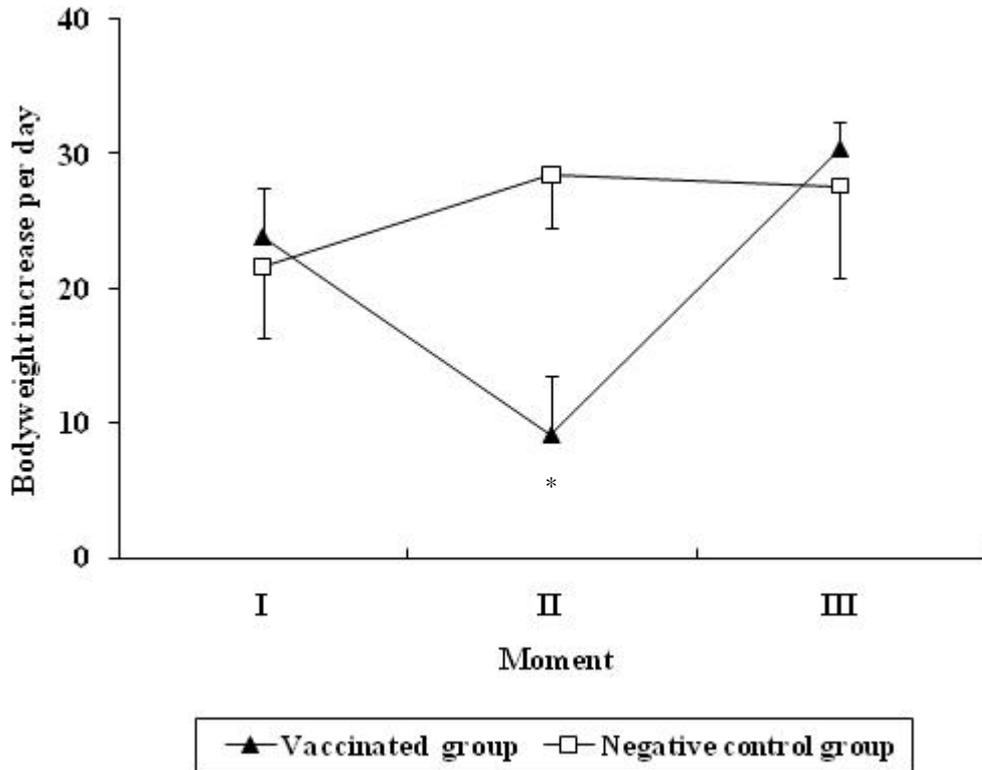


그림 40. 야외균주 접종 후 1-3일(I), 4-6일(II), 7-10일(III)의 1 일당 평균체중증가 (g).

(라) 병리소견

야외균주 접종 후 10일째 모든 생존동물을 희생하여 육안적 병리소견을 관찰하였다. Liver 및 spleen에서 enlargement와 necrotic foci를 관찰하고 0점(정상)에서 3점(심각)까지 개체별로 종합적으로 평가하였으며, 평균값 및 standard error of mean 을 산출하여 표 37에 나타내었다. 이처럼 positive control군은 모두 매우 심한 병리소견을 나타낸 데 비해 백신접종군은 negative control의 병리소견과 통계학적으로 차이를 보지 못하는 정도의 경미한 병변을 보였다.

(라) 미생물학적 검사

야외균주가 얼마나 병아리 안에 생존하고 있는지 비교하기 위하여 간장 및 비장을 Buffered peptone water (BPW, Becton, Dickinson and Company, France)에서 분쇄하고 상층액을 Brilliant Green Agar (BGA, Becton, Dickinson and Company, France)에 접종하여 colony count를 실시하며 negative인 경우 enrichment culture를 BPW에서 37도 16시간 배양 후 Rappaport-Vassiliadis R10 broth (Becton, Dickinson and Company,

France)에 1/100 volume 접종하여 42도에서 48시간 배양후 BGA에서 Salmonella의 유무를 확인하였다. Colony수는 장기 1 gram당의 세균수를 산출하여 log₁₀ 값으로 환산하여 군간 비교를 실시하였다. 그 결과 positive control군은 모두 심한 폐혈증이 인정되었지만 백신접종군은 비장에서 세균 분리 건수가 negative control군보다 유의하게 많았던 것을 예외로 negative control군과 비슷한 결과, 즉 소수의 세균이 분리된데 그쳤다 (그림 37).

표 39 Gross lesion and bacterial recovery of *Salmonella* in the vaccinated chickens after challenge

Group	n	Gross lesion ^a				Recovery			
		Liver		Spleen		Liver		Spleen	
		EN ^b	NF ^c	EN	NF	Number positive ^d	Count ^e	Number positive	Count
Vaccinated	16	0.1 ± 0.3A	0.4 ± 0.7A	0.5 ± 0.7A	0.0 ± 0.0A	2/16A	0.20 ± 0.60A	8/16AB	1.66 ± 1.67A
Negative control	16	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B	0/16B	0.00 ± 0.00B	0/16AC	0.00 ± 0.00B
Positive control	16	2.9 ± 0.3AB	2.0 ± 0.7AB	2.3 ± 0.7AB	2.1 ± 0.6AB	16/16AB	4.96 ± 0.20AB	16/16BC	4.87 ± 0.32AB

^a Group lesion score (Mean ± SEM).

^b Enlargement.

^c Necrotic foci.

^d Number of positive sample after enrichment culture.

^e Mean ± SEM Log₁₀cfu/g.

n, numbers of the chickens used.

Values within a column with same capital script differ at least at the 5% of significance by pair-wise comparisons.

(6) 결 론

JOL916 백신후보 균주를 2×10⁶ CFU/bird 씩 근육접종 함으로 효과적으로 방어 면역을 유도하고 야외균주 도전을 거의 완벽하게 방어하였다. 야외균주 접종 후 급성기(4-7 일 후)에 약간의 증상이 나타날 수 있으나 얼마 안 되어서 회복 되어감을 관찰하였다. 사후 부검 및 미생물검사에서도 백신후보균주의 2×10⁶ CFU의 근육접종이 도전감염에서 병아리를 방어하였음을 볼 수 있었다.

7. 백신후보균주 JOL916와 SG9R균주의 비교 실험

가. 균주

본 실험에서 사용한 균주는 백신후보균주 JOL916, 시판중인 JOL966 (9R), 그리고

야외균주 JOL422 다. 균주는 glycerol-TSB freezing culture (-80C)에서 TSA에 streaking하여 overnight culture (37C)후 one colony를 다시 TSA에 streaking하여 overnight culture (37C)하여 얻은 one colony를 TSB에 overnight culture (37C, 200 rpm, 17~18 hours)하고 PBS로 3번 세척한 후 적당한 농도로 PBS에 재부유시켜 투여 하였다.

나. 실험동물 및 experimental design

5주령의 갈색 산란계를 분양받아 1주동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 각군 15 마리씩으로 JOL916접종군, SG9R접종군, 음성대조(PBS 접종)군의 3군으로 구성하였다 (표 38). 6주령에 2×10^7 CFU/100 μ l 씩 근육접종하여 백신접종 후에 임상증상 및 체중 증가를 관찰하였다.

표 40 Experimental design

Group	n	Vaccination (5주령)			Challenge (25일 후)		
		Strain	Dose	Route	Strain	Dose	Route
JOL916	15	JOL916	2×10^7	IM	JOL422	2×10^6	IM
SG9R	15	JOL966	2×10^7	IM	JOL422	2×10^6	IM
PBS	15	-	-	-	JOL422	2×10^6	IM

다. 안전성 비교

(1) 임상증상

백신 접종 후 매일 임상증상을 관찰하였다. 모든 군에서 별다른 임상증상이 나타나지 않았다.

(2) 체중 증가

백신 접종 후 10일간 및 백신접종 후 10일부터 25일까지(도전감염 전)의 기간에 1일 평균 체중 증가량을 산출하였다. 그 결과 JOL916, SG9R 접종군 모두 대조군과 차이가 없어 체중증가로는 병원성의 검출이 불가능하거나 병원성이 무시할 수 있는 정도인 것으로 들어났다 (표 39).

표 41 Bodyweight increase in chickens vaccinated with JOL916 and SG9R

Group	<i>n</i>	Post vaccination ^a	Before challenge ^b
JOL916	15	6.96 ± 0.52	10.13 ± 0.85
SG9R	15	7.69 ± 0.70	7.90 ± 0.75
PBS	15	9.37 ± 0.99	9.32 ± 0.84

^a First 10 days post-vaccination (dpv).

^b From the 10th to the 25th dpv.

Values represent the means ± SEM (g).

Values in the same column were analyzed for differences between groups; no statistically significant differences were observed using the Mann-Whitney *U* test with Bonferroni correction.

라. 항원 특이적 면역 반응 비교

(1) 샘플 채취

Heparin을 첨가한 추사기로 말초혈액 0.8 ml를 채혈 후 원심분리 (40 rpm, 15 min, 실온) 하여 얻은 림프구는 세포성면역측정시험에 사용하였고, 혈장은 냉장보관(4°C) 하여 혈장 IgG 측정에 사용하였다. 분비형 IgA 측정의 목적으로 다음과 같은 방법으로 소화관 세척액을 얻었다 (Berthelot-Herault et al., Vet Immunol Immunopathol, 2003). 즉, Lavage solution (48.5 mM PEG [polyethylene glycol 3350], 40mM Na₂SO₄, 20mM NaHCO₃, 10mM KCl, 25 mM NaCl)을 경구적으로 12 ml/kgBW(body weight)씩 투여하고 30분 후 pilocarpine을 13mg/kgBW (BW<300 g의 경우 20mg/kgBW) 의 용량으로 근육 주사한다. 병아리를 한 마리씩 깨끗한 용기에 수용하고 용기에는 STI/EDTA solution (0.1 mg soybean trypsin inhibitor in 50 mM EDTA, pH 8.0) 을 5 ml 씩 넣고 배출물과 잘 혼합하도록 하였다. 30분 후 배출물을 회수하고 100mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)를 1ml당 10 μ l씩 첨가한 다음 원심분리기(13,000 rpm, 2 min, 4°C)로 투명한 상층액을 얻었다. 상층액에 다시 100mM PMSF, 1% Sodium azide, 5% BSA(bovine serum albumin)를 각각 1ml당 10 μ l씩 첨가하고 4°C에 보관하여 익일 ELISA의 sample로 사용하였다.

(2) 세포성면역 측정

백시 접종 전후 매주 세포성면역 측정을 위해 말초림프구를 이용한 lymphocytes proliferation assay 를 실시하였다. 원심분리하여 얻은 림프구를 Trypan blue exclusion test로 생세포수를 계수한 다음 RPMI 1640 complete medium (송아지 혈청 및 항균항진

균제 포함) 에 부유시켜 1×10^4 cfu/100 μ l/well 가 되게 96-well plate 에 분주하였고, *S. Gallinarum* soluble antigen과 함께 72시간 배양하였다. 배양 후 도립현미경으로 관찰 후 Lonza사의 ViaLight[®] Plus Kit 를 사용하여 Luminescence assay를 실시하였다. Stimulation Index (SI)를 다음과 같이 산출하여 백신접종군에서 세포성면역이 유도되어 있는지를 확인하였다.

식) $SI = (\text{항원첨가된 well에서 측정된 발광량}) / (\text{항원을 첨가하지 않은 well에서 발광량})$

그 결과 JOL916백신 접종군에서 2주째에 SG9R 군과 PBS군보다 강한 반응을 나타내었다 (표 40).

표 42. Cellular immune responses in the vaccinated and control chickens.

Group	n	Weeks post-vaccination			
		0	1	2	3
JOL916	5	1.02 ± 0.10	1.14 ± 0.14	1.88 ± 0.11 ab	1.02 ± 0.10
SG9R	5	1.02 ± 0.10	1.17 ± 0.07	1.14 ± 0.14 a	1.02 ± 0.09
PBS	5	0.92 ± 0.10	1.02 ± 0.09	0.92 ± 0.10 b	1.02 ± 0.09

Values represent the means ± SEM of SI value. Values with the same letter are significantly different at the 5% level of significance according to the Mann-Whitney *U* test with Bonferroni correction.

(3) Enzyme-linked immunosorbent assay

특이면역 정량을 위해 outer membrane fraction (omp fraction)을 야외균주 JOL422에서 정제하였다. 이는 SG9R이 R-type LPS를 지니고 있기 때문에 LPS를 사용하는 것이 적절하지 않기 때문이다. 항원을 flat-bottom 96 well high binding ELISA plate (Greiner, Germany)에 흡착시켜서 chicken IgG ELISA quantitation kit (Bethyl, Tx, USA)를 사용하여 사용설명서를 따라서 실시하였다. 즉, 1%BSA (bovine serum albumin)이 첨가된 50 mM Tris-NaCl buffer (pH 8.0) 로 비특이반응을 blocking한 다음 sample을 적절하게 희석하여 반응시키고 HRP (horse radish peroxidase)로 label된 2 차항체를 결합시키는 indirect ELISA를 실시하였다.

그 결과 JOL916군은 백신 접종 1주 후부터 미약하지만 면역반응을 검출할 수 있었고, 2주후 부터는 JOL916과 SG9R군 모두 높은 수준의 반응을 나타내 보였다(표 41).

표 43. Systemic immune response of chickens.

Group	n	Weeks post-vaccination			
		0	1	2	3
JOL916	5	22.1 ± 12.1	58.9 ± 4.8 a	417.5 ± 94.4 b	381.6 ± 110.8 d
SG9R	5	25.4 ± 5.2	47.4 ± 8.6	336.6 ± 91.2 c	338.1 ± 108.1 e
PBS	5	32.7 ± 8.8	39.0 ± 4.1 a	57.3 ± 11.6 bc	72.8 ± 13.8 de

Values represent the means ± SEM (µg/ml) of SG antigen-specific serum IgG concentrations. Values with the same letter are significant at the 5% level according to the Mann-Whitney *U* test with Bonferroni correction.

마. 방어력 비교

(1) 임상증상 및 폐사

양외균주 접종 후 매일 임상증상을 관찰하였다. 먼저 백신 미접종 대조군에서는 3일째에는 모든 병아리가 침울상태를 나타냈으며, 12일까지에 모두 폐사하였다. JOL916군에서 관찰가능한 침울, 설사, 및 폐사를 보이지 않았다. 그러나 이 군에서 2일째에서 4일째까지 2 마리의 병아리가 식별이 가능한 약한 식욕감퇴를 보였다. 한편 SG9R 군에서는 6 마리가 약한 침울을, 또 6 마리가 분명한 식욕감퇴를, 그리고 5마리가 노랑색 설사증상을 보였으며, 3마리는 10일째까지 계속 증상을 나타내고 1마리는 폐사하고 나머지는 10일째까지에 회복되었다. 폐사수에 있어 JOL916군과 SG9R군 간에 통계학적 차이는 없었다 (표 42).

표 44. Mortality of vaccinated chickens after virulent challenge.

Group	n	Day post challenge												Death rate (%)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
JOL916	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0 a
SG9R	15	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	6.7 b	
PBS	15	0	0	0	1	9	3	2	0	0	0	0	0	100 ab	

Values with the same letter indicate significant differences according to the chi-square test ($P < 0.05$).

(2) 병리소견 및 세균분리

야외균주 접종 후 12일째 모든 생존동물을 희생하여 육안적 병리소견을 관찰하였다. Liver 및 spleen에서 enlargement와 necrotic foci를 관찰하고 0점(정상)에서 3점(심각)까지 개체별로 종합적으로 평가하였으며, 평균값 및 standard error of mean 을 산출하여 표 43에 나타내었다. JOL916군은 SG9R군보다 Liver necrotic foci와 Spleen lesions에 있어 경미한 병변을 보였다($P < 0.05$).

(3) 세균 분리

야외균주가 얼마나 병아리 안에 생존하고 있는지 비교하기 위하여 간장 및 비장을 Buffered peptone water (BPW, Becton, Dickinson and Company, France)에서 분쇄하고 상층액을 Brilliant Green Agar (BGA, Becton, Dickinson and Company, France)에 접종하여 colony count를 실시하며 negative인 경우 enrichment culture를 BPW에서 37도 16시간 배양 후 Rappaport-Vassiliadis R10 broth (Becton, Dickinson and Company, France)에 1/100 volume 접종하여 42도에서 48시간 배양후 BGA에서 Salmonella의 유무를 확인하였다. Colony수는 장기 1 gram당의 세균수를 산출하여 \log_{10} 값으로 환산하여 군간 비교를 실시하였다. 그 결과 JOL916군은 SG9R군보다 spleen에서 분리 건수 및 세균수에 있어 보다 경미한 야외균주 감염이 일어나 있는 것을 알 수 있었다 (표 43).

표 45. Gross lesions and bacterial recovery of the challenge strain in the vaccinated chickens.

Group	Gross lesions ^a				Recovery				
	Liver		Spleen		Liver		Spleen		
	<i>n</i>	ENL ^b	NF ^c	ENL	NF	Number positive ^e	Count ^f	Number positive	Count
JOL916	15	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1a	0.5 ± 0.2b	0.1 ± 0.1c	2	0.20 ± 0.15	9d	2.04 ± 0.43e
SG9R	14 ^d	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.2a	2.0 ± 0.3b	0.9 ± 0.1c	6	0.94 ± 0.31	14d	3.69 ± 0.33e

Values with the same letter are significantly different at the 5% level according to the Mann-Whitney *U* test.

^a Gross lesions were given scores of: 0, 1, 2, or 3 for each lesion. Values represent group mean scores (Mean ± SEM).

^b Enlargement.

^c Necrotic foci.

^d Chickens that survived until the 12th dpc were examined.

^e Number of chicken that was positive for bacterial recovery.

^f Number of bacteria per gram tissue (Mean ± SEM \log_{10} cfu/g).

바. 결론

SG9R과 비교한 결과 본 백신후보균주는 SG9R와 안전성이 비슷하지만 방어력에 있어 우수함을 야외균주 접종 후 병리소견 및 세균분리시험 성적에서 알 수 있었다.

8. 어린 병아리에서 JOL916의 접종 조건 탐색

가. 개요

JOL916은 시판생백신보다 안전성이 비슷하고 방어력이 우수함을 실험적으로 확인할 수 있었다. 여기서는 시험백신을 생백신으로 동물에 적용할 수 있는 최소 주령 및 적용 조건을 탐색하였다. 가금티푸스를 비롯한 salmonellosis는 매우 어린 시절부터 감수성이 있기 때문에 이른 시기에 백신을 접종하여 부작용이 없고 어느 정도 방어력을 발휘한다면 경제효과가 크다.

또한 여기서 부과적으로 언급하는 JOL969 및 JOL971는 arabinose 의존성 promoter를 지닌 매우 안전성이 높은 균주들이다. 이론적으로 high copy number의 plasmid를 지닌 JOL971가 middle copy number를 지닌 JOL969보다 생존력이 강할 것으로 추론되기 때문에 여기서는 일단 JOL971를 연구대상으로 삼았다. 어린 병아리에 병원성이 강한 생백신을 적용할 수 없기 때문에 JOL971과 같은 안전성이 보장된 균주들을 유용할 수 있다.

어린 병아리에서 백신적합성을 조사하기 위한 연구를 부작용 및 방어력 평가, 그리고 면역유도의 순서로 정리하여 기술한다.

나. 균주

JOL916, JOL971, JOL966을 사용하였다. JOL971를 위하여는 모든 배지에 L-arabinose를 0.2%씩 첨가하여 배양 및 보존하였다. Glycerol-TSB freezing culture (-80C)에서 TSA에 streaking하여 overnight culture (37C)후 one colony를 다시 TSA에 streaking하여 overnight culture (37C)하여 얻은 one colony를 TSB에 overnight culture (37C, 200 rpm, 17~18 hours)하고 PBS로 3번 세척한 후 적당한 농도로 0.05% Gelatin-PBS에 재부유시켜 투여하였다.

다. 실험동물

육계 초생추 100마리, Brown Nick 암초생추 200마리, Brown Nick 수초생추 100마리를 분양받아 적절한 주령까지 사육 후 실험에 사용하였다. 항생제가 첨가되지 않은 사료를 자유섭취하도록 하였다.

라. 실험 design

Set I 부터 Set VII까지 모두 7번의 실험을 실시하였다 (표 44). 1일령(0주령) 육계, Brown Nick 의 1, 2, 3, 4주령에 2×10^7 또는 2×10^8 CFU씩 경구투여 하였다. 백신접종 후 2주(0주령에 백신접종 시) 또는 2주반 후에 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$ CFU의 야외균주를 경구적으로 투여하여 방어력을 관찰하였다. 단, 0주령에는 JOL971의 적합성만 (JOL966는 비교를 위하여 접종) 접종하였으며, 0, 1, 2주령에서 JOL971의 방어력이 실용적 수준에 못 미치는 것을 확인하여 3, 4주령에서는 JOL916 및 JOL966만을 접종하였다.

마. 부작용 평가

백신접종 전후에 매일 임상증상을 관찰하여 임상증상을 침울, 식욕감퇴, 설사의 항목별로 0점(건강)부터 3점(심각)까지 점수화하여 평가하였다. 또한 접종 후 10일까지 체

중측정함으로 중체곡선을 작성하여 성장억제여부를 조사하였다. 백신 접종 2주후에 모든 군에서 5마리씩 해부검사를 실시하여 간장 및 비장의 병변을 0점(정상)부터 3점(심각)까지 성적을 매겨 평가하였다. 점수 및 체중은 모두 SPSS ver 10.을 이용하여 General linear model의 multiple comparison test 및 post hoc test의 결과 $P < 0.05$ 인 경우 부작용이 있는 것으로 인정하였다.

3주령에 JOL966을 접종 후 한마리가 폐사한 것을 제외하고 모든 주령 및 모든 군주에서 건강상태 및 10일동안의 중체곡선을 비교한 결과 백신미접종군과 통계학적 차이를 인정할 수 없어 급성부작용이 없는 것으로 추정되었다 (표 44).

백신접종 2주 후에 해부검사를 실시한 결과 JOL971보다 JOL916에서 병변이 더 생겼으며 JOL966과 JOL916을 비교한 경우 JOL966에서 더 병변이 강하게 나타났다. 0주령의 육계 및 1, 2주령의 숫병아리에 백신접종한 경우는 병변을 나타내지 않았다.

바. 면역유도 측정

백신접종 2주 후에 특이면역 반응을 측정하였다. 혈장 IgG 및 세포성 면역반응 측정을 위하여 1 ml 혈액을 채취하여 원심분리하여 말초림프구를 분리해, 위에 기술한 방법으로 lymphocytes proliferation assay를 실시하였다. 혈장은 냉장보관 후 1:500로 희석하여 JOL420에서 정제한 omp fraction으로 indirect ELISA를 실시하였다. 소화기내 IgA 측정을 위해 실험동물의 ileum의 정해진 부위를 10cm 절제하여 1ml의 PBS (pH7.2)로 세척하고 13,000 rpm 로 투명한 상층액을 얻어 1:00로 희석하여 동일하게 indirect ELISA를 실시하였다.

세포성면역, 점막면역, 체액성 면역에서 모두 JOL971는 특이면역유도력이 매우 약했으며 JOL916과 JOL966은 접종하는 주령과 접종량에 따라 차이가 있었다 (표45). 세포성면역은 말초혈구로 반응을 본 결과 약간의 증가를 보이기도 하였으나 통계학적 유의성을 나타내지 못하였다. 점막면역과 체액성 면역 반응으로 보면 1주령에 2×10^7 CFU를, 2주령에 2×10^8 CFU를 경구접종하는 경우에 반응이 강하게 나타났다.

사. 방어력 평가

야외균주 접종 전후 폐사가 발견될때 까지 임상증상을 매일 침울, 식욕감퇴, 설사의 항목별로 0점(건강)부터 3점(심각)까지 점수화하여 평가하였다. 또한 접종 후 10일까지 폐사가 없는 경우 체중측정함으로 중체곡선을 작성하여 성장억제여부를 조사하였다. 폐사수도 기록하였다. 야외균주 접종 10일후에 생존한 모든 동물의 해부검사를 실시하여 간장 및 비장의 병변을 0점(정상)부터 3점(심각)까지 성적을 매겨 평가하였다.

야외균주에 대한 방어력을 Relative risk reduction으로 나타내었다 (표 45). 0주령(1일령)에 백신접종한 경우 전혀 14.3%~20%로 매우 낮은 성적을 보였다. JOL916를 접종한 경우 1, 2, 3주령 접종에서 100%를 나타냈으나 3, 4주령에 접종한 경우 효과가 약화되었다. JOL966는 66.7%~100%이었으며 주령이 커지면서 효과가 약해지는 양상을 보였다. 이는 백신균주의 침입이 경구접종의 경우 감소되는 것이 원인으로 사려한다. 1, 2, 3주령에서 100%의 방어효과를 보였던 JOL916접종군 가운데 임상소견 및 중체율의 평가에서 1주령에 접종한 경우에 가장 좋은 결과를 보였다. 방어력은 접종하는 주령과 접종량의 영향을 받는 것으로 알 수 있었다. 폐사율을 기준으로 한 방어력으로 보면 1주령에 2×10^7

CFU를, 2주령에 2×10^8 CFU를 경구접종하는 경우에 우수하였다. 또한 야외균주 접종 후 임상증상 관찰 결과로는 1주령에 2×10^7 CFU를 접종하는 경우에 방어력이 가장 좋았다.

자. 결론

이상의 결과, 0주령에 백신접종 하여도 효과가 없으며, JOL971는 어린 병아리에서 독성이 없지만 효과도 없어 실용성이 없음을 알 수 있었다. 또한, JOL916은 1주령에 2×10^7 CFU를 경구접종함으로써 방어효과를 기대할 수 있음을 알 수 있었으며, 이런 경우 약간의 병리소견이 나타났으나 성장억제 및 임상소견에 있어 부작용이 관찰되지 않았다. JOL916을 경구적으로 접종함에 있어서는 병아리의 주령에 따라 접종량을 가감하여야 하며, 1주령은 2×10^7 CFU를, 2주령은 2×10^8 CFU를, 3주령이상은 2×10^8 CFU이상을 접종하여야 방어력을 기대할 수 있을 것으로 판단되었다. 아울러, 어린 병아리와 경구접종까지 시야에 둔 더욱 안전성이 높은 균주를 발전적으로 개발해나가야 할 것으로 생각한다.

표 44. 어린 병아리에서 백신적합성 실험

Set	Group	Animal	Vaccination											Challenge						
			n	age	strain	dose	RT ^a	SE ^b	Gross lesion ^c				n	wpv	dose	RT	death [%]	RRR [%] ^h	P ⁱ	
									n	LE ^d	LS ^e	SE ^f								SM ^g
1	A	broiler	20	0	971	2x10 ⁷	PO	-	4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	14	2	2x10 ⁵	PO	28.6	14.3	0.550
	B		20	0	971	2x10 ⁸	PO	-	4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	14	2	2x10 ⁵	PO	28.6	14.3	0.550
	C		20	0	966	2x10 ⁷	PO	-	4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	15	2	2x10 ⁵	PO	28.6	20.0	0.500
	D		20	0	None	-	-	-	3	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	15	2	2x10 ⁵	PO	33.3	-	-
2	A	hen	15	1	916	2x10 ⁷	PO	-	5	0.4±0.5	1.2±0.8	0.6±0.5	1.2±0.4	10	2.5	2x10 ⁶	PO	0.0	100	0.000*
	B	B.Nick	15	1	971	2x10 ⁷	PO	-	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.4±0.5	10	2.5	2x10 ⁶	PO	80.0	0	0.709
	C		15	1	None	-	-	-	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	10	2.5	2x10 ⁶	PO	80.0	-	-
3	A	rooster	15	1	966	2x10 ⁷	PO	-	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	10	2.5	2x10 ⁶	PO	20.0	66.7	0.709
	B	B.Nick	15	1	None	-	-	-	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	10	2.5	2x10 ⁶	PO	50.0	-	-
4	A	hen	15	2	916	2x10 ⁷	PO	-	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.4±0.8	0.6±0.8	10	2.5	2x10 ⁶	PO	0.0	100	0.002*
	B	B.Nick	15	2	971	2x10 ⁷	PO	-	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.2±0.4	10	2.5	2x10 ⁶	PO	60.0	14.3	0.500
	C		15	2	None	-	-	-	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	10	2.5	2x10 ⁶	PO	70.0	-	-
5	A	rooster	15	2	916	2x10 ⁸	PO	-	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	10	2.5	2x10 ⁷	PO	0.0	100	0.000*
	B	B.Nick	15	2	966	2x10 ⁸	PO	-	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	10	2.5	2x10 ⁷	PO	10.0	88.9	0.001*
	C		15	2	None	-	-	-	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	10	2.5	2x10 ⁷	PO	90.0	-	-
6	A	hen	15	3	916	2x10 ⁸	PO	-	5	0.4±0.5	0.0±0.0	0.2±0.4	0.2±0.4	10	2.5	2x10 ⁷	PO	20.0	75.0	0.012*
	B	B.Nick	15	3	966	2x10 ⁸	PO	+ ^j	5	1.0±0.0	0.4±0.5	0.8±0.4	1.0±0.9	9	2.5	2x10 ⁷	PO	0.0	100	0.001*
	C		15	3	None	-	PO	-	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	10	2.5	2x10 ⁷	PO	80.0	-	-
7	A	hen	15	4	916	2x10 ⁸	PO	-	5	0.6±0.5	0.2±0.4	1.0±0.9	0.4±0.5	10	2.5	2x10 ⁷	PO	20.0	60.0	0.175
	B	B.Nick	15	4	966	2x10 ⁸	PO	-	5	1.0±0.0	1.0±0.9	1.0±0.9	0.6±0.5	10	2.5	2x10 ⁷	PO	10.0	80.0	0.070
	C		15	4	None	-	-	-	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	10	2.5	2x10 ⁷	PO	50.0	-	-

(p 97 주 참조)

표45. 어린 병아리에서 면역반응 측정결과

Animal			Vaccination		LPA ^a		intestinal IgA		plasma IgG			
set	breed	age	n	strain	dose	GMR ^b	<i>P</i> ^c	rate	<i>P</i>	rate	<i>P</i>	
1	broiler	0	4	971	7	-	-	1.49	0.210	0.76	1.000	
		0	4	971	8	-	-	1.28	1.000	1.21	1.000	
		0	4	966	7	-	-	1.23	1.000	1.20	1.000	
		0	3	none	-	-	-	-	-	-	-	
2	hen	1	5	916	7	1.09	1.000	1.09	0.014*	39.7	0.001*	
		B.Nick	1	5	971	7	0.92	1.000	0.21	1.000	2.19	1.000
		1	5	none	-	-	-	-	-	-	-	
3	rooster	1	5	966	7	0.94	0.686	1.21	0.541	1.63	0.841	
		1	5	none	-	-	-	-	-	-	-	
4	hen	2	5	916	7	1.63	0.148	1.34	0.899	2.67	0.285	
		B.Nick	2	5	971	7	1.07	1.000	1.20	1.000	1.24	1.000
		2	5	none	-	-	-	-	-	-	-	
5	rooster	2	5	916	8	1.12	0.394	1.06	1.000	19.3	0.001*	
		B.Nick	2	5	966	8	0.96	1.000	2.26	0.391	23.7	0.000*
		2	5	none	-	-	-	-	-	-	-	
6	hen	3	5	916	8	1.58	0.243	1.06	1.000	19.3	0.001*	
		B.Nick	3	5	966	8	1.39	0.728	2.26	0.391	23.7	0.000*
		3	5	none	-	-	-	-	-	-	-	
7	hen	4	5	916	8	1.12	0.394	0.99	1.000	32.7	0.521	
		B.Nick	4	5	966	8	0.96	1.000	2.00	0.403	61.3	0.053
		4	5	none	-	-	-	-	-	-	-	

^a Lymphocytes proliferation assay.

^b Group mean rate was calculated from group mean values divided with value of unvaccinated group.

^c P-value was determined by Bonferroni's multiple comparisons analysis and only the result of comparing to unvaccinated group in each set was presented. Asterisk means the statistically significant increase of the immune responses ($P < 0.05$).

(표 44 주)

^a Route of inoculation

^b Side Effect. 중체곡선을 General linear model의 multiple comparison test 및 post hoc test로 백신미접종군과 비교하여 성장억제 유무를 분석한 결과 $P < 0.05$ 인 경우 부작용을 인정하였다.

^c Group mean score $\pm SE$ at 2nd WPV. Each lesion was scored from 0 (healthy) to 3 (severe)

^d Liver enlargement

^e Liver white spot

^f Spleen enlargement

^g Spleen white spot

^h 백신미접종군에 대한 Relative Risk Reduction

ⁱ One-sided Chi-square exact test로 백신미접종군에서 보인 RRR의 통계학적 유의성을 P -value 로 나타내었다. Asterisk 는 통계학적으로 폐사율이 감소하였음을 나타낸다 ($P < 0.05$).

^j 접종 17일후 갑자기 특이적 설사를 보이다가 폐사하였다.

9. 시험백신의 생산 및 일반, 안전 시험

가. 시험백신의 생산

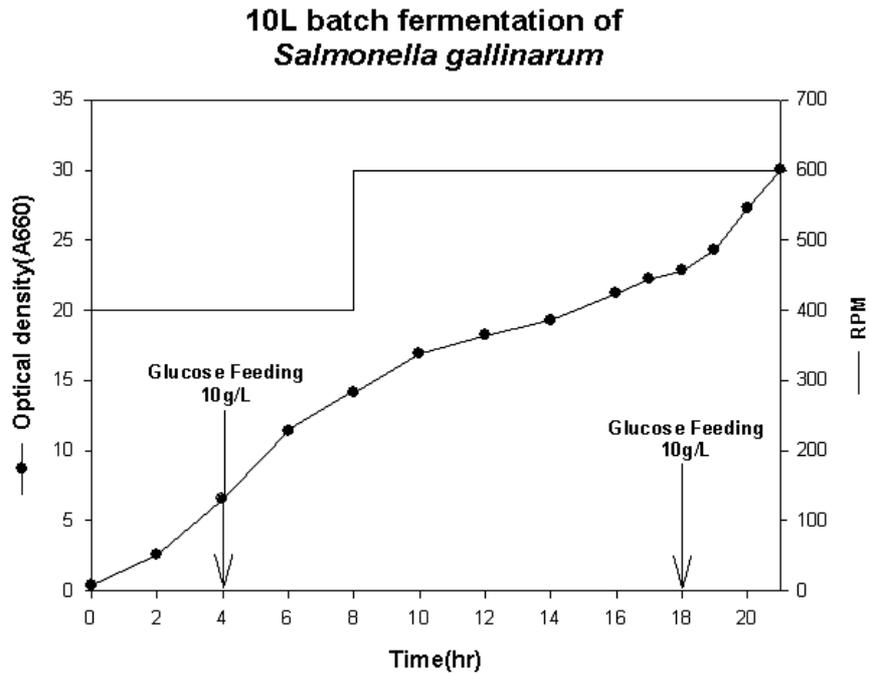


그림 41. *Salmonella Gallinarum* JOL916 strain의 10L fermentation에 따른 배양결과

표46-47. *Salmonella Gallinarum*을 함유한 시험백신제조

동결건조 조성	비율	시험백신조성 (ml)
<i>Salmonella Gallinarum</i> JOL916 bulk	2	510
TPGG (3X)	1	255
Total		765

구분	균수	생존률
동결건조 전 균수	196.7×10^8 CFU / vial	91%
동결건조 후 균수	179.3×10^8 CFU / vial	

나. 시험백신의 일반시험

(1) 특성시험

(가) 시험방법

Lot별 시험백신 2병씩 6병에 대하여 색, 혼탁도, 이물 또는 이취에 대하여 검사하며, 색, 혼탁도, 이물시험은 100룩스 광도하에서 실시하며, 현탁상태를 검사할 때는 소분된 용기마다 규정된 희석액을 가하여 가볍게 흔들어서 용해도, 혼탁도, 색조를 검사한다.

(나) 시험결과

유백색의 건조괴로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하였으며, 용이하게 현탁되었고 현탁도나 색조에 차이를 관찰할 수 없었다.

(2) 진공도시험

(가) 시험방법

Lot별 시험백신 3병씩 9병에 대하여 암실에서 테스터코일을 시험백신으로부터 5mm 이내의 위치에 놓고 방전의 유무를 관찰하여 모두 방전이 인정되어야 한다.

(나) 시험결과

시험백신 모두 방전이 인정되었다.

(3) 흡습도시험

(가) 시험방법

Lot별 시험백신 3병씩 9병에 대하여 동물용 생물학적제제 일반검정기준에 의하여 칼-피쉬법(Karl-Fischer method)으로 흡습도를 측정하여 시험한 성적중 최고치가 6%이하이어야 한다.

(나) 시험결과

아래의 표와 같이 시험백신의 흡습도는 3.16%, 3.14%, 3.04%를 각각 나타내어 적합하였다.

표 50 시험백신의 함습도 시험 결과

Lot. No.	Sample			Highest	Remark
	1	2	3		
SG01	2.75%	3.16%	2.87%	3.16%	Pass
SG02	2.98%	2.65%	3.14%	3.14%	Pass
SG03	2.65%	3.04%	2.99%	3.04%	Pass

(4) 순수시험

(가) 순수시험방법

시험백신마다 각각 도말표본을 만들어 그람 및 일반세균염색을 하여 현미경으로 관찰하는 현미경 검사와 시험백신을 Nutrient agar(NA), Nutrient broth(NB), Fluid thioglycollate medium(Thio)에 각각 2개의 시험관에 접종하여 22℃와 37℃에서 7일간 배양하면서 잡균의 존재 여부를 관찰하는 배양검사에서 시험품에 함유된 *S. Gallinarum* 이외에 어떠한 세균도 인정되어서는 안 된다.

(나) 시험결과

S. Gallinarum 이외의 어떠한 세균발육도 관찰할 수 없었다.

표 51 시험백신의 순수시험

Lot. No.	22℃			37℃			Remark
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio	
SG01	-*	-	-	-	-	-	Pass
SG02	-	-	-	-	-	-	Pass
SG03	-	-	-	-	-	-	Pass

*- : No growth of any microorganism

(5) 균수시험

(가) 시험방법

멸균 생리식염수로 10진 희석한 후 면양혈액한천배지에 접종하고 37℃에서 48시간 배양하여 평판법으로 균수를 측정하여 균수가 2.0×10^7 CFU/dose 이상이어야 한다.

(나) 시험결과

균수측정 결과 시험 백신 3 lot의 균수는 아래의 표와 같이 각각 169×10^8 , 189×10^8 CFU/vial을 나타내었다.

표 52 시험백신의 균수 시험

Lot. No.	Included antigen	dose/vial
	CFU/vial	
SG01	169×10^8	845
SG03	189×10^8	945

(6) 목적동물 안전 시험

(가) 시험 방법

살모넬라 갈리나룸에 감수성이 있는 8~16주령 닭 15마리를 사용하여 10마리는 시험군으로, 5마리는 무접종 대조군으로 한다. 시험군에 백신 10수분을 사용법에 따라 접종하고 14일간 관찰한다. 시험군은 관찰기간 동안 국소 또는 전신 증상 없이 생존하여야 한다.

(나) 시험결과

시험결과 시험백신 모두 관찰기간 동안 국소 또는 전신 증상없이 생존하였다.

10. 시험 백신 효능성 평가

가. 공격접종군의 농도 결정시험

(1) 시험방법

Salmonella Gallinarum 공격 균주를 Brain Heart Infusion Broth에서 배양하여 균수측정결과 1.65×10^{10} 이였으며 배양액을 10진 희석하여 아래 표와 같이 5개의 공격시험군과 1개의 대조군을 두었다. 공격접종에 사용된 닭은 6~8주령의 갈색계(하이라인)를 사용하였으며, 수당 1ml씩 구강내로 접종하였고, 접종 후 14일간 관찰하고 치사율을 측정하였으며, 공격접종 14일후 까지 생존계는 간, 비장에서 접종군의 재분리를 시도하였다.

(2) 시험결과

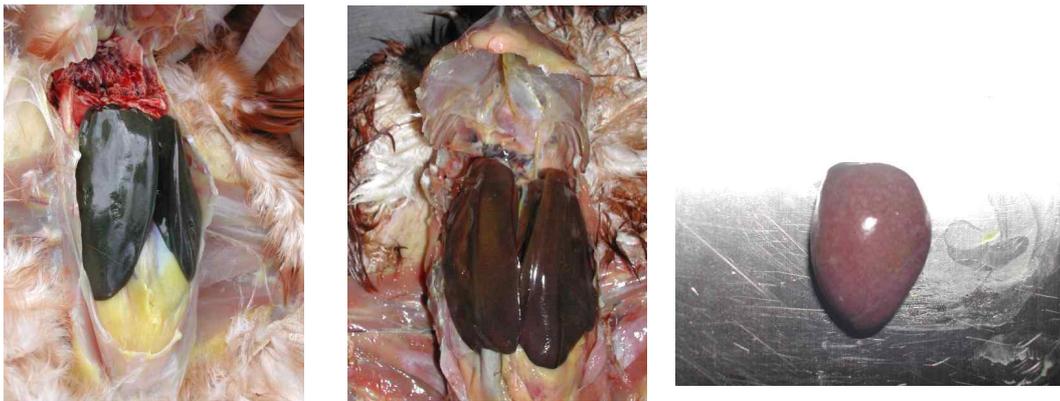
아래와 같이 실험한 결과 공격균주의 LD₅₀은 1.65 × 10⁷로 확인되었다.

표 53 시험백신 공격접종균 농도결정시험

Group	Inoculation (1ml)	Dead num. /Test num. (Dead rate)	Average date of death	Positive num. ¹⁾ /Autopsy num.	Reisolation num. ²⁾	
					Liver	Spleen
1	1.65 × 10 ¹⁰	6/6(100)	6.5(6)	6/6	6/6	6/6
2	1.65 × 10 ⁹	5/6(83.3)	6.8(5)	6/6	6/6	6/6
3	1.65 × 10 ⁸	5/6(83.3)	7.5(5)	6/6	6/6	6/6
4	1.65 × 10 ⁷	4/6(66.6)	9.3(4)	5/6	5/6	5/6
5	1.65 × 10 ⁶	0/6(0)	-	1/6	1/6	2/6
Control		0/6(0)	-	0/6	0/6	0/6

¹⁾ Positive num. : 간종대, 청동간, 비장종대, 패혈증 등.

²⁾ Reisolation num : API 20E kit 과 PCR 이용한 균동정



< A. 간의 비정상적 모습(청동간과 간종대) >

< B. 비장종대 >

그림 42. *S. Gallinarum* 공격균주를 접종한 뒤 폐사계의 간과 비장의 육안병변

나. 시험백신의 항원함량 확인시험

SG 시험백신(JOL916)과 현재 상용화 제품인 인터벳의 Nobilis SG9R, 중앙백신의 PoulShot S/9R과 효능을 비교시험 하였다. 먼저 각 시험백신의 항원 함량을 측정해 본 결과 다음과 같았다.

표 54 시험백신의 항원량

No.	시험백신	생균수 함량(CFU/vial)
1	SG시험백신 JOL916	1.7 x 10 ¹⁰
2	PoulShot S/9R	2.7 x 10 ¹⁰
3	Nobilis SG9R	5.2 x 10 ¹⁰

다. 시험백신의 효능시험

4주령 닭 각 10마리에 1수분을 피하 접종하고, 백신접종 3주 후, 야외분리주(닭 티푸스 병원성균주로 중앙백신연구소에서 보관하고 있는 야외 분리주)를 약1.6x10⁷CFU/dose로 경구접종하고 2주간 관찰하면서 폐사율을 확인하였으며, 폐사된 개체는 티푸스로 폐사됨을 확인 하였다.

표 55 시험백신의 효능시험 design

No.	그 룩		마릿수	접 종
1	SG시험백신 (JOL916)	전북대	10	4주령 1수분, 피하접종 3주후 공격접종
2	PoulShot S/9R (39SG9R01)	중앙백신	9	
3	Nobilis SG9R	인터벳	10	
4	Control		12	

3종류의 시험백신을 접종하고, 3주후에 야외 분리주로 공격접종한 결과 모두 만족할 만한 결과를 다음과 같이 얻게 되었다.

표 56 시험백신의 효능시험 결과

No.	그 룩	생존수/시험수	생존율(%)	폐사율(%)
1	SG시험백신 JOL916	9/10	90	10
2	PoulShot S/9R	8/9	89	11
3	Nobilis SG9R	10/10	100	0
4	Control	3/12	25	75

공격접종 후, 모든 폐사계 11수에서 닭 티푸스 특이병변 등의 임상관찰을 실시하였다. 또한 공격접종 군주 재분리 확인한 결과, 공격 접종 후(7 dpi) 분변에서 공격 접종군주 재분리되지 않았으며, 공격 접종 후(14 dpi) 생존한 닭에서 공격군주 재분리 시도하였으나 모두 음성을 나타냈다.

11. 시험백신의 면역원성 시험

가. 시험방법

3가지 시험백신을 4주령 닭 각 10마리에 피하접종 3주 후 채혈하여 S. Gallinarum에 대한 microplate agglutination test를 실시하여 항체역가를 측정하였다. 시험용 항원은 SG9R을 사용하였다.

표 57 시험백신의 면역원성 시험

No.	그 룩	MAT 결과(기하평균)		
		백신3주후	공격1주후	공격2주후
1	SG시험백신 JOL916	105.6	160.0	186.6
2	PoulShot S/9R	92.5	345.6	269.1
3	Nobilis SG9R	183.8	259.9	226.3
4	Control	24.2	353.3	640.0

나. 시험결과

3종류의 시험백신을 각 10마리 닭에 피하 접종 후 백신 접종 3주후, 공격 접종 1주후, 공격 접종 2주후에 채혈하여 MAT결과를 다음과 같이 얻었다. 시험결과 기존 상용화 백신과 동일한 면역원성 결과를 확인하게 되었다.

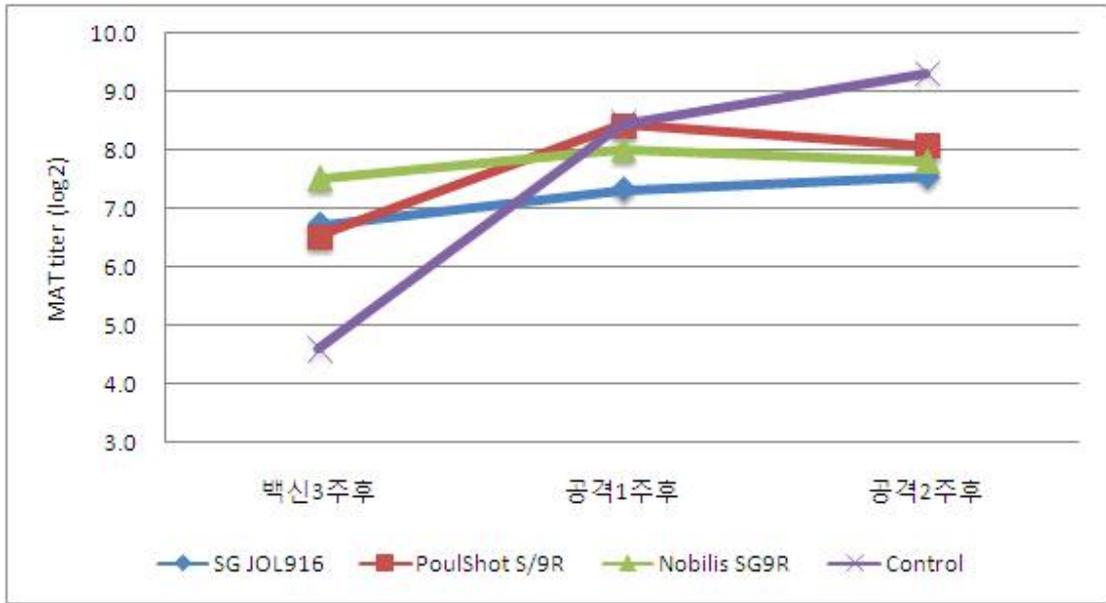


그림 43. 백신접종 및 공격접종 후 각 시험군의 MAT 항체역가 변화

12. 야외농장에서의 안전시험

가. 임상시험 농장선발

(주) 중앙백신연구소 추풍령 무균동물사육장에서 가금티푸스에 대한 평판응집반응과 ELISA를 시험을 통하여 음성으로 확인하여 SG 시험백신(JOL916)과 중앙백신연구소의 Poulshot S/9R을 1차, 2차 접종을 한 후 임상증상, 증체율, 병리소견을 평가하였다.

(1) 시험농장

표 58 야외 농장 시험장인 시험농장 정보

농장 정보	
Name of Farm	(주) 중앙백신연구소 추풍령 무균동물사육장
Farmer	윤인중
Breed	하이라인 갈색계
Address	충북 영동군 추풍령면 계룡리 452-1
Farm size	4,000수
Clinical history	가금티푸스 발병 없었음
Group	Vaccination group 3,000수, Nonvaccination group 500수

(2) 야외농장시험계군의 *Salmonella* 음성 확인시험

상기 농장의 닭에 대하여 *Salmonella* 음성 계군임을 확인하기 위하여 녹십자수의약품(주)에서 생산되는 추백리 진단액을 이용한 평판응집반응과 ELISA를 이용하여 실험하였으며, 시험계 100수를 채혈하여 시험계군의 살모넬라 감염여부를 파악하여, 음성농장으로 확인되었다.

표 59 사용된 동물의 살모넬라 음성 확인 실험

Farm name	Weeks	No. of test	Results	
			Plate Agglutination	ELISA
추풍령 무균동물사육장	6	100	100 (-)	100 (-)

나. 야외농장에서의 임상증상 평가

(1) 시험방법

SG 시험백신(JOL916)을 7주령 2,500수, 중앙백신연구소(CAVAC)의 Poulshot S/9R백신을 500수에 각각 1수분씩 경부피하 접종하고, 무접종 대조군 500수와 함께 그 중에서 각

그룹별로 30수를 대조군 30수와 함께 14일간 접종반응 및 임상증상을 관찰하였으며, 19주령에 2차 접종하고 1차 접종시와 마찬가지로 접종반응 및 임상증상을 14일간 관찰하였다.

(2) 시험결과

모든 시험계에서 백신접종 후 접종반응이나 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았다.

표 60 백신 후 부작용 관찰 결과

Lot. No.	Vaccination		Chicken	Period	Reaction	
	Age	Method			Local ¹⁾	Systemic ²⁾
JOL 916	7 Weeks	SC 1 dose	30	14 days	-	-
	19 Weeks		30		-	-
Poulshot S/9R	7 Weeks		30		-	-
	19 Weeks		30		-	-
	Control		30		-	-

SC : Subcutaneous

Local¹⁾ : swelling and granuloma of inoculation region, dyskinesia etc.

Systemic²⁾ : dead, septicemia, depression, sleeping etc.

다. 백신접종 후 증체곡선 확인

(1) 시험방법

SG 시험백신(JOL916)을 7주령 2,500수, 중앙백신연구소(CAVAC)의 Poulshot S/9R백신을 500수에 각각 1수분씩 경부피하 접종하고, 무접종 대조군 500수와 함께 그 중에서 각 그룹별로 30수를 대조군 30수와 함께 접종전과 1차 접종 3주후에 증체량을 확인하였으며, 19주령에 2차 접종하고 1차 접종시와 마찬가지로 접종 3주후에 증체량을 확인하였다.

(2) 시험결과

아래의 표와 같이 시험백신 접종군과 중앙백신연구소(CAVAC) S/9R 백신접종군 모두 증체율에서 대조군과의 차이가 없음을 확인하였다.

표 62 백신 후 사망율 및 산란 능력

Weeks	Tested number	Death		Weeks Egg-laying rate		Remark
		Quantity	Rate(%)	Egg-laying Rates(%)	Standard Table(%)	
20	3,000	7	0.05	5	26	
21		15	0.10	43	52	
22		28	0.19	67	77	
23		35	0.23	88	90	
24		54	0.36	91	93	
25		54	0.36	92	94	
26		65	0.44	94	94	
27		54	0.37	95	95	
28		54	0.37	94	95	
29		48	0.33	94	95	
30		42	0.29	93	94	
31		54	0.37	93	94	
32		56	0.39	94	94	
33		54	0.38	93	94	
34		53	0.37	93	94	
35		53	0.37	94	94	
36		52	0.37	93	93	
37		49	0.35	93	93	
38		63	0.45	92	93	
39		70	0.50	92	93	
40	48	0.34	92	93		

바. 백신균주에 의한 계란의 Salmonella 오염여부

(1) 시험방법

산란개시되는 20주령부터 매주 계란을 15개씩 그룹별로 회수하여, 계란 표면을 Swab 하여 Selenite Cystine broth에 1차 선택 증균한 다음, Brilliant Green agar나 Salmonella Shigella agar에 2차 선택배양하여 특이적인 단독집락(colony)을 선별하여 Nutrient agar에 순수배양한 다음 순수배양된 단독집락은 API 20E kit 과 Salmonella 특이 검출 PCR 방법을 이용하여 최종 동정하였다.

(2) 시험결과

매주 검사한 결과 계란 표면에서 살모넬라가 검출되지 않음을 확인하였다.

표 63 백신 후 난각 오염 유무

Group	Chicke n	Reisolation number of egg surface																			
		20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
JOL 916	15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15
Poulshot S/9R	15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15
Control	15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15

사. 백신균주에 의한 야외균주의 오염방어 조사

(1) 시험방법

산란개시되는 20주령부터 매주 계란을 15개씩 그룹별로 회수하여 계란 표면 Swab을 채취하여 Selenite Cystine broth에 1차 선택 증균한 다음, Brilliant Green agar나 Salmonella Shigella agar에 2차 선택배양하여 특이적인 단독집락(colony)을 선별하여 Nutrient agar에 순수배양한 다음 순수배양된 단독집락은 API 20E kit 과 S. Gallinarum 특이 검출 PCR 방법을 이용하여 최종 동정하였다.

(2) 시험결과

매주 검사한 결과 계란 표면에서 살모넬라가 검출되지 않음을 확인하였다.

표 64 야외균주 도전 후 난각 오염 유무

Group	Chicke n	Reisolation number of egg surface																			
		20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
JOL 916	15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15
Poulshot S/9R	15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15
Control	15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15	0 /15

자. 장기면역 유지 및 2차 접종 시기 조사

(1) 백신 접종 후 장기간 사육

SG 시험백신(JOL916)을 2,500마리에 접종하고 접종반응 관찰한 결과 국소적인 반응과 전신적인 반응 모두 어떠한 증상도 관찰할 수 없었으며, 중앙백신연구소 Poulshot S/9R 접종군 500수와 무접종군 500수와 비교에서도 어떠한 차이점도 발견할 없음을 따라서 백신의 안전성을 확인할 수 있었다.

(2) 산란율 및 폐사율 확인시험

백신접종이 산란율과 폐사율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 산란율을 표준산란율과 비교한 결과 유의성 있는 차이를 관찰할 수 없었으며, 폐사율 역시 국내 평균 산란계 주간 폐사율 0.2~0.5% 범위내에 존재하는 것을 관찰할 수 있었다.

(3) 정기적 면역측정

시험백신 접종군, 중앙백신연구소(CAVAC) S/9R접종군 및 대조군의 닭 15수씩 백신접종전인 8주령부터 시작하여 4주 간격으로 40주령까지 채혈하고, *S. Gallinarum* 에 대하여 Microplate agglutination test (MAT)를 통한 응집역가를 확인하였다.

표 65 백신 후 면역 추이

Group	Chicken Num.	MAT titer								
		7W	12W	16W	20W	24W	28W	32W	36W	40W
JOL 916	15	<80	685*	640	452	905	685	519	394	367
Poulshot S/9R	15	<80	519	557	422	970	844	343	452	367
Control	15	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80

W : Weeks old * : GMT(Geometric mean titer)

MAT : Microplate Agglutination test

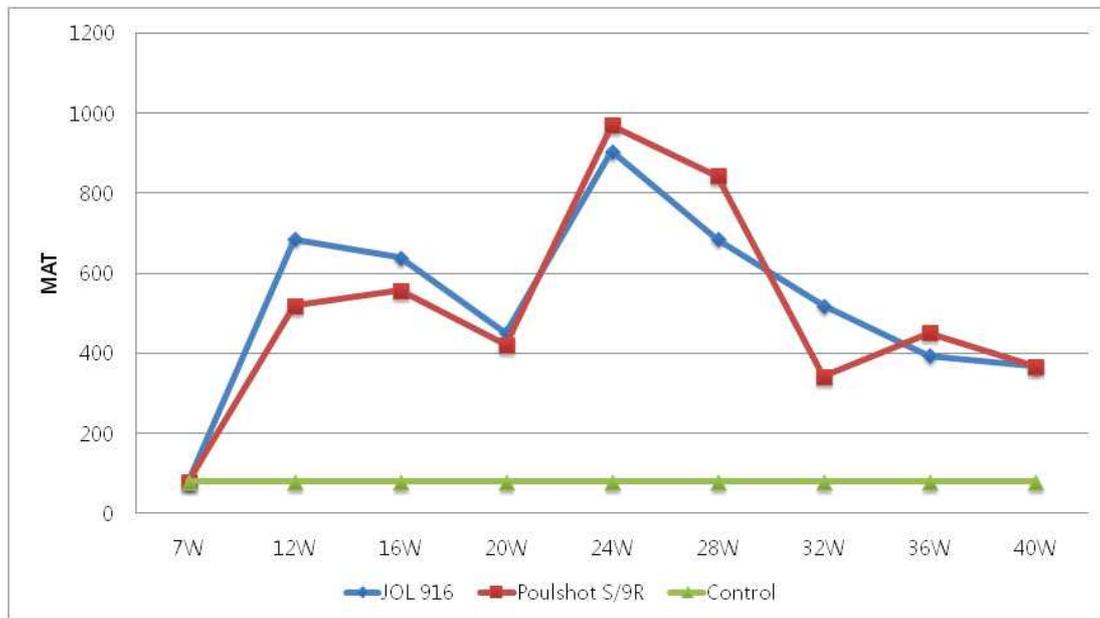


그림 45. 백신접종 후 40주령에까지의 *S. Gallinarum*의 MAT 항체역가 변화

(4) 정기적 방어력 시험

2차 백신접종(18~20주령) 3주후에 시험백신 접종군 15수, 중앙백신연구소(CAVAC) S/9R접종군 15수, 대조군 15수를 실험실로 운반하여 *S. Gallinarum* 공격균주(100LD₅₀/ml) 1ml를 구강으로 접종한 후 14일간 폐사율 및 임상증상, 부검소견 및 균분리를 하였다.

표 66 장기적 방어력 시험 결과

Lot. No.	Challenge	Chick	Period	Dead chick				Autopsy of live chick		
				Num.	Death rate (%)	Reisolation		Positive lesion ¹⁾	Reisolation	
						Liver	Spleen		Liver	Spleen
JOL 916		15		0	0	NT	NT	0/5 ²⁾	0/5	0/5
Poulshot S/9R	100LD ₅₀ /ml 1ml PO	15	14 days	0	0	NT	NT	0/5	0/5	0/5
Control		15		14	93.3	14	14	1/1	1/1	1/1

NT : Not tested

PO : Per Oral

Positive lesion¹⁾ : 간종대, 청동간, 비장종대, 폐혈증 등

0/5²⁾ : Positive number / Autopsy number

(5) 2차 접종 후 면역측정, 방어력 측정

S. Gallinarum에 항체음성인 7주령의 갈색산란계(하이라인)를 사용하여 시험백신, 중앙백신연구소(CAVAC) S/9R 백신을 각각 경부피하로 1수분씩 1차 백신접종하고, 12주후에 2차 백신을 접종한 후 3주 후에 그룹당 15마리에 공격접종(100LD₅₀/ml)을 실시하고, 14일간 임상증상을 관찰한 후 관찰기간 중에 폐사가 발생시 바로 부검 및 균분리하며, 생존한 닭은 관찰이 끝난 후 5마리씩 부검하여 간, 비장에서 균분리 및 균동정을 실시하였다. 백신접종전, 공격접종 전에 각각 채혈하여 S. Gallinarum 9R에 대하여 MAT를 통한 응집역가를 확인하였다.

표 67 2차 접종 후 방어력 시험

Lot. No.	Challenge	Chicken	MAT		Check point(dead chicken)					Reisolation of live chicken	
			BI	BC	Dead Num.	Average date	Dead rate (%)	Reisolate		Liver	Spleen
								Liver	Spleen		
JOL 916		15	<80	970	0	-	0	NT	NT	0/5	0/5
Poulshot S/9R	100LD ₅₀ /ml 1ml PO	15	<80	1167	0	-	0	NT	NT	0/5	0/5
Control		15	<80	<80	13	7.0	86.6	13/13	13/13	2/2	2/2

MAT : Microplate Agglutination test

BI : Before Inoculation

BC : Before Challenge

PO : Per Oral

13. 면역증강 LTB 균주 JOL1229 제작

SG9R를 비롯해 가금티푸스 백신은 경구접종의 경우 비경구접종보다 방어력이 상당히 저하된다는 사실이 점점 지적되지만, JOL916의 경우도 이와 동일한 경향을 나타내었다. 여기서는 간편하게 경구접종이 가능하도록 JOL916을 더욱 발전적으로 변이시킨 균주를 제작하였다. 이는 Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC)의 heat-labile toxin subunit B (LTB)를 지속적으로 생산하여 세포외부로 분비하는 약독화 Salmonella Gallinarum 이며, LTB의 작용으로 점막면역이 활성화되고 경구접종에 유리할 뿐만 아니라 면역강화 adjuvant효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

가. LTB 발현 벡터 제작

항원보강제로 사용될 LTB를 발현시키기 위해 정제된 PCR 증폭산물과 pET28a (EcoRI과 HindIII) 벡터를 프라이머 제조시 첨부한 제한 효소로 각각 절단한 후 agaros gel에서 AccuPrep gel purification kit (Bioneer)를 이용하여 절편을 분리하고, T4 DNA ligase (Takara)를 이용하여 라이게이션을 한 후 E. coli BL21(DE3)pLysS을 숙주 박테리아로 하여 kanamycin이 각각 첨가된 LB agar에서 LTB가 삽입된 발현용 벡터로 형질전환된 E. coli BL21(DE3)pLysS을 선택하였다.

약독화 살모넬라균 (Asd-)에서 발현벡터로 이용되는 pMMP65 벡터에 LTB를 클로닝

하기 위해 발현이 확인된 LTB가 클로닝된 발현벡터 pET28a-LTB와 pMMP65를 해당 제한 효소로 절단한 후 agarose gel로부터 AccuPrep gel purification kit (Bioneer)를 이용하여 절편을 분리하고, T4 DNA ligase (Takara)를 이용하여 라이게이션하여 E. coli x6212를 숙주 박테리아로 하여 DAP이 존재하지 않는 LB agar에서 LTB가 삽입된 pMMP65에 의하여 형질전환된 균주를 선택하였다. LTB삽입 pMMP65의 확인은 E. coli x6212로부터 plasmid를 분리하여 LTB에 해당하는 제한 효소로 절단하여 확인하였다. (Table 13, 14.)

나. 면역강화 균주 제작

LTB가 클로닝된 pMMP65를 electroporation방법에 의하여 Salmonella Gallinarum JOL394^Δ lon^Δ cpxR (JOL916)에 형질전환시켜 JOL1229을 얻었다. 즉, Salmonella Gallinarum JOL394^Δ lon^Δ cpxR을 DAP (50 μ g/ml)이 포함된 LB broth에서 mid-log phase까지 배양한 후 멸균된 ice-cold 10% glycerol 함유 증류수로 두 번 세척하였다. 준비된 Salmonella Gallinarum JOL394^Δ lon^Δ cpxR을 0.2 cm cuvette에 넣고 플라스미드 0.1 μ g과 섞는다. Bio-Rad MicroPulser의 Pre-Programmed Settings 중 Ec2에 따라 전기충격을 가한 후 균을 cuvette에서 회수한 다음 DAP을 넣지 않은 LB broth 1ml에 넣고 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 형질전환된 살모넬라균을 선별하기 위해 배양된 균액 100 μ l를 다시 DAP을 첨가하지 않은 LB agar에 도말평판법으로 형성된 콜로니를 선별하였다. 선택된 살모넬라균은 LB broth에서 다시 배양한 후 플라스미드를 분리한 다음 클로닝 때 사용된 같은 제한 효소로 절단하여 LTB의 존재 유무를 확인하였다. (표 66, 67)

표 66. Bacterial strains and plasmids

Strain	Relevant characteristics	Source or reference
<i>S. Gallinarum</i>		
JOL394	Wild type, Nal ^R	This study
JOL420	Wild type, used for antigen preparation	
JOL422	Wild type, highly virulent	This study
JOL916	JOL394 ^Δ lon ^Δ cpxR	This study
JOL1229	JOL916 containing pMMP65-LTB	This study
<i>E. coli</i>		
χ6212	F-λ- Φ80Δ(lacZYA-argF)ΔasdA4	
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ , ompT, hsdSB (rB ⁻ , mB ⁻), dcm, gal, λ(DE3), pLysS, Cmr	Promega
Plasmids		
pET28a	IPTG-inducible expression vector; Kmr	Novagen
pET28a-LTB	pET28a derivative containing eltB gene	This study
pMMP65	Asd ⁺ vector, pBR ori, β-lactamase signal sequence-based periplasmic secretion plasmid, 6xHis	This study
pMMP65-LTB	pMMP65 derivative containing eltB	This study

표 67. Primers used for construction of LTB strains

Primer	Sequence (5'-3')
LTB-F	CCGC GAA TTC GCT CCC CAG TCT ATT ACA G
LTB-R	CCGC AAG CTT CTA GTT TTC CAT ACT GAT TG

다. in vitro에서 항원보강 단백질의 발현 유무 확인

JOL1229으로부터의 LTB 항원 분비를 면역점적분석법(immunoblotting assay)으로 확인하였다. 단백질이 분비되는 JOL1229를 준비하기 위해, 이 균주를 37°C 온도로 LB broth에서 배양하여 20분간 4000rpm으로 원심분리를 한 후, 배양액의 상청액을 0.22 μm-pore-size 필터에 통과시켰고, 단백질의 분비를 검출하기 위해 20% trichloroacetic acid (TCA)와 함께 overnight로 침전시켰다. TCA pellet은 원심 분리 한 후 차가운 PBS와 acetone으로 재부유하였다. JOL1229 단백질 샘플은 5분간 끓이고 나서 SDS-PAGE로 분리 되었다. LTB의 발현 확인은 면역점적분석법 중 웨스턴블롯분석법(Western blot analysis)으로 확인하였다. 즉, SDS-PAGE로 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride (PVDF)막 으로 전기영동하여 전달시켜, 5% skim milk와 0.01% Tween 20이 첨가된 PBS로 4°C overnight하여 blocking하고, anti-his-tag antibodies (IG Therapy Co., Ltd., Chuncheon, Korea)와 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG로 반응시켰다. 면역 활성 band는 화학발광(chemiluminescence) 염색과 the West-one™

Western Blot detection System (iNtRON, Seongnam, Korea)으로 전개되었고, the multi-wavelength illumination system KODAK Image Station 4000MM (Kodak, New Haven, Connecticut, USA)을 이용하여 확인하였다. (그림 46)

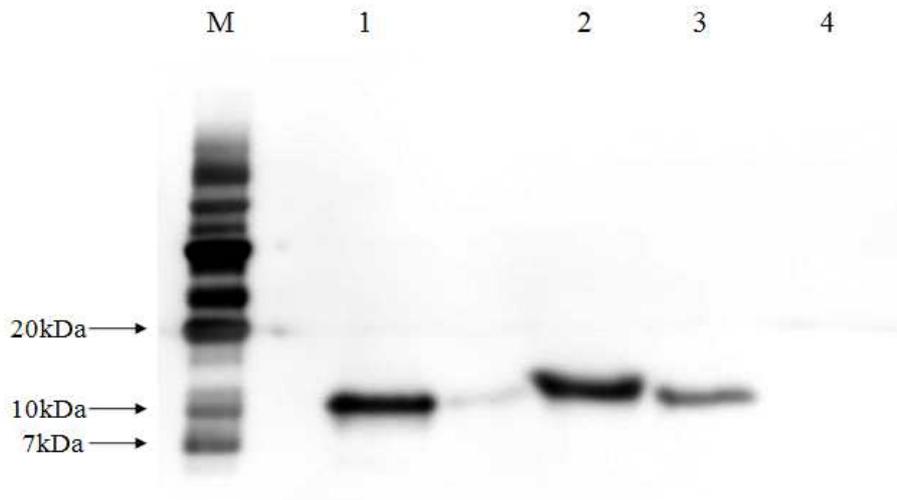


그림 46. 웨스틴블롯분석법(Western blott analysis)으로 LTB발현 확인

M: Size marker

1: JOL1229로부터의 LTB

2.: JOL904(Salmonella Typhimurium harboring LTB gene)로부터의 LTB

3: Positive control

4: Negetive control

14. 1주령 병아리에서 JOL1229의 혼합비율 결정 및 안전성 평가

가. 균주

본 실험에 사용된 균주는 백신균주로 JOL916을, 면역강화균주로 JOL1229 (Salmonella enterica serotype Gallinarum harboring LTB gene), 야외도전균주로 JOL422를 사용하였다. freezing culture (-80°C)에서 LB broth에 inoculation하여 shaking incubator (37도, 150 rpm)에 서 16시간 배양 후 OD₆₀₀ 값을 근거로 농도를 구하여 접종하였다.

나. 동물 및 실험 design

1일령 Brown Nick 갈색산란계 120마리를 부화 농장에서 분양 받아 각각 20마리씩 6

개 군으로 나누었다. 모든 개체들은 동일하게 항생제가 함유되지 않은 사료와 수돗물을 자유섭취 시켰다.

백신 군주는 모두 생균으로 접종하였으며, 실험군에 사용된 군주는 동일하게 백신균주 JOL916과 면역강화균주 JOL1229를 5:1 비율로 혼합하여 백신접종에 사용되었다. 각 군마다 접종 용량을 달리하였다. 즉, 각각 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 으로 총 5개군으로 실험군을 설계하였고 모든 접종은 경구접종을 한번만 실시하였다. 이전 실험과 마찬가지로 방어력 시험을 위해 백신접종 30일 후에 야외균주 JOL422를 구강 접종하였다. (표 68)

표 68. 접종량 결정 실험 design

Group	n	Vaccination (Day 7)			Challenge (30dpv)		
		Strain	Total vaccine dose	Route	Strain	Dose	Route
A	20		1×10^5	PO			
B	20		1×10^6	PO			
C	20	JOL916+JOL1229 (5:1)	1×10^7	PO	JOL422	1×10^6	PO
D	20		1×10^8	PO			
E	20		1×10^9	PO			
F	20	PBS	-	PO			

다. 부작용 조사

(1) 임상증상 관찰

매일 anorexia, diarrhea, depression의 점수를 매일 개체별로 평가하였다. 접종 후 모든 군에서 아무 임상증상이 나타나지 않았다.

(2) 백신접종후 병리소견

접종 용량 1×10^7 군을 대상으로 백신접종 후 4주까지 임의로 5마리를 선택하여 병리소견과 미생물검사를 실시하였다. 병리소견 평가를 위하여 Liver의 병변으로 enlargement, white spot의 정도를, spleen의 병변으로 enlargement, white spot의 정도를 각각 관찰하고 장기별로 0점(정상)부터 3점(심각)까지 개체별로 점수화하였다. 백신접종 후 3주까지 경미한 병변을 보였으며, 4주째에는 병변이 관찰되지 않았다. (표 69)

표 69. 백신접종후 병리소견

Group	Gross lesion		Week post vaccination			
	Organ	Finding	1	2	3	4
JOL916+ JOL1229 (5:1)	Liver	Enlargement	0.2 ± 0.16	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
		Necrotic foci	0.4 ± 0.2	0.4 ± 1.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Spleen	Enlargement	0.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
		Necrotic foci	0.4 ± 0.2	1.2 ± 0.31	0.4 ± 0.33	0.0 ± 0.0
Control	Liver	Enlargement	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
		Necrotic foci	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Spleen	Enlargement	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
		Necrotic foci	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

(3) 백신접종후 미생물검사

미생물학적 검사는 백신균주의 잔존 유무를 확인하기 위한 것으로, 간장 및 비장을 Buffered peptone water (BPW, Becton, Dickinson and Company, France)에서 분쇄하고 상청액을 Brilliant Green Agar (BGA, Becton, Dickinson and Company, France)에 접종하여 colony 출현 유무를 검사하였으며, negative인 경우 enrichment culture를 BPW에서 37도 16시간 배양 후 Rappaport-Vassiliadis R10 broth (Becton, Dickinson and Company, France)에 1/100 volume 접종하여 42도에서 48시간 배양후 BGA에서 Salmonella의 colony 출현 유무를 확인하였다. 백신 접종후 3주째 까지 장기에 존속하고 있는 것으로 확인되었고, 4주째에는 비장에서 1개 개체이외에 모든 선정된 개체에서 백신 균주가 분리되지 않았다 (표 70).

표 70. 내부 장기에서 백신균주 분리

Group	Organ	Weeks post vaccination							
		1		2		3		4	
		NP ^a	Count ^b	NP ^a	Count ^b	NP ^a	Count ^b	NP ^a	Count ^b
JOL916 + JOL1229 (5:1)	Liver	4/5	2.61±0.71	2/5	0.780±0.49	4/5	0.8 ± 0.2	0/0	0
	Spleen	5/5	3.02±0.52	4/5	2.78±0.75	4/5	2.10 ± 0.9	1/5	0.55±0.55
Control	Liver	0/5	0.0 ± 0.0	0/5	0.0 ± 0.0	0/5	0.0 ± 0.0	0/5	0.0 ± 0.0
	Spleen	0/5	0.0 ± 0.0	0/5	0.0 ± 0.0	0/5	0.0 ± 0.0	0/5	0.0 ± 0.0

^a Number of positive sample after enrichment culture.

^b Values represent the means ± SEM log₁₀ cfu/g

라. 면역형성 확인

(1) 샘플 채취

Heparin을 첨가한 추사기로 말초혈액 1 ml를 채혈 후 원심분리 (40 rpm, 15분, 실온) 하여 얻은 림프구는 세포성면역측정시험에 사용하였고, 혈장은 냉장보관(4°C) 하여 혈장 IgG 측정에 사용하였다. 분비형 IgA측정의 목적으로 다음과 같은 방법으로 소화관 세척액을 얻었다(Berthelot-Herault et al., Vet Immunol Immunopathol, 2003). 즉, 병아리를 한 마리씩 소독된 용기에 분리 수용하여 Lavage solution (48.5 mM PEG [polyethylene glycol 3350], 40mM Na₂SO₄, 20mM NaHCO₃, 10mM KCl, 25 mM NaCl)을 경구적으로 12 ml/kgBW(body weight)씩 투여하고 30분 후 pilocarpine을 13mg/kgBW (BW<300 g의 경우 20mg/kgBW) 의 용량으로 근육 주사하였다. 다시 30분 후 배출된 소화관 세척액과 5ml의 STI/EDTA solution (0.1 mg soybean trypsin inhibitor in 50 mM EDTA, pH 8.0)을 잘 혼합하여 회수하여, 원심분리를 한 후 (700×g, 10분, 4°C) 상청액 1ml을 얻었다. 분리한 상청액 1ml에 100mM PMSF, 1% Sodium azide, 5% BSA(bovine serum albumin)를 각각 1ml당 10 μ l씩 첨가하고 4°C에 보관하여 ELISA의 sample로 사용하였다.

(2) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

특이면역 정량을 위해 Outer Membrane Protein fraction (OMP fraction)을 야외균주 JOL420에서 정제하여 ELISA의 항원으로 사용하였다. OMP fraction은 modified lysozyme-osmotic shock method에 의하여 얻는다. 즉, 150 ml의 세균배양액을 원심분리 (7000×g, 10분, 4°C) 하여 pellet을 얻는다. 800 μ l의 100mM Tris-HCl (500mM sucrose, 0.5mM EDTA, pH8.6)에 재부유시켜 lysozyme (400 μ l, 4mg/ml)을 첨가한다. 그 즉시 3.2 ml의 50mM Tris-HCl (250mM sucrose, 0.25mM EDTA, 2.5mM MgCl₂, pH8.6)를 첨가하여 ice 위에서 15분간 incubation 한다. 이를 원심분리(7000×g, 6분, 4°C) 하여 pellet을 얻는다. Pellet을 4 ml의 20 mM Tris-HCl (pH8.6)에 재부유시켜 sonication후 원심분리 (7000×g, 6분, 4°C)하여 상청액을 얻는다. 상청액을 초고속원심분리기로 원심분리(132,000×g, 4°C, 1시간)하여 pellet을 얻는다. Pellet(cell envelopes)을 4 ml의 20mM Tris-HCl containing 1% Sarkosyl (pH8.6)에 재부유시켜 상온에서 30분 동안 incubation하고 다시 초고속원심분리기로 원심분리(132,000×g, 4°C, 1시간)하여 상청액을 얻는다. 준비한 OMP 항원을 flat-bottom 96 well high binding ELISA plate (Greiner, Germany)에 흡착시켜서 chicken IgG (또는 IgA) ELISA quantitation kit (Bethyl, Tx, USA)를 사용하여 사용설명서를 따라서 실시하였다. 즉, 10% Skim milk로 비특이반응을 blocking한 다음 sample를 적절하게 희석하여 반응시키고 HRP (horse

radish peroxidase)로 표지된 2차항체를 결합시키는 indirect ELISA를 실시하였다.

혈장 IgG 농도를 Figure 27에, 접종 후 소화기 세척액내 sIgA의 농도를 Figure 28에 나타내었다. 혈장 IgG의 경우에는 1×10^5 그룹을 제외하고 다른 모든 실험군이 전반적으로 대조군에 비해 월등한 증가를 보였고, 특히 백신 접종 후 4주까지 지나면 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 그룹의 IgG 역가는 비슷해짐을 확인할 수 있다 (그림 47). 소화관 내 sIgA 측정 결과는 백신 접종 후 3주째 가장 높은 역가를 보이며, 그 중에서 1×10^7 실험군이 가장 높은 측정값을 나타내었다 (그림 48).

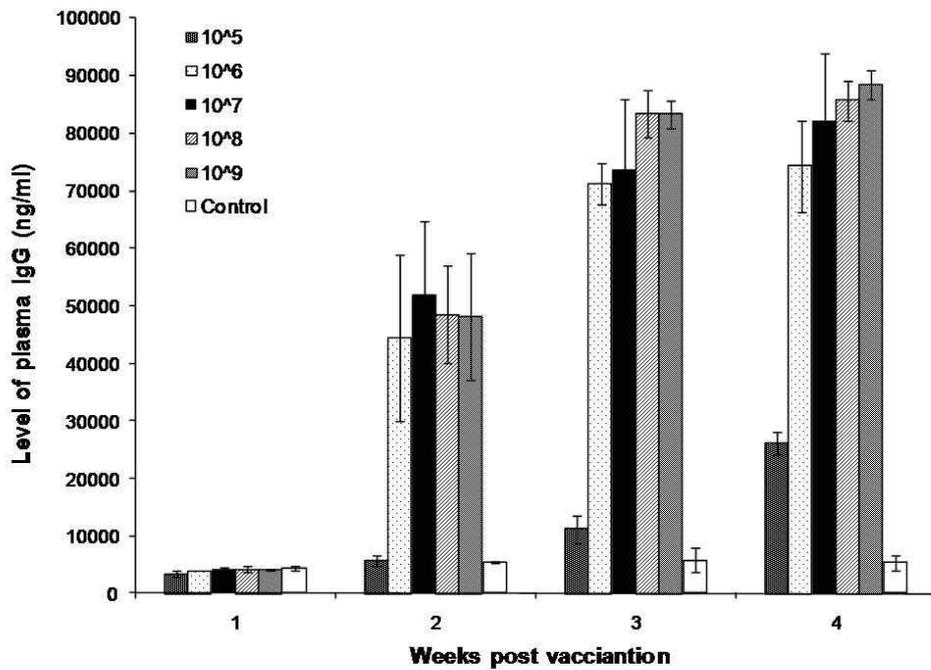


그림 47. 접종 후 혈장 IgG 농도

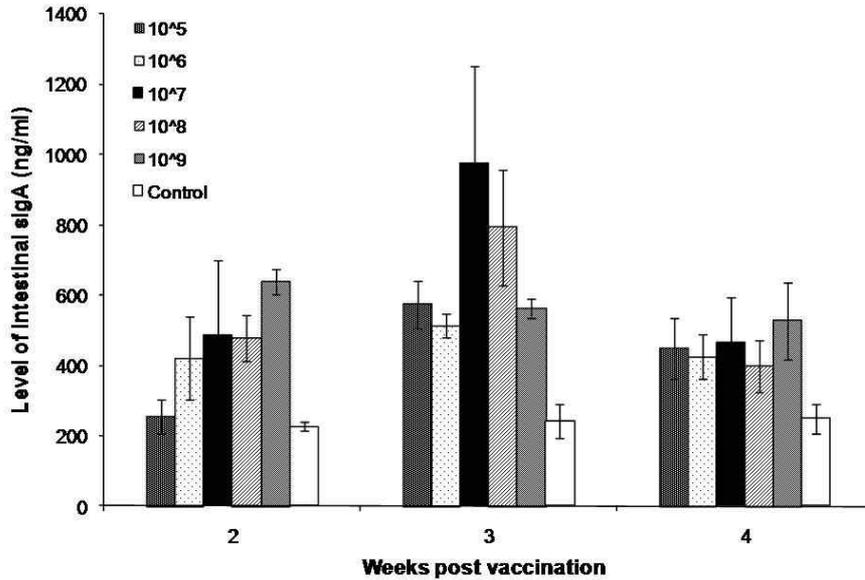


그림 48. 접종 후 소장에서 분비형 IgA 농도

(3) 세포성면역 측정

접종 후 3주에 세포성 면역 측정을 위해 말초 혈액의 림프구를 이용한 lymphocytes proliferation assay (LPA)를 실시하였다. 원심분리 (40rpm, 15분, 실온)한 후 얻은 림프구를 Trypan blue exclusion test로 살아있는 세포수를 계산한 다음 RPMI 1640 complete medium (송아지 혈청 및 항균항진균제 포함)에 부유시켜 1×10^5 cfu/100 μ l/well 가 되게 96-well plate 에 분주하였고, *S. Gallinarum* soluble antigen과 함께 72시간 동안 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. *Salmonella Gallinarum* wild type에서 soluble antigen은 다음 방법으로 얻었다. 즉, 200 ml의 배양액을 원심 분리하여 pellet 을 얻는다. PBS로 2회 세척 후 40 ml 의 PBS에 재부유시켜 freeze-thaw를 3 번 반복한다. 이 용액을 sonication 후 4,250 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 원심 분리하여 얻은 상청액을 또 다시 30,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 원심 분리하여 상청액을 회수하여 농도를 측정한다. CO₂ incubator에서 72시간 동안 림프구를 배양한 후 광학현미경으로 림프구의 상태를 관찰하고, Lonza사의 ViaLight[®] Plus Kit를 사용하여 Luminescence assay를 실시하였다. Stimulation Index (SI)를 다음과 같이 계산하여 백신 접종군에서 세포성면역이 유도되었는지 확인하였다. 1×10^9 의 용량으로 접종한 군이 가장 높은 SI 수치를 나타내었고, 대조군과 비교 할 때, 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 실험군 모두 의미있는 증가를 보였다(그림 49).

식) SI = (항원첨가된 well에서 측정된 발광량)/(항원을 첨가하지 않은 well에서 발광량)

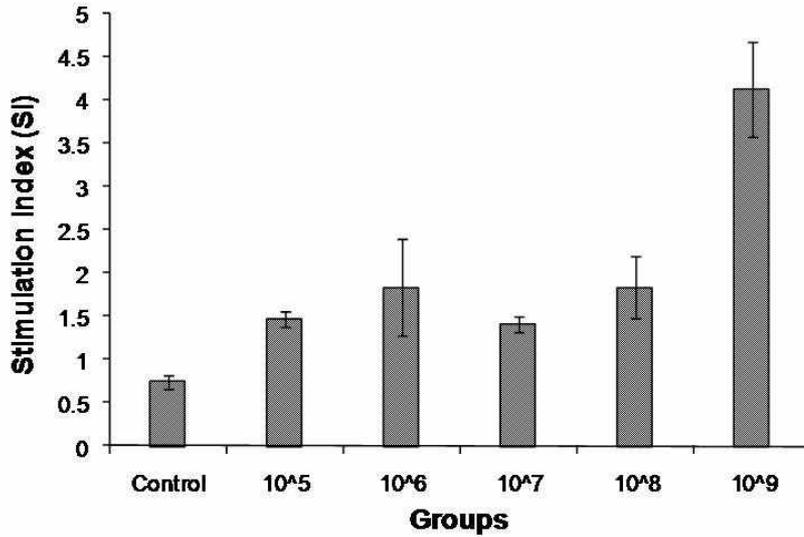


그림 49. 접종 3주째 세포성면역 반응

다. 방어력 유무 확인

(1) 폐사수

야외균주 접종 후 매일 폐사수를 확인하였다. (표 71) 1×10^6 , 1×10^8 , 1×10^9 실험군에서 폐사를 보이지 않았고 1×10^5 , 1×10^7 실험군에서는 각각 7마리, 1마리가 폐사 하였으며, 음성대조군은 20마리중 13마리가 폐사하였다.

표 71. 야외균주 접종 후 폐사수

Group	n	Days post challenge													Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
A	20	0	0	0	0	0	1	1	2	2	1	0	0	0	7
B	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	20	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
D	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	20	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4	1	0	0	13

(2) 임상증상

생존중인 동물을 대상으로 식욕, 침울 상태를 0점 (정상), 1, 2, 3점(매우 심각)으로 평

가하여 평균값을 나타내었다 (표 72, 73).

표 72. 야외균주 접종 후 식욕감퇴

Group	Days post challenge												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	0	0	0	0	0	0.05	0.11	0.13	0.07	0.15	0.07	0.15	0.07
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0.15	0.58	0.75	1.08	0.25	0.14	0.43	0.43

표 73. 야외균주 접종 후 침울 상태

Group	Days post challenge												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	0	0	0	0	0	0.05	0.2	0.05	0.05	0.05	0.05	0.1	0.05
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0.2	0.63	0.69	1.08	0.25	0.14	0.43	0.43

라. 결론

백신균주 JOL916과 면역강화균주 JOL1229를 5:1의 비율로 혼합하여 접종할 때, 백신접종 용량을 각각 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 로 다르게 하여 면역반응의 유도과 야외균주로부터 방어력을 시험한 결과, 혈액 내 IgG 면역반응 측면에서는 1×10^5 을 제외한 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 이 모두 비슷하게 유의있게 증가하여 음성대조군에 비해 월등하였고, 소화관 내 sIgA의 경우에는 특히 1×10^7 이 가장 높게 측정이 되었다. 세포성 면역반응에서는 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 이 모두 음성대조군에 비교하여 유의있게 증가하였다. 야외균주에 대한 방어력은 1×10^5 을 제외한 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 이 모두 비슷하다고 판단된다. 따라서, 백신균주 JOL916과 면역강화균주 JOL1229 혼합 접종에서는 1×10^7 cfu의 용량이 가장 적합한 것으로 판단된다.

15. 1주령 병아리에서 JOL1229를 이용한 백신 program 시험

가. 균주

백신균주로 JOL916을, 면역강화균주로서 JOL1229 , 야외도전균주로 JOL422를 사용하였으며 freezing culture (-80°C)에서 LB broth에 inoculation하여 shaking incubator (37도, 150 rpm)에 서 16시간 배양 후 OD₆₀₀ 값을 근거로 농도를 구하여 접종하였다.

나. 동물 및 실험 design

산란계 부화농장에서 1일령된 Lohmann Brown 산란계 42마리를 분양받아 14마리씩 3개 군으로 나눠서 실험에 사용하였다. 항생제가 함유되지 않은 사료와 수돗물을 자유섭취 시켰다.

본 실험은 백신접종을 2회 실시하여 JOL1229를 이용한 가금티푸스 백신의 최적화된 적용을 목적으로 실시되었다. 이전 실험결과에 의거하여 1차 백신접종 시 JOL916을 면역강화균주 JOL1229와 5:1 비율로 혼합한 백신을 사용하였고, 2차 백신접종 시에 A군은 JOL916을 단독 접종하였으며, B군은 JOL916을 면역강화균주 JOL1229와 5:1 비율로 혼합하여 사용하였다. 모든 백신 접종은 경구접종으로 실시하였으며 접종용량은 7일령에는 1×10⁷cfu로, 6주령에는 1×10⁸cfu로 적용하였다. 2차 백신접종 후 30일에 야외균주 JOL422를 접종하여 야외균주에 대한 방어력 시험을 실시하였다 (표 74).

표 74. 실험design

Group	n	Vaccination						Challenge (백신접종후 30일)		
		Prime (7일령)			Booster (6주령)			Strain	Dose	Route
		Strain	Dose	Route	Strain	Dose	Route			
A	14	JOL916+ JOL1229 (5:1)	1×10 ⁷	PO	JOL916	1×10 ⁸	PO			
B	14	JOL916+ JOL1229 (5:1)	1×10 ⁷	PO	JOL916+ JOL1229 (5:1)	1×10 ⁸	PO	JOL422	1×10 ⁶	PO
C	14	PBS	-	PO	PBS	-	PO			

다. 부작용 조사

(1) 임상증상 관찰

매일 anorexia, diarrhea, depression의 점수를 매일 개체별로 평가하였다. 접종 후 모든 군에서 아무 임상증상이 나타나지 않았다.

라. 면역형성 확인

(1) 샘플 채취

Heparin을 첨가한 추사기로 말초혈액 1 ml를 채혈 후 원심분리 (40 rpm, 15분, 실온) 하여 얻은 림프구는 세포성면역측정시험에 사용하였고, 혈장은 냉장보관(4°C) 하여 혈장 IgG 측정에 사용하였다. 분비형 IgA측정의 목적으로 다음과 같은 방법으로 소화관 세척액을 얻었다(Berthelot-Herault et al., Vet Immunol Immunopathol, 2003). 즉, 병아리를 한 마리씩 소독된 용기에 분리 수용하여 Lavage solution (48.5 mM PEG [polyethylene glycol 3350], 40mM Na₂SO₄, 20mM NaHCO₃, 10mM KCl, 25 mM NaCl)을 경구적으로 12 ml/kgBW(body weight)씩 투여하고 30분 후 pilocarpine을 13mg/kgBW (BW<300 g의 경우 20mg/kgBW) 의 용량으로 근육 주사하였다. 다시 30분 후 배출된 소화관 세척액과 5ml의 STI/EDTA solution (0.1 mg soybean trypsin inhibitor in 50 mM EDTA, pH 8.0)을 잘 혼합하여 회수하여, 원심분리를 한 후 (700×g, 10분, 4°C) 상청액 1ml을 얻었다. 분리한 상청액 1ml에 100mM PMSF, 1% Sodium azide, 5% BSA(bovine serum albumin)를 각각 1ml당 10 μ l씩 첨가하고 4°C에 보관하여 ELISA의 sample로 사용하였다.

(2) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

특이면역 정량을 위해 Outer Membrane Protein fraction (OMP fraction)을 야외균주 JOL420에서 정제하여 ELISA의 항원으로 사용하였다. OMP fraction은 modified lysozyme-osmotic shock method에 의하여 얻는다. 즉, 150 ml의 세균배양액을 원심분리 (7000×g, 10분, 4°C) 하여 pellet을 얻는다. 800 μ l의 100mM Tris-HCl (500mM sucrose, 0.5mM EDTA, pH8.6)에 재부유시켜 lysozyme (400 μ l, 4mg/ml)을 첨가한다. 그 즉시 3.2 ml의 50mM Tris-HCl (250mM sucrose, 0.25mM EDTA, 2.5mM MgCl₂, pH8.6)를 첨가하여 ice 위에서 15분간 incubation 한다. 이를 원심분리(7000×g, 6분, 4°C) 하여 pellet을 얻는다. Pellet을 4 ml의 20 mM Tris-HCl (pH8.6)에 재부유시켜 sonication후 원심분리 (7000×g, 6분, 4°C)하여 상청액을 얻는다. 상청액을 초고속원심분리기로 원심분리(132,000×g, 4°C, 1시간)하여 pellet을 얻는다. Pellet(cell envelopes)을 4 ml의 20mM Tris-HCl containing 1% Sarkosyl (pH8.6)에 재부유시켜 상온에서 30분 동안 incubation하고 다시 초고속원심분리기로 원심분리(132,000×g, 4°C, 1시간)하여 상청액을 얻는다. 준비한 OMP 항원을 flat-bottom 96 well high binding ELISA plate (Greiner, Germany)에 흡착시켜서 chicken IgG (또는 IgA) ELISA quantitation kit (Bethyl, Tx, USA)를 사용하여 사용설명서를 따라서 실시하였다. 즉, 10% Skim milk로 비특이반응을 blocking한 다음 sample를 적절하게 희석하여 반응시키고 HRP (horse

radish peroxidase)로 표지된 2차항체를 결합시키는 indirect ELISA를 실시하였다.

1차 백신 접종 후 각 주마다의 혈장 IgG 농도를 Figure 30에, 소화기 세척액내 sIgA의 농도를 Figure 31에 나타내었다. 1차 백신 접종 후 5주째에 2차 백신접종을 실시한 것이며, 2차 백신 접종은 두 실험군이 한 군은 백신균주만을 다른 한 군은 백신균주에 면역강화균주를 혼합하여 실시하였다. 혈장 IgG 농도는 1차 백신접종 후 4주까지 증가하다가 5주 짜부터 감소하였고, 5주째 2차 백신 접종을 한 후 2주 후부터 즉, 1차 백신 접종 후 주별로 볼 때 7주째부터 증가하기 시작하여 8, 9주째 모두 1차 반응보다 높게 증가하였다. 소화관내 sIgA 농도 측면에서는 혈장 IgG 농도와 양상은 비슷하지만 2차 백신접종 시 백신균주 JOL916만 단독 접종한 실험군에서 2차 백신 접종후 2주째 크게 증가한 것으로 측정되었다 (그림 50). 또한 2차 백신접종 후 에는 백신균주 JOL916만 단독 접종한 실험군이 면역강화균주와 혼합하여 접종한 실험군보다 평균적인 sIgA수치가 높은 것으로 나타났다 (그림 51).

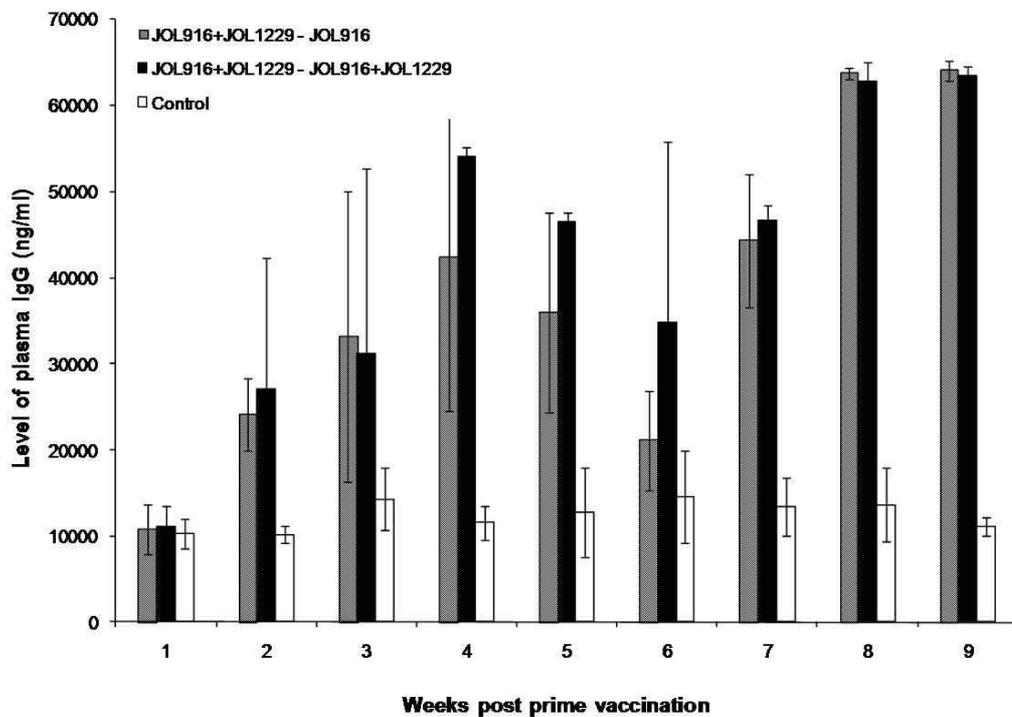


그림 50. 접종 후 혈장 IgG 농도

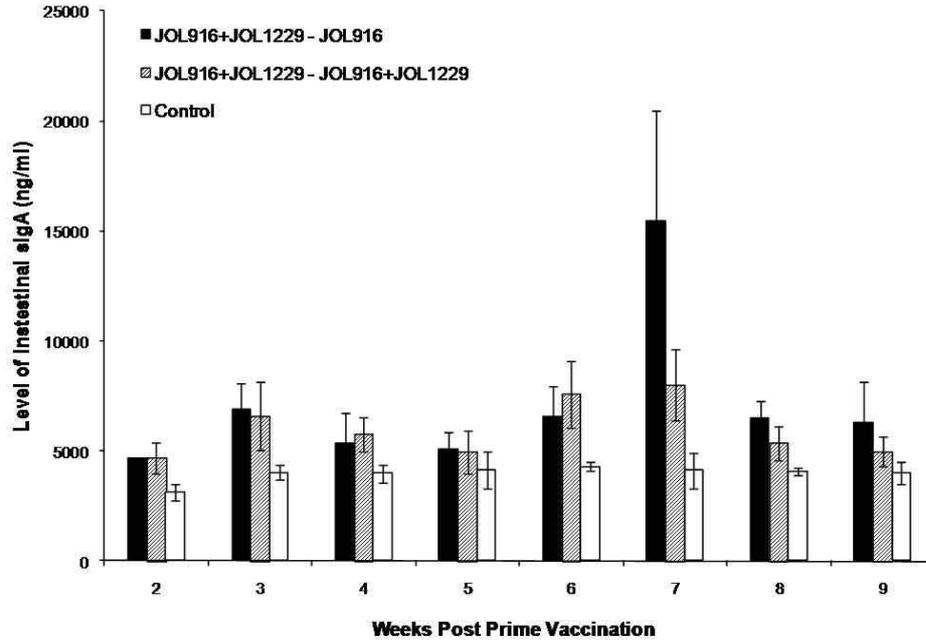


그림 51. 접종후 소화기 세척액 IgA 농도

(3) 세포성면역 측정

접종 후 3주에 세포성 면역 측정을 위해 말초 혈액의 림프구를 이용한 lymphocytes proliferation assay (LPA)를 실시하였다. 원심분리 (40rpm, 15분, 실온)한 후 얻은 림프구를 Trypan blue exclusion test로 살아있는 세포수를 계산한 다음 RPMI 1640 complete medium (송아지 혈청 및 항균항진균제 포함)에 부유시켜 1×10^5 cfu/100 μ l/well 가 되게 96-well plate 에 분주하였고, *S. Gallinarum* soluble antigen과 함께 72시간 동안 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. *Salmonella Gallinarum* wild type에서 soluble antigen은 다음 방법으로 얻었다. 즉, 200 ml의 배양액을 원심 분리하여 pellet 을 얻는다. PBS로 2회 세척 후 40 ml 의 PBS에 재부유시켜 freeze-thaw를 3 번 반복한다. 이 용액을 sonication후 4,250 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 원심 분리하여 얻은 상청액을 또 다시 30,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 원심 분리하여 상청액을 회수하여 농도를 측정한다. CO₂ incubator에서 72시간 동안 림프구를 배양한 후 광학현미경으로 림프구의 상태를 관찰하고, Lonza사의 ViaLight[®] Plus Kit를 사용하여 Luminescence assay를 실시하였다. Stimulation Index (SI)를 다음과 같이 계산하여 백신 접종군에서 세포성면역이 유도되었는지 확인하였다. 2차 백신 접종 후 백신 균주만을 단독 투여한 실험군이 면역증강균주와 혼합한 실험군과 비교했을 때, 세포성 면역유도에 있어 더 높은 수치를 보였다 (그림 52).

식) $SI = (\text{항원첨가된 well에서 측정된 발광량}) / (\text{항원을 첨가하지 않은 well에서 발광량})$

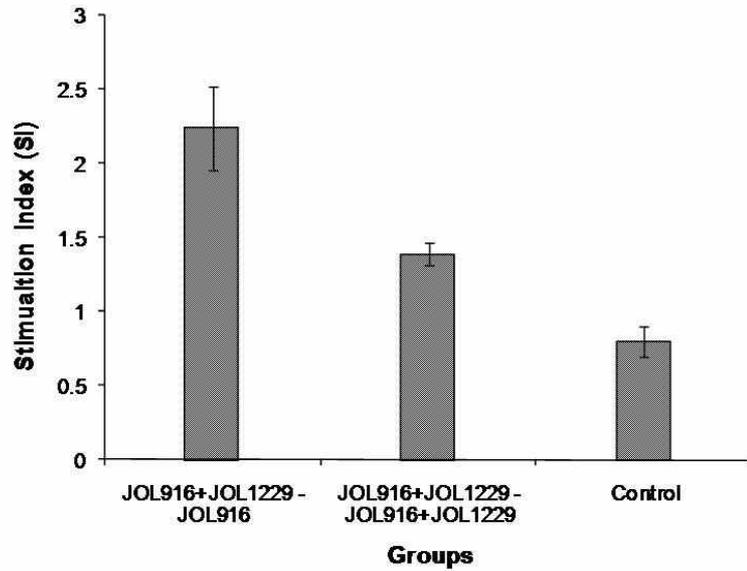


그림 52. 2차 접종 후 3주째 세포성면역 반응

(4) 유세포분석 측정 (Flow cytometry)

백신 접종 후 7일에 세포성 면역 측정을 위한 한 방법으로 말초 혈액 내 T림프구의 분화 양상을 유세포분석법으로 측정하였다. 원심분리 (40 rpm, 15분, 실온)한 후 얻은 림프구를 Trypan blue exclusion test로 살아있는 세포수를 1×10^6 cell로 계산하여 희석한 다음 FACS buffer(PBS, 0.5% BSA, 0.01% NaN_3)로 washing하고, 각 샘플에 세 종류의 형광-표지 단일클론항체 (CD3-FITC, CD4-BIOT, CD8-PE)를 $1 \mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 30분간 얼음에 꽂아 ice incubation을 실시하였다. 그 후 곧바로 FACS buffer로 washing을 하고 나서 형광-표지 단일클론항체 중에 CD4-BIOT를 형광 염색하기 위해 streptavidin-APC를 각 샘플에 $1 \mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 30분간 ice incubation을 실시하였다. 다시 FACS buffer로 washing을 하고 나서 4°C 를 유지한 상태로 유세포분석기 (FACS Calibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA)로 유세포분석을 시행하여, 채취한 혈액 내 T림프구의 분포비율을 측정하였다. 1차 백신 접종 후 1주째에는 두 실험군이 동일한 상황으로, 말초 혈액 내에서 T세포의 분화 양상 또한 비슷하게 측정되었다. 즉, 1차 백신 접종 후 1주째에 두 실험군 모두 음성대조군에 비해 각각 CD4+ 보조T세포와 CD8+ 세포독성 T세포의 분포비율이 의미있게 증가하였다. 2차 백신 접종 후에는 CD4+ 보조T세포의 분포비율은 크게 차이가 없었지만, CD8+ 세포독성 T세포의 분포비율은 2차 백신 접종 시 백신군주만 단독 접종한 실험군이 면역강화군주와 혼합한 실험군보다 높은 비율로 측정되었다 (그림 53, 54).

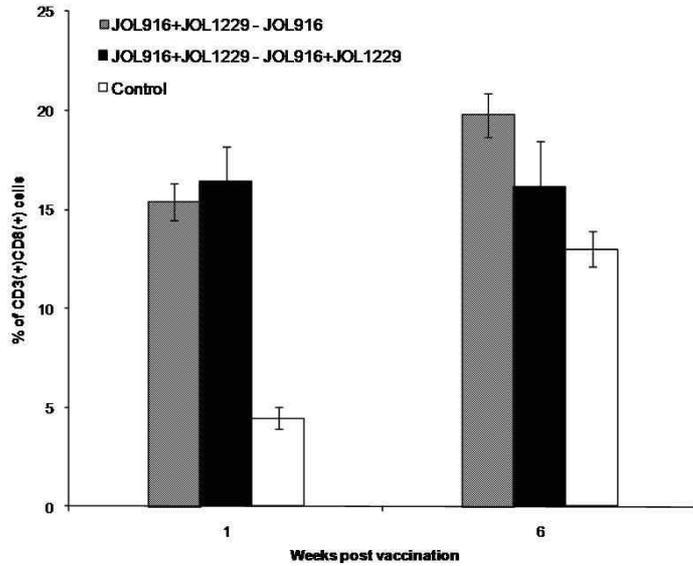


그림 53. 유세포분석법에 의한 말초 혈액내 CD3(+)CD4(+) T세포 비율

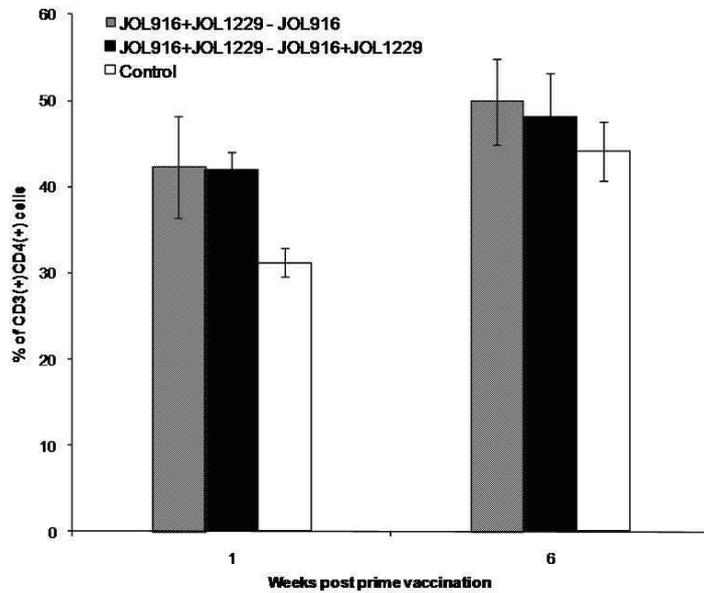


그림 54. 유세포분석법에 의한 말초 혈액내 CD3(+)CD8(+) T세포 비율

다. 방어력 유무 확인

(1) 폐사수

야외균주 접종 후 매일 폐사수를 확인하였다 (표 75). 두 실험군 모두 2마리의 폐사를 보였다.

표 75. 야외균주 접종 후 폐사수

Group	n	Days post challenge											Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A	14	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2
B	14	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
C	14	0	0	0	0	0	0	1	1	5	2	1	10

(2) 임상증상

생존중인 동물을 대상으로 식욕, 침울 상태를 0점 (정상), 1, 2, 3점(매우 심각)으로 평가하여 평균값을 나타내었다 (표 76, 77).

표 76. 야외균주 접종 후 식욕감퇴

Group	Days post challenge											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A	0	0	0	0	0	0.21	0.29	0.31	0.33	0.25	0.25	
B	0	0	0	0	0	0.36	0.38	0.33	0.33	0.33	0.33	
C	0	0	0	0	0	0.36	0.54	0.67	1.14	0.8	0	

표 77. 야외균주 접종 후 침울 상태

Group	Days post challenge											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A	0	0	0	0	0	0.14	0.21	0.15	0.16	0.16	0.16	
B	0	0	0	0	0	0.21	0.23	0.16	0.16	0.16	0.16	
C	0	0	0	0	0	0.21	0.38	0.5	0.71	0.2	0	

라. 결론

본 실험은 면역강화균주 JOL1229를 이용한 백신의 최적화 실험으로 1차-2차 백신 접종 프로그램을 실시하여 각각 백신 접종 시 가장 적절한 균주를 결정하는 것을 목표로 하였다. 1주령에 백신균주 JOL916에 면역강화균주 JOL1229를 혼합하여 1차 접종한 후, 6주령에 한 실험군은 백신균주만을 다른 한 실험군은 백신균주에 면역강화균주를 혼합하여 백신접종을 실시하였다. 2차 백신 접종후 면역 반응 측정 결과, 2차 백신 접종 시 백신균주 JOL916만을 단독 접종한 실험군이 소화관 내 sIgA 농도 측정 결과와, 세포매개 반응 측정결과에서 2차 백신접종 시 면역강화균주와 혼합하여 투여한 실험군보다 높은 수치로 나타났으며, 혈액 내 IgG 농도는 비슷한 것으로 측정 되었다. 따라서, 2차 백신 접종 시에는 백신 균주만을 단독으로 접종하는 것이 백신 균주 JOL916에 면역강화균주 JOL1229를 혼합하여 접종하는 것보다 더 적합한 것으로 판단된다.

16. 6주령 산란계에서 JOL1229의 혼합비율 결정 및 안전성 평가

가. 균주

본 실험에 사용된 균주는 백신균주로 JOL916을, 면역강화균주로 JOL1229 (*Salmonella enterica* serotype Gallinarum harboring *eltB* gene), 야외도전균주로 JOL422를 사용하였다. freezing culture (-80 °C)에서 LB broth에 inoculation하여 shaking incubator (37 °C, 150 rpm)에서 16시간 배양 후 OD₆₀₀ 값을 근거로 농도를 구하여 접종하였다.

나. 실험동물 및 실험design

산란계 부화농장에서 1일령된 Lohmann Brown 산란계 50마리를 분양받아 10마리씩 5개 군으로 나눠서 실험에 사용하였다. 항생제가 함유되지 않은 사료와 수돗물을 자유섭취 시켰다.

4개의 각 실험군은 백신균주 JOL916과 면역강화균주 JOL1229를 혼합하여 그 비율을 달리하여 JOL916과 JOL1229를 각각 50%+50%, 80%+20%, 90%+10%, 100%+0%로 경구 접종하여 구분하였고, 1개의 음성대조군은 phosphate buffered saline (PBS)을 경구 투여하여 구분하였다. 백신 접종 용량은 1×10^8 colony-forming unit (cfu)으로 동일하게 하였고 6주령에 경구접종으로 한번만 접종하였다. 백신 접종 30일 후에 각 그룹 개체에 야외균주 JOL422를 경구 접종하였다 (표 78).

표 78. 실험 design

Group	n	Vaccination (6주령)			Challenge (백신접종 후 30일)		
		Strain	Dose (cfu)	Route	Strain	Dose (cfu)	Route
A	10	JOL916+ JOL1229 (50%+ 50%)	1×10^8	PO			
B	10	JOL916+ JOL1229 (80%+ 20%)	1×10^8	PO			
C	10	JOL916+ JOL1229 (90%+ 10%)	1×10^8	PO	JOL422	1×10^6	PO
D	10	JOL916	1×10^8	PO			
E	10	PBS	-	PO			

다. 6주령 산란계에서 JOL1229 백신의 안전성 평가

(1) 임상증상 관찰

백신 접종 후, 매일 anorexia, diarrhea, depression의 점수를 개체별로 평가하였다. 방

어려 평가를 위한 병원성 야외균주 접종 전까지 모든 실험군에서 임상증상이 나타나지 않았다.

(2) 백신접종 후 JOL1229 균주의 분변 배출 여부

실험군 중에 B군을 대상으로 백신접종 후 1, 2, 3, 5, 7일째 임의로 5마리를 선택하여 분변으로의 adjuvant 균주 배출 여부 검사를 실시하였다. 분변 내 미생물학적 검사를 실시하여 백신균주의 잔존 유무를 확인하였다. 즉, 알콜로 소독한 용기에 분변을 받아 샘플을 채취하여, buffered peptone water (BPW, Becton, Dickinson and Company, France)에서 분쇄하고 상청액을 Brilliant Green Agar (BGA, Becton, Dickinson and Company, France)에 접종하여 colony 출현 유무를 검사하였으며, negative인 경우 enrichment culture를 BPW에서 37 °C 16시간 배양 후 Rappaport-Vassiliadis R10 broth (Becton, Dickinson and Company, France)에 1/100 volume 접종하여 42 °C에서 48시간 배양 후 BGA에서 *Salmonella*의 colony 출현 유무를 확인하였다. 백신접종 후 1, 2, 3, 5, 7일째 모든 분변 샘플에서 백신 균주가 분리되지 않았다.

(3) 백신접종 후 병리소견

실험군 중에 B군을 대상으로 백신접종 후 5주까지 매주 임의로 3마리를 선택하여 병리소견과 미생물검사를 실시하였다. 병리소견 평가를 위하여 간장과 비장의 병변으로 종대 (enlargement), 흰색반점 (white spot)의 정도를 각각 관찰하고 장기별로 0점(정상)부터 3점(심각)까지 개체별로 점수화하였다. 백신 접종 후 5주까지의 병리검사 결과, 백신 접종 후 4주까지 병변이 없거나 또는 매우 경미한 병변이 관찰되었으며, 5주째에는 병변이 관찰되지 않았다 (표 79).

표 79. 백신 접종 후 병리소견

Group	Gross lesion ^a		Week post immunization				
	Organ	Finding	1	2	3	4	5
Immunized ^b	Liver	EN ^c	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
		NF ^d	0.3 ± 0.6	0.7 ± 1.2	0.7 ± 0.6	0.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0
	Spleen	EN	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.6	0.7 ± 0.6	0.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0
		NF	0.0 ± 0.0	0.7 ± 1.2	0.7 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Control	Liver	EN	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
		NF	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Spleen	EN	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
		NF	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

^a Gross lesion score (mean ± SD).

^b Group immunized with a mixture consisting of 4 parts JOL916 and 1 part JOL1229.

^c Enlargement.

^d Necrotic foci.

(4) 백신접종 후 미생물학적 검사

미생물학적 검사는 백신균주의 잔존 유무를 확인하기 위한 것으로, 간장 및 비장을 Buffered peptone water (BPW, Becton, Dickinson and Company, France)에서 분쇄하고 상청액을 Brilliant Green Agar (BGA, Becton, Dickinson and Company, France)에 접종하여 colony 출현 유무를 검사하였으며, negative인 경우 enrichment culture를 BPW에서 37 °C, 16시간 배양 후 Rappaport-Vassiliadis R10 broth (Becton, Dickinson and Company, France)에 1/100 volume 접종하여 42 °C에서 48시간 배양 후 BGA에서 *Salmonella*의 colony 출현 유무를 확인하였다. 백신 접종 후 4주째 까지 장기에 존속하고 있는 것으로 확인되었고, 5주째에는 모든 선정된 개체에서 백신 균주가 분리되지 않았다 (표 80).

표 80. 내부 장기에서 백신균주 분리

Group	Organ	Week post immunization									
		1		2		3		4		5	
		NP ^a	Count ^b	NP	Count	NP	Count	NP	Count	NP	Count
Immunized ^c	Liver	3/3*	1.7 ± 1.3*	2/3	1.8 ± 1.6	1/3	0.6 ± 1.1	1/3	0.9 ± 1.5	0/3	0.0 ± 0.0
	Spleen	3/3*	2.6 ± 0.4*	3/3*	3.5 ± 0.3*	3/3*	3.1 ± 0.7*	1/3	1.2 ± 2.1	0/3	0.0 ± 0.0
Control	Liver	0/3	0.0 ± 0.0	0/3	0.0 ± 0.0	0/3	0.0 ± 0.0	0/3	0.0 ± 0.0	0/3	0.0 ± 0.0
	Spleen	0/3	0.0 ± 0.0	0/3	0.0 ± 0.0	0/3	0.0 ± 0.0	0/3	0.0 ± 0.0	0/3	0.0 ± 0.0

^a Number of positive sample after enrichment culture.

^b Values represent the means ± SD log₁₀ cfu/g.

^c Group immunized with a mixture consisting of 4 parts JOL916 and 1 part JOL1229.

*Significant difference compared to the control group ($P \leq 0.05$).

라. 면역유도 관찰

(1) 샘플채취

Heparin을 첨가한 추사기로 말초혈액 1 ml를 채혈 후 원심분리 (40 rpm, 15분, 실온)하여 얻은 림프구는 세포성면역측정시험에 사용하였고, 혈장은 냉동보관(-20 °C)하여 혈장 IgG 측정에 사용하였다. 분비형 IgA측정의 목적으로 다음과 같은 방법으로 소화관 세척액을 얻었다(Berthelot-Herault et al., Vet Immunol Immunopathol, 2003). 즉, 병아리를 한 마리씩 소독된 용기에 분리 수용하여 Lavage solution (48.5 mM polyethylene glycol, 40 mM Na₂SO₄, 20 mM NaHCO₃, 10 mM KCl, 25 mM NaCl)을 경구적으로 12

ml/kgBW(body weight)씩 투여하고 30분 후 pilocarpine을 13 mg/kgBW (BW<300 g의 경우 20mg/kgBW) 의 용량으로 근육 주사하였다. 다시 30분 후 배출된 소화관 세척액과 5 ml의 STI/EDTA solution (0.1 mg soybean trypsin inhibitor in 50 mM EDTA, pH 8.0)을 잘 혼합하여 회수하여, 원심분리를 한 후 (700 ×g, 10분, 4 °C) 상청액 1 ml을 얻었다. 분리한 상청액 1ml에 100 mM PMSF, 1% Sodium azide, 5% BSA(bovine serum albumin)를 각각 1 ml당 10 µl씩 첨가하고 -20 °C에 보관하여 ELISA의 sample로 사용하였다.

(2) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

특이면역 정량을 위해 Outer Membrane Protein (OMP) fraction을 야외균주 JOL420에서 정제하여 ELISA에서의 항원으로 사용하였다. OMP fraction은 modified lysozyme-osmotic shock method에 의하여 얻었다. 즉, 150 ml의 세균 배양액을 원심분리 (7000 ×g, 10분, 4 °C) 하여 pellet을 얻고, 800 µl의 100 mM Tris-HCl (500 mM sucrose, 0.5 mM EDTA, pH 8.6)에 채부유시켜 lysozyme (400 µl, 4 mg/ml)을 첨가한다. 그 즉시 3.2 µl의 50mM Tris-HCl (250 mM sucrose, 0.25 mM EDTA, 2.5 mM MgCl₂, pH8.6)를 첨가하여 ice 위에서 15분간 incubation 한다. 이를 원심분리(7000×g, 6분, 4 °C)하여 pellet을 얻는다. Pellet을 4 ml의 20 mM Tris-HCl (pH 8.6)에 채부유시켜 sonication후 원심분리 (7000 ×g, 6분, 4 °C)하여 상청액을 얻는다. 상청액을 초고속 원심분리기로 원심분리(132,000 ×g, 1시간, 4 °C)하여 pellet을 얻는다. Pellet(cell envelopes)을 4 ml의 20 mM Tris-HCl containing 1% Sarkosyl (pH 8.6)에 채부유시켜 상온에서 30분 동안 incubation하고 다시 초고속원심분리기로 원심분리(132,000 ×g, 1시간, 4 °C)하여 상청액을 얻는다. 준비한 OMP 항원을 flat-bottom 96 well high binding ELISA plate (Greiner, Germany)에 흡착시켜서 chicken IgG (또는 IgA) ELISA quantitation kit (Bethyl, TX, USA)를 사용하여 사용설명서를 따라서 실시하였다. 즉, 10% Skim milk로 비특이반응을 blocking한 다음 sample을 적절하게 희석하여 반응시키고 HRP (horse radish peroxidase)로 표지된 2차 항체를 결합시키는 indirect ELISA를 실시하였다. 백신 접종 후 혈장 IgG 농도와 소화기 세척액내 sIgA의 농도를 그림 55 (A, B)에 나타내었다. 혈장 IgG의 경우에는 모든 실험군이 대조군에 비해 유의적으로 월등한 증가를 보였고, 소화관 내 sIgA 측정 결과는 백신 접종 후 1주째와 3주째에 A군과 B군에서 대조군의 측정값에 대해 유의적인 증가를 보였고, 백신 접종 후 4주째에는 B군에서만 유의적인 증가를 보였다.

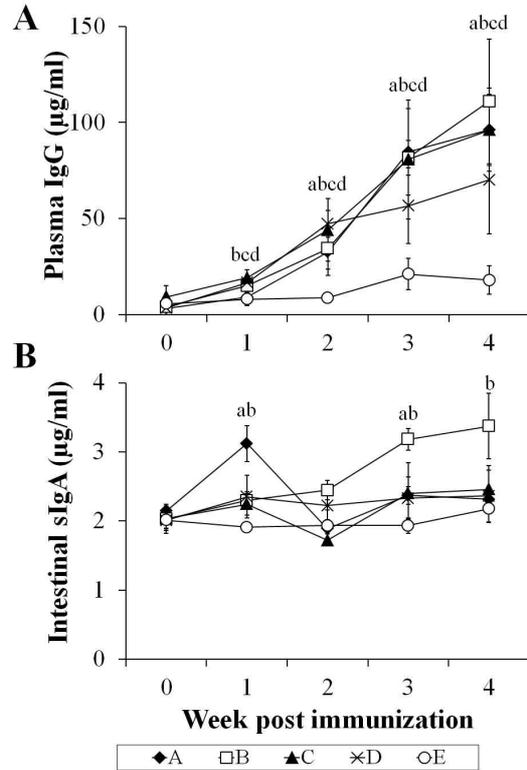


그림 55. 백신 접종 후 혈장 IgG와 소화관 세척액 sIgA 농도

(3) 세포성면역 측정

백신 접종 후 3주째에 세포성 면역 측정을 위해 말초 혈액의 림프구를 이용한 lymphocytes proliferation assay (LPA)를 실시하였다. 원심분리 (40 rpm, 15분, 실온)한 후 얻은 림프구를 Trypan blue exclusion test로 살아있는 세포수를 계산한 다음 RPMI 1640 complete medium (송아지 혈청 및 항균항진균제 포함)에 부유시켜 1×10^5 cfu/100µl/well 가 되게 96-well plate 에 분주하였고, *S. Gallinarum* soluble antigen과 함께 72시간 동안 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양한 후 광학현미경으로 림프구의 상태를 관찰하고, Lonza사의 ViaLight[®] Plus Kit를 사용하여 Luminescence assay를 실시하였다. Stimulation Index (SI)를 다음과 같이 계산하여 백신 접종군에서 세포성면역이 유도되었는지 확인하였다. B군에서 가장 높은 SI 수치를 나타내었고, 대조군과 비교 할 때, 모든 실험군에서 유의성있는 증가를 보였다 (그림 56).

식) $SI = (\text{항원첨가된 well에서 측정된 발광량}) / (\text{항원을 첨가하지 않은 well에서 발광량})$

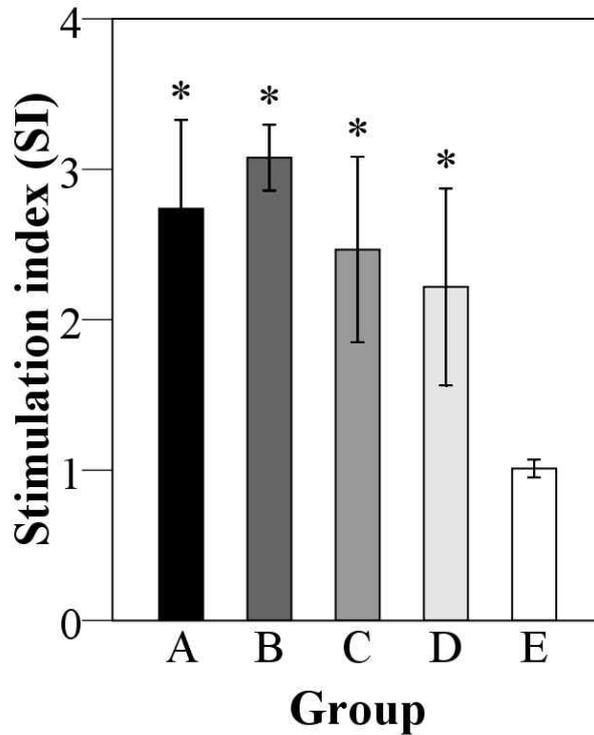


그림 56. 백신 접종 후 3주째 세포성면역 반응

(4) 유세포분석 측정 (Flow cytometry analysis)

백신 접종 후 7일째에 세포성 면역 측정을 위한 한 방법으로 말초 혈액 내 T림프구의 분화 양상을 유세포분석법으로 측정하였다. 실험군으로서 JOL916과 JOL1229를 80:20으로 혼합하여 접종한 군 (I군)과 JOL916만을 접종한 군 (II군), 그리고 대조군으로서 PBS를 접종한 그룹 (III군)에 대하여 유세포분석을 실시하였고, 그 방법은 다음과 같다. 즉, 원심분리 (40 rpm, 15분, 실온)한 후 얻은 림프구를 Trypan blue exclusion test로 살아있는 세포수를 1×10^6 cell로 계산하여 희석한 다음 FACS buffer(PBS, 0.5% BSA, 0.01% NaN₃)로 washing하고, 각 샘플에 세 종류의 형광-표지 단일클론항체 (CD3-FITC, CD4-BIOT, CD8-PE)를 1 μ l씩 첨가한 후 30분간 얼음에 꽃아 ice incubation을 실시하였다. 그 후 곧바로 FACS buffer로 washing을 하고 나서 형광-표지 단일클론항체 중에 CD4-BIOT를 형광 염색하기 위해 streptavidin-APC를 각 샘플에 1 μ l씩 첨가한 후 30분간 ice incubation을 실시하였다. 다시 FACS buffer로 washing을 하고 나서 4 °C를 유지한 상태로 유세포분석기 (FACS Calibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA)로 유세포분석을 시행하여, 채취한 혈액 내 T림프구의 분포비율을 측정하였다. 백신 접종 후 1주째에 I군에서 음성대조군에 비해 각각 CD4⁺ 보조T세포와 CD8⁺ 세포독성 T세포의 분포비율이 유의적으로 증가하였고, II군에서는 CD8⁺ 세포독성 T세포의 분포비율만 유의적인 증가를 보였다 (그림 57 A, B, C).

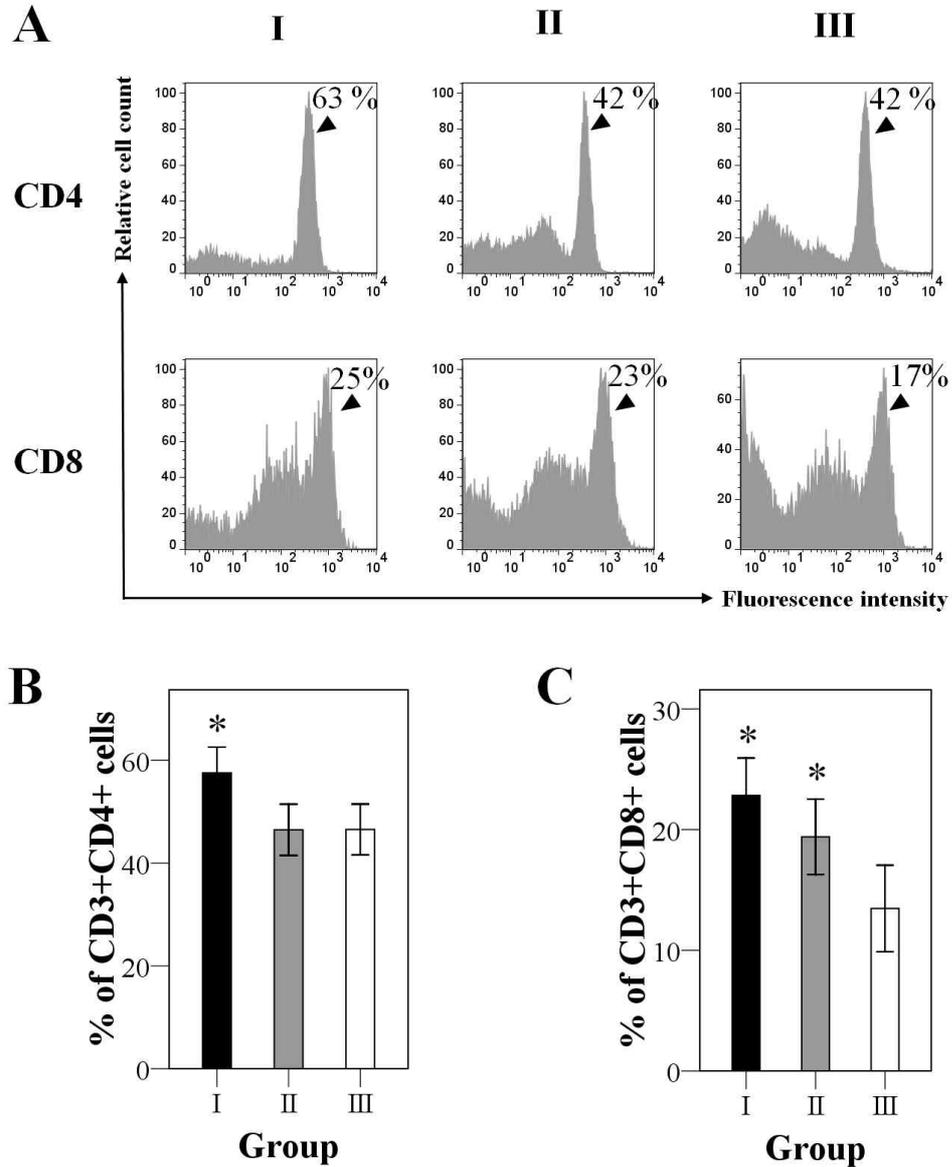


그림 57. 백신 접종 후 1주째 말초혈액내 T림프구의 분화 측정

(5) 실시간 역전사 중합효소연쇄반응법 분석 (Real-time RT-PCR analysis)

백신 접종 후 4주째에 실험군으로서 JOL916과 JOL1229를 80:20으로 혼합하여 접종한 군 (I군)과 JOL916만을 접종한 군 (II군), 그리고 대조군으로서 PBS를 접종한 그룹 (III군)에서 각각 임의대로 선택한 5마리 개체를 안락사 시킨 후 비장을 채취하여 비장세포를 분리하고, 그룹별로 모았다. 분리한 비장세포를 24-well 조직배양 plate에 1×10^6 cells/well로 계산하여 옮기고 SG soluble antigen ($4 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가하여 항원자극을 시킨 상태에서 40°C 72시간 동안 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양된 비장세포의 사이토카인 인터루킨-6 (cytokine IL-6) mRNA 수준을 실시간 역전사 중합효소연쇄반응법 분석법 (real-time RT-PCR analysis)으로 정량화 하였다. Hybrid-R™ Total RNA Isolation Kit (GeneAll, Korea)를 이용하여 배양된 비장세포의 total RNA를 추출한 후,

각 그룹의 비장세포에서 정제된 RNA를 RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, WI, USA) 처리를 하고, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하여 DNA 샘플의 준비를 하였으며, real time PCR을 위해 -20 °C에 보관하였다. IL-6 and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primer에 해당하는 특이적인 증폭과 검출은 QuantiTect® SYBR® Green PCR Kits (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)를 이용하였고, 기기는 StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하였다. 증폭 cycle의 설계는 1 cycle of 95 °C 15분 이후 40 cycle of 94 °C 15초, 56 °C 25초, 72 °C 30초로 실시하였다. mRNA level의 정량은 역가측정법 (threshold method)을 이용하였고 세포내 GAPDH를 housekeeping 유전자를 사용하여 ΔC_T 값(threshold cycle 차이값, 즉 반응을 일으키는 최소의 역가와 증폭곡선이 만나는 값의 차이값)을 계산하였다. 최종 결과값은 $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ (n-fold change to the non-treated control group)로 표시 하였다. 백신 접종 후 4주째에 채취한 비장 세포를 in vitro에서 SG soluble anitigen으로 자극하여 배양한 다음 real time RT-PCR로 세포내 IL-6 mRNA의 발현 정도를 측정 한 결과, I군에서 음성대조군에 비해 약 4.2배 증가하였고, II군에서는 오히려 상대적인 발현량이 감소한 것으로 측정되었다 (그림 58).

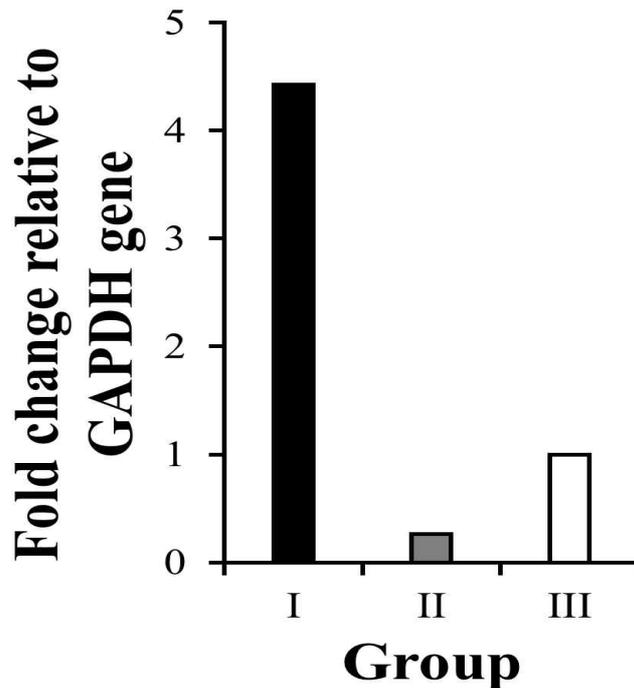


그림 58. 백신 접종 후 4주째 비장세포의 IL-6 mRNA 발현의 상대량

마. 방어력 비교

(1) 생존율

야외균주 접종 후 매일 폐사수를 확인하였다. 백신을 접종한 실험군 중에 A군과 B군

은 90%, C군과 D군은 80%의 생존율을 보였으며, 반면에 백신을 접종하지 않은 대조군인 E군은 20%의 산란계만이 생존하였다 (그림 59). 모든 실험군의 생존율은 대조군과 비교하여 유의적으로 높게 나타났다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

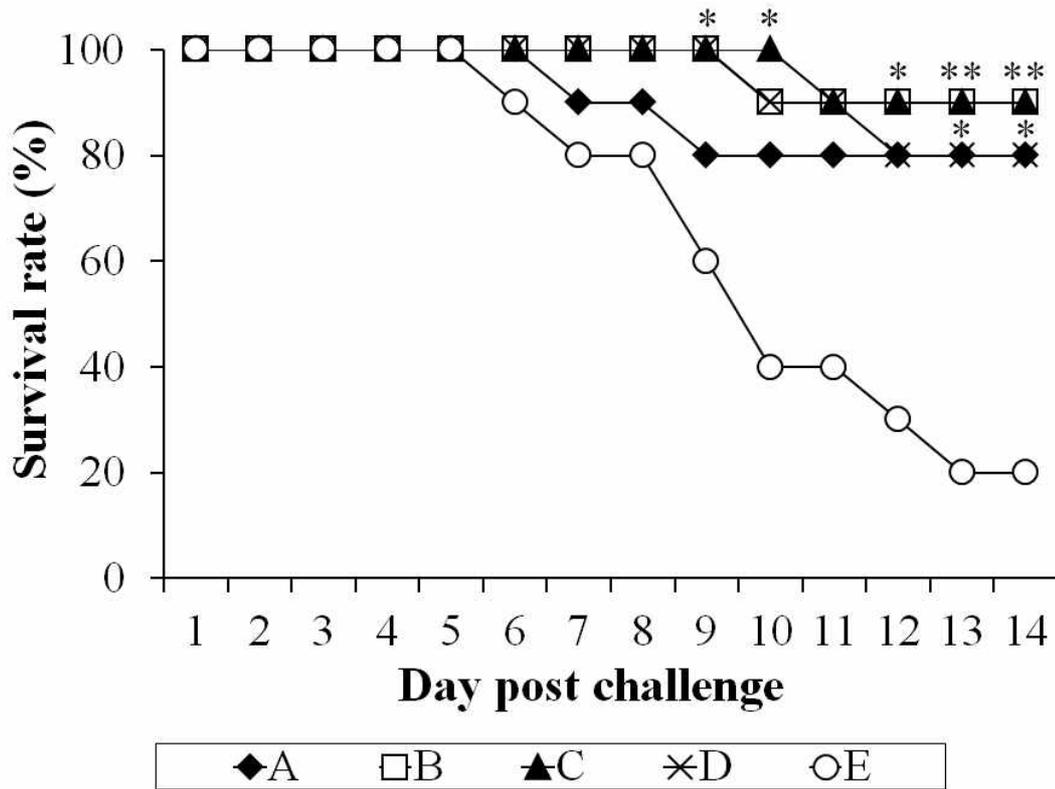


그림 59. 야외군주 접종 후 생존율

(2) Challenge 후 14일째 병리소견

야외군주 접종 후 14일째 살아남은 개체를 안락사 시켜 간장과 비장의 병리소견을 검사하였다. 백신 접종 후 실시한 병리소견 평가와 같은 방법으로 간장과 비장의 병변으로 종대 (enlargement), 흰색반점 (white spot)의 정도를 각각 관찰하고 장기별로 0점(정상)부터 3점(심각)까지 개체별로 점수화하였다. A군에서 비장의 종대 소견을 제외하고는 모든 실험군에서 간장과 비장의 병리소견은 대조군의 동일한 장기의 병리소견에 비해 통계학적으로 유의하게 매우 경미한 병변을 보였다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) (표 81).

표 81. 백신 접종 및 도전감염 후 사망률과 병리소견

Group	Immunization ^a	n	Death rate (%)	Gross lesion ^b			
				Liver		Spleen	
				EN ^c	NF ^d	EN	NF
A	1 part JOL916 and 1 part JOL1229	10	20	0.8 ± 1.2**	0.8 ± 1.2**	1.5 ± 1.3	1.0 ± 1.2**
B	4 parts JOL916 and 1 part JOL1229	10	10	0.5 ± 1.0**	0.6 ± 1.1***	0.6 ± 1.1**	0.8 ± 1.2**
C	9 parts JOL916 and 1 part JOL1229	10	10	0.3 ± 0.9***	0.5 ± 1.1***	0.6 ± 1.1**	0.7 ± 1.1**
D	JOL916	10	20	0.9 ± 1.2**	1.3 ± 1.3**	0.9 ± 1.2*	1.2 ± 1.1**
E	PBS	10	80	2.6 ± 0.8	2.8 ± 0.6	2.4 ± 1.3	2.7 ± 0.7

바. 결론

백신균주 JOL916과 면역강화균주 JOL1229를 여러 가지의 비율로 혼합하여 접종하여, 면역반응의 유도 및 야외균주로부터의 방어력을 시험한 결과, 혈장 IgG 면역반응에서는 모든 백신 접종군에서 유의성있게 증가하여 음성대조군에 비해 월등하였고, 소화관 내 sIgA의 경우에는 B군 (JOL916과 JOL1229를 80%와 20%로 혼합하여 접종한 그룹)에서 백신 접종 4주째까지 유의적으로 증가하였다. 세포성 면역반응은 모든 백신 접종군에서 음성대조군에 비교하여 통계학적으로 의미있게 증가하였다. 야외균주에 대한 방어력은 모든 실험군의 결과가 대조군에 비해 유의적으로 높은 방어력을 보였으며, 특히 A군과 B군에서 90%로 가장 좋은 결과를 보였다. 이상의 면역반응과 방어력 결과를 종합할 때, 가금티푸스를 예방하기 위해 경구적으로 생균 백신을 접종할 때, adjuvant 균주인 JOL1229를 같이 혼합하여 접종한 그룹이 백신 후보 균주인 JOL916만 단독으로 접종한 그룹보다 면역반응과 방어력에서 우세하였고, 특히 JOL916과 JOL1229를 80%와 20%로 혼합하여 접종한 그룹 (B군)이 가장 좋은 결과를 보였다. 또한, JOL1229의 안전성 평가를 위해 백신 접종 후 adjuvant 균주의 분변 배출 검사와 내부 장기내 미생물학적 검사 및 병리소견을 관찰한 결과, JOL1229 균주는 6주령 산란계에서 경구 접종 후 분변 샘플에서 발견되지 않았으며, 백신 접종 후 5주째에 간장과 비장의 병리소견과 미생물학적 검사에서 음성으로 나타났다. 따라서 6주령의 산란계에서 JOL1229 균주를 혼합한 가금티푸스 생균 백신 경구접종은 환경에 대해서나 해당 개체에 대해서 모두 안전하다고 판단되며, 또한 JOL916과 JOL1229를 80%와 20% 비율로 혼합한 백신 조성물이 면역반응과 방어력 측면에서 가장 우수하였다.

17. 6주령 산란계에서 JOL1229를 이용한 백신 program 실험

가. 균주

백신균주로 JOL916을, 면역강화균주로 JOL1229를, 그리고 병원성 야외균주로 JOL422를 사용하였으며, freezing culture (-80 °C)에서 LB broth에 inoculation하여 shaking incubator (37 °C, 150 rpm)에서 16시간 배양 후 OD₆₀₀ 값을 근거로 농도를 구하여 접종하였다.

나. 실험 동물 및 실험 design

1일령 Lohmann Brown 산란계 40마리를 분양받아 10마리씩 4개 군으로 나눠서 실험에 사용하였다. 항생제가 함유되지 않은 사료와 수돗물을 자유섭취 시켰다.

본 실험은 6주령과 16주령에 백신접종을 2회 실시하여 산란시작 전에서의 JOL1229를 이용한 경구용 가금티푸스 백신의 최적화된 적용을 목적으로 실시되었다. 실험군의 경우, A군은 이전 실험결과에 의거하여 1차 백신접종 시 JOL916을 면역강화균주 JOL1229와 80%와 20%의 비율로 혼합한 백신을 사용하였고, 2차 백신접종 시에도 같은 백신 조성물을 접종하였고, B군은 1차 백신 접종 시 JOL916을 면역강화균주 JOL1229와 80%와 20%의 비율로 혼합한 백신을 사용하고, 2차 백신 접종 시에는 JOL916을 단독 접종하였으며, C군은 1차와 2차 백신 접종 시 모두 JOL916을 사용하였으며, 대조군으로서 D군의 개체에는 1차와 2차 백신 접종 시기에 동일한 용량의 PBS를 접종하였다. 모든 접종은 경구접종으로 실시하였으며 접종용량은 6주령과 16주령 모두 1×10^8 cfu로 적용하였다. 2차 백신접종 후 30일에 야외균주 JOL422를 경구 접종하여 야외균주에 대한 방어력 시험을 실시하였다 (표 82).

표 82. 실험 design

Group	n	Vaccination						Challenge (백신접종후 30일)		
		Prime (6주령)			Booster (16주령)			Strain	Dose	Route
		Strain	Dose	Route	Strain	Dose	Route			
A	10	JOL916+ JOL1229 (80%+ 20%)	1×10^8	PO	JOL916+ JOL1229 (80%+ 20%)	1×10^8	PO			
B	10	JOL916+ JOL1229 (80%+ 20%)	1×10^8	PO	JOL916	1×10^8	PO	JOL422	1×10^6	PO
C	10	JOL916	1×10^8	PO	JOL916	1×10^8	PO			
D	10	PBS	-	PO	PBS	-	PO			

다. 부작용 조사

(1) 임상증상 관찰

백신 접종 후, 매일 식욕부진, 설사 여부, 침울 정도를 점수화하여 개체별로 평가하였다. 그 결과, 방어력 평가를 위한 병원성 야외균주 접종 전까지 모든 실험군에서 임상증상이 나타나지 않았다.

라. 면역형성 확인

(1) 샘플채취

Heparin을 첨가한 추사기로 말초혈액 1 ml를 채혈 후 원심분리 (40 rpm, 15분, 실온) 하여 얻은 림프구는 세포성면역측정시험에 사용하였고, 혈장은 냉동보관(-20 °C) 하여 혈장 IgG 측정에 사용하였다. 분비형 IgA 측정의 목적으로 다음과 같은 방법으로 소화관 세척액을 얻었다(Berthelot-Herault et al., Vet Immunol Immunopathol, 2003). 즉, 병아리를 한 마리씩 소독된 용기에 분리 수용하여 Lavage solution (48.5 mM polyethylene glycol, 40 mM Na₂SO₄, 20 mM NaHCO₃, 10 mM KCl, 25 mM NaCl)을 경구적으로 12 ml/kgBW(body weight)씩 투여하고 30분 후 pilocarpine을 13 mg/kgBW (BW<300 g의 경우 20mg/kgBW) 의 용량으로 근육 주사하였다. 다시 30분 후 배출된 소화관 세척액과 5 ml의 STI/EDTA solution (0.1 mg soybean trypsin inhibitor in 50 mM EDTA, pH 8.0)을 잘 혼합하여 회수하여, 원심분리를 한 후 (700 ×g, 10분, 4 °C) 상청액 1 ml을 얻었다. 분리한 상청액 1ml에 100 mM PMSF, 1% Sodium azide, 5% BSA(bovine serum albumin)를 각각 1 ml당 10 µl씩 첨가하고 -20 °C에 보관하여 ELISA의 sample로 사용하였다.

(2) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

특이면역 정량을 위해 Outer Membrane Protein (OMP) fraction을 야외균주 JOL420에서 정제하여 ELISA에서의 항원으로 사용하였다. OMP fraction은 modified lysozyme-osmotic shock method에 의하여 얻었다. 준비한 OMP 항원을 flat-bottom 96 well high binding ELISA plate (Greiner, Germany)에 흡착시켜서 chicken IgG (또는 IgA) ELISA quantitation kit (Bethyl, TX, USA)를 사용하여 사용설명서를 따라서 실시하였다. 즉, 10% Skim milk로 비특이반응을 blocking한 다음 sample을 적절하게 희석하여 반응시키고 HRP (horse radish peroxidase)로 표지된 2차 항체를 결합시키는 indirect ELISA를 실시하였다. 백신 접종 후 혈장 IgG 농도와 소화기 세척액내 sIgA의 농도를 Fig 6에 나타내었다. 혈장 IgG의 경우에는 모든 실험군이 대조군에 비해 유의적으로 월등한 증가를 보였고, 소화관 내 sIgA 측정 결과는 A군의 경우 1차 백신 접종 후

3, 5, 7주째에 대조군의 수치와 비교하여 유의적인 증가된 수치를 나타냈고, 2차 백신 접종 후 1, 3주째 유의적으로 증가하였다. B군에서는 1차 백신 접종 후 3, 5주째와 2차 백신 접종 후 3주째에 유의적으로 증가하였으며, C군의 경우 그 수치가 대조군에 비해 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 보이지 않았다 (그림 60 A, B).

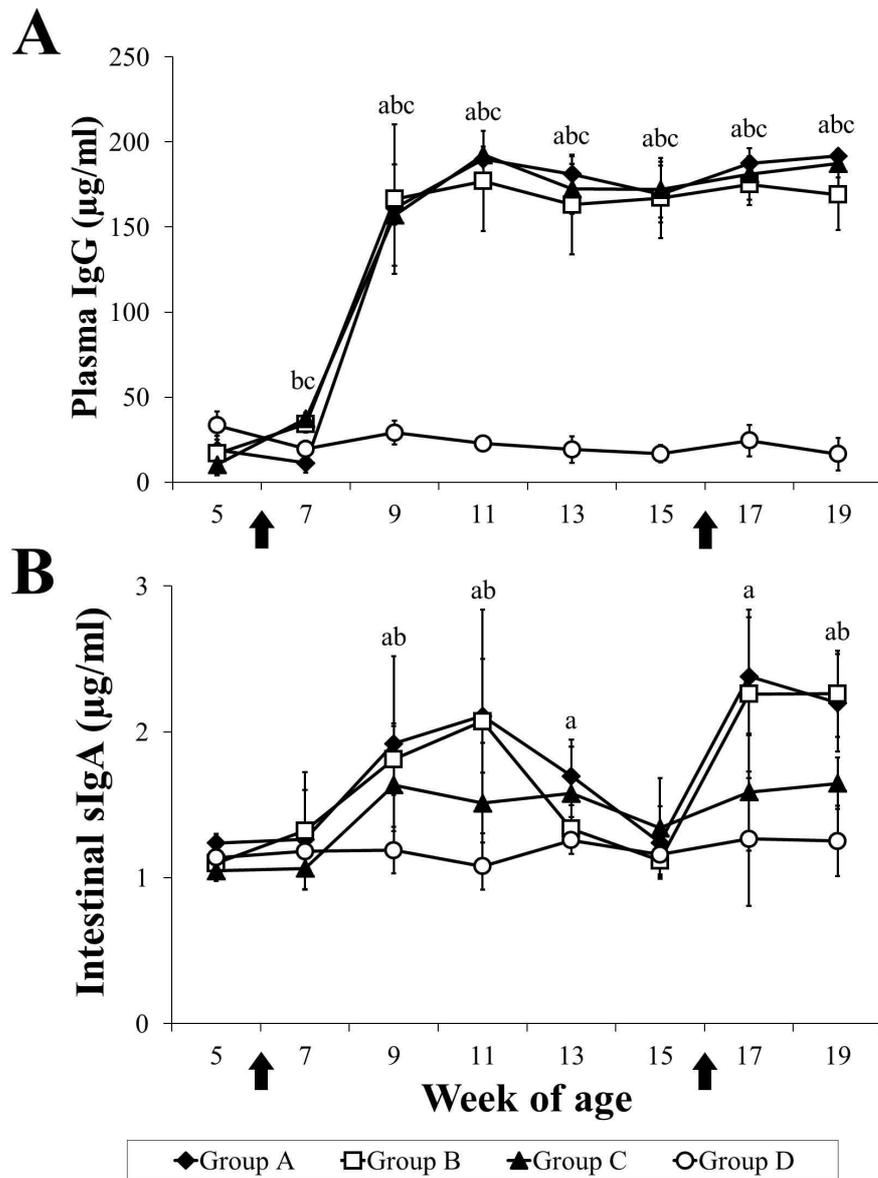


그림 60. 백신 접종 후 혈장 IgG와 소화관 세척액 sIgA 농도

(3) 세포성면역 측정

백신 접종 후 3주째에 세포성 면역 측정을 위해 말초 혈액의 림프구를 이용한 lymphocytes proliferation assay (LPA)를 실시하였다. 원심분리 (40 rpm, 15분, 실온)

한 후 얻은 림프구를 Trypan blue exclusion test로 살아있는 세포수를 계산한 다음 RPMI 1640 complete medium (송아지 혈청 및 항균항진균제 포함)에 부유시켜 1×10^5 cfu/100 μ l/well 가 되게 96-well plate 에 분주하였고, *S. Gallinarum* soluble antigen과 함께 72시간 동안 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양한 후 광학현미경으로 림프구의 상태를 관찰하고, Lonza사의 ViaLight[®] Plus Kit를 사용하여 Luminescence assay를 실시하였다. Stimulation Index (SI)를 다음과 같이 계산하여 백신 접종군에서 세포성면역이 유도되었는지 확인하였다. 1차 백신 접종 후 3주째에는 모든 실험군에서 SI값이 대조군의 수치와 비교하여 유의적으로 증가하였으며, 2차 백신 접종 후에도 마찬가지로 모든 실험군에서 유의성있는 증가를 보였고, 특히 B군에서 가장 높은 SI 수치를 나타냈다 (그림 61).

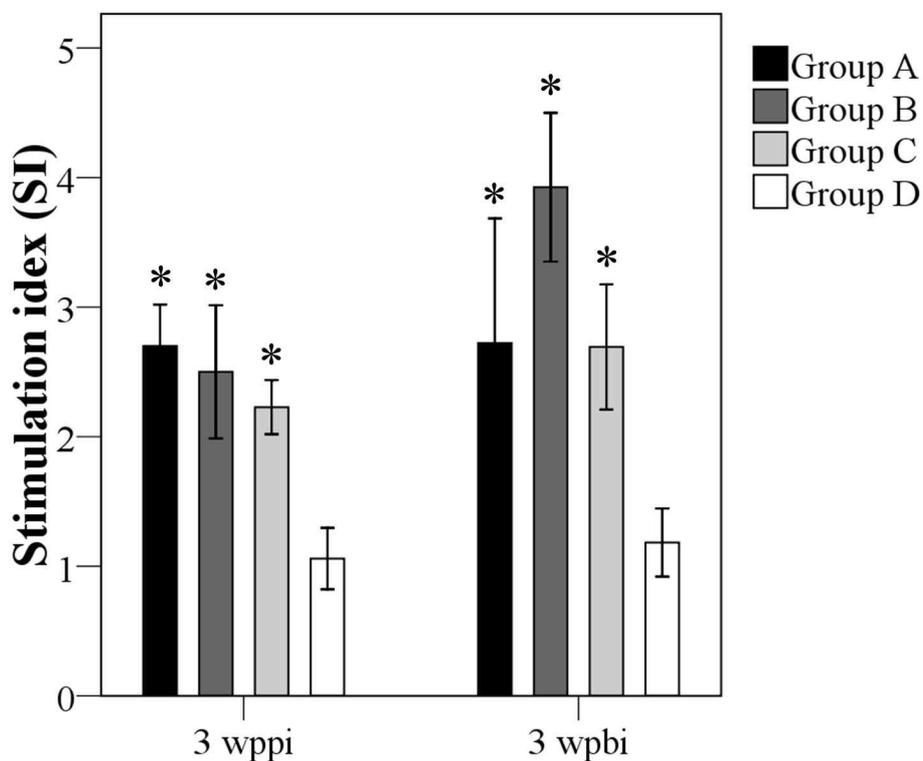


그림 61. 1차와 2차 백신 접종 후 3주째 세포성면역 반응

마. 방어력 유무 확인

(1) 생존율

야외군주 접종 후 매일 폐사수를 확인하였다. A군과 B군은 90%, C군과 D군은 80%의 생존율을 보였으며, 반면에 백신을 접종하지 않은 대조군인 E군은 30%의 산란계만이

생존하였다 (그림 62). 모든 실험군의 생존율은 대조군과 비교하여 유의적으로 높게 나타났다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

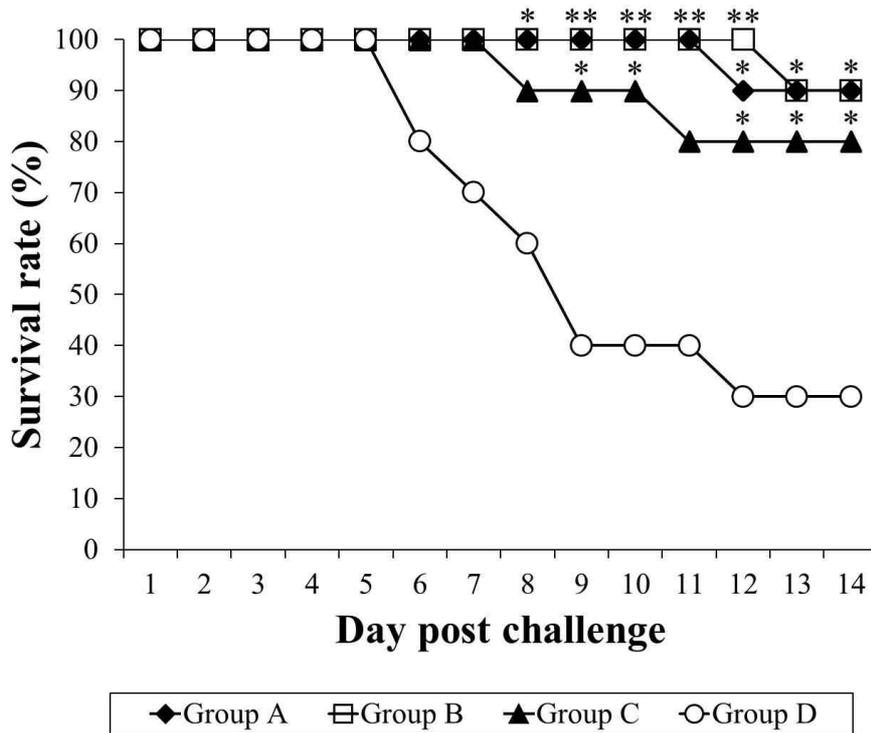


그림 62. 야외균주 접종 후 생존율

(2) Challenge 후 14일째 병리소견

야외균주 접종 후 14일째 살아남은 개체를 안락사 시켜 간장과 비장의 병리소견을 검사하였다. 간장과 비장의 병변으로 종대 (enlargement), 흰색반점 (white spot)의 정도를 각각 관찰하고 장기별로 0점(정상)부터 3점(심각)까지 개체별로 점수화하였다. C군에서 간장의 종대 소견을 제외하고는 모든 실험군에서 간장과 비장의 병리소견은 대조군의 동일한 장기의 병리소견에 비해 통계학적으로 유의하게 매우 경미한 병변을 보였다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) (표 83).

표 83. 백신 접종 및 도전감염 후 사망률과 병리소견

Group	Immunization ^a		n	Death rate (%)	Gross lesion ^b			
	Prime	Booster			Liver		Spleen	
					EN ^c	NF ^d	EN	NF
A	4 parts JOL916 and 1 part JOL1229	4 parts JOL916 and 1 part JOL1229	10	10	0.7 ± 1.1*	0.4 ± 1.0*	0.4 ± 1.0*	0.7 ± 0.9*
B	4 parts JOL916 and 1 part JOL1229	JOL916	10	10	0.6 ± 1.0*	0.8 ± 1.1*	0.7 ± 1.2*	0.5 ± 1.0**
C	JOL916	JOL916	10	20	0.8 ± 1.2	0.9 ± 1.3	0.7 ± 1.3*	0.9 ± 1.3*
D	PBS	PBS	10	70	2.1 ± 1.4	2.1 ± 1.4	2.1 ± 1.4	2.3 ± 1.3

바. 결론

본 실험은 면역강화균주 JOL1229를 이용한 16주령이하에서의 백신의 최적화 실험으로 1차-2차 백신 접종 프로그램을 실시하여 각각 백신 접종 시 가장 적절한 백신 접종 전략을 결정하는 것을 목표로 하였다. 6주령에 백신균주 JOL916에 면역강화균주 JOL1229를 혼합하여 1차 경구 접종한 후, 2차 접종으로 16주령에, A군은 백신균주만을, 또한 B군은 백신균주에 면역강화균주를 혼합하여 경구적으로 백신접종을 실시하였다. 2차 백신 접종 후까지의 면역 반응을 측정된 결과, 소화관 내 sIgA 농도 측정 결과와, 세포매개 반응 측정결과를 종합해 볼 때, 1차와 2차 백신 접종 시 JOL916과 JOL1229를 80%와 20%로 혼합하여 접종한 A군이, 2차 백신접종 시 JOL916 균주만 접종한 B군보다 더 높은 수치로 나타났으며, 혈액 내 IgG 농도는 비슷한 것으로 측정 되었다. 따라서 6주령-16주령 1차-2차 경구 백신 접종에서는 백신 균주 JOL916에 면역강화균주 JOL1229를 혼합하여 접종하는 것이 가장 적합한 것으로 판단된다.

18. JOL1229를 이용한 백신의 장기적 실험

가. 균주

백신균주로 JOL916을, 면역강화균주로 JOL1229를, 그리고 병원성 야외균주로 JOL422를 사용하였으며, freezing culture (-80 °C)에서 LB broth에 inoculation하여 shaking incubator (37 °C, 150 rpm)에서 16시간 배양 후 OD₆₀₀ 값을 근거로 농도를 구하여 접종하였다.

나. 동물 및 실험 design

1일령 Lohmann Brown 산란계 60마리를 분양받아 15마리씩 4개 군으로 나눠서 실험에 사용하였다. 항생제가 함유되지 않은 사료와 수돗물을 자유섭취 시켰다.

본 실험은 6주령과 16주령에 백신접종을 2회 실시하여 산란개시 후 4주째까지 실제 산란계 농장에서 적용할 수 있는 백신 프로그램을 시험할 목적으로 실시되었다. 즉, 면역반응 측정과 백신 접종 후 임상증상 관찰은 물론, 산란개시 후 계란의 생산성과 계란의 백신 균주 오염 여부를 검사하였다. 실험군의 경우, A군은 1차와 2차 백신접종 시 JOL916을 면역강화균주 JOL1229와 80%와 20%의 비율로 혼합한 백신을 경구적으로 투여하였고, B군은 1차와 2차 백신 접종 시 JOL916 균주를 피하주사로 접종하였다. C군은 기존 상업용 백신인 SG 9R 균주 (JOL966)을 제조사의 권장 방법에 따라 피하 주사로 1차와 2차 2회 접종 하였으며, 대조군으로서 D군의 개체에는 1차와 2차 백신 접종 시기에 동일한 용량의 PBS를 접종하였다. 접종용량은 경구 접종한 A군의 경우 6주령과 16주령 모두 1×10^8 cfu로 적용하였고, 피하 접종의 경우 1×10^7 cfu으로 적용하였다 (표 84).

표 86 JOL1229 prime-boost 접종실험 design

Group	n	Vaccination					
		Prime (6주령)			Booster (16주령)		
		Strain	Dose(cfu)	Route	Strain	Dose(cfu)	Route
A	15	JOL916+ JOL1229 (80%+ 20%)	1×10^8	PO	JOL916+ JOL1229 (80%+ 20%)	1×10^8	PO
B	15	JOL916	1×10^7	SC	JOL916	1×10^7	SC
C	15	SG 9R (JOL966)	1×10^7	PO	SG 9R (JOL966)	1×10^7	SC
D	15	PBS	-	PO/SC	PBS	-	PO/SC

다. 부작용 조사

(1) 백신접종 후 임상증상 및 체중측정

접종 전 후에 지속적으로 임상증상 관찰 및 체중측정을 실시하였다. 백신접종 후 산란 개시 후 4주째까지 모든 군에서 특별한 증상이 나타나지 않았으며, 체중증가도 군 간에서 차이를 보이지 않았다 (그림 63).

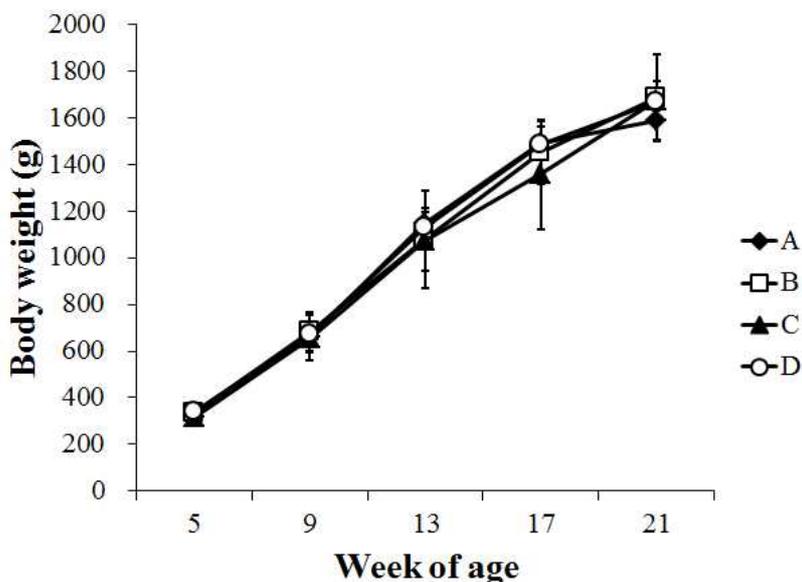


그림 63. 백신 접종 후 체중 변화

라. 면역형성 확인

(1) 샘플채취

백신 접종 전 후로 5주마다 간격으로 Heparin을 첨가한 추사기로 말초혈액 1 ml를 채혈 후 원심분리 (40 rpm, 15분, 실온) 하여 얻은 림프구는 세포성면역측정시험에 사용하였고, 혈장은 냉동보관(-20 °C) 하여 혈장 IgG 측정에 사용하였다. 분비형 IgA측정의 목적으로 다음과 같은 방법으로 소화관 세척액을 얻었다(Berthelot-Herault et al., Vet Immunol Immunopathol, 2003). 즉, 병아리를 한 마리씩 소독된 용기에 분리 수용하여 Lavage solution (48.5 mM polyethylene glycol, 40 mM Na₂SO₄, 20 mM NaHCO₃, 10 mM KCl, 25 mM NaCl)을 경구적으로 12 ml/kgBW(body weight)씩 투여하고 30분 후 pilocarpine을 13 mg/kgBW (BW<300 g의 경우 20mg/kgBW) 의 용량으로 근육 주사하였다. 다시 30분 후 배출된 소화관 세척액과 5 ml의 STI/EDTA solution (0.1 mg soybean trypsin inhibitor in 50 mM EDTA, pH 8.0)을 잘 혼합하여 회수하여, 원심분리

를 한 후 (700 ×g, 10분, 4 °C) 상청액 1 ml을 얻었다. 분리한 상청액 1ml에 100 mM PMSF, 1% Sodium azide, 5% BSA(bovine serum albumin)를 각각 1 ml당 10 µl씩 첨가하고 -20 °C에 보관하여 ELISA의 sample로 사용하였다.

(2) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

특이면역 정량을 위해 Outer Membrane Protein (OMP) fraction을 야외균주 JOL420에서 정제하여 ELISA에서의 항원으로 사용하였다. 준비한 OMP 항원을 flat-bottom 96 well high binding ELISA plate (Greiner, Germany)에 흡착시켜서 chicken IgG (또는 IgA) ELISA quantitation kit (Bethyl, TX, USA)를 사용하여 사용설명서를 따라서 실시하였다. 즉, 10% Skim milk로 비특이반응을 blocking한 다음 sample을 적절하게 희석하여 반응시키고 HRP (horse radish peroxidase)로 표지된 2차 항체를 결합시키는 indirect ELISA를 실시하였다. 백신 접종 후 혈장 IgG 농도와 소화기 세척액내 sIgA의 농도를 그림 64에 나타내었다. 혈장 IgG의 경우에는 모든 실험군이 대조군에 비해 유의적으로 월등한 증가를 보였고, 소화관 내 sIgA 측정 결과는 1차와 2차 백신 접종 후 3주째에 A군에서 대조군의 측정값에 대해 유의적인 증가를 보였고, 다른 실험군인 B군과 C군에서는 대조군과 비교하여 유의적인 증가를 보이지 않았다 (그림 64).

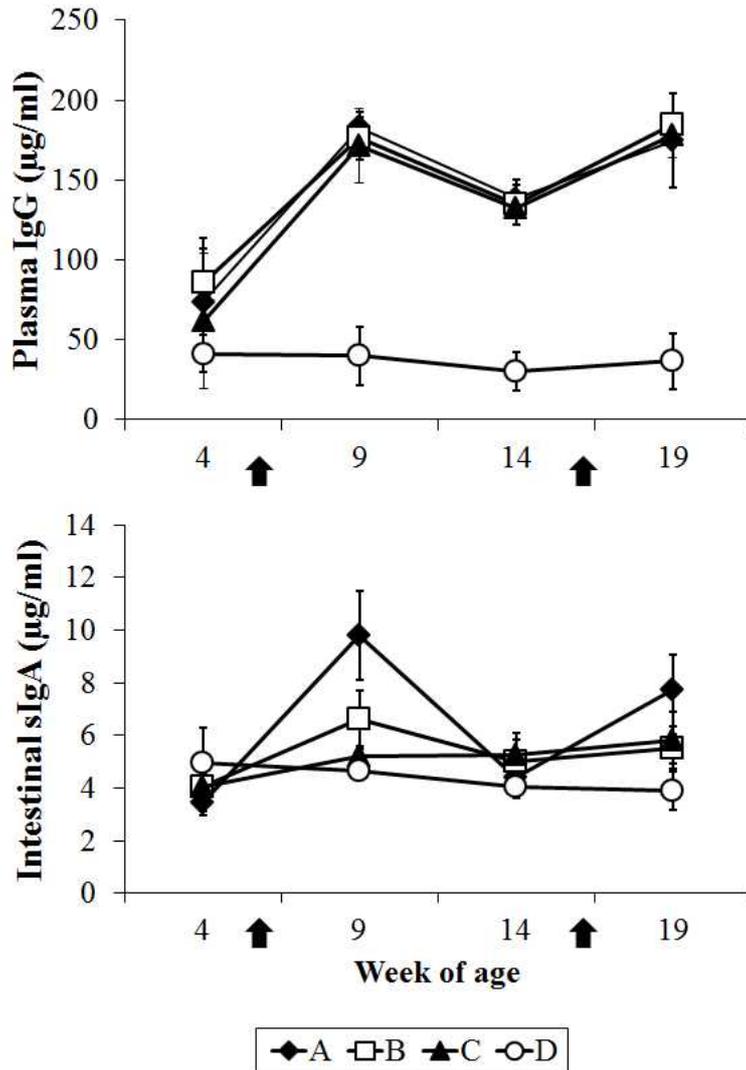


그림 64. 백신 접종 후 혈장 IgG와 소화관 세척액 sIgA 농도

(3) 세포성면역 측정

1차와 2차 백신 접종 후 3주째에 세포성 면역 측정을 위해 말초 혈액의 림프구를 이용한 lymphocytes proliferation assay (LPA)를 실시하였다. 원심분리 (40 rpm, 15분, 실온) 한 후 얻은 림프구를 Trypan blue exclusion test로 살아있는 세포수를 계산한 다음 RPMI 1640 complete medium (송아지 혈청 및 항균항진균제 포함)에 부유시켜 1×10^5 cfu/100µl/well 가 되게 96-well plate 에 분주하였고, *S. Gallinarum* soluble antigen과 함께 72시간 동안 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. wild-type SG에서 soluble antigen은 방법은 다음과 같다. 즉, 200 ml의 배양액을 원심 분리하여 pellet 을 얻는다. PBS로 2회 세척 후 40 ml PBS에 재부유시켜 freeze-thaw를 3 번 반복한다. 이 용액을 sonication 후 4,250 ×g, 4 °C에서 20분 동안 원심 분리하여 얻은 상청액을 또 다시 30,000 ×g, 4 °C에서 20분 동안 원심 분리하여 상청액을 회수하여 농도를 측정한다.

LPA에서 CO₂ incubator에서 72시간 동안 림프구를 배양한 후 광학현미경으로 림프구의 상태를 관찰하고, Lonza사의 ViaLight[®] Plus Kit를 사용하여 Luminescence assay를 실시하였다. Stimulation Index (SI)를 다음과 같이 계산하여 백신 접종군에서 세포성면역이 유도되었는지 확인하였다. 1차와 2차 백신 접종 후 3주째에 모두 A군에서 가장 높은 SI 수치를 나타내었고, 대조군과 비교 할 때, 모든 실험군에서 유의성있는 증가를 보였다 (그림 65).

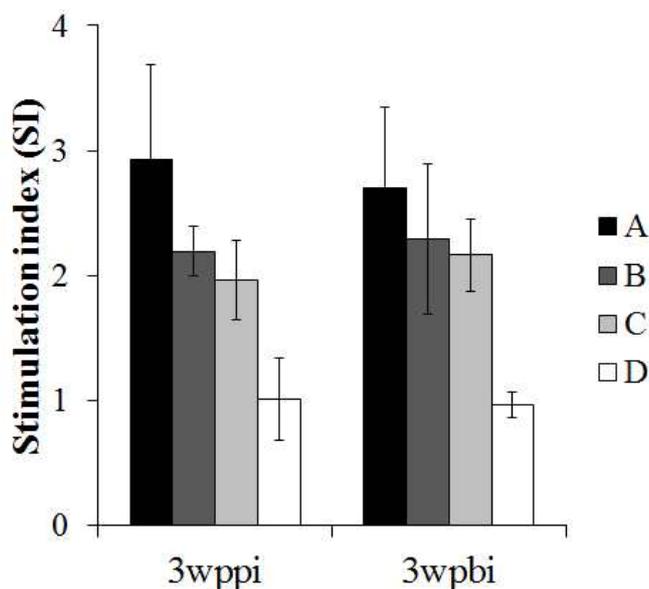


그림 65. 1차와 2차 백신 접종 후 3주째 세포성면역 반응

마. 산란시기에서 JOL1229 백신의 안전성 평가

(1) 산란율 측정

백신 접종 후 산란시기에서의 JOL1229 균주의 안전성을 평가하기 위해 산란율을 조사 하였다. 각 군의 모든 개체가 산란을 시작하였던 22주령부터 4주 동안 1주일 간격으로 산란율을 계산하였다. 산란율의 계산은 다음의 식을 사용하였다.

$$7\text{일 동안의 산란율 (\%)} = (7\text{일간 산란된 계란의 총 개수}) \times 100 / (\text{개체 수} \times 7\text{일})$$

22주령부터 25주령까지의 산란율은 모든 군에서 90~95% 사이로 군 간의 큰 차이를 보이지 않았다 (그림 66).

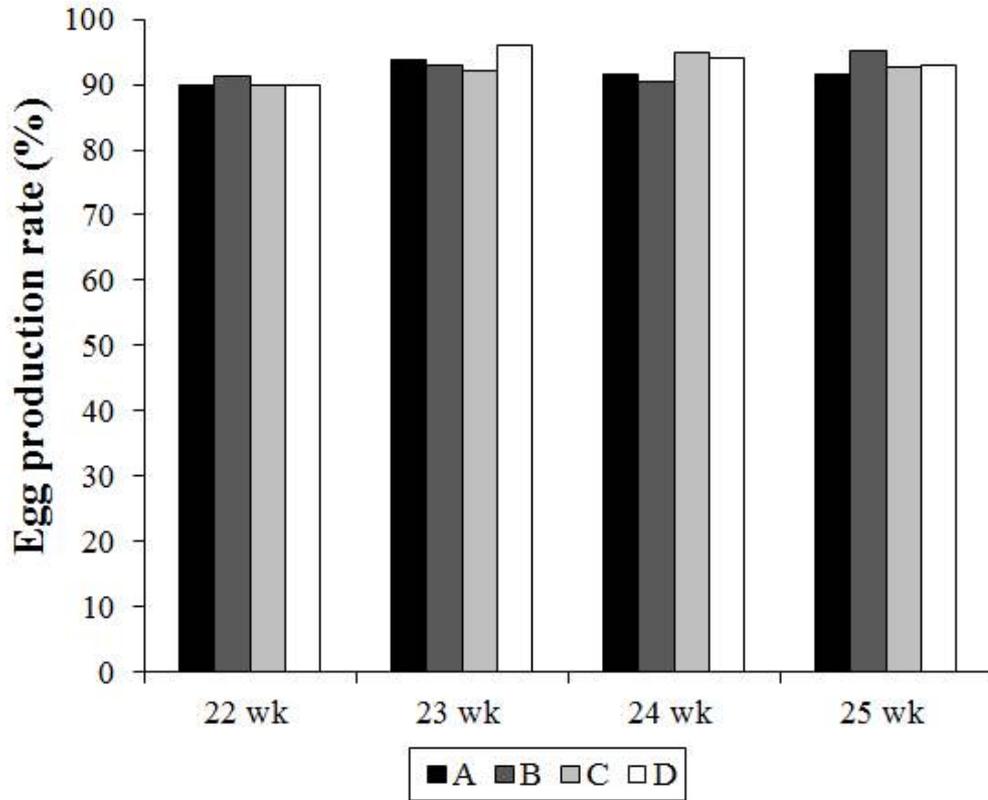


그림 66. 22주령이후 4주간 산란율 측정

(2) 계란 오염 검사

산란개시 후 JOL1229 균주의 계란으로의 이행 여부를 검사하기 위해 A군에서 처음 산란이 시작된 날부터 4주 동안 계란 오염 검사를 실시하였다 (Gantois et al., Vaccine, 2006). 수거한 계란에 난각 외부에 묻어있는 분변 등의 이물질은 소독용 알콜로 제거한 후, 95% 알콜에 1분간 담가 외부를 소독하고, 멸균적으로 난각을 깬 다음 계란의 모든 내용물을 멸균된 비커에 넣고 균질화시킨다. 한 개의 비커에 1~6개의 계란을 함께 넣어서 한 묶음(batch)으로 만든다. 계란 한개당 40 ml의 BPW를 첨가한 후 37 °C, 24 시간 동안 incubator에 배양하고, 증균배양을 위해 배양된 샘플을 Rappaport-Vassiliadis R10 broth (Becton, Dickinson and Company, France)에 1/100 volume 접종하여 42 °C에서 48시간 배양 후 BGA에서 *Salmonella*의 colony 출현 유무를 확인하였다. 산란의 시작된 날부터 모든 계란 오염 검사에서 JOL1229 균주는 검출되지 않았다.

바. 결론

본 실험은 실제 농장에 적용할 수 있게 하기 위해 실시한 장기 임상 실험으로서 6주령과 16주령에 백신접종을 2회 실시하여 산란개시 후 4주째까지 실험을 진행하였으며, 면

역반응 측정과 백신 접종 후 임상증상 관찰 및 체중을 측정하였다. 또한 실제 농장에서 중요시되는 산란율 평가와 함께 공중보건학적으로 중요하게 여겨지는 백신 균주의 계란 오염 검사를 실시하여 산란시기까지의 JOL1229 백신 접종의 안전성을 평가 하였다. 6주령과 16주령에 각각 백신균주 JOL916에 면역강화균주 JOL1229를 혼합하여 경구 접종한 A군과 JOL916 균주를 피하 접종한 B군, 그리고 상업용 가금티푸스 백신인 SG 9R (JOL966) 균주는 피하 접종한 C군과 PBS를 접종한 대조군으로 구성하였다. 면역 반응 측정 결과, A군과 B군에서 소화관 내 sIgA 농도 측정 결과와, 세포매개 반응 측정결과가 높은 수치로 나타났으며, 혈액 내 IgG 농도는 비슷한 것으로 측정 되었다. 또한 모든 개체가 산란을 시작한 후 산란율은 모든 실험군에서 대조군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았으며, 산란 개시 후 4주동안 JOL1229 균주의 계란 오염 검사에서는 모두 음성을 나타내었다. 따라서 경구용 가금티푸스 예방 백신 조성물의 접종은 충분한 면역 반응을 유도하였으며, 산란 시기까지도 계란으로 이행되지 않으면서 산란율은 정상적인 수치를 보였으므로 면역강화 균주인 JOL1229 균주를 이용한 경구용 백신 조성물은 실제 농장에서도 충분히 안전하고 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 연도	연구개발의 목표	연구개발의 달성도	관련분야의 기술발전예의 기여도
1차 연도 2009년도	<ul style="list-style-type: none"> -백신균주(JOL916) 제작 -JOL916 적합성 평가 -시험백신 제조 -시험백신의 일반시험 -JOL916 접종조건 탐색 -영양요구성 백신후보균주 (JOL969, JOL971) 제작 	<ul style="list-style-type: none"> -lon 및/또는 cpxR을 결실시킨 변이균주들을 제작하여 변이균주의 백신균주 적합성을 in vitro 및 in vivo에서 평가하여 긍정적 결과를 얻음 -상용화 검토를 위한 시험백신 제조 및 일반시험 수행 -영양요구성의 더욱 완벽한 안전성을 추구하는 백신후보균주 제작 	<ul style="list-style-type: none"> -해당 유전자 결실이 Salmonella Gallinarum의 병원성기전에 주는 영향에 관한 학술적 지식을 제공 -병원성의 약독화와 면역원성 발현을 확인하여 백신후보균주 제공 -유전자 변이균주의 시험백신의 일반적 특성을 밝혀내어 향후 다른 변이균주를 고려할 경우 참고할 수 있다. -숙주 체내에서 생존이 불가능한 안전성을 지닌 새로운 개념의 백신화로 학술적 지식을 제공
2차 연도 2010년도	<ul style="list-style-type: none"> -JOL916 접종조건 탐색 -JOL916 안전성 평가 -JOL916 방어력 평가 -시험백신(JOL916) 면역원성 및 방어력 평가 -시험백신 장기사육 농장 시험 -시험백신 제조 -시험백신 일반시험 및 안전성 시험 -영양요구성 백신후보균주(JOL969, JOL971) 적합성 시험 -면역강화균주(JOL1229) 제작 -JOL1229 접종조건 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> -사균/생균 형태로 접종하는 경우 효능을 밝혀냄 -생균접종 시 경구접종/비경구접종으로 효능의 차이를 밝혀냄 -백신후보균주의 안전성을 병리해부학적 소견과 세균학적 수법으로 평가 -백신후보균주의 방어력을 음성/양성 대조군과 비교하여 자세히 비교 평가함 -시험백신 형태로 방어력을 평가 -장기적 농장실험 시작 -시험백신의 제조 및 일반/만전 시험 수행 -영양요구균주 적합성을 평가 -면역강화균주 제작 및 접종조건 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> -접종조건별 효능 차이를 향후 참고할 수 있음 -가금티푸스 백신 및 인공감염 시 건강상태 평가수법이 세련되어 있어 향후 참고할 수 있음 -영양요구균주의 면역유도력과 방어력에 관한 지견은 향후 백신 개발사업에서 참고할 만 하다. -또 하나의 백신후보균주로서 면역강화균주를 얻음 -면역강화균주의 면역 및 방어에 관한 결과는 향후 백신개선 개발에서 참고할 수 있다.

<p>3차 연도 2011년도</p>	<p>-JOL916 기존백신과 성능 비교 -JOL916 어린 병아리에 적용 가능성 평가 -시험백신 장기사육 농장 시험 및 2차 접종 시기 결정 -JOL1229 의 산란계 적용 시험</p>	<p>-기존백신 SG9R과 안전성 및 방어력을 비교 -어린 병아리에서 JOL916의 적용가능성을 평가 -장기적 농장시험에서 부작용 유무 및 안전성, 방어력을 평가함 -면역강화균주를 산란계에 적요하기 위한 중/장기 시험 실시</p>	<p>-SG9R과의 비교실험은 세계적 가금티푸스 백신개발 영역에서 참고할 만 하다. -어린 병아리에서 백신접종 시 주령별 반응의 특성을 참고할 수 있음. -실제 농장에서와 비슷한 환경 및 조건에서 중/장기적 실험으로 얻은 결과는 백신개발연구에서 참고할 만 함.</p>
-------------------------	--	--	---

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 기술양도 및 산업화 계획

본 연구에서 제작 및 적합성 평가한 백신후보균주들 (JOL916, JOL969, JOL971, JOL1229)는 각각에 가치들이 있다. JOL916은 안전성과 방어력이 우수한 유전적 배경이 명확한 변이균주로서 야외농장에서의 임상시험 허가를 받게 되면 복수의 농장에서 시험한 후에 실용화를 목표로 한다.

특히 **JOL916**에 관련된 연구 성과물은 기업부담금을 부담하여 본 세부과제를 성실하게 진행한 (주)중앙백신연구소와 기술양도계약서를 체결하여 **기술이전 (이전료: 68,000,000 원)**을 완료하였다.

JOL969 및 JOL971는 방어력이 떨어지지만 숙주에 접종 후 생존능력이 없는 균주들로 안전성을 더욱 강조하여야 할 경우에 보조적으로 사용할 수 있다.

JOL1229는 경구접종으로도 강한 방어면역을 유도함으로 더욱 편리하게 음수혼합 등의 방법으로 접종이 가능하여, 실용화를 목표로 한다.

2. 교육지도 홍보 등 기술확산 계획 등

본 연구를 통하여 얻은 가금티푸스 백신접종 및 인공감염 시에 나타나는 임상소견, 병리소견, 세균계수, 체중증가, 면역 반응 등 의 수많은 관찰결과는 현재 SG9R 접종 시 일어나는 부작용 형상이나 감염사례를 이해하는 데 도움이 되고, 가금티푸스 조기 제압에 도움이 된다. 향후 교육, 지도, 홍보 활동을 통하여 얻은 지식을 알림으로 가축방역에 이바지한다.

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보 계획 등

가. 특허출원

발명의 명칭	출원번호 (등록번호)	출원일자 (등록일자)	비고
살모넬라 변이균주를 포함하는 가금티푸스 예방용 백신 조성물	10-2009-0073973 (10-1146372)	2009.08.11. (2012.05.08)	국내 특허 (A)
살모넬라 변이균주를 포함하는 가금티푸스 예방용 백신 조성물	10-2009-0105152 (10-1146372)	2009.11.02. (2012.05.08)	국내 특허 (A') (A 의 분할특허)
살모넬라 변이균주를 포함하는 가금티푸스 예방용 백신 조성물	PCT/KR2010/003233	2010.05.24.	국제 특허
생물형 면역증강제를 이용한 경구용 가금티푸스 백신 조성물	10-2012-0032579	2012.03.29	국내 특허

나. 균주기탁

KCTC번호	Specification	기탁기관	JOL번호
KCTC 11539BP	Salmonella enterica serovar Gallinarum	Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)	JOL916
KCTC 12150BP	Salmonella enterica serovar Gallinarum	Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)	JOL1229

다. 학술논문

본 연구개발 사업을 수행한 결과물로 현재까지 다음 7편이 SCI급국제학술논문에 게재되었다.

Title	Journal	Year	Vol	Authors (특기사항)
Avian colibacillosis caused by an intestinal pathogenic Escherichia coli isolate from calf diarrhea	Research in Veterinary Science	2010	89	Matsuda et al. (JCR 상위 20% 이내 SCI 지)
Physiology, pathogenicity and immunogenicity of <i>lon</i> and/or <i>cpxR</i> deleted mutants of <i>Salmonella</i> Gallinarum as vaccine candidates for fowl typhoid	Veterinary Research	2010	41	Matsuda et al. (JCR 상위 1% 이내 SCI 지)
Safety and efficacy of a virulence gene-deleted live vaccine candidate for fowl typhoid in young chickens	Avian Pathology	2011	40	Matsuda et al. (JCR 상위 20% 이내 SCI 지)
Construction of a conditional lethal <i>Salmonella</i> mutant via genetic recombination using the <i>ara</i> system and <i>asd</i> gene	Journal of Microbiological Methods	2011	87	Kim et al.
Evaluation of safety and protection efficacy on <i>cpxR</i> and <i>lon</i> deleted mutant of <i>Salmonella</i> Gallinarum as a live vaccine candidate for fowl typhoid	Vaccine	2011	29	Matsuda et al. (2009년 JCR 상위 1% 이내 SCI 지)
Comparison of the safety and efficacy of a new live <i>Salmonella</i> Gallinarum vaccine candidate, JOL916, with the SG9R vaccine in chickens	Avian Disease	2011	55	Matsuda et al. (JCR 상위 20% 이내 SCI 지)
Safety evaluation and immunogenicity of arabinose-based conditional lethal <i>Salmonella</i> Gallinarum mutant unable to survive ex vivo as a vaccine candidate for protection against fowl typhoid	Avian Disease	2011	55	Chaudhari et al. (JCR 상위 20% 이내 SCI 지)

4. 추가연구, 타 연구에 활용 계획

본 연구 접근방법, 실험방법, 그리고 관찰된 결과를 기반으로 더욱 발전된 백신조성물을 개발연구 해 나갈 것이다. 특히 본 연구개발 사업을 진행함에 있어 야외논장 임상시험 허가를 받는 부분이 어려웠다. 이는 JOL916이 생균백신이 때문에 생기는 어려움이기도 하였다. 해외에서는 유전자 변이 미생물뿐만 아니라 유접자변이 애완동물까지 허용되고 판매 중에 있는데, 변이균주에 대한 인식은 나라마다 차이가 있다. 본 연구에서는 일반 생균백신 보다 더욱 안전한 유전적 배경을 지닌 영양요구성 변이균주를 제작 시험하였지만 실용화단계에 이르지 못하였으며, 향후 유전자 변이균주에 대한 인식이 보수적인 나라나 지역에서도 안심하여 수용할 수 있는 정도로 안전한 백신을 더욱 지향하려고 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당 없음

제 7 장 참고문헌

- Barrow P.A., Immunity to experimental fowl typhoid in chickens induced by a virulence plasmid-cured derivative of *Salmonella gallinarum*, *Infect. Immun.* (1990) 58:2283-2288.
- Barrow P.A., Huggins M.B., Lovell M.A., Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system, *Infect. Immun.* (1994) 62:4602-4610.
- Basnet H.B., Kwon H.J., Cho S.H., Kim S.J., Yoo H.S., Park Y.H., et al, Reproduction of fowl typhoid by respiratory challenge with *Salmonella Gallinarum*, *Avian Dis.* (2008) 52:156-159.
- Boddicker J.D., Ledebor N.A., Jagnow J., Jones B.D., Clegg S., Differential binding to and biofilm formation on, HEp-2 cells by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is dependent upon allelic variation in the *fimH* gene of the *fim* gene cluster, *Mol. Microbiol.* (2002) 45:1255-1265.
- Boddicker J.D., Jones B.D., Lon protease activity causes down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells, *Infect. Immun.* (2004) 72:2002-2013.
- Bouzoubaa K., Nagaraja K.V., Kabbaj F.Z., Newman J.A., Pomeroy B.S., Feasibility of using proteins from *Salmonella gallinarum* vs. 9R live vaccine for the prevention of fowl typhoid in chickens, *Avian Dis.* (1989) 33:385-391.
- Christensen J.P., Barrow P.A., Olsen J.E., Poulsen J.S., Bisgaard M., Correlation between viable counts of *Salmonella Gallinarum* in spleen and liver and the development of anaemia in chickens as seen in experimental fowl typhoid, *Avian Pathol.* (1996) 25:769-783.
- Crichton P.B., Yakubu D.E., Old D.C., Clegg S., Immunological and genetical relatedness of type-1 and type-2 fimbriae in salmonellas of serotypes Gallinarum, Pullorum and Typhimurium, *J. Appl. Bacteriol.* (1989) 67:283-291.
- Crouch S.P., Kozlowski R., Slater K.J., Fletcher J., The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* (1993) 160:81-88.
- Danese P.N., Pratt L.A., Kolter R., Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture, *J. Bacteriol.* (2000) 182:3593-3596.
- Dorel C., Lejeune P., Rodrigue A., The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? *Res. Microbiol.* (2006) 157:306-314.
- Duguid J.P., Anderson E.S., Campbell, Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *J. Pathol. Bacteriol.* (1966) 92:107-138.
- Gogal R.M. Jr, Ahmed S.A., Larsen C.T., Analysis of avian lymphocyte proliferation by a new, simple, nonradioactive assay (lympho-pro), *Avian Dis.* (1997) 41:714-725.

- Griffin H.G., Barrow P.A., Construction of an *aroA* mutant of *Salmonella* serotype Gallinarum: its effectiveness in immunization against experimental fowl typhoid, *Vaccine* (1993) 11:457–462.
- Higgins S.E., Erf G.F., Higgins J.P., Henderson S.N., Wolfenden A.D., Gaona-Ramirez G., Hargis B.M., Effect of probiotic treatment in broiler chicks on intestinal macrophage numbers and phagocytosis of *Salmonella enteritidis* by abdominal exudate cells, *Poult. Sci.* (2007) 86:2315–2321.
- Jeong J.H., Song M., Park S.I., Cho K.O., Rhee J.H., Choy H.E., *Salmonella enterica* serovar gallinarum requires ppGpp for internalization and survival in animal cells, *J Bacteriol.* (2008) 190:6340–6350.
- Jones M.A., Wigley P., Page K.L., Hulme S.D., Barrow P.A., *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens, *Infect. Immun.* (2001) 69:5471–5476.
- Kang H.Y., Dozois C.M., Tinge S.A., Lee T.H., Curtiss R. 3rd., Transduction-mediated transfer of unmarked deletion and point mutations through use of counterselectable suicide vectors, *J. Bacteriol.* (2002) 184:307–312.
- Kang H.Y., Srinivasan J., Curtiss R. 3rd., Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine, *Infect. Immun.* (2002) 70:1739–1749.
- Kim S.W., Moon K.H., Baik H.S., Kang H.Y., Kim S.K., Bahk J.D., et al., Changes of physiological and biochemical properties of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by deletion of *cpxR* and *lon* genes using allelic exchange method, *J. Microbiol. Methods* (2009) 79:314–320.
- Ledeboer N.A., Jones B.D., Exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on HEP-2 cells and chicken intestinal epithelium, *J. Bacteriol.* (2005) 187:3214–3226.
- McEwen J., Silverman P., Genetic analysis of *Escherichia coli* K-12 chromosomal mutants defective in expression of F-plasmid functions: identification of genes *cpxA* and *cpxB*, *J Bacteriol.* (1980) 144:60–67.
- Matsui H., Suzuki M., Isshiki Y., Kodama C., Eguchi M., Kikuchi Y., et al., Oral immunization with ATP-dependent protease-deficient mutants protects mice against subsequent oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar typhimurium, *Infect. Immun.* (2003) 71:30–39.
- Nakayama S., Watanabe H., Identification of *cpxR* as a positive regulator essential for expression of the *Shigella sonnei virF* gene, *J. Bacteriol.* (1998) 180:3522–3528.
- Nakayama S., Kushiro A., Asahara T., Tanaka R., Hu L., Kopecko D.J., Watanabe H., Activation of *hilA* expression at low pH requires the signal sensor *CpxA*, but not the cognate response regulator *CpxR*, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Microbiology* (2003) 149:2809–2817.

- Paulsen I.T., Beness A.M., Saier M.H. Jr, Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalysing export of complex carbohydrates in bacteria, *Microbiology* (1997) 143:2685-2699.
- Pomeroy B.S., Nagaraja K.V., Fowl Typhoid, in: Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., Reid W.M., Yoder Jr H.W. (Eds.), *Diseases of Poultry*, Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1991, pp. 87-99.
- Qureshi M.A., Dietert R.R., Bacon L.D., Genetic variation in the recruitment and activation of chicken peritoneal macrophages, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1986) 181:560-568.
- Rana N., Kulshreshtha R.C., Cell-mediated and humoral immune responses to a virulent plasmid-cured mutant strain of *Salmonella enterica* serotype gallinarum in broiler chickens, *Vet. Microbiol.* (2006) 115:156-162.
- Rahn A., Drummelsmith J., Whitfield C., Conserved organization in the *cps* gene clusters for expression of *Escherichia coli* group 1 K antigens: relationship to the colanic acid biosynthesis locus and the *cps* genes from *Klebsiella pneumoniae*, *J. Bacteriol.* (1999) 181:2307-2313.
- Reed I.J., Muench H., A simple method of estimating fifty percent endpoints, *Am. J. Hyg.* (1938) 27:493-497.
- Robitaille G., Moineau S., St-Gelais D., Vadeboncoeur C., Britten M., Detection and quantification of capsular exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* using lectin probes, *J. Dairy Sci.* (2006) 89:4156-4162.
- Rosu V., Chadfield M.S., Santona A., Christensen J.P., Thomsen L.E., Rubino S., Olsen J.E., Effects of *crp* deletion in *Salmonella enterica* serotype Gallinarum, *Acta Vet. Scand.* (2007) 49:14.
- Shah D.H., Lee M.J., Park J.H., Lee J.H., Eo S.K., Kwon J.T., Chae J.S., Identification of *Salmonella gallinarum* virulence genes in a chicken infection model using PCR-based signature-tagged mutagenesis, *Microbiology* (2005) 151:3957-3968.
- Shah D.H., Shringi S., Desai A.R., Heo E.J., Park J.H., Chae J.S., Effect of *metC* mutation on *Salmonella* Gallinarum virulence and invasiveness in 1-day-old White Leghorn chickens, *Vet. Microbiol.* (2007) 119:352-357.
- Smith H.W., The use of live vaccines in experimental *Salmonella gallinarum* infection in chickens with observation on their interference effect, *J. Hygiene* (1956) 54:419-432.
- Takaya A., Suzuki M., Matsui H., Tomoyasu T., Sashinami H., Nakane A., Yamamoto T., Lon, a stress-induced ATP-dependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection of mice, *Infect. Immun.* (2003) 71:690-696.
- Takaya A., Tomoyasu T., Tokumitsu A., Morioka M., Yamamoto T., The ATP-dependent lon protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium regulates invasion and expression of genes carried on *Salmonella* pathogenicity island 1, *J. Bacteriol.* (2002) 184:224-232.
- Torres-Cabassa A.S., Gottesman S., Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is

- regulated by proteolysis, *J. Bacteriol.* (1987) 169:981–989.
- Tsilibaris V., Maenhaut-Michel G., Van Melderen L., Biological roles of the Lon ATP-dependent protease, *Res. Microbiol.* (2006) 157:701–713.
- Wigley P., Hulme S.D., Bumstead N., Barrow P.A., In vivo and in vitro studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by the *SALI* locus, *Microbes Infect.* (2002) 4:1111–1120.
- Wigley P., Hulme S., Powers C., Beal R., Smith A., Barrow P., Oral infection with the *Salmonella enterica* serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterise immunity to fowl typhoid in the chicken, *BMC Vet. Res.* (2005) 1:2.
- Wilson R.L., Elthon J., Clegg S., Jones B.D., *Salmonella enterica* serovars gallinarum and pullorum expressing *Salmonella enterica* serovar typhimurium type 1 fimbriae exhibit increased invasiveness for mammalian cells, *Infect. Immun.* (2000) 68:4782–4785.
- Wolfe A.J., Parikh N., Lima B.P., Zemaitaitis B., Signal integration by the two-component signal transduction response regulator CpxR, *J. Bacteriol.* (2008) 190:2314–2322.
- Yamamoto K., Hirao K., Oshima T., Aiba H., Utsumi R., Ishihama A., Functional characterization *in vitro* of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* (2005) 280:1448–1456.
- Zhang-Barber L., Turner A.K., Dougan G., Barrow P.A., Protection of chickens against experimental fowl typhoid using a *nuoG* mutant of *Salmonella* serotype Gallinarum, *Vaccine* (1998) 16:899–903.

주 의

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