

최 종 보 고 서

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001352-01

수지상세포의 Toll-like receptor
활성화 유도기술을 응용한 차세대 돼지
마이코플라즈마 폐렴 제어기술 개발

(Development of new swine mycoplasma vaccine using the activation
of Toll-like receptors on dendritic cells)

주관연구기관 : 강원대학교 산학협력단

농림수산식품자료실



0009512

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “수지상세포의 Toll-like receptor 활성화 유도기술을 응용한 차세대 돼지 마이코플라즈마 폐렴 제어기술 개발에 관한 연구” 의 보고서로 제출합니다.

2012 년 04 월 일

주관연구기관명 : 강원대학교
주관연구책임자 : 한 태 욱
세부연구책임자 : 한 태 욱
연 구 원 : 최 원 종
연 구 원 : 아비히지트바레히트
연 구 원 : 홍 은 진
연 구 원 : 장 규 성
협동연구기관명 : 제주대학교
협동연구책임자 : 주 홍 구
연 구 원 : 변 윤 영
연 구 원 : 고 은 주
협동연구기관명 : (주)중앙백신연구소
협동연구책임자 : 김 은 희
연 구 원 : 최 환 원
연 구 원 : 원 호 근
연 구 원 : 이 현 숙
연 구 원 : 백 필 수
연 구 원 : 민 선 영

요 약 문

I. 제 목

수지상세포의 Toll-like receptor 활성화 유도기술을 응용한 차세대 돼지 마이코플라즈마 폐렴 제어기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

양돈의 호흡기 전염병중 원발성 요인의 하나인 돼지 마이코플라즈마성 폐렴의 원인균인 *Mycoplasma hyopneumoniae*와 최근 돼지 마이코플라즈마성 폐렴의 새로운 병원체로 인식되고 있는 *Mycoplasma hyorhinis*를 예방하기 위해 주요 항원제시세포인 수지상 세포를 활성화 시키는 기술을 접목하여 현재 사용 중인 예방백신보다 방어효과가 월등히 뛰어난 새로운 개념의 돼지 마이코플라즈마성 폐렴의 예방기술을 개발하고자 함. 이를 통해 양돈산업에서 큰 경제적 피해를 일으키고 있는 돼지 호흡기 전염병을 제어하여 양돈농가의 소득을 증대시키고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 돼지 마이코플라즈마성 폐렴을 예방하기 위하여 수지상 세포를 활성화시키기 위한 기술을 접목한 새로운 *Mycoplasma hyopneumoniae*의 불활화 백신의 개발
- *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 수지상세포를 활성화시킬 수 있는 agonist의 탐색 및 기전 연구
- 돼지 호흡기 전염병의 새로운 병원체로 인식되고 있는 *Mycoplasma hyorhinis*의 돼지 호흡기 전염병에 대한 분포조사 및 불활화 백신균주의 확보
- *Mycoplasma hyorhinis*를 예방하기 위한 수지상 세포를 활성화시키기 위한 기술을 접목한 *M. hyorhinis*의 불활화 백신의 개발
- *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 이가 백신의 개발(당초계획에서 삭제)
- *M. hyopneumoniae*의 major adhesin P97의 재조합 단백질을 발현 및 효능검사(새로 추가된 계획)

IV. 연구개발결과

본 연구에서 1단계로 국내에서 마이코플라즈마폐렴의 피해조사를 관찰하기 위해 도축

돈에서의 마이코플라즈마 폐병변에서 균분리를 실시하였다. 총 36개의 농장에서 사육된 폐병변이 관찰된 총 370두의 돼지에에서 폐조직을 적출하여 Mycoplasma를 분리하였다. 이 과정중 최종 진단을 위해 *M. hyopneumoniae*(Mhp)와 *M. hyorhinis*(Mhr)을 동시에 진단할 수 있는 multiplex PCR(M-PCR)을 개발하였다. 새로 개발된 M-PCR은 Mhp가 430bp, Mhr이 346bp의 PCR product가 증폭되어 두 product간의 크기 차이가 100bp미만으로 효율적으로 두 병원체를 검출할 수 있고 또한 예민도에 있어서 Mhp의 경우 0.01cc (color change unit)(125fg DNA), Mhr의 경우 0.1ccu(65fg DNA)까지 검출되어 기존의 M-PCR보다 특이성은 동일하고 예민도는 최소 10배 이상 높았다. 개발된 M-PCR kit는 국내 진단회사에서 시제품이 완성되어 시판계획이 예상된다. 폐병변에서의 균분리율을 보면 총 370개의 재료에서 Mhp가 14%, Mhr이 10%, 두 가지 모두 감염된 경우가 5%를 차지하는 것으로 나타났다. 농장의 감염률을 볼 때 36개의 농장 중 34개의 농장에서 마이코플라즈마가 분리되어 94.4%의 감염률을 보였다.

백신균주를 선별하기 위해서는 Mhp의 경우 병원성을 분류를 할 필요가 있다. 현재까지 알려진 Mycoplasma의 병원성 측정은 SPF돼지 또는 CDCD 돼지에 접종한 후 폐병변, 임상 증상을 분리하는 것이 유일한 방법이고 *In vitro*에서는 adherence측정하는 방법이 있다. 즉 부착성이 높을수록 병원성이 높은 것으로 알려져 왔다. 따라서 본 연구에서는 Mhp분리주를 대상으로 micotiter plate adherence assay(MPAA)를 실시했으나 특별한 유의적인 차이는 관찰할 수 없었다. 또한 최근 *In vitro* adhesin assay(MPAA) 정도와 돼지에서의 병원성과는 상관관계가 없음이 최근 보고 되었다.

In vitro 에서의 병원성 분리주를 감별하기 위해 SDS-PAGE를 실시한 후 silver staining을 실시하여 181kDa의 밴드의 유무를 확인한 결과 일부의 균주에서 181 kDa의 밴드가 있는 균주를 확인하여 고병원성 Mhp균주로 분류하였다. 이와 유사하게 random amplified polymorphic DNA(RAPD)를 실시하여 5kbp크기의 밴드가 검출되는 균주가 고병원성이라는 보고가 있어 이와 유사하게 시도를 했으나 동일한 크기의 밴드가 관찰되는 분리주를 검출하지 못했다.

Mhp의 분리주의 protein profile의 분석한 결과, 표준균주인 J strain과 국내분리주를 비교한 결과 최대 25.3%의 단백질의 다양성이 관찰되었고 분리주간에는 22.2%의 다양성을 보였다. 또한 동일농장에서 분리된 분리주의 경우에도 다양성이 관찰되는 것으로 나타났다.

Mhr의 경우 특별한 병원성을 분류하는 방법은 돼지 접종의외의 방법은 없다. 따라서 분리주에 대한 protein profile을 실시하여 대표적인 protein profile을 보이는 균주를 백신 후보균주로 선정하고자 실시하였다. 표준주인 Mhr 27717주와 비교한 결과 44.9%의 다양성이 보였고 분리주간에는 최대 34.2%의 다양성을 보였다. 이는 Mhp분리주간의 다양성보다는 다소 높은 것으로 나타났다. 동일한 농장에서 분리한 분리주간에도 Mhp와 마찬가지로

약간의 다양성이 관찰되었다.

RAPD를 실시하여 유전형을 분석한 결과 Mhp의 경우 표준주인 J주와 국내분리주간에는 35.5%의 다양성을 나타내고 있었고 이는 protein profile결과와 일치하지 않는 것으로 나타났다. 또한 병원성을 기준으로 clustering도 나타나지 않았다. Mhr의 경우 표준주 Mhr 27717주와 분리주간의 비교한 결과 37.7%의 다양성을 나타냈다. 마찬가지로 protein profile과 RAPD에 의한 분류는 100%일치하지 않았다.

불활화백신균주는 증식성에 있어서 일단 고역가를 나타내야 경제성이 있다. 또한 최근에는 폐병변에서 분리한 분리주의 증식성이 높을수록 병원성이 높다는 보고가 있었다. 따라서 국내분리주를 대상으로 역가(color change unit: ccu)를 P0(분리후 바로 측정)와 P5(분리 후 5번계대배양 후 측정)에서 측정하였다. Mhp의 경우 대부분의 고병원성주가 10^7 ccu이상의 역가를 나타내 기존의 보고와 일치하였다. 일부의 경우 P5에서는 급격히 역가가 감소되는 균주가 있었다. 반대로 P0에서는 역가가 낮았다가 P5에서는 급격히 상승되는 균주도 일부 있었다. 백신균주의 선발은 고병원성주로 분류된 분리주중 P0와 P5에서 모두 높은 역가를 나타내는 균주로 선정하였고 Mhr의 경우 대표적인 protein profile과 RAPD type을 지니는 분리주 가운데 P0와 P5에서 높은 역가를 지니는 균주로 선정하였다.

Mhp의 감염기전 중 집락화를 위해 균이 섬모세포에 부착하는 adhesion이 가장 중요하고 여기에 관련된 단백질이 P97 adhesin이다. 최근의 보고에 의하면 시판화된 백신균주도 P97이 결여되어 있는 것으로 나타났다. P97은 97 kDa의 단백질인데 이중에서 섬모세포에 직접 부착되는 epitope는 R1 repeat region으로 알려져 있고 이 부위를 대장균에 발현시켜 재조합으로 만든 항원 또는 돈단독균에 이 유전자를 삽입하여 생균백신으로 접종을 했을 때 Mhp자연감염에 방어를 하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 이점에 착안해 불활화백신에 대장균에서 발현시킨 재조합 R1단백질을 첨가하여 P97항원 대한 항체 또는 특이적 세포매개성면역을 유도하고자 R1단백질을 대장균에서 발현시켰다(이 계획은 당초계획에 없었던 것으로 3차년도에 새로 삽입한 것임). R1유전자의 항원성을 높이기 위해 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)의 labile toxin유전자를 fusion시켜 재조합 LTBR1(rLTBR1) 단백질을 발현시켰다. 추출정제된 rLTBR1은 예상되는 크기의 29와 35 kDa의 크기를 나타냈고 이는 기존의 보고대로 느린 이동속도 때문으로 추측된다. rLTBR1의 양은 1L당 9.8 mg의 수율을 나타냈고 anti-6XHis단크론 항체와 anti-cholera toxin 항체를 사용한 Western blot hybridization을 통해 확인되었고 oligomer를 형성하는 것으로 확인되었다. 또한 염기서열 분석을 통해 r1유전자는 5-amino acid tandem repeat(AAKPV-E)를 11 copy가 된 것으로 확인되었다. 재조합된 단백질은 마우스에 접종후 전신항체와 anti-rR1 IgA를 측정하는 전신성 및 국소성 점막면역유도를 확인 중에 있다.

또한 당초계획에 없었던 생균백신균주 개발을 시도하여 현재 Mhr의 경우 온도감수성 변이주를 제작하여 약독화 및 온도감수성변이주의 안정성을 조사하고 있는 중이다.

일반적으로 Mycoplasma의 역가 측정은 ccu를 사용하는 이를 측정하기 위해서는 시간이 많이 필요하다. 따라서 항원량을 보다 정확하고 신속하게 측정하기 위해 정량적 real time PCR 분석방법을 개발하였다. 불활화백신균주로 선발된 5주의 Mhp의 ccu와 real time PCR의 항원정량결과를 비교한 결과 비슷하게 나와 real time PCR을 사용한 항원정량법을 개발하였다.

선발된 Mhp불활화 백신후보주 5주에 대한 돼지에서의 면역원성을 조사하였다. 불활화백신주를 불활화시킨 후 10^8 CCU/ml용량이 되게 오일 adjuvant와 혼합하였다. 4주령의 Mhp 항체인 4주령의 자돈에 각 불활화백신후보주당 3회 접종하였다. 이중 3개의 백신후보균주가 3차접종후 5주후까지 상대적으로 높은 항체가를 유지하는 것으로 나타났고 Mhp5-3주를 최종 백신후보균주로 선정하였다. 불활화 백신후보주의 2차 면역원성 조사에서 현재 시판되고 있는 Mhp백신중에서 유일하게 항체를 형성하는 레스피슈어백신과의 비교시험을 실시한 결과 2차 백신접종 후 1차접종 후 2주후에 급속하게 항체형성이 나타나나 급격히 항체가가 떨어지는 것으로 나타났고 백신후보주들은 서서히 항체가가 상승하는 것으로 나타났다.

Mhr의 경우 현재 항체가를 측정할 수 있는 ELISA 키트가 없기 때문에 우선 항체가를 측정할 수 있는 ELISA 키트를 제작하였다. 제작된 키트를 사용하여 Mhr 항체 및 Mhp항체 음성인 4주령의 자돈을 선별하여 선발된 5주의 불활화백신후보주에 대해 각각 3두씩 3차에 걸쳐 접종한 후 항체가를 측정하였다. 5주중에 항체형성능이 가장 우수한 2개의 균주를 선발하였고 이들 중 배양성이 뛰어난 Mhr 10-10주를 최종 Mhr 불활화백신후보주로 선정하였다.

최종 선발된 Mhp 5-3백신주를 대량배양하였다. pilot배양을 위해 계대배양을 할 때 마다 매번 확립된 real-time PCR로 역가를 측정하였고 최종 pilot배양에서의 항원역가는 2.5×10^8 CCU/ml로 확인되어 대량배양에서도 우수한 증식성을 나타낸 것으로 확인되었다.

수지상세포의 연구에서는 마우스 또는 돼지의 골수세포에서 유래된 수지상세포와 비장세포를 주로 사용하였다. 마우스 수지상세포는 CD11c와 같은 세포특이적인 표면마커와 성숙마커의 발현을 확인하였다. 수지상세포 또는 비장세포에 마이코플라즈마 항원을 처리한 후 어떤 toll-like receptor(TLR) agonist가 세포활성화에 적합한 지 확인하였다. TLR agonist로 TLR 2(peptidoglycan), 3(poly I:C), 4(lipopolysaccharide; LPS), 7/8(imiquimod), 9(CpG) agonist를 사용하였다. TLR agonist로 처리된 수지상세포의 표면에서 MHC class II와 CD86의 발현양을 확인하였다. 또한 수지상세포의 주요 기능인 항원탐식능, 항원제시능, 면역사이토카인의 생산량을 확인하였다.

In vitro 실험에서 LPS가 가장 적절한 TLR agonist로 선발되어 마우스 접종실험을 통해 기존에 사용하던 어쥬번트인 alum과 단독 또는 복합사용에 대한 효과를 검증하였다. 혈청에서 항원특이적인 항체생산량을 측정하였고 마우스에서 면역된 비장세포를 채취한 뒤 *in*

vitro 실험에서 항원재자극한 후 생존율, 항원특이적 항체생산량, 사이토카인 생산량을 확인하였다. 어쥬번트 후보물질을 백신항원과 함께 사용하여 제한적인 돼지 접종실험을 실시하였다. TLR agonist들 이외에도 신규 어쥬번트후보물질인 JB115 beta-glucan, BCG의 cell-wall skeleton, Ginsan 등의 면역증강효과를 확인하였다. 마이코플라즈마(*Mycoplasma hyopneumonia*) 항원이 자체적으로 면역증강 또는 감소효과가 있는 지 알아보기 위해 수지상세포와 비장세포를 대상으로 실험했다. 농도의존적인 면역세포 자극효과와, T 림프구 활성화 시 마이코플라즈마 항원에 의한 사이토카인 생산량 변화현상을 확인했다. 돼지 수지상세포를 대상으로 *Mycoplasma hyopneumonia*(Mhp) 또는 *Mycoplasma hyorhinis*(Mhr) 항원을 처리한 후 면역세포자극에 적합한 TLR agonist를 찾는 실험을 수행하였다. 생존/성장률 시험, 항원탐식능, 표면마커 발현, 면역사이토카인 생산을 확인한 결과 Mhp항원의 경우 TLR 2와 TLR 4 agonist, Mhr항원의 경우 TLR 3 agonist가 백신개발에 가장 적합한 물질로 확인했다.

결론적으로 본 연구에서는 증식성과 면역원성 우수한 고병원성의 Mhp5-3주에 재조합된 rLTBR1을 첨가한 후 TLR2 또는 TLR4 agonist를 첨가한 오일백신으로 제작할 것이다. Mhr의 경우 증식성과 면역원성이 우수한 Mhr 10-10을 불활화시킨 후 TLR3 agonist를 첨가하여 불활화백신을 제작할 것이다. 향후 돼지에서 보다 다양한 임상시험을 통해 백신 내 각 성분이 최종 첨가량 수준을 결정할 것이다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

- Mhp와 Mhr의 신속하고 동시에 진단할 수 있는 예민도가 높은 multiplex PCR의 개발
- 증식성과 면역원성이 좋은 고병원성의 Mhp불활화 백신균주의 선발
- Mhp주요부착인자인 P97면역 유도를 위한 재조합 rLTBR1단백질의 제작 및 정제
- 증식성과 면역원성이 좋은 Mhr불활화 백신균주의 선발
- Mhp와 Mhr의 TLR agonist의 선발
- 보다 개량된 Mhp와 Mhr 불활화백신의 formulation의 선정

2. 성과활용계획

- 개발 백신의 기술이전 및 실용화
- 돼지 마이코플라즈마성 폐렴의 예방으로 양돈 농가 생산성 기여
- 새롭게 출현하는 신병원체에 대한 예방 기술개발로 인한 백신시장에 대한 선점효과
- 기존의 불활화 백신보다 방어력이 우수한 백신의 개발로 인한 국내 동물약품업계의 경쟁력 제고 및 국내 자체 기술 개발로 외화 유출 방어
- 기존 기술보다 우수한 백신의 수출로 인한 외화 획득
- 본 기술의 성공 시 타 병원체 예방기술에 접목시켜 방어효과가 뛰어난 새로운 백신 개발에 기여

SUMMARY

(영문요약문)

Mycoplasma hyopneumoniae and *Mycoplasma hyorhinis*, the causative organisms of swine enzootic pneumonia(SEP), are important concern for the porcine industry worldwide, and rapid identification of these organisms is important to initiate appropriate preventive measures. The first purpose of this study was to develop a new multiplex PCR method for the detection of these organisms in lung lesions from slaughtered pigs in South Korea. This multiplex reaction was specific and highly sensitive; it was capable of detecting as little as 125 fg genomic DNA from *M. hyopneumoniae* and 62.5 fg genomic DNA from *M. hyorhinis*. Application of this multiplex PCR method to field isolates showed that *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* were present in 29%(107 of 370) of lung specimens, and no mycoplasmas were detected in 56%(208 of 370) of the slaughtered pig' lungs. At the farm level, *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* were detected in 34 of 36(94.4%) randomly selected farms. These findings suggest that both *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* have been spread widely in South Korea and highlight the need for better preventive measures.

Control measures against SEP include improvement of managerial practices, housing, use of antimicrobials and vaccination. However, antigenic and genetic heterogeneity has been reported by several authors among *M. hyopneumoniae* isolates. These differences affect the infection pattern of mycoplasmal disease and success of vaccination. The second aim in this study was to analyze the *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* field isolates from South Korea by using SDS-PAGE and Random amplification of polymorphic DNA(RAPD). Using SDS-PAGE, 25.3% variability was detected for *M. hyopneumoniae* isolates and 44.9% variability was detected for *M. hyorhinis* field isolates. RAPD patterning revealed 35.5% and 37.7% variability for *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* field isolates, respectively. All the isolates used in this study had non-identical DNA and protein patterns indicating presence of heterogenous *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* isolates in herds. Additionally, fifteen high virulent strains were isolated based on the presence of 181 kDa protein, known specifically to be expressed in high virulent strains. The high virulent strains did show high CCU titres. Bacterins made from five high virulent strains induced slower and lower immune response in the immunogenicity trail. To conclude, this is the first report on antigenic and genetic heterogeneity of *M. hyorhinis* isolates and optimized bacterin production comparable to commercial vaccines is required to evaluate the high virulent strains.

Protein P97, an immunodominant adhesin, mediates the attachment of *M. hyopneumoniae* to respiratory tract cilia. Commercially available inactivated whole cell vaccines lack this important antigen. The third objective of this study was to produce a recombinant chimera(rLTBR1) composed of containing the R1 repeat region of P97 adhesin of Mhp(R1) and B subunit of the heat-labile enterotoxin of *E. coli*(LTB). The gene sequences were cloned into the expression vector pET-DEST42 and expression was induced with IPTG. The protein rLTBR1 was expressed in the soluble form and was purified through affinity chromatography method. The purity and antigenicity was evaluated by the methods of SDS-PAGE and Western Blot, respectively. The rLTBR1 was also able to form oligomers in native form. Currently mouse trial is underway to evaluate the immunogenicity of this recombinant protein.

In TLR study, the dendritic cells(DCs) derived from mouse or swine bone marrow cells and mouse spleen cells were used. CD11c and other maturation marker molecules were used for the identification of DCs and maturation status. After treatment of mycoplasma antigen and toll-like receptor(TLR) agonists, we evaluated which one is the best for activating immune cells. TLR agonists include TLR 2(peptidoglycan), 3(poly I:C), 4(lipopolysaccharide; LPS), 7/8(imiquimod), 9(CpG; ODN1826 etc.) agonist. The expression levels of MHC class II and CD86 molecules on the surface of DCs treated with TLR agonists were measured. And also, the major DC functions, such as antigen(Ag) uptake, antigen presenting capability, the production of cytokine, were investigated. After selection of LPS as the most appropriate TLR agonist, we evaluated its adjuvant effects in the use of alone or with alum using mouse *in vivo* model; Ag-specific Ig level in serum, Ag-restimulation of immunized spleen cells to check viability, Ag-specific Ig level in culture media, cytokine production. And also, we injected mycoplasma Ag and LPS into pigs in a limited scale. New adjuvant candidates including JB115 beta-glucan, cell-wall skeleton of BCG, Ginsan were tested for their immunostimulatory effect. To investigate if mycoplasma(*Mycoplasma hyopneumoniae*) Ag itself is immunostimulatory or immunosuppressive, we tested the Ag using DCs or spleen cells. The mycoplasma Ag revealed the concentration-dependent immunostimulatory effect on spleen cells and also the alteration of cytokine production in the activation of T lymphocytes. We performed the search for the appropriate TLR agonist in the combination with mycoplasma Ag to stimulate immune cells for the best vaccine preparation. Swine DCs were treated with *Mycoplasma hyopneumoniae*(MHP) or *Mycoplasma hyorhinis*(MHR) and TLR agonists. Viability/proliferation, antigen uptake capability, surface marker expression, cytokine production were examined. We confirmed that TLR 2 and 4 agonists for MHP Ag, TLR 3 agonist for MHR can be the appropriate adjuvant for the development of high efficient vaccines.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Proposal	i
Summary in Korean	iii
SUMMARY	ix
CONTENTS (영문목차)	xi
Contents in Korean	xiii
Chapter 1. Introduction of the research project	3
Section 1. Research significance and background	3
Chapter 2. Present state of development of the research	13
Section 1. Present state of the research	13
Section 2. Previous achievements of the research	14
Chapter 3. Achievement contents and results	19
Section 1. Goals and contents of the research	19
Section 2. Goals and contents of the research by teams and year	21
Section 3. Research scopes and methods제 3 절 연구개발 범위 및 실험방법	25
1. Research scope	25
2. Methods	32
Section 4. Results of the research	47
Chapter 4. Achievements and Contribution to related industry	113
Chapter 5. Practical Use and plan for field application	123
Chapter 6. Oversea gathering of information and technology	129
Chapter 7. References	133

목 차

제출문	i
요약문	iii
SUMMARY	ix
CONTENTS (영문목차)	xi
목차	xiii
제 1 장 연구개발과제의 개요	3
제 1 절 연구개발의 중요성 및 필요성	3
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	13
제 1 절 국내·외 기술개발 현황	13
제 2 절 본 연구팀의 선행연구 수준	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	19
제 1 절 연구개발의 목표 및 내용	19
제 2 절 연차별·세부과제별 연구개발의 목표 및 내용	21
1. 1차년도 개발목표 및 개발내용	21
2. 2차년도 개발목표 및 개발내용	21
3. 3차년도 개발목표 및 개발내용	23
제 3 절 연구개발 범위 및 실험방법	25
1. 연구개발범위	25
가. 1차년도	25
나. 2차년도	28
다. 3차년도	30
2. 실험방법	32
제 4 절 연구개발 수행결과	47

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	113
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	123
	1. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)	123
	2. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등	124
	3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획	124
	4. 추가연구, 타연구에 활용 계획	125
	5. 활용방법	125
	6. 기대성과	125
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	129
제 7 장	참고문헌	133

제 1 장

연구개발과제의 개요

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 중요성 및 필요성

1. 연구개발대상 기술의 경제적, 산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

(1) 기술적 측면

- ▷ 끊임없는 질병 모니터링을 통해 새롭게 출현되는 병원체가 보고되고 있음. 이러한 새로운 병원체의 출현은 병원체가 숙주의 면역체계에 대항하여 항원성과 병원성이 변화되는 양상과 숙주의 면역체계의 저하로 인해 과거에는 문제시 되지 않았던 병원체가 최근에는 심각한 질병을 일으키는 병원체로 인정받게 되는 양상으로 나타남. 양돈질병에서도 이러한 새로운 병원체의 출현이 예외가 되지 않고 있음. 1990대 초 돼지생식기호흡기증후군(PRRS)의 출현, 돼지 썬코바이러스의 출현, 그리고 니파바이러스의 출현으로 현재까지 양돈산업은 어린 자돈의 폐사의 증가, 모돈의 생산성 하락으로 국내 양돈산업은 심한 경제적 피해를 입고 있음. 또한 과거에는 문제시 되지 않았던 저병원성의 병원체가 품종개량으로 인한 면역체계의 저하로 인해 뚜렷한 임상증상을 나타내며 경제적 피해를 일으키는 예가 속출하고 있는데 예를 들어 *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*등이라 할 수 있음.
- ▷ 양돈산업은 국내 축산업 가운데 가장 국제경쟁력이 있는 것으로 평가되고 있음. 그러나 이러한 경쟁력을 유지하기 위해서는 질병의 예방 및 근절이 매우 중요함. 특히 최근 수년간 양돈장에 많은 피해를 준 대표적인 질병은 돼지 썬코바이러스 감염증, 돼지 호흡기 증후군(Porcine respiratory disease complex: PRDC)으로 돼지의 증체율의 저하, 치료비용의 상승, 폐사율의 증가 등으로 인해 양돈농가에 엄청난 경제적 손실을 초래하고 있다. PRDC의 원발성 원인체는 돼지생식기호흡기증바이러스(PRRSV), 돼지 인플루엔자 바이러스(SIV)와 *Mycoplasma hyopneumoniae*가 주요 원인체로 인정되고 있고 기타 *Pasteurella*, *Actinobacillus*등이 2차 원인체로 작용하는 것으로 알려지고 있음.
- ▷ 이중 돼지 유행성 폐렴(Swine enzootic pneumonia) 또는 돼지 마이코플라즈마성 폐렴을 일으키는 *Mycoplasma hyopneumoniae*는 일단 농장에 발생하면 근절이 매우 어려운 병원체로 알려져 있으며 전 세계적으로 대부분의 농장이 감염되어 있는 것으로 보고되고 있음. 국내의 경우 돼지 마이코플라즈마성 폐렴의 감염은 매우 높은 것으로 알려져 있으며 지난 수십 년간 양돈 산업에서 주된 경제성 피해를 일으키는 질병의 하나로 자리매김함. 따라서 국내의 경우 가장 시장규모가 큰 백신이 돼지 마

이코플라즈마 백신으로 나타남.

- ▷ *M. hyopneumoniae*가 단일 감염되었을 때에는 건성기침, 성장정체, 사료효율의 감소 등의 증상으로 국한되나, 이러한 예는 거의 드물며 다른 호흡기 병원체와의 복합 감염을 유발하여 심각한 호흡기 증상과 이로 인한 심한 경제적 피해를 일으킴. 병원성 기전은 대식세포의 활성을 떨어뜨리고, 기관지 표면의 섬모와 상피세포에 부착하여 섬모를 파괴함으로써 이물질이나 다른 병원체의 침입을 방어하는 1차 방어기능을 상실케 함(Thacker, 2006). 이로 인해 *Pasteurella*나 *Actinobacillus*와 같은 2차세균의 침입이 손쉽게 일어남.
- ▷ *M. hyopneumoniae*는 다른 병원체와의 복합감염을 통해 호흡기 증상을 악화시키는 것으로 알려져 있음. 다른 병원체와의 관련성은 아래와 같음.
 - 썬코바이러스(PCV 2형)가 감염된 후 *M. hyopneumoniae*가 감염되면 매우 심한 폐렴 증상을 유발하며 이 중 23.5%는 전형적인 PMWS의 증상으로 발전됨. 따라서 *M. hyopneumoniae*는 PMWS를 일으키는 중요한 원인체로 인정됨.
 - 돼지생식기호흡기 증후군 바이러스(PRRSV)에 의해 생긴 폐렴을 마이코플라즈마는 더욱 심화 시키며 기간도 오래 지속시키는 것으로 보고됨.
 - *M. hyopneumoniae*가 감염된 후 Swine influenza virus(SIV) H1N1이 감염되면 SIV가 단독으로 감염된 것보다 14일 동안 심한 폐렴증상을 보이며 기침지수가 높아지는 것으로 나타남.
- ▷ 최근 선진국에서 돼지 마이코플라즈마성 폐렴의 감염예방 및 근절은 완전 돈군재편성(total depopulation), 부분적 돈군재편성(partial depopulation) 및 백신접종 등에 의하여 수행되고 있음. 그러나 국내의 실정으로 볼 때 부분적 돈군재편성에 의한 돼지 마이코플라즈마성 폐렴의 근절은 양돈규모의 영세성으로 충분한 여유돈사의 확보가 어려워 실효를 거두지 못하고 있으며, 완전한 돈군재편성에 의한 돼지 마이코플라즈마성 폐렴의 근절은 비용이 많이 들고 또한 값진 유전자원의 손실 등으로 인하여 실시하지 못하고 있음.
- ▷ 마이코플라즈마는 세균성 질병이나 특성이 바이러스와 매우 유사하며 전파력이 매우 빠르고 유비쿼터스한 세균이기 때문에 근절은 매우 어려움. 또한 투약을 통한 마이코플라즈마의 치료나 근절은 극히 제한적임. 마이코플라즈마는 세포벽이 없고 항생제에 대한 내성이 쉽게 획득되기 때문에 항생제를 이용한 투약으로는 근절이 어려움. 따라서 유일한 예방법은 백신접종에 의한 예방이 유일한 방법임. **마이코플라즈마 백신의 매출규모는 전 세계적으로 단일 백신으로서 매출규모가 2위에 해당하는 큰 시장을 형성하고 있고 국내에서도 100억원 정도의 가장 큰 시장규모를 지니고 있는 백신품목임.**
- ▷ *M. hyopneumoniae*의 백신은 약독화 백신이 없고 모든 백신이 불활화 백신임.

- 약독화 백신이나 온도변이주 백신 개발에 대한 연구가 있었으나 효과면에서는 매우 부정적임. 최근 연구에 의하면 저병원성 *M. hyopneumoniae* 균주를 접종한 후 고병원성 *M. hyopneumoniae* 를 접종할 경우 심한 임상증상과 높은 폐병변 지수를 나타냄. 따라서 약독화 백신균주에 의한 방어효과는 매우 부정적임 (Villarreal 등, 2008)
 - 일부 연구에서는 DNA백신, 서브유닛 백신 등이 개발이 되었으나 현재까지는 불활화 백신에 비해 방어효과가 좋지 않아 실용화 되고 있지는 않음.
 - 서브유닛 백신을 사용하여 돼지에 대한 방어효과 측면에서 볼 때, 폐병변 발현율은 감소되었으나 체중의 개선효과는 백신을 접종하지 않은 대조군과 유의성 있는 차이를 보이지 않아 실용화 되지 못했음.
 - 따라서 현재로서는 불활화 백신이 돼지 마이코플라즈마성 폐렴에 사용될 수 있는 유일한 백신으로 인정됨.
- ▷ *M. hyopneumoniae*의 불활화 백신은 전형적인 whole cell bacterin임. 회사마다 균주와 성분함량은 다소 차이가 있으며 부형제(adjuvant)는 회사마다 다른 형태를 사용하고 있음.
- ▷ 현재 사용하고 있는 *M. hyopneumoniae* 불활화 백신의 단점 중 가장 큰 단점은 임상증상을 완화시킬 수는 있으나 자연 감염자체를 방어할 수 없다는 점임 (Haesebrouck 등, 2004). 또한 다국적 기업의 백신 한 종류 이외에 국내에서 상용화되고 있는 백신은 접종 후 항체 형성이 잘 일어나지 않는 것이 최대 단점임. 아래의 사항은 현재 사용중인 불활화 백신의 단점을 요약한 것임.
- 현재 사용되고 있는 불활화 백신은 폐병변 생성을 완전히 방어하지 못함. Pommier 등(2000)에 의하면 백신접종이 폐병변의 생성억제를 74%에서 56%로 감소시킬 수는 있으나 병변이 일어나는 폐의 출현은 7%에서 5.6%밖에 감소시키지 않는 것으로 보고함. 외국기업 P사 백신의 경우 6~10%정도밖에 폐병변을 감소시키지 않는 것으로 나타남.
 - 불활화 백신은 야외 *M. hyopneumoniae* 의 집락화 형성을 방어하지 못함 (Stakenborg 등, 2006).
 - 불활화 백신은 농장내에 순환하는 *M. hyopneumoniae* 의 전파를 유의적으로 감소시킬 수 없음(Meyns 등, 2004).
 - 마이코플라즈마 감염에 노출된 모돈에서 생산된 자돈에 백신접종을 할 경우 모체 이행항체에 의한 간섭현상이 일어나 자돈에 의한 백신효과가 거의 없음. 따라서 다량의 항원과 강한 면역을 제공할 수 있는 백신의 개발이 필요가 절실함.
 - 현재 사용되고 있는 불활화 백신의 단점을 극복하기 위한 방법으로 체액성 면역은 물론 세포매개성 면역을 상승시켜 양돈장에서 순환하는 고병원성의 야외 *M.*

hyopneumoniae 의 감염방어, 집락화 방어, 전파차단은 물론 임상증상을 완화시킬 수 있는 보다 효과적인 방어효과를 보이는 차세대 불활화 백신의 개발이 절실히 필요함.

- ▷ 최근 *M. hyorhinis*가 *M. hyopneumoniae*에 뒤이어 돼지의 호흡기 전염병에서 새로운 역할을 하는 병원체로서 대두되고 있음 (Lin 등, 2006; Shin 등, 2003). 또한 돼지생식기호흡기증(PRRS)바이러스와 혼합감염으로 병증을 악화시키는 것으로도 보고되고 있음(Kobayashi 등, 1996; Kawashima 등, 1996). 최근 연구에서는 *M. hyorhinis* 단독으로도 *M. hyopneumoniae*에서 발현되는 마이코플라즈마성 병변의 폐렴이 일어나는 것으로 보고됨(Weng 등, 2006).
- ▷ 오래전부터 *Mycoplasma hyorhinis*는 돼지의 호흡기내에 흔한 기생세균(common inhabitant)로 알려져 왔으며 어린 돼지에서 다발성 장막염과 관절염을 일으키는 세균이며 증체저하, 사료효율의 감소를 일으키는 것으로 알려져 왔음(Friis와 Feenstra, 1994). *M. hyorhinis*는 또한 돼지에서 중이염(otitis media)의 주요 병원체로도 작용하는 것으로 알려졌고, 유스타키오관염증(eustachitis)의 원인체로도 알려져 있다. 또한 비정형 PRRS에서의 유산과 모돈의 폐사를 증가시키는 병원체로도 보고되고 있음 (Shin 등, 2003).
- ▷ 국내의 돼지 마이코플라즈마 연구의 기술 및 인적 수준은 매우 빈약하고 전문가가 거의 없었기 때문에 자체적인 연구보다는 외국에서 개발된 백신을 수입 의존하였으며 국내제조 백신의 경우 농림수산검역검사본부(이전 국립수의과학검역원)에서 분리한 분리주를 국내 백신제조회사에서 분양받아 백신을 제조하는 수준에 머물러 있음. 그러나 이와 같은 국내 백신제조 균주에 대한 생화학적 특성, 병원성, 방어효과에 관한 자세한 연구는 보고되고 있지 않음. 다만 국내제조 백신의 시장매출액이 외국 백신에 비해 현저히 적은 것으로 볼 때(국내시장 100억원 규모중 국내 기업3사가 차지하는 매출액은 13억원 정도임) 양돈가들에게는 국내회사가 제조한 마이코플라즈마 백신의 효과가 외국백신에 비해 떨어져 선호도가 떨어지는 것으로 판단됨. 따라서 단편적이고 산발적인 연구에 그쳐 그 결과가 양돈산업에 기여하지 못하였고 막대한 외화손실을 초래하였음.
- ▷ 수지상세포는 면역체계에서 각종 면역세포와 밀접한 관련이 있으며 특히 체액성 면역과 세포매개성 면역을 동시에 관장하는 항원공여세포임(Mellman and Steinman, 2006). 이에 본 연구에서는 수지상세포를 활성화시켜 백신항원의 효능을 배가시킨 백신을 개발하고자 한다. 학술적인 측면에서 수지상세포는 많이 연구되고 있음에도 불구하고 표면수용체, activation(활성화)/maturation(성숙), signaling(신호전달)에 대한 기초적인 연구에 머무르고 있다. 따라서 본 연구에서는 면역체계의 중심세포인 수지상세포의 활성화를 통해 기존 백신의 단점들을 극복하고자 함.

- ▷ 수지상세포의 활성화는 표면에 발현하는 수용체의 일종인 Toll-like receptor (TLR)를 자극할 수 있는 agonist(이하 ‘효능자’)를 선별하여 마이코플라즈마 백신의 adjuvant로 사용한다. TLR은 다양한 면역세포에서 발현되고 있지만 수지상세포 표면의 TLR을 효능자로 자극하여 활성화시킬 경우 IL-12 등 체액성 면역과 세포매개성 면역에 필수적인 면역사이토카인의 생산과 T 림프구를 효과적으로 자극할 수 있는 MHC class II, B7 molecule 등의 세포표면 단백질을 수지상세포에서 대량 발현한다 (Kaisho and Akira, 2003). 이러한 기능들은 백신항원을 체내에 면역시키는 반응에서 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있음.
- ▷ 현재 면역학계에서 TLR이 활발히 연구되고 있지만 그 대부분이 사람과 마우스를 대상으로 기초적인 학술연구에 국한되고 있다. 이에 본 연구과제에서 마이코플라즈마 백신항원을 생체 내에 접종 시 효율적으로 면역반응을 유도할 수 있는 수지상세포 표면 TLR 활성화용 효능자를 선별할 경우 특허획득이 용이하고 논문 등의 학술발표가 가능할 것으로 판단된다. 현재까지 밝혀진 Toll-like receptor(TLR) 효능자는 다음과 같다(Takeda, et al., 2003). TLR2는 lipoprotein, peptidoglycan, zymosan, GPI anchor, lipoarabinomannan, phosphatidylinositol dimannoside, TLR3는 double-stranded RNA, TLR4는 LPS, heat shock protein 60, TLR5는 flagellin, TLR7/8은 single-stranded RNA, TLR9은 CpG DNA가 현재까지 잘 알려진 효능자이다. 이 중에서 *M. hyopneumoniae* 와 *M. hyorhinis* 백신에 적합한 효능자를 선별할 예정이며 특히 가능성이 높은 CpG를 우선적으로 실험할 계획이다(그림1-1 참조).

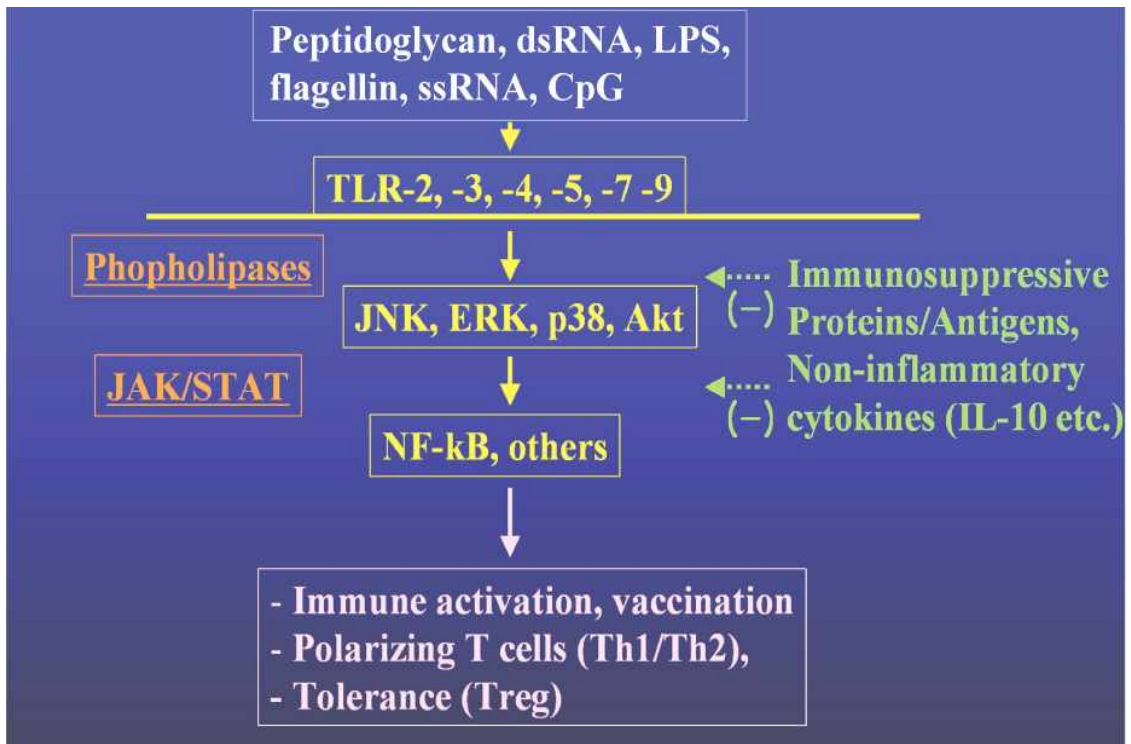


그림1-1. 수지상세포의 표면에 발현된 TLR와 그 효능자의 작용기전

- ▷ 외부유래의 병원성미생물에 대한 면역증진을 위해 수지상세포의 표면에 각종 TLR을 발현하고 있으며 각 효능자가 결합하여 kinase, transcription factor 수준의 신호전달이 이루어지며 관련된 기능성단백질이 발현된다(Martin and Wesche, 2002; Amati, et al., 2006). 그러나 종양세포 또는 마이코플라즈마균 등은 이러한 면역반응기전을 억제하는 항원단백질을 포함하고 있는 것으로 추정되고 있다. 따라서 본 연구에서는 마이코플라즈마 백신항원의 면역반응을 증진시킬 수 있는 최적의 TLR 효능자를 찾아 그 신호전달을 강화함으로써 성능이 매우 향상된 차세대 백신을 개발하고자 한다.
- ▷ 기존의 TLR 효능자에 대한 연구에 더해 본 연구실에서 수행되어왔던 천연물질들 중 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis* 백신에 adjuvant 효과를 보이는 천연물질을 선별할 예정이다. 이러한 연구는 원천특허의 가능성을 높일 수 있으며 천연물질로부터 유래되었으므로 생체에 적용 시 비교적 적은 독성을 유발하는 장점이 있다. 현재 보유하고 있는 천연물질은 *Elaeocarpus sylvesteris* (담팔수)의 잎 추출물 외 59종이다.

(2) 기술적 측면

- ▷ 국내에서 마이코플라즈마성 폐렴의 발생상황을 보면 도축장 출하돈 750두를 조사한 결과 마이코플라즈마성 폐렴 62%, 흉막 폐렴 및 기타 폐렴이 17.2%로 관찰되었고 (석 등, 2002), 다른 보고에 의하면 도축돈 682두 중 마이코플라즈마 감염돈이 367두로 53.8%를 차지하였다고 보고하였다(김 등, 1999).
- ▷ 마이코플라즈마 백신 접종이 생산성 증가에 미치는 영향은 다음 표와 같다.
 - 백신 비접종군에 비해 마이코플라즈마 백신 접종시 보고된 생산성 향상은 표에 나타난대로 일당증체량의 경우 약 53g/day가 향상되었고, 사료효율은 0.13 feed unit/Kg 감소하였으며, 폐사율은 0.9%감소하였다.

표 1-1. *M. hyopneumoniae*백신접종으로 인한 생산성 증가 결과

항 목	백신접종군	대조군	차이
실험 돼지수	2211	6293	
일당증체량 (g/day)	853	798	+53
사료효율(FCR, feed unit/kg)	2.71	2.84	-0.13
폐사율 (%)	1.9	2.8	-0.9

- 이를 경제적 이윤으로 환산을 하면 다음 표와 같다. 총 돼지 1두당 최소 7,231원 가량 수익을 향상시키는 것으로 나타났다.

표 1-2. *M. hyopneumoniae*백신접종으로 인한 개선된 경제적 이윤

측정 대상	계 산	원
체중증가	도체체중 4.3Kg증가	5,931원
사료	74kg체중증가로 사료비 감소	1,560원
폐사율	두당 10% 감소	877원
치료비용, 백신 및 노동력	치료비용 절감, 백신접종 비용	-1,137원
총 계		7,231원

- ▷ 백신접종에 의한 돼지 마이코플라즈마성 폐렴의 예방 및 근절이 현재 국내에서 가장 보편적으로 수행되고 있지만 백신을 다국적 기업을 통해 많은 양이 수입하고 있으므로 외화낭비가 발생하고 있는 실정이다. 국내 마이코플라즈마 시장은 약 100억 원인데 비해 국내에서의 제조 백신(국내 3개사가 제조)은 약 13억원 밖에 미치지 못한다.

(3) 사회·문화적 측면

- ▷ 양돈산업은 국민에게 중요한 단백질 공급원으로 국민 1인당 육류소비량을 1998년도를 기준으로 28.1kg 이었고 그 중 돈육은 15.1kg(54%)를 차지하고 있으며 매년 1%씩 증가하고 있다. 또한 각종 돈육 요리는 독특한 먹거리를 제공한다.
- ▷ 그러므로 위생적인 돈육을 공급하는 것은 국민건강 향상을 위하여 필요하며 위생적인 돈육생산의 선결요건은 건강한 원료생산의 출발점인 양돈장의 질병관리가 매우 중요하다.
- ▷ 따라서 본 연구가 성공적으로 수행될 경우 사회 문화적 측면에서의 기대효과는 양돈 농가의 소득증대로 양돈가의 생활 수준을 향상시킬 수 있으며 위생적인 돈육을 소비자에게 공급함으로써 국민건강증진은 물론 돈육 소비문화를 정착시킬 수 있다.

제 2 장

국내·외 기술개발 현황

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 기술개발 현황

(1) 국내외 기술 현황

- ▷ 전세계적으로 *M. hyopneumoniae* 백신은 불활화 백신을 사용하고 있으며 단일 백신으로는 산업동물에서 2위의 매출규모를 지닌 백신이며 국내의 경우 지난 2년간 평균 100억의 시장규모를 지닌 국내 최고의 시장 규모를 지닌 백신임.
- ▷ 이와 같은 큰 시장규모를 외국에서 제조한 수입백신이 대부분 차지하고 있어 경제적인 손실이 크며 국내의 경우 국립수의과학검역원에서 분리한 균주를 분양받아 백신을 제조하고 있는 실정임.
- ▷ *M. hyopneumoniae*에 대한 약독화 백신은 개발이 되어 있지 않으며 최근의 연구결과를 볼 때 효능이 없는 것으로 사료됨.
- ▷ 전세계적으로 사용하는 불활화 백신은 임상증상 완화 및 증체율 저하를 막을 수는 있으나 감염에 대한 방어를 하지 못하며 호흡기도내의 집락을 형성하는 것을 막지 못하며 전파를 차단시킬 수 없으며 폐병변의 형성을 방어하지 못함. 또한 모체이행 항체의 간섭현상으로 자돈에 백신을 할 경우 백신의 효능이 없게 될 수 있음.
- ▷ 현재 사용되는 마이코플라스마용 백신을 투여한 후 질병을 악화시키는 경우가 발견되고 있음(Maes, et al., 2008). 이는 불활화시킨 마이코플라스마 병원체가 숙주의 면역기능을 효율적으로 활성화시켜 주지 못하여 백신효과가 미흡하거나, 오히려 숙주의 면역기능을 저하시켜 기존의 질병 또는 새로 발생하는 질병에 대해 방어하지 못하는 것이 원인일 수 있음.
- ▷ *M. hyorhinis*의 경우 외국과 국내에서 다른 호흡기 병원체와의 혼합감염으로 피해를 일으키고 있으나 이를 방어하는 백신은 없는 상태임.
- ▷ *M. hyopneumoniae*의 경우 감염자체를 방어하고 집락화를 저지하고 폐병변의 생성을 억제하는 보다 완전한 방어효과를 지닌 백신개발이 진행되고 있어 향후 상용화될 것으로 전망됨.
- ▷ 우수한 백신 개발은 백신 접종 후 세포 매개성 면역의 유도, 국소 면역을 유도하는 백신이 개발될 것으로 전망하며 이에 대한 방법으로는 아래와 같은 분야의 연구가 지속적으로 진행될 것으로 전망함.
 - 보다 개량된 서브유닛 백신, DNA 백신 등이 연구가 세포 매개성 면역의 유도 및 모체이행항체의 간섭현상을 억제하는 측면으로 진행.

- 국소 면역, 호흡기 점막면역을 유도할 수 있는 백신의 개발이 진행될 것으로 전망.
 - 비록 부정적인 결과가 있으나 강력한 면역형성을 유도하는 백신균주의 개발(예, 온도변이주 등)의 약독화 백신의 개발 연구.
 - 부형제(adjuvant)의 연구를 통해 강력한 세포매개성 면역을 유도하여 감염을 방어하는 백신 보조제의 출현이 전망됨.
- ▷ *M. hyorhinis*의 경우 보다 현재 보다 PRDC에 영향을 미치는 중요한 병원체로 인식될 것으로 전망하며 이에 대한 예방백신이 개발될 것으로 전망함.

제 2 절 본 연구팀의 선행연구 수준

1. 수지상세포의 면역싸이토카인 생산능

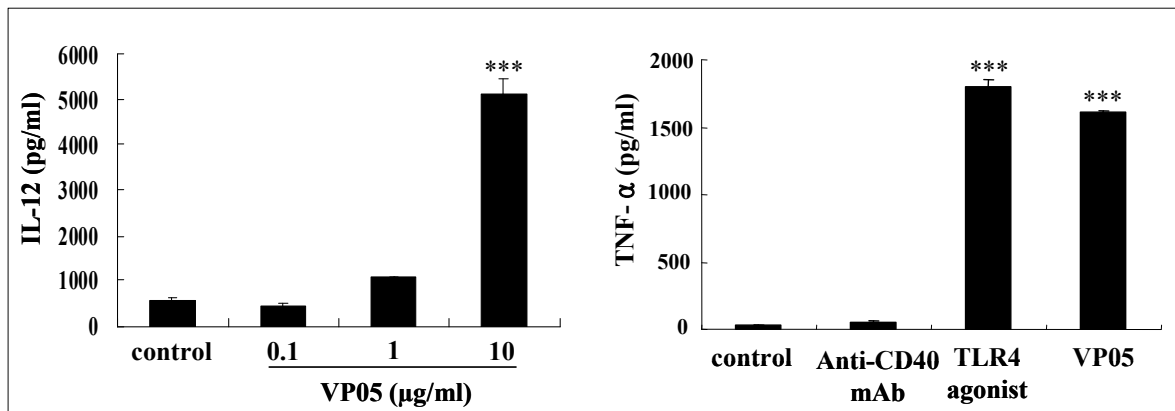


그림 2-1. 골수유래의 배양된 수지상세포를 대상으로 천연물질 ‘VP05’를 처리한 결과

면역싸이토카인의 일종인 IL-12와 TNF- α 가 대량으로 생산되는 것을 확인하였다. 특히 IL-12는 자연면역과 적응면역에서 모두 중요한 역할을 하며 세포성면역의 증진에 기여한다. 또한 TLR4 효능자를 수지상세포에 처리하여 TNF- α 가 대량으로 생산되는 사실을 확인하였다. 본 연구진은 수지상세포에 대한 TLR과 그 효능자에 대한 실험을 다수 시행하고 있다.

2. 수지상세포의 allostimulatory능에 관한 Eckol의 효과

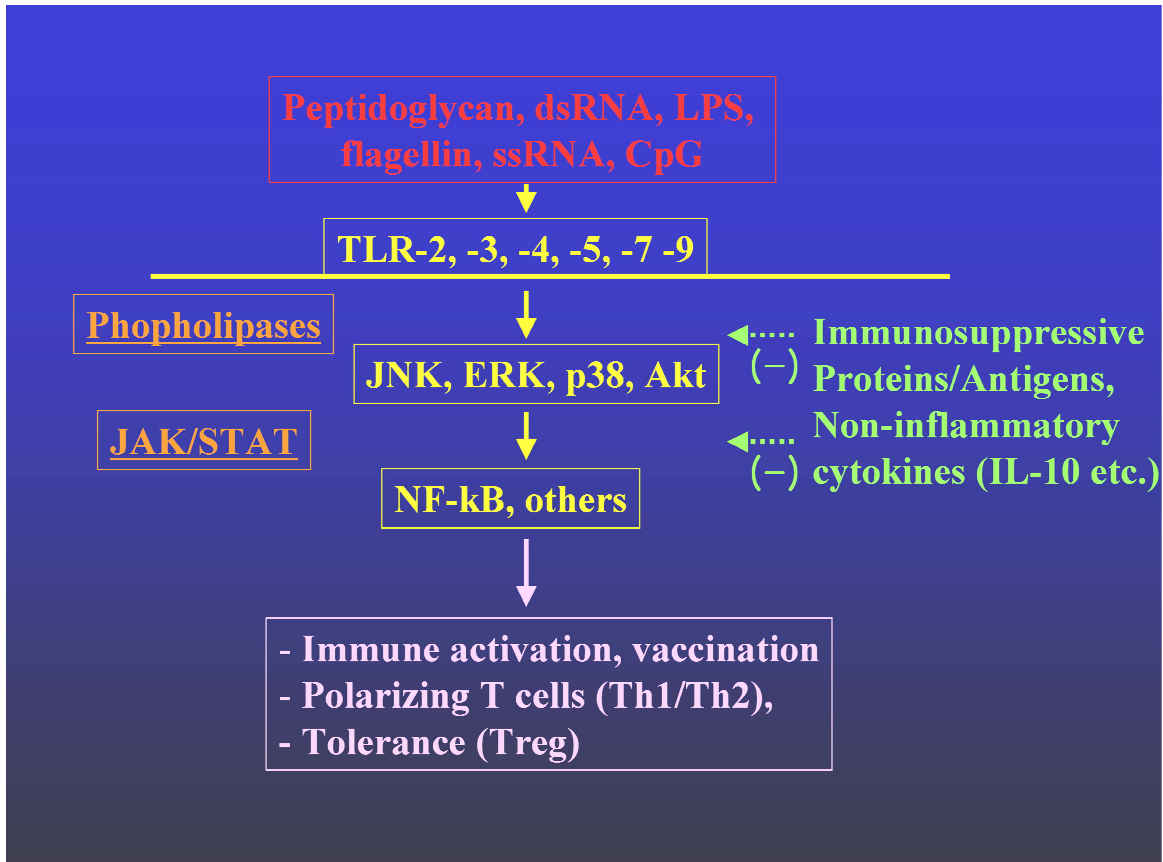


그림 2-2. 수지상세포를 대상으로 천연물질 'Eckol'을 처리한 결과.

천연순수분리물질인 'Eckol'을 처리한 수지상세포(5×10^3 cells/well)는 순수하게 분리된 CD4⁺ T 림프구(1×10^5 cells/well)의 alloproliferation 자극능을 유의하게 증가시켰다. Eckol의 이러한 능력은 수지상세포의 성숙과정을 유도할 수 있고 그와 관련된 면역반응을 조절할 수 있는 가능성을 보여준다. Anti-CD40 항체는 잘 알려진 수지상세포의 성숙유도인자로서 양성대조군으로 사용하였으며 CD4⁺ T 림프구의 alloproliferation 자극능을 현저하게 보여주었다. 본 연구진은 다수의 관련실험을 통해 수지상세포와 관련된 면역기능시험을 실시하고 있다.

제 3 장

연구개발수행 내용 및 결과

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구 목표

양돈의 호흡기 전염병중 원발성 요인의 하나인 돼지 마이코플라즈마성 폐렴의 원인균인 *Mycoplasma hyopneumoniae*와 최근 돼지 마이코플라즈마성 폐렴의 새로운 병원체로 인식되고 있는 *Mycoplasma hyorhinis*를 예방하기 위해 주요 항원제시세포인 수지상 세포를 활성화 시키는 기술을 접목하여 현재 사용 중인 예방백신보다 방어효과가 월등히 뛰어난 새로운 개념의 돼지 마이코플라즈마성 폐렴의 예방기술을 개발하고자 함. 이를 통해 양돈산업에서 큰 경제적 피해를 일으키고 있는 돼지 호흡기 전염병을 제어하여 양돈농가의 소득을 증대시키고자 함

2. 연구내용

가. 돼지 마이코플라즈마성 폐렴을 예방하기 위하여 수지상 세포를 활성화시키기 위한 기술을 접목한 새로운 *Mycoplasma hyopneumoniae*의 불활화 백신의 개발

1. 호흡기 증상을 나타내는 돼지의 폐에서 *M. hyopneumoniae* 분리주의 확보
2. 최근 국내에서 분리되는 분리주를 포함한 국내 *M. hyopneumoniae* 불활화 백신균주의 시험관내 병원성, 면역원성, 생화학적 특성 비교 조사
3. 도축돈 폐병변에서의 *M. hyopneumoniae* 및 *M. hyorhinis*의 분리 및 두 병원체를 진단할 수 있는 multiplex PCR의 진단기법 개발
4. 야외분리주의 filtration cloning을 통한 single clone의 확보
5. 표준주와 분리주의 단백질 프로파일의 분석 및 유전형 분석 및 병원성 단백질의 검출
6. *M. hyopneumoniae*의 백신후보균주의 항원성 발현 및 항체형성능 검사
7. *M. hyopneumoniae*의 major adhesin 인 P97부위의 R1 repeat region부위의 대장균에서의 발현, 정제 및 마우스에서의 항체 형성능 조사, 수율조사
8. *M. hyopneumoniae* 백신후보균주를 사용한 백신 시제품의 항체 형성능 조사 및 방어능 조사
10. TLR효능자를 포함한 *M. hyopneumoniae* 백신의 최종 구성성분 결정

나. 돼지 호흡기 전염병의 새로운 병원체로 인식되고 있는 *Mycoplasma hyorhinis*의 돼지 호흡기 전염병에 대한 피해 조사 및 병원성 조사

1. 도축돈 폐에서 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 분리 완료 및 개체 및 농장별 오염도 분석
2. 호흡기 증상을 나타내는 돼지의 폐에서 *M. hyorhinis* 분리주의 확보
3. 야외분리주의 filtration cloning을 통한 single clone의 확보
4. 표준주와 분리주의 단백질 프로파일의 분석 및 병원성 단백질의 검출
5. *M. hyorhinis*의 불활화 백신균주의 스크리닝
6. *M. hyorhinis*의 백신후보균주의 최적성장조건의 조사
7. 백신후보균주를 사용한 백신 시제품의 항체 형성능 조사 및 방어능 조사

다. *Mycoplasma hyorhinis*를 예방하기 위한 수지상 세포를 활성화시키기 위한 기술을 접목한 *M. hyorhinis*의 불활화 백신의 개발

1. 배양된 수지상세포에 마이코플라즈마 백신 항원의 pulse 적정조건 수립
2. T 림프구와 수지상세포의 혼합배양, 면역싸이토카인의 종류 및 생산 조건 연구
3. 수지상세포의 마이코플라즈마 백신항원 탐식과 소화에 관한 연구
4. TLR4 효능자인 LPS를 이용한 마우스, 돼지 접종실험 (*in vivo*), 백신효과 검증 연구 (*in vitro*)
5. TLR3, TLR9 효능자인 polyI:C와 CpG ODN 1826의 수지상세포에 대한 면역기능 시험
6. 신규 TLR 효능자 (JB115 beta-glucan, CWS)에 대한 면역증진 시험 및 기전 연구
7. *M. hyopneumoniae* soluble 항원을 이용한 면역세포 (수지상세포와 비장세포) 영향 평가
8. 돼지수지상세포를 이용한 *Mycoplasma hyopneumoniae*와 TLR효능자의 작용기전 연구
9. 돼지수지상세포를 이용한 *Mycoplasma hyorhinis*와 TLR효능자의 작용기전 연구
10. 신규 adjuvant 발굴
11. *M. hyopneumoniae*와 LPS의 접종후 발적, 발열, 행동이상 및 면역싸이토카인 분석, 항원특이적 항체 분석 및 항체 isotype의 분석
12. TLR 4효능자 LPS와 CSW에 대한 돼지의 실험을 실시

제 2 절 연차별·세부과제별 연구개발의 목표 및 내용

1. 1차년도 개발목표 및 개발 내용

가. 세부연구팀 (강원대): 차세대 돼지마이코플라즈마성 폐렴의 예방백신균주의 특성연구

- (1) *M. hyopneumoniae* 불활화 백신 균주의 탐색
 - 호흡기 증상을 나타내는 돼지의 폐에서 *M. hyopneumoniae* 및 *M. hyorhinis* 분리주의 확보
- (2) *M. hyorhinis*의 분리 및 분리율 조사
 - 최근 국내에서 분리되는 분리주를 포함한 국내 *M. hyopneumoniae* 불활화 백신균주의 시험관내 병원성, 면역원성, 생화학적 특성 비교 조사

나. 1협동연구팀 (제주대): 수지상세포 활성화 유도를 이용한 새로운 마이코플라즈마 백신 개발

- (1) 수지상세포를 이용한 새로운 백신 adjuvant 개발 시험체계를 수립
 - 배양된 수지상세포에 마이코플라즈마 백신 항원의 pulse 적정조건 수립
 - T 림프구와 수지상세포의 혼합배양, 면역싸이토카인의 종류 및 생산 조건 연구
 - 수지상세포의 마이코플라즈마 백신항원 탐식과 소화에 관한 연구

다. 2협동연구팀 (중앙백신) : 차세대 돼지 마이코플라즈마 폐렴예방백신 연구

- (1) *M. hyopneumoniae*의 분리 및 병원성 조사와 *M. hyorhinis*의 분리 및 분리율조사
 - 1세부과제와 공동으로 호흡기 증상을 나타내는 돼지의 폐에서 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 분리
- (2) 수지상세포를 이용한 새로운 백신 adjuvant 개발 시험체계 수립공동연구
 - 1협동연구팀에서 실험결과 LPS가 수지상 세포 자극능이 가장 우수한 것으로 판정됨. 따라서 돼지를 이용한 innate immunity를 효과적으로 유도하는 한편 패혈증등의 부작용을 일으키지 않는 기초자료를 얻고자 수행
 - LPS의 tolerable dose결정시험: 부작용의 유무 및 면역싸이토카인 분석
 - *M. hyopneumoniae*와 LPS의 접종후 발적, 발열, 행동이상 및 면역싸이토카인 분석, 항원특이적 항체 분석 및 항체 isotype의 분석

2. 2차년도 개발목표 및 개발 내용

가. 1세부연구팀 (강원대): 차세대 돼지마이코플라즈마성 폐렴의 예방백신균주의 특성연구

- (1) 도축돈 폐병변에서의 *M. hyopneumoniae* 및 *M. hyorhinis*의 분리 및 두 병원체를 진단할 수 있는 multiplex PCR의 진단기법 개발

- 도축돈 폐에서 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 분리 완료 및 개체 및 농장 별 오염돈 분석
- 두 병원체를 진단할 수 있는 multiplex PCR의 특이도, 민감도 조사 및 (주) 인 트론과 시제품 제작
- (2) *M. hyopneumoniae*의 분리주의 특성 연구 및 백신후보균주의 탐색
 - 야외분리주의 filtration cloning을 통한 single clone의 확보
 - 교차반응이 덜한 표준주에 대한 항혈청 제조
 - 표준주와 분리주의 단백질 프로파일의 분석 및 병원성 단백질의 검출
 - *M. hyopneumoniae*의 불활화 백신균주의 선정
- (3) *M. hyorhinis*의 분리주의 특성 연구 및 백신후보균주의 탐색
 - 야외분리주의 filtration cloning을 통한 single clone의 확보
 - 교차반응이 덜한 표준주에 대한 항혈청 제조
 - 표준주와 분리주의 단백질 프로파일의 분석 및 병원성 단백질의 검출
 - *M. hyorhinis*의 불활화 백신균주의 스크리닝

나. 1협동연구팀 (제주대): 수지상세포 활성화 유도를 이용한 새로운 마이코플라즈마 백신 개발

- (1) *M. hyopneumoniae* 백신의 면역기능향상에 적합한 기존의 TLR 효능자 연구
 - TLR4 효능자인 LPS를 이용한 마우스, 돼지 접종실험 (*in vivo*), 백신효과 검증 연구 (*in vitro*)
 - TLR3, TLR9 효능자인 polyI:C와 CpG ODN 1826의 수지상세포에 대한 면역기능 시험
- (2) *M. hyopneumoniae* 백신에 적합한 신규TLR 효능자 후보물질 발굴 및 기전 연구
 - 신규 TLR 효능자 (JB115 beta-glucan, CWS)에 대한 면역증진 시험 및 기전 연구
- (3) *M. hyopneumoniae* 유래 단백질의 면역증진 및 저하기능 연구
 - MH soluble 항원을 이용한 면역세포 (수지상세포와 비장세포) 영향 평가

다. 2협동연구팀 (중앙백신) : 차세대 돼지 마이코플라즈마 폐렴예방백신 연구

- (1) *M. hyopneumoniae*기존 시판된 백신의 항체 형성능 비교
 - 마우스를 대상으로 *M. hyopneumoniae*기존 시판 백신을 접종한 후 항체형성능을 비교할 때 검사한 백신이 모두 항체를 높게 형성함
 - 상기의 백신을 목적동물인 돼지에 접종하였을 때 1품목의 백신만 유의성이

있는 항체형성이 관찰되었고 나머지 백신은 항체가 형성되지 않았음.

- (2) *M. hyopneumoniae* 백신의 면역기능향상에 적합한 기존의 TLR 효능자 연구
(1협동기관과 공동연구)
 - 협동2와 공동으로 TLR 4효능자 LPS와 CSW에 대한 돼지의 실험을 실시함
- (3) *M. hyopneumoniae* 및 *M. hyorhinis*의 항체형성능 검사 및 병원성 조사
 - 세부팀에서 특성분석이 완료된 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 대표균주분리에 대한 돼지의 면역원성을 보는 시험을 실시하고자 했는데 구제역으로 발생으로 돼지의 수급에 차질이 되어 하지 못함

3. 3차년도 개발목표 및 개발 내용

가. 1세부연구팀 (강원대):차세대 돼지마이코플라즈마성 폐렴의 예방백신균주의 특성연구

- (1) *M. hyopneumoniae*의 백신후보균주의 항원성 발현 및 항체형성능 검사
 - *M. hyopneumoniae* 최종 백신후보균주의 항원발현 및 안전성 검사
 - *M. hyopneumoniae*의 major adhesin 인 P97부위의 R1 및 R2 repeat region부위의 대장균에서의 발현, 정제 및 돼지에서의 항체 형성능 조사, 수율조사
 - *M. hyopneumoniae*의 백신후보균주의 최적성장조건의 조사
- (2) *M. hyorhinis*의 백신후보균주의 특성조사 및 항체형성능 조사
 - *M. hyorhinis*의 백신후보균주의 특성 및 알려진 항원발현조사
 - *M. hyorhinis*의 백신후보균주의 최적성장조건의 조사
- (3) Mycoplasma의 생균백신균주를 위한 온도감수성변이주의 제작 시도

나. 1협동연구팀 (제주대): 수지상세포 활성화 유도를 이용한 새로운 마이코플라즈마 백신 개발

- (1) *M. hyopneumoniae* (MH), *M. hyorhinis* (MR) 백신의 면역기능 향상에 적합한 기존의 TLR 효능자 연구
- (2) MH, MR 백신에 적합한 천연물질 adjuvant 발굴 및 관련기전 연구
 - 베타-글루칸, CWS를 이용한 지속실험을 돼지 대상으로 수행하며 신규 adjuvant 발굴
- (3) MH, MR 유래 단백질의 면역 증진 및 저하기능 연구
 - 주요 면역세포에 대한 면역능 시험 (*in vitro*), 작용기전 연구

다. 2협동연구팀(중양백신) : 차세대 돼지 마이코플라즈마 폐렴 예방 백신의 효능연구

- (1) *M. hyopneumoniae* 와 *M. hyorhinis* 의 백신후보균주의 항체 형성능 조사 및 방어능조사
 - *M. hyopneumoniae* 백신후보균주를 사용한 백신 시제품의 항체 형성능 조사 및 방어능 조사
 - 생산에 적합한 최적 배양조건, 항원량, 불활화 조건, 부형제 선발 및 수율조사
- (2) *M. hyorhinis*의 백신후보균주의 항체 형성능 조사 및 방어능 조사
 - 백신후보균주를 사용한 백신 시제품의 항체 형성능 조사 및 방어능 조사
 - 생산에 적합한 최적 배양조건, 항원량, 불활화 조건, 부형제 선발 및 수율조사
- (3) *M. hyopneumoniae* 백신의 면역기능향상에 적합한 기존의 TLR 효능자 연구(1협동기관과 공동연구)
 - 협동1에 필요시 돼지를 사용한 TLR효능자 연구시험에 공동연구

제 3 절 연구개발 범위 및 실험방법

1. 연구개발 범위

가. 1차년도

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p><i>M. hyopneumoniae</i>와 <i>M. hyorhinis</i>의 국내분리주의 분리를 위한 대상 지역의 선정 (세부 및 협동2)</p>	<p>세부과제팀과 2협동과제와 더불어 초기 호흡기 증상을 나타내는 돼지농장에서 비강내 추출하였으나 오염만 심하고 균분리가 되지 않았기 때문에 농장내에서의 비강내 채취는 중단함 이후 돼지 도축장에서 간변화를 보이는 폐에서 균분리를 실시하였음. (자세한 방법은 하단에 설명)</p>	<p>세부연구팀: 강원도 원주, 홍천 및 춘천지역의 도축장에서 폐를 수집하여 균분리 실시 검역원과의 협조를 얻어 전국적인 도축장에서 폐의 수집 협동연구2팀: 충남북지역의 도축장에서 폐를 수집하여 세부연구팀으로 운반</p>
<p>폐에서 <i>M. hyopneumoniae</i>와 <i>M. hyorhinis</i>의 균분리 (세부)</p>	<p>기존에 보고된 방법을 이용하여 균분리를 실시함 (자세한 방법은 하단에 설명)</p>	<p>과제수행 초기 호흡기 증상을 나타내는 돼지의 비강내에서 균분리를 실시하였으나 오염이 심하고 균분리가 되지 않아 중단함. 이후 도축장에서 마이코플라즈마의 특이적인 병변인 간변화등의 병변을 보인 폐를 수집하여 균분리</p>
<p><i>M. hyopneumoniae</i>와 <i>M. hyorhinis</i>의 동정을 위한 multiplex PCR의 개발 (세부)</p>	<p>배양액에서 <i>M. hyopneumoniae</i>와 <i>M. hyorhinis</i>의 동정을 위해 PCR의 수행이 필요함. 기존의 보고는 각각에 대한 single PCR의 경우과 보고되고 있고 최근 두 병원체를 동시에 측정할 수 있는 Multiplex PCR이 개발되었으나 두 PCR product의 크기의 차이가 커서 상대적으로 크기가 작은 PCR이 예민도가 뛰어난 단점을 가지고 있음. (자세한 방법은 하단에 설명)</p>	<p><i>M. hyopneumoniae</i>와 <i>M. hyorhinis</i>의 PCR product의 차이가 100bp차이 밖에 나지 않는 새로운 multiplex PCR을 개발하였음</p>
<p><i>M. hyopneumoniae</i>와 <i>M. hyorhinis</i>의 단일 항원을 지닌 세균의 분리 (filter cloning) (세부)</p>	<p>Mycoplasma의 경우 항원성이 다양한 clone으로 형성되어 있기 때문에 단순히 집락(colony)만을 분리하는 것이 아니라 filtration & cloning을 실시하여 동일한 항원성을 지닌 homogeneous clone을 분리해야함</p>	<p><i>M. hyopneumoniae</i>와 <i>M. hyorhinis</i>의 표준주 및 분리주를 filtration & cloning을 실시하고 있음.</p>
<p><i>M. hyorhinis</i>의 역학적 조사를 위한 혈청학적 진단방법의 개발(세부)</p>	<p>현재 <i>M. hyopneumoniae</i>에 대한 혈청학적 진단 키트는 ELISA kit로 국내외에서 개발되었음. 그러나 <i>M. hyorhinis</i>는 전세계적으로 개발 보고된 예가 없음. 당초 <i>M. hyorhinis</i>의 균분리를 통해 역학적 조사를 할 예정이었으나 혈청학적 조사도 필요할 것으로 판단되어 당초계획에 없는 ELISA kit개발을 시도하였음</p>	<p>세포외막항원 (OMP)을 추출한 후 이를 항원으로 사용한 ELISA 방법을 개발하였으나 <i>M. hyopneumoniae</i>의 혈청과 교차반응이 심하게 나타남</p>

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p><i>M. hyopneumoniae</i>와 <i>M. hyorhinis</i>의 표준균주와 백신주의 생화학적 특성비교조사 (세부)</p>	<p>세부과제팀과 2협동과제와 더불어 초기 호흡기 증상을 나타내는 돼지농장에서 비강내 추출하였으나 오염만 심하고 균분리가 돼지 않았기 때문에 농장내에서의 비강내 채취는 중단함 이후 돼지 도축장에서 간변화를 보이는 폐에서 균분리를 실시하였음. (자세한 방법은 하단에 설명)</p>	<p>세부연구팀: 강원도 원주, 홍천 및 춘천지역의 도축장에서 폐를 수집하여 균분리 실시 검역원과의 협조를 얻어 전국적인 도축장에서 폐의 수집 협동연구2팀: 충남북지역의 도축장에서 폐를 수집하여 세부연구팀으로 운반</p>
<p><i>M. hyopneumoniae</i>와 <i>M. hyorhinis</i>의 면역혈청제조를 위한항원의 제조 및 토끼에서의 항혈청 제조 (세부 및 협동2)</p>	<p>야외분리균주의 분리동정 및 면역학적 profile의 검사에 있어서 양성혈청은 반드시 필요함. 따라서 항원은 세부연구팀에서 제조하고 토끼에서의 항혈청 생산은 협동2에서 수행함.</p>	<p>총 6두의 토끼를 사용하였음. (<i>M. hyopneumoniae</i> 3두, <i>M. hyorhinis</i> 3두 사용) - 제조한 혈청의 항체가 <i>M. hyopneumoniae</i>의 경우 제노바 이텍에서 생산한 ELISA kit를 사용하여 측정하고 높은 역가를 지닌 양성항체를 제조하였음.</p>
<p><i>M. hyopneumoniae</i>의 돼지에서의 병원성 조사 (세부 및 협동2)</p>	<p>계획서 제출시 1차년의 <i>M. hyopneumoniae</i>에 대한 강병원성 야외 분리주에 대한 시험을 실시할 계획을 수립했으나 더 많은 균주의 확보와 2차년도에 계획하고 있는 <i>M. hyorhinis</i>와 동일시기에 실시하는 것이 비용과 노력면에서 효율적이라는 판단하에 2차년도에 실시하는 것으로 자체 연기함.</p>	<p>돼지에서의 병원성은 2차년도에 <i>M. hyorhinis</i>와 동시에 실시하고자 함.</p>
<p><i>M. hyorhinis</i>의 혈청학적 진단방법 개발 (세부 및 협동2)</p>	<p>2차년도에 실시할 예정이었던 <i>M. hyorhinis</i>의 ELISA시험법을 필요성 때문에 1차년도부터 시작하였음. whole bacteria를 항원으로 사용하는 것보다 OMP로 사용하는 것이 비특이적 반응을 억제한다는 기존의 보고에 따라 실시함.</p>	<p>추출한 OMP를 항원으로 하여 ELISA를 실시한 결과 <i>M. hyorhinis</i>에 대한 높은 항체를 보였으나 비특이적인 반응이 다소 높았음. 비특이적인 반응을 낮추는 방법을 수행중에 있음.</p>
<p><i>M. hyopneumoniae</i>의 항체조사를 통한 역학적 사항의 분석 (협동2)</p>	<p>농장별 사육단계별 항체조사를 통해 농장내 감염의 유지 및</p>	<p>13개 농장을 대상으로 사육단계별 농장의 항체가 조사.</p>
<p><i>M. hyopneumoniae</i>백신주의 대량 배양 및 공급 (협동 1 및 협동2)</p>	<p><i>M. hyopneumoniae</i>백신 adjuvant 개발을 위한 LPS의 돼지 임상시험</p>	<p>LPS의 tolerable dose의 결정시험: 접종량에 따른 접종부위의 발적, 발열 및 패혈증관련 면역 사이토카인의 분석 <i>M. hyopneumoniae</i>와 LPS접종 후 접종부위의 발적, 발열 및 패혈증의 사이토카인 분석 및 항원특이적 항체 분석 및 isotype분석</p>

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
배양된 수지상세포에 마이코플라즈마 백신 항원의 pulse 적정 조건 수립(협동1)	<ul style="list-style-type: none"> - 표면마커분석 (FACS) - MTT assay - ELISA (IL-12, TNF-alpha) 	<ul style="list-style-type: none"> - 수지상세포 purity검증 (CD11c) - TLR agonist처리후 생존을 평가 - TLR agonist처리후 IL-12분석
T 림프구와 수지상세포의 혼합 배양, 면역사이토카인의 종류 및 생산 조건 연구 (협동1)	<ul style="list-style-type: none"> - 수지상세포/림프구 coculture - CCK-8 assay 	<ul style="list-style-type: none"> - Syngeneic 마우스의 림프구에 대한 항원 pulsed 수지상세포의 항원제시능 시험, 최적조건 수립
수지상세포의 마이코플라즈마 백신항원 탐식과 소화에 관한 연구(협동1)	<ul style="list-style-type: none"> - Mycoplasma FITC 부착실험 - 항원 uptake 분석 (FACS) 	<ul style="list-style-type: none"> - 수지상세포에 Myco-FITC 처리조건 수립 후 형광강도 분석
면역조절물질 효과 분석 (협동1)	<ul style="list-style-type: none"> - Ginsan 등의 천연물질 	<ul style="list-style-type: none"> - 골수세포에 대한 증진효과 분석

나. 2차년도

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
폐에서 <i>M. hyopneumoniae</i> 와 <i>M. hyorhinis</i> 의 균분리(세부)	기존에 보고된 방법을 이용하여 균분리를 실시함(자세한 방법은 하단에 설명)	1차년도에 이어 계속하여 도축장에서 마이코플라즈마의 특이적인 병변인 간변화등의 병변을 보인 폐를 수집하여 균분리를 실시하였음.
<i>M. hyopneumoniae</i> 와 <i>M. hyorhinis</i> 의 동정을 위한 multiplex PCR의 개발 및 시제품 제작(세부)	배양액에서 <i>M. hyopneumoniae</i> 와 <i>M. hyorhinis</i> 의 동정을 위해 PCR의 수행이 필요함. 기존의 보고는 각각에 대한 single PCR의 경우과 보고되고 있고 최근 두 병원체를 동시에 측정할 수 있는 Multiplex PCR이 개발되었으나 두 PCR product의 크기의 차이가 커서 상대적으로 크기가 작은 PCR이 예민도가 뛰어난 단점을 가지고 있음(자세한 방법은 하단에 설명).	<i>M. hyopneumoniae</i> 와 <i>M. hyorhinis</i> 의 PCR product의 차이가 100bp차이 밖에 나지 않는 새로운 multiplex PCR을 개발하였음(특이성이 매우 높은 것으로 확인되었고 민감도가 기존에 보고된 자료 보다 약 10배 정도 높은 것으로 나타났음. 시제품의 제작, 논문발표)
<i>M. hyopneumoniae</i> 와 <i>M. hyorhinis</i> 의 단일 항원을 지닌 세균의 분리(filter cloning) (세부)	Mycoplasma의 경우 항원성이 다양한 clone으로 형성되어 있기 때문에 단순히 집락(colony)만을 분리하는 것이 아니라 filtration & cloning을 실시하여 동일한 항원성을 지닌 homogeneous clone을 분리해야함	<i>M. hyopneumoniae</i> 와 <i>M. hyorhinis</i> 의 표준주 및 분리주를 filtration & cloning을 실시하고 있음. 현재까지 총 20주를 filter & cloning 실시하였음.
<i>M. hyopneumoniae</i> 와 <i>M. hyorhinis</i> 의 면역혈청제조를 위한 항원의 제조 및 토끼에서의 항혈청 제조 (세부 및 협동2)	야외분리균주의 분리동정 및 면역학적 profile의 검사에 있어서 양성혈청은 반드시 필요함. 따라서 항원은 세부연구팀에서 제조하고 토끼에서의 항혈청 생산은 협동2에서 수행함.	총 6두의 토끼를 사용하였음. (<i>M. hyopneumoniae</i> 3두, <i>M. hyorhinis</i> 3두 사용) - 제조한 혈청의 항체가는 <i>M. hyopneumoniae</i> 의 경우 제노바 이텍에서 생산한 ELISA kit를 사용하여 측정하고 <i>M. hyorhinis</i> 는 western blot을 통해 확인하여 높은 역가를 지닌 양성항체를 제조하였음.
<i>M. hyopneumoniae</i> 의 병원성과 관련된 단백질의 검출 및 protein profile의 분석 (세부)	분리된 <i>M. hyopneumoniae</i> 의 분리주의 병원성을 돼지에서 조사하기에 앞서 실험실적으로 고병원성 분리주와 저(비)병원성 분리주를 구분하기 위해 SDS-PAGE 실시한 후 silver stain을 염색하여 181 kDa 크기의 밴드를 보유하고 있는 고병원성 분리주를 확보하고 현재 계속하여 진행되고 있음. 아울러 분리주의 protein profile을 분석하고 있음.	Single clone된 <i>M. hyopneumoniae</i> 분리주와 표준주에 대해 병원성과 관련된 단백질이 보이는 분리주를 다수 확보하였고 현재 계속해서 분석중에 있음. 표준주에 대해서는 기존의 보고와 일치하였기에 본 결과가 타당성이 있음을 입증. 아울러 protein profile을 분석하고 있는중임.

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<i>M. hyorhinis</i> 의 protein profile의 분석 (세부)	<i>M. hyorhinis</i> 에 있어서는 병원성 관련유전자와 단백질에 대해서는 알려진 것이 전무함. 따라서 분리된 <i>M. hyorhinis</i> 의 분리주의 병원성을 돼지에서 조사하기에 앞서 실험실적으로 SDS-PAGE 실시한 후 silver stain을 염색하여 분리주의 protein profile을 분석하고 있음. 이를 통해 동일한 protein profile을 보이는 것끼리 그룹을 구분한 뒤 돼지에서 병원성 실험을 할 예정임	Single clone된 <i>M. hyorhinis</i> 분리주와 표준균주에 대해서 protein profile을 분석하고 있으며 추후 대표적인 protein profile을 보이는 균주를 수개 선발하여 돼지에 병원성 시험을 할 예정임
<i>M. hyopneumoniae</i> 의 유전형 분석 및 병원성 관련 유전자의 검출 (세부)	Single clone된 <i>M. hyopneumoniae</i> 를 대상으로 Random amplified polymorphic DNA(RAPD)를 이용하여 고병원성 분리주에서 검출되는 5 kbp크기의 PCR산물의 검출 및 genotyping을 분석	많은 시행 착오 끝에 RAPD의 분석방법은 확립되었으나 아직까지 5kbp의 증폭산물의 검출은 성공하지 못하고 있음. 2차년도에 마무리 하려고 계속해서 진행중임. genotyping과 protein profile결과와 비교 분석을 통해 국내에서 유행하는 대표분리주를 선발하여 백신후보주 균주를 선발 예정
<i>M. hyorhinis</i> 의 유전형 분석 및 병원성 관련 유전자의 검출 (세부)	Single clone된 <i>M. hyorhinis</i> 를 대상으로 RAPD를 이용하여 genotyping을 분석	많은 시행 착오 끝에 RAPD의 분석방법은 확립되어 일부 결과는 도출하였고 2차년도에 마무리 하려고 계속해서 진행중임. genotyping과 protein profile결과와 비교 분석을 통해 국내에서 유행하는 대표분리주를 선발하여 백신후보주 균주를 선발 예정
<i>M. hyopneumoniae</i> 국내 시판 백신의 마우스 및 돼지에서의 항체 형성능 조사 (협동 2)	국내에서 시판중인 백신에 대한 항체 형성능을 조사하기 위해 마우스 및 돼지에 접종한 후 항체 형성능을 조사하였음.	국내에서 시판중인 백신의 경우 마우스에서는 항체가 매우 높게 잘 형성되었음. 그러나 목적동물인 돼지에서는 백신1만 제외하고는 항체형성이 거의 이루어지지 않았음.
<i>M. hyopneumoniae</i> 의 돼지에서의 항체형성능 조사 및 병원성 조사 (세부 및 협동2)	분석완료된 <i>M. hyopneumoniae</i> 와 <i>M. hyorhinis</i> 에 대한 돼지에 접종한 후 항체형성능 시험과 병원성 시험을 실시	구제역 발생으로 돼지의 수급이 어려워 현재 돼지를 구입할 때까지 연기하고 있음.
○ TLR 2와 4 효능자 이외에 TLR 3와 9 효능자를 추가로 실험 (협동1, 2)	- MH-specific Ig 정량 ELISA - CFSE/마커 이용한 FACS분석 - MTT assay	- 마우스, 돼지 접종후 면역능평가 - 비장유래 CD19+ 세포 증식확인 - 시료 내의 MH-specific Ig 정량
○ 베타-글루칸을 비롯한 신규 TLR효능자 2종의 백신 증진 효과 실험 (협동1, 2)	- 수지상세포, 림프구 배양 - MH-specific Ig 정량 ELISA - MTT assay	- 베타-글루칸의 생체내 효능시험 - 베타-글루칸의 생체의 효능시험 - CWS 돼지 접종후 면역능평가
○ 균체 유래의 백신항원 후보단백질 1-2 종 선정 후 실험 (협동1)	- 수지상세포, 비장세포 배양 - MTT assay - Cytokine (IL-12) ELISA	- MH soluble antigen 제작 - MH항원의 세포생존율 영향평가 - MH항원의 IL-12 생산능 확인

다. 3차년도

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>○ Mhp 불활화 백신균주의 선발 (세부 & 협동 2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Mhp 분리주의 protein profile 조사 - Mhp 분리주의 유전형 조사를 위한 RAPD 실시 - 고병원성 Mhp분리주를 포함한 분리주의 증식성을 조사 - 고병원성 분리주에서 Mhp불활화백신후보균주 5주 선발 - 선발된 5주를 불활화 시킨 후 어쥬반트를 첨가한 후 돼지에서 2회에 걸쳐 최종 항체형성능을 조사 - Mhp최종 백신후보주의 결정 	<p>Mhp 국내분리주에서 Protein profile의 분석, RAPD의 분석 및 증식성 분석을 통해 고병원성분리주중 일차로 5주의 후보균주를 선발함. 선발된 5주를 사용하여 각각 시험백신으로 제조한 후 돼지에서 항체형성능을 2차에 걸쳐 비교하여 최종 Mhp5-3주를 불활화백신주로 선정함</p>
<p>○ Mhr 불활화 백신균주의 선발 (세부 & 협동 2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Mhr분리주의 protein profile의 조사 - Mhr 분리주의 유전형 조사를 위한 RAPD 실시 - Mhr 분리주의 증식성 조사 - 상기의 결과를 바탕으로 Mhr 백신후보균주 5주를 1차로 선발 - 선발된 5주를 불활화시킨 후 어쥬반트를 첨가한 후 돼지에서 항체형성능 조사 - Mhr불활화백신균주의 결정 	<p>Mhr 국내분리주를 대상으로 protein profile의 분석, RAPD의 분석 및 증식성 분석을 통해 국내 대표주 5주를 선발한 뒤 각각 시험백신으로 제조한 후 돼지에서 항체형성능을 비교조사하여 최종 Mhr10-10 주를 Mhr불활화백신주로 선정함</p>
<p>○ Mhp major adhesin P97의 epitope인 R1 재조합단백질의 발현, 정제 및 면역원성 시험 (3차년도 추가 계획) (세부)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Mhp에서 P97에서 major epitope인 r1유전자의 증폭 - 면역원성을 높이기 위해 fusion 단백질을 제작하기 위해 <i>E. coli</i> LT유전자의 증폭 - r1+ltb를 합친 ltbr1유전자의 fusion유전자 제작 - 대장균에서 rLTBR1단백질의 발현, 정제 및 확인 (SDS-PAGE 및 Western blot hybridization) - 마우스에서의 면역원성 시험 	<p>Mhp의 초기 감염단계인 부착인자인 P97에 대한 항체를 유도하기 위해 불활화백신에 P97의 epitope인 r1에 대한 재조합 단백질을 발현, 정제하고 확인하였음. (생산량은 9.8mg/ml로 확인)</p> <p>-마우스에서 전신성 면역 및 점막면역능을 확인</p>
<p>○ 생균백신균주 확보를 위한 Mhp와 Mhr의 온도감수성 변이주의 제작 (세부)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - NTG를 처리하여 백신후보주를 대상으로 33℃에서는 증식이 잘되나 37℃에서는 증식이 되지 않는 온도감수성변이주의 제작 시험 	<ul style="list-style-type: none"> - Mhp의 경우 NTG농도를 달리 하여 6차례 시도했으나 온도감수성 변이주를 제작하는데 실패함 - Mhr의 경우 온도감수성 변이주를 제작하는데 성공함. 현재 안전성 조사 실시

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
○ filter cloning을 통한 homogeneous Mhp 및 Mhr clone의 확보 (세부)	- Mhp 및 Mhr의 국내분리주의 homogeneous clone확보를 위한 filter cloning 실시	현재 분리된 Mhp와 Mhr분리주 및 표준균주를 Single clone주로 제조하여 seed 균주로 보유
○ real time PCR을 이용한 항원정량법 개발 (협동2)	- 정량적 real time PCR을 개발하여 보다 CCU와의 비교 시험	마이코플라즈마 기존 정량법인 CCU와 비교시험하여 이와 유사한 결과를 나타내는 정량 real time PCR방법을 개발함
○ Mhr 항체측정을 위한 ELISA법의 개발 (협동2)	- 국내에서는 개발되지 않은 Mhr 항체를 측정하기 위한 ELISA법의 확립	whole Mhr을 항원으로 하는 ELISA방법을 개발하였으나 아직 Mhp와의 교차반응이 잔존함
○ MH에 대한 TLR 효능자 지속실험이외에 MR에 대한 TLR (2, 3, 4, 9) 효능자 평가실험(협동1) ○ 돼지수지상세포를 이용한 TLR효능자의 작용기전 연구 (협동1)	- MHP항원과 MHR 항원의 준비 - 사전시험에서 항원의 종류별 TLR agonist의 최적농도 설정 - MTT assay - 세포크기변화 등 FACS 분석 - ELISA (IL-12, TNF-alpha)	MHP와 MHR 항원에 대한 돼지수지상세포 대상 실험을 실시. MTT 분석으로 생존율 변화, FACS 분석을 통한 세포크기 및 항원탐식능력 변화, ELISA에 의한 면역사이토카인 생산량 변화를 근거로 각 항원에 가장 적합한 TLR agonist의 조합을 발견하였음
○ 베타-글루칸, CWS를 이용한 지속실험을 돼지 대상으로 수행하며 신규 adjuvant 발굴(협동1)	- 돼지골수유래 수지상세포 배양 - MTT assay - FACS 분석	베타-글루칸의 경우 면역증가 정도가 약하였으며, CWS는 보유량이 소진되어 돼지 실험에 어려움이 있었음. 베타-글루칸은 돼지세포를 이용한 <i>in vitro</i> 실험 진행중에 있음
○ 주요 면역세포에 대한 면역능 시험 (<i>in vitro</i>), 작용기전 연구(협동1)	- MHP항원의 비장세포에 대한 면역기능 시험 - 생존율시험, ELISA, FACS 분석	MHP항원은 단독으로 비장세포에 처리 시 생존율을 증진시켰으며, T림프구 mitogen의 존재 하에서는 Th1 shift되는 현상을 확인하였음 (세포성면역 증진효과가 추정됨).

2. 실험방법

(1) Mycoplasma 증식 배지 및 사용한 균주 (세부/협동2)

배지는 20% swine serum이 함유된 Friis배지(Friis, 1975)를 사용하였다. 분리용배지에는 잡균의 오염을 막기 위해 Ampicillin과 bacitracin을 첨가하였다. 고체 배지는 1%의 noble agar가 함유된 Mycoplasma agar media를 사용하였다 항생제로는 1%의 ampicillin과 0.5mg/mL의 bacitracin을 첨가하였다.

사용한 균주는 표준균주로 *M. hyopneumoniae*(Mhp) J(ATCC 25934)를 사용하였고 *M. hyorhinis* Mhr의 경우는 Mhr (ATCC27717)를 ATCC에서 구입하여 사용하였다. 그리고 국내 동물약품제조회사에서 사용하는 백신균주인 Mph NSM 백신균주를 사용하였다. 국내분리주는 경기와 강원지역에서 위치한 36개의 농장의 출하돈의 폐에서 분리하여 분리주로 사용하였다. 분리주의 명명은 가령 Mhp7.25의 경우 7은 농장번호이고 25는 그 농장에서 분리한 분리주순서별로 번호를 매겼다.

(2) 폐에서의 균분리 방법 (세부)

간변화등 마이코플라즈마의 특징적이 폐병변이 관찰되는 폐의 일부를 절개하여 표면을 100% 에탄올로 화염소독을 한 후 내부의 부위를 1cm³정도 절개한 후 bead가 들어간 tube에 옮긴 후 Friis배지를 1mL첨가한 후 Tissue lyzer를 사용하여 조직을 파쇄하였다. 5000rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 수거한 후 다시 12,000 rpm에 30분간 원심분리후 상층액을 버리고 새로운 배지로 2mL로 cell pellet를 부유시킨 후 0.45 μ m syringe filter로 여과후 여과액을 4mL의 Friis배지에 접종 한 후 37°C에서 색깔이 오렌지색 또는 노란색으로 변할 때까지 배양하였다. 배양액을 agar배지에 접종하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 21일간까지 배양하면서 집락을 stereomicroscope으로 관찰하였다. 형성된 집락을 pasteur pipette으로 채취한 후 다시 Friis배지에 접종한 후 색깔이 변할 때까지 37°C에서 배양한 후 일부는 stock을 하고 일부는 DNA를 추출하여 multiplex PCR을 실시하여 species를 동정하였다.

(3) Multiplex PCR방법 (세부)

- 배양액에서 genomic DNA는 Intron의 G-spin Genomic DNA extraction kit 또는 RBC사의 Genomic DNA extraction kit를 사용하여 추출하였다.
- 배양액에서 Mhp와 Mhr 를 동시에 검출하기 위해 multiplex PCR을 다음과 같이 실시하였다.
- 사용한 primer는 아래와 같다(표 3-1).

표 3-1. 사용한 PCR primer와 조건

Primer	Sequence	Old name	Remarks
MhpF-1	5'-act aga tag gaa atg ctc tag-3'	NMF	Size: 430 bp Temp: 60C MgCl ₂ : 2.5mM Weng 2006
MhpR-2	5'-ata cta ctc agg cgg atc att taa c-3'	N2	
MhrF-3	5'-gta gtc aag caa gag gat gt-3'	Sp37	Size: 346 bp Temp: 50C MgCl ₂ : 1.5mM DEA et al (2000)
MhrR-4	5'- gct gga gtt att ata cca gga-3'	Asp37	

- PCR 조건은 아래와 같다.

표 3-2. PCR 조건

No.	PCR conditions	Temp.	Time	Cycle
1	Pre-Denaturation	95℃	5min	30 cycles
2	Denaturation	94℃	1min	
3	Annealing	60℃	1min	
4	Extension	72℃	1min	
5	Post-extension	72℃	15min	

- PCR 실시 후 1.8%의 agarose gel에서 전기영동한 후 PCR 산물을 관찰하여 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinae*를 동정하였다.

(4) 면역혈청을 제조하기 위한 항원의 제조, 동물접종, 혈청분리 (세부/협동2)

- *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinae* 표준균주를 1L 키운 후 15,000rpm에서 40분간 원심분리후 상층액을 제거한 후 PBS(pH7.4)로 2회 세척한 후 PBS로 최종 8mL로 부유했다. 이 중 4mL을 동량의 Freund complete adjuvant와 혼합한 후 emulsion으로 제조했다.
- 나머지 4mL은 -70℃에 보관하다가 boosting시 동일한 방법으로 제조하여 접종하였다.
- Emulsified된 항원을 협동2에서 각 균주당 3마리씩 마리 마리당 1.5mL의 항원을 근육

및 피내로 접종을 한 후 접종 후 21일 후에 채혈을 한 후 다시 제조된 항원을 동량으로 접종하였다.

- 2차 접종 후 3주 후에 채혈을 해서 세부연구팀에서 ELISA와 western blotting으로 면역혈청의 유무를 확인하였다.

(5) Filtration-cloning 방법 (세부)

야외에서 분리된 균주는 mixed clumping이 되어 있고 또한 mycoplasma의 경우 항원적인 다양성이 많이 나타나기 때문에 순수하게 형성된 집락을 분리해야 된다. 이와 같이 순수하고 동질성이 있는 세균들로 이루어진 집락을 분리하기 위해서 다른 세균처럼 단순히 colony를 순수하게 분리하는 방법으로는 성취될 수 없다. Mycoplasma의 경우 0.45 μ m의 filter에 배양액을 통과시키고 통과시킨 배양액을 다시 agar에 접종한 후 다시 집락을 수확하여 Friis배지에 접종하여 배양하고 다시 여과하는 과정을 3반복을 해야 하는데 이러한 과정을 filtration-cloning이라 한다. 이러한 방법대로 국내분리주를 filtration-cloning을 실시하였다.

(6) 분리주의 Protein profile의 분석을 위한 SDS-PAGE와 Westernblot hybridization방법 (세부)

- Mycoplasma에서 단백질을 분리하기 위해서는 균을 Friis배지에서 배양한 후 원심분리를 실시하여 배양액을 제거한 후 균 pellet를 PBS로 2회 세척하였다. 다시 균을 PBS로 잘 부유시킨 후 Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였다. 분석할 총단백질을 1X 샘플 buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS (w/v), 20% glycerol (v/v), 8% 2-mercaptoethanol (v/v) 와 0.02% bromophenol blue (w/v))에 동량으로 희석한 후 5분간 끓였다.
- SDS-PAGE는 Lammlid 등이 보고한 방법에 의해 실시하였으며 10% running gel, 15%의 stacking gel에서 실시하였다. 단백질양은 lane당 보통 7.5 μ g을 분주하였고 size마커로는 Xpert Prestained Protein Marker (GenDepot, USA)를 사용하였다.
- 염색은 Coomassie blue 또는 silver staining을 이용하였고 실버염색의 경우 PlusOne Silver Staining Kit (GE Healthcare, Germany)을 사용하여 염색하여 관찰하였다.
- Gel 이미지는 스캐닝을 한 후 Bionumerics (V5.1, Applied Maths, Belgium)로 데이터를 분석하였다. 서로다른 gel에서 스캐닝한 밴드는 Mhp와 Mhr의 표준균주와 사이즈마커로 표준화시킨 후 분석하였으며 unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA)으로 Curve-based pearson similarity를 산출하였다.
- Western blot 후 membrane을 4% calf serum으로 blocking 시킨 후 1차항체를 2% calf serum이

함유한 TTBS에 1:1000으로 희석한 후 반응시켰다. 사용한 1차 항체는 다음과 같다.

- rabbit anti-*M. hyopneumoniae* whole Ig(본연구팀에서 자체 제조)
- rabbit anti-*M. hyorhinis* whole Ig(본 연구팀에서 자체 제조)
- anti-*M. hyopneumoniae* monoclonal antibody IgG1(제노바이오텍 cat # 9141, *M. hyopneumoniae* OMP)
- 이차항체는 HRP conjugate된 항체를 사용하였으며 1차항체에 따라 다음의 항체를 2% calf serum이 함유된 TTBS에 1:1000으로 희석하여 사용하였다.
- goat anti-mouse IgG-HRP(Santa Cruz Biotechnonology cat # SC-2005)
- goat anti-rabbit IgG-HRP(Santa Cruz Biotechnonology cat # SC-2054)
- 발색은 DAB substrate를 첨가하여 시킨 후 band를 관찰하였다.

(7) Microtiter plate adherence assay (MPAA) (세부)

- *In vitro* adherence를 위해 microtiter assay를 실시하였으며 이 방법은 Zhang등(1994)이 발표한 방법에 따라 실시하였음.
- 7-12주령의 돼지에서 후두에서부터 기관지까지 기관을 무균적으로 채취한 후 결합조직을 제거한 후 RPMI1640배지에 옮겨놓음
- 기관내강의 섬모세포(ciliated cell)을 시료용 스폰으로 긁어 모은 후 Toumanen등(1988)이 보고한 방법에 따라 섬모를 추출하였음. 섬모세포를 TES buffer(20mM Tris, 10mM EDTA, 125mM sucrose, pH7.2)에 부유한 후 원심분리를 300 xg에서 5분간 실시하였음. cell pellet을 6mL의 AES buffer(80mM acetate, 10 mM EDTA, 125 mM sucrose pH6.8)에 부유시킨 후 25°C에 배양한 후 0.2 M CaCl₂를 최종 10 mM되게 첨가하였음.
- 혼합액을 20 mL의 TES로 희석시킨 후 500 xg에서 10분간 원심분리하면 침전물은 주로 cell bodies이고 상층액은 주로 섬모(cilia)로 구성되어 있음. 상층액을 18,000xg에 15분간 원심하여 상층액을 제거한 후 침전된 ciliary pellet을 PBS로 2회 세척한 후 바로 단백질 정량을 실시함 (또는 사용하기 전까지 -70°C에 보관함).
- Cilia를 bicinchoninic acid assay(BCA, Pierce)방법으로 단백질 정량을 실시한 후 PBS에 2mg/mL 되게 농도를 조정한 후 1mg단백질 당 SDS를 1mg을 첨가한 후 37°C에서 45분간 배양시킴. 배양액을 0.1M carbonate buffe(pH9.5)로 희석하여 단백질 농도 10 µg/mL로 조정함.
- 96 well flat bottom m,icrotiter plate에 희석된 섬모단백질 용액을 100µl씩 분주하고 실온에서 18시간 방치시킨 후 -70°C에 보관함. 이 때 음성대조군으로는 섬모단백질 대신에 10 µg/mL porcine albumin(fatty acid free)과 10 µg/mL gelatin용액으로 well을 코팅시킴.
- 상기에서 보관중이던 ciliated cell body도 동일하게 처리한 후 10 µg/mL농도로 조정한 후 microplate well에 분주하여 코팅시킴. PBS(pH 7.4)로 각 well을 4회 세척한 후 200µl의 adherence buffer(AB buffer, 1% gelatin이 함유된 RPMI1640 media)를 각 well에 분주하여 37°C

에서 2시간 배양함으로 blocking시킴.

- 검사할 *M. hyopneumoniae*표준균주, 백신균주, 야외분리주를 동일한 100 color change unit (CCU)/mL로 AB buffer로 희석한 후 well당 100 μ l씩 분주한 후 37°C에서 90분간 반응시킴. 반응 후 부착되지 않은 마이코플라즈마를 제거하기 위해 PBS로 4번 세척함. 1/500로 희석한 anti-*M. hyopneumoniae*토끼혈청을 well당 100 μ l씩 분주한 후 37°C에서 60분간 반응시킨 후 PBS로 4회 세척함.
- 1/500으로 희석한 goat anti-rabbit peroxidase conjugate를 well당 100 μ l씩 분주한 후 37°C에서 60분간 반응시킨 후 PBS로 4회 세척함. 각 well에 100 μ l의 ABTS를 첨가한 후 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 405nm에서 흡광도를 측정하였음.
- ciliated cell body에 대한 마이코플라즈마의 부착도는 microplate에 코팅한 항원만 다를 뿐 동일한 방법으로 실시하였음.

(8) *M. hyorhinis*의 혈청검사를 위한 ELISA진단 방법 (세부)

- *M. hyorhinis*를 2 L 배양한 후 15,000rpm으로 30분간 원심분리한 후 상층액을 제거한 후 10mM HEPES로 3회 세척하였다. 1% sarkosyl처리한 후 OMP를 수확한 후 BCA방법으로 단백질 정량을 한 후 ELISA항원으로 사용하였다.

(9) 면역혈청에 대한 역가 측정 (세부)

- 토끼에서 제조한 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 혈청에 대해 ELISA를 실시하여 양성혈청의 역가를 조사하였다. *M. hyopneumoniae*의 양성혈청에 대한 역가는 1/50 - 1/6400으로 계단 희석을 한 뒤 제노에서 판매하는 MH-OMP항원과 MH r-P46항원이 코팅된 ELISA를 사용하였고 방법은 제조회사의 방법대로 실시한 후 OD 405nm에서 측정하였다.
- *M. hyorhinis*는 제노바이오텍과 공동으로 제조한 OMP항원을 코팅한 후 혈청을 상기의 방법대로 희석한 후 반응시킨 후 이차항체는 Goat-anti-rabbit IgG (50ng/mL)로 반응시킨 후 TMB로 발색시켜 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

(10) 분리주의 유전형 분석을 위한 Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석 (세부)

분리주의 유전형과 기존의 보고대로 약 5kbp의 밴드가 검출되는 고병원성 균주를 스크리닝 하기 위해 RAPD를 실시하였다. 균을 배양한 후 genomic DNA는 Genomic DNA extraction Mini kit(RBC Biosciences, Taiwan)을 사용하여 추출하였다. DNA정량은 NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer(Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)을 사용하여 정량하였다. RAPD는 이전에 보고된 방법을 약간 수정하여 실시하였다(Stakenborg et al., 2006; Vicca et al., 2003). 증폭사이클은(1 min at 95° C; 1 min at 37° C; 2 min at 72° C) PTC100 Thermal Cycler(MJ Research, USA)을 사용하여 실시하였다. 30ng의 추출한 genomic DNA,

2 mM MgCl₂, 20 pmol OPA-3 primer, 1X AccuPower[®]PCR Premix (Bioneer, South Korea), 1X Stoffel Buffer와 2U Amplitaq DNA polymerase Stoffel Fragment(Applied Biosystems, USA)를 넣은 후 총25μl 되게 맞추었다. 증폭된 PCR산물을 전기영동하였으며 이때 사이즈 마커로는 Quick-Load[®]1kb DNA ladder(NEB, USA)을 사용하였다. DNA fragments의 촬영은 GelDocTMXR(Biorad, USA)로 실시하였고 Bionumerics(V5.1, Applied Maths, Belgium)를 이용하여 분석하였으며 500 bp이하되는 것은 분석에서 제외시켰다. similarity coefficients 의 계산은 Dice algorithm을 이용하여 수행하였으며, unweighted pair group 방법으로 with arithmetic means(UPGMA) clustering을 실시하였다.

(11) 시험관내 증식성 측정 (세부)

시험관내 증식성을 측정하기 위해서 Friis 배지에 배양한 균을 기존의 방법에 의해 희석을 한 후 CCU를 측정하였다. CCU의 정확성을 높이기 위해 3회 반복하여 측정하였다.

(12) 돼지에서의 항체측정 (협동2)

3주령된 Mhp항체 음성인 자돈을 구입하여 임의로 균을 구분한 뒤 분리주를 접종하였다. 시험백신은 일정량의 CCU를 가진 균주를 불활화 시킨 후 동량의 오일 어쥬반트와 혼합한 후 근육내 접종하였다. 이 때 양성대조군으로 시판중인 레스피슈어 백신을 접종하였다. 백신접종 후 2주후에 채혈을 실시하였고, 2차백신 접종 후 2주와 4주째에 채혈을, 3차백신접종 후 2주째에 채혈을 실시하였다. 혈청을 분리한 후 Mhp의 항체는 indirect ELISA (IDEXX HerdChek *Mycoplasma hyopneumoniae*[®], IDEXX Laboratories, USA)을 사용하여 제조회사의 방법에 따라 수행하였다. 항체 양성은 sample-positive (S/P) ratio를 산출하였고, S/P > 0.4 인 혈청을 양성으로 간주하였다.

(13) 주요 부착항원인 P97의 대장균에서의 발현 (세부)

(가) 목적

- *M. hyopneumoniae* 의 감염의 초기이자 중요한 단계는 호흡기내로 침투한 후 호흡기 섬모에 부착되어 집락을 형성하는 과정이다. 이 과정에 주요 부착인자(adhesin)을 작용하는 P97의 R1(AAKPV-E) repeat가 섬모의 수용체와 결합을 한다(Minion et al., 2000). 집락화가 된 이후 장상피세포로부터 섬모가 탈락되면서 이차감염을 유도하게 된다(DeBey and Ross, 1994). P97 adhesin은 면역원성이 높은 항원으로 돼지에서 이에 대한 항체가 형성이 된다(Klinkert et al., 1985; Zhang et al., 1995). 또한 회복기 돼지 항체에서는 R1 repeat 에 대한 항체가 검출된다고 보고되었다(Minion et al., 2000).
- 더욱 중요한 것은 현재 시판되고 있는 whole cell 불활화백신에는 P97에 대한 전신성

항체가 형성이 되지 않는다고 보고되었다. 그러한 이유는 불활화백신으로 사용하는 균주가 P97을 발현하지 않기 때문으로 추측하고 있고, P97 이 백신균주를 계대배양하는 동안 소실되는 것으로 알려지고 있다(King et al., 1997). 따라서 P97을 백신에 포함된다면 효과가 더욱 우수한 백신이 될 수 있을 것으로 판단된다.

- 현존하는 이러한 장애를 극복하기 위해 본 연구팀에서는 당초 계획했던 계획을 대폭 수정하여 P97의 R1 repeat를 대장균에서 발현시켜 정제한 후 현재 제조하고 있는 불활화백신에 첨가할 때 P97에 대한 항체가 야의 Mhp의 감염에 효과적인 방어를 할 수 있으리라 판단되어 정제를 수행하였다.

(나) 대장균에서의 클로닝

Mhp 7-25 분리주에서 Genomic DNA extraction Mini kit (RBC Biosciences)를 추출하였다. Enteritoxigenic E. coli (ETEC)에서 genomic DNA는 boiling method에 의해 추출하였다. 이 경우 ETEC대장균을 Luria-Bertani(LB) 배지에서 37° C 20시간 배양한 후 세균을 수확한 후 PBS로 부유한 후 100° C에서 5분간 끓인 후 14,000 × g에서 1분간 원심분리한 후 상층액을 채취 -20° C에서 보관하였다.

(다) P97 클로닝

Mhp의 주요 부착인자인 p97의 R1 repeat region (r1)을 다음과 같이 PTC-100 thermocycler를 사용하여 증폭하였다 : 95 ° C, 2분 denaturation시킨 뒤 95 ° C, 20초, 56.5 ° C 40초, 72 ° C, 15초간 30 cycle을 증폭시킨 뒤, 72 ° C에서 5분간 최종 증폭시켰다. E. coli heat-labile enterotoxin subunit B gene (eltb)유전자의 증폭을 위해서는 95 ° C, 2분간 denaturation시킨 뒤, 95 ° C, 20초, 57.5 ° C, 40초, 72 ° C, 15초간 30 cycle을 증폭한 뒤, 72 ° C에서 5분간 최종 증폭시켰다. 반응용량은 50 μl로 5 μl 10× buffer, 4 μl 2.5 mM dNTPs, 20 pmol primer, 0.5 μl (1.25 unit) PfuX DNA polymerase (Solgent), 10 μl 5X Band Doctor, 24.5 μl Milli-Q 증류수 및 20 ng template DNA를 첨가하였다.

다음 primer를 사용하였다:

R1 forward 5' -CACCATGGGGATCCCTACAAAAGAAG;

R1 reverse 5' -GCCAAGCTTAGTAGCAACTGGT;

LTB forward 5' -CACCATGGCTCCCCAGACTATTACA;

LTB reverse 5' -CTGGATCCCCATACTGATTGC(Conceicao et al., 2006).

LTB reverse primer와 R1 forward primer에 BamHI restriction site 추가로 삽입하였고 ltb의 3' end와 r1유전자의 5' end가 inframe로 fusion되게 클로닝을 하였다. 이 방법은 각각의 PCR산물을 제한효소로 처리한 후 ligation을 시킬 때 직접 fusion이 되도록 하기

위함이었다. LTB forward primer는 5' 말단에 CACC 서열을 가지고 있는데, 이를 통해 직접 pENTR/SD cloning plasmid에 클로닝을 시켰다(Gateway system, Invitrogen). PCR amplification 후, 각각의 PCR산물을 HiYield Gel/PCR DNA Extraction Kit(Real Biotech)으로 clean up 시킨 후 BamHI 제한효소로 처리한 후 phenol-chloroform방법을 통해 단백질을 제거한 후 침전을 시킨 후 T4 DNA ligase (Invitrogen) 로 반응시켜 Itbr1 fusion을 제작하였다. 추가 클로닝을 위해 Itb1절편을 증폭하기 위해 PfuX DNA polymerase를 사용하였다. 이 반응은 LTB forward와 R1 reverse primers를 사용하여 Itb과 r1 fragment를 하나의 fusion으로 클로닝하기 위해 수행하였다. 따라서 Itbr1 gene을 pENTR/SD vector에 직접 클로닝이 가능하게 되었다(Gateway system, Invitrogen). E. coli TOP 10 competent cell에 상기의 ligation product를 electroporation시켜 형질전환을 실시하였고 재조합된 클론의 집락을 50 μ g/ml의 kanamycin이 함유된 LB medium 에 접종한 후 배양하였다. pENTR/SD-Itbr1 plasmid는 HiYield Plasmid Mini Kit 를 사용하여 분리하였고 colony PCR 과 M13 universal primer를 사용하여 DNA 염기서열을 분석하였다.

(라) *M. hyopneumoniae* major adhesin P97 재조합 rLTBR1단백질 발현과 정제

Itbr1 유전자를 pENTR/SD에 클로닝한 후 Gateway LR-Clonase™ II Enzyme Mix를 사용하여 제조회사의 방법에 따라 site-specific recombination reaction을 실시하였다(Gateway System, Invitrogen). 이 방법은 pENTR/SD cloning vector에 있는 insert 유전자를 pETDEST42™ 발현벡터에 삽입하는 것이다(Invitrogen) (그림 3-1). 이 Itbr1이 포함된 재조합 발현 벡터를 E. coli TOP 10 competent cell에 형질전환시켜 재조합 단백질 발현 clone을 제조하였다. Transformant를 100 μ g/ml ampicillin LB배지에 옮긴 후 colony PCR 과 DNA sequencing을 통해 pETDEST42-Itbr1 clone을 동정하였다. 동정된 단백질 발현 plasmid를 E. coli BL21 (DE3) competent cell에 electroporation에 의해 형질전환시켰다. 선발된 recombinant clone을 100 μ g/ml ampicillin이 첨가된 50 ml LB broth에 접종한 후 18시간 진탕배양을 하였다(37 ° C, 220 rpm). 배양액 25 ml를 100 μ g/ml ampicillin이 첨가된 1 L LB broth에 접종한 뒤 OD600 = 0.6때까지 진탕배양을 실시하였다(37 ° C, 220 rpm). 이 때 재조합 단백질의 발현을 위해 1 mM isopropylthio- β -d-galactoside (IPTG)을 첨가한 후 추가로 3시간 더 배양하였다. 배양액을 4000 \times g 20분간 원심분리를 한 뒤, pellet을 lysis buffer(20 mM Tris, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10% glycerol, 0.25% Tween 20, 1 mg/ml lysozyme)로 부유한 뒤 sonication을 실시하여 세포벽을 파쇄하였다. 10,000 \times g, 30분간 원심분리한 뒤 상층액을 수확한 뒤 Ni-NTA 50%와 1시간 흡착시켰다. 발현된 재조합 단백질은 HisPur Ni-NTA affinity chromatography을 사용하여 제조방법에 따라 정제하였다 (Thermo Scientific, USA).

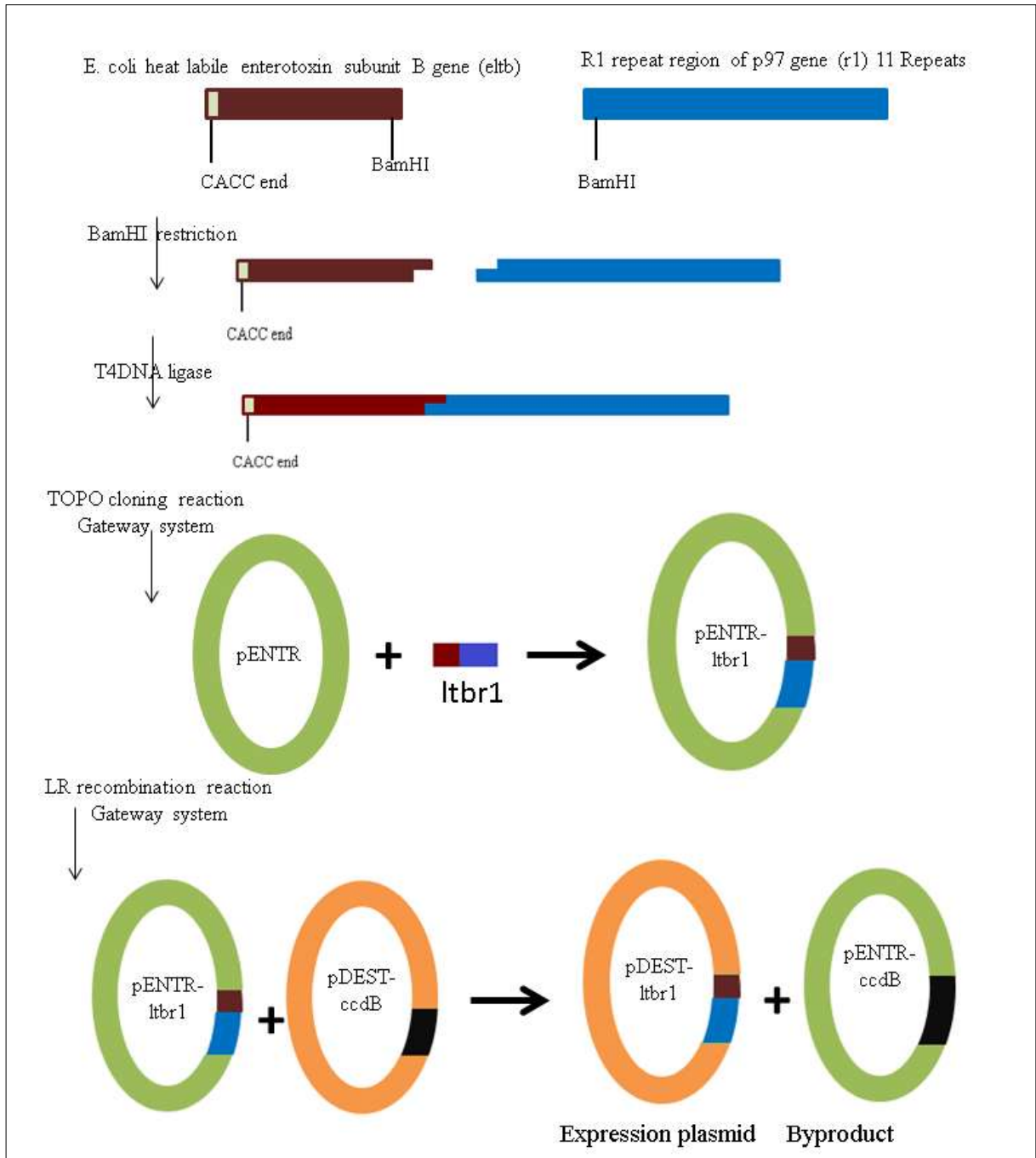


그림 3-1. Flow chart depicting the steps involved in cloning of ltbr1 into pDEST vector.

(마) SDS-PAGE와 Western blotting

Induction 시키고 분리정제한 rLTBR1 단백질을 1X sample buffer(0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS(w/v), 20% glycerol(v/v), 8% 2-mercaptoethanol(v/v), 0.02% bromophenol blue(w/v)와 섞은 뒤 끓는 물에 5분간 처리하였다. 재조합 단백질의 분석은 12% SDS-PAGE 를 실시하였고(Laemmli, 1970), 단백질 농도는 Pierce® BCA Protein Assay Kit(Thermo Scientific, USA)을 사용하여 측정하였고, Xpert Prestained Protein Marker(GenDepot, USA)를

사이즈마커로 사용하였다.

Western blotting을 위해서, 정제된 rLTBR1을 12% SDS-PAGE로 전기영동한 후 membrane에 흡착시켰다. 5% non-fat dry milk로 blocking시킨 후 membrane을 1:100으로 희석한 rabbit anti-6XHis antibody와 반응시켰다. PBS-T로 3회 membrane을 세척한 뒤, 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride(Sigma, USA)으로 발색시켰다.

재조합 단백질 rLTBR1이 polymerization이 되는지를 확인하기 위해, 먼저 열처리 하지 않은 정제된 fusion단백질을 anti-cholera toxin antibody로 확인하였다. 이를 위해 blotting한 membrane을 1:3000으로 희석한 rabbit IgG anti-cholera toxin으로 반응시킨 뒤, 1:2000으로 희석한 goat IgG anti-rabbit IgG peroxidase antibody로 반응시켰다. 나머지는 상기에 기술한 방법과 동일하게 수행하였다

(바) 마우스에서의 유전자 재조합단백질의 면역원성의 측정을 위한 시험

7주령된 BALB/c 암컷을 구입하여 개체식별을 위해 표시를 한 뒤 5마리씩 4군으로 나누었다. 1군에는 비강내로 정제된 rLTBR1 21.7 μg 을 0, 15, 30일째 접종하여 총 65.1 μg 의 rLTBR1을 접종하였다. 2군에는 21.7 μg 의 rLTBR1을 0, 15, 30일째 근육내 접종을 해서 총 65.1 μg 의 rLTBR1을 접종하였다. 3군에는 시판중인 *M. hyopneumoniae* 불활화 백신(bacterin)을 돼지의 접종용량의 1/20 dose로 0, 15일째 근육내 접종하였다(양성대조군). 4군의 경우 PBS 30 μl 를 0, 15, 30일째 접종하였다(음성대조군). 비강내 접종은 마취를 하지 않고 실시하였고 micropipette을 사용하여 15 $\mu\text{l}/\text{nare}$ 로 접종하여 총 30 $\mu\text{l}/\text{animal}$ 을 접종하였다. 혈액의 채취는 접종 후 0, 15, 30, 45, 60일째에 retro-orbital sinus에서 실시하였고 혈청을 분리한 후 사용할 때까지 -20°C 에서 보관하였다. 실험동물의 사용은 강원대학교 실험동물윤리규정에 의해 수행하였다.

(14) 온도변이주 (temperature sensitive mutant)의 제작 (세부)

신선한 broth culture 10ml을 준비하여 10mg/ml의 NTG(N-methyl-N'-nitrosoguanidine) 100ul을 처리한 후 37°C에서 한 시간 동안 incubation시킨 다음 agar에 접종하여 33°C incubator에서 배양한다. 1~2주 동안 배양하면서 colony가 관찰되면 pick-up하여 broth에 배양하고 균이 잘 자라면 33°C와 37°C에서 각각 배양하여 33°C에서만 자란 균을 선발하여 screening을 실시하였다. Screening은 96well plate에 균주를 10진 희석하여 동일한 두 개의 plate를 준비하고 33°C와 37°C에서 각각 배양하여 10-2이상 차이나는 것을 1차적으로 temperature-sensitive phenotype으로 선발하고 선발된 균주를 다시 CCU/ml을 측정하여 33°C와 37°C에서의 CCU/ml차이를 비교하여 확실한 차이를 보이는 것을 ts phenotype으로 선발하였다.

(15) 마우스의 사용 및 접종실험 (협동1)

본 연구에 사용된 마우스는 C57BL/6 또는 Balb/c strain이었고 모든 실험에서 7-12주령의 암컷을 사용하였다. 동물실험은 제주대학교 동물실험위원회의 동물사용에 관한 규정에 따라 실시하였다. *Mycoplasma hyopneumonia*(이하 MHP) 접종을 위해 마우스를 control(대조군), MHP only, MHP+Alum, MHP+LPS, MHP+Alum+LPS 5군으로 나누었다. MHP는 마리당 50 µg, Alum은 마리당 25 µl, LPS는 마리당 1 mg/kg씩 접종하였다. 2주 간격으로 동일한 용량으로 2번 접종을 하고나서 2주 후에 그 효과에 대한 실험을 실시하였다.

(16) Mycoplasma 균체 및 TLR agonists (협동1 & 2)

MHP균체를 중앙백신(주)에서 공급받아 실험에 사용하였다. 균체는 배양액에서 자란 후 포르말린에 고정된 상태였으며 본 연구에서 사용 전 인산완충액 또는 세포배양배지로 넣어 사용하였다. Mycoplasma균체는 intact bacteria 또는 sonication에 의한 soluble 항원으로 사용하였으며, 단백질 함량을 알아보기 위해 Bradford method(Bio-Rad Labs, Inc.)를 사용하였다. 표준단백질로 bovine serum albumin(Sigma Co.)을 사용해 측정된 결과 Mycoplasma 균체(intact bacteria)의 단백질 함량은 123 µg/ml이었다. 또한 본 연구에서는 TLR agonist로서 TLR2의 대표적인 agonist인 zymosan(A from *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma)과 PGN(Peptidoglycan SA), TLR3의 대표적인 agonist인 polyI:C(Sigma), TLR4 agonist인 lipopolysaccharide(*E. Coli* serotype O26:B6유래, Sigma), TLR7/8 agonist인 imiquimod(Sigma) TLR9 agonist인 oligodeoxynucleotide(ODN) 1826(강원대), 2007(InVivogen)을 사용하였다. 수지상세포의 항원탐식능 측정을 위해 Mycoplasma균체에 형광물질(fluorescein isothiocyanate; 이하 FITC)부착한 후 실험에 이용하였다. TLR agonist 처리 시 수지상세포의 항원탐식능을 알아보기 위해서 FluoroTag FITC conjugation kit(Sigma)를 이용하여 mycoplasma 균체를 FITC로 labeling시켰다. 균체를 sodium carbonate-bicarbonate(CB) buffer로 세척한 후 FITC 용액과 실온에서 2시간동안 반응시킨 후 실험 시까지 냉장으로 보관하였다.

(17) 마우스 수지상세포, 비장세포의 채취, 배양, coculture실험, 돼지 수지상세포의 배양 (협동1)

마우스 수지상세포의 배양 : C57BL/6 마우스의 대퇴골과 경골을 채취하여 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)을 골수 강 내로 넣어주어 골수세포를 채취하였다. 이 후 저장 용액 (hypotonic solution)인 ammonium chloride potassium(ACK) lysis buffer를 이용하여 실온에서 10분간 반응하여 적혈구를 용혈시켰다. 골수세포를 mouse GM-CSF(granulocyte macrophage-colony stimulating factor)가 첨가된 RPMI-164(5% FBS) 배지에 부유시켜

6-well plate 넣고 5% CO₂가 공급되는 37°C incubator에서 배양하였다. 2일마다 GM-CSF가 첨가된 새로운 배지로 교체하였다. 배양 2일과 4일에는 전체 배지를 교체하여 배양액 중에 떠 있는 granulocyte와 lymphocyte를 제거하였고, 배양 6-10일에는 60% 이상의 배지를 새 것으로 교체하였고, 떠 있는 수지상세포를 실험에 사용하였다.

마우스 비장세포의 채취 및 배양 : 비장세포를 채취하기 위해 7-12 주령의 C57BL/6J 또는 Balb/c mouse의 비장을 떼어내 PBS에서 비장을 세척한 후 분쇄시켜 세포를 얻어내었다. 이 세포들을 저삼투압 용액에 실온에서 10분 간 반응시켜 적혈구를 용혈 시키고 원심분리 한 후 5 % Fetal Bovine Serum(FBS)와 L-glutamine, penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI1640 배지에서 1시간 간 배양하여 부착세포를 제거하였다. 그 뒤 부유되어 있는 세포를 걸어내 원심분리 한 후 10 % FBS와 L-glutamine, penicillin/streptomycin, sodium pyruvate, non-essential amino acids, 2-mercaptoethanol이 첨가된 RPMI 1640 배지를 넣고 실험에 필요한 세포수를 맞춰서 6 well 또는 96 well culture plate에 seeding 하여 배양하였다. 세포배양 시 온도는 37 °C, CO₂의 농도는 5%를 유지하도록 하였다.

수지상세포와 비장세포의 coculture 실험 : 수지상세포에 Mycoplasma균체와 TLR agonist를 처리하여 2일 동안 반응시킨 후 수거하였다. Trypan blue exclusion test로 숫자를 센 후 비장세포와 함께 배양하였다. 비장세포는 2×10^5 /well, 수지상세포는 1×10^4 /well과 3배 단계 희석농도로 96-well plate에 각각 100 μ l/well로 넣고 5일간 함께 배양한 후 림프구의 성장률과 면역사이토카인을 정량하였다. 림프구의 성장률 측정을 위해 Cell counting kit(CCK)-8 assay를 이용하였다. 배양한 세포에 10 μ l/well로 CCK-8 용액을 넣고 4시간 후에 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

돼지 골수 유래 수지상세포 배양 : 4주령 돼지의 상완골, 대퇴골, 경골에서 골수세포를 분리한 후 적혈구를 제거하고 5 % FBS와 L-glutamine, penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI1640 배지에 swine GM-SCF(10 ng/ml)를 첨가하여 6일 이상 배양한다. 매 2일마다 세포배양배지를 교환해 주며 8일 이상 배양한 수지상세포를 실험에 사용하였다.

(18) 세포관련 실험 (In vitro tests): (협동1)

세포의 생존율시험, 세포모양 관찰 : 세포를 96 well culture plates에 seeding 하고 2일간 배양한 후 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma) assay와 trypan blue exclusion test로 분열능력과 생존능력을 평가하였다. 세포에 MH항원, TLR agonist, 후보물질 등을 처리한 뒤 배양시켰다. MTT assay를 위해서 배양한 세포에 10 mg/ml MTT solution을 10 μ l/well씩 처리하여 4시간 동안 37°C에서 배양을 한 후, 다시 10% sodium dodecyl sulfate(SDS)를 100 μ l/well를 처리하여 2시간 후 microplate reader(Molecular devices, Sunnyvale, CA)를 사용하여, 570 nm - 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 배양 세포의 생존율을 알아보기 위해 trypan blue solution(Invitrogen,

Carlsbad, CA)으로 세포를 염색하여, 살아있는 세포와 죽은 세포의 수를 세었다. 배양된 세포의 사진은 inverted microscope(Olympus Co., Tokyo, Japan)에서 digital camera(Cannon Inc., Tokyo, Japan)를 연결하여 촬영하였다.

분리된 골수세포에 대한 면역조절물질 효과시험 : 마우스를 안락사 시킨 후 수지상세포를 얻을 때와 같은 방법으로 골수세포를 채취하였다. Cell strainer를 이용하여 single cell만을 모으고 ACK lysis buffer를 이용하여 비장세포에서 적혈구를 제거한 후 실험에 사용하였다. Mycoplasma 백신의 효과를 증진시키기 위해 면역조절이 가능한 후보물질들을 시험하였으며, 실험이 까다로운 수지상세포 대신에 상대적으로 배양이 쉬운 골수세포를 대상으로 효과를 시험하였다. 본 연구에서는 원자력병원에서 공급받은 ginsan이라는 polysaccharide와 수종의 저분자 ginsenosides, beta-glucan의 면역조절효과를 측정하였다.

(19) 항체가 시험 (Humoral immunity) (협동1)

마우스 혈청채취와 MH-specific IgG, IgM 정량시험 : 마우스에 백신후보물질 등을 2주 또는 2주/4주에 접종하였다. 접종 끝난 후 2주 뒤에 마우스를 안락사시킨 뒤 심장채혈을 통해 마우스 혈액을 채취했다. 마리당 채혈량은 500 ~ 1000 μ l였으며 상온에서 2시간동안 응고한 후 microcentrifuge를 이용해 혈청을 분리하였다. MH항원을 immunosorbent plate에 넣어 16시간동안 coating시킨 후 희석된 혈청(시료)을 넣고 2시간 동안 배양하였다. 이후 Ig의 isotype을 확인하기 위해 horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 goat anti-mouse IgG, IgM, IgA, IgE를 넣었고 substrate를 첨가하여 발색시켰다. 흡광도는 405 nm에서 측정하였다.

돼지 혈청채취와 MH-specific IgG 정량시험 : 돼지에 백신후보물질을 냉장상태로 (주) 중앙백신으로 보냈으며, (주)중앙백신은 처치군 별로 2-3마리의 돼지를 이용하여 접종하였고 접종이 끝난 후 2주에 혈청을 채취하여 냉장상태로 제주대에 보냈다. MH-specific swine IgG의 정량시험은 HRP가 결합된 anti-swine IgG를 사용한 것을 제외하고는 마우스와 동일하였다.

혈청, 세포배양액 내 면역글로블린 항체가 측정 : 접종한 마우스의 혈청과 비장세포 세포배양액 내의 MHP 특이적인 항체를 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)를 이용하여 측정하였다. MHP를 1 μ g/ml이 되도록 carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)에 희석시켜 Microtiter plates wells(NUNC사)에 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 코팅시켰다. 그 후 5% FBS를 포함한 PBS를 각 well에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 배양하여 blocking하였다. PBST(PBS containing 0.05% Tween20)로 세척한 후 0.5% FBS를 포함한 PBS로 희석시킨 혈청과 세포배양액을 well 당 100 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 PBST로 세척한 후 horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG 또는 IgM을 0.5% FBS를 포함한 PBS에 8000배 희석시켜 well당 100 μ l씩 넣고 실온에서 30분간 반응시켰다. 세척단계

후에 tetramethyl benzidine용액을 각 well에 100 μ l씩 넣어 어두운 곳에서 30분간 발색시키고 stop solution으로 enzyme reaction을 중단시킨 후 microplate reader(Molecular devices사)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과값은 흡광도가 0.1인 수치를 환산하여 나타내었다.

(20) 면역싸이토카인 정량분석 (협동1)

마우스 면역싸이토카인 분석 : CytoSet antibody pair(Biosource international)을 이용하여 ELISA를 실시하였다. Interleukin(IL)-4, IL-12, interferon(IFN)-gamma, tumor necrosis factor(TNF)-alpha 등을 분석하였으며, 표준항원으로 standard curve를 만들어 정량하였다.

돼지 면역싸이토카인 분석 : 위와 같은 방법으로 swine IL-12, swine TNF-alpha의 생산량을 CytoSet™kit(Invitrogen)를 이용해 측정하였다.

(21) 유세포분석 (협동1)

마우스 비장세포 분석 : 백신후보물질이 접종된 마우스의 비장세포를 채취한 뒤 carboxyfluorescein succinimidyl ester(CFSE)로 labeling시켰다. 이후 비장세포를 96-well culture plate에 setup한 후 MH항원을 첨가하거나 첨가하지 않고 배양하였다. 배양이 끝난 세포는 CD3와 CD19 특이항체를 1 μ g/sample의 농도로 30분간 염색한 후 유세포분석을 실시하였다. CFSE는 proliferation이 진행될수록 intensity가 낮아지고 CD3와 CD19는 phycoerythrin(PE)으로 염색되어, FACS의 dot plot quadrant에서 left/upper region에 나타나는 세포의 %가 높을수록 특정마커의 proliferating세포의 수가 많음을 나타낸다.

세포형태 및 기능변화 측정 : 세포의 크기 변화와 면역세포의 비율변화, 활성화 여부 등을 알아보기 위해 면역형광 염색을 실시하고 FACSCalibur® flow cytometer(BD Biosciences)와 CellQuest software를 이용하여 분석하였다.

- Cell size : 세포 크기 측정을 위해 세포들을 2일 간 배양 후 걷어내어 각각 5% FBS와 0.1% sodium azide가 함유된 FACS Staining Solution(FSS)을 이용하여 washing 한 후 FACS Calibur를 이용해 FSC와 SSC를 측정하였다.

- Surface marker staining : 면역세포들의 표면 마커 발현 변화를 알아보기 위해 biotinylated anti-mouse CD3, CD19, mouse IgG labeled anti-swine MHCII, FITC labeled anti-human CD40를 이용하여 표면 형광염색을 하였다. 2차 항체로는 streptavidin PE 와 anti-mouse Ig PE를 이용하였다.

- Antigen uptake : 수지상세포의 항원탐식 능력을 알아보기 위해 FITC labeled mannosylated albumin을 5 mg/ml 씩 넣고 4 °C 또는 37 °C에서 1시간 동안 반응시킨 후 세포를 걷어 분석하였다. 또한 intact bacteria를 사용한 경우 수지상세포를 TLR agonist

로 각각 처리한 후 FITC labeled mycoplasma균체를 처리하여 ice-cold PBS로 세척한 후 0.1% sodium azide, 5% FBS, 1% paraformaldehyde이 첨가된 FACS fixation solution에 고정한 후 FACSCalibur flow cytometer(Becton Dickinson)와 CellQuest software를 이용해 측정하였다.

- Mitochondrial membrane potential - Rhodamine123 staining : Rhodamine123 solution을 이용하여 세포 내 mitochondria의 membrane potential 변화를 알아보았다. 다른 유세포분석과 마찬가지로 2 일 배양 후의 세포들을 걷어내어 Rhodamine123를 첨가 해 반응시켰고 염색한 당일 분석하였다.

제 4 절 연구개발 수행 결과

1. 도축돈 폐에서의 마이코플라즈마 균의 분리 (세부 & 협동2)

도축장에 출하된 총 36개농장 370개의 폐 샘플에서 Mycoplasma 균분리를 실시하였다. 출하돈은 농장별로 그룹으로 나누어 분리를 했다. 모두 폐에 간경화를 특징으로 하는 마이코플라즈마 병변을 나타내는 폐를 사용하여 분리하였다. 폐조직을 유제후 배지에 접종 한 후 노란색으로 변화되는 배양액에서 DNA를 추출한 후 multiplex PCR을 실시하였다. 168개의 폐재료에서 배양이 되었으며 표 4-1에서 나타나는 바와 같이 이중 *M. hyopneumoniae*(Mhp)가 53개에서 양성을 나타내 14%의 양성율을 보였고 *M. hyorhinis*(Mhr)는 36개에서 양성을 나타내 총 10%의 양성율을 나타냈다. 또한 18개(5%)의 샘플에서 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*가 혼합감염되어 있는 것으로 나타났으며 배양된 55개(15%)의 샘플에서는 두 가지 병원체 검출되지 않았다. 전혀 배양되지 않은 샘플은 208개로 총 56%를 차지하였다(표 4-1).

표 4-1. 도축돈 폐병변에서의 Mycoplasma의 검출

	Number of Isolates	%
<i>M. hyopneumoniae</i>	53	14
<i>M. hyorhinis</i>	36	10
Co-infection of <i>M. hyopneumoniae</i> and <i>M. hyorhinis</i>	18	5
Negative on PCR	55	15
No mycoplasma species	208	56
Total	370	100

상기의 결과를 농장별로 분석을 해 보면 *M. hyopneumoniae*, 또는 *M. hyorhinis* 단독 또는 두 가지 병원체가 혼합감염된 농장은 36개의 농장중 34개를 차지해 94.4%를 나타냈고, 마이코플라즈마가 감염되지 않은 농장은 모두 2개로 5.6%을 차지하여 국내의 대부분의 농장이 백신접종을 하더라도 매우 심각한 수준에 감염되어 있는 것으로 나타났다(표 4-2).

표 4-2. 국내 양돈장에서의 Mycoplasma 감염 실태

<i>Mycoplasma</i> species	Number of farms	%
(<i>M. hyopneumoniae</i> , <i>M. hyorhinis</i> , co-infection of <i>M. hyopneumoniae</i> and <i>M. hyorhinis</i>)	34	94.4
No mycoplasma species	2	5.6
Total	36	100

2. *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 동정을 위한 Multiplex PCR의 개발

- 기존의 multiplex PCR은 증폭된 PCR산물 크기의 차이가 300bp 또는 600bp로 컸기 때문에 상대적으로 primer pair끼리의 경쟁적 관계인 multiplex의 경우 작은 크기의 target부위가 잘 증폭되는 단점이 있었음. 이를 보완하기 위해 기존에 보고된 primer를 재 선택하여 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 PCR산물의 크기가 100bp밖에 되지 않게 조정하여 새로운 PCR을 개발하였음.
- PCR산물의 크기: *M. hyopneumoniae*: 430 bp / *M. hyorhinis* 346 bp
- 돼지에서 흔히 분리되는 *M. flocculare*를 검출하는 primer를 첨가하여 3가지 mycoplasma species를 동시에 검출하는 multiplex를 개발할 예정이었으나 *M. flocculare*의 국내 도입이 지연됨에 따라 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 두가지 병원체만을 폐조직이나 배양액에서 검출할 수 있는 multiplex PCR을 개발하였음.

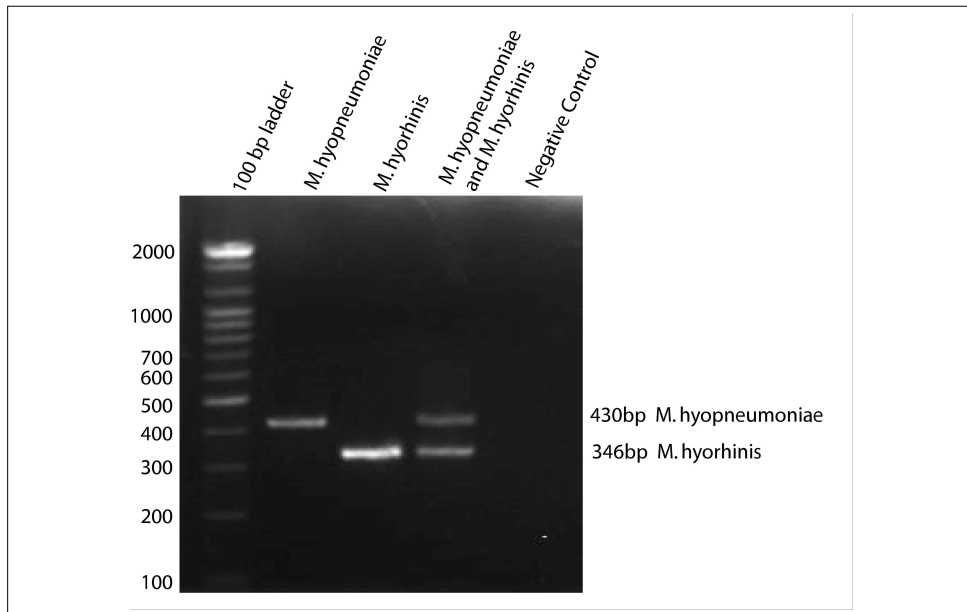


그림 4-1. Multiplex PCR을 이용한 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 검출.

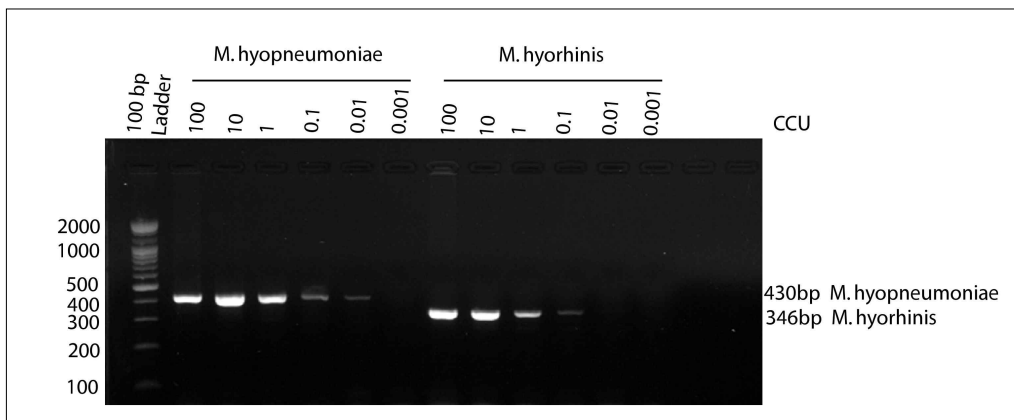


그림 4-2. Multiplex PCR을 이용한 민감도의 측정(CCU).

개발된 mPCR을 사용하여 검출도를 측정한 결과 *M. hyopneumoniae*의 경우 0.01 ccu까지 검출되는 것으로 나타났고 *M. hyorhinis*의 경우 0.1 ccu까지 검출되는 것을 나타냈음. 이러한 검출율은 기존에 보고된 Multiplex PCR보다 민감도가 매우 높은 것으로 나타났음.

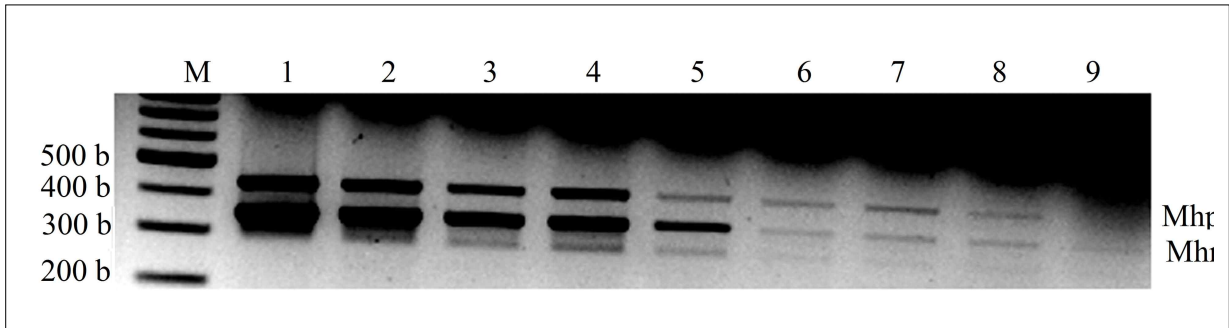


그림 4-3. Multiplex PCR을 이용한 민감도의 측정(DNA 농도).

*M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 DNA를 분리하여 nano drop을 이용하여 DNA를 정량한 후 민감도를 살펴보았다. 본 PCR은 125 fg의 DNA까지 검출하는 것으로 나타났고 Mhr의 경우 65 fg 까지 검출하는 것을 나타남. 이를 균수로 환산하면 Mhp의 경우 100개의 균을, Mhr의 경우 60개의 균이 있으면 검출되는 것으로 사료됨. 기존에 보고된 논문에 의하면 가장 민감도가 높은 것이 Mhp의 경우 1pg, Mhr의 경우 500 fg으로 본 연구에서 개발한 mPCR kit가 10배정도 민감도가 높았다(4-3).



그림 4-4. Multiplex PCR kit의 시제품 제조.

상기의 mPCR기술을 (주)인트론의 요청에 따라 시제품을 제조하여 시험 완료하였고 기술이전 예정임.

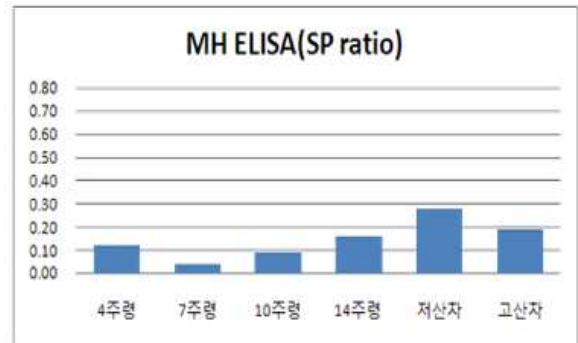
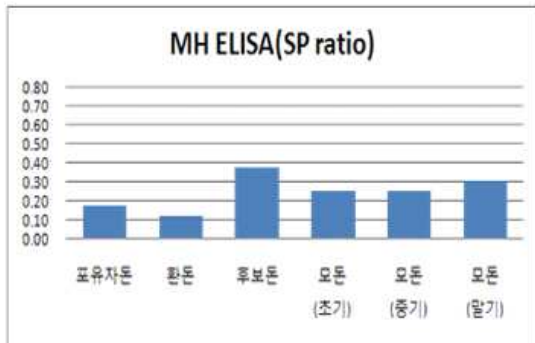
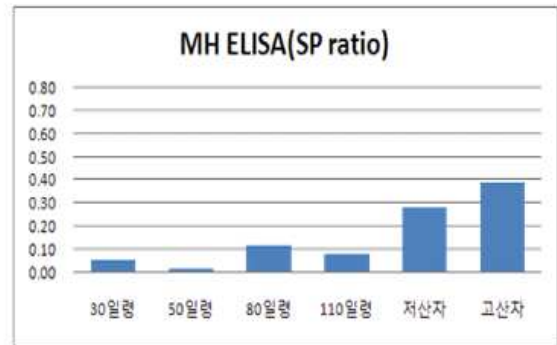
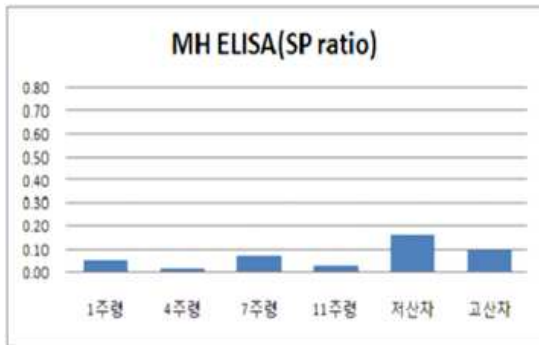
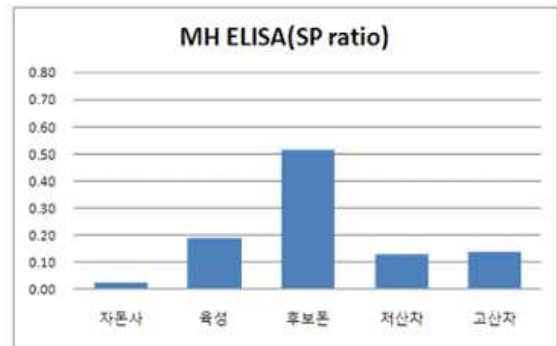
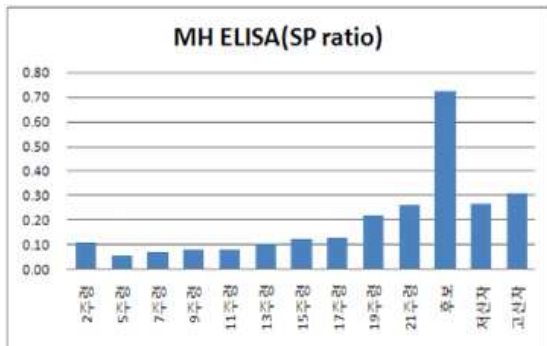
3. Filtration-cloning (세부)

M. hyopneumoniae 및 *M. hyorhinis* 표준균주 및 백신주를 포함하여 Filter cloning을 실시하

였다. Mhp의 경우 총 46개 균주가 single colony로 확보되었고 이 중 filter cloning한 균주는 총 18개주를 선발하여 완료하였다. Mhr의 경우 총 32주가 single colony로 분리 확보되었고 이 중 23주를 filter cloning을 완료하였다.

4. *M. hyopneumoniae*의 혈청학적 역학조사 (세부 & 협동 2)

- 농장내 *M. hyopneumoniae*의 혈청학적 역학조사를 하기 위해 지역적으로 2~3개 농장을 대상으로 혈청학적 조사를 실시하였다.
- 농장별로 차이가 있으나 전반적으로 4주령에서 12주령 사이에 양성율이 낮아 취약한 시기로 나타났다. 따라서 새로 개발된 백신의 경우 이러한 취약한 시기를 극복할 수 있는 제품 개발이나 백신 프로그램을 본 연구과제에서 제공되어야 한다고 판단된다.



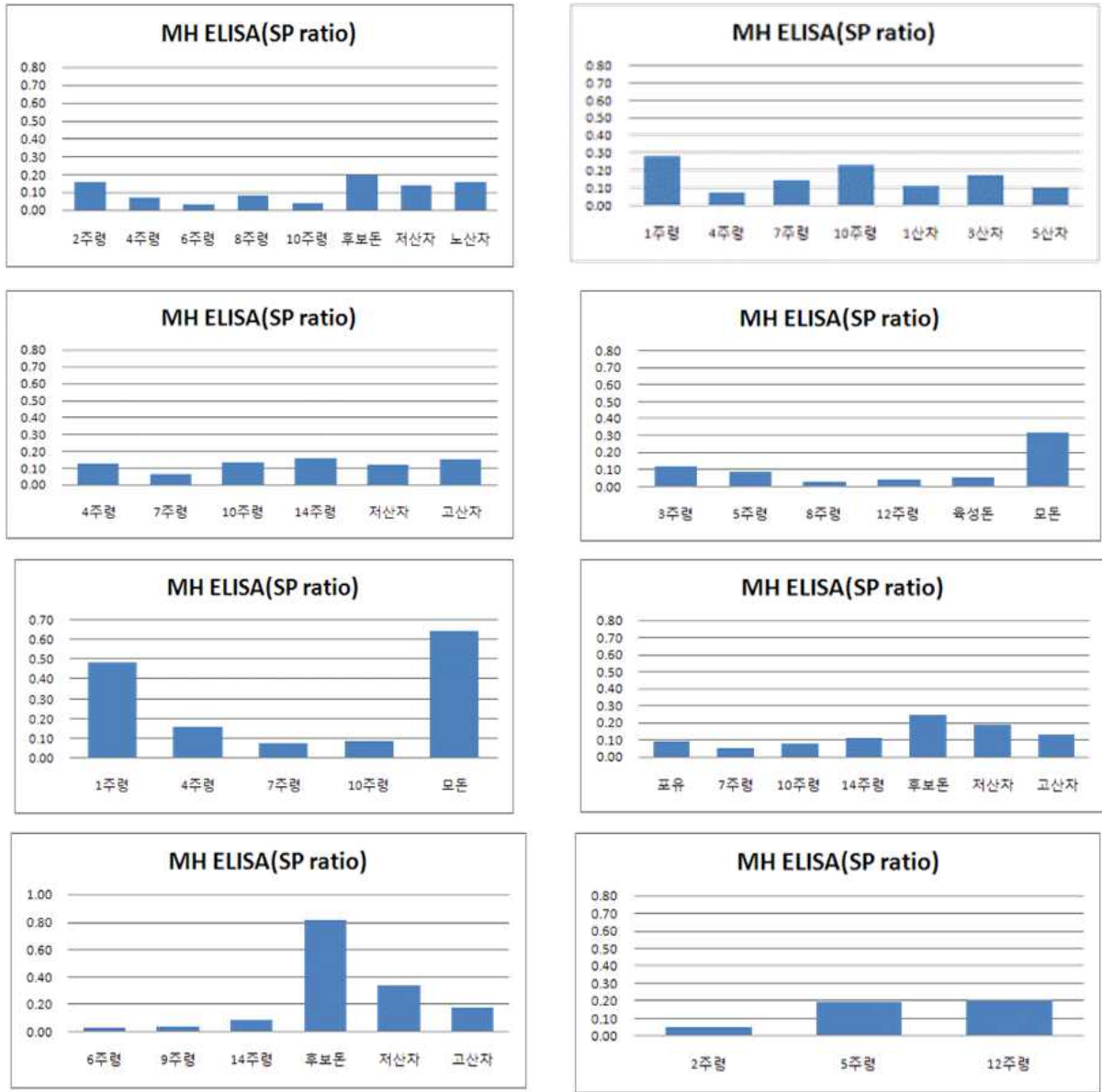


그림 4-5. *M. hyopneumoniae*의 농장별 혈청학적 조사.

5. 분리된 균주의 역가의 측정 및 계대 배양 (세부)

불활화 백신균주는 우선 역가가 일정 수준이상으로 높아야만 백신생산에 기본적인 요건이 됨. 따라서 single clone된 야외 분리주에 대한 역가를 CCU로 측정을 하였다. 분리주의 경우 1대 계대배양 후 역가를 측정한 결과 표 과 같이 비교적 역가가 10^{6-7} CCU를 나타내고 있다. Mhp의 경우 10^5 이상의 CCU를 보이나 Mhr의 경우 일부균주에서는 역가가 결정이 안될 정도로 증식이 매우 미약하거나 10^2 정도의 CCU를 나타냈다. 일단 역가가 낮은 것은 백신주로서의 적합하지 않기 때문에 제외시켰다.

표 4-3. Titration (CCU) of *M. hyopneumoniae*

Strain/Isolate name	Passage No.	CCU/ml
J 25934	Unknown	9.8×10^7
4-3	1	7.2×10^7
23-8	1	3.5×10^7
11-1	1	2.3×10^7
19-4	1	2.8×10^5
26-3	1	4.7×10^6
5-3	1	1.0×10^7
29-1	1	7.7×10^6
7-25	1	5.8×10^7

표 4-4. Titration (CCU) of *M. hyorhinis*

Strain/Isolate name	Passage No.	CCU/ml
std 27717	Unknown	9.8×10^7
11-6	1	2.8×10^2
7-12	1	9.8×10^7
15-3	1	NE
7-8	1	NE
24-8	1	2.3×10^6
2-3	1	2.1×10^6
16-1	1	9.8×10^7
18-10	1	2.3×10^2
21-6	1	3.6×10^2
36-2	1	1.2×10^6
24-6	1	3.0×10^6

NE = note estimable, as the color change is very little.

6. *M. hyopneumoniae*의 병원성 균주의 스크리닝 (세부)

- 불활화 백신 균주는 약독화 백신균주와는 달리 강한 병원성을 지닌 균주를 사용하는 것이 바람직하다. 병원성 기전이 알려져 있지 않기 때문에 어떠한 병원성 인자가 포함되어 있는지 보고되지 않기 때문에 강병원성의 균주를 사용하는 것이 통상적이다. 그러나 아직까지도 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 병원성에 대해 많은 것이 밝혀져 있지 않으나 adherence는 병원성의 한 요인으로 알려져 있다.
- Mycoplasma의 병원성을 측정하는 가장 유일한 방법은 SPF돼지 또는 CDCD(ceaserian derived and colostrum deprived)돼지를 사용하는 것이나 이를 이용하기 전에 실험실적으로 야외분리주

에 대한 병원성을 파악하는 방법을 이용하여 강병원성 균주를 선발한 후 이를 돼지에 접종하여 병원성을 분류하는 것이 지금까지의 방법이다.

- Ross 등(1994)의 보고에 의하면 *In vivo*에서의 병원성 측정결과와 *In vitro* adherence test결과와 유의적인 상관성이 있는 것으로 나타났기 때문에 본 연구 1차년도 에서는 microplate adherence test를 실시하여 분리주에 대한 adherence결과를 일부 얻었으나 특별한 차이는 없었음.
- Microtiter plate adherence assay(MPAA) (세부): MPAA방법을 확립시켰음. 이는 기존의 보고의 방법대로 Well당 cilia의 단백질농도는 1 μ g으로 고정하였고, mycoplasma용액을 첨가후 부착되는 시간은 37 $^{\circ}$ C에서 90분간하는 것이 가장 좋은 것으로 나타남.
- 그러나 실험에 사용한 Mycoplasma의 역가가 기존 보고에 비해 매우 낮은 편임. 기존 보고에 의하면 Mycoplasma의 역가가 보통 10⁸ ccu를 보이고 본 연구팀의 표준균주는 약 10⁸ ccu를 보이나 일부 측정된 야외분리주의 경우 10⁴ - 10⁵ ccu를 보여 흡광도가 다소 낮게 나타남. 모든 분리주를 ccu를 측정하기 위해서는 노력과 시간이 많이 소모됨. 따라서 mycoplasma를 배양한 후 세균을 수확하여 세척한 후 BCA로 단백질농도를 측정한 후 일정한 농도로 희석하여 MPAA를 측정하는 것이 편리한 방법이라 생각하여 예비적으로 단백질농도에 따른 MPAA에서 흡광도를 측정하였음. 예비시험으로 단백질 정량으로 mycoplasma 단백질을 측정한 후 2.5 5.0, 10.0 15.0 μ g/mL으로 MPAA를 측정하였음.

표 4-5. *M. hyopneumoniae*(Mhp98-1)의 단백질농도에 따른 MPAA에서의 흡광도의 차이

Protein concentration (μ g/mL)	Mean \pm SD of Absorbance (405nm)
0	0.07 \pm 0.01
2.5	0.26 \pm 0.03
5.0	0.50 \pm 0.06
10.0	0.71 \pm 0.04
15.0	0.87 \pm 0.06

- *M. hyopneumoniae*의 단백질농도가 높아질수록 MPAA의 흡광도가 높아짐. 이는 기존의 보고와 유사한 결과를 나타냄. 그러나 부착성이 약한 균주와 높은 균주와의 차이를 보기 위해서는 최소 5~10 μ g/mL의 단백질농도가 필요함이 확인됨.
- *M. hyopneumoniae*의 ccu역가에 따른 MPAA의 결과: *M. hyopneumoniae*(Mhp98-1)를 배양한 후 ccu를 측정한 후 희석농도에 따라 MPAA를 측정한 결과 다음과 같이 나타났음. 본 균주의 역가는 2.3 X 10⁷ ccu를 보여 1 X 10⁹의 경우 농축을 시켜 사용하였음. 이러한 결과는 기존의 보고에서 나타난 결과보다 낮은 ccu에서도 높은 흡광도가 나타났음. 그러나 최소 10⁷ ccu정도가 있어야만 MPAA에서 부착성이 낮은 균주와 높은 균주의 차이를 식별할 수 있을 것으로 판단됨.

표 4-6. *M. hyopneumoniae*의 역가(ccu)에 따른 MPAA의 흡광도의 차이

Titer (ccu/mL)	Mean±SD of Absorbance (405nm)
1 X 10 ⁹	1.31±0.04
5 X 10 ⁸	1.06±0.05
1 X 10 ⁸	0.62±0.05
5 X 10 ⁷	0.53±0.05
1 X 10 ⁷	0.40±0.02
5 X 10 ⁶	0.22±0.02
1 X 10 ⁶	0.17±0.06
5 X 10 ⁵	0.08±0.01
1 X 10 ⁵	0.06±0.01
Negative	0.08±0.01

- 현재까지 분리된 야외균주중 동일한 농장에서 분리한 것은 동일한 균주로 가정하고 그 중 1균주만을 filtration-cloning을 한 후 총 21 *M. hyopenumoniae* 균주를 MPAA를 실시하였다. 농도는 단백농도기준으로 5ug/mL기준으로 해서 MPAA를 실시한 결과 다음과 같이 나타났다. 본 결과는 3 well의 흡광도를 반복한 것이다. 결과 야외균주 일부에서 다소 높은 흡광도(adherence)를 보이는 것으로 나타났다.

표 4-7 . *M. hyopneumoniae*의 MPAA결과

Isolate (Strain)	Adherence by mean absorbance (OD ₄₀₅)	Remark
<i>M. hyopneumoniae</i> (ATCC25617)	0.38±0.04	
<i>M. hyopneumoniae</i> (ATCC25934)	0.47±0.06	
<i>M. hyopneumoniae</i> (표준균주)	0.37±0.05	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp98-1)	0.50±0.06	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp1-1)	0.36±0.06	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp3-1)	0.49±0.04	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp4-1)	0.39±0.04	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp5-1)	0.35±0.05	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp6-1)	0.45±0.02	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp7-1)	0.27±0.03	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp8-1)	0.27±0.03	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp9-1)	0.29±0.04	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp10-1)	0.47±0.04	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp12-1)	0.22±0.02	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp13-1)	0.37±0.02	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp14-1)	0.40±0.03	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp15-1)	0.12±0.03	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp16-1)	0.23±0.02	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp17-1)	0.27±0.05	
Negative	0.06±0.01	

- 그러나 최근 Calus 등(2009)이 발표한 논문에 의하면 *In vitro* adhesion assay(MPAA)와 *in vivo* virulence 결과와는 어떠한 상관성이 없고 따라서 *M. hyopneumoniae*의 virulence는 adherence이외의 다른 요인이 작용하는 것으로 보고함. 따라서 virulence와 관련된 단백질을 검출하는 것으로 연구방향을 전환하였음.
- *In vitro*에서 고병원성 *M. hyopneumoniae*와 저병원성 *M. hyopneumoniae*를 구분하여 스크리닝 한 후 이중 대표주를 선발하여 돼지를 통해 확인하고자 하였다.

7. SDS-PAGE를 이용한 고병원성 *M. hyopneumoniae* 고병원성 분리주의 감별 (세부)

- Calus 등(2007)이 발표한 보고에 의하면 SDS-PAGE후 silver staining을 실시하여 단백질 프로파일을 분석한 결과, highly virulent Mhp주에서 181 kDa의 protein band가 관찰되고 이 크기의 band는 low virulent Mhp에서는 관찰되지 않는 것으로 보고가 되었음. 이러한 protein의 다양성은 genome 다양성과 유사하다고 발표하였다.
- Ross등(1994)이 발표한 보고에 의하면 회복기 혈청을 사용한 immunoblotting에서 145 kDa 크기의 항원이 high-adherence clone에서 검출되는 한편, low-adherence clone에서는 약하거나 희미하게 검출된다고 보고 하였다. 또한 200kDa크기 이상의 항원은 low-adherence clone에서 관찰된다고 보고 하였다. 이러한 자료를 근거로 1년 동안 145 kDa의 protein band를 검출하고자 노력하였으나 검출되지 않았다. 따라서 Ross등의 결과는 재현성이 없다고 판단하여 Calus 등(2007)의 결과를 기준으로 SDS-PAGE를 실시하여 silver staining으로 염색한 후 protein profile을 분석하였고 181 kDa의 band를 찾아내는데 주력하였다. 최근 수주의 분리주에서 이와 같은 크기의 band를 검출하였다.

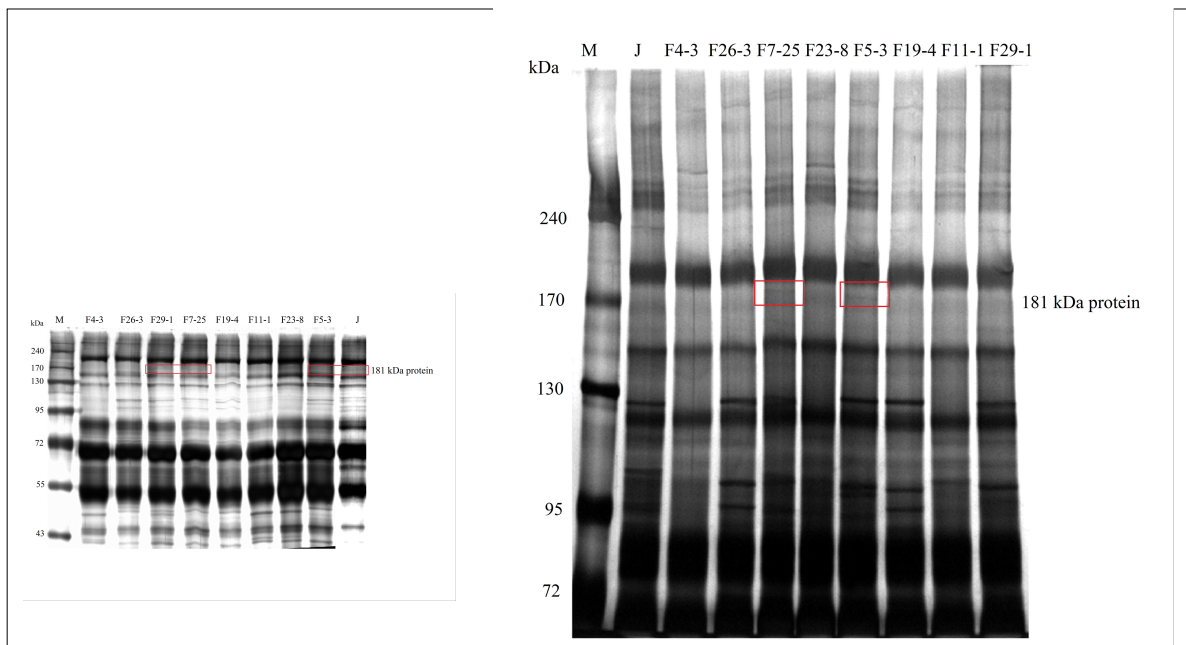


그림 4-6(A). 고병원성 *M. hyopneumoniae*에 특이적인 181 kDa밴드의 검출을 위한 SDS-PAGE분석.

- F29-1, F7-25, F5-3주에서 기존의 보고와 같은 181 kDa의 band가 검출되어 고병원성 분리주(highly virulent strain)으로 확인되었다. 또한 표준균주인인 J주에서도 관찰되어 기존의 보고와 일치하였음. 이러한 결과는 많은 시행착오 끝에 도출된 결과로 single clone으로 분리된 분리주를 대상으로 계속 많은 고병원성 분리주를 확보하였다.
- 다른 농장에서 분리된 분리주들의 SDS-PAGE pattern 비교 결과 균주들 사이에서 다양한 pattern을 얻었다.
- 72~130kDa 과 34~55kDa사이의 분자량 범위에서 높은 다양성을 보이는 것을 확인 할 수 있었으며 130~240 kDa, 72~55 kDa 및 34kDa 이하의 분자량범위에서는 균주들 사이에서 낮은 다양성을 보였다. 이러한 결과는 기존에 보고된 Mhp protein pattern과 일치 하였다(Assuncao et al., 2005 Calus et al., 2007 Scarman et al., 1997).
- 기존에 보고된 고병원성 단백질 pattern에 따라 15개의 고병원성 균주를 분리하였으며 고병원성균주에서 발견되는 181 kDa 크기의 단백질은 5%의 gel에서 가장 확연히 구분할수 있었지만 J strain의 경우 기존보고에서는 181kDa 단백질이 검출되는 것으로 알려졌는데 본 실험결과에서는 181kDa 밴드가 검출되지 않았음. 이것은 아마도 본 실험에서 사용한 J strain이 많은 계대배양을 통해 소실된 것으로 사료된다(Chen et al., 1992 DeBey and Ross, 1994 Zhang et al., 1995 Zielinski and Ross, 1990). 이러한 결과는 반복시험을 통해서도 동일하게 나타났다.

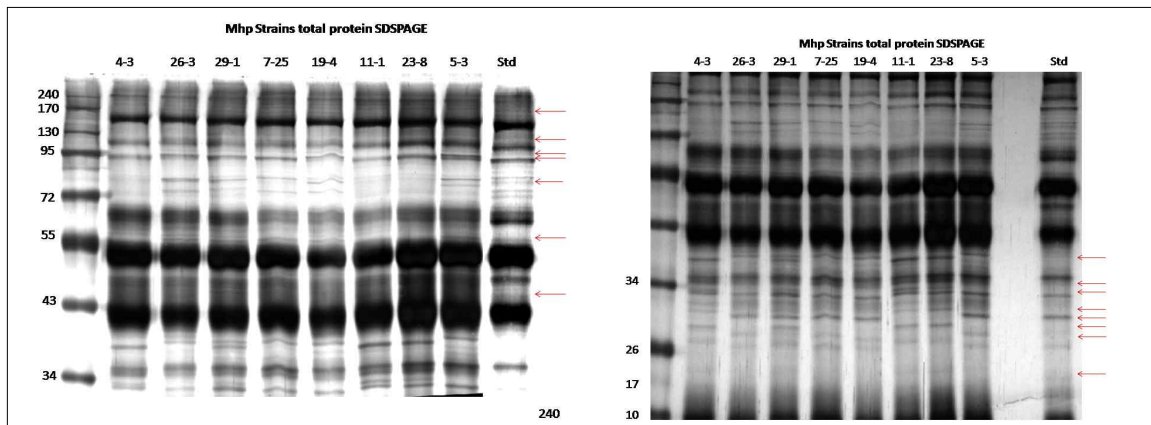


그림 4-6(B). *M. hyopneumoniae*의 Protein variability의 분석.

좌측은 high molecular range의 것이며 우측은 low molecular range임.

각각의 그림에서 우측에 적색으로 표시한 것이 다양성을 보이는 위치임.

8. *M. hyopneumoniae* 분리주의 protein profile의 분석

- Mhp분리주의 계통발생학적분석(phylogenetic analysis)을 통한 단백질 patterns을 파악 하기 위해서 10% gel에서 분리된 단백질들은 Bionumerics software 프로그램을 통해 분석되었으며 curve-based Pearson 유사도로 계산되고, unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) 로 분리주간에 grouping을 실시하였다(그림 4-7).

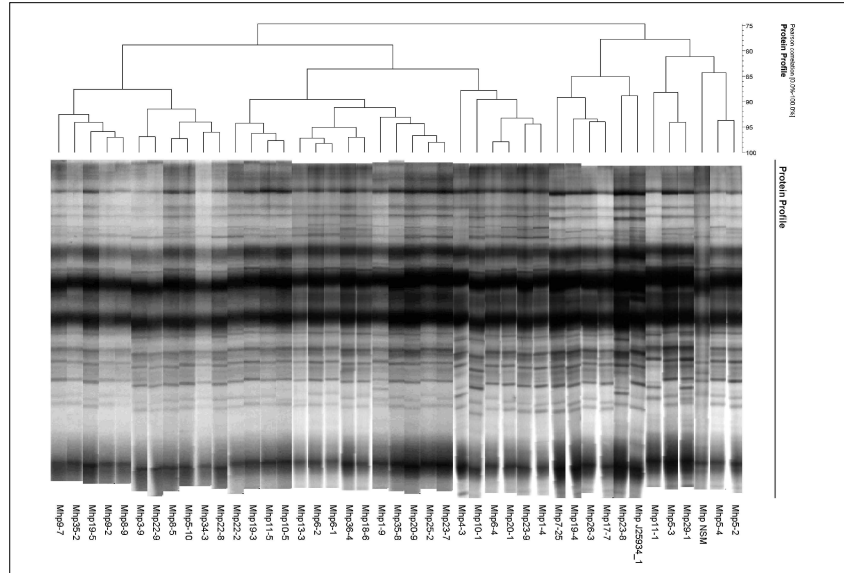


그림 4-7. Cluster analysis of Mhp protein patterns using the curve-based Pearson similarity coefficient.

- J strain과 분리주들을 비교한 결과 최대 25.3%의 단백질의 다양성을 보였다. 분리주 간에는 22.2%의 divergence를 보여주었다. 같은 농장으로부터 분리된 균주간에도 일정하지 않은 pattern을 보이기도 했다. 동일한 시험을 반복한 결과 균주의 밴드의 위치가 바뀌지 않아 이는 gel에 따른 차이 때문은 아닌 것으로 확인되었다.
- Mhp의 단백질 분석은 기존에 보고에 의해 비교적 잘 규명되었다(Assuncao et al., 2005 Calus et al., 2007 Zhang et al., 1995). 특히 초기의 결과에서는 Mhp의 단백질 프로파일이 분리주에 관계없이 매우 유사한 것으로 추측되었다(Assuncao et al., 2005 Scarman et al., 1997). 그러나 본 결과에서는 표준주인 J주와 비교할 때 23.5%의 차이를 보이는 것으로 나타났다.

9. *M. hyorhinis* 분리주의 protein profile의 분석 (세부)

- 동일한 방법으로 Mhr 분리주에 대해 protein profile을 분석하였다. 이와 관련된 기존의 연구결과는 없기 때문에 비교를 할 수 없으나 Bionumerics로 비교분석하였다.
- Mhr 단백질 pattern의 계통분석 및 다양성을 확인하기 위해서 10% gel 로 단백질을 전개한 후 Bionumerics software로 분석하였으며 curve-based Pearson 유사도로 계산되고, UPGMA 로 분리주간에 grouping을 실시하였다(그림 4-8, 4-9).
- 서로 다른 농장사이에서 분리한 분리주를 비교한 결과 높은 다양성이 관찰되었다. 표준주인 Mhr 27717주와 상대적으로 비교한 결과 최대 44.9%의 proteomic variability를 보였다. 또한 Mhr분리주간에는 최대 34.2%의 divergence가 관찰되었다. 동일농장에서 분리한 분리주들은 유사한 패턴을 보였지만 동일하지는 않았다.

- 170~72 kDa와 72~34 kDa의 크기영역에서 높은 다양성이 관찰되었다. 170~240 kDa와 34 kDa이하의 크기에서는 낮은 다양성이 관찰되었다. 이러한 결과는 2회 반복 실시한 결과 동일한 밴드패턴이 관찰되어 재현성이 높은 것으로 나타났다.

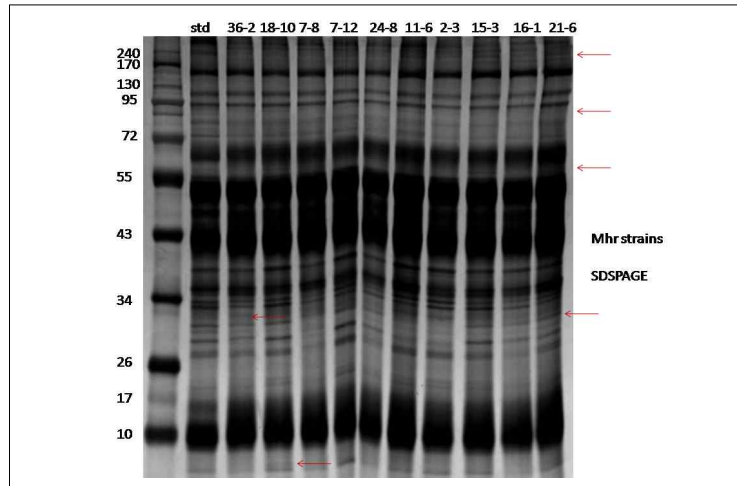


그림 4-8. *M. hyorhinis*의 protein variability의 분석. 우측에 적색으로 표시한 것이 밴드의 다양성을 보이는 위치를 표시함.

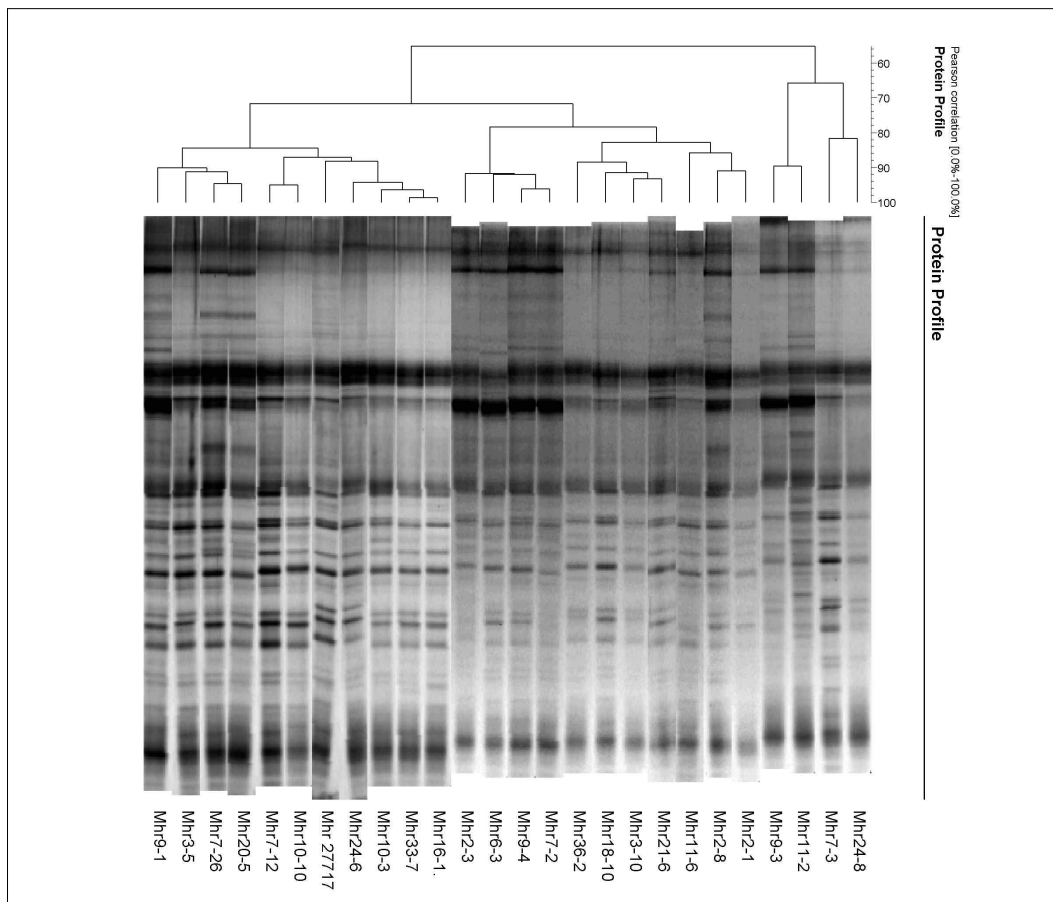


그림 4-9. Cluster analysis of Mhr protein patterns using the curve-based Pearson similarity coefficient.

10. Western blot을 이용한 mycoplasma의 면역학적 profile의 분석

- *M. hyorhinis*와 *M. hyopneumoniae*의 양성혈청에 대한 Western blot 결과: (A) 경우 *M. hyorhinis*(ATCC 27717)을 anti-*M. hyorhinis*항체로, (B)의 경우 *M. hyopneumoniae* (ATCC25617)과 백신주 (NSM)을 anti-*M. hyopneumoniae* OMP MoAb로 반응을 시켰다.

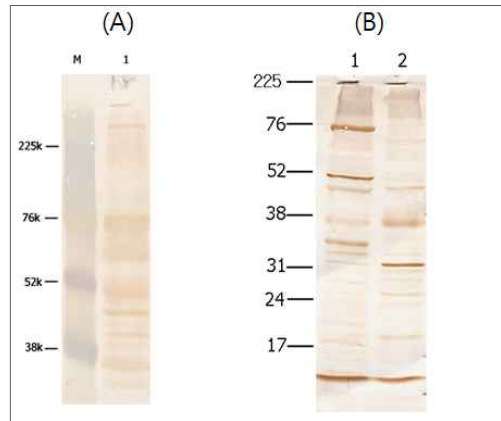


그림 4-10. *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 immuno profile

- *M. hyorhinis*의 경우 immunodominant한 크기의 밴드가 6개정도가 관찰되었는데 크기는 76, 60, 50, 48, 36kDa의 밴드가 강하게 관찰되었다.
- *M. hyopneumoniae*의 경우 ATCC균주와 백신주간에 OMP항체에 대한 반응성이 뚜렷이 다르게 나타났는데 ATCC주의 경우 76, 50, 48, 35, kDa 크기의 밴드가 강하게 반응하는 한편, 백신주의 경우 35와 31kDa 크기의 밴드가 강하게 반응하여 두 균주간에 차이가 관찰되었다.
- *M. hyopneumoniae*분리주의 면역학적 프로파일 분석: *M. hyopneumoniae*의 면역학적 프로파일을 분석하였으며, 아래의 그림은 결과의 한 예이다. *M. hyopneumoniae*양성 혈청은 일반적으로 76, 60, 50, 40kDa의 밴드와 강하게 반응하는 일부균주에서는 40kDa가 소실되어 있는 것으로 나타나고 있다. 또한 100~225kDa사이에 희미한 밴드들이 나타나고 있는데 기존의 보고에 의하면 이러한 크기의 밴드가 attachment와 병원성과 관련된 것으로 보고하고 있다.

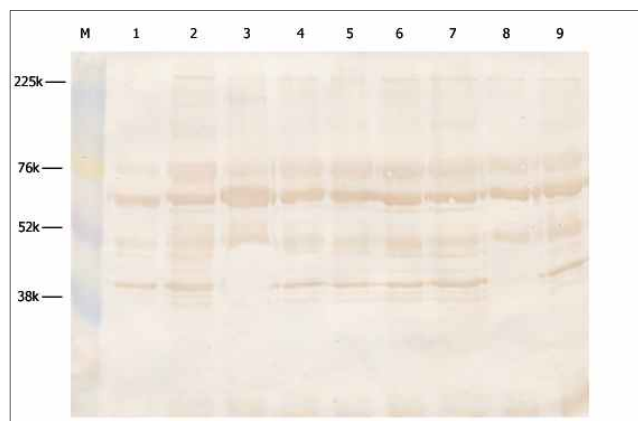


그림. 4-11. *M. hyopneumoniae*표준주 및 분리주의 면역학적 프로파일 분석의 예 1, 백신주, 2. 표준균주, 3~9야외분리주.

- *M. hyorhinis*의 면역학적 프로파일의 분석: 표준균주와 야외균주에 대한 *M. hyorhinis*의 면역학적 프로파일을 분석하였다. anti-*M. hyorhinis*의 항체는 30, 35, 40, 43, 48, 52, 60, 76kDa의 크기의 8개 밴드에 강한 반응을 보이고 있으며 표준균주와 분리주간의 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었다.

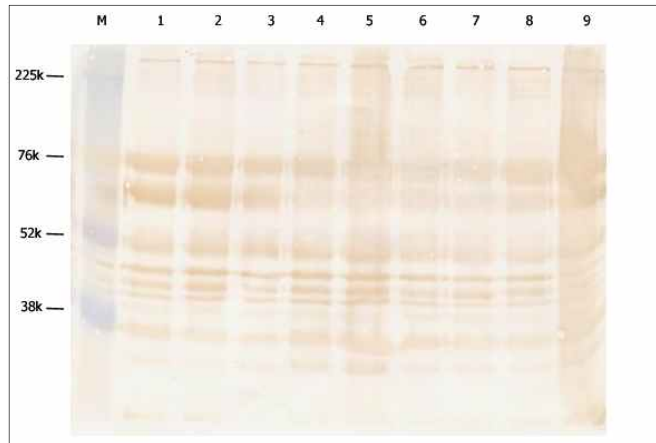


그림 4-12. 야외에서 분리한 *M. hyorhinis*의 western blot

- *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 교차반응성: *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 교차반응성은 매우 높은 것으로 알려져 있다. 아래 그림처럼 anti-*M. hyorhinis*의 항체로 반응시킨결과, *M. hyorhinis*의 경우 30~76kDa사이의 9개의 밴드가 강하게 반응하는데 *M. hyopneumoniae*의 경우 30~40 kDa사이의 6개의 밴드는 미약하거나 거의 반응을 하지 않은 것으로 나타나 이 부분이 species특이적인 단백질로 판단된다.

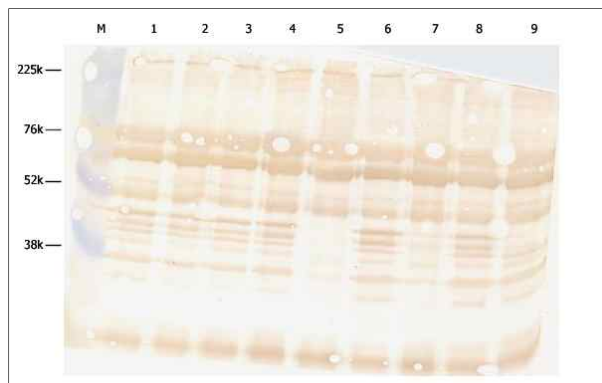


그림 4-13. *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 Western blot.

11. 토끼에서 제조한 양성 혈청의 역가분석

- OMP항원을 사용한 ELISA에서는 *M. hyopneumoniae* (Mhp)과 *M. hyorhinis* (Mhr)을 토끼에 접종하여 제조한 양성혈청은 서로 교차반응이 높게 나타남. 그러나 r-P46항원을 사용한 ELISA에서는 50배 희석을 제외하고는 *M. hyopneumoniae*에 대한 양성 혈청에 대한 교차반응이 없이 *M. pneumoniae*에 특이적으로 반응을 함.

- 제조한 양성혈청은 OMP나 whole bacteria에 대해서는 서로 교차반응이 높은 것으로 나타났고 이는 두 가지 Mycoplasma에서 흔히 나타나는 현상으로 기존의 보고에서 알려져 있음. 따라서 교차반응이 보다 낮은 제조 방법을 강구해서 새롭게 양성혈청을 만들어야 한다고 판단됨.

표 4-8. *M. hyopneumoniae*항원에 대한 양성 혈청의 결과

혈청희석 배수	MH r-P46 Coated Plate						MH OMP Coated Plate					
	Mhr-1	Mhr-2	Mhr-3	Mhp-4	Mhp-5	Mhp-6	Mhr-1	Mhr-2	Mhr-3	Mhp-4	Mhp-5	Mhp-6
50	0.197	0.411	0.690	3.419	2.860	3.385	1.191	1.275	1.354	1.444	1.848	1.735
100	0.130	0.205	0.356	3.394	2.243	3.008	0.967	1.026	1.107	1.179	1.555	1.378
200	0.093	0.129	0.207	3.195	1.555	2.410	0.648	0.696	0.738	0.828	1.255	0.978
400	0.076	0.090	0.138	2.657	1.022	1.779	0.440	0.480	0.525	0.560	0.857	0.628
800	0.065	0.078	0.096	2.051	0.610	1.126	0.279	0.314	0.330	0.338	0.574	0.433
1600	0.051	0.061	0.074	1.301	0.357	0.667	0.171	0.190	0.197	0.213	0.358	0.253
3200	0.053	0.059	0.062	0.743	0.204	0.362	0.116	0.119	0.128	0.143	0.211	0.164
6400	0.049	0.054	0.054	0.421	0.126	0.207	0.087	0.088	0.093	0.098	0.130	0.124

12. RAPD를 이용한 *M. hyopneumoniae* genomic variability의 분석 (세부)

- Vicca 등(2003)이 발표한 논문에 의하면 *M. hyopneumoniae*의 분리주를 대상으로 random amplified polymorphic DNA(RAPD) 분석을 실시한 결과, 병원성이 있는 분리주의 경우 RAPD pattern에서 5,000bp크기의 band가 관찰되나 병원성이 없는 균주는 5,000bp의 크기가 없는 것으로 나타났다. 그러나 5,000bp의 밴드를 증폭하는 시도는 이후의 보고에서는 발표되지 않았다 (Hong et al., 2005 Nathues et al., 2011 Stakenborg et al., 2006).
- 본 연구에서는 기존의 실험방법을 변경해서 수주의 분리주에서 5,000 bp근처에서 매우 희미한 밴드를 증폭할 수 있었다(그림 4-14). 그러나 RAPD를 이용해서 5,000bp를 증폭한 분리주가 고병원성이라는 결과와 상기의 SDS-PAGE에서 181 kDa의 밴드가 있는 고병원성 분리주의 분류와는 결과가 일치하지 않았음. 따라서 본 결과에서 얻은 5,000bp의 밴드는 Vicca등이 발표한 밴드와 다른 것으로 사료된다.
- 1300bp와 500bp크기의 밴드는 모든 분리주에서 검출되었다. 또한 1,700bp와 900bp크기의 밴드는 많은 Mhp분리주에서 검출되었다. 매우 다른 크기의 강한 intensity를 보이는 band pattern이 RAPD의 분석을 어렵게 만들었다. 단백질 패턴과 유사하게 동일농장에서 분리한 분리주들 사이에도 서로 다른 RAPD 패턴을 보이는 균주가 관찰되어 동일한 농장에서도 서로 다른 유전형의 Mhp분리주가 감염되어 있음이 추측된다.
- 조정된 RAPD방법으로 분석한 결과 표준주인 J주와 국내분리주와는 35.5% RAPD variability를 보

이고 있다. Stakenborge 등(2011)은 서로 다른 나라에서 분리된 분리주 사이에 50% variability가 있다고 보고하였고 Nathuse 등(2011)은 역학적인 사항과 지역적인 사항을 고려하여 분석을 실시해야 한다고 제안하였다.

- 단백질 패턴 및 RAPD패턴 결과를 대상으로 Bionumeric분석을 실시한 결과 기존의 보고와 마찬가지로 병원성에 따라 분리주가 clustering을 하지 않는 것으로 나타났다(Calus et al . 2007). 또한 protein profile분석과 RAPD분석결과에 따른 typing이 100%일치하지 않는 것으로 나타났다.

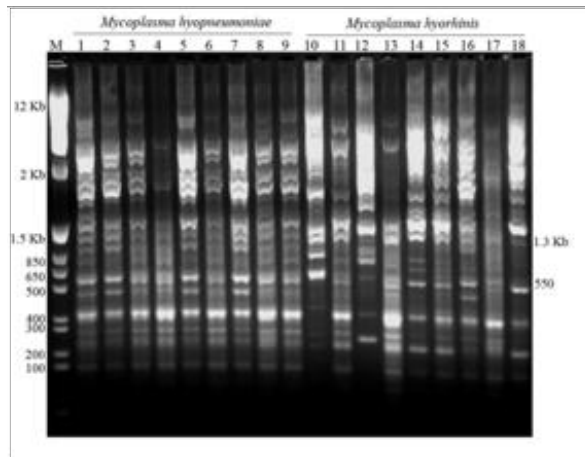


그림 4-14. OPA-3 primer를 이용한 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis* 분리주의 RAPD profile

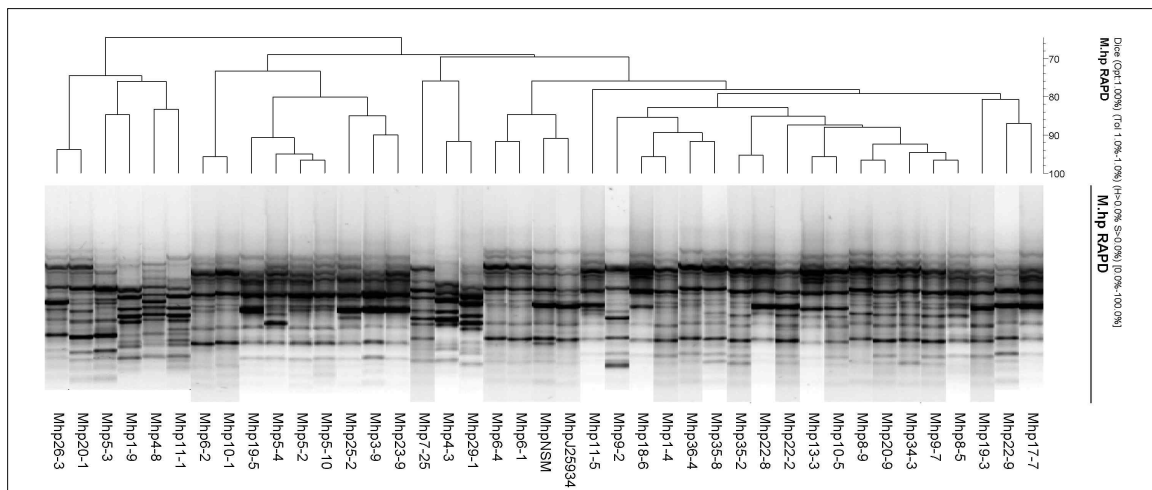


그림 4-15. RAPD profile을 근간으로 한 *M. hyopneumoniae*의 UPGMA cluster analysis.

13. APD를 이용한 *M. hyorhinis*의 genomic variability의 분석 (세부)

- 그림 4-16는 Mhr의 RAPD 패턴과 phylogenetic tree를 구성한 그림이다. Mhp분리주와 비교할 때 검출되는 밴드수가 다소 적은 것으로 나타났다. Mhr11-2분리주가 다른 분리주에 비해 가장 다른 RAPD 패턴을 나타냈다. 1,100bp, 800bp 및 700 bp의 크기의 밴드가 Mhr11-2를 제외하고는 모든 분리주에서 검출되었다. 1,700bp크기의 강한 intensity를 보이는 밴드는 Mhr11-6분리주에서만 관찰되었다.

- Mhr 27717표준주와 비교할 때 국내 Mhr분리주간에 총 37.7%의 다양성을 보였다. 심지어 한 농장에서 여러가지 다른 유전적 다양성을 보이는 Mhr분리주가 관찰되었다.
- 총 2주(Mhr6-3과 18-1)에서 3,200bp 크기의 밴드가 관찰되었고 20주의 분리주에서 4,000bp와 3,200bp 크기의 밴드가 관찰되었다. Mhr11-6분리주의 경우 크기가 다른 3,500bp와 2,800bp크기의 밴드가 검출되었다.
- 동일한 농장에서 분리된 분리주라 하더라도 동일하게 나타나지 않았다. 밴드패턴이 나타내는 의미는 알려져 있지 않으며 특히 병원성과 관련되어서는 지속적인 연구가 필요하다.
- 단백질 패턴에 의한 분류와 RAPD 패턴에 의한 분류는 100% 일치하지 않았다.

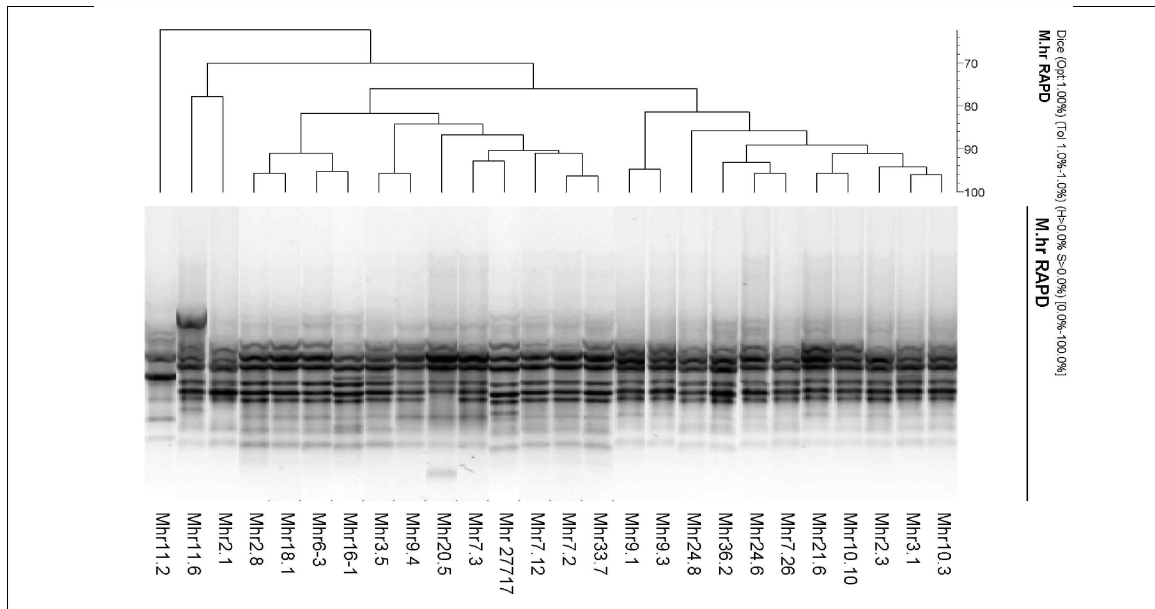


그림 4-16. RAPD profile을 근간으로 한 *M. hyorhina*의 UPGMA cluster analysis.

14. Mycoplasma 분리주의 증식역가의 분석 (세부)

- 보고에 의하면 Mhp의 병원성이 높을수록 시험관내에서의 증식역가가 매우 높은 것으로 최근 밝혀졌다. 따라서 Mhp의 경우 protein profile에서 밝혀진 고병원성 균주(HV)중 시험관내 역가가 높은 것을 스크리닝하기 위해 계대배양 P0에서의 역가와 5대 계대배양 한 후의 역가(P5)를 분석하였다. 이 결과는 표 4-9에 나타났다. 이 중 고병원성의 경우 P0에서 역가가 비교적 10^7 이상으로 높게 나타났다. 그러나 P5에서는 오히려 역가가 급속히 감소하는 분리주가 더 많았다. 이 경우 분리주가 시험관내 배지의 적응이 되지 않아 증식역가가 급감할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 백신후보주의 선발은 Protein profile에서 고병원성 균주중 P0에서도 역가가 높게 나왔고 P5에서도 역가가 높게 유지되는 것을 백신후보주의 선발 기준으로 삼았다. 고병원성이 아닌 일부 분리주의 경우 P5에서 증식역가를 측정하지 않았다.
- Protein profile 분석에서 181 kDa의 밴드가 검출되어 고병원성으로 분류된 Mhp 15주는 모두 높은 CCU를 보였다.

표 4-9. 계대배양 P0와 P5에서의 *M. hyopneumoniae* (Mhp) 분리주의 역가

Strain No.	Virulence	Titer (CCU/ml)		Remark
		P0	P5	
25934	Std strain	3.5×10^7	5.82×10^7	
NSM	Vaccine	4.45×10^8	3.22×10^8	
1-4	HV	5.08×10^7	7.74×10^7	
1-9		Cannot measure	ND	
4-3		7.18×10^7	5.82×10^4	Candidate
4-5		1.63×10^8	ND	
4-8		1.56×10^7	ND	
4-10		1.89×10^7	ND	
5-2	HV	4.45×10^9	1.58×10^8	
5-3	HV	3.62×10^8	2.87×10^7	Candidate
5-4	HV	2.31×10^5	2.67×10^8	
5-10		2.59×10^8	ND	
6-1	HV	6.22×10^7	2.87×10^6	
6-2	HV	4.67×10^7	0.52×10^2	
6-4	HV	1.91×10^8	6.22×10^4	
6-6		9.2×10^7	3.62×10^5	
7-25	HV	5.8×10^7	1.59×10^8	Candidate
8-5	HV	1.59×10^8	1.03×10^6	
8-9		1.91×10^8	ND	
9-2		4.67×10^8	1.59×10^6	
10-1		2.87×10^8	1.91×10^6	
11-1		3.62×10^5	2.3×10^7	Candidate
11-5		1.59×10^7	ND	
13-3		1.63×10^8	5.82×10^7	
17-7		1.23×10^8	6.22×10^5	
18-6		1.20×10^4	ND	
19-3		1.23×10^7	ND	
19-4		2.8×10^5	1.59×10^6	Candidate
19-5		4.67×10^7	Cannot measure	
20-9		1.15×10^8	3.50×10^6	
22-2		1.23×10^7	1.91×10^8	
22-8		1.15×10^8	2.87×10^6	
23-7		1.15×10^8	4.67×10^7	
23-8		3.5×10^7	ND	
23-9		6.22×10^7	1.15×10^7	
26-3		4.67×10^6	3.62×10^7	Candidate
26-5		1.91×10^8	2.87×10^8	
29-1	HV	6.22×10^6	8.42×10^6	Candidate
35-2		6.22×10^8	Cannot measure	
35-8		8.42×10^7	ND	

ND: Not done. HV: high virulent strain by protein profile.

표 4-10. 계대배양 P0와 P5에서의 *M. hyorhinis* (Mhr)분리주의 역가

Strain No.	Virulence	CCU/ml		Remark
		P0	P5	
27717	Std strain	9.82×10^7	6.22×10^8	
2-1		1.15×10^6	ND	
2-3		2.08×10^4	2.1×10^6	Candidate
2-8		2.31×10^2	ND	
3-5		8 columns	1.38×10^7	
3-10		7.74×10^6	ND	
6-3		2.98×10^8	ND	
7-2		Cannot measure	ND	
7-3		1.59×10^7	ND	
7-8		Cannot measure	ND	
7-12		9.82×10^6	9.8×10^7	Candidate
7-14		2.31×10^2	ND	
7-22		Cannot measure	ND	
7-26		5.82×10^7	ND	
8-3		Cannot measure	ND	
9-1		Cannot measure	ND	
9-3		Cannot measure	ND	
9-4		Cannot measure	ND	
10-3		3.62×10^4	3.62×10^4	
10-10		1.38×10^6	ND	
11-2		5 Columns	ND	
11-6		2.8×10^2	1.63×10^3	Candidate
15-3		Cannot measure	ND	
16-1		9.82×10^7	9.8×10^7	Candidate
18-10		2.31×10^2	2.3×10^2	Candidate
20-5		Cannot measure	ND	
21-6		3.6×10^2	3.6×10^2	Candidate
23-3		2.31×10^3	ND	
24-6		3.0×10^6	ND	
24-8		2.26×10^6	ND	
33-7		7.74×10^6	1.89×10^9	
36-2		1.15×10^6	1.2×10^6	Candidate

15. rLTBR1의 발현 및 동정 (세부)

(1) P97 adhesin 유전자 *ltbr1*의 PCR 및 sequencing

- *r1* gene과 *eltb* gene을 PCR에 의해 증폭시킨 결과 예상한 크기의 270과 320 bp의 amplicon이 각각 검출되었다(그림. 4-17A).
- 제한효소 *Bam*HI으로 처리한 뒤, *r1* sequence을 *eltb* gene의 downstream쪽에 T4 DNA ligase을 사용하여 삽입시켰다. pENTR/SD-*ltbr1*을 선별하기 위해 colony PCR을 실시한 결과, 예상되는 크기의 918bp의 amplicon을 확인하였다(그림 4-17B).
- Site specific recombination을 실시한 후, 예상되는 크기의 pETDEST42-*ltbr1*의 clone을 colony PCR을 사용하여 선별하였다. pETDEST42-*ltbr1* clone의 PCR product는 935bp크기로 예상크기와 같았다(그림 4-17C).
- *ltbr1* gene이 삽입된 pENTR/SD-*ltbr1*과 pETDEST42-*ltbr1*의 염기서열을 분석한 결과 *eltb* gene과 p97 gene의 *r1* region의 염기서열이 100%일치하는 것으로 나타났다. 본 연구결과로 증폭된 *r1*은 5-amino acid tandem repeats (AAKPV-E)를 11 copy가 된 것으로 확인되었다.

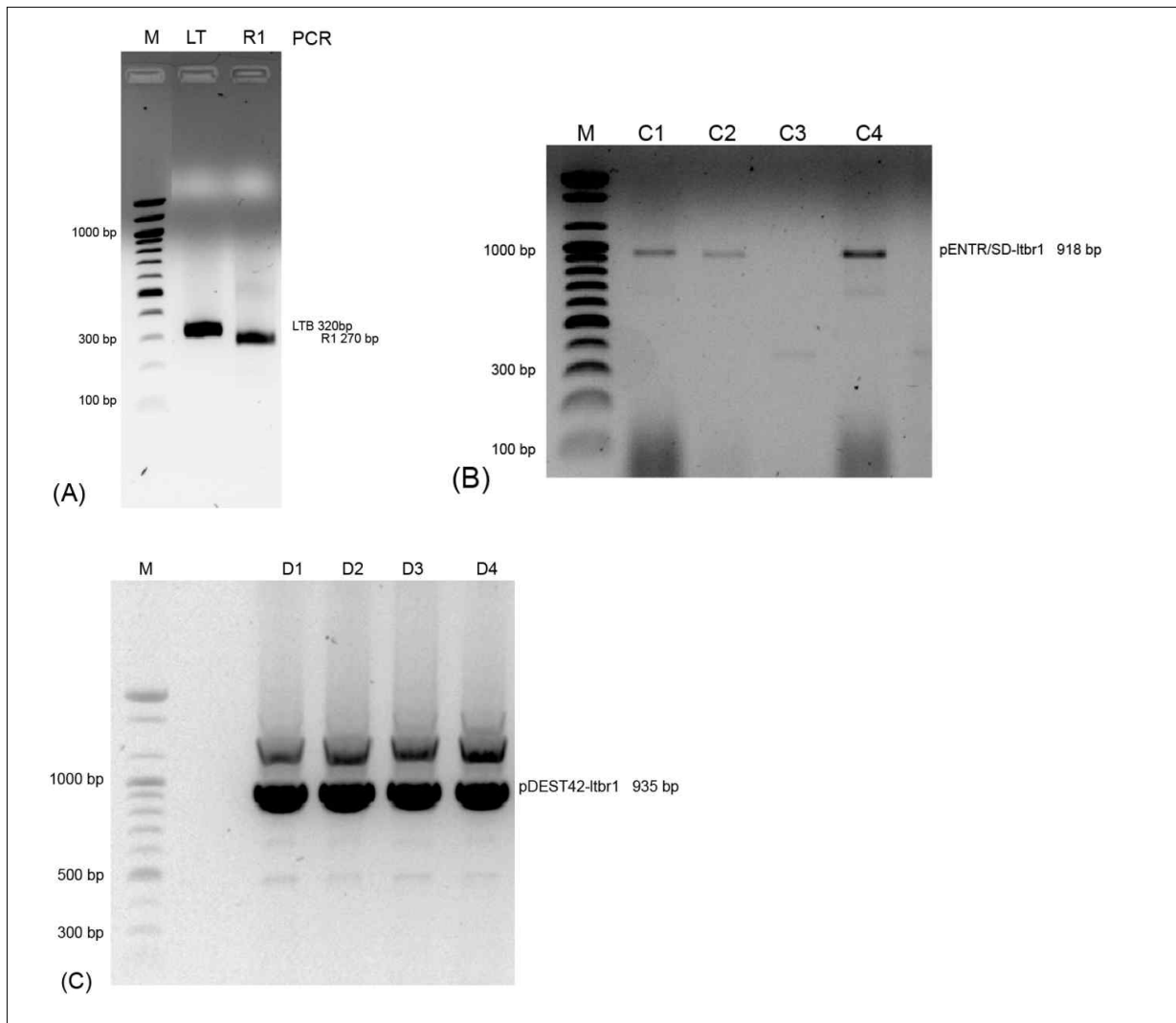


그림 4-17. (A) Amplification of *eltb* and *r1* gene by PCR. (B) Colony PCR of pENTR/SD-*ltbr1* clones (C) Colony PCR of pETDEST42-*ltbr1* clones. M - Bioneer 100bp Ladder; LT - *eltb* amplicon; R1 - *r1* amplicon; C1 to C4- Colonies containing pENTR/SD-*ltbr1* plasmid; D1 to D4- Colonies containing pETDEST42-*ltbr1* plasmid.

(2) 재조합 rLTBR1 단백질의 발현, 정제 및 확인

- 염기서열로 분석(Dnastar Lasergene 7.0.0) 한 rLTBR1의 예상크기는 25.5kDa이나 *E. coli* BL21(DE3)에 pDEST42- *ltbr1* plasmid를 형질전환시킨 후 발현시킨 결과 약 29kDa 과 35kDa 크기의 밴드가 검출되었다(그림 4-18A). 예상되는 크기와 다른 이유는 기존의 보고대로 rLTBR1의 느린 이동때문으로 판단된다(Conceicao et al., 2006).
- R1 region의 repeat에 존재하는 lysine과 repeat의 conformation이 SDS-gel에서 단백질의 이동속도를 감소시킬 수 있다는 것은 이전의 보고에 양전하인 단백질의 전기영동 결과에서 이미 나타났다.
- Ni-NTA affinity chromatography을 통해 rLTBR1은 정제되었고 고농도의 다량의 재조합 단백질을 추출, 정제하였다(그림 4-18B). 보는바와 같이 29와 35 kDa 크기의 rLTBR1을 확인하였다. rLTBR1의 생산량은 배양액 1L당 약 9.8 mg이 생산, 정제되었다.
- Western blot analysis을 통해 rLTBR1임을 확인하였다. anti-6XHis MAb를 사용하여 29와 35 kDa 크기의 rLTBR1을 확인하였다(그림 4-18C). 이유는 이 재조합 단백질이 His-tag과 fusion되어 있고 이를 통해 anti-6XHis antibody에 의해 결합되기 때문이다. Anti-cholera toxin antibody를 사용하였을 경우 열처리를 하지 않았을 경우 35kDa 크기보다 다소 큰 크기의 밴드가 검출되는데 이는 rLTBR1이 oligomer를 형성하는 것으로 사료된다(그림 4-18D).

(3) 마우스 시험

- 현재 재조합 단백질을 3회 접종한 것을 마치고 혈액도 백신접종전과 후 일정한 간격으로 채취하였다. 최종 도태시키는 날에는 anti-rR1 IgA을 측정하기 위해, tracheobronchic washing을 수행하였다(De Haan et al., 1998).
- 따라서 본 결과는 rLTBR1의 성공적인 발현이 확인되었다. 주요부착인자인 P97은 Mhp가 호흡기 섬모에 부착하는데 있어 key 역할을 한다(Minion et al., 2000). 현재 rLTBR1의 systemic 과 local immunity를 마우스에서 확인중에 있다. 이후 돼지에서도 면역원성을 확인 할 예정이다.

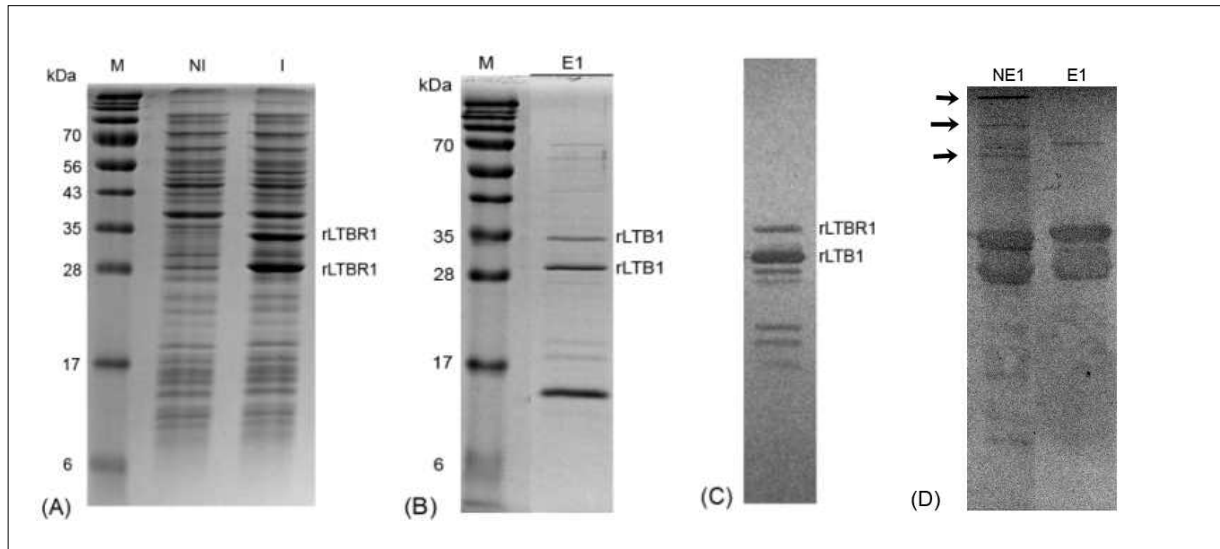


그림 4-18 (A)Induction of rLTBR1 with 1mM IPTG. (B)Ni-NTA purified rLTBR1. (C) Western blot analysis of rLTBR1 with PAb anti 6X his antibodies. (D) Western blot characterization of rLTBR1 oligomerization with anti-cholera toxin antibodies. M - Protein marker; NI - Non-induced culture; I -Induced culture; E1- Elutel from Ni-NTA chromatography; NE1- Non-heated rLTBR1; E1- heated rLTBR1

- *M. hyopneumoniae* 의 감염의 초기이자 중요한 단계는 호흡기내로 침투한 후 호흡기 섬모에 부착되어 집락을 형성하는 과정이다. 이 과정에 주요 부착인자 (adhesin)을 작용하는 P97의 R1 (AAKPV-E) repeat가 섬모의 수용체와 결합을 한다(Minion et al., 2000). 집락화가 된 이후 장상피세포로부터 섬모가 탈락되면서 이차감염을 유도하게 된다(DeBey and Ross, 1994). P97 adhesin은 면역원성이 높은 항원으로 돼지에서 이에 대한 항체가 형성이 된다(Klinkert et al., 1985; Zhang et al., 1995). 또한 회복기 돼지 항체에서는 R1 repeat 에 대한 항체가 검출된다고 보고되었다(Minion et al., 2000).
- 더욱 중요한 것은 현재 시판되고 있는 whole cell 불활화백신에는 P97에 대한 전신성 항체가 형성이 되지 않는다고 보고되었다. 그러한 이유는 불활화백신으로 사용하는 균주가 P97을 발현하지 않기 때문으로 추측하고 있고, P97 이 백신균주를 계대배양하는 동안 소실되는 것으로 알려지고 있다(King et al., 1997). 따라서 P97을 백신에 포함된다면 효과가 더욱 우수한 백신이 될 수 있을 것으로 판단된다.
- 현존하는 이러한 장애를 극복하기 위해 본 연구팀에서는 당초 계획했던 계획을 대폭 수정하여 P97의 R1 repeat를 대장균에서 발현시켜 정제한 후 현재 제조하고 있는 불활화백신에 첨가할 때 P97에 대한 항체가 야의 Mhp의 감염에 효과적인 방어를 할 수 있으리라 판단되어 정제를 수행하였다.
- 재조합 단백질의 최종 수율은 9.8mg/ml로서 기존의 보고된 수율과 유사하였다

(10mg/ml) (Conceicao et al., 2006). 본 과제에서 제작된 P97은 11 r1 repeat로 이루어진 것으로 확인되었다. 섬모에 부착되기 위해서는 최소 8 R1 repeating unit이 필요하고 항체에 감지되기 위해서는 3 repeating unit 이어야만 된다(Minion et al., 2000). 따라서 본 연구에서 제조된 단백질은 항체반응을 용이하게 유도할 수 있는 것으로 판단된다. 재조합단백질 rLTBR1은 western blotting에 의해 확인되었다. 현재 이 단백질에 대해 마우스에서의 전신성 및 국소성 면역원성을 평가하고 있는 중이다. 이렇게 발현된 단백질을 whole cell bacterin에 첨가하거나 혹은 서브유닛 백신으로 사용될 계획이다.

16. *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 불활화 백신균주의 선발

- Mhp의 경우 Protein profile에서의 181 kDa 밴드가 검출되고 Protein profile과 RAPD에서 가장 대표적인 균주중 증식성이 가장 좋은 균주를 5주를 선발하여 백신후보균주로 선정하였다 (표 4-11).

표 4-11. Mhp 불활화백신 후보균주 및 역가

Group	Isolate	CCU/ml
Mhp-1	Mhp5.3	10.3×10^8
Mhp-2	Mhp6.1	8.4×10^7
Mhp-3	Mhp7.25	15.9×10^7
Mhp-4	Mhp10.1	11.5×10^7
Mhp-5	Mhp23.9	6.2×10^7

- *M. hyorhinis*의 불활화백신균주의 선발은 protein profile과 RAPD 분석결과 및 증식성 결과에서 국내에서 대표분리주로 판정된 5주를 백신후보균주로 선발하였다(표 4-12).

표 4-12. Mhr의 불활화 백신 후보균주 및 역가

No.	sample name	CCU 결과 (log10)
1	6-3	1.59×10^{11}
2	7-3	8.42×10^7
3	10-10	1.89×10^{10}
4	11-2	5.82×10^6
5	11-6	6.22×10^2

17. 온도변이주의 제작 (세부)

- 현재 *M. hyorhinae*의 경우 한 개의 ts mutant를 선발하였으며 *M. hyopneumoniae*는 진행 중이다. Mhp의 경우 6회 이상 시도하였는데 성공하지 못했다. 현재 *M. hyorhinae*의 경우 한 개의 ts mutant (Mhr 10-10)를 선발하였으며 *M. hyopneumoniae*는 진행 중이다.

18. 배양된 수지상세포에 마이코플라즈마 백신 항원의 pulse 적정조건 수립 (협동 1)

가. 수지상세포의 배양과 세포표면마커, CD11c 발현 조사

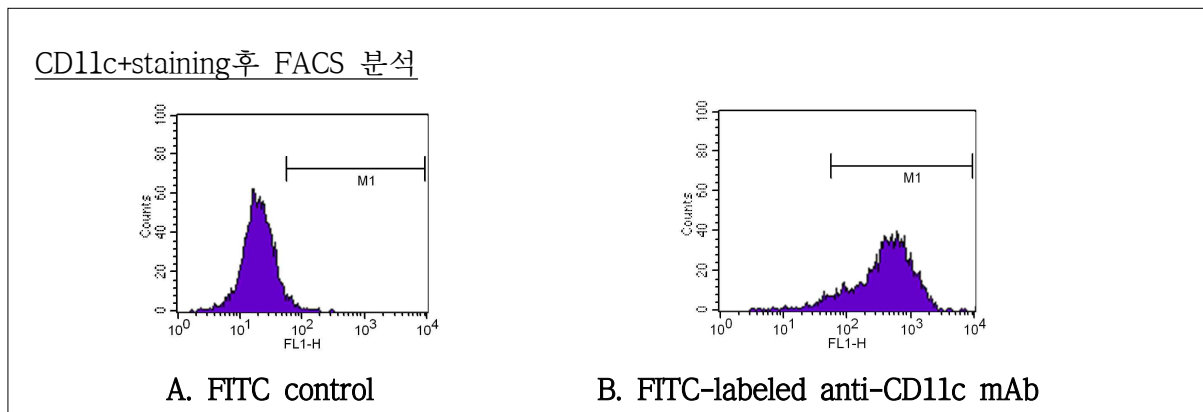


그림 4-19. Immature DCs의 세포표면마커, CD11c를 염색한 결과.

- 본 연구를 위해 마우스의 골수세포를 얻은 후 recombinant mouse GM-CSF를 이용해 6-10일간 배양하였다. 골수세포는 림프구를 비롯해 다양한 세포가 포함되어있는 세포 군으로서 세포배양 후 contaminant cells이 혼입되어 있을 가능성이 많다. 실험에 사용하기 전 수지상세포의 순도를 확인하기 위해 대표적인 세포표면마커의 일종인 CD11c의 발현을 확인하였다.
- FITC 형광물질이 부착된 anti-CD11c monoclonal antibody(mAb)를 사용하였고 항체에 의한 nonspecific 반응여부를 확인하기 위해 streptavidin-FITC를 대조군으로 사용하였다. 실험결과 FITC control(대조군)은 양성%가 2.23%였고(그림 4-19A), CD11c-FITC는 94.3%였다. 따라서 본 실험에 사용된 세포는 수지상세포 표면마커인 CD11c를 90%이상 발현하는 수지상세포임을 확인하였다.
- FACS분석에서 수지상세포의 고유 cell size(FSC/SSC)를 확인하였고(data not shown), inverted microscope을 이용해 수지상세포의 사진을 촬영한 바 있다(file size가 커서 not shown). 골수세포 유래의 수지상세포를 확인하기 위해 사용하는 세포표면마커로는 CD11c외에 MHC class II molecule이 있고, 본 실험에서 사용된 TLR agonist의 성숙효과를 측정하기위해 CD86도 이용된다.

나. 수지상세포에 mycoplasma균체 처리 시 TLR agonist의 효과

; MTT test를 이용한 생존율 측정

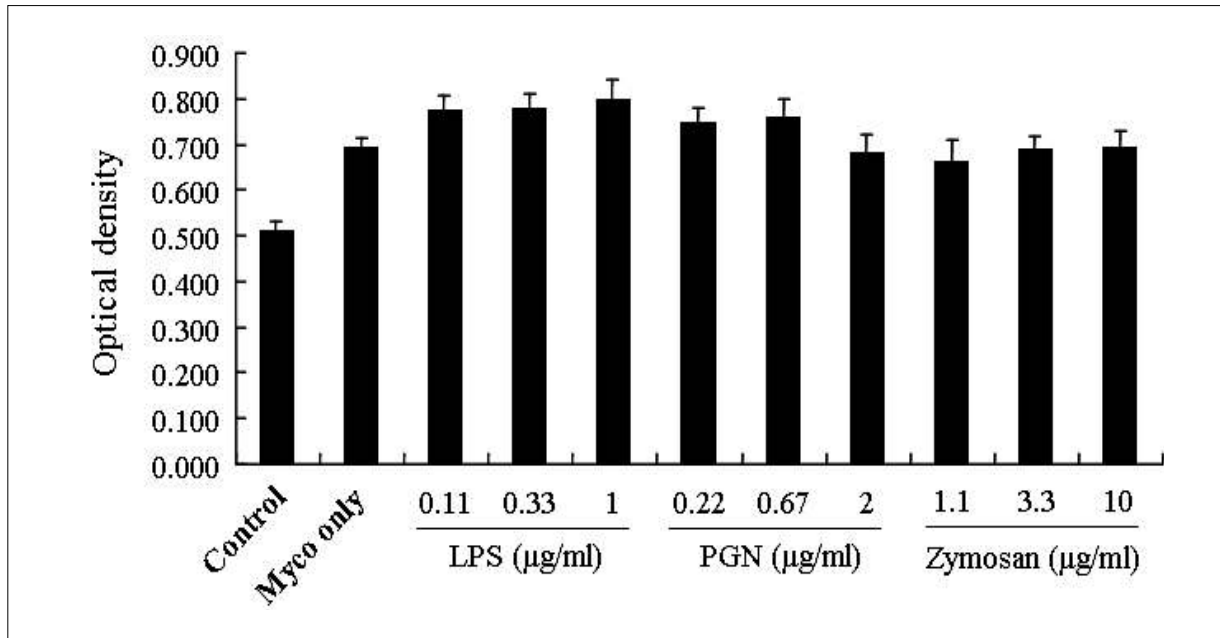


그림 4-20. Mycoplasma균체 처리된 수지상세포에서 TLR agonist의 생존율에 대한 효과

- 배양된 수지상세포를 96 well 배양 plate에 5×10^4 cells/well의 농도로 setup한 후 control에는 5% 배지만, Myco only에는 *Mycoplasma hyopneumonia* 균체를 5%(v/v)로, 나머지 처리군에는 Mycoplasma 균체를 5%(v/v)을 처리한 후 각 TLR agonist를 농도별로 처리하였다. 2일간 배양한 후 MTT solution과 10% SDS 용액을 처리하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- TLR agonist의 농도는 다른 research group에서 수지상세포 및 면역세포를 사용해 실험한 논문들을 참조하였다. 본 실험에서는 LPS는 1 µg/ml, PGN은 2 µg/ml, Zymosan은 10 µg/ml로 초기농도를 정하고 연속적인 3배 희석농도를 사용하여 잠재적으로 나타날 수 있는 고농도에 의한 세포독성과 생존율에 대한 영향을 측정하였다.
- 실험결과, 대조군(control)에 비해 모든 처리군의 생존율이 증가하였고 Myco only군에 비해 대부분의 agonist 처리군이 증가하였다. 가장 높은 생존율을 보인 것은 LPS처리군이었고, PGN과 Zymosan처리군 순이었다. 이 결과로 부터 Mycoplasma균체를 처리한 수지상세포에 LPS를 비롯한 TLR agonist의 처리 시 생존율의 증가를 관찰하였고 뚜렷한 세포독성은 없는 것으로 추정된다. 또한 agonist 중에서는 LPS와 PGN이 상대적으로 좋은 생존율을 보여 향후 백신개발에서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

다. 마이코플라즈마 균체와 TLR agonist 처리 후 수지상세포의 세포표면 마커 발현

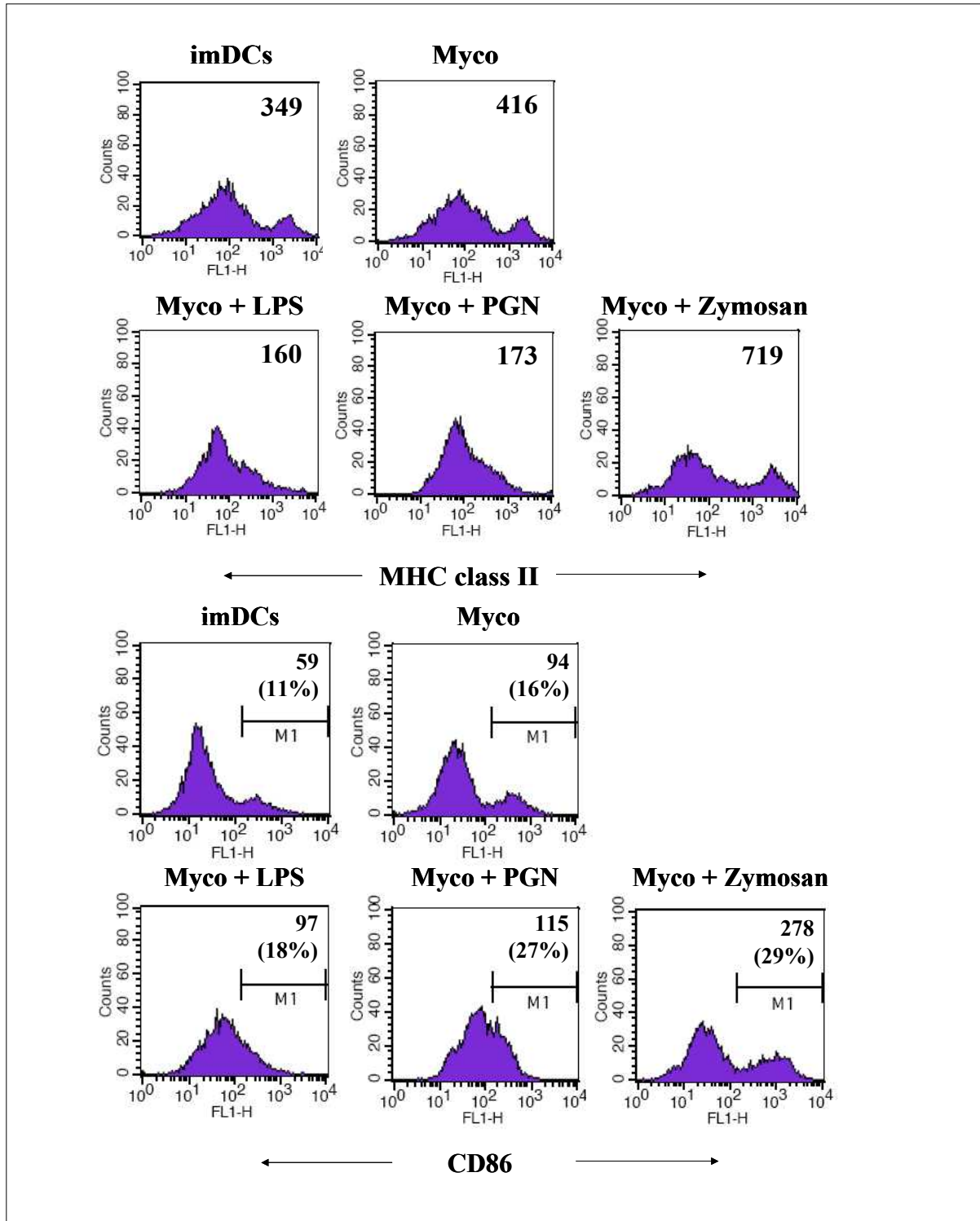


그림 4-21. TLR agonist가 처리된 수지상세포 표면에서 MHC class II와 CD86의 발현

MHC class II와 CD86의 발현에서 Zymosan 처리군이 가장 높았고, LPS 처리군은 MHC class II, imDCs는 CD86의 발현이 처리군 들 중에서 가장 낮았다.

19. T 림프구와 수지상세포의 혼합배양, 면역싸이토카인의 종류 및 생산 조건 연구 (협동 1)

가. 수지상세포의 syngeneic 림프구에 대한 항원제시능 측정

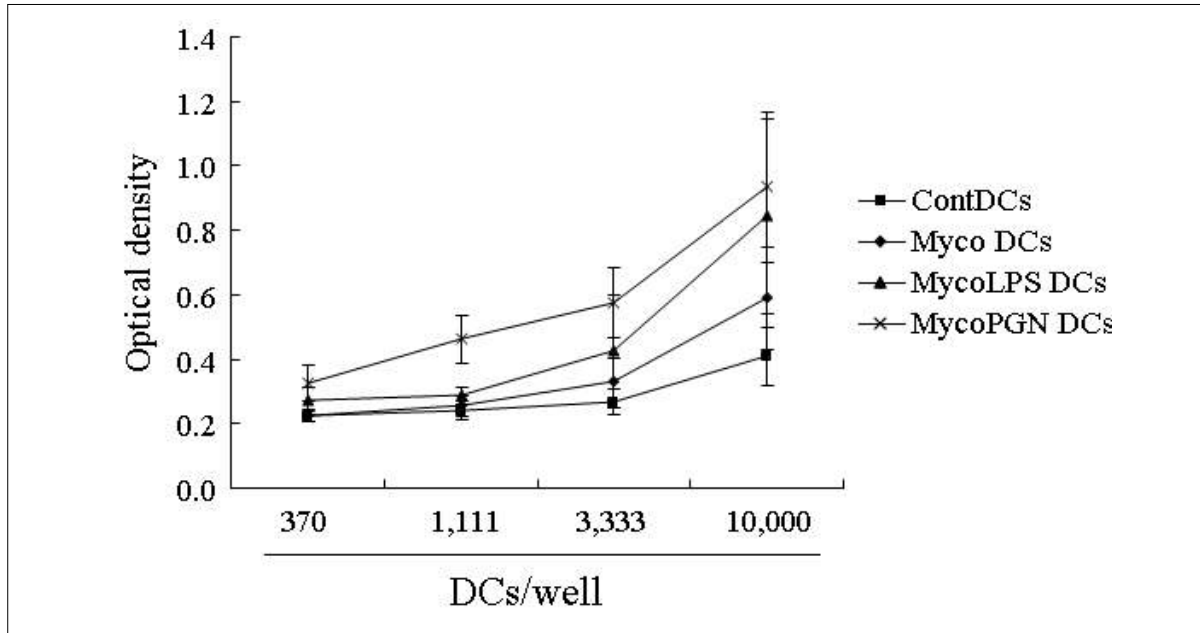


그림 4-22. 수지상세포와 림프구의 coculture를 통한 Mycoplasma항원제시능

- 일반적으로 수지상세포의 기능을 검증하는데 antigen-presenting capability를 측정한다. 이때 allogeneic 림프구를 수지상세포와 coculture하여 림프구의 증식능을 측정한다. 마우스를 이용하는 경우 Balb/c 유래의 림프구와 C57BL/6 유래의 수지상세포가 사용된다. 그러나 이는 두 가지 세포가 자연적으로 반응할 수 있는 allogeneic 항원을 인식하고 면역반응을 일으키는 수지상세포의 능력을 측정하는 것이다.
- 본 실험에서는 외래 병원성 항원에 대한 백신개발을 목적으로 하기 때문에 림프구와 수지상세포 모두 같은 종의 마우스를 이용해 coculture를 실시했다. 또한 앞의 실험에서 zymosan의 수지상세포 활성화 정도가 상대적으로 약해 TLR agonist로 LPS와 PGN을 선택해 수지상세포에 처리하였다.
- 본 실험에서 항원처리를 하지 않은 대조군 수지상세포(ContDCs)와 *Mycoplasma hyopneumonia* 균체만을 처리한 Myco DCs는 상대적으로 낮은 림프구 증식능을 보여 해당 수지상세포의 항원제시능이 낮음을 알 수 있었다. 그러나 LPS와 PGN처리군은 대조군과 Myco DC군에 비해 높은 수지상세포 항원제시능을 보였으며 PGN처리군이 수지상세포의 전체 농도에서 높은 림프구 증식능을 보였다.

나. 수지상세포에 mycoplasma균체 처리 시 TLR agonist의 효과

; ELISA를 이용한 interleukin-12(IL-12)의 생산능 비교

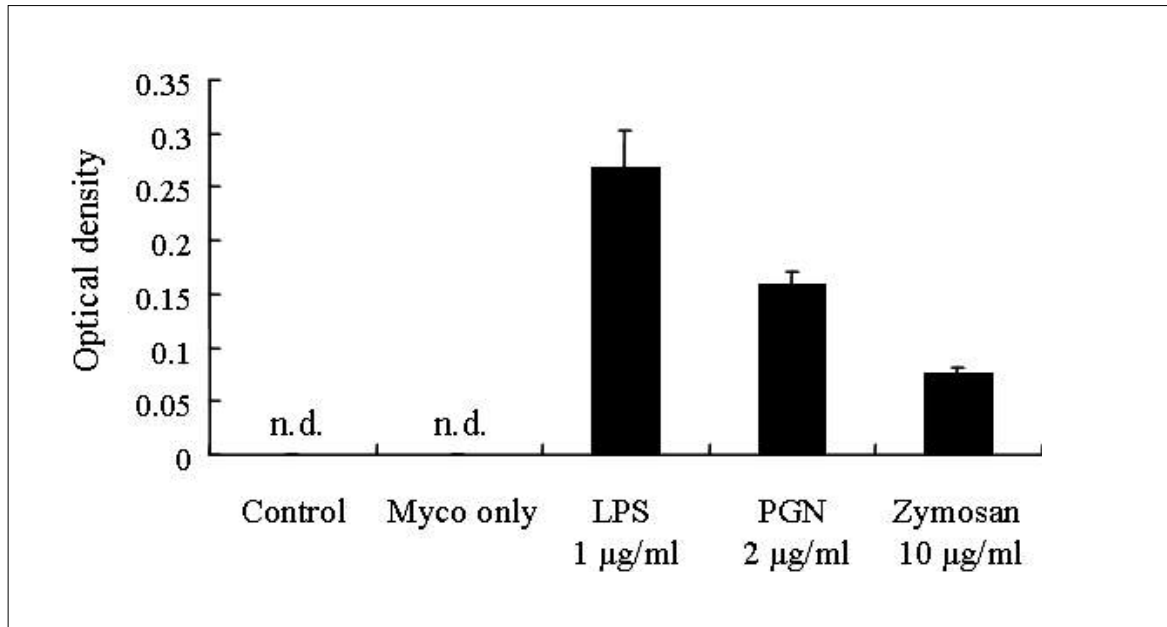


그림 4-23. Mycoplasma균체 처리된 수지상세포에서 TLR agonist의 IL-12 생산능에 대한 효과. Non-detectable (n.d.)

- 배양된 수지상세포를 96 well 배양 plate에 5×10^4 cells/well의 농도로 setup한 후 control에는 5% 배지만, Myco only에는 *Mycoplasma hyopneumonia* 균체를 5%(v/v)로, 나머지 처리군에는 Mycoplasma 균체를 5%(v/v)을 처리한 후 각 TLR agonist를 농도별로 처리하였다. 2일간 배양한 후 배양 supernatant를 회수하여 IL-12 생산능 비교에 이용하였다. ELISA는 mouse IL-12 specific antibody set을 사용하였으며 microplate reader를 이용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- IL-12 면역사이토카인은 innate immunity와 adaptive immunity 모두에서 중요한 역할을 하며 수지상세포와 대식세포를 비롯한 주요 항원제시세포 (antigen-presenting cells)에서 생산한다. 특히 세포매개성면역(cell-mediated immunity)에 중요 사이토카인으로 작용하므로 백신 adjuvant 개발 시 수지상세포의 항원제시능(antigen-presenting capability ; APC) 측정과 함께 주요 parameter로 사용된다.
- 실험결과 LPS의 IL-12 생산능이 가장 높았으며 PGN과 zymosan은 상대적으로 적은 생산능을 보였다. 또한 배지만을 처리한 control군과 mycoplasma균체 처리군은 IL-12 양을 측정할 수 없어 IL-12 생산이 되지 않은 것으로 판단된다. 이는 mycoplasma균체 자체로는 수지상세포가 IL-12를 생산시킬 수 있을 정도로 활성화시키기 힘들고 백신개발을 위해 TLR agonist와 같은 adjuvant가 반드시 필요하다는 사실을 보여주는 결과로 사료된다.

다. Commercial bacterin, Mycoplasma, IMS1313의 수지상세포에 대한 효과

: TNF-alpha 생산능과 세포모양 관찰

- 실제 field에서 사용하고 있는 돼지 마이코플라즈마 백신의 APC 자극능을 알아보기 위해 공동연구자인 중앙백신(주)으로부터 Sui vaccine(JooAng Vac.)를 공급받아 commercial bacterin으로 사용했다. *Mycoplasma hyopneumonia* 균액도 재료 및 방법에 기술되어 있는 대로 중앙백신(주)으로부터 공급받은 후 배양원액이 포함된 상태로 사용하였으며 IMS1313은 국내에서 돼지에 사용하는 대표적인 백신 adjuvant로서 중앙백신(주)으로부터 공급받아 실험에 사용했다.
- 수지상세포에 대한 위 시험물질들을 각각 처리한 후 세포배지를 회수하여 TNF-alpha에 대한 ELISA를 실시하였다. TNF-alpha는 innate immunity를 일으킬 수 있는 대표적인 면역싸이토카인으로 수지상세포와 대식세포 등에서 생산되며 항원제시세포의 활성화 정도를 확인할 수 있는 주요 parameter이다.

표 4-13. 시험물질 처리 후 수지상세포의 TNF-alpha의 생산량 비교 (단위: pg/ml)

원액에 대한 희석배수	Sui vaccine	Mycoplasma균액	IMS1313
3 ⁷ 희석액	120.0	7.7	17.6
3 ⁶ 희석액	120.3	9.4	9.6
3 ⁵ 희석액	121.8	7.7	7.0
3 ⁴ 희석액	124.9	6.7	6.7
3 ³ 희석액	32.8	6.7	
3 ² 희석액	8.7	6.5	
3 ¹ 희석액	6.8	6.0	
3 ⁰ 희석액	5.9	6.0	

- 실험결과 Sui vaccine이 수지상세포에서 TNF-alpha를 가장 많이 생산시켰으며 다른 처리군인 Mycoplasma 균액과 IMS1313은 미약한 생산능을 보였다. Mycoplasma의 균액은 상층액에 포함된 보존용액에 의해 수지상세포의 활성이 영향을 받았을 가능성과 Mycoplasma균체 자체가 수지상세포의 활성화를 유도하지 않아 TNF-alpha의 생산이 미약했을 가능성이 있다.
- 수지상세포에 대한 시험물질의 처리 후 inverted microscope으로 세포모양을 확인한 결과 Sui vaccine의 경우에는 3⁷ dilution에서 세포가 살아있는 모습이 관찰되었으나 IMS1313의 경우 3⁷ 과 3⁶ 모두 세포가 커지고 응집되었으며 죽어있는 모습이 관찰되

었다. (3^3 - 3^0 희석액은 세포독성에 의해 TNF-alpha 측정을 하지 않았음.) 따라서 IMS1313가 전반적으로 TNF-alpha의 생산이 미약한 이유로서 수지상세포에 대한 활성화 능력 부족 보다 시험물질자체가 일정농도 이상에서 세포독성이 있을 가능성이 있는 것으로 사료된다.

20. 수지상세포의 마이코플라즈마 백신항원 탐식과 소화에 관한 연구 (협동 1)

가. 수지상세포의 항원탐식능에 대한 TLR agonist의 효과

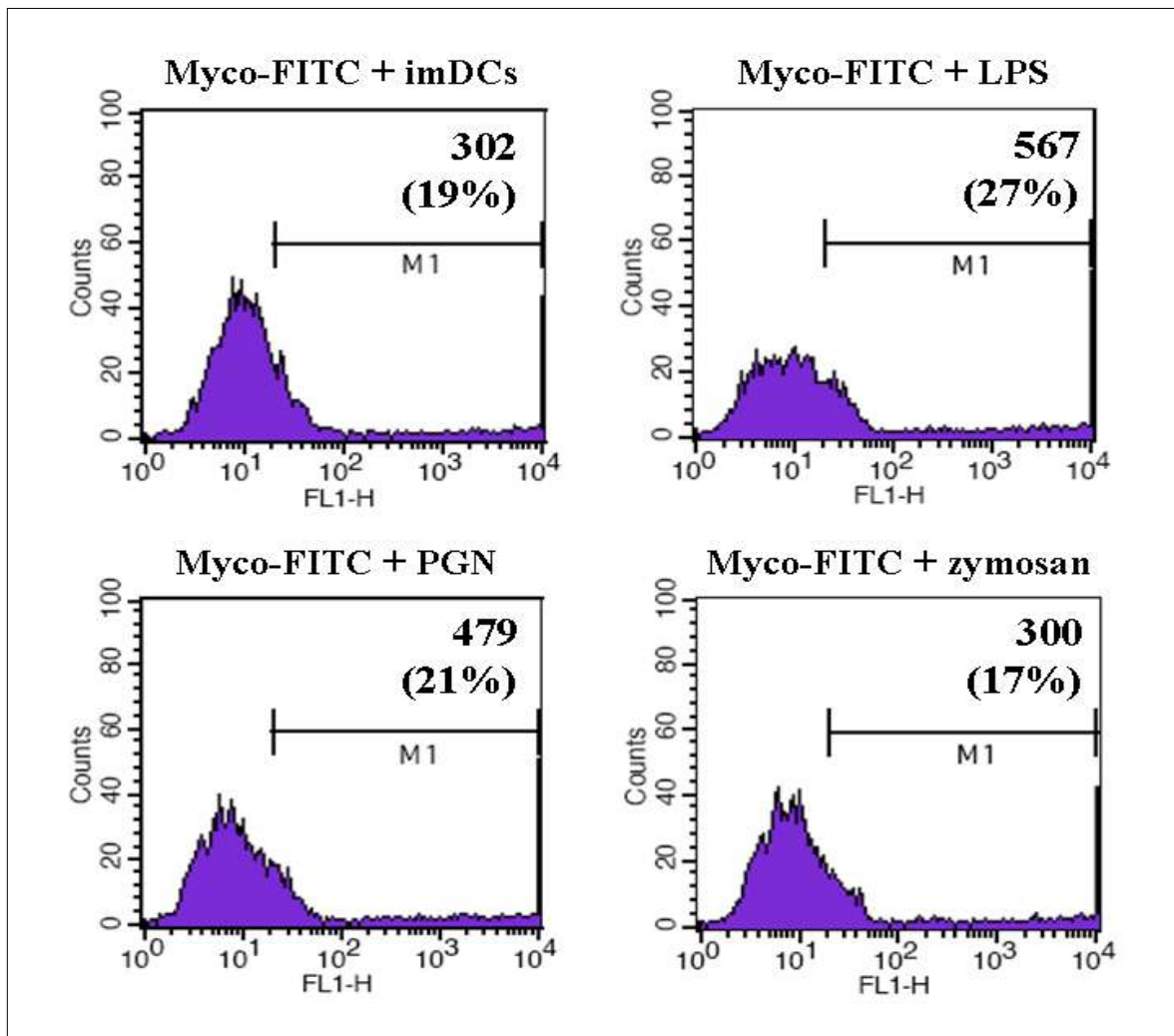


그림 4-24. FITC-labeled mycoplasma균체를 이용한 수지상세포의 항원탐식능 측정.

- 수지상세포에 FITC-mycoplasma 균체(Myco-FITC)를 처리하여 탐식시킨 결과 미성숙 수지상세포에 비해 LPS와 PGN 처리군이 보다 높은 탐식능을 보였으며, zymosan 처리군은 대조군과 비슷한 탐식능을 보였다(MFI와 positive cell ratio 모두). 이는 *Mycoplasma hyopneumonia* 균체를 항원 source로 공급하였을 때 TLR agonist 중

LPS와 PGN가 수지상세포와 같은 항원제시세포의 항원탐식을 촉진하여 백신효과를 증진시킬 것으로 예상된다.

그림 6에서 histogram의 오른쪽 위 숫자는 mean fluorescence intensity (MFI)를 나타내며 전체세포의 평균형광강도를 나타낸다. 괄호안의 %는 형광균체를 많이 탐식한 것으로 추정되는 세포 범위를 정한 뒤 그 ratio를 수치화한 positive cell ratio (M1)이다.

21. TLR4 효능자인 LPS를 이용한 마우스, 돼지 접종실험 (in vivo), 백신효과 검증 연구 (in vitro) (협동 1)

가. 마우스 접종실험

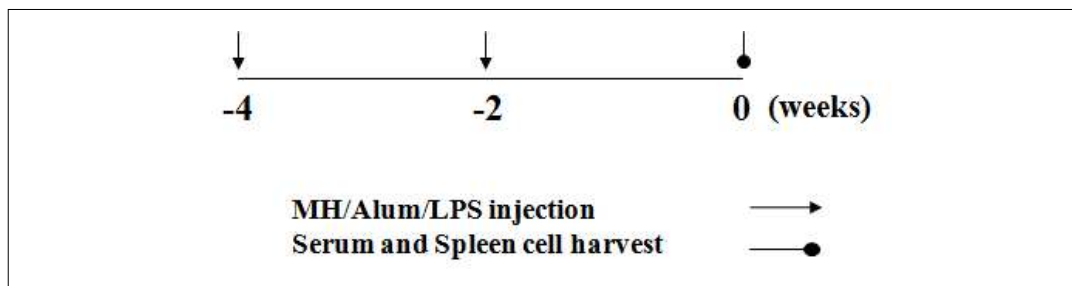


그림 4-25. 마우스 접종 schedule

마우스에서 *Mycoplasma hyopneumoniae* (MH)와 alum, LPS의 백신효과를 알아보기 위해 접종을 실시하였다. 대조군(control), MH only, MH+Alum, MH+LPS, MH+Alum+LPS 5군으로 나누어 접종하였으며 2주 간격으로 2번 접종을 하고나서 2주 후에 그 면역효과에 대한 실험을 실시하였다.

나. 마우스 혈청에서 MH 특이적인 면역글로블린 함량 측정

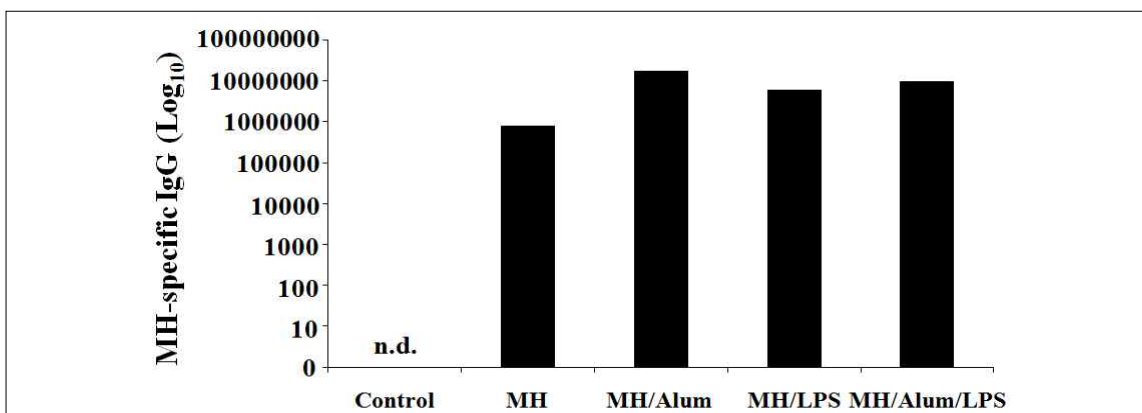


그림 4-26. 마우스 혈청에서 MH-specific IgG 검출

백신후보물질을 두 번 접종한 뒤 2주가 지난 후, 마우스를 희생시킨 뒤 혈청을 채취했다. 혈청 내의 *Mycoplasma hyopneumonia* (MH) 특이적인 IgG와 IgM을 ELISA법을 이용하여 측정하였다. MH-specific IgG는 MH only, MH+Alum, MH+LPS, MH+Alum+LPS 군에서 모두 나타났으며 MH+Alum과 MH+Alum+LPS를 접종한 군에서 가장 높게 나타났다. 하지만 LPS에 의한 증가효과는 나타나지 않았다.

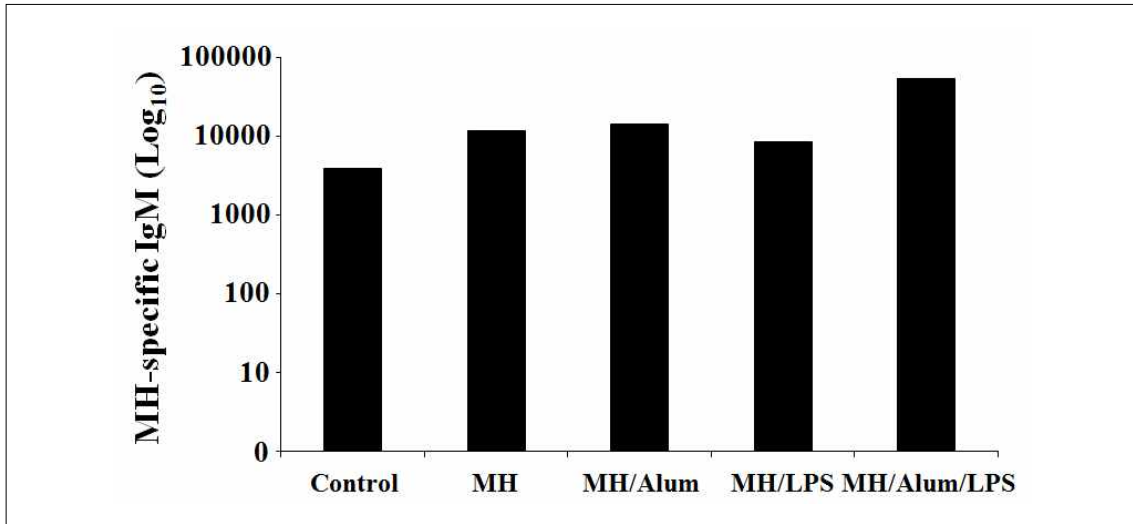


그림 4-27. 마우스 혈청에서 MH-specific IgM

MH-specific IgM은 모든 군에서 나타났으며 이 또한 MH+Alum, MH+Alum+LPS 군에서 가장 높게 나타났다. IgM의 경우 MH+Alum만 투여하였을 때보다 LPS를 함께 투여하였을 경우인 MH+Alum+LPS군에서 가장 많이 생산되는 것을 알 수 있다.

다. 면역된 비장세포에 대한 생체 외 항원자극시험

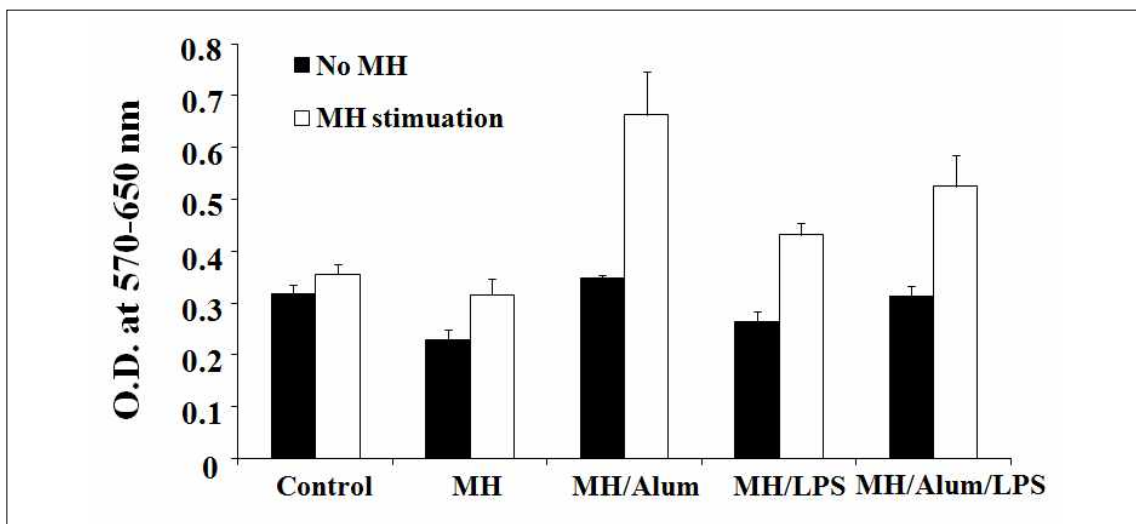


그림 4-28. MH항원 자극에 의한 비장세포 생존율 변화

마우스 비장세포를 harvest하여 각 군 별로 *Mycoplasma hyopneumonia* (MH)를 처리하거나 처리하지 않은 후 4일 간 배양하였다.

비장세포의 생존율을 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 이용하여 알아보았다. MH를 처리하지 않았을 경우에는 각 군별로 큰 차이를 보이지 않으나 MH를 처리한 경우 MH+Alum군과 MH+LPS군, MH+Alum+LPS군에서 높은 생존율을 나타냈다. 이는 마우스에 접종한 백신후보물질에 의해 MH를 인식한 비장세포가 생체 외에서 MH에 의해 자극을 받아 그 생존율이 증가한 것이다.

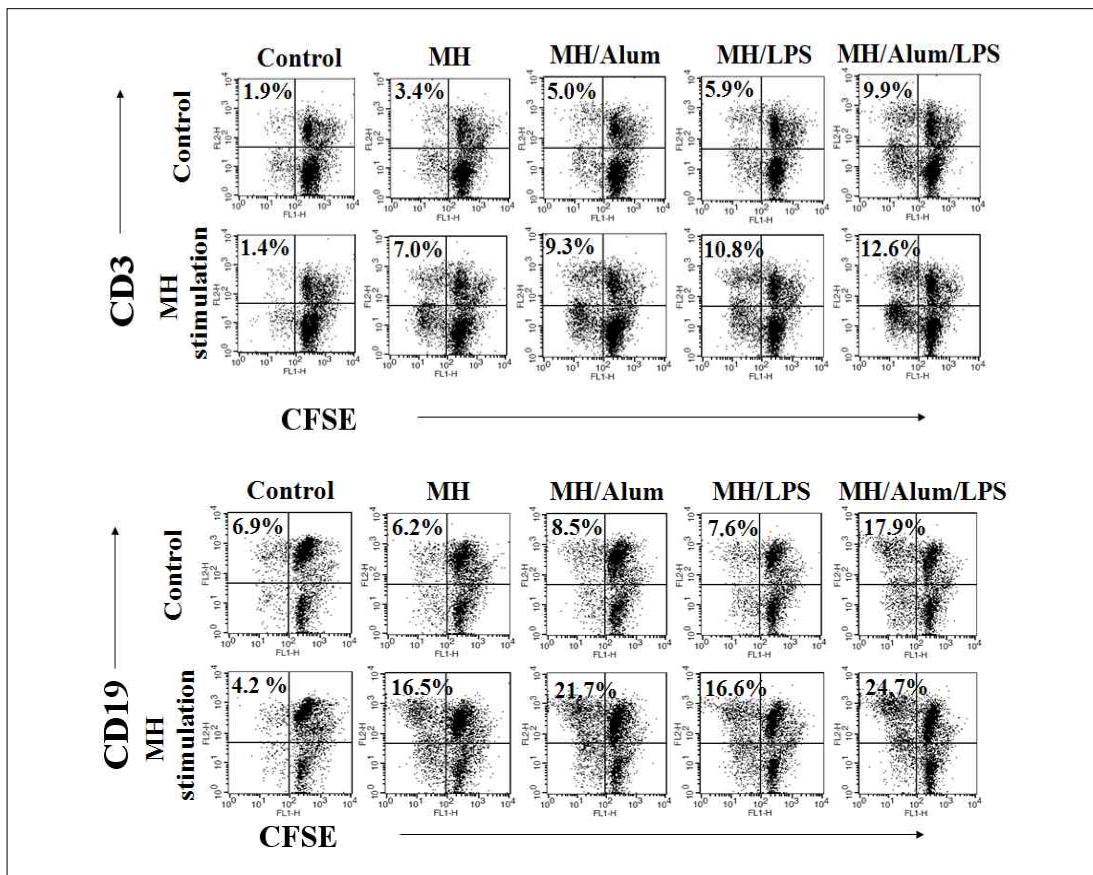


그림 4-29. MH항원자극에 의한 CD3, CD19 양성 비장세포의 비율 변화

MH stimulation에 의해 증가하는 비장세포의 subset population을 알아보았다. 백신후보 물질이 접종된 마우스로부터 비장세포를 채취하였고 proliferation 정도를 측정하기 위해 형광물질의 일종인 carboxyfluorescein succinimidyl ester(CFSE)를 처리하였다. CFSE 형광물질은 세포분열이 진행될수록 그 함량이 낮아진다. 비장세포를 culture plate에 setup한 뒤 MH를 처리하거나 처리하지 않고 4일 간 배양한 후 CD3와 CD19 항체를 이용해 staining을 실시하였다. 위 dot plot data에서 quadrant중 왼쪽 위의 percentage는 subset, 즉 CD3 또는 CD19 positive 세포이면서 proliferation이 왕성하게 된 세포군의 수를 의미한다.

대조군(control)군에서는 CD3와 CD19 positive cell의 증식된 세포수에서 변화가 없었던 반면, MH가 접종되었던 마우스의 비장세포(MH군)에서는 MH자극에 따라 cell population의 증가가 나타났다. CD3 positive cell은 상대적으로 약한 증가를 보였으나 CD19 positive cell은 *in vitro* 상에서 MH 처리에 따라 proliferation이 활발히 일어나는 것을 알 수 있다. 특히 MH+Alum군과 MH+Alum+LPS 군에서의 CD19 positive cell의 증가가 확연히 나타났으며 MH+Alum+LPS 군에서는 MH 처리를 하지 않은 세포에서도 CD19 positive cell의 증가가 나타났다. 이는 마우스에 MH+Alum+LPS를 접종한 후 생체 내에서 CD19 positive cell의 분화 및 증식이 왕성하게 일어남을 의미한다.

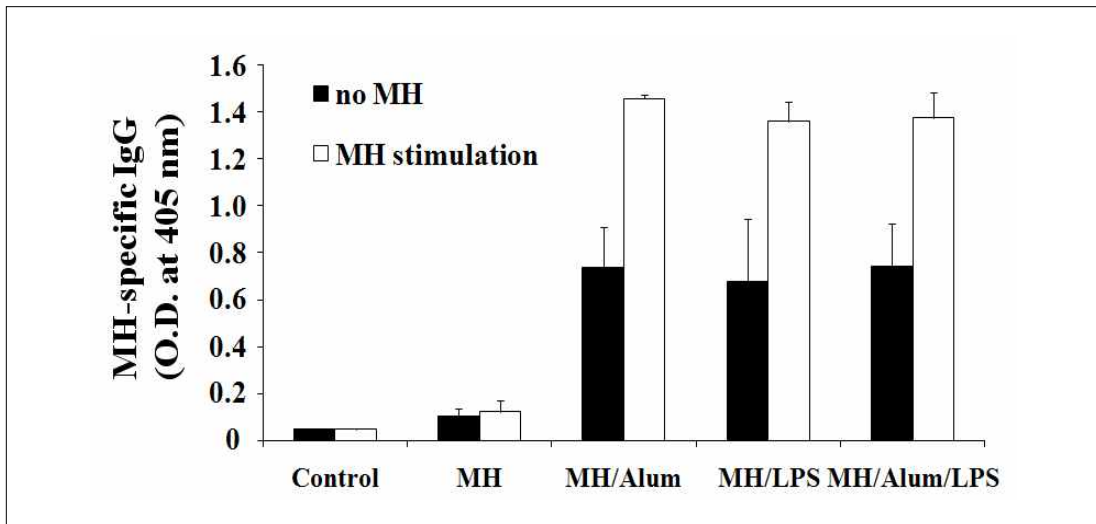
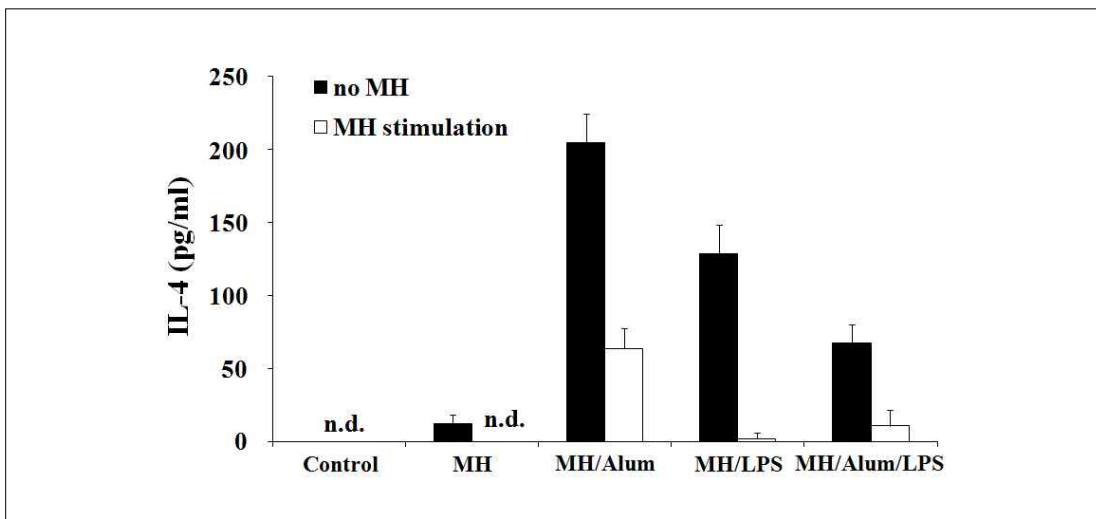


그림 4-30. 비장세포 배양액에서 MH-specific IgG 검출

앞과 동일한 setup에서 상층액을 회수하여 MH-specific IgG 생산 정도를 알아보았다. MH 자극이 없을 경우에도 MH+Alum, MH+LPS, MH+Alum+LPS군에서는 높은 MH-specific IgG 생산을 보였다. 하지만 MH 자극을 하였을 경우 그 생산량이 더욱 증가하였다.



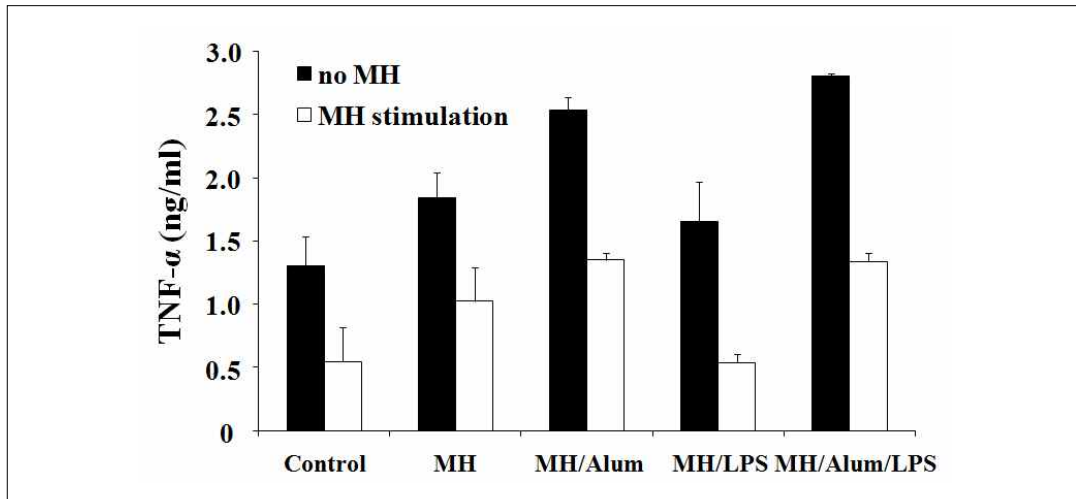


그림 4-31. 비장세포에 의한 면역사이토카인의 생산

MH 자극에 의한 cytokine 생산 변화를 알아보았다. Cytokine 생산 또한 immunoglobulin 생산 경향과 비슷하게 나타났으나, 특이하게도 MH 자극이 없을 경우보다 MH 자극이 있을 경우 IL-4와 TNF- α 의 생산이 감소하는 사실을 확인하였다.

라. 백신후보물질의 돼지접종 실험

마우스를 이용한 백신후보물질의 면역능시험을 마친 후 돼지를 이용한 실험을 실시하였다. 협동연구팀인 (주)중앙백신에서 돼지를 준비하였고 실험군마다 2-3 마리의 자돈을 배치하여 실험에 이용하였다. 백신후보물질의 마리당 접종량은 표 4-14와 같다.

표 4-14. 돼지에 접종한 백신후보물질의 종류와 용량

	control	MH Alum	MH Alum LPS	MH IMS1113	SuiVac	MH CWS	MH Alum CWS
MH (μ g)	-	100	100	100	-	100	100
Alum (μ l)	-	110	110	-	-	-	110
LPS (μ g)	-	-	1000	-	-	-	-
IMS1113 (μ l)	-	-	-	250	-	-	-
CWS (μ g)	-	-	-	-	-	1000	1000
SuiVac (μ l)	-	-	-	-	1000	-	-

물질의 성상은 다음과 같다.

항원으로 사용된 MH는 (주)중앙백신에서 공급된 포르말린으로 사멸화된 *Mycoplasma hyopneumoniae* 균체를 sonication하였고 원심분리를 통해 soluble antigen만을 얻어 사용하였다. Bradford법을 이용하여 단백질 정량을 실시한 후 마리당 100 μ g을 접종하였다. 대조군에는 MH 대신 인산완충액을 해당 volume만큼 넣었다.

Alum은 Pierce사, LPS는 Sigma사에서 구매한 후 사용하였다. IMS1113은 돼지에 많이 사용하는 commercial adjuvant로 (주)중앙백신에서 공급하였고, CWS (cell-wall skeleton)는 BCG 균체를 특정방법대로 가공한 물질이며 충남의대에서 공급받아 사용하였다. SuiVac은 (주)중앙백신의 상품이며 정량대로 사용하였다.

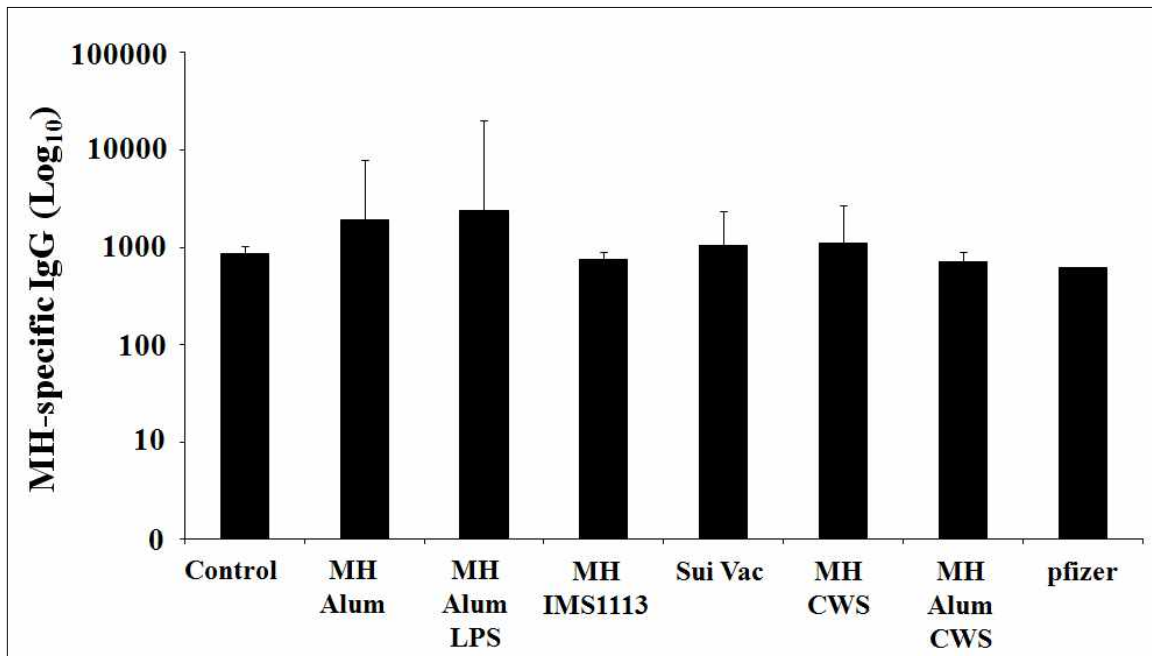


그림 4-32. 면역된 돼지의 혈청에서 MH-specific IgG의 검출

MH와 여러 adjuvant 후보물질을 돼지에 직접 접종하여 MH-specific 항체의 형성 정도를 알아보았다. 혈청은 접종 뒤 2주 후에 채취하였으며 혈청의 MH-specific IgG level을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 혈청 내 MH specific IgG는 MH/Alum/LPS 군에서 가장 높게 나타났으며 MH/Alum군도 다른 접종군에 비해 비교적 높은 항체가 측정되었다. 또한 CWS도 대조군에 비해 높은 항체를 보이는 사실을 확인하였다.

22. TLR3, TLR9 효능자인 polyI:C와 CpG ODN 1826의 수지상세포에 대한 면역 기능 시험(협동1)

가. Toll-like receptor (TLR) 3, 9 agonist의 면역능 평가

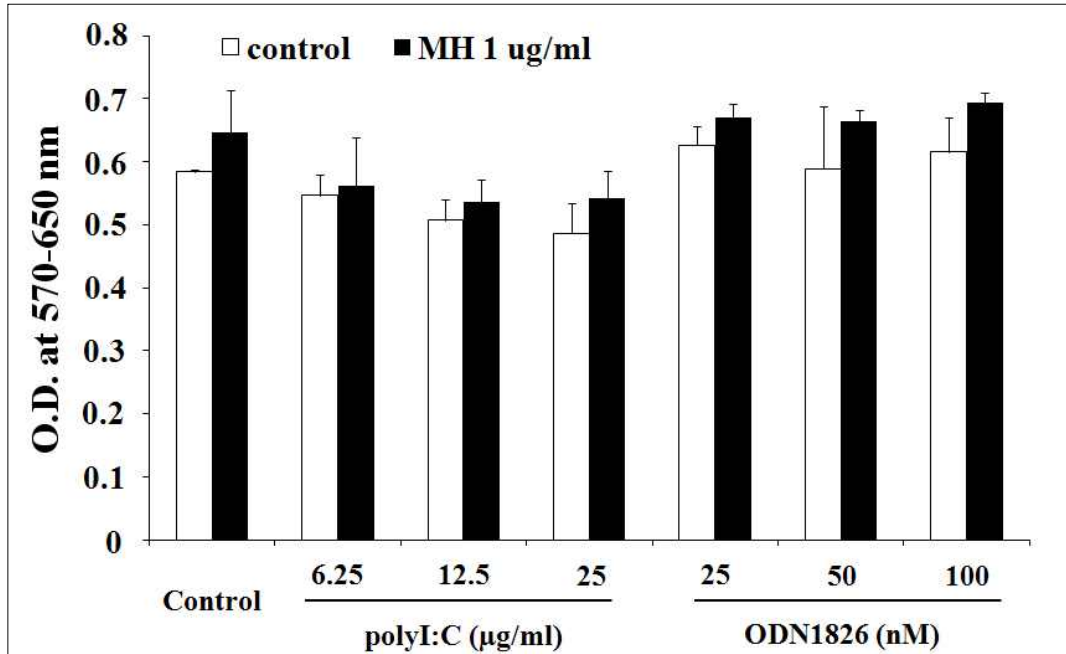


그림 4-33. *M. hyopneumoniae* (MH)와 toll-like receptor agonists 자극에 의한 수지상세포의 생존율 변화

연구1차년도에 TLR 2, 4 agonist의 면역능 평가를 수행한 바 있다. 연구2차년도에는 보완실험으로 다른 TLR agonist의 adjuvant로서의 가능성을 알아보기 위해 대표적인 항원제 시세포인 수지상세포(dendritic cells)에 TLR-3 agonist인 polyI:C와 TLR-9 agonist인 ODN1826을 농도별로 처리하였다. MTT assay 실험결과, 모든 군에서 MH를 처리한 군이 처리하지 않은 군보다 높은 세포활성을 나타내었으나 agonist 별로는 polyI:C 보다 ODN1826에서 높은 세포활성이 있음을 알 수 있었다.

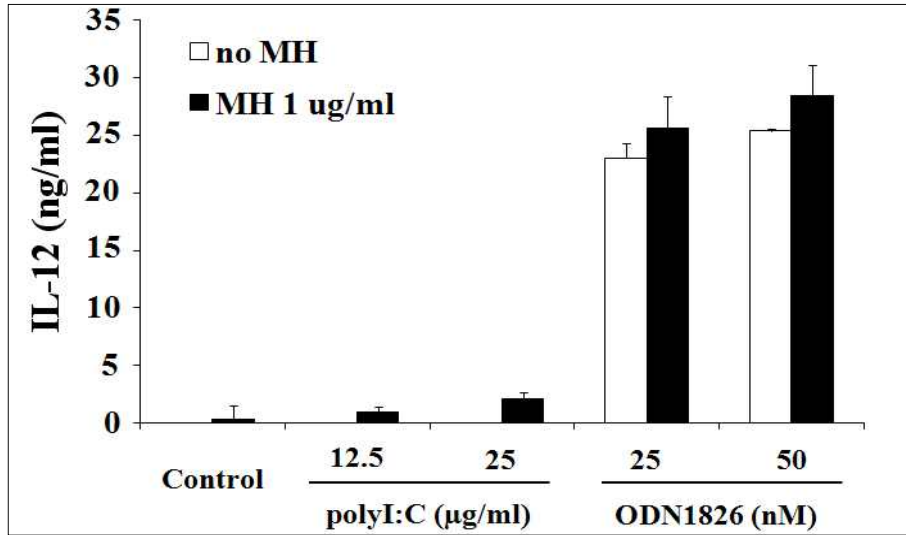


그림 4-34. TLR 3, 9 agonist에 의한 수지상세포의 IL-12 생산

수지상세포가 활성화되면 생산되는 대표적인 cytokine인 IL-12의 생산정도를 알아보았다. IL-12는 innate immunity와 adaptive immunity에서 중요한 역할을 하는 면역사이토카인이며 특히 세포성면역반응을 일으키는데 필수적이다. PolyI:C에서는 IL-12의 생산이 거의 증가되지 않았으나 ODN1826을 처리하였을 경우 IL-12의 생산이 매우 증가함을 알 수 있었으며 또한 MH를 처리하였을 경우 더욱 증가함을 확인하였다.

23. 신규 TLR효능자 (JB115 beta-glucan, CWS)에 대한 면역증진시험 및 기전연구 (협동 1)

가. Beta-glucan의 면역능 증진 시험, 기전연구

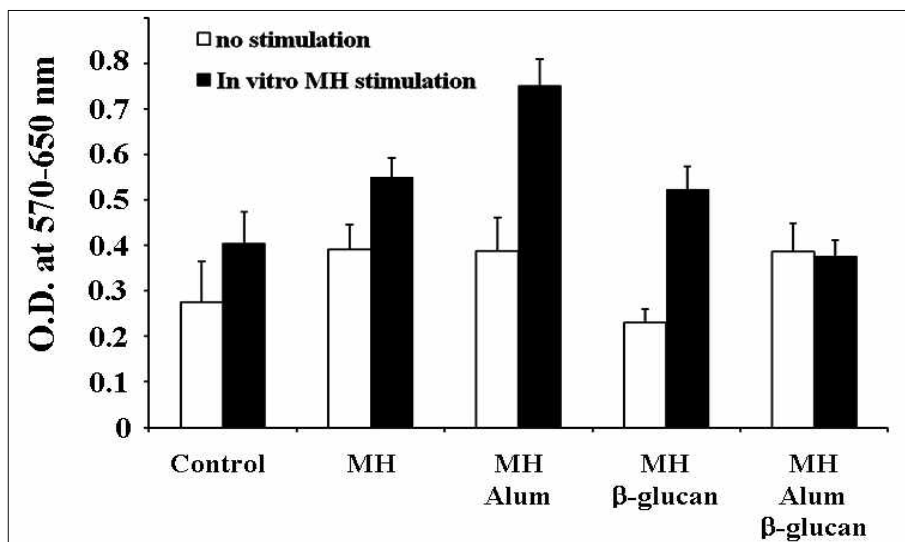


그림 4-35. 비장세포 생존율에 대한 beta-glucan의 효과

새로운 adjuvant 후보물질을 탐색하기 위한 노력의 일환으로 경북대학교로부터 JB115 미생물유래의 beta-glucan을 입수하여 LPS와 유사한 면역능 실험을 수행하였다. 마우스에 *Mycoplasma hyopneumonia* (MH), MH/Alum, MH/beta-glucan, MH/Alum/beta-glucan을 접종한 뒤 비장세포를 채취하였다. 체내 면역반응 유무를 확인하기 위해 비장세포에 MH항원을 restimulation한 결과 MH/Alum, MH/beta-glucan군에서 MH항원이 없을 때에 비해 세포 생존율이 유의적으로 증가하는 것을 확인했다.

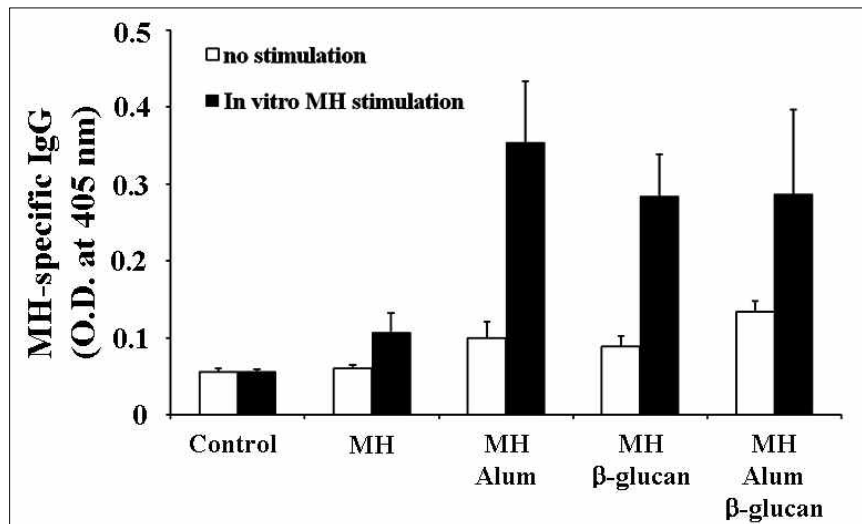


그림 4-36. MH항원자극 시 비장세포의 MH-specific IgG 생산에 대한 beta-glucan의 효과

동일한 실험에서 MH-specific IgG의 함량을 분석한 결과, MH/Alum, MH/beta-glucan, MH/Alum/beta-glucan군에서 MH항원 자극에 의해 증가하였다. 또한 MH군의 경우에서도 MH항원자극에 의해 약간 증가하였다. 이는 생체 내에서 MH항원 자체에 의한 약한 면역반응이 생성되지만 면역 adjuvant에 의해 훨씬 증가될 수 있음을 의미한다.

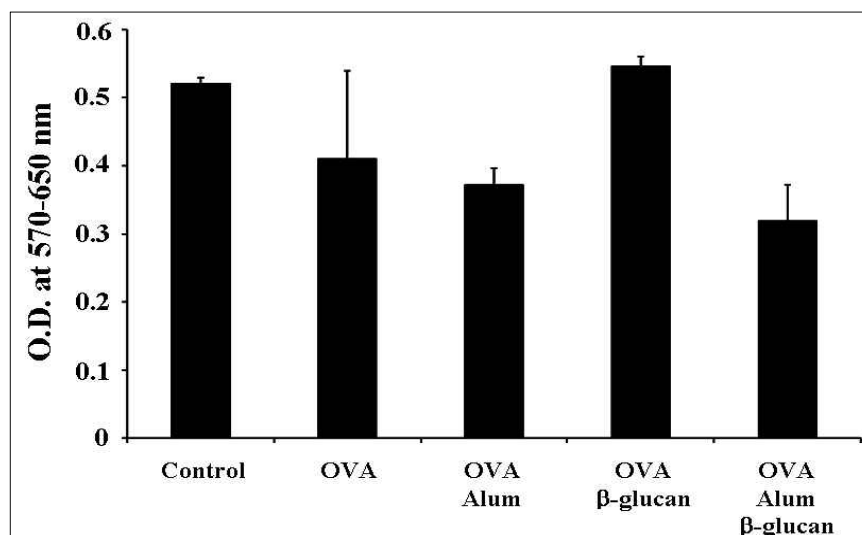


그림 4-37. 수지상세포의 생존율에 대한 beta-glucan의 효과

마우스에 대한 생체 내 면역반응을 실시한 후 면역중심세포인 수지상세포에 대해 표준항원 ovalbumin(OVA)을 처리했을 때 beta-glucan이 생존율 변화에 영향을 미치는 지 여부를 확인하기 위해 MTT assay를 실시했다. 배양된 수지상세포에 OVA/beta-glucan이 유의하게 생존율을 높였으나 다른 처리군은 대조군에 비해 생존율이 저하되는 현상을 확인했다. 가능한 원인으로는 *in vitro*시험에서 투여된 alum이 수지상세포에 세포독성이 있거나 세포활성을 떨어뜨릴 수 있는 점을 생각할 수 있다.

나. CWS의 면역능 증진 시험, 기전연구

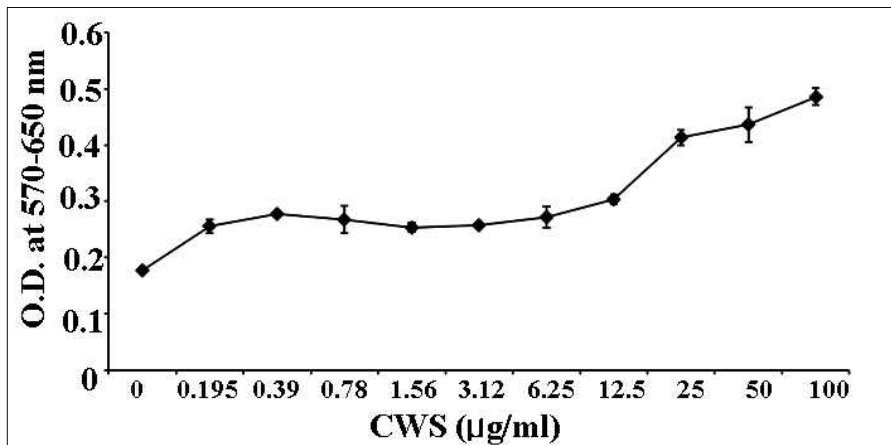


그림 4-38. 비장세포 생존율에 대한 BCG-CWS의 효과

충남대학교로부터 입수한 BCG균의 cell-wall skeleton (CWS)을 마우스 비장세포에 처리하여 세포성장/활성화 능력을 확인하였다 (MTT분석). 0-100 ug/ml의 BCG-CWS를 처리한비장세포를 3일간 배양한 후, 흡광도를 측정하였다. 이 결과, 3.12-100 ug/ml의 CWS를 처리한 비장세포의 성장/활성화 능력이 증가되었다.

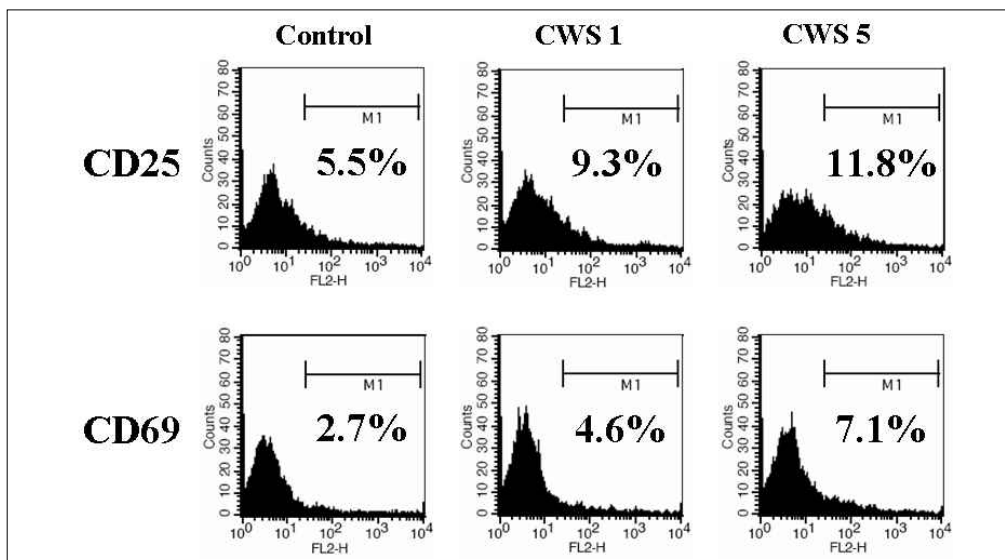


그림 4-39. BCG-CWS의 비장세포 표면마커 발현 증가

비장세포는 주로 T 림프구, B 림프구, 자연살해세포 (natural killer cell)로 구성되어 있다. 대식세포와 수지상세포도 일부 있지만 본 실험실의 비장세포 정제과정에서 많이 제거된다. 예비실험을 통해 T 림프구 보다는 B 림프구가 세포분열을 일으키고 활성화된다는 사실을 확인한 후 그 작용기전을 확인하기 위해 림프구의 활성화와 세포분열을 일으키는 데 중요한 표면마커인 CD25, CD69에 대한 특이항체를 사용하여 발현정도를 확인하였다. CWS는 두 가지 활성화마커 모두에서 농도의존적으로 발현을 증가시켰다. 특히 CD25의 경우 림프구의 성장에 필요한 주요 사이토카인인 IL-2의 수용체 일부분으로서 다른 chain과 결합하여 적은 양의 IL-2에도 반응할 수 있도록 림프구를 sensitive 하게 만드는 주요 분자이다.

24. MH soluble 항원을 이용한 면역세포 (수지상세포와 비장세포) 영향 평가 (협동 1)

가. 비장세포의 성장과 생존을 변화

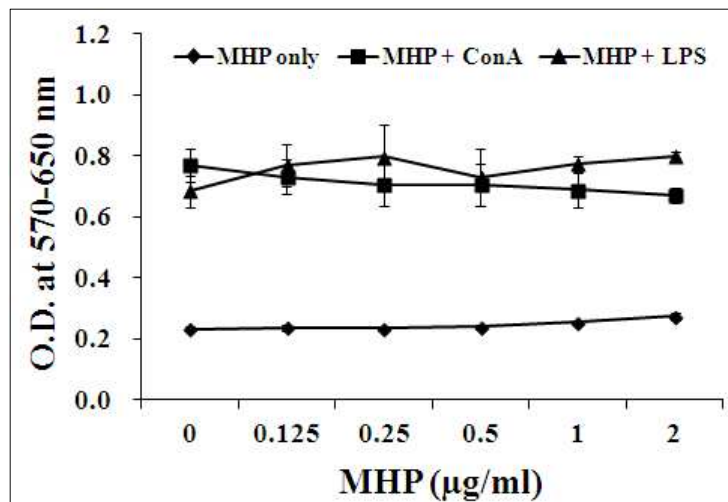


그림 4-40. MHP와 mitogen 자극에 의한 비장세포의 성장 변화

비장세포에 *Mycoplasma hyopneumonia* (MHP)를 각 농도마다 4개 well씩 0~2 µg/ml을 처리하여 2일간 배양한 후 MTT assay를 통해 세포증식능력을 측정하고 평균을 구하였다. 한편 대표적인 B 림프구 mitogen인 LPS 또는 T 림프구 mitogen인 ConA을 비장세포에 처리하였을 때, MHP에 의해 어떠한 영향을 받는지 알아보기 위해 MHP를 0~2 µg/ml로 처리한 well에 LPS 또는 ConA를 각각 1 µg/ml씩 처리하였다. 이들을 2일간 배양한 후 MTT assay를 통해 세포증식능력을 측정하였다. 그 결과, MHP 단독, MHP + LPS, MHP +ConA를 처리한 군에서 모두 MHP 농도의존적으로 유의한 변화는 없었다.

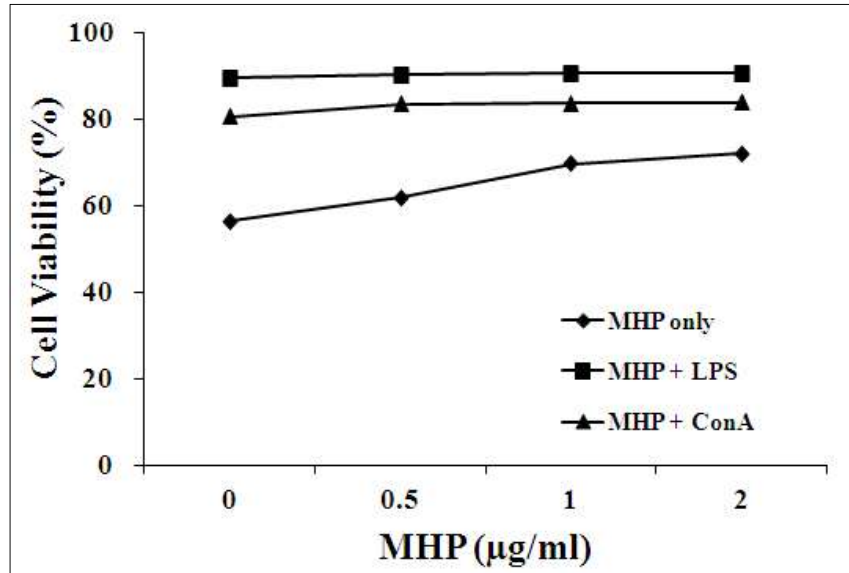
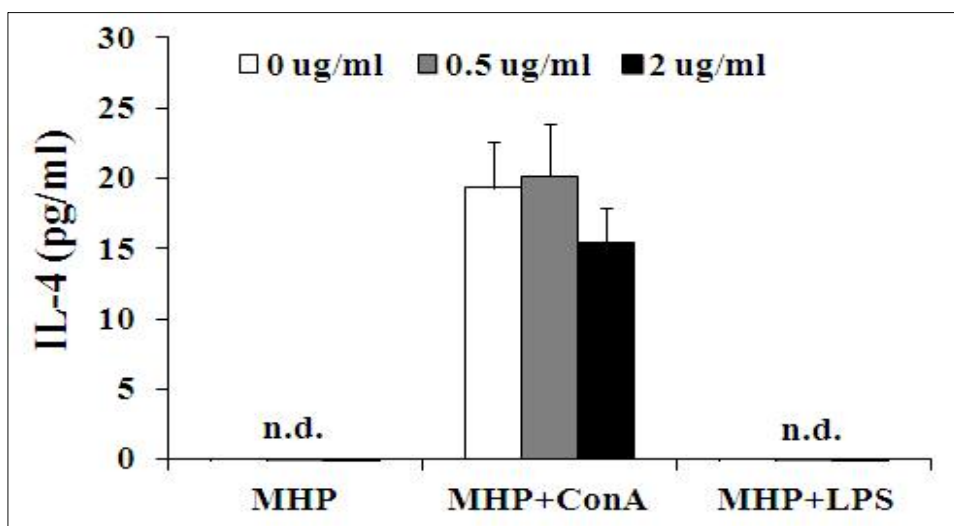


그림 4-41. MHP와 mitogen 자극에 의한 비장세포의 생존율 변화

비장세포에 MHP를 각 농도마다 2개 well씩 0~2 µg/ml을 처리하여 2일간 배양한 후, 각 농도별로 trypan blue 염색을 하여 살아있는 세포와 죽은 세포의 수를 세어 생존율을 구했다. 또한 LPS 또는 ConA에 의해 활성화된 비장세포에서 MHP에 의한 생존율의 변화가 어떠한지 알아보기 위해 MHP를 0~2 µg/ml로 처리한 well에 LPS 또는 ConA를 각각 1 µg/ml씩 처리하였다. 이들을 2일간 배양한 후, 동일한 염색을 실시하였다. 그 결과, LPS와 ConA를 MHP와 함께 처리한 비장세포에서는 유의적인 변화가 없으나, MHP 단독을 처리한 경우 생존율이 농도의존적으로 증가하였음을 확인하였다.

나. 비장세포의 면역사이토카인 생산



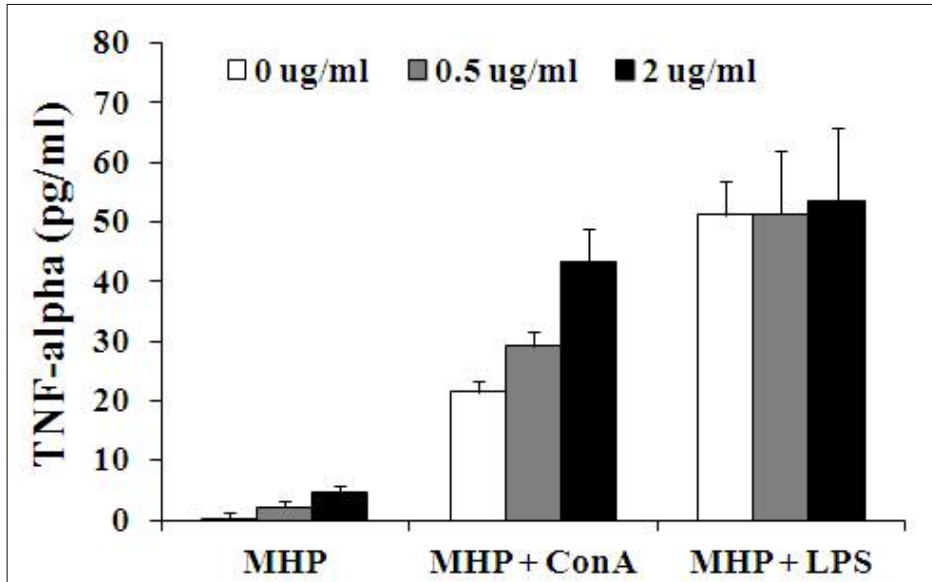


그림 4-42. MHP와 mitogen 자극에 의한 비장세포의 사이토카인 생산

MHP에 의한 비장세포의 사이토카인 생성의 변화를 보기 위해 ELISA를 실시하였다. MHP 단독 또는 LPS를 처리한 세포에서는 IL-4가 거의 생산되지 않으나, ConA를 처리한 세포에서는 그 생산이 크게 증가하였다. ConA는 T 림프구에 특이적인 mitogen이므로, ConA에 의한 T 림프구의 증식이 IL-4 생산에 영향을 주었음을 추론할 수 있다. 또한 MHP 0 $\mu\text{g/ml}$ 에서 MHP 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 변화할 때에는 유의성이 없으나, MHP 2 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 유의적으로 IL-4가 감소되었다. 따라서 MHP 2 $\mu\text{g/ml}$ 에서 T 림프구의 활성화가 억제되었음을 알 수 있다. 염증관련 사이토카인 중 하나인 TNF-alpha의 생산량을 측정된 결과, ConA 처리군에서는 MHP의 농도의존적으로 TNF-alpha의 생산이 증가한 반면 LPS 처리군은 농도에 따른 변화가 관찰되지 않았다.

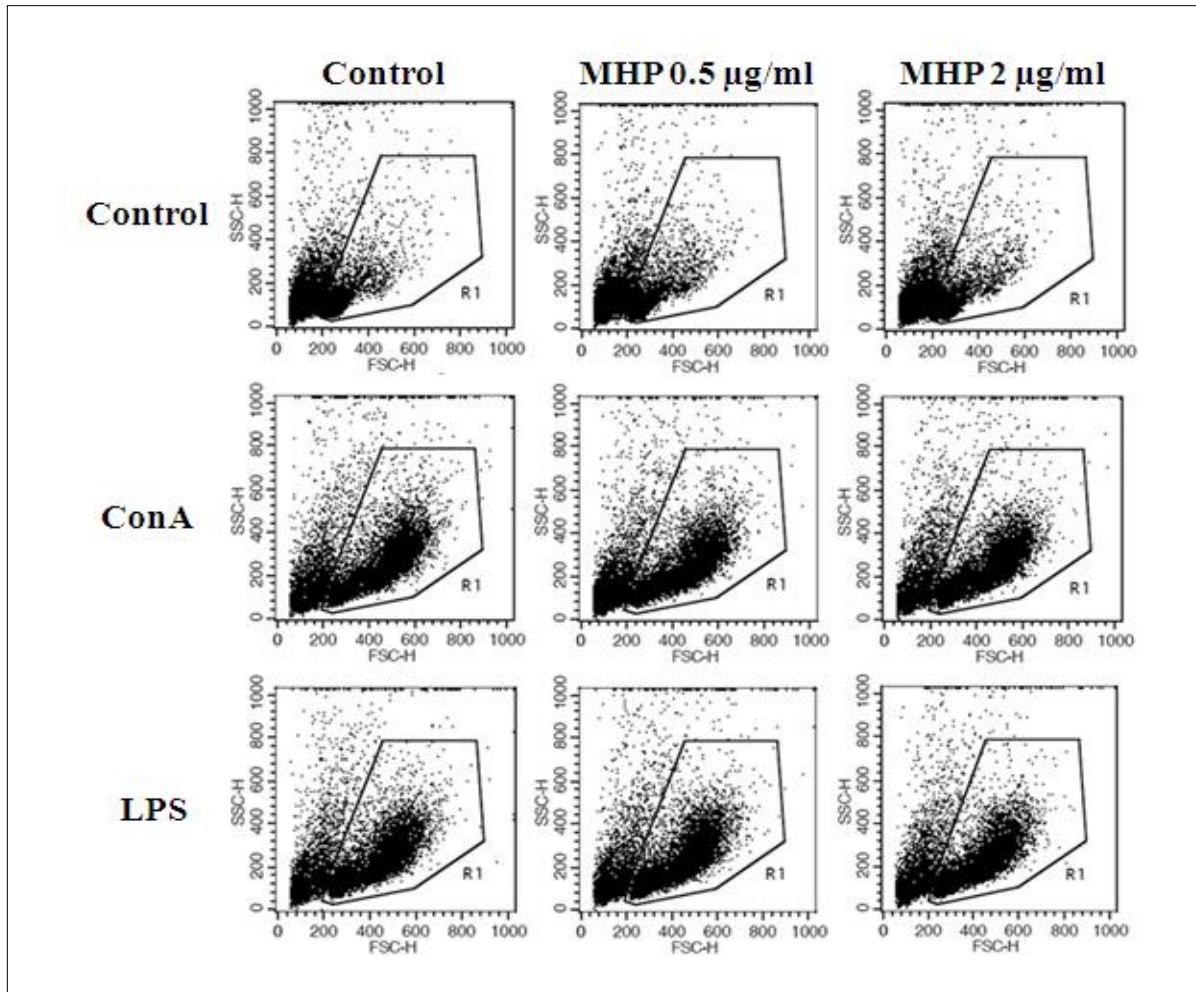


그림 4-43. MHP와 mitogen 자극에 의한 비장세포의 세포크기 변화

유세포분석기를 이용하여 세포크기 변화를 관찰하였다. 비장세포는 활성화 시 크기가 증가하는 경우가 많다. R1구역 (비장세포의 major population)의 세포를 보면 MHP 단독 처리군에 비해 ConA 또는 LPS 처리군에서의 세포 크기가 현저히 증가하였다. 그러나 MHP 농도에 따른 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 MHP 단독으로는 림프구의 크기를 증가시키지 않지만, ConA 또는 LPS를 처리한 경우 림프구의 크기가 증가되는 사실을 확인하였다.

다. 비장세포의 세포크기와 미토콘드리아 막전위 변화

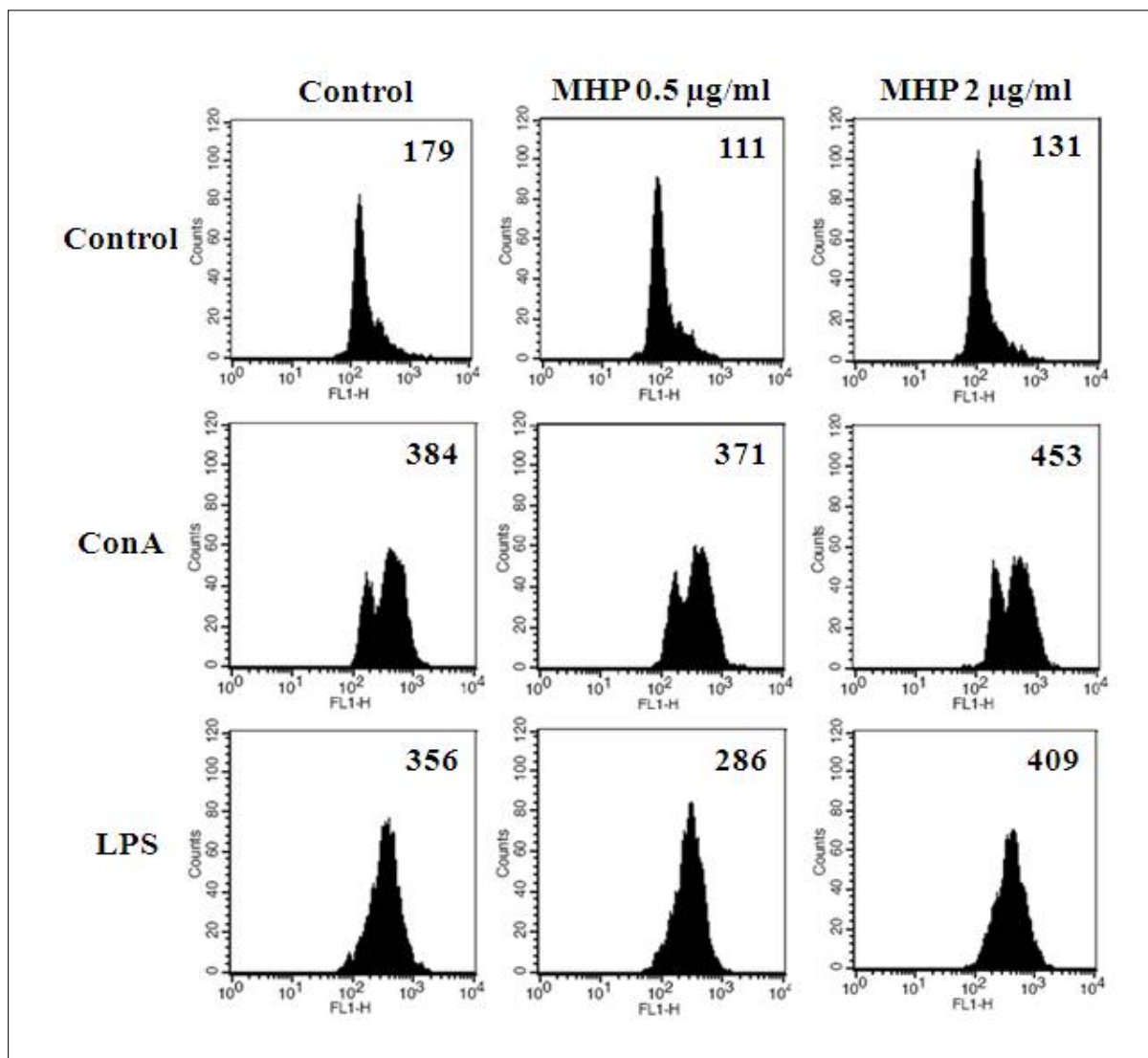


그림 4-44. MHP와 mitogen 자극에 의한 비장세포의 미토콘드리아 막전위 변화

Cell death에 대한 MHP의 효과를 알아보기 위해, 미토콘드리아 막전위를 측정할 수 있는 Rhodamine 123 염색을 실시하였다. 미토콘드리아의 막전위 저하는 세포가 죽어갈 때 일어나는 대표적인 현상으로 Rhodamin 123의 염색정도, 즉 유세포분석기에서 측정된 histogram의 mean fluorescence intensity(MFI)의 감소로 확인할 수 있다. 따라서 미토콘드리아의 막전위가 높다는 것은 세포가 그만큼 안정화 또는 활성화되었다는 것을 의미한다. FACSCalibur™ 을 이용하여 분석한 결과, ConA 또는 LPS를 처리하였을 때 MFI 수치가 높고 MHP 단독으로 처리 시 수치가 상대적으로 낮았다. 그러나 각 처리군에서 MHP의 농도 의존적인 변화는 관찰되지 않았다.

25. 돼지수지상세포를 이용한 *Mycoplasma hyopneumoniae*와 TLR효능자의 작용기전 연구 (협동1)

가. MHP항원과 TLR agonist 처리에 의한 돼지수지상세포 성장, 세포크기 변화

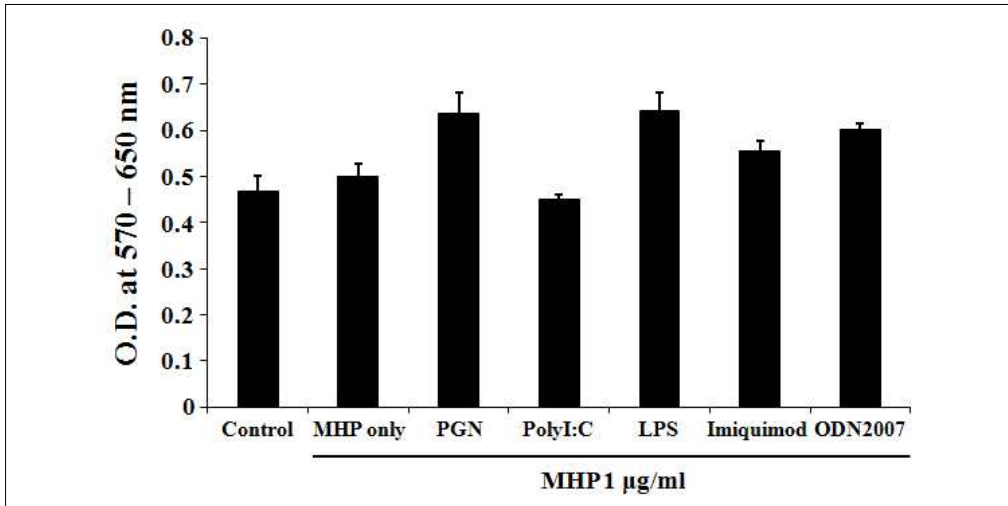


그림 4-45. *Mycoplasma hyopneumoniae* 와 TLR agonist에 의한 돼지 수지상세포의 성장 변화

돼지의 골수세포 유래 수지상세포를 배양한 후 *Mycoplasma hyopneumoniae* (MHP)와 Toll-like receptor (TLR) agonists를 처리하였다. 이들 간 배양하고 MTT assay를 실시한 결과, MHP만을 처리한 경우와 polyI:C를 함께 처리한 경우는 세포성장능이 대조군과 큰 차이를 보이지 않았으나 peptidoglycan (PGN)과 lipopolysaccharide (LPS), imiquimod, oligodeoxynucleotide(ODN)2007를 함께 처리한 군에서는 대조군에 비해 높은 세포성장(활성화)능을 나타냈다.

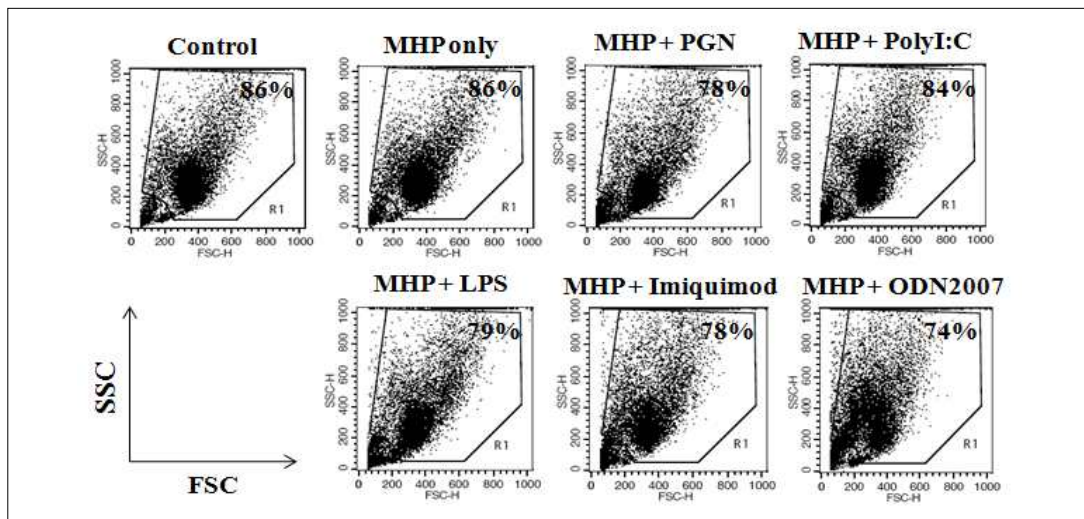


그림 4-46. *Mycoplasma hyopneumoniae* 와 TLR agonist에 의한 돼지 수지상세포의 세포크기 변화

유세포분석을 통해 MHP와 TLR agonists 처리에 의한 세포크기의 변화를 알아보았다. 대부분 처리군에서 정상세포(gated region)의 비율과 세포크기에서 변화가 크게 나타나지 않았으나, ODN2007 처리군에서는 세포의 과립정도가 약간 증가되었음을 알 수 있었다.

나. MHP항원과 TLR agonist처리에 의한 돼지수지상세포의 항원탐식능 변화

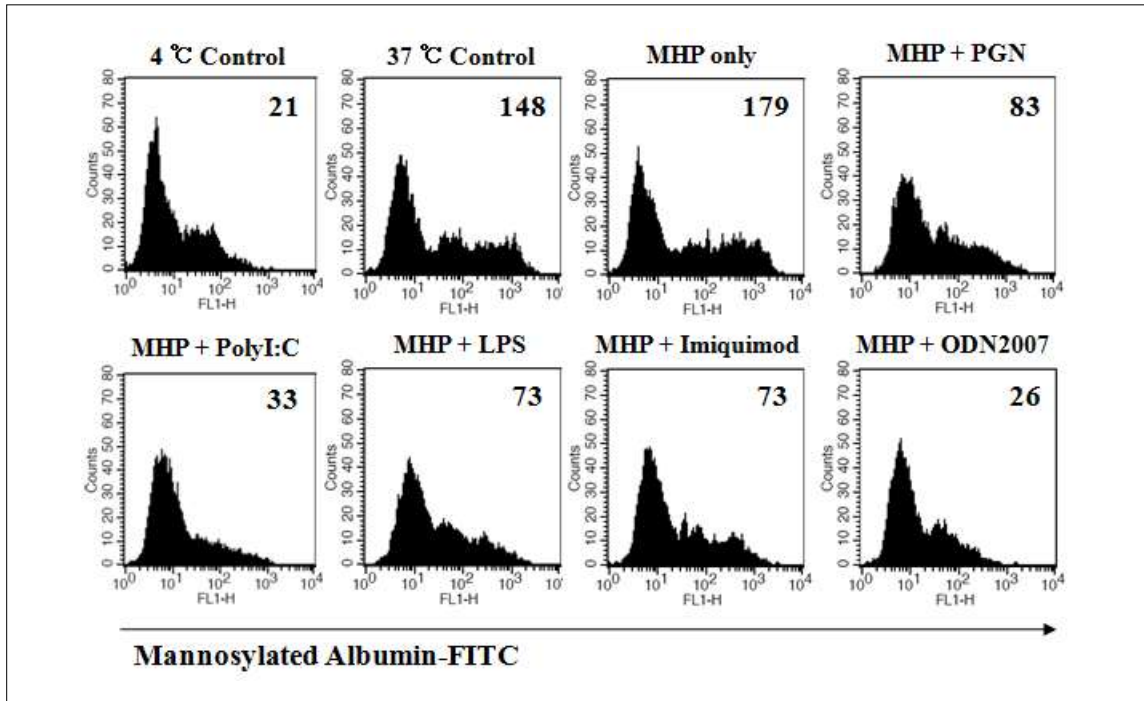


그림 4-47. *Mycoplasma hyopneumoniae* 와 TLR agonist에 의한 돼지 수지상세포의 항원탐식능 감소

수지상세포 표면의 mannose binding receptor에 의한 endocytosis를 측정하기 위해 mannosylated albumin-FITC를 이용하였다. 이는 수지상세포의 주요 항원탐식경로이다. 수지상세포는 대표적인 항원제시세포로서 미성숙 상태에서는 항원탐식능이 높게 나타나지만 성숙하게 되면 항원탐식능이 감소한다. 분석결과, MHP 단독처리 시에는 항원탐식능이 약간 증가하지만 TLR agonists를 함께 처리하였을 경우 항원탐식능이 크게 감소하였으며 특히 PolyI:C 또는 ODN2007 처리군에서의 항원탐식능이 현저히 감소하였다.

다. MHP항원과 TLR agonist 처리에 의한 돼지수지상세포 표면마커 발현 변화

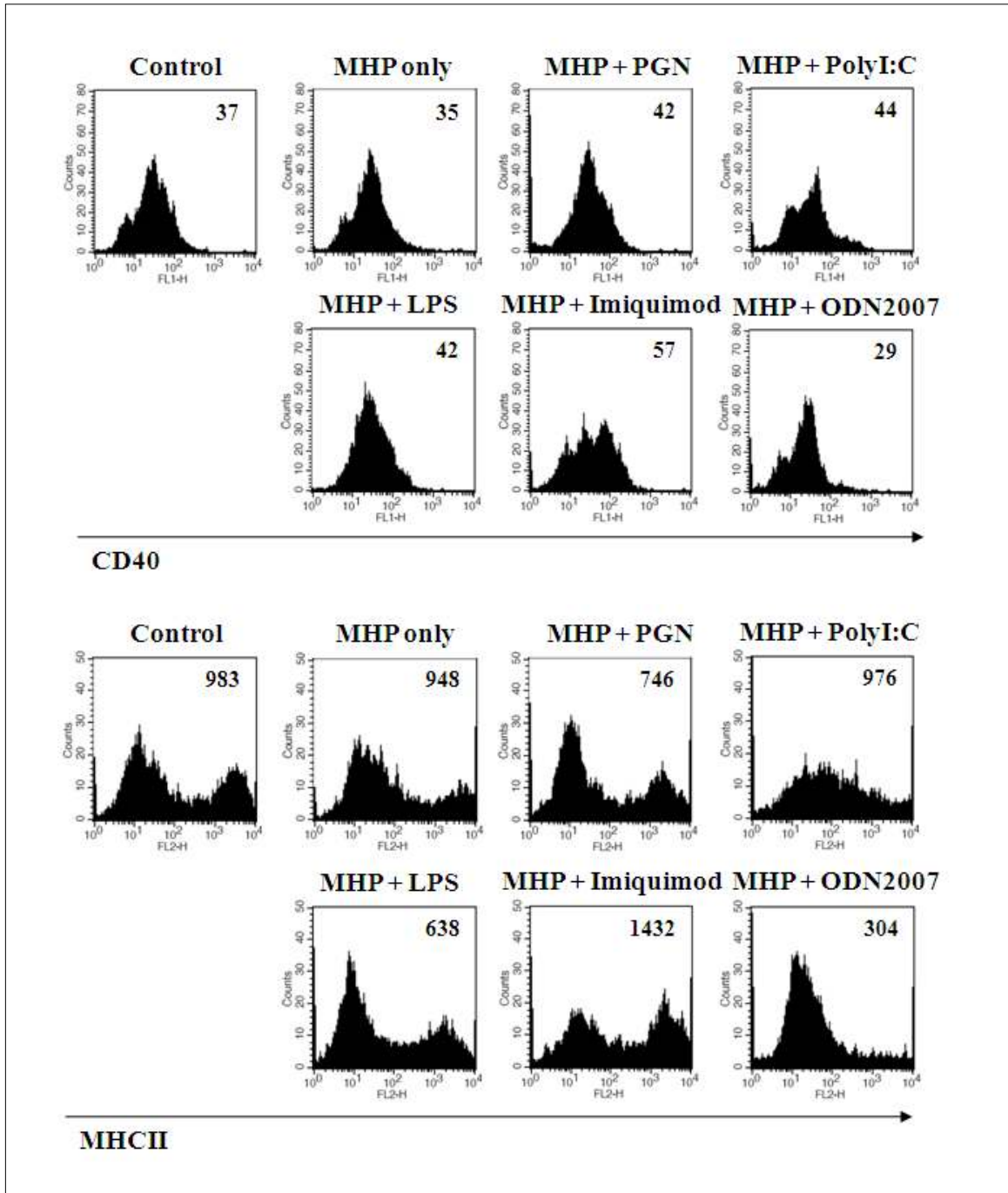


그림 4-48. MHP/TLR agonist에 의한 돼지 수지상세포의 표면마커 발현

성숙된 수지상세포의 표면마커인 MHC class II와 CD40의 발현 변화를 알아보았다. MHP와 TLR agonists에 의해 MHC class II와 CD40의 증가는 imiquimod 처리군에서만 나타났으며, ODN2007 처리군의 경우 두 가지 표면마커 모두 현저히 감소하는 사실을 확인하였다.

라. MHP항원과 TLR agonist 처리에 의한 돼지수지상세포 면역사이토카인 생산

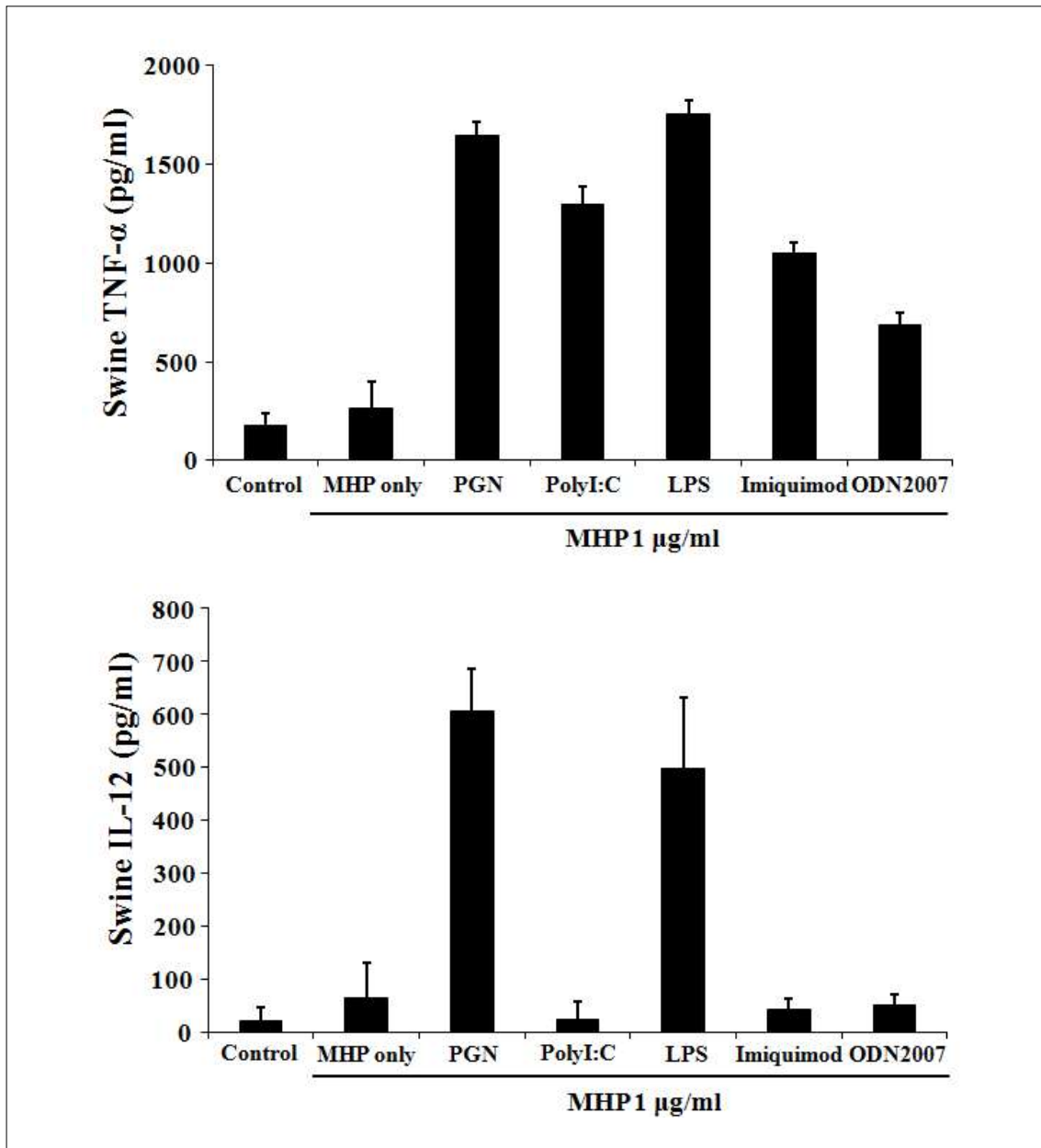


그림 4-49. MHP/TLR agonist에 의한 돼지 수지상세포의 면역사이토카인 생산

돼지 골수세포 유래의 수지상세포에 MHP단독 또는 TLR agonist 복합투여를 한 후 돼지 수지상세포에서 생산되는 주요 면역사이토카인의 생산정도를 알아보았다. Innate immunity의 주요 사이토카인 중 하나인 tumor necrosis factor(TNF)-alpha는 MHP 단독 처리 시에는 약간 증가하였지만 다른 TLR agonist의 처리 시에는 모두 증가하였다. 반면에 innate immunity와 adaptive immunity에서 모두 중요한 역할을 하는 주요 수지상세포 특이적 면역사이토카인인 interleukin(IL)-12의 경우 TLR 2 agonist인 PGN 또는 TLR 4 agonist인 LPS 처리군에서만 그 생산이 현저히 증가하였다.

마. MHP항원과 TLR agonist 처리에 의한 돼지수지상세포 미토콘드리아 막전위 변화

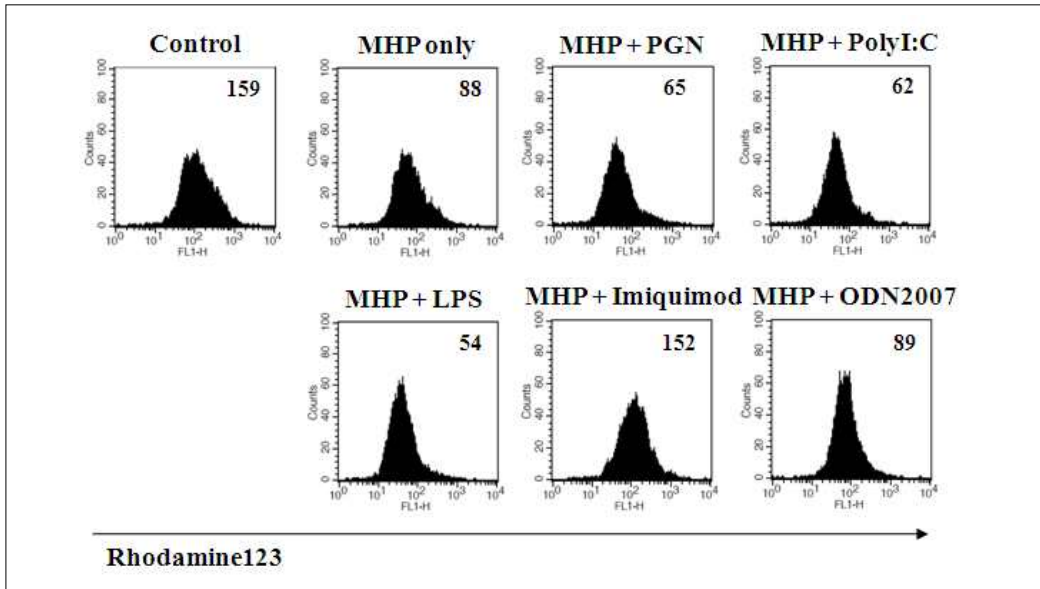


그림 4-50. MHP/TLR agonist에 의한 돼지 수지상세포의 미토콘드리아 막전위 변화

세포의 상태, 세포사와 관련이 깊은 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential)를 측정하기 위해 Rhodamine123으로 염색하였다. 유세포분석을 통해 MFI수치를 확인한 결과, MHP와 대부분의 TLR agonist를 처리하였을 때 감소한 반면 imiquimod 처리군에서는 감소하지 않았다.

26. 돼지수지상세포를 이용한 *Mycoplasma hyorhinitis*와 TLR효능자의 작용기전 연구 (협동 1)

가. MHR항원과 TLR agonist 처리에 의한 돼지수지상세포 성장, 세포크기 변화

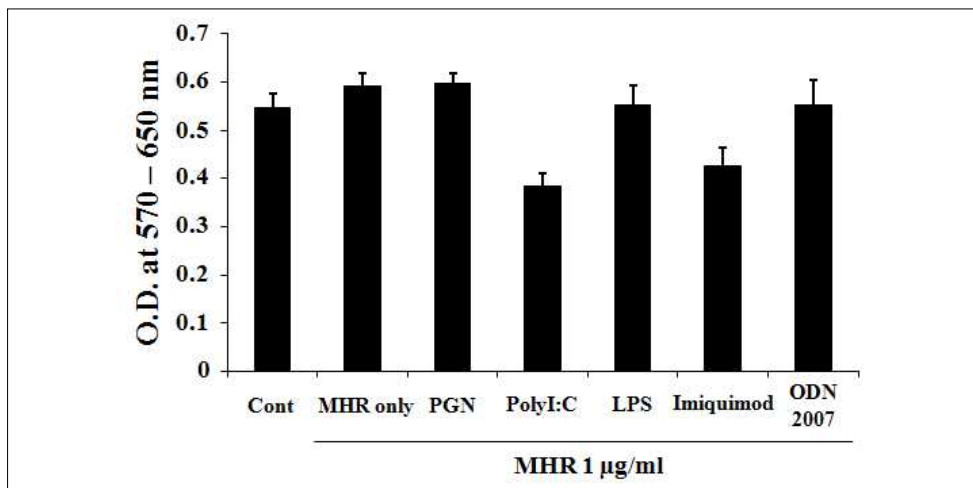


그림 4-51. MHR/TLR agonist에 의한 돼지 수지상세포의 성장률 변화

Mycoplasma hyorhinis (MHR)과 TLR agonists를 돼지 수지상세포에 처리한 결과 유의한 세포성장(활성)의 증가는 나타나지 않았으며, polyI:C 또는 imiquimod 처리군에서는 세포성장의 감소를 확인할 수 있었다. 이는 MHP의 결과와는 매우 다른 양상이다.

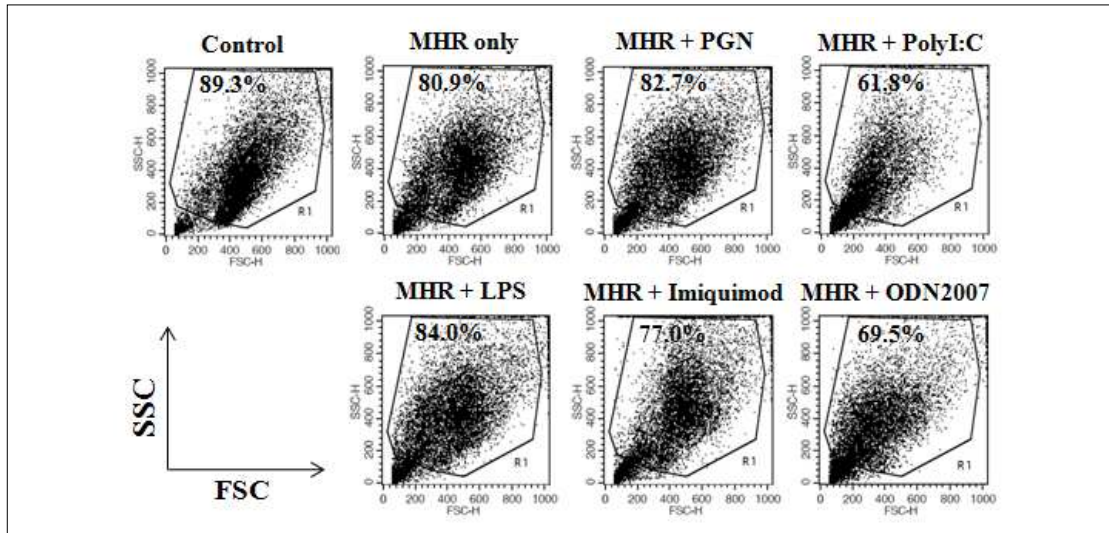


그림 4-52. MHR/TLR agonist에 의한 돼지 수지상세포의 세포크기 변화

또한 FACS 분석을 통해 MHR과 TLR agonists 처리에 의한 세포크기와 과립정도를 확인한 결과 polyI:C 또는 ODN2007에 의한 처리군의 경우 정상크기의 세포비율이 감소하였음을 확인하였다. 또한 imiquimod 처리군의 경우 세포의 과립정도가 증가함을 확인할 수 있었다.

나. MHR항원과 TLR agonist 처리에 의한 돼지수지상세포의 항원탐식능 변화

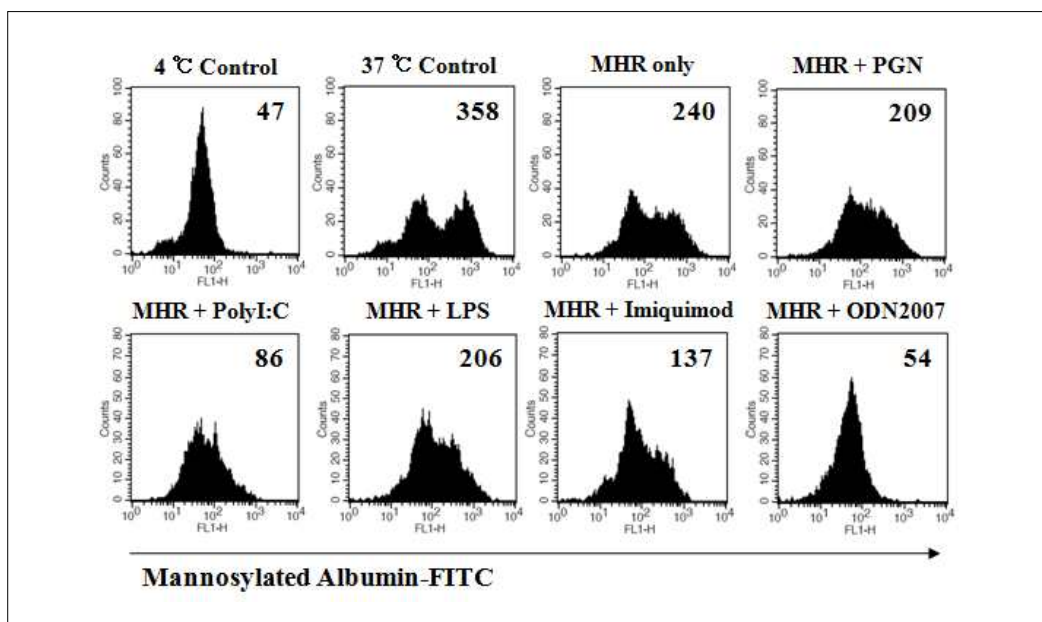


그림 4-53. MHR/TLR agonist에 의한 돼지 수지상세포의 탐식능 감소

돼지 수지상세포의 항원탐식능 (antigen uptake)은 PGN, LPS 처리군의 경우 MHR 단독처리군과 비슷하였으나, polyI:C, imiquimod, ODN2007 처리군의 경우 현저한 감소를 보였다.

다. MHR항원과 TLR agonist 처리에 의한 돼지수지상세포의 사이토카인 생산

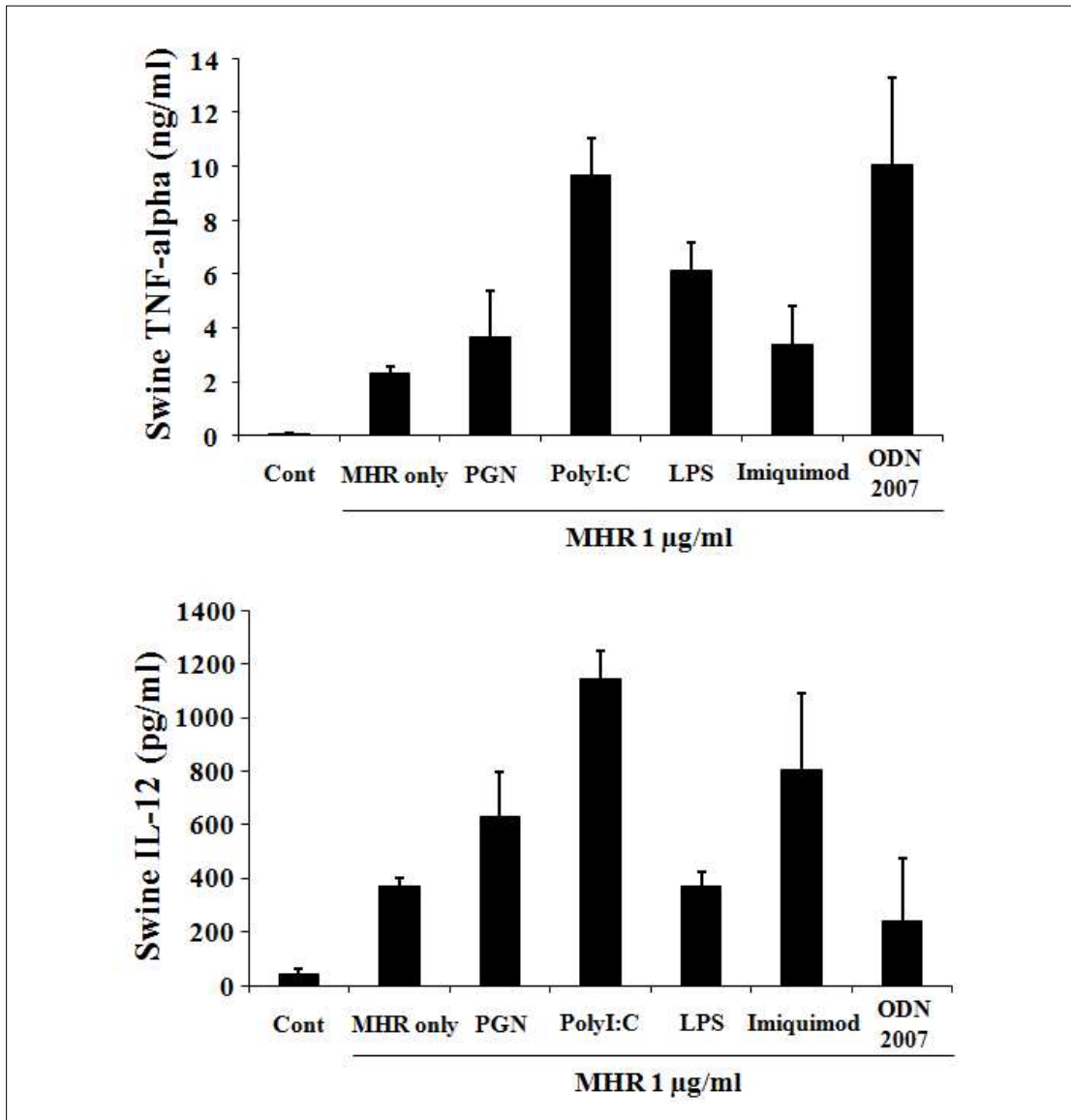


그림 4-54. MHR/TLR agonist에 의한 돼지 수지상세포의 면역사이토카인 생산

면역사이토카인의 분석결과, MHR 단독으로도 TNF-alpha와 IL-12 생산을 약간 증가시킬 수 있었다. 이는 MHR항원에 의한 면역자극이 가능함을 보여주는 것이다. 가장 특이한 점은 MHR항원과 함께 처리한 polyI:C 군의 경우 주요한 두 가지 사이토카인 모두에서 생산이 증가되었으며, ODN2007 처리군은 TNF-alpha의 생산을, imiquimod 처리군은 IL-12의 생산을 각각 현저히 증가시켰다.

27. 신규 adjuvant 발굴 (협동 1)

가. 골수세포에 대한 면역조절 후보물질, Ginsan의 효과

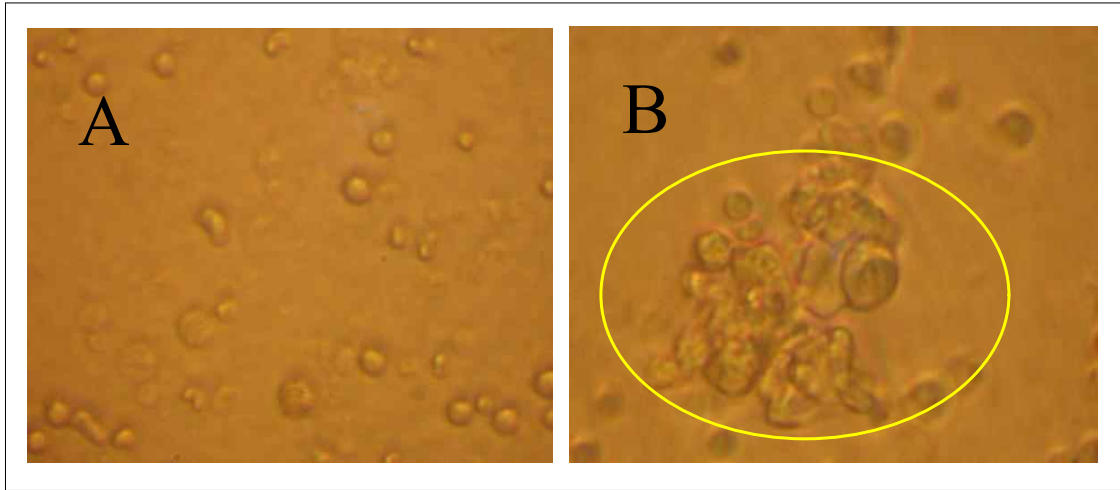


그림 4-55. 대조군(A)과 Ginsan처리군(B)의 골수세포 모양

신규 adjuvant 후보물질을 발굴하기 위해 원자력의학원으로부터 입수한 Ginsan을 골수세포에 실험하였다. 20 μ g/ml 농도의 Ginsan을 투여한 후, 24시간 동안 배양해 현미경으로 세포 모양을 관찰하였다. 대조군(A)에 비해 Ginsan을 처리하였을 때(B) 세포의 크기가 확연하게 증가하였으며 다수의 cluster가 관찰되어 활성화되는 것을 알 수 있었다.

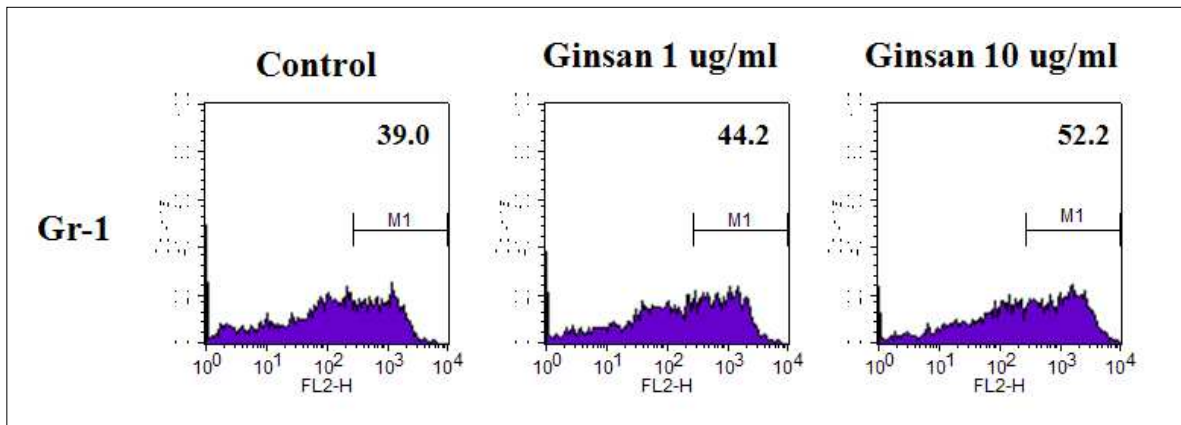


그림 4-56. 대조군과 Ginsan에 의한 granulocyte 표면 마커의 발현 변화.

대조군에 비해 Ginsan 투여 시, granulocyte의 표면 마커인 Gr-1의 비율이 증가하였음을 확인할 수 있었다. 또한 Ginsan 1 μ g/ml 투여군 보다 Ginsan 10 μ g/ml 투여군에서 Gr-1의 비율이 더 높아 농도의존적인 것을 알 수 있었다. Histogram의 숫자는 Gr-1+세포의 ratio를 나타낸다. 골수세포에서 granulocyte의 증가는 면역활성의 일부 parameter로 이용되므로 Ginsan이 면역증강물질로서 역할을 할 수 있으며 백신개발에 응용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

28 *M. hyopneumoniae*의 기존 상업백신에 대한 항체형성능 평가 (협동 2)

가. 기존 백신의 실험동물의 항체형성능 평가



그림 4-57. 시판되고 있는 백신의 마우스에서의 항체 형성능 평가.

- 기존 시판백신의 문제점을 파악하기 위해 마우스에서의 항체 형성능을 조사하였음. 마우스에 백신접종을 한 후 14일째 항체를 조사한 결과 음성대조군에 비해 유의성이 있는 항체가 생성된 것을 확인하였다. 그러나 역가는 백신에 따라 다소 차이가 있었다.

나. *M. hyopneumoniae*의 기존 상업백신에 대한 목적동물의 효능평가

- 목적동물에서의 *M. hyopneumoniae*의 백신접종 이후 항체역가의 변화는 아래 표와 같다.

(1) 모체이행 항체 음성돈군에서의 항체역가 변화

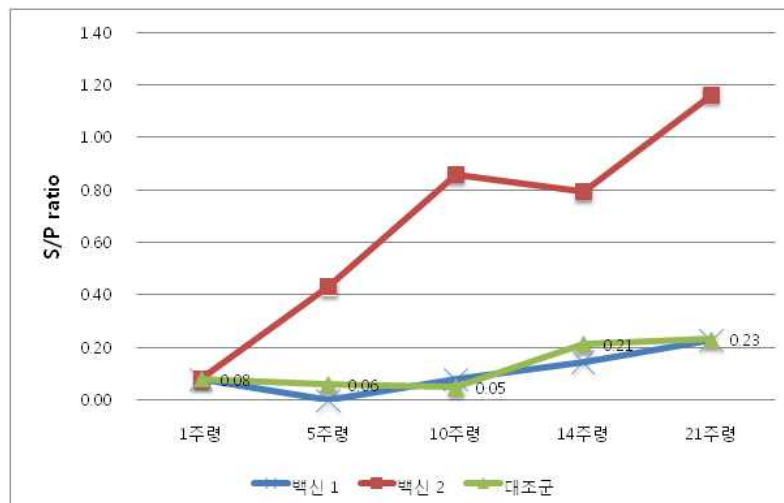


그림 4-58. 시판되고 있는 백신의 항체 음성 돼지에서의 항체 형성능 평가

- 모체 이행항체 음성 돈군에 백신을 접종한 후 항체를 해당 주령에 따라 조사한 결과 백신1의 경우 Mhp 특이적인 항체가 주령에 따라 지속적으로 상승하는 것으로 나타났다. 그러나 백신 2의 경우 대조군과 유사하게 항체가 나타나지 않는 것으로 나타났다.

(2) 모체이행 항체 양성돈군에서의 항체역가 변화



그림 4-59. 시판되고 있는 백신의 양성항체 돼지에서의 항체 형성능 평가

- 모체이행항체 양성돈군에 백신을 접종한 후 항체를 살펴본 결과 백신 1의 경우 5주령에는 항체가 검출되지 않다가 10주령부터는 항체가 검출되기 시작하여 상승하는 반면에 백신2의 경우는 21주령까지 백신접종에 의한 특이 항체가 검출되지 않았음. 따라서 마우스에서는 항체가 형성되지만 목적동물인 돼지에서는 항체가 검출되지 않기 때문에 이를 극복하는 백신의 조성이 필요함.

29 *M. hyopneumoniae* 백신후보균주의 효능 평가 (협동 2)

가. 1차 선발된 5개 균주의 배양역가 확인시험 (균역가와 정량적 real time PCR과의 비교)

- 세부과제에서 1차 선발된 5개의 *M. hyopneumoniae* 균주는 아래 표 1과 같다. 이 균주들의 정확한 항원역가를 확인하기 위해 세부과제의 Color change unit (CCU)의 결과와 기존에 발표되어 있는 *M. hyopneumoniae*의 real-time PCR 방법을 활용하여 항원역가를 비교해 보았다. 시험에 사용된 primers와 probe는 아래와 같다.

표 4-15. *M. hyopneumoniae* 정량적 분석을 위해 사용된 real time PCR의 primer

Primer/Probe	Sequence
Mhp183 F	5'-CCAGAACCAAATTCCTTCGCTG-3'
Mhp183 R	5'-ACTGGCTGAACTTCATCTGGGCTA-3'
Mhp183 P	5'-FAM-AGCAGATCTTAGTCAAAGTGCCCGTG-BHQ_1-3'

표 4-16. 1차 선발된 *M. hyopneumoniae* 백신 후보균주의 역가

No.	sample name	CCU 결과 (log10)	
		1차	2차
1	5-3	9.0	8.6
2	6-1	6.5	7.8
3	7-25	8.2	8.2
4	10-1	9.0	8.5
5	23-9	8.1	7.8

- Real-time PCR을 통해 확인된 *M. hyopneumoniae*의 항원역가는 그림 4-60 에서와 같이 CCU 결과와 비슷한 양상으로 나옴을 확인하였다. 앞으로 *M. hyopneumoniae*의 항원역가를 확인할 때, CCU와 함께 사용함으로써 항원역가 측정에 오류가 없도록 하였다.

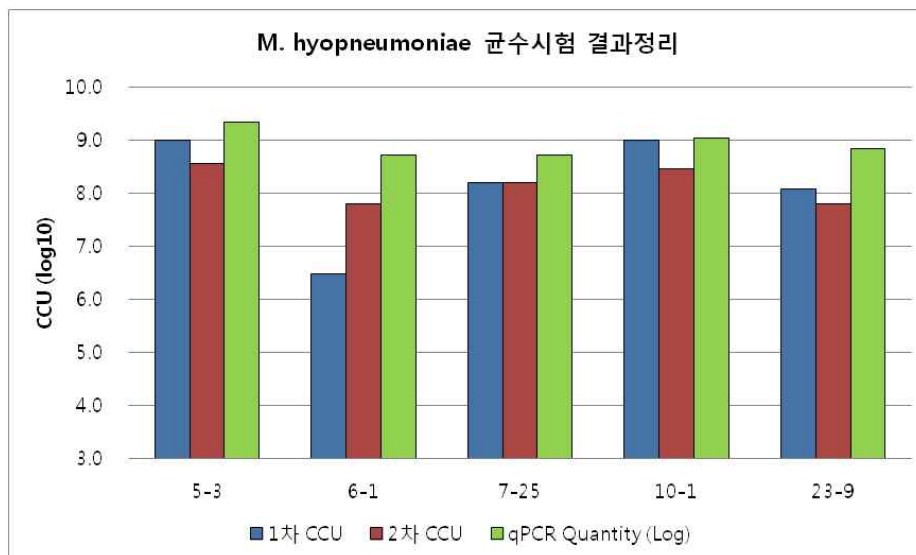


그림 4-60. *M. hyopneumoniae*의 CCU 와 real-time PCR 결과 확인

나. 1차 선발된 백신후보 균주의 돼지에서 면역원성 비교시험

(1) 시험돈의 *M. hyopneumoniae* 항체역가 음성 확인시험

- 먼저 엑스피바이오(경기도 안성)에서 구입한 자돈이 *M. hyopneumoniae*의 항체를 가지고 있는지 확인하기 위해 4주령 25두에서 채혈한 혈청을 상업용 항체진단키트 (IDEXX)를 이용하여 확인하였다(표2). S/P ratio가 0.4 이상인 항체 양성 돼지를 제외한 나머지 돼지를 이번 시험에 사용하였다.

표 4-17. 구입전 자돈의 항체역가 분포

No.	ELISA OD	S/P ratio	No.	ELISA OD	S/P ratio
1	0.221	0.44	14	0.209	0.40
2	0.219	0.43	15	0.251	0.53
3	0.122	0.12	16	0.116	0.10
4	0.102	0.05	17	0.213	0.41
5	0.080	-0.02	18	0.306	0.71
6	0.101	0.05	19	0.185	0.32
7	0.120	0.11	20	0.165	0.26
8	0.113	0.09	21	0.156	0.23
9	0.122	0.12	22	0.182	0.31
10	0.265	0.57	23	0.204	0.38
11	0.301	0.69	24	0.075	-0.03
12	0.272	0.60	25	0.098	0.04
13	0.240	0.49	-		

(2) 백신 후보주의 돼지 면역원성 확인시험

- 5개의 백신 후보주의 항원역가를 위의 결과를 토대로 10^8 CCU/ml로 조정한 뒤, 1차 선발된 후보 균주별로 4주령의 *M. hyopneumoniae* 항체 음성인 자돈 3두씩 무작위로 그룹을 나누어 3회 접종하여 가장 면역원성이 높은 균주를 선발하기로 하였다.

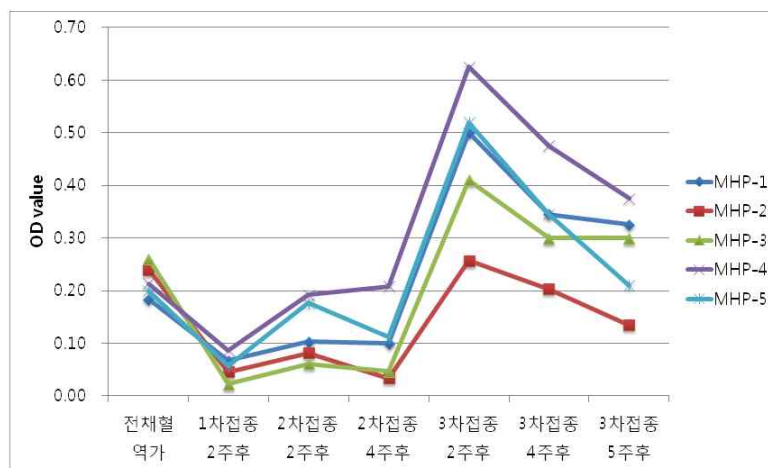


그림 4-61. *M. hyopneumoniae* 후보 균주를 돼지에 접종한 뒤 ELISA 항체가 변화

- 후보균주 접종 후 일정한 간격으로 채혈한 뒤, 항체역가 음성확인시험과 동일한 방법으로 돼지의 *M. hyopneumoniae* 항체역가를 확인하였다. 시험결과 1번, 3번 및 4번 균주가 상대적으로 높은 항체역가를 형성하는 것을 확인하였다. 그 중에서 4번 균주는 3마리의 개체편차가 크게 나타나서 제외시키고 1번(5-3번) 균주를 최종 백신의 후보균주로 선정하였다.

(3) 기존 시판백신과 불활화백신 후보균주와의 자돈에서의 비교시험

- SDS-PAGE에서 181 kDa의 밴드가 검출되어 고병원성 Mhp로 분류되고 높은 증식성을 보인 분리주를 사용하여 시험백신을 만들고 이를 자돈에 아래와 같이 접종한 후 일정기간마다 채혈을 한 후 항체가를 측정하였다. 이때 양성대조 백신균으로 현재 국내에서는 유일하게 항체양성이 나타나는 레스피슈어 Mhp백신을 접종한 후 비교하였다. 백신내 포함되는 adjuvant는 물론 다른 것이다. 레스피슈어를 접종한 자돈은 모두 2차 백신 접종 후 2주부터 항체 양성으로 나타났다(그림4-62). Mhp1, 3, 4와 5는 3차백신접종 후 2주부터 항체 양성으로 전환되기 시작했다.
- Mhp 1, 3, 4, 5는 Mhp2에 비해 다소 높은 항체가를 나타냈다. 항체전환속도와 역가는 대조백신인 레스피슈어에 비해 느리고 낮게 나타났다.

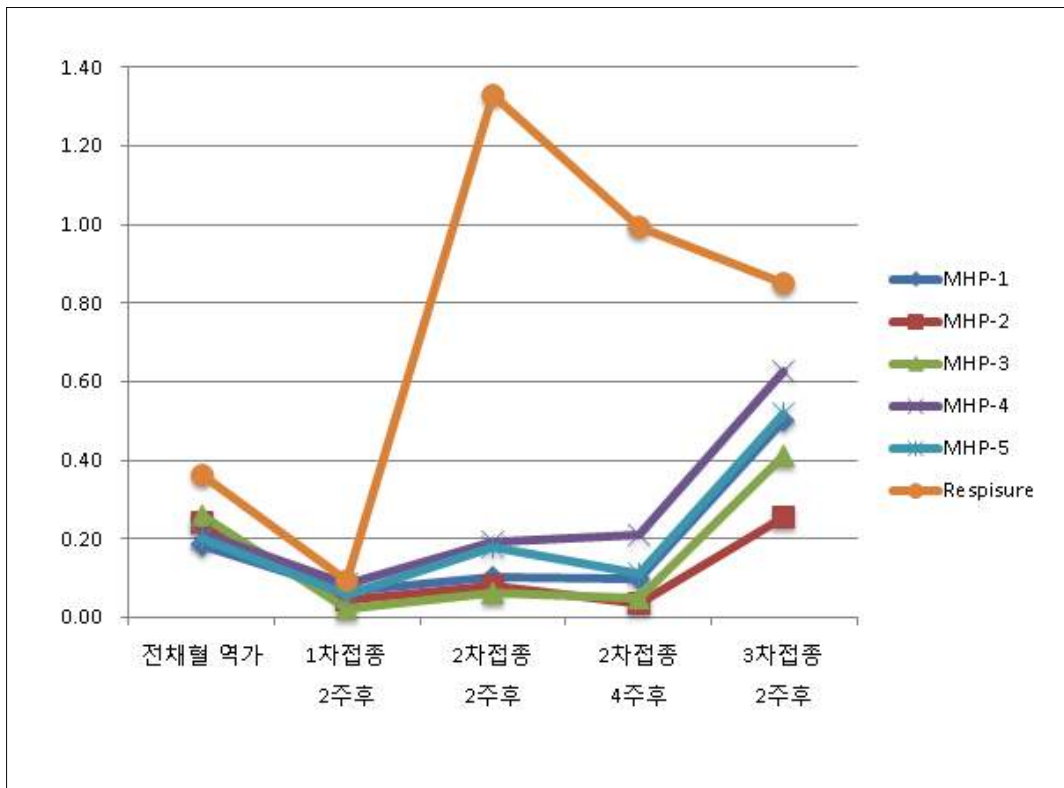


그림 4-62. Antibody titers against different Mhp test bacterins

30. *M. hyorhinis* 불활화백신후보균주 선발 (협동 2)

가. 1차 선발된 5개 균주의 배양역가 확인시험

- *M. hyopneumoniae*의 후보 균주 선발방법과 동일한 방법으로 수행되었다. 세부과제에서 1차 선발된 5개의 *M. hyorhinis* 균주는 아래 표 4-18과 같다.

표 4-18. 1차 선발된 *M. hyorhinis* 백신 후보균주

No.	sample name	CCU 결과 (log10)
1	6-3	1.59×10^{11}
2	7-3	8.42×10^7
3	10-10	1.89×10^{10}
4	11-2	5.82×10^6
5	11-6	6.22×10^2

나. 1차 선발된 균주의 돼지에서 면역원성 비교시험

(1) 시험돈의 *M. hyorhinis* 항체역가 음성 확인시험

- 엑스피바이오(경기도 안성)에서 구입한 자돈이 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 항체를 가지고 있는지 확인하기 위해 4주령 25두에서 채혈한 혈청을 사용하여 *M. hyopneumoniae*의 항체역가는 상업용 항체진단키트 (IDEXX)를, *M. hyorhinis*의 항체역가는 직접 ELISA를 setting하여 항체역가를 각각 확인하였다. 시험결과 항체 음성인 자돈만을 선별하여 시험에 사용하였다.

(2) *M. hyorhinis*의 ELISA의 확립: 협동의 경우 *M. hyorhinis* whole cell lysate를 가지고 ELISA를 확립하였다.

(가) ELISA 항원의 제조

- ① *M. hyorhinis* 배양액 1,000ml을 8,000rpm, 20분 동안 원심분리한다.
- ② Cell pellet을 10mM HEPES Buffer (pH7.4)에 용해하여 완전히 녹인 뒤, sonication을 한다.
- ③ 5,000rpm, 20분간 원심분리한 뒤, 상층액을 회수한다.
- ④ 이 상층액을 다시 43,000rpm, 1시간동안 초원심분리기를 이용하여 원심분리 한다.
- ⑤ 원심분리 후 상층액에 상층액 volume의 4배 volume 100% cold-ethanol 첨가 후 -20°C에서 overnight 시킨다.

- ⑥ 13,000rpm, 20분간 원심분리 후 pellet 회수하여 0.5% zwittergent 3-14 (50Mm Tris, pH8.0) with 10Mm EDTA + 0.02% NaN₃로 침전용해 후 37°C, 16시간동안 반응시킨다.
- ⑦ 다시 13,000rpm, 20분 동안 원심분리한 후 상층액 회수한다.
- ⑧ 이 상층액을 단백질 정량시험을 거쳐 ELISA coating antigen으로 사용한다.

(나) ELISA 시험방법

- ① 항원을 10,000배 희석하여, ELISA plate에 100 μ l씩 분주하여, 37°C에서 30분간 정치 후, 4°C에서 하룻밤동안 반응시켜 코팅한다.
- ② Plate를 실온에 30정도 둔 뒤, PBST(washing buffer) 3회 세척하고 각 well을 2% BSA in PBS 150 μ l로 채운 후, 37°C, 1시간 반응시켜 blocking한다.
- ③ PBST로 3회 세척 후, 혈청을 2진 희석하여 100 μ l씩 각 well에 넣고 37°C, 1시간 반응시킨다.
- ④ PBST 200 μ l로 3회 세척 후, Blocking buffer를 이용하여 Anti-pig IgG conjugate를 1:10,000 희석하여 각 well에 100 μ l씩 넣고 37°C, 1시간 반응시킨다.
- ⑤ PBST 200 μ l로 3회 세척 후 Substrate soln.을 각 well에 100 μ l씩 분주한다.
- ⑥ 실온에서 30분 반응시킨 다음, Stop soln.을 각 well에 50 μ l씩 넣어 반응을 정지시킨다.
- ⑦ 반응이 정지된 ELISA plate를 10분안에 492nm에서 흡광도를 측정한다.

(3) *M. hyorhinae*에 대한 ELISA kit의 개발 결과 (세부 1 & 협동 2)

- 세부연구팀의 경우 OMP를 가지고 ELISA 항원을 사용하였다. *M. hyorhinae* 2L배양한 후 OMP를 추출하여 ELISA항원으로 농도를 달리하여 코팅을 한 후 토끼에서 제조한 각 species에 대한 양성혈청을 이용하여 반응성을 관찰한 결과 *M. hyorhinae*는 Mhr의 양성혈청에도 높은 반응성을 보이나 Mhp양성혈청에도 높은 교차반응을 보여 ELISA항원으로는 부적합한 것으로 나타났다. 따라서 교차반응을 줄일 수 있는 *M. hyorhinae*특이적인 재조합 발현단백질을 항원으로 사용하던가 아니면 교차반응을 낮출 수 있는 방법을 강구하기 위한 연구를 수행중임.

표 4-19. *M. hyorhinis* OMP를 항원으로 한 ELISA에서 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis*의 양성혈청의 특이성 비교

혈청희석 배수	1 μ g/ml						0.5 μ g/ml					
	Mhr-1	Mhr-2	Mhr-3	Mhp-4	Mhp-5	Mhp-6	Mhr-1	Mhr-2	Mhr-3	Mhp-4	Mhp-5	Mhp-6
50	3.619	3.635	3.609	3.526	3.602	3.564	3.594	3.521	3.577	3.162	3.347	3.313
100	3.568	3.572	3.503	3.478	3.433	3.500	3.447	3.367	3.342	2.985	3.167	3.212
200	3.433	3.530	3.516	3.372	3.517	3.353	3.325	3.175	3.351	2.898	3.187	3.135
400	3.358	3.253	3.355	2.988	3.310	3.109	3.152	2.964	2.986	2.534	2.950	2.688
800	3.068	3.018	3.111	2.588	3.083	2.610	2.665	2.576	2.628	2.098	2.695	2.328
1600	2.561	2.528	2.639	2.102	2.705	2.191	2.081	2.053	1.854	1.562	2.170	1.858
3200	1.903	1.874	2.006	1.618	2.221	1.521	1.597	1.367	1.338	1.086	1.614	1.269
6400	1.295	1.395	1.399	1.152	1.607	1.026	0.993	1.037	1.055	0.853	1.250	0.971

혈청희석 배수	0.25 μ g/ml						0.125 μ g/ml					
	Mhr-1 -1	Mhr-2	Mhr-3	Mhp-4	Mhp-5	Mhp-6	Mhr-1	Mhr-2	Mhr-3	Mhp-4	Mhp-5	Mhp-6
50	2.770	2.682	3.042	2.231	2.686	2.588	2.447	2.267	2.560	1.670	2.173	1.884
100	2.670	2.605	2.680	2.066	2.394	2.381	2.053	1.853	2.020	1.391	1.706	1.584
200	2.353	2.473	2.421	1.830	2.173	1.981	1.703	1.485	1.678	1.282	1.459	1.295
400	1.906	1.918	2.017	1.467	1.979	1.617	1.310	1.154	1.318	0.926	1.236	1.009
800	1.460	1.510	1.549	1.066	1.553	1.271	0.900	0.857	0.969	0.694	0.970	0.717
1600	1.000	1.036	1.091	0.763	1.100	0.817	0.591	0.561	0.619	0.476	0.675	0.483
3200	0.638	0.626	0.667	0.504	0.825	0.553	0.356	0.368	0.368	0.288	0.459	0.294
6400	0.409	0.400	0.385	0.331	0.544	0.362	0.231	0.236	0.234	0.188	0.305	0.199

(4) 백신 후보주의 돼지 면역원성 확인시험

- 5개의 백신 후보주를 1차 선발된 후보 균주별로 4주령의 *M. hyopneumoniae*와 *M. hyorhinis* 항체 음성인 자돈 3두씩 무작위로 그룹을 나누어 3회 접종하여 가장 면역원성이 높은 균주를 선발하기로 하였다.

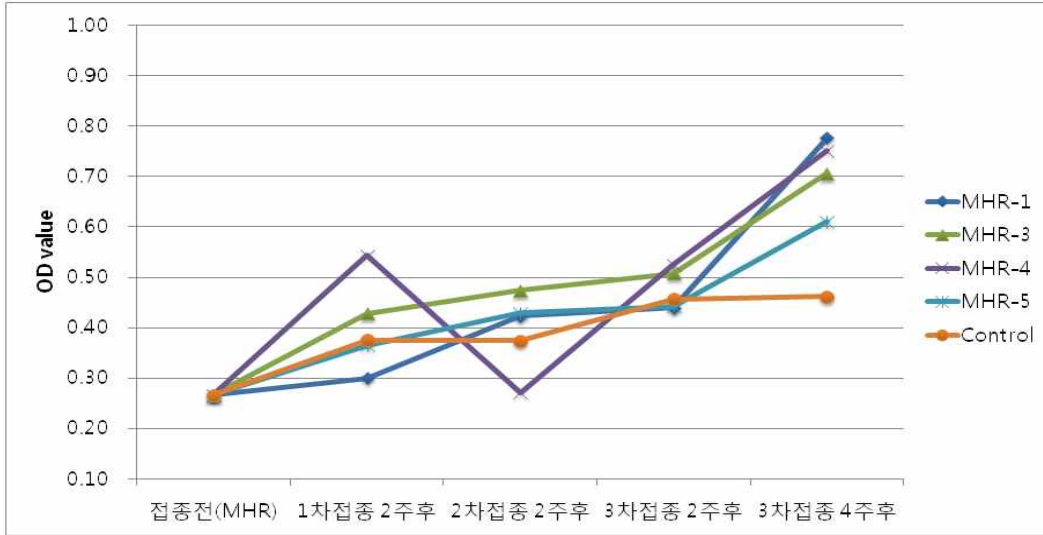


그림 4-63. *M. hyorhinis* 후보 균주를 돼지에 접종한 뒤 ELISA 항체가 변화

- 각 후보균주를 3회 접종한 뒤 일정한 간격으로 채혈하여 *M. hyopneumoniae* 및 *M. hyorhinis* 항체를 ELISA를 이용하여 측정된 결과, *M. hyopneumoniae*는 항체변화 없이 음성임을 확인하였으며, *M. hyorhinis* 항체의 경우 항체역가가 상승하는 것을 확인하였다. 이 후보 균주중에서 1번과 3번 균주가 면역원성이 좋았으며, 배양성을 고려하여 3번(10-10번) 균주를 최종 백신균주로 선발하였다.

31. 최종선발된 균주의 대량배양 (협동 2)

가. *M. hyopneumoniae* 최종선발 균주의 pilot scale 배양

- 최종 선발된 5-3번 균주의 pilot scale 배양을 위해 계대배양을 통해 최종균주의 volume을 키우는 공정을 진행하였으며, 매번 계대 배양이 될 때마다 sample을 채취하여 항원의 역가를 확인하기 위해 real-time PCR 시험을 진행하였다.

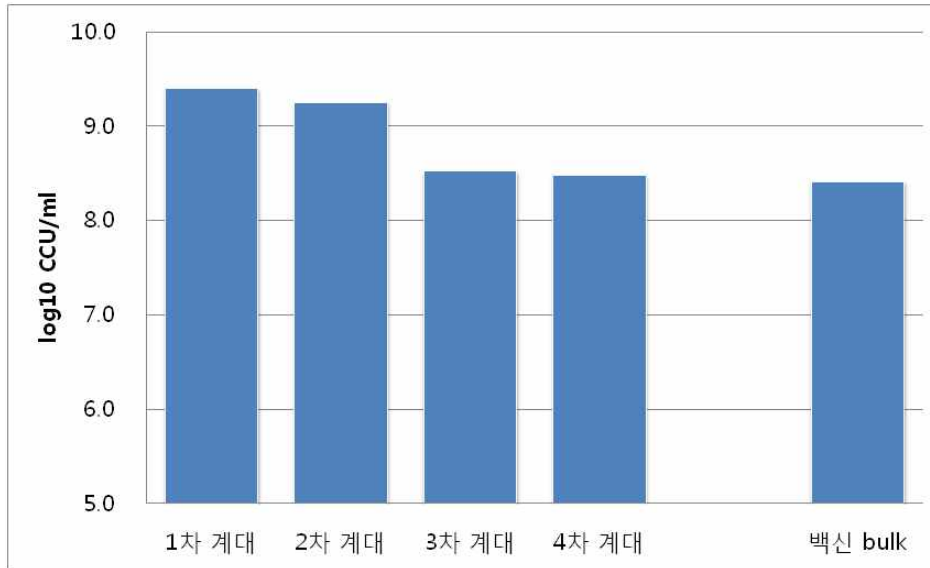


그림 4-64. *M. hyopneumoniae*의 pilot scale 배양에 따른 항원역가

- 그림 4-64와 같이 계대 배양 시험의 결과, 최종적으로 시험백신을 생산을 위한 pilot scale 배양액 *M. hyopneumoniae*의 항원역가는 2.5×10^8 CCU/ml로 확인되었다.

제 4 장

목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

년 도	연구목표	연구개발목표의 달성도	관련분야의 기술발전 기여도
1 차 년 도	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp) 불활화 백신 균주의 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 호흡기 증상을 나타내는 돼지의 폐에서 Mhp 분리주 확보 및 분리율 및 농장내 감염을 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지금까지 국내 돼지 마이코플라즈마 균을 확보하는 연구실은 거의 전무하기 때문에 본 연구에서 확보된 분리주는 향후 중요한 유전자원으로 활용가능함
	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>M. hyorhinis</i> (Mhr)의 분리 및 역학 (분리율) 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 호흡기 증상을 나타내는 돼지의 폐에서 Mhr 분리주 확보 및 감염돈군의 조사 및 분리율 조사 	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>M. hyopneumoniae</i>와 <i>M. hyorhinis</i>의 신속검출을 위한 진단기법의 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 배양액에서 두가지 균을 신속하기 진단하기 위한 기존의 방법보다 특이도와 민감도가 뛰어난 multiplex PCR의 기술의 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기존의 방법보다 특이도는 동일하나 민감도 측면에서 훨씬 개선된 multiplex PCR 개발하여 진단기여
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 수지상세포를 이용한 새로운 백신 adjuvant 개발 시험체계를 수립 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 배양된 수지상세포에 마이코플라즈마 백신 항원의 pulse 적정조건 수립 ○ T 림프구와 수지상세포의 혼합배양, 면역싸이토카인의 종류 및 생산 조건 연구 ○ 수지상세포의 마이코플라즈마 백신항원 탐식과 소화에 관한 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 백신항원을 처리하고 제시하는 수지상세포를 이용해 마이코플라즈마 항원의 면역반응 조건을 최초로 수립 (세계적으로 학계에 보고된 바 없음)
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mhp의 분리주의 병원성 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mhp 국내 분리주를 대상으로 시험관내 병원성 및 생화학적 특성 비교 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 상용화된 백신주(NSM)와 특성비교시험을 통해 새로운 백신후보균주의 확보

년도	연구목표	연구개발목표의 달성도	관련분야의 기술발전 기여도
1 차 년 도	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mhr의 국내분리주의 특성조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>M. hyorhinis</i>분리주의 생화학적 특성조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mhr 국내분리주의 특성을 처음으로 파악함
	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>M. hyopneumoniae</i>의 백신 adjuvant개발을 위한 돼지 임상연구 분리 및 역학 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1협동연구팀에서 실험결과 LPS가 수지상 세포 자극능이 가장 우수한 것으로 판정됨. 따라서 돼지를 이용한 innate immunity를 효과적으로 유도하는 한편 패혈증등의 부작용을 일으키지 않는 기초자료를 얻고자 수행. ○ LPS의 tolerable dose결정시험: 부작용의 유무 및 면역싸이토카인 분석 ○ <i>M. hyopneumoniae</i>와 LPS의 접종후 발적, 발열, 행동이상 및 면역싸이토카인 분석, 항원특이적 항체 분석 및 항체 isotype의 분석 	

년 도	연구목표	연구개발목표의 달성도	관련분야의 기술발전 기여도
2 차 년 도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 도축돈 폐병변에서의 Mhp 및 Mhr의 분리 및 두 병원체를 진단할 수 있는 multiplex PCR의 진단기법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 도축돈 폐에서 Mhp 및 Mhr의 분리 완료 및 개체 및 농장별 오염도 분석 ○ 두 병원체를 진단할 수 있는 multiplex PCR의 특이도, 민감도 조사 및 시제품 제작 완료 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 보다 정확하고 Mhp와 Mhr을 동시에 진단할 수 있는 키트의 최초 제작
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mhp의 분리주의 특성 연구 및 백신후보균주의 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 야외분리주의 filtration cloning을 통한 single clone의 확보 ○ 교차반응이 덜한 표준주에 대한 항혈청 제조 ○ 표준주와 분리주의 단백질 프로파일의 분석 및 병원성 단백질의 검출 ○ Mhp의 불활화 백신균주의 선정을 위한 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ○ homogeneous clone의 확보로 인해 항원성의 변화가 적은 국내 대표성이 있는 Mhp 백신 seed 균주의 확보
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mhr의 분리주의 특성 연구 및 백신후보균주의 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 야외분리주의 filtration cloning을 통한 single clone의 확보 ○ 교차반응이 덜한 표준주에 대한 항혈청 제조 ○ 표준주와 분리주의 단백질 프로파일의 분석 및 병원성 단백질의 검출 ○ Mhr의 불활화 백신균주의 스크리닝 	<ul style="list-style-type: none"> ○ homogeneous clone의 확보로 인해 항원성의 변화가 적은 국내 대표성이 있는 Mhr 백신 seed 균주의 확보

년 도	연구목표	연구개발목표의 달성도	관련분야의 기술발전 기여도
2 차 년 도	○ Mhp 백신의 면역기능향상에 적합한 기존의 TLR 효능자 연구	○ TLR4 효능자인 LPS를 이용한 마우스, 돼지 접종실험 (<i>in vivo</i>), 백신효과 검증 연구 (<i>in vitro</i>) ○ TLR3, TLR9 효능자인 polyI:C와 CpG ODN 1826의 수지상세포에 대한 면역기능 시험	○ 다양한 TLR 효능자를 분석하였고 LPS를 최종적으로 선별하였음 (새로운 백신 제조 가능성이 있음)
	○ Mhp백신에 적합한 신규TLR 효능자 후보물질 발굴 및 기전 연구	○ 신규 TLR 효능자 (JB115 beta-glucan, CWS)에 대한 면역증진 시험 및 기전 연구	○ 신규 면역증강을 위한 후보물질로서 기초적인 정보 제공
	○ Mhp유래 단백질의 면역증진 및 저하기능 연구	○ Mhp soluble 항원을 이용한 면역세포 (수지상세포와 비장세포) 영향 평가	○ 마이코플라즈마 항원 자체의 면역능에 대한 기초정보 제공
	○ Mhr 및 Mhp의 분리주의 특성연구를 위한 항혈청제조	○ 교차반응이 적은 Mhp와 Mhr의 항혈청 제조를 시도했으나 여전히 교차반응이 높음.	
	○ Mhp기존 시판된 백신의 항체 형성능 비교	○ 마우스를 대상으로 Mhp기존 시판 백신을 접종한 후 항체형성능을 비교할 때 검사한 백신이 모두 항체를 높게 형성함 ○ 상기의 백신을 목적동물인 돼지에 접종하였을 때 1품목의 백신만 유의성이 있는 항체형성이 관찰되었고 나머지 백신은 항체가 형성되지 않았음.	○ 숙주의 종에 따라 동일한 Mhp백신균주의 면역원성이 다른 것을 확인

년 도	연구목표	연구개발목표의 달성도	관련분야의 기술발전 기여도
2 차 년 도	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mhp백신의 면역기능향상에 적합한 기존의 TLR 효능자 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 협동2와 공동으로 TLR 4효능자 LPS와 CSW에 대한 돼지의 실험을 실시함 	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mhp 및 Mhr의 항체형성능 검사 및 병원성 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 세부팀에서 특성분석이 완료된 Mhp와 Mhr의 대표균주분리에 대한 돼지의 면역원성을 보는 시험을 실시하고자 했는데 구제역으로 발생으로 돼지의 수급에 차질이 되어 하지 못함 ○ 돼지에 대한 병원성 시험은 실험돼지를 구매 후 수행할 예정임 	

년 도	연구목표	연구개발목표의 달성도	관련분야의 기술발전 기여도
3 차 년 도	○ Mhp의 P97 adhesin 중 R1 repeat의 클로닝 및 발현 (당초계획수정)	○ Mhp의 major adhesin인 P97의 r1 유전자를 증폭하고 면역원성을 높이기 위해 <i>E. coli</i> 의 LT 유전자와 fusion시켜 클로닝함.	○ P97유전자 R1 repeat와 LTB유전자의 fusion의 클로닝은 국내에서 처음으로 성공한 예임.
	○ Mhp의 P97 adhesin R1 repeat의 발현 및 정제 (당초계획수정함)	○ P97 R1 repeat fusion 단백질이 대장균에서 발현되고 정제하였음. 정제수율이 9.8mg/ml여서 기존의 보고된 수율과 유사함	○ P97유전자 R1 repeat와 LTB유전자의 fusion의 발현과 정제는 국내에서 처음으로 성공한 예임.
	○ 발현된 P97R1-LTB의 마우스에서의 면역원성 시험 (전신성 및 국소성 면역시험)	○ 발현, 정제된 P97R1-LTB의 면역원성을 마우스에 측정함. 기존 시판되는 불활화 백신과 비교 시험 실시	○ 국내시판백신과 비교시험을 통해 본 연구과제에서 제조한 P97R1-LTB백신의 비교시험을 통한 면역원성 비교는 처음으로 시도되는 결과임.
	○ Mhp와 Mhr의 백신균주의 선정	○ Protein profile, RAPD, 증식성 시험을 통해 Mhp, Mhr의 국내분리주중 대표적인 백신균주를 각 5주씩 선발함.	○ filter cloning 백신균주의 선정으로 국내 백신업계에 균주의 이전으로 다양한 균주로 제조된 백신이 가능함.
	○ Mhp, Mhr 백신의 면역기능 향상에 적합한 기존의 TLR 효능자 연구	○ 돼지수지상세포를 이용한 주요 기능분석을 통해 각 항원에 적합한 TLR효능자 선별 및 작용기전 연구 (주요 차이점 확인)	○ Mhp, Mhr 항원에 가장 적합한 TLR agonist를 최초로 선별하였음
	○ Mhp, Mhr 백신에 적합한 천연물질 adjuvant 발굴 및 관련기전 연구	○ 베타-글루칸, BCG-CWS를 이용한 지속실험을 통해 신규 adjuvant로서 가능성 발견	○ 새로운 천연물질 유래의 백신 adjuvant 개발 가능성을 제공하였음

년 도	연구목표	연구개발목표의 달성도	관련분야의 기술발전 기여도
3 차 년 도	○ Mhp, Mhr 유래 단백질의 면역 증진 및 저해기능 연구	○ 주요 면역세포인 비장세포를 대상으로 다양한 면역능 시험 (<i>in vitro</i>)을 실시하고 작용기전을 연구	○ 마이코플라스마 항원자체가 면역자극 효과가 있다는 사실을 최초로 증명함
	○ Mhp의 백신후보균주의 항체 형성능 조사 및 방어능 조사	○ Mhp의 백신후보균주의 항체 형성능 조사를 통해 불활화 백신균주 1주를 최종 선발	
	○ Mhr의 백신후보균주의 항체 형성능 조사 및 방어능 조사	○ Mhr의 백신후보균주의 항체 형성능 조사를 통해 불활화 백신균주 1주를 최종 선발	
	○ 생균백신후보주로서의 가능성이 있는 온도변이주의 개발 (계획 신규추가)	○ 최종 Mhr 불활화백신균주를 사용하여 Mhr 온도감수성변이주를 제작함. (Mhp주는 여러 시도를 했으나 실패)	○ 최초로 Mhr 온도 감수성 변이주를 제작함.
	○ Mhp백신의 면역기능향상에 적합한 기존의 TLR 효능자 연구 (1협동기관과 공동연구)	○ Mhp 및 Mhr 불활화백신에 TLR효능자를 첨가하는 백신의 구성성분 (formulation)을 최종 결정함	○ TLR효능자를 첨가한 새로운 Mhp 및 Mhr 불활화 백신을 제시함.

제 5 장

연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화 산업화 계획

- *Mycoplasma hyopneumonia* (Mhp)와 *Mycoplasma hyorhinis* (Mhr)를 신속하고 동시에 진단될 수 있고 기존의 multiplex PCR보다 예민도가 뛰어난 개선된 multiplex PCR의 시제품 제작 효능을 통해 산업화 가능성이 있음.
- 기존의 상용화된 백신중 다국적 기업에서 판매하는 백신 1종류만을 제외하고는 항체형성이 전혀 일어나지 않고 국내 백신의 경우 효능에 대한 신뢰도가 떨어져 있음. 본 연구에서 최종 선발된 Mhp백신의 경우 증식성, 항원성 및 유전형까지도 국내분리주중에서 대표성이 있기 때문에 산업화 가능성이 높음. 아울러 항체형성능이 있기 때문에 기존의 불활화백신을 대체할 가능성이 높음.
- Mhr의 경우 상용화된 백신이 없으나 PRDC에 중요한 원인체로 작용할 가능성이 크다고 판단되며 따라서 본 연구에서 최종 선발된 Mhr후보균주는 항원성 및 유전형에 있어서 국내분리주중 대표성이 있고 증식성 및 항체형성능이 있기 때문에 새로운 백신시장을 창출할 수 있기에 산업화가 가능함
- 기존의 상용화된 백신주는 감염초기에 중요한 역할을 하는 P97에 대한 항원이 결여된 것으로 확인됨. 따라서 이 성분을 대표하는 P97의 major epitope인 R1이 함유된 rLTBR1재조합 단백질을 백신성분으로 첨가시 이로 인해 감염초기에 중요한 역할을 하는 P97에 대한 항체형성을 유도할 수 있기 때문에 보다 효과적인 백신으로서 산업화 가능성이 높음
- 본 연구를 통해 밝혀진 TLR효능자의 첨가는 기존의 불활화 백신이 제한적으로 유도되었던 전신성, 세포매개성 면역을 보다 극대화 시킬 수 있다고 전망함, 이를 위해서는 현재 밝혀진 효능자의 추출 및 정제가 경제성이 있는 방법으로 진행되어야 할 것으로 판단됨. 따라서 추후 효능자의 첨가수준과 adjuvant의 용량을 결정하여 TRL효능자를 첨가한 불활화 백신이 산업화 될 가능성은 매우 높음
- Mhp와 Mhr 항원에 특이적으로 적합한 toll-like receptor(TLR) agonist를 선별하였으므로, 이를 새로운 백신 개발에 응용하고자 함. 기존에 사용하던 백신 adjuvant를 대체하거나 효력을 증진시킬 수 있을 것으로 판단되며, 여러 가지 백신항원에 공통된 백신 adjuvant를 사용하는 대신에 각 항원에 가장 적합한 백신 adjuvant를 디자인해서 효율적인 백신을 제작할 수 있는 가능성이 있음
- 새로운 adjuvant 후보물질로서 beta-glucan, BCG-CWS, Ginsan의 면역세포 자극효과를 시험하였으며 유용한 결과를 얻었음. 실제 백신에 적용이 가능하도록 하기 위해

서 마우스와 돼지를 대상으로 한 *in vivo* 효능실험, 독성실험을 실시하여야 함. 또한 산업체에서 백신개발에 적용하기위해 원가계산, 순수물질을 분리하는 공정 개선 등이 필요할 것으로 판단됨

2. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

- 본 연구를 통해 습득한 마이코플라즈마의 분리 및 filter cloning기술은 여러가지 노하우가 있기 때문에 이를 필요로 하는 국내 연구진에게 교육 지도를 통해 전수할 예정.
- 본 연구를 통해 습득한 마이코플라즈마 백신항원에 특이적인 TLR agonist 선별기술은 면역세포에 물질을 처리해 기능분석을 하는 일반적인 실험과정과 여러 면에서 특화된 기술이 필요함. 따라서 특허출원과 논문발표가 끝나면 과제연구팀을 중심으로 기술의 홍보 및 확산이 필요함
- 실험실 내 교육을 통해 백신항원에 대한 adjuvant 개발기술을 습득한 전문인력을 양성하고, 필요할 경우 해당 기술을 참여기업과 함께 응용기술을 개발, 구현할 계획이다. 또한 국내외 백신학회를 포함한 면역관련학회에서 포스터 발표와 구두발표를 실시할 예정임

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

- Mhp와 Mhr의 국내분리주 중 서로 다른 항원성 및 유전형을 지닌 백신후보균주는 유전자원품종으로서 특허를 출원하고 추후 백신후보균주로서의 지식재산권을 확보할 계획임.
- TLR효능자를 첨가하는 최종 Mhp와 Mhr백신은 기존의 백신과는 다른 차원의 백신으로 인정되어 특허를 출원할 예정임.
- Mhp와 Mhr을 동시에 신속하게 진단할 수 있는 multiplex PCR은 특허를 출원하고 등록할 계획임.
- Mhp의 major adhesin인 P97의 epitope인 rLTBR1단백질은 효과분석후 특허를 출원할 계획임.
- *Mycoplasma hyopneumonia*와 *Mycoplasma hyorhinis* 항원에 특이적으로 적합한 toll-like receptor (TLR) agonist를 발견한 사실은 새로운 백신개발에 빠른 적용이 가능하므로 특허를 출원할 예정임
- 새로운 adjuvant 후보물질인 beta-glucan, BCG-CWS, Ginsan의 면역세포 자극효과, 마이코플라즈마 항원과 TLR agonist에 대한 연구결과는 현재 다수의 SCI급 논문과 국내전문저널에 발표되거나 제출된 상태임

4. 추가연구, 타연구에 활용 계획

- *Mycoplasma hyopneumonia*와 *Mycoplasma hyorhinis* 항원과 가장 적합한 TLR agonist를 혼합하여 만든 후보백신을 돼지에 접종하여 규모있는 임상실험을 실시해야 하고, 돼지의 면역세포를 추출하여 세포성면역 증강여부를 검증해야 한다. 현재 마우스와 사람을 대상으로 세포성면역의 측정은 비교적 용이하지만 돼지를 비롯한 가축에서는 매우 어려운 실정이다. 백신전문회사 또는 대규모 동물병원에서 이용이 가능한 세포성면역진단법이 개발될 필요가 있다.
- 최근까지 백신 adjuvant와 관련된 연구 경향을 보면 다국적회사에 의한 국내 백신 adjuvant 시장 주도, 기존에 사용되던 adjuvant의 작용기전 규명, 새로운 천연물질 adjuvant의 개발 등으로 요약할 수 있다. 본 연구팀은 후속연구로서 새로운 천연물질 adjuvant를 개발하고 그 세부 작용기전을 규명하고자 한다.

5. 활용방안

- 돼지 마이코플라즈마 백신은 현재 양돈농가에서 심각한 피해를 일으키고 있는 PMWS 및 PRRS의 예방에도 밀접한 관계가 있고 돼지 호흡기 질병 증후군 (PRDC) 예방에 크게 활용될 것으로 예상함
- 개발된 백신은 연구종료후 중앙백신에 기술 이전하여 산업화 시킬 예정임
- 백신 시판 허가를 위한 추가 연구가 필요할 것으로 예상됨
- 수지상 세포 활성화 기술은 다른 병원체를 이용한 백신기술에 접목시킬 예정임

6. 기대성과

가. 기술적 측면

- 현재 상용화되고 있는 돼지 마이코플라즈마 백신보다 수지상 세포를 활성화 시킴으로써 세포매개성 면역증진과 국소 면역을 증진시킨 백신이기에 우수한 방어효과를 보일 것으로 예상
- 국내에서는 발생이 보고되고 있는 *M. hyorhinis*의 피해상황을 정확히 분석하고 이에 대한 백신의 개발로 돼지의 호흡기 전염병 발생을 보다 억제시킬 수 있음.
- 수지상 세포 활성화 기술은 다른 종류의 백신에 접목시켜 기존 백신보다 우수한 방어효과를 나타내는 백신의 개발로 이어질 것으로 기대됨.
- 현재 양돈장에서 발생하는 *M. hyorhinis*의 발생현황, 병원성, 다른 호흡기 병원체와의 관련성 등의 역학적 조사는 새롭게 출현하는 신종 전염병에 대한 예방대책을 앞서 강구하는 계기가 됨.

- 마이코플라즈마 백신의 효율증대에 필요한 adjuvant 정보를 특허, 논문발표

나. 경제 산업적 측면

- 현재 시판중이 백신보다 방어효과가 뛰어난 신개념의 마이코플라즈마 백신은 양돈의 생산성 증가에 기여
- 100억의 마이코플라즈마 국내시장에 국내업체의 판매점유율이 확대되어 이로써 수입백신의 의존도가 감소되어 외화낭비를 개선할 것으로 기대됨.
- 감염을 방어할 수 있을 경우 항생제 투여 비용의 절감 및 안전한 먹거리 제공
- 다가백신(polyvalent vaccine)의 생산으로 생산단가 및 백신 시술비를 절감할 수 있으며 마이코플라즈마의 근절로 건강한 돈육을 공급하여 국민보건향상에 기여할 수 있음은 물론 생산성 제고로 양돈산업을 수출산업을 성장시킬 수 있음.
- 우수한 마이코플라즈마 백신의 개발 및 생산은 동남아 시장에 수출할 수 있으며 이에 대한 기술경쟁력의 우위를 점할 수 있으리라 기대됨.

제 6 장

연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- Mycoplasma의 백신개발에 관련된 국내연구진의 연구는 거의 없다시피했고 특히 국내 백신의 경우 과거에 분리된 분리주에 대한 특성 파악과 homogenous clone으로 제조하지 않았기 때문에 효능에 있어 다국적 백신보다 열세인 것으로 야외에서 인정받고 있었음. 본 연구를 진행하는 동안 학회참가와 발표 논문의 리뷰를 통해 이와 관련된 많은 해외과학기술정보를 습득하였음.
- 특히 Mhp백신의 경우 항체형성이 잘 안되고 P97이 결여되었기에 감염초기단계를 방어할 수 있는 항체 및 세포매개성 면역의 유도가 없기 때문에 이에 대한 대처 방안이 계획되었고 병원성과 관련된 많은 수의 해외정보를 습득하였음.
- 동물에 사용하는 백신 adjuvant는 그 허가기준이 비교적 까다롭지 않지만, 사람의 경우 오래 사용되었던 Alum 이외에 최근 MF59(Novartis 사), AS03, AS04(GSK 사), Liposome(Crucell 사) 등이 사용허가를 얻었다. 또한 임상시험 중에 있는 adjuvant로서 Montanide, PLG, QS21 등 수종이 있지만 TLR agonist를 이용하는 연구는 이제 시작 단계이다(Mbow ML et. al., 2010). 더구나 동물용 백신 adjuvant 등은 낮은 수준의 안전성 기준에 의해 주사부위에서 조직손상, 농(pus)의 형성 등의 심각한 부작용을 초래하는 경우가 많고 그 작용기전의 규명을 위한 연구는 거의 전무한 실정이다.
- 돼지에서 마이코플라즈마는 폐렴을 일으키는 주 원인균으로 돼지 산업에 지대한 영향을 미친다. 질병제어를 위해 all-in/all-out 생산체계, 군별 면역교란요소 배제, 타 호흡기질환 원인 병원체 예방 등이 있지만, 기본적으로 상업용 마이코플라즈마 백신에 의존하고 있다. 하지만 실제 임상에서 부분적인 보호와 원인체의 집락형성을 막지 못하는 등 백신의 주요 효과가 의문시되고 있는 실정이다. 따라서 aerosol 또는 식이로 공급하는 백신 등 신규 백신개발과 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다(Maes D et. al., 2008).

제 7 장

참 고 문 헌

제 7 장 참고문헌

- Ahn, J.Y., Choi, I.S., Shim, J.Y., Yun, E.K., Yun, Y.S., Jeong, G., Song, J.Y., 2006, The immunomodulator ginsan induces resistance to experimental sepsis by inhibiting Toll-like receptor-mediated inflammatory signals. *Eur J Immunol* 36, 37-45.
- Amati, L., Pepe, M., Passeri, M.E., Mastronardi, M.L., Jirillo, E., Covelli, V., 2006, Toll-like receptor signaling mechanism involved in dendritic cell activation: potential therapeutic control of T cell polarization. *Curr Pharm Des* 12, 4247-4254.
- Assuncao, P., De la Fe, C., Ramirez, A.S., Gonzalez Llamazares, O., Poveda, J.B., 2005, Protein and antigenic variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by SDS-PAGE and immunoblot. *Vet Res Commun* 29, 563-574.
- Baksh, S., Burakoff, S.J., 2000, The role of calcineurin in lymphocyte activation. *Semin Immunol* 12, 405-415.
- Brunelle, J.K., Letai, A., 2009, Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci* 122, 437-441.
- Calus, D., Baele, M., Meyns, T., de Kruif, A., Butaye, P., Decostere, A., Haesebrouck, F., Maes, D., 2007, Protein variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *Vet Microbiol* 120, 284-291.
- Chang, Z.Q., Lee, J.S., Gebru, E., Hong, J.H., Jung, H.K., Jo, W.S., Park, S.C., 2010, Mechanism of macrophage activation induced by β -glucan produced from *Paenibacillus polymyxa* JB115. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 1358-1362.
- Chen, J.W., Zhang, L., Song, J., Hwang, F., Dong, Q., Liu, J., Qian, Y., 1992, Comparative analysis of glycoprotein and glycolipid composition of virulent and avirulent strain membranes of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Current Microbiology* 24, 189-192.
- Conceicao, F.R., Moreira, A.N., Dellagostin, O.A., 2006, A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine* 24, 5734-5743.

Darveau, R.P., Hancock, R.E., 1983, Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *J Bacteriol* 155, 831-838.

De Haan, L., Verweij, W.R., Feil, I.K., Holtrop, M., Hol, W.G.J., Agsteribbe, E., Wilschut, J., 1998, Role of GM1 binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. *Immunology* 94, 424-430.

DeBey, M.C., Ross, R.F., 1994, Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect Immun* 62, 5312-5318.

Friis, N.F., 1975, Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med* 27, 337-339.

Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R., Decostere, A., 2004, Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet Microbiol* 100, 255-268.

Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R.M., Romani, N., Schuler, G., 1996, Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 26, 659-668.

Hong, Y., García, M., Levisohn, S., Savelkoul, P., Leiting, V., Lysnyansky, I., Ley, D.H., Kleven, S.H., 2005, Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using amplified fragment length polymorphism and other DNA-based typing methods. *Avian Diseases* 49, 43-49.

Kaisho, T., Akira, S., 2003, Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. *Curr Mol Med* 3, 373-385.

King, K.W., Faulds, D.H., Rosey, E.L., Yancey, R.J., Jr., 1997, Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. *Vaccine* 15, 25-35.

Klinkert, M.Q., Herrmann, R., Schaller, H., 1985, Surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* identified from an *Escherichia coli* expression plasmid library. *Infect Immun* 49, 329-335.

Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Larsen, C.P., Ritchie, S.C., Hendrix, R., Linsley, P.S., Hathcock, K.S., Hodes, R.J., Lowry, R.P., Pearson, T.C., 1994, Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J Immunol* 152, 5208-5219.

Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., 2008, Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary Microbiology* 126, 297-309.

Martin, M.U., Wesche, H., 2002, Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta* 1592, 265-280.

Mbow, M.L., Gregorio, E.D., Valiante, N.M., Rappuoli, R., 2010, New adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol* 22, 411-416.

McGhee, J.R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M.T., Eldridge, J.H., Hirasawa, M., Kiyono, H., 1992, The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 10, 75-88.

McGowin, C.L., Ma, L., Martin, D.H., Pyles, R.B., 2008, *Mycoplasma genitalium*-encoded MG309 activates NF-kappaB via Toll-like receptors 2 and 6 to elicit proinflammatory cytokine secretion from human genital epithelial cells. *Infect Immun* 77, 1175-1181.

Mellman, I., Steinman, R.M., 2006, Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255-258.

Minion, F.C., Adams, C., Hsu, T., 2000, R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect Immun* 68, 3056-3060.

Nathues, H., Beilage, E.G., Kreienbrock, L., Rosengarten, R., Spargser, J., 2011, RAPD and VNTR analyses demonstrate genotypic heterogeneity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs housed in a region with high pig density. *Vet Microbiol* 152, 338-345.

Paik, T.H., Lee, J.S., Kim, K.H., Yang, C.S., Jo, E.K., Song, C.H., 2010, Mycobacterial cell-wallskeleton as a universal vaccine vehicle for antigen conjugation. *Vaccine* 28, 7873-7880.

Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C.L., Gold, M.R., Ricciardi-Castagnoli, P., 1998, Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* 188, 2175-2180.

Scarman, A.L., Chin, J.C., Eamens, G.J., Delaney, S.F., Djordjevic, S.P., 1997, Identification of novel species-specific antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* by preparative SDS-PAGE ELISA profiling. *Microbiology* 143 (Pt 2), 663-673.

- Stakenborg, T., Vicca, J., Maes, D., Peeters, J., de Kruif, A., Haesebrouck, F., Butaye, P., 2006, Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *J Microbiol Methods* 66, 263-275.
- Thacker, E.L., 2006. Mycoplasmal disease. pp. 701-717. In: *Diseases of swine*, 9th Edition. Blackwell Pub. Professional, Iowa, (Straw, B. E., Zimmerman, J. J., D'Allaire, S., Taylor, D. J. eds.), xv, 1153 p. pp.
- Thacker, E.L., Thacker, B.J., Boettcher, T.B., Jayappa, H., 1998, Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and production induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *J Swine Health Prod* 6, 107-112.
- Vicca, J., Stakenborg, T., Maes, D., Butaye, P., Peeters, J., de Kruif, A., Haesebrouck, F., 2003, Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet Microbiol* 97, 177-190.
- Villarreal, I., Vranckx, K., Calus, D., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Maes, D., 2012, Effect of challenge of pigs previously immunised with inactivated vaccines containing homologous and heterologous *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *BMC Vet Res* 8, 2.
- Zhang, Q., Young, T.F., Ross, R.F., 1995, Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect Immun* 63, 1013-1019.
- Zielinski, G.C., Ross, R.F., 1990, Effect of growth in cell cultures and strain on virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* for swine. *Am J Vet Res* 51, 344-348.