

최 중
연구보고서

유산균 벡터를 이용한 돼지로타바이러스
감염증 및 돼지증식성회장염 예방 백신개발

Vaccine development for the prevention of
porcine rotavirus infection and porcine
proliferative ileitis using *Lactobacillus* or/and
Bifidobactor vector

연구기관

건국대학교 수의과 대학

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

이 보고서를 “유산균 벡터를 이용한 돼지로타바이러스 감염증 및 돼지증식성 회장염 예방 백신개발” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2004년 08월 30일

주관연구기관명: 건국대학교

총괄연구책임자: 이 중 복

세부연구책임자: 김 태 중

세부연구책임자: 박 승 용

연 구 원: 송 창 선

최 인 수

예 정 용

이 상 원

문 영 찬

남 윤 주

노 형 정

이 정 근

요 약 문

I. 제 목

유산균 벡터를 이용한 돼지로타바이러스 감염증 및 돼지증식성회장염 예방 백신개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내 양돈산업에 있어서 돼지설사병에 의한 눈에 보이지 않는 경제적 손실은 간과할 수 없는 실정이다. 돼지설사병은 여러 원인에 의해서 발병되고 있으며 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 그중 돼지 증식성 회장염과 돼지 로타바이러스 감염증은 둘 다 뚜렷한 증세 없이 만성적인 설사를 유발하여 많은 농장에 막대한 피해를 주고 있다. 또한 돼지 증식성 회장염의 경우 마땅한 백신이 개발되어 있지 않기 때문에 더욱 큰 문제라 할 수 있겠다.

돼지 증식성 회장염은 매우 중요한 질병으로 인식되어지고 있는데 주로 6주에서 8주령의 자돈에서 만성적인 설사를 유발하며 성장률과 사료효율의 저하를 가져온다. 또한 성돈에서는 갑작스런 설사와 급사를 일으키는 질병으로 질병의 특성상 설사 외의 임상증상이 뚜렷하지 않아 사육가들이 자신의 농장에 질병이 발생되고 있는지조차 파악하기 힘든 형편이다. 양돈 선진국인 미국의 통계에 의하면 돼지 증식성 회장염에 의한 경제적 손실은 연간 두당 22.19 달러로 조사된 바 있어 국내에서의 경제적 손실도 비슷할 것으로 추정된다. 또한 최근 본 연구실의 연구에 의하면 항생제의 치료 후에도 재발이 일어나는 것을 알 수 있었으며, 재발을 막을 정도의 항생제 치료는 비용이 너무 많이 소요되어 현실감이 없음을 알 수 있었다. 회장염의 원인체인 *Lawsonia intracellularis*는 세포내에 기생하는 세균이기 때문에 보통의 항생제에는 쉽게 치료되기 힘들며 지속적인 항생제 투여만이 회장염의 재발을 막는 유일한 방법이나 이는 항생제 잔류 문제가 심각하게 대두될 수 있다.

돼지로타바이러스 감염증은 1주에서 5주령 특히 이유자돈에서 설사가 생기

는 질병으로 국내 전 농가에 상재되어 있는 것으로 보고된 바 있으며 원인체인 로타바이러스가 외부의 환경에 저항력이 강하기 때문에 상재 농가에서는 매해마다 발생하고 있는 질병이다. 로타바이러스 단독 감염일 경우에는 설사의 증세를 보이다가 자연 치유되는 편이며 폐사율도 높지 않으나 국내에 문제가 되고 있는 돼지전염성위장염 이나 돼지유행성설사와 같은 다른 설사 유발 바이러스 또는 세균에 의한 혼합 감염시 높은 폐사율을 가져오게 된다. 국내에서는 돼지 로타바이러스 감염증에 의한 설사가 돼지 설사병 중 24%를 차지할 정도로 심각한 경제적 피해를 가져오고 있다.

지금까지의 백신의 경우 대부분이 주사제이어서 각 개체마다 접종을 해주어야 했으며 그에 따른 시간의 소비와 노동력의 손실이 많았고 백신 접종시 돼지 자체에도 많은 스트레스의 요인이 되었었다. 돼지에서 회장염을 일으키는 원인체인 *Lawsonia intracellularis*와 로타바이러스는 전신적으로 확산되는 것이 아니라 소화기계에만 국한되어 질병을 일으키기 때문에 소화기계의 점막으로 침투되는 원인체를 막을 수 있도록 백신도 점막면역을 증가시킬 수 있는 것으로 선택되어야 한다. 이러한 점막면역을 증가시킬 수 있는 백신 중에서 그 사용성이 편리하며 경제적인 것이 바로 구강으로 투여하는 구강백신이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구를 통해 돼지의 소화기계 질병 중 특히 설사를 유발하는 돼지 증식성 회장염과 돼지 로타바이러스에 대한 효과적인 구강백신을 만들고 이를 사용해 양돈 농가에서 설사로 인해 발생하는 경제적인 피해를 줄이는 데에 목표를 실현하기 위해서 다음과 같이 연구 범위를 설정하였다. 1) 돼지 증식성 회장염의 국내주 분리 및 동정 2) 회장염균과 로타바이러스의 방어항원 유전자를 발현할 유산균주의 살모넬라 감염에 대한 저항성 연구 3) 로타바이러스 VP8*을 발현하는 유산균 백터를 작제하고 이를 모델로한 회장염균의 방어항원 유전자 발현 가능성 및 백신 개발 연구

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 연구개발 결과

1. 돼지증식성회장염균의 분리 및 동정

돼지 증식성회장염은 우리나라를 비롯하여 전 세계적으로 양돈 산업에 큰 문제가 되고 있으며 수많은 양돈 농가가 돼지 증식성회장염으로 경제적인 피해를 강요받고 있지만, 그 원인체 분리 및 배양의 어려움으로 인하여 연구가 미진한 실정이다. 앞서 영국과 미국 등지에서 돼지 증식성회장염의 원인균으로 알려진 *Lawsonia intracellularis*를 순수 분리 배양하는 데 성공하여 연구가 활발히 진행 중에 있으며, 이에 아시아 및 국내 분리주 확보에 대한필요성이 대두되고 있기에, 국내 *L. intracellularis* 균주 분리 시도 및 분리주의 병원성 재현에 관한 연구를 수행하였다. 본 실험에서는 돼지 증식성출혈성장염에 자연 감염되어 폐사한 비육돈의 회장에서 추출한 돼지 증식성회장염균을 분리에 이용하였으며, 순수 배양에 시도된 회장염균은 McCoy 세포에서 5 계대를 넘어서면서 실험실 내에서 증식 배양이 가능하게 되었다. 유럽과 미국에서 발표된 두 가지 단클론 항체를 이용한 면역조직화학염색과 중합효소연쇄반응법을 적용한 유전자염기서열분석법에 의하여 분리주를 증명하였다. 이와 함께 돼지 증식성출혈성장염으로 폐사한 돼지의 장 유제물과 순수 배양된 분리주 (PHE/KK421)를 사용하여 4주령 돼지에 감염을 유도하였으며 3주간 병원성을 관찰하였다. 접종된 실험동물들은 현저한 설사를 동반한 임상증상과 증체율 저하를 보였으며, 접종 후 3주째에 실시한 부검에서는 두 가지 접종군 모두에서 전형적인 돼지 증식성회장염 소견인 회장 말단부 장상피조직의 충혈 및 과도하게 비후된 병변을 관찰할 수 있었고, 면역조직화학법에 의해 염색된 돼지 증식성회장염균 항원을 확인할 수 있었다. 또한 혈청학적인 검사를 실시한 결과 접종 후 2주를 전후하여 형성된 항체가 계속 증가하는 양상으로 관찰되었다. 그리고 돼지 증식성회장염균에 감수성이 높은 것으로 알려진 햄스터를 이용한 병원성 재현실험에서도 유사한 결과를 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통하여 아시아 및 국내에서의 *L. intracellularis* 최초 분리 시도가 성공적이었으며, 분리주(PHE/KK421)의 병원성이 돼지와 햄스터에서 분명하게 재현됨을 확인하였다.

2. 발현 벡터로 사용할 유산균에 대한 살모넬라 방어시험

유산균은 동물에서 장관계 병원체의 감염에 대한 방어효과를 가지는 것으로 알려져 있다. 이러한 방어효과는 면역증강이 관여하는 것으로 사료되나, 정확한 기전은 밝혀지지 않았다. 본 실험에서는 *Salmonella enteritidis*에 대한 유산균의 방어효과를 알아보기 위해서 실험동물로 사용한 마우스를 두 그룹으로 나누어 각각 10^9 c.f.u의 *Lactobacillus casei*와 *Bifidobacterium longum*을 8 일동안 경구 투여하였고 대조군은 skim milk만 급여하였다. 투여기간 종료 후 하루가 지나서, LD100의 1회 투여 용량으로 *S. enteritidis*를 경구 감염시킨 후 21일 동안 관찰하였다. 그 결과 대조군과 *L. casei*를 접종하였던 군의 생존율은 14%에 불과했던 반면, *B. longum*를 접종했던 군은 71%의 높은 생존율을 보였다. 그러므로 *B. longum*군이 *Salmonella* 감염에 대한 방어 작용이 있음을 확인하였다. 또한 *B. longum* 투여군에서 간과 비장으로의 *Salmonella* 균의 전이 역시 다른 실험군에 비해 어느 정도 감소하는 것으로 관찰되었다. Mitogen 자극에 의한 비장세포의 증식정도와 혈청 IgA의 농도는 각 군 간의 큰 차이를 보이지 않았으나 장관내의 분비형 IgA의 경우엔 *B. longum*를 접종했던 군에서 두 배 이상으로 증가한 것을 확인하였다. 따라서 *B. longum*이 나타내는 *Salmonella*에 대한 방어작용은 전신면역 증강의 영향보다는 국소 면역의 증강의 효과에 의한 것을 시사한다.

3. 유산균 벡터를 이용한 돼지 로타바이러스 VP8* 발현

로타바이러스는 새끼돼지에서 설사를 유발하는 중요한 원인들 중의 하나이며, 점막면역은 소장에서 로타바이러스의 감염을 방어하는 데 중요하다. 로타바이러스의 방어항원 중에는 VP4가 두 부분으로 잘려져서 VP5*와 VP8*이 생성되고 이중 VP8* 만으로도 로타바이러스 감염을 예방할 수 있다고 알려져 왔다. 예방하는 방법은 근육에 백신을 접종하여 전신면역을 예방하는 방법과 소화기 점막에 국소면역을 유도하는 방법이 있는데 전자는 전신성 질병을 예방하는데는 효과적이거나 호흡기나 소화기 계통의 국소성 전염병을 예방하는데는 장점이 없다. 따라서 로타바이러스를 예방하기 위한 하나의 방편으로 점막면역을 효과

적으로 유발하기 위해서는 VP8* 방어항원을 근육내로 백신접종하는 것 보다는 경구투여 하는 것이 낫다.

Lactobacillus 는 위와 장내 공생생물들의 산성 환경에 저항성이 있기 때문에 전달매개체로 사용될 수 있다. 돼지 로타바이러스 VP4의 Trypsin 절단 산물인 VP8* 항원을 이상적으로 전달하기 위해서는, VP8*을 코딩하는 VP4 유전자의 3분의 1을 증폭하고 shuttle vector (*Lactobacillus casei* 의 pAT:pgsA와 *Bifidobacteria longum*의 pBESAF2) 안에 넣어 크로닝했다. 두 가지 발현체 시스템에서 VP8* 의 발현을 확증하기 위해서 Bovine rotavirus 에 대한 항혈청을 사용하여 Western Blot을 실행한 결과, VP8* 항원 발현은 *Lactobacillus casei* 에서는 확인되었으나 *Bifidobacteria longum* 에서는 검출되지 않았다. 이 데이터는 유산균을 이용해서 rotavirus 감염증이나 돼지증식성회장염 같은 장내질환을 막는 전달체로서 사용될 수 있음을 시사한다.

나. 활용에 대한 건의

돼지증식성회장염균을 분리·동정한 후 돼지에서 병원성 재연 실험에 성공하였으며 감수성 세포에서 순화 계대 중이다. 또한 현재 인터페론감마 수용체가 제거된 마우스에 접종하여 병원성을 확인하고 in vitro가 아닌 생체 내에서 대량 배양하는 법을 정립하였다.

세균성 전염병을 예방하는 측면에서 돼지증식성회장염을 고찰해 볼 때 세균성 질병을 예방하는 데는 단일의 유전자를 발현해서 전염병을 예방하는 것은 분자생물학적 논리로 볼 때 방어가 충분하지 않을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구의 목적인 유산균 발현 벡터를 이용한 항원의 장내 전달에 의한 백신 개발 보다는 순화된 회장염균을 이용한 생균 백신 개발을 산업화 할 수 있도록 건의하는 바이다.

돼지의 로타바이러스 감염증을 예방하는 방법으로는 유산균에서 VP8*을 발현하도록 벡터를 제작하여 구강 접종을 통하여 장내에 전달하는 백신 접종은 가능할 것으로 사료된다.

Summary

Proliferative enteropathy (PE) is one of the most important enteric diseases, caused by *Lawsonia intracellularis* (*L. intracellularis*), all over the world including Korea. Significant economic losses were reported in the PE-suffered farms in Korea because of poor growth rates and high mortality. In spite of economic losses and concerns, little is known about the introduction mechanism of PE due to difficulty of isolation and cultivation of *L. intracellularis*. Successful isolation of *L. intracellularis* and experimental reproduction of PE were reported in Europe and the United States. However, there was no report of isolation of *L. intracellularis* in Korea. The objectives of this study were to isolate Korean strain of *L. intracellularis* and to reproduce the disease using a pure culture of *L. intracellularis* as well as intestinal mucosa homogenate obtained from a pig showing PE. In addition, several parameters were evaluated, such as clinical signs, growth performances, the severity of lesions and serology. For isolation *L. intracellularis*, McCoy cells were inoculated with the extract of intestine demonstrating proliferative hemorrhagic enteropathy (PHE). In vitro cultivation and maintenance of the bacteria were established at five passages. Identification of the isolate was accomplished by staining the infected cells with mouse monoclonal antibodies, IG4 and 2001MAb, as well as by sequencing PCR (polymerase chain reaction) product using primers specific for genomic DNA of *L. intracellularis*. Furthermore, 4-week-old pigs were challenged with intestinal mucosa homogenate and pure culture of *L. intracellularis*. All pigs, challenged with intestinal mucosa homogenate and the bacteria, developed clinical signs of PE,

such as a severe diarrhea. Necropsy was carried out on 3 weeks post infection and significant macroscopic lesions, such as the corrugated with hyperemic and thick folds, and microscopic lesions were observed in all the pigs challenged with intestinal homogenate and pure culture of bacteria. *L. intracellularis* antigen was also demonstrated in intestinal tissues of the infected pigs by immunoperoxidase staining. Serological responses developed in about 2 weeks post infection in all of the challenged pigs. When hamsters, known as highly susceptible animal to *L. intracellularis*, were challenged with same methods described above, the similar pathogenicity was observed in infected hamsters. In conclusion, this study demonstrates the successful isolation and in vitro maintenance of Korean isolate of *L. intracellularis* (PHE/KK421) for the first time in Korea: also proves that pure culture strain induced the PE in the infected commercial pigs and hamsters.

In order to develop probiotics with protective activity against diarrheal diseases as well as with expression of interest gene such as protective antigen gene of *Lawsonia intracellularis* and VP8 of rotavirus, two kinds of lactic acid bacteria (LAB), *Lactobacillus casei* E5 and *Bifidobacterium longum* BL730, were evaluated with a *Salmonella* infection model in mice. Each strain was administered orally to the mice for eight consecutive days, and one day after the last feeding, the mice were orally challenged with *Salmonella enteritidis* at a dose of LD100 and then observed for 21 days. While the survival rate of the control group and *L. casei* E5-treated group was 14%, 71% of the *B. longum* BL730-treated group survived, indicating that feeding BL730 has a protective effect against *Salmonella* infection. The possible immune mechanisms involved in this protective activity were investigated. The proliferative response of splenocytes with mitogens

and the production of inflammatory cytokines from macrophages did not increase, whereas the concentration of secretory IgA (sIgA) in intestinal contents of the mice fed with BL730 was 2.5 times higher than that of the control group, suggesting that local intestinal immunity plays an important roles in protecting against the Salmonella infection.

Rotaviruses are one of the most important causes of diarrhea in piglets. Mucosal immunity is important to protect rotavirus infection in small intestine. It has been known that one of protective antigens of rotavirus is VP8* of VP4 cleavage product. To effectively induce mucosal immunity, the VP8* antigen may be injected by oral administration rather than by intramuscular vaccination.

Since *Lactobacillus* is resistant to acid environment in stomach and commensals of the guts, it may be used as delivery vehicle. To ideally deliver VP8* antigen of trypsin cleavage product of porcine rotavirus VP4, one third of VP4 gene coding for VP8* antigen was amplified and cloned in shuttle vector pAT:pgsA of *Lactobacillus casei* and in pBESAF2 of *Bifidobacteria longum*. To confirm expression of recombinant VP8* in both expression system, Western blot was carried out using antisera against bovine rotavirus. Expression of VP8* antigen was detected in *Lactobacillus casei* but not in *Bifidobacteria longum*. These data indicate that *Lactobacillus* may be used as delivery system to protect enteric disease as well as rotavirus infection.

Contents

I. Introduction of project-----	1
II. General consideration of related technology -----	5
III. Results of the research	
A. Isolation and identification of <i>Lawsonia intracellularis</i>	
1. Introduction-----	6
2. Materials and methods	
2.1. Isolation and in vitro cultivation of <i>L. intracellularis</i>	
2.1.1. Source material-----	9
2.1.2. Cell culture-----	9
2.1.3. Infection of cell culture with intestine mucosal homogenate	
2.1.4. Blind passage of the infected cells-----	10
2.1.5. Monitoring of infection-----	11
2.1.6 Immunohistochemistry-----	12
2.2. Experimental induction of PE	
2.2.1. Animals-----	12
2.2.2. Preparation of <i>L. intracellularis</i> pure culture inoculum--	13
2.2.3. Preparation of intestinal mucosa homogenate inoculum--	13
2.2.4. Quantification of inoculum-----	14
2.2.5. Inoculation-----	14
2.2.6. Clinical observation-----	15
2.2.7. Fecal shedding tests(PCR)-----	15
2.2.8. Serology testing -----	15
2.2.9. Indirect fluorescent antibody tests(IFAT)-----	16
2.2.10. Necropsy and evaluation of macroscopic lesions-----	16
2.2.11. Histologic tests-----	16
3. Results	
3.1. In vitro cultivation and maintenance of <i>L. intracellularis</i>	

3.1.1. Source material used in isolation of <i>L. intracellularis</i>	17
3.1.2. Isolation of <i>L. intracellularis</i>	19
3.1.3. Cultivation and maintenance	19
3.1.4. Confirmation of the isolate	21
3.2. Experiment 1-Experiment reproduction of PE	
3.2.1. Clinical results	22
3.2.2. PCR and serum IgG titer	23
3.2.3. Macroscopic lesions	26
3.2.4. Immunohistochemistry staining	26
3.3. Experiment 2- Induction of PE in hamsters	28
3.4. Prevalence of PPE in Korea	30
4. Discussion	33
B. Comparison of protective potentials between <i>Bifidobacterium longum</i> <i>and Lactobacillus casei</i> against Salmonella Infection	
1. Introduction	35
2. Materials and methods	
2.1.1. Animals	37
2.1.2. Feeding procedure	37
2.1.3. Protective effect test against <i>Salmonella</i> infection in mice	37
2.1.4. Spleen cell proliferation assay	37
2.1.5. Macrophage activation assay	38
2.1.6. Determination of the level of sIgA from the intestinal contents	
2.1.7. Immunohistochemistry	38
2.1.8. Statistical analysis	39
3. Results	
3.1. Protective effect of <i>B. longum</i> against the Salmonella infection	
3.2. The effects of <i>B. longum</i> on the activation of splenic T and B	

lymphocytes-----	41
3.3. The effects of <i>B. longum</i> on the macrophage activities-----	42
3.4 The effects of <i>B. longum</i> for sIgA levels in intestine-----	44
4. Discussion-----	46

C. Expression of porcine rotavirus VP8* in *Lactobacillus casei* and
Bifidobacterium longum

1. Introduction-----	49
2. Materials and methods	
2.1. Bacterial strain and culture media-----	52
2.2. Plasmid and DNA manipulation-----	52
2.3. Construction of shuttle vector pNZ123:SPO/ <i>B</i> -galactosidase-----	53
2.4. Cloning of VP8* gene in <i>L.casei</i> and <i>B.longum</i> -----	53
2.5. Gel electrophoresis and Western blot analysis-----	54
3. Results	
3.1. Construction of shuttle vector pNZ123:SPO2/ <i>B</i> -galactosidase-----	56
3.2. Expression of <i>B</i> -galactosidase in <i>E.coli</i> -----	56
3.3. Construction of shuttle vector pBESAF2/VP8*-----	56
3.4. Expression of shuttle vector pBESAF2/VP8*-----	56
3.5. Construction of shuttle vector pAT:pgsA/VP8*-----	57
3.6. Expression of VP8* in <i>E.coli</i> and <i>Lactobacillus casei</i> -----	57
4. Discussion-----	63

목 차

제 1 장 연구 개발과제의 개요-----	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황-----	5
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과-----	6
제1절 돼지증식성회장염균의 분리 및 동정	
1. 서론-----	6
2. 재료 및 방법	
가. 돼지증식성회장염균의 분리 및 배양	
1) 분리재료-----	9
2) 조직배양-----	9
3) 장조직유체의 세포 감염-----	10
4) 감염 세포조직의 맹목적 계대배양-----	10
5) 감염 세포조직의 감염 여부 관찰-----	11
6) 면역조직화학염색-----	12
나. 돼지 증식성회장염의 재연성 실험	
1) 실험동물-----	12
2) 조직배양된 돼지증식성회장균의 준비-----	13
3) 장조직유체추출균의 준비-----	13
4) 접종량의 결정-----	14
5) 접종-----	14
6) 임상증상의 평가기준설정-----	15
7) 분변에서의 균체검사-----	15
8) 혈청학적 검사-----	15
9) 간접형광항체법-----	16
10) 부검-----	16
11) 조직학적 검사-----	16
3. 결과	

가. 국내에서 분리된 <i>Lawsonia</i> 균의 배양과 유지	
(1) 균 분리에 사용된 재료-----	17
(2) <i>Lawsonia</i> 균의 분리-----	19
(3) <i>Lawsonia</i> 균의 유지배양-----	19
(4) 분리균주의 동정-----	21
나. 실험적 증식성 회장염의 유도	
(1) 임상증상-----	22
(2) 분변내 <i>Lawsonia</i> 균 검출 및 혈중 항체가 검사-----	23
(3) 부검 소견-----	26
(4) 면역조직화학 염색 결과-----	26
다. 햄스터에서의 증식성 회장염 유도-----	28
라. 국내 돼지증식성회장염의 감염 분포상황-----	30
4. 고찰-----	33

제2절 유산균의 *Salmonella*균 감염 방어능 비교

1. 서론-----	35
2. 재료 및 방법	
가. 실험동물-----	37
나. 유산균 급여-----	37
다. 살모넬라 감염에 대한 유산균 급여 마우스의 방어효과-----	37
라. 비장세포 증식 시험-----	37
마. 탐식세포 활성화 시험-----	38
바. 장관내 분비형 IgA의 정량 분석-----	38
사. 면역화학적 검사-----	38
아. 통계학적 분석-----	39
3. 결과	
가. 비피도박터 유산균의 살모넬라균 감염에 대한 방어효과-----	40
나. 비피도박터 유산균의 비장 T와 B세포 활성화 효과-----	41

다. 비피도박터 유산균의 탐식세포 활성화 효과-----	42
라. 비피도박터 유산균의 장내 분비형 IgA 증강 효과-----	44
4. 고찰-----	46
제3절 유산균을 이용한 돼지로타바이러스 VP8 유전자 발현	
1. 서론-----	49
2. 재료 및 방법	
가. 세균의 종류 및 배양 배지-----	52
나. 플라스미드와 DNA 조작-----	52
다. 서플렉터 작제 pNZ123:SPO2/ <i>B</i> -galactosidase-----	53
라. <i>Lactobacillus</i> 와 <i>Bifidobacterium</i> 에서 발현할 서플렉터에 VP8*의 크로닝-----	53
마. 전기영동 과 Western blot-----	54
3. 결과	
가. Shuttle vector pNZ123:SPO2:beta-galactosidase 의 제작--	56
나. XL1-Blue 에서의 beta-galactosidase 의 발현-----	56
다. Shuttle vector pBESAF2/VP8* 의 제작-----	56
라. <i>E. coli</i> 와 <i>Bifidobacteria</i> 에서 VP8* 의 발현-----	56
마. Shuttle vector pAT:pgsA/VP8*의 제작-----	57
바. <i>E. coli</i> 와 <i>Lactobacillus casei</i> 에서 VP8*의 발현-----	57
4. 고찰-----	63
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	65
제 5 장 연구개발결과의 활용계획-----	66
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	68
제 7 장 참고문헌-----	69

제 1 장 연구개발과제의 개요

국내 양돈산업에 있어서 돼지설사병에 의한 눈에 보이지 않는 경제적 손실은 간과할 수 없는 실정이다. 돼지설사병은 여러 원인체에 의해서 발병되고 있으며 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 그중 돼지 증식성 회장염과 돼지 로타바이러스 감염증은 둘 다 뚜렷한 증세없이 만성적인 설사를 유발하여 많은 농장에 막대한 피해를 주고 있다. 또한 돼지 증식성 회장염의 경우 마땅한 백신이 개발되어 있지 않기 때문에 더욱 큰 문제라 할 수 있겠다.

돼지 증식성 회장염은 매우 중요한 질병으로 인식되어지고 있는데 주로 6주에서 8주령의 자돈에서 만성적인 설사를 유발하며 성장율과 사료효율의 저하를 가져온다. 또한 성돈에서는 갑작스런 설사와 급사를 일으키는 질병으로 질병의 특성상 설사 외의 임상증상이 뚜렷하지 않아 사육가들이 자신의 농장에 질병이 발생되고 있는지조차 파악하기 힘든 형편이다. 양돈 선진국인 미국의 통계에 의하면 돼지 증식성 회장염에 의한 경제적 손실은 연간 두당 22.19 달러로 조사된 바 있으나 아직 국내에서는 체계적인 경제적 손실을 파악하지 못하고 있으며 최근 건국대학교 수의전염병학연구실에서 면역형광항체법을 이용해 회장염을 진단한 결과, 국내에 만연되고 있는 질병이라는 것만이 밝혀져 있을 뿐이다. 세계적으로 아직까지 예방약이 개발되지 못하고 있는 실정이어서 국내의 양돈 산업도 질병이 발생된 후 항생제로 치료하는 정도의 수준에 머무르고 있다. 최근 본 연구실의 연구에 의하면 항생제의 치료 후에도 재발이 일어나는 것을 알 수 있었으며, 재발을 막을 정도의 항생제 치료는 비용이 너무 많이 소요되어 현실감이 없음을 알 수 있었다. 회장염의 원인체인 *Lawsonia intracellularis*는 세포내에 기생하는 세균이기 때문에 보통의 항생제에는 쉽게 치료되기 힘들며 지속적인 항생제 투여만이 회장염의 재발을 막는 유일한 방법이나 이는 항생제 잔류 문제가 심각하게 대두될 수 있다.

돼지 로타바이러스 감염증은 1주에서 5주령 특히 이유자돈에서 설사가 생기는 질병으로 국내 전 농가에 상재되어 있는 것으로 보고된 바 있으며 원인체인 로타바이러스가 외부의 환경에 저항력이 강하기 때문에 상재 농가에서는 매해 마다 발생하고 있는 질병이다. 로타바이러스 단독 감염일 경우에는 설사의 증세

를 보이다가 자연 치유되는 편이며 폐사율도 높지 않으나 국내에 문제가 되고 있는 돼지전염성위장염 이나 돼지유행성설사와 같은 다른 설사 유발 바이러스 또는 세균에 의한 혼합 감염시 높은 폐사율을 가져오게 된다. 국내에서는 돼지 로타바이러스 감염증에 의한 설사가 돼지 설사병 중 24%를 차지할 정도로 심한 경제적 피해를 가져오고 있다.

지금까지의 백신의 경우 대부분이 주사제이어서 각 개체마다 접종을 해주어야 했으며 그에 따른 시간의 소비와 노동력의 손실이 많았고 백신 접종시 돼지 자체에도 많은 스트레스의 요인이 되었었다. 돼지에서 회장염을 일으키는 원인체인 *Lawsonia intracellularis*와 로타바이러스는 전신적으로 확산되는 것이 아니라 소화기계로 국한되어 질병을 일으키기 때문에 소화기계의 점막으로 침투되는 원인체를 막을 수 있도록 백신도 점막면역을 증가시킬 수 있는 것으로 선택되어야 한다. 이러한 점막면역을 증가시킬 수 있는 백신 중에서 그 사용성이 편리하며 경제적인 것이 바로 구강으로 투여하는 구강백신이다. 구강백신은 장관으로 항원을 옮겨주는 벡터가 필요한데, 이 운반체로 유산균을 사용할 수 있다. 유산균은 음식물의 보존이나 다른 음식물의 창출에 사용되어 왔으며 매우 안전한 세균으로 인식되고 있다. 또한 장내 세균총 중 일부분을 차지하여 *Salmonella* 감염증과 같은 다른 세균에 의한 소화기 감염을 막아주기도 한다. 이에 돼지 증식성 회장염과 돼지 로타바이러스 감염증의 병원체를 분리하고, 그들의 방어항원 유전자를 조작하여 다시 조합한 후 유산균에 넣어줌으로써 유산균으로부터 각 질병에 대한 항체를 생산할 수 있는 방어항원이 생성되도록 하여 이것을 구강백신으로 사용할 수 있도록 하는 것이 이 실험의 목적이다.

1. 연구개발의 필요성

1) 기술적인 측면

국내에서 돼지 증식성 회장염에 대한 중요성을 인지하기 시작한 시점은 최근에 들어서였다. 이것은 돼지 회장염의 원인체인 *Lawsonia intracellularis*의 분리가 매우 까다로웠기 때문이며 현재까지도 국내에서는 이 균을 분리한 보고

가 없다. 이번 연구를 통해 외국의 *Lawsonia intracellularis*의 분리배양법을 도입하여 이를 확립시키고 국내주를 분리하며 더 나아가 이에 대한 효과적인 백신 개발과 이와 더불어 현재 국내의 모든 돼지농장에 상재되어 있는 것으로 판단되는 돼지로타바이러스와의 혼합백신을 연구하고 이를 구강으로 투여하여 지금보다 더 나은 구강백신을 연구 개발하는 것이 이번 연구의 목적이다.

2) 경제 · 산업적인 측면

국내에서는 돼지 증식성 회장염에 대한 체계적인 조사가 아직 미비한 실정 이어서 정확한 경제적 피해가 어느 정도인지 파악할 수 없으나 미국의 경우 돼지 증식성 회장염에 의해 연간 2천만 달러의 경제적 손실을 보고 있다는 보고가 있었으며 국내의 사정도 그리 낙관적이진 않은 것으로 파악된다.

돼지로타바이러스의 경우도 국내의 모든 농장에 만연되어 있는 질병으로 보고된 바 있으며 환경요인에 강한 저항력을 갖고 있는 원인체에 의해 이유자돈에서 심한 설사를 보이며 다른 장관계 바이러스에 혼합 감염시 폐사하게 되는 등 심각한 피해를 주고 있다. 또한 두 질병 모두 분변을 통해 다른 개체에 전파될 수 있는 전염성 질병이기 때문에 한번 질병이 발생한 농장에선 근절시키기가 매우 힘들다.

특히 돼지 증식성 회장염의 경우 아직까지 국내에서는 백신이 개발되지 않아 질병이 발생된 후에 항생제를 투여할 수 있을 뿐 다른 예방책이 전무한 실정이다. 이러한 상황에서 국내 대부분의 농장에 상재하는 두 질병에 대한 보다 효과적인 백신의 개발은 양돈농가의 돼지 생산비의 20%를 절감해줄 것으로 예상된다.

3) 사회 · 문화적인 측면

백신의 효과에 의해 돼지의 설사병이 조금이나마 줄어들 수 있다면 현재 생산되는 돼지의 출하시기를 앞당길 수 있을 것이며 이는 사료비나 사양관리비의 절감을 가져와 결과적으로 좀 더 양질의 돈육을 국민의 건강 증진을 위해

공급할 수 있도록 하는데 도움을 줄 것이다. 유산균을 이용한 백신의 가장 큰 장점은 사람에게서 식중독을 일으키는 세균, 즉 *Salmonella*균의 성장을 저지함으로써 국민의 건강증진에 기여한다는 것이다. 즉 하나의 백신으로 가축질병의 예방은 물론이고 국민건강증진이라는 일석이조의 결과를 가져올 수 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

돼지 증식성 회장염의 원인체인 *Lawsonia intracellularis*는 1993년에 Lawson과 McOrist등에 의해 분리 보고된 바 있다. 그 전까지는 이 질병의 원 인체를 제대로 파악하지 못했으며, 원인체가 분리됐음에도 불구하고 그 분리배 양과정이 까다로워 많은 연구가 이루어지지 못하고 있는 실정이었다. 그러나 2003년도에는 Boeringer Ingerheim에서 세계 최초로 생균 약독화 백신을 생 산하여 현재 미국에서 2000만두 이상이 백신 접종을 받고 있는 실정이다. 또한 이 회사는 독일에서도 백신 사용 허가를 신청한 상태여서 머지않아 유럽에서도 시판될 것으로 추정된다. 2005년도에는 Boeringer Ingerheim사에서 국내에도 사용 신청을 요구할 것으로 사료된다.

이러한 시점에서 본 연구를 통해서 돼지 증식성 회장염균을 지난 4년간의 노력의 결과로 아시아 최초로 분리하였다는 것은 자축할 만한 일이다. 또한 이 세균을 조직배양을 통해서 순화하고 있어 돼지에서 회장염은 일으키지 않고 면 역력은 유발할 수 있는 순화 회장염균을 작제할 수 있을 것으로 확신하고 있다. 또한 대량생산하는 기술을 자체 확립하게 됨으로써 백신 생산의 기틀을 마련할 수 있게 되었다는 점에서 기술 개발의 성과를 높이 평가한다.

또한 이번에 분리한 한국형 회장염균은 유전자분석법을 통하여 분석한 결 과 미국에서 분리한 미국형 회장염균 과는 다른 계통 프로파일을 보임으로써 향후 백신 개발을 함에 있어서도 지적 재산권의 침해를 막을 수 있는 전기가 되었다는 점에서 매우 중요한 결과라고 할 수 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 돼지증식성회장염균의 분리 및 동정

1. 서 론

증식성 회장염이라고도 불리우는 증식성 장염은 *Lawsonia intracellularis*에 의해 발생하는 질병으로 전세계에 만연하여 양돈농가에 큰 피해를 주고 있다. 전 세계적으로 발병율은 약 30%정도인 것으로 알려져 있으며 (McOrist and Gebhart, 1999) 돼지출혈성장염으로 알려진 급성형과 돼지장선종증으로 진행되는 만성형의 두가지 임상형으로 대별된다. 농가 피해는 주로 육성돈, 비육돈에서의 급성 출혈성 장염과 폐사 그리고 만성형 설사에 의한 비육 성적 감소로 비롯되고 있는 실정이다. 비육 성적 감소와 폐사율 증가는 생산성 감소로 연계되어 양돈산업에 경제적으로 피해가 강요되고 있다(Rowland et al., 1992; Lawson et al., 1993). 급성형 및 만성형의 증식성 장염은 이제 현대 양돈 산업에 매우 중요한 질병으로 대두되고 있으며, 2000년에 미국의 국립동물건강모니터링시스템(NAHMS)의 조사 결과 육성돈 비육돈에서 가장 문제가 되는 질병으로 확인된 바 있다. 이 조사에서는 전체농가의 1/3이상, 대규모 농가의 75%가 감염되어 있는 것으로 보고되었다 (Highlights, 2002). 한국에서도 대상 돼지의 53%가 감염되어 있는 것으로 조사된 바 있다(Lee et al., 2001). 증식성 장염은 이미 한국에서도 가장 중요한 장관계 질환의 하나가 된 것이다. 경제적 피해와 심각성에도 불구하고, 원인체인 *Lawsonia intracellularis*의 분비와 배양에 어려움 때문에 연구가 미비한 실정이다.

원인체인 *Lawsonia intracellularis*는 그람음성의 혐기균으로 세포내에서 증식하는 특징을 보인다. *Lawsonia*균은 단간균으로 둔형 또는 첨단형을 말단을 가진 만곡 또는 선형의 균체로, 길이는 1.25~1.75 μm , 0.25~0.43 μm 의 폭으로 관찰된다. 증식성 장염의 병인론적인 연구는 원인균인 1993년 로소니아균의 분

리, 배양과 순수배양균을 이용한 병원성 재현 실험이 성공하면서 급진전할 수 있었다(Lawson et al., 1993). 로소니아균을 분리배양하기 위한 병변부 자체가 다른 오염원이 상재하는 장관내라는 어려움과 세포내에서 증식배양되는 등의 *Lawsonia*균만의 까다로운 배양조건 때문에 균의 실험실 내 유지배양은 많은 난제에 부딪히게 되었다(Lawson et al., 1993).

증식성 장염은 돼지를 비롯한 햄스터, 랫트, 여우, 말, 토끼, 사슴, 타조 및 마우스에서 감수성이 있는 것으로 보고되고 있다(McOrist and Gebhart, 1999; Steve et al., 2000). 그러나 현재까지의 연구는 주로 돼지와 햄스터에 국한되어 이루어지고 있다. 실험적으로 감염부의 장점막을 이용하여 증식성 장염을 유도한 최초의 연구는 Robert 등에 의해 1977년도에 실시되었으나, 1993년 병원체로 의심되는 균을 실험실내에서 분리한 1993년도 이후에야 순수배양한 원인체를 이용한 증식성 장염 유도 연구가 활발히 진행될 수 있었다(McOrist et al., 1993). 이후 장점막추출물을 이용한 연구(Lomax et al., 1982; Maphother et al., 1987; Winkleman et al., 2002)와 순수배양된 로소니아균을 이용한 연구(McOrist et al., 1996; Knittel et al., 1998; Knittel et al., 2000)가 활발히 진행되었다. 1960년대부터 1980년에 이르기까지 증식성 장염은 실험실에서 사육되는 햄스터에서도 중요한 질병으로 인식되었으며, 일반적으로 'wet-tail'이라는 병명으로 불리워졌다. 그러나 사육시설의 개선과 더불어 실험실내에서의 햄스터에서는 근년에 잘 발생되지 않고 있다. 병변이 관찰되는 햄스터의 회장부 점막을 이용하여 햄스터에서의 증식성 장염을 유도한 논문(Stills and Hook, 1989)과, 햄스터에서의 증식성 장염 병변에서 분리한 균을 이용하여 병원성을 재현한 논문도 발표된 바 있다(Stills et al., 1991). 또한 돼지와 햄스터에서의 증식성 장염의 원인체의 유사한 특징으로 인해 상호 감염의 가능성을 제기한 논문이 보고된 바도 있다(McOrist and Lawson., 1987).

더욱이 증식성 장염의 연구에는 혈청학적인 검사 방법의 확립이 필요하다. 현재까지 증식성 장염 진단법을 소개한 논문(Knittel et al., 1998; Guedes et al., 2002)이 발표된 바 있으며, 혈청학적인 진단은 로소니아균에 대한 노출여부 및 기왕력을 파악하는 데 좋은 자료로 이용할 수 있다. 더불어 분변으로의

균체 배출 여부 조사는 농장에서의 질병 전파 콘트롤 전략을 짜는 데 좋은 정보가 될 수 있다.

따라서 본 연구의 목적은 다음과 같다. (1) *Lawsonia*의 한국균주의 분리 및 세포배양기술을 이용한 증식배양법 구축, (2) 분리된 한국균주의 병원성을 돼지와 햄스터 등과 같은 감수성 동물에서 재현, (3) 실험적으로 감염을 유도한 돼지에서의 혈청학적 검사법과 분변에서의 균체 검사법을 개발하는 것이다.

2. 재료 및 방법

가. 돼지증식성장염균의 분리 및 배양

1) 분리재료

*Lawsonia intracellularis*의 분리에 사용된 재료는 출혈성 증식성 회장염 (Proliferative hemorrhagic enteropathy, PHE)에 감염된 비육돈의 소장 부위를 채취하여 사용하였다. 감염부위가 돼지 증식성 회장염(Porcine proliferative enteropathy, PPE)으로 인한 병변 부위임을 확증하기 위해 면역조직화학염색법(immunohistochemistry, IHC)과 PCR법을 수행하였다.

감염돈의 소장부위의 약 2 cm 정도를 멸균된 가위와 핀셋을 이용하여 잘라내고 열어 젖혔다. 장관 점막 표면을 긁어내고, 1% 트립신이 첨가된 인산 버퍼(pH 7.2; PBS) 2 ml을 이용하여 긁혀진 점막 조직을 수거하였다. 수거된 점막 조직은 30 초간 균질화하여 무균적으로 원심 튜브에 옮겨 담고 37°C에서 35 분간 반응시켰다. 그리고 10 ml의 10% FBS(Fetal bovine serum)가 첨가된 SPG(Sucrose-potassium-glutamine) 용액을 첨가하고 조직연마기를 사용하여 갈아낸 후 10%의 FBS가 첨가된 SPG 10ml을 추가로 넣고, 순차적으로 다음과 같이 여과시켰다. 먼저 60개의 그물망으로 된 스테인레스 재질의 철망으로 여과시킨 후, 여과 구멍 크기가 각각 2.7 μ m, 1.2 μ m, 0.8 μ m, 그리고 0.65 μ m인 여과막을 통과시키고 여기서 얻어진 여과액은 무균 원심튜브에 옮겨 담는다. 곧바로 세포 접종용으로 사용할 경우 여과액은 4°C에서 보관하고 최초 세포 접종시에는 여과액을 1:10으로 희석하여 사용하였다. 이 때 희석을 위해서는 7%의 FBS가 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 사용하며 희석된 접종용 시료는 25 cm²의 조직배양플라스크에 접종하기에 알맞았다.

2) 조직 배양

*Lawsonia intracellularis*의 감염을 위해 사용되는 세포는 McCoy (ATCC

CRL 1696) 세포를 이용하였다. 배양을 위해 사용되는 배지는 5%의 FBS(Fetal bovine serum), 1%의 L-글루타민과 암포테리신 B가 첨가된 DMEM을 사용하였으며 5%의 이산화탄소가 공급되는 37°C에서 배양하였다. 세포는 1주일 간격으로 트립신을 이용하여 계대 배양을 하였고, 1ml 당 5×10^5 의 세포의 농도가 되도록 하여 새로운 조직배양플라스크로 옮겨 담았다.

3) 장조직 유제의 세포감염

상기항에서 준비된 세포 감염에 적합하게 희석된 접종액을 세포 단층 표면에 적용시키고, 세포 단층 표면은 2,090 X g 의 원심력을 이용하여 회전시킨 후 혐기 배양 용기로 옮겼다. 혐기 배양 용기의 가스는 500 mmHg의 압력으로 탈기하였다가 의료용 순도의 수소가스로 교체하고, 다시 500 mmHg의 압력으로 재탈기한 후 8.0%의 수소, 8.8%의 이산화탄소, 83.2%의 질소로 혼합된 가스로 재교체하였다. 이러한 공기 조건 하의 37°C, 3시간동안 배양한 후, 동일한 세포 배양배지 구성에 네오마이신, 겐타마이신, 반코마이신 등과 같은 항생제를 50에서 300 ppm의 농도로 첨가한 배지로 교체하여 주었다. 접종 후 2일, 4일이 경과한 시점에서 동일한 항생제 첨가 배지로 교체하였고, 이 때는 FBS 농도가 5%가 되게 하여 사용하였다. 그리고 접종 후 7 일째가 되는 날에 계대를 위한 처리를 하였다.

4) 감염 세포조직의 맹목적 계대배양

감염세포의 계대에는 0.1% 염화칼륨 용액을 이용한 세포 용해액을 1:3의 비율로 사용하였다. 일단 감염 후 일주일이 지난 조직배양 플라스크 배양상층액을 수거하였다. 수거된 상층액은 2,090g로 원심분리하였다. 상층액이 제거된 세포 단층 표면에 0.1% 염화칼륨을 적용시키고 20분에서 30분간 반응한다. 반응이 끝나면 0.1% 염화칼륨 용액을 제거하고 10% FBS가 첨가된 SPG 용액과 세포 스크레이퍼를 이용하여 조직배양플라스크 바닥면의 세포를 수거하였다 (Fig. 1-1.). 수거된 세포들은 20게이지의 유제화 바늘을 통해 10회 반복하여 물리적으로 파열시켰다. 이 과정에서 생긴 세포핵들은 100 X g의 힘으로 5분

간 원심분리하여 제거하고, 이때 얻어진 상층액을 새로 준비한 신선한 McCoy 세포에 접종하는 데 이용하였다.

*Lawsonia intracellularis*에 감염된 McCoy 세포들은 일주일 간격으로 상기 방법에 의해 계대하였다. 계대를 넘어갈 때 하나의 조직배양플라스크는 다음 계대에서 3개의 조직배양플라스크가 되도록 1:3의 비율을 적용하여 계대하였다.

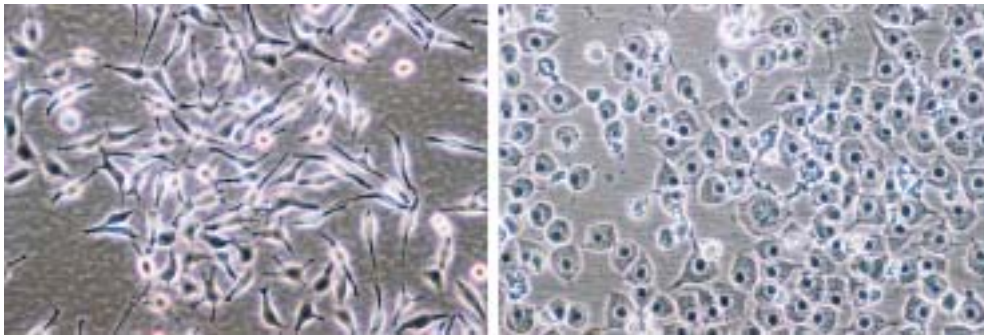


Fig. 1-1. McCoy cells in normal condition (left) and treated by 0.1% KCl for mechanical rupture of cell membrane (right)

5) 감염 세포조직의 감염 여부 관찰

Lawsonia intracellularis 감염세포의 계대 배양을 하기 전에는 반드시 감염이 어느 정도 진행되었는지에 대한 모니터링을 실시하였다. 모니터링은 감염된 세포가 있는 조직배양플라스크의 일정 구획을 긁어내어 도말염색을 수행하였다. 도말 염색하는 세포들은 IG4 (영국에서 분리된 *Lawsonia intracellularis* 균주를 이용하여 생산된 단클론항체, McOrist박사로부터 제공받음)나 2001MAb(미국균주를 이용하여 생산된 단클론항체, 미국 미네소타 대학으로부터 구입)와 같은 단클론항체를 이용하여 면역조직화학염색을 하였다. 세포의 증식 정도는 일정구획이나 세포 내에서 염색된 세균의 수를 측정함으로써 평가하였다. 염색의 공정은 다음과 같다.

유리 슬라이드로 옮겨진 세포들은 상온에서 건조시키고, 100% 아세톤으로 5분 반응하여 고정 슬라이드 위에 고정시켰다. 그리고 증류수로 37°C 에서 10분 반응하여 재 가수화시키고, 증류수를 제거하였다. 그리고 3% 과산화수소로 15분간 반응시키고, 비특이 반응을 줄이기 위해 Tris 버퍼를 이용하여 1:10으로 희석된 염소 혈청으로 15분간 처리하였다. 여기에 *Lawsonia intracellularis*에 특이적으로 반응하는 항혈청(IG4 또는 2001MAb)을 30분간 37°C에서 적용시키고, 바이오틴이 부착된 항체 15분, 아비딘과 효소(HRP)를 15분 반응한 후, 3-amino-9-ethylcarbazole이라는 발색제에 10분간 노출시켰다. 대조염색을 위해서 Mayer's hematoxylin을 사용하였고, 결과물은 광학 현미경 하에서 관찰하였다.

6) 면역조직화학염색

96칸 조직배양플레이트의 각 칸에 5×10^3 의 농도로 McCoy 세포를 24시간 배양한 후 10^5 의 *Lawsonia intracellularis*를 감염시켰다. 이 조직배양플레이트를 전술한 바와 같이 5일간배양한 후, 상층액을 제거하고 아세톤과 메탄올을 50:50으로 희석한 용액을 이용하여 감염 세포 단층을 고정하였다. 그리고 상기한 면역조직화학염색법을 동일하게 적용하여 혈청 시료를 이용하여 염색하고 광학현미경 하에서 염색된 세균 항원을 관찰하였다. 발색제에 의해 면역반응을 보인 세균 항원이 관찰되는 경우 양성으로 판정하였다.

나. 돼지 증식성회장염의 재현성 실험

1) 실험동물

3주령된 자돈 다섯마리를 돼지 증식성 회장염으로부터 청정한 농장의 돈군으로부터 입식(入植)하였다. 청정 돈군의 선별은 농장의 기왕력(既往歷)의 청취 및 면역조직화학염색법을 통한 혈청학적인 검사와 PCR법을 이용한 DNA검사로 수행하였다. 입식된 돈군은 PCR법을 통해 살모넬라증, 돈적리, 돼지 전염성 위장염 바이러스 등 다른 설사유발질병에 대한 음성여부도 확인한 후 실시하였다.

실험돼지들은 14일령에 포유돈사에 분리하였고, 이유(離乳) 후 일주일간은 일반 비육돈(肥育豚) 사료와 우유를 혼합하여 사육하고, 이유 후 이주일 쯤부터는 일반 비육돈 사료만 공급하였다. 접종 이틀 전에, 모든 실험돈의 혈청 검사를 면역조직화학염색법으로 실시하여 *Lawsonia intracellularis*에 대한 노출 여부를 확인하였다. 이와 함께 분변을 수거하여 *Lawsonia intracellularis* DNA검사를 수행하여 음성 여부를 확인하였다. 접종 하루 전, 한 마리의 음성대조군(그룹 1), 두마리의 순수배양군 접종군(그룹 2), 두 마리의 장점막 조직추출군 접종군(그룹 3) 등 세개의 돈군으로 편성하였다. 각 군에 편성된 돼지들은 각기 다른 돈방에서 사육하였다.

시리안 햄스터를 일본의 실험동물회사(SLC)를 통해 입식하였다. 햄스터들은 실험 동물 사육에 적합한 시설에서 사육되었고, 일반적인 마우스/햄스터 사료를 공급하였다. 모든 햄스터들은 3주령에 이유되었고, 4주령에 접종 실험에 이용되었다. 음성 대조군과 감염햄스터들은 각기 다른 케이지에서 분리 사육되었으며, 접종 하루 전에 세개의 실험군으로 편성되었다. 음성대조군 두마리, 순수배양군 접종군에 네마리, 장유래추출군 접종군 네마리로 편성되었다.

2) 조직배양된 돼지증식성회장염균의 접종

McCoy 세포를 이용한 *Lawsonia intracellularis*(PHE/KK421)균의 배양과 균의 농축은 전술한 바와 같이 실시하였다. 배양에 이용한 균은 여섯 번째 계대한 PHE/KK421 균주였으며, 이를 이용하여 아홉 번째 계대까지 배양하여 동물 접종에 이용하였다. 아홉 번째 계대한 시점에서는 배양상층액과 0.1% 염화칼륨 용액을 모두 수거하였으며, 세포 과열로 얻어낸 균주와 함께 2,090 X g의 속도로 원심 분리하여 농축한 후 SPG 용액으로 부유시켜서 4℃에 보관하였다가 실험동물에 적용하였다.

3) 장조직유제액의 접종

약 50 cm가량의 감염돈의 소장 조직을 균추출을 위해 사용하였다. 열려진 상태에서 보관되어 있던 소장조직을 신속하게 녹인 후 병변 부위에서 수술용

칼이나 유리 슬라이드를 이용하여 점막 조직을 유리시켰다. 유리된 점막 조직은 5%의 FBS가 첨가된 SPG 용액을 이용하여 수거하고, 믹서기에 넣고 15분간 유제하였다. 유제화된 조직은 멸균된 용기에 옮긴 후 4℃에 보관하다가 실험 동물에 적용하였다. 장점막 조직에서 유래한 접종 시료의 경우에는 돈적리(豚赤痢)와 살모넬라증과 같은 원인균에 대한 검사를 수행하여 음성 여부를 확인하고 적용하였다.

4) 접종량의 결정

순수배양균과 장점막조직 추출균의 접종시료 내의 균체 수 측정은 MAAb2001이라는 단클론항체를 이용한 면역조직화학염색법에 의해 수행되었다. 균체의 수 측정을 위해 각 접종시료는 10진법으로 PBS용액에 희석되었으며, 희석된 용액은 12칸으로 구획된 유리 슬라이드에 10 μ l씩 도말하여 염색 반응하였다. 면역조직화학염색법은 전술한 바와 같이 수행하였으며, 염색 종료 후 광학 현미경으로 관찰할 때에는 균체 수 측정이 최대한 가능한 50-500개의 균체가 확인되는 농도의 칸을 정하여 평가하였으며 평가된 농도의 칸을 기준으로 시료 내의 전체 균수를 계산하였고, 두 번이상의 측정을 통하여 정확한 균체 수를 측정을 하고자 하였다.

5) 접종

실험돈과 실험 햄스터들은 접종 전 24시간 절식시켰으며, 30ml과 1ml씩 양으로 접종되었다. 접종군 실험동물들은 위장관 튜브를 이용하여 0일째에 되는 날에 접종되었다. 돼지의 경우 순수배양균 접종군은 마리당 4.5 x 10⁸의 세균을 투여하였고, 장점막조직추출균 접종군은 마리당 2.2 x 10¹⁰의 세균을 투여하였다. 햄스터의 경우 순수배양균 접종군은 개체당 1.5 x 10⁷의 세균을 투여하였고, 장점막 조직유래 접종군은 개체당 7.3 x 10⁸의 세균을 투여하였다. 나머지 음성 대조군의 돼지와 햄스터에는 비감염 McCoy 세포를 SPG 용액에 담아 투여하였다.

6) 임상증상 평가 기준설정

실험동물에 접종한 날로부터 매일 임상증상을 관찰하였다. 임상증상의 경과
는 분변의 성상, 행동이나 신체상태를 기준으로 평가하였다.

분변의 상태는 다음과 같은 기준에 의해 채점되었다. 1=설사 없음, 정상변, 2=
출혈소견은 없으며 반고형 상태, 3=출혈 소견은 없으나 수양성(水樣性)인 상태,
4=혈액 소견이 관찰되는 점액변, 5=다량의 혈변으로 타르형태.

행동이나 몸상태는 다음과 같은 기준에 의해 채점되었다. 1=정상, 2=수척해지
고 외부 반응에 둔감하여 침울하지만 서있음, 3=심하게 수척해지고, 외부 반응
에 반응하지 않으며 누워있음.

7) 분변에서의 균체 검사

분변 시료를 접종일, 접종 후 4일, 6일째와 이후 격일 간격으로 수거하였
다. 수거된 분변에서 DNA를 추출하여 *Lawsonia intracellularis* DNA을 target
으로 PCR법을 이용한 유전자 검사를 수행하였다. 돼지 증식성 회장염 진단에
널리 사용되고 있는 primer를 주문 제작하여 사용하였다(Jones et al., 1993).

8) 혈청학적 검사

혈액 시료는 접종일, 접종 후 5일, 그리고 이후 격일 간격으로 채취하였다.
혈청학적인 검사를 위해 간접 형광항체법과 면역과산화효소단층분석법이 수행
되었다. 혈청 검사를 위해 채혈된 혈액에서 혈청을 분리하고, 최초 1:30 농도의
희석 혈청을 시작으로 2진법 희석을 적용하였다. 1:30 농도 이상에서 양성
이 나오게 되면 해당 동물을 양성으로 판정하였다. 혈청학적인 검사에 사용된 항원
세균의 도말을 위해 전술한 바와 같이, 감염된 세포를 0.1% 염화칼륨 처리로
파열시켜 항원을 얻는 방법을 사용하였다. 항원은 1ml 당 10^6 개의 세균을 포함
하도록 농도를 조정하였고, 12칸짜리 유리 슬라이드를 사용하는 경우 $10\mu\text{l}$ 씩
각 칸에 적용하여 도말하였다. 유리 슬라이드는 37°C 에서 30분간 건조한 후
100% 아세톤으로 고정하여 언제든지 사용할 수 있도록 준비하였다.

9) 간접형광항체법

혈청학적인 검사에 사용되는 양성 혈청은 동물실험에서 얻은 실험돈의 혈청을 이용하였다. 간접형광항체법에 사용된 세균 항원은 전술한 바와 같은 방법으로 농축하여 PBS로 희석하여 사용하였다. 항원이 도말되어 고정된 유리 슬라이드에 혈청 시료를 희석하여 $20\mu\text{l}$ 씩 적용하여 37°C 에서 30분간 반응하였다. 그리고 나서 30분간 PBS로 5차례 세척한 후 $20\mu\text{l}$ 의 형광물질이 결합된 rabbit anti-pig IgGs을 이용하여 37°C 에서 30분간 반응시킨 후 형광현미경 하에서 관찰하였다. 200배에서 400배의 배율에서 형광을 발하는 세균항원이 동일한 시야 내에서 100개 이상 관찰될 때 양성으로 판정하였다.

10) 부검

모든 실험동물은 접종 후 21일째에 안락사 후 부검하였다. 회장말단부, 장간막 림프절 그리고 편도는 조직학적인 검사를 위해 10% 포르말린 고정하여 파라핀 처리하고 $4\mu\text{m}$ 의 두께로 절편을 얻어 슬라이드에 마운팅하였다.

11) 조직학적검사

10% 포르말린 고정 후 파라핀 절편으로 얻어진 시료에 대해 면역조직화학 염색법을 실시하여 균체 유무를 검사하고 헤마톡실린 및 에오신 염색을 통한 검사를 실시하였다.

3. 결 과

1) 국내에서 분리된 *Lawsonia*균의 배양과 유지

(1) 균분리에 사용된 재료

로소이나균 분리에 사용될 재료는 간헐적인 급성출혈성장염의 피해사례가 있는 돈군의 140일령 된 비육돈의 소장부였다(Fig. 1-2). 감염돈은 증식성 장염의 전형적인 부검소견과 현미경적 소견을 보이고 있었으며, 중합효소연쇄반응법과 간접면역조직화학염색을 통해 로소니아균 감염을 확인하였다(Fig. 1-3). 장관내부는 혈액 및 혈괴 성분으로 가득하였으며(Fig. 1-4), IG4와 2001MAb와 같은 단클론항체를 이용한 면역조직화학염색 결과, 많은 수의 *Lawsonia*균이 병변부 융모와 크립트 부위 세포의 세포질 첨단에서 관찰되었다(Fig. 1-5). *Lawsonia*균 항원은 균분리에 사용된 폐사돈의 편도의 대식세포에서도 세포내 과립형태로 관찰되었다.



Fig. 1-2. Gastrointestinal tract of pig infected with acute hemorrhagic PE

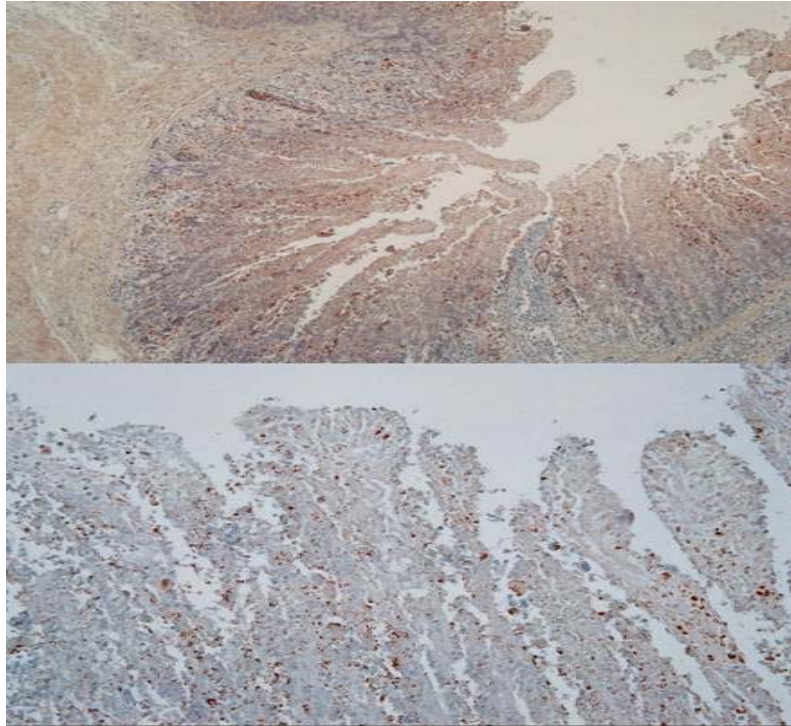


Fig. 1-3. Intestinal section from a pig with acute hemorrhagic PE, immunostained with monoclonal antibody IG4. Magnification, X50 and X100



Fig. 1-4. Blood clot in the lumen and hemorrhagic terminal ileum taken from a pig infected with acute hemorrhagic PE

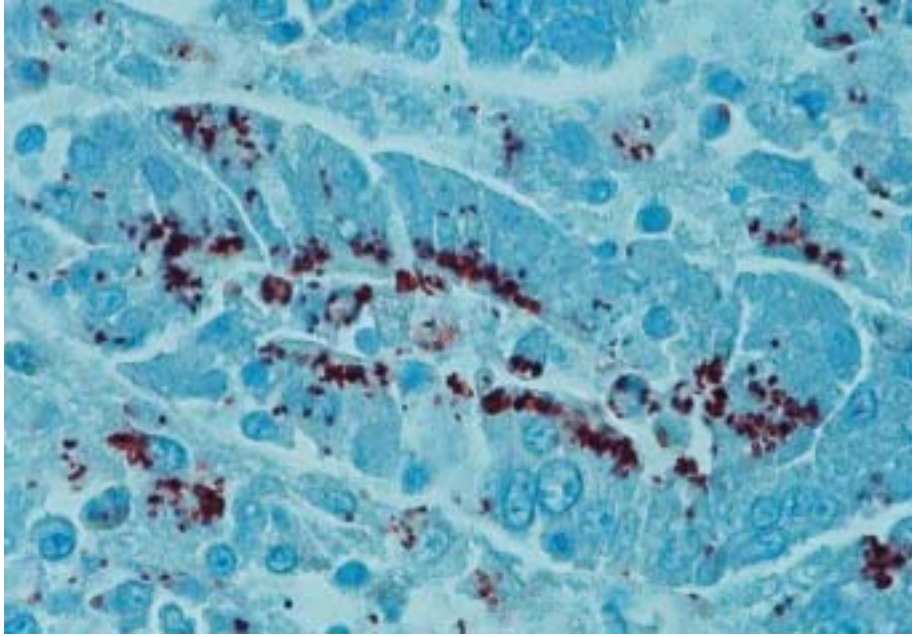


Fig. 1-5. *L. intracellularis* in the apical cytoplasm of the ileal gland of a pig infected with acute hemorrhagic PE. Magnification, X400

(2) *Lawsonia*균의 분리

최초계대에서부터 다른 장내 세균의 오염이 배제될 때까지 겐타마이신, 네오마이신 등과 같은 항생제와 반코마이신과 같은 항생제를 혼용한 결과 5계대에서부터는 세균학적 오염이 극복되었다. 세균학적 오염이 극복된 이후의 계대에서는 항생제 사용을 중단하였다.

(3) *Lawsonia*균의 유지배양

상기 방법으로 분리된 균주는 5계대에 이르러 실험실 내에서의 세포 배양에 알맞게 순화 적응되었으며, *Lawsonia intracellularis* PHE/KK421로 명명하였다.

이 시점에서는 세포 배양 상층액에서도 균이 관찰 가능하였다(Fig. 1-6). 그리고 면역조직화학염색법으로 모니터링한 결과 대부분의 감염 세포는 심하게 감염되어 대부분의 세포가 20여개 이상의 세균에 감염되어 있는 양상을 관찰할

수 있었다(Fig. 1-7). 하지만 일반적인 바이러스의 세포배양에서 관찰되는 세포의 원형화, 세포 융합, 탈락 및 공포화(空胞化) 현상 같은 세포병변효과는 관찰할 수 없었다. 감염이 심하게 진행된 경우는 대부분의 세포질 부분이 세균으로 가득찬 형태로 관찰되기도 하였다. 원형을 띠며 조직배양플라스크 바닥면에서 이탈된 일부세포의 경우는 더욱 많은 수의 세균에 감염되어 있는 것을 확인하였다. 감염 후 매일 모니터링한 결과에 따르면 5일에서 7일이 경과한 시점에 이르게 되면 80~90%의 세포가 감염되는 것으로 관찰되었다. 7일이 경과한 시점에서부터는 거의 100%의 세포가 감염되는 모습을 보였다. 감염을 유도하지 않은 음성 대조군의 McCoy 세포단층에서는 위와 같은 어떠한 모습도 관찰되지 않았다.

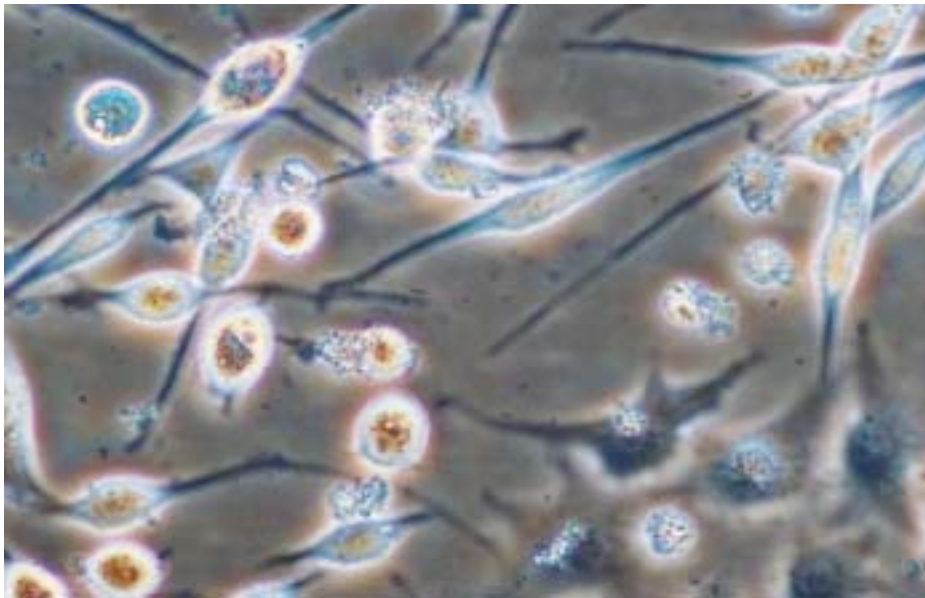


Fig. 1-6. PHE/KK421, *L. intracellularis* strain isolated in Korea, in the supernatant of the cell culture medium. Magnification, X300

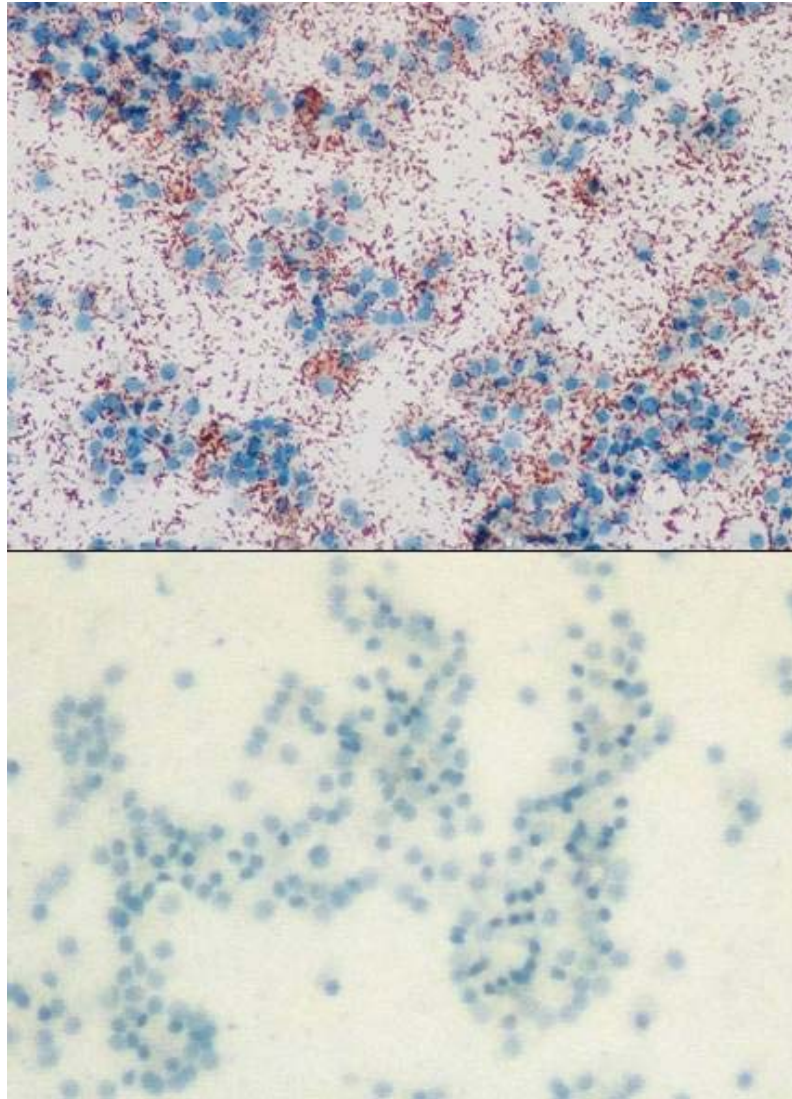


Fig. 1-7. McCoy cell monolayer heavily infected with *L. intracellularis*. Immunoperoxidase with monoclonal antibody 2001 MAb (left) and uninfected control monolayer cells (right). Magnification, X200

(4) 분리균주의 동정

*Lawsonia intracellularis*에 특이적으로 면역 반응하는 단클론항체인 IG4와 2001MAb를 통해 균의 분리 및 유지 배양을 모니터링하고, 균의 존재를 확인할 수 있었다. 또한 Jones 등이 1993년에 발표한 논문에 제시한 프라이머 세

트를 이용하여 실시한 PCR법의 결과산물을 유전자 분석하여 NCBI GenBank에 등록된 16s rRNA와 상동성을 조사한 결과 99% 일치하는 것으로 확인되어 분리 균주를 증명할 수 있었다.

2) 실험적 증식성 회장염의 유도

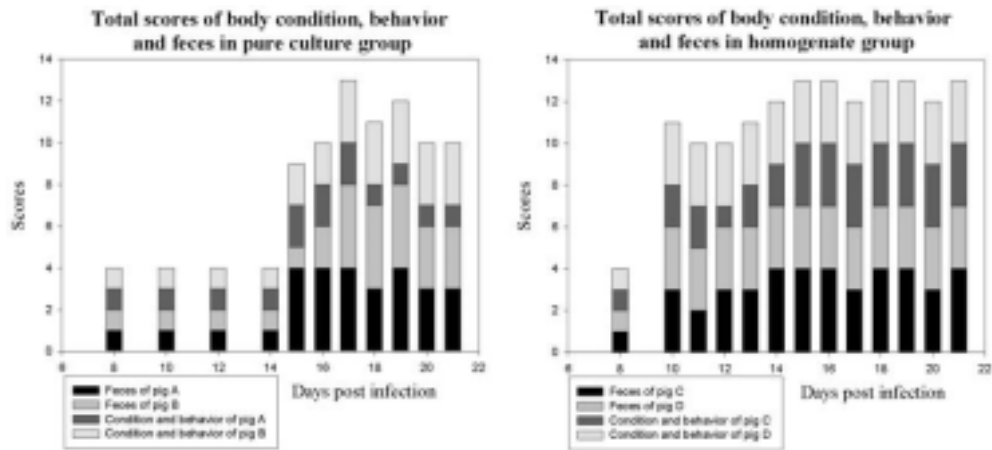
(1) 임상증상

그룹 2(순수배양균을 접종한 실험군)와 그룹 3(장점막조직 추출균을 접종한 실험군)의 모든 감염 돼지에서 임상 증상이 관찰되었으며(Fig. 1-8), 음성 대조군인 그룹 1의 돼지에서는 어떠한 임상 증상도 관찰되지 않았다. 그룹 2와 그룹 3의 실험동물들에서 각각 접종 후 15일과 11일 뒤에 임상 증상이 관찰되어 실험종료 시점인 접종 후 21일까지 계속되었다(Fig. 1-9). 임상증상을 보인 실험동물들은 외부 자극에 대해 매우 무기력하게 반응하였고, 서있지 못하고 허리를 구부려 누워 있는 자세를 취하고 있었으며, 식욕이 현저히 감소되었다. 음성대조군의 돼지는 실험종료 시점까지 정상적으로 관찰되었다. 그룹 2와 그룹 3 모두에서 현저한 증체율 저하가 확인되었으며(Fig. 1-10), 반면에 음성 대조군인 그룹 1에서는 높은 증체율을 관찰할 수 있었다. 실험간에 급성형이나 출혈성장염으로 폐사하는 일은 발생하지 않았다.



Fig. 1-8. Watery diarrhea after challenge with *L. intracellularis*

Fig. 1-9. Total scores of body condition, behavior and feces in groups



challenged with pure culture and intestinal mucosa homogenate on day 5 and from 10 to 21 post infection.

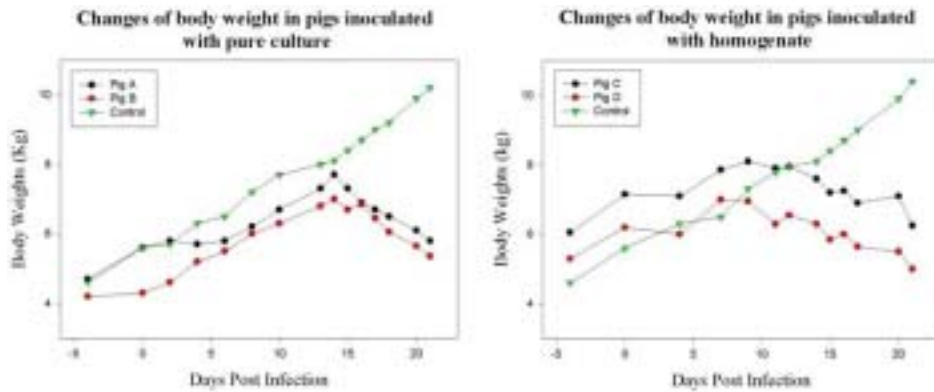


Fig. 1-10. Body weight gain in pigs challenged with pure culture and intestinal mucosa homogenate

(2) 분변내 *Lawsonia* 검출 및 혈청 항체가 검사

Lawsonia intracellularis DNA를 타깃으로 한 분변 시료의 PCR법 검사 결과, 분변에서의 증식성 회장염 DNA는 그룹 2와 그룹 3 모두에서 접종 후 6일째부터 검출되었으며 실험이 종료되는 시점까지 계속 되었다. 증폭된 DNA 단편은 319 base pairs로써 확인되었으며(Fig. 1-11), 증폭된 DNA 산물을 얻을 수 있었다. 반면에 동일한 실험기간동안 음성대조군 돼지의 분변에서는 어떠한 DNA 증폭도 관찰할 수 없었다.

감염된 돼지들의 혈청검사 결과를 분석한 결과, *Lawsonia intracellularis*에 대한 면역글로불린G의 경우 접종 후 12일에서 14일 사이에 형성되어 검출되는 것으로 확인되었다. 이 시기에 검출되기 시작한 혈중 항체는 실험이 종료되는 시점까지 꾸준히 증가하는 양상을 나타내었다(Fig. 1-12, 13).

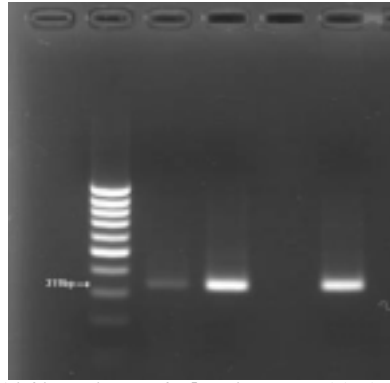


Fig. 1-11. PCR amplification of *L. intracellularis* DNA from the feces of challenged pigs

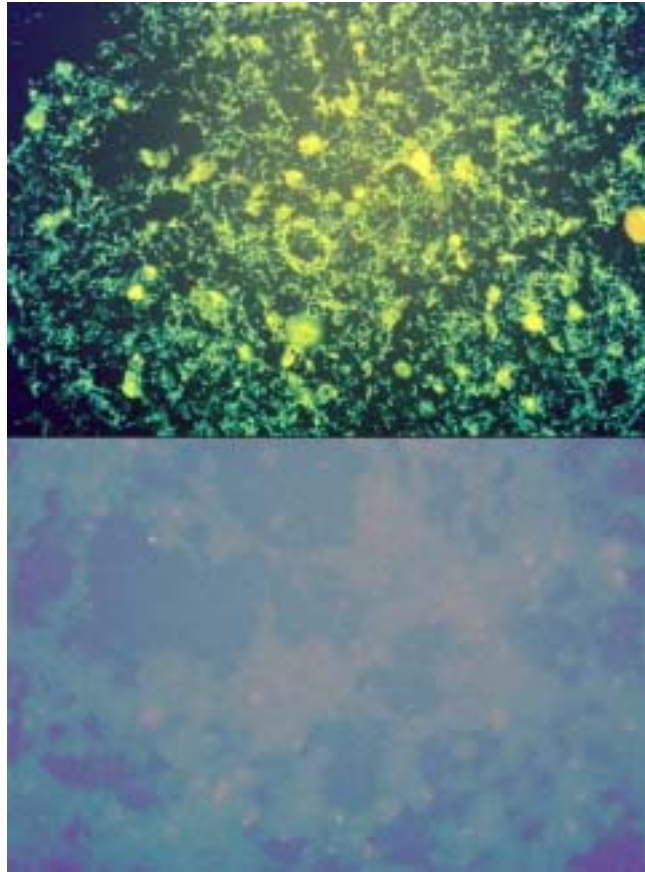


Fig. 1-12. *L. intracellularis* antigen immunostained by indirect fluorescent antibody. Magnification, X200

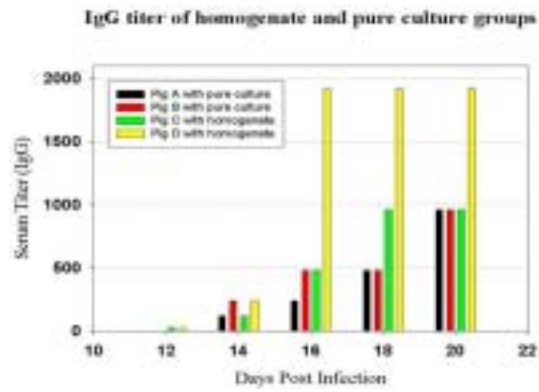


Fig. 1-13. Serological responses of pigs challenged with pure culture and homogenate

(3) 부검 소견

음성대조군을 포함한 모든 실험군의 돼지들은 접종 후 3주째에 안락사를 유도한 후 부검을 실시하였다. 모든 접종군의 돼지에서 돼지 증식성 회장염의 전형적인 병변이 관찰되었다. 조직학적인 병리 변화는 소화관과 복강내, 장간막 림프절에 국한하여 나타났다(Fig. 1-14). 병변부는 주로 소장에서 명확히 나타났으며, 감염된 실험군의 소장은 두껍게 비후(肥厚)되어 주름진 점막과 충혈 소견을 확인할 수 있었다(Fig. 1-15). 음성대조군의 부검소견에서는 위와 같은 병리학적인 변화를 관찰할 수 없었다(Fig.1-16). 순수배양군을 접종한 그룹의 병변부는 약 35에서 40센티미터 가량이었으며, 장조직 추출군을 접종한 그룹의 병변부는 50에서 55센티미터로 확인되었다.

(4) 면역조직화학 염색 결과

접종된 모든 돼지의 회장 절편에서 발색제에 의해 염색된 세균 항원을 관찰할 수 있었다. 균체 항원이 병리 병변을 보이는 주름지고 충혈된 소장 부위의 장점막세포 세포질 침단 부위에서 많은 수로 관찰되었다 (Fig. 1-17). *Lawsonia intracellularis* 항원은 실험적 유도된 감염군의 편도와 장간막 림프절에서는 관찰되지 않았다. 음성대조군의 돼지에서는 염색된 항원을 전혀 관찰할 수 없었다(Fig. 1-18).



Fig. 1-14. Enlargement of the mesenteric lymph nodes of a pig challenged with pure culture PHE/KK421



Fig. 1-15. Intestinal wall corrugated with thick and hyperemic folds.



Fig. 1-16. Intestinal wall of a control pig

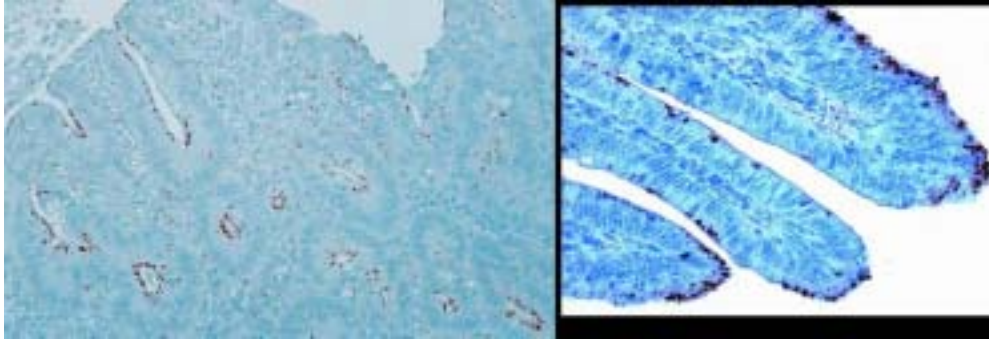


Fig. 1-17. Immunoperoxidase staining of a terminal ileum from a pig infected with *L. intracellularis*, PHE/KK421, isolated in Korea.
Magnification, X100 and X400

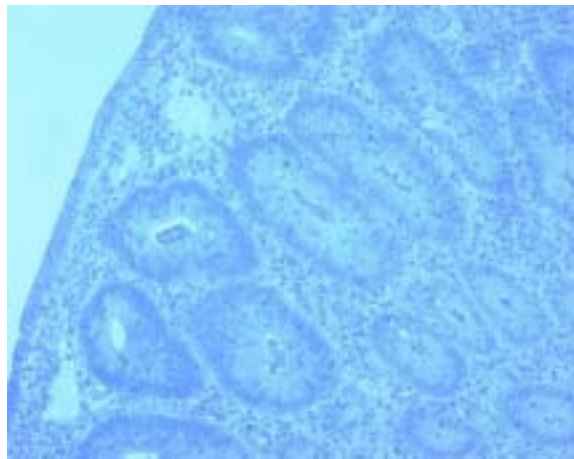


Fig. 1-18. Ileal section from a control pig stained by IHC.
Magnification, X200

3) 햄스터에서의 증식성 회장염 유도

증식성 회장염에서 볼 수 있는 전형적인 병변이 순수배양균 및 장점막조직 추출균을 접종한 햄스터군 모두에서 확인되었다. 병변은 소화기에 국한하여 관찰되었고, 병리 변화를 보인 장관벽은 음성 대조군의 장관벽에 비해서 현저히 비후(肥厚)되고 충혈(充血)되어 있음을 확인할 수 있었다. 병변을 보인 실험군의 햄스터의 소장 길이가 역시 음성대조군의 햄스터들의 소장에 비해 확연히 짧아

져 있었다(Fig. 1-19).

감염실험군의 햄스터들의 병변 회장부위를 면역조직화학염색한 결과 폐지에서의 실험에서와 동일하게 발색제에 의해 염색된 *Lawsonia intracellularis* 항원이 많은 수로 확인되었고(Fig. 1-20), 음성대조군 햄스터들에서는 전혀 관찰할 수 없었다(Fig. 1-21). 대부분의 세균 항원은 주로 회장부 장점막 세포의 세포질 첨단 부분에서 관찰되었으며 일부는 라미나프로프리아(lamina propria) 층이나 장관 공간에서도 관찰되었다.

접종 후 실험군 및 대조군 햄스터들의 분변 시료를 대상으로 실시한 *Lawsonia intracellularis* DNA 검사한 결과, 장점막조직접종군 및 순수배양균 접종군 모두에서 접종후 6일부터 실험이 종료되는 21일까지 분변으로의 균배출이 확인되었다. 또한 장점막추출균 및 순수배양균을 접종한 햄스터군 모두에서의 증체율 저하를 관찰할 수 있었다.



Fig. 1-19. Gastrointestinal tracts of hamsters challenged with intestinal mucosa homogenate (left) and pure culture(right). No thickening is observed in left control intestines of each figures

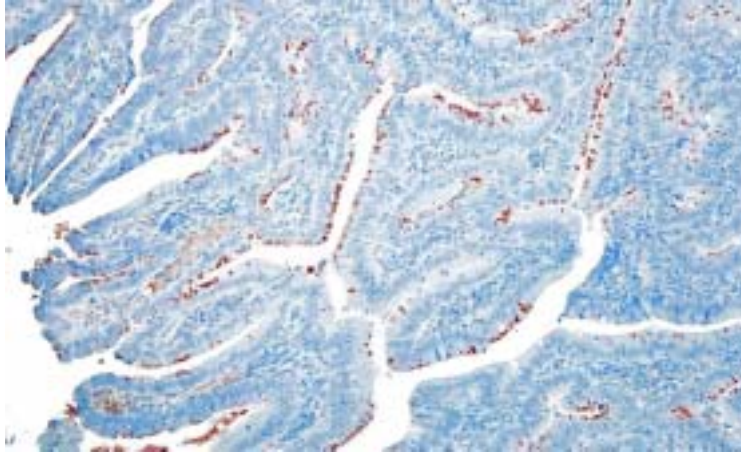


Fig. 1-20. *L. intracellularis* observed in apical cytoplasm of epithelial cells in immunohistochemistry stained ileal section (X100)

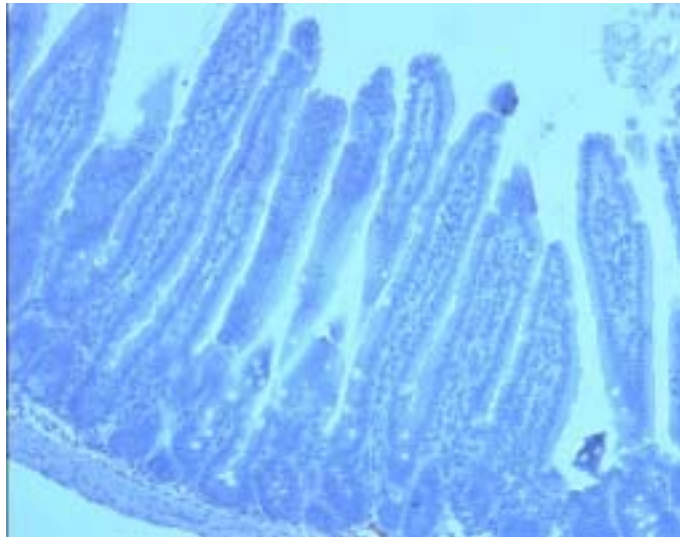


Fig. 1-21. Section of ileum from a control hamster stained by IHC.
Magnification, X100

4) 국내 돼지증식성회장염의 감염 분포 상황

국내 65개의 농장에서 828개의 혈액 가검물을 채취하였다. 본 연구의 대다

수의 농장에서 최소한 두 개의 가검물이 양성으로 나타났다. 최소 한 개의 가검물이 양성으로 나타났을 경우 그 농장을 양성으로 간주하였다. 그러므로 검사한 농장의 양성 반응은 100 %이다 (Table 1-1). 검사한 각 농장의 양성율은 18 %에서 90 %로 *L. intracellularis*의 감염은 대한민국 전체에 걸쳐 분포되어 있다.

개체별로는 828마리 중에 467마리가 양성으로 나왔고(56.4 %) 양성 혈청 가검물의 분포는 경기도 68.6 %(105/153), 경상도 55.4 %(153/276), 충청도 43.9 %(29/66), 강원도 55.6 %(5/9), 전라도 54 %(175/324)였다 (Table 1-1).

Province	No. of farms		%	No. of pigs		%
	Total	Positive		Total	Positive	
Gyeonggi-Do	13	13	100	153	105	68.6
Gyung-sang-Do	20	20	100	276	153	55.4
Chungcheung-Do	5	5	100	66	29	43.9
Ganwgwon-Do	1	1	100	9	5	55.6
Cholla-Do	20	20	100	324	175	54
Total	65	65	100	828	467	56.4

TABLE 1 : 국내 *L. intracellularis* 감염 분포 상황

PPE의 지역적 분포는 73.7 %가 경기 북부지역(연천, 포천, 파주)에서, 55.6 %가 평택과 안성, 78 %가 인천, 78.9 %가 부여와 공주, 29.8 %는 당진, 55.6 %가 강릉, 52 %가 전남, 54.6 %가 충북, 54.9 %가 경남, 66.6 %가 대구였다(Fig 1-22).

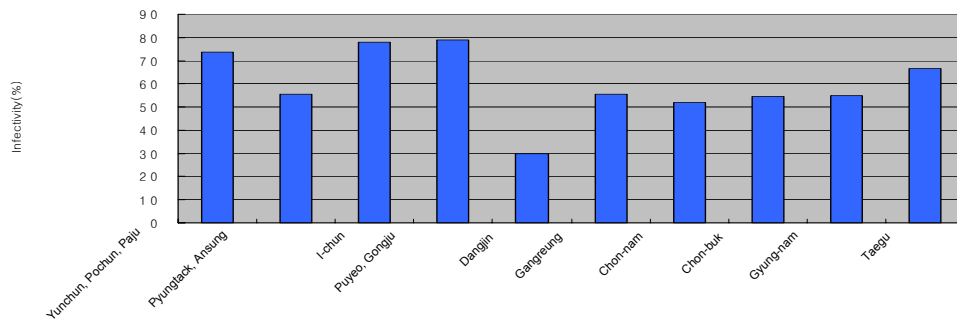


Fig. 1-22. 대한민국 돼지 농장의 PPE의 지역적인 분포

4. 고 찰

본 연구를 통해 국내 최초로 *Lawsonia*균의 한국균주의 분리 및 배양이 성공적으로 수행됨을 확인하였다. 또한 이번에 분리된 로소니아 한국균주의 돼지에 대한 병원성을 실험적 유도를 통해 증명할 수 있었으며, 이는 감염된 가금물에서 추출한 장조직으로 유도한 병원성과 동일하게, 실험적으로 순수배양된 국내분리균주가 감수성 돼지에서 명백한 임상증상, 부검소견 및 조직학적 변화를 야기한 것으로 확인할 수 있었다. 본 실험의 결과는 앞서 발표된 증식성 장염 유도 관련 논문과 일치하는 것으로(Lawson et al., 1989; Harold et al., 1991; Guedes et al., 2003), 이번에 분리된 국내균주는 미국에서 발표된 단클론항체와 유럽에서 발표된 단클론항체를 각각 사용한 염색법과 중합효소연쇄반응법을 통해 *Lawsonia*균으로 확정할 수 있었다.

장점막추출균과 순수배양균을 이용한 실험으로 발표된 다른 논문들과 마찬가지로, 본 실험에서도 설사로 특징되는 전형적인 증식성 장염의 임상증상과 부검소견 및 조직학적 소견이 접종군 모두에서 관찰되었고, 접종 후 3주째에 그 정도가 가장 심하게 관찰되었다. 그러나 출혈성 증식성 장염으로 폐사돈에서 관찰되는 편도에서의 *Lawsonia* 항원은 실험적으로 유도된 감염돈의 편도에서는 관찰할 수 없었는데, 이는 기존의 연구 자료와 같은 결과로 확인되었다(Jensen et al., 2000). 임상증상과 분변의 성상을 점수화한 결과에서는 장점막추출균을 접종한 그룹에서 좀더 일찍 점수가 상승하는 것으로 관찰되었으며, 병변을 보이는 장점막의 길이도 좀더 길게 관찰되었다. 이는 순수배양균 그룹과 장점막조직추출균 그룹에 접종한 균수의 차이(각각 4.5×10^8 과 2.2×10^{10} , 약50배)에서 기인한 것으로 판단된다. 이런 감염 접종량에 따른 감염력에 대한 논문이 최근 발표(Guedes et al., 2003)되어 본 실험결과와 그 맥을 같이하였다. 비록 감염 유도시의 균체수에 따른 정도의 차이가 존재하기는 하였으나, 장조직추출균과 순수배양균을 이용하여 유도된 병원성에서는 큰 차이가 확인되지 않았다. 또한 모든 접종군에서 동일한 부검소견 및 조직학적 소견, 그리고 혈청학적인 변화 패턴과 분변으로의 균배출을 관찰할 수 있었다.

본 실험에서는 접종후 10일이 경과한 시점에서부터 현저한 임상증상과 증

체울 저하를 확인하였다. 분변에서의 균배출은 접종후 6일부터 관찰되어 실험 종료되는 21일째까지 관찰되었다.

*Lawsonia*균에 대한 면역글로불린G의 반응은 접종후 14일 후부터 관찰되어 실험이 종료되는 순간까지 증가되는 양상으로 관찰되었다. 혈청학적인 검사에는 감염된 세포단층을 고정하여 염색하는 방법과 감염된 세포에서 추출된 균체를 고정하여 혈청을 적용하는 간접형광항체법을 사용하였으며, 두 방법 모두 항체 진단에 적용하기 쉽고 결과해석이 명확하여 혈청학적인 스크리닝에 유용한 것으로 확인되었다.

또한, 이번에 분리된 로소니아 국내주는 시리안 햄스터에서도 병원성이 있는 것으로 확인되었다. 임상증상은 돼지에서에 비해 약하였지만, 부검소견을 비롯하여 병변부에서의 항원이 검출되는 결과는 돼지에서의 병원성 재현시와 동일하였다.

유사한 실험을 실시한 다른 연구결과에서는 주로 감염 후 4주 때에 가장 심한 임상 증상이 있었음을 보고하고 있으며, 장기간에 걸친 병원성의 변화와 면역학적인 연구에 대한 많은 연구가 수행되었다. 하지만 본 연구는 질병의 회복과 치사율 등의 조사를 비롯한 장기간에 걸친 질병의 경과를 평가하지 못하였다. 또한 많은 수의 실험 동물을 사용하지 못하였기 때문에 신뢰성 있는 데이터 확보를 위해 좀더 많은 개체를 이용한 병원성 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

결론적으로, 본 실험의 결과는 이번에 분리된 *Lawsonia*균 국내주의 실험실내 배양법이 완전하게 구축되었으며, 감수성 있는 동물에서의 병원성이 명확히 재현되어 증식성 장염의 전형적인 병변과 임상증상을 유도하는데 성공하였음을 제시하고 있다. 나아가 이 실험이 국내에서 추가적으로 수행될 *Lawsonia*균에 관련한 각종 연구의 교두보로 이용되고, 동시에 동물실험에서의 공격접종 실험의 모델로서 제시될 수 있을 것으로 판단된다.

제 2 절 유산균의 *Salmonella*균 감염 방어능 비교

1. 서론

설사성 질환은 지금까지 위독한 질환 중의 하나로 알려져 왔으며, 신생아와 노인 등 면역 시스템이 약한 개체에 발생할 경우에는 치명적일 수도 있다 (Black, 1993). *Salmonella* 의 몇몇 균주와 *Shigella*, 그리고 *Escherichia* 가 설사를 일으키는 대표적인 장내 세균성 병원체이며, 따라서 이들 세균을 방어하는 것이 사람과 동물에 있어서의 설사성 질환을 예방하는 데 가장 중요하다고 할 수 있다(Anon, 1990).

위장계 소화기는 복잡한 미생물환경을 포함하고 있는데, 그 수는 항생제, 약물, 식이 등 다양한 환경적 요인에 민감하게 영향을 받는다. 장내세균성 병원체는 숙주의 정상세균총이 파괴되었을 때 질병을 일으킨다. 설사는 주로 위장계 소화기의 정상세균총이 파괴됨으로써 발생하기 때문에, 정상 세균총을 회복시키고 강화시키는 치료가 효과적이며 부작용도 적다고 입증되어 왔다. 이러한 점에서, 위장계 소화기의 미생물 균형을 개선하는 능력이 있는 probiotics 가 오랫동안 설사성 질환의 예방 및 치료제로 사용되어 왔다(Fuller, 1989; Katelaris et al., 1995; Gonzalez et al., 1994; Isolauri, 1991).

Probiotics 는 주로 microorganism bacteria 에 속하거나 *Saccharomyces boulardii* 와 같은 yeast cells 에 속하는 두 종류로부터 유래된다(Buts, 1999). Microorganism 의 경우, *Lactobacilli*, *Streptococci*, *Lactococci*, 그리고 *Bifidobacteria* 등 lactic acid를 생산하는 세균들이 probiotics 로서 작용한다 (Gibson and Fuller, 2000). 그러나 모든 유산균이 probiotics 로서 작용할 수 있는 것은 아니며, 이들의 효과는 세균주에 따라 모두 다르므로, 실험 이전에 필수적으로 좋은 세균주의 개발과 특성화가 이루어져야 한다.

설사성 질병에 대한 probiotics 의 예방 효과를 알아보기 위하여, 본 연구에서는 *Bifidobacterium* 과 *Lactobacillus* genera를 포함한 두 종류의 유산균을 마우스에서의 *Salmonella* 감염모델을 사용하여 시험하였다. *Salmonella* 는

미국에서 두 번째로 많은 설사성 질환의 병원체다(Edwards, 1999). 본 연구에서는 *B. longum* 이 치사량의 *Salmonella* 공격에 대한 방어 작용을 한다는 것을 밝혔으며, 나아가서 장내에서의 sIgA 생산의 증가가 이러한 방어 효과를 보일 수 있다는 것을 시사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 실험동물

암컷 SPF ICR 와 BALB/c를 대한 바이오링크에서 구입하고 실험 전 1주일간의 적응기간을 주었다. 마우스들은 12시간 light-dark cycle의 온도조절 ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) 의 환경에서 사육하였고 물과 사료를 임의로 공급하였다.

나. 유산균 급여

B. longum 과 *L. casei* 균의 동결건조물은 5 ml 의 MRS 배지에서 녹였고 37°C 에서 하룻밤동안 배양하였다. whole grown cell 들은 같은 배지 500ml에 옮기고 37°C 에서 shaking 하면서 더 길렀다. Cell 들이 log phase 에 이르도록 자란 후에 원심 분리하여 수확하고 10% skim milk 에 적정 농도로 풀었다. 그 후 세균을 $2-4 \times 10^9$ cfu 로 연속 8일간 마우스에 경구투여 하였으며 대조군의 마우스들은 skim milk 만 투여하였다.

다. 살모넬라 감염에 대한 유산균 급여 마우스의 방어효과

마지막 급식 1일 후에 ICR mice (각 그룹당 8 마리) 에 *S. enteritidis*를 1×10^9 cfu 로 경구 접종하였으며, 용량은 LD_{100} 에 가까웠고 생존률 (생존개체수/전체개체수) 는 매 21일마다 기록하였다.

라. 비장세포 증식 시험

마지막 급식 1일 후에 proliferation assay를 위해 각 그룹당 3마리의 BALB/c로부터 비장세포를 추출하였다. 비장세포의 single cell suspension은 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2mM L-glutamine, 50 μM 의 2-mercaptoethanol, 1mM의 sodium pyruvate, 100U/ml penicillin, 100 μg /ml streptomycin이 포함된 RPMI 1640 에 준비하였다. 비장세포는 Tris/ NH_4Cl 을 처리하여 적혈구를 제거하고 96-well microtiter plate 에 각 well 당 5×10^5 cell을 200 μl 의 lipopolysaccharide와 Concanavalin A 포함

또는 비포함 RPMI 1640에 분주하여 3 plate를 제작한 후 37°C 5% CO₂ 환경에 48시간, 72 시간동안 배양하였다. 세포의 증식은 XTT reagent를 사용하여 매뉴얼에 따라 측정하였다.

마. 탐식세포 활성화 시험

B. longum을 먹인 BALB/c mice (그룹당 3마리) 에서 복강삼출세포 (peritoneal exudate cells ; PECs)를 얻기 위해 쥐에 4% thioglycollate medium을 1ml 씩 주사하였다. 4일 후 복강세척으로 PECs를 추출하고 24-well tissue culture plate 에 각 well 당 1×10^6 씩 평균 배양하였다. LPS (5 μ g/ml) 포함 또는 비포함 배지에서 37°C , 5% CO₂에서 24, 72 시간 배양시 부착 세포만이 자랐으며, 각각 주어진 시간에서의 배양 상층액의 cytokine level 은 sandwich ELISA를 사용하여 확인하였다.

바. 장관내 분비형 IgA의 정량 분석

B. longum을 공급한 BALB/c mice 의 장관내용물은 다음과 같이 미리 준비하였다. 즉, 소장의 안쪽을 0.1mg/ml의 soybean trypsin inhibitor, 50mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride가 포함된 ice-cold PBS 1ml 로 씻어내었으며, 장 내용물의 sIgA 농도는 sandwich ELISA를 사용하여 확인하였다.

사. 면역화학적 검사

마지막으로 B. longum을 급여한 후 1일이 지난 BALB/c mice 그룹당 3마리의 소장을 4% paraformaldehyde 에 하룻밤동안 고정하고 모두를 PBS(PH 7.2)로 1시간동안 washing 하였다. 장의 관강에 graded sucrose solution (5%-20%)를 통과시킨 후 조직을 isopentane-cooled liquid nitrogen에 동결시켰다. 동결된 조직은 Cryostat을 사용하여 8 μ m 두께로 자르고

gelatin-coated slide에 부착시켰다. 그 후 PBS, 0.3% H₂O₂, 0.4% Triton-X, 그리고 5% normal mouse serum 등으로 비특이 반응을 제거하고 슬라이드를 rat anti-mouse IgA와 반응한 후 biotin-labelled anti-rat Ig k chain와 2차로 반응시켰다. 슬라이드를 avidin-horseradish peroxidase와 반응 시킨 후 3'-diaminobenzidine 기질을 이용하여 발색시켰다. 이때 반응의 활성을 위해서 촉매제로 H₂O₂를 이용하였으며 대조 염색한 후 현미경으로 관찰하였다.

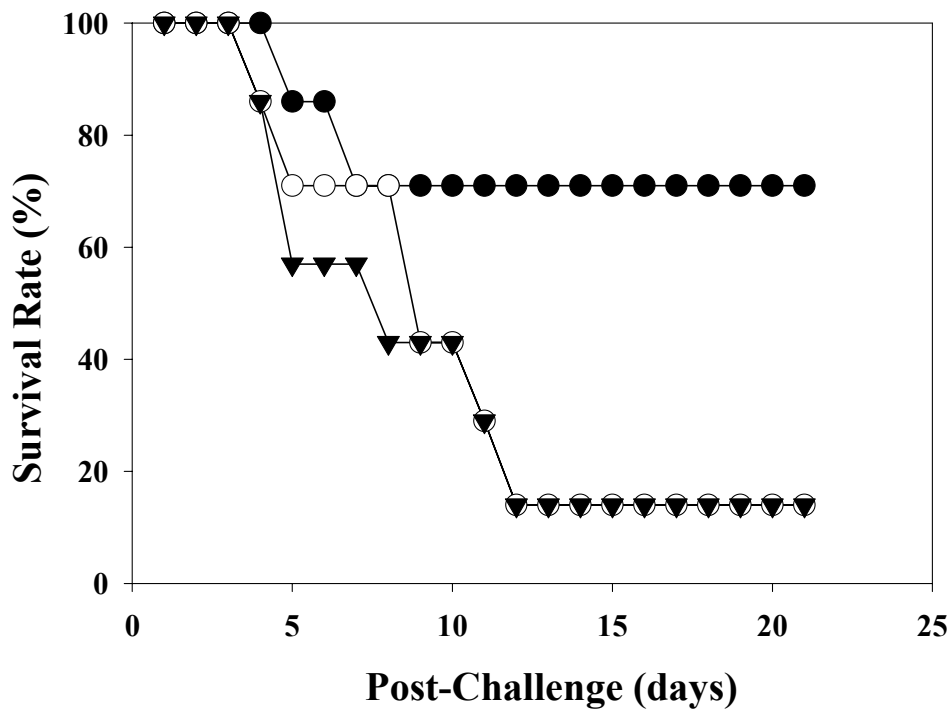
아. 통계학적 분석

각 그룹간 차이의 통계학적 유의차는 Student's *t* test을 이용하였다.

3. 결 과

가. 비피도박터 유산균의 살모넬라 감염에 대한 방어효과

Probiotics 가 설사성 질환을 예방하는 효과가 있음을 밝히기 위하여 본 연구에서는 *B. longum* 과 *L. casei* 두 종류의 유산균을 마우스에서의 살모넬라 감염 모델을 사용하여 시험하였다. ICR mice 는 각 유산균과 skim milk를 8일 동안 연속하여 투여하였다. 마지막 급이 1일 후 LD₁₀₀ 의 *S. enteritidis*를 경구 접종하고 생존률을 21일마다 기록하였다. 쥐들은 접종 후 4일째부터 아프거나 죽기 시작하였으며 7일째의 대조군, *L. casei* 급여군, *B. longum* 급여군의 생존률은 각각 55%, 71%, 71% 였다(Fig. 2-1). *L. casei* 급여군과 *B. longum* 급여군의 생존율의 차이는 8일 후부터 나타나기 시작하였는데, *L. casei* 급여군의 생존률은 40% 까지 급격히 감소한 반면 *B. longum* 급여군은 실험이 종료되는 21일까지 건강한 상태를 유지하였다. *L. casei* 급여군의 최종 생존율은 14% 였고, 이는 대조군의 생존율과 크게 다르지 않았다. 이 결과는 *B. longum* 은 *Salmonella* 감염에 대한 방어능을 가지고 있으나 *L. casei* 는 그렇지 않다는 것을 시사한다. 이 결과에 의해, 본 연구는 후에 특히 immunopotentiating activity 와 관련하여 특성 분석할 probiotics 로서 *B. longum*을 선별하였다.



* Fig. 2-1 *Salmonella enteritidis* 접종 후 유산균 급여군의 생존률 비교 시험. 검은 사각형은 비피도박터 급여군을 나타내며 검은 동그라미는 락토바시러스 급여군, 하얀 동그라미는 대조군을 나타낸다.

나. 비피도박터 유산균의 비장 T와 B 세포 활성화 효과

몇몇 유산균의 경구투여가 전신면역 반응을 활성화한다는 것은 지금까지 여러 연구에서 밝혀져 왔다. 따라서 본 연구에서는 *B. longum* 의 anti-*Salmonella* 효과가 면역시스템을 증강시킬 수 있는 가능성을 가지는지 그렇지 않은지를 밝혀내고자 노력하였다. 면역체계 중에서 우선 *B. longum* 이 비장의 T 또는 B lymphocyte 의 활성화에 영향을 미치는지를 체크하였다. 이를 위해, *B. longum*을 공급한 마우스의 비장세포를 각각 T 와 B lymphocyte mitogen 인 Con A 와 LPS를 농도별로 포함되어 있는 배지에 배양하고 각각의 mitogen-induced proliferation을 48시간, 72 시간 후에 평가하였다. 그 결과,

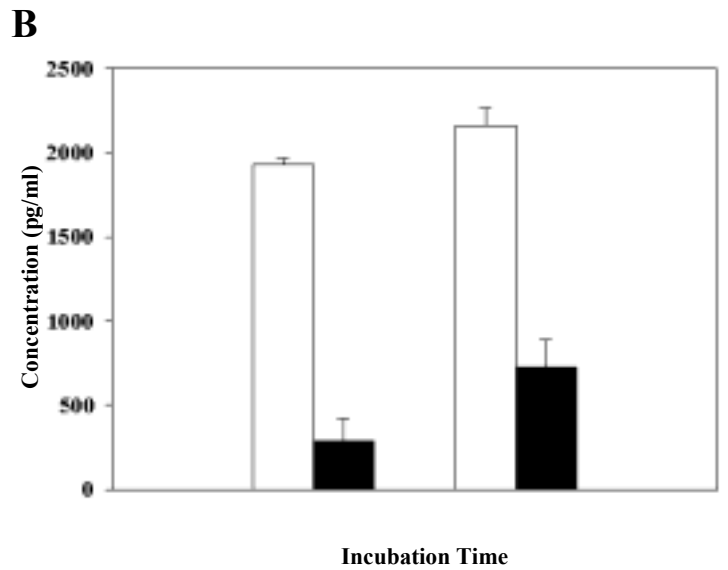
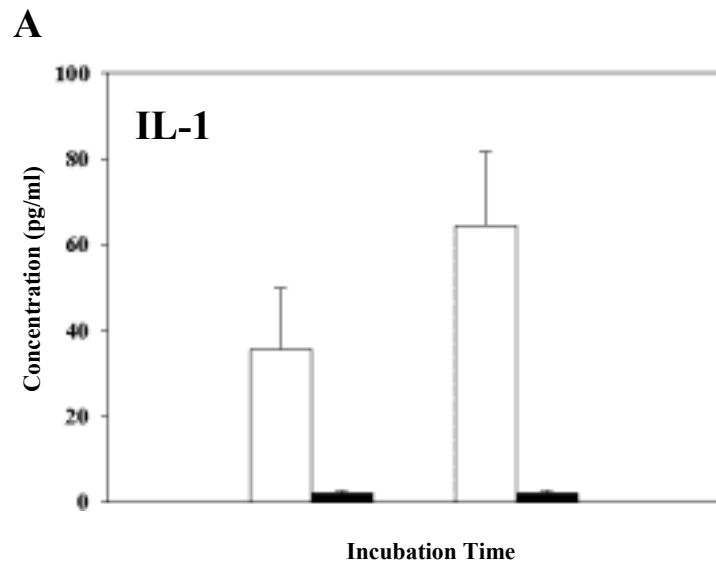
Table 2-1에서 보는 것과 같이, *B. longum* 급여균과 대조군 사이에서는 이렇다 할 특징적 차이가 나타나지 않았으며, 이는 적어도 이 투여방법을 통해서는 systemic T, B lymphocyte 의 activity에 변화를 야기하지 못한다는 것을 알 수 있었다.

Mitogens	Time	Splenocytes from the mice fed with	
		Skim milk	<i>B. longum</i> BL730
ConA	48	2.2 ± 0.10	2.0 ± 0.07
	72	2.0 ± 0.10	1.8 ± 0.10
LPS	48	1.0 ± 0.07	1.2 ± 0.08
	72	1.0 ± 0.20	1.1 ± 0.20

* Table 2-1. 대조군, *L. casei* 급여균, *B. longum* 급여균에서의 Splenocyte preparation 의 Lymphocyte mitogen response.

다. 비피도박터 유산균의 탐식세포 활성화 효과

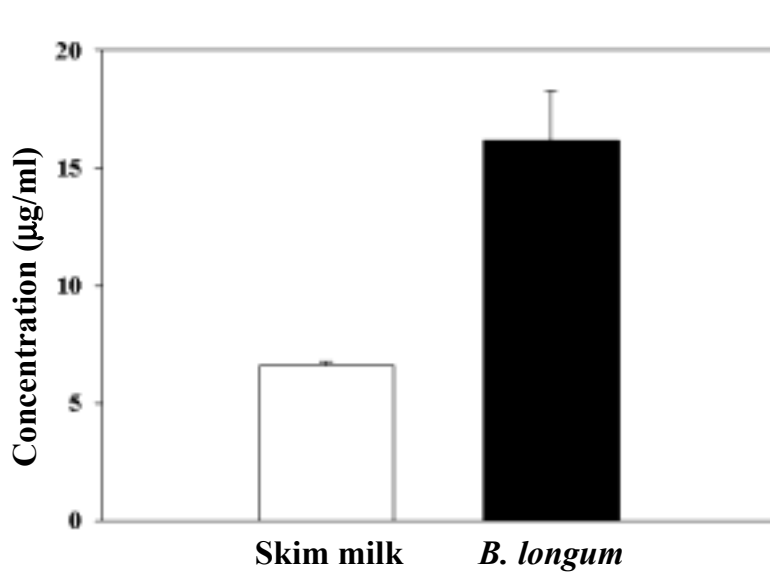
탐식세포는 미생물 감염에 대항하는 방어기작에서 중심적인 역할을 하며, 그 주된 역할 중 하나는 interleukin(IL)-1 과 Interleukin-6 등의 proinflammatory cytokine을 분비하여 감염 부위에서의 염증반응을 상승시키는 것이다. *B. longum*을 투여하는 치료가 탐식세포의 cytokine 분비에 영향을 미치는지를 알아보기 위하여, 본 연구에서는 thioglycolate를 사용하여 아무것도 처리하지 않은 PECs를 분리한 후 LPS 포함 또는 비포함 배지에 24시간, 72시간 동안 배양하고, 배양 상층액의 IL-1 와 IL-6 의 농도는 sandwich ELISA를 사용하여 측정하였다. Fig. 2-2는 *B. longum* 급여균의 쥐에서 추출한 macrophage 에서 LPS 의 첨가 여부와는 상관없이 cytokine 분비량의 증가를 보이지 않았음을 보여주었다. 흥미롭게도, *B. longum* 급여균의 cytokine level 은 오히려 대조군보다도 낮았다($P < 0.05$). 이 결과는, *B. longum* 의 투여에 따른 생존율의 증가는 탐식세포의 활성화에 의한 것이 아님을 시사한다.



* Fig. 2-2 *Bifidobacterium longum* 급여균(검은색) 과 대조군 (하얀색) 의 macrophage 에 의한 IL-1 (A) 과 IL-6 (B) 생산량. - 배양 상층액 의 cytokine 농도는 sandwich ELISA 로 측정하였다. Mean concentration \pm standard errors.

라. 비피도박터 유산균의 장내 분비형 IgA 증강 효과

기존의 연구는 몇몇 probiotics 의 경구투여는 gut-associated lymphoid tissue (GALT)를 자극함으로써 이로인 효과를 나타낸다는 것을 밝혔다. GALT 의 변성을 증가시키는 여러 변수들 중, 본 연구에서는 *B. longum* 이 장내에서 sIgA 의 농도를 증가시키는가를 연구하였다. Fig 2-3에서 보듯, *B. longum* 급여균에서의 sIgA 의 농도는 평균 15 μ g/ml 인 반면 대조군에서의 농도는 평균 6.5 μ g/ml 에 그쳐, *B. longum* 이 sIgA 의 생산을 2.5 배 정도 증가시킨다는 것을 알 수 있었다. 이 결과를 확증하기 위해, IgA를 생산하는 장내 plasma cell 의 총 수를 immunohistochemistry stain을 통하여 측정하였다. IgA+ cell 의 정확한 수를 세기는 어려웠으나, *B. longum* 급여균의 소장에서 대조군에 비해 훨씬 더 많은 양의 IgA-plasma cell 이 검출된 것은 뚜렷이 알 수 있었다. Hematoxylin 으로 대조염색 해 본 결과, 염색시의 양성반응은 비특이적인 반응 이 아님을 확증할 수 있었다.



* Fig. 2-3 소장에서의 sIgA 생산에 대한 *B. longum* 급여의 효과

BL730 급여균 (검은색) 과 대조균 (하얀색) 의 장액 중의 sIgA 농도는 sandwich ELISA를 사용하여 측정하였다. Mean values \pm Standard errors. (*P < 0.05)

4. 고찰

유산균이 건강상 이로운 효과들이 실험적, 임상적으로 밝혀지면서, 지금까지 유산균의 여러 세균주들이 보조식품, 유제품, 약물대용품 등으로써의 실용적 사용을 위하여 개발되어 왔으며 앞으로도 다양한 방면에서 더욱 효과적인 probiotics 의 개발을 위한 집중적인 노력이 계속되어야 할 것이다. Probiotics 의 개발 단계에서 최종적인 사용 목적을 고려하는 동안 실험하는 세균에 영향을 미칠 수 있는 요소를 검토할 수 있는 실험 환경이나 변수들을 지정해 놓아야 한다. 이러한 점에서, 본 연구에서는 *B. longum* 과 *L. casei* 두 종류의 유산균을 마우스에서의 *Salmonella* infection model을 사용하여 시험하였다. 두 종은 모두 현재 발효유제품의 일반적 구성 성분으로 가장 널리 알려져 있다. *Salmonella* 는 사람과 동물에서의 식중독과 설사 질환의 원인체로서, 다른 장내병원균과 같이 이것의 감염에 의한 장내 정상세균총의 파괴가 설사와 사망의 주 원인이 되는 것으로 알려져 있다. Probiotics 의 가장 긍정적인 효과는 장내 세균총의 균형을 안정화시키고 발달시키는 기능이기 때문에, salmonella 감염 모델은 생체실험에서 probiotics 의 효과를 측정할 수 있는 가장 좋은 실험모델 중에 하나라고 할 수 있다.

마우스에 *S. enteritidis* 치사량을 경구로 접종했을 때, 접종 후 21일까지의 생존율은 *L. casei* 급여군의 경우 14% 였던 반면 *B. longum* 급여군의 경우는 71% 였다. 이 결과는 *B. longum* 이 probiotics 로서의 특성을 가지고 있다는 것을 확연하게 입증하며, 본 연구로 하여금 salmonella 에 대한 방어능을 상승시키는 데 기여할 수 있는 면역기전을 연구하게끔 촉구하였다.

기존의 연구들은 몇몇 probiotics 들은 면역 자극 기능을 가진다고 밝혀 왔으나(Perdigon, 1995; Perdigon, 1998), 그 작용 방식이나 면역세포들은 probiotics 의 종류나 투여용량, 투여방법, 실험스케줄 등의 실험 환경에 의해 달라질 수 있다(Nagafuchi, 1999). 우선 본 연구에서는 *B. longum* 이 비장에서 lymphocyte activity를 증가시키는지를 실험하였다. 몇몇 probiotics 는 경구 투여시 전신면역에 영향을 미친다는 것이 mitogen 에 대한 비장 lymphocyte 의 증식 능력으로 증명된 바 있다(Heria et al., 1999;

Kirjavainen et al., 1999; Shimizu et al., 1981; Shu et al., 2000). 특히 B. lactin의 경구투여는 비장 lymphocyte 의 mitogenic response을 증가시켰다 (Shu et al., 2000). 보다 중요한 것은, 같은 논문에서 B. longum를 공급한 쥐가 salmonella 감염에 대한 저항성을 가졌다는 점이나, 본인의 실험에서는 B. longum 급여군과 skim milk 급여군 사이의 mitogen-induced proliferation response 에 이렇다 할 뚜렷한 차이는 없었다. 이 결과는 B. longum 의 경구투여가 salmonella 감염에 대한 방어능을 부여한다고 하더라도 그 근원적인 기전은 비장의 T cell 이나 B cell 보다는 그 외 다른 요인에 의존한다는 것을 시사한다.

방어기전에서 탐식세포가 중요한 역할을 한다는 것은 익히 알려져 있다. 활성화된 탐식세포는 다양한 cytokine 및 reactive oxygen radical을 분비하여 면역시스템을 증강시키고 직접적으로 세균을 죽인다. 몇몇 probiotics 는 macrophage 의 기능을 상승시킨다고 알려져 왔다. 예를 들어, 쥐에 L. casei를 복강투여한 경우, phosphatase의 분비, phagocytosis 등의 복강 macrophage 기능이 향상되었다(Kato et al., 1983). 몇몇 유산균의 cell-free extract 또한 macrophage cell line 의 enzyme production 이나 phagocytosis를 증강시킨다(Hatcher and Lambrecht, 1993). B. longum 의 경구투여가 복강 macrophage 의 기능을 상승시키는지를 측정하기 위하여, 본인은 LPS로 자극한 후의 IL-1 과 IL-6 등의 proinflammatory cytokine 생산을 분석하였다. Macrophage 의 phagocytosis, enzyme secretion, nitric oxide production 등의 기능과 더불어, cytokine 분비 또한 macrophage의 activation state를 나타내는 중요한 지표이다. 이 실험에서는 B. longum 급여군에서 cytokine level 의 상승을 관찰할 수 없었다. 오히려 B. longum 급여군의 cytokine level 은 대조군보다 낮았는데, 이는 적어도 IL-1 과 IL-6 은 salmonella 감염에 대한 방어기전에 포함되어 있지 않음을 의미한다.

많은 연구들이 sIgA level 과 감염에 대한 저항성에는 높은 상관관계가 있다고 밝혀 왔다(Bosch et al., 1988). 이 실험에서, 본 연구에서는 대조군에 비해 2.5 배 높은 sIgA level을 B. longum 급여군에서 관찰할 수 있었다. 이 결

과를 확증하기 위해, 본 연구에서는 장내의 IgA 분비세포를 detection 하기 위해 immunohistochemistry를 시행하였다. *B. longum* 급여군의 마우스 장내 lamina propria 에서는 IgA+ cell 의 수가 대조군에 비하여 확연히 크게 증가하였다. Immunohistochemistry의 결과와 더불어 ELISA 결과에서도 역시 *B. longum* 이 장내 IgA 가 증가하는 시기에 해당 부위의 국소면역을 상승시킨다는 것이 확연히 드러났다. 이 실험에서 관찰된 sIgA 가 접종한 세균에만 국한되어 특이적으로 작용하는 것이 아니기 때문에 sIgA 의 증가가 방어 효과를 증명한다는 것은 확실하지 않다는 점이 논쟁의 소지가 될 수는 있겠으나, sIgA 가 몇몇 장내병원균의 fimbriae 에 비특이적으로 부착하여 해당 균을 박멸한다는 점은 salmonella 감염을 방어하는 데 있어서의 sIgA 의 중요성을 제시한다 (Chen and Schifferli, 2000).

*B. longum*의 공급이 어떻게 장내 IgA 의 level을 상승시키는지 아직 추측의 단계에 머물러 있다. 면역기전뿐 아니라, PH, probiotics의 antimicrobial substances, 장내 병소의 경쟁적 방해 작용 등의 여러 요인들이 salmonella 감염에 대한 방어 작용에 포함된다(Cherrington et al., 1992; Bernet-Camard et al., 1997; Gopal et al., 2001)). 따라서, 이러한 요인들과 sIgA 의 증가가 어떠한 관련이 있는지를 밝혀내는 것은 *B. longum* 의 방어기능을 완전하게 특성규명을 하는 데 상당히 중요하다고 할 수 있다.

제 3 절 유산균을 이용한 돼지로타바이러스 VP8* 발현

1. 서 론

갓 태어난 돼지에서, 로타바이러스는 중요한 장내병원체들 중 하나로서, 설사증상을 보이는 돼지에서 빈번하게 확인된다. 로타바이러스는 50%의 치사율을 보이는 이유기 돼지 급성 설사의 일차적 원인에 포함되어 왔으며, 한국의 돼지 설사성 질병 중 24%는 로타바이러스 감염에 의한 것이라고 밝혀진 바 있다 (National Veterinary Research and Quarantine Service, 1998).

Reoviridae 과에 속하는 로타바이러스는 11개의 gene segment 로 구성된 double strand RNA 바이러스이고 외피가 없으며, 세 층의 protein capsid를 가지고 있다(Espejo et al., 1981, Estes et al., 1981). 제일 바깥쪽의 층은 VP7 과 VP4 의 두 가지 단백질로 구성되어 있는데, VP7 은 37kDa의 coat glycoprotein 이고 VP4 는 항체중화를 유도하는 역할을 하는 86kDa의 spike protein 이다. VP4 는 Trypsin 에 의해 두 fragment 로 절단되는데, N-terminal 쪽의 fragment 는 VP8* (28kDa) 이고 C-terminal 의 fragment 는 VP5* (60kDa) 이며 세포막 투과성이 있다(Ruggeri, R. M., 1991).

VP8* 은 5개의 epitope을 가지고 있고 VP5*는 3개의 epitope을 가지고 있음이 알려져 있으며(Mackow, E. R, 1988), 각각의 epitope 에 대한 monoclonal antibody 는 로타바이러스가 susceptible cell에 부착하는 것을 막는다고 입증되어 있다(Ruggeri, R. M., 1991). 이 데이터는 VP8*이 돼지 로타바이러스 감염에 대한 humoral immunity를 유도한다는 것을 확실하게 입증한다.

전신면역은 새끼돼지에서 돼지유행성설사바이러스(PEDV) 나 돼지전염성위장염바이러스(TGEV) 또는 새끼돼지의 장내 용모의 꼭대기 부분으로 침습하는 swine rotavirus 등에 대해서는 방어작용을 일으키지 못하기 때문에, 점막면역이 동물들에게 있어서 이러한 바이러스감염을 막는 데 중요한 역할을 한다. 이 바이러스들의 감염을 방지하기 위해서는 항원들은 장내로 직접적으로 운반되어

야 하지만, 만약 native antigen 과 바이러스가 장내로 직접 전달되면 면역원들은 면역반응의 유도가 불가능한 수준의 위 내 산성 환경에 의해서 파괴되어 버릴 것이다. 로타바이러스와 같은 장내병원체의 감염을 막기 위해서는, 새끼돼지에게 산성환경에 저항성을 가지는 항원으로 경구 백신투여를 해야 한다.

방어항원의 구강을 통한 성공적인 백신접종을 위해서는, protective gene 은 산에 저항성을 가진 *Lactococcus* 의 일부 gene의 leader sequence 와 조합해야 한다. 이를 위해서, 본인은 SPO2 leaky promoter 와 *Lactococcus lactis* 의 natural plasmid를 이용하여 shuttle vector pNZ123:SPO2를 구성했다. beta-galactosidase gene 을 *E.coli*에서 marker 로 발현시켰으나 기대치만큼 많이 발현되지는 않았다.

따라서 서울대학교의 지근억교수가 입증한 바 있는 다른 항산성 세균을 선택하여 사용하였다. 이 *Bifidobacteria* 는 동물의 장내 정상세균총의 하나로, enterobacteria 나 clostridia 등과 같은 장내 부패세균에 경쟁적으로 대항한다. *Bifidobacteria* 는 carbohydrate catabolism 에 의해 acetate 와 lactate를 생산하여 소장 내의 PH를 낮추어 결국 병원성 세균이 낮은 PH 에 의해 죽게 만든다. 또한 *Bifidobacteria* 는 면역반응을 자극하여 쥐에서 방어능을 높여 준다고 밝혀진 바 있다. 그러나 protective gene 이 *Bifidobacteria* 내에서 발현된다고 해도 이 세균은 무산소 배양을 해야 하기 때문에 경구용 백신으로서의 이용은 상당한 한계가 있다. 따라서 본 연구에서는 다른 전달시스템을 선택하여야 했다.

*Lactobacillus*는 정상세균총의 일부이며 특이적인 위장계 소화기의 점막 벽면에 자연적으로 존재한다. *Lactobacillus* 는 산소가 있는 환경에서도 잘 자라므로 항원과 함께 경구로 투여했을 때 보조 효과를 얻을 수 있다. 따라서 본인은 충남대학교의 김철중 교수로부터 *Lactobacillus* 와 shuttle vector를 얻었다. 돼지 로타바이러스의 VP8*을 발현시키기 위해서, VP8* 은 *Lactobacillus* 와 *Bifidobacteria* 모두에서 shuttle vector 에 삽입하여 증폭 및 클로닝하였으며, VP8* 의 발현을 확인하기 위해 rabbit anti-bovine rotavirus IgG를 사용하여 Western Blot을 실행하였다. VP8* 은 *E.coli* 내에서 *Bifidobacterium*

vector를 사용한 경우에는 발현되었으나 Lactobacillus vector를 사용했을 경우에는 발현되지 않았다. 그러나 VP8* 은 Lactobacillus 자체 내에서는 발현되지 않았고 Bifidobacterium 에서는 발현되었다.

2. 재료 및 방법

가. 세균 종류와 배양배지

pNZ123과 pBESAF2의 크로닝을 위해서는 대체로 *E. coli* XL1-blue를 사용하였다. *Bifidobacterium longum* MG1은 서울대학교의 지근익 교수로부터 제공받아 37°C의 무산소 환경에서 0.05%의 L-cystein을 포함한 MRS 배지로 배양하였다.

E. coli JM83 과 *Lactobacillus casei* BLS001(BLS, Japan)은 shuttle vector pAT:pgsA를 위한 형질전환 숙주세포로서 사용되었다. *E. coli*의 배양을 위해서는 Luria-Bertani medium을 사용하였으며 *L. casei*의 배양을 위해서는 MRS broth를 사용하였다. 배양 온도는 *E. coli*와 *L. casei*에 각각 37°C와 30°C를 적용하였다.

XL1-blue는 plasmid pBESAF2를 발현시켜 형질전환 시켰으며 ml당 100 마이크로그램의 ampicillin을 포함한 agar plate에서 선별하였다. JM83은 pAT:pgsA를 발현시켜 형질전환 시켰고 ml 당 300 마이크로그램의 erythromycin을 포함한 agar plate에서 선별하였다. *L. lactis*와 *B. longum*은 각각 ml당 16 마이크로그램의 erythromycin 과 ml당 3 마이크로그램의 chloramphenicol로 선별하였다.

나. plasmid와 DNA 조작

*L. lactis*의 vector, pNZ123은 NIZO Food Research로부터 구입했다. *B. longum*의 shuttle vector pBESAF2는 서울대 지근익 교수님으로부터 제공받았으며 *L. casei* pAT:pgsA는 충남대학교의 김철중 교수님으로부터 분양받았다.

DNA fragment는 Qiaquick gel extraction kit (Qiagen)를 사용하여 agarose gel로부터 추출하였고 절단, 분해, 접합 등의 과정은 기존의 방법에 따라 시행하였다.

Electroporation 에 의한 형질전환을 위해서, ligation sample 은 n-butanol 10 volume 과 혼합하여 14,000 rpm, 4'C에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 버린 후 pellet 에 70% ethanol 20 volume을 첨가하고 eppendorf tube를 다시 14,000 rpm, 4'C에서 15분간 원심 분리하였으며 pellet 은 건조시킨 후 증류수에 풀어주었다.

다. shuttle vector pNZ123:SPO2/beta-galactose의 제작

본 연구에서 사용한 promoter SPO2는 Williams 박사로부터 구입했다. Plasmid 는 *EcoRI*(Polisk, B., 1975)를 사용하여 절단하고 pNZ123 내로 삽입하여 크로닝했다. pNZ123:SPO2 에 마커 유전자인 beta-galactosidase 유전자를 조합하기 위해서는 pUC19의 beta-galactose 유전자를 PCR로 증폭했다. PCR primer 는 말단에 제한효소 *XhoI* 서열 (CTCGAG)을 포함하게끔 디자인 되었으며, Forward primer 는 5'-CTC GAG GCT GGC TTA ACT ATG-3' 으로, reverse primer 는 5'-CTC GAG AGC TAT GAC CAT GAT T-3' 으로 디자인했다(밑줄은 *XhoI*). PCR 산물은 pGEM-T easy vector 에 삽입하고 pGEM-T/beta-galactosidase라 명하였으며, 이후 이 construct를 제한효소 *XhoI*로 자르고, beta-galactosidase에 해당하는 단편을 agarose gel 상에서 잘라냈다. beta-galactosidase 의 DNA band 는 Qiaquick gel extraction kit를 이용하여 추출하였으며 pNZ123 내로 재크로닝했다.

라. *Lactobacillus* 와 *Bifidobacterium* 에서 발현할 셔틀벡터에 VP8*의 크로닝

돼지 로타바이러스는 수의과학검역원의 김병한 박사님으로부터 제공받아 본 연구실에서 석사학위를 한 김영인씨가 VP4 유전자의 일부분인 VP8* 유전자를 pGEM-T vector 안에 클로닝하여 본 실험실에 보관하고 있었던 것을 사용하였다(김영인 2000). 이후의 shuttle vector 클로닝을 위하여 vector 내의 VP8*을 PCR을 이용하여 증폭하여 놓았으며, forward primer 는 5'-GGA

TCC GCT TCA CTC ATT TAT AG-3' (밀줄은 *Bam*HI)로, reverse primer 는 5'-GGT ACC TCT TGT GTG TAC TA-3' 로 (밀줄은 *Kpn*I) 디자인하였고, PCR 산물들은 pAT;pgsA에 삽입하여 크로닝하였다.

VP8*을 pBESAF2에 삽입하기 위해서 reverse primer 는 5'-CTC GAG CGG CTC TTG TGT GTG TGT GCT ATC TC-3' 로 변형시켜 (밀줄은 *Xho*I) *Bam*HI를 대체하였고, forward primer 는 pAT;pgsA를 사용할 때와 동일하게 사용하였다. PCR 은 기존의 방법과 동일한 방법으로 시행하였으며 30 사이클을 반복하여 시행하였다. DNA 는 92°C에서 1분 동안 denaturation 시켰고 60°C에서 30초간 annealing 시킨 후, 72°C에서 1분동안 polymerization했다. PCR 산물은 pGEM-T Easy vector 에 크로닝했다. plasmid는 증폭한 후 숙주세균으로부터 추출하고 *Bam*HI, *Kpn*I, *Xho*I 등의 효소를 사용하여 절단했다.

Electroporation을 위해서, electroporator 는 electrode gap 이 2,0mm 인 electroporation cuvette을 사용하여 세팅했고, *E. coli* 는 25 μ F capacity, 2.5kV, 200 Ω 의 저항으로, *L. casei* 는 25 μ F capacity, 2kV, 200 Ω 의 저항으로, *B. longum* 은 25 μ F capacity, 12kV, 200 Ω 의 저항으로 각각 single pulse 를 주었다.

마. 전기영동과 Western Blot

*B. longum*과 *L. casei* 안에 shuttle vector를 삽입하여 형질전환 시킨 후 chloranphenicol과 erythromycin이 포함된 MRS 배지에 배양하였다. 세균이 log phase 의 마지막 단계에 이르기까지 자랐을 때 1500Xg 에 10분간 원심분리하였다.

SDS-PAGE 와 Western Blot 은 기존의 방법으로 시행하였다. 즉, resolving gel 은 0.1% SDS(sodium dodecyl sulfate)를 포함한 0.75 M Tris hydrochloride buffer (PH 8.8) 에 0.1% bisacrylamide 와 10% acrylamide 를 cross-link 시켜서 만들었다. gel 은 0.0375% 의 ammonium persulfate와 0.375% 의 N,N,N',N'-tetramethylethlenediamine을 사용하여 polymerize 했

다. Stacking gel 은 3.2% acrylamide, 0.2% bisacrylamide, 그리고 0.1% SDS를 포함한 0.125 M 의 Tris-Cl (PH 6.1)로 구성되었으며, 샘플은 같은 볼륨의 loading buffer (0.03 M Tris-Cl, PH 6.1, 2% SDS, 10% glycerol, 0.005% bromphenol blue, 1.25% beta-mercaptoethanol) 과 혼합하여 95℃ 에 5분간 열처리한 후 loading하였다. Prestained molecular marker을 gel 에 첨가하고, 전기영동은 running buffer (0.025 M Tris, PH 8.3, 0.192 M glycine, 0.1% SDS) 에 100V, 1시간 동안 시행하였다.

전기영동 후에, 단백질은 100V에서 1시간의 전기적 처리를 통하여 nitrocellulose membrane (0.45 μ m: BioRad) 로 옮겼다. Blotting buffer 는 0.02M Tris base, 0.150 M glycine, 20% methanol로 구성되었으며 PH는 8.3 이었다. 단백질을 옮긴 이후에 nitrocellulose membrane 은 PBS 로 씻어내고 3% skim milk PBS 에 37℃에서 30분 동안 blocking 했다. Nitrocellulose 는 그 후 1:1,000 으로 희석된 rabbit anti-rotavirus antisera를 포함한 PBST (0.05% Tween 20 in PBS)에서 하룻밤동안 보관한 후 PBST 로 3회 씻어내고 1:1,000 으로 희석된, alkaline phosphate를 붙인 goat anti-rabbit IgGs 로 염색하였다.

발색반응은 10ml의 Alkaline phosphate solution에서 66 μ l NTB (nitroblue tetrazolium) 기질과 33 μ l 의 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) 기질을 첨가하여 확인하였다.

3. 결 과

가. shuttle vector pNZ123:SPO2:beta-galactosidase 의 제작

pNZ123:SPO2 vector 의 제작을 위해서, promoter SPO2를 구입하여 pNZ123 에 붙였다. 삽입 시작점은 제한효소에 의하여 잘려 0.3kbp 크기의 SPO2 와 2.8kbp 의 pNZ123 밴드로 떼다. pNZ123:SPO2:beta-galactosidase 를 만들기 위해서, beta-galactosidase을 증폭한 후 pGEM-T 에 삽입하고 XhoI로 절단하였다. 잘려진 fragment 는 beta-galactosidase 에 상응하는 0.35kbp 위치에 떼고 이로써 beta-galactosidase 가 pNZ123:SPO2 안에 삽입되었음을 알 수 있다.

나. XL1-Blue 에서의 beta-galactosidase 의 발현

pNZ123:SPO2:beta-galactosidase 유전자는 XL1-blue를 삽입하여 형질전환되고 형질전환된 세균은 2% X-Gal 이 포함된 LB agar plate에서 배양하였다. 배양 4일 후에 파란색의 콜로니들이 보였으며, 이는 promoter 가 제대로 활성화되었음을 나타낸다.

다. shuttle vector pBESAF2/VP8* 의 제작

VP8* 은 PCR 로 증폭되고 pBESAF2(pBESAF2/VP8*) 에 삽입되어 크로닝하였고, 삽입 시작점을 만들기 위해 *Bam*HI 로 절단한 결과 각각 VP8*, pBESAF2 에 해당하는 0.7kbp, 8.2 kbp 의 밴드가 나타났다(Fig. 3-1).

라. *E. coli* 와 *Bifidobacteria* 에서 VP8* 의 발현

VP8* 이 *E. coli* 안에서 발현 되었는가를 알아보기 위해서 Western blot 분석을 SDS-PAGE 와 병행하여 실행하였다. 그림 2에서 보여지는 것처럼, VP8* 에 해당하는 28kDa의 밴드가 나타났다. *B. longum*에서 VP8*를 발현시키기 위해서, pBESAF2/VP8*를 electroporation을 사용하여 전기영동 하였으

나 VP8* 은 nitrocellulose 에서는 보이지 않았다. VP8* 발현의 효율성을 알아보기 위해, plasmid를 VP8* 특이적 primer를 사용하여 *Bifidobacterium* 안에서 PCR 하였다. 그 결과 PCR 산물은 gel 상에서 전혀 보이지 않았으며, 이는 plasmid 가 *Bifidobacteria* 로부터 제거kick out 되었음을 의미한다.

마. shuttle vector pAT:pgsA/VP8* 의 제작

위에 서술한 방법대로 VP8*을 발현시키기 위하여 노력했음에도 불구하고 이와 같은 시도들은 *L. lactis* 와 *B. longum* 에서는 성공하지 못했다. 따라서, VP8* 의 발현을 위하여 다른 shuttle vector pAT:pgsA를 사용하기로 결정했다.

pAT:pgsA에 VP8*을 삽입하기 위하여, VP8*을 forward primer 와 reverse primer를 사용하여 pGEM-T/VP8* 로부터 증폭하였다. 이 primer 은 각각 VP8* 의 5' 말단과 3' 말단에 있는 BamHI 와 KpnI 제한효소 절단부위에 붙게끔 디자인되었다. agarose gel 에 PCR을 영동한 후 PCR 산물을 gel 로부터 잘라내고 추출하였다. 정제된 PCR 산물은 pGEM-Y Easy vector 에 클로닝하였으며, VP8*을 shuttle vecot 에 삽입하여 재클로닝 하기 위하여 pAT:pgsA를 BamHI 와 KpnI 로 절단하고 VP8*을 삽입하여 ligation 했다. 형질전환은 적절한 세포 내에서 시행하였으며 그 후 선별 과정을 거쳐 conventional mini-prep 에 의해 plasmid를 추출하였다. 삽입을 위하여 plasmid 는 BamHI 와 KpnI 로 절단하고 agarose gel에서 영동하였다. gel 상에서 두 band 가 떴으며, 한 fragment 는 VP8* 에 해당하는 0.75kbp 위치에 떴고 다른 fragment 는 pAT:pgsA 에 해당하는 7.7kbp 위치에 떴다. 다음번의 삽입시작점 확인을 위해, 제작된 pAT:pgsA/VP8* 은 ABI PRISM 3700 DNA Analyzer을 사용하여 염기서열을 분석하였다.

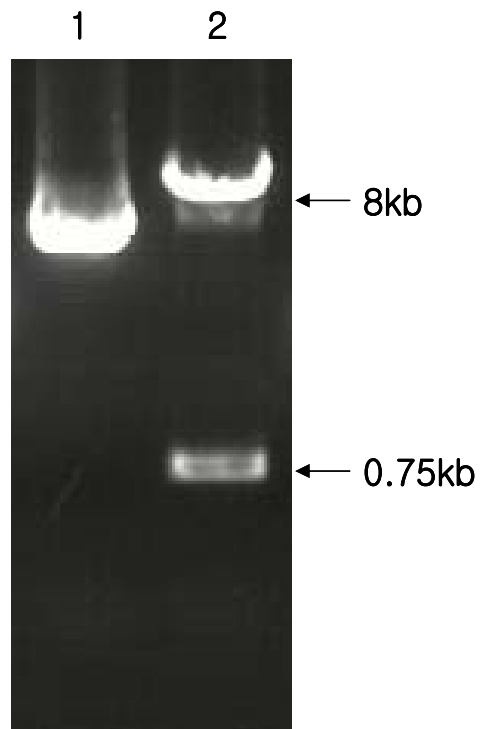
바. *E. coli* 와 *Lactobacillus casei* 에서 VP8* 의 발현

pAT:pgsA/VP8* 은 JM83 안에서 증폭된 후 mini-prep 에 의해 추출하였

다. plasmid 는 전기영동하였으며, Qiaquick gel extraction kit 으로 추출하였다. 정제된 plasmid 는 electroporation을 사용하여 적절한 *E. coli* 와 *L. casei* BLS001 에 삽입하였다. *L. casei* 와 pAT:pgsA/VP8 의 삽입은 PCR 에 의해 입증하였다. (Fig. 3-3)

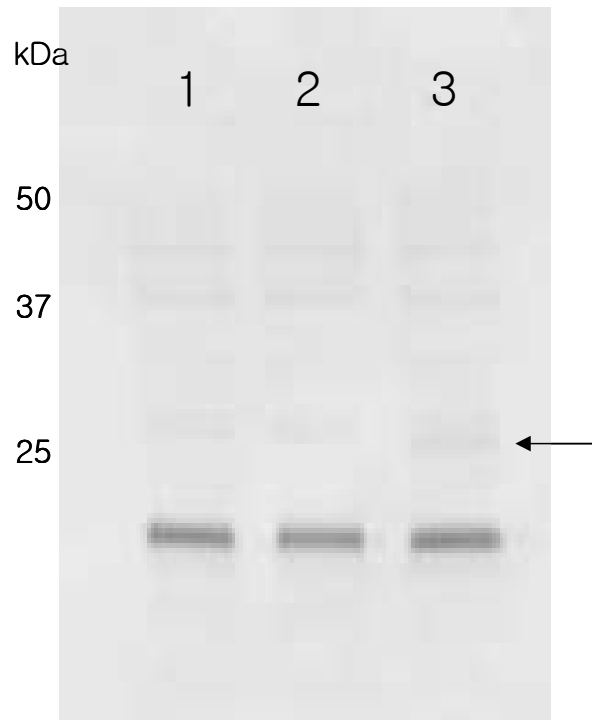
E. coli 와 *L. casei* 에서의 VP8* 의 발현을 입증하기 위하여, VP8*을 포함한 *E.coli* 와 *L. casei* 는 배양된 후 원심분리에 의해 침전시키고 pellet 은 sample buffer로 처리하고 boiling 하였다. 샘플은 SDS-PAGE 에 loading 하고 nitrocellular paper에서 Western Blot 하였으며, Rabbit anti-rotavirus antisera를 nitrocellulose 에 loading 하고 순서적으로 발색제를 결합시킨 anti-rabbit IgGs를 결합시켜 발생반응을 일으켰다.

Fig 3-4에서 보는 것처럼, 예상했던 fusion protein 의 molecular weight (42.6kDa pgsA + 28kDa VP8*)와 비교되는 70kDa 가량의 fusion protein 가 나타났다. 앞으로의 VP8* 발현 확인을 위해 단백질을 nitrocellulose 로 옮기고 conjugated anti-mouse IgG 와 결합된 pgsA monoclonal antibody 와 반응시켰다. 그림 4에서 보여지는 것과 같이, 같은 molecular weight 의 밴드가 70kDa 의 위치에 떴으며, *E. coli* 에서는 70kDa 의 위치에 아무런 밴드도 뜨지 않았다.



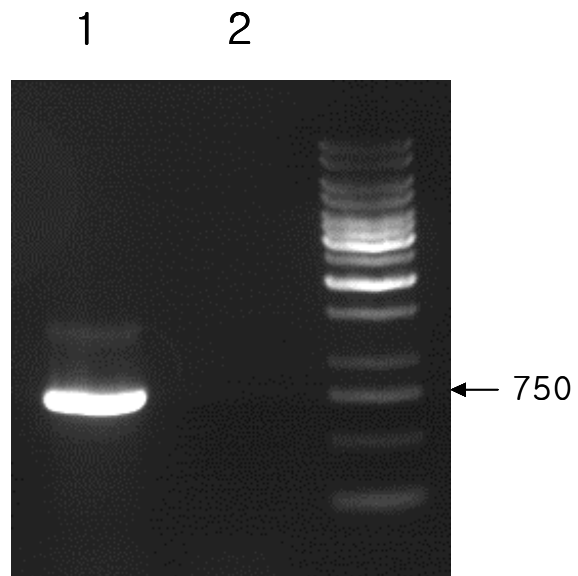
* Fig. 3-1 *

*Bam*HI 와 *Xho*I 로 절단한 pBESAF2/VP8* 의 전기영동. lane 1 은 절단하지 않은 pBESAF2/VP8* gene이고, lane2는 *Bam*HI 과 *Xho*I으로 절단된 DNA를 나타낸다. VP8* 은 0.75 kb의 화살표로 표시되어있다.



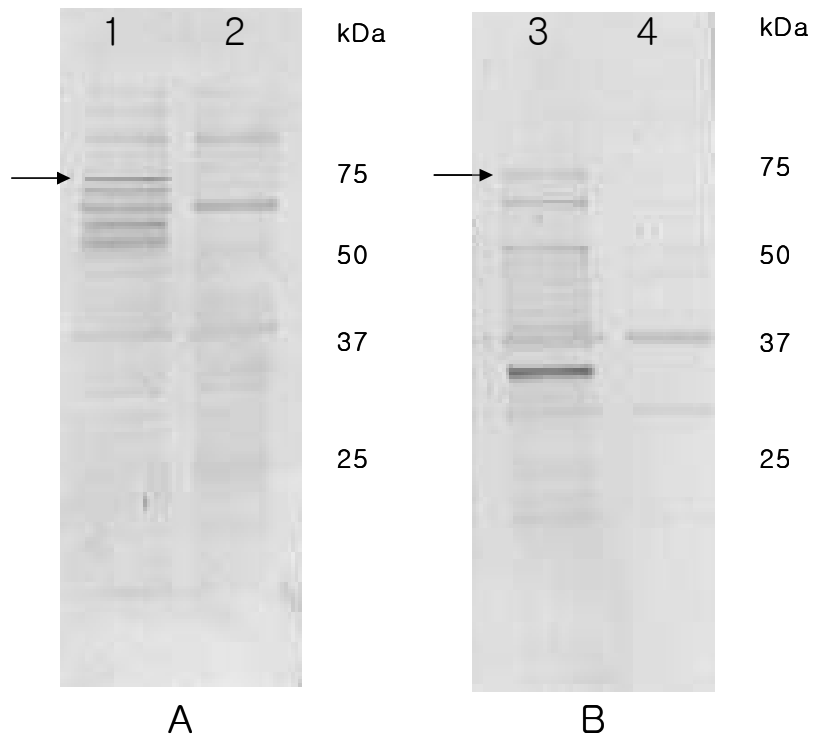
* Fig 3-2 *

XL1-blue lysates 에서의 pBESAF2/VP8* 의 Western blot analysis. Lane 1과 2는 아무것도 포함하지 않은 XL1-blue lysate 와 VP8* gene을 제외한 pBESAF2만을 포함한 lysate 이며, 대략 28kDa 크기의 밴드가 lane 3에서 보인다.



* Fig 3-3 *

pAT:pgsA/VP8*을 포함한 *L. casei*(lane 1) 와 아무것도 포함하지 않은 *L. casei* (lane 2) 의 PCR 산물을 agarose gel에서 전기영동한 것. Primer 는 *E. coli* 에 pGEM-T Easy vector를 삽입하여 VP8*을 증폭했을 때와 동일한 것을 사용하였다.



* Fig 3-4 *

pgsA:VP8* 의 Western blot analysis. 샘플들은 SDS-PAGE 상에서 전기영동하고 nitrocellulose에서 Western blot 하였다. paper는 rabbit anti-rotavirus antisera (A) 와 반응시키고, conjugated commercial 2nd antibody 와 결합된 monoclonal antibody anti-pgsA IgG 로 처리하였다. Lane 1과 lane 3 은 형질전환된 *L. casei* BLS 001 lysate 이고 lane 2와 4는 아무 처리도 하지 않은 *L. casei* BLS 001 lysate 이다.

4. 고 찰

대부분의 병원성 미생물들은 점막 표면에서 감염사이클을 시작한다. 로타바이러스 역시 소장 점막으로 침입한다. 점막 감염의 효과적인 방어는 감염부위 표면에서의 국소면역반응 시작에 의해 유도된다. 점막 백신접종은 IgA의 분비를 촉진한다고 알려져 왔으나, 항원이 경구를 통하여 침입한 경우 위내의 산성 환경으로 인하여 면역유도 효과는 현저하게 떨어진다.

생균운반체(Live bacterial vehicle)로서의 젓산균은 지난 10년간 다양한 실험에 의해 개량되어 왔다. 이러한 지식들에 기초하여, 본 연구에서는 VP8*을 세 종류의 세균 *Lactococcus lactis*, *B. longum*, *Lactobacillus casei*에서 발현시키려는 시도를 하였다. 본 연구에서는 *L. lactis*에 삽입할 shuttle vector를 제작하고 beta-galactosidase를 marker gene으로 발현시켰다. 그러나 *E. coli*에서는 발현속도도 너무 느리고 발현 수준도 너무 낮아서, 항원전달시스템으로서의 사용은 그다지 효율적이지 못한 것으로 밝혀졌다.

두 번째로 *B. longum*에서도 VP8*을 발현시켜 보았다. shuttle vector는 *E. coli*에서는 VP8* protein을 생산하였으나 *B. longum*에서는 생산하지 않았다. *B. longum*에서 VP8*이 발현되지 않는 메커니즘을 이해하기 위하여, 계대한 *B. longum*을 PCR하였다. VP8*은 2~3 계대 후에는 증폭되지 않았으며, 이는 VP8*을 포함하는 shuttle vector가 계대가 진행됨에 따라 *B. longum*안으로부터 튕겨져 나온다는 것을 의미한다. 이 결과는 *L. lactis*와 *B. longum*은 본인의 목적인 VP8*의 발현에는 적합하지 않음을 시사한다.

세 번째 live-vectored vaccine으로 사용한 것은 *Lactobacillus casei*였다. 이 시스템은 충남대학교 김철중 교수님의 연구소에서 돼지 전염성 설사에 대한 방어항원 유전자를 생산해 내기 위해서 시도되어 왔으며, 사료에 혼합해서 투여할 수 있을 정도로 상업적으로도 이용 가능하도록 제품화되었다. 이 논문에서 *L. casei*는 VP8*을 생산함이 입증되었다. 그러나 본 연구는 *L. casei*안의 VP8*이 점막면역 반응을 유도할 수 있는지에 관해서는 연구하지 못했다. VP8*을 산출해내는 *Lactobacillus*를 이용한 면역유도에 관한 연구는 가까운 시일 내에 시행될 것이다.

로타바이러스 백신을 위한 *Lactobacillus* 의 이용은 다음 세 가지 조건을 모두 충족시킨다. 첫째, 효과적인 장내 유산균을 이용한 바이러스 백신은 충분한 양의 장내 IgA 항체 생산을 유도해야 한다. 둘째, 중화항체 생산을 유도할 수 있는 바이러스 항원을 포함해야 하며, 셋째, 효과적인 점막면역에 대한 면역보강제로서의 역할과 항원전달시스템으로 사용할 수 있어야 한다.

Lactobacillus delivery vaccine 은 소장에서 probiotics 로써 머무를 수 있고, GRAS statue(Generally Recognized As Safe) 에 의해 안전한 미생물로 여겨져 왔다. 로타바이러스의 VP8* 부분은 중화 epitope을 가지고 있다고 알려져 온 반면, *Lactobacillus casei* 는 효과적인 보조기능을 가진다고 밝혀져 왔다. 따라서 실용적인 사용을 위해서는 *L. casei* 의 성장곡선, VP8* 의 발현수준, 최적 투여시기, *lactobacillus* 배양의 단계, *Lactobacillus* 균주 등의 연구가 진행되고 있다. 이러한 문제들이 해결되고 나면, *Lactobacillus* 는 로타바이러스 감염 등의 장내 질환 예방을 위한 좋은 delivery vaccine 으로 제시될 가능성이 높다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

현재까지의 연구결과를 보아 국내 모든 양돈 농장이 돼지 증식성 회장염과 돼지로타바이러스에 노출되어 있는 것으로 판단되며 이에 대한 백신의 개발은 매우 시급한 문제가 아닐 수 없다. 특히 돼지 증식성 회장염에 대한 원인체의 국내주 분리와 백신의 개발은 국내 양돈장에 최소한 개체당 30,000원의 경제적 이익을 가져올 수 있을 것이며 이와 더불어 지금까지 많은 구강백신의 vector 들이 개발되고 사용되어 왔으나 이보다 더 나은 vector로서 유산균을 사용하는 연구는 앞으로의 다른 질병에 대한 백신 개발에도 다양하게 적용될 수 있을 것이며 백신의 효능에도 많은 발전을 가져올 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1) 학문적인 측면

국내에서 뿐만 아니라 외국에서도 돼지 증식성 회장염의 연구가 활발히 진행되지 못하고 있는 실정이다. 이는 원인체인 *Lawsonia intracellularis*의 배양이 매우 까다롭기 때문인데 본 연구 결과 돼지 증식성 회장염균을 배양하는 기술을 완벽하게 보유함으로써 앞으로 계속되어 지는 연구는 선진국에 뒤지지 않는 학문적인 성과를 가져올 수 있는 가능성을 충분히 내포하고 있다.

2) 기술적인 측면

유산균을 사용하여 edible vaccine을 제조하는 기술은 차후에 백신을 생산하는 기업에 기술을 이전하여 전국적으로 효과적인 백신의 혜택을 받을 수 있도록 할 것이며 이러한 기술은 앞으로 개발될 백신에 있어서 새로운 방향을 제시할 수 있을 것이다. 또 계속적으로 효과적인 백신의 개발에 다방면으로 적용되어 백신 산업의 다각화를 가져올 것이 예상된다. 유산균을 백신으로 사용하는 기술은 지금까지의 유산균의 활용범위를 확장시켜 여러 가지로 유산균을 적용해 보려는 노력들이 진행되어 새로운 기술이 개발될 소지를 갖고 있다.

3) 경제, 산업적인 측면

백신 산업에 있어 유산균을 사용한 백신의 개발은 그 생산비의 절감과 단기간의 다량의 백신 생산을 가능하게 하여 경제적으로 많은 이윤을 추구할 수 있게 될 것이며 이는 여러 다른 백신에도 적용될 수 있어 그 경제적, 산업적 유용성은 매우 높을 것이라 예상된다. 또 효과적인 백신의 전국적인 보급에 의해 양돈 농가에서의 설사병에 의한 보이지 않는 경제적 손실이 줄어들어 국내 양돈 농가에도 많은 경제적 보탬이 될 수 있을 것이다. 나아가 계속되는 외국 농

산물의 수입에서 질 좋은 국산 돈육을 공급할 수 있는 계기가 될 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구를 수행함에 있어서 돼지증식성회장염균의 최초 분리 성공 연구진의 Steve McOrist 박사의 연구 협력을 지원받을 수 있었으며, 2003년도 약독화 돼지 회장염 백신 개발에 성공하고 가장 왕성한 회장염 연구를 수행하고 있는 미국 미네소타 대학의 회장염 연구진의 연구 자문 및 상호 협력 기반을 마련하였다. 이로써 돼지증식성회장염 연구 분야의 가장 권위있는 연구진들과 학문적 교류가 가능해졌으며, 보다 앞선 연구 수행과 해외기술정보 확보에 필요한 다양한 커뮤니케이션 채널을 구축하게 되었다. 본 연구개발과정을 통해 돼지증식성회장염 연구 분야에서 우리나라 연구기술을 세계적인 연구진들에 견줄만한 것으로 발전시킬 초석마련에 성공하였다고 판단하며, 이를 기반으로 앞으로 더욱 향상된 기술력 축적이 가능할 것으로 예상된다.

제 7 장 참고문헌

Alderton, M.R., Borland, R., Coloe, P.J., 1992. Experimental reproduction of porcine proliferative enteritis. *J. Comp. Pathol.* 106, 159-167.

Anon 2002 Highlights of NAHMS Swine 2000: Part II. www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cahm/Swine2000/Swine2Highlights.pdf. Fort Collins, United States Department of Agriculture: Animal and Plant Health inspection Service. Accessed June 18, 2003

Bernet-Camard, M.F., Lievin, V., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L. and Hudault, S. 1997 The human *Lactobacillus acidophilus* Strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active *in vitro* and *in vivo*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2747-2753.

Bezirtzoglou, E. & Romond, C. 1990. Effect of the feeding practices on the establishment of bacterial interactions in the intestine of the new born delivered by caesarean section. *J. Perinat. Med.*, 18, 139-143.

Boersma, W.J.A., Zegers, N.D., Van Den Boerdt, A., Leer, R. J., Bergmans, A., Puowels, P. H., Posno, M. and Claassen, E. Development of safe oral vaccines based on *Lactobacillus* as a vector with adjuvant activity. *Proc. ICHM 2nd. Internatl. Conger. Biotech UK, Brighton*, p43-46.

Black, R.E. 1993 Epidemiology of diarrhoeal disease: implications for control by vaccines. *Vaccine* 11: 100-106.

Bosch, A., Benedi, V.J., Pares, R. and Jofre, J. 1988 Enhancement of the humoral immune response and resistance to bacterial infection in mice by the oral administration of a bacterial immunomodulator (OM-89). *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 10: 333-343 .

Buts, J.P. 1999 Mechanisms of action of biotherapeutic agents, pp. 27-46.
In: *Biotherapeutic Agents and*

Edwards, B.H. 1999 *Salmonella* and *Shigella* species. *Clin. Lab. Med.* 19:
469-487

Casewell, M., Friis, C., Macro, E., McMullin, P., Phillips, I., 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52, 159-161.

Chen, H. and Schifferli, D.M. 2000 Mucosal and systemic immune responses to chimeric fimbriae expressed by *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine strains. *Infect. Immun.* 68: 3129-3139.

Cherrington, C.A., Allen, V. and Hinton, M. 1992 The influence of temperature and organic matter on the bactericidal activity of short-chain organic acids on salmonellas. *J. Appl. Bacteriol.* 72: 500-503.

Claasse, E., Puowels, P.H., Posno, M. and Boersma, W.J.A. 1994. Development of safe oral vaccines based on *Lactobacillus* s a vector. In: Kurstak, E. (Ed), *Recombinant Vaccines: New Vaccinology*. Ont. Comp. Virology Org. Montreal, in press.

Collins A., Love, R.J., Pozo, J., Smith, S.H., McOrist, S., 2000. Studies on the ex vivo survival of *Lawsonia intracellularis*. *Swine Health and Production*. 8, 211–215.

Cooper, D.M., Swanson, D.L., Barns, S.M., Gebhart, C.J., 1997. Comparison of the 16s ribosomal DNA sequences from the intracellular agents of proliferative enteritis in a hamster, deer, and ostrich with the sequence of a porcine isolate of *Lawsonia intracellularis*. *International Journal of Systemic Bacteriology*. 47, 635–639.

Cooper, D.M., Swanson, D.L., Gebhart, C.J., 1997. Diagnosis of proliferative enteritis in frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from a hamster, horse, deer and ostrich using a *Lawsonia intracellularis*-specific multiplex PCR assay. *Vet. Microbiol.* 54, 47–62.

Cooper, D.M., Gebhart, C.J., 1998. Comparative aspects of proliferative enteritis. *JAVMA*, 9, 1446–1454.

Elder, R.O., Duhamel, G.E., Mathiesen, M.R., Erickson, E.D., Gebhart, C.J., Oberst, R.D., 1997. Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, and salmonellae in porcine intestinal specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 281–286.

Elmer, G.W., McFarland, L.V. and Surawicz, C.M. (eds.). Human Press, New Jersey, USA.

Espejo, R. T., Lopez, S., and Arias, C. 1981. Structural polypeptides of

simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. J. Virol. 37:156-60.

Estes, M. K., D. Y. Graham, C. P. Gerba, and E. M. Smith. 1979. Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures. J. Virol. 31:810-15.

Estes, M. K., Graham, D. Y. and Mason, B. B. 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infection:molecular mechanism. J. Virol. 39:879-88.

Gibson, G.R. and Fuller, R. 2000 Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. J. Nutr. 130 (2S Suppl.): 391S-395S.

Gonzalez, S.N., Cardozo, R., Apella, M.C. and Oliver, G. 1994 Biotherapeutic role of fermented milk. Biotherapy. 8: 129-134.

Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J. and Gill, H.S. 2001 *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. Int. J. Food. Microbiol. 67: 207-216.

Grewal, H.M.S., Karlsen, T.H., Vetvik, H., Aaren, C., Gjessing, H.K., Sommerfelt, H. and Haneberg, B. 2000 Measurement of specific IgA in faecal extracts and intestinal lavage fluid for monitoring of mucosal immune responses. J. Immunol. Methods 239: 53-62.

Guedes, R.M.C, Gebhart, C.J., Winkleman, N.L., Mackie-Nuss, R.A., 2002. A comparative study of an indirect immunofluorescent test and the

immunoperoxidase monolayer assay for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 420-423.

Guedes, R.M.C, Gebhart, C.J., Winkleman, N.L., Mackie-Nuss, R., Marsteller, T.A., Deen, J., 2002. Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Can. J. Vet. Res.* 66, 99-107.

Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., Deen, J., Winkleman, N.L., 2002. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay as a serologic test for porcine proliferative enteropathy. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 528-530.

Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., 2003. Comparison of intestinal mucosa homogenate and pure culture of the homologous *Lawsonia intracellularis* isolate in reproducing proliferative enteropathy in swine. *Vet. Microbiol.* 2534, 1-8.

Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., 2003. Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune response in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. *Vet. Microbiol.* 91, 135-145.

Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., 2003. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. 15, 438-446.

Guedes, R.M.C, Gebhart, C.J., Winkleman, N.L., 2003. Relationship between the severity of porcine proliferative enteropathy and the

infectious dose of *Lawsonia intracellularis*. *Vet. Rec.* 153, 432-433.

Harold, F. Stills, JR., 1991. Isolation of an intracellular bacterium from hamsters (*Mesocricetus auratus*) with proliferative ileitis and reproduction of the disease with a pure culture. *Infection and Immunity.* 59, 3227-3236.

Hatcher, G.E. and Lambrecht, R.S. 1993 Augmentation of macrophage phagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid-producing bacteria. *J. Dairy Sci.* 76: 2485-2492.

Herias, M.V., Hesse, C., Telemo, E., Midtvedt, T., Hanson, L.A. and Wold, A.E. 1999 Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats. *Clin. Exp. Immunol.* 116: 283-290.

Ibrahim, S. A. & Bezkorovainy, A. (1993), Inhibition of *Escherichia coli* by Bifidobacteria. *J. Food Prot.*, 56, 713-715.

Isolauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T., Sillanauke, P. and Koivula, T. 1991 A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 88: 90-97.

Jasni, S., McOrist, S., Lawson, G.H.K., 1994. Reproduction of proliferative enteritis in hamsters with pure culture of porcine ileal symbiont intracellularis. *Vet. Microbiol.* 41, 1-9.

Jensen, T.K., Moller, K., Lindecrona, R., Jorsal, S.E., 2000. Detection of *Lawsonia intracellularis* in the tonsils of pigs with proliferative

enteropathy. Research in Veterinary Science. 68, 23-26.

Jones L.A., Nibbelink, S., Glock, R.D., 1997. Induction of gross and microscopic lesions of porcine proliferative enteritis by *Lawsonia intracellularis*. Am. J. Vet. Res. 58, 1125-1131.

Jones, G.F., Ward, G.E., Murtaugh, M.P., Lin, G., Gebhart, C.J., 1993. Enhanced detection of the intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 31, 2611-2615.

Jones, G.F. Ward, G.E., Collins, J.E., Genhart, C.J., 1993. Transmission of proliferative enteritis to swine by use of embryonating chicken eggs. Am. J. Vet. Res. 54, 1256-1261.

Joens, G.F., Ward, G.E., Murtaugh, M.P., Rose, R., Gebhart, C.J., 1993. Relationship between ileal symbiont intracellularis and porcine proliferative enteritis. Infection and Immunity. 61, 5237-5244.

Jones, G.F., Davies, P.R., Rose, R. Ward, G.E., Murtaugh, M.P., 1993. Comparison of techniques for diagnosis of proliferative enteritis of swine. Am. J. Vet. Res. 54, 1980-1985.

Katellaris, P.H., Salam, I. and Farthing, M.J. 1995 *Lactobacilli* to prevent traveler's diarrhea? N. Engl. J. Med. 333: 1360-1361.

Kato, I., Yokokura, T. and Mutai, M. 1983 Macrophage activation by *Lactobacillus casei* in mice. Microbiol. Immunol. 27: 611-618.

Kim, J., Choi, C., Cho, W.S., Chae, C., 2000. Immunohistochemistry and polymerase chain reaction for the detection of *Lawsonia intracellularis* in porcine intestinal tissues with proliferative enteropathy. *J. Vet. Med. Sci.* 62(7), 771-773.

김영인 2000 Molecular and immunological study of VP8, N-terminal trypsin cleavage product of porcine rotavirus VP4. 건국대학교 석사학위논문

Kirjavainen, P.V., El-Nezami, H.S., Salminen, S.J., Ahokas, J.T. and Wright, P.F. 1999 The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 26: 131-135.

Klein, E.C., Gebhart, C.J., Duhamel, G.E., 1999. Fetal outbreaks of proliferative enteritis caused by *Lawsonia intracellularis* in young colony-raised rhesus macaques. *J Med Primatol.* 28, 11-18.

Knittel, J.P., Jordan, D.M., Schwartz, K.J., Janke, B.H., Roof, M.B., McOrist, S., Harris, D.L., 1998. Evaluation of antemortem polymerase chain reaction and serologic methods for detection of *Lawsonia intracellularis*-exposed pigs. *Am. J. Vet. Res.* 59, 722-726.

Knittel, J.P., Roof, M., Swartz, K.J., Jordan, D.M., Harris, D.L., McOrist, S., 1997. Diagnosis of porcine proliferative enteritis. *American Journal of Veterinary Research* v59, no.6, 722-726.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.

Lawson, G.H.K., McOrist, S., 1993. The enigma of the proliferative enteropathies: a review. *J. Comp. Path.* 108, 41-46.

Lawson, G.H.K., McOrist, S., Jasni, S., Mackie, R.A., 1993. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance in vitro. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1136-1142.

Lawson, G.H.K., Gebhart, C.J., 2000. Proliferative enteropathy: review. *J. Comp. Pathol.* 122, 77-100.

Lee, J., Ametani, A., Enomoto, A., Sato, Y., Motoshima, H. Ike, F. & Kaminogawa, S. 1993, Screening for the immunopotentiating activity of food microorganisms and enhancement of the immune response by *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57:2127-2132.

Lee, S.W., Kim, T.J., Park, S.Y., Song, C.S., Chang, H.K., Yeh, J.K., Park, H.Y., Lee, J.B., 2001. Prevalence of porcine proliferative enteropathy and its control with tylosin in Korea. *J. Vet. Sci.* 2(3), 209-212.

Lee, W.C., Lee, M.J., Kim, J.S. and Park, S.Y. 2001 Foodborne illness outbreaks in Korea and Japan studied retrospectively. *J. Food. Prot.* 64: 899-902.

Lomax, L.G., Glock, R.D., 1982. Naturally occurring porcine proliferative

enteritis: Pathologic and bacteriologic findings. 1982, 43, 1608-1614.

Lomax, L.G., Glock, R.D., Hogan, J.B., 1982. Experimentally induced porcine proliferative enteritis in specific-pathogen-free pigs. *Am. J. Vet. Res.* 43, 1615-1621.

Lomax, L.G., Glock, R.D., Harris, D.L., Hogan, J.B., 1982. Porcine proliferative enteritis: experimentally induced disease in cesarean-derived colostrum-deprived pigs. *Am. J. Vet. Res.* 43, 1622-1630.

MacIntyre, N., Smith, D.G.E., Shaw, D.J., Thompson, J.R., Rhind, S.M., 2003. Immunopathogenesis of experimentally induced proliferative enteropathy in pigs. *Vet Pathol.* 40, 421-432.

Mackow, E. R., Shaw, R. D., Matsui, S. M., Vo, P. T., Dang, M. N., and Greenberg, H. B. 1988. The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3 : location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *proc. Natl. Acad. Sci. UAS* 85, 645-49.

Mapother, M.E., Joens, L.A., Clock, R.D., 1987. Experimental reproduction of porcine proliferative enteritis. *Vet. Rec.* 121, 533-536.

McOrist, S., Lawson, G.H.K., 1987. Possible relationship of proloferative enteritis in pigs and hamsters. *Vet Microbiol.* 15, 293-302.

McOrist, S., Boid, R., Lawson, G.H.K., McConell, I., 1987. Monoclonal

antibodies to intracellular Campylobacter-like organisms of porcine proliferative enteropathies. *Vet. Rec.* 121, 421-422.

McOrist, S., Lawson, G.H.K., 1989. Reproduction of proliferative enteritis in gnotobiotic pigs. *Research in Veterinary Science*, 46, 27-33.

McOrist, S., Lawson, G.H.K., Rowland, A.C., MacIntyre, N., 1989. Early lesions of proliferative enteritis in pigs and hamsters. *Vet. Pathol.* 26, 260-264.

McOrist, S., Jasni, S., Mackie, R.A., MacIntyre, N., Neef, N., Lawson, G.H.K., 1993. Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure culture of ileal symbiont intracellularis. *Infect. Immune.* 61, 4286-4292.

McOrist, S., Gebhart, C.J., Lawson, G.H.K., 1994. Polymerase chain reaction for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Vet. Microbiol.* 41, 205-212.

McOrist, S., Mackie, R.A., Neef, N., Aitken, I., Lawson, G.H.K., 1994. Synergism of ileal symbiont intracellularis and gut bacteria in the reproduction of porcine proliferative enteropathy. *Vet. Rec.* 134, 331-332.

McOrist, S., Mackie, R.A., Lawson, G.H.K., 1995. Antimicrobial susceptibility of ileal symbiont intracellularis isolated from pigs with proliferative enteropathy. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1314-1317.

McOrist, S., Jasni, S., Mackie, R.A., 1995. Entry of the bacterium ileal symbiont intracellularis into cultured enterocytes and its subsequent

release. *Research in Veterinary Science*. 59, 255-260.

McOrist, S., Gebhart, C.J., Boid, R., Barns, S.M., 1995. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov, sp nov, the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 520-525.

McOrist, S., Reoberts, L., Jasni, S., Rowland, A.C., Lawson, G.H.K., Gebhart, C.J., Bosworth, B., 1996. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenetic mechanism. *J. Comp. Path.* 115, 35-45.

McOrist, S. Mackie, R.A., Lawson, G.H.K., Smith, D.G.E., 1997. In-vitro interactions of *Lawsonia intracellularis* with cultured enterocytes. *Vet. Microbiol.* 54, 385-392.

McOrist, S., Gebhart, C.J., 1999. Porcine proliferative enteropathies. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.), *Disease of Swine*, 8th ed. Iowa State University Press, Ames, pp. 521-534.

Medaglini, D., Maggi, S., Maggi, T., et al. 1997. Recombinant Gram-positive bacteria as vehicles vaccine antigens. *Biotechnol Ann Rev* 3:297-312.

Media, E., Guzman, C.A. 2001. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery : potential and limitations. *Vaccine* 19:1573-80.

Nagafuchi, S., Takahashi, T., Yajima, T., Kuwata, T., Hirayama, K. and Itoh,

K. 1999 Strain dependency of the immunopotentiating activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 474-479.

Norton, P., M., Le Page RWF, Wells J., M. 1995. Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery. Folia Microbiol 40:225-30.

Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G. and Gobbato, N. 1995 Immune system stimulation by probiotics. J. Dairy Sci. 78: 597-606.

Perdigon, G., Vintini, E., Alvarez, S., Medina, M. and Medici, M. 1992 Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 82: 1108-1114.

Polisky, B., Greene, P., Garfin D.E., 1975. Specificity of substrate recognition by the EcoRI restriction endonuclease. Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 72(9):3310-3314.

Pouwels, P. H., Leer, R. J., Shaw M, et al. 1998. Lactic acid bacteria as antigen delivery for oral immunization purposes. Int J Food Microbiol 41:155-67.

Roberts, L., Rowland, A.C., Lawson, G.H.K., 1977. Experimental reproduction of porcine intestinal adenomatosis and necrotic enteritis. Vet. Rec. 100, 12-13.

Ruggeri, R. M., and Greenberg, H. B. 1991. Antibody to the trypsin

cleavage to peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cell in culture. J. Virol. 65, 2211-19.

Saavedra, J. M., Bauman, N. A., Oung, I., Perman, J. A. & Yolken, R. H. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. Lancet, 344:1046-1049.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Shimizu, T., Mifuchi, I. and Yokokura, T. 1981 Mitogenic effect of lactobacilli on murine lymphocytes. Chem. Pharm. Bull. 29: 3731-3734 .

Shu, Q., Lin, H., Rutherford, K.J., Fenwick, S.G., Prasad, J., Gopal, P.K. and Gill, H.S. 2000 Dietary *Bifidobacterium lactis* (HN019) enhances resistance to oral *Salmonella typhimurium* infection in mice. Microbiol. Immunol. 44: 213-222.

Smith, S.H., McOrist, S., 1997. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by pigs. Vet. Sci. 62, 6-10.

Smith, D.G.E., Mitchell, S.C., Nash, T., Rhind, S., 2000. Gamma interferon influences intestinal epithelial hyperplasia caused by *Lawsonia intracellularis* infection in mice. Infect. Immun. 68, 6737-6743.

Smith, D.G.E., Lawson, G.H.K., 2001. *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. *Vet. Microbiol.* 82, 331-345.

Suh, D.K., Lym, S.K., Bae, Y.C., Lee, K.W., Choi, W.P., Song, J.C., 2000. Detection of *Lawsonia intracellularis* in diagnostic specimens by one-step PCR. 1, 33-37.

Suh, D.K., Choi, W.P., Song, J.C., 2000. Duplex PCR for simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis* and *Salmonella* in swine. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* 24, 27-34.

Suh, D.K., Choi, W.P., Song, J.C., 2001. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* and *Salmonella* spp. on selected swine farms in Kyongpook province by duplex PCR. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* 25, 179-184.

Svanbord, C., Godaly, G. and Hedlund, M. 1999 Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:99-105.

Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Poyart-Salmeron, C., and Courvalin P. 1991. Shuttle vector containing a multiple cloning site and a *lacZ* alpha gene for conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to gram-positive bacteria. *Gene.* 102(1):99-104.

Williams D.M., Duvall E.J., Lovett P.S., 1981, Cloning Restriction fragments that promote expression of a gene in *Bacillus subtilis*. *J.*

Bacteriol. 146(3):1162-1165.

Wilson, T.M., Chang, K., Gebhart, C.J., Kurtz, T.R., Drake, T.R., Linter, V., 1986. Porcine Proliferative Enteritis: Serological, microbiological and pathological studies from three field epizootics. *Can. J. Vet. Res.* 50, 217-220.

Yashi, K. & Ohwaki, M. 1991, Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*. *J. Dairy Sci.*, 74:1187-1195.

Yuan, L., Saif, L. J., 2002. Induction of mucosal immune responses and protection against enteric viruses: rotavirus infection of gnotobiotic pigs as a model. *Vet. Immuno Immunopatho* 87:147-160.