

최 중
보 고 서

고면역 난황항체를 이용한 가축전염병의
효율적 방제에 관한 연구

Studies on efficient prevention of animal
diseases using egg yolk antibodies

연구기관
국립수의과학검역원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “고면역 난황항체를 이용한 가축 전염병의 효율적 방제에 관한 연구” 과제 (제1세부과제: 돼지 세균성 복합호흡기질병 치료, 예방용 난황면역제 개발, 제2세부과제: 돼지 복합소화기질병 치료, 예방용 난황면역제 개발, 제3세부과제: 개 주요 소화기, 호흡기질병 치료, 예방용 난황면역제 개발)의 최종 보고서로 제출합니다.

2001년 11월 일

주관연구기관 : 국립수의과학검역원

총괄연구책임자 : 김 종 만

세부연구책임자 : 이 희 수

협동연구기관 : 서울대학교

협동연구책임자 : 유 한 상

참 여 기 업 : (주)녹십자수의약품, (주)대성미생물연구소

요 약 문

I. 제 목

고면역 난황항체를 이용한 가축전염병의 효율적 방제에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구에서는 축산업의 생산성 향상 및 가축질병의 효율적인 방제를 위하여 고역가의 단, 복합난황항체를 생산하여 돼지 및 개의 주요 소화기, 호흡기질병을 효과적으로 치료, 예방할 수 있는 기법을 개발하는데 있다.

이러한 목적을 달성하기 위한 세부목표로 “돼지 복합 호흡기질병 치료, 예방용 난황면역제”, “돼지 복합소화기 질병 치료, 예방용 난황면역제”, 및 “개 주요 소화기, 호흡기질병 치료, 예방용 난황면역제”를 개발하여 축산현장에 적용함으로써 경제적 피해를 감소시키는데 있다.

가축 전염병에 의한 피해는 축산총생산의 20%를 점할 정도로 막대하며, 이중에서도 돼지 질병은 종류도 많고 사육규모도 대규모, 집단화하여 피해가 가장 많이 일어나고 있다. 이중에서도 위축성비염, 파스튜렐라페염 등의 호흡기질병과 대장균설사증, 로타바이러스 설사증 등의 소화기질병이 대표적인 생산성저하질병으로 알려져 있다. 개의 질병 또한 양견장은 물론 애완견에서 파보바이러스 설사증, 기관지폐렴, 디스토프라 등이 빈발하여 집단폐사하는 예가 빈발하고 있다.

이러한 동물들의 질병예방을 위하여 일부 백신이 사용되고 있으나 지금까지 세계적으로 호흡기와 소화기 즉 점막면역계에 완벽한 면역능을 유발하는 백신이 없어 이들 질병에 만족스러운 예방효과를 나타내는 경우가 적

었다. 질병치료 측면에서도 바이러스성질병은 항균제로 치료가 불가능하며, 세균성질병도 약제의 오남용으로 양측장별로 감수성이 다르고 빈번한 내성균 발생으로 치료가 어려워 적절한 질병관리 대책이 없는 어려운 상황에 직면해 있다.

최근 국내외적으로 여러 가지 항원물질을 닭에 면역시킨 후 얻어지는 난황항체를 이용하여 질병을 치료, 예방하는 새로운 기술이 개발되고 있으며, 특히 미국, 캐나다, 독일, 일본 등에서 일부 세균, 바이러스에 대한 난황항체를 실험적으로 생산하여 질병치료, 예방효과가 있음을 보고한 바 있으며, 국내에서는 연구자 등이 돼지 대장균설사증에 대한 난황항체를 개발하여 우수한 치료, 예방효과가 있음을 보고한 바 있다. 이러한 기법은 기존의 백신접종에 따른 불확실한 점막면역능 부여와 부작용 문제를 해결할 수 있을 뿐아니라 항생제 남용에 따른 내성균 출현과 이에 따른 치료의 어려움을 해소할 수 있을 것으로 기대된다.

그러나 대부분의 병원체는 축종별로 특이성이 있어 필요한 난황항체를 생산하기 위하여는 닭에대한 면역원성이 확인되어야 하며, 항체의 활용성을 높이기 위해서는 난황으로부터 항체를 효율적으로 순수추출하여야 한다. 또한 이들을 효과적으로 이용하기 위하여는 여러종류의 질병에 대한 복합난황항체 생산 및 질병특성에 맞는 투여방법을 선별하여야 하는 등 기술상의 해결하여야 할 문제들이 많이 있다.

따라서 본 연구에서는 돼지 및 개의 주요 병원체들의 닭에 대한 면역원성, 난황항체의 안전하고 효율적인 추출법, 목적동물에서의 질병 치료, 예방효과를 확인코자 하였다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구과제의 목적을 달성하기 위하여 3소과제로 나누어 수행하였으며, 세부과제별 연구내용 및 범위는 다음과 같다.

먼저 세부과제 “세균성 복합호흡기질병 치료, 예방용 난황면역제 개발 연구”에서는 돼지호흡기질병 발생상황을 조사하기 위하여 야외 가검물로부터 원인균을 분리, 동정하고 생화학적 특성 및 유전자 검출기법을 시험하고, 닭 접종용 백신생산을 위하여 주요 호흡기병원체인 위축성비염균 (*Bordetella bronchiseptica*) 및 파스튜렐라균(*Pasteurella multocida*, 4D)의 균체와 DNT toxoid 항원, 파스튜렐라 폐렴균(*Pasteurella multocida*, 3A)의 균체 및 OMP (outer membrane protein) 항원, 홍막폐렴균 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, 2, 5)의 균체 및 OMP항원의 정제 및 분석기법 시험하고자 하였으며, 면역능을 증진시키기 위하여 adjuvant별 백신을 생산하여 면역원성을 시험하고, 백신접종후 주기별로 산란계의 혈중 및 난황중의 항체가를 조사하였다. 또한 실험동물(마우스)에 대한 난황항체의 치료, 예방효과를 조사하였으며 목적동물에서 투여방법별 치료, 예방효과를 조사하였다.

세부과제 “세균성 복합소화기질병 치료, 예방용 난황면역제 개발 연구”에서는 배양조건별 병원성대장균의 주요 항원(pilus) 생성능을 비교시험하여 최적배양조건을 알아보고자 하였으며, 닭 접종용 백신생산을 위하여 주요 소화기병원체인 병원성대장균(*E. coli*/k88, k99, 987p pilus, LT)항원, 장독혈증균(*Clostridium perfringens* type C/ α , β toxoid) 항원 및 로타바이러스(*Rotavirus* serotype 10, 175) 항원의 정제 및 분석기법을 확립하고 면역능을 증진시키기 위하여 adjuvant별 백신을 생산하여 백신접종후 주기별로 산란계의 혈중 및 난황중의 항체가 조사하였다. 난황항체의 효능을 조사하기 위하여 실험동물(마우스)에 대한 난황항체의 치료, 예방효과시험 수행하였으며 최종적으로 개발한 난황면역제의 목적동물에서 투여 방법별 치료, 예방효과를 조사하였다.

세부과제 “개 주요 소화기, 호흡기질병 치료, 예방용 난황면역제 개발 연구”에서는 개 기관지폐렴 원인균의 분리, 동정기법을 확립하고 닭 백신 접종용 백신생산을 위하여 기관지폐렴(*Bordetella bronchiseptica*)의 균체

및 DNT항원, 파보바이러스(*Parvovirus*) 및 디스토펙파바이러스(*Distemper virus*)항원의 생산 및 분석기법을 확립하고자 하였으며, 면역능을 증진시키기 위하여 adjuvant별로 백신을 생산하여 백신접종후 주기별로 산란계의 혈중 및 난황중의 항체가 조사하였다. 또한 난황항체의 실험동물(마우스)에 대한 치료, 예방효과를 조사하고, 목적동물에서 투여 방법별 치료, 예방효과를 조사하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용방안

난황항체 생산을 위해 주요 돼지 세균성 호흡기 질병인 위축성 비염, 파스튜렐라성 폐렴 및 홍막폐렴의 주요 원인체들에서 유용 항원의 생성 여부를 PCR, SDS-PAGE, Western blot, 마우스에서의 toxicity test 등의 방법으로 분석, 확인하였고, 이들 항원을 이용하여 대상 질병에 따라서 항원, adjuvant 및 항원 단독 또는 복합 투여의 방법을 이용하여 시험백신을 제조하여 접종후 ELISA 법을 이용하여 난황 및 혈청내의 면역반응을 분석한 바, 난황에서의 항체가는 첫접종 2주후부터 상승하기 시작하여 6-8주 사이에 최고치를 나타내었고, 이 항체가는 약 12주 까지 지속되었다. 본 연구에 사용한 adjuvant 중에서는 ISA75 가 우수하였으며, 난황항체의 특이성을 Western blot 기법을 이용하여 증명하였다. 위축성비염 원인균인 *B. bronchispetica* 와 *P. multocida* 4D 에서는 33, 40, 43, 67 및 141 kDa 의 항원이 주요 항원이었고, *P. multocida* 3A 는 40 및 110kDa 가 *A. pleuropneumoniae* serotype 2 및 5 에서는 40 및 47 kDa 가 주요 항원으로 나타났다. 난황항체의 예방 및 치료효과는 실험동물 (마우스) 및 목적동물 (돼지)에 대하여 실시한바 난황항체의 투여군이 비투여군에서보다 건강상태, 임상증상 발현상태, 생존율등에서 우수하였고 특히 돼지에서는 난황항체 투여후 공격접종에서도 우수한 방어효과를 나타내었다. 야외 농장에서 호흡기 증상을 나타내는 개체들을 선별하여 치료제로 사용하였던바 우수한

치료 효과를 나타내었다.

자돈의 주요 설사병 원인체인 병원성대장균증, 장독혈증 및 로타바이러스에 대한 효과적인 치료 및 예방을 위한 난황항체개발 시험에서 다양한 종류의 adjuvant에 대한 난황항체 형성능 비교시험결과 ISA70은 닭에서 빠른 항체가 상승과 고역가의 항체를 장기간 유지하는 데 효과적인 것으로 나타내었으며, 난황중 항체가는 닭 혈중에 비해 항원종류에 따라 1~4주 늦게 나타내는 것으로 나타내었다. 난황중 항체가 수준은 대장균 항원의 경우 ELISA 흡광도 2.0이상을 8주이상 유지하였고 장독혈증균 특소이드는 1.5이상의 수준을 4주이상 유지하였으며, 로타바이러스의 경우 바이러스 중화역가 8.0이상의 비교적 높은 수준을 7주이상 유지하였다.

실험동물에 대한 난황항체의 질병 예방 및 치료 효과시험에서 Fimbriae type K88 및 K99 균주의 복강에 의한 공격접종 24시간 후 난황항체투여 결과 무투약 대조군의 마우스는 24시간이내 100% 폐사하였으나 난황항체투여군은 대장균 K88에 대하여 85.0%, 대장균 k99 대해서는 95.0%의 높은 방어효과를 나타내었다. 난황항체의 마우스에 대한 *Cl. perfringens type C* 특신의 중화효과시험에서 닭 혈중항체역가는 3,200에서 320까지 100% 마우스 생존율을 나타내었으며, 난황항체는 농도 100mg~50mg/ml의 경우 100%의 마우스생존율을 확인할 수 있었다.

목적동물에서의 난황항체의 질병방제효과시험을 위하여 이유자돈(체중 20kg내외) 20두를 대장균과 장독혈증균 및 대장균과 로타바이러스를 각각 혼합공격접종하여 설사증상을 유발시킨 후 난황항체 대장균+장독혈증혼합액(항체역가 대장균 4종 1:6400~1:12,800, *Cl. perfringens* 1:3200) 및 난황항체 대장균+로타바이러스혼합액(항체역가 대장균 4종 1:6400~1:12,800, 로타바이러스 1:128)을 각각 3일간 투여한 전시험군에서는 임상 증상이 관찰되지 않아 치료효과를 확인할 수 있었으며, 시험기간인 7일간의 평균증체량의 경우는 난황항체 투여군인 그룹 A 및 그룹 B에서 대조군인 그룹 C 및 그룹 D에 비해 각각 1.0~2.0Kg, 0.4~0.9Kg씩 더 증체된 것

으로 나타내었다. 또한, 난황항체의 투여경로에 따른 효과시험에서는 경구 투여가 근육 및 복강투여시 보다 효율적인 것으로 나타내었다. 한편으로 공격접종으로 임상증상이 계속 발현된 대조군의 2두에 대하여 난황항체를 3일간 경구투여시 정상상태로의 회복되는 치료효과를 확인할 수 있었다. 야외 자돈에 대한 질병 치료효과시험에서는 8개 양돈장의 대장균증 등에 의한 설사발생 자돈 598두를 대상으로한 시험에서 582두에서 회복되어 97.3%의 높은 치료효율을 나타내었다. 이상의 시험결과에서 개발된 난황면역제는 소화기 질병의 대부분을 이루고 있는 대장균, 클로스트리듐 및 로타바이러스 등에 의한 단독 및 복합감염에 대하여 난황면역제의 단독 또는 적절한 혼합 및 선택적인 사용으로 설사발생 등 자돈 소화기질병에 의한 피해를 감소시키는 데 크게 기여할 것으로 판단되었다.

개 기관지 폐염균, 파보바이러스 및 개 디스토펙퍼바이러스 항원에 대한 닭에서의 면역반응 조사결과 adjuvant로 ISA70을 사용할 시 이들 항원에 대한 높은 항체가 상승을 유도할 수 있었으며, 기관지 폐염균의 경우 닭 혈중응집 항체가는 1,280~10,240를, 난황중항체가는 160~1,280의 수준으로 가장 높게 나타내었으며, 파보바이러스는 ISA25로 초기면역시킨 후 ISA70을 사용한 경우에서 항체형성 및 지속기간이 우수하게 나타내어 혈중 바이러스 중화항체가 80~320, 난황중항체가는 64~256를 각각 나타내었다. 한편으로 개 디스토펙퍼의 경우는 닭에서의 항체형성능은 개 기관지폐염균이나 파보바이러스에 비해 상대적으로 낮게 나타내었으며, ISA70을 사용 시 닭 혈중 평균항체 및 난황항체가는 각각 8~64의 바이러스 중화역가를 나타내었다.

개 기관지폐염균 난황항체의 실험동물인 마우스에 대한 질병예방효과시험에서 항체역가 640~2,560를 근육접종시 100%의 생존율을 나타내어 경구접종의 40~50%보다 높은 질병예방효과를 나타내었다. 마우스에 대한 질병 치료효과시험을 위하여 기관지 폐염균 공격접종 6시간 후 난황항체(응집역가 1,280)를 투여한 결과 근육 및 복강투여의 경우 83.3%의 생존율을 나타

내어 경구투여에 의한 66.7%보다 높은 방어효과를 나타내었다.

시험용 난황면역제인 개 기관지폐염균 및 파보바이러스 혼합 난황항체분말을 제조하여 목적 동물인 개에 대한 임상시험에서 혈변성설사 등 임상증상으로 파보바이러스감염이 의심되는 환축에 난황면역제를 투여한 결과 근육 및 피하투여시 각각 81.6% 및 86.7%의 높은 치료율을 나타내었으며, 개 기관지폐염에 대한 임상시험에서도 경구보다는 근육투여에서 치료효율이 높게 나타내었다.

개기관지폐염균 및 개파보바이러스 혼합 난황면역제 건조분말에 대한 목적동물인 개에 대한 안전성시험에서 권장 투여량의 2배의 양을 경구, 피하 및 근육으로 7일간 접종한 결과 과민반응이나 구토, 부종 또는 열발생 등의 이상증상이 전혀 관찰되지 않아 안전성이 확인되었다.

따라서 본 연구에서 개발된 난황면역제는 기 특허를 획득한 대장균 등의 경우는 참여기업 등에 기술이전하여 산업화하여 활용하고, 개 파보바이러스 등에 대해서는 특허출원과 동시에 산업화를 추진하고자 한다.

SUMMARY

Although several attempts such as vaccines and use of antibiotics have been made to control infectious diseases in animal industry, there are still problematic in the industry, especially alimentary and respiratory diseases. During the last decade, passive immunization with antibodies originated from mammals has been considered as an alternative measure to control infectious diseases.

However, the method also had some problems in the cost and productivity. Recently, the utilization of immunoglobulin (IgY) from chicken eggs has been focused in immunotherapy and immunodiagnosis since bird can actively transfer IgG to their offspring, egg yolk, with at least the same content as like seen in mammals. Also, the use of chicken antibody for the production in large scale has several advantages in comparison with mammalian antibodies such as animal welfare, low production coast and physicochemical characteristics resulted from phylogenetical difference between avian and mammalian species. Efficacy of IgY has been proven in several applications in animal as well as humanbeings. Based on those knowledge, this project was carried out to develop a new efficient strategy for prevention and treatment of animal diseases using egg yolk antibodies. Mono or multi egg yolk antibodies were produced to improve the animal productivity by prevention and treatment of gastrointestinal or respiratory diseases in swine and canine.

Swine respiratory disease induce severe economic losses in swine industry worldwide. Several methods have been developed and applied to control the diseases. However, those are still problematic in

swine industry. Therefore, IgY was considered as another preventive and treatment measure.

As the first step in applying egg yolk antibodies to control respiratory diseases in the swine, we analysed the immunogens of the diseases causative agents, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* 3A and 4D and *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5 and immune response in egg yolk of hens immunized with them. Also, immunogens of the disease causative agents were prepared and immune response in egg yolk of immunized hens with them were evaluated. The specificity and prophylactic effects of the IgY were investigated with mice and piglets. Bacterial antigens prepared from *B. bronchiseptica*, *P. multocida* 3A and 4D and *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5 were analyzed by using methods of PCR, SDS-PAGE, Western blot, and mice toxicity test. The antigens were injected into laying hens to produce antibodies against them in egg yolk. After chickens were immunized three times in 2 weeks interval, the profiles of antibody production against the antigens were examined by ELISA. Antibody production in egg yolk began in 2 weeks after the first injection and antibody titer was reached peak in 6-8 weeks and maintained until 12 weeks. Of two adjuvants used in this study, ISA75 was more effective than aluminum hydroxide gel in immunogenicity, and appeared to be safer than that. Also, it less affected in egg laying rates than aluminum hydroxide gel in treated chickens.

Immunological specificity of the IgY was analysed by Western blot analysis. In the analysis of causative agents of atrophic rhinitis, *B. bronchiseptica* and *P. multocida* 4D, proteins of 33, 40, 43, 67 and 141 kDa were specifically reacted with IgY. Also, 40 and 110 kDa

proteins were identified as the major immunogens in *P. multocida* 3A. In *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5, 40 and 47 kDa proteins were found to be the major reactive ones.

The immunoprotective effects of produced IgY were evaluated in mice. Mice were challenged with minimal lethal doses of *P. multocida* 3A and 4D, *B. bronchiseptica* and *A. pleuropneumoniae* serotype 2 after intraperitoneal administration of IgY and the protectivity of IgY was dose-dependent at the concentration of 100, 200 and 400 mg/ml. Also, the immunoprotective effects was proven in pigs challenged with *P. multocida* or *A. pleuropneumoniae* after administration of IgY against them. Groups injected with IgY intraperitoneally showed reduced clinical scores and lung lesion scores in compared with IgY non-injected groups. In the field trials, the IgY showed effective treatment results in pigs with respiratory clinical symptoms.

In order to prevent or treat alimentary disorders in piglets, antigens of pathogenic *E. coli* (k88, k99, 987p pilus and LT), *Cl. perfringens* type C (α , β toxoid) and rotavirus were used to prepare experimental vaccines to immunize chickens after analysis and purification of all those antigens. In the comparison of adjuvants, ISA70 was the best in the rapid induction and maintenance of antibody titer. Appearance of antibody in egg yolk was later about 1-4 weeks than that in serum depending on the antigens. High antibody titer was maintained about 8, 4 and 7 weeks in chickens immunized with antigens of *E. coli*, *Cl. perfringens* and rotavirus, respectively.

Immunoprophylactic effects of IgY against antigens of *E. coli* and *Cl. perfringens* type C were proven with high protection rates in mice. The effect was also observed in pigs in the challenge with

those pathogenic organisms. Average body weight gain was also increased by the administration of IgY. Oral administration of the IgY was more effective than intramuscular or intraperitoneal administration. In the field trials with the IgY, 598 piglets with diarrhea were cured with 97.3% recovery rate by administration of the IgY.

In the development of IgY against *B. bronchiseptica*, Parvovirus and distemper virus that are major pathogens in alimentary and/or respiratory diseases of dogs, antigens of the pathogens were analysed and prepared for experimental vaccines to immunize hens.

Immunization with those antigens and ISA70 as an adjuvant could induce the high antibody titer. Agglutination antibody titers against *B. bronchiseptica* were 1:1,280 - 1:10,240 in sera and 1:160 - 1:1,280 in egg yolk. SN titers against Parvovirus in sera and egg yolk were 1:80 - 1:320 and 1:64 - 1:256, respectively. The SN titers against canine distemper virus was 1:8 - 1:64 in sera and egg yolk.

Immunoprophylactic effect of IgY against *B. bronchiseptica* was proven with 100% preventive rate in mice administered with IgY with antibody titer 1:640 - 1:2,560. Intramuscular administration was more efficient than oral administration. This phenomenon was also observed in the challenge with *B. bronchiseptica* in mice. In the field trials with the egg yolk antibodies from hens immunized with combined antigens with *B. bronchiseptica* and parvovirus, curing rates in dogs with severe clinical signs such as bloody diarrhea were 81.6% and 86.7% by intramuscular or subcutaneous administration of IgY, respectively. Safety of the antibodies in dogs was proven without any side effects such as vomiting, edema, fever, etc. by administration of

double doses for 7 days.

These results indicated that the egg yolk antibodies could be used as effective prevention and treatment of alimentary and respiratory diseases in pigs and dogs.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	24
Part 1. Background of this project	24
Part 2. Necessity of this project	25
Part 3. Subject and range of this project	25
Part 4. Annual subject and content	26
Chapter 2. Development of egg yolk antibodies against respiratory disease complex in pigs	27
Part 1. Introduction	27
Part 2. Materials and Methods	30
1. Immunological analysis of bacterial antigens	30
가. Strains	30
나. Bacterin	30
다. Production and analysis of outer membrane protein(OMP) ...	30
라. Production and analysis of IROMP	31
마. Production and analysis of dermonecrotxin(DNT)	32
2. Production and inoculation of experimental vaccine	33
3. Extraction and analysis of egg yolk antibodies	36
가. Extraction of egg yolk antibodies with chloroform	36
나. Antibody test of sera and egg yolk	36
다. Laying rates	37
라. Immunological analysis of egg yolk antibodies	37
4. Preventive effects of egg yolk antibodies in experimental animal ..	38
5. Statistical analysis	39
6. Absorption test of egg yolk antibodies in suckling piglets	39

7. Protective effects of egg yolk antibodies in piglets	39
Part 3. Results	41
1. Immunological analysis of pathogenic bacterial antigens	41
2. Immune response in sera and egg yolk	46
가. Test 1	46
나. Test 2	55
3. Immunological analysis of egg yolk antibodies	69
4. Preventive effects of egg yolk antibodies in mice	73
가. Mass production of egg yolk antibodies	73
나. Analysis of egg yolk antibodies	73
다. Minimum lethal dose(MLD) of the pathogens of swine respiratory disease in mouse	74
라. Protective effect of egg yolk antibodies in mice	74
5. Absorption tests of egg yolk antibodies in suckling piglets	79
6. Protective effect of egg yolk antibodies in weaning piglets ...	84
7. Preventive and therapeutic effects of egg yolk antibodies on pig farms	86
Part 4. Discussion	89
Part 5. Summary	101
Chapter 3. Development of egg yolk antibodies against diarrheal complex disease in pigs	103
Part 1. Introduction	103
Part 2. Material and Methods	104
1. Strains of bacteria and virus	104
2. Condition for production of <i>E. coli</i> pilus antigens	104
3. Culture and antigens	105

가. <i>E. coli</i> pilus and Heat-labile toxin(LT)	105
나. <i>Cl. perfringens</i> toxoid	106
다. <i>Rotavirus</i>	106
4. Production and inoculation of experimental vaccine	107
가. Experimental test 1	107
나. Experimental test 2	107
5. Purification of egg yolk antibodies	108
6. Antibody titers of egg yolks and sera of chickens	108
7. Neutralization test of egg yolk antibodies against <i>Cl. perfringens</i> toxins in mice	109
8. Protective effect of egg yolk antibodies in piglets	110
Part 3. Results and Discussion	111
1. Productional conditions of <i>E. coli</i> pilus antigens	111
가. Cultural condition of <i>E. coli</i> K88 antigens	111
나. Cultural condition of <i>E. coli</i> K99 antigens	112
다. Separative rates of <i>E. coli</i> K88 pilus antigens	113
라. Separative rates of <i>E. coli</i> K99 pilus antigens	115
2. Immune response of chickens vaccinated with various antigens	115
가. Comparison of the production of egg yolk antibodies by different adjuvants	115
나. Comparison of the production of egg yolk antibodies by alone and combined antigens	117
3. Preventive and protective effects of egg yolk antibodies in mice ..	120
가. Protective effect of egg yolk antibodies against pathogenic <i>E.</i> <i>coli</i> K88 and K99 strain	120
나. Neutralization effects of egg yolk antibodies against <i>Cl.</i> <i>perfringens</i> type C toxin	121

4. Protective effects of egg yolk antibodies in piglets	123
가. Protective effects of egg yolk antibodies against challenge with pathogens in piglets	123
나. Therapeutic effects of egg yolk antibodies against diarrheal piglets	125
Part 4. Summary	126

Chapter 4. Development of egg yolk antibodies against respiratory
and diarrheal disease in dogs

Part 1. Introduction	129
Part 2. Materials and Methods	130
1. Strains of bacteria and virus	130
2. Purification and production of antigens	130
가. <i>Bordetella bronchiseptica</i>	130
나. Canine <i>Parvovirus</i>	131
다. Canine <i>Distempervirus</i>	131
3. Immune response in chickens vaccinated and production of experimental vaccine	131
4. Mass production of egg yolk antibodies	132
5. Antibody titers of egg yolks and sera of chickens	133
가. <i>Bordetella bronchiseptica</i>	133
나. <i>Parvovirus</i>	134
다. <i>Distempervirus</i>	134
6. Protective effects of egg yolks antibodies against canine <i>Bordetella bronchiseptica</i> in mice	134
가. Preventive effects of egg yolk antibodies against pathogens	134
나. Therapeutic effect of egg yolk antibodies against pathogens	135

7. Therapeutic effects of egg yolk antibodies on dogs	135
8. Safety of egg yolk antibody powder in dogs	136
Part 3. Results and Discussion	136
1. Comparison of the production of egg yolk antibodies by alone and combined antigens	136
2. Mass production of egg yolk antibodies	138
가. Antibody titer against <i>Bordetella bronchiseptica</i>	138
나. Antibody titer against Canine <i>Parvovirus</i>	140
다. Antibody titer against Canine <i>Distempervirus</i>	142
3. Preventive and protective effects of egg yolk antibodies in mice ...	143
가. Protective effects of egg yolk antibodies against <i>Bordetella bronchiseptica</i>	143
나. Therapeutic effects of egg yolk antibodies against <i>Bordetella bronchiseptica</i>	146
4. Therapeutic effects of egg yolk antibodies on dogs showed clinical signs	146
가. Diarrheal disease with canine <i>Parvovirus</i>	146
나. Respiratory disease with <i>Bordetella bronchiseptica</i>	148
다. Disease with canine <i>Distempervirus</i>	149
5. Safety of egg yolk antibodies powder in dogs	149
Part 4. Summary	150
Chapter 5. References	152
Part 1. Development of egg yolk antibodies against respiratory disease complex in pigs	152
Part 2. Development of egg yolk antibodies against diarrheal disease complex in pigs	161
Part 3. Development of egg yolk antibodies against respiratory and diarrheal disease in dogs	166

목 차

제 1 장 서론	24
제 1 절 연구배경	24
제 2 절 연구개발의 필요성	25
제 3 절 연구개발의 목표	25
제 4 절 연차별 연구개발 목표와 내용	26
제 2 장 돼지 복합 호흡기질병 치료 예방용 난황면역제 개발	27
제 1 절 서 설	27
제 2 절 재료 및 방법	30
1. 돼지호흡기 질병 주요 세균성 원인체의 면역원 및 분석	30
가. 사용균주	30
나. Bacterin의 생산	30
다. Outer Membrane Protein (OMP)의 생산 및 분석	30
라. IROMP의 생산 및 분석	31
마. Dermonecrotxin(DNT)의 생산 및 분석	32
2. 백신제조 및 산란계 백신 접종	33
가. 산란계 1차 백신 접종	33
나. 산란계 2차 백신 접종	35
3. 난황항체 추출 및 항체분석	36
가. Chloroform을 이용한 난황항체 추출	36
나. 난황 및 혈청내 항체가 변화 조사	36
다. 시험백신 접종계의 산란율 조사	37
라. 난황항체의 특이성 분석	37
4. 실험동물에서의 난황항체의 예방효과시험	38
가. 난황항체의 대량생산	38

나. 돼지 호흡기 질병 원인균의 mouse에서의 minimum lethal dose(MLD) 설정	38
다. 난황항체의 마우스에서의 방어능 조사	38
5. 통계적 분석	39
6. 포유자돈에서의 난황항체 흡수실험	39
가. IgY 검출 방법의 결정	39
나. 포유자돈에서의 난황항체 흡수시험	39
7. 돼지에서의 방어 실험	39
가. 난황항체의 돼지에서의 방어시험	49
나. 난황항체의 야외 농장 적용	40
제 3 절 결 과	41
1. 돼지 호흡기 질병 주요 세균성 원인체의 면역원 분석	41
2. 백신접종계에서의 난황항체가 변화	46
가. 산란계에서의 1차 접종시험 결과	46
나. 산란계에서의 2차 접종시험 결과	55
3. 난황항체의 특이성 분석	69
4. 난황항체의 마우스에서의 예방효과 시험	73
가. 난황항체의 대량생산	73
나. 추출한 난황항체의 분석	73
다. 돼지 호흡기 질병 세균성 원인체의 마우스에서의 Minimal lethal dose(MLD)	74
라. 난황항체의 마우스에서의 방어효과	74
5. 포유자돈에서의 난황항체 흡수시험 결과	79
6. 이유자돈에서의 난황항체의 방어효과	84
7. 야외 농장에서의 난황 접종 효과	86
제 4 절 고 찰	89
제 5 절 결과요약	101

제 3 장 돼지 복합소화기질병 난황면역제 개발	103
제 1 절 서 설	103
제 2 절 재 료 및 방 법	104
1. 균/독 주	104
2. 대장균 pilus 항원 생성조건	104
3. 배양 및 항원의 조제	105
가. 대장균 pilus 및 LT	105
나. 장독혈중균 독소	106
다. 로타바이러스	106
4. 시험백신 제조 및 접종	107
가. 산란계에 대한 접종방법별 면역원성 비교(1차시험)	107
나. 산란계에 대한 복합난황항체 대량생산(2차시험)	107
5. 난황항체 추출	108
6. 닭 혈중 및 난황중의 항체가 조사	108
7. 난황항체의 마우스에 대한 특신증화시험	109
8. 목적동물에 대한 방제효과	110
제 3 절 결 과 및 고 찰	111
1. 대장균 pilus항원 생성조건	111
가. <i>E. coli</i> K88항원 생성균주의 배양조건별 pilus 생성능 조사 ..	111
나. <i>E. coli</i> K99 항원생성균주의 배지종류별 Pilus 생성능 조사 ..	112
다. <i>E. coli</i> K88항원의 처리별 섬모항원의 분리율	113
라. <i>E. coli</i> K99항원의 처리별 섬모항원의 분리율	114
2. 항원에 대한 항체 형성능	115
가. 보좌제 종류별 난황항체 형성능 비교	115
나. 주요 소화기질병 단, 복합항원별 난황항체 생성 비교	117
3. 실험동물에 대한 난황항체의 질병 예방 및 치료 효과	120
가. 마우스에서 병원성대장균 공격접종에 대한 예방효과	120

나. 마우스에서 <i>Cl. perfringens</i> type C 특신에 대한 중화효과	121
4. 목적동물에서의 방제효과	123
가. 균 공격접종에 대한 난황항체의 질병 치료효과	123
나. 야외 자돈에 대한 질병 치료효과	125
제 4 절 결과요약	126
제 4 장 개 주요 소화기, 호흡기질병 난황면역제 개발	129
제 1 절 서 설	129
제 2 절 재료 및 방법	130
1. 균/독 주	130
2. 항원의 정제 및 조제	130
가. 보데텔라균	130
나. 개 파보바이러스	131
다. 디스토프바이러스	131
3. 시험백신 제조 및 닭에서의 면역원성 조사	131
4. 복합 난황항체 대량생산	132
5. 닭 혈중 및 난황중의 항체가 조사	133
가. 개 기관지폐렴균	133
나. 파보바이러스	134
다. 디스토프바이러스	134
6. 마우스를 이용한 개 기관지폐염 난황항체 효능조사	134
가. 질병예방효과 시험	134
나. 질병치료효과 시험	135
7. 목적동물에 대한 방제효과	135
8. 난황항체분말의 목적동물에 대한 안전성시험	135
제 3 절 결과 및 고찰	136
1. 개 주요질병 원인균에 대한 단일 및 복합난황항체 생성능비교	136
2. 개 주요 호흡기 및 소화기질병 원인균에 대한 복합난황항체 대량생산	138

가. 기관지폐염균에 대한 항체형성능	138
나. 파보바이러스에 대한 항체형성능	140
다. 디스토펙 바이러스에 대한 항체형성능	142
3. 실험동물에 대한 예방, 치료효과	143
가. 난황항체 역가 및 투여경로별 질병예방효과	143
나. 질병치료효과	146
4. 목적동물에서의 질병치료효과	146
가. 개 파보바이러스감염 설사병	146
나. 개 기관지염	148
다. 개 디스토펙 바이러스 감염증	149
5. 목적동물에 대한 안전성	149
제 4 절 결과요약	150
제 5 장 참고문헌	152
제 1 절 돼지 복합 호흡기질병 치료 예방용 난황면역제 개발	152
제 2 절 돼지 복합소화기질병 난황면역제 개발	161
제 3 절 개 주요 소화기, 호흡기질병 난황면역제 개발	166

제 1 장 서 론

제 1 절 연구배경

가축 전염병에 의한 피해는 축산 총생산의 20%를 점할 정도로 막대하며, 이중에서도 돼지 질병은 종류도 많고 사육규모도 대규모, 집단화하여 피해가 가장 많이 일어나고 있다. 이중에서도 위축성비염, 파스튜렐라페염 등의 호흡기질병과 대장균설사증, 로타바이러스 설사증 등의 소화기질병이 대표적인 생산성저하질병으로 알려져 있다. 개의 질병 또한 양견장은 물론 애완견에서 파보바이러스 설사증, 기관지폐렴, 디스토프라 등이 빈발하여 집단폐사하는 예가 빈발하고 있다.

이러한 동물들의 질병예방을 위하여 일부 백신이 사용되고 있으나 지금까지 세계적으로 호흡기와 소화기 즉 점막면역계에 완벽한 면역능을 유발하는 백신이 없어 이들 질병에 만족스러운 예방효과를 나타내는 경우가 적었다. 질병치료 측면에서도 바이러스성질병은 항균제로 치료가 불가능하며, 세균성질병도 약제의 오남용으로 양축장별로 감수성이 다르고 빈번한 내성균 발생으로 치료가 어려워 적절한 질병관리 대책이 없는 어려운 상황에 직면해 있다.

최근 국내외적으로 여러 가지 항원물질을 닭에 면역시킨 후 얻어지는 난황항체를 이용하여 질병을 치료, 예방하는 새로운 기술이 개발되고 있으며, 특히 미국, 캐나다, 독일, 일본 등에서 일부 세균, 바이러스에 대한 난황항체를 실험적으로 생산하여 질병치료, 예방효과가 있음을 보고한 바 있으며, 국내에서는 연구자 등이 돼지 대장균설사증에 대한 난황항체를 개발하여 우수한 치료, 예방효과가 있음을 보고한 바 있다. 이러한 기법은 기존의 백신접종에 따른 불확실한 점막면역능 부여와 부작용 문제를 해결할 수 있을 뿐아니라 항생제 남용에 따른 내성균 출현과 이에따른 치료의

어려움을 해소할 수 있을 것으로 기대되고 있다.

제 2 절 연구개발의 필요성

난황항체의 다양한 유용성에도 불구하고 광범위한 실용화가 활발하지 못한 이유는 대부분의 병원체는 축종별로 특이성이 있어 필요한 난황항체를 생산하기 위하여는 닭에대한 면역원성이 확인되어야 하며, 항체의 활용성을 높이기 위해서는 난황으로부터 항체를 안전성이 확보된 상태에서 효율적으로 순수추출하여야 한다. 또한 이들을 효과적으로 이용하기 위하여는 여러종류의 질병에 대한 복합난황항체 생산 및 질병특성에 맞는 투여방법을 선별하여야 하는 등 기술상의 해결하여야 할 문제들이 많이 있다.

따라서 축산업에서 피해가 많은 돼지 및 개의 주요 질병원인 병원체들의 닭에 대한 면역원성, 난황항체의 안전하고 효율적인 추출법, 목적동물에서의 질병 치료, 예방효과를 시급히 시험하여 실용화할 필요가 있다.

이러한 축산생산성 향상을 위한 기술개발 필요성 이외에도 가축질병의 예방, 치료를 위하여 오남용되고 있는 항균물질로 인하여 슈퍼박테리아 등 내성균 발생에 따른 사람의 세균성질병 치료의 문제점이 제기되고 있으며, 축산물에 약제의 잔류로 축산식품의 안전성이 사회문제화 되고 있어 이러한 약제사용 없이도 질병을 치료, 예방할 수 있는 무공해 질병방제 기술개발이 요구되고 있다.

제 3 절 연구개발의 목표

본 연구에서는 축산업의 생산성 향상 및 가축질병의 효율적인 방제를 위하여 고역가의 단, 복합난황항체를 생산하여 돼지 및 개의 주요 소화기, 호흡기질병을 효과적으로 치료, 예방할 수 있는 기법을 개발하는데 있다.

이러한 목적을 달성하기 위한 세부목표로 “돼지 복합소화기 질병 치료, 예방용 난황면역제 개발연구”에서는 돼지의 주요 소화기질병 원인체인 대장균, 장독혈증균 및 로타바이러스에 대한 단,복합 난황항체를, “돼지 복합 호흡기질병 치료, 예방용 난황면역제 개발연구”에서는 돼지위축성비염균, 파스튜렐라 폐렴균 및 홍막폐렴균에 대한 단,복합 난황항체를 그리고 “개 주요 소화기, 호흡기질병 치료, 예방용 난황면역제 개발연구”에서는 개파보바이러스, 디스토펜바이러스 및 개 기관지폐렴균에 대한 난황항체를 개발하여 축산현장에 적용함으로써 경제적 피해를 감소시키는데 목표를 두고있다.

제 4 절 연차별 연구개발 목표와 내용

1차년도('98.10-'99.10)에는 질병별 난황항체 개발의 기초확립을 위하여 유용 균,독주 선발 및 시험백신 생산이라는 연차목표하에 질병별, 병원체별 유용균,독주 선발 및 닭에 대한 면역원성을 확인하고자 질병 원인체의 신속진단 기법확립, 질병별 원인체의 혈청형, 생물형 등 특성조사, 특히 항원별 면역원성 조사, 보좌제 및 면역방법별 항체형성능 비교 그리고 효율적인 항체검사법 선발 및 항체지속성을 조사코자 하였다.

2차년도('99.10-'00.10)에는 효율적인 난황항체 생산, 추출 및 활용법 개발과 실험실내 유효성을 확인하기 위하여 닭의 항체 생성능 향상법 개발, 효율적이고 안전한 난황항체 추출법 선발 그리고 실험실내에서 난황항체의 원인체에 대한 효능 및 마우스에 대한 방어능을 조사코자 하였다.

3차년도('00.10-'01.10)에는 난황항체 적용방법에 따른 질병방제 효과와 난황항체의 목적동물에 대한 야외 치료, 예방효과를 조사하여 본 연구를 완결하고자 하였다.

제 2 장 돼지 복합 호흡기질병 치료, 예방용 난황 항체 면역제 개발

제 1 절 서 론

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

최근 난황항체를 이용하여 질병을 치료 또는 예방하는 기법들이 사람, 동물 등에서 적용되어 오고 있다. 난황항체는 어미닭이 획득한 면역항체가 난황 중에 이행 축적된 것으로서 분자량이 적은 전형적인 혈청유래 항체로, 조류, 파충류, 양서류, 폐어에서 발견되며, 포유류의 IgG와 유사하나 그 물리, 화학적 성상에 차이가 있어 Immunoglobulin yolk(IgY)라 명명하였다. 수동면역을 위하여 토끼, 기니픽, 마우스를 통한 항체를 이용하였으나 최근 들어 난황항체를 이용하여 특이항체를 생산하는 방법이 많이 사용되고 있다. 후자는 전자에 비하여 다음과 같은 장점을 지닌다. 첫째, 닭은 매일란을 생산할 뿐 아니라 닭의 대량사육이 가능하기 때문에 많은 양의 항체를 생산할 수 있고, 대규모 양계의 자동화시스템으로 되어 있어 항체 생산의 비용이 적게 든다. 또한 계란 한 개 당 항체의 양은 90-100mg 정도로 토끼 한 마리에서 생산되는 양과 비슷하여 면역된 닭 한 마리로부터 생

산될 수 있는 항체의 양은 매우 많다. 둘째, 면역된 닭으로부터 생산된 란은 수집이 쉽기 때문에 채혈 등의 전문적인 기술이 필요 없으며, 면역된 동물에게 있어서도 통증이나 스트레스를 야기시키지 않을 수 있다. 셋째, IgY는 IgG와 달리 동물의 Fc receptor와 반응하지 않기 때문에 비특이적 반응이 감소되며 종간의 면역반응을 배제시킬 수 있다. 그리고 포유류의 보체와 protien A와의 결합력이 없기 때문에 포유류의 체내에 주입시 쉽게 제거되지 않는다. 넷째, 조류와 포유류의 계통발생학적인 차이로 인해 닭의 IgY가 포유동물의 IgG와 교차반응을 하지 않기 때문에 포유류 항원에 대해 특이성이 높은 IgY 항체를 생산할 수 있으며, 포유동물에서는 항원성이 없거나 혹은 약한 항원이라도 어미닭에서는 특이적인 항체생산이 가능하다. 현재 난황의 특이항체를 이용한 연구는 돼지 대장균성 설사증의 치료 및 예방, 신생우에서의 감염성 설사 예방, 사람에서의 식중독 및 영아 바이러스성 설사예방, 치석 예방 및 뱀의 교상에 대한 해독등에서도 진행되고 있다.

전세계적으로 양돈산업에 있어서 많은 경제적인 손실을 야기시키는 주요 세균성 돼지 호흡기 질병인 위축성 비염, 파스튜렐라성 폐렴, 흉막폐렴에 대한 많은 연구가 진행중이다. 국내에서도 이들 질병들이 매우 문제시되어 여러 가지 측면에서 이들 질병 방제를 위한 연구가 진행중이다. 위축성 비염은 *Pasteurella multocida* 4D와 *Bordetella bronchiseptica*에 의해 유발되는 질병으로, 이들 원인체에서 생성되는 140kDa 전후의 dermonecrotic toxin(DNT)은 질병을 유발하는 가장 중요한 virulence factor로서 in vitro에서는 bovine embryonic lung과 Vero cell에 대해 독성물질로 작용하고, 설치류나 조류의 치사를 유발하며, swine turbinat bone의 osteolysis를 유도한다. DNT는 exotoxin의 특성을 가지지만 생균으로부터 분비되지 않고 sonication에 의해 균체로부터 추출될 수 있으며 불활화된 DNT(toxoid)는 여러 나라에서 돼지 위축성 비염 예방을 위한 백신의 한 구성요소로서 사용되고 있다. 파스튜렐라성 폐렴의 원인체는 *Pasteurella*

multocida 3A로서, 이 원인체에는 여러 가지 병원성 인자들이 존재하나 그 중 outer membrane protein(OMP)은 균외막의 주요 구성성분으로 outer membrane의 integrity를 유지하는 역할을 한다. 또한 OMP는 antigenically heterogeneous하고 specific epitope과 cross-reacting epitopes을 모두 포함하고 있으며, 다양한 크기의 OMP fraction 중 일부가 고도의 항체반응을 나타내므로 효과적으로 면역을 형성할 수 있다는 장점을 지니고 있다. 흉막폐렴은 *Actinobacillus pleuropneumoniae*에 의해 유발되는 질병으로, 2가지의 biotype과 14가지의 serotype이 존재하며 이들 간에 cross-protection이 결핍되어 있기 때문에 면역을 유도하고자 하는 경우 장애 요인이 된다. 그러나 최근 truncated RTX protein과 OMP가 cross reactivity를 유도하는 것으로 밝혀짐으로써 Apx toxin과 OMP를 포함하는 백신이 상업적으로 이용되고 있다. 그러나 Wongnarkpet S의 보고에 따르면 돼지에게 생후 2주와 4주경에 *Mycoplasma hyopneumoniae*와 *A. pleuropneumoniae*의 복합백신을 투여한 후 4주경에 처음으로 *A. pleuropneumoniae*가 분리되었으며, 이는 이미 농장에 *A. pleuropneumoniae*가 만연되어 있음으로 인해 어린 돼지가 farrowing pen으로부터 감염되거나 carrier sow에 의해 감염되기 때문이라고 하였다. 즉, 이는 백신을 투여하는 것으로 prevalence를 낮출 수는 있으나 자돈에 있어서 *A. pleuropneumoniae* 감염을 절대적으로 막을 수는 없다는 것을 의미한다. 이처럼 이들 질병의 원인체들에 대한 연구 결과를 바탕으로 본 연구에서는 임상학적 및 경제적으로 많은 문제가 되고 있는 이들 질병을 난황항체를 이용하여 효율적으로 예방할수 있는 방법을 개발 하고자 하였다. 본 연구에서는 이들 질병원인체들의 주요 면역원들을 분석하였고 이들 면역원들을 분리, 정제 하였으며 이를 이용한 백신을 제조하여 산란계에 접종 면역시켜서 혈중 및 난황내에서 면역반응을 조사 하였고, 난황을 대량생산하여 이들 난황의 주요 면역원에 대한 특이성, 실험동물 및 숙주 동물인 돼지에서 의 방어능과 또한 야외 농장에서의 호흡기 질병 치료 효과를 조사 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 돼지호흡기 질병 주요 세균성 원인체의 면역원 및 분석

가. 사용균주

본 실험에 사용한 균주는 서울대학교 수의과대학 전염병학교실에 의뢰된 돼지 호흡기 질병 가검물로부터 blood agar, chocolate agar, G20G (Bactopeptone 20g, NaCl 5g, Bromthymol blue 40mg, Furaltadone 0.5mg, gentamicin 0.5mg, penicillin 20mg, Fungizone 20mg, Glucose 10g, Lactose 10g in 1,000 ml of D.W.) 등을 이용하여 균을 분리한 후 집락형태, Gram염색성, 용혈성, MacConkey agar에서의 발육여부, oxidase test, urease test, catalase test 등 일반적인 생화학 검사 및 CAMP test, NAD 요구성 등 균특성과 관련된 검사와 자동 미생물 동정 장치인 Vitek (Vitek, Hazelwood, MD, USA) 및 혈청학적 방법을 이용하여 동정한 *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* 3A 및 4D, *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2와 5이었다.

나. Bacterin의 생산

본 실험에 사용한 각 균에 대한 whole cell antigen 을 얻기 위해 각각의 균주를 tryptic soy broth(Difco Co., Detroit , MI, USA)에 접종하여 37℃에서 24시간동안 진탕 배양 한 후, 배양액의 일부를 취하여 plate count method를 이용하여 균수를 측정한 다음, 나머지 배양액에 formalin 을 최종 농도가 0.05%가 되도록 첨가하여 실온에서 방치하였다. 18시간 후 불활화된 균주를 8,000rpm으로 30분간 원심분리하여 균을 수확한 후, PBS(pH7.2)를 이용하여 1×10^9 CFU/ml 이 되도록 조절하였다.

다. Outer Membrane Protein (OMP)의 생산 및 분석

OMP 의 분리는 Confer(1996)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, TSB에

배양한 균을 8,000rpm으로 30분간 원심분리한 후 침전된 균을 10배량의 10mM HEPES buffer(pH7.4)로 부유시키고, 부유한 균을 sonicator(Bandelin Co., Germany)를 사용하여 30분간 파쇄한 후, 8,000rpm에서 30분간 다시 원심분리하여 상층액을 회수하고, 20,000rpm에서 1시간 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물을 0.5% sodium N-lauryl sarcosine in 0.01M Tris buffer를 혼합하여 실온에서 1시간 방치한 후 20,000rpm에서 1시간 원심분리하여 침전물을 회수하고, 증류수 1ml로 재부유시켜 Bio-Rad DC protein assay kit(Bio-rad Co., Hercules, CA, USA)로 단백질 농도를 측정한다. 다음, -70°C에 냉동보관하면서 시험백신의 제조, 항체가 측정 등의 실험에 사용하였다.

생산된 OMP는 Marandi 와 Mittal 의 방법(1995)에 따른 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 분석하였다. 즉, 12% polyacrylamide gel의 각 well 당 5mg/ml의 sample 13 μ l을 loading하여 25mA에서 150분간 전기영동한 후 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하여 분리된 OMP의 band를 확인하였다.

라. IROMP의 생산 및 분석

IROMP 생산은 Choi 등의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, *P. multocida* 3A를 37°C에서 100 μ M 2,2'-dipyridyl이 첨가된 brain heart infusion broth(BHI, Difco, Detroit, MI)에 배양하였으며, BHI에 배양한 균을 8,000rpm으로 30분간 원심분리한 후 침전된 균을 10배량의 10mM HEPES buffer(pH7.4)로 부유시키고, 부유한 균을 sonicator(Bandelin Co., Germany)를 사용하여 30분간 파쇄한 후, 8,000rpm에서 30분간 다시 원심분리하여 상층액을 회수하여 20,000rpm에서 1시간 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 0.5% sodium N-lauryl sarcosine in 0.01M Tris buffer를 혼합하여 실온에서 1시간 방치한 후 20000rpm에서 1시간 원심분리하여 침전물

을 회수하고, 증류수 1ml로 재부유시켜 protein concentration assay kit(Bio-rad Co., Hercules, California, USA)로 단백질 농도를 측정한다. 다음, -70℃에 냉동보관하면서, 시험백신의 제조 등 실험에 사용하였다. IROMP은 Marandi와 Mittal의 방법에 따른 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 이용하여 분석하였다. 즉, 12% polyacrylamide gel의 각 well당 5mg/ml의 sample 13 μ g을 loading하여 25mA에서 150분간 전기영동한 후 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하여 분리된 OMP와 IROMP의 band를 확인하였다.

마. Dermonecrotxin(DNT)의 생산 및 분석

DNT 는 *B. bronchiseptica*와 *P. multocida* 4D를 tryptic soy broth(TSB)에 접종하여 37℃에서 24시간동안 진탕배양한 후, 8,000rpm으로 30분간 원심분리하여 수확한 균을 PBS로 부유시켜 sonicator로 30분간 균을 파쇄한 다음, 20,000rpm에서 1시간 원심분리하여 그 상층액을 취한후 0.45 μ m filter로 여과하였다. 여과액은 단백질 함량을 측정할 후 formalin을 최종 농도가 0.05 % 되도록 첨가하여 37℃에서 shaking 상태로 3일간 방치하여 DNT를 불활화시켰다. 공시균주에서 DNT분석은 DNT 유전자의 검색, Western blot을 이용한 검색 및 마우스 접종시험을 이용하여 실시하였다. 즉, *B. bronchiseptica*와 *P. multocida* 4D에서 DNT를 생성하는 유전자를 검출하기 위해 PCR기법을 이용하였다. 유전자의 증폭을 위해 사용한 primers의 염기서열은 Table 1과 같다. DNT 유전자의 증폭은 GeneAmp PCR system 2400(Perkin Elmer Co., Foster, CA, USA)를 사용하였으며, 10xPCR buffer(Bioneer Co., Taejon, Korea) 5 μ l, 25mM MgCl₂ 3 μ l, 10mM dNTP 1 μ l, forward와 reverse primer 각각 1 μ l, template DNA 1 μ l, Taq DNA polymerase(5u/ μ l) 5 μ l를 첨가하여 최종량이 50 μ l가 되도록 증류수로 조정된 후, 반응조건은 최초 denaturation을 95℃에서 5분으로 한 다음, denaturation 94℃ 1분, annealing 55℃ 1분, extension 72℃ 1분으로 하

여 30회 반복 실시하고 최종 extension은 72℃에서 7분간 실시하였다. PCR 증폭산물은 1.0% agarose gel에서 전기영동한 후 Ethidium bromide (10mg/ml)로 염색하여 UV illuminator로 확인하고, polaroid camera를 이용하여 사진촬영하였다.

Table 1. Oligonucleotide sequences of primers for the detection of the dermonecrotxin genes from *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida*

Primers	Oligonucleotide sequences	Size of amplified product
<i>B.bronchiseptica</i> forward	5'-AATCGGCATTGCGGCAACTT-3'	643bp
DNT reverse	5'-TGTCCGGCGGTATCCAGACT-3'	
<i>P.multocida</i> forward	5'-TCATCTTCTGACAGCTCCGA-3'	1080bp
DNT reverse	5'-TGCAGATTGCACTAAGGACC-3'	

P. multocida 4D DNT (PMT) 분석은 PMT에 대한 monoclonal antibody(MAb)를 이용하여 Western blot으로 실시하였다. 즉, 12% polyacrylamide gel에 DNT추출액을 전기영동하여 nitrocellulose membrane에 전사한 후 bovine serum albumin (BSA, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)으로 blocking시키고 PMT MAb를 1차 항체로, alkaline phosphatase(AP) conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma Co.)를 2차 항체로 사용하여 일반적인 방법에 따라서 반응 후 AP conjugate substrate kit(Bio-Rad Co.)를 이용하여 DNT를 확인하였다. 활성 DNT의 생성 및 불활화 여부는 마우스 접종시험을 이용하여 실시하였다.

2. 백신제조 및 산란계 백신 접종

가. 산란계 1차 백신 접종

주요 돼지 호흡기 질병 예방을 위한 IgY 생산을 위한 시험 백신에 사용한 항원의 종류, 농도, adjuvant 등에 의해서 9개의 시험군으로 구분하였다(Table 2). Adjuvant의 혼합은 ISA75에 대해서는 항원이 30%, adjuvant가 70%가 되도록 조절하였고, aluminum hydroxide gel의 경우는 gel의 최종농도가 10mg/ml이 되도록 조절하여 사용하였다. 백신 접종은 2주 간격으로 3회 실시하였으며, 접종량은 1차 접종시, adjuvant의 종류에 따라 ISA75을 사용한 경우는 0.5ml씩을, aluminum hydroxide gel을 사용한 경우는 0.5ml씩을 각각 접종하였으며, 2차 및 3차 접종은 모두 1ml씩 동일하게 접종하였다. 접종부위는 aluminum hydroxide gel을 사용한 경우 대퇴부에, ISA75을 사용한 경우 pectoral muscle에 각각 접종하였다.

Table 2. Experimental groups designed for the first study.

Groups	Target diseases	Bacterial species	Antigens	Adjuvants	No. of chicken
1	Atrophic rhinitis	<i>B. bronchiseptica</i> <i>P. multocida</i> 4D	Whole cell(1×10^9 cells/ml), DNT($150 \mu\text{g}$)		6
2	Pneumonic pasteurellosis	<i>P. multocida</i> 3A	Whole cell(1×10^9 cells/ml), OMP($150 \mu\text{g}$)	Aluminum hydroxide gel	6
3	Pleuropneumonia	<i>A. pleuropneumoniae</i> serotypes 2 & 5	Whole cell(1×10^9 cells/ml), OMP($150 \mu\text{g}$)		6
4	Pneumonic pasteurellosis and pleuropneumonia	<i>P. multocida</i> 3A, <i>A. pleuropneumoniae</i> serotypes 2 & 5	Whole cell(1×10^9 cells/ml), OMP($150 \mu\text{g}$)		5
5	Atrophic rhinitis	<i>B. bronchiseptica</i> <i>P. multocida</i> 4D	Whole cell(1×10^9 cells/ml), DNT($150 \mu\text{g}$)		6
6	Pneumonic pasteurellosis	<i>P. multocida</i> 3A, <i>A. pleuropneumoniae</i> serotypes 2 & 5	Whole cell(1×10^9 cells/ml), OMP($150 \mu\text{g}$)	ISA70	6
7	Pleuropneumonia	<i>A. pleuropneumoniae</i> serotypes 2 & 5	Whole cell(1×10^9 cells/ml), OMP($150 \mu\text{g}$)		6
8	Pneumonic pasteurellosis and pleuropneumonia	<i>P. multocida</i> 3A <i>A. pleuropneumoniae</i> serotypes 2 & 5	Whole cell(1×10^9 cells/ml), OMP($150 \mu\text{g}$)		5
9	control		PBS		4

나. 산란계 2차 백신 접종

주요 돼지 호흡기 질병 예방을 위한 IgY 생산을 위한 시험 백신에 사용한 항원의 종류 및 농도 등에 의해서 9개의 시험군으로 구분하였다(Table 3). Adjuvant로는 ISA75만을 사용하였으며, adjuvant의 혼합은 항원이 30%, adjuvant가 70%가 되도록 조절하여 사용하였다. 백신 접종은 2주 간격으로 3회 실시하였으며 첫 백신접종 13주 후 4차접종을 실시하였다. 접종량은 1차 접종시 각 산란계마다 1ml씩 접종하였으며 2차 및 3차 접종은 모두 0.5ml씩 동일하게 pectoral muscle에 접종하였다.

Table 3. experimental groups designed for the second study

Groups	Target disease	Bacterial species	Antigens	Adjuvant	No. of chicken
1	Atrophic rhinitis	<i>B. bronchiseptica</i> <i>P. multocida</i> 4D	Whole cell(1×10^9 cells/ml)	ISA75	7
2	Atrophic rhinitis	<i>B. bronchiseptica</i> <i>P. multocida</i> 4D	DNT(150 μ g)		7
3	Atrophic rhinitis	<i>B. bronchiseptica</i> <i>P. multocida</i> 4D	1차 Whole cell(1×10^9 cells/ml) 2차 DNT(150 μ g), 3차 혼합접종		7
4	Atrophic rhinitis	<i>B. bronchiseptica</i> <i>P. multocida</i> 4D	Whole cell(1×10^9 cells/ml) DNT(100 μ g)		7
5	Pneumonic pasteurellosis	<i>P. multocida</i> 3A	1차 live cell (1×10^4 cells/ml), 2차 killed cell(1×10^9 cells/ml)		7
6	Pneumonic pasteurellosis	<i>P. multocida</i> 3A	Whole cell(1×10^9 cells/ml) IROMP(150 μ g)		7
7	Pleuropneumonia	<i>A. pleuropneumoniae</i> serotypes 2 and 5	Whole cell(1×10^9 cells/ml) OMP(150 μ g)		7
8	Pneumonic pasteurellosis and pleuroneumonia	<i>P. multocida</i> 3A <i>A. pleuropneumoniae</i> serotypes 2 and 5	Whole cell(1×10^9 cells/ml) IROMP & OMP(150 μ g)		7
9	Control		PBS		7

3. 난황항체 추출 및 항체분석

가. Chloroform을 이용한 난황항체 추출

난황내 항체가 변화를 조사하기 위하여 계란은 백신접종 전 및 접종 후 2주부터 1 주 간격으로 수집하였다. 난황항체는 우 등(1998)의 방법에 준하여 추출하였다. 즉, 수집한 계란을 난황만 분리하여 50ml 원심튜브에 넣은 후에 동량의 PBS(pH7.2)를 가하여 vortex하고, 다시 혼합액에 동량의 chloroform을 가하고 실온에서 2시간 정치시킨 후 상층액을 수거하거나 일부를 취하여 eppendorf tube에 옮겨 8,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 취해 IgY 항체가를 측정하였다. 난황내의 항체가와 비교하기 위하여 백신 접종 전 및 접종 2주후부터 2주 간격으로 닭의 익하정맥에서 혈액을 채취하여 4℃에 24시간 방치한 다음, 원심분리로 혈청을 수거하고 56℃에서 30분간 비동화하여 항체가 측정에 사용하였다.

나. 난황 및 혈청내 항체가 변화 조사

난황 및 혈청내 항체가 조사를 위한 ELISA 검사를 위한 항원으로는 1차 접종시험에서는 *B. bronchiseptica*, *P. multocida* 4D와 3A, *A. pleuropneumoniae* serotypes 2와 5 각각의 OMP를 사용하였고, 2차접종시험에서는 *B. bronchiseptica*, *P. multocida* 4D 및 *A. pleuropneumoniae* serotypes 2와 5 각각에 대해서는 DNT와 OMP를, *P. multocida* 3A에 대해서는 IROMP를 사용하였다. 먼저, 각각의 항원을 coating buffer와 혼합하여 ELISA용 plate에 각 well당 0.14 μ g가 되도록 하여 4℃에서 18시간 정치한 후 Tween-PBS(0.05% Tween20 in PBS) 용액으로 3회 이상 세척한 후, 1% BSA 가 포함된 Tween-PBS로 blocking시켜 37℃에 1시간동안 방치하고 다시 3회이상 세척하였다. *A. pleuropneumoniae* serotypes 2와 5 및 *P. multocida* 3A에 대한 IgY는 100:1로, *P. multocida* 4D와 *B. bronchiseptica*에 대한 IgY는 200:1로 각각 희석하여 각 well당 100 μ 씩 분주하고 37℃에서 1시간동안 반응시킨 후, 세척과정을 다시 반복하였다.

2차항체로 horseradish peroxidase-conjugated rabbit IgG fraction to chicken IgG (Cappel Co., Aurora, OH, USA)를 사용하여 1시간동안 반응시킨 다음 세척하였고, substrate로는 2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) 용액을 100 μ l씩 가하고 실온에서 30분 경과 후 stop solution(0.5M HCl)을 50 μ l씩 분주한 후에 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. 시험백신 접종계의 산란율 조사

산란율은 시험백신 1차 접종후부터 11주까지 11 주간 각 시험군별로 총 산란량을 산란한 닭의수와 총 산란일로 나눈후 100을 곱하여 산출하였다.

라. 난황항체의 특이성 분석

난황항체의 특이성 분석을 위해 Western blot을 실시하였다. Western blot을 위한 항원으로는 *B. bronchiseptica*와 *P. multocida* 4D에 대해서는 whole cell, DNT 및 OMP를 사용하였고, *P. multocida* 3A와 *A. pleuropneumoniae* serotypes 2와 5에 대해서는 백신제조에 사용한 항원인 whole cell과 OMP를 사용하였다. 먼저, 12% polyacrylamide gel의 각 well 당 5mg/ml의 sample 13 μ l를 loading하여 25mA에서 150분간 전기영동한 다음 nitrocellulose membrane에 전사한 후 항원이 전사된 membrane을 3% BSA가 포함된 Tris-buffered saline(TBS)으로 shaking 상태 하에서 2시간 동안 blocking시키고 *A. pleuropneumoniae* serotype 2, *P. multocida* 3A와 4D 및 *B. bronchiseptica*에 대한 IgY는 50:1로, *A. pleuropneumoniae* serotype 5에 대한 IgY는 10:1으로 각각 희석하여 실온에서 3시간 동안 반응시킨 후, horseradish peroxidase -conjugated rabbit IgG fraction to chicken IgG (Cappel Co.)를 2차 항체로 사용하여 결합시키고 AP conjugate substrate kit(Bio-Rad Co.)를 이용하여 발색시킴으로써 항체의 특이성을 확인하였다.

4. 실험동물에서의 난황항체의 예방효과시험

가. 난황항체의 대량생산

동물접종실험을 위한 난황항체의 대량생산은 각 그룹마다 란을 대량 수거하여 난황만을 분리한 다음, 동량의 멸균증류수를 가하여 30초간 homogenization시킨 후 다시 0.1% carrageenan lamda solution(Sigma Co.)을 난황무게의 4배만큼 첨가하여 혼합하였다. 혼합액을 30분간 실온에 방치한 다음 6,000rpm에서 20분간 원심분리하고 상층액을 취하여 Whatman No. 1 filter로 여과한 후 여과액을 동결건조하여 냉장보관하면서 사용하였다.

나. 돼지 호흡기 질병 원인균의 mouse에서의 minimum lethal dose (MLD) 설정

돼지 세균성 호흡기 원인체들의 mouse에 대한 MLD를 구하기 위하여 plate count method를 이용하여 균 농도를 측정한 다음 10배 단위로 균을 희석하여 마리 당 0.3ml씩 5주령 ICR mouse 복강 내로, 각 희석농도마다 마우스 5수씩 접종하였다. 접종 3일 후 마우스의 폐사여부를 조사하여 각 원인체의 MLD를 결정하였다.

다. 난황항체의 마우스에서의 방어능 조사

난황항체의 예방효과를 알아보기 위한 마우스 접종시험은, gum solution을 이용하여 추출한 난황항체 powder의 protein 농도가 100, 200, 400mg/ml가 되도록 PBS에 용해시킨 다음 5주령 마우스 복강 내에 0.3ml씩 24시간 간격으로 2회 접종한 후 24시간 후에 각 원인체를 최소치사농도가 되도록 PBS에 용해한 항체가 투여된 마우스 복강내에 0.3ml씩 접종하였으며, 대조군으로서 PBS를 사용하였다. 3일간 마우스를 관찰하면서 마우스의 폐사여부를 측정함으로써 방어능을 분석하였다.

5. 통계적 분석

ELISA 결과 및 본 실험의 결과는 Student t-test를 이용하여 통계분석하였다.

6. 포유자돈에서의 난황항체 흡수실험

가. IgY 검출 방법의 결정

혈청내 IgY의 검출 기법을 확립하기 위하여 ELISA 실시하였다. 즉, 돼지혈청에 IgY를 각각 0, 1, 5, 10, 20, 50, 80, 100%가 되도록 첨가하여 각 원인체에 대한 OMP를 항원으로 하여 ELISA를 실시함으로써 돼지혈청 내에 존재하는 IgY의 검출가능여부 및 검출가능한 최소희석배수가 얼마인지 확인하였다.

나. 포유자돈에서의 난황항체 흡수실험

1주일령 포유자돈 10마리를 파스튜렐라성폐렴 및 홍막폐렴 복합 그룹과 위축성비염 그룹으로 나눈 다음, 마리당 각각의 난황항체 2g을 0hr 및 24hr에 구강으로 섭취시키고, 섭취후 2, 4, 8, 12 시간마다 채혈하였으며, 2일간 반복 실시하였다.

7. 돼지에서의 방어 실험

가. 난황항체의 돼지에서의 방어실험

난황항체의 돼지에서 방어능을 조사하기 위하여 이유자돈 (체중 20kg 내외) 20두를아래의 표와 같이 5개의 군으로 설정하고 *P. multocida* 및 *A. pleuropneumoniae* 배양액을 실험설계에 따라서 10ml 씩 기관내로 직접 공격 접종을 실시한후 임상증상 (body temperature, respiratory rate, respiratory effort, amount of lethargy, inappetence, vomiting, 기타 호흡기 증상)을 5 단계 [0(normal), 1 (slight increase), 2 (marked increase), 3 (severe increase), 4 (most severe increase)], 로 나누어

관찰, 기록하였고, 폐사여부 및 10 일후 부검하여 폐병변 형성도 정도를 조사함으로써 실시하였다. 본 실험은 2 회 반복 실시하였다.

Table 4. Experimental design to study protectivity of IgY against *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*

난황항체	공 격 접 종	공격접종후 난황투여	동물수	실험군
투여군	<i>A. pleuropneumoniae</i>	복강내투여	4	1
	<i>P. multocida</i>	복강내투여	4	2
비투여군	<i>A. pleuropneumoniae</i>	No	4	3
	<i>P. multocida</i>	No	4	4
대조군	No	No	4	5

나. 난황항체의 야외 농장 적용

난황항체의 야외 농장에서 돼지 호흡기 질병의 치료 효과를 조사하기 위하여 경기도 평택시 소재의 농장 1개소와 경북 영주시 소재의 농장 1개소에서 임상학적으로 호흡기증상을 나타내는 돼지를 선발하여 임상증상의 정도에 따라서 1회 또는 2회 근육 접종한후 질병의 경과를 관찰함으로써 실시하였다. 경북 영주시 소재 농장에서는 40두를, 경기도 평택시 소재 농장에서는 20두를 선발하여 실시하였다.

제 3 절 결 과

I. 돼지 호흡기 질병 주요 세균성 원인체의 면역원 분석

가. 면역원 분석

*B. bronchiseptica*와 *P. multocida* 4D를 합성한 독소 유전자 primer를 이용하여 PCR한 결과 각각 643bp, 1080bp의 독소유전자 증폭산물을 확인할 수 있었다(Fig 1). 각각의 균체 및 OMP에 대하여 SDS-PAGE를 실시하여 40kDa 전후의 주요항원을 포함한 다양한 크기의 단백질 항원들을 확인할 수 있었다 (Figs 2, 및 3). *P. multocida* 3A IROMP에 대한 SDS-PAGE를 실시한 결과 IROMP에서 OMP보다 74, 94 및 99kDa 크기의 단백질이 더 많이 존재함을 확인하였다(Fig 4). *B. bronchiseptica*와 *P. multocida* 4D의 DNT에 대한 SDS-PAGE를 실시한 결과 143kDa의 band를 확인하였고 (Fig. 4), Western blot을 실시하여 *P. multocida* toxin(PMT)에 대한 MAb를 이용하여 대하여 DNT 추출액에서 PMT를 확인하였고 (Fig 6), 이들 DNT 용액을 농도 8mg/ml로 원액 및 formalin을 이용한 불활화액을 마우스 복강내로 0.3ml 씩 접종한 결과, 원액을 접종한 마우스는 24시간 내에 모두 폐사하였으나 불활화액을 접종한 마우스는 모두 생존하여 DNT의 존재 및 불활화 여부를 확인할 수 있었다.

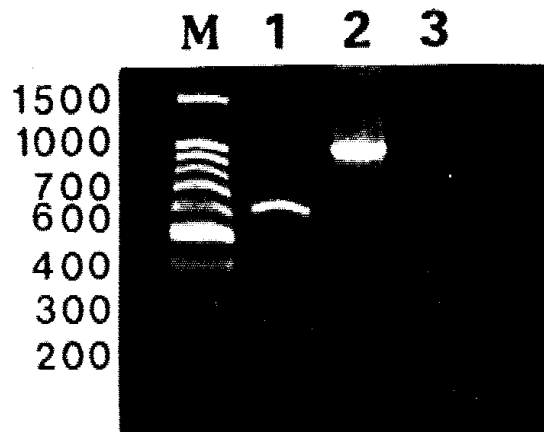


Fig 1. Amplification of gene encoding DNT from *B. bronchiseptica* and *P. multocida* 4D by PCR. lane M : Molecular weight marker(100bp ladder, Promega). The number indicates size of the DNA fragments(bps)), lane 1 : *B. bronchiseptica*, lane 2 : *P. multocida*, lane 3 : negative control(no template DNA)

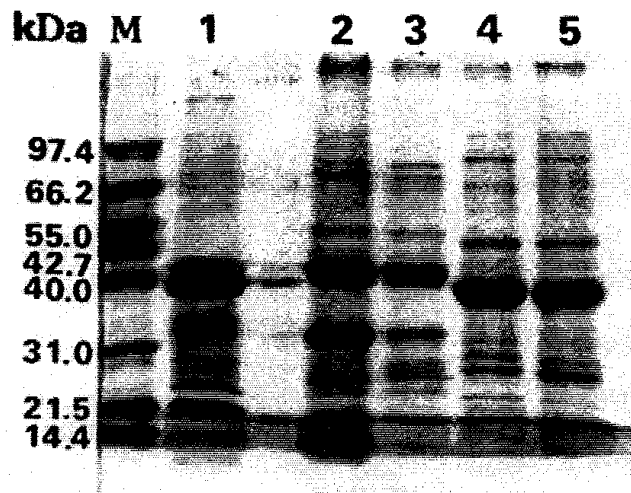


Fig 2. Electrophoretic analysis of bacterial cells by 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. lane M : Molecular weight marker low-range (Bio-rad), lane 1 : *B. bronchiseptica*, lane 2 : *A. pleuropneumoniae* serotype 2, lane 3 : *A. pleuropneumoniae* serotype 5, lane 4 : *P. multocida* 3A, lane 5 : *P. multocida* 4D.

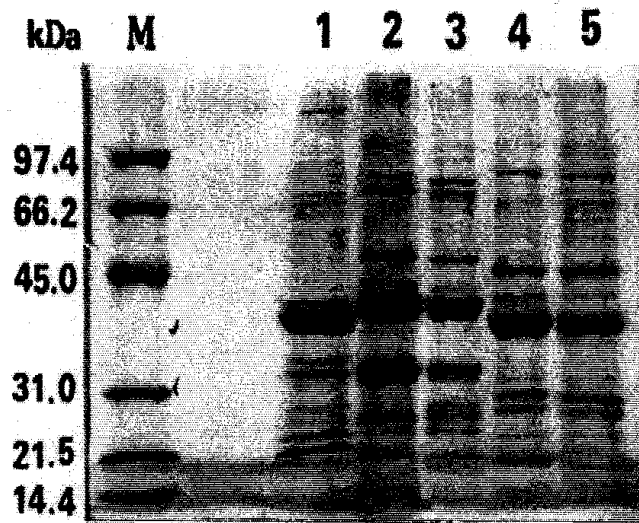


Fig 3. Electrophoretic analysis of outer membrane proteins by 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. lane M : Molecular weight marker mid-range(Promega), lane 1 : *B. bronchiseptica*, lane 2 : *A. pleuropneumoniae* type 2, lane 3 : *A. pleuropneumoniae* type 5, lane 4 : *P. multocida* 3A, lane 5 : *P. multocida* 4D.

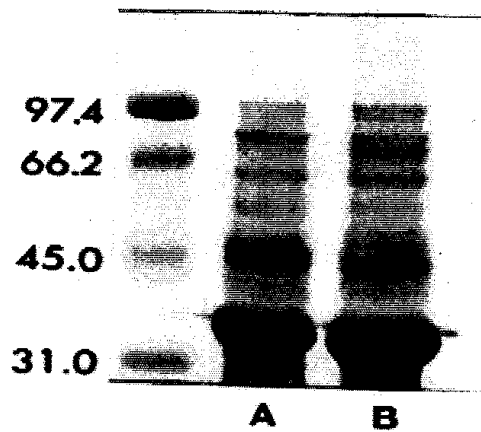


Fig 4. SDS-PAGE with OMP and IROMP of *P. multocida* 3A.
Lane A: OMP. Lane B: IROMP.

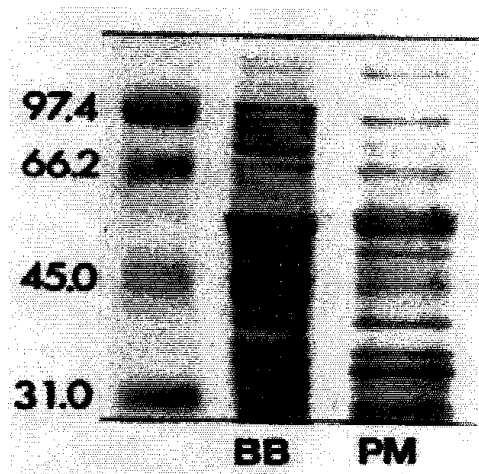


Fig 5. Electrophoretic analysis of DNT in *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* 4D by 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. lane M : Molecular weight marker low-range(Bio-rad), lane 1 : *B. bronchiseptica*, lane 2 : *P. multocida* 4D.

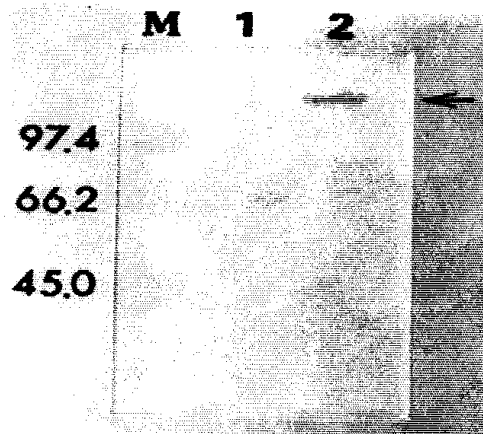


Fig 6. Immunological analysis of DNT of *Pasteurella multocida* 4D with monoclonal antibody. lane 1; Molecular weight marker, lane 2; *Bordetella bronchiseptica*, lane 3; *Pasteurella multocida* 4D.

2. 백신접종계에서의 난황항체가 변화

가. 산란계에서의 1차 접종 시험 결과

1) 위축성비염 원인체로 면역된 닭의 항체가 변화

면역된 닭의 혈중 항체는 접종 전 및 1차 접종 후 2주 간격으로 채혈하여 ELISA로 측정하였다. Aluminum hydroxide gel을 adjuvant로 사용한 1번 그룹은 첫 접종후 산란을 멈추었으며 주저앉음, 침울, 설사 등의 증상을 보이다가 6주 내에 모두 폐사하였다. ISA75를 사용한 5번군에서의 *B. bronchiseptica*와 *P. multocida* 4D의 혈중항체가 변화는 비슷한 양상을 띠고 있었으며 항체가 6주째 최고치를 나타내었다(Fig 7). 면역된 닭의 난황항체를 난황추출액을 이용하여 ELISA로 측정한 결과 ISA75의 adjuvant를 이용한 그룹에서 위축성비염의 난황항체가 역시 *B. bronchiseptica*와 *P. multocida* 4D가 비슷한 양상으로 변화하였다. 항체는 1차접종후 급격히 증가하였으며 8주를 최고치로 하여 그 후 점차 감

소하는 경향 나타내었으나 11주까지도 높은 항체를 계속 유지하고 있었다. 혈중항체가와 난황항체를 비교해 볼 때 난황항체는 혈청 중의 항체가보다는 다소 낮았지만 대조군의 3배이상의 항체를 유지하였고 혈청보다 오래 항체를 보유하고 있었다(Fig 8).

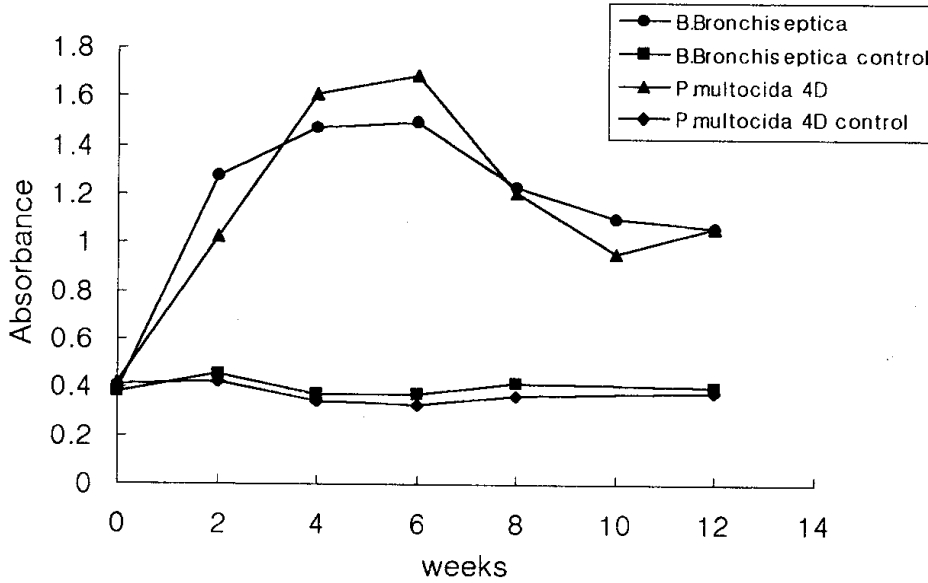


Fig 7. Immune response in sera of hens immunized with antigens of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* 4D with ISA75 as adjuvant.

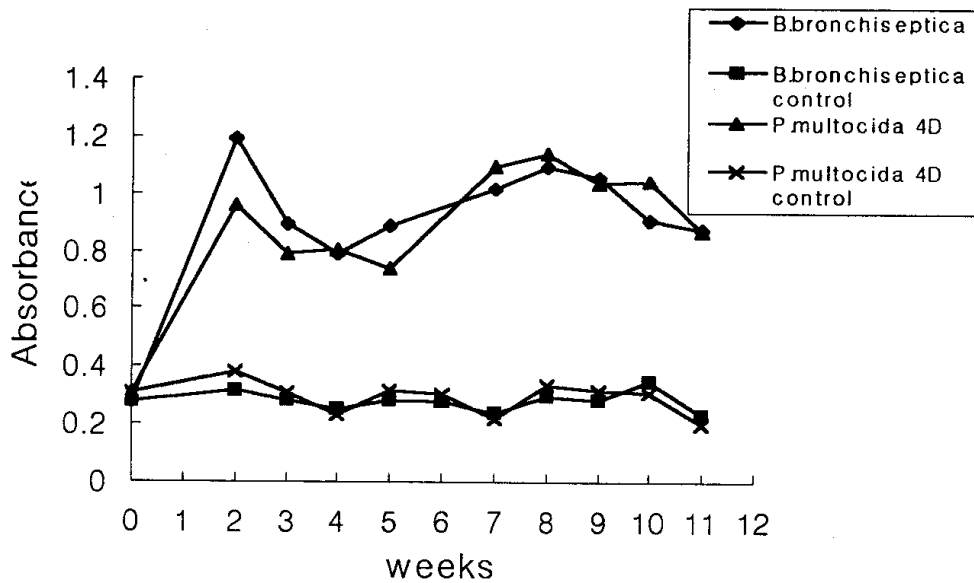


Fig 8. Immune response in egg yolk antibodies of hens immunized with antigens of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* 4D with ISA75 as adjuvant.

2) 파스튜렐라성 폐렴의 원인체로 면역된 닭의 항체가 변화

P. multocida 3A를 접종한 처치군에서의 혈중항체는 대조군의 약 2배 정도의 항체를 나타내었다. 1차접종 후에 8번군($p < 0.01$)을 제외한 다른 군은 항체가 증가율이 매우 저조하였으나, 2번군과 4번군의 경우 첫 접종 2주후부터 항체가 상승이 뚜렷하였다($p < 0.05$). 6번군은 첫 접종 4주 후부터 항체가 상승에 있어서 유의성 있는 차이를 나타내었다($p < 0.01$). 2차 및 3차 접종 후에는 항체가 증가율이 현저하지는 않지만 12주까지 계속 증가하는 양상을 나타내었다(Fig 9). Adjuvant에 따른 난황종의 항체가 변화는 ISA75를 사용한 경우에 Aluminum hydroxide gel을 사용한 경우보다 높은 항체가 및 초기면역 형성이 현저하였으며, *P. multocida* 3A 단독 및 *A. pleuropneumoniae* 와의 복합 투여의 경우에는 복합투여한 경우 더 높은 항체를 나타내었고, 모든 *P. multocida* 3A 처치군에서 6-8주 사이에 정점

에 도달한 후 점차 감소하였다(Fig 10).

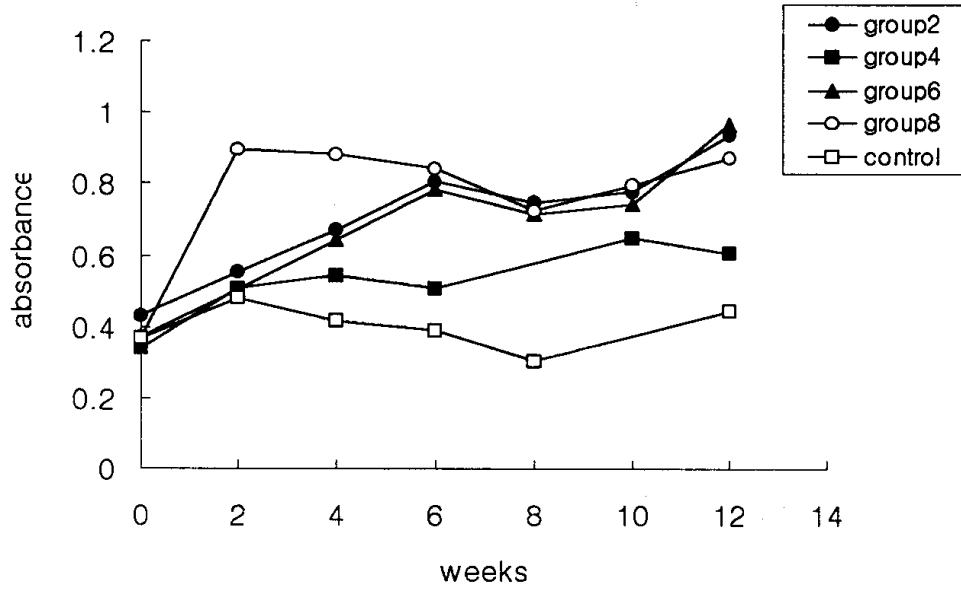


Fig 9. Immune response against *P. multocida* 3A in sera of hens immunized with *P. multocida* 3A alone or combined with *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5 with aluminum hydroxide gel and *P. multocida* 3A alone or combined with *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5 with ISA75.

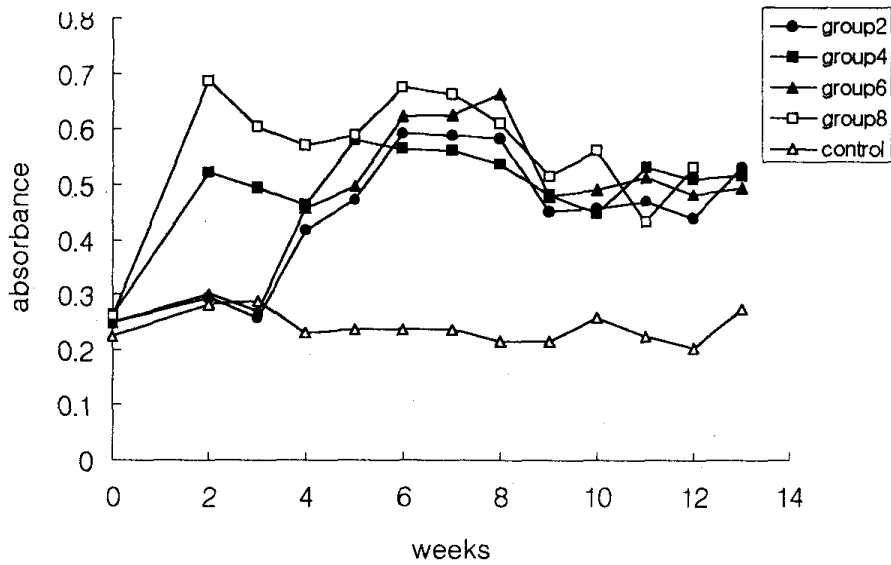


Fig 10. Immune response against *P. multocida* 3A in egg yolk antibodies of hens immunized with *P. multocida* 3A alone or combined with *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5 with aluminum hydroxide gel and *P. multocida* 3A alone or combined with *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5 with ISA75.

3) 흉막폐렴 원인체로 면역한 닭에서의 항체가 변화

A. pleuropneumoniae type 2와 type 5를 2주 간격으로 3회 접종한 후 혈중 및 난황항체가 변화를 조사한 결과, *A. pleuropneumoniae* type 2의 경우 혈중항체는 대조군의 3배 이상 증가하였으며 1차, 2차 및 3차 접종으로 계속 면역반응이 증가 되었다. *P. multocida* 3A와 혼합접종한 8번군의 항체가가 가장 높았으며 adjuvant 면에 있어서는 *P. multocida* 3A 접종군과 마찬가지로 ISA75를 사용한 경우에 면역반응 유도가 더 현저하였다 (Fig 11). 난황항체가 역시 adjuvant 별로 양상이 다르게 나타났으며 ISA75가 더 높은 항체를 나타내었고 초기면역을 더 잘 유도하였다. 항체

가 최고치는 ISA75를 사용한 경우 첫 접종 후 8주, aluminum hydroxide gel을 사용한 경우 6-7주로 aluminum hydroxide gel이 oil보다 항체가 최고치에 먼저 도달하였으나, 항체의 소실도 빨랐다(Fig 12). *A. pleuropneumoniae* type 5 역시, 혈중항체가 면에서 adjuvant 별로 다른 변화양상을 나타냈는데 type 2와 마찬가지로 ISA75 사용시에 초기면역 유도 및 항체가 상승률이 현저하였다(Fig 13). 난황항체는 6주에 정점을 나타냈으나 초기면역이 잘 이루어졌음에도 불구하고 항체가 증가치 변화는 전반적으로 낮았다. type 5에서는 *P. multocida* 3A와의 혼합백신의 항체가 상승이 홍막폐렴 단독 투여군보다 다소 높았으며 특히, oil adjuvant를 사용한 8번군이 대조군의 3배 가까이 항체가 증가함을 보였다(Fig 14).

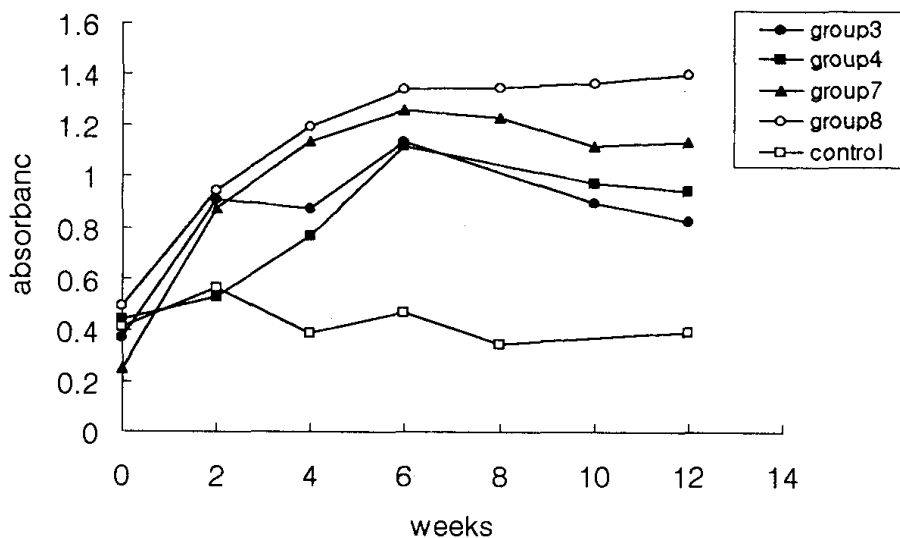


Fig 11. Immune response against *A. pleuropneumoniae* serotype 2 in sera of hens immunized with *A. pleuropneumoniae* serotype 2 combined with *A. pleuropneumoniae* serotypes 5 or *P. multocida* 3A and *A. pleuropneumoniae* serotype 5 with aluminum hydroxide gel and *A. pleuropneumoniae* serotype 2 combined with *A. pleuropneumoniae* serotype 5 or *P. multocida* 3A and *A. pleuropneumoniae* serotype 5 with ISA75.

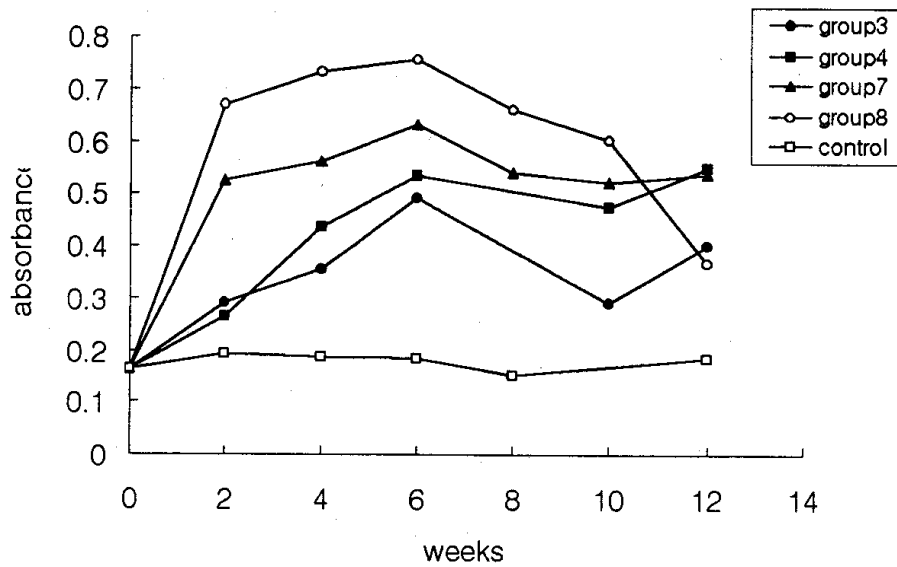


Fig 12. Immune response against *A. pleuropneumoniae* serotype 2 in egg yolk antibodies of hens immunized with *A. pleuropneumoniae* serotype 2 combined with *A. pleuropneumoniae* serotype 5 or *P. multocida* 3A and *A. pleuropneumoniae* serotype 5 with aluminum hydroxide gel and *A. pleuropneumoniae* serotype 2 combined with *A. pleuropneumoniae* serotype 5 or *P. multocida* 3A and *A. pleuropneumoniae* serotype 5 with ISA75.

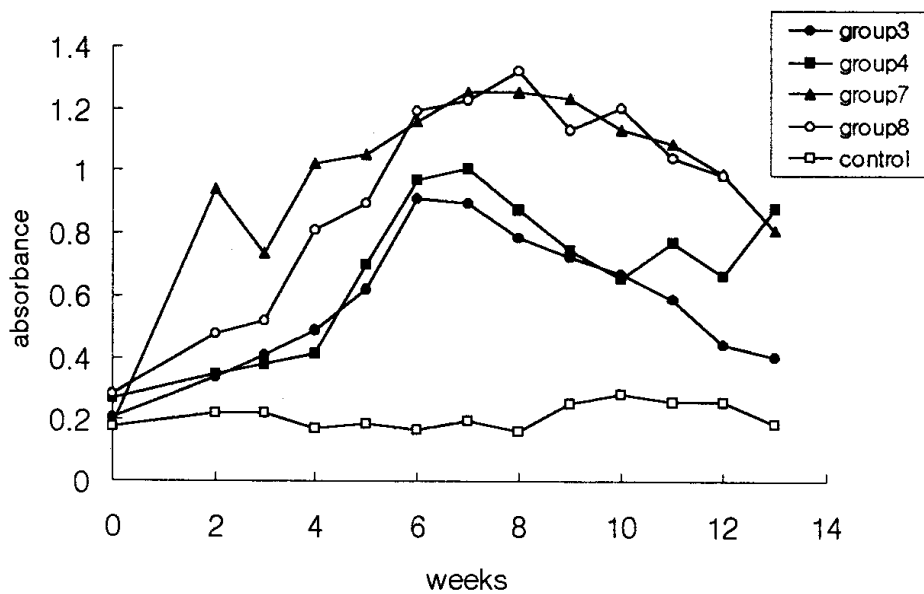


Fig 13. Immune response against *A. pleuropneumoniae* serotype 5 in sera of hens immunized with *A. pleuropneumoniae* serotype 5 combined with *A. pleuropneumoniae* serotype 2 or *P. multocida* 3A and *A. pleuropneumoniae* serotype 2 with aluminum hydroxide gel and *A. pleuropneumoniae* serotype 5 combined with *A. pleuropneumoniae* serotype 2 or *P. multocida* 3A and *A. pleuropneumoniae* serotype 2 with ISA75.

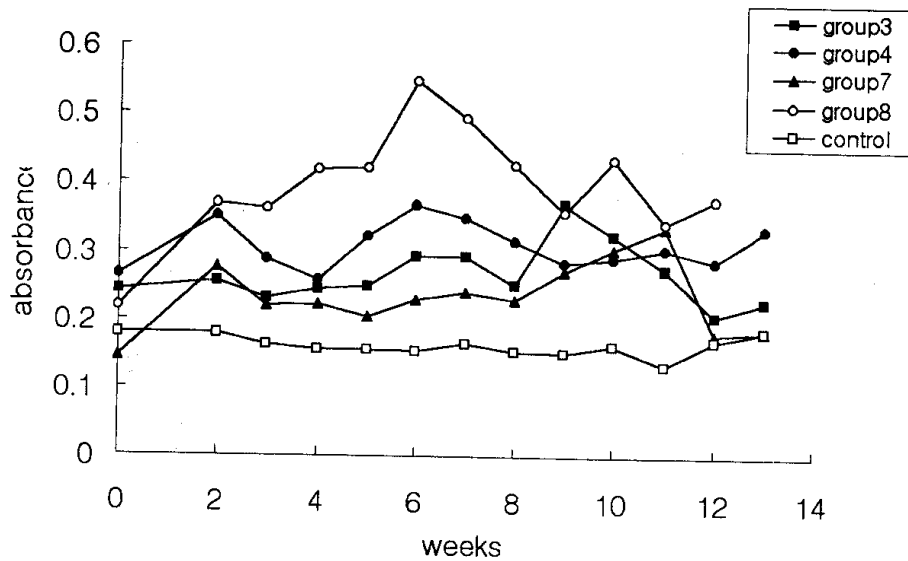


Fig 14. Immune response against *A. pleuropneumoniae* serotype 5 in egg yolk antibodies of hens immunized with *A. pleuropneumoniae* serotype 5 combined with *A. pleuropneumoniae* serotype 2 or *P. multocida* 3A and *A. pleuropneumoniae* serotype 2 with aluminum hydroxide gel and *A. pleuropneumoniae* serotype 5 combined with *A. pleuropneumoniae* serotype 2 or *P. multocida* 3A and *A. pleuropneumoniae* serotype 2 with ISA75.

4) 산란율

산란율을 1차 접종시부터 11주동안 조사한바, 1번군은 1 차 접종후부터 산란을 하지 않았고 6주 안에 모두 폐사했으나 1번군을 제외한 다른 군의 닭은 모두 생존하여란을 생산하였다. 5번군의 경우 3회 접종이 끝난 다음 산란율이 매우 저조하였으나 점차 회복되었고, 각 군당 산란율은 Fig.15과 같다.

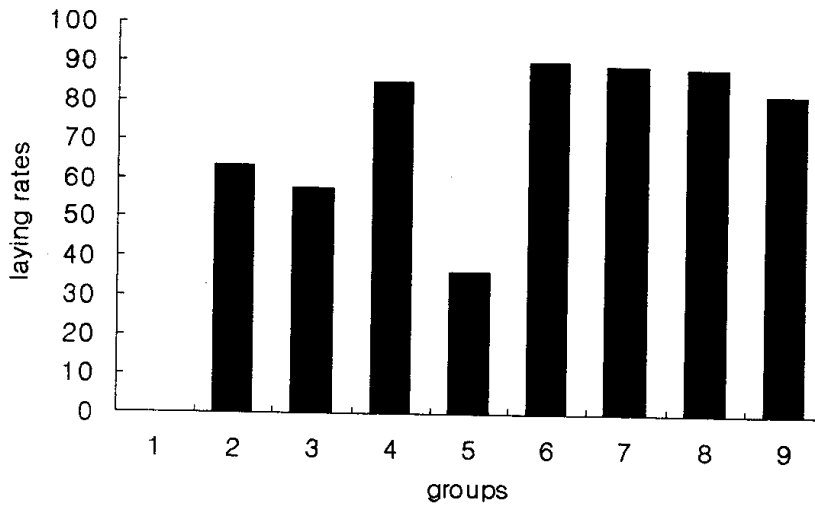


Fig 15. Comparison of laying rates among experimental groups.
Explanation of each group was specified in Table 2.

나. 산란계에서의 2차시험접종 결과

1) *B. bronchiseptica*에 대한 혈중 및 난황 항체가 변화

*B. bronchiseptica*는 1번에서 4번까지의 그룹에 대하여 적용되었으며, 혈중 및 난황 항체는 접종 전 및 접종 후 약 2주 혹은 1주 간격으로 계란 및 혈청을 수집하여 DNT와 OMP를 항원으로 하여 ELISA로 측정하였다. 위축성 비염 원인체를 접종한 모든 그룹에 있어서 DNT와 OMP에 대한 혈청내 항체는 약 4-8주, 난황내 항체는 약 6-10주 사이에 최고치를 나타내었고 대조군에 비해 3배 이상의 높은 항체가 상승률을 나타내었으며 첫 접종 14주 후 4차 접종을 실시한 후 난황 및 혈청내 항체가 재상승하였다.

*B. bronchiseptica*의 OMP에 대한 난황내 항체를 조사한 결과, 1차 접종시 DNT가 포함되어 있던 2번과 4번 그룹의 경우 whole cell만 투여된 1번과 3번 그룹에 비하여 초기면역 형성이 현저하였으며 1차에 whole cell을, 2차에 DNT를 접종한 3번 그룹의 경우 DNT를 접종한 후 항체가 급상

승하였다. 또한 DNT만을 접종한 2번 그룹이 위축성 비염에 대한 항원을 접종한 그룹 중 가장 먼저 최고치에 도달하였으며 4차 접종을 실시하기까지 높은 항체가를 가장 안정적으로 유지하였다. whole cell만을 접종한 1번 그룹의 경우 대조군의 약 3배 가량 항체가가 상승하였으나 가장 낮은 항체가 상승률을 나타내었다. 혈청내 항체가 역시 난황내 항체가와 마찬가지로 2번 그룹이 가장 우수하였으며 1, 3 및 4번 그룹이 유사한 항체가 변화 양상을 보였으나 그중 1번 그룹의 항체가가 가장 낮았다.

*B. bronchiseptica*의 DNT에 대한 난황내 항체가를 조사한 결과, OMP와 마찬가지로 DNT가 포함된 1번과 4번 그룹의 초기면역 형성이 현저하였으며, 2번 그룹이 항체가 유지 면에서 가장 안정적이고 대조군의 7배 이상으로 가장 높은 항체가를 나타내었다. 또한 1번과 3번 그룹의 항체가 상승 양상이 유사하였으나 3번 그룹이 1번 그룹보다 항체가 상승 정도 및 안정성에 있어서 더 우수하였다. 전체적인 항체가 상승 정도 면에 있어서도 2, 4, 3번 및 1번 순으로 OMP와 유사한 결과를 나타내었다. 혈청내 항체가는 모든 그룹이 대체적으로 유사하였으나 난황내 항체가와 마찬가지로 1번 그룹이 현저히 낮았다.

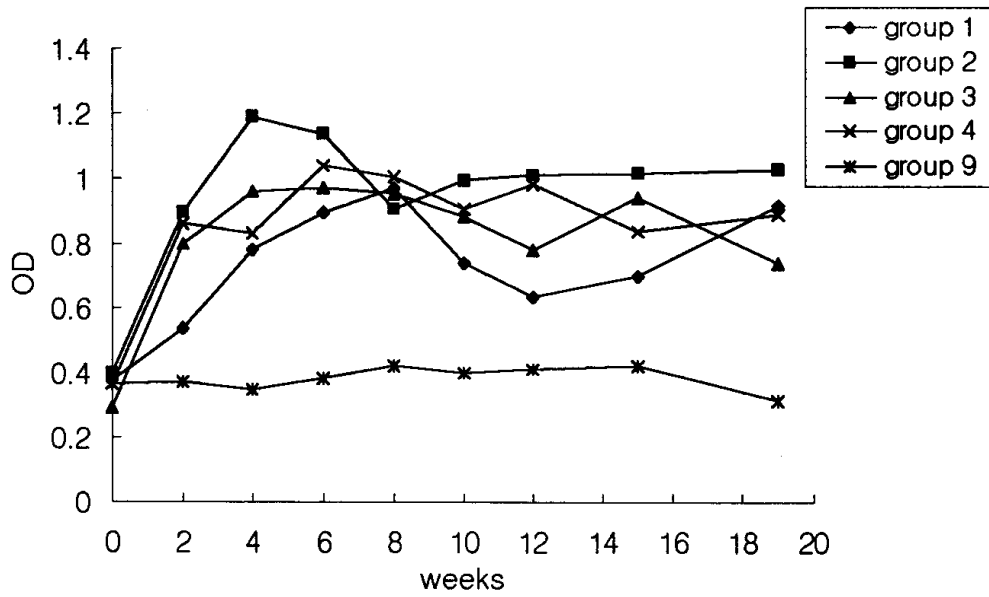


Fig 16. Immune response in sera of hens immunized with OMP of *Bordetella bronchiseptica* with ISA75 as adjuvant.

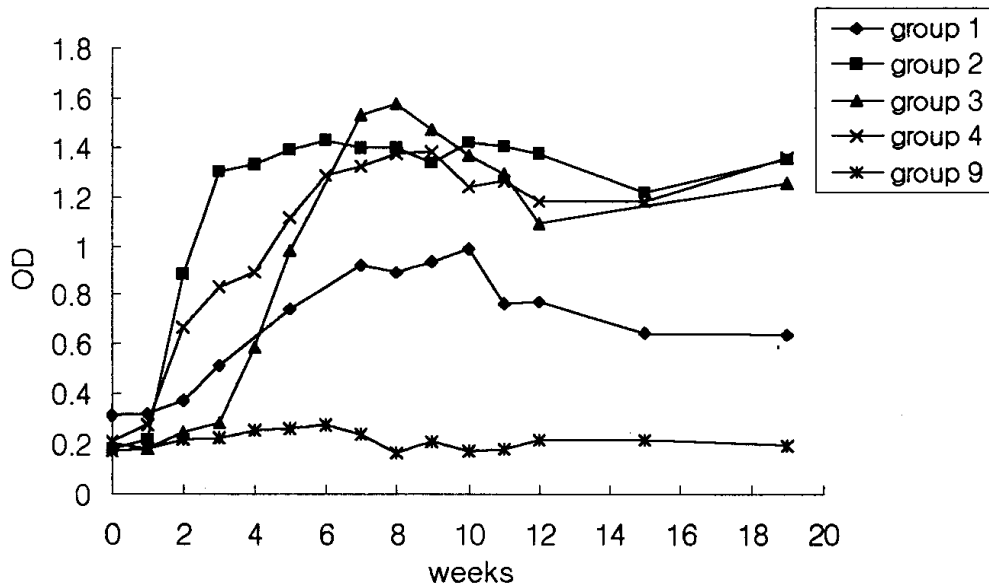


Fig 17. Immune response in egg yolk antibodies of hens immunized with OMP of *Bordetella bronchiseptica* with ISA75 as adjuvant.

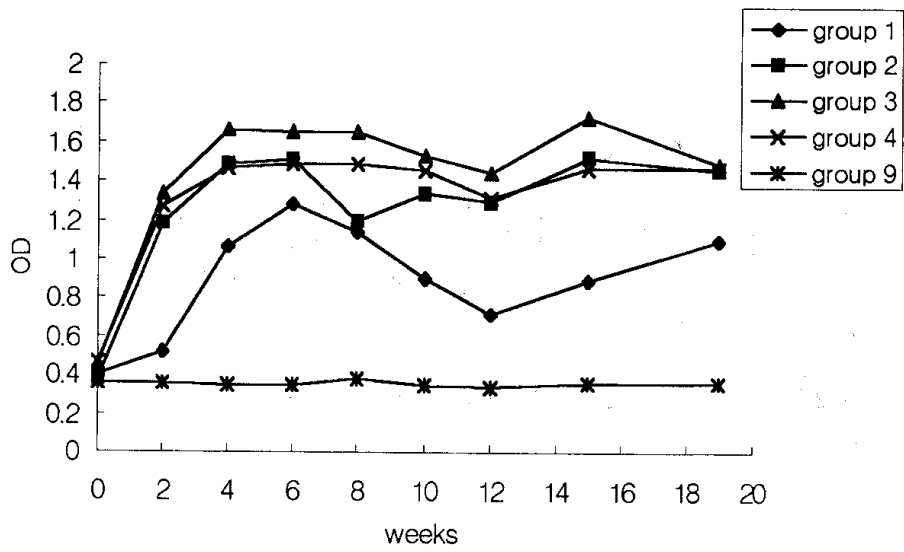


Fig 18. Immune response in sera of hens immunized with DNT of *Bordetella bronchiseptica* with ISA75 as adjuvant.

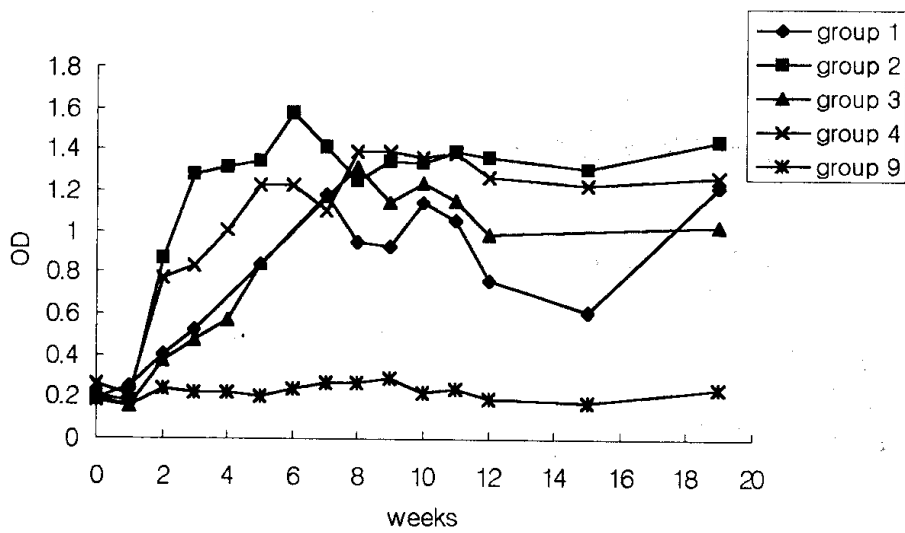


Fig 19. Immune response in egg yolk antibodies of hens immunized with DNT of *Bordetella bronchiseptica* with ISA75 as adjuvant.

2) *P. multocida* 4D에 대한 혈중 및 난황 항체가 변화

P. multocida 4D는 *B. bronchiseptica*와 같이 1번에서 4번까지의 그룹에 대하여 적용되었으며, *P. multocida* 4D의 변화 양상 역시 *B. bronchiseptica*와 유사하였다. 즉, 위축성 비염 원인체를 접종한 모든 그룹에 있어서 혈청내 항체는 약 4-8주, 난황내 항체는 약 6-10주 사이에 최고치를 나타내었으며, 난황내 항체가 대조군에 비해 3배 이상의 항체가 상승률을 나타내었다.

P. multocida 4D의 OMP에 대한 난황내 항체를 조사한 결과, *B. bronchiseptica*에 대한 결과와 대조적으로 DNT만 접종한 2번 그룹이 초기 면역 형성 및 항체가 상승률이 가장 낮았으며, 항체가 빨리 하강하였다. 또한 1번과 4번 그룹이 유사한 항체가 변화양상을 보이나 전체적으로 1번의 항체가 더 우수하였으며 높은 항체를 지속적으로 유지하였고, 결과적으로 항체가 상승 정도는 1, 4, 3, 2번 그룹 순으로 나타났다. 혈청내 항체는 대체로 유사하나 난황과 마찬가지로 1번과 4번 그룹 항체가 변화 양상이 유사하였으며 1번 그룹이 가장 높은 항체를 지속적으로 유지하였고, 2번 그룹의 항체가 가장 먼저 하강하기 시작하였다.

P. multocida 4D의 DNT에 대한 난황내 항체를 조사한 결과, OMP에 대한 결과와 마찬가지로 whole cell만 접종한 1번 그룹의 항체가 상승률이 가장 높았으며, 4차 접종 후에도 항체가 가장 현저하게 상승하였다. 또한 2번 그룹의 항체가 가장 먼저 최고치에 도달하였으나 가장 먼저 하강하기 시작하였으며 3번과 4번 그룹이 유사한 양상이 나타내었으나 1차접종 시 DNT가 포함되어 있는 4번 그룹의 항체가 3번 그룹보다 먼저 상승하였다. 즉, 결과적으로 DNT 접종시 whole cell보다 먼저 항체가 상승 및 하강하였다. 혈청내 항체는 모든 그룹이 유사한 양상을 나타내었으며, 항체의 상승 및 하강이 뚜렷하였고 4차 접종 후 1번 그룹 상승률이 가장 현저하였다.

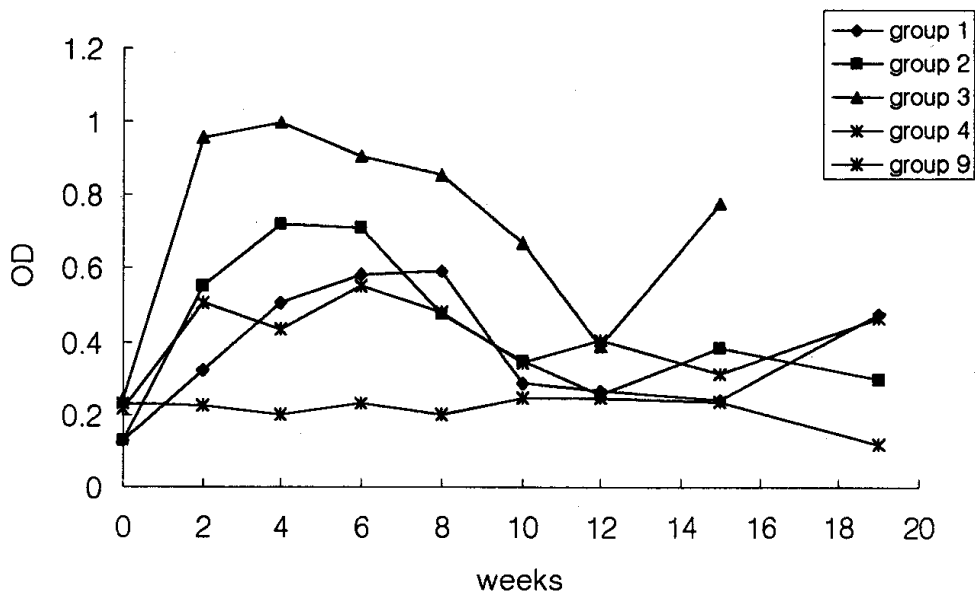


Fig 20. Immune response in sera of hens immunized with OMP of *Pasteurella multocida* 4D with ISA75 as adjuvant.

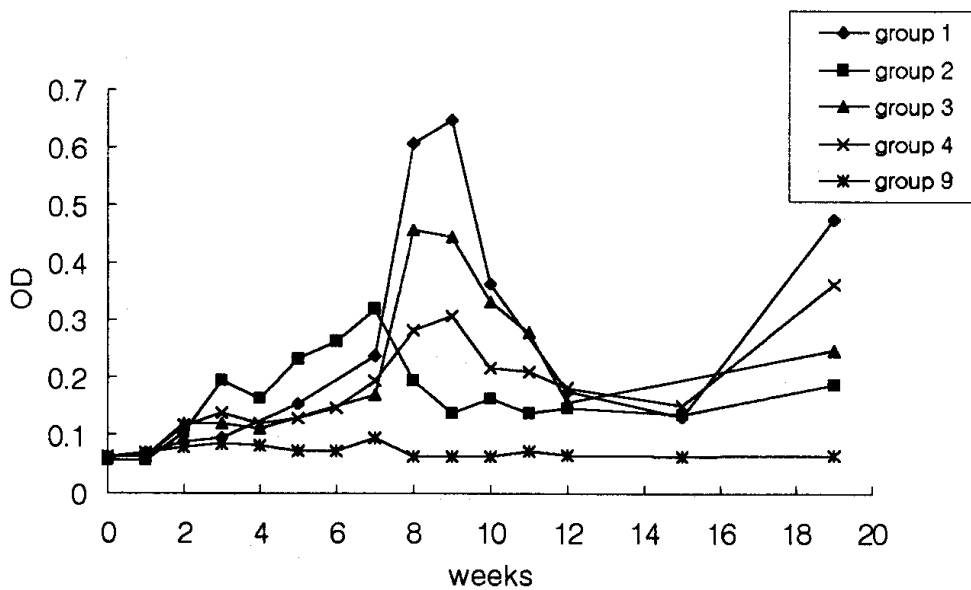


Fig 21. Immune response in egg yolk antibodies of hens immunized with OMP of *Pasteurella multocida* 4D with ISA75 as adjuvant.

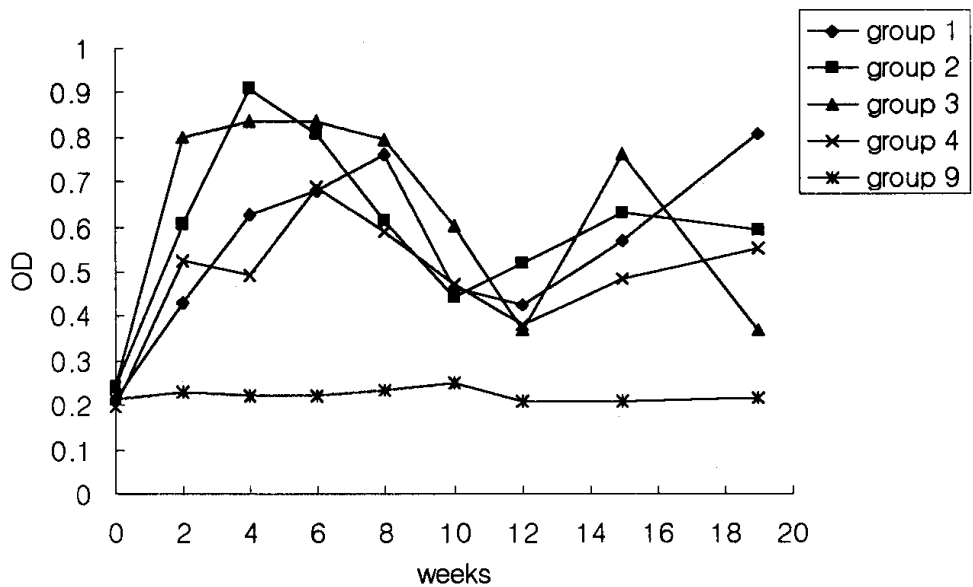


Fig 22. Immune response in sera of hens immunized with DNT of *Pasteurella multocida* 4D with ISA75 as adjuvant.

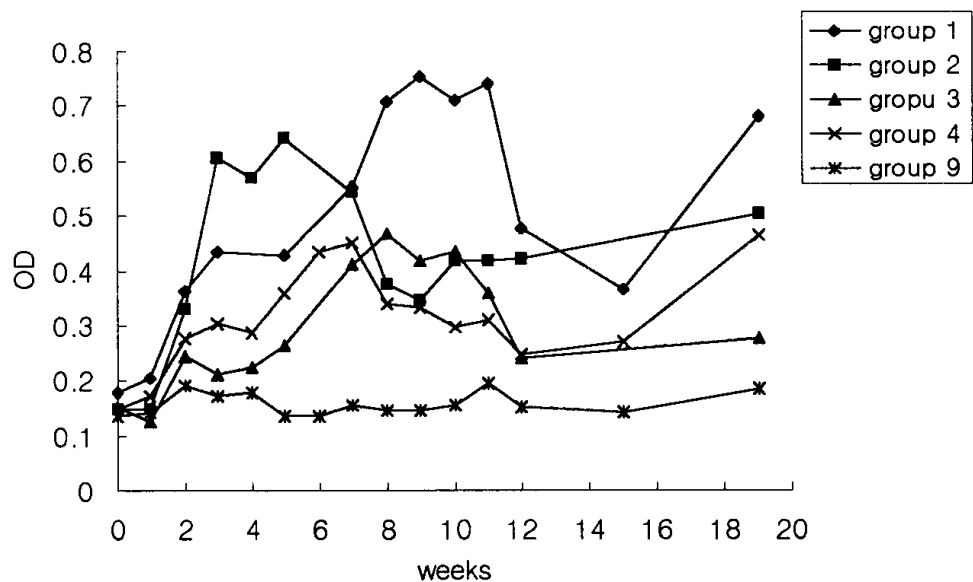


Fig 23. Immune response in egg yolk antibodies of hens immunized with DNT of *Pasteurella multocida* 4D with ISA75 as adjuvant.

3) *P. multocida* 3A에 대한 혈중 및 난황 항체가 변화

P. multocida 3A에 대한 혈중 및 난황 항체는 모든 그룹에 있어서 항체가 상승 정도의 차이는 있었으나 유사한 항체가 변화 양상을 나타내었다. 1차 접종은 *P. multocida* 3A의 live cell을, 2차 접종은 killed cell을 접종한 5번 그룹의 경우 혈중 항체는 어느 정도 형성이 되었으나 난황내 항체는 대조군의 약 2배로 가장 낮은 증가치를 나타내었으며 4차 접종 후에도 항체가 증가가 거의 이루어지지 못하였다. *P. multocida* 3A의 whole cell과 IROMP를 투여한 6번 그룹은 파스튜렐라성 폐렴 원인균을 투여한 모든 그룹 중 초기 면역 형성이 가장 먼저 이루어졌으며 난황 및 혈청내 항체가 또한 가장 높이 상승하였다. 난황내 항체는 대조군의 4배 이상 상승하였으며 첫 접종 후 약 6주경에 최고치를 나타낸 후 높은 항체를 계속 유지하다가 4차 접종 후 재상승하였다. *A. pleuropneumoniae* serotype 2와 5를 혼합 투여한 8번 그룹의 경우 혈청 항체는 가장 낮았으나 난황내 항체는 대조군의 3.5배 정도 증가하여 6번 그룹과 유사한 정도의 증가율을 나타내었다.

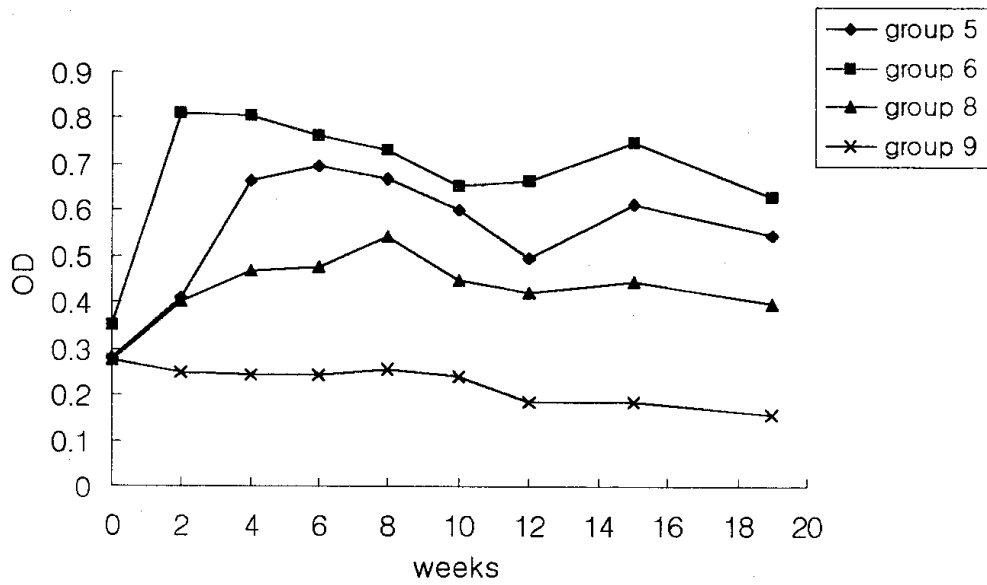


Fig 24. Immune response against *P. multocida* 3A in sera of hens immunized with *P. multocida* 3A alone or combined with *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5 with ISA75.

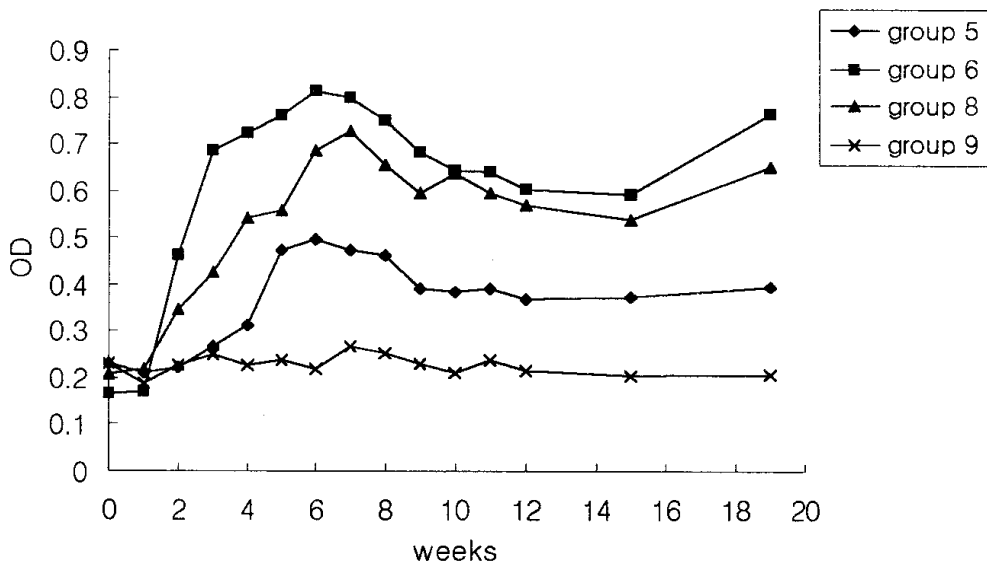


Fig 25. Immune response against *P. multocida* 3A in egg yolk antibodies of hens immunized with *P. multocida* 3A alone or combined with *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5 with ISA75.

4) *A. pleuropneumoniae* serotypes 2와 5에 대한 혈중 및 난황 항체가 변화

*A. pleuropneumoniae*를 접종한 모든 그룹에서 난황 및 혈중 항체는 1차 접종 후 3차 접종까지 지속적으로 증가하였으며, 3차 접종 후 4차 접종을 실시한 14주까지 대조군의 4배 이상의 높은 항체를 유지하였다. *A. pleuropneumoniae* serotype 2에 대한 혈중 항체는 홍막폐렴 원인체의 단독 접종군인 7번 그룹이 파스튜렐라성 폐렴 원인체와의 혼합 접종군인 8번 그룹보다 높았으나 난황 항체는 유사하였으며, 두 그룹의 난황 및 혈청에서의 항체가 변화 양상은 매우 유사하였다. *A. pleuropneumoniae* serotype 5에 대한 혈중 항체는 serotype 2와는 반대로 8번 그룹이 7번 그룹보다 높은 항체를 나타내었으나 난황 항체는 두 그룹이 유사하였고, 두 그룹의 그래프 변화 양상도 *A. pleuropneumoniae* serotype 2와 마찬가지로 유사하였다.

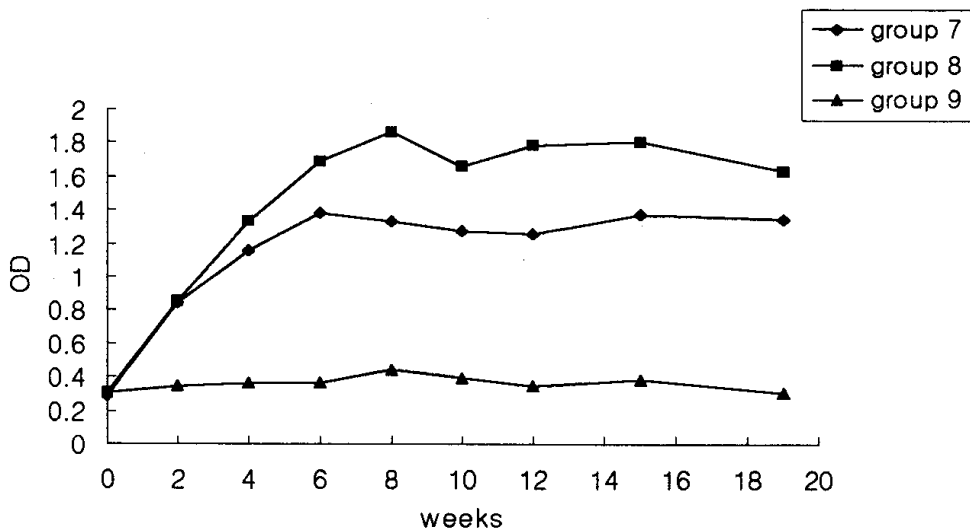


Fig 26. Immune response against *A. pleuropneumoniae* serotype 2 in sera of hens immunized with *A. pleuropneumoniae* serotype 2 combined with *A. pleuropneumoniae* serotypes 5 or *P. multocida* 3A and *A. pleuropneumoniae* serotype 5 with ISA75.

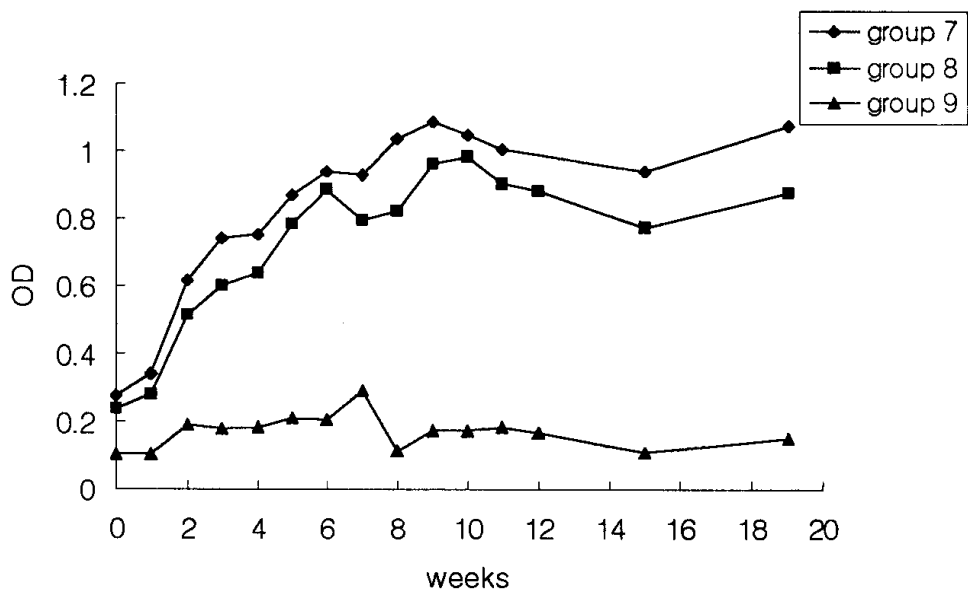


Fig 27. Immune response against *A. pleuropneumoniae* serotype 2 in egg yolk antibodies of hens immunized with *A. pleuropneumoniae* serotype 2 combined with *A. pleuropneumoniae* serotype 5 or *P. multocida* 3A and *A. pleuropneumoniae* serotype 5 with ISA75.

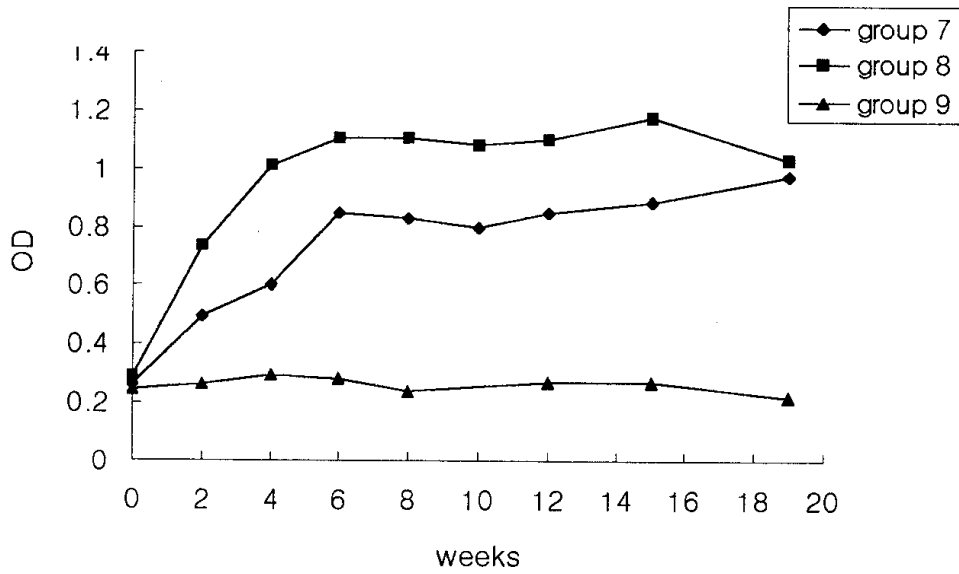


Fig 28. Immune response against *A. pleuropneumoniae* serotype 5 in sera of hens immunized with *A. pleuropneumoniae* serotype 5 combined with *A. pleuropneumoniae* serotype 2 or *P. multocida* 3A and *A. pleuropneumoniae* serotype 2 with ISA75.

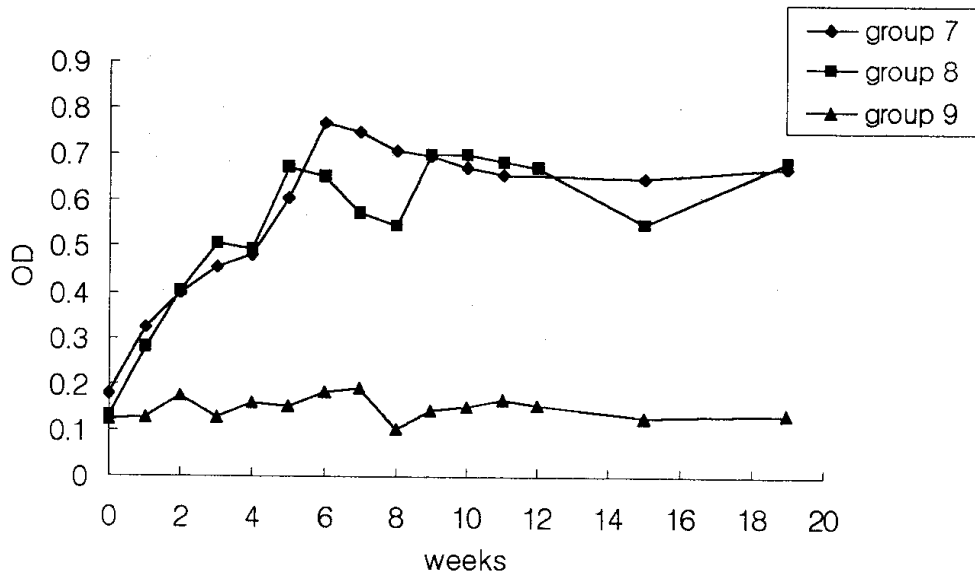


Fig 29. Immune response against *A. pleuropneumoniae* serotype 5 in egg yolk antibodies of hens immunized with *A. pleuropneumoniae* serotype 5 combined with *A. pleuropneumoniae* serotype 2 or *P. multocida* 3A and *A. pleuropneumoniae* serotype 2 with aluminum hydroxide gel and *A. pleuropneumoniae* serotype 5 combined with ISA75.

5) 산란율

B. bronchiseptica 와 *P. multocida* 4D 혼합접종군에서의 산란율 및 생존율은 다양하게 나타났다. 대조군의 산란율을 100%로 환산하여 고려해 볼 때, 2번 그룹에서 산란율이 가장 높았으며, 접종한 모든 산란계가 생존하였다. 하지만 다른 그룹에서의 산란율은 약 60 % 정도에 머물렀으며, 산란율도 각각 87.5, 62.5 and 50%로 나타났다. *B. bronchiseptica* 와 *P. multocida* 4D 혼합접종군의 산란계들은 1차 백신접종 후 산란을 일시적으로 멈추었으나 점차 회복되었다. *A. pleuropneumoniae* serotypes 2와 5 단독접종군은 산란율에 있어서 *P. multocida* 3A와의 복합접종군보다 매우 효과적이었다.

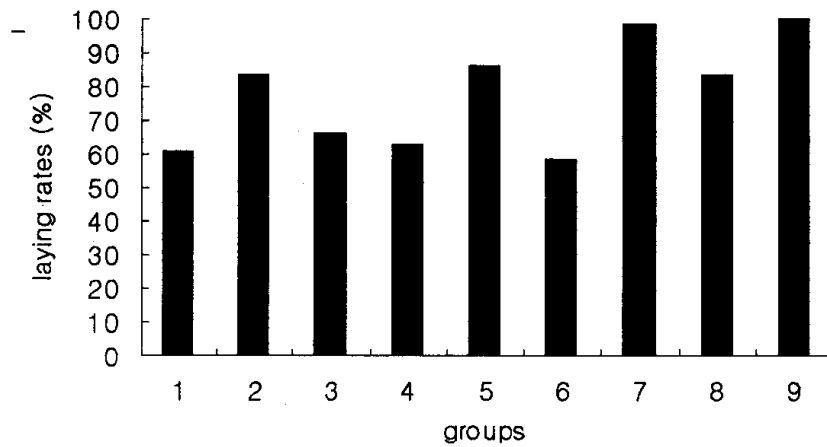


Fig 30. Comparison of laying rates among experimental groups.

Explanation of each group was specified in Table 3.

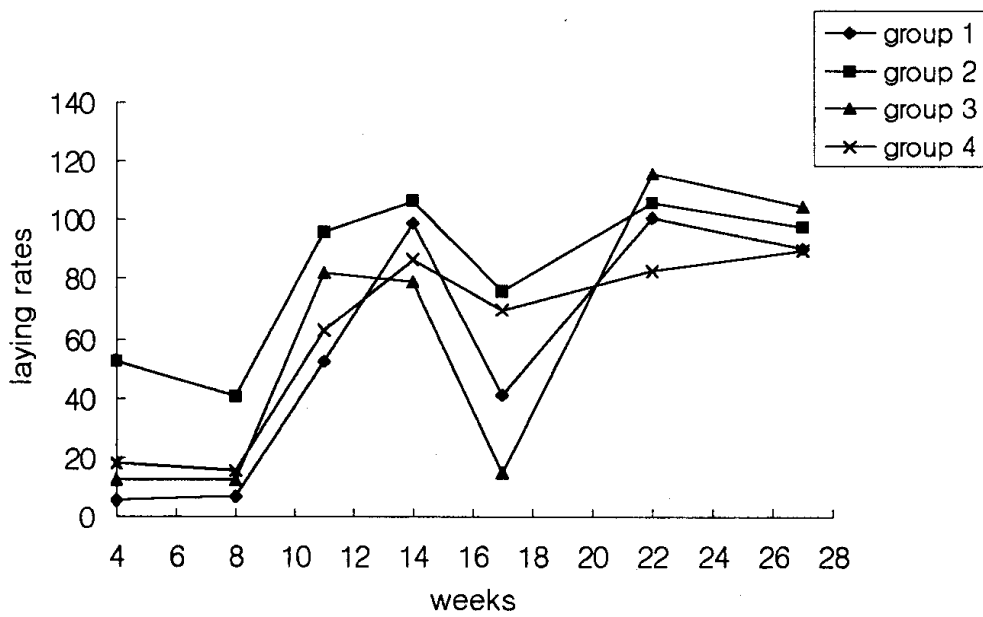


Fig 31. Comparison of laying rates among experimental groups with antigens from causative agents of atrophic rhinitis.

3. 난황항체의 특이성 분석

난황항체를 이용하여 Western blot을 조사한 결과, 각 투여군마다 접종에 사용한 항원에 대한 특이성을 가지고 있음을 확인하였다. *B. bronchiseptica*와 *P. multocida* 4D에 대해서는 백신접종의 구성성분으로 사용한 whole cell bacterin 및 DNT와 더불어 OMP를 항원으로 하여 Western blot을 실시한 결과 *B. bronchiseptica*의 경우 whole cell bacterin에 대하여 18, 38, 65kDa의 band가, DNT에 대하여 18kDa이, OMP에 대하여는 31 및 65kDa의 band가 확인되었으며, *P. multocida* 4D의 경우 모든 항원에 대하여 40 및 65kDa의 분자량을 가진 단백질에 대한 항체가 형성되었음을 확인하였다(Fig 32). *P. multocida* 3A에 대해서는 41과 110kDa(Fig 33)이 주요 band로 나타났으며, *A. pleuropneumoniae* serotypes 2와 5에 대해서는 40kDa과 47kDa 크기의 항원들과 특이적인 반응을 보였다(Fig 34 and Fig 35).

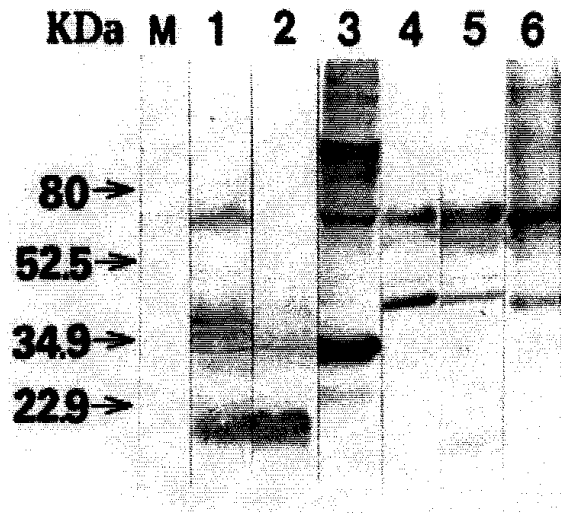


Fig 32. Immunological analysis of the egg yolk antibody of hens immunized with whole cell and dermonecrotxin(DNT) of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* 4D. Lane M: Molecular weight marker, lane 1: whole cell of *B. bronchiseptica*, lane 2: DNT of *B. bronchiseptica*, lane 3: OMP of *B. bronchiseptica*, lane 4: whole cell of *P. multocida* 4D, lane 5: DNT of *P. multocida* 4D, lane 6: OMP of *P. multocida* 4D.

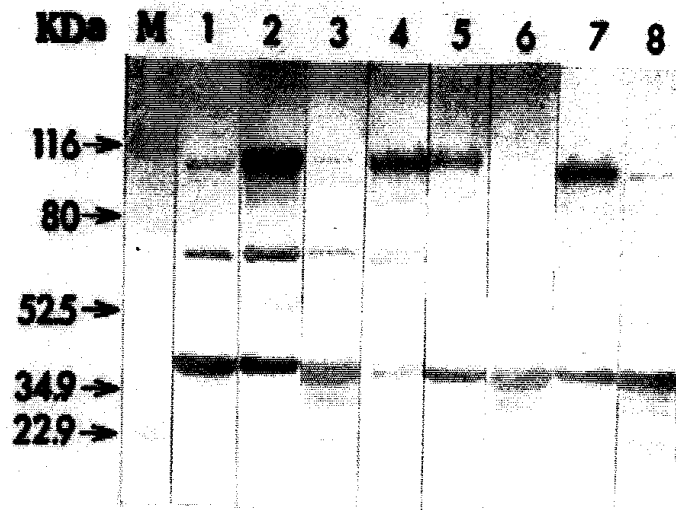


Fig 33. Immunological analysis of the egg yolk antibodies of hens immunized with *P. multocida* 3A OMP and whole cell. Lane M: Molecular weight marker, lane 1, 2, 3 and 4: Aluminum hydroxide gel, lane 5, 6, 7 and 8: ISA70. lane 1 and 5: whole cell with *P. multocida* 3A alone, lane 2 and 6: OMP with *P. multocida* 3A alone, lane 3 and 7: whole cell with *P. multocida* 3A combined with *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5, lane 4 and 8: OMP with *P. multocida* 3A combined with *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5.

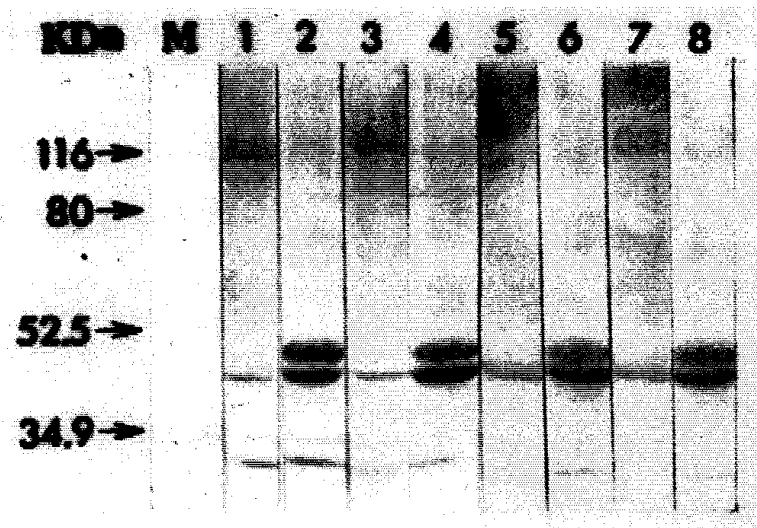


Fig 34. Immunological analysis of the egg yolk antibody of hens immunized with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 whole cell and OMP. Lane M: Molecular weight marker, lane 1, 2, 3 and 4: Aluminum hydroxide gel, lane 5, 6, 7 and 8: ISA70. lane 1 and 5: whole cell with *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5, lane 2 and 6: OMP with *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5, lane 3 and 7: whole cell with *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5 combined with *P. multocida* 3A, lane 4 and 8: OMP with *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and combined with *P. multocida* 3A.

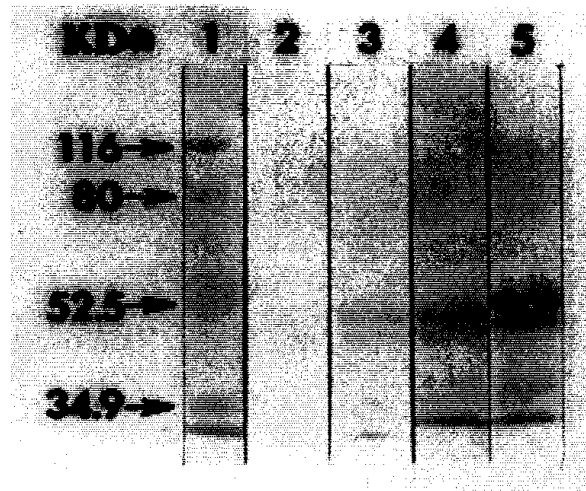


Fig 35. Immunological analysis of the egg yolk antibody of hens immunized with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 whole cell and OMP. Lane 1: Molecular weight marker, lane 2 and 3: Aluminum hydroxide gel, lane 4 and 5: ISA75. lane 2 and 4: OMP with *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5, lane 3 and 5: OMP with *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5 combined with *P. multocida* 3A.

4. 난황항체의 마우스에서의 예방효과 시험

가. 난황항체의 대량생산

Gum solution을 이용한 난황항체 추출은 산란계 첫 백신접종 후 10주 부터 2주 간격으로 3회 그룹별(Table 2)로 이루어 졌으며, 2번, 3번 및 4 번 그룹의 경우 각각 43, 56 및 59개, 5번그룹의 경우 31개, 6번, 7번 및 8번 그룹의 경우 각각 79, 120 및 102개의 계란을 처리하여, 총 528개의 계란으로부터 총 23,620ml의 난황항체를 추출하였다.

나. 추출한 난황항체의 분석

chloroform과 gum solution을 이용하여 추출한 난황항체를 분석하기 위해

항체액에 대한 SDS-PAGE를 실시한 결과, 64.4kDa과 32kDa의 두 band가 순수하게 분리되는 것을 확인하였다(Fig 36).

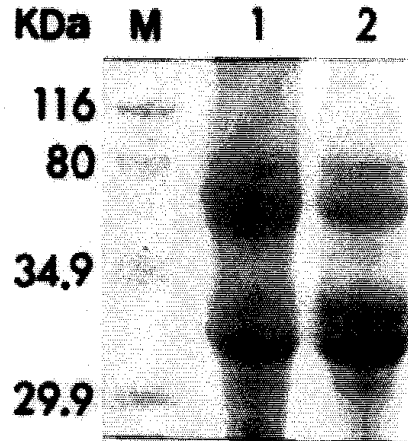


Fig 36. SDS-PAGE with IgY. Lane 1 ; IgY extracted with chloroform, Lane 2 ; IgY extracted with gum solution.

다. 돼지 호흡기 질병 세균성 원인체의 마우스에서의 Minimal lethal dose(MLD) 설정

마우스에 대한 돼지 세균성 호흡기 질병 각 원인체의 MLD를 구하기 위해 cfu/ml부터 10배 농도 단위로 마우스에게 균 접종 실험을 실시한 결과, *P. multocida* 4D에 대해서는 1.0×10^3 CFU가, *P. multocida* 3A에 대해서는 1.0×10^4 CFU가, *B. bronchiseptica*와 *A. pleuropneumoniae* serotype 2에 대해서는 1.0×10^8 CFU가, 그리고 *A. pleuropneumoniae* serotype 5에 대해서는 1.0×10^9 CFU가 MLD로 나타났다.

라. 난황항체의 마우스에서의 방어효과

B. bronchiseptica, *P. multocida* 3A와 4D 및 *A. pleuropneumoniae*

serotype 2에 대하여 난황항체의 마우스 방어효과에 대한 실험을 실시한 결과는 Figs 37-40과 같다. 즉, 모든 돼지 호흡기 질병 원인체에 대하여 PBS를 투여한 마우스는 모두 투여 1-3일 사이에 모두 치사하였으며, 난황항체 투여 후 MLD의 병원체를 투여한 마우스는 난황항체의 농도 100mg/ml 이상에서 방어효과를 나타내기 시작하였고 100, 200 및 400mg/ml로 농도가 증가함에 따라 방어효과도 증가하였다. *B. bronchiseptica*의 경우 투여한 난황항체 추출액의 모든 농도에 대하여 모든 마우스가 생존하여 병원체에 대하여 높은 방어효과를 나타내었으며 그에 비해 *P. multocida* 4D에 대해서는 고농도인 400mg/ml에서도 40%만이 생존하였다. *P. multocida* 3A에 대해서는 100과 200mg/ml에서 균점종 4일 후 40%의 생존율을 보였으나 고농도인 400mg/ml에서는 모든 마우스가 생존함으로써 우수한 방어효과를 나타내었고, *A. pleuropneumoniae* serotype 5의 경우 농도가 증가함에 따라 각각 20, 60, 100%의 생존율을 보였다.

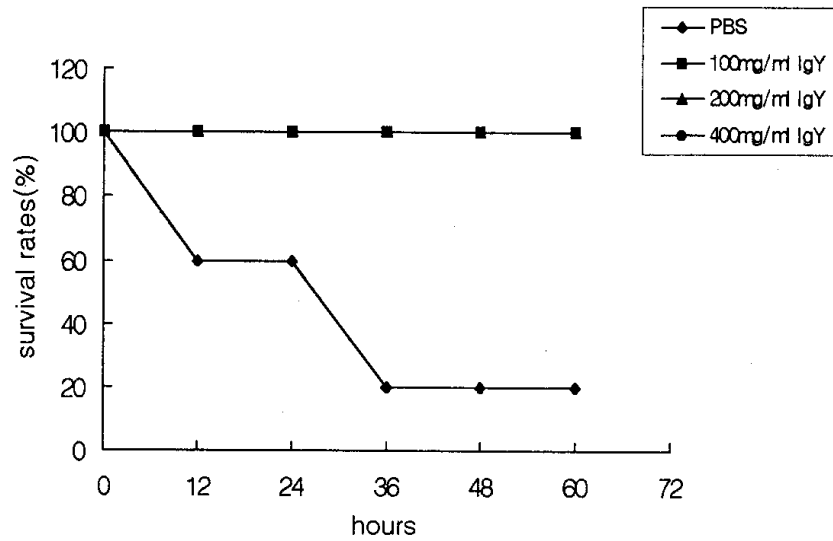


Fig 37. Protective effect of egg yolk antibody against *B. bronchiseptica* in mice. Mice were injected with 0.3ml of 100, 200 and 400mg/ml IgY twice in 24 hour-interval and challenged with 0.3ml of 1×10^8 CFU/ml of *B. bronchiseptica* per animal, intraperitoneally. Mice in control group were injected with 0.3ml of PBS before challenge with *B. bronchiseptica*. Survival was monitored for 3 days or until no further deaths.

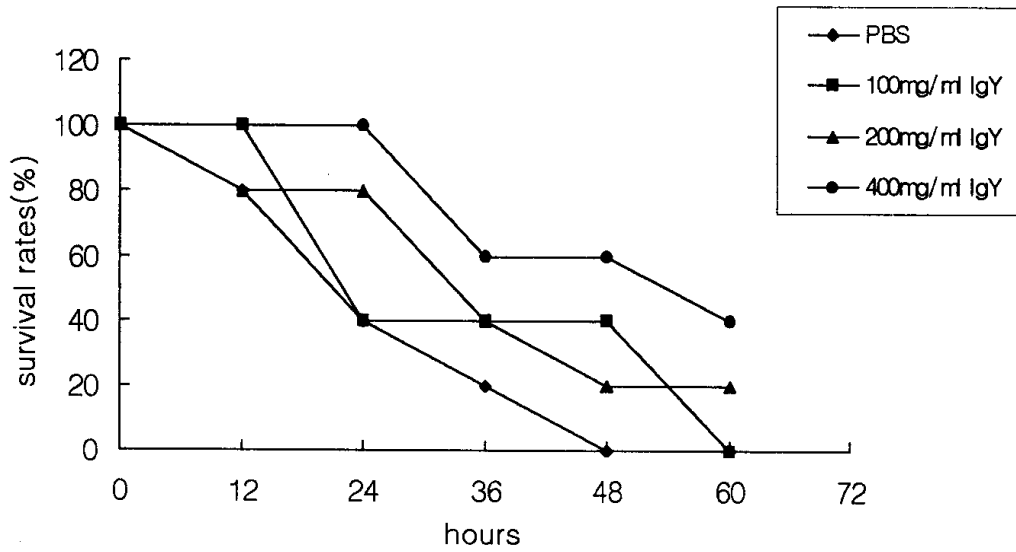


Fig 38. Protective effect of egg yolk antibody against *P. multocida* 4D in mice. Mice were injected with 0.3ml of 100, 200 and 400mg/ml IgY twice in 24 hour-interval and challenged with 0.3ml of 1×10^8 CFU/ml of *P. multocida* 4D per animal, intraperitoneally. Mice in control group were injected with 0.3ml PBS before challenge with *P. multocida* 4D. Survival was monitored for 3 days or until no further deaths.

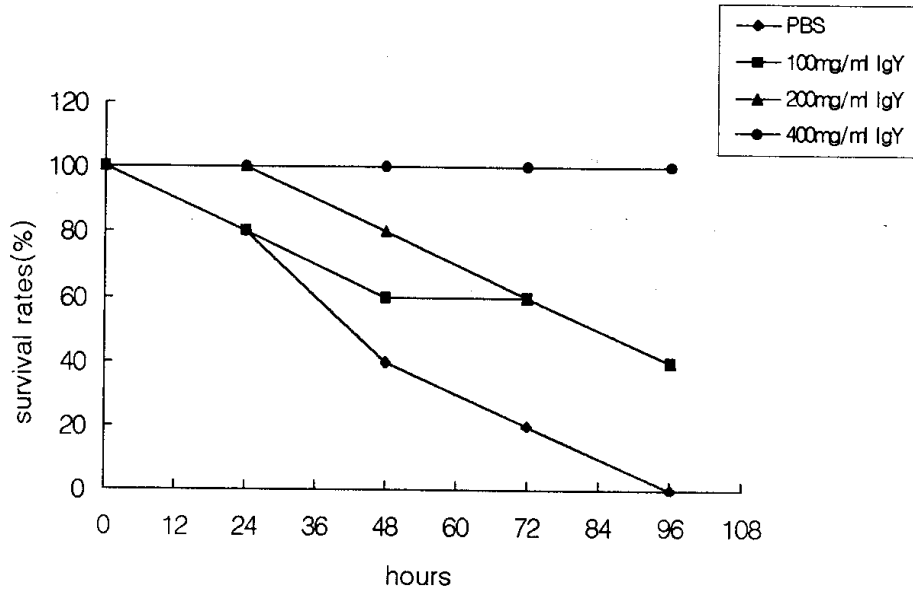


Fig 39. Protective effect of egg yolk antibody against *P. multocida* 3A in mice. Mice were injected with 0.3ml of 100, 200 and 400mg/ml IgY twice in 24 hour-interval and challenged with 0.3ml of 1×10^8 CFU/ml of *P. multocida* 3A per animal, intraperitoneally. Mice in control groups were injected with 0.3ml PBS before challenge with *P. multocida* 3A. Survival was monitored for 3 days or until no further deaths.

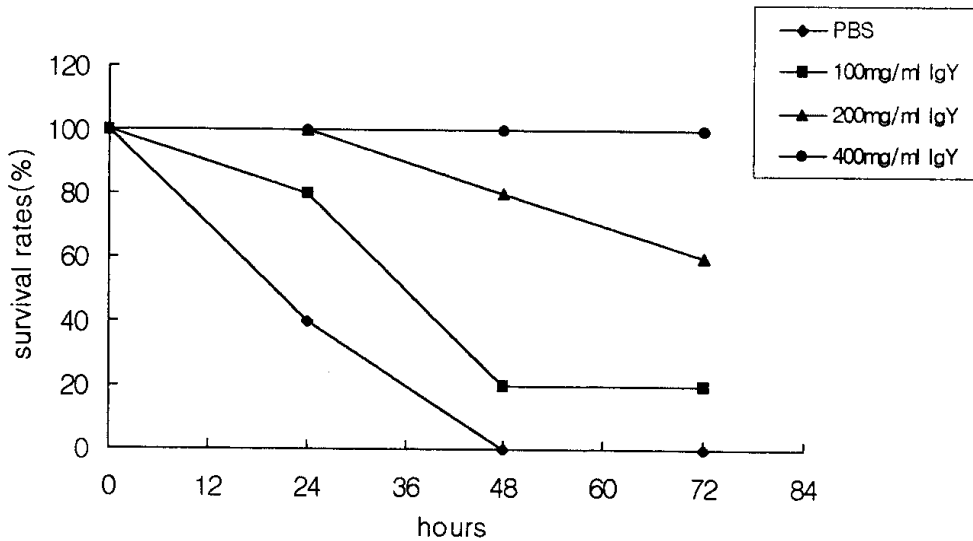


Fig 40. Protective effect of egg yolk antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 2 in mice. Mice were injected with 0.3ml of 100, 200 and 400mg/ml IgY twice in 24 hour-interval and infected with 0.3ml of 1×10^8 CFU/ml of *A. pleuropneumoniae* serotype 2 per animal, intraperitoneally. Mice in control groups were challenged with 0.3ml PBS before challenge with *A. pleuropneumoniae* serotype 2. Survival was monitored for 3 days or until no further deaths.

5. 포유자돈에서의 난황항체 흡수시험 결과

임의적으로 난황항체와 돼지유래혈청을 혼합하여 ELISA를 이용하여 IgY의 검출여부 및 최소검출농도를 조사하여 본 결과, 돼지 혈청에 IgY가 1% 이상 존재하여야 detection이 가능한 것으로 나타났다 (Fig 41-45). 실제 포유자돈에게 난황항체를 구강투여한 결과, 난황항체 투여 8시간 전후에 혈중 난황항체가 최고치를 나타내는 경향을 나타내었으나, 전반적으로 항체흡수정도는 미미하였다(Fig 46-50).

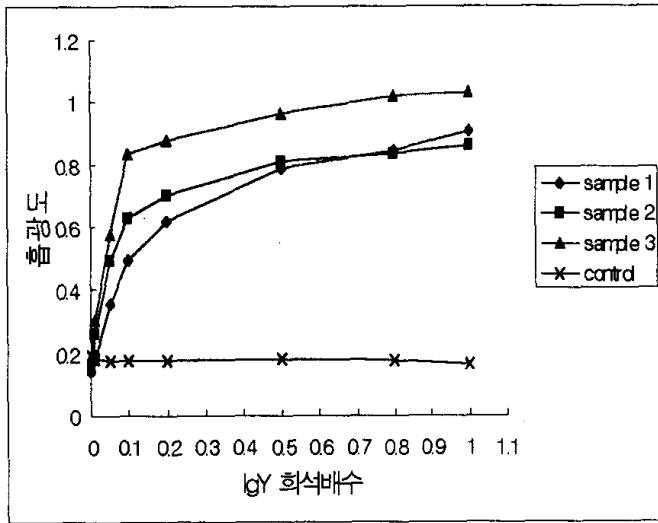


Fig 41. *B. bronchiseptoca*

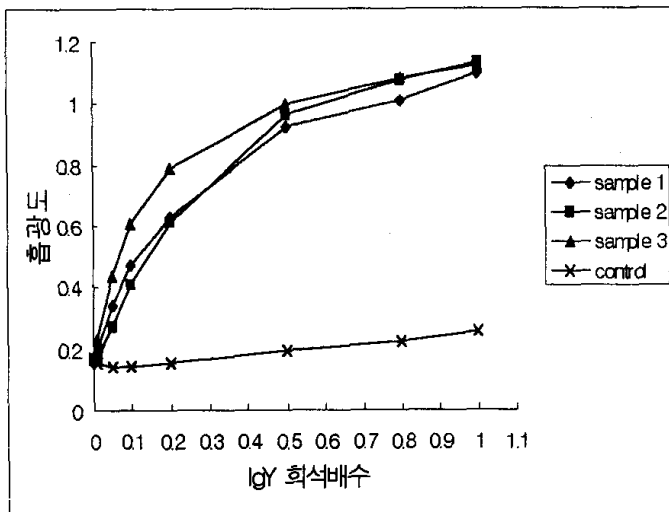


Fig 42. *P. multocida* 4D

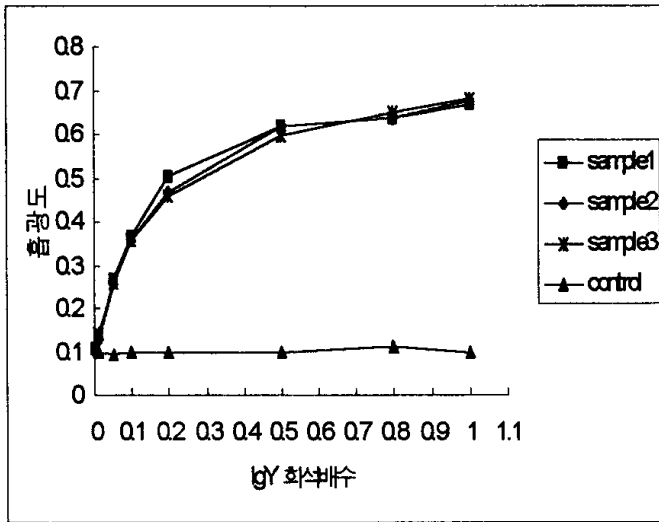


Fig 43. *P. multocida* 3A

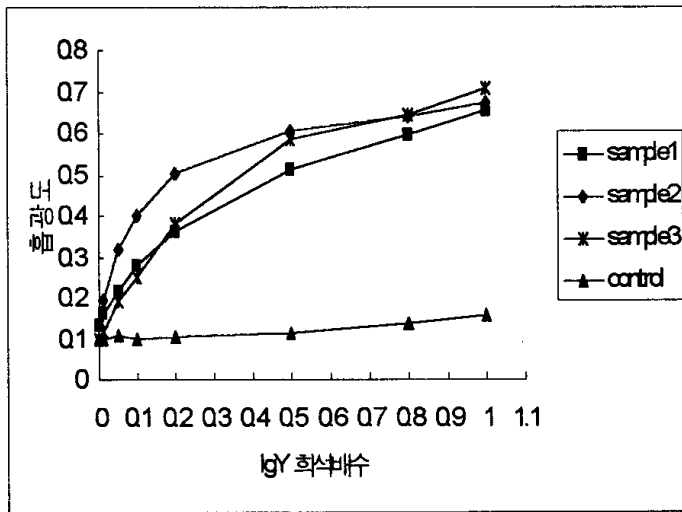


Fig 44. *A. pleuropneumoniae* serotype 5

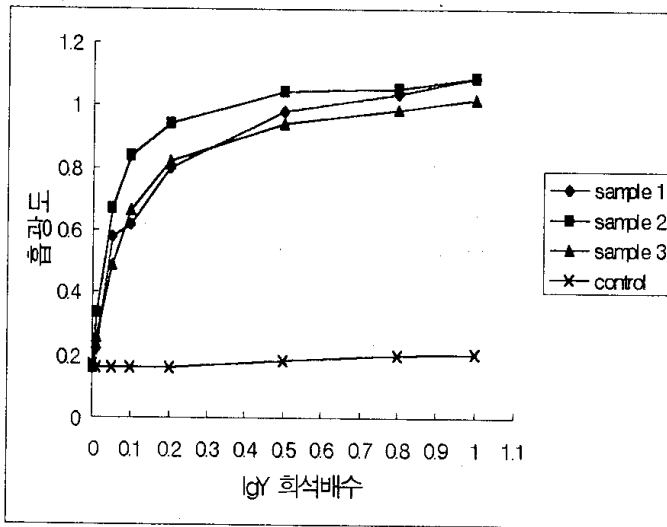


Fig 45. *A. pleuropneumoniae* serotype 2

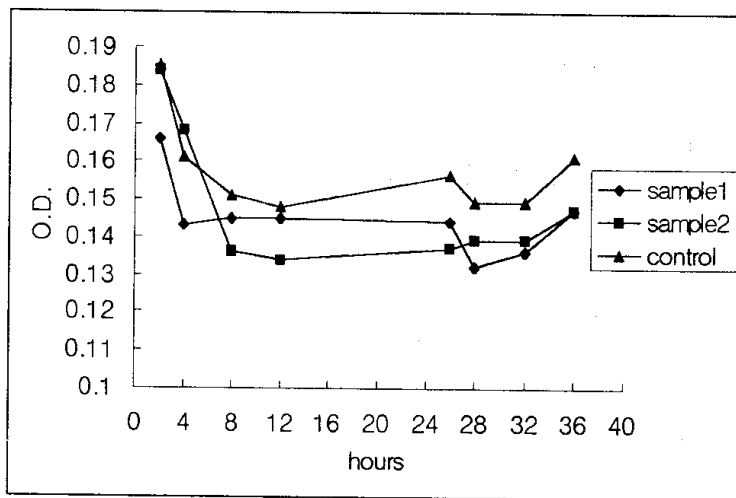


Fig 46. *B. bronchiseptica*

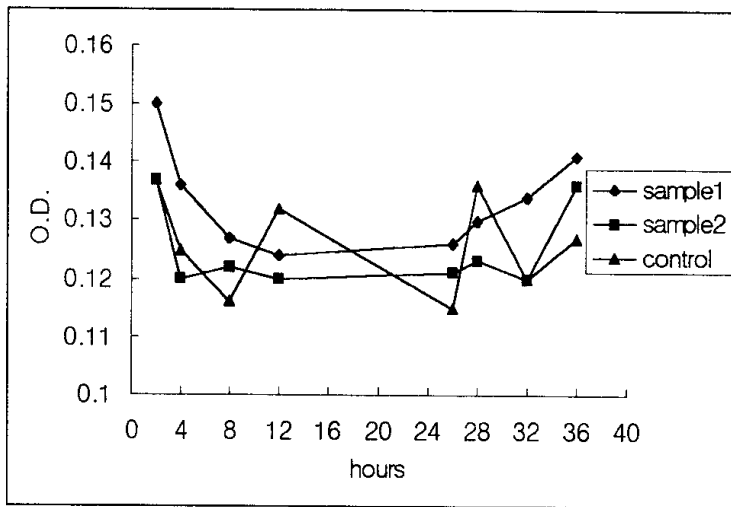


Fig 47. *P. multocida* 4D

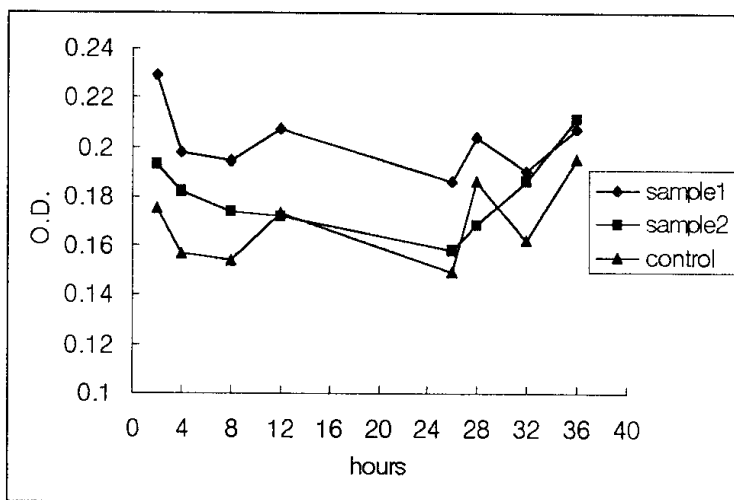


Fig 48. *P. multocida* 3A

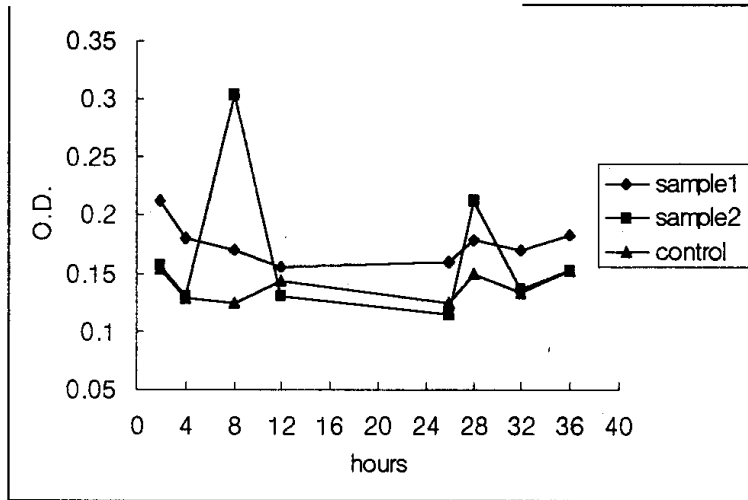


Fig 49. *A. pleuropneumoniae* serotype 2

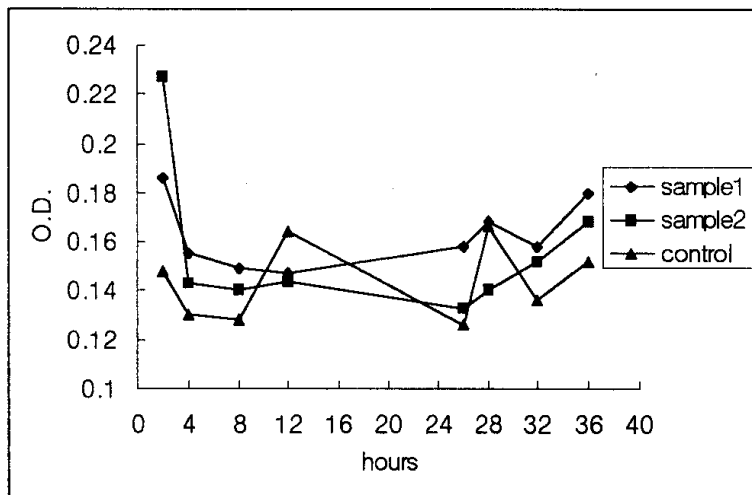


Fig 50. *A. pleuropneumoniae* serotype 5

6. 이유자돈에서의 난황항체의 방어효과

실험 1 : 난황항체가 자돈에서의 호흡기 질병 유발을 어느정도 방지할수 있는지를 알아보기 위하여 *A. pleuropneumoniae* serotype 2 국내 분리주와 *P. multocida* 3A을 공격접종한후 난황을 복강내로 접종한군과 비접종한군

에서의 호흡기 증상 발현등을 중심으로한 임상증상 (폐사여부 포함), 폐병변 발생정도등을 조사하였다. 본 실험에서 나타난 결과는 홍막폐렴원인균만을 접종한 군에서는 접종후 1일내에 2 두, 접종후 2일내에 2 두가 폐사하여 접종 48 시간내에 전두수 폐사하였으나, 홍막폐렴원인균과 이에 대한 난황항체를 동시에 같이 접종한 군에서는 접종후 1 일내에 1 두, 접종후 2 일내에 1두 가 폐사하였고 마취과다로 접종직후 폐사한 1두를 제외한 나머지 1두는 시험종료시까지 생존하였다. 홍막폐렴 원인균 접종군에서 난황접종에 따라서 폐사율이 50% 정도 감소하는 것으로 나타났다. 홍막폐렴 접종군에서는 원인균만을 접종한군에서 접종 2일이내에 전두수 폐사가 나타나 임상증상 및 폐병변 지수는 비교할수 없었다. 또한 파스튜렐라균 접종군에서는 원인균만 접종한군에서는 접종 1 일이내에 1두가 폐사하였고, 난황과 동시에 접종한 군에서는 접종 2일후 1두가 폐사하였다. 나머지 생존한 개체들의 임상증상 지수는 원인균과 난황을 동시에 접종한군에서는 11 (평균 3.67)을, 원인균만을 접종한군에서는 28 (평균 9.3)을 나타내어 현저한 차이를 나타내었으나, 폐병변지수에서는 난황과 원인균을 동시에 접종한군 (5.2%)에서 원인균만 접종한군 (2.95%) 보다 약간 높게 나타났다. 어떠한 원인균과 난황도 접종하지 않은 대조군은 임상증상 및 부검후 폐병변에서도 정상적이었고 시험 종료시까지 생존 하였다.

실험 2 : 실험1 에서는 원인균 접종시 과다한 균의 접종등으로 조기폐사가 이루어진 점을 감안하여 실험 2에서는 시험군 배치는 동일시 하였으나, 접종한 원인균의 량을 감소하여 접종후 동일한 방법으로 관찰 비교 하였다. 본 실험2에서는 접종한균량의 감소로 인하여 과다한 임상증상 또는 폐병변 지수를 관찰하기는 쉽지 않았지만, 임상증상 지수에서 난황의 접종에 따라서 접종하지 않은 군보다는 홍막폐렴균에 대하여는 평균 약 65%을, 파스튜렐라균 접종군에서는 평균 약 25% 정도의 임상증상 지수 감소를 나타내었다. 또한 폐병변 발생정도에서는 난황과 홍막폐렴원인균을 동시에 접

종한군에서는 1두에서만 폐병변이 발생하였고, 그정도도 매우 미약하였다. 그러나 흉막폐렴 원인균만 접종한군에서는 2두에서 폐병변이 관찰되었고, 그중 1두에서는 매우 심한 흉막폐렴의 증상을 나타내었다. 파스튜렐라 접종군에서는 난황 접종군에서는 4두중 2 두가 폐병변을 나타냈고, 난황 비접종군에서는 3두중 2두가 폐병변을 나타내었으며, 폐병변 정도에서도 난황 비접종군에서는 더 심하였다 (Fig. 51).

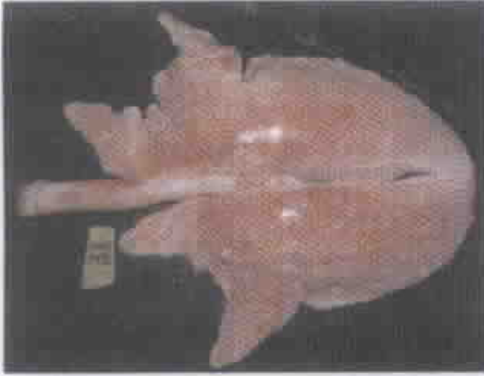
7. 야외 농장에서의 난황 접종 효과

경기도 평택시 소재 A 농장의 경우 호흡기 질병 증상을 나타내는 돼지 20두에 난황을 접종한 결과 경미한 호흡기 증상을 나타내는 10 두에서는 경우에는 1회의 주사로 증상이 호전되었으며, 심한 호흡기증상을 나타내는 5두의 경우에는 2회 주사로 호전되었으며, 나머지 5두는 항생제와 부과 적용함으로써 효과를 나타낼수 있었다.

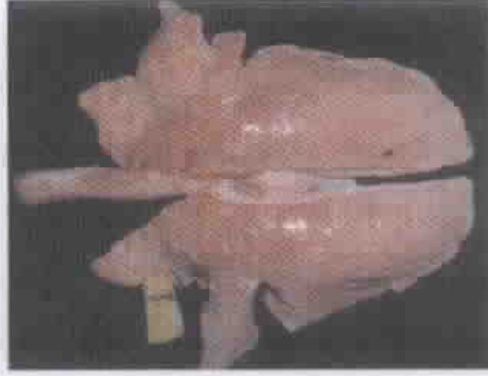
경북 영주시 소재 S 농장의 경우 총 40두에 대하여 실시한 결과 약한 호흡기 증상을 나타내는 돼지 20두에서는 난황 1회의 주사로 효과를 나타낼수 있었으며, 심한 호흡기 증상을 나타내는 10두 경우는 난황 2회 주사로 증상이 호전되었다. 그러나, 심한 호흡기 증상으로 위축돈이 된 경우에는 난황 2 회 주사보다는 난황 1회 주사후 항생제 주사가 더 효과적이었다.

또한 위축성 비염의 예방효과를 검증하기 위하여 경북 영주시 소재 S 농장에서 난황제제를 자돈에 투여후 임상증상등에 대한 경과를 관찰 중에 있다.

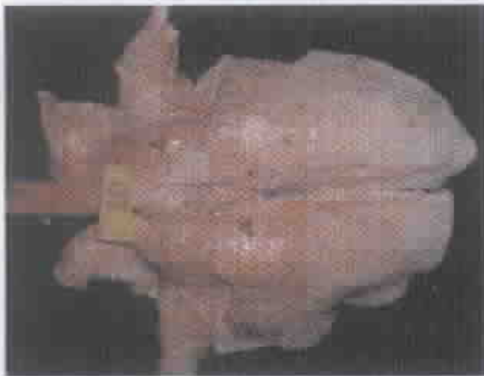
A



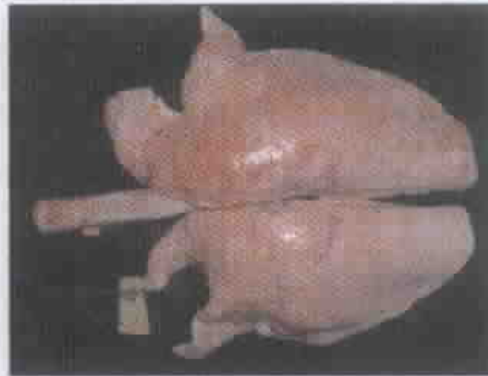
B



C



D



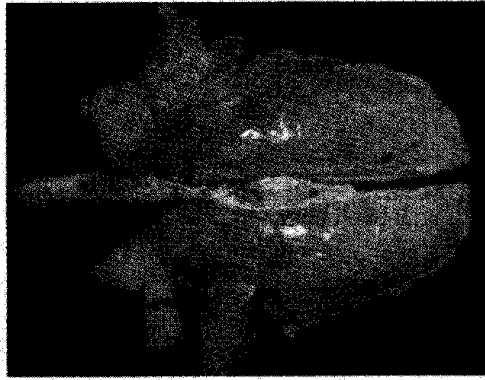
E



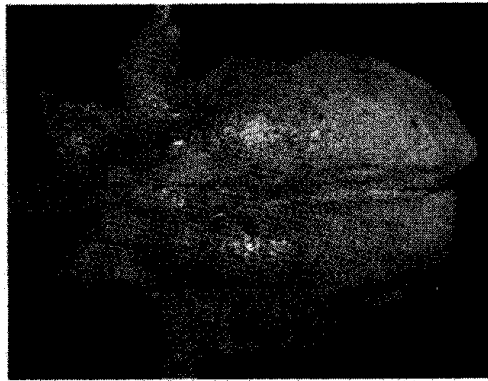
A



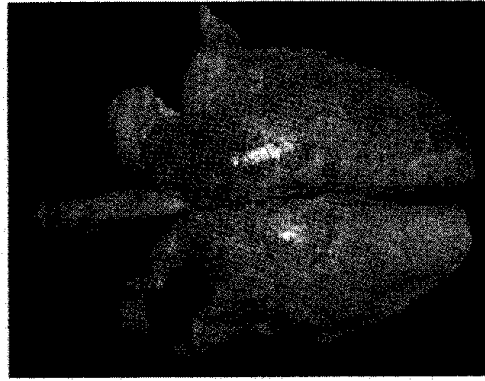
B



C



D



E



Fig 51 . Protective effects of IgY against *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* 3A in weaned piglets challenged with Korean isolates of *A. pleuropneumoniae* serotype 2 and *P. multocida* 3A, respectively. Gross pathological findings of piglets with (panel A) or without (panel B) administration of IgY against *A. pleuropneumoniae* after challenge with a Korean isolate of *A. pleuropneumoniae*. Gross pathological findings of piglets with (panel C) or without (panel D) administration of IgY against *P. multocida* 3A after challenge with a Korean isolate of *P. multocida* 3A. Panel E indicates the control without any treatment.

제 4 절 고 찰

국, 내외 양돈 산업에서 경제적 및 임상학적으로 많은 문제를 유발하는 질병중의 하나인 호흡기질병의 원인 중 가장 높은 비중을 차지하는 것 중 하나가 세균성 원인체의 감염에 의해 유발되는 질병으로, 가장 자주 문제 시되는 질병으로는 위축성비염, 파스튜렐라성 폐렴, 홍막폐렴을 들 수 있으며, 이러한 돼지호흡기질병은 국내 에서 전체 돼지질병의 약 20%를 차지 하고 있어 생산성 저하등으로 막대한 경제적 손실을 초래하고 있다. 이러한 돼지 호흡기 질병들을 예방 및 치료를 위해 백신접종, 항생제 투여 등의 방법이 적용되고 있으나, 이러한 방법들은 쇼크, 내성균 출현, 항생제 잔류 등의 문제점들이 유발되어 새로운 예방, 치료법의 개발이 요구되어 왔다. 또한 최근 난황항체를 이용한 사람 및 동물의 질병치료 및 예방을 위하여 적용된바 있다. 본 연구에서는 돼지 호흡기질병의 예방 및 치료를 목적으로 난황항체 이용법을 시도하고자, 주요 호흡기 질병의 원인체들의 병원성 인자들을 분석하고 이들에 대한 닭 및 난황내에서의 면역반응을 조사하였고, 이때에 생산된 난황항체의 특이성 분석 및 실험동물 및 목적 동물 (돼지) 에서의 방어능 및 치료효과에 대하여 조사 하였다.

사람 및 동물의 질병을 유발하는 세균성 원인체들은 원인체의 종류에 따라서 각기 다른 병원성 인자를 소유할수 있기 때문에 질병 예방을 위한 백신을 제조하기 위해서는 각 질병에서 중요하게 작용하는 병원성 인자들 분석하여 이들을 항원으로 사용하는 것이 매우 중요하다. 위축성비염은 *B. bronchiseptica*와 *P. multocida* 4D가 원인체로, 이들이 생성하는 143kDa의 DNT가 진행성 위축성비염에 대한 필수적인 병원성인자로 작용하고 또한 세균의 외부 부착소들은 점막에 부착하는데 매우 중요한 역할을 하여 이들이 비갑개골 위축에 의한 본 질병 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다. 파스튜렐라성 폐렴은 주로 *P. multocida* 3A에 의해 유발되는 질병이며, 이 원인균의 주요 병원성 인자로는 capsular polysaccharide,

lipopolysaccharide(LPS), exotoxin, OMP, DNT 등이 있으며, 이들 중 최근 지속적인 항체 생성을 유도할 수 있는 OMP가 잠재력 있는 항원으로 가장 주목을 받고 있다. 특히, IROMP는 철이 제한된 환경 하에서 배양된 *P. multocida*가 형성하는 surface protein으로, *P. multocida*의 homologous 및 heterologous serotypes에 대한 protective immunity를 형성할 수 있다. 또한 Zhao 등에 의하면 *P. multocida*에 자연감염된 돼지의 혈청에 IROMP에 특이적인 항체가 존재한다고 하였으며 이는 IROMP가 생체내 virulence mechanism에서 매우 중요한 역할을 하는 것을 의미한다. 이러한 IROMP는 *P. multocida* 외에 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella haemolytica*, *Salmonella enteritidis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* 등에서도 발견된다. 돼지 흉막폐렴은 *A. pleuropneumoniae*가 원인체이며 현재 12개의 serotypes가 알려져 있으나 국내에서는 2형과 5형이 주로 관련이 있는 것으로 나타났다. *A. pleuropneumoniae*의 주요 병원성 인자로는 capsule, lipopolysaccharide(LPS), exotoxin, OMP 등이 있으며, 특히 OMP는 serotype 간에 cross-reaction이 존재하여 heterolous strain에 대한 immunity를 유발할 수 있어 질병의 예방 및 방제에 있어 매우 효과적인 것으로 알려졌다. 따라서 이번 실험에서는 면역유도에 효과적인 각각의 병원체의 주요 단백질을 포함한 OMP, IROMP, live cell, bacterin 및 DNT toxoid을 항원으로 사용하였다.

백신 제조에 사용할 공시균주들 각각에서 주요 면역원이 될 수 있는 주요 병원자들의 존재 여부의 분석을 위하여 *B. bronchiseptica*와 *P. multocida* 4D 의 DNT는 PCR, SDS-PAGE, Western blot, mouse 접종 등의 방법을 이용하여 분석, 확인하였으며, *P. multocida* 3A 및 *A. pleuropneumoniae* serotypes 2와 5의 whole cell과 OMP 및 IROMP에 대하여는 SDS-PAGE를 실시하여 분석하였다. OMP의 분석 결과 *A. pleuropneumoniae*에 대하여는 약 40 kDa 정도의 크기로 예전의 보고와 동

일하였으며, *P. multocida* 3A에 대하여는 Dado에 의하면 14-46kDa 사이에 8개의 주요 OMP protein이 존재한다고 하였고, Zhang 은 35.5kDa의 OMP를 보고하였으며, Confer 는 36-38kDa의 surface protein을 보고하였다. SDS-PAGE 분석 결과 *P. multocida* 3A에 대하여 36kDa과 41kDa의 단백질을 확인하였으므로, 상술한 이전의 보고들과 유사한 결과를 나타내었다. 또한 DipyriddyI이 첨가된 배지에서 배양된 *P. multocida* 3A로부터 IROMP를 추출하여 기존의 OMP와 SDS-PAGE를 이용하여 비교하여 본 결과 IROMP에서 OMP보다 74, 94 및 99kDa 크기의 단백질이 더 많이 존재함을 확인하였다. 이는 Zhao 등의 보고와 유사한 결과로 이러한 크기의 단백질이 *P. multocida* type A의 iron-uptake system과 관련이 있음을 의미한다. ELISA의 항원으로 사용하기 위하여 *P. multocida* 4D에 대한 OMP를 추출한 결과, *P. multocida* 3A와 같은 크기의 단백질을 확인하였으며, 이는 Marandi 가 32와 37kDa이라고 보고한 결과와 거의 유사한 결과라고 할 수 있다.

이들 항원을 이용하여 시험제조한 백신으로 닭에서의 면역반응양상을 조사한 결과, 모든 실험군에 대하여 난황내 항체가가 대조군과 비교하여 2-4배 정도의 상승률을 나타내었으며 전반적으로 1차접종후 6-8주 경에 최고 항체가를 나타내어 12주까지 비슷한 수준의 항체가를 유지하였다. 이는 다른 세균들이나 virus를 이용한 결과와 유사하며, 이는 본 실험에 사용한 bacterin, OMP 및 DNT가 닭에서 우수한 면역원성이 있음을 나타내고 있다. 또한 각각의 항원을 접종한 닭의 난황내 항체가 변화양상은 혈중항체가 변화와 유사하였으나, 혈중항체가보다 1-2주 정도 후에 상승 및 하강하는 것으로 보아 혈중항체가 난황으로 이행하는 데 소요되는 시간이 1-2주 정도로 생각되며 이는 이전 실험자들의 보고와 일치하는 결과이다. 이러한 결과들은 난황항체가와 혈중항체가는 높은 연관성이 있어 이들 중 하나를 이용하여 상호간의 항체가를 예측할 수 있을 것으로 생각된다. 본 실험에서 2가지의 adjuvant를 사용하여 비교한 결과 시험백신의 안전성, 항체가의 수준 및 지속성, 산란율 등을 고려할 때에 난황항체 생산시 oil adjuvant

를 사용하는 것이 효과적임을 나타내었다. 또한 파스튜렐라성 폐렴 및 홍막폐렴의 단독 및 복합투여를 한 경우를 비교해 보면 산란율 및 항체가 상승정도 양쪽 모두 복합투여를 한 경우가 초기면역형성 및 항체가 상승에 있어서 더 효과적이었다. 이는 닭에서 면역 반응시 *P. multocida* 3A 및 *A. pleuropneumoniae* serotypes 2와 5 간에 synergistic effect 에 의한 것에 의한 것이 아닌가 생각된다. 이러한 결과는 파스튜렐라성 폐렴 및 홍막폐렴에 대한 난황 항체 생산시 복합투여하는 경우가 더욱 효율적임을 암시하고 있다. 위축성비염 원인체들의 접종군의 경우 산란율 저하, 폐사 등의 원인은 *P. multocida* 4D bacterin 또는 DNT의 의한 것으로 사료되나 이는 추가 실험을 통하여 이들의 원인을 밝힌 후 이에 대한 대책을 수립하여야 할 것으로 사료된다.

난황항체 생산을 위한 산란계 2차 백신접종에서는 1차 접종 결과에서 유발된 문제점의 원인을 밝혀내고 개선하기 위하여 백신의 성분을 다양화하여 재적용하여 조사하였다. 이전 연구에서 위축성 비염의 원인체로 투여한 산란계 그룹에서 폐사, 기립불능, 산란 정지 등의 문제점을 나타내었다. 이러한 결과가 나타나는 원인을 분석하기 위해 이번 연구에서는 백신의 위축성 비염의 원인체 및 병원성 인자의 구성을 다양화하여 4그룹으로 구성하여 실험하였다. 1번 그룹은 위축성 비염을 유발하는 *B. bronchiseptica*와 *P. multocida* 4D를 불활화한 whole cell만을, 2번 그룹은 DNT만을, 3번 그룹은 1차 접종시 whole cell, 2차 접종시 DNT를, 4번 그룹은 whole cell과 DNT를 혼합하여 투여하되 이전 보고에서의 그룹보다 성분을 감소시켜서 접종하였으며, adjuvant로는 모두 ISA75를 사용하였다. 그 결과 DNT만을 접종한 2번 그룹을 제외한 모든 처치군에서 이전의 결과와 마찬가지로 첫 백신 접종 후 약 9주까지 산란 정지 증상을 보였으며, 그 이후에 점차 산란율이 회복되었다. 즉, 산란율에 영향을 미치는 인자는 *P. multocida*의 killed whole cell로 사료되며, free endotoxin(FET)이 광범위한 혈관변형과 폐사를 야기시키며 turkey에서 급성 가금 콜레라에 감

염시 FET가 순환계 내에 존재한다는 점과 *P. multocida*의 lipopolysaccharide (LPS)가 조류에 있어서 다른 종보다 더 치명적인 것을 고려해 볼 때 *P. multocida* whole cell의 외막성분인 endotoxin 중 특히 LPS가 산란 정지의 주요 원인인 것으로 생각된다. 또한 산란을 저하의 또 다른 원인으로 구조적으로 *P. multocida*의 whole cell bacterin의 가장 외부에 존재하는 capsule을 의심해 볼 수 있는데, capsule은 중요한 virulence factor 중 하나이며, in vivo 상에서는 얇은 층만을 형성하나 in vitro에서 배양시 capsule의 생성량이 증가하여 두꺼운 층을 형성하게 된다. 즉, 중균배지에서 배양하여 제조한 bacterin은 다량의 capsule을 포함하고 있으므로 virulence를 유발할 가능성이 더 크다고 볼 수 있을 것이다. *P. multocida* 3A를 접종한 5번과 6번 그룹의 결과 역시 killed whole cell bacterin이 산란을 저하의 원인이라는 생각을 뒷받침하고 있다. 즉, 1차 접종시 live cell을, 2차 접종시 killed cell을 접종한 5번 그룹의 경우 2차 접종 1주일 후부터 산란율이 저하되기 시작하였으며, whole cell과 IROMP를 혼합접종한 6번 그룹의 경우 첫 접종 후부터 9주동안 매우 낮은 산란율을 나타내었다.

이번 연구의 모든 산란계 실험군에 있어서 난황내 항체는 첫접종 후 6-10주, 혈청내 항체는 4-8주 사이에 항체가 최고치를 보였고 난황내 항체는 10주 이상 높은 항체가를 유지하였으며, 이는 이전의 보고와 유사한 결과이다. 또한 첫 백신접종 14주 후 재접종으로 다시 항체가가 증가함으로써 재접종으로 지속적으로 난황항체를 생산할 수 있음을 시사하였다. 재접종은 항체가 변화양상을 토대로 하여 볼 때 난황내 항체는 높은 항체를 형성한 경우 대체로 혈청내 항체가보다 변화 속도가 늦으므로 혈청내 항체가가 급하강하는 12-14주 사이에 이루어지는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

위축성 비염의 원인체인 *P. multocida* 4D와 *B. bronchiseptica*의 OMP 및 DNT에 대한 난황내 항체는 위축성 비염 원인체의 항원으로 투여한 모든

그룹에서 대조군의 약 3-7배까지 증가하였다. *B. bronchiseptica*에 대해서는 DNT만 접종한 2번 그룹의 경우 접종한 모든 산란계가 생존하였고 백신 접종의 산란에 미치는 영향도 다른 그룹에 비해 낮았으며 난황내 항체라도 가장 우수하므로 DNT만을 접종하는 것이 *B. bronchiseptica*에 대한 효과적인 백신 접종 방법으로 생각된다. DNT를 접종함으로써 OMP에 대한 항체가 형성이 가능한 이유는 DNT의 분리 방법이 순수정제를 위한 방법이 아니기 때문에 crude DNT 내에 OMP가 첨가되어 있어서 OMP에 대한 항체가 형성될 수 있었을 것으로 생각된다. *P. multocida* 4D에 대하여는 *B. bronchiseptica*와는 대조적으로 killed whole cell만 접종한 1번 그룹의 경우 DNT와 OMP에 대하여 가장 높은 항체를 나타내었으며 최종생존두수도 우수하나 산란율에 있어서 문제점을 나타내었다. 이상의 결과를 통하여 위축성 비염의 원인체에 대한 난황항체를 생산하고자 할 때 whole cell 뿐만 아니라 DNT도 좋은 immunogen이 될 수 있으며, 충분한 면역 형성이 이루어 질 수 있으나, 생산성 면을 고려해 볼 때 일부 virulence factor의 양을 조절하여야 할 것으로 생각된다.

파스튜렐라성 폐렴의 원인체인 *P. multocida* 3A에 대한 난황항체를 생산하기 위해 사용한 항원으로서 5번 그룹에 대해서는 live cell을 적용하였으며, 파스튜렐라성 폐렴의 원인체를 단독투여한 6번 그룹과 홍막폐렴의 원인체와 복합투여한 8번 그룹에 대해서는 IROMP를 적용하였다. Whole cell bacterin은 어느 정도의 protection을 제공할 수 있지만 단지 homologous LPS serotype에 대해서만 가능하며 cross-protective antigens이 in vivo 하에서만 발현되는 것은 이의 좋은 증거가 된다. 즉, live, attenuated vaccines은 heterologous serotype에 대해 protection을 할 수가 있다. 이러한 이유로 live cell을 적용하여 보았으나 ELISA 결과 live cell을 접종한 5번 그룹의 경우 초기 면역 형성이 매우 미미했으며 2차 및 3차 접종으로 killed cell을 적용한 후에 항체가가 상승하였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 live cell은 난황항체를 생산하기 위한 적용방법으로서

부적합한 것으로 사료된다. IROMP는 철이 제한된 환경 하에서 배양된 *P. multocida*가 형성하는 surface protein으로, *P. multocida*의 homologous 및 heterologous serotypes에 대한 protective immunity를 형성할 수 있다. 또한 Zhao 등에 의하면 *P. multocida*에 자연감염된 돼지의 혈청에 IROMP에 특이적인 항체가 존재한다고 하였으며 이는 IROMP가 생체내 virulence mechanism에서 매우 중요한 역할을 하는 것을 의미한다. 이러한 IROMP는 *P. multocida* 외에 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella haemolytica*, *Salmonella enteritidis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* 등에서도 발견된다. 이번 실험에서는 *P. multocida* 3A에 대한 가장 효과적인 난황항체 생산 방법을 결정하기 위해 6번과 8번 그룹에 대하여 IROMP를 적용하였다. IROMP를 생산하기 위해 *P. multocida*를 iron chelator인 2,2'-dipyridyl이 첨가된 배지에 배양하였으며 배양된 균으로부터 IROMP를 추출하여 기존의 OMP와 SDS-PAGE를 이용하여 비교하여 본 결과 IROMP에서 OMP보다 74, 94 및 99kDa 크기의 단백질이 더 많이 존재함을 확인하였다. 이는 Zhao 등의 보고와 유사한 결과로 이러한 크기의 단백질이 *P. multocida* type A의 iron-uptake system과 관련이 있음을 의미한다. 6번과 8번 그룹에 대하여 ELISA를 실시한 결과 대조군의 4배 가량 항체가가 상승하였으며 IROMP가 첨가되지 않은 5번 그룹과는 달리 14주 후 4차 접종을 실시한 후 항체가가 현저히 재상승함을 볼 수 있었다. 즉, IROMP는 산란계에 있어서 항체형성에 매우 효과적인 immunogen이며, 지속적인 항체 생산을 가능하게 하는 좋은 source로 생각된다. 또한 흉막폐렴의 원인체와의 복합 투여한 경우 파스튜렐라성 폐렴의 원인체를 단독투여한 경우보다 항체가는 다소 낮았으나 대조군의 약 3.5배 정도로 높은 항체가 상승률을 나타내었고 산란율에 있어서는 6번 그룹보다 더 우수한 결과를 나타내었으며 이는 이전의 보고와 동일한 결과이다. 이는 흉막폐렴의 원인체와 복합투여한 경우 *Actinobacillus pleuropneumoniae*가 산란계의 *P. multocida*의 LPS에 대한 민감성을 완화시킬 수 있다는 것을 나타내는 결과

라 할 수 있다.

홍막폐렴의 원인체인 *A. pleuropneumoniae*에 대한 난황항체를 생산하기 위해 사용한 항원은 이전의 보고와 동일하였으며 그 결과 이전의 보고와 마찬가지로 *A. pleuropneumoniae*의 whole cell과 OMP에 대하여 높은 항체가를 형성하였으며 다른 질병에 대한 그룹과 비교하여 산란율도 우수하였다. 즉, 이러한 결과는 산란계를 통하여 홍막폐렴 원인체에 대한 난황항체를 생산하고자 할 때 whole cell과 OMP가 매우 효과적인 immunogen임을 의미한다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 위축성 비염에 대하여는 DNT 및 whole cell의 사용이, 파스튜렐라성 폐렴에 대하여는 whole cell과 IROMP의 사용이, 그리고 홍막폐렴에 대하여는 whole cell 및 OMP의 사용이 난황항체 생산을 위해 효과적이라 생각된다. 그러나, 위축성 비염에 대한 항체를 생산하고자 할 때 일부 문제점이 존재하므로 이의 정확한 원인을 증명하기 위해서는 추가적인 실험이 병행되어야 할 것으로 사료된다.

생산된 난황항체의 투여한 항원에 대한 특이성 및 주요항원을 조사하기 위해 Western blot을 실시한 결과, 각 원인체의 병원성 인자에 따라 그리고 각각의 산란계 투여군마다 여러 가지 크기의 항원에 대한 항체를 생산하였음을 확인하였다. 특히 실험에 사용된 모든 원인체의 major protein으로 추측되었던 40kDa 전후의 OMP에 대하여 특이항체 생산이 이루어졌으며, 이는 40kDa 전후의 OMP가 생체 내에서도 immunogen으로서 강하게 반응한다는 것을 의미한다.

*B. bronchiseptica*와 *P. multocida* 4D 대한 Western blot 결과, *B. bronchiseptica*의 경우 항원의 종류에 따라 다양한 크기의 band에 반응하였으며, 특히 whole cell이나 DNT보다 OMP에 대하여 강한 반응을 나타낸 경우에 비해 *P. multocida* 4D는 모든 항원에 있어서 거의 유사한 결과가 나타났다. 즉, *P. multocida* 4D의 경우 whole cell에서 sonication으로 획득되어지는 crude DNT나 OMP가 면역원으로서 작용하는 매우 중요한 구성성

분일 것으로 생각된다. 파스튜렐라성 폐렴의 원인체인 *P. multocida* 3A의 경우, 단독 및 다른 원인체와의 복합투여와 상관없이 adjuvant 및 접종부위에 따라 인식된 항원이 각기 달랐으며, 이는 항원의 체내 흡수 속도에 따라 면역체계가 인식하는 항원이 달라질 수 있음을 의미한다.

그러나 *P. multocida* 3A와는 달리 *A. pleuropneumoniae* serotype 2의 경우, adjuvant의 종류 및 접종부위에 상관없이 모두 whole cell bacterin 및 OMP에 대하여 각기 동일한 항원에 대한 특이항체를 생산하였으며, 특히 OMP에 대하여 강하게 반응한 것으로 보아 bacterin보다 OMP를 항원으로 사용한 경우가 산란계에서 특이적인 면역을 유도하는 데 있어서 더욱 효과적임을 알 수 있었다. *A. pleuropneumoniae* serotype 5의 경우 whole cell bacterin에 대해서는 반응이 미약하거나 거의 일어나지 않았으며 OMP에 대해서만 반응을 나타내었고, OMP에 대한 Western blot의 결과 역시 *A. pleuropneumoniae* serotype 2와 마찬가지로 group에 관계없이 40과 47kDa의 동일한 크기의 항원에 대한 특이항체를 생산하였다. 이러한 *A. pleuropneumoniae* serotypes 2와 5에 대한 Western blot의 결과는 *A. pleuropneumoniae*의 virulence factor인 OMP가 pathogenesis와 protection에 있어서 우선적으로 중요한 것임을 제안하며, 이는 Haesebrouck F 등의 보고²³와 동일한 결과이다. 또한 Haesebrouck F의 보고에 따르면 *A. pleuropneumoniae*의 serotype마다 OMP profile이 다르지만 모든 serotype에 공통적인 OMP가 존재한다고 하였으며 공통적인 OMP의 분자량 크기 중 일부가 이번 실험 결과와 거의 일치하였다. 즉, *A. pleuropneumoniae*의 항원에 대하여 특이적으로 생산된 난황항체는 serotype에 공통적인 OMP에 대하여 생성된 난황항체이며 이러한 결과는 여러 가지 다양한 혈청형이 존재함으로써 백신제조가 어려운 흉막폐렴에 대한 면역을 효과적으로 형성하는 데 있어서 좋은 자료가 될 수 있을 것이라 생각된다. 또한 *A. pleuropneumoniae* serotype 5에 있어서 adjuvant로서 oil을 사용한 경우에 반응이 더 잘 나타난 것은 oil adjuvant가 aluminum hydroxide gel을

adjuvant로 사용한 경우보다 특이항체 유도에 있어서 더 효과적임을 나타내는 결과이며 이는 이전의 보고와 일치하는 결과이다. 이상의 결과들을 종합하여 볼 때, 돼지 호흡기 질병에 대한 백신제조에 사용한 DNT 및 OMP와 같은 virulence factor가 whole cell bacterin보다 특이적인 항체를 형성하는 데 있어서 중요한 인자로 작용하는 것으로 작용하며, adjuvant의 종류나 백신접종 부위 등도 특이항체를 형성하는 데 영향을 미치는 인자라 할 수 있겠다.

*in vivo*에서의 난황항체의 효능을 조사하기 위해 마우스 접종시험을 실시하였다. 난황항체의 마우스에서의 방어효과를 조사하기 위한 첫 단계로 난황항체를 대량생산하였다. 이전의 난황항체 추출에 사용하였던 chloroform은 독성물질이기 때문에 마우스 접종에 부적합하므로 여러 보고에 의해 제시된 난황항체 추출 방법들 중 large scale 생산에 적합하면서 생체에 부작용이 없는 방법을 선별하여 난황항체 대량생산에 적용하였다. Gum solution을 이용한 추출방법은 natural gum이 food ingredient로서 항체의 작용을 저해하는 지질제거에 효과적이며, chromatography나 dialysis 등의 시간적 소비가 많은 단계가 없고 절차가 간단하다는 점에서 다른 방법들에 비해 효과적이라고 사료된다. chloroform과 gum solution을 이용하여 추출한 난황항체를 분석하기 위해 추출항체액에 대한 SDS-PAGE를 실시한 결과, 64.4kDa과 32kDa의 두 band를 확인하였으며 이는 이전에 보고들을 미루어 볼 때, 두 band 중 64.4kDa의 band는 IgY의 heavy chain으로 추측되며 32kDa의 band는 IgY의 light chain으로 생각된다. 즉, 이러한 결과는 chloroform-extracted method 및 gum solution을 이용한 IgY 추출 방법이 난황항체를 추출하는 데 있어서 효과적임을 나타낸다.

마우스에서의 난황항체의 방어효과를 시험해 보기 위하여 MLD를 측정해 본 결과, *P. multocida*에 대해서는 낮은 농도에서도 마우스의 치사가 가능하였으며, 그 외 *B. bronchiseptica*와 *A. pleuropneumoniae*에 대해서는 $1 \times 10^8 - 10^9$ CFU/ml로 고농도를 투여하여야 마우스가 모두 치사하는 것으로

나타났다. 이를 이용하여 마우스에서의 난황항체의 방어효과를 시험해 본 결과, *B. bronchiseptica*에 대하여 난황항체를 적용한 마우스의 경우 접종한 모든 마우스가 생존하였으며, 이는 *B. bronchiseptica*에 대한 방어효과가 다른 원인체에 대한 방어효과보다 우수함을 의미한다. *B. bronchiseptica*를 제외한 모든 마우스 실험군에 있어서는 난황항체의 농도 100mg/ml 이상에서 방어효과를 나타내기 시작하였으며, 난황항체 접종농도 100, 200 및 400mg/ml에 있어서 농도에 비례하여 방어효과를 나타내었고, 난황항체의 농도 400mg/ml에서 접종한 모든 마우스에 대한 방어효과를 나타내었다. 이는 난황 ml당 약 8-20mg의 IgY가 포함되어 있으며 계란 한 개당 난황량이 약 15ml인 것을 고려해 볼 때 난황항체가 passive immunization을 유도할 수는 있으나 고농도로 투여하여야 방어효과가 나타남을 의미한다. 이러한 결과에는 마우스의 접종에 의한 스트레스, 이물질에 대한 clearance 작용 등이 IgY의 균에 대한 방어효과를 저해하는 요인으로 작용할 수 있었을 것으로 생각된다. 또한 여러 실험 결과 난황항체의 추출은 항원 접종 후 시기에 따라서 난황내 항체가의 차이가 있기 때문에 난황추출을 위해 계란의 수집시기가 매우 중요하며 또한 지속적으로 높은 항체가를 유지할 수 있는 방법의 강구가 요구된다.

포유자돈에서 혈중에 난황항체가 존재하는 경우 난황항체의 검출을 위한 기법을 확립하기 위하여 IgY와 돼지유래혈청을 일정량 혼합하여 ELISA를 실시하였다. 그 결과, 돼지 혈중에 IgY가 1% 이상 존재하여야 detection이 가능한 것으로 나타났으며, 이는 난황항체가 혈중에 낮은 비율로 존재하여도 ELISA로 검출이 가능함을 의미한다. 포유자돈에의 구강을 통한 난황항체의 흡수정도를 알아보기 위하여 난황항체를 구강투여한 결과, 난황항체 투여 8시간 전후에 혈중 난황항체가 최고치에 도달하는 경향을 나타내는 것으로 보아 난황항체 섭취후 장관에서 흡수되어 혈중으로 이동하는 데 약 8시간 정도 소요되는 것으로 사료된다. 그러나, 혈중의 난황항체량이 일정시간대를 제외하고는 전반적으로 ELISA로 검출해 내기에

적은 양이었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 실제 돼지에게 적용하고자 하는 경우 혈중에 난황항체의 농도를 증가 시키기 위하여는 구강투여보다 좀 더 효율적인 다른 투여방법을 강구하여야 할 것으로 사료된다.

난황항체의 돼지 호흡기 질병에 대한 치료 및 방어 효과를 측정하기 위하여 이유자돈 40두를 이용하여 돼지에서 방어 효과를 분석 하였다. 2회 반복실험을 통하여 실시한결과 *A. pleuropneumoniae* 및 *P. multocida* 3A 에 대한 난황을 투여한후 *A. pleuropneumoniae* serotype 2 국내 분리주 및 *P. multocida* 3A 로 공격 접종후 임상증상, 폐사시 폐사시간의 여부, 폐병변 발생정도등에 대하여 조사한 결과 흉막폐렴균을 접종한군에서는 난황항체에 의하여 폐사율은 50%, 임상증상은 65% 정도을 감소 시킬수 있었으며, 또한 파스튜렐라균을 접종한군에서도 임상증상 및 폐병변 발생율을 25-35% 정도 감소 시킬수 있었다. 그러나, 실험1에서 난황접종군(5.2%)이 난황비접종군(2.95%)보다 폐병변 발생율이 다소 높았던 것은 실험1에서는 공격접종시 원인균의 과다 접종으로 1두에서 초기에 다소 심한 폐병변을 나타내었던 것과 발병초기에 부검을 실시한 때문으로 생각된다. 그러나, 실험 2를 통하여 볼때에 폐병변발생율이나 또는 발생정도에서 난황 비접종군이 난황접종군보다 심하게 나타났다. 이러한 실험 결과를 바탕으로 야외 농장 2 개소를 선택하여 총 60두에 대하여 야외 농장에서의 난황투여에 의한 돼지 호흡기 질병의 치료효과를 조사한 결과 치료당시 임상증상의 정도에 따라서 다르기는 하나 초기에 증상이 심하지 않은경우에는 1회 근육주사에 의하여 충분한 치료 효과를 나타내었으며, 임상증상이 매우 심한 위축돈을 제외하고는 모든 개체에서 2회 근육주사를 통한 투여로 모든 돼지들이 회복되었으며, 임상증상이 매우 심한 중증일 경우는 항생제와 복합 적용으로 임상증상이 호전을 되었다. 이러한 결과를 통하여 볼때 난황항체의 투여가 돼지 호흡기 질병치료제로 상당한 효과가 있을 것으로 사료된다. 또한 돼지 위축성 비염에 대한 치료 또는 예방을 위한 난황항체의 적용은 위의 타 돼지 호흡기 질병에서 나타난 것처럼 생후 1-2 일령에 비강분무 등에 의하

여 접종하면 상당한 정도의 질병 감소효과를 기대할수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과들을 종합하여 볼때 돼지 세균성 호흡기 질병 예방을 위하여 난황항체를 사용하기 위하여는 무엇보다 첫째로 원인균들의 주요 병원성인자 및 면역원들을 분석하여 산란계에서 접종시 기립불능, 산란정지 또는 산란을 저하와 같은 문제가 유발되지 않도록 하여야 하며, 둘째로 생산된 난황은 항원들에 대하여 특이성이 있어야 하며 또한 돼지에서의 투여방법이 현실적이고 혈중에 난황에 대한 항체가를 어느정도 유지 할수 있다면 난황을 이용한 돼지 호흡기 질병의 치료 및 예방에 상당한 기여를 할 수 있을 것으로 생각된다.

제 5 절 결과요약

난황항체 생산을 위해 주요 세균성 호흡기 질병인 위축성 비염, 파스투렐라성 폐렴 및 흉막폐렴의 주요 원인체들에서 항원의 생성 여부를 PCR, SDS-PAGE, Western blot, 마우스에서의 toxicity test 등의 방법으로 분석, 확인하였고, 이들 항원을 이용하여 대상 질병에 따라서 항원, adjuvant 및 항원 단독 또는 복합 투여의 방법을 이용하여 시험백신을 제조하여 접종후 ELISA 법을 이용하여 난황 및 혈청내의 면역반응을 분석한 바, 난황에서의 항체가는 첫접종 2주후부터 상승하기 시작하여 6-8주 사이에 최고치를 나타내었고이 항체가는 약 12주 까지 지속되었다. 본 연구에 사용한 adjuvant 중에서는 ISA75 가 우수하였으며, 난황항체의 특이성을 Western blot 기법을 이용하여 증명하였다. 위축성비염 원인균인 *B. bronchispetica* 와 *P. multocida* 4D 에서는 33, 40, 43, 67 및 141 kDa 의 항원이 주요 항원이었고, *P. multocida* 3A 는 40 및 110kDa 가 *A. pleuropneumoniae* serotype 2 및 5 에서는 40 및 47 kDa 가 주요 항원으로 나타났다. 난황항체의 예방 및 치료효과는 실험동물 (마우스) 및 목적동물

(돼지)에 대하여 실시한바 난황항체의 투여군이 비투여군에서보다 건강상태, 임상증상 발현상태, 생존율등에서 우수하였고 특히 돼지에서는 난황항체 투여후 공격접종에서도 우수한 방어효과를 나타내었다. 야외 농장에서 호흡기 증상을 나타내는 개체들을 선발하여 치료제로 사용하였던바 우수한 치료 효과를 나타내었다.

제 3 장 돼지 복합 소화기 질병 난황면역제 개발

제 1 절 서 설

돼지의 소화기질병은 자돈에서 설사를 주요 증상으로 하는 급, 만성전염병으로 자돈 특히 포유기 자돈의 경우 생리기능, 면역기능 등이 매우 취약한 시기로서 병원체가 감염하여 발병하게 되면 폐사하거나 회복하여도 위축돈이 되어 막대한 경제적 손실을 유발하는 양돈산업의 고질적인 질병이다.

이러한 자돈의 소화기질병의 원인은 세균성, 바이러스성, 기생충성, 식이성 등으로 다양하나 이중 병원성대장균, 장독혈증균 그리고 로타바이러스가 단독 또는 혼합감염하여 발생하는 설사가 주류를 이루고 있다. 이들 자돈 주요 설사병원인체에 대한 예방대책으로 병원성대장균에 대해서는 몇종의 병원성균주로 만든 사균백신이나 k88, k99, 987p 등 주요 섬모항원으로 만든 정제백신을, 장독혈증은 *Clostridium perfringens*의 분비 독소이드 백신을, 로타바이러스는 생독백신을 각각 임신모돈에 접종하여 초유를 통하여 자돈에 면역을 부여하는 방법을 사용하고 있다. 그러나 백신이나 임신돈의 조건에 따라 면역형성도가 다양할 뿐아니라 충분한 면역이 형성되었어도 자돈의 초유섭취 및 위생관리상태 등에 따라 면역효과가 다양하여 이들에 의한 설사가 지속적으로 발생하고 있다. 치료대책으로 세균성설사병에 대해서는 각종 항균제를 사용하고 있으나 약제의 오, 남용으로 인한 내성균의 증가로 야외에서는 효과적으로 쓸 수 있는 치료제가 희귀한 실정이며, 바이러스성 설사병은 대중요법 외에는 치료대책이 전무한 실정이다. 이러한 질병관리상의 문제를 해결하기 위하여 세계 각국에서는 유전자재조합백신, 면역증강제, 슈퍼항생제, 난황항체 개발연구 등에 박차를 가하고

있으나 실용화는 극소수에 그치고 있다.

본 연구에서는 자돈의 주요 설사병원인체인 병원성대장균증, 장 독혈증, 로타바이러스 설사증에 대한 복합 난황항체를 개발하여 효율적으로 이들 질병을 치료, 예방할 수 있는 기법을 개발하여 실용화 하고자 하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 균/독 주

본 연구과제에 공시한 균독주는 국립수의과학검역원에 보관중인 것으로, 병원성대장균주는 k88 pilus 항원생산용 균주로 S-175, k99 pilus 항원생산용 균주로 S-20, 987p pilus 항원생산용 균주로 987p주, LT(heat-labile toxin) 항원생산용 균주로 S-99를 , 장독혈증균 α/β 독소생성용 균주는 *Clostridium perfringens type C* 균주를 그리고 *Rotavirus* 독주는 serotype 10, 175주를 이용하였다.

2. 대장균 pilus 항원 생성조건

검역원에서 보유하고 있는 E.coli K88항원 생성균주 및 K99항원 생성균주에 대하여 pilus 생성용 배지종류별, 배양시간의 경과에 따라 균을 원심분리하여(12,000rpm, 2min 5℃) 집균하고 PBS(pH7.2)로 1회 세척한 뒤 pilus 생성량을 mannose resistant hemagglutination(MRHA) 시험에 의해 측정하였다. 즉, 세척된 균을 0.5% D-mannose 함유한 PBS에 부유시킨 후에 spectrophotometer를 이용 흡광도를 측정하여 균의 농도를 동일하게 조절한 후, 균액 50 μ l를 U형 마이크로플레이트에 넣고 2진 희석한 뒤 동량의 1% 기니픽 또는 말 적혈구를 가하고 5℃ 냉장고에서 3시간 반응시킨 뒤에 응집여부를 판독하여 최적 생성 조건을 조사하였다. 또한 pilus 분리율 측정을 위하여 K88(S-175) 및 K99(S-20) 생성주 각각 1주를 선정하여

isovitalex가 첨가된 minca broth 6L에 접종하여 37°C 18시간 동안 진탕배양하고 그 배양액을 8,000rpm 20분 동안 원심분리하여 균을 수집, 50ml의 PBS에 재부유시킨 후, blending, heating 및 sonication의 방법으로 pilus를 분리한 후 원심분리하여 상층액과 균체에 대하여 MRHA시험을 실시하여 분리된 pilus의 생성량을 조사하였다.

3. 배양 및 항원의 조제

가. 대장균 pilus 및 LT 항원

대장균 pilus 항원생산을 위하여 공시 균주(S-175, S-20, 987p)를 합성 배지인 Minca broth에 접종하고 37°C에서 18시간동안 진탕배양 하였다. 배양한 균액을 8,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 균을 수집한 후, 최초 배양액의 1/10 양의 PBS(pH 7.2)로 부유시켰다. 부유한 균액을 mixer를 이용하여 4°C에서 2분간 blending하여 균체에서 pilus를 분리하였다. 이것을 30,000×g에서 15분간 원심분리하여 pilus를 함유한 상층액을 수집하여 ammonium sulfate로 포화되도록 처리하여 4°C 냉장실에서 하루밤 동안 정치하였다. 이것을 다시 30,000×g에서 15분간 원심분리하여 침전물을 모으고 최초 배양액의 1/100 양의 PBS(pH 7.2)로 부유시킨후에 4°C, 48시간동안 투석하였다. 투석한 액을 0.45µm filter로 여과한 후 단백질의 농도를 키트(BCA reagent, Pierce company)를 이용하여 측정하고 백신제조에 사용하였다. 이열성독소(LT)는 S-99균주를 CAYE(Casamino Acid Yeast Extract) 배지에 접종하고 37°C에서 18시간동안 배양한 후에 lincomycin(45µg/ml)이 첨가된 CAYE 배지에 계대하여 37°C에서 24시간동안 진탕배양하였다. 배양한 균액을 원심분리하여 수집한 후에 최초 배양액의 1/10 양의 PBS(pH 7.2)로 재 부유시킨 후에 polymyxin B(0.2g/L)를 첨가한 후 37°C에서 2시간 동안 처리하였다. 처리된 액을 4°C에서 12,000×g, 20분동안 원심분리한 후에 상층액을 취하여 ammonium sulfate로 포화되도록 처리하여 4°C 냉장실에서 하루밤 동안 정치하였다. 이액을 원심분리하여 침전물을 최초 배

양액의 1/100 양의 PBS(pH 7.2)로 부유시킨 후에 4°C, 48시간동안 투석하였다. 투석한 액을 0.22 μ m filter로 여과한 후 이열성독소의 불활화를 위해서 60°C에서 2시간동안 처리한 후 formalin을 0.5%되게 가하였다. 이후 특소이드화한 이열성독소의 단백질농도를 키트(BCA reagent, Pierce company)를 이용하여 측정하고 백신제조에 사용하였으며, 생산된 LT toxoid의 역가는 VET-RPLA(Seiken co.) kit를 이용하여 측정하였다.

나. 장독혈증균 독소

공시 균주를 DS medium(Ducan-Strong Sporulation Medium)에 접종한 후 37°C에서 18시간동안 진탕배양하였다. 배양한 균액을 8,000rpm으로 20분간 원심분리하여독소가 함유된 상층액을 수집하였다. 이 상층액에 ammonium sulfate로 포화되도록 처리하여 4°C 냉장실에서 하루밤 동안 정치하였다. 이액을 원심분리하여 침전물을 최초 배양액의 1/100 양의 PBS(pH 7.2)로 부유시킨 후에 4°C, 48시간동안 투석하였다. 이후 투석한 용액에 formalin을 0.5%되게 가하여 독소를 불활화 시킨후에 단백질 농도를 bovine serum albumin(BSA)키트(pierce)을 이용하여 측정하고 항원으로 사용하였다.

다. 로타바이러스

돼지유래 로타바이러스 2주(serotype 10, 175)를 각각 원숭이 콩팥 유래세포(CV-1 주화세포)를 VTP용액으로 소화시켜 분산된 세포수를 3 \times 10⁵ cell/ml가 되도록 조절하여 Medium 199 Earl's에서 배양하면서 단층이 형성되었을 때 세포유지용 배지로 3-4회 닦아서 혈청성분을 제거하고 종독(돼지유래 로타바이러스 2주, serotype 10, 175)을 배양액의 10%가 되도록 각각 접종하여 37°C에서 회전배양하면서 세포변성이 80%이상 나타났을 때 채득하여 역가를 측정하고 10^{6.0}TCID₅₀ 이상인 것을 동결보존하면서 항원으로 사용하였다.

4. 시험백신 제조 및 접종

가. 산란계에 대한 접종 방법별 면역원성 비교시험(Test 1)

다양한 adjuvant를 이용하여 접종방법에 따른 각 항원별 최적 난황항체 생성조건을 알아보기 위한 시험으로서 이시험에 사용된 항원으로는 시제백신 1ml당 대장균 k88 pilus항원(41 μ g), k99 pilus항원(8 μ g/ml), 987p pilus항원(38 μ g), LT항원(46 μ g), 크로스트리디움 퍼프린젠스의 α/β 독소이드(77 μ g)항원 및 로타바이러스 10,175 항원을 200배 농축하여 동량으로 혼합, 혈청형별로 각각 역가가 $10^{8.5}$ - 10^9 TCID₅₀ 되도록하여 시험백신을 조제하였다. 면역형성능을 비교하기 위하여 첨가한 adjuvant으로는 Aluminum hydroxide gel, ISA 25, ISA 70, Freund's Complete adjuvant(FCA) 및 Freund's incomplete adjuvant를 다양하게 복합항원과 혼합하여 대조군 포함 7개군으로 하여 2~4간격으로 3회에 걸쳐 백색 산란계에 1ml씩 근육접종하였다(Table 1).

Table 1. Vaccination schedule in chicken for test 1

Group	No. of chicken	Inoculation conditions				
		1 st	Interval	2 nd	Interval	3 rd
1	5	ISA25	2weeks	FCA*	2weeks	ISA70
2	5	Gel	2weeks	FCA	4weeks	ISA70
3	5	ISA25	2weeks	FCA	4weeks	ISA70
4	5	ISA25	2weeks	FCA	4weeks	FCA
5	5	ISA25	2weeks	ISA70	4weeks	ISA70
6	5	FCA	2weeks	FIA**	4weeks	ISA70
Control	5	-	-	-	-	-

* Freund's complete adjuvant. ** Freund's incomplete adjuvant

나. 산란계에 대한 복합난황항체(2종) 대량생산(Test 2)

실험 2는 1차 시험에서의 최적 난황항체생성 시험조건을 이용하여 각 항원에 대한 난황항체의 대량생산을 위한 시험으로서 시제백신 1ml당 대장균 k88 pilus항원(52.3 μ g), k99 pilus항원(62.81 μ g), 987p pilus항원(43.5

μg), LT항원(76μg)과 크로스트리디움 퍼프린젠스의 α/β 독소이드(400μg)이 함유하도록 제조하였다. 로타바이러스는 면역원성을 높이기 위하여 생산한 바이러스 항원을 200배 농축하여 혈청형별로 각각 역가가 10^{8.5}-10⁹TCID₅₀ 되도록하여 2개 그룹의 혼합항원으로 시험백신을 조제하였다. 즉, 대장균/로타바이러스 혼합군과 대장균/장독혈증균 혼합군으로 하였으며, adjuvants는 1차년도 시험결과를 참조하여 1차접종에는 FAC를, 2차접종에는 FIA를, 3차접종에는 ISA70을 사용하여 2주 간격으로 백색 산란계에 1ml씩 접종하였으며, 그 이후 7주후에 보강(4차) 접종하였다(Table 2).

Table 2. Vaccination schedule in chicken for test 2

Group	Antigens	No. of chicken	Inoculation schedule						
			1st	Interval	2nd	Interval	3rd	Interval	4th
A	<i>E. coli</i> + <i>Cl. perfringens</i>	15	FCA	2weeks	FIA	2주	ISA70	7주	ISA70
B	<i>E. coli</i> + <i>Rotavirus</i>	15	FCA	2weeks	FIA	2주	ISA70	7주	ISA70

5. 난황항체 추출

난황항체의 추출은 우 등(1998)의 방법에 준하여 시험하였다. 즉, 난황내 항체가 변화를 조사하기 위하여 주기별로 수집한 계란의 껍질을 알콜과 옥도를 이용하여 소독한 후에 깨서 계란의 노른자만을 분리, 수집하고 동량의 PBS(pH 7.2)를 가하여 혼합하였다. 이 혼합액에 동량의 chloroform을 가하고 실온에서 2시간동안 정치시킨 후에 일부를 취하여 12,000rpm에서 2분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 항체를 측정하였다.

6. 닭 혈중 및 난황중의 항체가 조사

닭의 혈중 및 난황중의 항체가 측정은 대장균 및 크로스트리디움 퍼프린젠스의 경우 ELISA법을, 로타바이러스의 경우 세포중화시험법을 이용하

였다. ELISA에 이용된 항원은 시험백신 제조에 사용한 각 항원을 적정농도로 희석하여 사용하였으며 시험방법을 요약하면 다음과 같다. 즉, 각각의 항원을 coating buffer에 부유시켜 ELISA plate에 100 μ l씩 각 well에 분주한 후에 4 $^{\circ}$ C 하루밤 방치하였다. plate를 tween-PBS(0.05% tween 20 in PBS)로 5-6회 세척한 후에 blocking buffer(1% gelatin 첨가)를 200 μ l를 가한 후에 실온에서 30분 동안 정치시켰다. tween-PBS로 5-6회 세척한 후 혈청은 1:200으로, 난황추출액은 1:100으로 각각 희석하여 100 μ l씩 가한후 37 $^{\circ}$ C, 30분동안 반응시켰다. 이후 tween-PBS로 5-6회 다시 세척한 후 conjugate(Goat anti-chicken IgG HRP)를 1:1,000으로 희석한 후 100 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C, 30분동안 반응시킨 후에 substrate(ABTS solution)를 100 μ l씩 가한후 실온에서 30분 동안 반응시키고, stop solution(0.5M HCl)을 50 μ l씩을 넣은 후에 492nm에서 흡광도를 측정하였다.

로타바이러스에 대한 항체역가는 바이러스중화시험법에 의해 측정하였다. 즉, 로타바이러스를 200TCID₅₀/0.05ml이 되도록 트립신(0.5 μ g/ml, bovine type III, sigma)이 포함된 α -MEM배지로 희석하고, 닭 혈청 또는 난황액을 동일한 배지를 사용하여 단계별로 희석한 다음 로타바이러스와 동량 섞어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 트립신이 포함된 배지로 세척한 단층이 형성된 MA104세포에 로타바이러스와 혈청이 혼합된 용액을 혈청 희석단계별로 옮겨 담고 37 $^{\circ}$ C에서 7일간 관찰하여 바이러스 증식이 억제되는 최대 혈청희석배수를 중화항체역가로 나타내었다.

7. 난황항체의 마우스에서 독신중화시험

장독혈증균(*Cl. perfringens* toxoid)독소 난황항체의 실험실내 효능조사를 위하여 마우스(ICR, 15~20g)를 이용하여 독신 중화시험을 실시하였으며, 닭 혈청 항체의 효능조사는 혈청을 단계별로 희석하여 사용하였고, 난황항체는 동결건조된 분말 1g를 증류수 10ml에 녹인 것을 원액으로 희석하여 사용하였다. 중화시험에 이용한 독신은 *Cl. perfringens* type C로서

마우스를 100% 폐사시킬 수 있는 최소량으로 하여 난황항체와 특신을 동량으로 혼합하고 실온에서 1시간 방치하여 중화시킨 후 0.2ml를 마우스 미정맥에 접종하여 폐사유무를 조사하였다.

8. 목적동물에 대한 방제효과

난황항체의 돼지에서 방어능을 조사하기 위하여 이유자돈(체중20Kg 내외) 20두를 아래의 표와 같이 4개 시험군으로 설정하고 *E. coli*(4종, 1×10^9 cfu/ml), *Cl. perfringens type C*(2.3×10^8 cfu/ml) 및 로타바이러스 10,171(1×10^6 TCID₅₀) 배양액을 2개군 즉, 대장균과 장독혈증균, 대장균과 로타바이러스로 구분하여 동량씩 혼합하여 경구로 10ml씩 공격접종을 실시하고 3일이 경과된 후에 난황면역제 분말 1g을 증류수 10ml에 녹여 표3에 서와 같이 투여경로를 달리하여 마리당 5ml씩 3일간 투여한 후 4일간 치료효과를 임상증상, 체중증체량, 병변 및 균회수율을 통하여 조사하였다(Table 3). 또한 설사발생 야외 자돈에 대하여 1일 1회 3일간 3ml씩 난황항체를 경구투여 질병치료효과를 관찰하였다. 공시한 난황항체는 ELISA 측정시 대장균은 1:6,400~1:12,800, *Cl. perfringens*는 1:3,200 및 로타바이러스는 중화항체가로 1:128이 되도록 제조하여 사용하였다.

Table 3. Experimental design to study protectivity of egg Yolk antibodies against pathogenic *E. coli*, *Cl.perfringens* and *Rotavirus*

Group	Pathogen challenged	No. of pigs	Administration of yolk antibody *	
			Routes	Times treated
A	<i>E. coli</i> + <i>Cl.perfringens</i>	3	Oral	5ml/day for 3days
		3	I.M	
B	<i>E. coli</i> + <i>Rotavirus</i>	3	Oral	5ml/day for 3days
		3	I.M	
		3	I.P	
C	<i>E. coli</i> + <i>Cl.perfringens</i>	3	No	No
D	<i>E. coli</i> + <i>Rotavirus</i>	3	No	No

* Antibody titers of *E.coli* and *Cl.perfringens* are 6,400~12,800, 3,200 respectively by ELISA, and *Rota virus* is 128 by virus neutralization test

제 3 절 결과 및 고찰

1. 대장균 pilus항원 생성조건

가. *E. coli* K88항원 생성균주의 배양조건별 pilus 생성능 조사

대장균 중 K88섬모항원 양성균주 3주(S-175, 3030-2, SS-18)에 대하여 24시간동안 200rpm에서 진탕배양하면서 시간별로 균액을 수집하여 흡광도, pH, MRHA titer를 조사한 결과 흡광도를 이용한 균의 성장은 3030-2균주의 경우 Minca Isovitalax 배지에서, SS-18균주는 Minca 배지에서 성장이 늦었으며 E. broth에서는 3가지 균주 모두 비슷한 균의 성장을 보였다. pH 변화는 세가지 균주 모두 7.0근처의 변화를 보였으나, E. broth의 경우

는 균배양 8시간 이후부터는 pH 4.7까지 감소하였다. MRHA 역가는 배지별로는 차이가 없었으나, 균주별로는 산생율에 있어서 큰 차이를 보였다(Table 4).

Table 4. Comparative production of *E. coli* K88 antigens in various conditions of incubation

Parameters	Time	Blood agar(S-175)*			Blood agar(3030-2)			Blood agar(SS-18)		
		Mincals**	Minca	E.broth	Mincals	Minca	E.broth	Mincals	Minca	E.broth
Obsorbance (620nm)	8hr.	0.495	0.412	0.420	0.185	0.409	0.348	0.432	0.109	0.541
	24hr.	0.553	0.522	0.254	0.170	0.612	0.417	0.627	0.089	0.547
	0hr.	7.34	7.49	7.2	7.34	7.49	7.2	7.34	7.49	7.2
pH	8hr.	6.96	6.99	5.76	7.20	6.98	6.04	6.93	7.11	5.40
	24hr.	6.97	6.97	4.78	7.21	7.08	4.86	7.00	6.96	4.74
MRHA titer	8hr.	128	128	128	4	8	4	0	0	0
	24hr.	256	128	128	4	16	8	0	0	0

* first culture. ** second culture

나. *E. coli* K99 항원생성균주의 배지종류별 Pilus 생성능 조사

대장균 K99 생성균주에 대한 섬모항원 생성능 조사에서는 공시한 10주 중 S-20 및 S-101균주의 섬모항원 생성능이 가장 높게 나타내었으며, 배지에 있어서는 거의 유사하게 나타내었으나 Minca agar, Minca broth, Minimal salt agar의 순으로 섬모항원의 생성능을 보였다(Table 5).

Table 5. Comparative production of E.coli K99 antigens in various medium by MRHA test

Strains	Serotype	MRHA titers					
		MB ^a	MIB ^b	MSB ^c	MA ^d	MIA ^e	MSA ^f
S-20	O101:K99:H ⁻	64	32	16	16	64	16
S-91	O8:K85:K99	0	0	0	0	0	0
S-92	O9:K35:K99, F41	64	64	32	64	32	64
S-93	O9:K30:K99, F41	0	0	0	0	0	0
S-94	O101:K32:K99, F41	0	0	0	0	0	0
S-95	O101:K99, F41	0	0	0	0	0	0
S-101	O101:K99, F41	32	32	16	64	32	128
S-122	O101:K :K99, STa	4	16	0	0	16	16
S-125	O101:K30:K99	64	32	0	64	32	32
S-172	K99	0	0	0	0	0	0

^aMB:Minca broth, ^bMIB:Minca isovitalex broth, ^cMSB:Minimal salt broth, ^dMA:Minca agar, ^eMIA:Minca isovitalex agar, ^fMSA:Minimal salt agar.

다. K88 섬모항원의 처리별 섬모항원의 분리율

K88을 생성하는 균주(S-175)를 선발하여 Minca broth 배지 6L에 접종하여 37°C 18시간 동안 진탕 배양하였다. 진탕 배양한 균액을 원심분리하여 균체를 수집한 후 PBS 30ml에 부유시킨 후 10ml씩 나누어 60°C 30분, 70°C 20분, 85°C 5분 동안 열처리한 후 상층액과 균체중의 MRHA 역가를 측

정하였다. 배양한 균액의 MRHA의 역가가 64이었고, 열처리 방법중 70℃, 80℃에서의 20분 동안의 방법들은 원심분리 후 상층액과 균체부유액 모두에서도 MRHA 역가를 보이지 않았다. 60℃ 20분 동안의 열처리 방법은 상층액은 원액의 1/4, 균체부유액은 원액의 1/2 수준으로 섬모항원의 분리에 있어서 세가지 열처리 방법중 가장 효과적이었다(Table 6).

Table 6. The separation of K88 antigen by different heating methods

Cultured bacterial cells	Heating at 60℃ for 30min.		heating at 70℃ for 20min.		heating at 85℃ for 5min.	
	Supernatant	Pellet	Supernatant	Pellet	Supernatant	Pellet
64	16	32	0	0	0	0

라. K99 섬모항원의 처리별 섬모항원의 분리율

K99 섬모항원을 생성하는 균주인 (S-20)을 Minca broth 6L에 접종하여 배양하여 37℃ 18시간동안 진탕 배양하였다. 진탕 배양한 균액을 원심 분리하여 균체를 수집한 후 PBS 30ml에 부유시킨후 10ml씩 나누어 60℃ 30분간 열처리 방법, 4℃에서의 2분간 blending 방법, 4℃에서의 3분간의 sonication 방법을 이용하여 처리한 후, 각각의 방법간에 K99 섬모항원의 분리율을 비교하였다. 3분간의 sonication 법은 원심분리후 상층액과 균체액 모두에서 MRHA 역가를 보이지 않았으며, 60℃, 30분간 열처리 방법은 원심분리후 상층액에서는 원액 수준의, 균체 부유액에서는 원액의 1/4수준의 MRHA 역가를 보였다. 한편, 2분간 blending 방법은 원심후 상층액은 원액보다 4배수준의 높은 MRHA 역가를 보였으며, 균체부유액은 원액의 1/8 수준으로 blending 방법이 K99 섬모항원의 분리에 가장 효과적인 방법임을 알 수 있었다(Table 7).

Table 7. The separation of K99 antigen by three different heating methods

Cultured bacterial cells	Heating at 60°C for 30min.		heating at 70°C for 20min.		heating at 85°C for 5min.	
	Supernatant	Pellet	Supernatant	Pellet	Supernatant	Pellet
256	256	64	1024	32	0	0

2. 항원에 대한 항체형성능

가. 보좌제 종류별 난황항체 형성능 비교

대장균 섬모항원 4종과 크로스트리디움 독소이드의 혼합항원을 다양한 종류의 adjuvant를 사용하여 시험백신을 닭에 접종한 후 각 항원별 최적 난황항체 생성조건을 알아보기 위하여 백신접종 후 2주간격으로 계란을 수거하여 난황중 항체역가를 조사한 결과 그룹 6에서 모든항원에서 가장 높은 항체역가를 나타내었으며, 다음으로 그룹 5의 순으로 나타내었다. 모든 그룹에서 2차 접종 2주후에 항체가 상승이 시작되어 대부분의 그룹에서 ISA70를 사용한 3차접종 후 2주인 8주이후에서 모든 항원에 대하여 최고치의 난황항체를 나타내었다. 이와같은 결과에서 adjuvant ISA70은 닭에서의 면역형성에 가장 우수한 면역보좌제로 판단되었으며 본 시험에서는 그룹 7에서의 1차 FCA 사용 및 2차 FIA 사용후 3차 ISA70의 사용이 빠른 항체가 상승과 고역가의 항체를 장기간 유지하는 데 효과적인 것으로 나타내었다(fig 1~5)

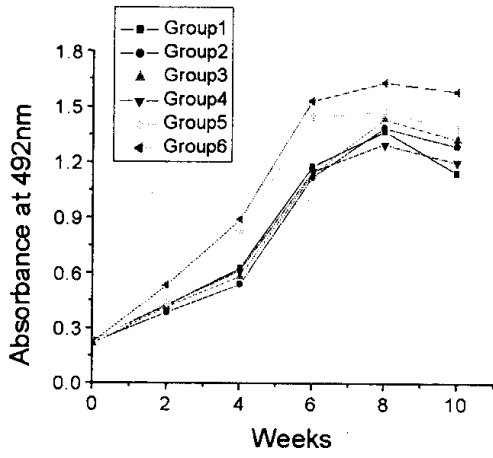


Fig 1. *E. coli* K88

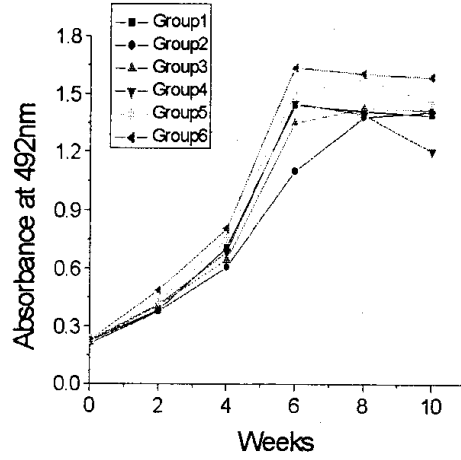


Fig 2. *E. coli* K99

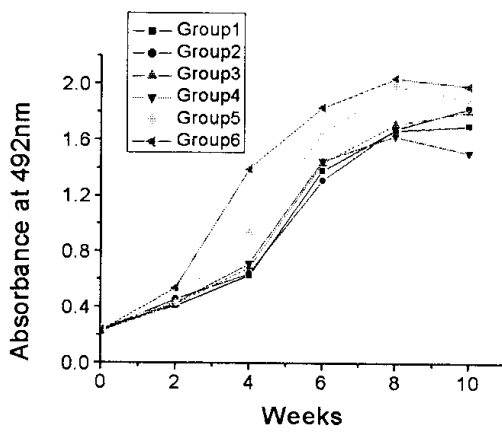


Fig 3. *E. coli* 987P

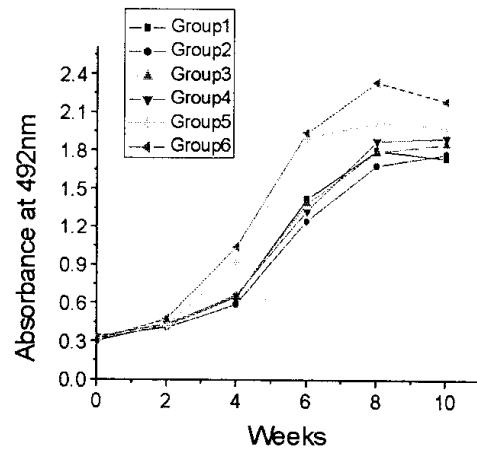


Fig 4. *E. coli* LT

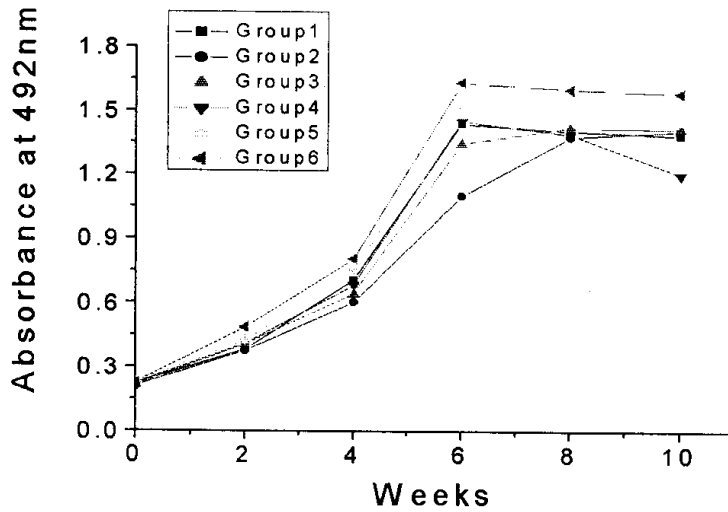


Fig 5. *Cl. perfringens* type C toxoid

나. 주요 소화기질병 단, 복합항원별 난황항체 생성비교

1) 대장균 및 클로스티리듐균 항원에 대한 산란계 혈중 항체가 변화

백신접종후 닭혈중 항체가 변하는 항원종류별 다소 다른 양상으로 나타났으며 1차접종 2주에 나타나는 항체는 대장균 K99섬모항원과 LT에서 가장 높았으며, *Cl. perfringens* toxoid (CLT) 항원이 가장 낮게 나타났다. 2차백신후에서는 K99에서 가장 높았고 LT, 987P의 순이었으며, CLT 항원의 경우도 K88수준으로 상승된 것을 확인할 수 있었다. 그 이후 adjuvant로서 ISA70을 사용한 3차 백신 2주후에서는 모든 항원에 대한 혈중항체는 계속 상승되어 K99, LT 및 CLT의 경우 2.0이상이었으나 K88 및 987P의 경우는 1.5~1.7수준으로서 상대적으로 다소 낮게 나타내었다. 특히 CLT의 경우는 3차 접종후 가장 급속한 항체가 상승을 나타내었으며 987P이 경우는 가장 낮은 상승율을 나타내었다. 그 이후 혈중항체는 7주까지 모든 항원에서 1.5~2.0의 높은수준을 계속유지하였고, 4차 보강접종 후 대장균 4종의 항원에 대한 항체는 최고 수준으로 상승하였으며, CLT는 그 상승폭이

다소 낮게 나타내었다(Fig 6).

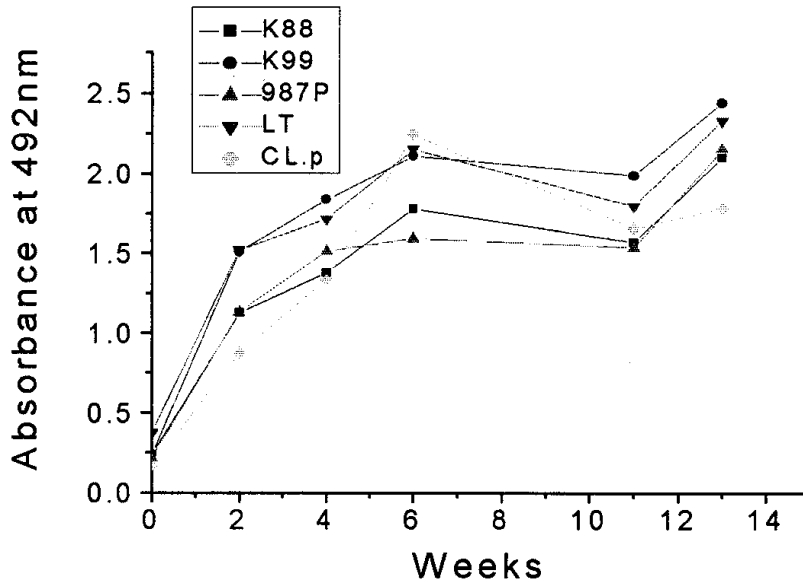


Fig 6. Immune response in sera of hens immunized with antigens of pathogenic *E. coli* and *Cl. perfringens* toxoid

2) 대장균 및 클로스티리듐균 항원에 대한 난황중 항체역가 변화

난황중에 나타나는 항체의 변화양상은 닭 혈중 항체가 변화 양상과 유사한 양상으로 K99 및 LT항원에 대한 난황중 항체가 전 시험기간동안 가장 높게 나타내 것은 닭 혈중항체와 동일한 양상이었으며, 클로스트리듐 독소이드의 경우 대장균 항원에 비해 전반적으로 낮았고 3차백신 이후 백신접종 4주후의 역가수준이 2주전 혈중 항체가 수준과 유사한 수준으로 나타난 것이나 최고 수준의 항체가 혈중항체의 경우 3차 백신접종후 2주에 비해 난황중 항체는 항원에 따라 다소 다르지만 3주(987P)에서 4주(LT), 5주(CLT) 및 6주(K99, K88)에서 최고 수준으로 나타내어 닭 혈중에 비해 1~4주 늦게 나타내는 것을 알 수 있었다. 전반적으로 대장균 항원 4종은 3차접종 후 2.0 이상의 높은 수준의 항체를 7주 이상 유지하고 있

었으며, 반면 CLT의 경우 3차접종 후 5주까지 상승하였으나 그 이후 급속히 하락하는 양상을 나타내었으며, 4차 보강접종 2주후에 다시 빠른 상승 곡선을 나타내었다(Fig 7).

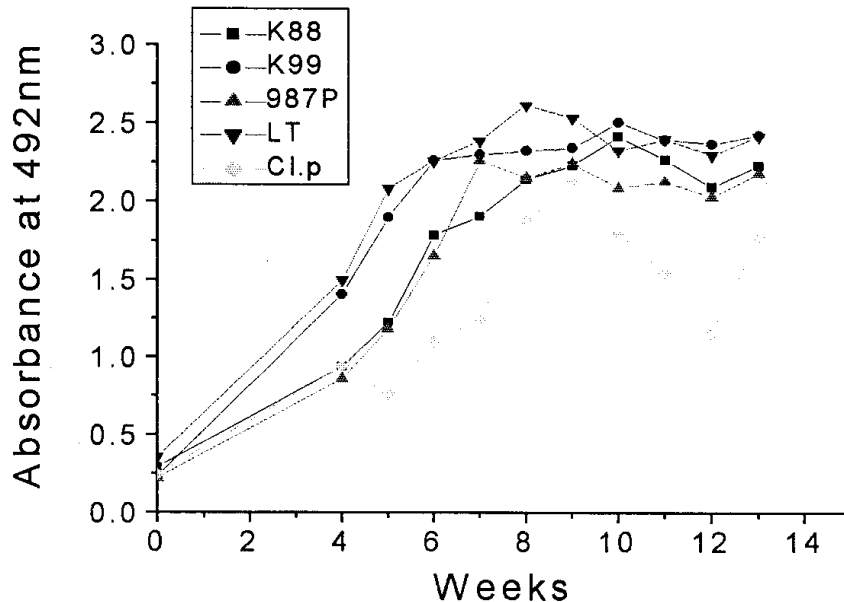


Fig 7. Immune response in egg yolk antibodies of hens immunized with antigens of *E. coli* and *Cl. perfringens* toxoid

3) 로타바이러스 항원에 대한 닭 혈중 및 난황중 항체가 측정

로타바이러스 및 대장균의 복합백신 접종 후 닭의 혈중 및 난황에 대한 항체역가를 바이러스중화시험에 의해 측정한 결과 1차 백신 2주후부터 닭 혈중 중화항체는 8(Log₂ base)이상의 비교적 높은 수준으로 나타내었으며, 3차접종 2주후에 약간상승되었으나 전 시험기간에 걸쳐 8이상의 수준을 유지하는 것으로 나타내었다. 반면, 난황중 항체는 3차 접종후 4주에서도 6수준으로서 혈중항체에 비해 상대적으로 낮게 나타내었으나 점차적으로 서서히 상승되는 경향으로 나타내었다.

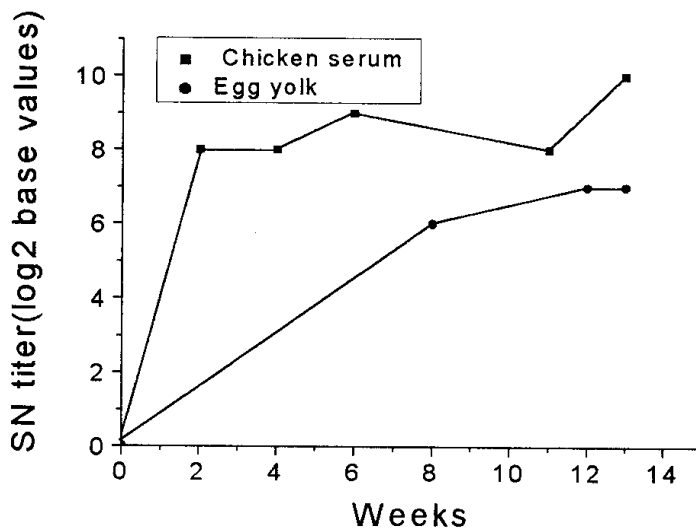


Fig 8. Immune response in sera and egg yolk of hens immunized with antigens of *Rota virus*

3. 실험동물에 대한 난황항체의 질병 예방 및 치료 효과

가. 마우스에서 병원성대장균 공격접종에 대한 예방효과

복합난황항체(*E. coli*+ *Cl. perfringens*)를 K88 및 K99에 대한 ELISA 항체역가를 1:6,400으로 조절하여 0.3ml를 복강으로 투여한 후 24시간에 대장균 fimbriae type K88 및 K99 배양액을 10MLD(1×10^9 cfu/0.2ml)의 농도로 조절하여 복강으로 1×10^9 cfu/ml 공격접종하고 5일간 관찰한 결과 대조군 마우스는 24시간이내 100% 폐사하였으나 난황투여군 중 K88 대장균으로 공격접종한 마우스는 20수중 17수(85.0%), k99대장균으로 접종한 군에서는 20수중 19수(95.0%)가 생존하여 높은 방어효과를 나타내었다(Table 8).

Table 8. Protective effect of egg yolk antibodies in mice after challenge with enterotoxigenic *E. coli* K88 and K99 strains

Group	Challenge * strain	No. of mouse	Result(%) **	
			Dead	Survival
Administration	K88	20	3(15.0)	17(85.0)
	K99	20	1(5.0)	19(95.0)
Control	K88	10	10(100)	0
	K99	10	10(100)	0

* Challenged with 0.2ml of about 1×10^9 cfu/ml of *E. coli* K88 and K99 strain by intraperitoneal

** Administrated with 0.3ml of egg yolk antibodies(ELISA titer 1: 6,400) by intraperitoneal route at 24hour before challenge.

나. 마우스에서 *Cl. perfringens type C* 독신에 대한 중화효과

1) 닭 혈중항체의 마우스에 대한 독신 중화효과

Cl. perfringens type C 표준독신(10MLD)에 대한 닭 혈중 항체의 중화능력을 알아보기 위하여 미리 ELISA역가를 측정하고 혈청을 단계별로 희석하여 동양의 독신과 혼합하여 실온에서 1시간 방치하여 중화시킨 후 마우스에 접종하여 중화효과를 관찰한 결과 항체역가 3,200에서 320까지 100% 마우스 생존율을 나타내었으며, 반면에 항체역가 160 및 80의 경우는 각각 40% 및 20%의 생존율을, 독신만 접종군에서는 접종 6시간 이내에 100%의 폐사율을 나타내었다(Table 9).

Table 9. Neutralization effects of serum antibodies against *Cl. perfringens* type C toxin in mice

Treatments	No. of mouse	No. of mouse died at hours * after inoculation				Survival (%)	
		2	6	18	Total		
1 : 3,200 *	10	-	-	-	0	100	
1 : 1,600	10	-	-	-	0	100	
1 : 640	10	-	-	-	0	100	
1 : 320	10	-	-	-	0	100	
1 : 160	5	1	1	1	3	40	
1 : 80	5	2	2	-	4	20	
Control	Toxins	10	9	1	-	10	0
	Serum	5	-	-	-	0	100

* Serum antibody titers(ELISA) using toxin neutralization test

** Venous inoculated with 0.2ml of toxin solution neutralized with serum antibody.

2) 마우스에서 난황항체의 독신중화 효과

복합난황항체(*E. coli*+ *Cl. perfringens*)의 마우스에서 *Cl. perfringens* type C 표준독신에 대한 중화효과를 알아보기 위하여 난황항체 농도를 Table 10과 같이 단계별로 희석하여 동량의 독신액과 혼합하여 중화시킨 후 마우스에 대한 독신중화 효과를 조사한 결과 난황항체 농도 100mg~50mg/ml의 경우 마우스 20수(100%) 모두 생존하여 생산된 난황항체의 독신중화능력을 확인할 수 있었다. 반면, 난황항체 농도 20mg/ml 및 10mg/ml의 경우는 각각 40% 및 20%의 생존율을 나타내었고, 독신만의 접종군에서는 접종 2시간내에 모두 폐사하였으며, 난황항체용액(100mg/ml)만의 접종한 대조군

에서는 폐사가 발생되지 않아 투여한 난황항체의 마우스에 대한 안전성을 확인할 수 있었다.

Table 10. Neutralization effects of egg yolk antibodies against *Cl. perfringens* type C Toxin in mice

Tretments	No. of mouse	No. of mouse died at hours *				Survival (%)	
		2	6	18	Total		
Toxin + 100mg**	10	-	-	-	0	100	
Toxin + 50mg	10	-	-	-	0	100	
Toxin + 20mg	10	2	2	2	6	40	
Toxin + 10mg	10	4	3	1	8	20	
Toxin + 5mg	10	4	2	2	8	20	
Control	Toxins	10	10	-	-	10	0
	Toxin+reference antiserum	5	-	-	-	0	100
	Egg yolks solution	5	-	-	-	0	100

* Concentration(mg/ml) of egg yolk used toxin neutralization test

** Venous inoculated with 0.2ml of toxin solution neutralized with egg yolks antibodies.

4. 목적동물에서의 방제효과

가. 균 공격접종에 대한 난황항체의 질병 치료효과

난황항체의 돼지에서 치료시험을 위하여 이유자돈(체중20Kg 내외) 21두의 체중을 측정하여 4개 시험군으로 균등히 배분하고 난황항체(A)의 경우 *E. coli*(4종)와 *Cl. perfringens* type C이 혼합되어 있고, 난황항체(B)의 경우 *E. coli*와 로타바이러스(2종)이 각각 혼합되어 있는 점을 감안하여

이들 항체의 원인균을 공격접종하고 공격접종 3일 후에 설사발생을 확인하고 그룹 A 및 그룹 B에 대하여는 각각 난황항체(A) 및 (B)를 각 경로별로 3일동안 투여하여 치료효과를 조사하였다(Table 11). 시험결과 3일간 난황 투여한 전군에서는 별다른 임상증상이 관찰되지 않았으나 대조군에서는 계속적으로 설사발생, 식욕부진 및 쇠약 등 임상증상이 관찰되었다. 균공격 접종일부터 부검당일까지 8일간의 평균증체량의 경우 난황항체 투여군인 그룹 A 및 그룹 B에서 대조군인 그룹 C 및 그룹 D에 비해 각각 1.0~2.0Kg, 0.4~0.9Kg의 높은 증체효과를 나타내었다. 특히 그룹 A의 경구투여의 경우는 평균 증체량이 3.6Kg으로서 대조군인 그룹 C의 1.9Kg에 비해 통계적으로 유의차가 인정되는 체중증체효과를 확인할 수 있어 난황항체의 경구투여가 근육 및 복강투여시 보다 효율적인 것으로 나타내었다. 난황항체 3일투여후 4일째의 분변 및 장내용물에서의 공격접종 대장균의 회수율에서도 난황항체투여군에서는 총 15두 중 2두에서 분리되어 대조군의 6두 중 3두에 비해 낮은 회수율을 나타내었다. 한편으로 각 대조군에서 계속적으로 설사발생 및 쇠약 등 심한 임상증상을 보인 2두에 대한 난황항체를 3일간 경구투여한 결과 정상상태로의 회복하는 치료효과를 확인할 수 있었다.

Table 11. Protective effect of egg yolk antibodies in piglets after challenge with *E. coli*, *Cl. perfringens* and *Rotavirus* strain

Group	Challenge ^a Patogens	Routes ^b	Results			
			Weight ^c gains	Recovery of ^d pathogens	Clinical ^d signs	Lesion ^d
A	<i>E. coli</i> + <i>Cl. perfringens</i>	Oral	3.6±0.2 ^a	0/3	0/3	1/3
		I.M	3.1±1.0 ^{ab}	1/3	0/3	1/3
B	<i>E. coli</i> + <i>Rotavirus</i>	Oral	3.4±1.0 ^a	0/3	0/3	1/3
		I.M	2.9±0.6 ^{ab}	1/3	0/3	1/3
		I.P	3.0±0.5 ^{ab}	0/3	0/3	1/3
C	<i>E. coli</i> + <i>Cl. perfringens</i>	No	1.9±1.0 ^b	1/3	1/3	1/2
D	<i>E. coli</i> + <i>Rotavirus</i>	No	2.5±0.3 ^{ab}	2/3	1/3	1/2

^A Challenged with 10ml of about 1x10⁹cfu/ml of *E. coli*(4 strains), 2.3x10⁸ cfu/ml of *Cl. perfringens* and 10^{6.0}TCID₅₀ of *Rotavirus* 10 and 171, respectively.

^B Intramuscular(I.M), intraperitoneal(I.P) and oral treated with egg yolk antibodies for 3days from 3days after challenge. Antibody titers of *E. coli* and *Cl. perfringens* are 6,400~12,800, 3,200 respectively by ELISA, and Rota virus is 128 by virus neutralization test.

^C Mean values in the column not followed by the same letter are significantly different(p<0.05).

^D No. of positive/ No. of piglets treated for 3days after challenge.

나. 야외 자돈에 대한 질병 치료효과

경기도 3개지역 8개 양돈장의 대장균증 등에 의한 설사발생 자돈 598두를 대상으로 1일 1회 3ml씩 3일간 대장균 및 로타바이러스 복합난황항체

를 경구 투여한 결과 전체적으로 582두에서 치료되어 97.3%의 높은 치료효율을 나타내었다. 투여 경과별치료 효과는 치료 2일에서 318두(53.2%)로서 가장 높았고, 3일후가 152두(30.6%) 및 1일후가 112두(18.7%)의 순으로 나타내었다. 따라서 개발된 난황 면역제는 로타바이러스에 대한 임상시험이 다소 미흡하나 대부분의 설사 발생이 대장균, 클로스트리디움 및 로타바이러스 등에 의한 단독 또는 복합적으로 작용하여 그 증상이 심하게 발현되는 상황에서 질병발생 원인에 따라 이들 난황항체의 적절한 혼합 및 선택적인 사용은 설사발생 등 자돈 소화기질병에 의한 피해를 줄이는 데 크게 기여할 것으로 판단되었다.

Table 12. Therapeutic effects of egg yolk antibodies against K88, K99, 987P 및 LT on diarrheal piglets

Farm	No. of piglets treated	No. of piglet recovered from diarrhea *			
		on day after treatment			
		1	3	5	Total(%)
A	48	12	15	21	48(100)
B	34	10	18	4	32(94.1)
C	19	6	11	0	17(89.5)
D	497	84	274	127	485(97.6)
Total	598	112(18.7)	318(53.2)	152(30.6)	582(97.3)

* Administrated with 3ml/day of egg yolk antibodies by oral for 3day

제 4 절 결과요약

자돈의 주요 설사병 원인체인 병원성대장균증, 장독혈증 및 로타바이러스에 대한 효과적인 치료 및 예방을 위한 난황항체개발 시험에서 다양한

종류의 adjuvants에 대한 난황항체 형성능 비교시험결과 FCA에 의한 기초 면역 후 ISA70을 사용한 닭에서 빠른 항체가 상승과 고역가의 항체를 장기간 유지하는 데 효과적인 것으로 나타내었으며, 난황중 항체가는 닭 혈중에 비해 항원종류에 따라 1~4주 늦게 나타내는 것으로 나타내었다. 난황중 항체가 수준은 대장균 항원의 경우 주이상 유지하였고 장독혈중균 특소이드는 수준은 주이상 유지하였으며, 로타바이러스의 경우 8이상의 비교적 높은 수준을 7주이상 유지하였다.

실험동물에 대한 난황항체의 질병 예방 및 치료 효과시험에서 fimbriae type K88 및 K99 균주의 복강에 의한 공격접종 24시간후 난황항체 투여결과 무투약 대조군의 마우스는 24시간이내 100% 폐사하였으나 난황항체투여군은 대장균 K88에 대하여 85.0%, 대장균 k99 대해서는 95.0%의 높은 방어효과를 나타내었다. 난황항체의 마우스에 대한 *Cl. perfringens type C* 특신의 중화효과시험에서 닭 혈중항체역가는 3,200에서 320까지 100% 마우스 생존율을 나타내었으며, 난황항체는 농도 100mg~50mg/ml의 경우 100%의 마우스생존율을 확인할 수 있었다.

목적동물에서의 난황항체의 질병방제효과시험에서 3일간 난황항체를 투여한 시험군에서는 임상증상이 관찰되지 않은 반면, 대조군에서는 계속적으로 설사발생, 식욕부진 및 쇠약 등 임상증상이 관찰되어 난황항체의 치료효과를 확인할 수 있었으며, 평균중체량의 경우 난황항체 투여군인 그룹 A 및 그룹 B에서 대조군인 그룹 C 및 그룹 D에 비해 각각 1.0~2.0Kg, 0.4~0.9Kg의 높은 증체효과를 나타내었다. 난황항체의 투여경로에 따른 효과시험에서는 경구투여가 근육 및 복강투여시 보다 효율적인 것으로 나타내었다. 또한 임상증상이 계속적으로 발현된 대조군의 2두에 대하여 난황항체를 3일간 경구투여시 정상상태로의 회복되는 치료효과를 확인할 수 있었다. 야외 자돈에 대한 질병 치료효과시험에서는 8개 양돈장의 대장균증등에 의한 설사발생 자돈 598두를 대상으로한 대장균 및 로타바이러스 난황항체 투여시험에서 582두에서 회복되어 97.3%의 높은 치료효율을 나타내

었다. 이상의 시험결과에서 개발된 난황면역제는 소화기 질병의 대부분을 이루고 있는 대장균, 클로스트리디움 및 로타바이러스 등에 의한 단독 및 복합감염에 대하여 난황면역제의 단독 또는 적절한 혼합 및 선택적인 사용으로 설사발생 등 자돈 소화기질병에 의한 피해를 감소시키는 데 크게 기여할 것으로 판단되었다.

제 4 장 개 주요 소화기, 호흡기 질병 난황면역제 개발

제 1 절 서 설

우리나라의 개사육두수는 애완건을 중심으로 꾸준히 증가되고 있으며 이들에 대한 사육환경이나 질병에 대한 예방관리가 소홀하여 소화기 및 호흡기전염병에 의한 집단 폐사발생으로인하여 개 사육농가에 큰 피해를 주고 있다.

개에서 tracheobronchitis와 kennel cough를 유발하는 *Bordetella bronchiseptica*는 대부분의 포유동물에서 상부호흡기 질병을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 구토와 혈액성 설사 및 급사를 주증으로 높은 폐사율로 큰 피해를 주고 있는 파보바이러스감염증과 기침, 콧물 및 폐염 등의 호흡기증상과 구토 및 설사 등의 위장증상, 화농성 피부염 및 마비 등 신경증상이 단독 또는 복합적으로 나타나 개디스템퍼는 개 사육농가에 가장 큰 피해를 주고 있으나 아직까지 효과적인 치료제가 없는 실정이다.

최근 난황항체를 이용하여 질병의 치료나 예방목적으로 백신이나 항균 물질 대용하려는 연구들이 사람이나 동물 등을 대상으로 국내·외에서 활발이 이루어지고 있다. 난황항체는 백신접종에 의한 부작용이나 항생제 투약에 의한 내성균 출현 등과 같은 여러가지 문제점에 대하여 상대적으로 안전한 것으로 인식되고 있다.

따라서 본 연구에서는 개의 주요 질병중 그 피해가 큰 것으로 알려진 세균성 호흡기 질병인 개기관지 폐염과 바이러스성 장염을 주증으로 하는 개 파보바이러스 감염증 및 개 디스템퍼 바이러스 항원을 이용하여 시험백신을 제조하고 산란계에 면역접종시킨 후 닭 혈중 및 난황중의 항체가를 조사하였으며, 난황항체를 대량생산하여 실험동물에서의 방어능과 목적동

물에 대한 질병 치료 효과를 조사하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 균/독 주

본 연구를 위해 사용된 균독주로서 개 기관지 폐염의 원인균인 *Bordetella bronchiseptica*은 검역원 세균과에서 보관중인 분리균주를, 개 파보바이러스는 참여기업인 주) 녹십자수의약품에서 보유하고 있는 KCPVC 주를, *Distempervirus*는 시판되고 있는 백신주(Durammune DH2P+PV)를 종독으로하여 사용하였다.

2. 항원의 정제 및 조제

가. 보데텔라균

균체항원제조를 위하여 기관지폐염 증상이 있는 개 가검물로부터 분리된 *Bordetella bronchiseptica* 분리균을 사용하였으며, 냉동보관중인 분리균을 Bood agar에 1차 배양하고 다시 BHI broth에서 37°C, 18시간 배양한 후에 8,000rpm, 30분간 원심분리하여 균을 집균하고 PBS(pH 7.2)로 2회 세척하여 적당량의 PBS에 부유시켜 2% formalin을 첨가하여 37°C에서 2일간 불활화시킨다. 8,000rpm, 30분간 원심분리하여 PBS(pH 7.2)로 1회 세척하고 O.D를 측정하여 균 농도를 조절하였다.

DNT toxoid는 균을 BHI broth에서 37°C, 18시간 배양한 후에 8,000rpm, 30분간 원심분리하여 균을 집균하고 PBS(pH 7.2)로 2회 세척하여 적당량의 PBS에 부유시켜 sonication으로 균을 파괴하였다. 이것을 8,000rpm, 30분간 원심분리하여 상층액을 수집하고 BCA kit를 이용하여 단백질농도를 측정한 후에 crude DNT로 하고 이것을 formalin으로 불활화하여 toxoid로 사용하였다.

나. 개 파보바이러스

Seed virus는 KCPVC(녹십자수의약품보유)를 사용하였으며 세포단층이 80% 형성된 CRFK(Crandell feline kidney) cell에 접종하고 4일간 배양한 후 80% CPE가 보일 때 채득하는 방법으로 배양하였다. 이것을 2회 동결 용해를 반복한 후 동결시켜 놓고 항원으로 사용하였다.

다. 디스토펜바이러스

개 디스토펜과 백신주를 종독으로 하여 7일령 SPF란의 장노막에 계란 1개당 0.2ml씩 접종하여 37°C에서 7일간 배양한 후 장노막만을 분리, 수집하여 homogenizer로 유제를 한다. 유제후 원심분리하여 상층액중의 바이러스를 SPF란을 이용하여 작성한 chicken embryofibroblast(CEF)에 접종하고 6일간 37°C에서 배양하고 세포변성이 80-90% 나타났을 때 채득한다. 바이러스를 다시 단층이 형성된 MDCK cell에 접종하고 37°C에서 6일간 배양하면서 세포변성이 100% 나타났을 때 채득하고 MDCK cell에서 2회 계대한 다음 항원으로 사용하였다.

3. 시험백신 제조 및 닭에서의 면역원성 조사

3가지 항원 즉 보데텔라균, 파보바이러스 및 디스토펜바이러스의 단독 및 혼합 시험백신을 표에서와 같이 제조하여 각 그룹별 5수의 닭에 먹여시킨 후 난황중의 항체를 비교조사하였다. 즉, 1차접종은 각각의 항원과 보좌제로 ISA25를 사용하여 접종하였으며, 2 및 3차 접종은 Freund's adjuvant를 보좌제로 사용하여 1차접종 후 2주 및 6주에 각각 접종을 실시하였다. 시험에 사용한 바이러스의 항원은 파보바이러스의 경우 HA역가가 1:1,024인 벌크를 사용하였으며, 디스토펜바이러스는 $10^{7.1}$ TCID₅₀/0.1ml인 벌크를 200배 농축하여 사용하였다.

Table 1. Experimental groups of alone and combined vaccination

Groups	Antigens *	Concentration of antigens inoculated **		
		1st	2nd	3rd
B. bronchiseptica(Bb)	Whole cell(Wc)	10 ⁸ cfu/ml	10 ⁸ cfu/ml	10 ⁸ cfu/ml
	DNT	6.75mg	4.5mg	4.5mg
Parvo virus(Pv)	Whole cell(Wc)	4.5ml	3ml	3ml
Distempervirus(Dv)	Whole cell(Wc)	2.25ml	1.5ml	1.5ml
Bb+ Pv+ Dv	Bb(Wc)+DNT	10 ⁸ cfu/ml +2.7mg	10 ⁸ cfu/ml +1.8mg	10 ⁸ cfu/ml +1.8mg
	Parvo(Wc)	0.9ml	0.6ml	0.6ml
	Distemper(Wc)	0.9ml	0.6ml	0.6ml
Control	-	-	-	-

* Antigens inoculated with concentration of 1,024 HA titers in Parvo virus and 200x 10^{7.1} TCID₅₀/0.1ml of distemper virus.

** The first vaccine used ISA 25 as adjuvant, 2nd and 3rd vaccine inoculated antigens with Freund's adjuvant as adjuvants, 2 weeks and 4 weeks after 1st vaccination, respectively.

4. 복합난황항체 대량생산

기관지폐염균과 파보바이러스(2종) 또는 디스토포바이러스가 혼합된 3종 복합난황항체를 대량생산하기 위한 시험백신의 항원은 개 기관지폐염균의 경우 균체항원은 410nm 파장에서 흡광도 1.3의 농도로 조절하여 사용하였으며, crudeDNT항원은 500 μ g/ml의 농도를, 파보바이러스는 hemagglutination inhibition(HI) test 역가 2¹⁰의 농도를, 디스토포바이러스 MDCK cell에서의 바이러스역가 10^{8.1}TCID₅₀/ml 농도의 항원을 면역보좌제로서 Gel, ISA25 및 면역증강제와 Freund's complete adjuvant 및 ISA70 등을 다양하게 사용하여 시험백신을 제조하였으며, 보좌제와 혼합된 시험백신의 경우는 근육접종을, 정맥주사시에는 항원만을 주사하였다. 1차 시험의 경우는 개 기관지폐염과 파보바이러스 항원에 대한 항체 형성능을, 2차 시험의 경우는 개 디스토포 바이러스를 추가한 시험백신에 대한 항체

생성 양상을 조사하였다.

Table 2. Vaccination Schedule(test 1) of Chickens for mass production of egg yolk antibodies

Groups	Vaccines (Antigens)	No. of chickens	Inoculation schedule(on weeks after 1st)									
			1st	2nd(1)	3rd(4)	4th(5)	5th(6)	6th(7)	7th(9)	8th(22)	9th(24)	10th(29)
A	Gel (Bb+BbcDNT+Pv)	4	IM		IV (Antigens)		IM		IV (Antigens)		IM (ISA70)	
B	ISA25 (Bb+BbcDNT+Pv)	4										
C	Immunomodulators (Bb+BbcDNT+Pv)	4										

Table 3. Vaccination Schedule(test 2) of Chickens for mass production of egg yolk antibodies

Groups	Vaccines (Antigens)	No. of chickens	Inoculation schedule(on weeks after 1st)						
			1st	2nd(1)	3rd(2)	4th(4)	5th(17)	6th(19)	7th(24)
D	Gel+ISA 25 (Bb+BbcDNT+Pv+Dv)	4	IM			IV (Antigens)		IM (ISA70)	
E	ISA25 (Bb+BbcDNT+Pv+Dv)	4							
F	Antigens (Bb+BbcDNT+Pv+Dv)	5							IV

5. 닭 혈중 및 난황중의 항체가 조사

가. 개 기관지폐렴균

Microplate agglutination test에 의해 항체역가를 측정하였으며,

응집용 항원은 *B. bronchiseptica* 균을 BHI broth에 30°C, 18~24시간 배양한 뒤 PBS로 2회 세척하고(6,000rpm 30분) spectrophotometer로 410nm에 OD 0.5정도의 탁도가 되도록 조정된 뒤 formalin을 0.2% 첨가하여 냉장보관하며서 사용하였으며, 응집항체역가의 검사는 96 well micriplate를 이용하여 PBS(pH7.2)로 혈청의 경우 10배부터, 난황의 경우 2배부터 단계적으로 희석한 후 동량의 항원(50 μ l/well)을 가하여 2-3분간 Shaking한 후 37°C에서 overnight 반응시킨 후 응집역가를 측정하였다.

나. 파보바이러스

Hemagglutination inhibition(HI) test에 의해 각각 혈중 및 난황중의 항체역가를 측정하였으며 닭 혈청의 경우 56°C에서 30분간 비동화시킨 후 kaoline 처리한 혈청을 5배부터, 난황의 경우 2배부터 단계별로 희석하였으며, 시험에 이용된 혈구는 pig erythrocyte를 0.7%농도로 희석하여 사용하였으며, HI 시험에 이용한 바이러스 항원은 8 HA units/50 μ l로 조정하여 사용하였다.

다. 디스토포바이러스

디스토포바이러스에 대한 항체역가는 바이러스 중화시험법으로 측정하였다. 즉, 디스토포바이러스를 α -MEM배지로 200TCID₅₀/0.05ml이 되도록 희석하고, 닭 혈청 또는 난황액을 동일한 배지를 이용하여 96공 플레이트에 단계별로 희석한 다음 희석된 디스토포바이러스를 동량 넣고 37°C에서 1시간 감작시켰다. 1시간 반응후 트립신으로 소화시켜 부유시킨 vero 세포를 첨가하여 37°C에서 7일간 관찰한 다음 바이러스 증식이 억제되는 최대 혈청희석배수를 중화항체역가로 나타내었다.

6. 마우스를 이용한 개 기관지폐염 난황항체 효능조사

가. 질병예방효과 시험

난황항체를 단계별로 희석하여 응집역가 1:2,560에서 1:320이되게 한 후 근육 또는 경구 등 다양한 경로를 통하여 마리당 0.2ml씩 접종하였으며 항체접종 후 6시간이 경과된 후 개 기관지폐염균을 10LD₅₀농도인 $1 \times 10^9/0.2\text{ml}$ 를 복강내로 공격접종하여 난황항체역가 및 투여경로에 따른 방어여부를 5일간 관찰하였다.

나. 질병치료효과 시험

상기의 질병예방효과 시험과 동일한 방법으로 $1 \times 10^9\text{cfu/ml}$ 농도의 기관지폐염균 0.2ml를 복강으로 공격접종한 후 6, 18 및 24간 경과후 질병예방효과가 충분히 인정되는 응집역가(1,280~2,560)의 난황항체를 0.2ml씩 1일 2회 경구, 복강 및 근육 투여한 후 투여경로에 따른 치료효과를 5일간 조사하였다.

7. 목적동물에 대한 방제효과

난황으로부터 추출한 개기관지폐염 및 파보바이러스 혼합 난황항체 건조분말을 증류수에 녹일 경우 실험동물에 대한 질병치료 및 예방을 항체역가를 감안하여 기관지폐염의 경우 응집역가 1:1,000이상 및 개 파보바이러스는 HI역가 1:200이상이 되게한 후 각 동물병원에 사용설명서 및 시험성적서 양식을 제공하여 시험의뢰하거나 질병발생농가를 직접방문하여 적용 시험하였다. 즉 기관지폐염의 경우 큰 개는 두당 3~4ml를, 애완용 개는 2~3ml를 1일 2회 3일간 경구 등 투여경로에 따른 효과를 비교하였으며, 개 파보바이러스 및 디스토포바이러스의 경우는 기관지폐염에서의 사용법에 준하여 경구투여를 원칙으로 하고 구토 등으로 경구투여가 곤란한 경우는 근육 및 피하로 주사하고 치료여부를 관찰하였다.

8. 난황항체분말의 목적동물에 대한 안전성시험

목적동물인 개에 대한 안전성시험을 위하여 동결건조 분말 1g을 증류수

10ml에 녹인후 권장 투여량 및 투여기간의 2배인 6~8ml를, 1일 2회, 6~7일간 접종경로인 경구, 근육 및 피하로 각각 3두씩 접종한 후 난황항체 투여에 대한 열, 부종, 쇼크, 구토 등의 임상증상으로 부작용의 유무를 관찰하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 개 주요질병 원인균에 대한 단일 및 복합 난황항체 생성능 비교

보데텔라균, 파보바이러스 및 디스토포바이러스 항원의 단독 및 혼합 시험백신을 제조하여 1차접종은 각각의 항원과 보좌제로 ISA25를, 2 및 3차 접종은 Freund's adjuvant를 보좌제로 사용하여 닭에 면역시킨 후 난황 중의 항체를 비교조사한 결과 *B. bronchiseptica* DNT 항원에 대한 ELISA 역가는 단독 및 혼합접종군간의 차이가 없이 높게 나타내었으며, 반면 *Parvo virus* 및 *Distemper virus*의 경우는 단독 접종군에서 혼합접종군에 비해 유의성 있는 차이로 높은 항체가 변화를 나타내었다(Fig 1~3). 이와 같은 결과는 항원의 투여농도에 따른 차이에서 나타나는 결과로 추정되며 혼합투여시 고려되어야할 사항으로 판단되었다.

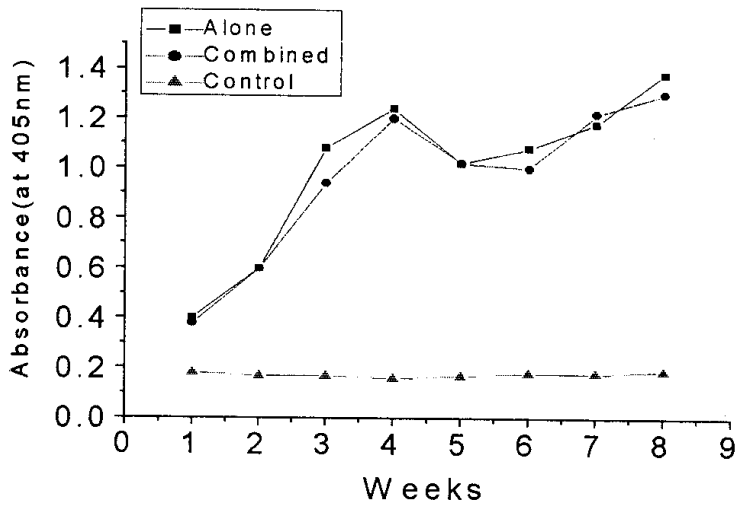


Fig 1. Immune response against *B. bronchiseptica* DNT antigen in egg yolk antibodies of hens immunized with vaccine of *B. bronchiseptica* (B.B) alone and combined vaccine (B.b+*Parvo virus*+*Distemper virus* antigens)

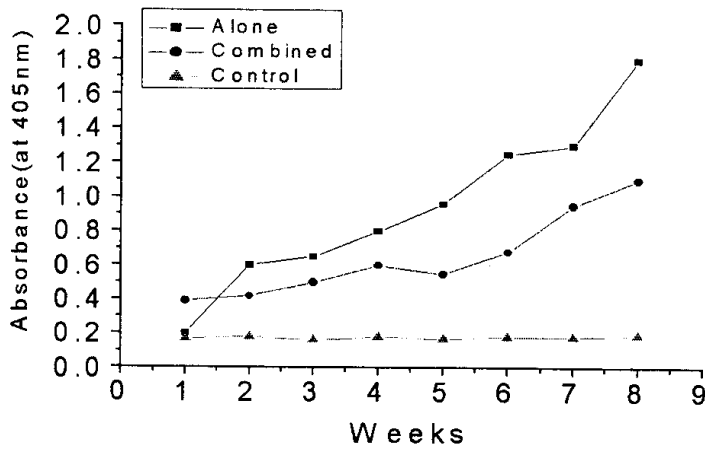


Fig 2. Immune response against *Parvo virus* antigen in egg yolk antibodies of hens immunized with vaccine of *Parvo virus* alone and combined vaccine (B.b+*Parvo virus*+*Distemper virus* antigens)

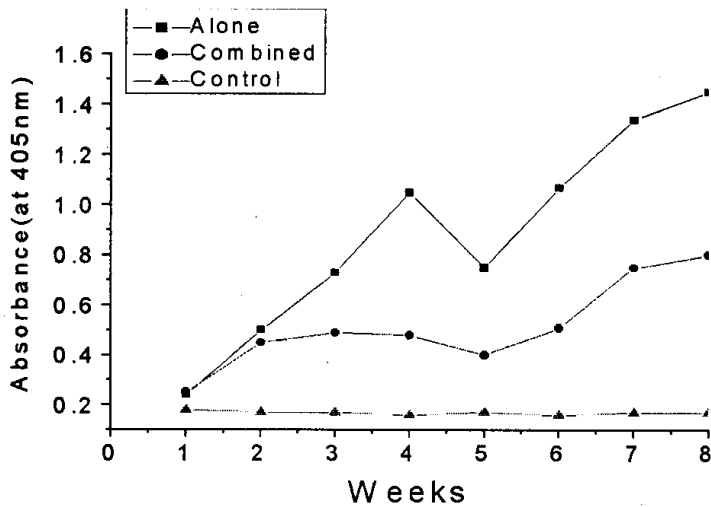


Fig 3. Immune response against *Distemper virus* antigen in egg yolk antibodies of hens immunized with vaccine of *Parvo virus* alone and combined vaccine(B.b+*Parvo virus*+*Distemper virus* antigens)

2. 개 주요 호흡기 및 소화기질병 원인균에 대한 복합난황항체 대량생산

가. 기관지폐염균에 대한 항체형성능

1) 산란계 혈중 항체가

개 기관지폐염균 항원을 파보 등 타 항원과 혼합한 후 여러가지 adjuvant를 이용하여 닭에 면역접종하여 나타나는 닭 혈중의 항체를 마이크로플레이트 응집역가로 조사하였다(Fig 4). 시험1에서 백신접종 후 5주까지는 adjuvant로서 gel 및 ISA25사용한 경우보다 면역증강제를 사용한 그룹에서 다소 높게 나타났으나 그 이후 25주까지 Gel 백신접종그룹에서 높은 혈중 항체를 나타내었다. 다량의 높은 난황항체를 얻기 위하여 모든 그룹에 ISA70를 사용한 결과(시험1 24주, 시험2 19주) 사용전의 수준인 4.0~8.0($1/10 \times \log_2$ base) 혈중항체가 사용 후 크게 상승하여 모든 그룹에서 9~10 수준의 높은 항체가 나타내었다. 이와 같은 결과는 개디스

템퍼 항원을 첨가하여 백신접종한 시험2에서도 같은 양상으로 나타내었으며, 또한 이는 신 등(2000)이 보고한 돼지 호흡기질병 원인균 항원에 대한 난항항체 생성시험에서 gel사용 그룹보다 ISA70를 사용한 그룹에서 높은 ELISA 항체가가 장기간 유지한 시험성과 일치하는 결과이다.

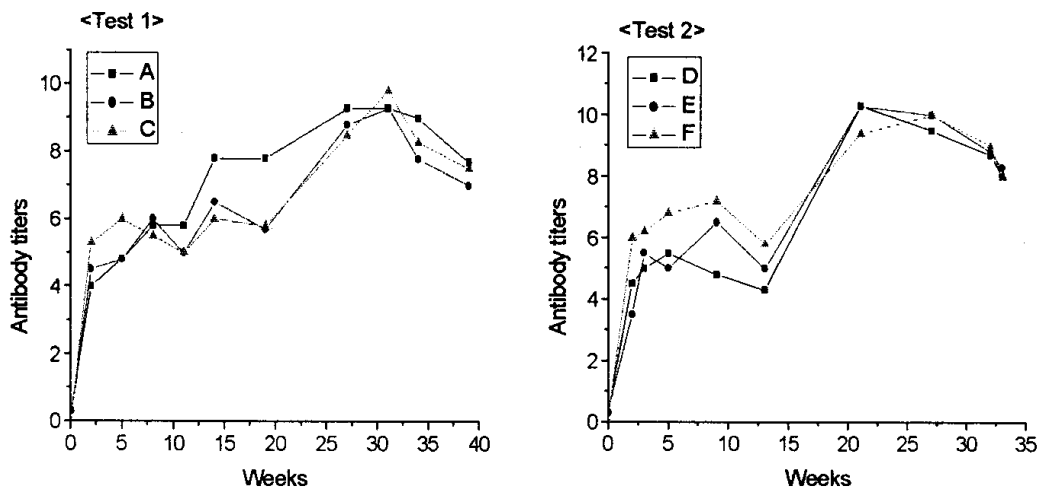


Fig 4. Immune response against *B. bronchiseptica* antigens in sera of chicken immunized vaccines of various types
Antibody titers are means based on data transformed to $1/10 \log_2$ base values by microplate agglutination test(n=3~4).

2) 난황중 항체가

닭 혈중 항체가 측정과 같은 방법으로 시험한 결과 난황중의 항체는 모든 그룹에서 4.0~7.0($1/10 \log_2$ base)의 수준으로 닭 혈중 항체가 4.0~10.0보다는 다소 낮은 경향이었으며, ISA25 및 gel사용한 그룹보다는 면역증강제를 사용한 그룹에서 높게 나타낸 것이나, 모든 그룹에 ISA70를 사용한 이후의 난황중 항체가의 상승은 닭 혈중항체가의 향상과 유사한 결과로 나타내었으나 전반적으로 닭 혈중에서와 같이 8이상의 높은 항체가를

나타내지는 못하였다(Fig 5). 이와 같은 결과는 신 등(2000)의 난황에서 닭 혈중보다 낮은 ELISA항체가를 보인 성적과 유사한 결과이며, ISA70 사용이후 전그룹에서 난황중 항체가가 높게 상승하여 나타낸 것은 adjuvant의 선택이 면역반응에서 중요하게 작용함을 알 수 있었다.

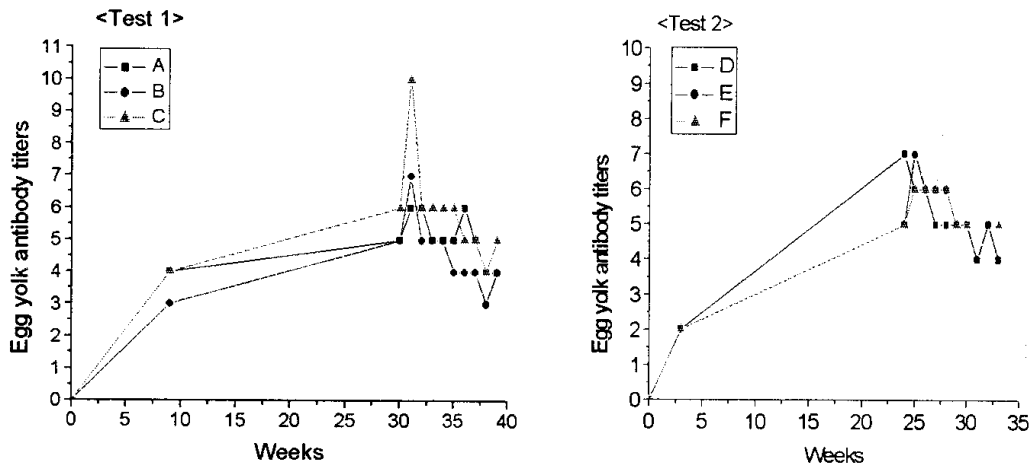


Fig 5. Immune response against *B. bronchiseptica* antigens in egg yolk antibodies of hens immunized with vaccines of various types.

Antibody titers are means based on data transformed to $1/10 \log_2$ base values by microplate agglutination test(n=15~20).

나. 파보 바이러스에 대한 항체형성능

1) 산란계 혈중 항체가

개 파보바이러스 백신접종 후 닭 혈중 항체가를 HI역가로 조사하였다. 1차시험에서 1차 및 2차 접종후 나타나는 각 adjuvant별 항체가는 ISA25(B)가 가장 높게 나타내었으며, 이후 2차례의 혈관내 항원 접종 및 3차례에 걸친 각 백신의 근육접종결과 계속적으로 혈중항체가는 상승하였고 그 이후 백신을 중단한 22주까지의 항체가 변화에서도 그룹 B에서 가장 완만한 하향곡선을 나타내어 파보

바이러스항원에 대한 닭 혈중항체는 ISA25가 Gel이나 면역증강제보다 면역형성 및 항체가 유지에 우수하게 나타났다(Fig 6).

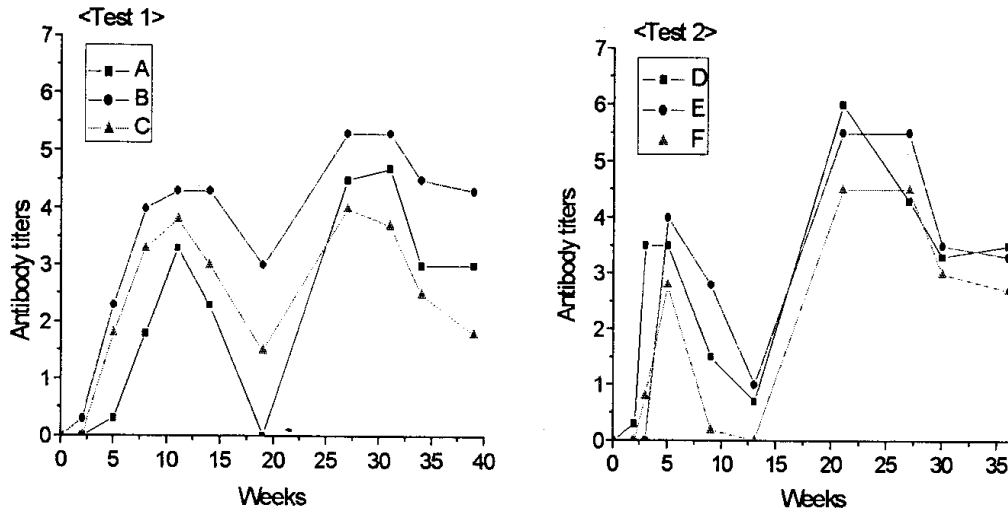


Fig 6. Immune response against canine *Parvovirus* antigens in sera of chicken immunized with vaccines of various types.

Antibody titers are means based on data transformed to $1/10 \log_2$ base values by hemagglutination inhibition test(n=3~4).

이와 같은 결과는 전반적으로 시험2에서도 같은 양상이었으나, 그룹D의 Gel과 ISA25를 혼합하여 사용한 경우에서 ISA25 단독(E) 및 항원만 접종시보다 빠른 항체형성능을 나타내었으며, 특히 그룹 E에서 5주이후에 나타나는 최고 항체가와 항체소실이 가장 완만하게 이루어지는 것으로 나타내었다. 그 이후 모든 시험그룹에 ISA70을 사용한 결과 기관지 폐염균과 같은 양상으로 급속하게 항체는 상승하여 평균적으로 장기간 높은 수준의 항체를 유지하는 것으로 나타내었다.

2) 난황중 항체가

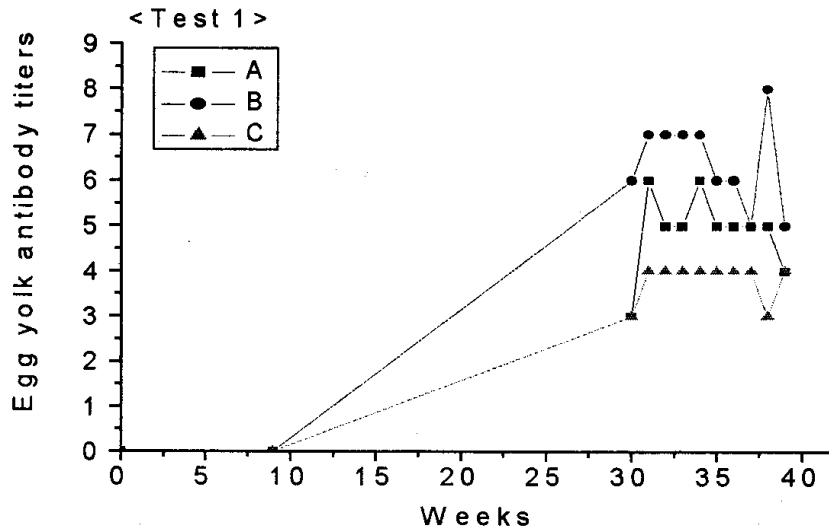


Fig 7. Immune response against canine parvovirus antigens in egg yolk antibodies of hens immunized with vaccines of various types

Antibody titers are means based on data transformed to \log_2 base values by hemagglutination inhibition test (n=15~20).

난황 중 개파보바이러스에 대한 항체역가는 백신접종후 9주째 측정된 결과 음성으로 나타났으며 그 이후 adjuvant로써 ISA70를 사용하여 닭 혈중항체가가의 상승을 확인한 후 난황 중 항체를 측정한 결과 닭 혈중 항체가와 같이 adjuvant를 ISA25를 사용한 그룹B에서 평균항체가 6~7(이하 \log_2 base values)로서 가장 높게 나타내었으며, 그 다음으로 Gel이 5~6) 및 면역증강제 3~4의 순이었다. 이들 항체가는 마지막접종 후 약 10주까지 계속적으로 유지하였다.

다. 디스토프 바이러스에 대한 항체형성능

개 디스토프항원에 의해 면역된 닭의 혈중 및 난황에 대한 항체역가

를 바이러스증화시험에 의해 측정하였다. 이 시험 결과는 2차시험에서의 타 항원과의 혼합에 의한 닭에 대한 백신접종시 adjuvant 종류 및 접종횟수에 관계없이 증화시험에 의한 항체형성이 확인되지 않았으며, 그 이후 디스토펜퍼 단일항원에 대하여 adjuvant로서 ISA70을 사용하여 2주가격으로 3회에 걸쳐 추가접종한 후 항체형성을 Fig 8에서와 같이 확인할 수 있었다. 즉, 디스토펜퍼 항원량의 증가와 계속적인 ISA70의 사용으로 닭 혈중 평균항체 및 난황항체는 각각 3.0에서 6.0(이상 \log_2 base)으로서, 디스토펜퍼 항원에 대한 닭에서의 항체형성능은 전술한 개 기관지폐염균이나 파보 바이러스에 비해 매우 낮게 나타내었다.

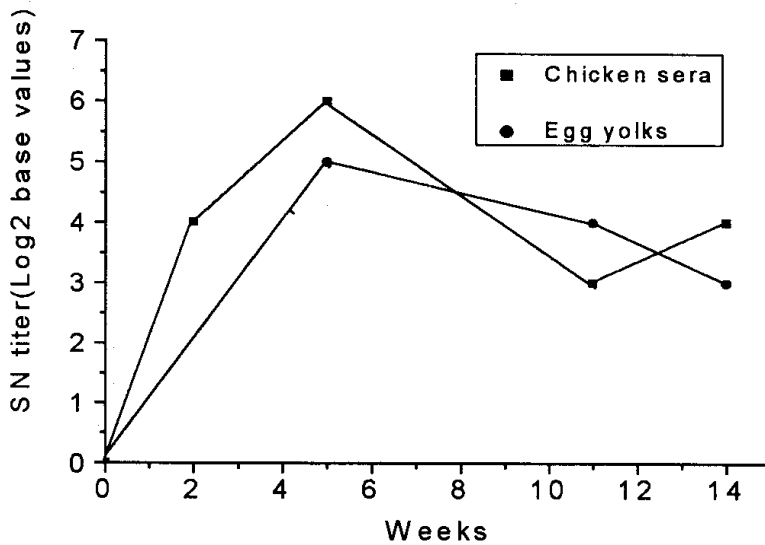


Fig 8. Immune response in sera and egg yolk antibodies of hens immunized with antigens canine *Distemper virus* with ISA70 as adjuvant.

3. 실험동물에 대한 예방, 치료효과

가. 난황항체 역가 및 투여경로별 질병예방효과

마우스를 이용하여 난황항체 역가에 따른 개 기관지 폐염균에 대한

질병예방효과시험에서 응집역가 320~2,560의 난황항체 0.2ml를 근육 또는 경구접종 6시간 후 기관지 폐염균(1×10^9 cfu/ml) 0.2ml을 공격접종한 결과 근육접종시 항체역가 1:640, 1,280 및 2,560의 경우 모두 100%의 생존율을 나타내어 같은 항체역가의 경구접종에서의 50%, 40% 및 50%보다 높은 질병 예방효과를 나타내었다. 반면 항체역가 1:320의 경우는 근육접종의 경우 40%, 경구 20%의 생존율을 보였으며, 항체 무투여 대조군에서는 100%의 폐사율을 나타내었다(Table 3).

Table 3. Protective effects of egg yolk antibodies against *B. bronchiseptica* in mice

Antibody titers*	Routes	No. of mouse	No. of mouse died at day **					Survival rate (%)
			1	2	3	4	Total	
1 : 320	Oral	5	3	1	-	-	4	20
	I.M	5	1	2	-	-	3	40
1 : 640	Oral	6	-	3	-	-	5	50
	I.M	5	-	-	-	-	0	100
1 : 1,280	Oral	5	-	2	1	-	3	40
	I.M	5	-	-	-	-	0	100
1 : 2,560	Oral	6	-	2	1	-	3	50
	IM	6	-	-	-	-	0	100
Control		5	4	6	-	-	10	0

* Antibody titer by microagglutination test

** Intraperitoneally challenged with 0.2ml of 1×10^9 cfu/ml of *B. bronchiseptica* on 6 hours after inoculation with 0.2ml of egg yolk antibody solution per animal.

난황항체의 투여경로에 따른 질병예방 효과를 알아보기 위하여 응집역가 1,280의 난황용액을 마우스 마리당 0.2ml를 근육, 복강 및 경구로 각각 접종한 후 복강내로 균 공격접종한 결과 난황항체를 근육 또는 복강내로 접종한 경우 100%의 마우스 생존율을 나타내었으며, 반면 경구접종한 경우는 40%의 생존율을 나타내어 투여경로에 따른 큰차이를 보였다. 반면 무투여 대조군에서는 100%의 폐사율을 나타내었다(Table 4). 한편으로 기관지 폐염균의 감염경로인 비강을 통한 항체투여 및 비강공격접종 시험에서는 모든 시험군에서 폐사가 발생되지 않아 난황항체에 대한 예방효과를 확인할 수 없었다.

Table 4. Protective effect of egg yolk antibody against *B. bronchiseptica* in mice

Routes*	No. of mouse	No. of mouse died on day after ** challenge					Survival rates (%)
		1	2	3	4	Total	
Intramuscular	5	-	-	-	-	0	100
Intraperitoneal	5	-	-	-	-	0	100
Oral	5	-	2	1	-	3	40
Control	5	2	3	-	-	5	0

* Inoculated with 0.2ml of egg yolk antibody titers of 1: 1,280 per animal.

** Intraperitoneally challenged with 0.2ml of 1×10^9 cfu/ml of *B. bronchiseptica* on 6 hours after inoculation with 0.2ml of egg yolk antibody solution per animal

나. 질병치료효과

마우스에 대한 난황항체의 질병치료효과를 알아보기 위하여 기관지 폐염균 공격접종 6시간 후 난황항체(응집역가 1: 1,280)를 0.2ml를 투여한 후 5일동안 생존여부를 관찰한 결과 근육 및 복강투여의 경우 83.3%의 생존율을 나타내어 경구투여에 의한 66.7%보다 높은 방어효과를 나타내었다. 반면 무투여 대조군에서는 28.6%의 생존율을 나타내어 전술한 난황항체의 질병예방효과의 시험성적 100%의 생존율보다 상대적으로 낮게 나타내었다 (Table 5).

Table 5. Therapeutic effects of egg yolk antibody against *B. bronchiseptica* in mice

Routes*	No. of mouse	No. of mouse died on day after **					Survival rates (%)
		1	2	3	4	Total	
Oral	6	1	1	-	-	2	66.7
Intraperitoneal	6	-	1	-	-	1	83.3
Intramuscular	6	-	-	1	-	1	83.3
Control	14	10	12	-	-	10	28.6

* Egg yolk antibodies were injected with 0.2ml of titers of 1:1,280 at 6 hours after challenge

** Intraperitoneally challenged with 0.2ml of 1×10^9 cfu/ml of *B. bronchiseptica* per animal

4. 목적동물에서의 질병치료효과

가. 개 파보바이러스 설사병

시험용 난황면역제인 개 기관지폐염균 및 파보바이러스 혼합 난황항체분말을 제조하여 목적 동물인 개에 대한 임상시험을 위하여 2001. 7월부

터 10월까지 서울시 충무로, 경기도 안양시, 경북 안동시 및 영천시 등의 동물병원에 시험의뢰한 임상성적과 임상 case가 있는 경우 연구자들이 직접 적용하여 얻은 임상성적을 Table 6,7에 나타내었다. 혈변성 설사등 임상증상으로 파보바이러스감염이 의심되는 환축에 난황면역제를 투여한 결과 근육투여의 경우 22두 중 18두가 회복되어 81.6%의 치료율을, 피하투여 시 15두중 13두가 회복되어 86.7%의 높은 치료율을 나타내었으며, 회복기간은 근육이 2~4일로 피하접종의 3~5일보다 다소 빠른 것으로 나타내었다. 반면, 경구투여는 24두 중 5두(20.8%)가 회복되고 25두(79.2%)가 폐사되어 상대적으로 낮은 치료율을 나타내었다(Table 6). 이와같은 결과는 오등(1996)의 초유결핍 신생자견에 난황항체의 경구투여후 바이러스접종에 대한 질병예방효과시험에서 무투여 대조군의 7두중 6두폐사에 비해 난황항체투여군은 폐사발생 없이 소수에서의 임상증상만을 나타낸 성적과 다른 양상으로서 본실험에 적용한 환경의 경우 이미 병이 진행된 상태로서 구토 및 손상된 장상피 등으로 인하여 경구투여에 의한 치료효과가 낮게 나타낸 것으로 판단되었다. 그러나 본 연구에서의 난황항체를 근육 및 피하접종에 의한 결과가 기대이상으로 치료효과를 나타내어 앞으로 높은 폐사율로 개 사육농가에 막대한 손실을 주고 있는 개 파보바이러스감염증에 별다른 치료약제가 없는 현실에서 본 질병에 의한 피해를 줄이는 데 크게 기여할 것으로 기대된다.

Table 6. Therapeutic effects of egg yolk antibodies on hemorrhagic diarrheal dogs.

Administration routes	Test of Parvovirus	No. of dogs treated	Results						
			No. of dogs recovered on day after treatment					No. of dead dogs	
			Total(%)	2	3	4	5		6
Intarmuscular	Positive	14	12(85.7)	2	2	6	1	1	2
	NT	8	6(75.0)	5	1	-	-	-	2
	Subtotal	22	18(81.8)	7	3	6	1	1	4(18.2)
Subcutaneous	NT	15	13(86.7)	-	2	4	7	-	2(13.3)
Oral	Positive	5	0	-	-	-	-	-	5
	NT	19	5(26.3)	-	-	-	5	-	14
	Subtotal	24	5(20.8)						19(79.2)
Total(%)		61	36(59.0)						25(41.0)

나. 개 기관지 폐염

난황항체의 개 기관지폐염에 대한 임상시험결과에서도 파보바이러스감염증에서와 같이 경구투여보다는 근육투여에서 치료효율이 높게 나타났으며, 특히 원인균이 분리되어 기관지폐염으로 진단된 경우에는 100%의 치료효율을 나타내었다. 반면, 단지 본병으로 의심되는 경우에는 치료효율이 50%으로서 낮게 나타났는데, 이는 개 호흡기질병의 경우 원인체가 다양하고 특히, 화농성 피부염이나 신경증상을 동반하는 개 디스토프 바이러스 감염증이 의심되는 사례에서 치료효율이 낮게 나타내었다(Table 7).

Table 7. Therapeutic effects of egg yolk antibodies on dogs with respiratory disease complex.

Administration routes	Test of bacteria	No. of dogs treated	Results				
			No. of dogs recovered on day after treatment				No. of* dead dogs
			Total(%)	2	3	7	
Intarmuscular	Positive	5	5(100)	-	5	-	0
	NT	11	3(27.3)	2	-	1	8(72.7)
	Subtotal	16	8(50.0)				8(50.0)
Oral	NT	4	0	-	-	-	4(100)
Total(%)		20	8(40.0)				12(60.0)

* Most of dead dogs showed vomiting and purulent dermatitis

다. 개 디스토프와 감염증

디스토프 바이러스항원에 대한 닭에서의 항체형성은 다른 항원에 비해 매우 낮게 나타내었으며 고역가의 난황항체를 대량생산하는 데 다소의 어려움이 있었다. 특히 다른 항원과 혼합하여 백신접종시의 항체형성이 미약하였으며 디스토프와 바이러스 단일항원에 보좌제로서 ISA70을 사용한 경우 닭 혈중 및 난황중 바이러스 중화항체가 상승함을 확인할 수 있었다. 따라서 개 디스토프와 감염증에 대한 난황항체의 치료효과시험은 진행중에 있다.

5. 목적동물에 대한 안전성

목적동물인 개에 대한 안전성시험을 위하여 동결건조 분말을 증류수에 녹인후 권장 투여량의 2배의 량을 각 경로별로 3두씩 7일간 접종한 결과 접종후 2시간이내의 과민반응이나 구토, 부종 또는 열발생 등의 이상증상이 전혀 관찰되지 않아 난황항체분말의 개에 대한 안전성을 확인할 수 있

었다. 이와같은 결과는 질병의 예방목적으로 사용되는 대부분의 백신들이 피하 또는 근육접종시 발열이나 부종등 약간의 부작용의 발생이 일반적이고, 항균물질 등 치료약제 또한 약제내성유발이나 약제에 따라서는 과민반응등 이 알려지고 있어, 난황항체는 이들 백신이나 타 치료약제보다 적용에 있어서 안전할 것으로 사료되었다.

Table 8. Safety of egg yolk antibody powder against *B. bronchiseptica* and canine parvovirus in dogs

No. of dogs treated	Routes	Dosage	Results*			
			Fever	Edema	Shock	Vomiting
3	Oral	8ml	None	None	None	None
3	Subcutaneous	6ml	None	None	None	None
3	Intramuscular	6ml	None	None	None	None

* Observed and inoculated for 7days.

제 4 절 결과 요약

개 기관지 폐염균, 파보바이러스 및 개 디스토포바이러스 항원에 대한 닭에서의 면역반응 조사결과 adjuvant로 ISA70을 사용할 시 이들 항원에 대한 높은 항체가 상승을 유도할 수 있었으며, 기관지 폐염균의 경우 닭 혈중항체가가는 1,280~10,240를, 난황중항체가는 160~1,280의 수준으로 가장 높게 나타내었으며, 파보바이러스는 ISA25로 초기면역시킨 후 ISA70을 사용한 경우에서 항체형성 및 지속기간이 우수하게 나타내어 혈중항체가 80~320, 난황항체가는 64~256를 각각 나타내었다. 한편으로 개 디스토포의 경우는 닭에서의 항체형성능은 개 기관지폐염균이나 파보바이러스에 비해 상대적으로 낮게 나타내었으며, ISA70을 사용시 닭 혈중 평균항체

및 난황항체가 각각 8~64의 바이러스 중화역가를 나타내었다.

난황항체의 실험동물인 마우스에 대한 질병예방효과시험에서 항체역가 640~2,560를 근육접종시 100%의 생존율을 나타내어 경구접종의 40~50%보다 높은 질병예방효과를 나타내었다. 마우스에 대한 질병치료효과시험을 위하여 기관지 폐염균 공격접종 6시간 후 난황항체(응집역가 1,280)를 투여한 결과 근육 및 복강투여의 경우 83.3%의 생존율을 나타내어 경구투여에 의한 66.7%보다 높은 방어효과를 나타내었다.

시험용 난황면역제인 개 기관지폐염균 및 파보바이러스 혼합 난황항체분말을 제조하여 목적 동물인 개에 대한 임상시험에서 혈변성 설사등 임상증상으로 파보바이러스감염이 의심되는 환축에 난황면역제를 투여한 결과 근육 및 피하투여시 각각 81.6% 및 86.7%의 높은 치료율을 나타내었으며, 개 기관지폐염에 대한 임상시험에서도 경구보다는 근육투여에서 치료효율이 높게 나타났다.

난황면역항체 건조분말에 대한 목적동물인 개에 대한 안전성시험에서 권장 투여량의 2배의량을 7일간 접종한 결과 과민반응이나 구토, 부종 또는 열발생 등의 이상증상이 전혀 관찰되지 않았다.

제 5 장 참고문헌

제 1 절 돼지 복합호흡기질병 치료, 예방용 난황 면역제 개발

Akita EM and Nakai S. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *J. Food. Sci.*, 57(3) : 629-634, 1992.

Akita EM and Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J. Immunol. Methods*, 160 : 207-214, 1993.

Almeida CM, Kanashiro MM, Rangel FB, Mata MF, Kipnis TL and Silva WD. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. *Vet Rec*, 143(21) : 579-584, 1998.

Bhatia B, Mittal KR and Frey J. Factor involved in immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Vet. Microbiol.*, 29 : 147-158, 1991.

Bogaard AEJM, London N and Stobberingh EE. Antimicrobial resistance in pig fecal samples from the Netherlands(five abattoirs)and Sweden. *J. Antimicrob. Chemother.*, 45 : 663-671, 2000.

Bollen LS, Crowley A, Stodulski G, Hau J. Antibody production in

rabbits and chickens immunized with human IgG. *J. Immunol. Methods.*, 191 : 113-120, 1996.

Brown J, Resurreccion RS, Dickson TG and Horne A. The relationship of egg yolk and serum antibody I. Infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, 33 : 654-656, 1989.

Bunka S, Christensen C, Potter AA, Willson PJ and Gerlach GF. Cloning and characterization of a protective outer membrane lipoprotein of *Actinobacillus poeuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.*, 63(7) : 2797-2800, 1995.

Choi K, Maheswaran SK, Felice LJ, et al. Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of in vivo grown *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol.*, 28:75-92, 1991.

Confer AW, Nutt SH, Dabo SM, Panciera RJ and Murphy GL. Antibody responses of cattle to outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* A:3. *Am. J. Vet. Res.*, 57(10) : 1453-1457, 1996.

Confer AW. Immunogens of *Pasteurella*. *Vet. Microbiol.*, 37 : 353-368, 1993.

Dado SM, Confer AW, Murphy GL. Outer membrane proteins of bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates. *Vet. Microbiol.*, 54 : 167-183, 1997.

Hadge D and Ambrosius H. Evolution of low molecular weight immunoglobulins - IV. IgY-like immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians, precursors of mammalian IgA. *Mol. Immunol.*, 21(8) : 699-707, 1984.

Hatta H, Kim M and Yamamoto T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". *Agric. Biol. Chem.*, 54(10) : 2531-2535, 1990.

Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M and Yamamoto T. Productivity and some properties of egg yolk antibody(IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(3) : 450-454, 1993.

Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M, Yamamoto T and Ebina T. Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(7) : 1077-1081, 1993.

Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, Kim M, Yamamoto T, Otake S, Hirasawa M, Katz J, Childers NK and Michalek SM. Passive immunization against dental plaque formation in humans : effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, 31(4) : 268-74, 1997.

Ikemori Y, Kuroki M, Peralta RC, Yokoyama H and Kodama Y. Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with

K99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.*, 53(11) : 2005-2008, 1992.

Jemseius JC, Andersen I, Hau J, Crone M and Koch C. Eggs : conveniently packaged antibodies. methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. methods*, 46 : 63-68, 1981.

Janson AK, Smith CIE and Hammarstrom L. Biological properties of yolk immunoglobulins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 371 : 685-690, 1995.

Jin LZ, Baidoo SK, Marquardt RR and Frohlich AA. In vitro inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to piglet intestinal mucus by egg-yolk antibodies. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 21 : 313-321, 1998.

Kamp EM, Bokken GCAM, Vermeulen TMM, Jong MF, Buys HECM, Reek FH, Smits MA. A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 8 : 304-309, 1996.

Kuhlmann R, Wiedemann V, Schmidt P, Wanke R, Linckh E and Losch U. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious diseases. *J. Vet. Med.*, 35 : 610-616, 1988.

Larsson A, Balow R, Lindahl TL and Forsberg PO. Chicken Antibodies: Taking advantage of evolution-a review. *Poultry sci.*, 72 : 1807-1812, 1993.

Li X, Nakano T, Sunwoo HH, Peak BH, Chae HS and Sim JS. Effects of egg and yolk weights on yolk antibodies(IgY) production in laying chickens. *Poultry sci.*, 77 : 266-270, 1998.

Marandi MV, Mittal KR. Identification and characterization of outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* serotype D by using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, 33(4) : 952-957, 1995.

Marandi MV, Mittal KR. Role of outer membrane protein H (Omp H)- and OmpA-specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors in protection of mice against *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.*, 65(11) : 4502-4508, 1997.

Nakai T, Kawahara K, Horiguchi Y, Danbara H and Kume K. Characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Am. J. Vet. Res.*, 53(9) : 1519-1523, 1992.

Ruffolo CG, Jost BH, Adler B. Iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* and their role in immunity. *Vet Microbiol*, 59:123-137, 1998.

Rutter JM. Virulence of *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of gnotobiotic pigs infected with *Bordetella bronchiseptica*. *Res Vet Sci.*, 34 : 287-295, 1983.

Schmidt P, Wiedemann V, Kuhlmann R, Wanke R, Linckh E and Losch U.

Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious diseases. *J. Vet. Med.*, 36 : 619-628, 1989.

Shimizu M, Fitzsimmons RC and Nakai S. Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food Sci.*, 53(5) : 1360-1366, 1988.

Shimizu M, Miwa Y, Hashimoto K and Goto A. Encapsulation of chicken egg yolk immunoglobulin G (IgY) by liposomes. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(9) : 1445-1449, 1993.

Shimizu M, Nagashima H, Sano K, Hashimoto K, Ozeki M, Tsuda K and Hatta H. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(2) : 270-274, 1992.

Shimizu M and Nakane Y. Encapsulation of biologically active proteins in a multiple emulsion. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59(3) : 492-496, 1995.

Silim A, Venne D. Comparison of egg-yolk and serum antibody titers to four avian viruses by enzyme-linked immunosorbent assay using paired filed samples. *Avian Dis.*, 33 : 643-648, 1989.

Smith IKM and Lida J. Passive protection of piglets by monoclonal antibodies against experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Res. in Vet. Sci.*, 49 : 144-150, 1990.

Sugita-Konishi Y, Shibata K, Yun SS, Hara-Kudo Y, Yamaguchi K and Kumagai S. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(5) : 886-888, 1996.

Warr GW, Magor KE and Higgins DA. IgY : clud to the origins of modern antibodies. *Immunol. today*, 16(8) : 392-398, 1995.

Weltzin R and Monath TP. Intranasal antibody prophylaxis for protection against viral disease. *Clin. Microb. Rev.*, 12(3) : 383-393, 1999.

Wiedemann V, Kuhlmann R, Schmidt P, Erhardt W and Losch U. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious diseases. *J. Vet. Med.*, 36 : 163-172, 1990.

Wiedemann V, Linckh E, Kuhlmann R, Schmidt P and Losch U. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious diseases. *J. Vet. Med.* 38 : 283-291, 1991.

Wierup M. The control diseases in animals: alternatives to the use of antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 14 : 315-319, 2000.

Yokoyama H, Paralta RC, Diaz R, Sendo S, Ikemori Y and Kodama Y. Passive protective effect of chicken egg yolk Immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect. Immun.*, 60(3) : 998-1007, 1992.

Yokoyama H, Paralta RC, Diaz R, Sendo S, Ikemori Y and Kodama Y. Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulins in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing. *Am. J. Vet. Res.* 54(6) : 867-872, 1993.

Zeitlin L, Cone RA, Moench TR and Whaley KJ. Preventing infectious disease with passive immunization. *Microbs. Infect.*, 2 : 701-708, 2000.

Zhang H, Ainsworth AJ, Montgomery RD. Use of a 35.5 kDa cell membrane composition of *Pasteurella multocida* and an anti-idiotypic antibody to induce protective immunity in leghorn chickens. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 41 : 89-100, 1994.

Zhao G, Pijoan C, Choi Keumhwa, et al. Expression of Iron-regulated outer membrane proteins by porcine strains of *Pasteurella multocida*. *Can J Vet Res*, 59:46-50, 1995.

김종만, 우승룡, 권창희, 김종염, 허원. 난황항체를 이용한 돼지 대장균설사증 방제기법 개발 II. 난황항체의 돼지 대장균증에 대한 치료효과. 대한수의학회지, 38(4) : 837-842, 1998.

신나리, 김종만, 유한상. 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제 관한 연구 I. *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* 및 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 주요 면역원 분석 및 IgY의 생산. 대한수의학회지, 40(3) : 551-561, 2000.

신나리, 김종만, 최인수, 유한상. 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제에 관한연구 II. 면역된 산란계로부터 생산된 난황항체에의 특이성 분석. 대한수의학회지, 41(2) : 197-202, 2001.

신나리, 김종만, 유한상. 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제에 관한연구 III. 마우스에서의 방어효과. 대한수의학회지, 41(3) : 351-356, 2001.

신나리, 박주연, 박용호, 유한상. 돼지 폐렴병소로부터 분리한 *Pasteurella multocida*에 관한 연구 : 항생제 감수성, plasmid profile 및 *toxA* 유전자 분포. 대한수의학회지, 39(6) : 1091-1098, 1999.

우승룡, 김종만, 권창희, 이희수, 임숙경, 김종염. 난황항체를 이용한 돼지 대장균설사증 방제기법 개발 I. 대장균 pilus 항원과 LT로 면역시킨 닭의 면역반응. 대한수의학회지, 38(4) : 829-836, 1998.

이남형, 노정해, 한찬규, 성기승. 여러 가지 산란계 사료 첨가제가 계란의 IgY 수준과 산란율에 미치는 영향. 한축지, 41(2) : 155-166, 1999.

이승배, 최석호, 고태송, 장문주, 한석현. 계란의 난황에서 IgY항체 생산 및 특성에 관한 연구. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, 16(1) : 85-88, 1996.

이정희, 정종율, 전용수, 석호봉. Multiplex PCR 기법 및 면역확산법을 이용한 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 혈청형 분류에 관한 연구. 한축지, 41(3) : 387-396, 1999.

제 2 절 돼지 복합소화기질병 치료, 예방용 난황 면역제 개발

Akita EM and Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J. Immunol. Methods*, 160 : 207-214, 1993.

Bianchi ATJ, Scholten JW, van Zijderveld AM, *et al.* Parenteral vaccination of mice and piglets with F4⁺ *Escherichia coli* suppresses the enteric anti-F4 response upon oral infection. *Vaccine*, 14:199-206, 1996.

Brown J, Resurreccion RS, Dickson TG, *et al.* The relationship of egg yolk and serum antibody. I. Infectious bursal disease virus. *Avian Disease*, 33:654-656, 1989.

Davis JW, Allen RC, Smibert RM. Studies on hemolytic *Escherichia coli* associated with edema disease of swine. I. Separation and properties of a toxin of hemolytic *Escherichia coli*. *Am J Vet Res.* 736-740, 1961.

Dean EA. Comparison of receptors for 987p pili of enterotoxigenic *Escherichia coli* strain in the small intestines of neonatal and older pigs. *Infect Immun*, 58:4030-4035, 1990.

Farrelly CO, Branton D, and Wanke CA. Oral Ingestion of Egg Yolk Immunoglobulin from Hens Immunized with an Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strain Prevents Diarrhea in Rabbits Challenged with

the Same Strain. *Infection and Immunity*, vol. 60, no 7 .1992. 2593-2597.

Gordon VM, Whipp SC, Moon HW, *et al.* An enzymatic mutant of shiga-like toxin IIvariant is a vaccine candidate for edema disease of swine. *Infect Immun.* 60:485-490, 1992.

Gyimah JE, Panigrahy B, and Williams JD. Immunogenicity of an *Escherichia coli* Multivalent Pilus Vaccine in Chickens. *AVIAN DISEASE*. vol. 30, no. 4. 1986. 687-689.

Haan L, Holtrop M, Verweij WR, *et al.* Mucosal immunogenicity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin : role of the subunit. *Vaccine*, 14: 260-266, 1996.

Hideaki Y, Robert C. Peralta, Sadako S, Yukata I, Yoshikatsu K. Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulin in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing. *Am J Vet Res*, vol. 54, no 6. 1993. 867-872.

Hideaki Y, Robert C. Peralta, Roger Diaz, Sadako Sendo, Yutaka Ikemori, and Yoshikatsu Kodama. Passive Protective Effect of Chicken Egg Yolk Immunoglobulins against Experimental Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection in Neonatal Piglets. *Infection and Immunity*. vol. 60, no. 3. 1992. 998-1006.

Ikemori Y, Kuroki M, Peralta RC, *et al.* Protection of neonatal calves against fetal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with k99-piliated enterotoxigenic

Escherichia coli. *Am J Vet Res*, 53:2005-2008, 1992.

Jin LZ, Baidoo SK, Marquardt RR and Frohlich AA. In vitro inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to piglet intestinal mucus by egg-yolk antibodies. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 21 : 313-321, 1998.

Johansen M, Andresen LO, Jorsal SE, *et al.* Prevention of edema disease in pigs by vaccination with verotoxin 2e toxoid. *Can J Vet Res.*, 61:280-285, 1997.

Jungling A, Wiedemann V, Kuhlmann R, *et al.* Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. *J Vet Med*, B38:373-381, 1991.

Ketyi I., Kuch A., Vertenyi A. Stability of *Escherichia coli* adhesive factors k88 and k99 in mice. *Acta. Microbiol Acad Sci Hung* 25:77-86, 1978.

Nagy B, Casey TA, Whipp SC, *et al.* Susceptibility of porcine intestine to pilus-mediated adhesion by some isolates of piliated enterotoxigenic *Escherichia coli* increases with age. *Infect Immun* 60:1285-1294, 1992.

Nagy LK, Bhogal BS, Mackenzie T. The effect of colostrum or past colibacillosis on the adhesion of *Escherichia coli* to the small intestine of the pig. *Research in Veterinary Science*, 21:303-308,

1976.

Runnels PL, Moon HW, Schneider RA. Development of resistance with host age to adhesion of k99⁺ *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells. *Infect Immun*, 298-300:28, 1980.

Sam CM To. F41 antigen among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* strains lacking k88, k99, and 987p pili. *Infect Immun* 43:549-554, 1984.

Schneider RA, Sam CM To. Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains that express k88 and 987p pilus antigens. *Infect Immun*, 36:417-418, 1982.

Silim A and Venne D. Comparison of Egg Yolk and Serum Antibody Titers to Four Avian Viruses by Enzyme linked Immunosorbent Assay Using Paired Field Samples. AVIAN DISEASE. vol 33. 1989. 643-648.

Smith HW, Huggins MB. The influence of plasmid determined and other characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* on their ability to proliferate in the alimentary tracts of piglets, calves and lambs. *J Med Microbiol*, 11:471-492, 1978.

Svendsen L, Crowly A, Ostergaard LH, *et al*. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. *Laboratory Animal Science*, 45:89-93, 1995.

Theresa H. Piela, Vance J. Yates, and P.W. Chang. Use of Egg Yolk to

Determine Antibody Levels in Chickens Introduced with a Hemmagglutinating Duck Adenovirus. AVIAN DISEASE vol. 29. no.2. 1984. 457-464.

Theresa H. Piela M. Gulka, Vance J. Yates, and Pei WC. Use of Egg Yolk in Serological Tests(ELISA and HI) to Detect Antibody to Newcastle Disease, Infectious Bronchitis, and Mycoplasma gallisepticum. AVIAN DISEASE vol. 28 no 4. 1984. 877-883.

Yokoyama H, Peralta RC, Diaz R, *et al.* Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect Immun*, 60:998-1007,1992.

Yokoyama H, Peralta RC, Sendo S, *et al.* Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulins in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing. *Am J Vet Res*, 54:867-872, 1993.

Yukata I, Masahiko k, Robert C. Peralta, Hideaki Y. Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Am J Vet Res*, vol. 53, no. 11. 1992. 2005-2008.

신나리, 감종만, 유한상. 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제에 관한 연구. 1. Bordetella bronchiseptica, Pasteurella multocida 및 Actinobacillus pleuropneumoniae의 주요 면역원 분석 및 IgY의 생산.

Korean J Vet Res 40(3): 551~561.

우승룡, 김종만, 권창희, 이희수, 임숙경, 김종염. 난황항체를 이용한 돼지 대장균설사증 방제기법 개발 I. 대장균 pilus 항원과 LT로 면역시킨 닭의 면역반응. 대한수의학회지, 38(4) : 829-836, 1998.

제 3 절 개 주요 소화기, 호흡기 질병 치료, 예방용 난황면역제 개발

Akita EM and Nakai S. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *J. Food. Sci.*, 57(3) : 629-634, 1992.

Bianchi ATJ, Scholten JW, van Zijderveld AM, *et al.* Parenteral vaccination of mice and piglets with F4⁺ *Escherichia coli* suppresses the enteric anti-F4 response upon oral infection. *Vaccine*, 14:199-206, 1996.

Brown J, Resurreccion RS, Dickson TG, *et al.* The relationship of egg yolk and serum antibody. I. Infectious bursal disease virus. *Avian Disease*, 33:654-656, 1989.

Farrelly CO, Branton D, and Wanke CA. Oral Ingestion of Egg Yolk Immunoglobulin from Hens Immunized with an Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strain Prevents Diarrhea in Rabbits Challenged with the Same Strain. *Infection and Immunity*, vol. 60, no 7 .1992. 2593-2597.

Gyimah JE, Panigrahy B, and Williams JD. Immunogenicity of an

Escherichia coli Multivalent Pilus Vaccine in Chickens. AVIAN DISEASE. vol. 30, no. 4. 1986. 687-689.

Haan L, Holtrop M, Verweij WR, *et al.* Mucosal immunogenicity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin : role of the subunit. *Vaccine*, 14: 260-266, 1996.

Hideaki Y, Robert C. Peralta, Sadako S, Yukata I, Yoshikatsu K. Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulin in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing. *Am J Vet Res*, vol. 54, no 6. 1993. 867-872.

Hideaki Y, Robert C. Peralta, Roger Diaz, Sadako Sendo, Yutaka Ikemori, and Yoshikatsu Kodama. Passive Protective Effect of Chicken Egg Yolk Immunoglobulins against Experimental Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection in Neonatal Piglets. *Infection and Immunity*. vol. 60, no. 3. 1992. 998-1006.

Ikemori Y, Kuroki M, Peralta RC, *et al.* Protection of neonatal calves against fetal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with k99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Am J Vet Res*, 53:2005-2008, 1992.

Jungling A, Wiedemann V, Kuhlmann R, *et al.* Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. *J Vet Med*, B38:373-381, 1991.

Ketyi I., Kuch A., Vertenyi A. Stability of *Escherichia coli* adhesive

factors k88 and k99 in mice. *Acta. Microbiol Acad Sci Hung* 25:77-86, 1978.

Nagy B, Casey TA, Whipp SC, *et al.* Susceptibility of porcine intestine to pilus-mediated adhesion by some isolates of piliated enterotoxigenic *Escherichia coli* increases with age. *Infect Immun* 60:1285-1294, 1992.

Nagy LK, Bhogal BS, Mackenzie T. The effect of colostrum or past colibacillosis on the adhesion of *Escherichia coli* to the small intestine of the pig. *Research in Veterinary Science*, 21:303-308, 1976.

Silim A and Venne D. Comparison of Egg Yolk and Serum Antibody Titers to Four Avian Viruses by Enzyme linked Immunosorbent Assay Using Paired Field Samples. *AVIAN DISEASE*. vol 33. 1989. 643-648.

Svendsen L, Crowley A, Ostergaard LH, *et al.* Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. *Laboratory Animal Science*, 45:89-93, 1995.

Theresa H. Piela M. Gulka, Vance J. Yates, and Pei WC. Use of Egg Yolk in Serological Tests(ELISA and HI) to Detect Antibody to Newcastle Disease, Infectious Bronchitis, and *Mycoplasma gallisepticum*. *AVIAN DISEASE* vol. 28 no 4. 1984. 877-883.

Yokoyama H, Peralta RC, Diaz R, *et al.* Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic

Escherichia coli infection in neonatal piglets. *Infect Immun*, 60: 998-1007, 1992.

Yokoyama H, Peralta RC, Sendo S, *et al.* Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulins in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing. *Am J Vet Res*, 54:867-872, 1993.

Yukata I, Masahiko k, Robert C. Peralta, Hideaki Y. Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Am J Vet Res*, vol. 53, no. 11. 1992. 2005-2008.

신나리, 김종만, 유한상. 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제 관한 연구 I. *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* 및 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 주요 면역원 분석 및 IgY의 생산. 대한수의학회지, 40(3) : 551-561, 2000.

신나리, 김종만, 최인수, 유한상. 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제에 관한연구 II. 면역된 산란계로부터 생산된 난황항체에의 특이성 분석. 대한수의학회지, 41(2) : 197-202, 2001.

오진식, 전용수, 강보규, 이상선, 윤용덕. 개 *Bordetella bronchiseptica* bacterin-toxoid 백신의 효능에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지, 24(2): 123~131. 2000.