

소의 탄저기종저 불활화 혼합백신에 관한 연구

전 윤 성
서울대학교 농과대학 수의학과

Studies on Inactivated Combined Vaccine of Bovine Anthrax and Blackleg

Yun Seong Jeon, DVM, MS, PhD
(College of Agriculture, Seoul National University)

목 차

- I. 서 론
- II. 재료 및 방법
 - 1. 공시세균
 - 2. 탄저 및 기종저균의 배양
 - 3. 채균 및 불활화
 - 4. 수산화 알루미늄 겔
 - 5. 백신과 백신의 접종
 - 6. 공시 동물
 - 7. 안전시험
 - 8. 후독접종
- III. 실험성적
 - 1. 백신제조용 탄저균주 선정시험
 - 2. 탄저 기종저 불활화백신의 기니퓰에 대한 면역원성 시험
 - 3. 탄저기종저 불활화 겔흡착백신의 기니퓰에 대한 면역원성 시험
- IV. 고 찰
- V. 결 론
- VI. 참고문헌

ABSTRACT

Due to the fact that an inactivated anthrax vaccine may lack its immunogenicity and stability of immunogen a number of spore vaccines were exclusively used worldwide. In these studies a number of important factors were emphasized to achieve the following: selection of non or less allergic strain of anthrax bacillus, capsulation of bacteria, obtaining of non sporulating but vegetative organisms, adequate inactivation of B. anthracis by means of formalin, adsorption of immunogen to aluminum hydroxide gel.

Non or less allergic strains of anthrax bacillus which is inactivated with formalin was selected by a hyperimmunization and shock test in rabbits. Obtaining capsular material and vegetative immunogen, a virulent anthrax organisms were cultivated on sodium bicarbonate medium with or without adding of l-alanine in which B. anthracis grew luxuriantly without forming spores. Inactivation was carried out at 37°C water bath for 3 days after the bacterial culture was mixed with formalin in a final concentration of two per cent of formalin. Aluminum hydroxide gel was added to the mixture of anthrax and blackleg bacterin. Vaccines were injected guinea pig via subcutaneous or intramuscular route and challenged after three weeks and the possibilities of protection was tested.

Throughout the studies, the above mentioned vaccines possibly protected the vaccinated guinea pigs more than 80 per cent compared to that of the controls. This experimental results strongly suggest that the vaccine may possibly applicable to bovine.

I. 서 론

소의 탄저는 Pasteur의 아포백신(2묘균)으로 예방되어 왔다. 1묘백신은 병원성은 없으나 면역원성이 약하고 2묘백신은 병원성과 면역원성이 중등도이며 3묘 및 4묘백신은 강력한 면역원성과 병원성을 지니고 있다.

그래서 우리나라에서는 탄저 상제지에 한해서 2묘백신을 사용하고 있다. 탄저 2묘백신은 그 면역기간이 6개월인 데다가 병원성이 인정되기 때문에 Sterne의 새로운 백신이 개발되었다⁽¹⁾.

Sterne의 무핵막아포(無莢膜芽胞)백신은 그 병원성이 Pasteur의 1묘 아포백신에 가까우면서 그 면역원성은 높아서(12개월) 지금까지 개발된 어떤 백신보다 그 우수성이 인정되고 있다.

현재 세계 여러나라에서 사용하는 위의 두 백신은 모두 생균백신이다. 이 백신균은 소에 대한 병원성이 인정되고 있지 않으나 실험동물인 기니픽이나 마우스에서는 병원성을 띄울수 있다. 이 사실은 우유를 생산하는 젖소에 대하여 이상적인 백신이 못됨을 암시해주고 있다. 사실인즉 우리나라에서는 탄저생아포백신이 황소에만 적용되고 있으며 다른나라에서는 젖소의 탄저 불활화 백신에 관한 개발이 많이 시도된바 있다.

탄저의 불활화 백신을 만드는 일이 여의치 않은 원인은 여러가지가 있다. 하나는 제조과정에 난점이 많은 것이고 둘째는 완제품의 보존성이 나쁜 점이다. 즉 탄저균은 쉽게 아포를 형성하는데 이 아포는 불활화 될 때 그 면역원성을 상실하며 설사 발육형으로 백신이 만들어 졌을경우 그 발육형균의 액상에서의 안정성이 극히 불량해서 쉽게 면역원성을 상실하는 점이다.

이 연구에서는 젖소에 보다 안전하게 사용할수 있는 탄저의 불활화 백신을 만들고 이것을 다시 기종저 불활화백신과 혼합하는 2가 백신을 만드는 데 그 목적이 있다.

이 연구에서 이루어진 불활화 백신이 지니는 장점은 크게 나누어 3가지가 있다. 첫째, 피접종 젖소가 안전하며 이 젖소가 생산하는 우유를 음용하는 사람 역시 안전하기에 젖소의 방역은 물론 이터니와 공중위생의 견지에서서도 큰 장점이 있다. 둘째, 백신의 성장점 정중 필수적인 실험동물에서의 이 백신의 면역원성이나 방어시험이 가능하며 검정이 성립된다. 셋째, 탄저와 기종저의 혼합백신인 까닭에 접종 횟수를 1회로 줄일수 있다는 장점이 있다.

이 연구에 있어서는 면역형성시험동물이 소가 아니

고 기니픽이어서 이 실험은 어디까지나 소에 사용할수 있는 탄저기종저 혼합백신의 제조 검정 면역형성 능력의 기초적인 것에 불과하다. 따라서 이 백신의 효력이 젖소나 황소에서 시험되어야 하며 이 연구는 꼭 실현되어야 할 과제라고 믿어진다.

II. 재료 및 방법

1. **공시세균**: 탄저균은 야외균주인 함안균주와 2묘균인 육군균주 그리고 Sterne 균주를 사용하였다. 기종저균은 역시 야외균주인 청천균주와 비병원성균주인 2묘 변독균주를 사용하였다.

2. **탄저 및 기종저균의 배양**: 탄저균은 Nutrient agar에 심고 37°C에서 72시간 배양한 다음 Seline에 침균하였다. 그리고 아포만을 얻게하고 발아를 촉진할 목적과 비탄저균을 제거할 목적으로 70°C에서 30분간 가온한 다음에 이것을 L-alanine⁽²⁾이 들어있는 Burdon의 NaHCO₃배지에 심었다⁽³⁾.

L-alanine이 함유된 Burdon의 NaHCO₃배지는 다음과 같이 만들었다. 즉 dehydrated nutrient broth 8g, yeast extract 3g, glucose 5g, agar 25g, distilled water 1,000ml을 섞고 용해시킨다음 일정량을 배양용병에 넣고 121°C에서 20분간 고압멸균하였다. 이 기본배지에 7% NaHCO₃를 굳기전에 넣어서 NaHCO₃의 최종농도가 0.7%가 되게 하였다. NaHCO₃수용액은 증류수로 만들었고 Seitz 여과기에 여과한 다음 배지에 넣었다. L-alanine은 Merck 회사의 L(+)-α-alanine(C₃H₇NO₂, MW 89.09)을 사용하였다. 우선 40mM의 alanine수용액을 만들어 Seitz 여과기로 여과한 다음 최종농도가 0.4mM가 되도록 배지에 넣고 배지는 사면으로 굳게 하였다. 거기에 탄저균의 부유액을 넣고 세균이 배지 표면에 잘 묻게한 다음 37°C에서 24~30시간 배양하고 나서 채균하여 백신의 재료로 삼았다.

기종저균은 간혹집배지에서 72시간 배양된 것을 65°C에서 20분간 가온하여 접종재료로 삼았다. 즉 이 세균 재료를 L-alanine이 함유된 소의 간집배지에 심고 98시간 배양한 다음 백신재료로 삼았다. 배지는 소의 간을 갈아서 죽같이 한것 50g을 Nutrient Broth 100ml에 넣고 100°C에서 30분 가열 추출하고 냉각시킨 다음 여과지로 여과하였다. 이 여액에 0.4mM가 되도록 L(+)-alanine을 넣고 pH를 7.5로 수정한 다음 배양병에 넣고 121°C에서 20분간 고압멸균하였다. 배양시간을 단축하기 위하여 공시균의 접종량을 가급적 많이 하였고 배양은 37°C에서 96시간 하였다.

3. **채균 및 불활화**: 탄저균과 기종저균의 배양물을

채균하기 전에 아포의 생성여부를 일단 검사하였다. 한 시야에 아포가 하나도 보이지 않은 경우에 한하여 채균토록 하였다.

탄저균은 0.3% formalin Saline 으로 채균하였고 기종저균은 액체배양물의 최후 농도에 대하여 0.3%가 되도록 formalin 을 첨가하였다. 이것을 37°C 항온수조에서 96 시간 불활화한 다음 무균적으로 여과지에 여과하였다.

공시백신의 세균농도는 탄저균의 경우 4,500,000/ml로 하였고 기종저균의 경우 400,000/ml가 되도록 하였다. 즉 탄저균액은 9,000,000/ml로 만들고 기종저균액은 800,000/ml로 하여 동량을 혼합하였다.

4. 수산화 알미늄겔 : 항체 형성을 촉진하기 위해서 adjuvant 로 수산화 알미늄 겔을 사용하였다. 처음에 수산화알미늄을 이온수지 컬럼에 통과 시킨 물에 녹여서 포화액을 만들었다. 이 포화액에 2배로 희석한 암모니아수를 겔의 생성량이 최고에 이를때까지 서서히 가하면서 교반하며 첨가하였다. 형성된 겔은 약 20회에 걸쳐서 그 상층액을 정수로 교환하여 증으로써 겔의 산도를 낮추었다. 세척한 겔을 다시 1N NaOH로 중성이 되도록 pH를 수정하였고 그후에 증류수로 물을 빼낸 겔에 대하여 그 농도가 10%가 되도록 겔을 만들고 이것을 121°C에서 30분간 고압멸균하였다.

5. 백신과 백신의 접종 : 앞의 3항에서 밝힌바 있는 백신의 재료에 10% 수산화 알미늄겔을 혼합하였다. 탄저균액에 소량의 겔을 첨가하면 겔이 응고되는데 거기에 더 많은 겔을 넣으면 다시 균일하게 부유된다. 그와같은 균일한 백신을 얻기 위해서 백신재료 3에 10% 겔 1의 비율로 잘 혼합하여 공시백신으로 삼았다.

6. 공시동물 : 백신의 안전성을 검사하기 위하여 마우스를 사용하였고 백신의 면역원성 검사에는 기니피크를 사용하였다.

마우스는 체중 15gm 내외인 것을 사용하였으며 기니피크는 체중 300gm의 것을 사용하였다.

7. 안전시험과 백신접종 : 백신의 안전성을 검사하기 위하여 모든 공시백신 0.5ml을 5수의 마우스 복강내에 접종하였고. 접종후 2주일을 관찰하여 아무런 접종반응이 없는 것을 면역원성 시험에 사용하였다. 기니피크 역시 한 시험군에 5수를 사용하였고 백신 0.5ml를 복강내에 접종하였다. 백신의 접종을 받은 기니피크는 목적에 따라 2주 또는 3주간 사육하였다가 후독접종에 사용하였다.

8. 후독접종 : 탄저균으로는 2묘균주를 그리고 기종저균으로는 청천균주를 후독접종에 사용하였다. 탄저균은 nutrient agar에서 3일간 배양한 것을 saline에

부유하여 4 MLD가 되는것 1.0ml를 기니피크의 피하에 접종하였다.

기종저균은 간육집배지에서 4일간 배양된 것을 4.0% CaCl₂ 수용액으로 4MLD(10⁻⁵)가 되도록 희석하고 이것의 1.0ml을 역시 피하에 접종하였다. 혼합백신의 경우에는 기니피크 등 양쪽에 각각 탄저균 1.0ml와 기종저균 1.0ml를 접종하였다. 후독접종된 기니피크는 백신의 접종을 받고 2~3주된 것으로서 관찰은 후독접종후 3주까지 하였다.

III. 실험 성적

1. 백신제조용 탄저균주 선정시험 : 탄저균은 균주에 따라서 동물에 유발하는 과민증의 정도에 심한 차이를 초래함을 예비시험에서 경험하였기에 탄저 야외균주를 선정하는데 과민증에 의한 속크반응과 침강소 형성능력을 검사하였다.

즉 속크사를 유발하는 균주는 토끼로 하여금 혈증항체의 생성을 거의 불가능하게 하였기 때문이다.

공시균주로는 함안주와 일본육군 강균주 세 가지를 시험하였다. 균액은 세균을 L-alanine 함유 NaHCO₃ 배지에서 배양하여 얻은 것으로 만들었고 0.3% formalin으로 37°C에서 3일간 불활화한 것을 사용하였다. (재료 및 방법 2항 및 3항 참조)

불활화균액 0.1ml, 0.2ml, 0.4ml, 1.0ml를 체중 2kg 가량의 가토에 1주일 간격으로 정맥내 접종하며 최종 접종일로부터 2주일을 관찰하였다. 이때 한 시험군 5수의 가토중 속크사가 유발되거나 가토가 극히 허약하게 하는 균주는 시험 대상군에서 제외하였다. 그러나 속크사를 유발하지 않는 가토에서는 혈액을 채취하여 혈청중의 침강소를 Ascoli 반응으로 검사하였다.

함안주는 속크사를 유발치 않고 혈중 침강소의 역가가 10,000 이상이 되게 하였기에 이를 본 시험에 공시 탄저 야외균 주로 선정하였다. 이 시험의 성적은 1표와 같다.

즉 탄저균의 야외 주는 동물에 대한 혈증항체형성 능력이 다르며 과민증상태조성과 혈증항체형성능력과의 관계는 서로 상반됨을 알수 있고 나아가서는 불활화 백신의 균주선정이 절대 필요함을 암시하여 주고 있다.

2. 탄저 기종저 불활화 백신의 기니피크에 대한 면역원성시험 : 탄저균의 아포형 불활화 백신은 면역원성이 없기 때문에 이 실험에서는 탄저균의 발육형 배양물을 얻어서 그것을 불활화하여 이것을 백신재료로 삼고 이의 면역원성을 실험하였다.

기종저균은 아포형 불활화 백신이라 할지라도 면역 원성을 지니고 있기에 여기에서는 주로 탄저균백신의 단미로서 또는 2가 백신으로서의 효력을 시험하였다.

탄저균의 협막 비아포세균의 불활화백신은 재료와 방법에서 적은대로 L-alanine 이 함유된 NaHCO₃ 배지에서 얻었으며 이것의 단미 또는 2가백신을 만들었다. 2가 혼합백신을 5 마리의 기니픽에 피하 또는 근육내 접종하고 3 주일후에 후독접종한 결과 기니픽은 거의 방이 되지 않았다.

이 실험의 결과는 2표와 같다.

3. 탄저기종저 불활화 겔콜차백신의 기니픽에 대한 면역원성 시험 : 탄저균이나 기종저균의 formalin 불활화백신은 탄저균의 경우 그것이 모든 면역원성물질인 협막항원이나 균체항원을 지니고 있어도 기니픽에 대한 면역원성은 거의 띄우지 못함이 앞에서 실증되었다 따라서 이 시험에서는 항체형성을 촉진하는 adjuvant 를 사용함으로써 기니픽에 있어서 특히 탄저균의 면역 원성을 높히도록 하였다.

탄저균과 기종저균의 단미백신과 이의 혼합백신의 제조방법 그리고 수산화알미늄겔의 흡착방법은 재료와 방법에 기술한 바와 같다.

접종경로에 관해서는 피하접종법이나 근육접종법 사이에 별다른 차이가 없어서 탄저기종저 혼합백신에 한하여 피하접종경로와 근육내 접종경로의 두 가지를 실험하였다. 그리고 백신의 lot 별 차이를 없이기 위하여 동일한 방법을 두가지 이상의 백신 lot에서 시험하였다. 그러나 근육내 접종법은 중요시 되지 않았기에 한 lot에 한하여 시험하였다. 이의 실험성적은 3 및 4표와 같다.

3 및 4표의 실험성적에서 알 수 있는바 탄저나 기종저의 1가 백신이나 이의 혼합백신은 수산화알미늄을 adjuvant 로 부형될때 뚜렷한 면역효과를 보여 주었다. 즉 대조군은 100%의 기니픽 폐사율을 보인때 반하여 기종저 백신은 100%의 방어율을 보였고 탄저균 백신이나 탄저기종저 혼합백신도 최하 80% 최고 100%의 방어율을 보여 주었다.

Table 1. Hypersensitive Activity of Vaccine Strains of B. anthracis in Rabbits

Strains of B. anthracis	Number of booster injection when rabbit died					Precipitin titer	Mortality
Haman strain	○	○	○	○	○	>10,000**	0
Army strain No. 1	③*	③	④	○	○	<100	60
Army strain No. 2	③	④	④	○	○	<100	60
Army strain No. 3	③	④	④	④	○	<100	80

* Three means that the rabbit was died after 3rd injection of antigen in the hypersensitivity test

** Reciprocal dilution of antiserum showing a positive Ascoli test.

Table 2. Immunogenicity of Anthrax-Blackleg Bacterins in Guinea pig

Vaccinated and challenged with	Route of injection and dose of vaccine	5 guinea pigs of 1 group died after day of challenge					Mortality	
Anthrax-Blackleg*	Subcutaneous	1.0ml 1 dose	⑧**	⑧	⑧	⑨	○	80
		0.5ml 4 doses	⑦	⑦	⑧	⑨	⑩	100
	Intramuscular	1.0ml 1 dose	⑧	⑧	⑨	⑩	⑩	100
Controls:***	Subcutaneous	1.0ml 4MLD	⑥	⑦	⑦	⑧	⑩	100
Anthrax		1.0ml 4MLD	⑨	⑨	⑩	⑪	⑪	100
Blackleg		1.0ml 4MLD each	⑥	⑦	⑦	⑧	⑩	100
Blackleg								
100								

* Vaccinated and challenged with anthrax and blackleg

** 8 means that the vaccinated guinea pig was died after 8 days of challenge

*** Controls were not vaccinated but only challenged

Table 3 Immunogenicity of Mono Anthrax and Blackleg Inactivated and Gel Adsorbed Vaccines in Guinea Pigs

Vaccinated and Challenged with	Route of injection and dose of vaccine	5 guinea pigs of 1 group died after day of challenge					Mortality
Anthrax	1.0ml 1 dose	⑤*	○	○	○	○	20
	1.0ml 1 dose	⑤	○	○	○	○	20
	Subcutaneous 1.0ml 1 dose	○	○	○	○	○	0
	0.5ml 4 doses	③	○	○	○	○	20
	0.5ml 4 doses	○	○	○	○	○	0
Blackleg	1.0ml 1 dose	○	○	○	○	○	0
	1.0ml 1 dose	○	○	○	○	○	0
	Subcutaneous 0.5ml 4 doses	○	○	○	○	○	0
	0.5ml 4 doses	○	○	○	○	○	0
Controls:							
Anthrax**	Subcutaneous 1.0ml 4MLD	③	③	⑤	⑥	⑥	100
Blackleg***	Subcutaneous 1.0ml 4MLD	⑧	⑩	⑫	⑫	⑭	100

* 5 means that the vaccinated guineapig was died after 5 days of challenge

** Not vaccinated but challenged with anthrax bacillus

*** Not vaccinated but challenged with blackleg bacillus

Table 4 Immunogenicity of Anthrax-Blackleg Inactivated and Gel Adsorbed Combined Vaccines in Guinea Pig

Vaccinated and Challenged with	Route of injection and dose of vaccine	5 guinea pigs of 1 group died after day of challenge					Mortality	
Anthrax	Subcutaneous {	1.0ml 1 dose	○	○	○	○	○	0
		0.5ml 4 doses	○	○	○	○	○	0
Blackleg	Intramuscular	1.0ml 1 dose	③*	○	○	○	○	20
Control**	Subcutaneous	1.0ml 4MLD each	⑥	⑥	⑦	⑦	⑧	100

* 3 means that the vaccinated guinea pig was died after 3 days of challenge

** Not vaccinated but challenged with anthrax and blackleg bacillus

IV. 고 찰

탄저균의 아포형 불활화 백신의 면역원성은 아직 인정되지 않고 있다. 그 이유는 확실치 않으나 이 실험에서 그 이유로 삼은 것은 첫째, 아포성분은 면역원성이 될 수 없다고 착상한 것이다.

즉 아포가 생체내에서 발아함으로써 면역원성이 부여된다고 추측되고 있기 때문이다. 따라서 발육형의 균체성분이 면역원성을 띄운다는 추측이다. 둘째, 혐막성분도 면역원성물질로 중요한 일을 맡아보고 있다는 추측이다. 이 착상은 대부분의 비병원성 탄저균도 생체내에서는 혐막을 생산하기 때문이다. 따라서 이 실험에 사용한 탄저균의 백신재료는 시험관내에서 생체내에서 처럼 혐막을 완성토록 하였다.

셋째, 최근에 알려진 탄저균의 균체외독소인 1,2 및 3 분층은 면역원성 물질로서의 역할이 없거나 크지 않다고 추측하였다. 이를 뒷받침하는 사실로서 비병원

성 탄저균이라 할지라도 그것이 동물체내에서 육할발 때에는 면역원성을 띄우기 때문이다. 이상과 같은 추측을 기초로 하여 시작한 백신재료라 할지라도 그것이 항체형성을 조장하는 adjuvant와 함께 접종되었을때 면역원성을 띄웠음은 매우 흥미있는 사실이라 아니할 수 없다.

이상과 같은 가설을 실험에 옮길수 있게한 l-alanine의 아포형성 억제효과나 NaHCO₃의 혐막형성촉진효과는 매우 가치있는 것이라 믿어진다.

탄저균의 제2차 접종으로 기니픽의 주사부위가 심한 염증내지는 과사반응을 보였는데 이것은 하나의 과민증 현상이라고 믿어지며 이 현상을 최소한으로 감소시키거나 없이 하기 위하여서는 백신제조에 사용하는 탄저균의 선정을 필요로 하는 것이라고 믿어진다.

기종저균의 면역원성은 소에 있어서 매우 양호한 것으로 알려져 있으나 이것이 백테린으로서는 기니픽에 대해 매우 얇은 방어울을 보여준점은 흥미있는 것이라

고 본다.

탄저기종저균의 불활화 혼합백신이 기니픽에서 높은 방어율을 보여주었음은 이 백신이 소에 이용될 수 있다는 것을 암시하여 주고 남음이 있다. 특히 이 백신은 실험동물에서 그 면역원성이 검정될 수 있는 최초의 것이라는 점과 지금까지 사용하고 있는 생균백신을 보다 안전한 불활화 백신으로 대체할 수 있을 뿐더러 나아가서는 탄저와 기종저를 동시에 예방할 수 있다는 점은 이 실험에서 얻어진 커다란 성과라고 믿어진다.

V. 결 론

탄저기종저의 불활화 혼합백신의 기니픽에 있어서의 면역원성 시험을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 탄저균이나 기종저균의 단미 또는 혼합불활화 백신은 기니픽에 대한 면역원성을 조성할 수 없었던 반면에
2. 탄저균이나 기종저균의 단미 또는 혼합불활화 결

합백신은 기니픽에 대한 면역원성을 80~100%의 방어시험성적으로 보여주었다.

이 연구를 수행함에 있어서 협조를 아끼지 않은 농촌진흥청 가축위생연구소 조현주씨와 서울대학교 농과대학 서익수선생께 감사합니다.

VI. 참 고 문 헌

1. Sterne, M. (1946). Avirulent anthrax vaccine. Onderstepoort JI. 21, 41-43
2. Church, B. D. and Halvorson H., and Halvorson, H.O. (1954). Studies on spore germination: its independence from alanine recemese activity. J. Bacterial., 68, 393-399
3. Burdon, K.L. (1956). Useful criteria for the identification of *Bacillus anthracis* and related species. J. Bacteriol. 71, 25-42