

## Baculovirus Vector System에 의해 발현된 재조합 Pseudorabies Virus Major Capsid Protein의 면역원성

충남대학교 수의과대학, <sup>1</sup>수의과학연구소

전무형 · 안동준<sup>1</sup> · 장경수 · 조용성 · 박종현<sup>1</sup> · 송재영<sup>1</sup> · 현방훈<sup>1</sup> · 안수환<sup>1</sup>

=Abstract=

### Immunogenicity of the Recombinant Pseudorabies Virus Major Capsid Protein Expressed by Baculovirus Vector System

Moo-hyung Jun, Dong-jun An<sup>1</sup>, Kyung-soo Chang, Young-sung Cho, Jong-hyeon Park<sup>1</sup>,  
Jae-young Song<sup>1</sup>, Bang-hun Hyun<sup>1</sup> and Soo-hwan An<sup>1</sup>

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

<sup>1</sup>Veterinary Research Institute, Anyang 430-016, Korea

The recombinant pseudorabies virus major capsid protein (rMCP) was produced by expression of the MCP gene in Sf-9 cell using baculovirus transfer vector system. Following evaluation of the immunochemical properties of the rMCP, the immunogenicity of the recombinant subunit proteins were investigated in guinea pig and swine to obtain the preliminary guide line for the subunit vaccine using rMCP and gP50.

It was proved that ultrasonication and 30% ammonium sulfate was most efficient to concentrate and purify the protein. The rMCP was safe in mice, guinea pigs and piglets. In guinea pigs, rMCP mixed with various adjuvants induced substantial degree of serum neutralizing antibody titers, but revealed incomplete protectivity against challenge. In swine, the combination of rMCP and gP50 showed the higher serum neutralizing antibody titers and cellular immune responses than rMCP alone. However, the protectivity was lower in comparison with the commercial gI-deleted inactivated vaccine.

We expect these results to contribute to characterization of MCP gene of Korean isolate of PRV and to utilize as preliminary information for production and evaluation of PRV recombinant subunit vaccines.

**Key Words:** Recombinant Pseudorabies virus MCP, Korean isolate, major capsid protein, immunogenicity, safety.

### 서 론

Pseudorabies (일명; Aujeszky's disease)는 돼지, 소, 개, 고양이, 토끼, 밍크, 마우스, 랫트, 기니픽 그리고 조류를 포함한 광범위한 숙주 영역을 가지며 돼지를 제외한 다른 동물에서는 심한 소양

증과 신경증상을 동반하는 전염병으로 높은 패사율을 나타낸다. 원인체는 *Herpesviridae*의 Alpha herpesvirinae subfamily에 속하는 Pseudorabies virus (PRV)이며 분자량은  $90 \times 10^6$  daltons이고, 핵산은 150kb 정도인 double stranded linear DNA 바이러스로서 162개의 capsomere로 구성된 capsid와 envelope를 가지며 크기는 150-186nm이다

[1, 2, 3].

Pseudorabies에 이환된 돼지는 다른 동물에서 나타나는 특징적인 가려움증은 없으나, 자돈의 높은 폐사율, 비육돈의 심한 호흡기 증상과 성장 저해 및 임신돈에서 유사산 등 번식장애를 수반하고 보독동물이 되기 때문에 본 병으로 기인된 양돈산업의 경제적 손실이 크다 [1,2,3].

국내에서는 1987년 처음 본 병이 보고된 이래 경남, 경기 및 충청지역에서 수주의 바이러스를 분리하였고, 분리주의 병인기전에 대한 연구를 수행하였으며 [4,5], 분리주 유전자에 대해 제한 효소분석을 시도하여 국내 분리주는 Taiwan의 TNL주와 거의 동일하다고 보고한 바 있다 [6]. 또한 표준 Shope주의 gIII 및 gP50 유전자를 클로닝 하고 염기서열을 분석하였고 baculovirus를 이용하여 단백질을 발현시켰다. 그리고 발현된 gIII과 gP50에 대한 면역원성을 기니피과 돼지에서 시험한 결과 면역원성이 있음이 보고되었다 [7,8]. 한편 국내 분리주에서 gX gene을 제거하고  $\beta$ -galactosidase 유전자 재조합백신을 개발하여 야외 감염돈과 백신접종돈을 감별 진단할 수 있는 기법 개발에 대해 연구된 바 있다.

Pseudorabies에 대한 백신으로는 세계 각국에서 특이 유전자 결손 mutant주를 이용한 사독과 약독 생독백신이 개발 응용되고 있으며, 최근에는 subunit vaccine에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 [1,2,3]. 국내에서는 본 병에 오염된 돈군에 한해서 특이 유전자 결손 mutant주를 이용한 백신이 사용되고 있으며, 재조합 subunit vaccine에 대한 연구가 진행중에 있다. 그러나 국내분리주를 이용한 유전자 재조합기법으로 작성된 gIII 및 gP50 항원은 돼지에서 면역원성이 낮다는 문제점이 있으며 이들 항원의 면역원성은 gIII과 gP50을 혼합할 경우 증대될 가능성이 있다고 지적된 바 있다 [19]. 특히 MCP가 세포성 면역

증강시킨다는 Scherba 등 [9]의 보고를 참고해 볼 때, gIII 및 gP50 protein과 MCP를 혼합할 경우 면역원성이 증대될 가능성이 있다.

그러므로 본 연구에서는 baculovirus transfer vector system에 의해 발현된 재조합 PRV MCP의 면역원성을 기니피과 자돈에서 시험하고, 아울러 각종 아쥬반트와 gP50 단백질과의 면역학적 상호관계에 대한 연구를 수행하여 PRV recombinant subunit vaccine 생산에 대한 기초자료를 얻고자 일련의 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재조합 PRV subunit proteins

재조합 PRV MCP는 안 등 [20]의 시험을 통해 baculovirus expression system에서 얻어진 rMCP를 공시하였고, 재조합 PRV gP50은 전 및 안 [19]에 의해 baculovirus expression system에서 발현되고 성상이 확인된 것을 공시하였다.

### 2. 단백질정제농축법

MCP recombinant baculovirus가 감염된 Sf-9 세포로부터 rMCP의 추출은 freezing-thawing 법, ultrasonication (16 $\mu$ , 30sec) 및 NP40 처리법으로 수행하였고, 여러가지 농도의 ammonium sulfate, calcium chloride 및 zinc acetate를 이용하여 농축시켰다 [10]. 단백질의 농도는 Biuret 법으로 측정하였다 [11].

### 3. 동물접종

rMCP의 생체내 안전성을 시험하기 위해 마우스 (20-25g)에 0.5ml씩, 그리고 기니피 (300-350g)에 1.0ml씩 각각 피하 및 복강내에 접종하였고, 자돈 (3-4주령)에는 3.0ml씩을 2두에 피하와 근육내에 각각 접종하여 6주간 관찰하였다. 준비된

Table 1. Experimental design for swine

Groups	Antigens (2mg/ml)	Adjuvants	No.of pig	Immunization		Challenge**
				Primary	Booster	at 4weeks after booster
I	rMCP	Al(OH) <sub>3</sub>	4	3.0ml, im	3.0ml, im	2.0ml im
II	rMCP	Min. Oil	4	"	"	"
III	rMCP-gP50	Al(OH) <sub>3</sub>	4	"	"	"
IV	rMCP-gP50	Min. Oil	4	"	"	"
V	Commercial vaccine <sup>†</sup>	Al(OH) <sub>3</sub>	3	"	"	"
VI	Control	-	3	"	"	"

<sup>†</sup>50-60 days old, male, \*\*PRV(NYJ-1) 10<sup>7.5</sup>TCID<sub>50</sub>/0.2ml, <sup>†</sup>gl-deleted PRV inactivated vaccine (USA)

recombinant subunit antigen의 기니픽에 대한 면역원성을 시험하기 위해 임상적으로 건강한 기니픽 (300-350g) 20수를 선정하여 rMCP 단독항원과 rMCP-gP50 혼합항원을 각각 aluminium hydroxide gel, mineral oil, Aviridin (Pfizer Co)에 혼합하여 1.0ml씩을 3수의 근육내에 각각 접종하였다. 대조군으로는 gI-deleted PRV inactivated vaccine (SmithKline Beecham)을 2주에 1.0ml씩 접종하여 시험하였다.

또한 18두 (50-60일령)의 PRV항체 음성 자돈을 구입하여 Table 1에서 나타낸 바와 같이 시험군을 배치하여 rMCP 단독, rMCP-gP50 혼합항원에 대한 자돈에 대한 면역원성 시험을 수행하였다. 실험기간중 시험돈은 격리돈사에서 표준사양법에 준하여 사육하였으며, 매일 임상관찰을 실시하고 정기적으로 체중을 측정하였다.

#### 4. 가검물채취 및 바이러스 분리

기니픽은 심장 그리고 자돈은 전대정맥으로부터 무균적으로 혈액을 채취하여 헤파린으로 처리된 시험관에 넣은 다음 혈액학적 검사, 바이러스 분리 및 leucocyte adherence inhibition test에 공시하였고, 항체검사를 위해서는 채혈된 혈액을 응고시킨 후 혈청을 분리하여 비동화 (56℃, 30분)한 다음 냉동 (-20℃) 보관하였다가 사용하였다.

평균한 면봉으로 시험돈의 비강, 구강 및 직장으로부터 가검물을 채취한 후  $\alpha$ -MEM (항생제 3배 첨가) 1ml를 가한 스크류캡 시험관에 넣어 실험실로 옮긴 다음 4℃에 보관하였으며, 채취 후 48시간 이내에 세포에 접종하였다.

바이러스 분리는 Hsiung [12]의 방법을 응용하였다. 요약하면, 채취된 가검물에 5배 량의  $\alpha$ -MEM을 가하여 균질화시킨 다음 냉장 원심 (3,000rpm, 30분)하고, 그 상층액을  $\alpha$ -MEM으로 10진 희석한 후 PK-15 cell이 배양된 96 well tissue culture plate (Linbro Scientific., McLean, VA)에 100 $\mu$ l씩 접종하고 5일간 관찰하였다. 그리고 cytopathic effects (CPE)가 일어난 well의 최대 희석 배수를 기점으로하여 50% tissue culture infective dose (TCID<sub>50</sub>)를 Reed 및 Muench 방법으로 산정하였다.

#### 5. 중화항체시험 (virus neutralization test)

Hill 등 [13]의 방법을 응용하여 수행하였다. 상

술하면, 비동화한 혈청을  $\alpha$ -MEM 배지로 2배 계단 희석한 다음 각 시험관에 200TCID<sub>50</sub>/0.2ml의 PRV를 동량 가한 후 CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 PK-15 cell monolayer가 형성된 microplate에서 배지를 제거한 다음 위의 바이러스와 혈청 혼합물 100 $\mu$ l씩을 각 well에 분주하고, CO<sub>2</sub> incubator 내에서 1시간 정치한 후 우태아 혈청이 5% 첨가된  $\alpha$ -MEM 배지를 100 $\mu$ l씩 각 well에 추가 분주하여 배양하면서 CPE를 관찰하였다. 중화항체역가 계산은 바이러스 대조 well에서 95%의 CPE가 일어났을 때에 CPE가 일어나지 않은 희석배수의 역수를 혈청의 중화항체역가로 계산하였다.

#### 6. Leucocyte adherence inhibition (LAI) test

박 등 [14] 및 전 등 [15]의 방법을 응용하여 수행하였다. 요약하면, 헤파린 처리된 시험동물의 말초혈액으로부터 백혈구를 분리하여 RPMI 1640 배지 (Gibco, Grand Island, NY, USA)에 5 × 10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 부유시키고, 이 부유액 100 $\mu$ l에 PRV항원 (1.5mg/ml) [12] 100 $\mu$ l를 가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 혈구계산판에 넣고 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 반응시켰다. 백혈구 수를 계산하고 혈구계산판을 가볍게 수세한 다음 동일한 부위에 부착되어 잔류한 백혈구의 수를 계산하여 다음 공식에 의해 LAI치를 산출하였다.

$$\%LAI = \left( 1 - \frac{\text{mean\% adherence with antigen}}{\text{mean\% adherence with no antigen}} \right) \times 100$$

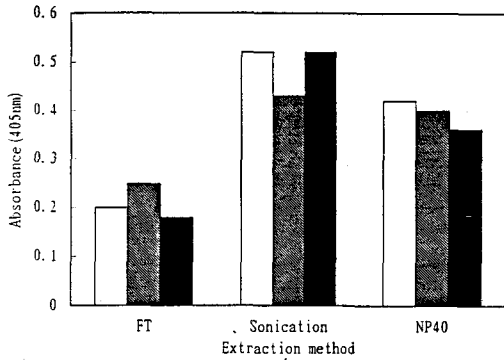
#### 7. 피부시험 (skin test)

지연형 과민반응을 측정하기 위해 피부시험을 실시하였다. 항원은 LAI test에 사용한 PRV 항원을 56℃에서 45분간 처리하고 단백 농도를 1.5mg/ml로 조정된 것을 사용하였다. 이 항원을 0.1ml씩 자돈의 내고부 피내에 접종하였으며, 대조군은  $\alpha$ -MEM을 동일한 방법으로 접종한 후 24시간과 48시간에 각각 접종 부위의 발적증상반응의 직경을 calipers로 측정하였다.

## 결 과

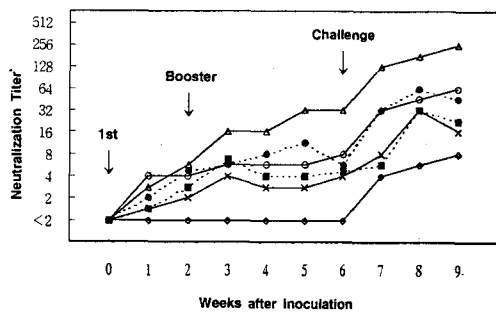
### 1. rMCP 추출 및 농축효과

MCP recombinant baculovirus에 감염된 Sf-9 세포에 대한 rMCP 추출효과를 freezing-thawing, ul-



**Fig. 1.** Yields of total proteins from the MCP recombinant baculovirus-infected Sf-9 cells using various extraction methods. The bar represents the value of each trial.

FT = freezing-thawing, sonication = ultra-sonication treated (16 $\mu$ , 30sec), NP40 = NP40 detergent treatment



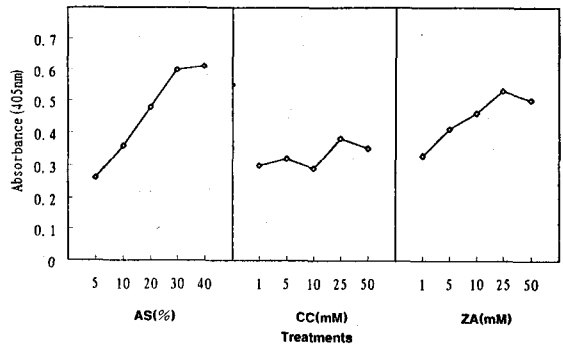
**Fig. 3.** Antibody responses in the swine injected with the recombinant PRV subunit antigens mixed with various adjuvants.

-x- Group I : rMCP with Al(OH)<sub>3</sub>, -■- Group II : rMCP with mineral oil, -○- Group III : MCP-gP50 with Al(OH)<sub>3</sub>, -●- Group IV : rMCP with mineral oil, -△- Group V : Commercial gl-deleted inactivated vaccine, -◇- Group VI : Control, Reciprocal of final dilution Data represent the mean values of each group.

trasonication, NP40 처리법을 이용하여 시험한 바 Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 ultrasonication 처리법이 흡광도 0.43-0.52로 가장 높았고, NP40 처리는 0.36-0.42로 나타났고, freezing-thawing법은 가장 낮았다. 또한 획득된 추출액으로부터 단백질 농축효능을 ammonium sulfate, calcium chloride 및 zinc acetate로 사용하여 시험한 바 (Fig. 2), 30% ammonium sulfate에서 가장 높게 나타났다.

## 2. 실험동물에 대한 안전성

마우스, 기니픽 및 자돈에 대한 rMCP의 안전성



**Fig. 2.** Concentrating effects of rMCP from the recombinant baculovirus-infected Sf-9 cells using various concentration of salts.

AS = ammonium sulfate, CC = calcium chloride, ZA = zinc acetate.

을 시험한 바 모든 접종동물은 6주간 임상관찰에서 특이한 임상소견이 관찰되지 않았다. rMCP 접종 후 4주에 기니픽과 자돈의 중화항체검사를 실시한 바 전자에서는 2-16 그리고 후자에서는 0-8의 중화항체가 인정되었다 (Table 2).

## 3. 기니픽에 대한 면역원성

rMCP 단독 또는 rMCP-gP50 혼합액을 aluminium hydroxide gel, mineral oil 및 Aviridin에 혼합하여 기니픽에 1차 접종한 후 4주째에 중화항체를 측정한 바 (Table 3), rMCP 단독 접종군에서는 mineral oil 사용군에서 4-16으로 높았고, rMCP-gP50 혼합투여군에서는 aluminium hydroxide gel 사용군에서 8-64로 가장 높았다. 4주째에 booster 접종한 다음 2주째에 중화항체를 측정한 바 rMCP-gP50 혼합투여군이 rMCP 단독투여군보다 현저히 높은 항체를 나타내었다. Booster 접종 후 3주째에 강독 PRV를 접종한 후 1주간 관찰한 바 rMCP 단독 투여군에는 임상소견이 관찰되었으나 rMCP-gP50 혼합 투여군에서는 특이 소견이 관찰되지 않았다.

## 4. 자돈접종시험

### 가. 임상병리학적 관찰

rMCP 단독 또는 rMCP-gP50 혼합항원에 Al(OH)<sub>3</sub> 또는 mineral oil를 첨가하여 제조한 시제 백신과 상용 PRV 사독백신을 자돈에 접종한 후 외부 임상증세, 체중변화 및 강독접종후 바이러스 배설상태를 시험한 바 Table 4와 같은 결과를 얻었다. 항원을 접종한 모든 시험군의 자돈은 강

독접종전에는 아무런 특이 임상조건이 없었으며, 강독접종후에는 rMCP 단독접종군에서만 열반응, 신경증세 및 하리가 각각 4두중 2두에서 관찰되었다. 2차 항원접종후 체중변화를 측정할 때 Group I, II, III, IV는 Group VI (대조군)에 비해 약간의 체중감소를 나타내었으며 Al(OH)<sub>3</sub> 보다 mineral oil 사용군에서 감소율이 크게 나타났다. 강독접종후 체중증가율은 상용백신 접종군 (Group V)이 가장 높았고, Group I, II, III, IV는 체중증가율이 낮았으며, 대조군 (Group VI)는 -6.7±1.4로 현저한 체중감소를 보였다. 강독접종후 비침으로부터 바이러스 재분리 시험을 실시한 결과 rMCP 단독접종군 (Group I, II)에서 가장 높았고 (50~75%), rMCP-gP50 접종군 (Group III, IV) 및 상용백신 접종군 (Group V)에서는 비교적 낮았다 (25%).

나. 중화항체반응

위 실험대상 자돈에 대한 항체반응을 중화항체

시험으로 측정할 때 (Fig. 3), Group I 과 II는 1차 접종후 2주째에 0-4였고, booster 접종후에는 2-8의 역가를 보였다. Group III과 IV는 1차 접종후 2주째에 2-8, booster 접종후에는 4-16의 항체역가를 보였다. 상용백신 (Group V)은 1차 접종후 2-8 그리고 booster 접종후에는 16-32의 역가를 나타내었다. Group I, II, III, IV에서 Al(OH)<sub>3</sub> 사용군과 mineral oil 사용군을 비교시 mineral oil 사용군은 유의하게 높은 항체가를 나타내었다.

다. 세포성 면역반응

시험돈군에 대해 항원접종전, 1차 항원접종후 2주 그리고 booster 접종후 1주째에 각각 LAI치를 측정할 때 (Table 5), Group III과 IV는 Group I 과 II에 비해 1차 항원접종후 2주째에 유의하게 높은 LAI치를 나타내었다. 그리고 booster 접종후 항원접종군은 모두 LAI치의 증가를 보였으며, adjuvants간에는 Al(OH)<sub>3</sub> 접종군에 비해 mineral oil 접종군이 높은 경향을 보였으나 유의한

Table 2. Safty of the recombinant MCP

Experimental animal	Inoculum (ml)	Inoculation		Observation period(Wks)	No showing clinical sign	Safety (%)	SN titer**
		Heads	Site				
Mice (20-25g)	0.5	5	IP	6	0	100	ND
	0.5	5	SC	6	0	100	ND
Guinea pigs (300-350g)	1.0	3	IP	6	0	100	2-16
	1.0	3	SC	6	0	100	4-16
Piglets (3-4wks)	3.0	2	SC	6	0	100	2-8
	3.0	2	IM	6	0	100	0-8

\*Protein conc: 2mg/ml, \*\*Examined at 4th weeks post inoculation

Table 3. Immunogenicity of the recombinant subunit antigens mixed with various adjuvants in guinea pigs

Antigens (2mg/ml)	Adjuvants	Inoculation			SN titers		Post** challenge
		No.	Dosage	Site	4th week after 1st injection	2nd week after booster	
rMCP	Al(OH) <sub>3</sub>	3	1.0	im	4- 8	16- 64	1/3
	Mineral oil	3	1.0	im	4-16	16- 32	1/3
	Aviridin	3	1.0	im	2- 8	16- 32	2/3
rMCP-gP50	Al(OH) <sub>3</sub>	3	1.0	im	8-64	32-128	0/3
	Mineral oil	3	1.0	im	8-32	32- 64	0/3
	Aviridin	3	1.0	im	4-32	32- 64	0/3
Commercial vaccine	Al(OH) <sub>3</sub>	2	1.0	im	8-32	64-128	0/3

Al(OH)<sub>3</sub>: 30%, Mineral oil = Span+Tween 80+mineral oil, Aviridin(Pfizer, 1:1): a synthetic lipid, \*gl-deleted inactivated vaccine(USA), \*\*Challenged with PRV at 10<sup>7.5</sup>TCID<sub>50</sub>/0.2ml intranasally, No. showing clinical signs/No. inoculated.

**Table 4.** Clinical responses of the swine inoculated with the recombinant subunit antigens mixed with the various adjuvants

Groups	Antigens (2mg/ml)	Adjuvants	Clinical signs <sup>*</sup>		Weight gain(%)		Virus recovery <sup>**</sup> after challenge(%)		
			Pre-challenge	Post-challenge	1 week after booster	1 week after challenge	2	4	8 day
I	rMCP	Al(OH) <sub>3</sub>	0/4	2/4	22.8±1.9	7.7±1.9	2/4	2/4	0/4
II	"	Mineral oil	0/4	2/4	25.3±2.4	9.4±1.4	3/4	2/4	1/4
III	MCP+GP50	Al(OH) <sub>3</sub>	0/4	0/4	21.4±2.3	16.4±4.1	1/4	0/4	0/4
IV	"	Mineral oil	0/4	0/4	23.7±1.9	17.8±3.9	1/4	1/4	0/4
V	Commercial vaccine	Al(OH) <sub>3</sub>	0/3	0/3	22.7±2.4	18.1±2.4	/3	1/3	0/3
VI	Control	-	0/3	0/3	24.4±2.6	6.7±1.4	2/3	3/3	3/3

<sup>\*</sup>Mainly fever, nervous signs and diarrhea were observed, <sup>\*\*</sup> the nasal swabbing were tested. No. of positive/No. of pigs tested.

**Table 5.** Responses of leucocyte adherence inhibition in the swine inoculated with the recombinant subunit antigens

Groups	Antigens inoculated	LAI(mean% of group±SD)		
		Before injection	2nd week after 1st injection	1st week after booster
I	rMCP+Al(OH) <sub>3</sub>	2.3±1.1	9.4±4.2	19.5±10.7
II	rMCP+m. oil	4.0±1.6	10.9±4.9	18.6± 8.4
III	rMCP-gP50+Al(OH) <sub>3</sub>	3.3±2.0	16.3±9.7 <sup>*</sup>	29.1±10.0 <sup>*</sup>
IV	rMCP-gP50+m. oil	1.8±1.2	17.7±8.9 <sup>*</sup>	31.7±12.1 <sup>*</sup>
V	Commercial vaccine	2.6±1.5	18.6±8.8	29.4±11.4
VI	Control	3.8±1.8	2.6±0.9	4.3± 2.4

<sup>\*</sup>Significant different at p<0.05 (Student's t test)

**Table 6.** Skin test for delayed-type hypersensitivity reaction in the swine inoculated with the recombinant subunit antigens

Groups	Antigens inoculated	No. tested	Inoculation of antigen <sup>*</sup>	Range of skin reaction (mm)	
				24hr	48hr
I	rMCP+Al(OH) <sub>3</sub>	2	0.1ml. id	6.2- 7.8	8.5- 9.2 <sup>**</sup>
II	rMCP+m. oil	2	0.1ml. id	8.7-10.3	9.4-11.2
III	rMCP-gP50+Al(OH) <sub>3</sub>	2	0.1ml. id	9.2-11.4	9.6-12.0
IV	rMCP-gP50+m. oil	2	0.1ml. id	8.6- 9.7	8.2- 9.9
V	Commercial vaccine	2	0.1ml. id	7.6- 8.4	6.9- 9.1
VI	Control	2	0.1ml. id	<1.0	<1.0

<sup>\*</sup>Concentration of antigen : 1mg/ml, <sup>\*\*</sup>Data represent the men of triplicate measures of each animal.

차이가 인정되지 않았다 (p>0.05).

Booster 접종후 3주째에 시험돈의 세포성 면역 반응을 skin test로 시험한 바 Table 6과 같은 결과를 얻었다. Group I 및 II는 24시간에는 6.2-10.3mm 그리고 48시간에는 8.5-11.2mm의 반응범위가 관찰되었으며 Group III과 IV는 24시간에는 8.

6-11.4mm, 48시간에는 8.2-12.0mm의 반응범위가 관찰되어 Group I 및 II에 비해 높은 반응치를 보였다. 또한 adjuvant간에는 유의한 차이가 인정되지 않았으며, Group V 즉 상용백신접종군은 subunit 항원접종군에 비해 낮은 반응치를 보였다. 대조군은 반응직경이 접종후 24시간 및 48시

간에 모두 1.0mm 이하였다.

## 고 찰

국내 이환자돈에서 분리한 Pseudorabies virus 양산주의 major capsid protein 유전자를 클론닝하고 baculovirus transfer vector system과 곤충세포 Sf-9를 이용하여 recombinant MCP를 생산하고 그 성상을 생화학적 및 면역학적 기법으로 시험하여 rMCP는 142kDa로 시험관내에서 항체양성 혈청과 특이 면역반응이 있음이 보고된 바 있다 [20]. 또한 PRV MCP는 동물체내에서 PRV envelope glycoprotein (GP)에 비해 강한 세포성 면역반응을 유발하는 것으로 알려져 있다 [21]. 그럼으로 국내 분리주에서 얻어진 rMCP의 생체내 면역원성과 gP50항원과 혼합사용시 일어나는 면역반응에 대해 시험하였다.

rMCP의 면역원성을 기니픽시스템에서 시험한 바 rMCP 단독으로 접종시에는 MCP-gP50 혼합항원으로 접종한 경우보다 증화항체역가가 낮았고 강독바이러스 공격에 대한 방어효과도 낮게 나타났다 (Table 3). 또한 자돈 접종시험에서도 이와 유사한 결과가 관찰되었다. 즉 rMCP 단독접종군은 rMCP-gP50 혼합항원 접종군에 비해 증화항체가 지속적으로 낮게 관찰되었다 (Fig. 3). 또한 강독접종시 비좁으로부터 바이러스 회수율도 rMCP 단독투여군은 높게 나타났고, 반면에 혼합항원 투여군에서는 낮았다 (Table 4). 기니픽과 자돈에 대한 시험결과를 종합해 볼 때 rMCP는 증화항체를 유발하는 항원성이 gP50을 이용한 혼합항원에 비해 약하다는 사실이 입증되었으며 이런 결과는 gP계열 항원이 PRV 항체생성에 중요한 역할을 한다고 보고한 Thomsen 등 [16] 및 송 등 [7]의 연구결과와 유사한 것이라 사료된다. 또한 사용한 adjuvant의 효과를 비교해 보면 기니픽에서는 adjuvant 간에 현저한 차이가 인정되지 않았으나 자돈에서는 mineral oil이 Al(OH)<sub>3</sub> 보다 다소 높은 증화항체역가를 보였다. 그러나 LAI test와 skin test를 이용한 세포면역반응시험에서는 adjuvant 간에 유의한 차이가 인정되지 않았으며 기니픽과 자돈에서 강독공격에 대한 방어효과와 항원접종후 바이러스 분비율에도 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 그럼으로 adjuvant의 사용은 공시한 항원의 면역원성을 높여 주지만, adjuvant 간에는 체액성 및 세포성 면

역반응에 특이한 차이가 없다고 사료되었다.

또한 rMCP 제제의 기니픽과 자돈접종시험 결과 얻어진 증화항체역가의 변동은 공시한 상용백신 (gI-deleted PRV inactivated vaccine)보다 지속적으로 2-4배 (200-400%) 낮게 관찰되었고, 국내에서 전 등 [15]이 whole PRV virus를 이용하여 생산한 불활화백신보다 현저히 낮았다. 특히 rMCP 단독접종군에서는 강독공격후 PRV 특이 임상증세가 4두중 2두에서 관찰되어 rMCP 단독으로는 항체와 세포성 면역반응이 있음에도 불구하고 백신효과가 없다는 사실이 입증되었다.

Scherba 등 [9], Davison과 Scott [17], Yamada 등 [18]은 Herpesviridae의 MCP는 체액성 면역보다 세포성 면역을 유발하는 항원으로 역할이 크다고 지적한 바 있으며 본 실험에서도 이와 유사한 성적이 얻어졌다. 그럼으로 rMCP는 gP계열 subunit 백신과 혼합해서 사용함으로써 백신의 면역원성을 높여주는 효과가 있으리라고 생각된다. 본 연구에서 얻어진 결과는 recombinant PRV subunit 항원의 면역원성을 이해하고 subunit type 백신개발을 위한 기초자료가 될 것으로 사료된다. 또한 PRV subunit 항원과 adjuvant 및 immunomodulator와의 상호연관성에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

Pseudorabies virus (PRV), Yangsan주의 major capsid protein (MCP) gene에 대한 recombinant MCP (rMCP) 항원의 기니픽과 자돈에 대한 면역원성을 밝혀 유전자 재조합 PRV subunit vaccine 생산에 대한 기초자료를 획득하기 위해 일련의 실험을 수행한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MCP recombinant baculovirus가 감염된 Sf-9 세포로부터 rMCP 추출효과는 초음파처리법과 30% ammonium sulfate 처리시 가장 높았다.

2. rMCP를 마우스, 기니픽 및 자돈에 접종시 특이 임상소견이 관찰되지 않았으며 안전하였다.

3. 기니픽에 대한 면역원성 시험결과 rMCP 단독접종군은 rMCP-gP50 혼합접종군에 비해 증화항체역가가 낮았으며, 상용백신에 비해 두군 모두 2-4배의 낮은 항체가를 보였으며, 강독공격후에는 rMCP 단독접종군에서 특이 임상소견이 관찰되었으며 adjuvants 간에는 유의한 차이가 없었다.

4. 자돈접종시험결과 rMCP 단독접종군은 rMCP-gP50 혼합접종군에 비해 중화항체가 낮았으며, 강독접종시 rMCP 단독접종군에서 4두 중 2두에서 특이 임상소견이 관찰되었고 현저한 체중감소가 나타났으며 3군 중 가장 높은 바이러스 배설이 인정되었다. rMCP-gP50 혼합접종군은 rMCP 접종군보다 높은 면역원성을 보였으나 상용백신보다는 2-4배 정도 낮았다. leucocyte adherence inhibition 및 skin test에 의한 세포면역 반응시험에서는 rMCP 단독접종군과 rMCP-gP50 혼합접종군이 상용백신보다 높은 반응을 나타내었다.

#### 감사의 글

이 연구는 1994년도 한국과학재단 연구비 지원에 의한 결과임. 과제번호: 941-0600-032-2.

#### 참 고 문 헌

- Baskerville A, McFerran JB and Dow D: Aujeszky's disease in pigs. *Vet Bulletin* 43: 465-480, 1973.
- Gillespie JH and Timony JF: The domestic animals. Cornell Univ Press. USA 8th ed: 615-622, 1988.
- Wittmann G and Rziha HJ: Aujeszky's disease (pseudorabies) in pigs, Herpes diseases of cattle, horses and pigs. edited by Wittmann G, Klower Academic Publisher, 231-325, 1989.
- 전무형, 조성환, 안수환, 박성국, 윤석민, 하용공: 이환자돈으로부터 오제스키 바이러스의 분리와 생물학적 성상. *대한 수의사회지* 24: 163-171, 1988.
- 이중복, 안수환, 김병한, 송재영, 김용희, 설동섭: 돼지오제스키병에 관한 연구. I. 감염자돈으로부터 원인체 분리 및 동정. *대한수의학회지* 28: 99-103, 1988.
- 김병한, 이중복, 송영재, 김용희, 전무형, 안수환: 국내돼지에서 분리한 오제스키병에 관한 연구. II. 국내 돼지에서 분리한 오제스키 바이러스의 DNA제한 효소 분석. *농사시험논문집* 30: 37-41, 1988.
- 송재영, 이중복, 현방훈, 박종현, 권창희, 안수환: 국내에서 분리된 돼지 오제스키 바이러스 gIII 유전자의 baculovirus에서 발현 및 이용. *대한수의학회지* 31: 1991.
- 현방훈: 국내 분리 오제스키병 바이러스 gP50 유전자의 cloning과 expression에 관한 연구. *건국대학교 석사학위논문*, 1992.
- Scherba G, Turek JJ and Gustafson DP: Pseudorabies virus nucleocapsid antigen for skin testing in swine. *J Clin Microbiol* 17: 539-544, 1983.
- Choi CS, Molitor TW and Joo HS: Inhibition of porcine parvovirus replication by empty virus particles. *Arch Virol* 96: 75-87, 1987.
- Sonnenwirth AC and Jarett L: Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis. The CV Morby Co, St Louis, 1980.
- Hsiung GD: Diagnostic Virology. Yale Univ Pres, USA, 3rd ed, 13-34, 1982.
- Hill HT, Crandell RA, Kanitz CL, Mcadaragh JP, Seawright GL, Solorzano RF and Stewart WC: Recommended minimum, standards for diagnostic tests employed in the diagnosis of pseudorabies (Aujeszky's disease). *Proc Annu Meet Am Assoc Vet Lab Diagn* 378-390, 1977.
- 박성국, 전무형, 이현준, 민원기, 윤용덕: Leucocyte adherence inhibition test를 이용 Mycobacterium 감작 기니피그의 세포면역반응의 특이성. *대한수의학회지* 29: 283-289, 1989.
- 전무형, 장치훈: 국내에서 분리된 Aujeszky's disease virus의 면역원성. II. Oil adjuvants를 가한 ADV 불활화 항원의 자돈에 대한 면역원성. *대한바이러스 학회지* 22: 27-36, 1992.
- Thomsen DR, Petrovskis EA, Miller AM, Wardley RC and Post LE: Expression of the pseudorabies virus glycoprotein gP50 in the baculovirus vector in insect cells. 12th Int. Herpesvirus Workshop, Univ of Pennsylvania, Philadelphia, USA, 1990.
- Davison AJ and Scott JE: DNA sequence of major capsid protein gene of herpes simplex virus type I. *J Gen Virol* 67:2279-2286, 1986.
- Yamada S, Imada T, Watanabe W, Honda Y, Nakajima I, Ijima S, Shinmizu Y and Sekikawa K: Nucleotide sequence and transcriptional mapping of major capsid protein gene of pseudorabies virus. *Virology* 185:56-65, 1991.
- Jun MH and An SH: Characterization of recombinant gIII and gP50 proteins of Korean



isolate of Aujeszky's disease virus. Proc of International Symposium on Aujeszky's disease virus, Hungary, 29-31 Aug. p53, 1993.

20. 안동준, 전무형, 송재영, 박종현, 현방훈, 장경수, 안수환: Pseudorabies virus의 major capsid protein 유전자의 클로닝과 baculovirus

vector system에 의한 발현. 대한바이러스학회지 26: 35-46, 1996.

21. Scherba G, Turek JJ and Gustafson DP: Pseudorabies virus nucleocapsid antigen for skin testing in swine. J Clin Microbiol 17:539-544, 1983.