

## 돼지 오제스키바이러스 재조합단백질 gp50, gIII와 $\alpha$ -ADV을 이용한 Quil A-ISCOMs 접종시 백혈구아군 분포율에 관한 연구

문진산 · 박용호\* · 정석찬 · 구복경 · 이성일 · 현방훈 · 안수환 · W.C.Davis\*\*

농촌진흥청 수의과학연구소 · 서울대학교 수의과대학\*

미국 워싱턴 주립대학교 수의과대학\*\*

(1995년 11월 24일 접수)

### Effect on lymphocyte subpopulations of Quil A-ISCOMs with recombinant Aujeszky's disease virus(ADV) gp50, gIII and $\alpha$ -ADV protein

Jin-san Moon, Yong-ho Park\*, Suk-chan Jung, Bok-gyeong Ku,  
Sung-il Lee, Bang-hun Hyun, Soo-hwan An, W.C. Davis\*\*

Veterinary Research Institute, RDA, Anyang, Korea · Seoul National University\*

Washington State University, Pullman, USA\*\*

(Received Nov 24, 1995)

**Abstract** : An effective candidate subunit vaccine was prepared by using the immunostimulating complexes(ISCOMs) with Quil A and recombinant protein(gp50, gIII and inactive  $\alpha$ -ADV) Aujeszky's disease virus(ADV). The weaned pigs were twice immunized with a ADV-ISCOMs, and followed by intramuscular challenge with  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> ADV(strain Yangsan). The unvaccinated pigs were also challenged with same dose of ADV. At 5 days after challenge, the control pigs have developed ADV clinical signs. Whereas, the vaccinated pigs protected them from ADV-induced acute symptoms and death. Also, to identify the lymphocyte subpopulation in peripheral blood with pigs from ADV-ISCOMs vaccinated and control group, lymphocyte reacted with a panel of monoclonal antibodies which are specific to swine leukocyte surface antigens and assayed by the flow cytometry. MHC class I, CD2, CD8, N cells, CD11a, and CD45 antigen positive cells were decreased after inoculating virulent ADV Yangsan strain in control group. The data indicated that ISCOMs technique was useful in ADV subunit vaccine preparation and demonstrated the importance of gp50, gIII as a component of ADV vaccine.

---

**Key words** : pig, Aujeszky's disease virus(ADV), Immunostimulating complexes(ISCOMs), Quil A, subunit vaccine,

## 서 론

돼지 오제스키병(Aujeszky's disease)은 자돈의 높은 폐사율, 비육돈의 심한 호흡기 증상과 성장저하, 임신돈에서의 유사산 등의 번식장애를 수반함으로써 양돈 산업에 큰 경제적 손실을 주는 가장 중요한 질병중 하나로서 원인체는 Herpesviridae의 Alpha herpesvirina subfamily에 속하는 Suid herpes I 인 Aujeszky's disease virus(ADV)이다<sup>1-5</sup>.

우리나라에서는 1987년 경상남도 양산군에서 처음 발생된 이래, 이 병의 박멸대책을 도입하여 더 이상의 확산을 방지하고자 노력하고 있으나 근절되고 있지 않은 실정이다<sup>6,8</sup>. 돼지 오제스키병 예방을 위해서 세계 각국에서는 현재까지 사독이나 순화 바이러스를 이용한 백신접종이 주가 되고 있으나 이들 백신은 다른 herpesvirus와 같이 잠복성 감염이 가능하기 때문에 이 질병의 완전퇴치에는 많은 어려움이 있다. 최근에는 유전자조각 기법에 의한 subunit 백신이 개발됨으로써 안전성과 면역원성을 증진시키며, 방역상의 감별진단의 문제점들을 극복할 수 있기 때문에 이 분야에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>9,10,11</sup>.

돼지 오제스키바이러스에 존재하는 당단백질은 바이러스 감염, 항체 형성, 병원성과 이 항원을 이용한 백신의 가능성 등으로 매우 중요한 성분으로 인식되고 있다. 1986년 Petrovskis 등<sup>10</sup>은 특이 방어 관련항원으로 gI, gIII 및 gp50 등 3종의 당단백질로 보고하였으며, 1991년 Shigeki<sup>11</sup>는 gIII에 대한 유전자를 재조합한 후 baculovirus에 삽입, 발현시켜, 발현한 당단백질을 mouse에 접종하여 얻은 면역혈청으로 조직배양상의 ADV에 대한 중화능을 보고한 바 있다. 그러나 이러한 정제 단백질은 생체에서 가장 중요한 세포성 면역(cell mediated immunity) 유도에는 많은 문제점이 나타나고 있다. 따라서 효과적인 면역방어를 위해서는 적정한 항원 뿐만 아니라 지속적인 방어 면역을 부여하기 위한 부형제 개발의 필요성이 대두되어 최근에 면역증강부형제(adjuvant) 또는 비특이 면역조절제를 개발함으로써 면역증진효과를 개선하려고 하고 있다<sup>12,13</sup>. 최근에 면역자극복합체(immune-stimulating complexes, ISCOMs)이 높은 체액성 및 세포성 면역반응의 증가로 인하여 envelope가 있는 바이러스에서 추출한 glycoprotein을 운반하는 system으로 널리 이용되고 있다. Quil

A는 가장 잘 알려진 식물성 유래의 부형제로서 1925년 Romon이 diphtheria toxoid에 대해서 면역증진효과를 최초로 보고한 이래, 수의 분야에서 1951년 Espinet에 의해 foot-and-mouth disease 백신에서 최초로 사용되었다. 현재에는 정제된 추출물이 feline leukemia virus, canine parvovirus, equine influenza virus의 백신제도시 부형제로 시판되고 있으며, Trypanosoma cruzi, Schistomansonnia와 같은 기생충성 질병방어에도 매우 효과적이었다고 보고하였다<sup>12,14,15</sup>. Quil A의 부형제로서의 정확한 작용기전은 알려져 있지 않지만, 세포막 성분 또는 비용해성 항원의 소수성 부분과 잘 결합하여 micelle 형태를 취함으로써 탐식세포의 탐식작용을 향상시키고 국소 림프질의 림프구 이동상황을 변화시킴으로써 면역반응을 향상시키는 것으로 보고되고 있다<sup>14,16</sup>. 한편 최근에 개발된 백혈구 표면 항원에 특이적인 단클론항체와 레이저를 부착한 형광세포 유출장치(flow cytometry)의 개발은 각종 병원체에 대한 생체내 면역계의 역할과 기능에 대해서 세포수준에서의 연구가 진행되게 하였다. 즉, 질병발현, 백신접종, 공격접종 등에 따른 면역세포의 변화를 확인함으로써 숙주의 건강 및 질병상태 등 정밀한 세포성 면역기전을 확인하여 전신 면역체계를 연구하는데 널리 응용되어지고 있다<sup>17</sup>. Bolin 등<sup>18</sup>은 소에 bovine viral diarrhea virus를 인공감염 후 혈액에서 B 림프구와 T 림프구의 수 및 백분율을 조사한 결과 접종후 7일간에 걸쳐 B 림프구와 T림프구 모두에서 숫적 감소를 초래하였다고 보고하였다. 또한 국내에서도 황 등<sup>19</sup>이 돼지콜레라 바이러스를 접종후 백혈구 표면항원에 특이적인 단클론항체와 flow cytometry를 이용하여 돼지콜레라의 발병기전을 말초혈액의 림프구수준에서 조사한 결과, MHC class II, CD1, CD2, CD4, CD8, sIgM 양성 세포수가 접종 2일부터 폐사시까지 계속해서 감소를 나타냈다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 돼지 오제스키병 국내분리주에 대한 gp50, gIII 단백질과 inactivated ADV과 Quil A를 이용한 면역자극복합체(ISCOMs)을 작성함으로써 효과적인 subunit 백신을 개발하고, 이 백신의 접종에 따른 방어효과 및 림프구아군별 분포율을 백혈구 표면 항원에 특이적인 각종 단클론항체와 flow cytometry를 이용하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

**바이러스주 및 항원** : 사용 바이러스로는 1987년 경남 양산지역에서 분리된 ADV Yangsan 주로서 PK-15 (Pocine Kidney cell line)에 배양 증식시킨 것을 사용하였다. 백신에 사용한 항원으로는 수의학연구소 바이러스과에서 개발한 ADV의 중요 방어 항원인 재조합단백질 gp50과 gIII, 야의 감염주와 백신주를 구별하기 위해 gene을 deletion시킨 inactivated recombinant ADV( $\gamma$ -ADV)를 사용하였다.

**Quil A를 이용한 ADV-ISCOMs 제조** : Quil A(Sigma)를 이용한 ADV-ISCOMs 작성은 Morrein 등<sup>12</sup>의 standard technique에 의해서 실시하였으며, 재조합단백질과 Quil A의 농도 비율은 1:10으로 하였다. 최종 작성된 ISCOMs은 0.45ul로 filter한 다음 micelle의 형성유무를 전자현미경으로 확인한 후 사용할때까지 -70°C에서 보관하였다.

**실험동물** : 혈청학적으로 오제스키병에 음성반응을 보인 20-30일령의 이유자돈 8두를 암수 구별없이 선발하여 외부와 격리된 곳에서 대조군, 백신군 각각 4두씩을 실험에 사용하였다.

**백신 및 공격 접종** : 작성된 ADV-ISCOMs을 이유자돈 4두에 각각 2ml씩 근육주사하고, 4주 후 booster를 실시하였다. ADV 공격접종은 booster후 12일째에 ADV YS Strain  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>의 역가를 가진 바이러스 부유액을 대조군 및 백신군에 각각 2ml씩 근육 주사하였다.

**백혈구 분리** : 말초혈액 백혈구(peripheral blood leukocyte ; PBL)는 Davis 등<sup>20</sup>의 방법에 따라 돼지의 전대정맥으로부터 채혈한 혈액과 항응고제인 acid citrate dextrose(ACD ; sodium citrate 22.0g, citric acid 7.3g, dextrose 24.5g, D.W 1,000ml)용액을 3:1의 비율로 혼합하여 잘 섞은 다음, 1,500rpm에서 30분간 원심분리하였다. Buffy coat 층을 채취한 후 37°C로 가온한 0.87% tris-buffered ammonium chloride(tris-NH<sub>4</sub>Cl ; 0.01M tris, pH 7.2)용액과 혼합하여 37°C 항온수조에 넣어 약 5분간 적혈구를 용혈시켰다. 다시 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 버린 후 pellet을 phosphate buffered saline(PBS ; sodium chloride 7.6g,

disodium phosphate 1.2g, monosodium phosphate 0.1g, monopotassium phosphate 0.2g, pH 7.2)과 ACD용액을 9:1로 혼합한 PBS-ACD buffer로 3회 이상 원심 세척하였다. 마지막 원심후 pellet은 1.0ml의 PBS로 부유시킨 다음, tryphan blue exclusion technique에 의해 생존 세포수를 측정된 후 최종농도가  $1 \times 10^7$ /ml 정도로 조절하여 이용하였다.

**단클론항체** : 돼지 백혈구 아군별 분포율을 조사하기 위하여 MHC class I, MHC class II, CD2, CD4, CD8 및 surface IgM, Non T/Non B, CD 11a, CD45, granulocyte와 momocyte에 특이적인 백혈구 표면 단클론항체 등 총 11종을 실험에 사용하였다(Table 1).

**형광세포 유출장치 분석** : Davis 등<sup>20</sup>의 방법에 준해서 conical bottom microplate의 한 well당 단클론항체 50 $\mu$ l(15 $\mu$ g/ml)와  $1 \times 10^7$ /ml의 50 $\mu$ l 릫프구를 첨가한 후 4°C에서 30분간 감작시킨 다음, 4°C의 first washing buffer(PBS 450ml, ACD 50ml, 20% NaN<sub>3</sub>, 5ml, gamma globulin free horse serum 10ml, 250mM EDTA 20ml, 0.5% phenol red 1ml)로 3회 원심(2,000rpm, 3분, 4°C) 세척한 후 상층액을 버리고 밀부분에 모인 백혈구의 pellet을 plate 또는 vortex mixer를 이용하여 부유시켰다. 부유된 백혈구는 secondary antibody로 단일 염색을 하기 위하여 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM antibody (Caltag Lab, Inc, U.S.A)를 200배 희석한 후 각 well에 100 $\mu$ l씩 첨가하였다. 이를 다시 4°C에서 30분간 감작시킨 다음, 4°C의 secondary washing buffer (first washing buffer 성분중 horse serum만 제거한 것)로 3회 원심 세척한 다음, 2% PBS-formalin(38% formalin 20ml, PBS 980ml)용액을 200 $\mu$ l/well 되게 가하여 고정시킨 후 염색이 끝난 세포들은 검사 때까지 모두 냉암소(4°C)에 보관하였다. 염색이 완료된 재료는 flow cytometry를 이용하여 총 2,000개 이상의 세포를 검사하여 양성반응 세포수를 측정하였으며, 측정과 자료분석은 Becton Dickinson사의 Consort 32 컴퓨터 및 Lysis program을 이용하여 실시하였다.

**바이러스 분리 및 중화항체가 조사** : 바이러스 분리 및 중화항체 실험은 Tsuda & Yosuke<sup>5</sup>의 방법

을 변형하여 실시하였다. 즉, 돼지의 폐, 뇌, 비장, 편도를 무균적으로 채취하여 EMEM(Eagle's minimum essential medium)에 10배 유제를 만들고 2,000rpm에서 15분간 원심 분리한 후 각각의 상층액을 단층 배양된 초대 돼지신장세포(PK 15)에 접종하고 37°C에서 1시간 흡착시켰다. 이것을 PBS로 2회 세척 후 EMEM에 5% 소혈청을 첨가한 유지배지를 가지고 37°C에서 배양하면서 세포변성효과(CPE)를 관찰하였다.

또한 혈청 중화항체 실험은 200 TCID<sub>50</sub>/ml의 ADV 50ul와 혈청희석액(56°C 30분간 비동화 후 2진법으로 희석함)를 동량 혼합한 뒤 37°C에서 24시간 감작하였으며, 이와같이 감작이 끝난 재료를 PK 15 cell을 2×10<sup>5</sup>/ml되게 조정된 다음, 100ul를 첨가하여 5일간 세포변성효과를 관찰하였다.

## 결 과

Quil A를 이용한 제조합 오제스키 항원에 대한 ISCOMs를 작성한 다음, 전자현미경으로 관찰한 결과 cage와 같은 micelle 구조가 형성된 것을 확인하였으며, 크기는 약 50~100 nm인 것으로 조사 되었다(Fig 1).

ADV-ISCOMs 접종전 후에 백혈구아군 분포율을 비교 조사한 결과, 백신접종 후에는 백신군이 대조군에 비해서 MHC class I(93.8% & 90.2%), CD2(43.7% & 30.1%), CD8(23.2% & 13.4%), CD45(73.5% & 64.9%) 양성세포의 분포율이 증가하였다(Fig 2, Table 2).

백신군과 대조군에 대한 ADV를 공격접종 후 임상증상을 관찰한 결과, 대조군은 공격접종 2일부터 체온상승, 식욕결핍, 활동성 저하 및 침울 등의 임상증상을 나타낸 뒤, 5일째에 기침, 콧물 등 호흡기 증상을 나타내었다. 또한 7일째에는 근육진전, 보행이상 등 신경증상을 보이기 시작하였으며 9일째부터 견좌자세 및 후구마비를 보인 뒤 12일째에 2두가 폐사하였으며 나머지도 비슷한 증상을 나타내었다. 그러나 백신접종군 4두는 실험종료시까지 아무런 임상증상을 나타내지 않고 모두 생존하였다(Table 3).

백신군과 대조군에 대한 ADV를 공격접종한 후 5일과 12일째의 백혈구아군분포율을 조사한 결과, 5일째에 백신군이 대조군에 비해서 MHC class II, sIgM의 분포율이 다소 높은 것으로 나타났다. 그러나 접종

12일째에는 백신군이 MHC class I 및 CD2, CD8, N cell, CD11a, CD45 양성세포 분포율이 대조군에 비해서 높게 나타났다. 특히 MHC class I(96.1% & 59.1%)과 CD8(51.3% & 33.4%)는 대조군과는 큰 차이를 나타내었다(Fig 3, Table 4).

ADV를 공격접종 후 12일째에 폐사된 대조군을 비롯하여 백신군의 폐, 뇌, 비장, 편도의 장기로 부터 바이러스 분리와 중화항체를 조사한 결과 대조군의 폐에서는 모든 개체에서 바이러스가 분리되었고 뇌, 비장, 편도에서는 2번 개체를 제외하고는 모두 바이러스가 분리되었다. 한편 백신군에서는 모든 장기에서 바이러스가 분리되지 않았다(Table 5). 또한 중화항체는 백신군이 256배 이상의 높은 항체가를, 대조군에서는 2배 이하의 낮은 항체가를 나타내었다.

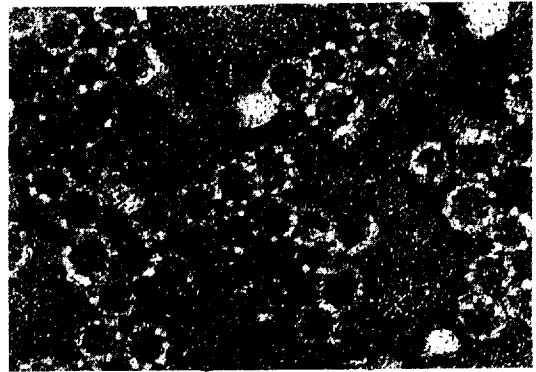
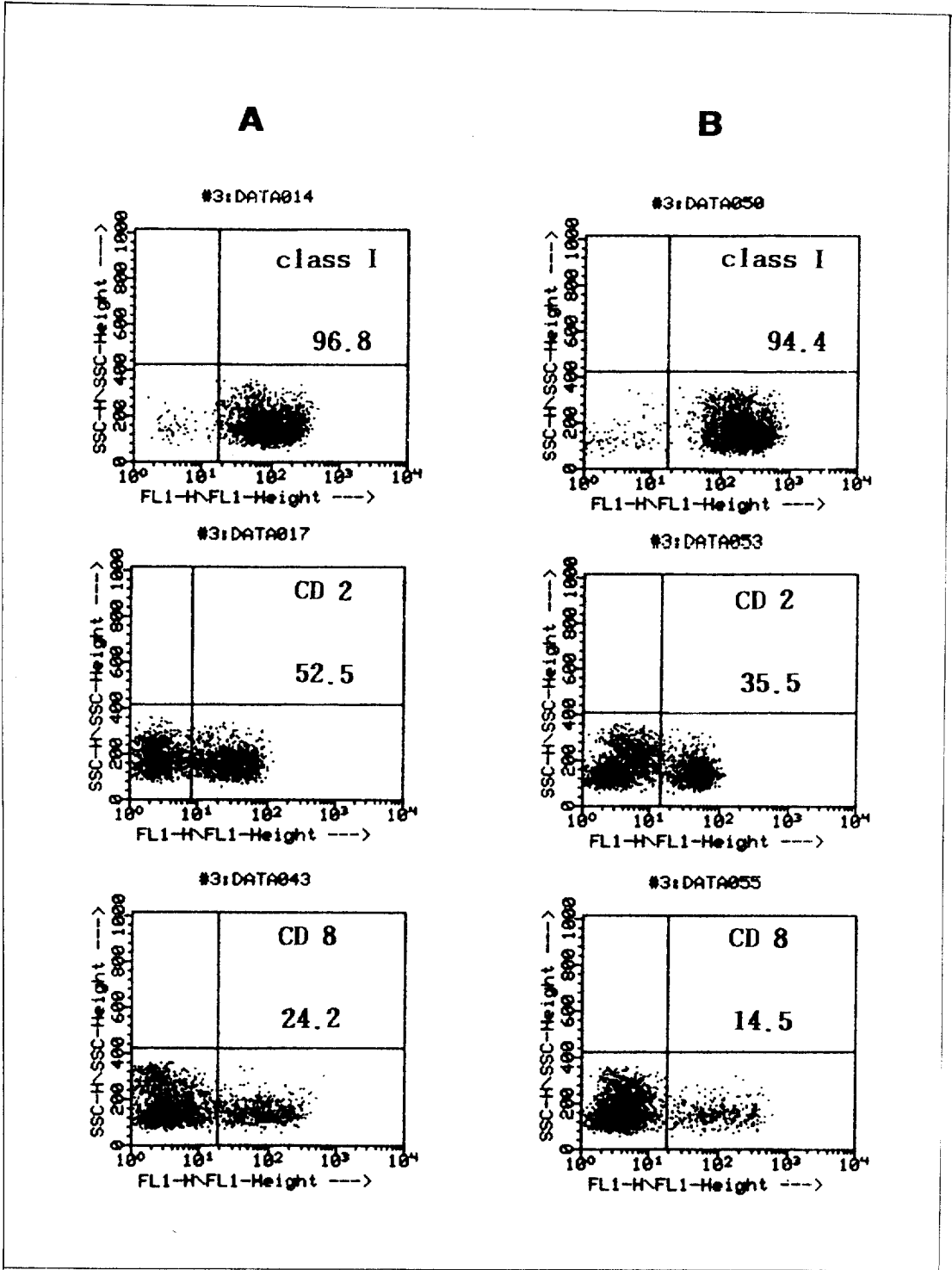


Fig 1. Electron micrograph of Quil A ISCOMs stained with phosphomolybdate. (×130,000).

## 고 찰

생화학, 분자생물학, 면역학의 발달에 따른 순수 정제 항원으로 제조된 subunit 백신이 개발에 이르게 되었으며 이 subunit 백신은 안전성이 우수하고, 불필요한 단백질에 기인되는 항원 경쟁성이 적고, 면역에 요구되는 부위에 적용할 수 있으며 감염동물과 백신한 동물을 구별할 수 있는 등 여러가지 장점이 있다<sup>21,22</sup>.

부형제중 Quil A는 다양한 항원과 결합할 수 있으며, cholesterol, phosphatidyl choline과의 자발적인 공유결합에 의해서 micelle를 형성함으로써 MHC-class I, II 제한 T 세포에 대한 면역원성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다<sup>12,13</sup>. 본 실험에서는 ADV의 주요 방어 항원인 재조합단백질 gp50과 gIII, 야외감염주와 백신주를 구



**Fig 2.** Representative dot plot profile of peripheral blood lymphocyte with ADV-ISCOMs vaccinated (A) and control pigs (B) using monoclonal antibodies specifically reactive with MHC class I, CD2, CD8 antigen at 12 days after second vaccination.

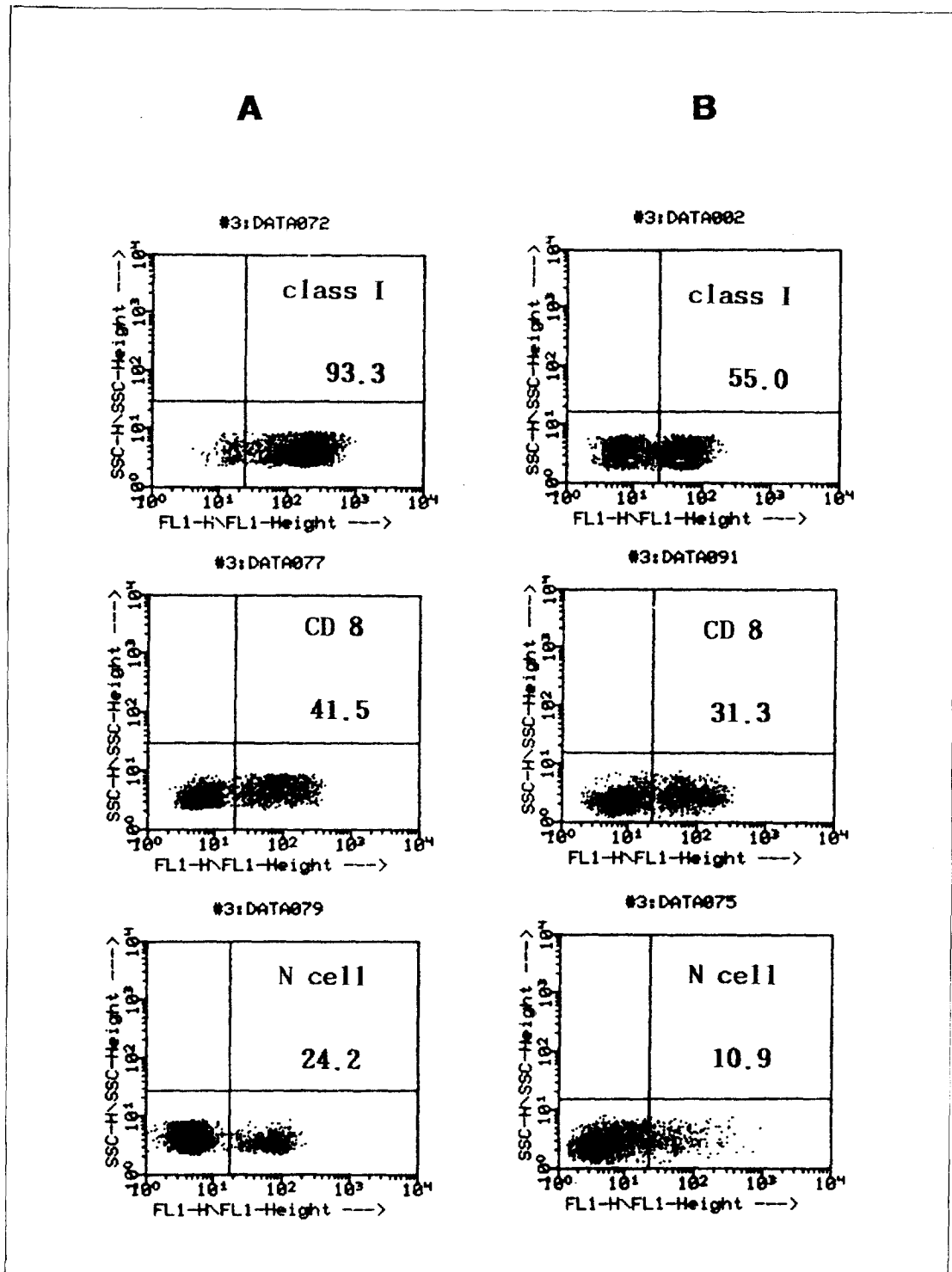


Fig 3. Representative dot plot profile of peripheral blood lymphocyte with ADV-ISCOMs vaccinated (A) and control pigs (B) using monoclonal antibodies specifically reactive with MHC class I, CD8, N cell at 12 days after ADV challenge.

**Table 1.** Panel of monoclonal antibodies specifically reactive with swine leukocyte differentiation antigens

Specificity of Monoclonal Antibodies	Monoclonal Antibodies	Cell types	References
MHC class I	PT85A	All nucleated cell	Davis et al <sup>20</sup>
MHC class II	H42A	Antigen presenting cell	"
PoCD2	TH81A5	"	Hammerberg & Schurig <sup>21</sup>
PoCD4	MSA4	T cells	"
PoCD8	PT168A	T h/i cells	"
sIgM	PT81B	T c/s cells	Davis et al <sup>20</sup>
$\delta\gamma$ TCR $\oplus$ N	PIg45A	B cells	Davis et al <sup>20</sup>
PoCD11a	PT79A	N cells	"

**Table 2.** Expression level of the leukocyte differentiation antigens in peripheral blood with pigs from ADV-ISCOMs vaccinated and control group at 12 days after second vaccination

Specificity of MoAbs	Positive(% $\pm$ SD)			
	before vaccination		12 days after second vaccination	
	Vaccinated (n=4)	Control (n=4)	Vaccinated (n=4)	Control (n=4)
CONTROL	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.5
MHC-class I	90.2 $\pm$ 9.8	93.4 $\pm$ 3.2	93.8 $\pm$ 7.0	90.2 $\pm$ 4.5
MHC-class II (DQ)	13.8 $\pm$ 4.7	15.8 $\pm$ 4.2	17.6 $\pm$ 4.5	16.7 $\pm$ 7.5
MHC-class II (DR)	12.5 $\pm$ 3.2	13.3 $\pm$ 4.4	16.2 $\pm$ 3.2	13.7 $\pm$ 7.6
Po CD 2	61.6 $\pm$ 6.8	65.5 $\pm$ 5.3	43.7 $\pm$ 6.2	30.1 $\pm$ 4.0
Po CD 4	14.9 $\pm$ 3.6	12.9 $\pm$ 3.7	18.8 $\pm$ 2.1	16.0 $\pm$ 1.5
Po CD 8	46.3 $\pm$ 5.4	53.9 $\pm$ 2.4	23.2 $\pm$ 5.9	13.4 $\pm$ 3.0
sIg M	8.4 $\pm$ 1.8	7.3 $\pm$ 2.4	10.2 $\pm$ 2.2	7.3 $\pm$ 3.8
$\delta\gamma$ TCR $\oplus$ N	11.5 $\pm$ 3.2	8.3 $\pm$ 4.3	19.0 $\pm$ 5.2	23.9 $\pm$ 3.5
Po CD 11a	70.8 $\pm$ 9.2	76.7 $\pm$ 5.7	79.3 $\pm$ 1.7	75.4 $\pm$ 9.1
Po CD 45	65.2 $\pm$ 6.2	67.4 $\pm$ 6.1	73.5 $\pm$ 3.8	64.9 $\pm$ 9.7
G+M	7.0 $\pm$ 3.8	5.0 $\pm$ 3.2	13.2 $\pm$ 3.5	15.2 $\pm$ 8.3

**Table 3.** Clinical signs of pigs from ADV-ISCOMs vaccinated and control group after ADV challenge

Group	Days of ADV challenge							
	0	1	3	5	7	9	11	13
Control (n=4)	Normal	anorectic febrile nasal discharge snorer		cough ataxia	muscle tremor posterior Paralysis		incordination	death
Vaccinated (n=4)	Normal							

별하기 위해 gene을 deletion시킨 inactivated recombinant  $\alpha$ -ADV와 Quil A를 이용하여 ISCOMs을 작성한 다음, 전자현미경으로 관찰한 결과 cage와 같은 micelle을 관찰할 수 있었고, 크기는 약 50-100 nm인 것으로 확인되었다. 이는 Tsuda와 Yosuke<sup>5</sup>이 Quil A와 ADV

glycoprotein gII에 대한 ISCOMs 35-40 nm 정도의 honey-comb-shaped 구조를 보인 결과에 비추어 볼 때 약간 크지만 형태는 유사하였다.

ADV는 비강점막부위에서 일차 증식한 다음 편도, 상부기도를 거쳐 중추신경계와 하부호흡기를 침투하

**Table 4.** Changes of leucocyte subpopulations in peripheral blood of pigs from ADV-ISCOMs vaccinated and control group at 5, 12 days after ADV inoculation.

Specificity of MoAbs	Positive(% ± SD)			
	Days after ADV Inoculation			
	5 days		12 days	
	Vaccinated (n=4)	Control (n=4)	Vaccinated (n=4)	Control (n=4)
CONTROL	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0.3	0.7 ± 0.5
MHC-class I	94.1 ± 8.2	95.6 ± 2.2	96.1 ± 4.0	59.1 ± 1.3
MHC-class II (DQ)	17.5 ± 5.1	8.7 ± 3.3	13.2 ± 3.5	12.7 ± 4.0
MHC-class II (DR)	16.2 ± 5.4	9.6 ± 4.4	17.7 ± 3.5	10.1 ± 5.3
Po CD 2	46.5 ± 11.0	48.9 ± 6.2	62.4 ± 13.5	51.3 ± 5.4
Po CD 4	16.1 ± 3.3	15.2 ± 1.6	12.8 ± 4.2	16.3 ± 4.5
Po CD 8	33.2 ± 8.5	36.0 ± 4.7	51.3 ± 8.7	33.4 ± 9.6
s Ig M	9.3 ± 4.0	3.1 ± 1.7	4.9 ± 2.2	7.5 ± 3.4
δγ TCR⊕N	19.3 ± 4.8	26.8 ± 4.8	17.2 ± 4.6	8.9 ± 2.5
Po CD 11a	86.3 ± 2.0	82.9 ± 2.0	79.12 ± 1.9	65.2 ± 2.5
Po CD 45	80.2 ± 4.3	86.2 ± 4.3	86.21 ± 2.5	56.5 ± 8.9
G+M	12.0 ± 4.8	6.7 ± 2.57	2.1 ± 0.8	3.7 ± 0.9

**Table 5.** Virus isolation and neutralizing antibody titer of pigs from ADV-ISCOMs vaccinated and control group at 12 days after ADV inoculation.

Groups	pig					Neutralizing antibody titer
	No.	lung	brain	spleen	tonsil	
Vaccinated	1	-	-	-	-	>256
	2	-	-	-	-	>256
	3	-	-	-	-	>256
	4	-	-	-	-	>256
Control	1	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>1</sup>	<2
	2	10 <sup>-1</sup>	-	-	-	<2
	3	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>	<2
	4		* N.T			

\* N. T : Not test

며, 이 과정에서 ADV는 림프절을 거치면서 국소 및 전신 면역세포의 구조 및 기능에 큰 변화를 주어 질병을 발현한다. 또한 질병의 방어와 회복시 NK 세포와 interferon 등의 비특이 면역반응과 체액성 및 세포성 면역반응이 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>9</sup>. 따라서 본 실험에서는 세포수준에서의 면역체계의 변화를 규명하기 위하여 ADV-ISCOMs 백신 및 공격접종시 말초혈액에 대한 백혈구아군별 분포율을 조사하였던 바, cytotoxic T 림프구 활성화능력의 제한을 주는 MHC class

I molecule과 모든 T 림프구가 발현하는 CD2 발현 세포의 분포율이 대조군에 비해서 ADV-ISCOMs 백신군에서 높게 나타났다. 또한 CD8 항원 소유의 cytotoxic/suppressor T 림프구와 모든 백혈구의 adhesion molecule로 알려진 CD45 발현세포도 백신시 증가하였다. 이와같은 결과는 Mowat 등<sup>13</sup>이 보고한 생체에서 ISCOMs 이 지연성 면역반응 및 T 세포 매개성 면역반응을 유도하는데 있어서 매우 효과적이었다는 결과를 확인시켜 주었으며 특히 MHC class I 제한 cytotoxic T 림프구를



자극시켰다는 보고와 비슷한 결과를 나타내었다.

한편 백신 후 공격접종에 따른 MHC class I 및 class II molecule을 발현하는 세포의 분포율을 조사한 결과, MHC class I 항원을 소유하는 세포의 분포율이 공격접종 5일째에는 백신군과 대조군이 각각 94.1%와 95.6%을 나타내었으나, 공격접종 12일째에는 백신군(96.1%)에 비해서 대조군(59.1%)이 매우 낮은 것으로 나타났다. 이것은 Munoro와 Bright<sup>23</sup>가 숙주세포에 바이러스가 감염되면 세포표면에 존재하는 MHC class I 항원이 변형을 일으키게 되고 이렇게 변형된 세포를 cytotoxic T 세포가 nonself 로 인식하여 파괴하므로 질병발현에 따른 변화를 나타낸다는 사실에 비추어 볼 때 MHC class I molecule이 바이러스 감염시 세포성 면역기전을 밝힐 수 있는 매우 중요할 것으로 사료된다<sup>24,25</sup>.

또한 면역반응에서 매우 중추적인 역할을 하는 T 림프구에 대한 분포율을 조사한 결과, 모든 성숙 T 세포가 소유하고 있는 CD2 항원에 대한 양성율이 공격접종 12일째에 백신군 62.4%, 대조군 51.3%로 나타났다. T 림프구중 CD4 양성세포인 helper/inducer T 림프구에 대한 분포율은 공격접종 후 서로 비슷한 결과를 나타내었다. 그러나 CD8<sup>+</sup> T 림프구의 분포율은 2차 백신 후 12일째에 백신군이 23.2%, 대조군이 13.4%를 나타내었다. 그후 공격접종 5일째에는 백신군과 대조군에서 각각 33.2%와 36.0%로 서로 비슷하였지만 12일째에는 백신군이 51.3%로 대조군 33.4%에 비해서 매우 높게 나타났다. 이와같은 결과는 Chinsakchai & Moliter<sup>9</sup>의 ADV에 활성화된 림프구가 초기방어에 매우 중요하며, gIII와 gp50이 혈청학적으로 ADV에 양성반응을 보인 돼지의 T 림프구의 증식을 유도하는 중요항원으로 보고한 성적에 비추어 볼 때 또한 Janeway & Jones<sup>26</sup>와 Kaufmann<sup>27</sup>이 CD8 양성세포 즉, cytotoxic T 림프구는 helper T 림프구에서 분비되는 IL-2와 MHC-class I 복합체에 의해 활성화되며, 이렇게 활성화된 CD8 세포는 바이러스 항원과 밀착된 MHC class I 항원을 감지함으로써 표적세포(target cell)에 직접 또는 간접적으로 작용하여 용해시켜 제거함으로써 바이러스 감염시 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 사실에 비추어 볼 때 ADV 방어에 있어서도 cytotoxic T 림프구가 매우 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

최근 그 기능과 역할에 있어서 광범위한 연구가 집중되고 있는 N 세포에 대한 양성율에 있어서도 공격

접종 12일째에 백신군이 17.2%로 대조군 8.9%에 비해서 2배정도 높은 것으로 나타났다. 이와같은 결과는 Chinsakchai & Moliter<sup>9</sup>가 ADV에 대한 면역기전에서 감염초기에 NK 세포와 interferon의 비특이적인 면역반응이 관여한다는 사실에 비추어 볼 때 또한 Herberman 등<sup>28</sup>이 N 림프구는 이 세포의 대다수를 차지하는 NK 세포와 항체의존성 세포매개성 세포독성세포(ADCC)들로 구성되어 있으며 이 세포는 종양과 바이러스성 발현세포에 대한 숙주방어의 제일선에서 중요한 역할을 한다는 보고에 비추어 볼 때 N 세포가 돼지 오제스키병 방어에도 매우 중요할 것으로 사료된다.

또한 모든 성숙 B 세포가 가지고 있는 sIgM에 대해서는 공격접종 후 5일째에는 백신군이(9.3%) 대조군(3.1%)에 비해서 높은 분포율을 나타냈는데 접종 12일째는 오히려 대조군이 약간 높은 분포율을 나타내었다. 또한 MHC class II에 있어서는 예방접종시에는 별다른 차이를 나타나지 않았으나 공격접종 5일째에 대조군에 비해서 백신군이 좀 더 높은 분포율을 나타내었으나 12일째에는 비슷한 분포율을 나타내었다. 이는 황등<sup>19</sup>이 돼지콜레라를 접종후 림프구아군별 분포율을 조사한 결과 MHC class II, sIgM 양성세포수가 접종 2일부터 폐사시까지 계속해서 감소를 나타냈다고 보고한 결과와 약간의 차이를 보였다. 이러한 차이는 접종한 바이러스 균주 및 접종량, 돼지의 연령 및 건강상태, 사양조건의 차이로 추측된다.

한편 Carlsson 등<sup>29</sup>이 임신 면양에 대한 bovine virus diarrhoea, Trudel 등<sup>30</sup>이 mouse에서 respiratory syncytial virus, Weijer 등<sup>31</sup>이 feline leukaemia virus에 대한 ISCOMs이 방어효과에서 매우 효과적이었다는 보고에 비추어 볼 때, 본 실험에서의 결과는 ADV-ISCOMs이 T 세포 매개성 면역반응을 유도하는데 있어서 매우 효과적이었다는 결과를 확인시켜 주었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 돼지 오제스키 바이러스에 대한 재조합단백질과 부형제로 Quil A 를 이용한 ISCOMs를 백신시 생체에서 세포성 면역반응에서 매우 중요한 역할을 하는 MHC class I 및 CD2, CD8, CD45 발현 림프구를 활성화함으로써 ADV에 대한 공격접종에 따른 방어효과도 매우 효과적인 것으로 조사되었다. 앞으로 면역보강제별 체액성 및 세포성 면역증강효과를 비교 조사하고, 돼지 오제스키병 방어에 세포성 및 체액성면역과의 관계를 다양한 방법들에 의해

서 연구되어져야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

돼지 오제스키병 국내분리주의 gp50과 gIII 재조합 단백질과 inactivated ADV를 Quil A와 함께 ISCOMs을 작성하고, 작성된 ISCOMs를 돼지에 접종한 후 백혈구 표면 항원에 특이적인 각종 단백질항체와 flow cytometry를 이용하여 림프구 아군별 분포율과 방어효과를 조사한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 오제스키 재조합단백질에 대한 ISCOMs를 작성하여 50-100nm 크기의 cage와 같은 micelle이 형성됨을 전자현미경으로 확인 되었다.

2. ADV-ISCOMs 접종시 MHC class I, CD2, CD8, CD45 항원을 소유하는 세포의 분포율이 증가하였다.

3. ADV-ISCOMs 백신군의 방어효과는 대조군에서 ADV를 공격접종한 후 2일부터 체온상승, 식욕결핍, 활동성 저하 및 침울 등의 증상을 나타낸 뒤 5일째에 호흡기 증상을, 7일째에는 근육진전 등 신경증상을 보인 뒤 12일째에 2두가 폐사되기 시작하였으나 백신군 4두는 실험 종료시까지 아무런 임상증상을 나타내지 않고 모두 생존하여 방어효과가 인정되었다.

4. ADV-ISCOMs 백신군과 대조군에 대한 공격접종에 따른 5일과 12일째에 백혈구아군별 분포율을 비교 조사한 결과, 공격접종 후 5일째에는 백신군이 MHC class II, sIgM 소유세포가 높게 나타났으며, 12일째에는 MHC class I 및 CD2, CD8, N cell, CD11a, CD45 항원 소유 세포의 분포율이 높게 나타났다. 특히 MHC class I 및 CD8 소유세포의 분포율이 대조군에 비해서 큰 차이를 나타내었다.

5. 공격접종 후 12일째에 폐, 뇌, 비장, 편도의 장기로부터 바이러스를 분리한 결과, 백신군에서는 모든 장기에서 바이러스가 분리되지 않았으나, 대조군에서는 모두 바이러스가 분리되었으며, 혈중 중화항체는 백신군이 256배 이상의 높은 항체를 나타내었고, 대조군에서는 2배 이하의 낮은 항체를 나타내었다.

## 참 고 문 헌

1. Andries K, Pensaert MB, Vandeputte J. Effect of experimental infection with ADV on pigs with mat-

ernal immunity from vaccinated sows. *Am J Vet Res*, 39 : 1282~1289, 1984.

2. Ben-Porat T, Lonis B, Kaplan AS. Further characterization of a population of defective, interfering pseudorabies virions. *virology*, 65 : 179~186, 1975.

3. Corner AH. Pathology of experimental Aujeszky's disease in piglets. *Res Vet Sci*, 6 : 337~343, 1965.

4. Donaldson AI, Wardley RC, Martin S, et al. Experimental Aujeszky's disease in pigs, excretion, survival and transmission of the virus. *Vet Res*, 19 : 490~494, 1983.

5. Tsuda T, Sugimura T, Murakami Y. Evaluation of glycoprotein gII ISCOMs subunit vaccine for pseudorabies in pig. *Vaccine*, 9 : 648~652, 1991.

6. 안수환, 권창희, 이중복, 등. 단크론항체를 이용한 돼지 가성 광견병 진단법 개발에 관한 연구. 대한바이러스학회지, 17 : 45~50, 1987.

7. 이중복, 안수환, 김병한, 등. 돼지 오제스키병에 관한 연구. 1. 감염자돈으로부터 원인균 분리 및 동정, 대한수의사회지, 28 : 99~103, 1988.

8. 전무형, 조성환, 안수환, 등. 이환자돈으로부터 오제스키바이러스의 분리와 생물학적 성상, 대한수의사회지, 24 : 163, 1988.

9. Chinsakchai S, Molitor TW. Immunology of pseudorabies virus infection in swine. *Vet Immunol Immunopathol*, 43 : 107~116, 1994.

10. Petrovskis EA, Timmins JG, Post LE. Use gtl1 isolate genes for two pseudorabies virus glycoprotein with homology to herpes simplex virus and varicella zoster virus glycoproteins. *J Virol*, 60 : 185~193, 1986.

11. Shigeki I. Foreign gene expression by baculovirus vector.(Japan) *Bull Natl Inst Anim Health*, 96 : 85~90, 1991.

12. Morein B, Sundouist B, Hoglund S, et al. ISCOM. a novel structure for antigenic presentation of membrane protein from enveloped viruses. *Nature*, 308 : 457, 1984.

13. Mowat AM, Donachie AM, Reid G, et al. ISCOMs containing QuilA and proteinantigen prime class I MHC-restricted T lymphocytes in vivo and are im-

- munogenic by the oral route. *Immunology*, 72 : 317~322, 1991.
14. Dalsgaard K. The saponin adjuvant Quil A. *Vaccine*, 3 : 155, 1985.
  15. Peters AR. Vaccines for veterinary application. London boston:Butterworth Heinemann Ltd, 298~299, 1993.
  16. Bumford R. Relative adjuvant efficacy of Al(OH<sub>3</sub>) and saponin is related to the immunogenicity of the antigen. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 75 : 280~281, 1984.
  17. Parks DR, Herzenberg LA. Flowcytometry and fluorescence-activated cell sorting. *Fundamental Immunol 2nd eds Raven press Ltd New York*, 29 : 781, 1989.
  18. Bolin SR, McClurkin AW, Coria MF. Effects of bovine viral diarrhea virus on the percentages and absolute numbers of circulating B and T lymphocytes in cattle. *Am J Vet Res*, 46 : 884~886, 1985.
  19. 황의경, 김재훈, 윤순식, 등. 돼지 콜레라 바이러스 접종이 돼지 혈액의 림프구 아군별 분포율에 미치는 영향. 농업과학논문집, 36 : 576~586, 1994.
  20. Davis WC, Marusic S, Lewin HA, et al. The development and analysis of species specific and cross reactive monoclonal antibodies to leukocyte differentiation antigens and antigens of the major histocompatibility complex for use in the study of the immune system in cattle and other species. *Vet Immunol Immunopathol*, 15 : 337~376, 1987.
  21. Larryfeldman R, Frazer J, Jean JH, et al. The evaluation of a lectin agarose based subunit vaccine and complementary diagnostic antigen for Aujeszky's disease in the pig. *Vet Microbiol*, 9 : 35~51, 1984.
  22. Maes RK, Schutz JC. Evaluation in swine of a subunit vaccine against pseudorabies. *Am J Vet Res*, 44 : 123~125, 1984.
  23. Munro A, Bright S. Products of the MHC and their relationship to the immune response. *Nature*, 264 : 145~152, 1976.
  24. Falk K, Rotzschke O, Rammensee HG. Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele specific T cell epitope forecast. *J Exp Med*, 174 : 425~434, 1991.
  25. Rammensee HG, Falk K, Rotzschke O. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol*, 11 : 213~244, 1993.
  26. Janeway CA, Jones B, Hayday A. Specificity and function of T cells bearing receptors. *Immunol Today*, 9 : 73~76, 1988.
  27. Kaufmann SHE. Immunity against intracellular bacteria : Biological effector functions and antigen specificity of T lymphocytes. *CurrTop Microbiol Immunol*, 198 : 141~176, 1988.
  28. Herberman RB. Natural killer(NK) cells and their possible roles in resistance against disease. *Clin Immunol Rev*, 1 : 1~65, 1981.
  29. Carlsson U, Alenius S, Suudquist B. Protective effect of an ISCOM BVDV vaccine against an experimental BVDV infection in vaccinated and non-vaccinated pregnant ewes. *Vaccine*, 9 : 577~580, 1991.
  30. Trudel M, Nadon F, Seguin O, et al. Initiation of cytotoxic T-cell response and protection of Balb/c mice by vaccination with an experimental ISCOMs respiratory syncytial virus subunit vaccine. *Vaccine*, 10 : 107~112, 1992.
  31. Weijer K, Pfauth A, Van Herwijnen R, et al. Induction of feline leukaemia virus-neutralizing antibodies by immunization with synthetic peptides derived from the FeLV env gene. *Vaccine*, 11 : 946~956, 1993.
  32. Hammerberg C, Schurig GG. Characterization of Monoclonal antibodies directed against swine leukocyte. *Vet Immunol Immunopathol*, 11 : 107~121, 1986.