

## 진드기 백신 개발을 위한 기초연구(I)

- 수용성 항원에 대한 면역반응에 관하여 -

정우석 · 강승원 · 최은진 · 윤용덕

수의과학연구소 기생충과  
(1996년 3월 27일 접수)

### Studies on the development of the tick (*Haemaphysalis longicornis*)-vaccine (I)

- Immune responses on the crude soluble -

Woo-seog Jeong, Seung-won Kang, Eun-jin Choi, Yong-dhuk Yoon

National Veterinary Research Institute  
(Received Mar 27, 1996)

**Abstract** : *Haemaphysalis longicornis* is the common cattle tick of great economic importance in Korea. Chemical control using dips or sprays has been the traditional method of attempting to kill these ticks during the infestation period. However, the presence of resistant forms to chemical, the rising costs of acaricides and environmental problems have made it almost impossible to use these chemicals on a regular basis according to the pest problem.

For this reason, vaccination against ticks and breeding for host resistance against ticks are being studied.

In order to determine the common proteins and antigens according to developmental stages, SDS-PAGE and western blotting were performed. In SDS-PAGE 103.3kD and 98.3kD proteins were observed as common proteins, and these proteins were observed as common antigens in western blotting.

Unimmunized rabbits were infested three times with *H longicornis*. The weight of the second and the third engorged ticks were 0.153g and 0.104g respectively. This weight is 69% and 47% of the first engorged ticks weight respectively.

Immunized rabbits by adult ticks antigen and control were infested with *H longicornis*. The control taked 3-4 days to fully engorge, but the immunized rabbits taked about 7 days. So adult tick antigen may be effective to render the immunity to host.

## 서 론

진드기는 흡혈성 외부기생충으로 theileriosis, babesiosis, anaplasmosis 등의 매개체이며 또한 마비와 창상을 일으켜 경제적 손실을 입히게 되므로 가축에 있어서 매우 중요한 해충이다.

전세계적으로 연간 약 5조 6천억원의 경제적 손실을 추산하고 있으며 국내에서는 약 800억원의 손해를 예상하고 있다<sup>2</sup>. 따라서 진드기 구제는 일차적으로 진드기 매개 질병방제를 목표로 하고 있지만 진드기 자체로 인한 피해는 증체량 및 산유량의 감소 등을 들 수 있으나 대개는 눈에 잘 띄지 않기 때문에 축주로부터 무시되는 경향이 있다.

진드기의 구제는 숙주에 붙어 있을 때가 가장 효과적이지만 여러 숙주를 거치면서 생활사를 마치는 종류에 있어서는 흡혈을 하는 며칠동안을 제외하고는 대부분을 숙주에서 떨어져 지내기 때문에 살충제를 사용하여 동물을 약욕시키거나 만연지역에 살포하는 화학적 방제법이 그동안 많이 사용되어왔고<sup>1</sup> 상당한 효과를 거둔 경우도 있었다.

그러나 살충제를 사용하는 화학적 방제법의 경우 진드기의 흡혈기간이나 활동기간 등의 시기를 잘 맞추어야 하며, 과도한 살포로 인한 환경문제와 내성을 갖는 종류의 발생과 경제적으로도 부담이 된다는 단점이 있다<sup>1</sup>.

이러한 이유 등으로 진드기 구제를 위한 다른 방법으로 진드기 백신에 대한 연구가 시작되었다.

진드기 백신개발을 위한 시도로는 가축을 적은 수의 진드기에 노출시킴으로써 자연면역을 유도하는 방법<sup>3,11</sup>, soluble antigen을 투여하는 방법<sup>7</sup> 그리고 진드기 장표피세포에 결합되어있는 당단백질을 항원으로 사용하는 방법 등이 연구되어 왔다<sup>5,8,9,12,14,15</sup>. 이 중에서 자연면역을 유도하는 방법과 soluble antigen을 이용하는 방법으로는 소에 있어서 면역반응을 자극시키기는 하지만 진드기로부터 소를 보호하지는 못하였다<sup>7,13</sup>.

반면에 Willadsen은 1 숙주성 진드기인 *Boophilus microplus*의 장표피세포로부터 방어능력이 뛰어난 항원을 분리해 내었다<sup>14,15</sup>. 그리고 이 항원 단백질의 아미노산 서열과 DNA 염기서열을 밝히고 이를 바탕으로 재조합 단백질 백신을 만들었으며<sup>8</sup>, 야의 적용실험에서도 우수한 결과를 얻었다<sup>9</sup>. 이러한 Willadsen의 실험결과는 진드기가 숙주와 직접 접촉하는 부위로부터 항원을 분리하려던 시도와는 다른 결과이었다<sup>12</sup>. 진드기 장표피세포에서 분리

한 당단백질에 대하여 생성된 숙주의 IgG만으로도 진드기의 장표피세포에 치명적인 영향을 끼치며 면역된 숙주의 피를 흡혈한 진드기는 장표피세포가 용해되고 따라서 진드기의 무게와 생식력의 감퇴로 개체수가 줄게 된다<sup>5</sup>.

본 실험은 진드기 매개질환의 근본원인인 진드기 자체에 대한 백신개발을 목표로 하여 국내에 가장 많이 서식하고 있는 3숙주성 진드기인 *Haemaphysalis longicornis*를 대상으로 이들의 각 단계별 특이항원부위를 찾아내고 아울러 공통항원부위를 밝혀내어 백신개발을 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

항원의 제조 : 진드기 성충 암수 300마리를 lysing buffer (0.1M Phenylmethylsulfonylfluoride, 65000U Trypsin inhibitor, 0.5% NP-40)를 넣고, 마쇄한 다음 1시간 방치후 원심분리(1500rpm, 30min)하였다. 상등액을 취하여 초음파 마쇄(1min, 3회)한 다음 1시간 방치후 다시 원심분리(15000rpm, 20min)의 과정을 거쳐 상등액만을 취하여 3일간 투석한 후 -70℃에서 보관하였다.

정제항원액을 TCA(Trichloroacetic acid) precipitation 법으로 농축하고, BCA(Bicinchoninic acid, Pierce) 법으로 단백질의 양을 측정하였다.

약충에 대해서도 상기와 같은 방법으로 항원을 정제하였다.

항체의 제조 : 항체를 얻기 위하여 토끼 2마리에 정제된 성충항원 1ml과 동량의 complete Freund's adjuvant와 혼합하여 피하로 1ml씩 접종한 다음, incomplete Freund's adjuvant와 혼합하여 10일 간격으로 2차례 접종하고 마지막으로 항원 0.6ml과 PBS 0.4ml을 혼합하여 근육으로 접종한 후 충분히 역가가 올랐을 때 전체혈하였다.

SDS-PAGE 및 Western blotting : 전기영동은 Laemmli<sup>6</sup>의 방법에 따라 separating gel과 stacking gel이 각각 10%와 3%가 되도록 만들었다. protein은 각 well 당 50μl씩을 loading하여 70 Volt에서 12시간동안 running하였고, 염색은 coomassie blue로 하였다.

Western blotting은 전기영동이 끝난 gel을 nitrocellulose paper에 80 Volt에서 1시간 동안 transfer를 하였다. N.C paper를 blocking solution [3% BSA in 0.1M TBS, 0.05% Tween 20]에 상온에서 2시간 방치한 후 TBS로 3회 세척하였다. 1차 항체(1:100)와 상온에서 1시간 반응시킨 후

다시 TBS로 3회 세척하고 peroxidase-conjugated goat antibody to rabbit IgG(1 : 500)와 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 3회 세척후 발색을 하였으며, 발색을 위한 기질은 4-chloro-1-naphthol과 diaminobenzidine을 사용하였다.

**진드기의 공격 방어 실험** : 면역된 토끼와 대조군에 각각 진드기 성충 50마리씩을 공격접종하고 포혈 후 탈락한 진드기의 마리수를 시간별로 확인하였다.

**진드기 자연획득면역실험** : 면역시키지 않은 토끼에 3회 진드기를 접종하여 포혈후 낙하한 진드기의 무게를 측정함으로써 숙주의 진드기에 대한 자연획득면역반응을 조사하였다.

## 결 과

진드기 백신 개발을 위한 기초자료로 사용하기 위한 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

진드기로 부터 적출한 순수 protein을 BCA법으로 정량한 결과 1.0~1.2mg/ml이었다.

SDS-PAGE결과 성충의 경우 14kD, 98.3kD와 103.3kD에서 3개의 주 bands와 40kD, 55kD, 69kD에서 수개의 작은 band가 관찰되었으며(Fig 1), 약충에서는 75kD, 98.3kD와 103.3kD에서 3개의 주 bands와 80kD 부근에

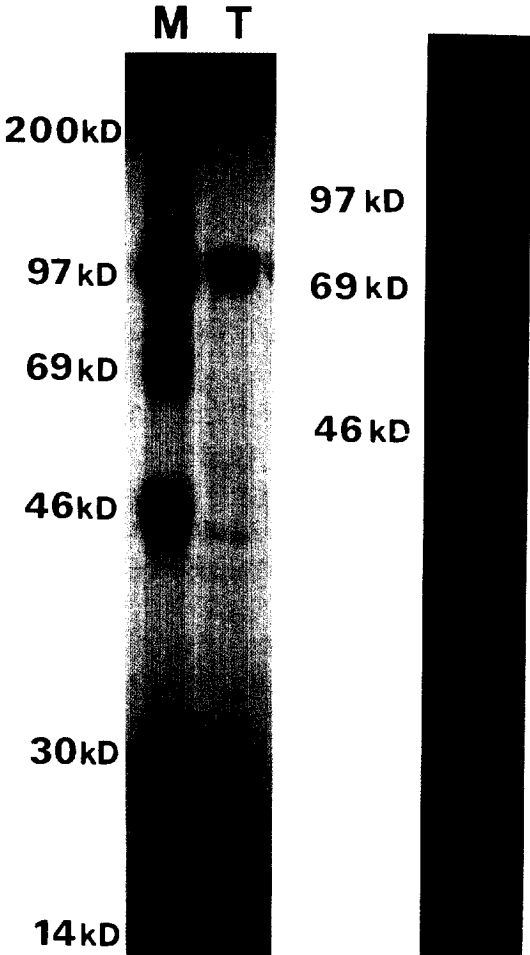


Fig 1. SDS-PAGE pattern of adult ticks.  
M : Marker T : Adult tick

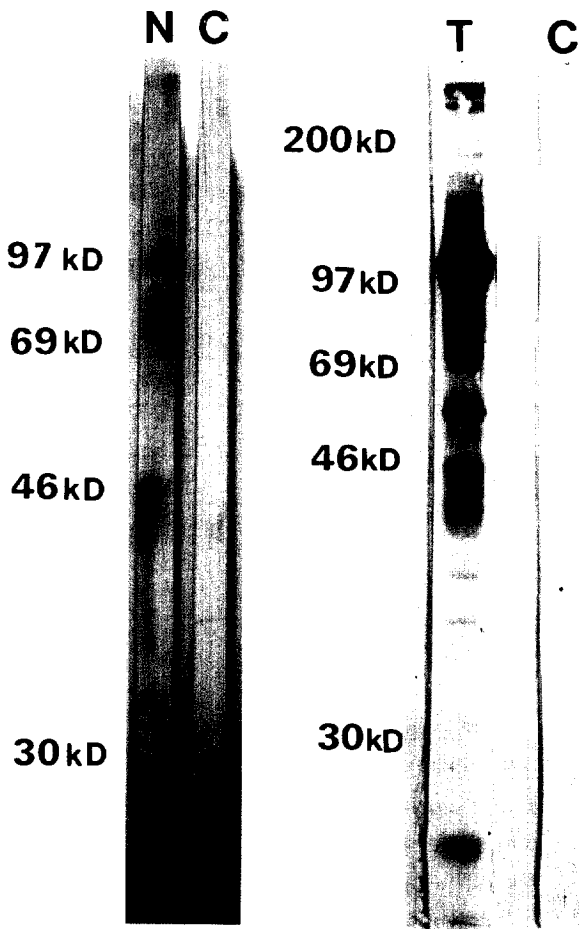


Fig 3. Western blotting of adult ticks.  
T : Adult ticks C : Control

Fig 4. Western blotting of nymphs.  
N : Nymphs C : Control

서 작은 bands가 관찰되었다(Fig 2).

진드기 성충의 항원으로 면역시킨 토끼로부터 얻은 혈청을 이용하여 western blotting을 한 결과 SDS-PAGE에 주 band로 나온 98.3kD와 103.3kD 항원성이 가장 큰 것으로 나왔으며 20kD, 46kD, 55kD 부근에서도 비교적 강한 항원성이 관찰되었다(Fig 3). 또한 성충에 대한 혈청을 이용하여 약층에 대해서 western blotting을 한 결과 46kD, 80kD, 100kD 부근에서 bands가 관찰되었다(Fig 4).

면역된 토끼와 대조군에 진드기 50마리씩을 공격 접종한 결과 대조군에서는 평균 3일만에 포혈 낙하한 반면 면역된 토끼에서는 흡혈 7일만에 낙하하였다(Table 1).

Table 1. The number of fallen ticks after challenged to vaccinated rabbit

Day	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	8th	9th
Control			38	12					
Vaccination				4	14	21	9		

부가적으로 진드기에 대한 토끼의 자연획득면역능력을 확인한 결과 흡혈후 탈락한 성충의 평균무게는 1회 0.223±0.050g, 2회 0.153±0.051g, 3회 0.104±0.017g이었다(Table 2).

Table 2. Appearance of the weight of adult ticks according to number of challenge.

No. of challenge	1st	2nd	3rd
No. of ticks attached	32	9	25
Mean weight of ticks	0.223±0.050g	0.153±0.051g	0.104±0.017g

## 고 찰

진드기는 숙주의 표지에 붙어 흡혈을 하며 생활하기 때문에 자체가 외부기생충일 뿐만 아니라 theileriosis, babesiosis, anaplasmosis와 같은 疾病을 매개하기 때문에 가축에 있어서 매우 중요한 해충으로 주목받아왔다. 따라서 이에 대한 구제방법으로 살충제를 이용한 화학적 방제법이 그동안 많이 사용되어 왔으나 새로운 살충제를 만드는 시간보다 그 살충제에 대한 내성을 지니는 개체들의 출현이 더 빨라 새로운 살충제의 개발에 걸림돌이 되었을 뿐만 아니라 과도한 살포로 인한 환경오염의 문제까지 야기되

었다.

이러한 문제들을 극복할 수 있는 방법으로서 진드기에 대한 백신개발에 관심을 갖기 시작되었다. 진드기 교상에 따른 숙주의 일차적인 면역반응은 보체의 삼입에 따른 mast cell의 변성과 함께 교상부위에 basophil과 eosinophils의 침착을 일으킨다. 동시에 T세포의 감작은 면역글로블린 G1의 생산을 유발한다. 만약 감작된 숙주가 재차로 진드기에 흡혈당했을 경우 면역항체 생성이 체현되어 진드기 침샘에서 나오는 항원 물질은 숙주의 Langerhance cells과 macrophage와 반응하여 항체를 생산하게 된다. 또한 교상부위에는 histamine이 분비되어 혈관벽을 확장시켜 교상부위에 가려움증을 유발한다. 이 현상은 진드기에 대한 숙주의 저항력을 검사하는 피부검사에 이용되기도 한다.

*Haemaphysalis longicornis*는 발달단계마다 각각의 숙주를 필요로 하는 3숙주성 진드기이므로 교과적인 진드기 백신을 만들기 위해서는 이들의 발달단계에 따른 공통된 단백질과 그 중에서 공통된 항원을 찾는 것이 우선적이라 할 수 있다.

성충과 약층에 있어 공통 단백질을 알아보기 위한 SDS-PAGE에서 103.3kD와 98.3kD의 위치에 공통적인 bands가 관찰되었다. 성충의 항원으로 만든 항체를 이용한 western blotting에서 성충과 약층에서 같은 위치에 큰 band가 관찰되어 이 위치의 단백질이 성충과 약층에 있어서 공통적인 단백질인 동시에 공통항원인 것으로 생각된다.

Wikel<sup>10</sup>에 따르면 진드기에 대한 저항성은 다음의 다섯 가지 유형으로 표현된다고 하였는데 그 유형으로 i) 흡혈한 진드기 수의 감소, ii) 흡혈한 무개의 감소, iii) 알의 수와 생존율의 감소, iv) 흡혈기간의 지연, v) 진드기의 죽음을 들었다.

이 기준에 따라 성충의 항원으로 면역시킨 토끼에 대한 진드기의 공격방어실험을 한 결과, 다른 기준들은 대조군과 큰 차이가 없었으나 흡혈기간에 있어 대조군이 충분한 흡혈후 탈락하는데 3-4일 걸리는데 비해서 실험군에서는 7일 정도로 遲延되었으며 이렇게 遲延되는 것으로 보아 성충의 항원으로 면역시키는 것이 Wikel<sup>10</sup>의 기준에 부합하는 진드기에 대한 저항성을 유도할 수 있음을 시사하는 것이라 생각된다.

진드기에 대한 숙주의 자연면역반응을 알아보기 위해 면역되지 않은 토끼에 진드기를 수회 접종한 결과 2회와 3회 흡혈후 탈락한 진드기의 무게가 각각 0.153g과 0.104g으로 1회 흡혈후 탈락한 진드기의 무게인 0.223g의

69%와 47%에 지나지 않았다. 이러한 결과는 진드기 흡혈이 숙주의 면역체계를 자극하여 면역반응을 유도한다는 Wikel<sup>11</sup>과 Dipeolu et al<sup>3</sup>의 실험과도 동일하였고, Wikel<sup>10</sup>이 제시한 흡혈한 무게의 감소와 흡혈기간의 遲延이라는 기준에도 부합되었다.

반면에 Dipeolu et al<sup>3</sup>은 토끼에 10회에 걸쳐 유충과 약충을 접종시켜본 결과 처음 4회까지는 무게가 점차로 감소하였으나 그 이후로는 서서히 증가하여 7회나 8회째에는 최고치를 이루었으며 이 값은 처음 접종시켰을 때의 무게보다도 증가된 것이었다. 이러한 결과들을 바탕으로 진드기에 대한 숙주의 자연적인 면역성에 대한 판단기준은 장기와 단기적 측면 그리고 직접적인 결과와 간접적인 결과로 나누어 평가하여야 한다고 제안하였다. 이러한 기준에서 볼 때 흡혈한 무게의 감소는 그 경향이 일정하지 못하기 때문에 단지 단기적인 측면에서만 인정된다고 하였다. 또한 흡혈기간의 遲延은 정확한 판단기준으로 보기 어려우며 오히려 장기적인 측면에서는 흡혈기간이 단축된다고 하였다<sup>10</sup>. 그리고 진드기에 대한 저항성의 판단기준은 수정되어야 하고, 저항성에 대해 새로이 정량화시키는 방법으로서 백분율을 이용할 것을 제시하였다. 이들이 백분율로 나타낼 판단기준으로는 i) 흡혈하지 않은 성충의 암컷, ii) 죽은 성충의 암컷, iii) 죽은 성충의 수컷, iv) 300mg이하로 흡혈한 암컷, v) 흡혈하지 않았거나 죽은 유충과 약충, vi) 탈피하지 않은 유충과 약충에 대한 것이었다. 이러한 기준에 의한 백분율이 높을수록 저항성도 크다고 하였다<sup>4</sup>.

성충의 항원으로 면역시킨 토끼에서의 결과가 비록 Dipeolu et al<sup>3</sup>의 기준에는 부합되지는 않으나, Wikel이 제시한 흡혈기간의 遲延이라는 기준에는 일치하는 것으로 보아 성충의 항원로서의 면역이 어느 정도 숙주의 저항성을 유도할 수 있다고 생각된다. 따라서 성충으로부터 얻은 단백질중 Western blotting에서 가장 항원성이 크게 나타난 103.3kD와 98.3kD의 단백질을 정제하여 면역시킨 후 다시 진드기로 공격접종실험을 수행하여 동일한 결과 여부를 확인하고 이 부위의 단백질에 대한 유전자 분석을 통한 유전자재조합 백신 개발에 연구방향을 두어야 할 것으로 사료된다.

## 결론

진드기 백신 개발을 위한 기초연구로서 발생단계에 따

른 공통항원을 조사하기 위한 실험에서 성충과 약충에 공통적으로 존재하고 항원성이 있는 단백질은 98.3kD와 103.3kD이었다. 성충의 항원으로 면역된 토끼를 흡혈한 진드기는 흡혈기간이 遲延되는 것으로 보아 성충의 항원은 면역원성이 있는 것으로 생각되며 성충의 항원성분중 98.3kD와 103.3kD의 단백질이 중요한 역할을 하리라 여겨진다. 금후에는 이들 단백질의 성분규명과 대량생산을 위한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다. 또한 진드기의 흡혈이 숙주의 면역체를 자극하는 것으로 확인되었다.

## 참고 문헌

1. Chizyuka HG, Mulilo JB. Methods currently used for the control of multi-host ticks ; their validity and proposals for future control stratages. *Parasitologia*, 32:127-132, 1990.
2. de Castro JJ, Navson RM. Host resistance in cattle tick control. *Parasitology today*, 9:13-17, 1993.
3. Dipeolu OO, Mongi AO, Essuman S, et al. Studies on naturally acquired immunity to African ticks. II Observation on cattle exposed to *Rhipicephalus appendiculatus* under varying periods of repeated infestations. *Veterinary Parasitology*, 41:293-320, 1992.
4. Dipeolu OO, Mongi AO, Kamanga-Sollo EIP. Studies on naturally acquired immunity against African ticks. I: Long-term observations on the immunity acquired by rabbit host during repeated infestation with *Rhipicephalus appendiculatus*. *J Med Entomol*, in press. 1991.
5. Kemp DH, Pearson RD, Gough JM. Vaccination against *Boophilus microplus* : localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. *Exp Appl Acarol*, 7:43-58, 1989.
6. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 227:680-685, 1970.
7. Opdebeeck JP, Wong JYM, Jackson LA, et al. Hereford cattle immunized and protected against *Boophilus microplus* with soluble and membrane associated antigens from the midgut of ticks. *Parasite*

- Immunology, 10:405-410, 1988.
8. Rand KN, Moore T, Sriskantha A, et al. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus* *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 9657-9661, 1989.
  9. Rodriguez M, Penichet ML, Mouris AE, et al. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm 86 antigen preparation. *Veterinary Parasitology*, 57:339-349, 1995.
  10. Wikel SK. Immunomodulation of host responses to ectoparasite infestation - an overview. *Veterinary Parasitology*, 14:321-339, 1984.
  11. Wikel SK, Osburn RL. Immune responsiveness of the bovine host to repeated low-level infestations with *Dermacentor andersoni*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 76:405-414, 1982.
  12. Willadsen P, Kemp DH. Vaccination with 'Concealed' antigens for tick control. *Parasitology today*, 4:196-198, 1988.
  13. Willadsen P, Kemp DH, Cobon GS, et al. Successful vaccination against *Boophilus microplus* and *Babesia bovis* using recombinant antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87:289-294, 1992.
  14. Willadsen P, Mckenna RV, Riding GA. Isolation from the cattle, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *International Journal for Parasitology*, 18:183-189, 1988.
  15. Willadsen P, Riding GA, Mckenna RT, et al. Immunological control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *The Journal of Immunology*, 143:1346-1351, 1989.
-