

## 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제 관한 연구

### I. *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* 및 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 주요 면역원 분석 및 IgY의 생산

신나리 · 김종만\* · 유한상

서울대학교 수의과대학 및 농생명 공학부  
국립수의과학검역원 세균과\*  
(2000년 8월 15일 게재승인)

### Control of swine respiratory disease using egg yolk antibodies I. Analysis of immunogens of *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* and production of IgY

Na-ri Shin, Jong-man Kim\* , Han-sang Yoo

Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine and School of Agricultural  
Biotechnology, Seoul National University, Suweon 441-744  
Division of Bacteriology and Immunology, National Veterinary Research and Quarantine Service  
AnYang 430-016, Korea\*  
(Accepted by Aug 15, 2000)

**Abstract** : Swine respiratory diseases have induced severe economic losses in swine industry worldwide. Several methods have been developed and applied to prevent and control the disease. However, those are still problematic in swine industry. Recently, the use of egg yolk antibodies with several advantages was introduced and applied to control diseases in animal as well as human. As the first step of the use of egg yolk antibodies in the control of the swine respiratory diseases, we investigated the immunogens of the causative agents of the diseases and immune response in egg yolk of hens immunized with them. Bacterial antigens prepared from *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* 3A and 4D, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and 5 were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, Western blot and toxicity test in mice. The antigens were injected into laying hens in order to produce antibodies against them in egg yolk. After chickens were immunized three times in 2 weeks interval, the profile of antibody production was examined by ELISA. The production of antibody in egg yolk was started in 2 weeks after the first injection, reached peak in 6-8 weeks and maintained until 12 weeks. Of

---

본 연구는 농림기술개발사업(관리번호 198010-3)에 의해서 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

Address reprint requests to Dr. Han-sang Yoo, Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon, 441-744, Republic of Korea.

two adjuvants used in this study, ISA70 was more effective than aluminum hydroxide gel in enhancing immunogenicity, laying rates and safety in hens. These results suggested that egg yolk antibodies could be a good source for production of antibodies specific to pathogenic bacteria inducing respiratory diseases of swine.

**Key words** : respiratory diseases, Immunogens, IgY.

## 서 론

호흡기 질병은 양돈산업에서 직·간접적으로 많은 피해를 주는 질병으로 경제적, 임상학적으로 중요한 질병 중 하나이다. 이러한 주요 질병으로는 돼지 위축성 비염, 흉막폐렴, 파스튜렐라성 폐렴이 있으며 이들 질병의 예방 및 치료를 위하여 많은 연구가 진행되었고 또한 진행 중이다. 그러나 기존의 방법들은 백신접종에 따른 부작용, 항생제 투여에 의한 내성균 출현 등과 같은 여러가지 문제점을 유발하고 있어서 새로운 예방법들의 강구가 요구되어 왔다. 최근 난황항체를 이용하여 질병을 치료 또는 예방하는 기법들이 사람, 동물 등에서 적용되어 오고 있다.

난황항체는 어미닭이 획득한 면역항체가 난황중에 이행, 축적된 것으로서 분자량이 적은 전형적인 혈청유래 항체로 조류, 파충류, 양서류, 폐어에서 발견되며<sup>1,2</sup>, 포유류의 IgG과 유사하나 그 물리화학적 성상에 차이가 있어 Immunoglobulin yolk(IgY)라 명명하였다. 피동면역을 위하여 토끼, 기니피, 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 항체생산의 비용이 적게 든다. 또한 계란 한 개 당 항체의 양은 90~100mg 정도로 토끼 한 마리에서 생산되는 양과 비슷하여 면역된 닭 한 마리로부터 생산될 수 있는 항체의 양은 매우 많다. 둘째, 면역된 닭으로부터 생산된 계란은 수집이 쉽기 때문에 채혈 등의 전문적인 기술이 필요없다. 셋째, IgY는 IgG와 달리 동물의 Fc receptor와 반응하지 않기 때문에 비특이적 반응

이 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<sup>3-7</sup>. 현재 난황의 특이항체를 이용한 연구는 돼지 대장균성 설사증의 치료 및 예방<sup>8-10</sup>, 신생우에서 감염성 설사예방<sup>11</sup>, 사람에서의 식중독 및 영아 바이러스성 설사예방<sup>12</sup>, 치석예방<sup>13</sup> 및 뱀의 교상에 대한 해독<sup>14</sup> 등에서도 진행되고 있다.

본 연구는 국내 양돈산업에서 경제적으로 많은 피해를 주는 주요 돼지 호흡기성 질병을 예방 및 치료의 목적으로 난황항체를 생산하기 위하여 이들 질병의 주요 원인균의 주요 면역원인들을 분석하였고, 이들을 이용한 시험백신을 제조하여 닭에서 이들에 대한 IgY의 생산 및 항체가 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

**사용균주** : 본 실험에 사용한 균주는 서울대학교 수의과대학 전염병학교실에 돼지 호흡기 질병을 나타내어 의뢰된 가검물로부터 blood agar, chocolate agar, G20G (Bactopectone 20g, NaCl 5g, Bromthymol blue 40mg, Fural-tadone 0.5mg, gentamicin 0.5mg, penicillin 20mg, Fung-izone 20mg, Glucose 10g, Lactose 10g in 1,000ml of D.W.) 등을 이용하여 분리한 후 집락형태, 그람염색성, 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 동정장

치인 Vitek(Vitek, Hazelwood, Missouri, USA) 및 혈청학적 방법<sup>15-17</sup>을 이용하여 동정한 *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* 3A 및 4D, *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2와 5이었다.

**Bacterin의 생산** : 본 실험에 사용한 각 균의 whole cell antigen 을 얻기 위해 각각의 균주를 tryptic soy broth (Difco Co., Detroit, Michigan, USA)에 접종하여 37℃에서 24시간동안 진탕배양한 후, 배양액의 일부를 취하여 plate count method를 이용하여 균수를 측정한다. 나머지 배양액에 formalin를 최종 농도가 0.05%가 되도록 첨가하여 실온에서 방치하였다. 18시간후 불활화된 균주를 8000rpm으로 30분간 원심분리하여 균을 수확한 후, PBS(pH 7.2)를 이용하여 1x10<sup>9</sup>CFU/ml이 되도록 조절하였다.

**Outer Membrane Protein(OMP)의 생산** : OMP의 분리는 Confer AW *et al*<sup>18</sup>의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, TSB에 배양한 균을 8000rpm으로 30분간 원심분리한 후 침전된 균을 10배량의 10mM HEPES buffer(pH 7.4)로 부유시키고, 부유한 균을 sonicator(Bandelin Co., Germany)를 사용하여 30분간 균질화한 후, 8000rpm에서 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 침전물을 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.

**Dermonecrotxin(DNT)의 생산 및 분석** : DNT는 *B bronchiseptica*와 *P multocida* 4D를 TSB에 접종하여 37℃에서 24시간동안 진탕배양한 후, 8000rpm으로 30분간 원

심분리하여 수확한 균을 PBS로 부유시켜 sonicator(Bandelin Co., Germany)로 30분간 균을 파쇄 다음, 20,000rpm에서 1시간 원심분리하여 그 상층액을 취한 후 0.45µm filter로 여과하였다. 여과액은 단백질 함량을 측정 후 formalin을 최종 농도가 0.05% 되도록 첨가하여 37℃에서 shaking 상태로 3일간 방치하여 DNT를 불활화시켰다.

**OMP의 분석** : OMP는 Marandi와 Mittal의 방법<sup>19</sup>에 따른 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 분석하였다. 즉, 12% polyacrylamide gel의 각 well당 5mg/ml의 sample 20µl을 loading 하여 25mA에서 150분간 전기영동한 후 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하여 분리된 OMP의 band를 확인하였다.

**Dermonecrotic toxin(DNT)의 분석** : 공시균주에서 DNT 분석은 DNT 유전자의 검색, Western blot을 이용한 검색 및 마우스 접종실험을 이용하여 실시하였다. *B bronchiseptica*와 *P multocida* 4D에서 DNT를 생성하는 유전자를 검출하기 위해 PCR 기법<sup>20</sup>을 이용하였다. 유전자의 증폭을 위해 사용한 primers의 염기서열은 Table 1과 같다. DNT 유전자의 증폭은 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer Co., Foster city, California, USA)를 사용하였으며, 10xPCR buffer(Bioneer Co., Taejon, Korea) 5µl, 25mM MgCl<sub>2</sub> 3µl, 10mM dNTP 1µl, forward와 reverse primer 각각 1µl, template DNA 1µl, Taq polymerase(5u/µl) 5µl를 첨가하여 최종량이 50µl가 되도록 증류수로 조정 한 후, 반응조건은 최초 denaturation을 95℃에서 5분으로 한 다음, denaturation 94℃ 1분, annealing 55℃ 1분, extension 72℃ 1분으로 하여 30회 반복 실시하고 최종 extension은 72℃에서 7분간 실시하였다. PCR 증폭산물은 Molecular weight marker인 100bp ladder(Promega)와 함께 1% agarose gel에서 전기영동한 후, ethidium bromide로

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

Primers	Oligonucleotide sequence	Size of amplified product
<i>B bronchiseptica</i> DNT	forward	5'-AATCGGCATTGCGCAACTT-3'
	reverse	5'-TGTCCGGCGGTATCCAGACT-3'
<i>P multocida</i> DNT	forward	5'-TCATCTTCTGACAGCTCCGA-3'
	reverse	5'-TGCAGATTGCACTAAGGACC-3'

염색하여 UV illuminator로 확인하고 polaroid camera를 이용하여 사진촬영하였다.

*P. multocida* 4D DNT(PMT)<sup>21,22</sup> 분석은 PMT에 대한 monoclonal antibody을 이용하여 Western blot으로 실시하였다. 즉, 12% polyacrylamide gel에 DNT 추출액을 전기영동하여 nitrocellulose membrane에 electrotransfer 한 후 Bovine serum albumin(BSA, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)으로 blocking 시키고 PMT MAb를 1차 항체로, alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG(Sigma Co.)를 2차 항체로 사용하였고, AP conjugate substrate kit(Bio-Rad Co.)를 이용하여 DNT를 확인하였다.

백신제조 및 산란계 백신접종 : 주요 돼지 호흡기 질병 예방을 위한 IgY 생산을 위한 시험백신에 사용한 항원의 종류, 농도, adjuvant 등에 의해서 9개의 시험군으로 구분하였다(Table 2). Adjuvant의 혼합은 ISA70에 대해서는 항원이 30%, adjuvant가 70%가 되도록 조절하였고, aluminum hydroxide gel의 경우는 gel의 최종농도가 10mg/ml이 되도록 조절하여 사용하였다. 백신접종은 2주 간격으로 3회 실시하였으며, 접종량은 1차 접종시, adjuvant의 종류에 따라 ISA70을 사용한 경우는 1ml씩을, alu-

minum hydroxide gel을 사용한 경우는 0.5ml씩을 접종하였으며, 2차 및 3차 접종은 모두 1ml씩 동일하게 접종하였다. 접종부위는 aluminum hydroxide gel을 사용한 경우 대퇴부에, ISA70을 사용한 경우 pectoral muscle에 각각 접종하였다.

난황항체 추출 : 난황내 항체가 변화를 조사하기 위하여 계란은 백신접종전 및 접종후 2주부터 1주 간격으로 수집하였다. 난황항체는 우 등<sup>8</sup>의 방법에 준하여 추출하였다. 즉, 수집한 계란을 난황만 분리하여 50ml 원심튜브에 넣은 후에 동량의 PBS(pH 7.2)를 가하여 vortex 하였다. 다시 혼합액과 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 백신접종전 및 접종 2주후부터 2주 간격으로 닭의 익하정맥에서 혈액을 채취하여 4℃에 24시간 방치한 다음, 원심분리로 혈청을 수거하고 56℃에서 30분간 비동화하여 항체가 측정에 사용하였다.

ELISA에 의한 항체가 측정 : ELISA 검사를 위한 항원으로는 *B. bronchiseptica*, *P. multocida* 4D와 3A, *A. pleu-*

Table 2. Experimental groups desinged in this 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( $1 \times 10^9$ cells/ml), DNT(150 $\mu$ g)	Aluminum hydroxide gel	6
2	Pneumonic pasteurellosis	<i>P. multocida</i> 3A	Whole cell( $1 \times 10^9$ cells/ml), OMP(150 $\mu$ g)		6
3	Pleuropneumonia	<i>A. pleuropneumoniae</i> type 2 & 5	Whole cell( $1 \times 10^9$ cells/ml), DNT(150 $\mu$ g)		6
4	Pneumonic pasteurellosis and Pleuropneumonia	<i>P. multocida</i> 3A <i>A. pleuropneumoniae</i> types 2 & 5	Whole cell( $1 \times 10^9$ cells/ml), DNT(150 $\mu$ g)		5
5	Atrophic rhinitis	<i>B. bronchiseptica</i> <i>P. multocida</i> 4D	Whole cell( $1 \times 10^9$ cells/ml), DNT(150 $\mu$ g)	ISA 70	6
6	Pneumonic pasteurellosis	<i>P. multocida</i> 3A	Whole cell( $1 \times 10^9$ cells/ml), OMP(150 $\mu$ g)		6
7	Pleuropneumonia	<i>A. pleuropneumoniae</i> types 2 & 5	Whole cell( $1 \times 10^9$ cells/ml), OMP(150 $\mu$ g)		6
8	Pneumonic pasteurellosis and Pleuropneumonia	<i>P. multocida</i> 3A <i>A. pleuropneumoniae</i> types 2 & 5	Whole cell( $1 \times 10^9$ cells/ml), OMP(150 $\mu$ g)		5
9		Control	PBS		4

*ropneumoniae* serotypes 2와 5 각각의 OMP를 사용하였다. 먼저 OMP를 coating buffer와 혼합하여 ELISA용 plate에 각 well당 0.14µg이 포함되도록 100µl씩 분주하여 4℃에서 18시간 정치한 후 Tween-PBS(0.05% tween20 in PBS)로 3회 이상 세척한 후, 1% BSA가 포함된 Tween-PBS로 blocking 시켜 37℃에 1시간동안 방치하고 다시 3회 이상 세척하였다. *A pleuropneumoniae* type 2와 5 및 *P multocida* 3A에 대한 IgY는 100:1으로, *P multocida* 4D와 *B bronchiseptica*에 대한 IgY는 200:1으로 각각 희석하여 각 well당 100µl씩 분주하고 37℃에서 1시간동안 반응시킨 후, 세척과정을 다시 반복하였다. Substrate(ABTS solution)을 100µl씩 가하고 실온에서 30분 경과후 stop solution(0.5 M HCl)을 50µl씩 분주한 후에 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

산란율 : 산란율은 시험백신 1차 접종후부터 11주까지 11주간 각 시험군별로 총산란량을 산란한 닭의 수와 총산란일로 나눈 후 100을 곱하여 산출하였다.

## 결 과

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

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

실시하여 40kDa 전후의 주요 항원을 포함한 다양한 크

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 pleuropneumoiniae* 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 pleuropneumoiniae* type 5, lane 4: *P multocida* 3A, lane 5: *P multocida* 4D.

기의 단백질 항원들을 확인할 수 있었다(Figs 2, 3). *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 확인하였다(Fig 5).

위축성 비염 원인체로 면역된 닭의 항체가 변화 : 면역된 닭의 혈중 항체가는 접종전 및 1차 접종후 2주 간격으로 채혈하여 ELISA로 측정하였다. Aluminum hydroxide gel을 adjuvant로 사용한 1번 그룹은 첫 접종후 산란을 멈추었으며 주저앉음, 침울, 설사 등의 증상을 보이

고치를 나타내었다(Fig 6). 면역된 닭의 난황항체가를 난

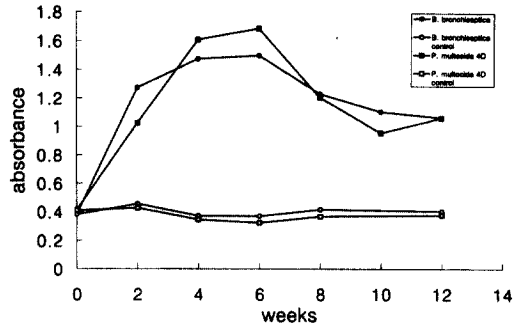


Fig 6. Immune response in sera of hens immunized with antigens of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* 4D with ISA70 as adjuvant.

Fig 4. 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.

황추출액을 이용하여 ELISA로 측정된 결과 ISA70의 adjuvant를 이용한 그룹에서 위축성 비염의 난황항체가 역시 *B bronchiseptica* 와 *P multocida* 4D가 비슷한 양상으로 변화하였다. 항체는 1차 접종후 급격히 증가하였으며 8주를 최고치로 하여 그후 점차 감소하는 경향을 나타내었으나 11주까지도 높은 항체가를 계속 유지하고 있었다. 혈청항체가와 난황항체가를 비교해볼 때 난황항체가는 혈청중의 항체가보다는 다소 낮았지만 대조군의 3배 이상의 항체가를 유지하였고 혈청보다 오래 항체를 보유하고 있었다(Fig 7).

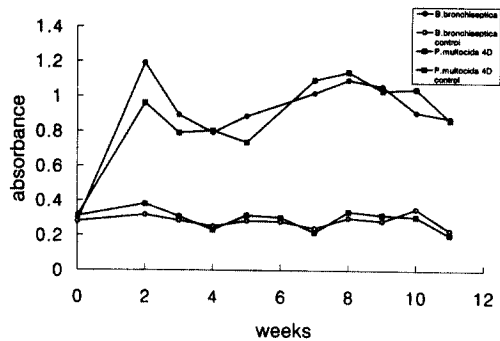


Fig 7. Immune response in egg yolk antibodies of hens immunized with antigens of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* 4D with ISA70 as adjuvant.

Fig 5. 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.

다가 6주 내에 모두 폐사하였다. ISA70을 사용한 5번군에서의 *B bronchiseptica* 와 *P multocida* 4D의 혈청항체가 변화는 비슷한 양상을 띠고 있었으며 항체가가 6주째 최

파스튜렐라성 폐렴의 원인체로 면역된 닭의 항체가 변화 : *P multocida* 3A를 접종한 처치군에서의 혈청항체

가는 대조군의 약 2배 정도의 항체가 나타내었다. 1차 접종 후에 8번 균을 제외한 다른균은 항체가 증가율이 매우 저조하였다. 2차 및 3차 접종 후에는 항체가 증가율이 현저하지는 않지만 12주까지 계속 증가하는 양상을 나타내었다(Fig 8). Adjuvant에 따른 난황중의 항체가

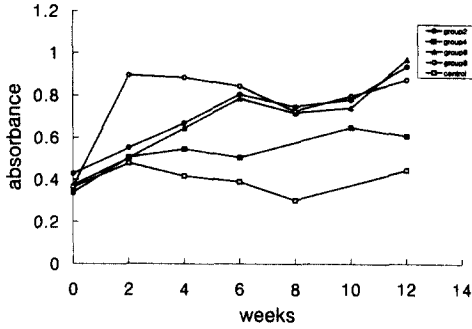


Fig 8. Immune response against *P multocida* 3A in sera of hens immunized with *P multocida* 3A alone or combined with *A pleuropneumoniae* serotype 2 and 5 with aluminum hydroxide gel and *P multocida* 3A alone or combined with *A pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5 with ISA70.

변화는 ISA70을 사용한 경우에 높은 항체가 및 초기면역 형성이 현저하였으며 모든 *P multocida* 3A 처치군에서 6~8주 사이에 정점에 도달한 후 점차 감소하였다(Fig 9). 단독 및 복합투여의 경우 초기항체가 형성면에서 복합투여의 경우에 매우 월등하였다.

홍막폐렴 원인체로 면역한 닭에서의 항체가 변화 : *A pleuropneumoniae* type 2와 type 5를 2주 간격으로 3회 접종

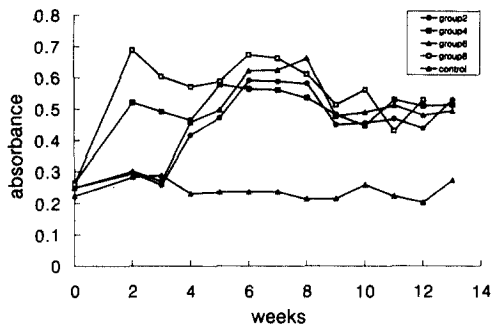


Fig 9. Immune response against *P multocida* 3A in egg yolk antibodies of hens immunized with *P multocida* 3A alone or combined with *A pleuropneumoniae* serotype 2 and 5 with aluminum hydroxide gel and *P multocida* 3A alone or combined with *A pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5 with ISA70.

한 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 항체가 가장 높았으며 adjuvant 면에 있어서는 *P multocida* 3A 접종군과 마찬가지로 ISA70을 사용한 경우에 면역반응 유도가 더 현저하였다(Fig 10). 난황항체가 역시 adjuvant 별로 양상이 다르게 나타났으며 ISA70이

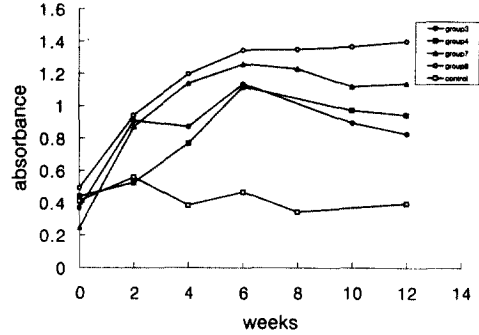


Fig 10. Immune response against *A pleuropneumoniae* serotype 2 in sera of hens immunized with *A pleuropneumoniae* serotype 2 combined with *A pleuropneumoniae* serotype 5 or *P multocida* 3A and *A pleuropneumoniae* serotype 5 with aluminum hydroxide gel and *A pleuropneumoniae* serotype 2 combined with *A pleuropneumoniae* serotypes 5 or *P multocida* 3A and *A pleuropneumoniae* serotype 5 with ISA70.

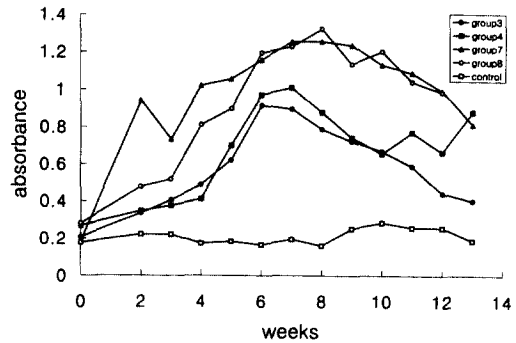


Fig 11. Immune response against *A pleuropneumoniae* serotype 2 in egg yolk antibodies of hens immunized with *A pleuropneumoniae* serotype 2 combined with *A pleuropneumoniae* serotype 5 or *P multocida* 3A and *A pleuropneumoniae* serotype 5 with aluminum hydroxide gel and *A pleuropneumoniae* serotype 2 combined with *A pleuropneumoniae* serotypes 5 or *P multocida* 3A and *A pleuropneumoniae* serotype 5 with ISA70.

더 높은 항체가 나타내었고 초기면역을 더 잘 유도하였다. 항체가 최고치는 ISA70를 사용한 경우 첫 접종후 8주, aluminum hydroxide gel을 사용한 경우 6~7주로 aluminum hydroxide gel이 oil보다 항체가 최고치에 먼저 도달하였으나 항체가의 소실도 빨랐다(Fig 11). A pleuropneumoniae type 5 역시, 혈중항체가 면에서 adjuvant 별로 다른 변화양상을 나타냈는데 type 2와 마찬가지로 ISA70 사용시에 초기면역 유도 및 항체가 상승률이 현저하였다(Fig 12). 난황항체가는 6주에 정점을 나타냈으

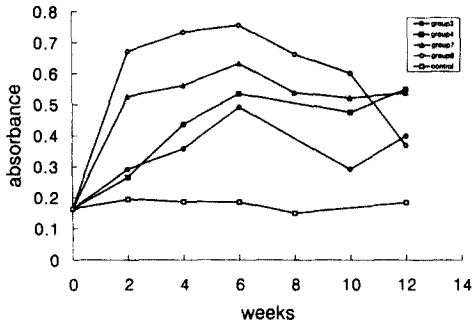


Fig 12. Immune response against A pleuropneumoniae serotype 5 in sera of hens immunized with A pleuropneumoniae serotype 5 combined with A pleuropneumoniae serotype 2 or P multocida 3A and A pleuropneumoniae serotype 2 with aluminum hydroxide gel and A pleuropneumoniae serotype 5 combined with A pleuropneumoniae serotype 2 or P multocida 3A and A pleuropneumoniae serotype 2 with ISA70.

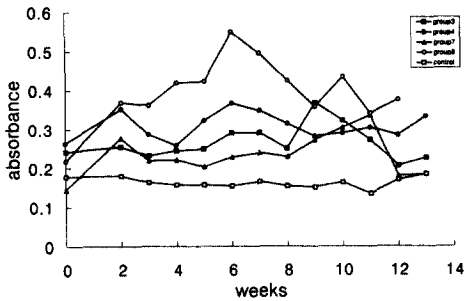


Fig 13. Immune response against A pleuropneumoniae serotype 5 in egg yolk antibodies of hens immunized with A pleuropneumoniae serotype 5 combined with A pleuropneumoniae serotype 2 or P multocida 3A and A pleuropneumoniae serotype 2 with aluminum hydroxide gel and A pleuropneumoniae serotype 5 combined with A pleuropneumoniae serotype 2 or P multocida 3A and A pleuropneumoniae serotype 2 with ISA70.

나 초기면역이 잘 이루어졌음에도 불구하고 항체가 증가치 변화는 전반적으로 낮았다. Type 5에서는 P multocida 3A와의 혼합백신의 항체가 상승이 흉막폐렴 단독 투여군보다 다소 높았으며 특히 oil adjuvant를 사용한 8번 군이 대조군의 3배 가까이 항체가가 증가함을 보였(Fig 13).

산란율 : 산란율을 1차 접종시부터 11주동안 조사한 바, 1번 군은 1차 접종후부터 산란을 하지 않았고 6주 안에 모두 폐사했으나 1번 군을 제외한 다른 군의 닭은 모두 생존하여란을 생산하였다. 5번 군의 경우 3회 접종이 끝난 다음 산란율이 매우 저조하였으나 점차 회복되었고, 각 군당 산란율은 Fig 14과 같다.

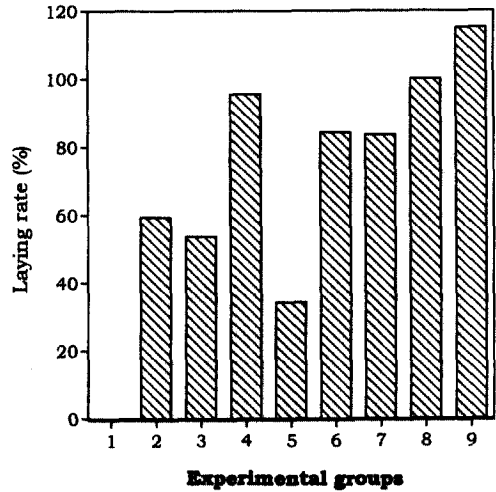


Fig 14. Comparison of laying rates in the experimental groups.

## 고 찰

국내의 양돈산업에서 많은 문제를 유발하는 주요 질병중의 하나가 호흡기 질병이다. 그 중에서도 경제적 및 임상학적으로 높은 비중을 차지하는 것이 세균성 원인체의 감염에 의해 유발되는 질병으로 위축성 비염, 파스튜렐라성 폐렴, 흉막폐렴이 있다. 이러한 돼지 호흡기 질병은 국내에서 전체 돼지 질병의 약 20%를 차지하고 있어 막대한 경제적 손실 및 생산성 저하를 초래하고 있다. 이러한 돼지 호흡기 질병들의 예방 및 치료를 위해 백신접종, 항생제 투여 등의 방법이 적용되고 있으나 이러한 방법들은 쇼크, 내성균 출현<sup>23,24</sup>, 항생제 잔류 등의 문제점들이 유발되어 새로운 예방, 치료법의 개발이요



구되어 왔다. 또한 최근 난황항체를 이용한 사람 및 동물의 질병치료 및 예방을 위하여 적용된 바 있다. 본 연구에서는 돼지 호흡기 질병의 예방 및 치료를 목적으로 난황항체 이용법을 시도하고자 주요 호흡기 질병의 원인체들의 병원성 인자들을 분석하고 이들에 대한 닭 및 난황내에서의 면역반응을 조사하였다.

사람 및 동물의 질병을 유발하는 세균성 원인체들은 원인체의 종류에 따라서 각기 다른 병원성 인자를 소유할 수 있기 때문에 질병예방을 위한 백신을 제조하기 위해서는 각 질병에서 중요하게 작용하는 병원성 인자들 분석하여 이들을 항원으로 사용하는 것이 매우 중요하다. 위축성 비염은 *B bronchiseptica* 와 *P multocida* 4D가 원인체로 이들이 생성하는 143kDa의 DNT가 진행성 위축성 비염에 대한 필수적인 병원성 인자로 작용하고 또한 세균의 외부 부착소들은 점막에 부착하는데 매우 중요한 역할을 하여 이들이 비강개골 위축에 의한 본 질병 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다<sup>26</sup>. 파스튜렐라성 폐렴은 주로 *P multocida* 3A에 의해 유발되는 질병이며, 이 원인균의 주요 병원성 인자로는 capsular polysaccharide, lipopolysaccharide(LPS), exotoxin, OMP, DNT 등이 있으며 이들중 최근 지속적인 항체생성을 유도할 수 있는 OMP가 잠재력 있는 항원으로 가장 주목을 받고 있다. 돼지 흉막폐렴은 *A pleuropneumoniae* 가 원인체이며 현재 12개의 serotype이 알려져 있으나 국내에서는 2형과 5형이 주로 관련이 있는 것으로 나타났다<sup>27,28</sup>. *A pleuropneumoniae* 의 주요 병원성 인자로는 capsule, lipopolysaccharide(LPS), exotoxin, OMP 등이 있는데 이번 실험에서는 면역유도에 효과적인 단백질을 포함한 OMP 및 균체항원을 사용하였다.

백신제조에 사용할 공시균주들 각각에서 주요 면역원이 될 수 있는 주요 병원인자들의 존재여부의 분석에서는 *B bronchiseptica* 와 *P multocida* 4D의 DNT는 PCR, SDS-PAGE, Western blot, mouse 접종 등의 방법을 이용하여 분석, 확인하였다. *P multocida* 3A 및 *A pleuropneumoniae* serotypes 2와 5에 대하여는 OMP의 분석결과 크기에서는 다소 차이가 있었으나 그 양상에서는 이전의 보고들<sup>18,30-35</sup>과 유사하였다. 본 실험에서 크기의 차이는 OMP의 크기 계측과정 또는 detergent 등 추출방법 등에 있어서 실험실간의 차이에 의한 것으로 사료된다.

이들 항원을 이용하여 시험제조한 백신으로 닭에서의 면역반응양상을 조사한 결과, 전반적으로 1차 접종후 6-

8주경에 최고항체가를 나타내어 12주까지 비슷한 수준의 항체가를 유지하였다. 이는 다른 세균들이나 virus를 이용한 결과와 유사하였으며<sup>8,36-39</sup>, 이는 본 실험에 사용한 bacterin, OMP, 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 이행하는데 소요되는 시간이 1~2주 정도로 생각되며 이는 이전 실험자들의 보고<sup>8,40-42</sup>와 일치하는 결과이다. 이러한 결과들은 난황항체가와 혈중항체가는 높은 연관성이 있어 이들중 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 난황 항체생산시 oil adjuvant를 사용하는 것이 효과적임을 나타내었다. 또한 파스튜렐라성 폐렴 및 흉막폐렴의 단독 및 복합투여를 한 경우를 비교해보면 산란율 및 항체가 상승정도 양쪽 모두 복합투여를 한 경우가 초기면역형성 및 항체가 상승에 있어서 더 효과적이었다. 이는 닭에서 면역반응시 *P multocida* 3A 및 *A pleuropneumoniae* serotypes 2와 5간의 synergistic effect에 의한 것이 아닌가 생각된다. 이러한 결과는 파스튜렐라성 폐렴 및 흉막폐렴에 대한 난황 항체생산시 복합투여하는 경우가 더욱 효율적임을 암시하고 있다. 위축성 비염 원인체들의 접종군의 경우 산란율 저하, 폐사 등의 원인은 *P multocida* 4D bacterin 또는 DNT의 의한 것으로 사료되나 이는 추가실험을 통하여 이들의 원인을 밝힌 후 이에 대한 대책을 수립하여야 할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Hsu E, Flajnik MF, Pasquier LD. A third immunoglobulin class in amphibians. *J Immunol*, 135(3):1998-2004, 1985.
2. Magor KE, Higgins DA, Middleton DL. One gene encodes the heavy chains for three different forms of IgY in the duck. *J Immunol*, 153:5549-5555, 1994.
3. Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today*, 16(8): 392-8, 1995.

4. Larsson A, Balow R, Lindahl TL, *et al.* Chicken Antibody : Taking advantage of evolution-a review. *Poultry Science*, 72:1807-1812, 1993.
5. 이남형, 노정해, 한찬규 등. 여러가지 산란계 사료첨가제가 계란의 IgY 수준과 산란율에 미치는 영향. *한축지*, 41(2):155-166, 1999.
6. 이승배, 최석호, 고태송 등. 계란의 난황에서 IgY 항체 생산 및 특성에 관한 연구. *Korean J Food Sci Ani Resour*, 16(1):85-88, 1999.
7. Kowalczyk K, Daiss J, Halpern J. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunol*, 54: 755-762, 1985.
8. 우승룡, 김종만, 권창희 등. 난황항체를 이용한 돼지 대장균 설사증 방제기법개발 I. 대장균 pilus 항원과 LT로 면역시킨 닭의 면역반응. *대한수의학회지*, 38(4):829-836, 1998.
9. 우승룡, 김종만, 권창희 등. 난황항체를 이용한 돼지 대장균 설사증 방제기법 개발 II. 난황항체의 돼지 대장균증에 대한 치료효과. *대한수의학회지*, 38(4): 837-842, 1998.
10. Yokoyama H, Paralta RC, Diaz R, *et al.* Passive protective effect of chicken egg yolk Immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect Immun*, 998-1007, 1992.
11. Ikemori Y, Kuroki M, Peralta RC, *et al.* Protection of neonatal calves against fatal 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.
12. Hatta H, Tsuda K, Akachi S, *et al.* Oral passive immunization effect of anti-human Rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. *Biosci Biotech Biochem*, 57(7):1077-1081, 1993.
13. Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, *et al.* 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.
14. Almeida CM, Kanashiro MM, Rangel FB, *et al.* Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. *Vet Rec*, 143(21): 579-84, 1998.
15. Bouh KC, Mittal KR. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 strains by using polyclonal and monoclonal antibodies. *Vet Microbiol*, 31;66(1):67-80, 1999.
16. Dubreuil JD, Letellier A, Stenbaek E, *et al.* Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 strains using a monoclonal-based polystyrene agglutination test. *Can J Vet Res*, 60(1):69-71, 1996.
17. Fussing V, Nielsen JP, Bisgaard M, *et al.* Development of a typing system for epidemiological studies of porcine toxin-producing *Pasteurella multocida* sbp. *multocida* in Denmark. *Vet Microbiol*, 23;65(1):61-74, 1999.
18. Confer AW, Nutt SH, Dabo SM, *et al.* Antibody responses of cattle to outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* A:3. *Am J Vet Res*, 57(10): 1453-1457, 1996.
19. Marandi MV, Mittal KR. Characterization of an outer membrane protein of *Pasteurella multocida* belonging to the OmpA family. *Vet Microbiol*, 53:303-314, 1996.
20. Lichtensterger CA, Steembergen SM, Lee RM, *et al.* Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol*, 34(12):3035-3039, 1996.
21. Bording A, Foged NT. Characterization of the immunogenicity of formaldehyde detoxified *Pasteurella multocida* toxin. *Vet Microbiol*, 29(3-4):267-80,1991.
22. Nielsen JP, Foged NT, Sorensen V, *et al.* Vaccination against progressive atrophic rhinitis with a recombinant *Pasteurella multocida* toxin derivative. *Can J Vet Res*, 55(2):128-38, 1991.
23. Wierup M. The control diseases in animals : alternatives to the use of antibiotics. *Int J Antimicrob Agents*, 14:315-319, 2000.
24. Van den Bogaard AEJM, London N, Stobberingh EE. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from the Netherlands(five abattoirs) and Sweden. *J Antimicrob Chemother*, 45:663-671, 2000.
25. Bogaard AE, Stobberingh EE, Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans.

- Int J Antimicrob Agent* , 14:327-335, 2000.
26. Rutter JM. Virulence of *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of gnotobiotic pigs infected with *Bordetella bronchiseptica* . *Res Vet Sci* , 34:287-295, 1983.
  27. 이정희, 정중을, 전용수 등. Multiplex PCR 기법 및 면역확산법을 이용한 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 의 혈청형 분류에 관한 연구. *한축지*, 41(3):387-396, 1999.
  28. Min K, Chae C. Serotype and *apx* genotype profiles of *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates in Korea. *Vet Rec* , 145:251-254, 1999.
  29. Marandi MV, Dubreuil JD, Mittal KR. The 32kDa major outer-membrane protein of *Pasteurella multocida* capsular serotype D. *Microbiol* , 142:199-206, 1996.
  30. Haesebrouck F, Chiers K, Overveke V. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs : the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet Microbiol* , 238-249, 1997.
  31. Dado SM, Confer AW, Murphy GL. Outer membrane proteins of bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates. *Vet Microbiol* , 54:167-183, 1997.
  32. Zhang H, Ainsworth AJ, Montgomery RD. Use of a 35.5kDa 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.
  33. Marandi MV, Mittal KR. Identification and characterization of outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* serotype D by using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* , 952-957, 1995.
  34. Confer AW. Immunogens of *Pasteurella* . *Vet Microbiol* , 37:353-368, 1993.
  35. Bunka S, Christensen C, Potter AA, *et al* . Cloning and characterization of a protective outer membrane lipoprotein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect Immun* , 2797-2800, 1995.
  36. Yoshiko Sugita-Konishim, Shibata K, Yun SS, *et al* . Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria . *Biosci Biotech Biochem* , 60(5):886-888, 1996.
  37. Heller ED. The immune response of hens to multiple *Escherichia coli* injections and transfer of immunoglobulins to the egg and hatched chick. *Res Vet Sci* , 18: 117-120, 1975.
  38. 오태호, 한홍을. Production of chicken egg yolk antibody to canine Parvovirus. *대한수의학회지*, 36(4):895-902, 1996.
  39. Li X, Nakano T, Sunwoo HH, *et al* . Effects of egg and yolk weights on yolk antibody(IgY) production in laying chickens. *Poultry Science* , 77:266-270, 1998.
  40. 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.
  41. Silim A, 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* , 33:643-648, 1989.
  42. Bollen LS, Crowley A, Stodulski G, *et al* . Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. *J Immunol Meth* , 191:113-120, 1996.