

## 돼지 위축성 비염, 파스튜렐라성 폐렴 및 흉막폐렴 원인균의 주요 항원에 대한 IgG 와 IgY 의 상관 관계 분석

신나리, 김종만<sup>1</sup>, 유한상<sup>\*</sup>

서울대학교 수의과대학 및 농생명공학부, <sup>1</sup>국립수의과학검역원 세균과  
(게재승인 : 2002년 6월 20일)

### Relationship of Antibodies in Egg Yolk and Serum against Major Antigens of Bacterial Agents in Porcine Atrophic Rhinitis, Pneumonic Pasteurellosis and Pleuropneumonia

Na-Ri Shin, Jong-Man Kim<sup>1</sup> and Han-Sang Yoo<sup>\*</sup>

Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology,  
Seoul National University, Suwon, 441-744 and <sup>1</sup>Division of Bacteriology and Immunology,  
National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang, 430-016, Korea

(Accepted : June 20, 2002)

**Abstracts :** Swine respiratory diseases have induced severe economic losses in swine industry worldwide. Therefore, several methods have been made and applied to prevent and control the diseases. However, these methods still have a problem and also induce side effects. Recently, the use of egg yolk antibody was introduced to control and prevent the diseases as one of new trials. As a study of using egg yolk antibody, antibody titers against several different antigens of major pathogens in swine respiratory diseases were compared in egg yolk and serum of hens immunized with those antigens. The titers were measured by ELISA using the antigens as coating antigens. The relationship in antibody titers between egg yolk and serum were identified by analysis of variance for linear regression. Almost of antigens used in this study showed the high relationship in antibody titers between egg yolk and serum ( $r = 0.87 \sim 0.93$ ) even though the relationship in antibody titers against *P. multocida* A:3 IROMP was slightly low ( $r = 0.74$ )( $P < 0.01$ ). These results indicated that antibody titer in egg yolk could be useful to predict the titer in serum of chicken.

**Key words :** Comparison of antibody titer, egg yolk, serum.

## 서 론

돼지 호흡기 질병은 양돈산업에서 직, 간접적으로 많은 피해를 주는 질병으로서 임상학적, 경제적으로 매우 중요한 질병중 하나이다. 국, 내외적으로 오래전부터 많은 문제를 유발해온 돼지 호흡기 질병으로서는 돼지 위

축성 비염, 흉막폐렴, 파스튜렐라성 폐렴 및 마이코플라즈마성 폐렴이 있다. 이들 질병의 효율적인 치료 및 예방을 통한 양돈산업에서의 경제적 피해를 감소하고자 많은 연구가 진행되어 왔고 또한 진행중이다.

그러나, 이들 방법중 주로 사용되었던 백신접종, 항생제 투여 등은 백신 부작용, 내성균 출현 등과 같은 여러

\* Corresponding author: Dr. Han Sang Yoo, Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea  
Tel : 031-290-2737, Fax : 031-290-2737, E.mail : yoohs@plaza.snu.ac.kr

가지 문제점들을 유발하고 있어서 최근 이에 대한 대체 방법이 모색되고 있다. 최근 들어서 사람 및 동물에서 수동면역에 의한 예방, 치료법인 난황항체를 이용하는 방법이 널리 적용되고 있다. 난황항체는 어미 닭에서 획득한 면역항체가 난황 중에 이행<sup>1</sup>, 축적된 것으로 분자량이 비교적 적은 전형적인 혈청유래 항체로서 조류, 파충류, 양서류, 폐어 등에서 발견되며, 포유류의 IgG 와는 물리 화학적 성상이 다소 차이가 있다<sup>2,3,4</sup>. 수동면역에 의한 질병 치료 및 예방을 위한 항체를 토끼, 마우스, 기니피그 등에서 생산하였으나, 난황항체를 이용하여 특이 항체를 생산하면 여러 가지의 장점이 있어서 이를 이용한 항체를 생산하고자 하는 시도가 증가하고 있다<sup>2,3</sup>.

현재 난황의 특이항체를 이용한 연구는 돼지 설사증의 치료 및 예방<sup>5,6,7</sup>, 신생우의 감염성 설사 예방<sup>8</sup>, 사람에서의 식중독 및 영아 바이러스성 설사 예방<sup>9</sup>, 치석 예방<sup>10</sup> 및 뱀의 교상에 대한 해독<sup>11</sup> 등에 대한 보고가 있다. 또한 돼지 호흡기 질병 예방을 위한 난황항체 이용 연구는 난황 항체의 생산<sup>12,13</sup>, 항체특이성 분석<sup>14</sup>, 실험동물에서의 방어능<sup>15</sup> 등에 대한 연구가 이루어졌다. 그러나, 닭의 혈중 항체에서 이행되어 오는 난황항체가 서로 어떤 상관 관계를 가지는지에 대한 조사는 매우 미약하다<sup>16</sup>. 닭의 주요 Virus 성 원인체에 대한 vaccine 접종 후 난황항체가 및 혈중 항체의 비교에 대한 보고는 있으나<sup>17,18</sup>, 세균성 원인체를 이용한 실험 vaccine 접종에 따른 이러한 상관 관계에 대한 조사 보고는 아직까지 없다. 이는 난황항체 생산을 위한 기초자료 뿐만 아니라, 세균성 질병에 대한 계군의 혈중 항체를 추정하는데도 필요한 기초 자료라고 사료된다.

이에 본 연구에서는 면역된 닭의 혈중 항체와 난황 내의 항체가 사이의 상관 관계를 조사하고, 이를 바탕으로 닭의 혈중내 항체를 추정함으로써 효율적인 난황 항체 생산을 위한 기초 자료로 사용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

본 실험에 사용된 균주는 서울대학교 수의과대학 전염병학 교실에 돼지에서 호흡기 질병의 증상을 나타내어 가검의뢰된 가검물로부터 분리한 균주를 이용하였다. 가검물로부터 Blood agar, Chocolate agar 및 G20G agar (Bactopeptone 20g, NaCl 5g, Bromthymol Blue 40 mg, Furaladone 0.5 mg, gentamicin 0.5 mg, penicillin 20 mg, Fungizone 20 mg, Glucose 10 g, Lactose 10 g in 1,000 ml of D. W.)을 이용하여 균을 순수분리한 후

Gram 염색성, hemolysis, MacConkey agar에서의 발육여부, oxidase test, urease test, catalase test 등 일반적인 생화학적 검사 및 CAMP test, NAD 요구성 등 균특성 관련 검사와 자동 미생물 동정 장치인 Vitek (BioMerieux, Hazelwood, Missouri, USA) 및 혈청학적 방법을 이용하여 동정한 *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* 3:A 및 4:D, *Actinobacillus pleuropneumonia* serotypes 2와 5를 사용하였다.

### 항원의 생산

산란계에 면역할 항원은 bacterin, outer membrane protein (OMP), iron-restricted outer membrane protein (IROMP) 및 dermonecrotoxin (DNT)을 사용하였고, 이때 사용한 항원의 준비는 Shin 등의 방법에 준용하여 추출 후 SDS-PAGE, Western blot 및 실험동물 접종 등을 통하여 분석하였다<sup>12,13</sup>. 또한 항체가 측정을 위한 ELISA에 사용하였던 항원도 동일한 방법에 의하여 추출하여 사용하였다<sup>12,13</sup>.

### 산란계의 면역

난황항체 생산을 위하여 사용한 12주령의 백색 산란계로서 4월부터 10월까지 일반적인 야외 조건에서 사육하면서 실험을 실시하였다. 이들 산란계의 면역는 Shin 등이 서술한 방법<sup>12,13</sup>에 따라서 실시하였다. 즉, 돼지 호흡기 질병의 주요 원인균인 *B. bronchiseptica*, *P. multocida* 3:A 및 4:D, *A. pleuropneumoniae* serotype 2 및 5의 OMP, DNT, IROMP 및 균체 항원을 적정농도로 조절하여 ISA 70을 adjuvant 로 사용하였으며, 접종은 2주간격으로 3회 접종하였다. 면역된 산란계는 2주간격으로 첫백신 접종 후 12주까지의 혈청 및 계란을 수거하여 각 시험군별로 4수씩의 닭의 혈청 또는 난황 항체를 합하여 항체가 분석에 사용하였다.

### 난황 및 혈중 항체 준비

난황항체의 추출은 이전의 연구에서 서술한 바와 같이 chloroform extraction method을 이용하여 추출하였다<sup>5,12,13</sup>. 즉, 수집한 계란을 난황만 분리하여 50 ml 원심튜브에 넣은후 동량의 PBS를 가한 후 잘 혼합하고 다시 동량의 chloroform을 가하고 실온에서 2시간 정치한 후 상층액을 취하여 IgY의 항체가 측정에 사용하였다. 산란계의 혈청은 백신 접종 전 및 접종 후 매주 닭의 익하정맥에서 혈액을 채취하여 4℃에서 24시간 방치한 후 혈청을 분리하여 56℃에서 30분간 비동화를 실시한 후 항체가 측정에 사용하였다.

## ELISA

난황과 혈청내 항체가 ELISA 법을 이용하여 측정하였다<sup>12,13</sup>. ELISA 항원으로는 *B. bronchiseptica* 와 *P. multocida* D:4 는 DNT 와 OMP를, *P. multocida* A:3 는 OMP 와 IROMP를 *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 와 5 는 OMP을 ELISA 항원으로 사용하여 실시하였다. 이들 ELISA 항원은 coating buffer (Citrate buffer pH 9.6) 에 희석하여 microplate well 당 0.14  $\mu$ g 이 포함되도록 100  $\mu$ l 씩 분주하여 4°C에서 18 시간 방치한 후, 0.05% Tween 20-PBS(T-PBS) buffer로 3 회 세척한 후 1% bovine serum albumin (BSA)을 함유한 PBS 로 37°C에서 1 시간동안 정치 시킴으로써 blocking 하였다. Blocking 후 T-PBS 로 3 회 세척한후, PBS 로 적정농도로 희석한 egg yolk 와 혈청을 37°C에서 1 시간 동안 반응시킨후 반응하지 않은 항체는 T-PBS을 이용하여 3 회 세척함으로써 제거하였다. 3 회 세척후 horseradish peroxidase 가 conjugate 된 rabbit anti-chicken IgG (Cappel Co.)를 1:1,000 으로 희석하여 37°C에서 1 시간 동안 반응시킨 후, 반응하지 않은 conjugate 는 PBS로 3 회 세척함으로써 제거 하였다. 반응 후 기질, 2,2-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)를 각 well에 100 $\mu$ l 씩 첨가한 후 15 분간 반응후 stop solution (2M HCl) 을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 microplate ELISA reader을 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정 하였다.

## 통계처리

본 결과의 분석은 Excell(Microsoft Corp., Redmond, Wash. USA)을 이용한 analysis of variance for linear regression을 이용하여 분석하였다. 혈중 항체가 난황내로 전달되기 때문에 이 분석에서는 혈청내의 항체가를 독립변수 (X) 로 하였고, 난황내 항체가를 종속변수 (Y) 로 하여 분석 하였다. 회귀 방정식, 상관계수(r) 및 결정 계수 (r<sup>2</sup>)는 Excell program 을 이용하여 산출하였다.

## 결 과

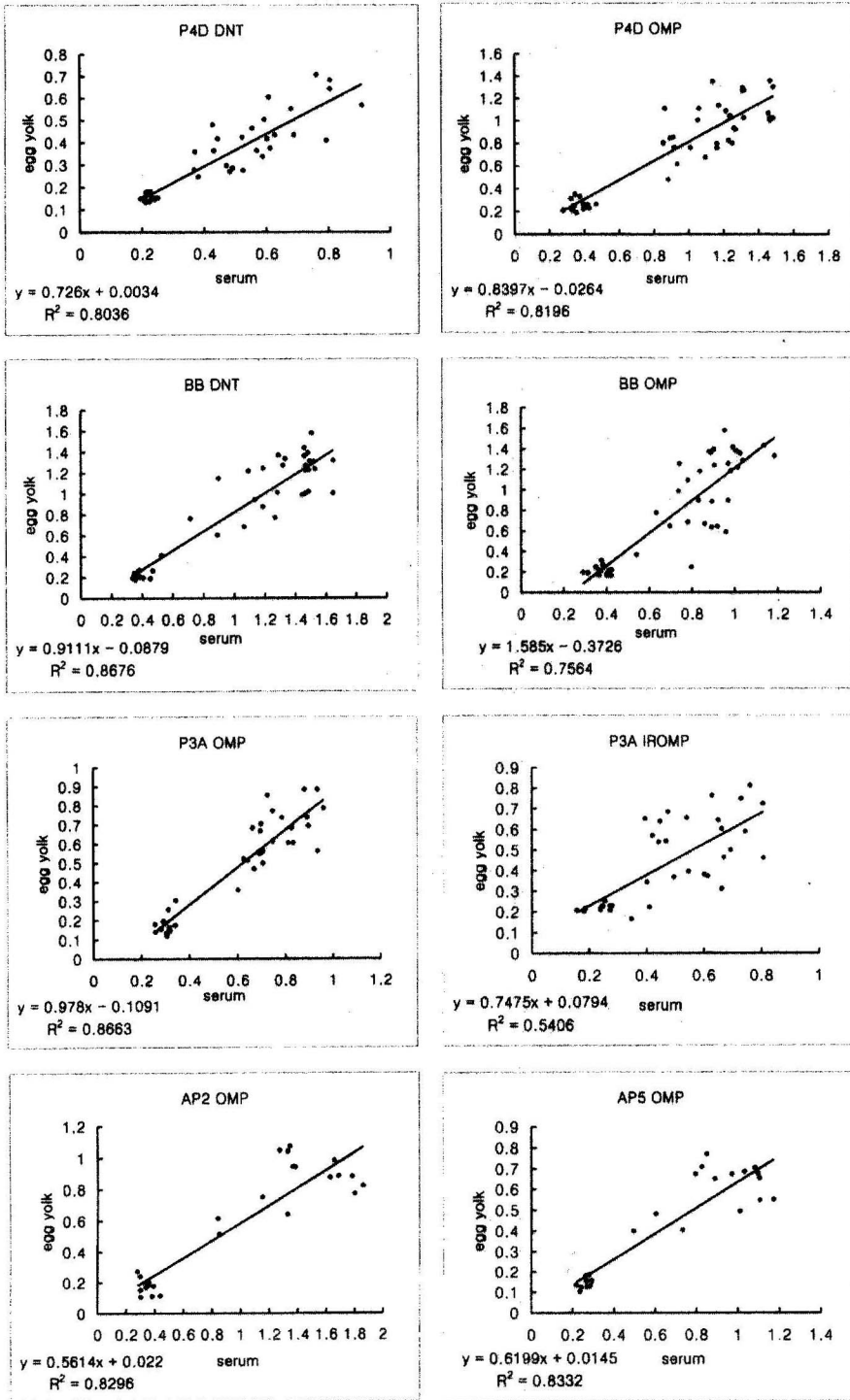
최근 사람 및 동물에서 질병의 예방 및 치료를 위한 피동 면역제 개발을 위하여 많은 연구가 이루어지고 있는 난황 항체의 개발을 위한 일환으로 돼지 호흡기 질병의 주요 원인체들의 주요 항원을 이용한 실험백신을 제조하여 산란계를 면역시킨후 난황내의 항체가와 혈중 항체가의 변화 추이 및 상관 관계를 비교하였다.

돼지 위축성비염의 주요 원인체인 *B. bronchiseptica* 의 DNT 와 OMP 는 난황 및 혈중 항체가의 관계는 각각  $Y = 0.9111 X - 0.8676$  ( $r = 0.93$ ) 와  $Y = 1.585 X -$

$0.3726$  ( $r = 0.87$ ) 로서 고도의 유의성을 나타내었다 ( $P < 0.01$ )(Fig 1). 또한 돼지 위축성 비염의 주요 원인체중의 하나인 *P. multocida* D:4 의 DNT 및 OMP 에 대한 난황 및 혈중의 상관관계에서는 각각  $Y = 0.726 X + 0.0034$  ( $r = 0.90$ ) 와  $Y = 0.839 X - 0.0264$ ( $r = 0.91$ ) 로서의 고도의 유의성 ( $P < 0.01$ )을 가지는 상관 관계를 나타내었다 (Fig 1). 돼지 파스튜렐라성 폐렴의 원인체인 *P. multocida* A:3 의 OMP 및 IROMP 에 대한 난황 및 혈중 항체가는 각각  $Y = 0.978 X - 0.1091$  ( $r = 0.93$ ) 과  $Y = 0.745 X + 0.0794$  ( $r = 0.74$ ) 로 상관 관계의 식에서는 고도의 유의성을 나타내었으나, IROMP 의 경우 상관계수 ( $r = 0.74$ )가 다른 항원들에 비하여 가장 낮았다 (Fig. 1). 돼지 홍막폐렴의 주요 원인체인 *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 와 5 의 OMP 에대한 난황 및 혈중의 항체가의 상관관계는 각각  $Y = 0.5614 X + 0.022$  ( $r = 0.91$ ) 과  $Y = 0.6199 X + 0.0145$  ( $r = 0.91$ ) 로 고도의 유의성 ( $P < 0.01$ )이 있는 상관 관계를 나타내었다 (Fig. 1). 이들에 대한 결정 계수 역시 *P. multocida* A:3 IROMP 항원에서만 약 56% 로 낮게 나타났고, 기타 나머지 항원에서는 76 - 87% 까지로 높게 나타났다.

## 고 찰

동물 및 사람에서 질병의 치료 및 예방을 위한 난황 항체의 이용은 최근들어서 그 적용범위가 확대되어 가고 있다. 특히 동물에서 질병 예방 및 치료를 위하여 사용하여 왔던 백신 접종, 항생제 투여 등의 방법이 이들 적용에 따른 쇼크의 유발, 항생제 내성균의 출현 등과 같은 여러 가지 부작용문제가 대두되면서 새로운 치료 예방법의 하나로 난황항체의 개발 및 적용이 증가되고 있다<sup>4,13</sup>. 난황 항체가는 접종계의 혈중항체가에 따라서 변화한다<sup>1</sup>. 그러므로 지속적인 고역가의 난황항체생산을 위하여는 항원 접종 산란계의 혈중 항체가를 파악하는 것이 기본이면서 또한 매우 중요하다. 만약 난황항체가와 혈중 항체가의 상관 관계를 알 수 있으면 닭에서의 매번 채혈없이 닭의 혈중 항체가 변화를 난황항체가의 변화를 통하여 알 수 있을 것으로 사료된다. 혈중항체가와 난황의 항체가의 상관관계 비교는 양계산업에서 중요하게 대두되는 몇가지의 virus 성 질병에 대하여 vaccine 접종후 계군의 항체가 파악을 통한 계군의 면역 상태 파악 또는 계군의 질병 발생양상 파악을 위한 방법정도로 이들의 관계를 분석하였다<sup>17,18</sup>. 그러나, 아직까지 타 동물에 적용하기 위한 목적으로 난황항체를 생산함에 있어서는, 특히 세균성 원인체의 주요 병원성인자를 이용한 백신 제조 후 접종에 따른 항체가 변화양상에



**Fig. 1.** Correlation between serum and egg yolk antibody titers to eight antigens of five major pathogens in swine respiratory diseases using a single linear regression.  $R^2$  = Coefficient of determination, Y = simple linear regression equation for each antigen

대한 분석에 대한 보고는 없다. 본 연구에서 돼지에서 주요 호흡기 질병인 위축성 비염, 파스튜렐라성 폐렴, 및 흉막폐렴의 주요 원인체의 항원물질을 이용하여 실험백신을 제조한 후 이들 백신으로 면역시킨 산란계에서의 혈중항체와 난황항체가 변화의 상관관계를 분석하였다. 상관관계를 분석한 결과 *P. multocida* A:3 IROMP 에 대한 항체가 변화 양상에서만 상관계수 ( $r$ ) 이 0.74 로서 가장 낮게 나타났고, 돼지 위축성 비염의 주요 원인체인 *B. bronchiseptica* 의 OMP에 대한 상관계수 ( $r$ ) 가 0.87를 나타내었으며, 기타 나머지 원인체에 대한 항원 상관계수( $r$ )가 0.90 이상으로 높게 나타내었다. 이들에 대한 결정계수 [Coefficient of determination ( $r^2 \times 100$ )] 는 낮은 상관계수를 나타낸 *P. multocida* A:3 IROMP 에서는 56%를 나타내어 이를 이용한 예측은 어려울것으로 생각되나, *B. bronchiseptica* OMP을 항원으로 이용하여 실시한 경우에는 약 76%의 상관관계를 나타냄으로서 어느정도의 의미를 부여할 수 있었고, 나머지 항원들에서는 결정계수가 80 - 87%의 아주 높게 나타났다. 이러한 결과는 Brown 등<sup>17</sup>이 commercial broiler breeder hens에서 채취하여 Infectious Bursal Disease (IBD) virus 에 대한 항체를 조사한 결과와 비교할 때에 *P. multocida* A:3 IROMP 항원에 대한결과와 유사하였고 다른 항원들에 대한 결과는 매우 높은 결정계수를 나타내었다. 그러나, Silim 과 Venne<sup>18</sup> 가 IBD virus, infectious bronchitis (IB) virus, New Castle Disease (ND) virus 및 Reovirus (RV)에 대하여 조사한 결과와는 *P. multocida* A:3 IROMP 항원에 대한 결과를 제외한 다른 항원들에 대하여는 유사하였다.

이러한 결과는 난황항체를 생산하기 위한 목적 이외에도, 계군의 세균성 질병에 대한 항체가 추이 파악에도 좋은 기초 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다. 그러나, *P. multocida* A:3 의 IROMP 항원과 같이 낮은 상관 계수 및 결정계수를 나타내는 항원들에 대하여는 추가적으로 항원의 제조 방법, ELISA 항원의 정제 또는 닭의 면역 방법 등에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

### 감사의 글

본 연구는 농림기술개발사업 (관리번호198010-3), Brain Korea 21 Project 및 서울대학교 수의과대학 수의 과학연구소의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Patterson R, Youngner JS, Weigle WO, Dixon FJ. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J Immunol*, 89:272-278,1962.
2. Hsu E, Flajnik MF, Pasquier LD. A third immunoglobulin class in amphibians. *J Immunol*, 135:1998-2004, 1985.
3. 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.
4. Warr GW, Magor KE, Higgins DA, IgY : clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today*, 16:392-398, 1995.
5. 우승룡, 김종만, 권창희 등. 난황항체를 이용한 돼지 대장균 설사증 방제 기법 개발 I. 대장균 pilus 항원과 LT 로 면역시킨 닭의 면역반응. 대한수의학회지, 38:829-836, 1998.
6. 우승룡, 김종만, 권창희 등. 난황항체를 이용한 돼지 대장균 설사증 방제기법 개발 II. 난황항체의 돼지 대장균증에 대한 치료효과. 대한수의학회지, 38:837-842, 1998.
7. Yokoyama H, Paralta RC, Diaz R. et al. Passive protective effects of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect Immun*, 60:998-1007, 1992.
8. Ikemori Y, Kuroki M, Peralra 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*, 53:2005-2008, 1992.
9. 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*, 57:1077-1081, 1993.
10. 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*, 31:268-274, 1997.
11. Almeida CM, Kanashiro MM, Rangel FB, et al. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. *Vet Rec*, 143:579-584, 1998.
12. 신나리, 김종만, 유한상. 난황항체를 이용한 돼지 호

- 흡기 질병 방제에 관한 연구 I. *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* 및 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 주요 면역원 분석 및 IgY의 생산. 대한수의학회지, 40:551-561, 2000.
13. Shin NR, Choi IS, Kim JM, Hur W, Yoo HS. Effective methods for the production of immunoglobulin Y using immunogens of *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Vet Sci*, 3:47-57, 2002.
  14. 신나리, 김종만, 최인수, 유한상. 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제에 관한연구 II. 면역된 산란계로부터 생산된 난황항체의 특이성 분석. 대한수의학회지, 41:197-202, 2001.
  15. 신나리, 김종만, 유한상. 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제에 관한연구 III. 마우스에서의 방어 효과. 대한수의학회지, 41:351-356, 2001.
  16. Bollen LS, Crowley A, Stodulski G, Hau J. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titer and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *J Immunol Meth*, 191:113-120, 1996.
  17. 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 Diseases*, 33: 643-648, 1989.
  18. Brown J, Resurreccion RS, Dickson TG, Horne A. The relationship of egg yolk and serum antibody. I. Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Diseases*, 33 : 654-656, 1989.