

아카바네 생 바이러스 백신 접종에 의한 한우 백혈구 아군의 변화

박영남, 손승미, 신명균, 권명상*

강원도가축위생시험소, 강원대학교 수의학부대학*
(접수 2006. 7. 24, 게재승인 2006. 9. 1.)

Leukocyte subpopulations of peripheral blood in Korean indigenous cattle vaccinated with attenuated live Akabane virus vaccine

Young-Nam Park, Sung-Mi Son, Myung-Kyun Shin, Myung-Sang Kwon*

*Kangwon Veterinary Service Laboratory,
College of Veterinary Medicine, Kangwon National University**
(Received 24 June 2006, accepted in revised from 1 September 2006)

Abstract

To identify immune response of leukocytes in peripheral blood of cattle vaccinated with an attenuated live Akabane virus vaccine, leukocytes were reacted with monoclonal antibodies which are specific to bovine lymphocyte surface antigens and assayed by the flow cytometry. Serum neutralizing (SN) test was used to measure antibody titers after vaccination. SN antibody was appeared to 7 days post-vaccination (PV) and 2-8 antibody titers were observed in 14 days PV. Proportion of CD8⁻MHC class II⁺ expressing cells were rapidly increased at 3 days PV. CD8⁺MHC class II⁻ cells were increased at 7 days PV. CD4⁺CD8⁻, WC⁺CD4⁻, CD4⁺CD8⁺, WC1⁻CD4⁺, WC1⁻CD8⁺, and CD4⁻CD8⁺ cells were highly increased at 3, 3, 7, 7, 14, 14 days PV, respectively.

key words : Leukocyte surface antigen, Monoclonal antibodies, Attenuated live Akabane virus vaccine

¹Corresponding author

Phone : +82-33-243-9581, Fax : +82-33-243-9584

E-mail : ynsky@naver.com

서 론

아카바네병은 모기 및 절족동물이 매개하여 소에 감염되며, 어미에게는 임상증상을 일으키지는 않지만 임신한 소의 태반을 통과하여 태자에 감염함으로써 조산 및 유, 사산 등을 일으키고, 선천성 관절만곡증 및 대뇌수종 등의 증상을 나타내는 송아지를 생산하는 기형유발성 바이러스 질병이다¹⁾.

국내에서는 1980년 박 등²⁾이 이병의 발생을 처음 보고하였고, 이후 이 등³⁾에 의해 한 국내에 아카바네병이 발생되고 있음이 확인되었고, 1988년과 1989년에 많은 소에서 아카바네병으로 의심되는 병이 발생되어 약 700두 이상의 송아지가 유, 사산 및 기형 분만되었으며⁴⁾ 현재 계속 발생되고 있다.

소 아카바네병의 예방을 위하여 아카바네 불활화 및 생독예방백신이 개발되어 사용되고 있다^{4, 5)}. 생독백신은 년 1회 접종으로써 면역항체를 획득할 수 있는 반면, 사독백신은 년 2회 접종해야 하며 획득한 항체수준이 빠르게 소실되는 결점이 있어 야외에서는 생독백신이 널리 쓰이고 있다⁵⁾.

동물은 체내로 침입한 병원체 및 이물체를 비자기(nonself)로 인식하고 그것을 제거하려는 일련의 면역반응 과정을 가지고 있다. 이러한 자기방어를 위한 면역체계는 크게 두 가지 기작으로 나누어진다. 항원이 생체에 침입하였을 때 그것과 반응할 수 있는 항체를 만들어 세균이나 바이러스의 중화, 살균, 제거하는 체액성면역(humoral immunity)과 그 항원과 반응하는 림프구를 유도하여 그 자체가 효과세포(effect cell)로 작용하여 침입해 온 세포나 조직을 직접 파괴하는 세포매개성면역(cell-mediated immunity)으로 나눌 수 있다⁶⁻⁹⁾.

면역반응은 주로 백혈구에 의해서 일어나는데 백혈구에는 몇 가지 종류가 있다. 백혈구 중 중요한 그룹은 단핵구(monocyte), 대식세포(macrophage) 및 다형핵 중성구(neutrophil)와 같은 탐식세포들(phagocytes)이다. 이들은

미생물과 결합하여 그것들을 세포안으로 흡수하여 파괴하며 비특이적인 면역반응을 일으킨다. 또 다른 그룹은 림프구(lymphocytes)인데 이들은 면역계를 구성하고 있는 주세포이다. 림프구는 크게 T림프구와 B림프구로 구별되어지는데 이들은 각 항원을 대하여 특이적으로 인지한다. 모든 림프구는 골수간세포로부터 유래하나 포유동물에 있어서 T림프구는 흉선에서 발육하고 B림프구는 골수에서 발육한다^{8, 9)}.

T림프구는 대식세포 또는 수지상 세포(dendritic cell) 등의 항원제시세포(antigen present cell, APC)와 주요조직적합복합체(major histocompatibility complex, MHC) 분자들에 의하여 항원을 인식한다. 이러한 T림프구는 다시 그 기능에 따라 T_H(helper T)림프구, T_S(suppressor T)림프구 및 T_C(cytotoxic T)림프구의 3가지로 나뉘어진다. T_H림프구는 항원을 인식하게 되면 대식세포의 활성화, B림프구의 Ig 합성능 증대 및 T_C림프구의 활성화 등 면역계의 다른 세포들을 자극하여 효과적인 면역반응을 유도한다. T_S림프구는 T_H림프구와는 반대로 다른 세포들의 면역반응을 억제하는 기능이 있기 때문에, T_H림프구와 더불어 생체 내에서 이루어지는 전반적인 면역반응을 조절하는 기능 즉 항상성(homeostasis)을 유지하는 역할을 담당하고 있다. T_C림프구는 활성화되면 인식된 바이러스나 종양 등의 항원을 보유한 표적세포(target cell)들에 직접 또는 간접적으로 작용하여 이들 세포를 용해시켜 없애버리는 기능을 가지고 있다⁷⁻⁹⁾.

B림프구는 항원의 자극과 T림프구의 도움을 받게 되면 더욱 분화하여 성숙한 B림프구로 된 다음, 형질세포로 분화되어 항체를 생산한다. B림프구는 T림프구와는 달리 아군별로 나누어지지 않고 단지 항원의 자극을 받아 활성화되면 형질세포가 되어 특정항원에 대한 특이항체를 생산하며, 일부는 memory B림프구가 되어 다시 동일한 항원을 만났을 때 반응할 수 있도록 준비를 한다⁸⁻¹⁰⁾.

사람이나 동물에서 혈액은 살아 있는 상태에서 쉽게 구할 수 있는 림프구의 유일한 공급원이기 때문에 혈액에 대한 림프구를 이용한 주요조직적합복합체 및 백혈구 감별항원 (CD항원)에 대한 특이 단클론항체(mono-clonal antibody)를 이용한 림프구 아군별 분포율을 조사하여 젖소와 여러 반추류의 면역체계에 관한 많은 연구가 이루어졌다⁹⁻¹⁶⁾. 단클론항체를 이용하여 Köhler 등¹⁸⁾은 돼지에서 *Pasteurella multocida* 비강분무 예방약 접종 후 백혈구 표면 분자에 대하여 연구한 바 있고, Parsons과 MacHugh¹⁶⁾, Morrison과 Davis¹⁹⁾, Davis와 Splitter¹⁰⁾, Davis 등²⁰⁾에 의해 소의 T 림프구의 표면 분자에 대한 조사 보고가 있었으며, Sopp 등²¹⁾은 단클론항체를 사용 two-colour immunofluorescence 염색으로 소의 백혈구 아군의 분류에 대하여 연구하였으며, Clark 등²²⁾은 rat에서 단클론항체를 이용 T림프구의 활성화에 대해서 조사 보고된 바 있고, 그 외 많은 학자들^{9, 12, 14, 15, 17, 23-28)}에 의해 T림프구의 표면 항원과 면역기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

한편 국내에서의 단클론항체를 이용한 림프구 아군별 분포율에 관한 보고는 문 등²⁹⁾이 건강한 한우 및 젖소의 백혈구 아군에 관하여 조사 보고하였고, 황 등^{30, 31)}, 양 등^{32, 33)}에 의해 돼지의 림프구 아군의 분포에 대하여 연구된 바 있으나, 백신 접종 후 한우의 백혈구 아군에 변화에 관한 보고는 미미한 실정이다.

본 연구는 소 아카바네 백신 접종 후 순환 말초 혈액 중 림프구의 아군별 분포율을 소 백혈구 표면항원에 특이적으로 반응하는 단클론항체와 flow cytometry를 이용하여 조사함으로써 한우의 아카바네 백신에 대한 면역학적인 특성을 림프구 차원에서 규명하고자 실시되었다.

재료 및 방법

실험동물

강원도 축산기술연구센터에서 배합사료와 조 사료 및 지하수를 급여하여 사육하고 있는 한우 중 임상적으로 건강하고, 아카바네 백신 접종경력이 없으며 아카바네 바이러스 혈청 중화 항체가가 2이하인 13-15개월령 미경산 암소 12두를 실험에 사용하였다.

아카바네 생독 백신

시판되는 소아카바네 생독 백신 (JaGar-39주, Hmlu-1 cell 계대배양, $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml, 중앙가축전염병연구소)을 마리 당 1ml씩 피하 접종하였다.

백신접종 및 채혈

공시동물 12두 중 6마리에 소 아카바네 생독백신을 접종하였으며 나머지 6마리는 예방백신을 접종치 않고 대조군으로 사용하였다. 백신은 모기출현 시기 이전인 5월에 접종하였으며, 접종하기 전, 접종 후 1일, 3일, 7일, 그리고 14일째에 경정맥에서 각각 채혈하였다.

혈청중화항체 역가 실험

아카바네 바이러스 및 Vero cell : 혈청중화항체 역가 측정에 필요한 Vero cell은 국립수의과학검역원에서 분양받아 minimum essential medium (α -MEM, GibcoBRL, USA)에 5% FBS (Sigma, USA)를 첨가하고, 37°C의 CO₂ 인큐베이터에서 세포수가 2×10^5 개/ml로 배양하였다. 아카바네 바이러스(93-FMX주)는 국립수의과학검역원에서 분양받아 사용하였다. 바이러스의 역가는 바이러스 배양액을 α -MEM으로 10진 계단 희석한 후 96well microplate에 분주하고, 미리 희석된 세포부유액을 100 μ l 씩 더한 다음, 37°C에서 5일간 배양하면서 세포변성효과(cytopathic effect, CPE)를 관찰하여 결정하였고, 200TCID₅₀/ml로 희석하여 혈청중화 시에 사용하였다.

혈청중화항체 검사 : 96 well microplate 에 α -MEM을 50 μ l 씩 분주하고, 56°C에서 30분간 비동화처리한 가검혈청 50 μ l을 첫 번째 well에 가한 다음, 2배 계단 희석하였다. 200TCID₅₀/ml의 바이러스 부유액을 각 well에 동량 섞어 37°C에서 1시간 잠작시킨 다음, 2 \times 10⁵cells/ml의 세포를 100 μ l 더하고 37°C의 습상 CO₂ 인큐베이터에서 2일-3일 배양 후 CPE가 나타나지 않는 최대희석 배수의 역수를 혈청중화항체 역가로 결정하였다.

림프구 아군 검사

백혈구 분리 : 백혈구 분리는 Boyum³⁴⁾의 방법에 준하여 실험하였다. 경정맥에서 heparin으로 처리된 vacutainer(Becton Dickenson, USA)로 채혈하여 응고되지 않게 잘 섞은 다음, 혈액과 동량의 3% dextran-T500(w/v sol. in 0.9% NaCl, Sigma, USA)을 혼합하여, 실온에서 45분간 방치하여 적혈구를 침전시킨 후, 상청액을 취하여 Ficoll(density: 1.077, Sigma, USA)용액 위에 중층시키고 300 \times g 10분간 원심하여 상층액과 Ficoll의 중간에 있는 백혈구 층을 분리하였다. 분리된 백혈구층을 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco BRL, USA)로 20°C, 800 g, 30분간 원심 세척하여 분리된 백혈구를 0.2% trypan blue (Sigma, USA)로 염색하여 혈구 계산판으로 생존 세포수를 센 후 백혈구수가 1 \times 10⁶/ml 되게 세포농도를 조절하여 본 실험에 이용하였다.

림프구 아군실험용 단클론 항체 : 실험에 사용한 단클론 항체는 Serotec(UK)에서 MHC class II, CD8, CD4, WC1에 특이적인 항체를 구입하였으며, 각각 15 μ g/ml로 희석하여, WC1/CD8, WC1/CD4, MHC class II/CD8, CD4/CD8으로 double stain하였다 (Table 1).

Flow cytometry 검사 : 백혈구 double stain-

ing은 Davis와 Hamilton³⁵⁾의 방법에 준하여 실시하였다. Primary antibody로서 단클론항체 50 μ l(15 μ g/ml) 2종을 double stain 하기 위하여 96 well microplate(V-bottom)의 각 well에 분주하고, 분리한 1 \times 10⁶/ml의 백혈구를 각 well에 50 μ l씩 분주하여 4°C에서 30분간 잠작시켰다.

반응이 끝난 다음 10% FBS(fetal bovine serum)를 함유한 RPMI-1640을 100 μ l 넣고 2,000rpm에서 3분간 3회 원심 세척하여 상청액을 버리고 밑부분에 모인 pellet을 10% FBS를 함유한 RPMI-1640으로 부유시켰다. 여기에 secondary antibody로서 primary antibody에 사용된 Ig isotype과 일치하는 fluorescein isothiocyanate conjugated goat anti-mouse antibodies와 R-phycoerytherin-conjugated goat anti mouse (IgG1, IgG2)를 약 150배로 희석한 후 각각 50 μ l/well를 가하고, 알루미늄 호일로 빛을 차단시켜 4°C에서 30분간 잠작시킨 다음, 10% FBS-RPMI-1640에 100 μ l로 4°C, 2,000 rpm, 3분간 3회 원심 세척한 후 2% formalin 200 μ l를 넣어 4°C의 암실상태에서 고정하여 시료로 사용하였다. 시료는 Flow-cytometry 용 tube에 PBS 1ml을 넣어 FACscanTM (CELL Quest software Ver 1.2, Becton Dickinson, USA)를 사용하여 측정하였다.

Table 1. Monoclonal antibodies used for immunostaining of bovine peripheral blood mononuclear cells

Bovine specificity (antibody)	Cell types
MHC class II (IgG1-P.E)	B cell, some Monocyte
CD8-FITC	T _C cell, some N.K cell
CD4-P.E, FITC	T _H cell, some Monocyte
WC1 (IgG2-P.E)	γ δ T cell

통계처리

실험군 및 대조군의 각 일자별 결과는 평균치와 표준오차로 표기하고 통계처리 pac-

kage인 SAS 프로그램³⁶⁾으로 proc ANOVA 로 분석하였으며 각 일자별 실험군은 dun-can's t-test를 사용하여 유의성을 검정하였다 ($p < 0.05$).

결 과

혈청중화항체 역가

혈청중화항체가 실험에서 바이러스 접종 3일째 CPE가 관찰되었으며, 항체는 아카바네 생독백신 접종 7일 이후부터 형성하기 시작하여 14일째에 백신 접종군은 2-8배의 항체역가를 나타내었으며 개체별 항체 역가는 Table 2와 같다.

림프구 아군 분포

Table 2. Serum-neutralizing antibody titers of Korean indigenous cattle vaccinated with an attenuated live Akabane virus vaccine.

Groups	Cattle No.	Serum-neutralizing antibody titers				
		0*	1	3	7	14
Vaccinated	1	< 2	< 2	< 2	2	4
	2	< 2	< 2	< 2	2	4
	3	< 2	< 2	< 2	< 2	2
	4	< 2	< 2	< 2	2	4
	5	< 2	< 2	< 2	2	8
	6	< 2	< 2	< 2	2	2
Unvaccinated	7	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
	8	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
	9	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
	10	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
	11	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
	12	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2

*: Days post-vaccination

T림프구 중 T_H세포만 보유하는 CD4⁺CD8⁻ 세포발현의 변화는, 백신접종군의 세포율을 대조군 세포율로 나눈 비율(Fig 2)이 7일째 증가하여 14일째에는 다시 감소한 반면, T림

항원제시세포와 결합하여 helper T세포에 의해 인지되는 CD8⁻MHC class II⁺세포발현의 변화는, 백신접종군의 양성세포율을 대조군 양성세포율로 나눈 비율이 접종전, 접종후 1일, 3일, 7일, 15일째에 각각 1.08, 1.15, 21.06, 11.41, 4.59로 3일째에 급격히 상승하였고, 이후 실험기간동안 대조군에 비하여 증가된 경향을 나타내었다. CD8⁺MHC class II⁻세포발현의 변화는 백신접종 전, 접종 후 1일, 3일, 7일, 15일째에 각각 1.06, 1.10, 1.03, 1.37, 1.85로 백신 접종 7일 후부터 다소 증가하였다. CD8⁺MHC class II⁺세포발현의 비율은 CD8⁻MHC class II⁺, CD8⁺MHC class II⁻세포발현에 비하여 월등히 낮은 비율을 보였고 실험 기간 중 변화는 관찰되지 않았다(Table 3, Fig. 1, Fig. 3).

프구 중 T_C세포 및 T_S세포가 보유하는 CD4⁻CD8⁺세포발현의 변화는 백신접종 전, 접종 후 1일, 3일, 7일, 15일째에 각각 1.09, 0.86, 1.22, 1.16, 3.45로 백신 접종 직후에는

다소 감소하였으나 14일째에 유의성 있게 증가하였다. CD4⁺CD8⁺세포발현은 7일째부터 증가하기 시작하였다(Table 4, Fig. 2, Fig. 3).

γ δ T cell receptor를 발현하는 WC1⁺CD8⁻세포발현의 변화는 백신접종군의 세포율을 대조군 세포율로 나눈 비율이 백신접종 후 날짜에 따른 변화는 관찰되지 않았으며, α β T cell receptor를 발현하는 WC1⁻CD8⁺발현세

포의 비율을 대조군의 비율과 비교시 백신접종 전, 접종 후 1일, 3일, 7일, 14일째에 0.99, 0.95, 1.13, 0.93, 1.80으로 14일째에 증가하였다.

WC1⁺CD8⁺세포발현은 WC1⁻CD8⁺ 및 WC1⁺CD8⁻세포발현에 비하여 월등히 낮은 비율을 보였고 실험 기간 중 변화는 관찰되지 않았다 (Table 5, Fig 4).

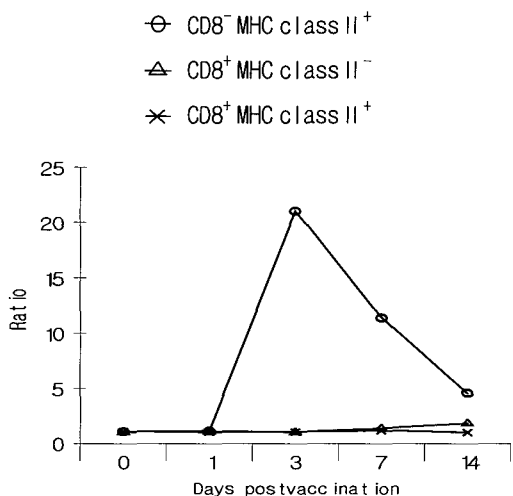


Fig 1. The ratio of CD8 and MHC class II positive cells of vaccinated group versus control group

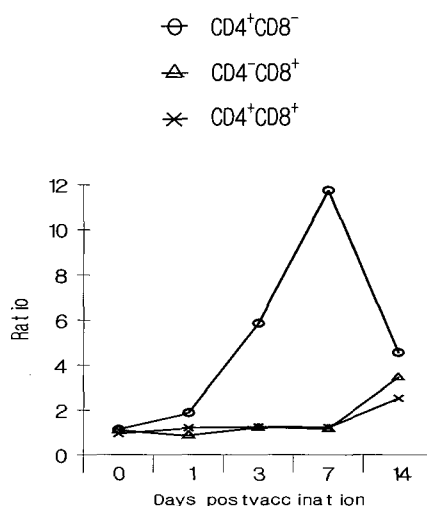


Fig 2. The ratio of CD4 and CD8 positive cells of vaccinated group versus control group

Table 3. Changes of CD8 and MHC class II positive cells in peripheral blood of Korean indigenous cattle vaccinated with attenuated live Akabane virus vaccine

Specificity	Group	% positive cells(mean ± SD)				
		0 ^{***}	1	3	7	14
CD8 ⁻	V [*]	40.49 ± 15.55	29.37 ± 9.98	42.37 ± 11.24	33.67 ± 8.88	18.12 ± 6.19
MHC class II ⁺	C ^{**}	38.20 ± 16.77	25.54 ± 7.98	2.01 ± 1.09	3.71 ± 1.93	3.95 ± 1.45
CD8 ⁺	V	13.03 ± 7.25	22.85 ± 6.12	7.19 ± 2.34	8.26 ± 2.25	8.69 ± 2.56
MHC class II ⁻	C	12.29 ± 6.99	20.77 ± 7.22	6.98 ± 3.43	6.03 ± 3.03	4.70 ± 1.79
CD8 ⁺	V	2.72 ± 1.95	3.95 ± 2.10	4.65 ± 2.21	2.01 ± 0.98	2.53 ± 1.14
MHC class II ⁺	C	2.49 ± 1.55	4.18 ± 2.45	4.39 ± 1.99	1.71 ± 1.10	2.50 ± 1.65

* Vaccinated group(n=6), ** Control group(n=6), *** Days post-vaccination

Table 4. Changes of CD4 and CD8 positive cells in peripheral blood of Korean indigenous cattle vaccinated with attenuated live Akabane virus vaccine

Specificity	Groups	% positive cells (mean±SD)				
		0***	1	3	7	14
CD4 ⁺ CD8 ⁻	V*	35.11±12.76	28.26±11.67	25.34±9.99	32.28±9.21	29.24±8.75
	C**	31.07±11.45	15.11±6.22	4.32±2.09	2.74±1.37	6.41±2.85
CD4 ⁻ CD8 ⁺	V	24.83±9.87	19.66±5.87	16.98±6.87	26.51±8.09	25.55±7.79
	C	22.78±7.66	22.86±6.35	13.92±5.45	22.85±9.27	7.40±2.64
CD4 ⁺ CD8 ⁺	V	5.77±2.69	7.05±2.50	6.66±2.25	7.60±2.52	8.44±2.91
	C	6.07±2.34	5.92±2.68	5.33±2.43	6.22±2.65	3.34±1.26

*: Vaccinated group (n=6), **: Control group (n=6), ***: Days post-vaccination

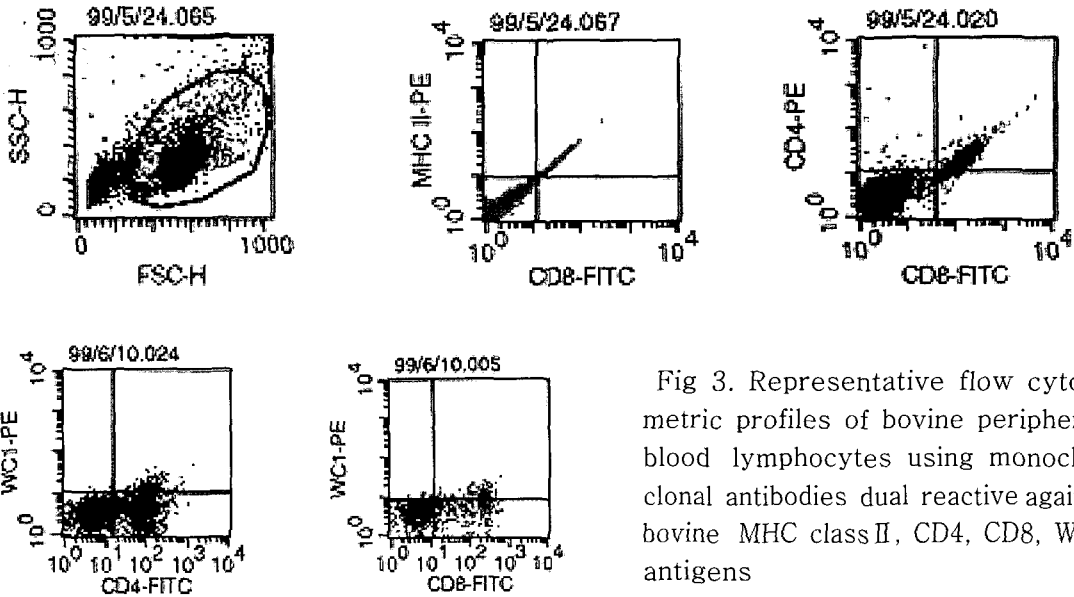


Fig 3. Representative flow cytometric profiles of bovine peripheral blood lymphocytes using monoclonal antibodies dual reactive against bovine MHC class II, CD4, CD8, WC1 antigens

WC1⁻CD4⁺세포발현은 백신접종 후 7일째부터 유의성 있게 증가되기 시작하였으며(0.98, 1.73, 1.95, 11.10, 3.34), WC1⁺CD4⁻세포발현은 3일째까지는 대조군과 차이가 없었으나 3일후부터 시간이 경과함에 따라 서서히 증가하였고, WC1⁺CD4⁺세포발현은 WC1⁻CD4⁺ 및 WC1⁺CD4⁻세포발현에 비하여 월등히 낮은 비율을 보였고 WC1⁺CD8⁺세포발현과 유사하게 실험 기간 중의 변화는 관찰되지 않았다(Table 6, Fig 5).

고찰

본 실험에서는 소 아카바네백신 접종 후에 백혈구 표면 특이항원에 대한 단클론항체를 이용하여 한우 말초 혈액내에 존재하는 백혈구아군별 분포율을 조사함으로써 백신에 의한 림프구의 면역기전을 규명하였다.

항원특이 T림프구가 항원을 인식하는데는

MHC분자가 외부단백질항원과 결합하여 복합체를 형성한 뒤, 항원특이 T림프구에 이복합체를 제시하여 인지한다고 알려져 있다. MHC class I 분자와 결합한 항원은 CD8⁺ T_C cell에 의해 인식되는 반면, MHC class II 분자에 결합된 항원은 CD4⁺ T_H cell에 의해 인식된

다. CD4⁺ T_H cell은 B림프구가 항체를 생산하게 하거나 대식세포의 살균작용을 도와주며, CD8⁺ T_C cell은 비자기 항원을 발현하는 세포를 제거하는 기능을 함으로써 세포내외에 바이러스나 박테리아를 제거하는데 중요한 역할을 한다⁶⁻⁹⁾.

Table 5. Changes of WC1 and CD8 positive cells in peripheral blood of Korean indigenous cattle vaccinated with attenuated live Akabane virus vaccine.

Specificity	Group	% positive cells(mean±SD)				
		0***	1	3	7	14
WC1 ⁺ CD8 ⁻	V*	18.89±5.67	20.21±6.98	18.69±6.99	18.18±6.26	20.20±7.43
	C**	15.35±6.76	15.42±6.52	15.07±5.68	13.46±5.09	19.61±6.41
WC1 ⁻ CD8 ⁺	V	16.74±7.45	23.72±8.92	17.90±6.76	23.94±6.43	30.58±9.87
	C	16.90±6.43	24.96±7.98	15.84±5.70	25.74±5.97	16.98±7.21
WC1 ⁺ CD8 ⁺	V	2.95±1.10	4.08±1.87	6.99±2.35	5.79±2.46	4.27±1.96
	C	3.07±1.28	4.34±2.02	5.46±2.85	5.26±2.82	4.31±2.14

* Vaccinated group(n=6), ** Control group(n=6), *** Days postvaccination

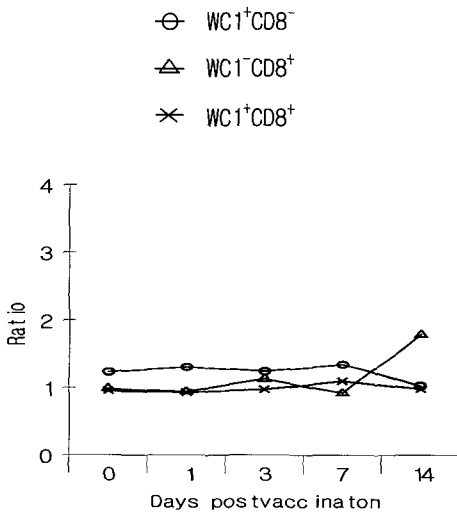


Fig 4. The ratio of WC1 and CD8 positive cells of vaccinated group versus control group

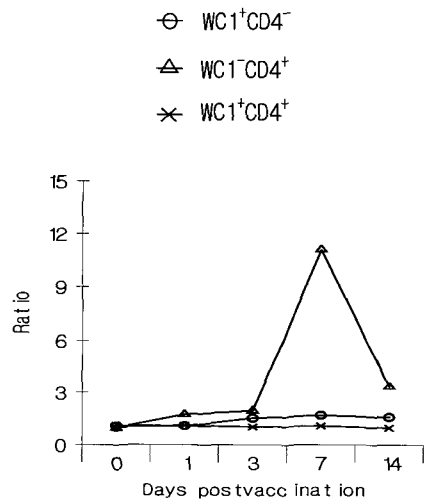


Fig. 5. The ratio of WC1 and CD4 positive cells of vaccinated group versus control group.

Table 6. Changes of WC1 and CD4 positive cells in peripheral blood of Korean indigenous cattle vaccinated with attenuated live Akabane virus vaccine

Specificity	Group	% positive cells(mean±SD)				
		0***	1	3	7	14
WC1 ⁺ CD4 ⁻	V*	19.32±8.76	21.38±9.34	19.81±7.54	21.15±9.09	26.14±8.09
	C**	17.40±5.71	19.61±8.42	12.94±6.43	12.51±6.84	16.34±6.45
WC1 ⁻ CD4 ⁺	V	29.50±8.65	25.11±9.32	29.65±9.65	33.39±12.98	31.49±12.87
	C	30.10±9.99	14.51±7.76	15.20±6.90	3.00±1.89	9.42±4.65
WC1 ⁺ CD4 ⁺	V	6.37±2.86	4.80±2.59	4.99±2.46	6.76±2.67	5.93±2.68
	C	6.18±2.99	4.32±2.23	4.79±2.21	6.20±3.02	6.05±2.90

* Vaccinated group(n=6), ** Control group(n=6), *** Days post-vaccination

T림프구가 인식할 수 있는 형태로 펩타이드-MHC복합체를 제시하는 것을 항원제시라고 하며, 이처럼 항원을 제시하는 세포를 항원제시세포라 한다. 항원제시세포는 펩타이드-MHC복합체를 특이적 T_H cell에 제공한다. 그리하여 T_H cell은 사이토카인과 새로운 세포표면분자를 확장하여 기능을 시작한다. 활성화된 T_H cell의 산물은 인근 세포의 항원제시기능을 증강시키고 항원제시세포의 수를 확장시키며, 또한 B림프구, 대식세포, 항원제시세포의 기능을 향진시킨다고 알려져 있다⁶⁻⁹⁾.

CD4와 CD8분자는 서로 다른 종류의 흉선세포를 구분하거나 이들의 성숙과정을 추적하는데 용이하게 쓰이는 표지이다. 흉선세포는 세단계의 발달과정을 거치게 되는데, 초기의 흉선세포는 CD4⁻CD8⁻에서 CD4⁺CD8⁺로 마지막 단계에서는 CD4⁻CD8⁺ 또는 CD4⁺CD8⁻ cell 등의 single positive로 발전해 나간다. 발전과정 중 CD4⁻CD8⁻의 double negative cell에서는 $\gamma\delta$ T cell receptor (WC1)가 발현되며, single positive로 발전한 세포에서는 $\alpha\beta$ T cell receptor가 발현되고, 이어 MHC의 제한을 받는 T림프구로 성숙하게 된다^{15, 17, 19, 20, 25, 28)}.

백신접종 후 혈청중화 항체가는 7일 이후부터 나타나기 시작하여 14일째에는 2-8배의 항체가를 나타내어 백신에 의한 항체는 7일째부터 형성됨을 알 수 있었다. 이는 박 등⁵⁾

의 보고와 비슷한 항체 역가 수준을 보였으며, 4-8배의 항체 역가를 형성한 소에서 유, 사산 등의 임상증상 없이 정상 분만하였다는 박 등⁵⁾의 보고로 미루어 질병방어 수준으로서의 역가는 충분하다고 사료된다.

수지상세포, 단핵탐식구(mononuclear phagocyte), B림프구(B lymphocyte) 등의 항원제시세포에 의해 APCs내로 유입된 항원은 일련의 과정을 거쳐 항원 펩타이드-MHC class II분자 복합체의 세포표면에 발현되어 T_H cell에 의해 인지되는 MHC class II 양성 세포^{6-9, 17, 24)}의 변화는 백신접종 3일 후에 급격히 상승하다 점차적으로 감소하는 경향을 보였는데 이는 APCs의 항원제시 활성이 3일째에 가장 활발하다는 것을 나타내는 것으로 사료된다. 또한 백신접종군의 CD4⁺CD8⁻세포비율은 백신접종 후 3일째부터 상승하였는데 이는 항원 펩타이드-MHC class II분자 복합체를 발현하는 APCs가 CD4⁺세포를 활성화시킨다는 Abul 등⁶⁾, Unanue⁷⁾, Roit 등⁹⁾의 보고와 일치하였다.

WC1⁻CD4⁺세포발현은 3일째까지는 대조군과 차이가 없었으나 7일째부터 서서히 증가하였는데, 이는 Köhler 등¹⁸⁾이 돼지에서 *P. multocida* 비강 분무 백신 접종 72시간 후 WC1⁻CD4⁺ T cell이 활성화되었다는 보고와 유사하였고 축종간의 차이는 인정되지 않았다.

또한 CD4⁻CD8⁺세포발현은 백신 접종 직후에는 다소 감소하였다가 14일째에 유의성 있게 증가하였고, WC1⁻CD8⁺세포발현도 14일째에 증가한 경향을 보였다. 이는 APCs에 의해 활성화된 CD4⁺세포가 사이토카인을 분비해 CD8⁺세포를 활성화 하여 CD8⁺세포가 증가하며, 또한 CD4⁺세포의 증식을 억제하기 위해 γ δ T 세포가 나타난다는 다른 학자들의 보고^{15, 17, 19, 20, 25, 28)}와 일치하였다. 이는 백신 접종 7일차에 가장 크게 활성화 된 CD4⁺ 세포발현에 의해 CD8⁺세포가 백신접종 14일차에 유의성 있게 증가되었다고 사료된다.

WC1⁺CD4⁻세포발현의 변화는 3일 후부터 서서히 증가하였고, CD4⁺CD8⁺세포발현은 7일째부터 증가하기 시작하였다. 이는 백신접종에 의한 T 림프구가 증식되는 과정 중의 미성숙 세포^{6, 15, 17-21, 25, 28)}가 발현됨을 알 수 있었다.

이상의 결과로 볼 때 아카바네 백신접종 후 CD4⁺, MHC class II⁺발현 세포 비율이 증가됨을 알 수 있었는데, 이는 APCs의 기능 향진으로 T_H 림프구가 활성화되어, B 림프구를 활성화 시켜 백신접종에 의한 항체를 생산하는 일련의 면역반응을 시작하는 것임을 알 수 있다.

결 론

소아카바네 바이러스 생독백신을 한우에 접종하여 혈청중화항체가를 관찰하고, 백신에 대한 면역효과를 백혈구 표면항원에 특이적으로 반응하는 단클론항체를 이용하여 조사하였다. 백신접종 전과 접종후 1일, 3일, 7일, 14일째에 말초혈액에서 분리한 백혈구와 4종의 특이 단클론항체(MHC class II, WC1, CD4, CD8)를 double stain(WC1/CD8, WC1/CD4, MHC class II/CD8, CD4/CD8)하여 반응시킨 후에 flow cytometry로 검사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 아카바네 생독백신 접종에 의한 혈청중

화항체는 7일 이후부터 나타나기 시작하여 14일째에 2-8의 항체를를 형성하였다.

2. CD8⁻MHC class II⁺세포발현의 비율은 백신접종 3일 후에 급격히 상승하였고, CD8⁺MHC class II⁻세포발현은 백신접종 7일 후부터 증가하였다.

3. CD4⁺CD8⁻세포발현의 비율은 백신접종 3일 후부터 증가하였고, CD4⁻CD8⁺세포발현은 백신 접종 후 14일째에, CD4⁺CD8⁺세포발현은 7일째부터 증가하기 시작하였다.

4. WC1⁻CD8⁺세포발현은 백신접종 14일 후에, WC1⁻CD4⁺세포발현은 백신접종 7일째부터 증가하기 시작하였으며, WC1⁺CD4⁻세포발현은 3일 후부터 서서히 증가하였다.

참고문헌

- Walton TE. 1994. Akabane. In: Castro AE, Heuschele WP ed, *Veterinary diagnostic virology, a practitioner's guide*. Mosby Year Book, St. Louis: 72-76.
- 박용복, 임창형, 정창국 등. 1980. 한국에서의 소의 Akabane병의 발생. 대한수의학회지 20: 65-77.
- 이오수, 김순재. 1990. 소 아카바네병에 관한 혈청학적 역학 연구. 농시논문집 32: 6-15.
- 류영수, 장정호, 이재진 등. 1990. 소 아카바네병 사독백신 개발에 관한 연구. 농시논문집 32: 9-14.
- 박봉균, 장정호, 류영수 등. 1992. 소 아카바네병 생독백신 개발에 관한 연구. 농시논문집, 34: 20-26,
- Abul KA, Andrew HL, Jordan SP. 1977. Antigen processing and presentation to T lymphocyte. T lymphocyte antigen recognition and activation. *Cellular and molecular immunology*. WB Saunders Co, Sunderland, Massachusetts: 138-170.
- Unanue ER. 1992. Cellular studies

- on antigen presentation by class II MHC molecules. *Curr Opin Immunol* 4(1) : 63-69.
8. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. 1985. Adaptive and innate immunity. In *Immunology*. CV Mosby Co, St Louis : 1-9.
 9. Van Kampen C, Mallard BA. 1997. Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. *Vet Immunol Immunopathol* 59(1-2) : 79-91.
 10. Davis WC, Splitter GS. 1991. Individual antigens of cattle. Bovine CD2 (BoCD2). *Vet Immunol Immunopathol* 27(1-3) : 43-50.
 11. Ellis JA, Morrison WI, Goddeeris BM, et al. 1987. Bovine mononuclear phagocytic cells: identification by monoclonal antibodies and analysis of functional properties. *Vet Immunol Immunopathol* 17(1-4) : 125-134.
 12. Ellis JA, Baldwin CL, MacHugh ND, et al. Characterization by a monoclonal antibody and functional analysis of a subset of bovine T lymphocytes that express BoT8, a molecule analogous to human CD8. *Immunology* 58(3) : 351-358.
 13. Giegerich GW, Hein WR, Miyasaka M, et al. 1989. Restricted expression of CD2 among subsets of sheep thymocytes and T lymphocytes. *Immunology* 66(3) : 354-361.
 14. Howard CJ, Sopp P, Parsons KR, et al. 1989. *In vivo* depletion of BoT4 (CD4) and of non-T4/T8 lymphocyte subsets in cattle with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 19(4) : 757-764
 15. O'Reilly KL, Eskra L, Splitter GA. 1991. Biochemical analysis of bovine T cell antigens with workshop monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 27(1-3) : 223-229.
 16. Parsons KR, MacHugh ND. 1991. Individual antigens of cattle. Bovine CD1(BoCD1). *Vet Immunol Immunopathol* 27 : 37-41.
 17. Teale AJ, Baldwin CL, Morrison WI, et al. 1987. Phenotypic and functional characteristics of bovine T lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 17 : 113-123.
 18. Kohler H, Lemser B, Muller G, et al. 1997. Early changes in the phenotypic composition of lymphocytes in the bronchoalveolar lavage of pigs after aerogenic immunization with *Pasteurella multocida* aerosols. *Vet Immunol Immunopathol* 58 : 277-286.
 19. Morrison WI, Davis WC. 1991. Individual antigens of cattle. Differentiation antigens expressed predominantly on CD4⁻CD8⁻ T lymphocytes(WC1, WC2). *Vet Immunol Immunopathol* 27 : 71-76.
 20. Davis WC, Brown WC, Hamilton MJ, et al. 1996. Analysis of monoclonal antibodies specific for gamma delta TcR. *Vet Immunol Immunopathol* 52 : 275-283.
 21. Sopp P, Howard C. J. Parsons K.R. 1991. Investigating monoclonal antibodies to bovine "null" cell antigens using two-colour immunofluorescence. *Vet Immunol Immunopathol* 27 : 163-168.
 22. Clark SJ, Law DA, Paterson DJ, et al. 1988. Activation of rat T lymphocytes by anti-CD2 monoclonal antibodies. *J Exp Med* 167(6) : 1861-1872.
 23. Baldwin CL, Teale AJ, Naessens JG, et al. Characterization of a subset

- of bovine T lymphocytes that express BoT4 by monoclonal antibodies and function : similarity to lymphocytes defined by human T4 and murine L3T4. *J Immunol* 136 : 4385-4391.
24. Lewin HA, Davis WC, Bernoco D. 1985. Monoclonal antibodies that distinguish bovine T and B lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 9 : 87-102.
25. Mackay CR, Hein WR. 1989. A large proportion of bovine T cells express the gamma delta T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. *Int Immunol* 1 : 540-545.
26. MacHugh ND, Bensaid A, Howard CJ, et al. 1991. Analysis of the reactivity of anti-bovine CD8 monoclonal antibodies with cloned T cell lines and mouse L-cells transfected with bovine CD8. *Vet Immunol Immunopathol* 27 : 169-172.
27. Stone DM, McElwain TF, Davis WC. 1994. Enhanced B-lymphocyte expression of IL-2R alpha associated with T lymphocytosis in BLV-infected persistently lymphocytotic cows. *Leukemia* 8(6) : 1057-1061.
28. Wyatt CR, Brackett EJ, Perryman LE, et al. 1996. Identification of gamma delta T lymphocyte subsets that populate calf ileal mucosa after birth. *Vet Immunol Immunopathol* 52 (1) : 91-103.
29. 문진산, 박용호, 정석찬 등. 1996. 백혈구 표면항원 특이 단클론 항체를 이용한 한우의 말초혈액 백혈구 아군에 관한 연구. *대한수의학회지* 36(2) : 337-348.
30. 황의경, 김재훈, 윤순식 등. 1994. 돼지 콜레라 바이러스 접종이 돼지 혈액의 림프구 아군별 분포율에 미치는 영향. *농업논문집* 1 : 576-586.
31. 황의경, 임창형, 윌리엄 씨 데이비스. 1993. 돼지 혈액 및 림프계장기 내 림프구의 아군에 관한 연구. 1. 혈액, 비장, 장간막림프절, 악하림프절 및 편도 림프구의 아군별 분포율. *농업논문집* 35(1) : 720-732.
32. 양창근, 김순재, 문진산 등. 1994. 돼지에서 plasma protein에 의한 세포성면역증진에 관한 연구. 1. 혈액내 백혈구 아군 및 세포별 분포율. *대한수의학회지* 34(2) : 275-286.
33. 양창근, 김순재, 문진산 등. 1994. 돼지에서 plasma protein에 의한 세포성면역증진에 관한 연구. 2. 혈액내 T림프구 아군 및 MHC class 세포의 분포율. *대한수의학회지* 34(2) : 287-299.
34. Boyum A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97 : 77-89.
35. Davis WC, Hamilton MJ. 1993. Identification of leukocyte subpopulations by flow cytometry. In Barta O, *Monographs in animal immunology*. Veterinary clinical immunology laboratory. BAR-LAB, Inc, Blackburg VA. B5 : 1-12.
36. SAS. 1985. *SAS User's Guide, Statistic*, Cary, Nc: SAS Inst. Inc.