

## 닭의 전염성 F낭병 바이러스 유전자백신에 의한 방어 면역에 Genetic Adjuvant (Chicken Interleukin-6)와 Chemical Adjuvant (Levamisole)의 효과

박정호 · 성환우 · 윤병일 · 박선일 · 권혁무\*  
강원대학교 수의학부대학 및 동물의학종합연구소

닭의 전염성 F낭병 바이러스(IBDV)가 원인 바이러스인 전염성 F낭병은 전 세계 양계산업에 경제적으로 피해가 큰 중요한 질병이다. 이 연구의 목적은 닭에서 IBDV에 대한 방어면역을 유도하기 위한 *in ovo* 초회항원자극(priming)과 불활화백신에 의한 보강접종 방법에 항원보강제(adjuvant)로 chicken interleukin 6 (pcDNA-ChIL-6; plasmid encoding chicken interleukin-6)와 levamisole (LMS)의 효과를 조사하는 것이다. IBDV의 VP2, VP, VP3 protein을 암호화하는 유전자백신인 plasmid DNA vaccine (pcDNA-VP243) 단독 또는 pcDNA-ChIL-6 또는 LMS와 함께 18일령 부화란의 양막낭(amniotic sac)에 접종하고 부화한 1주령의 병아리에 불활화 IBD 백신을 근육 접종한 다음 3주령에 고병원성 IBDV인 SH/92 주로 공격 접종하고 10일 동안 관찰하였다. 백신하지 않은 공격접종 대조군이 100%의 폐사율을 보인 반면 pcDNA-VP243 단독 접종군과 pcDNA-VP243에 pcDNA-ChIL-6 또는 LMS를 첨가한 실험군은 모두 100%의 생존율을 나타내었다. 그러나 공격접종 후 F낭의 손상을 평가하기 위한 IBDV RNA의 검출, B/B ratio와 F낭의 병변지수(lesion score) 등을 분석한 결과 pcDNA-VP243에 pcDNA-ChIL-6 또는 LMS를 첨가한 실험군은 pcDNA-VP243 단독 접종군보다 향상된 방어효과를 나타내지 않았다. 이 실험결과는 유전자백신에 의한 *in ovo* 초회항원자극-불활화백신에 의한 보강접종법이 고병원성 IBDV로부터 닭을 보호하기 위한 효과적인 방법이었으나 pcDNA-ChIL-6 또는 LMS의 첨가로 인한 방어효과의 향상은 나타나지 않았다.

**Key words** □ chicken interleukin 6, genetic vaccine, *in ovo* vaccination, infectious bursal disease, levamisole

전염성 F낭병 바이러스(infectious bursal disease virus, IBDV)가 원인체인 전염성 F낭병(infectious bursal disease, IBD)은 닭에서 경제적으로 피해가 크고 전염성이 높은 질병이다(22). 감염 후 IBDV는 조류의 특이 면역 기관인 F낭에서 발육 중인 B 림프구에서 급속히 증식하여 감염동물의 폐사와 회복된 동물에서 면역억제를 일으켜 다양한 2차 감염과 백신에 대한 반응을 감소시켜 양계산업에 피해가 크다(4, 15). 고병원성 IBDV (highly 또는 very virulent IBDV)가 1987년에 유럽에서 출현한 이후 한국을 포함한 전세계적으로 확인되고 있으며 항원적 변이형 IBDV도 발생이 보고되고 있다(18, 21, 32, 35). 이들 IBDV는 기존 백신 프로그램을 적용하여도 매우 빠르게 확산되고 있다.

IBDV는 이중 가닥 RNA로 구성된 두 개의 segment (A와 B)로 구성되어 Birnaviridae의 Avibirnavirus에 속한다(15). Segment A (약 3.3 kb)는 VP2, VP3, 그리고 VP4로 되는 109-kDa의 precursor polyprotein과 VP5를 발현한다(15, 26). 그 중에서 VP2는 구조의존형으로 중화항체와 혈청형의 특이성과 관계 있는 항원 부위를 포함하고 있고 segment B (약 2.9 kb)는 dsRNA polymerase인 VP1을 발현한다(15).

IBD를 효과적으로 예방하기 위해서는 능동면역과 수동면역을 예방 프로그램 작성시 모두 고려하여야 한다. 수동면역은 부화 초기에 어린 병아리에서 매우 중요하지만 어린 병아리에 약하게 혹은 매우 약독화된 생백신을 접종하면 높은 역가의 모체항체가 능동면역의 생성을 간섭한다(35). 모체 이행항체에 의한 간섭은 어린 병아리에서 항체 역가가 균일하지 않기 때문이므로 모체 이행항체가 소실될 때 까지 반복적인 백신 투여가 필요하다. 그러나 이러한 방법은 고병원성 IBDV에 의한 심각한 손실을 완벽하게 예방할 수 없다(4). 약독화된 생 IBD 백신의 경우 다양한 정도의 F낭 위축과 면역억제를 일으켜 다른 백신의 효과를 감소시킬 수 있으며 세균의 기회 감염을 가능하게 할 수 있고 항원성과 병원성이 불안정할 수 있어 항원적 또는 병원성 변이주를 생성할 수 있다(34). 불활화백신의 경우 안전하지만 약독화 백신보다 덜 효과적이다(25, 35). 이와 같은 기존 백신의 문제점을 해결하기 위하여 IBDV의 VP2 또는 VP2-VP4-VP3 유전자를 포함한 유전자백신(DNA vaccine)이 제조되어 닭에서 시험되었다(3, 6, 16). 개발된 유전자 백신은 접종시기와 방법, 항원보강제(adjuvant)의 사용여부, 백신제조와 공격접종에 사용한 IBDV의 종류와 백신의 접종량 및 접종시기가 매우 다양하였고 방어효과가 매우 다양하게 나타났으며 방어를 위하여 다량의 유전자백신의 반복 투여가 요구되었다.

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-33-250-8652, Fax: 82-33-244-2367  
E-mail: kwonhm@kangwon.ac.kr

최근 유전자백신의 방어 효과를 향상시키고 면역반응을 조절하기 위하여 다양한 항원보강제가 연구되고 있다. 항원보강제로는 면역시스템의 자연조절 인자로 작용하는 다양한 사이토카인(cytokine)과 다양한 화학물질(chemical agents)이 연구되어 오고 있다. 가장 널리 연구되어온 사이토카인은 interleukin-2 (IL-2)와 Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )인데 특히 IFN- $\gamma$ 의 경우 동물의 종류, 나이, 사용된 항원의 종류, IFN- $\gamma$ 의 형태와 사용된 양 또는 항원 발현을 위하여 사용한 플라스미드(plasmid)의 종류에 따라 결과가 다양하게 보고되었다(11, 12). 닭의 interleukin-6 (chicken interleukin-6, ChIL-6)는 B 세포의 활성화 및 항체 생성의 조절과 관련 있고 세균에서 발현된 ChIL-6는 IL-6-dependent murine hybridoma cell line 7TD1의 증식을 유도할 수 있고 정제된 재조합 ChIL-6는 성계에 정맥으로 투여 시 혈청 코르티코스테론(corticosterone)의 농도를 증가시켰다(31). 그리고 세균에서 발현된 ChIL-6는 닭의 하이브리도마 세포(hybridoma cell)에서 항체생성을 유도하였다(27). IBDV 유전자백신에 ChIL-6를 첨가한 실험에서 ChIL-6를 첨가한 닭 실험군에서 방어효과가 향상된 결과가 보고되었으나(33) *in ovo* 백신에 대한 연구는 보고되지 않았다. Levamisole (LMS)은 동물에서 약제로 오랜 동안 사용되어 안전성이 입증되었으며 항암효과가 발견되어 암 치료제로서의 가능성이 시험되고 있다(7, 17). LMS는 쉽게 유전자백신과 혼합하여 부작용 없이 함께 동물에 접종할 수 있다. FMDV 유전자백신에 대한 LMS의 효과시험에서 LMS의 첨가가 강력한 Th1 자극반응을 유도하였는데 특히 IFN- $\gamma$ 의 생성 증가가 확인되어 유전자백신의 면역 반응을 조절할 수 있는 후보물질로서의 가능성을 보여주었다(13).

이 연구에서는 ChIL-6와 LMS의 항원보강제로서의 역할을 조사하기 위하여 IBDV 유전자백신과 ChIL-6 또는 LMS를 함께 *in ovo*로 접종하고 부화 후 불활화백신으로 보강 접종한 다음 고병원성 IBDV로 공격접종한 후 방어효과를 비교 조사하였다.

## 재료 및 방법

### IBDV 유전자백신

IBDV 유전자백신(pcDNA-VP243)은 본 연구실에서 개발한 것을 사용하였다(16). IBDV 유전자백신을 제조하기 위하여 사용한 진핵세포 발현 플라스미드인 pcDNA3.1/V5/His-TOPO plasmid는 human cytomegalovirus immediate-early promoter에 의하여 전사가 조절되고, mRNA 안정성을 위한 bovine growth hormone (BGH) poly A signal을 포함하고 있다. 유전자백신은 고병원성 IBDV SH/92 주의 segment A (VP2, VP4, VP3 region 포함)를 클로닝하여 제조하였다. 대량의 유전자백신은 IBDV 유전자백신으로 형질 전환된 대장균을 암피실린이 첨가된 LB broth에 접종한 후 37°C 진탕배양기에서 24시간 배양한 다음 EndoFree Plasmid Giga kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 준비하였다.

### ChIL-6 발현 plasmid의 제조

ChIL-6는 plasmid pcDNA/ChIL-6-5-1로부터 클로닝하였다(31). ChIL-6 유전자를 ChIL-6-F3 (5'-GCCATGAAGTTCACCGAGGGC-

3')과 ChIL-6-R3 (5'-TCAGGCACTGAAACTCTGG-3') primer pair와 Advantage-GC2 PCR polymerase (Clontech, USA)를 이용하여 94°C에서 1 min의 denaturation, 50°C에서 1 min의 annealing, 72°C에서 2 min의 extension 프로그램을 30회 반복하여 증폭하였다. 증폭된 PCR 생성물을 1% agarose gel에서 확인 후 GENE CLEAN Turbo kit (BIO101, USA)를 이용하여 정제하였다. 정제된 ChIL-6 유전자는 유전자백신 제조에 사용한 진핵세포 발현 플라스미드인 pcDNA3.1/V5/His-TOPO cloning vector (Invitrogen, USA)에 클로닝하여 plasmid-encoded ChIL-6를 제조하였다. 준비한 ChIL-6 DNA를 pcDNA3.1/V5/His-TOPO cloning vector에 5분간 ligation 반응을 시킨 뒤, 2  $\mu$ l의 ligation 반응액을 competent cell (*Escherichia coli*, TOP10)에 혼합하여 형질전환을 실시하였다. 형질전환된 것으로 확인된 competent cell을 증식시킨 후 플라스미드를 분리하여 클로닝한 ChIL-6 유전자를 제한효소와 염기서열 분석법을 통하여 확인하였다. 결정된 염기서열은 발표된 chicken IL-6 염기서열과 비교하여 ChIL-6 유전자가 올바르게 삽입된 클론을 선택하였다(31). 최종적으로 ChIL-6 유전자와 방향(orientation)이 확인된 plasmid-encoded ChIL-6를 pcDNA-ChIL-6로 명명하였고 EndoFree Plasmid Giga kit를 이용하여 접종하기 위한 pcDNA-ChIL-6를 준비하였다.

### *In vitro* transcription과 translation

제조한 pcDNA-ChIL-6에 chicken IL-6 유전자가 올바르게 클로닝되고 발현 여부를 확인하기 위하여 *in vitro* transcription/translation을 실시하였다. *In vitro* transcription/translation 실험을 위하여 TnT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, USA)과 Transcend Colorimetric Translation Detection System (Promega)을 이용하였다.

### 면역과 공격접종

특정병원체 부재(specific pathogen free, Hy-Vac, USA) 수정란을 무작위로 5개의 실험군으로 할당하였다. 각 그룹에 대한 설명은 Table 1에 기술하였다. 18일령의 부화란에 priming을 위하여 pcDNA-VP243 (100  $\mu$ g)과 pcDNA empty vector (50  $\mu$ g)[A군], pcDNA-VP243 (100  $\mu$ g)과 pcDNA-ChIL-6 (50  $\mu$ g)[B군], 0.3% LMS (Sigma, USA)가 포함된 pcDNA-VP243 (100  $\mu$ g)과 pcDNA empty vector (50  $\mu$ g)[C군] 또는 멸균 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)을 1 inch 23-gauge needle을 사용하여 amniotic sac route로 접종하였다. 실험군의 부화율은 95%~100%이었다. 보강접종 없는 공격접종 대조군[Challenge control group, CC군]과 정상대조군[Normal control group, NC군]을 제외한 군의 병아리는 1주령에 불활화 IBDV 백신(Intervet, Netherlands)으로 추가 접종 하였다.

공격접종을 위하여 3주령 된 닭에 수당  $1 \times 10^{4.8}$  egg lethal dose (ELD<sub>50</sub>/100  $\mu$ l)의 고병원성 IBDV SH/92주를 구강으로 공격접종한 후 10일 동안 관찰하였다. 공격접종 10일 후 생존한 닭은 채혈을 실시한 다음 부검을 위하여 안락사 시켰다. F<sub>1</sub>과 체중을 측정하여 bursa weight/body weight (B/B)  $\times 1000$ 으로 B/B

ratio를 결정하였다. 그리고 F낭은 조직병리학적 병변과 RT-PCR을 위한 IBDV RNA 검출에 이용되었다.

**F낭으로부터 IBDV RNA의 검출**

F낭으로부터 Viral Gene-spin (Intron, Korea)을 이용하여 IBDV RNA를 분리하였다. IBDV RNA는 VP2 gene에 있는 474-bp의 hypervariable region을 P2.3 (5'-CCCAGAGTCTACACCATA-3')와 RP5.3 (5'-TCCTGTGCCACTCTTTC-3') primer pair를 이용한 RT-PCR로 증폭 후 확인하였다(21). RT-PCR은 42°C에서 60 min, 94°C에서 5 min의 RT 반응과 94°C에서 30 sec, 51°C에서 30 sec, 그리고 72°C에서 2 min 등으로 35회, 마지막으로 74°C에서 15 min의 PCR을 실시하였다. PCR 생성물은 1.5% agarose gel에서 분석하였다.

**F낭의 조직병리학 소견**

각 그룹의 생존한 닭으로부터 채취한 F낭을 10% buffered formalin으로 고정하였다. 일반적인 조직처리 과정 후 조직을 파라핀으로 포맷하였고 조직 절편(약 3 μm)으로 만든 다음 hematoxylin과 eosin (H&E) 염색을 실시하여 조직학적 검사를 실시하였다. F낭 병변은 5 단계로 점수화 하였다(0-4); 0 = 정상 ; 1 = 림프구의 괴사가 미약하므로 미약한 정도로 관찰 ; 2 = 소절 간 결합조직 증식 없이 심한 림프구 괴사를 나타내는 소절이 50% 이하로 관찰 ; 3 = 소절 간 결합조직 증식 없이 심한 림프구 괴사를 나타내는 소절이 50% 이상으로 관찰 ; 4 = 소절 간 결합조직증식과 함께 뚜렷한 위축을 보이지만 소절의 윤곽은 남아 있는 상태(8, 34). H&E 염색한 조직은 조직에 대하여 아무런 정보가 없는 두 명의 다른 수의병리학자가 관찰하였고 점수화하는데 이견이 있는 경우 토론 후 점수화 하였다.

**림프구 증식 분석(Lymphocyte proliferation assay)**

림프구 증식 분석은 이전에 기술한대로 실행하였다(16). 공격

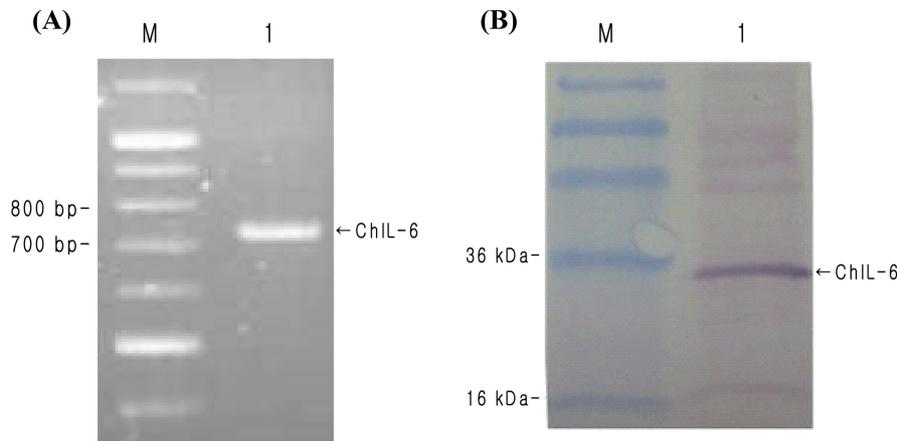
접종 전과 공격접종 10일 후에 각 군에서 생존한 닭으로부터 말초혈액 림프구(peripheral blood lymphocyte, PBL)를 얻기 위하여 전혈을 항응고제 ACD (acid citrate dextrose)가 들어있는 주사기를 이용하여 무균적으로 채취하였고, 공격접종 10일 후 채취한 비장은 metallic sieve를 이용하여 세포를 수집하였다. 전혈과 비장세포 용액으로부터 림프구는 HISTOPAQUE-1077 (Sigma, USA)을 이용하여 분리하였다. 분리된 림프구는 RPMI-1640 배지로 세척한 후 부유시켰다. 세포수를 8×10<sup>6</sup>/ml로 맞춘 후 세포부유액 50 μl/well를 96 well plate에 각각 분주하였고, Concanavalin A (Con A, 14 μg/ml, Sigma) 첨가군은 Con A를 50 μl/well 더하고 대조군은 Con A를 첨가하지 않은 배지를 더한 후, 5% CO<sub>2</sub>, 40°C 습윤배양기에서 48시간 배양하였다. 10 μl Cell Counting Kit-8 solution (Dojindo Laboratories, Japan)을 각 well마다 더하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 습윤배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후, 450 nm의 파장에서 흡광도 (optical density, OD)를 측정 한 다음 stimulation index (SI) = mean OD of ConA-stimulated cells / mean OD of non-stimulated cells를 계산하였다.

**Enzyme-linked immunosorbent assay를 이용한 IBDV에 대한 항체생성 검사**

항체역가를 측정하기 위하여 백신 투여 전과 투여 후 10일에 채혈한 다음 혈청을 분리하였다. 혈청을 56°C에서 30분간 비등화 시킨 다음 IBD antibody test kit (IDEXX, USA)를 이용하여 S/P ratio로 양성을 판정하였고, 혈청검사 결과 항체 역가가 396 이상인 것을 양성으로 판정하였다.

**통계처리**

모든 분석은 통계패키지 SAS 8.01을 사용하여 수행하였다. 시험군 간에 B/B ratio의 차이는 post-hoc 분석을 위한 Dunn method를 사용하여 multiple comparison과 함께 non-parametric Kruskal-Wallis rank test로 분석하였다. 혈청 항체 역가와 림프구



**Fig. 1.** (A) Agarose gel electrophoresis of chicken interleukin-6 (ChIL-6) gene PCR product. Lane M, 100 bp DNA ladder; 1, ChIL-6. Numbers at left indicate molecular weight in bp, and the predicted ChIL-6 position is marked right. Amplified ChIL-6 product was the expected size of 729 bp, including primers. (B) Colorimetric translation detection of an SDS-PAGE analysis of a coupled in vitro transcription/translation reaction. Lane M, SDS-PAGE molecular weight standard, broad range; 1, pcDNA-ChIL-6; The position of the ChIL-6 protein is on the right of lane 1. The sizes of the marker proteins are on the left.

증식 분석의 차이는 one-way ANOVA를 사용하여 평가하였다. 데이터의 균질성을 위한 Levene's test는 시험군 간에 변화의 균질성을 결정하기 위하여 사용되었다(10). P value가 0.05 이하 ( $P < 0.05$ )일 때 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

## 결 과

### ChIL-6의 제조와 발현

ChIL-6 유전자를 PCR로 증폭한 결과 예상한 729 bp의 PCR 생성물을 얻었다(Fig. 1A). 증폭된 ChIL-6 유전자를 진핵세포 발현 벡터에 클로닝하여 ChIL-6 유전자와 방향이 올바르게 클로닝된 pcDNA-ChIL-6를 얻었다. pcDNA-ChIL-6에 클로닝된 ChIL-6 유전자의 단백질 발현을 *in vitro* transcription/translation으로 확인한 결과 예상했던 크기인 약 32 kDa의 ChIL-6를 확인할 수 있었다(Fig. 1B)(5, 31).

### 닭에서 고병원성 IBDV로 공격접종한 후 백신 효과 평가

항원보강제로서 ChIL-6와 LMS의 효과를 알아보기 위하여 IBDV 유전자백신과 ChIL-6 또는 LMS를 함께 *in ovo*로 접종하고 부화 후 1주령의 닭에 불활화백신을 추가 접종하고 3주령 때 고병원성 IBDV로 공격접종을 실시한 후 10일 동안 임상증상을 관찰하였다. 닭에서의 방어 효과는 생존율, B/B ratio, IBDV RNA 검출, 혈청 항체역가, 말초혈액과 비장 림프구 증식 분석으로 평가하였다 (Table 1 and Fig. 2).

유전자백신군과 비백신대조군의 부화율은 모두 95% 이상으로

유전자백신과 함께 투여된 ChIL-6와 LMS는 부화율에 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 공격접종 후 백신접종군인 A, B, C군은 임상증상 없이 모두 100%의 생존율을 나타내었다. 그러나 백신하지 않은 CC군은 공격접종 후 2일부터 IBDV 임상증상(식욕부진, 우울증, 주름 장식의 깃털)을 나타내었고 3일에 100%의 폐사율을 나타내었다. 폐사한 닭의 부검결과 F낭의 위축과 출혈이 관찰되었다. 정상대조군인 NC군의 경우 임상증상 없이 100% 생존율을 나타내었다.

정상대조군인 NC군을 제외한 백신접종군 A, B, C군에서 모두 IBDV RNA가 F낭에서 검출되었으나 A군과 C군이 B군에 비하여 낮은 검출율을 나타내었으나 유의성 있는 차이는 아니었다 ( $P > 0.05$ ). IBDV RNA는 실험완료 전에 폐사한 CC군의 모든 닭에서 검출되었다. 공격접종하지 않은 NC군의 경우 IBDV 유전자가 검출되지 않았다.

공격접종한 고병원성 IBDV에 의한 F낭의 손상은 공격 접종 10일 후 채취한 닭의 B/B ratio와 조직학적 병변으로 평가하였다. A군의 B/B ratio가 다른 백신접종군인 B와 C군에 비하여 높게 나타났고 그들의 B/B ratio는 정상대조군에 비하여 낮았지만 유의성 있는 차이는 아니었다 ( $P > 0.05$ ). 백신접종군 중 LMS를 첨가한 C군이 가장 낮은 B/B ratio를 나타내었으나 다른 백신군인 A군 및 B군과 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다 ( $P > 0.05$ ). F낭의 병변은 위축과 함께 림프구소실과 소절의 부종, 소절 간 결합조직 증식 그리고 세망상피세포의 증식 등이다. A군은 다른 군에 비하여 매우 낮은 F낭 병변지수를 나타내었다. A군의 경우 비록 F낭의 위축과 손상이 관찰되었지만 대부분의 림프소절은

**Table 1.** Protective immunity against very virulent infectious bursal disease virus provided by an *in ovo* prime with DNA vaccine followed by a killed-vaccine boost

Group <sup>A</sup>	Survival <sup>B</sup>	Detection of IBDV RNA <sup>C</sup>	B/B ratio (Mean±SD) <sup>D</sup>	Bursal lesion score <sup>E</sup>	ELISA antibody titer (Mean±SD) <sup>F</sup>	
					Prechallenge	Postchallenge
A. DNA vaccine plus Boost	10/10 (100%)	4/10 (40%) <sup>a</sup>	4.08 ± 1.38 <sup>ab</sup>	1.90 ± 1.37	482.6 ± 514.66 <sup>a</sup>	7,354.9 ± 4,743.57 <sup>a</sup>
B. DNA vaccine with ChIL-6 plus Boost	10/10 (100%)	7/10 (70%) <sup>a</sup>	3.35 ± 1.83 <sup>ab</sup>	2.65 ± 1.51	416.3 ± 559.14 <sup>a</sup>	10,025.8 ± 4,750.88 <sup>a</sup>
C. DNA vaccine with levamisole plus Boost	10/10 (100%)	5/10 (50%) <sup>a</sup>	2.85 ± 1.62 <sup>b</sup>	2.67 ± 1.17	609.4 ± 705.58 <sup>a</sup>	8,329 ± 5,540.26 <sup>a</sup>
CC. Challenge control	0/10 (0%)	- <sup>G</sup>	-	-	<396	-
NC. Normal control	10/10 (100%)	0/10 (0%) <sup>b</sup>	5.27 ± 1.27 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0	<396	<396

<sup>A</sup> Definition and numeric value of each group. A, DNA vaccine plus Boost: vaccinated with pcDNA-VP243 DNA vaccine, boost and challenge; B, DNA vaccine with ChIL-6 and Boost: vaccinated with pcDNA-VP243 DNA vaccine mixed with ChIL-6, boost and challenge; C, DNA vaccine with levamisole plus Boost: vaccinated with pcDNA-VP243 vaccine mixed with levamisole, boost and challenge; CC, Challenge control: without vaccine but with challenge; NC, Normal control: without vaccine and challenge.

<sup>B</sup> Number of surviving chickens (the percentage survival) at 10 days post-challenge/total number of chickens in each group.

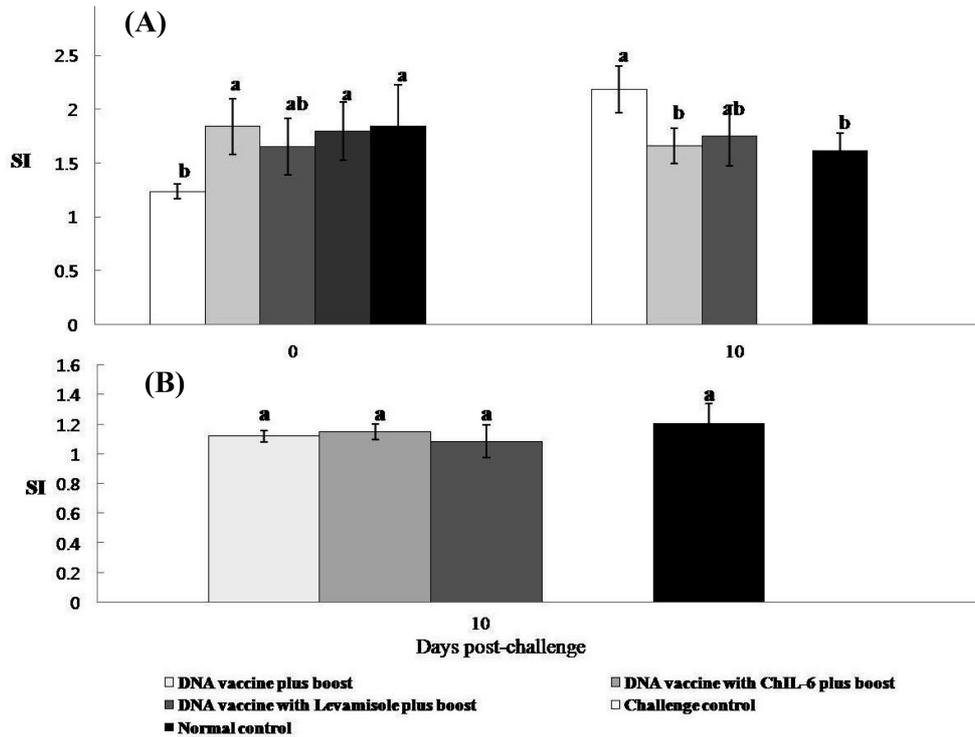
<sup>C</sup> Presence of IBDV RNA in the bursae of surviving chickens at 10 days post-challenge. Values followed by different lowercase superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

<sup>D</sup> The B/B ratio of the surviving chickens 10 days post-challenge. Values followed by different lowercase superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

<sup>E</sup> Bursal lesion score (mean ± SD). The bursae of surviving chickens were histologically examined at 10 days post-challenge and scored from 0 to 4 on the basis of increasing severity.

<sup>F</sup> ELISA antibody titers (mean ± SD) measured from blood samples collected pre-challenge and at day 10 post-challenge. A titer level greater than 396 was considered to be positive. Values followed by different lowercase superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

<sup>G</sup> None of birds in this group survived to 10 days after the challenge.



**Fig. 2.** The mitogenic responses of peripheral blood (A) and splenic (B) lymphocytes prepared from chickens before and after challenge with the very virulent IBDV SH/92 strains. The groups of chickens are listed in Table 1. Cells were stimulated with Con A (1.25 µg/well) and each value was presented as mean stimulation index ± SD. Within same day, values followed by different lowercases are significantly different ( $P < 0.05$ ). Stimulation index (SI)=(mean OD of ConA-stimulated cells)/(mean OD of unstimulated cells). All birds in the challenge control group died within 10 days after the challenge.

여전히 존재하였고 상당히 많은 수의 분화된 림프구를 가지고 있었다.

NC와 CC군을 제외한 백신접종군인 A, B, C군은 공격접종 전에 IBDV에 대한 항체를 가지고 있었다. ELISA로 측정된 항체 역가는 C, A, B군 순으로 나타났으나 유의성 있는 차이는 아니었다( $P > 0.05$ ). 공격 접종 10일 후 정상대조군인 NC군을 제외한 각 군의 생존한 닭에서 IBDV에 대한 항체 역가를 측정한 결과 ChIL-6를 첨가한 B군이 가장 높게 나타났다. 세포매개성 면역을 조사하기 위하여 Con-A를 이용한 말초혈액 림프구와 비장 림프구 증식 분석을 실시하였다. 말초혈액 림프구의 경우 공격접종 전 B군, CC군, NC군의 SI가 비슷하게 나타났다. 그러나 공격접종 후 생존한 닭의 림프구를 가지고 조사한 결과 A군의 SI가 가장 높게 나타났는데 B군과 NC군 보다 유의성 있게 높게 나타났고( $P < 0.05$ ), C군 보다 높게 나타났으나 유의성 있는 차이는 아니었다( $P > 0.05$ ). 공격접종 10일 후 채취한 비장 림프구의 경우 A, B, C군 모두 비슷한 SI를 나타내었으나 NC군보다는 낮게 나타났다.

### 고 찰

증식하는 바이러스 없이 면역을 유도하는 것으로 알려진 바이러스 단백질을 암호화하는 유전자를 이용하는 유전자백신은 생

바이러스 백신의 병원성 회복 문제, 다양한 변이형 바이러스 생성 원인 제공과 환경오염 가능성을 최소화시킬 수 있어 안전하고 효과적인 백신 개발의 대안으로 제안되어 오고 있다. 유전자 백신은 전통적인 백신에 비하여 화학적 및 생물학적 안정성, 생산의 간편성과 사용의 편리함과 함께 체액성면역과 세포매개성 면역을 유도하여 다양한 병원체에 대한 방어면역을 유도하는데 효과적인 것으로 보고되고 있다(20). 그러나 병원체에 따라 유전자백신 단독으로는 약한 면역만이 유도되어 충분한 방어효과를 얻을 수 없다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 다양한 연구가 진행되어 왔는데 genetic adjuvant로 cytokine gene과 co-stimulator의 공동 발현, CpG motifs 등이 연구되고 있다(24, 30). 그리고 bupivacaine, LMS 등의 화학물질이 항원보강제로 연구되고 있다(13, 36).

이 연구에 사용된 유전자백신(pcDNA-VP243)은 2주령의 병아리에 1차 접종하고 4주령에 추가접종 한 다음 2주 후에 고병원성 IBDV로 공격 접종하였을 때 공격접종 대조군이 10%의 생존율을 보인 반면 70%의 생존율을 나타내어 유전자백신의 효과가 입증되었다(16). 이번 연구에서는 현재 IBD 백신을 접종하는데 널리 사용되고 있는 *in ovo* 백신법에 유전자백신을 적용하고 항원보강제인 ChIL-6와 LMS의 효과를 조사하였다. 유전자백신을 *in ovo*로 단독 접종한 경우 고병원성 IBDV에 충분한 방어효과를 나타내지 못하여 부화 후 1주령 된 닭에 불활화백신으로 보

강접종을 실시하는 prime-boost 백신기법을 사용하였다(11, 28).

F낭의 림프구 괴사(lymphoid necrosis) 및 상실(depletion)과 같은 조직학적 병변은 약독화생 IBDV 백신주를 이용한 백신에 의하여 방어된 닭에서 관찰될 수 있고(34), 고병원성 IBDV의 경우 닭에서 높은 폐사율을 일으키기 때문에 고병원성 IBDV 감염에 대한 백신의 방어효과 평가에서 폐사율을 막는 방어효과가 중요하게 평가되어야 한다(4, 18, 35). 본 연구실에서 수행한 이전 연구에서 고병원성 IBDV로 공격접종한 후 공격접종 대조군이 20%의 생존율을 보인 반면 *in ovo* DNA vaccine plus boost 군의 닭은 100%의 생존율을 나타내었다(28). 이번 연구에서 공격접종 대조군의 경우 100% 폐사율을 보였고 *in ovo* DNA vaccine plus boost 군인 A군의 경우 고병원성 IBDV로 공격접종 후 100%의 생존율을 나타내었다. 이러한 연구결과는 다양한 유전자백신에서 효용성이 입증된 prime-boost 백신기법을 응용한 *in ovo* DNA vaccine plus boost 백신법이 IBDV를 방어하기 위한 효과적인 방법임을 보여주었다(9). 공격접종 대조군의 생존율 차이는 특정병원체 부재 수정란의 유래와 실험환경의 차이에 기인한 것으로 추정된다(16). 부화 후 접종과 추가접종 또는 항원보강제 없이 접종하는 전통적인 유전자백신 방법은 많은 양의 유전자백신을 반복적으로 투여하여야 하므로 노동력이 많이 소요되고 방어 정도가 다양하게 보고되고 있다. 특히 이들 백신 실험에서 백신을 제조 또는 공격접종하기 위하여 사용한 IBDV strain, 백신과 공격접종 방법, 그리고 평가 기준이 각 실험마다 달라 *in ovo* DNA vaccine plus boost 방법이 효과적인 대안이 될 수 있을 것으로 판단된다(3, 6, 16).

공격접종 후 생존율과 함께 백신의 효과를 조사하기 위한 F낭의 손상(IBDV RNA 검출, B/B ratio, bursal lesion score) 여부와 체액성 및 세포매개성 면역반응을 평가한 결과 본 연구에서 항원보강제로 *in ovo* 유전자백신과 함께 투여된 ChIL-6와 LMS의 경우 모두 유의성 있는 방어면역의 항진 효과는 관찰되지 않았다. 부화된 병아리에 IBDV의 VP2-4-3 유전자를 포함하는 유전자백신 (300 µg)과 ChIL-6 (300 µg) 혼합백신을 7, 14, 21일령에 3회 접종한 실험에서 ChIL-6의 첨가가 공격접종 후 체액성 면역을 증가시켜 임상증상을 늦추고 방어효과를 증진시키는 것으로 보고되었다(33). 위 연구의 경우 공격접종 대조군의 폐사율이 35%에 불과하였고 백신과 ChIL-6의 접종량과 횟수가 현실에 적용하기는 매우 어려운 결과로 사료된다. 마우스에서 말 인플루엔자바이러스의 hemagglutinin 유전자를 암호화하는 유전자백신과 함께 투여된 human IL-6는 말 인플루엔자바이러스로 공격 접종하였을 때 바이러스 특이 점막 IgG의 증가와 함께 폐감염을 막는 것으로 보고되었다(19). IL-6는 쥐와 닭에 *Eimeria*를 감염시켰을 때 유도되어 면역반응에 영향을 주는 것으로 보고되었다(23). IBV를 감수성의 차이가 있는 닭에 각각 감염시켰을 때 IL-6 mRNA level은 감염 4일 후 신장에서 증가되었지만 IL-6 mRNA의 증가 정도는 감수성 있는 닭에서 20배 높았고 혈청 내 IL-6 농도도 3배 높게 나타나 IL-6가 특정 질병의 감수성을 결정하는 중요한 요소로 보고되었다(1). 이상과 같이 IL-6는 다양한 면역 반응 조절기능이 있어 병원체의 감염 결과에 영향을 주는 것

로 사료된다.

수용성 phenylimidazolthiazole인 LMS는 동물의 약제와 사람의 항암약제로 임상 실험에 사용되어 왔고 면역조절 효과가 보고되었다(29). LMS는 다양한 백신실험에서 면역조절 기능이 있는 것으로 보고되고 있다. 마우스에서 FMD 바이러스 또는 PRRS 바이러스에 대한 불활화백신과 함께 투여된 LMS는 항원제시, 동시자극인자 신호와 사이토카인 생성 경로를 동시에 상향 조절함에 의하여 강한 T 세포 반응을 유도하였다(14). 마우스에서 LMS가 첨가된 불활화 ND 바이러스 백신은 IL-2, IFN- $\gamma$ 의 생성과 T 세포 증식의 항진효과가 관찰되었고 MHC와 costimulatory molecule의 발현을 증가시켰으며 닭에서 병원성 ND 바이러스에 대한 공격접종에 방어효과를 나타내었다(37). LMS는 이유돈에서 대장균 구강백신과 함께 접종하였을 때 회장 Peyer's patch의 T 세포를 자극하는데 상승작용을 하는 것으로 보고되었다(2). LMS와 FMD 바이러스에 대한 DNA 백신을 함께 마우스에 접종하였을 때 IgG2a 생성을 우호적으로 증가시켰으며, IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 생성을 증가시켰는데 특히 IFN- $\gamma$ 의 생성은 100배까지 증가하였다. IBDV 유전자백신과 함께 투여된 닭의 IFN- $\gamma$ 는 병원성 IBD 바이러스로 공격접종 시 방어효과를 증가시키지 못하였는데 이는 IFN- $\gamma$ 가 유전자백신 제조에 사용한 CMV promoter를 포함하고 있는 플라스미드에 클로닝된 유전자의 발현을 억제하기 때문으로 추정되었다(11, 30). 본 연구에서 LMS 첨가군인 B군의 F낭 병변이 A군 보다 심한 것은 LMS에 의하여 생성된 IFN- $\gamma$ 이 이번 연구에 사용한 유전자백신인 pcDNA-VP243에 클로닝된 IBDV의 VP 2-4-3 유전자의 발현을 저하시킨 것으로 추정된다. 앞으로 prime-boost 백신방법을 적용한 후 시간별로 발현되는 사이토카인의 발현양상을 조사할 필요가 있다고 판단된다.

결과를 요약하면 *in ovo*로 DNA 백신을 접종한 다음 불활화백신을 추가접종한 군의 닭은 고병원성 IBDV의 공격접종에 대하여 임상증상을 나타내지 않았고 100% 생존율을 나타내었으나 바이러스 감염을 막지는 못하였다. 그리고 유전자백신과 *in ovo*로 함께 투여한 ChIL-6와 LMS의 경우 방어효과의 유의성 있는 항진작용은 나타나지 않았다.

## 감사의 말

이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2007-521-E00139).

## 참고문헌

- Asif, M., J.W. Lowenthal, M.E. Ford, K.A. Schat, W.G. Kimpton, and A.G. Bean. 2007. Interleukin-6 expression after infectious bronchitis virus infection in chickens. *Viral Immunol.* 20, 479-486.
- Bozi, F., G. Lackovi, A. Kovsca-Janjatovi, O. Smolec, and I. Valpoti. 2006. Levamisole synergizes experimental F4ac+ *Escherichia coli* oral vaccine in stimulating ileal Peyer's patch T cells in weaned pigs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 29, 199-204.
- Chang, H.C., T.L. Lin, and C.C. Wu. 2001. DNA-mediated vaccination against infectious bursal disease in chickens. *Vaccine* 20,

- 328-335.
4. Chettle, N., J.C. Stuart, and P.J. Wyeth. 1989. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Vet. Rec.* 125, 271-272.
  5. Cho, S.H., P.C. Loewen, and R.R. Marquardt. 2004. A plasmid DNA encoding chicken interleukin-6 and *Escherichia coli* K88 fimbrial protein FaeG stimulates the production of anti-K88 fimbrial antibodies in chickens. *Poult. Sci.* 83, 1973-1978.
  6. Fodor, I., E. Horvath, N. Fodor, E. Nagy, A. Rencendorsh, V.N. Vakharia, and S.K. Dube. 1999. Induction of protective immunity in chickens immunised with plasmid and encoding infectious bursal disease virus antigens. *Acta. Vet. Hung.* 47, 481-492.
  7. Foon, K.A., J. Yannelli, and M. Bhattacharya-Chatterjee. 1999. Colorectal cancer as a model for immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 5, 225-236.
  8. Francois, A., C. Chevalier, B. Delmas, N. Eterradosi, D. Toquin, G. Rivallan, and P. Langlois. 2004. Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens. *Vaccine* 22, 2351-2360.
  9. Haygreen, E.A., P. Kaiser, S.C. Burgess, and T.F. Davison. 2006. *In ovo* DNA immunisation followed by a recombinant fowlpox boost is fully protective to challenge with virulent IBDV. *Vaccine* 24, 4951-4961.
  10. Hicks, C.R. and K.V. Turner. 1996. Fundamental concept in the design of experiments. Oxford University Press, New York, N.Y., USA.
  11. Hsieh, M.K., C.C. Wu, and T.L. Lin. 2007. Priming with DNA vaccine and boosting with killed vaccine conferring protection of chickens against infectious bursal disease. *Vaccine* 25, 3417-3427.
  12. Hulse, D.J. and C.H. Romero. 2004. Partial protection against infectious bursal disease virus through DNA-mediated vaccination with the VP2 capsid protein and chicken IL-2 genes. *Vaccine* 22, 1249-1259.
  13. Jin, H., Y. Li, Z. Ma, F. Zhang, Q. Xie, D. Gu, and B. Wang. 2004. Effect of chemical adjuvants on DNA vaccination. *Vaccine* 22, 2925-2935.
  14. Kang, Y., H. Jin, G. Zheng, Q. Xie, J. Yin, Y. Yu, C. Xiao, X. Zhang, A. Chen, and B. Wang. 2005. The adjuvant effect of levamisole on killed viral vaccines. *Vaccine* 23, 5543-5550.
  15. Kibenge, F.S.B., A.S. Dhillon, and R.G. Russell. 1988. Biochemistry and immunogenicity of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* 69, 1757-1775.
  16. Kim, S.J., H.W. Sung, J.H. Han, D. Jackwood, and H.M. Kwon. 2004. Protection against very virulent infectious bursal disease virus in chickens immunized with DNA vaccines. *Vet. Microbiol.* 101, 39-51.
  17. Kimball, E.S. and M.C. Fisher. 1996. Levamisole effects on major histocompatibility complex and adhesion molecule expression and on myeloid cell adhesion to human colon tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 109-116.
  18. Kwon, Y.K., I.P. Mo, H.W. Seong, M.I. Kang, H.B. Koh, J.G. Lee, and C.K. Yang. 1995. Studies on the pathogenicity of infectious bursal disease virus (SH/92) isolated in Korea. *RDA. J. Agric. Sci.* 37, 637-647.
  19. Larsen, D.L., N. Dybdahl-Sissoko, M.W. McGregor, R. Drape, V. Neumann, W.F. Swain, D.P. Lunn, and C.W. Olsen. 1998. Co-administration of DNA encoding interleukin-6 and hemagglutinin confers protection from influenza virus challenge in mice. *J. Virol.* 72, 1704-1708.
  20. Lewis, P.J. and L.A. Babiuk. 1999. DNA vaccines: a review. *Adv. Virus Res.* 54, 129-188.
  21. Lin, A., A. Kato, Y. Otaki, T. Nakamura, E. Sasmaz, and S. Ueda. 1993. Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian. Dis.* 37, 315-323.
  22. Lukert, P.D. and Y.M. Saif. 2003. Infectious bursal disease, pp. 161-179. In Y.M. Saif, H.J. Barnes, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, and D.E. Swayne (eds.), *Disease of poultry*. Iowa State University Press, Ames, IA, USA.
  23. Lynagh, G.R., M. Bailey, and P. Kaiser. 2000. Interleukin-6 is produced during both murine and avian *Eimeria* infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 76, 89-102.
  24. Min, W., H.S. Lillehoj, J. Burnside, K.C. Weining, P. Staeheli, and J.J. Zhu. 2001. Adjuvant effects of IL-1beta, IL-2, IL-8, IL-15, IFN-alpha, IFN-gamma TGF-beta4 and lymphotactin on DNA vaccination against *Eimeria acervulina*. *Vaccine* 20, 267-274.
  25. Miller, H., M.R. Islam, and R. Raue. 2003. Research on infectious bursal disease--the past, the present and the future. *Vet. Microbiol.* 97, 153-165.
  26. Mundt, E., J. Beyer, and H. Muller. 1995. Identification of a novel viral protein in infectious disease virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 76, 437-443.
  27. Nishimichi, N., M. Aosasa, T. Kawashima, H. Horiuchi, S. Furusawa, and H. Matsuda. 2005. Biological activity of recombinant chicken interleukin-6 in chicken hybridoma cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106, 97-105.
  28. Park, J.H., H.W. Sung, and H.M. Kwon. 2008. Evaluation of priming with *inovo* DNA vaccine and boosting with killed vaccine strategies for protective immunity against IBDV and effects of plasmid-encoded chicken interleukin-2 and chicken interferon- $\gamma$ . In *Proceedings of AVMA/AAAP 77*, New Orleans, LA, USA.
  29. Renoux, G. 1980. The general immunopharmacology of levamisole. *Drugs* 20, 89-99.
  30. Roh, H.J., H.W. Sung, and H.M. Kwon. 2006. Effects of DDA, CpG-ODN, and plasmid-encoded chicken INF- $\gamma$  on protective immunity by a DNA vaccine against IBDV in chickens. *J. Vet. Sci.* 7, 361-368.
  31. Schneider, K., R. Klaas, B. Kaspers, and P. Staeheli. 2001. Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties. *Eur. J. Biochem.* 268, 4200-4206.
  32. Snyder, D.B., V.N. Vakharia, and P.K. Savage. 1992. Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. *Arch. Virol.* 127, 89-101.
  33. Sun, J.H., Y.X. Yan, J. Jiang, and P. Lu. 2005. DNA immunization against very virulent infectious bursal disease virus with VP2-4-3 gene and chicken IL-6 gene. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 52, 1-7.
  34. Tsukamoto, K., N. Tanimura, S. Kakita, K. Ota, M. Mase, K. Imai, and H. Hihara. 1995. Efficacy of three live vaccines against highly virulent infectious bursal disease virus in chickens with or without maternal antibodies. *Avian. Dis.* 39, 218-229.
  35. Van den Berg, T.P., M. Gonze, and G. Meulemans. 1991. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian. Pathol.* 20, 133-143.
  36. Wang, B., K.E. Ugen, V. Srikantan, M.G. Agadjanyan, K. Dang, Y. Refaeli, A.I. Sato, J. Boyer, W.V. Williams, and D.B. Weiner. 1993. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4156-4160.
  37. Yin, J., H. Jin, F. Yang, Z. Ding, C. Huang, Q. Zhu, and B. Wang.

2007. Synergistic effects of adjuvants interferon-gamma and levamisole on DNA vaccination against infection with Newcastle disease virus. *Viral. Immunol.* 20, 288-299.

(Received May 8, 2009/Accepted June 4, 2009)

---

**ABSTRACT : Efficacy of Genetic Adjuvant (Plasmid-Expressed Chicken Interleukin-6) and Chemical Adjuvant (Levamisole) on the Protective Immunity of Genetic Vaccine against Infectious Bursal Disease Virus**

**Jeong Ho Park, Haan Woo Sung, Byung Il Yoon, Son Il Pak, and Hyuk Moo Kwon\***  
(School of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea)

Infectious bursal disease (IBD) caused by the infectious bursal disease virus (IBDV) has an important economic impact on the poultry industry worldwide. This study examined the adjuvant effects of a plasmid encoding chicken interleukin-6 (pcDNA-ChIL-6) and levamisole (LMS) on *in ovo* prime-boost vaccination using a genetic vaccine (pcDNA-VP243) to prime in chicken followed by a killed-vaccine boost. A pcDNA-VP243 was injected into the amniotic sac alone or in combination with a pcDNA-ChIL-6 or LMS at embryonation day 18, followed by an intramuscular injection of killed IBD vaccine at 1 week of age. The chicken were orally challenged with very virulent IBDV (vvIBDV) strain at 3 weeks of age and observed for 10 days. No mortality was observed in the groups that received the pcDNA-VP243 alone and pcDNA-VP243 plus pcDNA-ChIL-6 or LMS compared to 100% mortality in unvaccinated challenge control group. However, as determined by bursal damage (the presence of IBDV RNA, B/B ratio, and lesion score), a pcDNA-VP243 alone group was superior to pcDNA-VP243 plus pcDNA-ChIL-6 or LMS groups in the protection against post-challenge. These findings suggest that *in ovo* priming with genetic vaccine and boosting with killed vaccine is an effective strategy for protecting chicken against vvIBDV and the addition of pcDNA-ChIL-6 or LMS did not enhance protective immunity.