ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2014** Vol. 24. No. 1. 39~45 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2014.24.1.39

Ghost Vaccine Prepared from Strong Virulent *Salmonella typhimurium* Does not Improve Immune Responses of BALB/c Mice

Yeon Jo Ha[1†], Tae Wan Kim[2†], Seung Tae Kim[1], Sang Wan Gal[1*] and Sam Woong Kim[1*]

[1]*Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea*
[2]*Swine Science & Technology Center, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea*

Received September 13, 2013 / Revised December 16, 2013 / Accepted January 21, 2014

Salmonella typhimurium MMP13 and *S. typhimurium x*8554 were derived from weak JOL401 and strong *x*3339 virulent strains. Heat-labile subunit B (LT-B) was used as an adjuvant to increase the effectiveness of the vaccine. Plasmid pMMP184 carrying a ghost cassette was transformed into MMP13 and *x*8554 to produce the ghost, and the prepared ghost cells were administered into the muscles of BALB/c mice. In the absence of the adjuvant, the total IgG content showed a tendency to increase contrary to the original virulent strength. In contrast, in the presence of the adjuvant, the strain that originated from the strong virulent showed a tendency to promote the immune more than that of weak virulent strain. However, the final concentration of total IgG was similar between the compared groups, indicating that the originated virulent strength does not affect a specific immune. Other elements of the immunoglobulins IgG1, IgG2a, and sIgAs did not show a specific trend. The results of *Salmonella* challenge showed a similar tendency to regardless of the originated virulence. Taken together, the results suggest that the *Salmonella* ghost cells promoted the immune system of BALB/c mice, irrespective of the virulence applied to create the ghost cells.

Key words : Ghost vaccine, immunoglobulin, protection, *S. typhimurium*, virulence

서 론

돼지 자돈은 소화기 계통의 질병이 만연되어 성장이 억제되거나 폐사 되는 경우가 많다. 소화기 질병을 야기하는 대표적인 원인균은 *Salmonella* 계열과 병원성 *Escherichia coli* (*E. coli*)가 주류를 형성하고 있다. 그러므로 소화기 계통 질병을 방어하기 위한 수단으로 *Salmonella* 고스트 세포에 병원균 *E. coli* 항원을 운반하는 체계가 개발되어 있다[3, 11]. 따라서 다목적 고스트 백신으로 살모넬라와 병원성 대장균 방어용으로써 생산을 위해서는 우선 enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)의 한 원인균으로부터 특정 목표 항원을 설정한 다음, 이를 항시적 고발현이 가능한 vector와 표면단백질로의 발현을 유도하는 유전자, 그리고 온도나 기타 특정조건에 반응하여 고스트 형태로 유도하는 유전자(*cI*857-λP$_R$-*E* gene) 등과 함께 클로닝 과정을 통해 재조합 플라스미드를 제작한다[10, 23]. 이 때 시스템에 포함된 항원유전자는 필요에 따라 다양하게 바꿀 수 있으며, 기존의 *E. coli*에 대한 형질전환기법과 배양법을 통해 고스트 백신을 생산 할 수 있다. 고스트 카세트(*cI*857-λP$_R$-*E* gene)를 유지하는 벡터를 형질 전환한 균주는 30℃ 미만의 온도에서 균체량을 얻기 위해 배양하고 42℃ 이상의 온도에서 고스트 카세트를 유도하면 고스트화가 진행된다[3, 11].

고스트 백신이란 세포막에 hole의 발생에 기인하여 세포의 빈껍질만 남는 상태를 말한다[2, 8, 23]. 따라서 박테리아 고스트의 형태는 용균과정 동안에 실활되지 않기 때문에 주요 면역 자극 요소가 보존된다[16]. 이들 요소들을 질병균 연관된 분자 패턴(pathogen-associated molecular patterns; PAMPs)이라고 하며, 리포폴리싸칼라이드(LPS), 모노포스포릴 리피드 A (MPL), 펩티도글리칸이나 편모 등이 포함된다[1, 6, 22]. PAMPs는 패턴인식수용체(toll-like receptors; TLR)에 의해 인식되기 때문에, 우선적 반응으로서 선천적 면역 응답을 유도한다[19, 20]. 또한, 실험동물에서 체액성 및 세포매개 면역 응답을 특이적으로 유도한다[12, 21].

본 연구에서는 면역보강제의 유무와 고스트 백신에 의한 면역 능력을 평가하고, 약독성 및 강독성 유래 균주의 면역성 증진에 관한 연구를 수행하였다.

†**Authors contributed equally.**
***Corresponding author**
Tel : +82-55-751-3688, Fax : +82-55-759-1893
E-mail : sangal@gntech.ac.kr (Sang Wan Gal)
swkim@gntech.ac.kr (Sam Woong Kim)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons. org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Descriptions	References
E.coli		
Top10	F-mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZ⊿M15 ⊿lacX74 nupG recA1 araD139 ⊿(ara-leu)7697 galE15 galK rpsL (Str^R)endA1	Invitrogen
DH5α	*fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*	Lab stock
χ6212	*ϕ* 80d lacZ △M15 *deoR⊿(lacZYA-argF)U169 supE44λ⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 asdA4 ⊿zhf-2::Tn10 hsdR17* (R^-M^+)	Lab stock
Salmonella		
MMP13	*S. typhimurium* JOL401 *asd*A16	This study
S.typhimurium χ3339	wild-type strain SL1344, hisG rpsL	
S.typhimurium χ8554	*S. typhimurium* χ 3339 asdA16	Lab stock
Plasmids		
pMMP184	a derivative of pYA3342 carrying cI857 PR E ara and PR ompA TM	Lab stock
pMMP300	a derivative of pMMP184 carrying LT-B	Lab stock

재료 및 방법

사용된 균주 및 플라스미드

사용된 균주 및 플라스미드는 Table 1에 정리되어 있다. *E. coli* 및 *Salmonella* strain은 연구실에 보관중인 균주를 사용하였다.

고스트화 및 잔존 생균수 측정

고스트화를 유도하기 위해 100 ml 배지에 전배양된 균주를 1/100로 접종하여 28℃에서 24 시간 배양한 후, 42℃에서 24시간 동안 배양하였다. 잔존 생균수를 측정하기 위해 42℃ 배양 동안에 일정한 시간 간격으로 샘플링을 실시하였다. 샘플링된 배양액은 10배씩 적절하게 희석한 후 LB 배지에 도말하여 생균수를 측정하였다. 다른 한편으로 고스트의 효율을 증진시키기 위해 28℃에서 24 시간 배양한 후, 배양액을 제거하고 신선한 배지를 제공하기 위해 배양된 액을 멸균된 원심분리관에 일정량을 첨가한 후 8,000 rpm으로 4℃에서 20분간 원심분리하여 배양상등액을 완전히 제거하였다. 침전된 세포에는 배양액과 동일한 양의 PBS buffer를 첨가한 후 위와 동일한 조건으로 2회에 걸쳐 원심분리 하여 불순물을 완전히 제거하였다. 처리된 세포에는 신선한 M9 배지를 첨가하여 42℃에서 계속 배양하여 고스트화의 수율을 상승시켰다.

고스트 세포의 마우스 vaccination

동결 건조된 고스트 세포를 PBS buffer을 사용하여 1 mg/ml (1×10^8 CFU/ml)로 조제된 고스트 세포를 농도별로 희석하여 일주일간 순화된 BALB/c 마우스에 근육으로 접종하였다. 접종량은 근육으로 1×10^8 CFU/ml 로 접종하였다 2주 경과 후 동일량에 의해 근육으로 추가 접종을 실시하였다. 접종하기 전에 4시간 이상 절수 및 절식을 시켰고 접종 후 1시간 후 음수 및 사료를 제공하였다. 접종을 실시한 후 6주 동안 마우스를 관찰하였고 혈액중의 면역글로불린 함량을 측정하기 위한 혈액의 채취는 0, 2, 4, 6주에서 실시하였다. 또한 분비액 중에 sIgA를 측정하기 위해 질세척액과 분변을 0, 2, 4, 6주에서 채취하였다.

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

LPS (Sigma, *S. typhimurium* 유래)를 200 ng/100 ul 농도로 0.05 M carbonate 용액(pH 9.6)에 넣어서 4℃에서 overnight 시켜서 microtiter plate의 표면에 항원을 코팅 시켰다. 코팅용액을 버리고 1x PBS (pH 7.4) 용액으로 한번 washing을 하였다. 1x PBS (pH 7.4) 용액을 완전히 제거한 후 1% skim milk 용액으로 상온에서 30분 동안 blocking 시켰다. Blocking 용액인 1% skim milk 용액을 버리고 새로운 1% skim milk 용액에 샘플(혈액(1:50), 분변(1:2), 질분비액(1:2))을 희석하여 넣고 2시간 동안 37℃에서 반응 시켰다. 반응 후1x PBS (pH 7.4) 용액으로 두 번 washing을 하였다. 1x PBS (pH 7.4) 용액을 완전히 제거한 후, HRP가 결합된 항체 IgG (1:2,000), lgG1 (1:2,000), IgG2a (1:2,000), IgA (1:2,000)의 희석액을 첨가하여 상온에서 2시간 반응 시켰다. 반응 후 1x PBS (pH 7.4) 용액으로 두 번 washing을 하였다. 1x PBS (pH 7.4) 용액을 완전히 제거한 후 반응 기질 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6- sulphonic acid; ABTS)를 유지하는 용액에서 10-90분 동안 반응 시켰다. 0.1% SDS로 반응을 정지 시킨 후 ELISA reader (Dynex, USA)로 파장 405 nm에서 발현 정도를 관찰하였다.

고스트 세포의 살모넬라균에 대한 보호능력 확인

김 등[14, 15]에 의해 사용된 방법에 의해 수행하였다. 간단히 서술하면 다음과 같다. 고스트 세포가 독력이 있는 살모넬라균에 대한 보호능력을 관찰하기 위해서 도전실험을 다음과

같이 실시하였다. 근육으로 1×10^8 CFU/ml 고스트 세포를 접종하고 동량으로 2주 간격으로 2회 추가 접종하였다. 고스트 세포 접종 6주 후에 8.4×10^6 CFU/ml *S. typhimurium* χ3339를 경구로 투여하였다. 접종하기 전에 4시간 이상 절수 및 절식을 시켰고 접종 후 1시간 후 음수 및 사료를 제공하였다. 접종을 실시한 후 4주 동안 마우스를 관찰하였다. 이 연구에 사용된 동물 실험은 한국동물보호위원회의 가이드라인에 따른 경남과학기술대학교 동물윤리위원회의 승인에 의해 수행하였다 (ACE-20100730 -0002).

결과 및 고찰

독력에 따른 살모넬라 균주로부터 제조된 고스트 백신에 의한 면역 유도 능력의 평가 결과

S. typhimurium MMP13은 *S. typhimurium* JOL401로부터 aspartate semialdehyde dehydrogenase (*asd*) 유전자를 결손시켜 제조하였다. *S. typhimurium* χ8554는 *S. typhimurium* χ3339로부터 *asd* 유전자를 결손시켜 제조된 균주이다[13, 14]. MMP13 야생균주의 LD50는 10^9 이상으로 나타나기 때문에 독력이 매우 낮은 *S. typhimurium* 균주인 반면에 χ8854의 야생균주는 LD50가 10^5 정도를 나타내는 매우 강력한 독력을 가진 균주이다[15]. 플라스미드 pMMP184는 host-balanced lethal system인 pYA3342를 backbone으로 하여 제조하였다 (unpublished data). 고스트를 유도하는 카세트는 *cI*857 P_R::*E*로 구성되어 transcriptional control을 할 수 있고, antisense 방향에서 *araC* P_{araBAD}에 의해 translational control을 유도하도록 되어 있다. 외부항원은 *araC cI*857 P_R::*E*에 의해 발현이 조절되도록 클로닝을 수행하였다. 플라스미드 pMMP300은 pMMP184에 LT-B를 클로닝하였다. 따라서 이 체계로부터 발현된 LT-B는 면역보강제로서 사용되었고, LT-B는 잘 알려진 면역보강제이다[4, 18].

각 균주의 조합을 Fig. 1과 같이 구성하여 마우스에 백신화 실험을 수행하였다. 그 결과 살모넬라 고스트 백신에 대한 총 IgG 면역응답은 2주차부터 반응이 나타나기 시작했다. 근육으로 살모넬라 고스트 백신을 투여하여 나타난 연구 결과가 아직 발표되지 않아 비교 대상이 되지 못했지만, 본 연구에서 얻어진 결과는 구강으로 살모넬라 live attenuated vaccine을 투여한 결과와 유사한 양상을 보였다[9]. 독력이 강한 χ8554균주로부터 유래된 고스트에 비교하여 독력이 낮은 MMP13이 면역 증강 능력이 강하게 나타났다. 단독 균주보다 χ8554 [pMMP300]의 LT-B를 포함하는 백신 그룹에서 면역 증강 능력이 강한 것으로 나타났다. 복합 백신 그룹인 χ8554 [pMMP184]/χ8554 [pMMP300]은 MMP13 [pMMP184]/χ8554 [pMMP300]보다 면역 증강 능력이 강한 것으로 나타났다. 이 결과를 종합해 보면 면역보강제인 LT-B가 추가되면 IgG 면역성을 증진시킬 수 있는 것으로 나타났지만, 독력이 세기가 반드시 면역성의 증진과 연관성이 있는 것은 아닌 것으로 추정된다.

면역 반응 타입의 분석 결과

면역글로블린 IgG의 subtype인 IgG1과 IgG2a 생성은 Th2와 Th1에 의해 촉진되어지고, 각각 체액성 면역과 세포 매개 면역 응답을 유발하도록 한다[5, 7, 17]. 본 연구에 사용된 고스트 백신이 각 subtype의 발현성에 대해 알아보기 위해 IgG1과 IgG2a가 분석되었다. 그 결과 IgG1은 LT-B을 포함하는 복합 균주 군에서 4주차에서 단독 균주 그룹보다 발현성이 높은 것을 관찰할 수 있다(Fig. 2). 그러나 4주차에서 단독 균주 그룹

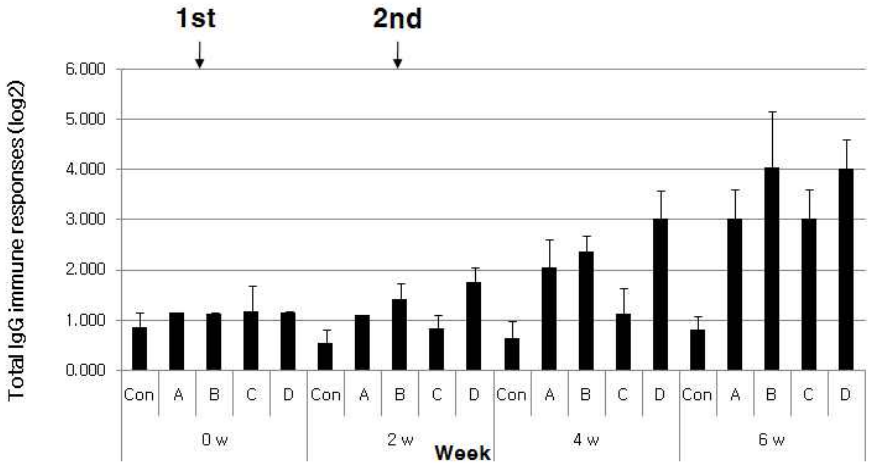

Fig. 1. Total IgG immune responses according to ghost strains via IM route of BALB/c. LPS and IgG conjugated with HRP was treated for 2 hr at room temperature by 2 ug/ml concentration and by 1:2,000 dilution, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; IM administration by only PBS, A; MMP13 [pMMP184], B; MMP13 [pMMP184] + χ8554 [pMMP300], C; χ8554 [pMMP184], D; χ8554 [pMMP184] + χ8554 [pMMP300].

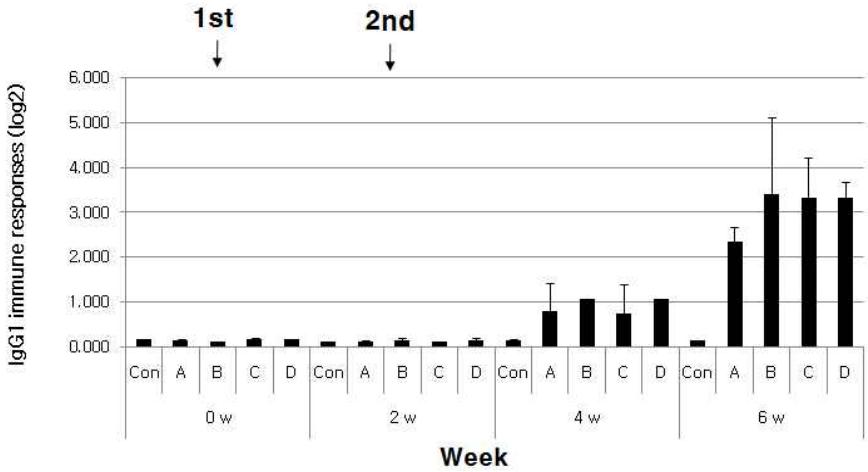

Fig. 2. IgG1 immune responses according to ghost strains via IM route of BALB/c. LPS and IgG1 conjugated with HRP was treated for 2 hr at room temperature by 2 ug/ml concentration and by 1:2,000 dilution, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; IM administration by only PBS, A; MMP13 [pMMP184], B; MMP13 [pMMP184] + X8554 [pMMP300], C; X8554 [pMMP184], D; X8554 [pMMP184] + X8554 [pMMP300].

은 유사한 발현 양상을 나타내어 특이적인 경향성을 보이지 않았다. 그러나 6주차에서 MMP13 [pMMP184]보다 X8554 [pMMP184] 그룹에서 발현성이 증가되는 경향성을 보였고, 이 수치는 복합 균주 그룹과 유사한 양상을 보였다.

IgG2a는 대체적으로 발현성이 낮게 나타났으며, 특히 4주차에서는 X8554 [pMMP184]/X8554 [pMMP300] 그룹을 제외하고, 대부분이 발현이 유발되지 않는 경향성을 보였다(Fig. 3). 그러나 6주차에서 특이적으로 MMP13 [pMMP184]/X8554 [pMMP300] 그룹에서 발현이 상승되는 경향을 보였다. 이상의 결과로 볼 때, 고스트 백신 균주를 근육으로 투여할 때 세포성 면역보다 체액성 면역의 유도가 높게 나타나는 것으로 추정된다.

분비 면역 연관성의 분석 결과

고스트 백신을 근육으로 주사하여도 부분적으로 점막 면역에 연관성이 있는 분비 IgA (sIgA)을 발현하는 것으로 나타났다(unpublished data). 그래서 본 연구에서도 각 그룹의 고스트 백신을 투여했을 경우, sIgA에 발현에 영향이 있는가를 관찰해 보았다. 그 결과 질분비액에서는 발현성이 낮아 대조군에 비교하여 유의적인 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 4). 그러나 분변에서는 6주차에서 MMP13 [pMMP 184] 그룹을 제외하고 나머지 그룹에서 sIgA 발현이 관찰되었다(Fig. 5). 흥미롭게도

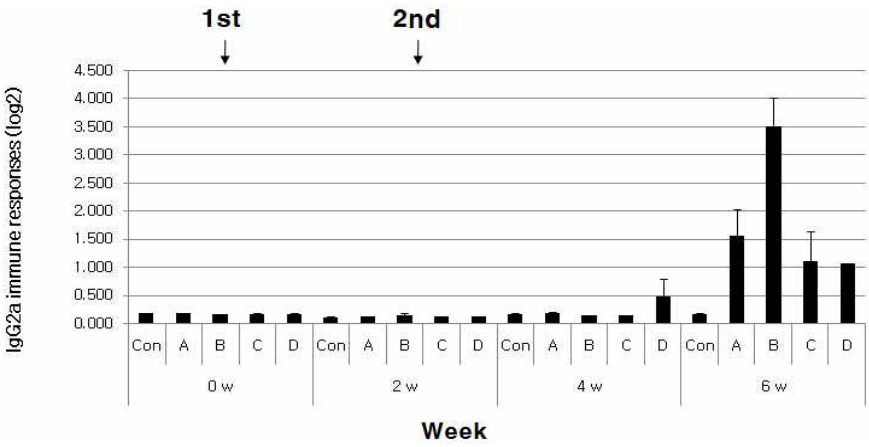

Fig. 3. IgG2a immune responses according to ghost strains via IM route of BALB/c. LPS and IgG2a conjugated with HRP was treated for 2 hr at room temperature by 2 ug/ml concentration and by 1:2,000 dilution, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; IM administration by only PBS, A; MMP13 [pMMP184], B; MMP13 [pMMP184] + X8554 [pMMP300], C; X8554 [pMMP184], D; X8554 [pMMP184] + X8554 [pMMP300].

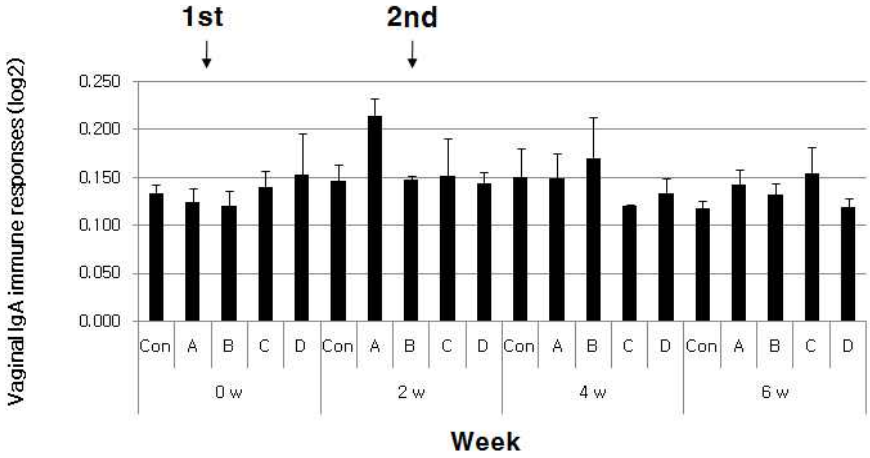

Fig. 4. Vaginal IgA immune responses according to ghost strains via IM route of BALB/c. LPS and IgA conjugated with HRP was treated for 2 hr at room temperature by 2 ug/ml concentration and by 1:2,000 dilution, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; IM administration by only PBS, A; MMP13 [pMMP184], B; MMP13 [pMMP184] + X8554 [pMMP300], C; X8554 [pMMP184], D; X8554 [pMMP184] + X8554 [pMMP300].

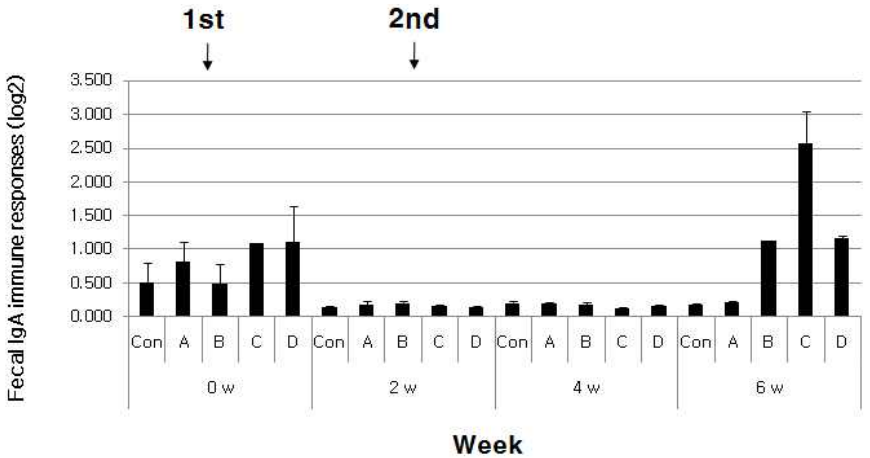

Fig. 5. Fecal IgA immune responses according to ghost strains via IM route of BALB/c. LPS and IgA conjugated with HRP was treated for 2 hr at room temperature by 2 ug/ml concentration and by 1:2,000 dilution, respectively. The treated solutions were measured at 405 nm by ELISA reader. X- and Y-axes indicate week post injection and immune response by log value, respectively. C; IM administration by only PBS, A; MMP13 [pMMP184], B; MMP13 [pMMP184] + X8554 [pMMP300], C; X8554 [pMMP184], D; X8554 [pMMP184] + X8554 [pMMP300].

X8554 [pMMP184] 그룹에서 매우 높은 값이 감지되는 것으로 나타났다. 이들 결과는 이전 연구와 유사하게 근육 내 주사가 부분적으로 sIgA의 발현성에 연관성이 있으며, 이 결과는 근육주사라도 점막 면역에 연관성이 있을 것으로 추정된다.

면역보강제에 의한 보호효과의 관찰

본 연구에서 사용된 고스트 백신 그룹에 대한 독력 *S. typhimurium*에 대한 보호 효과를 관찰하기 위해, *S. typhimurium* x3339을 이용한 도전실험결과 대조군은 33.3%의 생존율을 보였지만, 단일 균주 백신 그룹인 MMP13 [pMMP184]와 X8554 [pMMP184]는 대조군에 비교하여 47% 정도의 보호효과가 관찰되었다(Fig. 6). 그러나 두 균주를 이용한 MMP13 [pMMP184]/ X8554 [pMMP300] 및 X8554 [pMMP184]/ X8554 [pMMP300]은 대조군에 비교하여 모두 67% 이상의 보호 효과가 관찰되는 것으로 나타났다. 이 실험 결과 보호효과는 균주의 독력의 강도에 의존하는 것이 아니라 면역보강제인 LT-B의 사용에 의존하여 증가되는 것으로 나타났다.

감사의 글

논문은 농림수산식품부 (농림, 식품, 수산)기술개발사업의 지원(110050033HD110), 2012년도 경남과학기술대학교 기성

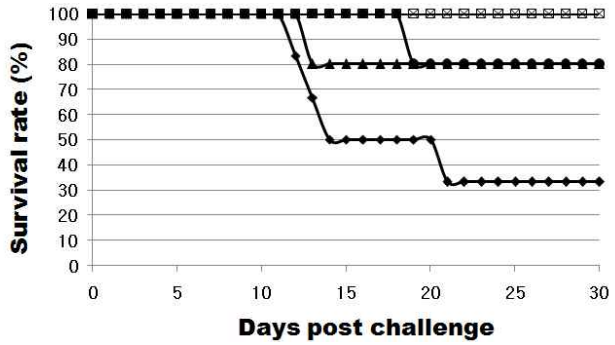

Fig. 6. Challenge test to BALB/c vaccinated via IM according to ghost strains. The virulent *S. typhimurium* χ3339 was orally administrated by 8.4×10^6 CFU at 2 weeks post twice administration by ghost strains. The challenged mice were observed for 4 weeks.

회 연구비 지원 및 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업으로 수행된 연구임(2009-0093813).

References

1. Ausubel, F. M. 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?. *Nature Immunol* **6**, 973-979.
2. Cai, K., Zhang, Y., Yang, B. and Chen, S. 2013. *Yersinia enterocolitica* ghost with *msbB* mutation provides protection and reduces proinflammatory cytokines in mice. *Vaccine* **31**, 334-340.
3. Chaudhari, A. A., Jawale, C. V., Kim, S. W. and Lee, J. H. 2012. Construction of a *Salmonella* Gallinarum ghost as a novel inactivated vaccine candidate and its protective efficacy against fowl typhoid in chickens. *Vet Res* **43**, 44-55.
4. Chaudhari, A. A. and Lee, J. H. 2013. Evaluation of the adjuvant effect of Salmonella-based *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunits on the efficacy of a live *Salmonella*-delivered avian pathogenic *Escherichia coli* vaccine. *Avian Pathol* **42**, 365-372.
5. DeKruyff, R. H., Rizzo, L. V. and Umetsu, D. T. 1993. Induction of immunoglobulin synthesis by CD4+ T cell clones. *Semin Immunol* **5**, 5421-5430.
6. Didierlaurent, A., Simonet, M. and Sirard, J. 2006. Innate and acquired plasticity of the intestinal immune system. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1285-1287.
7. Gor, D. O., Rose, N. R. and Greenspan, N. S. 2003. Th1-Th2: a procrustean paradigm. *Nat Immunol* **4**, 503-505.
8. Hu, M., Zhang, Y., Xie, F., Li, G., Li, J., Si, W., Liu, S., Hu, S., Zhang, Z., Shen, N. and Wang, C. 2013. Protection of piglets by a *Haemophilus parasuis* ghost vaccine against homologous challenge. *Clin Vaccine Immunol* **220**, 795-802.
9. Hur, J. and Lee, J. H. 2011. Immune responses to new vaccine candidates constructed by a live attenuated *Salmonella typhimurium* delivery system expressing *Escherichia coli* F4, F5, F6, F41 and intimin adhesin antigens in a murine model. *J Vet Med Sci* **73**, 1265-1273.
10. Jalava, K., Hensel, A., Szostak, M., Resch, S. and Lubitz, W. 2002. Bacterial ghosts as vaccine candidates for veterinary applications. *J Control Release* **85**, 17-25.
11. Jawale, C. V., Chaudhari, A. A., Jeon, B. W., Nandre, R. M. and Lee, J. H. 2012. Characterization of a novel inactivated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis vaccine candidate generated using a modified cI857/λ PR/gene E expression system. *Infect Immun* **80**, 1502-1509.
12. Jones, B. D. and Falkow, S. 1996. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol* **14**, 533-561.
13. Kang, H. Y., Moon, K. H., Kim, S. W., Bahk, J. D., Gal, S. W., Cho, K. K., Kim, C. W., Lee, J. H. and Kim, S. W. 2011. An efficient secretion of the protein fused to the AgfA signal sequence in *Salmonella*. *African J Biotechnol* **10**, 11611-11619.
14. Kim, S. W., Kang, H. Y., Hur, J., Gal, S. W., Bang, W. Y., Cho, K. K., Kim, C. W., Bahk, J. D. and Lee, J. H. 2011. Construction of a conditional lethal Salmonella mutant via genetic recombination using the *ara* system and *asd* gene. *J Microbiol Methods* **87**, 202-207.
15. Kim, S. W., Moon, K. H., Baik, H. S., Kang, H. Y., Kim, S. K., Bahk, J. D., Hur, J. and Lee, J. H. 2009. Changes of physiological and biochemical properties of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by deletion of *cpxR* and *lon* genes using allelic exchange method. *J Microbiol Methods* **79**, 314-320.
16. Langemann, T., Koller, V. J., Muhammad, A., Kudela, P., Mayr, U. B. and Lubitz, W. 2010. The Bacterial Ghost platform system: production and applications. *Bioeng Bugs* **1**, 326-336.
17. Li, Y., Wang, S., Xin, W., Scarpellini, G., Shi, Z., Gunn, B., Roland, K. L. and Curtiss, R. 3rd. 2008. A sopB deletion mutation enhances the immunogenicity and protective efficacy of a heterologous antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* vaccines. *Infect Immun* **76**, 5238-5246.
18. Nandre, R. M., Jawale, C. V. and Lee, J. H. 2013. Enhanced protective immune responses against *Salmonella* Enteritidis infection by *Salmonella* secreting an *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protein. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **36**, 537-548.
19. Noreen, M., Shah, M. A., Mall, S. M., Choudhary, S., Hussain, T., Ahmed, I., Jalil, S. F. and Raza, M. I. 2012. TLR4 polymorphisms and disease susceptibility. *Inflamm Res* **61**, 177-188.
20. Qian, C. and Cao, X. 2013. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Ann N Y Acad Sci* **1283**, 67-74.
21. Riedmann, E. M., Kyd, J. M., Cripps, A. W. and Lubitz, W. 2007. Bacterial ghosts as adjuvant particles. *Expert Rev Vaccines* **6**, 241-253.
22. Rumbo, M., Nempont, C., Kraehenbuhl, J. and Sirard, J. 2006. Mucosal interplay among commensal and pathogenic bacteria: Lessons from flagellin and Toll-like receptor 5. *FEBS Letters* **580**, 2976-2984.

23. Tabrizi, C. A., Walcher, P., Mayr, U. B., Stiedl, T., Binder, M., McGrath, J. and Lubitz, W. 2004. Bacterial ghosts-biological particles as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr Opin Biotechnol* **15**, 530-537.

초록 : 독력이 강한 *S. typhimurium*으로부터 유도된 고스트 백신으로 면역응답 개선에 관한 연구

하연조[1†] · 김태완[2†] · 김승태[1] · 갈상완[1*] · 김삼웅[1*]

([1]경남과학기술대학교 제약공학과, [2]경남과학기술대학교 양돈과학기술센터)

S. typhimurium MMP13과 χ8554는 독력이 약한 JOL401과 독력이 강한 χ3339로부터 유래되었다. Heat labile subunit B (LT-B)는 백신의 효율성을 증가시키기 위한 면역보강제로서 일반적으로 사용되고 있다. 고스트 카세트를 운반하는 pMMP184를 MMP13과 χ8554에 형질전환하여 고스트를 생성시킨 후 BALB/c 마우스에 근육으로 투여하였다. 면역 보강제가 없는 경우에는 독력에 상반하여 총 IgG 함량이 증가되는 경향성을 보였다. 반대로, 면역보강제를 발현하는 pMMP300을 운반하는 고스트 백신이 동시에 투여되는 경우에는 독력이 강한 균주에서 면역성이 증진되는 경향성을 보였다. 그러나 최종 총 IgG 농도는 유사하게 관찰되었기 때문에, 독력의 세기가 특별히 면역성에 영향을 미치지 못하는 것으로 추정된다. 다른 면역 요소인 IgG1, IgG2a, sIgAs는 특이적인 경향성을 보이지 않았다. 살모넬라 도전실험 결과 독력 유래에 상관없이 유사한 경향성을 보이는 것으로 나타났다. 이상의 결과는 고스트를 생성에 사용된 독력에 관계없이 살모넬라에 대한 면역성이 유발되는 결과를 보였다.