大韓獸醫學會誌 (2014) 第 54 卷 第 2 號
Korean J Vet Res(2014) 54(2) : 75~79
http://dx.doi.org/10.14405/kjvr.2014.54.2.75

<원 저>

Bordetella bronchiseptica 백신항원의 면역원성 평가

우수한 · 문선영 · 변윤영 · 주홍구*
제주대학교 수의과대학 수의약리학실

(접수: 2014년 1월 13일, 수정: 2014년 3월 28일, 게재승인: 2014년 4월 9일)

Evaluation of the immunogenicity of *Bordetella bronchiseptica,* a vaccine antigen

Su-Han Woo, Sun-Young Moon, Yun-Young Byon, Hong-Gu Joo*

Laboratory of Veterinary Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

(Received: January 13, 2014; Revised: March 28, 2014; Accepted: April 9, 2014)

Abstract : *Bordetella* (*B.*) *bronchiseptica* is a causative agent of swine atrophic rhinitis that promotes colonization of the mucous membrane of the swine nasal cavity by *Pasteurella* (*P.*) *multocida*. Mixed infection with *B. bronchiseptica* and *P. multocida* leads to growth inhibition of pigs, resulting in significant economic loss. There are many commercial vaccines for atrophic rhinitis, including *B. bronchiseptica* as a killed vaccine antigen (Ag). However, the immunogenicity of killed *B. bronchiseptica* Ag has not yet been elucidated; therefore, this study was conducted to investigate the immunogenicity of killed *B. bronchiseptica* Ag and the type of immune response it induces. *In vitro* assays using mouse spleen cells and flow cytometry revealed that *B. bronchiseptica* Ag induced high proliferation capability of lymphocytes, especially B lymphocytes, and the proliferating cells showed a significant response to interleukin (IL)-2. *B. bronchiseptica* Ag also enhanced the production of IL-12, a representative cytokine for cell-mediated immunity. *In vivo* experiments using mice showed that the injection of *B. bronchiseptica* Ag markedly induced Ag-specific antibody. Taken together, these results indicate that *B. bronchiseptica* Ag has high immunogenicity by itself.

Keywords : *Bordetella bronchiseptica*, immunogenicity, spleen cells

서 론

위축성 비염(atrophic rhinitis)은 돼지에서 흔히 발생하는 호흡기 질병으로서, 비말감염이나 접촉감염에 의해 전파된다. 질병에 걸린 돼지는 비출혈, 비갑개골 위축, 안면 비대칭의 증상을 나타낸다 [9]. *Bordetella* (*B.*) *bronchiseptica*에 단독 감염된 돼지의 경우에는 비진행성 위축성 비염을 나타내며 그 피해는 미미한 편이다. 그러나 *B. bronchiseptica*는 *Haemophilus parasuis*를 포함한 다른 세균들이 비강점막에 정착하는 것을 촉진하여 혼합 감염을 일으킨다 [3]. *B. bronchiseptica*와 *Pasteurella multocida*가 혼합 감염된 돼지는 심각한 진행형의 위축성 비염과 성장장애를 나타낸다 [4, 5]. 이는 돼지의 체중증가율 감소와 성장률의 저하로 이어져 양돈 농가에 막대한 경제적 손실을 입힌다. 따라서 *B. bronchiseptica* 항원이 포함된 백신들이 지속해서 개발됐다 [7].

효과적인 백신은 감염원의 정확한 에피토프(epitope)에 대한 항체와 T세포가 생성되어야 하며, 림프구를 초회자극(priming)하여 초기면역반응과 면역기억반응이 이루어져야 한다. 그리고 백신의 면역성을 증가시키기 위해서는 적절한 adjuvant가 필요하며 [1], 백신접종으로 인한 부작용은 최소화시켜야 한다. 효과적인 백신을 개발하기 위해서는 항원 자체의 면역원성에 대한 이해가 선행되어야 하지만 기존의 백신은 항원 자체의 면역원성에 대한 명확한 이해 없이 개발되어 사용되었다.

본 연구팀은 이전 연구에서 *B. bronchiseptica* 항원이 비장세포의 활성, TNF-alpha와 림프구의 활성화 마커 발현을 증가시키는 사실을 보고한 바 있다 [6]. 이에 본 연구에서는 포르말린으로 불활성화시킨 *B. bronchiseptica*를 비장세포에 처리하여 세포활성도, interleukin(IL)-12 및 nitric oxide(NO)의 생산 등에 미치는 영향을 알아보고 *B. bronchiseptica* 항원 자체의 면역원성을 규명하고자 한다.

*Corresponding author
Tel: +82-64-754-3379, Fax: +82-64-756-3354
E-mail: jooh@jejunu.ac.kr

재료 및 방법

실험동물과 백신 항원

제주대학교 수의약리학실의 6~12주령 사이의 BALB/c 마우스를 사용하였다. 동물실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 승인(2013-0008, 2013-0024)을 받아 시행되었으며, 제주대학교 동물실험윤리지침을 준수하였다. *B. bronchiseptica*는 ㈜고려비엔피에서 사균(killed bacteria)을 공급받아 단백질을 정량한 후 실험에 사용하였다.

비장세포의 배양 및 실험

BALB/c 마우스를 안락사시킨 후, 외과적 방법을 사용하여 비장을 적출하였다. 적출한 비장을 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 후 분쇄하였고, 412 × g에서 7분간 원심분리하여 비장세포를 분리하였다. 이 세포들을 10분간 hypotonic lysis buffer와 반응시켜 적혈구를 용혈시킨 후 원심분리하였다. 이후 T75 flask에 넣고 37°C CO_2 배양기에서 30분간 배양하여 대식세포, 수지상세포 등의 불필요한 세포들은 flask 바닥에 부착시켜 제거하고, 상층액을 걷어내어 floating cell(lymphocyte)을 분리하였다. 이 세포를 96-well 또는 6-well 배양 용기에 2×10^6 cells/mL의 농도로 배양하여 실험에 사용하였다. 세포의 IL-2에 대한 반응성을 확인하기 위해 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 실시하였다.

Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) cytostaining assay

B. bronchiseptica 처리에 의한 비장세포의 증식반응을 알아보기 위해서 CFSE cytostaining assay를 실시하였다. 비장세포를 15 mL의 conical tube에 2×10^6 cells/mL의 농도로 넣고 412 × g에서 7분간 원심분리한 후 상층액을 버렸다. 이후 비장세포를 0.1% BSA가 포함된 pre-warmed PBS(1×10^7 cells/mL)로 부유시킨 후, 5 mM stock CFSE 용액을 1 μL/mL의 농도로 넣었다. 이후 37°C 배양기에서 10분간 배양한 뒤, 5 mL의 ice-cold 5% CM을 세포에 넣어 quenching 하였다. CFSE로 염색한 비장세포를 96-well 배양 용기에 200 μL/well씩 넣었다. 이후 *B. bronchiseptica*를 제시된 농도로 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군으로 나누어 BD FACSCalibur(Beckton, Dickinson and Company, USA)을 이용하여 염색된 세포를 분석하였다.

유세포분석

*B. bronchiseptica*를 처리한 비장세포에서 어떤 면역세포가 반응하는지 알아보기 위해 유세포분석을 시행하였다. 비장세포를 넣은 2개의 6-well plate(3 mL/well)를 *B. bronchiseptica*를 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군으로 나누어 3일간 배양하였다. 림프구 표면 마커인 CD4, CD8, CD19의 발현 정도를 측정하기 위해서 1차 항체인 biotin-labeled anti-CD4, -CD8, -CD19 antibody(1 μL/sample)를 각각 넣은 후 30분간 4°C에서 반응시켰다. 이후 FACS staining solution을 사용하여 2번 세척한 후 2차 항체인 streptavidin-phycoerythrin(0.5 μL/sample)을 넣고 30분간 4°C에서 반응시켰다. 같은 방법으로 세척한 후 1% paraformaldehyde 용액(300~400 μL/sample)을 넣어 부유시킨 후 FACS tube로 옮기고 FACSCalibur을 이용하여 염색된 세포를 분석하였다.

ELISA를 이용한 cytokine의 측정

*B. bronchiseptica*를 처리한 비장세포의 cytokine 생성변화를 알아보기 위해 ELISA를 실시하였다. IL-12 Cytoset(Invitrogen, USA)을 이용하였으며, 제조사의 측정방법을 따랐다.

NO assay

*B. bronchiseptica*를 처리한 비장세포의 NO 생성 변화를 알아보기 위해 NO assay를 실시하였다. 96-well 배양용기에 sodium nitrate를 0~100 μM의 농도범위에서 2배 단계 희석법으로 넣어 standard를 준비하였다. 비장세포는 *B. bronchiseptica*를 0, 1.25, 2.5, 5 μg/mL의 농도로 처리하였고, 각각의 농도마다 4개의 sample을 준비하였다. 준비된 sample(50 μL/well)에 Griess reagent(50 μL/well)를 섞어준 뒤 10분간 반응시키고 microplate reader(Multiskan FC; Thermo Scientific, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

B. bronchiseptica 항원을 접종한 마우스에서 특이항체 역가 분석

마우스에 인산 완충액(대조군), *B. bronchiseptica* 항원(처치군)을 접종하였다. 사전연구를 통해 *B. bronchiseptica* 항원의 최적농도를 10 μg/마우스로 설정하였고 2주 간격으로 2회 복강접종을 하였다. 2차 접종 후 2주 뒤에 마우스로부터 혈청을 채취한 후 *B. bronchiseptica* 항원 특이적인 항체가를 측정하였다. Maxisorp Nunc-Immuno module(Thermo Scientific)에 항원을 코팅한 후, blocking, 단계 희석한 혈청, horseradish peroxidase가 결합한 anti-mouse IgG 항체(SouthernBiotech, USA), 효소기질을 차례로 처리한 후 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도가 0.1 이상인 희석배수를 계산하여 항체역가를 계산하였다.

유의성분석

대조군과 실험군 사이의 각각의 면역반응에 대한 유의차는 two-taled, unpaired student *t* test(InStat; GraphPad Software, USA)를 사용하여 분석하였다. 대조군에 대한 실험군의 유의성(significant difference)은 *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$)로 나타내었다.

결 과

*B. bronchiseptica*에 의한 비장세포의 증식

*B. bronchiseptica*에 의한 비장세포의 증식능력을 알아보기

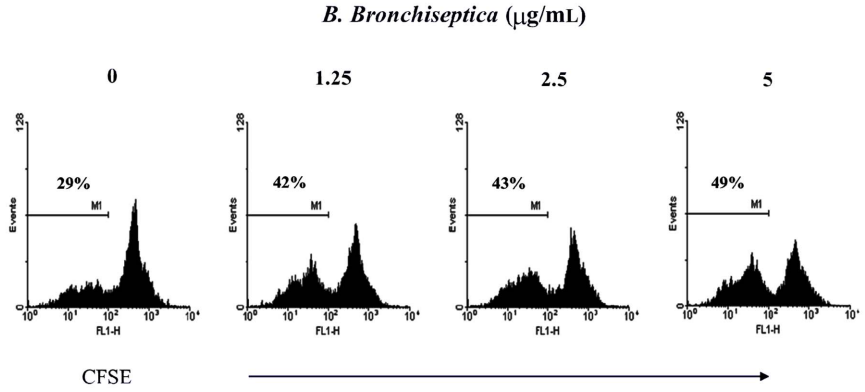

Fig. 1. Enhanced proliferation of spleen cells treated with *Bordetella* (*B.*) *bronchiseptica*. Spleen cells were stained with Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) and cultured in 96-well culture plates in the presence of *B. bronchiseptica* at indicated concentrations. The number in histogram is the percentage of proliferation cells with low fluorescence intensity.

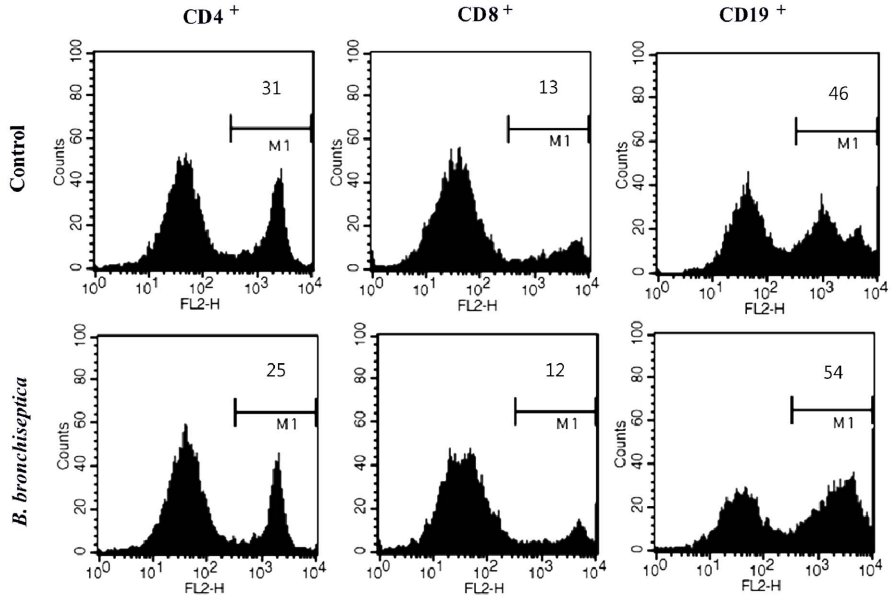

Fig. 2. High proliferation of $CD19^+$ B lymphocytes by *B. bronchiseptica* treatment. Spleen cells were cultured in 6-well culture plates with medium alone or *B. bronchiseptica*. After harvesting, the cells were stained with surface marker-specific antibodies. The numbers are the percentage of positive cells of a specific subset.

위해 CFSE cytostaining assay를 실시하였다(Fig. 1). 96-well plate에 CFSE로 염색한 비장세포를 200 μL/well씩 준비하였다. 이후 *B. bronchiseptica*를 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군으로 나누어 FACSCalibur을 이용하여 염색된 세포를 분석하였다. CFSE는 분열되기 전 처음 세포의 intensity가 가장 높고 세포분열이 진행될수록 intensity가 낮아진다. 따라서 histogram의 가장 오른쪽 정점(peak)이 반응 초기세포이고, 퍼센트(%)로 나타낸 왼쪽 부분이 분열된 세포이다. 분석결과 *B. bronchiseptica*에 의해 비장세포의 증식능력이 증가하는 사실을 확인하였다. *B. bronchiseptica* 처리군 사이에서는 비율 증가가 작지만 대조군과 비교할 때 *B. bronchiseptica* 1.25 μg/mL 처리군이 분열세포의 비율이 현저히 증가하는 것으로 보아 *B. bronchiseptica* 1.25 μg/mL 처리군이 비장세포의 증식에 충분한 농도로 판단된다.

*B. bronchiseptica*에 의한 B 림프구의 증가

*B. bronchiseptica*를 처리한 비장세포에서 림프구 표면 마커인 CD4, CD8, CD19의 발현 정도를 측정하기 위해 형광염색을 한 후 유세포분석을 시행하였다(Fig. 2). *B. bronchiseptica*를 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군으로 나누어 배양한 비장세포에 1차 항체와 2차 항체로 염색한 후 FACSCalibur을 이용하여 CD4, CD8, CD19의 발현 정도를 측정하였다. 도움 T 세포의 표면 마커인 CD4의 경우에는 고도 발현한 세포의 비율이 감소하였으며 B 세포의 표면 마

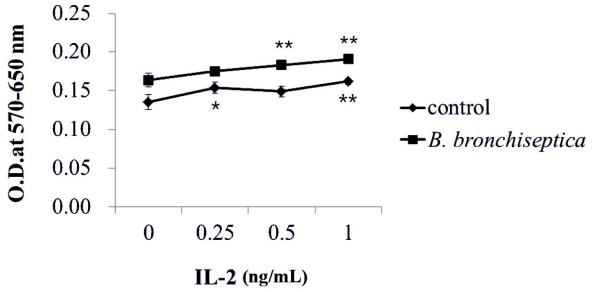

Fig. 3. *B. bronchiseptica*-treated spleen cells respond to interleukin (IL)-2. Spleen cells were cultured and treated with phosphate buffered saline (PBS) or *B. bronchiseptica*. The cultured cells were incubated in the presence of IL-2 at a range of (0~1 ng/mL). The proliferation rate of responding cells was measured by MTT assay. Data are the mean ± SD from four individual wells.

커인 CD19의 경우에는 고도 발현한 세포의 비율이 증가하였다. 따라서 *B. bronchiseptica*가 비장세포 중에서 B 림프구를 증가시키는 사실을 확인했다. 이 결과는 상대적인 세포 비율의 변화지만, *B. bronchiseptica* 처리로 전체 세포 수가 현저히 증가하는 것을 고려할 때 CD4와 CD8 T 림프구도 절대적으로는 감소하지 않았을 것으로 추정된다. *B. bronchiseptica*는 B 림프구를 선택적으로 증식시켜 항체생산을 촉진하며, 이를 통해 항원 자체적으로 백신 자극능력이 있음을 보여주고 있다.

*B. bronchiseptica*로 처리된 비장세포의 IL-2에 대한 반응성

*B. bronchiseptica*를 처리한 비장세포가 IL-2에 대해 반응하는지 clonal expansion assay를 실시하였다. 세포증식 여부는 MTT assay로 확인하였다(Fig. 3). *B. bronchiseptica*를 처리한 비장세포는 처리하지 않은 비장세포보다 모든 IL-2 농도에서 높은 증식능력을 보였다. 또한 *B. bronchiseptica*를 처리한 군은 0.25~1 ng/mL의 범위에서 IL-2에 대해 농도 의존적으로 유의하게 증가했지만, *B. bronchiseptica*를 처리하지 않은 대조군은 0.25와 1 ng/mL의 농도에서만 유의하게 높았고 전반적으로 농도 의존적인 증가는 보이지 않았다.

*B. bronchiseptica*에 의한 비장세포의 세포면역 관련 cytokine의 생산 변화

*B. bronchiseptica*의 농도에 의한 비장세포의 IL-12 생성변화를 측정하기 위해 ELISA를 실시하였다(Fig. 4A). 그 결과 대조군보다 *B. bronchiseptica*를 처리한 군이 모든 농도에서 유의하게 IL-12의 생산을 증가시켰다. 그러나 IL-12의 생산이 *B. bronchiseptica*의 농도에 의존적이지는 않았다. 이러한 사실은 *B. bronchiseptica* 1.25 μg/mL의 농도 처리로도 비장세포의 IL-12 생산이 충분한 것으로 추정된다. 또한 *B. bronchiseptica*의 농도에 의한 비장세포의 NO 생성변화를 측정하기 위해 Griess reagent를 이용한 분석을 실시하였다

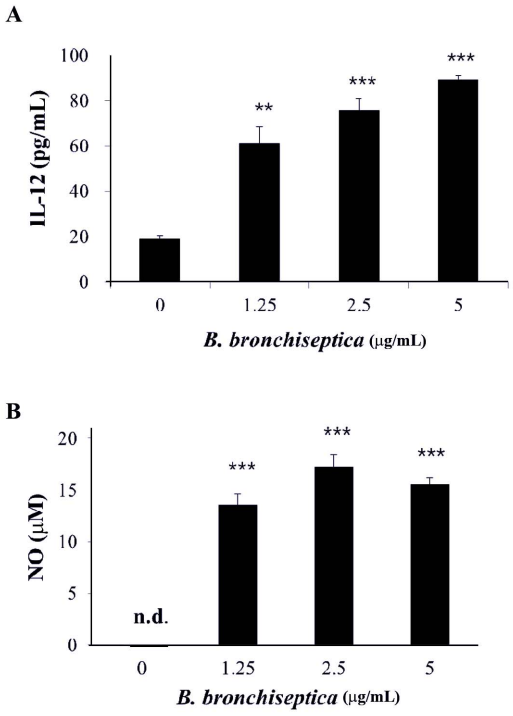

Fig. 4. *B. bronchiseptica* significantly enhances the production of IL-12 and nitric oxide (NO). Spleen cells were cultured in 96-well culture plates. Following *B. bronchiseptica* treatment, the culture supernatants were harvested and the amounts of IL-12 (A) and NO (B) were determined. All values are represented as the mean ± SD.

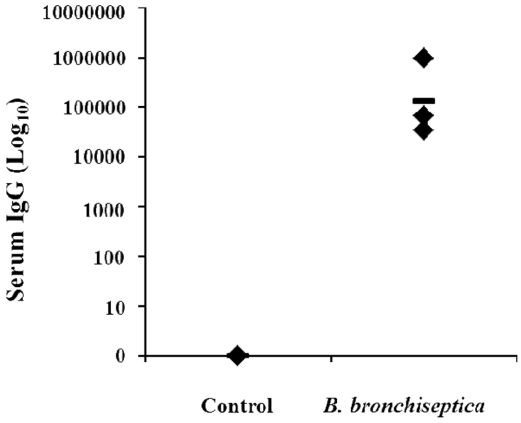

Fig. 5. Production of *B. bronchiseptica*-specific IgG antibody in mice after the immunization with *B. bronchiseptica* antigen. Groups of three mice were injected intraperitoneally with PBS alone, *B. bronchiseptica* (10 μg/mouse). The serum was harvested 2 weeks after immunization and *B. bronchiseptica*-specific IgG antibodies in serum from each group were detected by ELISA. The antibody titer was determined with O.D. cutoff 0.1.

(Fig. 4B). 그 결과 대조군보다 *B. bronchiseptica*가 처리된 모든 농도에서 유의하게 NO의 생산을 증가시켰다. 그러나 NO의 생산이 *B. bronchiseptica*의 농도에 의존적이지는 않았

다. 이러한 사실은 *B. bronchiseptica* 1.25 μg/mL 농도 처리로도 비장세포의 NO 생산이 충분히 활성화한 것으로 추정된다.

B. bronchiseptica 항원을 접종한 마우스에서 특이항체 생산

*B. bronchiseptica*항원을 접종한 처치군에서는 항원 특이적인 IgG를 현저히 생산하였다(Fig. 5). 사전연구에서 *B. bronchiseptica* 항원의 최적농도를 설정하였으며 항원을 1회만 접종하였을 때도 항원 특이적인 IgG가 생산된다는 사실을 확인하였다(결과 미제시). *In vitro* 실험에 이어, 마우스를 이용한 *in vivo* 실험에서도 *B. bronchiseptica* 항원의 면역자극 효과를 확인하였다.

고 찰

본 연구에서 *B. bronchiseptica*의 항원으로서 면역원성을 알아보기 위해 대표적인 면역세포인 비장세포에 *B. bronchiseptica*를 처리한 후 증식능력, 세포표면 마커의 발현, cytokine과 NO의 생산량 변화를 측정하였다. CFSE cytostaining assay를 실시한 결과 *B. bronchiseptica*는 비장세포를 현저히 증식시켰다. 또한 림프구 표면 마커인 CD19을 고도로 발현한 세포의 비율이 증가되어 *B. bronchiseptica*는 비장세포 중에서 특히 B 림프구를 증가시키는 사실을 확인할 수 있었다. 활성화된 비장세포는 clonal expansion 과정을 거친 후 effector cell과 memory cell로 분화한다 [2]. 따라서 본 연구에서는 *B. bronchiseptica*를 처리한 비장세포가 IL-2에 대한 반응성을 확인하여 clonal expansion이 가능한지를 확인하고자 하였다. MTT assay를 실시한 결과, *B. bronchiseptica*를 처리한 활성화된 비장세포는 IL-2에 대해 농도 의존적으로 증식하였다.

또한 활성화된 비장세포가 세포성면역을 일으킬 수 있는지 여부를 확인하기 위해, 대표적인 cytokine인 IL-12와 NO의 생산량을 확인하였다. 병원체에 의해 활성화된 대식세포 등을 비롯한 항원제시세포 등은 IL-12를 분비한다. IL-12는 natural killer(NK) 세포와 보조 T 세포에서 IFN-γ의 분비를 자극하며 대식세포의 식균작용을 활성화시키고, NK 세포와 세포독성 T 세포의 살세포작용을 증가시킨다 [11, 12].

또한 대식세포와 호중구는 탐식한 미생물을 죽이기 위해 NO를 생산한다 [8]. *B. bronchiseptica*로 처리된 비장세포는 대조군보다 IL-12와 NO의 생산을 유의하게 증가시켰다. 이러한 결과를 통해 *B. bronchiseptica*가 세포성면역을 일으킬 수 있는 면역원으로 기능할 수 있다는 것이 증명되었다. 최종적으로 *B. bronchiseptica* 항원을 마우스에 접종한 후 IgG 역가 측정을 하여 생체 내에서 면역자극 능력을 확인하였다.

현재 사용되고 있는 *B. bronchiseptica*가 포함된 상용화 백신들은 항원 이외에도 adjuvant를 포함하고 있다. 백신의 adjuvant는 costimulatory molecule의 발현증가와 IL-12와 같은 필수 cytokine의 생성을 통해 효과적인 면역반응을 유도하지만 [10], 과도한 면역반응에 의한 부작용 가능성은 남아있다. 그러나 이번 연구에서 확인한 *B. bronchiseptica*의 면역세포에 대한 증식 유도능력과 cytokine 생산능력을 고려하면 adjuvnant 없이, 항원 단독으로만 백신을 제작해도 효능을 나타낼 수 있을 것으로 기대된다. 향후 *B. bronchiseptica*를 처리한 비장세포의 항원 특이적인 면역반응과 실제 host에서 어떤 형태로 면역반응이 일어나는지에 대해 추가 연구가 필요하다. 또한 *B. bronchiseptica* 항원만으로도 효과적인 백신이 가능한지에 대한 효능 및 독성평가 실험이 요구된다.

감사의 글

이 논문은 2014학년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 연구되었습니다.

References

1. **Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G.** Mechanisms of action of adjuvants. Front Immunol 2013, **4**, 114.
2. **Bosca L, Stauber C, Hortelano S, Baixeras E, Martinez C.** Characterization of signals leading to clonal expansion or to cell death during lymphocyte B cell activation. Curr Top Microbiol Immunol 1995, **200**, 39-50.
3. **Brockmeier SL.** Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine. Vet Microbiol 2004, **99**, 75-78.
4. **Chanter N, Magyar T, Rutter JM.** Interactions between *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs. Res Vet Sci 1989, **47**, 48-53.
5. **Horiguchi Y.** Swine atrophic rhinitis caused by *Pasteurella multocida* toxin and *Bordetella* dermonecrotic toxin. Curr Top Microbiol Immunol 2012, **361**, 113-129.
6. **Jo Y, Joo HG.** Immunostimulatory effects of *Bordetella bronchiseptica* antigen on mouse spleen cells. J Prev Vet Med 2013, **37**, 35-38.
7. **Kang ML, Kang SG, Jiang HL, Guo DD, Lee DY, Rayamahji N, Seo YS, Cho CS, Yoo HS.** Chitosan microspheres containing *Bordetella bronchiseptica* antigens as novel vaccine against atrophic rhinitis in pigs. J Microbiol Biotechnol 2008, **18**, 1179-1185.
8. **MacMicking J, Xie QW, Nathan C.** Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol 1997, **15**, 323-350.
9. **Moore EJ, Kern EB.** Atrophic rhinitis: a review of 242 cases. Am J Rhinol 2001, **15**, 355-361.
10. **Reed SG, Orr MT, Fox CB.** Key roles of adjuvants in modern vaccines. Nat Med 2013, **19**, 1597-1608.
11. **Scott P.** IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. Science 1993, **260**, 496-497.
12. **Trinchieri G.** Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Annu Rev Immunol 1995, **13**, 251-276.