

< Original Article >

마우스에서 살모넬라 감염증 예방을 위한 신개념
Salmonella Typhimurium 불활화 사균체에 최적
adjuvant 선택을 위한 효능 비교 시험

문자영¹ · Enkhsaikhan Ochirkhuyag¹ · 김원경¹ · 이준우¹ · 조영규¹ · 광길한² · 박병용¹ · 허 진^{1*}
전북대학교 수의과대학¹, 전라북도가축위생시험소²

Comparative evaluation to select optimal adjuvant of novel type
Salmonella Typhimurium inactivated bacteria for protecting
Salmonella infections in a murine model

Ja-Young Moon¹, Enkhsaikhan Ochirkhuyag¹, Won-Kyong Kim¹, Jun-Woo Lee¹,
Young-Gyu Jo¹, Kil Han Kwak², Byung Yong Park¹, Jin Hur^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, Iksan 54596, Korea
²Animal Health Institute of Jeollabukdo, Jeongeup 56134, Korea

(Received 15 June 2020; revised 23 June 2020; accepted 23 June 2020)

Abstract

This study was carried out to examine a novel inactivated *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) vaccine candidate for protection of mice against salmonellosis by immunization of BALB/c mice using various type adjuvant. The novel type-inactivated vaccine candidate was constructed by adding Chlorhexidine digluconate solution. BALB/c mice were divided into 6 groups of 15 mice apiece. The mice were intramuscularly (IM) primed at 6 weeks of age and were IM boosted 8 weeks of age. Groups A and B mice were injected with sterile phosphate-buffered saline as controls; group C mice were inoculated with 5×10^8 cells/100 μ L of formalin-inactivated *S. Typhimurium* cells and adjuvant ISA70; groups D~F mice were immunized with 5×10^8 cells/100 μ L of the inactivated vaccine candidate and adjuvant ISA70, adjuvant IMS1313 and adjuvant IMS1313 containing 30 μ g/mL of GI24, respectively. All mice (except group A mice) were orally challenged with a virulent *S. Typhimurium* strain at 10 weeks of age. Mice from groups C-F had significantly increased IgG levels compared to control groups (A-B) mice. The levels of splenocyte IFN- γ and IL-4 in mice of all groups were measured by ELISA, resulting in increased immunity in group F mice compared to those of groups A-E mice. These data suggested that systemic and cell-mediated immune responses were highly induced by IM immunization with the vaccine candidate and adjuvant IMS1313 containing GI24. Furthermore, clinical signs such as death were observed in only 20% of group F mice after virulent *Salmonella* strain challenge, however, groups B and C (100%), and groups D and E (60%) mice died. This data suggested that mice immunized by intramuscular prime and booster with this vaccine candidate and adjuvant IMS1313 containing GI24 effectively protected mice from salmonellosis.

Key words : *Salmonella* Typhimurium, Adjuvant, Ghost vaccine, GI24, Vaccine

*Corresponding author: Jin Hur, E-mail. hurjin@jbnu.ac.kr
ORCID <https://orcid.org/0000-0003-2658-0747>
These first two authors contributed equally to this work.

서론

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*)은 세포 내에 기생하는 병원성 그람 음성 세균이며 식품 매개 질병의 가장 흔한 원인체 중 하나로 사람에게서 식중독을 일으키는 주요 원인균이다(Norimitsu 등, 2004; Fàbrega와 Vila, 2013). 이 질병은 건강한 성인의 경우 2, 3일안에 회복되지만 어린이, 노인 및 면역력이 저하된 환자들은 급성 살모넬라증으로 사망의 주요 원인이 될 수 있다(Fàbrega와 Vila, 2013). 또한 돼지 및 닭 등 가축에서의 살모넬라증은 어린 새끼 때 주로 발생하며 패혈증과 설사, 발열, 황달 등 전신증상을 일으키며 사료 효율의 저하와 높은 폐사율 등 사육 농가에 심각한 경제적 피해를 입히고 있는 것으로 알려져 있다(Schwartz 등, 1999; Kim 등, 2014). 또한 회복 후에도 보균 가축으로 장기간 균을 배출하여 주변 가축 및 환경을 오염시키는 것으로 보고 되고 있다(Schwartz 등, 1999). 다양한 동물에서 위장염 및 장티푸스를 포함한 여러 질병을 유발하는 살모넬라증은 약독화 생균 및 불활화 사균체를 이용하여 예방하고자 하는 시도가 이루어지고 있다 (Berndt와 Methner, 2001; Hur 등, 2011; Hur와 Lee, 2011; 문 등 2019). 불활화 사균 백신은 물리적으로 열을 가하거나 화학약품(포르말린 및 아세트 등)으로 처리하여 불활화를 유도할 수 있으며, 유도된 불활화 사균체 백신은 안전성은 높으나 종종 항원 발현이 제한적이어서 면역보강제(adjuvant)를 함께 사용해야 한다(Desin 등, 2013). 반면 약독화 백신은 살아있는 병원성 세균을 장기간 계대 배양하여 독성을 없애거나 아주 약한 독성만 남아 있게 만든 백신으로 생산비용이 적게 들고 1회접종만으로도 충분한 면역이 형성되며 면역지속기간이 길지만 남아있는 독성으로 인한 독성 균주로의 복귀 가능성이 내재하고 있어 안전상의 문제로 인해 약독화 생백신은 사용에 신중을 기해야 하는 불편함이 있다(Barbezange 등, 2000).

지난 몇 년간 박테리아 세포에 구멍을 내어 불활화시키는 기술은 광범위한 그람 음성 균주에 대한 효과적인 새로운 형태의 불활화 사균 백신 후보 제조 기술로 사용되고 있다 (Kim 등, 2018; 허 등, 2019). 항균 펩타이드(Antimicrobial peptides; AMP)는 선천성 면역과 세포의 구조를 변화시키지 않고 구멍을 만들어 lysed를 유도하고 있으며(Gazit 등, 1995; Yang 등, 2001; Henzler-Wildman 등, 2004), lysed된 박테리아 세포는 세포질 성분이 없는 온전한 세포막 구조를 가지고 있

어(Hensel 등, 2000; Langemann 등, 2010; Liu 등, 2015; Kwon 등, 2016; Won 등, 2016; Hajam 등, 2017) 새로운 형태의 불활화 사균 백신 제조에 효과적인 후보 물질로 여겨지고 있다. 또한 일부 AMP는 면역보조제로서의 기능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(King 등, 2003; Diamond 등, 2009). 하지만 AMP는 고가로 산업동물용 백신 제조에는 한계가 있다. 최근 클로르헥시딘은 AMP와 유사하게 그람 음성 세균에 작용을 하는 것으로 보고 되고 있다(Cheung 등, 2012). 따라서 이번 연구에서는 클로르헥시딘을 이용하여 *S. Typhimurium*을 새로운 형태의 불활화 사균체로 제조하고 AMP의 일종인 GI24를 포함한 다양한 adjuvant와 혼합하여 새로운 형태의 불활화 사균 백신에 최적의 백신 효능을 알아보기 위해 마우스를 대상으로 하여 클로르헥시딘-*S. Typhimurium* 불활화 사균 백신에 adjuvant ISA70, IMS1313으로 각각 혼합 제조, 불활화 사균 백신에 adjuvant 1313과 함께 GI24를 혼합 제조, *S. Typhimurium* 포르말린 불활화 백신에 adjuvant ISA70으로 혼합 제조하여 마우스에 예방접종 한 뒤 병원성 *S. Typhimurium*으로 도전 감염하여 방어여부로 효능을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

실험에 사용된 균주 및 프라이머

국내 닭에서 분리한 *S. Typhimurium* HJL 812를 백신 제조 균주 및 도전감염 균주 및 백신 접종 후 항체 역가 측정(ELISA)을 위한 *S. Typhimurium* out membrane proteins (OMPs) 추출을 위해서도 사용하였다. GI24 (GRFRRLRKKTRKRLKKGKVLKWI-NH 2)는 Pepton (대전, 한국)에서 합성되었다. 백신 균주 및 도전감염 후 분리된 균주 확인을 위해 Table 1에서 제시된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 *S. Typhimurium*을 확인하였다.

포르말린- *S. Typhimurium* 불활화 사균체 제조

S. Typhimurium 분리균주 HJL 812 한 콜로니를 선택하여 200 mL의 LB 액체 배지에 접종한 후 37°C에서 150 rpm으로 교반하면서 흡광도가 0.9에 도달할 때까지 배양하였다. 배양된 배양액에 포르말린을 0.3%가 되도록 첨가하여 37°C에서 48시간 반응시켰다. 반

Table 1. Nucleotide sequence of oligonucleotide primers used in this study

Primer	Primer sequence	size (bp)	Reference number
OMPCF	5'-ATC GCT GAC TTA TGC AAT CG-3'	208	Hur와 Lee, 2011
OMPCR	5'-CGG GTT GCG TTA TAG GTC TG-3'		
TYPHF	5'-TTGTTCACTTTTTACCCCTGAA-3'	401	Hur와 Lee, 2011
TYPHR	5'-CCCTGACAGCCGTTAGATATT-3'		

응 후 사균 여부를 확인하기 위해 5% fetal bovine serum 이 첨가된 BGA Agar 배지 및 Broth에 반응액 100 µL 씩 각각 접종하여 37°C에서 5일간 배양하여 사균 여부를 확인하였다. 확인된 포르말린- *S. Typhimurium* 불활화 사균체는 4000 xg에서 30분간 원심하여 농축하였고, 멸균 PBS로 세번 세척한 후 adjuvant ISA70과 혼합하여 최종 5×10⁸ cells/0.1 mL가 되도록 제조(이하 포르말린-불활화 사균체-ISA라 칭함)하여 실험에 사용하였다.

Chlorhexidine- *S. Typhimurium* 불활화 사균체 제조

HJL 812 한 콜로니를 선택하여 200 mL의 LB 액체 배지에 접종한 후 37°C에서 150 rpm으로 교반하면서 흡광도가 0.9에 도달할 때까지 배양하였다. 배양된 배양액에 chlorhexidine digluconate solution이 3%가 되도록 첨가하여 37°C에서 2시간 반응 시켰다. 반응 후 사균 여부를 확인하기 위해 5% fetal bovine serum이 첨가된 BGA Agar 배지 및 Broth에 반응액 100 µL씩 각각 접종하여 37°C에서 5일간 배양하여 사균 여부를 확인했다. Chlorhexidine-*S. Typhimurium* 불활화 사균체는 4000 xg에서 30분간 원심하여 농축하였고, 멸균 0.3M D-glucose로 세번 세척한 후 adjuvant ISA70 (이하 chlorhexidine-불활화 사균체-ISA라 칭함), IMS1313 (이하 chlorhexidine-불활화 사균체-IMS라 칭함)와 각각 혼합하여 최종 5×10⁸ cells/0.1 mL가 되도록 제조하여 실험에 사용하였다. 더불어 chlorhexidine-불활화 사균체에 30 µg/mL의 GI24가 첨가된 IMS1313와 혼합하여 최종 5×10⁸ cells/0.1 mL가 되도록 제조(이하 chlorhexidine-불활화 사균체-IMS-GI24라 칭함)하여 실험에 사용하였다.

Transmission Electron Microscope (TEM)

Chlorhexidine digluconate solution으로 반응 후 새로운 형태의 *S. Typhimurium*의 불활화 사균체 백신의 세포 내 변화 및 세포벽 형태 변화 등의 관찰을 위한

TEM의 샘플은 chlorhexidine- *S. Typhimurium* 불활화 사균체 제조 방식과 동일한 방법으로 준비하였으며, TEM은(Lv 등, 2014)의 방법에 따라 수행하였다.

백신접종과 가검물 채취

5주령의 암컷 BALB/c 90마리를 구입하여 각각 15 마리씩 6그룹으로 나누어 실험에 사용하였다. 모든 마우스는 6주령에 근육으로 1차(0 WPPI), 8주령에 근육으로 2차(2WPPI) 접종하였다. 그룹 A, B의 마우스는 음성, 양성 대조군으로 각각 멸균 생리식염수로 접종하였다. 그룹 C의 마우스는 5×10⁸ cells/0.1 mL의 포르말린-불활화 사균체-ISA로 접종하였고, 그룹 D의 마우스는 5×10⁸ cells/0.1 mL의 chlorhexidine-불활화 사균체-ISA로 접종하였다. 그룹 E의 마우스는 5×10⁸ cells/0.1 mL의 chlorhexidine-불활화 사균체-IMS로 접종하였다. 또한 그룹 F의 마우스는 5×10⁸ cells/0.1 mL의 chlorhexidine-불활화 사균체-IMS-GI24로 접종하였다. 본 실험에서 보고된 동물실험은 Korean Council on Animal Care의 인가를 받은 전북대학교 동물윤리 위원회의 승인(CBNU2016-35)을 받아 진행하였다.

면역반응 평가를 위한 ELISA

혈청에서 *S. Typhimurium* OMPs 특이 항체 역가를 조사하기 위해 마우스 IgG (Bethyl Lab Inc. Montgomery, TX, USA) ELISA quantitative kit를 이용하여 제조사의 설명에 따라 측정하였다. 혈청 역가를 측정하기 위해 혈청은 1:100으로 희석하여 사용하였다.

사이토카인 측정

2차 백신 접종 후 7일 뒤 각 그룹에서 5마리 마우스를 무균적인 방법으로 비장을 채취하여 RPMI1640에 모아 0.8% ammonium chloride (w/v) 용액을 이용하여 적혈구를 용해하고, 1,800 rpm, 4°C, 10분 조건으로 원심한 후 침전물을 멸균 PBS로 세척을 3번 반복한 다

음 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 10% FCS가 각각 첨가된 RPMI 1460 용액으로 부유 후, 배양 cell 수를 계산하여 *S. Typhimurium* OMPs항원으로 72시간 반응 시켰다. 그리고 반응액을 1,800 rpm, 4°C, 10분 조건으로 원심 분리 한 후 상등액은 ELISA Ready-SET-GO! (eBioscience INC, San Diego, CA, USA)를 이용하여 IFN-γ, IL-4 농도를 측정하였다.

도전감염 및 생존율

도전감염을 위해 야외 독성 균주인 HJL812를 Hur 등(2011) 이 기술한 방법에 따라 준비하였다. 그룹 A를 제외한 모든 마우스는 2차 백신접종 후 2주뒤에 5×10^8 colony-forming unit (CFU)/0.1 mL로 경구로 도전감염 하였다. 그 후 14일 동안 매일 하루에 두 번 폐사 여부를 관찰하였다. 도전감염 후 14일 내에 폐사할 경우, 폐사 직 후 무균적으로 부검하여 비장 및 간 등으로부터 Hur와 Lee (2011)가 기술한 방법에 따라 살모넬라 균주를 분리하였으며 분리된 균주는 Table 1에서 기술한 프라이머를 이용하여 도전감염균주가 맞는지 확인하였다. 이렇게 균이 분리된 경우에만 도전감염에 의한 폐사로 인정하였다.

통계분석

항체 역가와 사이토카인 농도는 SPSS version 16.0

software (SPSS, Chicago, IL)를 이용하여 Kruskal-Wallis test와 one-way analysis of variance로 각각 분석되었다. *P*의 값이 0.05이하일 때 통계학적으로 유의성이 있다고 평가하였다.

결 과

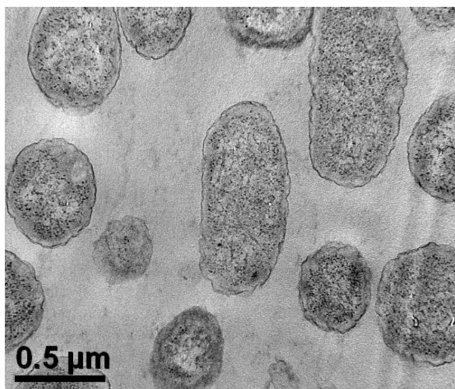
TEM

신개념 불활화 사균체인 고스트 백신 여부를 TEM으로 확인하여 본 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 chlorhexidine digluconate solution 미처리 *S. Typhimurium* 균주는 세포질 내용물이 가득 차 있으며, 온전한 세포벽을 이루고 있음이 관찰되었다(Fig. 1A). 하지만, Chlorhexidine digluconate solution으로 반응시킨 *S. Typhimurium* 균주는 세포질 내용물이 비어 있으며, 세포벽에 구멍이 나 있지만 세포 형태를 유지하고 있는 형태가 관찰되었다(Fig. 1B).

면역반응 결과

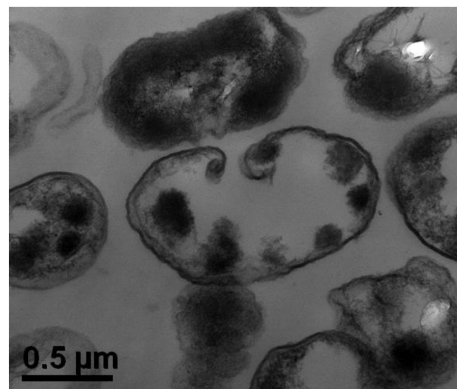
S. Typhimurium OMPs에 대한 항체 역가는 Fig. 2에서 보는 바와 같이, 백신 접종 전 그룹 A~F의 항체 역가는 각각 0.02962 ± 0.011893 , 0.03603 ± 0.014979 , 0.02767 ± 0.008494 , 0.03804 ± 0.027938 , 0.018311 ± 0.0089 , 그리고

A



Specimen :
Operator : Lee Jeong Ok
Voltage : 100 kV
Microscope Name : H7650
Device Name : Sptera 1
Total Magnification : X74300
Indicated Magnification : X60000
Image Name : 3e60000
Resolution : 1573 x 1334 pixels
Acquisition Date : 2019/2019
Acquisition Time : 3:23:55 PM
Collection Number :
Exposure Time : 1.2 s

B



Specimen :
Operator : CHOI EUN JIN
Voltage : 100 kV
Microscope Name : H7650
Device Name : Sptera 1
Total Magnification : X74300
Indicated Magnification : X60000
Image Name : 1z60000
Resolution : 1573 x 1334 pixels
Acquisition Date : 7/10/2018
Acquisition Time : 2:15:14 PM
Collection Number :
Exposure Time : 1.2 s
Image Notes :

Fig. 1. Transmission electron microscope of *Salmonella* Typhimurium treated with Chlorhexidine digluconate solution. (A) The untreated *S. Typhimurium* cells. (B) The bacterial cells treated by Chlorhexidine digluconate solution. The bacterial cells were incubated with 3% of Chlorhexidine digluconate solution for 2 h at 37°C.

F; 0.02781 ± 0.02411 이었다. 백신 접종 2주 후에는 그룹 A와 B는 각각 0.02112 ± 0.002283 , 0.02734 ± 0.011596 으로 관찰된 반면 그룹 C~F는 각각 0.07853 ± 0.083564 , 0.1581 ± 0.043101 , 0.18552 ± 0.062223 , 0.26601 ± 0.131366 이었다. 그리고 접종 4주 후에는 그룹 A와 B는 여전

히 0.01862 ± 0.005213 , 0.02358 ± 0.007555 으로 관찰된 반면, 그룹 C~F는 각각 0.24977 ± 0.162676 , 0.74792 ± 0.095586 , 1.01571 ± 0.141501 , 1.0893 ± 0.130528 로 증가하였다(Fig. 2).

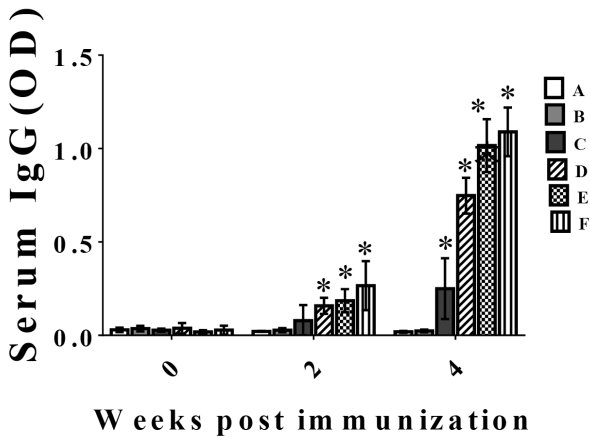


Fig. 2. Serum IgG titers against OMPs of *Salmonella* Typhimurium in mice immunized with inactivated *S. Typhimurium* vaccine candidate. Groups A and B mice were injected with sterile phosphate-buffered saline as controls; group C mice were inoculated with 5×10^8 cells/100 μ L of formalin-inactivated *S. Typhimurium* cells and adjuvant ISA70; groups D~F mice were immunized with 5×10^8 cells/100 μ L of the inactivated vaccine candidate and adjuvant ISA70, adjuvant IMS1313 and adjuvant IMS1313 containing 30 μ g/mL of GI24, respectively. Data shown are the means of all mice in each group and errorbars show the standard deviations (SD). Asterisks indicate a significant difference between the values of the groups immunized with the vaccine candidate ($*P \leq 0.05$) and those of the control group.

사이토카인 분석

백신 접종된 마우스 비장을 무균적으로 채취하여 얻은 splenocytes를 *S. Typhimurium* OMPs로 자극 후 측정된 각 그룹의 IFN- γ 와 IL-4 농도는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 즉, A~F 그룹의 IFN- γ 농도는 각각 10.23 ± 4.67 , 10.35 ± 4.15 , 16.31 ± 6.6 , 24.23 ± 4.02 , 34.57 ± 12.12 , 그리고 43.8 ± 16.41 이었다. 그리고 IL-4 농도는 각각 9.92 ± 4.53 , 10.04 ± 4.06 , 15.33 ± 5.7 , 30.77 ± 5.11 , 40.29 ± 7.24 , 그리고 46.7 ± 7.99 이었다(Fig. 3).

도전감염에 대한 방어효과

모든 마우스는 백신 2차 접종 후 2주째에 그룹 A를 제외한 모든 그룹의 마우스에 병원성 *S. Typhimurium* 으로 경구로 도전감염 하였다. 그 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이, 도전감염을 하지 않은 그룹 A는 100% 생존하였고, 그룹 F는 80%, 그룹 D와 E에서는 각각 40%만이 생존한 반면, 그룹 C와 대조군인 그룹 B 마우스는 모두 폐사하였다.

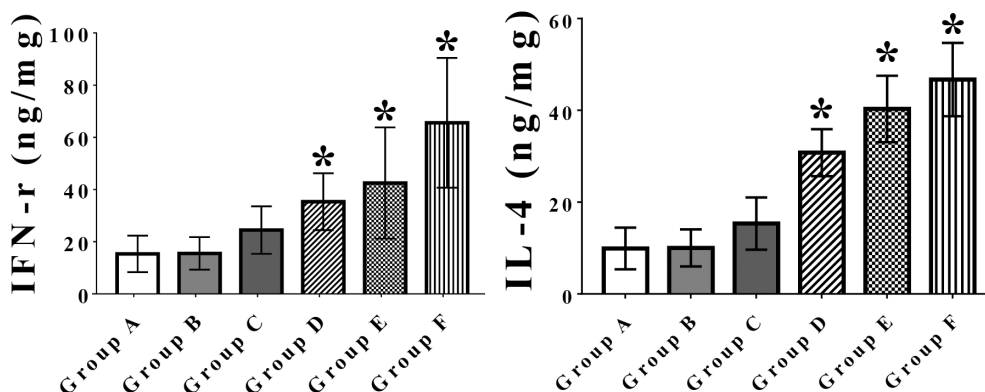


Fig. 3. IFN- γ (ng/mL) and IL-4 (ng/mL) concentrations in the supernatants of splenocytes stimulated with OMPs of *Salmonella* Typhimurium at 10 days post booster immunization. Groups A and B mice were injected with sterile phosphate-buffered saline as controls; group C mice were inoculated with 5×10^8 cells/100 μ L of formalin-inactivated *S. Typhimurium* cells and adjuvant ISA70; groups D~F mice were immunized with 5×10^8 cells/100 μ L of the inactivated vaccine candidate and adjuvant ISA70, adjuvant IMS1313 and adjuvant IMS1313 containing 30 μ g/mL of GI24, respectively. Data are the mean of all mice in each group; error bars show SD. Asterisks indicate a significant difference between the values of groups C~F mice, and those of the control group mice.

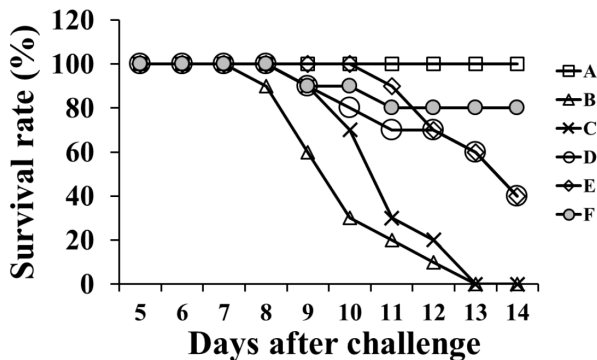


Fig. 4. Survival rates of mice challenged with virulent *S. Typhimurium* in mice (except mice in group A only) immunized with the vaccine candidates. Groups A and B mice were injected with sterile phosphate-buffered saline as controls; group C mice were inoculated with 5×10^8 cells/100 μ L of formalin-inactivated *S. Typhimurium* cells and adjuvant ISA70; groups D~F mice were immunized with 5×10^8 cells/100 μ L of the inactivated vaccine candidate and adjuvant ISA70, adjuvant IMS1313 and adjuvant IMS1313 containing 30 μ g/mL of GI24, respectively.

고찰

*S. Typhimurium*은 세포 내 기생세균으로, 병원성 살모넬라증으로부터 방어를 하기 위해서는 세포 매개성 면역 반응이 중요하며, 효과적인 방어를 위해서는 체액성 면역 반응이 또한 필요하다(Roesler 등, 2006; Brumme 등, 2007). 즉, 마크로파지는 살모넬라 감염증을 제어하는데 중요한 역할을 수행한다. 하지만 마크로파지 단독으로 직접 살모넬라균을 섭취하기 보다는 혈청 IgG 등을 포함한 항체 등에 의한 살모넬라균 opsonization 후 식작용이 증대된다(Mastroeni 등, 2001; Roesler 등, 2006; Abd 등, 2007; Brumme 등, 2007).

국내 농장에서 많이 사용하는 백신의 adjuvant는 ISA70으로 Water in Oil (W/O) 정제된 mannitol/oleic acid 유화제를 합한 미네랄 오일기반 용액으로 가금류, 소 및 반추동물의 병원체에 대한 면역반응을 높이고 안전성 또한 효과적인 것으로 밝혀져 많이 사용되고 있다(Dupuis 등, 2006). 그러나 W/O adjuvant를 사용할 경우 백신 제형이 오일이기 때문에 점막 면역이 중요한 백신에서는 효과적이지 않다, 그러나 IMS1313은 Oil in Water (O/W)로 면역 자극 성분을 함유하고 상용성인 수성상 액체 나노 입자 분산액으로 점막 전달에 용이 하고 대량 백신 접종을 위해 사용될 수도 있다(Jang 등, 2011; Ismail 등, 2018).

따라서 금번 연구에서 chlorhexidine- *S. Typhimurium* 불활화 사균체의 백신으로서의 가능성을 평가하기 위

해, chlorhexidine- *S. Typhimurium* 불활화 사균체를 다양한 adjuvant와 혼합하여 90마리의 암컷 BALB/c 마우스를 대상으로 접종하여 안전성과 방어효과를 평가하였다. 우선 다양한 adjuvant와 혼합 접종 후 침울, 식욕부진, 운동소실, 발열, 폐사 등과 같은 임상 증상이 관찰되지 않아 마우스에서의 다양한 adjuvant와 혼합된 chlorhexidine- *S. Typhimurium* 불활화 사균체의 안전성이 확인되었다. 이 결과는 다양한 adjuvant로 혼합된 chlorhexidine- *S. Typhimurium* 불활화 사균체가 마우스에서 근육접종에 따른 안전한 백신 후보물질로서 사용할 수 있음을 보여주는 결과이다.

높은 혈청 IgG 항체 역가는 수주동물이 세포 내 기생세균에 의한 전신 감염을 방어하는데 있어 매우 필요하다(Mastroeni 등, 2001; Alvarez 등, 2007; Kim 등, 2019). 이들 혈청 IgG는 opsonization을 통해 숙주의 식세포의 phagocytosis 효능을 자극함으로써 혈액으로부터 감염성 세균을 제거하는데 일조할 수 있다(Mittrücker 등, 2000; Mastroeni 등, 2001; Kim 등, 2019). 따라서 금번 연구에서 다양한 adjuvant와 혼합된 chlorhexidine-불활화 사균체가 마우스에 근육접종된 후 얻은 혈청을 대상으로 *S. Typhimurium* OMPS에 대한 특이 혈청 IgG 항체 역가와 같은 면역 역가가 측정되었다. *S. Typhimurium* OMPs에 대한 항체 역가는 백신 접종 후 대조군 그룹 A, B의 항체 역가는 접종전과 비슷한데 반해 그룹 C~F는 2WPPI 째에 점차적으로 증가되어 그룹 D~F는 대조군에 비해 유의성 있는 증가가 관찰되었다. 4WPPI에는 그룹 A, B에 비해 그룹 C-F 모두 유의성 있는 항체 역가 증가가 관찰되었다($P < 0.05$). 그리고 Group C~E와 비교해도 Group F가 보다 높게 유도됨을 확인되었으며, 통계학적으로도 그룹 F 마우스는 그룹 C~D에 비해 유의성 있는 항체 역가 증가가 관찰되었다($P < 0.05$). 이상의 결과를 바탕으로, chlorhexidine-불활화 사균체는 adjuvant의 종류에 따라 항체를 유도하는데 차이가 있으며 마우스에서 chlorhexidine-불활화 사균체는 W/O 계인 adjuvant ISA70보다는 O/W계인 adjuvant IMS1313이 보다 효과적으로 항체를 유도할 수 있음을 보여 주었다. 특히 IMS1313에 GI24를 첨부함으로써 보다 높은 항체를 유도할 수 있음을 확인할 수 있었다.

체액성 면역반응 뿐만 아니라 IFN- γ 와 같은 세포 매개 면역반응 또한 살모넬라와 같은 세포 내 기생세균을 제거하기 위해서는 반드시 필요하다(Norimatsu 등 2004; Feng 등, 2005; Roesler 등 2006; Brumme 등 2007; Pascual 등, 2009; Hur 등, 2011). IFN- γ 는 마크로

파지가 섭취한 살모넬라균주 제거를 증진시킨다(Brumme 등, 2007). 비록 살모넬라 백신들이 IFN- γ 의 생산과 같은 Th1 형태의 세포 매개 면역반응 유도가 반드시 필요(Mittrücker 등, 2000; Pascual 등, 2002; Nagarajan 등, 2009; Pathangey 등, 2009)하다고는 하지만, 점막면역 IgA 분비 및 2차 살모넬라 감염을 예방하기 위해서는 IL-4 또한 필요하다(Pathangey 등, 2009). 즉, 다시 말해 살모넬라 감염을 완벽하게 방어하기 위해서는 IFN- γ 와 IL-4의 유도가 필요하다(Pascual 등, 2002; Norimatsu 등, 2004; Medina 등, 2006; Hur 등, 2011). 다양한 adjuvant로 혼합된 chlorhexidine-불활화 사균체를 근육 접종 후 측정된 splenocyte IFN- γ 와 IL-4는 대조군이나 formalin-불활화 사균체 접종 군에 비해 유도됨을 확인할 수 있었다. 특히 chlorhexidine-불활화 사균체에 GI24를 함유한 adjuvant IMS131으로 혼합한 경우에는 대조군 뿐만 아니라 다른 백신 접종 군에 비해 월등하게 IFN- γ 와 IL-4 유도가 관찰되었다. 이상의 결과는 chlorhexidine-불활화 사균체에 GI24를 함유한 adjuvant IMS131으로 혼합하여 근육 접종 할 경우 Th1 type 및 Th2 type 세포 매개 면역 반응을 잘 유도 할 수 있음을 확인할 수 있었다.

놀랍게도, 병원성 *S. Typhimurium*를 경구로 도전감염 후 5일째부터 그룹 F를 제외 한 모든 그룹에서, 식욕 부진 및 운동 실조 등이 관찰 되었고, 8일째부터 대조군인 그룹 B에서 폐사가 시작되어 13일째 모두 폐사하였고, 포르말린 백신 그룹 C에서는 9일째부터 폐사가 시작되어 13일째 모두 폐사하였다. Chlorhexidine-불활화 사균체에 adjuvant를 혼합 접종 그룹의 경우에는 adjuvant ISA70 혼합 그룹인 그룹 D에서는 9일째부터 폐사가 시작되어 실험 종료 시점에서 40%의 생존율이 관찰되었고, adjuvant IMS1313을 혼합 접종한 그룹인 그룹 E에서는 11일째부터 폐사가 시작되어 실험 종료 시점에서 40%의 생존율이 관찰되었다. 하지만 adjuvant IMS1313에 GI24를 첨가한 그룹인 그룹 F에서는 9일째부터 폐사가 진행되었지만 실험 종료 시점에서 80%의 생존율이 관찰되었을 뿐이었다. 이를 통해 GI24 포함된 adjuvant IMS1313 혼합 백신이 GI24가 포함되지 않은 그룹에 비해 높은 방어 효과와 면역반응 유도가 관찰되었다. 하지만 보다 완벽한 방어를 위해서는 GI24의 첨가량 증가, adjuvant의 종류 변경 또는 접종량 증가 등 추가 연구가 필요함이 확인되었다.

결론

결론적으로 chlorhexidine-불활화 사균체에 다양한 종류의 adjuvant를 혼합하여 근육 접종한 후 면역유도 및 방어 유효성을 조사하였다. 그 결과, chlorhexidine-불활화 사균체를 GI24 포함 adjuvant IMS1313과 혼합하여 준비된 백신 후보주를 근육접종한 BALB/c 마우스에서 체액성 및 세포성 매개 면역반응을 효과적으로 유도하였으며, 병원성 *S. Typhimurium* 도전감염에 대해 효과적으로 방어할 수 있음이 확인 되었다. 이상의 결과를 종합하여 보면, chlorhexidine-불활화 사균체에 GI24 포함 adjuvant IMS1313 혼합하여 근육 접종 하였을 경우 마우스에서 살모넬라 감염을 효과적으로 방어 할 수 있음이 확인되었다. 하지만 도전감염 후 80%의 생존률을 보다 효과적인 높이기 위해서는 접종 항원량의 증가, 또는 첨부되는 GI 농도의 증가 등과 같은 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

감사의 글

이 논문은 정부(농림축산식품부)의 재원으로 농림식품기술기획평가원(IPET)의 지원을 받아 연구되었습니다(119082-1).

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ORCID

Ja-Young Moon, <https://orcid.org/0000-0002-9301-5388>
 Enkhsaikhan Ochirkhuyag, <https://orcid.org/0000-0001-5176-0868>
 Won-Kyong Kim, <https://orcid.org/0000-0003-3015-0416>
 Jun-Woo Lee, <https://orcid.org/0000-0002-9889-9557>
 Young-Gyu Jo, <https://orcid.org/0000-0001-7546-2478>
 Kil Han Kwak, <https://orcid.org/0000-0002-1727-023X>
 Byung Yong Park, <https://orcid.org/0000-0001-8897-2258>
 Jin Hur, <https://orcid.org/0000-0003-2658-0747>

REFERENCES

- 문자영, 광길한, Enkhsaikhan Ochirkhuyag, 김선민, 이준우, 조영규, 김원경, 방우영, 배창환, 허진. 2019. 가금티푸스 예방을 위한 adjuvant로서 mastoparan V1을 사용한 포르말린-불활화 *Salmonella* Gallinarum 사균체 백신의 효능 평가. 한국가축위생학회지 42(4): 257-264.
- Abd El Ghany M, Jansen A, Clare S, Hall L, Pickard D, Kingsley RA, Dougan G. 2007. Candidate live, attenuated *Salmonella enterica* serotype Typhimurium vaccines with reduced fecal shedding are immunogenic and effective oral vaccines. *Infect Immun* 75: 1835-42.
- Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, Garaizar J. 2004. Development of a Multiplex PCR Technique for Detection and Epidemiological Typing of *Salmonella* in Human Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 42: 1734-8
- Barbezange C, Ermel G, Ragimbeau C, Humbert F, Salvat G. 2000. Some safety aspects of *Salmonella* vaccines for poultry: in vivo study of the genetic stability of three *Salmonella typhimurium* live vaccines. *FEMS Microbiol Lett* 192: 101-6.
- Berndt A, Methner U. 2001. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella typhimurium* strains. *Vet Immunol Immunopathol* 78: 143-61.
- Brumme S, Arnold T, Sigmarsson H, Lehmann J, Scholz HC, Hardt WD, Hensel A, Truyen U, Roesler U. 2007. Impact of *Salmonella* Typhimurium DT104 virulence factors invC and sseD on the onset, clinical course, colonization patterns and immune response of porcine salmonellosis. *Vet Microbiol* 124: 274-85.
- Cheung HY, Wong MNK, Cheung SH, Liang LY, Lam LY, Chiu SK. 2012. Differential actions of chlorhexidine on the cell wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *PLoS One* 7(5): e36659.
- Desin TS, Köster W, Potter AA. 2013. *Salmonella* vaccines in poultry: past, present, and future. *Expert Rev Vaccines* 12: 87-96.
- Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, Kisich KO. 2009. The role of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des* 15: 2377-2392.
- Dupuis L, Ascarateil S, Aucouturier J, Ganne V. 2006. SEPPIC vaccine adjuvants for poultry. *Ann NY Acad Sci* 1081: 202-205.
- Fàbrega A, Vila J. 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev* 26: 308-41.
- Feng P, Wilson QM, Meissler Jr JJ, Adler MW, Eisenstein TK. 2005. Increased sensitivity to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice undergoing withdrawal from morphine is associated with suppression of interleukin-12. *Infect Immun* 73: 7953-9.
- Gazit E, Boman A, Boman HG, Shai Y. 1995. Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry*. 34:11479-11488.
- Hajam IA, Dar PA, Won G, Lee JH. 2017. Bacterial ghosts as adjuvants: Mechanisms and potential. *Vet Res* 48: 37.
- Hensel A, Huter V, Katinger A, Raza P, Strnistschie C, Roesler U, Brand E, Lubitz W. 2000. Intramuscular immunization with genetically inactivated (ghosts) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 protects pigs against homologous aerosol challenge and prevents carrier state. *Vaccine* 18: 2945-2955.
- Henzler-Wildman KA, Martinez GV, Brown MF, Ramamoorthy A. 2004. Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. *Biochemistry* 43: 8459-8469.
- Hur J, Kim MY, Lee JH. 2011. Evaluation of efficacy of a new live *Salmonella* Typhimurium vaccine candidate in a murine model. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 34: 171-177.
- Hur J, Lee JH. 2010. Immunization of pregnant sows with a novel virulence gene deleted live *Salmonella* vaccine and protection of their suckling piglets against salmonellosis. *Vet Microbiol* 143: 270-6.
- Hur J, Lee JH. 2011. Enhancement of immune responses by an attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain secreting an *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protein as an adjuvant for a live *Salmonella* vaccine candidate. *Clin Vaccine Immunol* 18: 203-9.
- Ismail NM, El-Deeb AH, Emara MM, Tawfik HI, Wanis NA, Hussein HA. 2018. IMS 1313-nanoparticle mucosal vaccine enhances immunity against avian influenza and Newcastle disease viruses. *Int J Poult Sci* 17: 167-174.
- Jang SI, Lillehoj HS, Lee SH, Lee KW, Lillehoj EP, Bertrand F, Dupuis L, Deville S. 2011. Mucosal immunity against *Eimeria acervulina* infection in broiler chickens following oral immunization with profilin in Montanide™ adjuvants. *Exp Parasitol* 129: 36-41.
- Kim SJ, Kim JH, Jun SY, Paik HR, Han JH. 2014. Protective effect of bacteriophages against *Salmonella* Typhimurium infection in weaned piglets. *Korean J Vet Serv* 37: 35-43.
- Kim WK, Moon JY, Cho JS, Ochirkhuyag E, Akanda MR, Park BY, Hur J. 2019. Protective efficacy of an inactivated *Brucella abortus* vaccine candidate lysed by GI24 against brucellosis in Korean black goats. *Can J Vet Res* 83: 68-74.
- King TP, Jim SY, Wittkowski KM. 2003. Inflammatory role of two venom components of yellow jackets (*Vespula vulgaris*): A mast cell degranulating peptide mastoparan and phospholipase A1. *Int Arch Allergy Immunol* 131: 25-32.
- Kwon AJ, Moon JY, Kim WK, Kim S, Hur J. 2016. Protection efficacy of the *Brucella abortus* ghost vaccine candidate lysed by the N-terminal 24-amino acid fragment (GI24) of the 36-amino acid peptide PMAP-36 (porcine myeloid antimicrobial peptide 36) in murine models. *J Vet Med Sci* 78: 1541-1548.

- Langemann T, Koller VJ, Muhammad A, Kudela P, Mayr UB, Lubit W. 2010. The Bacterial ghost platform system: Production and applications. *Bioeng Bugs* 1: 326-336.
- Liu J, Li Y, Sun Y, Ji X, Zhu L, Guo X, Zhou W, Zhou B, Liu S, Zhang R, Feng S. 2010. Immune responses and protection induced by *Brucella suis* S2 bacterial ghosts in mice. *Vet Immunol Immunopathol* 166: 138-144.
- Lv Y, Wang J, Gao H, Wang Z, Dong N, Ma Q, Shan A. 2014. Antimicrobial properties and membrane-active mechanism of a potential α -helical antimicrobial derived from cathelicidin PMAP-36. *PLoS One* 9: e86364.
- Mastroeni P, Chabalgoity JA, Dunstan SJ, Maskell DJ, Dougan G. 2001. *Salmonella*: immune responses and vaccines. *Vet J* 161: 132-64.
- Medina FA, de Almeida CJ, Dew E, Li J, Bonuccelli G, Williams TM, Cohen AW, Pestell RG, Frank PG, Tanowitz HB, Lisanti MP. 2006. Caveolin-1-deficient mice show defects in innate immunity and inflammatory immune response during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 74: 6665-74.
- Mittrücker HW, Raupach B, Köhler A, Kaufmann SH. 2000. Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella typhimurium* infection. *J Immunol* 164: 1648-52.
- Nagarajan AG, Balasundaram SV, Janice J, Karnam G, Eswarappa SM, Chakravorty D. 2009. sopB of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is a potential DNA vaccine candidate in conjugation with live attenuated bacteria. *Vaccine* 27: 2804-11.
- Norimatsu M, Chance V, Dougan G, Howard CJ, Villarreal-Ramos B. 2004. Live *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) elicit dendritic cell responses that differ from those induced by killed *S. Typhimurium*. *Vet Immunol Immunopathol* 98: 193-201.
- Pascual DW, Trunkle T, Sura J. 2002. Fimbriated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium abates initial inflammatory responses by macrophages. *Infect Immun* 70: 4273-81.
- Pathangey L, Kohler JJ, Isoda R, Brown TA. 2009. Effect of expression level on immune responses to recombinant oral *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccines. *Vaccine* 27: 2707-11.
- Roesler U, Heller P, Waldmann KH, Truyen U, Hensel A. 2006. Immunization of sows in an integrated pig-breeding herd using a homologous inactivated *Salmonella* vaccine decreases the prevalence of *Salmonella* Typhimurium infection in the offspring. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53: 224-8.
- Schwartz KJ, Taylor DJ, Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL. 1999. Diseases of swine. Iowa state University. press. Ames, Iowa 535-551.
- Won G, Chaudhari AA, Lee JH. 2016. Protective efficacy and immune responses by homologous prime-booster immunizations of a novel inactivated *Salmonella* Gallinarum vaccine candidate. *Clin Exp Vaccine Res* 5: 148-158.
- Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* 81: 1475-1485.