

제 3 차 년 도  
최 종 보 고 서

생체방어기능 측정에 의한 유방염내성인자연구 및  
유전자 특이 백신개발에 관한 연구

Studies on Mastitis-Resistant Factors by Measuring Host Defense  
Function and Development of Recombinant DNA Vaccine  
for Bovine Mastitis

농 립 부  
국립수의과학검역원

과 학 기 술 부

# 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “생체방어기능 측정에 의한 유방염내성인자 연구 및 유전자 특이백신개발에 관한 연구”과제의 3차년도 최종보고서로 제출합니다.

1998 . 9 .

주관연구기관명 : 국립수의과학검역원

총괄연구책임자 : 김종엽  
연구 원 : 주이석 정석찬  
문진산 임숙경  
장금찬 구복경  
전용수 이지연  
이상운 류영수  
우승룡 조윤상  
정병열 이재진

협동연구기관명 : 서울대학교 수의과대학

협동연구책임자 : 박용호

협·공동연구기관명 : 엘지화학 바이오텍연구소

협·공동연구책임자 : 유영준

위탁 연구기관명 : 서울대학교 수의과대학

위탁 연구책임자 : 한홍률

여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

생체방어기능 측정에 의한 유방염 내성인자 연구 및 유전자 특이 백신개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

국민건강과 직결되어 있는 축산물의 안전한 생산과 공급이 국가적인 차원에서 다루어 지고 있는 실정으로 수입개방에 따른 생체, 식육 및 축산관련 가공품의 교역이 증가됨에 따라 외래성질병 확산의 위험성이 크게 우려되고 있다. 따라서 세계 각국은 질병방제를 위한 대책수립을 위하여 축종별 숙주 특성을 유전면역 및 분자 생물기법을 이용하여 정립하고 이를 이용한 질병별 내성인자를 분석, 활성화함으로써 주요 질병의 근본적인 방제기술을 실용화 하려 시도하고 있다. 이에 본 연구의 목적은 국내에서도 젖소에서 가장 문제 시 되고 있는 질병을 모델로 하여 질병 내성인자를 분석하고, 동물질병 원인체에 대한 구조적합항원 질병내성인자를 분석 활성화시켜 질병방제 효율을 극대화 시키는데 있다.

국내 젖소에서 유방염 한가지 질병으로 연간 약 650억원의 경제적 손실을 보고 있는 실정으로 이들의 효과적인 방제를 위하여 유방염의 주요 원인균인 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)의 예방약을 개발하여 사전에 방어할 수 있는 능력을 배양하기 위한 재조합 단백질을 개발 하고져 한다. 이는 그동안의 연구자들에 의한 수많은 시도가 있었지만 유방의 면역 반응 및 방어능력이 전신감염을 일으키는 질병과는 매우 상이하므로 연구결과 효과가 높은

백신의 개발이 쉽지 않았다. 이러한 지난 수년간에 걸쳐 유방염을 근절하기 위한 노력들은 원인균을 예방하기 위한 방향으로 전환되었으며, 이제는 유방염 예방을 위한 혁신적인 접근이 필요하게 되었다. 젖소에서 유방염에 의한 경제적 손실을 예방하고 완화시키기 위한 노력 가운데 유방염 백신개발의 초점은 유방염 원인균에 대한 유선내 방어기전으로 몇 가지 병원성 인자에 의해 매개되기 때문에 이러한 병원성 인자를 이용해 젖소가 감염에 저항할 수 있는 자연능력을 높이는데 있다. 지금까지 몇가지 병원성인자중 알파톡신, pseudocapsule, fibronectin-binding protein은 주로 황색포도상구균의 백신개발에 있어 방어능력을 갖춘 병원성 인자로 간주되고 있다.

이에 본 연구에서는 동물의 주요질병인 젖소 유방염 원인체에 대한 구조적 적합 항원 질병내성인자 분석 및 활성화로 질병 방제 효율을 극대화시키고, 유전면역기법을 활용하여 조기에 유방염 내성인자를 선별하려고 시도 하였다. 또한 유방염 주요 원인체인 *S. aureus*의 Enterotoxin을 이용하여 재조합 단백질을 만들고, 이의 면역원성을 파악하여 백신의 개발을 위한 기초자료를 획득하고자 하였다. 또한 위탁과제를 통하여 유방염 주요 원인체인 *S. aureus*의 Whole cell과 Pseudocapsule,  $\alpha$ -toxin과 Fibronectin-binding protein을 이용하여 실험동물 및 젖소에서의 면역력을 확인하는데 있다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

유전면역기법을 이용한 생체 방어기능 측정에 의한 유방염 내성인자를 활성화 시키기 위하여 먼저 구조적 적합 항원의 제 1등급 및 제 2등급 유전자를 조사하고, 특히 유전자를 분석 하였다. 그중 MHC class II DRB 3 유전자를 정밀 분석하여 젖소 유방염 내성양상을 조기에 파악할 수 있는지 여부를 분석하였다. 또한 유방염의 주요 원인체인 *S. aureus*의 유전자 분석과

Enterotoxin의 분포현황을 파악하고, 이를 이용한 재조합 백신의 기초 실험 및 위탁과제를 통한 재조합 단백질을 통한 면역원성 시험도 시도하였다. 주요 연구개발의 내용을 요약하면 다음과 같다.

1. 구조적 적합 항원 유전자 조사

가. Human MHC class II DNA로부터 공통 항원부위 추출(Exon III,IV)

나. Bovine MHC class II DQ,DR 특이 DNA Probe 작성

2. 동물 특이 구조적 적합항원 조사

가. 유전적 유방염 내성우 및 감수성우의 원유중 백혈구 MHC class II 항원 발현능 비교

나. Bovine CD2, CD4, CD8 항원 발현능 비교

다. 활성화된 Bovine CD8(ACT CD8), IL-2R 발현능 조사

라. 유방염감염우와 비감염우간의 혈액에서의 유전면역학적 비교 조사

- 5세대를 분석하여 유방염 발생빈도를 정밀 분석한 후 유방염 감염우와 내성우에 대한 혈액중 Lymphocyte subpopulation을 분석함

3. 구조적적합 항원 MHC class II DRB 3 유전자 정밀 분석

가. 유방염 내성우와 감수성 우군의 MHC class II DRB3 유전자 분석

- BoLA-DRB 3 Exon 2에 대하여 유전자 증폭장치(PCR)를 통하여 증폭 시킨후 제한 효소를 이용 유전적 요인을 분석함

나. 야외 목장중 젖소의 MHC class II DRB3 유전자의 분포현황 조사

- 야외목장에 대하여 젖소의 유방염 내성에 따른 그룹을 확인함

4. 젖소 유방염 주요원인체인 *S. aureus*의 장내독소 분석

가. 젖소 유방염 발생 특이 독소에 대한 Typing

- PCR 기법을 이용하여 분리 *S. aureus*의 독소 생산능을 조사
- 나. Crystallographic technique를 이용한 SEC 구조 연구
- 5. *S. aureus*의 SEC의 재조합 단백질 생산
  - 가. SEC deletion mutants 이용한 재조합 단백질 생산
- 6. *S. aureus*의 SEC의 재조합 단백질의 면역원성 조사
  - 가. 젯소를 이용한 SEC 단백질에 대한 면역원성 조사
  - 나. 젯소 실험동물을 통한 면역원성 조사
- 7. *S. aureus*의 Pseudocapsule, fibronectin-binding protein 재조합 단백질
  - 작성 연구(위탁과제)
  - 가. Pseudocapsule 및  $\alpha$ -toxin의 생산
  - 나. fibronectin-binding protein 재조합 단백질 작성
  - 다. 시험동물에 대한 면역원성 조사

## IV. 연구개발 결과

생체방어기능 측정에 의한 유방염 내성인자 연구 및 유전자 특이백신개발에 대한 연구결과는 유전 면역기법을 이용하여 생체 방어기능을 분석하고, 활성화를 통한 질병예방 극대화를 시키기 위하여 연구한 결과와 유방염 주요 원인체인 *S. aureus*의 재조합 단백질을 생산하여 그 면역원성을 측정하고, 이를 실용화 시킬수 있는 전단계를 획득하는데 있다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 유방염 내성인자와 밀접한 관계가 있는 것으로 사료되는 Bovine MHC



class II DQ 및 DR 항원에 대한 DNA probe를 작성하여 분석하여 본 결과 Human MHC class II DNA와 crossreactivity가 인정되었다.

2. 젖소 백혈구 표면 특이 단클론항체를 이용하여 유전적으로 유방염 내성 우와 감수성 우군에 대하여 분석해 본 결과, CD4/CD8의 비율이 감수성우에서는 0.8 이었지만 내성우군에서는 1.34로 높게 나타났다.

3. 동물질병 내성 유전자 선발을 위하여 Bovine 구조적적합 항원의 유전인자를 결정하는 BoLA-DRB 3 exon II의 증폭을 위해 PCR primer HLO 30, HLO31, HLO32 등 3개를 작성하였다. 이를 이용하여 증폭된 DNA를 *Hea* III, *Rsa* I, *Xho* II 등의 제한효소로 절단하여 각각의 혈액 면역세포중에서 유전자를 분석하였다. 이들 유전자의 양상이 유방염에 감수성이 있는 우군은 DRB 3.2\* 8 유형이었고, 내성 우군은 DRB 3.2\* 11의 haplotypes를 확인할 수 있었다. 이를 조기 내성우 선발에 응용하면 송아지 상태에서 유방염 내성인자가 있는 젖소를 조기 선발이 가능할 것으로 사료된다.

4. 젖소 유방염 발생 유도 특이 독소 분석을 위하여 주요 원인균인 *S. aureus*의 야외분리주들에서 독소 생산능을 PCR 기법을 이용하여 그 분포도를 확인하였고, 그 결과 국내 독소의 분포가 장내독소 C-Type(SEC)이 가장 높은 30.1%를 나타냈다. 그리고 SEC에 대하여 Crystallographic 기술을 이용하여 단백질 구조를 확인하였고, 여기에 Deletion mutagenesis를 이용하여 재조합 단백질을 생산하였다.

5. 작성된 재조합 단백질을 이용하여 실험동물과 젖소에 그 면역원성을 조사 하여 본 결과, 마우스에서 혈중 항체가가 매우 높게 나타났으며, 젖소에서 실험에서도 대조군에 비하여 면역세포들의 활성화 및 분포도가 유의성 있게



높게 인정되었다. 앞으로 이들 재조합 단백질의 획득 생산기술을 더욱 높이고 우수한 부형제를 선발한 후 백신으로 사용할 때 가장 효과적인 예방약을 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 연구개발 결과의 활용계획

본 연구의 결과를 토대로 젖소 유방염을 일으키는 주요 원인균중 가장 문제 질병인 *S. aureus*의 특성을 분석해 본 결과, 그 독소의 유형이 장내독소중 SEC 등 4가지 형태로 분석되어 이를 유방염의 예방대책을 수립하는데 응용할 수 있으며, 여기서 가장 많은 분포를 나타내는 SEC를 이용하여 독소 성상을 분석 재조합 단백질을 생산하여 실험동물과 젖소에서 면역원성을 조사한 결과 그 효능이 인정되었다. 이와같은 재조합 단백질 대량생산 기술의 확립과 면역력을 극대화 시킬 수 있는 보조제를 개발하면 곧 바로 산업화가 가능한 연구의 마지막 단계에 이르게 될 것이다. 앞으로 대량생산 공정 개발 및 시제품에 대한 동물 실험 및 목적 동물에 대한 야외적용시험을 실시한 후 산업화하여 국내에서 젖소 유방염으로 인한 경제적 손실을 최소화 시키고, 세계적으로 아직 백신이 개발되어 있지 않기 때문에 세계 시장을 무대로 수출할 수 있는 경쟁력 있는 제품이라 할 수 있다.

동물의 백혈구 표면 단크론항체를 통하여 젖소 유방염 및 동물질병의 면역효과를 측정하여 질병의 예방효과를 극대화 시킬 수 있을 것이며, 또한 동물의 혈액을 채취하여 백혈구를 분리하고, 백혈구 DNA를 순수 분리한 후 PCR 기법을 이용하여 젖소 주조직적합항원중 MHC class II, BoLA-DRB 3 exon2의 분석으로 송아지 수준에서 유방염 및 질병의 내성 양상을 조기에 측정하여 선발하는데 응용이 가능할 것으로 사료된다.

# S U M M A R Y

## I. Title

Studies on Mastitis-Resistant Factors by Measuring Host Defense Function and Development of Recombinant DNA Vaccine for Bovine Mastitis

## II. Objectives and Necessities of Study

As an increasement of international trade of live animals, livestock products and their processed products and increased demands for the production and provision of safe food for people by each country, importance and risk of exotic animal diseases has been greatly emphasized. To achieve these goal, each country eastablishes animal disease control program by analyzing host defensive system using immunogenetic and molecular biological technology. Also, the country develops tools detecting disease-resistant genes and application for practical use. Therefore, the study was designed to target the most prolematic animal disease economically and to control the disease by dissecting host defense function and disease-resistant factors against causative microorganisms.

Bovine mastitis causes 65 billion won economic losses annually and *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*) is the major causative microorganism. To prevent the disease effectively, the study also focused to develop the

recombinant vaccine against the pathogen. Although many researches has examined to evaluate the immune function and defensive system of mammary gland systemically, the difference of local and systemic immune system made difficulties and repeated failures to find the methods through designing the efficient vaccine.

All the efforts were merged to develop the vaccine against major pathogenic factors from major mastitis-causing microorganisms and these innovative approaches by analyzing molecular determination of pathogenic factors could provide possible way to control the disease. Since the bovine mastitis is commonly induced by several factors of major pathogens, characterization of pathogenic factors may open the way to reduce the economic losses caused by the bovine mastitis. Alpha-toxin, pseudocapsule and fibronectin-binding protein (FBP) are the most essential candidates to develop the vaccine among many pathogenic factors of *Staphylococcus aureus*.

Therefore, the study was conducted to prevent the diseases effectively through the analysis of host defensive system, particularly by examining the major compatibility complex(MHC)-associated molecules and early selection of mastitis-resistant cattle by immunogenetic approaches. The study was also conducted to develop the recombinant vaccine against enterotoxins which act as superantigens in the bovine host by immunogenetic and molecular approaches to this factor. In addition, immunogenicity of alpha-toxin, pseudocapsule and FBP of *S. aureus* were also evaluated to enhance the host immune responses of the vaccine.

### III. Research Areas and Results Performed

First of all, immunogenetic analysis of MHC class I and class II molecules of bovine species were conducted to determine the mastitis-resistant factors in the host. Among many candidates associated with disease-resistance, MHC class II DRB3 exon was the most related to mastitis-resistant properties since the antigen was processed by antigen presenting cells and association with MHC class II was the critical to induce the host immune responses, particularly in *S. aureus*. Molecular characteristics of enterotoxins and their influence to persistence of bovine mastitis could provide the design for the recombinant vaccine for the application to experimental animal and target animal in the field. Identification and determination of other pathogenic factors including FBP, alpha-toxin and pseudocapsule were also examined in the separate research project in this study. The important research areas we performed in this study are as follows.

1. Molecular determination of MHC genes
  - a) elucidation of common epitopes from human MHC class II antigens (exon III and IV).
  - b) Design for DNA probe specific to bovine MHC class II DQ and DR
2. Characterization of immune cell proportion and function using species-specific monoclonal antibodies to leukocyte differentiation molecules
  - a) Comparison of MHC class II molecule expression of leukocytes from mammary gland secretions between mastitis-resistant and mastitis-susceptible cattle genetically

- b) Determination of expression of BoCD2, BoCD4 and BoCD8 antigens from mastitis-infected animals
  - c) Determination of expression of activated BoCD8 (ACT BoCD8) and IL-2R molecules
  - d) Difference of immune cell function of *S. aureus*-infected and healthy animals from carefully selected by computerized analysis for past five generations
3. Detailed molecular determination of bovine MHC class II DRB3 antigen
- a) Analysis of bovine MHC class II DRB3 antigen from mastitis-resistant and mastitis-susceptible cows by haplotype determination using PCR-RFLP analysis
  - b) Prevalence of haplotypes of MHC class II DRB3 by group from field study
4. Analysis of *S. aureus* enterotoxins causing bovine mastitis
- a) Toxin typing using multiplex PCR method
  - b) Morphological characterization of SEC using crystallography
5. Production of SEC recombinant protein using *E. coli* system from different SEC mutant strain
6. Immunogenicity of recombinant protein from SEC mutant strain
- a) Immunogenicity in experimental animals
  - b) Immunogenicity in target animals
7. Production of recombinant protein against FBP, pseudocapsule and alpha-toxin of *S. aureus*(separate research project attached to this project)
- a) production of pseudocapsule and alpha-toxin



- b) production of recombinant FBP
- c) immunogenicity to experimental animals

## IV. Reseach Results

The study was conducted to analyze the bovine mastitis-resistant factors by immunogenetic approaches and to develop the recombinant vaccine against *S. aureus* as a major pathogen in bovine mastitis. Through the detailed performance for the application of useful technology obtained from the study, we could establish the method to detect animal possessing disease-resistant genes and could design the vaccine for practical use. The brief results obtained from the study are as follows.

1. We were able to produce bovine MHC class II DQ and DR specific DNA probe from human MHC class II antigen by selecting cross-reactive epitopes.

2. Study of lymphocyte subpopulation has indicated that high proportion of BoCD2, BoCD4 and IL-2R expressed cells was examined and the ratio between BoCD4/BoCD8 was 1.34 in mastitis-resistant animal otherwise, only 0.8 in mastitis-susceptible animals.

3. Bovine MHC class II DRB3-specific PCR primers, HLO 30, HLO 31, HLO 32, were designed and amplified DNA was fragmented by HaeIII, RsaI and XhoII restriction enzyme. The molecular analysis on MHC class II DRB3 haplotype has revealed that DRb3\*28 was the most prevalent in



mastitis-susceptible animals and DRB3\*11 haplotype was closely associated to mastitis-resistant animals. This characterization of haplotypes may be used to select mastitis-resistant candidate animal from early age or at parturition.

4. Staphylococcal enterotoxins inducing persistent infection in the mammary gland were characterized at molecular basis and multiplex PCR method was developed in this study. Using developed multiplex PCR, we could examine the prevalence of SEC types from mastitic milk and the results have shown that SEC was the most prevalent as 30.1% in the county. Detailed protein structure was examined by crystallography to define the epitope which possesses the high affinity with MHC class II molecule and T cell receptor. To avoid the superantigenicity which induce persistent infection through non-processed manner, we designed recombinant protein which can produce high immune responses in the host using deletion mutagenesis method.

5. Immunogenicity was evaluated in experimental animals and target animals with recombinant proteins and the study has provided that high antibody titers and significant increased immune cell function and proportion in vaccinated animals were observed.

These results could enlighten the effective way to control bovine mastitis and moreover, active participation of the involved industry (LG biotech) promised us the commercialization of products for domestic and international market with further extended application in the field.

## V. Practical Use of Research Results

The current research results have provided that effective control strategy could be established by early selection of mastitis-resistant animals using immunogenetic and molecular biological approaches, such as an analysis of bovine MHC class II molecules and proportion of lymphocyte subpopulations in the host.

The results has also provided that the most desirable preventive method could be determined by recombinant protein vaccine which can eliminate persistent infection of bovine mastitis. This is possibly established using SEC mutant protein propagated in *E. coli* system and specific to major pathogenic factor of major mastitis-causing microorganism, *S. aureus*. Significantly increased antibody titers and lymphocyte proportion and function in experimental animals and cattle in preliminary examination in this study with further effective and economical adjuvant selection will make possible to produce bovine mastitis vaccine first in the world and its commercialization will minimize economic losses and will provide potent product in the international market with high competitiveness.

In conclusion, this project is very promising and should be supported for commercialization and industrialization since the research partner of industry, LG Biotech, also believes the product will bring us a great economic benefits in the near future.

여 백

# CONTENTS

I. Introduction .....	21
II. Current Status of Technology Development in Domestic .....	28
III. Research Areas and Results Performed .....	31
IV. Achievement of Research Object .....	67
V. Practical Use of Research Results .....	69
VI. References .....	71

여 백

## 목 차

제 1 장	서 론 .....	21
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	28
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	31
제 4 장	연구개발목표 달성도 및 대외기여도 .....	67
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 .....	69
제 6 장	참고문헌 .....	71



여 백

# 제 1 장 서 론

## 1절 연구개발의 목표

사람들에게 우유를 공급하여 국민들의 건강증진을 위해 사용되어지는 젖소의 위생관리 및 질병관리는 무엇보다도 우선되어야 한다. 이에 본 연구의 목적은 젖소의 유방염을 일으키는 원인체에 대한 구조적합항원 질병내성인자를 분석하고, 이들을 활성화 시켜 질병방제에 효율을 극대화 시키기 위함에 있다.

숙주 면역증진체계 확립으로 근본적인 진단, 예방 및 치료기술을 확립하여, 유전면역학적 기법과 분자 생물학적 기법을 응용하고 숙주 면역체계를 확립하여 조기에 질병 내성인자를 진단하여 송아지 단계에서 조기 발견하고 내성우균을 작성하여 생산성을 향상할 수 있는 기초자료를 제공하는데 있다.

또한 유전자 조작에 따른 유방염 주요 원인체인 황색포도상구균에 대한 유전자 재조합 백신을 개발하여 보급 하고져 한다.

## 2절 연구개발의 필요성

### 1) 기술적 측면

국민건강과 직결되어 있는 축산물의 안전한 생산과 공급이 국가적인 차원에서 다루어지고 있는 실정으로서, 수입개방에 따른 생체 식육 및 관련 축산가공품의 교역이 증가됨에 따라 외래성질병 확산의 위험성이 크게 우려되고 있다. 따라서 각국은 질병방제를 위한 대책수립을 위하여 축종별 숙주특

성을 유전면역 및 분자생물기법을 이용하여 정립하고 이를 이용한 질병별 내성인자를 분석, 활성화함으로써 주요질병의 근본적인 방제기술을 실용화하려고 하고 있다.

국내 젖소 질병은 그 발생율로 비교 분석하여 보면 유방염이 가장 많은 발생율을 보이며, 유방염관리 프로그램이 적용되지 않고 있는 목장의 젖소는 50%이상의 다양한 형태로 유방염에 감염되어 있으며, 이런 유방에서 생산된 우유는 세균 및 염증 산물로 인하여 우유의 품질이 극히 저하되고 생산성이 감소된다. 그럼에도 불구하고 아직 우리나라에서는 기존에 개발된 유방염 관리 프로그램을 적용시키지 않고 있을 뿐만 아니라 목부에 의한 무분별한 항생물질의 투여로 인하여 유즙내 항생물질의 잔류가 국민건강을 위협하는 실정에 있다. 또한 유방염에 의한 경제적 손실은 젖소에서 발생하는 모든 질병으로 인한 총피해액의 약 26%로 추정하고 있다.

젖소의 유방염 원인체를 보면 최근 국내 6,867개 분방의 우유중에서 24%의 분방이 유방염에 감염되어 있었으며, 이들의 원인균을 분석해 본 결과, *Staphylococcus aureus*를 비롯하여 *Streptococcus agalactiae* 등이 발견되었다. 이들중 유방염 발생시 고질적이고, 급만성으로 전환되어 낙농가들에게 가장 많은 피해를 주는 병원체인 *Staphylococcus aureus*가 19.2%를 차지하여 황색포도상구균에 대한 대책이 요구된다.

*Staphylococcus aureus*에 의한 유방염 발생은 치료효율이 높지 않기 때문에 목장에서 목부들의 항생제 남용으로 국내 분리 세균에서는 항생제에 대한 약제다제내성 양상이 갈수록 심화되고 있는 실정이다. 황색포도상구균에 대한 내성 양상은 2개이상 중복내성 빈도수가 14.6%, 3개가 11.7%, 6개이상의 다제내성 균주 분포율이 4.4%로 나타났으며(1991년), 그 양상은 최근들어 더욱 심화되고 있다. 이와같은 현상은 농가에서 항생제를 부적절하게 사용한 결과라 할 수 있다. 또한 *Staphylococcus aureus* 균주중  $\beta$ -Lactamase 산생능은 56.4%를 차지하고 있었으며 이들중 대부분이 페니실린 내성을 나타

내고 있는 실정이므로 유방염은 치료보다는 위생관리 및 예방대책을 수립해야 할 것이다.

*Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus pyogenes* 등에서 분비되는 독소는 Superantigen의 역할을 하여 숙주면역기능을 저하시켜 그 질병을 더욱 증폭시키게 된다. Superantigen은 MHC class II의 항원과 T림프구 수용체의 V region에 동시에 작용하는 매우 강력한 T림프구 자극제로 알려져 있으며, 이들은 숙주의 질병에 대한 방어기전을 파괴하는 역할을 하여 숙주 면역기능저하 및 자가면역질환을 일으킨다. 특히 유방염 발생 비율이 높은 *Staphylococcus aureus*는 Superantigen으로 작용하는 SEC 및 TSST 독소를 생산하는 균들이 많이 분포되고 있다. 최근에 Superantigen은 유방염에서 직접적으로 작용되는 것으로 밝혀졌으며, 이 독소의 분자구조를 분석하여 변이주를 작출하였으며, 3차구조 분석기법을 활용하여 독소의 주요한 접합부위를 확인하였다. *Staphylococcus aureus* SEC 등은 젖소의 유방염 발생을 장기간 지속시키고, 면역기능을 저해시키는 것으로 인정되었기 때문에 이들로부터의 보호와 예방이 중요하다고 하겠다. 한편, 분자생물학적 최첨단 기술을 응용하여 재조합단백질을 작성하고, 값싸고 면역원성이 높은 대량 생산체제를 개발하여 예방백신을 개발 보급하여 젖소에서 사전에 유방염을 차단하는 예방대책을 수립함이 무엇보다도 시급하다 하겠다.

생체의 면역기전에 관여하는 주요방어인자들은 탐식세포 성분이 특이적 면역시스템 그리고 정균성 및 살균성 단백질로 분류되고 있으며, 방어기전에 대한 연구는 비특이적으로 면역작용을 높이는 역할 규명에 집중되어지고 있다. 그래서 호중구나 대식세포 등 탐식성 백혈구들이 Lactoferrin이나 Lysozyme 같은 용해성 매개체들과 함께 비특이적 유선방어 작용에 참여한다고 밝혀졌다. 그러나 유방의 제 1 방어선이라 할 수 있는 호중구의 기능들이 비유단계별로 차이가 있을 뿐만 아니라 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 감염되면 그 기능이 현저히 저하된다. 또한 이들은 유방에서 유방



염을 일으키는 세균으로 작용한 후 탐식된 세포내에서도 생존 증식하기 때문에 이런 비특이적 방어기전을 용이하게 피할 수 있다.

유선 면역억제 조절기전에 대해서는 *Staphylococcus aureus*균으로 감염된 젖소의 유방에서 림프구에 대한 면역억제효과의 기전이 건강한 젖소에서도 면역억제 T림프구인 활성화된 CD8+세포가 존재하며, 이렇게 활성화된 CD8+ 림프구 집단이 유선내에서 면역을 증가시키는 T림프구인 CD4+세포의 mitogen이나 특이항원 자극에 의한 증식반응을 억제시킨다. 그러나 감염된 유선분비물에서는 이런 특정세포군이 증가된다고 알려져 유방내 림프구 아집단 구성에 대한 세포성 면역기전이 밝혀지고 있다.

유방염 내성우 및 감수성우의 말초혈액중에서 CD2, CD4 및 CD8 marker의 발현능을 비교한 결과, CD2 와 CD4 marker의 발현 T 림프구의 분포가 감수성우보다 내성우에서 훨씬 높게 나타났고, N림프구, B림프구 및 인터루킨-2 수용체 발현능은 세포성 면역의 중심체인 N림프구 및 T림프구의 활력은 내성우에서 높게 나타나고, 체액성 면역의 중심체인 B림프구의 분포가 내성우에서는 낮게 나타나 이들 세포 활성화도 분석으로 질병내성 및 유전 면역학적 구명에 지침으로 활용되고 있다. 질병의 발생에 따라 세포의 활성화도를 측정하여 면역기전과 질병의 발생현황 분석 및 송아지 차원에서 조기에 질병에 강한 우군을 선발하고, 좋은 종축우군을 형성할 수 있을 것으로 사료된다.

## 2) 경제산업적 측면

젖소의 유방염은 질병으로써 그 경제적 피해도 크게 나타나지만 최근 원유의 위생등급제가 '93. 6. 1일 시행된 이후로 3차에 걸쳐 지속적으로 강화되어 낙농가들에게 경제적 여파가 크게 작용되고 있다. 같은 원유의 생산에서도 원유의 위생등급에 따라 Kg당 143원의 차이를 보여주고 있다. 이는 우리나라 평균 착유두수 20두, 1일 생산량 20Kg/day, 1개월 기준으로 평균 값

은 우유를 생산하고자 1등급에 비해 4등급 생산농가에서는 매월 약 170만원, 연간 약 2천 59만원의 막대한 수입금이 목장에 따라 차이를 나타내고 있다. 이는 가장 중요한 유방염을 막지 못하기 때문에 발생하는 현상이라 할 수 있다. 유방염으로 인한 경제적 손실은 염증으로 인한 백혈구 증가 유선상피세포 탈락, 세균의 감염 등으로 인하여 유량의 감소, 유질의 저하를 일으켜 젖소 도태, 치료경비, 판매가치 감소, 노동력 경비 증가, 대체우 경비 등을 들 수 있다. 또한 도태를 결정하는 요인중 첫번째로는 유방염과 관련되어 있다. 낙농가들에게 연간 수입을 보면 유대가 90% 이상을 차지하며 기타 송아지 및 도태우 판매비가 10% 미만으로 유대에 의하여 젖소 사육농가들의 수입이 결정되기 때문에 유량, 유지방 뿐만 아니라 원유의 위생등급 즉 원유중 세균수 및 체세포수가 농가의 수입과 직접적인 관련이 있다. 한마디로 말해서 낙농의 성공여부는 우유의 질을 좌우하는 유방염과 밀접한 관련이 있다.

예를 들면 착유우 30만두를 대상으로 50%가 유방염에 감염되었을때 연간 유량감소로 인한 경제적 손실은 360억 정도이며 기타 모든 것을 포함하면 총년간 670억원의 손실을 가져온다. 이것을 1회 유방염 감염시 두당 경제적 손실액으로 환산하면 45만원정도이다.

유방염으로 인한 농가손실을 착유두수 25두를 기준으로 하여 조사해 본 결과, 임상형유방염 발생에 의한 손실로 약 46만원, 준임상형 유방염에 의한 유량감소가 약 15만원, 그리고 체세포수 페널티가 약 47만원으로 매월 약 110만원의 경제적 손실을 입고 있는 실정이다<Table 1>.

국내에서는 최근 외국기술 습득 연구원을 중심으로 축종별 주요질병에 대한 질병내성인자 연구기술 개발이 가능하며, 그 중에서도 젖소질병중 가장 큰 경제적 손실을 일으키는 젖소 유방염에 대한 생체면역 증진 기술개발 및 특이유전자 백신개발이 시급히 요구되고 있다.



<Table 1> 유방염으로 인한 농가손실

구 분	산 출 근 거	금 액(%)
임상형 유방염 ① 유량감소	$6,000\text{kg}(\text{년간산유량}) \times 0.006(\text{유량 감소량;6\%}) \times 1.76\text{두}(\text{발생두수}) \times 500\text{원}(\text{유대}) \div 12(\text{월})$	26,400 (2.4%)
② 폐기우유	$21\text{Kg}(\text{일일평균유량}) \times 10\text{일}(\text{치료 기간 7일+휴약기간3일}) \times 1.76\text{두수}(\text{발생두수}) \times 500\text{원}(\text{유대})$	164,800 (16.9%)
③ 수의사 진료비 및 약물치료비	$5\text{만원}(\text{두당치료비}) \times 1.76(\text{발생두수})$	88,000 (8.0%)
④ 대체우 경비	$0.13(\text{도태율;13\%}) \times 1.76(\text{발생두수}) \times 700,000\text{원}(\text{도태우-구입우})$	160,160 (14.7%)
준임상형 유방염에 의한 유량감소	$25\text{두}(\text{평균착유두수}) \times 0.25\%(\text{유방염감염율}) \times 0.1(\text{평균우유감소량(10\%)}) \times 21\text{Kg}(\text{일일평균유량}) \times 30\text{일} \times 500\text{원}(\text{유대})$	156,875 (14.4%)
체세포 페널티	$25\text{두수}(\text{평균착유두수}) \times 21\text{Kg}(\text{일일평균유량}) \times 30\text{일} \times 30\text{원}(\text{페널티})$	472,500 (43.3%)
합 계	임상형: 459,360    준임상형: 629,375	1,088,735 (100%)

### 3) 사회·문화적 측면

수입개방에 따른 생체·식육 등의 급속한 수입증가에 따라 외래성 질병 확산은 식용동물에 경제적으로 막대한 피해를 야기시킬 가능성이 있다. 식품의 국제 경쟁력은 가격뿐만 아니라 품질과 소비자의 기호성 등에 따른 선택이 크게 영향을 미친다는 것을 감안할 때 국민이 신뢰하고 소비를 즐길 수 있는 국적있는 자국산 우유의 생산은 무엇보다 중요하다. 무역 자유화 이후 사육환경이 전혀 다른 외국산 원유와 각종 유제품의 무분별한 수입으로 약물잔류에 의한 안전성 문제는 국민보건에 큰 영향을 미칠 수 있다. 한편 경제성장과 더불어 식생활의 변화는 비단 우유의 양적인 증가 뿐만 아니라 위생적이고 안전성이 높은 생산품을 요구하고 있기 때문에 저가의 고품질 원유를 생산하는 것은 개방화에 대비한 한국 낙농산업의 국제 경쟁력 강화에 필수적이며 국내산을 선호하는 국민의 정서에 부합된다고 하겠다.

우리나라 낙농의 역사는 30여년에 불과하지만 80년대이후 비교적 짧은 기간에 괄목할 만한 양적·질적 성장을 이룩했고, '98년 현재 약 1만 8천 가구가 낙농산업에 종사함을 감안해 볼때 낙농산업의 기반강화를 위한 연구가 절대적으로 필요하다고 볼수 있겠다. 특히 인수공통전염병(Zoonosis), 외래성 질병 및 소모성 질병의 발생증가로 이에 따른 예방 치료 대책수립 부재는 국내 관련 산업의 경제적, 산업적 손실을 가져올 수 있다.

따라서 선진 외국의 첨단 유전면역, 분자유전 및 유전공학기법을 이용하여 주요 질병에 대한 생체 주조직적합항원(Major Histocompatibility Complex) 분석, 특이반응세포와 그 분비 생성물질의 특이 유전자를 선별, 이를 활성화함으로써 질병방제의 선택적인 생체면역 증진을 통한 질병내성을 유도함이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절 지금까지의 연구개발 현황

#### 1. 외국의 경우

##### 가. *Staphylococcus aureus* Vaccine 개발

① Ward 등(1977)은 순수 분리한 *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin과  $\beta$ -toxin을 토끼에 접종을 실시하여  $\alpha$ -toxin이 치사성 출혈성 부종의 주요 병원성 독소라고 보고하였다.

② Norcross와 Opdebeck(1983)은 유방염 유증에서 직접 분리한 *Staphylococcus aureus*의 95%가 Pseudocapsule를 가지고 있다고 보고하여 pseudocapsule이 유방염 병원성에서 중요한 인자임을 강조하였다.

③ Kehoe 등(1983)은 *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin gene을 *E. coli*에 Cloning하여 expression을 유도하였다.

④ Gray와 Kehoe(1984)는 *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin gene의 Sequence를 보고하였다.

⑤ Pattee(1986)는 *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin gene의 Chromosomal mapping을 하였다.

⑥ Bhakson 등(1989)은 *Staphylococcus*  $\alpha$ -toxin에 대한 고도 면역글로블린은  $\alpha$ -toxin의 세포 독성작용으로부터 보호작용이 있다고 보고하였다.

⑦ Nickerson 등(1993)은 Pseudocapsule을 함유하는 bacterin으로 예방접종하고 *S. aureus*로 공격하였을때 예방접종우의 유방감염율이 감소되었다고 보고하였다.

⑧ Nordhauga 등(1994)은 Pseudocapsule,  $\alpha$ 와  $\beta$ -toxin을 함유하는 *S. aureus* 불활화 vaccine을 처녀우에 예방접종을 하였을때 Pseudocapsule과  $\alpha$ -toxin에 대한 항체가 초산 비유기 동안 대조군보다 현저히 높았다고 보

고하였으며, 108두에 대한 임상시험에서 예방접종군은 *S. aureus*에 대한 임상형 유방염이 발생하지 않았지만 대조군에서는 6.0%의 소에서 발생하였다고 보고하였다.

⑨ 포도상구균 백신 개발은 최근에 균체의 협막, protein-A, toxoid, staphylococcal adhesion protein(fibronectin receptor) 등을 항원물질로 하는 연구가 젓소에서 가장 난치병인 포도상구균성 유방염을 대상으로 진행되었다.

⑩ Mamo W 등(1995)의 Sweden 연구팀은 Fibronectin binding protein을 이용한 *S. aureus* 유방염 백신을 시험적으로 생쥐에 백신접종하였고 그 면역학적 반응을 보고하여 FBP의 면역유효성을 검증하였다.

⑪ Girando J.A 등(1995)은 Argentina에서 0.4% formalin으로 inactivation 시켜 aluminum hydroxide을 adjuvant로 하는 *Staphylococcus mastitis vaccine*을 개발하고 2차에 걸친 야외시험 결과를 발표하였으며 특허를 획득하고 시판할 계획에 있음을 '95 Tel Aviv 학술대회(May 28~June 1, '95)에서 발표하였다. 그러나 이 vaccine은 기존의 복제품일 뿐 진전된 기법 적용이 없었다.

#### 나. 유전면역학적 연구

① 최근(1992) UN 국제식량기구 주관하에 진행되고 있는 세계각국의 우수 가축품종(중국의 다산돼지, 일본의 화우 등)에 대한 유전면역학적 특이성을 구조적적합항원을 이용하여 구명하고 있다.

② 구조적적합항원은 사람(제 6염색체) 및 마우스 (제 17염색체)에서 추출, 분석 되었으며, 최근 젓소 (제 23염색체) 및 돼지 등에서도 매우 활발한 연구가 진행되고 있다.

③ Lewin 등(1989)은 젓소에 있어서의 질병 내성인자와 면역반응 유전자 분석을 구조적적합항원의 기능과 비교검토 하였고, 이에 따라



HSA(Human serum albumin)에 높은 반응을 보이는 인자(BoLA-W16)는 유방염에 감수성이 높은 반면, HSA에 낮은 반응을 보이는 인자(BoLA-W2)는 유방염에 저항성이 높음을 고찰하였다.

④ Wu 등(1988)은 소백혈병 원인체인 BLV(Bovine Leukemia Virus)의 표면 단백질(BLV-gp51)에 대한 높은 항체 생성율이 BoLA-W14와 관계된 구조적 적합항원에서만 가능함을 밝혀내었다.

## 2. 국내의 경우

### 가. 유전면역학적 연구

○ 국내에서는 1994년 수의과학연구소가 미국 워싱턴주립대학의 기술자문으로 젓소 특이 주 조직적합항원에 대한 유전자 분석과 이에 따른 유전자 탐색자를 작성하여 활용가능토록 시도하였다.

○ 생체면역주관 구조적합항원(MHC)를 분석하여 젓소에 특이적인 MHC DQ, DR 유전자 탐색자를 작성하여 조기에 내성인자를 확인하였다. 그 중 MHC-classII DRB3 유전자가 유방염 저항인자로 인정되었으며 이를 위한 PCR기법이 확립되었다.

○ 젓소의 유방염 내성우 및 감수성우의 림프구를 분리하여 CD2, CD4 등 10여종의 림프구 표면 특이항체를 이용 세포활성도를 분석하여 유전면역학적으로 내성우와 감수성우와의 관계를 분석하였다.

### 나. *Staphylococcus aureus* 백신 연구

○ 유방염의 주요 원인균인 *Staphylococcus aureus*의 독소산생능을 조사한 결과, SEC 및 TSST 독소의 분포가 많았으며 이들 독소생산균주들이 임상형 유방염 및 준임상형으로 지속적인 감염이 인정되었다.

○ 최근의 연구결과로써 deletion mutagenesis를 이용하여 SEC-1 재조합 단백질을 생산하여 그 면역원성과 방어능을 비교 조사하였다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1절 연구개발 수행내역

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 실험재료

##### (1) 시험동물

축산기술연구소 종축개발부 우량 젖소를 대상으로 5대까지 거슬러 올라가 생시 젖소 유방염의 기록을 컴퓨터를 통해 분석한후 유방염에 감수성이 높은 우군과 비유기중 유방염 감염이 1회 이하인 우군을 분리하여 시험에 공시하였다. 국내 젖소의 우유중 체세포수 500,000개/ml이상의 분방별, 우유를 조사하였으며, 이들의 원유중 유방염을 일으키는 원인균을 분리하였다.

##### (2) 백혈구 특이 단클론 항체

유전면역학적 분석을 위해 면역세포의 활성화도 및 반응도 측정을 위하여 젖소의 백혈구 단클론항체를 <Table 2>와 같이 공시하였다.

또한 단클론항체 및 flow Cytometry를 이용한 면역세포 특이성 분석을 요약하면 다음과 같다.



Table 2. Monoclonal antibody specific to bovine leukocyte differentiation molecules used to define the composition of leukocyte subpopulation from peripheral blood and mammary gland secretions.<sup>1</sup>

Molecules <sup>2</sup>	Mr <sup>3</sup>	Cell type <sup>4</sup>	MAb <sup>5</sup>	Isotype of MAb
BoCD2	58 to 62 KD	T	BAQ95A	IgG <sub>1</sub>
BoCD4	50	T helper, inducer	CACT138A	IgG <sub>1</sub>
BoCD8	35, 38	T cytotoxic suppressor	CACT80C	IgG <sub>1</sub>
surface IgM		B	Pig45A	IgG <sub>2b</sub>
N2	210, 300	non T/non B	BAQ4A	IgG <sub>1</sub>
ACT2	- <sup>6</sup>	non T/non B	CACT77A	IgM
		Subpopulation of BoCD8	CACT26A	IgG <sub>1</sub>
ACT3	120	BoCD4	CACT114A	IgG <sub>2b</sub>
GM1	- <sup>6</sup>	Granulocytes, Monocytes	DH59B	
M1	- <sup>6</sup>	Monocytes	CA137A	IgM
MHC class I	45	Leukocytes	H58A	IgG <sub>2a</sub>
MHC class II	34	Monocytes, Macrophages	TH81A	IgG <sub>2a</sub>

<sup>1</sup> First international workshop on leukocyte differentiation molecules in cattle, sheep and goats (1989, Hannover, W. Germany)

<sup>2</sup> Molecules = Bovine leukocyte differentiation molecules

<sup>3</sup> Mr = relative molecular mass.

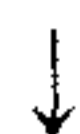
<sup>4</sup> Cell type = Cells expressing molecules.

<sup>5</sup> MAb = Monoclonal antibodies which specifically react with leukocyte differentiation antigen.

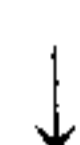
<sup>6</sup> - = not known

### **Preparation of mammary gland leukocytes**

Collect 200ml of mammary secretions from 4 different quarters



Mix with equal volume of PBS-ACD-EDTA  
(PBS pH 7.2 20% ACD, 20mM EDTA)



Centrifuge at 400g, at 10°C for 30 min



Dilute cell pellet with PBS-ACD-EDTA solution



Separate leukocytes by H/F density gradient (d= 1.086)



Examine the cell types by flow cytometry and cyto-spin  
centrifugation followed by Diff-Quik staining

### **Flow cytometric analysis of leukocyte subpopulations**

Resuspend cells to  $10^7$  cells/ml in PBS containing 10mM EDTA  
0.1 % sodium azide, 10% ACD and 2% globulin free horse serum  
(first washing buffer, PBS-FB)



Distribute in  $50\mu\text{l}$  aliquots ( $5 \times 10^5$  cells) to wells of 96 well microtiter  
plates to which 50ul (0.7ug) of MoAbs which had been previously added



Incubate for 30 min at 4°C, then wash 3 times with PBS-FB



Mix with 100ul of 1:200 dilution of fluorescein-conjugated goat  
anti-mouse Ig (H & L chain specific) of single fluorescence analysis



Mix with 2 MoAbs of different isotype, then react with isotype  
specific goat anti-mouse Ig conjugated with phycoerythrin and fluorescein  
dual fluorescence analysis



Incubate for 39 min at 4°C, then wash 3X in PBS containing 0.1%  
sodium azide & 10% ACD (second washing buffer, PBS-SB)



Fix with 2% formaldehyde in PBS and analyze by FC

## 나. 실험 방법

### (1) 반응세포특이성 및 내성인자 활성화

#### (가) 형광세포유출장치 분석(flow cytometry analysis)

Davis 등의 방법에 준해서 conical bottom microplate의 한 well당 단크론항체  $50 \mu\text{l}$  ( $15 \mu\text{g/ml}$ )와  $1 \times 10^7/\text{ml}$ 의 림프구를 첨가한 후  $4^\circ\text{C}$ 에서 30분간 감각시킨 다음  $4^\circ\text{C}$ 의 first washing buffer(PBS 450 ml, ACD 50 ml, 20%  $\text{NaN}_3$  5 ml, gamma globulin free horse serum 10 ml, 250mM EDTA 20 ml, 0.5% phenol red 1 ml)로 3회 원심(2,000 rpm, 3분,  $4^\circ\text{C}$ ) 세척한 후 상층액을 버리고 밑부분에 모인 백혈구의 pellet을 plate 또는 vortex mixer를 이용하여 부유시켰다.

부유된 백혈구는 secondary antibody로 단일 염색을 하기 위하여 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM antibody(Caltag Lab, Inc, U.S.A)를 200배 희석한 후 각 well에  $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 이를 다시  $4^\circ\text{C}$ 에서 30분간 감각시킨 다음  $4^\circ\text{C}$ 의 secondary washing buffer(first washing buffer 성분중 horse serum만 제거한 것)로 3회 원심 세척한 다음 2% PBS-formalin(38% formalin 20 ml, PBS 980 ml) 용액을  $200 \mu\text{l/well}$  되게 가하여 고정시킨 후 염색이 끝난 세포들은 검사때까지 모두 냉암소( $4^\circ\text{C}$ )에 보관하였다.

염색이 완료된 재료는 flow cytometry를 이용하여 총 2,000개 이상의 세포를 검사하여 양성반응 세포수를 측정하였다. 측정과 자료분석은 Becton Dickinson사의 Consort 32 컴퓨터 및 Lysys program을 이용하여 실시하였다.

#### (나) 림프구 증식 반응

림프구는 Kehrlí 등의 percoll을 이용한 방법에 따라 순수 분리하였다. ACD액을 넣은 혈액을 1,500 rpm, 30분 원심 분리한 후 buffy coat cell를 분리하여 Dulbecco's modified Eagles's medium(DMEM, Gibco)배지에 부유시

킨 뒤 percoll(비중 1.083, Sigma)에 중층시킨 후 1,500 rpm 으로 20분간 원심 분리한 다음 percoll과 혈장과의 경계면에서 림프구를 채취하였다. 분리된 림프구는 PBS로 3회 세척하여 15% fetal bovine serum 이 함유된 DMEM 배지가 들어있는 조직배양용 플라스틱 샬레에 5 ml 씩 분주한 다음 CO<sub>2</sub> 항온기(37°C)에서 2시간 배양하였다. 그 뒤 부유 세포만을 선택하여 trypan blue 염색과 hemacytometer를 이용하여 현미경하에서 계산한 뒤  $1 \times 10^6$ /ml 되게 조정하여 부유시켰다.

분리한 림프구를  $10^4$ /well로 조절하여 96 well U-bottom microplate에 분주한 다음, Con A, pokeweed mitogen(PWM), *Salmonella typhimurium* 유래의 water soluble proteinaceous 추출물(STM), *Escherichia coli* 유래의 lipopolysaccharide(LPS) 등 4종의 mitogen을 적정농도별로 100  $\mu$ l씩 가하여 실험실내에서 반응시켰다. 48시간 후 <sup>3</sup>H-thymidine 1  $\mu$ ci 씩 첨가하여 다시 18시간 배양 후 cell harvester에 의해 glass fiber filter paper에 흡착시켜 실온에서 건조시킨 다음 scintillation tube에 filter disc를 넣어 4 ml scintillation cocktail로 용해시켰다. 모든 작업이 완료된 후  $\beta$ -liquid scintillation counter(Packard Model 1,600 TCR)로 방사능 활성을 측정하였으며 모든 실험은 3개 well의 평균치를 구하였다.

## (2) 유전면역기법 분석

### (가) BoLA-DRB3 analysis

유전면역기법 분석을 위해 구조적적합 항원중 BoLA DRB3중 exon2의 유전자를 유전자증폭방법(PCR)을 이용하여 증폭시킨후 이들의 유전인자형을 제한효소를 이용하여 유전자를 절단시킨후 전기영동을 통하여 유전자 유형을 분석하였다.

<Table 3> Preparation of Primers : specific for the second exon of the BoLA DRB3 locus

Primer	sequence	location
HLO30	5'-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3'	- seven nucleotide of the 5' end of exon2
HLO31	5'-TTTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCGT-3'	- eight nucleotides of the 3' end of exon 2 plus intron sequence
HLO32	5'-TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC-3'	- nucleotides at the 3' end of exon 2 and eight base pairs overlap with the 3' end of HLO31

\* Primers were synthesized using DNA/RNA synthesizer( ABI 392 )

#### (나) PCR 기법 확립

##### 1) 혈액으로부터 백혈구 분리

목장에서 헤파린 처리된 Vacuum container를 이용하여 젖소의 미정맥을 통하여 혈액을 채취하였다. 실험실에 5°C를 유지하면서 운반한 후, 실험실에서 800 rpm으로 30분간 원심하였다. 15 ml conical tube에서 원심시킨후 한 층으로 형성된 Buffy coat층만 수거하여 시험관에 옮겼다. 이어 6 ml D.W와 6 ml PBS를 동량 첨가하여 부유시키면서 적혈구를 용혈시키면서 제거하였다. 15ml 원심관을 이용 1,000~1,200 rpm 으로 15분간 원심시킨 후 상층액을 버리고 2 ml PBS로 pellet을 다시 부유시킨후, 두개의 작은병에 나누어 담아 -70°C에 보관하면서 DNA 분리 및 시험에 공시하였다.

##### 2) 백혈구로부터 DNA 분리

PBS로 부유된 buffy coat로부터 DNA를 분리하기 위하여 -70°C에 보관중인 백혈구를 취하여 30  $\mu$ l 백혈구 부유액중에 100  $\mu$ l proteinase K buffer를 첨가하였고 여기에 4  $\mu$ l의 proteinase K(4mg/ml)를 첨가하여 37°C 에



서 2~3시간 작용시켰다. 여기에 사용된 proteinase K를 다시 불활화 시키기 위하여 94°C에서 10분간 작용하였다.

### 3) PCR 실시

정확한 증폭을 위해 백혈구 중에 있는 구조적 적합항원내 유전자를 확인하기 위해 실시된 PCR은 Round 1, Round 2 등 2회에 걸쳐 PCR를 실시하였다. 한번 확인시 여러 sample을 동시에 처리하기 위해 master mix를 만들어서 시험오차를 줄였다.

Round 1		Round 2	
DNA	10 $\mu$ l	DNA (1차 생산물)	3.5 $\mu$ l
dNTPs	5 $\mu$ l	dNTPs	5 $\mu$ l
10X PCR buffer	5 $\mu$ l	10X PCR buffer	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1.5 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub>	1.5 $\mu$ l
primer #30	4 $\mu$ l	primer #30	4 $\mu$ l
primer #31	4 $\mu$ l	primer #32	4 $\mu$ l
Distilled water	20.5 $\mu$ l	Distilled water	20.5 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l	Total	50.5 $\mu$ l

제 1차 PCR을 위해 40  $\mu$ l의 master mix에 각각 10  $\mu$ l의 DNA를 첨가하였고, 각 Tube에 50  $\mu$ l의 mineral oil를 첨가한 후 2-3초간 원심하여 mix시켰다. PCR 기계를 80°C로 맞추어 놓은 후 각 Well 마다 광유를 첨가, 시료 tube를 well에 넣고, 0.4  $\mu$ l의 Taq polymerase를 tube바닥에 까지 넣어 첨가

하였다. 효소는 반드시 -20℃ 냉동고에 보관하고, 얼음 상자에 보관하면서 운반하였고, 제 1차는 화일 #65로 10회 돌리고, 제2차는 화일 #69로 25회를 돌렸다. 광유가 첨가된 후 사용하는 피펫을 항상 닦으면서 사용하였다.

(3) 유방염 주요원인체 유전자 분석

(가) 표준균주 ; 유방염의 주요 원인체중 *Staphylococcus aureus*의 유전자 분석을 위하여 사용된 표준 균주의 성상을 보면 다음과 같다. 여기에서 생성된 독소 및 균주의 특성은 미국 아이다오 대학으로부터 확인되어 분양받아 사용하였다.

<Table 4> *S. aureus* reference strains used in this study

Reference Strains	Enterotoxin types
S.aureus MNHOCCH	SEB
S.aureus MNDON	SEC
S.aureus FRI 472	SED
S.aureus FRI 326	SEE
S.aureus MN8	TSST-1
S.aureus RN4220 pGIM 403	SEC-bovine
S.aureus FRI 913	SEA, SEC3, SEE and TSST-1

\* Reference strains were kindly provided by Dr. G.A. Bohach, University of Idaho, USA.

(나) 유방염 원인균 분리

유방염 원인균 분리는 혈액배지와 Baird Parker 배지를 사용하였으며, *S. aureus* 분리 동정은 Vitek Gram-Positive Identification Card (Vitek Systems, Inc., Hazelwood, Mo.)를 이용하여 실시하였다.

(다) DNA Preparation

분리된 유방염 원인균으로부터 DNA를 분리 하기 위하여 먼저 BHI broth에 37°C에서 18시간 배양하였으며 DNA분리는 Lysostaphin방법과 Boiling방법을 이용하였다.

(라) Primers

PCR에 사용한 Primer는 <Table 5>과 같다.

<Table 5> Preparation of primers

Genes	5' → 3'	Location within gene	Size of amplified products
sea SEA-1	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	490 - 509	
SEA-2	GAACCTTCCCATCAAAAACA	591 - 610	121
seb SEB-1	TCGCATCAAAGTACAAAGG	634 - 653	
SEB-2	GCAGGTACTCTATAAGTGCC	1091 - 1110	477
sec1 SEC-1	GACATAAAAGCTAGGAATTT	676 - 695	
SEC-2	AAATCGGATTAACATTATCC	913 - 932	257
sed SED-1	TAGATAAAGTTAAAACAAGC	354 - 373	
SED-2	TAACTTACCGTGGACCTTC	652 - 671	318
see SEE-1	TAGATAAAGTTAAAACAAGC	491 - 510	
SEE-2	TAACTTACCGTGGACCCTTC	640 - 659	169
tst TSST-1	ATGGCTATATACATTCAATT	251 - 270	
TSST-2	TTCCAATAACCACCCGTTT	581 - 600	350

(마) 특이성 및 민감성 조사

(1) 특이성(Specificity)

- Comparison with 23 species of other pathogenic bacteria

(2) 민감성(Sensitivity)

① Duplicated by standard plate count agar method

② 10-fold serial dilutions of bacterial cells in 20% skim milk

(바) PCR 반응조건

(1) Thermal conditions

① Denaturation : 1 min at 95°C

② Annealing : 2 min. at 56°C (for SEA,, SEC and SED)

or 50°C (for SEB, SEE and TSST-1)

③ extension : 1 min at 72°C.

④ No. of cycles : 30 cycles

(2) Analysis of amplified products

: Electrophoresis in 1.5% agarose gel.

## 2절 연구 결과

### 1. 유전면역학적기법 이용 구조적 적합항원 작성연구

#### 가. 구조적 적합항원 특이성 분석

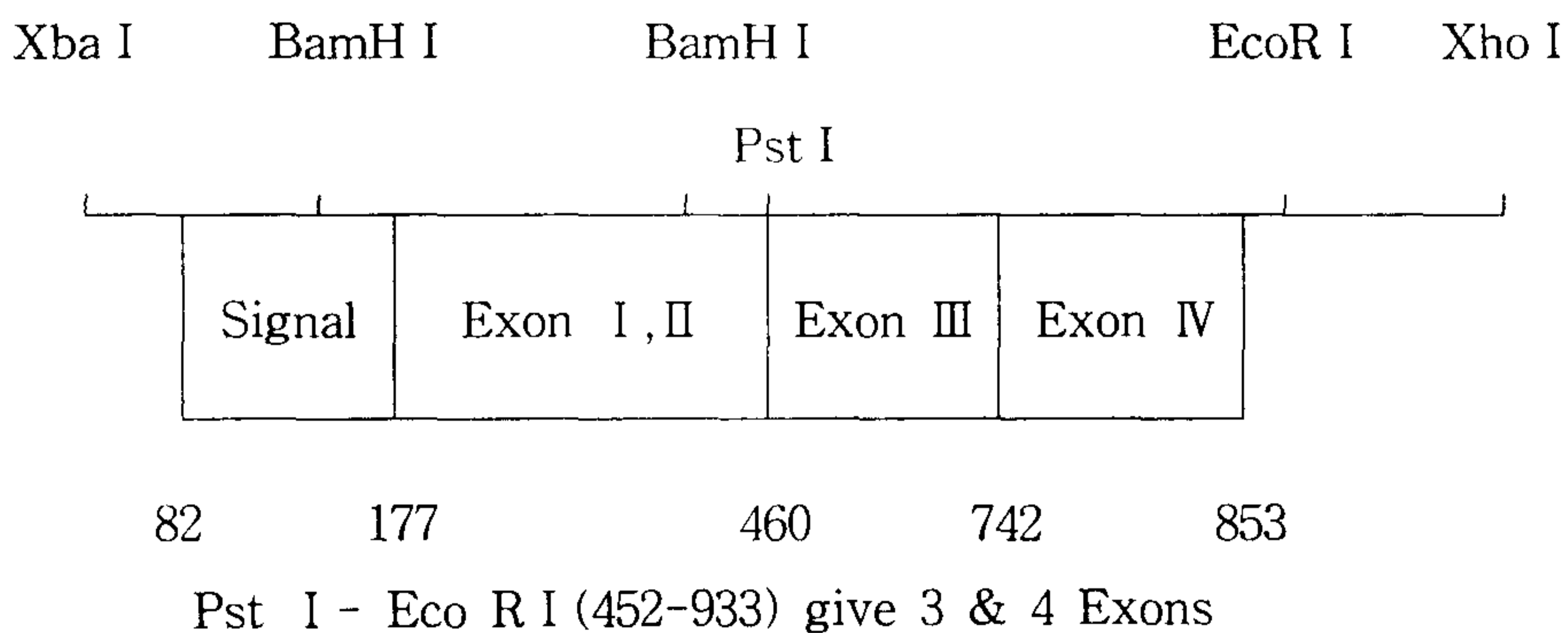
젓소에서 구조적 적합항원의 유전자 현황을 분석하기 위해 유전면역학적으로 질병의 내성양상과 관련이 있는 MHC-class II DNA에 대한 특이 DNA Probe의 작성이 필요하여 먼저 Bovine MHC-class II DQ, DR, DP 3가지의 Probe를 작성하였다.

젓소에서의 Probe작성을 위하여 먼저 사람에서 작성된 Probe를 이용하여 젓소의 혈액 중 백혈구를 분리하여 젓소 특이 공통항원 부위를 추출하였다.

#### ① Bovine MHC Class II (BoLA-DQ-DR) 특이 DNA Probe작성

A. Human MHC-class II DNA로 부터 共通 抗原 부위 추출(Exon III, IV)하여 아래와 같이 젓소 특이 구조적적합항원 유전자 probe를 제작하였다.

#### o DQ $\beta$ 1(wl.1)







한 후 Human cDNA library를 작성하였다. 작성된 cDNA library에서 Pst I 과 EcoR I 제한효소를 이용 작성하였다. 그 결과 Human MHC ClassII DQ  $\beta$  1(W1,1)의 Conserved Region인 exon 3와 exon 4에 해당되는 1.29 kb의 DNA fragment를 얻을 수 있었다. PstI - HindIII의 제한효소를 이용 그 중 절단하여 만든 DNA Probe는 HLA-DR  $\beta$  1의 Conserved Region인 exon 3, 4 및 5의 일부 DNA가 포함된 1,323 kb의 DNA fragment를 얻었다.

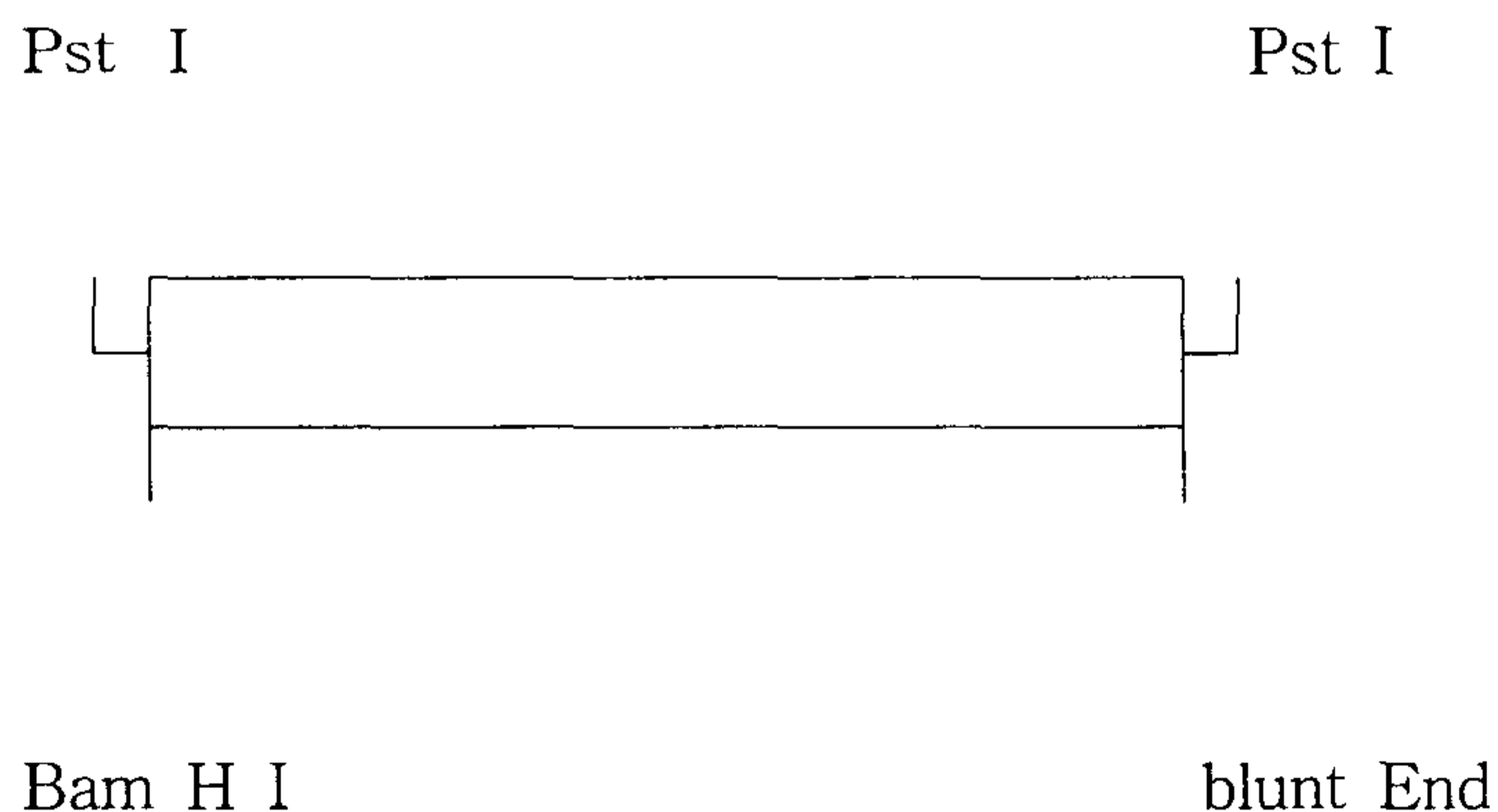
또한 Pst I 과 Sst I 의 제한효소를 이용하여 획득한 DNA Probe는 HLA-DP  $\beta$  (W2)에 해당되는 exon 3, 4 및 5의 일부인 1,172 kb의 DNA를 얻을 수 있었다.

나. 젓소 특이 구조적합항원 및 내성관련 항원 Typing

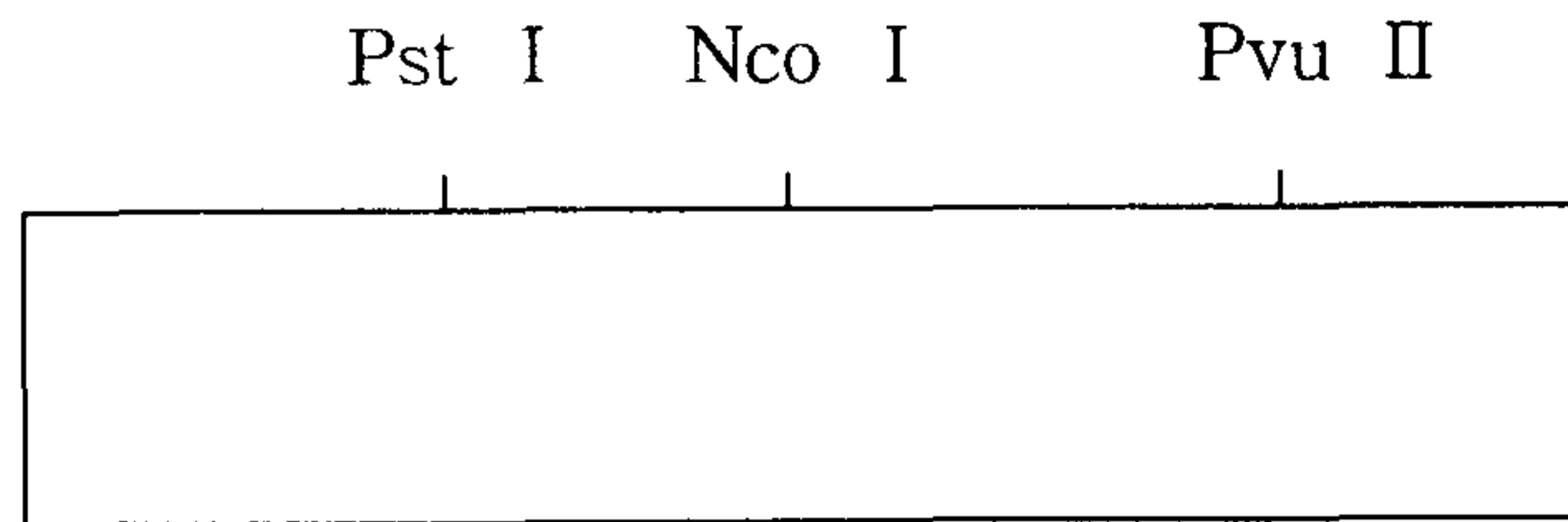
① Bovine DQ DNA Probe 작성 및 특이성 확인

A. Bovine MHC-class II DNA로 부터 직접 probe 작성

DQ  $\beta$  2 in Blueskript : Subcloned Pst I fragment into pUC 19로 2nd extracellular exon 특이 DNA probe를 아래와 같이 작성 하여 유방염 내성인자 확인에 이용 가능토록 하였다.



DR  $\beta$  2 in pGEM 3 : Xba I / EcoR I Excision 하여 2nd extracellular exon 특이 DNA probe 작성 (Inserted as Blunt and with Hin f I into Sma I site)



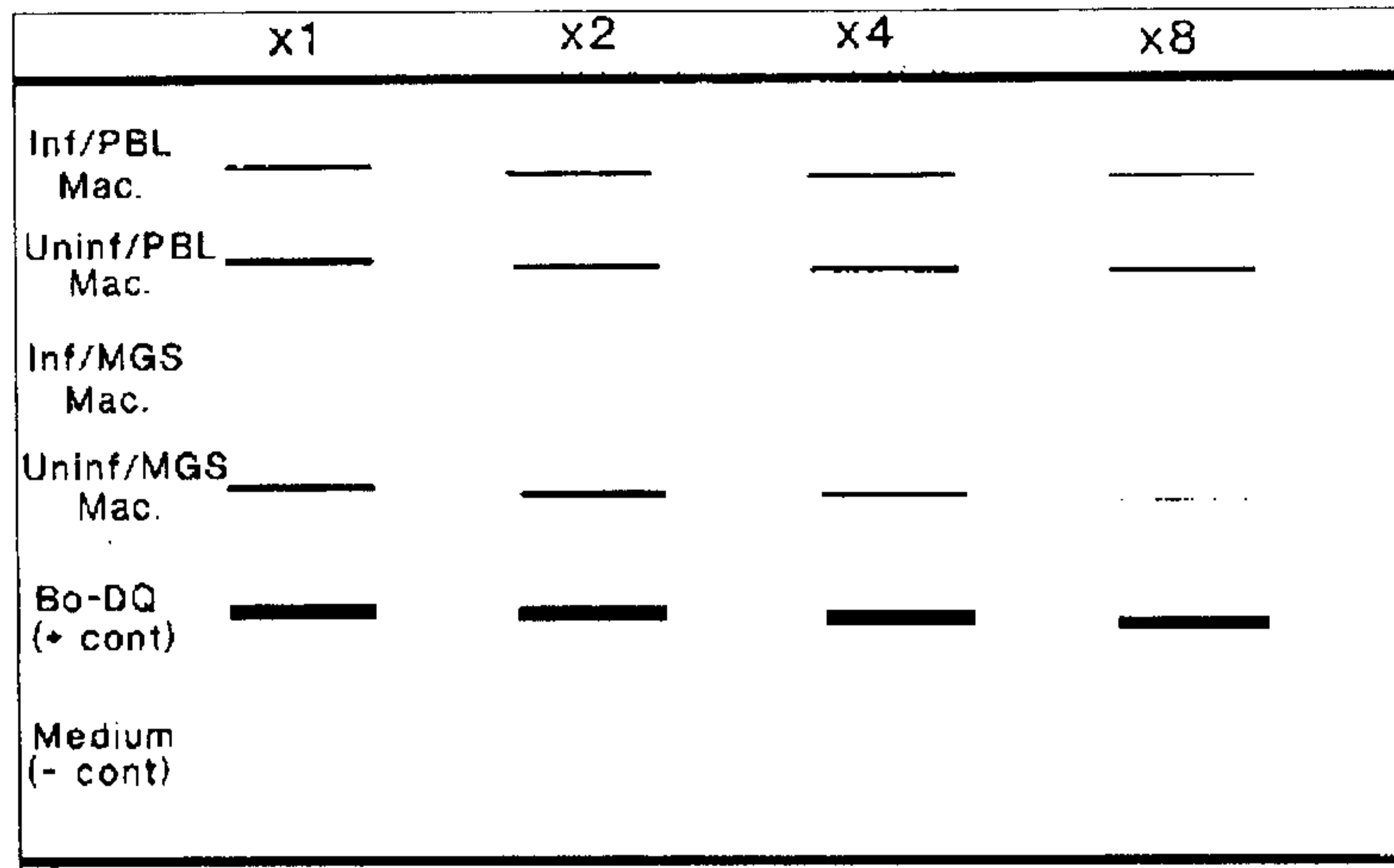
Random Primer를 이용하여  $^{32}\text{P}$ - $\alpha$ ATP로 label된 DNA Probe를 이용하여 0.7Kb size의 bovine MHC-Class II DQ의 특이성을 인정할 수 있었으며 Bam H I 제한효소를 이용하여 순수정제된 Human MHC-Class II DP DNA를 Probe로 확인하였다.

또한 Bovine DQ Probe의 특이성 확인은 Bovine cDNA library에서 직접 얻어진 MHC-Class II DQ Probe를 이용하였으며, Bovine DR Probe의 특이성은 Human MHC-Class II DR로부터 순수 분리한 DNA Probe를 이용하여 확인하였다.

bovine cDNA library에서 직접 얻어진 MHC-Class II DQ probe를 이용하여 특이성을 확인한 결과, Pst I 제한효소 이용 처리후 0.7 Kb 크기의 bovine MHC-Class II DQ DNA와 작용하였으나, 이는 human MHC-Class II DQ (1.29 kb)와도 작용함이 인정되었다.

#### B. DR Probe의 특이성 확인

DR Probe를 이용하여 Human MHC-Class II DR DNA로부터 확인한 결과, 1.3Kb의 Human DR DNA를 확인할 수 있었고, 이는 다시 bovine DR(0.45kb)와도 크게 반응하는 것이 인정되었으며 Bovine DR DNA와 반응시킨 결과 0.45 kb에서 인정되었다.



**Fig 1. Northern slot bolt analysis using P<sup>32</sup>-labelled bovine MHC-class II DQ probe**

다. 선발 내성우 및 감수성우의 유전면역학적 특성 확인

MHC class II DR 및 DQ 발현 림프구 분포가 감수성우에서 유의성 있게 감소되었으며, 혈액중 림프구에 비해 현저히 낮은 경향을 보였다. Single Laser beam 이용 Flow Cytometry 결과는 다음과 같다.

- MHC class II DP는 PBL에서는 87.6% MAM에서는 11.7%
- MHC class II DQ는 PBL에서는 83.7% MAM에서는 10.0%
- MHC class II DR는 PBL에서는 88.5% MAM에서는 12.3%

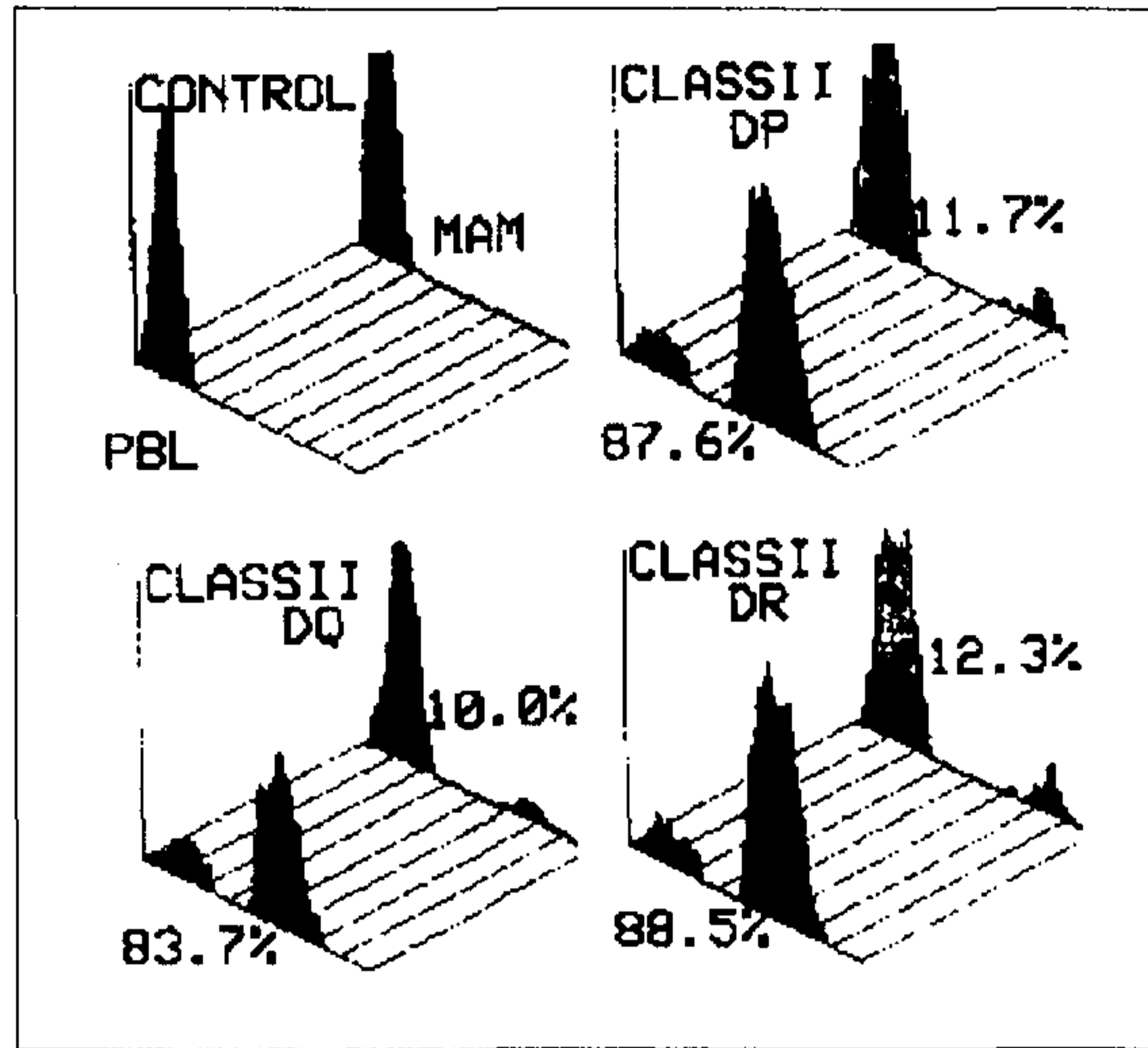


Fig 2. Suppressed expression of MHC-classII molecules by antigen-presenting cells from mammary gland of cows with *S. aureus* infection

## 2. 반응특이세포 특이성 및 내성인자 활성화와 질병원인체 내성인자 분석 및 분자 생물학적 연구

### 가. 젖소 유방염 특이 반응세포 선발

#### 1) Bovine CD2, CD4 및 CD8 항원능 비교 조사

세포성면역의 가장 중심적인 역할을 하며 Antigen-Presentation에 관여하는 Macrophage의 활성화 및 T helper 임파구의 활성화와 T cytotoxic 임파구의 성숙을 위하여 필수적인 Interleukin 유전자를 PCR 방법을 통하여 bovine 특이 IL-2 gene sequencing을 확인한 결과, 155 amino acid로 구성되어 있었으며 앞으로 이에 대한 PCR 특이성 및 감수성우와 내성우의 발현능을 mRNA 생성차원과 Protein 생성에 직접 관여하는 Post-translational modification 여부를 확인하는 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.



<Table 6> Proportion of Lymphocyte Subpopulations of Genetically Mastitis-resistant and susceptible Cows Analyzed by MoAbs specific to Bovine Leukocyte Differentiation and Flow Cytometry

MoAbs to Bovine Leukocyte Differentiation Antigen	Mean Proportion of Bovine Leukocyte Subpopulation			
	M G S		P B L	
	Mastitis resistant (n=6)	Mastitis susceptible (n=5)	Mastitis resistant (n=6)	Mastitis susceptible (n=5)
MHC-class II				
DP	78.5	31.2	35.1	43.0
DQ	59.8	31.2	38.0	47.4
DR	68.0	21.6	42.3	42.5
CD 2	38.25	13.0	31.4	19.4
CD 4	27.90	7.7	15.4	2.3
CD 8	8.6	18.5	6.1	15.1
Non T / Non B (N)	10.1	3.4	6.0	2.3
sIgM (B)	31.6	15.7	21.0	34.4
Activated T,N	33.3	19.0	6.6	11.2
Activated CD 8	5.8	10.8	7.9	8.7
IL-2 receptor	13.45	4.3	7.5	2.9
$\gamma\delta$ - TCR $\oplus$ N1	20.25	14.5	6.4	5.8
$\gamma\delta$ - TCR $\oplus$ N2	17.65	8.5	9.5	7.7
CD 4 / CD 8 ratio	3.2	0.42	2.5	0.15

또한 거의 모든 T 림프구가 소유하고 있는 CD2 surface marker와 Th/i 림프구 특이 CD4는 높은 비율로 나타났으나, Tc/s 림프구 특이 CD8 marker는 매우 낮은 것으로 나타났다. MHC-ClassII 항원과 원인체가 peptide로 분쇄되어 결합된후, T림프구에 전달되어 면역반응을 유도할 때, 결합력 및 면역기능 강화에 중요한 역할을 하는 CD2 및 CD4 marker 소유 림프구의 증가는 중요한 의미가 있다.

한편 CD4+/CD8+ 비율을 유방염 내성우와 유방염 감수성우에서의 분포비율을 조사한 결과, 유방염 내성우에서 3.2 감수성우에서 0.42로 각각 나타났다.

## 2) N 및 $\gamma\delta$ T cell receptor 소유 림프구 분포율 비교

T림프구 및 B림프구 외에 숙주 생체방어기전에 주요한 역할을 하고 있다는 최근 보고에 의한 N 림프구의 분포율을 조사해본 결과, 유방염 내성우에서 매우 높은 비율의 N림프구, 특히  $\gamma\delta$  (T cell receptor-1) - T 림프구 수용체 소유가 매우 높게 나타난 것을 알 수 있었다. 이와 같이 비특이 면역증강 및 방어기전 형성에 있어서의 N림프구의 상대적인 급증은 앞으로 질병내성 유전자 분석과 함께 병행되어 연구가 이루어져야 할 분야로서 관심이 높다고 할 수 있다.

## 나. 반응세포의 능력 및 유전자분석

### 1) 구조적 적합항원 제2등급 (MHC-ClassII) 항원발현능력 비교

반추류 백혈구 표면특이 단크론항체를 이용하여 선발된 유전적으로 유방염 내성우 및 감수성우로 부터 채취된 유즙 백혈구를 분리하였다. 이들을 생체방어기전의 중심적 면역체계인 구조적적합 항원에 대한 3종의 단크론항체(MHC-에, DQ와 DR)와 작용시킨후 FITC-conjugate goat anti-mouse IgG+M(light and heavy chain specific)를 2항체로 이용하여

반응시켰다. V-bottom의 96well micro-plate로 부터 얻어진 각각의 반응은 Flow Cytometry (Beckton-Dickison FACScan 420)를 이용하였고 Consort 32 Software Program으로 정밀 분석하였다.

그 결과 유방염 내성우의 유즙중 림프구는 유방염 감수성우에 비하여 MHC-DP,DQ 및 DR 항원 발현능이 유의성 있게 높은 것으로 나타났다. 이는 외부로부터 질병원인체의 생체 침입시 원인체 탐식과 이를 분해한 후 T 림프구에 전달시킬 때 중심적인 역할을 하는 macrophage의 MHC Class II molecule의 비율이 증가함으로써 보다 효율적인 생체방어체계를 구축할 수 있게 된다는 것을 시사해 주고 있다.

#### 다. 인터루킨-2 (IL-2) 수용체 발현 림프구 조사

1) 혈액중 N 림프구 및 IL-2발현 림프구의 분포를 조사해 본 결과 유방염 내성우에서 1.2배의 높은 분포율을 나타낸 반면, B 림프구의 분포는 오히려 유방염 감수성우에서 높게 나타났음을 알 수 있었다. 이는 세포성 면역에 중심으로 역할을 하는 N. T림프구의 활력이 유방염 내성우에서 강하게 나타나 유방염을 세포면역 차원에서 방어하는 능력을 소유하는 반면 감수성우에서는 체액성 면역이 주요하게 작용하는 B림프구의 활성화로 유방염에 잘 걸리는 우군에서 높은 비율을 보였다.

2)  $\gamma \delta$  T 림프구에 대한 각각의 분포율을 비교 조사한 결과, 유방염 내성우에서 3배이상의 높은 민감한 반응을 보여 이는 유방염 원인체나 유방내로 침투시 세포성 면역기전이 신속하게 반응하여 각 균들에 매우 민감하고 효율적으로 대처하여 질병 발생초기에 방어하여 유방염에 걸리지 않도록 대처함을 알 수 있었다.

#### 라. 유방염 감염우와 내성우간의 반응세포분석

5세대 Generation 분석에 의한 유방염 발생 빈도를 조사하여 유방염

저항우 8두와 감수성우 7두를 선발하여 말초혈액중에서 Lymphocyte subpopulation을 분석하였다. 그결과 <Table 7>에서와 같이 유방염 내성우와 감수성우 사이에 림프구 세포 활성도를 비교 분석한 결과, CD4/CD8 비율이 감수성우에서는 0.8밖에 되지 않았지만 내성우에서는 1.34로 높게 나타났다.

Table 7. 젖소 유방염 감수성우와 내성우간의 세포 분포 현황

Mastitis	BoLA Class I	BoLA Class II	BoCD2	BoCD4	BoCD8	N cell	B cell	Monocyte	CD4/CD8 ratio
Susceptible	86.9	51.2	28.3	9.8	12.9	11.4	29.4	28.2	0.8
Resistant	92.2	69.8	15.4	9.6	7.25	5.8	42	12.3	1.34

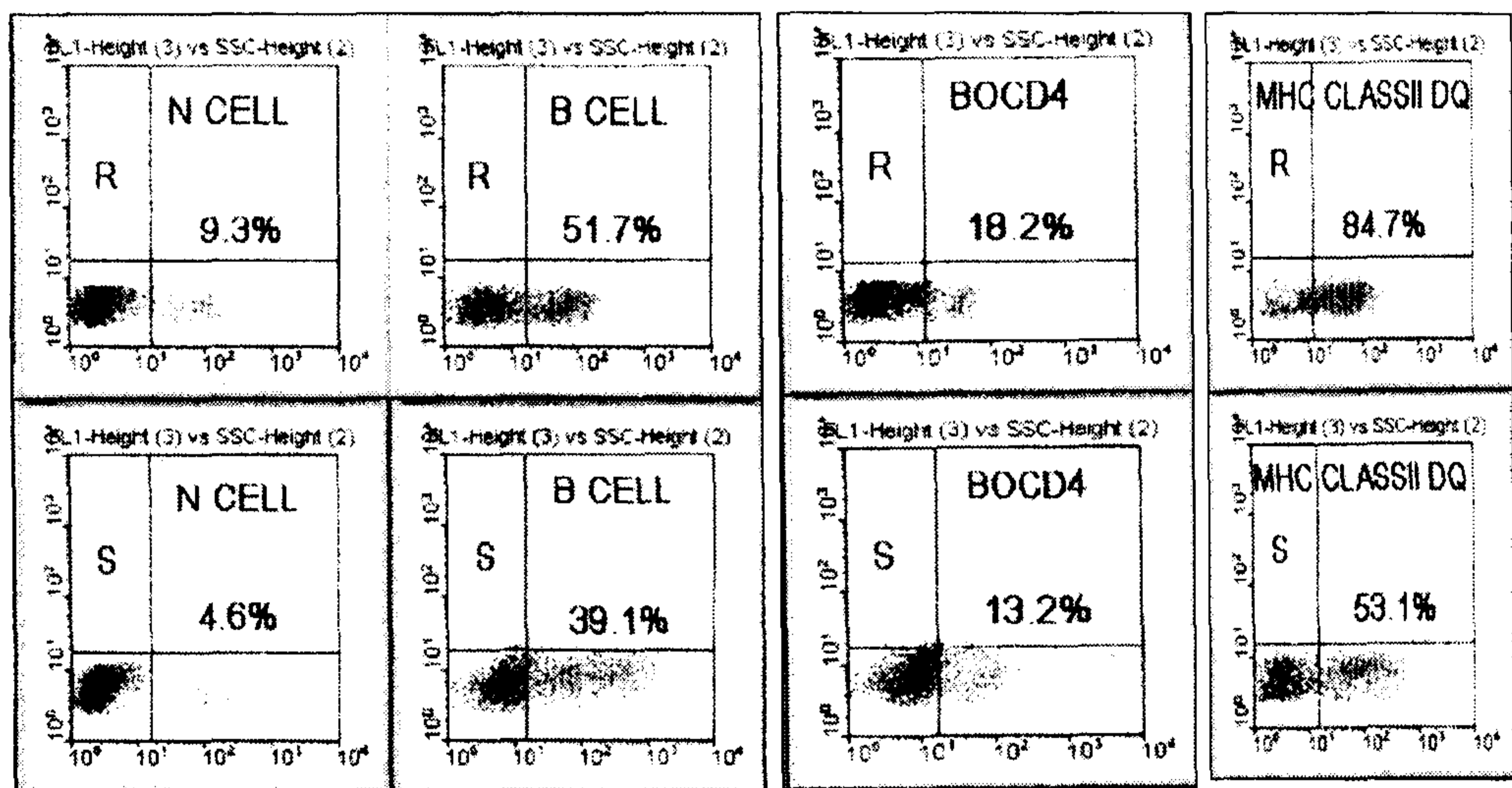


그림 3. 유방염 감수성우와 내성우간의 반응세포 분포현황

(R: 내성우, S: 감수성우)



마. 유방염 내성 선발 유전자 활성화

1) BoLA-DRB3 Typing

o 특이 primer의 합성

BoLA-DRB3 second exon의 증폭에 이용된 primer는 Groenen 등 (1990)의 보고에 따른 BoLA-DRB3 allele sequence에 준하여 합성하였고 PCR의 특이성을 높이기 위해 heminesting법을 이용하여 2단계에 걸쳐서 PCR을 실시하였다.

<Table 8> Nucleotide sequences of HLO 30, HLO31, and HLO32

Primers	Nucleotide sequences	Sources
HLO 30	5'-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3'	BoLA-DRB3 exon 2의 5' end 7 bp와 intron Exon 2의 3' end의 8 bp와 intron
HLO 31	5'-TTTAAATTGCGCTCACTCGCGCT-3'	Exon 2의 3' end와 HLO 31의 3' end의 8 bp
HLO 32	5'-TCGCGCTGCACAGTGAACTCTC-3'	중첩

o PCR을 통한 BoLA-DRB3 exon 2의 증폭

Genomic DNA는 Marcus 등의 방법에 따라 젓소의 말초 혈액으로부터 분리하였다. 250µl의 anticoagulated blood에 500µl 증류수를 가하여 적혈구를 용혈시킨 다음 원심 침전하여 백혈구만 모았다. 10µl의 0.1N NaOH와 2M NaCl을 넣고 부드럽게 혼합하여 세포를 부유하였다. 세포가 완전히 부유되면 95°C-100°C heating block에서 2분간 처리하고 원심 침전하여 세포 찌꺼기를 버린 다음 상청액을 PCR에 이용하였다.

PCR은 분리한 20ng의 DNA를 이용하였고 50µl에 최종 농도 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>이 되도록 PCR buffer를 첨가하였고 100µM의 dNTP, 0.5µM DRB3 각 primer, 1 unit의 Taq polymerase를



넣은 다음 thermal cycler를 이용하여 증폭하였다. 1단계 thermal cycling은 94℃, 4분, denaturation, 94℃, 1분, 60℃, 2분, 72℃, 1분에서 10 cycles, 72℃, 5 분간 extension을 실시하였고 1단계의 PCR product 2μl을 취하여 2단계의 PCR template로 이용하였다. 2단계의 thermal cycling은 94℃, 4분, denaturation, 94℃, 1분, 65℃, 30초에서 25 cycles, 72℃, 5 분간의 extension으로 실시하였다. 1% agarose gel electrophoresis를 통하여 BoLA DRB3에 특이적인 284 bp의 PCR 산물을 확인하였다.

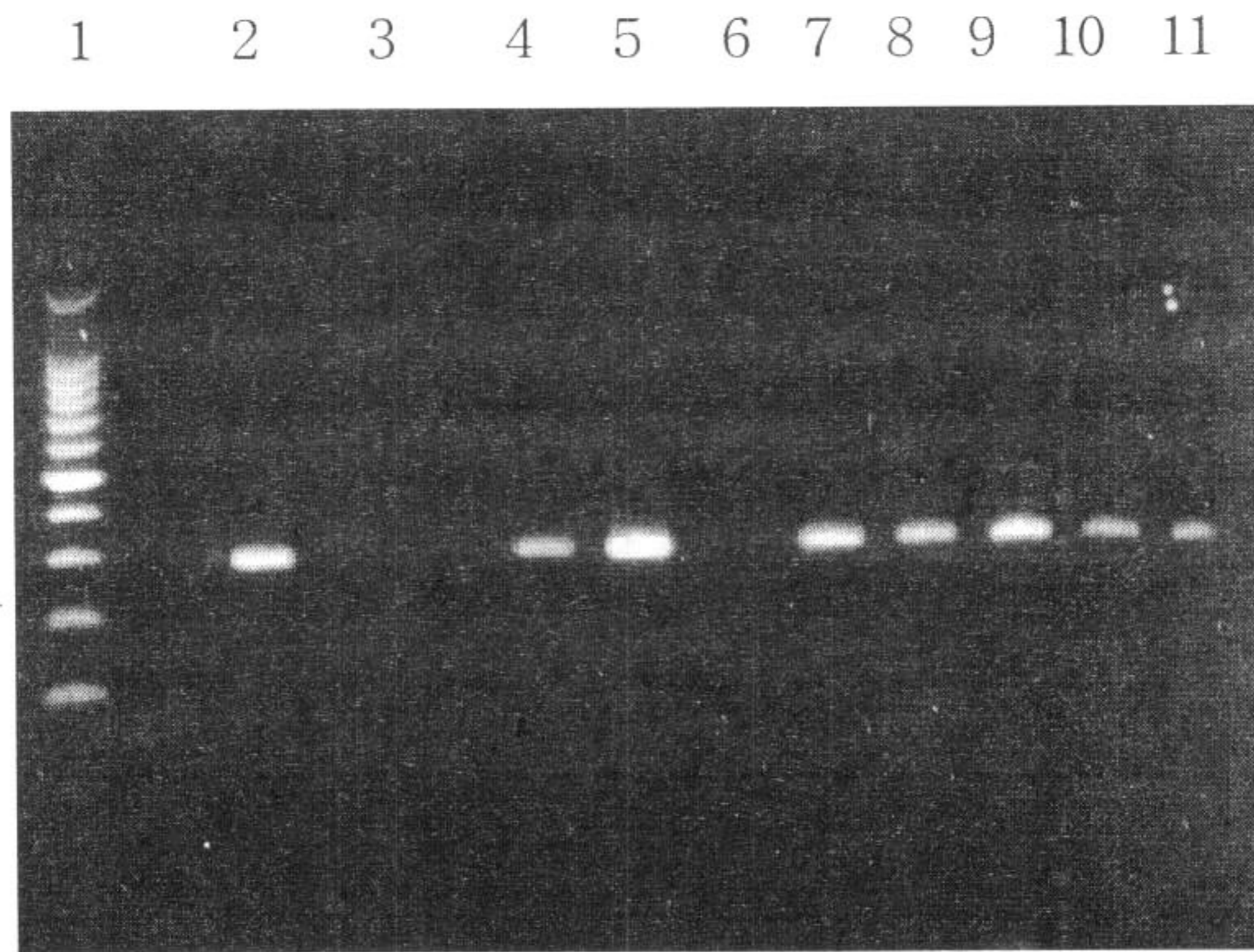


Fig 4. Electrophoretic analyses of PCR amplified products of BoLA-DRB3 exon 2 gene on 1% agarose gel.  
 Lane ; 1 : 100bp ladder DNA marker, 2 : -ve control,  
 3 - 5 : 우돈목장, 6 - 11 : 영환 목장

o MHC Class II Gene RFLP 결과

Marker    1    2    3    4    5    6    7    8    9

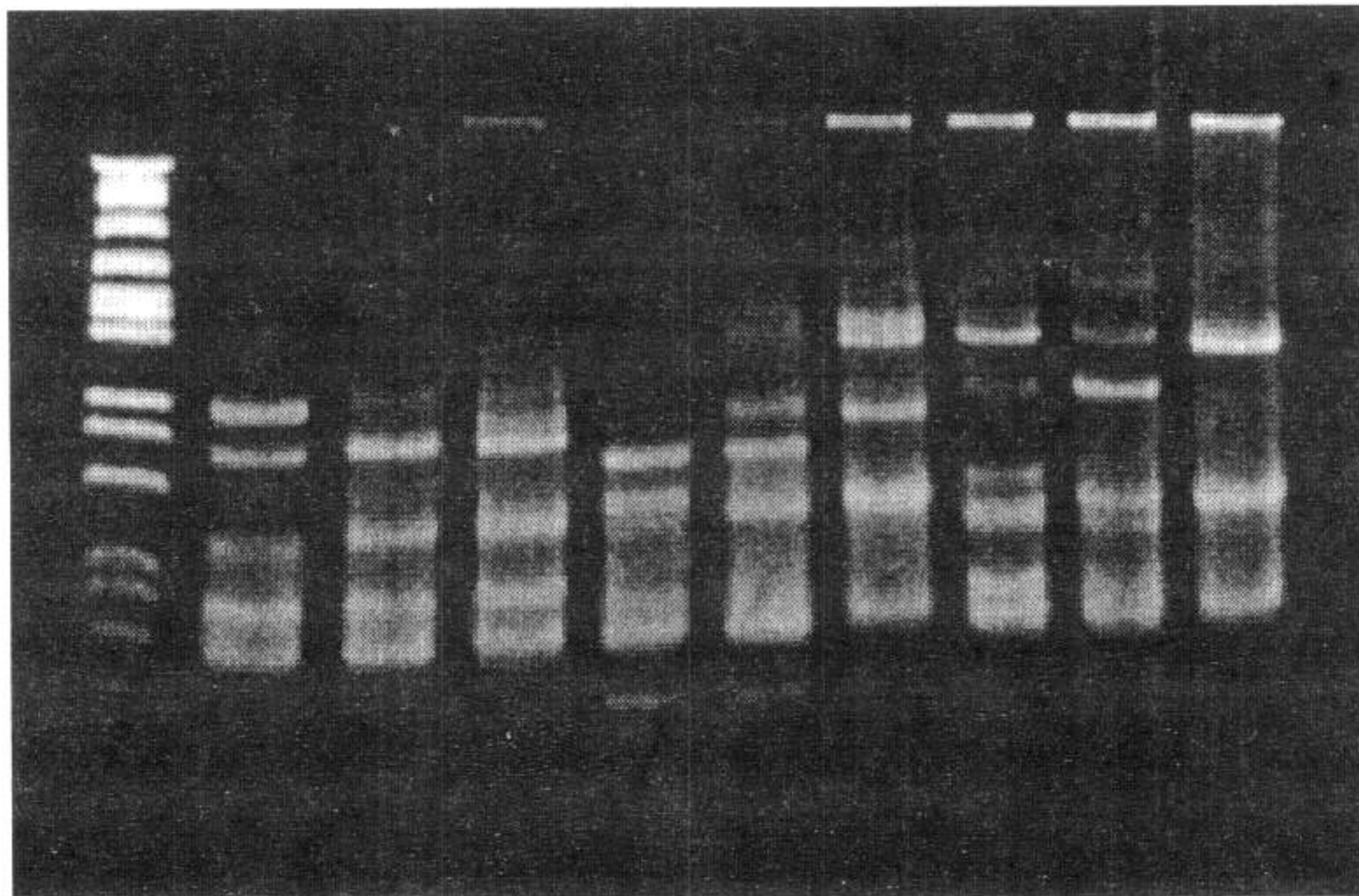


Fig 5. PCR 생산물에 대한 제한효소 처리결과  
 Lane ; 1 - 3 : *Hae* III, 4 - 6 : *Rsa* I, 7 - 9 : *Xho* II, 영환 목장



Marker

PBR322,/MSP-1    1    2    3    4    5

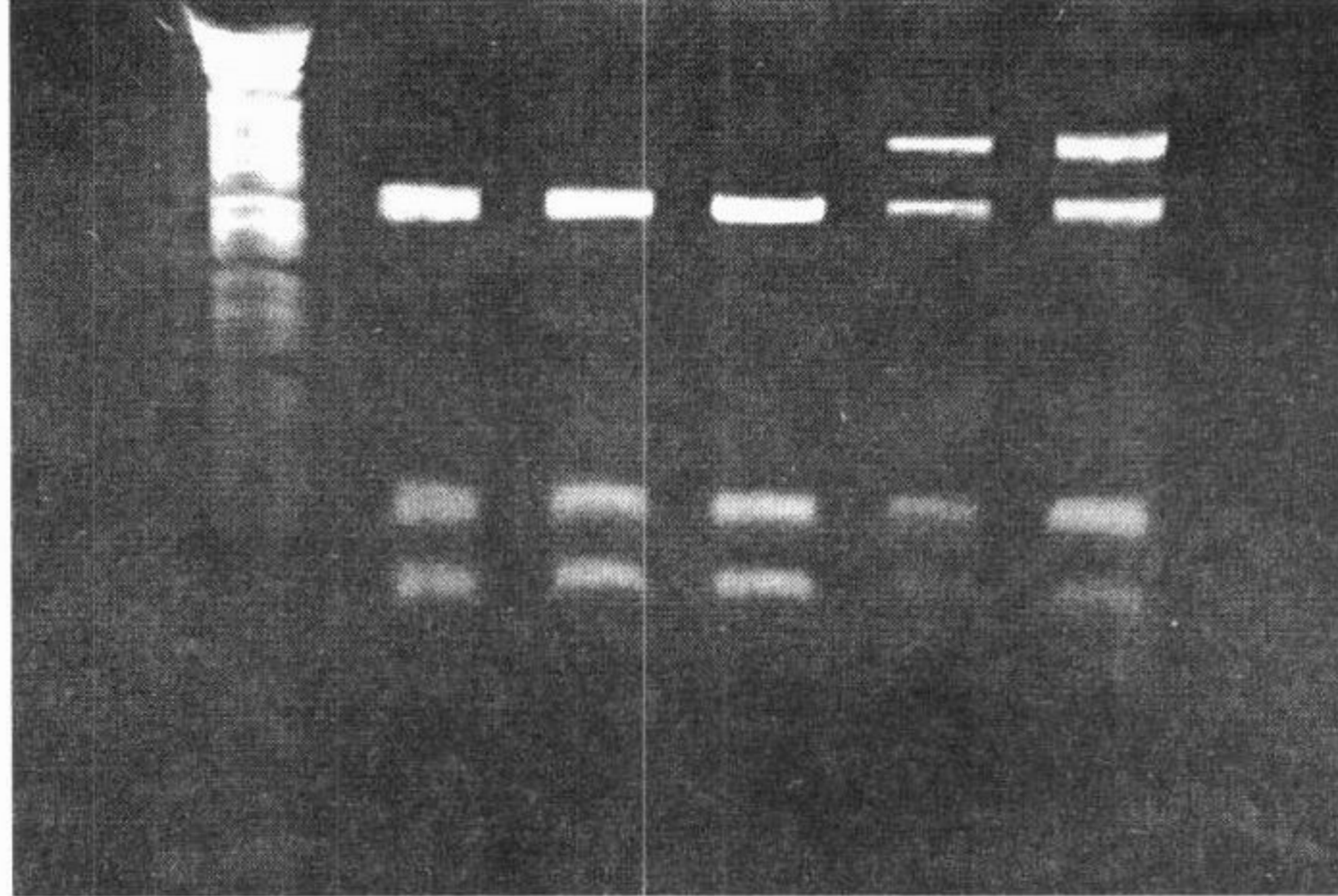


Fig 6. *BstYI* 제한효소 처리결과

Marker

PBR322,/MSP-1    1    2    3    4    5

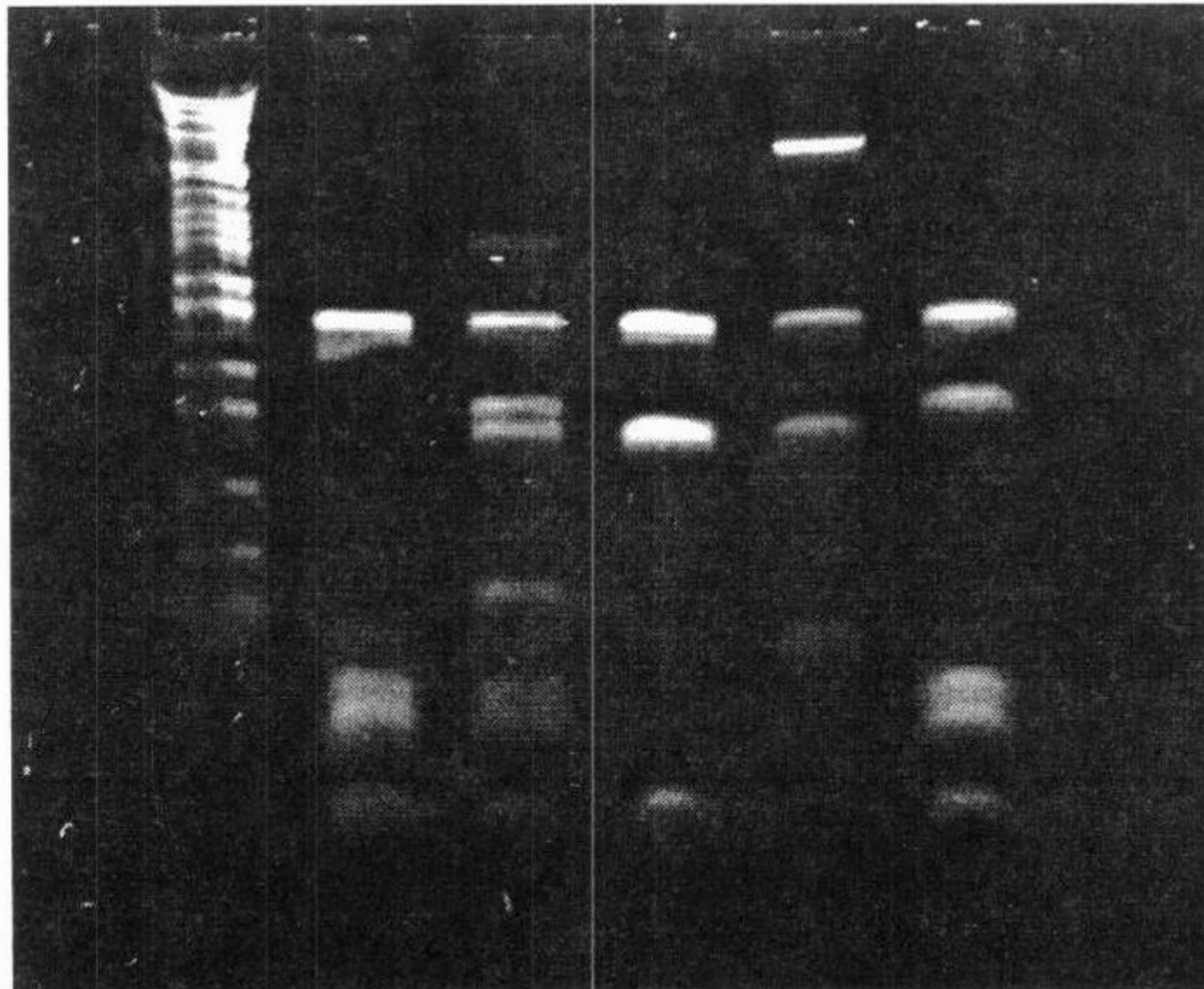


Fig 7. *HaeIII* 제한효소 처리결과



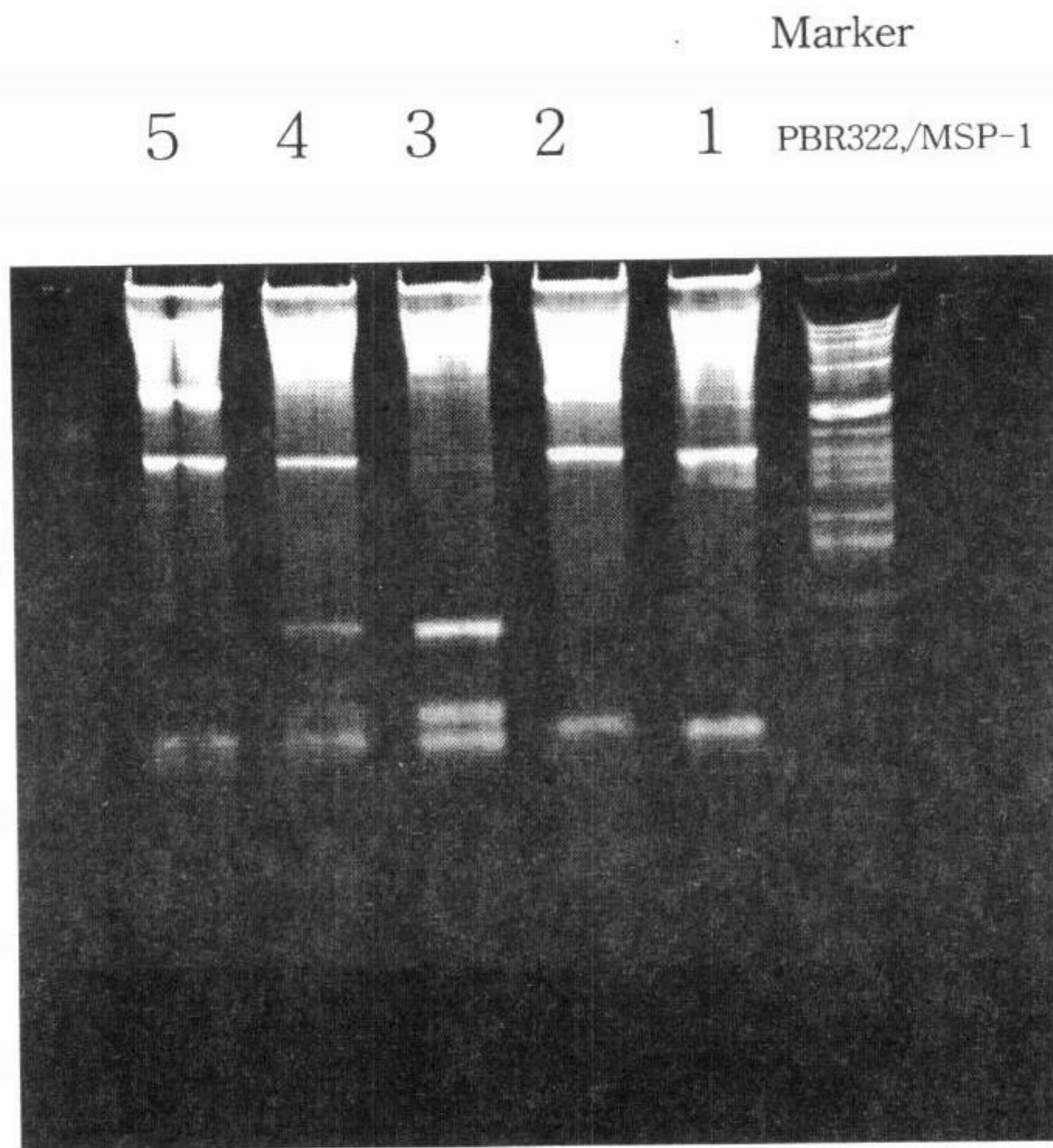


Fig 8. *RsaI* 제한효소 처리결과

야외에서 채취한 젖소 혈액으로부터 백혈구를 분리하여 DNA를 추출한 후 PCR 특이성을 높이기 위해 heminesting법을 이용 2단계 PCR를 실시한 후 생산된 PCR product를 확인한 후 *Bst*YI, *Hae*III 및 *Rsa*I의 제한효소를 이용 절단하여 MHC Class II gene에 대한 RFLP 즉 BoLA typing를 실시하였다.

*Bst*YI의 제한효소로 절단한 재료들은 3개의 fragments 3개, 4개의 fragments 2개를 나타냈고, 같은 Sample의 혈액에서 *Hae*III의 제한효소로 절단한 경우에는 1번이 4개, 2번은 7개, 3번이 3개 4번이 4개, 5번은 5개의 다양한 유형을 보였으며, *Rsa* I으로 처리한 경우에는 1, 2, 5번이 2개의 fragments과 3, 4 번이 각각 3개씩으로 3가지 그룹으로 typing 되는 것을 알 수 있었다.

BoLA-DRB3 exon2의 특이적인 primer를 이용한 PCR을 통하여 284bp의 증폭 산물을 확인하였고, 1차 15두에 대해 Rsa I, Xho II, Hind III 3종의 제한 효소를 처리한 결과 기히 보고된 DRB3. 2\*8 (감수성우) 및 2\*11(내성우) 등과 유사한 4종의 haplotypes을 확인할 수 있었다. sequencing data를 확보하는 대로 보고된 haplotypes과 비교 분석 할 수 있을 것으로 사료된다.

앞으로 더욱 많은 Sample에서 typing을 실시하여 유방염 내성우와 감수성우에서의 유형을 감별해야 할 것으로 생각된다.

#### 바. 적용개체 반응 분석

##### 1) 획득된 PCR산물에 대한 제한효소 처리후 개체별 내성능력 비교

유방염 내성우 조기 선발을 위한 RFLP실시(BstYI, HaeIII, Rsa I)한 후 목장별 개체별 내성유전자 지속적으로 조사 분석

#### 3. 젖소 유방염 발생유도 특이독소 단백질 변이 이용 연구

##### 가. 젖소 유방염 특이 독소에 대한 Typing

###### a) Multiplex PCR을 이용한 특이 독소 Typing 기법 확립

Multiplex PCR을 이용하여 *S. aureus*의 enterotoxin A, B, C, D, E 와 TSST-1 독소를 typing 하는 기법을 확립하였고, 이를 이용하여 유방염 감염 우유로부터 toxin type를 확인할 수 있었다.

###### b) 독소형 확인

유방염 감염우유로부터 분리한 131주의 *S. aureus*에서 36 주(27.5%)가 한가지 이상의 enterotoxin을 분비함이 확인되었다.

SEC형이 10.7%로 가장 많았고, TSST-1 : 7.7%, SED : 6.9%, SEA : 4.6%로 각각 나타났다.



<Table 9> Prevalence of enterotoxin types produced by *S. aureus* strains in matitic milk

Enterotoxin Types Toxin producers	No. of Strains	Relative proportion of toxin types(%)	% of SE (+)ve <i>S. aureus</i> isolates
SEA	6	16.7	4.6
SEB	1	2.8	0.8
SEC	11	30.1	8.4
SED	8	22.2	6.1
SEE	0	0	0
TSST-1	5	13.9	3.8
SEB & TSST-1	1	2.8	0.8
SEB & TSST-1	3	8.3	2.3
SEB & TSST-1	1	2.8	0.8
Subtotal	36	100	27.5
Non-toxin producers	96	-	72.5
Total	131	-	100

#### 나. Crystallographic technique를 이용한 SEC 구조 연구

첫째, *Staphylococcus aureus*에 의해 생산된 SEC3는 Ammonium sulfate와 polyethylene glycol 400을 이용하여 결정화하였으며, 1.9Å의 해상도로 결정구조를 관찰하였다. 둘째, SEC3 분자는  $\alpha/\beta$  구조가 혼합된 다른 크기의 두 개의 domain으로 구성되어 있다(그림 9). 작은 domain (Domain 1)은 전형적인 oligonucleotide/oligosaccharide binding fold와 disulfide loop를 가지며, 큰 domain (Domain 2)은 5개의 antiparallel  $\beta$ -sheet와 일련의  $\alpha$ -helix로 구성되어 있다. 셋째, SEC3는 두 domain 사이의 공간에 얇은  $\alpha_3$  cavity와 긴  $\alpha_5$  groove를 형성하며,  $\alpha_5$  groove의 기저부에 zinc-binding site를 가진다(그림 10).

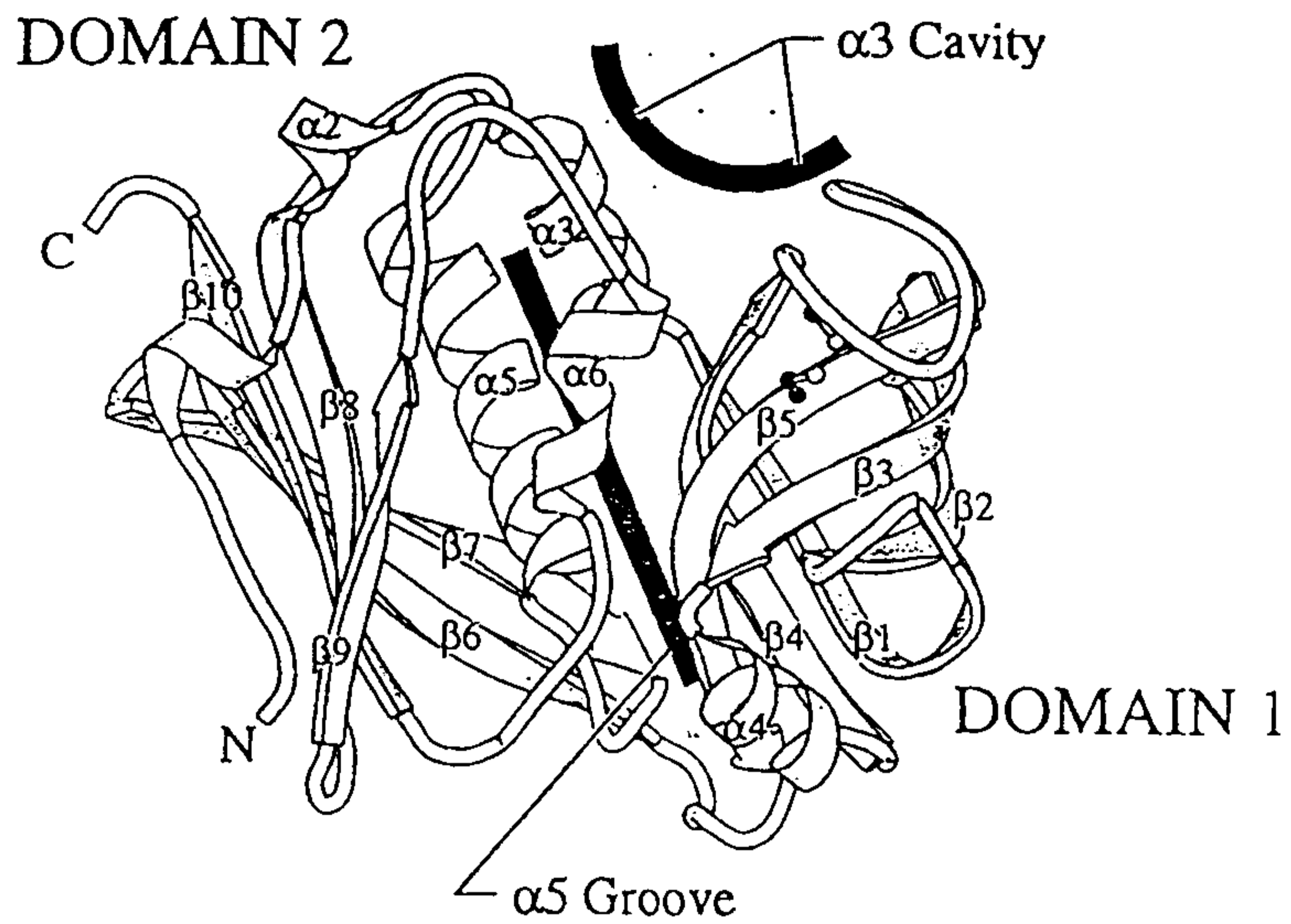


Fig. 9. Schematic diagrams of the SEC3 structure illustrating major structural features and proposed regions of biological importance.

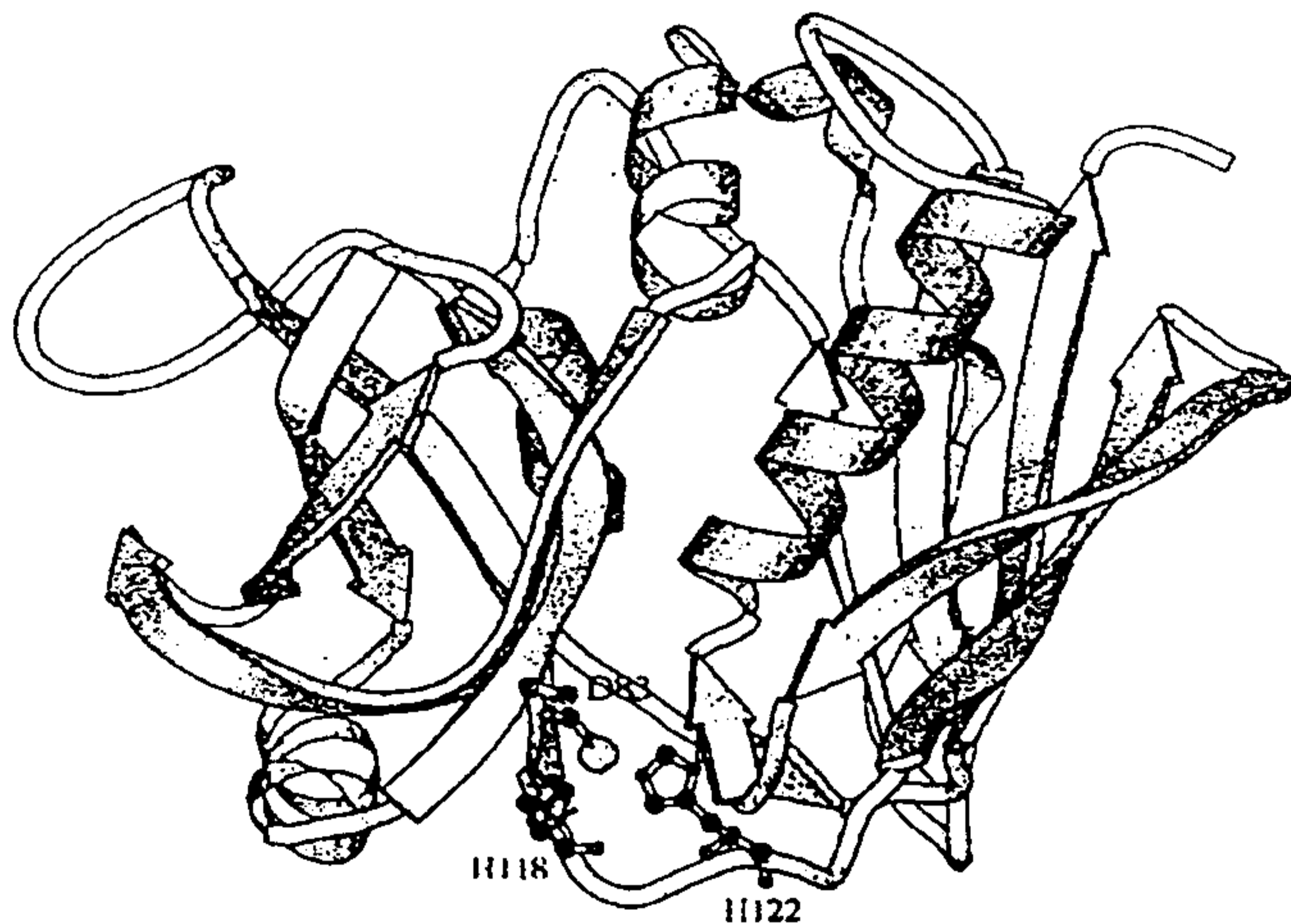


Fig. 10. Schematic diagram of the SEC3 molecules rotated  $180^\circ$  compared to Figure. 1 showing the zinc site at the base of the  $\alpha 5$  groove.

#### 다. SEC 독소의 변이형 및 유전자 분석

SEC 독소의 변이형 및 유전자 분석 결과를 요약하면 다음과 같다.

첫째, 기존에 밝혀진 SEC1, SEC2, 그리고 SEC3를 생산하는 균주와 사람, 식품, 그리고 소와 양 등 동물 유래 균주 중 SEC를 생산하는 균주를 선별하여 여러 biotype test, antibiogram, 그리고 phage typing을 실시하고 single-linkage cluster analysis를 통해 균주의 특성을 분석한 결과, 사람과 식품 유래의 SEC+ 균주는 기존에 보고된 SEC1, SEC2, 그리고 SEC3과는 차이를 나타내는 다양한 변이형을 나타내었으며, 소와 양에서 분리한 균주 역시 두 개의 다른 group으로 나눌 수 있었다.

둘째, SEC를 ammonium sulfate를 이용하여 정제한 후, SDS-PAGE와 IEF (isoelectric focusing)을 이용하여 분석한 결과, SDS-PAGE상에서 각각의 독소는 모두 약 27KDa 정도의 동일한 분자량을 나타내나, IEF 결과에서는 사람과 식품 유래의 균주가 생산하는 독소들은 매우 다양한 pI를 나타내는 것이 확인되었으며, 소와 양 유래의 SEC는 사람과 식품 유래 SEC와는 다르지만 서로간에 동일한 pI (7.6)를 나타내었다.

셋째, 선별된 균주의 *sec* 유전자를 clone하여 염기서열 분석을 실시하고 이로부터 추정되는 아미노서열을 밝히고 이를 비교 분석한 결과, 사람과 식품 유래의 균주에서 기존의 SEC subtype (SEC1, SEC2, SEC3)과는 일부 아미노기가 다른 아미노기로 치환된 변이형들이 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 소와 양 유래의 독소도 각각 다른 변이형임이 확인되었다 (Fig. 11).

			*	*	*	*	*	*	*		*	*	*
SEC1	1	ESQPDPTPDE	LHKASKFTGL	MENMKVLYDD	HYVSATKVKS	VDKFLAHDLI	YNISDKKLN	60					
SEC2	1	ESQPDPTPDE	LHKSSEFTGT	MGNMKYLYDD	HYVSATKVMS	VDKFLAHDLI	YNISDKKLN	60					
SEC3-FRI913	1	ESQPDMPDD	LHKSSEFTGT	MGNMKYLYDD	HYVSATKVKS	VDKFLAHDLI	YNISDKKLN	60					
SEC3-FRI909	1	ESQPDMPDD	LHKSSEFTGT	MGNMKYLYDD	HYVSATKVKS	VDKFLAHDLI	YNINDKLN	60					
SEC-MNCopeland	1	ESQPDPTPDE	LHKSSEFTGT	MGNMKYLYDD	HYVSATKVKS	VDKFLAHDLI	YNISDKKLN	60					
SEC-4446	1	ESQPDMPDD	LHKSSEFTGT	MGNMKYLYDD	HYVSATKVKS	VDKFLAHDLI	YNISDKRLN	60					
SEC-bovine	1	ESQPDPTPDE	LHKASKFTGL	MENMKVLYDD	RYVSATKVKS	VDKFLAHDLI	YNISDKKLN	60					
SEC-ovine	1	ESQPDPTPDE	LHKASKFTGL	MENMKVLYDD	RYVSATKVKS	VDKFLAHDLI	YNISDKKLN	60					
			*	*		*	*						
SEC1	61	YDKVKTELLN	EGLAKKYKDE	VVDVYGSNYY	VNCYFSSKDN	VGKVTGGKTC	MYGGITKHEG	120					
SEC2	61	YDKVKTELLN	EDLAKKYKDE	VVDVYGSNYY	VNCYFSSKDN	VGKVTGGKTC	MYGGITKHEG	120					
SEC3-FRI913	61	YDKVKTELLN	EDLAKKYKDE	VVDVYGSNYY	VNCYFSSKDN	VGKVTGGKTC	MYGGITKHEG	120					
SEC3-FRI909	61	YDKVKTELLN	EDLANKYKDE	VVDVYGSNYY	VNCYFSSKDN	VGKVTSGKTC	MYGGITKHEG	120					
SEC-MNCopeland	61	YDKVKTELLN	EDLAKKYKDE	VVDVYGSNYY	VNCYFSSKDN	VGKVTGGKTC	MYGGITKHEG	120					
SEC-4441	61	YDKVKTELLN	EDLAKKYKDE	VVDVYGSNYY	VNCYFSSKDN	VGKVTGGKTC	MYGGITKHEG	120					
SEC-bovine	61	YDKVKTELLN	EDLAKKYKDE	VVDVYGSNYY	VNCYFSSKDN	VGKVTGGKTC	MYGGITKHEG	120					
SEC-ovine	61	YDKVKTELLN	EDLAKKYKDE	VVDVYGSNYY	VNCCFSSKDN	VGKVTGGKTC	MYGGITKHEG	120					
			*	*		*							
SEC1	121	NHFDNGNLQN	VLIRVYENKR	NTISFEVQTD	KKSVTAEQELD	IKARNFLINK	KNLYEFNSSP	180					
SEC2	121	NHFDNGNLQN	VLIRVYENKR	NTISFEVQTD	KKSVTAEQELD	IKARNFLINK	KNLYEFNSSP	180					
SEC3-FRI913	121	NHFDNGNLQN	VLIRVYENKR	NTISFEVQTD	KKSVTAEQELD	IKARNFLINK	KNLYEFNSSP	180					
SEC3-FRI909	121	NHFDNGNLQN	VLIRVYENKR	NTISFEVQTD	KKSVTAEQELD	IKARNFLINK	KNLYEFNSSP	180					
SEC-MNCopeland	121	NHFDNGNLQN	VLIRVYENKR	NTISFEVQTD	KKSVTAEQELD	IKARNFLINK	KNLYEFNSSP	180					
SEC-4441	121	NHFDNGNLQN	VLVRVYENKR	NTISFEVQTD	KKSVTAEQELD	IKARNFLINK	KNLYEFNSSP	180					
SEC-bovine	121	NHFDNGKLQN	VLIRVYENKR	NTISFEVQTD	KKSVTAEQELD	IKARNFLINK	KNLYEFNSSP	180					
SEC-ovine	121	NHFDNGNLQN	VLIRVYENKR	NTISFEVQTD	KKSVTAEQELD	IKARSFLINK	KNLYEFNSSP	180					
			*		*	*	*						
SEC1	181	YETGYIKFIE	NNGNTFWYDM	MPAPGDKFDQ	SKYLMMYNDN	KTVDSKSVKI	EVHLTTKNGX	240					
SEC2	181	YETGYIKFIE	NNGNTFWYDM	MPAPGDKFDQ	SKYLMMYNDN	KTVDSKSVKI	EVHLTTKNGX	240					
SEC3-FRI913	181	YETGYIKFIE	NNGNTFWYDM	MPAPGDKFDQ	SKYLMMYNDN	KTVDSKSVKI	EVHLTTKNGX	240					
SEC3-FRI909	181	YETGYIKFIE	SNGNTFWYDM	MPAPGDKFDQ	SKYLMIYKDN	KMVDSKSVKI	EVHLTTKNGX	240					
SEC-MNCopeland	181	YETGYIKFIE	NNGNTFWYDM	MPAPGDKFDQ	SKYLMMYNDN	KTVDSKRVKI	EVHLTTKNGX	240					
SEC-4441	181	YETGYIKFIE	NNGNTFWYDM	MPAPGDKFDQ	SKYLMMYNDN	KTVDSKSVKI	EVHLTTKNGX	240					
SEC-bovine	181	YETGYIKFIE	NNGNTFWYDM	MPAPGDKFDQ	SKYLMMYNDN	KTVDSKSVKI	EVHLTTKNGX	240					
SEC-ovine	181	YETGYIKFIE	NNGNTFWYDM	MPAPGDKFDQ	SKYLMMYNDN	KTVDSKSVKI	EVHLTTKNGX	240					

Fig. 11. Alignment of the predicted primary sequences of the eight known SEC variants following cleavage of the signal peptide. The N terminus of each of the mature proteins was verified by amino acid sequencing. Amino acid positions that contain residues that are not conserved among all SEC are indicated by asterisks.



라. Deletion mutagenesis를 이용한 SEC1의 T 세포 증식에 관련된 구조와 기능 분석

Deletion mutagenesis를 이용한 SEC1의 T 세포 증식에 관련된 구조와 기능 분석한 결과를 요약하면 다음과 같다.

첫째 *sec+* MNDON 유전자의 exonuclease *Bal31* digestion 등에 의해 아미노 서열 6 - 33에 해당하는 잔기의 deletion mutation을 실시한 후, 생산된 항체 양성반응을 나타내는 50여개의 변이독소 단백질 가운데 크기와 결손된 부위에 따라 8개의 mutant를 선발하였다<Table 10>.

<Table 10> Characteristics of SEC1 deletion mutants

Toxin designation	Nucleotide deletions	Amino acid deletions	N-terminal sequence and deletions
			1 ESQPDPTPDELHKASKFTGLMENMKVLYDDHYVSATKVKS 40
SEC-1	None	None	-----
SEC-1818	19-27	7-9	-----(TPD)-----
SEC-1819	17-31	6-10	-----(PTPDE)-----
SEC-1820	25-39	9-13	------(DELHK)-----
SEC-1821	24-53	9-18	------(DELHKASKFT)-----
SEC-1822	54-62	19-21	------(GLM)-----
SEC-1823	64-69	22-23	------(EN)-----
SEC-1824	67-84	23-28	------(NMKVLY)-----
SEC-1825	82-99	28-33	------(YDDHYV)-----

둘째, PBMC에 대하여 T 림프구의 증식을 자극하는 변이독소 단백질의



능력을 변이시키지 않은 native SEC1의 능력과 비교 시험한 결과, 아미노 서열의 7-18에 해당하는 부위를 결손한 변이독소 단백질은 T 림프구의 증식을 유도하는데 있어서 변이시키지 않은 SEC1과 거의 차이를 나타내지 않았으나, 아미노 서열의 19-33에 해당하는 부위를 결손시킨 mutant에서는 거의 T 림프구의 증식을 유도하지 않았다 (Fig. 12).

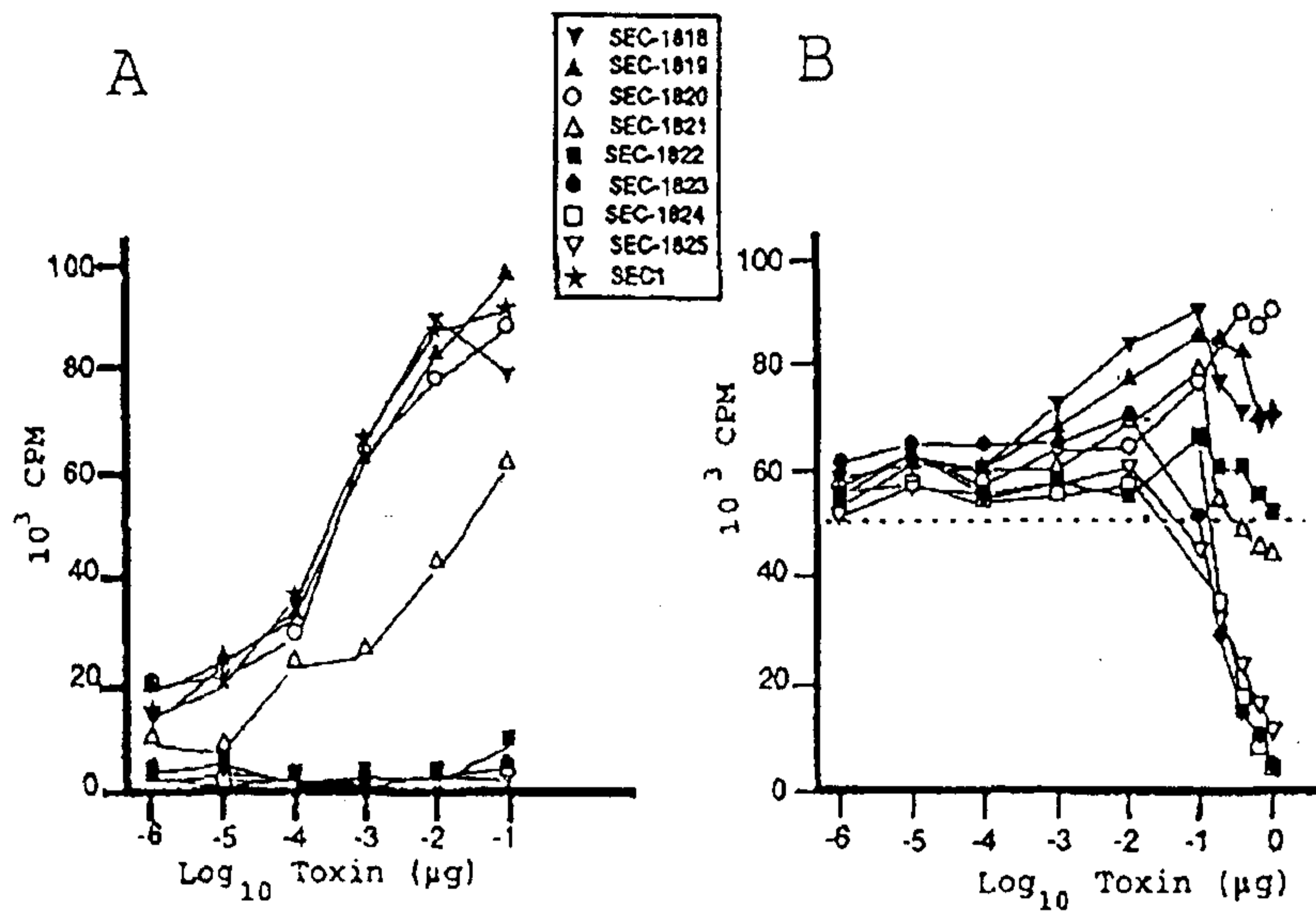


Fig. 12. Effect of N-terminal deletions in SEC1 on lymphocyte proliferation. (A) Representative experiment showing proliferation induced by SEC1 and deletion mutants. PBMC were stimulated with each mutant as indicated. Proliferation was quantitated as incorporation of radiolabel (counts per minute [CPM]) into cellular DNA. (B) Inhibition of SEC1-induced T-cell proliferation by mutant toxins. A constant amount of native SEC1 ( $10^{-3}$   $\mu\text{g}$ ) was mixed with mutant toxins ( $10^{-6}$  to 1  $\mu\text{g}$ ) before the lymphocyte assay was performed. The level of proliferation induced by SEC1 without inhibitors is represented by the dashed line. The average standard error for all data points was  $\pm 9.3\%$  (A) and  $\pm 3.4\%$  (B) of the means.

셋째, SEC3는 전형적인 oligonucleotide/oligosaccharide binding fold와 disulfide loop를 가지는 domain 1과 5개의 antiparallel  $\beta$ -sheet와 일련의  $\alpha$ -helix로 되어 있는 domain 2로 구성되어 있으며, 두 domain 사이의 공간에 얇은  $\alpha$ 3 cavity와 긴  $\alpha$ 5 groove를 형성한다. 또한  $\alpha$ 5 groove의 기저부에 zinc binding site를 가진다. 이들 cavity와 groove는 SEC의 superantigenicity와 관련되어 일반 항원과는 다른 차원에서 TCR의 V $\beta$  부위와 antigen presenting cell의 MHC class II molecule에 작용한다.

넷째, 사람과 식품 유래의 Sec+ 균주는 기존에 보고된 SEC1, SEC2, 그리고 SEC3과는 차이를 나타내는 다양한 변이형을 나타내었으며, 소와 양에서 분리한 균주 역시 두 개의 다른 group으로 나눌 수 있었다. 또한 각 유래의 균주들이 생산한 SEC는 SDS-PAGE상에서 각각의 독소는 모두 약 27KDa 정도의 동일한 분자량을 나타내었으나, IEF 결과에서는 매우 다양한 pI를 나타내는 것이 확인되었다.

다섯째, 각 유래의 균주의 아미노 서열은 기존에 밝혀진 SEC subtype (SEC1, SEC2, SEC3)과 일부 아미노기가 다른 변이형들이 확인되었으며, 이는 향후 더욱 많은 변이형들이 출현할 가능성을 시사한다.

여섯째, 인위적으로 생성시킨 변이 독소 단백질 중 아미노서열 19-33 부위를 결손시킨 변이 단백질에서 변이를 일으키지 않은 native SEC에서 일어나는 림프구 증식이 유도되지 않음이 확인되었으며, 이 부위는 구조적으로 TCR과 결합하는데 중요한 역할을 하는 것을 밝혔다. 이로써 아미노 서열의 N-terminal end로 부터 19-33에 해당하는 부위를 결손시킨 SEC1 변이독소 단백질은 면역 억제반응을 나타내지 않기에 숙주의 젓소 유방염 방어를 위한 특이단백질로 이용하는데 효과적이라 기대된다.

#### 마. 젓소에서 SEC 단백질의 면역원성 조사

SEC 단백질의 면역원성을 조사하기 위하여 건유기간에 있는 젓소를 4개

그룹으로 나누어 각 군별로 투여한 후 혈액을 채취하여 그 변화를 조사한 결과 <Table 11>과 같다.

SEC 시험백신의 경우, 대조군(control)에 비하여 전반적으로 세포성 면역(CMI) 반응이 항진되었으며, 특히 BoCD4 T 림프구는 접종전에 비하여 크게 증가하였다가, challenge 후 다시 상승하는 경향을 보였다.

한편, 시험군의 경우 B cell이 점차적으로 증가하였으며, 이는 challenge 후에도 다소 상승하였다. 반면에 대조군은 거의 변화가 없었다.

숙주 면역을 억제하는 것으로 알려진 activated BoCD8 림프구는 접종전에 비하여 백신접종후 상승하였으나, challenge 후 다소 감소하였다. 반면에 대조군은 challenge 후 4~5배 이상 증가하였다. 또한 1차 면역에 관여하는 granulocyte/monocyte 군은 시험군에서 challenge 후에 증가 하였으며, 대조군에서는 더욱 크게 증가하는 경향을 보였다.

이상의 결과를 요약하여 볼 때, 본 연구개발 SEC백신은 숙주의 세포성면역(CMI) 반응을 특히 항진시키며 (BoCD4, B cell 등), 이는 면역억제세포의 기능을 저하시킴으로써 가능하고, 또한 체액성면역(Humoral immunity) 반응을 위한 B 세포 분포증강도 함께 유도할 수 있는 것으로 사료된다.

<Table 11> SEC시험백신에 대한 면역세포 활성화도 예비시험 결과

구 분	시험 백신						대조군					
	MHC CL II	CD4	CD8	sIgM	G/M	Act. CD8	MHC CL II	CD4	CD8	sIgM	G/M	Act. CD8
접종전	68.0	18.4	2.8	29.6	-	3.3	52.6	26.0	5.6	23.8	-	4.7
1차 접종후	28.0	47.0	16.0	42.0	8.1	10.0	24.3	17.6	13.7	33.6	8.7	9.1
2차 접종후	23.0	28.0	8.9	52.4	9.9	20.1	4.4	14.7	39.5	29.9	9.9	10.5
Challenge 후	-	37.5	8.6	58.9	27.9	10.8	-	10.5	22.5	21.0	41.4	22.0

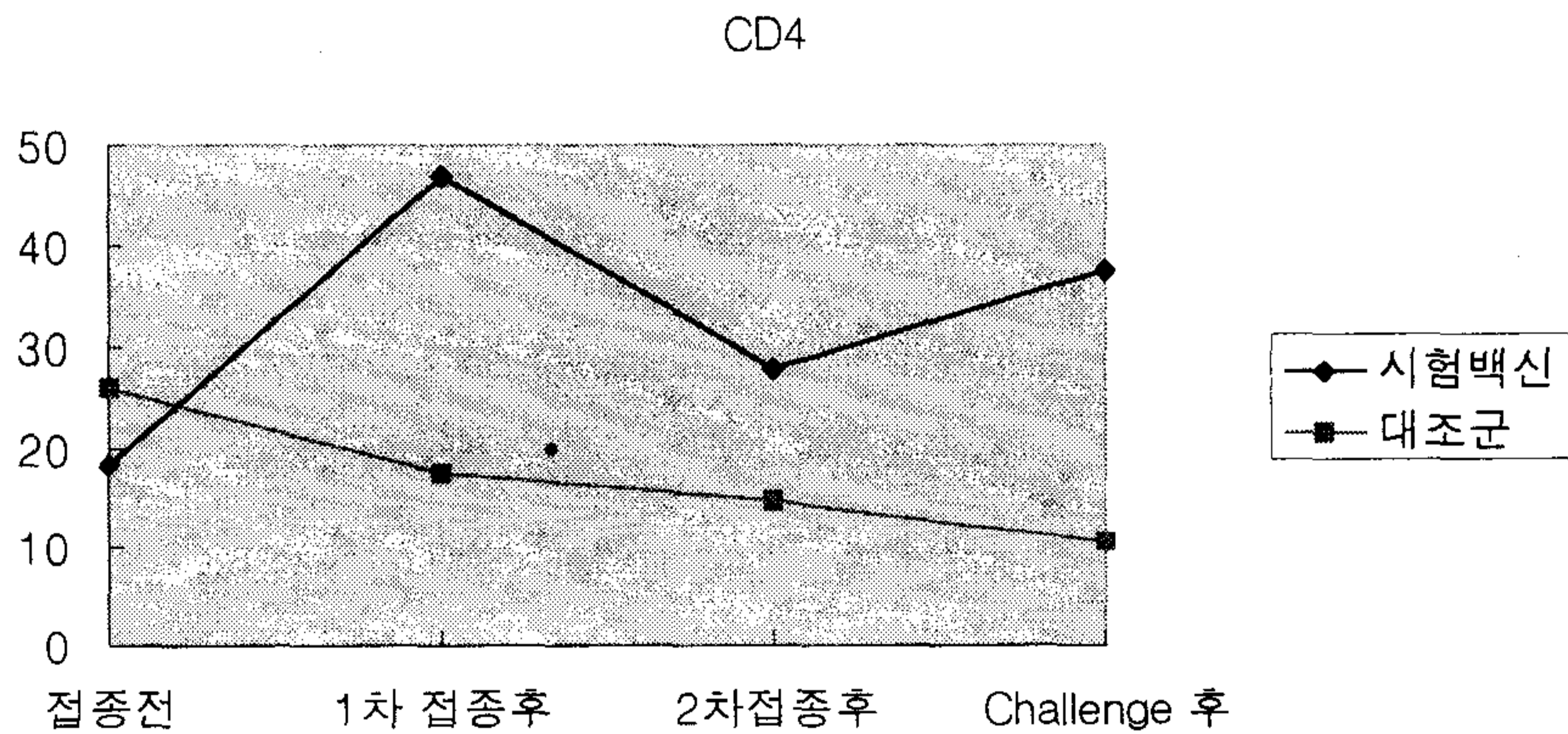


Fig 13. 백신 접종에 따른 CD4 세포 활성화도 변화

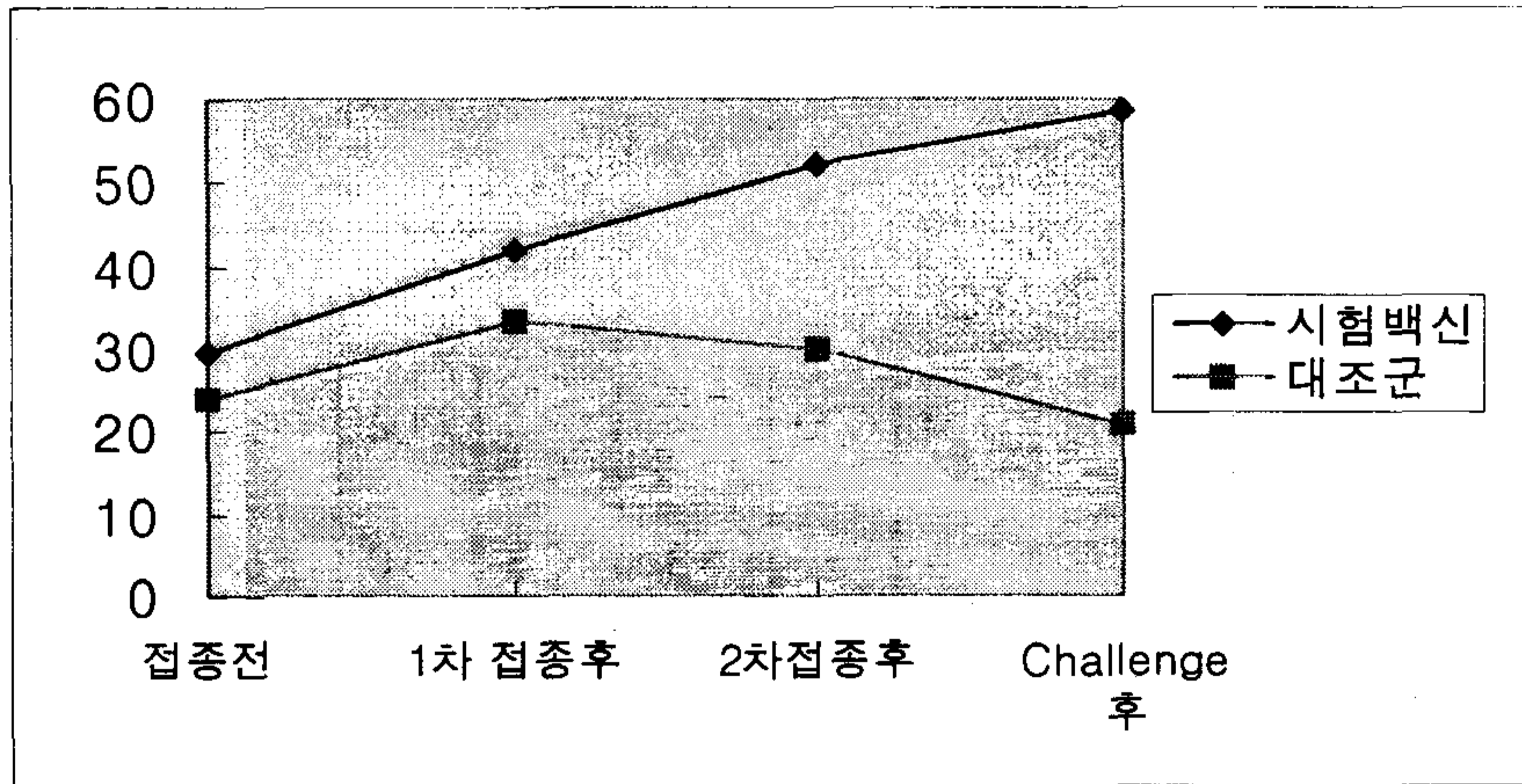


Fig 14. 백신 접종에 따른 sIgM 발현 변화



## 제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

### 1절 연구개발 목표 및 달성도

#### 1. 개발목표

유전면역기법을 이용하여 구조적적합 항원의 분석으로 젓소 유방염 내성 특이 반응세포를 선별하고 포도상구균의 특이 유전자를 확인하여 면역원성을 확인하는데 있다.

#### 2. 연구개발 달성도

연구개발 내용	달성도(%)
1. 구조적적합 항원의 특이성 분석	100%
2. MHC class II 구조적적합 항원 유전자 작성	100%
3. 젓소 유방염 특이 반응세포 특성조사	100%
4. 젓소 유방염 주요원인체 조사분석	100%
5. 주요원인체 <i>S. aureus</i> enterotoxin 단백질 구조 분석	100%
6. 추출 특이 유전자 염기서열 분석	100%
7. 포도상구균의 독소에 대한 유전자 특이성 확인	100%
8. 유전자 조작 생산 단백질의 면역원성 연구	100%
9. 재조합 FnBP 및 pseudocapsule 정제	100%
10. 항원의 면역원성 및 관련성 평가	100%
11. 재조합 유방염 백신의 임상시험	100%

### 2절 대외 기여도

1. 젓소 유방염은 낙농산업에 있어서 경제적 손실이 가장 큰 질병으로 연간 약 600억 이상의 손실을 주기 때문에 예방약 개발, 치료제 선별 등 많은

연구를 세계각국에서 진행해 왔으나 아직까지 뚜렷한 성과를 거두지 못하고 있다.

2. 선진외국과 국내에서의 효과적인 예방대책 프로그램을 작성하고, 유방내 면역체제 연구가 급선무라는 데에서 연구방향을 설정하기에 이르렀고, 일차면역체제인 호중구 등의 탐식작용 및 항체생산 이외에 결정적인 역할을 하는 세포성 면역체제 및 기능분석에 의한 유방염 정복 연구를 시작하였다.

3. 본 연구는 선진 낙농국의 최근 연구방향과 일치되는 것으로 여러분야 전문가들의 전문지식을 종합함으로써 젖소 유방염에 대한 근본적인 대책수립은 물론, 숙주 방어체계 연구에 의한 유방염 내성인자 확인을 통한 질병 발생을 급격히 줄일 수 있는 충분한 가능성이 있다 하겠다.

4. 숙주 방어체계중 유전면역기법을 이용하여 숙주의 면역세포를 활성화시키고, 질병내성인자를 유전학적으로 분석하여 조기에 선발하여 송아지 단계에서 내성우균을 작출하여 낙농을 시도하므로 농가의 경제적 손실을 최소화 할 수있다.

5. 세계적으로 유방염 재조합 백신을 생산하고 실용화 단계에 있는 국가는 아직 없으며, 재래식 사균백신은 시판되고 있으나 감염자체를 예방하지 못하는 수준의 것들이다. 그러므로 본 연구의 결과로 숙주 면역체계의 활성화 및 주요 원인체의 예방을 위한 백신의 개발로 양면에 있어서 확실한 질병의 방제 대책수립에 따른 superantigen을 응용한 재조합 단백질이나, FnBP단백질을 이용한 재조합 백신의 개발은 젖소 유방염에 크게 기여할 것으로 예상된다.

## 제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

### 1절. 활용분야

1. 유전면역학적 기법응용 구조적적합 항원의 분석기술 확립
2. 젖소 및 동물의 MHC class II 유전자 분석기술 확대적용 가능
3. MHC class II DRB<sub>3</sub> exon2 유전자 분석으로 질병 내성우와 감수성 우군을 조기에 선발하여 낙농가 경제적 이득 극대화
4. 유전 면역세포의 분석으로 세포성면역 체계의 확인 및 동물에서의 각 요인 별 면역 활성화도 평가 및 분석기법 확립
5. 젖소 유방염 주요 원인체중 병원체인 *S. aureus*의 enterotoxin의 유형 분석으로 유방염 방제프로그램 개발 및 적용에 활용
6. Enterotoxin의 Crystallographic 기술을 이용한 SEC독소의 구조연구를 그 병원성 원리를 조사
7. 국내에서 가장 많이 분포하고 있는 SEC독소의 재조합 단백질 생산 및 면역원성 조사로 백신개발의 기초자료 확립

### 2절 활용계획

1. 동물중 MHC class II 유전자 분석을 위한 DR, DQ probe를 이용한 분석 활용
2. 젖소 유방염 감수성우와 내성우를 송아지 단계에서 젖소 생산우를 결정할 때 MHC class II DRB<sub>3</sub> exonII 유전자를 분석하여 조기 선발에 따른 질병 내성을 극대화시켜 농가의 소득증대에 활용
3. 동물의 면역효과 및 각 원인체와 개체의 면역력을 조사하기 위하여 유전 면역세포의 활성화도의 각 세포항원별 활성 양상을 분석, 평가하는데 활용할

수 있음.

4. 젖소 유방염의 주요원인체인 *S. aureus* enterotoxin에 대한 분석 및 재조합 단백질의 생산에 따라 그 면역원성이 인정되어, superantigen의 활용으로 젖소 농가에 의해 최대 현안 문제인 젖소 유방염을 예방 시킬 수 있는 재조합 백신의 개발이 가능하며 이를 협동연구한 산업체에서 3단계 사업으로 공정개발 및 대량 생산기업 확립으로 산업화가 가능할 것으로 사료됨

## 제 6 장 참고문헌

1. Lunden A. et al : The relationship between bovin MHC class II polymorphism and disease studied by use of bull breeding values. *Animal Genetics* (1990) : 21:221-232
2. Oddgeirsson O. et al : Relationship between the bovine MHC(BOLA), erythrocyte markers and susceptibility to mastitis in Iceland cattle. *Animal Genetics*(1988) 19:11-16
3. Larsen B. et al : Association of the M blood group system with bovine mastitis. *Animal blood Groups and Biochemical Genetics.* (1985) 16:165-173.
4. Lindberg P-G. and anderson L. : Close association between DNA polymorphism of bovine MHC class I genes and serological BOLA-A specificities. *Animal Genetics* (1988) 19:245-255..
5. Larsen RA, Monghan ML, Park YH, Hamilton MJ, Ellis JA, Davis WC. Identification and characterization of monoclonal antibodies reactive with bovine, caprine, and ovine T-lymphocyte determinants by flow microfluorimetry. *Vet Immunol Immunopathol* 25:195-200, 1990.
6. Davis WC, Hamilton MJ, Park YH, Larsen RA, Wyatt CR. 1990. Ruminant leukocyte differentiation molecules. In : *MHC, Differentiation Antigens, and Cytokines in Animals and Birds.* Ed. O. Barta, BAR-LAB, Inc., Blacksburg, VA, pp47-70. *Monographs in Animal Immunology.*
7. Park YH, Fox LK, Hamilton MJ, Davis WC. 1992. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland



- secretions during lactation. 75:998-1006, J Dairy Sci.
8. Park YH, Fox LK, Hamilton MJ, Davis WC. 1993. Suppression of proliferative response of BoCD4<sup>+</sup> T lymphocytes by activated BoCD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the mammary gland of cows with S.aureus mastitis. 36:137-151, Vet Immunol Immunopathol.
  9. Park YH, Davis WC, Selection of BoCD5 MoAbs by screening mouse L cells transfected with the bovine p55-IL2-receptor genes. 1992. 76:305-309. Immunology.
  10. Davis WC, MacHugh ND, Park YH, Hamilton MJ, Wyatt CR. 1993. Identification of a monoclonal antibody reactive with the bovine orthologue of CD3(BoCD3). 39:85-91, Vet. Immunol. Immunopathol.
  11. Park, Y.H., L.K. Fox, W.C. Davis, M.J. Hamilton, R.A. Larsen, K. Okada. Flow cytometric analysis of the distribution of bovine leukocytes in peripheral blood and mammary secretions at different stages of lactation. Immunobiology Suppl 4, pp. 81. 2nd International Veterinary Immunology Symposium, July 24-28, 1989.
  12. Park YH, LK Fox, WC Davis, MJ Hamilton, RA Larsen. Distribution of bovine leukocytes in peripheral blood and mammary secretions at different stages of lactation. Proc, soc. Exp. Biol. Med 190:305, 1989.
  13. Park YH, SC Jung, LK Fox, MJ Hamilton, WC Davis. Phenotypic and functional characteristics of bovine mammary gland T lymphocytes with Stap. aureus infection. 88th annual Mtg. American Dairy Science Assn. Univ. of Maryland. p187. 1993.
  14. Park YH, LK Fox, WC Davis, MJ Hamilton, Suppression of proliferative responses of CD4<sup>+</sup>(T helper) T lymphocytes by activated CD8<sup>+</sup>(T cytotoxic/suppressor) T lymphocytes in mammary gland of

- cows with *Staphylococcus aureus* infection. 86th Annual Meeting of ADSA, Utah. p74. 1991.
15. Park, YH, LK FOX, MJ Hamilton, WC Davis. Suppression of the immune response by activated CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the bovine mammary gland with *S.aureus* infection. Abstracts of 3rd IVIS, Budapest, Hungary, PS-10.3, p125, Aug. 17-21, 1992.
  16. Davis WC, YH Park, MJ Hamilton, CW Wyatt, RJ Chiodini. Identification of a membrane molecule expressed on all Non T/Non B lymphocytes. Abstracts of 3rd IVIS, Budapest, Hungary, PS-4.2, p 49, Aug: 17-21, 1992.
  17. Larsen R.A., M.L. Monaghan, Y.H. Park, M. Hamilton, J.A. Ellis and W.C.Davis. Identification and characterization of monoclonal antibodies reactive with bovine, caprine and ovine T-lymphocyte determinants by flow microfluorimetry. Immunobiology, Suppl 4, pp. 47. 2nd International Veterinary Immunology Symposium, July 24-28, 1989.
  18. Hamilton, J.J., W.C. Davis, R.A. Larsen, Y.H. Park, M.L. Monaghan, K.Okada. Flow cytometric analysis of the distribution of caprine leukocytes in peripheral blood of normal goats. Immunobiology suppl 4, pp.44. 2nd international Veterinary Immunology Symposium, July. 24-28, 1989.
  19. Davis, W., R.A. Larsen, Y.H. Park, M.L.Monaghan, M.J.Hamilton, L.E.Perryman. Bovine non-T/non-B(N) lymphocytes represent an antigenically distinct population of cells comprised of at least 5 subpopulations. Immunobiology. Suppl 4, pp. 81. 2nd International Veterinary Immunology symposium, July 24-28, 1989.
  20. Davis W.C., G.H. Palmer, Y.H. Park, H. Ungar-Waron, Z. Trainin.

1991. Analysis of the immune response to candidate sununit vaccines against bovine leukemia virus. Cancer awareness day, Washington State University, Sponsored by American Cancer society.
21. Lyon JD, YH Park, J Roberson, WC Davis, Ga Bohach. 1992. Molecular heterogeneity of type c Staphylococcal enterotoxins from human and animal sources. ASM General Meeting, New Orleans, LA.
  22. Characterization of Staphylococcal bovine mastitis isolates using the polymerase chain reaction . Journal of Food Protection In press. 1998.
  23. Production of the recombinant fibronectin-binding protein of Staphylococcus aureus. 대한 수의학회지 37(4):875-882, 1997
  24. Determination of alpha-toxin antibodies against Staphylococcus aureus and phagocytic ability postimmunization in rabbit. National Mastitis Council, Inc. 3차 269. 1997
  25. Capsular polysaccharide antibodies against Staphylococcus aureus smith strain and protective ability postimmunization in rabbits. National Mastitis Council, Inc. 37차 339-340. 1998
  26. Determination of alpha-toxin antibodies against Staphylococcus aureus and phagocytic ability postimmunization in rabbit. Journal of American Association of Bovine Practitioner 31(1): 339-340. 1998.
  27. Effects of autogenous toxoid-bacterin in lactating cows with Staphylococcus aureus with subclinical mastitis. World Association for Buiatrics In press. 1998.
  28. Effects of autogenous toxoid-bacterin in lactating cows with Staphylococcus aureus with subclinical mastitis. World Association for Buiatrics In press. 1998.
  29. Immune response of alpha-toxin, capsular polysaccharide and

- fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus* in rabbits. Reserch in Veterinary Science In preparation. 1998.
30. Activation of bovine lymphocyte subpopulation by staphylococcal enterotoxin C. *Infection and Immunity* 66(2):573-580. 1998.
  31. Bramley AJ, Dodd FH. Reviews of the progress of dairy scinece : mastiis control progress and prospects. *J Dairy Sci* 1984 ; 51 : 481-512.
  32. Hurley DJ, Kensinger MH, Mastro AM, et al. An evaluation of the mononuclear cells derived from bovine mammary gland dry secretions using leukocyte antigen specific monoclonal antibodies, light scattering properties and nonspecific esterase staining. *Vet Immunol Immunopathol* 1990 ; 25 : 177-193.
  33. Oliver SP, Sordillo LM. Udder health in the periparturient period. *J Dairy Sci* 1988 ; 71 : 2584-2606.
  34. Smith KL. Mastitis control : A discussion. *J Dairy Sci* 1983 ; 66 : 1790-1798.
  35. Eberhart RJ. Management of dry cows to reduce mastitis. *J Dairy Sci* 1986 ; 69 : 1721-1732.
  36. Oliver SP, Mitchell A. Susceptibility of bovine mammary gland to infections during the dry period. *J Dairy Sci* 1983 ; 66 : 1162-1166.
  37. Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Environment pathogens and intramammary infection during the dry period. *J Dairy Sci* 1985 ; 68 : 402-417.
  38. Hogan KS, Smith KL, Hoblet KH, et al. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J Dairy Sci* 1989 ; 72 : 1547-1556.
  39. Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Environmental mastitis :



- cause, prevalence. prevention. *J Dairy Sci* 1985 ; 68 : 1531-1553.
40. Smith KL, Todhunter DA. The physiology of mammary glands during the dry period and the relationship to infection. *Proc. 21st Annu Mtg Natl mastitis Counc* 1982 ; 87.
41. Targowski SP, Berman DT. Leukocyte response of bovine mammary gland to injection of killed cells and cell walls of *Staphylococcus aureus*. *Am J Vet Res* 1975 ; 36 : 1561-1565.
42. Russell MW, Brooker BE, Reiter B. Electron microscopic observations of the interaction of casein micelles and milk fat globules with bovine polymorphonuclear leukocytes during the phagocytosis of staphylococci in milk. *J Comp Pathol* 1977 ; 87 : 43-52.
43. Paape MJ, Guidry AJ, Kirk ST, et al. Measurement of phagocytosis of <sup>32</sup>P-labeled *S. aureus* of bovine leukocytes : Lysozyme digestion and inhibitory effect of cream. *Am J Vet Res* 1975 ; 36 : 1737-1743.
44. Pickering LK, Cleary TG, Kohl S, et al. PMN of human colostrum. I. Oxidative metabolism and kinetics of killing of radiolabelled *S. aureus* *J Infect Dis* 1980 ; 142 : 685-692.
45. Nonnecke BJ, Harp JA. Symposium : Genetics of disease resistance. *J Dairy Sci* 1989 ; 72 : 1313-1327.
46. Craven N, Williams MR. Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. *Vet Immunol Immunopathol* 1985 ; 10 : 71-127.
47. Targowski SP. Role of immune factors in the protection of the mammary gland. *J Dairy Sci* 1983 ; 66 : 1781-1789.
48. Harmon RJ, Newbould FHS. Neutrophil leukocytes as a source of lactoferrin in bovine milk *Am J Vet Res* 1980 ; 41 : 1603-1610.



49. Richie ER, Steinmetz KD, Meistrich ML, et al. T lymphocytes in colostrum and peripheral blood differ in their capacity to form thermostable E-rosettes. *J Immunol* 1980 ; 125 : 2344-2346.
50. Barta O, Barta VD, Crisman MV, et al. Lymphocyte blastogenesis inhibition by milk whey as an indicator of mastitis. *J Dairy Sci* 1990 ; 73 : 2112-2120.
51. Park YH, Fox LK, Hamilton MJ, et al. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *J Dairy Sci* 1991 ; 75 : 998-916.
52. Smith JW, Schultz RD. Mitogen and antigen-responsive milk lymphocyte. *Cell Immunol* 1977 ; 29 : 165-173.
53. Park YH, Jung SC, Moon JS, et al. A subset of mammary gland  $\nu\delta$  T lymphocytes downregulates BoCD4 T lymphocyte response to *Staphylococcus aureus* in cattle with intramammary infection. *Korea J Immunol* 1994 ; 16 : 19-27.
54. J Westermann, R Pabst. Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system? *Immunology Today* 1990 ; 11 : 406-410.
55. Bolin SR, McClurkin AW, Coria NF. Effects of bovine viral diarrhea virus on the percentages and absolute numbers of circulating B and T lymphocytes in cattle. *Am J Vet Res* 1985 ; 46 : 884-886.
56. Woldehiwet Z. Lymphocyte subpopulation in peripheral blood of sheep experimentally infected with tick-borne fever. *Res Vet Sci* 1991 ; 51 : 40-43.
57. Kehrli ME, Nonnecke BJ, Wood RL et al. In vivo effects of a thymosin  $\alpha 1$ -containing colostrum whey product on neutrophils and

- lymphocytes from lactating cows without and with experimentally induced *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Vet Immunol Immunopathol* 1989 ; 20 : 149-163.
58. Cowan ST. *Manual for the identifications of medical bacteria*. 2nd ed., Cambridge University Press, London, 1974 ; 45-50.
59. Davis WC, Marusic S, Lewin HA, et al. The development and analysis of species specific and cross reactive monoclonal antibodies to leukocyte differentiation antigens and antigens of the major histocompatibility complex for use in the study of the immune system in cattle and other species. *Vet Immunol Immunopathol* 1987 ; 15 : 337-376.
60. Davis WC, Hamilton MJ, Park YH et al. Ruminant leukocyte differentiation molecules. In: Barta O, ed. *MHC, differentiation antigens, and cytokines in animal and birds*. Monographs in Animal Immunol Blacks burg, VA:BAR-LAB, INC 1990 : 47-70.
61. Cousins CL, Higgs ER, Jackson FK, et al. Susceptibility of the bovine udder to bacterial infection in the dry period. *J Dairy Res* 1980 ; 47: 11-18.
62. Thomas CL, Neave FK, Dodd FH, et al. The susceptibility of milked and unmilked udder quarters to intramammary infection. *J. Dairy Res* 1972 ; 39 : 113-120.
63. Breau WC, oliver SP. Growth inhibition of enviromental mastitis pathogens during physiologic transitions of the bovine mammary gland. *Am J Vet Res* 1986 ; 47 : 218-222.
64. Kehrli ME, Shuster DE. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 1994 ; 77 :

619-627.

65. Harmon RJ. Symposium : Mastitis and genetic evaluation for somatic cell count *J Dairy Sci* 1994 ; 77 : 2103-2112.
66. Schalm OW, Carroll EJ, Lasmanis J. The leukocyte barrier and serologic investigations of experimental coliform(*Aerobacter aerogenes*) mastitis in cattle. *Am J Vet Res* 1964 ; 25 : 90-96.
67. Schalm OW, Lasmanis J, Carroll EJ. Effects of pre-existing leukocytosis on experimental coliform(*Aerobacter aerogenes*) mastitis in cattle *Am J Vet Res* 1964 ; 25 : 83-89.
68. Paul VDV, Chester JH. Biology of disease-Leukocyte functions. *Lab Investig* 1987 ; 57 : 127-137.
69. Fitzpatrick JL, McLean N, Young F, et al. MHC Class II expression on milk mononuclear cells from low or high somatic cell counts. *Proc 40th intern Vet Immunol Symp* 1995 ; 258.
70. Parks DR, Herzenberg LA. Flow cytometry and fluorescence activated cell sorting. *Fundamental Immunol* 2nd ed. Raven press Ltd New York. 1989 ; 29 : 781-785.
71. Westermann J, Pabst R. Lymphocyte subsets in the blood : a diagnostic window on the lymphoid system. *Immunol Today* 1990 ; 11 : 406-410.
72. Biddison WE, Shaw S. CD4 expression and function in HLA class II-specific T cells. *Immunol Rev* 1989 ; 109 : 5-16.
73. Harp JA, Kehrli ME, Hurley DJ, et al. Numbers and percent of T lymphocytes in bovine peripheral blood during the periparturient period. *Vet Immunol Immunopathol* 1991 ; 28 : 29-35.
74. Nonnecke BJ, Kehrli ME. Isolation of mononuclear cells from bovine

- milk by continuous-flow and density gradient centrifugation : Response to cells to mitogens. *Am J Vet Res* 1985 ; 46 : 1259-1262.
75. Torre PM, Oliver P. Suppression of mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells by bovine mammary secretions. *J Dairy Sci* 1989 ; 72 : 219-227.
76. Hurley WL. Mammary gland function during involution. Symposium : mammary gland phase of lactation *J Dairy Sci* 1989 ; 72 : 1637-1989.
77. Targowski SP. Role of immune factors in the protection of the mammary gland. *J Dairy Sci* 1983 ; 66 : 1781-1789.
78. Wyatt CR, Claudio M, Chris C, et al. Differential distribution of  $\nu\delta$  T-cell receptor lymphocyte subpopulation in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 1994 ; 40 : 187-199.
79. Machugh ND, Sopp P. Bovine CD8 (BoCD8). *Vet Immunol Immunopathol* 1991 ; 27 : 65-69.
80. Doymaz MZ, Sordillo LM, Oliver SP, et al. Effect of *Staphylococcus aureus* mastitis on bovine mammary gland plasma cell populations and immunoglobulin concentrations in milk. *Vet Immunol Immunopathol* 1988 ; 20 : 87-93.
81. Yang TJ, Jantzen-Abo PA, Williams LF. Depression of B-lymphocyte levels in the peripheral blood of cows with mastitis. *Infect Immun* 1980 ; 27 : 90-93.
82. Concha C, Holmberg O, Morein B. Proportion of B- and T-lymphocytes in normal bovine milk. *J Dairy Res* 1982 ; 45 : 287-293.
83. Franklin ST, Young JW. Proliferation and phenotype of bovine Mononuclear leukocytes in cultures stimulated by pokeweed mitogen. *J Dairy Sci* 1994 ; 77 : 3592-3600.



84. Taylor BC, Dellinger JD, Cullor JS, et al. Response to bacterial infection of the bovine mammary gland is associated with changes in the T cell profile on milk. *Proc 4th Intern Vet Immunol Symp* 1995 ; 263.
85. 젖소 유방염에서의 포도상구균 enterotoxin C의 병원성. 한국수의공중보건학회지 20(4):299-309. 1996.
86. 동물 질병에서 포도상구균 enterotoxin superantigen의 면역세포 작용기전 연구. 한국수의공중보건학회지 20(4):337-348. 1996.
87. 숙주의 병리생리학적 측면에서 cytokine의 역할과 유방염의 예방. 한국수의공중보건학회지 21(3):261-270. 1997.
88. 건유기 유방염 감염우의 유방내 면역저하요인 규명에 관한 연구: I. 유방염 감염우와 정상우의 말초혈액 및 유즙내 림프구 아집단 분포율 비교. 대한수의학회지 37(3):647-655. 1996.
89. 건유기 유방염 감염우의 유방내 면역저하 요인 규명에 관한 연구: II. 호중구에 의한 말초혈액 및 유즙 림프구의 mitogen유도성 증식반응 억제 작용. 대한수의학회지 36(3):647-655. 1996.
90. 박용호. 1993. 우유의 위생학적 환경과 검사현황. 8(2), S33-39. 한국식품위생학회지.
91. 박용호. 1992. 백혈구 표면항원 특이 단클론성 항체를 이용한 젖소 면역항체 연구. 1:33-47. 동물면역연구소보.
92. 박용호. 1993. 침단유전면역기법 이용 동물질병 연구. 2:5-17. 동물면역연구소보.
93. 박용호, 정석찬, 문진산, 구복경 et al. : Staphylococcus aureus 유방염 감염 젖소에서의 유방내  $\gamma \delta$  T림프구의 CD4 T 림프구에 대한 면역억제효과. 대한면역학회지(1994)



여 백

위탁과제

## 젖소 유방염 재조합 백신개발

Development of Bovine Recombinant Mastitis  
Vaccine

서울대학교 수의과대학

과학기술부

여 백

# 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “생체방어기능 측정에 의한 유방염내성인자 연구 및 유전자 특이 백신개발에 관한 연구”과제 (위탁과제 “젖소 유방염 재조합 백신개발에 관한 연구”)의 최종 보고서로 제출합니다.

1998. 9.

주관 연구기관명 : 서울대학교 수의과대학

총괄 연구책임자 : 한 홍 율

연 구 원 : 안 수 환, 유 한 상  
김 두, 정 순 욱  
오 태 호, 박 선 일  
박 희 명, 황 철 용  
한 숙 희, 최 낙 성  
정 미 선

여 백



# 요 약 문

## I. 제 목

젖소 유방염 재조합 백신개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

젖소의 유방염은 유질과 유량에 막대한 영향을 주는 전염성 질병으로 경제적으로도 중요한 질병이다. 전세계적으로 이 질병으로 인한 연간 손실량은 350억달러에 달하며(10, 11) 우리나라에서도 연간 유손실량은 매년 650억 원에 달한다. 최근의 연구결과에 의하면 젖소의 19~40%까지 황색포도상구균에 의한 유방염을 가지고 있으며 감염의 경과와 경중에 따라 감염우는 영구적으로 생산능력을 상실하게 된다. 몇 가지의 예방법들은 주로 젖소 유방염을 최소화시키기 위해 행하여지는 방법들로서 위생적인 착유과정, 철저한 유두침지소독, 건유기와 비유기의 항생제 치료 및 만성감염우의 도태등과 같은 방법들이 이용되고 있다.

백신을 이용한 방법들은 peptidoglycan, toxoid(22), adhesin(29)을 이용한 백신, 사멸시킨 whole cell과 toxoid를 결합한 백신(14, 15, 20)등 다양한 방법들이 연구되고 있다. 이러한 백신들은 자연 치유율을 증가시키며 감염증상을 완화시키는 역할을 하지만 지금까지 신규감염을 예방할 수 있는 백신은 개발된 바 없다.

수년간에 걸쳐 유방염을 근절하기 위한 노력들은 원인균을 예방하기 위한 방향으로 전환되었으며 분명히 이제는 유방염 예방을 위한 혁신적인 접근

이 필요하게 되었다. 젖소에서 유방염에 의한 손실을 예방하고 완화시키기 위한 노력 가운데 유방염 백신개발의 초점은 유방염 원인균에 대한 유선내 방어 기전은 몇 가지 병원성 인자에 의해 매개되기 때문에 이러한 병원성 인자를 이용해 젖소가 감염에 저항할 수 있는 자연능력을 높이는데 있다. 지금까지 몇가지 병원성인자중 알파톡신(13), pseudocapsule(3,4), fibronectin-binding protein(23, 24, 25)은 주로 황색포도상구균의 백신개발에 있어 방어능력을 갖춘 병원성 인자로 간주되고 있다.

본 연구의 목적은 비유우와 처녀우에서의 재조합 유방염 백신의 예방효과를 평가하는 데 있으며 이를 이용해 황색포도상구균에 대한 효과적이며 매우 경제적인 백신을 개발하는데 있다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

#### 1. 균주

*Staphylococcus aureus* Smith strain과 Wood 46 strain을 이용하였다.

#### 2. Pseudocapsule, alpha-toxin과 fibronectin-binding protein의 확인

capsule 발현확인은 semisolid agar상에서의 확산형태로 확인하였으며 투과전자현미경을 이용하여 최종 확인하였다. 알파톡신의 존재는 SDS-PAGE 전기영동을 실시한 후 Western blot법을 이용하여 확인하였다.

fibronectin-binding protein은 공동연구자인 김두 박사로부터 재조합 단백질을 공급받아 실험에 이용하였다.

#### 3. 백신제조

백신은 Watson(16)의 방법을 수정하여 제조하였다. 황색포도상구균을

BHI 액체배지에 10% 유청을 첨가시켜 37도에서 세균의 속도가 정지기에 이르는 시간인 48시간까지 배양하였다. 세균을 포르말린(1%)으로 사멸시킨후 원심분리(600g, 20분간, 냉장상태)한 후 PBS(pH 7.2)에서 재부유하였다.

Pseudocapsule은 Poutrel 등(21)의 방법을 수정하여 사용하였다. live 세균을 원심분리하고 재부유하여 20분간 멸균시킨다음 다시 원심분리한다음 건물양으로 5mg이 되게 상청액을 백신액에 포함시켰으며 각 백신은 최종 부피가 5ml가 되게 조제한다. 이렇게 간이정제한 pseudocapsule은 70%의 환원당을 포함하고 있으며 sodium azide, thiomerosal, 포르말린을 최종농도가 각각 0.0015%, 0.001%와 1%가 되게 첨가하였다. dextran sulphate는 100mg/ml단위로 첨가하며 mineral oil은 항원과 동량 첨가한다. 대조군은 dextran sulphate와 mineral oil만을 이용하여 백신조제액과 동량으로 맞추어 사용한다.

400 $\mu$ g의 알파톡신과 1mg의 fibronectin-binding protein을 첨가하였다.

#### 4. 우군평가

본 실험은 강원도 대관령의 H목장을 대상으로 11개월간에 걸쳐 수행되었으며 본 목장은 200두의 착유우와 100두의 건유우를 사육하고 있는 목장으로 개체우당 일일 착유량은 16리터였다. 분만은 전기간에 고루있지만 특히 봄철에 분만율이 높다. 기계착유를 하고 있으며 유두침지소독을 잘 실시하고 있는 목장이다. 젖소는 건유기에 항생제 치료를 하고 있으며 평균체세포수는 24만으로 평균 18만에서 37만사이의 수준이었다.

18두의 처녀우는 초지에서 방목을 정기적으로 시키면서 분만 10일전에 분만동으로 옮겨 사육하였으며 분만후 다른 비유우와 함께 사육하였다. 임상형 유방염의 발생은 관리수의사와 실험실 연구원에 의해 기록되었으며 채취한 유즙은 냉장상태로 실험실내로 운반되어 세균분리동정을 실시하였다. 샘플링후 치료가 필요한 개체는 항생제 감수성검사를 실시하여 그 결과를 통보하여 치료에 도움이 되도록 하였다. 처녀우의 경우 실험개시전 임상형 유방염이

검출되는 분방은 없었다.

## 5. 실험디자인

18두의 처녀우를 대조군과 백신접종군으로 나누어 2회에 걸쳐 분만추정 일인 8주전과 4주전에 접종하였다. 비유우(총 23두; 대조군 11두, 백신접종군 12두)도 처녀우와 같은 방법으로 3주간격으로 2회 접종하였으며 대조군은 adjuvant를 비유기간 동안 접종하였다. 접종부위는 상유방림프절 주위피하조직에 접종하였다.

## 6. 유즙 채취 및 실험실 분석

모든 분방의 유즙채취는 2주간격으로 첫 3개월간 실시하였으며 나머지 기간은 3-4주간격으로 비유기간에 실시하였다. 처녀우에서는 유즙채취를 분만 후 3주간격으로 실시하였다. 샘플채취전 유두는 70% 알콜-1% 베타딘 솜으로 멸균시켰다. 처음 몇 줄기를 짜내고 10ml의 튜브에 유즙을 채취하였다. 수의사가 샘플을 채취하는 동안 유즙성상과 유방의 건강상태(젖응고, 열감, 부종, 유즙이상)를 기록하였다. 유즙은 샘플처리전까지 냉장상태를 유지한 후 5% 우혈액배지에 접종한다. 37°C, 24시간동안 배양한 후 세균집락의 형태와 수를 기록하고 그람양성균을 카탈레이즈 검사와 coagulase검사를 실시한다. 황색포도상구균으로 추정되는 경우에는 IDF(10)의 방법에 준하여 확진한다. 체세포수를 Fossomatic cell counter를 이용하여 International Dairy Federation(11)에서 권장한 방법에 준하여 실시하였다.

## 7. 유방염 진단

임상형 유방염의 분류는 유즙내에서 황색포도상구균이 분리되며 열감, 젖응고물이 발견되고 부종등의 유방이상이 관찰되는 것으로 간주하였으며 준임상형 유방염은 황색포도상구균이 분리되지 않고 체세포수가 25만이상인 분방



으로 간주하였다. 잠복감염의 경우는 체세포수의 증가없이 황색포도상구균이 분리되는 경우를 잠복감염 분방으로 간주하였다.

#### 8. 통계 분석

Fisher exact 검정은 유방염의 발생율을 비교하는 데 이용하였으며 ANOVA검정은 평균체세포수를 검정하는 데 이용하였다. 유의성은  $P < 0.05$ 를 유의수준으로 간주하였다.

### IV. 연구개발 결과

비유우 23두와 처녀우 18두 모두 백신접종후 폐사두수는 없었다. 백신접종후 일시적인 발적과 열감 및 부종이 관찰되었으며 7-14일 이후에는 모두 소실되었다. 이밖의 다른 부작용은 관찰되지 않았다.

표 5는 11개월간 비유우 23두의 분방별로 착유자와 실험연구원에 의해 기록된 임상형 유방염의 누적발생율을 비교한 것이다. 처치군과 대조군의 백신접종전 임상형 유방염의 발생율은 백신접종군에서 높았지만 백신접종후 대조군의 임상형 유방염의 발생율이 백신접종군에 비해 유의성있게 높았다.

준임상형 유방염의 누적발생율은 표 6과 같다. 백신접종전 대조군과 백신접종군의 준임상형 발생율은 차이가 없었지만 백신접종후 대조군에서 백신접종군보다 발생율이 유의성있게 높았다( $P < 0.001$ ). 잠복감염을 발생비교에서 백신접종전후동안 그룹간 유의성있는 차이는 인정되지 않았다(표 7). 백신접종군에서 황색포도상구균에 의한 유선내 감염율은 백신접종전 16.7%에서 백신접종후 5.96%로 감소하였다. 하지만 대조군에서는 백신접종전 15.0%에서 백신접종후 36%로 유의성있게 증가하였다( $P < 0.001$ ). 비유우에서의 대조군과 비교하여 백신접종군에서 각각 상대적 위험율은 0.31과 0.28이었다.



표 8은 처녀우에서 10개월간의 임상형, 준임상형과 잠복감염율의 누적발생을 보여주고 있다. 임상형, 준임상형 및 잠복감염수는 대조군의 처녀우와 비교하여 백신접종군의 처녀우에서 유의성있게 낮았다( $P < 0.001$ ). 황색포도상구균에 의한 상대적 유선내 감염위험율은 백신접종군과 대조군 각각 0.28과 0.31이었다( $P < 0.001$ ).

백신접종군과 대조군간 평균 체세포수의 유의성있는 차이는 없었지만 백신 2차접종후인 3개월째에는 대조군에서 백신접종군에 유의성있게 높았다( $P < 0.001$ ). 백신접종전 대조군과 백신접종군간 체세포수의 유의성있는 차이는 없었다(그림 25). 건유후, 처녀우의 체세포수의 변화는 백신 접종 3개월부터 8개월사이의 백신접종군에서 대조군에 비해 유의성있게 낮았다( $P < 0.001$ )(그림 26).

## V. 연구개발 결과의 활용계획

본 백신실험은 황색포도상구균의 type 2 exopolysaccharide, alpha-toxin과 Fibronectin binding protein을 포르말린으로 불활화시켜 만든 백신이다. 본 실험결과로 미루어볼 때 황색포도상구균에 의한 임상형유방염, 준임상형 유방염의 발생빈도는 비유우와 처녀우모두에서 대조군이 백신접종군보다 발생빈도수가 유의성있게 높았다. 이와유사하게 잠복감염의 빈도수도 백신접종군에서 대조군의 발생빈도수보다 낮았다. 따라서 모든 황색포도상구균에 의한 유선내 감염은 비유우와 처녀우에서 감소되었다. Mench(18)와 Oliver(19) 등의 연구결과는 분만 1주후에 가장 유방염에 대한 감수성이 높기때문에 건유기때에 백신을 접종함으로써 좀더 좋은 면역능을 유발할 수 있는 장점을 가지고 있다고 한 바 있다. Nordhaug 등(15)은 캡슐형성하는 황색포도상구균을 사멸화 시켜 처녀우를 대상으로 실험한 결과 대조군에 비해 백신접종군에서 유

의성있게 유방염 발생이 낮았다고 하였다. 한 등 (12)은 실험적으로 3가지 병원성 인자를 포함하는 유방염 subunit백신을 개발하여 토끼를 대상으로 면역능을 실험한 바 있다. 한 등 (12)에 따르면 백신접종군에서 alpha-toxin, type 2 capsular polysaccharide와 fibronectin-binding protein에 대한 항체가 혈청에서 형성된다고 하였다. 또한 공격접종후 접종 4시간후까지 균수가 감소하다 12시간과 24시간 후에는 약간 증가하는 경향을 보인다고 하였다.

본 백신연구사업은 황색포도상구균에 대한 방어능과 백신의 유용성을 결정하기 위해 수행되었으며 본 실험에서 임상형, 준임상형 및 잠복감염의 발생수가 감소하는 것은 황색포도상구균을 이용하여 백신접종한 젖소에서 전신적인 방어능이 증가하였다고 생각된다. 본 자료는 다형핵백혈구가 황색포도상구균의 alpha-toxin, fibronectin-binding protein 및 capsular polysaccharide에 대한 옹소닌 작용이 유발되었다고 생각된다. 따라서 이 세가지 항원(alpha-toxin, capsular polysaccharide와 fibronectin-binding protein)에 대한 항체가 황색포도상구균의 집락형성에 대한 방어능이 유발되어 젖소의 임상증상을 감소시키는 역할을 한 것으로 사료된다. Herbelin 등 (13)은 병원성 인자들중 alpha-toxin은 젖소를 알파톡신으로 면역화시킨 젖소에서 유즙내로 백혈구의 유주능을 촉발시킨다고 보고한 것은 본 실험결과와 동일한 결과를 보여주는 것이다.

백신접종후 체세포수의 변화는 비유우에서 각 구간 유의성있는 차이가 없었다. 하지만 백신 접종 6개월시기에 백신접종군에서 체세포수가 증가한 원인은 아마도 몇가지 환경성 세균인 연쇄상구균이 다른 시기보다 이 시기에 더 많이 검출된 것은 이 증가원인과 관련이 있는 것으로 생각된다.

따라서 비유기동안 백신접종우는 체세포증가와 관련이 없지만 처녀우의 백신접종군의 체세포수의 변화는 추가접종후 대조군에 비해 유의성있게 낮았다.

본 백신은 항원으로 사용한 균주에 대해 젖소의 방어능을 전달하는 능력을

가지고 있기 때문에 본 실험결과 유방염 subunit백신은 황색포도상구균의 발생에 대한 방어능이 있으며 체세포수 증가에 대한 작용은 없는 것으로 생각된다. 따라서 유방건강과 관련된 이러한 변수들을 모두 포함하는 백신은 비유전기간과 건유기간에 걸쳐 잠재적인 방어능이 있지만 본 실험에서는 1개의 목장만을 대상으로 하였기 때문에 좀 더 대규모적인 임상실험이 추진되는 것이 필요하다고 생각된다.

# S U M M A R Y

## I . Title

Development of bovine recombinant mastitis vaccine

## II . Purpose and significance of the research

Bovine mastitis is the most important infectious disease that affects both the quality and quantity of milk and economically important disease in dairy cattle. All of the world, annual economical losses caused by this disease are nearly 35 billion(10, 11) and In korea, milk production losses reach 65 billion Won annually.

According to result of recent study, 19 to 40% of dairy cows have mastitis caused by *staph. aureus*. Depending on the duration and severity of the infection, the productive performance of infected cows may be diminished permanently.

Several preventive strategies have been applied to minimize bovine mastitis, including hygienic cleaning procedures, disinfection, antibiotic therapies and culling. Numerous attempts of vaccination have been made that employ live or killed *Staph. aureus*, isolated peptidoglycan, toxoids(22), adhesins(29), or preparations of killed cells and toxoids(14, 15, 20). These vaccines increased the spontaneous cure rate of infections and lessened the severity of the infections, but did not prevent the occurrence of new infections during the trial.

The attempts, over the years, to eradicate mastitis has resulted in

a shift in the prophylaxis of the causative bacteria. It is now clear that innovative approaches for mastitis control are needed. Of all means to decrease and protect the impact of mastitis on the dairy industry, vaccine development of mastitis was focused on increasing the natural ability of the cows to resist infections now that defense of the mammary gland against mastitis-causing pathogens is mediated by several protective factors. Until now, of several virulence factors, alpha-toxin(13), pseudocapsule(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) and fibronectin-binding protein(23, 24, 25) were mainly considered to be protective antigen in vaccine development of *S. aureus* mastitis.

The present study was performed to evaluate the preventive effects of recombinant mastitis vaccine under field conditions of lactating cows and heifers and to develop a more efficacious and economical mastitis vaccine against *Staph. aureus*.

### III. Scope and content of research

#### 1. *Bacterial strains*

The bacteria used were *Staph. aureus* Smith strain, an encapsulated capsular type 2, and *Staph. aureus* Wood 46, producing alpha-toxin and fibronectin-binding protein (fnbp).

#### 2. *Confirmation of the pseudocapsule, Alpha-toxin and fibronectin-binding protein*

The presence of the capsule was confirmed by diffuse morphology in



semisolid agar with serum. The capsule also was confirmed with transmission electron microscopy of cells. The presence of alpha-toxin was verified with SDS-PAGE electrophoresis and Western blotting with anti-alpha-toxin antibody. The fibronectin binding protein was provided by Dr. KIM in Kangwon National University.

### **3. Vaccine preparation**

The vaccine was prepared by the methods of Watson (16). Briefly, cells of *Staph. aureus* were grown in brain-heart infusion broth supplemented with 10% whey at 37°C with aeration to stationary phase (determined by optical density). The cells were inactivated with formalin (1%, v/v), centrifuged (at 6000 g for 20 min at 4°C), and resuspended in PBS (pH 7.2). The crude type 2 capsular polysaccharide was prepared by the method of Poutrel *et al*(21). Live cells were centrifuged, resuspended in a small volume of PBS (pH 7.2), and autoclaved for 20 min. This preparation was centrifuged under the same conditions, and the supernatant was added to the vaccine preparation at a concentration of approximately 5 mg of dry weight per dose. This extract contained about 70% reducing sugars, determined by the anthrone method (32). Sodium azide, thimerosal, and formalin were added as preservatives at final concentrations of 0.0015% (w/v), 0.001% (w/v), and 1% (v/v), respectively. Dextran sulfate (100mg/ml, MW:500,000) and mineral oil (SIGMA Chemicals, USA) was added as an adjuvant. For the placebo, Dextran sulfate and mineral oil were added to saline at the same concentration used in the vaccine. 400 µg of Alpha-Toxoid and 1 mg of fibronectin-binding protein per dose were added.

#### **4. Herd**

The trial was carried out on a H dairy farm in Dae Kwan Ryung, Kang Won Do during 11 months period. The dairy farm had 200 lactating Holstein cows and 100 dry cows had a mean annual milk production of 16 L/d per cow. Calving occurred all the year round, but calving frequencies were higher in spring. Machine milking was used, and teat dipping was practiced. Cows were routinely treated with antibiotics at drying off. The mean bulk tank SCC was 240,000 cells/ml during the year prior to the start of the trial and varied between 180,000 and 370,000 cells/ml throughout the experimental period. Eighteen heifers that were maintained on pasture without contact with lactating cows and were included in the herd about 10 days before calving. Heifers then received the same feed and treatment as the other cows. None of the management conditions that were applied in the dairy before the trial were modified during the trial. Cases of clinical mastitis were diagnosed by the dairy farmer or the veterinarian, who sent samples of milk to our laboratory for confirmation. After sampling, diagnosed cases were treated by intramammary administration of antibiotics. No quarters with clinical mastitis were detected in the heifers before calving.

#### **5. Experimental Design**

The 18 heifers were randomly assigned to two groups of 9 heifers each. The heifer group received two injections of the vaccine at 8 and 4 wk before the estimated time of calving, and the lactating group received two times with 3 weeks interval. The control group received two injections of a placebo during the lactation period. The vaccine or the

placebo was administered subcutaneously in the supramammary lymph node.

## **6. Sampling and Laboratory Analysis**

Milk samples from all quarters were collected every 14 days during the first 3 months and every 3-4 weeks during subsequent months of the trial in lactating cows. In heifers, samples were taken every 21 days following calving. Prior to sample collection, the teat was disinfected with 70% alcohol included in 1% iodine. The several streams of milk was discarded, and 10 ml sample of the milk was collected in sterile test tubes by the laboratory staff. While the veterinarians were collecting sample, the milk and udder abnormalities (clotting, heat, swelling, discoloration) were recorded. The milk samples were kept at 4°C and processed within 10 hours in the laboratory. For the bacterial isolation, a 10  $\mu$ l sample of milk was streaked on bovine blood agar (5%, v/v) and incubated at 37°C for 24 hours. The number and type of the colonies and the type of hemolysis were recorded. Gram-positive cocci were further investigated for production of catalase and coagulase. Presumptive *Staphylococcus aureus* was confirmed as described previously (10). The Somatic Cell Counts (SCC) were determined electronically with a Fossomatic Coulter Counter (Fossomatic Co., Ltd, Denmark) according to the technique recommended by the International Dairy Federation as described previously (11).

## **7. Diagnosis of Mastitis**

The criteria to classify clinical mastitis were the presence of a primary pathogen (*Staph. aureus*) in milk samples and clinical signs with

heat, clotting, and swelling of the udder. An SCC >250,000 cells/ml was considered to be indicative of subclinical mastitis showed absence of primary pathogens. The presence of a primary pathogen without a corresponding increase in SCC was assessed as a latent infection.

## IV. Results

None of the 41 vaccinated cows in lactating cows and heifers died. A transitory swelling, erythema and heat around the vaccination site were observed and disappeared within 7 - 14 days following vaccination. No other adverse reaction was recorded in lactating cows and heifers.

Table 5 shows the cumulative incidence of clinical mastitis caused by *Staph. aureus* recorded by Milkers and researcher in the quarters of the 40 lactating cows during the 10-mo period. Clinical mastitis incidence between treatment groups prior to immunization was higher in vaccination group, compared with that in the control group of lactating cows. However, the clinical mastitis incidence following immunization was higher in the control group, compared with that in the vaccination group. The cumulative incidence of subclinical mastitis of lactating cows was shown in Table 6. Subclinical mastitis incidence prior to immunization was not different between treatment groups. However, the subclinical mastitis incidence following immunization was higher in the control group than that of the vaccination group. The cumulative incidence of latent infection in lactating cows showed no significant difference between treatment groups for both pre- and postimmunization (Table 7). The frequencies of intramammary infections (IMI) caused by *Staph. aureus* in vaccination group were reduced from 16.7% before vaccination to 5.96% following



immunization for lactating cows during the lactation period, while those of intramammary infections in control group were increased from 15.0% preimmunization to 36% postimmunization throughout the lactation period ( $P < 0.001$ ).

Table 8 shows the cumulative incidence of clinical, subclinical and latent infection in heifers during 9-mo period. The number of clinical, subclinical and latent infections were significantly lower in the vaccination group compared with heifer in the control group ( $P < 0.001$ ). No significant differences were observed between the mean SCC from mammary quarters of the vaccinated and control groups. However, 3 months later, 2nd postimmunization, the SCC in cows unvaccinated tended to be highest through the trial. The SCC among treatments prior to *S. aureus* immunization was not significantly different between the vaccinated and unvaccinated groups (Figure 25). After cows were dried off, SCC of heifers through the trial tended to be decreased and lower than that of unvaccinated group between 3 and 8 months. The SCC among treatments preimmunized was not significantly (Figure 26).

## V. Appliance plan of Research Results

The vaccine evaluated in this work was developed on the basis of a type 2 exopolysaccharide of *Staph. aureus* Smith strain, alpha-toxin and Fibronectin binding protein inactivated with formalin. The results of this trial revealed that the frequencies of clinical and subclinical *Staph. aureus* mastitis in the vaccinated groups of heifers and lactating cows were



significantly lower than those of heifers and lactating cows in the control group. Similarly the frequencies of latent *S. aureus* IMI were also reduced for the heifers and lactating cows that had been vaccinated compared with the frequency for heifers in the control group. All *S. aureus* IMI decreased in the lactating cows, compared with that in the control group. Several studies (18, 19) have shown advantages of administering a mastitis vaccine at drying off because of a better immune response and a higher susceptibility of the mammary gland during the 1st week after calving. A vaccine that was developed on a killed, encapsulated *S. aureus* was tested in heifers by Nordhaug *et al* (15). This vaccine showed a significant lower incidence of mastitis compared with the control. Han *et al* (12) developed a experimental mastitis subunit vaccine composed of three virulence factors (alpha-toxin, type 2 capsular polysaccharide and fibronectin-binding protein) and tested on the rabbits. According to the results of Han *et al* (12), the vaccinated groups showed increased alpha-toxin, type 2 capsular polysaccharide and fibronectin-binding protein specific antibody in serum when compared with PBS control group. Also, the bacterial number was decreased until postchallenge 4 hrs and then slightly increased trends was observed 12 hrs and 24 hrs postchallenge.

The vaccine evaluated in this study was developed to determine its usefulness and protective ability in *S. aureus* pathogens. In this trial, the decreased incidence of clinical, subclinical and latent mastitis revealed that increased systemic protective ability in the *S. aureus*-immunized cows. These data show that the bovine can effect an immune response to *S. aureus* capsule, alpha-toxin and fibronectin-binding protein that is opsonic for PMN. It is estimated that antibody for alpha-toxin was responsible for

reducing the clinical signs of cows infected with *S. aureus* and antibody for capsular polysaccharide and fibronectin-binding protein could elicit a protecting ability against colonization of *S. aureus* in the udder. Herbelin *et al* (13) demonstrated that a bacterial virulence factor, alpha-toxin, is able to induce immune recruitment of neutrophil for efficient bactericidal activity in milk when cows are immunized with alpha-toxin. Therefore, it is likely in our trial that neutrophils recruitment from blood are activated during inflammation in response to specific antigens. In lactating cows, the level of SCC had no significant difference between groups except 6th sampling time which showed significantly higher SCC in the control group. It is maybe that several environmental pathogens (*Streptococci spp*) were isolated more frequently than any other sampling time in the control group. Therefore, vaccination for cows during the lactation period had no effects of increasing somatic cell counts. But, level of SCC in vaccination group of heifers showed lower than that of the control group following booster injection. The vaccine conferred effective protection to cows against *Staph. aureus* strain Smith and Wood, which had been used to prepare the vaccine. The results of the present study only showed that the bovine mastitis subunit vaccine had a protective effect on the incidence of *S. aureus* mastitis and on the SCC. Therefore, when all this parameters included the udder health were considered together, the results revealed a potential protective ability of the vaccine during the entire lactation and dry period. Because only one herd was tested in this field trial, further study on a larger field was needed.

여 백

# CONTENTS

I . Introduction .....	109
II . Technical state in domestic and foreign country .....	114
III . Contents and Results of the Research .....	122
IV . Results .....	171
V . Appliaance plan of the Rearch Results .....	174
VI . Reference .....	176

여 백



## 목 차

제 1 장	서 론 .....	109
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	114
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과 .....	122
제 4 장	연구개발목표 달성도 및 대외기여도 .....	171
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 .....	174
제 6 장	참고문헌 .....	176

여 백

# 제 1 장 서 론

## 1 절 연구개발의 경제·사회·기술적 중요성

### 1. 기술적 측면

젖통(乳房)은 젖소(乳牛)의 생명이다. 유방염 관리 프로그램이 적용되지 않고 있는 목장의 젖소는 최소한 50% 까지 다양한 형태로 유방염에 감염되어 있고 그 젖통에서 생산된 젖은 염증 산물로 인하여 우유의 품질이 극히 저하되고 생산성이 감소된다는 것은 오래 전 부터 잘 알려져 온 사실이다. 그럼에도 불구하고 아직 우리나라에는 유방염 백신 프로그램이 개발되어 있지도 않을 뿐만 아니라 목부에 의한 무분별한 항생물질의 투여로 인하여 유즙내 항생물질의 잔류가 국민건강을 위협하는 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 또한 유방병에 의한 경제적 손실은 젖소에서 발생하는 모든 질병으로 인한 총피해액의 약 26%를 이 유방염이라는 단일질병이 차지하고 있는 실정이다.

오늘날 모든 산업동물(예: 젖소, 돼지, 닭등)의 수의학적 질병관리는 이미 개체치료의 수준을 떠나 우군단위의 예방의학적인면으로, 그리고 더 나아가 생산의학(productive medicine) 측면으로 방향을 전환한 지 오래지만 아직까지 개체 치료수준을 벗어나지 못하고 있는 것이 젖소의 질병중 유방염에 대한 치료이다. 그렇다면 왜 이 질병의 퇴치가 난해한가 하는 의문을 가지게 되는 데 그 원인으로 중요한 기술적인 측면을 소개하자면 다음과 같다.

첫째: 유방염을 일으키는 원인균은 크게 전염성 유방염 원인균(Contagious pathogens)과 환경성 원인균(Environmental pathogens)으로 구별할 수 있으며 이중 주된 원인균은 무려 30여 종에 이르고 있어 이들 균종을 모두 방제할 수 없다는 문제점이 있다.

둘째: 환경성 유방염 원인균은 젖소의 사육환경과 사양관리및 착유기 계통

의 관리를 통하여 인위적인 방제가 가능하다. 그러나 전염성 유방염 원인균, 특히 *Staphylococcus aureus*균은 젖소의 체표면에 늘 상재하는 균일뿐만 아니라 유두를 통해 유방내 침입과정이 성립되면 유즙내에 출현한 PMN cells에 의해서 탐식되더라도 유즙내에 출현하는 PMN cells의 살균력은 에너지원의 고갈로 인해서 혈중에서보다 약 38%까지 저하하게 되어 PMN cells내에서 계속 생존할뿐 아니라 오히려 치료약제로부터 보호를 받게된다.

셋째: 또한 이 균은 유선조직 내에서 섬유조직으로 encapsulation된 다양한 크기의 microabscess를 형성함으로써 한번 감염이 형성되면 치유약물의 침투가 불가능하여 준임상형과 임상형 감염 형태를 반복하는 고질적인 질병 양상을 띠게 된다.

넷째: *S. aureus*균은 유선조직의 병변이 형성되는 첫단계에서 protein A(30) 와 fibronectin binding protein이 관여하고 있으며 이 과정이 다른 어떤 환경에서보다 유즙내에서 안전하게 진행되며 *S. aureus*가 다른 원인균보다 각종 항생물질에 대한 유즙내에서의 내성 출현율이 높다.

다섯째: *Streptococcus agalactiae* 및 *Str. dysgalactiae*등과 같은 주된 유방염 원인균은 항생제 투여로 비교적 쉽게 치유가 되지만 *S. aureus*는 이러한 여러 이유등으로 인하여 각종 항생물질을 대량으로 상당기간 동안 투여하더라도 치료가 잘 안되며 유방염 치료최적기인 건유기에 치료를 실시하더라도 그 치료율이 26%밖에 되지않는 난치의 원인균이다.

여섯째: 지금까지 유방염 예방 백신개발이 이렇다 할 수준에 와 있지 않을 뿐만아니라 설령 백신접종을 2 ~ 3차 거듭 실시하여 혈중 항체가를 일정 수준이상으로 높인다 하더라도 유방의 유즙내 농도는 하루에 적어도 2회이상 젖을 짜내야 하기때문에 감염을 막을 만한 유방내 항체가 수준을 유지하기가 곤란하다는 점이다. 평생동안 유방염 백신개발에 전념하다가 금년에 정년퇴임하는 미국 코-넬 수의과대학의 Norcross 박사는 최근에 이르러서야 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 항원성에 가장 밀접한 영향을 미치는

Pseudocapsule을 이용한 실험적 백신제조(17, 28)와 야외실험 보고(15, 16, 31)를 하고 있으나 아직도 유방내 감염자체를 막지 못하는 수준에 있는 것이다. 즉 유방염에 관한한 “백신”이라는 용어 자체의 개념을 달리 해야 한다는 것을 암시하고 있다. 즉 감염자체는 예방하지 못하더라도 임상증상을 완화시키고 체세포수를 감소시킬 수 있다면 그것 자체만으로도 큰 효과가 있다고 봐야 한다는 것이다. 이는 곧 아직도 유방염 백신개발 분야에는 미지의 기술적 결함이 누적되어 있음을 뜻하며 연구개발의 필요성이 그 어느 분야보다도 많이 강조되어야 함을 지적하고 있다.

일곱째: *S. aureus* 균은 人體에서도 세균감염을 일으키는 주요 질병원인균으로서 작용하고 있으나 아직 이에 관한 제제가 없다. 특히 병원성을 나타내는 포도상구균은 capsule의 type이 8가지로 알려져 있고 그중 capsular type 5 와 8 이 거의 80%를 차지하고 있어 이 pseudocapsule을 이용한 백신제조는 젖소 유방염 방제뿐만 아니라 인의분야에서도 활용할 수 있다(26, 27). 더구나 항원성이 큰 pseudocapsule을 대량 생산하게 되면 젖소 유방염 백신 개발 기술을 인체의학에 이전할 수 있으며, 병원성 포도상구균에 의한 질병의 새로운 예방법을 제시할 수 있을 것이다.

## 2. 경제 산업적 측면

첫째 : 유방염은 젖소의 질병들 중에서 단일 질병으로는 가장 큰 경제적 피해를 초래하는 질병으로 불임증이나 생식기 질병에 의한 손실보다 두배나 높고 젖소의 질병에 의한 경제적 총 피해액의 26%가 유방염에 기인되고 있다.

둘째 : 유방염 관리 대책을 적용하지 않고 있는 목장은 약 50% 젖소의 1~2개 분방이 유방염에 감염되어 있고 이들 감염우의 2/3는 일평생동안의 75%에 해당하는 기간동안을 준임상형 감염상태로 유지됨으로써 눈에 띄지 않는 상태에서 막대한 경제적 손실(현재 30만두 착유우 추정으로 연간 650억원 손실)을 초래하는 주원인으로서 낙농인에게 최대의 골치거리 질병으로 대두되



고 있다. 우리나라의 사육두수를 55만두로 볼 때 실제 착유두수는 30만 두로 추정되는데 이 중 약 2~3%는 유방염에 이환되어 현재 치료를 받고 있다. 일단 치료가 시작되면 3일동안 지속적으로 치료를 받아야 하며 치료를 받은 후에도 인체에 대한 약물의 부작용이 우려되어 3 - 4일동안 착유한 우유를 폐기처분해야 하기때문에 총 6-7일간은 유방염으로 인해 납유하지 못하게 된다. 또한 불현성 상태인 준임상형 유방염 감염우는 현재 약 40%로 보고되고 있는바 이런 상태에서 산유량의 감소로 초래된 경제적 손실을 분방단위로 10~26%로 계산하고 있기때문에 이를 우리나라 실정에 환산한다면 연간 약 1,000 억이 넘는 계산이 된다. 첨단기법을 이용하는 종축개량도 중요하지만 그 보다는 유방병을 관리하는 기술개발이 시간적으로나 인위적인 면에서 더 용이하고 경비가 적게 소요되며 조기에 효과를 성취할 수 있는 확실한 경제적인 기술사업이다.

셋째 : 오늘날 유방염 치료 기법상의 전 세계적인 추세는 항생물질과 소염제의 투여이다. 선진 낙농국에서는 한 두번의 치료로 그 결과가 불량할때는 과감하게 도태해야 하는 것이 이 질병을 관리하는 수칙의 하나로 되어 있으며 아무리 핵이식 기법이나 고등형질을 가진 고품종이라 할지라도 일단 유방염에 감염되면 젖소로서의 기능을 제대로 발휘할수 없기 때문에 유전공학 기술의 의미를 잃게 된다. 우리나라의 낙농인은 선진 낙농국의 목장주와는 달라 유방염 증세가 없어 질때 지속적으로 항생물질을 투여하기 때문에 심각한 유즙내 잔류항생물질 문제를 야기시킬 뿐만아니라 항생물질 투여로 증상이 완화되고 치료되었다 하더라도 유방내 유선조직이 파괴되어 능력이 크게 저하되어 그 비유기 동안에는 결코 산유량의 원상회복이 어렵기 때문에 역시 낙농가에게 손해를 가져다 주는 주된 요인이 된다. 이런 이유로 유방염에 감염된 젖소의 치료기간을 단축시키고 치료를 하였다하더라도 지속적으로 납유를 할 수 있는 비항생물질 요법의 개발이나 백신의 개발 시급히 요구되며 또한 일반 낙농현장에서 가장 간절히 원하는 애로사항으로 지적되고 있다.

넷째 : 유방염은 젖소의 질병중에서 조기진단이 가장 용이한 질병이다. 아침 저녁으로 1일 2회씩 착유하는 시간에 육안적 시진이나 젖통을 만져 감지할 수 있는 촉진이 가능하기 때문에 임상적으로 목부 수준에서 손쉽게 값싸며 부담이 되지 아니하는 간편한 착유와 사육위생 측면이 강조된 감염억제 대책을 수립도 중요하지만 유방염 원인균의 감염자체를 근본적으로 예방할 수 있는 백신의 개발은 절대적으로 필요하며 유방염 방제 기술개발의 중요한 연구 분야이다. 즉 젖소 유방염 방제 기술은 백신개발, 비항생 치료제 개발, 관리프로그램 개발 등 3개 분야의 총체적인 기술적 개발이 절실히 요구되지만 예방적 차원에서의 백신개발은 어떤 부분보다도 경제적 가치가 있다.

### 3. 사회문화적인 측면

식품의 국제 경쟁력은 가격뿐만 아니라 품질과 소비자의 기호성 등에 따른 선택이 크게 영향을 미친다는 것을 감안할 때 국민이 신뢰하고 소비를 즐길 수 있는 「국적있는 자국산 우유」의 생산은 무엇보다 중요하다. 무역 자유화 이후 사육환경이 전혀 다른 외국산 원유와 각종 유제품의 무분별한 수입으로 약 물잔류에 의한 안전성 문제는 국민보건에 큰 영향을 미칠 수 있다. 한편 경제 성장과 더불어 식생활의 변화는 비단 우유의 양적인 증가 뿐만아니라 위생적이고 안전성이 높은 생산품을 요구하고 있기 때문에 저가의 고품질 원유를 생산하는 것은 개방화에 대비한 한국낙농산업의 국제 경쟁력 강화에 필수적이며 「국내산」을 선호하는 국민의 정서에 부합된다고 하겠다.

우리나라 낙농의 역사는 30여년에 불과하지만 80년 이후 비교적 짧은 기간에 괄목할 만한 양적·질적 성장을 이룩했고 95년 현재 약 2만 8천 가구가 낙농산업에 종사함을 감안해 볼때 낙농산업의 기반강화를 위한 연구가 절대적으로 필요하다고 볼수 있겠다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1 절 지금까지의 연구 개발 실적

#### 1. 외국의 경우

##### 가. 국외 현황

##### (1) *Staphylococcus aureus* Vaccine 개발

- ① Ward(1977)등은 순수 분리한 *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin과  $\beta$ -toxin을 토끼에 접종을 실시하여  $\alpha$ -toxin이 치사성 출혈성 부종의 주요 병원성 독소라고 보고하였다.
- ② Norcross와 Opdebcek(1983)은 유방염 유즙에서 직접 분리한 *Staphylococcus aureus*의 95%가 Pseudocapsule를 가지고 있다고 보고하여 pseudocapsule이 유방염 병원성에서 중요한 인자임을 강조하였다.
- ③ Kehoe(1983)등은 *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin gene을 E. coli에 Cloning하여 expression을 유도하였다.
- ④ Gray와 Kehoe(1984)는 *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin gene의 Sequence를 보고하였다.
- ⑤ Pattee(1986)는 *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin gene의 Chromosomal mapping을 하였다.
- ⑥ Bhakdi등(1989)은 *Staphylococcus*  $\alpha$ -toxin에 대한 고도 면역글로블린은  $\alpha$ -toxin의 세포 독성작용으로부터 보호작용이 있다고 보고하였다.
- ⑦ Nickerson등(1993)은 Pseudocapsule을 함유하는 bacterin으로 예방접종하고 *S. aureus*로 공격하였을 때 예방접종우의 유방감염율이 감소되었다고 보고하였다.
- ⑧ Nordhaug 등(1994)은 Pseudocapsule,  $\alpha$ 와  $\beta$ -toxin을 함유하는 *S. aureus* 불활화 vaccine을 처녀우에 예방접종을 하였을 때 Pseudocapsule과  $\alpha$

-toxi에 대한 항체가 초산 비유기 동안 대조군보다 현저히 높았다고 보고하였으며 108두에 대한 임상시험에서 예방접종우군은 *S. aureus*에 대한 임상형 유방염이 발생하지 않았지만 대조우군에서는 6.0%의 소에서 발생하였다고 보고하였다.

- ⑨ 포도상구균 백신 개발은 최근에 균체의 협막, protein-A, toxoid, staphylococcal adhesion protein(fibronectin receptor) 등을 항원물질로 하는 연구가 젖소에서 가장 난치병인 포도상구균성 유방염을 대상으로 진행되었다.
- ⑩ Mamo W등(1995)의 Sweden 연구팀은 Fibronectin binding protein을 이용한 *S. aureus* mastitis vaccine을 시험적으로 생쥐에 백신접종하였고 그 면역학적 반응을 보고하여 FBP의 면역유효성을 검증하였다.
- ⑪ Girando J.A(1995)등은 Argentina에서 0.4% formalin으로 불활화시켜 aluminum hydroxide을 adjuvant로 하는 *Staphylococcus mastitis* vaccine을 개발하고 2차에 걸친 야외시험 결과를 발표하였으며 특허를 획득하고 시판중에 있다.
- ⑫ 앞으로 *S. aureus* 백신은 Fibronectin binding protein(FBP)과 pseudocapsule을 항원으로 하는 관점에서 제조되어야 한다는 것은 확실한 것 같다. FBP을 재조합하는 유전공학적 기술은 Sweden의 Dr. P. Jonsson 교수를 중심으로 하는 연구팀과 본 연구진도 기술을 보유하고 있다.
- ⑬ Pseudocapsule 생산면에 있어서도 Dr. P. Jonsson 교수의 연구진이며 제자인 Dr. W. Mamo가 세계적으로 최첨단에 있으나 어떤 면에서는 본 연구책임자 팀이 기술력으로 앞서 있는 점을 발견하였다.

## (2) 대장균 백신개발현황

- ① Hogan등(1992)은 G. negative-세균에 대한 공통 항원성을 갖는



Lipopolysaccharide core antigen(J5 bacterin)을 항원으로 사용한 예방접종 실험에서 대장균성 임상형 유방염 발생율은 감소되었으나 분만시 그람음성 세균성 유방감염율은 감소되지 않았다고 보고하였다.

② Tyler등(1992)은 Lipopolysaccharide core antigen(J-5 bacterin) Vaccine은 *E. coli*, *Salmonella spp*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* 및 lipid A에서 분리한 endotoxin과 공통항원을 갖고 있으므로 그람 음성균성 유방염 예방에 기여한다고 보고하였다.

③ 그람음성 세균성 백신

최근 백신생산에 사용되고 있는 것은 균체 외막이 없는 rough-mutant(R) coliforms이며 이 백신(J-5 bacterin)은 교차면역원성을 가지고 있기 때문에 동일한 그람음성균이 감염되었을 때 임상증상을 줄이고 유방염발생을 줄여 주는 효과를 가지고 있다.

### (3) Adjuvant에 관한 연구

① Hogan등(1992)은 *E.coli* J5 bacterin제조시 Freund's Incomplete adjuvant를 부형제로 사용하여 임상형 대장균성 유방염의 발생이 감소되었다고 보고하였다.

② Watson와 Davies(1993)는 *S. aureus*의 불활화 vaccine의 효과를 높이기 위한 adjuvant에 대한 연구에서 dextran sulfate를 10-20mg/kg체중으로 투여했을때 가장 뛰어난 효과를 발휘하였으며 Freund's Incomplete Adjuvant를 병용하면 항체가 적어도 1년까지 연장시킨다고 보고하였다.

③ Nordhaug등(1994)은 *S. aureus* 불활화 vaccine을 mineral oil과 detergent (Montanide 103)로 혼합 제조하여 실제적인 방어효과를 얻었다고 보고하였다.



지금까지 유방염 백신에 대한 외국의 연구는 유방염에서 가장 문제가 되는 포도상구균(*S. aureus*)과 대장균(*E. coli*)을 대상으로 하였으며 인공배지내에서 배양한 균체를 이용한 bacterin 이었다. 이들 bacterin은 임상형 유방염의 발생을 감소시키고 임상증상을 완화시키는 긍정적인 효과가 인정되지만 신규 감염을 감소시키는 효과는 크지 않은 것으로 보고하였다.

#### (4) 항생제 대체약물들

##### ① 면역체계의 촉진

숙주의 방어기전을 이용해 유방염 원인균에 대해 사전에 면역시키거나 면역치료법으로 유방에 감염되어 있는 세균을 제거하는 치료법으로 최근 연구가 활발하게 진행중이다.

백신접종은 유방내 접종, 근육주사 및 상유방임과절에 접종하는 세가지 방법이 있는데 이 방법들은 임상증상의 발현을 줄여주며 완전한 유방내 세균 감염을 방어하는지에 대해서는 연구가 계속 진행중이다.

사이토카인은 최근 재조합사이토카인(IL-1 $\beta$ , IL-2, 인터페론, Colony Stimulating Factor:CSF)은 유방내 탐식세포의 탐식능을 활성화시킴으로써 유방염의 예방과 치료에 희망을 불어 넣어주고 있다.

비특이성 면역치료제는 비특이성 biostimulant(Yatren casein,)은 중부유럽에서 널리 사용되고 있으며 최근에는 *Propionibacterium acnes* preparation(Eqstim, ImmunoVet)은 그 효능에 대한 연구가 진행중이다.

##### ② 비항균물질

bacterial bee wax(propolis = bee glue)는 유럽일부지역에서 사용되고 있으며 lysostaphin과 nisin을 액제로 사용할 경우 *S. aureus*, *Str. agalactiae*와 *S. uberis*성 유방염에 효과가 있다고 하였으며 최근에는 Lactobacilli을 이용한 Probiotic culture법이 연구중이다.

우유내 항균인자의 활성을 높이는 약제들 desferroxamine(Desferal, iron binder), allopurinol(xanthine oxidase inhibitor), glucose-glucose oxidase, superoxide dismutase(Orgotein), aprotin(Trasylo) 등은 유방내주입으로도 별 다른 긍정적인 결과를 기대할 수 없었다.

### ③ 항산화제와 사료첨가제

사료내 비타민 A, 비타민 E, 베타카로틴과 셀레늄의 수준이 낮아졌을 때 감염에 대한 저항능의 감소로 인해 유방염이 발생하는 데 지속적으로 비타민 A, 비타민E, 베타 카로틴과 셀레늄의 수준을 높여주면 유방염 발생이 감소하는 것으로 보고되었고 일부에서 사료배합에 응용되고 있는 중이다.

최근 유방염치료에서의 약리학적 평가는 연구자들간에도 그 연구결과의 변동이 심하기 때문에 주로 치료목적이라기 보다는 유방염을 초기에 예방하여 낙농가에게 이익이 돌아가도록 하는 쪽으로 치중하여 연구되어 오고 있는 실정이다.

### (5) 기타개발 현황

Nilsson 등 (1997)은 패혈증과 패혈성 관절염에서 포도상구균의 polysaccharide microcapsule이 관절염의 발생빈도를 증가시키며 질병의 경과를 더욱 심하게 하는 원인임을 증명하였으며 Lee 등(1997)은 rat를 이용한 실험에서 카테터삽입으로 인해 발생하는 포도상구균성 심내막염은 type specific capsular polysaccharide에 대한 항체가 포도상구균의 공격접종시 방어능이 있으며 특히 polysaccharide와 protein conjugate vaccine이 더 방어에 효과적임을 증명하였다.

또한 황색포도상구균의 type 8 capsular polysaccharide의 분자생물학적 특징과 유전자 수준에서의 분석을 실시하여 cap 8 gene은 하나의 커다란 transcript에서 전사되어 나옴을 증명하였으며(Sau 등, 1997), type 1 capsule

gene은 Ouyang과 Lee (1997), type 5 CPS는 Lee 등(1994)이 증명하였다. Fattom 등(1995)은 황색포도상구균에 대한 예방백신은 conjugated된 형태로 사용될 경우 5배이상 면역형성능이 높았다고 하였으며 Robbins 등(1995)은 group B와 황색포도상구균의 다가 capsular polysaccharide-protein conjugated백신이 Group B 연쇄상구균과 황색포도상구균의 전신감염에 대한 예방가능성이 있다고 보고하였다.

Soell 등(1995)은 황색포도상구균의 capsular polysaccharide type 5와 capsular polysaccharide type 8은 사람의 상피 KB cells, 내피세포와 단핵구에 면역조절작용을 가지고 있는 세균의 adhesin으로 작용한다고 하였다.

Fattom (1993)은 황색포도상구균의 capsular polysaccharide type 5와 8을 *Pseudomonas aeruginosa* recombinant exoprotein A와 결합시킨 conjugated vaccine이 탐식능이 높았으며 생물학적으로 활성이 높은 항체를 생산한다고 보고하였다.

CPS와 carrier protein을 결합시킨 conjugated vaccine은 *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A를 carrier protein으로 사용할 경우 non-conjugated vaccine에 비해 conjugated vaccine의 면역능이 높았다. 더욱이 conjugated vaccine은 T세포 의존성 특징을 나타낸다(Fattom, 1990)고 하였다.

Fibronectin-binding protein은 세포외기질(ECM)에 결합하는 매개체로 작용하며(Speziale 등, 1986, Patti 등, 1992), 세포외기질에 결합하는 것이 상처부위의 감염과정의 초기에 일어난다고 하였다. 따라서 이 FnBP가 virulence factor로 간주되어진다고 하였다(Beachey, 1981, Christensen 등, 1985, Kuypers와 Proctor, 1989).

젖소의 유방염과 사람의 감염부위에서 분리된 *staphylococcus aureus*는 fibronectin에 특이적으로 결합하며 fnbp단백질은 fnbA와 fnbB로 나누어지는데 이 단백질이 염기서열과 클로닝이 완료되었다고 하였다(Jonsson 등, 1991). 결합력 때문에 fusion protein의 형태로 생산되어지는데 대량생산이 가

능하다고 보고 하였다(Mamo 등, 1994).

#### (6) 지금까지의 국내 연구개발 주요실적

*Staphylococcus aureus* 준임상형 유방염을 보이는 비유기 젖소에서 자가 박테린-toxoid의 치료효과 실험(세계우병학회, 호주 시드니, 1988, 8월발표)에서 상유방임파절 주위 피하부에 4주간격으로 2차접종한 결과 혈청과 유즙내 *Staphylococcus aureus*에 대한 IgG항체가는 백신접종군에서 대조군에 유의성 있게 높았으며( $P < 0.05$ ) 혈청과 유즙내  $\alpha$ -toxin에 대한 IgG의 수준도 백신접종군에서 유의성있게 증가하였다( $P < 0.05$ ). 또한 백신접종군에서 자연치유율을 높이고 황색포도상구균에 대한 감염의 정도를 크게 약화시켜며 신규감염을 억제할 수 있다고 보고하였다.

*Staphylococcus aureus*의 fibronectin-binding protein gene의 클로닝과 발현에 대한 연구(대한수의학회지 37(4) 875-882, 1997)에서 중합효소 연쇄반응에 의하여 *Staphylococcus aureus* chromosomal DNA로부터 signal sequence 부터 membrane-spanning domain까지(3079bp), D1에서 membrane-spanning domain까지(961bp), 그리고 D1에서 D3까지의(475bp)의 FnBP gene을 각각 증폭시켰으며 vector에 클로닝하여 발현시킨 결과 26kDa의 glutathione-s-transferase(GST)와 fusion된 signal sequence로부터 membrane-spanning domain까지(129kDa), 그리고 D1에서 D3까지(49kDa)의 재조합 GST-FnBP를 포르말린으로 처리하여 면역시킨 토끼에서 정맥내 공격 접종결과 제거율이 대조군에 비해 빨랐다.

*Staphylococcus aureus*의 capsular polysaccharide의 증명과 생산 및 정제에 관한 실험에서(대한수의학회지 37(3)부록, 1995), 97kDa의 type 2 capsular polysaccharide를 anion exchange chromatography를 이용하여 정제하였다.

기니픽을 이용하여 박테리오신이 *Staphylococcus aureus*에 미치는 영향을 연구하였으며(이스라엘, 1995, the 3rd international mastitis seminar) 전자현



미경촬영을 통해 lysostaphin과 nisin합제가 *Staphylococcus aureus*를 위축시키고 세포벽을 파괴시킨다고 보고하였다(세계수의사대회, proceedings of XI X, WVC, 1995).

*Staphylococcus aureus* Smith strain을 이용한 토끼에서의 type 2 capsular polysaccharide항체가 정맥내 공격접종시 대조군에 비해 방어능과 세균제거율이 높다고 보고하였다(1997, National Mastitis Council)

*Staphylococcus aureus*의  $\alpha$ -toxin에 대한 항체가 형성능과 혈중방어능을 연구하여 10hemolytic activity를 이용한 toxoid백신이 공격접종한 토끼의 혈중내  $\alpha$ -toxin을 중화할 수 있다고 보고하였다(American Animal Bovine Practitioner, v(32)14-15, 1998).

*Staphylococcus aureus*의 virulence factor중  $\alpha$ -toxin, type 2 capsular polysaccharide, fibronectin-binding protein을 이용한 재조합 유방염 백신을 개발하여 정맥내 접종과 혈중항체가 등을 조사한 바 백신접종군에서 대조군에 비해 유의성있게 세균분리율과 방어능, 항체생성능이 우수하여 향후 유방염 재조합 백신개발이 가능하다고 보고하였다(Research in Veterinary Science, 투고).

덧소 *Staphylococcus aureus*성 유방염 발생을 예방하기 위해  $\alpha$ -toxin, type 2 capsular polysaccharide, 재조합 fibronectin-binding protein을 이용한 재조합 백신을 개발하여 비유우와 건유우 각각 20두씩을 4주간격으로 2회 근육접종하여 세균분리 및 유방염 발생체세포수 증가 등에 관한 논문 준비중임(1998년 8월말 American Animal Bovine Practitioner 투고예정).



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1 절 최종목표

우리나라 젖소 유방염 감염원인균의 36%를 차지하고 있는 *staphylococcus aureus*균에 대한 재조합 백신을 개발하여 유방염을 예방함으로써 유방염 감염을 대폭 감소시킴으로써 원유의 고품질화 및 생산성 향상을 기한다. 또한 일단 주 원인균에 대한 백신개발에 성공하면 기타의 유방염 원인균에 대한 개발 기술의 가능성을 적립하게 되며 특히 사람에서 문제시 되고 있는 methicillin저항성 황색포도상구균에 대한 고면역항혈청 생산 및 예방백신의 제조가 가능하게 된다.

### 2 절 당초목표

#### 1. 1차년도

1차년도의 연구개발목표는 재조합 백신에 필요한 항원을 생산이며 재조합 FnBP gene클로닝 및 염기서열 분석과 재조합 FnBP의 발현 및 정제과정이다. 또한 황색포도상구균의 Capsular polysaccharide의 최적발현조건과 확인 방법 및 간이정제를 실시하고 아울러 알파독신의 최적 발현조건 및 간이정제를 통한 항원정제법 실시한다.

#### 2. 2차년도

2차년도의 연구개발목표는 항원의 면역원성과 안정성 평가 및 항원의 대량 생산 및 정제 공정개발으로써 FnBP, Capsular polysaccharide, alpha-toxin의 면역원성 평가, 실험동물에서의 방어효과 및 안전성 평가, 젖소 면역효과 및 안전성 평가, 항원의 대량생산 방법 개발 및 항원의 정제단계이다.

### 3. 3차년도

3차년도에는 야외목장을 대상으로 한 유방염 재조합 백신의 임상실험을 실시하며 항원의 대량생산법 및 백신제조 기술의 확립과 유방염 재조합 백신의 산업화 가능성을 탐색한다.

## 3 절 주요 연구내용

### 1. 1차년도

- 가. 알파톡신의 최적 발현 조건선정, 용혈능평가, 알파톡신확인 및 간이 정제방법 확립
- 나. pseudocapsule의 최적발현 조건선정 및 발현여부를 전자현미경 및 기타 미생물학적 방법으로 검증하고 난 후 간이 정제기술법 확립
- 다. Fibronectin-binding protein의 발현, gene cloning 및 염기서열 분석
- 라. Fibronectin-binding protein의 정제법 확립

### 2. 2차년도

- 가. 알파톡신에 대한 면역원성 평가
- 나. pseudocapsule에 대한 면역원성 평가
- 다. fibronectin-binding protein에 대한 면역원성 평가
- 라. 각 항원의 상승작용 평가 및 adjuvant의 효과분석
- 마. 면역화된 토끼를 이용한 공격집종 및 방어능 평가
- 바. 가장 우수한 방어능그룹 선정

### 3. 3차년도

- 가. 실험목장 선정 및 백신접종우 선정과 사전 세균 및 유방염 감염여부 검사
- 나. 젖소 유방염 백신 알파톡신 항원 대량생산
- 다. 젖소 유방염백신 pseudocapsule 항원대량생산
- 라. 젖소 유방염 백신 fibronectin-binding protein 항원대량생산
- 마. 3가지 항원을 기본으로 하는 adjuvant효과분석
- 바. 3주간격으로 유즙내 세균분리 및 체세포수 변동여부 조사

## 4 절 주요 연구개발결과

### 1. 백신항원정제

#### 가. 알파톡신의 분리 및 정제

##### (1) 최적배지

Yeast extract medium에 casein hydrolysate, Casamino acid, glucose, thiamine과 nicotinic acid를 첨가한 배지에 *Staphylococcus aureus* Wood 46를 접종한 후 37°C의 rotary shaker에서 분당 220 cycles로 48시간 동안 배양하였다. 배양후 원심분리한 상청액을 0.45 $\mu$ m의 filter unit로 여과한후 Peterson 법에 의하여 crude toxin의 양을 측정하였고 Loeffler법에 따라 알파독소의 활성을 측정하였다(표 1).

**Table 1.** Comparison of bacterial growth rate, protein concentrations with alpha-toxin hemolytic activity following 0, 8, 11, 16, 18, 33, 46 hrs on casein-yeast extract medium

Postinoculation	A(absorbance)	B(mg/dl)	C(HU)
0 hr	0.039	9.5	0
8 hrs	1.325	13	2400
11 hrs	1.346	12	1800
16 hrs	1.040	11.5	4800
18 hrs	1.241	9	9600
33 hrs	1.228	7	3600
46 hrs	0.91	8	1200

A : Absorbance of bacterial growth rate (578nm)

B : Total protein concentration of 1ml culture medium, 562nm

C : Hemolytic activity using 10% rabbit erythrocytes suspension, 412nm with time (end-point method)

## (2) 알파독신 정제

알파독신 최적배지를 선정하여 배양후 분리정제한 결과 33kDa의 알파독신 분획을 확인하였으며 표준균주인 *Staphylococcus aureus* wood 46균주와 야외균주를 비교한 결과 야외균주의 알파독신 발현율도 표준균주와 유사하였다.

배양 18시간후 배양액의 상청액을 ammonium sulfate로 침전시켜 투석막과 column chromatography를 이용하여 정제하였다. 알파독신의 확인은 western blot으로 확인하였으며 알파독신 분획은 정제과정의 각 단계별로 SDS전기영동법을 이용하여 확인하였다. 1차 최종실험결과 배양후 측정된 용혈능은 배지 상청액은 4HU의 역가를 나타냈으며 백신으로 사용하기 위해서는 약간의 농축단계가 필요하였다.

나. pseudocapsule 분리 및 정제

(1) 최적배양조건

Pseudocapsule의 생산성을 극대화하기 위하여, 임상형유방염에서 분리한 *Staphylococcus aureus* 균주를 다양한 배지 조성으로 24시간 동안 호기성 배양조건 하에서 배양하여 pseudocapsule의 최적 배양 조건을 조사한 결과는 표2과 같다.

**Table 2.** Summarized results of three separate tests carried with *Staphylococcus aureus* in various medium

Culture medium	TEM*	India ink+	Autoagglutination
NB	<10	-	-
BHI broth	<10	-	-
Modified 110	20-30	-	-
BHI+whey(10%)	>90	-	+
BHI+whey(20%)	>80	-	+
BHI+lactose(100mg/ml)	<20	-	+
BHI+dextrose(100mg/ml)	<20	-	+
BHI+casein(20mg/ml)	<10	-	-
NB+BST	<10	-	-

\* : Percentage of bacteria expressing pseudocapsule

+ : Test for presence of 'in vitro' surface antigen

NB : nutrient broth

BHI : brain heart infusion



Pseudocapsule의 생성은 BHI 배지에 유청을 첨가한 상태에서 현저히 증가하였으며 유청을 10%를 첨가한 배지가 20%를 첨가한 배지보다 생산성이 더 우수하였다. 따라서 pseudocapsule의 발현율을 높이기 위해서는 유청을 첨가해야 하며 사용하는 일반배지도 BHI보다는 TSI배지에 유청을 첨가하는 편이 더 Capsule의 발현율을 높일 수 있을 것 같다.

배지조성이 pseudocapsule의 표면항원성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, *Staphylococcus aureus*를 다양한 배지조성하에 배양한후 sodium hydroxide를 이용하여 자가응집상태를 조사한 결과는 표3와 같다.

**Table 3.** Autoagglutination test for detecting the degree of hydrophobicity in *Staphylococcus aureus*

Culture medium	Molarity of sodium hydroxide											
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/532	1/1064	
HI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NB + BST	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
BHI+ 1(100mg/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
BHI +2(100mg/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHI + whey(10%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BHI + 3(100mg/ml)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
BHI+ 4(100mg/ml)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BHI + 5(100mg/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

1: thiamine, 2: dextrose, 3: glucose, 4: nicotinic acid, 5: lactose

위의 실험에서 포도상구균의 표면항원성이 가장 우수하게 발현되는 것은 BHI 배지에 10%의 유청을 첨가한 것과 lactose를 첨가한 배지이었으며, 약하지만 dextrose, thiamine, glucose 등의 성분도 포도상구균의 막 표면항원의 hydrophobicity를 높여주었다. 포도상구균의 막 항원성은 유청 첨가군과 lactose 첨가군에서 유의성있는 hydrophobicity를 확인할 수 있었으며 백신에 사용되는 균체의 항원성발현을 높여주는 역할을 할 수 있을 것 같다.

## (2) pseudocapsule의 확인

투과전자현미경관찰을 위하여 0.01% bovine serum albumin (BSAS)이 함유된 0.9% saline으로 2회 정도 세척을 하였다. BSAS액을 만들때는 완전히 알부민이 용해되도록 하는 것이 부유물을 줄이고 현미경 촬영하는 데 도움이 되었다. 200 MESH Formvar coated grids를 이용한 세균검사는 세균의 pseudocapsule을 가시화하는 데 있어 신뢰할 만한 방법이었다. 배양 직후에 염색을 하지 않는 방법이 염색을 하는 방법보다 pseudocapsule을 관찰하기에 용이하였다.

실험에서 배지에 첨가된 유청의 유무에 따라 pseudocapsule을 형성하는 것과 형성하지 않는 것을 구별할 수 있었으며 배지에 유청을 함유하지 않은 세균은 pseudocapsule을 형성하지 않는 것으로 확인되었다. pseudocapsule은 얇게 세포의 가장자리에 위치하고 있으며 매우 유약하기 때문에 투과 전자현미경 전처리 과정에서 쉽게 손상받았다. 따라서 anti-pseudocapsule antibody가 포함된 혈청을 전자현미경 전 처리과정에서 배지에 첨가해 세척을 하면 pseudocapsule의 안정화를 기할 수 있다고 생각된다. 그러나 이 방법은 정확한 구별이 어렵고 해상도에 문제가 있어 신뢰할 만한 방법은 아니라고 사료된다.

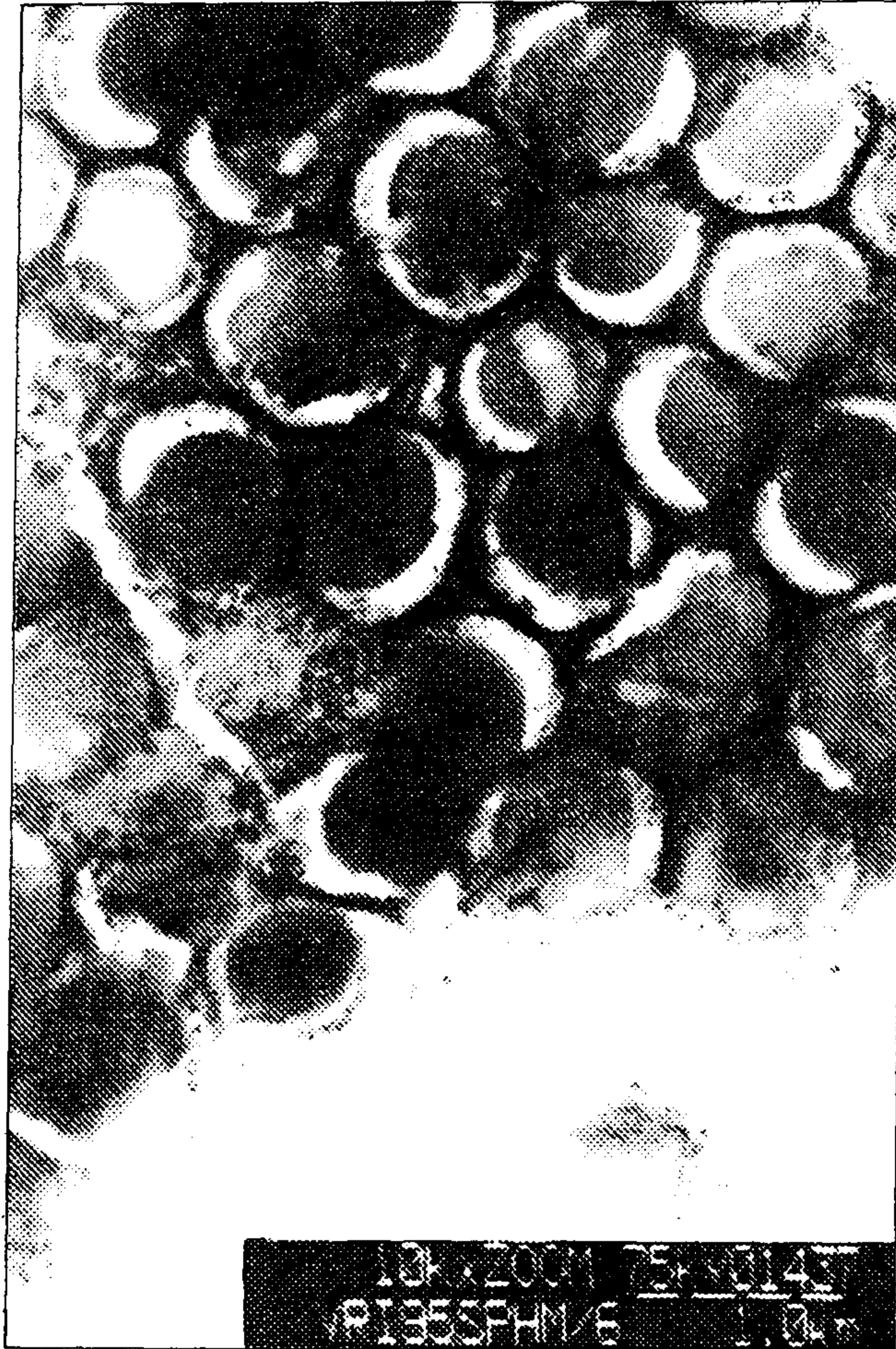


Fig 1. Transmission electron microscopic picture of pseudocapsules of *Staphylococcus aureus*

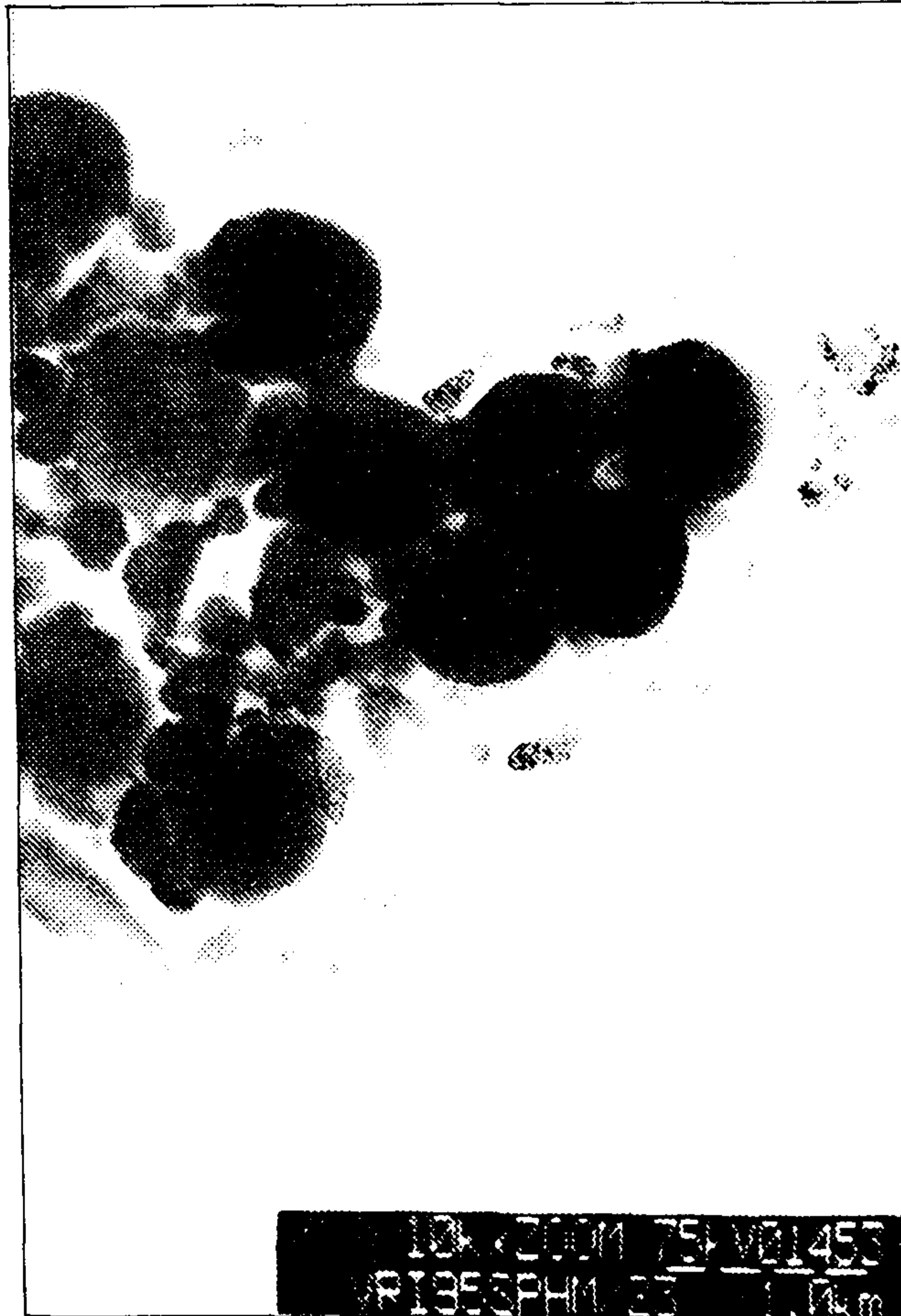


Fig 2. Transmission electron microscopic picture of non-pseudocapsules of *Staphylococcus aureus*



(3) capsular polysaccharide의 정제

1. 2ml의 균배양액을 1.25 liter에 넣어 mass culture하였다.
2. 배양조건은 37°C에서 120rpm으로 세균의 성장이 일정한 시점까지 배양 하였다.
3. 세균을 0.16  $\mu$ m filter를 이용해 농축시킨다음 5500g에서 30분간 원심분리하였다.
4. 침전물을 버리고 상청액을 10kda ultrafilter를 이용해 500ml까지 농축시켰다.
5. 이 상청액은 최종 농도가 0.1%가 되도록 sodium azide를 첨가하여 37°C에서 50mg의 DNase와 10mg의 RNase을 섞어 하루밤 배양하였다.
6. 다음날 다시 같은 양의 DNase와 RNase를 첨가하고 하루밤 배양한 후 다시 pronase를 다음 날 아침에 50mg 첨가하였다.
7. 6시간 후에 나머지 단백질을 phenol extraction method으로 제거하였다(phenol:chlorform:iso-amyl alcohol의 비율은 75:25:1의 비율로 혼합하여 섞는다).
8. 10kda의 ultrafilter를 이용하여 (세척액; 증류수) 여러번 세척한다 음동결건조시켰다.
9. Bradford method(Anal Biochemistry; 1976, 72;248-254)에 따라 단백질의 양이 1%이하가 되도록 정제하며 핵산은 260nm에서 0.5%이하가 되도록 정제하였다.
10. polysaccharide의 증명은 anion exchange chromatography를 이용해서 실시하였다.
11. 투석은 먼저 증류수로 한 후 0.05M sodium acetate-0.1M Nacl(pH6)로 이차투석하였다.
12. Dialysate(200ml containing 5g of dry extract) - DEAE -



- sephacel(column 5×64cm)에 적용시켰다.
13. 0.05M sodium acetate buffer(0.1M NaCl pH6이 포함되어 있는)로 equilibration시켰다.
  14. column의 5 volume으로 세척하였다.
  15. elution(0.05M sodium acetate-0.5M NaCl pH6)시켰다.
  16. capillary precipitation을 이용해 검출하였다.
  17. 모아서 0.05M sodium acetate-0.1N NaCl(pH6)으로 투석하였다.
  18. 투석은 DEAE-sephacel column(2.6×48cm)에 적용시켰다.
  19. 0.05M sodium acetate 속에 0.1M NaCl이 농도차가 나게 1.2L 제조하였다.
  20. type 8 CP의 fraction을 모아 탈염화시켰다.
  21. 동결건조시켰다.
  22. 용출은 0.05M Sodium acetate buffer(pH 6)으로 다시 Sephacryl S-300 column(Pharmacia; 1.5×90 cm), 0.5ml/min, 5×60cm, 4ml/min)에 적용시켰다.
  23. capillary precipitation으로 CP의 분획을 확인하고 sephadex G-25 column에서 탈염화시켰다.
  24. 다시 최종 동결건조시켰다.

pseudocapsule의 정제는 1단계로 표준균주인 smith strain을 이용하여 간이 정제를 실시한 바 97kDa의 분획에서 검출되었다. 최종적으로 백신항원으로 사용하고자 할 경우 2회 멸균과정을 거쳐 상청액을 수거한 후 동결건조시켜 사용하거나 plate에 접종후 세균집락만을 수거하여 멸균과정후 고농도의 상청액을 사용하는 백신제조과정상 경제적인 것 같다.

다. fibronectin-binding protein 염기서열 분석 및 발현정제

(1) 중합효소 연쇄반응에 의한 fibronectin-binding protein gene의 증폭

재조합 fibronectin-binding protein 생산을 목적으로 cloning에 필요한 *Staphylococcus aureus*의 *fnbp* gene을 증폭하기 위하여, *S. aureus* Cowan I, Wood 46과 KNU 194 strain에서 분리한 chromosomal DNA를 주형으로 하여 signal sequence부터 membrane-spanning domain까지, D1에서 membrane-spanning domain까지, 그리고 D1에서 D3까지의 *fnbp* gene을 PCR기법으로 각각 증폭시켰다. 여기에서 얻어진 PCR product를 0.7% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bormide로 염색하여 *fnbp* gene의 증폭 여부를 확인한 결과, 그림 3에서와 같이 Cowan I에서 분리한 chromosomal DNA 주형으로 하여 증폭시킨 경우에는 D1에서 membrane-spanning domain까지(Lane 4)와 D1에서 D3까지(Lane 2)의 *fnbp* gene으로 판단되어지는 DNA band가 관찰되었으며, Wood 46 strain의 chromosomal DNA를 주형으로 증폭시킨 경우에는 signal sequence부터 membrane-spanning domain까지(Lane 8), D1에서 membrane-spanning domain까지(Lane 5), 그리고 D1에서 D3까지(Lane 3)의 *fnbp* gene으로 판단되어지는 DNA band가 모두 확인되었다. 그러나 KNU 196 strain의 chromosomal DNA를 주형으로 하여 반응시킨 경우에는 모든 구간의 PCR 생산물에서 증폭된 DNA marker가 관찰되지 않았다. 이상의 결과에서 Wood 46 strain의 chromosomal DNA를 주형으로 한 PCR에서만 모든 구간의 *fnbp* gene이 증폭되었기 때문에 이후의 실험은 Wood 46 strain에서 증폭된 PCR 생산물을 이용하여 실시하였다.

(2) *Staphylococcus aureus fnbp* gene의 cloning

PCR기법에 의하여 증폭된 *fnbp* gene을 vector plasmid인 pGEX-4T-2에 cloning 하기 위하여 *fnbp* gene과 pGEX-4T-2를 각각의 제한효소로 잘라 ligation시켰으며, 재조합 DNA를 competent DH5 $\alpha$  *E. coli*에서 분리한

plasmid가 *fnbp* gene을 함유하고 있는지 확인하기 위하여 다시 각각의 제한 효소로 잘라 1.5% agarose gel에 전기영동하여 확인한 결과, 그림 4와 같이 pGEX-4T-2(3970bp)의 DNA band와 insert되었던 signal sequence부터 membrane-spanning domain까지(Lane 2), D1에서 membrane-spanning domain까지(Lane 3), 그리고 D1에서 D3까지(Lane 4)의 *fnbp* gene의 DNA band들이 관찰되었다.

### (3) 형질전환된 DH5 $\alpha$ *E. coli*로부터 재조합 FnBP의 발현

Signal sequence부터 membrane-spanning domain까지, D1에서 membrane-spanning domain까지, 그리고 D1에서 D3까지의 *fnbp* gene이 형질 도입된 각각의 DH5 $\alpha$  *E. coli*로부터 재조합 FnBP를 발현시켜 다음과 같은 결과를 얻었다.

각 부위 별로 발현된 재조합 FnBP glutathion-S-transferase(GST; M<sub>w</sub>=26 kDa)와 fusion된 GST-FnBP의 형태로서 그림 5에서와 같이 signal sequence부터 membrane-spanning domain까지 (Lane 3), 그리고 D1에서 D3까지의 *fnbp* gene에서 발현된 재조합 FnBP(Lane 4)의 크기가 각각 236, 129와 49 kDa의 band를 나타내었다. 발현량에 있어서는, D1에서 D3까지의 *fnbp* gene에서 발현된 재조합 FnBP D1-D3의 경우가 가장 발현량이 많았으며, signal sequence부터 membrane-spanning domain까지와 D1에서 membrane-spanning domain까지의 *fnbp* gene에서 발현된 재조합 FnBP는 그 발현량이 소량이었다. 또한 GST-FnBP D1-D3를 배양시간 별로 각각 배양 0시간, 1시간, 3시간과 5시간에 그 발현량을 확인하여 본 결과, 그림 6에서와 같이 배양시간에 비례하여 발현량이 증가하였다.

### (4) 재조합 FnBP의 순수분리

재조합 GST-FnBP를 순수분리하기 위하여, Bulk GST Purification Module

을 이용한 affinity chromatography를 실시하였다. 그 결과 그림 7에서와 같이 49 kDa에 해당하는 D1-D3의 재조합 GST-FnBP만이 관찰되었으며, signal sequence부터 membrane-spanning domain까지와 D1에서 membrane-spanning domain 까지의 *fnbp* gene에서 발현된 재조합 FnBP는 순수분리되지 않았다. 그리고 첫 번째 elution한 부분에서 대부분의 단백질이 분리되었으며, 2번째나 3번째의 elution 부위에서도 순수분리 되었으나 그 분리량이 점차 감소되었다.

#### (5) 재조합 FnBP의 Western blot

Affinity chromatography를 통해 순수분리된 D1에서 D3까지에 해당하는 재조합 GST-FnBP가 면역원성을 갖는지를 확인하기 위하여, 재조합 GST-FnBP를 polyclonal anti-FnBP rabbit serum과 Horse radish peroxidase anti-rabbit IgG를 이용한 Western blot을 시행하고 4-chloro-1-naphthol용액을 첨가하여 발색시켜 관찰한 결과, 그림 8에서와 같이 49 kDa에 해당하는 부위에서 면역반응이 나타났다. 이상의 결과를 보아 이 연구에서 생산한 FnBP는 *S. aureus*의 FnBP와 동일한 것으로 보인다.

## 2. 실험동물을 이용한 면역능 실험

### (1) 3가지 항원을 기본으로 한 백신접종

30마리의 토끼를 황색포도상구균의 병원성인자인 알파독신 10HU, capsular polysaccharide 600 $\mu$ g, 200 $\mu$ g의 fibronectin-binding protein을 혼합하여 백신을 제조하여 2주간격으로 근육주사하였다. 대조군에 비해 알파독신은 4주후에 유의성있게 증가되었지만(그림 9) 세균제거율의 차이는 없었다. 하지만 백신접종군에서 대조군에 비해 임상증상의 발현이 늦게 나타났으며 장기내 세균검출율에서도 백신접종군에서 대조군에 비해 낮게 나타났다(그림 12, 그림 13).

capsular polysaccharide의 항체가 수준은 단백질인 알파독신에 비해 낮은



수준이었지만 5주후부터 서서히 증가된 상태였다(그림 10). adjuvant의 효과 별로는 dextran sulphate가 다른 군에 비해 높게 나타났다. 공격접종 실험에서 백신접종군에서 대조군에 비해 세균제거율이 높았으며 장기간 지속되는 결과를 보여주었다. 또한 장기별 세균검출율에서도 백신접종군에서 대조군에 비해 낮게 검출되었다.

실험용 Combined vaccine의 제조로 토끼에서의 *s. aureus*에 대한 항체형성능은 대조군의 경우 OD값이 백신접종전과 2주 및 4주후의 반응에 차이가 없었다. Hydrogel을 adjuvant로 사용한 그룹에서도 항체형성능은 다른 실험군에 비해 백신접종에 대한 반응이 좋지 않았다. 이와는 반대로 FIA, ISCOM Adjuvant는 1차접종후 약간 상승하였지만 1차 추가접종을 실시한 2주후에는 약간 감소하는 경향을 보여주었다.

adjuvant를 dextran sulfate로 사용한 그룹에서 가장 우수한 면역원성을 보였다. 특히 2주후에 1차 추가접종을 실시한 후에 유의성있는 항체생성능을 보였다. 다른 그룹에서는 1차 백신접종후 항체가 다소 증가하는 경향을 보였으나 2차백신을 접종한 후에는 감소하는 경향을 보였지만 dextran sulfate의 경우 1차 백신접종 후 다소 증가를 보였지만 2차 추가접종을 실시한 후에는 1차에 비해 상당히 항체가 증가하는 경향을 보였다.

## (2) 항원대량생산법

알파톡신의 생산은 알파톡신의 생산을 최대화할 수 있는 배지를 사용하는 것이 다른 일반 세균배지에서 배양한 것보다 톡신의 생산이 많았으며 pseudocapsule의 발현의 경우 특이하게 유청을 10% 첨가한 배지에서 일반배지보다 pseudocapsule의 발현율이 높았다. pseudocapsule의 증명은 투과전자현미경을 이용하여 염색을 하지 않고 보는 방법이 pseudocapsule을 손상시키지 않고 쉽게 확인할 수 있는 방법이었다. 사진상의 pseudocapsule 발현의 증명은 세균주위에 halo를 형성하는 것으로 쉽게 구별할 수 있으며 유청을 첨



가하지 않은 세균배양액은 이러한 halo를 형성하지 못하였다.

백신에 첨가한 알파독신의 경우 배지에서 독신이 생산된 후 오랜시간 냉장고에 보관하면 쉽게 용혈능이 저하되어 백신에 첨가한 다고 하더라도 그 면역원으로서의 작용은 높지 않았다. pseudocapsule의 경우 특별히 정제단계를 거치는 것보다는 pseudocapsule이 잘 발현되는 배지를 선택하여 배양한 후 그 자체로 백신에 첨가하는 것이 백신제조에 용이했다.

### (3) 재조합 GST-FnBP와 fibronectin의 결합

재조합 GST-FnBP가 Fn과 결합할 수 있는지를 확인하기 위하여 ELISA를 실시하였다. 재조합 GST-FnBP와 Fn과의 결합을 확인한 결과, Fn의 양에 비례하여 특이적으로 결합이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(그림 14).

### (4) 포르말린으로 처리한 재조합 GST-FnBP와 Fibronectin과 결합

포르말린으로 처리한 재조합 GST-FnBP가 Fn과의 결합력이 어느정도 상실되는지를 알아보기 위하여 ELISA를 실시한바 포르말린으로 처리한 재조합 GST-FnBP의 Fn과의 결합력은 포르말린으로 처리하지 않은 재조합 GST-FnBP와 Fn과의 결합력의 4% 수준이었다(그림 15).

### (5) 재조합 GST-FnBP의 면역원성

재조합 GST-FnBP의 면역원성을 확인하기 위하여 재조합 GST-FnBP를 토끼에 면역시킨 혈청을 사용하여 Western blot을 실시하였다. 항GST-FnBP 혈청은 S. aureus에서 순수분리한 FnBP의 200kDa과 165kDa에 해당하는 밴드에서 강한 면역반응을 보였다(그림 16).

### (6) 재조합 GST-FnBP의 면역접종 후 항체수준의 변화

포르말린으로 처리한 재조합 GST-FnBP로 면역시킨 토끼의 FnBP에 대한

항체는 첫 접종후 2주까지 서서히 증가하였고 2주부터 3주까지 급격히 증가하였으며 3주이후부터 5주까지 점차 증가하였다. 그리고 3차 접종이후 급격히 증가하였으나 6주이후부터는 증가세가 둔화되었다.

포르말린으로 처리하지 않은 재조합 GST-FnBP로 면역시킨 토끼의 FnBP에 대한 항체는 3주째까지 서서히 증가하였고 3주이후부터 6주까지 급격히 증가하였으나 그 이후는 증가세가 둔화되었다. 포르말린으로 처리한 재조합 GST-FnBP로 면역시킨 토끼는 포르말린으로 처리하지 않은 재조합 GST-FnBP로 면역시킨 토끼보다 FnBP의 항체형성이 빠르게 나타났으며 항체수준도 높게 나타났다. 그러나 BSA로 면역시킨 대조군에서는 FnBP에 대한 항체가 관찰되지 않았다(그림 17).

#### (7) 항FnBP혈청의 재조합 GST-FnBP와 fibronectin의 결합억제 효과

포르말린으로 처리한 재조합 GST-FnBP로 면역시킨 항혈청의 방어효과는 83.4%였고 포르말린으로 처리하지 않은 재조합 GST-FnBP로 면역시킨 토끼의 항혈청의 방어효과는 66.7%를 나타내었다(그림 18).

포르말린으로 처리한 재조합 GST-FnBP로 면역시킨 항혈청의 방어효과는 대조군의 그것과 비교하여 약 2.5배나 높은 것으로 나타나으며 혈청 희석배수 640배까지 결합억제 효과가 인정되어 포르말린으로 처리하지 않은 재조합 GST-FnBP로 면역시킨 항혈청보다 결합억제효과가 높게 나타났다.

#### (8) 재조합 GST-FnBP로 면역시킨 토끼의 *S. aureus*에 대한 제거효과

세균접종후 1시간에는 포르말린으로 처리한 재조합 GST-FnBP 면역군, 포르말린으로 처리하지 않은 재조합 GST-FnBP면역군과 대조군 순으로 *S. aureus*가 제거되었으나 각 군간에 통계적인 유의차가 인정되지 않았다. 3시간 후에는 포르말린으로 처리하거나 처리하지 않은 재조합 GST-FnBP 면역군은

대조군과 비교하였을 때 세균의 제거에서 두군간 모두 유의할 만한 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). 그 이후 6시간, 12시간과 24시간후의 혈액에서의 세균의 제거는 세투여군 사이에 차이가 인정되지 않았으나 모든 시간대에서 1시간째와 마찬가지로 포르말린으로 처리한 재조합 GST-FnBP로 면역시킨 군이 포르말린으로 처리하지 않은 재조합 GST-FnBP로 면역시킨 군이나 대조군보다 세균의 제거가 효과적이었다(표 4).

### 3. 야외목장대상 임상실험

#### 가. 연구내용

- (1) 실험목장 및 백신접종우 선정 및 사전 세균 및 유방염 감염여부 검사
- (2) 젖소 유방염 백신 알파톡신항원 대량생산
- (3) 젖소 유방염 백신 pseudocapsule항원 대량생산
- (4) 젖소 유방염 백신 fibronectin-binding protein항원 대량생산
- (5) 3가지 항원을 기본으로 하고 adjuvant별 효과분석
- (6) 3주간격으로 유즙 및 혈액내 항체가 측정 및 세균분리 및 체세포수 변동 여부 조사

#### 나. 연구방법

##### (1) 실험동물

비유우 23두, 건유우 18두를 대상으로 12개월간 백신실험을 실시하였다. 비유우와 건유우는 각각 백신 접종군과 대조군으로 나누어 실시하였다.

##### (2) 백신항원제조

capsular polysaccharide가 발현되어 있는 *Staphylococcus aureus* smith strain  $5 \times 10^{10}$  cells/ml을 최종농도가 1%되게 포르말린을 첨가하여 사멸시킨후 6,00g로 원침시킨 후 PBS로 재부유시켜 사용하였으며 알파톡신  $400\mu\text{g}$ 과 재조

합 단백질인 rFnBP(400 $\mu$ g)을 최종농도가 1%되게 포르말린을 첨가하여 이용하였다. Adjuvant는 Dextran sulphate 100mg과 mineral oil을 이용하였다. Control group은 adjuvant만을 이용하였다.

### (3) 백신접종

비유우는 3주간격으로 2회 상유방림프절 주위조직에 피하주사하였으며 처녀우는 분만 2개월전에 3주간격으로 2회 비유우의 경우와 동일하게 접종하였다. 1차접종시 오른쪽후지 안쪽 상유방림프절 주위피하에 주사하였으며 추가접종시에는 왼쪽 후지 안쪽 1차접종부위와 동일 부위에 접종하였다.

### (4) 체세포 측정

Fossomatic somatic cell counter기를 이용하여 4주간격으로 비유우의 경우에는 11회, 처녀우의 경우에는 9회 검사하였다.

### (5) 미생물학적 유즙배양 검사

3-4주간격으로 채취한 유즙을 24시간이내에 냉장상태로 운반하여 5%우혈액배지에 초기접종을 실시하여 황색포도상구균 및 기타 세균을 분리동정하여 기록하였으며 유즙의 응고상태 및 유색을 면밀히 검사하여 기록하였다.

### (6) 백신접종우의 임상증상 평가

백신접종전과 백신접종후 젖소의 상태를 평가하였으며 특히 접종부위의 열감과 부종등을 관찰기록하였다.

## 다. 연구결과

### (1) 백신접종전 우군평가

대관령 H목장의 착유우중 23두의 비유우와 처녀우 18두를 백신접종전 임의

로 선발하여 검사를 실시하였으며 41두중 한분방이 맹유두 상태였으며 세균율은 황색포도상구균이 7.3%, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)이외의 포도상구균(*Staphylococci*)감염율은 5.6%, 연쇄상구균(*Streptococci*)류 감염율은 5.6%, *Proteus spp* 감염율은 4.5%, *Pseudomonas spp* 3.4%, 수생 진균류 17.9%, 샘플링시 오염된 경우 15%, 음성분방은 39.7%였다.

체세포수준은 평균 정도였다.

최종 백신접종에 사용된 비유우는 23두와 18두를 실험에 이용하였다. 이 실험에 이용된 젖소는 모두 신체검사 및 유즙배양검사서 *Staphylococcus aureus*-free상태를 2회 검사하여 선발하여 실험에 이용하였다.

## (2) 신체검사결과

백신접종부위 상유방림프절 주위피하조직은 백신접종후 열감과 발열, 동통 및 부종이 나타났으며 심한 경우 약간의 파행을 보였다. 대부분의 백신접종군은 7-10일 경과후에는 부종과 발열증상이 소실되었지만 경결조직이 관찰되었다.

## (3) 유방염 발생을 비교

### (가) 임상형 유방염 발생

비유우는 백신접종군은 1차와 2차 접종전까지는 대조군에 비해 임상형 유방염의 발생이 높았지만 백신접종후 6주부터는 백신접종군에서 대조군에 비해 임상형 유방염의 발생율이 유의성있게 낮았다(그림 20). 또한 전반적으로 11개월간의 백신접종군에서의 임상형 유방염 발생은 전반적으로 낮은 수준을 유지하였다(그림 20).

처녀우에서는 백신접종후 9개월까지는 전반적으로 낮은 발생율을 보였지만 백신접종후 4개월후에는 유의성있게 대조군에서 백신접종군에 비해 임상형 유방염 발생율이 높았다( $P < 0.001$ ). 하지만 백신접종 8개월째에는 백신접종군



이 대조군에 비해 유의성있게 높았다( $p < 0.001$ )(그림 22).

비유우의 경우 백신접종전 임상형 유방염의 발생율이 대조군의 경우 0%에서 백신접종후 14.3%로 유의성있게 증가하였지만 백신접종군에서는 백신접종전 11.1%에서 백신접종후 3.9%로 유의성있게 감소하였다( $P < 0.001$ )(표 5).

처녀우의 경우에도 임상형 유방염의 발생이 대조군의 경우 12.5%였지만 백신접종군에서의 발생율은 3.6%로 유의성있게 낮았다( $P < 0.001$ )(표 8).

#### (나) 준임상형 유방염 발생

비유우는 백신접종군과 대조군의 준임상형 유방염 발생은 1차와 2차 접종 전까지 유의성있는 차이는 없었다. 하지만 백신접종 2개월부터는 대조군이 백신접종군에 비해 7개월동안 준임상형 유방염의 발생이 유의성있게 높았다( $P < 0.001$ ). 전반적으로 백신접종군에서의 준임상형 유방염 발생은 낮은 수준을 보였지만 백신접종후 8개월째부터는 약간 증가경향을 보였지만 발생율은 낮은 수준이었다. 하지만 대조군의 경우 백신접종 4개월이후부터 9개월까지 준임상형 유방염의 발생율이 높게 나타났다(그림 19). 그러나 백신군의 경우 유방염의 발생율이 전반적으로 낮은 수준을 유지하였다(그림 20).

처녀우의 경우 백신접종후 3개월째에 백신접종군이 대조군에 비해 준임상형 유방염의 발생율이 높았지만 백신접종 5개월이후부터는 유의성있게 대조군에 백신접종군에 비해 높았다( $P < 0.001$ ). 전반적으로 백신접종군의 경우 발생율은 백신 접종 3개월경을 제외하고는 거의 준임상형 발생율이 없었다. 하지만 대조군의 경우 백신접종시간이 경과할수록 준임상형 유방염의 발생이 증가하는 경향을 보였다(그림 23).

비유우의 준임상형 발생율은 백신접종전 대조군이 0%에서 백신접종후 11.0%로 크게 발생율이 증가한 반면 백신접종군에서는 백신접종전 0%에서 1.8%로 그 증가량이 대조군에 비해 유의성있게 낮았다( $P < 0.001$ )(표 6).

처녀우의 경우에는 대조군의 준임상형 유방염의 발생율이 5.0%였지만 백신

접종군에는 이보다 훨씬 낮은 0.6%를 보여 유의성있게 감소한 것을 알 수 있다( $P < 0.001$ )(표 8).

#### (다) 잠복감염 발생률

비유우의 잠복감염률의 차이는 백신접종군과 대조군의 경우 큰 차이가 인정되지 않았다. 하지만 백신접종 6개월과 7개월째에는 백신접종군의 발생률이 대조군에 비해 유의성있게 높았지만( $P < 0.001$ ), 대조군의 경우에는 9개월경에 백신접종군에 비해 높게 나타났다( $P < 0.001$ ). 백신접종군에는 전반적으로 백신접종 전 높은 수준상태를 계속유지하다 백신접종 7개월이 경과하는 시기부터는 점차 감소하는 경향을 보였다(그림 21).

처녀우의 경우에는 전반적으로 백신접종군에 비해 잠복감염률이 백신접종 2개월이후부터 높게 나타났다(그림 24). 백신접종 후 3개월, 5개월, 6개월, 8개월경에 백신접종군이 대조군에 비해 발생률이 유의성있게 낮았다( $P < 0.001$ ).

비유우의 경우 백신접종 전 잠복감염의 발생률이 대조군에서는 15.0%에서 10.7%로 감소한 반면 백신접종군에서는 백신접종 전 발생률이 5.6%에서 3.0%로 감소하여 대조군과 백신접종군의 차이가 인정되지 않았다( $P > 0.001$ )(표 7).

처녀우에서의 잠복감염률은 대조군의 경우 15.0%였지만 백신접종군에서는 1.2%로 유의성있게 낮았다( $P < 0.001$ )(표 8).

#### (라) 신규감염률

비유우의 경우 대조군의 경우 백신접종 전 신규감염률이 15.0%에서 백신접종 후 36%로 증가하였으며 백신접종군에는 백신접종 전 신규감염률이 16.7%에서 5.96%로 유의성있게 감소하였다( $P < 0.001$ ). 처녀우의 경우에서도 총 신규감염률이 대조군의 경우 32.5%였지만 백신접종군에서의 발생은 5.4%로 유의성있게 낮았다( $P < 0.001$ )(표 8). 결과적으로 백신접종이 대조군에 비해 유방염발생률을 크게 감소시키는 효과가 있다고 생각된다.

Table 4. The in vivo elimination of challenged *S aureus* from the bloodstream of GST-FnBP vaccinated rabbit. The animal were injected i.v. with  $1.0 \times 10^{10}$  bacteria. The one group was immunized with formalin treated GST-FnBP; the second was immunized with formalin non-treated GST-FnBP; the third was immunized with BSA V. Blood samples, taken after 1-24h, were tested for colony count.

Group \ Time injection	1 hour	3 hours	6 hours	12 hours	24 hours
Formalin treated GST-FnBP	2500	110 <sup>a</sup>	5.7	3	1
Formalin non-treated GST-FnBP	6400	560 <sup>a</sup>	5	3.3	2.41
BSA V	14400	2030 <sup>b</sup>	53.3	3.6	3.38

a, b Means with different subscripts in the same column differ significantly ( $p < 0.05$ ).

**Table 5.** Cumulative incidence of clinical mastitis in lactaing cows immunized with subunit mastitis vaccine composed of alpha-toxin, pseudocapsule and fibronectin-binding protein with 3 weeks period two times

Diagnosis	Treatment			
	Control		Vaccinated	
	(%)	(n=20)	(%)	(n=20)
Clinical mastitis Preimmunization	0	0	11.1	8
Clinical mastitis Postimmunization	14.3	11	3.86	3

**Table 6.** Cumulative incidence of subclinical mastitis in lactaing cows immunized with alpha-toxin, pseudocapsule and fibronectin-binding protein with 3 weeks period two times

Diagnosis	Treatment			
	Control		Vaccinated	
	(%)	(n=20)	(%)	(n=20)
Subclinical mastitis Preimmunization	0	0	0	0
Subclinical mastitis Postimmunization	11.0	9	1.8	1

**Table 7.** Cumulative incidence of latent infection in lactaing cows immunized with subunit mastitis vaccine composed of alpha-toxin, pseudocapsule and fibronectin-binding protein with 3 weeks period two times

Diagnosis	Treatment			
	Control		Vaccinated	
	(%)	(n=20)	(%)	(n=20)
Latent infection Preimmunization	15.0	12	5.6	5
Latent infection Postimmunization	10.7	8	3.0	2

**Table 8.** Cumulative incidence of clinical mastitis, subclinical mastitis and latent infection in heifers immunized with subunit mastitis vaccine composed of alpha-toxin, pseudocapsule and fibronectin-binding protein with 3 weeks period two times

Diagnosis	Treatment			
	Control		Vaccinated	
	(%)	(n=20)	(%)	(n=20)
Clinical mastitis	12.5	10	3.6	3
Subclinical mastitis	5.0	4	0.6	1
Latent infection	15.0	12	1.2	1
Total Staph. aureus IMI	32.5	26	5.4	5

#### (4) 체세포수 변화

비유우의 경우 백신접종군과 대조군의 체세포수의 차이는 백신 접종 4개월 경을 제외하고는 유의성이 없었다(그림 25). 하지만 백신접종군이 백신접종 4개월경에 대조군에 비해 유의성있게 높게 나타났다( $P < 0.001$ ). 전반적으로 대조군과 백신접종군 모두에는 체세포수의 큰 변화는 없었으며 본 목장의 경우 전반적인 체세포수준이 양호한 상태였다.

처녀우의 분만후의 체세포수의 변화는 백신접종후 1개월째에는 대조군과 백신접종군에서 유의성있는 차이는 인정되지 않았지만 전반적인 변화추이는 대조군의 경우 백신접종 3개월 이후부터는 증가경향을 보이다 6개월이후에는 다시 감소하는 경향을 보였다. 하지만 백신접종군에서는 전반적으로 낮은 수준을 백신 접종 7개월이후까지 지속적으로 낮은 수준을 유지하였다(그림 26).



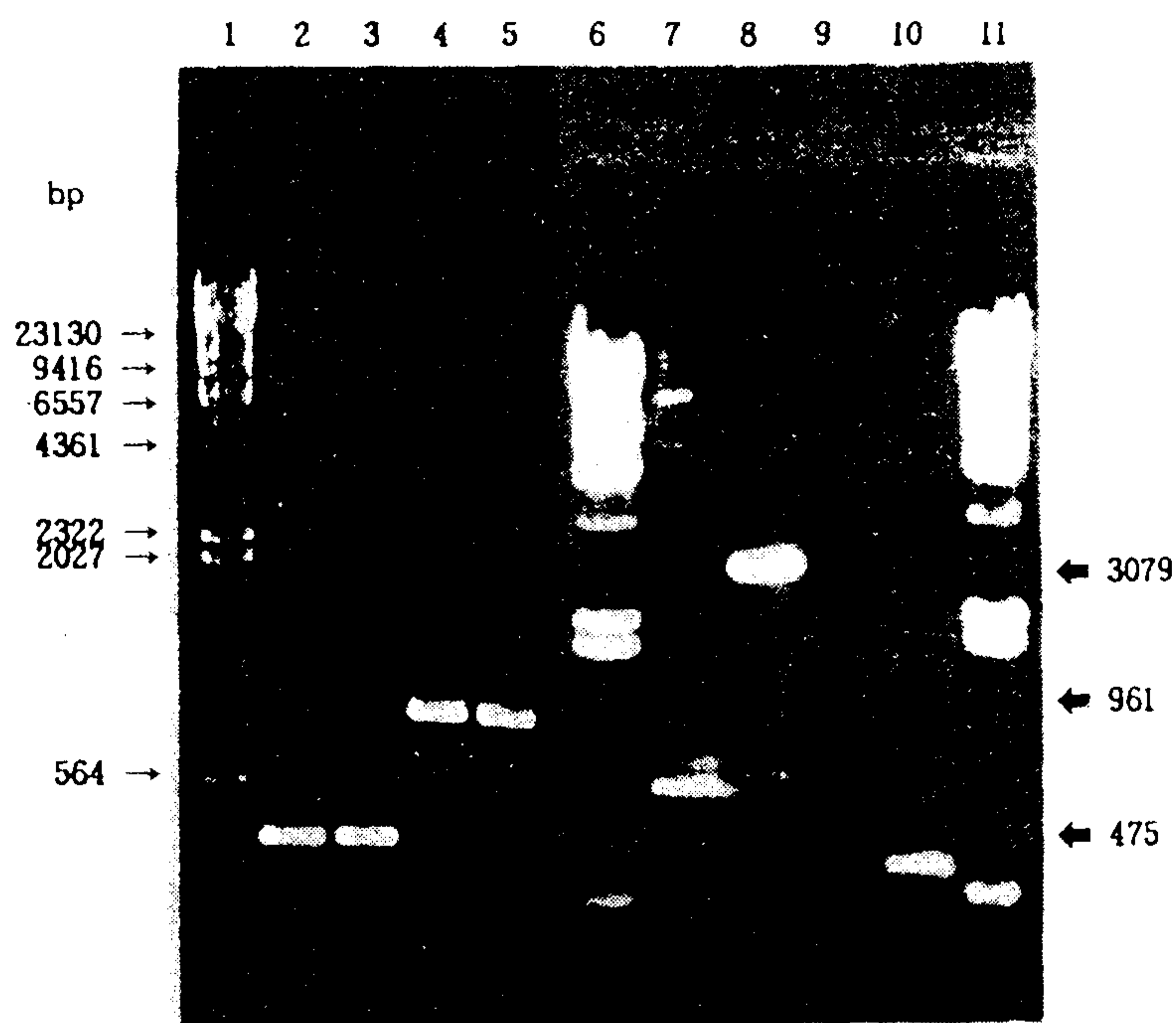


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from chromosomal DNA of *S. aureus*.

Lane 1, 6, 11 ; molecular weight markers ;  $\lambda$  DNA digested with *HindIII*

Lane 2 ; D1-D3 fragment of *fibp* gene amplified from Cowan I strain

Lane 3 ; D1-D3 fragment of *fibp* gene amplified from Wood 46 strain

Lane 4 ; D1-M fragment of *fibp* gene amplified from Cowan I strain

Lane 5 ; D1-M fragment of *fibp* gene amplified from Wood 46 strain

Lane 7 ; there was no specific band of S-M fragment of *fibp* gene amplified from Cowan I strain

Lane 8 ; S-M fragment of *fibp* gene amplified from Wood 46 strain

Lane 9, 10 ; there was no specific band of S-M fragment of *fibp* gene amplified from KNU 196 strain.

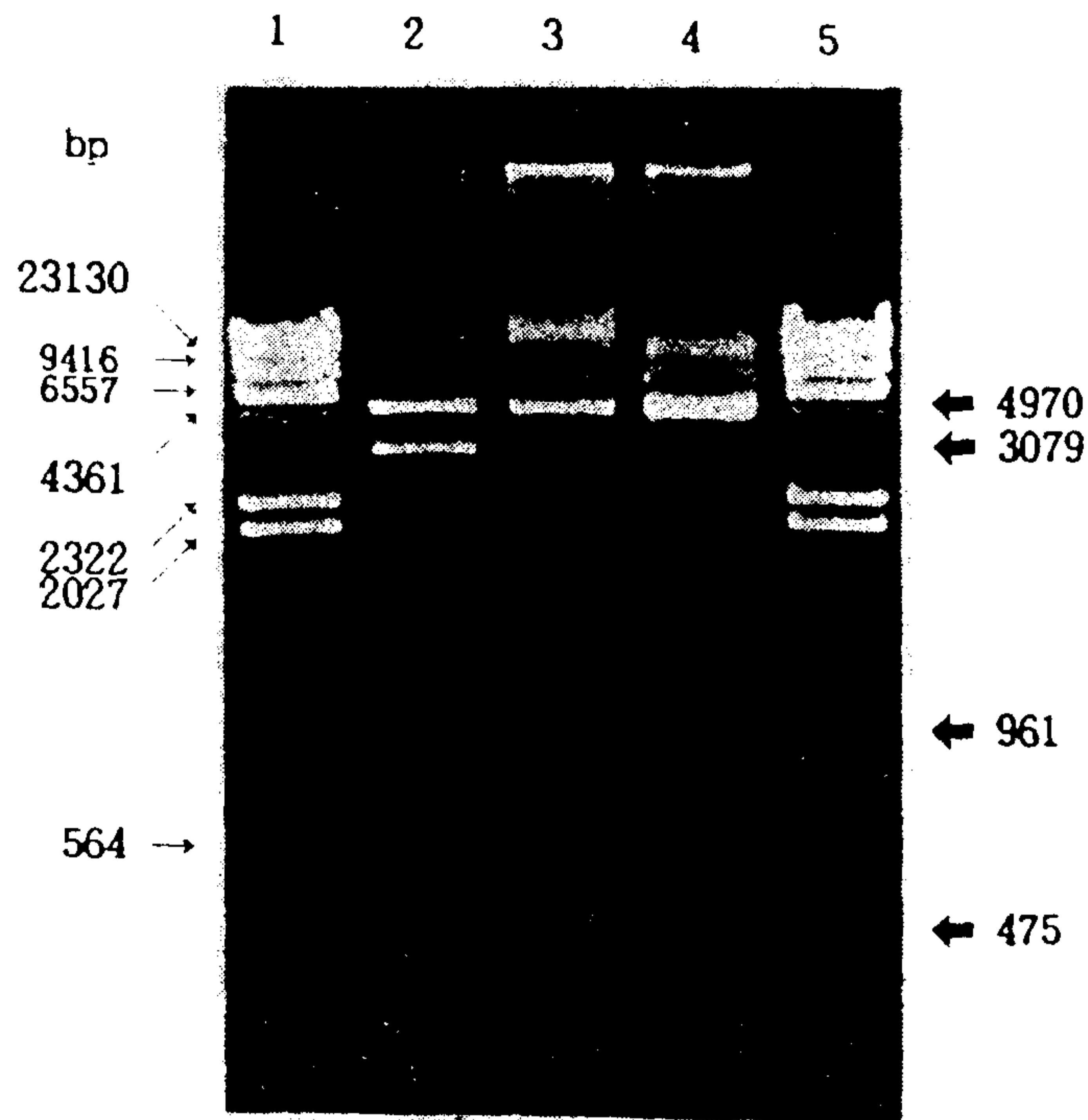


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of cloned *fibp* gene of *S. aureus* strain Wood 46 in plasmid DNA which were digested with restriction enzymes.

Lane 1, 5 ; molecular weight markers ;  $\lambda$  DNA digested with *HindIII*

Lane 2 ; bands of S-M fragment of *fibp* gene and vector pGEX-4T-2

Lane 3 ; bands of D1-M fragment of *fibp* gene and vector pGEX-4T-2

Lane 4 ; bands of D1-D3 fragment of *fibp* gene and vector pGEX-4T-2.

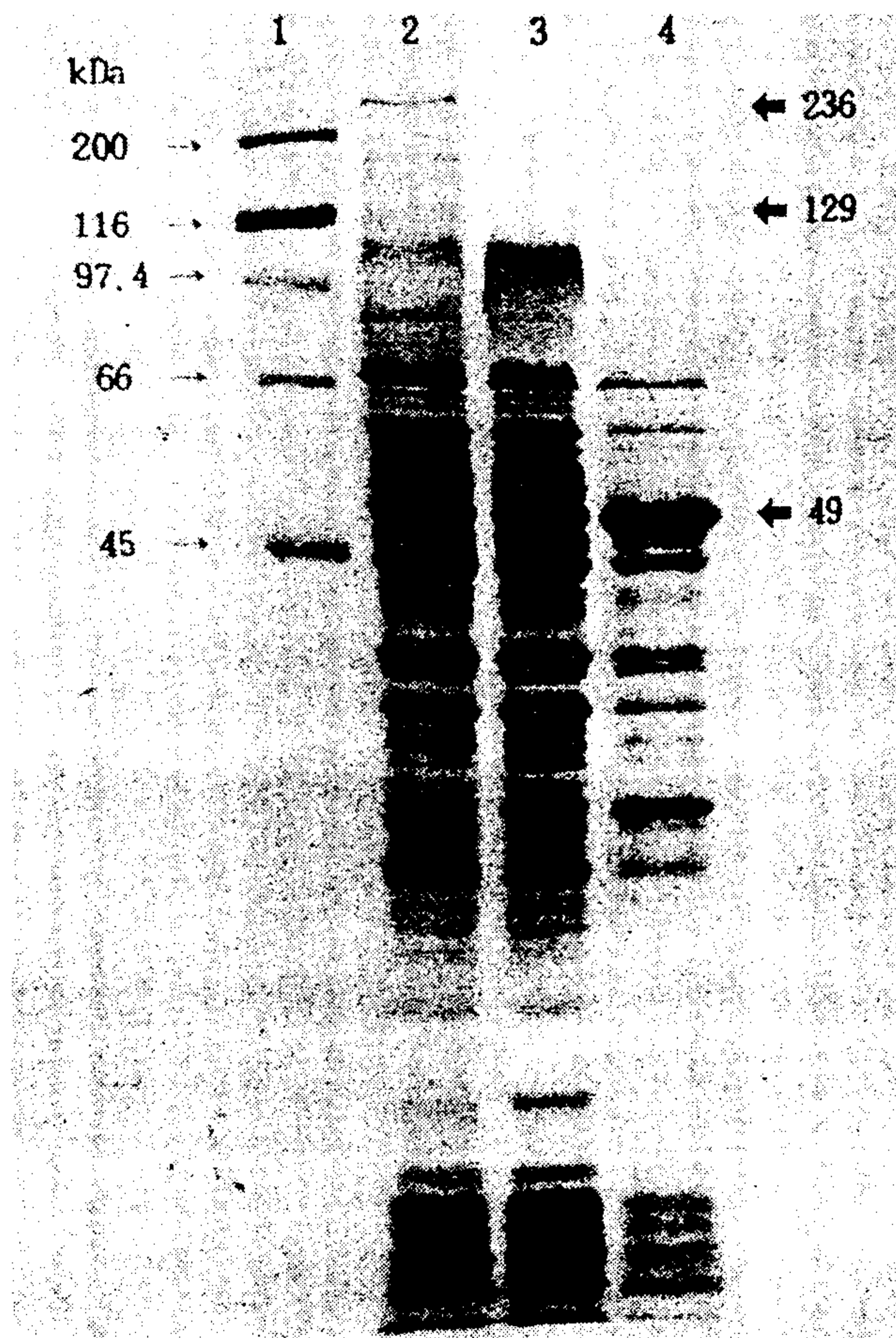


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of recombinant FnBPs of *S. aureus* which were fused with glutathione-S-transferase(GST).

Lane 1 ; molecular weight standards

Lane 2 ; S-M fragment of GST-FnBP

Lane 3 ; D1-M fragment of GST-FnBP

Lane 4 ; D1-D3 fragment of GST-FnBP.

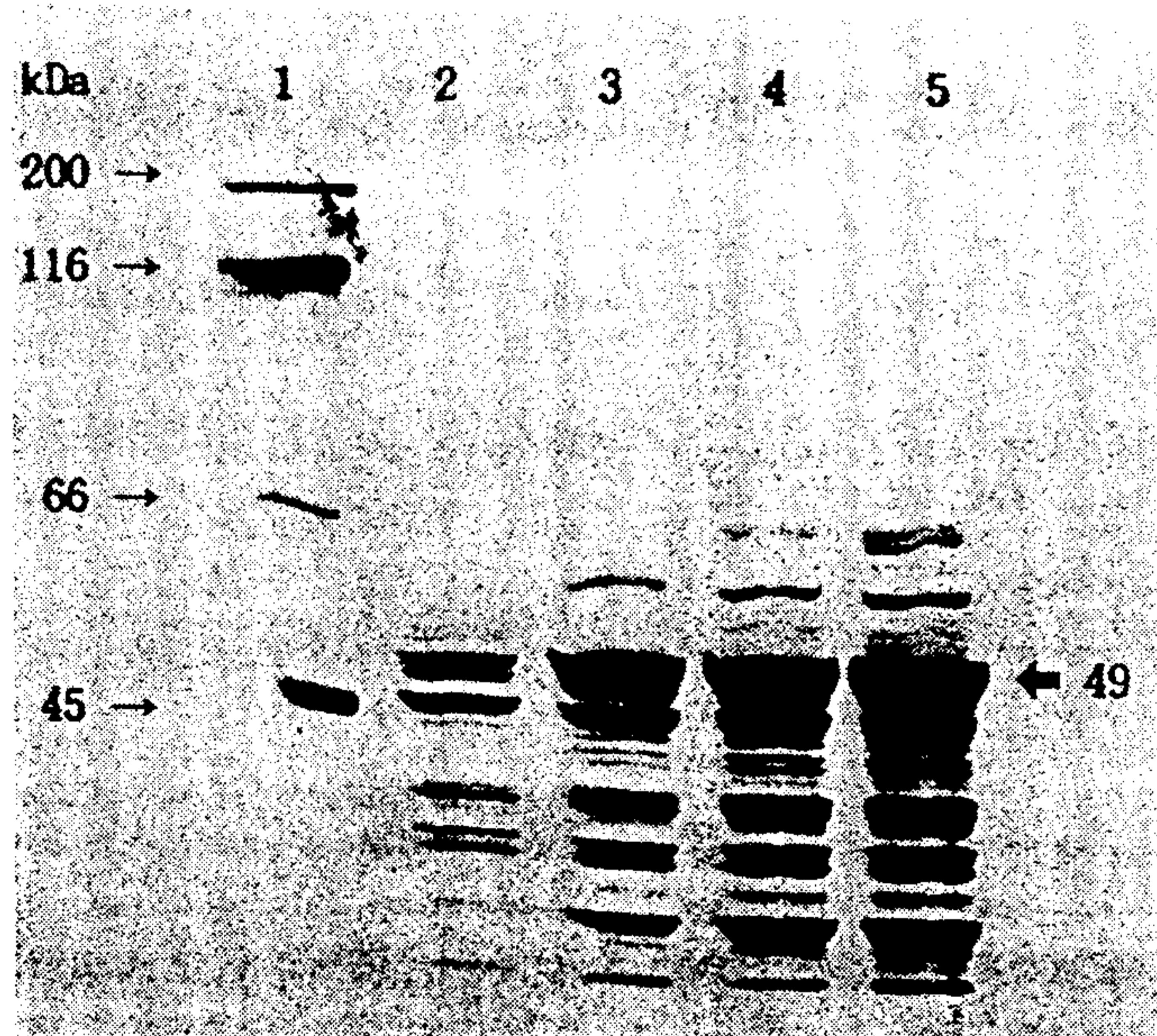


Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the recombinant D1-D3 fragment of GST-FnBP which was expressed for various hours.

Lane 1 ; molecular weight standards

Lane 2 ; before the induction of GST-FnBP

Lane 3 ; 1 hour after the induction of GST-FnBP

Lane 4 ; 3 hours after the induction of GST-FnBP

Lane 5 ; 5 hours after the induction of GST-FnBP.



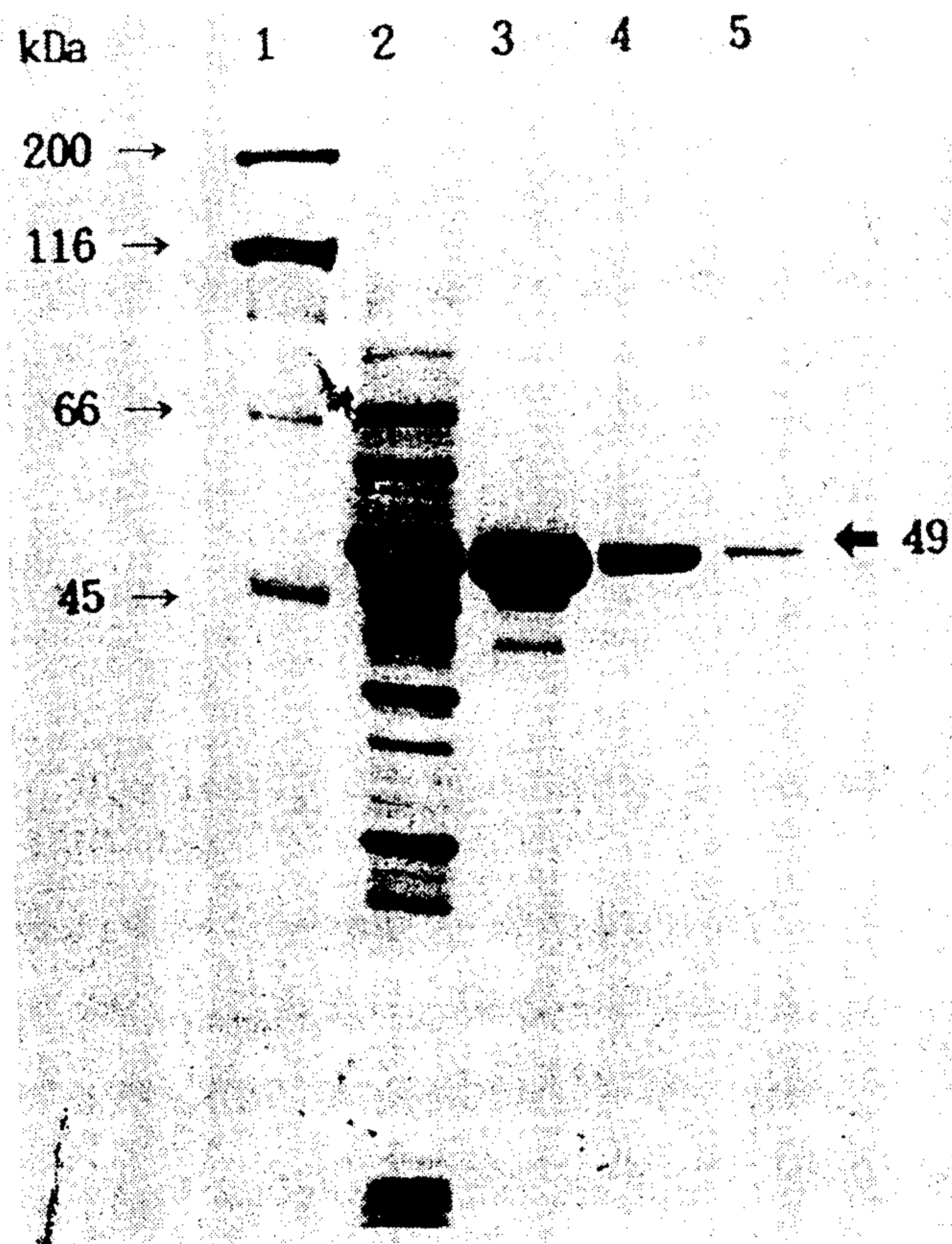


Fig. 7. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the D1-D3 fragment of GST-FnBP purified by the GST affinity chromatography system.

- Lane 1 ; molecular weight standards
- Lane 2 ; D1-D3 fragment of GST-FnBP
- Lane 3 ; purified GST-FnBP D1-D3 after first elution
- Lane 4 ; purified GST-FnBP D1-D3 after second elution
- Lane 5 ; purified GST-FnBP D1-D3 after third elution.



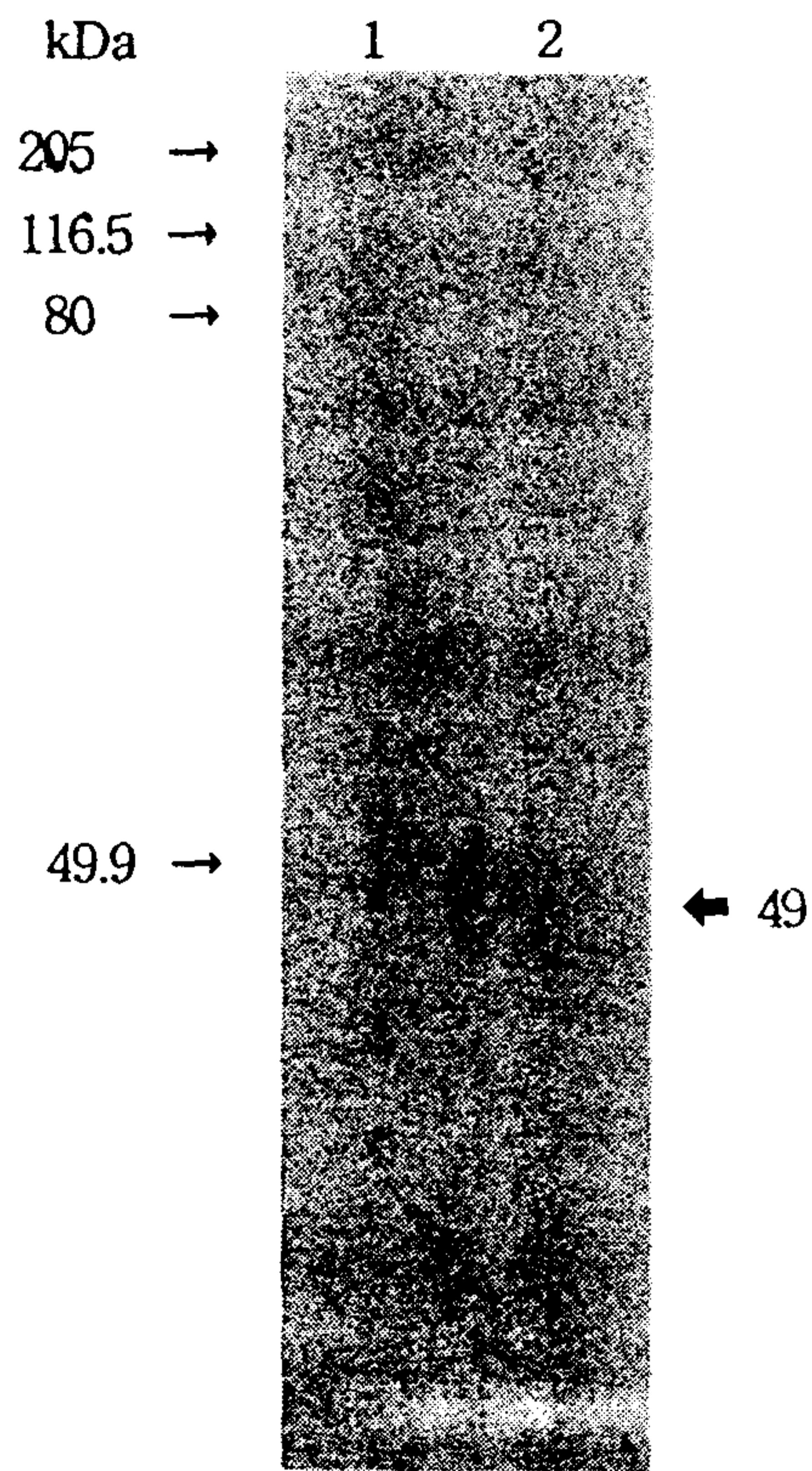


Fig. 8. Western blot analysis of the recombinant D1-D3 fragment of FnBP purified by affinity chromatography.

Lane 1 ; molecular weight standards

Lane 2 ; Western blot of D1-D3 fragment used rabbit anti-FnBP as the first antibody.

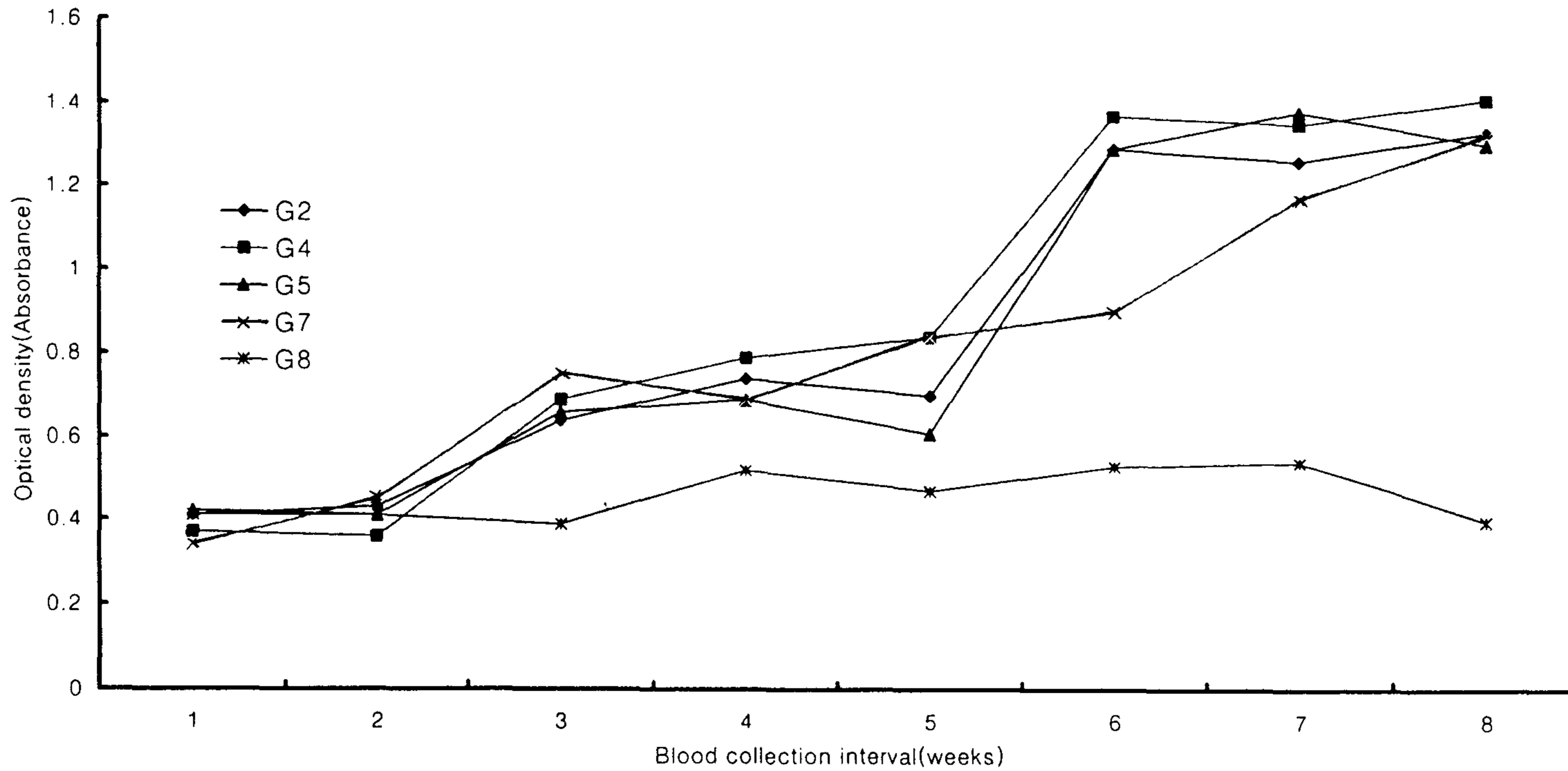


Figure 9. ELISA results for IgG specific for staphylococcal alpha toxin in rabbits immunized with subunit vaccine 2 times every 2 weeks (G2: alpha toxin, G4: alpha toxin + FnBP, G5: alpha toxin + CPS, G7: alpha toxin+FnBP+CPS, G8: PBS)

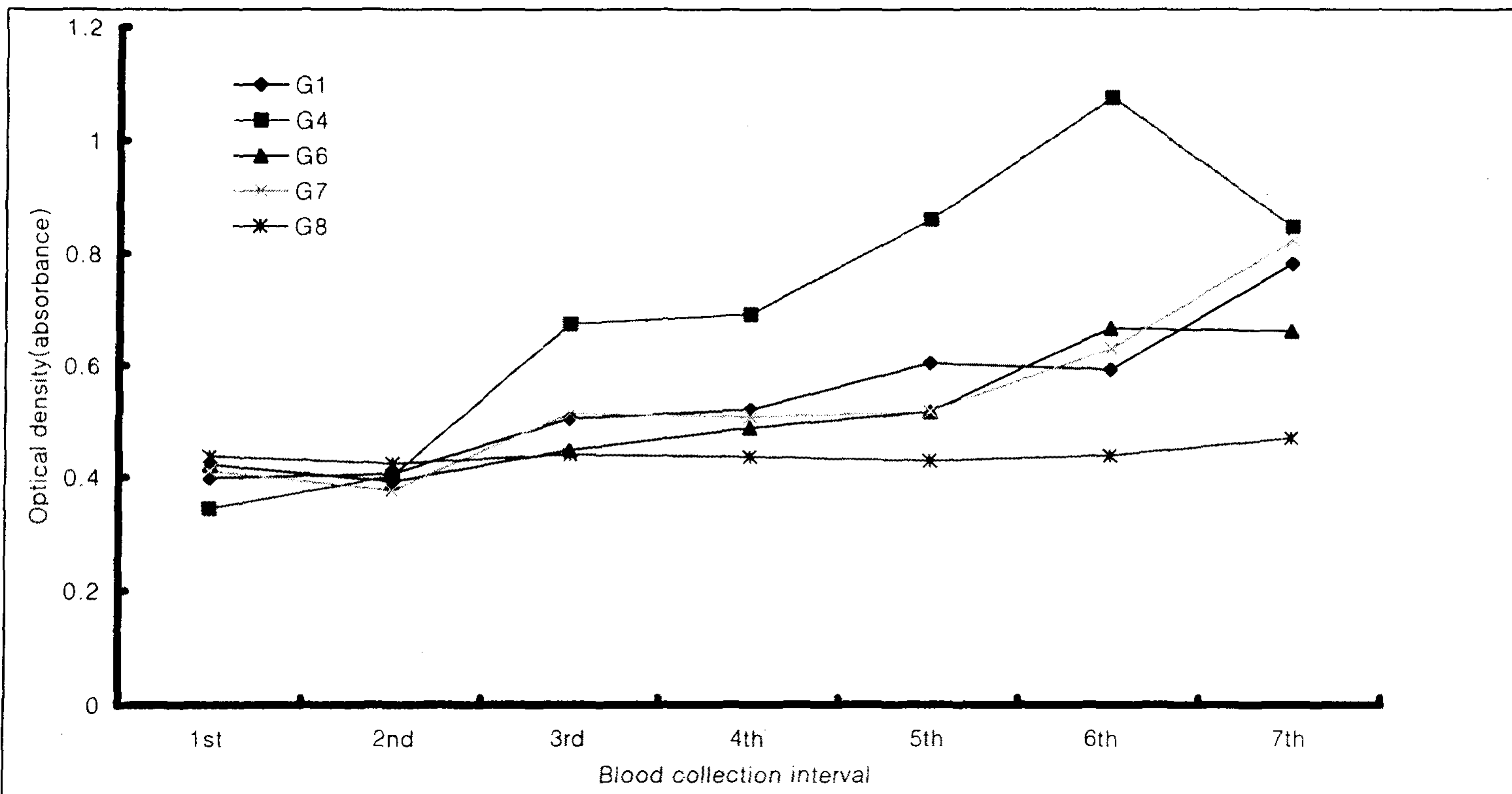


FIG 10: ELISA results for IgG specific for staphylococcal Capsular polysaccharide subjected to bacterin-toxoid stimulation three times every 2 weeks (G1: CPS, G4: alpha toxin + CPS, G6: CPS + FnBP, G7: alpha toxin + CPS + FnBP, G8: PBS)

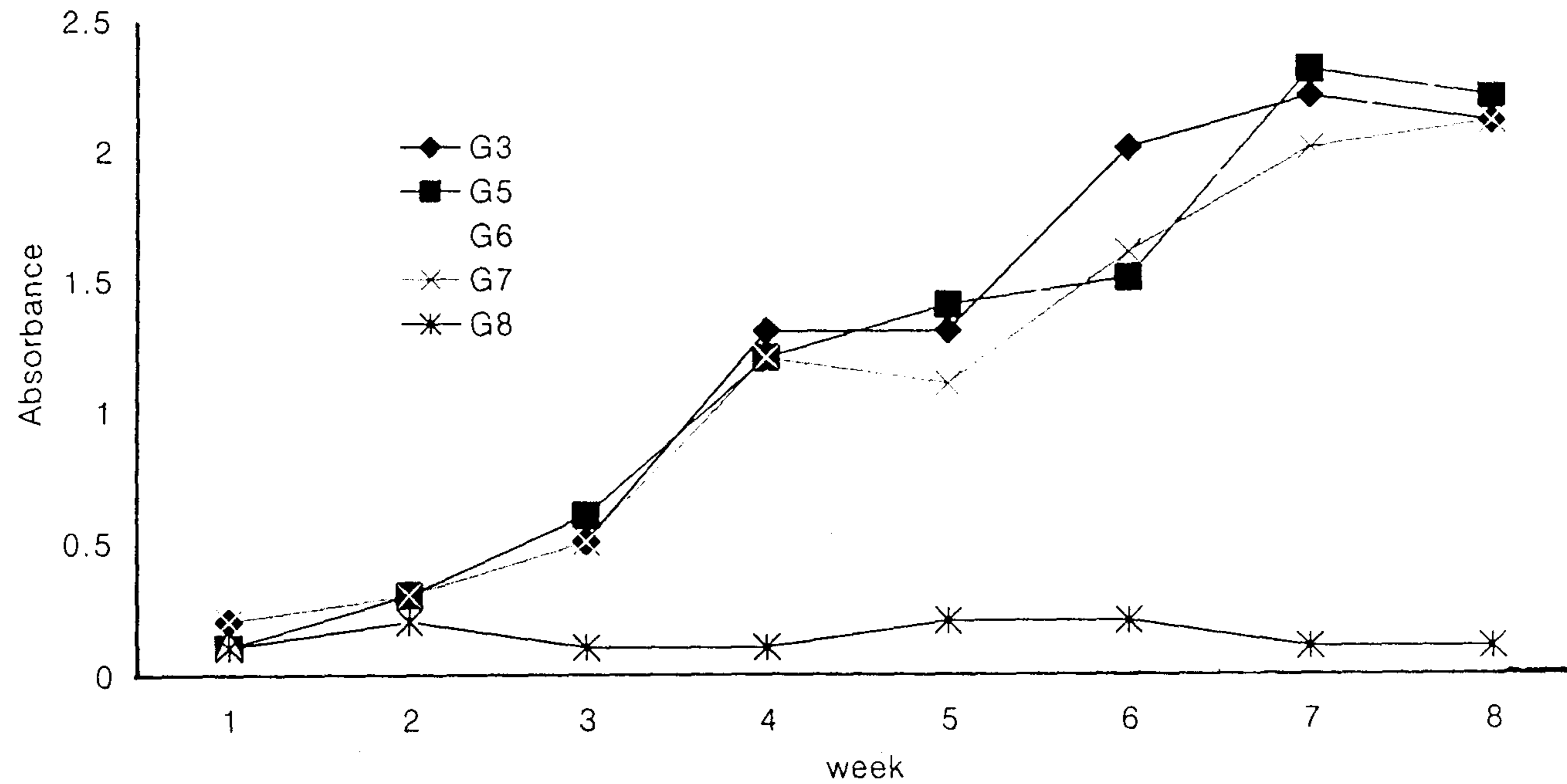


FIG 11. ELISA results for IgG specific for formalin treated GST-FnBP in rabbits immunized with subunit vaccine(G3:FnBP, G5:alpha-toxin+FnBP, G6: FnBP+CPS, G7:alpha-toxin+FnBP+CPS, G8:PBS)



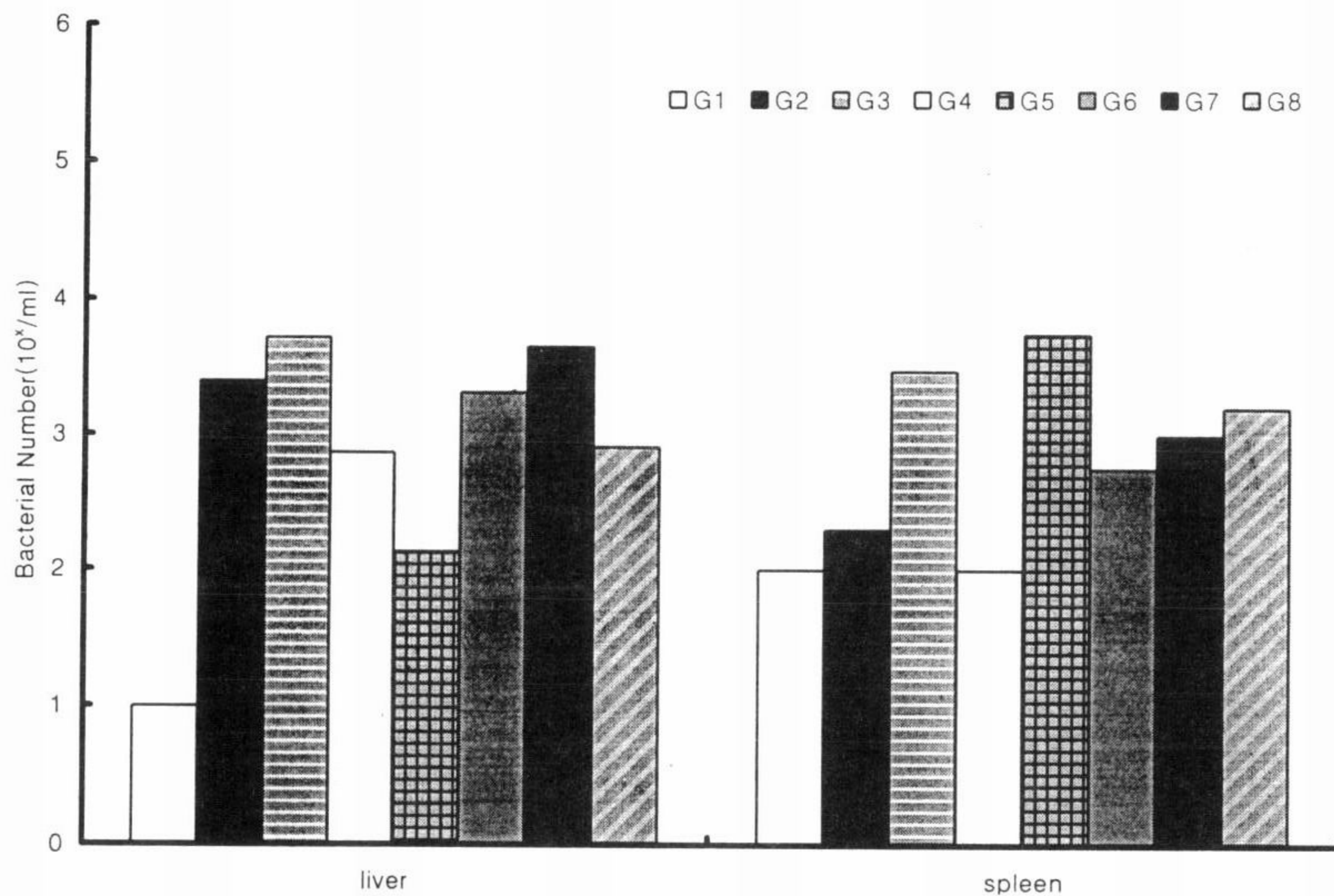


Fig 12. Effect of IM immunization on bacterial counts from liver and spleen of rabbits challenged with  $10^8$ cfu/ml of *S. aureus* Wood 46 (G1:CPS, G2:alpha toxin, G3:FnBP, G4:alpha toxin+CPS, G5:alpha toxin+FnBP, G6:CPS+FnBP, G7;alpha toxin+CPS+FnBP, G8:PBS)



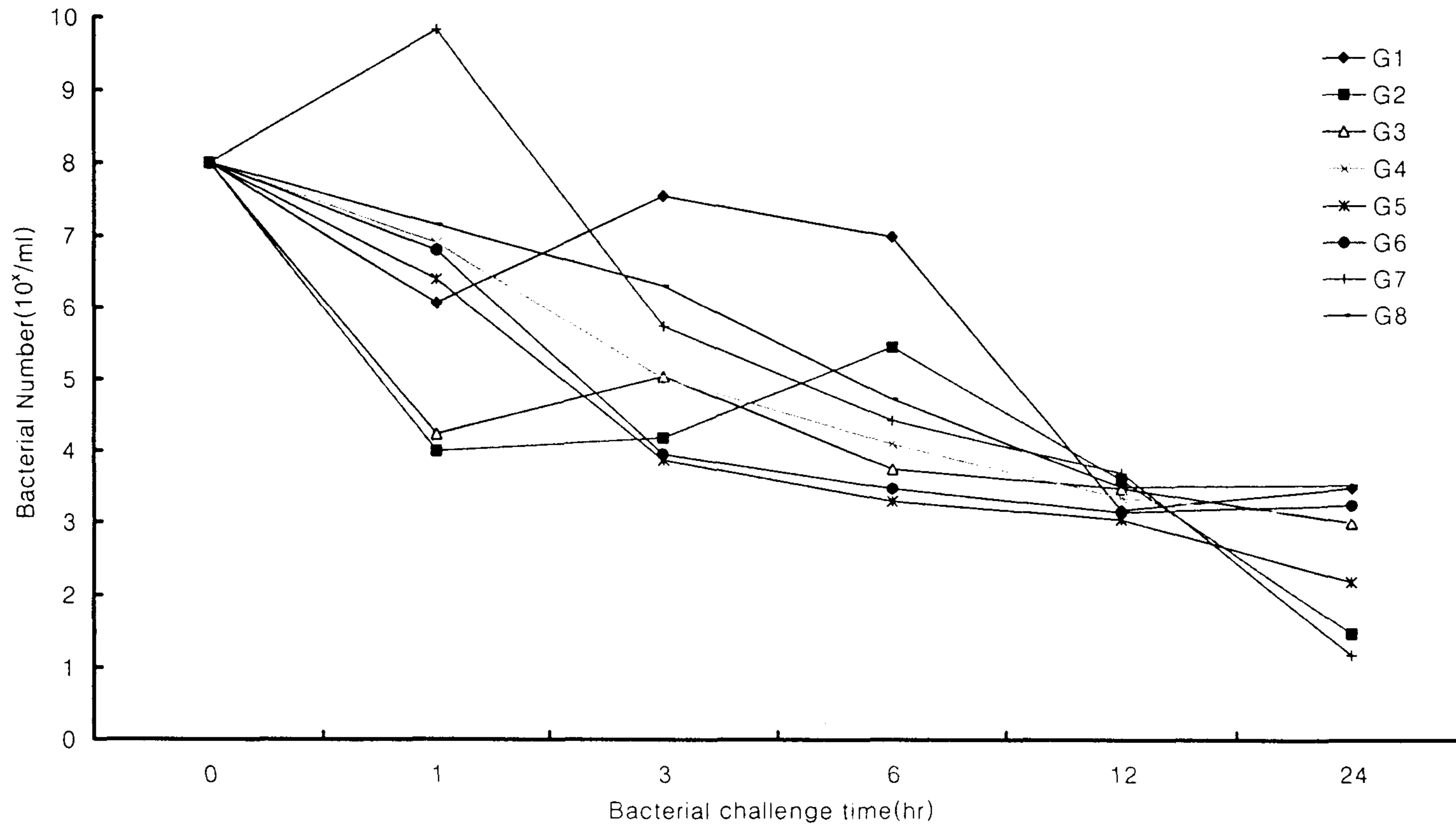


Fig 13. Effect of IM immunization on the blood counts of rabbits challenged with  $10^9$ cfu/ml of *S. aureus* Wood#6 (G1:CPS, G2:alpha toxin, G3:FnBP, G4: alpha toxin + CPS, G5: alpha toxin + FnBP, G6: CPS+FnBP, G7: alpha toxin + FnBP + CPS, G8: PBS)

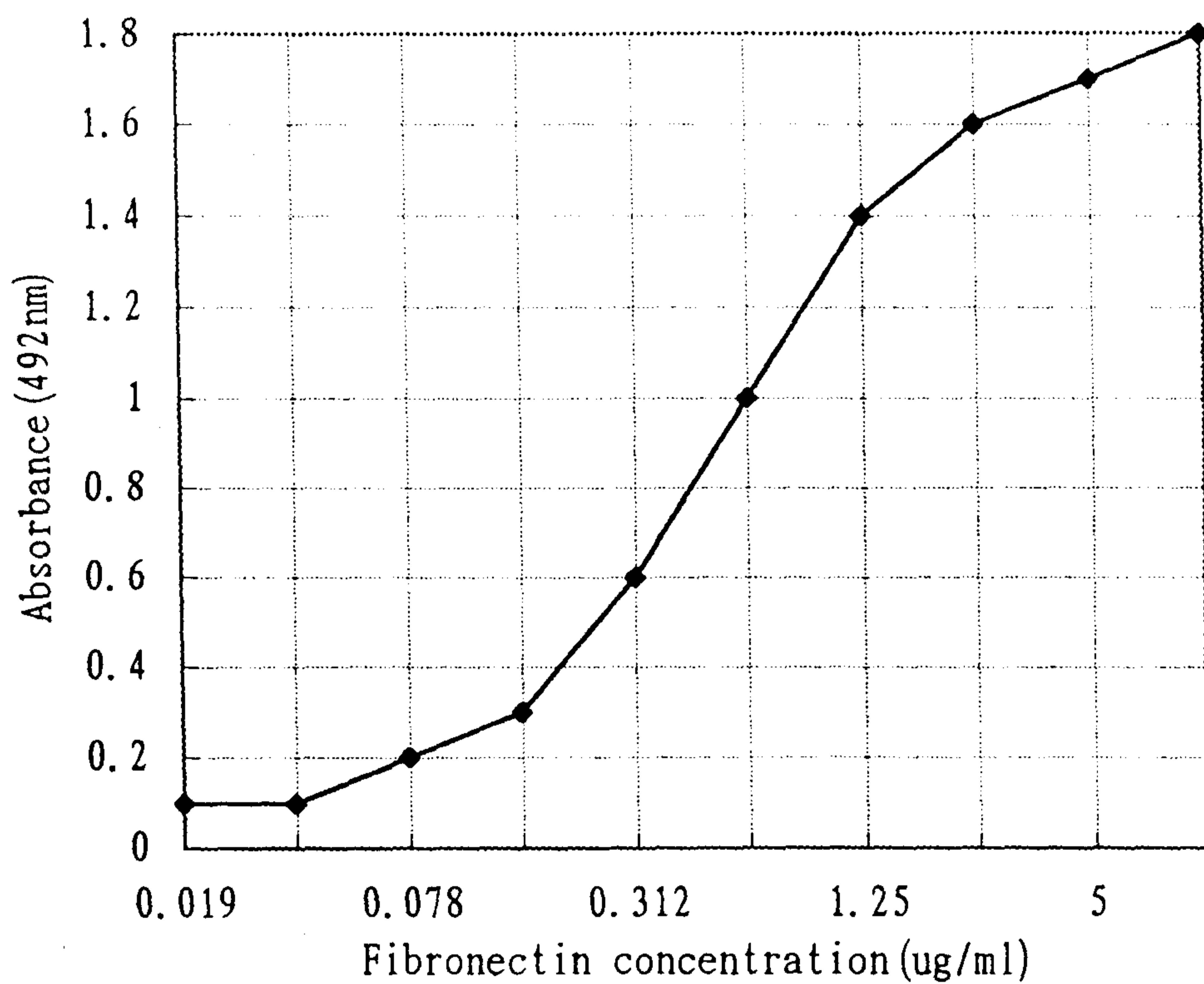


Fig 14. Titration curve showing binding of human plasma fibronectin to immobilized GST-FnBP in ELISA. 1/1000 dilution of anti-fibronectin conjugated to horseradish peroxidase were used to determine the binding activity

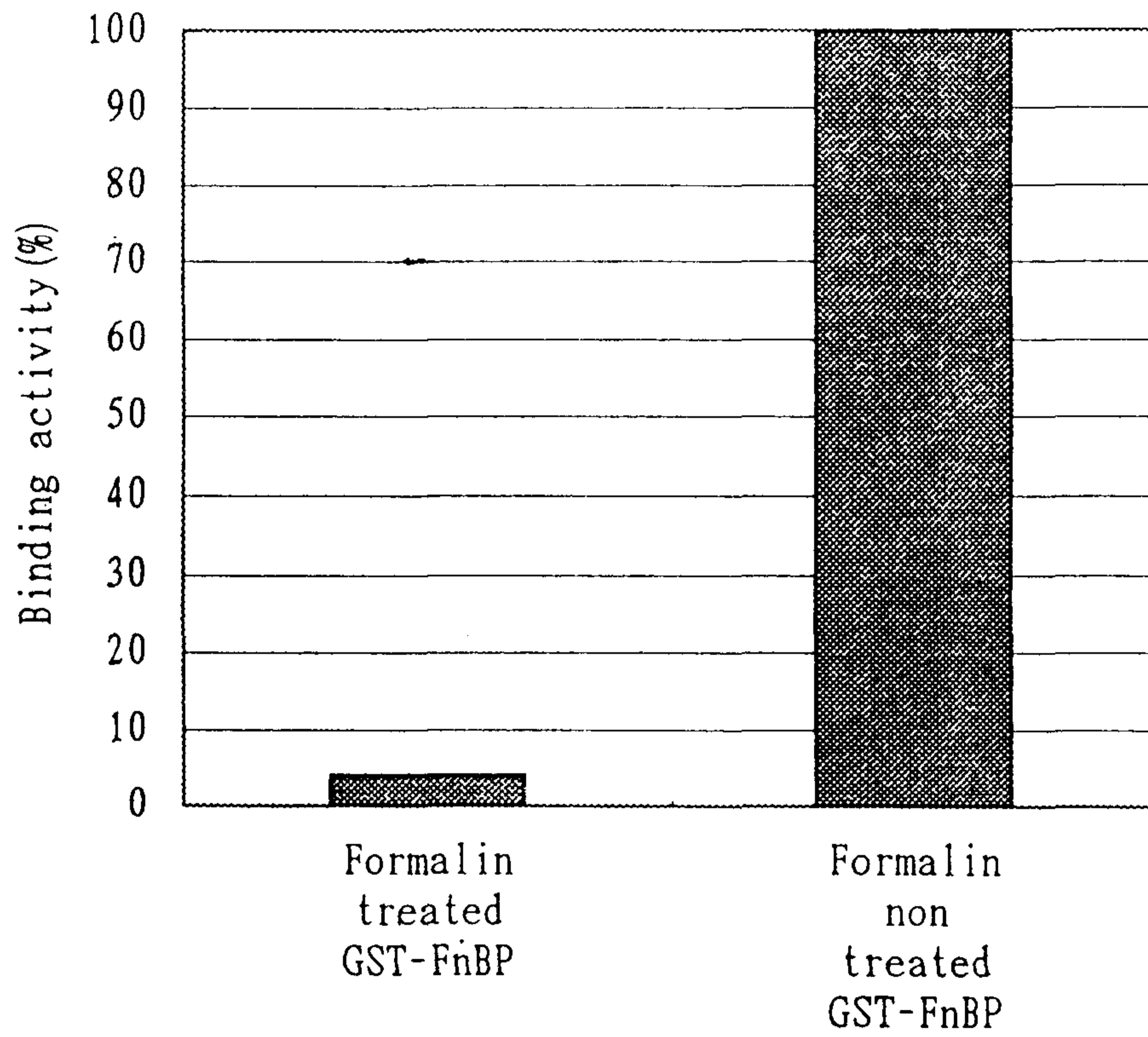


Fig 15. Fibronectin binding activity of formalin-treated and formalin non-treated GST-FnBP.

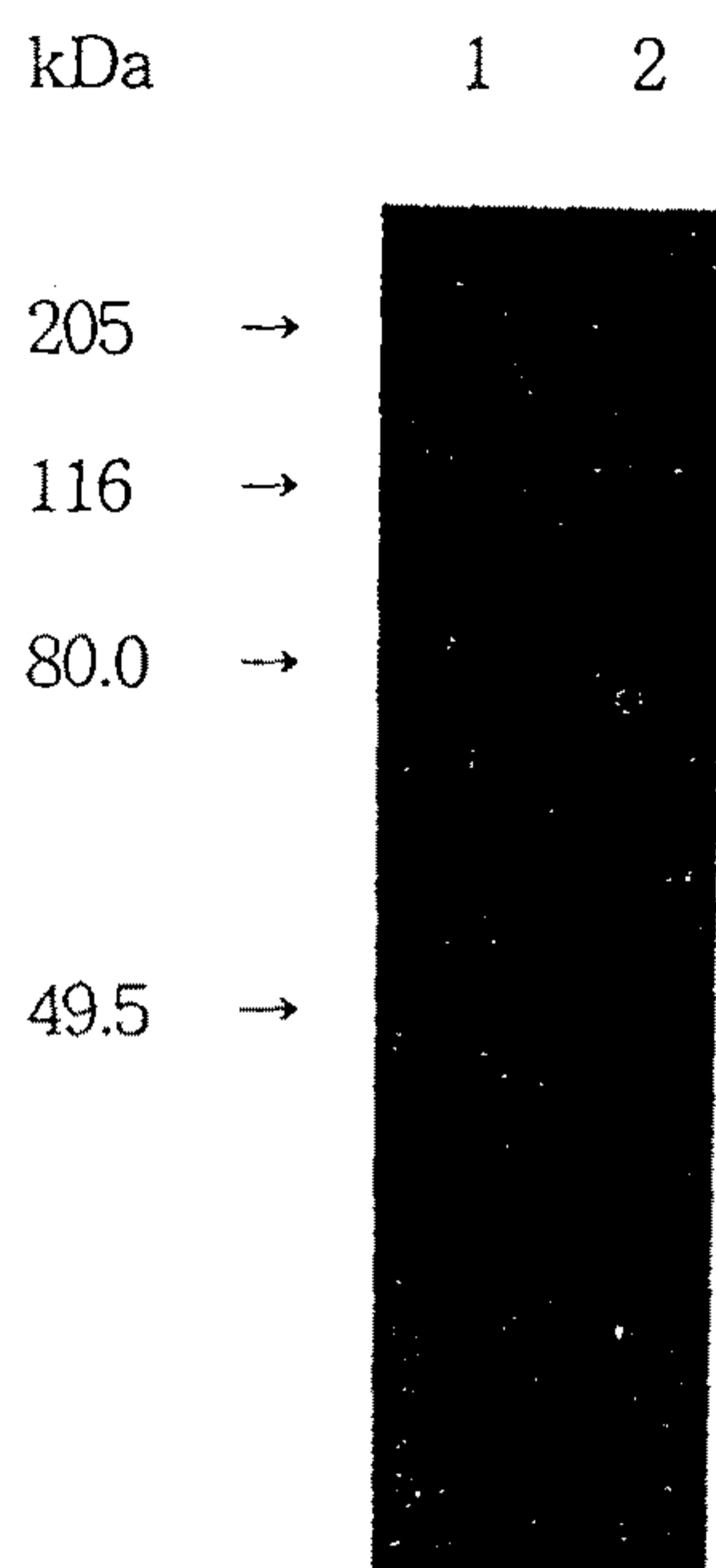


Fig. 16. Western blot analysis of anti GST-FnBP serum with the native FnBP of *S aureus*. Lane 1 : Molecular weight standards(Bio Rad, USA). Lane 2 : Western blot of rabbit anti GST-FnBP serum as the first antibody.

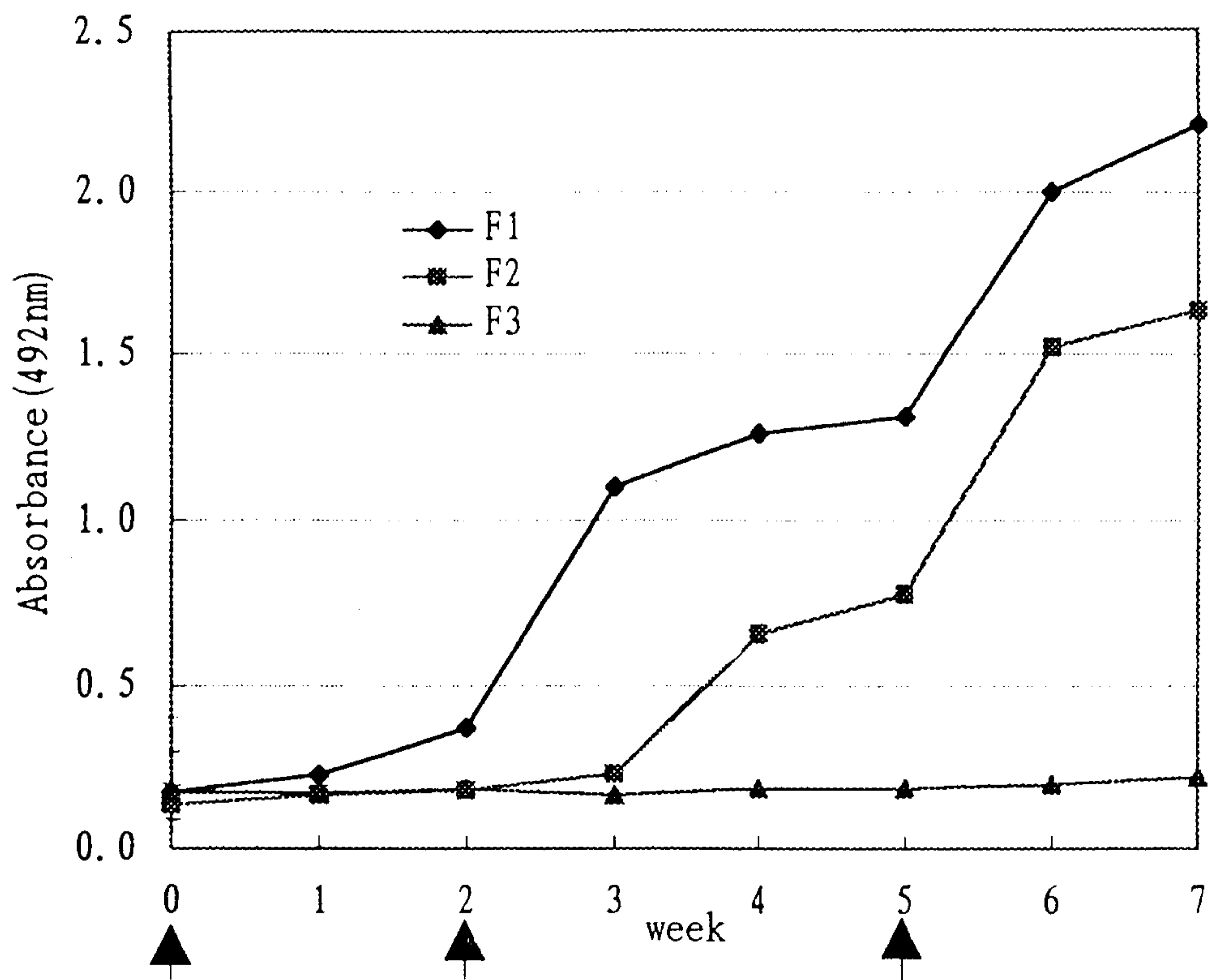


Fig 17. Antibody response of formalin treated GST-FnBP, formalin non-treated GST-FnBP, and BSA fraction V in rabbit.

F1 : Antibody response against FnBP generated by immunization with formalin-treated GST-FnBP.

F2 : Antibody response against FnBP generated by immunization with formalin non-treated GST-FnBP.

F3 : Antibody response against FnBP generated by immunization with BSA fraction V.

▲ : Immunization



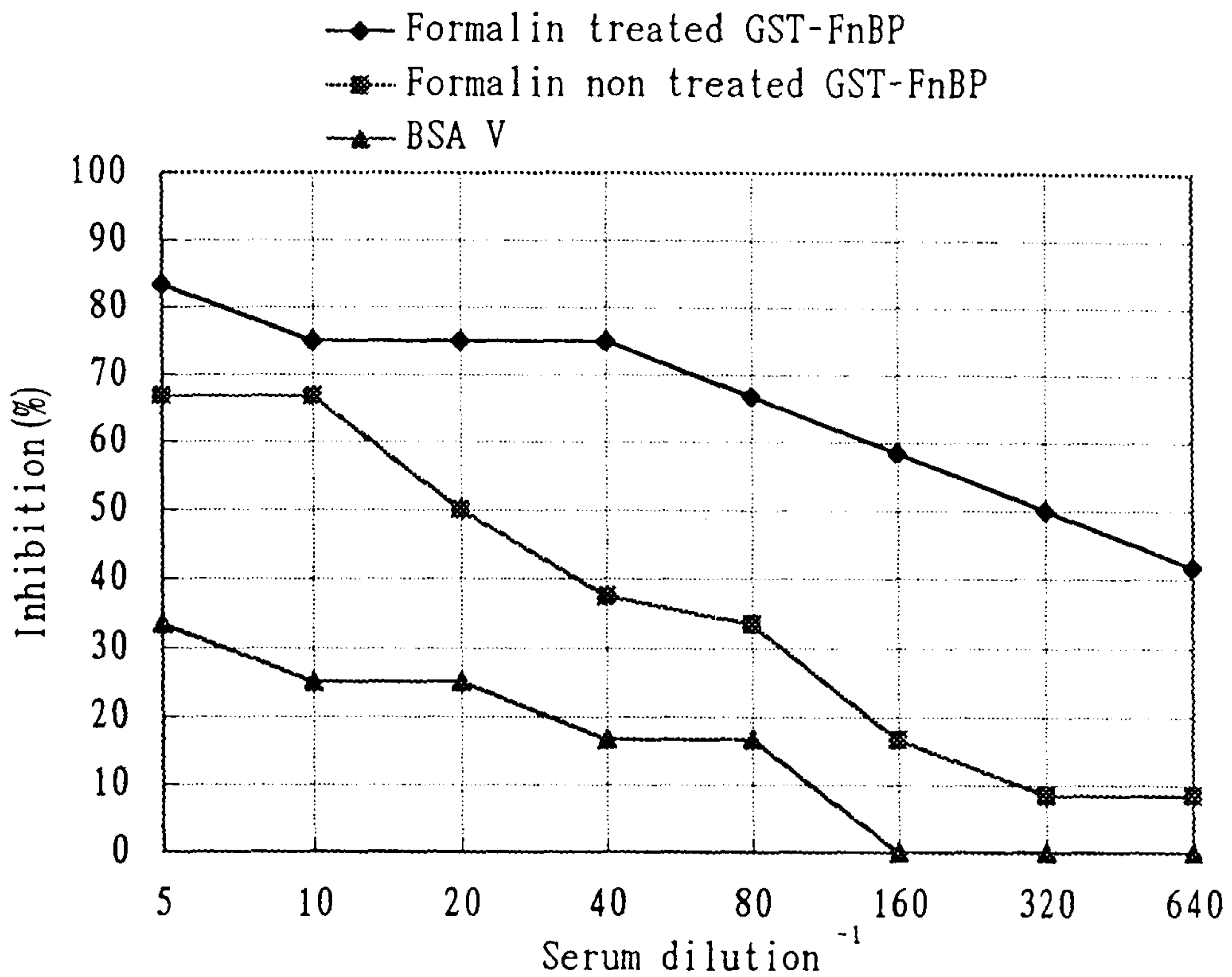


Fig 18. Inhibition of fibronectin binding to immobilized GST-FnBP by hyperimmune rabbit sera. After competition with various dilution of anti-formalin treated GST-FnBP sera, anti-formalin non treated GST-FnBP sera, and BSA V sera, the residual amount of fibronectin binding to immobilized GST-FnBP was determined by ELISA. The results are expressed as percentages of the fibronectin binding of control (no competing antibody).

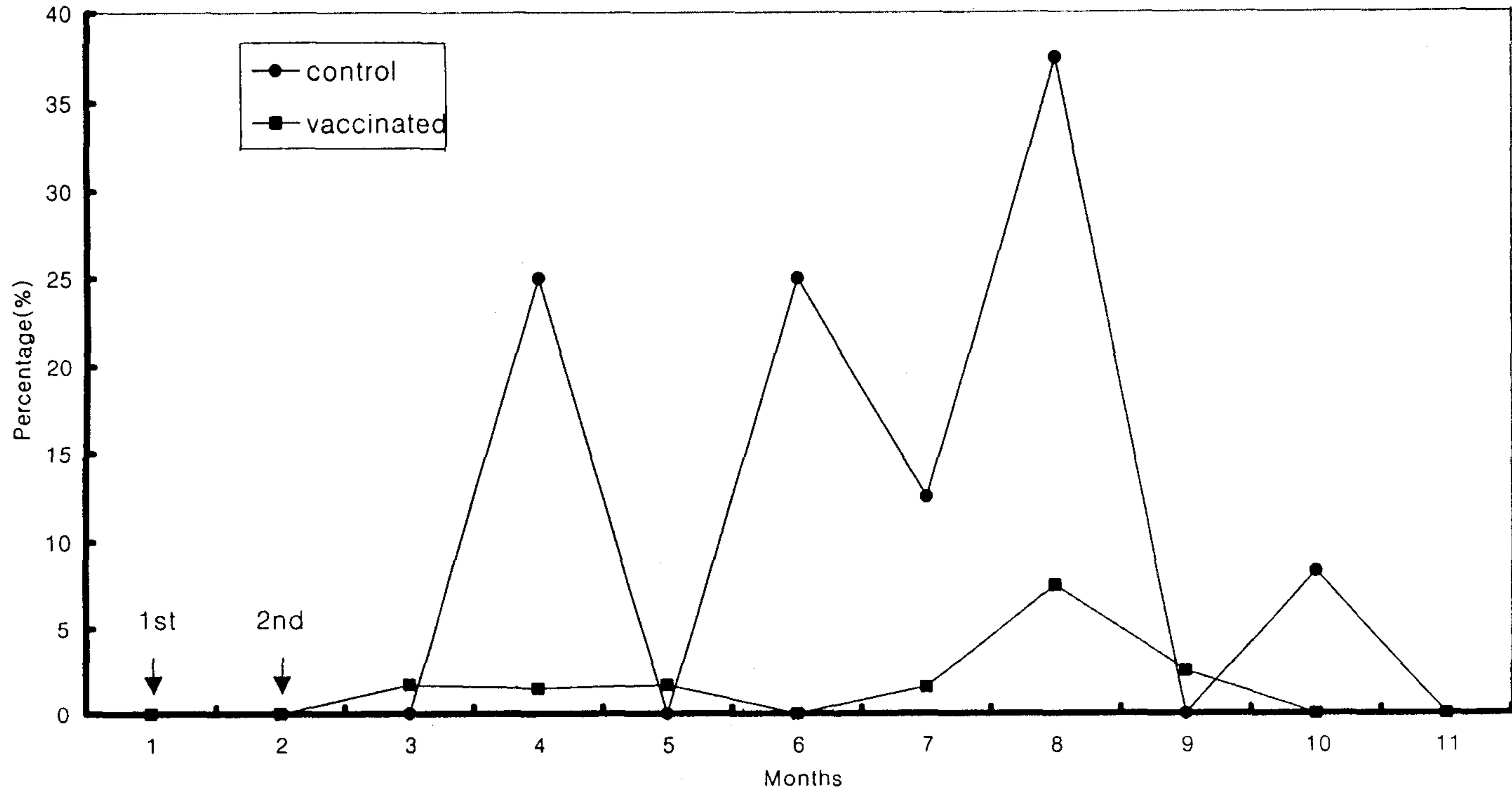


Figure 19. Prevalence of subclinical mastitis between control and vaccinated group in the lactating cows

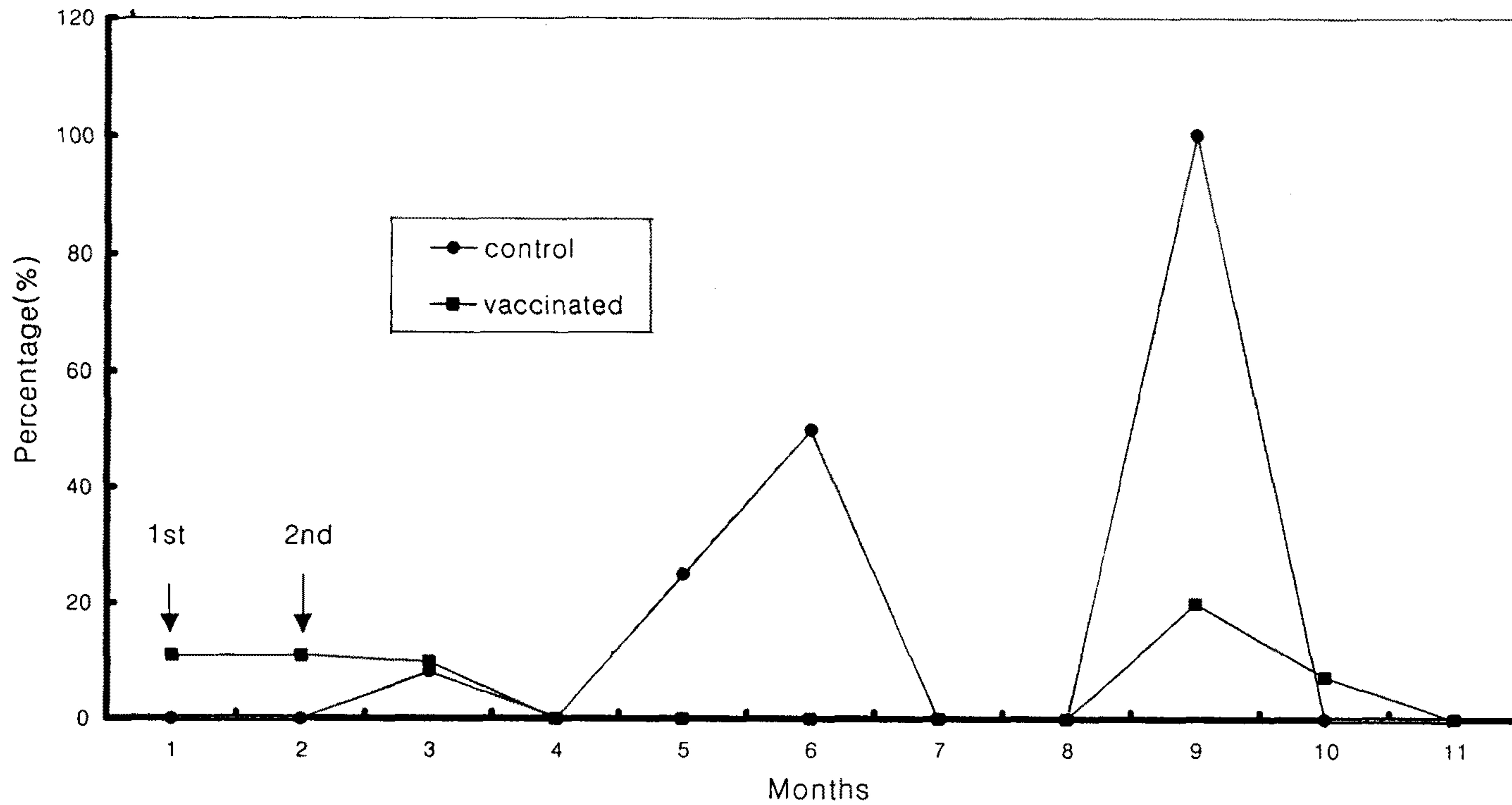


Figure 20. Prevalence of clinical mastitis between control and vaccinated group in the lactating cows

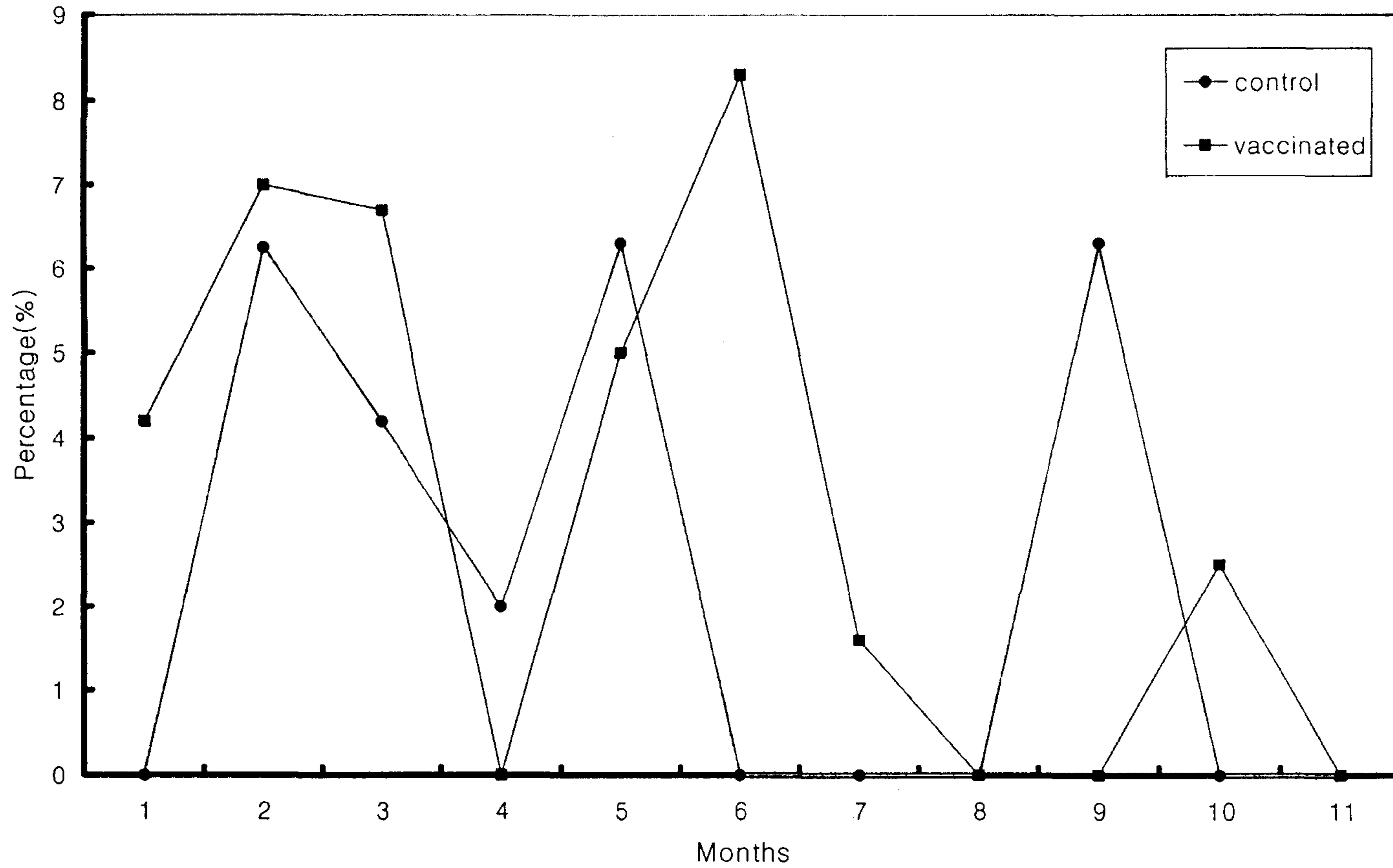


Figure 21. Prevalence of latent infection between control and vaccinated group in the lactating cows

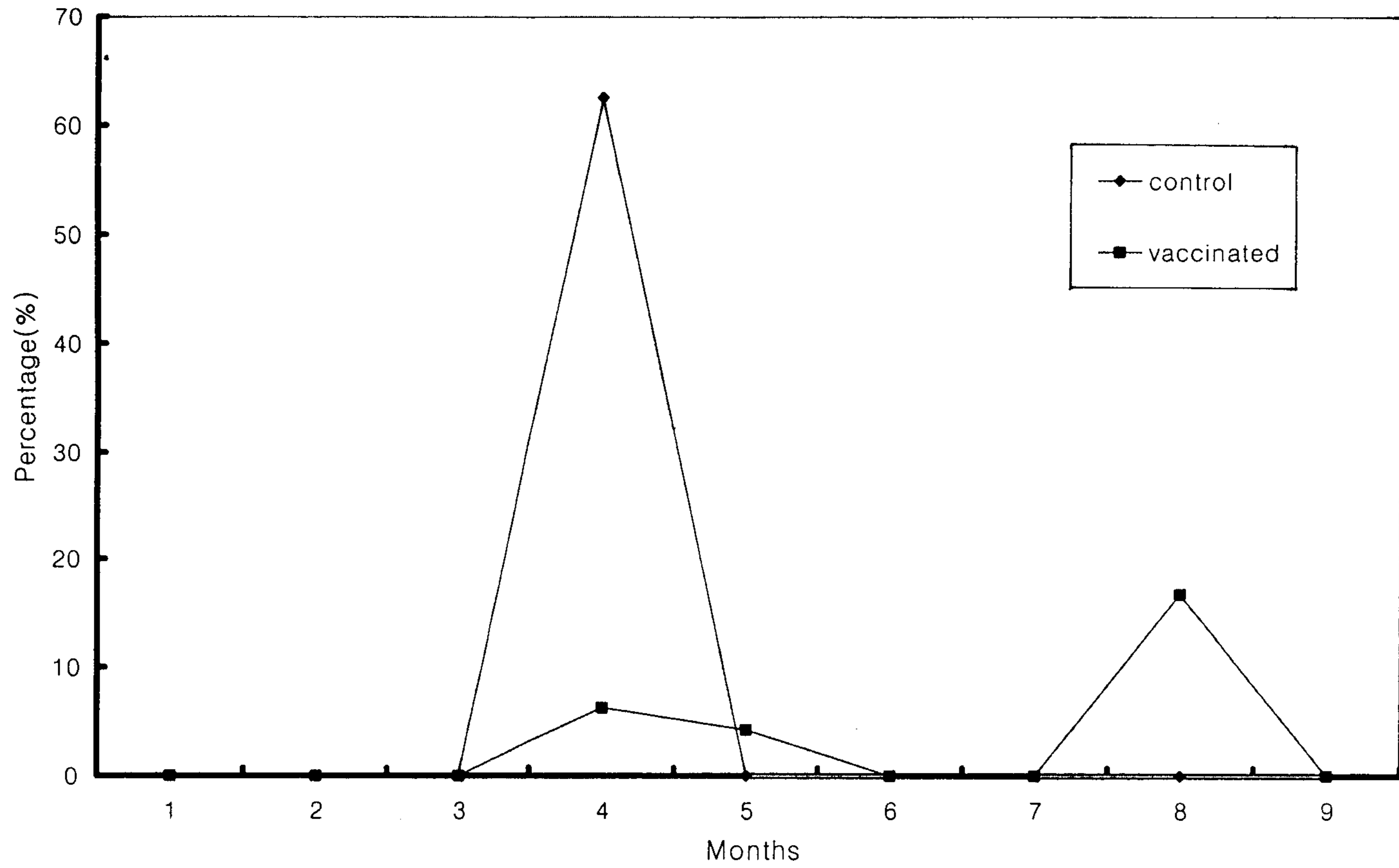


Figure 22. Prevalence of clinical mastitis between control and vaccinated group in heifers



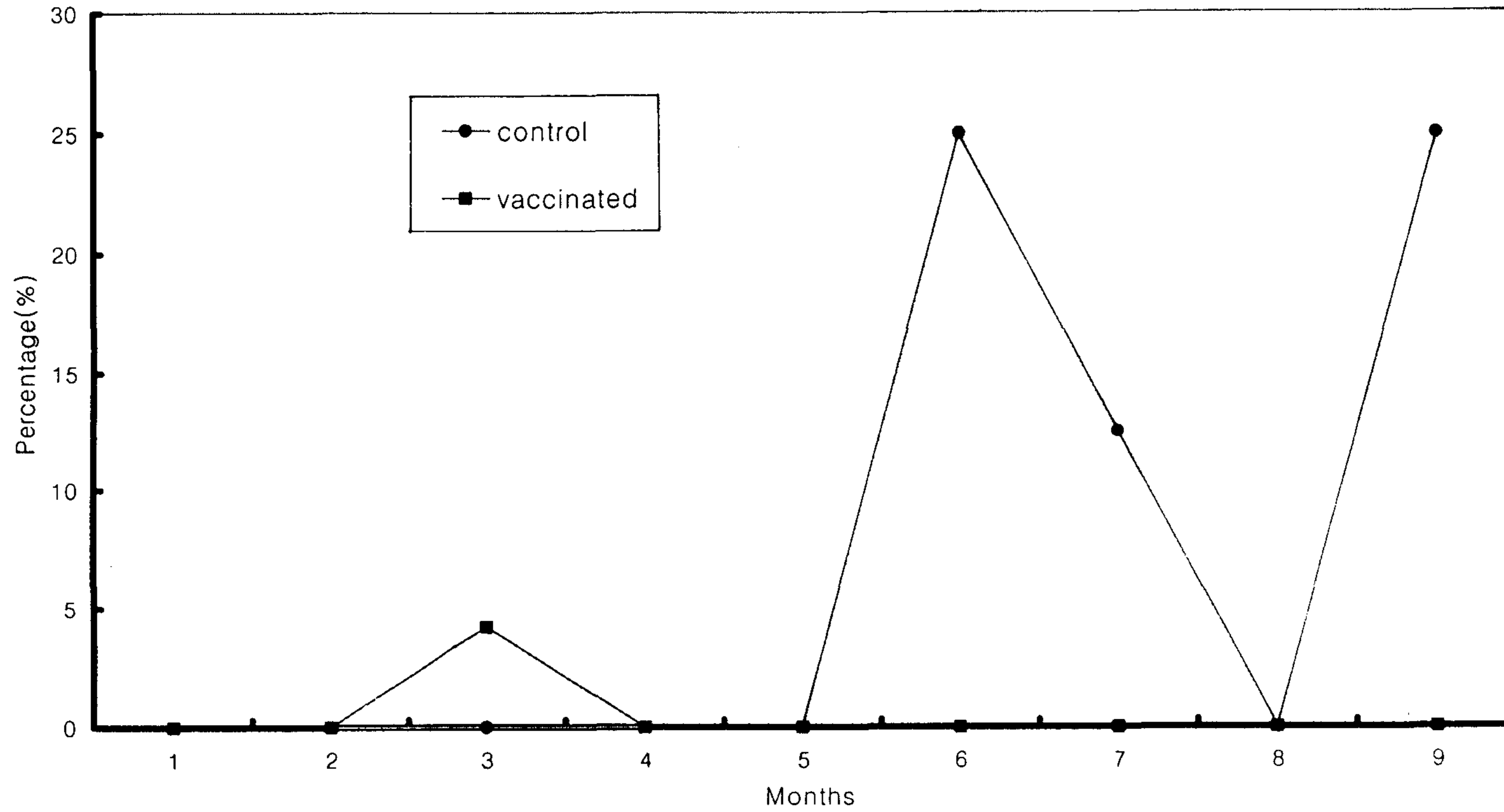


Figure 23. Prevalence of subclinical mastitis between control and vaccinated group in heifers

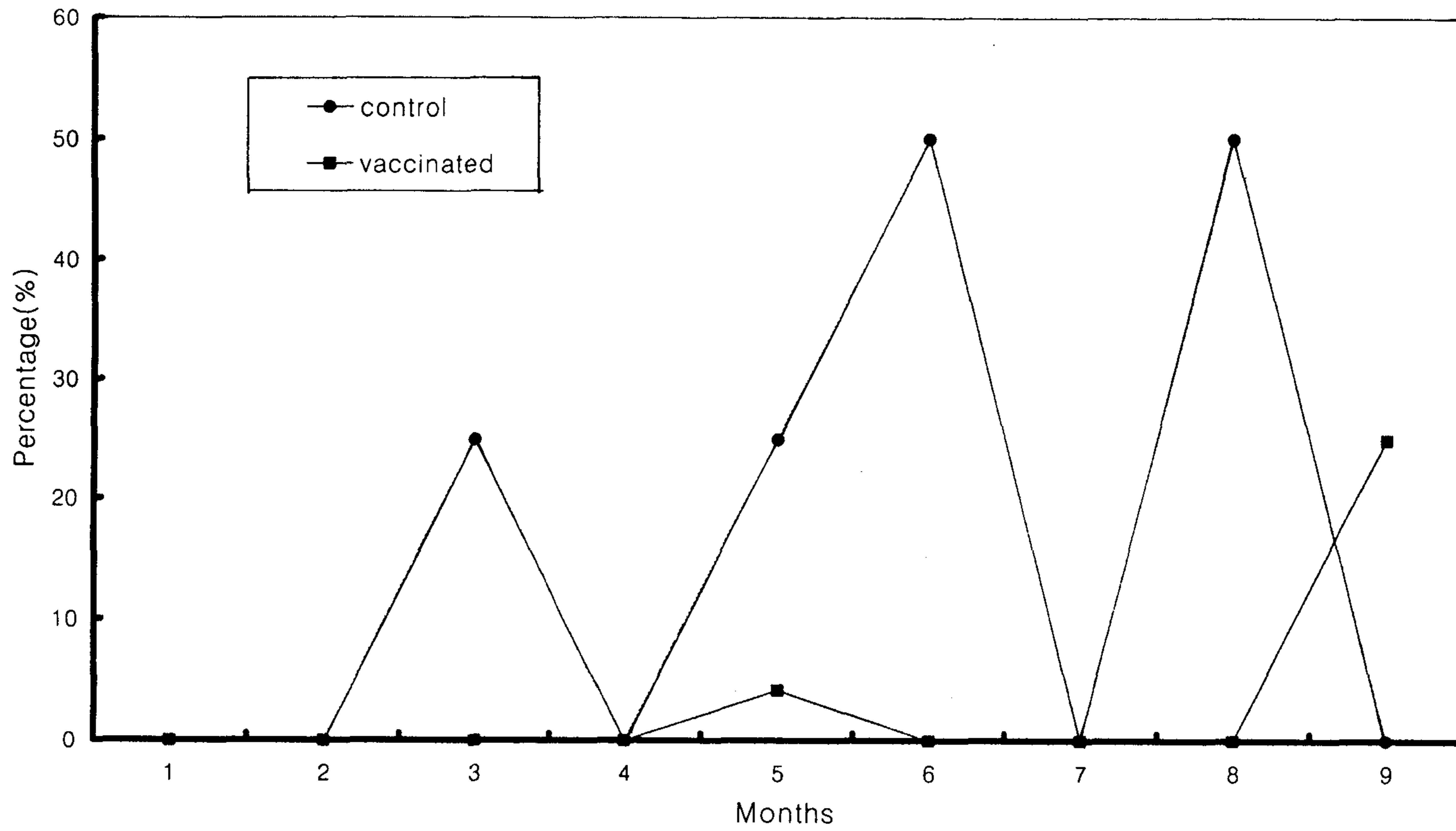


Figure 24. Prevalence of latent infection between control and vaccinated group in heifers

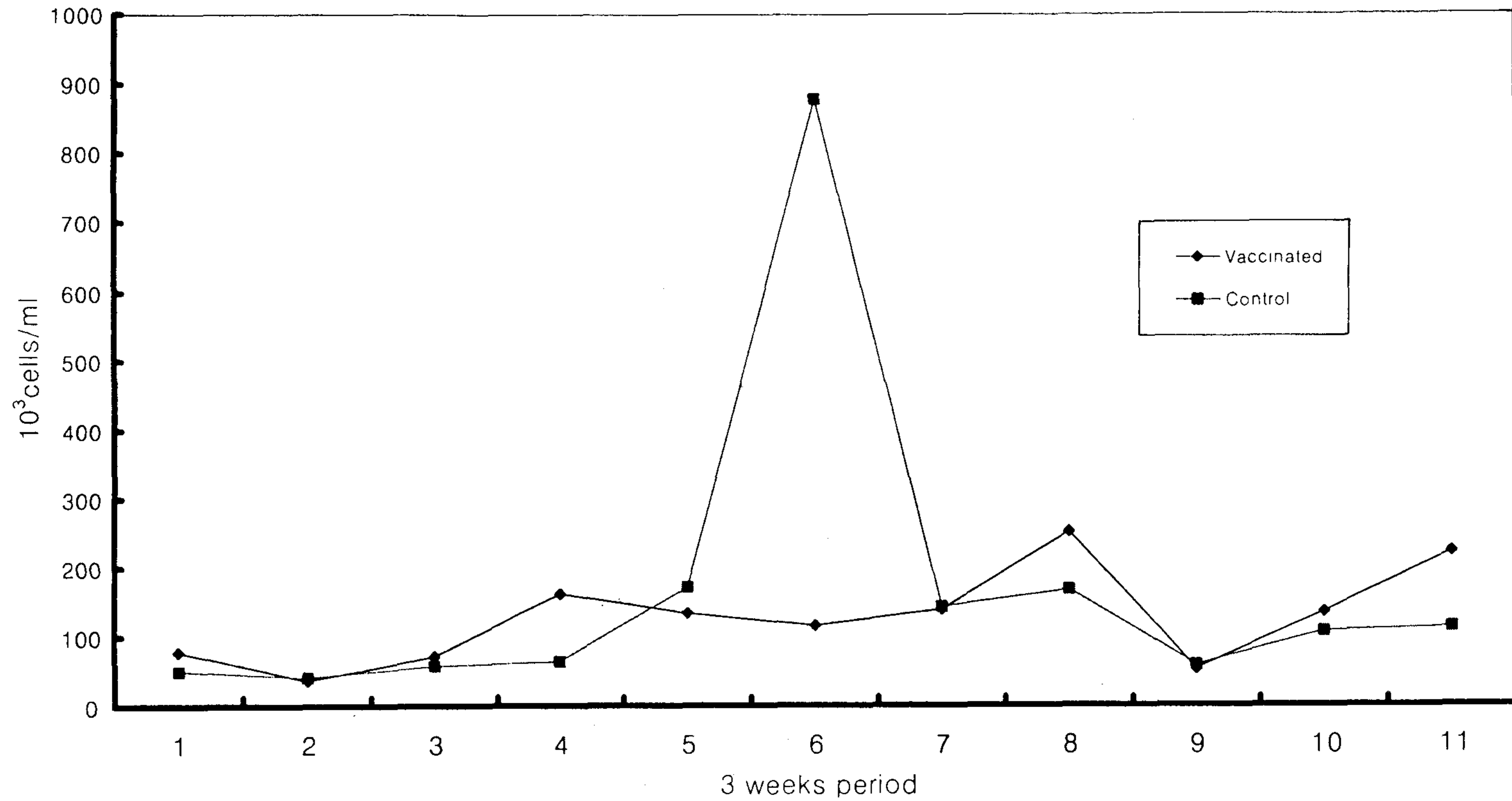


Figure 25. Mean SCC level of lactating cows that were unvaccinated (□), vaccinated in the area of the supramammary lymph node with alpha-toxin, capsular polysaccharide and fibronectin binding protein every 3 weeks twice

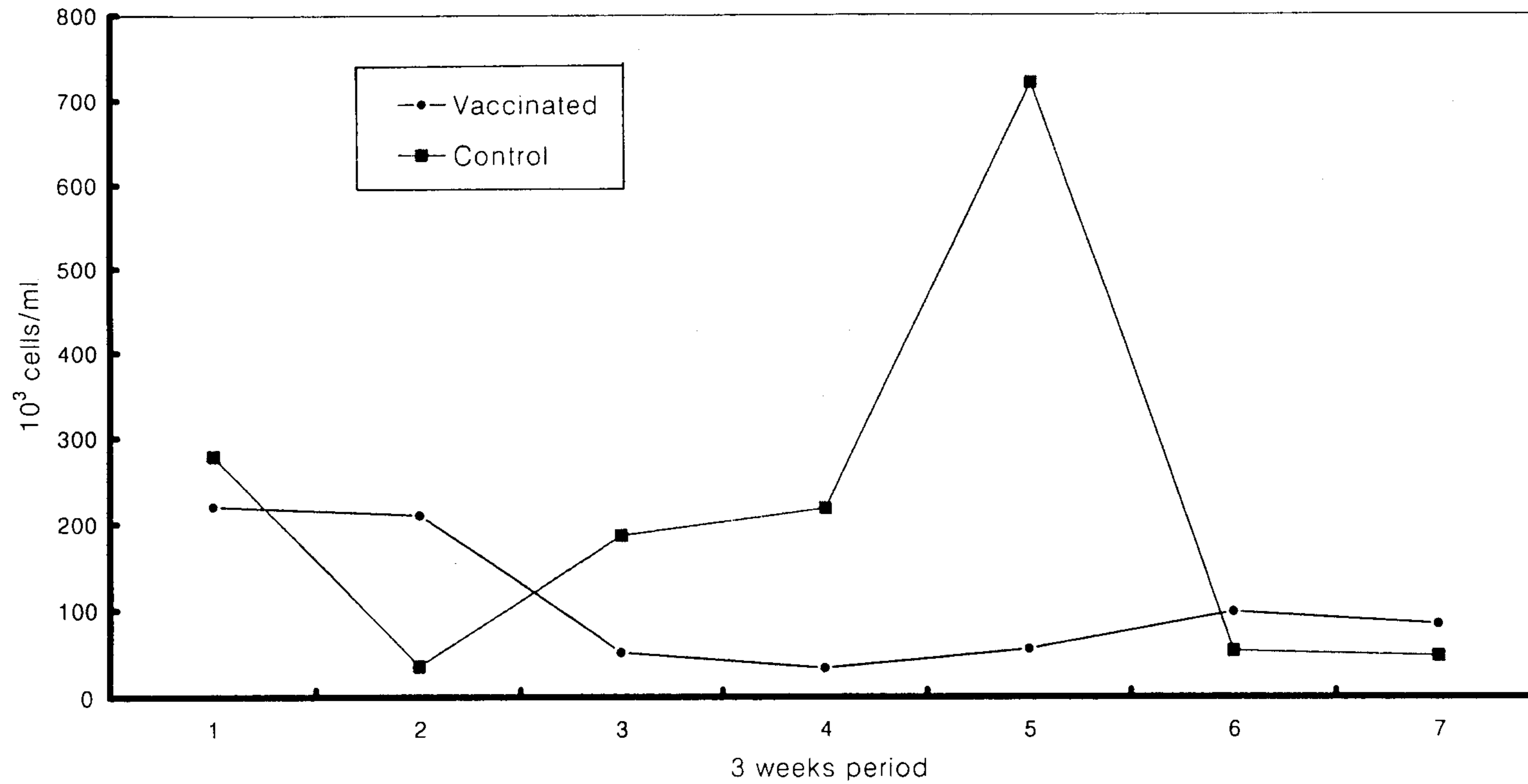


Figure 26. Mean SCC of heifers that were unvaccinated (□), vaccinated in the area of the supramammary lymph node (●) with alpha-toxin, capsular polysaccharide and fibronectin-binding protein every 3 weeks twice

## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 1 절 연구개발목표 달성도

#### 1. 연구계획 달성정도

번호	세 부 연구목표	달 성 내 용	달성도 (%)
1	-재조합백신의 항원생산	1. 재조합 FnBP의 클로닝 및 염기서열 분석 2. 재조합 FnBP의 발현 및 정제 3. <i>S. aureus</i> 의 pseudocapsule정제 4. alpha-toxin분리 및 정제	100%
2	-항원의 면역원성과 안전성 평가 -항원의 대량생산 및 정제공정 개발	1. FnBP, pseudocapsule, alpha-toxin의 면역원성 평가 2. 실험동물에서의 방어효과 및 안전성 평가 3. 항원의 대량생산 방법개발 4. 항원의 정제공정개발	100%
3	-재조합유방염 백신의 임상시험 및 산업화 탐색	1. 야외 목장을 대상으로 한 유방염 재조합 백신 임상실험 2. 항원의 대량생산방법 및 백신제조 기술 확립 3. 유방염 재조합 백신의 산업화 가능성 탐색	100%

#### 2. 달성정도에 대한 평가

본 연구사업에서 실시한 3가지 항원중 알파톡신과 fibronectin-binding protein에 대한 항원이용은 쉬운편이지만 pseudocapsule은 다양하기 때문에 이 capsule타입을 결정하여 우리나라에서 가장 널리 퍼져 있는 capsule 타입



을 사용한다면 유방염 백신에 사용한다면 아마 좀더 좋은 결과를 볼 수 있을 것으로 생각된다. 아울러 본 실험과정에서 황색포도상구균과 연쇄상구균의 문제점이 심각함으로써 여기에 대한 하나의 예방책으로써 이미 일부 국가에서는 여기에 대한 연구가 진행되어 오고 있지 만 우리나라에서도 황색포도상구균과 연쇄상구균의 혼합백신을 개발하여 대규모 목장을 상대로 연구사업이 진행된다면 좀 더 파급효과가 큰 결과를 도출 할 수 있을 것으로 생각된다.

## 2 절 대외기여도

황색포도상구균에 대한 젖소 유전자 재조합 유방염 백신개발의 관건은 첫째 병원균의 집락형성을 차단하고 황색포도상구균이 분비하는 독소를 중화시키며 혈중내 황색포도상구균에 대한 항체의 작용을 무력화시키는 capsular polysaccharide에 대한 항체를 혈중내에 지속적으로 유지시킴으로써 황색포도상기구균의 전파와 신규감염을 차단하는 기술이 확립되었으며 유전자 재조합기법을 이용한 fibronectin-binding protein을 생산함으로써 세균의 adhesin을 이용한 백신개발가능성을 확립시켜주었다. 또한 본 백신개발은 여타 선진국에서 행하고 있는 백신개발법 가운데 아직까지 시도된 바 없다.

젖소 총 질병피해액의 26%를 차지하는 유방염 감염에 의한 경제적 손실을 방지(연간 650억원)하며 유방염 치료약제사용으로 인한 경비절감효과 및 외국 수입약제 의존도 격감으로 인한 경제성 제고가 기대되며 의료용 희귀항원 물질들 고부가가치 재조합 유전자 물질을 생산가능하게 되어 세계 의약품 시장에 진출가능하다. 또한 잔류항생물질 문제가 배제된 안전 유제품 공급에 의한 국민보건 위행향상 및 국제 경쟁력 제고가 기대된다.

황색포도상구균에 대한 점막면역체계에 대한 세균백신 기술을 확립함으로써 유방염을 일으키는 기타의 병원성 미생물에 대한 백신개발과 유용물질 생

산이 가능하게 되었으며 유방염 방제를 위한 치료·예방 및 관리대책이 확립될 수 있으며 사람의 병원내 감염의 주원인균인 황색포도상구균에 대한 항혈청 생산과 예방백신의 개발에 필요한 기초기술을 보유하게 됨

1998년 세계우병학회(호주, 시드니)에서 황색포도상구균의 자가박테린-toxoid의 치료 및 예방효과에 대해 발표하며 1998년 2월호 American Animal Bovine Practitioner에 황색포도상구균의 알파독신에 대한 항체형성능과 혈중방어능에 관한 연구가 발행되었다. 1997년 37차 미국 National Mastitis Council에 staphylococcus aureus smith strain을 이용한 토끼에서의 type 2 capsular polysaccharide 항체형성능과 혈중방어능에 관한 연구가 실린 바 있으며 1996년 36차 미국 National Mastitis Council에서 알파독신의 항체가 혈중공격접종시 탐식능에 관한 연구를 발표한 바 있다. 국내에서는 1997년 대한수의학회지에 재조합 fibronectin-binding protein의 정제 및 발현에 관한 방법을 발표하였다. 또한 1997년 대한수의학회지에 capsular polysaccharide에 대한 정제 방법을 발표한 바 있다. 또한 알파독신, capsular polysaccharide와 fibronectin-binding protein을 이용한 subunit vaccine에 대한 연구결과를 Research in Veterinary Science지에 투고하였으며 젖소를 이용한 대단위 목장실험결과물은 American Animal Bovine Practitioner 9월말 투고예정에 있다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 1 절 활용분야

1. *staphylococcus aureus*균주의 완전한 유전자 분석기술 확립
2. *staphylococcus aureus*균주의 capsular polysaccharide 타입 결정과 역학적 조사가능
3. *staphylococcus aureus*의 capsular polysaccharide정제 기술 확립
4. capsular polysaccharide를 가진 기타 병원성세균에 대한 퇴치기술 확립
5. *staphylococcus aureus*균주와 streptococcus spp균주를 혼합한 예방백신개발 가능
6. *staphylococcus aureus*차기 DNA백신 개발에 대한 기초연구자료 제시

### 2 절 기대효과

1. 기술적 측면(생산능력 증대)
  - 가. secretory mammary gland의 분비성 면역체계에 대한 세균백신 제조기술 확립함으로써 유방염을 일으키는 기타의 세균병원체에 대한 백신 기술과 유용물질 생산 가능
  - 나. 유방염 방제를 위한 치료·예방 및 관리 대책 확립
  - 다. 인체용 포도상구균 백신개발에 필요한 기초기술 파급
  - 라. 단백질과 capsular polysaccharide의 conjugated vaccine개발 가능
  - 마. 재조합 단백질 기술 보급과 대량생산 체계 기술 확립
  - 바. capsular polysaccharide type 결정과 정제기술 확립가능

## 2. 경제산업적 측면

- 가. 젓소 총 질병피해액의 26%를 차지하는 유방염 감염에 대한 경제적 손실방지(연간 650억원)
- 나. 유방염 치료 약제 경비절감 및 외국 수입약제 의존도 격감으로 경제성 제고
- 다. 낙농업 생산성 향상과 낙농산업상의 폐기율 감소 및 공정간소화로 경제성 제고
- 라. 의료용 희귀항원 물질등 고부가가치 재조합 산물생산으로 세계 의약품 시장에 진출가능
- 마. 잔류항생물질 문제가 배제된 안전유제품 공급에 의한 국민보건 위생향상 및 국제경쟁력 제고
- 바. 백신개발로 인한 항생제 저항성 세균의 출현율을 크게 감소시킬 수 있음

## 3 절 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구사업의 결과로 보아 유방염 재조합 백신은 임상증상을 완화시키고 새로운 황색포도상구균의 감염을 감소시키며 백신접종후 큰 체세포수 증가에 대한 영향은 없어 앞으로 대단위 목장을 대상으로 본 연구사업에서 생산한 백신을 접종하여 그 결과를 광범위하게 조사해 볼 가치가 있다고 생각된다. 또한 유방염을 일으키는 연쇄상구균이나 대장균에 대한 혼합백신 연구가 진행된다면 목장마다 우점종 세균종이 다르기 때문에 단일 백신보다는 혼합유방염 예방백신을 개발하는 것도 좋을 것 같다.

## 제 6 장 참고문헌

1. John B Robbins, Rachel Schneerson, Willie F Vann, Dolores A Brayla, and Ali Fattom, 1996, Annals New York Academy of Sciences. Prevention of Systemic infections Caused by Group B Streptococcus and Staphylococcus aureus by Multivalent polysaccharide-protein conjugate vaccines, 68-82.
2. Ali Fattom, Xiuru Li, Yun Hee Cho, Amy Vu, Abbas Hawwari, Sara E Shepherd, Richard Coughlin, Scott Winston, and Robert Naso, 1996 13(14): 1288-1293. Effect of conjugation methodology, carrier protein, and adjuvant on the immune response to Staphylococcus aureus capsular polysaccharides.
3. Nilsson IM, Lee JC, Bremell T, Ryden C, Tarkow A, The role of Staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis
4. Lee JC, Park JS, Sheperd SE, Carey V, Fatteum A, Protective efficacy of antibodies to the Staphylococcus aureus Type 5 capsular polysaccharide in a modified model of endocarditis in rats. Infect Immun. 1997, 65(10): 4146-4151
5. Sau S, Sun J, Lee Cy. Molecular Characterization and Transcriptional analysis of Type 8 capsule genes in Staphylococcus aureus, J Bacteriol, 1997, 179(5): 1614-1621
6. Ouyang S, Lee Cy, Transcriptional analysis of type 1 capsule genes in Staphylococcus aureus. Mol Microbiol. 1997. 23(3): 473-482
7. Soell M, Diab M, Haan-Archipoff G, Beretz A, Herbelin C, poutrel B,



- Klein JP. Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells and monocytes and induce release of cytokines, *Infect Immun*, 1995, 63(4): 1380-1386.
8. Fattom A, Qualitative and quantitative immune response to bacterial capsular polysaccharides and their conjugates in mouse and man. *Adv Exp Med Biol* 1995, 383; 131-139.
  9. Lee JC, Takeda S, Livols PJ, Paoletti LC, Effects of in vitro and in vivo growth conditions on Expression of Type 8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*, *Infect Immun*, 1993, 61(5); 1853-1858.
  10. International Dairy Federation. 1987, Bovine mastitis. Definition and guideline for diagnosis. *IDF Bull. No. 211. Int. Dairy Fed. Brussels, Belgium.*
  11. International Dairy Federation. 1995, Milk enumeration of somatic cells *IDF Bull. No. 148A. Int. Dairy Fed. Brussels, Belgium.*
  12. H. R. Han, H. M. Park, T. H. Oh, C. Y. Hwang (1998) Capsular polysaccharide antibodies against *Staphylococcus aureus* Smith strain and protective ability postimmunization in Rabbits. p339-340, National Mastitis Council (NMC)
  13. C. Herbelin, B. Poutrel, F. B. Gilbert and P. Rainard (1997) Immune recruitment and bactericidal activity of neutrophils in milk of cows vaccinated with *Staphylococcal* alpha-toxin. *J Dairy Sci.* 80:2025-2034
  14. J. A. Giraudo, A. Calzolari, H. Rampone, A. Rampone, A. T. Giraudo, C. Bogni, A. Larriestra and R. Nagel (1997) Field trials of a vaccine against bovine mastitis : 1. Evaluation in Heifers. *J. Dairy Sci* 80:845-853

15. M. L. Nordhaug, L. L. Nesse, L. L. Norcross and R. Gudding (1994) A field trial with an experimental vaccine against staphylococcus aureus mastitis in cattle: 1. clinical parameters. *J. Dairy Sci* 77:1267-1275.
16. D. L. Watson (1992) Vaccination against experimental staphylococcus aureus mastitis in dairy heifers *Res Vet Sci* 53:346
17. A. I. Fattom, J. Sarwar, A. Ortiz and R. Naso (1996) A staphylococcus aureus capsular polysaccharide (CP) vaccine and CP-specific antibodies protect mice against bacterial challenge. vol 64 No.5 1659-1665.
18. Munch-Peterson, E. (1968) Incidence of udder infections arising at various stages of lactation of cows. *Aust. Vet. J.* 44:543.
19. Oliver, J., F. H. Dodd, F. K. Neave and G. L. Bailey (1956) variation in the incidence of udder infection and mastitis with stage in lactation age and season of the year. *J. Dairy Res.* 23:181.
20. A. J. Guidry, C. N. O'Brien, S. P. Oliver, H. H. Downlen, and L. W. Douglass (1994) Effect of whole staphylococcus aureus and mode of immunization on bovine opsonizing antibodies to capsule. *J. Dairy Sci.* 77:2965-2974.
21. J. Poutrel, J. A. Bouttonier, L. Sutra, and J. M. Fournier (1988) Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among *S. aureus* isolates from cow, goat, and ewe milk. *J. Clin. Microbiol.* 26:8.
22. Adlam C, Ward PD, McCartney AC, and et al. 1977. Effect of immunization with highly purified alpha- and beta-toxins on staphylococcal mastitis in rabbits. *Infect Immun.* 17:250.
23. Chhatwal G, Albohn G and Blobel H. 1987. Interaction between fibronectin and purified staphylococcal clumping factor. *FEMS Microbiol Lett.* 44:147.

24. Froman G, Switalski LM, Speziale P and Hook M. 1987. Isolation and characterization of a fibronectin receptor from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* . 262:6564.
25. Hermann M, Vaudaux PE, Pittet D, and et al. 1988. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis*. 158:693.
26. Jennings HJ. 1989. Capsular polysaccharides as vaccine candidates. In *Current Topics in Microbiology*, Eds Jann K and Jann B, Springer. Vol 150:97.
27. Nickerson SC, Pankey JW and Watts JL. 1985. Enhancement of the cellular immune response to the bovine udder by local and systemic immunization against staphylococcal mastitis. *Agri-Practice*. 6:34.
28. Robbins JB and Schneerson R. 1990. Polysaccharide-protein conjugates: a new generation of vaccines. *J. Infect Dis*. 161:821.
29. Signas C, Raucci G, Jonsson K, and et al. 1989. Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:699.
30. Uhlen M, Guss B, Nilsson B, and et al. 1984. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. *J Biol Chem*. 259:1695.
31. Watson DL and Davies HI. 1993. Influence of adjuvants on the immun response of sheep to a novel *Staphylococcus aureus* vaccine. *Vet. Microbiol*. 34(2):139.
32. Geiquel, F. 1975. *Manual del Analisis Quimicos y Clinicos*. 3rd ed. Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.