

碩士學位論文

Canine Distemper 백신의 비강내
접종에 의한 국소면역 유도



濟州大學校 大學院 書館
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

獸醫學科

韓 熊

2000년 2月

Canine Distemper 백신의 비강내 접종에 의한 국소면역 유도

指導教授 林 允 圭

韓 熊

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로
提出함.



韓 熊의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함.

審査委員長
委 員
委 員

의 주석
김종태
이우성

濟州大學校 大學院

2000年 2月

초 록

Canine Distemper 백신의 비강내 접종에 의한 국소면역 유도

(지도교수 : 임윤규)

한 용

제주대학교 대학원

수의학과

Canine distemper virus(CDV)에 대한 국소면역을 유도하기 위하여 canine distemper(CD) 백신을 50일령 자견의 비강 내에 3회 접종하며 nasal swab과 혈청 중에서의 항체형성을 관찰하였다. 면역 후 5주 후에 제주에서 분리한 야외 바이러스를 비강 내에 challenge 하였다. 항체가 검사를 위하여 sucrose gradient ultracentrifugation법으로 정제한 Lederle주 바이러스 항원과 goat anti-canine IgA-HRP 접합체 혹은 goat anti-canine IgG-HRP 접합체를 이용한 ELISA법을 실시하였다. Nasal swab에서의 challenge 바이러스 증식검사를 위하여 Vero cell에 바이러스 시료를 접종하여 감염시킨 후 rabbit anti-CDV 항체 및 goat anti-rabbit IgG-HRP를 반응시킨 cell ELISA(C-ELISA)를 실시하였다. 비강내 접종군의 nasal swab과 혈청 중에서는 CDV에 특이적인 IgA와 IgG type 항체의 증가가 관찰되어, CD 백신의 비강내 접종은 국소면역 및 전신적인 체액성 면역을 유도함을 확인하였다. 그러므로 CD 백신의 비강내 투여를 위한 용량과 제형의 보완이 이루어진다면 효과적인 국소면역의 방법론이 제시될 수 있을 것이다. 또한 본 연구에서 제시된 ELISA와 C-ELISA는 CDV 감염진단을 위한 유효한 검사법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

중심어 : Canine distemper virus, 비강내 접종, 국소면역, ELISA, cell ELISA

목 차

I. 서	론	1
II. 재료 및 방법	4	
III. 결	과	10
IV. 고	찰	21
V. 결	론	25
VI. 참 고 문 헌	26	
VII. 영 문 초 록	35	



I. 서 론

Canine distemper(CD)는 개과(Canidae) 동물에서 높은 치사율을 나타내고 매우 전염성이 높은 급성 혹은 아급성의 전신성 질병이다(Blythe 등, 1983; Halbrooks 등, 1981; Kazacos 등, 1981; Mamaev 등, 1996; Montali 등, 1983; Roelke-Parker 등, 1996; 김 등, 1996). CD는 전세계적으로 발병한다. 감수성 있는 동물간에 쉽게 전파되고 개가 가장 중요한 전염원의 역할을 하며, 대부분 어린 자견에서 발병한다(Timoney 등, 1988). Canine distemper virus(CDV)는 감염견의 분변, 오줌, 눈물 및 콧물 등으로 배설되며 공기와 비말을 통해 호흡기 감염되어 호흡기 점막에서 일차적으로 증식한 다음 혈류를 따라 중추신경계 및 전신에 파급된다(Appel 등, 1969).

CDV는 Paramyxoviridae의 Morbillivirus에 속하며, 형태는 구형이며 직경은 100내지 250nm이고, 철침학적으로는 사람 홍역바이러스(human measles virus) 및 소 우역바이러스(bovine rinderpest virus) 등과 연관성이 있다(Brown 등, 1972; Krakowka 등, 1979; Orvell 등, 1974). 핵산은 대략 16,000nucleotide의 negative single stranded RNA로 구성되어 있다. 구조단백질은 NP(nucleocapsid protein), P(phosphoprotein), M(membrane protein), F(fusion protein), H(haemagglutin protein) 및 L(large protein)의 6가지가 있는데, 이 중 H단백질과 F단백질은 감염기전에 관여한다(Timoney 등, 1988). H단백질은 바이러스를 숙주세포에 적절하게 부착시키며, F단백질은 부착된 바이러스의 외피와 세포의 endosomal membrane을 융합시킨다. H단백질에 대한 항체는 바이러스 중화 및 부착 억제 작용이 있다. F단백질에 대한 항체는 바이러스 감염 전파를 저해하는 것으로 알려져 있다. H단백질은 체액성 면역에 관여하고 F단백질은 주로 세포매개성 면역과 약간의 체액성 면역에 관여하므로 이 두 단백질에 대한 면역은 CDV 감염에 중요한 방어 체계를 이룬다고 하였다(Hirayama 등, 1991).

CD 진단법으로는, 임상증상 관찰, 봉입체의 관찰, 바이러스 입자의 전자현미경적 관찰, 폐 macrophage의 초대배양세포 혹은 Vero cell 등에 바이러스 접종한 후의 세포변성확인(Kai 등, 1993), 면역조직화학염색(Blixenkrone-Moller, 1989;

Ducatelle 등, 1980) 및 RT-PCR(An 등, 1999; Iwatsuki 등, 1998; Mamaev 등, 1996; Shin 등, 1995; Welter 등, 1999; 안 등, 1998) 등이 알려져 있다.

혈청학적 진단법으로는, 혈청중화항체법(Montali 등, 1983; Olson 등, 1988; Stephensen 등, 1997), 면역조직화학염색(Appel, 1969; 김 등, 1996; 성과 서, 1996; 윤 등, 1995) 및 ELISA법(Bernard 등, 1982; De Vries 등, 1988; Gemma 등, 1995; Gemma 등, 1996b; Jones 등, 1997; Von Messling 등, 1999) 등이 이용되고 있으나 국내에서는 혈청중화항체법(김 등, 1991)과 면역조직화학염색(김 등, 1996; 성과 서, 1996; 윤 등, 1995)만 보고되었으며 ELISA를 이용한 진단법은 그 예를 찾기 힘들다.

농촌진흥원(1991)의 CDV 백신에 대한 역사 소개에 의하면, 1928년 Laidlaw와 Dunkin에 의해 불활화 백신이 시도된 이래 현재는 전염성 간염, parvovirus, parainfluenza, leptospira 백신이 혼합된 생독 CDV 제제가 널리 사용되고 있다고 한다. 최근에는 CDV 면역자극복합체 백신(De Vries 등, 1988), CDV의 H, F유전자를 이용한 DNA 백신(Sixt 등, 1998), canarypox virus에 CDV의 H, F유전자를 삽입한 재조합 백신(Jones 등, 1997; Pardo 등, 1997; Stephensen 등, 1997; Welter 등, 1999)에 대한 연구도 보고되었다.

국내의 경우, 강 등(1964)에 의해 최초로 병원체가 분리된 이래 백신의 안전성과 효능, 보존성 및 혼합 백신에 대한 연구가 이루어졌다(강 등, 1966; 박 등, 1967; 김과 김, 1969). 1990년대 후반에는 백신 개발을 위한 기초연구로서 야생동물의 발병사례 보고 및 야외 바이러스의 유전자 변이에 관한 연구(김 등, 1996; 안 등, 1998; An 등, 1999)가 이루어지고 있다.

1960년대 이후 백신의 보급으로 개에서의 CD 발병은 전세계적으로 감소하였다. 그러나 1990년대에 독일(Blixenkroner-Moller 등, 1993), 일본(Mori 등, 1994; Gemma 등, 1995), 미국(Johnson 등, 1995) 및 핀란드(Ek-Kommonen 등, 1997) 등에서는 백신을 접종한 개에서도 CD가 발병하였음이 보고되었다. 또한, Halbrooks 등(1981), Kazacos 등(1981)의 보고에 의하면 백신을 접종한 야생 동물에서도 CD가 발병하였음을 보고하였다. 이러한 사실들은 효과적인 백신주의 선택, 접종 방법 및 접종 프로그램이 재고되어야 할 것임을 시사한다(Gemma 등,

1996a, b; Iwatsuki 등, 1998; Kai 등, 1993; 성과 서, 1996; 안 등, 1998).

CD의 임상 증상은 바이러스 감염에 의한 호흡기 점막의 손상에 따르는 기관지 폐혈증균(*Bordetella bronchiseptica*)의 2차 감염에 의해 악화되므로, CDV의 부착장소인 호흡기 점막에 국소면역을 형성시켜 주어 일차적인 조기방어 체계를 성립시켜주는 것이 보다 효율적인 예방법이라고 생각된다.

그러므로 본 연구는 CD 백신을 비강 내로 접종하여 국소면역을 유도한 자견군과, 피하에 접종한 자견군에서 점막면 및 혈중의 항체형성과 방어효과의 정도를 비교 조사하고자 실시하였고, 이를 수행하기 위한 cell ELISA(C-ELISA; Lee, 1992a, b)와 ELISA의 실험실적 조건을 설정하기 위하여 실시하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험동물

약 50일령의 잡종견 12두(2~3kg의 암·수 각각 6두)를 사용하였다. 일주일의 계류 시 구충을 실시하였다. 실험 전기간 자견용 사료(천 · 제일사료)와 상수를 급여하였다. 실험군은 비강내 접종군, 피하 접종군 그리고 대조군으로 나누어 군당 4두씩 배정하였다.

각 접종군은 $10^{5.8}$ TCID₅₀ 역가의 Lederle주를 2주 간격으로 1ml씩 비강내와 피하로 각각 접종하였다. 대조군은 바이러스가 함유되지 않은 medium 199(Sigma, USA) 1ml를 비강 내로 접종하였다(Table 1.).



Table 1. Group of experimental animals

Vaccine group	No. of dogs	Inoculation Route	Dose(TCID ₅₀ /ml)
IN	4	Intranasal	$10^{5.8}$
SC	4	Subcutaneous	$10^{5.8}$
CON	4	Intranasal	Vehicle*

* Vehicle medium199

- Each group consists of two male and two female puppies

2. 백신

(주)녹십자 수의약품에서 제공한 CDV 백신(Lederle주)을 사용하였다.

면역 접종용 바이러스의 역가는 eagle's minimum essential medium(Gibco, USA)에 5% calf serum(Gibco, USA), 1% non-essential amino acid(Gibco, USA), 1% antibiotic-antimycotic(Gibco, USA)을 첨가한 배지에 Vero cell을 단층 배양한 후 접종하여 산정하였다(Whetstone 등, 1981; Metzler 등, 1984; De Vries 등, 1988). 백신은 Table 2.와 같이 $10^{5.8}$ TCID₅₀을 비강내 혹은 피하로 접종하였다.

3. Challenge

Challenge 바이러스는 CD로 진단된 환축의 폐장으로부터 분리된 야외 바이러스를 사용하였다.

야외 바이러스 증식을 위해 공여견으로부터 분리한 폐장을 1% antibiotic-antimycotic(Gibco, USA)이 첨가된 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)으로 유제하였다. 7일령 계태아의 장뇨막에 0.1ml씩 접종하고 37℃에서 7일간 배양한 후 pock가 형성된 장뇨막을 거두어 -70℃에 보관하였다(국가검정 동물용 의약품 검정규칙, 1995).

Challenge 바이러스의 역가는 medium 199(Sigma, USA)에 5% calf serum(Gibco, USA), 1% antibiotic-antimycotic(Gibco, USA)을 첨가한 배지에 계태한 10일령 계태아 섬유아세포를 2차 배양한 세포에 접종하여 산정하였다(Kruse와 Patterson, 1973; 김 등, 1991). Challenge 바이러스는 $10^{3.0}$ TCID₅₀을 비강 내로 접종하였다.

4. CDV 항원

토끼의 면역과 ELISA를 위해 CDV Lederle주 배양액 250ml를 원심분리하여

(265,000×g, 3hrs, 4℃)(L8-70M, Beckman, USA) 침전을 회수한 후 PBS 10ml에 부유시키고 sucrose gradient ultra-centrifugation(SGUC) 법으로 정제하였다. 즉, 20% 2ml, 30% 2ml, 50% 1ml의 농도경사를 둔 sucrose(Sigma, USA)용액에 바이러스 부유액 2ml를 중층하고 원심분리(265,000×g, 3hrs, 4℃)(L8-70M, Beckman, USA)하여 2ml씩 분획을 회수하였다. 각 분획의 흡광도를 280nm에서 측정하여 (Uvikon922, Kontron, Denmark) 극대값을 보이는 분획들을 선정하고 microplate에 단계별로 회석 흡착시킨 후 CD 양성 혈청과 반응하는 분획을 선택하였다.

5. Rabbit anti-CDV antibody

CDV에 대한 항혈청을 생산하기 위하여 약 8주령의 New Zealand white rabbit 암컷 2두에 SGUC로 정제한 Lederle주 바이러스 항원 200μg을 freund's complete adjuvant에 유제하여 1ml씩 10일 간격으로 4회 피하 접종하였다. 최종 접종 10일 후에 신장을 통하여 채혈한 후 혈청을 분리하였다.

Affinity chromatography gel은 다음과 같이 준비하였다. 즉 SGUC로 정제한 Lederle주 바이러스 항원을 초음파 파쇄한(50mA, 10mins)(Ohtake works, Japan) 후 4℃에서 coupling buffer(0.1M NaHCO₃; pH 8.3, containing 0.5M NaCl)에 16시간 투석하였다. CNBr-activated Sepharose 4B(Pharmacia, Sweden) 1g을 1mM HCl로 충분히 불리고 세척한 후 투석한 항원부유액에 혼합하고 실온에서 2시간 흔들어 교반한 후 4℃에 16시간 정치시켰다. 이후 0.2M glycine(pH 8.0)을 1ml 가하여 여분의 활성기를 봉쇄하였다. 준비된 affinity gel은 소형 column에 채운 후 anti-CDV 정제에 사용하였다.

Rabbit anti-CDV 항혈청은 포화된 (NH₄)₂SO₄ 용액 동량을 가하여 염석시킨 후 침전을 회수하여 20mM sodium phosphate buffer(PB, pH 7.2)에 투석하였다. 투석된 항혈청을 affinity gel이 충전된 column에 가한 후 3M NaSCN으로 용출시킨 분획을 PBS에 투석하였다. 투석액은 제균 여과하여(0.45μm) C-ELISA에 사용하였다.

6. Nasal swab 및 혈청 시료

Nasal swab과 혈청은 매 접종 직전에 채취하였다. 야외 바이러스로 challenge 한 후에는 1주일간 매일 멸균면봉으로 nasal swab을 취하였다.

Nasal swab은 시료 운송액(medium 199(Sigma, USA)에 5% calf serum(Gibco, USA)과 1% antibiotic-antimycotic(Gibco, USA)을 첨가한 배지 1ml)에 침지하였다. Nasal swab이 첨가된 시료 운송액은 잘 흔들어서 섞은 후 300µl씩 소분하고, 혈청은 경정맥으로부터 2ml씩 채혈한 후 분리하여 -70℃의 냉동고에 보관하였다(Table 2.).

Table 2. Design of experiment

		weeks					
		0	1	2	3	4	5
Vaccination ¹⁾		●		●		●	
Challenge ²⁾							●
Sampling	Sera	●		●		●	●
	Nasal swabs	●		●		●	●●●●●● ³⁾

1) Vaccination: 1ml of 10^{5.8} TCID₅₀ Lederle strain CDV was administered to each dog via nostril

2) Challenge: 1ml of 10^{3.0} TCID₅₀ wild strain CDV which was isolated in Cheju was administered to each dog via nostril

3) Nasal swabs were collected for first six days of the fifth week after the first vaccination

7. 항체가 측정을 위한 ELISA

SGUC로 정제한 CDV항원을 50mM carbonate buffer로 희석하여 96well microplate(flat bottom, high binding, EIA/RIA plate, Costar, USA)에 100 μ l씩 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 정치시킨 후 PBS(pH 7.2)로 3회 세척하였다. 여분의 면적을 봉쇄하기 위하여 0.2% bovine serum albumin(BSA, Sigma, USA)이 용해된 PBS를 200 μ l씩 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 정치한 후 PBS로 3회 세척하여 ELISA용 plate를 준비하였다. 항체가 측정을 위하여 혈청의 경우는 100배, nasal swab의 경우는 2배씩 0.2% BSA와 0.05% Tween 20(Showa, Japan)이 용해된 PBS(BSA PBS-T)에 희석하여 100 μ l씩 가하고 실온에 2시간 반응시켰다. 이후 goat anti-canine IgA-HRP 접합체(Bethyl, USA) 혹은 goat anti-canine IgG-HRP 접합체(Bethyl, USA)를 100 μ l씩 가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 발색반응은 0.1% ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid))(Sigma, USA)를 0.1M citrate-phosphate buffer(pH 4.0)에 녹이고 0.02% H₂O₂(Showa, Japan)를 첨가한 발색제를 각 well에 100 μ l씩 가하고 실온에서 1시간 동안 발색시킨 후 ELISA reader(SLT, Columbus, Austria)로 405nm(대조과장. 492nm)에서 흡광도를 측정하였다.

8. 바이러스 검출을 위한 C-ELISA

96well microplate(flat bottom, Costar, USA)에 배양한 Vero cell에 nasal swab을 medium 199로 2배씩 계단 희석하여 100 μ l씩 접종하였다. 바이러스 접종 48시간에 PBS로 3회 세척 후 2.5% glutaraldehyde(pH 7.2, Sigma, USA)를 100 μ l씩 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 고정하였다. 항원 plates의 고정액을 버리고 PBS로 세척한 후 1% triton X-100(Sigma, USA)을 각 well당 100 μ l씩 분주하고 실온에 30분간 정치하였다. PBS로 4회 세척한 후 1% BSA(Sigma, USA)를 첨가한 PBS를 100 μ l씩 분주하고 30분간 실온에 정치하여 봉쇄하였다.

바이러스가 감염된 세포를 염색하기 위하여, BSA PBS-T에 rabbit anti-CDV

항체를 100배 희석하여 각 well에 100 μ l씩 분주하고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS로 4회 세척하였다. 효소 접합체는 BSA PBS-T에 희석하여 각 well당 100 μ l씩 가하고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS로 4회 세척하였다. 발색은 DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)(Sigma, USA) 6mg을 0.05M Tris-HCl(pH 7.2) 10ml에 녹이고 0.03% H₂O₂(Showa, Japan)를 첨가한 발색제를 각 well에 100 μ l씩 분주하였다. 바이러스 대조군의 바이러스 감염부위에 진한 갈색의 반응이 나타나면 삼차증류수로 반응을 정지시키고 현미경으로 관찰하였다.

III. 결 과

1. CDV 항원정제

CDV Lederle주 배양액을 SGUC법으로 각 2ml씩 분획한 후 파장 280nm의 흡광도와 sucrose 농도를 Fig. 1.에 나타내었다. 단백질이 극대를 보이는 제 1번 분획(O.D. at 280nm: 1.0026, sucrose 농도 48.8%), 제 4번 분획(O.D at 280nm: 0.3941, sucrose 농도 18%)을 회수하여 항원적인 특이성을 조사하였다.

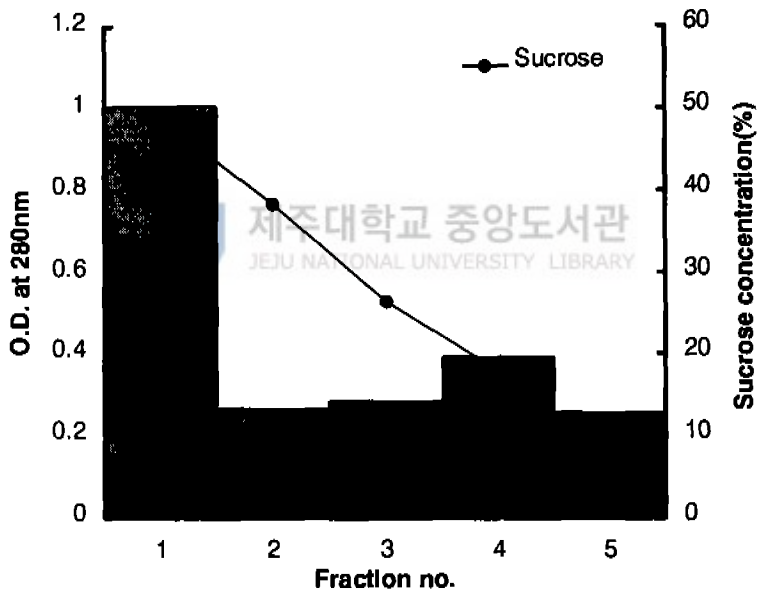


Fig. 1. Purification of CDV antigen from the CDV culture medium by SGUC.

- Fraction volume 2ml each

2. Rabbit anti-CDV 정제

토끼에 면역시켜 얻은 항혈청을 CDV 항원이 고정된 agarose gel에 가하여 affinity chromatography를 실시하였다. CDV와 특이하게 반응하는 면역글로불린 분획은 3N NaSCN으로 용출시켜 단일분획을 얻어내었다(Fig. 2). 즉, 15ml의 혈청을 20mM PB에 2배 희석하여 가한 후 20mM PB로 column을 충분히 세척하고 3M NaSCN으로 rabbit anti-CDV 항체를 용출시켰다. 용액들의 유속은 분당 0.5ml로 실시하였다.

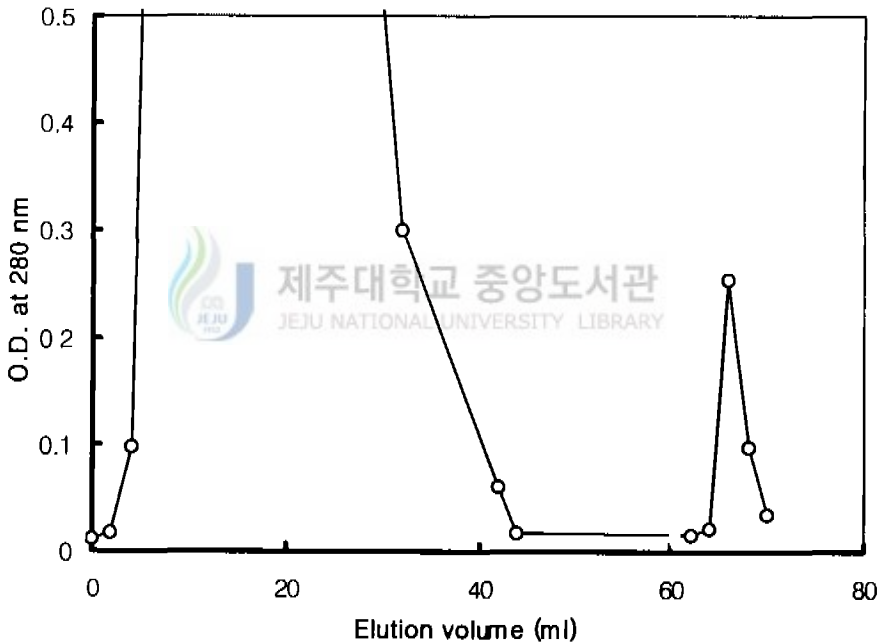


Fig. 2. Affinity purification of anti-CDV specific antibodies. Immunized rabbit serum was applied on the gel coupled with CDV antigen. Anti-CDV specific antibodies were eluted by 3M NaSCN. Each fraction was diluted $\times 10$ by PB and measured in optical density at 280nm.

3. CDV 측정을 위한 ELISA

(1) 흡착용 항원 희석 조건

단백량의 peak를 보이는 제 1번 및 제 4번 분획을 회수하여 항원의 흡착적정 농도를 결정하였다. 환측에서 취한 CDV 양성 혈청을 100배 희석하여 사용하였다. Fig. 3.에서와 같이 제 1번 분획은 1,000배와 10,000배 희석 배수 사이에서 항원농도와 반응량의 비례한 상관관계가 나타났으므로, 흡착항원의 적정 희석배수는 반응의 최대값을 나타내는 1,000배로 결정하였다. 한편 제 4번 분획은 전체 희석농도별로 반응의 상관관계는 보이지 않았으므로 ELISA의 항원으로서 적합하지 않은 것으로 판단하였다.

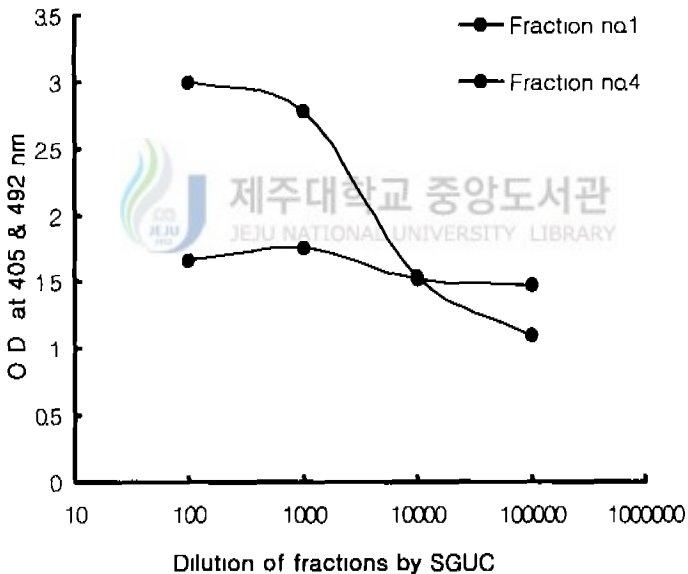


Fig. 3. Optimum dilution of CDV antigens in the ELISA for the detection of antibodies against CDV.

(2) 시료희석액 조건

비특이적인 양성반응을 제거하기 위하여 PBS-T를 기본 희석액으로 설정한 후 첨가물에 따른 ELISA결과를 비교하였다. 검사혈청은 CD 감염견의 혈청 3건을 임의로 선정하였다. BSA 0.2%를 첨가한 것, 계태아 장노막 유제 상층액 0.1%가 첨가된 경우 및 BSA 0.2%와 계태아 장노막 유제 상층액 0.2%가 모두 첨가된 것을 비교하였다. 장노막 유제 상층액은 12일령 계태아의 장노막을 거두어 유제한 후 원심분리한(3000rpm, 10mins) 상층액을 사용하였다. 결과는 Figure 4.와 같이 계태아 장노막 유제액 1%와 BSA 0.2%가 첨가된 PBS-T로 시료를 희석하였을 때 비특이적인 양성반응이 가장 낮았다. 그러나 BSA 0.2%가 첨가된 PBS-T를 사용한 결과와 큰 차이가 없다고 판단되어, 추후의 실험에서는 BSA 0.2%가 첨가된 PBS-T를 시료희석액으로 사용하였다.

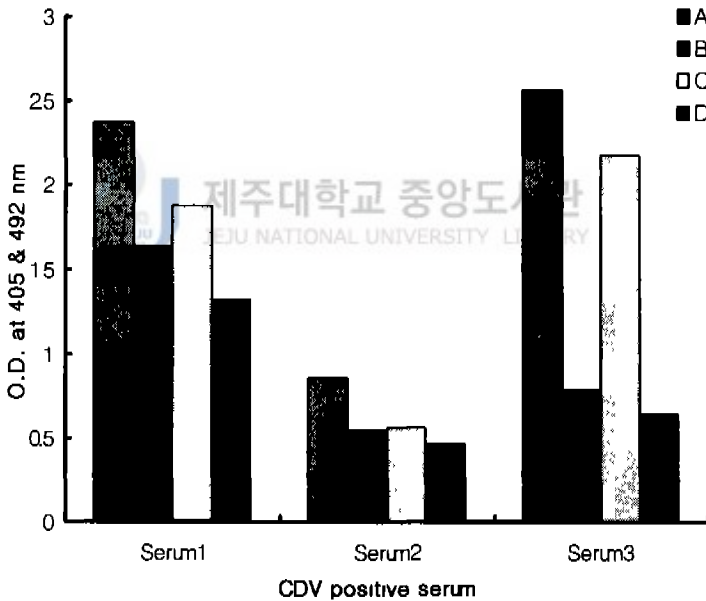


Fig. 4. Comparison of serum dilution buffers for the elimination of nonspecific positive reaction in the ELISA for the detection of antibodies against CDV.

- A PBS-T, B PBS-T containing BSA 0.2%, C PBS-T containing the supernatant of homogenized chicken coryoallontic membrane 1%, D PBS-T containing BSA 0.2% and the supernatant of homogenized chicken coryoallontic membrane 1%

4. 백신 효능 실험

(1) Nasal swab에서의 IgA 항체가

비강내 접종군에서는 면역 횟수의 증가에 따라 항체가의 지속적인 상승이 관찰되었다. 피하 접종군에서는 IgA 항체가는 증감의 경향이 뚜렷하지 않았다. 대조군에서는 전 시험기간을 통하여 다소 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5).

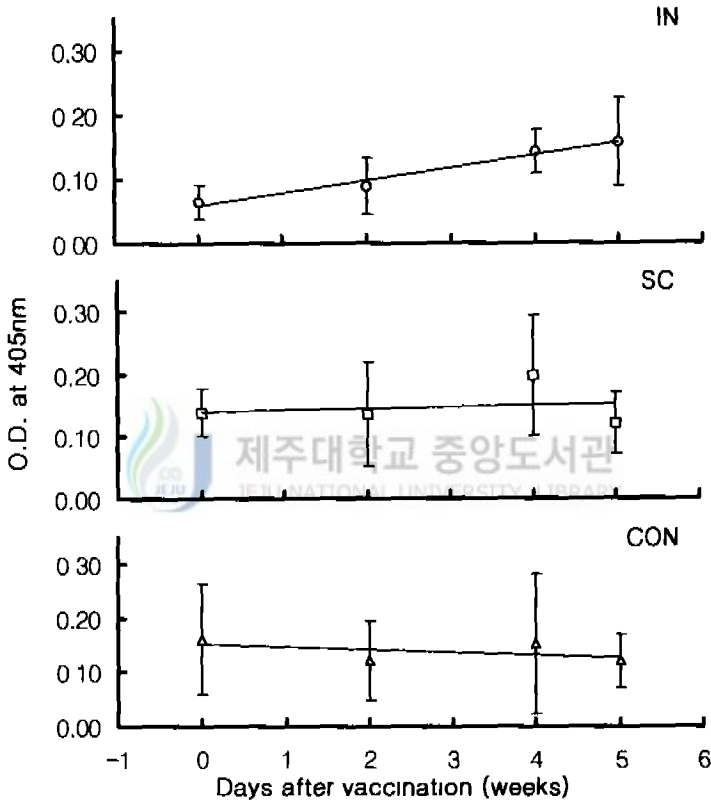


Fig. 5. Development of IgA type antibody against CDV in nasal swabs of dogs immunized with live attenuated CDV. Nasal swabs were collected from the nostril at the time of immunization and challenge.

- IN: dog's group immunized intranasally
- SC dog's group immunized subcutaneously
- CON dog's group of vehicle control

(2) Nasal swab에서의 IgG 항체가

비강내 점종균에서의 IgG 항체는 3차 접종 시점까지 증가하였고 그 후 야외 바이러스 challenge 시에는 감소한 값을 나타내었으며 전반적으로 증가의 경향을 나타내었다. 피하 점종균에서는 IgG 항체의 뚜렷한 증감의 변화가 없었다. 대조군에서는 nasal swab에서의 IgA 항체와 마찬가지로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6.).

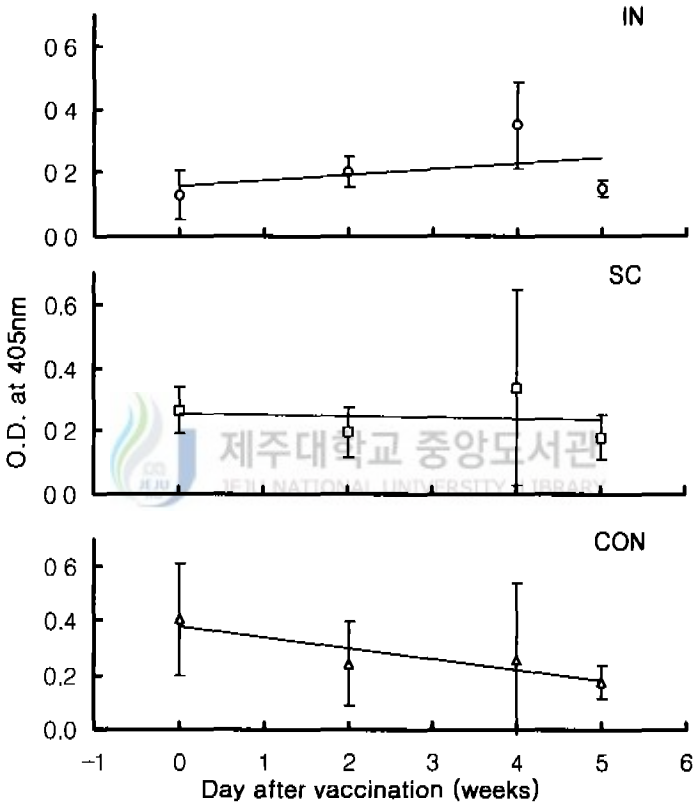


Fig. 6. Development of IgG type antibody against CDV in nasal swabs of dogs immunized with live attenuated CDV. Nasal swabs were collected from the nostril at the time of immunization and challenge.

- IN: dog's group immunized intranasally
- SC: dog's group immunized subcutaneously
- CON: dog's group of vehicle control

(3) 혈청 중에서의 IgA 항체가

혈청 중에서의 IgA 항체가의 경우에는 비강내 접종군에서 3차 접종 후 뚜렷한 증가를 보였다. 피하 접종군에서는 최초 접종 후 항체가가 상승하였으나 추가적인 2차 접종 이후에는 오히려 감소하였다. 대조군에서는 별다른 증감의 경향이 뚜렷하지 않았다(Fig. 7.).

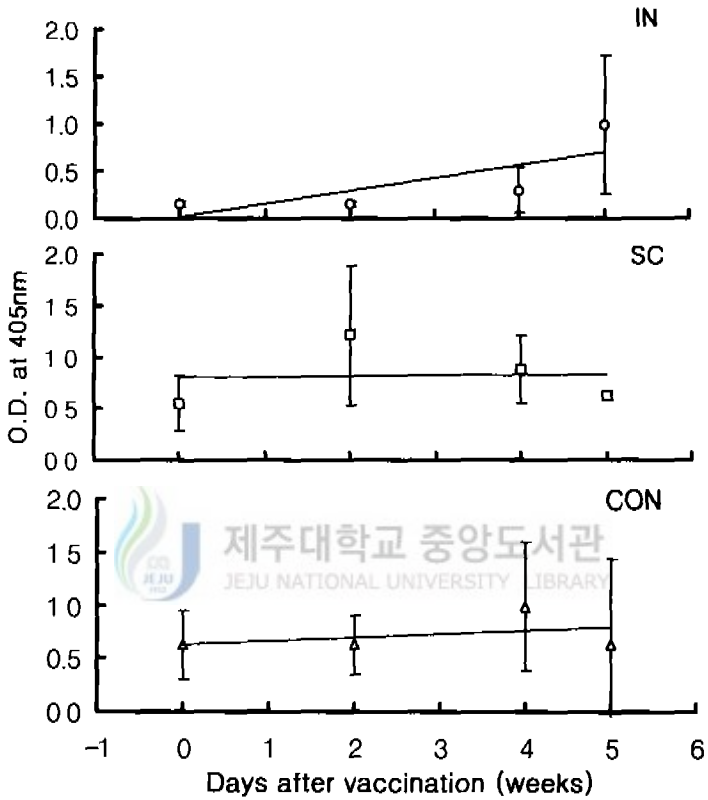


Fig. 7. Development of IgA type antibody against CDV in sera of dogs immunized with live attenuated CDV. Nasal swabs were collected from the nostril at the time of immunization and challenge.

- IN: dog's group immunized intranasally.
- SC: dog's group immunized subcutaneously.
- CON dog's group of vehicle control

(4) 혈청 중에서의 IgG 항체가

혈청 중에서의 IgG 항체는 비강내 접종군과 피하 접종군에서 모두 증가하는 경향을 보였다. 대조군에서의 IgG 항체는 증감의 변화가 없었다(Fig. 8).

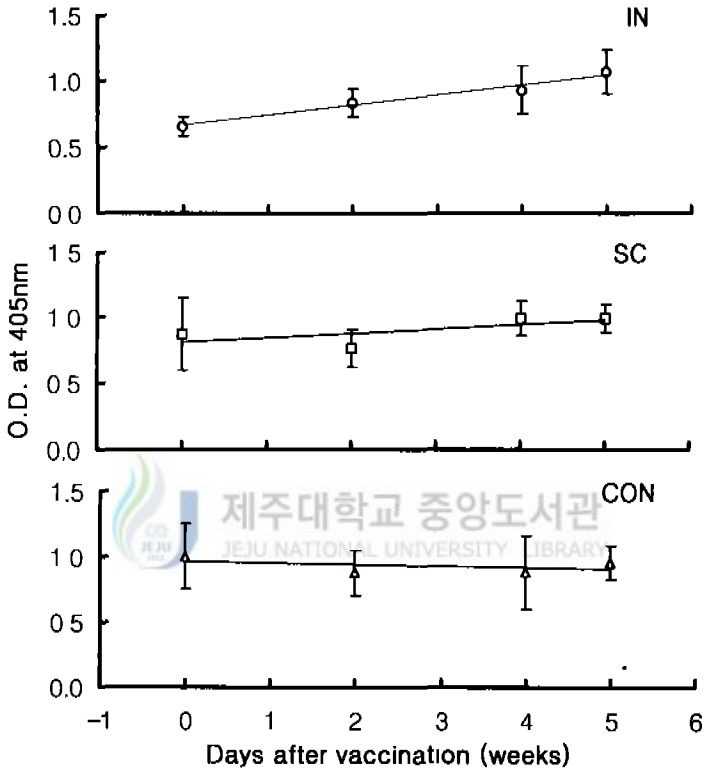


Fig. 8. Development of IgG type antibody against CDV in sera of dogs immunized with live attenuated CDV. Nasal swabs were collected from the nostril at the time of immunization and challenge.

- IN. dog's group immunized intranasally
- SC dog's group immunized subcutaneously
- CON: dog's group of vehicle control.

6. 감염 바이러스 검출을 위한 C-ELISA

Vero cell을 이용하여 바이러스 검출을 위한 C-ELISA를 실시하였다. 바이러스가 감염되지 않은 well에서는 특이적인 발색반응이 나타나지 않았다(Fig. 9). 그러나 야외 바이러스와 백신용 바이러스를 접종한 경우에는 바이러스에 감염된 세포에 선택적인 갈색의 염색상이 관찰되었다(Fig. 10.). 바이러스 항원은 세포질 내부(intracytoplasm)에 검출되어 관찰되었다(Fig. 11.)

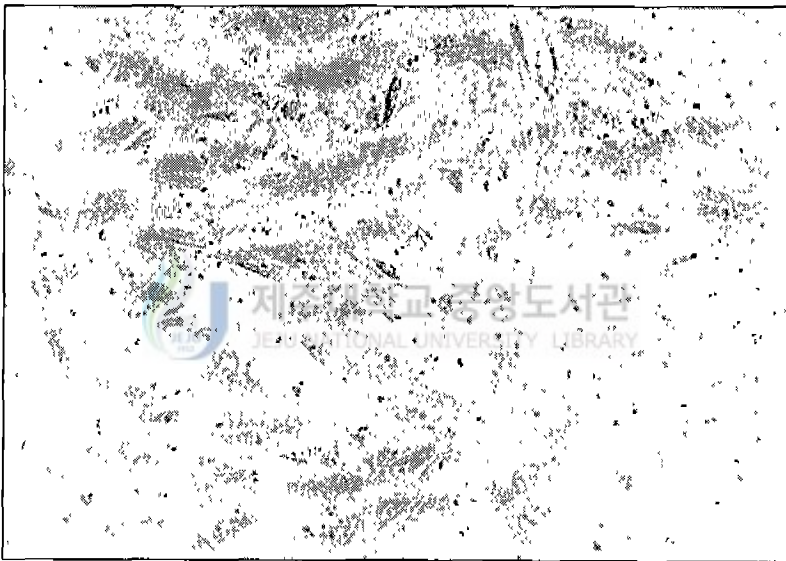


Fig. 9 Photomicrograph of Vero cell monolayer which was not infected with CDV is not showing CDV antigen-specific staining($\times 100$).

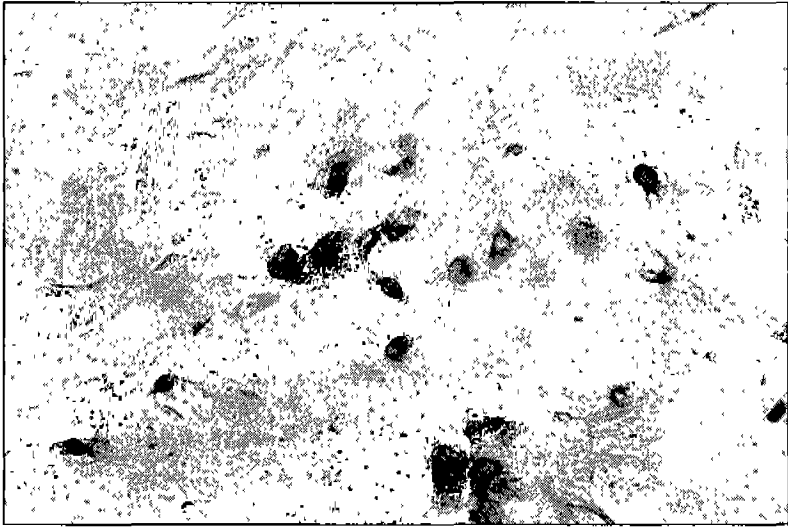


Fig. 10. The CDV isolated in Cheju-infected Vero cells at postinoculation hour 48 stained by C-ELISA. Infected cells are stained brown color(arrows) ($\times 100$).

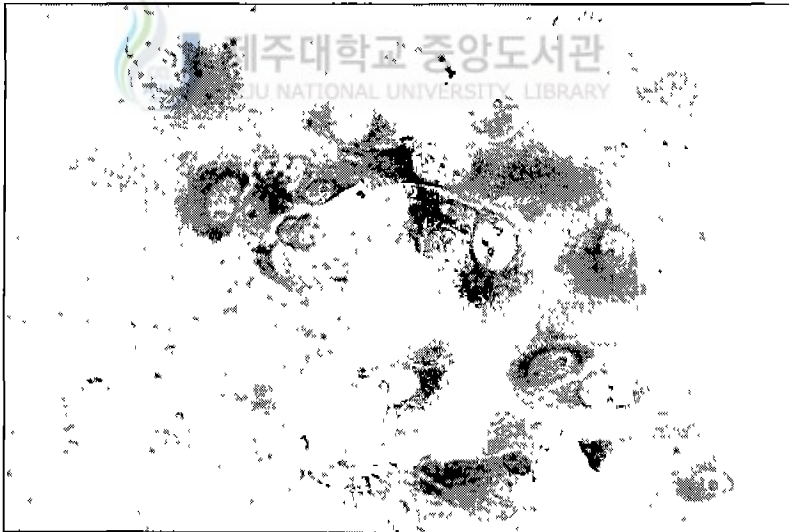


Fig 11. The CDV vaccinated-infected Vero cells at postinoculation hour 48 stained by C-ELISA. Staining is limited to the intracytoplasmic area(arrows) ($\times 250$).

7. Challenge 바이러스 회수 시험

면역 접종 5주 후에 계태아에 증식시켜 분리한 야외 바이러스를 10^{30} TCID₅₀ 씩 실험건의 비강 내로 각각 challenge하여 바이러스가 호흡기 점막에서 증식하였는가를 확인하기 위하여 C-ELISA를 실시하였다. 바이러스의 회수는 challenge 이후 1주 동안에 음성이 나타났으므로, 실험군 뿐만 아니라 대조군에서도 바이러스의 증식이 이루어지지 않았던 것으로 판단된다.



IV. 고 찰

백신을 접종하였음에도 불구하고 이러한 동물에서 CD가 발병한 사실은 야외 바이러스의 항원성 변이, 면역 유도의 비효율, 모체이행항체의 잔존에 의한 백신 효과 저하 등에 의한 원인일 가능성이 있다.

본 연구는 비강 내 접종을 통하여 백신 효율의 개선 가능성을 확인하고자 약독화 백신을 자건의 비강 내로 접종한 후 nasal swab과 혈청 중의 항체 생성을 조사하였다. 이후 야외 바이러스를 비강 내로 challenge하고 호흡기 점막에서의 바이러스 증식억제효과의 유무를 관찰하였다. 이를 위하여 항체가 측정을 위한 ELISA와 바이러스 검출을 위한 C-ELISA 조건을 설정하였다

비강내 접종군의 nasal swab에서는 IgA type 특이 항체의 형성이 확인되었다. 반면에 피하 접종군과 대조군에서는 항체가의 증가가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 점막면으로의 직접적인 항원자극이 바이러스의 침입경로인 호흡기 점막에서의 방어를 위해 효과적인 방법이 될 수 있다는 증거가 될 것이다. 이는 Takada 등(1994), Takada와 Kida(1996), Lim 등(1998)의 결과에서와 같이 비강 내 접종은 호흡기 점막에 바이러스에 대한 IgA type의 특이 항체가 형성됨으로서 국소면역을 유도할 수 있음을 시사한다.

혈청 중 IgA type 항체가는 비강내 접종군에서만 증가되었으며 피하 접종군은 증감의 경향이 뚜렷하지 않았다. 이는 Takada와 Kida(1996)의 결과와 같이 비점막에서 인지된 CDV에 대한 면역반응은 비점막 뿐만 아니라 혈청 중 IgA type 항체가의 상승 요인이 되고 있음을 보여주고 있다.

혈청 중 IgG type 항체가는 비강내 접종군과 피하 접종군에서 모두 상승하였다. 이러한 결과는 Hathaway 등(1995), Welter 등(1999)의 사람 홍역바이러스 예방을 위한 백신 연구에서 비강내 접종이 전신적인 체액성 면역을 유도한다는 결과와 같은 맥락이며, CD 백신의 비강내 접종이 국소면역 뿐만 아니라 전신적인 체액성 면역을 동시에 일으키고 있음을 알 수 있었다.

감염에 대한 점막에서의 국소면역은 병원체로부터 숙주를 방어하는 일차기구로서 하부 호흡기 점막 면역반응의 중요한 구성요소이며(Ban 등, 1997; Wang

등, 1997; Zierhut, 1998), 특히 Secretary IgA(sIgA)는 바이러스의 침입부위에서 바이러스의 부착을 일차적으로 차단한다(Wilkie, 1982; Takada와 Kida, 1996; Kiyono 등, 1996). 호흡기 감염성 질병에 있어서 비강내의 국소면역은 호흡기 점막을 통한 감염으로부터 동물을 보호하고 전신면역을 유지하는데 중요한 역할을 하며, 비경구 접종에 의한 전신적인 체액성 면역보다 효과적인 예방을 할 것이라 하였다(Takada 등, 1994; Kiyono 등, 1996).

비강내 접종에 의한 국소면역의 효율성과 비경구 예방접종 시에는 국소면역이 형성되지 않는다는 결과가 다양한 병인체에 대하여 다양하게 보고되었다(Takada 등, 1994; Takada와 Kida, 1996; Ban 등, 1997; Lim 등, 1998; Welter 등, 1999) 본 연구의 결과, CD 백신의 비강내 접종은 호흡기 점막에서의 국소면역을 유도하였고 동시에 전신적인 체액성 면역을 유도하였다 그러나 기존의 피하 접종 경로를 통한 백신 접종은 백신 투여 후 효과가 없었다. 이러한 면역 형성의 실패는 CD 백신 접종전의 CD 발병의 한 이유가 될 수 있을 것이다. 이러한 증거는 백신 투여경로의 개선 필요성의 한 증거이다.

CDV 감염에 대한 방어효과를 확인하기 위하여, 야외 바이러스 challenge 후 1주일 간 nasal swab에서 바이러스가 분리되는지 조사한 결과, 실험군과 대조군에서 공히 바이러스의 증식이 확인되지 않았다. 이러한 원인은 초회 백신 접종 시에도 여전히 모체이행항체가 잔존하였기 때문으로 사료된다. 이것은 Schultz(1982)의 보고와 같이 자건의 CD 백신 접종시기를 모체 이행항체 잔존에 따라 효율적으로 결정하여야 함을 시사한다.

한편, Hathaway 등(1995)은 홍역 예방접종 시 어린아이의 모체이행항체에 의한 백신의 효능 저하를 막기 위하여 비강내 접종을 실시함이 타당하다고 주장하였다. 본 연구의 공시동물인 50일령의 자견에서도 모체이행항체의 역가가 다양하게 나타나는 사실을 감안할 때 피하 접종보다 비강내 경로의 백신 접종이 권장된다. 또한 CDV 감염은 바이러스에 의한 호흡기 점막의 손상에 따르는 2차 감염의 합병증에 의해 악화되므로 국소면역 유도를 통한 호흡기 점막의 일차적인 손상을 막는 원리를 응용한다면 국소점막으로 감염하는 병원체들에 대한 다양한 백신의 효능향상을 기대할 수 있을 것이다

본 연구의 수행을 위해 CDV에 대한 항체의 검사와 바이러스 검출법의 응용이 필수적이므로 이를 위해 ELISA 및 C-ELISA의 방법과 조건을 설정하였다. ELISA법은 항체진단에 널리 사용되고 있으나 국내에서는 이에 대한 보고의 예를 찾기 힘들다. Nasal swab과 혈청 중 CDV 항체가 진단을 위한 ELISA를 위하여, 흡착용 항원으로 CDV Lederle주 항원을 사용하였다. CDV 백신은 계태아 장노막에서 바이러스를 증식시킨 다음 장노막을 유제하여 만들어진다(사단법인 한국 동물약품 협회, 1995년). 그러므로 백신 투여 시 CDV에 대한 항체뿐만 아니라 계태아 장노막에 대한 항체도 일부 생성될 가능성이 있으므로 이로 인한 비특이적인 양성반응을 제거하기 위하여 검체 회석액에 계태아 장노막 유제액을 가하여 ELISA를 실시하여 보았다. 결과적으로 0.2% BSA가 첨가된 PBS-T와 0.2% BSA와 1% 계태아 장노막 유제가 첨가된 PBS-T에서 명확하게 비특이적인 양성반응이 감소되었으나 두 경우의 뚜렷한 차이는 인정되지 않았으므로 본 실험에서는 0.2% BSA가 첨가된 PBS-T를 시료회석액으로 사용하여 ELISA를 실시하였다.

야외 바이러스의 확인을 위하여 일반적으로 제시된 마땅한 방법이 알려져 있지 않은 실정이다. Vero cell을 이용한 야외 CDV 분리의 경우 여러 차례 계대 증식시켜야 세포 변성 효과 관찰이 가능하다는 번거로움 때문에 실험실 진단에 있어서 실질적이지 못하다고 하였다(Kai 등, 1993). Immunoperoxidase 법인 C-ELISA는 ELISA를 응용한 방법(Higgins 등, 1982; Lee, 1992a, b)으로 매우 특이적이고 민감성이 있는 진단법이 될 수 있다고 보고하였다. 또한, 많은 시료를 한꺼번에 검사하는데 유용하다고 하였다.

본 연구에서는 Vero cell 단층배양에 야외 바이러스 검사 대상물을 접종한 후 affinity chromatography로 정제한 rabbit anti-CDV 항체를 사용하여 바이러스에 감염된 세포에 특이적으로 반응시켜 발색하였다. Vero cell monolayer 형성 후 바이러스 시료를 접종할 경우에는 세포의 과다 증식에 의한 염색상의 비특이적인 양성반응이 관찰되었으나, Vero cell을 계대 후 monolayer가 75% 정도 형성되는 시점에 바이러스 시료를 접종하고, 48시간 후에 고정 및 염색을 하였을 때 CDV가 감염된 세포의 세포질 내 양호하게 염색이 관찰되었고 주변의 감염되지

않은 세포들과는 명확한 차이를 보였다. 이러한 방법을 이용한 C-ELISA의 적용은 야외 CDV 감염 진단을 위한 바이러스 검출의 유용한 방법이 될 수 있을 것이다.



V. 결 론

약독화 CD 백신을 비강내와 피하로 접종한 실험군의 nasal swab 및 혈청 중의 IgA 및 IgG type 항체가 변화를 ELISA법으로 비교하였다. 백신 접종 5주 째에는 제주에서 분리한 야외 바이러스를 비강 내로 challenge하였다. Challenge 바이러스 증식의 확인을 위하여 nasal swab을 C-ELISA로 분석하였다.

비강내 접종군의 nasal swab과 혈청 중에서는 IgA 및 IgG의 증가가 있었으며 특히, IgA type 항체가 상승이 뚜렷함을 관찰하여 비강내 CDV 백신 투여가 국소면역 및 전신적인 체액성 면역도 동시에 형성시킴을 확인하였다. 피하 접종군에서는 혈청 중 IgG의 상승만 관찰되었다.

공시동물로 사용한 한국 재래견은 약 50일령의 경우에도 모체이행항체가 잔류함이 확인되어 피하를 통한 CD 백신 접종 시 초회 면역 시기의 재고가 필요할 것으로 생각되나, 비강내 접종을 실시한다면 이러한 부분까지도 개선이 가능할 것으로 사료되었다.

본 연구에서 신시한 항체 및 바이러스 검출을 위한 ELISA, C-ELISA법은 CD 감염 진단을 위한 간편한 실험실적 방법으로 사용될 수 있을 것이다.

VI. 참고 문헌

An, D., Song, J., Lee, J., Park, J., Shin, J., Kim, Y. and An, S. Strain differentiation of canine distemper virus by reverse transcriptase polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Kor. J. Vet. Res.* 39(4): 778~785. 1999.

Appel, M.J.G. Pathogenesis of canine distemper. *Am. J. Vet. Res.* 30(7): 1167~1182. 1969.

Ban, E.M., Ginkel, F.W., Simecka, J.W., Kiyono, H., Robinson, H.L. and McGee, J.R. Mucosal immunization with DNA encoding influenza hemagglutinin. *Vaccine.* 15(8): 811~813. 1997.

Bernard, S.L., Shen, D.T. and Gorham, J.R. Antigen requirements and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of canine IgG against canine distemper viral antigens. *Am. J. Vet. Res.* 43(12): 2266~2269. 1982.

Blixenkron-Moller, M. Detection of intracellular canine distemper virus antigen in mink inoculated with an attenuated or a virulent strain of canine distemper virus. *Am. J. Vet. Res.* 50(9): 1616~1620. 1989.

Blythe, L., Schmitz, J., Roelke, M.C. and Skinner, S. Chronic encephalitis caused by canine distemper virus in a bengal tiger. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183(11): 1159~1162. 1983.

Brown, A.L., Vitamvas, J.A., Merry, D.L. Jr. and Beckenhauer, W.H. Immune

response of pups to modified live-virus canine distemper-measles vaccine.

Am. J. Vet. Res. 33(7): 1447~1456. 1972.

De Vries, P., Uytdehaag, F.G. and Osterhaus, A.D. Canine distemper virus(CDV) immune-stimulating complexes(Iscoms), but not measles virus Iscoms, protect dogs against CDV infection. J. Gen. Virol. 69: 2071~2083. 1988.

Ducatelle, R., Coussement, W. and Hoorens, J. Demonstration of canine distemper viral antigen in paraffin section, using an unlabeled antibody-enzyme method. Am. J. Vet. Res. 41(11): 1860~1862. 1980.

Ek-Kommonen, C., Sihvonen, L., Pekkanen, K., Rikula, U. and Nuotio, L. Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. Vet. Rec. 141: 380~383 1997.



Gemma, T., Miyashita, N., Shin, Y., Okita, M., Mori, T., Iwatsuki, K. and Kai, C. Serological survey of canine distemper virus infection using enzyme-linked immunosorbent assay. J. Vet. Med. Sci 57(4): 761~763. 1995.

Gemma, T., Watari, T., Akiyama, K., Miyashita, N., Shin, Y., Iwatsuki, K., Kai, C. and Mikami, T. Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo. J. Vet. Med. Sci. 58(6): 547~550. 1996a.

Gemma, T., Iwatsuki, K., Shin, Y., Yoshida, E., Kai, C. and Mikami, T. Serological analysis of canine distemper virus using an immunocapture ELISA. J. Vet. Med. Sci. 58(8): 791~794. 1996b.

Halbrooks, R.D., Swango, L.J., Schnurrenberger, P.R., Mitchell, F.E. and Hill, E.P. Response of gray foxes to modified live-virus canine distemper vaccines. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179(11): 1170~1174. 1981.

Hathaway, L.J., Partidos, C.D., Vohra, P. and Steward, M.W. Induction of systemic immune responses to measles virus synthetic peptides administered intranasally. *Vaccine.* 13(16): 1495~1500. 1995.

Higgins, R.J., Krakowka, S., Metzler, A.E. and Koestner, A. Immunoperoxidase labeling of canine distemper virus replication cycle in Vero cell. *Am. J. Vet. Res.* 42(10): 1820~1824. 1982.

Hirayama, N., Senda, M., Nakashima, N., Takagi, M., Sugiyama, M., Yoshikawa, Y. and Yamanouchi, K. Protective effects of monoclonal antibodies against lethal canine distemper virus infection in mice. *J. Gen. Virol.* 72: 2827~2830. 1991.



Iwatsuki, K., Miyashita, N., Yoshida, E., Shin, Y., Ohashi, K., Kai, C. and Mikami, T. The nucleotide and predicted amino acid sequence of the fusion protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. *J. Vet. Med. Sci* 60(3): 381~385. 1998.

Johnson, R., Glickman, L.T., Emerick, T.J. and Patronek, G.J. Canine distemper infection in pet dogs: I. Surveillance in Indiana during a suspected outbreak. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 31(3): 223~229. 1995.

Jones, L., Tenorio, E., Gorham, J. and Yilma, T. Protective vaccination of ferrets against canine distemper with recombinant pox virus vaccines

expressing the H or F genes of rinderpest virus. *Am. J. Vet. Res.* 58(6): 590~593. 1997.

Kai, C., Ochikubo, F., Okita, M., Inuma, T., Mikami, T., Kobune, F. and Yamanouchi, K. Use of B95a cells for isolation of canine distemper virus from clinical cases. *J. Vet. Med. Sci.* 55(6): 1067~1070. 1993.

Kazacos, K.R., Thacker, H.L., Shivaprasad, H.L. and Burger, P.P. Vaccination-induced distemper in Kinkajous. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179(11): 1166~1169. 1981.

Kiyono, H., Ogra, P.L. and McGee, J.R. *Mucosal vaccines.* Academic Press. pp. 1~33. 1996.

Krakowka, S. and Wallace, A.L. Lymphocyte-associated immune responses to canine distemper and measles viruses in distemper-infected gnotobiotic dogs. *Am. J. Vet. Res.* 40(5): 669~672. 1979.

Kruse, P.F. and Patterson, M.K. *Tissue culture-Methods and applications.* Academic Press. pp. 119~122. 1973.

Lee, D. Detection of antibodies against infectious Borna disease virus -a comparison of three serological methods-. *Kor. J. Vet. Res.* 32(1): 57~61. 1992a.

Lee, D. Evaluation of a cell enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Borna disease virus antibodies in experimentally infected animals. *Kor. J. Vet. Res.* 32(3): 377~380. 1992b.

Lim, Y., Ozaki, K., Matsuki, S., Ogasawara, K., Kida, H. and Lee, Y. Intranasal immunization of pigs against influenza with synthetic peptides based on the cassette theory. Kor. J. Publ. Hlth. 22(3): 245~252. 1998.

Mamaev, L.V., Visser, I.K.G., Belikov, S.I., Denikina, N.N., Harder, T., Goatley, L., Rima, B., Edgington, B., Osterhaus, A.D.M.E and Barrett, T. Canine distemper in Lake Baikal seals(*Phoca sibirica*). Vet. Rec. 138. 437~439. 1996.

Metzler, A.E., Krakowka, S., Axthelm, M.K. and Gorham, J.R. In vitro propagation of canine distemper virus-Establishment of persistent infection in vero cell Am. J. Vet. Res 45(10). 2211~2215. 1984.

Montali, R.J, Bartz, C.R., Teare, J.A., Allen, J.T, Appel, M.J.G. and Bush, M. Clinical trials with canine distemper vaccines in exotic carnivores. J. Am. Vet. Med. Assoc 183(11): 1163~1167. 1983.

Mori, T., Shin, Y., Okita, M., Hirayama, N., Miyashita, N., Gemma, T., Kai, C. and Mikami, T. The biological characterization of field isolates of canine distemper virus from Japan. J. Gen. Virol. 75(9): 2403~2408. 1994.

Olson, P, Klingeborn, B. and Hedhammar, A. Serum antibody response to canine parvovirus, canine adenovirus-1 and canine distemper virus in dogs with known status of immunization: Study of dogs in Sweden. Am. J. Vet. Res. 49(9): 1460~1466. 1988.

Orvell, C. and Norrby, E.J. Further studies on the immunologic relationships among measles, distemper, and rinderpest viruses. J. Immunol. 113(6): 1850~

1858. 1974.

Pardo, M.C., Bauman, J.E. and Mackowiak, M. Protection of dogs against canine distemper by vaccination with a canarypox virus recombinant expressing canine distemper virus fusion and hemagglutinin glycoproteins. *Am J. Vet. Res.* 58(8): 833~836. 1997.

Roelke-Parker, M.E., Munson, L., Packer, C., Kock, R., Cleaveland, S., Carpenter, M., O'Brien, S.J., Pospischil, A., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., Mwangengele, G.L.M., Mgasa, M.N., Machange, G.A., Summer, B.A. and Appel, M.J.G. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature.* 379. 441~445. 1996

Schultz, D.D. Theoretical and practical aspects of an immunization program for dogs and cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180(10): 1142~1149. 1982.



Shin, Y., Mori, T., Okita, M., Gemma, T., Kai, C. and Mikami, T. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 57(3): 439~445. 1995.

Sixt, N., Cardoso, A., Vallier, A., Fayolle, J., Buckland, R. and Wild, T.F. Canine distemper virus DNA vaccination induces humoral and cellular immunity and protects against a lethal intracerebral challenge. *J. Virol.* 72(11): 8472~8476. 1998.

Stephensen, C.B., Welter, J., Thaker, S.R., Taylor, J., Tartaglia, J. and Paoletti, E. Canine distemper virus (CDV) infection of ferrets as a model for testing morbillivirus vaccine strategies: NYVAC- and ALVAC-based CDV

recombinants protect against symptomatic infection. *J. Virol.* 71(2): 1506~1513. 1997.

Takada, A., Shimizu, Y. and Kida, H. Protection of mice against Aujeszky's disease virus infection by intranasal vaccination with inactivated virus. *J. Vet. Med. Sci.* 56(4): 633~637. 1994.

Takada, A. and Kida, H. Protective immune response of chickens against Newcastle disease induced by the intranasal vaccination with inactivated virus. *Vet. Microbiol.* 50: 17~25. 1996.

Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W. and Barlough, J.E. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. eighth edition. pp. 792~804. 1988.

Von Messling, V., Harder, T.C., Moennig, V., Rautenberg, P., Nolte, I. and Haas, L. Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M(IgM) and IgG antibody against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 37(4): 1049~1056. 1999.

Wang, B., Dang, K., Agadjanyan, M.G., Srikantan, V., Li, F., Ugen, K.E., Boyer, J, Merva, M., William, W.V. and Weiner, D.B. Mucosal immunization with a DNA vaccine induces immune response against HIV-1 at a mucosal site. *Vaccine.* 15(8): 821~825 1997.

Welter, J., Taylor, J., Tartaglia, J., Paoletti, E. and Stephensen, C.B. Mucosal vaccination with recombinant poxvirus vaccines protects ferrets against

symptomatic CDV infection. *Vaccine*. 17: 308~318. 1999.

Whetstone, C.A., Bunn, T.O. and Gourlay, J.A. Canine distemper virus titration in ferret peritoneal macrophages *Cornell Vet*. 71: 144~148. 1981.

Wilkie, B.N. Respiratory tract immune response to microbial pathogens. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181(10): 1074~1079. 1982.

Zierhut, M., Elson, C.O., Forrester, J.V., Kijlstra, A., Kraehenbuhl, J.P. and Sullivan, D.A. Mucosal immunology and the eye *Immunol. Today*. 79(4): 148~156 1998.

강병직, 이현수, 권혁진. 한국견에 있어서의 디스토펙의 분포와 생독면역에 대하여. *농사시험연구보고*. 7(3): 35~41. 1964.

강병직, 이현수, 권혁진. 개디스토펙 및 전염성간염 생독예방약에 대한 기초시험 *농사시험연구보고* 9(3): 105~115. 1966

김덕원과 김배정. 개의 디스토펙 백신의 보존성에 관한 시험. *가축위생연구소보*. 15: 25~26. 1969.

김두희, 신진호, 박준철, 박종현, 이재진, 위성환, 강영배, 김종만, 정석찬, 조성수, 김자숙, 이태욱, 오철수. 한국 진도견 질병조사연구. *농시논문집*. 33(2): 61~68. 1991

김재훈, 황의경, 박수원, 손현주, 서일복, 김대영, 배유찬, 최상호. 너구리의 개디스토펙 감염 증례 보고. *농업논문집*. 38(1): 864~869. 1996.

농촌진흥원 가축위생연구소. 한국의 가축 위생 연구- 가축 위생 연구사 80년. pp. 176~179. 1991.

박명한, 김용희, 이현수. 犬디스토펜퍼와 광견병 혼합예방약에 대한 시험. 농사시험 연구보고. 10(5): 43~48. 1967.

사단법인 한국 동물약품 협회. 국가검정 동물용 의약품 검정 규칙. 개 디스토펜퍼 생백신 검정기준. 1-4-03-02. 1995.

성승규와 서일복. 개 디스토펜퍼바이러스에 감염된 장기병변의 병리조직학적 관찰 및 조직내 항원분포 조사에 관한 연구. 대한수의학회지. 36(2): 405~415. 1996.

안동준, 송재영, 박종현, 이중복, 현방훈, 김재훈, 배용태, 최갑철, 안수환. 진도견에서 분리된 개 디스토펜퍼 H 유전자의 분자생물학적 특성. 수의과학논문집. 40(1): 37~47. 1998.



윤기복, 강문일, 박남용, 한동운. 간접형광항체법에 의한 개의 바이러스-canine distemper virus, canine parvovirus, canine coronavirus, canine adenovirus type-2, canine parainfluenzavirus-항체분포 조사. 대한수의학회지 35(1): 75~85. 1995.

이창희, 정운익. 한국견에서 분리한 Canine Distemper Virus에 관한 연구. 가축 위생연구소보. 10(1): 19~27. 1964.

Induction of Local Immunity by Intranasal Vaccination with Live Attenuated Canine Distemper Virus in Dogs.

Woong Hahn

Department of Veterinary Medicine, Graduate School
Cheju National University
Cheju, Korea

(Supervised by Professor Yoon-Kyu Lim)

Abstract

In order to induce local immunity on the respiratory mucosa against canine distemper virus(CDV), live attenuated CDV(Lederle strain) was administered into nasal cavities of 12 dogs of 50 days old. Dogs were challenged intranasally with the CDV isolated in Cheju on the fifth weeks from the date of first vaccination. For the detection of antibody titer in nasal swabs and sera, ELISA was performed with the antigen purified by SGUC along with goat anti-canine IgA-HRP or goat anti-canine IgG-HRP conjugator. For the detection of challenge virus replication on the respiratory mucosa, cell ELISA (C-ELISA) was performed by using rabbit anti-CDV antibody and goat anti rabbit IgG-HRP conjugator after inoculation of nasal swabs into the Vero cell monolayer. Raising of IgA and IgG type antibodies against CDV was observed in nasal swabs and sera of dogs vaccinated intranasally. Vaccination by intranasal route with live attenuated CDV could induce not only local immunity but also systemic immune responses. Therefore intranasal

immunization by live attenuated CD vaccine could be suggested as effective local immunity method if proper dosage and type of application are supplemented. Furthermore, ELISA and C-ELISA developed in this study could be applied as a useful diagnostic tools to detect antibody titer and virus

Key words Canine distemper virus, Intranasal vaccination, Local immunity, ELISA, cell ELISA



감사의 글

이 논문을 쓰기까지 가까이 그리고 멀리서 지켜봐 주신 많은 분들께 감사의 말씀을 드립니다.

오랜 시간 동안 저를 바라보시며 따뜻하고 따끔한 말씀을 항상 전해주시신 임윤규 교수님께 충심으로 감사드립니다. 논문 지도에 시간과 정성을 아끼지 않고 격려와 조언을 해주신 이두식 교수님, 정종태 교수님 그리고 항상 따뜻한 눈길로 바라봐 주시던 다른 모든 교수님들께 감사의 말씀을 올립니다.

실험하는데 많은 배려를 해준 우리 공중보건학 실험실 식구들, 김우택님, 김영주님, 양재혁 선배님, 김성희 선배님, 이미현, 김수연, 유진아에게 감사하다는 말을 전하고 싶습니다

못난 자식 멀리 두고 항상 가슴 졸이시며 사랑을 아끼지 않으신 아버지, 어머니 그리고 사랑하는 동생 지혜에게 감사의 말씀을 전합니다.

한결 같은 맘으로 사랑을 키우고 지켜준 사랑하는 은하에게 감사의 말을 전하고 싶습니다.

마지막으로 하루하루의 생활 가운데 말씀으로써 제게 생명을 공급하시고 과정을 거쳐 매일의 부활 생명에 참여케 하시는 하나님께 감사드립니다.