



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

골수세포에 대한 *Bordetella bronchiseptica*
항원의 면역기억반응과 백신 adjuvant 효과

濟州大學校

獸醫學科

任 雪 花

2015年 8月

골수세포에 대한 *Bordetella bronchiseptica*
항원의 면역기억반응과 백신 adjuvant 효과

指導教授 朱 洪 球

任 雪 花

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2015年 6月

任雪花의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 손 원 근 (印)

委 員 지 영 혼 (印)

委 員 유 은 숙 (印)

濟州大學校 大學院

2015年 6月

초 록

골수세포에 대한 *Bordetella bronchiseptica* 항원의 면역기억반응과 백신 adjuvant 효과

(지도교수: 지영훈)

임설화

제주대학교 수의학과 대학원

골수는 조혈과 면역을 담당하는 주된 장기로, 백신의 효능에 중요한 역할을 담당하는 다양한 면역세포를 제공한다. *Bordetella(B.) bronchiseptica* 항원은 마우스 비장세포에서 높은 면역원성을 가지는데 반해, *Mycoplasma(M.) hyopneumoniae* 항원은 마우스 비장세포와 골수세포에서 낮은 면역원성을 나타내는 것을 이전의 연구에서 보고하였다. 본 연구에서는 두 항원이 숙주의 중추 면역 기관에서 면역기억반응을 보이는지, 그리고 *B. bronchiseptica* 항원이 *M. hyopneumoniae*에 대해 백신 adjuvant로서 효과가 있는지에 대해 조사하였다. *B. bronchiseptica* 항원의 재감작은 동일한 항원이 접종된 마우스의 골수세포에서 세포 활성화 및 분열을 증가시켰다. 한편 접종된 마우스의 골수세포에 *B. bronchiseptica*를 재감작하면 항원 특이적인 immunoglobulin G(IgG) 생산이 증가하였다. 접종된 마우스의 혈청에서 각각의 두 항원에 특이적인 IgG의 항체가가 높아졌으며, 특히 두 항원을 모두 접종한 마우스에서 *M. hyopneumoniae* 특이적인 IgG의 항체가가 *M. hyopenumoniae* 항원만

접종한 마우스보다 높아졌다. 또한 항원을 인식한 포식세포가 생산하는 대표적인 물질인 nitric oxide 및 tumor necrosis factor- α 는 마우스 골수세포에 두 항원을 모두 처리한 마우스에서 *M. hyopneumoniae*를 단독으로 처리한 마우스보다 생산이 증가하였다. 결과적으로, 본 연구에서는 *B. bronchiseptica* 항원에 감염된 골수세포의 기억 반응을 확인할 수 있었다. 또한, *B. bronchiseptica* 항원에 의해 *M. hyopneumoniae* 항원의 면역원성이 증가하는 것을 관찰하였다. 따라서 본 연구결과를 통해 *B. bronchiseptica*와 *M. hyopneumoniae*의 백신 개발에 유용한 정보가 될 것이며, 특히 *B. bronchiseptica*가 효과적인 백신 adjuvant로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

Keywords: *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, vaccine, adjuvant, bone marrow, immunogenicity, immune memory

Abstract

Immune memory responses and vaccine adjuvant effects of *Bordetella bronchiseptica* antigen on bone marrow cells

Supervised by professor Youngheun Jee

Seol-Hwa Yim

College of Veterinary Medicine,

Graduate school,

Jeju National University

Bone marrow is the main organ for hematological and immunological function and plays a critical role in the efficacy of vaccination by providing multiple immune cells including lymphocytes. In our previous report, we demonstrated that *Bordetella (B.) bronchiseptica* antigen has high immunogenicity in mouse spleen cells while *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* showed low immunogenicity in mouse bone marrow cells (BMs). In this follow-up study, we investigated if the host immune cells can recognize both antigens and if *B. bronchiseptica* antigen may enhance the immunogenicity of *M.*

hyopneumoniae antigen. It turned out that the stimulation of *B. bronchiseptica* antigen significantly increased the cellular activity and proliferation rate of the primed cells. Also, in BMs primed with *B. bronchiseptica* antigen *in vivo*, the production of immunoglobulin G (IgG) was increased by *B. bronchiseptica* antigen treatment. The level of each antigen-specific IgG in immunized mice sera was all elevated. Especially, *M. hyopneumoniae*-specific IgG was more enhanced in mice sera immunized by both antigens than those by *M. hyopneumoniae* antigen alone. Also, the levels of nitric oxide and tumor necrosis factor- α , typical signaling molecules for producing antigen-recognized phagocytes, were increased more in BMs treated by both antigens than those by *M. Hyopneumoniae* antigen alone. Taken together, present study demonstrated that *B. bronchiseptica* antigen recalls the immune response of the primed bone marrow cells and boosts the immunogenicity of *M. hyopneumoniae*. This study provides an experimental proof that *B. bronchiseptica* antigen can be used as a vaccine adjuvant as well as vaccine antigen itself, and information valuable in the development of *B. bronchiseptica* and *M. hyopneumoniae* vaccines.

Keywords: *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, vaccine, adjuvant, bone marrow, immunogenicity, immune memory

목 차

I. 서	론	-----	1
II. 재료	및 방법	-----	4
III. 결	과	-----	8
IV. 고	찰	-----	16
V. 참 고 문 헌		-----	20

I. 서론

*Mycoplasma(M.) hyopneumoniae*와 *Bordetella(B.) bronchiseptica*는 돼지 호흡기 질환의 원인체이다. *M. hyopneumoniae*는 유행성 폐렴(enzootic pneumoniae)의 원인체로, 돼지의 호흡기 점막에 부착하여 섬모와 상피세포를 손상시킨다 [9]. 이 병원체는 38~100%의 돼지 농가에 분포할 만큼 만연해 있다 [23]. 한편, *B. bronchiseptica*는 위축성 비염(atrophic rhinitis)의 원인체로 그람 음성 세균에 속하며, 호흡기점막에서 집락(colony)을 형성하여 피부괴사독소(dermonecrotic toxin)를 생산하여 조직을 손상시킨다 [8]. *M. hyopneumoniae*와 *B. bronchiseptica*의 단독 감염은 호흡기계에 심각한 손상을 유발하지 않으나, Porcine circovirus type 2(PCV 2), *Pasteurella multocida*와 같은 다른 병원체와 복합 감염될 경우 심각한 손상을 유발하게 된다 [18, 29]. 이들 병원체는 돼지의 증체량을 감소시켜 경제적 손실을 일으키기 때문에 백신 개발을 필요로 하고 있다 [9, 13]. 이러한 백신을 효과적으로 제작하기 위해서는 접종된 항원이 체내의 면역기관에서 어떠한 면역반응을 유도하는지에 대한 연구가 필요하다. 현재까지 개발된 백신들을 살펴보면, PCV 2를 함께 예방할 수 있는 *M. hyopneumoniae* 백신은 혈중에서 항원 특이적인 항체의 생산이 증명되었고 [16], *B. bronchiseptica* 백신은 병원체의 방출을 감소시키고 호흡기의 병변을 제한하는 효과가 확인되었다 [12]. 하지만 접종된 항원이 면역기관의 세포, 특히 중추 면역세포에 어떠한 면역반응을 유도하는지에 대한 연구는 이루어지지 않았다.

한편 백신은 이러한 체내 면역계의 면역 기억반응을 이용하여 동일한 병원체에 노출되었을 때 더 빠르고 강력하게 반응함으로써 질병을 예방하는데 중요한 역할을 한다. 이러한 백신은 일반적으로 백신항원과 adjuvant로 구성이 되는데, adjuvant는 백신의 효능을 높이고 적절한 면역 반응이 일어나도록 자극하는 역할을 한다 [24]. 일반적으로 사용이 승인된 adjuvant에는 alum, MF59와 같은

물질이 대표적이다. Alum은 가장 널리 쓰이며 안전성이 입증된 물질이나, T helper(Th) 1 유형의 면역반응을 유도하지 못하고, 합제 백신(combination vaccine)을 제작할 경우 효율이 떨어진다는 단점이 있다. MF59는 oil-in-water 유형의 adjuvant로, alum에 비해 보다 안정하고 강력한 Th 2 유형의 면역반응을 유도한다. 하지만 alum과 마찬가지로 Th 1 유형의 면역반응을 유도하지 못하고, 동물 종에 따라 particle을 다르게 제작해야 하므로 다양한 종에 적용하기 어렵다 [14, 22]. 이를 보완하기 위해 개발된 Bacillus Calmette-Guerin(BCG)는 세균 유래의 항원으로 강력한 세포매개성면역(cell-mediated-immunity, CMI)을 유도한다 [11]. 하지만 항원 자체의 독성으로 인해 접종 부위에 괴사 등의 조직 손상을 유도한다. 따라서 돼지와 같은 산업동물에서는 상품의 가치를 떨어뜨리기 때문에 사용하기에는 적합하지 않다 [26]. 한편, 중앙백신연구소에서는 nanoparticle adjuvant의 일종인 Immulant- α 를 사용하여 유행성 폐렴과 위축성 비염에 대한 백신을 제작하고 있다. 이 adjuvant는 CMI와 체액성 면역 모두를 유도할 수 있지만, 제작하기 어렵고 particle 자체의 독성이 있으며 면역 과정에서 liposomal delivery system이 불안정하다는 단점이 있다 [2]. 따라서 시판중인 이들 adjuvant를 보완할 수 있는 새로운 adjuvant 개발이 필요하다.

기존의 연구를 살펴보면, *M. hyopneumoniae*에 이환된 돼지의 호흡기 분비물(bronchoalveolar lavage fluid)에서 IL-6, tumor necrosis factor(TNF), IL-1과 같은 여러 가지 cytokine을 검출하였으며 [3, 4], *B. bronchiseptica*에 이환된 돼지의 역학 또는 병리학적 소견에 대한 여러 가지 보고가 있다 [7, 10]. 하지만 이들 항원 자체에 대한 면역원성의 연구는 미흡하다. 따라서 선행 연구에서는 말초면역기관인 비장에서 두 항원에 대해 일어나는 면역반응을 살펴 보았다. *M. hyopneumoniae* 항원은 비장세포의 활성화 및 TNF- α 등의 염증성 cytokine 생산량의 변화가 적게 나타났지만 [28], *B. bronchiseptica* 항원은 단독으로 처리하였을 경우에도 비장세포를 유의적으로 활성화하고 TNF- α 와 같은 cytokine 분비를 유도하였다 [15, 27]. 결과적으로 *M. hyopneumoniae* 백신은 항원의 면역원성을 높이는 adjuvant를 필요로 하지만, *B. bronchiseptica*

항원은 adjuvant 없이도 백신에 필요한 면역원성을 충분히 지닌다는 것을 알 수 있었다.

앞서 수행된 연구를 본 연구에서는 바탕으로 *B. bronchiseptica* 항원을 이용한 백신 개발을 위해 먼저 면역기억과 밀접한 관련이 있는 골수의 세포에서 *B. bronchiseptica* 항원에 대한 면역기억반응을 살펴보았다. 또한 *B. bronchiseptica* 항원이 *M. hyopneumoniae* 항원의 면역원성을 증가시켜 adjuvant로 이용될 수 있는지 살펴보았다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물과 백신항원

실험동물은 오리엔트 바이오에서 제공받아 제주대학교 수의약리학실에서 사육된 8-12주령 사이의 C57BL/6 마우스와 BALB/c 마우스를 사용하였다. 마우스의 안락사에는 CO₂ gas를 이용하였다. 동물실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 제주대학교 동물실험윤리지침을 준수하여 시행되었다(승인번호 2013-0024). *B. bronchiseptica* 항원은 (주)고려비엔피에서, *M. hyopneumoniae* 항원은 (주)중앙백신연구소에서 사균을 공급받아 단백질 정량을 시행한 후 실험에 사용하였다. 단백질 정량에는 bovine serum albumin(Sigma, USA)을 사용한 표준곡선이 이용되었다.

2. *In vivo* 접종 실험 설계

BALB/c 마우스를 사용하였으며, 대조군에는 PBS를, 항원접종군에는 *B. bronchiseptica*(10 µg/mouse), *M. hyopneumoniae*(5 µg/mouse), *B. bronchiseptica*+*M. hyopneumoniae* 항원을 각각 복강내 접종 하였다. 2주 간격의 2회 접종 후 안락사시켜 접종마우스의 골수세포와 혈청을 채취하여 실험에 이용하였다.

3. 골수세포의 준비 및 배양

골수세포는 마우스에서 분리하여 얻었다. 안락사시킨 마우스의 대퇴골과 경골을 외과적으로 적출하였다. 이들의 양측 골단을 절단하여 골수강을 노출하고, 골수강 내의 골수조직을 phosphate buffered saline(PBS, Life Technologies, USA)으로 flushing 하여 채취하였다. 이 세포들은 10분간 ammonium chloride-potassium lysis buffer로 처리하여 적혈구를 제거하였다. 이후 40 µm cell strainer(BD Bioscience, USA)에 걸러 내어 골수세포를 획득하였다. 이 세포를 96-well 배양 용기에 배양하여 실험에 사용하였다. 세포배양을 위해

우태아혈청 5%, 페니실린/스트렙토마이신 100 U/mL, L-glutamine 2 mM이 포함된 RPMI-1640배지를 사용하였다. 혈청은 마우스를 안락사한 뒤 심장천자를 통해 얻은 혈액을 microcentrifuge로 분리하여 획득하였다.

4. *B. bronchiseptica* 항원의 면역기억반응

4.1. *B. bronchiseptica* 접종 마우스의 골수세포 활성화 및 세포분열 측정

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 살아있는 세포에서 보라색의 formazan으로 환원되는 물질이다. 보라색의 formazan에 대한 흡광도를 측정함으로써 세포의 활성도를 확인할 수 있다 [25]. *B. bronchiseptica* 항원을 접종한 마우스의 골수세포를 2일간 배양한 후 MTT assay를 실시하여 골수세포의 활성화 정도를 측정하였다. 배양한 세포에 MTT 용액을 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하여 배양한 후 10% sodium dodecyl sulfate 용액을 처리하여 배양하였다. 그 후 microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific, USA)를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편, carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)는 세포 투과성의 non-fluorescent pro-dye로 살아있는 세포의 세포 내 esterase에 의해 분해되어 형광을 띠게 되는 물질이다. 분해된 CFSE는 세포 내부의 단백질과 결합하게 되며, 세포가 분열하면 그 정도가 절반으로 감소하기 때문에 유세포분석을 이용해 분해된 형광물질을 측정함으로써 세포의 분열 능력을 확인할 수 있다 [21]. *B. bronchiseptica* 항원을 접종한 마우스의 골수세포가 증식하는 정도를 측정하기 위해 CFSE cell proliferation assay를 실시하였다. 골수세포에 CFSE 용액을 5 μM 농도로 처리한 후 골수세포를 계수하여 96-well plate에 넣고 *B. bronchiseptica* 항원을 처리하여 4일간 배양하였다. 배양된 세포를 1% paraformaldehyde 용액으로 고정한 뒤 FACSCalibur (BD Biosciences)를 이용해 분석하였다.

4.2. *B. bronchiseptica* 접종 마우스의 항원 특이적인 항체가의 측정

B. bronchiseptica 항원을 접종한 마우스에서 분리한 골수세포를 96-well plate에 1×10^6 cells/mL의 농도로 넣고 *B. bronchiseptica* 항원을 처리하여 3

일간 배양한 뒤 세포배양액을 이용하여 항원 특이적인 Immunoglobulin G(IgG) 수준을 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)로 측정하였다. *B. bronchiseptica* 항원을 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)에 희석시켜 F8 Maxisorp Nunc-Immuno module(Thermo Scientific)에 넣어 코팅시켰다. 그 후 5% 우태아혈청을 포함한 PBS를 이용하여 blocking하였다. PBST(PBS containing 0.05% Tween20)로 세척한 후 0.5% 우태아혈청을 포함한 PBS로 희석시킨 혈청과 세포배양액을 처리하고, 다시 PBST로 세척한 후 horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG를 0.5% 우태아혈청을 포함한 PBS에 8000배 희석하여 반응시켰다. 세척단계 후에 tetramethyl benzidine용액을 넣어 어두운 곳에서 5~10분간 발색시키고 1N hydrogen chloride 용액으로 효소반응을 중단시킨 후 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. *M. hyopneumoniae* 항원에 대한 *B. bronchiseptica* 항원의 adjuvant 효과

5.1. 골수세포의 활성화 측정

B. bronchiseptica 항원과 *M. hyopneumoniae* 항원을 처리하여 4일간 배양한 마우스의 골수세포를 이용하여 실험에 이용하였다. 실험을 위해 앞서 제시된 방법으로 MTT assay를 진행하였다.

5.2. Nitric oxide(NO) assay

마우스의 골수세포를 2×10^6 cells/mL의 농도로 96-well culture plates에 넣은 후 *B. bronchiseptica* 항원과 *M. hyopneumoniae* 항원을 처리하거나 처리하지 않고 3일 간 배양하였다. 세포배양 상층액을 얻은 후 회사에서 제공하는 방법에 따라 NO detection kit(iNtRON, 한국)를 이용하여 NO의 생산량을 측정하였다. 흡광도는 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 측정하였다.

5.3. ELISA를 이용한 cytokine의 측정

마우스의 골수세포를 1×10^6 cells/mL의 농도로 96-well culture plates에 넣은 후 *B. bronchiseptica* 항원과 *M. hyopneumoniae* 항원을 처리하거나 처리하

지 않고 3일 간 배양하였다. 세포배양 상층액을 얻은 후 회사에서 제공하는 방법에 따라 ELISA kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 TNF- α 의 생산량을 측정하였다. 흡광도는 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

5.4. *B. bronchiseptica* 및 *M. hyopneumoniae* 접종 마우스의 항원 특이적인 항체가의 측정

B. bronchiseptica 및 *M. hyopneumoniae* 항원을 접종한 마우스의 혈청에서 항원 특이적인 IgG 수준을 측정하기 위해 앞서 제시된 방법으로 IgG ELISA를 실시하였다.

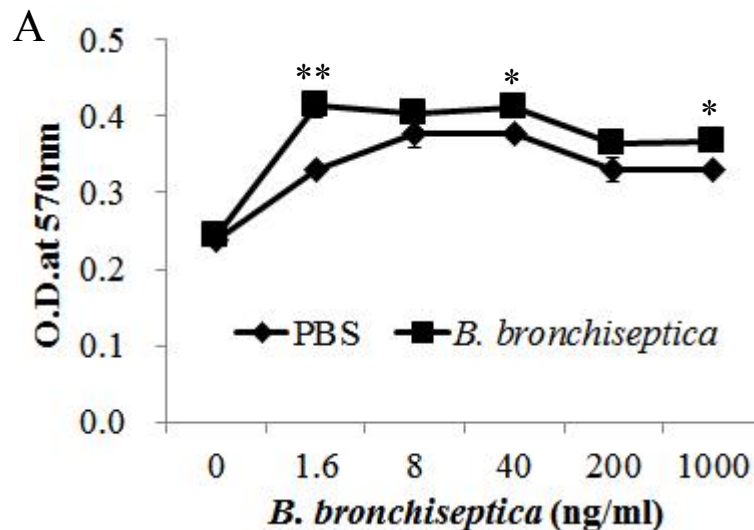
6. 유의성 분석

대조군과 실험군에서 얻은 결과 사이의 유의차는 ANOVA 분석 후에 Turkey 검정으로 유의성을 확인하였다. 대조군에 대한 실험군의 유의성은 *(#) $p < 0.05$, **(**#) $p < 0.01$, ***(**#*) $p < 0.001$ 로 나타내었다.

III. 결과

B. bronchiseptica 접종 마우스에서 항원 재감작에 의한 골수세포의 활성화 및 세포분열 증가

PBS 또는 *B. bronchiseptica* 항원을 접종한 마우스의 골수세포에 *B. bronchiseptica* 항원을 처리하여 배양한 후, MTT assay를 통해 세포의 활성화 정도를 측정하였다(Fig. 1A). 또한 세포 단위의 분열 측정을 위해 같은 방법으로 항원을 접종한 마우스의 골수세포를 형광물질의 일종인 CFSE로 염색하여 배양한 뒤 FACSCalibur을 이용해 분석하였다(Fig. 1B). MTT assay 결과 대조군보다 *B. bronchiseptica* 항원 접종군에서 *B. bronchiseptica* 항원에 의해 세포의 활성화 정도가 증가했다. 특히 실험에서 가장 낮은 농도였던 1.6 ng/mL의 경우 대조군보다 항원접종군의 골수세포가 높은 세포활성도를 보였다. 하지만 골수세포 활성화도의 증가가 *B. bronchiseptica* 항원의 농도에 비례하지는 않았다. CFSE cell proliferation assay 결과 대조군에 비해 *B. bronchiseptica* 항원 접종군에서 세포분열이 증가했다.



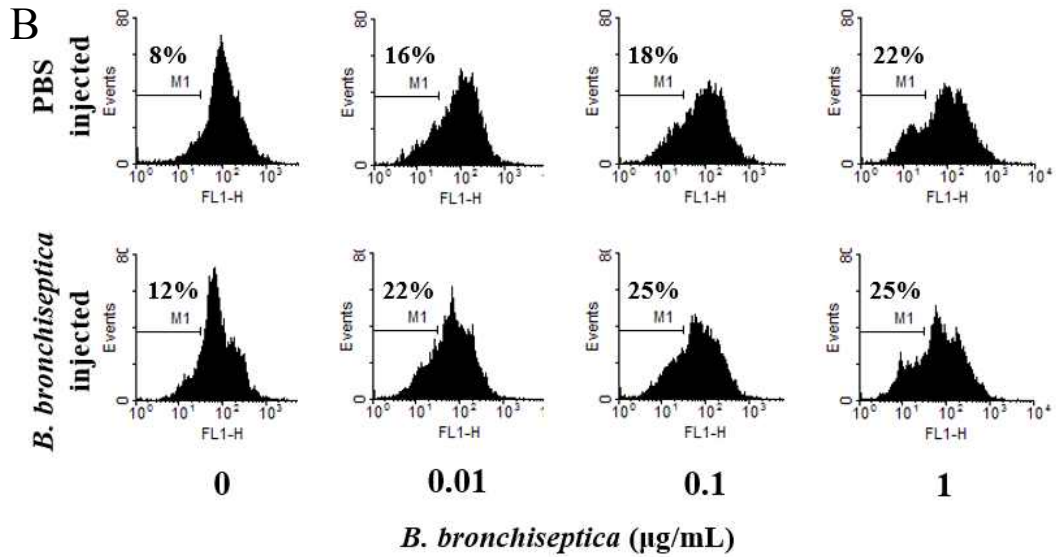


Fig. 1. Enhanced cellular activity and proliferation of the bone marrow cells primed with *B. bronchiseptica* upon the same antigen stimulation *in vitro*. The cellular activity and proliferation rate were measured by MTT assay (A) and CFSE assay (B), respectively. The cells were cultured in the presence of *B. bronchiseptica* antigen at indicated concentrations for 2 days (A) or 4 days (B). Data are mean \pm standard deviation (SD) from four individual wells. Significant difference is expressed as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ for a comparison of the PBS group and *B. bronchiseptica* treated group (A). The number in histogram indicates the percentage of proliferating cells with low fluorescence intensity (B).

B. bronchiseptica 접종 마우스에서 항원 재감작에 의한 골수세포의 항원 특이적 항체 생산량의 증가

PBS 또는 *B. bronchiseptica* 항원을 접종한 마우스의 골수세포에 *B. bronchiseptica* 항원을 처리하여 배양한 후, 항원 특이적인 항체 생산량을 측정하였다(Fig. 2). PBS를 접종한 대조군 마우스는 항원 특이적인 항체가 거의 생

산되지 않았던 반면, *B. bronchiseptica* 항원 접종군에서는 항원 특이적인 항체의 생산량이 높게 나타났다. 특히 *B. bronchiseptica* 항원의 재감작 농도가 10 ng/mL일 때 항원 특이적 항체가 가장 많이 생산되었다.

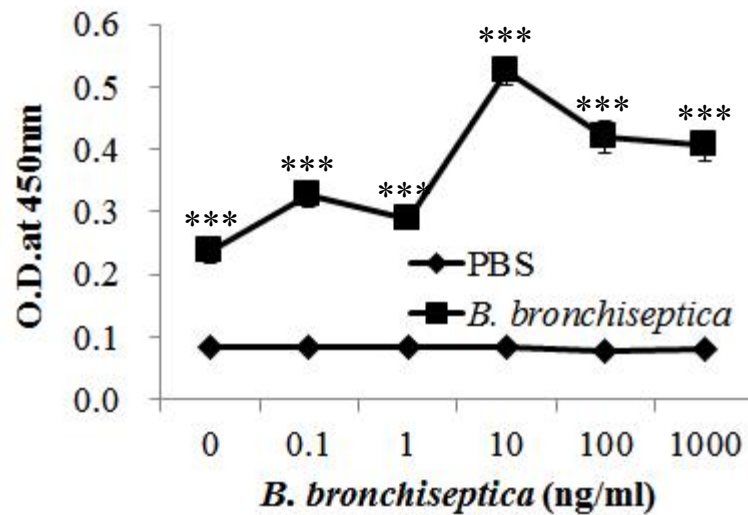


Fig. 2. Production of *B. bronchiseptica* antigen-specific IgG antibody of bone marrow cells primed with *B. bronchiseptica* antigen. Mice were injected with PBS or *B. bronchiseptica* antigen (10 μ g/mouse). After 2 weeks, the bone marrow cells were cultured and stimulated with the same antigen for 3 days. The culture supernatant were used for the measuring the production of *B. bronchiseptica*-specific IgG antibodies by ELISA. The antibody titer was determined with optical density (O.D.) at 450 nm by a microplate reader. All data are mean \pm SD from four individual wells. Significant difference is expressed as *** $p < 0.001$ for a comparison of the PBS group and *B. bronchiseptica* treated group.

B. bronchiseptica 및 *M. hyopneumoniae* 항원 자극에 의한 골수세포의 활성도 변화

M. hyopneumoniae 항원을 0 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 골수세포에 *B. bronchiseptica* 항원을 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 후 MTT assay를 이용하여 골수세포의 활성도를 측정하였다(Fig. 3). *B. bronchiseptica* 항원의 자극은 골수세포의 활성도에 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 또한 *M. hyopneumoniae* 항원에 대한 골수세포의 농도의존적인 증가는 관찰되지 않았고, 두 가지 항원 사이의 상승효과는 없었다.

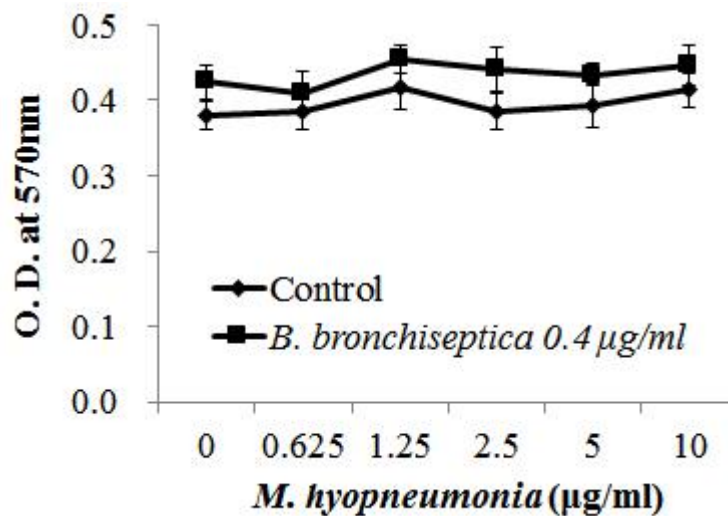


Fig. 3. The effect of *B. bronchiseptica* on the viability of BMs. Cells were cultured for 4 days treatment of 0 to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *M. hyopneumoniae* with 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *B. bronchiseptica*. MTT solution were treated at the concentration of 0.5 mg/mL. The O.D. was measured at 570 nm by a microplate reader. All values are represented as mean \pm SD from four individual wells.

B. bronchiseptica 항원에 의한 골수세포의 NO 생산량 증가

M. hyopneumoniae 항원을 0 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 골수세포에 *B. bronchiseptica* 항원을 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 후 NO assay를 이용하여 골수세포의 NO 생산량을 측정하였다(Fig. 4). *M. hyopneumoniae* 항원을 처리한 골수세포는 항원의 농도 의존적으로 NO 생산량이 증가하였다. 특히 *M. hyopneumoniae*의 농도가 0 ~ 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 범위에서 *B. bronchiseptica* 항원을 함께 처리한 경우 대조군에 비해 NO의 생산량이 유의적으로 증가하였다.

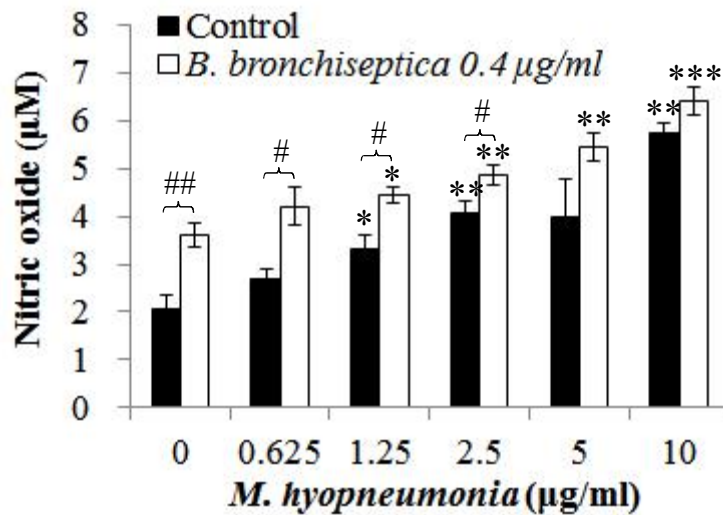


Fig. 4. *B. bronchiseptica* enhances the production of NO on the BMs. After 3 days treatment of 0 to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *M. hyopneumoniae* with 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *B. bronchiseptica*, the supernatant of BMs was collected for measurement of NO. The O.D. was measured at 570 nm by a microplate reader. All values are represented as mean \pm SD from four individual wells. Significant difference is expressed as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ for a comparison of the absence and presence of *M. hyopneumoniae*. Also, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ express significant difference for a comparison of the PBS group and *B. bronchiseptica* treated group.

B. bronchiseptica 항원에 의한 골수세포의 TNF- α 생산량 증가

M. hyopneumoniae 항원을 0 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 골수세포에 *B. bronchiseptica* 항원을 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 후 ELISA를 이용하여 골수세포의 TNF- α 생산량을 측정하였다(Fig. 5). 대조군에 비해 *B. bronchiseptica* 항원을 처리한 골수세포는 TNF- α 의 생산량이 유의적으로 증가하였다. *M. hyopneumoniae* 항원의 자극은 골수세포의 TNF- α 생산에 유의적인 변화를 나타내지 않았다.

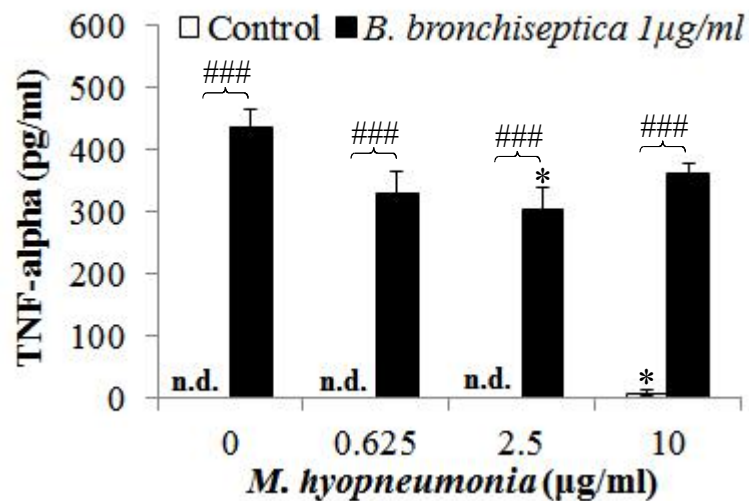
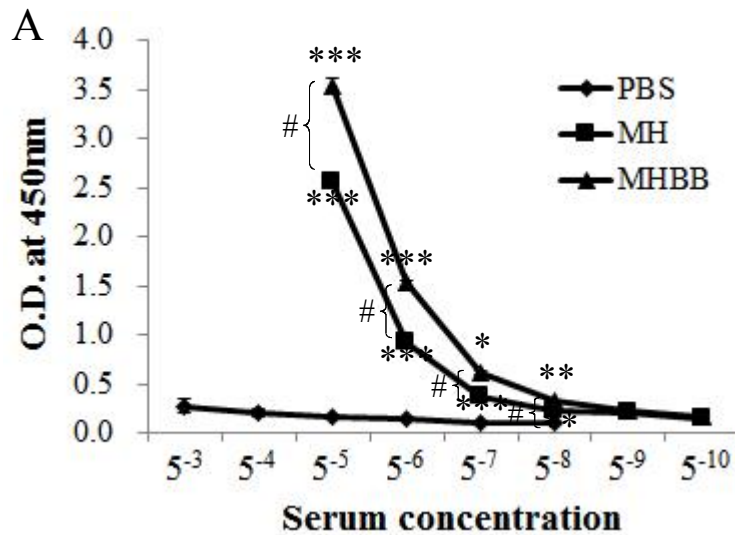


Fig. 5. *B. bronchiseptica* promotes the production of TNF- α on the BMs. After 3 days treatment of 0 to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *M. hyopneumoniae* with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *B. bronchiseptica*, the supernatant of BMs was collected for measurement of TNF- α . The O.D. was measured at 450 nm by a microplate reader. All values are represented at means \pm SD from four individual wells. n.d. means not detectable. Significant difference is expressed as * $p < 0.05$ for a comparison of the absence and presence of *M. hyopneumoniae*. Also, ### $p < 0.001$ express significant difference for a comparison of the PBS group and *B. bronchiseptica* treated group.

B. bronchiseptica 항원에 의한 혈청 내 *M. hyopneumoniae* 항원 특이적인 IgG 증가

PBS, *M. hyopneumoniae*(이하 MH), *M. hyopneumoniae*+*B. bronchiseptica* (이하 MHBB) 항원을 접종한 마우스의 혈청에서 *M. hyopneumoniae* 항원에 특이적인 IgG의 양을 확인하기 위해 ELISA를 이용하여 항원 특이적인 IgG의 양을 측정하였다(Fig. 6A). PBS를 접종한 마우스의 혈청에서는 항원 특이적인 IgG의 생산이 거의 나타나지 않았으나, MH 또는 MHBB 항원을 접종한 마우스의 혈청에서는 높은 역가의 항원 특이적인 IgG가 측정되었다. 특히, MHBB 항원을 접종한 마우스의 혈청 내 항원 특이적인 IgG의 양은 MH 항원을 접종한 것 보다 높게 나타났다. 동일한 혈청에서 *B. bronchiseptica* 항원에 특이적인 IgG의 양을 확인하기 위해 같은 방법으로 항원 특이적인 IgG의 양을 측정하였다(Fig. 6B). MHBB 항원을 접종한 마우스의 혈청에서는 높은 역가의 항원 특이적인 IgG가 측정된 반면, PBS나 MH 항원을 접종한 마우스의 혈청에서는 항원 특이적인 IgG가 거의 나타나지 않았다.



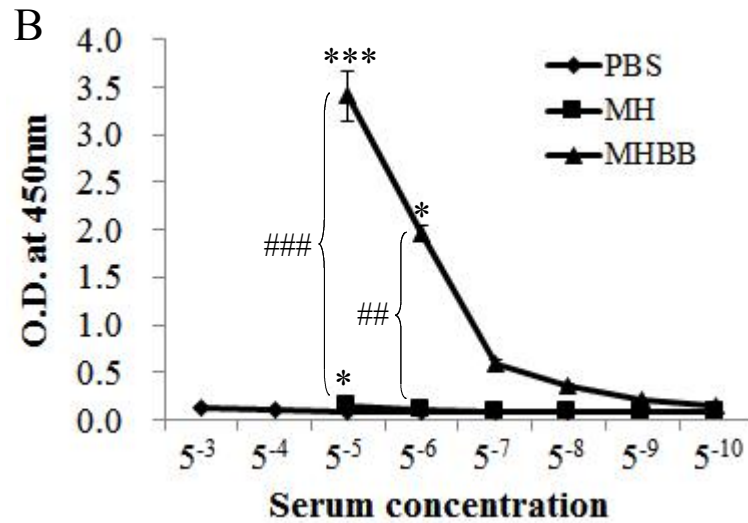


Fig. 6. *M. hyopneumoniae*-specific IgG was increased by *B. bronchiseptica* treatment. Mice were injected with PBS, *M. hyopneumoniae* (10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$), or *B. bronchiseptica* (5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$). After 2 weeks, blood was collected by cardiac puncture after CO₂ euthanasia. After generation blood clot, serum was purified by using microcentrifuge. Serum was diluted, 5-fold serial dilution. The serums were used for the measuring the production of both antigen-specific IgG antibodies by ELISA. For serum IgG ELISA, the ELISA modules coated 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *M. hyopneumoniae* (A) or *B. bronchiseptica* (B) was used. The antibody titer was determined with O.D. at 450 nm by a microplate reader. All values are represented as mean \pm SD from four individual wells. Significant difference is expressed as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ for a comparison of the PBS group and othes. Also, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ express significant difference for a comparison of the MH group and MHBB group.

IV. 고찰

백신의 효능은 장기기억과 관련된 항체 생산 세포와 밀접한 관련이 있다. 항체 생산 세포는 골수에서 생산되는 B 세포로부터 분화된다. 미성숙 B 세포는 골수의 림프구 전구세포(lymphoid progenitors)로부터 발생하여 말초림프기관으로 이동한다. 말초림프기관에서 항원을 인식한 B 세포는 여러 단계의 활성화 과정을 거쳐 기억 B 세포(memory B cell)와 항체를 생산하는 형질세포(plasma cell)로 분화하며, 이들이 분비하는 항체는 면역체계에서 중요한 역할을 수행한다 [17]. 면역기억은 면역시스템이 동일한 항원에 재감작되었을 때 이전보다 강력한 면역반응이 일어나게 되는 생체 방어기전이다. 병원성 미생물에 노출된 숙주는 항원 특이적인 항체를 일정 기간 생산하여, 병원성 미생물의 재침입시 효율적인 방어를 하게 된다. 이러한 면역방어기전에서 단기 및 장기 기억능력을 갖춘 기억 B 세포와 형질세포가 결정적인 역할을 한다 [6]. 기억 B 세포는 미감작 B 세포(naive B cell)가 최초 면역반응에서 생산하는 것 보다 높은 역가의 항원 특이적 항체를 생산함으로써 항원을 보다 효율적으로 제거한다. 이들 세포는 골수가 주요 저장부위인 것으로 알려졌다, IgG는 B 세포에서 분화된 형질세포가 생산하는 물질이다. 골수는 이들 두 세포를 모두 포함하여 체액 면역에서 중요한 역할을 담당한다. 특히 장기기억과 관련된 항체생산세포는 백신의 효능에 중요한 역할을 담당한다 [1, 19]. 이러한 백신의 효능을 높이고 적절한 면역반응이 일어나도록 유도하기 위해 백신을 제작할 때 adjuvant를 사용한다. 현재까지 개발된 adjuvant는 대부분 화학물질로 독성과 안정성, 면역유도 효과 등에서 약점을 가지고 있다[2, 14, 26, 22]. 따라서 독성이 낮아 신체에 해가 없으며 적절한 면역반응을 유도할 수 있는 새로운 adjuvant의 개발이 필요하다.

B. bronchiseptica 항원에 대한 골수세포의 면역기억반응을 알아보기 위해 접종된 마우스의 골수세포를 이용하여 진행된 실험에서, *B. bronchiseptica* 항원이 미리 접종된 마우스에서 채취된 골수세포가 동일한 항원에 재감작되었을 때 저

농도의 항원을 처리하였을 때도 골수세포가 활성화되고 세포의 분열능력이 증가하는 것을 알 수 있었다. 이는 *B. bronchiseptica* 백신을 접종한 경우 소량의 병원체에 노출되어도 충분한 골수 유래 면역반응을 유도할 수 있다는 것을 의미한다. 한편 미리 감작된(primed) 골수세포에서 IgG 생산을 측정한 결과 항원 재감작 시 항원 특이적인 항체를 유의하게 생산하였다. 특히 10 ng/mL 부근에서 *B. bronchiseptica* 항원에 특이적인 항체를 높은 수준으로 생산하였다. 이는 항체생산에 필요한 최적의 항원농도가 있다는 것을 의미한다.

한편, *B. bronchiseptica* 항원의 백신 adjuvant 능력을 알아보기 위한 실험에서, 두 항원의 처리는 골수세포의 활성화도에 별다른 영향을 미치지 않았다. 이는 이들 항원이 골수세포에 세포독성이 거의 없다는 것을 의미한다. 한편, NO는 생체 내에서 주로 포식세포에서 생산되는 물질이다. 생산된 NO는 숙주 세포에 침입한 병원성 미생물을 제거하기 위한 세포매개성면역(cell-mediated-immunity, CMI)에 중요하게 작용한다 [20]. 두 항원을 모두 처리한 경우 *M. hyopneumoniae* 항원만을 처리한 경우보다 골수세포의 NO 생산량이 증가하였다. 특히 *M. hyopneumoniae* 항원의 농도가 낮은 범위일 때 *B. bronchiseptica* 항원의 효과가 더욱 두드러졌다. NO 생산에 있어서 가장 이상적인 *M. hyopneumoniae* 항원의 농도는 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었으며, 이는 이들 항원의 combination vaccine 제작에 있어서 중요한 정보가 될 것이다. 포식세포가 분비하는 또 다른 물질인 TNF- α 는 대표적인 염증성 cytokine이다. TNF- α 는 백신의 효능과 밀접한 관계에 있는 필수적인 면역 반응이기 때문에, TNF- α 생산이 낮은 항원의 백신을 제작하는 경우 면역 자극 능력이 높은 adjuvant를 요구한다 [5]. ELISA를 이용한 TNF- α 생산을 측정한 실험에서 *M. hyopneumoniae* 항원은 매우 적은 양의 TNF- α 를 생산하였다. 하지만, *B. bronchiseptica* 항원을 함께 처리한 경우 생산량이 크게 증가하였다. 따라서 *M. hyopneumoniae* 항원을 처리한 골수세포에서 *B. bronchiseptica* 항원을 처리한 경우 포식세포의 NO 및 TNF- α 생산기능이 증가하는 것을 확인하였다. *M. hyopneumoniae* 항원의 면역기억에 대한 *B. bronchiseptica* 항원의 증강 효과를 알아보기 위해 접종된 마우스의 혈청을 이용하여 IgG ELISA를 수행하였다.

MHBB군의 혈청 내 IgG의 양은 MH군보다 *M. hyopneumoniae* 특이적인 IgG의 양이 증가하였으며, 동일한 혈청에서 *B. bronchiseptica* 특이적인 IgG의 양이 높은 수준으로 유지되었다. 따라서 *B. bronchiseptica* 항원이 자신의 면역기억을 유지하면서 *M. hyopneumoniae* 항원의 면역기억반응을 증강시키는 것을 확인할 수 있었다.

실험 결과를 종합해 볼 때 *B. bronchiseptica* 항원의 접종은 소량의 병원체에 재감작되어도 adjuvant 없이 충분한 골수 유래의 면역반응을 유도하였으며, 상당한 기간 동안 숙주의 면역기억을 유지할 수 있다는 사실을 확인했다. 이는 기존의 *B. bronchiseptica* 백신에서 사용하고 있는 adjuvant의 적절성 및 효율성을 재고하여 새로운 백신을 개발하는 데 유용한 자료가 될 것이다. 또한 *B. bronchiseptica*는 *M. hyopneumoniae*와 함께 처리하였을 때 골수의 활성을 떨어뜨리지 않고 포식세포의 기능을 증가시켰다. 또한 두 항원을 접종하였을 때 *B. bronchiseptica*는 자신의 면역기억을 유지하면서 *M. hyopneumoniae*의 면역기억을 증강하였으며, 특히 *M. hyopneumoniae* 항원의 농도가 낮은 경우에 *B. bronchiseptica* 항원의 효과가 두드러지게 나타났다. 이는 *B. bronchiseptica* 항원이 *M. hyopneumoniae* 백신 개발에서 면역증강을 유도할 수 있는 adjuvant로서 제공되어 새로운 백신 개발에 적용될 가능성을 제시한다. 이러한 면역 증강은 *B. bronchiseptica*가 그람 음성 세균임을 감안할 때 세균 외막의 lipopolysaccharide에 의한 면역세포자극, 즉 Toll-like receptor 4를 통한 면역증강효과일 것으로 추정된다.

하지만 *B. bronchiseptica* 항원의 면역기억능력 및 adjuvant로서의 효능을 입증하고 실제 임상에 적용하기 위해서는 표준 실험 동물모델로 사용된 마우스가 아닌 다른 동물모델, 특히 실제 백신 접종 대상인 돼지를 이용한 실험을 진행하여 동물 종에 따른 독성, 효과의 차이 등이 존재하는지 확인해야 한다. 그리고 실제로 *B. bronchiseptica* 항원이 *in vivo* 또는 *in vitro*에서 어떤 수용체를 통하여 이러한 면역기억능력 및 adjuvant 효과를 나타내는지 밝혀진 바가 없으므로 자세한 작용기전에 대한 연구가 필요하다. 마지막으로 투여 경로에 따른 백신의 효

능이 다르게 나타날 수 있으므로 약동학적인 연구도 진행되어야 할 것이다.

V. 참고문헌

1. Abbas AK, MBBS, Lichtman AHH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology, 5th ed, p. 10, Saunders Elsevier, 2005.
2. Anthony EG, Richard T, Diane W. Vaccine delivery using nanoparticles. Front Microbiol. 2013, 3, 1–13.
3. Asai T, Okada M, Ono M, Mori Y, Yokomizo Y, Sato S. Detection of interleukin 6 and prostaglandin E2 in bronchoalveolar lavage fluids of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Immunol Immunopathol. 1994, 44, 97–102.
4. Asai T, Okada M, Ono M, Irisawa T, Mori Y, Yokomizo Y, Sato S. Increased levels of tumor necrosis factor and interleukin 1 in bronchoalveolar lavage fluids from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Immunol Immunopathol. 1993, 38, 253–260.
5. Audibert FM, Lise LD. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. Immunol Today. 1993, 14, 281–284.
6. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. Sci. 2002, 298, 2199–2202.
7. Brockmeier SL. Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine. Vet

Microbiol. 2004, 99, 75–78.

8. Chanter N, Magyar T, Rutter JM. Interactions between *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs. Res Vet Sci. 1989, 47, 48–53.

9. Chi YZ, Lu C, Han JH, Hahn TW. Efficacy of atrophic rhinitis vaccine in pigs. Kor J Vet Res. 2004, 40, 707–717.

10. Goodnow RA. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol Rev. 1980, 44, 722–738.

11. Haaff EO, Dresner SM, Ratliff TL, Catalona WJ. Two courses of intravesical Bacillus Calmette–Guerin for transitional cell carcinoma of the bladder. J Urol. 1986, 136, 820–824.

12. Haesebrouck F, Pasmans F, Chiers K, Maes D, Ducatelle R, Decostere A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect?. Vet Microbiol. 2004, 100, 255–268.

13. Horichi Y. Swine atrophic rhinitis caused by *Pasteurella multocida* toxin and *Bordetella* dermonecrotic toxin. Curr Top Microbiol Immunol. 2012, 361, 113–129.

14. Jennifer HWW, Maria PT, Matt JK, Surya KM, Michael JW, Balaji N. Vaccine Adjuvants: Current challenges and future approaches. J Pharm Sci. 2009, 98, 1278–1316.

15. Jo Y, Joo HG. Immunostimulatory effects of *Bordetella*

bronchiseptica antigen on mouse spleen cells. J Prev Vet Med. 2013, 37, 35–38.

16. Kim D, Kim CH, Han K, Seo HW, Oh Y, Park C, Kang I, Chae C. Comparative efficacy of commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus 2 (PCV2) vaccines in pigs experimentally infected with *M. hyopneumoniae* and PCV2. Vacc. 2011, 29, 3206–3212.

17. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Kuby Immunology. 6th ed. p. 42, W. H. Freeman and Company. 2007.

18. Kyriakis SC, Saoulidis K, Lekkas S, Miliotis CC, Papoutsis PA, Kennedy S. The effects of immune–modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. J Comp Pathol. 2002, 126, 38–46.

19. Lanzavecchia A, Sallusto F. Toll–like receptors and innate immunity in B–cell activation and antibody responses. Curr Opin Immunol. 2007, 19, 268–274.

20. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol. 1997, 15, 323–350.

21. Parish CR, Warren HS. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. Curr Protoc Immunol. 2009, 84, 4.9, 1–13.

22. Samuele C, Marco T, Barbarea CB, Alessandra P, Mario C, Derek TOH, Ennio DG, Anja S, Andreas W. Vaccine adjuvants alum and MF59

induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vacc.* 2011, 29, 1812–1823.

23. **Simons S, Silvana BM, Dominiek M, Odir AD.** *Mycoplasma hyopneumoniae*: From disease to vaccine development. *Vet Microbiol.* 2013, 165, 234–242.

24. **Sunita A, Lome AB, George M.** Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol.* 2013, 114, 1–10.

25. **Tim M.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth.* 1983, 65, 55–63.

26. **Wangoo A, Brown IN, Marshall BG, Cook HT, Young DB, Shaw RJ.** Bacille Calmette–Guerin (BCG)–associated inflammation and fibrosis: modulation by recombinant BCG expressing interferon–gamma (IFN– γ). *Clin Exp Immunol.* 2000, 119, 92–98.

27. **Woo SH, Moon SY, Byon YY, Joo HG.** Evaluation of the immunogenicity of *Bordetella bronchiseptica*, a vaccine antigen. *Kor J Vet Res.* 2014, 54, 75–79.

28. **Yim SH, Joo HG.** T helper 1–type immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen on mouse spleen cells. *J Biomed Res.* 2013, 14, 55–59.

29. **Zhanqin Z, Chen W, Yun X, Xibiao T, Bin W, Xiangchao C, Qigai HE, Huanchun C.** The occurrence of *Bordetella bronchiseptica* in pigs with

clinical respiratory disease. *The Vet J.* 2011, 188, 337–340.