



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](#)

博士學位論文

단백질 항원 발현 세포배양법을 이용한
구제역 항원-항체 결합 백신 개발

濟州大學校 大學院

獸醫學科

全慶翼

2014年 6月



단백질 항원 발현 세포배양법을 이용한 구제역 항원-항체 결합 백신 개발

指導教授 黃圭桂

全慶翼

이 論文을 獸醫學 博士學位 論文으로 提出함

20014年 6月

全慶翼의 獸醫學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 : 임윤규

委員 : 손원근

委員 : 윤영민

委員 : 김석

委員 : 황규계

濟州大學校 大學院

2014年 6月

목 차

초록	1
표 차례	3
그림 차례	4
총 론	6
구제역과 구제역 백신의 개발 현황	6
항원-항체 결합 백신	8
항원 생산용 세포주	10
제 I 장. 기니피그에서의 항원-항체 결합 백신의 제작 및 항체가 검증	13
1. 서론	13
2. 재료 및 방법	15
2-1 항원 및 실험동물	15
2-2 기니피그 면역	15
2-3 기니피그 IgG의 정제	17
2-4 항원-IgG 결합체의 제작	17
2-5 SDS-PAGE	18
2-6 백신의 제작	18
2-7 백신의 투여와 항체가 측정	18
3. 결과	20
3-1 IgG 정제와 항원-IgG 결합체의 제작	20
3-2 항체가 측정	22
4. 고찰	25

제 II 장. 재조합 레트로 바이러스 입자를 이용한 구제역 항원 생산용 세포주 제작 -----	27
1. 서론 -----	27
2. 재료 및 방법 -----	31
2-1 소와 돼지 태아의 장기적출 -----	31
2-2 조직으로부터 RBC의 제거 -----	31
2-3 조직의 효소처리 -----	34
2-4 초대배양 세포의 계대수 측정 -----	34
2-5 섬유아세포 제거를 통한 초대상피세포의 선별 -----	34
2-6 불멸화를 위한 레트로 바이러스 벡터 제작 -----	36
2-7 재조합 단백질 발현을 위한 레트로 바이러스 벡터 제작 --	37
2-8 재조합 레트로 바이러스 입자의 제작 -----	41
2-9 Telomerase 발현 세포의 cloning -----	44
2-10 세포배양 가능 계대수의 측정 -----	44
2-11 Telomerase 발현양상 조사 -----	45
2-12 배양특성과 형태 관찰 및 마이코플라즈마 감염검사 -----	47
2-13 면역형광염색 -----	48
3. 결과 -----	49
3-1 초대배양 세포의 계대수 측정 -----	49
3-2 섬유아세포 제거를 통한 초대상피세포의 선별 -----	52
3-3 레트로 바이러스 벡터의 확인 -----	54
3-4 불멸화 세포의 선별과 세포의 cloning -----	56
3-5 Telomerase 발현양상 조사 -----	58
3-6 배양특성과 형태 관찰 및 마이코플라즈마 감염검사 -----	61
3-7 면역형광염색 -----	63
3-8 재조합 유전자의 발현 확인 -----	65
4. 고찰 -----	67

제 III 장. 구제역 항원-항체 백신의 제작 및 효과 검증 -----	69
1. 서론 -----	69
2. 재료 및 방법 -----	71
2-1 재조합 항원의 정제 -----	71
2-2 돼지 면역 -----	71
2-3 돼지 IgG의 정제 -----	71
2-4 항원-IgG 결합체 제작 및 확인 -----	72
2-5 백신의 투여와 항체가 측정 -----	73
3. 결과 -----	74
3-1 IgG 정제와 IgG-항원 결합체의 제작 -----	74
3-2 항체가 측정 -----	76
4. 고찰 -----	79
결론 -----	82
참고문헌 -----	85
국문 초록 -----	96

Abstract

Development of foot-and-mouth disease antigen-antibody complex vaccine using antigen expression cell culture technology

Kyong-Leek Jeon

(Supervised by Professor Kyu-Kye Hwang)

Department of Veterinary Medicine

Graduate School

Jeju National University

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is the first confirmed and well studied virus in animal. It causes foot-and-mouth disease (FMD), a highly contagious animal disease, is spread by air, produces vesicle symptoms, and inflicts tremendous economic damages. It is classified as an *Aphthovirus* of *Picornaviridae*, lacks an envelope, and its nucleic acid size is about 8,500 base pairs. The complete virus particle is a regular icosahedron consisting of 60 combinations of 4 types of capsid proteins (VP1, VP2, VP3 and VP4). The inactivated vaccines, currently used in many countries, have low antibody formation rate, which creates a potential risk for FMD outbreaks. The development of a new vaccine, such as recombinant vaccine, without the problems of the inactivated vaccine is

urgently needed but is limited by the high production costs.

To evaluate the possibility of a new generation of vaccine, antigen-antibody complex vaccines were developed, and their efficacy was tested in guinea pigs as the preliminary experiment. The antigen-antibody complex vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and newcastle disease virus (NDV) were produced by combining antigens and antigen specific antibodies. Inactivated antigens (PEDV and NDV) and antigen-antibody complex (PEDV-IgG and NDV-IgG) were vaccinated into four guinea pigs, respectively. Antibody titers produced by antigen-antibody complex have been identified 60-110% higher than those by antigen alone.

The aims of this study were to increase the immunogenicity and decrease the production costs by using cell strains that express recombinant FMDV proteins (VP1-3C and VP1-3D). Cell strains continuously producing the recombinant antigens were developed by transducing retroviral vector particles. Specific IgG against VP1-3C and VP1-3D were refined from immunized pigs. VP1-3C-IgG and VP1-3D-IgG antigen-antibody complex vaccine were made by combining antigens and specific antibodies. Inactivated FMDV vaccine and antigen-antibody complex vaccines (VP1-3C-IgG and VP1-3D-IgG) were inoculated in 4 pigs, respectively. The antibody titers of the developed antigen-antibody complex vaccines were confirmed as 2-3 times higher than that of the inactivated vaccine currently used in Korea. These studies may provide academic backgrounds for next generation of vaccine with high efficiency.

Keywords: Foot-and-mouth disease, cell culture technology, Antigen-antibody complex vaccine, antigen expression, recombinant protein

표 차 례

Table 1.	Immunization conditions for various antigens -----	19
Table 2.	Enzyme treatments for tissue digestion -----	33
Table 3.	Real-time PCR assay design for the telomerase detection -----	46

그림 차례

Fig. 1	Hyper immunization schedule for raising anti-porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) IgG and anti-newcastle disease virus (NDV) IgG in guinea pigs -----	16
Fig. 2	SDS-PAGE profiles of IgG fraction and IgG-antigen complex purified by affinity chromatography -----	21
Fig. 3	Serial changes in titers of antibody against PEDV -----	23
Fig. 4	Serial changes in titers of antibody against NDV -----	24
Fig. 5	Schematic diagram of Na ₂ EDDA treatments for the separation of fibroblasts from epithelial cells -----	35
Fig. 6	Diagram of constructs used for FMDV recombinant protein expression -----	38
Fig. 7	In-fusion enzyme protocol overview -----	39
Fig. 8	Mimetic diagram of the FMDV recombinant protein VP1-3C and VP1-3D directed by the pDONAI-2 vector -----	40
Fig. 9	Diagram of all process for retrovirus particle production -----	42
Fig. 10	Principle of the generation of recombinant retroviruses ----	43
Fig. 11	The ability of cell division of immortalized bovine kidney cell lines and primary cultured cell -----	50

Fig. 12	The ability of cell division of immortalized porcine kidney cell lines and primary cultured cell -----	51
Fig. 13	Separation of fibroblasts from epithelial cells by treating with Na ₂ EDDA -----	53
Fig. 14	PCR detection of retrovirus vector -----	55
Fig. 15	Immortalized primary epithelial cell lines -----	57
Fig. 16	Real-time PCR analysis of telomerase expression in primary cultured cells and immortalized primary bovine epithelial cell lines -----	59
Fig. 17	Real-time PCR analysis of telomerase expression in primary cultured cells and immortalized primary porcine epithelial cell lines -----	60
Fig. 18	PCR analysis of mycoplasma contamination in established cell lines -----	62
Fig. 19	Immunofluorescence analysis of cytokeratin and fibronectin in established cell lines. -----	64
Fig. 20	PCR detection of recombinant proteins -----	66
Fig. 21	SDS-PAGE profiles of IgG fraction and IgG-antigen complex purified by affinity chromatography -----	75
Fig. 22	Serial changes in antibody titers against FMDV antigens -----	77

총 론

구제역과 구제역 백신의 개발 현황

1514년 이탈리아의 소에서 구제역(foot-and-mouth disease: FMD)으로 의심이 되는 증상이 최초로 보고된 이후에, 400여년이 지난 1897년에 Loeffle와 Frosch가 여과할 수 있는 어떤 물질이 이 질병을 유발시킨다는 것을 확인하여 구제역이라 명명하였다(1). 구제역은 개달 전염과 공기를 통한 전파가 가능하여 전염성이 높고, 입과 발굽 등에 수포의 발생을 주요 증상으로 하는 치사율이 55%에 달하는 동물 질병이다(3~4). 한국에서는 1934년에 처음으로 구제역 발생이 보고되었다. 2010년과 2011년에는 전국적 발생을 보였는데 예방적 살처분에 의한 직접적 피해와 함께 한우와 돼지고기의 소비 위축 그리고 축산물의 수출 제한과 같은 간접적 피해를 합쳐 막대한 경제적 피해를 유발하였다(2-5). 국제수역사무국(World Organization for Animal Health; OIE)은 구제역을 중요한 질병으로 전염력이 매우 높으며 국제적인 교역에 있어서 피해가 큰 질병으로 분류하고 있으며, 한국에서도 구제역을 제1종 가축법정전염병으로 관리하고 있다.

구제역의 원인체가 바이러스인 것이 확인된 이후에 구제역 바이러스는 오랜 기간 동안 그 특성에 대한 연구와 예방백신에 대한 개발이 이루어져 왔으며, 지금까지도 많이 연구가 되고 있는 대표적인 동물 바이러스 중 하나이다(1, 2). 구제역 바이러스는 *Picornaviridae*의 *Aphthovirus*속에 속하는 외피가 없는 정 20면체의 RNA 바이러스로 O, A, C, Asia1, SAT1, SAT2 및 SAT3의 7가지 혈청형이 존재하며, 유전적으로 변이가 발생할 수 있는 가능성이 크기 때문에 아형이 많다(2, 7-9).

1930년대 Waldmann 등은 구제역에 걸린 가축의 혀에서 분리한 구제역 바이러스를 포름알데히드로 불활화 하여 최초의 구제역 백신을 제작하였다(2, 10). 현재는 ethylene imines을 사용하여 구제역 바이러스를 불활화한 후 oil-adjuvant를 첨가한 불활화 백신이 사용되고 있다(11, 12). 한국에서는 그동안 구제역 백신의 접종을

하지 않았지만, 2010-2011년 전국적인 구제역의 발생을 기점으로 하여 현재까지 백신을 접종하고 있다. 한국에서 사용되는 불활화 백신은 접종 2주 안에 구제역에 대한 방어능력을 형성케 하는데 소에서는 높은 방어능력을 부여 하지만 돼지에서는 충분한 방어능력을 제공하지 못하는 것으로 알려져 있으며, 면역의 지속 기간도 6개월 정도로 짧다는 문제점이 있다(3). 불활화 백신의 특성상 구제역의 다양한 혈청형 및 아형에 대한 통합적인 예방이 어려우며, 3~4주 간격으로 2회에 걸친 연속 투여를 해야 하는 번거로운 문제점도 있다(3~4). 또한, 이 백신을 대량으로 생산하기 위해서는 바이러스 배양에 오랜 시간이 소요되며, 완벽한 차폐시설을 갖추어야 하기 때문에 생산 비용이 비싸다는 단점 그리고 잠재적으로 원료가 되는 구제역 바이러스가 생산시설로부터 유출될 수 있는 위험성이 있다는 문제점을 가지고 있다. 실제로 2007년 영국의 불활화 백신 제작회사에서 구제역 백신주가 유출되어 인근 농가로 구제역이 전파된 사고가 발생하였다(4). 이 사고는 차폐시설을 구축하더라도 살아 있는 구제역 바이러스를 다룬다는 것이 항상 구제역 바이러스의 유출에 대한 위험을 가지고 있다는 것을 강력히 시사한다.

이러한 불활화 백신의 문제점 때문에 구제역 백신을 제작하려는 여러 나라에서는 안전하게 생산이 가능하고 효과가 뛰어난 차세대 백신의 개발에 많은 노력을 기울이고 있다(13). 이들 중에는 재조합 DNA 기술을 기반으로 한 재조합 단백질 백신과 바이러스 유전자를 직접 투여하는 백신이 있다(13, 5). 다른 백신의 종류로는 subunit 백신, 합성 펩타이드 백신, 사이토카인 첨가 DNA 백신, 재조합 바이러스형 백신, 혼합형 바이러스 백신, 유전자 조작 약독화 백신, 재조합 바이러스 벡터 백신 등이 있다(5). 이와 함께 구제역 바이러스에 대한 치료 목적으로 항 바이러스제의 개발도 진행 중에 있다(5-7). 2010년 이전의 한국에서와 마찬가지로 대부분의 국가에서 구제역 발생 시에 백신 접종을 하지 않으려고 하고 있다. 그 이유 중 하나는 백신접종 자체가 지역 내에서 지속 감염의 문제를 야기할 수 있다는 우려가 있기 때문이다(6,7). 따라서 새로운 구제역 백신의 연구와 개발은 이러한 기존 불활화 백신의 문제점을 해결 및 보완 할 수 있어야 할 것이다.

새로운 백신이 갖추어야 할 사항으로는 구제역 백신 접종 가속과 야외 감염 가속

이 혈청학적으로 감별되어야 하고, 오랜 기간 동안 면역을 형성시킬 수 있어야 한다 (13, 7). 또한 새로 개발되는 백신은 경제동물에 사용되므로 개발 시에 경제성도 중요하게 생각하여야 하며, 구제역의 다양한 혈청형과 아형에서 발생하는 새로운 변이주에 대하여 신속하게 대응할 수 있어야 할 것이다. 이를 위해서는 변이된 구제역 바이러스의 혈청형 또는 아형에 맞는 백신을 빠르게 개발할 수 있는 기술을 보유하여야 하며, 개발된 백신을 단시간 내에 생산할 수 있는 방법과 시설이 있어야 할 것이다.

한국을 비롯해 세계적으로 가장 문제가 되고 있는 구제역 바이러스 혈청형은 O, A, Asia1형이며 각각의 혈청형은 많은 아형을 가지고 있다(7-9). 따라서 다양한 혈청형과 아형에 대항할 수 있는 새로운 백신의 연구개발은 지금 보다 훨씬 활발하게 진행되고 있다

항원-항체 결합 백신

면역이란 라틴어 *immunitas*에서 유래된 말로 감염성 질병으로부터 보호를 의미한다. 면역에 관여하는 세포와 분자들이 면역계(immune system)를 구성하며, 외부 물질의 침입에 대한 이들 세포와 분자들의 협동적이고 집합적인 반응을 면역반응(immune response)이라고 한다(14). 면역의 분류는 다양하지만 크게 선천면역(innate immunity)과 적응면역(adaptive immunity)이 있다. 선천면역은 미생물에 대한 방어의 제 일선을 담당하며, 항원에 대한 미세한 차이를 구별하지 못하는 반면, 적응면역은 밀접하게 연관되어 있는 미생물과 분자들을 구분 하는 것으로 알려져 있다(13). 적응면역은 이러한 특징 때문에 특이면역(specific immunity)이라고도 불리며, 특이면역은 주로 후천적으로 획득되는데 외부에서 항원이 침입하면 복잡한 단계를 거쳐서 결과적으로 항원을 제거하기 위한 항체를 생산하게 된다(13, 14). 백신은 일반적으로 항원으로 작용하여 바로 이 특이면역 반응을 유도하여 항체를 생성하게 하는 것이다. 항원과 항체 반응에 의한 특이적 반응은 면역반응뿐만 아니라 면역억제작용(immunosuppressive action)도 의미하며, 항원이 림프구

(lymphocyte)나 대식세포(macrophage) 등의 수용체에 결합하여 이들을 활성화시킴으로써 일어난다(15).

항원은 세포 친화성의 유무를 기준으로 흥선 의존성 항원과 흥선 비의존성 항원으로 나뉘며, 면역원성을 기준으로 면역원성과 항원성을 둘 다 가지는 완전항원과 단독으로는 면역원성이 없는 불완전항원으로 구분 된다(14). 항원은 항체분자 또는 T 림프구 수용체에 특이적으로 결합하는 물질이며, 항원은 모두 유기물이어야 한다(15). 특히 완전항원 일수록 유기물인데, 그 이유로는 동물에는 무기물에 대한 T, B 세포 수용체가 없기 때문이다(15, 19, 20). 항원 중에는 반응원성은 있으나 면역원성이 없는 것을 합텐(hapten)이라고 하는데, 무기물이 유기물에 결합하여 합텐으로 작용할 때는 무기물의 특이성이 적용된다(13, 14). 면역원성이 강한 것으로 세균, 바이러스, 이종적혈구, 헤모시아닌(hemo-cyanin) 등이 있는데, 이들은 탐식세포에 탐식 및 탐지가 잘 일어나서 면역응답이 잘 발생한다(21).

항체는 단백질, 복합 탄수화물, 인지질, 핵산, 자극성 약물 그리고 호르몬을 포함한 거의 모든 종류의 생물학적 생성물들을 항원으로 인식할 수 있다(14, 15). B 림프구는 항체를 생산할 수 있는 유일한 세포로, 태생기에는 간에서 분화되고 출생 후에는 골수에서 분화되어 항체를 생산한다(14). 또한, B 림프구는 혈액으로 각 조직과 림프절 그리고 비장을 순환하다가 항원을 발견하면 T 세포의 도움을 받아 항체를 만들며, 순환 림프구의 약 5~15%를 차지하고 있다(14, 21, 22). 면역반응에 관여하는 immunoglobulin G (IgG)는 전체 면역글로불린의 약 80% 이상을 차지하고 있으며, 24 kDa의 경쇄와 55~70 kDa의 중쇄로 구성되어 있다(14, 15, 21). 특히 IgG에서 Fc 부분은 세포표면 수용체 혹은 C1q 보체단백질에 결합 한다고 알려져 있다(23, 24). 따라서, Fc 수용체는 선천면역세포인 대식세포, 단핵구, 호중구, 비만세포 및 수지상세포에 발현하여 항체의 세포의존 작동 기능을 매개하는데, 특히 수지상세포에서 발현하는 Fc 수용체는 항원을 탐식한 후 교차제시를 통하여 CD4 helper T cell 이나, CD8 cytotoxic T cell에 항원을 제시하는 역할을 하여 세포성 면역반응을 활성화시킨다(21, 24, 25). 수지상세포는 T cell 의존성 면역반응의 개시자로 알려져 있으며, 면역계의 핵심적인 항원의 공여세포로서 natural killer (NK) 세포를 활성화

시켜 인터페론(interferon)과 interleukin 12 (IL-12) 등 면역에 필수적인 cytokine을 생산하여 항원에 특이적인 면역반응을 유도하는 것으로 알려져 있다(26). 또한, 수지상세포의 기능단백질 중 endocytosis에 관여하는 물질로 IgG의 Fc 수용체 등이 알려져 있다.

IgG의 domain인 Fc는 antigen presenting cells (APCs)의 표면에 있는 Fc receptors (FcRs)를 통해 APCs가 항원-항체 복합체를 탐식하는 것을 증가시킨다(26, 27). FcRs는 면역복합체의 탐식작용과 면역매개역할, antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, superoxide production 등의 기능을 매개한다(28). IgG-FcRs를 통한 항원-항체 복합체의 세포 내 탐식은 FcRs의 매개가 없는 탐식작용의 경우와 비교하여 더 강한 면역반응을 유도한다고 보고되었다(22, 23). 또한 FcRs에서 Fc와의 상호작용은 수지상세포의 표면분자들의 활동을 촉진하여 항원 표현인자를 포함한 cytokine들을 활성화시킨다(14). 항원과 더불어 수지상세포의 수용체를 활성화시킬 IgG의 Fc 분획을 첨가하는 경우에 면역기능의 증가가 가능할 것이라고 생각되어, 백신에 Fc 부분을 첨가한 백신이 제작되었으며, 일반적인 백신보다 높은 항체형성을 보였다(26). 또 다른 연구에서는 Fc 부분이 대식구와 림프구 표면 수용체와 결합하여 면역세포 활성을 촉진하고(27, 28), Fc 부분을 세포에서 발현하여 제조한 불활화 백신에서 항체 생산 유도가 증가되며 공격 접종에서 우수한 방어능력을 발휘했다는 보고가 있다(26, 27-30). 이와 같은 항원과 항체의 특성을 응용하여 항원-항체 결합 백신을 개발하고자 하는 연구가 진행되고 있다(31).

항원 생산용 세포주

1970년대 초반, 현대 생명과학의 기초가 되는 유전자재조합 기술(recombinant DNA technique)의 탄생으로 인하여 새로운 백신에 대한 연구가 활발하게 시작되었다(31). 재조합 백신을 생산할 때 가장 많은 시간과 비용이 소요되는 부분이 바로 원료의 생산 즉, 재조합 단백질의 생산이다. 1974년 Cohen 등에 의하여 유전자재조합 기술이 개발된 이후 많은 새로운 단백질이 제작되었으며, 현재는 동물과

식물 그리고 미생물에서도 재조합 단백질이 생산되고 있다(32). 국내에서도 여러 가지 기능성 재조합 단백질이 개발되어 인터페론이나 성장호르몬 같은 단백질 치료제들이 상품화 되었다. 그러나 현재 이런 재조합 단백질을 이용한 백신이나 치료제는 산업 동물에서는 전무한 실정이다(7). 산업동물에서 재조합 백신이 상용화되지 못한 가장 큰 이유 중에 하나는 판매되는 백신의 가격에 비해 생산 단가가 비싸기 때문이다.

유전자를 세포내로 전달하기 위한 방법은 크게 물리화학적 방법과 생물학적 방법으로 나눌 수 있는데, 일반적으로 물리화학적 방법은 간단하고 별다른 기술을 요하지 않으며 대량의 시료를 다루기 용이하다는 장점이 있지만 유전자발현 효율이 낮고 발현기간이 일시적이라는 단점을 갖는다(33). 반면, 바이러스를 유전자전달의 매개체로 이용하는 방법은 재조합 바이러스 입자의 제조법이 복잡하고 기술 의존적이며 대량으로 다루기는 어렵지만, 물리화학적 방법과 비교하면 유전자전달 효율이 상당히 높다는 장점이 있다(33, 34). 유전자 전달을 위한 주요 바이러스 벡터로는 아데노바이러스와 아데노부속바이러스 그리고 레트로 바이러스 등이 많이 사용되고 있다. 이 중에서 레트로 바이러스는 원하는 유전자를 감염된 세포의 염색체내로 삽입이 가능하여 자손 세포에 원하는 유전자를 계속하여 전달할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 반면에 레트로 바이러스는 분열하고 있는 세포에만 감염될 수 있으며, 다른 바이러스 벡터에 비해 생산 역가가 비교적 낮다는 단점을 가지고 있다(35).

이처럼 장기적으로 유전자 발현을 유도할 수 있다는 특징으로 인해 레트로 바이러스 벡터는 유전자의 기능을 조사하고자 하는 실험이나 transgenic animal을 제조하는 경우 그리고 유전자치료에 다양하게 이용되고 있다(36, 37). 레트로 바이러스의 경우 바이러스 게놈(genome)에서 *gag*와 *pol* 그리고 *env* 유전자가 제거되어도 외부로 부터 유전자가 공급되면 바이러스 RNA는 virion 내로 packaging될 수 있다. 이러한 레트로 바이러스의 특성을 이용하여 재조합 레트로 바이러스 입자가 제조될 수 있다(38). 레트로 바이러스 벡터 시스템은 유전자 전달 벡터와 packaging plasmid로 구성되는데, 유전자 전달 벡터는 역전사와 integration에 필요한 cis-acting sequence와 외래 유전자로 구성 되어 있는 형태며, packaging

plasmid는 대부분의 cis-acting sequence가 결여되고 *gag*와 *pol* 그리고 *env* 바이러스 단백질만을 발현하도록 되어 있다(39). 벡터와 packaging plasmid를 293T 세포에 co-transfection 하면 packaging construct로부터 in trans로 공급되는 구조 단백질이 벡터 게놈을 packaging하여 재조합 바이러스 입자를 만들 수 있다. 이 재조합 바이러스 입자를 원하는 세포에 감염시키면 원하는 유전자만 염색체 내로 삽입이 가능하며, 삽입된 유전자는 표적 세포에서 발현이 가능하게 된다(39, 40). 이와 같은 레트로 바이러스 벡터의 특성을 이용하면 목적 세포에서 원하는 단백질을 거의 무한으로 생산할 수 있는 항원 생산용 세포주의 수립이 가능하다.

제 I 장. 기니피그에서의 항원-항체 결합 백신의 제작 및 항체가 검증

1. 서 론

항원이란 동물체에 접종하면 항체를 생성하여 그 항체와 특이적으로 반응하는 물질을 말한다. 이때, 특이적 반응은 면역반응이나 면역억제반응을 의미하며 이는 림프구나 대식구 등의 수용체에 결합하여 이를 활성화시킴으로써 일어난다(15). 1798년 영국의 의사 Jenner가 종두법(vaccination)으로 천연두를 예방하는데 성공한 이후, 동물 질병에서는 Pasteur가 최초로 닭에서 콜레라균을 항원으로 이용한 백신을 개발하였다(16-18). 항원은 다양하여 세균 항원, 바이러스 항원, 기생충 항원, 조직적합성항원, 자기면역성항원, 종양항원 등이 알려지고 있다(16-18). 하지만 항원성 단백질의 분자량이 작을 때에는 대식세포가 탐식을 하지 않아서 면역반응을 유도하기 힘들기 때문에, 항원성 단백질은 1만 Da 이상이어야 이상적이라고 알려져 있다(17). 항원의 침입에 대한 면역반응은 항원이 생체에 접종된 후에 여러 과정을 거쳐 항체가 분비되는 복잡하고 긴 과정이다. 항원은 대식세포에 섭취된 다음 항원 결정 분자단이 T 세포와 B 세포에 잘 감지되기에 이른바 T 세포와 B 세포의 협동 작용으로 면역원성을 발휘하는 T 세포의존성 항원(T-dependent antigen)과, B 세포만으로도 면역감응을 유도하는 T 세포비의존성 항원(T-cell independent antigen)으로 나뉘는데, 항원으로 작용하는 백신에는 두 가지의 반응이 모두 나타난다(14, 16).

백신 접종에 의한 항체 생성을 높이기 위한 방법으로는 여러 가지가 있지만, 대표적으로 항원에 대한 탐식을 잘하도록 하는 방법과 여러 가지의 면역 활성 물질을 첨가하여 면역 반응이 더 잘 이루어지도록 하는 방법, 그리고 항원 탐식 후에 항원 제시를 증가시키는 방법 등이 있다(31). 이 중에서 항원 제시를 증가시키는 방법으로 IgG의 Fc 부분을 이용하는 연구가 진행되고 있다. Fc 부분을 첨가한 백신에서 항체의 생산 유도가 증가되었으며, 바이러스의 공격 접종에서도 높은

방어능력을 보였다는 연구보고가 있다(20-23). 하지만 이러한 백신의 제작 방법은 IgG에서 Fc 부분을 papain 효소 등을 이용하여 절단한 후 Fc 부분만을 정제하여 사용하거나 유전자 발현을 통한 Fc 부분의 재조합 단백질 생산과정을 거쳐야 하는 번거로움이 있다(21-23). 이렇게 백신 제조의 과정이 복잡해지면 백신 제작의 기간은 길어지며 생산 비용 또한 상승하게 된다.

생체에 항원이 침입하면 면역 반응에 의하여 침입한 항체에 대하여 감작된 IgG가 생성된다. 이렇게 생성된 IgG가 항원과 만나면 상보성 결정부위(complementarity-determining regions: CDRs)의 상보적인 아미노산 서열에 의하여 인식되고 서로 결합한다(14). 이런 특성을 이용하면 손쉽게 항원-항체 결합체를 제작할 수 있다.

이러한 항원-항체 복합체를 백신으로 개발하여 사용한다면 동물 체내에서 항체의 형성률이 높아질 것이라고 사료된다. 따라서 본 실험에서는 먼저 항원-항체 결합 백신의 효능을 알아보기 위한 예비실험을 하였다. Corona virus인 porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)와 *paramyxovirus* 속의 newcastle disease virus (NDV)를 실험용 기니피그에 항원으로 접종하여 고도로 면역을 유도한 후 항원에 감작된 IgG를 분리 하였다. 분리된 IgG를 항원과 결합시켜 항원-항체 결합체를 만들고, 이를 항원-항체 결합 백신으로 제작하는 연구를 하고자 하였다. 최종적으로 위와 같이 제작된 항원-항체 결합 백신을 기니피그에 투여하여 항체 형성률을 측정하여 새로운 개념의 백신에 대한 성능을 평가하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1 항원 및 실험동물

항원으로 사용한 PEDV와 NDV는 중앙 백신연구소(대전, 한국)의 백신 제작용 백신주 원액을 공여 받아 사용하였다. 실험에 이용된 기니피그(Dunkin-Hartley)는 12주령의 암컷 24마리로, SLC사(Japan SLC Inc, Japan)에서 6주령을 구입한 후에 실험동물 사육사에서 6주 동안 적응을 시켜서 실험에 투입하였다.

2-2 기니피그 면역

정제된 바이러스 항원액(PEDV: 1 ml 중 120 Dose Unit (DU), NDV: 1 ml 중 220 DU)을 동량의 생리식염수와 혼합한 후, 기니피그 마리당 200 μ g(PEDV: 1 DU = 10 μ g, NDV: 1 DU = 6 μ g)씩 생후 12주령인 기니피그의 복강에 주사하였다. 초회 면역 후 1주일 간격으로 총 5회 접종을 하였으며 마지막 최종 접종 후 2주일이 지나서 전혈을 채취하였다. 기니피그의 고도 면역 스케줄은 Fig. 1에서 나타내었다.

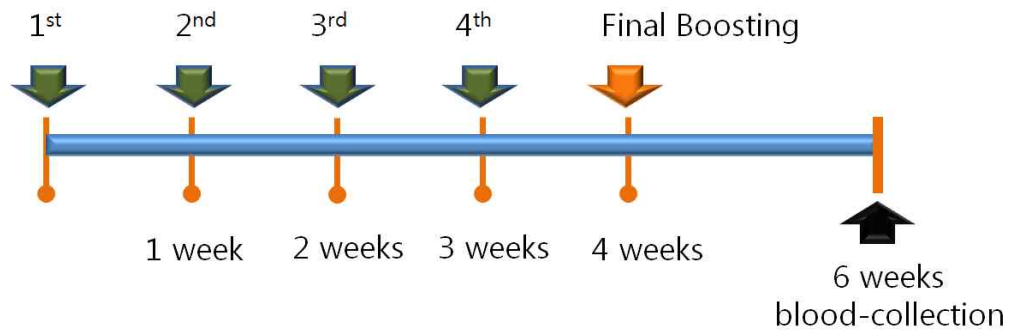


Fig. 1. Hyper immunization schedule for raising anti-porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) IgG and anti-newcastle disease virus (NDV) IgG in guinea pigs. Guinea pigs were immunized with the antigens five times weekly. Blood was collected two weeks after final inoculation.

2-3 기니피그 IgG의 정제

기니피그 혈청을 Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, UK)를 이용한 affinity chromatography를 실시하여 IgG를 분리하였다. Sepharose resin을 syringe column (16 X 80 mm)에 충전한 후, PBS (pH 7.2)로 2배 희석한 기니피그 혈청 40 ml을 flow rate가 1.0 ml/min이 되도록 하여 column에 가하였다. Protein G와 결합하지 않은 혈청 성분들은 충분한 양의 PBS로 세척하여 제거하였다. 결합된 IgG는 3 M NaSCN을 가하여 용출시켰다. 용출된 분획은 PBS로 3회 외액을 교환하며 72시간 투석하고 제균여과를 실시하였다. 정제된 IgG를 확인하기 위하여 sodium dodecyl sulfate polyarylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)분석을 non-reducing condition으로 실시하였다. 정제된 IgG 분획을 10% polyacrylamide gel에 loading한 후 50 V로 15분간 영동하고, 이어서 100 V로 전압을 높인 후 bromophenol blue dye가 바닥에 도달할 때까지 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 coomassie gel staining solution으로 40분간 염색하였고 destaining solution으로 24시간 탈색하였다.

정제한 후, IgG는 Bio-Rad 사의 Protein Assay kit을 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 즉, 1 mg/ml의 BSA를 10진 희석하여 96-well plate의 각 well에 180 μ l가 되도록 분주를 하고 정제된 IgG를 10진 희석하여 각 well에 180 μ l가 되도록 하였다. 각 well에 Protein Assay Dye 20 μ l를 첨가한 후 흔들어 주었다. 30초 후에 plate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 농도를 구하였다.

2-4 항원-IgG 결합체의 제작

앞에서 정제된 각각의 IgG 2 mg과 각각의 항원액(PEDV: 25 mg, NDV: 20 mg)을 생리식염수에 혼합하고 38°C에서 1시간 동안 20 rpm으로 진탕하여 결합시켰다. 진탕 종료 후 PD MiniTrap™ G-25 column (GE Healthcare, UK)을 이용하여 IgG-항원 결합체를 농축 및 정제하였다. Column에 세척액을 5 ml 첨가하여 세척하고, 각각의 IgG-항원 결합체 2 ml를 column에 넣은 후 중력에 의하여 삼출되는 분획을 200 μ l마다 수거하였다. 수거된 삼출액을 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다.

2-5 SDS-PAGE

Bio-rad의 MINI-PROTEIN II 기기를 사용하였으며, non-reducing condition으로 SDS-PAGE를 수행하기 위하여 buffer에 2-mercaptoethanol이나 dithiotreitol은 첨가하지 않았다. Separating gel은 12%, stacking gel은 5%의 polyacrylamide gel을 사용하였다. Gel을 running tank에 장착한 후, running buffer를 채우고, 시료를 4 x sample buffer를 이용하여 전체 volume 20 μ l에 맞춘 후 100°C에서 3분간 끓인 후, well에 loading하고 bromophenol blue dye가 바닥으로 빠져나올 때까지 전기영동 (100 V) 하였다.

2-6 백신의 제작

PEDV-IgG 결합체와 NDV-IgG 결합체를 각각 1 mg/ml이 되도록 4 ml를 제작하여 항원-항체 결합 백신을 제작하였다. PEDV와 NDV를 접종하지 않은 기니피그의 전혈을 채취하고 Protein G Sepharose gel column을 이용하여 IgG를 정제하였다. 이렇게 정제된 IgG는 단독 투여 대조군으로 사용하였다. PEDV와 NDV 항원은 이미 정제되어 있으므로 별도의 농축이나 정제과정 없이 백신용 항원으로 사용하였다. 백신 제작 시 adjuvant는 혼합하지 않았다.

2-7 백신의 투여와 항체가 측정

IgG, anti-PEDV IgG, anti-NDV IgG, 불활화 된 PEDV 및 불활화된 NDV, PEDV-IgG 결합체 및 NDV-IgG 결합체를 마리당 1 ml (200 μ g/ml)씩 군당 각각 4 마리에 접종을 하였다. 백신의 종류와 접종 용량은 Table 1에 나타내었다.

백신 접종 바로 전의 pre-serum과 백신 접종 1, 2, 3, 4, 5 그리고 6주에 혈청을 대퇴정맥에서 채혈 하였다. 채혈된 혈청을 PED Antibody One Step test kit (NOVAmed. Israel)과 ProFLOK NDV Plus ELISA Kit (SynBioTics. UK)으로 항체가를 측정 하였다. 항체 역가는 kit의 사용 매뉴얼에 따라서 계산하였으며, 경시적인 비교를 위하여 접종 전의 항체가에 대한 백분율로 계산하여 나타내었다.

Table 1. Immunization conditions for various antigens

	IgG ⁻ ^a	IgG ⁺ ^b	Inactivated vaccine	Antigen-antibody complex vaccine
PEDV	IgG ⁻ (200 µg/ml) 1 ml	IgG ⁺ (200 µg/ml) 1 ml	PEDV ^c (120 DU/ml) 1 ml	IgG-PEDV complex (200 µg/ml) 1 ml
NDV	IgG ⁻ (200 µg/ml) 1 ml	IgG ⁺ (200 µg/ml) 1 ml	NDV ^d (220 DU/ml) 1 ml	IgG-NDV complex (200 µg/ml) 1 ml

^a Normal guinea pig IgG

^b Hyper immunized anti-PEDV antibody (IgG type) or anti-NDV antibody (IgG type)

^c PEDV: porcine epidemic diarrhea virus

^d NDV: Newcastle disease virus

3. 결 과

3-1 IgG와 IgG-항원 결합체의 정제

Normal 기니피그 IgG는 PEDV와 NDV에 노출되지 않은 기니피그의 혈액에서 Protein G Sepharose gel column을 이용하여 정제하였다. PEDV 및 NDV에 대한 항혈청으로부터 정제한 IgG는 SDS-PAGE를 통하여 IgG의 원래 크기인 160 kDa임을 확인할 수 있었다(Fig. 2-A).

기니피그에서 고도면역한 후 정제된 특이 IgG와 각 항원을 반응 시키고 PD-10 column을 이용하여 농축한 PEDV-IgG 결합체와 NDV-IgG 결합체를 SDS-PAGE를 통하여 단백질의 크기를 측정하였다. 그 결과, PEDV-IgG 결합체(190 kDa)와 NDV-IgG 결합체(210 kDa)를 각각 확인할 수 있었다(Fig. 2-B).

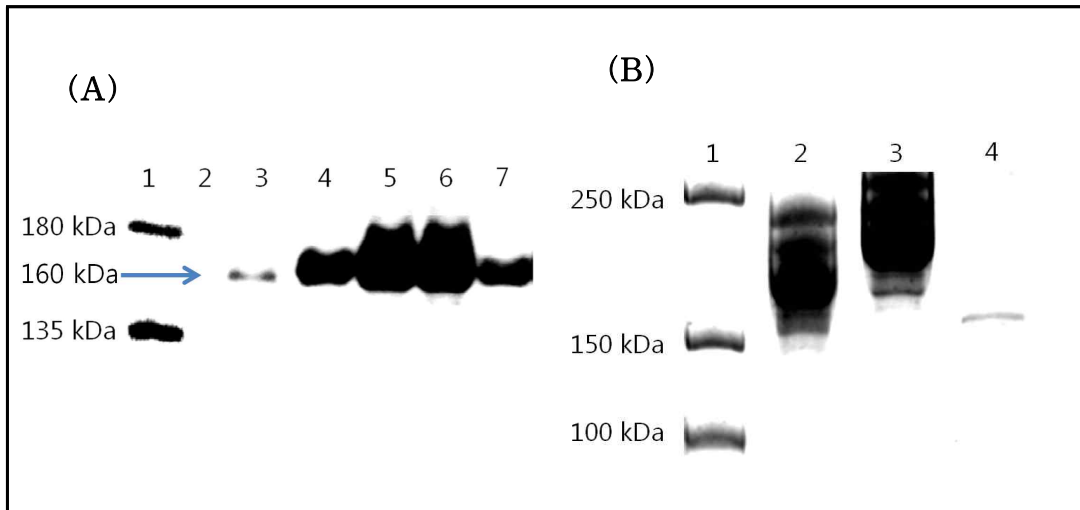
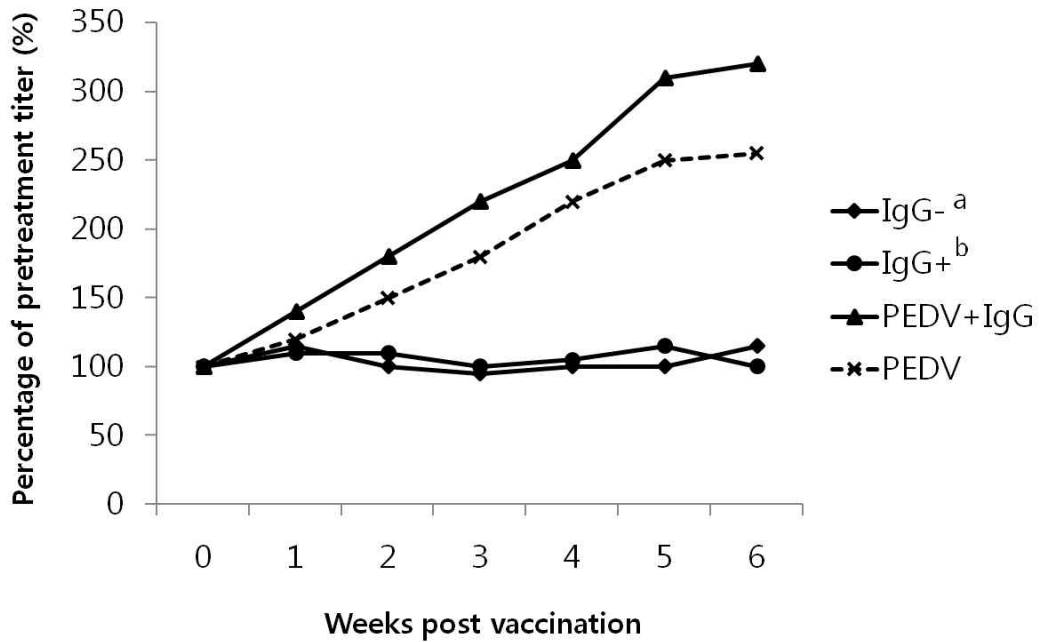


Fig. 2. SDS-PAGE profiles of IgG fraction and IgG-antigen complex purified by affinity chromatography. (A) SDS-PAGE patterns of affinity purified fraction of IgG. The size of main band was matched with that of IgG (160 kDa). lane 1: size marker (SDS-PAGE analysis of protein: Rockland Immunochemicals Inc, USA), lane 2: fraction 1, lane 3: fraction 2, lane 4: fraction 3, lane 5: fraction 4, lane 6: fraction 5, lane 7: fraction 6. (B) SDS-PAGE patterns of IgG-antigen complex. lane 1: size marker (Clearly Protein Ladder: TAKARA, Japan), lane 2: IgG-newcastle disease virus (NDV) complex fraction, lane 3: IgG-porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) complex fraction, lane 4: IgG fraction. SDS-PAGE was performed under non-reducing condition.

3-2 항체가 측정

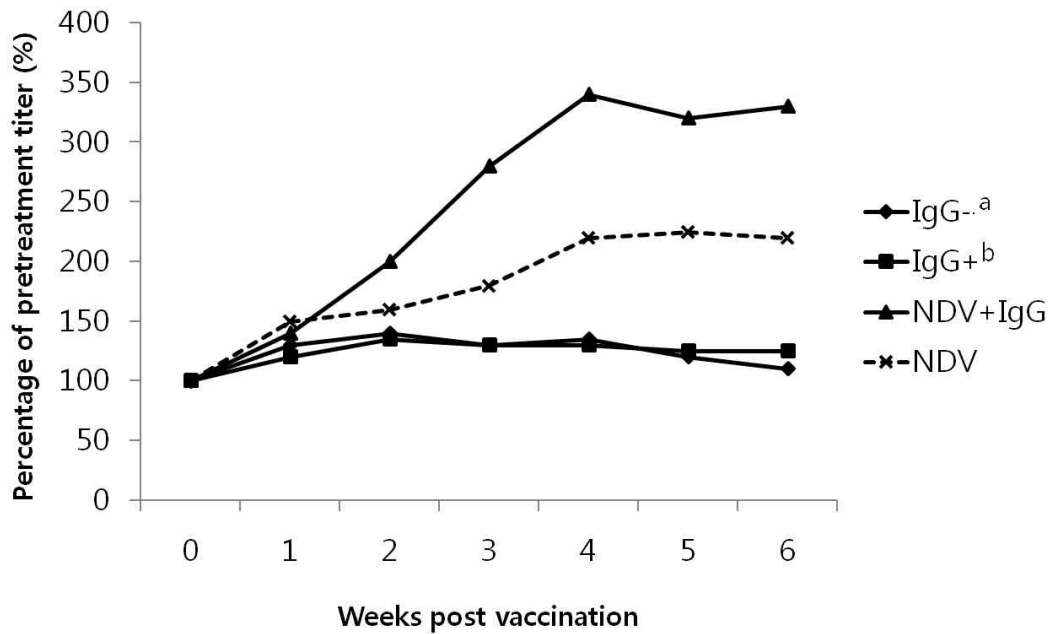
면역 전 기니피그 IgG, 면역된 기니피그 IgG, 불활화 PEDV, 불활화 NDV, PEDV-IgG 결합체 그리고 NDV-IgG 결합체를 각각 면역 접종한 후 경시적으로 NDV와 PEDV에 대한 역가의 변동을 조사하였다(Fig. 3과 Fig. 4). 항체가의 변화는 접종 전의 OD 값을 농도로 환산한 후 각각의 주차별 OD 값을 농도로 환산하고 접종 전의 농도를 기준으로 변화된 값을 백분율로 나타내었다. 총 6주 동안 항체가의 변화를 측정한 결과 정상 기니피그 IgG (IgG⁻)와 면역된 기니피그 IgG (IgG⁺)를 접종한 그룹에서는 예상한대로 NDV와 PEDV에 대한 항체가의 증가가 전혀 관찰되지 않았다. PEDV와 NDV를 접종한 그룹에서는 항체가의 증가가 확인되었는데, PEDV를 접종한 경우 접종 1주 후부터 항체가가 증가하여 4주에는 접종 전과 비교하여 220%의 항체가 상승을 보였으며 5주 이후에는 약 250%의 항체가 상승이 관찰되었다. NDV를 접종한 경우도 꾸준한 항체가의 상승이 관찰되었으며 4주 후에는 약 210%의 상승을 보였고 측정 최대 기간인 6주까지 약 200% 수준으로 일정한 항체가의 상승을 확인할 수 있었다. PEDV-IgG 결합체를 접종한 경우 6주의 기간 동안 항체가의 최대치는 약 330%로 나타났다. 접종 4주 후에 약 250%의 상승을 보였으며 6주까지 지속적인 항체가의 상승이 확인되었다. NDV-IgG 결합체를 접종한 경우 접종 후 4주차에 약 350%의 항체가 상승이 확인되었고, 그 이후로 6주까지는 약 320%의 항체가 상승이 확인되었다.



^a Normal guinea pig IgG

^b Hyper immunized anti-PEDV antibody (IgG type)

Fig. 3. Serial changes in titers of antibody against PEDV. Titers obtained before vaccination and at 1, 2, 3, 4, 5 and 6 weeks after the inoculation are expressed as percentages of pretreatment titer measured by ELISA. There were no significant changes in antibody levels for IgG⁻ and IgG⁺. The PEDV-IgG complex vaccine exhibited higher antibody levels than the PEDV vaccine from one week after its administration.



^a Normal guinea pig IgG

^b Hyper immunized anti-NDV antibody (IgG type)

Fig. 4. Serial changes in titers of antibody against NDV. Titers obtained before vaccination and at 1, 2, 3, 4, 5 and 6 weeks after the inoculation are expressed as percentages of pretreatment titer measured by ELISA. There were no significant changes in antibody levels for IgG⁻ and IgG⁺. When the animal model was administered with the NDV vaccine, it exhibited higher antibody levels than the NDV-IgG complex vaccine one week after its administration. However, from two weeks after administration, antibody levels were higher in the animal model administered with the NDV-IgG complex vaccine than one administered with the NDV vaccine.

4. 고찰

백신의 종류로는 생독백신(avirulent or attenuated live vaccine), 사독 또는 불활화백신(killed or inactivated vaccine), 서브유닛 백신(subunit vaccine), 유전자 재조합 백신(recombinant vaccine), 펩타이드 백신(synthetic peptides), DNA 백신(DNA vaccine) 등이 있다(7). 앞의 다양한 백신들은 그 작용 원리와 제작의 방법이 서로 다르다. 우수한 백신을 제작하기 위한 여러 연구자의 노력이 현재도 세계 각지에서 이루어지고 있다. 특히 최근에는 IgG의 Fc 부분을 이용하여 백신의 효율을 높이는 연구가 진행되어 지고 있다(26, 29).

본 연구에서는 항원-항체 결합백신의 효용성을 알아보기 위하여 먼저 항원-항체 결합 백신을 제작하였다. 항원-항체 결합 백신을 제작하기 위하여 기니피그에 항원으로 사용한 PEDV와 NDV를 고도 면역 시키고 채혈하여 IgG를 분리 정제하여 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다(Fig. 2-A). 분리된 IgG에 PEDV와 NDV를 각각 섞어서 항원-항체 결합체인 PEDV-IgG 결합체와 NDV-IgG 결합체를 제작하였다(Fig. 2-B). 실험에 사용된 IgG는 고도면역으로 인하여 각각 PEDV와 NDV에 이미 감작이 된 상태였기 때문에 항원에 감작된 항체와 항원을 섞어주는 것만으로도 충분히 항원-항체 결합체를 제작할 수 있었다. 항원과 항체 사이에는 쿨롱힘(Coulomb force)과 반데르발스힘(van der Waals force) 그리고 수소결합 등의 각종 힘이 작용하게 되어 항원-항체 반응이 일어나 결합을 하게 되는데(14,15), 이 때문에 비교적 간단하게 항원-항체 결합체를 제작할 수 있었던 것으로 사료가 된다.

항원-항체 결합 백신의 접종 실험결과(Fig. 3)를 보면 IgG-PEDV 결합체의 경우 약 330%의 항체가 상승을 확인할 수 있었다. IgG-NDV 결합체를 접종한 결과(Fig. 4)에서는 최대 350%의 항체가 상승이 확인되었다. 불활화 백신인 PEDV와 NDV만을 접종한 결과를 보면 PEDV는 접종 후에 최대 250%의 항체가 상승이 관찰되었으며, NDV를 접종한 경우에는 최대 210%의 상승을 확인할 수 있었다. 항원-항체 결합 백신과 기존의 불활화 백신을 비교하면 항원-항체 결합 백신이 불활화 백신

보다 80%~140% 높은 항체가를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이는 Fc 부분을 세포에서 발현하여 제조한 불활화백신에서 항체 생산 유도가 증가되며 공격 접종에서 우수한 방어능을 가졌다(29-30)는 보고와 맥락을 같이 하는 결과라고 할 수 있다.

결과적으로, 기니피그에서의 항원-항체 결합 백신의 항체가를 검증한 결과 불활화 백신 단독투여의 경우보다 높은 수준에서 항체가를 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 이렇게 항원의 고도 면역으로 정제한 IgG와 그 특이 항원의 결합체를 이용하여 제작한 항원-항체 결합 백신을 응용한다면, 추후 산업 동물에서 우수한 효과를 나타내는 새로운 백신의 개발이 가능하리라고 생각된다.

제 II 장. 재조합 레트로 바이러스 입자를 이용한 구제역 항원 생산용 세포주 제작

1. 서 론

구제역은 전염성이 아주 강하고 급속히 전파되기 때문에 세계 각국에서는 구제역의 확산을 막기 위해 살처분 정책을 사용하고 있다. 따라서 구제역은 발생에 따른 직접적 피해(폐사, 생산성 저하, 번식장애 등)와 더불어 살처분에 따른 경제적 피해가 아주 큰 질병이라 할 수 있다(47-48). 이와 더불어 육류소비의 저하와 관광산업의 위축 등 간접적 손실을 주고 사회적 혼란까지 야기할 수 있는 중요한 가축전염병이다(7, 8).

구제역백신은 19세기 말까지 병원성 바이러스에 노출시켜 동물의 면역을 유도하는 방법이 이용되었다(49). Vallée 등이 1926년에 처음 formaldehyde (FA)로 생 바이러스를 불활화하여 백신을 만드는 연구를 시작한 이래, 1937년에는 Waldmann 등이 FA로 바이러스를 불활화하여 Al(OH)₃-gel와 혼합한 구제역 백신을 사용하였다(50). Frenkel (1947)은 혀를 얇게 잘라 실험실에서 바이러스를 접종하여 배양하는 방법을 개발하여 그 당시 널리 이용되었다. 그러나 구제역 발생 시에 이동 제한 등으로 도축장으로부터 도축되는 소에서 상피세포를 구하지 어려운 문제점으로 생산에 있어서 불편한 점이 많았다(50). 1960년 초 소 초대신장세포(bovine primary kidney cell)를 roller bottle을 이용하여 대량으로 배양할 수 있는 백신생산 라인이 개발되었으며 이 백신은 1960년대 유럽에서는 청정화를 이루는 계기가 되었다(50). 이후 햄스터 신장 유래세포(BHK-21)와 같은 세포주가 개발되면서 초대배양세포의 대체가 가능하게 되었고, 그 후 BHK-21 세포에서 구제역 바이러스의 배양이 성공적으로 이루어졌으며, 불활화제를 FA에서 aziridines, binary ethylenimine (BEI) 등으로 바꾸면서 백신의 안전성을 확보할 수 있게 되었다(51, 52). 또한, 껌 백신에서 오일 백신으로 전환하면서 돼지에서 면역 형성이 떨어지던 문제점 점을 다소나마

해결할 수 있게 되었고, 1970년대에 double oil을 이용하여 면역지속력도 향상되었다.

현재 불활화 백신은 구제역 발생 전에 사용하는 예방용과 발병 시에 사용이 가능한 두 개의 종류가 있다. 구제역 예방을 위하여 매년 접종되는 일반용 백신은 3 PD₅₀ (50% protective dose)의 항원량을 가지고 있으며, 발생 시에 사용되는 백신은 6 PD₅₀ 이상의 항원량을 가지고 있다(48). 구제역 발병에 따른 항체와 백신 투여에 따른 항체 형성을 구분하기 위한 방법이 필요한데, 백신투여 시에는 형성 되지 않는 비구조 단백질 항체를 마커로 하는 ELISA를 통하여 감별진단이 가능 하다(53). 불활화 백신은 질병의 예방을 위한 효과적인 방법이지만, 백신을 생산하는데 생 바이러스를 다루기 때문에 위험하다는 단점을 가지고 있다(54). 이와 같은 불활화 백신의 문제점을 해결할 수 있는 재조합 백신의 경우 불활화 백신보다 생산 가격이 높아 산업동물에는 적용하기 힘들다는 문제점을 가지고 있다. 이러한 재조합 백신의 문제점을 해결하기 위하여 재조합 백신제작에 사용할 수 있는 항원 생산용 세포주의 개발이 필요하다.

일반적으로 초대배양세포는 유효계대수가 짧아 항원생산에 오래 사용하기가 어려울 뿐 아니라 초저온 동결 후 해동 시에 그 특성이 변화한다. 초대배양세포의 가장 큰 장점 중 하나는 암 조직으로부터 제작된 세포주 또는 암화 된 세포주와 달리 각 장기의 세포가 가지고 있는 생리학적 특성을 그대로 간직하고 있다는 점이다. 각종 동물에서 초대배양 방법은 많은 연구가 되어 있으나 동물의 태아를 이용한 연구는 미진한 실정이다. 태아를 이용할 경우 분열기에 있는 세포가 풍부하여 초대배양 시에 오랜 기간 세포가 생존하고 분열속도도 왕성한 장점을 지니고 있다(55). 초대배양 시에 사용하는 많은 효소들 가운데 collagenase와 dispase는 trypsin과 달리 세포 독성이 적어서 장시간 동안 조직이나 세포에 적용이 가능하고 세포간의 연결을 효과적으로 절단 할 수 있으며 농도와 처리시간을 잘 조정하면 상피세포만을 분리 할 수 있어 초대배양 세포에서 섬유아세포의 혼입을 최소화 할 수 있다(56-58). 또한 초대 배양 시 RBC가 다량 포함되어 있으면 RBC가 세포의 부착을 저해하게 된다. 상피세포의 배양에 있어서 가장 문제가 되는 것 중 하나가 섬유아세포의 혼입이라

할 수 있다. 섬유아세포는 상피세포보다 세포간의 결합력이 강하고 상피세포보다 분열이 빠른 특성을 가지고 있다. 이러한 특성 때문에 상피세포와 섬유아세포가 함께 자라고 있으면 계대수가 늘어나면서 상피세포의 비율은 점점 줄어들고 섬유아세포의 비율은 점점 늘어나는 섬유아세포 우점현상이 발생하고 이러한 우점 현상에 의하여 상피세포들은 대부분 조기에 사멸하게 된다(59, 60).

초대배양 시에 가장 문제가 되는 섬유아세포의 제거를 위하여 edetate disodium dihydrate (Na_2EDDA)를 이용하는 방법이 연구되었는데, Na_2EDDA 는 섬유아세포의 세포간 결합의 가장 큰 비중을 차지하는 Ca^{2+} 결합 사이에 들어가서 섬유아세포들간의 결합을 효과적으로 저해 할 수 있다(61). 물론 상피세포 또한 Ca^{2+} 결합을 가지고 있지만 섬유아세포에 비하여 그 비율이 낮으므로 Ca^{2+} 의 결합만을 제거해 주면 섬유아세포의 박리가 먼저 일어나게 된다. 이러한 섬유아세포와 상피세포간의 박리가 이루어지는 시간적 차이를 이용하면 효과적으로 섬유아세포와 상피세포를 분리할 수 있다. 또한 상피세포와 섬유아세포가 초대배양 시 배양 용기에 붙기 위해 필요한 부착인자의 양에도 차이가 있다(62, 63). 섬유아세포는 상피세포에 비해 초기 배양 용기에 부착을 위해 더 많은 fetal bovine serum (FBS)을 필요로 하지만 상피세포는 적은 양의 FBS 만으로도 충분히 부착이 가능하다. 이러한 세포종류에 따른 특성을 이용하면 효과적으로 섬유아세포를 제거할 수 있다(64, 65).

새로운 구제역 백신을 개발하기 위하여, 구제역 바이러스의 다양한 유전자에 대한 연구가 이루어져 왔다. 과거부터 VP1은 가장 많이 연구된 유전자로 구제역 바이러스의 외피를 구성하는 부분에서 가장 변이가 심하다(68, 69). 구제역 바이러스의 VP1의 G-H loop는 중화항체를 유도하는 중요한 부위이므로, 이 부위의 펩타이드를 이용한 연구가 이루어지고 있다(69, 70). 하지만, 소와 돼지에 VP1 또는 G-H loop 합성 펩타이드를 접종한 경우 그리고 T 세포 에피토프만을 면역한 경우에서 모두 기대하는 만큼의 효과는 나타나지 않는다고 보고하였다(70-74). 또한, 구제역에 감염된 동물에서 외피가 아닌 구조 단백질인 3C와 3D에 대한 항체가 발견되었다는 보고도 있다(75, 76). 이는 VP1 뿐만 아니라 3C와 3D 또한 주요 항원 부위로 작용할 수 있다는 증거이다.

본 연구는 현재 한국에서 사용되는 구제역 불활화 백신의 문제점을 해결할 수 있는 새로운 재조합백신을 개발하고자 수행하였다. 재조합 백신을 만들기 위해서는 새로운 항원 생산용 세포주의 개발이 요구되는바, 초대배양상피세포에 유전자를 도입하여 지속적인 항원생산과 연속배양이 가능한, 불멸화 세포주를 구축하고자 하였다. 이를 위하여 초대배양 세포주에 human telomerase (hTERT)를 발현하는 레트로 바이러스 입자를 삽입하여 소와 돼지 세포의 불멸화를 시도하였다. 또한, 불멸화된 세포주에 재조합 레트로 바이러스 입자를 삽입하여 동시에 재조합 단백질을 지속적으로 생산할 수 있는 세포주의 개발을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2-1 소와 돼지 태아의 장기적출

도축장을 통하여 소와 돼지 태아를 확보하고 무균적으로 자궁을 적출 한 후 초대 배양 재료로 사용하였다. 태아가 들어 있는 자궁은 70% 에탄올을 사용하여 자궁표면을 소독하고 클린벤치로 옮겨서 태아를 적출하였다. 외과용 수술가위를 사용하여 자궁을 절개하고 실크 봉합사를 이용하여 탯줄을 결찰한 후 절단하였다. Potadine (Povidone Iodide, 100mg/ml) 용액을 사용하여 태아의 피부를 소독하고 chlorhexidine 용액으로 Potadine 용액을 닦아낸 후 복강을 절개하여 신장 등을 적출하였다(64). 태아장기 적출의 모든 과정은 무균적으로 실시하였다.

2-2 조직으로부터 RBC의 제거

무균적으로 적출된 조직을 Dulbecco's modified essential medium (DMEM: GIBCO, USA)에 넣은 후 초자 비이커 안에서 가능한 잘게 저민 후 50 ml conical tube로 옮겼다. RBC 제거하기 위하여 1~2분 정치시켜 조직 소편이 다 가라앉으면 상층액을 제거하였다. 조직소편이 남아있는 50 ml conical tube에 DMEM을 30 ml 첨가하고 피펫으로 조직 소편을 다시 부유시킨 후 30초간 정치하고 상층액을 제거하였다. 이와 같은 처리를 2~3회 반복하여 RBC를 충분히 제거하였다(65).

2-3 조직의 효소처리

소 및 돼지 태아 신장조직의 처리 전과정은 (37 or 36°C)에서 수행하였다. RBC가 제거된 소태아 신장 조직소편에 1차로 0.25% collagenase를 20~60분 동안 처리하고, 2차 처리에는 trypsin/ EDTA 혹은 dispase (0.01%, 10~30분 처리)를 사용하였다. 본 연구에서는, trypsin/EDTA (0.05%/0.53 M, GIBCO, USA)를 2 ml 첨가하고 36°C에서 1~3분 동안 처리한 후, 천천히 피펫팅을 20회 하여 단일세포로 분리하고

10% FBS (GIBCO, USA)가 첨가된 DMEM배지(DMEM-10)을 30 ml 첨가하여 160 x g로 3분 동안 원심분리한 후 단일세포를 회수하였다. 수거된 단일세포를 24-well cell culture cluster에 1×10^4 개씩 분주한 후 DMEM-10를 각 1 ml씩 첨가하고 36°C, CO₂ 인큐베이터에서 12시간 배양하였다(65).

돼지 신장 조직을 잘게 절편하고 RBC가 제거된 1 g의 조직을 실험에 사용하였다. 각 조직을 단일세포로 분리하기 위하여 2차에 걸쳐 효소처리를 하였다. 37°C DMEM 배지 5 ml에 0.25% collagenase를 첨가하여 20~60분 동안 37°C, CO₂ 인큐베이터에서 처리하고, collagenase의 처리가 완료되면 0.01%의 dispase를 첨가하여 10~30분 동안 반응을 시킨 후 천천히 20번 가량 피펫팅을 하여서 세포를 분리하였다. 상층액 만을 수거하고 DMEM을 10 ml 첨가한 후 160 x g에서 3분간 원심분리하였다. 가라앉은 세포만을 새로운 배지에 부유시키고 T25 세포배양용 flask에 배양하였다(66). 조직의 효소처리 조건은 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Enzyme treatments for tissue digestion

Animals	1 st treatment (collagenase)			2 nd treatment (dispase, trypsin)		
	Enzyme	Concentration (%)	Time* (min)	Enzyme	Concentration (%)	Time* (min)
Bovine	collagenase	0.25				10
			20	dispase	0.01	20
			40			30
			60	trypsin	0.05	1
						3
Porcine	collagenase	0.25	20			10
			40	dispase	0.01	20
			60			30

* Reaction time of enzyme treatment

2-4 초대배양 세포의 계대수 측정

상피세포를 분리하고 상피세포가 사멸할 때 까지 계대배양을 실시하여 몇 세대까지 지속 하는가 알아보기 위하여, 대수증식기로부터 접촉에 의한 증식저해까지 2일 간격으로 한번에 3개의 well에서 검사하여 증식곡선을 측정하였다. 1×10^3 개의 세포를 6-well plate 6 개에 분주 하고 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12일에 세포수를 측정하였다. 측정을 위하여, PBS로 원심세척한 세포를 crystal violet (Sigma-Aldrich, USA)으로 염색한 후 세포수를 혈구 계산판으로 측정하여 3개의 well의 평균을 구하였다(64).

2-5 섬유아세포 제거를 통한 초대상피세포의 선별

초대배양 후 세포의 성장 상태를 확인하고 섬유아세포를 제거하였다. 소와 돼지 태아의 초대배양 2세대인 신장세포를 각각 3개의 T25 flask에 24시간 배양하여 세포단층이 70%가 되도록 하였다. 배양된 flask에 섬유아세포와 상피세포가 혼재하여 있는 것을 현미경으로 확인하고, PBS를 4 ml 첨가하여 세포를 세척하였다. 세척한 다음 각각의 flask에 0.05%의 Na_2EDDA 를 1 ml씩 첨가하였다. Na_2EDDA 를 첨가하고 3~5분 동안 현미경을 통하여 섬유아세포가 박리되는지를 관찰하였다. 섬유아세포가 박리되기 시작하면 flask를 손가락으로 가볍게 쳐주면서 상피세포가 박리되기 직전까지 지속 하였다(64). Na_2EDDA 를 이용한 섬유아세포의 제거에 대한 단계는 Fig. 5에 도식화 하였다.

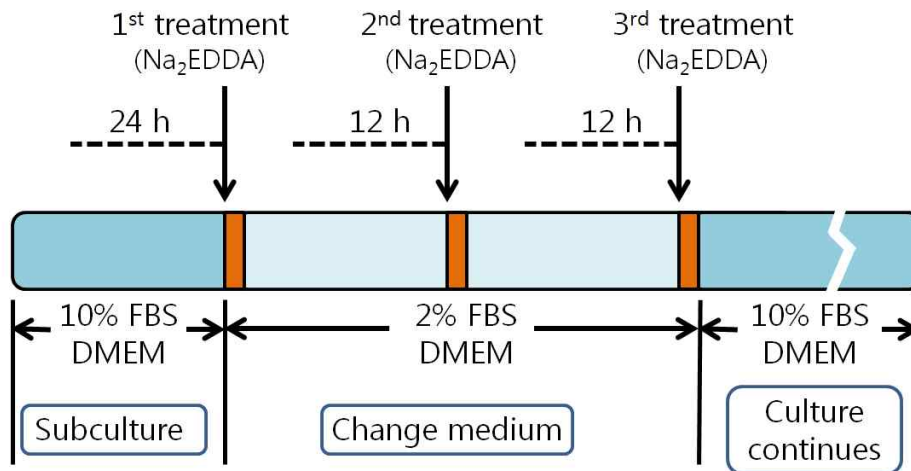


Fig. 5. Schematic diagram of Na_2EDDA treatments for the separation of fibroblasts from epithelial cells. Primary cells were cultured for 24 hours by adding Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS). DMEM containing 2% FBS was added and fibroblasts were removed using edetate disodium dihydrate (Na_2EDDA). Fibroblasts were additionally removed twice by Na_2EDDA treatment.

2-6 불멸화를 위한 레트로 바이러스 벡터 제작과정

세포의 불멸화를 위한 레트로 바이러스 벡터는 Michiie Sakamoto (Department of Pathology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku 160-8582, Tokyo)로부터 공여 받아 실험에 사용하였다(76, 68). 벡터의 제작과정은 다음과 같다. pCLXSN-ACC-hTERT 벡터의 제작을 위해서 HeLa cell을 이용하여 RT-PCR (Thermoscript reverse transcriptase (Invitrogen, USA)과 KOD polymerase (TOYOBO, Japan)를 통하여 RNA를 추출하였다. 연구에서 사용한 Primer는 5' GGA ATT CGC CGC GCG CTC CCC GCT GCC GAG CC 3'과 5' GCT CTA GAT TAG TCC AGG ATG GTC TTG AAG TCT 3'을 사용하였다. 2개의 clones을 결합하기 위한 Primer는 5' AAA AAG CAG GCT CCA CCA TGC CGC GCG CTC CCC GCT GCC GAG CC 3'과 5' AGA AAG CTG GGT TAG TCC AGG ATG GTC TTG AAG TCT 3'을 사용하였다. Adaptor primer는 5' GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT 3'와 5' GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT 3'을 사용하였다. pDONR201 벡터로 BP reaction을 통하여 cDNA를 cloning하였다. pCLXSN 벡터(Imgenex, USA)의 multicloning site에 attR, ccdB (Invitrogen, USA)가 들어가도록 제작하여 pDEST-CLXSN 벡터를 제작하였다. pDEST-CLXSN에 hTERT (cDNA)삽입하여 pCLXSN-ACC -hTERT 벡터를 제작하였다(67).

pCMSCV-puro-hBmi-1 벡터의 제작을 위해서 K526 cell에서 RT-PCR Thermoscript reverse transcriptase (Invitrogen, USA)와 KOD polymerase을 통하여 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였고 primer로 5' ACG CGT CGA CCG CCA TGC ATC GAA CAA CGA GAA T 3'과 5' CGG ATC CTC AAC CAG AAG AAG TTG CTG 3'를 사용하였다. pDONR201 벡터로 BP reaction을 통한 cDNA cloning하고, pMSCVpuro vector의 5'LTR 위치에 CMV/LTR fusion promoter를 삽입하여 pCMSCV-puro vector를 제작하였다. 최종적으로 pCMSCV-puro vector의 MCS에 hBmi-1 (cDNA)을 삽입하여 pCMSCV-puro-hBmi-1 벡터를 제작하였다(68).

2-7 재조합 단백질 발현을 위한 레트로 바이러스 벡터 제작과정

재조합 단백질을 발현할 수 있는 재조합 레트로 바이러스 벡터를 제작하였다. 과거부터 면역원성을 가진다고 알려져 있는 구제역 바이러스의 VP1과 근래의 연구에 의하여 구제역 바이러스에 감염된 돼지에서 특이항체가 형성된 부분으로 확인이 된 3C 그리고 3D 구조단백질을 결합하여 VP1-3C와 VP1-3D의 재조합 단백질을 발현하도록 디자인 하였다. 또한, 재조합 단백질 정제를 위하여 VP1-3C와 VP1-3D에 6 x *His*를 삽입하였다. VP1과 3C 그리고 3D 유전자를 복제하기 위한 Primer는 벡터와 각 유전자가 앞과 뒤로 15 bp가 겹치도록 디자인 하였다. VP1을 PCR로 합성하기 위한 Primer는 5' GAA TCC TAT GCG CCC CCA AGC TTT GCC GCC ACC 3'과 5' CCC CCC CCC ATC GGG CTC GAG TTT TGC AGG TGC 3'이다. 3C 부분을 PCR로 합성하기 위한 Primer는 5' CCC GAT GGG GGG GGG AAC TTG TGA CCT AGG ATT 3'와 5' ATT ATG ATT ATG ATT ATG ATT ATG CCT ATC TTG GA 3'이다. 3D 부분을 PCR로 합성하기 위한 Primer는 5' CCC GAT GGG GGG GGG TCA AAA TTC GCC AAC GA 3'와 5' ATT ATG ATT ATG ATT ATG ATT ATG CCG GTA ACA CTG 3'이다.

VP1과 3C 그리고 3D 유전자 부분을 TAKARA사(Japen)의 Long PCR 방법으로 복제를 하고 In-fusion 효소를 이용하여 VP1-3C와 VP1-3D를 결합시킴과 동시에 제한효소인 *pmaC* I으로 절단된 pDONAI-2 벡터에 삽입하여 pDONAI-2-VP1-3C 벡터와 pDONAI-2-VP1-3D 벡터를 제작하였다. 벡터 제작의 모식도는 아래에 나타내었다(Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8).

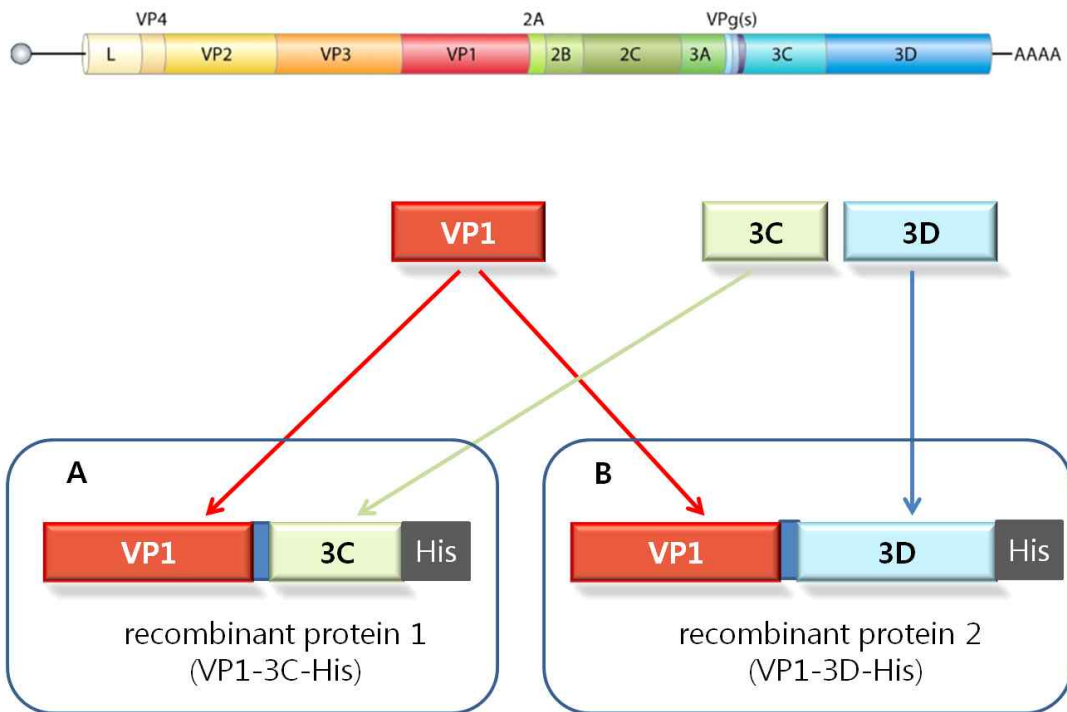


Fig. 6. Diagram of constructs used for FMDV recombinant protein expression. A: FMDV recombinant protein 1 (VP1-3C-His), B: FMDV recombinant protein 2 (VP1-3D-His). A and B are depicted below the diagram of the epitopes coding for the FMDV polyprotein. Segments representing individual proteins are shown.

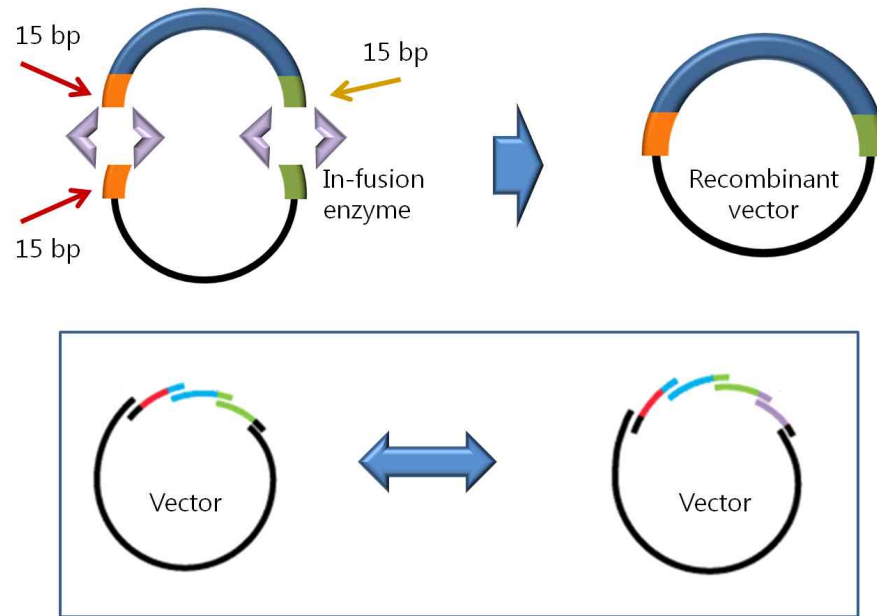


Fig. 7. In-fusion enzyme protocol overview. In-Fusion allows to join two or more fragments, vector and insert (or multiple fragments), as long as they share 15 bases of homology at each end.

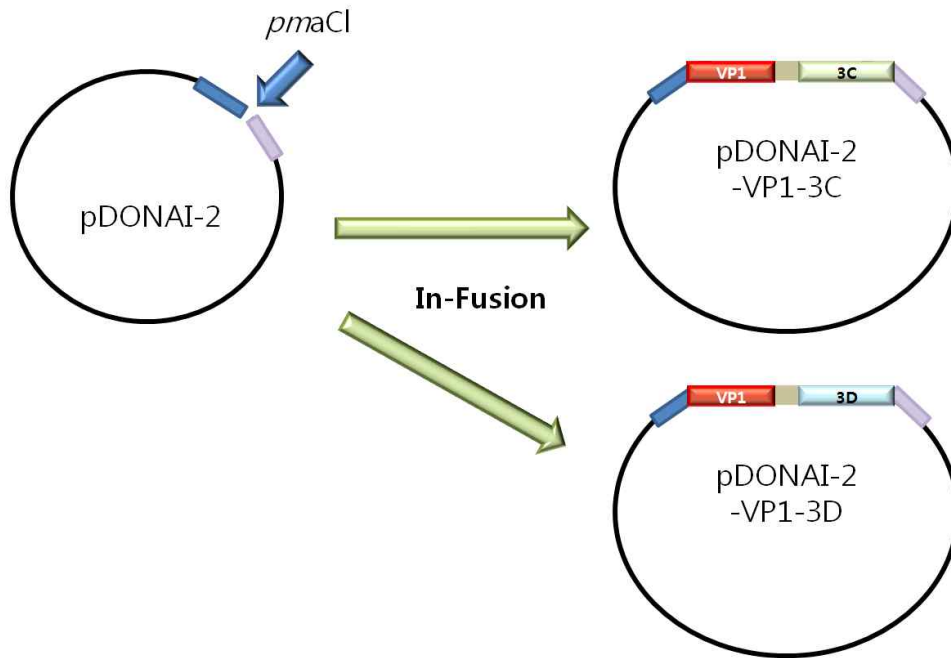


Fig. 8. Mimetic diagram of the FMDV recombinant protein VP1-3C and VP1-3D directed by the pDONAI-2 vector. VP1-3C and VP1-3D were infused into pDONAI-2 vector. The inserts between VP1 and 3C or VP1 and 3D were designed to give the fused proteins flexibility for functional conformation.

2-8 재조합 레트로 바이러스 입자의 제작

안정적으로 세포내로 유전자를 도입시키기 위하여 사용할 레트로 바이러스 입자를 Retrovirus Packing System (TAKARA Bio, Japan)을 이용하여 co-transfection 방법을 통하여 제작하였다. 293cell에 recombinant retrovirus vector와 pGP vector 그리고 pE-ampho vector를 calcium phosphate transfection method로 co-transfection을 하였다. Co-transfection 후 7~11시간동안 5% CO₂, 37℃에 처리 후 새로운 배지로 교환해 주었다. Transfection 48시간 후, 원심분리로 상층액을 회수하고 0.45 μm sterilized filter를 사용하여 여과후 -80℃에 보관하며 transduction에 사용하였다(Fig. 9).

VP1-3C와 VP1-3D의 재조합 단백질을 발현하는 레트로 바이러스 입자를 레트로 바이러스 벡터를 사용하여 생산하였다. 즉, 293cell에 pDONAI-2-VP1-3C 벡터 또는 pDONAI-2-VP1-3D 벡터를 각각 pGP vector 그리고 pE-ampho vector와 함께 calcium phosphate transfection method로 co-transfection 하였다. co-transfection 후 7~11시간동안 5% CO₂, 37℃로 incubating한 후 새로운 배지로 교환해 주었다. Transfection 48시간 후 원심분리로 상층액을 수거하고 Retrovirus titer set (TAKARA Bio, Japan)을 이용하여 Real-Time PCR을 통하여 역가를 측정 하였다 (Fig 10).

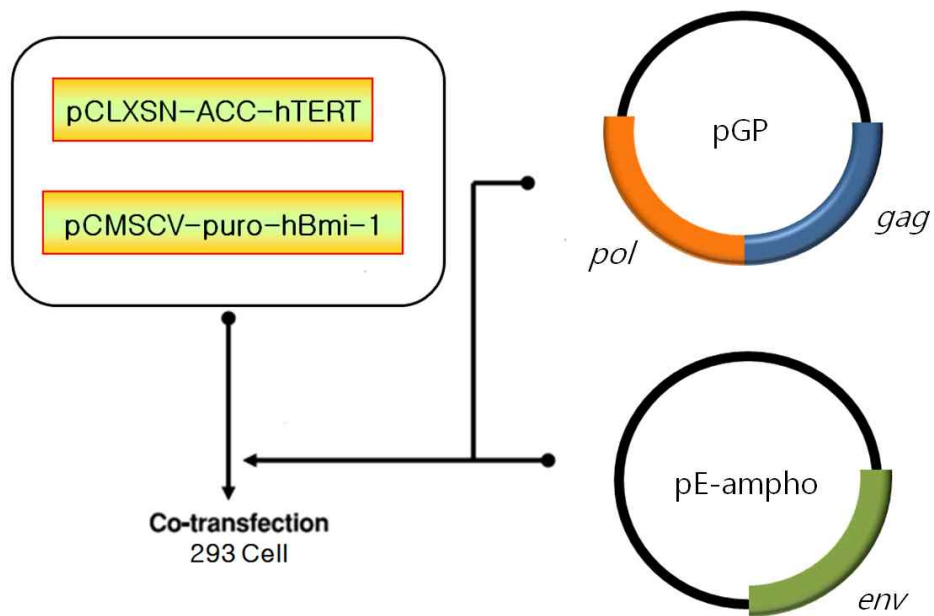


Fig. 9. Diagram of all process for retrovirus particle production. The recombinant retrovirus vector was co-transfected with pGP vector and pE-ampho vector to produce recombinant retrovirus particles.

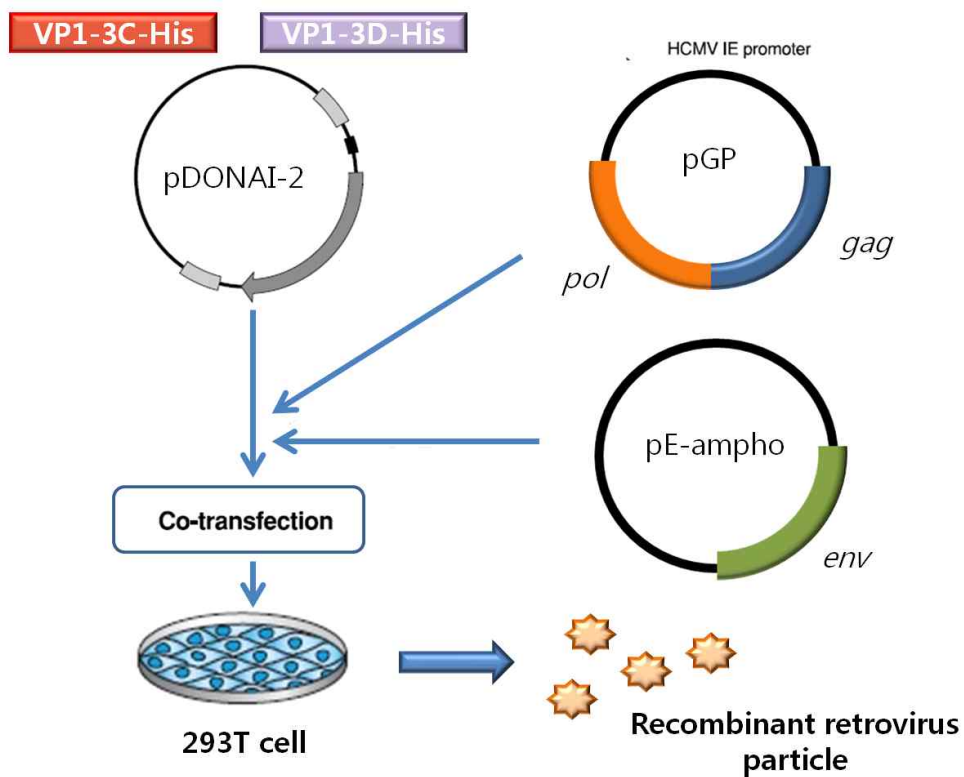


Fig. 10. Principle of the generation of recombinant retroviruses. Schematic diagram of recombinant retrovirus particles for producing cells expressing recombinant proteins VP1-3C and VP1-3D.

2-9 Telomerase 발현 세포의 cloning

Telomerase가 발현되는 세포를 선별하기 위해 G418 (geneticin)을 배지에 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 첨가하고 매일 G418이 첨가된 배지로 갈아주면서 2주일 정도 배양하였다. 생존한 세포는 G418 농도를 반으로 줄인 배지에 배양하며 불멸화 여부를 확인하였다.

2-10 세포배양 가능 계대수의 측정

세포를 계대배양하여 30대 이상 계대가 가능한지 알아보지 위하여, 대수증식기로부터 접촉에 의한 증식저해까지 2일 간격으로, 한번에 3개의 well씩 검사하였고 대수 증식기 이후 confluent상태로 되기까지 증식곡선을 확인하였다. 각각의 well에 1×10^3 개의 세포를 6-well plate 6개에 분주 하고 1일, 2일, 4일, 6일, 8일, 10일 그리고 12일에 세포를 수거하여 PBS로 세척한 후 crystal violet 염색을 하여 세포수를 측정하였다.

세포의 증식능력을 검사하기 위하여 tritium 표지 thymidine을 취득한 세포를 scintillation counter로 방사능을 측정하였다. T25 세포배양용 flask 2개를 4시간 배양하여 배양액을 교환하고 세포증식 자극제(Epidermal growth factor: GIBCO, USA)를 0.01 ml 추가하고 1시간 배양한 후 tritium 표지 thymidine (0.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$)을 첨가하여 4~24시간 배양하였다. 아이스에서 1% NaN₃ 0.01 ml 추가해 반응을 정지시키고, PBS로 2번 세척한 후 0.2 N NaOH 0.5 ml로 세포를 용해시켰다. 5분 뒤 용해 세포액을 시험관으로 옮기고, 0.5 ml의 0.2 N NaOH 용액으로 세척하여(well에 남은 세포 회수) 시험관에 추가한 후 2 N 염산 0.2 ml로 중화시켰다. 5% TCA 0.15 ml를 첨가해 4°C에서 30분 정치하여 침전 시키고 상층액을 제거하였다. 이후, 침전물을 5% TCA로 부유한 뒤 300 × g에서 3분간 원심분리하였다. 침전물을 글라스필터에 옮기고 5% TCA에 2번, 그리고 에틸알콜과 아세톤을 이용하여 차례로 세척하였다. 글라스필터를 vial에 넣고 10 ml의 scintillation 각테일을 첨가한 뒤 베타카운터에서 측정하였다.

2-11 Telomerase 발현양상 조사

불멸화 과정을 거친 세포들을 5세대별로 나누어 telomerase 발현양상을 TRAPeZe[®]RT Telomerase Detection Kit, FAM detection (Chemicon international, USA)을 사용하여 Real-Time PCR (iQ5 Real-Time PCR Detection System, Bio-rad, USA)을 실시하였다. 각각의 제작된 세포를 1×10^6 개씩 5세대 별로 준비하고, TSR8 quantitation control, 1000 cell equivalents of telomerase positive extract control, minus telomerase control, no template control (NTC), 및 experimental sample control을 제작 하여 Real-time PCR을 실시하였다. 샘플당 3회의 Real-time PCR을 수행하여 평균값을 계산하였다. Real-Time PCR을 위한 디자인은 Table 3과 같다. 아래의 공식을 이용하여 copy number를 측정하여 plasmid DNA의 정량분석을 하였다.

$$\text{Copi}/\mu\text{l} = [6.02 \times (\text{copy}/\text{mol}) \times \text{amount}] / [\text{length}(\text{bp}) \times (\text{g}/\text{mol}/\text{bp})]$$

Table 3. Real-time PCR assay design for the telomerase detection

	well 1	well 2	well 3	well 4
A	TRS8 ^a 40 amoles	Sample 1	Sample 1 Heat Treated	Sample 1 +TSK ^b
B	TRS8 4 amoles	Sample 2	Sample 2 Heat Treated	Sample 2 +TSK
C	TRS8 0.4 amoles	Sample 3	Sample 3 Heat Treated	Sample 3 +TSK
D	TRS8 0.04 amoles	Sample 4	Sample 4 Heat Treated	Sample 4 +TSK
E	Positive Extract ^c	Sample 5	Sample 5 Heat Treated	Sample 5 +TSK
F	Minus telomerase control	Sample 6	Sample 6 Heat Treated	Sample 6 +TSK
G	NTC ^d	Sample 7	Sample 7 Heat Treated	Sample 7 +TSK
H		Sample 8	Sample 8 Heat Treated	Sample 8 +TSK

^a Control template, TRS8 is an oligonucleotide with a sequence identical to the TS primer extended with 8 telomeric repeats AG (GGTTAG)

^b Inhibition/normalization control, 0.2 amole/ μ l TSK template

^c Telomerase positive cells (10^6 cells)

^d No template control

Three samples for each were produced and polymerase chain reaction was performed to calculate the average values.

2-12 배양특성과 형태 관찰 및 마이코플라즈마 감염검사

세포를 계대배양하면서 상피세포의 형태 유지, contact inhibition 현상, 복층 (multi-layer)으로 증식하는 현상 등이 있는지를 관찰하여 세포가 암세포화 되었는지 그리고 상피세포의 특성을 유지하는지를 여부를 확인하였다. 불멸화된 세포의 마이코플라즈마 감염여부는 PCR kit (Mycoplasma PCR detection kit. iNtRON, Korea)으로 확인하였다.

2-13 면역형광염색

제작된 불멸화 세포주가 섬유아세포가 제거된 상피세포임을 확인하기 위하여 cytokeratin과 fibronectin의 발현을 확인하였다. 12-well 세포배양용 plate의 각각의 well에 acetone과 3-aminopropyl-triethoxysaline이 코팅된 커버글라스를 바닥에 넣은 후 불멸화를 거치지 않은 초대배양세포와 불멸화 이후 45세대인 신장 세포를 계대하고 48시간 동안 배양하였다 (5% CO₂, 37°C). 배양된 세포의 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. 세척 후 4% paraformaldehyde로 10 분 동안 처리하고 1% BSA가 첨가된 PBS로 3회 세척하였다. 0.25%의 triton X-100이 첨가된 PBS로 10분간 처리하고 PBS로 3회 세척하였다. 0.2% BSA로 30분 동안 blocking을 하고 1차 항체로 1:100으로 희석시킨 anti-cytokeratin 18 antibody (Abcam®, USA)를 상온에서 2시간 동안 반응시켰고 1:200으로 희석시킨 anti-fibronectin antibody (Abcam®, USA)는 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 PBS로 3회 세척하고 2차 항체로 1:100으로 희석시킨 mouse anti IgG FITC (Abcam®, USA)를 45분 동안 상온에서 처리한 후 PBS로 3회 세척하였다. 세척 후에 1:3000으로 희석시킨 DAPI를 10분간 처리하여 핵을 염색한 후 PBS로 1회 세척하고 Prolong® gold antifade reagent (Sigma, USA)로 mounting 하여 형광현미경으로 관찰하였다(64).

3. 결 과

3-1 초대배양 세포의 계대수 측정

세포의 증식능력을 검사하기 위하여 각각 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 세대에 배양되고 있는 세포를 대상으로 tritium 표지 thymidine을 취득하게 하고 scintillation counter로 방사능을 측정하였다. 소 유래와 돼지 유래 세포의 경우 초대배양 세포는 15세대 이후부터는 분열을 하지 않았다(Fig. 11, Fig. 12). 소 유래 세포주 중에서 가장 분열 증식이 높았던 세포주는 JNUBK-3과 JNUBK-4 세포주로 JNUBK-3 세포주가 가장 높은 수치를 보였다(Fig. 11). 돼지 유래 세포의 경우 JNUSK-2 세포주가 가장 높은 수치를 보였으나 JNUSK-1a와 JNUSK-1b는 각각 20세대와 25 세대 이후에는 거의 분열하지 않았다(Fig. 12).

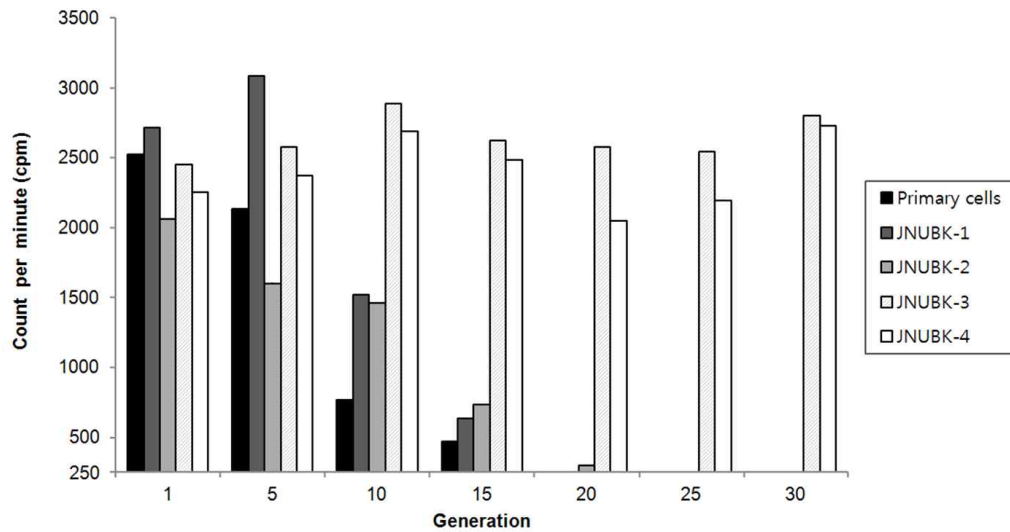


Fig. 11. The ability of cell division of immortalized bovine kidney cell lines and primary cultured cell. Among bovine cell lines, cell lines whose proliferation was active until the 30th generation were JNUBK-3 and JNUBK-4 cell lines. JNUBK-1 cell lines showed the highest cell division ability in the first and the fifth generations but their ability to divide rapidly decreased in the 10th generation and they did not divide after the 15th generation. The division speed of JNUBK-2 cell lines slowly went down and they did not proliferate from the 20th generation.

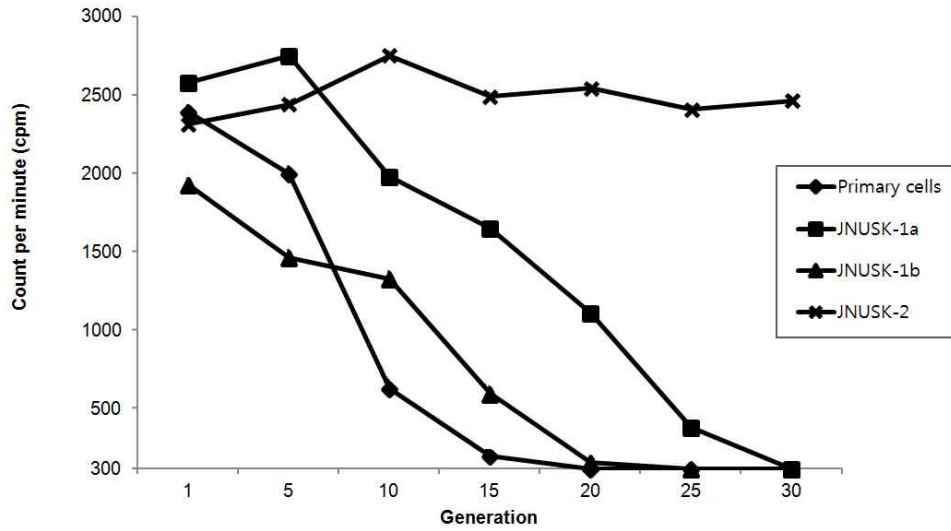


Fig. 12. The ability of cell division of immortalized porcine kidney cell lines and primary cultured cell. In the case of porcine cell lines, JNUSK-2 cell lines showed high division ability until the 30th generation. The division ability of primary cultured cells and JNUSK-1a cell lines continued to decrease from the 1st generation and they did not divide from the 20th generation. JNUSK-1b cell lines had the highest division ability in the 1st and 5th generations but their division ability continued to decrease from the 10th generation and they did not divide the 25th generation.

3-2 섬유아세포 제거를 통한 초대상피세포의 선별

초대배양한 후 계대수와 배양 시간에 따른 섬유아세포의 제거 효율을 실험하였다. 초대배양의 계대수가 증가하면서 섬유아세포가 제거되는 비율은 점점 감소하였다. 초대배양 세포를 4회 계대할 때 까지는 섬유아세포의 제거율이 높지만 8번 계대를 한 장기들은 50% 이하의 제거율을 보였다. 계대수가 4회 이하의 경우는 Na_2EDDA 를 처리하고 현미경으로 관찰하면 Fig. 13의 B 사진에서 보는바와 같이 섬유아세포의 세포질이 빠르게 수축하여 서로 엉겨 붙는 모습을 관찰 할 수 있었다. 초대배양세포를 24시간 배양 후 100%의 단층이 형성되도록 배양하고, 배양 24~48시간 사이에 0.01% Na_2EDDA 로 3분간 처리를 하면 섬유아세포의 세포질은 50% 정도 수축을 하게 되고 배양용기를 가볍게 쳐 주어도 배양용기에서 박리가 되지 않는 상태가 된다. 이때 trypsin/EDTA를 일반 세포계대 시 사용하는 양과 농도로 약 15~30초간 36℃에서 처리를 하고 trypsin/EDTA 처리가 끝나면 곧바로 배양용기에 가볍게 충격을 주면 섬유아세포가 박리되는데, 10% FBS가 함유된 DMEM을 첨가하여 세척을 하고 흡인하여 배지를 제거하면 섬유아세포의 70%~90%를 제거할 수 있었다.

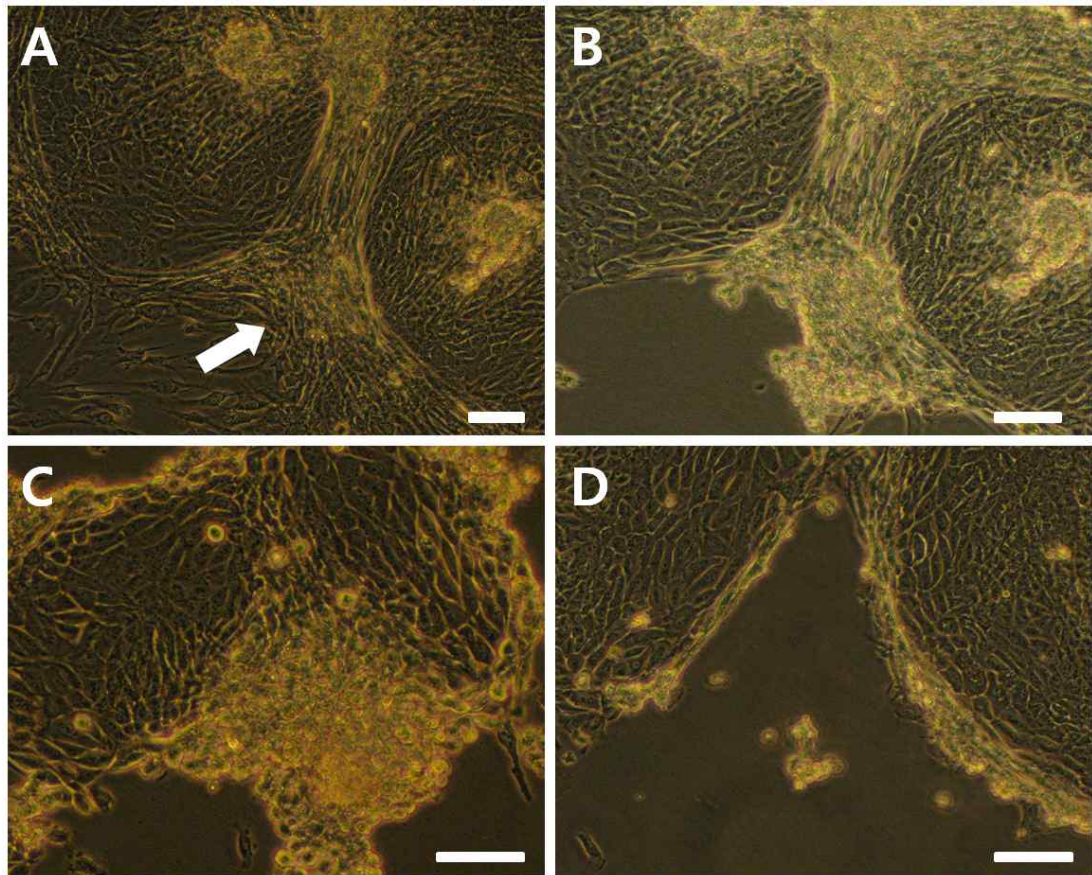


Fig. 13. Separation of fibroblasts from epithelial cells by treating with Na_2EDDA . Appearance of fibroblasts removed by Na_2EDDA treatment. A: Mixed cells right before Na_2EDDA treatment and the arrow indicates fibroblast clustering between epithelial cells. B: Contracted cytoplasm of fibroblasts thirty seconds after Na_2EDDA treatment. C: Fibroblasts were detaching from the bottom of flask 50 seconds after Na_2EDDA treatment. D: Epithelial cells attached on the surface of flask with a few fibroblasts after Na_2EDDA treatment. Scale-bar: $40\ \mu\text{m}$.

3-3 레트로 바이러스 벡터의 확인

초대배양세포를 불멸화하기 위한 레트로 바이러스 벡터를 제한효소를 사용하여 확인하였다(Fig. 14). 제작된 pCLXSN-ACC-hTERT 벡터를 *Xba* I과 *Hind* III를 이용하여 절단하고 전기영동을 통하여 확인하였다. pCMSCV-puro-hBmi-1 벡터는 *Bam*H I 제한효소와 *Cla* I 제한효소를 사용하였다. 그 이외에 *Xcm* I, *Afl* II, *Eco*R I, *Cla* I, *Nde* I 그리고 *Xho* I 제한효소를 사용하여 1~3부분을 절단하여 벡터의 제작을 확인 하였다.

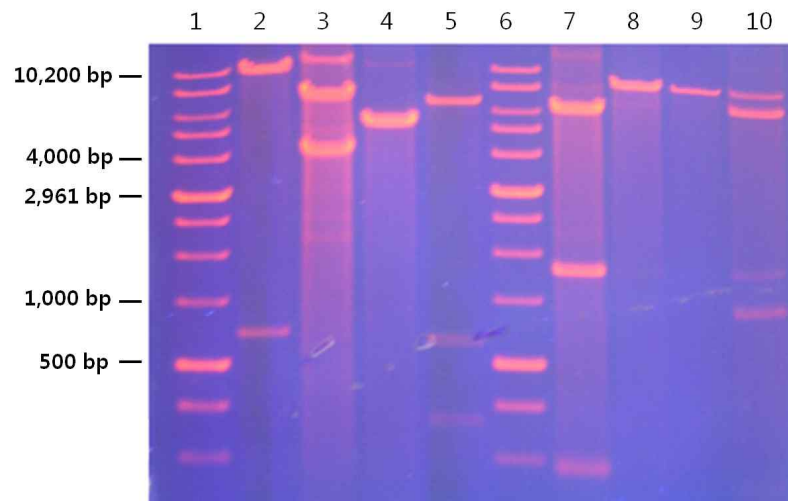


Fig. 14. PCR detection of retrovirus vector. lane 1: 1 kbp DNA Marker (BioNEER, Korea), lane 2: hTERT (*Xba* I, *Hind* III), lane 3: hTERT (*Xcm* I, *Xba* I), lane 4: hTERT (*Afl* II, *Xba* I), lane 5: hBmi-1 (*Cla* I, *Hind* III), lane 6: 1 kbp DNA Marker (BioNEER, Korea), lane 7: hBmi-1 (*Eco*R I, *Cla* I), lane 8: hBmi-1 (*Bam*H I, *Cla* I), lane 9: hBmi-1 (*Xba* I), lane 10: hBmi-1 (*Nde* I, *Xho* I).

3-4 불멸화 세포의 선별과 세포의 cloning

불멸화세포를 선별하기 위해 매일 G418이 첨가된 배지로 갈아주면서 2주일 정도 배양을 지속하였다. 살아남은 세포는 G418 농도를 반으로 줄인 배지를 이용하여 배양하면서 불멸화 여부를 확인하였다. 불멸화가 확인된 세포는 세포의 성장특성과 모양을 기준으로 장기별로 세포 type을 구별하여 cloning하였다. 세포를 계대배양하면서 상피세포의 모양 유지, contact inhibition 현상, 복층(multi-layer)으로 증식하는 현상 등이 있는지를 관찰 하여 세포가 암세포화 되었는지 그리고 상피세포의 특성을 유지하는 지를 확인 하였다. Fig. 16의 그림 A는 소 신장유래 상피 세포인 JNUBK-3 세포주의 모습으로 세포질이 큰 세포와 세포질이 작은 세포가 섞여 있었다. 그림 B는 소 유래 세포인 JNUBK-4 세포주이고 중간 크기의 세포질을 가지는 세포들로만 이루어져 있는 것을 확인할 수 있었다. 그림 C는 돼지 유래 세포인 JNUSK-1a 세포주의 모습으로 크기가 작은 세포질로만 이루어져 있었다. 그림 D는 돼지 유래인 JNUSK-2 세포주의 모습으로 크기가 매우 큰 세포질로만 이루어져 있었으며, JNUSK-1a와 비교하면 세포질의 크기가 2배정도 큰 것을 확인할 수 있었다.

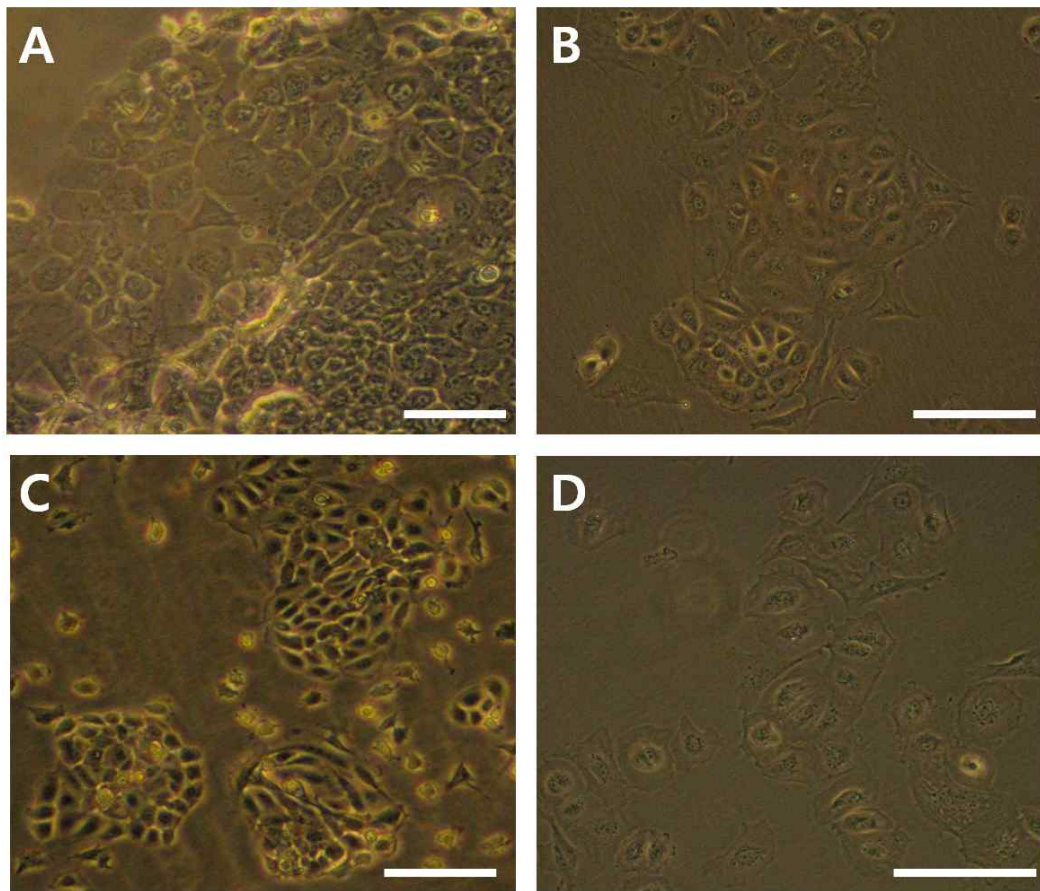


Fig. 15. Immortalized primary epithelial cell lines. A: The appearance of JNUBK-3. Cells with large cytoplasm and those with small cytoplasm are mixed. B: The appearance of JNUBK-4 cell lines. They are composed of cells with middle-sized cytoplasm only. C: The appearance of JNUSK-1a cell lines. They are composed of cells with small-sized cytoplasm only. D: The appearance of JNUSK-2 cell lines. They are composed of cells with large-sized cytoplasm only. Their cytoplasm was twice larger than those of JNUSK-1a cell lines. Scale-bar: 40 μ m.

3-5 Telomerase 발현양상 조사

Telomerase의 발현양상을 확인결과 소와 돼지 모두 초대배양 세포의 telomerase 양이 가장 낮게 나왔으며 소유래 세포주의 경우 JNUBK-3 세포주가 25세대까지 telomerase를 우수하게 발현 하였고, 돼지 세포주의 경우 JNUSK-2가 가장 많은 telomerase를 발현 하였다. JNUSK-1a와 JNUSK-1b의 경우 초대배양 세포와 비슷한 수준의 발현양상을 나타냈다. 3번 반복 실험 결과 cycle threshold (Ct) 값은 거의 동일하게 나와서 재현성이 확인되었다.

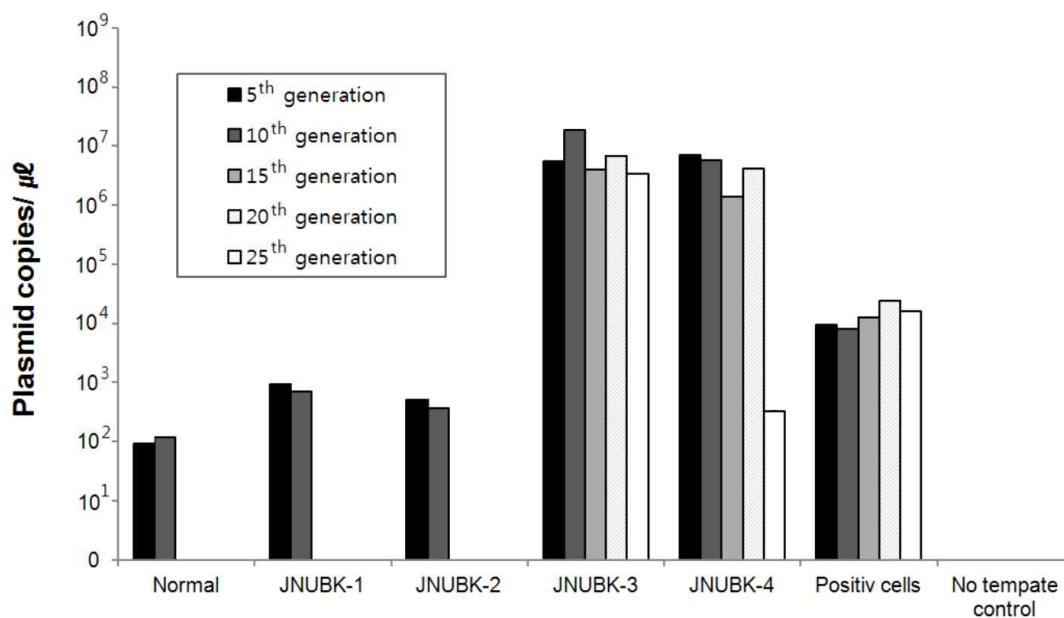


Fig. 16. Real-time PCR analysis of telomerase expression in primary cultured cells and immortalized primary bovine epithelial cell lines. In the 5th and 10th generations, telomerase expression of JNUBK-3 and JNUBK-4 cell lines was twice higher than that of JNUBK-1 and JNUBK-2 cell lines. JNUBK-1 and JNUBK-2 cell lines did not divide from the 10th generation, therefore measurement was not taken from the 15th generation. JNUBK-3 and JNUBK-4 cell lines showed high telomerase expression until the 25th generation.

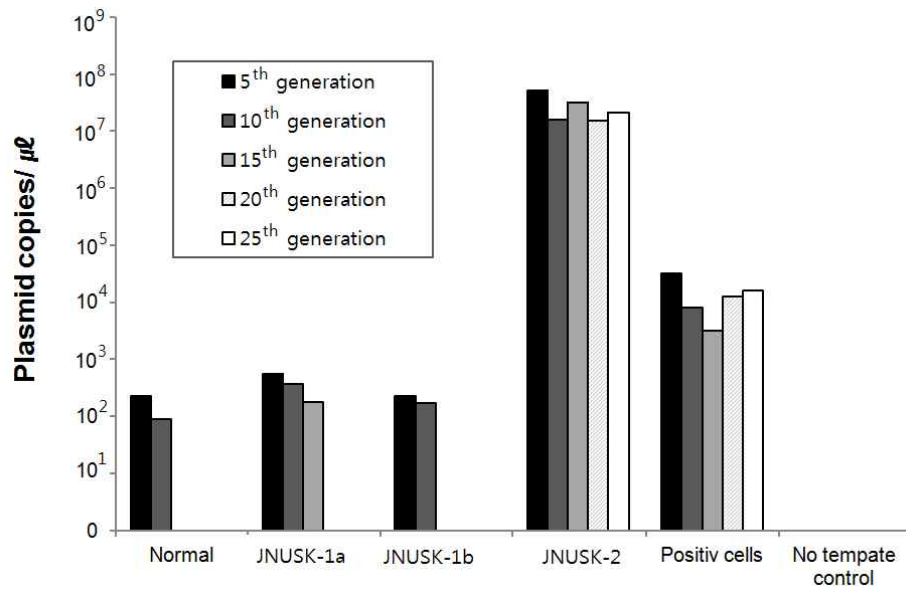


Fig. 17. Real-time PCR analysis of telomerase expression in primary cultured cells and immortalized primary porcine epithelial cell lines. JNUSK-2 cell lines showed the highest telomerase expression from the 5th to the 25th generation.

3-6 배양특성과 형태 관찰 및 마이코플라즈마 감염검사

제작된 세포주 들은 세대수가 증가하여도 상피세포의 형태를 잘 간직하였으며, 복층으로 자라는 모습은 관찰되지 않았다. 불멸화된 세포의 마이코플라즈마 감염 여부를 PCR kit (Mycoplasma PCR detection kit. iNtRON, seoul, Korea)을 통하여 확인한 결과 모두 음성으로 나왔다 (Fig. 18).

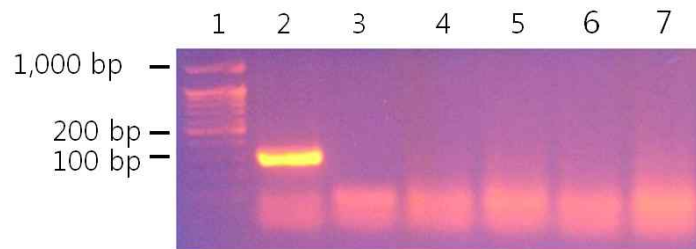


Fig. 18. PCR analysis of *Mycoplasma* contamination in established cell lines. lane 1: 100 bp DNA marker (TAKARA, Japan), lane 2: positive control, lane 3: negative control, lane 4: JNUBK-3 cell lines, lane 5: JNUBK-4 cell lines, lane 6: JNUSK-1 cell lines, lane 7: JNUSK-2 cell lines.

3-7 면역형광염색

제작된 불멸화 세포주가 상피세포임을 확인하기 위하여 cytokeratin과 fibronectin의 발현을 확인하였다(Fig. 19). 초대배양 세포를 fibronectin으로 염색한 결과 약 40%의 세포만 fibronectin을 분비하는 것을 확인할 수 있었다. 섬유아세포를 제거한 JNUBK-3와 JNUBK-4 세포주를 cytokeratin으로 염색한 결과 90% 이상의 세포에서 cytokeratin을 분비하는 것을 확인 하였다. 유전자 도입 이후 15세대인 JNUSK-2 세포주와 35 세대인 JNUSK-2를 cytokeratin으로 염색한 결과 세대수가 증가하여도 계속하여 cytokeratin이 분비되는 것을 확인하였다. 이는 섬유아세포의 제거가 잘 되었다는 직접적인 증거가 될 수 있을 것으로 사료된다.

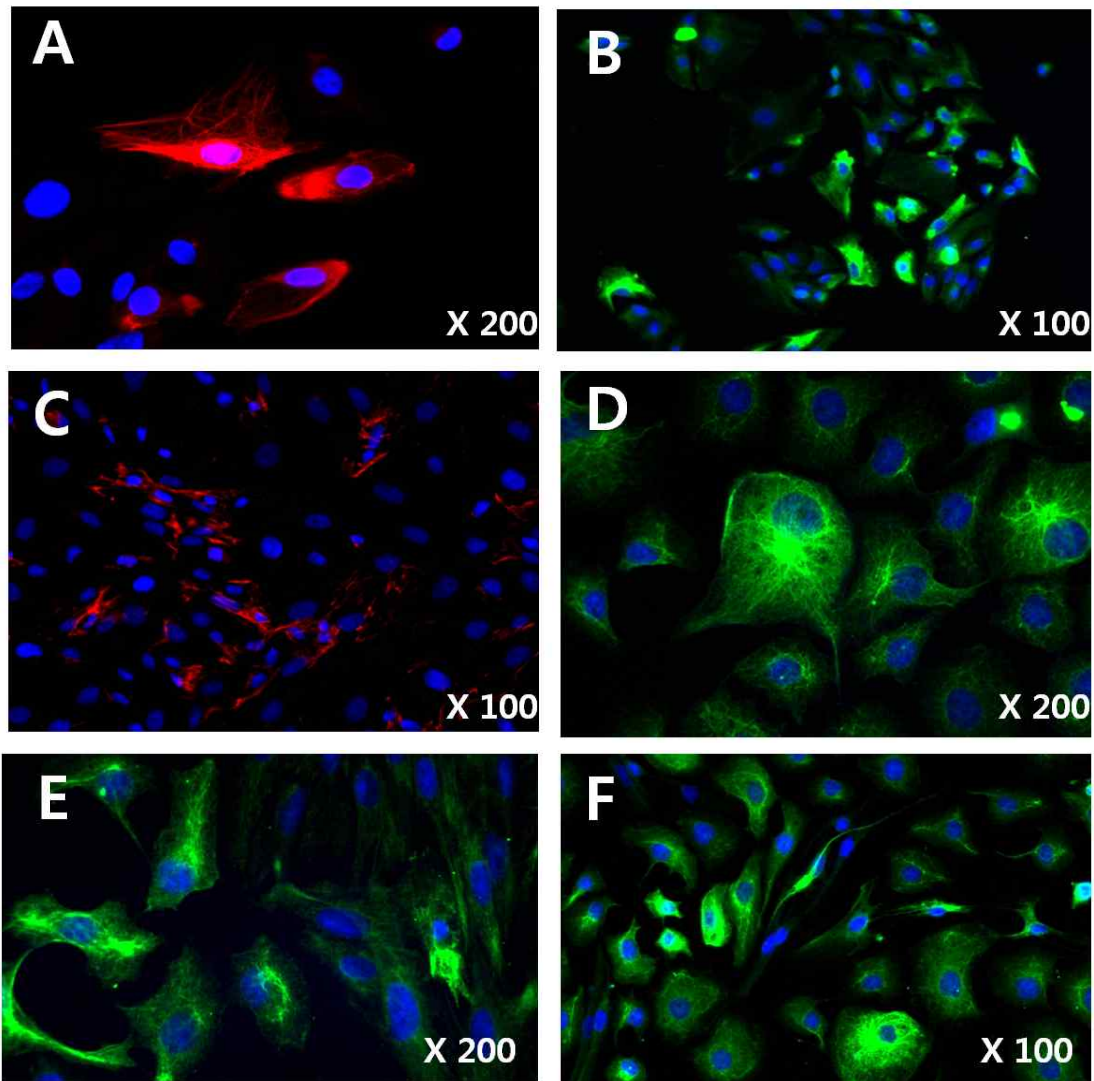


Fig. 19. Immunofluorescence analysis of cytokeratin and fibronectin in established cell lines. A: Primary cultured cell lines with the fibroblast cells, only a part of cells produced fibronectin (red color), B: The expression of cytokeratin (green color) in JNUBK-3 cell line, C: The expression of fibronectin in JNUBK-3 cell line (red color), D: The expression of cytokeratin (green color) in JNUBK-4 cell line, E: The expression of cytokeratin (green color) in JNUSK-2 cell line (15 generation), F: The expression of cytokeratin (green color) in JNUSK-2 cell line (35 generation).

3-8 재조합 유전자의 발현 확인

재조합 레트로 바이러스 입자를 불멸화 된 세포주에 접종을 하고 배양을 하였다. 배양된 세포주에서 유전자를 추출하고 PCR을 수행하여 VP1-3C와 VP1-3D 유전자의 발현을 전기영동을 통하여 확인하였다. 약 1 kbp의 VP1-3C와 약 1.5 kbp의 VP1-3D의 발현을 확인 할 수 있었다(Fig. 20).

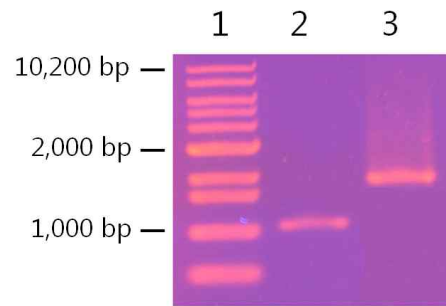


Fig. 20. PCR detection of recombinant proteins. lane 1: 1 kbp DNA marker (BioNEER, Korea), lane 2: The recombinated VP1-3C gene was identified about 1 kbp, lane 3: The recombinated VP1-3D gene was identified about 1.5 kbp.

4. 고 찰

현재 우리나라에서 사용하고 있는 구제역 백신은 구제역 바이러스를 대량 배양하여 불활화 시킨 다음 농축 및 정제 과정을 거친 바이러스 항원과 오일성분의 adjuvants를 혼합시킨 불활화 오일 백신이다(7). 현재 사용하고 있는 불활화 백신을 생산하기 위해서는 살아있는 구제역 바이러스의 배양이 필수적이기 때문에 생산비용이 높고 바이러스의 유출 위험이 항상 존재한다. 따라서 안전하고 적은 비용으로 생산이 가능한 구제역 백신을 개발하기 위하여 구제역 재조합 항원을 생산할 수 있는 세포주를 제작하고자 하였다.

선행 연구결과(64)를 바탕으로 소와 돼지 태아의 신장에서 상피세포만을 초대배양 하였다. 초대배양한 세포주의 증식능력을 검사한 결과 소유래 세포주에서는 JNUBK-3 세포주가(Fig. 11), 돼지유래 세포주에서는 JNUSK-2 세포주가(Fig. 12) 세대수가 증가하여도 높은 증식능력을 보유하고 있었다. 초대배양된 세포주에서 Na₂EDDA를 사용하여 효과적으로 섬유아세포를 제거할 수 있었다(Fig. 13). 이는 섬유아세포에서 세포간 결합의 가장 큰 비중을 차지하는 Ca²⁺결합을 Na₂EDDA를 이용하면 효과적으로 저해 할 수 있다(61)는 보고와 같은 결과이다. 더불어, 섬유아세포는 상피세포에 비해 초기 부착을 위해 많은 FBS를 필요로 하지만 상피세포는 적은 양의 FBS 만으로도 충분히 부착이 가능하다는 연구보고가 있다(64, 65). 따라서 2% FBS가 함유된 배지를 이용하여 배양한 후 Na₂EDDA를 처리한 결과 보다 효율적으로 섬유아세포를 제거할 수 있었다.

hTERT 유전자를 삽입할 수 있는 재조합 레트로 바이러스 입자를 제작하고 초대배양된 세포주에 감염을 시켜서 세포의 불멸화를 시도하였다. G418을 이용하여 성공적으로 유전자가 도입된 세포주 만을 선별하고 telomerase 발현양상을 Real-Time PCR을 통하여 확인한 결과 소유래 세포주의 경우 JNUBK-3 세포주가 25세대까지 telomerase를 우수하게 발현 하였고(Fig. 17), 돼지 세포주의 경우

JNUSK-2가 가장 많은 telomerase를 발현 하였다(Fig. 17). 이와 같은 telomerase 발현양상의 결과는 초대배양한 세포주의 증식능력 검사 결과와 일치하는 것으로 레트로 바이러스의 특징이 분열하고 있는 세포에만 감염 된다는 보고(39, 40)와도 연관이 있으리라 사료가 된다. 최종적으로 제작된 불멸화 세포주가 상피세포임을 확인하기 위하여 cytokeratin과 fibronectin의 발현을 확인한 결과 섬유아세포를 제거한 JNUBK-3와 JNUBK-4 세포주 그리고 JNUSK-2 세포주에서 cytokeratin의 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 19).

불멸화된 세포주에 VP1-3C와 VP1-3D의 재조합 유전자를 전달할 수 있는 재조합 레트로 바이러스 입자를 감염시킨 후에 전기영동을 통하여 확인 하였다. 재조합 단백질인 VP1-3C와 VP1-3D의 유전자 발현을 확인한 결과 각각의 세포에 성공적으로 유전자가 삽입된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 20).

결과적으로 새로 제작된 세포주는 불멸화가 되었으며 각각의 세포주는 VP1-3C와 VP1-3D를 생산한다는 것을 확인하였다. 제작된 세포주를 이용하면 구제역 백신 연구에 많은 도움이 될 것이라고 판단이 된다. 구제역 재조합 백신의 개발에 있어 중요한 요소 중 하나는 재조합 단백질을 고역가로 생산할 수 있는 세포주의 확보라 할 수 있는데, 본 연구에서 구축된 세포주는 이에 적합하다고 사료된다. 이번 연구에서 구축한 유전자 재조합 세포주 제작기술을 응용을 하면 다양한 백신개발에 사용할 수 있는 숙주세포의 개발이 가능하리라 판단된다.

제 III 장. 구제역 항원-항체 백신의 제작 및 효과 검증

1. 서 론

인류에 의하여 처음 백신이 개발된 이후 꾸준한 연구와 사용으로 인하여 천연두는 지구상에서 완전히 사라진 것으로 알려져 있다. 이처럼 질병을 예방하고 근절하기 위한 목적으로 백신의 개발은 지속적으로 이루어지고 있다. 일반적으로 백신의 종류는 제작 방법이나 항원의 특징을 기준으로 사독백신, 약독화 백신, DNA 백신, 수용체 백신 그리고 재조합 백신 등으로 나눌 수 있고, 새로운 개념의 백신으로 항원-항체 결합 백신이 있다(76). 항원-항체 결합체를 이용한 백신의 연구는 1988년 Berzofsky 등에 의하여 처음 연구가 되었다(81). 그 이후 항원-항체 결합 백신에 대한 연구가 거의 이루어지지 않다가, 20여년이 지난 1994년에 Celis 등에 의하여, hepatitis B (HB)에 감염된 IgG가 항원제시세포의 내부로 들어가 hepatitis B surface antigen (HBsAg)의 양을 증가시킨다는 것이 확인되었다. 또한, 이 백신은 결과적으로 T 세포와 IFN- γ 의 생산을 증가시켰다. 이후에 치료 백신으로 항원-항체 결합체의 치료 효과 및 메커니즘을 확인하기 위한 실험 및 연구가 진행이 되었다(82). 이처럼 항원-항체 결합 백신은 세포 매개면역(cellular immunity)에 대한 효과도 높다는 연구 결과에도 불구하고 아직까지 연구가 많이 이루어지지 않고 있다.

1960년경 세포를 대량으로 배양할 수 있는 방법이 개발됨에 따라서 숙주세포를 이용한 구제역 바이러스의 대량 배양이 가능하게 되면서 본격적인 구제역 백신이 생산되었다(10). 그 후 1970년대에는 구제역 바이러스의 중요한 항원 부위인 VP1에 대한 연구가 많이 이루어졌다(83). 현재 구제역 백신은 DNA 백신, 전달 수용체 백신, 면역 보강제를 이용한 백신 그리고 식물 및 식물바이러스를 이용한 백신 등 다양한 방법으로 연구되고 있다(13). 이렇게 구제역 백신에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있으나 아직까지 불활화 백신을 대체할 정도의 효과와 경제성을 두루 갖춘 백신의 개발은 이루어지지 않고 있다(7, 13).

한국에서 구제역 백신의 사용은 2010-2011년 전국적인 구제역 발생 이후에 정부의 적극적인 구제역 백신 접종 정책에 의하여 시작이 되었으며, 중앙정부가 백신을 수입하여 공급하였다. 현재는 녹십자, 중앙백신연구소, 코미팜, 대성 미생물연구소, 그리고 고려비엔피의 5개 업체가 메리알사(Merial, France)에서 원료를 공급받아 생산하고 있다(9). 따라서 현재 국내에서 생산되고 있는 구제역 백신은 국내에서 생산될 뿐이지 원료를 전량 수입에 의존하고 있어서 사실상 수입품이다. 따라서 수입을 대체할 수 있는 새로운 백신 개발이 시급하다.

앞선 연구에서 구제역 바이러스의 다양한 항원을 대량으로 발현할 수 있는 항원 발현 세포주를 개발하였다(제 II 장). 개발된 항원발현 세포주를 이용하여 구제역 제조항원을 대량으로 생산 하고, 이 항원을 돼지에 고도로 면역시켜 항원에 감작된 IgG를 분리 및 정제를 한 후에, 이 IgG를 사용하여 항원-항체 결합 백신을 제작하고자 하였다. 제 I 장에서 PEDV와 NDV의 항원-항체 결합 백신의 효과를 알아본 결과 기존의 불활화 백신보다 항체형성이 더 많이 되는 것을 확인하였다(Fig. 3, Fig. 4). 제 I 장의 결과와 다른 항원-항체 결합백신의 연구결과(78, 79)를 바탕으로 유추하면, 구제역에 대한 항원-항체 결합백신도 효과가 좋을 것으로 사료가 된다. 최종적으로, 제작된 항원-항체 백신을 돼지에 접종하여 제작된 백신의 효과를 알아보려고 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1 재조합 항원의 정제

앞의 연구 2에서 제작된 항원생산용 세포주를 대량배양 하였다. 항원 생산용 세포주를 72 시간 동안 배양한 후 배지를 수거하였다. 수거한 배지를 HisTALON Cartridges & Gravity Columns (TAKARA, Japan)을 이용하여 정제하였다. Columns을 보관액 6 ml를 사용하여 세척한 후 수거된 배지를 2 ml 첨가 하였다. 세척용 완충액 A를 6 ml 첨가하여 결합이 되지 않은 단백질을 세척하였다. 용출용 완충액 2 ml를 첨가한 후 용출되어진 VP1-3D 단백질과 VP1-3C 단백질을 수거 하였다. 수거된 재조합 단백질은 Bio-Rad 사의 Protein Assay kit을 사용하여 단백질 농도를 측정 하였다. 즉, 1 mg/ml의 BSA를 10진 희석하여 96-well plate의 각 well에 180 μ l가 되도록 분주를 하고 정제된 VP1-3C과 VP1-3D를 10진 희석하여 각 well에 180 μ l이 되도록 하였다. 각 well에 Protein Assay Dye를 20 μ l 첨가한 후 흔들어 주고, 30초 후에 plate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 농도를 구하였다.

2-2 돼지 면역

정제된 재조합 항원액인 VP1-3C와 VP1-3D을 동량의 생리식염수와 혼합한 후, 마리당 400 μ g씩 되도록 생후 8주령인 암컷 돼지의 복강에 각 시료당 4마리씩 주사 하였다. 초회 면역 후 2주일 간격으로 6주간 접종을 하였으며 마지막 최종 접종을 하고 2주 후에 혈액을 채취 하였다. 고도 면역 실험에 사용된 돼지는 landrace와 berkshire의 교잡종으로 축산과학원 제주 시험장에서 사육하였다.

2-3 돼지 IgG의 정제

VP1-3C와 VP1-3D로 면역한 후 채혈한 돼지 혈청을 Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, UK)를 이용한 affinity chromatography

를 실시하여 IgG를 분리하였다. Sepharose resin을 syringe column (16 X 80 mm)에 충전한 후, PBS (pH 7.2)로 2배 희석한 기니피그 혈청 40 ml을 flow rate가 1.0 ml/min이 되도록 하여 column에 가하였다. Protein G와 결합하지 않은 혈청 성분들은 충분한 양의 PBS로 세척하여 제거하였다. 결합된 IgG는 3 M NaSCN을 가하여 용출시켰다. 용출된 분획은 PBS로 3회 외액을 교환하며 72시간 투석하고 제균여과를 실시하였다. 정제된 IgG를 확인하기 위하여 non-reducing condition으로 SDS-PAGE 분석을 실시하였다. 정제된 IgG 분획을 10% polyacrylamide gel에 loading한 후 50 V로 15분간 영동하고, 이어서 100 V로 전압을 높인 후 bromophenol blue dye가 바닥에 도달할 때까지 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 coomassie gel staining solution으로 40분간 염색하였고 destaining solution으로 24시간 탈색하였다.

정제한 후, IgG는 Bio-Rad 사의 Protein Assay kit을 사용하여 단백 농도를 측정하였다. 즉, 1 mg/ml의 BSA를 10진 희석하여 96-well plate의 각 well에 180 μ l가 되도록 분주를 하고, 정제된 IgG를 10진 희석하여 각 well에 180 μ l이 되도록 하였다. 각 well에 Protein Assay Dye를 20 μ l를 첨가한 후 흔들어 주었다. 30초 후에 plate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 단백 농도를 구하였다.

2-4 항원-IgG 결합체 제작 및 확인

앞에서 정제된 각각의 IgG 2 mg과 각각의 항원액(VP1-3C: 10 mg, VP1-3D: 10 mg)을 생리식염수에 혼합하고 38°C에서 1시간 동안 20 rpm으로 진탕하여 결합시켰다. 진탕 종료 후 PD MiniTrapTM G-25 column (GE Healthcare, UK)을 이용하여 IgG-항원 결합체를 농축하였다. Column에 세척액을 5 ml 첨가하여 세척을 하고, 각각의 IgG-항원 결합체 2 ml를 column에 넣은 후 중력에 의하여 삼출되는 분획을 200 μ l마다 수거하여 하였다. 수거된 삼출액을 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다. Bio-rad의 MINI-PROTEIN II 기기를 사용하였으며, non-reducing condition으로 SDS-PAGE를 수행하기 위하여 buffer에 2-mercaptoethanol이나 dithiothreitol은 첨가하지 않았다. separating gel은 12%, stacking gel은 5%의 polyacrylamide gel을

사용하였다. Gel을 running tank에 장착한 후, running buffer를 채우고, 시료를 4 x sample buffer를 이용하여 전체 volume 20 μ l에 맞춘 후 100°C에서 3분간 끓인 후, well에 loading하고 bromophenol blue dye가 바닥으로 빠져나올 때까지 전기영동 (100 V) 하였다. 앞에서 제작된 VP1-3C-IgG 결합체와 VP1-3D-IgG 결합체를 각각 5 mg/ml이 되도록 4 ml를 제작하여 항원-항체 결합 백신을 제작하였다.

2-5 백신의 투여와 항체가 측정

IgG, anti-VP1-3C IgG, anti-VP1-3D IgG, VP1-3C-IgG 결합체 및 VP1-3D-IgG 결합체를 생후 2개월령의 암컷 돼지(landrace와 berkshire의 교잡종)에 투여 하였다. 투여한 용량은 마리당 1 ml (400 μ g/ml)씩 군당 각각 4마리에 접종하였다. 불활화 백신은 사용 설명서의 투여 용량에 맞추어 2 ml를 4마리에 접종하였다. 모든 투여군의 돼지에서 백신 접종 바로 전의 pre-serum과 백신 접종 1, 2, 3, 4 그리고 5주의 혈청을 대퇴정맥에서 채혈한 후 분리하였다. 분리한 혈청을 FMDV antibody detection kit (LPB ELISA kit: BDSL, UK)을 이용하여 측정 하였다. 항체역가는 LPB ELISA kit의 사용 매뉴얼에 따라서 계산하였다. 실험 결과는 평균(mean)과 표준 오차 (standard error; SE)로 나타내었으며, 실험군간의 통계학적 분석은 Student's t-test 를 사용하여 $P < 0.01$ 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정 하였다.

3. 결 과

3-1 IgG 정제와 IgG-항원 결합체 제작

FMDV 항원에 노출이 되지 않은 돼지의 전혈에서 Protein A Sepharose gel column을 이용하여 IgG를 정제하였다. 재조합 단백질인 VP1-3C와 VP1-3D 각각을 고도 면역한 후 IgG를 정제하고 SDS-PAGE를 통하여 단백질의 크기를 측정하였다. IgG의 원래 크기인 160 kDa에서 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 21).

돼지에서 고도면역 후 항원에 감작된 IgG와 각 항원을 반응 시킨 후 PD-10 column을 이용하여 정제한 VP1-3C-IgG 결합체와 VP1-3D-IgG 결합체를 SDS-PAGE를 통하여 단백질의 크기를 측정하였다. VP1-3C-IgG 결합체와 VP1-3D-IgG 결합체를 각각 확인할 수 있었다(Fig. 21).

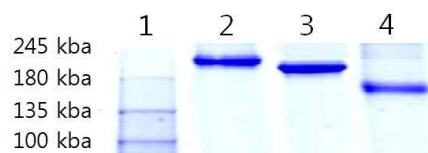


Fig. 21. SDS-PAGE profiles of IgG fraction and IgG-antigen complex purified by affinity chromatography. lane 1: size marker (SDS-PAGE analysis of protein: Rockland Immunochemicals Inc, USA), lane 2: VP1-3D-IgG complex fraction, lane 3: VP1-3C-IgG complex fraction, lane 4: IgG fraction.

3-2 항체가 측정

미감작된 IgG, 감작된 IgG, VP1-3C, VP1-3D, VP1-3C-IgG 결합체 그리고 VP1-3D-IgG 결합체를 접종 바로 전과 접종 1, 2, 3, 4 그리고 5주에 채혈하여 항체 역가를 측정한 결과는 아래에 나타내었다(Fig. 22, Fig. 23). 접종 전의 항체가를 기준으로 1주 간격으로 총 5주 동안 항체가의 변화를 측정한 결과, 미감작된 IgG와 감작된 IgG를 접종한 그룹에서는 유의한 항체가의 변화를 확인할 수 없었다.

VP1-3C를 접종한 경우 접종 1주 후부터 꾸준히 항체가가 증가하여 4주와 5주에는 약 240%의 항체가 상승이 관찰되었다. VP1-3D를 접종한 경우도 꾸준한 항체가의 상승이 관찰되었으며 4주 후에는 약 180%의 상승을 보였고 측정 최대 기간인 5주까지 약 200% 수준으로 일정한 항체가의 상승을 확인할 수 있었다. VP1-3C-IgG 결합체를 접종한 경우 접종 4주 후에 약 260%의 상승을 보였으며 5주까지 지속적인 항체가의 상승을 확인하였다. 5주의 기간 동안 최대치는 약 310%로 나타났다. VP1-3D-IgG 결합체를 접종한 경우 접종 후 4주차에 약 320%의 항체가 상승이 확인되었고, 그 이후로 5주까지는 약 340%의 항체가 상승을 확인하였다. 결과 적으로 VP1-3D-IgG 백신이 가장 높은 항체가를 나타내었다.

VP1-3C와 VP1-3C-IgG를 각각 투여한 후 주차별 항체가의 변화를 살펴본 결과 투여 2주차 이후부터 유의성을 가지고 VP1-3C-IgG의 항체가가 더 높았다($p < 0.01$, Fig. 22-A). 또한, VP1-3D와 VP1-3D-IgG를 각각 투여한 후 주차별 항체가의 변화를 살펴본 결과 투여 2주차 이후부터 유의성을 가지고 VP1-3D-IgG의 항체가 비율이 더 높았다($p < 0.01$, Fig. 22-B). 대조군인 IgG⁻와 IgG⁺를 투여한 경우와 실험군인 VP1-3C, VP1-3C-IgG, VP1-3D 그리고 VP1-3D-IgG를 투여한 경우를 각각 비교한 결과 실험군에서 모두 유의한 항체가의 상승을 보이는 것으로 나타났다($p < 0.01$, Fig. 22).

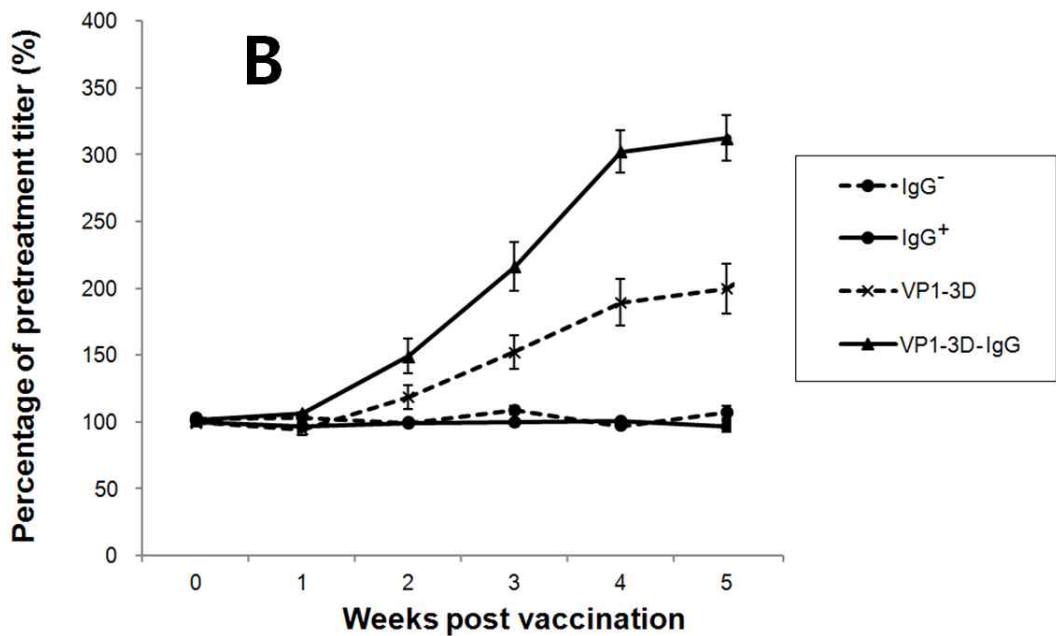
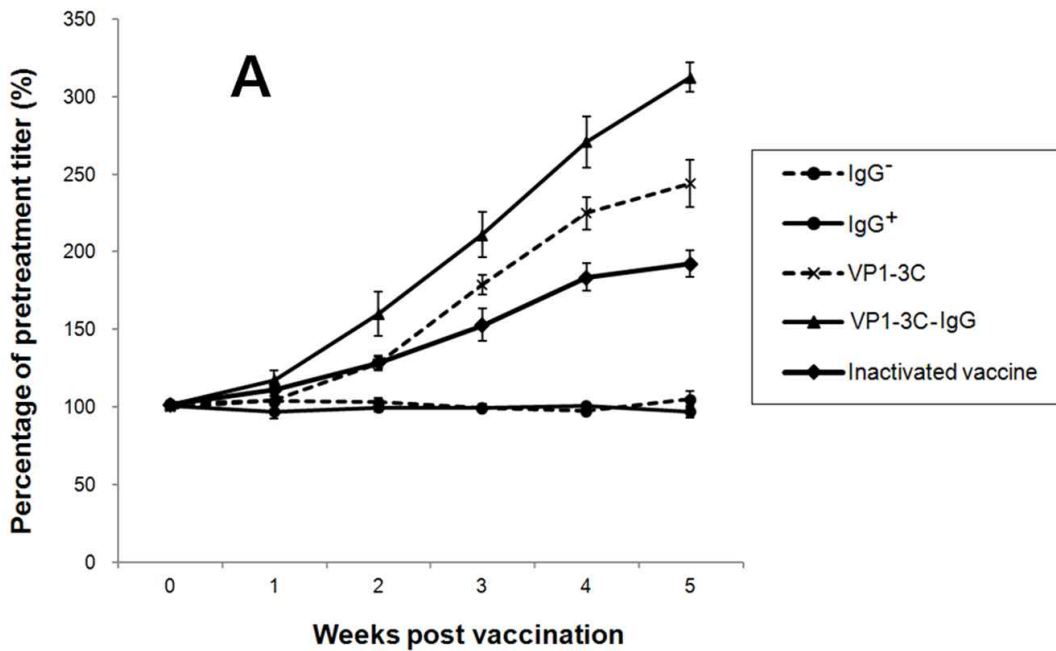


Fig. 22. Serial changes in antibody titers against FMDV antigens. Titers obtained before vaccination and at 1, 2, 3, 4, 5 and 6 weeks after the inoculation are expressed as percentages of pretreatment titer measured by ELISA. (A): After

inoculation with the VP1-3C-IgG antigen, the maximal antibody level during the period of five weeks stood at about 300%. The antibody level was elevated to about 260% four weeks after the inoculation and continuously increased until the 5th week. (B): After inoculation with the VP1-3D-IgG antigen, the antibody level rose to about 300% in the 4th week and increased up to about 330% until the 5th week. Results are reported as means \pm standard error (S.E.). Results were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student's t-test, and $p < 0.01$ was considered statistically significant.

4. 고 찰

시험관 내에서 항원-항체반응을 유도하면 최대량의 항원-항체 결합체가 신속하게 형성되며, 서로 결합하지 않은 항원이나 항체가 거의 남지 않는 영역이 존재하게 된다. 이 영역에서의 항원과 항체의 농도비를 최적비(optimal ratio)라고 한다. 반면, 항원이나 항체가 상대적으로 너무 많이 존재하면 반응이 억제됨으로써 항원-항체 결합체의 형성이 감소하는데 이를 지대현상(zone phenomenon)이라고 한다(84). VP1-3C와 VP1-3D를 각각에 감작된 IgG와 섞어서 VP1-3C-IgG 결합체와 VP1-3D-IgG 결합체를 제작하고 SDS-PAGE를 통하여 확인을 하였다(Fig. 21). 항원-항체 결합체의 형성이 확인된 것으로 미루어 보아 농도의 불균형에 따른 지대현상은 많지 않았던 것으로 생각되어 진다. 하지만 항원이나 항체의 소실 없이 효율적으로 항원-항체 결합체를 제작하기 위해서는 추가적인 실험을 통하여 최적비를 찾아야할 것으로 사료된다.

미감작된 IgG, 감작된 IgG, VP1-3C, VP1-3D, VP1-3C-IgG 결합체 그리고 VP1-3D-IgG 결합체를 돼지에 각각 투여한 후에 1주씩 항체가의 변화를 측정할 결과는 Fig. 22와 같다. 미감작된 IgG와 감작된 IgG를 접종한 그룹에 대한 총 5주 동안의 항체가 변화를 측정할 결과 유의한 변화는 확인할 수 없었다. 이는 동종의 IgG를 접종하였기 때문에 IgG 자체의 면역 반응은 없었던 것으로 당연한 결과로 생각되어 진다. 또한, 미감작된 IgG와 감작된 IgG를 서로 비교하면 둘 다 항체가 비율에 변화가 없었다. 따라서 항원이 없는 상태에서 IgG 자체가 항원에 감작된 여부와 항체가의 변화 사이에는 상관이 없다는 것을 시사한다.

현재 사용하고 있는 불활화 백신과 VP1-3C-IgG 백신의 항체가 비율을 비교한 결과 모든 주차에서 VP1-3C-IgG 백신이 더 높은 항체가 비율을 보였다(Fig. 22-A). 재조합 백신인 VP1-3C는 5주차에 240%의 항체가 증가를 보여 불활화 백신 보다는 높은 항체가의 상승이 있었으나, 310%의 항체가 상승을 보인 항원-항체 결합 백신인 VP1-3C-IgG 보다는 낮았다. 실험에 사용한 불활화 백신은 4주의 간격

으로 2회 접종을 하도록 되어 있다. 하지만 본 실험에서는 불활화 백신과 항원-항체 결합 백신의 효과를 비교하기 위하여 모든 백신을 1회만 접종한 후에 항체가 비율의 변화를 측정하였다.

VP1-3C와 VP1-3C-IgG 결합체를 투여한 후에 5주 동안의 항체가 변화의 결과는 Fig. 22-A에서 보는 것과 같다. VP1-3C은 주차가 지남에 따라서 꾸준히 항체가 비율이 변화하여 5주차에는 약 240%의 유의한 증가를 보였다. VP1-3C-IgG 결합체를 접종한 결과 접종 후 5주차 까지 계속적인 항체가 비율의 상승을 보였으며, 5주차에는 최대치인 약 310%의 증가를 확인하였다. 단순히 재조합 백신인 VP1-3C를 투여한 것 보다 항원-항체 결합 백신인 VP1-3C-IgG를 투여하면 최대 항체가의 비율 차이는 110%였다. 이렇게 재조합 백신인 VP1-3C와 항원-항체 결합 백신인 VP1-3C-IgG에서 유의한 차이가 발생한 것은 Berzofsky 등(81)과 Celis 등(82)의 보고에서처럼 항원-항체 결합 백신의 가능성을 강력히 시사해 준다고 생각되어진다. 항원-항체 결합 백신에 대한 다른 실험에서는 항원-항체 결합체를 B형 간염의 치료백신(therapeutic vaccine)으로 사용하여 우수한 결과를 얻었다는 보고를 하였다. 또한, 환자에게 항원-항체 결합체를 투여한 결과 T 세포가 자극이 되었으며, IL-2와 IFN-gamma의 증가를 확인하였다고 보고하였다(85).

불활화 백신과 항원-항체 결합 백신인 VP1-3D-IgG의 항체가 비율을 비교한 결과 모든 주차에서 VP1-3D-IgG 백신이 더 높은 항체가 비율을 보였다(Fig. 22-B). 재조합 백신인 VP1-3D는 5주차에 220%의 항체가 증가를 보여 최대값이 180%인 불활화 백신 보다는 높은 항체가 비율의 상승이 있었다. 가장 상승 폭이 높았던 VP1-3D-IgG 백신은 5주차에 340%의 항체가 비율의 상승을 나타내어 모든 실험군 중에서 가장 높은 수치를 보였다.

재조합 백신인 VP1-3C와 VP1-3D를 비교한 결과 최대값은 각각 240%와 220%로 큰 차이는 보이지 않았다. 모든 결과를 종합적으로 고려하여 판단하면, 기존에 사용하고 있는 불활화 백신과 비교하여 새로 개발한 재조합 백신과 항원-항체 결합 백신이 더 우수한 효능을 보인 것을 확인할 수 있었다.

항원-항체 결합체를 투여할 시에 세포매개 면역의 증가가 확인이 되었다는 보고가 있다(81, 82, 85). 본 실험에서는 항원-항체 결합 백신 투여 후 세포매개 면역반응에 대한 실험을 시행하지 못하였다. 항원-항체 결합 백신의 효능을 더욱더 과학적이고 명료하게 증명하기 위해서는 세포매개 면역에 대한 반응을 추가로 실험해야할 것으로 사료 된다.

결론

항원-항체 결합 백신의 효능을 알아보기 위하여 실험용 기니피그에 PEDV와 NDV를 접종하여 고도로 면역을 유도하였으며, 기니피그 혈청에서 감작된 IgG를 affinity chromatography를 실시하여 분리하였다. 분리된 IgG에 PEDV와 NDV를 섞어서 PEDV-IgG 결합체와 NDV-IgG 결합체를 만들고, 제작된 항원-항체 결합 백신을 기니피그에 접종하여 항체가 비율의 변화를 측정하였다.

소와 돼지의 초대배양상피세포에 재조합 레트로 바이러스 입자를 감염시켜 hTERT와 hBmi를 발현케 함으로써 불멸화 세포주를 확립하였다. 불멸화된 세포주에 VP1-3C과 VP-3D를 발현하는 재조합 레트로 바이러스 입자를 감염시켜서 재조합 단백질 VP1-3C과 VP-3D를 발현하는 세포주를 개발하였다.

구제역 항원-항체 결합 백신을 제작한 후 제작된 백신의 효능을 알아보았다. 개발된 항원발현 세포주를 이용하여 구제역 재조합 항원인 VP1-3C과 VP-3D를 대량으로 생산 하고, 이 항원을 돼지에 고도로 면역시켜 항원에 감작된 IgG를 분리한 후에 VP1-3C-IgG 결합체와 VP1-3D-IgG 결합체를 만들고 이를 돼지에 접종하여 주차별 항체가 비율의 변화를 측정하였다.

기니피그에서 항원-항체 결합 백신의 효능검사와 구제역 항원 생산용 세포주의 제작 그리고 돼지에서의 항원-항체 복합 백신의 효능검사는 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 기니피그에서 PEDV와 NDV 각각을 고도 면역 후에 IgG를 정제하고 SDS-PAGE로 분석하였을 때, 160 kDa에서 IgG를 확인되었다. PEDV와 NDV를 감작된 IgG와 섞어서 PEDV-IgG 결합체와 NDV-IgG 결합체를 제작하여 SDS-PAGE로

분석하였을 때, 190 kDa의 PEDV-IgG 결합체와 210 kDa의 NDV-IgG 결합체를 각각 확인하였다.

2. 기니피그에 PEDV를 접종한 결과 접종 1주 후부터 꾸준히 항체가가 증가하여 5주 이후에는 약 250%의 항체가 비율의 상승이 관찰되었다. NDV를 접종한 경우도 꾸준한 항체가의 상승이 관찰되어 6주에는 약 200%의 항체가 비율의 상승을 확인할 수 있었다.

3. 기니피그에 PEDV-IgG 결합체를 접종한 결과 6주 동안에 최대치는 약 330%의 항체가 상승이 나타났다. NDV-IgG 결합체를 접종한 결과 접종 후 4주차에 약 350%의 항체가 상승이 확인되었고, 그 이후로 6주까지는 약 320%의 항체가 상승을 확인 하였다.

4. 초대배양 세포의 증식능력 검사결과 소 유래 세포주 중에서 가장 분열 증식이 높았던 세포주는 JNUBK-3과 JNUBK-4 세포주로 확인되었고 JNUBK-3 세포주가 가장 높은 수치를 보였다. 돼지 유래 세포의 경우 JNUSK-2 세포주가 가장 높은 수치를 보였다.

5. JNUBK-3와 JNUBK-4 세포주를 cytokeratin으로 면역형광염색한 결과 90% 이상의 세포에서 cytokeratin을 분비하는 것을 확인 하였다. JNUSK-2를 cytokeratin으로 염색한 결과 세대수가 증가하여도 계속하여 cytokeratin이 분비되는 것을 확인되어 상피세포임이 입증되었다.

6. 구제역 재조합 항원 생산용 세포주를 개발하고 PCR 분석을 통해 VP1-3C와 VP1-3D 유전자가 발현됨을 전기영동으로 확인하였고, 그 크기는 약 1 kbp (VP1-3C)와 약 1.5 kbp (VP1-3D)이었다.

7. 돼지에서 면역된 IgG와 VP1-3C 또는 VP1-3D를 섞어주어 제작된 VP1-3C-IgG 결합체와 VP1-3D-IgG 결합체를 SDS-PAGE로 확인한 결과, 210 kDa와 220 kDa에

서 확인되었다.

8. 돼지에서 미감작된 IgG와 감작된 IgG를 접종한 그룹에서 5주 동안의 FMDV 항원에 대한 항체가를 측정한 결과 유의한 변화는 확인할 수 없었다.

9. 돼지에 불활화 FMD백신과 VP1-3C-IgG 복합체 그리고 VP1-3D-IgG 복합체를 투여한 후 항체가 비율을 비교한 결과 모든 주차에서 VP1-3C-IgG 백신과 VP1-3D-IgG 백신이 더 높은 항체가 상승을 보였다.

이상의 결과를 바탕으로 볼 때 개발된 세포주 제작기술을 응용하면 다양한 재조합 단백질을 대량으로 생산할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 개발된 항원-항체 결합 백신을 응용하면 앞으로 다양한 동물에서의 백신개발이 가능하리라고 사료된다. 항원-항체 결합 백신은 질병의 예방뿐만 아니라 치료용 백신으로도 가능성이 크기 때문에 이에 대한 연구도 필요로 할 것으로 생각되어 진다.

참 고 문 헌

1. Berentsen PBM, Dijkhuizen AA, Oskam AJ. A dynamic model for cost-benefit analyses of foot-and-mouth disease control strategies. *Prev Vet Med.* 1992;12:229-243.
2. Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:465-493.
3. Balamurugan V, Kumar RM, Suryanarayana VV. Past and present vaccine development strategies for the control of foot-and-mouth disease. *Acta Virol.* 2004;48:201-214.
4. Krystynak RH, Charlebois PA. The potential economic impact of an outbreak of foot-and-mouth disease in Canada. *Can Vet J.* 1987;28:523-527.
5. Mahul O, Durand B. Simulated economic consequences of foot-and-mouth disease epidemics and their public control in France. *Prev Vet Med.* 1999;47:23-38.
6. Mahul O, Gohin A. Irreversible decision making in contagious animal disease control under uncertainty: an illustration using FMD in Brittany. *Eur Rev Agric Econ.* 1999;26:39-58.
7. Yoo HH. Foot-and-mouth disease : Etiology, Epidemiology and control measures. *Infect Chemother.* 2011;43:178-185.

8. 배유찬, 윤순식, 박중원, 진영화. 국내 발생 구제역 및 구제역 유사질병 도감. Anyang: National Veterinary Research & Quarantine Service, MAF; 2003.
9. Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries. 구제역백서. Anyang: National Veterinary Research & Quarantine Service. 2003.
10. Barteling SJ. Development and performance of inactivated vaccines against foot-and-mouth disease. Rev Sci Tech. 2002;21:577-588.
11. Capstick PB, Telling RC, Chapman WG, Stewart DL. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth disease. Nature. 1962;195:1163-1164.
12. Brown F, Hyslop NS, Crick J, Morrow AW. The use of acetyleneimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines. J Hyg. 1963;61:337-344.
13. Park JH, Kim SM, Lee KN, Ko YJ, Lee HS, Cho IS. Strategy for novel vaccine and antivirals against foot-and-mouth disease. J Bacteriol Virol. 2010;40:1-10.
14. Abul k, Abbas, Andrew HL. Cellular and molecular immunology. Elsevier PET. 2004.
15. Asai. Antibodies in cell biology. Academic Press. 1993.
16. Confer AW. Immunogens of pasteurilla. Vet Microbiol. 1993;37:353-368.
17. Delany I, Rappuoli R, Gregorio E. Vaccines for the 21st century. EMBO Mol

Med. 2014;6:708-720.

18. Finco O, Rappuoli R. Designing Vaccines for the twenty-first century society. *Front Immunol.* 2014;5:1-6.
19. O'Connor CM, Wilson-Robles H. Developing T cell cancer immunotherapy in the dog with lymphoma. *ILAR J.* 2014;55:169-181.
20. Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood.* 2012;120:1175-1184.
21. Goldsby, Kindt, Osborne. *Kuby immunology.* W H Freeman. 2006.
22. Sharma G, Holt RA. T-cell epitope discovery technologies. *Hum Immunol.* 2014;75:514-519.
23. Pratt KP, Thompson AR. B-cell and T-cell epitopes in anti-factor VIII immune responses. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2009;37:80-95.
24. Karsten CM, Köhl J. The immunoglobulin, IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases. *Immunobiology.* 2012;217:1067-1079.
25. Rath T, Kuo TT, Baker K, Qiao SW, Kobayashi K, Yoshida M, Roopenian D, Fiebiger E, Lencer WI, Blumberg RS. The immunologic functions of the neonatal Fc receptor for IgG. *J Clin Immunol.* 2013;33:S9-17.
26. Rodríguez-Fernández JL, Riol-Blanco L, Delgado-Martín C. What is the function of the dendritic cell side of the immunological synapse? *PLoS One.* 2010;3:re2.

27. Martinez O, Leung LW, Basler CF. The role of antigen-presenting cells in filoviral hemorrhagic fever: gaps in current knowledge. *Antiviral Res.* 2012;93:416-428.
28. Lutz HU. How immune complexes from certain IgG NAb and any F(ab')₂ can mediate excessive complement activation. *Adv Exp Med Biol.* 2012;750:186-196.
29. Pepponi I, Stylianou E, van Dolleweerd C, Diogo GR, Paul MJ, Drake PM, Ma JK, Reljic R. Immune-complex mimics as a molecular platform for adjuvant-free vaccine delivery. *PLoS One.* 2013;8:1-11
30. Van der Poel CE, Spaapen RM, van de Winkel JG, Leusen JH. Functional characteristics of the high affinity IgG receptor, Fcγ. *J Immunol.* 2011;186:2699-2704.
31. Wen Y, Wang X, Wang B, Yuan Z. Vaccine therapies for chronic hepatitis B: can we go further? *Front Med.* 2014;8:17-23.
32. Hughes SS. Making dollars out of DNA. The first major patent in biotechnology and the commercialization of molecular biology, 1974-1980. *Isis.* 2001;92:541-575.
33. Kreuzer. *Recombinant DNA and Biotechnology : A Guide for Students.* Blackwell. 1997.
34. Jones, Elizabeth; Hartl, Daniel L. *Genetics: principles and analysis.* Jones and Bartlett Publishers. 1998.

35. Biasco L, Baricordi C, Aiuti A. Retroviral integrations in gene therapy trials. *Mol Ther.* 2012;20:709-716.
36. Goff SP, Berg P. Construction of hybrid viruses containing SV40 and lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell.* 1976;9:695-705.
37. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, Yates F, de Villartay JP, Le Deist F, Fischer A. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *J Gene Med* 2001;3:201-206.
38. Hirai H. Basic research on cerebellar gene therapy using lentiviral vectors. *Cerebellum.* 2012;11:443-445.
39. Miyazaki Y, Miyake A, Nomaguchi M, Adachi A. Structural dynamics of retroviral genome and the packaging. *Front Microbiol.* 2011;2(264):1-9
- 40 Miller AD. Retroviral vector production. *Curr Protoc Hum Genet.* 2014. 21:80;U12.5.
41. Lu H, Huo X, Zhang Y, Zheng M, Ma M, Zhang H, Jin M, Shen G, Jia L, Ji Y, Li X, Jin K, Jin N. Enhancing effects of the chemical adjuvant levamisole on the DNA vaccine pVIR-P12A-IL18-3C. *Microbiol Immunol.* 2008;52:440-446.
42. DeBey MC. Primary immunodeficiencies of dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2010;40:425-438.

43. Qi H. From SAP-less T cells to helpless B cells and back: dynamic T-B cell interactions underlie germinal center development and function. *Immunol Rev.* 2012;247:24-35.
44. Ishii-Watabe A, Suzuki T, Tada M, Kawanishi T, Yamaguchi T, Kawasaki N. FcRn, a critical regulator of antibody pharmacokinetics. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2010;136:280-284.
45. Wang T, Kumru OS, Yi L, Wang YJ, Zhang J, Kim JH, Joshi SB, Middaugh CR, Volkin DB. Effect of ionic strength and pH on the physical and chemical stability of a monoclonal antibody antigen-binding fragment. *J Pharm Sci.* 2013;102:2520-2537.
46. Balamurugan V, Kumar RM, Suryanarayana VV. Past and present vaccine development strategies for the control off foot-and-mouth disease. *Acta Virol.* 2004;48:201-214.
47. Bachrach HL. Foot-and-mouth disease. *Annu Rev Microbiol.* 1968;22:201-244.
48. Paton DJ, Valarcher JF, Bergmann I, Matlho OG, Zakharov VM, Palma EL, Thomson GR. Selection of foot and mouth disease vaccine strains-a review. *Rev Sci Tech.* 2005;24:981-993.
49. Rodriguez LL, Grubman MJ. Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine.* 2009;27:D90-D94.
50. Barteling SJ. Development and performance of inactivated vaccines against foot and mouth disease. *Rev Sci Tech.* 2002;21:577-588.

51. Capstick PB, Garland AJ, Chapman WG, Masters RC. Production of foot-and-mouth disease virus antigen from BHK 21 clone 13 cells grown and infected in deep suspension cultures. *Nature*. 1965;205:1135-1136.
52. Bahnemann HG. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch Virol*. 1975;47:47-56.
53. Oem JK, Chang BS, Joo HD, Yang MY, Kim GJ, Park JY, Ko YJ, Kim YJ, Park JH, Joo YS. Development of an epitope-blocking-enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate between animals infected with and vaccinated against foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods*. 2007;142:174-181.
54. Ishimaru D, Sá-Carvalho D, Silva JL. Pressure-inactivated FMDV: a potential vaccine. *Vaccine*. 2004;22:2334-2239.
55. Strange K, Christensen M, Morrison R. Primary culture of *Caenorhabditis elegans* developing embryo cells for electrophysiological, cell biological and molecular studies. *Nat Protoc*. 2007;2:1003-1012.
56. Crabtree JE, Heatley RV, Losowsky ML. Immunoglobulin secretion by isolated intestinal lymphocytes: spontaneous production and T-cell regulation in normal small intestine and in patients with coeliac disease. *Gut*. 1989;30:347-354.
57. Benya RV, Schmidt LN, Sahi J, Layden TJ, Rao MC. Isolation, characterization, and attachment of rabbit distal colon epithelial cells. *Gastroenterology*. 1991;101:692-702.

58. Panja A, Barone A, Mayer L. Stimulation of lamina propria lymphocytes by intestinal epithelial cells: Evidence for recognition of nonclassical restriction elements. *J Exp Med.* 1994;179:943-950.
59. Sato G. Tissue culture: the unrealized potential. *Cytotechnology.* 2008;57:111-114.
60. Modéer T, Dahllöf G, Otteskog P. Potentiation of fibroblast spreading by extracellular matrix from fibroblasts derived from phenytoin-induced gingival overgrowth. *Acta Odontol Scand.* 1998;46:101-104.
61. Drewa T, Szmytkowska K, Wlodarczyk Z, Sir I, Kierzenkowska-Mila, C. Does the presence of unwanted dermal fibroblasts limit the usefulness of autologous epidermal keratinocyte grafts? *Transplant Proc.* 2006;38:3088-3091.
62. Niederauer GG, McGee TD, Keller JC, Zaharias RS Attachment of epithelial cells and fibroblasts to ceramic materials. *Biomaterials.* 1994;15:342-352.
63. Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, Fuchs E. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell.* 2000;100:209-219.
64. Jeon KL, Hwang KK. Immortalization of bovine primary epithelial cells to isolate foot-and-mouth disease virus. *Prev Vet Med.* 2014;38:15-25.
65. Jeon KL, Hwang KK. Establishing bovine epithelial cells by removing fibroblast during primary culture. *Lab Anim Res.* 2009;25:251-256.
66. Jeon KL, Hwang KK. Primary bovine cell cultures using various digestion conditions. *Lab Anim Res.* 2009;25:237-242.

67. Kyo S, Nakamura M, Kiyono T, Maida Y, Kanaya T, Tanaka M, Yatabe N, Inoue M. Successful immortalization of endometrial glandular cells with normal structural and functional characteristics. *Am J Pathol.* 2003;163:2259-2269.
68. Haga K1, Ohno S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Fujita M, Sakamoto M, Galloway DA, Kiyono T. Efficient immortalization of primary human cells by p16INK4a-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Sci.* 2007;98:147-154.
69. Kitching RP. Clinical variation in foot-and-mouth disease: cattle. *Rev Sci Tech.* 2002;21:499-504.
70. Sanson RL. The epidemiology of foot-and-mouth disease: implications for New Zealand. *N Z Vet J.* 1994;42:41-53.
71. World Organisation for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: mammals, birds and bees. Office international des epizooties. 2008.
72. Cox SJ, Barnett PV. Experimental evaluation of foot-and-mouth disease vaccines for emergency use in ruminants and pigs: a review. *Vet Res.* 2009;40:13.
73. Ryan E, Mackay D, Donaldson A. Foot-and-mouth disease virus concentrations in products of animal origin. *Transbound Emerg Dis.* 2008;55:89-98.

74. Reid SM, Ferris NP, Hutchings GH, Samuel AR, Knowles NJ. Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 2000;89:167-167.
75. Kim SM, Lee KN, Park JY, Ko YJ, Joo YS, Kim HS, Park JH Therapeutic application of RNA interference against foot-and-mouth disease virus in vitro and in vivo. *Antiviral Res*. 2008;80:178-184.
76. Chen W, Liu M, Jiao Y, Yan W, Wei X, Chen J, Fei L, Liu Y, Zuo X, Yang F, Lu Y, Zheng Z. Adenovirus-mediated RNA interference against foot-and-mouth disease virus infection both in vitro and in vivo. *J Virol*. 2006;80:3559-3566.
77. Park JH , Kim SM, Lee KN, Ko YJ, Lee HS, Cho IS. Strategy for Novel Vaccine and Antivirals Against Foot-and-Mouth Disease. *J Bactol & Virol*. 2010;40:1-10.
78. Ludi A, Rodriguez L. Novel approaches to foot-and-mouth disease vaccine development. *Dev Biol*. 2013;135:107-116.
79. Delzor A, Escartin C, Déglon N. Lentiviral vectors: a powerful tool to target astrocytes in vivo. *Curr Drug Targets*. 2013;14:1336-1346.
80. Yang JH, Wu Y, Zi YM, Li XF, Liao XY, Chen YZ. Packaging of lentivirus carrying gene h β c and overexpression of gene h β c in NB4 cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2011;19:706-710.
81. Berzofsky JA, Bensussan A, Cease KB, Bourge JF, Cheynier R, Lurhuma Z, Salaün JJ, Gallo RC, Shearer GM, Zagury D. Antigenic peptides recognized

by T lymphocytes from AIDS viral envelope-immune humans. *Nature*. 1988; 334:706-708,

82. Celis E, Zurawski VR Jr, Chang TW. Regulation of T-cell function by antibodies: enhancement of the response of human T-cell clones to hepatitis B surface antigen by antigen-specific monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81: 6846-6850.
83. Rowlands DJ, Sangar DV, Brown F. Relationship of the antigenic structure of foot-and-mouth disease virus to the process of infection. *J Gen Virol* 1971;13:85-93.
84. Ponder E, Ponder RV. A zone phenomenon and a progressive reaction occurring with a radioactive hemolysin, sodium erucate, I 131. *J Gen Physiol*. 1958;41:651-655.
85. Wen YM, Qu D, Zhou SH. Antigen-antibody complex as therapeutic vaccine for viral hepatitis B. *Int Rev Immunol*. 1999;18:251-258.

국 문 초 록

구제역 바이러스(foot-and-mouth disease virus: FMDV)는 처음으로 확인된 동물 바이러스로, 동물 바이러스 연구의 최초 모델이다. 구제역은 동물의 가축 전염병 중에서 공기 전파 등으로 가장 전파력이 강하며, 동물에 수포 증상에 의한 피해와 경제적으로도 영향을 주는 질병이다. 구제역 바이러스는 *picornaviridae*의 *aphthovirus*속으로 분류되는 바이러스로 envelope를 갖고 있지 않으며, 핵산의 크기는 약 8,500 bp 정도이다. 바이러스 완전입자는 4종류의 capsid 단백질(VP1, VP2, VP3, VP4)이 각각 60개가 결합하여 이루어져 있는 정이십면체구조를 하고 있다. 국내에서 사용되는 불활화 백신은 돼지에서 항체 형성률이 떨어지며 불활화 백신의 사용은 구제역 발생에 잠재적인 위험성이 있다. 따라서 현재 백신의 문제점을 해결할 수 있는 새로운 백신의 개발이 시급히 이루어져야 한다. 산업동물에서 재조합 백신은 생산 단가가 너무 높아 이용하기에 무리가 있다.

불활화 백신을 대체할 새로운 백신의 개념으로 항원-항체 결합 백신의 가능성을 알아보기 위한 예비실험으로, 기니피그에서 porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)와 newcastle disease virus (NDV)를 이용한 항원-항체 결합 백신의 제작 및 효능 평가를 하였다. PEDV, NDV, PEDV-IgG 결합체 그리고 NDV-IgG 항원을 그룹 당 4마리씩 투여한 결과 항원 단독 백신보다 항원-항체 결합 백신을 투여한 그룹에서 60%~110%의 항체가 비율의 상승이 확인되었다.

본 연구에서는 FMDV에 대한 면역원성을 높이고 낮은 비용으로 생산이 가능한 재조합 단백질을 생산하기 위하여, VP1과 3C 그리고 3D 단백질을 조합하여 VP1-3C와 VP1-3D의 재조합 단백질을 지속적으로 발현할 수 있는 세포주를 개발하였다. 개발된 세포주를 이용하여 항원을 대량으로 생산 및 정제하고 돼지에 VP1-3C와 VP1-3D 재조합 단백질을 고도 면역시켰다. 면역된 돼지로 부터 IgG를 정제하여 VP1-3C-IgG와 VP1-3D-IgG의 항원-항체 결합 백신을 제작하였다. 개발된 항원-항체 결합 백신과 현재 한국 등에서 사용하는 불활화 FMDV

백신을 그룹 당 4마리의 돼지에 투여하여 항체 형성률을 비교하였다. 본 연구에서 개발된 항원-항체 복합체 백신은 현재 사용되는 불활화 백신에 비해 약 2-3배 높은 항체가를 나타내었다. 이상의 결과를 바탕으로, 본 연구를 더욱더 발전시키면 다양한 질병에 대한 항원-항체 결합 백신의 개발이 가능하리라고 사료되고 본 연구의 결과는 효율이 높은 신세대 세대의 백신의 가능성을 제시하여 준다고 할 수 있다.

색인어: 구제역, 세포배양법, 백신, 항원 발현, 항원-항체 결합 백신

감사의 글

A little sleep, a little slumber, a little folding of the hands to rest and poverty
will come on you like a bandit and scarcity like an armed man.

- Proverbs 24:33-34 -

어머니께서 주신 성경책의 잠언 24장 33절과 34절에 “네가 좀 더 자자, 좀 더
졸자, 손을 모으고 좀 더 누워있자 하니 네 빈궁이 강도 같이 오며 네 곤핍이
군사 같이 이르니라”라는 말씀이 있습니다. 박사 과정을 하면서 힘들고 지치면
마음속으로 되뇌던 저에게는 힘이 되어주는 말씀입니다. 학부 6년과 석사 2년
그리고 박사 4년 동안 항상 곁에서 힘과 용원을 보내준 **아버지, 어머니** 그리고
누님에게 감사를 전합니다. 부족한 저를 위한 가족의 희생과 용원이 없었다면
이 논문은 아마도 완성되지 못 하였을 거라고 생각이 됩니다. 9년 전에 예방수의학
실험실에 처음 들어와 많은 시행착오를 겪었던, 그리고 때때로 길에서 벗어나
방황을 하는 저에게 나아갈 길을 제시해 주신 저의 영원한 스승이신 **황규계**
교수님의 그 은혜 너무나 감사합니다. 한없이 부족하기만 한 저에게 많은
조언과 관심을 아끼지 않으시며, 연구자의 길로 믿고 이끌어 주신 **황규계** 교수님
덕분에 제가 지금 이 자리에 있을 수 있었습니다. 그리고 학부 과정과 대학원
과정 동안 늘 관심과 조언으로 학문의 길로 이끌어 주신 **임윤규** 교수님 너무나
감사합니다. 논문에 대한 따끔한 지적과 조언을 아끼지 않으셨던 **손원근** 교수님,
윤영민 교수님 그리고 경상대학교의 **김석** 교수님 감사드립니다. 항상 저에 대한
과분한 관심과 애정을 보내주신 **김재훈** 교수님, **주홍구** 교수님 그리고 **지영혼**
교수님에게도 이 지면을 빌려 감사의 말씀을 전하고자 합니다.

지금은 졸업을 했지만 옆에서 같이 울고 웃으면서 실험실 생활을 했던 **한만권**, 논문 실험에 있어서 조언을 해준 조직실험실의 **빙소진**, 같이 박사 과정을 하면서 서로 조언을 아끼지 않았던 내과학교실의 **김소연**과 산과학교실의 **박용상** 그리고 야생동물 구조센터의 **문경하** 이들 모두에게 감사를 드립니다. 특히 항상 좋은 친구이자 동료로 옆에서 울고 웃으면서 함께한 **박석재**에게 고맙다는 말을 하고 싶습니다.

앞으로 더 정진하여 여러 교수님들과 학우들 그리고 가족에게 보답할 수 있는 제가 되도록 하겠습니다.

2014년 6월

- 전경익 올림 -