<원 저>

자돈 설사병에 대한 형질전환 당근백신의 방어 효능 평가

김영훈¹ · 남진영² · 이향근² · 황철호² · 한정희^{1,*}

¹강원대학교 수의과대학 및 동물의학종합연구소, ²단국대학교 생명자원과학부
(게재승인: 2011년 3월 14일)

Protective effects of a transgenic carrot vaccine on piglet diarrhea

Yeong-Hun Kim¹, Jin-Young Nam², Hyang-Keun Lee², Cheol-Ho Hwang², Jeong-Hee Han^{1,*}

¹College of Veterinary Medicine and Institution of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²School of bioresource Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

(Accepted: March 14, 2011)

Abstract : The study evaluated whether a transgenic carrot vaccine could induce a K88-specific immune response in sows and whether the resultant maternal antibody could protect piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88ac infection. Sows (n=15) selected randomly from a farm in Korea were assigned to three groups (n=5 per group: control [untreated]), group A (orally inoculated with a non-transgenic and transgenic carrot vaccines at 2 and 4 weeks ante partum, respectively), and group B (conventionally vaccinated according to the manufacturer's instructions). After 7 days of lactation, 5 piglets selected randomly from each group were challenged with 1×10^{10} colony forming units/mL ETEC K88ac. Group C had the lowest mean fecal consistency score on post-challenge days 1 and 7. Histologically, On post-challenge day 7, group C showed an increased duodenum and ileum villus: crypt ratio, compared to group A in the duodenum, with group B displaying the highest ratio. Groups B and C had more increased villus width than group A in the jejunum. Group C displayed the greatest increase in villus width in the ileum. The colostrums and serum from groups B and C displayed higher concentrations of IgA and IgG against ETEC K88, compared to group A. Based on the results, it was concluded that the transgenic carrot vaccine in sow per oral may have an effect on preventing piglet diarrhea as good as commercial recombinant vaccine.

Keywords : Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88ac, maternal antibody, plant edible vaccine

서 론

*Escherichia (E.) coli*는 이유기 자돈에서 설사를 일으키는 가장 중요한 원인으로 이유후 대장균증(postweaning enteric colibacillosis)이기도 하며 전 세계적으로 발생하여 폐사, 이환, 성장률 저하와 높은 치료의 비용으로 경제적 손실을 일으킨다 [7]. 혈청형에 따라 somatic antigen (lipopolysaccharide: O) 171종 이상, flagellar antigen(H) 56종 이상, capsular antigen(polysaccharide: K) 80종 이상으로 9,000여종 이상이 알려져 있고, 병인론적으로 설사를 일으키는 *E. coli*는 O:H 혈청군을 토대로 4가지 장

독소성 *E. coli*(enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), 장침입성 *E. coli*(enteroinvasive *E. coli*, EIEC), 장병원성 *E. coli*(enteropathogenic *E. coli*, EPEC), 장출혈성 *E. coli*(enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)로 분류된다 [9, 14]. ETEC은 섬모항원(fimbriae or pilus)과 장내독소(enterotoxin)인 이열성 독소(heat-labile toxin, LT)와 내열성 독소(heat-stable toxin, ST)를 분비한다. EHEC과 특이한 EPEC은 LT와 ST를 분비 대신 Shiga-like toxin을 분비한다 [4].

신생자돈이나 이유자돈에서 ETEC에 의한 설사로 주로 이유후에 문제가 되며 일반적으로 폐사를 일으키는

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-8691, Fax: +82-33-256-3722

E-mail: hanjh@kangwon.ac.kr

것은 탈수이나, 장내로 들어간 ETEC이 장세포에 부착하여 내독소(endotoxin)를 혈액내로 분비하여 발생하는 패혈증에 의한 것이다 [8]. 일령이 낮을수록 장점막이나 점액층에 이들 수용체가 많기 때문에 특히 어린 자돈에서 ETEC이 문제가 되는 것이다 [3, 24]. ETEC가 장세포에 부착할 수 있는 것은 막대(rod)형 또는 필라멘트형의 fimbriae 또는 pilus라고 하는 항원 때문으로 장세포에는 fimbriae와 결합할 수 있는 탄수화물 수용체가 있어 결합하여 ETEC의 침략을 형성하게 한다 [14]. 설사를 일으키는 내독소에는 LT와 ST가 있는데 LT는 A subunit과 B subunit으로 구성되어 있다. B subunit이 장세포의 솔변연(brush border)에 부착하여 A subunit이 세포질로 들어갈 수 있게 하여 세포내 cyclic adenosin 5'-monophosphate(cAMP)를 증가시키고 삼투압의 변화를 일으켜 수용성 설사를 일으키게 한다 [15]. 또한 ST는 STa와 STb가 있는데 STa는 사람과 돼지에서, STb는 돼지서만 영향을 미친다. STa는 LT의 B subunit와 마찬가지로 장세포의 특이 단백질 수용체에 결합하는데 STa는 세포내 cyclic guanosine 5'-monophosphate(cGMP)를 증가시켜 장세포의 흡수를 감소시키고 분비를 증가시킨다 [18].

ETEC의 예방 및 치료 전략으로 항생제 처치를 하고 있으나 동물의 장관내 미생물이 항생제 저항성 유전자의 발현이 증가하여 내성균이 증가하고 장관내 정상세균총의 균형을 파괴하는 부작용을 일으키고 있다. 또한 항생제 사용시 어린 돼지에게 내성 및 체내에 잔류될 가능성이 있기 때문에 이런 항생제의 사용에 대한 소비자들의 부정적인 시각은 전 세계적으로 항생제 사용 규제에 대한 압박을 증가시키고 있는 상황이다 [21]. 이런 상황에서 대장균 재조합 백신은 가장 바람직한 형태의 백신으로 여겨졌으나 열 저항성이 약하기 때문에 냉장보관을 해야 하며 다른 사람이나 동물의 병원체를 이동시킬 수 있는 매개체로 작용할 수 있는 위험이 있다 [25]. 또한 번역 후 변형되는 일부 동물 단백질의 경우 대장균과의 변형 체계의 차이로 인해 발현 단백질의 면역원성이 저하되기도 하며 재조합 대장균 백신의 경구투여 시 장내 비 우호적 조건에 의해 단백질이 파괴되어 비실용적이다 [2, 26].

위와 같은 단점 때문에 산업적, 제약적 사용을 위한 재조합 단백질의 대량생산이 가능한 새로운 개념의 식물백신이 주목 받고 있다 [30]. 이런 식물백신은 생산 단가가 낮을 뿐만 아니라 관리나 보관이 용이하며, 대장균 재조합백신에 비해 전문 의료인력이나 장비요구도가 없어 최종 사용자나 농민들에게 별도의 비용을 부담시키지 않으며 이미 효과적인 재배나 운송, 저장 등에 대한 방법들이 이미 알려져 있어 새로운 지식전달이 필요가

없다 [23]. 최근까지도 식물백신의 연구가 활발한 가운데 당근은 섭취할 수 있는 곧은 뿌리를 갖고, 조리 없이 생식할 수 있어 발현시킨 단백질의 손상을 최소화 할 수 있는 등 식물백신을 적용할 수 있는 최적의 조건을 갖추었으며, 이미 *Mycobacterium tuberculosis* MPT64, glutamic acid decarboxylase, measles hemagglutinin유도체와 같은 단백질들이 발현되었다 [27].

따라서 본 연구는 포유기와 이유자돈기 대장균 설사증에 F4 fimbriae를 분리하여 당근에 도입시킨 식물백신과 상업백신의 비교를 통하여 ETEC K88ac에 대한 치료 및 예방 효과를 시험하고자 하였다.

재료 및 방법

시험동물 및 시험설계

ETEC에 대한 백신을 실시하지 않은 양돈장의 모돈(요크셔 × 랜드레이스)을 대상으로 비형질전환 당근 투여군(이상 대조군), 상업 백신 처리군(실험군 A), 형질전환 당근백신 투여군(이상 실험군 B 또는 당근백신 처리군)으로 나누어 각 5두씩을 선발하여 대조군은 분만 4주 전과 2주 전에 각 25 g 씩의 비형질전환 당근을 사료 내 투여하였고, 상업백신 처리군은 시판된 상업백신(2 mL, Porcilis coli; Intervet, Korea)을 제조사의 지시에 따라 분만 12주 전과 6주 전에 목뒤 근육부위에 접종하였으며, 당근백신 처리군은 이와 황[1]의 방법에 의해 제작된 당근백신을 western blotting(Fig. 1) 수행 후 Melanie II image analysis software(Swiss Institute of Bioinformatics, Switzerland)를 이용하여 분석한 결과 1 g당 93.6 µg의 항원량을 확인하여 25 g의 형질전환 당근백신을 분만 4주 전과 2주 전에 각각 경구 투여 하였다. 분만 당일 초유를 수집해 같은 시기에 출생된 포유자돈을 각 군당 10두를 선발하여 7일간 포유시킨 후에 단국대학교 동물자원과학과 사료 영양학 실험실에서 분양 받은 ETEC K88ac를 1.0×10^{10} CFU/mL로 공격접종 한 후, 각 군당 5두씩을 7일간 관찰하였다. 본 실험은 강원대학교 동물실험윤리위원회의 승인(KIACUC-10-0019) 하에 실시를 하였다. 실험자돈은 실험사육돈방(2.5 m × 2.5 m × 0.5 m)에서 사육되었으며 보온시설 하에서 주위환경을 통제하였고 돈방의 온도와 습도는 일정하게 유지시켰으며 돈방바닥은 매일 청소를 실시하였다.

설사 지수

공격접종을 한 후, 최초 12시간 후와 공격접종 후 24시간 간격으로 7일간 Sherman 등 [22]의 방법에 의하여 설사여부를 Fecal Consistency(FC) score(정상적인 분: 0, 연변: 1, 묽은 설사: 2, 심한설사: 3)로 측정하였다.

Fig. 1. Western analysis showing the antigens expressed in the transgenic carrot callus. FW: Approximately 2.5 μ g of fresh weight of transgenic carrot vaccine, DW1: Approximately 0.25 μ g of dry weight of transgenic carrot vaccine after 1 month culture, DW2: after 38 days culture, DW3: after 45 days culture, C: non-transgenic carrot vaccine, P: Purified pili protein.

장조직 형태학적 분석

실험 종료 후 안락사 시킨 실험자돈의 십이지장(유문 부로부터 10 cm 부위), 공장(회맹부로부터 150 cm 부위), 회장(회맹부로부터 10 cm 부위)의 조직을 각각 3 cm씩 채취한 후 5 mL 주사기를 이용하여 10% 중성포르말린으로 장관내를 세척한 후 10% 중성포르말린에 넣어 48시간 고정 후 Hematoxylin과 Eosin 염색을 실시하였다. 장의 형태학적 분석은 용모의 높이, 음와의 깊이를 측정하여 분석하였다. 용모의 높이와 음와의 깊이는 각 샘플당 염색된 십이지장, 공장, 회장의 상, 하, 좌, 우 네 부위를 Digital Camera(IN 1820; SPOT Insight, USA)를 이용하여 촬영 후 각 슬라이드당 세 개의 용모의 높이와 음와의 깊이를 측정한 후 음와의 높이, 음와의 깊이, 음와의 높이:음와의 깊이의 비를 측정 후 통계학적 분석을 위하여 평균값을 구하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

각 실험군의 이유자돈은 공격접종 전, 공격접종 후 3일, 공격접종 후 7일에 혈액을 채취하여 3,000 rpm에 15 분 동안 원심분리한 후 상층액을 56°C에서 30분 동안 비동화시켰다. 각 실험모든의 초유는 3,000 rpm에 30분 간 원심분리한 후 유청을 분리하여 단백질을 저해 억제제인 0.01 M phenylmethy sulfonyl fluoride를 첨가하였다. 얻어진 혈청과 유청에서 항체반응을 보기 위하여 ELISA를 이용하여 실험하였다.

단국대학교 식량생명공학과 식물 분자 생물학 실험실에서 제공받은 *E. coli*에서 발현시킨 특이항원을 10 μ g/mL이 되도록 coating buffer(KPL, USA)에 희석하여 Corning 96 well EIA/RIA plate (CLS3590; Corning, USA)에 100 μ g씩 넣어 4°C에서 16시간 이상 coating 하였다. Coating된 plate는 PBST(0.15M PBS, 0.05% Tween 20)로 3회 세척한 후 PBST에 2% bovine serum albumine이 포함된 용액을 200 μ L씩 분주하여 실온에서 2시간 동안 blocking하였다. PBST로 7회 washing 후 획득된 혈청, 초유를 dilution buffer로 희석하여 37°C에서 2시간

반응시켰고, 혈청과 초유에 대한 secondary antibody는 각각 anti-swine IgG-HRP conjugate(KPL, USA)와 anti-pig IgA-HRP conjugate(Novus, USA)를 1 : 12,000의 비율로 PBST에 희석하여 사용하였으며 회장 세척액에 대한 secondary antibody는 anti-pig IgA-HRP conjugate(Novus, USA)를 1 : 2,000의 비율로 PBST에 희석하여 사용하였다. 반응이 끝난 plate는 TMB solution(KPL, USA)을 사용하여 10분간 상온 암조건에서 발색반응을 수행한 후 Stop solution(KPL, USA)을 사용하여 반응을 억제시키고 microtiter plate reader(BIO-RAD, Korea)로 450 nm에서 조사하였다.

통계분석

모든 데이터에 대한 각 군간 유의성을 확인하기 위해 one-way ANOVA를 실시 후 유의적 차이가 인정되는 경우 LSD's multiple range test를 통하여 분석하였다. 통계학적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검정되었다.

결 과

설사지수

Sherman 등 [22]의 방법에 의하여 fecal consistency score를 측정하였다. 측정한 결과 대조군은 공격접종 후 12시간 후에 설사를 시작하였으나 실험군은 24시간 후부터 설사를 시작하였다.

공격접종 후 3일부터 6일까지는 유의적인 차이가 없었으나 2일과 7일에 당근백신 처리군의 설사지수가 대조군과 실험군 A보다 유의적으로 낮은 설사 지수를 보였다(Fig. 2).

장조직의 형태학적 분석

일반적으로 용모의 높이와 음와의 깊이는 장세포의 성숙도와 흡수력을 가리킨다 [9]. 십이지장의 형태학적 분석 중, 용모의 높이에서 대조군보다 두 처리군이 유의적으로 높게 나타났으며 음와의 깊이에서는 유의적으로

Fig. 2. Fecal consistency score of piglets fed diet with the transgenic carrot as time passed after challenge with enterotoxigenic *Escherichia* (*E.*) *coli* K88ac.
Control: administrated with nontransgenic carrot and challenged with *E. coli*.
Group A: injected with commercial vaccine and challenged with *E. coli*.
Group B: administrated with transgenic carrot and challenged with *E. coli*.
Feces = 0: normal, 1: mild diarrhea, 2: moderate diarrhea, 3: severe diarrhea.
^{a, b}Significant difference between the groups at $p < 0.05$.

Table 1. Intestinal morphology in experimental groups after challenge with enterotoxigenic *Escherichia* (*E.*) *coli* K88ac

Item	Group [*]			SEM
	Control	A	B	
Duodenum				
Villi height (μm)	383.1 ^b	411.7 ^a	431.0 ^a	6.73
Crypt depth (μm)	219.5 ^a	154.6 ^b	169.9 ^b	3.27
Villi width (μm)	91.0 ^a	84.3 ^a	92.9 ^a	5.45
V : C ratio [†]	1.7 ^c	2.6 ^a	2.5 ^b	0.02
Jejunum				
Villi height (μm)	187.3 ^b	191.4 ^b	253.1 ^a	3.40
Crypt depth (μm)	133.3 ^b	116.8 ^c	142.4 ^a	1.62
Villi width (μm)	84.0 ^b	92.2 ^a	96.4 ^a	2.71
V : C ratio	1.4 ^c	1.6 ^b	1.8 ^a	0.01
Ileum				
Villi height (μm)	248.0 ^b	305.4 ^a	302.5 ^a	1.72
Crypt depth (μm)	157.4 ^a	134.9 ^b	147.1 ^{ab}	1.24
Villi width (μm)	104.1 ^b	98.5 ^b	115.0 ^a	1.77
V : C ratio	1.9 ^c	2.3 ^a	2.0 ^b	0.01

^{*}Control: administrated with nontransgenic carrot and challenge with *E. coli*.
Group A: injected with commercial vaccine and challenge with *E. coli*.
Group B: administrated with transgenic carrot and challenge with *E. coli*.
[†]Villus height to crypt depth ratio.
^{a, b, c}Significant difference between the groups at $p < 0.05$.

낮은 경향을 보였다. 그러나 용모의 넓이는 군간에 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 용모와 음와의 비(villus : crypt ratio, V/C ratio)는 상업백신군이 가장 높은 비율을

보였고 대조군이 가장 낮은 비율을 보였다. 공장의 형태학적 분석에서 용모의 높이는 당근백신군이 가장 높았으며 음와의 깊이는 상업백신군이 유의적으로 가장 낮

Fig. 3. Optimal density value of IgA (A) and IgG (B) in serum and IgA (C) and IgG (D) in colostrum.

Control: administrated with nontransgenic carrot and challenged with *E. coli*.

Group B: injected with commercial vaccine and challenged with *E. coli*.

Group C: administrated with transgenic carrot and challenged with *E. coli*.

^{a, b}Significant difference between the groups at $p < 0.05$.

은 경향을 보였다. 용모의 넓이는 두 처리군이 대조군에 비해 유의적으로 넓은 용모의 넓이를 보였다. V/C ratio에서는 당근백신이 유의적으로 가장 높은 비율을 보였으며 다음으로 상업백신군과 대조군순으로 뒤를 이었다. 회장에서의 용모의 높이는 두 처리군이 대조군과 비교할 때 유의적으로 높은 수치를 보였다. 음와의 깊이에서는 유의적으로 상업백신군이 가장 얇은 수치를 보였으며 대조군이 가장 깊은 수치를 보였다. 또한 용모의 넓이는 상업백신군이 대조군과 당근백신군보다 유의적으로 더 넓은 경향을 보였다. V/C ratio는 상업백신군이 대조군과 당근백신군보다 유의적으로 높은 비율을 보였다(Table 1).

혈청 반응

ETEC K88ac에 대한 당근백신의 효과를 관찰하기 위하여 실험돈의 혈청과 실험 모돈의 초유에 대한 혈청반응을 측정하여 실험기간 비교를 하였다.

각 군별 이유자돈의 혈청반응은 공격접종 후 시간이 경과할수록 감소하는 경향을 보였는데 공격접종 전과 공격접종 후 3일의 혈청에서 두 처리군의 OD값은 특이적 IgA와 IgG 모두 대조군에 비해 높은 값을 보였다. 공

격접종의 7일의 혈청에서는 특이적 IgA의 경우 당근백신군이 대조군과 상업백신군에 비해 높은 OD값을 보였으며, 특이적 IgG는 상업백신군이 대조군에 비해 높은 값을 보였다(Figs. 3A and B).

초유내 특이적 IgA에 대한 평균 OD값은 당근백신군이 유의적으로 가장 높은 값을 보였다(Fig. 3C). 또한 특이적 IgG에 대한 평균 OD값은 두 처리군 모두 대조군에 비해 높은 항체 반응을 보였다(Fig. 3D).

고 찰

ETEC K88ac의 감염으로 인한 자돈설사병은 돼지에서 설사를 일으켜 양돈산업에 큰 경제적 손실을 일으키는 소모성질병이다 [17]. 모든 백신을 통한 초유와 상유의 신생자돈에 항체이행은 소화기 계통 질병을 예방하는데 효과적임이 증명되었고 현장에서 실제 적용되고 있다 [19, 20]. 따라서 본 연구는 ETEC에 면역반응을 일으키는 fimbriae를 당근에 융합한 당근백신을 모돈에 투여하여 면역능을 형성케 함으로서 그 자돈이 초유를 통한 ETEC K88ac에 대한 면역반응이 ETEC에 대한 방어능의 형성 여부를 상업백신과의 비교를 통해 효과를 알

아보았다.

자돈에서 발생하는 소화기계 질병은 대장균증, 전염성위장염, 로타바이러스성 설사, 콕시듐증 등이 주로 발생하며 대장균증은 신생자돈 설사증, 3주령 설사증, 이유후 설사증으로 분류하며 특히 이유후 설사증은 이유스트레스와 사료교체 등의 환경변화와 ETEC의 감염에 의해 설사가 발생한다 [7]. ETEC K88ac는 각각 LT와 ST를 분비하여 ETEC가 장내 집락을 형성하고 장의 점막층으로부터 전해질과 수분의 분비를 자극하여 설사를 일으킨다 [29]. 이런 설사는 ETEC에 의한 주요 임상증상이며 ETEC에 의한 설사는 ETEC의 독성인자와 돼지의 연령과 면역상태에 따라 달라질 수 있다 [7]. 본 연구에서 형질전환 당근백신을 투여한 모돈의 자돈에서 ETEC에 대한 설사 방어 효과를 확인하기 위하여 설사지수를 확인한 결과, 상업백신을 접종한 모돈의 자돈과 형질전환 당근백신을 투여한 모돈의 자돈은 일반당근을 투여한 모돈의 자돈에 비해 설사가 늦게 시작되었으며, 공격접종 후 7일에는 형질전환 당근백신을 투여한 모돈의 자돈이 유의적으로 낮은 설사지수를 보여 형질전환 당근백신의 모든 경우투여는 모든 수유를 통한 면역이 행으로 ETEC에 대한 설사 방어효과가 있음을 확인하였다.

ETEC에 의한 설사는 병리조직학적으로 점막하직층과 peyer's patch에 호중구가 침윤 되어있는 가벼운 염증소견과 점막층의 형태적 변화를 관찰 할 수 있다 [8, 12]. 본 연구에서는 병리조직학적 검사를 하여 소장의 형태학적 특징을 용모의 높이, 음와의 깊이, 용모의 넓이와 용모와 음와의 비를 측정하여 확인하였다. 음와는 소화작용을 거의 하지 않으며 짧고 미세용모가 거의 없으나 소화기의 다른 상피세포로 대체되는 전구세포로 세포중식의 지표이며, 용모 상피를 구성하는 장세포는 미세용모를 갖고 소화와 흡수 효소를 갖는 표면 glycocalyx를 갖고 있다 [11]. Hooper와 Haelterman [12]은 정상적인 10일령 포유자돈의 소장용모와 음와의 길이가 795 μm 와 110 μm 로 용모의 높이와 음와의 깊이의 비가 평균 7:1이라고 보고하였다. 본 연구에서는 1:1.4~2.6의 비율을 가졌는데 이는 ETEC K88ac의 공격접종으로 인한 것으로 사료된다. 상업백신을 투여한 모돈과 형질전환 당근백신을 투여한 모돈이 용모의 넓이와 용모의 높이와 음와의 깊이의 비에서 유의적으로 높은 비와 큰 넓이를 갖는 경향을 보였다. 따라서 상업백신과 형질전환 당근백신의 증가된 용모의 높이와 넓이, 감소된 음와의 깊이는 높은 소화와 흡수능력과 분비세포로부터의 분비가 적어짐을 의미하기 때문에 이유후에 일어나는 설사에 대한 방어효과가 있으므로 사료된다.

IgA는 IgG 다음으로 혈청내 많이 존재하는 항체로 특

히 secretory IgA(sIgA)는 소화기, 호흡기, 비뇨기와 같이 미생물에 노출되기 쉬운 부위에서 중요한 점막 면역에 관여하는 면역글로불린이다 [30]. sIgA는 두 개의 IgA 단량체가 chain으로 연결된 이량체의 형태를 갖고 있는 중합체이다 [13]. 장에서 sIgA의 근원은 두 가지로 나뉘는데 첫 번째는 sIgA의 75%는 Peyer's patch와 같은 점막림프조직의 종자중심의 B2 lymphocyte로부터 나오며 두 번째는 25%의 sIgA는 복막강의 B1 lymphocyte와 장점막하층에 분포되어있다 [6, 16]. 모체의 초유에는 높은 농도의 sIgA를 포함하고 있는데 이들은 미생물의 항원이나 독소와 바이러스를 중화시키는 다양한 항체를 가짐으로써 수동면역반응에 중요한 역할을 담당하는데 다양한 미생물에 대한 수동면역의 방어효과는 사람뿐만 아니라 많은 동물 실험에서 증명되고 있다 [19]. 비장, 림프절, 골수의 형질세포에 의해 만들어 지고 분비되며 IgG 180 kDa의 분자량에 두 개의 light chain과 두 개의 heavy chain으로 구성되어있으며 항체매개 방어기작에 중요한 역할을 담당하고 있다 [26]. IgG는 혈관내에 가장 많이 포함되어있는 면역글로불린으로, 상피세포의 표면에 있는 Fc γ 수용체의 매개에 의해 혈액내에서 유선으로 이동 후 초유를 통해 신생자돈에 전달된다 [20]. 백신의 경구투여와 근육주사를 통해 큰포식세포와 lymphocyte의 반응으로 B세포가 분화하여 immunoglobulin형성을 유도하게 된다 [5]. 본 실험의 ELISA와 면역조직화학염색 결과 초유, 자돈의 혈청과 회장세척액내 IgA와 IgG의 항체가에서 형질전환 백신 투여군과 상업백신 투여군이 일반당근을 투여한 대조군에 비해 유의적으로 높은 항체가가 측정되었다. 또한 IgA와 IgG producing cell은 더욱 강한 발현을 보여 전신 체액성 면역과 국소 체액성 면역을 형성하는 IgG와 IgA를 효과적으로 유도 하는 것으로 사료된다.

본 연구는 ETEC K88ac에 대한 형질전환 당근백신의 효과를 평가하였다. 식물 백신은 유전자변형체(Genetically Modified Organism)로서 박테리아, 바이러스 또는 동물에 있는 유전자를 삽입하여 새로운 종을 만들어내는 것에는 매우 유용하나 GMO를 섭취함으로써 인한 인체에 대한 안전성과 GMO 재배로 인한 유전자오염으로 환경위해성에 대한 문제가 제기되고 있다 [28]. GMO 재배로 인한 환경에 대한 위해성을 피하고자 세대진전을 할 수 없는 유전자 변형체 종을 만들거나 식물의 꽃가루가 발생할 수 없는 상태의 기내 배양된 조직을 이용하는 방법을 고려할 수 있으며 위의 방법으로 제작된 형질전환 당근백신은 본 실험 결과를 바탕으로 자돈에서 설사를 일으켜 문제가 되는 ETEC K88ac에 대한 새로운 개념의 백신으로 적용 가능할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 최근 주목 받고 있는 신개념의 식물백신과 상업백신의 비교를 통하여 돼지에서 문제시 되는 대장균 설사증과 관련한 효과를 관찰하기 위하여 실시하였다. 당근백신 투여군은 대조군과 비교할 때 낮은 설사지수를 보였고 장 형태학적 분석에서도 높은 용모의 높이, 얇은 음와의 깊이, 넓은 용모의 넓이, 큰 용모와 음와의 비를 보였으며 혈청과 초유내 IgA와 IgG의 농도는 높게 확인되었다. 상업백신과 비교할 때, 그 방어 효과가 떨어지지 않음을 확인하였다. 따라서 본 F4 fimbriae를 당근에 도입시킨 식물백신이 기존 백신에 대한 대체제로서의 적용 가능성을 확인하였다.

감사의 글

이 연구는 농촌진흥청 BioGreen 21 사업(20080401034019)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. 이영선, 황철호. 자돈 설사병 방지를 위한 경구백신용 형질전환 당근 개발. *식물생명공학회지* 2002, **29**, 287-293.
2. Austin S, Bingham ET, Koegel RG, Mathews DE, Shahan MN, Straub RJ, Burgess RR. An overview of a feasibility study for the production of industrial enzymes in transgenic alfalfa. *Ann N Y Acad Sci* 1994, **721**, 234-244.
3. Brown J, Resurreccion RS, Dickson TG, Horne A. The relationship of egg yolk and serum antibody. I. Infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1989, **33**, 654-656.
4. Chae C. Shiga toxin, Shiga-like toxin and Verotoxin. *Korea J Vet Res* 1993, **33**, 773-779.
5. Demicheli V, Jefferson T. Economic aspects of vaccination. *Vaccine* 1996, **14**, 941-943.
6. Fagarasan S, Kinoshita K, Muramatsu M, Ikuta K, Honjo T. *In situ* class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature* 2001, **413**, 639-643.
7. Fairbrother JM, Gyles CL. *Escherichia coli* infections. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (eds.). *Diseases of Swine*. 9th ed. pp. 639-674, Blackwell, Ames, 2006.
8. Fairbrother JM, Nadeau É, Gyles CL. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on

bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* 2005, **6**, 17-39.

9. Gaastra W, de Graaf FK. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol Rev* 1982, **46**, 129-161.
10. Gelberg HB. Alimentary system. In: McGavin MD, Zachary JF (eds.). *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. pp. 361-363, Mosby, St. Louis, 2007.
11. Hampson DJ, Smith WC. Influence of creep feeding and dietary intake after weaning on malabsorption and occurrence of diarrhoea in the newly weaned pig. *Res Vet Sci* 1986, **41**, 63-69.
12. Hooper BE, Haelterman EO. Concepts of pathogenesis and passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine. *J Am Vet Med Assoc* 1966, **149**, 1580-1586.
13. Krugmann S, Pleass RJ, Atkin JD, Woof JM. Structural requirements for assembly of dimeric IgA probed by site-directed mutagenesis of J chain and a cysteine residue of the α -chain CH2 domain. *J Immunol* 1997, **159**, 244-249.
14. Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 1987, **155**, 377-389.
15. Levine MM, Kaper JB, Black RE, Clements ML. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol Rev* 1983, **47**, 510-550.
16. Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 2000, **288**, 2222-2226.
17. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998, **11**, 142-201.
18. Rao MC. Toxins which activate guanylate cyclase: Heat-stable enterotoxins. *Ciba Found Symp* 1985, **112**, 74-93.
19. Russell MW, Kilian M. Biological activities of IgA. In: Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, Mayer L (eds.). *Mucosal Immunology*. 3th ed. pp. 267-289, Elsevier, Amsterdam, 2005.
20. Salmon H, Berri M, Gerdt V, Meurens F. Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Dev Comp Immunol* 2009, **33**, 384-393.
21. Shea KM. Antibiotic resistance: what is the impact of agricultural uses of antibiotics on children's health?

- Pediatrics 2003, **112**, 253-258.
22. **Sherman DM, Acres SD, Sadowski PL, Springer JA, Bray B, Raybould TJ, Muscoplat CC.** Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered *Escherichia coli* K99-specific monoclonal antibody. Infect Immun 1983, **42**, 653-658
 23. **Streatfield SJ.** Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. Methods 2006, **38**, 150-157.
 24. **Svendsen L, Crowley A, Ostergaard LH, Stodulski G, Hau J.** Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. Lab Anim Sci 1995, **45**, 89-93.
 25. **Tacket CO, Mason HS.** A review of oral vaccination with transgenic vegetables. Microbes Infect 1999, **1**, 777-783.
 26. **Tizard IR.** Veterinary Immunology: An Introduction. 7th ed. pp. 256-258, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2004.
 27. **Twyman RM, Schillberg S, Fischer R.** Transgenic plants in the biopharmaceutical market. Expert Opin Emerg Drugs 2005, **10**, 185-218.
 28. **Uzogara SG.** The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: a review. Biotechnol Adv 2000, **18**, 179-206.
 29. **Whitelam GC, Cockburn B, Gandeche AR, Owen MR.** Heterologous protein production in transgenic plants. Biotechnol Genet Eng Rev 1993, **11**, 1-29.
 30. **Woof JM, Kerr MA.** The function of immunoglobulin A in immunity. J Pathol 2006, **208**, 270-282.