

## *Theileria sergenti* merozoite로부터 합성한 polypeptide vaccine의 예방효과 연구

백병걸 · 정재명 · 김병수\*

전북대학교 수의과대학

군산전문대학\*

(1996년 1월 23일 접수)

### Immunoprophylactic effect of synthetic polypeptide vaccine derived from *Theileria sergenti* merozoite

Byeong-kirl Baek, Jae-myeong Jung, Byung-soo Kim\*

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju, 561-576, Korea  
Kunsan Junior College\*

(Received Jan 23, 1996)

**Abstract** : Eighteen holstein-calves(4~5 months old) in a divided groups including the matched control were immunized with 100 $\mu$ g/dose of 34kDa, 45kDa polypeptide and *T sergenti* merozoite vaccine(protein content 100 $\mu$ g/dose) respectively, previously mixed with aluminium hydroxide to elicit antibodies. All groups of calves were boosted with same dose and intervals. The animals were challenged by tick infestations in the endemic pasture of theileriosis from March to September 1994. The animals were monitored for the erythrocyte count, parasitemia, hematocrit and the specific antibody reactions elicited by immunization. The immunological responses demonstrated that vaccination with 34kDa polypeptide and *T sergenti* merozoite derived vaccine inhibited to produce the 75kDa band immunological responds even in the vaccinated calves after being challenged by tick infestations in the pasture. However, the specific antibody reactions were detected at the 32kDa band in the non-immunized calves and *T sergenti* merozoite derived vaccine by the western blot.

The 34kDa polypeptide vaccine and *T sergenti* merozoite derived vaccine were evaluated to be able to protect inducing anemia and to decrease parasitemias level. These vaccines have the efficacy of inhibition to produce a certain antigen corresponding 75kDa band antigen of parasite in the calves as challenged with tick infestations.

**key words** : *Theileria sergenti*, polypeptide vaccine, cattle, tick.

\* 이 논문은 1994년도 과학재단(협력연구지원과제)의 연구지원비로 이루어졌음.

Address reprint requests to Dr. Byeong-kirl Baek, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Republic of Korea.

## 서 론

우리나라 소에서 유행하고 있는 theileriosis에 의한 경제적 손실을 최소화하기 위하여 진단, 치료 그리고 예방방법 등에 관한 연구는 흔히 접할 수 있다<sup>1,2,6-8</sup>. 우리나라에 있어서의 theileriosis의 진단은 정확히 이루어지고 있으나<sup>2,11</sup>, 예방약 생산과 이의 활용을 위한 연구는 아직도 진행 중에 있다<sup>3,14</sup>. 저자 등은 *T sergenti* merozoite 항원을 이용한 예방접종시험<sup>3,12,13</sup> 면역원성 항원의 amino acid 구조 규명<sup>14</sup> 그리고 실험동물을 이용한 항체형성 정도를 관찰 보고한 바 있다<sup>5</sup>.

이번에는 *T sergenti* merozoite 항원중에서 항원성<sup>1</sup>과 면역성<sup>5</sup>을 잘 나타내었던 34kDa와, 가장 많은 항원량을 나타내었던 45kDa 물질을 선택, 합성하여<sup>5</sup> *T sergenti* merozoite 항원<sup>1,12</sup> 냉동건조 백신과 함께 theileriosis가 유행하고 있는 충남 J 목장의 소에게 접종한 후 방목하면서 합성 polypeptide의 예방효과를 일반 혈액소견, 적혈구내 기생충을 그리고 western blot 방법으로 관찰하였기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

**접종동물** : 1993년도 10월과 11월의 동절기에 태어난 4~5개월령의 holstein 24두를 6두씩 구분하여 34kDa polypeptide(34kDa군) 45kDa polypeptide(45kDa군), *T sergenti* merozoite 항원의 예방접종군(merozoite 백신군)과 예방접종을 하지 않은 군(대조군)으로 구분하였다.

**예방접종 목장 및 접종방법** : 충남(성환)의 J 목장의 소에게 준비한 백신을 aluminum hydroxide과 잘 혼합하여 1994년 2월, 3월에 2차에 걸쳐서 예방접종하였다. 예방접종은 1차 예방접종한 후 4주 후에 2차 예방접종 방목하였으며, 대조군에는 예방접종을 하지 않았다.

**Polypeptide vaccine의 준비** : *Theileria sergenti* merozoite 수용성 항원중 34kDa와 45kDa의 항원물질을<sup>5,14</sup> Biosystem Model 470 A Protein Sequencer를 이용하여 제조하였다. 합성한 polypeptide는 전보의 방법<sup>5</sup>에 준하여 전처리 하였다. 즉, cationized 방법<sup>16,26,27</sup>으로 항원성을 부여한 후 난 단백질을 carrier protein으로 하여 합성 polypeptide를 면

역원으로 사용하였다<sup>5</sup>.

**백신의 종류 및 접종** : 전 처리한 34kDa와 45kDa의 합성 peptide를 100 $\mu$ g/2ml 되도록 증류수로 조정하여, 동량의 aluminum hydroxide과 혼합하여 백신으로 사용하였다. *T sergenti* merozoite 백신은 전보의 방법으로 준비하였다<sup>12</sup>. 즉, *T sergenti* merozoite 수용성 항원의 단백질을 100 $\mu$ g 되도록 하여, 단백질 보호제(lactose 74.42gm, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.517gm, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.854gm, sodium L-glutamate 10.0gm, gelatine 7.5gm, penicillin1,000IU/ml, streptomycin 2mg/ml, 증류수 1,000ml)를 첨가, 냉동건조 백신을 제조하였으며(*T sergenti* merozoite 백신), 이를 2ml의 증류수로 희석한 후, 동량의 aluminum hydroxide과 혼합, 사용하였다.

**임상적 소견 관찰** : 매일 혈액을 채혈하여 총적혈구수(RBC, 10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>), 총백혈구수(WBC, 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>), 적혈구용적비율(hematocrit, %) 그리고 혈소판(10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)등의 혈액 소견을 관찰하였다.

**기생충 조사** : 예방접종 전후에 있어서 적혈구내 기생충의 감염율을 giemsa 염색과 acridine orange 염색법<sup>20</sup>으로 염색하여 광학현미경하에서 적혈구 1,000개중 감염된 적혈구수를 계수하여 측정하였다.

**SDS-PAGE와 Western blot** : 예방접종에 따른 항체반응 특성은 *T sergenti* merozoite 항원을 준비, 전보의 방법<sup>1</sup>에 준하여 SDS-PAGE 및 western blot 방법으로 관찰하였다.

## 결 과

**총적혈구수의 변화** : 34kDa와 45kDa polypeptide 백신 접종군에 있어서 총적혈구수 Table 1에서 보는 바와 같이 3월에는 8.52 $\pm$ 0.58(10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)과 8.14 $\pm$ 1.03(10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)이었으나 야외방목에 따른 적혈구수는 9월에는 8.64 $\pm$ 0.39(10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)과 6.70 $\pm$ 0.39(10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)로서 45kDa 접종군에서 유의적 차이(p<0.05)로 낮게 관찰되었다. Merozoite 백신과 대조군에 있어서 3월에는 9.28 $\pm$ 1.54(10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)과 9.06 $\pm$ 0.2(10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)이었으나 9월에는 7.67 $\pm$ 1.29(10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)과 4.23 $\pm$ 4.92(10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)로 관찰되었다.

**총백혈구수의 변화** : 예방접종 전, 후의 총백혈

구수의 변화는 Table 2에서 보는 바와 같다. 즉, 3월에 있어서 34kDa와 45kDa polypeptide 접종군에서는  $10.7 \pm 0.76(10^3/\text{mm}^3)$ 과  $9.55 \pm 0.53(10^3/\text{mm}^3)$ 이었으며, 이들은 약간씩 증가되어 9월에는  $14.15 \pm 0.62(10^3/\text{mm}^3)$ 와  $12.95 \pm 1.38(10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타났다. Merozoite 백신접종군과 대조군에 있어서  $11.52 \pm 0.53(10^3/\text{mm}^3)$ 과  $11.43 \pm 0.67(10^3/\text{mm}^3)$ 이었으나 9월에는  $13.45 \pm 1.97(10^3/\text{mm}^3)$ 과  $20.03 \pm 0.3(10^3/\text{mm}^3)$  증가를 관찰하였다.

Hematocrit 치의 변화 : Hematocrit 치는 Table 3에서 보는 바와 같이, 35kDa와 45kDa polypeptide 백신을 접종한 군에 있어서 3월에는  $38.3 \pm 0.9(\%)$ 와  $31.2 \pm 1.6(\%)$ 이었으나, 점차적으로 감소하여 34kDa 접종군에서는 9월에는  $35.1 \pm 1.7(\%)$ 이었지만, 45kDa에서는 현저히 저하되어  $27.3 \pm 1.9(\%)$ 로 관찰되었다. Merozoite 백신접종군에 있어서 e-matocrit는 3월에는 평균  $34.5 \pm 2.2(\%)$ 이었으며, 7월과 9월에  $28.4 \pm 1.4(\%)$ 과  $27.6 \pm 2.9$ 로 저하를 가져왔으며, 대조군에 있어서는 3월에  $32.3 \pm 1.7(\%)$ 이었으나 5월에는  $37.8 \pm 1.7(\%)$ 로 상승하였으며, 9월에는  $25.4 \pm 1.6(\%)$ 으로 심히 저하되었다.

혈소판 수의 변화 : 혈소판 수의 변화는 Table 4에서 보는 바와 같이 34kDa, 45kDa polypeptide 그리고 merozoite 백신접종군에 있어서 3월에는  $335.5 \pm 32.4(10^6/\text{mm}^3)$ ,  $312.5 \pm 22.3(10^6/\text{mm}^3)$  그리고  $350.5 \pm 44.5(10^6/\text{mm}^3)$ 이었다. 그러나 예방접종 후 이들은 7월부터 9월에는 모두 감소하여

각각  $262.6 \pm 54.7(10^6/\text{mm}^3)$ ,  $230.5 \pm 60.6(10^6/\text{mm}^3)$ ,  $210.8 \pm 25.9(10^6/\text{mm}^3)$  그리고  $90.5 \pm 32.5(10^6/\text{mm}^3)$ 으로서 모든 군에서 심히 저하되었다.

적혈구내 기생물 : 34kDa, 45kDa polypeptide 그리고 merozoite 백신의 예방접종에 따른 적혈구내 기생물 변화는 Table 5에서 보는 바와 같이 예방접종과 비교하여 전반적으로 증가되었다. 즉, 3월에는  $0.35 \pm 0.21(\%)$ ,  $0.75 \pm 0.34(\%)$  그리고  $0.545 \pm 0.46(\%)$ 이었는데 이들은 점차적으로 상승하여, 9월에는  $0.45 \pm 0.37(\%)$ ,  $0.95 \pm 0.59(\%)$  그리고  $0.34 \pm 0.34(\%)$ 이었다. 그러나 대조군에 있어서 3월에는  $0.50 \pm 0.25(\%)$ 이었으나, 9월에는  $1.28 \pm 0.78(\%)$ 로 가장 높게 관찰되었다.

Western blot : *T. heileria sergenti* merozoite 항원을 SDS-PAGE한 겔에 매월 채혈하여 얻은 혈청으로 Western blot하였던 바, Fig 1에서 보는 바와 같이 merozoite 백신접종군에서는 6월부터 전형적인 31kDa, 34kDa 등이 나타났으며, 대조군에서는 기생충의 감염에 따른 32kDa, 34kDa, 75kDa, 90kDa 등의 반응대 물질을 나타내었다. 그러나 34kDa와 45kDa polypeptide 백신을 접종한 소에서는 특이한 면역반응대가 관찰되었다. 즉, 34kDa 예방접종군의 혈청에 대한 *T. sergenti* merozoite 항원에 대한 면역반응은 5월에서부터 12kDa, 35kDa, 90kDa 등의 물질 반응대가 나타나며, 45kDa 접종군의 혈청에 대하여서는 5월부터 미약한 면역반응이 나타나기 시작하여 *T. sergenti* mero

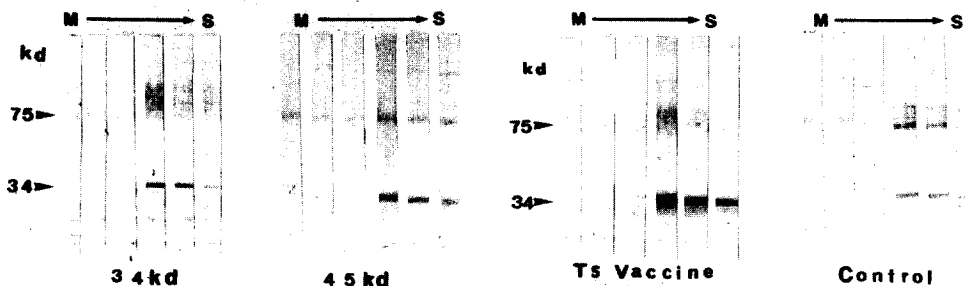


Fig 1. Western blot immunized cattle with 34kDa synthetic polypeptide (34kDa), 45kDa synthetic polypeptide (45kDa), *T. sergenti* merozoite derived vaccine (T svaccine) and control cattle. The cattle were exposed in endemic theileriosis pasture from March to September. 34kDa and T s vaccine inhibit to elicit the immunological responds at 75kDa band. T s vaccine produce a strong antibody corresponding 34kDa antigen of *T. sergenti*.

M;March, S;September, → ; From March to September, kDa: Kilodalton.

Table 1. Comparison of red blood cell count in vaccinated cattle with nonvaccinated cattle chronologically

		(10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )				
Month Group	March	April	May	July	September	
34kDa polypeptide Vaccine	8.52±0.58	7.29±0.27	10.68±0.54	7.10±0.36	8.64±0.39	
45kDa polypeptide Vaccine	8.14±1.03	7.15±0.73	9.99±0.12	6.88±0.52	6.70±0.81	
Merozoite Vaccine	9.28±1.54	8.80±0.80	10.46±1.14	7.73±0.78	7.67±1.29	
Control	9.06±0.2	9.02±0.37	11.77±0.35	6.12±1.11	4.23±4.92	

Table 2. Comparison white blood cell count of vaccinated cattle with nonvaccinated cattle chronologically

		(10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )				
Month Group	March	April	May	July	September	
34kDa polypeptide Vaccine	10.72±0.76	11.35±0.39	11.34±0.73	12.34±0.36	14.15±0.62	
45kDa polypeptide Vaccine	9.55±0.53	9.85±0.81	13.73±1.45	14.00±1.85	12.95±1.38	
Merozoite Vaccine	11.52±0.53	11.82±0.86	14.82±0.81	12.48±0.94	13.45±1.97	
Control	11.43±0.67	11.97±1.23	16.35±1.18	15.07±1.65	20.03±0.3	

Table 3. Comparison of hematocrit in vaccinated cattle with nonvaccinated group chronologically

		(%)				
Month Group	March	April	May	July	September	
34kDa polypeptide Vaccine	38.3±0.9	27.5±1.5	33.5±0.6	32.6±1.3	35.1±1.7	
45kDa polypeptide Vaccine	31.2±1.6	27.3±1.3	32.0±0.9	28.2±1.1	27.3±1.9	
Merozoite Vaccine	34.5±2.2	33.9±1.2	37.0±2.4	28.4±1.4	27.6±2.9	
Control	32.3±1.7	32.02±1.1	37.8±1.7	25.8±2.5	25.4±1.6	

zoite 항원중 34kDa 물질에서 강한 면역반응을 나타내었으며, 45kDa peptide 백신에서도 34kDa에서 강한 면역반응을 하였다.

## 고 찰

우리나라를 포함한 동남아시아 지역의 소에 분포하

는 *T sergenti*는 *T parva*와 비교하여 병원성은 낮지만, 체중 및 비유량 감소, 심한 빈혈증 등으로 양축농가에 있어서 경제적 손실을 크게 일으키고 있다<sup>7</sup>. *Theileria sergenti*에 대한 연구는 한국과 일본에서 단크론 항체 생산<sup>23</sup>, PCR을 이용한 진단방법<sup>11,36</sup>, 태반감염 규명<sup>4,29</sup>, 면역시험<sup>12,13</sup> 그리고 *T sergenti* merozoite 항원의 am-

**Table 4.** Comparison of platelet value in vaccinated cattle with control group chronologically

		(10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )				
Month Group	March	April	May	July	September	
34kDa peptide Vaccine	335.5 ± 32.4	354.5 ± 70.2	413.0 ± 48.0	332.5 ± 20.2	262.6 ± 54.7	
45kDa peptide Vaccine	317.5 ± 22.3	31.7 ± 47.4	393.0 ± 29.7	293.9 ± 51.2	230.5 ± 60.6	
Merozoite Vaccine	350.5 ± 44.5	413.6 ± 223.4	477.3 ± 48.2	295.3 ± 34.2	210.8 ± 25.9	
Control	370 ± 23.7	575.4 ± 48.9	403.5 ± 25.5	377.5 ± 123.5	90.5 ± 32.5	

**Table 5.** Comparison of parasitemia red blood cell count in vaccinated cattle with control group chronologically

		(PPE,%)				
Month Group	March	April	May	July	September	
34kDa peptide Vaccine	0.35 ± 0.21	0.63 ± 0.32	0.27 ± 0.16	0.22 ± 0.18	0.45 ± 0.37	
45kDa peptide Vaccine	0.75 ± 0.34	0.73 ± 0.54	0.29 ± 0.26	1.01 ± 0.56	0.95 ± 0.59	
Merozoite Vaccine	0.54 ± 0.46	0.87 ± 0.17	0.3 ± 0.08	0.84 ± 0.32	0.34 ± 0.34	
Control	0.50 ± 0.25	1.20 ± 0.22	0.88 ± 0.15	1.20 ± 0.32	1.28 ± 0.78	

ino acid 구조결정과 합성 polypeptide백신의 생산에 관한 연구 등이 이루어진 바 있다<sup>5,14</sup>. 합성 polypeptide의 백신의 항원성과 면역성에 관한 연구는 많은 병인체를 대상으로 연구되고 있으나<sup>35</sup>, 주혈기생충의 예방을 위한 polypeptide 백신생산에 관한 연구는 말라리아병에서 주로 이루어졌을 뿐이다. 말라리아에 있어서 합성 peptide 백신의 하나인 hybrid polymeric spf 66 vaccine에 대한 항원성, 안전성, 효능 등에 관한 인체면역시험, Helper cell과 T cell의 면역 반응 등의 연구가 이루어진 바 있다<sup>30-32</sup>.

본 연구자 등은 *T sergenti*에서 특이 항원의 합성을 위하여 *T sergenti* merozoite 항원 중에서 고면역 혈청과의 western blot에서 강한 면역반응을 나타내었던 18kDa, 34kDa과 45kDa 물질(SDS-PAGE에서 항원성만 나타내었음)의 아미노산 서열을 결정<sup>4</sup>하여 가토와 소에게 접종하여 면역형성능력을 관찰한 바 있다.

34kDa polypeptide를 접종한 소에서의 western immunoblot 소견은 34kDa polypeptide를 면역시키면 34kDa,

55kDa, 58kDa 및 70kDa에서 반응을 보였으며, 45kDa의 예에 있어서는 58kDa과 45kDa의 반응이 비교적 강하게, 34kDa 및 32kDa에서 미약한 반응을 나타내었지만 이같은 면역원성만으로 야외목장에서 감염되는 *T sergenti*에 대하여 얼마나 방어능력을 발휘할 수 있는지를 밝히는 것은 매우 중요하다. 이같은 이유로 진드기가 밀집 서식하고 있는 방목장(theileriosis가 유행 목장)의 소에게 상기의 polypeptide 백신을 접종한 후 방목함으로써 백신의 효과를 직접적으로 판정할 수 있는 길이라 생각되었다. 이처럼 polypeptide와 같은 면역원성이 약한 물질의 효능판정을 위하여서는 전혀 *T sergenti*가 감염되지 않은 소를 선택하여 사용하여야 하나 그렇지 못하였는데 그 이유는 실험목장에 이미 진드기 서식하고 있었고 대부분의 송아지가 4~5개월령이지만 태반 감염이 이루어지므로<sup>4,29</sup>, 음성 송아지의 선발이 불가능하였기 때문이다. 이미 감염된 질병의 예방을 위한 homeopathy 방법 활용 견지에서 보면, 본 연구에서의 예방접종 시도는 실험동물 선발의 애로점을 감안하여

보건대, 이해될 수 있을 것이며, 예방접종전의 상태와 비교하면 면역성의 판정에도 긍정적인 결과를 관찰할 수 있었다. 주혈성 원충병의 예방능력 실험을 위하여서는 scid mouse와 같은 실험동물<sup>21</sup> 모델을 개발하여 완전한 음성 실험동물로 면역기전을 관찰함이 타당하지만 이 또한 실험실의 여러 조건도 새로이 고려되어야 할 문제점이라 할 것이다. 본 실험에 사용된 모든 소에서 백신의 접종전과 비교하여 34kDa, 45kDa polypeptide 그리고 merozoite 백신의 접종에 따른 면역반응이 특이하게 관찰되었다. 즉, Fig 1에서 보는 바와 같이 백신의 접종에 따른 면역반응이 나타나기 시작하여, 진드기의 지속적인 도전에 따른 또다른 면역반응이 나타나고 있었다. *T. sergenti* merozoite 백신을 접종한 군에 있어서는 32kDa 반응물질이 명확히 출현하였으며, 대조군 즉, 총체의 감염에 따른 항체의 형성을 뜻하는 32kDa, 34kDa, 75kDa 그리고 90kDa 등의 물질이 출현함으로써 아마도 자연감염되면 여러 종류의 면역 반응대의 항체가 형성되는 것 같다. 더욱이 45kDa 접종군에 있어서는 이들 물질 외에도 75kDa 반응물질이 출현하고 있어 34kDa와 *T. sergenti* merozoite 백신접종은 자연감염된 소의 항체형성과 다르게 나타나고 있었는데 말라리아병에 있어서 polypeptide 백신에 의하여 형성된 항체는 몇개의 항원에 대하여서는 반응을 나타내지만 그렇지 않은 예도 있었다<sup>21,22</sup>. 임상혈액학적 소견에서도 방어능력은 예측하게 할 수 있는 몇개의 검색항목에서 찾아 볼 수 있었다. 즉, 하절기로 감에 따라서 감염율이 높아지면서 백혈구수는 약간 증가하나 대조군에서는 2차 감염증을 의심토록 하는 백혈구의 유의적 증가( $p < 0.05$ )를 나타내었으며 또한 대조군에서는 혈소판수와 적혈구수, hematocrit가 감소되었다. 혈소판의 변화조건을 보면 타 예방접종군과 비교하여 대조군이 가장 많이 감소된 것으로 미루어 보아, 예방접종군에서의 백신접종에 따른 예방효과가 혈소판 형성에 크게 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. 말라리아병에 있어서의 합성한 polypeptide 항원성 물질을 *in vivo* 접종시 이에 대한 면역반응 기계에 있어서의 peptide 접종에 따른 면역반응은 세포성 면역 유발 사실<sup>28</sup>과 면역원성과 방어능력의 측면에서 관찰한 예<sup>19</sup>가 있지만, 아직 소에 있어서의 theileriosis 예방을 위한 합성 polypeptide의 접종을 통한 면역반응 기계 반응에 대한 관찰보고에는 접할 수 없는 실정인 바, 전보<sup>5</sup>에서 polypeptide의 면역원성을 입증하기 위한 IFA,

ELISA 그리고 Western immunoblot 방법의 활용은 vaccine의 가치평가에 충분할 것이다. Polypeptide의 면역성은 실험동물의 종류에 따라서 큰 차이가 있다. 즉, 말라리아병의 합성 peptide 백신(Spf 66)의 항원성을 관찰하기 위하여 사람을 포함한 쥐, 토끼 및 원숭이와 같은 실험동물에서 보면 쥐와 토끼는 면역반응이 혈청학적으로 쉽게 입증되지만 사람이나 원숭이에서는 잘 나타나지 않는다<sup>18,24,25,36</sup>. 또한 사람에서도 개인적 차이가 심하여 Spf 66 백신 2ng를 피하주입(3차)하였을 경우와 면역반응을 나타내지 않는 사람도 있어 개체간의 차이도 보고되었다<sup>22</sup>. 본 예에 있어서도 마찬가지로 적혈구내 기생율이나 hematocrit가 전혀 예방효과를 나타내지 못하는 예도 있어 peptide 백신의 단점을 관찰하였다. 같은 주혈기생충의 하나인 *Babesia spp.*에 대한 합성 polypeptide를 carrier없이 BALB/C 마우스에 접종시 B-cell과 T-cell의 epitope에 의한 강한 항체가 형성되며 임파구의 증가되는 것으로<sup>19</sup> 미루어 보아, 본 예에서의 western blot에서 나타난 강한 면역반응은 이들 세포의 활성화에 의한 면역기계의 반응에 하나이라고 생각된다. *Theileria sergenti*의 감염에 대한 백신의 방어효과의 평가방법의 하나로서 적내형 원충과 스포로조이트로 면역한 소에서의 면역시킨 후 혈류중의 적내형 원충의 출현을 관찰한다. 즉, 방어능력이 형성되어 있으면 새로이 침입하는 스포로조이트에서 적내형 원충까지의 발육 stage의 어떤 단계의 원충증식에 대하여 억제작용하는 것으로 생각된다. 더욱이 적내형 원충에 대한 면역처치의 효과를 검토하기 위하여 면역시킨 소의 적혈구로부터 분리한 원충을 접종할 경우 대조에 비교하여 혈류중에서의 *T. sergenti*의 출현이 지연되고 그 peak치도 낮아지는 경향을 인정할 수 있었다. Polypeptide의 면역처치로서 스포로조이트로부터 적내형 원충 발육시기, 특히 적내형 원충의 증식에 대하여 억제작용을 하는 것으로 생각된다. 이같은 적내형 원충의 발육억제 작용은 *T. sergenti*에 대한 이형항체를 보유한 소를 비장적출 후, *T. sergenti* 감염 적혈구를 접종하여 감염시킬 경우 원충증식 억제효과가 입증되고 있다.

결론적으로 가축 특히 소에 기생하는 theileriosis를 예방하기 위하여 최근 사람의 말라리아병의 예방법으로서 합성 polypeptide 백신의 개발기술과 활용기법을 받아들여려는 시도는 바로 수의학계의 영역을 일층 넓힐 수 있는 효과가 기대되며, 앞으로 가축질병의 예방

에 있어서도 더욱 합성 polypeptide의 항원성, 면역성 보강을 위한 연구가 계속되어야 할 것이다.

## 결 론

소의 theileriosis 예방을 연구 일환으로 *T sergenti* merozoite 항원 중에서 34kDa, 45kDa polypeptide를 합성하여 진드기가 서식하고 있는 목장의 holstein 송아지(4~5개월령)를 6두씩 4개군으로 구분하여 접종한 후 1994년 4월부터 9월까지 반복하면서 일반혈액성상, 적혈구내 기생충의 감염율의 변화 그리고 western blot에 의한 항원, 항체반응을 관찰하였다. *T sergenti* merozoite로부터 합성한 34kDa, 45kDa polypeptide 백신과 *T sergenti* merozoite 백신을 각각 6두씩 100 $\mu$ g과 100mg를 aluminum hydroxide와 혼합하여 3차에 걸쳐서 각각 접종하였다. 34kDa를 접종한 군이 총적혈구수와 적혈구 용적비에서 타군과 비교하여 유의적 차이 ( $P<0.05$ )로 가장 명확히 예방효과를 나타내었다. Western blot 소견에서 34kDa polypeptide 접종군과 *T sergenti* merozoite vaccine 접종군에서는 75kDa 반응대를 나타내지 않았지만 45kDa polypeptide 접종군과 대조군에서는 75kDa를 나타내었다. 또한 대조군에서 나타난 32kDa반응대는 타 예방접종군에서는 나타내지 않았다.

결론적으로 34kDa polypeptide vaccine과 *T sergenti* merozoite vaccine은 야외목장에서 진드기로 자연감염된 *T sergenti*에 대하여 빈혈증세경감과 감염을 저하 등과 같은 예방효과를 인정할 수 있었으며, 이들 백신은 총체의 75kDa 항원을 중화시키는 항체를 형성함을 관찰하였다.

## 참 고 문 헌

1. 백병걸, 김병수, 이재구 등. 한우에 있어서 *Theileria sergenti*의 항원성에 관한 연구. 대한수의학회지, 30 : 223~229, 1990.
2. 백병걸, 김병수, 이호일 등. 한우에 감염된 *Theileria sergenti* merozoite의 미세구조. 대한수의학회지, 30 : 465~471, 1990
3. 백병걸, 송희중, 김병수 등. 소에 있어서 주혈기생충병의 면역학적 예방에 관한 연구. 한국수의공중

- 보건학회지, 15 : 127~141, 1991.
4. 백병걸, 임병무, 이우중 등. 신생송아지에 있어서 *Theileria sergenti*의 감염에 관한 연구. 대한수의학회지, 33 : 665~671, 1993.
5. 백병걸, 서창희, 김진호 등. *Theileria sergenti* merozoite의 합성 polypeptide 백신의 면역원성에 관한 연구. 대한수의학회지, 35 : 87~94, 1995.
6. 서명득. 도입우의 진드기 매개 주혈원충 감염상과 *Theileria sergenti*의 치료예방에 관한 연구. 농시보고, 24 : 57~75, 1982.
7. 손제영, 유동열, 김교준. 경북지방에 수입된 Canada산 유우의 Piroplasma 감염피해에 관한 조사보고(II). 대한수의학회지, 12:59~66, 1972.
8. 이주목, 김명철. 젖소의 파이로프라스마의 효과적인 집단검색과 치료방법에 관한 연구. 대한수의학회지, 27 : 321~330, 1987.
9. 전영. 국내 소의 주혈원충과 그 혈액학치에 관한 조사연구. 농시보고, 13 : 81~87, 1970.
10. 전영, 김동성, 김용희 등. 간접 형광항체법에 의한 한우 타이레리아병의 혈청학적 진단에 대한 연구. 농시보고, 19 : 27~32, 1977.
11. 채준석, 이주목, 권오덕 등. 한우에 감염된 *Theileria sergenti*의 순수분리와 genomic DNA probe에 관한 연구. 대한수의학회지, 34 : 387~394, 1994.
12. Baek BK, Choi IH, Kim BS, et al. Immunogenicity and protective efficacy of solubilized merozoite-enriched *Theileria sergenti* immunogens. I: Protection against homologous stabilate challenge. *Korean J Parasitol*, 30(2) : 133~140, 1992.
13. Baek BK, Kim BS, Choi IH et al. Immunogenicity and protective efficacy of solubilized merozoite-enriched *Theileria sergenti* immunogens. II: Protection against natural exposure under field condition. *Korean J Parasitol*, 30 : 201~208, 1992.
14. Baek BK, Kim BS, Rhim BM, et al. Immunogenicity and protective efficacy of solubilized merozoite enriched *Theileria sergenti* immunogens. III. Characterization of immunodominant peptides. *Korean J Parasitol*, 32 : 111~116, 1994.
15. Bose R, Jacobson RH, Gale KR, et al. An improved ELISA for the detection of antibodies against *Ba-*

- besia bovis* using either a native or recombinant *B bovis* antigen. *Parasitol Res*, 76 : 648~652, 1990.
16. Briand J P, Muller S and Van Regenmortel MHV. Synthetic peptides as antigens : Pitfalls of conjugation methods. *J Immunol Methods*, 78:59~69, 1985.
  17. Brown WC, Palmer GH and McElwain TF. *Babesia bovis*: Characterization of the T helper cell response against the 42-kDa merozoite surface antigen (MSA-1) in cattle. *Exper Parasitol*, 77 : 97~110, 1993.
  18. Campbell GH, Aley SB, Ballou WR, et al. Use of synthetic and recombinant peptides in the study of host-parasite interactions in the malarial. *Am J Trop Med Hyg*, 37 : 428~444, 1987.
  19. Chauhan VS, Chatterjee S, Johar PK. Synthetic peptide based on conserved *Plasmodium falciparum* antigens are immunogenic and protective against *Plasmodium yoelii* malaria. *Parasite Immunology*, 15 : 239~242, 1993.
  20. Gainer JH. Demonstration of *Anaplasma marginale* with the fluorescent dye, acridine orange; Comparisons with the complement-fixation test and wright's strain. *Am J Vet Res* 22 : 882~886, 1961
  21. Hagiwara K, Tsuji M, Ishihara C, et al. Serum from *Theileria sergenti*-infected cattle accelerates the clearance of bovine erythrocytes in SCID mice. *Parasitol Res*, 81 : 470~474, 1995.
  22. Herrera S, Herrera MA, Corredor A, et al. Failure of a synthetic vaccine to protect *Aotus lemurinus* against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, 47 : 682~690, 1992.
  23. Kobayashi N, Onuma M, Kirisawa R et al. Monoclonal antibodies against intraerythrocytic merozoites (Piroplasms) of *Theileria sergenti*. *Jpn J Vet Sci*, 49 : 697~702, 1987.
  24. Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. 1. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc*, 85 : 2149~2154, 1963.
  25. Millet P, Campbell GH, Sulzer AJ, et al. Immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* asexual blood-stage synthetic peptide vaccine SPf66. *Am J Trop Med Hyg*, 48 : 424~431, 1993.
  26. Muckerheide A, Apple RJ, Pesce AJ, et al. Cationization of protein antigens. I. Alternation of immunogenic properties. *J Immunol*, 138 : 833~837, 1987.
  27. Muckerheide A, Domen RL, Michael JG. Cationization of proteins. II. Alternation of regulatory properties. *J Immunol*, 138 : 2800~2804, 1987.
  28. Murillo L, Tenjo FA, Clavijo OP, et al. A specific T-cell receptor genotype preference in the immune response to a synthetic *Plasmodium falciparum* malaria vaccine. *Parasite Immunology*, 14 : 87~94, 1992.
  29. Onoe S, Sugimoto C, Tanaka M et al. Prenatal infections with *Theileria sergenti* in calves. *J Protozool Res*, 4 : 119~123, 1994.
  30. Patarroyo G, Franco L, Amador R. Study of the safety and immunogenicity of the synthetic malaria SPf66 vaccine in children aged 1~14 years. *Vaccine*, 10 : 175~178, 1992.
  31. Rocha CL, Murillo LA, Mora AL, et al. Studies in owl monkeys leading to the development of a synthetic vaccine against the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Am J Med Hyg*, 43(3) : 339~354, 1990.
  32. Rocha CL, Murillo LA, Mora AL, et al. Determination of the immunization schedule for field trials with the synthetic malaria vaccine SPf 66. *Parasite Immunology*, 14 : 95~109, 1992.
  33. Rogers RJ, Dimmock, CK, Vos AJ, et al. Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced in vivo against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Aust Vet J*, 65 : 285~287, 1988.
  34. Roggon G, Ceard B, Van Rietschoten J, et al. Induction with a synthetic peptide of antibodies to HLA class I C-terminal intracytoplasmic region. *Mol Immunol*, 21 : 461~468, 1984.
  35. Shinnick TM, Stteliffe JG, Green N, et al. Synthetic peptide immunogens as vaccines. *Ann Res Microbiol*, 37 : 425~446, 1983.



36. Sutcliffe JG, Shinnick TM, Green N. Chemical synthesis of a polypeptide predicted from nucleotide sequence allows detection of a new retroviral gene product. *Nature*, 287 : 801~805, 1980.
37. Tanaka M, Onoe S, Matsuba T, et al. Detection of *Theileria sergenti* infection in cattle by polymerase chain reaction amplification of parasite-specific DNA. *J Clin Microbiol*, 2565~2569, 1993.
-