

## 포도상구균 장내 C형 변이독소(SEC mutant)의 면역원성에 대한 연구

장병선 · 주이석\* · 문진산\* · 서근석\*\* · 양수진\*\* · 김소현\*\* · 박용호\*\*

LG 화학

\*국립수의과학검역원

\*\*서울대학교 수의과대학 미생물학 교실 및 농생명공학부

(2001년 4월 16일 게재승인)

## Immunogenicity of staphylococcal enterotoxin C mutant antigen in mice and dairy cows

Byoung-sun Chang, Yi-seok Joo\*, Jjin-san Moon\*, Keun-seok Seo\*\*,  
Soo-jin Yang\*\*, So-hyun Kim\*\*, Yong-ho Park\*\*

LG Chemical LTD, Seoul 150-721, Korea

\*National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-016, Korea

\*\*Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, School of Agricultural Biotechnology,  
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

(Accepted by April 16, 2001)

**Abstract :** Mastitis is one of the most significant cause of economic loss to the dairy industry. Especially, *Staphylococcus aureus* is a major contagious mastitis-causing pathogen in dairy cattle. Because of its high transmission rate and resistance to antibiotic therapy, staphylococcal mastitis presents a constant threat to the dairy industry. Staphylococcal enterotoxin C(SEC) produced by *S aureus* has been known as one of superantigens which are able to stimulate a large proportion of T lymphocytes independently of their antigenic specificity. In this experiment, we have conducted preliminary studies with mice and lactating cows to evaluate the immunogenicity and safety of the experimental vaccine consists of SEC mutant antigen on controlling the bovine mastitis associated with *S aureus* infections. The average value of somatic cell counts in quarter milk, isolation rate of *S aureus* were consistently decreased in SEC-SER vaccinated groups, whereas antibody titers were highly increased in SEC-SER vaccinated groups. Peripheral blood were also collected from the lactating cows to determine the proportion of leukocyte subpopulation associated with humoral immunity(HI) and cell mediated immunity(CMI). Proportion of leukocyte subpopulation expressing BoCD2<sup>+</sup>(total T lymphocyte), BoCD4<sup>+</sup>(T helper cell), BoCD8<sup>+</sup>(T cytotoxic/suppressor cell) and NonT/NonB lymphocyte which are involved in CMI in SEC-SER vaccinated groups were decreased for the initial stage after first vaccination and then increased from ten weeks after first vaccination maintaining elevated level till 14 weeks after vaccination. In contrast, proportion of monocyte, MHC class II and B lymphocyte which are associated with the production of primary immune response in SEC-SER vaccinated groups were increased for the initial period and then decreased from ten weeks after first vaccination. We present evidence that vaccination of SEC-SER mutant antigen in lactating cows induced a significant proliferation of bovine T lymphocytes. These results suggest that SEC-SER mutant antigen used in this experiment might be one of potential immunogen in developing innovative vaccine against bovine IMI associated with *S aureus*. Additional challenge trials should be carried out to evaluate substantial protection against *S aureus* under the commercial farm conditions.

**Key words :** Staphylococcal enterotoxin type C mutant(SEC mutant), immunogenicity

## 서 론

젖소 유방염은 병원성세균이 젖소의 유방내로 침입하여 유방조직에 염증을 일으키는 상태로써 세계적으로 젖소의 질병 중 가장 많이 발생하며 아울러 막대한 경제적 손실을 초래하는 것으로 알려져 있다. 젖소에서 일단 유방염이 발생하면 산유량 감소와 우유품질의 저하는 물론 항생제 등의 치료제 투약 기간 및 휴약 기간 동안 착유한 우유를 폐기해야할 뿐만 아니라 젖소의 경제적 수명을 단축시키는 결정적 요인으로 작용하게 된다. 국내외적으로 유방염 방제를 위한 수많은 연구가 다각도로 이루어졌으나 아직까지 유방염의 예방 및 치료에 대한 만족할만한 성과가 도출되지 않고 있는 것은 젖소 유방염 자체가 본질적으로 가지고 있는 여러 특성들 때문이다. 현재까지 세계적으로 효율적인 유방염 백신이 상용화되지 않았을 뿐 아니라 설령 유용한 백신이 개발되어 백신접종을 2~3회 실시하여 혈 중 항체가를 일정 수준 이상 높인다 하더라도 유방내의 항체가 수준을 유지시키기가 어렵기 때문이다. 전염성유방염 원인균 중 특히 *S aureus*의 경우는 예방 및 치료가 매우 어려운 특성을 지니고 있는데, 그 이유는 *S aureus*가 젖소의 체표에 늘 존재하는 상재성 세균이기 때문이다. 또한 유즙내에 출현하는 호중구는 에너지원의 고갈로 인하여 살균력이 혈중에서 보다 약 40% 이상 저하된 상태이기 때문에, 일단 유두를 통해 침입한 *S aureus*가 유즙내에 출현한 호중구에 의해 탐식이 이루어져도 계속 생존할 뿐 아니라 오히려 치료약제 등으로부터 보호받게 되는 것이다. 더우기 *S aureus*는 유선조직 내에서 섬유조직으로 encapsulation된 다양한 크기의 microabscess를 형성함으로써 외부에서 투약한 치료약제의 침투가 어려워져 임상형과 준임상형의 감염형태를 반복하는 고질적인 질병 양상이 나타나게 된다<sup>2,3</sup>. 따라서 전염성유방염 원인균 중 가장 문제가 되고 있는 *S aureus*의 신규감염을 효율적으로 방어할 수 있는 예방백신의 개발이 세계적으로 연구 목표가 되고 있는 실정이다. 또한 젖소 유선조직의 방어기전에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있어 젖소에 대한 면역조절물질이 적절하게 사용될 경우 유방염의 예방 및 치료에 많은 도움을 줄 수 있다는 연구결과가 다양하게 보고되고 있다<sup>4,7</sup>.

포도상구균 장독소(Staphylococcal Enterotoxins; SEs)는 *S aureus*, *S pyrogenes* 등에 의해 산생되는 것으로서 발열성독소(Pyrogenic Toxins; PTs)에 속하는 exotoxin subgroup 중의 하나이다. SEs의 면역조절능력의 대부분은 SEs이 superantigens (SAGs)으로서 작용하기 때문인 것으로 알려지고 있다<sup>8-10</sup>.

본 연구는 superantigen으로 작용하는 것으로 보고된

SEs 중에서 *S aureus* 감염우증 국내에서 가장 흔히 나타나는 SEC에서 독성을 제거시킨 SEC 변이독소의 젖소 유방염백신 항원물질로서의 개발 가능성을 탐색하기 위하여 실험동물인 mouse 및 대상동물인 젖소를 대상으로 면역원성을 확인하는데 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### Mouse에서의 면역원성

#### (1) 실험동물

5~6주령의 체중이 25~30 g 되는 BALB/c mouse를 국립수의과학검역원으로부터 분양 받아 시험에 사용하였다.

#### (2) 균주

*S aureus*의 enterotoxin typing을 multiplex PCR 기법<sup>11</sup>에 의하여 수행하여 *sec\** 유전자를 보유하는 것으로 확인된 야의 유방염 분리주(No.877)를 사용하였다.

### 변이독소

#### (1) 대장균 배양 · 회수 및 세포파쇄

Staphylococcal enterotoxin C의 독성을 제거하기 위하여 천연 아미노산 서열 중 제 94번부터 106번 사이를 제거시켜 잔여 염기서열의 조합에 의해 변이단백질 SEC (mutant protein SEC)를 제조하였다. 이어 SEC의 안정성을 향상시키기 위하여 SEC의 아미노산 서열 중 제 95번 아미노산인 cysteine를 serine으로 치환시킨 SEC-SER mutant protein(SEC-SER)을 제조하였다. SEC 및 SEC-SER을 발현하도록 제조한 *E coli* w3110을 30 L 발효조에서 M9 배지로 진탕 배양한 후 연속원심분리기(LAPX 202BTG, Alfa-Laval)로 수확한 후 이를 4 L의 10 mM Tris buffer(pH 7.0)에 현탁하였다. 이 현탁액을 Microfluidizer (Microfluidics Corp., USA)를 이용하여 8,000 psi의 압력으로 2회 통과시켜 대장균의 세포막을 분쇄하고 연속원심분리기로 상등액을 회수하였다.

#### (2) 분별침전 및 환외여과

이 상등액에 ammonium sulfate(Sigma, St. Louis, MO, USA)가 1.6 M이 되도록 넣고 4°C에서 용해시켜 8,500 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 이 상등액에 다시 최종 농도가 3.5 M이 되도록 ammonium sulfate를 넣고 4°C에서 용해시킨 후 원심분리기로 침전층을 회수하였다. 이 침전층을 4 L의 10 mM Tris buffer (pH 6.5)로 용해시킨 후, 300 kDa 크기의 구멍을 가진 환외여과막을 통과시켜 여과액(filtrate)을 모았으며 다시 10 kDa 크기의 구멍을 가진 환외여과막을 통과시켜 잔류액(retentate)을 농축시켰다. 잔류액은 10 mM Tris buffer(pH 6.5)로 희석, 농축을 반복하여 진도도를 800 μmho 이하

로 조정하였다.

(3) 컬럼크로마토그래피 및 완충용액 교환

10 mM Tris buffer(pH 6.5)로 평형화시켜 놓은 양이온 교환수지인 CM-sepharose 컬럼을 통과시켜 결합시킨 후 10 mM Tris buffer(pH 6.5)로 세척하고 다시 10 mM Tris buffer(pH 8.0)로 세척하였다. 컬럼에서의 용출은 0~200 mM의 NaCl 선형구배를 주어 수행하였다. 모아진 용출액은 10 mM Tris buffer(pH 8.0)으로 평형화시킨 음이온 교환수지(DEAE-sepharose) 컬럼을 통과시켜 통과액을 모았다. 모아진 통과액은 10 kDa 크기의 구멍을 가진 한외여과막으로 농축하고 phosphate buffered saline(PBS)로 희석하고 다시 농축하는 과정을 거쳐 최종 정제액을 얻었다.

(4) 백신 접종

SEC 및 SEC-SER 변이독소를 유성부형제(Emulsigen ISA-25 oil adjuvant)와 3:1의 비율로 혼합한 뒤 마리당 0.375-375 µg 용량으로 마우스 복강 내에 0.1 ml 씩 접종하였다.

(5) 공격접종용 특신의 정제

Multiplex-PCR 기법에 의한 *S aureus*의 enterotoxin typing 방법<sup>11</sup>으로 sec<sup>+</sup> 유전자를 보유하는 것으로 확인된 야외 유방염 분리주(No.877)를 선발하였으며 특신 정제는 다음과 같이 실시하였다. 즉 공격접종 균주는 brain heart infusion(BHI, Difco, Detroit, MI, USA) broth에 하루 밤 배양하여 8,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층

액을 수거하였다. 상층액에 ammonium sulfate(Sigma)를 52.5% 되도록 녹인 후 4°C에서 하루 밤 반응시켜 10,000 ×g에서 30분간 원심분리하여 침전독소를 수집하였다. 침전독소를 증류수로 용해시킨 후 4°C에서 하루 밤 투석하여 동결건조시켜 냉장고에 보관하였다. 정제된 항원은 Micro BCA protein assay reagent(Bio-Rad Co., Hercules, CA, USA)를 이용하여 농도를 5 mg/ml로 조절하여 4°C에 보관하면서 사용하였다.

(6) 공격접종

SEC 및 SEC-SER 변이독소의 생체 방어능 측정을 위해 2회에 걸쳐 Table 1 및 Table 2에서와 같이 식염수로 희석하여 0.5 mg/ml 농도로 마리 당 1 ml 씩 공격접종을 실시하였다.

(7) 채혈 및 림프구 분리

Mouse에서 안와 채혈을 한 후, Ficoll-Hypaque(D = 1.086; Lympholyte-M, Sigma)을 이용하여 Density-gradient centrifugation 방법으로 분리하였다. 분리한 림프구는 PBS로 3회 세척한 후 1×10<sup>7</sup>/ml 정도로 계수하여 사용하였다.

(8) 항체가 측정

ELISA 용 plate(Costar, USA)에 coating buffer(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.5 g, NaHCO<sub>3</sub> 2.93 g, D.W. 1,000 ml, pH 9.6)에 희석한 SEC 변이독소를 각 well 당 100 µl(5 µg/ml) 씩 분주하고 4°C에서 일야 정치시켰다. 다음날 아침 washing buffer(PBST; NaCl 8 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.87 g, KCl 0.2

**Table 1.** Experimental design for the determination of SEC or SEC-SER mutant antigen dose in mice

Groups	No. of mice	Antigen (µg/head)	Post-inoculation				No. of mice challenged
			wk 0 (1st vacc.)	wk 1 (2nd vacc.)	wk 2 (3rd vacc.)	wk 3	
SEC	23	0.375	-	5*	5*	5*	8
SEC	23	3.75	-	5*	5*	5*	8
SEC	23	37.5	-	5*	5*	5*	8
SEC	23	375	-	5*	5*	5*	8
Adjuvant	23	Adjuvant**	-	5*	5*	5*	8
Control	23	PBS***	-	5*	5*	5*	8
SEC-SER	23	0.375	-	5*	5*	5*	8
SEC-SER	23	3.75	-	5*	5*	5*	8
SEC-SER	23	37.5	-	5*	5*	5*	8
SEC-SER	23	375	-	5*	5*	5*	8
Adjuvant	23	Adjuvant**	-	5*	5*	5*	8
Control	23	PBS***	-	5*	5*	5*	8
	276	-	-	-	-	-	-

\*No. of mice sacrificed

\*\*Emulsigen ISA-25

\*\*\*Phosphate buffered saline (pH 7.2)

**Table 2.** Experimental design for immunogenicity of SEC or SEC-SER mutant antigen in mice

Groups	No. of mice	Antigen ( $\mu\text{g}/\text{head}$ )	Post-inoculation				No. of mice challenged
			wk 0 (1st vacc.)	wk 1 (2nd vacc.)	wk 2 (3rd vacc.)	wk 3	
SEC	26	0.375	-	2*	2*	2*	20
SEC	26	3.75	-	2*	2*	2*	20
SEC-SER	26	0.375	-	2*	2*	2*	20
SEC-SER	26	3.75	-	2*	2*	2*	20
Adjuvant	26	Adjuvant**	-	2*	2*	2*	20
Control	26	PBS***	-	2*	2*	2*	20
	156	-	-	-	-	-	-

\*No. of mice sacrificed

\*\*Emulsigen ISA-25

\*\*\*Phosphate buffered saline(pH 7.2)

g, Tween 20 0.5 ml, D.W. 1 L, pH 7.2)로 세척한 후, washing buffer에 bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 1% 되게 녹여 각 well 당 100  $\mu\text{l}$  씩 넣은 후 37°C에서 1시간 동안 blocking을 하였다. 각 well은 washing buffer로 5~6회 세척한 후 혈청을 washing buffer에 1:2,000으로 희석하여 각 well 당 100  $\mu\text{l}$  씩 넣고 다시 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 5~6회 세척하여 HRP conjugated anti-mouse IgG(Sigma)를 4,000배 희석하여 각 well 당 100  $\mu\text{l}$  씩 넣고 다시 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 계속하여 4~6회 세척한 후, 발색제 ABTS[(2,2-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)), KPL, USA]를 100  $\mu\text{l}$  씩 넣은 후 실온에서 30분간 반응시킨 후 2.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 100  $\mu\text{l}$  씩 넣어 반응을 정지시킨 다음 405 nm 흡광도에서 항체가를 측정하였다.

(9)  $\gamma$ -IFN 및 IL-2 assay

Mouse에서 혈청을 분리하여 mouse  $\gamma$ -interferon(IFN) 및 interleukin(IL)-2 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit(Endogen, Woburn, MA, USA)을 사용하여 제조사의 지시에 따라 수행하였다. Anti-mouse  $\gamma$ -IFN 및 anti-mouse IL-2가 미리 코팅된 plate에 mouse serum을 1:10으로 희석하여 각 well 당 100  $\mu\text{l}$  씩 넣은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 washing buffer를 사용하여 5회 세척하였다. 최종적으로  $\gamma$ -IFN 및 IL-2 standard의 흡광도로 직선 회귀식을 작성한 후 405 nm 흡광도에서 판독하였다.

## (10) 접종량 결정

백신 접종량을 결정하기 위하여 mouse 276마리를 Table 1과 같이 12개 groups(SEC mutant 2종에 대해 0.375~375  $\mu\text{g}$ 의 4개 용량군, 무투여 대조군 및 adjuvant 투여 대조군을 각각 설정)으로 나누어 1주 간격으로 3회에 걸쳐 mouse 1마리 당 1 ml 씩 복강 내 주사를 한 후 1차

접종 후 1, 2, 3주째 blood sampling을 통하여 항체가 측정,  $\gamma$ -IFN 및 IL-2 assay를 실시하고 최종(3차) 접종 후 1주째에 공격접종을 실시하였다(Table 1).

## (11) 면역원성 확인

접종량 결정시험에서 얻은 결과를 바탕으로 3.75  $\mu\text{g}$  및 37.5  $\mu\text{g}$  용량을 선정하여, mouse 156마리를 대상으로 Table 2와 같이 6개 group으로 나누어 면역원성 확인 시험을 실시하였다. 백신접종은 접종량 결정시험에서와 동일한 방법으로 실시하였으며 공격접종은 최종(3차) 접종 후 1주째에 실시하였다(Table 2).

## 젖소에서의 면역원성

## (1) 실험동물

연암축산원에대학 실습농장에서 사육중인 2~3 산차의 비유기 젖소 25두를 선발하여 실험에 사용하였다(Table 3).

## (2) 시험용 백신 제조

SEC-SER mutant antigen 100 mg을 주사용 증류수 150 ml에 잘 섞은 다음, Emulsigen ISA-25를 제조사의 지시대로 혼합하여 magnetic stirrer 상에서 잘 섞어주어 멸균된 병에 10 ml 씩을 넣고 멸균 밀봉시켰다. CMC adjuvant 및 control 대조액은 CMC와 SEC-SER mutant antigen을 각각 포함하는 수용액을 분무 건조하여 1~3  $\mu\text{m}$  크기의 미세입자를 만든 후, 이 미세입자를 먼실유에 분산시켜 최종분산액을 제조하였다. 제조된 시험백신들은 순도시험, protein 함량시험, endotoxin 확인시험 등의 QC test를 통하여 품질 기준에 적합한지를 확인하였다. 또한 혈액배지에 도말하여 세균 오염여부를 판정하였으며 안전성 확인을 위해, 5마리의 mouse를 대상으로 마리 당 시험용 백신 1 ml을 복강 내에 접종한 후, 7일간 관찰하였다.

**Table 3.** Experimental design for immunogenicity of SEC mutant antigen in dairy cows

Group	Antigen* (mg/head)	Adjuvant	N	Post-inoculation				
				wk 0 (1st vacc.)	wk 2 (2nd vacc.)	wk 6 (3rd vacc.)	wk 10	wk 14
Group 1	4	ISA-25**	5					
Group 2	4	CMC***	5					
Group 3	0.4	ISA-25	5					
Group 4	0.4	CMC	5					
Group 5	Control	CMC	5					
Total	-	-	25					

\*Antigen : SEC-SER

\*\*ISA-25 : Emulsigen ISA-25

\*\*\*CMC : Carboxy methyl cellulose-Na(Sigma, USA)

### (3) 백신 접종

시험용 백신은 ml 당 각각 4 mg, 0.4 mg이 되도록 농도를 조정하여 ISA-25(Emulsigen)와 CMC(Carboxy methyl cellulose-Na, Sigma)를 3:1의 비율로 혼합하여 젖소의 등근 부위에 두당 1 ml 씩 근육 접종을 실시하였다.

### (4) 혈액 및 유즙 채취

혈액은 정해진 일정(Table 3)에 따라 젖소의 미정맥에서 무균적으로 채혈하였으며, 유즙 역시 정해진 일정에 따라 젖소의 분방별로 무균적으로 채취하여 냉장 운반을 하였다.

### (5) 우유중 체세포수 분석

Fossomatic 4000(Foss Electric Co., Denmark) 기기를 이용하여 체세포수를 측정하였다.

### (6) 유방염 원인균 분리 동정

먼저 유즙을 혈액배지에 도말한 후 37°C에서 24시간 배양한 후 의심되는 집락은 그람 염색, coagulase 응집 시험, Baird- Parker 배지(Difco)에의 배양, DNase 시험, Voges-Proskauer 시험, 혐기상태의 Mannitol 발효능 등으로 확인하였다.

## 혈액 중 백혈구 아집단 분포율 분석

### (1) 혈액 중 백혈구 분리

말초혈액 백혈구의 분리는 Davis 등<sup>12)</sup>의 방법으로 실시하였다. 미정맥에서 채혈한 혈액과 항응고제인 acid citrate dextrose(ACD; sodium citrate 22.0 g, citric acid 7.3 g, dextrose 24.5 g, D.W. 1,000 ml) 용액을 3:1의 비율로 혼합하여 잘 섞은 다음, 1,500 rpm에서 30분간 원심분리를 하였다. Buffy coat 층을 채취한 후 37°C로 가온한 0.87% Tris-buffered ammonium chloride(Tris-NH<sub>4</sub>Cl; 0.01 M Tris, pH 7.2) 용액과 혼합하여 37°C 항온수조에 넣어 약 5분간 적혈구를 용혈시켰다. 다시 1,500 rpm에서 10

분간 원심분리하여 상층액을 버린 후, pellet을 PBS (sodium chloride 7.6 g, disodium phosphate 1.2688 g, monosodium phosphate 0.1 g, monopotassium phosphate 0.2113 g, pH 7.2)와 ACD 용액을 9:1로 혼합한 PBS-ACD buffer로 2회 정도 원심 세척을 하였다. 마지막 원심 후 pellet을 RPMI 1640(Sigma) 배지에 부유시킨 뒤 histopaque(비중 1.083, Sigma)에 중층시킨 후 1,500 rpm에서 20분간 원심분리를 한 다음, histopaque와 혈청과의 경계면에서 백혈구를 채취하였다. 분리한 백혈구는 PBS로 3회 세척하여 PBS에 부유시킨 다음, trypan blue 염색을 하여 생존 세포수를 측정한 후 최종농도를 1×10<sup>7</sup>/ml 정도로 조정하여 실험에 사용하였다.

### (2) 단클론항체

미국 워싱턴 주립대학교 수의과대학 단클론항체센터로부터 분양받은 단클론항체 8종을 실험에 사용하였다(Table 4).

### (3) 형광세포 유출장치 분석(Flow cytometry analysis)

백혈구 아집단별 분포율 분석은 Davis *et al*<sup>12)</sup>의 방법에 준해서 flow cytometry를 이용하여 실시하였다. 즉, conical bottom microplate의 well 당 각 단클론항체 50 µl (15 µg/ml)를 미리 넣은 다음, 혈액에서 분리한 1×10<sup>7</sup>/ml의 백혈구 100 µl 씩을 첨가하고 4°C에서 30분간 감작시킨 후 4°C의 first washing buffer(PBS 450 ml, ACD 50 ml, 20% Na<sub>3</sub>N 5 ml, gamma globulin free horse serum 10 ml, 250 mM EDTA 20 ml, 0.5% phenol red 1 ml)로 3회 원심분리(2,000 rpm, 3분, 4°C) 세척한 후, 상층액을 버리고 침전된 백혈구 세포덩어리를 plate shaker 또는 voltex mixer로 흔들어 와해시켰다. 와해된 백혈구를 secondary antibody를 이용, 단일 염색을 하였다. Fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG + IgM antibody(Caltag Lab Inc., USA)를 200

**Table 4.** Monoclonal antibodies specific to bovine leukocyte differentiation molecules

Molecules*	MAb**	Isotype of MAb	Cell type***	Reference
MHC Class I	H58A	IgG <sub>2a</sub>	Leukocyte	Davis <i>et al.</i> <sup>12</sup>
MHC Class II	H42A	IgG <sub>2a</sub>	Monocyte	"
BoCD2	BAQ95A	IgG <sub>1</sub>	T	"
BoCD4	CACT138A	IgG <sub>1</sub>	T helper, inducer	"
BoCD8	CACT80C	IgG <sub>1</sub>	T cytotoxic, suppressor	"
Surface IgM	PIG45A	IgG <sub>2b</sub>	B	"
TcR1-N12	CACT61A	IgM	N cell	"
GM1	DH59B	IgG <sub>1</sub>	Granulocyte/Monocyte	"

\*Molecules : Bovine leukocyte differentiation molecules

\*\*MAb : Monoclonal antibodies which specically react to leukocyte differentiation antigen

\*\*\*Cell type : Cells expressing molecules

배 희석한 후 각 well에 100  $\mu$ l 씩 첨가하였으며, 이를 다시 4°C에서 30분간 감작시킨 다음, 4°C의 secondary washing buffer(first washing buffer 성분 중 horse serum 만 제거한 것)로 3회 원심 세척하였다. 다음 2% PBS-formalin(38% formalin 20 ml, PBS 980 ml) 용액을 200  $\mu$ l/well 되게 가하여 고정시킨 후 염색이 끝난 세포들은 분석할 때까지 모두 냉암소(4°C)에 보관하였다. 염색이 완료된 시료는 flow cytometry를 이용하여 양성반응 세포 수를 측정하였다. 측정과 자료분석은 FACScalbur 및 Cell Quest version 3.1f(Becton Dickinson, USA) program을 이용하여 실시하였다.

## 결 과

### Mouse 에서의 면역원성

#### (1) 백신 접종 후 항체가 형성능

실험동물 mouse를 대상으로 SEC mutant protein 2종의 면역원성 확인을 위해, 접종용량 결정시험에서 항체 생성능 등을 통하여 적정용량 범위로 확인된 바 있는 3.75~37.5  $\mu$ g 용량으로 백신 접종을 실시한 후 항체가 변화를 분석하였다. 그 결과, 최초 희석배수 1:1000을 기준으로 1차 접종 2주째에 상승하기 시작하여 3주째에 SEC-SER 3.75  $\mu$ g 투여군에서 가장 높게 나타났고 SEC-SER 37.5  $\mu$ g 투여군 순으로 나타났다(Fig 1).

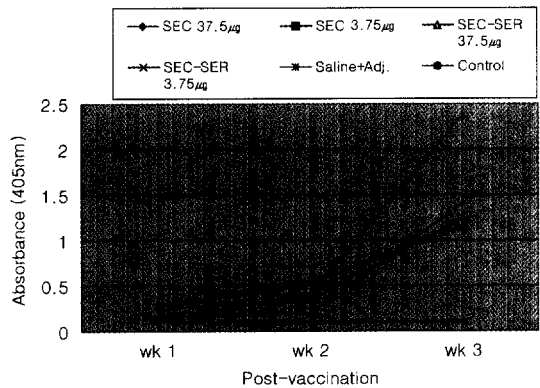
### Cytokine 분석

#### (1) $\gamma$ -IFN 생성능

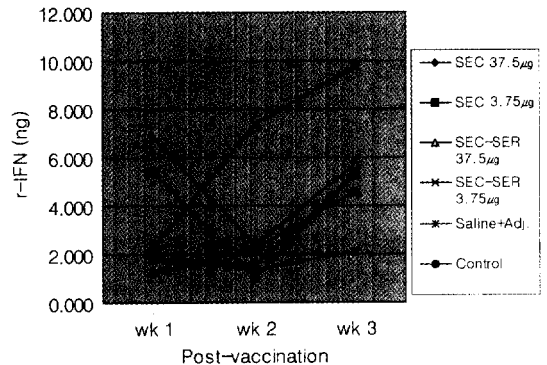
SEC-SER 3.75  $\mu$ g 투여군에서 1차 접종 후 2주부터 높게 상승하여 3주째에 최고치에 도달하였다(Fig 2).

#### (2) IL-2 생성능

SEC 투여군에서 1차 접종 후 2주부터 높게 상승하여 역시 3주째에 최고치를 나타내었다(Fig 3).



**Fig 1.** Serum antibody titers of mice vaccinated with SEC or SEC-SER mutant antigen determined by ELISA.



**Fig 2.** Production of  $\gamma$ -IFN in mice vaccinated with SEC or SEC-SER mutant antigen determined by ELISA.

#### (3) Mouse에서의 방어효과

Mouse에 대한 시험 백신 접종 후 방어 효과를 확인하기 위하여, SEC mutant 2종을 3.75~37.5  $\mu$ g의 투여 용

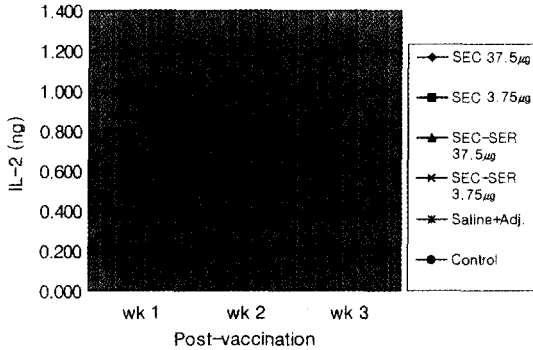


Fig 3. Production of IL-2 in mice vaccinated with SEC or SEC-SER mutant antigen determined by ELISA.

Table 5. Mortality of mice vaccinated with SEC or SEC-SER mutant antigen followed by SEC toxin challenge

Vaccines	Challenged with crude toxin*
SEC 37.5 μg	1/10**
SEC 3.75 μg	1/10
SEC-SER 37.5 μg	4/10
SEC-SER 3.75 μg	1/10
Adjuvant (Emulsigen)	3/10
Control (PBS)	8/10

\*LD<sub>50</sub>(1.1 mg/ml) of *S. aureus* No.877 isolate containing *sec*<sup>+</sup>  
 \*\*No. of mice died/No. of mice challenged

량으로 접종한 후 방어효과를 시험한 결과, 백신 접종군에서는 SEC-SER 37.5 μg 접종군에서만 40%의 폐사율을 나타낸 반면 기타의 백신 접종군 및 adjuvant 투여군에서는 10~30%의 폐사율을 나타내 면역형성 능력이 인정되었다. 반면, 대조군에서는 80%의 폐사율을 나타내었다(Table 5).

젖소에서의 면역원성

(1) SEC-SER mutant 백신 접종에 따른 체세포수 변화  
 백신접종에 따른 분방별 우유 중 체세포수 변화는 대조군(Group 5)인 carboxy methyl cellulose-Na(CMC; Sigma) 단독 투여군에서는 1차 접종 후 6주부터 증가하였고, Group 2(4 mg, CMC 투여군)에서는 약간의 상승을 보였으며 전체적으로 1차 접종 후 6주와 10주에서 유방염 감염에 의한 체세포수의 증가 현상이 있었다. 또한 체세포수 50만/ml 이상의 분방수를 조사한 결과, 대조군에서는 1차 접종 후 10주, 14주에서 각각 2배 이상의 증가를 보인 반면, Group 3(0.4 mg, ISA-25 투여군)

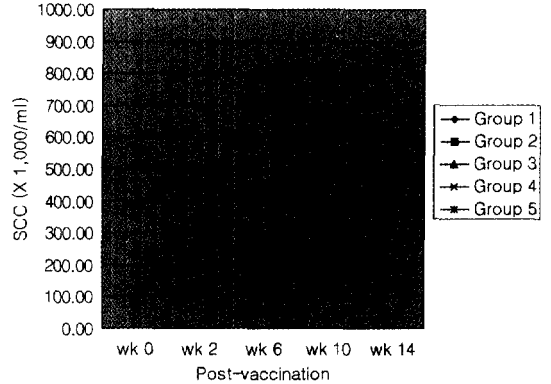


Fig 4. Changes of milk somatic cell counts in dairy cows vaccinated with SEC-SER mutant antigen. Group 1 : SEC-SER 4 mg, ISA-25; Group 2 : SEC-SER 4 mg, CMC; Group 3 : SEC-SER 0.4 mg, ISA-25; Group 4 : SEC-SER 0.4 mg, CMC; Group 5 : CMC adjuvant.

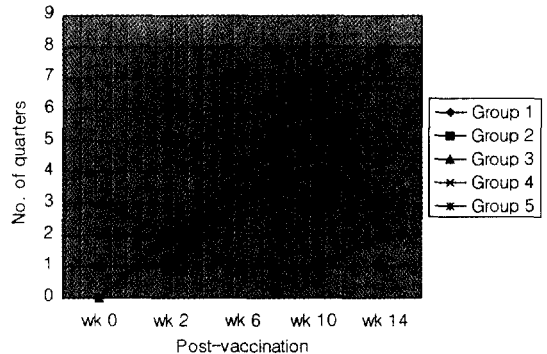
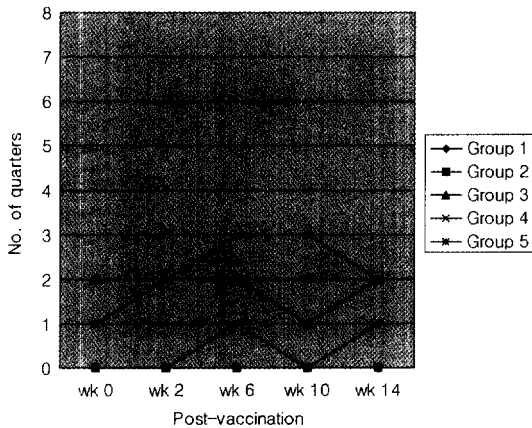


Fig 5. Number of quarters of mammary gland over 500,000/ml somatic cell counts in dairy cows vaccinated with SEC-SER mutant antigen. Group 1 : SEC-SER 4 mg, ISA-25; Group 2 : SEC-SER 4 mg, CMC; Group 3 : SEC-SER 0.4 mg, ISA-25; Group 4 : SEC-SER 0.4 mg, CMC; Group 5 : CMC adjuvant.

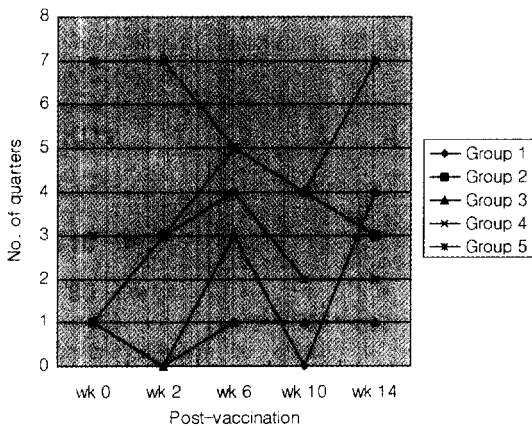
에서는 1차 접종 후 2주에 상승하였다가 다시 감소하였으며 Group 4(0.4 mg, CMC 투여군)의 경우는 1차 접종 후 10주에 가장 증가한 후 14주에 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figs 4, 5).

(2) 젖소 유방염 원인균 분리

젖소 유방염의 주요 원인균의 하나인 *S aureus*의 분리 현황은 Group 2(4 mg, CMC 투여군)에서는 전혀 분리되지 않은 반면 대조군(Group 5)에서는 지속적으로 분리되었다. 이러한 경향은 1차 접종 후 6주까지 지속되어 원인균의 분리율이 체세포수의 증가와 함께 높아졌다. 또한 비교적 항생제 치료가 잘 되는 coagulase negative *Staphylococcus*(CNS)균 분리율도 6주째 상승을 보임과



**Fig 6.** Isolation of *S. aureus* from milk samples of dairy cows vaccinated with SEC-SER mutant antigen. Group 1 : SEC-SER 4 mg, ISA-25; Group 2 : SEC-SER 4 mg, CMC; Group 3 : SEC-SER 0.4 mg, ISA-25; Group 4 : SEC-SER 0.4 mg, CMC; Group 5 : CMC adjuvant.

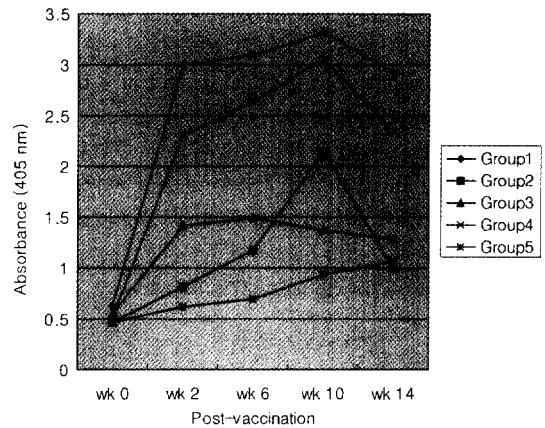


**Fig 7.** Isolation of Coagulase Negative Staphylococcus (CNS) from milk samples of dairy cows vaccinated with SEC-SER mutant antigen. Group 1 : SEC-SER 4 mg, ISA-25; Group 2 : SEC-SER 4 mg, CMC; Group 3 : SEC-SER 0.4 mg, ISA-25; Group 4 : SEC-SER 0.4 mg, CMC; Group 5 : CMC adjuvant.

아울러 체세포수의 증가를 나타내었다. 이러한 경향은 1차 접종 후 10주까지 지속된 후 14주에서는 Group 별 감소되는 경향을 보였다(Figs 6, 7).

### (3) SEC-SER 항체가 분석

ELISA 방법에 의해 투여 Group 별 항체 형성능을 측정된 결과, Group 1(4 mg, ISA-25 투여군)에서 가장 높은 항체 형성능을 보였으며, 이러한 높은 항체 수준은 1차 접종 후 14주까지 지속되었다. Group 2(4 mg, CMC 투여군) 및 Group 4(0.4 mg, CMC 투여군)에서도 높은



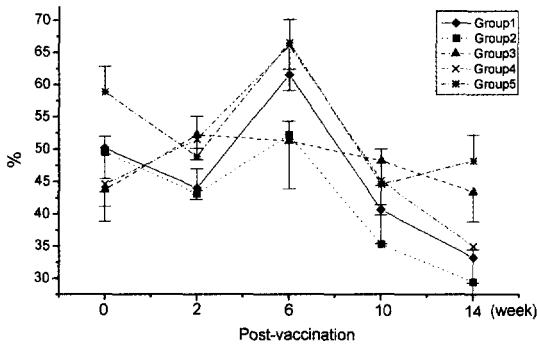
**Fig 8.** Serum antibody titers of dairy cows vaccinated with SEC-SER mutant antigen determined by ELISA. Group 1 : SEC-SER 4 mg, ISA-25; Group 2 : SEC-SER 4 mg, CMC; Group 3 : SEC-SER 0.4 mg, ISA-25; Group 4 : SEC-SER 0.4 mg, CMC; Group 5 : CMC adjuvant.

수준의 항체가를 나타냈으며, 이러한 항체가는 1차 접종 후 10주에 가장 상승된 결과를 보였다(Fig 8).

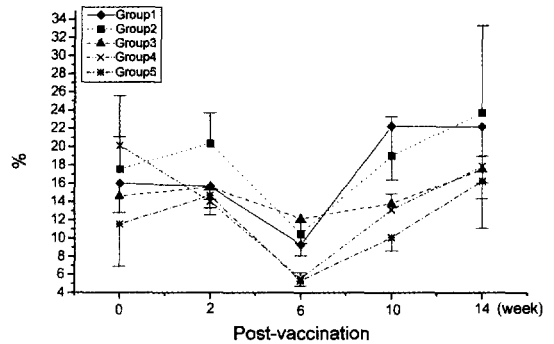
### (4) 백혈구 아집단 분포의 변화

시험대상군별로 혈액 중 백혈구 아집단 분포의 변화를 백신 1차 접종전, 2차 접종시(1차 접종후 2주째), 3차 접종시(1차 접종후 6주째) 및 1차 접종후 10주, 14주 등 5회에 걸쳐 분석한 결과, 전체적으로 항원의 투여용량이나 부형제 종류(ISA-25, CMC)에 따른 뚜렷한 차이를 확인하기는 어려웠으나 Group 2(4 mg, CMC 투여군)에서 세포성 면역형성이 가장 우수한 결과를 나타내었다. 전반적인 면역세포 변화 추이로 볼 때, 2차 면역에 관련하는 Total T 림프구( $\text{BoCD2}^+$ ), T helper cell ( $\text{BoCD4}^+$ ), T cytotoxic/suppressor cell( $\text{BoCD8}^+$ ) 등의 T 림프구 및 아집단세포의 비율이 1차 접종후 6주(2차 접종 후 4주)까지 현저한 감소를 보인 후 3차 접종 전·후부터는 다시 상승하는 경향을 나타내어 1차 접종 후 14주에는  $\text{BoCD8}^+$  T 림프구를 제외한  $\text{BoCD2}^+$  및  $\text{BoCD4}^+$  T 림프구 분포의 지속적인 상승이 유지되어 세포성면역형성이 이루어짐을 간접적으로 시사하고 있다. 또한 NonT/NonB 림프구의 변화 추이도  $\text{BoCD2}^+$  및  $\text{BoCD4}^+$  T 림프구의 변화 추이와 거의 유사한 경향을 보이고 있어 백신 3차 접종 후부터 효과적인 면역형성이 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다. 반면 생체 내 초동 방어 기전에 주로 관여하는 monocyte 및 항체 생성에 결정적인 역할을 담당하는 B 림프구의 분포가 3차 접종 전(1차 접종 후 6주)까지 매우 큰 폭으로 증가함을 확인할 수 있었다. 이후 B 림프구의 분포는 다소 감소하는 경향을 나타냈으며, monocyte의 경우는 현저히 감소하여

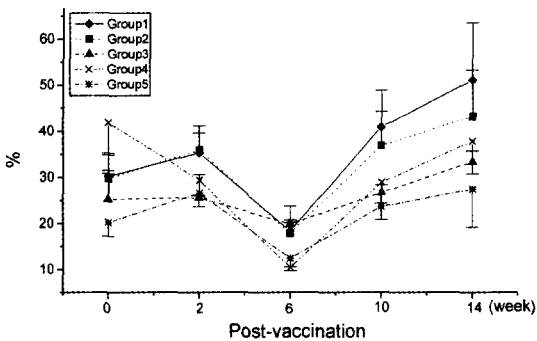




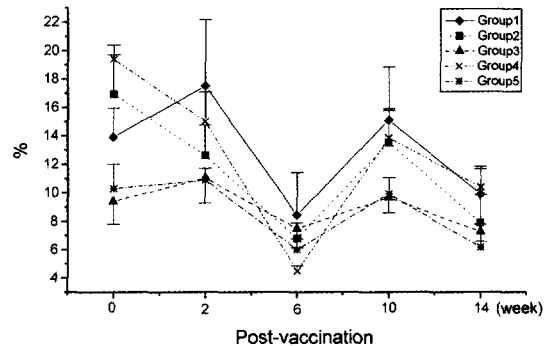
**Fig 9.** Changes of proportion of MHC class II expressing leukocyte subpopulations in peripheral blood of dairy cows vaccinated with SEC-SER mutant antigen. Group 1 : SEC-SER 4 mg, ISA-25; Group 2 : SEC-SER 4 mg, CMC; Group 3 : SEC-SER 0.4 mg, ISA-25; Group 4 : SEC-SER 0.4 mg, CMC; Group 5 : CMC adjuvant.



**Fig 11.** Changes of proportion of BoCD4<sup>+</sup> expressing leukocyte subpopulations in peripheral blood of dairy cows vaccinated with SEC-SER mutant antigen. Group 1 : SEC-SER 4 mg, ISA-25; Group 2 : SEC-SER 4 mg, CMC; Group 3 : SEC-SER 0.4 mg, ISA-25; Group 4 : SEC-SER 0.4 mg, CMC; Group 5 : CMC adjuvant.



**Fig 10.** Changes of proportion of BoCD2<sup>+</sup> expressing leukocyte subpopulations in peripheral blood of dairy cows vaccinated with SEC-SER mutant antigen. Group 1 : SEC-SER 4 mg, ISA-25; Group 2 : SEC-SER 4 mg, CMC; Group 3 : SEC-SER 0.4 mg, ISA-25; Group 4 : SEC-SER 0.4 mg, CMC; Group 5 : CMC adjuvant.



**Fig 12.** Changes of proportion of BoCD8<sup>+</sup> expressing leukocyte subpopulations in peripheral blood of dairy cows vaccinated with SEC-SER mutant antigen. Group 1 : SEC-SER 4 mg, ISA-25; Group 2 : SEC-SER 4 mg, CMC; Group 3 : SEC-SER 0.4 mg, ISA-25; Group 4 : SEC-SER 0.4 mg, CMC; Group 5 : CMC adjuvant.

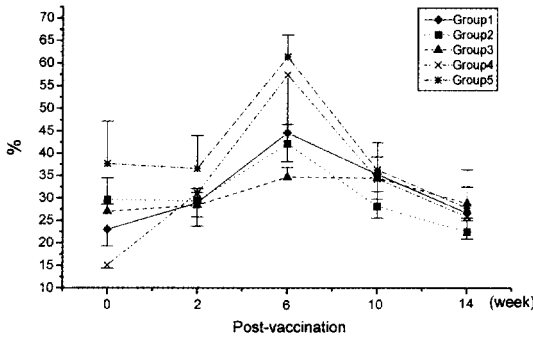
1차 접종 후 14주 경과시에는 백신 접종전과 거의 동일한 수준의 정상치를 보였다. 또한 이러한 경향은 주로 1차 면역에 관여하는 macrophage/monocyte가 발현하는 MHC class II molecule의 분포에서도 확인되고 있어 백신접종에 따른 일시적인 체세포수 증가가 있을 수 있음을 예상할 수 있었다(Figs 9-15).

## 고 찰

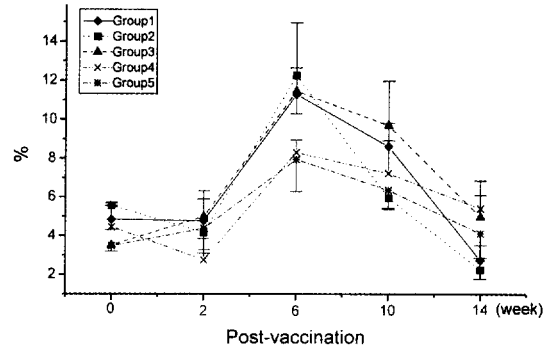
본 연구는 superantigens(SAGs)으로 알려진 staphylococcal enterotoxins(SEs) 중에서 국내 *S aureus* 감염우 중 가장 흔히 나타나는 것으로 보고된 staphylococcal enterotoxin type C(SEC) 변이독소의 유방염백신 항원 성분으로서의

개발 가능성을 탐색하기 위하여 실험용 백신을 제조하여 실험동물인 mouse 및 목적동물인 젖소를 대상으로 항체가 형성능, cytokines 생성능을 비롯한 면역원성 여부를 확인하는데 목적이 있었다.

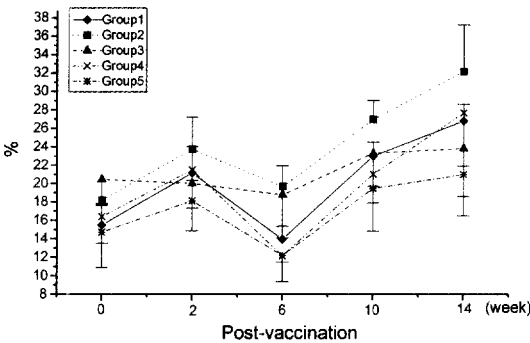
*S aureus*의 virulence는 fibronectin-binding protein(FnBPs) 등 cell surface proteins의 유선 상피세포에의 결합능력, pseudocapsule의 형성 및 toxins 분비 등의 다양한 특성들에 의해 결정된다<sup>13-19</sup>. *S aureus* surface protein으로 구성된 실험용 백신은 *S aureus*가 유선 상피세포에 결합하는 것을 방해하고 탐식능력을 증가시키는 작용을 목적으로 하고 있으며, FnBPs의 발현이 결핍된 *S aureus* 균주는 집락 형성, 유선세포 내 결합 및 침입능력이 현저히 저하된 결과로 미루어 볼 때 FnBPs가 유



**Fig 13.** Changes of proportion of B cells(sIgM<sup>+</sup>) in peripheral blood of dairy cows vaccinated with SEC-SER mutant antigen. Group 1 : SEC-SER 4 mg, ISA-25; Group 2 : SEC-SER 4 mg, CMC; Group 3 : SEC-SER 0.4 mg, ISA-25; Group 4 : SEC-SER 0.4 mg, CMC; Group 5 : CMC adjuvant.



**Fig 15.** Changes of proportion of monocyte in peripheral blood of dairy cows vaccinated with SEC-SER mutant antigen. Group 1 : SEC-SER 4 mg, ISA-25; Group 2 : SEC-SER 4 mg, CMC; Group 3 : SEC-SER 0.4 mg, ISA-25; Group 4 : SEC-SER 0.4 mg, CMC; Group 5 : CMC adjuvant.



**Fig 14.** Changes of proportion of N cells(TcR1-N12) in peripheral blood of dairy cows vaccinated with SEC-SER mutant antigen. Group 1 : SEC-SER 4 mg, ISA-25; Group 2 : SEC-SER 4 mg, CMC; Group 3 : SEC-SER 0.4 mg, ISA-25; Group 4 : SEC-SER 0.4 mg, CMC; Group 5 : CMC adjuvant.

선세포에의 결합 및 침입과정에 필수적인 것으로 보고된 바 있다<sup>20</sup>. 그러나 FnBPs를 구성 성분으로 하는 vaccine의 경우, 병원체의 침입에 의한 숙주세포 내 부착을 사전에 방어하는데 그 역할이 있으므로 많은 병원체의 침입시 일부 통과한 유방염 원인균에 의한 숙주 damage를 방어하지 못할 뿐 아니라, 이미 앞선 연구진들에 의해 광범위한 청구범위로 특허등록이 되어 있는 상태로서 독자적 개발이 현실적으로 어렵다는 측면이 있다. 이에 따라 숙주 내에 침입한 병원체에 의한 숙주 세포 및 세포성면역 기능 손상 억제를 target으로 하는 연구가 크게 주목받게 되었다<sup>21</sup>.

*S aureus*의 중요한 virulence factors 중의 하나는 exoprotein group 중의 일종인 SEs로서 숙주내에서 T 림

프구를 매우 높은 비율로 생성되게끔 자극하는 능력을 지녔기 때문에 prototypic microbial SAGs이라 일컬어진다<sup>8,10</sup>. 최근 SEC가 *in vitro*에서 bovine T cell을 비정상적으로 활성화시켜 stimulated cells의 증식을 억제시킨다는 사실이 밝혀졌으며 또한 cellular proliferation의 억제에는 activation markers의 발현을 일시적으로 down-regulation 시킨 후 T cell이 활발히 증식되는 시기가 이어진다는 사실 역시 보고되었다<sup>22</sup>. 또한 SAGs이 젖소에서 면역억제를 유발하여 *S aureus*에 의한 유방염이 감염되는 과정에 작용을 한다는 것이 밝혀졌고 SEC가 T cell의 subpopulation을 독특하고 비정상적으로 활성화를 유도한다는 연구결과가 보고되었다<sup>23</sup>. 한편 국내에서 *S aureus* 감염 젖소를 대상으로 multiplex PCR 기법으로 typing 한 결과 SEs types 중 SEC가 가장 우세한 독소형으로 보고된 바 있다<sup>11</sup>. 따라서 SEC에서 독성을 제거시킨 변이독소를 실험용 vaccine의 항원 성분으로 선정하여 유방염 주요 원인체에 의한 숙주세포 및 세포성면역 기능 손상을 억제하는 효과를 얻고자 하였다.

Mouse를 대상으로 한 시험을 통하여, 변이독소별 접종용량과 항체 생성능력, cytokine 생성능력 및 공격접종 후 방어능력과의 상관관계 및 변이독소 자체의 안정성을 포함한 물리화학적 특성 등을 종합적으로 검토한 끝에, 변이독소 2종 가운데 아미노산 서열 제 95번 위치의 cysteine을 serine으로 치환시켜 안정성을 향상시킨 SEC-SER을 선정하였으며, mouse에서의 접종용량은 마리 당 3.75~37.5 µg이 적절한 용량으로 판단하였다. 목적동물인 젖소에 대한 접종용량은 다른 면역조절 물질의 용량 설정 및 체중 차이 등을 고려 mouse 용량의 약 100배 용량인 두당 0.4~4.0 mg이 적절할 것으로 판단하였다.

목적동물인 비유기 젖소를 대상으로 한 시험에서, 유방염 감염 여부를 확인하는데 일반적인 지표로 사용되고 있으며 현재 낙농가들 사이에 가장 큰 관심 대상인 체세포수(SCC)의 변화를 백신접종 전후로 조사하였던 바 모든 group에서 체세포수가 1차 접종 후 6주 및 10주째에 전반적으로 다소 증가되는 양상을 보였다. 이러한 현상은 원인균 *S aureus* 분리 결과 및 백혈구 아집단 분석을 함께 검토한 결과로 미루어 볼 때, 계절적 요인과 함께 위생관리상 문제가 작용하였을 것으로 판단되며 백혈구아집단 중 백신접종 후 1차 면역세포 중 체세포의 주요 구성 성분인 monocyte 및 macrophage(MHC Class II\*)의 증가와 일치되는 것으로 확인되었다. 따라서 본 시험용 백신 투여 후 숙주면역기능의 향진에 따라 다소의 체세포수 상승작용이 있는 것으로 믿어진다. 이러한 사실은 어떤 항원이나 면역증강제를 투여할 경우 일시적인 1차 면역기능 상승에 기인한다고 할 수 있다. 일반적으로 유방염 감염으로 판단하는 체세포수 50만/ml 이상인 분방수를 조사한 결과, control 군에서는 접종 전 대비 약 2~3배의 증가를 보여 14주 째에 8개 까지 증가한 반면, Group 1(4 mg, ISA 투여군)을 제외한 나머지 투여군에서는 1차 접종 후 10주보다 14주 째에 50만/ml 이상의 분방수가 급격히 낮아지는 경향을 나타내어, 이 결과를 혈액 중 백혈구 아집단 세포에서 BoCD2<sup>+</sup>, BoCD4<sup>+</sup> 및 BoCD8<sup>+</sup> molecule 분석과 상관하여 검토한 결과로 미루어 볼 때 백신접종 후 4~6주경까지는 1차 면역에 의한 체세포수의 상승을 예견할 수 있고, 그 후 숙주의 세포성면역 기능 향진이 정착화 해 가는 것으로 추측되어진다. 추후 이와 같은 증가 경향은 면역세포 활성화 및 기능분석을 위한 연구를 시도한다면 확실한 근거를 확인할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 유방염의 주요 원인균인 *S aureus*를 분리 동정한 결과, control group에서는 *S aureus*가 지속적으로 분리된 반면, Group 2(4 mg, CMC 투여군)에서는 전혀 분리되지 않았다. 하지만 전반적으로 시험대상우 선정 시 모집단의 숫자가 제한된 관계로 group 당 두수를 5두씩으로 편성한 까닭에, 백신접종 전 group 별 *S aureus*가 분리된 분방수가 0~2개로 너무 적었던 점을 고려한다면 큰 의미를 부여하기는 어렵다고 판단되며, 향후 추가시험 시 충분한 두수로 group을 편성하여 백신접종 전에 *S aureus* 분리가 확인된 개체를 고르게 배치하여 수행하여야 할 것이다. 한편 비교적 항생제 치료가 잘 되는 coagulase negative staphylococcus(CNS)군 분리율에서도 전반적으로 1차 접종 6주 이후 증가하는 경향을 보여 체세포수의 증가를 뒷받침 해 주었다. 백신접종 후 SEC-SER에 대한 항체가의 변화를 분석한 결과, Group 1(4 mg, ISA-25 투여군)에서 1차 접종 후 10주째 최고치를

보인 후 14주까지 가장 높은 항체 형성능을 보였던 바, 백신접종 후 14주 이후까지 연장하여 항체가가 완전히 baseline level로 떨어지는 시기를 확인함이 필요할 것으로 사료되었다. 또한 사용 대상동물의 한정된 숫자 때문에 control group을 새로운 adjuvant인 carboxy methyl cellulose(CMC) 단독으로 투여하는 group으로 설정하였는데 항체가를 전혀 상승시키지 않는 PBS와 같은 물질만을 투여하는 negative control group을 함께 설정하였다면 control과의 비교를 보다 객관적으로 할 수 있었을 것으로 사료되었다.

결론적으로, SEC-SER mutant antigen을 구성성분으로 제조한 시험용 백신 접종 6주 이후 젖소에서의 세포성 면역 형성이 이루어진다는 사실을 확인할 수 있었으며 비유기 및 건유기 젖소를 충분히 확보하여 challenge 시험을 통한 실제 방어효과 측정 및 젖소에서의 *S aureus* 원인균 분리를 통하여 야외 임상적 조건하에서 *S aureus* 원인균에 대한 방어효과가 어느 정도, 오랜 기간 유지되는지에 대한 검증이 필요하다고 판단된다.

## 참고문헌

1. Mamo W, Hallen SC, Lindahl M, et al. Induction of anti-phagocytic surface properties of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis by growth in milk whey. *J Vet Med*, 38:401-410, 1991.
2. Craven N, Anderson JC, Jones TO. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet Rec* 118:290-291, 1986.
3. Shanson DC. Staphylococcal infection in hospitals. *Br J Hosp Med*, 35:312-319, 1990.
4. Nickerson SC, Owens WE, Boddie RL. Effect of *Staphylococcus aureus* bacterin on serum antibody, new infection and mammary histology in nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 16:1290-1299, 1993.
5. Daley M, Williams T, Coyle P, et al. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* infections with recombinant cytokines. *Cytokine*, 5:276-284, 1993.
6. Pighetti GM, Sordillo LM. Enhanced antigen-specific responses in bovine mammary glands following administration of interleukin-2. *J Dairy Sci*, 78:528-537, 1995.
7. Sordillo LM, Park YH, Joo YS. Role of cytokines in the pathophysiology and control of mastitis. *Kor J Vet Publ Hlth*, 21:261-270, 1997.
8. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248:705-711, 1990.
9. Bohach GA, Ferens W, Deobald C, et al. Interaction of staphylococcal enterotoxins with immune cells and their role in animal disease. *Kor J Vet Publ Hlth*, 20:337-348, 1996.
10. Bohach GA, Fast DJ, Nelson RD, et al. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic

- shock syndrome and related illnesses. *Crit Rev Microbiol*, 17:251-272, 1990.
11. 윤장원. Staphylococcal enterotoxins A,B,C,D,E와 TSST-1의 독소형 분석을 위한 multiplex PCR 확립. 서울대 대학원 석사학위 논문. 1998.
  12. Davis WC, Marusic S, Lewin HA, *et al.* The development and analysis of species specific and cross reactive monoclonal antibodies to leukocyte differentiation antigens and antigens of the major histocompatibility complex for use in the study of the immune system in cattle and other species. *Vet Immunol Immunopathol*, 15:337-376, 1987.
  13. Sutra LB, Poutrel B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 40:79-89, 1994.
  14. Iandolo JJ. The genetics of staphylococcal toxins and virulence factors. In: Molecular basis of bacterial pathogenesis. Eds. B.H. Iglewski and V.L. Clark. Academic Press, Inc., San Diego - New York - Boston - London - Sydney. 399-426, 1990.
  15. Moks T, Abrahmsin L, Nisson B, *et al.* Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur J Biochem*, 156:637-641, 1986.
  16. Nordhaug ML, Nesse LL, Norcross NL, *et al.* A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. *J Dairy Sci*, 77:1267-1275, 1994.
  17. Greenberg DP, Bayer AS, Cheung AL, *et al.* Protective efficacy of protein A-specific antibody against bacteremic infection due to *Staphylococcus aureus* in an infant rat model. *Infect Immun*, 57:1113-1118, 1989.
  18. Adlam C, Ward PD, McCartney AC, *et al.* Effect immunization with highly purified alpha- and beta-toxins on staphylococcal mastitis in rabbits. *Infect Immun*, 17:259-266, 1977.
  19. Mamo W, Jonsson P, Flock, JI, *et al.* Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis : Immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein(FnBP-A) to challenge with *S aureus*. *Vaccine* 12:988-992, 1994.
  20. Lammers A, Nuijten PJM, *et al.* Cell tropism of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary gland cell culture. *Vet Microbio*, 67:77-89, 1999.
  21. Sordillo LM, Shafer-Weaver K, Derosa D. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci*, 80:1851-1865, 1997.
  22. Ferens WA, Bohach GA, Davis WC, *et al.* Suppression of bovine T lymphocytes responses by the superantigen staphylococcal enterotoxin C. *Kor J Vet Publ Hlth*, 22:233-244, 1998.
  23. Ferens WA, Davis W, Hamilton MJ, *et al.* Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. *Infect Immun*, 66:573-580, 1998.