

## 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제에 관한 연구 II. 면역된 산란계로부터 생산된 난황항체의 특이성 분석

신나리 · 김종만\* · 최인수 · 유한상  
서울대학교 수의과대학 및 농생명공학부  
\*국립수의과학검역원 세균과  
(2001년 5월 30일 게재승인)

### Control of swine respiratory disease using egg yolk antibodies II. Specificity of immunoglobulin Y of hens immunized with bacterial pathogens related with swine respiratory diseases

Na-ri Shin, Jong-man Kim\*, In-soo Choi, Han sang Yoo

Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology,  
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

\*Division of Bacteriology and Immunology, National Veterinary Research and Quarantine Service,  
AnYang 430-016, Korea

(Accepted by May 30, 2001)

**Abstract :** Although several methods have been developed and applied to control swine respiratory diseases, the disease induces severe economic impact to swine industry worldwide. As one of the new trials, application of egg yolk antibody(IgY) was attempted for the purposes and immune response in sera and egg yolk was analysed with ELISA in previous study. In this study, immunological specificity of the IgY was analysed by Western blot analysis. In the analysis of causative agents of atrophic rhinitis, *B bronchiseptica* and *P multocida* 4D, proteins of 33, 40, 43, 67 and 141 kDa were specifically reacted with IgY. Also, 40 and 110 kDa proteins were identified as the major immunogens in *P. multocida* 3A. In *A pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5, 40 kDa and 47 kDa proteins were found to be the major reactive ones. These results suggested that egg yolk antibodies from immunized hens was specific with antigens injected into hens and partially purified antigens, outer membrane proteins and dermonecrotic toxin, were more effective than bacterin for the production of specific antibody.

**Key words :** IgY, specificity, Western blot, swine, respiratory diseases

## 서 론

난황항체는 어미닭이 획득한 면역항체가 난황중에 이행축적된 것으로서 포유류의 IgG class에 해당하나 그 물리화학적 성질이 약간 다르고 난황유래 항체이므로 IgY(Immunoglobulin Yolk)라고 명명하였다<sup>1-3</sup>. 난황항체는 생산적인 측면, 동물관리적 측면, 계통발생학적인 차이에 의한 면역학적인 측면 등에서 포유류에서 생산한

IgG 보다 유리한 장점을 지니고 있음이 밝혀졌으며<sup>4-5</sup>, 현재 이러한 난황항체를 사람 및 동물 질병의 예방 및 치료에 적용하고자 하는 노력이 많이 이루어지고 있다<sup>6-12</sup>.

전세계적으로 양돈산업에 있어서 많은 경제적인 손실을 야기시키는 주요 질병중 하나로 호흡기 질병이 있으며, 이는 주로 위축성 비염, 파스투렐라성 폐렴, 흉막 폐렴 등에 의하며 국내에서도 많은 경제적 피해를 주고 있

다. 위축성 비염은 *Bordetella bronchiseptica*와 *toxigenic Pasteurella multocida* 4D에 의해 유발되는 질병으로, 이들 원인체에서 생성되는 약 140 kDa 크기의 dermonecrotic toxin(DNT)은 질병을 유발하는 여러 인자중 가장 중요한 병원성 인자로서 알려져 있으며, *in vitro*에서는 bovine embryonic lung cell과 Vero cell에 대해 독성을 나타내고, 설치류나 조류의 치사를 유발하며, 돼지 비강의 turbinate bone에 osteolysis를 유도한다<sup>13</sup>. DNT는 exotoxin의 특성을 가지고 있으나, 생균으로부터 분비되지 않아 균체 파쇄에 의해 균체로부터 추출할 수 있으며 불활화된 DNT의 toxoid는 최근 들어서 돼지 위축성 비염 예방을 위한 백신의 중요한 구성 요소 중 하나로서 사용되고 있다<sup>13,16</sup>. 파스튜렐라성 폐렴의 원인체는 *Pasteurella multocida* 3A로서, 이 원인체에는 여러 가지 병원성 인자들 중 outer membrane protein(OMP)은 균외막의 주요 구성성분으로 균체의 integrity를 유지하는데 중요한 역할을 한다. 또한 OMP는 균체 특이 및 공통의 epitope을 모두 포함한 heterogenous 한 항원으로서 다양한 크기의 OMP fraction 중 일부가 고도의 항체반응을 나타내므로 여러 항원형(혈청형)에 대하여 효과적으로 면역을 형성할 수 있다는 장점을 지니고 있다<sup>14,17-19</sup>. 흉막폐렴은 *Actinobacillus pleuropneumoniae*에 의해 유발되는 질병으로, 2가지의 biotype과 14가지의 serotype이 존재하며 이들 간에 cross-protection이 결핍되어 있기 때문에 효율적인 vaccine 개발에 많은 장애 요인이 되어 왔다. 그러나 최근 truncated RTX toxin과 OMP가 cross reactivity를 유도하는 것으로 밝혀짐으로써 Apx toxin과 OMP를 이용하여 여러 종류의 혈청형을 동시에 방어할 수 있는 백신이 개발되어 이용되고 있다<sup>20,23</sup>. 이러한 내용들을 바탕으로 돼지 호흡기 질병을 효율적으로 예방, 치료하고자 이들 주요 인자들에 대한 난황항체를 이용하는 방법을 시도하였다.

신 등의 보고에서 돼지 호흡기 질병의 주요한 병원성 인자들을 포함한 시험백신을 제조하여 혈청 및 난황내에서의 이들 병원성 인자들에 대한 항체 생성 양상을 조사하였으나<sup>25</sup>, 생산된 난황항체가 집종항원에 대한 특이성 여부에 대한 검토의 필요성 있어 본 연구에서는 Western blot 기법을 이용하여 생산된 난황항체의 특이성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

본 실험에 사용한 균주는 국내에서 돼지 호흡기질병을 유발한 가검물에서 분리 동장된 균주로 *B bronchiseptica*, *P multocida* 3A 및 4D, *A pleuropneumoniae* serotypes 2

와 5로 이전의 보고<sup>25</sup>와 동일한 균주를 사용하였다.

### Bacterin의 생산

각 균주에 대한 Bacterin은 신 등의 보고<sup>25</sup>와 동일한 방법을 이용하여 생산하였다. 즉, 각각의 균주를 Tryptic soy broth(Difco Co., Detroit, MI, USA)에 접종하여 37°C에서 24시간동안 진탕 배양한 후, 배양액의 일부를 취하여 plate count method를 이용하여 균수를 측정하였고, 나머지 배양액에 formalin를 최종 농도가 0.05%가 되도록 첨가하여 실온에서 방치하여 불활화하였다. 불활화된 균주는 8,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 수확한 후, Phosphate-buffered saline(PBS, pH7.2)를 이용하여  $1.0 \times 10^9$  cells/ml이 되도록 조절하였다.

### Outer membrane protein(OMP)의 생산

OMP의 분리는 Confer AW 등의 방법<sup>17</sup>에 준하여 실시하였다. 즉, TSB에 배양한 균을 8,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후 침전된 균을 10배량의 10 mM HEPES buffer(pH7.4)로 부유시키고, 부유한 균을 sonicator(Bandelin Co., Germany)를 사용하여 30분간 파쇄한 후, 8,000 rpm에서 30분간 다시 원심분리하여 상청액을 회수하여, 20,000 rpm에서 1시간 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물은 0.5% sodium N-lauryl sarcosine in 0.01M Tris buffer를 혼합하여 실온에서 1시간 방치한 후 20,000 rpm에서 1시간 원심분리하여 침전물을 다시 회수하고, 증류수 1.0 ml에 재부유시켜 protein concentration assay kit(Bio-rad Co., Hercules, CA, USA)로 단백질 농도를 측정한 후, -70°C에 보관하면서 추후 실험에 사용하였다.

### Dermonecrotxin(DNT)의 생산

DNT는 *B bronchiseptica*와 *P multocida* 4D를 TSB에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 진탕배양한 후, 8,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 수확한 균을 PBS에 부유시켜 sonicator로 30분간 균을 파쇄 다음, 20,000 rpm에서 1시간 원심분리하여 그 상청액을 취한후 0.45 µm filter로 여과하였다. 여과액은 단백질 함량을 측정한 후 특이성 분석 실험의 항원으로 실험에 사용하였다.

### 난황항체 추출

특이성 분석을 위한 난황항체는 chloroform-extracted method<sup>25</sup>를 이용하여 추출하였던 것 중 집종 후 8주차의 난황항체를 사용하였다. 즉, 난황항체 추출 방법은 수집한 계란을 난황만 분리하여 50 ml 원심튜브에 넣은 후에 동량의 PBS(pH7.2)를 가하여 vortex 하고, 다시 혼합액에 동량의 chloroform을 가하여 실온에서 2시간 정치

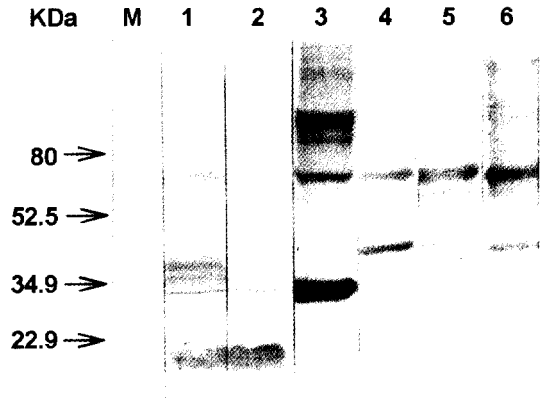
시킨 후 상청액을 취하여 난황항체를 사용하였다.

**Western blot analysis**

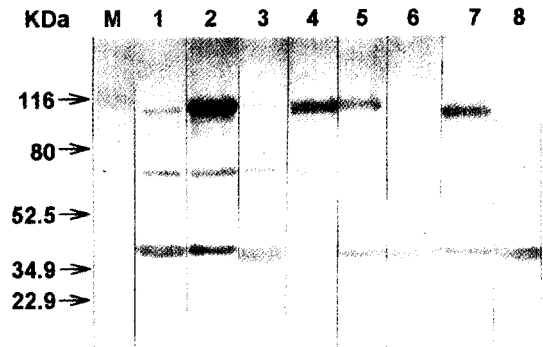
난황항체의 특이성 분석을 위해 Western blot을 실시하였다. Western blot을 위한 항원으로는 *B bronchiseptica*와 *P multocida* 4D에 대해서는 whole cell, DNT 및 OMP를 사용하였고, *P multocida* 3A와 *A pleuropneumoniae* serotypes 2와 5에 대해서는 백신제조에 사용한 항원인 whole cell과 OMP를 사용하였다. 먼저, 12% SDS-polyacrylamide gel의 각 well 당 5 mg/ml의 sample 13 µl를 loading 하여 25 mA에서 150분간 전기영동한 다음 Trans-blot SD-Dry Transfer cells(Bio-rad Co.)로 nitrocellulose membrane에 전사한 후 항원이 전사된 membrane을 3% BSA가 포함된 Tris-buffered saline(TBS)으로 shaking 하면서 2시간 동안 blocking 시키고 *A pleuropneumoniae* serotype 2, *P multocida* 3A와 4D 및 *B bronchiseptica*에 대한 IgY는 50:1로, *A pleuropneumoniae* serotype 5에 대한 IgY는 10:1으로 각각 희석하여 실온에서 3시간 동안 반응시킨 후, horseradish peroxidase-conjugated rabbit IgG fraction to chicken IgG (Cappel Co., Aurora, OH, USA)를 2차 항체로 사용하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 AP conjugate substrate kit(Bio-Rad Co.)를 이용하여 발색시켜서 반응하는 band의 양상을 확인하여 IgY 항체의 반응 특이성을 확인하였다.

**결 과**

돼지호흡기 질병의 효율적인 치료 예방대책을 수립하기 위한 방안의 하나로 난황항체 이용 기법의 개발을 시도하였다. 신 등의 보고<sup>25</sup>에서 접종계의 난황 및 혈중 항체가 변화에 대하여 ELISA를 실시하였으나, 그 특이성에 대하여는 조사 보고된 적이 없다. 본 연구에서는 Western blot 방법을 이용하여 IgY의 각 항원들에 대한 특이성을 분석한 결과, Fig 1에서 처럼 위축성 비염의 원인체인 *B bronchiseptica*와 *P multocida* 4D는 ISA75의 adjuvant로 사용하여 접종한 군에서 *B bronchiseptica*의 whole cell에 대하여는 20, 36, 40 및 67 kDa 크기의 band가, OMP에 대하여는 20 kDa의 크기, DNT에 대하여는 33, 67, 87, 100 및 141 kDa 크기의 band가 확인되었으며, *P multocida* 4D의 경우에는 whole cell, OMP 및 DNT의 모든 항원에 대하여 공통적으로 43 kDa 및 67 kDa의 크기에서 반응을 나타내었으며, 특히 *P multocida* 4D의 DNT에 대해 143, 100, 60 kDa에 대해 더 강한 반응을 나타내었다(Fig 1). *P multocida* 3A의 경우는 whole cell과 OMP를 항원으로 하여 분석한 결과, 사용한 항원과 관계없이 산란계 접종시 적용한 adjuvant에 따라 생

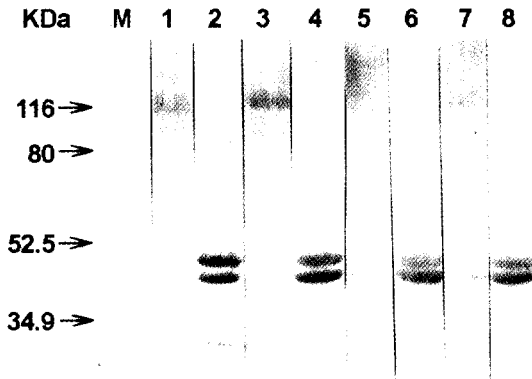


**Fig 1.** Immunological analysis of the egg yolk antibody of hens immunized with whole cell and dermonecrotxin (DNT) of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* 4D with ISA75 as adjuvant. Lane M: Molecular weight marker, lane 1: whole cell of *B bronchiseptica*, lane 2: OMP of *B bronchiseptica*, lane 3: DNT of *B bronchiseptica*, lane 4: whole cell of *P multocida* 4D, lane 5: OMP of *P multocida* 4D, lane 6: DNT of *P multocida* 4D.

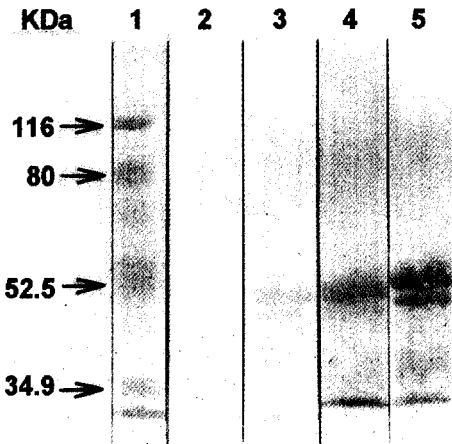


**Fig 2.** Immunological analysis of the egg yolk antibodies of hens immunized with *Psteurella multocida* 3A OMP and whole cell. Lane M: Molecular weight marker, lane 1, 2, 3 and 4: Aluminum hydroxide gel, lane 5, 6, 7 and 8: ISA75. lane 1 and 5: whole cell with *P multocida* 3A alone, lane 2 and 6: OMP with *P multocida* 3A alone, lane 3 and 7: whole cell with *P multocida* 3A combined with *A pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5, lane 4 and 8: OMP with *P multocida* 3A combined with *A pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5.

성된 band가 달리 나타났다. Aluminum hydroxide gel을 adjuvant로 사용하여 면역한 닭의 난황에서는 40, 60 및 110 kDa 크기의 단백질이 주요 반응 band로 나타났다 (lanes 1, 2, 3 and 4 in Fig 2). 그러나, ISA75를 adjuvant로 사용한 경우에는 40 kDa 만이 주요 반응 band로 나타났다(lane 5, 6, 7 and 8 in Fig 2), Western blot에서



**Fig 3.** Immunological analysis of the egg yolk antibody of hens immunized with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 whole cell and OMP. Lane M: Molecular weight marker, lane 1, 2, 3 and 4: Aluminum hydroxide gel, lane 5, 6, 7 and 8: ISA75. lane 1 and 5: whole cell with *A pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5, lane 2 and 6: OMP with *A pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5, lane 3 and 7: whole cell with *A pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5 combined with *P multocida* 3A, lane 4 and 8: OMP with *A pleuropneumoniae* serotypes 2 and combined with *P multocida* 3A.



**Fig 4.** Immunological analysis of the egg yolk antibody of hens immunized with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 whole cell and OMP. Lane 1: Molecular weight marker, lane 2 and 3: Aluminum hydroxide gel, lane 4 and 5: ISA75. lane 2 and 4: OMP with *A pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5, lane 3 and 5: OMP with *A pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5 combined with *P multocida* 3A.

의 반응은 균일한 정도로 나타났다. 흉막폐렴의 원인균인 *A pleuropneumoniae*를 분석한 결과, serotype 2에서는 whole cell antigen에 대하여 adjuvant의 종류에 관계없이 40 kDa의 항원과 반응하였고(lanes 1, 3, 5 and 7 in

Fig 3), OMP를 항원으로 한 경우에는 40 kDa과 47 kDa 크기의 항원들과 특이적인 반응을 나타내었으며(lanes 2, 4, 6 and 8 in Fig 3), OMP 항원이 whole cell 항원보다 더 강한 반응을 나타내었다. *A pleuropneumoniae* serotype 5의 경우에는 생성된 난황항체가 whole cell에 대하여는 매우 미약한 반응을 나타내었고 (data not shown), OMP에 대한 반응은 serotype 2와 유사하였다(Fig 4).

## 고 찰

양돈산업에서 가장 문제시되는 질병 중의 하나인 돼지 호흡기 질병을 방제하기 위한 새로운 방법의 일환으로 난황항체의 적용을 제시한 바 있다. 돼지 호흡기 질병 원인체에 대한 난황항체를 생산하기 위해 백신을 제조하여 산란계에서 고도면역을 유도하였으며 혈청 및 난황내에서의 면역반응 변화 양상을 조사 보고하였다<sup>25</sup>. 본 보에서는 생산된 난황항체의 특이성 여부에 대하여 조사하였다.

난황항체의 특이성을 조사하기 위해 Western blot을 실시한 결과, 각 원인체의 병원성 인자에 따라 그리고 각각의 산란계 투여군마다 다양한 크기의 항원에 대한 항체를 생산하였음을 확인하였다. 특히 실험에 사용된 대부분의 원인체의 major protein으로 추측되었던 40 kDa 전후의 OMP에 대하여 특이항체 생산이 이루어졌으며, 이는 40 kDa 전후의 주요 OMP가 생체 내에서도 immunogen으로서 강하게 반응한다는 것을 의미한다.

*B bronchiseptica*와 *P multocida* 4D 대한 Western blot 결과, *B bronchiseptica*의 경우 항원의 종류에 따라 다양한 크기의 band에 반응하였으며 특히 whole cell이나 OMP 보다 crude DNT에 대하여 더 강한 반응을 나타내었다. 이는 *B bronchiseptica*의 DNT가 돼지에서 뿐 아니라 산란계에서도 중요한 면역원이며, 이행항체로서 작용할 수 있음을 나타낸다. *B bronchiseptica*의 whole cell을 항원으로 IgY와 반응시킨 결과, 이전의 SDS-PAGE의 결과와 마찬가지로 약 40 kDa의 band에 대하여 반응하였으며 그 외 20, 36 및 67 kDa 크기의 band도 반응하였다. 그러나, OMP의 경우, 단지 약 20 kDa의 단백질에 대하여만 반응하였으며 이는 OMP의 추출과정에서 OMP의 물리적인 변화에 의한 파괴로 분자량의 감소에 의한 것으로 생각된다. 즉, 이러한 결과는 *B bronchiseptica*에 대하여 산란계에게 면역시키고자 하는 경우 OMP 보다 whole cell을 사용하는 것이 효과적이며, whole cell 성분 중 OMP 외의 LPS, capsule 등의 다른 구성성분에 대해 면역이 형성됨을 의미한다. *B bronchiseptica*의 DNT의 경우, 다양한 크기의 band에 대하여 강한 반응이 이루어졌으며 특히, 약 140 kDa의 band가 나타난 것은 DNT

의 intact molecule에 대한 항체가 생성되었음을 의미하는 것으로 사료된다. *B bronchiseptica*와는 달리 *P multocida* 4D는 모든 항원에 있어서 거의 유사한 결과를 나타내었다. 즉, *P multocida* 4D의 경우 whole cell에서 균체의 파괴에 의해서 획득되어지는 crude DNT나 OMP가 면역원으로서 작용하는 매우 중요한 구성성분일 것으로 생각되며 특히, *B bronchiseptica*에 대한 결과와 마찬가지로 *P multocida* 4D의 DNT를 항원으로 사용한 경우 더 다양한 크기의 단백질에 대해 반응하였고 DNT로 사료되는 140 kDa 정도의 고분자 단백질에 대하여 반응한 것으로 미루어 볼 때 *P multocida* 4D의 DNT가 산란계에 있어서도 중요한 면역원으로서 작용함을 의미한다. *P multocida* 4D에 대한 SDS-PAGE의 결과와 비교해 볼 때 주요 단백질로 나타났던 40 kDa 정도의 크기의 단백질에 대해 항체가 생성되었으며, crude DNT와 OMP의 SDS-PAGE 결과에서 확인되었던 약 67 kDa 크기의 단백질에 대해서도 항체가 형성되었음을 알 수 있었다. 이상의 결과는 산란계로부터 *P multocida* 4D에 대한 면역을 유도하고자 할 때, DNT와 함께 whole cell의 구성성분인 OMP가 중요한 면역원으로서 작용할 수 있음을 나타내는 결과라 할 수 있다.

파스튜렐라성 폐렴의 원인체인 *P multocida* 3A는 단독 및 다른 원인체와의 복합투여와 상관없이 adjuvant 및 접종부위에 따라서 인식된 항원이 각기 달랐다. 이는 항원의 체내 흡수 속도에 따라 면역체계가 인식하는 항원이 달라질 수 있음을 의미하며, *P multocida* 3A가 함유하고 있는 60 kDa 크기의 단백질이 흡수속도가 빠를수록 항체 형성에 효과적임을 나타낸다.

그러나 *P multocida* 3A와는 달리 *A pleuropneumoniae* serotype 2의 경우, adjuvant의 종류 및 접종부위에 상관없이 모두 whole cell bacterin 및 OMP에 대하여 각기 동일한 항원에 대한 특이항체를 생산하였으며, 특히 OMP에 대하여 강하게 반응한 것으로 보아 bacterin보다 OMP를 항원으로 사용한 경우가 산란계에서 특이적인 면역을 유도하는데 있어서 더욱 효과적임을 알 수 있었다. *A pleuropneumoniae* serotype 5의 경우 whole cell bacterin에 대해서는 반응이 매우 미약하게 일어났으나, OMP에 대하여서는 비교적 강한 반응을 나타내었고, OMP에 대한 Western blot의 결과 *A pleuropneumoniae* serotype 2와 마찬가지로 group에 관계없이 40과 47 kDa의 동일한 크기의 항원에 대한 특이항체를 생산하였다. 이러한 *A pleuropneumoniae* serotypes 2와 5에 대한 Western blot의 결과는 *A pleuropneumoniae*의 virulence factor 중 하나인 OMP가 pathogenesis와 protection에 있어서 우선적으로 중요한 것임을 제안하며, 이는 Haesebrouck F 등의 보고<sup>23</sup>와 일치하는 내용이었다. 또

한 Haesebrouck F의 보고<sup>23</sup>에 따르면 *A pleuropneumoniae*의 serotype 마다 OMP profile이 다르지만 모든 serotype에 공통적인 OMP가 존재한다고 하였으며 공통적인 OMP의 분자량 크기 중 일부가 이번 실험 결과와 거의 일치하였다. 즉, *A pleuropneumoniae*의 항원에 대하여 특이적으로 생산된 난황항체는 serotype에 공통적인 OMP에 대하여 생성된 난황항체이며 이러한 결과는 여러 가지 다양한 혈청형이 존재함으로써 백신제조가 어려운 흉막폐렴에 대한 면역을 효과적으로 형성하는데 있어서 좋은 자료가 될 수 있을 것이라 생각된다. 또한 *A pleuropneumoniae* serotype 5에 있어서 adjuvant로서 oil을 사용한 경우에 반응이 더 잘 나타난 것은 oil adjuvant가 aluminum hydroxide gel을 adjuvant로 사용한 경우보다 특이항체 유도에 있어서 더 효과적임을 나타내는 결과이며 이는 이전의 보고<sup>25</sup>와 일치하는 결과이다. 이상의 결과들을 종합하여 볼 때, 돼지 호흡기 질병에 대한 백신제조에 사용한 DNT, OMP 등과 같은 virulence factor가 whole cell bacterin보다 특이적인 항체를 형성하는데 있어서 중요한 인자로 작용하는 것으로 사료되며, adjuvant의 종류나 백신접종 부위 등도 특이항체를 형성하는데 영향을 미치는 인자라 할 수 있겠다.

본 연구의 결과, 생성된 난황항체는 돼지호흡기 질병 원인체들에 대하여 특이적으로 생성되었음이 확인되었으며, 앞으로 이러한 특이항체를 실제 적용하기 위해 실험동물 및 목적동물인 돼지에의 적용 시험이 추가적으로 이루어져야 할 것이다.

## 참고문헌

1. Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY. clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today*, 16(8): 392-398, 1995.
2. Larsson A, Balow R, Lindahl TL *et al.* Chicken Antibodies: Taking advantage of evolution-a review. *Poult Sci*, 72:1807-1812, 1993.
3. 이남형, 노정해, 한찬규 등. 여러 가지 산란계 사료 첨가제가 계란의 IgY 수준과 산란율에 미치는 영향. *한축지*, 41(2):155-166, 1999.
4. 이승배, 최석호, 고태송 등. 계란의 난황에서 IgY 항체 생산 및 특성에 관한 연구. *Korean J Food Sci Ani Resour*, 16(1):85-88, 1996.
5. Kowalczyk K, Daiss J, Halpern J. Quantitation of maternal-fatal IgG transport in the chicken. *Immunol*, 54:755-762, 1985.
6. 우승룡, 김종만, 권창희 등. 난황항체를 이용한 돼지 대장균설사증 방제기법 개발 I. 대장균 pilus 항원과 LT로 면역시킨 닭의 면역반응. *대한수의학회지*, 38(4):829-836, 1998.
7. 우승룡, 김종만, 권창희 등. 난황항체를 이용한 돼지 대장균설사증 방제기법 개발 II. 난황항체의 돼지대

- 장균증에 대한 치료효과. 대한수의학회지, 38(4):837-842, 1998.
8. Yokoyama H, Paralta RC, Diaz R *et al.* Passive protective effect of chicken egg yolk Immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect Immun*, 60(3):998-1007, 1992.
  9. Ikemori Y, Kuroki M, Peralta RC *et al.* Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Am J Vet Res*, 53(11):2005-2008, 1992.
  10. Hatta H, Tsuda K, Akachi S *et al.* Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. *Biosci Biotech Biochem*, 57(7):1077-1081, 1993.
  11. Hatta H, Tsuda K, Ozeki M *et al.* Passive immunization against dental plaque formation in humans : effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, 31(4):268-74, 1997.
  12. Almeida CM, Kanashiro MM, Rangel FB *et al.* Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. *Vet Rec*, 143(21):579-584, 1998.
  13. Rutter JM. Virulence of *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of gnotobiotic pigs infected with *Bordetella bronchiseptica*. *Res Vet Sci*, 34:287-295, 1983.
  14. Confer AW. Immunogens of *Pasteurella*. *Vet Microbiol*, 37:353-368, 1993.
  15. Marandi MV, Mittal KR. Identification and characterization of outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* serotype D by using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*, 33(4):952-957, 1995.
  16. Nakai T, Sawata A, Kume K. Intracellular locations of dermonecrotic toxins in *Pasteurella multocida* and in *Bordetella bronchiseptica*. *Am J Vet Res*, 46(4):870-874, 1985.
  17. Confer AW, Nutt SH, Dabo SM *et al.* Antibody responses of cattle to outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* A:3. *Am J Vet Res*, 57(10):1453-1457, 1996.
  18. Dado SM, Confer AW, Murphy GL. Outer membrane proteins of bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates. *Vet Microbiol*, 54:167-183, 1997.
  19. Marandi MV, Mittal KR. Characterization of an outer membrane protein of *Pasteurella multocida* belonging to the OmpA family. *Vet Microbiol*, 53:303-314, 1996.
  20. Nakai T, Kawahara K, Horiguchi Y *et al.* Characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Am J Vet Res*, 53(9):1519-1523, 1992.
  21. Bunka S, Christensen C, Potter AA *et al.* Cloning and characterization of a protective outer membrane lipoprotein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect Immun*, 63(7):2797-2800, 1995.
  22. Furesz SE, Mallard BA, Bosse JT, *et al.* Antibody- and cell-mediated immune responses of *Actinobacillus pleuropneumoniae*-infected and Bacterin-vaccinated pigs. *Infect Immun*, 65(2):358-365, 1997.
  23. Haesebrouck F, Chiers K, Overbeke IV, *et al.* *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs : the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet Microbiol*, 58:239-249, 1997.
  24. Wongnarkpet S, Pfeiffer DU, Morris RS, *et al.* An on-farm study of the epidemiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs as part of a vaccine efficacy trial. *Prev Vet Med*, 39:1-11, 1999.
  25. 신나리, 김종만, 유한상. 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제 관한 연구 I. *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* 및 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 주요 면역원 분석 및 IgY의 생산. 대한수의학회지, 40(3):551-561, 2000.