

최종보고서

한약제(고삼 등)를 이용한 소 유산질병의
원인체인 네오스포라 치료제 개발에 관한 연구

Development of anti-protozoal drug from medicinal herbs
(*Sophora flavescens* and *Torilis japonica*) against
Neospora caninum, cause of bovine abortion disease

연구기관
서울대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “한약제(고삼 등)를 이용한 소 유산질병의 원인체인 네오스포라 치료제 개발에 관한 연구” 과제(세부과제: 한약제(고삼 등) 추출액 HPLC 분석의 배양세포내 항원총 효능 평가 및 안전성 연구, 협동과제: 한약제(고삼 등) 추출액 HPLC 분석의 동물내 항원총 효능 평가 연구)의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 14 일

주관연구기관명 : 서울대학교 수의과대학

총괄연구책임자 : 윤 희 정

세부연구책임자 : 윤 희 정

연 구 원 : 김 대 용

연 구 원 : 조 명 행

협동연구기관명 : 제주대학교 수의학과

협동연구책임자 : 김 재 훈

연 구 원 : 강 상 철

요 약 문

I. 제 목

한약제(고삼 등)를 이용한 소 유산질병의 원인체인 네오스포라 치료제 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 국내 축산업은 북한 핵 문제 등 한반도 주변의 정세 악화로 어두운 국가 경제 전망과 큰 폭의 축산물 가격 변동 등으로 어려운 여건에 처해있다. 그간 육종, 사양 및 질병의 진단기술 개발 등 여러 면에서 외형적인 여건은 개선을 거듭하여 왔으나, 그 생산성은 선진국에 비하여 떨어지고 있다. 그 이유는 첫째 사료 공급 및 사양에 충분치 못한 국내의 축산 환경이며, 둘째 축산 기술을 과학적인 체계에서 개발 및 활용하기 위한 연구가 부족한 점이라 할 수 있다. 전자는 이미 주어진 여건이므로 근본 자체를 해결할 수 없는 일이지만, 후자를 해결하기 위하여 지난 3년간 서울대학교 수의과대학 등에서는 “국내 소 유산증의 원인분석 및 수립대책”이라는 과제로 연구사업을 수행하여 좋은 결과를 얻은 바 있다. 특히 소 유산증의 주요 원인체 중의 하나가 *Neospora caninum*이라는 것이 밝혀지고 이에 대한 면역학적 예방법과 한약제를 이용한 치료제의 개발에 대한 연구를 하여 좋은 결과는 얻었으나 아직 초보단계에 이르러 앞으로 더욱 이에 대하여 투자를 한다면 좋은 결과를 얻으리라 사려된다. Neosporosis는 개, 소, 양, 염소, 말, 사슴 등에서 자연발생 예가 보고되었으며, 개와 소를 비롯하여 마우스, 랫드, 토끼, 저빌, 면양, 산양, 돼지, 고양이, 여우, 너구리, 고요테 등에서 실험감염 예가 보고되었다. 원숭이와 같은 유인원에서도 실험적으로 태반감염이 이루어졌기 때문에 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)과 마찬가지로 인수공통전염병의 가능성을 완전히 배제할 수 없어 관심이 집중되고 있다. Neosporosis의 치료방법은 아

직까지 잘 알려지지 않았다. 지금까지 Neosporosis의 소 유·사산에 대한 치료가 이루어지지 못하여 속수무책으로 경제적 손실을 당하는 수밖에 없다. 그러므로 Neosporosis에 대한 치료제의 개발이 절대적으로 필요한 상황에서 본인 등은 지난 3년간 “국내 소 유산증의 원인분석 및 수립대책”의 연구과제를 수행하면서 한약제의 닭꼭시톱 원충에 대한 항원충 효능의 평가 경험을 바탕으로 한약제의 *N. caninum* 원충에 대한 항원충 효능을 screening한 결과 우수한 항원충 효능을 가진 한약제를 선발할 수 있는 가능성을 찾아 본 연구를 수행하였다.

경제동물인 소를 사육하여 얻는 소득은 우유, 고기 및 번식을 통한 송아지 생산이 주가 된다. 분만은 곧 생산의 시작이기 때문에 유우 또는 육우에서 경제성 산물의 창출을 통한 국제경쟁력을 향상시키기 위해서는 무엇보다도 정상적인 수태와 분만이 가장 중요하다. 젖소의 유·사산과 이어지는 번식장애는 우군관리시 가장 큰 문제가 되는 유방염 및 발굽병과 함께 목장의 3대 질병의 하나로서 이로 인하여 축산농가가 입는 피해는 실로 엄청나다. 이는 잘 알려진 사실이다. 소의 유·사산은 전 세계적으로뿐만 아니라 국내 낙농업의 최대 경제 손실요인의 하나로서 생산성의 저하로 인하여 매년 엄청난 손실을 주고 있는 것으로 간주되고 있다. 더욱이 최근에 와서는 새로운 원인체 및 요인 계재로 이러한 소의 유·사산이 증가하는 추세이다. 그 중의 하나가 Neosporosis이다. 이는 최근에 와서 상당히 중요한 유·사산의 원인체로 알려졌다. 그러나 이를 효과적으로 예방하기 위한 수단이 아직까지는 미흡한 실태이다. 물론 지난 3년간 “국내 소 유산증의 원인분석 및 수립대책”의 연구과제를 수행하면서 백신과 한약제에 의한 예방대책의 수립 가능성은 얻었으나 보다 확실하고 효과적인 한약제를 이용한 *N. caninum*에 대한 항원충 제제의 개발은 앞으로 국내 유·사산 질병의 상당부분을 치료할 수 있을 뿐만 아니라 축산업의 국제경쟁력을 높여줄 것으로 사려된다. 즉 본 연구진은 국내 유·사산의 전염성 요인들 중 하나인 Neosporosis에 대한 한약제 추출액의 치료효능 평가와 이를 기반으로 하여 우수한 항원충 효능을 가진 한약제의 구성성분을 HPLC 등을 이용 분획하여 그들의 항원충 효능을 평가하고 우수한 효능을 가진 분획을 선별하여 실험동물과 목적동물 중 산양에서의 항원충 효능을 평가하여 *N. caninum* 원충의 구충제를 선발하고자 하였다. 이를 현장에 적용하여 축산농가의 생산성을 향상시키는 것은 물론 궁극적으로 축산업의 국제경쟁력을 높일 수 있을 것으로 판단하였다.

최근 구제역 등의 발생으로 인하여 국내 축산업계는 큰 타격을 받았다. 더욱 더 심각한 것은 실제 목장에서 문제시되어 경영의욕을 감소시키는 요인들이라고 할 수 있다. 소 사육 목장의 소요 경비 중에서 질병의 예방 및 치료와 이에 수반되는 생산성 감소는 경제적인 측면뿐만 아니라 축산 농민의 소 사육의 사회적 의욕과 직결된다. 최근 들어 성우 및 송아지 가격의 하락뿐만 아니라 식육 잔류

항생제의 검사기준의 강화로 예후가 불량하거나 치료비가 비교적 높은 처치 등의 경우는 목장에서 기피하고 도태시키는 예를 많이 볼 수 있다. 특히 고능력 우에서 다발하는 번식장애의 원인 일부는 유·사산의 결과 발생하는 경우가 많이 있으며, 이에 대한 원인 파악과 대책을 요구받게 된다. 전면적인 수입 개방으로 축산농가의 기반이 위태로운 상황에서 사회적인 여건에 의한 가축 생산선의 저하는 농민들의 사회적 소외감과 축산의 의욕 상실로 이어질 것임을 재고할 여지가 없는 상황이기에 이를 진작시키기 위해 본 연구가 절실히 필요하였다. 본 연구를 통하여 소의 유산과 관련된 축산 농민들의 애로점 중 Neosporosis에 의한 질병을 해결함과 동시에 축산 농가들의 사기 의욕을 진작시킴으로써 사회 문화적 공감대 형성은 물론 침체되어 있는 축산업을 일정 부분은 회복시키는데 기여할 수 있으리라 기대하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제의 목적을 달성하기 위하여 1개의 세부과제와 협동과제로 나누어 연구를 수행하였으며 세부 및 협동과제별 연구내용 및 범위는 다음과 같다.

세부과제 “한약제(고삼 등) 추출액 HPLC 분획의 배양세포내 항원층 효능 평가 및 안전성 연구”에서는 먼저 1년차에 배양세포 내에서 한약제의 소의 유·사산을 일으키는 *N. caninum* 원충에 대한 항원층 효능 평가하고자 하였고, 한약제의 HPLC 분획의 안전성을 평가하고 *N. caninum*에 대한 항원층 효능을 평가하고자 하였다. 2년차에는 역시 배양세포 내에서 한약제의 소의 유·사산을 일으키는 *N. caninum* 원충에 대한 항원층 효능 평가하고자 하였고, 한약제의 HPLC 분획을 분석하고 *N. caninum*에 대한 항원층 효능을 평가하고자 하였다. 3년차에는 계속하여 배양세포 내에서 한약제의 소의 유·사산을 일으키는 *N. caninum* 원충에 대한 항원층 효능 평가하고자 하였고, *N. caninum*에 대한 한약제 HPLC 분획의 항원층 효능을 평가하고 HPLC 분획을 분석하고자 하였다.

협동과제 “한약제(고삼 등) 추출액 HPLC 분획의 동물내 항원층 효능 평가 연구”에서는 1년차에 실험동물에 *N. caninum*을 인공감염시키고, *N. caninum* 감염 실험동물 내에서 한약제의 HPLC 분획의 항원층 효능 평가하고자 하였다. 이들에 대하여 임상증상 및 부작용을 관찰하고자 하였으며, 병리조직학적으로 감염 장기를 확인하고 원충의 분포를 확인하고자 하였다. 2년차에는 산양에 *N. caninum*을 인공감염시키고, *N. caninum* 감염 산양에서 한약제의 HPLC 분획의 항원층 효능 평가하고자 하였다. 이들에 대하여 임상증상 및 부작용을 관찰하고자 하였으며, 병리조직학적으로 감염 장기를 확인하고 원충의 분포를 확인하고자 하였다. 3년차에는 계속하여 중숙주인 개에 *N. caninum*을 인공감염시키고, *N. caninum* 감

염 개에서 한약제의 HPLC 분획의 항원층 효능 평가하고자 하였다. 이들에 대하여 임상증상 및 부작용을 관찰하고자 하였으며, 병리조직학적으로 감염 장기를 확인하고 원충의 분포를 확인하고자 하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구개발 한약제를 HPLC 분획한 결과 1차 분획에서 얻은 7개의 분획을 세포내 배양된 *Neospora caninum*에 대한 항원층 효능을 평가하였다. 즉 96wells microplates에 *N. caninum*을 세포배양하여 7개의 분획을 단계희석하여 적용시키고 중수소(3H)가 주성분인 uracil을 처리한 후 일정기간 배양하였다. 대조군의 원충이 충분히 자라면 이것을 여과지에 수거하여 Wallac Microbeta workstation으로 방사선의 양을 측정하여 항원층 효능을 평가한 결과 7개의 분획 중 4(고삼 3, 사상자 1)개의 분획이 특히 높은 항원층 효능을 나타냈다. 또한 2차 분획에서 얻은 7개의 분획을 세포내 배양된 *Neospora caninum*에 대한 항원층 효능을 평가하였다. 즉 96wells microplates에 *N. caninum*을 세포배양하여 7개의 분획을 단계희석하여 적용시키고 중수소(3H)가 주성분인 uracil을 처리한 후 일정기간 배양하였다. 대조군의 원충이 충분히 자라면 이것을 여과지에 수거하여 Wallac Microbeta workstation으로 방사선의 양을 측정하여 항원층 효능을 평가한 결과 7개의 분획 중 4(고삼 3, 사상자 1)개의 분획이 특히 높은 항원층 효능을 나타냈다. 3차와 4차 분획의 결과 고삼에서 4개의 분획을 그리고 사상자에서 5개의 분획을 얻었다. 이 3차와 4차 분획에서 얻은 9개의 분획을 세포내 배양된 *N. caninum*에 대한 항원층 효능을 평가하였다. 즉 96wells microplates에 *N. caninum*을 세포배양하여 7개의 분획을 단계희석하여 적용시키고 세포의 생존 유무와 원충의 수를 측정하여 항원층 효능을 평가한 결과 7개의 분획 중 6(고삼 4, 사상자 2)개의 분획이 특히 높은 원충 억제효능을 나타냈다. 또한 이들 중 원충 억제효능이 우수한 분획을 선별하여 세포내 배양된 *N. caninum*에 대한 항원층 효능을 재평가하였다. 즉 96wells microplates에 *N. caninum*을 세포배양하여 7개의 분획을 단계희석하여 적용시키고 세포의 생존 유무와 원충의 수를 측정하여 항원층 효능을 평가한 결과 7개의 분획 중 4(고삼 3, 사상자 1)개의 분획이 특히 높은 항원층 효능을 나타냈다.

이 분획들을 GCMS로 분석한 결과 2개의 분획이 Sophoridane, 그리고 각각 1개의 분획이 Matridin-15-one(CAS), Furosardonin A, Tetraisopropylidene-cyclobutane, 5,17, beta-Dihydroxy-de-A-Estra- 5,7,9,14-Tetraene, Furanodiene, 9,12-Octadecadienoic acid(Z,Z)-(CAS) 등과 매우 유사한 구조로 밝혀졌으며, 3개의 미지의 분획이 있으므로 나왔다.

이 분획들 중 일부의 실험동물, 산양 및 개에서의 *Neospora caninum*에 대한 항원층 효능을 실험한 결과는 다음과 같다. 국내에서 네오스포라병에 대한 혈청 역학조사를 실시한 결과 젖소목장별 및 개체별 항체 양성율은 각각 53.5%와 35.6%에 달하고, 유산산 발생빈도별로는 유산산 다발 목장과 일반 목장이 각각 48.7%와 20.7%로 나타나 현실적으로 젖소 목장에서 매우 심각한 상태인 것으로 알려져 있다. 최근 소 유산태아 144두에 대하여 병리조직학적 검사와 PCR 검사를 병행하여 유산 원인을 분석한 결과 16.7%의 유산예가 네오스포라 감염에 의한 유산임이 밝혀져 많은 문제를 제시하고 있는 실정이다. 1988년 본 질병의 병원체가 미국에서 최초로 분리된 이후 분리된 원충을 이용하여 효율적인 진단법을 개발하고 원충 구제를 위한 예방 기법을 확립 및 치료 약제를 개발 또는 선 발하기 위한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있는 실정이다. 따라서 본 연구는 국내 분리 네오스포라 원충주 KBA-2를 BALB/c 마우스, 임신된 염소 및 포유 자견에 인공 감염시키고, 고삼 및 사상자와 같은 한약제 추출 HPLC 분획을 투여하여 본 제제들의 항원층 효능을 검사하였다. 원충 감염군과 약제 투여군 별로 임상증상 발현 정도, 생존율 또는 유산 발생율, 병리조직학적 병변의 정도 등을 비교하였다. 면역이 억제된 BALB/c 마우스에 원충을 접종한 감염군은 접종 후 14일부터 거친 피모, 운동성 상실, 사료섭취 저하 등의 임상증상을 나타내어 17~25일 중에 전 두수 폐사하였으며, 뇌, 췌장, 폐장, 간장, 비장 등의 장기에 괴사성 또는 비화농성 염증 병변을 형성하였다. 특히 괴사성 뇌염 병변 지수는 평균 8.15로 매우 심한 병변을 형성하고 있었다. 원충을 감염시킨 뒤 고삼 및 사상자 HPLC 분획을 투여한 마우스에서는 평균 생존일은 큰 차이를 나타내지 않았으나, 약제 투여군에서 감염군에 비하여 마우스의 생존율은 다소 향상되고, 뇌의 병변 지수는 감소하는 경향을 뚜렷이 나타내었다. 특히 고삼 고용량 (50 μ l) 투여군과 사상자 고용량 (50 μ l) 투여군의 경우 원충 감염 대조군에 비하여 생존율은 각각 25% 및 41.7%로 증가하였고, 뇌 병변 지수는 각각 1.81 및 2.23 정도 감소하였다. 임신된 염소에 원충을 투여하고 각 약제의 항원층 효능을 비교 하였다. 원충 감염-무투약군의 임신 산양 2두는 접종 후 27일째 모두 유산을 하였으며, 유산된 태아의 뇌에서 다발성 괴사성 뇌염 소견이 관찰되었다. 고삼 및 사상자 HPLC 분획을 투여한 임신 산양 8두에서 2두를 제외하고 6두가 유산을 하였다. 그러나 평균 유산발생일은 고삼 고용량 (1ml/kg) 군, 고삼 저용량(1ml/kg) 군, 사상자 고용량 (1ml/kg) 군 및 저용량 (1ml/kg) 군이 각각 51일, 45일, 78.5일, 50.5일로 나타나 감염 대조군에 비하여 늦어지는 양상을 나타내었다. 포유 자견을 이용한 실험 감염 및 항원층 시험 결과 국내 분리 원충이 개에 대한 병원성이 낮은 관계로 항원층 효능을 평가할 수 는 없었다. 본 실험을 통하여 고삼 및 사상자의 HPLC 분획이 마우스에서 *N. caninum* 감염을 어느 정도 방어하여 생존율

을 향상시킬 수 있었으며, 임신 염소에서는 감염 자체를 방어 또는 치료하지는 못하였지만 유산의 발생시기를 다소 늦출 수 있음을 확인하였다. 따라서 고삼 및 사상자와 같은 한약제 추출 HPLC 분획이 네오스포라병과 같은 원충성 질병의 치료에 사용될 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로 미루어 두 한약제의 HPLC 분획 중 4개의 분획이 *N. caninum*에 대하여 높은 항원충 효능을 가진 것으로 사려된다. 물론 동물실험에서는 아직 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 그러므로 현재의 결과만으로도 특허를 신청하기에는 충분한 것으로 사려되어 빠른 시일 내에 특허출원의 절차를 밟을 예정이며 아울러 동물실험을 더욱 확대 실시하여 좋은 약제로써 개발될 수 있도록 할 것이다.

SUMMARY

Neosporosis is one of the most critical disease problem of bovine abortion in the dairy cattle industry worldwide because of its negative economic impact. the korean livestock industry have difficulty because of decreasing economy situation and the price fluctuation of stock farm products in these days. the productivity of korean livestock industry is lower than that of the developed country in spite of the effort for breeding, rearing. but this effort contribute to the external livestock business. the first reason of low productivity in Korea is not good livestock industry circumstance and second reason is not enough research for the livestock technology from the scientific point of view. the veterinary college of seoul national university have taken effort to find out the solution for the second reason in the research of "Diagnostic survey of bovine abortion in korea and establishment of preventive measures" for last 3 years. In this research we found out the neosporosis the cause of bovine abortion and immunological prohibiton methods and treatment method using of the herb extracts. but the much investment is necessary for the good results.

Neospora was isolated from naturally infected canine, bovine, sheep, goat, deer and artificially infected in canine, bovine, mouse, rats, sheep, goat, swine, cats, fox, racoon. Anthropoid like monkey was artificially infected through placenta, so we have focus on zoonosis of *Neospora* like *Toxoplasma gondii*. the treatment method for neospora is not well known. there has been much economic damage because we have not known the treatment method for neospora abortion.

The developing of treatment method for neosporosis is very important, so we have been studied in the research of "Diagnostic survey of bovine abortion in korea and establishment of preventive measures" for last 3 years. The purpose of this study was to determine whether alcoholic extract of herbs possess anti-protozoal activity against *N. caninum*, using the research

experiences of screening of the anticoccidial effects of herbs extracts against avian coccidiosis.

the income of cattle industry is composed of milk production, meat production and calf production, so normal pregnancy and parturition is very important to strengthen the competitiveness of livestock industry on international markets. the reproduction failure is one of the three major disease including mastitis and foot disease in cattle. It is well known that the economic damage from abortion and stillbirth of bovine is enormous in korea and worldwide. the abortion and stillbirth rate of bovine is increasing now because of unknown disease and unknown cause. Neosporosis is the important disease for bovine abortion but there is no effective protection methods. through the research of "Diagnostic survey of bovine abortion in korea and establishment of preventive measures" we found out the possibility of protection for this disease using the vaccine and herb extracts and the development of treatment method for neosporosis will strengthen the competitiveness of livestock industry on international markets.

We have sought to determine which alcoholic extract of herbs possess anti-protozoal activity against *N. caninum* and evaluate anti-protozoal efficacy of high performance liquid chromatography(HPLC) fractions. and we focused on selection of effective anti-*Neospora* herb extract fractions through vivo test using sheep. If we could apply this result to the field, it will increase productivity of the farms and strengthen the competitiveness of livestock industry on international markets.

Recently, korea cattle industry had suffered damage from Food and Mouse disease. And the increasing protection cost and the decreasing productivity of Stock farm are related with the future of korea livestock industry. The decreasing price of cattle, the increasing protection cost and the social issue about tissue residue of antibiotics made the farmer weed out useless cattle. The reproduction failure of a high productivity cow is usually caused by abortion and stillbirth. so It is vary important to find out the cause and to settle treatment methods. In this study, we anticipated that we found out the treatment method of the *Neospora* abortion and motivated the farmer and widen the belt of consensus of the society and improved the depressed livestock industry. To achieve the object, we studied one detail project and one cooperative project. the contents of detail project and cooperative project

are like below this.

In the first year, we evaluated anti-neosporosis efficacy and safety of HPLC fractions. In The detail project of "the anti-protozoal efficacy and safety test of HPLC fractions of herb extract ". In the second year, we evaluated anti-protozoal efficacy of medical herb extracts against *Neospora* which cause bovine abortion and stillbirth in cell culture. In the third year, we evaluated anti-neosporosis efficacy of HPLC fractions in cell culture and anti-protozoal efficacy of medical herb extracts against *Neospora* which cause bovine abortion and stillbirth.

In the first year, we artificially infected *N. caninum* to animals and we evaluated the anti-protozoal efficacy test of HPLC fractions in the cooperative project of "the anti-protozoal efficacy test of HPLC fractions of herb extract in animals". we observed clinical signs and side effects and we wanted to certify infected organs and know distribution of neospora in infected animals with histo-pathology. In the third year, we infected *N. caninum* to canine which is the final host, and we evaluated the anti-protozoal efficacy test in this canine, and we observed clinical signs and side effects and we wanted to certify infected organs and know distribution of *Neospora* in infected animals with histo-pathology.

We evaluated anti-neosporal efficacy of 7 HPLC fractions of herb extracts that were obtained from first fraction in cell culture plate . For microtitre assay, we plated *N. caninum* into flat-bottomed 96 well tissue culture plates and we serially diluted herb extracts from 1:2 to 1:128 and we treated this plates with ³H-uracil, if the protozoa raised enough, the protozoa were filtered and we analyze ³H-uracil incorporation by *N. caninum* using Microbeta workstation. This provided a quantitative assessment to examine the effect of inhibitory compounds in vitro. We found 4 fractions (3 fractions of *Sophora flavescence*, 1 fraction of *Torillia japonica*) which showed good anti-protozoal efficacy in this study. In the second fraction, we evaluated anti-neosporal efficacy of 7 HPLC fractions of herb extracts. For microtitre assay, we plated *N. caninum* into flat-bottomed 96 well tissue culture plates and we serially diluted herb extracts from 1:2 to 1:128 and we treated this plates with ³H-uracil. If the protozoa raised enough, the protozoa were filtered and we analyze ³H-uracil incorporation by *N. caninum* using Microbeta workstation. We found 4 fractions (3 fractions of *S. flavescence*, 1 fraction of *T. japonica*)

which showed good anti-protzoal efficacy in this study out of 7 fractions. In the third and fourth fractions, we found 4 fractions of *S. flavescence* and 5 fractions of *T. japonica* which showed good anti-protzoal efficacy. We evaluated anti-neosporal efficacy of this 9 fractions. We evaluated anti-neosporal efficacy of this 9 fractions of herb extracts in cell culture plate. For microtitre assay, we plated *N. caninum* into flat-bottomed 96 well tissue culture plates, and serially diluted herb extracts from 1:2 to 1:128. After this assay, we found 4 fractions (3 fractions of *S. flavescence*, 1 fraction of *T. japonica*) which showed good anti-protzoal efficacy. We tested this effective fractions to canine and sheep to know anti-*Neospora* efficacy. The result is like below this. The *Neospora* sero-positive rate of farms and cattle is 53.5% and 35.6%, respectively in Korea. And the abortion and stillbirth rate of serious farms and usual farms are 48.7% and 20.7%, respectively. The damage of dairy cattle farm is very serious. The recent study showed that 16.7% out of 114 abortion fetus caused by *Neospora* infection using histo-pathology and PCR method. Many effective diagnosis method for neosporosis and protection and treatment, methods are developing in the world since 1988 when *Neospora* was discovered in USA.

In vivo anti-protzoal efficacy tests for HPLC fraction of several herbs such as *S. flavescens* and *T. japonica* were performed using immune suppressed BALB/c mice, pregnant goats and suckling dogs. We found out some evidences of anti-protzoal effects in mice and pregnant goats experiments. The mice groups treated HPLC fraction of herbs showed higher viability rate and lower mean brain lesions score than the *N. caninum* infected mice group. The treatment of herbal HPLC fraction did not protect *Neospora* infection in pregnant goats. However the abortion time of herb treated goats were significantly prolonged than the *Neospora* infected goats.

In this study, we infected Korea *Neospora* (KBA-2) to mouse, pregnant goat and suckling canine and we evaluated anti-neosporal efficacy of HPLC fractions of herb extracts (*S. flavescence*, *T. japonica*). We surveyed clinical signs, survival rate, abortion rate and histo-pathological lesions. The *Neospora* infected BALB/C mouse showed rough hair, anorexia and motor alexia from 14th days and all BALB/C mouse were dead after 17-25 days. Necrotic of non-suppurative inflammations were founded in brain, pancreas,

lung, liver, spleen. Especially necrotic encephalitis index was 8.15 that means severe lesion. There was no difference between control group and herb extract treated group in average survival days, but survival rate in treated mouse more improved than control group. Especially the mouse which was treated with high dose of *S. flavescence* (50 μl) and *T. japonica* ((50 μl) showed improved survival rate 25% and 41.7%, respectively and showed decreased brain lesion score to 1.81 and 2.23, respectively. We infected *Neospora* to pregnant goats and tested anti-neosporal efficacy. Two goats which was *Neospora* infected but not treated showed after 27 days, and mult-focal necrotic encephalitis were founded in fetus brain. Six pregnant goats out of 8 goats that was treated high dose of *S. flavescence* (50 μl) and *T. japonica* ((50 μl) showed abortion, but there is difference in average abortion days. Average abortion day of high dose of *S. flavescence* (50 μl), low dose of *S. flavescence* (1ml/Kg) and high dose of *T. japonica* ((50 μl), low dose of *T. japonica* (1ml/Kg) was 51 days, 45 days, 78.5 days and 50.5 days, respectively. We could not evaluated anti-protozoal test in sulking dogs because pathogenicity of neosporosis in dog was very low.

In this experiment, *S. flavescence* and *T. japonica* of HPLC fractions showed good efficacy in trotection of *Neospora*, and improved survival rates in mouse. We could found out that *S. flavescence* and *T. japonica* coulddelayed abortion days in pregnant goats but it couldn't prohibit *Neospora* infection or treat *Neospora*. Through this experiment, four fractions (3 fractions of *S. flavescence*, 1 fraction of *T. japonica*) showed high anti-protozoal efficacy for *N. caninum*. Further research on the herbal materials should be carried out. We are going to apply for a patent because of enough efficacy of this herbal materials. Further research will be carried out by authors by means of expended animal experiment.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Summary of Korean -----	1
I. Title -----	1
II. Objectives and significance of the project -----	1
III. Contents and categories of research -----	4
IV. Accomplishment of research and subsequent contributions for associated areas -----	5
 Summary of English -----	 8
 Contents of English -----	 13
Contents of Korean -----	17
 Chapter 1. Introduction -----	 21
Section 1. Outlines of the project -----	21
1. Objectives of the project -----	21
2. Significance of the project -----	21
3. Categories of research -----	25
Section 2. Present situation of development in techniques of Korean and foreign countries -----	25
 Chapter 2. Detailed title : Development of anti-protozoal drug from medicinal herbs (<i>Sophora flavescens</i> and <i>Torilis japonica</i>) against <i>Neospora caninum</i> , cause of bovine abortion disease, and its safety. -----	 27
Section 1. Outlines of the project -----	27

1. Objectives of the project -----	27
2. Significance of the project -----	27
3. Categories of the project -----	31
Section 2. Present situation of development in techniques of Korean and foreign countries -----	31
Section 3. Contents and results of research -----	32
1. Theoretical approach methods -----	32
2. Experimental approach methods -----	33
3. Contents of research -----	34
가. Fractionation of medicinal herb extracts by HPLC -----	34
1) Extracts of medicinal herbs -----	34
2) Fractionation of medicinal herb extracts by HPLC -----	34
3) Analysis HPLC fractions of medicinal herbs -----	35
나. Anti-protozoal efficacy of HPLC fractions of medicinal herbs against <i>N.</i> <i>caninum</i> in <i>in vitro</i> culture -----	35
1) Anti-protozoal efficacy of medicinal herb extracts against <i>N. caninum</i> in <i>in</i> <i>vitro</i> culture -----	35
2) Anti-protozoal efficacy of HPLC fractions of medicinal herbs against <i>N.</i> <i>caninum</i> in <i>in vitro</i> culture -----	36
3) Safety and toxicity tests of HPLC fractions of medicinal herbs -----	37
4. Accomplishment of research and subsequent contributions for associated areas -----	37
가. Anti-protozoal efficacy of HPLC fractions of medicinal herbs against <i>N.</i> <i>caninum</i> in <i>in vitro</i> culture -----	37
나. Analysis HPLC fractions of medicinal herbs -----	40
다. Safety and toxicity tests of HPLC fractions of medicinal herbs -----	48
Section 4. Discussion -----	48
Chapter 3. Collaborative title : In vivo anti-protozoal efficacy of HPLC fractions of medicinal herb extracts on <i>Neospora caninum</i> infection -----	49
Section 1. Outlines of the project -----	49
1. Objectives and significance of the project -----	49
2. Categories of the project -----	52

3. Goals of the project -----	52
Section 2. Present situation of development in techniques of Korean and foreign countries -----	53
Section 3. Contents and results of research -----	54
1. In vivo antiprotozoal efficacy of high performance liquid chromatography fractions of herb extracts on <i>N. caninum</i> infection -----	54
가) Introduction -----	56
나) Materials and methods -----	56
1) Preparation of <i>N. caninum</i> protozoa and tachyzoites -----	56
2) Preparation of slides for Indirect fluorescent antibody test (IFA) -----	57
3) Experimental animals -----	57
가) Mice -----	57
나) Goats -----	58
다) Dogs -----	58
4) Medicinal herbs -----	58
5) Experimental designs -----	59
가) Mice -----	59
나) Goats -----	59
다) Dogs -----	60
6) Serological tests -----	60
7) Histo-pathological tests -----	61
8) ELISA(Enzyme linked immuno-solvent assay) -----	61
다) Results -----	62
1) Artificial infection to mice -----	62
가) Clinical signs and survival rates -----	62
나) Histo-pathological findings and ELISA -----	64
2) Artificial infection to pregnant goats -----	66
가) Body temperature and antibody titers -----	66
나) Clinical signs and abortion rates -----	68
다) Histo-pathological findings and ELISA -----	69
3) Artificial infection to dogs -----	72
가) Body temperature and antibody titers -----	72

나) Clinical signs and dead rates -----	72
다) Histo-pathological findings -----	73
라. Discussion -----	75
Chapter 4. Accomplishment of research and subsequent contributions for associated areas -----	76
1. Valuation basis -----	77
2. Contribution to relative sciences -----	78
(1) Submitted papers -----	78
(2) Seminars -----	78
Chapter 5. Application schedule of research results -----	79
1. Necessity of subsequent researches -----	79
2. Application to other projects -----	79
3. Forward scheme for enterprise -----	79
가. Technical aspects -----	79
나. Economic and industrial aspects -----	79
다. Application methods -----	79
Chapter 6. Collection of foreign technology information -----	80
Chapter 7. References -----	81

목 차

요약문 -----	1
I. 제목 -----	1
II. 연구개발의 목적 및 필요성 -----	1
III. 연구개발 내용 및 범위 -----	4
IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의 -----	5
SUMMARY -----	8
 CONTENTS -----	 13
목차 -----	17
 제 1 장 서 론 -----	 21
제 1 절 연구개발과제의 개요 -----	21
1. 연구개발의 목적 -----	21
2. 연구개발의 필요성 -----	21
3. 연구개발의 범위 -----	25
제 2 절 국내·외 기술개발 현황 -----	25
 제 2 장 세부과제 “한약제(고삼 등) 추출액 HPLC 분석의 배양세포내 항원충 효능 평가 및 안전성 연구 -----	 27
제 1 절 연구개발과제의 개요 -----	27
1. 연구개발의 목적 -----	27
2. 연구개발의 필요성 -----	27
3. 연구개발의 범위 -----	31
제 2 절 국내·외 기술개발 현황 -----	31
제 3 절 연구개발수행 내용 및 결과 -----	32
1. 이론적 접근방법 -----	32

2. 실험적 접근방법 -----	33
3. 연구내용 -----	34
가. 한약제 추출액의 HPLC 분획 -----	34
1) 한약제 추출 -----	34
2) 한약제 추출액의 HPLC 분획 -----	34
3) 한약제 추출액 HPLC 분획의 성분분석 -----	35
나. 배양세포를 이용하여 <i>N. caninum</i> 에 대한 한약제 추출액 및 HPLC 분획의 항원 충 효능 -----	35
1) 배양세포를 이용하여 <i>N. caninum</i> 에 대한 한약제 추출액의 항원충 효능 --	35
2) 배양세포를 이용하여 <i>N. caninum</i> 에 대한 한약제 추출액 HPLC 분획의 항원 충 효능 -----	36
3) 한약제 추출액 HPLC 분획의 안전성 및 독성실험 -----	37
4. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의 -----	37
가. 세포배양 <i>N. caninum</i> 에 대한 한약제 추출액 HPLC 분획의 항원충 효능 -----	37
나. 한약제 추출액 HPLC 분획의 분석 -----	40
다. 한약제 추출액 HPLC 분획의 안전성 및 독성실험 -----	48
제 3 장 협동과제 : 한약제(고삼 등) 추출액 HPLC 분획의 동물내 항원충 효능 평가 연구 -----	49
제 1 절 연구개발 과제의 개요 -----	49
1. 연구개발의 목적과 필요성 -----	49
2. 연구개발의 범위 -----	52
3. 연구개발의 목표 -----	52
제 2 절 국내외 기술 개발 현황 -----	53
제 3 절 연구개발수행 내용 및 결과 -----	54
1. 한약제(고삼 등) 추출액 HPLC 분획의 동물내 항원충 효능 평가 연구 ---	54
가. 서 론 -----	56
나. 재료 및 방법 -----	56
1) 공시원충 및 tachyzoite 준비 -----	56
2) 간접형광항체 검사 (Indirect fluorescent antibody test: IFA)용 항원 슬라이드 제작 -----	57
3) 실험동물 -----	57

가) 마우스 -----	57
나) 염소 -----	58
다) 개 -----	58
4) 생약 제제 -----	58
5) 실험 설계 -----	59
가) 마우스 -----	59
나) 산양 -----	59
다) 개 -----	60
6) 혈청검사 -----	60
7) 병리학적 검사 -----	61
8) 면역조직화학염색 -----	61
다. 결 과 -----	62
1) 마우스 감염 실험 -----	62
가) 임상증상 및 생존율 -----	62
나) 병리조직학적 소견 및 면역염색 -----	64
2) 임신 염소 감염 실험 -----	66
가) 체온 및 항체가 변화 -----	68
나) 임상증상 및 유산 발생 현황 -----	68
다) 병리조직학적 소견 -----	69
3) 개 감염 실험 -----	72
가) 체온 및 항체가 변화 -----	72
나) 임상증상 및 폐사 상황 -----	72
다) 병리조직학적 소견 -----	73
라. 고 찰 -----	75
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	76
1. 연구평가의 착안점 -----	77
2. 관련분야의 기술발전예의 기여도 -----	78
(1) 논문 투고 -----	78
(2) 초청강연 -----	78
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	79
1. 추가연구의 필요성 -----	79

2. 타연구에의 응용 -----	79
3. 기업화 추진방안 -----	79
가. 기술적 측면 -----	79
나. 경제 · 산업적 측면 -----	79
다. 활용방안 -----	79
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	80
제 7장 참고문헌 -----	81

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적

- 한약제 HPLC 분획의 안전성 평가 및 *Neospora caninum*에 대한 항원충 효능 평가
- 한약제의 HPLC 분획 분석
- 실험동물 이용 한약제 HPLC 분획의 *N. caninum*에 대한 항원충 효능 평가
- 산양 이용 한약제 HPLC분획의 *N. caninum*에 대한 항원충 효능 평가
- 개를 이용한 *N. caninum*에 대한 항원충 효능 평가
- 한약제의 HPLC 분획을 이용한 *N. caninum*에 대한 항원충 구충제 개발

2. 연구개발의 필요성

현재 국내 축산업은 북한 핵 문제 등 한반도 주변의 정세 악화로 어두운 국가 경제 전망과 큰 폭의 축산물 가격 변동 등으로 어려운 여건에 처해있다. 그간 육종, 사양 및 질병의 진단기술 개발 등 여러 면에서 외형적인 여건은 개선을 거듭하여 왔으나, 그 생산성은 선진국에 비하여 떨어지고 있다. 그 이유는 첫째 사료 공급 및 사양에 충분치 못한 국내의 축산 환경이며, 둘째 축산 기술을 과학적인 체계에서 개발 및 활용하기 위한 연구가 부족한 점이라 할 수 있다. 전자는 이미 주어진 여건이므로 근본 자체를 해결할 수 없는 일이지만, 후자를 해결하기 위하여 지난 3년간 서울대학교 수의과대학 등에서는 “국내 소 유산증의 원인분석 및 수립대책”이라는 과제로 연구사업을 수행하여 좋은 결과를 얻은 바 있다. 특히 소 유산증의 주요 원인체 중의 하나가 *Neospora caninum*이라는 것이 밝혀지고 이에 대한 면역학적 예방법과 한약제를 이용한 치료제의 개발에 대한 연구를 하여 좋은 결과는 얻었으나 아직 초보단계에 이르러 앞으로 더욱 이에 대하여 투자를 한다면 좋은 결과를 얻으리라 사려된다.

소에서 유산을 일으키는 원충성 질병 중 Neosporosis는 최근(Dubey 등, 1988)에 밝혀진 *Neospora (N.) caninum* 감염에 의해 발생하는 원충성 질병으로 개와 소 등의 동물에서 유산과 신경근염을 유발한다고 알려져 있다. *N. caninum*은 분류학상 Apicomplexa 문, Coccidia 아강, Sarcocystidae 과에 속하는 원충으로 *Toxoplasma gondii*처럼 cyst를 형성하는 특징을 가지고 있다. *N. caninum*의 생활환(life cycle)은 알려져 있지 않으나 동물에 감염되면 tachyzoite와 tissue cyst

의 두 가지 형태를 취하는 것으로 알려져 있고 개가 종숙주의 역할을 하는 것으로 알려졌다. tachyzoite는 초승달 또는 난원형이고 크기는 길이 3~7 μm , 폭 1~5 μm 이며 분열증식과 세포내로의 침입이 매우 활발한 시기로 내부출아 이분열(endodyogeny)에 의해 분열한다. 감염된 동물에서 tachyzoite는 신경세포, 큰포식세포, 섬유모세포, 혈관내피세포, 근세포, 세뇨관 상피세포 및 간세포 등 여러 종류의 세포에서 관찰할 수 있다. Tissue cyst는 원형에서 난원형으로 직경은 107 μm 에 달하고 감염동물의 뇌, 척수, 망막 등의 신경조직에서만 관찰된다. Tissue cyst내에 있는 bradyzoite는 평균 60개 정도가 들어있으며 가늘고 크기는 길이 6~8 μm , 폭 1~1.8 μm 이며 tachyzoite에서 볼 수 있는 세포소기관을 함유하고 있고, endodyogeny에 의해 분열한다. 개 또는 소에서 관찰되는 *N. caninum*의 tissue cyst는 조직의 고정상태 또는 원충의 발육 단계에 따라 차이가 있을 수 있으나 근본적인 구조는 동일하다.

Bjerkas등은 노르웨이에서 부전마비를 보이다가 폐사한 개를 병리조직학적으로 검사하던 중 뇌척수염과 근염을 확인하고 병변 부위에서 *T. gondii*와는 다른 원충을 보고 하였으나 원충에 대한 명명은 하지 못하였다. Dubey등은 미국에서 1948년부터 1987년까지 Angell Memorial 동물병원에서 toxoplasmosis로 진단된 30두의 개 중 다수의 원충감염이 확인된 23두의 장기를 조직학적으로 검토한 결과 13두에서 *T. gondii*를, 나머지 10두에서는 광학 및 전자현미경 검사 시 *T. gondii*와 형태가 다른 원충에 감염되었다고 하였으며 "*Neospora caninum*"이라 명명하였다. 또한 생후 5~8 주령에 후구마비를 나타낸 5두의 개에서 다발성신경근염과 육아종성 다발성 근염을 관찰하였고, 세포배양, 마우스 및 개 접종실험을 통하여 *N. caninum*을 최초로 분리하였다.

Thilsted와 Dubey는 지속적으로 유·사산이 문제되는 미국 뉴 멕시코주 젓소 목장의 유산태아 뇌 조직에서 *N. caninum*과 유사한 원충의 감염을 최초로 보고한 바 있다. 그 후 유산한 어미 젓소의 혈청검사 시 *T. gondii*에 대한 항체가 검출되지 않았고, 유산태아의 뇌 조직 내 원충이 *N. caninum* 특이 항혈청에 반응하여 *N. caninum*감염에 의한 유산임이 밝혀졌다. 이 지역에서 neosporosis는 젓소의 유산과 관련된 질병 중 약 12%를 차지하는 가장 중요한 원인으로 밝혀졌으며, 연가 3,500만 달러 상당의 막대한 경제적 손실을 초래하는 것으로 현재까지 알려져 있다. 한편 비육우에서도 *N. caninum*에 의한 유산 또는 신경증상이 보고된 바 있다. 소의 neosporosis는 미국을 비롯하여 남아프리카, 네델란드, 뉴질랜드, 덴마크, 멕시코, 스웨덴, 아일랜드, 영국, 오스트레일리아, 이스라엘, 짐바브웨 및 캐나다에서 발생하고 있음이 보고 되어 전 세계적인 발생 분포를 나타내고 있다. 아시아에서는 일본의 Ogino등이 송아지에서 병리조직학적 관찰과 면역조직화학염색을 통해 *N. caninum*감염을 처음으로 입증하였다.

*N. caninum*에 의한 젖소 유산은 8세까지의 소에서 발생하고 있는데 본 질병과 나이와의 상관성은 알려진 바 없다. 그러나 Thornton등은 뉴질랜드에서의 발생양상을 살펴보았을 때 4세까지의 소에서 유사산이 다발하고 있다고 하였다. *N. caninum*에 감염된 소는 대개 임신 3개월부터 분만 전까지 다양한 임신일령에서 유산을 일으킨다. 태아는 자궁 속에서 죽거나 흡수되고 미이라화 또는 사산되기도 하며, 살아서 분만된 송아지는 외관상 정상이라 할지라도 만성감염을 나타내기도 한다. 감염된 태아는 뇌척수염, 심근염 및 근염 등의 병변을 보인다. Dubey 등은 *Neospora* sp. 가 비육우 송아지에서 심한 심근염을 유발할 수 있다고 하였다. 일부에서는 선천적으로 감염된 송아지에서 뇌수종이나 척수 또는 다리의 기형이 유발된 수 있음이 보고 된 바 있다. 소에 있어서 *N. caninum*에 의한 유산의 계절적 발생양상은 미국 캘리포니아에서는 여름이나 초가을 보다 겨울에 다발하고 네델란드에서는 늦여름이나 초가을에 많이 발생한다고 보고 된 바 있다. 따라서 나라마다 차이는 있으나 연중 발생하고 있다.

젖소목장의 유산 발현 양상은 한 젖소목장에서 지속적으로, 수 주 내에 일부 우군에서, 또는 산발적으로 발생하는 것으로 알려져 있으나 때로는 ‘abortion storm’과 같은 폭발적인 발생도 보고되었으나, 대부분의 진단이 유산 발생 목장의 일부 유산태아에 대한 검사에 한정되었기 때문에 전체 유산의 원인이 *N. caninum*에 의한 것인지는 확실하지 않다. Anderson등은 *N. caninum*에 의해 유산한 어미 소 112두를 검사하여 4두가 본 원충의 감염에 의하여 2회 연속 유산하였음을 확인하여, 동일 어미 소에서 *N. caninum* 감염에 의해 반복유산이 이루어짐을 보고하였다.

Neosporosis는 개, 소, 양, 염소, 말, 사슴 등에서 자연발생 예가 보고되었으며, 개와 소를 비롯하여 마우스, 랫드, 토끼, 저빌, 면양, 산양, 돼지, 고양이, 여우, 너구리, 고요테 등에서 실험감염 예가 보고되었다. 원숭이와 같은 유인원에서도 실험적으로 태반감염이 이루어졌기 때문에 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)과 마찬가지로 인수공통전염병의 가능성을 완전히 배제할 수 없어 관심이 집중되고 있다.

Neosporosis의 치료방법은 아직까지 잘 알려지지 않았다. 지금까지 Neosporosis의 소 유·사산에 대한 치료가 이루어지지 못하여 속수무책으로 경제적 손실을 당하는 수밖에 없다. 그러므로 Neosporosis에 대한 치료제의 개발이 절대적으로 필요한 상황에서 본인 등은 지난 3년간 “국내 소 유산증의 원인분석 및 수립대책”의 연구과제를 수행하면서 한약제의 닭콥시듬 원충에 대한 항원충 효능의 평가 경험을 바탕으로 한약제의 *N. caninum* 원충에 대한 항원충 효능을 screening한 결과 우수한 항원충 효능을 가진 한약제를 선별할 수 있는 가능성을 찾아 본 연구를 수행하였다.

경제동물인 소를 사육하여 얻는 소득은 우유, 고기 및 번식을 통한 송아지 생

산이 주가 된다. 분만은 곧 생산의 시작이기 때문에 유우 또는 육우에서 경제성 산물의 창출을 통한 국제경쟁력을 향상시키기 위해서는 무엇보다도 정상적인 수태와 분만이 가장 중요하다. 젖소의 유·사산과 이어지는 번식장애는 우군관리시 가장 큰 문제가 되는 유방염 및 발굽병과 함께 목장의 3대 질병의 하나로서 이로 인하여 축산농가가 입는 피해는 실로 엄청나다. 이는 잘 알려진 사실이다. 소의 유·사산은 전 세계적으로뿐만 아니라 국내 낙농업의 최대 경제 손실요인의 하나로서 생산성의 저하로 인하여 매년 엄청난 손실을 주고 있는 것으로 간주되고 있다. 더욱이 최근에 와서는 새로운 원인체 및 요인 계재로 이러한 소의 유·사산이 증가하는 추세이다. 그 중의 하나가 Neosporosis이다. 이는 최근에 와서 상당히 중요한 유·사산의 원인체로 알려졌다. 그러나 이를 효과적으로 예방하기 위한 수단이 아직까지는 미흡한 실태이다. 물론 지난 3년간 “국내 소 유산증의 원인분석 및 수립대책”의 연구과제를 수행하면서 백신과 한약제에 의한 예방대책의 수립 가능성은 얻었으나 보다 확실하고 효과적인 한약제를 이용한 *N. caninum*에 대한 항원층 제제의 개발은 앞으로 국내 유·사산 질병의 상당부분을 치료할 수 있을 뿐만 아니라 축산업의 국제경쟁력을 높여줄 것으로 사려된다. 즉 본 연구진은 국내 유·사산의 전염성 요인들 중 하나인 Neosporosis에 대한 한약제 추출액의 치료효능 평가와 이를 기반으로 하여 우수한 한원층 효능을 가진 한약제의 구성성분을 HPLC 등을 이용 분석하여 그들의 항원층 효능을 평가하고 우수한 효능을 가진 분획을 선별하여 실험동물과 목적동물 중 산양에서의 항원층 효능을 평가하여 *N. caninum* 원충의 구충제를 선발하고자 하였다. 이를 현장에 적용하여 축산농가의 생산성을 향상시키는 것은 물론 궁극적으로 축산업의 국제경쟁력을 높일 수 있을 것으로 판단하였다.

최근 구제역 등의 발생으로 인하여 국내 축산업계는 큰 타격을 받았다. 더욱 더 심각한 것은 실제 목장에서 문제시되어 경영의욕을 감소시키는 요인들이라고 할 수 있다. 소 사육 목장의 소요 경비 중에서 질병의 예방 및 치료와 이에 수반되는 생산성 감소는 경제적인 측면뿐만 아니라 축산 농민의 소 사육의 사회적 의욕과 직결된다. 최근 들어 성우 및 송아지 가격의 하락뿐만 아니라 식육 잔류항생제의 검사기준의 강화로 예후가 불량하거나 치료비가 비교적 높은 처치 등의 경우는 목장에서 기피하고 도태시키는 예를 많이 볼 수 있다. 특히 고능력 우에서 다발하는 번식장애의 원인 일부는 유·사산의 결과 발생하는 경우가 많이 있으며, 이에 대한 원인 파악과 대책을 요구받게 된다. 전면적인 수입 개방으로 축산농가의 기반이 위태로운 상황에서 사회적인 여건에 의한 가축 생산선의 저하는 농민들의 사회적 소외감과 축산의 의욕 상실로 이어질 것임을 재고할 여지가 없는 상황이기에 이를 진작시키기 위해 본 연구가 절실히 필요하였다. 본 연구를 통하여 소의 유산과 관련된 축산 농민들의 애로점 중 Neosporosis에 의한

질병을 해결함과 동시에 축산 농가들의 사기 의욕을 진작시킴으로써 사회 문화적 공감대 형성은 물론 침체되어 있는 축산업을 일정 부분은 회복시키는데 기여할 수 있으리라 기대하였다.

3. 연구개발의 범위

- 배양세포 내에서 한약제의 소의 유·사산을 일으키는 *N. caninum* 원충에 대한 항원충 효능
- 한약제 HPLC 분획의 안전성 평가 및 *N. caninum*에 대한 항원충 효능
- 한약제의 HPLC 분획 분석
- *N. caninum*에 대한 한약제 HPLC 분획의 항원충 효능 평가 및 분획 분석
- 실험동물에 *N. caninum* 인공 감염
- *N. caninum* 감염 실험동물 내에서 한약제 HPLC 분획의 항원충 효능 평가
- 임상증상 및 부작용 관찰
- 병리조직학적 감염 장기 및 원충의 분포 확인
- 산양에 *N. caninum* 인공 감염
- *N. caninum* 감염 산양에서 한약제 HPLC 분획의 항원충 효능 평가
- 임상증상 및 부작용 관찰
- 병리조직학적 감염 장기 및 원충의 분포 확인
- 종숙주인 개에 *N. caninum* 인공 감염
- *N. caninum* 감염 개에서 한약제 HPLC 분획의 항원충 효능 평가
- 임상증상 및 부작용 관찰
- 병리조직학적 감염 장기 및 원충의 분포 확인

제 2 절 국내·외 기술개발 현황

미국 뉴멕시코주 젓소 목장의 유산태아 뇌 조직에서 원충인 *N. caninum* 특이항체에 반응하여 *N. caninum*이 소 유산의 원인체임을 최초로 보고 된 이래로 미국의 경우 캘리포니아주에서는 유·사산이 발생한 목장에서 *T. gondii*와 유사한 원충이 면역조직화학염색시 *N. caninum* 특이항혈청에 반응하여 *N. caninum* 감염에 의한 유산임이 밝혀졌다. 특히 이 지역에서 neosporosis는 젓소의 유산과 관련된 질병 중 약 12%를 차지하는 가장 중요한 원인체로 밝혀졌으며, 연간 3,500만 달러 상당의 막대한 경제적 손실을 초래하는 것으로 현재까지 알려져 있다. 한편 비육우에서도 *N. caninum*에 의한 유산 또는 신경증상이 보고 된 바 있다. 소의 neosporosis는 미국을 비롯하여 남아프리카, 네덜란드, 덴마크, 멕시코,

스웨덴, 아일랜드, 영국, 오스트레일리아, 이스라엘, 짐바브웨 및 캐나다에서 발생하고 있음이 보고되어 전 세계적인 발생 분포를 나타내고 있다. 국내에서도 김등에 의하여 *N. caninum*에 의한 유산 및 동일 소에서의 반복 유산이 보고되었다. 또한 경기도 지역을 중심으로 사육중인 젖소를 대상으로 간접형광항체법을 이용하여 네오스포라에 대한 항체양성율을 조사한 결과 국내젖소의 일부도 이미 본 기생충에 감염되어 있는 것이 확인되었으며 항체양성율과 유산율에 있어서도 상관관계가 있음이 확인되었다. 특히 미국의 경우에는 최근 5년간 범국가적인 차원에서 neosporosis에 대한 연구에 몰두한 결과 몇 년 전에는 지금까지 미지였던 본충의 종숙주를 개로 밝혀내는데 성공하였다. 한편 지금도 국가적인 차원에서 소에서의 *Neospora* 감염실태에 대한 조사를 계속하고 있다. 국내에서도 이미 네오스포라 감염증에 대한 감염실태 및 진단을 하는데 필요한 일부의 기술은 이미 축적되었고 분포조사가 이루어졌으며, 새로운 진단법, 백신과 한약제를 이용한 치료 및 예방의 가능성에 대한 기술이 이미 확보되어 있기 때문에 이를 바탕으로 한약제에 대한 연구를 더욱 심도 깊게 하여 Neosporosis에 대한 새로운 구충제를 개발하여 치료 및 예방대책을 수립하고자 한다.

소의 유·사산을 일으키는 *N. caninum* 원충에 대한 새로운 치료제를 개발하여 축산농가의 생산성을 향상시키고 축산업의 국제경쟁력을 높임은 물론 이 약제의 효능을 다른 원충성 질병의 병원체들에게 확대 적용하여 연구함으로써 국내외에서 축산업에서 커다란 경제적 손실을 가져다주는 닭 콕시듐 병이나 임산부의 유사산을 가져오고 출산을 하더라도 수뇌증의 심각한 질병을 유발하는 인수공통원충성 질병인 톡소플라즈마병 등의 치료제를 개발할 수 있는 기틀을 마련할 수 있을 것으로 기대한다.

국내 축산 환경 및 지역적 특수성, 그리고 한약제에 대한 연구가 개재된 문제에 대한 해결 기술이기 때문에 외국의 기술 도입은 어려운 실정이며, 외국의 기술은 상황이 다른 국내 현장에 적용되지 않기 때문에 국내에서 종합적인 분석 및 약제 개발 기술의 수립이 필요하다. 다만 외국에서 neosporosis에 대한 전문가의 조언을 참고함이 바람직할 것이다.

제 2 장 세부과제 “한약제(고삼 등) 추출액 HPLC 분석의 배양세포내 항원총 효능 평가 및 안전성 연구

제 1 절 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적

- 한약제 HPLC 분석의 안전성 평가 및 *Neospora caninum*에 대한 항원총 효능 평가
- 한약제의 HPLC 분석 및 *N. caninum*에 대한 항원총 효능 평가
- *N. caninum*에 대한 한약제 HPLC 분석의 항원총 효능 평가 및 분석

2. 연구개발의 필요성

현재 국내 축산업은 북한 핵 문제 등 한반도 주변의 정세 악화로 어두운 국가 경제 전망과 큰 폭의 축산물 가격 변동 등으로 어려운 여건에 처해있다. 그간 육종, 사양 및 질병의 진단기술 개발 등 여러 면에서 외형적인 여건은 개선을 거듭하여 왔으나, 그 생산성은 선진국에 비하여 떨어지고 있다. 그 이유는 첫째 사료 공급 및 사양에 충분치 못한 국내의 축산 환경이며, 둘째 축산 기술을 과학적인 체계에서 개발 및 활용하기 위한 연구가 부족한 점이라 할 수 있다. 전자는 이미 주어진 여건이므로 근본 자체를 해결할 수 없는 일이지만, 후자를 해결하기 위하여 지난 3년간 서울대학교 수의과대학 등에서는 “국내 소 유산증의 원인분석 및 수립대책”이라는 과제로 연구사업을 수행하여 좋은 결과를 얻은 바 있다. 특히 소 유산증의 주요 원인체 중의 하나가 *Neospora caninum*이라는 것이 밝혀지고 이에 대한 면역학적 예방법과 한약제를 이용한 치료제의 개발에 대한 연구를 하여 좋은 결과는 얻었으나 아직 초보단계에 이르러 앞으로 더욱 이에 대하여 투자를 한다면 좋은 결과를 얻으리라 사려된다.

소에서 유산을 일으키는 원충성 질병 중 Neosporosis는 최근(Dubey 등, 1988)에 밝혀진 *N. caninum* 감염에 의해 발생하는 원충성 질병으로 개와 소 등의 동물에서 유산과 신경근염을 유발한다고 알려져 있다. *N. caninum*은 분류학상 Apicomplexa 문, Coccidia 아강, Sarcocystidae 과에 속하는 원충으로 *Toxoplasma gondii*처럼 cyst를 형성하는 특징을 가지고 있다. *N. caninum*의 생활환(life cycle)은 알려져 있지 않으나 동물에 감염되면 tachyzoite와 tissue cyst의 두 가지 형태를 취하는 것으로 알려져 있고 개가 종숙주의 역할을 하는 것으로 알려졌다. tachyzoite는 초승달 또는 난원형이고 크기는 길이 3~7 μ m, 폭 1~5

μm 이며 분열증식과 세포내로의 침입이 매우 활발한 시기로 내부출아 이분열(endodyogeny)에 의해 분열한다. 감염된 동물에서 tachyzoite는 신경세포, 큰포식세포, 섬유모세포, 혈관내피세포, 근세포, 세뇨관 상피세포 및 간세포 등 여러 종류의 세포에서 관찰할 수 있다. Tissue cyst는 원형에서 난원형으로 직경은 107 μm 에 달하고 감염동물의 뇌, 척수, 망막 등의 신경조직에서만 관찰된다. Tissue cyst내에 있는 bradyzoite는 평균 60개 정도가 들어있으며 가늘고 크기는 길이 6~8 μm , 폭 1~1.8 μm 이며 tachyzoite에서 볼 수 있는 세포소기관을 함유하고 있고, endodyogeny에 의해 분열한다. 개 또는 소에서 관찰되는 *N. caninum*의 tissue cyst는 조직의 고정상태 또는 원충의 발육 단계에 따라 차이가 있을 수 있으나 근본적인 구조는 동일하다.

Bjerkas등은 노르웨이에서 부진마비를 보이다가 폐사한 개를 병리조직학적으로 검사하던 중 뇌척수염과 근염을 확인하고 병변 부위에서 *T. gondii*와는 다른 원충을 보고 하였으나 원충에 대한 명명은 하지 못하였다. Dubey등은 미국에서 1948년부터 1987년까지 Angell Memorial 동물병원에서 toxoplasmosis로 진단된 30두의 개 중 다수의 원충감염이 확인된 23두의 장기를 조직학적으로 검토한 결과 13두에서 *T. gondii*를, 나머지 10두에서는 광학 및 전자현미경 검사 시 *T. gondii*와 형태가 다른 원충에 감염되었다고 하였으며 "*Neospora caninum*"이라 명명하였다. 또한 생후 5~8 주령에 후구마비를 나타낸 5두의 개에서 다발성신경근염과 육아종성 다발성 근염을 관찰하였고, 세포배양, 마우스 및 개 접종실험을 통하여 *N. caninum*을 최초로 분리하였다.

Thilsted와 Dubey는 지속적으로 유·사산이 문제되는 미국 뉴 멕시코주 젓소목장의 유산태아 뇌 조직에서 *N. caninum*과 유사한 원충의 감염을 최초로 보고한 바 있다. 그 후 유산한 어미 젓소의 혈청검사 시 *T. gondii*에 대한 항체가 검출되지 않았고, 유산태아의 뇌 조직 내 원충이 *N. caninum* 특이 항혈청에 반응하여 *N. caninum*감염에 의한 유산임이 밝혀졌다. 이 지역에서 neosporosis는 젓소의 유산과 관련된 질병 중 약 12%를 차지하는 가장 중요한 원인체로 밝혀졌으며, 연가 3,500만 달러 상당의 막대한 경제적 손실을 초래하는 것으로 현재까지 알려져 있다. 한편 비육우에서도 *N. caninum*에 의한 유산 또는 신경증상이 보고된 바 있다. 소의 neosporosis는 미국을 비롯하여 남아프리카, 네델란드, 뉴질랜드, 덴마크, 멕시코, 스웨덴, 아일랜드, 영국, 오스트레일리아, 이스라엘, 짐바브웨 및 캐나다에서 발생하고 있음이 보고 되어 전 세계적인 발생 분포를 나타내고 있다. 아시아에서는 일본의 Ogino등이 송아지에서 병리조직학적 관찰과 면역조직화학염색을 통해 *N. caninum*감염을 처음으로 입증하였다.

*N. caninum*에 의한 젓소 유산은 8세까지의 소에서 발생하고 있는데 본 질병과 나이와의 상관성은 알려진 바 없다. 그러나 Thornton등은 뉴질랜드에서의 발

생양상을 살펴보았을 때 4세까지의 소에서 유사산이 다발하고 있다고 하였다. *N. caninum*에 감염된 소는 대개 임신 3개월부터 분만 전까지 다양한 임신일령에서 유산을 일으킨다. 태아는 자궁 속에서 죽거나 흡수되고 미이라화 또는 사산되기도 하며, 살아서 분만된 송아지는 외관상 정상이라 할지라도 만성감염을 나타내기도 한다. 감염된 태아는 뇌척수염, 심근염 및 근염 등의 병변을 보인다. Dubey 등은 *Neospora* sp. 가 비육우 송아지에서도 심한 심근염을 유발할 수 있다고 하였다. 일부에서는 선천적으로 감염된 송아지에서 뇌수종이나 척수 또는 다리의 기형이 유발될 수 있음이 보고된 바 있다. 소에 있어서 *N. caninum*에 의한 유산의 계절적 발생양상은 미국 캘리포니아에서는 여름이나 초가을 보다 겨울에 다발하고 네델란드에서는 늦여름이나 초가을에 많이 발생한다고 보고된 바 있다. 따라서 나라마다 차이는 있으나 연중 발생하고 있다.

젖소목장의 유산 발현 양상은 한 젖소목장에서 지속적으로, 수 주 내에 일부 우군에서, 또는 산발적으로 발생하는 것으로 알려져 있으나 때로는 ‘abortion storm’과 같은 폭발적인 발생도 보고되었으나, 대부분의 진단이 유산 발생 목장의 일부 유산태아에 대한 검사에 한정되었기 때문에 전체 유산의 원인이 *N. caninum*에 의한 것인지는 확실하지 않다. Anderson 등은 *N. caninum*에 의해 유산한 어미 소 112두를 검사하여 4두가 본 원충의 감염에 의하여 2회 연속 유산하였음을 확인하여, 동일 어미 소에서 *N. caninum* 감염에 의해 반복유산이 이루어짐을 보고하였다.

Neosporosis는 개, 소, 양, 염소, 말, 사슴 등에서 자연발생 예가 보고되었으며, 개와 소를 비롯하여 마우스, 랫드, 토끼, 저빌, 면양, 산양, 돼지, 고양이, 여우, 너구리, 고요테 등에서 실험감염 예가 보고되었다. 원숭이와 같은 유인원에서도 실험적으로 태반감염이 이루어졌기 때문에 톡소포자충(*T. gondii*)과 마찬가지로 인수공통전염병의 가능성을 완전히 배제할 수 없어 관심이 집중되고 있다. Neosporosis의 치료방법은 아직까지 잘 알려지지 않았다. 지금까지 Neosporosis의 소 유·사산에 대한 치료가 이루어지지 못하여 속수무책으로 경제적 손실을 당하는 수밖에 없다. 그러므로 Neosporosis에 대한 치료제의 개발이 절대적으로 필요한 상황에서 본인 등은 지난 3년간 “국내 소 유산증의 원인분석 및 수립 대책”의 연구과제를 수행하면서 한약제의 닭콥시둑 원충에 대한 항원충 효능의 평가 경험을 바탕으로 한약제의 *N. caninum* 원충에 대한 항원충 효능을 screening한 결과 우수한 항원충 효능을 가진 한약제를 선별할 수 있는 가능성을 찾아 본 연구를 수행하였다.

경제동물인 소를 사육하여 얻는 소득은 우유, 고기 및 번식을 통한 송아지 생산이 주가 된다. 분만은 곧 생산의 시작이기 때문에 유우 또는 육우에서 경제성산물의 창출을 통한 국제경쟁력을 향상시키기 위해서는 무엇보다도 정상적인 수

태와 분만이 가장 중요하다. 젖소의 유·사산과 이어지는 번식장애는 우군관리시 가장 큰 문제가 되는 유방염 및 발굽병과 함께 목장의 3대 질병의 하나로서 이로 인하여 축산농가가 입는 피해는 실로 엄청나다. 이는 잘 알려진 사실이다. 소의 유·사산은 전 세계적으로뿐만 아니라 국내 낙농업의 최대 경제 손실요인의 하나로서 생산성의 저하로 인하여 매년 엄청난 손실을 주고 있는 것으로 간주되고 있다. 더욱이 최근에 와서는 새로운 원인체 및 요인 체계로 이러한 소의 유·사산이 증가하는 추세이다. 그 중의 하나가 Neosporosis이다. 이는 최근에 와서 상당히 중요한 유·사산의 원인체로 알려졌다. 그러나 이를 효과적으로 예방하기 위한 수단이 아직까지는 미흡한 실태이다. 물론 지난 3년간 “국내 소 유산증의 원인분석 및 수립대책”의 연구과제를 수행하면서 백신과 한약제에 의한 예방대책의 수립 가능성은 얻었으나 보다 확실하고 효과적인 한약제를 이용한 *N. caninum*에 대한 항원충 제제의 개발은 앞으로 국내 유·사산 질병의 상당부분을 치료할 수 있을 뿐만 아니라 축산업의 국제경쟁력을 높여줄 것으로 사려된다. 즉 본 연구진은 국내 유·사산의 전염성 요인들 중 하나인 Neosporosis에 대한 한약제 추출액의 치료효능 평가와 이를 기반으로 하여 우수한 항원충 효능을 가진 한약제의 구성성분을 HPLC 등을 이용 분석하여 그들의 항원충 효능을 평가하고 우수한 효능을 가진 분획을 선별하여 실험동물과 목적동물 중 산양에서의 항원충 효능을 평가하여 *N. caninum* 원충의 구충제를 선별하고자 하였다. 이를 현장에 적용하여 축산농가의 생산성을 향상시키는 것은 물론 궁극적으로 축산업의 국제경쟁력을 높일 수 있을 것으로 판단하였다.

최근 구제역 등의 발생으로 인하여 국내 축산업계는 큰 타격을 받았다. 더욱더 심각한 것은 실제 목장에서 문제시되어 경영의욕을 감소시키는 요인들이라고 할 수 있다. 소 사육 목장의 소요 경비 중에서 질병의 예방 및 치료와 이에 수반되는 생산성 감소는 경제적인 측면뿐만 아니라 축산 농민의 소 사육의 사회적 의욕과 직결된다. 최근 들어 성우 및 송아지 가격의 하락뿐만 아니라 식육 잔류항생제의 검사기준의 강화로 예후가 불량하거나 치료비가 비교적 높은 처치 등의 경우는 목장에서 기피하고 도태시키는 예를 많이 볼 수 있다. 특히 고능력 우에서 다발하는 번식장애의 원인 일부는 유·사산의 결과 발생하는 경우가 많이 있으며, 이에 대한 원인 파악과 대책을 요구받게 된다. 전면적인 수입 개방으로 축산농가의 기반이 위태로운 상황에서 사회적인 여건에 의한 가축 생산선의 저하는 농민들의 사회적 소외감과 축산의 의욕 상실로 이어질 것임을 재고할 여지가 없는 상황이기에 이를 진작시키기 위해 본 연구가 절실히 필요하였다. 본 연구를 통하여 소의 유산과 관련된 축산 농민들의 애로점 중 Neosporosis에 의한 질병을 해결함과 동시에 축산 농가들의 사기 의욕을 진작시킴으로써 사회 문화적 공감대 형성은 물론 침체되어 있는 축산업을 일정 부분은 회복시키는데 기여

할 수 있으리라 기대하였다.

3. 연구개발의 범위

- 배양세포 내에서 한약제의 소의 유·사산을 일으키는 *N. caninum* 원충에 대한 항원충 효능 평가
- 한약제 HPLC 분획의 안전성 평가 및 *N. caninum*에 대한 항원충 효능 평가
- *N. caninum*에 대한 한약제 HPLC 분획의 항원충 효능 평가 및 분획 분석

제 2 절 국내·외 기술개발 현황

미국 뉴멕시코주 젓소 목장의 유산태아 뇌 조직에서 원충인 *N. caninum* 특이항체에 반응하여 *N. caninum*이 소 유산의 원인체임을 최초로 보고 된 이래로 미국의 경우 캘리포니아주에서는 유·사산이 발생한 목장에서 *T. gondii*와 유사한 원충이 면역조직화학염색시 *N. caninum* 특이항혈청에 반응하여 *N. caninum* 감염에 의한 유산임이 밝혀졌다. 특히 이 지역에서 neosporosis는 젓소의 유산과 관련된 질병 중 약 12%를 차지하는 가장 중요한 원인체로 밝혀졌으며, 연간 3,500만 달러 상당의 막대한 경제적 손실을 초래하는 것으로 현재까지 알려져 있다. 한편 비육우에서도 *N. caninum*에 의한 유산 또는 신경증상이 보고 된 바 있다. 소의 neosporosis는 미국을 비롯하여 남아프리카, 네덜란드, 덴마크, 멕시코, 스웨덴, 아일랜드, 영국, 오스트레일리아, 이스라엘, 짐바브웨 및 캐나다에서 발생하고 있음이 보고되어 전 세계적인 발생 분포를 나타내고 있다. 국내에서도 김등에 의하여 *N. caninum*에 의한 유산 및 동일 소에서의 반복 유산이 보고되었다. 또한 경기도 지역을 중심으로 사육중인 젓소를 대상으로 간접형광항체법을 이용하여 네오스포라에 대한 항체양성율을 조사한 결과 국내젓소의 일부도 이미 본 기생충에 감염되어 있는 것이 확인되었으며 항체양성율과 유산율에 있어서도 상관관계가 있음이 확인되었다. 특히 미국의 경우에는 최근 5년간 범국가적인 차원에서 neosporosis에 대한 연구에 몰두한 결과 몇 년 전에는 지금까지 미지였던 본충의 종숙주를 개로 밝혀내는데 성공하였다. 한편 지금도 국가적인 차원에서 소에서의 *Neospora* 감염실태에 대한 조사를 계속하고 있다. 국내에서도 이미 네오스포라 감염증에 대한 감염실태 및 진단을 하는데 필요한 일부의 기술은 이미 축적되었고 분포조사가 이루어졌으며, 새로운 진단법, 백신과 한약제를 이용한 치료 및 예방의 가능성에 대한 기술이 이미 확보되어 있기 때문에 이를 바탕으로 한약제에 대한 연구를 더욱 심도 깊게 하여 Neosporosis에 대한 새로운 구충제를 개발하여 치료 및 예방대책을 수립하고자 한다.

소의 유·사산을 일으키는 *N. caninum* 원충에 대한 새로운 치료제를 개발하

여 축산농가의 생산성을 향상시키고 축산업의 국제경쟁력을 높임은 물론 이 약제의 효능을 다른 원충성 질병의 병원체들에게 확대 적용하여 연구함으로써 국내외에서 축산업에서 커다란 경제적 손실을 가져다주는 닭 콕시듐 병이나 임신부의 유사산을 가져오고 출산을 하더라도 수뇌증의 심각한 질병을 유발하는 인수공통원충성 질병인 톡소플라즈마병 등의 치료제를 개발할 수 있는 기틀을 마련할 수 있을 것으로 기대한다.

국내 축산 환경 및 지역적 특수성, 그리고 한약제에 대한 연구가 개재된 문제에 대한 해결 기술이기 때문에 외국의 기술 도입은 어려운 실정이며, 외국의 기술은 상황이 다른 국내 현장에 적용되지 않기 때문에 국내에서 종합적인 분석 및 약제 개발 기술의 수립이 필요하다. 다만 외국에서 neosporosis에 대한 전문가의 조언을 참고함이 바람직할 것이다.

제 3 절 연구개발수행 내용 및 결과

1. 이론적 접근방법

1년차에 배양세포 내에서 한약제의 소의 유.사산을 일으키는 *N. caninum* 원충에 대한 항원충 효능 평가하고자 하였고, 한약제의 HPLC 분획의 안전성을 평가하고 *N. caninum*에 대한 항원충 효능을 평가하고자 하였다. 2년차에는 역시 배양세포 내에서 한약제의 소의 유.사산을 일으키는 *N. caninum* 원충에 대한 항원충 효능 평가하고자 하였고, 한약제의 HPLC 분획을 분석하고 *N. caninum*에 대한 항원충 효능을 평가하고자 하였다. 3년차에는 계속하여 배양세포 내에서 한약제의 소의 유.사산을 일으키는 *N. caninum* 원충에 대한 항원충 효능 평가하고자 하였고, *N. caninum*에 대한 한약제 HPLC 분획의 항원충 효능을 평가하고 HPLC 분획을 분석하고자 하였다.

동의보감에서 구충제로 사용되는 약제로 기록된 15종의 한약제 중 항원충 효능이 있는 것으로 알려진 고삼, 방기, 무이, 백두옹, 사상자 5종을 선별하여 농림부 과제인 “국내 소 유산증의 원인분석 및 대책수립(1999-2002)”에서 1차적으로 세포내 배양된 *N. caninum*에 대한 항원충 효능이 우수한 약제의 선발시험을 하였다. 이 시험에서 고삼과 사상자가 우수한 효능을 보임으로써 본 연구에서는 이 약제를 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 분획을 실시하여 1차에 고삼 5개와 사상자 2개, 합 7개의 분획을 얻었다. 2차에 고삼 4개와 사상자 2개, 합 7개의 분획을 얻었다. 3차 분획에서는 고삼 5개와 사상자 4개, 합 9개의 분획을 얻었다.

차 분획에서는 고삼 5개와 사상자 4개, 합 9개의 분획을 얻었다. HPLC 분획은 각각 30g의 고삼과 사상자를 200ml 80% methanol로 추출하여 동결건조시킨 후 다시 10ml의 80% methanol로 용해시켰다. 이를 80% methanol로 1:9로 희석한 후 100 또는 200 μ l HPLC system (Perkin Elmer LC 250 pump a Perkin Elmer ISS 200 auto sampler and a Perkin Elmer LC 90 UV detector set at 220 nm with a strip chart recorder)에 주입한 후 분획을 받았다. Column은 a Rainin semipreparative Microsorb C18 column (1.2 X 30 cm)이었다. Mobile phase (acetonitrile:water=3:1)는 분당 2mlTlr pump하였다. 각각의 peaks 또는 그룹 peaks는 분획으로써 모아 acetonitrile은 질소 또는 공기의 흐름아래 낮은 온도에서 증발되었다. 분획 후 각각의 분획들은 동결건조 후 필요할 때 재용해시켜 실험에 사용하였다.

3. 연구내용

가. 한약제 추출액의 HPLC 분획

1) 한약제 추출

- ① 닭 맹장콕시딤증의 원인체인 *Eimeria tenella*에 대하여 효능이 있는 한약제를 선발한다.
- ② 선발된 한약제 (고삼 : *Sophora flavescens*, 사상자 : *Torillia japonica* 등)를 약탕기를 이용하여 증탕법으로 한약제 추출액을 만든다.
- ③ 또 다른 방법으로는 200ml의 80% EtOH에 한약제 30g을 넣어 한약제 성분을 추출한다.
- ④ 이렇게 얻어진 한약제 추출액을 냉동건조기를 이용하여 건조시킨다.
- ⑤ 이렇게 얻어진 한약제 추출액의 건조분말을 냉암소에 보관하면서 배양세포나 실험동물 실험 등 필요한 실험에 이용한다.

2) 한약제 추출액의 HPLC 분획

- 1차년도에 이어 고삼과 사상자 약제를 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 분획을 실시하여 3차에 고삼 4개와 사상자 5개, 합 9개의 분획을 얻었다. 4차에 고삼 4개와 사상자 5개, 합 9개의 분획을 얻

었다. 1차년도와 같이 HPLC 분획은 각각 30g의 고삼과 사상자를 200ml 80% methanol로 추출하여 동결건조시킨 후 다시 10ml의 80% methanol로 용해시켰다. 이를 80% methanol로 1:9로 희석하여 100 또는 200 μ l 씩 HPLC system (Perkin Elmer LC 250 pump a Perkin Elmer ISS 200 auto sampler and a Perkin Elmer LC 90 UV detector set at 220 nm with a strip chart recorder)에 주입한 후 분획을 받았다. Column은 a Rainin semipreparative Microsorb C18 column (1.2 X 30 cm)이었다. Mobile phase (acetonitrile: water=3:1)는 분당 2ml 씩 pump하였다. 각각의 peaks 또는 그룹 peaks는 분획으로써 모아 acetonitrile은 질소 또는 공기의 흐름아래 낮은 온도에서 증발되었다. 분획 후 각각의 분획들은 동결건조 후 냉동보관(-20 $^{\circ}$ C)하면서 필요할 때 재용해시켜 실험에 사용하였다.

3) 한약제 추출액 HPLC 분획의 성분분석

샘플 준비를 걸쳐 분리정제된 샘플을 quartz tube 1 μ l에 넣고 잔류용매를 조심스럽게 제거한뒤 이를 직접 EI-mass 에 insertion한 뒤 70 eV하에서 5분간 mass spectrum 을 분석(JEOL사 제품)하였다.

나. 배양세포를 이용하여 *N. caninum*에 대한 한약제 추출액 및 HPLC 분획의 항원충 효능

1) 배양세포를 이용하여 *N. caninum*에 대한 한약제 추출액의 항원충 효능

- ① Equine Dermal (ED) cells과 *N. caninum*을 배양한다.
- ② 96 well plate에 5 \times 10⁴ cells/well이 되도록 ED cells을 분주하여 37 $^{\circ}$ C Co₂ Incubator에서 6시간 정도 배양한다.
- ③ 96 well plate에 배양된 ED cells에 한약제 추출액의 건조분말을 80% EtOH로 희석하고 RPMI medium에 다시 희석하여 분주한다.
- ④ 이에 *N. caninum* taachyzoites를 1 \times 10⁵ cells/well이 되도록 감염시킨다.
- ⑤ 이를 37 $^{\circ}$ C Co₂ Incubator에서 2~5일 배양시키며 성장의 정도를 관찰한다.
- ⑥ 이 원충이 충분히 자라면 방사선 동위원소 ³H-uracil 5 μ l를 각각의 well에 첨

가하여

37°C Co₂ Incubator에서 24시간 배양한다.

- ⑦ 이렇게 배양된 96 well plate의 ED cells을 cells 회수용 96 well filter paper를 이용하여 cells Harvester로 수확한다.
- ⑧ b-선 카운터를 이용하여 *N. caninum* 원충이 ³H-uracil의 흡수 정도를 관찰한다.

2) 배양세포를 이용하여 *N. caninum*에 대한 한약제 추출액 HPLC 분석의 항원충 효능

- ① Equine Dermal (ED) cells과 *N. caninum*을 배양한다.
- ② 96 well plate에 5×10⁴ cells/well이 되도록 ED cells을 분주하여 37° °C Co₂ Incubator에서 6시간 정도 배양한다.
- ③ 96 well plate에 배양된 ED cells에 한약제 추출액의 건조분말을 80% EtOH로 희석하고 RPMI medium에 다시 희석하여 분주한다.
- ④ 이에 *N. caninum* tachyzoites를 1×10⁵ cells/well이 되도록 감염시킨다.
- ⑤ 이를 37°C Co₂ Incubator에서 2~5일 배양시키며 성장의 정도를 관찰한다.
- ⑥ 이 원충이 충분히 자라면 방사선 동위원소 ³H-uracil 5μl를 각각의 well에 첨가하여
37°C Co₂ Incubator에서 24시간 배양한다.
- ⑦ 이렇게 배양된 96 well plate의 ED cells을 cells 회수용 96 well filter paper를 이용하여 cells Harvester로 수확한다.
- ⑧ b-선 카운터를 이용하여 *N. caninum* 원충이 ³H-uracil의 흡수 정도를 관찰한다.

3차 분획에서 얻은 9개의 분획을 세포내 배양된 *N. caninum*에 대한 항원충 효능을 평가하였다. 즉 96wells microplates에 *N. caninum*을 세포배양하여 7개의 분획을 단계 희석하여 적용시키고 원충의 증식 수를 현미경하에서 관찰 측정하여 항원충 효능을 평가하였다.

4차 분획에서 얻은 9개의 분획을 세포내 배양된 *N. caninum*에 대한 항원충 효능을 평가하였다. 즉 96wells microplates에 *N. caninum*을 세포배양하여 7개의 분획을 단계 희석하여 적용시키고 원충의 증식 수를 현미경하에서 관찰 측정하여 항원충 효능을 평가하였다.

3) 한약제 추출액 HPLC 분획의 안전성 및 독성실험

한약제 추출액 HPLC 분획의 안전성 및 독성을 알아보기 위하여 마우스에 80% EtOH에 용해된 HPLC 분획을 50 μ l, 100 μ l, 150 μ l, 그리고 200 μ l를 피하주사 하였다.

4. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 세포배양 *N. caninum*에 대한 한약제 추출액 HPLC 분획의 항원충 효능

1차 분획에서 얻은 7개의 분획을 세포내 배양된 *N. caninum*에 대한 항원충 효능을 평가하였다. 즉 96wells microplates에 *N. caninum*을 세포배양하여 7개의 분획을 단계회석하여 적용시키고 중수소(3H)가 주성분인 uracil을 처리한 후 일정기간 배양하였다. 대조군의 원충이 충분히 자라면 이것을 여과지에 수거하여 Wallac Microbeta workstation으로 방사선의 양을 측정하여 항원충 효능을 평가한 결과 7개의 분획 중 4(고삼 3, 사상자 1)개의 분획이 특히 높은 항원충 효능을 나타냈다.

2차 분획에서 얻은 7개의 분획을 세포내 배양된 *N. caninum*에 대한 항원충 효능을 평가하였다. 즉 96wells microplates에 *N. caninum*을 세포배양하여 7개의 분획을 단계회석하여 적용시키고 중수소(3H)가 주성분인 uracil을 처리한 후 일정기간 배양하였다. 대조군의 원충이 충분히 자라면 이것을 여과지에 수거하여 Wallac Microbeta workstation으로 방사선의 양을 측정하여 항원충 효능을 평가한 결과 7개의 분획 중 4(고삼 3, 사상자 1)개의 분획이 특히 높은 항원충 효능을 나타냈다.

본 연구개발 한약제를 HPLC 분획한 결과 1차 분획에서 얻은 7개의 분획을 세포내 배양된 *Neospora caninum*에 대한 항원충 효능을 평가하였다. 즉 96wells microplates에 *N. caninum*을 세포배양하여 7개의 분획을 단계회석하여 적용시키고 중수소(3H)가 주성분인 uracil을 처리한 후 일정기간 배양하였다. 대조군의 원충이 충분히 자라면 이것을 여과지에 수거하여 Wallac Microbeta workstation으로 방사선의 양을 측정하여 항원충 효능을 평가한 결과 7개의 분획 중 4(고삼 3, 사상자 1)개의 분획이 특히 높은 항원충 효능을 나타냈다. 또한 2차 분획에서 얻은 7개의 분획을 세포내 배양된 *Neospora caninum*에 대한 항원충 효능을 평가하였다. 즉 96wells microplates에 *N. caninum*을 세포배양하여 7개의 분획을 단계회석하여 적용시키고 중수소(3H)가 주성분인 uracil을 처리한 후 일정기간 배양하였다. 대조군의 원충이 충분히 자라면 이것을 여과지에 수거하여 Wallac Microbeta workstation으로 방사선의 양을 측정하여 항원충 효능을 평가한 결과

7개의 분획 중 4(고삼 3, 사상자 1)개의 분획이 특히 높은 항원층 효능을 나타냈다. 3차와 4차 분획의 결과 고삼에서 4개의 분획을 그리고 사상자에서 5개의 분획을 얻었다. 이 3차와 4차 분획에서 얻은 9개의 분획을 세포내 배양된 *N. caninum*에 대한 항원층 효능을 평가하였다. 즉 96wells microplates에 *N. caninum*을 세포배양하여 7개의 분획을 단계희석하여 적용시키고 세포의 생존 유무와 원충의 수를 측정하여 항원층 효능을 평가한 결과 7개의 분획 중 6(고삼 4, 사상자 2)개의 분획이 특히 높은 원충 억제효능을 나타냈다. 또한 이들 중 원충 억제효능이 우수한 분획을 선별하여 세포내 배양된 *N. caninum*에 대한 항원층 효능을 재평가하였다. 즉 96wells microplates에 *N. caninum*을 세포배양하여 7개의 분획을 단계희석하여 적용시키고 세포의 생존 유무와 원충의 수를 측정하여 항원층 효능을 평가한 결과 7개의 분획 중 4(고삼 3, 사상자 1)개의 분획이 특히 높은 항원층 효능을 나타냈다.

1차년도에 이어 계속 고삼(*Sophora flavescens*) 및 사상자(*Torilis japonica*) 2종을 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 분획을 실시하여 3차와 4차에 고삼 4개와 사상자 5개, 합 9개의 분획을 얻었다. 동물실험을 위하여는 많은 양의 분획이 필요하므로 이 분획들을 대량을 얻기 위하여 계속하여 분획을 실시하여 지난 1년간 얻은 분획의 양은 표와 같다(표 1).

표 1. Group 별 한약재 추출량

(단위 ml)

Herbs		1	2	3	4	5
고삼	3차	0.2	5.3	5.2	5.3	
	4차	9.2	47.5	13.8	29	
사상자	3차	7.8	8.3	4.8	12.5	22
	4차	5.5	4	4.8	5.4	29

3차와 4차 분획에서 얻은 9개의 분획을 세포내 배양된 *N. caninum*에 대한 항원층 효능을 평가하였다. 즉 96wells microplates에 *N. caninum*을 세포배양하여 7개의 분획을 단계희석하여 적용시키고 세포의 생존 유무와 원충의 수를 측정하여 항원층 효능을 평가한 결과 7개의 분획 중 6(고삼 4, 사상자 2)개의 분획이 특히 높은 원충 억제효능을 나타냈다(표 2).

표 2. 한약제 HPLC 분획의 세포내 배양된 *Neospora caninum*에 대한 원충 억제효능

한약제	분획	차수	단계회석후 원충 억제효능(%)								
			1	2	3	4	5	6	7	8	
고삼	1	3	CT	100	100	100	100	100	87	78	
		4	CT	100	100	100	67	26	37	50	
	2	3	CT	100	100	100	100	95	77	67	
		4	CT	100	100	100	47	-21	-27	0	
	3	3	CT	100	100	100	100	84	93	92	
		4	CT	100	100	100	87	74	80	67	
	4	3	CT	100	100	100	80	84	93	53	
		4	CT	100	100	100	100	79	30	33	
사상자	1	3	CT	100	100	100	100	100	100	100	
		4	CT	100	100	100	100	100	93	29	
	2	3	CT	100	100	100	100	93	57	44	
		4	CT	100	92	67	50	54	50	16	
	3	3	CT	100	100	100	100	100	100	86	
		4	CT	100	100	72	41	57	23	41	
	4	3	CT	100	100	100	100	100	100	100	
		4	CT	100	71	67	73	54	47	-6	
	5	3	CT	100	100	100	100	100	100	100	
		4	CT	100	100	100	68	61	60	38	
	대조	80% EtOH	3	CT	2	4	9	15	19	30	36
			4	CT	10	24	18	22	28	30	34
<i>N. caninum</i>		3	7	8	12	16	24	17	32	25	
		4	31	34	32	29	24	26	38	34	

CT : cytotoxicity로 cell death

3차와 4차 분획에서 얻은 9개의 분획 중 위 실험에서 원충 억제효능이 우수한 분획을 선별하여 세포내 배양된 *N. caninum*에 대한 항원충 효능을 재평가하였다. 즉 96wells microplates에 *N. caninum*을 세포배양하여 7개의 분획을 단계회석하여 적용시키고 세포의 생존 유무와 원충의 수를 측정하여 항원충 효능을 평가한 결과 7개의 분획 중 4(고삼 3, 사상자 1)개의 분획이 특히 높은 항원충 효능을 나타냈다(표 3).

표 3. 한약제 HPLC 분획의 세포내 배양된 *Neospora caninum*에 대한 원충 억제

한약제	분획	단계회석후 원충 억제효능(%)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
고삼	1	CT	CT	100	100	86	88	84	79	76	60	50	44
	2	CT	CT	100	67	43	54	56	26	29	24	9	4
	3	CT	CT	67	44	43	46	41	42	43	31	27	27
	4	CT	CT	67	33	14	29	22	16	10	-5	-4	10
대조	80% EtOH	CT	CT	6	9	14	24	32	38	42	42	44	48
	<i>N. caninum</i>	52	54	50	58	53	56	47	58	46	52	48	49
사상자	1	CT	CT	100	100	53	54	42	44	48	44	31	26
	2	CT	CT	100	100	73	65	55	36	30	35	4	11
	3	CT	CT	100	90	67	54	52	44	26	33	24	21
	4	CT	CT	100	100	87	62	58	31	15	12	-6	-2
	5-1	CT	CT	100	90	47	54	39	28	20	17	4	2
	5-2	CT	CT	57	30	13	38	16	35	28	35	22	19
대조	80% EtOH	CT	CT	7	10	15	26	31	39	46	52	49	53
	<i>N. caninum</i>	52	56	57	49	53	50	49	54	51	52	58	54

효능

CT : cytotoxicity로 cell death

나. 한약제 추출액 HPLC 분획의 분석

한약제 HPLC 분획의 성분분석을 한 결과 그림 과 같다. 즉 그림 1a는 G2-1의 A는 total ion chromatogram (TIC)이며 이에 대한 구조분석을 거친 결과 Sophoridane (G2-1 VB)과 구조가 매우 유사함을 알 수 있었다.

이 분획들을 GCMS로 분석한 결과 2개의 분획이 Sophoridane, 그리고 각각 1개의 분획이 Matridin-15-one(CAS), Furosardonin A, Tetraisopropylidene-cyclobutane, 5,17, beta-Dihydroxy-de-A-Estra-5,7,9,14-Tetraene, Furanodiene, 9,12-Octadecadienoic acid(Z,Z)-(CAS) 등과 매우 유사한 구조로 밝혀졌으며, 3개의 미지의 분획이 있음을 알 수 있었다.

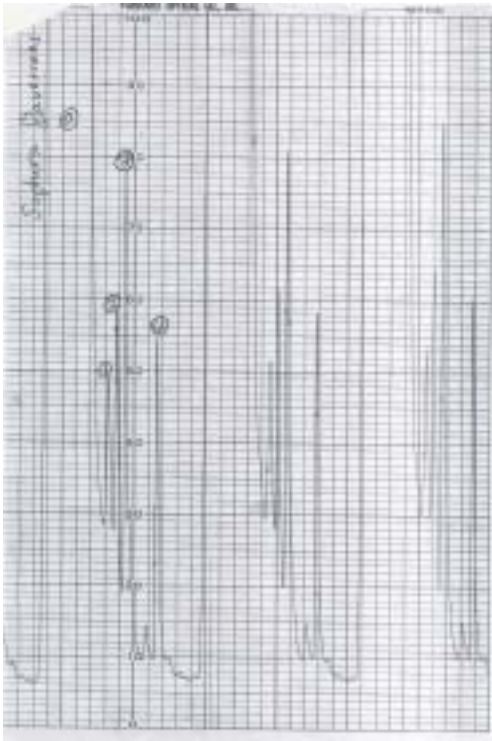


Fig. 1. HPLC fractions of
Sophora flavescens

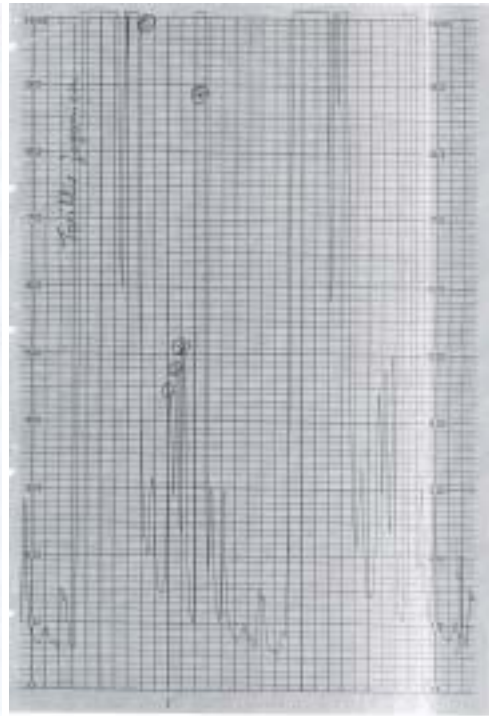


Fig. 2. HPLC fractions of
Torilis japonica

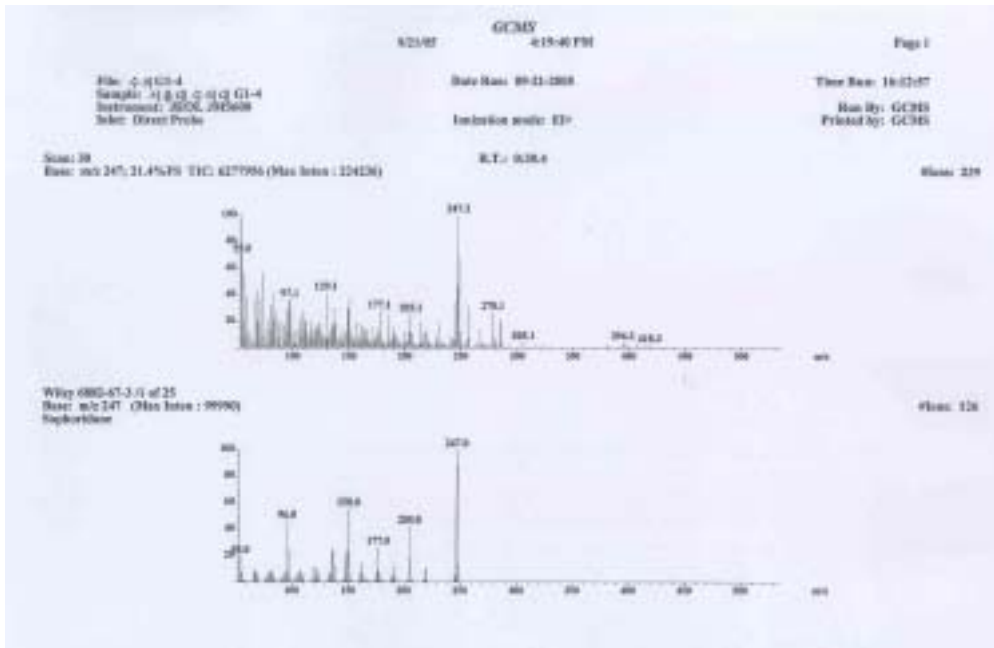


Fig. 3. HPLC fraction G1-4-1

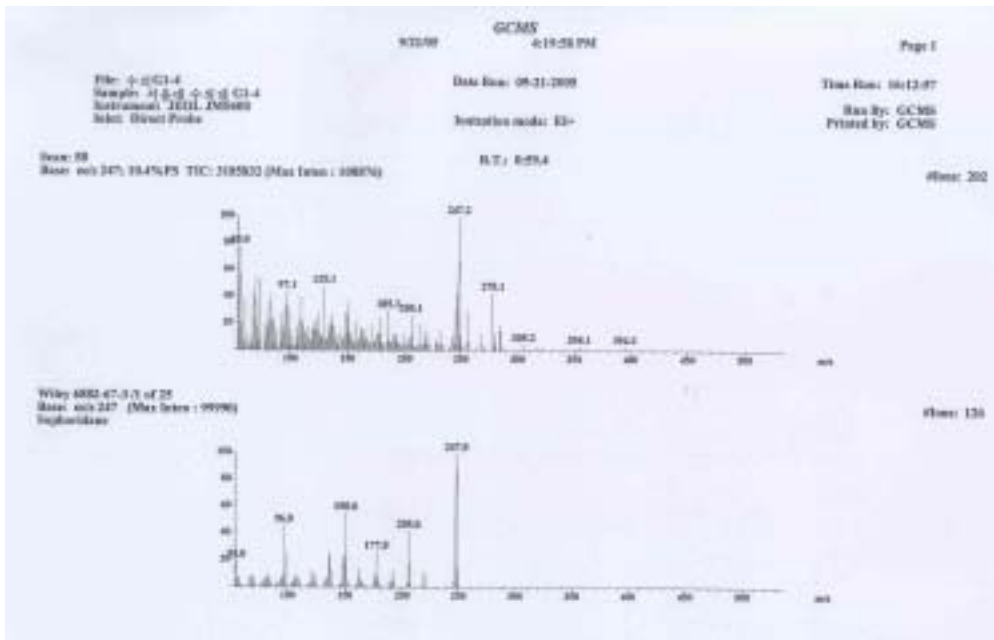
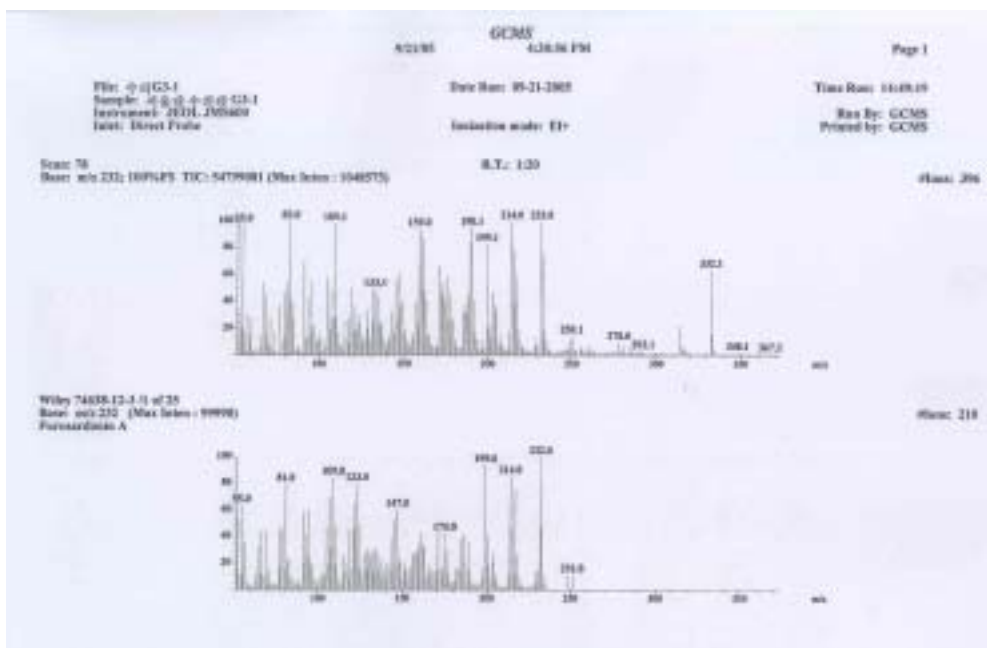


Fig. 4. HPLC fraction G1-4-2



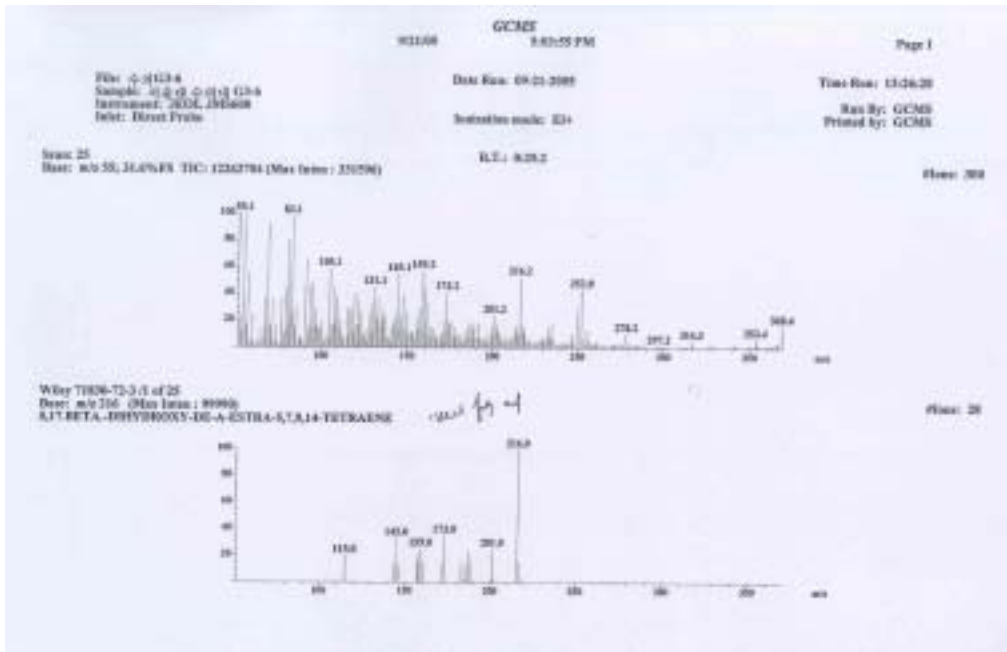


Fig. 7. HPLC fraction G3-6-1

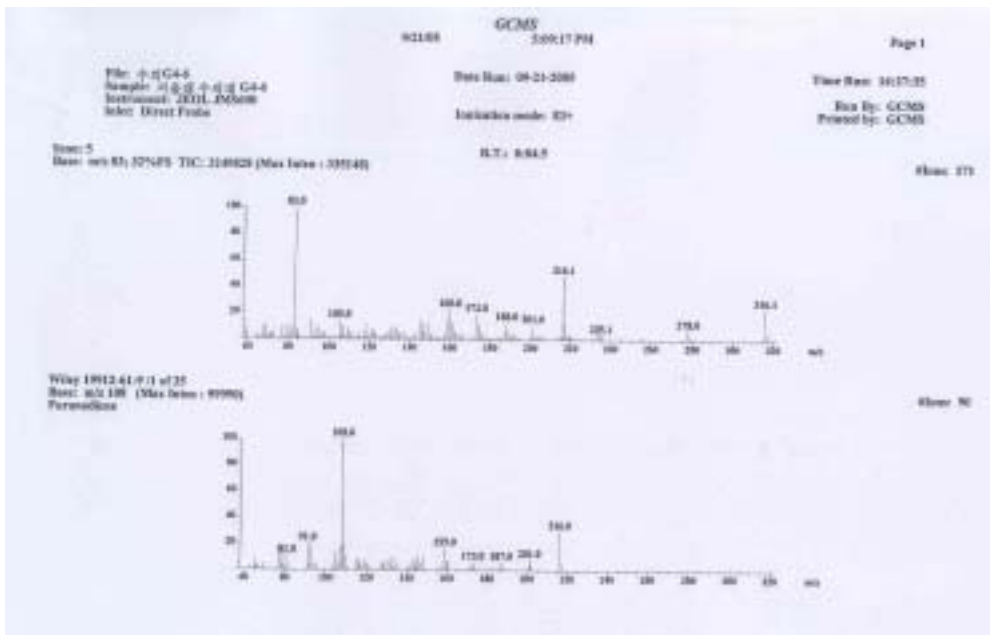


Fig. 8. HPLC fraction G4-6

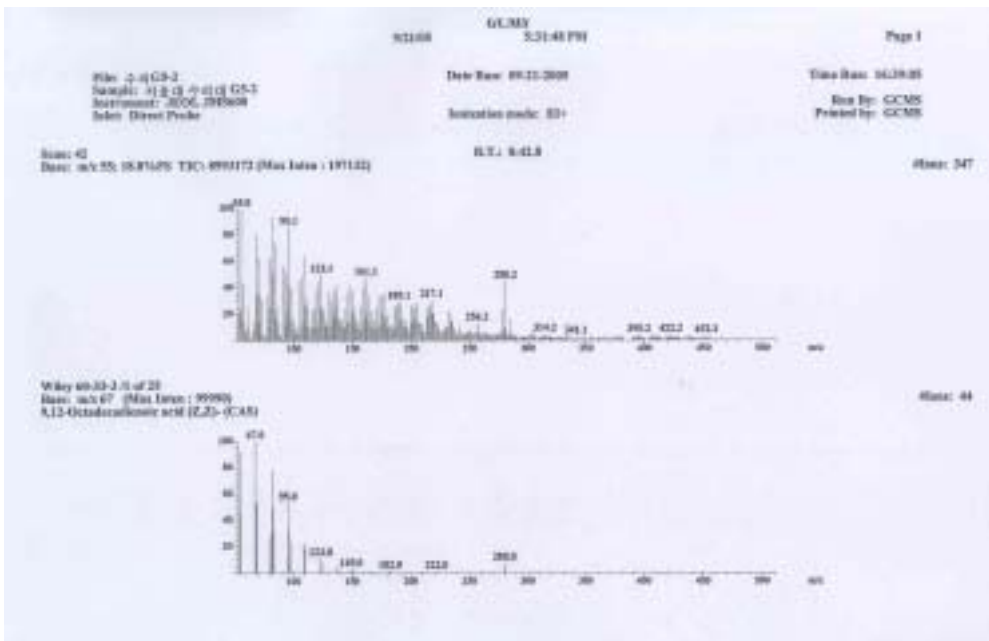


Fig. 9. HPLC fraction G5-2

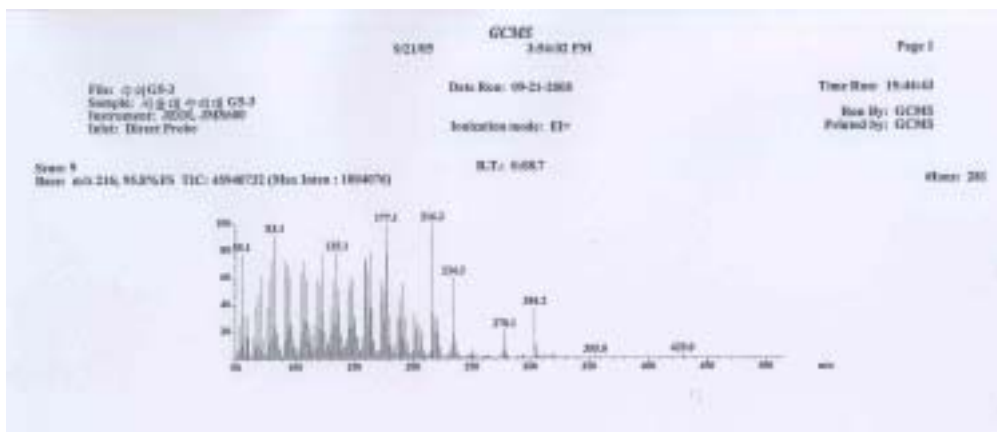


Fig. 10. HPLC fraction G5-3-1

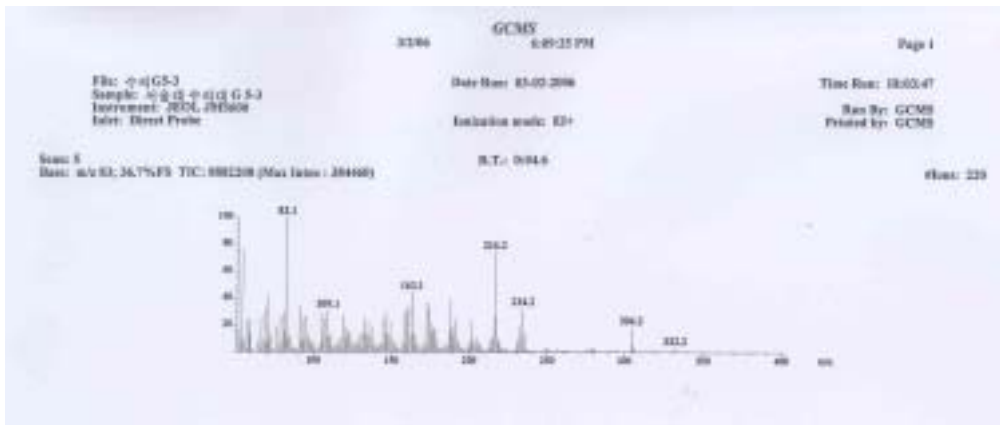


Fig. 11. HPLC fraction G5-3-2

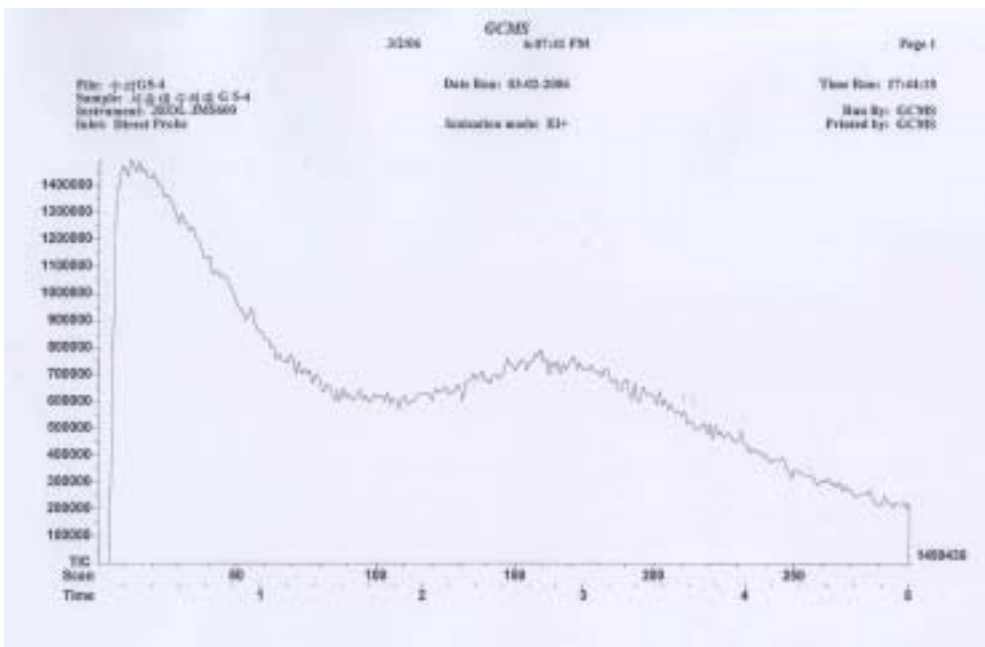


Fig. 12. HPLC fraction G5-4-1

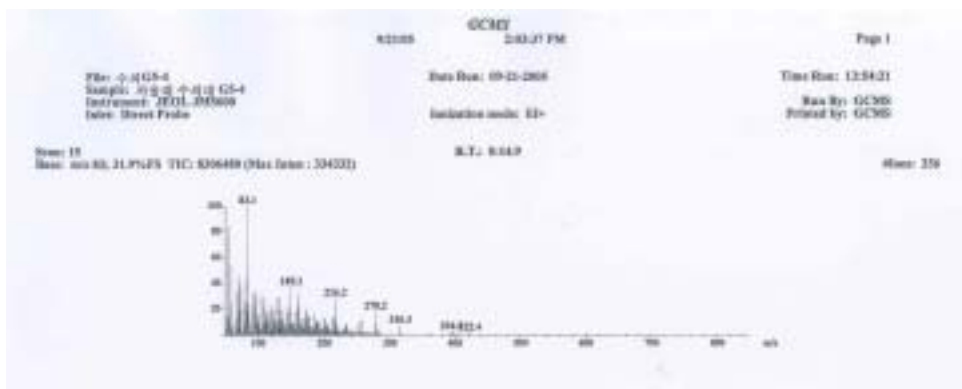


Fig. 13. HPLC fraction G5-4-2

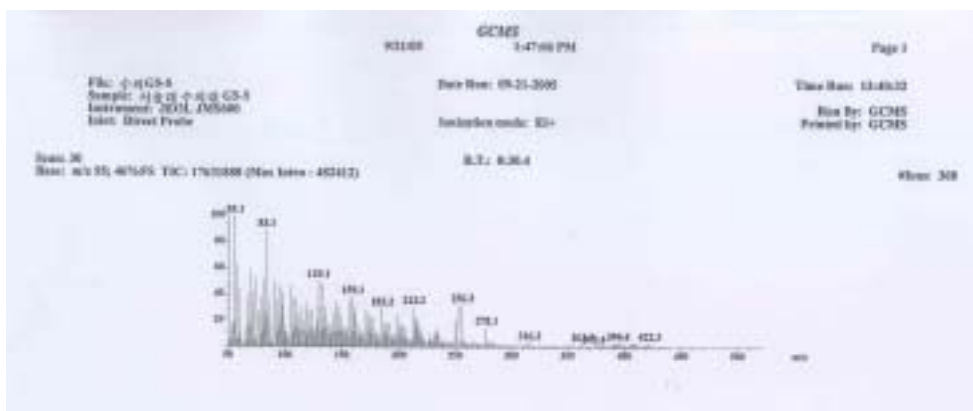


Fig. 14. HPLC fraction G5-5-1

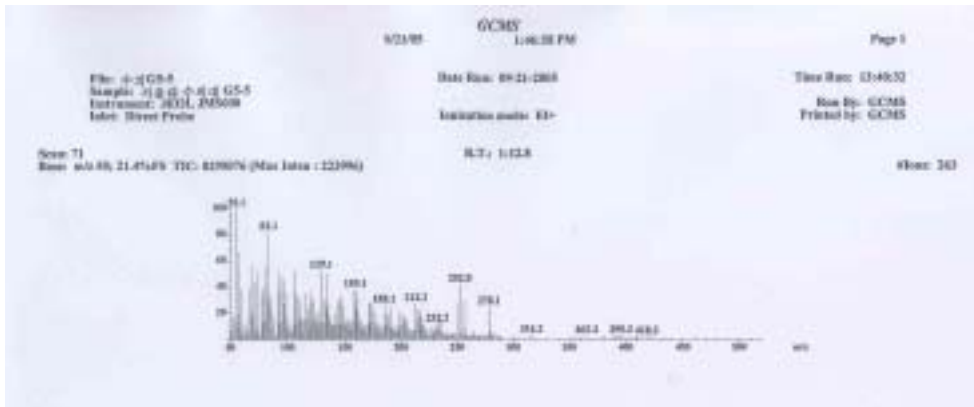


Fig. 15. HPLC fraction G5-5-2

다. 한약제 추출액 HPLC 분획의 안전성 및 독성실험

한약제 추출액 HPLC 분획의 안전성 및 독성을 알아보기 위하여 마우스에 80% EtOH에 용해된 HPLC 분획을 50 μ l, 100 μ l, 150 μ l, 그리고 200 μ l를 피하주사 한 결과 150 μ l 이상의 많은 용량을 주사하였을 때만 폐사가 나왔다.

제 4 절 고 찰

한약제를 이용한 기생충의 구충에 대한 기술은 동의보감에서 그 자료를 얻을 수 있었다. 약 15종의 한약제가 원충, 연충 등 각종 기생충의 구충에 대한 기술이 보고되었다. 그러나 구충효능이 있는 한약제를 선별하여 구충효능을 평가한 소수의 자료는 있으나 본연구와 같이 그 한약제를 HPLC 분획하여 구충효능을 평가하고 구성성분을 분석한 자료는 찾지를 못하였다. 그러나 총괄책임자의 닭꼭시뚱 원충에 대한 한약제의 항원충 효능 평가결과의 논문이 국제저널에 게재되자 많은 외국인 연구자들이 별쇄본을 요구해 와서 앞으로 이러한 연구의 결과들이 많이 나올 것으로 사려된다. 그러므로 이 분야에서 계속하여 선두그룹을 유지하려면 보다 많은 투자와 연구가 이루어져야 할 것으로 사려된다.

제 3 장 협동과제: 한약제(고삼 등) 추출액 HPLC 분석 의 동물내 항원총 효능 평가 연구

제 1 절 연구개발 과제의 개요

1. 연구개발의 목적과 필요성

현재 국내 축산업은 북한 핵 문제 등 한반도 주변의 정세 악화로 어두운 국가경제 전망과 큰 폭의 축산물 가격 변동 등으로 어려운 여건에 처해있다. 그간 육종, 사양 및 질병의 진단기술 개발 등 여러 면에서 외형적인 여건은 개선을 거듭하여 왔으나, 그 생산성은 선진국에 비해 떨어지고 있다. 그 이유는 첫째 사료 공급 및 사양에 충분치 못한 국내의 축산 환경이며, 둘째 축산 기술을 과학적인 체계에서 개발 및 활용하기 위한 연구가 부족한 점이라 할 수 있다. 전자는 이미 주어진 여건이므로 근본 자체를 해결할 수 없는 일이지만, 후자를 해결하기 위하여 지난 3년간 서울대학교 수의과대학 등에서는 “국내 소 유산증의 원인분석 및 대책수립”이라는 과제로 연구사업을 수행하여 좋은 결과를 얻은 바 있다. 특히 소 유산증의 주요 원인체 중의 하나가 *Neospora caninum*이라는 것이 밝혀지고 이에 대한 면역학적 예방법과 한약제를 위한 치료제의 개발에 대한 연구를 하여 좋은 결과는 얻었으나 아직 초보단계에 이르러 앞으로 더욱 이에 대하여 투자를 한다면 좋은 결과를 얻으리라 사료된다.

소에서 유산을 일으키는 원충성 질병 중 Neosporosis는 최근 (Dubey 등, 1988)에 밝혀진 *Neospora (N.) caninum* 감염에 의해 발생하는 원충성 질병으로 개와 소 등의 동물에서 유산과 신경근염을 유발한다고 알려져 있다. *N. caninum*은 분류학상 Apicomplexa 문, Coccidia 아강, Sarcocystidae 과에 속하는 원충으로 *Toxoplasma (T.) gondii*처럼 cyst를 형성하는 특징을 가지고 있다. *N. caninum*의 생활환 (life cycle)은 알려져 있지 않으나 동물에 감염되면 tachyzoite와 tissue cyst의 두가지 형태를 취하는 것으로 알려져 있고 개가 종숙주의 역할을 하는 것으로 알려졌다. Tachyzoite는 초승달 또는 난원형이고 크기는 길이 3~7 μ m, 폭 1~5 μ m이며 분열증식과 세포내로의 침입이 매우 활발한 시기로 내부출아 이분열 (endodyogeny)에 의해 분열한다. 감염된 동물에서 tachyzoite는 신

경세포, 큰포식세포, 섬유모세포, 혈관내피세포, 근세포, 세뇨관 상피세포 및 간세포 등 여러 종류의 세포에서 관찰할 수 있다. Tissue cyst는 원형에서 난원형으로 직경은 107 μ m에 달하고 감염동물의 뇌, 척수, 망막 등의 신경조직에서만 관찰된다. Tissue cyst내에 있는 bradyzoite는 평균 60개 정도가 들어있으며 가늘고 크기는 길이 6~8 μ m, 폭 1~1.8 μ m이며 tachyzoite에서 볼 수 있는 세포소기관을 함유하고 있고, endodyogeny에 의해 분열한다. 개 또는 소에서 관찰되는 *N. caninum*의 tissue cyst는 조직의 고정상태 또는 원충의 발육 단계에 따라 차이가 있을 수 있으나 근본적인 구조는 동일하다.

Bjerkås등은 노르웨이에서 부전마비를 보이다가 폐사한 개를 병리조직학적으로 검사하던 중 뇌척수염과 근염을 확인하고 병변 부위에서 *T. gondii*와는 다른 원충을 보고하였으나 원충에 대한 명명은 하지 못하였다. Dubey 등은 미국에서 1948년부터 1987년까지 Angell Memorial 동물병원에서 toxoplasmosis로 진단된 30두의 개 중 다수의 원충감염이 확인된 23두의 장기를 조직학적으로 검토한 결과 13두에서 *T. gondii*를, 나머지 10두에서는 광학 및 전자현미경 검사 시 *T. gondii*와 형태가 다른 원충에 감염되었다고 하였으며 "*N. caninum*"이라 명명하였다. 또한 생후 5~8 주령에 후구마비를 나타낸 5두의 개에서 다발성신경근염과 육아종성 다발성근염을 관찰하였고, 세포배양, 마우스 및 개 집종실험을 통하여 *N. caninum*을 최초로 분리하였다.

Thilsted와 Dubey는 지속적으로 유·사산이 문제되는 미국 뉴멕시코주 젓소 목장의 유산태아 뇌조직에서 *N. caninum*과 유사한 원충의 감염을 최초로 보고한 바 있다. 그 후 유산한 어미 젓소의 혈청검사 시 *T. gondii*에 대한 항체가 검출되지 않았고, 유산태아의 뇌 조직내 원충이 *N. caninum* 특이항체에 반응하여 *N. caninum*이 소 유산의 원인체임을 최초로 보고하였다. 미국 캘리포니아주에서는 유사산이 발생한 목장에서 *T. gondii*와 유사한 원충이 면역조직화학염색 시 *N. caninum* 특이 항혈청에 반응하여 *N. caninum* 감염에 의한 유산임이 밝혀졌다. 이 지역에서 neosporosis는 젓소의 유산과 관련된 질병 중 약 12%를 차지하는 가장 중요한 원인체로 밝혀졌으며, 연간 3,500만 달러 상당의 막대한 경제적 손실을 초래하는 것으로 현재까지 알려져 있다. 한편 비육우에서도 *N. caninum*에 의한 유산 또는 신경증상이 보고된 바 있다. 소의 neosporosis는 미국을 비롯하여 남아프리카, 네델란드, 뉴질랜드, 덴마크, 멕시코, 스웨덴, 아일랜드, 영국, 오스트레일리아, 이스라엘, 짐바브웨 및 캐나다에서 발생하고 있음이 보고되어 전

세계적인 발생 분포를 나타내고 있다. 아시아에서는 일본의 Ogino 등이 송아지에서 병리조직학적 관찰과 면역조직화학염색을 통해 *N. caninum* 감염을 처음으로 입증하였다.

*N. caninum*에 의한 젖소 유산은 8세까지의 소에서 발생하고 있는데 본 질병과 나이와의 상관성은 알려진 바 없다. 그러나 Thornton등은 뉴질랜드에서의 발생양상을 살펴보았을 때 4세까지의 소에서 유사산이 다발하고 있다고 하였다. *N. caninum*에 감염된 소는 대개 임신 3개월부터 분만 전까지 다양한 임신일령에서 유산을 일으킨다. 태아는 자궁 속에서 죽거나 흡수되고 미이라화 또는 사산되기도 하며, 살아서 분만된 송아지는 외관상 정상이라 할지라도 만성감염을 나타내기도 한다. 감염된 태아는 뇌척수염, 심근염 및 근염 등의 병변을 보인다. Dubey 등은 *Neospora* sp. 가 비육우 송아지에서도 심한 심근염을 유발할 수 있다고 하였다. 일부에서는 선천적으로 감염된 송아지에서 뇌수종이나 척수 또는 다리의 기형이 유발될 수 있음이 보고된 바 있다. 소에 있어서 *N. caninum*에 의한 유산의 계절적 발생양상은 미국 캘리포니아에서는 여름이나 초가을 보다 겨울에 다발하고 네델란드에서는 늦여름이나 초가을에 많이 발생한다고 보고된 바 있다. 따라서 나라마다 차이는 있으나 연중 발생하고 있다.

젖소목장의 유산 발현 양상은 한 젖소목장에서 지속적으로, 수 주 내에 일부 우군에서, 또는 산발적으로 발생하는 것으로 알려져 있으나 때로는 ‘abortion storm’과 같은 폭발적인 발생도 보고되었으나, 대부분의 진단이 유산 발생 목장의 일부 유산태아에 대한 검사에 한정되었기 때문에 전체 유산의 원인이 *N. caninum*에 의한 것인지는 확실하지 않다. Anderson등은 *N. caninum*에 의해 유산한 어미소 112두를 검사하여 4두가 본 원충의 감염에 의하여 2회 연속 유산하였음을 확인하여, 동일 어미소에서 *N. caninum* 감염에 의해 반복유산이 이루어짐을 보고하였다.

Neosporosis는 개, 소, 양, 염소, 말, 사슴 등에서 자연발생 예가 보고되었으며, 개와 소를 비롯하여 마우스, 랫드, 토끼, 저빌, 면양, 산양, 돼지, 고양이, 여우, 너구리, 코요테 등에서 실험감염 예가 보고되었다. 원숭이와 같은 유인원에서도 실험적으로 태반감염이 이루어졌기 때문에 *T. gondii*와 마찬가지로 인수공통전염병의 가능성을 완전히 배제할 수 없어 관심이 집중되고 있다.

Neosporosis의 치료방법은 아직까지 잘 알려지지 않았다. 그러므로 지금까지 Neosporosis의 소 유·사산에 대한 치료가 이루어지지 못하여 속수무책으로 경제

적 손실을 당하는 수밖에 없다. 그러므로 Neosporosis에 대한 치료제의 개발이 절대적으로 필요한 상황에서 본인 등은 지난 3년간 “국내 소 유산증의 원인분석 및 대책수립”의 연구 과제를 수행하면서 한약제의 닭콕시뚬 원충에 대한 항원충 효능의 평가 경험을 바탕으로 한약제의 *N. caninum* 원충에 대한 항원충 효능을 screening 한 결과 우수한 항원충 효능을 가진 한약제를 선발할 수 있는 가능성을 찾아 본 연구를 수행하고자 한다.

2. 연구개발의 범위

위한 기술을 개발 하고자 한다.

3. 연구개발의 목표

제 2 절 국내외 기술 개발 현황

미국 뉴멕시코주 젓소 목장의 유산태아 뇌조직에서 원충인 *N. caninum* 특이 항체에 반응하여 *N. caninum*이 소 유산의 원인체임을 최초로 보고된 이래로 미국의 경우 미국 캘리포니아주에서는 유·사산이 발생한 목장에서 *T. gondii*와 유사한 원충이 면역조직화학염색시 *N. caninum* 특이 항혈청에 반응하여 *N. caninum* 감염에 의한 유산임이 밝혀졌다. 특히 이 지역에서 neosporosis는 젓소의 유산과 관련된 질병 중 약 12%를 차지하는 가장 중요한 원인체로 밝혀졌으며, 연간 3,500만 달러 상당의 막대한 경제적 손실을 초래하는 것으로 현재까지 알려져 있다. 한편 비육우에서도 *N. caninum*에 의한 유산 또는 신경증상이 보고된 바 있다. 소의 neosporosis는 미국을 비롯하여 남아프리카, 네델란드, 뉴질랜드, 덴마크, 멕시코, 스웨덴, 아일랜드, 영국, 오스트레일리아, 이스라엘, 짐바브웨 및 캐나다에서 발생하고 있음이 보고되어 전세계적인 발생 분포를 나타내고 있다. 국내에서도 김 등에 의해서 *N. caninum*에 의한 유산 및 동일 소에서의 반복 유산이 보고되었다. 또한 경기도 지역을 중심으로 사육중인 젓소를 대상으로 간접형광항체법을 이용하여 네오스포라에 대한 항체양성율을 조사한 결과 국내젓소의 일부도 이미 본 기생충에 감염되어 있는 것이 확인되었으며 항체양성율과 유산율에 있어서도 상관관계가 있음이 아울러 확인되었다. 특히 미국의 경우에는 최근 5년간 범국가적인 차원에서 neosporosis에 대한 연구에 몰두한 결과 몇 년 전에는 지금까지 미지였던 본충의 종숙주를 개로 밝혀내는데 성공하였다. 한편 지금도 국가적인 차원에서 소에서의 neospora 감염상태에 대한 조사를 계속하고 있다. 국내에서도 이미 네오스포라 감염증에 대한 감염실태 및 진단을 하는데 필요한 일부의 기술은 이미 축적되었고 분포조사가 이루어졌으며, 새로운 진단법, 백신과 한약제를 이용한 치료 및 예방대책의 가능성에 대한 기술이 이미 확보되어있기 때문에 이를 바탕으로 한약제에 대한 연구를 더욱 심도 깊게 하여 neosporosis에 대한 새로운 구충제를 개발하여 치료 및 예방대책을 수립하고자 한다.

제 3 절 연구개발수행 내용 및 결과

1. 한약제(고삼 등) 추출액 HPLC 분획의 동물내 항원충 효능 평가 연구

In vivo antiprotozoal efficacy of high performance liquid chromatography fractions of herb extracts on *Neospora caninum* infection

국내에서 네오스포라병에 대한 혈청역학조사를 실시한 결과 젓소목장별 및 개체별 항체 양성율은 각각 53.5%와 35.6%에 달하고, 유산산 발생빈도별로는 유산산 다발 목장과 일반 목장이 각각 48.7%와 20.7%로 나타나 현실적으로 젓소목장에서 매우 심각한 상태인 것으로 알려져 있다. 최근 소 유산태아 144두에 대하여 병리조직학적 검사와 PCR 검사를 병행하여 유산 원인을 분석한 결과 16.7%의 유산예가 네오스포라 감염에 의한 유산임이 밝혀져 많은 문제를 제시하고 있는 실정이다. 1988년 본 질병의 병원체가 미국에서 최초로 분리된 이후 분리된 원충을 이용하여 효율적인 진단법을 개발하고 원충 구제를 위한 예방 기법을 확립 및 치료 약제를 개발 또는 선별하기 위한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있는 실정이다. 따라서 본 연구는 국내 분리 네오스포라 원충주 KBA-2를 BALB/c 마우스, 임신된 염소 및 포유 자견에 인공 감염시키고, 고삼 및 사상자와 같은 한약제 추출 HPLC 분획을 투여하여 본 제제들의 항원충 효능을 검사하였다. 원충 감염군과 약제 투여군 별로 임상증상 발현 정도, 생존율 또는 유산 발생율, 병리조직학적 병변의 정도 등을 비교하였다.

면역이 억제된 BALB/c 마우스에 원충을 접종한 감염군은 접종 후 14일부터 거친 피모, 운동성 상실, 사료섭취 저하 등의 임상증상을 나타내어 17~25일 중에 전 두수 폐사하였으며, 뇌, 췌장, 폐장, 간장, 비장 등의 장기에 괴사성 또는 비화농성 염증 병변을 형성하였다. 특히 괴사성 뇌염 병변 지수는 평균 8.15로 매우 심한 병변을 형성하고 있었다. 원충을 감염시킨 뒤 고삼 및 사상자 HPLC 분획을 투여한 마우스에서는 평균 생존일은 큰 차이를 나타내지 않았으나, 약제 투여군에서 감염군에 비하여 마우스의 생존율은 다소 향상되고, 뇌의 병변 지수는 감소하는 경향을 뚜렷이 나타내었다. 특히 고삼 고용량 (50 μ l) 투여군과 사상자 고용량 (50 μ l) 투여군의 경우 원충 감염 대조군에 비하여 생존율은 각각 25% 및 41.7%로 증가하였고, 뇌 병변 지수는 각각 1.81 및 2.23 정도 감소하였다.

임신된 염소에 원충을 투여하고 각 약제의 항원충 효능을 비교 하였다. 원충

감염-무투약군의 임신 산양 2두는 접종 후 27일째 모두 유산을 하였으며, 유산된 태아의 뇌에서 다발성 괴사성 뇌염 소견이 관찰되었다. 고삼 및 사상자 HPLC 분석을 투여한 임신 산양 8두에서 2두를 제외하고 6두가 유산을 하였다. 그러나 평균 유산발생일은 고삼 고용량 (1ml/kg) 군, 고삼 저용량(1ml/kg) 군, 사상자 고용량 (1ml/kg) 군 및 저용량 (1ml/kg) 군이 각각 51일, 45일, 78.5일, 50.5일로 나타나 감염 대조군에 비하여 늦어지는 양상을 나타내었다. 포유 자견을 이용한 실험 감염 및 항원충 시험 결과 국내 분리 원충이 개에 대한 병원성이 낮은 관계로 항원충 효능을 평가할 수 는 없었다.

본 실험을 통하여 고삼 및 사상자의 HPLC 분석이 마우스에서 *N. caninum* 감염을 어느 정도 방어하여 생존율을 향상시킬 수 있었으며, 임신 염소에서는 감염 자체를 방어 또는 치료하지는 못하였지만 유산의 발생시기를 다소 늦출 수 있음을 확인하였다. 따라서 고삼 및 사상자와 같은 한약제 추출 HPLC 분석이 네오스포라병과 같은 원충성 질병의 치료에 사용될 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

가. 서 론

*Neospora caninum*은 분류학상 Apicomplexa 문, Coccidia 강, Sarcocystidae 과에 속하는 원충으로 *Toxoplasma gondii*와 같이 tachyzoites와 tissue cyst (조식낭)의 두 가지 형태를 취하며, 종숙주의 분변을 통하여 oocysts를 배출하는 것으로 알려져 있다. 현재 본 질병은 미국을 비롯하여 남아프리카, 네델란드, 뉴질랜드, 덴마크, 멕시코, 스웨덴, 아일랜드, 영국, 오스트레일리아, 이스라엘, 일본, 짐바브웨, 캐나다 및 한국에서 발생하고 있어 거의 전 세계적인 발생을 하고 있는 것으로 생각되어 진다. 소에 있어서 *N. caninum*에 의한 유산 발생을 살펴보면 미국의 캘리포니아에서는 여름이나 초가을 보다는 겨울에 다발하고, 네델란드에서는 늦여름에서 초가을에 많이 발생하고 있다고 보고된 바 있다. 따라서 국가마다 다소간의 차이는 있으나 거의 연중 발생하고 있을 것으로 추정된다.

*N. caninum*은 소에서 임신 3개월부터 분만 전까지 다양한 임신연령에서 유산을 일으키며, 대체로 임신중기에 가장 흔하게 발생한다. 본 원충에 감염된 유산태어나 선천적으로 감염된 송아지에서는 괴사성 또는 비화농성 뇌척수염, 심근염, 근염 등의 병리조직학적 소견을 나타내는 경우가 흔하며, 드물게 간이나 신장에서 다발성 염증을 유발하기도 한다.

전 세계적으로 네오스포라 원충의 감염을 예방하기 위한 백신 개발에 주력하여 일부 실험적으로 개발되었다는 보고는 있으나 아직까지 뚜렷한 효과를 입증하고 있지는 못하다. 또한 본 질병의 치료를 위한 연구도 아직까지 세포배양법 또는 마우스를 이용한 실험결과만이 있을 뿐, 가장 경제적인 피해를 주고 있는 소나 종숙주에 해당하는 개에 대한 치료 결과는 매우 미흡한 실정이다. 세포배양을 통해 이 원충에 대한 치료약제 선발시험 결과 설파다이아진 (sulfadiazine), 트리메토프림 (trimethoprim), 라살로시드 (lasalocid), 모넨신 (monensin) 등의 약제가 어느 정도 효과가 있는 것으로 보고되었다.

본 연구에서는 국내 소 유산태아에서 분리된 *N. caninum* 원충 (KBA-2)을 실험동물에 인공접종하여 병원성을 가지고 있는지 여부를 알아보고, 동시에 배양세포에서 항원충 효능이 검증된 한약제의 성분 분석을 실험동물에 투여하여 동물체내에서의 항원충 효능을 평가하고자 하였다. *N. caninum*을 인공 접종한 마우스, 임신 산양, 개에 한약제 성분 HPLC 분석을 투여한 다음 임상증상 발현 여부, 폐사상황 및 유산 발생 여부를 관찰하였다. 실험동물 폐사축, 유산태아 및 안락사한 개체에 대하여 부검을 실시한 후 병변의 경중을 파악하기 위하여 병리조직학적 검사를 수행하였으며, 혈청검사 또는 면역조직화학 염색도 병행하여 수행하였다.

나. 재료 및 방법

1) 공시원충 및 tachyzoite 준비

*N. caninum*의 국내 분리주 KBA-2를 사용하였다. 원충은 원충이 신장 단층세포 (Vero cell : CRL6318, ATCC, MD)에서 5일에서 7일 간격으로 계대 유지되었으며, 배지로는 Minimum Essential Medium (MEM: GIBCO BRL USA)에 10% 말 혈청 (GIBCO BRL), 4 mM L-glutamine MEM vitamin solution (GIBCO BRL), MEM essential amino acid solution (GIBCO BRL), MEM non-essential amino acid solution (GIBCO BRL), antibiotic-antimycotic (100unit/ml penicillin G, 100 μ l/ml streptomycin, 0.25 μ g/ml amphotericin B: GIBCO BRL), 7.5% sodium bicarbonate를 첨가하여 사용하였다. 배양 조건은 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂를 유지하였다.

실험동물에 접종할 tachyzoite는 *N. caninum*이 약 75% 정도 감염되어 있는

vero cell을 cell scraper로 긁어 수확한 후 주사바늘 (22G, 26G)로 세포를 2~3회 붓고시키고 5 μ m filter로 세포붕괴물을 제거한 후 차가운 0.01 M PBS에 2,000 rpm에서 5분간 원심, 세척하였다. 혈구 계산판을 이용하여 tachyzoite의 수를 측정하였으며, 감염력을 유지하기 위하여 접종은 1~2시간 내에 수행하였다.

2) 간접형광항체 검사 (Indirect fluorescent antibody test: IFA)용 항원 슬라이드 제작

IFA를 위한 *N. caninum* 항원 슬라이드를 제작하기 위하여 국내 분리주 KBA-2를 사용하였으며, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 배양조건으로 유지하였다.

육안적으로 세포배양 플라스크에 증식된 Vero cell의 약 75%가 감염되었을 때 tachyzoite를 수거하였다. 감염된 세포를 플라스크로부터 수확하여 350g에서 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 약간의 PBS가 남아 있는 상태로 pellet을 부유시켜 주사바늘 (26G)로 세포를 붓고시키는 과정을 3회 반복하였다. 50ml 플라스크 시험관 (Greiner laboratory, Austria)에 tachyzoite와 세포 붓고물이 함유된 부유액에 30% percoll 용액 (Pharmacia Biotech AB, Sweden)을 첨가하였다. 멸균된 긴 바늘을 이용하여 50%와 80% percoll 용액을 50ml 시험관의 밑바닥에 첨가한 후 4 $^{\circ}$ C, 2,200g에서 30분간 원심분리하였다. 50%와 80% percoll 접합면에 위치한 tachyzoite를 수거하여 40ml 멸균 PBS를 첨가한 뒤 1,700g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 5ml 정도의 PBS가 남은 상태로 tachyzoite를 부유시켜 혈구계산판을 이용하여 수를 측정하고 1 μ 당 300~400개의 tachyzoite가 포함되도록 희석하였다. Teflon-coated 12 well 슬라이드(Superior, USA)의 well당 10 μ l tachyzoite 함유 용액을 떨어뜨린 후 상온에서 건조시키고, 2% paraformaldehyde가 함유된 PBS에 10분간 고정한 후 건조시켜 -80 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

기지의 양성 및 음성 대조 소 혈청을 이용하여 제작된 항원 슬라이드의 적합성을 검증하였다.

3) 실험동물

가) 마우스

대상 마우스는 국립수의과학검역원에서 분양 받은 4~5주령의 20~25g되는

BALB/c 마우스 수컷 60마리를 1주일 간 실험실에서 순화시킨 후 사용하였다. 각 군별로 동거 사육시켰으며, 플라스틱 cage에서 온도는 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 $55\pm 10\%$ 로 유지시키고, 물과 사료는 무제한으로 자유 급식하였다. 반입되는 cage 및 깔짚은 고온 멸균 처리한 후 사용하였다.

나) 염소

한약제 추출액 HPLC 분석의 *N. caninum*에 대한 항원충 효능을 검사하기 위하여 약 2~4산 경력의 임신한 한국재래산양 (Korean Native goats) 모축 12마리를 도입하였다. 배대식 (2002)에 따르면 국내 사육되고 있는 한국재래산양은 대체로 임신 기간이 152.19일 인 것으로 알려져 있다. 축주의 품고에 근거하여 종부가 이루어진 후 임신 약 60~80일 정도의 임신 모축을 사용하였다. 산양 도입 전 우측 경정맥으로부터 혈액을 10ml 채취하여 *N. caninum*에 대한 항체 소장 여부를 검사하여 항체 음성인 개체만을 사용하였다. 염소는 감염군, 한약제 추출액 HPLC 투여군, 대조군을 각각 2마리씩 동거사육하면서 건조, 생초, 육성우용 농후 사료를 급여하였으며, 물은 수돗물을 자유급식하였다. 접종 후에는 매일 아침과 저녁 2회에 걸쳐 임상증상의 발현 여부를 검사하였다.

다) 개

실험을 위한 대상 개는 임신축을 우선적으로 고려하여 임신 동기화를 수 차례 유도하였으나 실패하여 Cole 등 (1995)의 감염실험에 근거하여 차선책으로 포유단계의 자견을 활용하였다. 포유 중인 약 2주령의 잡종 자견 (mixed breed) 24두를 모축 5두와 함께 구입하였다. 4~5두의 자견이 딸린 각각의 모축을 cage에 사육하면서 포유토록 하였으며, 5주령에 이유를 시켰다. 이 후 육성견 사료과 잔반을 급여하였으며, 물은 수돗물을 자유급식하였다. 자견 도입 전 우측 요측피정맥 (cephalic vein)으로부터 혈액을 3ml 채취하여 *N. caninum*에 대한 항체 소장 여부를 검사하여 항체 음성인 개체만을 사용하였다. 접종 후에는 매일 아침과 저녁 2회에 걸쳐 임상증상의 발현 여부를 검사하였다.

4) 생약 제제

실험에 사용한 생약 제제는 Youn and Noh (2001)의 보고와 같이 닭 맹장 콕시들행에 어느 정도 효능을 보인 *S. flavescens* (고삼), *S. acutum* (방기), *U.*

macrocarpa (무이), *T. japonica* (사상자) 중에서 세포배양중인 *T. gondii*에 대하여 뛰어난 효과를 가지고 있는 것으로 나타난 (Youn 등, 2004) 고삼과 사상자를 선택하여 사용하였다. 제 1세부과제에서 선정되고 80% ethanol에 희석된 고삼 및 사상자 HPLC 분획을 냉장보관하면서 실험에 공하였다. 고삼 HPLC 분획은 100배, 사상자 HPLC 분획은 1,000배로 희석하여 실험동물에 투여하였다.

5) 실험 설계

가) 마우스

마우스에 면역억제제인 methylprednisolone acetate (MPA)를 근육으로 투약한 1주일 뒤 *N. caninum* 국내 분리주 KBA-2의 감염력이 있는 tachyzoite를 혈구계산관으로 세어 2×10^5 개/ml로 조정하여 60마리의 마우스에 복강 접종하였다. 실험군은 고삼 HPLC 분획 $50\mu\text{l}$ (B 군) 또는 $20\mu\text{l}$ (C 군)를 피하로 각각 12마리씩 투여하였다. 사상자 HPLC 분획 또한 $50\mu\text{l}$ (D 군) 또는 $20\mu\text{l}$ (E 군)를 피하로 각각 12마리씩 투여하였다. A군은 약제투약 없이 원충만을 접종한 양성 대조군으로 활용하였다. 한약제는 원충 접종과 동시에 투약하였으며, 3일 후 다시 한 번 투약하였다. 약물의 효능을 분석하기 위하여 매일 임상 증상, 폐사 상황을 관찰하였으며, 뇌의 병변을 비교 분석하였다.

뇌 병변에 대한 병리조직학적 분석 (Brain tissue lesion analysis)은 Lindsay 등 (1995)의 방법에 따라 다음과 같은 3가지 기준을 정하여 수치화 하였다. 그 기준은 1) 염증 또는 괴사 병변의 수, 병변 없음= 1, 1-5개= 2, 6-10개= 3, >11개= 4, 2) 병변 평균의 크기, 병변 없음= 1, $\leq 300\mu\text{m}$ = 2, $300-600\mu\text{m}$ = 3, $>600\mu\text{m}$ = 4, 그리고 3) 병변의 정도, 병변 없음= 1, slight= 2, mild= 3, moderate= 4, marked= 5, 으로 세분하여 등급을 나누어 평가하였다.

나) 산양

임신 산양에 면역억제제인 methylprednisolone acetate (MPA)를 근육으로 투약하고 1주일 후 *N. caninum* 국내 분리주 KBA-2의 감염력이 있는 tachyzoite를 혈구계산관으로 세어 1×10^8 개/ml로 조정하여 12마리의 산양에 우측 견갑골 인근 피하에 접종하였다. 실험군은 고삼 HPLC 분획을 체중 kg당 1ml (B 군) 또는 0.1ml (C 군)을 피하로 각각 2마리씩 투여하였다. 사상자 HPLC 분획 또한 체중

kg당 1ml (D 군) 또는 0.1ml (E 군)을 피하로 각각 2마리씩 투여하였다. A군은 약제투약 없이 원충만을 접종한 양성대조군으로 활용하였고, F군은 한약제 용매 대조군으로 80% ethanol을 체중 kg당 각각 1ml 또는 0.1ml을 1마리씩 피하로 투여하였다. 한약제는 원충 접종과 동시에 투약하였으며, 7일 후 다시 한 번 투약하였다. 약물의 효능을 분석하기 위하여 매일 임상 증상, 유산 상황을 관찰하였으며, 2주 간격으로 체온을 측정하고 채혈을 실시하였다.

다) 개

포유 자견에 면역억제제인 methylprednisolone acetate (MPA)를 근육으로 투약하고 1주일 후 *N. caninum* 국내 분리주 KBA-2의 감염력이 있는 tachyzoite를 혈구계산판으로 세어 5×10^6 개/ml로 조정하여 24마리 자견의복강에 접종하였다. 실험군은 고삼 HPLC 분획을 체중 kg당 1ml (B 군) 또는 0.1ml (C 군)을 피하로 각각 5마리씩 투여하였다. 사상자 HPLC 분획 또한 체중 kg당 1ml (D 군) 또는 0.1ml (E 군)을 피하로 각각 5마리씩 투여하였다. A군은 약제투약 없이 원충만을 접종한 양성대조군으로 활용하였다. 원충 접종과 동시에 한약제를 투여하였으며, 5일 후 다시 한 번 투약하였다. 약제 투여 후 35일 및 70일에 군별로 각각 2두씩 안락사하여 부검을 실시한 후 내부장기에 대한 병리학적 검사를 실시하였다. 나머지 1두는 이상 증상이 발현될 때까지 장기간 관찰하였다. 약물의 효능을 분석하기 위하여 매일 임상 증상, 폐사 상황을 관찰하였으며, 내부 장기의 병변을 비교 분석하였다. 이주일 간격으로 체온을 측정하고, 2주일 단위로 혈액을 채취하여 *N. caninum* 항체 형성 여부를 검사하였다.

6) 혈청검사

염소 및 개의 혈청을 분리한 다음 200 또는 50배 희석하여 원충 tachyzoite가 부착된 슬라이드 well에 각각 well 당 $10\mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 37°C 습상에서 1시간 동안 반응시키고 0.05% triton-X 100이 함유된 PBS로 5분씩 3회 세척하였다. 슬라이드상의 습기를 완전히 제거한 후 이차항체로 1:200으로 희석된 FITC-conjugated rabbit anti-goat 또는 anti-dog antiserum (Cappel Durham, USA)을 각 well 당 $10\mu\text{l}$ 씩 분주한 다음 37°C 습상에서 1시간 반응시키고, 반응이 끝난 다음 슬라이드를 PBS로 3회 세척한 다음 25% glycerol 함유 PBS로 봉입하여 형광현미경으로 관찰하였다. 항체역가를 측정하기 위하여 염소의 경우

200배에서, 개의 50배에서 2진 단계 희석하여 혈청검사를 수행하였다. 양성 및 음성 대조혈청은 VMRD로부터 구입하여 사용하였으며 양성반응은 슬라이드에 부착된 tachyzoite의 표면전체에서 형광을 발하는 것을 기준으로 판단하였다.

7) 병리학적 검사

마우스, 산양 유산태아 및 자견의 신선 조직을 얻기 위하여 혼수상태의 폐사 직전 개체를 안락사 시켜 장기를 채취하거나 폐사 후 최소의 시간이 경과된 후 장기를 채취하는 것을 원칙으로 하였다. 일반적인 부검 술식에 따라 부검하여 육안 병변을 관찰한 후, 뇌, 척수, 폐장, 심장, 간장, 비장, 신장, 췌장, 근육 등의 내부 장기를 채취하여 10% 중성 완충 포르말린에 24시간 고정하였다. 일반적 조직 처리 과정을 거쳐 파라핀 포매한 후 4 μ m로 박절하여 hematoxylin 과 eosin (H&E) 으로 염색하였다.

8) 면역조직화학염색

각 장기들 중 *N. caninum* 원충 감염이 의심되는 조직 표본을 4 μ m로 박절한 후 탈파라핀시키고 3% H₂O₂가 함유된 methanol에서 5분, 0.1% pronase로 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리한 후 0.1% gelatin에 희석한 5% 정상 토끼 혈청으로 37 $^{\circ}$ C 습상에서 20분간 반응시켰다. 일차항체는 1: 3,000으로 희석한 *N. caninum* hyperimmune serum (VMRD, USA)을 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리한 다음 차가운 10% Triton-X 함유 Tris buffer (TTBS-HS/Tx)로 수세하였다. 이차항체는 biotinylated anti-goat IgG (Vector Lab., USA)를 1:200으로 희석하여 37 $^{\circ}$ C 습상에서 20분간 반응시킨 뒤 avidin-biotin complex용액에 20분간 적용시키고, DAB (3,3'- diaminobenzidine tetrachloride) (Vector Lab., USA)로 발색시켰다. 대조염색으로 Harris's hematoxylin염색하여 광학현미경으로 검경하였다.

다. 결 과

1) 마우스 감염 실험

가) 임상증상 및 생존율

BALB/c 마우스를 면역억제 시킨 후 *N. caninum*을 감염시킨 다음 *S. flavescens* (고삼) 및 *T. japonica* (사상자)의 HPLC분획을 투여하고 이 두 가지 약제의 항원중 능력을 조사하였다.

약제를 투여하지 않고 원충만을 감염시킨 A군 (감염-무투약군)의 마우스는 접종 후 약 2주 후부터 피모가 매우 거칠고 운동성이 둔해지면서 점차 사료섭취를 못하였으며 (Fig. 2), 심한 경우 케이지의 벽에 기대어 혼수상태를 나타내다가 접종 17~25일 사이에 전 두수 폐사하였다 (Fig. 1).

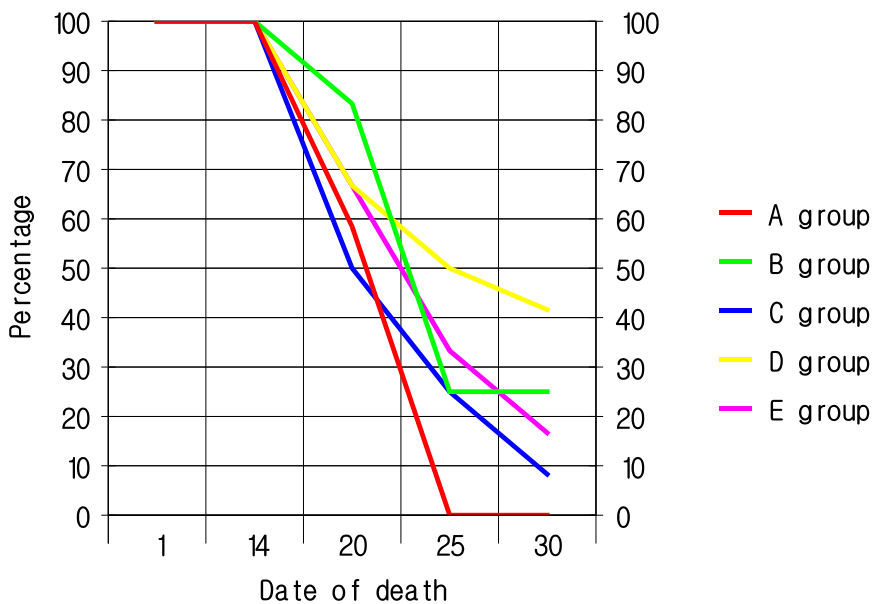


Fig 1. Diagram of viability of the herb extracts treated mice infected with *Neospora caninum* KBA-1

한약제 투여군의 경우 고삼 또는 사상자 50 μ l 투여군은 무투약 대조군과 유

사하게 약 13~14일부터 느린 행동과 거친 피부를 나타내다가 각각 19~25일, 17~27일까지 9마리 및 7마리가 폐사하였다. 그러나 고삼 또는 사상자 20 μ l 투여군은 각각 11마리 및 10마리가 폐사하는 양상을 나타내었다. 따라서 약제 투여에 따른 마우스의 생존율은 고삼 50 μ l, 고삼 20 μ l, 사상자 50 μ l, 사상자 20 μ l 투여군에서 각각 25%, 8.3%, 41.7% 및 16.7%로 확인되었다 (Table 1).

Table 1. Effects of treatment with herb extracts in mice infected *Neospora caninum*

Groups	No of mice	No. died	Day of death (day after challenge)	Mean day of death	Survival rates (%)
A. <i>Neospora</i> only	12	12	17(1*), 18(2), 19(2), 22(3), 23(2), 25(2)	21	0
B. <i>S. flavescens</i> 50 μ l	12	9	19(2), 21(2), 23(2), 25(3)	22.3	25
C. <i>S. flavescens</i> 20 μ l	12	11	17(2), 18(2), 19(2), 22(3), 26(2)	20.5	8.3
D. <i>T. japonica</i> 50 μ l	12	7	17(2), 20(2), 25(2), 27(1)	21.6	41.7
E. <i>T. japonica</i> 20 μ l	12	10	18(2), 19(2), 21(1), 22(1), 23(2), 26(2)	21.5	16.7

* Numbers of dead mice

나) 병리조직학적 소견 및 면역염색

원충만을 접종한 A군 (감염-무투약군)의 마우스 뇌에서는 대뇌와 소뇌 회색질 및 백색질, 뇌줄기에 주위 정상적인 부위와 명확하게 구분되는 방사상의 괴사성 비화농성 뇌염 소견이 다수 산재하여 있었으며, 부위에 따라 비화농성 뇌염 소견도 공존하고 있었다 (Fig. 3, 4). 국소적인 소상 괴사소는 뇌실질 혈관 주위 또는 뇌실 주변의 뇌실질에서 다수 관찰되었으며, 일부 심한 병변부에서는 해면상의 형태 (status spongiosa)로 나타나기도 하였다. 괴사 병변부 인근 뇌실질 또는 주위의 신경세포의 세포질에서 호염성으로 염색되는 초생달 모양의 원충 tachyzoite가 단독 또는 집락을 형성하며 분포하고 있었으며, 면역염색 시 강한 갈색의 양성 반응을 확인할 수 있었다. 일부에서는 주위에 염증세포의 침윤을 동반하지 않은 상태로 다수의 원충 집락이 모여 있는 pseudocysts도 관찰되었다 (Fig. 6). A군에서 폐사한 마우스의 평균 뇌 병변지수는 8.15로 나타나 실험군 중에서 가장 심한 뇌병변을 형성하고 있었다 (Table 2).

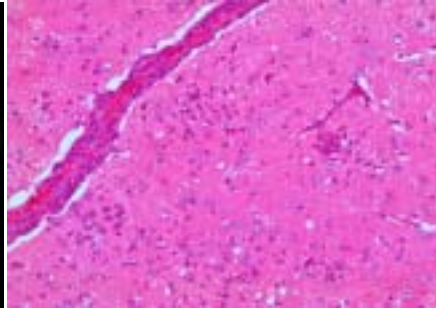
반면 고삼 50 μ l 투여군의 폐사축 9두 및 사상자 50 μ l 투여군의 폐사축 7마리의 평균 뇌병변 지수는 각각 6.34 및 5.92로 나타나 감염 대조군에 비하여 상대적으로 매우 낮은 병변 형성 정도를 나타내고 있었다 (Fig. 5). 그러나 적은 용량의 한약제 20 μ l를 투여한 군에서는 각각 7.82 및 7.35의 평균 뇌병변 지수를 가지고 있어 다소 낮지만 뚜렷한 유의성은 확인할 수 없었다.

Table 2. The results of brain lesion scores of BALB/c mice treated with herb extracts or infected with *Neospora caninum*.

	A.	B.	C.	D.	E.
Groups	Neospora only	<i>S flavescens</i> 50 μ l	<i>S flavescens</i> 20 μ l	<i>T japonica</i> 50 μ l	<i>T japonica</i> 20 μ l
Brain lesion scores (mean \pm SD)	8.15 \pm 1.62	6.34 \pm 2.52	7.82 \pm 2.82	5.92 \pm 1.86	7.35 \pm 2.38

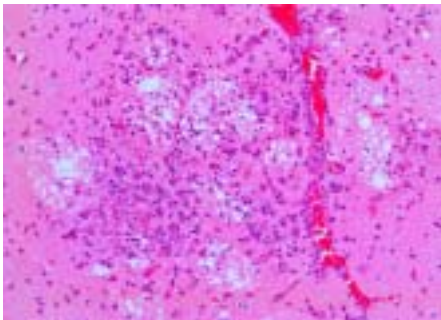


encephalitis mouse infected with *N. caninum*.

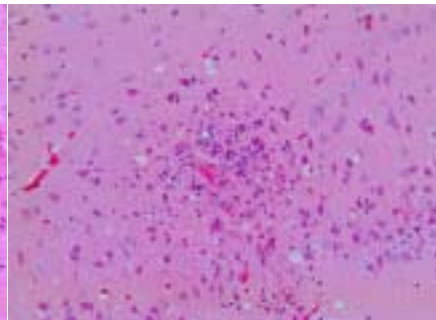


in the brain of mice infected with *N. caninum*. H&E, X200.

Fig. 2.
Note neurological signs of Fig. 3. Note nonsuppurative

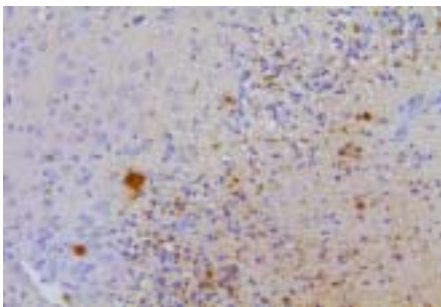


encephalitis in the brain of mice infected with *N. caninum*. H&E, X200

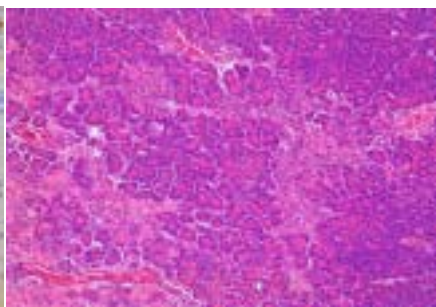


encephalitis in the brain of mice treated with *S. flavescens*. H&E, X200

Fig. 4.
Note severe necrotizing Fig. 5. Note mild necrotizin



of the brain of mice. IHC, X200.



and tachyzoites and necrosis in the mice infected with *N. caninum*. H&E, X200.

Fig. 6.
Note positive reaction Fig 7. Pancreatic inflamma

또한 기타 장기의 병변으로 대부분의 췌장에서 광범위한 다발성 괴사성 췌장염이 관찰되었다 (Fig. 7). 췌장의 선방을 피복하고 있는 상피세포들은 주위에 침

윤된 림프구, 형질세포 및 큰포식세포로 인하여 압박성 위축 또는 괴사를 나타내고 원충의 tachyzoite가 다수 실질에 매몰되어 있었다. 개체에 따라서 폐장, 간장, 비장, 위장관 등지에 비화농성 염증세포의 침윤과 함께 소수의 원충들이 산재하여 있었으며, 면역염색 시 더욱 뚜렷한 원충의 tachyzoite를 관찰할 수 있었다 (Fig. 6).

2) 임신 염소 감염 실험

가) 체온 및 항체가 변화

임신 60~80일령의 산양을 면역억제 시킨 후 *N. caninum*을 감염시킨 다음 *S. flavescens* (고삼) 및 *T. japonica* (사상자)의 HPLC분획을 투여하고 이 두 가지 약제의 항원충 능력을 조사하였다. 원충 접종 시 임신 산양의 체중은 18.0~23.6 kg 정도였으며, 스트레스를 가하지 않기 위하여 실험기간에 체중의 측정은 실시하지 않았다.

각각의 산양에 대하여 2주 간격으로 체온을 측정한 결과 낮게는 36.6℃ 높은 개체의 경우 39.6℃에 달하기도 하였으며, 개체별 체온 변화의 양상은 Table 3과 같다. 전반적인 실험기간 중 원충 접종군, 한약제 투여군 및 용매 대조군에서 유의성 있는 체온의 변화는 인지되지 않았다. 또한 개체별로 2주 간격으로 채혈을 실시하여 간접형광항체 검사를 통하여 항체의 생성여부를 조사한 결과 접종 2주 경부터 *N. caninum*에 대한 400~800배 정도의 항체를 형성하기 시작하였다. 전 실험기간 중 원충 단독 투여군인 A군은 3,200~6,400배의 높은 항체가를 유지하고 있었으나, 한약제 HPLC 분획 투여군에서는 감염-무투약 A군에 비하여 한두 단계 낮은 800~3,200배 정도의 항체가가 형성되어 있음을 확인할 수 있었다 (Table 4).

Table 3. The change of body temperature in pregnant goats infected *Neospora caninum*

Groups	No of goat	ID*	Day of post-inoculation (DPI)					
			1	2W	4W	6W	8W	10W
A. <i>Neospora</i> only	2	11	37.9	39.3	38.3	NT	NT	NT
		14	38.9	37.8	38.4	36.7	38	37.1
B. <i>S. flavescens</i> 1mℓ/kg	2	1	38.4	38.8	38.1	38.3	37.8	36.8
		15	39.5	38.1	37.4	36.6	37.8	38.1
C. <i>S. flavescens</i> 0.1mℓ/kg	2	3	38.1	38.9	38	38.4	37.8	38.1
		4	38.1	38.8	38.4	38.4	38.3	38.3
D. <i>T. japonica</i> 1mℓ/kg	2	5	38.8	38.3	37.9	38.3	38.5	37.1
		6	38.8	38.3	37.9	38.3	38.5	37.1
E. <i>T. japonica</i> 0.1mℓ/kg	2	7	37.6	39.2	38.3	38	37.9	37.3
		16	38.7	38.2	38.8	38.3	38	37
F. Solvent control	2	9	38.6	38.3	39.6	38.3	38.1	38.8
		10	38.8	39.4	39.3	38.8	37.3	39.1

* Animal ID of goat, NT= not tested

Table 4. Serum antibody levels against *Neospora caninum* in infected and herb extract treated pregnant goats determined by IFA test

Groups	No of goat	ID*	Titers in day of post-inoculation			
			1	2W	6W	10W
A. <i>Neospora</i> only	2	11	N	800	NT	NT
		14	N	800	6,400	3,200
B. <i>S. flavescens</i> 1mℓ/kg	2	1	N	400	3,200	1,600
		15	N	400	1,600	1,600
C. <i>S. flavescens</i> 0.1mℓ/kg	2	3	N	800	3,200	3,200
		4	N	800	3,200	3,200
D. <i>T. japonica</i> 1mℓ/kg	2	5	N	400	1,600	800
		6	N	800	1,600	1,600
E. <i>T. japonica</i> 0.1mℓ/kg	2	7	N	800	3,200	3,200
		16	N	800	1,600	1,600
F. Solvent control	2	9	N	N	N	N
		10	N	N	N	N

* Animal ID of goat, N= negative, NT= not tested

나) 임상증상 및 유산 발생 현황

산양 사육 경력이 15년 되는 축주의 품고에 근거하여 종부가 이루어진 후 임신 약 60~80일 정도의 임신 모축에 면역억제제인 methylprednisolone acetate (MPA)를 근육으로 투약하고 원충을 접종한 다음 고삼 및 사상자 추출 HPLC 분석을 투여하여 항원충 효능을 평가하였다.

감염-무투약 A군의 임신 산양 2두 (ID 11, 14)는 원충 접종 후 27일째에 각각 1두씩의 태아를 유산하였으며 (Fig. 8), 태아의 체장은 12 및 15cm에 달하였다 (Table 5). 모체 11번의 경우 유산 후 약 10일 경과 후 목줄이 엉키는 사고로 폐사하였다. 한약제 추출액 투여군에 있어서, 고삼 분석 1ml를 투여한 B 군의 임신 산양 2두 (ID 1, 15) 중 1두는 원충 접종 후 51일째 체장 16~17cm의 태아 2두를 유산하였다. 15번 개체의 경우 접종 후 60일에 허약자양 1두를 분만하였으나 생후 2일째에 폐사하였다. 고삼 분석 0.1ml를 투여한 C 군의 임신 산양 2두 (ID 3, 4) 중 1두는 원충 접종 후 45일째 체장 18~18.5cm의 태아 2두를 유산하였으나, 4번 개체의 경우 실험이 종료되는 시점까지 분만이 이루어지지 않아 임신이 되어 있지 않은 것으로 확인되었다. 사상자 분석 1ml를 투여한 D 군의 임신 산양 2두 (ID 5, 6)는 각각 원충 접종 후 116 및 41일째 체장 29~30cm 및 16~15.5cm의 태아를 2두씩 유산하였다 (Fig. 9). 또한 사상자 분석 0.1ml를 투여한 E 군의 임신 산양 2두 (ID 7, 16)는 각각 원충 접종 후 50 및 51일째 체장 17cm 및 22cm의 태아를 1두씩 유산하였다. 그러나 용매 대조군으로 80% ethanol을 투여한 F 군 (ID 9, 10)에서 1두의 경우 정상적인 염소를 분만하였으나, 1두는 임신이 이루어지지 않았었다.

Table 5. Pregnancy outcome for *Neospora caninum* infected and herb extract treated goats and histological brain lesions in their offsprings

Groups	ID*	State of offspring	Day of abortion	Number aborting	CR length	Brain lesions
A. <i>Neospora</i> only	11	abortion	27	1	12 cm	Necrotic encephalitis
	14	abortion	27	1	15 cm	Necrotic encephalitis
B. <i>S. flavescens</i> 1ml/kg	1	abortion	51	2	16/17 cm	Necrotic encephalitis
	15	weak born	60	1	-	-
C. <i>S. flavescens</i> 0.1ml/kg	3	abortion	45	2	18/18.5 cm	-
	4			Not pregnant		
D. <i>T. japonica</i> 1ml/kg	5	abortion	116	2	29/30 cm	Necrotic encephalitis
	6	abortion	41	2	16/15.5 cm	-
E. <i>T. japonica</i> 0.1ml/kg	7	abortion	50	1	17 cm	-
	16	abortion	51	1	22 cm	Necrotic encephalitis
F. Solvent control	9		Delivered 1 normal lambs			
	10		Not pregnant			

* Animal ID of goat, CR length= crown and rump length

다) 병리조직학적 소견 및 면역염색

임신 산양에서 유산한 유산태아 총 12두 및 개체번호 15번에서 분만된 허약 자양 1두에 대하여 부검을 실시하고, 주요 실질장기에 대하여 병리조직학적 검사를 수행하였다. 임신 중기 정도에 유산된 태아의 경우 전신 피부에는 털이 형성되어 있지 않았으며 담적색 내지 자적색조로 피부 발적이 관찰되었다 (Fig. 8). 대부분의 태아는 미약하거나 중등도의 사후변화가 동반되어 있었으며, 일부의 태아는 모축이 밟거나 건드려서 사지 또는 체강이 소실되어 있었다. 임신 말기에 유산된 태아 (모축 5번의 태아)의 경우 체강이 약 30cm에 달하며 검은 피모를 가

지는 완전한 산양의 형태를 취하고 있었다 (Fig. 9).

유산태아 12두 중 6두 (50%)에서 미약하거나 중등도의 괴사성 뇌염 병변이 관찰되었다. 원충만을 접종한 A군 (감염-무투약군)의 유산태아 2두의 뇌에서는 대뇌와 소뇌 회색질, 시상, 중뇌 및 연수에 림프구, 소교세포, 및 큰포식세포 등이 침윤된 방사상의 괴사성 뇌염이 관찰되었다 (Fig. 10). 또한 부위에 따라서는 위관성 원형세포 침윤 (perivascular cuffing)이 관찰되기도 하였다. 뇌막과 뇌실에는 국소적으로 또는 광범위하게 단핵구세포 계통의 염증세포들이 침윤되어 거미막 또는 맥락막층이 확장되어 있었다. 면역조직화학 염색을 수행한 결과 괴사소 인근 부위 뇌 실질에서 원충의 tissue cyst가 선명하게 나타는 경우도 있었다 (Fig. 11). 중추신경계 이외의 병변으로는 심장과 골격근에서 경미하나마 림프구 및 큰포식세포가 침윤되어 있는 국소적인 비화농성 심근염 또는 근염이 관찰되었다 (Fig. 12, 13). 그러나 다른 장기에서는 사후변화로 인하여 병변의 관찰이 용이하지 않았다.

한약제 추출액을 투여한 군에서 총 10두의 유산태아 중 4두 (40%)에서 병리조직학적 병변이 관찰되었다. 주로 대뇌 및 뇌줄기에서 경미한 국소 다발성 괴사성 뇌염 소견이 관찰되었으며, 일부 뇌혈관 주위로 비화농성 염증세포의 층판상 침윤이 나타나기도 하였다. 그러나 전반적인 병변의 정도는 감염-무투약 A군의 유산태아에 비하여 미약한 형태로 분포하고 있었다. 고삼 투여군의 모축 15번에서 허약자양으로 태어나 폐사한 개체에는 내부장기의 특별한 병리조직학적 소견을 관찰할 수 없었다.



Fig. 8. Aborted fetus from goat number 11. Fig. 9. Aborted fetus from the *N.*

caninum 11 infected with *N. caninum*. infected and then *T. japonica* treated goat number 5.

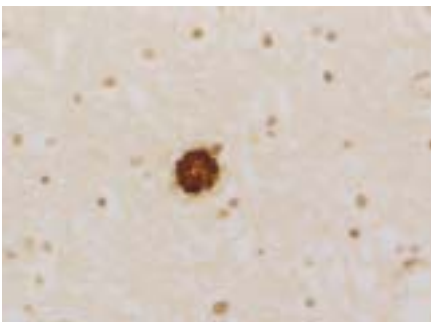
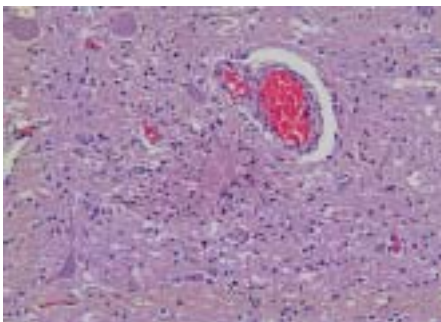


Fig. 10. Note moderate necrotizing Fig. 11. Note positive reaction of

encephalitis in the brain of goat infected with *N. caninum*. H&E, X200 tachyzoite in the brain of goat infected with *N. caninum*. IHC, X400

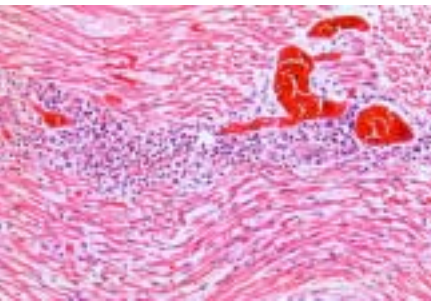
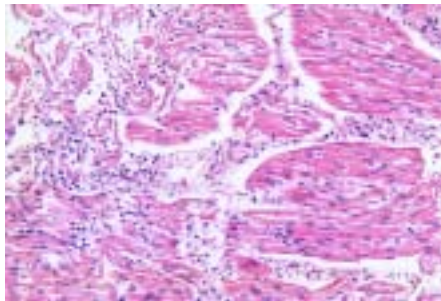


Fig. 12. Non-suppurative Fig. 13. Non-suppurative myositis myocardit

is in the heart of goat infected with *N. caninum*. H&E, X200. in the skeletal muscle of goat infected with *N. caninum*. H&E, X200.

3) 개 감염 실험

가) 체온 및 항체가 변화

포유 중인 생후 2주령의 잡종견 24두에 대하여 면역을 억제한 상태에서 *N. caninum*을 감염시킨 다음 *S. flavescens* (고삼) 및 *T. japonica* (사상자)의 HPLC 분획을 투여하고 이 두 가지 약제의 항원충 효능을 조사하였다.

각각의 자견에 대하여 2주 간격으로 체온을 측정된 결과 실험 전 기간에 걸쳐 대체로 $37.5 \pm 1.2^\circ\text{C}$ 정도로 특별한 이상 소견을 확인할 수 없었다. 자견 개체별로 2주 간격으로 채혈을 실시하여 간접형광항체 검사를 통하여 항체의 생성여부를 조사한 결과 접종 2주경부터 *N. caninum*에 대한 50~200배 정도의 항체를 형성하기 시작하였다. 전 실험기간 중 원충 단독 투여군인 A군은 400배 정도의 비교적 높은 항체가를 나타내다가 접종 후 8주부터는 200배 정도로 낮아지고 있었다. 이에 비하여 한약제 HPLC 분획 투여군에서는 감염-무투약 A군에 비하여 낮은 100배 정도의 매우 낮은 항체가가 형성되어 있음을 확인할 수 있었다 (Table 6).

Table 6. Serum antibody levels against *Neospora caninum* in infected and herb extract treated dogs determined by IFA test

Groups	No of dog	Titers in day of post-inoculation					
		1	2W	4W	6W	8W	10W
A. <i>Neospora</i> only	4	N	100 ~ 200	200 ~ 400	200 ~ 400	200	200
B. <i>S. flavescens</i> 1ml/kg	5	N	50	50~100	100	100	100
C. <i>S. flavescens</i> 0.1ml/kg	5	N	50~100	100	50~100	100	100
D. <i>T. japonica</i> 1ml/kg	5	N	50	100	100	100	100
E. <i>T. japonica</i> 0.1ml/kg	5	N	50~100	100 ~ 200	100 ~ 200	100	100

나) 임상증상 및 폐사 상황

원충 접종 후 24일경부터 감염-무투약 A군의 자견 4중 2두가 활동성이 떨어지고 의기소침하며 약간의 파행을 보이다가 점차 증상이 심하여져서 그 중 1두가 접종 후 29일째 폐사하였다 (Fig. 14). 나머지 1두는 약간의 설사 증상이 동반

되었으나 항생물질과 지사제 투여로 증상이 회복되었다. 폐사된 자견에 대한 병리학적 검사를 통하여 *N. caninum* 원충의 감염이 확인되었으며, 이 결과를 토대로 각 실험군의 자견을 각각 2두씩 35일 및 70일에 안락사 시킨 후 병리학적 검사를 실시하였다.

A군의 자견 2두를 제외하고 다른 실험군에서는 특징적인 임상증상을 관찰할 수 없었다.

다) 병리조직학적 소견

원충 접종 후 29일에 폐사한 감염-무투약 A군의 자견 1두에서는 괴사성 뇌염 및 근염이 주된 병변이었다. 뇌에서는 대뇌, 소뇌 및 뇌줄기 전반에 걸쳐 다발성 괴사성 뇌염과 비화농성 뇌염이 동반되어 있었다 (Fig. 15, 16). 즉, 국소적인 위관성 원형세포 침윤 및 소교세포증과 함께 뇌실질의 국소 다발성 괴사가 곳곳에 산재하여 있었다. 또한 원충의 tachyzoite와 tissue cyst 들이 병변의 중심 또는 주변부에 매몰되어 있었다 (Fig. 17). 골격근에서는 근육 세포의 변성 괴사와 함께 단핵구 계통의 세포가 침윤되어 있는 병변이 다수 분포하고 있었다. 그러나 다른 내부 장기에서는 별다른 병변이 확인되지 않았다.

원충 접종 후 35일 및 70일에 안락사 시킨 다른 자견에서는 국소적인 간질성 폐렴, 비화농성 간질성 신염 및 일부 개체의 소장예 콕시듐의 감염이 관찰되었다. 그러나 *N. caninum* 원충 접종과 관련된 병변 및 원충 항원은 검출할 수 없었다.



Fig. 14. Gross findings of dog infected with *N. caninum*.

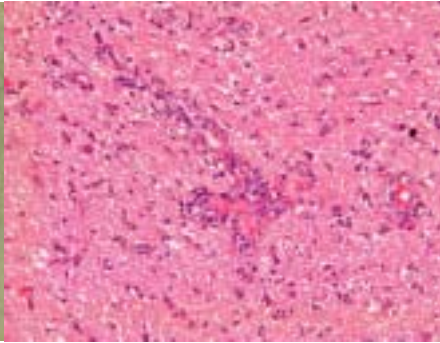


Fig. 15. Note perivascular cuffing and gliosis in the brain of dog infected with *N. caninum*. H&E, X200.

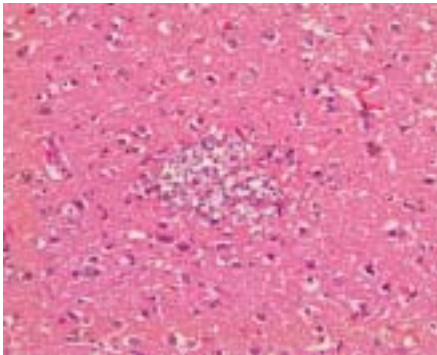


Fig. 16. Focal necrotic change in the brain of dog infected with *N. caninum*. H&E, X200

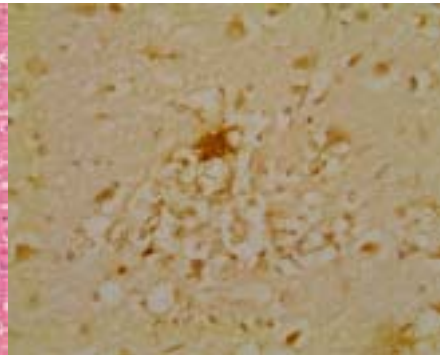


Fig. 17. Note positive reaction of tachyzoite in the brain of dog infected with *N. caninum*. IHC, X400

라. 고 찰

*N. caninum*은 소에서 유산 또는 기형 송아지를 발생시키고, 종숙주인 개에서는 뇌척수염, 근염 및 기타 장기의 염증성 병변을 형성하는 것으로 알려져 있다. 본 질병의 감염은 수직감염과 수평감염이 모두 이루어지며, 일부 숙주 동물에서 태반을 통한 감염이 증명되었다. 국내에서 가장 문제시되고 있는 젖소에서는 모체로부터 태아에 전파되는 수직감염이 주된 감염경로로 알려져 있다. 소, 개, 염소, 마우스, 돼지, 고양이, 원숭이 등지에서 실험감염을 통한 태반감염이 확인된 바 있다. 네오스포라병이 거의 전 세계적으로 발생하고 상황에서 많은 연구자들이 본 질병의 치료 및 예방을 위한 지속적인 연구에도 불구하고 아직까지 뚜렷한 방역대책이 마련되어 있지 않은 실정이다. 기존의 개발되어 있는 콕시듐 제제들 중에서도 일부 약제만이 실험실내 세포배양에서 다소간의 효과가 인정되었을 뿐이다. 따라서 본 연구에서는 최근 각광을 받고 있는 생약 제제들 중, 특히 고삼과 사상자의 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 분석의 *N. caninum*에 대한 항원충 효능을 실험동물을 이용하여 검증하고자 연구하였다.

국내 분리주 KBA-2를 면역이 억제된 BALB/c 마우스에 복강접종한 경우 접종 후 14일부터 임상증상을 나타내어 17~25일 중에 전 두수 폐사하였으며, 뇌에서의 괴사성 뇌염 병변 지수는 평균 8.15로 매우 심한 병변을 형성하고 있었다. 원충을 감염시킨 뒤 고삼 및 사상자 HPLC 분석을 투여한 마우스에서는 평균 생존일 (원충 접종 후 폐사일까지의 기간)은 20.5~22.3일로 감염 대조군의 21일과 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나 약제 투여군에서는 감염군에 비하여 마우스의 생존율은 다소 향상되고, 뇌의 병변 지수는 감소하는 경향을 뚜렷이 나타내고 있었다. 특히 고삼 고용량 (50 μ l) 투여군과 사상자 고용량 (50 μ l) 투여군의 경우 원충 감염 대조군에 비하여 생존율은 각각 25% 및 41.7% 증가하였고, 뇌 병변 지수는 각각 1.81 및 2.23 정도 감소하였다.

임신된 염소에 원충을 투여하고 각 약제의 항원충 효능을 비교 하였다. 원충 감염-무투약군의 임신 산양 2두는 접종 후 27일째 모두 유산을 하였으며, 유산된 태아의 뇌에서 다발성 괴사성 뇌염 소견이 관찰되었다. 고삼 및 사상자 HPLC 분석을 투여한 임신 산양 8두에서 2두를 제외하고 6두가 유산을 하였다. 그러나 평균 유산발생일은 고삼 고용량 (1ml/kg) 군, 고삼 저용량(1ml/kg) 군, 사상자 고용량 (1ml/kg) 군 및 저용량 (1ml/kg) 군이 각각 51일, 45일, 78.5일, 50.5일 나타

나 감염 대조군에 비하여 늦어지는 양상을 나타내었다.

포유 자견을 이용한 실험 감염 및 항원층 효능 시험에 있어서는 전체 24두의 자견 중 원층 감염 대조군 1두에서만 *N. caninum* 감염이 확인되어 항원층 효능을 평가하기에는 많은 무리가 따르고 있었다. 현재까지 전 세계적으로 개를 이용한 네오스포라 원층의 감염실험은 Cole 등 (1995), Dubey 등 (1988), Dubey와 Lindsay (1989) 등이 모견에 감염시켜 태반을 통한 수직감염의 성공 사례를 보고하였으며, 자견에서의 감염 실험 성공 예는 Cole 등(1995)의 실험이 유일하게 보고되어 있다. 또한 이들 시험 모두 병원성이 매우 높은 것으로 알려져 있는 미국 분리주 NC-1을 사용하였음에도 불구하고 개체에 따라 유산 발생 및 병변 형성 정도가 매우 차이가 많음을 보고하였다. 자견의 결과를 토대로 볼 때 국내 분리 네오스포라 원층주는 개에서 병원성이 매우 낮은 것으로 판단된다. 네오스포라 원층은 개나 소유래 원층 분리주간에 형태학적 및 분자 생물학적 차이가 없음이 보고된 바 있다. 그러나 Atkinson 등에 따르면 BALB/c 마우스에 대한 개 유래 분리주와 소 유래 분리주의 병원성을 비교해 본 결과 체중 감소의 정도 및 임상 증상의 발현 정도가 소 유래 분리주에 비하여 개 유래 분리주에서 더욱 심하게 나타난다고 하였다. 또한, 같은 개 유래 분리주인 NC-1과 NC-3 간의 병원성을 비교해 본 결과 같은 동물 중에서 유래 분리주 사이에서도 병원성의 차이가 나타남을 확인하였다. 따라서 병원성의 정도 차이는 각 분리주간의 특성으로 간주하고 있는 실정이다.

본 실험을 통하여 고삼 및 사상자의 HPLC 분획이 마우스에서 *N. caninum* 감염을 어느 정도 방어할 수 있음이 입증되었으며, 임신 염소에 있어서는 감염 자체를 방어 또는 치료하지는 못하지만 유산 발생을 다소나마 늦출 수 있음을 확인할 수 있었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1차년도에 이어 계속 고삼(*Sophora flavescens*) 및 사상자(*Torilis japonica*) 2종을 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 분획을 실시하여 3차와 4차에 고삼 4개와 사상자 5개, 합 9개의 분획을 얻었다. 동물실험을 위하여는 많은 양의 분획이 필요하므로 이 분획들을 대량을 얻기 위하여 계

속하여 분획을 실시하여 지난 1년간 얻은 분획의 양은 표와 같다(표 1).

3차와 4차 분획에서 얻은 9개의 분획을 세포내 배양된 *N. caninum*에 대한 항원층 효능을 평가하였다. 즉 96wells microplates에 *N. caninum*을 세포배양하여 7개의 분획을 단계회석하여 적용시키고 세포의 생존 유무와 원충의 수를 측정하여 항원층 효능을 평가한 결과 7개의 분획 중 6(고삼 4, 사상자 2)개의 분획이 특히 높은 원충 억제효능을 나타냈다(표 2).

3차와 4차 분획에서 얻은 9개의 분획 중 위 실험에서 원충 억제효능이 우수한 분획을 선별하여 세포내 배양된 *N. caninum*에 대한 항원층 효능을 재평가하였다. 즉 96wells microplates에 *N. caninum*을 세포배양하여 7개의 분획을 단계회석하여 적용시키고 세포의 생존 유무와 원충의 수를 측정하여 항원층 효능을 평가한 결과 7개의 분획 중 4(고삼 3, 사상자 1)개의 분획이 특히 높은 항원층 효능을 나타냈다(표 3).

동물실험의 결과를 간접적으로 확인하기 위하여 간접형광항체 검사(Indirect fluorescent antibody test: IFA)용 항원 슬라이드를 제작하였다.

실험동물에 대한 HPLC 분획의 항원층 효능 평가 결과 한약제 추출액 HPLC 분획의 실험군이 대조군에 비하여 항원층 효능의 효과를 나타냈다.

한약제 HPLC 분획의 성분분석이 분획들을 GCMS로 분석한 결과 2개의 분획이 Sophoridane, 그리고 각각 1개의 분획이 Matridin-15-one(CAS), Furosardonin A, Tetraisopropylidene-cyclobutane,5,17,beta-Dihydroxy-de-A-Estra- 5,7,9,14-Tetraene, Furanodiene, 9,12-Octadecadienoic acid(Z,Z)-(CAS) 등과 매우 유사한 구조로 밝혀졌으며, 3개의 미지의 분획이 있으므로 나왔다.

산양에 대한 HPLC 분획의 항원층 효능 평가 결과 한약제 추출액 HPLC 분획의 실험군이 대조군에 비하여 항원층 효능의 효과를 나타냈다.

개에 대한 HPLC 분획의 항원층 효능 평가 결과 한약제 추출액 HPLC 분획의 실험군이 대조군에 비하여 항원층 효능의 효과를 나타냈다.

나. 연구평가의 착안점

- 배양세포의 *N. caninum*에 대한 한약제 추출액의 항원층 효능평가 30

- 한약제의 HPLC 분획 분석 및 *N. caninum*에 대한 항원충 효능 평가 30
- 산양에 *N. caninum* 인공 감염 10
- *N. caninum* 감염 산양에서 한약제 HPLC 분획의 항원충 효능 평가 10
- 임상증상 및 부작용 관찰 10
- 병리조직학적 감염 장기 및 원충의 분포 확인 10

3. 관련분야의 기술발전예의 기여도

(1) 논문 투고

Youn HJ, J Lakritz, GE Rottinghaus, HS Seo, DY Kim, MH Cho and AE Marsh (2004). Anti-protozoal efficacy of high performance liquid chromatography fractions of *torillis japonica* and *sophora flavescens* extracts on *Neospora caninum* and *toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*. 125/3-4 : 409~414.

(2) 초청강연 : CRWAD meeting, Chicago과 FAVA, Seoul, Korea에서 아래 연 제 학술발표

Youn HJ, HS Seo, DY Kim, MH Cho, J Lakritz, GE Rottinghaus, and AE Marsh, Comparison of anti-protozoal efficacy of the HPLC fractions of *Sophora flavescens* and *Torilis japonica* extracts fractionated between Korea and USA for *Toxoplasma gondii*, CRWAD meeting, Chicago, 2004 and FAVA, Seoul, Korea, 2004

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가연구의 필요성

동물실험이 미흡하다고 생각되어 추가 연구가 필요하다고 사려됨

2. 타연구에의 응용

다른 원충인 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)이나 말라리아(*Plasmodium* spp) 원충에 대한 연구에 응용 가능할 것으로 사려됨

3. 기업화 추진방안

가. 기술적 측면

- 1) 한약제 중 소 유·사산의 원인체인 *N. caninum*에 대한 항원충 효능 약제의 선발
- 2) 항원충 효능이 우수한 한약제의 분획 중 소 유·사산의 원인체인 *N. caninum*에 대한 항원충 효능이 우수한 분획의 선발
- 3) 한약제 및 그 구성성분 분획의 콕시듐 원충에 대한 항원충 효능 평가 및 우수 물질 선발

나. 경제·산업적 측면

- 1) *Neospora caninum*에 의한 유산으로 인한 축산농가 피해 감소 예상 (유·사산의 10%)
- 2) *Neospora caninum*에 대한 구충제 개발
 - *N. caninum*에 대한 우수한 구충제가 아직까지 잘 알려지지 않아 우수한 구충제가 개발된다면 상당히 높은 국제경쟁력을 가질 것으로 사려된다.
- 3) 산업적 측면
 - *N. caninum*에 대한 우수한 구충제 개발로 국가 산업 경제의 발달에 기여
 - *N. caninum*에 대한 우수한 구충제 개발로 축산업의 국제경쟁력 강화
 - 항 콕시듐제제나 항톡소플라즈마 제제의 개발을 위한 기본 개념 마련

다. 활용방안

① 산업화 방안

- *N. caninum* 원충 구충제 개발 기술의 기술이전에 의한 산업화활용이 가능하다.

- 예방약제 및 치료제 개발 관련 상품의 산업적 요구량 증진에 활용가능하다.
- 동물약품 제약회사에 기술이전을 유도한다.
- *N. caninum* 원충 구충제 개발 기술을 콕시들통증, 말라리아, 및 톡소플라스마의 연구에 적용하여 새로운 정보들을 치료제의 개발 및 국제교류에 강력한 힘을 발휘할 수 있도록 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

본 연구개발과 같은 연구결과의 자료를 수집하지 못하였음.

제 7장 참고 문헌

1. Agerholm JS, Willadsen CM, Nielsen TK, Giese SB, Holm E, Jensen L and Agger JF 1997. Diagnostic studies of abortion in Danish dairy herds. J Vet Med A 44 :551-558.
2. Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Hoffman RL 1990. A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. J Vet Diagn Invest 2 : 283-287.
3. Andrianarivo, AG, Choromanski, L, McDonough, SP, Packham, AE, Conrad, PA 1999. Immunogenicity of a killed whole tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. Int J Parasitol 29 : 1613-25.
4. Barber, JS, Gasser, RB, Ellils, J, McMillan, D and Trees, AJ 1997. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. J Parasitol 83 : 1056-1058.
5. Basso, W, Venturini, L, Venturini, MC, Hill, DE, Kwok, OCH, Shen, SK, Dubey, JP 2001. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a natural infected dog. J Parasitol 87 : 612-618.
6. Baszler, TV, Gay, LJ, Long, MT 1999. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortion. J Clin Microbiol 37 : 4059-4064.
7. Bjerckås, I, Mohn, SF, Presthus, J 1984. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z Parasitenkd 70: 271-274.
8. Bjorkman, C, Uggla, A 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. Int J Parasitol 29 : 1497 -1507.
9. Buxton, D, Maley, SW, Pastoret, PP, Brochier, B, Innes, EA 1997. Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Vet Rec 141 : 308-309.
10. Cheadle, MA, Lindsay, DS, Blagburn, BL 1999. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. Vet Parasitol 85 :325-330.

11. Choromanski L and Block W 2000. Humoral immune response and safety of experimental formulations of inactivated *Neospora* vaccines. *Parasitol Res* 96(10) : 851-853.
12. Cole, RA, Lindsay, DS, Blagburn, BL, Dubey, JP 1995. Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *J Parasitol* 81(5): 730-732.
13. Cole, RA, Lindsay, DS, Blagburn, BL, Sorjonen, DC, Dubey, JP 1995. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J Parasitol* 81(2): 208-211.
14. Dubey JP and Lindsay 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 57 : 1-58.
15. Dubey, JP, Carpenter, JL, Speer, CA, Topper, MJ, Uggla, A 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *JAVMA* 192: 1269-1285.
16. Dubey, JP, Hattel, AL, Lindsay, DS, Topper, MJ 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent experimental transmission. *JAVMA* 193(10) : 1259-1263.
17. Dubey, JP, Lindsay, DS 1989. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am J Vet Res* 50(9) : 1578-1579.
18. Gozalo AQ, Bueno JP, Tabares E, Innes EA, Paniello RG, Mora L 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *Int J Parasitol* 29 :1201-1208
19. Kim JH, Sohn HJ, Hwang WS, Hwang EK, Jean YH, Yamane I, Kim DY 2000. *In vitro* isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. *Vet Parasitol* 90 : 147-154.
20. Kim JH, Sohn HJ, Lee JK, Hwang EK, Jean YH, Kim DY (accepted) Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Korean native beef cattle. *J Vet Med Sci*.
21. Kim, JH, Sohn, HJ, Lee, JK, Hwang, EK, Jean, YH, Kim, DY 2002. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Korean native beef cattle. *J. Vet Med Sci* 64(10) : 941-943.
22. Kim, JT, Park, JY, Seo, HS, Oh, HG, Noh, JW, Kim, JH, Kim, DY, Youn, HJ 2002. *In vitro* antiprotozoal effects of artemisinin on *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 103 : 53-63.

23. Kirkbride, CA et al. 1973. A diagnostic survey of bovine abortion and stillbirth in the northern plains states. *JAVMA* 162 : 556-560.
24. Liddell, S, Jenkins, MC, Collica, CM, Dubey, JP 1999. Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. *J Parasitol* 85(6) : 1072-1075.
25. Lindsay, DS, Blagburn BL 1999. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. *Vet Parasitol* 85 : 325-330.
26. Lindsay, DS, Lenz, SD, Cole, RA, Dubey, JP, Blagburn, BL 1995. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *J Parasitol* 81(2) : 313-315.
27. Lindsay, DS, Rippey, NS, Powe, TA, Sartin, EA, Dubey, JP, Blagburn, BL 1995. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. *Am J Vet Res* 56(9) : 1176-1180.
28. Lindsay, DS, Spencer, J, Rupprecht, C, Blagburn, BL 2001. Prevalence of agglutinating antibodies to *Neospora caninum* in raccoons, *Procyon lotor*. *J Parasitol* 87 : 1197-1198.
29. Long, MT, Baszler, TV, Mathison, BA 1998. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *J Parasitol* 84(2) : 316-320.
30. Maley, SW, Buxton, D, Thomson, KM, Schiefer, CE, Innes, EA 2001. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1-year study. *Vet Parasitol* 96(1) : 1-9.
31. Marsh, AE, Mullins, AL, Lakritz, J 2001. In vitro quantitative analysis of ³H-uracil incorporation by *Sarcocystis neurona* to determine efficacy of anti-protozoal agents. *Vet Parasitol* 95 : 241-249.
32. McAllister, MM, Dubey, JP, Lindsay, DS, Jolley, WR, Willis, RA, McGuire, AM 1998 Dogs are definite host of *Neospora caninum*. *Int. J Parasitol* 28 : 1473-1478.
33. McAllister, MM, McGuire, AM, Jolley, WR, Lindsay, DS, Trees, AJ, Stobart, RH 1996 Experimental neosporosis in pregnant ewes and their

- offspring. Vet Pathol 33 : 647-655.
34. Nishikawa, Y, Mikami, T, Nagasawa, H 2002. Vaccine development against *Neospora caninum* infection. J Vet Med Sci 64(1) : 1-5.
 35. Sanderson, MW, Gay, KM, Baszler, TV 2000. *Neospora caninu* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. Vet Parasitol 90 : 15-24.
 36. Son, ES, Ahn, HJ, Kim, JH, Kim, DY, Nam, HW 2001. Determination of antigenic domain in GST fused major surface prtein (Nc-p43) of *Neospora caninum*. The Korean J Parasitol 39 : 241-246.
 37. Swada, M, Park CH, Kondo, H, Morita, T, Shimada, A, Yamane, I, Umemura, T 1998. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. J Vet Med Sci 60 : 853-854.
 38. Thurmond, MC, Hietala, SK 1997. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cow. JAVMA. 86 : 49 -57.
 39. Wonda, W, Dijkstra, TH, Kramer, AMH, van Maanen, C, Brinkhof, JMA 1999. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infection in dogs and cattle. Int J Parasitol 29 : 1677-1682.
 40. Youn HJ, J Lakritz, DY Kim, GE Rottinghaus, and AE Marsh (2003). Anti-Protozoal efficacy of medicinal herb extracts against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. Vet Parasitol 116 : 7~14.
 41. Youn, HJ and JW Noh 2001. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. Vet Parasitol 96 : 257-263.
 42. Youn, HJ, Lakritz, J, Rottinghaus, GE, Seo, HS, Kim, DY, Cho, MH, Marsh, AE 2004. Anti-protozoal efficacy of high performance liquid chromatography fractions of *Torilis japonica* and *Sophora flavescens* extracts on *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Vet Parasitol 125 : 409-414.
 43. Youn, HJ, Noh JW 2001. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. Vet Parasitol 96 : 257-263.
 44. 김대용, 황우석, 김재훈, 허권, 황의경, 이병천, 진영화, 이재진, 최상호. 1997. Neospora에 의한 소 유산 발생. 대한수의학회지 37 : 607-612

45. 김재훈, 황의경, 손현주, 진영화, 윤순식, 김대용. 1998. *Neospora caninum*에 의한 짓소의 반복유산. 대한수의학회지 38 : 853-858.
46. 배대식. 2002. 염소 (흑염소). 내외출판사.
47. 배지선, 김재훈, 이중근, 이병천, 최양규, 현병화, 김대용. 2000. *Neospora caninum* 국내 분리주의 마우스 경시적 변화. 대한수의학회지 40 : 145-152.
48. 배지선, 김재훈, 허권, 김기석, 황우석, 최양규, 현병화, 김대용. 2000. *Neospora caninum* 국내 분리주의 마우스 감염실험. 대한수의학회지 40 : 138 -144.
49. 이중근, 김재훈, 김진현, 이병천, 황우석, 윤희정, 남호우, 진영화, 김대용. 2001. 파라핀 블록 PCR을 이용한 소 네오스포라 감염증의 진단법 확립. 대한수의학회지 41 : 381-385.
50. 허권, 김재훈, 황우석, 황의경, 진영화, 이병천, 배지선, 강영배, 山根逸郎, 김대용. 1998. 간접형광항체법을 이용한 국내 짓소의 *Neospora caninum*에 대한 혈청역학적 연구. 대한수의학회지 38 : 859-866.
51. 허준. 1610. 동의보감

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.