

최 종  
연구보고서

한국산 겨우살이를 이용한 조류독감 억제용  
기능성 사료첨가제의 개발

Development of functional chicken feed additive  
for suppression of avian influenza infection using  
Korean mistletoe

국립 한경대학교

농림수산식품자료실



0016108

농 립 수 산 식 품 부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “한국산 겨우살이를 이용한 조류독감 억제용 기능성 사료첨가제의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 한경대학교

총괄연구책임자 : 황성구

세부연구책임자 : 김종배

세부연구책임자 : 하상우

# 요 약 문

## I. 제 목

한국산 겨우살이를 이용한 조류독감 억제용 기능성 사료첨가제의 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

조류독감(Avian influenza: AI 또는 Bird flu)은 닭·오리 및 야생조류 등에 감염되는 급성 바이러스성 질병이다. 조류독감은 100여년 전 부터 나타났으며, 이후 아시아를 중심으로 하여 전 세계적으로 확산되어 양계산업에 치명적인 경제적 손실을 주고 있다. 또한 AI는 닭, 칠면조 등 가금류뿐 아니라 야생오리와 같은 야생조류에도 감염되며 전파속도도 매우 빠른 것으로 나타나, 고병원성의 경우 치사율이 100%에 이를 만큼 전염성과 폐사율이 높기 때문에 국내에서는 제1종 법정전염병, 국제수역사무국(OIE)은 A급으로 분류하고 있다. 한국에서는 1996년에 이어 2003년에 AI가 충북 음성의 닭 농장에서 12월 10일 처음 보고된 뒤 이듬해 3월까지 전국 6개 시·도, 10개 시·군으로 확산되었으며, 2007년 안성에 고병원성 AI가 발생하여 닭 13만 마리 등 가금류 24만여 마리를 살처분 하였으며, 올해에도 정읍을 시작으로 경기도 평택에서도 고(高)병원성 조류인플루엔자(AI)가 발생한 것으로 확인됐다. 발병 지역근처에 서식하는 청둥오리 분변에서 'H5N1형' 고(高)병원성 AI 바이러스가 확인된 점이나 2004년에 이어 올해 역시 AI가 발생한 점 등을 근거로 철새를 유력한 감염 경로로 의심하고 있다.

이들 감염은 AI감염 조류의 분비물을 직접 접촉할 때 주로 일어나며, 비말(飛沫)·물, 사람의 발, 사료차, 기구, 장비, 알 길면에 묻은 분변 등에 의해서도 전파된다.

AI 바이러스는 발현하는 단백질의 종류에 따라 H형(H1~H15 15종)과 N형(N1~N9 9종)으로 구분하며 두 가지 단백질의 조합에 의해 총 135종류의 혈청형으로 분류된다. 이 중 아시아 지역에 유행하는 조류독감 바이러스는 혈청형이 'H5N1'이며, 이 바이러스는 일반적으로 유전자의 변이 속도가 빠를 뿐만 아니라 타 동물의 독감 바이러스 유전자와도 잘 결합하는 특성을 가지고 있다(Sabirovic M등, 2007). AI 바이러스는 감염된 가금류의 분변 속에서 35일 이상 생존이 가능할 뿐만 아니라 바이러스에 오염된 분변 1g으로 약 100만 마리의 닭을 감염 시킬 수 있을 정도로 치명적인 바이러스이다.

증상은 감염된 바이러스의 병원성에 따라 다양하지만 대체로 호흡기 증상과 설사, 급격한 산란율의 감소가 나타난다. 경우에 따라 벋 등 머리 부위에 청색증이 나타나고, 안면에 부종이 생기거나 깃털이 한 곳으로 모이는 현상이 나타나기도 한다.

폐사율도 병원성에 따라 0~100%로 다양한데, 뉴캐슬병·전염성 후두기관염·마이코플라즈마 감염증 등과도 증상이 비슷하여 정확히 진단하는 것이 쉽지 않은 실정이다. 본

연구개발에서 도입하고자 하는 개념은 가축의 면역력을 증가시켜 질병에 대한 저항력을 높임으로 인해 생산성을 향상시키고자 하는 것이다. 대부분의 초생추와 자돈 등 태어난 지 얼마 되지 않은 유약한 자축은 질병에도 아주 취약할 뿐 아니라, 신체의 기능이 아직 미숙한 상태이므로 체외로부터 급여되는 기존의 사료첨가제만으로 질병을 예방 및 치료하는 데에는 어려움이 있다. 따라서 가축 자신의 생체방어체계 또는 항상성 유지 작용을 강화하고 그 기능을 극대화시킬 수 있는 방법을 도입함으로써, 자축의 육성율의 향상과 증체효과는 물론 미생물 감염에 의한 집단감염의 위험성을 최소화할 수 있다.

동물의 방어체계에 있어서 제1선의 장벽은 구강, 호흡기, 기관지, 생식기 등과 같은 상피(epithelium)조직에 싸여 있는 점막조직을 들 수 있는 데, 이 점막은 외부환경과 항상 접하고 있어 미생물을 비롯한 각종 항원은 물론 화학물질과 불순물 등의 침입으로부터 생체를 보호하는 역할을 수행한다. 특히 소화기 점막은 상피세포에 둘러싸여 양분의 흡수는 물론 장내 상재균(normal flora)의 유지와 병원성 미생물에 의한 체내 침투방지 등에 매우 중요한 역할을 한다. 또한 장 점막은 면역학적 관점에 있어서도 대단히 유의한 조직이라 할 수 있다. 즉 섭취된 음식물에 대한 면역반응을 조절하여 항상성을 유지시키며, 또한 소화기에 들어 온 병원성 미생물을 죽이거나 증식을 억제하여 감염증을 막아주는 역할을 한다.

특히 최근에는 CMIS (Common Mucosal Immune System)라고 불리우는 공통점막 면역체계의 개념이 도입되어, 하나의 점막조직을 통한 면역학적 자극은 개체 전체의 점막면역 기능을 활성화시키며, 나아가서는 전신성 면역(systemic immunity) 기능을 조절하는 작용을 갖는 것으로 인식되어 있다. 그러므로 점막면역기능의 증강에 유효하며 안전성이 확보된 점막면역 증강제의 개발이 절실히 요구되며, 사료첨가제에 있어서도 경구적으로 섭취되어 소화기를 통해 점막면역을 활성화시킴으로 소화기는 물론 호흡기 계통의 감염증에 대해서도 저항력을 부여시킬 수 있는 소재의 개발이 시급하다. 따라서 본 연구개발의 목적은 숙주의 점막면역체계를 증강시키는 활성을 가지는 한국산 겨우살이 추출물을 소재로 닭의 점막면역 체계를 강화하여 AI 바이러스에 의한 호흡기 감염을 억제할 수 있는 양계용 기능성 사료첨가제를 개발하고, 이에 관련하는 과학적 데이터를 체계화함으로써 양계농가와 국가경제에 유익한 고부가가치 영농기법을 확립하기 위한 것이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 2년에 걸쳐 한국산 겨우살이 추출의 최적화 시스템을 구축하여 마우스를 통해 기초 실험을 실시하여 점막면역강화 효능과 메커니즘을 일차적으로 확인한 후, 닭의 면역체계를 중심으로 활성화기전을 규명하고, 현장시험을 통해 조류독감에 효과적인 사료첨가제를 개발하여 제품화한다.

1. 제1세부과제: 조류독감 억제 기능성 사료첨가제의 최적화 시스템 개발

가. 실험실 수준에서의 닭 사양시험 성적 획득

- 1) 간이 사양시험에서 효능평가 시험 성적을 종합 (영양학적 특성 규명, 계종별 시험 성적의 계량화, 체중변화, 해부조직학적 변화, IgY측정 등)

나. 효능의 최적화 시스템 구축에 필요한 지표 확립

- 1) 기관지 표피세포의 염증성단백질인 IP-10, IL-6, RANTES, Interferon 등의 발현 조사

다. 소규모 사양시험에서 제품화에 필요한 재조건의 응용 및 formula의 결정

- 1) 소규모 사양시험을 통한 작용기전 해석 및 급이조건의 확립(닭의 면역체계를 중심으로 활성화 기전을 규명)
- 2) 기관지 표피세포의 염증성단백질인 IP-10, IL-6, RANTES, Interferon 등의 발현 조절 작용기전 조사

라. 닭을 이용한 AI바이러스 (H9N2) 감염방어 효능시험

- 1) AI 바이러스와 유사한 감염양식을 갖는 H9N2 type바이러스 감염시험을 통해 감염방어효과 확인

2. 제 2 세부과제 : 조류독감 억제 기능성 사료첨가제의 점막면역증강 활성 해석

가. 한국산 겨우살이 추출물의 분리법 확립

- 1) 한국산 겨우살이로부터 냉수추출법, 열수추출법, 유기용매추출법 등 다양한 추출법의 검토

나. 마우스를 이용한 점막면역 강화 활성의 검토 및 작용기전의 해석

- 1) 마우스 동물실험을 통한 면역학적 유효성 확인 (장내 및 혈청중의 IgA농도 증가, 세포성 면역의 증가, 점막면역세포의 활성화, 사이토카인 및 케모카인의 분비 유도 등)
- 2) 마우스 실험에서의 숙주의 대사 기능강화 효과 및 독성 시험 검토 (기초대사량 증가 효과, 체중의 변화, 간독성 및 신독성 테스트 등)
- 3) 마우스에서의 유효 투여량(경구)의 결정 (투여량, 투여기간 등)

다. 제품화에 필요한 한국산 겨우살이 추출법 확립 및 대량 추출법의 개발

- 1) 가장 효율적인 한국산 겨우살이 추출법의 확립 및 대량생산 기법의 완성
- 2) 한국산 겨우살이 추출물의 품질관리를 위한 시스템 확립

라. 마우스 동물실험에서의 작용기전 해석 연구의 계속

- 1) 마우스 동물실험에서 투여량, 투여간격, 투여기간 별 면역학적 효능의 정량화 (세포성 면역과 체액성 면역의 관점에서 해석)
- 2) 동물실험을 통한 독성 테스트의 완성 (정립된 투여법 및 투여량을 기초로 하여 제품유형에 맞춘 독성시험 성적의 확보)

3. 제 3 세부과제: 조류독감 억제 기능성 사료첨가제의 현장적용을 위한 시험 연구

가. 현장시험의 설계 및 사료제조 공정 검토

- 1) 한국산 겨우살이 추출물을 함유하는 사료첨가제의 formula작성 및 현장시험 준비

나. AI 바이러스 억제용 양계 기능성 사료첨가제의 제품화에 필요한 제반 조건의 처리

- 1) 제품화를 염두에 둔 배합비 및 함유량의 결정

다. 계종별 현장시험을 통한 효능의 확인 및 현장시험 데이터의 축적

- 2) 제품화를 위한 지적재산권 확보 및 마케팅 자료 제작

라. 산업화를 위한 마케팅 전략 및 홍보 전략의 구축

- 1) 논문을 통한 과학적 근거 확보

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 제1세부과제

가. 실험실 수준의 육계 사양실험 결과

겨우살이 추출물을 0.5, 1% 수준으로 육계사료에 첨가하였을 때 사료영양소 이용성 및 면역기능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Loss 중 병아리 수컷을 부화 후 3일간 환경에 적응시킨 후 4주간동안 사료에 첨가급여 한 후, 증체량, 사료효율, PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) 증식도, 혈액 내 ND (Newcastle Disease) 및 닭의 바이러스 질병중 대표적인 질병의 하나이며 바이러스의 특성에 의해 외부환경이나 소독약에 저항성이 강한 전염성 헤브리셔스낭병 또는 감보로(Gumboro Disease)라 불리는 IBD(Infectious Bursal Disease)항원에 대한 항체역가 등을 측정하였다.

시험사료급여에 의한 사료섭취량, 증체량, 사료효율에서는 차이를 나타내지 아니하였다. 이것은 겨우살이 추출물 급여를 통한 사료섭취량이나 육계의 생산성에는 1%까지 급여 하여도 영양소 이용성에는 특별한 차이를 가져오지 아니하는 것을 알 수 있다.

나. 사료 내 겨우살이 추출물의 면역기능 조절 능력 조사

육계병아리에 실험사료를 급여하면서 ND와 IBD virus 감염을 유도한 후 겨우살이 추출물 급여에 따른 PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells)와 비장세포 증식도를 조사함으로써 사료 중 겨우살이 급여가 면역반응에 미치는 영향을 평가하였다.

본 연구에서 겨우살이 0.5% 첨가는 ND/IBD 감염 후 7일째에 LPS와 ConA로 자극한 PBMC의 증식도를 겨우살이가 첨가되지 않은 사료를 급여한 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다( $p < 0.05$ ). 또한 ND/IBD 감염 후 14일째에 LPS와 ConA로 자극한 비장세포의 증식도가 대조군에 비해 유의하게 증가하였다.

본 연구에서 PBMC와 비장세포 증식도 측정에 사용된 Mitogen중 Concanavalin A는 T 림프구의 증식을 자극하는 물질이며, LPS는 B 림프구의 증식을 자극한다고 알려져 있다(Cochet 등, 1997). 따라서 사료 중 겨우살이 0.5% 첨가는 ND와 IBD 감염 시 육계에서 T 림프구의 증식을 증가시켜 세포성 면역(cell-mediated immunity)을 증강시키는 한편 B 림프구의 증식을 높여 항체에 의한 면역인 체액성 면역(humoral immunity)을 증강시킨다는 것을 나타낸다. 따라서 본 연구결과, 겨우살이 0.5% 첨가 시 ND및 IBD에 대한 항체역가가 증가한 것은 겨우살이 급여에 따른 B 림프구 증식이 증가한 것과 관련하는 것으로 사료되었다.

#### 다. ND 및 IBD 항체역가 조사

ND 및 IBD 항원을 주입하고 4주후 혈액 내 ND 및 IBD 항체역가를 조사한 결과를 아래 그림에 나타내었다. 혈청을 분리하여 8배로 희석한 후 역가를 분석한 결과, 사료 내 겨우살이를 0.5% 수준으로 첨가 급여한 결과, ND의 항체역가가 겨우살이 무첨가 대조군에 비해 증가한 반면 1% 수준으로 급여한 군에서는 오히려 낮아져 사료영양소의 이용성면이나 면역기능 조절을 위해서는 0.5% 이상 급여할 필요가 없는 것으로 조사되었다.

#### 라. 산란계를 이용한 사양실험 결과

겨우살이 추출물의 첨가와 더불어 Synergic 효과를 얻기 위한 부영제로 점토광물질 발효산물을 이용하였을 때의 영향을 동시에 조사하기 위하여 산란계 사료에 0.5% 수준의 점토광물질 발효산물(T1), 겨우살이 추출물(T2) 및 점토광물질 발효산물+겨우살이추출물 (T3)을 각각 첨가급여하고 6주간에 걸쳐 사양실험을 실시하였다. 이때 실험사료 급여에 따른 면역기능 조절효과를 조사하기 위하여 E. Coli 88 균주를 항원으로 근육주사한 후 계란의 노른자로 생산 배출하는 IgY를 분리 추출하여 이들의 역가를 조사하였다.

항원 주입 후 2주, 4주 및 6주차의 난황 내 IgY의 E. Coli 88에 대한 항체역가는 겨우살이 추출물 투여농도에 의존적으로 대조군에 비해 0.5% 및 1.0%의 겨우살이 추출물 급여군에서 증가하는 것으로 나타났다.

산란율이나 난각강도는 겨우살이 추출물 첨가 급여군에서 대조군에 비해 차이는 없었

으나 점토광물질과 혼합 급여하였을 때 유의하게 개선되는 결과를 나타내어 겨우살이 추출물 첨가제를 개발할 경우 미량광물질이 함께 보완되면 매우 효능이 증가한 것으로 기대되었다. 이하 계란의 신선도, 난백고, 난각두께에서도 유사한 결과를 나타내어 산란 생산성 및 난질에는 겨우살이 추출물 단독으로는 대조군과 차이를 보이지 않지만 미량 광물질이 첨가되면 개선되는 것으로 나타나 산업화를 위한 주요한 기초자료를 얻었다고 할 수 있다.

## 2. 제 2 세부과제

### 가. 한국산 겨우살이에 의한 비특이적 면역증강 효과

#### 1) 겨우살이 유래 추출물의 준비

본 연구에서는 다양한 한국산 겨우살이 추출물을 이용하여 점막경로(경구 혹은 경비적 투여)를 통해 급여 하였을 때 숙주의 면역기능을 비특이적으로 상승시키는 가를 조사하였다. 추출물은 한국산 겨우살이의 냉수 추출물을 비롯한 7가지의 추출물이 준비되었으며 가장 먼저 획득된 KM-110 추출물을 이용한 효능실험을 실시하였다.

#### 나. KM-110 점막투여의 면역력 증강활성

한국산 겨우살이로부터 냉수추출에 의해 추출한 KM-110이 가장 먼저 준비되어 이 분획에 대해 경구투여(oral administration) 및 경비투여(intranasal administration)에 의한 면역력 증강활성과 간이독성시험을 실시하였다.

KM-110을 경구적으로 매일 1회씩 7일간 총7회 투여하고, 마우스 혈중의 면역글로불린 IgGAM의 양을 ELISA법에 의해 측정 비교하였다. 그 결과 KM-110을 250ug에서 1,000 ug/mouse의 양으로 투여한 결과 혈중 IgGAM이 증가하였으며, KM-110에 의한 상승효과는 250ug/mouse가 가장 좋은 것으로 나타났다.

한편, 경구투여에 의한 점막면역의 상승효과를 조사하기 위하여, 장내 면역글로불린의 양을 분변 중에 함유된 면역글로불린을 측정함으로써 비교하였다. 그 결과 분변 중 IgGAM과 IgA의 양이 혈청 중의 IgGAM 농도와 동일하게 증가하는 것으로 나타났다. 이들 결과는 KM-110의 경구투여는 비특이적으로 면역기능을 높여 면역글로불린의 분비를 촉진하기 때문인 것으로 추정된다.

#### 다. KM-110의 경비적 투여에 의한 면역 활성화 조사

KM-110의 경비적 투여에 의한 면역 활성화 조절 가능성을 조사하기 위하여 경구투여와 동일하게 7일간 경비적으로 KM-110을 처리구별로 100 $\mu$ g, 200 $\mu$ g, 400 $\mu$ g/mouse 농도로 투여한 후, 분변 중에 포함되는 면역글로불린의 양을 측정하였다. 그 결과, 분변 중의 IgGAM 및 IgG에 있어서 분비량이 증가되는 것으로 나타났다. 조류인플루엔자가 호흡기를 통해 감염되는 바이러스성 질환임을 감안할 때, 비강을 통한 투여에 의해 면역



기능이 증가한다는 것은 대단히 유의한 결과인 것으로 사료된다.

위의 결과와 같이 KM-110은 경구 혹은 경비적 경로를 통해 마우스에 연속 투여할 경우, 비특이적인 면역증강 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 그래서 다음으로 이 투여 조건에서 숙주에 독성을 나타내는 가의 여부를 조사하기 위하여 체중의 변화와 간독성에 초점을 맞추어 간이독성 테스트를 행하였다. 1일 1회 총 7일간 KM-110을 경구 혹은 경비투여한 마우스를 대상으로 투여개시 8일째 체중 및 간독성을 측정해 본 결과, 경구투여는 아무런 영향이 없었으나, 경비투여는 약간의 체중감소를 동반하는 것으로 나타났다. 하지만 간독성에서는 경구투여나 경비투여 모두 간 손상을 유발하지는 않는 것으로 확인되었다.

#### 라. KM-110, HKM-110 및 KML-C의 활성 비교

KM-110을 비롯하여 열수추출한 HKM-110과 렉틴 성분층인 KML-C에 대해 5회 점막투여 후의 면역세포 활성화 여부를 조사하였다. 시료를 경구 혹은 경비적으로 투여할 경우 면역세포(비장세포)의 증식을 촉진하는 것으로 나타났다. 또한 이들 시료의 점막투여는 마우스의 기초대사량을 높이는 것으로 나타났으며, 체중감소나 간독성과 같은 독성도 유발하지 않는 것으로 관찰되었다.

#### 마. KMF-WE와 KM-PS의 활성조사

한국산 겨우살이 조다당 추출물(KM-PS)과 한국산 겨우살이 열매(물)추출물(KMF-WE)의 활성을 조사하기 위하여, 이들 추출물을 경구 혹은 경비적으로 5회 투여한 후 분변 중의 IgA양과 기초대사량을 측정하였으며, 또한 체중변화를 통해 간이독성시험을 실시하였다.

그 결과 KM-PS와 KMF-WE는 매일 1회씩 5회 투여하면서 6일째의 장내 IgA량을 분변 중에서 측정한 결과 IgA분비를 증가시키는 것으로 나타났으며, 기초대사량도 유의하게 상승시키는 것으로 확인되었다. 그리고 이들 추출물은 체중감소를 초래하지 않는 것으로 보아, 비교적 안전성이 인정되는 시료인 것으로 밝혀졌다.

#### 바. 마우스에서의 항원 특이적 면역증강 시험

조류독감이 인플루엔자 바이러스라는 것에 착안하여, 인플루엔자에서 유래한 HA peptide를 항원으로 삼는 경비 유발 점막면역을 확인하였다. 이로부터 경비투여시 특이적 항원의 증가추세를 확인하였으며, 이것은 총 혈청과 질 세척액에서부터 각기 IgG와 IgA의 역할을 측정함으로써 확인하였다.

KM-110을 면역증강제로 1 $\mu$ g, 5 $\mu$ g 및 10 $\mu$ g/mouse 사용하였을 때, 5 $\mu$ g/mouse 농도로 경비투여 시 가장 높은 혈중 IgG역가를 나타내었고, 이 수치는 LPS를 대조군으로 사용했을 때보다 더 높은 수치로 나타났다. 하지만 1 $\mu$ g이나 10 $\mu$ g에서의 역가는 농도 의존적인 결과가 나오지 않아 추가실험이 필요한 것으로 판단되었다.

헤파린 결합단백질 분획인 WHBP를 면역증강제로 사용한 경우 농도 의존적인 면역증

강효과를 나타내었으며 LPS를 대조군으로 사용했을 때보다 더 높은 수치를 나타내어 LPS와 WHBP 등이 투여에 의한 면역증강 synergic 효과도 관찰되었다.

#### 사. KML-C 경비투여에 의한 항체반응 상승효과 해석

HA+KML-C 혹은 HA+CTB (Cholera Toxin chain-B)를 2주 간격으로 경비투여하면서 면역개시 1주, 3주, 8주 후의 혈액과 질액(vaginal fluid)을 채취하여 항원 특이적인 immunoglobulin G(IgG)와 A(IgA)의 항체를 ELISA법을 이용하여 조사하였다. 먼저 혈액 내의 HA특이적인 IgG titer에 있어서는 면역개시 1주 후의 혈청에서는 KML-C 및 CTB 모두 HA에 대한 항체를 현저히 상승시키는 효과가 관찰되었다. 하지만 면역개시 3주 및 8주째의 혈청에 있어서는 항체의 평균치는 KML-C+HA와 CTB+HA 모두 HA만을 면역한 마우스보다 높은 수치를 나타내었으나, 통계학적 유의차는 확인되지 않았다. 한편 KML-C와 CTB 간의 활성비교에 있어서는 두 adjuvant는 항원 특이적인 IgG를 유도하는 작용은 거의 동등한 것으로 나타났다.

혈청 중의 IgG와는 달리, 질액 중의 IgA에 있어서는 면역개시 3주째에 항체의 상승이 관찰되었다. 혈청 IgG의 경우와 마찬가지로 질액 중의 IgA에 있어서는 KML-C와 CTB 간의 항체유도 활성의 차이는 관찰되지 않았다. 하지만 CTB의 투여량이 1 ug/head이고, KML-C의 투여량이 0.1ug/head인 것을 감안하면 KML-C는 매우 낮은 투여량에서 활성을 나타내는 것으로 사료된다.

본 실험에서는 IgG2b 항체에 주목하여 항원 특이적인 항체유도 활성을 측정하였다. 그 결과 KML-C와 CTB 모두 항원 특이적인 IgG2b를 상승시키는 효과가 관찰되었으며, 이들 adjuvant는 거의 동등한 수준의 활성을 지니는 것으로 확인되었다.

#### 아. KML-C 경비투여에 의한 세포성 면역 증강활성 해석

KML-C의 경비 투여에 의한 항원 특이적인 세포성 면역반응 유도활성을 측정하기 위하여 면역개시 3주째에 마우스의 비장을 채취하여 in vitro에서 항원 혹은 mitogen(LPS 또는 ConA)으로 면역세포를 재자극하여 세포증식반응을 조사하였다. 그 결과 HA항원으로 재자극하는 경우에 있어서 KML-C가 항원 특이적인 면역세포 증식반응을 현저히 상승시키는 것으로 나타났다. ConA나 LPS로 재자극한 경우에 있어서는 KML-C를 HA와 함께 투여한 그룹에서 가장 높은 활성이 관찰되었으나, 이들 mitogen에 의한 비특이적 활성화 유도에서는 항원 특이적인 활성화보다 증강효과가 크게 저하된 것으로 확인되었다. 즉 KML-C를 항원과 함께 경비투여 함으로서 항원 특이적인 세포성 면역의 증가를 유도할 수 있는 것으로 판단되었다.

항원특이적인 세포성 면역 증가를 구체적으로 확인하기 위하여 FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) 분석법을 이용하여 bromodeoxyuridine (BrdU)에 의한 세포증식 반응을 측정 한 결과에 있어서는 KML-C+HA 투여군에서 가장 높은 세포증식 반응이 관찰되었다.

면역자극을 유도시킨 마우스의 비장세포를 이용한 세포 증식반응 실험에서 관찰된 증

식증가 효과가 T세포에서 기인하는 가를 알아보기 위하여 anti-CD4항체와 anti-BrdU 항체로 동시에 염색하여 FACS분석을 행하였다. 그 결과 비장세포의 세포증식에서 나타난 세포증식 반응은 CD4+ T세포에 의한 것으로 확인되었다.

RT-PCR을 통해 IL-2, IFN- $\gamma$ , GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)의 mRNA를 조사한 결과, KML-C를 HA와 함께 경비투여 한 그룹에 있어서 이들 사이토카인에 대한 mRNA가 가장 강하게 유도되는 것으로 나타났다. 또한 IFN- $\gamma$  mRNA 발현에 대해 Real-time PCR을 통해 정량적 분석을 행한 결과, KML-C는 CTB 보다도 약 3.5배 정도 이 사이토카인에 대한 mRNA의 발현유도 활성이 높은 것으로 확인되었다. 이들 결과를 종합해 볼 때, KML-C는 HA와 함께 경비적 투여를 행할 경우 항체반응으로 대표되는 항원 특이적인 체액성 면역반응은 물론 T세포의 증식반응과 사이토카인의 분비 증가를 통해 세포성 면역반응을 높이는 것으로 확인되었다.

#### 자. KML-C에 의한 T세포 활성화 작용

KML-C는 항원(HA)과 함께 경비투여 하였을 때, T세포를 활성화하여 세포성 면역을 높이는 것으로 확인되었다. 본 실험에서는 KML-C에 의한 T세포의 활성화를 세포수준에서 해석하기 위하여 FACS기법을 이용하여 활성화 T세포를 동정, 확인하였다. 먼저 면역개시 3주째의 비장세포 내의 T세포/B세포의 비율을 조사한 결과, KML-C투여에 의해 이들 림프구의 population에는 영향이 없는 것으로 나타났다.

CD8+ T세포에 대한 분석에서는 CTB와 KML-C는 모두 항원만을 면역한 마우스에 비해 CD8+ T세포의 분포가 거의 동등한 수준으로 증가하였다. 이 결과는 KML-C를 항원과 함께 경비투여 할 경우, T세포와 B세포의 분포 상의 변화를 초래하지는 않지만, T세포에 있어서는 CD8+세포의 분포는 다소 높이는 경향이 있는 것으로 추정된다.

활성화 T세포를 분석하기 위하여 T세포의 활성화 지표로 알려진 CD25와 CD69분자에 대한 monoclonal antibody를 이용하여 KML-C 투여에 의해 T세포 상에서 이들 활성화 분자의 발현이 상승하는 가를 FACS로 분석하였다. 그 결과 KML-C를 항원과 함께 경비투여 한 마우스에서 CD25분자의 발현이 HA만을 투여한 마우스에 비해 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

CTB를 투여한 마우스에서는 HA만을 투여한 마우스와 거의 동등한 수준의 발현을 보였다. 또한 CD4 및 CD69분자에 대한 dual staining method를 통해 이들 분자를 공동 발현하는 활성화 CD4+ T세포의 분포를 조사한 결과에 있어서도, CD25+ T세포 분석결과와 동일하게 KML-C를 투여한 마우스에서 HA 혹은 CTB+HA를 면역한 마우스보다 double positive T세포가 증가하는 것으로 확인되었다.

#### 차. H9N2 인플루엔자 바이러스 공격접종 방어활성

- 1) 시험용 Influenza virus A/HS/K5/01 (H9N2)를 PBS로 10진 희석한 후 10일령 SPF 부화란의 요막강에 각각 접종하여 접종란의 폐사여부와 생존란의 요막액에 대한

혈구응집반응을 검사하여 바이러스 역가를 산출한 결과 108.0 EID<sub>50</sub>/ml로 확인되었다.

- 2) 시험물질 KM-110 투여 SPF 병아리에서 조류인플루엔자 바이러스 증식억제 시험을 실시한 결과 KM-110 10mg 투여군과 20mg 투여군은 공격접종 대조군에 비하여 기관 및 맹장편도에서 바이러스 재분리율이 유의성 있게 저하되었으며, 시험물질 투여량에 비례하여 바이러스 증식 억제 효과가 관찰되었다.
- 3) 시험물질 HKM-110 투여 SPF 병아리에서 조류인플루엔자 바이러스 증식억제 시험을 실시한 결과 KKM-110 10mg, 20mg 투여군은 공격접종 대조군에 비하여 기관에서 바이러스 재분리율이 유의성 있게 저하되었고, KKM-110 5mg, 10mg, 20mg 투여군은 공격접종 대조군에 비하여 맹장편도에서 바이러스 재분리율이 유의성 있게 저하되었으며, 시험물질 투여량에 비례하여 바이러스 증식 억제 효과가 관찰되었다.
- 4) 시험물질 HKM-110 투여에 따른 SPF 병아리의 체중변화와 아울러 1일 사료소비량, 일일 음수소비량을 비교조사 한 결과 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 시험 결과 공시된 겨우살이에서 추출한 KM-110과 HKM-110은 SPF 병아리에 투여 시 병아리 생체 내에서 조류인플루엔자 바이러스 증식억제 효능이 관찰되어 항조류인플루엔자 바이러스 효능이 있는 것으로 판단되었으며, 20mg 투여까지 병아리 체중과 사료 및 음수소비량에 변화가 없어 안전성이 확인되었으며, 향후 바이러스 증식이 억제 되는 기전연구와 아울러 항바이러스 효능이 있는 유효성분의 탐색, 치료 또는 예방 투여용량과 용법, 그리고 유효성분의 안전성 등에 대한 추가적인 시험을 실시 할 경우 향후 최근 전 세계적으로 문제시되고 있는 조류인플루엔자 바이러스에 유효한 기능성 식품이나 약품의 후보물질로서의 가능성을 확인하였다.

### 3. 제 3 세부과제

#### 가. 현장 사양시험 결과

한국산 겨우살이 추출물(KM-110)의 점막면역 강화활성이 양계 현장에서도 유효한가를 조사하기 위하여 양계 농가의 어린 병아리를 이용하여 현장시험을 실시하였다.

KM-110을 사료 내 0.2% 첨가하여 38일간 시험사육을 실시한 후 생산지수, 육성율, 체중(출하시의 체중) 증가 등을 지표로 하여 한국산 겨우살이 추출물의 유효성을 조사하였다. 그 결과 생산지수를 비롯하여 육성율 및 체중 등 모든 조사항목에 있어서 한국산 겨우살이 추출물을 혼합하여 급이 한 닭에 있어서 사양성적이 우수한 것으로 확인되었다.

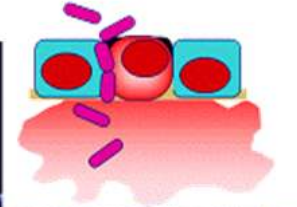
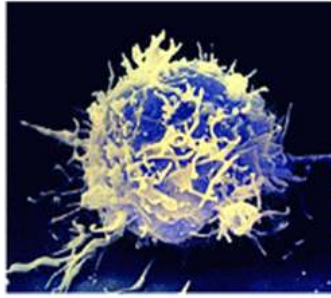
본 현장시험에서는 조류 인플루엔자에 대한 감염방어 효과를 직접적으로 확인할 수는

없었지만, 사료첨가제 형태로 한국산 겨우살이 추출물을 첨가하여 급이함으로서 닭의 점막면역 기능을 강화하여 AI로 대표되는 호흡기 질병과 같은 소모성 질환을 효과적으로 억제하여 닭의 성장을 촉진할 수 있을 것으로 추정된다. 이러한 추정은 닭의 출하 시 체중이 증가하는 것으로 부분적이거나 뒷받침되는 것으로 사료된다.

#### 나. 시제품 Formula 작성 및 제품디자인 개발

시제품의 원료는 암모니아 제거 및 부패성 박테리아 또는 바이러스 나아가 마이코톡신 등의 흡착기능을 갖는 것으로 알려진 흑운모화강편마암 분말을 부영제로 이용하여 소화 및 기호성 개선을 위한 생균제 및 기타 추출물을 일부 포함시키고 겨우살이 추출물을 첨가하여 시제품을 조제하였다. 시제품의 디자인은 겨우살이 추출물, 장점막 등을 상징하며 점막면역강화 및 바이러스 흡착을 강조하는 것으로 제작하였다.

# Immuno-Double MT



점막면역 강화

우진 B&G

바이러스/독신 흡착

## SUMMARY

AI (Avian Influenza) is a flu infection in birds. This disease is of concern to humans, who have no immunity against it. The virus that causes this infection in birds can mutate to easily infect humans. Such mutation can start a deadly worldwide epidemic. Historically, avian influenza viruses infected the pigs and mixed with pig influenza viruses. The viruses changed their genetic information which led to formation of a new virus. This new virus could then infect humans and easily spread from person to person. Avian influenza virus was first detected to infect humans in Hong Kong in 1997, during an avian influenza on that island.

Since these initial outbreaks, HPAI (H5N1) continued to cause illness and death in variety of wild birds in Asia (United States Geological Survey, 2007). Asian lineage HPAI virus (H5N1) was first detected in Europe, where it was isolated from dead wild waterfowl in several European Union member states and neighboring countries (Sabirovic M, 2005).

This outbreak was linked to chickens and classified as avian influenza A (H5N1). This avian influenza A (H5N1) is highly pathogenic, hence this disease was classified as the first grade legal communicable disease or as a "A grade" by Office International des Epizooties. The avian influenza had crossed the species barriers in Asia to cause an increasing pandemic threat and resulted to serious damage to poultry industry.

The outbreak of avian influenza in Korea was first reported in 1996 in one of the layer farms in Choongcheungbukdo province, and reported again in the same place in 2003. It then spreaded out to the other cities and prefectures. It was reported that highly pathogenic avian influenza had occurred in Ansong last year and even this year. Roughly 2,400,000 poultry animals including 1,300,000 chickens were killed and buried.

This influenza is acquired or transmitted through inhalation of infectious droplets, and direct or indirect contact of either human foot, equipment, facilities, feces on egg surfaces onto upper respiratory tract and conjunctive mucosa.

Avian influenza viruses belong to the Influenza virus A genus of the

Orthomyxoviridae family and are negative sense, single-stranded, segmented RNA viruses. Influenza viruses can be further categorized into subtypes according to the antigens of the haemagglutinin (H) and neuraminidase (N) projections on their surfaces. There are 14 haemagglutinin subtypes and 9 neuraminidase subtypes of influenza A viruses, and avian influenza viruses have representatives in all of these subtypes. However, to date all highly pathogenic AI viruses that cause generalized rather than respiratory disease belong to either the H5 or H7 subtypes. For example, the classical fowl plague virus is H7N7 and the virus responsible for the major epidemic in the eastern United States in 1983 and 1984 was H5N2 Avian Influenza.

The symptoms of AI are very variable according to pathogen of the infecting virus, but it generally shows respiratory problem, diarrhea, sudden decrease of egg production rate, blue color in cockscomb or head part, and some edema in front face.

The mortality of AI is pretty high (more than 50% at least), and symptoms are somewhat similar to newcastle disease, infectious laryngotracheitis (ILT) and mycoplasma. Therefore it is not easy to diagnose AI infection correctly. Mucosal membranes surrounding the epithelial tissues in mouth, respiratory tract, bronchi and genital organs are the first barrier in animal protection system. These mucosal membranes accomplish the role to protect the animal body from the invasion of contaminants, chemicals, various antigenic molecules including microorganisms.

In recent years, common mucosal immune system (CMIS) has been introduced. It is generally accepted that the immune stimulation through one of the mucosal membranes can activate the whole body mucosal immunity and further control the whole body immunity.

On this point of view, the objective of the present research was to develop the feed additive to suppress the respiratory infection by AI virus through fortification of mucosal immunity in chickens. Further, we aimed to accomplish the higher value-added agricultural managing techniques helpful for national economy and poultry industry through the scientific research data.



## 1. The first research subject

### A. Feeding trial using broiler at the laboratory level

In order to investigate the effect of mistletoe extract on nutrient availability and immune function, Loss strain male chicks adapted to new environment for 3 days after hatching were fed dietary mistletoe at the level 0.5% or 1% for 4 weeks.

After experimental feeding, body weight gain, feed efficiency, PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) proliferation, blood antibody titer against ND (Newcastle Disease) and IBD (Infectious Bursal Disease) antigens were measured.

There were no significant differences in feed intake, body weight gain, and feed efficiency.

It was observed that addition of 1% mistletoe into the diet did not show any differences in feed intake and broiler productivity.

### B. Investigation of immune modulation activity by dietary mistletoe

The effect of dietary mistletoe on immune response was evaluated through the proliferation of PBMC and splenocytes in chicks feed with experimental diets and challenged with ND and IBD virus infection.

In the present study, addition of 0.5% mistletoe showed significant increase in PBMC proliferation stimulated with both LPS and ConA after 7 days of ND and IBD challenge ( $P < 0.05$ ).

Also, when compared to the control group, addition of 0.5% mistletoe in broiler feed for 14 days after ND/IBD infection increased the proliferation of the splenocytes stimulated with LPS and ConA.

In the present study, concanavalin A, one of mitogen used in measurement of PBMC and splenocytes proliferation, is the compound known to stimulate the proliferation of T lymphocytes, and LPS is known to stimulate the proliferation of B lymphocyte (Cochet et al., 1997).

Therefore, it was demonstrated that addition of 0.5% mistletoe in the diet reinforced cell-mediated immunity through increased proliferation of T lymphocytes and humoral immunity through the increased proliferation of B lymphocytes in broiler challenged with ND and IBD infection.

Also, it is assumed that the increase of B lymphocytes proliferation by 0.5% mistletoe addition might be related with the increase of antibody titer against ND and IBD infection.

### C. ND and IBD antibody titer

The broilers serum was isolated and diluted 8 times. Then, antibody titer values were measured. As observed, the ND antibody titer value was increased by 0.5% dietary mistletoe when compared to the control group, but decreased in broilers fed the 1% dietary mistletoe. From these results, it is considered not to add more than 0.5% in the diet for nutrient availability and the modulation of immunity.

### D. Feeding trial using laying hens

In order to investigate the effect of fermented clay mineral to obtain the synergic action of the mistletoe extract, laying hens were fed 0.5% fermented clay mineral (T1), mistletoe extract (T2) and fermented clay mineral+mistletoe extract (T3) diets, respectively for 6 weeks.

To investigate the immune modulation activity by the feeding of experimental diets, IgY titer was measured after 6 weeks of muscular injection of *E. coli* 88 microbe.

Though there were no significant differences in egg production rate and eggshell strength between the groups with or without mistletoe, it is strongly suggested that the addition of micro minerals into the diet may increase the synergic effect of mistletoe for the layer diet.

Haugh unit showing egg freshness, height of egg white, eggshell thickness were also similar among treatments.

From these results, it is demonstrated that very useful information for industrialization of the product was achieved through the improvement of egg product and egg quality by the blending with the micro minerals more than dietary feeding of mistletoe only.

## 2. The 2nd research subject

### A. Non-specific immune stimulating effects of Korean mistletoe

#### 1) The preparation of mistletoe extracts

In the present study, various extracts of Korean mistletoe were administered to

the animal through the mucosal membrane (by oral or nose) to determine if the mistletoe extracts will increase the non-specific immunity of host animal. Seven different mistletoe extracts were prepared. The immuno-functional study was undertaken for the firstly prepared KM-110 mistletoe extract.

#### B. Immunity modulation activity of KM-110 administered into the mucosa

KM-110 extract was firstly prepared from Korean mistletoe by cold water extraction, and then immune modulation activity and simple toxicity test were done after oral or intranasal administration of each extract into the mice.

After the administration of KM-110 once in a day during 7 consecutive days, the blood immunity-globulin IgG,A,M levels were measured by ELISA method. When mistletoe level was increased from 250ug to 1,000 ug/mouse, blood IgG,A,M levels were increased in all groups compared to the control group. The group administered with 250ug/mouse showed the highest blood IgG,A,M levels.

On the other hand, to investigate the synergistic effect of mistletoe extract by oral administration on the modulation of mucosal immunity, the immuno-globulin was measured from blood and feces. As a result, both blood and fecal IgG,A,M were increased in similar pattern. This result could be attributed to the stimulation of immunoglobulin secretion in feces by the modulation of immunity through oral administration of KM-110.

#### C. Investigation of immune modulation of by oral administration of KM-110

In order to investigate the immune modulation activity, mice were administered KM-110 through nose during 7 days and then fecal immunoglobulin was measured equally with oral administration to investigate immunity activity possibility by dose in hard ball of KM-110. As results, fecal IgGAM and IgG secretions were increased.

With the consideration that AI is a virus infectious disease through respiratory tract, the results showing increased immunity at the present study by the administration of extracts through nose are considered much meaningful for the control of AI virus.

As observed above, it has been clarified that consecutive administration of

KM-110 by mouth or nose activated the non-specific immune response. At the next step, simple toxicity test was done to investigate if this administrative condition shows any toxicity to the host animal. The oral administration of KM-110 once in a day for seven days showed no side effects or negative effects, but there was slight decrease in body weight in mice administered with KM-110 by nose. However, it has been shown that there were no liver damage by both oral and nose administration of KM-110.

#### D. The comparison of immune modulation activities among KM-110, HKM-110 and KML-C

In order to investigate the activation of immune cells, mice were administered HKM-110 and KML-C including KM-110 five times through the mucosal membrane. It was found that both oral or nasal administration of these extracts stimulated the mouse splenocytes. Furthermore, the administration of these extracts increased the basal metabolism, and did not cause any weight loss or liver toxicity.

#### E. Immune modulation activities of KMF-WE and KM-PS

In order to investigate the immune modulation activity of crude polysaccharide extracts (KM-PS) or fruit extracts (KMF-WE) from Korean mistletoe, mice were administered with these extracts by mouth or nose 5 times, and then fecal IgA and basal metabolism were measured. In addition, simple toxicity test was done to check any toxicity through the change of their body weights.

As a result, it was observed that oral administration of KM-PS and KMF-WE once in a day for 5 consecutive days increased the intestinal IgA secretion, and basal metabolism was also clearly increased. By the observation that these extracts did not cause any weight loss, it has been considered that these extracts are comparatively safe samples.

#### F. Antigen—specific immune modulation activities in mice

On the view point that AI is influenza virus, mucosal immunity was investigated by intranasal administration of HA peptide antigen originated from influenza. From this study, it was found that antigen specific immunity was increased as measured by IgG and IgA titer values from samples of total serum and vaginal canal.

When KM-110 was used as immune modulator, highest titer activity was observed at 5 $\mu$ g administration and even higher immune modulation activity than that of control group stimulated with LPS. However, no dose-dependent results were observed among the titer activities at the level of 1 $\mu$ g, 5 $\mu$ g and 10 $\mu$ g. Therefore, it is supposed that more experiments are needed to clarify if the effects of extracts shows in dose-dependent manners.

When WHBP was used as a immune modulator, the highest titer values were observed in mice administered 10 $\mu$ g or LPS+10 $\mu$ g of extracts. These values were even higher than that of control group treated with LPS only.

#### G. Analysis of synergistic effect of antibody reaction by KML-C nasal administration.

The titer values of antigen specific IgG(immunoglobulin G) and IgA (immunoglobulin A) of the blood and vaginal fluid were measured using ELISA after 1week, 3weeks, 8weeks of immunization through the nasal administration of HA+KML-C or HA+CTB every other weeks. First, it was observed in blood HA specific IgG titer analysis that both KML-C and CTB increased antibody titer value against HA after a week of immunization.

Meanwhile, it appeared that blood antibody titer value was higher in mice administered KML-C+HA or CTB+HA than in mice administered HA only, but there was no significant statistical differences.

On the other hand, it was found that antigen specific IgG modulating activity was similar between KML-C and CTB. Unlike serum IgG, it was observed that IgA of vaginal fluid was increased after 3weeks of immunization. As in serum IgG, no difference was observed in antibody modulating activity by KML-C and CTB in IgA of vaginal fluid.

However, it was thought that, KML-C is acting under the very low dosage considering the administration concentration of CTB was 1ug/head and 0.1ug/head in KML-C.

In the present study, antigen specific antibody modulating activity was measured especially focusing on IgG2b antibody. As a result, it was observed that both KML-C and CTB increased antigen specific IgG2b. And these adjuvant have similar activity for antigen specific IgG2b antibody modulation.

#### H. Analysis of cell-mediated immunity modulation by intranasal administration of KML-C

In order to measure the antigen specific cell-mediated immune modulating activity, cell proliferation response were investigated by re-stimulation of splenocytes by antigen or mitogen (LPS or ConA) in vitro after 3 weeks of immunization. As a result, it appeared that, in case of re-stimulation with HA, KML-C remarkably increased antigen specific immune cell proliferation

In case of re-stimulation by ConA or LPS, it was observed that the highest activity was shown in group administered KML-C together with HA, but non-specific activation by mitogen was significantly decreased than antigen specific activation. In other words, it was thought that antigen specific cellular immunity was modulated by nose-administration of KML-C together with antigen.

In order to clarify antigen specific cellular immunity, cell proliferation was measured by bromodeoxyuridine (BrdU) using FACS. Cell proliferation was highest in group administered KML-C together with HA. In order to investigate if increased cell proliferation effect is due to T cell, FACS analysis was undertaken by using anti CD4 antibody and anti BrdU antibody. As a result, splenocytes proliferation was mediated through CD4+ T cell.

From the results of mRNA of IL-2, IFN- $\gamma$ , GM-CSF measured by RT-PCR, the highest mRNA expression was found in group administered KML-C together with HA by nose. Especially, IFN- $\gamma$  mRNA expression KML-C measured by quantitative real-time PCR was 3.5 times higher than CTB group. Altogether, it was clarified that KML-C administration by nose together with HA increased the cell mediated immune response by increasing of not only antigen specific humoral immunity but also T cell proliferation and cytokine secretion.

### I. T cell activation by KML-C

When KML-C was administered by nose together with HA, it was clarified that cellular immunity was increased through T cell activation. In the present study, activated T cell was isolated and classified by FACS analysis to interpret the mechanism of T cell activation in the cellular level. First of all, it was clear that there was no change in lymphatic cell population by nose administration of KML-C measured by B cell/T cell ratio of splenocytes after 3 weeks of immune stimulation.

CTB or KML-C administration increased the CD8+ T cell population compared to those of groups immunized antigen only. This results shows that, when KML-C was administered together with antigen, there were no change in T cell and B cell population but CD8+ T cell population seems to be increased.

In order to analyze the activated T cell, FACS analysis was undertaken to know if protein expression of CD25 and CD69 proteins known as marker protein in T cell activation. As a result, CD25 protein expression was markedly increased in mice administered KML-C by nose compared to those of mice administered HA only by nose.

Meanwhile, mice administered CTB showed nearly similar level of CD25 and CD69 proteins expression to those of mice administered HA only. From the results of CD4 and CD69 molecules, it was clarified that, like CD25+ T cell analysis results, mice administered KML-C showed increased double positive T cell compared to those of mice administered HA or CTB+HA.

### J. Protection activity against the H9N2 influenza virus challenging.

1) After the test Influenza virus A/HS/K5/01 (H9N2) was serially diluted with PBS, it was inoculated into the cavity of allantois of SPF eggs, which were previously incubated for 10 days. Mortality was determined and the EDI 50 virus titer value was measured by hemagglutinin assay. It was found that titer value was  $10^8$  EID<sub>50</sub>/ml.

2) The result of AI virus growth arrest test in KM-administered SPF chicks showed that 10mg and 20mg administration of KM-110 significantly decreased virus isolation rate in organ and caecum compared to control group challenged with test virus.

The arrest effect of test virus was shown in dose dependent manner of test sample concentration.

3) As a result of AI virus growth arrest test in SPF chicks, administration of 10mg and 20mg of HKM-110 decreased virus isolation rate in dose dependent manner compared to control group challenged with test virus.

4) There were no significant changes in body weight, daily feed and water intake in SPF chicks administered with test sample of HKM-110.

Altogether, it was thought that test sample Korean mistletoe extract KM-110 and HKM-110 has anti AI virus activity from the observation of decreased AI virus growth in SPF chicks challenged with test virus.

With the results that there were no changes in body weight, feed and water intake of chicks administered 20mg, mistletoe sample is accepted safe sample.

In the present study, if further studies in mode of action for virus growth arrest, screening of functional compound showing anti virus activity, dosage and using guideline for therapy and protection, safety of functional compound are completed, mistletoe extract is considered to be one of the strong candidate compound to produce functional food and medicine useful against worldwide AI virus program.

### 3. The 3rd research subject

#### A. The results of field trials

The field test were undertaken to investigate if the mucosal immune modulation activity of KM-110 is also available in poultry farm.

After the experimental feeding of dietary mistletoe for 38 days, the production index, growing rates, final body weight increase were used as a availability of Korean mistletoe.

The results showed that treated groups had higher growing rates, body weight gain including production index than control group.



In the present study, though it was impossible to clarify the infection defensive effects, it has been suggested that administration of Korean mistletoe extract can increase the broiler growth by the effective suppression of respiratory disease, one of AI disease showing wasting syndrome, by fortifying the mucosal immunity. This speculation was supported by the results of increased final body weight in shipping.

#### B. The development of design of pilot product of feed additive and its formulation

The original resources of pilot product consisted of Granitic Gneiss to fortify the absorptive function to reduce the ammonia, decomposition bacteria and mycotoxins. In addition to that, probiotics for stimulating the digestion and palatability, some other herbal extracts and mistletoe were added and well mixed. The design of trademark of pilot product was focused on symbolizing of mistletoe, intestinal mucosal membrane to emphasize the strengthening mucosal immunity; and virus adsorption.

## CONTENTS

1. The first research subject	6
A. Feeding trial using broiler at the laboratory level	16
B. Investigation of immune modulation activity by dietary mistletoe	16
C. ND and IBD antibody titer	17
D. Feeding trial using laying hens	17
2. The 2nd research subject	17
A. Non-specific immune stimulating effects by Korean mistletoe	17
B. Immunity modulation activity of KM-110 administered into the mucosa	18
C. Investigation of Immune modulation of by oral administration of KM-110	18
D. The comparison of immune modulation activities among KM-110, HKM-110 and KML-C	19
E. Immune modulation activities of KMF-WE and KM-PS	19
F. Antigen-specific immune modulation activities in mice	20
G. Analysis of synergistic effect of antibody reaction by KML-C administration by nose.	20
H. Analysis of cell-mediated immunity modulation by intranasal administration of KML-C	21
I. T cell activation by KML-C	22
J. Protection activity against the H9N2 influenza virus challenging.	22
3. The 3rd research subject	23
A. The results of field trials	23
B. The development of design of pilot product of feed additive and its formulation	24

# 목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요.....	27
제 2 장. 국내외 기술개발현황.....	28
제 3 장. 연구개발 수행 내용 및 결과.....	29
제 1 절. 한국산 겨우살이에 의한 비특이적 면역증강 효과 .....	29
제 2 절. 마우스에서의 항원 특이적 면역증강 시험.....	42
제 3 절. 닭을 이용한 파이로트 사양시험.....	48
제 4 절. 한국산 겨우살이에 의한 점막면역강화 기전해석.....	62
제 5 절. H9N2 인플루엔자 바이러스 공격접종 방어활성.....	71
제 6 절. 현장 사양시험 결과.....	77
제 7 절. 시제품 Formula 작성 및 제품디자인 개발.....	80
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	81
제 5 장. 연구개발결과의 활용계획.....	83
제 6 장. 참고문헌.....	84

## 제 1 장. 연구개발과제의 개요

### 1. 연구개발의 목표 및 내용

#### 가. 최종목표 및 내용

최종목표	내용	비고
조류독감 억제용 기능성 사료첨가제 제품을 개발한다.	닭의 점막면역 강화를 통해 AI감염을 억제하여 양계산업의 부가가치를 창출하고, AI에 의한 집단감염을 예방하여 청정축산 및 차별화된 영농기법을 확립한다. 또한 자축의 육성율의 향상과 증체효과는 물론 미생물 감염에 의한 위험성을 최소화 할 수 있는 새로운 개념의 사료첨가제 기법을 도입하도록 한다.	

#### 나. 향후 연구개발 목표 및 내용

목표	내용	연구범위	연구비 (천원)
제품화에 필요한 한국산 겨우살이 추출법 확립 및 대량 추출법의 개발	추출물의 분리법 확립 및 효능 극대화 혼합 formula의 작성	효능 극대화를 위한 혼합비를 결정하고, 각 추출법의 최적화를 구축	136,000
점막면역에 관련한 작용기전의 해석 계속 추진	면역학적 관점에서 비특이적 및 특이적인 면역증상 반응의 작용기전 해석	마우스를 이용한 in vivo 및 in vitro 실험	
실험실 수준의 소규모 사양시험을 통한 작용기전의 해석 계속 진행	예비 현장시험 결과를 확보하고, 현장에서의 AI 바이러스 억제효과를 예측	사양시험의 통한 현장적용 기초자료의 확보	
닭을 이용한 AI바이러스 (H9N2) 감염 방어 효능시험	AI 바이러스와 유사한 감염양식을 갖는 H9N2 type바이러스 감염실험을 통해 감염 방어 효과 확인	닭을 이용한 H9N2 코로나바이러스 감염실험 추진	
AI 바이러스 억제용 양계 기능성 사료첨가제의 제품화에 필요한 제반 조건의 처리	예비 현장시험 결과를 확보하고, 현장에서의 AI 바이러스 억제효과를 예측	양계 현장에서의 사양시험	

## 제 2 장. 국내·외 기술개발현황

최근 1차 산업계통의 바이오벤처 기업이 많아지면서 사료첨가제 제조업체도 급증하고 있으며 국내의 사료첨가제 제조업체도 수천을 헤아리며, 사료첨가제의 종류도 수백 가지를 넘고 있다. 하지만 주된 첨가물질은 그 수가 한정되어 있어 비슷한 item으로 제조업체 간에 치열한 경쟁이 이루어지고 있다. 또한 기능성 식품소재 개발의 중간단계에서 축산용 사료 첨가제로 응용을 시도하는 예가 많으나, 아직까지 AI 바이러스 감염의 억제에 유효한 사료첨가제는 개발되어 있지 않다.

국내 관련 산업체 중에서 면역강화용 사료 첨가제를 개발하여 시판하고 있는 업체가 있으나, 이들 기업에서도 AI 감염방어에 유효한 소재는 개발되어 있지 않다. 본 연구진이 개발하고자 하는 AI 바이러스 감염 억제를 위한 점막면역 증강용 기능성 양계 사료 첨가제는 국내는 물론 국외에 있어서도 그 예를 찾아보기 힘들며, 가축의 면역체계를 활성화시켜 질병을 예방하고 생산성을 향상시킴으로서 고수익을 창출한다는 의미에서 기존의 사료첨가제와는 차별적인 부분이 강하다고 할 수 있다.

### ▶ 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
(주)이지바이오	면역강화용 사료첨가제 개발	일반적인 면역강화 제품
(주)CTC바이오	면역강화용 사료첨가제 개발	일반적인 면역강화 제품

### 제 3 장. 연구개발 수행 내용 및 결과

#### 제 1 절. 한국산 겨우살이에 의한 비특이적 면역증강 효과

본 연구에서는 다양한 한국산 겨우살이 추출물을 이용하여 점막경로(경구 혹은 경비적 투여)를 통해 급이 하였을 때, 숙주의 면역기능을 비특이적으로 상승시키는 가를 조사하였다. 본 연구에 사용할 한국산 겨우살이 추출물은 Table 1-1과 같으며, 추출방식이 결정되어 추출된 순서대로 활성을 분석하였다. 특히 냉수추출법에 의해 얻어지는 KM-110이 가장 먼저 연구에 적용 되었으며, 그 외의 추출물들도 추출되는 순서대로 분석하였다.

Table 1-1. 연구에 이용된 한국산 겨우살이유래 추출물

번호	추출물명	추출방식 및 특징
1	KM-110	한국산 겨우살이의 냉수 추출물
2	HKM-110	한국산 겨우살이의 열수 추출물
3	WHBP	Heparin과 결합하는 단백질 분획
4	비렉틴 단백질 성분	렉틴을 제외한 단백질 성분
5	KMF-WE	한국산 겨우살이 열매 추출물
6	KM-PS	한국산 겨우살이 조다당 추출물
7	KML-C	한국산 겨우살이 렉틴성분

### 1. KM-110 점막투여의 면역 증강활성

한국산 겨우살이로부터 냉수추출에 의해 추출한 KM-110이 가장 먼저 준비되어 이 분획에 대해 경구투여(oral administration) 및 경비내투여(intranasal administration)에 의한 면역력 증가활성과 간이독성시험을 실시하였다.

KM-110을 경구적으로 매일 1회씩 7일간 총7회 투여하고, 경구투여는 마우스 두당 250 $\mu$ g, 500 $\mu$ g 및 1mg씩 투여하였고 경비투여는 비강내로 100 $\mu$ g, 200 $\mu$ g 및 400 $\mu$ g을 각각 투여하였다. 마우스 혈중의 면역글로부린 IgGAM의 양을 ELISA법에 의해 측정, 비교하였다. 그 결과 KM-110을 250 $\mu$ g에서 1,000 $\mu$ g/mouse의 양으로 투여한 결과 혈중 IgGAM이 증가하였으며(Fig. 1-1), KM-110에 의한 상승효과는 250 $\mu$ g/mouse가 가장 좋은 것으로 나타났다.

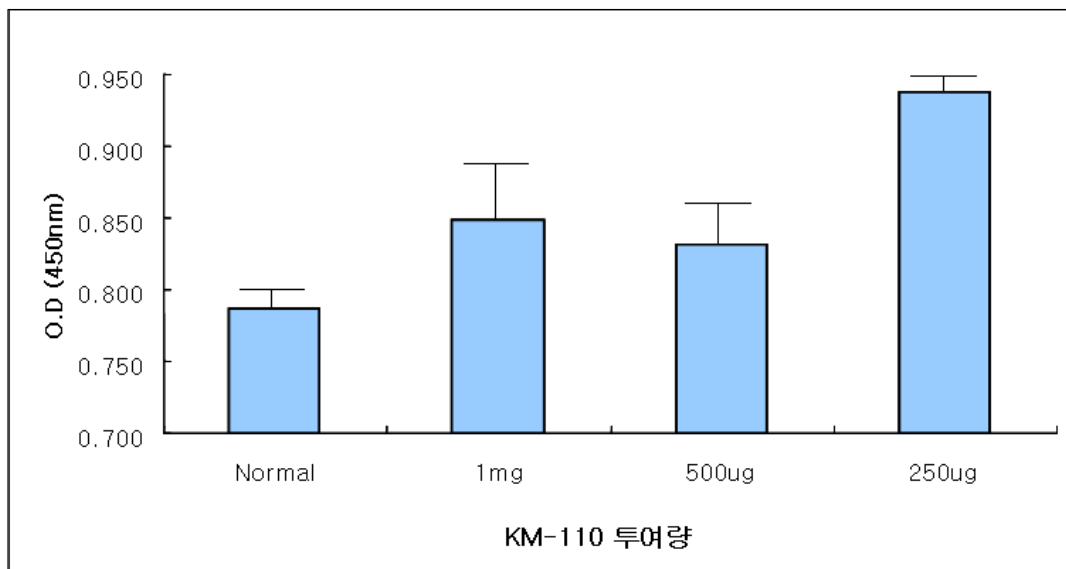


Fig. 1-1 KM-110 경구투여에 의한 혈중 IgGAM의 증가

또한 혈중 IgA에 있어서도 혈중 IgGAM과 유사한 결과가 관찰되었다(Fig. 1-2).

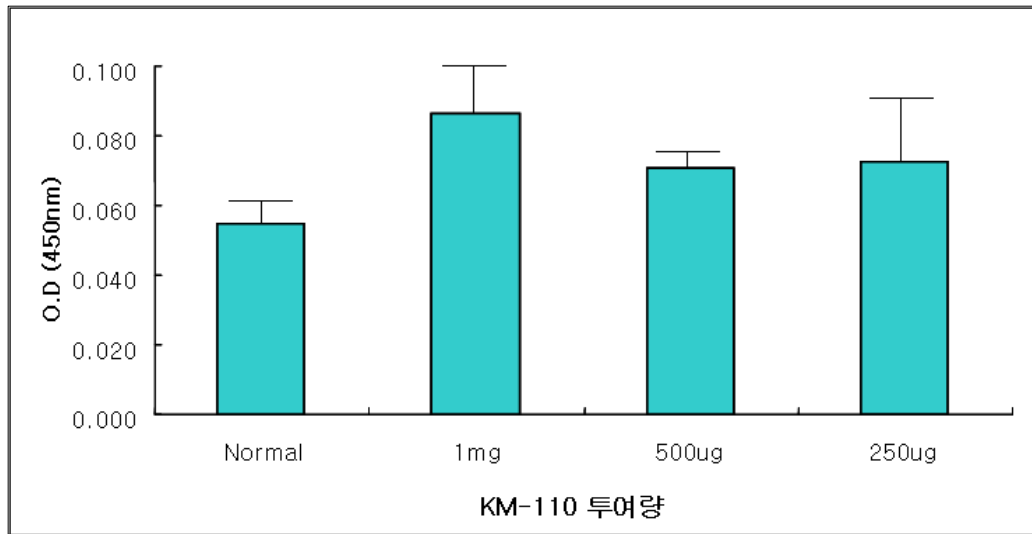


Fig. 1-2 KM-110 경구투여에 의한 혈중 IgA의 증가

한편, 경구투여에 의한 점막면역의 상승효과를 조사하기 위하여, 장내 면역글로불린의 양을 분변 중에 함유된 면역글로불린을 측정함으로써 비교하였다. 그 결과 분변 IgGAM과 IgA의 양이 혈청 중의 그것과 동일하게 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1-3, Fig. 1-4). 이들 결과는 KM-110의 경구투여는 비특이적으로 면역기능을 높여 면역글로불린의 분비를 촉진하기 때문인 것으로 추정된다.



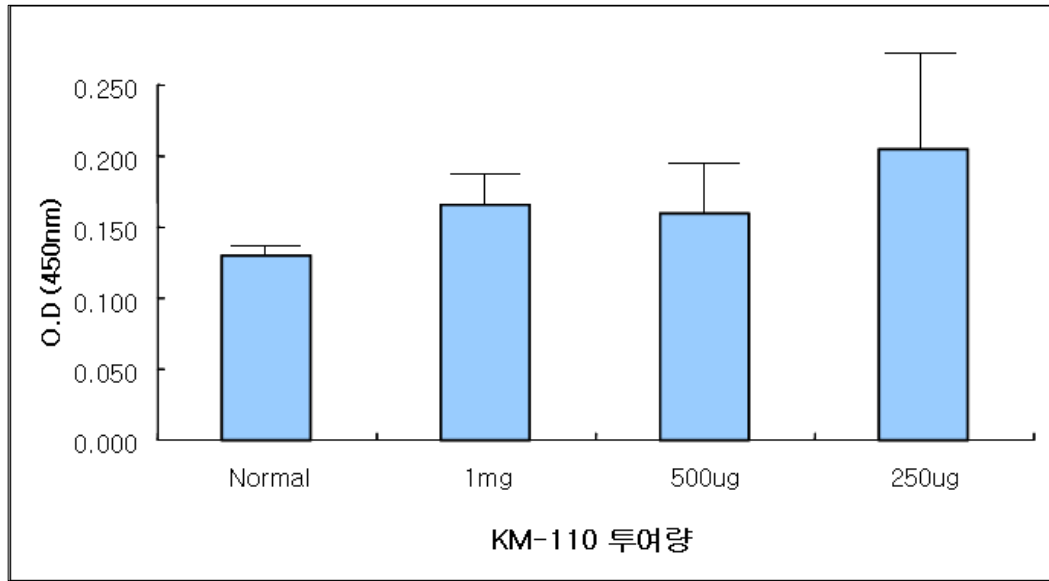


Fig. 1-3 KM-110 경구투여에 의한 분변 중 IgGAM의 증가

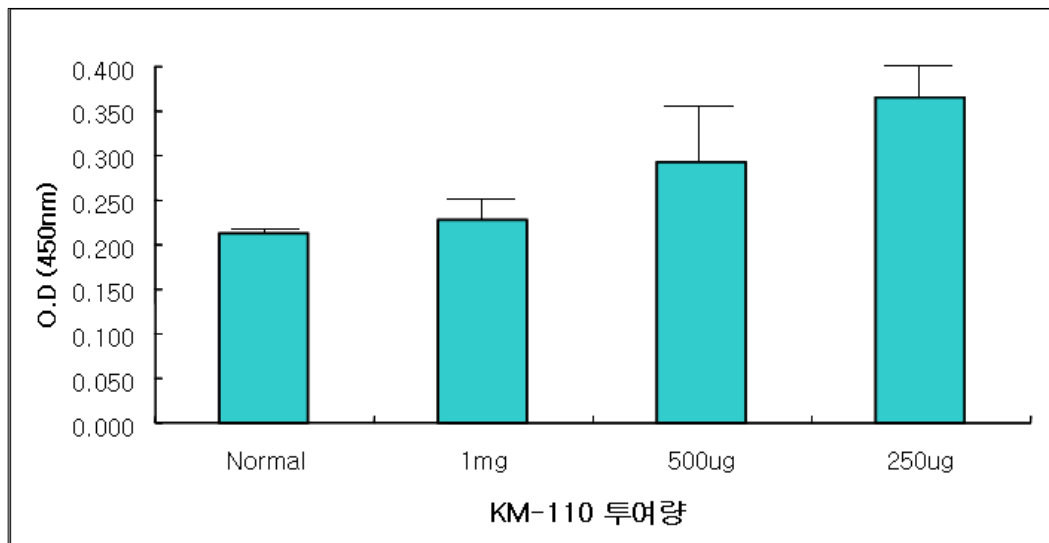


Fig. 1-4 KM-110 경구투여에 의한 분변 중 IgA의 증가

KM-110의 경비투여에 의한 면역 활성화 여부를 조사하기 위하여 경구투여와 동일하게 7일간 경비적으로 KM-110을 투여한 후, 분변 중에 포함되는 면역글로불린의 양을 측정하였다. 그 결과, 분변 중의 IgGAM 및 IgG에 있어서 분비량이 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 1-5, Fig. 1-6). 조류인플루엔자가 호흡기를 통해 감염되는 바이러스성 질환을 감안할 때, 비강을 통한 투여에 의해 면역기능이 증가한다는 것은 대단히 유의한 결과인 것으로 사료된다.

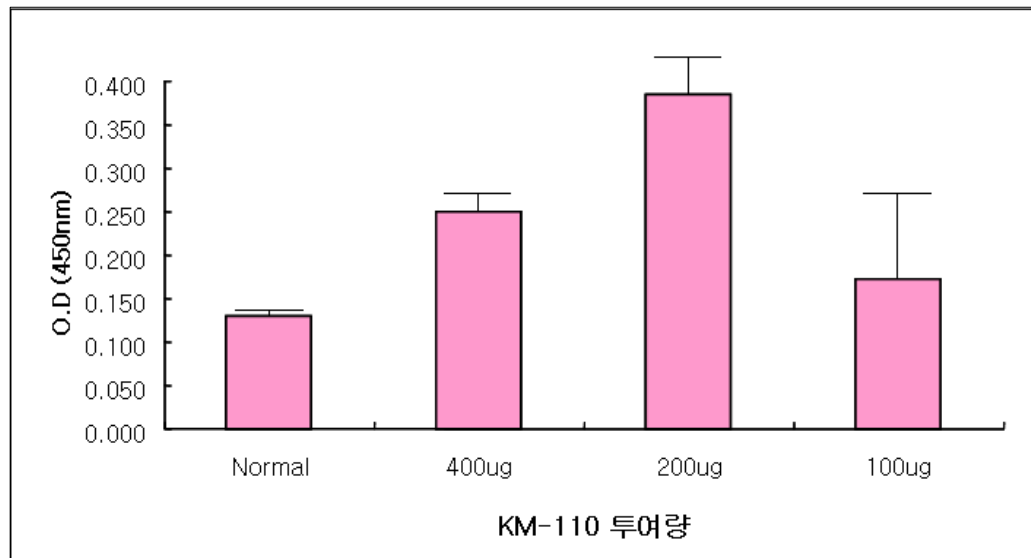


Fig. 1-5 KM-110 경비투여에 의한 분변 중 IgGAM의 증가

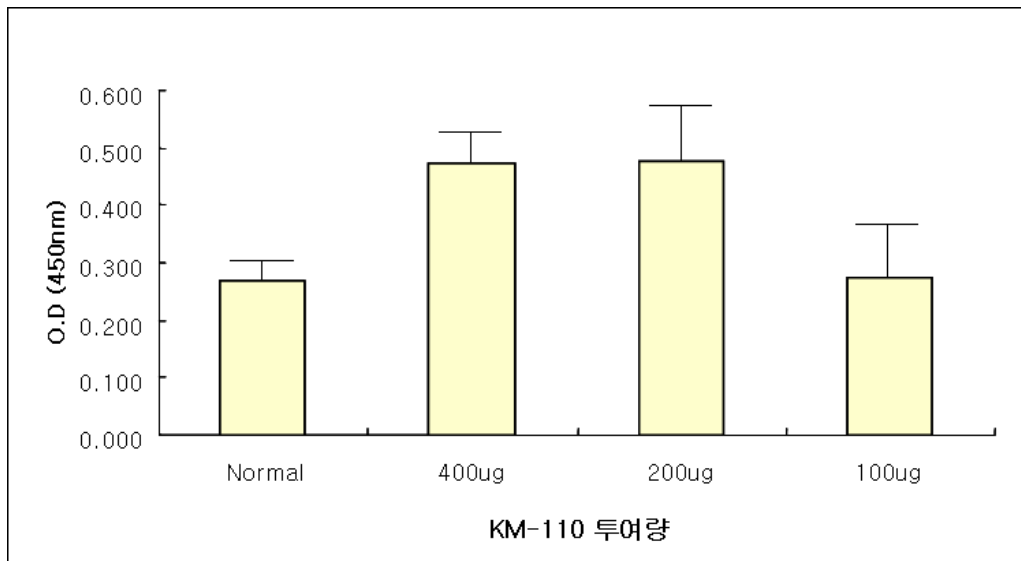


Fig. 1-6 KM-110 경비투여에 의한 분변 중 IgA의 증가

위의 결과와 같이 KM-110은 경구 혹은 경비적 경로를 통해 마우스에 연속 투여하였을 경우, 비특이적인 면역증강 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 그래서 다음으로 이 투여 조건에서 숙주에 독성을 나타내는가의 여부를 조사하기 위하여 체중의 변화와 간 독성에 초점을 맞추어 간이독성 테스트를 실시하였다. 1일 1회 총 7일간 KM-110을 경구 혹은 경비투여 한 마우스를 대상으로 투여 개시 8일째 측정해 본 결과, 경구투여는 아무런 영향이 없었으나, 경비투여는 약간의 체중감소를 동반하는 것으로 나타났다 (Table 1-2). 하지만 간독성에서는 경구투여나 경비투여 모두 간 손상을 유발하지는 않는 것으로 확인되었다 (Table 1-3).

Table 1-2. KM-110 접막투여가 체중변화에 미치는 영향

투여군	체중 (g)	증감
대조군 (정상마우스)	23.4 ± 0.6	-
경구투여 (1000ug)	24.1 ± 0.7	-
경구투여 (500ug)	24.0 ± 0.4	-
경구투여 (250ug)	23.8 ± 0.5	-
경비투여 (400ug)	19.6 ± 0.3	- 3.8 g
경비투여 (200ug)	20.1 ± 0.6	- 3.5 g
경비투여 (100ug)	20.8 ± 0.8	- 2.8 g

Table 1-3. KM-110 접막투여에 의한 간독성 유발시험

투여군	GPT단위 (karmen/ml)	판정
대조군 (정상마우스)	32 ± 4.8	40 ± 5 정도까지 정상
경구투여 (1000ug)	26 ± 3.7	정상
경구투여 (500ug)	28 ± 2.6	"
경구투여 (250ug)	31 ± 4.2	"
경비투여 (400ug)	44 ± 5.2	독성 의심
경비투여 (200ug)	29 ± 5.6	정상
경비투여 (100ug)	27 ± 3.8	"

한편 KM-110을 1일 1회(250ug/mouse/day)씩 5일간 총 5회 경구투여 할 경우, KM-110투여에 의한 면역증강 활성화에 변화가 생기는가를 조사하였다. 그 결과 7회와 5회 투여는 모두 유의하게 혈중 면역글로불린의 농도를 증가시키는 것으로 나타났다 (Fig. 1-7).

이 결과를 토대로 다른 추출물에 대해서는 1일 1회씩 총 5회 투여하고 최종 투여 1일째에는 샘플을 채취하여 분석을 실시하는 방식으로 실험을 진행하였다.

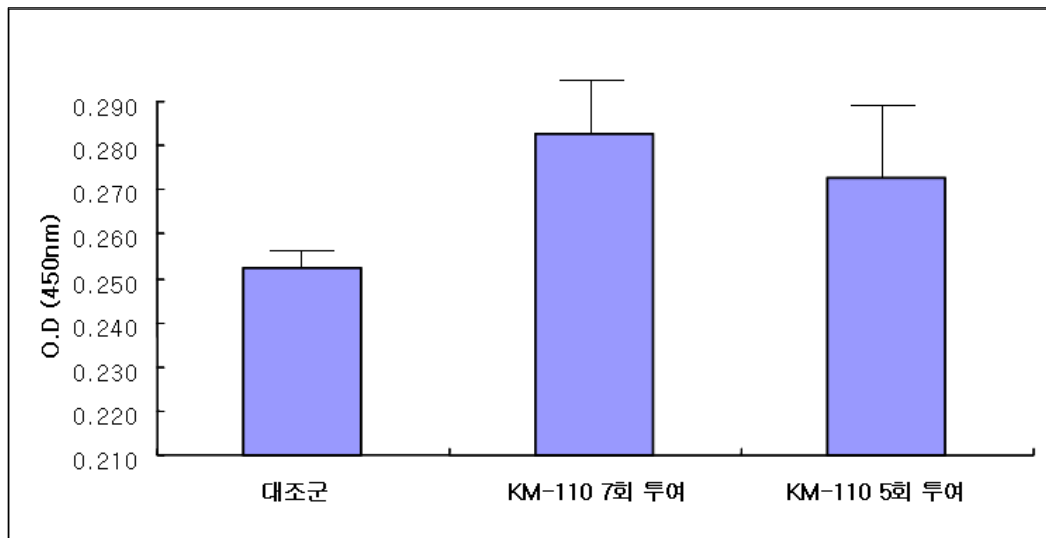
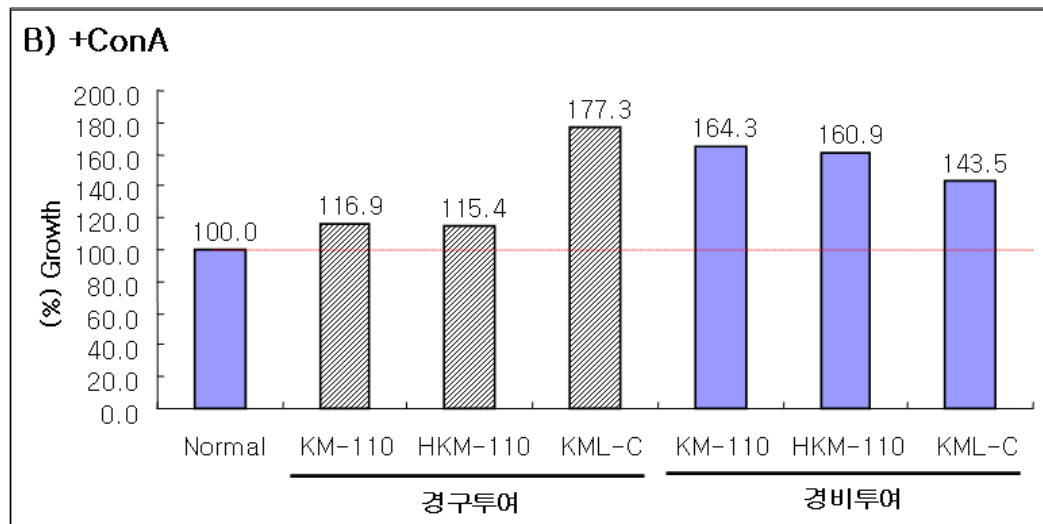
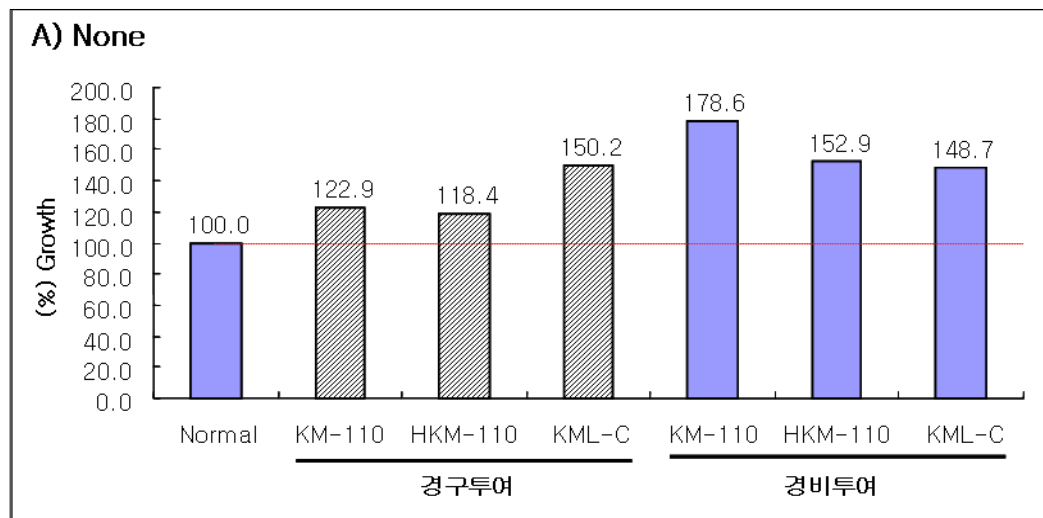


Fig. 1-7 KM-110의 투여횟수에 따른 혈중 IgGAM의 변화 측정

## 2. KM-110, HKM-110 및 KML-C의 활성 비교

KM-110(경구: 250ug/mouse, 경비: 20ug/mouse)을 비롯하여 HKM-110(경구: 250 ug/mouse, 경비: 20ug/mouse)과 KML-C(경구: 500ng/mouse, 경비: 50ng/mouse)에 대해 5회 점막투여한 후, 1일째의 면역세포 활성화 여부를 조사하였다. Fig. 1-8에서 보듯이 이들 시료를 경구 혹은 경비적으로 투여할 경우 마우스 면역세포(비장세포)의 증식을 촉진하는 것으로 나타났다. ConA와 LPS는 각각 5ug/ml 및 1ug/ml의 농도로 첨가하였다.



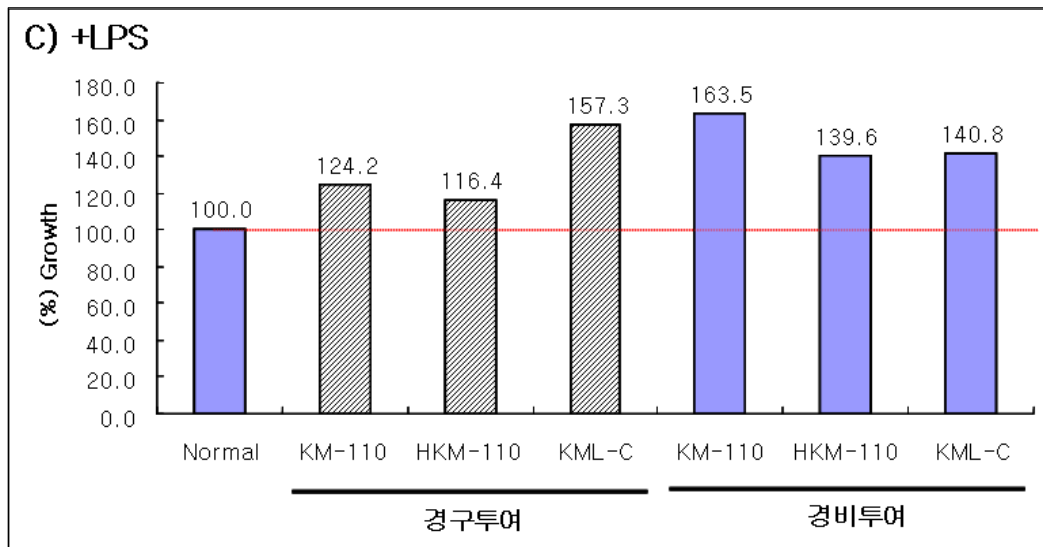


Fig. 1-8 각 시료의 점막투여에 의한 면역세포 증식반응

또한 이들 시료의 점막투여는 마우스의 기초대사량(산소소모량으로 간접적 측정)을 높이는 것으로 나타났으며(Fig. 1-9), 체중감소나 GPT 값을 이용한 간독성과 같은 독성도 유발하지 않는 것으로 관찰되었다(Fig. 1-10, Table 1-4).

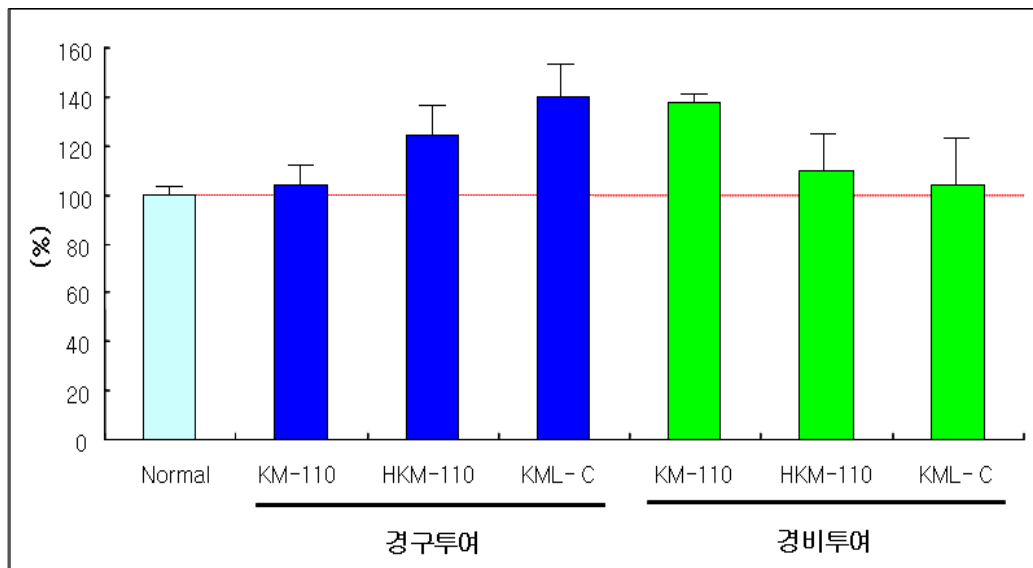


Fig. 1-9 각 시료의 점막투여에 의한 기초대사량 상승효과

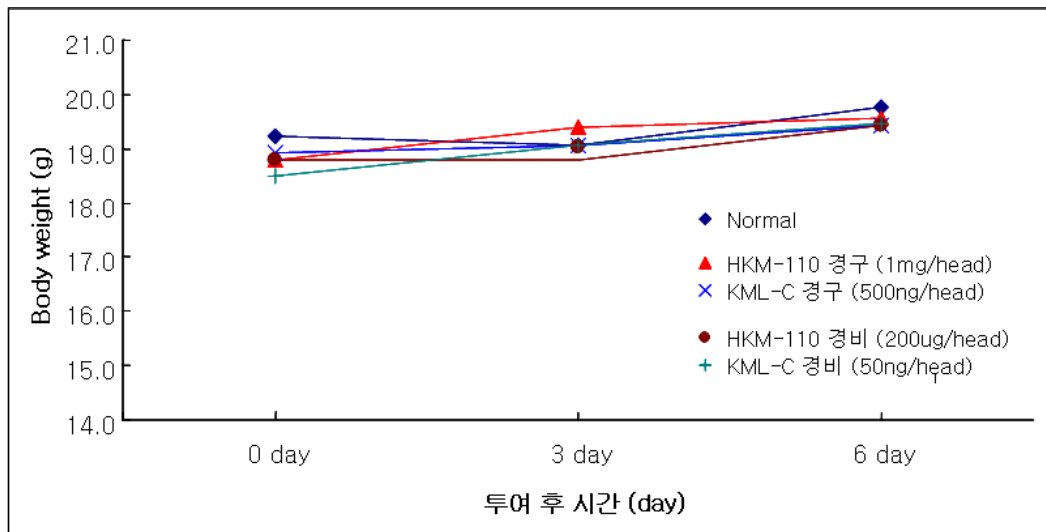


Fig. 1-10 각 시료의 점막투여에 의한 체중변화 시험

Table 1-4 HKM-110 및 KML-C 점막투여에 의한 간독성 시험

투여군	GPT단위 (karmen/ml)	판정
대조군 (정상마우스)	24 ± 3.7	40 정도까지 정상
HKM-110 경구투여 (1000ug/mouse)	27 ± 2.8	정상
HKM-110 경비투여 (200ug/mouse)	30 ± 1.6	"
KML-C 경구투여 (500ug/mouse)	29 ± 3.6	"
KML-C 경비투여 (50ug/mouse)	26 ± 4.7	"



### 3. KMF-WE와 KM-PS의 활성조사

한국산 겨우살이 조다당 추출물(KM-PS)과 한국산 겨우살이 열매(물)추출물(KMF-WE)의 활성을 조사하기 위하여, 이들 추출물을 경구(200ug/mouse) 혹은 경비적(20 ug/mouse)으로 5회 투여한 후 분변 중의 IgA양과 기초대사량을 측정하였으며, 또한 체중변화를 통해 간독성시험을 실시하였다.

그 결과 KM-PS와 KMF-WE는 매일 1회씩 5회 투여하면서 6일째의 장내 IgA량을 분변 중에서 측정한 결과 IgA분비를 증가시키는 것으로 나타났으며(Fig. 1-11), 기초대사량도 유의하게 상승시키는 것으로 확인되었다(Fig. 1-12). 그리고 이들 추출물은 체중감소를 초래하지 않는 것으로 보여져(Fig. 1-13), 비교적 안전성이 인정되는 시료인 것으로 밝혀졌다.

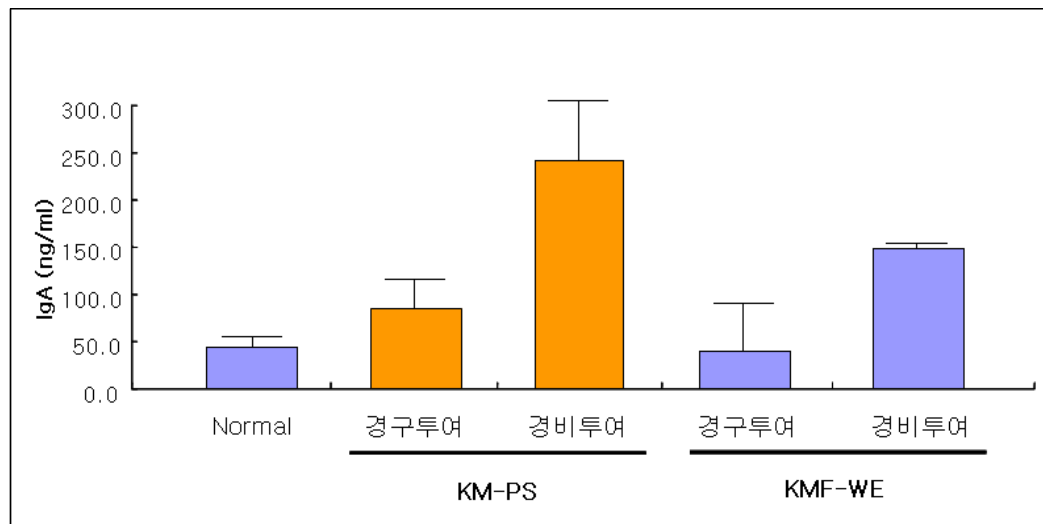


Fig. 1-11 KM-PS 및 KMF-WE의 투여에 의한 분변 중 IgA의 증가

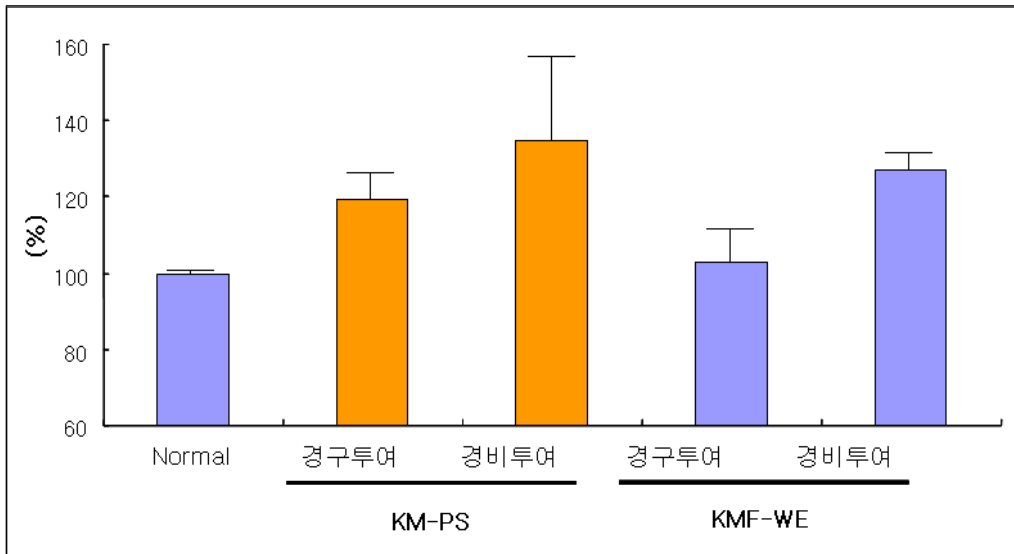


Fig. 1-12 KM-PS 및 KMF-WE 투여에 의한 기초대사량 증가

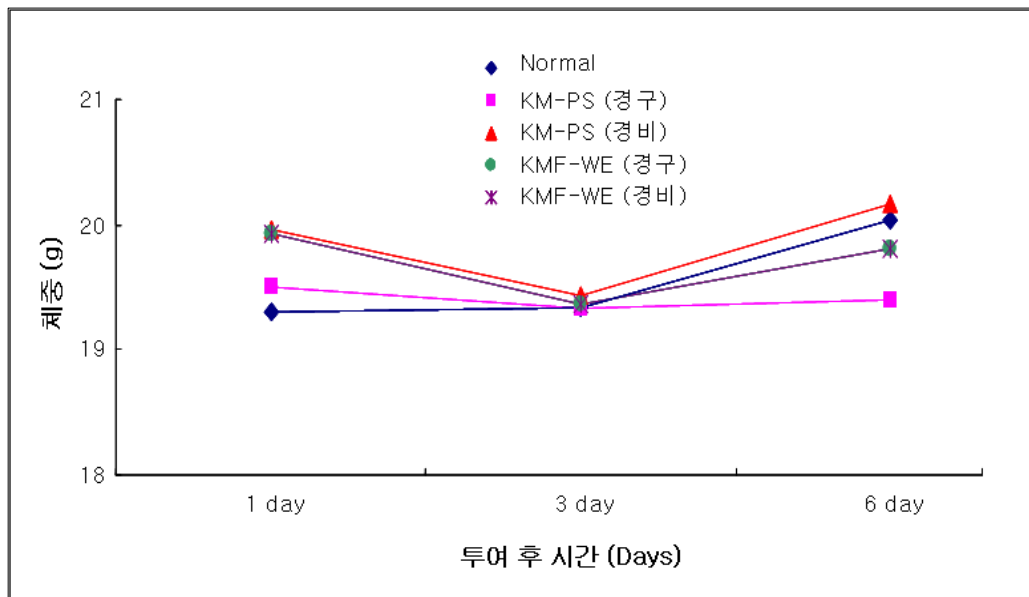


Fig. 1-13 KM-PS 및 KMF-WE 투여에 의한 체중변화

## 제 2 절. 마우스에서의 항원 특이적 면역증강 시험

조류독감이 인플루엔자 바이러스라는 것에 착안하여, 인플루엔자에서 유래한 HA peptide를 항원으로 삼는 경비 유발 접막면역을 확인하였다. 이로부터 경비투여시 특이적 항원의 증가추세를 확인하였으며, 이것은 총 혈청과 질 세척액에서부터 각기 IgG와 IgA의 역가를 측정함으로써 확인하였다. 이에 대한 자세한 실험 결과는 다음과 같다.

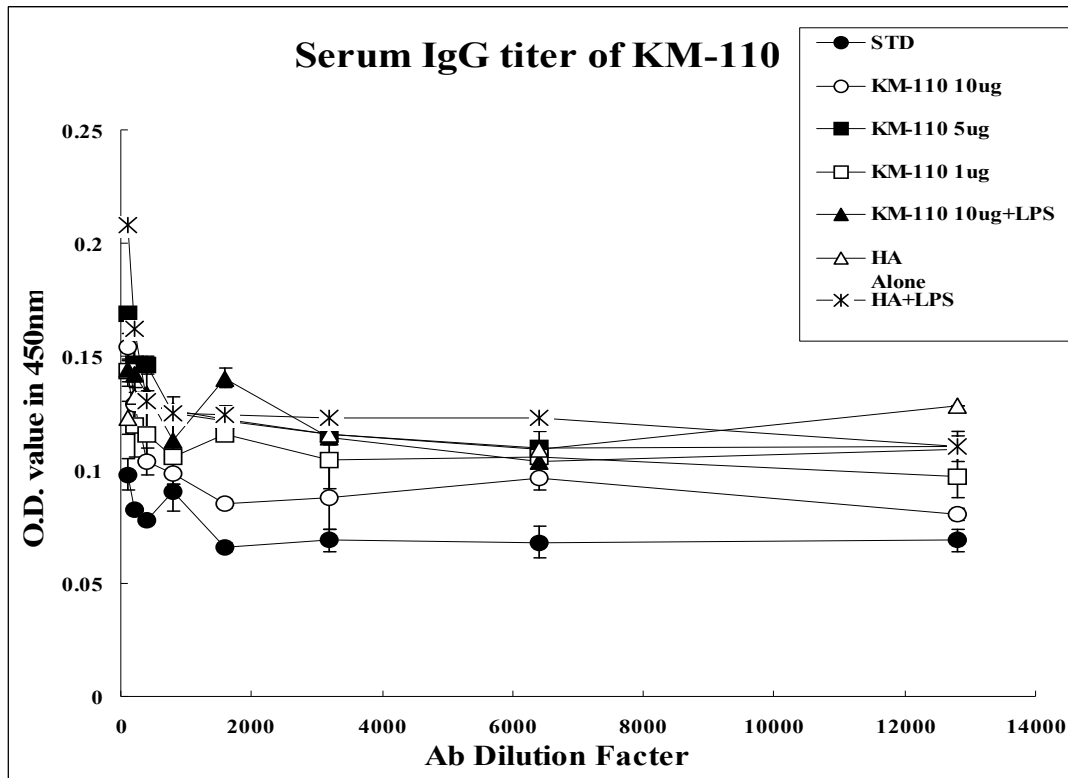


Fig. 2-1 겨우살이 추출물(KM-110)의 경비적 투여에 따른 혈청 내 IgG 함량 변화

그림 2-1은 여러 농도의 KM-110을 면역증강제로 사용하여 2주 간격으로 2회 경비투여 하고, 마지막 투여 1주 후에 혈청 내의 IgG의 역가를 측정하였다. 그림 2-1에서 도출되는 역가는 아래의 표와 같다. 역가는 정상 혈청보다 2배 이상의 OD값을 나타내는 최대 희석비의 역수로 나타내었다.

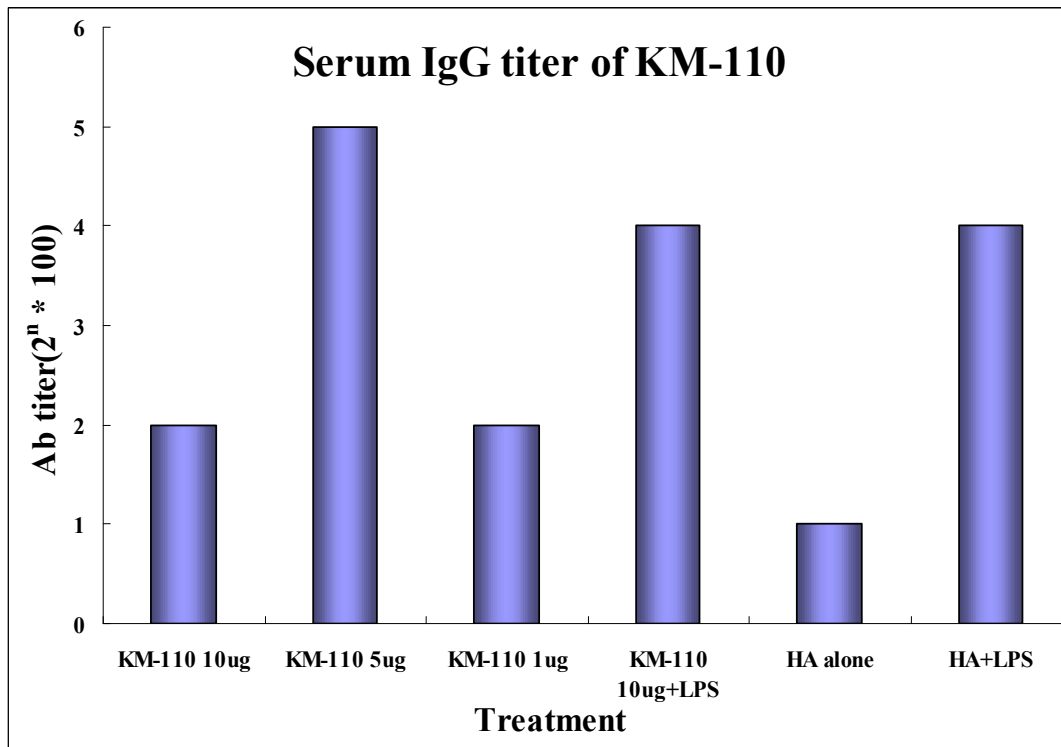


Fig. 2-2 KM-110 추출물 투여에 따른 항체역가 변화

KM-110을 면역증강제로 사용하였을 때 5 $\mu$ g의 농도에서 가장 높은 역가를 나타내었고, LPS를 대조군으로 사용했을 때보다 더 높은 수치를 나타내었다. 하지만 1 $\mu$ g이나 10 $\mu$ g에서의 역가는 농도 의존적인 결과가 나오지 않아 추가실험을 필요로 한다.

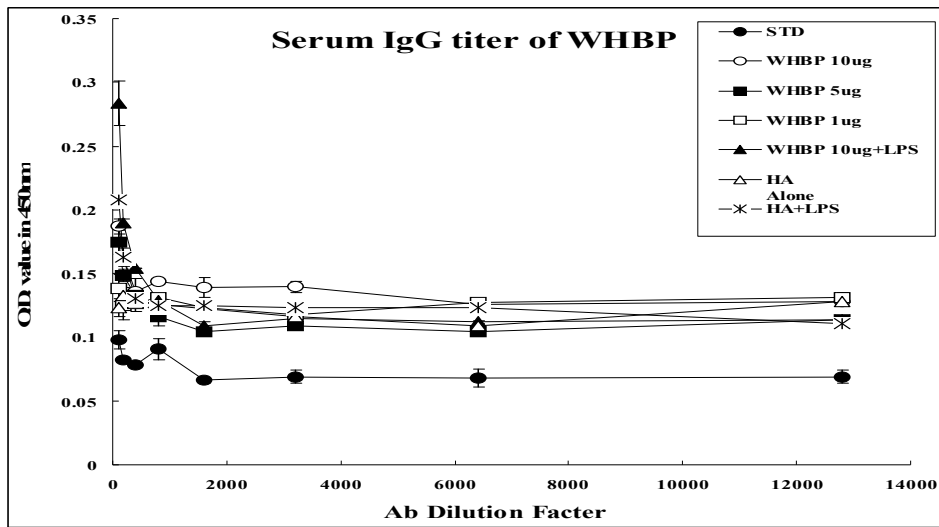


Fig. 2-3 겨우살이 추출물(WHBP)의 경비적 투여에 따른 혈청 내 IgG 함량 변화

상기의 표는 WHBP를 면역증강제로 사용하여 농도별 경비투여를 실시하였을 때 혈청에서의 IgG의 역가를 측정된 것이다. 상기의 표로 도출되는 역가는 아래의 그림과 같다 (Fig. 2-4). 역가는 Fig. 2-2와 동일한 방법으로 산출하였다.

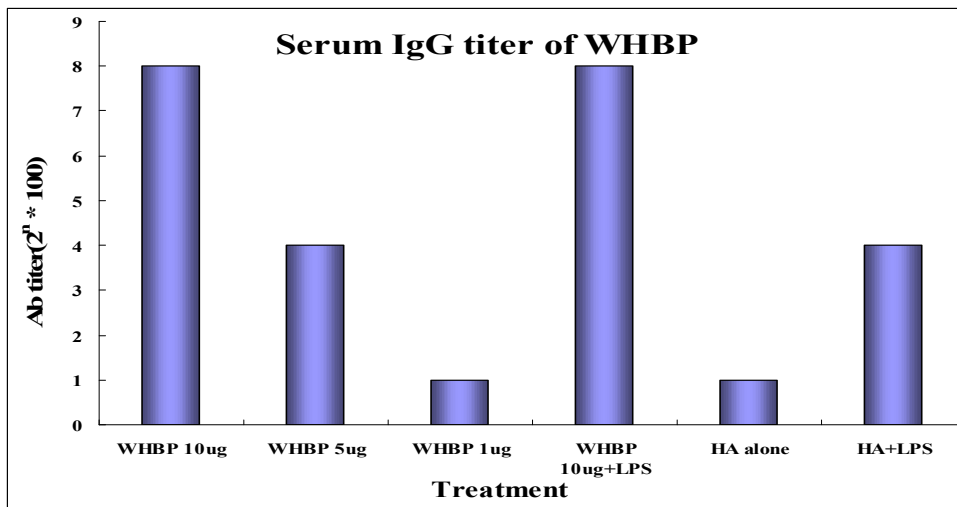


Fig. 2-4 WHBP 추출물 투여에 따른 항체역가 변화

WHBP를 면역증강제로 사용하였을 때 10 $\mu$ g의 농도와 LPS+10 $\mu$ g의 농도에서 가장 높은 역가를 나타내었고, LPS를 대조군으로 사용했을 때보다 더 높은 수치를 나타내었다. 이것은 농도 의존적인 면역증강 효과를 나타내고 있다.

Fig. 2-5 겨우살이 추출물(KM-110)의 경비적 투여에 따른 질 세척액 IgA 함량 변화

Fig. 2-5는 KM-110을 면역증강제로 사용하여 농도별 경비투여를 실시하였을 때 질 세척액에서의 IgA의 역가를 측정하는 것이다. 상기의 표로 도출되는 역가는 아래의 그림과 같다(Fig 2-6). 산출방법은 위의 실험과 동일하다.

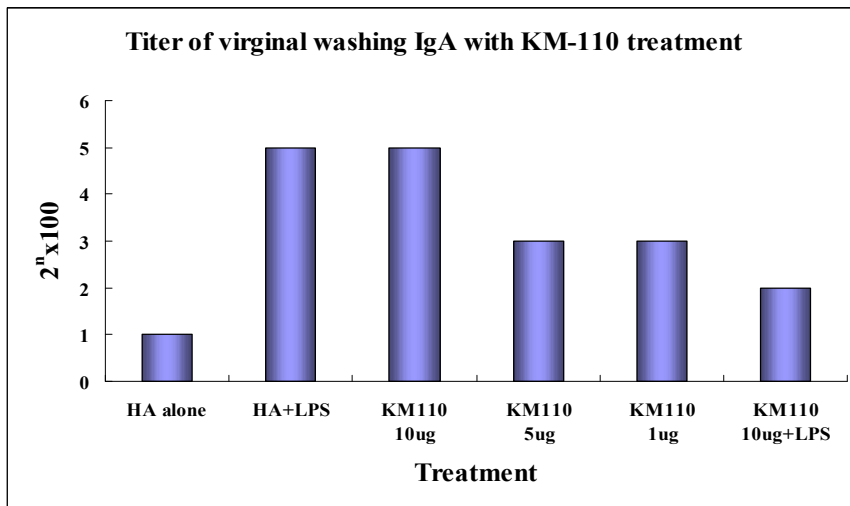


Fig. 2-6 KM-110 추출물 투여에 따른 질 세척액 IgA 항체역가 변화

KM-110을 면역증강제로 사용하였을 때 질 세척액에서의 IgA의 항체 역가는 농도 의존적인 그래프를 나타내며 점막면역이 증강되었음을 볼 수 있으나 LPS와의 synergic 효과는 그다지 높게 나타나지 않았다.

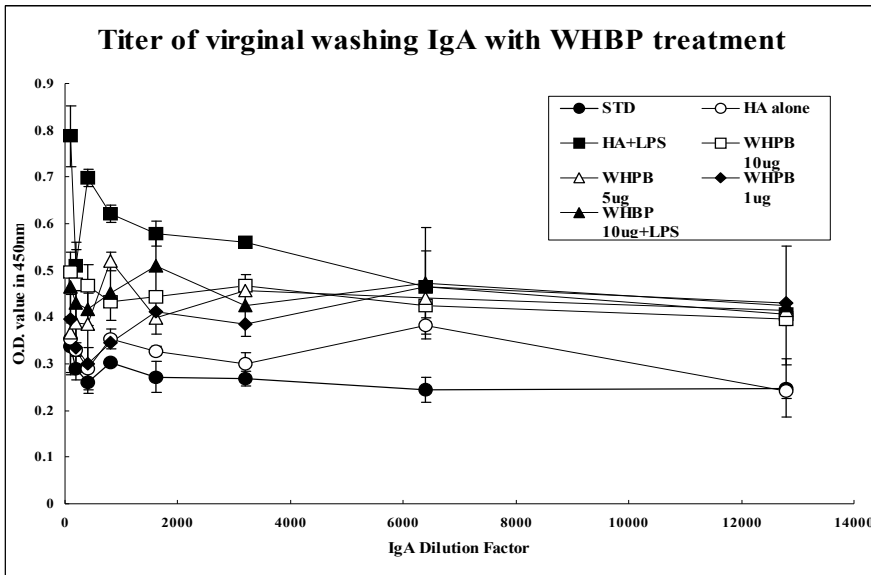


Fig. 2-7 겨우살이 추출물(WHBP)의 경비적 투여에 따른 질 세척액 IgA 함량 변화

Fig. 2-7은 WHBP를 면역증강제로 사용하여 농도별 경비투여를 실시하였을 때 질 세척액에서의 IgA의 역가를 측정하는 것이다. 상기의 표로 도출되는 역가는 아래의 그림과 같다(Fig. 2-8).

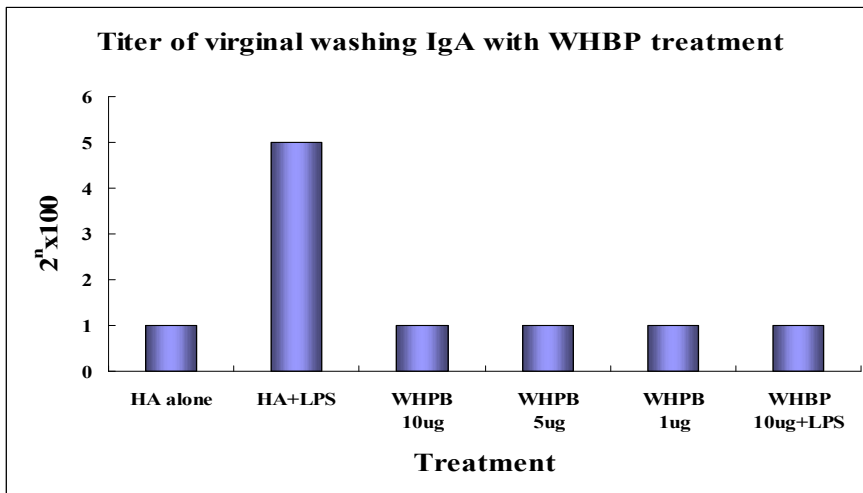


Fig. 2-8 WHBP 추출물 투여에 따른 질 세척액 IgA 항체역가 변화

앞의 결과와는 달리, WHBP의 경우 모든 농도에서 점막면역의 IgA를 증가시키는 효과는 없는 것으로 드러났다. 본 연구에서는 분자적 작용기전은 직접 비교할 수 없으나 Monocyte 또는 Macrophage 유사세포를 이용한 겨우살이 추출물의 면역 기능 조절실험

에서 겨우살이 추출물의 렉틴 성분에 의해 면역기능이 조절된다고 하는 연구보고의 결과는 본 연구의 WHBP를 통한 IgA 분비조절 가능성을 뒷받침해주고 있다(LEE 등, 2007). 따라서 KM-110은 IgA와 IgG 모두를 증가시키나, HWBP는 IgG의 역가만을 증가시키는 것으로 연구 결과를 유추할 수 있다.



### 제 3 절. 닭을 이용한 파이로트 사양시험

#### 1. 육계 사양실험 결과

겨우살이 추출물을 0.5, 1% 수준으로 육계사료에 첨가하였을 때 사료영양소 이용성 및 면역기능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Loss 중 병아리 수컷을 부화 후 3일간 환경에 적응 시킨 후 4주간동안 사료에 첨가급여 한 후, 증체량, 사료효율, PBMC (Pheripheral Blood Mononuclear Cells) 증식도, 혈액 내 ND (Newcastle Disease) 및 닭의 바이러스 질병중 대표적인 질병의 하나이며 바이러스의 특성에 의해 외부환경이나 소독약에 저항성이 강한 전염성 웨브리셔스낭병 또는 감보로(Gumboro Disease)라 불리는 IBD((Infectious Bursal Disease)항원에 대한 항체역가 등을 측정하였다. 사료섭취량 (Fig. 3-1), 증체량 (Fig. 3-2), 사료효율 (Fig. 3-3)에서는 차이를 나타내지 아니하였다. 이것은 겨우살이 추출물 급여를 통한 사료섭취량이나 육계의 생산성에는 1%까지 급여하여도 영양소 이용성에는 특별한 차이를 가져오지 아니하는 것을 알 수 있다.

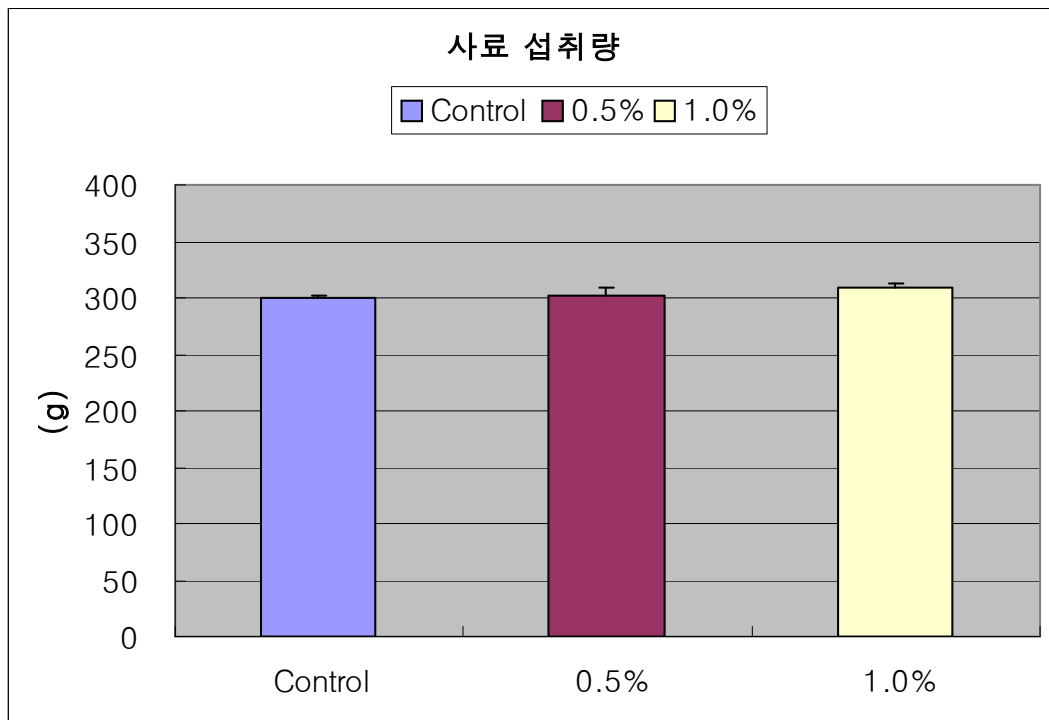


Figure 3-1. 사료 내 겨우살이 추출물 첨가가 육계의 사료섭취량에 미치는 영향

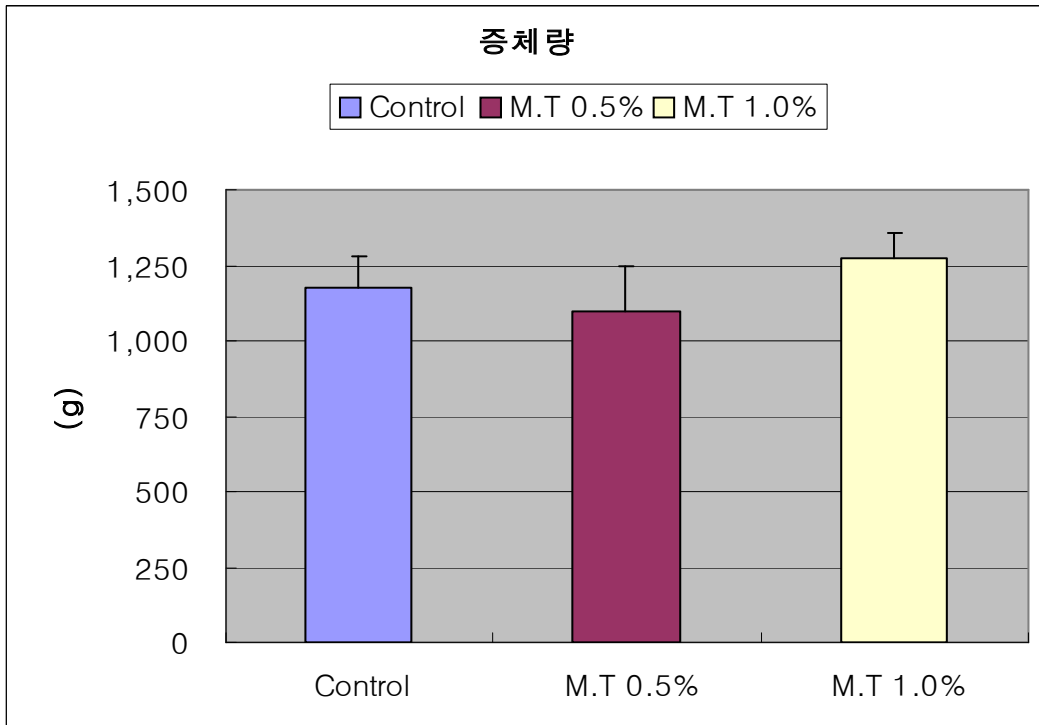


Figure 3-2. 사료 내 겨우살이 추출물 첨가가 육계의 사료섭취량에 미치는 영향

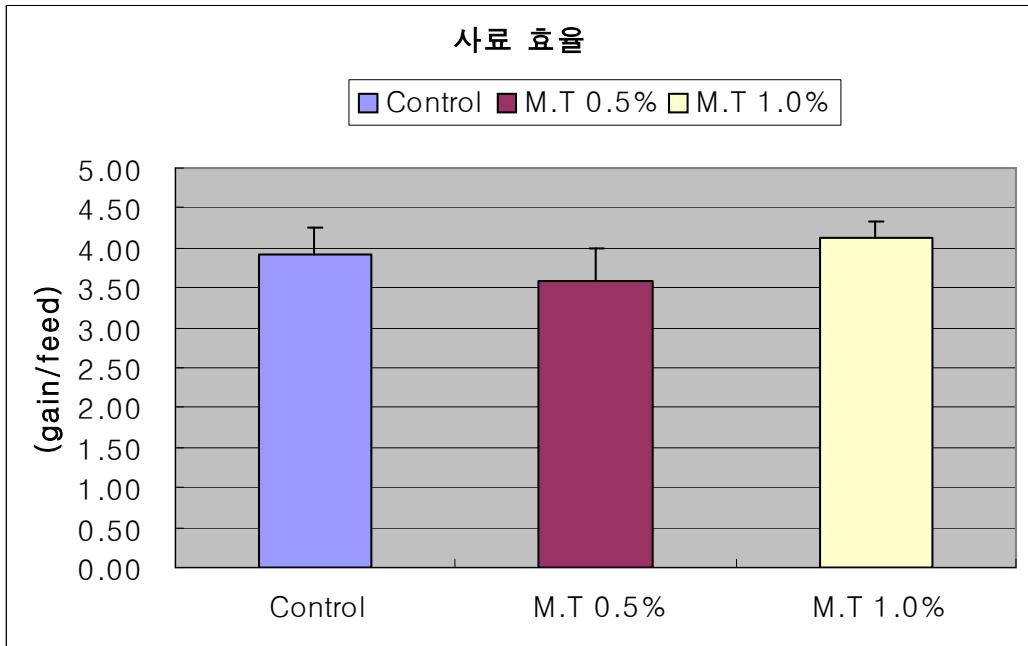
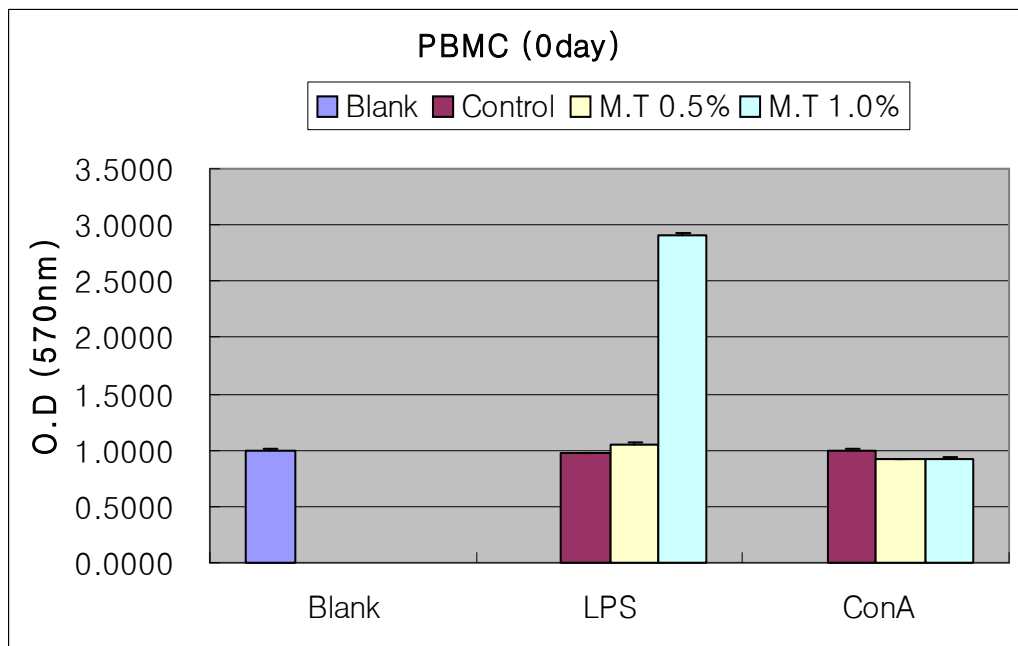


Figure 3-3. 사료 내 겨우살이 추출물 첨가가 육계의 사료효율에 미치는 영향

한편 영양소이용성에는 차이를 나타내지 않는 가운데 면역기능 조절 능력을 조사한 결과를 아래 그래프에 나타내었다(Fig. 3-4, Fig. 3-5). 병아리에 실험사료를 급여하면서 ND와 IBD virus 감염을 유도한 후 겨우살이 추출물 급여에 따른 PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells)와 비장세포 증식도를 조사함으로써 사료 중 겨우살이 급여가 면역반응에 미치는 영향을 평가하였다. PBMC는 70-80%의 T 림프구, 15-20%의 B 림프구 및 10%의 단구세포(monocyte)와 NK 세포로 구성되며(Cochet등, 1998), 림프구의 증식 연구를 비롯한 많은 면역학연구에서 이용되어지고 있다. 비장은 적비수(red pulp)와 백비수(white pulp)로 구성되며, 백비수에는 T 림프구 및 B 림프구등의 면역세포들로 채워져 있다. 따라서 비장세포의 증식도는 PBMC의 증식도와 함께 랫트(Lin등, 1997)와 육계(Takahashi등, 1999; Kramer등, 2001)등 다양한 동물에서 림프구들에 의한 면역능력과 싸이토카인 연구(Stephan등, 2002)등에 이용되어지고 있어 본 연구에서 면역기능 조절효과를 위해 겨우살이추출물 급여에 따른 PBMC 및 비장세포 증식도를 조사한 것은 중요한 기초자료가 되리라 판단된다.



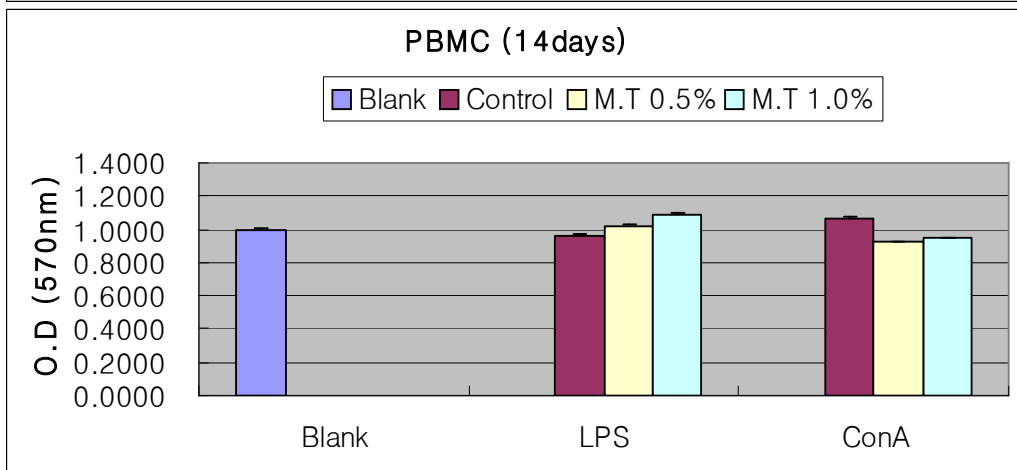
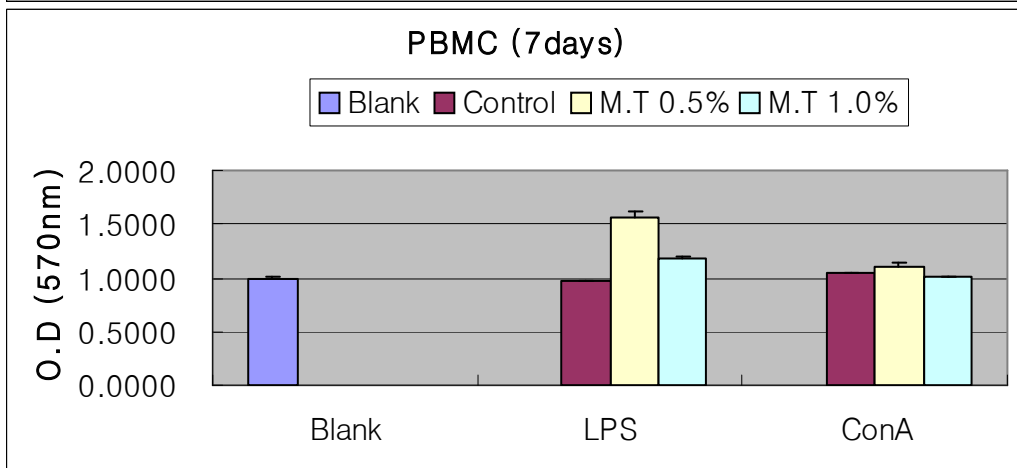
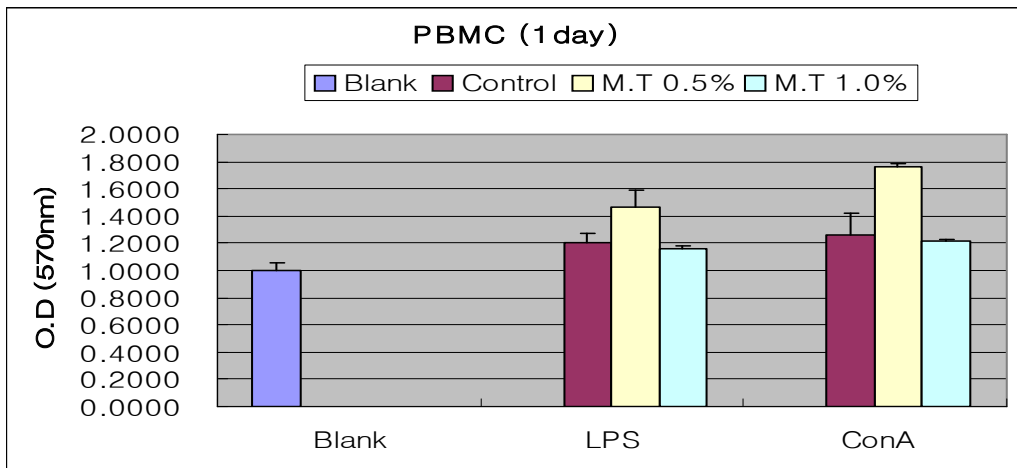
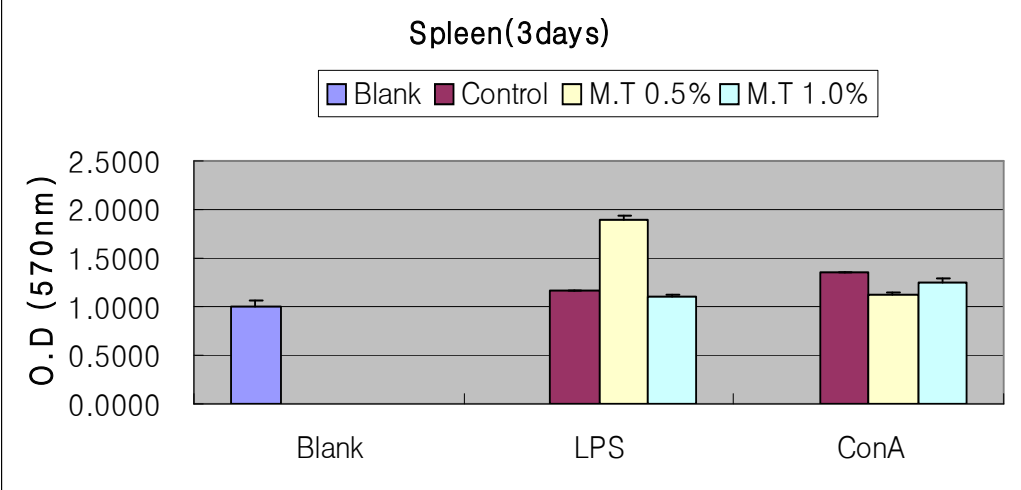
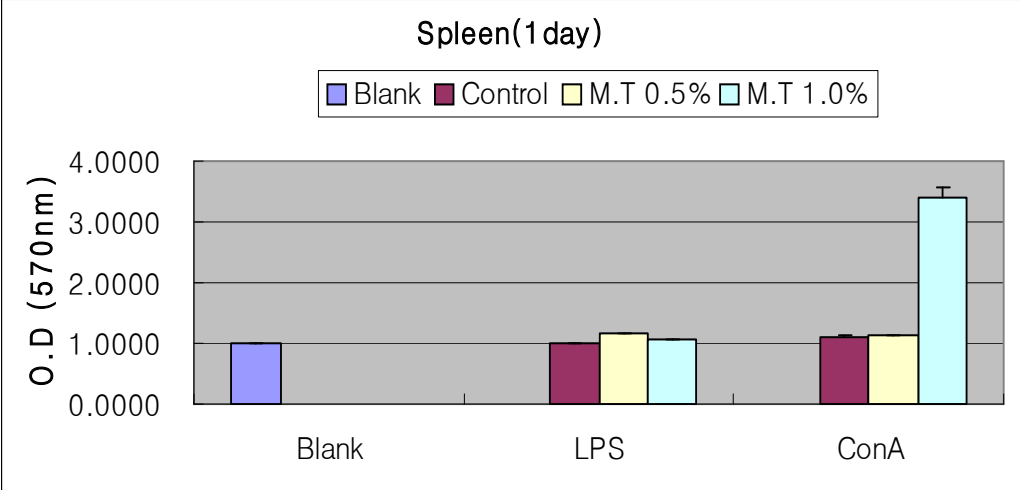
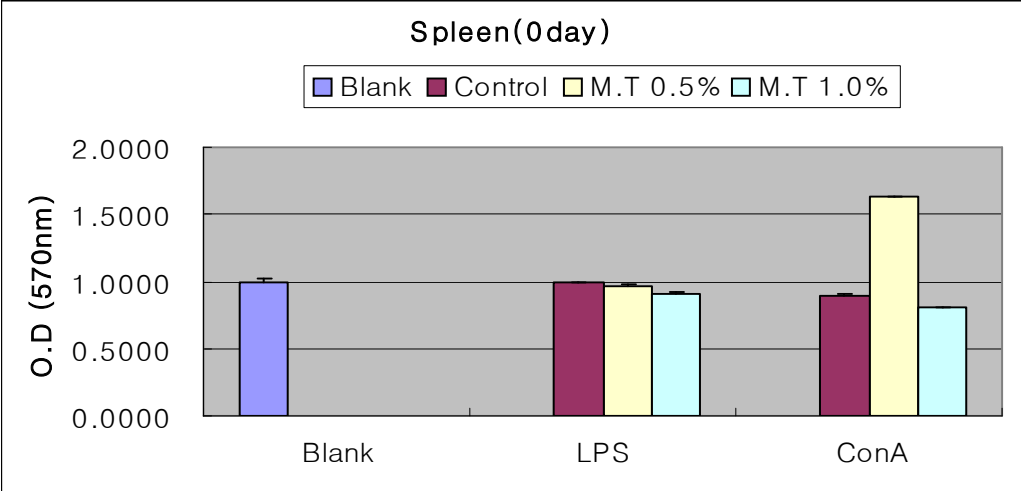


Fig. 3-4 겨우살이 추출물 급여에 따른 PBMC 증식도 변화



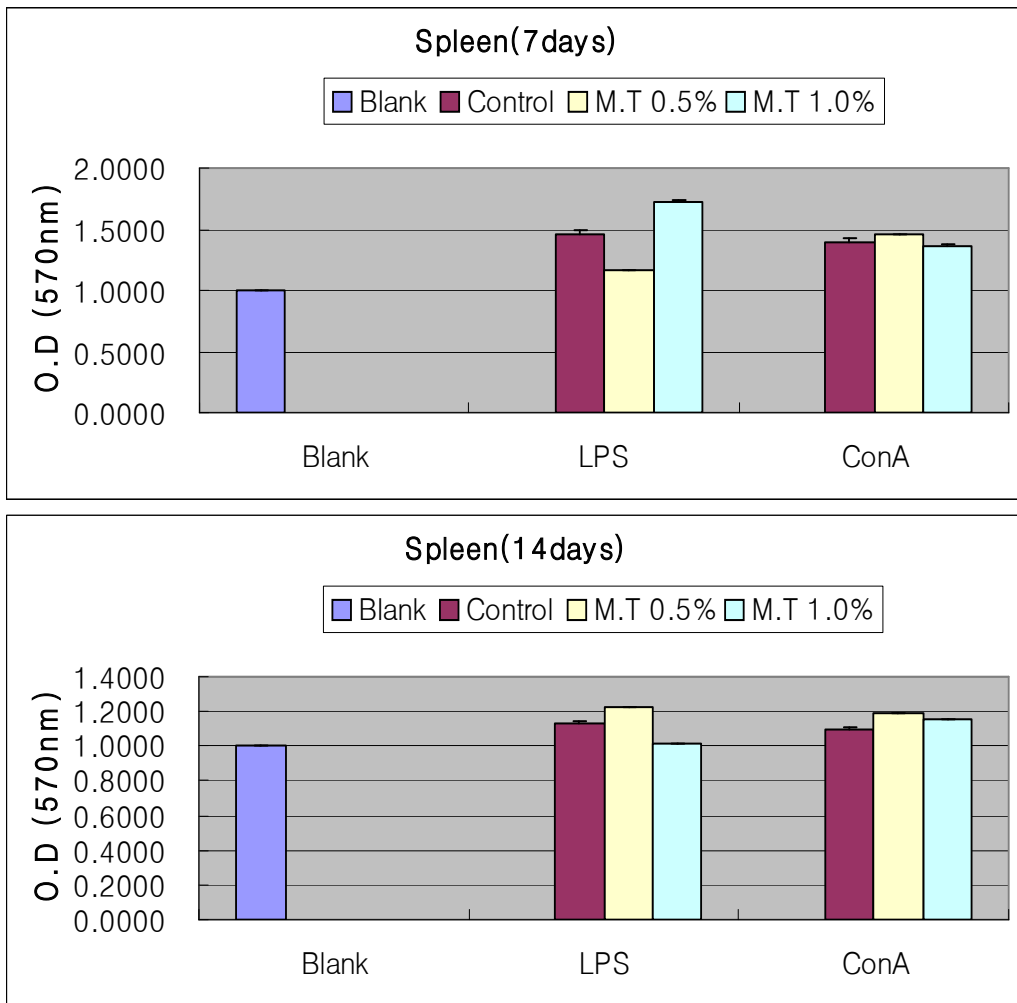


Fig. 3-5 겨우살이 추출물 급여에 따른 splenocytes 증식도 변화

본 연구에서 겨우살이 0.5% 첨가는 ND/IBD 감염 후 7일째에 LPS와 ConA로 자극한 PBMC의 증식도를 겨우살이가 첨가되지 않은 사료를 급여한 대조구에 비해 유의하게 증가시켰다( $p < 0.05$ ). 암 환자에 있어서 겨우살이 추출물 투여가 혈액 내 cytokine 수준이 변화하는데 이러한 cytokine 분비 조절은 PBMC 증식도와 밀접한 상관관계가 있다는 연구보고와 일치하는 결과이다(Kovacs 등, 2000). 또한 육용계 사료 중 겨우살이 0.5% 첨가로 ND/IBD 감염후 14일째에 LPS와 ConA로 자극한 비장세포의 증식도가 대조구에 비해 유의하게 증가하였다.

본 연구에서 PBMC와 비장세포 증식도 측정에 사용된 Mitogen중 Concanavalin A는 T 림프구의 증식을 자극하는 물질이며, LPS는 B 림프구의 증식을 자극한다고 알려져

있다(Cochet 등, 1997). 따라서 사료 중 겨우살이 0.5% 첨가는 ND와 IBD 감염 시 육계에서 T 림프구의 증식을 증가시켜 세포성 면역(cell-mediated immunity)을 증강시키는 한편 B 림프구의 증식을 높여 항체에 의한 면역인 체액성 면역(humoral immunity)을 증강시킨다는 것을 나타낸다. 또한 겨우살이 0.5% 첨가로 인한 B 림프구의 증식 증가는 겨우살이 0.5% 첨가 시 ND와 IBD에 대한 항체의 역가 증가와 관련되는 것으로 추정된다.

한편, ND 및 IBD 항원을 주입하고 4주후 혈액 내 ND 및 IBD 항체역가를 조사한 결과를 아래 그림에 나타내었다(Fig. 3-6, Fig. 3-7). 혈청을 분리하여 8배로 희석한 후 역가를 분석한 결과, 사료 내 겨우살이를 0.5% 수준으로 첨가 급여한 결과 ND의 항체역가가 겨우살이 무첨가 대조군에 비해 증가한 반면 1% 수준으로 급여한 군에서는 오히려 낮아져 사료영양소의 이용성면이나 면역기능 조절을 위해서는 0.5% 이상 급여할 필요가 없는 것으로 조사되었다.

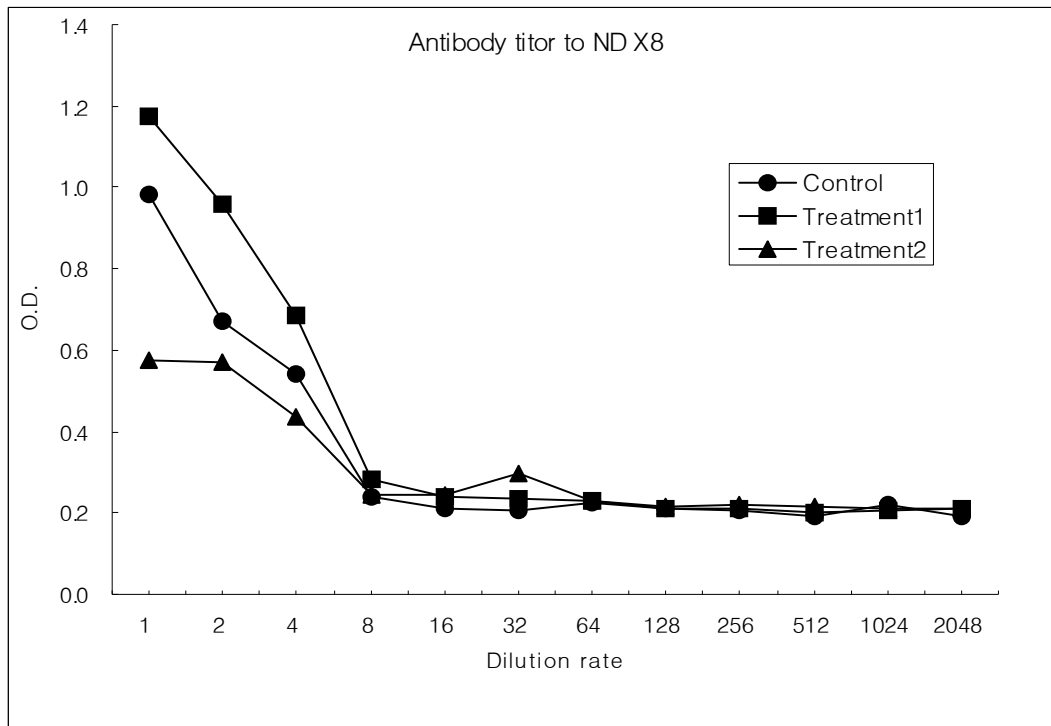


Fig. 3-6 겨우살이 추출물 급여에 따른 ND 항체 역가 변화

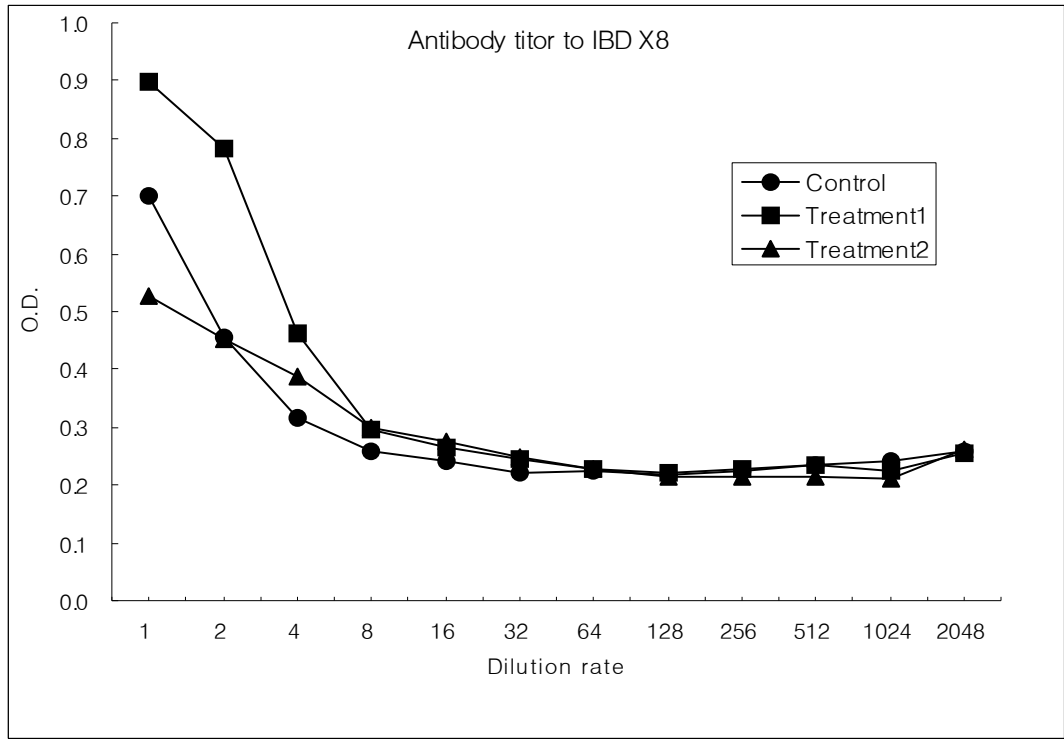


Fig. 3-7 겨우살이 추출물 급여에 따른 IBD 항체 역가 변화



## 2. 산란계 사양실험 결과

산란계를 이용한 사양실험 결과를 아래 그림에 나타내었다. 겨우살이 추출물의 첨가와 더불어 Synergic 효과를 얻기 위한 부영제를 점토광물질 발효산물을 이용하였을 때의 영향을 동시에 조사하기 위하여 산란계 사료에 0.5% 수준의 점토광물질 발효산물(T1), 겨우살이 추출물(T2) 및 점토광물질 발효산물+겨우살이추출물 (T3)을 각각 첨가 급여하고 6주간에 걸쳐 사양실험을 실시하였다. 이때 실험사료 급여에 따른 면역기능 조절효과를 조사하기 위하여 E. Coli 88 균주를 항원으로 근육주사한 후 계란의 노른자로 생산 배출하는 IgY를 분리 추출하여 이들의 역가를 조사하였다.

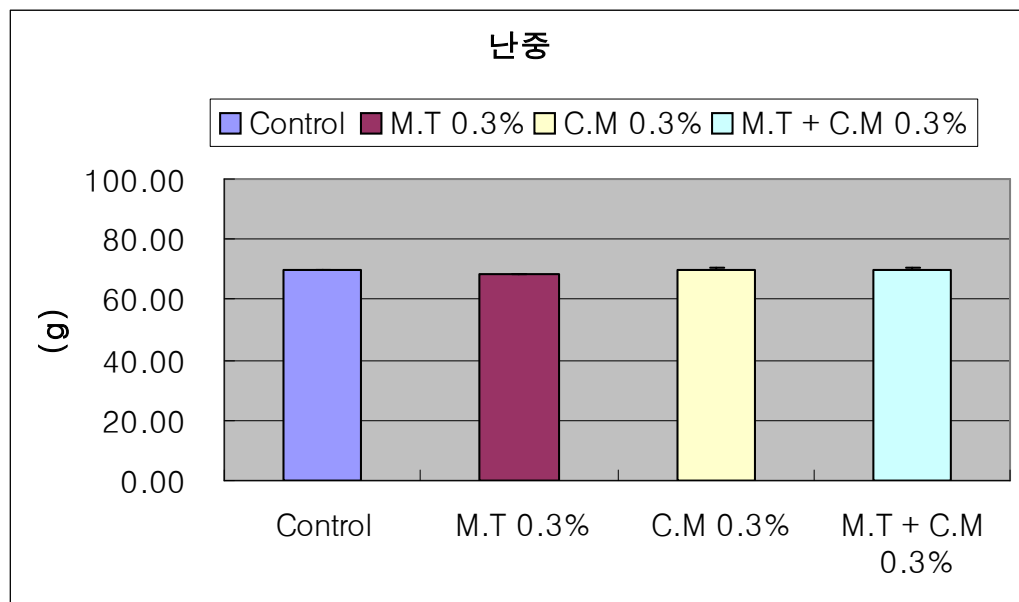


Fig. 3-8 겨우살이 추출물 급여가 산란계의 난중에 미치는 영향

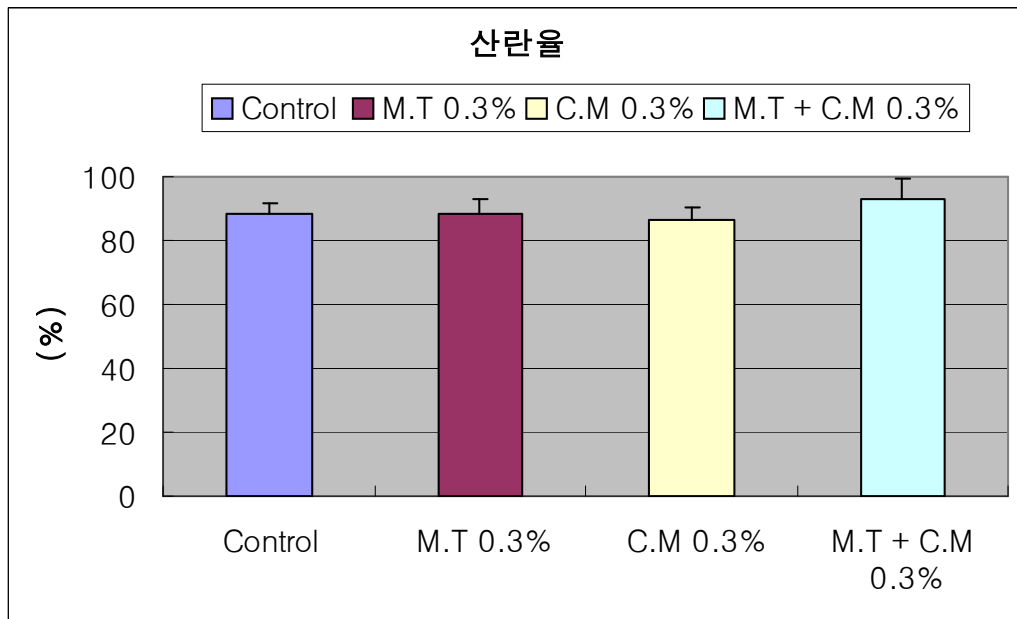


Fig. 3-9 겨우살이 추출물 급여가 산란계의 산란율에 미치는 영향

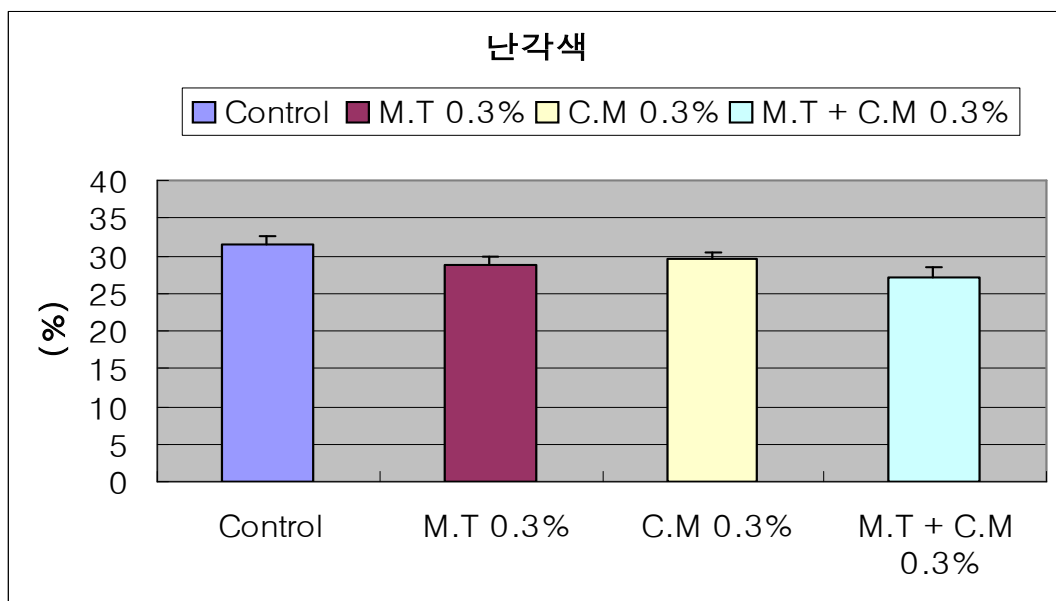


Fig. 3-10 겨우살이 추출물 급여가 산란계의 난각색에 미치는 영향

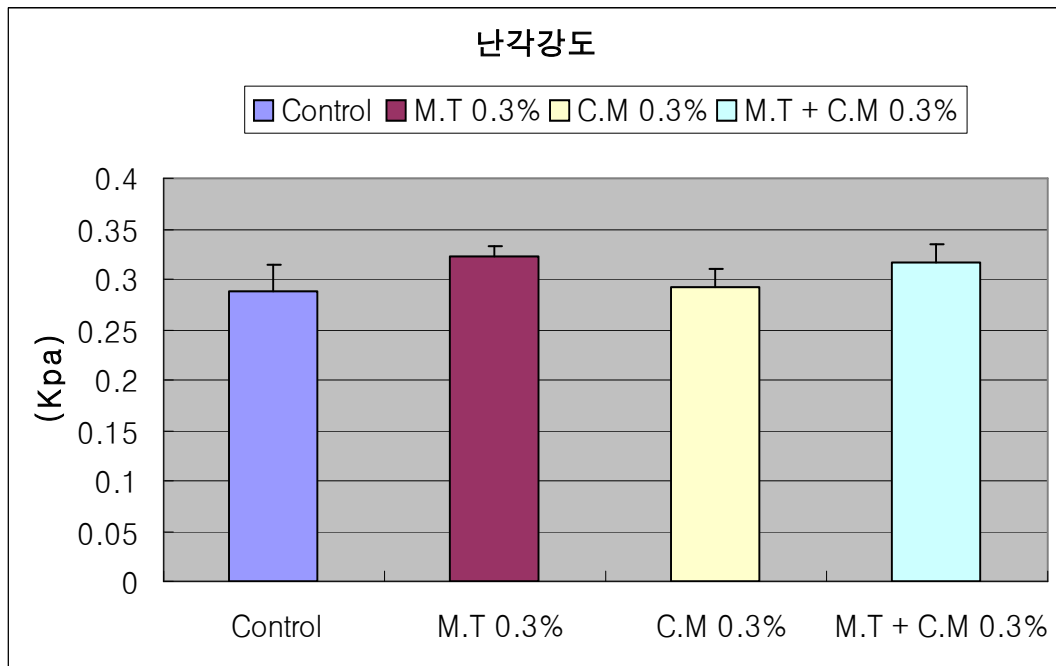


Fig. 3-11 겨우살이 추출물 급여가 산란계의 난각강도에 미치는 영향

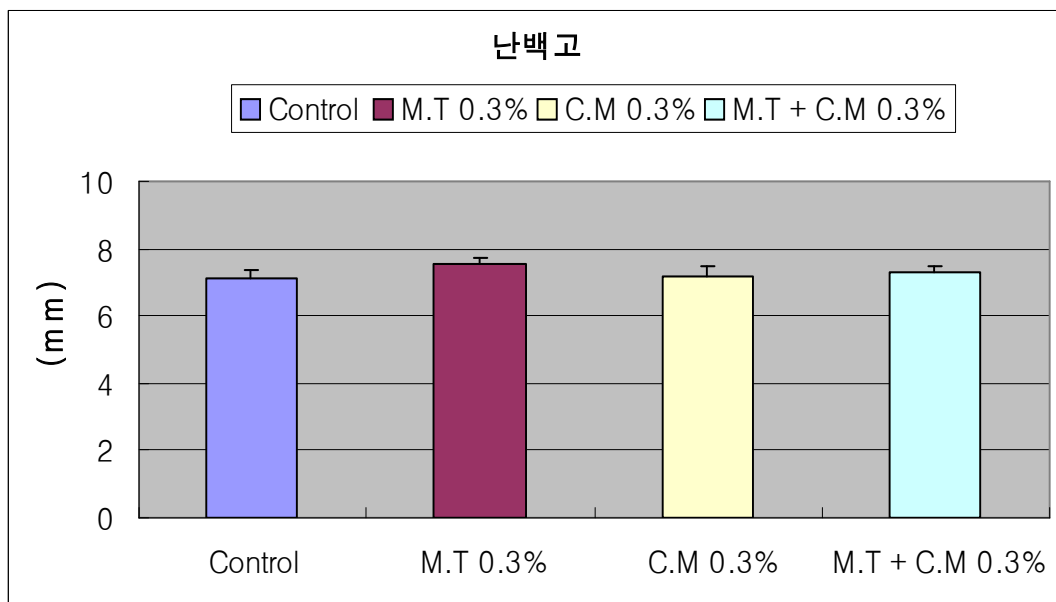


Fig. 3-12 겨우살이 추출물 급여가 산란계의 난백고에 미치는 영향

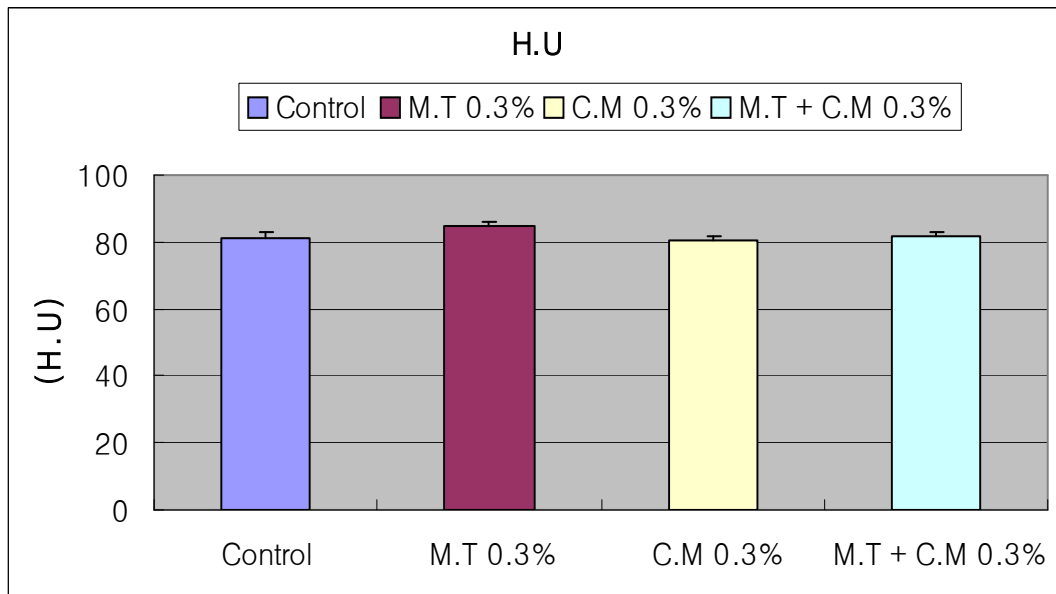


Fig. 3-13 겨우살이 추출물 급여가 산란계의 신선도에 미치는 영향

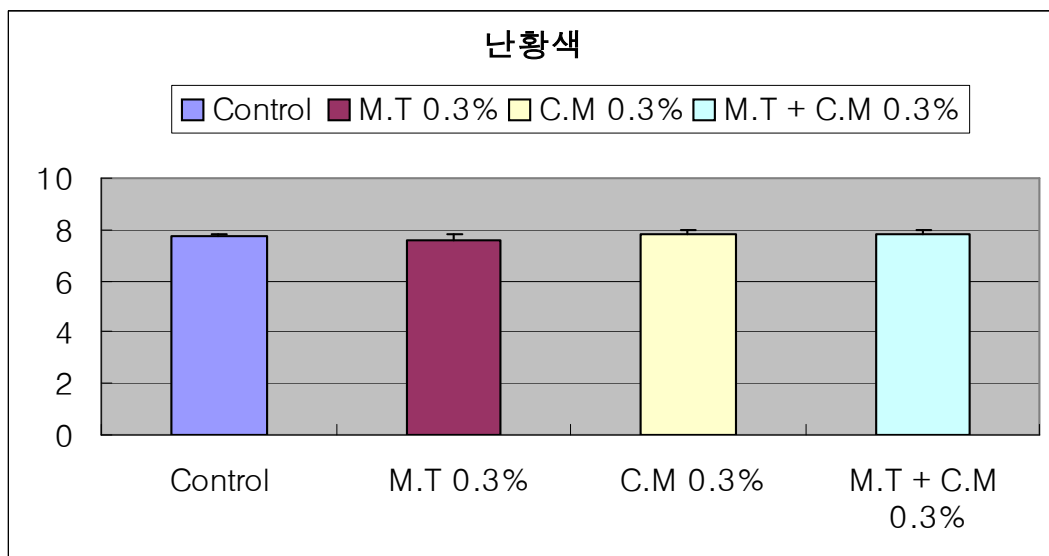


Fig. 3-14 겨우살이 추출물 급여가 산란계의 난황색에 미치는 영향

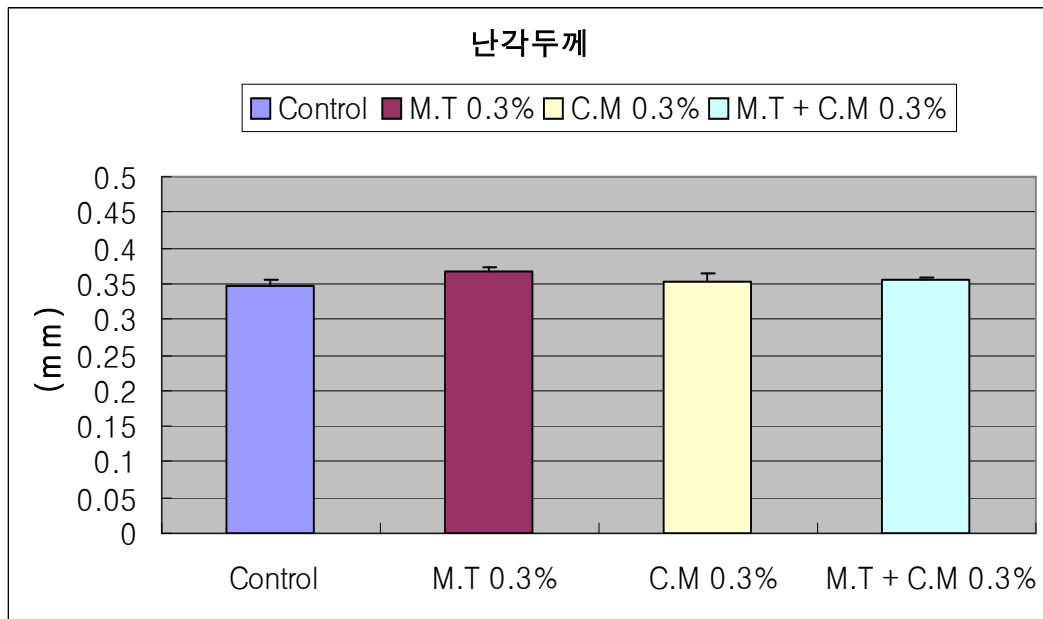


Fig. 3-15 겨우살이 추출물 급여가 산란계의 난각강도에 미치는 영향

산란율(Fig. 3-9)이나 난각강도(Fig. 3-11)는 겨우살이 추출물 첨가 급여군에서 대조군에 비해 차이는 없었으나 점토광물질과 혼합 급여하였을 때 유의하게 개선되는 결과를 나타내어 겨우살이 추출물 첨가제를 개발할 경우 미량광물질이 함께 보완되면 매우 효능이 증가할 것으로 기대되었다. 이하 계란의 난백고(Fig. 3-12), 신선도(Fig. 3-13), 난각두께(Fig. 3-15)에서도 유사한 결과를 나타내어 산란생산성 및 난질에는 겨우살이 추출물 단독으로는 대조군과 차이를 보이지 않지만 미량광물질이 첨가되면 개선되는 것으로 나타나 산업화를 위한 주요한 기초자료를 얻었다고 할 수 있다.

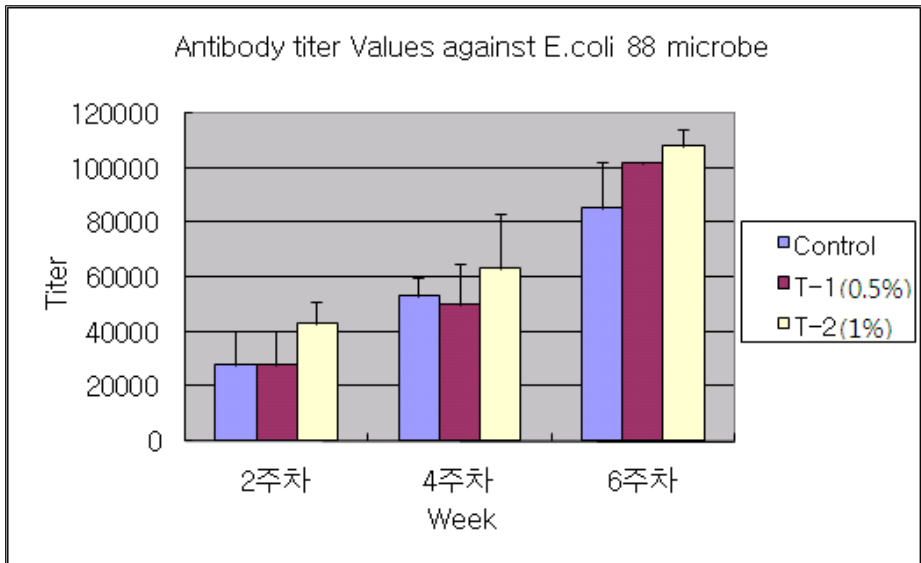


Fig. 3-16 사료 내 겨우살이 추출물 급여가 난황의 E. Coli 88 균주에 대한 항체역가

실험사료 급여에 따른 면역기능 조절효과 중 항체생산능력을 조사하기 위하여 E. Coli 88 균주를 항원으로 근육주사한 후 계란의 노른자로 생산 배출하는 IgY를 분리 추출하여 이들의 역가를 조사하였다.

항원 주입 후 2주, 4주 및 6주차의 난황 내 IgY의 E. Coli 88에 대한 항체역가는 겨우살이 추출물 투여농도를 의존적으로 대조군에 비해 0.5% 및 1.0%의 겨우살이 추출물 급여군에서 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3-16).

## 제 4 절. 한국산 겨우살이에 의한 점막면역강화 기전해석

본 연구에서는 한국산 겨우살이 추출물에 의한 점막면역 강화 활성의 작용기전을 해석하기 위한 목적으로, 마우스에 influenza virus hemagglutinin(HA)단백질과 함께 전년도의 연구결과에서 특이적인 점막면역기능을 향상시키는 것으로 확인된 한국산 겨우살이의 렉틴(KML-C)을 경비적으로(intranasal) 투여하여, 이 항원에 대한 체액성 면역 및 세포성 면역의 관점에서 면역증강 작용을 조사하였다. 또한 일반적으로 점막면역 강화 활성을 지니는 것으로 알려진 Cholera Toxin chain-B (CTB)을 사용하여 KML-C와의 활성비교를 행하였다.

이 실험에 사용된 항원과 각 시료는 Table 4-1의 조건에 맞추어 준비하였다.

Table 4-1. 특이적 점막면역강화 활성 기전해석을 위한 재료준비

	HA(100ug/ml)	PBS	CT(100ug/ml)	KML-C(10ug/ml)
PBS	-	20ul	-	-
HA	10ul	10ul	-	-
CT	10ul	-	10ul	-
KML-C	10ul	-	-	10ul

항원: HA (1ug/head), Adjuvant: CTB (1ug/head) or KML-C (0.1ug/head)

### 1. KML-C 경비투여에 의한 항체반응 상승효과 해석

HA+KML-C 혹은 HA+CTB를 2주 간격으로 경비투여하면서 면역개시 1주, 3주, 8주 후의 혈액과 질액(vaginal fluid)을 채취하여 항원 특이적인 immunoglobulin G(IgG)와 A(IgA)의 항체가를 ELISA를 통해 조사하였다. 먼저 혈액 내의 HA특이적인 IgG titer 값에 있어서는 면역개시 1주 후의 혈청에서는 KML-C 및 CTB 모두 HA에 대한 항체가를 현저히 상승시키는 효과가 관찰되었다(Fig. 4-1). 하지만 면역개시 3주 및 8주째의 혈청에 있어서는 항체가의 평균치는 KML-C+HA와 CTB+HA 모두 HA만을 면역한 마우스보다 높은 수치를 나타내었으나, 통계학적 유의차는 확인되지 않았다. 한편 KML-C와 CTB 간의 활성비교에 있어서는 두 adjuvant는 항원 특이적인 IgG를 유도하는 작용은 거의 동등한 것으로 나타났다.

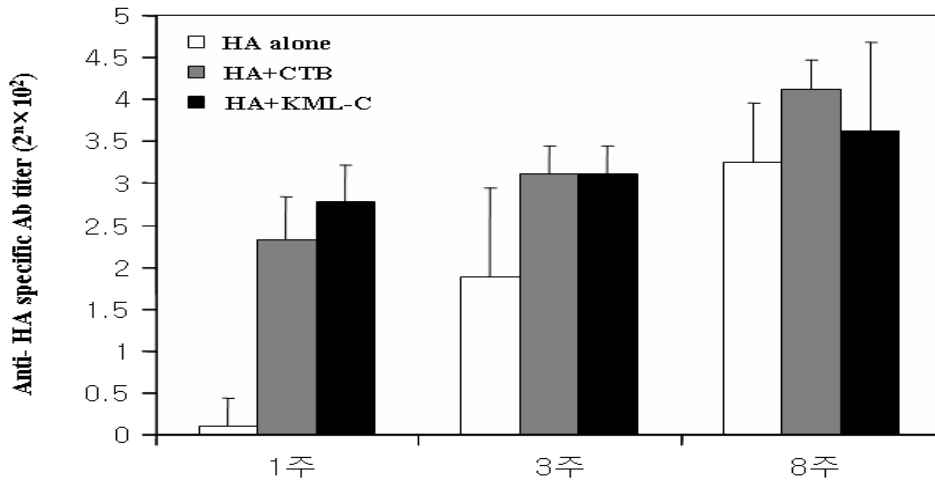


Fig. 4-1 KML-C 및 CTB에 의한 HA 특이적 혈청 IgG의 유도활성

KML-C 및 CTB의 경비투여에 따른 점막조직에서의 항원 특이적인 항체유도 활성을 조사하기 위하여 질액 중의 HA-specific IgA를 ELISA를 통해 정량하였다. 혈청 중의 IgG와는 달리, 질액 중의 IgA에 있어서는 면역개시 3주째에 항체가의 상승이 관찰되었다(Fig. 4-2). 혈청 IgG의 경우와 마찬가지로 질액 중의 IgA에 있어서도 KML-C와 CTB 간의 항체유도 활성의 차이는 관찰되지 않았다. 하지만 CTB의 투여량이 1 ug/head이고, KML-C의 투여량이 0.1ug/head인 것을 감안하면 KML-C는 매우 낮은 투여량에서 활성을 나타내는 것으로 사료된다.

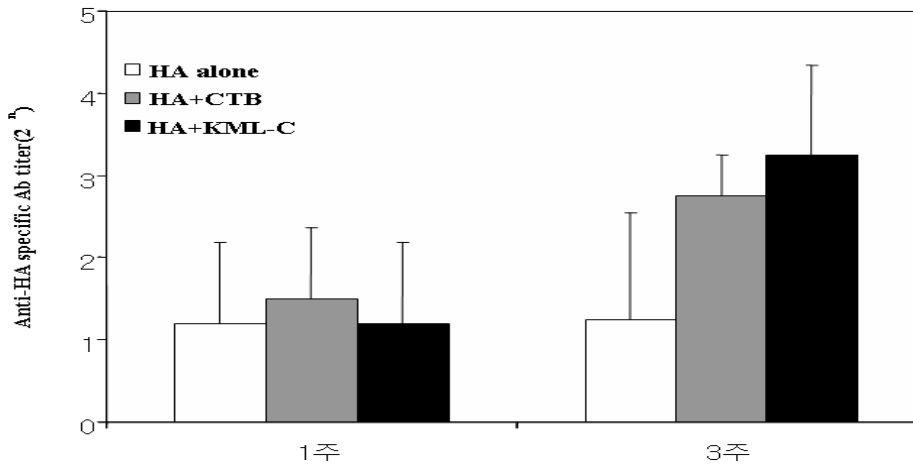


Fig. 4-2 KML-C 및 CTB에 의한 HA 특이적 질액 내 IgA의 유도활성



한편 이전의 마우스를 이용한 연구결과에 의하면, CTB를 항원과 함께 점막조직을 통해 면역하는 경우, 항체 중에서도 특히 IgG1의 유도가 상대적으로 크게 증가하는 것으로 보고되었으며, 이전의 연구결과에서 보면 유럽산 겨우살이 렉틴(ML-1)과 KML-C도 역시 그러한 경향이 있는 것으로 나타났다(data not shown). 한편 B세포로부터 IgA의 분비를 촉진하는 자극(예로서 TGF- $\beta$ 와 IL-5에 의한 자극)은 IgG2b의 분비도 촉진한다는 보고가 있어, 본 연구에서도 HA특이적인 IgG2b를 비교하였다. 그 결과, KML-C와 CTB 모두 항원 특이적인 IgG2b를 상승시키는 효과가 관찰되었으며(Fig. 4-3), 이들 adjuvant는 거의 동등한 수준의 활성을 지니는 것으로 확인되었다.

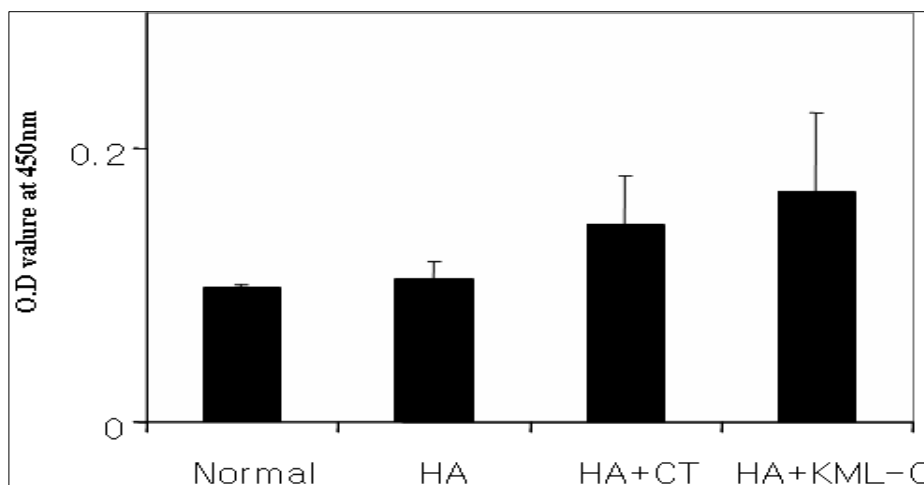


Fig. 4-3 KML-C 및 CTB에 의한 HA 특이적 질액 내 IgG2b의 유도활성

## 2. KML-C 경비투여에 의한 세포성 면역 증강활성 해석

KML-C의 경비 투여에 의한 항원 특이적인 세포성 면역반응 유도활성을 측정하기 위하여 면역개시 3주째에 마우스의 비장을 채취하여 *in vitro*에서 항원 혹은 mitogen(LPS 또는 ConA)으로 면역세포를 재자극하여 세포증식반응을 조사하였다. 그 결과 HA항원으로 재자극하는 경우에 있어서 KML-C가 항원 특이적인 면역세포 증식반응을 현저히 상승시키는 것으로 나타났다(Fig. 4-4). ConA나 LPS로 재자극한 경우에 있어서는 KML-C를 HA와 함께 투여한 그룹에서 가장 높은 활성이 관찰되었으나, 이들 mitogen에 의한 비특이적 활성화 유도에서는 항원 특이적인 활성화보다 증강효과가 크게 저하된 것으로 확인되었다. 즉 KML-C를 항원과 함께 경비투여 함으로서 항원 특이적인 세포성 면역의 증가를 유도할 수 있는 것으로 판단되었다.

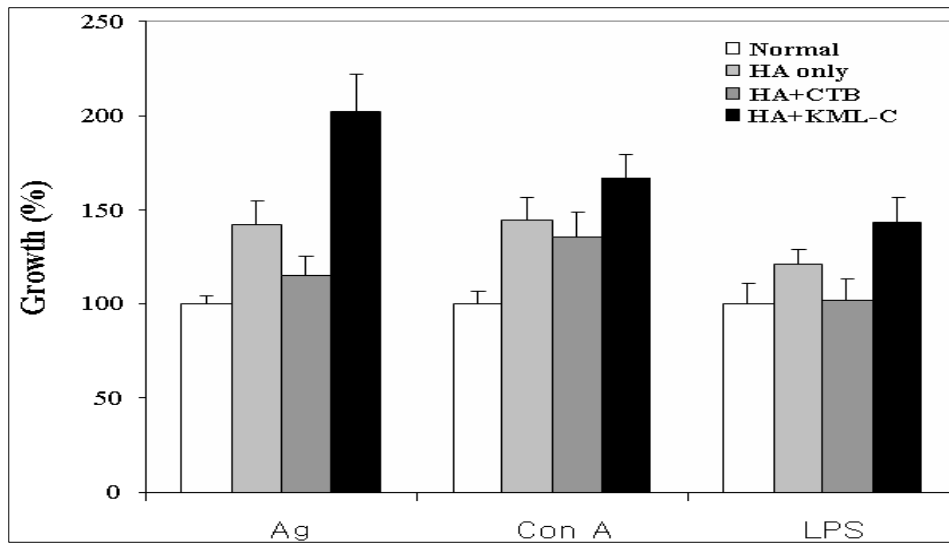


Fig. 4-4 KML-C에 의한 항원 특이적인 면역세포(Splenocytes) 증식반응 활성화

한편 Fig. 4-4의 결과를 보다 구체적으로 확인하기 위하여 FACS를 이용하여 bromodeoxyuridine (BrdU)에 의한 세포증식 반응을 측정된 결과에 있어서도 KML-C+HA 투여군에서 가장 높은 세포증식 반응이 관찰되었다(Fig. 4-5).

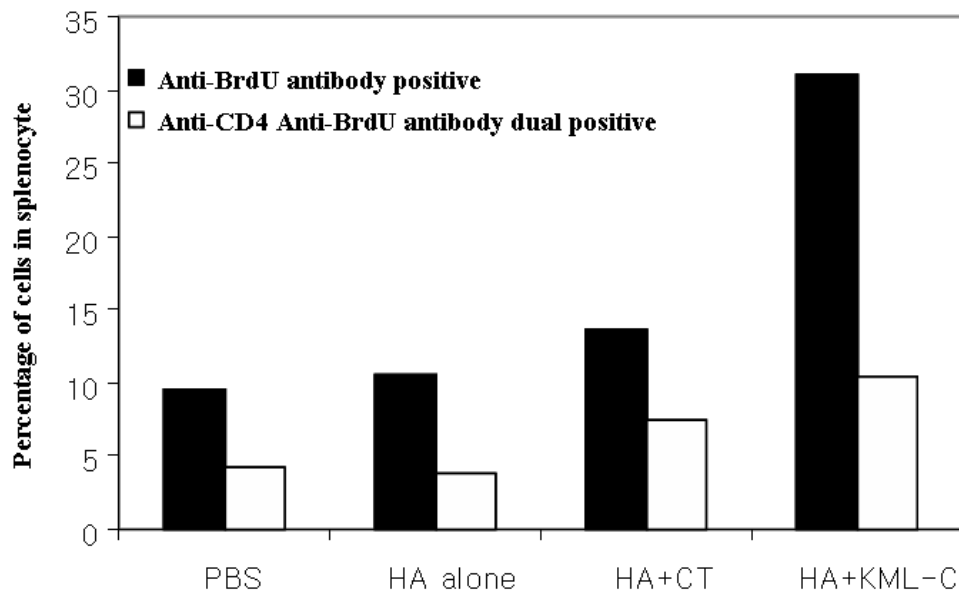


Fig. 4-5 BrdU를 이용한 면역세포(Splenocytes) 증식반응 측정

한편 면역 마우스의 비장세포를 이용한 세포 증식반응 실험에서 관찰된 증식증가 효과가 T세포에서 기인하는 것을 알아보기 위하여 anti-CD4항체와 anti-BrdU항체로 동시에 염색하여 FACS분석을 행하였다. 그 결과 비장세포의 세포증식에서 나타난 세포증식 반응은 CD4+ T세포에 의한 것으로 확인되었다(Fig. 4-5).

일반적으로 T세포에 의한 항원 특이적인 세포성 면역반응은 cytokine분비에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. Fig. 5에서 관찰된 KML-C에 의한 항원 특이적인 세포성 면역반응의 증가가 cytokine의 분비유도와 관련 있는 것을 알아보기 위하여 in vitro에서 재자극한 면역세포에서 total RNA를 추출하여 RT-PCR에 의해 IL-2, IFN- $\gamma$ , GM-CSF(Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) 등 3종류의 사이토카인에 대한 mRNA의 발현을 측정하였다. 이때 사용된 primer의 배열은 Table 4-2와 같다.

Table 4-2. RT-PCR에 사용한 primer의 배열

	forward(5'→3')	reverse(5'→3')	product size
$\beta$ -actin	AGG CTG TGT CCC TGT ATG	ACC CAA GAA GGA AGG CTG GAA A	499bp
IL-2	AGA TGA ACT TGG ACC TCT GCG G	GGG CTT GTT GAG ATG ATG CTT TG	222bp
IFN- $\gamma$	AGG TCA ACA ACC CAC AGG TCC A	CCA GAT ACA ACC CCG CAA TCA C	397bp
GM-CSF	AGA AGG GTC TAC GGG GCA AT	CAT TAC GCA ACA AAA GGCA G	258bp

RT-PCR을 통해 IL-2, IFN- $\gamma$ , GM-CSF의 mRNA를 조사한 결과, KML-C를 HA와 함께 경비투여 한 그룹에 있어서 이들 사이토카인에 대한 mRNA가 가장 강하게 유도되는 것으로 나타났다(Fig. 4-6). 또한 IFN- $\gamma$  mRNA 발현에 대해 real-time PCR을 통해 정량적 분석을 행한 결과, KML-C는 CTB보다도 약 3.5배 정도 이 사이토카인에 대한 mRNA의 발현유도 활성이 높은 것으로 확인되었다(Fig. 4-7). 이들 결과를 종합해 볼 때, KML-C는 HA와 함께 경비적 투여를 행할 경우 항체반응으로 대표되는 항원 특이적인 체액성 면역반응은 물론 T세포의 증식반응과 사이토카인의 분비 증가를 통해 세포성 면역반응을 높이는 것으로 확인되었다.

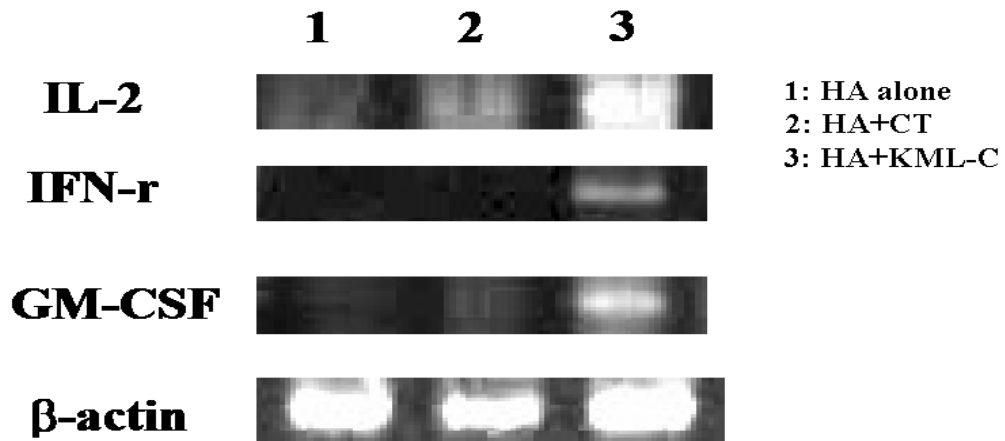


Fig. 4-6 RT-PCR에 의한 cytokine mRNA유도 분석

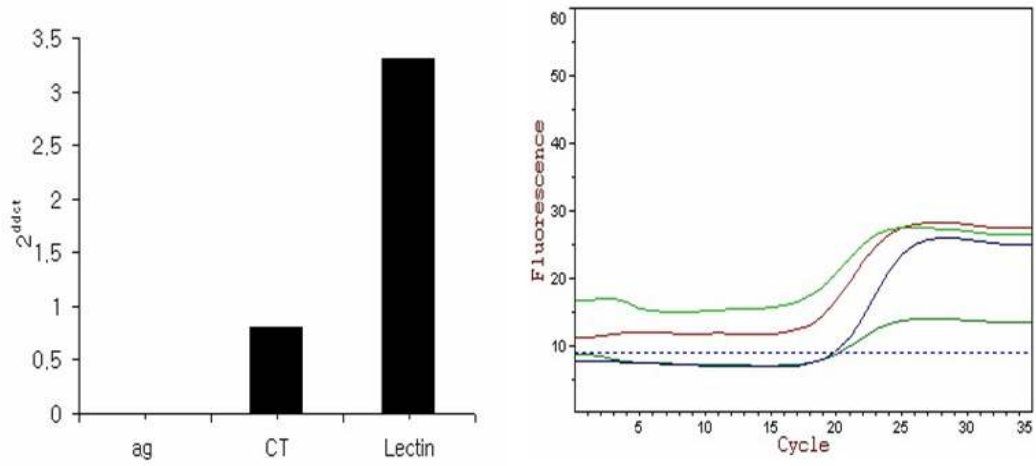


Fig. 4-7 IFN-r mRNA 발현에 대한 real-time PCR 분석

### 3. KML-C에 의한 T세포 활성화 작용

위에서 제시한 실험결과에서 나타나듯이 KML-C는 항원(HA)과 함께 경비투여 하였을 때, T세포를 활성화하여 세포성 면역을 높이는 것으로 확인되었다. 본 실험에서는 KML-C에 의한 T세포의 활성화를 세포수준에서 해석하기 위하여 FACS기법을 이용하여 활성화 T세포를 동정, 확인하였다. 먼저 면역개시 3주째의 비장세포 내의 T세포/B세포의 비율을 조사한 결과, KML-C투여에 의해 이들 림프구의 population에는 영향이 없는 것으로 나타났다(Fig. 4-8).

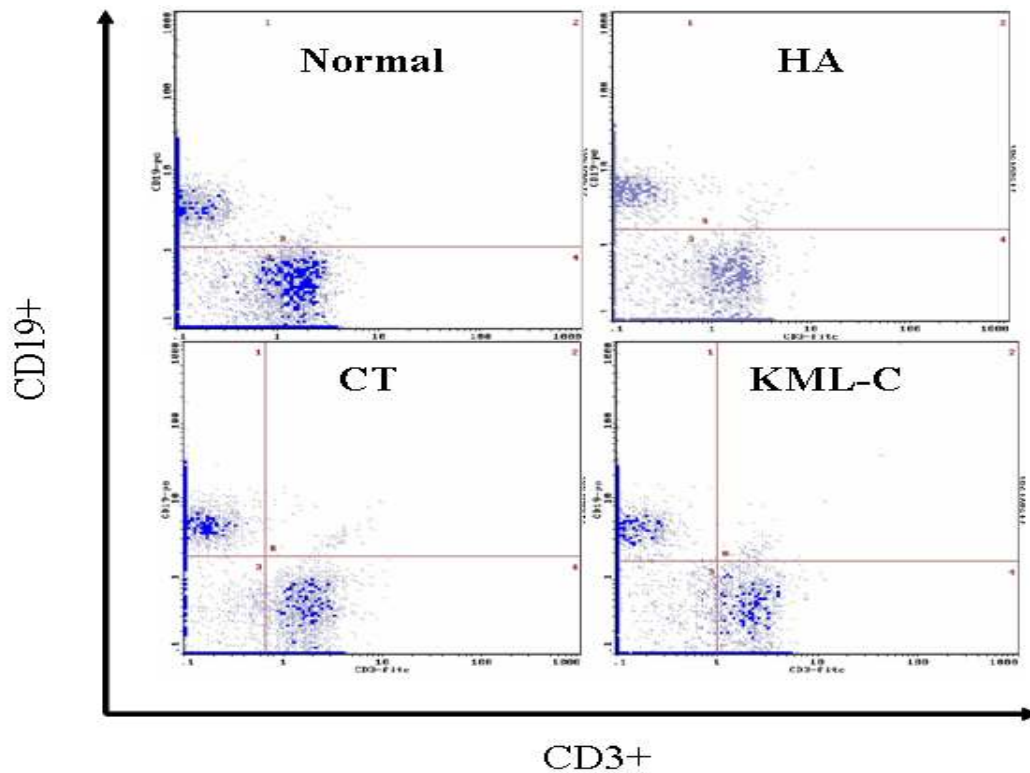


Fig. 4-8 FACS에 의한 비장세포 내의 T 및 B세포의 분포 분석

한편 CD8+ T세포에 대한 분석에서는 CTB와 KML-C는 모두 항원만을 면역한 마우스에 비해 CD8+ T세포의 분포가 거의 동등한 수준으로 증가하였다(Fig. 4-9). 이 결과는 KML-C를 항원과 함께 경비투여 할 경우, T세포와 B세포의 분포 상의 변화를 초래하지는 않지만, T세포에 있어서는 CD8+세포의 분포는 다소 높아지는 경향이 있는 것으로 추정된다.

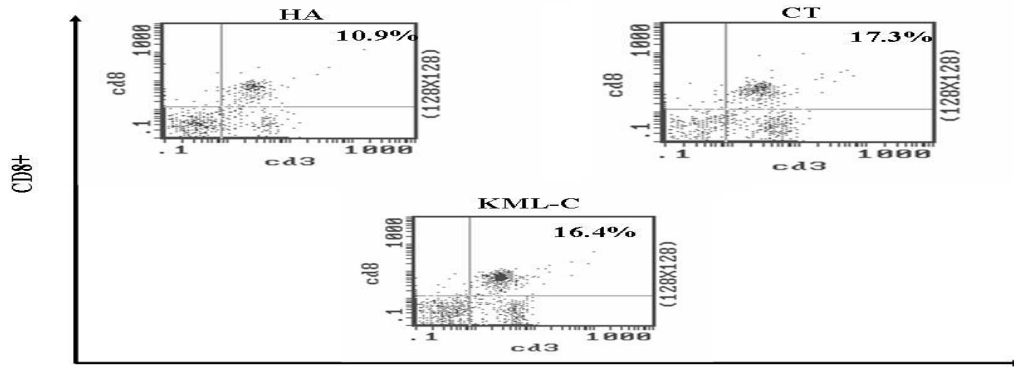


Fig. 4-9 FACS에 의한 비장세포 내의 CD8+ T세포의 분석

활성화 T세포를 분석하기 위하여 T세포의 활성화 지표로 알려진 CD25와 CD69분자에 대한 monoclonal antibody를 이용하여 KML-C 투여에 의해 T세포 상에서 이들 활성화 분자의 발현이 상승하는가를 FACS로 분석하였다. 그 결과 KML-C를 항원과 함께 경비투여 한 마우스에서 CD25분자의 발현이 HA만을 투여한 마우스에 비해 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4-10). 하지만 CTB를 투여한 마우스에서는 HA만을 투여한 마우스와 거의 동등한 수준의 발현을 보였다. 또한 CD4 및 CD69분자에 대한 dual staining method를 통해 이들 분자를 공동 발현하는 활성화 CD4+ T세포의 분포를 조사한 결과에 있어서도, CD25+ T세포 분석결과와 동일하게 KML-C를 투여한 마우스에서 HA 혹은 CTB+HA를 면역한 마우스보다 double positive T세포가 증가하는 것으로 확인되었다(Fig. 4-11).

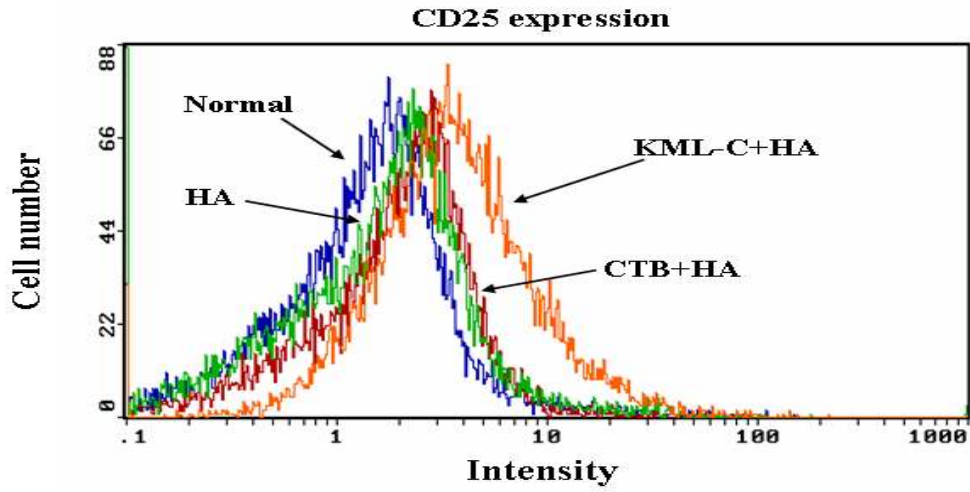


Fig. 4-10 FACS에 의한 CD25+ T세포의 분석

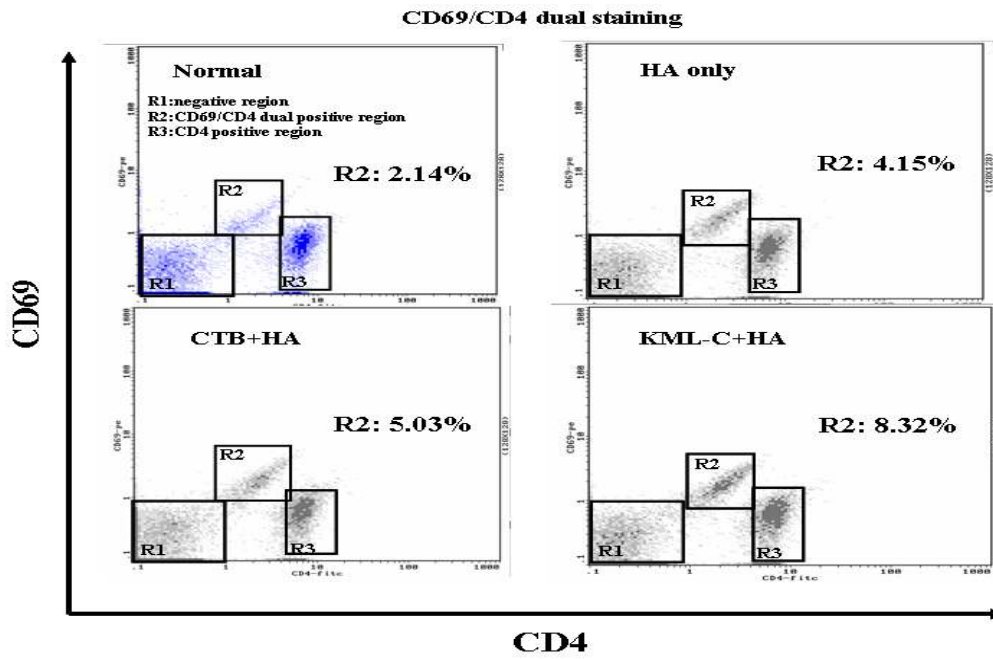


Fig. 4-11 FACS에 의한 CD4+CD69+ T세포의 분석

## 제 5 절. H9N2 인플루엔자 바이러스 공격접종 방어활성

### 1. 시험목적

두 종류의 한국산 겨우살이 추출물을 이용한 조류인플루엔자 바이러스(H9N2)에 대한 SPF 병아리 생체 내 증식억제 효능시험

### 2. 시험배경

가. 시료는 한국산 겨우살이에서 추출한 두 종류의 추출물(KM-110, HKM-110)을 사용한다.

나. 본 시험은 KM-110 혹은 HKM-110을 투여한 SPF 병아리에서 조류인플루엔자 바이러스의 생체 내 증식억제 효능이 있는지 여부를 조사하기 위함이다.

### 3. 시험방법

#### 가. 공시재료

- 1) 시험동물: SPF 유정란, 14일령 SPF 병아리
- 2) 시험물질: 건양대학교에서 의뢰한 겨우살이 추출물 (KM-110, HKM-110)
- 3) 시험바이러스: Influenza virus A/HS/K5/01 (H9N2)

#### 나. 처리내용

- 1) SPF 종란을 이용한 시험바이러스의 공격실험
- 2) SPF 병아리를 이용한 생체 내 조류인플루엔자 바이러스 증식억제 시험
  - 가) 14일령 SPF 병아리에게 시험물질을 3주간 투여 후 조류인플루엔자 바이러스를 비강으로 공격접종
  - 나) 시험물질 투여량 : 5mg/kg/day, 10mg/kg/day, 20mg/kg/day
  - 다) 바이러스 공격접종 5일후 기관과 맹장편도 채취

#### 다. 주요조사항목

- 1) 시험 미생물의 함량조사
- 2) SPF 병아리를 이용한 생체 내 조류인플루엔자 바이러스 증식억제 시험



4. 시험결과

가. SPF 종란을 이용한 시험바이러스의 공격실험

10일령 SPF 부화란의 요막강으로 시험용 바이러스를 10진 희석하여 종란 당 0.1ml씩 접종하고, 접종란의 폐사여부와 생존란의 요막액에 대한 혈구응집반응을 검사하여 역가를 산출한다. 접종 24시간내에 폐사한 종란은 버린다.

1) Influenza virus A/HS/K5/01 (H9N2)

바이러스 희석배수 (log10)	접종란 폐사	혈구응집반응
5	0/5	5/5
6	0/5	5/5
7	1/5	4/5
8	0/5	0/5
9	0/5	0/5
10	0/5	0/5
바이러스 역가	10 <sup>8.0</sup> EID <sub>50</sub> / ml	

2) 시험물질 투여 SPF병아리 생체 내 조류인플루엔자 바이러스 증식억제 효과

Treatments <sup>A</sup>	Result after challenge <sup>B</sup>			
	Virus isolation <sup>C</sup>		Mean virus titer (log <sub>10</sub> EID <sub>50</sub> /g)	
	Trachea	Cecal tonsil	Trachea	Cecal tonsil
KM-110 20mg/kg/day	4/10	4/10	2.40 ± 3.19	1.70 ± 2.21
KM-110 10mg/kg/day	6/10	5/10	2.80 ± 2.61	2.55 ± 3.02
KM-110 5mg/kg/day	7/10	9/10	3.55 ± 2.90	4.85 ± 2.03
공격접종 대조군	9/10	9/10	3.95 ± 2.06	5.55 ± 2.27
비공격접종 대조군	0/10	0/10	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

A KM-110 and HKM-110 solution was inoculated by sonde method for 26days beginning 5days before virus exposure.

B 5-week-old SPF chickens were challenged with A/HS/K5/01 (H9N2).

C Number of chickens virus isolated /Number of chickens inoculated

3) HKM-110투여 SPF 병아리 생체 내 조류인플루엔자 바이러스 증식억제효과

TreatmentsA	Result after challengeB			
	virus IsolationC		Mean virus titer (log10EID50/g)	
	Trachea	Cecal Tonsil	Trachea	Cecal Tonsil
HKM-110 20mg/kg/day	4/10	5/10	2.30 ± 2.98	2.95 ± 3.24
HKM-110 10mg/kg/day	4/10	5/10	1.80 ± 2.55	2.95 ± 3.44
HKM-110 5mg/kg/day	7/10	7/10	3.55 ± 3.16	3.65 ± 2.59
공격접종 대조군	9/10	9/10	3.95 ± 2.06	5.55 ± 2.27
비공격접종 대조군	0/10	0/10	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

A KM-110 and HKM-110 solution was inoculated by sonde method for 26days beginning 5days before virus exposure.

B 5-week-old SPF chickens were challenged with A/HS/K5/01 (H9N2).

C Number of chickens virus isolated /Number of chickens inoculated

4) KM-110투여 SPF 병아리 생체 내 조류인플루엔자 바이러스 증식억제 효과

TreatmentsA	Result after challengeB			
	Virus isolationC		Mean virus titer (log10EID50/g)	
	Trachea	Cecal tonsil	Trachea	Cecal tonsil
KM-110 20mg/kg/day	4/10	4/10	2.40 ± 3.19	1.70 ± 2.21
KM-110 10mg/kg/day	6/10	5/10	2.80 ± 2.61	2.55 ± 3.02
KM-110 5mg/kg/day	7/10	9/10	3.55 ± 2.90	4.85 ± 2.03
공격접종 대조군	9/10	9/10	3.95 ± 2.06	5.55 ± 2.27
비공격접종 대조군	0/10	0/10	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

5) KM-110 및 HKM-110 투여량 별 SPF 병아리 체중변화

조성	접종두수	체중(g) (mean±SD)	
		접종전	접종후
KM-110 20mg/kg/day	10	327.1 ± 39.5	526.4 ± 62.8
KM-110 10mg/kg/day	10	327.6 ± 25.6	499.7 ± 46.1
KM-110 5mg/kg/day	10	342.9 ± 36.1	506.4 ± 82.8
HKM-110 20mg/kg/day	10	333.6 ± 25.5	490.4 ± 51.4
HKM-110 10mg/kg/day	10	346.9 ± 25.4	512.6 ± 49.5
HKM-110 5mg/kg/day	10	335.0 ± 37.5	493.8 ± 60.4
공격접종 대조군	10	316.0 ± 59.0	467.6 ± 33.6
비공격접종 대조군	10	329.1 ± 28.0	494.9 ± 42.7

6) KM-110 및 HKM-110 투여량 별 SPF 병아리의 1일 사료 소비량 변화

일 (day post challgne) 사료량(g)	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0 (공격 접종일)	1	2	3	4
	KM-110 20mg/kg/day	61	61	59	63	63	74	72	61	66	64
KM-110 10mg/kg/day	65	67	67	56	63	73	70	74	69	78	66
KM 5mg/kg/day	60	62	60	63	62	66	66	56	52	58	57
HKM-110 20mg/kg/day	65	66	65	56	68	72	70	75	67	68	68
HKM-110 10mg/kg/day	59	60	65	56	67	74	69	64	62	59	65
HKM-110 5mg/kg/day	61	61	75	62	69	73	69	72	73	74	71
공격접종 대조군	59	58	61	59	63	76	70	67	50	55	60
비공격접종 대조군	59	60	65	63	63	74	70	70	69	74	71

7) KM-110 및 HKM-110 투여량별 SPF 병아리의 1일 음수 소비량 변화

일 (day post challenge) 사료량(g)	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0 (공격 접종일)	1	2	3	4
KM-110 20mg/kg/day	140	150	150	130	145	130	130	145	140	150	150
KM-110 10mg/kg/day	130	140	140	130	140	130	140	150	140	150	150
KM-110 5mg/kg/day	130	140	140	130	132	130	130	140	120	135	150
HKM-110 20mg/kg/day	130	140	140	130	140	135	135	130	125	140	140
HKM-110 10mg/kg/day	135	145	142	130	145	130	130	140	125	135	150
HKM-110 5mg/kg/day	140	140	142	130	145	130	140	145	125	145	145
공격접종 대조군	140	150	150	140	140	135	135	130	115	130	140
비공격접종 대조군	140	150	150	140	140	135	140	145	140	145	150

8) 시험결과 요약

KM/HKM 투여 SPF 병아리를 이용하여 생체 내 조류인플루엔자 바이러스 증식억제 효능 시험을 실시하였다. 시험성적을 요약하면 다음과 같다.

가) 시험용 Influenza virus A/HS/K5/01 (H9N2)를 PBS로 10진 희석한 후 10일령 SPF 부화란의 요막강에 각각 접종하여 접종란의 폐사여부와 생존란의 요막액에 대한 혈구응집반응을 검사하여 바이러스 역가를 산출한 결과 108.0 EID<sub>50</sub>/ml로 확인되었다.

나) 시험물질 KM 투여 SPF 병아리에서 조류인플루엔자 바이러스 증식억제 시험을 실시한 결과 KM-110 10mg 투여군과 20mg 투여군은 공격접종 대조군에 비하여 기관 및 맹장편도에서 바이러스 재분리율이 유의성 있게 저하되었으며, 시험물질 투여량에 비례하여 바이러스 증식 억제 효과가 관찰되었다.

다) 시험물질 HKM-110 투여 SPF 병아리에서 조류인플루엔자 바이러스 증식억제 시험을 실시한 결과 KKM-110 10mg, 20mg 투여군은 공격접종 대조군에 비

하여 기관에서 바이러스 재분리율이 유의성 있게 저하되었고, KKM-110 5mg, 10mg, 20mg 투여군은 공격접종 대조군에 비하여 맹장편도에서 바이러스 재분리율이 유의성 있게 저하되었으며, 시험물질 투여량에 비례하여 바이러스 증식 억제 효과가 관찰되었다.

라) 시험물질 HKM-110 투여에 따른 SPF 병아리의 체중변화와 아울러 1일 사료소비량, 일일 음수소비량을 비교조사 한 결과 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 시험 결과 공시된 겨우살이에서 추출한 KM-110과 HKM-110은 SPF병아리에 투여 시 병아리 생체 내에서 조류인플루엔자 바이러스 증식억제 효능이 관찰되어 항조류인플루엔자 바이러스 효능이 있는 것으로 판단되었으며, 20mg 투여 시 까지 병아리 체중과 사료 및 음수소비량에 변화가 없어 안전성이 확인되었으며, 향후 바이러스 증식이 억제 되는 기전연구와 아울러 항바이러스 효능이 있는 유효성분의 탐색, 치료 또는 예방 투여용량과 용법, 그리고 유효성분의 안전성 등에 대한 추가적인 시험을 실시 할 경우 향후 최근 전 세계적으로 문제시되고 있는 조류인플루엔자 바이러스에 유효한 기능성 식품이나 약품의 후보물질로서의 가능성을 확인하였다.

## 제 6 절. 현장 사양시험 결과

한국산 겨우살이 추출물(KM-110)의 점막면역 강화활성이 양계 현장에서도 유효한가를 조사하기 위하여 육계 농가의 어린병아리를 이용하여 현장시험을 실시하였다. 현장 사양시험의 조건은 Table 6-1과 같다.

Table 6-1. 현장 사양시험의 재조건

- 시험장소 : 전북 고창소재 H농장
- 대상가축 : 부화 후 0일령 삼계용 영추(38일간 사육)
- 투여조건 : KM-110(2 Kg/t)을 사료에 혼합하여 급이
- 시험계수: 각 군당 300 ~ 350수
- 검사항목: 생산지수, 육성율, 체중(출하시)

위의 조건으로 닭을 38일간 사육하면서 생산지수, 육성율, 체중(출하시의 체중) 증가 등을 지표로 하여 한국산 겨우살이 추출물의 유효성을 조사하였다. 그 결과 생산지수(Fig. 6-1)를 비롯하여 육성율(Fig. 6-2) 및 체중(Fig. 6-3) 등 모든 조사항목에 있어서 한국산 겨우살이 추출물을 혼합하여 급이 한 닭에 있어서 사양성적이 우수한 것으로 확인되었다.

본 현장시험에서는 조류 인플루엔자에 대한 감염방어 효과를 직접적으로 확인할 수는 없었지만, 사료첨가제 형태로 한국산 겨우살이 추출물을 첨가하여 급이함으로써 닭의 점막면역 기능을 강화하여 AI로 대표되는 호흡기 질병과 같은 소모성 질환을 효과적으로 억제하여 닭의 성장을 촉진할 수 있을 것으로 추정된다. 이러한 추정은 닭의 출하시 체중이 증가하는 것으로 부분적이거나 뒷받침되는 것으로 사료된다.

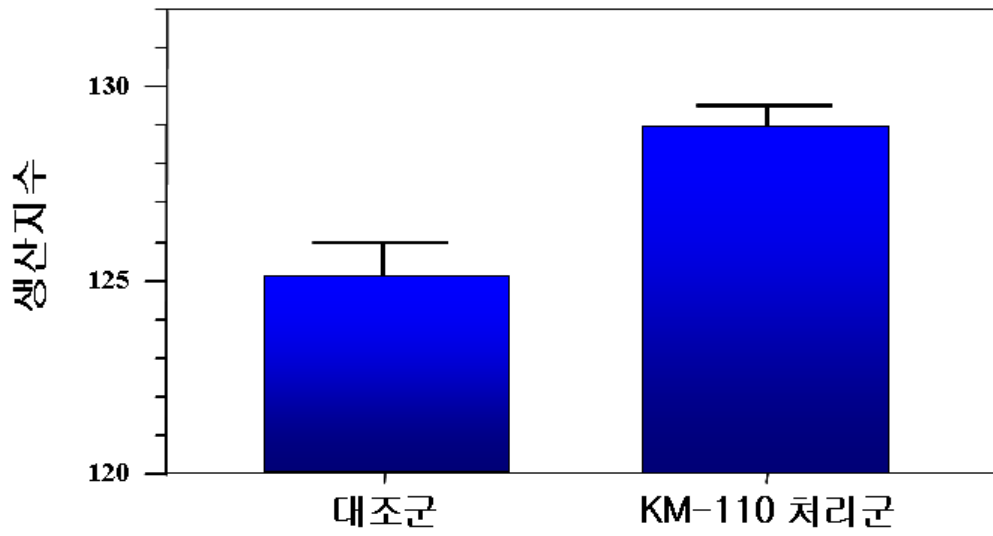


Fig. 6-1 KM-110 급이에 의한 닭의 생산지수 증가효과

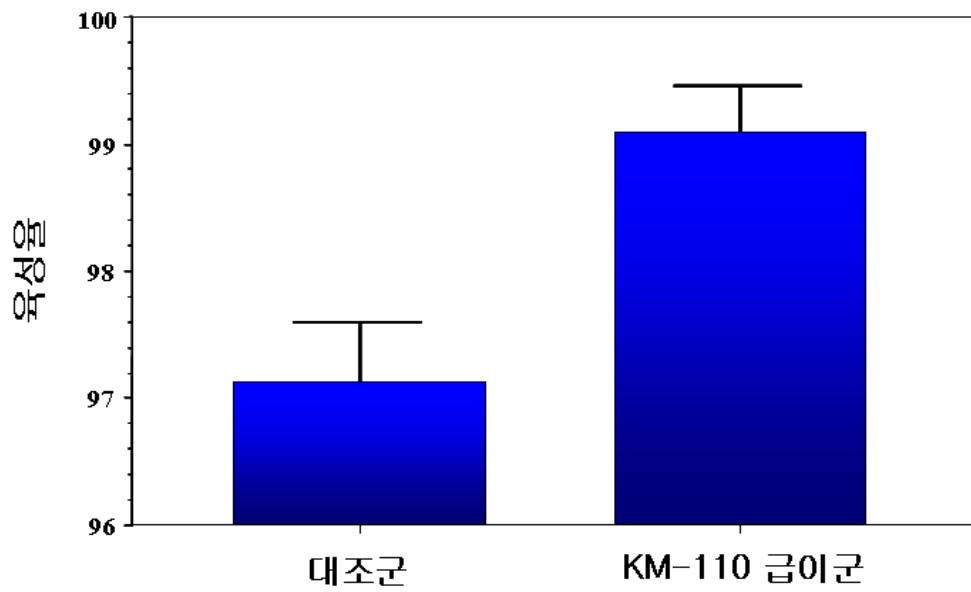


Fig. 6-2 KM-110 급이에 의한 닭의 육성을 증가효과

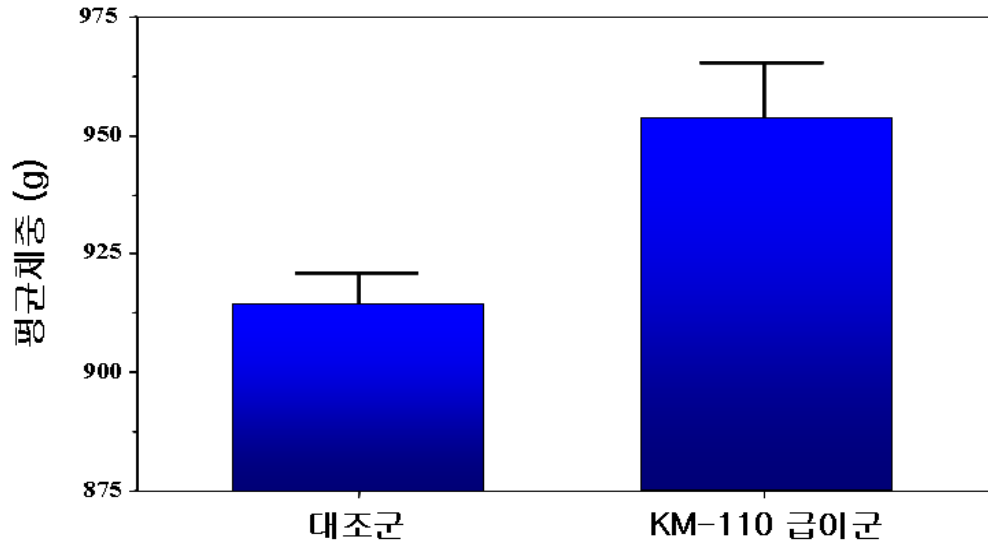


Fig. 6-3 KM-110 급이에 의한 닭의 체중 증가효과



## 제 7절 시제품 Formula 작성 및 제품디자인 개발

시제품의 원료는 암모니아 제거 및 부패성 박테리아 또는 바이러스, 나아가 마이코톡신 등의 흡착기능을 갖는 것으로 알려진 흑운모화강편마암 분말을 부영제로 이용하여 소화 및 기호성 개선을 위한 생균제 및 기타 추출물을 일부 포함시키고 겨우살이 추출물을 첨가하여 시제품을 조제하였다. 시제품의 디자인(Fig 7-1)은 겨우살이 추출물, 장점막 등을 상징하며 점막면역강화 및 바이러스 흡착을 강조하는 것으로 제작하였다.



Fig. 7-1 시제품 상표 디자인

## 제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 연구목표 대비 달성도

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 한국산 겨우살이 추출물의 분리법 확립</li> </ul>	천연물 분리법을 통한 한국산 겨우살이 추출의 적화 시스템 구축
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 마우스를 이용한 점막면역 강화 활성의 검토 및 작용기전의 해석</li> </ul>	동물실험을 통한 점막면역강화 효능과 메커니즘의 확인
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 실험실 수준에서의 닭 사양시험 성적 획득</li> </ul>	소규모 양계 사양시험을 통해 예비 사양 시험 실시 현장적용 가능성 준비완료
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 효능의 최적화 시스템 구축에 필요한 지표 확립</li> </ul>	실험실 수준의 소규모 양계 사양시험을 통해 현장 적용 가능성과 구체적인 급이 방식 완성
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 제품화에 필요한 한국산 겨우살이 추출법 확립 및 대량 추출법의 개발</li> </ul>	가장 효율적인 한국산 겨우살이 추출법의 확립 및 대량생산 기법의 완성
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 소규모 사양시험에서 제품화에 필요한 재조건의 응용 및 formula의 결정</li> </ul>	소규모 사양시험 결과를 바탕으로 환경 개선, 바이러스 흡착 등을 고려한 부영제 검토 및 시제품 Formula 완성
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 닭을 이용한 AI바이러스 (H9N2) 감염 방어 효능시험</li> </ul>	AI 바이러스와 유사한 감염양식을 갖는 H9N2 type바이러스 감염시험을 통해 감염방어효과 확인 실험 완료
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ AI 바이러스 억제용 양계 기능성 사료 첨가제의 제품화에 필요한 제반 조건의 처리</li> </ul>	겨우살이 추출물의 시너지 효과를 내기 위한 천연추출물과의 블랜딩을 통한 점막면역 강화 신 첨가제 시제품 완성
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 계종별 현장시험을 통한 효능의 확인 및 현장시험 데이터의 축적</li> </ul>	현장에 적용 가능한 제품별로 규격화에 필요한 정보 수집 완료 현재 농가에 시제품 적용 Test 실시
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 산업화를 위한 마케팅 전략 및 홍보 전략의 구축</li> </ul>	점막면역강화/질병예방 및 억제 등의 이미지 상표 개발 완료 / 출시 준비 중

## 2. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	한국산 겨우살이 추출법 확립 및 대량 추출 기술
②	마우스를 이용한 접촉면역 강화 활성의 검토 및 작용기전 연구기술
③	실험실 수준의 소규모 사양시험을 통한 면역작용기전 연구기술
④	닭을 이용한 AI바이러스 (H9N2) 감염방어 효능시험 기법
⑤	AI 바이러스 억제용 양계 기능성 사료첨가제의 제품개발 및 상용화기술

## 3. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡 수	외국기 술개선 ·개량	특허 출원	산업체 이전(상 품화)	현장애로 해결	정책 자료	기 타
①의 기술					●					
②의 기술		●			●					
③의 기술				●						
④의 기술		●				●				
⑤의 기술				●			●	●		

## 제 5 장. 연구개발결과의 활용계획

### 1. 각 핵심 연구 결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	추출분획에 따른 효능평가기법 및 산업화를 위한 대량 추출기술은 학계 및 산업체에서 시급히 요구되는 기술로 기능성식품 및 동물사료첨가제 개발에 매우 유용함
②의 기술	국내에서 동물의 점막면역에 관한 연구는 거의 없어 앞으로 각 축종별 점막면역 연구에 아주 중요한 정보를 제공하여 점막면역연구 활성화 기대
③의 기술	실험실 수준에서 산란계 및 육계를 이용한 닭의 면역기능을 연구하는 기법을 확립함으로써 쥐나 랫트를 주로 실험동물로 이용해오던 한계점을 극복하고 돼지에까지도 적용이 가능한 연구기법으로 학계 및 산업체의 활용 기대
④의 기술	고병원성 AI바이러스를 이용한 실험은 매우 위험하여 제한이 많으나 H9N2 바이러스를 이용한 공격실험 기법으로 AI 예방 관련 연구에 유용
⑤의 기술	기존의 많은 첨가제들이 있으나 점막면역을 강화시키는 겨우살이를 이용한 AI 예방용 제품은 국내 처음이며 앞으로 점막면역손상으로 인한 각 축종별 사료첨가제 개발에 다양하게 이용될 것이며 겨우살이 유사 효능 제품 개발에도 매우 도움이 되리라 기대됨

## 제 6 장. 참고문헌

Cochet P, Birckel P, Bromet-Petit M, Bromet N, Weil A., Skin distribution of fipronil by microautoradiography following topical administration to the beagle dog. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1997 Jul-Sep;22(3):211-6.

Cochet O, Kenigsberg M, Delumeau I, Virone-Oddos A, Multon MC, Fridman WH, Schweighoffer F, Teillaud JL, Tocqué B. Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression. *Cancer Res.* 1998 Mar 15;58(6):1170-6.

Lin Y, Vandeputte M, Waer M. Natural killer cell- and macrophage-mediated rejection of concordant xenografts in the absence of T and B cell responses. *J Immunol.* 1997 Jun 15;158(12):5658-67

Takahashi K, Orihashi M, Akiba Y. Dietary L-arginine level alters plasma nitric oxide and alpha-1 acid glycoprotein concentrations, and splenocyte proliferation in male broiler chickens following *Escherichia coli* lipopolysaccharide injection. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1999 Nov;124(3):309-14.

Kramer J, Visscher AH, Wagenaar JA, Boonstra-Blom AG, Jeurissen SH. Characterization of the innate and adaptive immunity to *Salmonella enteritidis* PT1 infection in four broiler lines. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001 May 30;79(3-4):219-33.

Stephan F, Yang K, Tankovic J, Soussy CJ, Dhonneur G, Duvaldestin P, Brochard L, Brun-Buisson C, Harf A, Delclaux C. Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2002 Feb;30(2):315-22.

Kovacs E. Serum levels of IL-12 and the production of IFN-gamma, IL-2 and IL-4

by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in cancer patients treated with Viscum album extract. *Biomed Pharmacother* 2000; 54:30510.

Ji Yeon LEE,<sup>a</sup> Joo Young KIM,<sup>a</sup> Yong Gyu LEE,<sup>a</sup> Se Eun BYEON,<sup>a</sup> Byung Hun KIM,<sup>a</sup> Man Hee RHEE,<sup>b</sup> Albert LEE,<sup>c</sup> Moosik KWON,<sup>d</sup> Sungyoul HONG,<sup>\*,d</sup> and Jae Youl CHO<sup>\*,a</sup> In Vitro Immunoregulatory Effects of Korean Mistletoe Lectin on Functional Activation of Monocytic and Macrophage-Like Cells *Biol. Pharm. Bull.* 2007; 30 (11) 20432051.

United States Geological Survey. List of species affected by H5N1 (avian influenza). 2007 May 12. Available from [http://www.nwhc.usgs.gov/research/avian\\_influenza/avian\\_influenza\\_text/htm](http://www.nwhc.usgs.gov/research/avian_influenza/avian_influenza_text/htm)

Sabirovic M, Hall S, Wilesmith J, Grimley P, Coulson N, Landeg F. Assessment of the risk of introduction of H5N1 HPAI virus from affected countries to the U.K. *Avian Dis.* 2007 Mar;51(1 Suppl):340-3.

Teifke JP, Klopfeisch R, Globig A, Starick E, Hoffman B, Wolf PU, et al. Pathology of natural infections by H5N1 highly pathogenic avian influenza virus in mute (*Cygnus olor*) and whooper (*Cygnus cygnus*) swans. *Vet Pathol.* 2007; 44:13743.

Joshua M. DiNapoli, Lijuan Yang, Amorsolo Suguitan, Jr. Subbiah Elankumaran, David W. Dorward, Brian R. Murphy, Siba K. Samal, Peter L. Collins, and Alexander Bukreyev Immunization of Primates with a Newcastle Disease Virus-Vectored Vaccine via the Respiratory Tract Induces a High Titer of Serum Neutralizing Antibodies against Highly Pathogenic Avian Influenza Virus, *JOURNAL OF VIROLOGY*, 2007, p. 1156011568

Liew, F. Y., S. M. Russell, G. Appleyard, C. M. Brand, and J. Beale. Cross-protection in mice infected with influenza A virus by the respiratory route is correlated with local IgA antibody rather than serum antibody or cytotoxic T-cell

reactivity. *Eur. J. Immunol.* 1984. 14:350356.

Lipatov, A. S., E. Hoffmann, R. Salomon, H. L. Yen, and R. G. Webster. Cross-protectiveness and immunogenicity of influenza A/Duck/Singapore/3/ 97(H5) vaccines against infection with A/Vietnam/1203/04(H5N1) virus in ferrets. *J. Infect. Dis.* 2006. 194:10401043.

Panda, A., Z. Huang, S. Elankumaran, D. D. Rockemann, and S. K. Samal. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microb. Pathog.* 2004. 36:110.

K. M. Lam, A. C. Vasconcelos and A. A. Bickford. Apoptosis as a cause of death in chicken embryos inoculated with Newcastle disease virus. *Microbial Pathogenesis* 1995; 19: 169174

Silke Rautenschlein, Georg von Samson-Himmelstjerna, Christine Haase. A comparison of immune responses to infection with virulent infectious bursal disease virus (IBDV) between specific pathogen-free chickens infected at 12 and 28 days of age. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2007;115 251260

Eldaghayes, I., Rothwell, L., Williams, A., Withers, D., Balu, S., Davison, F., Kaiser, P. Infectious bursal disease virus: strains that differ in virulence differentially modulate the innate immune response to infection in the chicken bursa. *Viral Immunol.* 2006. 19, 8391.

Rautenschlein. S, Yeh, H.Y, Sharma, J.M. Comparative immunopathogenesis of mild, intermediate, and virulent strains of classic infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 2003. 47, 6678.

Jochemsen, P., Negash, T., Boersma, W.J.A. Localisation of immune response against IBDV after in ovo vaccination. In: Proceedings of the 8th Avian Immunology Research Group Meeting, 47 September, Munich, Germany, 2004. P-57.

## 주 의

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