

최 중  
연구보고서

천연식물을 이용한 송아지질병치료 및 예방법 개발  
Development of the Therapeutic and Prophylatic  
program of Natural Herba in Calf Diarrhea  
and Respiratory Disease

천연식물 추출물의 정균성과 안전성 평가  
Evaluation of Bacteriostatic and Safty of the Natural Herba

제 주 대 학 교  
RNL생명과학

농림수산식품자료실



0016154

농림수산식품부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “천연식물을 이용한 송아지질병치료 및 예방법 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 제주대학교  
총괄연구책임자 : 이 경 갑  
세부연구책임자 : 이 경 갑  
연 구 원 : 윤 영 민  
연 구 원 : 김 승 용  
협동연구기관명 : RNL생명과학  
협동연구책임자 : 최 대 기

# 요 약 문

## I. 제 목

천연식물을 이용한 송아지질병 치료 및 예방법 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

한우 송아지의 폐사는 여러 가지 원인에 의한 설사증(43.1%), 호흡기 질병(30.7%), 설사증과 호흡기 질병 혼합감염(20.9%)에 의해 발생되어 농가에 피해를 주고 있다. 이들 질병을 치료 및 예방하기 위해서 항생제의 무분별한 과다 사용과 백신 개발이 이루어지고 있으나 그 효과는 기대에 미치지 못하고 있다. 그러므로 송아지 설사 및 호흡기 질병에 대한 항생제 대체제 개발과 내성균 출현을 방지할 수 있는 친환경적인 치료법 개발이 요구된다.

천연 식물(백화사설초, 고삼, 영지버섯, 어성초 등)은 항균 및 항바이러스, 면역증강 효과가 있다고 알려져 있다. 이들을 임상에 응용하는 연구들이 진행되고 있다. 본 연구에서는 천연식물 추출물을 이용한 송아지 질병의 예방 및 치료제를 개발하여 보다 친환경적인 축산물을 생산 공급하고 농가 소득증대에 기여하고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 천연식물을 이용한 송아지 질병 치료 효과

1차년도 : 송아지 설사증에 대한 치료 효과

한우목장에서 번식 사육되고 있는 한우 송아지 1-3개월령, 200두를 선정하여 설사 발병율, 원인균 분리 및 혈액검사를 실시하였다. 실험전 송아지 혈액 및 분변을 채취하였고, 바이러스는 분변을 채취하여 상품화된 항체검사 진단 kit로 검사하였고, 기생충은 분변검

사를 통해서 증란을 확인하였다. 원인에 따라 천연 식물체인 백화사설초를 투여하여, 예방 및 치료 효과를 평가하였다. 그리고, 폐사축에 대해서는 부검을 실시하고 가검물을 채취하여 원인 규명을 하였다. 또한 백화사설초 급여에 따른 면역세포의 분포변화와 증체율을 기간별로 측정하였다.

2차년도 : 송아지 호흡기 질병에 대한 치료 및 예방효과

설사증과 호흡기 질병(폐렴)이 있는 송아지에 백화사설초 단독 혹은 백화사설초와 어성초 혼합제를 투여하여 치료효과를 평가하였다. 또한 어린송아지에 백화사설초 단독 혹은 백화사설초와 어성초 혼합제를 급여하여 이들 질병에 대한 예방효과를 조사하였다. 비루 및 분변을 채취하여, 분변에서 virus를 진단 kit로 검사하였고, 비루에서 원인균을 배양하여 감수성검사를 실시하였다.

3차년도 : 송아지 설사증과 호흡기 질병에 대한 발효 백화사설초 효능 평가

1, 2차 년도실험에서 백화사설초와 어성초의 효과를 기초로 하여 사료첨가제 개발에 따른 기호성 문제를 해결하고자 백화사설초 발효체제의 효과를 평가하였다. 발효 백화사설초를 분만직후부터 송아지 사료에 첨가하여 급여함으로써 설사 및 호흡기질병의 예방효과를 확인하였다.

## 2. 천연식물 추출물의 정균성과 안전성 평가

1차년도 : 백화사설초, 고삼, 영지, 어성초의 항세균 작용 평가

백화사설초, 고삼, 영지, 어성초 추출물을 배지에 농도별로 첨가하여 세균성장억제 효과를 조사하였고, 적정 농도를 확인한 후 각 천연물질간의 비교 및 혼합제에 대한 효능 상승효과를 평가하였다.

5종의 후보식물체를 분쇄한 후 100, 75, 25%의 에탄올(EtOH)과 증류수(DW)로 50℃에서 5시간 동안 추출한 후 4종(*E. coli*, *E. coli* 0157, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*)의 세균을 접종한 배지위에 paper disk를 놓고 각 추출액을 30  $\mu$ l씩 투여한 후 37℃에서 24시간 동안 배양시켜 저해환을 측정하였다.

2차년도 : 백화사설초, 고삼, 영지, 어성초의 항바이러스 작용 평가

백화사설초, 고삼, 영지, 어성초를 각각 100%, 30% EtOH, DW 3종류의 용매로 추출한 추출물을 배지에 농도별로 첨가하여 바이러스 성장 억제 효과를 조사하였고, 적정 농도를 확인한 후 각 천연물질간의 비교 및 혼합제에 대한 효능 상승효과를 평가하였다.

3차년도 : 백화사설초, 고삼, 영지, 어성초의 안전성 평가

백화사설초, 고삼, 영지, 어성초를 90일간 랫드에 장기 반복 투여한 후 다음 임상증상, 사료 섭취량 측정, 음수 섭취량 측정, 체중 측정, 요검사, 혈액학적 및 혈청학적 검사를 통해서 안전성을 평가하였다. 장기 중량 및 크기 측정, 병리조직학적 검사를 하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 천연식물을 이용한 송아지 질병 치료 및 예방효과

한우목장 3곳에서 송아지 76두 중에서 설사를 보이는 송아지 47두에서 분변을 채취하여 원인을 조사한 결과, virus 양성 2두(Corona virus 1두, Rota virus 1두), 원충인 coccidium이 5두로 조사되었고, 나머지는 세균성 감염으로 확인되었다. 그리고 실험 중에 심한 수양성의 설사 증상을 보이다가 폐사한 송아지는 부검 결과 Cryptosporidia로 확인되었다.

목장 두 곳에서 송아지에 대한 백화사설초(ursolic acid; 0.2 %)를 투여한 결과 2005년도에는 159두에서 20두가 폐사하여 폐사율이 12.6 %로 나타내어 전년도보다 폐사율이 낮아졌다. 대용유를 급여하는 비육송아지에 백화사설초를 대용유에 희석하여 1g/일/개체를 송아지에 급여되는 대용유에 섞어 2007년 1월부터 12월까지 급여한 결과, 2007년도에는 총 786두를 매입하여 32두가 폐사하여, 그 폐사율은 4.07% 로 개선되었다.

비육우 목장에서 홀스타인 송아지(20일령) 30두에서 백화사설초 급여에 따라 설사 발생두수는 모든 실험군에서 낮아졌으며, 그 중 백화사설초와 어성초의 혼합제를 투여한 군에서는 20일 이후에는 거의 설사를 일으키지 않았다.

면역세포의 변화에서 백화사설초 처치군은 투여 1주와 2주후에 투여전에 비해서 CD<sup>4+</sup>, CD<sup>8+</sup>와 CD<sup>19+</sup> positive cell이 다소 증가되는 경향이 있었지만 유의적인 차이를 보이지 않았으며, monocyte계열인 CD<sup>14+</sup> positive cell이 백화사설초 투여 1주후 대조군

10.1±4.38(%)에 비해 16.3±3.06(%)로 유의성 있게 높게 관찰되었다.

한우목장 5곳에 사육중인 한우송아지 중에서 호흡기 질병 14마리 송아지의 비루에서 20개의 균주를 분리 배양한 결과, 10개의 균종이 확인되었다. 분리 동정된 20개의 균주를 18종 항생제에 대한 감수성 검사를 실시한 결과, 20균주 모두가 한 가지 이상의 항생제에 감수성을 나타내었다.

한우목장의 송아지 사료에 발효 백화사설초를 급여한 결과 송아지 질병 발생율이 2008년 1월과 2월에 각각 43.9%, 43.8%를 나타내었고, 발효 백화사설초 급여 전인 2007년 11월과 12월에는 각각 77.5%, 70.0%를 나타내었다.

## 2. 천연식물 추출물의 정균성과 안전성 평가

백화사설초, 영지, 어성초는 100% EtOH 추출물군에서만 모든 균주에서 상대적으로 높은 항균력을 보였다. 추출시 100% EtOH로 추출하는 것이 항균물질을 추출하는 최적 용매로 판단되며 후보 물질 5종 가운데 백화사설초, 영지, 어성초가 대상 균주에 대하여 항균효과를 나타내었다. 그리고 백화사설초, 영지, 어성초, 고삼 등에서 항바이러스 효과가 확인되었다.

## 3. 활용 방안

이 연구결과는 백화사설초가 송아지 질병의 예방과 치료효과가 있는 것으로 확인되었으나 기호성이 떨어져서 급여에 문제점이 발생하여 기호성을 개선하기위하여 협동연구팀인 RNL생명과학에서 발효 백화사설초를 개발하였다. 발효 백화사설초를 한우농장에 급여해본 결과 질병예방효과가 인정되어 앞으로 사료첨가제로 개발이 가능할 것으로 판단된다.

연구결과로 송아지 사육에 대한 농가교육자료를 제시하여 양축농가에 도움을 주고자 한다.

# SUMMARY

## I. Title

Development of the Therapeutic and Prophylactic program of Natural Herba in Calf Diarrhea and Respiratory Disease

## II. Research purpose

The major mortality of calf consists of diarrhea(43.1%), respiratory diseases(30.7%), mixed infection of diarrhea and respiratory diseases(20.9%) and both diseases damage the economic condition of farms. Overuse of antibiotics and the vaccine development occur to control the disease, their effects are minimal. We thus tried to develop the environment-friendly therapy to cure the calf disease and restrain the antibiotic uses by natural herbs(*Oldenlandia diffusa*, *Houttuynia cordata*, *Sophora flavescens*, *Ganoderma japonicum* etc.).

## III. Research contents, scopes and methods

### ***1. The Therapeutic and Prophylactic effects of Natural Herba in Calf Diseases***

#### ***The 1st research year : The therapeutic and prophylactic effects of calf diarrhea***

Two hundreds calves(1-3 months) of Korean beef cattle were selected for the diagnosis of causing bacteria, disease rate, blood test. We investigated the effects of administration of *Oldenlandia diffusa* such as the proportion of immune cells and weight gain during the feed.

#### ***The 2nd research year : The therapeutic and prophylactic effects of calf respiratory disease***

Calves with diarrhea and respiratory disease were administered with *Oldenlandia diffusa* only or the combination of *Oldenlandia diffusa* and *Houttuynia cordata*. We investigated their therapeutic and prophylactic effects. The samples including nasal discharge and feces were checked for the presence of virus using commercial diagnostic kit and the culture of causing bacteria or susceptible test for antibiotics were performed.

***The 3rd research year*** : The evaluation of the effects of fermented *Oldenlandia diffusa* for calf diarrhea and respiratory diseases.

Based on the effects of *Oldenlandia diffusa* at last year, we evaluated the effect of fermented *Oldenlandia diffusa*. After parturition, we provided calves with feed containing fermented *Oldenlandia diffusa* and determined their preventive effects for diarrhea and respiratory diseases.

## **2. The bacteriostatic effect and safety test of Herbs extracts**

***The 1st research year*** : Antibacterial effects of *Oldenlandia diffusa*, *Houttuynia cordata*, *Sophora flavescens*, *Ganoderma japonicum*

The four herbs were crushed and extracted using 100, 75, 25% EtOH and DW at 50 °C. We tested the antibacterial effects of extracts onto paper disks inoculated with 4 kinds of bacteria (*E. coli*, *E. coli* 0157, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*) for 24 hr at 37 °C. After the determination of the optimal concentration of extract, the effect of extracts alone or the combination were compared in the aspect of efficacy.

***The 2nd research year*** : Antiviral effects of *Oldenlandia diffusa*, *Houttuynia cordata*, *Sophora flavescens*, *Ganoderma japonicum*

The four herbs were extracted using 100%, 30% EtOH, water and the extracts were added into the culture media in the concentration manner. After the determination of optimal concentration, we evaluated the efficacy of extracts, alone or the combination.

***The 3rd research year*** : Safety test for *Oldenlandia diffusa*, *Houttuynia cordata*, *Sophora flavescens*, *Ganoderma japonicum*

The four herbs were administrated into rats for 90 days and then clinical symptoms, feed uptake, water uptake, weight gain, urine test, hematological/serological test, pathological test were performed for their safety.

## **IV. Research results and comments on utilization of the results**

### **1. The Therapeutic and Prophylatic effects of Natural Herba in Calf Diseases**

Among 76 calves with diarrhea in 3 farms, 47 calves were investigated for the causes and 2 virus positive 9 (Corona virus 1, Rota virus 1), 5 protozoa (coccidium),



and others were bacterial infection. During experiments, a dead calf with severe watery diarrhea was diagnosed with *Cryptosporidia*.

From two farms, calves administrated with *Oldenlandia diffusa* (ursolic acid; 0.2%) showed low mortality compared to last year. Substituted milk The addition of *Oldenlandia diffusa*(1g/day/head) into beef calves fed with substituted milk alone showed lower of mortality by 4.07% than last year. 30 holstein calves (20 days old) in beef farm were fed with *Oldenlandia diffusa* and showed lower diarrhea rate in all experimental groups and among them, the group fed with the combination of *Oldenlandia diffusa* and *Houttuynia cordata* showed almost no diarrhea.

In the changes of immune cells by *Oldenlandia diffusa* feeding, CD<sup>4+</sup>, CD<sup>8+</sup> and CD<sup>19+</sup> positive cells were increased 1 or 2 weeks later, but there was no significant difference. And also, CD<sup>14+</sup> positive cells were observed as 16.3±3.06(%), that is significantly higher than control 10.1±4.38(%) after the same feeding.

Among the calves of Korean beef cattle in 5 farms, 14 calves with respiratory diseases were diagnosed using nasal discharge and 10 bacteria were identified from 20 bacteria cultured. And also, we tested 20 bacteria for the sensitivity of 18 antibiotics and all bacteria were sensitive at least one antibiotic.

The *Oldenlandia diffusa* feeding for calves resulted in marked lower disease rate at January(43.9%), February(43.8%) of 2008 compared to January(77.5%), February(70.0%) of 2007.

## ***2. The bacteriostatic effect and safety test of Herbs extracts***

The 100% EtOH extracts of *Oldenlandia diffusa*, *Houttuynia cordata*, *Ganoderma japonicum* showed high anti-bacterial effects and thus 100% EtOH was the best solvent to get extract the herbs. Among 5 candidates, *Oldenlandia diffusa*, *Houttuynia cordata*, *Ganoderma japonicum* showed anti-bacterial effects and *Oldenlandia diffusa*, *Houttuynia cordata*, *Sophora flavescens*, *Ganoderma japonicum* showed anti-viral effects also.

## ***3. Comments on utilization of the results***

In this study, we confirmed the prophylactic and therapeutic effects of *Oldenlandia diffusa* for calf diseases, but *Oldenlandia diffusa* was not preferred by calves. To fix this problem, our collaborator, RNL biotech company developed some fermented product of *Oldenlandia diffusa* and the preference was progressed with the prophylactic effects of diseases. We thus suggest that the development of new additive for feed may be possible. In the future, we will try to provide farms with information of the efficacy of *Oldenlandia diffusa* to prevent the abuse of antibiotics and produce safe dairy products.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction	13
Chapter 2. Present Status of the Technical Development	Ⅶ
Chapter 3. Research Materials and Methods	18
Chapter 4. Accomplishment of Objectives and External Contribution	81
Chapter 5. Application of Developed Techniques	83
Chapter 6. References	87

## 목 차

제 1장 연구개발과제의 개요 .....	13
제 1절 연구개발의 필요성 .....	13
제 2절 천연식물의 효능 .....	14
1. 백화사설초 .....	14
2. 어성초 .....	14
3. 영지 .....	15
제 3절 사료첨가제의 개발 .....	16
제 2장 국내외 기술개발 현황 .....	17
제 1절 국내외 관련기술의 현황 .....	17
1. 백화사설초를 이용한 암연구 현황 .....	17
2. 백화사설초의 면역조절에 관한 연구 .....	17
3. 백화사설초 연구의 필요성과 문제점 .....	17
제 3장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	18
제 1절 천연식물을 이용한 송아지 질병 치료효과 .....	18
1. 송아지 설사 원인 .....	18
2. 천연 추출물의 치료효과 .....	19
3. 설사 송아지에서 천연 추출물 투여에 따른 혈액학적 변화 .....	20
4. 설사 송아지에 천연 추출물 투여에 따른 혈청학적 변화 .....	23
5. 설사 송아지에 대한 천연 추출물 투여에 따른 백혈구 분포의 변화 .....	24
5. 설사증과 건강한 송아지에 천연추출물 투여에 따른 체중과 혈액학적 변화 .....	27
제 2절 천연식물을 이용한 송아지 질병 치료 및 예방효과 .....	34
1. 실험 목적 .....	34
2. 실험 방법 .....	34
제 3절 호흡기 증상의 송아지에서 원인균 분리 및 감수성검사 .....	43
1. 재료 및 방법 .....	43
제 4절 발효 백화사설초의 급여가 송아지 폐사와 질병예방에 미치는 영향 .....	49
제 5절 천연 식물 추출물의 정균성 평가 .....	54
제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	81

제 1절 목표달성도 .....	81
제 2절 기여도 .....	82
1. 기술적 측면 .....	82
2. 경제 · 산업적 측면 .....	82
제 5장 연구개발결과의 활용계획 .....	83
제 1절 축산기술자료 .....	83
제 2절 사업화 추진 계획 .....	84
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	86
제 7장 참고문헌 .....	87

## 제 1장 연구개발과제의 개요

### 제 1절 연구개발의 필요성

한우 송아지의 폐사 원인이 설사증(43.1%), 호흡기 질병(30.7%), 설사증과 호흡기 질병 혼합감염(20.9%)에 의해 발생되어 농가에 경제적 손실을 주고 있다. 그리고 송아지 폐사를 예방 및 치료하기 위해서 백신 개발과 항생제의 무분별한 과다 사용이 이루어지고 있다. 그러므로 송아지 설사 및 호흡기 질병에 대해 환경 친화적이면서 항생제 내성균 출현을 방지할 수 있는 치료법의 개발이 요구된다.

사회적으로 식생활의 먹거리가 유기농의 생산물을 중요시하는 추세에 있으므로 항생제의 사용으로 오염된 유기질비료(퇴비)를 유기농에 사용할 수 없으며, 농촌에 유기농에 필요한 유기질비료(퇴비)의 생산면에서도 항생제를 대체할 수 있는 천연식물추출물의 질병 예방 사료첨가제의 생산이 요구되고 있다.

한편 제주도는 구제역, 광우병 등 각종 해외악성전염병으로부터 청정화된 지역으로 한우 송아지 육성사업 등 한우사육기반 확충을 위하여 많은 노력을 기울이고 있으며, 환경 및 지역적으로도 송아지 사육환경이 매우 뛰어난 곳이다. 천연추출물을 이용한 송아지 질병의 예방 및 치료는 소비자로서 하여금 **안전성 및 기능성 상품으로 인식될 수 있다.**

## 제 2절 천연식물의 효능

### 1. 백화사설초

백화사설초는 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 1년생 초본인 쌍낙시돌풀 *Hedyotis lindleyana* var. *hirsuta* HARA(꼭두서니과) 또는 *Oldenlandia diffusa* L. ROXB의 전초로서 일년초이다. 국내에서는 남부지방과 제주도에서 자생하거나 재배하고 있는 백화사설초는 차가우나 독이 없고 맛은 달고 쓰며, 청열해독(淸熱解毒), 이수통림(利水通淋), 활혈화어(活血化瘀) 효능이 있어 각종 염증성 질병(폐열기침, 편도선염, 인후염, 충수염, 이질, 자궁부속기염, 관절염)과 암 치료에 효과적이라는 보고가 있다.

백화사설초의 성분으로 ursolic acid, oleanolic acid,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol-d-glucoside, p-coumaric acid, iridids로 oldenlandoside 등이 밝혀져 있고, 백화사설초의 안전성 검사에서 생쥐에 복강주사 LD50이 104g/kg으로 독성이 없는 것으로 나타났다.

또한 백화사설초는 세망내피계와 백혈구의 탐식능 촉진, 대식세포의 탐식능과 반응 질소 중간물질의 형성능 촉진을 일으키며, DNA 합성 및 대사 억제작용과 대식세포의 기능을 활성화하여 **암세포의 성장을 억제**한다는 보고와 백화사설초의 면역조절에 관한 연구로 백화사설초를 가미한 가미길경탕의 면역효능을 비교 분석한 결과 면역 효능이 더욱 효과적이며 oldenlandoside가 대식세포의 탐식효과, 림프구의 증식을 촉진하고 백화사설초 다당체가 대식세포 탐식능을 증가시켰다는 연구보고도 있다.

### 2. 어성초

어성초는 제주도와 울릉도 및 남부지방의 산속 그늘지고 물기가 많은 땅에 자라는 여러해살이 풀로 잎모양은 고구마 잎을 닮았으며 줄기는 붉다. 초여름 줄기 끝에서 흰꽃받침이 있는 노란꽃이 하나씩 핀다. 잎과 줄기에서 고기 비린내를 닮은 냄새가 나서 어성초라고 부른다. 중약초, 즈채, 십약등 여러 이름이 있다. 요도염, 방광염, 자궁염, 폐렴, 축농증, 치루, 탈홍, 악창등 염증질환에 전통적으로 사용해 왔으며 고혈압, 해독작용, 혈당강하

에도 효과가 있다고 한다. 어성초의 정유에 향균물질이 존재하는데 그 성분은 decanoyl aetaldehyde, methyl-n-nonylketone, myrcene, lauric aldehyde, capric aldehyde, capric acid 등이다. decanoyl aetaldehyde가 대표적인 생리활성 물질로서 카타르 구균, 인플루엔자 간균, 폐렴구균, 황색포도상 구균 등에 대하여 뚜렷한 억제작용이 보고 되어졌으며 기타 생리활성으로는 항바이러스작용, 이노작용을 가진다.

### 3. 영지

영지는 불로초라고도 불리며 상수리 나무 및 활엽수의 뿌리에서 난다. 이 버섯은 갓자루가 단단한 각피로 싸여 있고 니스를 칠한 것 같은 광택이 있어 일본에서는 만년버섯, 중국에서는 영지라고 하여 한약재료로 사용한다. 영지에는 ergosterol, ricinoleic acid, fumaric acid, glucosamin, 다당류, 수지, manitol 등이 함유되어 있고 betaine,  $\gamma$ -butyrobetaine 등 아미노산 유도체가 함유되어 있으며 영지버섯의 주된 생리활성 작용은 혈관 안쪽에 생기는 혈전(血栓)을 없애 주며, 과산화지질의 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 영지에 다량 함유되어 있는 게르마늄은 체내에 신선한 산소를 보내고 세포를 더욱 활성화시키는 작용을 하며 한방에서는 강장·진해·소종(消腫) 등의 효능이 있어 신경쇠약·심장병·고혈압·각종 암종에 사용을 하고 있다. 최근의 연구에서는 메칠셀피닐 아테노신 이라는 물질이 혈소판 응집을 억제시킨다고 하였다.



### 제 3절 사료첨가제의 개발

국내에서 얻을 수 있는 약초(백화사설초, 고삼, 영지버섯, 어성초 등)에는 매우 다양한 생리활성물질들을 함유하고 있으며 송아지질병원인 균에 효과적인 물질들에 대한 최적추출조건 확립 및 항균, 항바이러스 시험을 통하여 최적 제형을 개발하고 그 유효 성분 및 적정함량을 규명하여 송아지질병에 효과적인 제품을 개발하여, 우리나라 축산물이 소비자로 하여금 안전성 및 기능성 상품으로 인식될 수 있게 하고, 건강한 송아지의 육성으로 고품질 육우 생산의 기반을 정착시켜 농가 소득증대에 도움이 될 것으로 여겨진다.

## 제 2장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절 국내·외 관련기술의 현황

#### 1. 백화사설초를 이용한 암연구 현황

백화사설초는 세망내피계와 백혈구의 탐식능 촉진, 대식세포의 탐식능과 반응 질소 중간물질의 형성능 촉진을 일으키며, DNA 합성 및 대사 억제작용과 대식세포의 기능을 활성화하여 암세포의 성장을 억제한다는 보고가 있다.

#### 2. 백화사설초의 면역조절에 관한 연구

백화사설초를 가미한 가미길경탕의 면역효능을 비교 분석한 결과 면역 효능이 더욱 효과적이며 oldenlandoside가 대식세포의 탐식효과, 림프구의 증식을 촉진하고 백화사설초 다당체가 대식세포 탐식능을 증가시켰다는 연구보고도 있다.

#### 3. 백화사설초 연구의 필요성과 문제점

백화사설초는 남부지방과 제주도에서 자생 및 재배하고 있다. 그러나 대부분이 중국에서 수입되고 있어 국산 농작물의 보호(국내산이 더 효과적)와 신기능성 작물개발을 통한 경쟁력 확보가 요구되고 있다.

**국산 백화사설초의 항균 및 항바이러스 효과에 대한 효능 입증은 국내 백화사설초 재배농가 및 낙농가의 소득증대에 큰 영향을 미칠 것으로 사료됩니다.**

백화사설초와 영지버섯, 고삼, 어성초의 적절한 배합으로 송아지 질병에 대한 약효능을 극대화시킨다.

## 제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1절 천연식물을 이용한 송아지 질병 치료효과

#### 1. 송아지 설사 원인

실험 결과는 76두의 송아지 중에서 설사를 보이는 송아지 47두에서 분변을 채취하여 원인을 조사하였다. Corona virus와 Rota virus 검출을 위해 분변에서 RNA를 추출하여 특이 Primer sets으로 PCR하여 전기영동한 결과 407bp정도에서 증폭산물이 확인되었다. Corona & Rota 검출 Kit를 사용하여 코로나감염으로 확인된 분변에 대해서는 모두 증폭산물이 확인되었다(Fig 1). 그리고 기생충 감염으로 원충인 coccidium이 5두로 조사되었고, 나머지는 정확한 원인을 알 수 없었다(Table 1). 그리고 실험 중에 심한 수양성의 설사 증상을 보이다가 폐사한 송아지는 부검 결과 Cryptosporidia로 확인되었다. 주혈원충인 Piroplasma는 B 목장(7월 채혈) 22마리의 혈액도말 상에서 모두 양성을 나타내었으며, 생후 1주일 전후 송아지에서도 관찰되었다.

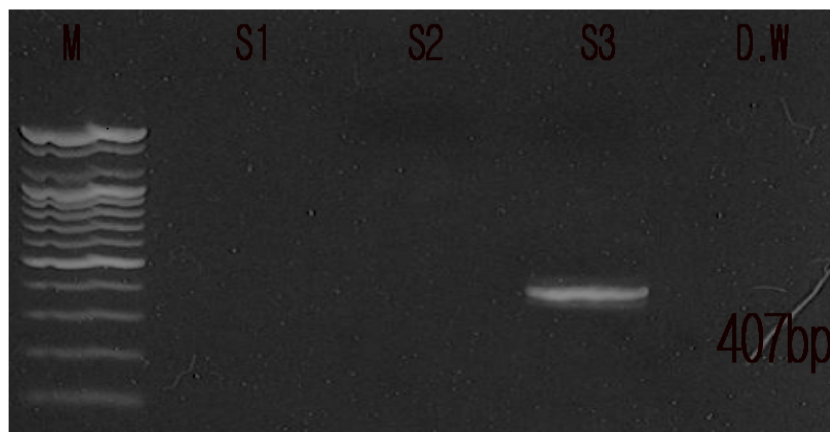


Fig. 1 PCR amplification of Bovine Coronavirus

M : Marker , S1, S2, S3 : Sample 1, 2, 3 , D.W : Distilled Water

Table 1. The Causes of Calves Diarrhea in Jeju Farms

Cause	Head	(%)
Corona Virus	1	2.1
Rota Virus	1	2.1
Coccidium	5	10.6
Other	40	85.2
Total	47	100

## 2. 천연 추출물의 치료효과

실험목장 두 곳에서 일정기간에 태어난 송아지에 대한 백화사설초(ursolic acid; 0.2 %)를 투여하여 치료한 결과 2004년도에는 179두에서 36두가 폐사하여 20.1%의 폐사율을 나타낸 반면, 백화사설초 투여기간인 2005년도에는 159두에서 20두가 폐사하여 폐사율이 12.6 %로 현저히 감소되었다(Table 2).

Table 2. Production of herd and mortality of calf in 2004 and 2005 year

Year	Herd	Head of death	Mortality (%)
2005	159	20	12.6
2004	179	36	20.1

### 3. 설사 송아지에서 천연 추출물 투여에 따른 혈액학적 변화

설사를 하고 있는 송아지의 혈액과 치료후 2주와 4주후의 혈액검사값은 A목장에서는 치료 2주후에 RBC와 PCV값은 증가되었으며, PCV는 치료 2주후에 치료전보다 유의성 있게 증가되었다( $p < 0.05$ ). TP, WBC, Fib은 유의성 없게 감소되었다. B 목장은 치료 2주후와 4주후에 변화가 다양하였는데, 치료4주후에 PCV와 TP은 다소 증가되었고, WBC와 Fib는 다소 감소되었다 (Table 3).

Table 3. The Changes of Hematological values before and after *Oldenlandiae Herba* administration in calf diarrhea (Mean±SD)

Group	No. of heads	RBC ( $10^4/\mu\text{l}$ )	PCV (%)	TP (g/100ml)	WBC (/ $\mu\text{l}$ )	Fib. (mg/100ml)
A farm in Diarrhea	10	882±124	31.2±4.3 <sup>a</sup>	7.3±0.46	11,085±1,644	780±274
A farm after 2weeks	10	930±257	35.9±5.3 <sup>A</sup>	7.0±0.54	9,400±2,394	600±189
B farm in Diarrhea	10	641±113	27.6±2.5	5.4±0.65	10,870±4,033 <sup>a</sup>	480±169
B farm after 2 weeks	10	624±196	26.8±6.8	5.7±0.87	15,450±6,373 <sup>A</sup>	620±274 <sup>A</sup>
B farm after 4 weeks	10	635±170	29.1±4.3	6.0±0.67	9,840±3,804 <sup>a</sup>	380±148 <sup>a</sup>

<sup>A:a</sup>; Significantly differential pairs with same column ( $P < 0.05$ )

#### 4. 설사 송아지에 천연 추출물 투여에 따른 혈청학적 변화

혈청의 AST활성도, BUN과 creatinine 농도는 A목장에서 약간의 증감이 있었고, B목장의 경우에 AST 활성도는 높은 수준으로 유의성있게 감소되었고( $P<0.05$ ), BUN 농도는 약간의 변화가 있었으며, creatinine 농도는 A목장에서 감소되었고 B목장에서는 유의성있게 증가되었다( $P<0.05$ ) (Table 4).

Table 4. The AST activity, Blood Urea Nitrogen and Creatinine concentration before and after *Oldenlandiae Herba* administration in calf diarrhea (Mean±SD)

Group	No. of heads	AST (IU/L)	BUN (mg/100ml)	Creatinine (mg/100ml)
A farm in Diarrhea	10	38.4± 7.8	12.8±7.0	1.06±0.46
A farm after 2weeks	10	51.5±19.6	12.1±7.1	0.83±0.11
B farm in Diarrhea	10	251±231 <sup>A</sup>	14.9±5.3	0.95±0.14 <sup>a</sup>
B farm after 2weeks	10	135± 69	22.2±16.1	1.83±0.29
B farm after 4weeks	10	97± 47 <sup>a</sup>	15.5±5.4	1.86±0.38 <sup>A</sup>

<sup>A,a</sup>; Significantly differential pairs with same column( $<0.05$ )



5. 설사 송아지에 대한 천연 추출물 투여에 따른 백혈구 분포의 변화

면역세포의 변화에서 백화사설초 처치군은 투여 1주와 2주후에 투여전에 비해서 CD<sup>4+</sup>, CD<sup>8+</sup>와 CD<sup>19+</sup> positive cell이 다소 증가되는 경향이 있었지만 유의적인 차이를 보이지 않았으며, monocyte계열인 CD<sup>14+</sup> positive cell이 백화사설초 투여 1주후 대조군 10.1±4.38(%)에 비해 16.3±3.06(%)로 유의성 있게 높게 관찰되었다(Table 5)(Fig 2, 3).

Table 5. The Change of percentage of circulating CD<sup>4+</sup>, CD<sup>8+</sup>, CD<sup>14+</sup> and CD<sup>19+</sup>(B-cell) positive lymphocyte before and after *Oldenlandiae Herba* administration in calf diarrhea

Time	Group	WBC (/μl)	CD <sup>4+</sup> (%)	CD <sup>8+</sup> (%)	CD <sup>14+</sup> (%)	CD <sup>19+</sup> (%)
1 week	Treated	14,967±4,715	28.0±8.72	18.2±6.54	16.3±3.06 <sup>A</sup>	44.8±7.57
	No Treated	11,750±3,758	22.5±8.95	14.1±2.05	10.1±4.38 <sup>a</sup>	40.7±2.69
2 weeks	Treated	14,083±2,632 <sup>A</sup>	35.6±5.35	14.6±3.60	4.2±1.25	34.8±7.06
	No Treated	9,700±2,183 <sup>a</sup>	33.5±8.65	16.5±3.18	5.7±2.78	36.9±7.27

<sup>A:a</sup>; Significantly differential pairs with same column (P<0.05)

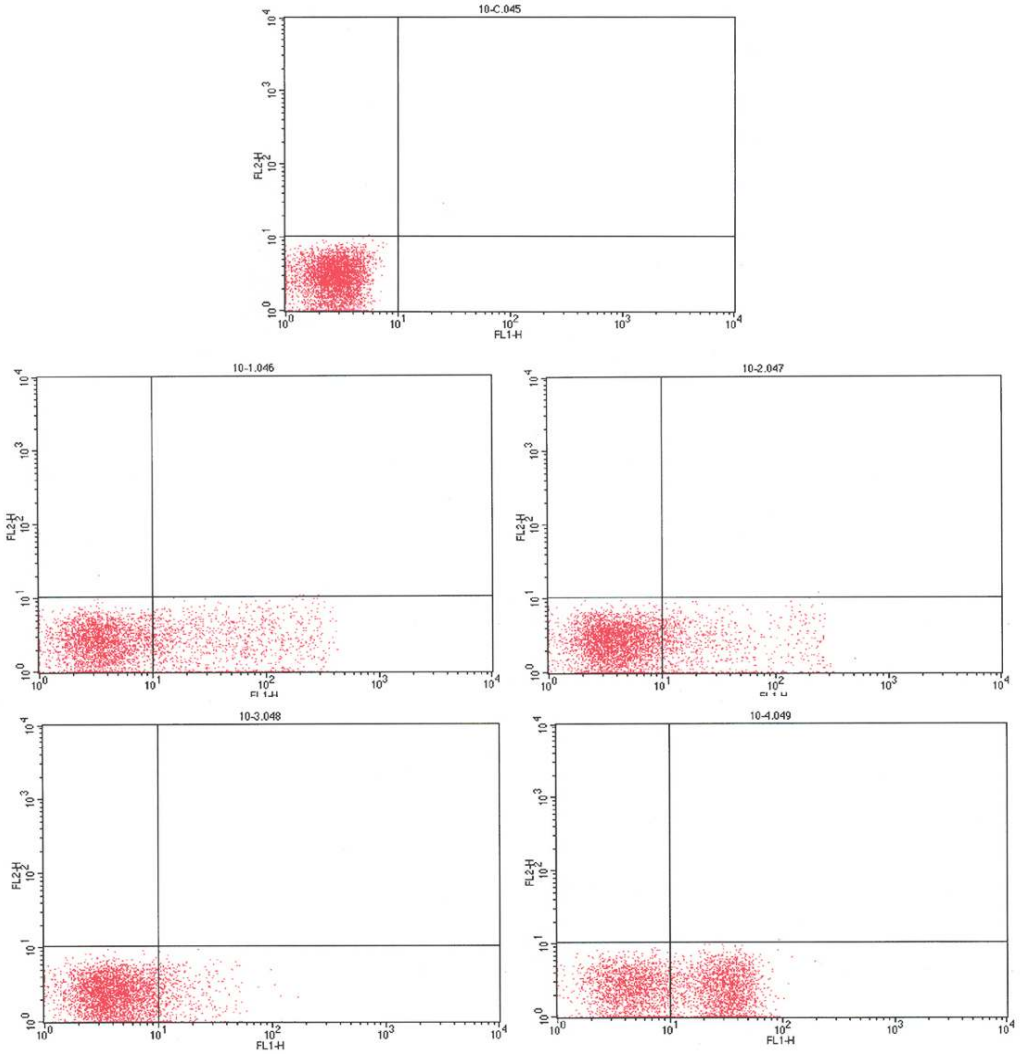


Fig 2. The result of Lymphocytes distribution( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD14^+$ ,  $CD19^+$ ) in control group

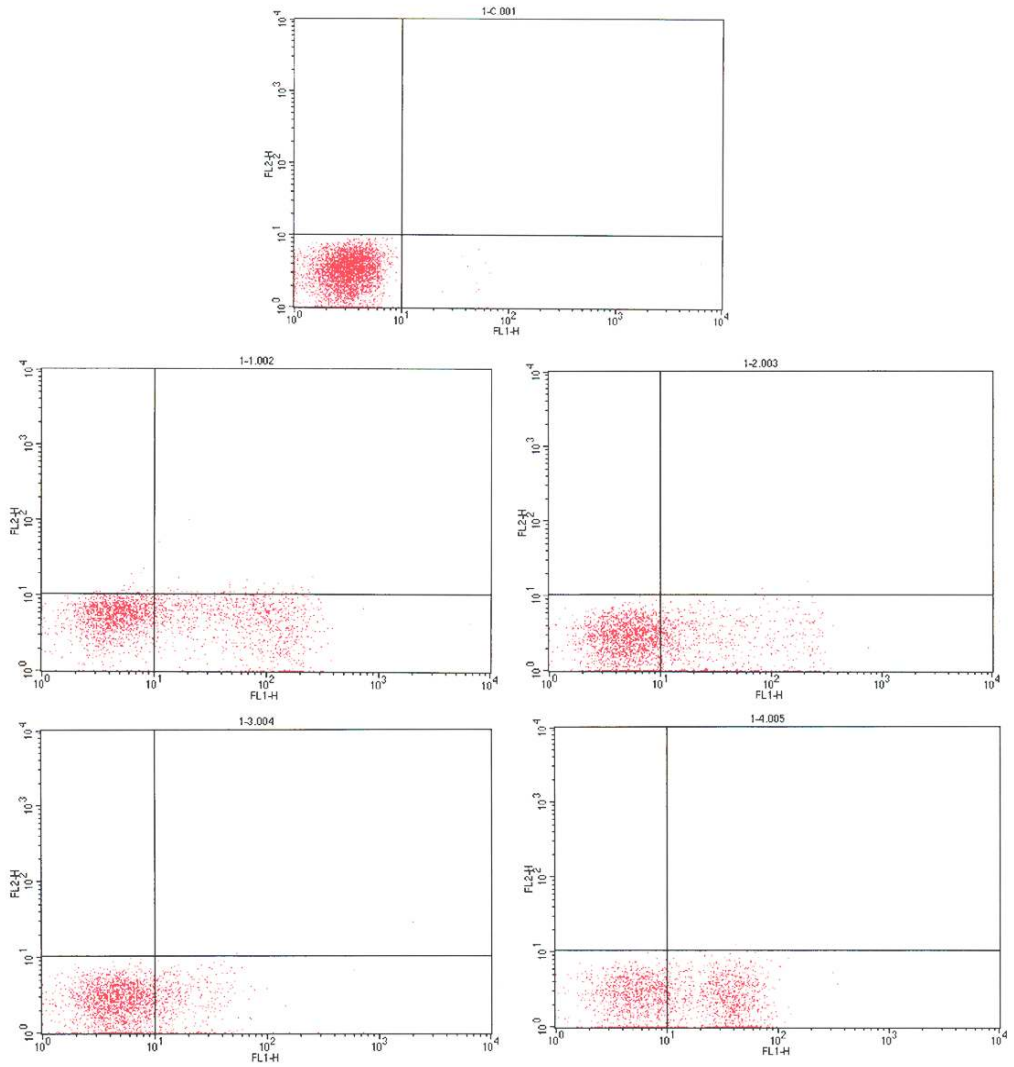


Fig 3. The result of Lymphocytes distribution( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD14^+$ ,  $CD19^+$ ) according to administration of *Oldenlandia diffusa*

## 5. 설사증과 건강한 송아지에 천연추출물 투여에 따른 체중과 혈액학적 변화

### 1) 체중의 변화

체중은 정상군에서는 0일째( $39.8 \pm 6.7$ )에서 24일째( $46.1 \pm 5.2$ )로 상승했다. 설사군에서는 0일째( $30.2 \pm 4.8$ )에서 24일째( $36.0 \pm 8.4$ )로 증가하였다. 건강한 송아지가 설사송아지에 비해 높게 유지되는 수준에서 설사송아지와 비교해서 증체율에 큰 변화를 보이지않았다 (Fig 4).

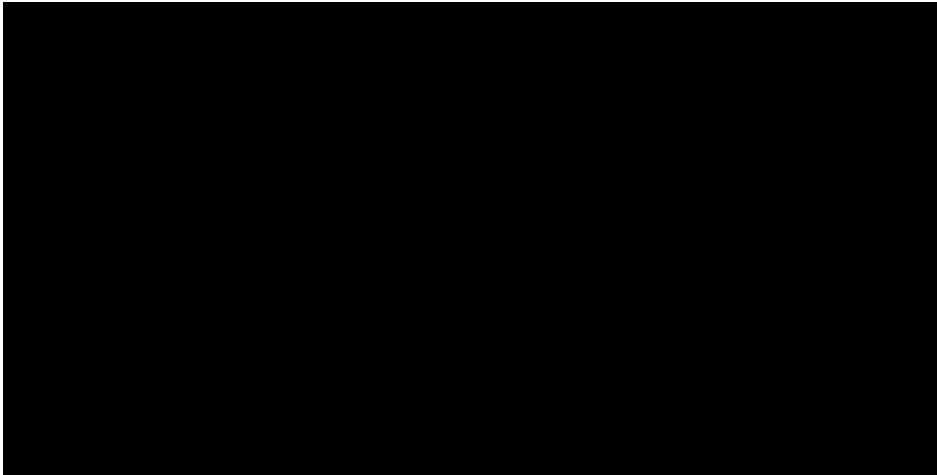


Fig 4. The changes of body weight according to administration of *Oldenlandia diffusa*

## 2) RBC의 변화

RBC는 정상군 실험 0일에  $825.5 \pm 124.8 (10^4/\mu\text{l})$ 에서 3일째  $846.7 \pm 104.6 (10^4/\mu\text{l})$ 로 증가한 후 6일째에  $846.4 \pm 108.7 (10^4/\mu\text{l})$ 로 약간 감소하였다. 9일째  $822.0 \pm 173.7 (10^4/\mu\text{l})$ 로 감소하였으며, 12일째에  $886.9 \pm 218.3 (10^4/\mu\text{l})$ 로 증가하였고 15일째에  $898.6 \pm 191.2 (10^4/\mu\text{l})$ 로 증가, 24일째에  $837.9 \pm 106.3 (10^4/\mu\text{l})$ 로 감소하였다 (Fig 5).

설사 송아지 군에서는 실험 0일째,  $865.9 \pm 118.3 (10^4/\mu\text{l})$ 에서 3일째에  $844.8 \pm 88.3 (10^4/\mu\text{l})$ 으로 감소하였고 9일째엔  $925.5 \pm 242.6 (10^4/\mu\text{l})$ 로 증가하였으며, 15일째에  $883.5 \pm 233.1 (10^4/\mu\text{l})$ 로 감소하고 24일째엔  $840.3 \pm 147.8 (10^4/\mu\text{l})$ 로 감소하였다 (Fig 5).

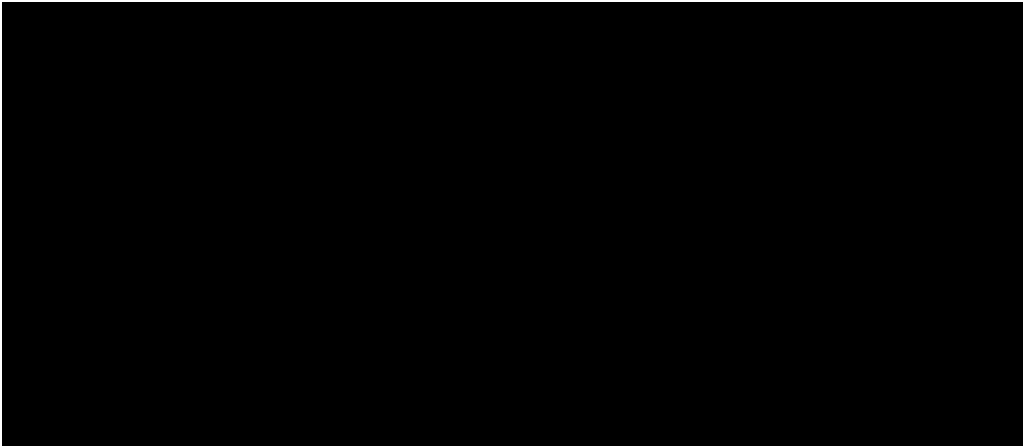


Fig 5. The changes of RBC value according to administration of *Oldenlandia diffusa*

### 3) WBC의 변화

WBC는 정상군 실험0일에  $7881.8 \pm 1808.9$ (/μl)에서 12일째는  $7941.8 \pm 1973.6$ 로 증가, 24일째는  $8899.1 \pm 1488.2$ (/μl)로 증가하였다. 설사송아지군은 0일째에  $10484.3 \pm 3167.6$ 에서 12일째에  $8315.2 \pm 2749.3$ (/μl)로 감소하였고, 15일째에는  $10300.0 \pm 2617.0$ 으로 증가하였다가, 18일째는  $8077.6 \pm 1545.9$ (/μl)로 감소하였고, 21일째는  $7811.9 \pm 1385.3$ (/μl)으로 감소하였다 (Fig 6).

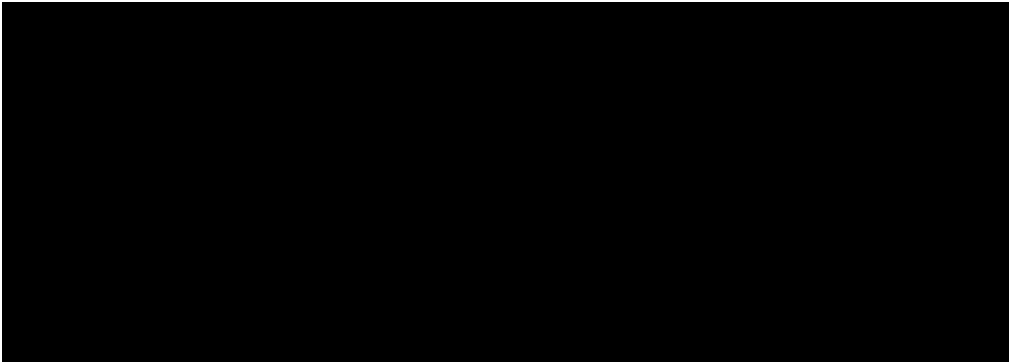


Fig 6. The changes of WBC value according to administration of *Oldenlandia diffusa*

#### 4) Fibrinogen의 변화

Fibrinogen은 정상군에서 0 일째( $418.2 \pm 166.2$ )에서 6일째( $509.1 \pm 339.0$ )으로 높아졌고, 다시 낮아지는 추세를 보이다가 15일째( $600.0 \pm 334.7$ )로 상승했다. 설사군에서의 Fibrinogen은 0일째( $828.6 \pm 291.8$ )에서 24일째( $609.5 \pm 293.1$ )로 감소하였다 (Fig 7).

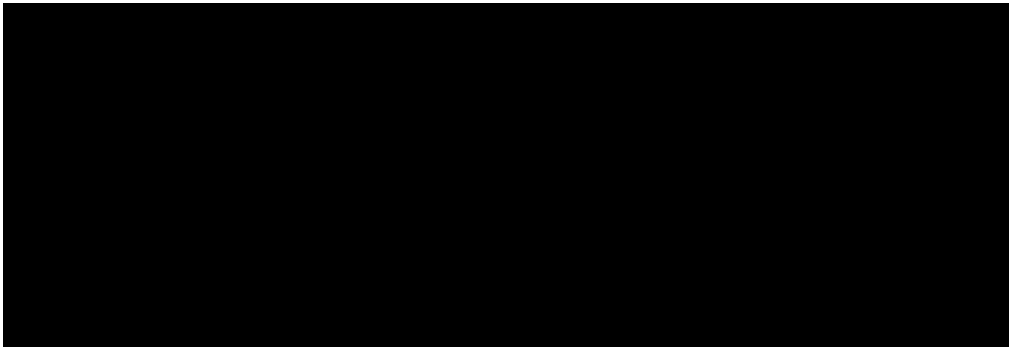


Fig 7. The changes of fibrinogen value according to administration of *Oldenlandia diffusa*

#### 5) Total protein의 변화

Total proein는 정상군에선 6일째( $6.9\pm 0.5$ )에서 9일째( $7.1\pm 0.5$ )로 높아졌다가 12일째( $6.9\pm 0.4$ )로 감소했다. 설사군에서는 Total protein는 0일째( $7.3\pm 0.5$ )에서 12일째( $6.7\pm 0.6$ )으로 감소하다가 15일째( $7.0\pm 0.5$ )로 크게 상승하고 다시 감소했다 (Fig 8).

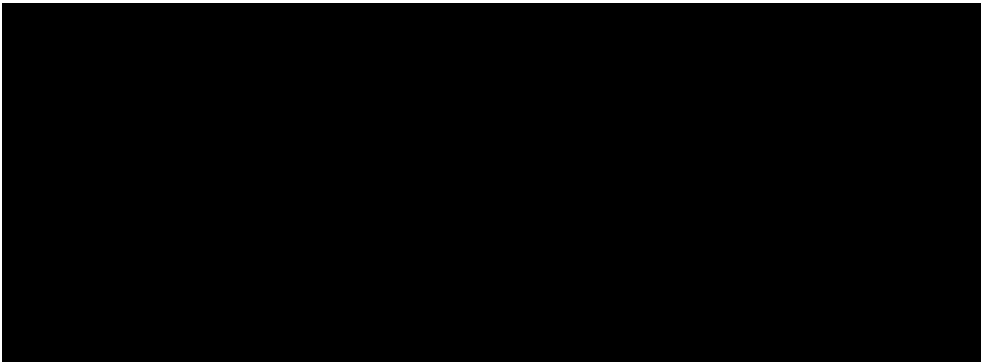


Fig 8. The changes of total protein level according to administration of *Oldenlandia diffusa*



#### 6) PCV의 변화

PCV는 정상군 0일째( $36.8 \pm 2.9$ )에서 완만히 감소하여 24일째( $34.1 \pm 1.9$ )에 낮아졌다. 설사군 PCV는 0일째( $40.5 \pm 4.7$ )에서 24일째( $33.6 \pm 4.7$ )로 감소했다 (Fig 9).

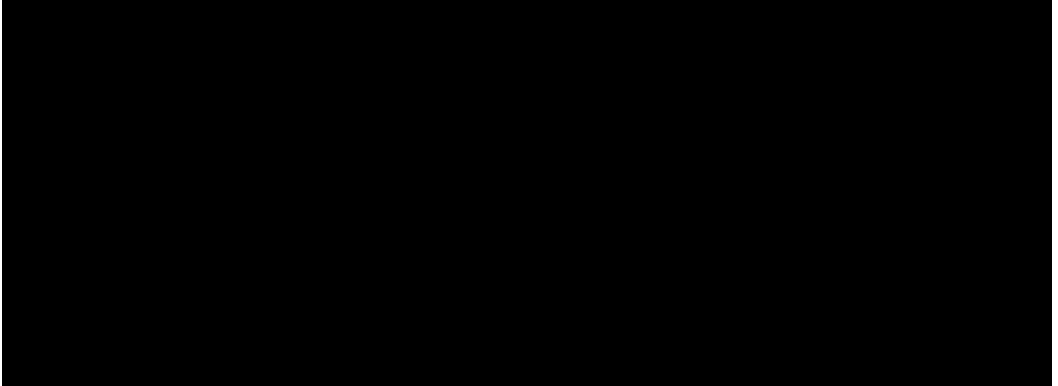


Fig 9. The changes of PCV level according to administration of *Oldenlandia diffusa*

## 6. 천연추출물 투여에 따른 혈청학적 변화

천연 추출물중의 하나인 백화사설초를 송아지에 급여한 군과 급여하지 않은 대조군간의 혈청학적 변화에서 큰 차이를 보이지 않았다. 이것으로 백화사설초가 간장 및 신장 장애를 일으키지 않은 것으로 사료된다 (Table 6).

Table 6. The AST activity, Blood Urea Nitrogen and Creatinine concentration before and after *Oldenlandiae Herba* administration in calf diarrhea (Mean±SD)

	<i>Oldenlandiae Herba</i> administration group	Control
AST(IU/L)	54.22±17.66	50.64±9.76
Creatinine(mg/dl)	0.98±0.17	0.88±0.14
BUN(mg/dl)	10.64±2.51	13.42±5.22

## 제 2 절 천연식물을 이용한 송아지 질병 치료 및 예방효과

### 1. 실험 목적

송아지에서 설사증 발생은 송아지 포유기간 동안 약 97.6%가 1회 이상 발병하며, 원인 체 별로는 Rotavirus, Coronavirus, 장독혈성 *E.coli*, *Salmonella* spp.와 *Cryptosporidium* 등이 있으며, 현재 *Campylobacter*등도 관심의 대상이 되고 있다. 이는 송아지에 발생하는 질병들 중에 중요한 질병중 하나이며, 이로 인하여 송아지를 키우는 농가에서 많은 경제적 손실을 유발시키게 한다. 송아지 설사증의 치료는 항생제나 대증요법에 의존하며, 정확한 진단에 따른 치료가 이루어지지 않고, 농가에서 자체적으로 진료를 하게 함으로써 항생제와 여러 가지 약물의 남용문제가 심각한 문제로 대두되고 있다. 이에 따라 현재 천연물 제제들을 동물에 적용을 하는 사례가 늘고 있다.

실험에서는 백화사설초, 어성초 및 몇가지 천연물 제제의 약물 효능을 평가하고 송아지 설사증에 대한 효과를 알아보았다.

### 2. 실험 방법

#### 가. 실험동물

제주지역의 대단위 목장에서 개별 사육되고 있는 포유중인 약20일령의 홀스타인 송아지 27마리를 대상동물로 사용하여 3개 군으로 나누어 실험하였다.

#### 나. 군분류 및 약물 투여방법

1) 백화사설초 투여군 (Group I) : 백화사설초 분말을 10% 용액으로 만들어 1g/30kg을 매일 1회 3주 동안 경구투여 하였다.

2) 백화사설초+어성초 투여군 (Group II) : 백화사설초와 어성초 분말을 혼합하여 10%용액으로 만든 후 각각 1g/30kg이 되도록 하여 매일 1회 3주 동안 경구 투여하였다.

3) 대조군 (Group III) : 동일 집단내 동일한 조건으로 사육하면서 아무런 처치를 하지 않은 송아지를 대조군으로 하였다.

#### 다. 시료채취

경정맥에서 10ml를 채혈하여 혈액검사를 위해 항응고제(EDTA) tube에 2ml, 나머지는 혈청검사를 위해 plain tube에 분주하였다. 채혈은 3일 간격으로 3주간 실시하였다.

#### 라. 혈액검사

PCV, RBC, WBC, T.P, Fibrinogen은 자동혈액 검사기(ABC coulter, Vetcom, Korea)로 측정하였으며, PCV는 micro-haematocrit reader(Hawksley Co, UK)를 사용하여 측정하였다. TP와 fibrinogen은 refractometer(Atago Co, Japan)을 사용하여 측정하였다.

#### 마. 혈청검사

AST, BUN, Creatinine, AST와 BUN은 Express 550/Plus wet type(Chiron, USA)의 AST, BUN, Creatinine, AST와 BUN 측정시약(Bayer Health Care Co, USA)을 이용하여 검사하였다.

#### 바. 림프구 분포(FACS) 분석

백혈구중 CD4<sup>+</sup>, CD8a<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> 검사를 위해서 EDTA tube에 5ml의 정맥혈을 채혈 후 원심관에 혈액을 옮기고 원심분리한다(2000rpm에서 10분). Buffy coat 부위를 1ml pipett이나 pasteur pipett으로 최대한 채취한다. ACK lysis buffer(NH<sub>4</sub>Cl 0.15M, KHCO<sub>3</sub> 10mM, Na<sub>2</sub> EDTA 0.1mM, pH 7.2) 동량 혼합하여 일정시간 방치(1분이내)하여 적혈구가 용혈되도록 한다. 원심분리(13,000 rpm에서 10초)하여 적혈구 용혈 상층액을 제거한 후 PBS로 남은 pellet이 깨끗하게 될 때까지 세척하였다. 남은 pellet을 재부유하여 세포수를 조정하고 Trypan blue, turk solution으로 염색하고 hemochamber을 이용하여 계산하였다. 백혈구가 1X10<sup>6</sup>이 되도록 백혈구 부유액을 E-tube에 넣고 labeling한다. FSS(FACS staining solution; FBS 5%, sodium azide 0.1%, in PBS)를 1ml이 되도록 첨가한다. 혼합 후 13,000rpm에서 10초간 원심분리(microcentrifuge)하여 상층액을 버린다. E-tube을 rack에 굽거나(7~10회) pipetting하여 남은 pellet과 용액(약 100ul 정도 상층액)을 재부유시킨다. 각각의 림프구 특이 단클론 항체(anti-mouse bovine CD4<sup>+</sup>, CD8a<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> (VMRD, Inc)를 1ul 첨가시키고 잘 혼합한다. 4℃에서 30분간 배양한다. 충분히 잘 반응하도록 혼합하고 적정 시간을 준다. FSS 700ul를 첨가하고 잘 혼합 후 원심분리한다. 위 과정을 2회 반복하여 1차 항체를 제거한다. 마지막 원심 후 상층액을 제거하고 남은 pellet을 재부유한다. FITC가 부착된 Goat anti mouse IgG(2차 단클론항체 (Jackson Immunoresearch) 1ul을 첨가하고 잘 혼합한다. 4℃에서 30분간 배양한다. 충분히 잘 반응하도록 혼합하고 적정 시간을 준다. FSS 700ul를 첨가하고 잘 혼합한 후 원심분리한다. 위 과정을 2회 반복하여 1차 항체를 제거한다. 마지막 원심후 상층액을 제거하고 남은 pellet을 재부유한다. sample



### 3. 실험결과

#### 1) 혈액학적 변화

3일 간격으로 실시한 혈액검사에서 PCV, RBC, 총단백질, 섬유소원 항목은 세 군 모두에서 정상범위 안에서 증감을 나타냈으며, PCV와 섬유소원은 대조군이 약간 높은 양상을 나타냈고, 실험 3일째 WBC 항목에서 백화사설초군과 대조군사이에서 유의적인 차이 ( $P<0.05$ )를 보였으나, 그 이후로는 세 군 모두 유의성을 나타내지 않았다. (Table 8)

Table 8. The changes of CBC values in each group

Date	Group	PCV	RBC	WBC	TP	FIB
0	I	32.6 ± 4.55	832 ± 128	8700 ± 3568	5.6 ± 0.68	400 ± 163
	II	32.9 ± 7.17	856 ± 166	9390 ± 2393	5.7 ± 0.60	360 ± 127
	III	27.4 ± 6.58	704 ± 153	8071 ± 2432	6.0 ± 0.76	400 ± 200
3	I	31.5 ± 6.06	885 ± 174	7450 ± 2787 <sup>A</sup>	5.3 ± 0.67	300 ± 170
	II	32.8 ± 6.76	967 ± 130	10030 ± 2685	5.2 ± 0.65	280 ± 103
	III	28.4 ± 6.37	930 ± 130	14386 ± 5351 <sup>a</sup>	5.3 ± 0.62	343 ± 151
7	I	32.8 ± 5.31	821 ± 124	7020 ± 1742	5.3 ± 0.65	460 ± 165
	II	33.6 ± 6.70	855 ± 155	7880 ± 2607	5.1 ± 0.53	340 ± 135
	III	28.9 ± 4.85	745 ± 142	7086 ± 1377	5.1 ± 0.61	486 ± 279
10	I	30.3 ± 4.88	795 ± 123	6460 ± 1276	5.4 ± 0.57	420 ± 148
	II	32.2 ± 5.05	816 ± 129	7830 ± 2786	5.2 ± 0.40	400 ± 94
	III	29.7 ± 5.85	766 ± 149	7986 ± 2336	5.2 ± 0.53	486 ± 157
13	I	28.1 ± 4.07	736 ± 97	6210 ± 1362	4.9 ± 0.58	360 ± 126
	II	30.1 ± 6.12	821 ± 149	8230 ± 2961	4.9 ± 0.38	340 ± 97
	III	28.0 ± 7.35	752 ± 201	7814 ± 1791	5.1 ± 0.47	400 ± 163
15	I	28.6 ± 3.27	758 ± 92	6280 ± 1549	5.0 ± 0.60	380 ± 148
	II	29.0 ± 5.29	797 ± 108	8030 ± 2480	4.9 ± 0.27	300 ± 141
	III	26.7 ± 6.50	729 ± 171	6943 ± 1987	5.1 ± 0.38	486 ± 279
18	I	28.5 ± 2.46	774 ± 65	7610 ± 1306	4.7 ± 0.49	380 ± 148
	II	28.4 ± 4.38	769 ± 107	7020 ± 1895	4.5 ± 0.31	420 ± 148
	III	24.4 ± 5.86	695 ± 153	6414 ± 2126	4.6 ± 0.35	429 ± 138
21	I	28.0 ± 2.62	739 ± 66	6990 ± 1858	4.6 ± 0.55	380 ± 199
	II	27.9 ± 4.28	775 ± 111	7870 ± 3196	4.7 ± 0.32	320 ± 193
	III	24.3 ± 5.02	694 ± 138	6329 ± 1359	4.5 ± 0.32	400 ± 115

A:a :  $P<0.05$ 의 유의적인 차이를 보이는 그룹, TP : total protein, FIB : fibrinogen

## 2) 혈청학적 변화

투여기간 동안 혈청화학 검사의 결과에서는 18일째에 BUN 항목에서 대조군과 백화사설초군 사이에서 유의적인 차이( $P < 0.05$ )를 보였다. 하지만 각 군에서 각 항목 모두 정상범위 내에서 증감을 보였다(Table 9).

Table 9. The changes of AST, BUN and creatinine values in each group

Date	Group	AST	BUN	Creatinine
0	I	45.5 ± 6.32 <sup>A</sup>	7.2 ± 1.83 <sup>B</sup>	1.52 ± 0.18
	II	38.2 ± 4.73 <sup>a</sup>	6.1 ± 1.71	1.53 ± 0.24
	III	40.6 ± 7.06	4.8 ± 1.09 <sup>b</sup>	1.37 ± 0.20
3	I	44.8 ± 9.28	8.0 ± 1.84	1.44 ± 0.20
	II	41.0 ± 6.75	7.8 ± 1.39	1.40 ± 0.16
	III	41.4 ± 5.40	6.4 ± 1.48	1.30 ± 0.12
7	I	51.4 ± 11.85	7.3 ± 0.91	1.47 ± 0.12
	II	43.5 ± 6.63	8.1 ± 1.40	1.33 ± 0.21
	III	50.4 ± 5.11	7.5 ± 1.72	1.33 ± 0.21
10	I	47.8 ± 11.35	8.3 ± 1.52	1.35 ± 0.36
	II	42.8 ± 8.04	8.5 ± 1.78	1.39 ± 0.47
	III	41.4 ± 5.48	8.1 ± 2.07	1.49 ± 0.43
13	I	51.3 ± 9.86	7.9 ± 1.27	1.32 ± 0.19
	II	48.5 ± 8.14	8.8 ± 2.31	1.39 ± 0.21
	III	49.8 ± 6.38	9.0 ± 1.70	1.41 ± 0.12
15	I	47.1 ± 7.25	8.0 ± 1.43	1.43 ± 0.25
	II	41.8 ± 8.67	8.2 ± 1.74	1.35 ± 0.15
	III	42.1 ± 5.66	10.2 ± 3.29	1.33 ± 0.11
18	I	47.8 ± 8.12	7.1 ± 1.29 <sup>C</sup>	1.23 ± 0.23
	II	46.6 ± 8.63	7.9 ± 1.39	1.35 ± 0.41
	III	49.8 ± 10.20	9.6 ± 1.77 <sup>c</sup>	1.30 ± 0.13
21	I	47.1 ± 5.51	8.1 ± 1.61	1.22 ± 0.25
	II	46.1 ± 7.66	8.8 ± 1.55	1.16 ± 0.21
	III	68.3 ± 52.04	8.7 ± 1.10	1.14 ± 0.08

A:a, B:b : P<0.05의 유의적인 차이를 보이는 그룹



3) 림프구 분포 변화

FACS 실험에서는 각 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 10).

Table 10. The changes of CD4<sup>+</sup>, CD8a<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> cell distribution in each group

Date	Group	CD4 <sup>+</sup>	CD8a <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup>
0	I	11.2±0.84	6.1±1.12	15.9±3.48
	II	6.4±0.87	6.7±1.07	11.4±1.98
	III	3.8±0.99	3.9±1.10	4.9±1.21
7	I	5.4±3.14	5.5±1.47	19.7±2.76
	II	8.3±3.45	6.7±1.91	10.3±1.87
	III	4.0±1.56	4.6±2.41	13.9±16.22
14	I	6.0±2.24	5.3±1.91	18.4±10.24
	II	9.1±1.40	6.3±1.55	24.3±9.45
	III	4.1±1.59	3.5±0.35	5.0±3.74
21	I	3.8±0.64	5.4±0.65	15.9±8.62
	II	10.2±1.23	4.4±0.41	22.2±8.71
	III	7.6±1.58	7.3±1.12	7.7±2.62

#### 4) 설사 발생두수

제주지역 대단위 목장의 홀스타인 송아지(20일령)를 대상으로 실시한 실험에서 실험을 하는 동안 설사 발생두수는 모든 실험군에서 매우 낮아졌으며, 그 중 백화사설초와 어성초의 혼합제를 투여한 군에서는 거의 설사를 일으키지 않았다(Table 11, Fig 10)

Table 11. The grade of diarrhea in each group

Date	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
I group	2.1± 0.74	1.8± 0.63	1.8± 0.63	1.9± 0.88	1.9± 0.57	2.1± 0.88	1.9± 0.88	1.7± 0.82	2.2± 0.63	1.8± 0.63	1.8± 0.79	1.9± 0.32
II group	2.3± 0.67	2.4± 0.52	2.2± 0.63	2.1± 0.88	1.8± 0.79	2.6± 0.52	2.4± 0.70	1.7± 0.48	1.8± 0.79	1.7± 0.67	2.0± 0.47	1.9± 0.57
III group	2.9± 0.38	2.6± 0.53	2.3± 0.95	2.4± 0.98	2.4± 0.53	3.0± 0.00	2.9± 0.38	2.1± 0.38	2.1± 0.38	2.3± 0.49	2.3± 0.49	2.3± 0.49
Date	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
I group	2.0± 0.82	1.8± 0.42	1.3± 0.95	1.9± 0.74	1.9± 0.32	1.7± 0.67	1.6± 0.63	1.6± 0.70	1.3± 0.95	1.5± 0.53	1.3± 0.48	0.6± 0.52
II group	1.9± 0.88	1.8± 0.63	1.3± 1.06	1.3± 0.48	1.2± 0.79	1.3± 0.48	1.5± 0.53	1.6± 0.52	1.4± 0.52	1.3± 0.48	1.1± 0.57	0.1± 0.32
III group	2.3± 0.49	2.1± 0.90	1.3± 1.11	1.7± 0.76	1.6± 0.53	1.9± 0.38	1.4± 0.53	1.4± 0.53	1.3± 0.76	1.6± 0.53	1.3± 0.49	1.0± 0.82

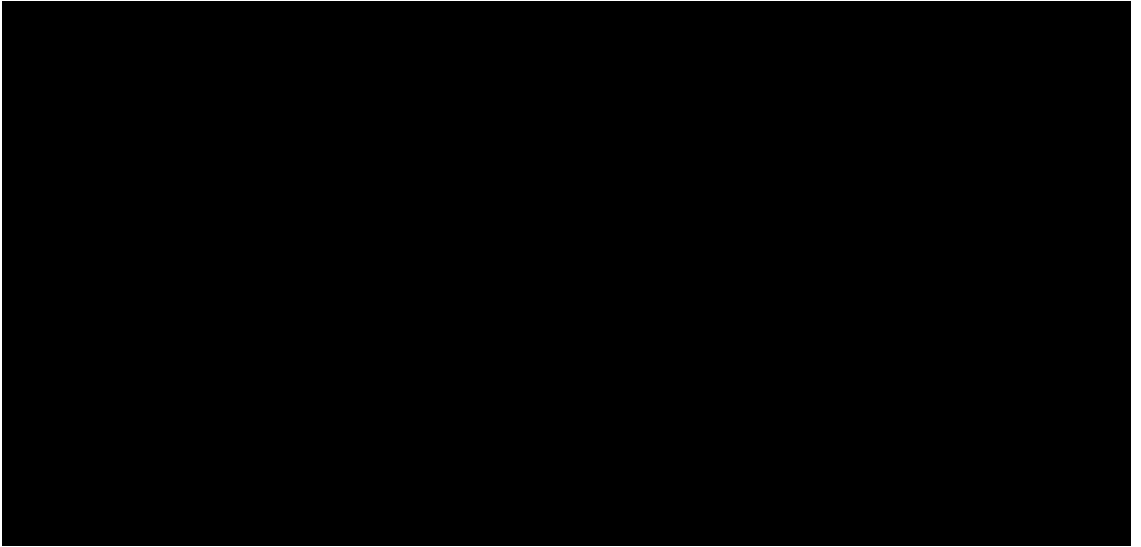


Fig 10. The changes of diarrhea grade in each group during treatment  
I; *Oldenlandiaae Herba* treatment group , II ; *Oldenlandiaae Herba* and  
*Hputtuynia cordata* treatment group, III ; No treatment group(control)

## 제 3절 호흡기 증상의 송아지에서 원인균 분리 및 감수성검사

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 실험재료

제주도내 목장 중 5곳에서 사육중인 한우송아지 중 호흡기 질병을 보이는 2~6개월령, 14두를 선정하여 실험하였다. 비강내 채취는 폐 내의 질병을 일으키는 미생물의 70%이상 미생물이 유전적으로 같다고 보고되었다.

한우 송아지의 비강내 비루를 멸균된 면봉으로 채취하여 수송배지에 넣어 냉장상태로 실험실로 운반한 후, 2일 이내에 실험에 사용하였다.

#### 나. 실험방법

##### 1) 원인균의 분리

시료들을 Blood Agar(BA: tryptose-soya-agar containing 5 % bovine blood)에 균을 접종한 후 37 °C에서 24~48시간 호기상태와 혐기상태로 배양을 하였다. 주 원인균으로 추정되는 균 집락을 다시 BA에 접종하여 동일한 조건하에서 배양한 후 4 °C에서 보관하면서 사용하였다.

##### 2) 원인균의 동정

Gram staining, Coagulase test, Oxidase test, 세균 생화학 분석기(Vitek 32, bio Merieux Vitek Inc. France)를 병용하여 원인균을 동정하였다.

##### 3) 항생제 내성 검사

항생제 감수성 검사는 디스크 확산법으로 수행하였으며, 항생제는 BBL사(USA)에서 구입한 Tetracycline(TE), Amoxicillin(AMC), Clostin(CL), Clindanycin(CC), Gentamicin(GM), Piperacillin(PIP), Kanamycin(K), Streptomycin(S), Ampicillin(AM), Moxifloxacin(MXF), Norfloxacin(NOR), Bacitracin(B), Cephalothin(CF), Penicillin(P), Cefuroxime(CXM), Enrofloxacin(ENR), Cefazolin(CZ), Trimethoprim/Sulfamethoxazole(SXT) 18종을 사용하였다.

균의 농도는 Vitek colorimeter(HACH company, USA)를 이용하여 혼탁도를 조정하였다. 이 균액을 BA와 Mueller-Hinton Agar(MHA)에 도말하여 균액이 흡수된 후 항생제

disk를 배지 위에 놓고 24시간 동안 37 °C에서 배양한 후 제조회사의 지침에 따라 항균범위를 측정하였다.

## 2. 결과

### 가. 호흡기 질병에서 분리된 균종과 분리빈도

호흡기 질병을 앓고 있는 제주도내 목장 5곳의 14마리 한우송아지의 비루부터 분리한 원인균 20개의 분포는 Table 12에서 보는 바와 같다. 총 20개의 균주 중 10개의 균종이 확인되었고, 그 중 5개의 균주(25%)에서 *Actinetobacter iwoffii* 가 분리되었으며, *Bacillus*(*assachalytic*), *Pantoea agglomerans*가 각각 3개씩(15%) 분리되었다. *Pasteurella multocida*와 *Stlphylococcus auricularis*는 각각 2개씩(10%) 분리되었고, *Streptococcus pneumoniae*, *Stlphylococcus sciuri*, *Enterobacter intermedius*, *Eikenella corrodens*, *Chrys. Ondolgene* 이 각각 1개씩(5%) 분리되었다(Table 12).

Table 12. Isolation rates of bacterial species from nasal discharge of calves

Bacterial species	No. of isolates(20)	Distribution rate(%)
<i>Actinetobacter iwoffii</i>	5	25
<i>Bacillus(assachalytic)</i>	3	15
<i>Pantoea agglomerans</i>	3	15
<i>Pasteurella multocida</i>	2	10
<i>Stlphylococcus auricularis</i>	2	10
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	5
<i>Stlphylococcus sciuri</i>	1	5
<i>Enterobacter intermedius</i>	1	5
<i>Eikenella corrodens</i>	1	5
<i>Chrys. Ondolgene</i>	1	5

나. 항생제 감수성 검사

분리 동정된 20개의 균주를 18종 항생제에 대한 내성빈도는 Table 13에서 나타낸 바와 같다.

Table 13. Antimicrobial resistance of bacterial agents from nasal discharges of calves

Bacterial spp.	No. of isolates	No.(%) of bacteria resistant to																	
		TE	AMC	CL	CC	GM	PIP	K	S	AM	MXF	NOR	B	CF	P	CXM	ENR	SXT	CZ
<i>Actinobacter iwoffii</i>	5	1 (20)	1 (20)	1 (20)		3 (60)	1 (20)	1 (20)	2 (40)	2 (40)	1 (20)	1 (20)	1 (20)	3 (60)	1 (20)	1 (20)	5 (100)	2 (40)	2 (40)
<i>Bacillus (assachalytic)</i>	3	1 (33)	2 (67)		2 (67)	3 (100)	2 (67)	1 (33)		1 (33)	2 (67)	2 (67)	1 (33)	1 (33)	1 (33)	1 (33)	1 (33)	3 (100)	1 (33)
<i>Pantoea agglomerans</i>	3	3 (100)	3 (100)	3 (100)	1 (33)	3 (100)	3 (100)	1 (33)	3 (100)	2 (67)	1 (33)			2 (67)	1 (33)	3 (100)	2 (67)	2 (67)	
<i>Pasteurella multocida</i>	2	1 (50)	2 (100)		2 (100)	2 (100)	2 (100)	1 (50)	1 (50)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	1 (50)	2 (100)	2 (100)
<i>Stlphylococcus auricularis</i>	2	2 (100)	2 (100)	1 (50)		1 (50)	2 (100)			2 (100)	2 (100)		2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	1 (50)	2 (100)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1		1 (100)			1 (100)	1 (100)	1 (100)		1 (100)	1 (100)		1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Stlphylococcus sciuri</i>	1		1 (100)			1 (100)	1 (100)			1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Enterobacter intermedius</i>	1	1 (100)	1 (100)			1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)		1 (100)	1 (100)		1 (100)		1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Eikenella corrodens</i>	1	1 (100)				1 (100)	1 (100)			1 (100)		1 (100)				1 (100)		1 (100)	
<i>Chrys. Ondogene</i>						1 (100)				1 (100)	1 (100)						1 (100)		
Total	20	10 (50)	13 (65)	5 (25)	5 (25)	17 (85)	14 (70)	6 (30)	7 (35)	11 (55)	13 (65)	9 (45)	8 (40)	13 (65)	9 (45)	13 (65)	15 (75)	14 (70)	10 (50)

\* TE: Tetracyclinetetracycline  
 CL: Clostin  
 GM: Gentamicin  
 K: Kanamycin  
 AM: Ampicillin  
 NOR: Norfloxacin  
 CF: Cephalothin  
 CXM: Cefuroxime  
 CZ: Cefazolin

AMC: Amoxicillin  
 CC: Clindanycin  
 PIP: Piperacillin  
 S: Streptomycin  
 MXF: Moxifloxacin  
 B: Bacitracin  
 P: Penicillin  
 ENR: Enrofloxacin  
 SXT: Trimethoprim/ Sulfamethoxazole

총 20균주 모두가 한 가지 이상의 항생제에 감수성을 나타내는 것으로 관찰되었다. 분리균들은 Gentamicin, Enrofloxacin에 대하여 85%, 75%의 높은 감수성을 나타내었으나 Clostin, Clindanycin 등은 30%미만의 감수성을 나타내 높은 내성율을 보여주었다. 그리고 동일 균주라도 개체에 따라 감수성이 다르게 나타내었다.

가장 분리율이 높았던 *Actinetobacter iwoffii*는 Enrofloxacin, Gentamicin, Cephalothin에 각각 100%, 60%, 60%의 감수성을 보였으나 대부분 50% 미만의 감수성을 나타내 내성율이 높음을 나타내었다. *Bacillus(assachalytic)*는 Gentamicin과 Trimethoprim/Sulfamethoxazole에 100% 감수성을 보이고, Amoxicillin, Clindanycin, Piperacillin, Moxifloxacin, Norfloxacin은 67%의 감수성을 나타내며 나머지 대부분은 33%의 감수성을 보이며, Clostin과 Streptomycin에 감수성을 나타내지 않았다. *Pantoea agglomerans*는 Tetracycline, Amoxicillin, Clostin, Gentamicin, Piperacillin, Streptomycin, Cefuroxime에 100%의 감수성을 보이며, Ampicillin, Cephalothin, Enrofloxacin, Trimethoprim/Sulfamethoxazole는 67%의 감수성을 보였고, Clindanycin, Kanamycin, Moxifloxacin, Penicillin에 33%의 감수성을 나타내었다. 그리고 Norfloxacin, Bacitracin, Cefazolin에는 감수성을 나타내지 않았다. *Pasteurella multocida*는 Amoxicillin, Clindanycin, Gentamicin, Piperacillin, Ampicillin, Moxifloxacin, Norfloxacin, Bacitracin, Cephalothin, Penicillin, Cefuroxime, Trimethoprim/ Sulfamethoxazole, Cefazolin에 100%의 높은 감수성을 보이고, Tetracycline, Kanamycin, Streptomycin, Enrofloxacin에 50%의 감수성을 보이며 Clostin에는 감수성을 나타내지 않았다. *Stlphylococcus auricularis*는 Tetracycline, Amoxicillin, Piperacillin, Ampicillin, Moxifloxacin, Bacitracin, Cefazolin, Cephalothin, Cefuroxime, Enrofloxacin, Penicillin에 100%의 감수성을 보이며 Clostin, Gentamicin, Sulfamethoxazole Trimethoprim에는 50%의 감수성을 보인다. 각각 1균주씩 분리된 *Streptococcus pneumoniae*는 Gentamicin, Piperacillin, Amoxicillin, Ampicillin, Bacitracin, Kanamycin, Moxifloxacin, Sulfamethoxazole Trimethoprim, Cephalothin, Cefazolin, Penicillin, Enrofloxacin, Cefuroxime에 감수성을 보이고, *Stlphylococcus sciuri*는 Gentamicin, Piperacillin, Amoxicillin, Ampicillin, Bacitracin, Norfloxacin, Moxifloxacin, Sulfamethoxazole Trimethoprim, Penicillin, Cefazolin, Enrofloxacin, Cephalothin, Cefuroxime에 감수성을 보이며, *Enterobacter intermedius*는 Gentamicin, Tetracycline, Amoxicillin, Piperacillin, Streptomycin, Kanamycin, Norfloxacin, Moxifloxacin, Enrofloxacin, Cefuroxime, Sulfamethoxazole Trimethoprim, Cefazolin,



Cephalothin에 감수성을 보인다. 또한 *Eikenella corrodens*은 Piperacillin, Gentamicin, Tetracycline, Cefuroxime, Sulfamethoxazole Trimethoprim, Moxifloxacin, Bacitracin에 감수성을 보이며, *Chrys. Ondolgene*는 Gentamicin, Moxifloxacin, Norfloxacin, Enrofloxacin에 감수성을 보인다. 이 중 Moxifloxacin만에 이들에게 감수성을 나타내었다(Table 13).

## 제 4절 발효 백화사설초의 급여가 송아지 폐사와 질병예방에 미치는 영향

### 1. 발효 백화사설초가 송아지 폐사율에 미치는 영향

#### 가. 실험 목적

송아지에 백화사설초를 급여하고 폐사율을 조사하여 그 효과를 조사하고자 한다.

#### 나. 재료 및 방법

##### 1) 실험동물

2006, 2007년도에 육우 비육 목장의 송아지 사육사에서 사육되는 모든 송아지를 대상으로 하여, 실험군(투여군)은 2007년도 1월부터 12월까지 입식된 송아지로 하고, 대조군은 2006년도 1월부터 12월까지 입식된 송아지로 하였다.

##### 2) 실험방법

백화사설초를 10%로 증류수와 희석하여 1g/day/개체를 송아지 사육사에 급여되는 우유에 섞어 2007년 1월부터 12월까지 급여하였다.

##### 3) 검사방법

제주도 육우 비육 목장에서 관리되는 송아지 매입 목록과 질병과 폐사에 대한 기록들을 조사하여 그 폐사율을 조사하였다.

#### 다. 결과

백화사설초를 급여하지 않은 2006년에 비하여 백화사설초를 급여한 2007년의 월 별 폐사율이 낮은 경향을 보이며 특히 2006년도 폐사율이 높았던 6월부터 8월 사이의 폐사율이 현저하게 줄어들었다. 각 년도 별로 9월이 폐사율의 최고조를 보이며 10월부터 2월 사이는 폐사율이 비교적 낮은 경향을 보인다. 7월과 8월, 11월과 12월을 제외하면 폐사율은 두 해 모두 비슷한 경향을 보인다. 폐사율은 최저 0%에서 최대 7.52%의 경향을 보인다.

폐사원인으로 식체를 제외한 세균, 바이러스성 질병에 의한 폐사는 장염(설사), 폐렴, 장출혈, 주혈원충(Piroplasma) 감염에 의한 순으로 나타났다.

백화사설초를 급여하지 않은 2006년도 월별 폐사율은 표와 같으며 총 731두를 매입하여 48두가 폐사하여, 폐사율은 6.57% 이었고, 백화사설초를 급여한 2007년도 월별 폐사율은 총 786두를 매입하여 32두가 폐사하여, 그 폐사율은 4.07% 이었다(Table 14).

Table 14. Mortality rate on 2006 and 2007 year.

2006	Head	Dead	Mortality(%)	2007	Head	Dead	Mortality(%)
January	119	1	0.84	January	121	2	1.65
February	98	0	0.00	February	79	1	1.27
March	101	5	4.95	March	94	3	3.19
April	102	2	1.96	April	132	0	0.00
May	109	4	3.67	May	123	4	3.25
June	138	2	1.45	June	102	2	1.96
July	140	9	6.43	July	157	3	1.91
August	157	8	5.10	August	196	4	2.04
September	133	10	7.52	September	152	9	5.92
October	129	2	1.55	October	127	3	2.36
November	111	2	1.80	November	137	1	0.73
December	107	3	2.80	December	150	0	0.00

## 2. 발효 백화사설초가 송아지 질병예방에 미치는 영향

### 가. 실험목적

발효 백화사설초를 어린송아지에게 급여하고 질병발생을 조사하여, 발효 백화사설초에 대한 질병예방 효과를 조사하였다.

### 나. 재료 및 방법

#### 1) 실험동물

제주 한우목장에서 사육중인 송아지를 대상으로 하여, 실험군은 2008년 1월, 2월에 사육중인 송아지로 하였고, 대조군은 2007년 11월, 12월에 사육된 송아지로 하였다.

#### 2) 실험방법

발효시킨 백화사설초 분말 5g/day/개체를 2008년 1월, 2월 중에 사육중인 송아지들에게 사료에 섞어 급여하였다.

#### 3) 검사방법

제주 한우목장의 송아지 사육 기록과 진료기록을 기초로 하여 질병발생률을 조사하였다.

### 다. 결과

한우목장의 분만사에 발효백화사설초를 송아지에 급여한 1월과 2월의 질병 발생율을 진료기록을 조사한 결과 발효백화사설초를 급여하기전인 2007년 11월과 12월의 질병 발생률은 각각 77.53%, 70%를 기록하였고(Table 15), 백화사설초를 급여한 후인 2008년 1월과 2월은 각각 43.86%, 43.75%로 질병이 감소하였다 (Fig 11).



Fig 11. 월별 질병 발생율

Table 15. 송아지에서 월별 발생된 질병분류

	2007년 11월	2007년 12월	2008년 1월	2008년 2월	계
총 두수	89	80	57	64	290
설사	52(75.4)	36(64.3)	12(48.0)	14(50.0)	114(64.0)
호흡기	10(14.5)	12(21.4)	13(52.0)	9(32.1)	44(24.7)
기타	7(10.1)	8(14.3)	0(0.0)	5(17.9)	20(11.2)
계	69	56	25	28	178
질병 발생율	77.53%	70.00%	43.86%	43.75%	

\* ( )안은 비율(%)을 나타냄

## 제 5절 천연 식물 추출물의 정균성 평가

### 1. 백화사설초, 고삼, 영지, 어성초의 항세균 작용 평가

최종상품화를 염두에 두고 후보물질을 문헌을 통해서 탐색하였다. 그 조건으로 주변에서 구하기 쉽고 비교적 저렴한 식물이며 항균 및 항바이러스 효과가 알려진 식물을 탐색하였다. 가장 타당성이 높은 식물로서 백화사설초, 고삼, 영지, 어성초, 백굴채, 인진쑥, 오리나무를 후보물질로 선정하였으며 경동시장내의 동양한약유통(주)에서 구매하여 사용하였다.

### 2.. 항균성 시험

가. 대상균주 4종 : *E. coli*, *E. coli* 0157, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*

#### 나. 시료 제조 방법

- 1) 후보물질을 각각 600g씩 담아 준비한다.
- 2) 분쇄기(믹서기)를 사용하여 분쇄한다.
- 3) 추출용매 제조 : 100% EtOH, 30% EtOH, Water 3종류 준비한다.
- 4) 추출조건

가) 100% EtOH, 30% EtOH 추출물 ; 50℃에서 5시간 추출, Shaking incubator, 90-100rpm

나) 물 추출물 ; 80℃에서 5시간 추출

5) 후보식물 분쇄물을 150g 씩을 2L 삼각 flask에 담은 후 추출용매 1500ml의 용매를 넣은 후 1차 추출 실시.

6) 추출한 후 깔때기에 filter paper를 깔고 진공펌프를 사용하여 filtering.

7) 추출액은 모아서 진공농축기에서 농축하고 깔때기에 걸러진 시료는 다시 한번 동일한 양의 추출용매를 넣고 5시간동안 2차 추출 진행.

8) 2차 추출물도 동일한 방법으로 filtering을 한 후 모아서 농축함.

9) 진공농축기에서 10-20배 정도 농축한 농축물을 모아서 동결건조 및 진공건조를 실시함.

#### 다. 항균시험 방법(Paper disk Method)

- 1) 사용배지 : Mueller Hinton media
- 2) Paper disk는 Toyo사의 8mm 크기를 사용 하였다.
- 3) 고체배지를 미리 만들서 각 세균을 도말한다.
- 4) 도말한 고체배지 표면에 paper disk를 부착시킨다.
- 5) paper disk에 각 추출액을 접종한다
- 6) 37℃에서 24hr 배양후 저해환을 측정한다.

#### 라. 결과 및 고찰

애기똥풀은 모든 추출균 및 모든 균주에서 항균력이 나타나지 않았고, 고삼은 100% EtOH 추출물균에서만 *E. coli o157*, *E.coli*, *Salmonella typhimurium*에서 미약한 항균력이 나타났으며, 백화사설초, 영지, 어성초는 100% EtOH 추출물균에서만 모든 균주에서 상대적으로 높은 항균력을 보였다. 추출시 100% EtOH로 추출하는것이 항균물질을 추출하는 최적 용매로 판단되며 후보 물질 가운데 백화사설초, 영지, 어성초가 대상 균주에 대하여 항균효과가 있었다(표 16).



표 16. 후보식물체 추출물의 항균력 시험결과

균주및약재명	1				2				3			
	100% EtOH	70% EtOH	30% EtOH	Water	100% EtOH	70% EtOH	30% EtOH	Water	100% EtOH	70% EtOH	30% EtOH	Water
<i>E. coli</i>	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	C	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	D	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	E	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. coli</i> 0157	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	C	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	D	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	E	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>S. typhimurium</i>	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	C	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	D	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	E	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. enteritidis</i>	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	C	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	D	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	E	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-

A : 애기똥풀 B : 고삼 C : 영지 D : 어성초 E : 백화사설초

+ : 저해환 2-4mm, - : 저해환 0mm

1차 2차, 3차는 추출물의 반복수

## 2. 천연 식물 추출물의 항바이러스 평가

### 1) 백화사설초, 고삼, 영지, 어성초의 항바이러스 작용 평가

#### 가) 후보물질 추출방법

- (1) 약용식물 7종에 대하여 각각 600g씩 담아 준비
- (2) 분쇄기(믹서기)를 사용하여 분쇄
- (3) 추출용매 제조 : 100% EtOH, 30% EtOH Water 3종류 제조
- (4) 추출조건
  - 100% EtOH, 30% EtOH 추출물 ; 50℃에서 5시간 추출, Shaking incubator, 90-100rpm
  - 물 추출물 ; 80℃에서 5시간 추출
- (5) 후보식물 분쇄물을 150g 씩을 2L 삼각 flask에 담은 후 추출용매 1500ml의 용매를 넣은 후 1차 추출 실시.
- (6) 추출한 후 깔때기에 filter paper를 깔고 진공펌프를 사용하여 filtering.
- (7) 추출액은 모아서 진공농축기에서 농축하고 깔때기에 걸러진 시료는 다시 한번 동일한 양의 추출용매를 넣고 5시간동안 2차 추출 진행.
- (8) 2차 추출물도 동일한 방법으로 filtering을 한 후 모아서 농축함.
- (9) 진공농축기에서 10-20배 정도 농축한 농축물을 모아서 동결건조를 실시함.
- (10) 농축액으로 제조시 가용성 고형분 함량을 측정(1g 을 칭량하여 100℃ 건조기 안에서 수분을 완전히 제거하여 고형분의 무게를 측정함)

#### 나) BCRNV, BHV, BVDV 항바이러스 시험방법

- (1) 96well Micro plate에 MDBK cell을 배양
- (2) 바이러스 접종전에 배지 버림
- (3) 배지 50ml+stock virus 0.1ml로 희석된 바이러스를 각 well당 50ul씩 접종후 1시간 동안 37℃ 인큐베이터에서 바이러스 흡착
- (4) 바이러스 감작배지를 버린 후, 각 well당 2배 계단 희석된 백초를 100ul씩 분주 하였다.
- (5) 37℃에서 24시간 배양

#### 다) 시험 결과

- 1차 년도에는 애기똥풀 (백굴채), 고삼, 백화사설초, 어성초, 영지. 5종의 후보식물에서

연구를 수행하였으나 보다 효능이 높을 것으로 예상되는 인진쑥과 오리나무를 추가하여 2차년도 연구를 수행하였다.

1차년도에 진행한 것과 동일하게 paper disk방법으로 진행했으며 균주는 *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* 3균주로 항균력을 확인하였다. 결과는 다음과 같이 오리나무 100% EtOH 추출물의 경우가 월등히 항균력이 높음을 확인하였다.

표 17. 추가 후보물질에 대한 항균효능평가

균주 및 약재명	추출용매명			
	100% EtOH	30% EtOH	Water	
<i>E. coli</i>	인진쑥	+	+	-
	오리나무	+	+	+
<i>S. typhimurium</i>	인진쑥	++	+	-
	오리나무	++	+	-
<i>S. aureus</i>	인진쑥	+	+	-
	오리나무	+++	++	+

+ : 저해환1-2mm, ++ : 저해환2-3mm, +++: 저해환3-4mm    - : 저해환 0mm

애기똥풀(백굴채), 고삼, 백화사설초, 어성초, 영지, 인진쑥, 오리나무를 각각 100%, 30% EtOH, Water 3종류의 용매로 추출한 후 진공농축기에서 10-20배 정도 농축한 농축물을 모아서 동결건조를 실시하여 분말화 한 후보물질을 바이러스에 첨가하여 항바이러스 효능을 평가하였다.

인진쑥 100% EtOH군에서 BCRNV, BHV에 대하여 1280배 희석군까지 효능이 있었다. 오리나무의 경우에는 세균 모두에서 1280배까지 효능이 있었다. 특히 BHV에서는 추출용매별로 세균 모두 5120개까지도 효능이 나타났다.

영지에서는 BVDV에서 1280배까지 효능을 타나냈으며 백굴채에서도 추출용매별 3군 모두 BVDV, BHV 2종 바이러스에서 640배 희석군까지 효과를 나타냈다.

후보물질들의 세포 상해도를 시험한 결과 어성초가 160배 희석농도에서 세포상해가 관찰되었으며 나머지 시료 모두에서는 40배 희석액 이하에서 세포상해가 관찰되었다.

어성초가 다른 시료에 비해서 세포독성이 있는 것으로 나타났으나 160배 희석액에서 세포상해가 관찰되었으므로 6.25mg/ml 이하의 농도에서는 세포독성이 없는 것으로 사료되며 항바이러스 시험결과 320배 희석(3.12mg/ml) 이상의 저농도로 사용할 것이므로 사용에 문제가 없는 것으로 사료된다. 나머지 시료들은 250mg/ml 의 농도에서도 세포상해가 관찰되지 않은 바 in vitro 상에서는 안전한 것으로 사료된다.

- 1차년도에서 항균효능이 입증된 백화사설초, 영지, 어성초와 2차년도에 새롭게 추가된 인진쑥, 오리나무가 항균효능이 있었고 항바이러스 시험으로 효능이 높았던 인진쑥, 오리나무, 영지, 백굴채 중에서 항균, 항바이러스 효능을 모두 가진 후보물질은 영지, 인진쑥, 오리나무로 압축된 상황이며 임상시험 데이터를 종합하여 3차년도에 최종 후보물질과 단일제형, 복합제형을 비교 검토하여 최종제형을 결정 할 예정이다.

2. 백화사설초 등의 소바이러스에 대한 항바이러스효능 검사 (1:희석배수)

표 18. 소바이러스에 대한 시험물질(고삼, 인진쑥, 어성초, 백화사설초, 오리나무, 영지, 백굴채)의 항바이러스 효능평가

추출조건/바이러스	BCRNV	BVDV	BHV
고삼 EtOH 100%	320	320	320
고삼 EtOH 30%	640	640	640
고삼 물 100%	160	320	320
인진쑥 EtOH 100%	1280	320	1280
인진쑥 EtOH 30%	320	640	640
인진쑥 물 100%	160	160	160
어성초 EtOH 100%	320	160	160
어성초 EtOH 30%	640	160	160
어성초물 100%	640	160	160
백화사설초 EtOH 100%	640	320	320
백화사설초 EtOH 30%	320	320	320
백화사설초물 100%	320	160	160
오리나무 EtOH 100%	2560	2560	5120
오리나무 EtOH 30%	2560	2560	5120
오리나무 물	5120	1280	5120
영지 EtOH 100%	320	640	320
영지 EtOH 30%	80	1280	320
영지 물	80	1280	320
백굴채 EtOH 100%	320	5120	5120
백굴채 EtOH 30%	1280	1280	2560
백굴채 물	320	1280	640

표 19. 시험물질(고삼, 인진쑥, 어성초, 백화사설초)에 대한 세포 상해 (1 : 희석배수)

추출조건/바이러스 및 세포	BRTV	BCRNV	BVDV	BHV
	MA104 cell	BK-cell	BK-cell	BK-cell
고삼 EtOH 100%	40이하	40이하	40이하	40이하
고삼 EtOH 30%	40이하	40이하	40이하	40이하
고삼 물 100%	40이하	40이하	40이하	40이하
인진쑥 EtOH 100%	40이하	40이하	40이하	40이하
인진쑥 EtOH 30%	40이하	40이하	40이하	40이하
인진쑥 물 100%	40이하	40이하	40이하	40이하
어성초 EtOH 100%	160	160	160	160
어성초 EtOH 30%	160	160	160	160
어성초 물 100%	160	160	160	160
백화사설초 EtOH 100%	40이하	40이하	40이하	40이하
백화사설초 EtOH 30%	40이하	40이하	40이하	40이하
백화사설초 물 100%	40이하	40이하	40이하	40이하

### 3. 백화사설초 추출분말의 Ursolic acid 함량분석

#### 가. 인진쑥 추출분말 제조방법

- 1) 백화사설초 600g을 저울로 측정한다.
- 2) 분쇄기(믹서기)를 사용하여 분쇄한다.
- 3) 추출용매 제조 : 100% EtOH, 70% EtOH, 30%, EtOH, Water 4종류 준비한다.
- 4) 추출조건 : 50℃에서 5시간 추출, Shaking incubator, 90-100rpm
- 5) 후보식물 분쇄물을 150g 썬을 2L 삼각 flask에 담은 후 추출용매 1500ml의 용매를 넣은 후 1차 추출 실시.
- 6) 추출한 후 깔때기에 filter paper를 깔고 진공펌프를 사용하여 filtering.
- 7) 추출액은 모아서 진공농축기에서 농축하고 깔때기에 걸러진 시료는 다시 한번 동일한 양의 추출용매를 넣고 5시간동안 2차 추출 진행.
- 8) 2차 추출물도 동일한 방법으로 filtering을 한 후 모아서 농축함.
- 9) 진공농축기에서 10-20배 정도 농축한 농축물을 모아서 동결건조 및 진공건조를 실시함

#### 나. 인진쑥 추출분말의 Chlorogenic acid 함량분석

##### 1) 사용기기 및 장비

HPLC system(YOUNGLIN INSTRUMENT)  
Pump-SP930D, Detector-UV730D, Column oven-CTS30  
Column : Bondapack C18 3.9 x 300mm Column(Waters)  
Chromatograph Data System  
: Autochro-1000(ver. 1.0: YOUNGLIN INSTRUMENT)

##### 2) 분석조건

Mobile Phase : ACN + DW(2ml phosphoric acid) = 800 : 200  
Column :  $\mu$ -Bondapacked C18 3.90 x 300mm(Waters)  
Flow rate : 1.0ml/min  
Column oven : 35℃  
Detector : UV206nm

##### 3) 표준액의 제조

가) Ursolic acid STD(sigma, min.98%) 5mg을 50ml vol. flask에 칭량하여 물 10ml을 넣고 30ml의MeOH를 가한 후 초음파로 약5분간 분쇄한 후 MeOH를 가하여 정확히 50ml로 한다. (최종80% MeOH) 0.45 $\mu$ m syringe filter로 여과 후 이를 표준액으로 한다.

나) 100ppm, 50ppm, 25ppm 희석하여 측정

#### 4) 검액의 제조

가) 백화사설초 물100% 추출분말 : 100ml vol. flask에 분말 0.2g을 칭량하고 80% MeOH 20ml을 가하여 초음파로 약60분간 추출하고 이하 표준액의 제법에 따른다.

나) 백화사설초 EtOH30%추출분말 : 100ml vol. flask에 분말 0.2g을 칭량하고 80% MeOH 20ml을 가하여 초음파로 약60분간 추출하고 이하 표준액의 제법에 따른다.

다) 백화사설초 EtOH70%추출분말 : 100ml vol. flask에 분말 0.2g을 칭량하고 80% MeOH 20ml을 가하여 초음파로 약60분간 추출하고 이하 표준액의 제법에 따른다.

라) 백화사설초 EtOH100%추출분말 : 100ml vol. flask에 분말 0.2g을 칭량하고 80% MeOH 20ml을 가하여 초음파로 약60분간 추출하고 이하 표준액의 제법에 따른다.

#### 5) 백화사설초 추출분말에 대한 분석결과

표 20의 결과로 보아 백화사설초 추출분말중 EtOH 100%추출분말에서 Ursolic acid함량이 가장 높았다. 하지만EtOH 100% 추출물의 성상이 분말이 아닌 끈적끈적한 덩어리 상태였으며 잘 깨지지도 않았다. 함량만 본다면 100% EtOH 추출하는 것이 당연하겠으나 향후 제품화까지 생각한다면 30% EtOH 추출법이 최선의 선택이라 사료된다. 이유는 제품의 안정성 측면을 확보하기 위함이다. 고농도 에탄올 추출물의 경우는 분말화 하는데 상당한 시간과 비용이 들어가며 분말화 후에도 쉽게 흡습이 되거나 덩어리를 만들어서 보조사료로서 주사료와 혼합시에 애로사항의 발생이 예상된다. 분말화하기 가장 쉬운 물 추출물의 경우는 유효성분 함량이 낮아 효능이 떨어지리라 예상된다. 3차년도에 추가한 균으로 발효 백화사설초 추출분말균이 들어있는데 이것은 백화사설초 추출분말의 냄새와 맛이 송아지가 좋아하지 않아서 이를 개선하고자 발효 백화사설초를 사용하여 기호성을 가미하였으며 발효공정을 거친 원료를 사용했을 때에도 유효성분 함량은 거의 동일하게 유지되었다.



표 20. Ursolic acid 함량

시료	농도	함량(%)	비고
Ursolic acid STD	5mg/50ml	98(%)	RT:21.85min
백화사설초 물100% 추출분말	204mg/100ml	0.009%	RT:21.85min
백화사설초 EtOH 30%추출분말	201mg/100ml	0.85%	RT:21.85min
백화사설초 EtOH 70% 추출분말	200mg/100ml	2.55%	RT:21.85min
백화사설초 EtOH 100%추출분말	212mg/100ml	4.18%	RT:21.85min
발효백화사설초 EtOH 30%추출분말	202mg/100ml	0.87%	RT:21.85min

#### 4. 백화사설초 추출분말에 대한 단회 투여독성시험

##### 가. 시험 개요

시험제목 : 랫드에서의 백화사설초 단회경구투여독성시험

시험목적 : 랫드를 이용하여 백화사설초의 단회투여독성 유무를 관찰하기 위해 실시하였다.

시험방법 : 식품의약품안전청 고시 제 2005-60호(2005년 10월 21일)'의약품등의 독성시험 기준'에 준하여 수행하였다.

시험기관 : 알앤엘생명과학(주)

시험책임자 : 최 대 우

시 험 자 : 이항영

이민로

서주연

##### 나. 시험일정

동물입수일 : 2007년 10월 09일

시험물질투여 : 2007년 10월 16일

시험종료일 : 2007년 10월 30일

최종보고서 : 2007년 11월 04일

#### 다. 요약문

시험물질 백화사설초의 단회경구투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 Sprague - Dawley(SD)계통 암수 랫드에 경구투여하였다.

시험물질은 백화사설초 추출물이고, 투여량은 시험물질 각각 1,000, 500, 250mg/kg B.W.으로 하였다. 용매대조군은 상수도로 설정하였다. 각 군별 동물 수는 암수 각 5마리로 하였고, 2주간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다. 시험결과는 다음과 같다.

- 1) 모든 시험군에서 전 시험기간을 통하여 시험물질의 투여와 관련된 사망 동물이 발생하지않았다.
- 2) 일반증상에서 시험물질에 의한 특이변화는 관찰되지 않았다.
- 3) 체중변화에서 시험물질에 의한 특이변화는 관찰되지 않았다.
- 4) 본 시험 조건에서 사망률, 일반증상, 체중변화, 부검소견에서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았고, 시험물질 백화사설초의 랫드에 대한 최소치사량은 암수 모두 1,000 mg/kg B.W.을 상회하는 것으로 판단하였다.

#### 라. 시험물질 및 부형제

##### 1) 시험물질

- 가) 명칭 : 백화사설초(*Oldenlandia diffusa*) 30% EtOH 추출분말
- 나) 구조식 : 표시불가
- 다) 화학명 : 표시불가
- 라) 공급원 : RNL생명과학(주)
- 마) 입수일 : 2007년 10월 07일
- 바) 보관조건 : 상온보관(20℃), 투명용기

##### 2) 부형제

- 가) 명칭 : 상수도

나) 선택이유

시험물질을 용해한 증류수와 유사하여 상수도를 선택하였다.

마. 재료 및 방법

1) 시험계

가) 종 및 계통

SD(Sprague-Dawley) 랫드

나) 공급원 : (주)샘타코 Biokorea

다) 시험계의 선택이유

본 시험에 사용된 랫드는 독성시험에 적당한 실험동물로서 일반독성시험에 널리 사용되고 있다. 또한 본 계통의 랫드는 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어서, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있기 때문이다.

라) 주령 및 체중범위

입수시 주령 : 암수 각 7 주령

입수시 동물수 : 암수 각각 25마리

투여 개시시 주령: 암수 각 8 주령

투여 개시시 동물수 : 암수 각 20마리

투여 개시시 체중 : 수컷 251.30~290.78 g, 암컷 184.95~209.04 g

군 분리법 : 무작위법

마) 순화기간

동물 입수 후 7 일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시켰다. 순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다.

2) 사육조건

가) 환경조건

본시험은 온도  $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 10\%$ , 환기회수 10-12/hr, 조명시간 12시간, 조도 150 - 200lux로 설정된 동물실험실에서 실시하였다.

나) 사육상자, 사육밀도 및 사육상자의 식별

동물은 순화기간 및 시험기간 중에 polycarbonate 상자에 5마리/사육상자로 사육하였다. 사육상자에는 시험번호, 동물번호 및 시험물질을 기입한 tag을 붙였다.

다) 사료 및 음수의 급여방법

사료는 고압증기멸균(121℃, 20분)한 실험동물용 고품사료(슈퍼피드)를 자유섭취시켰으며, 물은 상수도를 물병을 이용하여 자유섭취시켰다.

3) 투여량 및 시험군의 구성

가) 투여량 설정

백화사설초 추출분말을 부형제에 녹일 수 있는 최대용량인 1,000mg/1.5ml/kg B.W을 최대용량으로 정하고, 그 용량을 일정한 공비(×2)로 2단계를 설정하여, 시험물질을 1회 경구 투여한다.

나) 시험군의 구성

표 21. 시험군의 구성 및 약물투여방법

군	성별	동물수(마리)	투여액량(ml/마리)	투여량(mg/kg)	
대조군	Male	5	1.5	0	
	Female	5	1.5		
최고용량군	Male	5	1.5	1,000	
	Female	5	1.5		
중간용량군	Male	5	1.5	500	
	Female	5	1.5		
저용량군	Male	5	1.5	250	시
	Female	5	1.5		

다) 군분리 및 동물식별

동물의 군분리는 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정 후 순위화 하여 각 군별로 평균 체중이 비슷하게 되도록 군분리를 실시하였다. 동물의 개체식별은 ear punch를 이용하여 표시하였다.

4) 투여

가) 시험물질의 조제법

최고용량군의 경우 시험물질을 칭량한 후 증류수를 이용하여 투여할 시험물질을 조제하였다. 아래용량군은 최고용량군 시험물질을 희석조제하였다.

나) 투여경로 및 투여방법

투여경로는 경구투여를 선택하였다. 투여방법은 투여 전에 하룻밤 절식시켜 위 내용물을 비운 후 동물을 경배부 피부 고정법으로 고정하고 금속제 경구 투여용 존데를 이용하여 위내에 직접 주입하였다.

다) 투여경로 선택이유 : 사람에서의 임상적용 예상경로로서 경구투여를 선택하였다.

라) 투여횟수 및 투여기간 : 1 회/일

마) 투여액량 : 한 마리당 1.5 ml씩 투여하였다.

#### 5) 관찰 및 검사항목

##### 가) 일반증상 및 사망동물의 관찰

모든 동물에 대하여 매일 1회 이상 증상관찰을 실시하였다. 단, 투여당일에는 투여 직후 및 이후 6시간까지 매시간 관찰하였다.

##### 나) 체중측정

모든 동물에 대하여 투여 전, 투여 후 4, 7 및 14 일째의 체중을 측정하였다.

##### 다) 부검소견의 관찰

시험 중 폐사 동물은 그때마다 부검을 실시하고, 시험 종료 시 생존동물은 ether마취로 처사시켜 육안적으로 모든 장기를 검사한다. 육안적으로 이상이 확인되는 장기와 조직은 10% 중성 포르말린에 고정한다.

#### 6) 통계학적 방법

체중 증가량의 경우 평균과 표준편차를 산출하여 대조군과 시험물질 투여군을 비교하였다. 통계학적 분석은 일원배치 분산분석법을 이용하였다. 통계를 위한 전산 프로그램으로는 SPSS 12.0K를 이용하였다.

#### 바. 시험결과

##### 1) 사망동물 (Table 22)

전시험기간을 통하여 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않았다.

##### 2) 일반증상 (Table 23,24,25,26,27,28,29,30)

전시험기간을 통하여 랫드 암수 모두에서 본 시험물질에 의한다고 생각되는 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았다.

##### 3) 체중변화 (Table 31)

전 시험기간 동안 특이변화는 관찰되지 않았다.

#### 사. 고찰 및 결론

백화사설초의 단회투여독성시험 유무를 식품의약품 안전청 고시 제 99-61호 “의약품 등의 독성시험기준 (1999. 12. 22)”에 따라 랫드에서 14일간 관찰한 결과는 다음과 같다.

시험 전 기간 동안 어떠한 군에서도 시험물질을 투여한 뒤 폐사한 동물이 없었다. 또한 체중변화에 있어서 대조군과 백화사설초투여군 간의 체중차이는 관찰되지 않았다. 이로 미루어 볼 때 이 시험물질이 랫드에 독성이 미치지 않는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 본 시험 조건에서 랫드에 대한 백화사설초의 경구 적용시 사망한 동물은 없었으며, 백화사설초에 의한 유의한 어떠한 이상도 관찰되지 않았다고 판단된다. 따라서, 본시험의 조건에서 백화사설초의 개략적인 치사량은 경구투여시 최고용량인 1,000 mg/kg B.W. 이상일 것이라고 사료된다.

Table 22. 백화사설초 투여 당일시간과 투여 일에 따른 사망률

성별	용량군	처치당일(시간)						처치 후 (일)								사망률						
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8		9	10	11	12	13	14
male	고용량군 (1,000 mg/kg B.W)	0 <sup>a)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
	중용량군 (500 mg/kg B.W)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
	저용량군 (250mg/kg B.W)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
	control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
female	고용량군 (1,000mg/kg B.W)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
	중용량군 (500mg/kg B.W)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
	저용량군 (250mg/kg B.W)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
	control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)

a). 사망한 동물의 수



Table 23. 백화사설초 투여 후 수컷의 임상증상

임상증상	고용량군	처치당일(시간)					처치 후(일)														
	1,000 mg/kg B.W	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	동물수	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
빈 호흡		0 <sup>a)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
행동이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
후궁반장		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
반사이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
시각장애		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
심혈관계 이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
유연		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
입모		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
통각손실		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
근육이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
위장관 이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
피부		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* : 임상증상이 관찰된 동물의 수

Table 24. 백화사설초 투여 후 수컷의 임상증상

임상증상	중용량군	처치당일(시간)					처치 후(일)															
	500 mg/kg B.W	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
	동물수	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
빈 호흡		0 <sup>a)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
행동이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
후궁반장		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
반사이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
시각장애		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
심혈관계 이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
유연		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
입모		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
통각손실		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
근육이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
위장관 이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
피부		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<sup>a)</sup>, 임상증상이 관찰된 동물의 수

Table 25. 백화사설초 투여 후 수컷의 임상증상

임상증상	저용량군	처치당일(시간)					처치 후(일)														
	250 mg/kg B.W	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	동물수	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
빈 호흡		0 <sup>a)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
행동이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
후궁반장		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
반사이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
시각장애		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
심혈관계 이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
유연		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
입모		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
통각손실		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
근육이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
위장관 이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
피부		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<sup>a)</sup>, 임상증상이 관찰된 동물의 수

Table 26. 백화사설초 투여 후 수컷의 임상증상

임상증상	Control	처치당일(시간)	처치 후(일)																			
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
	동물수	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
빈 호흡		0 <sup>a)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
행동이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
후궁반장		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
반사이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
시각장애		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
심혈관계 이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
유연		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
입모		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
통각손실		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
근육이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
위장관 이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
피부		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a), 임상증상이 관찰된 동물의 수

Table 27. 백화사설초 투여 후 암컷의 임상증상

임상증상	고용량군	처치당일(시간)					처치 후(일)														
	1,000 mg/kg BW	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	동물수	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
빈 호흡		0 <sup>a)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
행동이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
후궁반장		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
반사이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
시각장애		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
심혈관계 이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
유연		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
입모		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
통각손실		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
근육이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
위장관 이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
피부		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<sup>a)</sup>, 임상증상이 관찰된 동물의 수

Table 28. 백화사설초 투여 후 암컷의 임상증상

임상증상	중용량군	처치당일(시간)						처치 후(일)													
	500 mg/kg B.W	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	동물수	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
빈 호흡		0 <sup>a)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
행동이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
후궁반장		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
반사이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
시각장애		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
심혈관계 이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
유연		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
입모		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
통각손실		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
근육이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
위장관 이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
피부		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<sup>a)</sup>, 임상증상이 관찰된 동물의 수

Table 29. 백화사설초 투여 후 암컷의 임상증상

임상증상	저용량군	처치당일(시간)	처치 후(일)													
	250 mg/kg B.W	1 2 3 4 5 6	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14													
	동물수	5 5 5 5 5 5	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5													
빈 호흡		0 <sup>a)</sup> 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													
행동이상		0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													
후궁반장		0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													
반사이상		0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													
시각장애		0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													
심혈관계 이상		0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													
유연		0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													
입모		0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													
통각손실		0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													
근육이상		0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													
위장관 이상		0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													
피부		0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													

<sup>a)</sup>, 임상증상이 관찰된 동물의 수

Table 30. 백화사설초 투여 후 암컷의 임상증상

임상증상	Control	처치당일(시간)						처치 후(일)														
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
	동물수	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
빈 호흡		0 <sup>a)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
행동이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
후궁반장		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
반사이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
시각장애		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
심혈관계 이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
유연		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
입모		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
통각손실		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
근육이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
위장관 이상		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
피부		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<sup>a)</sup>, 임상증상이 관찰된 동물의 수



Table 31. 백화사설초 투여 후 암컷과 수컷의 체중변화 (단위 : g)

성별	투여 후(일)	투여량			
		고용량군 1,000mg/kg B.W	중용량군 500mg/kg B.W	저용량군 250mg/kg B.W	Control
male	0	274.5 ± 5.8	275.0 ± 10.86	274.3 ± 16.8	273.9 ± 7.2
	4	304.9 ± 11.8	310.9 ± 18.0	310.4 ± 24.2	308.9 ± 8.9
	7	327.3 ± 14.8	331.2 ± 22.3	329.1 ± 26.2	327.9 ± 9.83
	14	361.5 ± 20.3	363.9 ± 28.5	363.7 ± 36.1	362.7 ± 9.6
female	0	199.9 ± 3.6	197.0 ± 6.9	196.8 ± 7.9	196.8 ± 7.8
	4	211.9 ± 3.1	210.2 ± 3.8	211.1 ± 11.2	210.11 ± 8.8
	7	219.3 ± 3.8	217.2 ± 4.3	220.3 ± 12.9	216.6 ± 8.3
	14	233.8 ± 2.8	229.0 ± 7.5	230.5 ± 16.9	230.9 ± 11.2

<sup>a)</sup> , 평균 ± 표준편차

## 제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1절 목표달성도

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도 (%)
1차연도	2005	송아지 설사증 원인 조사	15 %	○ 송아지 설사증의 원인 조사가 이루어졌나?	100
		송아지 설사증에 대한 치료 효과	20 %	○ 송아지 설사증에 대한 치료평가가 제대로 이루어졌나?	100
		송아지 호흡기 질병 원인 조사	35 %	○ 송아지 호흡기 질병의 원인 조사가 이루어졌나?	95
		천연 추출물의 항균작용 평가	30 %	○ 백화사설초, 고삼, 영지, 어성초의 항세균작용 연구가 이루어졌나?	100
2차연도	2006	송아지 설사증에 대한 치료 및 예방효과 조사	35 %	○ 송아지 설사증에 대한 치료 및 예방효과 연구가 이루어졌나?	100
		송아지 호흡기 질병에 대한 치료 및 예방효과 조사	35 %	○ 송아지 호흡기 질병에 대한 치료 및 예방효과 연구 이루어졌나?	95
		천연 추출물의 항바이러스 작용 평가	30 %	○ 백화사설초, 고삼, 영지, 어성초의 항바이러스작용 연구가 이루어졌나?	100
3차연도	2007	송아지 설사증에 대한 예방 프로그램 개발	35 %	○ 송아지 설사증에 대한 예방 프로그램 개발 및 효능평가가 이루어졌나?	100
		송아지 호흡기 질병에 대한 예방 프로그램 개발	35 %	○ 송아지 호흡기 질병에 대한 예방 프로그램 개발 및 효능평가가 이루어졌나?	95
		천연 추출물의 안정성 평가	30 %	○ 백화사설초, 고삼, 영지, 어성초, 애기똥풀의 안정성 평가가 이루어졌나?	100
최종평가		송아지 설사증과 호흡기 질병에 대한 천연 추출물의 치료 및 예방효과	35 %	○ 송아지 설사증과 호흡기 질병에 백화사설초, 고삼, 영지, 어성초의 효능 평가가 이루어졌나?	100
		천연 추출물의 항균 및 항바이러스 효과 조사	35 %	○ 백화사설초, 고삼, 영지, 어성초의 약리작용(항세균, 항바이러스)이 조사되었나?	100
		송아지 질병 치료 및 예방 프로그램 개발	30 %	○ 송아지 질병 치료 및 예방 프로그램이 개발되었나?	100

## 제 2절 기여도

### 1. 기술적 측면

가. 약용식물등 천연자원을 활용하기 위하여 항균 및 항 바이러스 효과 평가법 정립

나. 천연물을 활용한 송아지 기능성 첨가제품 개발

### 2. 경제 · 산업적 측면

가. 제주도에서는 향후 연간 10,000두의 송아지 생산이 예상되고 있으며, 현재 10~15%의 폐사율(설사증과 호흡기질환이 주 원인)로 경제적 손실이 크다. 제품 및 프로그램 개발로 폐사율을 줄여서(5% 이내) 송아지의 생산성 증대 및 향상을 가져올 수 있으리라 기대된다.

나. 약물(항생제 및 호르몬제) 남용으로 인한 경제적 손실과 약물 오염으로 여러 가지 문제점을 해결할 수 있다.

다. 청정 제주도 지역에서 친환경적인 사육방법(항생제를 사용하지 않으며 질병 치료 및 예방관리) 개발에 필요한 기능성 사료를 제공할 수 있다.

라. 새로운 친환경적인 치료와 예방법을 개발하여 송아지의 폐사율을 줄이고 증체율을 향상시킴으로써 농가소득 증대는 물론 국민보건향상에 기여할 수 있다.

## 제 5장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1절 축산기술자료

천연약초 식물을 이용한 송아지 질병의 예방과 치료보조 사료첨가제를 개발하기 위하여 백화사설초, 고삼, 영지, 어성초, 애기똥풀 등의 항세균과 항바이러스 효과를 분석하였고, 그 결과를 바탕으로 송아지에 투여하여 효과는 입증되었으나 송아지의 기호성이 떨어져서 **기호성 개선**을 목적으로 발효 백화사설초를 개발하여 그 효과를 신생송아지에 추가로 실험하여 그 효과를 입증하였다.

추가실험으로는 백화사설초와 항콕시디움 효과가 있는 어성초를 배합하여 대용유를 급여 하는 분만 2개월까지의 젖소송아지에 급여한 결과로 송아지설사에 예방효과가 있었다. 그러나 백화사설초와 어성초 합제도 기호성을 개선한다면 보다 나은 사료첨가제로 개발될 수 있을 것이다.

백화사설초와 어성초의 **항균 및 항바이러스 효과에 대한 효능 입증**은 국내 백화사설초와 어성초 재배농가 및 낙농가의 소득증대에 큰 영향을 미칠 것으로 사료된다.

## 제 2절 사업화 추진 계획

### 1. 사업개요

가. 항균, 항바이러스, 항산화, 항염, 면역증강등의 효능을 가지는 인진쑥 및 백화사설초의 유효성분을 이용하여 송아지 설사증과 호흡기질병 예방용 사료 첨가제를 개발한다.

나. 항바이러스, 항균, 면역증강 효과를 가진 천연소재를 활용한 무항생제, 친환경 축산물을 소비자에게 공급하기 위함.

다. 송아지의 주된 폐사원인인 설사증, 호흡기질병, 설사 호흡기 혼합감염을 예방을 할 수있는 천연물 보조사료 제품을 시판하여 항생제 및 백신비용 절감을 통한 사육농가의 경제적 이득을 주고 소비자에게도 항생제에 오염되지 않은 축산물을 공급하여 국민 보건향상에 이바지 할 수 있도록 함.

### 2. 시장성

국내 사료첨가제 시장규모 : 2003년도기준 263억원(2003년도 국내 생물산업 통계, 산업자원부 기술표준원)

### 3. 거래선 개척

가. 사료회사 : 퓨리나, 대상 팜스코, 삼양사 등.

나. 협동조합 : 농협, 축협, 수협사료

다. 대리점 : 전국의 지역 마다 총판을 확보 예정

### 4. 매출계획

가. 신제품 Launching 시기 : 2008년 하반기

나. 매출계획

년도	대상	매출계획(천원)
2008년	국내	20,000
2009년	국내	50,000
2010년	국내	100,000

##### 5. 추가 연구의 필요성

백화사설초 및 인진쑥의 추출, 농축, 건조시에 공정개선을 통하여 원가절감을 이뤄야 할 부분이 많다. 추출시 에탄올과 물을 사용하는데 추출 및 농축시에 회수에 신경쓰지 않으면 휘발되어 사라지는 에탄올이 다량 생긴다. 또한 현재는 유효물질의 추출효율을 어느 정도 포기하고 경제성과 가공성을 높이는 공정으로 진행하였지만 향후에는 에탄올 함량이 높은 용매로 추출하여 유효물질에 대한 효율을 높이면서 추출분말로서 가공성을 높일수있는 부형제 개발이 필요하다. 또한 인진쑥과 백화사설초를 가공하는 공정을 대량화하여 시간과 비용을 절감하고 유효물질 함량이 규정이상인 원재료를 공급받을 수 있도록 하는 품질관리 시스템을 적용하여야 원가절감 및 품질향상에 따라 당 업체의 이윤증대에도 도움을 줄 뿐만아니라 경제적이며 고효능을 가진 첨가제를 사용으로서 축산농가의 이윤증대에도 기여하리라 예상된다.

## 제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해 당 사 항 없 음.

## 제 7장 참고문헌

- Bae JH. Antibacterial Effect of Hedyotis diffusa extracts on Food-Borne Pathogens. J Kor Soc Food Sci Nutr 2005; 34(2): 107-112.
- Baricevic D, Sosa S, Della Loggia R, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A, Zupancic A, (2001), Topical anti-inflammatory activity of Salvia officinalis L. leaves: the relevance of ursolic acid, J. Ethnopharmacol. 75, 125-132.
- Choi YH, Kim YA, Park C, Choi BT, Lee WH, Hwang KM, Jung KO, Park KY, (2004),  $\beta$ -sitosterol induced growth inhibition is associated with up-regulation of Cdk inhibitor P21 in human colon cancer cells. J Kor. Soc. Food Sci. Nutr 33; 1-6.
- Curtis CR., White MEm, Erb HN.,(1989), Effect of calghood morbidity on long-term survival in New York Holstein herds. Preventive Vet Med. 7, 173-186.
- Derosa DC, Mechor GD, 2000, Comparison of Pasteurella spp. Simultaneously Isolated from Nasal and Transtracheal Swabs from Cattle with Clinical Signs of Bovine Respiratory Disease. Journal of Clinical Microbiology, Jan. 2000, p. 327-332
- Ebling TL, Fox LK, Byrne KM. Isolation of bovine mammary lymphocytes for fluorescent activated flow cytometry. Methods in Cell Science 2000; 22: 239-245.
- Es-saady, D, Simon A, Oller M, Maurizis JC, Chulia, AJ, Delage C, (1996), inhibitory effect of ursolic acid on B16 proliferation through cell cycle arrest, Cancer Lett., 106, 193-197.
- Fischer K, Andreesen R, Mackensen A. An improved flow cytometric assay for the determination of cytotoxic T lymphocyte activity. Journal of Immunological Methods 2002; 259: 159-169.
- Gupta MB, Nath R, Gupta GP, Bhargava KP. Antiulcer activity of some plant triterpenoids. *Indian Journal of Medical Research* 1981; 73: 649-652.
- Hartel H, Nikunen S, 2004, Viral and Bacterial Pathogens in Bovine Respiratory Disease in Finland. Acta vet. sacnd. 2004, 45, 193-200
- Jeong HG. Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. Toxicol Lett. 1999 Apr 12;105(3):215-22.



- Jeong, TS, Hwang EI, Lee HB, Kim YK, Min BS, Bae KH, Bok SH, Kim SU (1999), Chitin synthase II inhibitory activity of ursolic acid, isolated from *Crataegus pinnatifida*, *Planta Med.* 65, 261–263.
- Jie Liu, Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid, *Journal of Ethnopharmacology* 49 (1995) 57–68
- Julian WA, Laurent V, 1991, Changes in the Bacterial Flora of the Upper and Lower Respiratory Tracts and Bronchoalveolar Lavage Differential Cell Counts in Feedlot calves Treated for Respiratory Diseases, *Can J Vet Res* 1992; 56: 177–183
- Kang MI, Han DU, Chung YU, Chung DY, Lee CY, Lee CG, Wee SH, Cho JJ (2001), Survey on Korean-native Calves Disease and Mortality. *Kor. J Vet Serv.* 24(3), 223–241.
- Kim D, Lyoo YS, Lyoo HS, Yoon CK (1990), Etiology and clinical aspects of diarrhea of Korean native calves during the suckling period. *Kor. J Vet. Res.* 30(2), 255–260.
- Kim SC., Byun SH.(2005), The Effects of *Oldenlandia Diffusae* Herba Extract on Eosinophil, IgE and IL-4 in Experimental Asthma induced by Ovalumin, *Kor. J. Herbology*, 20(2): 35–42.
- Kim YH., 1995, Studies on the Constituents of *Oldenlandia diffusa*, *Kor J. Medicinal Crop. Sci.* 3:91–95.
- Li Y., Matsuda H, Yoshikawa M, (1999), Effects of oleanolic acid glycosides on gastrointestinal transit and ileus in mice, *Bioorganic Medicinal Chem.* 7, 1201–1205.
- Liu J. Oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 100: 92–94.
- Liu J. Pharmacology of Oleanolic acid and Ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* 1995; 49: 57–68.
- Martin SW, Nagy E, Armstrong D, 1999, The associations of viral and mycoplasmal antibody titers with respiratory disease and weight gain in feedlot calves. *Can Vet J* 40:560–7, 570.
- Martin SW, Meek AH, David DG, 1981, Factors associated with mortality in feedlot calves: the Bruce County Beef Project, years 1978, 1979, 1980. *Can J Comp Med* 46:341–349

- Mihai IG, Kenneth GB, Tony van D, 2006, Disease and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *J Vet Diagn Invest* 18:18–28
- Milanowski, JD, Potoczna H, Kus L, Urbanowicz B. (1998): Allergic alveolitis among agricultural workers in eastern Poland: a study of twenty cases. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 5, 31–34
- No HJ., Moon G., Moon SJ., Won JH., Moon YH., Park RG., Study of Hedyotis Diffuds Methanol Extract on Anti-tumoral Effect and Mechanism., *J. of Kor. Oriental Oncology*, vol.6 No.1, 2000.
- Robino P, Bert E, Tramuta C, Cerruti Sola S, Nebbia P. : Isolation of *Acinetobacter lwoffii* from a lovebird (*Agapornis roseicollis*) with severe respiratory symptoms. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2005 May;147(6):267–9.
- Sanjiv Kumar YADAV, Shao Chin LEE, Evidence for oldenlandia diffusa-evoked cancer cell apoptosis through superoxide burst and caspase activation, *Journal of Chinese Integrative Medicine*, September 2006, Vol.4, No.5 485–489
- Smith BP. *Large Animal Internal Medicine*. Mosby. 2001: 117–124
- Sohn, KH, Lee HY, Chung HY, Young HS, Yi SY, Kim KW (1995), Anti-angiogenic activity of triterpene acids, *Cancer Lett.*, 94, 213–218.
- Taguchi K, Hagiwara Y, Kajiyama K, Suzuki Y, Pharmacological studies of *Houttuynia herba*: the anti-inflammatory effect of quercitrin
- Tang HQ, Hu J, Yang L, Tan RX (2000), Triterpenoids and flavonoids from *Artemisia species*, *Planta Med.* 66, 391–393.
- Tarrant JM, The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine, *The Veterinary Journal* 2005; 170: 278–288.
- Tony L. Ebling, Lawrence K. Fox & Katherine M. byrne, Isolation of bovine mammary lymphocytes for fluorescent activated flow cytometry, *Methods in Cell Science* 22: 239–245 (2000)
- Vasconcelos MA, Royo VA, Ferreira DS, Crotti AE, Andrade e Silva ML, Carvalho JC, Bastos JK, Cunha WR., (2006), In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Z Naturforsch.* 61(7–8), 477–82.

- Yoshida Y, Wang MQ, Liu JN, Shan BE, Yamashita U. IMMUNOMODULATING ACTIVITY OF CHINESE MEDICINAL HERBS AND *OLDENLANDIA DIFFUSA* IN PARTICULAR. *Int J Immunopharmac* 1997; 19: 359-370.
- Yoshikawa M, Matsuda H, (2000), Antidiabetogenic activity of oleanolic acids glycosides from medicinal foodstuffs, *Biofactors* 13, 231-237.
- Zaletova NI, Shchavlinskii AN, Tolkachev ON. Preparation of some derivatives of ursolic acid and their antimicrobial activity. *Chemical Abstracts* 106, 18867
- 강운호, 수종의 한약물이 백서의 자연살해세포(Natural killer cell) 활성화에 미치는 영향. 박사학위논문, 경희대학교, 1986.
- 강정미, 차인호, 이영근, 류홍수. 어성초 휘발성 정유성분의 동정과 분획물의 향특성 및 항균활성. *한국식품영양과학회지* 1997; 26: 209-213.
- 강정미, 차인호, 이영근, 류홍수. 어성초 휘발성정유성분의 동정과 분획물의 향특성 및 항균활성 II. Prep-HPLC에 의한 분획물의 향특성과 항균활성. *한국식품영양과학회지* 1997; 26: 214-221.
- 권영방: 동절기 젖소의 호흡기 질병 예방대책. 월간서울우유, 1990, 22(1), 30-37
- 金珍, Enhancing Effect of *Paeonia japonica*, *Hoyttuynia cordata*, and *Aster scaber* Extracts on the Immunoreactivity *in vivo* in Mice, 淑明女子大學教 大學院 食品營養學科 食品營養專攻 博士學位論文
- 김근영, 정동욱, 정희중. 어성초의 화학성분 및 향미생물 활성화. *한국식품영양과학회지* 1997; 29: 400-406.
- 김성훈(1996), 백화사설초로부터 분리된 항암성물질에 관한 연구, 대전대학교 한의학연구소, 한의학 논문집, 4(2): 273-297.
- 백진호, 어성초 부위별 추출물의 항고혈압 생리활성 분석 및 화학 성분에 관한 연구. 석사학위논문, 서울대학교, 1998.
- 송호준(1994), 백화사설초 전탕액 투여가 마우스의 항종양 면역반응에 미치는 영향, 대한분초학회지, 9(1): 83-97.
- 이방환, 강정부, 권오덕, 김덕환, 김두, 진종욱, 양만표, 윤화영, 이경갑, 이근우, 이정길, 이주현, 이채용, 이현범, 이희석, 정병현, 최희인, 한홍윤. *대동물내과학. 교육문화원.* 2004: 161-168.
- 이주목, 권오덕, 김남수, 최경성, 박명규, 김민석, 김철민. 신생송아지의 특이 및 비특이 혈

- 청요법을 통한 질병예방법 개발. 농림부 최종 연구보고서, 전북대학교. 2000.
- 李春雨, Studies on the isolation of quercitrin from *Houttuyniae cordata* Thunb and antiproliferative effect of cadmium induced cytotoxicity, 圓光大學校 大學院 韓醫學科 博士學位論文 2002
- 이춘우. 어성초에서 분리한 Quercitrin과 카드뮴독성의 억제효과에 관한 연구. 석사학위논문, 원광대학교, 2002.
- 이효정, 김승애, 송규용, 라정찬, 안규석, 김성훈, 중국 및 국산 백화사설초의 항암 활성과 지표물질 연구. 동의생리병리학회지, 2003.
- 張鎔楠, Studies on the cytotoxicity and anticancer activity of HERBA HOUTTUYNIAE Extracts, 圓光大學校 大學院 韓醫學科 博士學位論文 2003
- 정인석, 백화사설초의 유도성 산화질소 생성 기전에 관한 연구. 박사학위논문, 원광대학교, 2002.