

최 종
연구보고서

식물자원을 이용한 동물용 항균제
개발에 관한 연구

Development of antibiotics for animals
using botanical resources

연구기관
원광대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식물자원을 이용한 동물용 항균제 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 05월 15 일

주관연구기관명 : 원광대학교

총괄연구책임자 : 권 동 렬

세부연구책임자 : 권 동 렬

세부연구책임자 : 박 현

협동연구기관명 : 전북대학교

협동연구책임자 : 이 준 화

요 약 문

I. 제 목

식물자원을 이용한 동물용 항균제 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 목적 : 국내 한약재로부터 축산에 사용하는 기존 항생제의 최대의 단점인 치료시의 내성 문제와 부작용 문제를 해결하기 위해 **3종 이상의 한약을 혼합하여 순수 한방적인 항균활성**을 갖는 선도물질을 개발한다.
2. 필요성 : 증가하는 세균의 약제 내성에 대처하고 다양한 세균을 효과적으로 치료하기 위해서는 기존의 항생제와는 다른(분자구조, 약제의 효능 등) 신약 개발이 절실히 요구된다. 항생제에 대해 내성을 갖는 슈퍼 박테리아들의 출현으로 인하여 새로운 항생제의 개발이 시급히 요청되고 있는 실정이다. 이 신약의 구비해야할 조건은 살균의 효과뿐만 아니라 사람과 동물의 세포에 부작용이 없는 안전한 약물이어야 한다. 즉, 식물자원은 현재까지 알려지지 않은 성분이 대부분이며, 개개의 작용이 다양한 단일성분의 혼합물이므로, 복합물상호간의 약리 작용으로 내성 등의 부작용이 감소되고 약효가 증가된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

다양한 천연물에서 감수성 검사 및 MIC 등의 방법을 이용한 다양한 세균성장을 억제하는 새로운 후보 물질의 screening하여 유효한 천연물을 탐색한다(200여종). 후보물질 중에서 활성이 가장 뛰어난 천연물(2-3개정도)을 다양한 화학적 방법으로 물질을 분리 및 동정한다. 이 유효한 약재를 혼합하여 그 추출물에 대한 세균성장 억제 능력의 in vitro 실험, in vitro 안전성 실험, 실험동물(쥐) 및 목적동물(닭)을 이용한 in vivo 약효활성과 안전성 실험을 하여 동물용 항균제(사료) 개발을 한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

상기 연구에서 활성이 제일 좋은 세 가지 한약재로, 최적의 경제성이 있고 활성을 가지는 혼합 비율로 동물용 항균제(사료) 후보물질을 도출하였다. 이 물질은 약효활성이 우수하고 부작용이 없는 훌륭한 동물용 항균제(사료)이다. 이 물질에 대한 특허를 출원하여 사료회사 혹은 제약회사와 공동으로 상품화하여 국내시장은 물론 세계시장에 축산 질병 치료 및 예방의 목적으로 활용하는데, 개발된 약재를 단독으로 사용하여 주 치료제로 사용하거나, 기존의 항생제와 병행하여 사용하여 보조제로 사용하기를 권장한다.

SUMMARY

I. Subject

Development of antibiotics for animals using botanical resources

II. Purpose and necessity of research development

1. Purpose

The purpose is to develop the pure-herbal natural materials that have the antibacterial activity by mixing three or more kinds of domestic medicinal herbs to solve the resistance and remaining side-effect problems that are the major weak points of traditional antibiotics.

2. Necessity

With the increasing threat of drug resistance, a new type of antibiotic is desperately needed. Emergence of 'super bacteria' that are resistance to multiple antibiotics, makes it urgent to develop a new antibiotics. The new antibiotics must be safe to human and animal cell on top of its effectiveness. Plant resource contains currently unknown ingredient and a mixture of simple compounds of which their interaction reduces the adverse drug reaction and enhances the efficacy.

III. Contents and range of research development

From natural compounds, candidate material that inhibits bacterial growth can be screened using various methods such as sensitivity test and MIC. Of the candidate material, select the ones (about 2-3) that are most active and use a chemical analysis to identify and separate the compound of the interest.

With the mixture of these effective compounds, an extract will be collected and it will go under the *in vitro* experiment for its ability to inhibit bacterial growth and *in vivo* experiment on subject animal (chicken) to test drug effectiveness and safety with the final objective of developing an antibiotics for the animal.

IV. Suggestion : result and application of research development

Three most effective herbs from the experiment described above were mixed with optimally economic and efficacious ratio to be used as the animal antibiotics. It is recommended that this compound should be patented and commercialized with pharmaceutical firms to be used both domestically and internationally as a treatment and prevention of disease by itself or in addition to current antibiotic regimen.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of research development subject	9
1. Purpose of research development	9
2. Necessity of research development	11
3. Range research development	16
Chapter 2. Present state of technical development at home and abroad	17
1. Present state of technical development and result of research	17
2. Position of Present state of technical development and result of research	20
Chapter 3. Contents and result of research development	26
1. Theoretical and experimental approaching method	26
2. Contents of research	26
3. Result of research	34
Chapter 4. Target achievement and contribution in related field	83
1. Target achievement in related field	83
2. Contribution in related field	86
Chapter 5. Utilizing project of result in research development	88
1. Necessity of additional research	88
2. Application of other research	88
3. Propulsive plan of industrialization	89
Chapter 6. Scientific technical information at abroad in process of research development	90
Chapter 7. Literature cited	91

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	9
제 1절	연구개발의 목적	9
제 2절	연구개발의 필요성	11
제 3절	연구개발의 범위	16
제 2 장	국내외 기술개발 현황	17
제 1절	국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과	17
제 2절	국내·외의 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황	20
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	26
제 1절	이론적, 실험적 접근방법	26
제 2절	연구내용	27
제 3절	연구결과	38
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	102
제 1절	연구개발목표의 달성도	102
제 2절	관련분야의 기술발전에의 기여도	104
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	106
제 1절	추가연구의 필요성	106
제 2절	타연구에의 응용	106
제 3절	기업화 추진방안	107
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	108
제 7 장	참고문헌	109

제 1장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

1. 연구개발 목표와 내용

가. 목표

축산에 사용하는 기존 항생제의 최대의 단점인 치료시의 내성문제와 부작용 문제를 **현재까지 알려지지 않은 새로운 성분의 혼합물로, 복합물 상호간의 약리 작용으로** 혁신적으로 해결할 수 있는 항생제를 천연물질에서 분리하여 개발하는데 그 목적을 둔다.

나. 내용

다양한 천연물에서 감수성 검사 및 MIC 등의 방법을 이용한 다양한 세균성장을 억제하는 새로운 후보 물질의 screening하여 유효한 천연물을 탐색한다(200여종). 후보물질 중에서 활성이 가장 뛰어난 천연물(1-2개정도)을 다양한 화학적 방법으로 활성 물질을 분리 및 동정한다. 이 유효한 분획이나 단일 성분에 대한 세균성장 억제 능력의 in vitro 실험, cell line culture를 통한 in vitro 안전성 실험, 실험동물을 이용한 in vivo 안전성 실험하여 동물용 신약개발의 임상시험을 한다. 그 뒤 억제물질을 유기 합성하여 대량 생산으로 신약을 개발한다.

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2004)	문헌조사와 약효검정	문헌조사, 항균력 검사 체계 구축, 약효검증
2차 년도 (2005)	성분분리와 안전성연구	단일성분분리, 약제의 효과 및 안전성 연구
3차 년도 (2006)	내성에 강한 신약 개발	약효가 확보된 천연물에서 신개념동물용 항생제 개발

가. 1차년도 연구개발 목표, 내용 및 범위(기초연구)

1) 각종 시약 구입 및 문헌조사

천연물에서 항염증작용이 있는 고대의 문헌을 다량 검색한다. 한방 본초서 중에서 가장 권위를 인정받는 중화본초(中華本草)의 청열해독(淸熱解毒) 편을 주로 참조하여 작용이 강한 약물을 후보물질그룹으로 분류한다. 고대로부터 열을 내려서 그 독을 푸는 약들이 강한 활성이 있다고 알려진 청열해독약과 기타 약물을 참조로 한다. 또한 현대 약리학적으로 그 활성이 현저하다고 보고 된 성분이나 약물을 찾아서 후보물질로 정한다. 200여종 이상의 천연물에서 후보물질로 분류된 약제의 약리작용 및 그 특징을 파악한다.

2) 한약재구입 및 추출

상기한 후보물질을 각각 구입하여 물 추출액으로 추출하여 동결건조 작업을 한다.

3) 항균력 검사 체계 구축, 한약재의 억제실험 및 결과 분석

상기의 건조된 천연물을 적정 농도와 용매를 가하여 Bauer-Kirby test, MIC test, MBC test등의 활성실험을 한다. 그 중 활성이 강한 우수한 약재 1-2가지를 선택한다.

나. 2차년도 연구개발 내용 및 범위

1) 천연물에서 단일 성분 분리

상기 기초연구에서 활성이 가장 강한 1-2가지 천연물에 대하여 극성이 다른 유기용매

를 이용하여 각각의 분획을 추출하여 약효를 확인한다. 약효가 있는 분획추출물중 단일 성분으로 된 성분을 다량 확보하여 그 구조를 동정한다.

2) 실험동물 모델 확립

실험동물 모델 확립하여 임상 증상과 조직 검사를 병행하여 진행한다.

3) 약제의 효과 및 안전성 연구

Serum Killing Power Test, PCR 및 Cell cytotoxicity Assay로 약제의 효과 및 안전성 연구를 한다.

다. 3차년도 연구개발 내용 및 범위

1) 약효가 확보된 천연물의 분획과 단일성분에서 약효 활성 재검정

기초실험에서 약효가 확보된 천연물에서 활성이 강한 분획 혹은 단일 성분을 대상으로 더 구체적인 약효활성실험과 안전성실험을 수행한다.

2) 신개념 동물용 항생제 개발

가장 이상적인 항생제 즉 천연물에서 약효가 확인된 물질을 추출하여 그 구조식을 동정하여 유기합성으로 대량 생산하여 신개념의 항생제를 개발한다. 2차적 방법으로 비교적 활성이 강한 약물의 조합으로 내성이나 부작용이 거의 없으며, 임상 치료율이 높으며, 저가인 항생제를 개발한다. 실험동물과 목적동물을 이용하여 약효활성검사와 조직조건으로 안전성 검사를 수행한다.

제 2절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

현재 급격히 증가하는 세균의 약제 내성에 대처하고 다양한 세균을 효과적으로 치료하기 위해서는 기존의 항생제와는 다른(분자구조, 약제의 효능 등) 신약 개발이 절실히 요구된다. 특히 최근에는 항생제에 대해 내성을 갖는 슈퍼 박테리아들의 출현으로 인하여 새로

운 항생제의 개발이 시급히 요청되고 있는 실정이다. 또한 이 신약의 구비해야할 조건은 살균의 효과뿐만 아니라 사람과 동물의 세포에 부작용이 없는 안전한 약물이어야 한다. 항생제는 아무리 효능이 우수하다하더라도 시간이 지나면 내성이 생기는데, 천연약물을 이용한다면 충분히 이런 문제를 해결할 수 있으리라 확신하는데, 그 이유는 천연물은 현재까지 알려지지 않은 새로운 성분이며, 개개의 작용이 다양한 단일성분의 혼합물이므로, 복합물상호간의 약리 작용으로 내성 등의 부작용을 감소하리라 확신한다.

현재 축산에 사용되는 많은 항생제의 경우 내성률 심각한 수준에 있으며 일부의 항생제의 경우 100% 근접해 있다. 현재 축산에서 항생제는 주로 사료 첨가제로 또는 육계의 경우 7일에서 10일 사이에 정기적으로 Cleaning 목적으로 사용된다. 보고에 의하면 전국 도축장에 온 소·돼지·닭에서 분리한 살모넬라, 장내구균 따위의 식중독 균의 항생제 내성률을 조사한 결과 닭 분변에서 나온 대장균은 퀴놀론계 항생제에 57%를 웃도는 내성률을 보였다. 식중독 균인 황색포도상구균은 테트라사이클린에 96.2%의 높은 내성률을 보였고, 이어 에리스로마이신에 57.6%, 페니실린에 32.7%의 내성률을 각각 나타냈다. 장내구균은 축산동물의 종류에 관계없이 테트라사이클린에 높은 내성을 보였다. 특히 돼지와 닭에서 분리한 황색포도상구균은 70% 이상이 두가지 이상의 항생제에 내성을 나타냈다. 또 다른 보고에 의하면, 축산 환경 중 항생제 내성균 모니터링을 한 결과, 전국 소·돼지·닭 축산 농가를 중심으로 가축 분변, 농부 손, 주변 토양, 하천 따위에서 대장균 197 균주, 황색포도상구균 42 균주, 캄필로박터 13 균주 등 세균을 분리했으며, 이들 세균의 항생제 내성을 조사한 결과 대장균은 69.4%, 황색포도상구균은 78.6%, 캄필로박터는 100%에서 하나 이상의 항생제에 내성을 지닌 것으로 나타났다. 두 가지 이상 항생제에 내성을 지닌 것도 대장균 19.2%, 황색포도상구균 11.6%, 캄필로박터 15.4%로 나타났다. 가장 강력한 항생제인 반코마이신에 내성을 지닌 균주도 2개 검출됐다. 이와 같이 현재 축산에 사용되고 항생제는 대부분 세균들이 내성을 지니고 있어 축산에 효과적으로 사용할 수 있는 새로운 항생제 개발이 시급하다.

최근 의약품의 연구동향은 여러 가지 부작용이나 독성 및 내성 등이 심각해지고 있으므로 세계적으로 천연물로부터의 의약품 개발에 관한 연구가 활발히 추진되고 있다. 한편, 우리나라를 위시한 동양에서는 장구한 시일을 통하여 천연약물의 하나인 전통약물의 꾸준한 발전을 도모해 온 배경을 갖고 있다. 항생물질은 1941년 페리실린이 임상적으로 사용된 후 현재까지 5500여종이 발견되었고, 이 중 100여종만이 발효 생산되고 있으며, 대부분은 화학적

으로 합성된다. 이것들이 질병치료에 효과적으로 이용되기 위해서는 치료용량이 숙주에 대해서는 독성을 주지 않고 감염원에 대해서는 항균효과가 매우 커야 하나 독작용이나 특이한 부작용을 가지고 있으며, 임상적으로 사용된 후 오래지 않아 내성균주가 증가하는 현상이다. 따라서 독성이 적으며 내성균에 유효한 새로운 항생물질을 연구개발하고, 병용투여와 같은 방법으로 내성균의 출현 및 독성을 감소시키기 위한 연구가 요구된다. 천연약품자원으로부터 항균력이 우수하고 독성이 적은 새로운 항생물질 및 내성균에 유효한 새로운 항생물질을 검색하여 신약개발을 할 수 있다.

2. 경제·산업적 측면

염증 치료에 이용되어지고 있는 항생제의 대부분이 외국에 로얄티를 주는 계약상태로 생산되고 있는 실정이므로, 막대한 외화가 반출되고 있는 실정이다. 또한 항생제의 빈번한 이용으로 나타나는 항생제 내성으로 다른 고가 항생제와 병용 투여하는 문제로 인하여 경제 비용이 상승되어 의료비의 증가가 필연적이다. 천연물에서 신약을 개발하면 비교적 저렴한 가격으로 약물을 공급할 수 있어 경제 비용이 상당히 감소하리라 예상된다. 최근 항생물질 의약품의 생산실적을 살펴보면 매년 10%내외의 증가하였다. 전체 의약품 생산실적 대비 항생물질의약품의 점유율은 현재 약 15%를 점유하여 총 시장규모 1조 5000억원에 육박하고 있으며 세계시장으로는 300억 달러에 육박하고 있다. 현재 미국에서만 150여 종의 항생제가 승인되었고 사람과 동물생체에 치명적인 악영향을 미치는 이러한 질병에 대한 치료제의 개발에 대한 연구가 전 세계적으로 매우 활발히 이루어지고 있으며, 많은 과학자들은 생체에 잔류하지 않고 인체에 영향을 주지 않는 항균성 약제, 생리활성물질, 생균제 또는 생체면역증강제에 대한 집중적인 연구에 높은 관심을 기울이고 있는 실정이다. 양계산업 또는 축산업에서 항생제 사용이 점점 증가하고 있는데, 이는 더욱 많은 항생제 내성균이 생성될 잠재가능성이 높아진다는 것을 의미하기도 한다. 이에 부흥하여 동물의 질병을 통제할 수 있는 새로운 친 환경적인 방법이 개발하고자 하는 요구가 전 세계적으로 점증하고 있는 상황이다. 최근, 전염병으로부터 가금류를 보호해 줄 수 있는 새로운 세대의 ‘천연’ 항생제 대체물이 개발에 노력하고 있다. 호주의 한 축산산업 연구팀은 천연 항생제 대체물질을 ‘닭’에게 전달할 수 있는 방법을 최근 새롭게 개발하고자 하여, 이 연구팀은 양계 닭을 이 물질로 처리하였을 때 닭의 건강상태가 호전되었고 그 결과 더욱 빨리 체중이 증가하는 것을 확인하였다.

3. 사회·문화적 측면

현재 이용되어지는 항생제의 작용원리 그리고 종류와 그 부작용 등을 보면 다음과 같다.

가. 세포벽 합성 억제: 세균 세포는 동물세포와 달리 단단한 세포벽이 있어 내부의 높은 삼투압을 유지하게 합니다. 따라서 세균 세포벽 합성에 장애가 오면 내부의 높은 삼투압으로 세균 원형질이 밖으로 빠져나와 파괴된다.

나. 단백질 합성 억제 및 장애: 대부분의 항생제가 여기에 속하며 여기에는 (1) mRNA의 misreading을 일으키는 약물 (2) translocation 억제 약물 (3) peptidyl transferase 억제 약물 (4) aminoacyl tRNA 의 결합억제 약물 (5) 단백질의 alkylation을 초래하는 약물이 있다.

다. 세포막 투과성 변동: 세포막의 투과성을 변동시켜 내외부와의 균형을 잃게하여 사멸시키는 기전이다.

라. 핵산 합성 억제: RNA 합성을 위해서는 DNA에 기록된 세포의 정보가 transcription 형태로 복사가 되어야 하는데 이과정에서 방해되면 항균효과가 나타난다.

마. 대사 억제: 세균의 필수대사물과 경쟁적으로 길항하여 항균작용을 나타내는 것이다.

항생제의 종류별 기전과 그 부작용을 살펴보면 아래와 같다.

1) 페니실린(penicillin)류 : 세균의 세포벽 합성을 억제함으로써 항균작용을 한다. 경구투여했을 때 일반적으로 잘 흡수되지만 초기제제들은 위산에 의해 불활성화한다. 화농성구균 등 대부분의 그람양성균과 임균·매독균 등에 강력한 효과가 있다. 페니실린에 감수성이 없는 세균감염증과 페니실린의 남용으로 생긴 내성균에 사용해서는 안된다. 부작용은 적은 편이지만 알레르기 반응에 의한 과민반응은 치명적이므로 투여하기 전에 피부반응 시험을 하는 것이 좋다.

2) 세팔로스포린(cephalosporin)류 : 병원균의 세포벽 합성을 억제하여 살균작용을 한다. 페니실린에 저항성이 생긴 포도상구균 등의 그람음성균뿐 아니라 프로테우스(proteus), 세라티아(serratia), 엔테로박테르(enterobacter) 등에도 효과가 있다. 경구투여를 하면 흡수가 잘 되지 않기 때문에 근육 또는 정맥주사를 사용한다. 부작용은 알레르기 반응 외에는 별로 없지만 발진, 설사, 백혈구 감소, 간 기능 이상 등이 올 수 있다.

3) 아미노글리코사이드(aminoglycoside)류 : 병원균의 단백질 합성을 억제하며 항균범위가 비교적 넓다. 정맥 또는 근육주사로 투여한다. 부작용은 제8뇌신경에 독작용을 나타내어 청각 및 평형장애를 일으키는 이 독성과 신장독성이 있으며 신경근 차단을 일으킬 수 있다.

4) 테트라사이클린(tetracycline)류 : 화학적으로 테트라사이클린핵을 가지고 있으며 미생물의 리보솜에서 t-RNA의 전사를 방해하여 단백질합성을 억제함으로써 항균작용을 한다. 그람양성균에 효과가 있지만 페니실린보다는 약하다. 살모넬라, 프로테우스 등의 그람음성균의 감염, 서혜립프육아종증, 연성하감 등에 효과가 있다. 부작용으로 오심·구토·설사·구내염·소장결장염을 일으키고 균교대현상에 의해 장내 정상 세균총의 변화로 칸디다증을 일으켜 소화관 및 점막의 손상을 일으킨다. 투여 후 광선과민증으로 홍반이나 부종을 일으키며 대량으로 투여했을 경우 간장장애를 일으킬 수 있다. 임산부·신생아·소아에게 신중히 투여해야 하는데 태아의 골격 발육을 지연시켜 기형아가 태어날 수 있으며 유즙으로 약물이 배출될 수 있다.

5) 클로람페니콜(chloramphenicol) : 그람양성균, 장티푸스균·변형균 등의 그람음성균, 리케차 및 대형 바이러스, 다른 항생제에 저항성이 있는 감수성균 감염에 효과가 있다. 경구투여 및 정맥 내 주사한다. 알레르기성 급·만성결막염, 결막염 등에 점안액으로도 투여하고 세균성 질염에는 좌약으로도 사용한다. 부작용으로 위장장애, 설염, 피부발진, 균교대 현상이 일어나고 특히 신생아의 경우 대사를 못하므로 복부팽창, 불규칙호흡, 신경성허탈, 혼수 및 사망까지 초래한다. 수유기의 유아, 소아, 임산부에게는 투약하지 않는 것이 좋다.

6) 폴리펩티드(polypeptide) 항생제 : 인체의 세포막에 작용하여 진신에 투여했을 때 신장독성을 나타내므로 거의 사용하지 않지만 국소투여용으로 사용한다.

7) 퀴놀론(quinolone)류 : 광범위 항생제이다. 세균 DNA를 초코일(supercoil)로 압축하는 효소인 DNA 선회 효소를 억제한다. 그람양성균과 특히 녹농균, 살모넬라 등의 그람 음성균에 대해 현저한 항균력을 나타낸다. 경구로 잘 흡수되어 조직 및 세포로 잘 침투하며 대부분은 신장으로 배설된다. 부작용은 드물지만 오심·구토·발진·현기증·두통 등이 일어날 수 있다.

앞으로 인류가 살아남기 위해서는 미생물과의 싸움이 계속 될 것이고 여기서 항생제는 없어서는 안 되는 물질이기 때문이다. 1928년에 Fleming이 페니실린을 처음 발견하였을 때 페니실린은 거의 모든 박테리아를 죽일 수 있는 능력을 가지고 있었다. 제 2차 세계대전 당시 부상당한 많은 사람들의 생명을 살렸고, 우리나라에서도 페니실린 한 병은 만병통치약으로 여겨졌었다. 이런 상황은 1960년도에 들어서부터 전 세계적으로 내성균이 출현하기 시작하면서 달라지기 시작하였다. 이런 내성 세균의 치료를 위해 더 강력하고 고가인 새로운 항생제가 필요하여, 끊임없는 항생제 개발의 역사, 즉 균주의 내성과 내성 균주를 죽이는 새로

운 물질과의 싸움이 끊임없이 시작되고 있다. 항생제는 임상에서 감염증 치료에만 사용되는 것이 아니라, 여러 가지 가축과 수산 양식에도 사용되고 있다. 지난 20년간 닭과 돼지 사육은 작은 규모의 개인 농장보다는 큰 시설에 집중적으로 이루어지고 있다. 이 경우 좁은 장소에 밀식하기 때문에 감염질환을 조절하기 위한 관리기술이 중요한데, 감염된 동물만을 골라내 항생제로 치료하려면 비용이 많이 들기 때문에 질병의 징조가 보이면 전체 동물에게 항생제(gentamycin, cepharosporin, lincomycin과 spectinomycin 등)를 예방과 치료의 목적으로 사용하게 되는데, 최근에는 사용량이 점차 증가하고 있는 실정이다. 이는 인간이 다시 이런 음식을 먹었을 때 체내축적이나 항생제 내성 등의 복잡한 사회적 문제를 불러오고 있다. 이러한 상황에서 새로운 항생작용을 가진 약물을 천연물에서 찾을 수 있다면, 기존의 항생제 대응뿐만 아니라 항생제와의 복합투여를 하여 치료효과는 올리고 항생제 사용량은 줄일 수가 있을 것으로 사료된다.

제 3절 연구개발의 범위

1. 연구범위 및 연구수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
단일성분 분리 및 구조 동정	오미자, 오매의 조추출물의 제조 및 성분 분리 및 구조 동정	각 분획의 활성을 측정
실험동물 모델 확립	살모넬라로 닭이나 쥐에게 감염시킴	살모넬라균수 확인, MIC측정
약제의 효과 및 안전성 연구	목적동물에게 항균활성 및 안전성 실험 실시	생존율 측정 및 조직 염색, 사양 실험

제 2장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과

1. 국내·외 타연구기관이 수행한 연구개발 내용

국내에서는 이러한 연구는 아직은 없는 상태이며, 중국에서는 위장 내 세균이며 위암의 유발균주로 알려진 헬리코박터를 천연물(순수한 한방약)로 치료한 임상 데이터가 있다. 상해중의약대학 소화기내과 채금 교수 등에서 치료율이 약 50-60%정도이며, 임상증상이 유효하게 개선된다고 보고하고 있는 실정이다. 현재 사용되고 있는 항생제의 가장 큰 취약점은 심각한 항생제 내성이다. 항생제 내성을 살펴보면, 새로운 항생제가 계속 개발되고 있으나, 우리가 가장 주목해야 하는 점은 새로운 항생제를 사용할 수 있는 기간이 점차 짧아지고 있다는 점이다. 즉, 새로운 항생제를 쓰기 시작한 날부터 내성 박테리아가 출현하는 날까지의 기간이 점점 단축되고 있다. 박테리아는 새로운 항생제를 개발하여 쓰기 시작하면 곧 이에 대한 내성을 가진 박테리아를 만들어 내고 있다. 우리가 페니실린을 사용하기 시작하자 박테리아는 이에 대한 내성 박테리아를 만들어 내었고, 우리가 제 2 세대 항생제를 만들어 사용했을 때 다시 이에 대응하였고, 다시 제 3 세대, 제 4 세대, 제 5 세대 항생제를 만들어야만 하는 처지에 와있다. 세균들이 쉽게 새로운 세대의 항생제에 저항성을 갖는 이유는 제 1세대의 항생제의 기본구조에 다음세대의 항생제는 약간의 변형을 주어 개발되었기 때문에 저항 획득에 쉽다는 것이다. 즉 세균의 내성패턴을 예상하여 항생제를 개발하지 않는다면 더 이상 세균을 죽일 수 없게 되는 날이 오게 될지도 모른다. 항생제 내성의 기전에는 첫째, 각 항생제 작용부위를 변화시키는 방법이다. 예를 들면 퀴놀론 항생제는 DNA topoisomerase II에 작용하는데 이 효소를 변화시켜 더 이상 퀴놀론 항생제가 작용하지 못하게 하는 것이다. 베타락탐계열 항생제의 경우는 세포벽의 트랜스펩티다제를 더 이상 항생제에 결합을 하지 못하게 변형시킨다. 예를 들어 tetracycline의 경우 이 항생제가 결합하는 리보조움의 구조를 변화시키는 것 등이다. 둘째, 세포내의 항생제 농도를 낮게 만드는 방법이다. 세포벽 막을 변화시켜 항생제가 세포 내로 유입되는 것을 막는 방법이다. 예를 들어 친수성 퀴놀론의 경우 porine 단백질의 양을 변화시켜 항생제 유입을 막는다. Pseudomonas

의 경우는 세포벽의 lipopolysaccharide가 변화되어 퀴놀론 항생제가 박테리아 내부로 들어 오지 못하게 하기도 한다. 또한 일단 박테리아 내부로 들어온 항생제를 다시 밖으로 내보내는 방법이 있다. 둘째, 우리 몸을 구성하는 진핵세포의 경우 항암제에 저항성을 보이는 암에서도 이런 배출기전이 발견되고 있다. 중금속에 저항성을 보이는 박테리아의 경우도 상당수가 배출기전에 의해 중금속에 저항성을 보이고 있다. 최근에 발견되는 박테리아의 반 이상이 포도상구균인 *Staphylococcus aureus*가 차지하고 있으며, 이중의 60 %이상이 MRSA(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)로 확인되었다. 이는 중환자실에서 발견되는 균주의 95%이상을 차지하고 있는 실정이다. MRSA는 methicillin에 저항성을 가진 균으로 대부분의 경우 multidrug exporter를 가지고 있어 여러 종류의 항생제에 내성을 가지고 있다. 현재 가장 우려하고 있는 것은 우리가 가진 모든 항생제에 내성을 보이는 박테리아들이 나타나고 있다는 사실이다. 특히 그람 음성(Gram-)박테리아의 경우 항생제가 세포 내부에서 억제작용을 나타내기 위해서는 박테리아 세포 내로 들어가야 한다. 베타락탐계 항생제는 세포 외부에서 접근하여 작용하나 다른 항생제들은 세포벽과 세포막을 통과해야 세포내로 이동된다. 그람 양성(Gram+) 박테리아는 세포벽이 펩티도글라이칸으로만 이루어져 있어 항생제 투과에 문제가 없다. 하지만 그람 음성 박테리아의 경우는 먼저 인지질과 당지질로 이루어진 세포외벽을 통과해야 하므로 확산이 상대적으로 제한된다. 특히 친수성 항생제의 경우는 porin이라는 단백질 통로를 통해서만 박테리아 안으로 들어올 수 있다. 이 porin에 돌연변이가 일어나 항생제 통과 통로가 감소하거나 없어지면 항생제가 박테리아 내부로 들어가지 못해 항생제 내성을 가지게 되는 경우도 있다. 이런 porin 돌연변이는 5-10 배정도 내성을 증가시킨다. 임상실험에서 감염부위에 작용할 수 있는 최고농도는 bacteria의 성장을 저해하거나 죽일 수 있는데 필요한 농도보다 최고 다섯 배 정도 높다. 이런 경우 10 배 내성 증가는 100배 증가만큼이나 치명적일 수 있다. 셋째, 항생제를 분해하는 효소를 생산하는 경우이다. 베타락탐계열의 항생제들에 대한 내성균들은 대부분 베타락탐 분해효소를 생성한다. 그래서 대부분의 베타락탐계의 항생제는 베타락탐 항생제 분해효소 억제제와 같이 처방되고 있다. 넷째, 항생제에 경쟁적으로 결합하여 항생제가 활성형으로 바뀌는 것을 방해하는 경우이다.

2. 현기술상태의 취약부분

이미 한국 내에서 동물에 감염된 세균들 중 항생제로 치료하기 힘든 세균들이 상재해 있고 외국으로부터 유입된 항생제 내성 세균들에 의한 문제는 심각하게 대두될 전망이다. 현 상황에서 완전한 치료제인 이상적인 치료제 즉 치료율이 양호하며, 내성 및 부작용이 없는 항생제는 없는 상황이다.

3. 앞으로의 전망

현재 의약품의 점유율 15%, 1조 5000억원의 항생제시장 규모에 대응하기 위하여 신종의 항균제제의 개발은 시급하다. 또한, 한국에서도 경제적 그리고 문화적으로 국제교류가 활발해지고 더불어 외국의 병원성 세균들의 유입 가능성이 더욱 많고 축산물 수입이 증가됨에 따라 이를 통한 신종세균의 국내 확산이 가속화될 전망이다. 현재 우리나라 축산에 상재하는 세균들은 대부분 기존 항생제에 내성을 나타내고 있어 그 치료가 점차 어려워지고 있다. 이들 치료 문제점은 이들 세균에 감염된 축산물을 통한 인체에 전파가 심각할 것이다. 최근 보고에 의하면 인체의 전염성 질병 중 50% 이상이 인수공통전염병으로 나타나고 있어 안전한 축산물 공급은 공중보건상 가장 신중하게 해결해야 될 선결 문제이다. 세균들의 항생제 내성 발현은 일부 국한된 항생제에 나타나지 않고 현재 사용되고 있는 거의 모든 약제에 발현되고 있어, 세균의 생리적 그리고 유전학적 성상 분석 결과 어떤 약제도 저항할 수 있는 능력을 가질 것으로 예상하고 있다. 항생제 내성을 가지는 여러 가지 세균들 중 대표적으로 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), vancomycin-resistant enterococci (VRE), vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA), 그리고 최소 6종 이상의 항생제 내성을 가진 *E. coli* O157:H7 등이다. 우리나라에서만도 MRSA는 nosocomial infection agent로 대형 종합병원에서 80%가까이 상재하고 있다. VRE와 VISA의 경우도 1990년대부터 만연하기 시작하여 전국적으로 확산하여 있는 상태이다. *E. coli* O157:H7 경우에도 multiple agent resistant로 이미 여러 종류의 항생제에 내성을 가지며 아직까지 완벽한 치료항생제가 없는 상태이다. 이 대장균의 경우 이미 미국, 유럽 그리고 가까운 일본에서 빈번히 발생하여 사회적 문제가 되어 있고, 우리나라에서 산발적으로 사람과 가축에서 발생하였다. 그리고 2001년부터 소의 수입이 자유화되면서 이 대장균 상재지역으로부터 축산물이나 생우 수입 시 우리나라에 이 대장균의 만연이 확실하다. 이들 내성균들은 우리나라의 경우 특별한 항생제 선택체계가 없고, 급격한 내성증가 요인은 다른 나라보다 훨씬 크다. 항생제 내성증가

는 새로운 고가 항생제 사용증가, 치료기간 증가, 사망률 등을 증가시켜, 결국 경제적 그리고 사회적 문제를 증가시키는 악순환이 되고 있다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위해서는 현재 발생되고 있는 내성기전을 이해하고 내성을 일으키지 않는 구조의 신종항생제의 개발이 절실히 요구된다.

4. 기술도입의 타당성

천연물에서 약효 활성을 살펴보면 치료율이 약 50-60%로 항생제의 80-90%에 비하면 다소 낮은 편이나, 최근 내성을 가진 균주의 출현으로 항생제의 치료율이 현저히 감소되고 있는 시점에서 천연물에서 신 개념의 약효 활성 물질은 이의 대처방안으로 연구될 것이다.

제 2절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

현재 사용되고 있는 항생제의 가장 큰 취약점은 심각한 항생제 내성이다. 항생제 내성을 살펴보면, 새로운 항생제가 계속 개발되고 있으나, 우리가 가장 주목해야 하는 점은 새로운 항생제를 사용할 수 있는 기간이 점차 짧아지고 있다는 점이다. 즉, 새로운 항생제를 쓰기 시작한 날부터 내성 박테리아가 출현하는 날까지의 기간이 점점 단축되고 있다. 박테리아는 새로운 항생제를 개발하여 쓰기 시작하면 곧 이에 대한 내성을 가진 박테리아를 만들어 내고 있다. 우리가 페니실린을 사용하기 시작하자 박테리아는 이에 대한 내성 박테리아를 만들어 내었고, 우리가 제 2 세대 항생제를 만들어 사용했을 때 다시 이에 대응하였고, 다시 제 3 세대, 제 4 세대, 제 5 세대 항생제를 만들어야만 하는 처지에 와있다. 세균들이 쉽게 새로운 세대의 항생제에 저항성을 갖는 이유는 제 1세대의 항생제의 기본구조에 다음 세대의 항생제는 약간의 변형을 주어 개발되었기 때문에 저항획득에 쉽다는 것이다. 즉 세균의 내성패턴을 예상하여 항생제를 개발하지 않는다면 더 이상 세균을 죽일 수 없게 되는 날이 오게 될지도 모른다. 항생제 내성의 기전에는 첫째, 각 항생제 작용부위를 변화시키는 방법이다. 예를 들면 퀴놀론 항생제는 DNA topoisomerase II에 작용하는데 이 효소를 변화시켜 더 이상 퀴놀론 항생제가 작용하지 못하게 하는 것이다. 베타락탐계열 항생제의 경

우는 세포벽의 트랜스펩티다제를 더 이상 항생제에 결합을 하지 못하게 변형시킨다. 예를 들어 tetracycline의 경우 이 항생제가 결합하는 리보조음의 구조를 변화시키는 것 등이다. 둘째, 세포내의 항생제 농도를 낮게 만드는 방법이다. 세포벽 막을 변화시켜 항생제가 세포내로 유입되는 것을 막는 방법이다. 예를 들어 친수성 퀴놀론의 경우 porine 단백질의 양을 변화시켜 항생제 유입을 막는다. Pseudomonas의 경우는 세포벽의 lipopolysaccharide가 변화되어 퀴놀론 항생제가 박테리아 내부로 들어오지 못하게 하기도 한다. 또한 일단 박테리아 내부로 들어온 항생제를 다시 밖으로 내보내는 방법이 있다. 둘째, 우리 몸을 구성하는 진핵세포의 경우 항암제에 저항성을 보이는 암에서도 이런 배출기전이 발견되고 있다. 중금속 속에 저항성을 보이는 박테리아의 경우도 상당수가 배출기전에 의해 중금속 속에 저항성을 보이고 있다. 최근에 발견되는 박테리아의 반 이상이 포도상구균인 *Staphylococcus aureus*가 차지하고 있으며, 이중의 60% 이상이 MRSA(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)로 확인되었다. 이는 중환자실에서 발견되는 균주의 95% 이상을 차지하고 있는 실정이다. MRSA는 methicillin에 저항성을 가진 균으로 대부분의 경우 multidrug exporter를 가지고 있어 여러 종류의 항생제에 내성을 가지고 있다. 현재 가장 우려하고 있는 것은 우리가 가진 모든 항생제에 내성을 보이는 박테리아들이 나타나고 있다는 사실이다. 특히 그람 음성(Gram-)박테리아의 경우 항생제가 세포 내부에서 억제작용을 나타내기 위해서는 박테리아 세포 내로 들어가야 한다. 베타락탐계 항생제는 세포 외부에서 접근하여 작용하나 다른 항생제들은 세포벽과 세포막을 통과해야 세포내로 이동된다. 그람 양성(Gram+) 박테리아는 세포벽이 펩티도글라이칸으로만 이루어져 있어 항생제 투과에 문제가 없다. 하지만 그람 음성 박테리아의 경우는 먼저 인지질과 당지질로 이루어진 세포외벽을 통과해야 하므로 확산이 상대적으로 제한된다. 특히 친수성 항생제의 경우는 porin이라는 단백질 통로를 통해서만 박테리아 안으로 들어올 수 있다. 이 porin에 돌연변이가 일어나 항생제 통과 통로가 감소하거나 없어지면 항생제가 박테리아 내부로 들어가지 못해 항생제 내성을 가지게 되는 경우도 있다. 이런 porin 돌연변이는 5-10배정도 내성을 증가시킨다. 임상실험에서 감염 부위에 작용할 수 있는 최고농도는 bacteria의 성장을 저해하거나 죽일 수 있는데 필요한 농도보다 최고 다섯 배 정도 높다. 이런 경우 10배 내성 증가는 100배 증가만큼이나 치명적일 수 있다. 셋째, 항생제를 분해하는 효소를 생산하는 경우이다. 베타락탐계열의 항생제들에 대한 내성균들은 대부분 베타락탐 분해효소를 생성한다. 그래서 대부분의 베타락탐계의 항생제는 베타락탐 항생제 분해효소 억제제와 같이 처방되고 있다. 넷째, 항생제에 경쟁적으

로 결합하여 항생제가 활성형으로 바뀌는 것을 방해하는 경우이다.

이미 한국 내에서 동물에 감염된 세균들 중 항생제로 치료하기 힘든 세균들이 상재해 있고 외국으로부터 유입된 항생제 내성 세균들에 의한 문제는 심각하게 대두될 전망이다. 현 상황에서 완전한 치료제인 이상적인 치료제 즉 치료율이 양호하며, 내성 및 부작용이 없는 항생제는 없는 상황이다.

현재 경제적 그리고 문화적으로 국제교류가 활발해지고 더불어 외국의 병원성 세균들의 유입 가능성이 더욱 많고 축산물 수입이 증가됨에 따라 이를 통한 신종세균의 국내 확산이 가속화될 전망이다. 현재 우리나라 축산에 상재하는 세균들은 대부분 기존 항생제에 내성을 나타내고 있어 그 치료가 점차 어려워지고 있다. 이들 치료 문제점은 이들 세균에 감염된 축산물을 통한 인체에 전파가 심각할 것이다. 최근 보고에 의하면 인체의 전염성 질병 중 50% 이상이 인수공통전염병으로 나타나고 있어 안전한 축산물 공급은 공중보건상 가장 신중하게 해결해야 될 선결 문제이다. 세균들의 항생제 내성 발현은 일부 국한된 항생제에 나타나지 않고 현재 사용되고 있는 거의 모든 약제에 발현되고 있어, 세균의 생리적 그리고 유전학적 성상 분석 결과 어떤 약제도 저항할 수 있는 능력을 가질 것으로 예상하고 있다. 항생제 내성을 가지는 여러 가지 세균들 중 대표적으로 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), vancomycin-resistant enterococci (VRE), vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA), 그리고 최소 6종 이상의 항생제 내성을 가진 *E. coli* O157:H7 등이다. 우리나라에서만도 MRSA는 nosocomial infection agent로 대형 종합병원에서 80%가까이 상재하고 있다. VRE와 VISA의 경우도 1990년대부터 만연하기 시작하여 전국적으로 확산하여 있는 상태이다. *E. coli* O157:H7 경우에도 multiple agent resistant로 이미 여러 종류의 항생제에 내성을 가지며 아직까지 완벽한 치료항생제가 없는 상태이다. 이 대장균의 경우 이미 미국, 유럽 그리고 가까운 일본에서 빈번히 발생하여 사회적 문제가 되어 있고, 우리나라에서 산발적으로 사람과 가축에서 발생하였다. 그리고 2001년부터 소의 수입이 자유화되면서 이 대장균 상재지역으로부터 축산물이나 생우 수입 시 우리나라에 이 대장균의 만연이 확실하다. 이들 내성균들은 우리나라의 경우 특별한 항생제 선택체계가 없고, 급격한 내성증가 요인은 다른 나라보다 훨씬 크다. 항생제 내성증가는 새로운 고가 항생제 사용증가, 치료기간 증가, 사망률 등을 증가시켜, 결국 경제적 그리고 사회적 문제를 증가시키는 악순환이 되고 있다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위해서는 현재 발생되고 있는 내성기전을 이해하고 내성을 일으키지 않는 구조의 신종항생제의 개발이 절실히 요구된다.

1. 우리나라의 기술개발 현황 및 개발수준

(1) 현재 항생제를 대체할 수 있는 물질로 유·무기산제, 생균제, 프리바이오틱스, 식물추출물, 광물질 등이 사용되고 있으나, 이들 중 많은 제제들이 외국산임.

(2) 단미사료협회의 자료에 따르면, 항생제 대체제로서 생균제의 생산량이 2001년 1000톤 수준이던 것이 2004년에는 11,763톤을 상회하는 등 그 수요가 폭발적으로 증가하고 있는 실정이나, 생균제의 효과에 대한 객관적인 검증 자료가 부족한 상황임.

(3) 국내 한방생약제 등을 이용한 항생물질의 추출이나 이의 활용을 통한 항생제 대체에 대한 연구가 진행된 바 있으나, 기존의 항생제를 대체할 수 있는 물질은 개발 되지 못하고 있음.

2. 외국의 기술개발 현황 및 개발수준

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
일본, 유럽연합(EU)	사료용 생균제를 항생제 대체제	항생제 대체제
유럽	지방산 성분을 이용 이유자돈에 대한 구연산과 초산의 급이	항생제 대체물질
미국농무부(USDA)	6개주(州)의 관계기관과 26개의 개 인 인증기관에서 2001년부터 인증서 비스를 시작	유기농으로 생산된 식육의 표시제 한을 개선 무항생제 유기축산이 폭발적으로 확대
호주(31개 생산자가 공동으로 조직한 OBE 회사)	항생제나 화학물질을 사용하지 않고 육성	자연의 들풀이나 약초를 사료

1) 국내 · 외 연구개발 현황

가) 국외

(1) 일본 : 인수공통전염병 예방 및 치료제 개발에 천연물(한약)을 이용한 예는 없음. 단, 천연물로부터 살균, 항균제의 개발은 일본을 중심으로 이루어지고 있으며 그 예는 아래와 같음.

(가) 개자(芥子) 정유의 용도개발(일본 녹십자)

- 개자 정유에 함유되어 있는 Arylisothiocyanate의 항균력 이용
- 개자 추출물로부터 정유 정제: “와사오로”(상품명)
- 판매용 도시락의 변질방지 목적으로 활용

(나) 노송나무로부터 광범위 항균물질인 “Hinokitiol”의 분리 및 상품화

- 항균 seat: 미쓰비시알루미늄(주)
- 신선도 유지용 film: 昭和電工(株), 日生化學(株), 三井物産(株)
- 신발 깔개: 石川工業
- 입욕제, 수건, 비누, 샴푸: 일본바이오프로젝트(株)

(다) 항염증 연구

- 부자가 함유된 순수한 한방약재를 이용해 당뇨병으로 인한 통증과 염증을 감소

(2) 중국

o 위장 내 세균이며 위암의 유발균주로 알려진 헬리코박터를 천연물(순수한 한방약)로 치료한 임상 데이터가 있다. 상해중의약대학 소화기내과 채금 교수 등에서 치료율이 약 50-60% 정도이며, 임상증상이 유효하게 개선된다고 보고하였음

(3) 기타

o 탄자니아에서는 조류에게 치명적인 질환인 뉴캐슬을 한약재인 알로에로 치료를 시도한 임상 자료가 있다.

나) 국내

(1) 천연물을 이용한 인수공통전염병 예방 및 치료제 연구는 진행되지 않고 있음. 단, 항염증 약효를 가진 의약품 개발현황은 아래와 같음.

(2) 코오롱(주)가 개발한 비스테로이드성 소염제인 록소프로펜(코록소)은 단일품목으로 세계

시장 규모가 연간 3억 달러에 달하는 대형 의약품으로 독자적인 제조기술을 개발함.

(3) ‘코록소’는 만성관절염, 류머티스 관절염, 요통, 외상 등에서 오는 염증을 제거하는 효능을 가짐.

(4) 국내에서는 ‘코록소’이외에 이러한 진통제 연구는 많았으나 상품화하여 성공한 예는 아직은 없는 상태임.

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 이론적, 실험적 접근방법

1. 이론적 접근방법

가. 고대 문헌 검색

천연물에서 항균 및 항염증작용이 있는 고대의 문헌을 다량 검색한다. 한방 분초서 중에서 가장 권위를 인정받는 중화본초(中華本草)의 청열해독(淸熱解毒) 편을 주로 참조하여 작용이 강한 약물을 후보물질그룹으로 분류한다. 고대로부터 열을 내려서 그 독을 푸는 약들이 강한 활성이 있다고 알려진 청열해독약과 기타 약물을 참조로 한다. 또한, 상한론, 금궤요략, 비급천금요방, 외대비요, 성제총록, 유문사친, 단계심법, 의림개착, 온병조변, 동의보감 및 중국의학대성 등 20여권의 방제학 서적과, 신농본초경, 신수본초, 대관본초 및 분초강목 등의 분초서적을 참고한다.

나. 현대 약리학적 자료 검색

현대 약리학적으로 그 활성이 현저하다고 보고 된 성분이나 약물을 찾아서 후보물질로 정한다. 200여종 이상의 천연물에서 후보물질로 분류된 약제의 약리작용 및 그 특징을 파악한다.

2. 실험적 접근방법

가. 한약재구입 및 추출

상기한 후보물질을 각각 구입하여 물 추출액으로 추출하여 동결건조 작업을 한다.

나. 항균력 검사 체계 구축, 한약재의 억제실험 및 결과 분석

상기의 건조된 천연물을 적정 농도와 용매를 가하여 Bauer-Kirby test, MIC test, MBC test 등의 활성실험을 한다. 그 중 활성이 강한 우수한 약제 2-3가지를 선택한다.

다. 선택된 약제의 조합을 구성하여 실험동물, 목적동물을 상대로 안전성, 효능을 측정한다.

제 2절 연구내용

1. 각 분획의 추출 및 성분 동정

가. 유기용매에 의한 추출법

실험에 사용한 각 분획은 T. Noro 등의 추출법에 의하여 실시하는데, 우선 천연물을 극성이 다른 benzene, chloroform, acetone 및 ethylacetate 등으로 추출하여 각각의 fraction을 얻은 후, 그 각각의 분획물의 활성실험을 진행한다.

나. TLC, HPTLC plate 분리법,

활성이 강한 fraction을 대량 수집하여, TLC plate 및 HPTLC plate 방법으로 성분을 분리한 후 각 성분의 약효활성을 실험한다.

다. UV, NMR 및 MS 성분 동정

그 중 가장 활성이 강한 단일 성분을 분리하여 UV Spectroscopy, 핵자기공명 spectroscopy를 이용한 NMR 및 Mass Spectrometry(chemical ionization, field desorption, fast atom bombardment와 secondary ion)등을 이용하여 구조를 결정한다.

2. Bauer-Kirby test(디스크 검사법)

세균 배양액을 Muller Hinton 한천 배지 위에 접종하고 이 위에 천연물질에서 추출한 약제를 디스크에 주입하면 배지에 항생제 농도구배가 생긴다. 이때 디스크 주위로 생기는 억제환이 항균력을 나타낸다. 억제환은 항생제의 용해도와 세균의 민감성 정도에 따라 크기가 나타나며 각 항생제에 대한 민감성은 항생제마다 일정한 억제환의 크기에 따라 감수성(sensitive, S), 중간내성(intermediately sensitive, I), 내성(resistant, R)으로 나눈다.

3. MIC(Minimal Inhibitory Concentration)

박테리아의 성장을 억제할 수 있는 가장 낮은 농도를 결정하기 위한 방법이다. 일정한 양의 박테리아를 약제가 연속적으로 희석된 튜브에 넣고 탁도의 변화로 박테리아의 성장여부를 결정하는 방법으로, 박테리아의 성장을 억제하기 위해 필요한 최소한의 항생제 농도를 MIC라고 한다. MIC와 체액에서 얻을 수 있는 항생제의 이론값으로부터 치료에 적절한 약제, 투약스케줄, 투여 방법을 결정할 수 있게 된다. 대개의 경우 병을 치료하기 위해서는 MIC의 10배를 사용하는 것이 바람직하다. 현재는 microtiter plate와 Automated Inoculation and Reading System으로 MIC측정 할 수 있게 되었다.

4. MBC(Minial Bactericidal Concentration)

일정기간동안 세균 현탁액 중에 살아있는 박테리아의 몇 %를 죽일 수 있는 항생제의 최종농도를 말한다. 대개의 경우 처음 1 ml안에 10^5 에서 10^6 의 박테리아가 들어있을 때 18-24시간동안 처리로 99.9%를 죽이는 농도를 MBC로 한다. MBC를 측정하기 위해서는 세균이 죽었는지 아니면 성장만 멈춘 것인지 확인하기 위해 고체 배지에 접종을 해서 생사유무를 확인한다. 대개의 경우 면역작용이 정상인 환자의 경우 MIC만으로 충분하나 endocarditis의 경우 MBC측정이 꼭 필요하며 특히 항암 치료 중인 환자와 같이 면역기능이 저하된 경우 MBC의 측정이 필요하다.

5. Serum killing power

실제 약제 치료를 받고 있는 환자 몸에서 박테리아는 성장을 하지 않아야 하기 때문에 약제를 투여한 후 일정 시간 뒤 혈액을 채취하여 박테리아를 접종한 후 박테리아 성장이 얼마나 억제되는지를 측정한다. 박테리아 성장이 일어나는 희석배수는 환자 혈액속의 항생제 농도가 실질적으로 감염을 조절할 수 있는 농도가 되는지, 실제 유효성을 보여주는 것으로 환자혈청의 희석배수가 1:8 또는 그 이상의 희석배수가 바람직하다.

6. 효소중합반응(PCR)

내성 유전자의 존재여부를 내성 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 염기서열을 가진 DNA 단편을 사용하여 효소 중합반응이 일어나는지 여부로 확인할 수 있다. 예를 들어 MRSA와 같이 새로운 단백질인 PBP2'가 만들어져 페니실린 내성이 생기는 경우는 이 유

전자의 존재유무를 PCR을 사용하여 검출할 수 있다. 또는 aminoglycoside 내성의 경우와 같이 리보솜의 RNA가 변화하여 내성이 발현되는 경우같이 항생제의 target site유전자가 변화하는 경우 내성을 유발시키는 부분을 효소중합반응으로 증폭시켜 이를 SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), sequencing등의 방법으로 돌연변이 발생유무를 확인하기도 한다. 이 방법은 결과를 얻는데 걸리는 시간이 짧고 적은 양의 샘플로도 검출이 가능하여 내성 유전자의 염기서열을 알고 있는 경우 매우 간편한 방법이다.

7. In vitro cell cytotoxicity Assay

BHI broth 증균 broth에 24시간 정도 (약제가 함유된 상태에서) 증균시킨 배양액을 2500rpm에서 30분간 원심침전을 시킨 후, 그 상층액만을 0.25um필터로 filtering한 액을 96well 에 배양하여 24시간 자란 cell (Vero cell 등)에 접종한다. Vero cell을 10% calf 혈청을 첨가한 Eagle MEM 배지를 사용하여 24시간 배양하고 cell을 monolayer로 배양하여 trypsin 처리한 후, 세포 부유액 200ul 에 50ul의 시료를 첨가하여 5% CO2 존재 하에서 18-24시간 배양한 후 전자현미경으로 vero cell의 사멸 정도를 관찰해 본다. Medium만 사용하여 control로 cytotoxicity 정도를 판정한다. 판정 시 사멸된 세포의 정도에 따라 등급을 0에서 10으로 분류한다.

8. 실험동물 모델 확립과 이를 이용한 약제의 효과 안전성 조사.

약제의 효과와 안전성을 생체 내에서 조사하기 위하여 다양한 세균 (*E. coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*; MRSA 등) 감염에 대한 균을 죽이거나 억제하는 기전,을 마우스 (SPF ICR, female, 5-6wk)나 돼지 등을 실험동물로 설정하여 세균을 투여한 후 분리된 약제를 투여한 후 임상증상과 조직검사를 통하여 투여 후 세균에 의한 병원성 변화, 세균 잔여량, 사망률 (생존율) 등을 조사한다. 생존율은 한 군당 8 마리의 동물에 lethal dose 50 혹은 그 이상 (40배까지)의 균을 경구로 투여하고 24시간을 방치한 다음 분리약제를 경구 혹은 복강내로 주사하여 20일간 동물을 관찰 survival rate를 산정한다.

9. 목적동물 모델 확립과 이를 이용한 약제의 효과 조사.

상기 실험에서 약효가 인정된 천연물의 복합물질을 사료(펠릿, 고형화, 과립 및 분말

화)로 만들어 본 연구팀의 목적동물인 닭에 네 개의 그룹으로 나누어 투여한다. 항생제를 포함한 사료(1)), 항생제를 포함하지 않은 사료(2), 연구팀에서 만든 혼합물질과 항생제를 포함한 사료의 혼합 사료(3), 연구팀에서 만든 혼합물질과 항생제를 포함하지 않은 사료의 혼합 사료(4)로 나누어 약효를 관찰한다. 이 연구결과를 산업화하기 위하여 닭 농가를 지정하여 마지막 필드실험을 한 후 사판한다.

10. 공시균주 및 배지와 균주배양

항균력 측정에 사용된 균주는 인체나 동물에서 분리 야외균주와 ATCC 표준균주이다 (Table. 1). 균주들은 Tryptic Soy broth (TSB; Difco, USA)에 접종되어 37°C 항온기에서 24시간동안 배양하여 실험에 사용하였으며 육안의 관찰을 위해서는 Muller-Hinton (MH; Difco, USA) agar를 사용하였다.

Table 1. List of the bacterial strains

Strains	Description	Origin
JOL 375	<i>Vibrio cholera</i> O1	Human
JOL 376	<i>Vibrio cholera</i> O139 ATCC 51394	
JOL 377	<i>Shigella dysenteriae</i>	Human
JOL 378	<i>Shigella flexeneri</i>	Human
JOL 379	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43890	
MRSA 104	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus Aureus</i>	Human
JOL284	O157(E.Coli O157)	Animal
ATCC	<i>Salmonella gallinarium</i> ATCC	
JOL 284	<i>Escherichia coli</i> O157	Animal

항균력 측정에 사용된 *Salmonella*균은 인체나 동물에서 분리된 자연 균주와 ATCC 균주이다 (Table 2). 균주들은 Tryptic Soy broth (TSB; Difco, USA)에 접종되어 37°C 항온기에서 24시간동안 배양하여 실험에 사용하였으며 육안의 관찰을 위해서는 Muller-Hinton (MH; Difco, USA) agar를 사용하였다.

Table 2. List of the *Salmonella*

Strain	Description	Origin
JOL380	살모넬라 티피 (Salmonella typhi)S.Typhi	사람
JOL381	살모넬라 파라티피 (Salmonella paratyphi)	사람
JOL386	살모넬라 엔테리티디스(S.Enteritidis)	돼지
JOL387	살모넬라 티피뮤리움(S.Typhimurium)	돼지
JOL388	살모넬라 티피뮤리움(S.Typhimurium)	돼지
JOL389	살모넬라 티피뮤리움(S.Typhimurium)	돼지
JOL394	살모넬라 칼리나리움 (Salmonella gallinarium)	닭(비장)
JOL395	살모넬라 칼리나리움 (Salmonella gallinarium)	닭(간)
JOL398	살모넬라 티피뮤리움(S.Typhimurium)	돼지
JOL399	살모넬라 티피뮤리움(S.Typhimurium)	돼지
JOL400	살모넬라 티피뮤리움(S.Typhimurium)	돼지
JOL401	살모넬라 티피뮤리움(S.Typhimurium)	닭
JOL402	살모넬라 티피뮤리움(S.Typhimurium)	닭
JOL403	살모넬라 티피뮤리움(S.Typhimurium)	닭
JOL404	살모넬라 티피뮤리움(S.Typhimurium)	닭
JOL405	살모넬라 엔테리티디스(S.Enteritidis)	닭
JOL407	살모넬라 엔테리티디스(S.Enteritidis)	소
JOL408	살모넬라 티피뮤리움(S.Typhimurium)	소
JOL409	살모넬라 듀블린(S.Dublin)	소
JOL410	살모넬라 더비S.Derby)	소
JOL411	살모넬라 콜레라시우스(S.Cholerasuis) ATCC 7001	돼지
JOL419	살모넬라 칼리나리움 (Salmonella gallinarium)	닭
JOL420	살모넬라 칼리나리움 (Salmonella gallinarium)	닭
JOL421	살모넬라 칼리나리움 (Salmonella gallinarium)	닭
JOL422	살모넬라 칼리나리움 (Salmonella gallinarium)	닭
JOL423	살모넬라 칼리나리움 (Salmonella gallinarium) ATCC 9184	닭

11. 실험동물(마우스)

5주령 ICR 마우스 수컷 17마리를 본 실험에 사용하였으며, 실험에 사용되기 전 *Salmonella*의 비감염임을 확인하기 위해 미생물학적 검사를 실시하여 육안으로 관찰한 후, 확인하여 실시하였다. Negative control군 5마리, 2종류의 약제 투여군 6마리씩을 임의로 택하여 케이지에 분리 사육하였으며 3일간의 적응기간을 둔 후 실험을 실시하였다. 적응 기간 동안 음수로 5g/ℓ streptomycin in DW를 사용하였고 사료, 깔짚 등을 날마다 갈아주며 사육하였다.

가. 마우스 접종실험 방법

마우스 접종실험에는 *Salmonella typhimurium*를 streptomycin (Sigma, USA)이 들어있는 TSB에 접종하여 37°C shaking incubator에서 24시간 배양 후 2,500rpm에서 30분간 원심 분리하여 균체를 회수하였다. 균체를 phosphate buffered saline (PBS)으로 1회 세척 후, 20% sucrose in 1X PBS에 재부유시켜 1X 10⁴cfu/ml로 맞추어 균액 0.5ml을 zonda에 이용하여 경구 접종하였다.

실험은 총 3군으로 나누어 실시하였다. Negative control군은 공시균주가 아닌 20% sucrose in 1X PBS를 접종하고 실험기간동안 5g/ℓ streptomycin in DW 만을 음수로 제공하였다. 약제투여군은 공시균주를 접종하고 한약재 추출물을 5g/ℓ streptomycin in DW에 희석시킨 것을 음수로 제공하였다. 한약재 추출물은 *Prunus mume* (오매)와 *Schizandra chinensis* (오미자) 모두 메탄올 추출물을 5mg/ml의 농도로 하였다. 그리고 실험 기간동안 케이지와 깔짚은 날마다 갈아주며 사육하였다.

나. 마우스에서의 한약재 추출물 치료효과 조사

분변으로 배출되는 *Salmonella*의 양상을 분석하기 위해 각 군의 마우스로부터 분변을 수집하였다. 균주 접종 전 1회, 접종 후 1일, 3일, 6일째에 각각 1회씩 모두 4회 각 군의 마우스에서 분변을 0.85% 생리식염수로 십진 희석하고 SS (Difco, USA) agar에 100μl 희석액을 도말하여 37°C 항온기에서 24시간정도 배양하여 *Salmonella*의 수를 측정한다.

12. 실험동물 및 목적 동물(닭)

가. 한약재 투여 후 닭의 성장, 활동성 및 안전성 조사

본 실험에 사용된 hyline 병아리는 약 5일령으로 42~58 g이고 총 20마리가 실험군이 각각 6 마리씩, 대조군 8마리로 나누어 약5주간에 걸쳐 실시하였다.

사료는 항생제가 포함되지 않은 것으로 제공되었으며 전체 시험기간동안 사료와 물을 자유로이 섭취하도록 하였고 약제는 동결 건조된 분말을 사료량의 1%로 첨가하여 제공하였다. 대조군은 항생제가 포함되지 않은 사료만 제공하였다.

나. 한약재 추출물 투여 후 *Salmonella gallinarum* 감염 닭의 치료효과 조사

본 실험에 사용된 병아리는 2주령 hyline 병아리 마리를 사용하였으며, 실험에 사용되기 전 *Salmonella*의 비감염임을 확인하기 위해 미생물학적 검사를 실시하여 음성 확인 후 실험에 사용하였다. 대조군 4마리, 오매와 오미자 약제 투여군 각각 5마리씩을 임의로 택하여 케이지에 분리 사육하였으며 3일간의 적응기간을 둔 후 실험을 실시하였다. 적응기간동안 음수로 물을 공급하였고, 사료에 0.5%의 메탄올 추출액의 상태의 약제를 섞은 후 충분히 공급해 준 후 사육하였다. 사료는 항생제가 포함되지 않은 상태이다.

다. 한약재 추출물의 *Salmonella* 감염증 치료 효과에 대한 연구

본 실험에는 7~10일령의 삼계용 닭을 사용하였다. 실험에 사용하기 전 3일간의 적응기간을 두었다. 실험동물은 각 군당 30마리씩 총 3군으로 나누어 분리사육 하였다.

1군(test group) - NP532를 2%씩 사료에 첨가해 제공

2군(positive control) - tetracycline을 권장량인 0.05%씩 사료로 첨가해 제공

3군(negative control) - 사료만 제공

실험 전에 미생물학적 검사를 실시하여 *Salmonella spp.*에 감염되어 있지 않음을 확인하였다. 실험을 수행하는 기간 내내 충분한 양의 사료와 음수를 공급하였다. 또한 사육장내에서의 재감염을 줄이기 위해 매일 사료통과 물통 및 바닥등을 갈아주었다.

라. 닭(육계, 산란계)의 사양시험

1) 육계 사양시험

시험 1은 육계 1일령 코브 수컷(평균 44g)을 이용하여 5주간 사양시험을 진행하였다. 육계 사료에 한약재를 0, 0.25, 0.5, 1, 2% 수준으로 첨가하였고, 처리구당 4반복, 반복당 16수씩 총 320수를 공시하였다. 사료내 영양소 함량은 사육전기 2주와 후기 3주로 구분하여 각

각 CP 22, 20%와 ME는 3,100kcal/kg 수준으로 하였고, 기타 영양소 함량은 NRC 사양표준 (1994)에 의거하였다.

2) 산란계 사양시험

시험 2에서는 강제환우 시킨 산란계 하이라인 갈색계(86주령)를 이용하여 4주간 사양실험을 시행하였다. 산란계 사료에 한약재를 0, 0.05, 0.1, 0.2% 수준으로 첨가하여 4개 처리구를 두었고, 처리구당 4반복, 반복당 18수씩, 총 288수를 공시하였다.

13. 병리학적 조사

마우스나 닭의 간, 비장, 소장, 신장 등의 조직을 잘라내고 10% NBF에 넣어 4°C에서 overnight한다. H&E stain 후 병리학적인 변화를 관찰한다.

14. 항염증활성 측정

1) 세포 배양

인간의 백혈병 肥滿 細胞 주 HMC-1(Dr. Y, Kitamura; Osaka University Medical School, Osaka, Japan 으로부터 제공 받았음)는 10%의 열 불활성화된 우태혈청(FBS), 2 mM 글루타민, 100 IU/mL 페니실린, 50 µg/mL streptomycin과 1.2 mMα-티오글리세롤이 추가된 Iscove's modified Dulbecco's medium(IMDM)에서 공기 중 이산화탄소 5% 이하 37°C 상태에서 배양되어졌다. 또, murine macrophage cell line은 RAW 264.7 cells(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, South Korea)은 10%의 열 불활성화된 우태혈청(FBS), 2 mM 글루타민, 100 IU/mL 페니실린이 추가된 RPMI 1640 medium에서 공기 중 이산화탄소 5% 이하 37°C 상태에서 배양되어졌다.

2) MTT assay

약물에 의한 세포독성을 알아보기 위해 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 조사하였다. 96well plate에 세포를 분주하여 약물을 농도별로 처리하고 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 MTT(5mg/ml)용액 10 µl를 첨가한 후 37°C에서 4시간 배양한 다음 DMSO를 가하여 실온에 30분간 방치한 후 540nm의 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 측정하였다.

3) Nitric oxide (NO) production 측정

NO production은 배양된 RAW 264.7 cells 상층액에 nitrite를 측정하는데 96-well culture plates에 세포를 5×10^5 /mL로 분주하고 pre-incubation하고 추출물(1,000 μ g/mL, 100 μ g/mL, or 10 μ g/mL)로 전처리하고 LPS (200 ng/mL)로 24시간 자극한다. 상층액과 동량의 Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, and 2.5% phosphoric acid)을 가하고 실온에서 5분간 방치하고, 570 nm에서 nitrite의 농도를 계산한다.

4) Western blot analysis

Protein expression은 Western blot analysis로 하였다. RAW 264.7 cells을 culture dishes (2×10^6 /mL)에 60분간 두고, 추출물(1,000 μ g/mL, 100 μ g/mL, or 10 μ g/mL)를 혼입하고 30분 후에 LPS (200 ng/mL)를 가한다. cells을 ice-cold PBS (pH 7.4)로 두 번 세척한다. cell pellets을 lysis buffer에 15분간 두고 원심분리하여 cell debris를 제거한다. protein concentrations는 BIO-RAPID protein assay reagent로 구입하여 지시서에 따라 측정하였다. 같은 양의 protein (20 μ g)을 SDS-PAGE에 두고 PVDF membrane (Millipore)로 옮긴다. membrane은 5% nonfat milk in TBS/T buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, and 0.05% Tween 20 pH 7.4)로 blocking한다. membrane을 primary antibody로 18시간 둔 다음 TBS/T용액으로 씻고 anti-mouse 혹은 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies로 인큐베이션한다. enhanced chemiluminescence (ECL Amersham, Milan)로 Immuno-reactivity를 측정한다.

5) 효소 면역 측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay. ELISA)

세포들은 24 well tissue culture plates 안에 well당 5×10^5 세포들을 배양해 A23187(1 μ M)가 첨가된 PMA(50nM)로 자극하기 전에 30분간 다양한 농도(1, 10, 그리고 100 μ g/mL)의 추출물로 전 처리되었다.

ELISA plate(Falcon, Becton Dickinson Labware, USA)는 coating buffer(0.1 M carbonate,

pH 9.5)에서 희석되어진 인간에 대한 TNF- α , IL-6, 그리고 GM-CSF 항체로 4°C에서 밤새도록 덧입혀졌다. 다음에 0.05% tween 20(PBS-T)을 함유한 PBS로 4번을 세척했다. 단백질이 결합할 수 있는 장소는 적어도 1시간 동안 assay diluent(FBS10% 농도의 PBS pH 7.0)로 차단되어졌고 각 샘플의 100 μ L 혹은 assay diluent로 표준 희석되어진 TNF- α ,

IL-6, 그리고 GM-CSF는 well에 적용되어졌다. 2시간 동안의 배양한 후에, 100 μ L의 발효 작용 검출기(바이오티널레이트된 인간에 대한 TNF- α , IL-6, 그리고 GM-CSF 모노클로날 항체와 avidin-HRP가 첨가되어 1시간 동안 배양되어졌다. 그 후, 100 μ L의 기질용해제(tetramethylbenzidine (TMB))가 각 well에 첨가되어졌고 50 μ L의 stop solution(2N H_2SO_4)에 의해 그 반응이 멈춰지기 전 30분간 암실에서 배양되어졌고, 그리고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 이후의 절차들은 실온에서 이루어졌고, 모든 표준 규격품 및 샘플들은 세 번씩 측정되어졌다.

6) RNA 추출 및 역전사 (revers-transcription PCR)

추출물로 전 처리 한 HMC-1 세포들은 PMA(50nM)와 A23187(1 μ M)로 2시간 동안 자극되어졌다. Total RNA는 easy-*BLUETM* RNA 추출 키트(iNtRON Biotech, Korea)을 사용하여 추출하였다. 마지막으로 녹여서 분리된 total RNA의 농도는 분광광도법(spectrophotometry)에 의해 측정되어졌다.

Total RNA(2 μ g)는 first-strand cDNA 합성 키트(Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 90분간 37°C에서 역전사 효소(reverse transcriptase)에 의해 cDNA로 바뀌어진다. GAPDH, IL-6, TNF- α , GM-CSF를 위한 primer sequences는 전에 언급했던 대로 사전에 형성되어졌다.³²⁾ 최종적인 PCR 생성품은 1%의 아가로스 젤에서 분리되어졌고 자외선 아래에서 선명하게 나타났다.

7) Cytosolic과 핵단백질 추출 및 I κ B와 NF- κ B에 대한 Western Blot 分析

추출물로 전 처리 한 HMC-1 세포들은 PMA(50 nM)와 A23187(1 μ M) 로 자극되어졌다. I κ B의 검출을 위해 세포질 추출물들은 다음과 같이 준비되어졌다. 세포들은 냉(冷) PBS에 두 번 세척되어졌고, lysis buffer[25 mmol/L Tris-HCl pH 7.4 , 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L CaCl₂, 1% Triton X-100, 1 mmol/L PMSF, 10 mL/mL aprotinin] 안에서 10분 동안 냉각

상태로 배양되어졌고, 플레이트에서 스크랩되어졌고, 그리고 4°C에서 10분 동안

14,000 × g 으로 꼬여졌다. 핵 추출물은 세포를 1 ml의 얼음 냉각된 PBS로 세척되어졌고, 400 ml의 얼음 냉각된 hypotonic buffer[10 mmol/L HEPES/KOH, 10 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L EDTA , 1 mmol/L DTT 와 0.5 mmol/LPMSF, pH 7.9]안에서 잘 섞여졌고, 10분간 냉각 상태로 유지되었고, vortexed 했고, 30 초 동안 15,000 × g 으로 원심분리 되어졌다.

핵 pellet은 얼음 냉각된 saline buffer[50 mmol/L HEPES/KOH, 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT, 300 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 10 % 글리세롤, 그리고 0.5 mmol/L PMSF, pH 7.9] 50mL 안에서 서서히 섞여졌고, 20분간 냉각 상태로 유지되었고, vortexed 했고, 4°C에서 5분 동안 15,000 × g 으로 원심분리 되어졌다.

Cytosolic과 핵 추출물들은 각각 IκB와 NF-κB를 검출하기 위해 12% SDS-PAGE에 의해 분리되어졌고 PVDF membrane(Millipore)에 전사되어졌다.

5% 의 무지방 우유로 차단되어진 후에, IκB와 NF-κB가 전사된 membrane은 제 각각 4°C 에서 12시간 동안 인간에 대한 NF-κB p65와 인간에 대한 IκB 항체(Santa Cruz Biotech. Inc, CA, USA)에서 배양되어졌다. Membrane들은 IgG-horseradish에 대한 페록시다아제 (DAKO, High Wycombe, Bucks, UK)에 서 1시간 동안 배양되어졌다. 항체에 의해 특별하게 인식되어진 Epitopes는 ECL 검출 시약을 사용함으로써 보여지게 된다.

IκB와 NF-κB 단백질 함량은 image analyzer(VILBER LOURMAT FC-26WL, France)에 의해 정량화되어진다.

8) 통계적 분석

결과들은 실험 횟수에 대한 평균 S.E.로서 표현되어졌다. Student's t-test 를 이용하여 처치군과 통제군 각 군의 통계적 유의성을 비교하였다. 각 실험 들은 적어도 세 번이 이루어졌고, 비교 가치가 있는 결과들이 나타났다. *p 값이 0.05보다 작으면 유의한 것으로 표현되어졌다.

제 3절 연구결과

1. 1차년도 실험 결과

가. 문헌조사(고전문헌과 현대약리적인 문헌)

1) 후보 약물을 한방 방제서에서의 활성 처방

(가) 방제서적 : 상한론, 금궤요략, 비급천금요방, 외대비요, 성제총록, 유문사친, 단계심법, 의림개착, 은병조변, 동의보감 및 중국의학대성 등 20여권

(나) 본초서적 : 중화본초(中華本草), 신농본초경, 신수본초, 대관본초 및 본초강목 등 15권

(다) 방제 : 보제소독환, 양격산, 사묘용안산, 사청환, 좌금환, 무기환, 청위산, 작약탕, 황금탕, 황연환, 백두옹탕 등 다수

(라) 한약재 : 금전초, 강황, 고분, 강활, 고련피, 견우자, 고삼, 귀전우, 길경, 금은화 등의 200종

나. 한약재 추출

200여종의 메탄올 추출물과 60여종의 전통처방에 대해서는 메탄올 fraction단계까지 추출을 진행하였다. 활성이 있는 후보 약재에 대해서는 T. Noro등의 추출법에 의하여 실시하는데, 우선 천연물을 극성이 다른 benzene, chloroform, acetone 및 ethylacetate 등으로 추출하여 각각의 fraction을 얻은 후, 그 각각의 분획물의 활성실험을 진행한다.

다. 항균력 검사 체계 구축, 한약재의 억제실험 및 결과 분석

1) 한약재추출물의 예비 스크리닝(디스크 검사법)

상기한 200여(200여종의 메탄올 추출물과 60여종의 전통처방에 대해서는 메탄올 fraction) 후보 약재를 대상으로 아래의 디스크 검사법을 시행하였다. 비교적 성적이 우수한 약재 114개의 성적을 기재하였다.(Table 3)

Table 3. Growth inhibiting activities of extracts from medical herbs against bacteria

비고	전체	chole	chole	shige	shige	E.coli	salmo	salmo	MRS	MRS	salmo	E.coli
	약물	균.1	균.2	균.3	균.4	균.5	균.6	균.7	균.8	균.9	균.10	균.11
1	wp1	12	7	-	-	-	-	-	8		-	-
2	wp2	8	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp3	14	8	-	-	-	-	-	9		-	-
2	wp4	11	10	-	6.5	-	-	-	9	7	-	-
1	wp5	10	9	-	7	-	-	-	-	8		-
2	wp6	14	9	-	-	-	-	-	12	12	-	-
2	wp7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp8	18	10	-	-	-	-	-	13	-	-	-
2	wp9	13	6.5	-	-	-	-	-	9	7		-
2	wp10	14	9	-	-	-	-	-	-	8		-
2	wp11	19	9	-	-	-	-	-	13	12		-
2	wp12	12	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	wp13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	wp14	13	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp15	18	10	-	-	-	-	-	22	16	-	-
1	wp16	11	8		-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp17	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp18	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	wp19	9	7	-	-	-	-	-	-	7	-	-
1	wp20	12	7		-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp21	10	7	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	wp23	7		-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp24	-	6.5	-	-	10	-	-	-	-	-	-
1	wp25	14	10	-	-	-	-	-	15	11	-	-
2	wp26	15	13	7	-	9	-	-	16	14	-	-
1	wp27	12	8	-	-	-	-	-	-	8		-
2	wp28	12	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp29	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp30	13	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp31	13	9		-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp32	16	10	16	6.5	10	-	7	15	12	-	6.5
2	wp33	15	9	-	-	-	-	-	11	-	-	-
2	wp34	11	8	-	6.5	13	-	-	-	7		-
2	wp35	12	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	wp36	10	8	-	-	-	-	-	-	-		-
2	wp37	11	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2	wp38	11	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp39	10	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp40	13	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	wp41	11	8	7	7	-	-	7	-	7	7	-
1	wp42	13	8	-	-	-	-	-	9	7	-	-
2	wp43	12	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp44	11	8	-	-	-	-	-	15	13	-	-
2	wp45	12	11	-	-	-	-	-	10	-	-	-
2	wp46	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	wp47	16	8	-	6.5	-	-	-	-	7	-	-
1	wp48	12	8	-	-	-	-	-	9	10	-	-
2	wp49	12	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	wp50	9	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp51	9	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp52	13	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp53	9	7	-	6.5	-	-	-	-	6.5	-	-
2	wp54	11	9	7	7	-	-	6.5	7	6.5	-	-
1	wp55	14	9	-	7	9	10	-	-	6.5	-	-
1	wp56	18	13	-	-	-	-	-	19	13	-	-
1	wp57	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp58	12	9	-	-	-	9	-	-	-	-	-
1	wp59	12	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp60	14	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp61	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	wp62	21	10	13	8	10	9	7	9	7	6.5	-
1	wp63	20	11	12	9	11	7	-	13	18	7	6
2	wp64	14	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp65	12	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp66	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp68	10	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	wp69	12	9	-	-	13	-	-	12	7	-	-
1	wp70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp71	10	6.5	-	-	-	-	6.5	-	-	-	-
2	wp72	13	6.5	-	-	-	-	-	8	8	-	-
2	wp73	11	7	-	-	-	-	-	16	13	-	-
1	wp74	14	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp75	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp76	11	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	wp77	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp78	14	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2	wp79	15	8	-	-	-	-	-	8.5	-	-	-
2	wp80	13	11	-	-	-	-	-	13	15	-	-
2	wp81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	wp82	17	7	-	-	-	-	-	-	6.5	-	-
2	wp83	17	10	-	9	10	-	-	19	11	-	-
2	wp84	11	6.5	-	-	-	-	-	-	6.5	-	-
2	wp85	14	9	-	-	-	-	-	9	6.5	-	-
2	wp86	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp87	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	wp88	10	7	-	-	-	-	-	-	8	-	-
2	wp89	17	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp90	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp91	19	-	-	-	-	-	-	12	11	-	-
2	wp92	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	wp93	20	9	-	-	11	-	-	-	7	-	-
1	wp94	11	6.5	-	-	-	-	-	-	6.5	-	-
2	wp95	14	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp96	15	9	-	-	-	-	-	11	10	-	-
1	wp97	12	10	7	-	-	-	-	-	7	-	-
2	wp98	9	-	10	-	-	-	-	10	-	-	-
2	wp99	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp100	18	9	-	-	-	-	-	8.5	9	-	-
1	wp101	9	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp102	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp103	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	wp104	9	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp105	11	8	-	-	10	-	-	14	9	-	-
2	wp106	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp107	9	6.5	-	6.5	-	-	-	-	-	-	-
2	wp108	12	11	-	6.5	13	7	-	10	10	-	-
2	wp109	18	11	-	9	10	-	-	14	14	-	-
2	wp110	14	11	-	-	7	-	-	12	10	-	-
1	wp111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	wp112	27	21	16	14	24	7	-	13	18	-	11
2	wp113	24	14	12	7	17	-	-	18	14	-	-
2	wp114	13	7	9	6.5	-	-	-	-	-	-	-

☆ 전체 시료 중에서 1은 식품공전에서 기재된 것이고, 2는 한약재로 기재된 것이다.

☆ 조건 : 6mm디스크에 10ul, 추출용매 100% MeOH

상기 실험의 결과에서 wp62(오매), wp63(오미자)는 식품공전에 기재된 한약재이고, wp112(황련)은 한약재로 기재된 것이 활성이 우수함을 알 수 있다. 이 세 가지 약재 등을 중심으로 실험을 진행하여 보았다.

2) 한약재추출물의 항균력

한약재추출물의 0.5mg/ml농도로 처리한 후, disc 확산법으로 항균성을 조사한 결과 오매 (*Prunus mume*), 오미자(*Schizandra chinensis*) 및 황련(*Coptis japonica*)의 항균작용이 우수함을 나타내었다 (Table 4).

Table 4. Growth inhibiting activities of extracts from medical herbs against bacteria

Botanical name	Clear zone diameter (mm)										
	JOL 375	JOL 376	JOL 377	JOL 378	JOL 379	JOL 380	JOL 381	MRSA 104	MRSA 6	ATCC	JOL 284
<i>Scutellaria baicalensis</i>	23	16	11	14	12	8	12	19	16	10	9
<i>Coptis japonica</i>	30	28	18	16	-	8	14	19	17	-	11
<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	8	-	-	-	28	-	-	-	-	-	-
<i>Gardenia jasminoides</i>	10	15	10	11	-	8	8	9	10	-	8
<i>Sophora flavescens</i>	9	15	-	10	-	-	-	9	-	-	-
<i>Paeonia suffruticosa</i>	20	14	13	13	-	-	9	11	16	-	-
<i>Scrophularia buergeriana</i>	11	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	16	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	20	11	-	8	8	-	-	10	7	-	-
<i>Schizandra chinensis</i>	28	24	16	24	17	18	16	18	16	7.5	10
<i>Prunus mume</i>	28	24	17	20	15	16	13	10	15	-	9
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (wild)	20	15	-	-	7	-	-	13	15	-	-
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (경작)	20	20	-	-	10	-	-	15	11	-	-
<i>Scutellaria baicalensis</i> (M)	12	15	12	9	11	10	13	12	14	9	7

<i>Coptis japonica</i> (M)	15	18	18	13	16	15	13	16	15	8	15
<i>Schizandra chinensis</i> (M)	13	14	12	11	10	13	13	13	15	9	-

* Disc size : 6mm

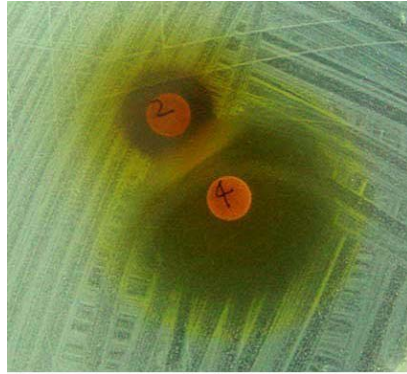


그림1. JOL 379(E. coli O157 ATCC 43890)에 대한 *Scutellaria baicalensis* (2) 와 *Coptis japonica* (4)의 Disc 확산법에 의한 항균력 검사

3) *Salmonella*에 대한 한약재추출물의 항균력시험(1차년도)

전체 군주에서 항균활성을 보인 약물에서 우선 식품공전에 기재된 두 약재(오매, 오미자)에 대한 집중적인 실험을 진행하였다. 즉 많은 균에 대한 활성실험보다는 가장 치료가 힘든 *Salmonella* 균에 대한 항균실험을 우선순위에 두고 실시하였다. *Salmonella*에 대한 한약재 추출물의 0.5mg/ml농도로 처리한 후의 항균성을 조사한 결과 오매(*Prunus mume*), 오미자(*Schizandra chinensis*)에서 높은 항균성을 보였다 (Table 5). 특히 증류수 추출물보다 메탄올 추출물에서 더 좋은 항균성이 나타남이 보였다.

Table 5. Growth inhibiting activities of extracts from medical herbs against *Salmonella*

Sample	Clear zone diameter (mm)						
	<i>Coptis japonica</i> (M)	<i>Scutellaria baicalensis</i> (M)	<i>Schizandra chinensis</i> (M)	<i>Prunus mume</i> (M)	<i>Coptis japonica</i> (D)	<i>Scutellaria baicalensis</i> (D)	<i>Schizandra chinensis</i> (D)
표준균주	-	-	11	13	8	10	9

JOL 380	13	-	19	20	19	18	23
JOL 381	12	8.5	17	20	18	16	18
JOL 386	-	-	14	15	7	10	12
JOL 387	13	11	19	20	13	15	11
JOL 388	9	10	12	14	10	6.5	11
JOL 389	-	-	12	18	13	7	9
JOL 407	-	-	14	15	NT*	NT	NT
JOL 408	-	-	13	13	NT	NT	NT
JOL 409	-	-	16	16	NT	NT	NT
JOL 410	-	-	14	13	NT	NT	NT
JOL 411	13	-	23	22	NT	NT	NT
JOL 419	10	-	23	24	NT	NT	NT
JOL 420	11	-	25	23	NT	NT	NT
JOL 421	9	-	21	22	NT	NT	NT
JOL 422	10	-	20	21	NT	NT	NT

* NT : not tested

* Disc of methanol extract : 8mm, disc of water extract : 6mm

4) 최소 억제 농도 (Minimum inhibitory concentration, MIC)(1차년도)

항균력이 확인된 3종의 한약재를 이용하여 *Salmonella* 균주에 대한 최소저해농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)를 검사한 결과 *S. chinensis*에서 대체적으로 낮은 농도의 범위에서 항균성을 나타나는 것을 보여주고 있다. *C. japonica*에서는 모든 균주들에게 항균성이 존재하였으나 높은 농도의 범위에서 항균성을 나타내고 있다 (Table 6).

Table 6. Minimum inhibitory concentration (MIC) of medical herbs for *Salmonella*
(100% methanol extract)

	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
--	--

	<i>Prunus mume</i>	<i>Schizandra chinensis</i>	<i>Coptis japonica</i>
표준균주	1000	-	500
JOL 380	125	500	62.5
JOL 381	250	15.6	125
JOL 387	500	-	125
JOL 388	1000	31.3	125
JOL 389	15.6	-	500
JOL 408	15.6	125	500
JOL 409	-	-	500
JOL 410	62.5	125	125
JOL 411	500	62.5	125
JOL 419	125	31.3	250
JOL 420	15.6	31.3	250
JOL 421	31.3	31.3	500
JOL 422	15.6	31.3	250

5) 약제 투여 후 마우스의 생존여부와 분변에서 *Salmonella*의 검출에 의한 약제효과측정(1차년도)

*S. typhimurium*을 공격 접종한 후 마우스 분변으로 *Salmonella*의 수를 측정한 결과 *P. mume* 와 *S. chinensis* 투여 마우스는 생존율이 대조군에 비해 월등히 높았으며 균의 수가 현저히 감소하는 경향을 나타내었다 (Table 7).

Table 7. Fecal shedding of *Salmonella* (cfu/g) after challenge with *Salmonella typhimurium*

Group	Days of fecal examination			
	day0	day1	day3	day4
Con-1	0	0	2.7×10^4	death
Con-2	0	3.0×10^5	2.0×10^5	death
Con-3	0	5.0×10^8	death	
Con-4	0	2.0×10^3	9.0×10^5	death
Con-5	0	6.0×10^7	death	
Exp1*-1	0	0	0	0
Exp1-2	0	6.0×10^3	2.4×10^2	0
Exp1-3	0	5.0×10^3	2.7×10^4	death
Exp1-4	0	0	0	0
Exp1-5	0	0	3.0×10^3	4.0×10^2
Exp2*-1	0	3.0×10^2	3.0×10^3	0
Exp2-2	0	2.5×10^2	3.0×10^2	2.0×10^2
Exp2-3	0	0	4.7×10^3	death
Exp2-4	0	0	0	0
Exp2-5	0	0	30	4.4×10^2

* Exp1 : *Prunus mume*, Exp2 : *Schizandra chinensis*

라. 실험동물 모델 확립과 이를 이용한 약제의 효과 안전성 조사(조직소견 요약)

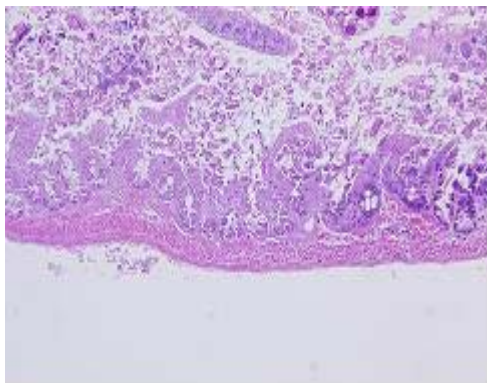
1) 수행내용

Table 6 에서 얻은 각각의 Small intestine, Spleen, Liver 및 Kidney의 조직을 이용하였다.

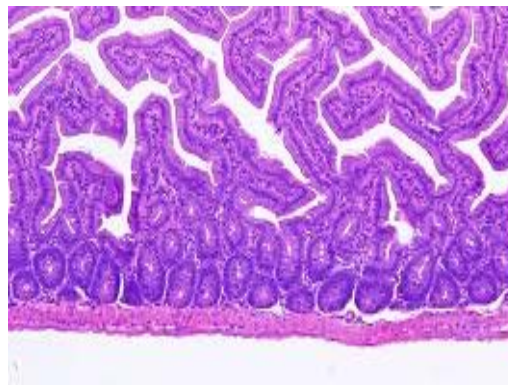
2) 수행결과

(1) Small intestine

Control은 장벽의 허혈성 괴사(ischemic necrosis)와 함께 장벽의 위축(atrophy)이 있으며 특히 대조군은 심함. 그러나 *Prunus mume* 또는 *S. chinensis* 처리군에서는 뚜렷한 조직 소견이 없었으며 정상 조직과 큰 차이가 없었음.



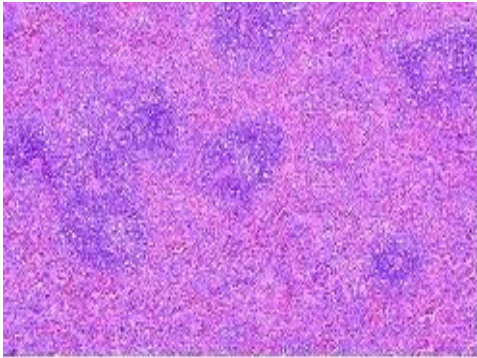
(장, 대조군, ×200)



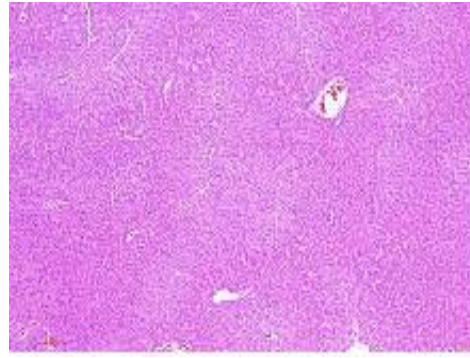
(장, *Prunus mume*, ×200)

(2) Spleen

Control에서는 전반적으로 적색속질(red pulp)쪽에 울혈(congestion) 및 출혈(hemorrhage)이 심하고 그리고 일부에서는 괴사 소견까지 동반되었으며, 특히 대조군에서는 더욱 심했음. 반면에 *Prunus mume*, *S. chinensis* 처리군에서는 울혈이 대조군에 비해 미약했으며, *Prunus mume* 또는 *S. chinensis* 처리군내에서는 다른 것 보다 심하였으나 Control 보다는 약했음.



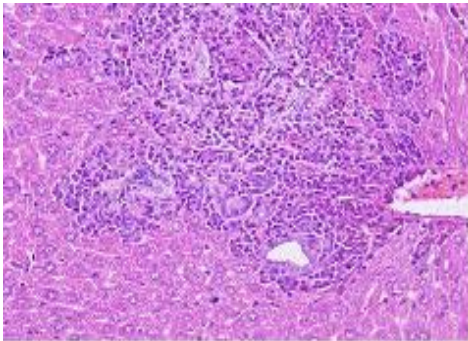
(비장, 대조군, ×100)



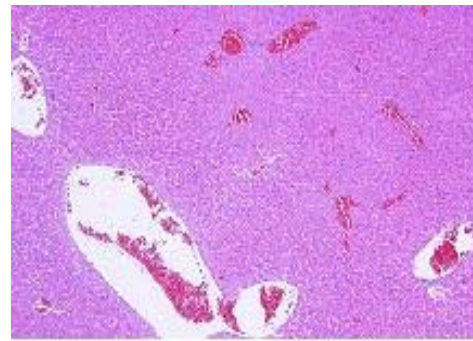
(비장, *S. chinensis*, ×100)

(3) Liver

Control에서는 2차 Control II-2를 제외하고는 중심정맥(central vein) 또는 문맥정맥(portal vein)에 울혈이 심했으나 *Prunus mume*, *S. chinensis* 처리군에서 상대적으로 울혈이 미약했음.



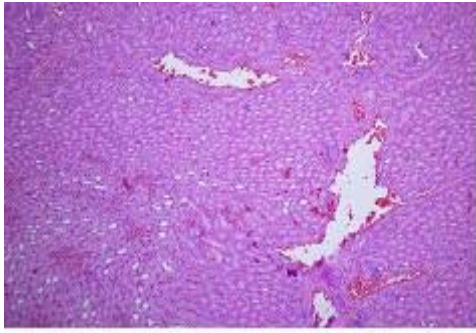
(간, *Prunus mume*, ×400)



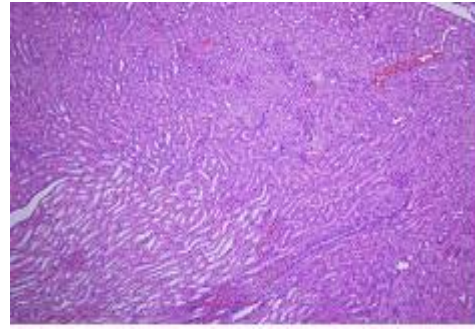
(간, 대조군, ×100)

(4) Kidney

대조군이 *Prunus mume*, *S. chinensis* 처리군에 비해서 혈관의 울혈이 심했음.



(신장, 대조군, ×100)



(신장, Prunus mume, ×100)

결과적으로 Control 군에 비해서 *Prunus mume*, *S. chinensis* 처리 군에서 울혈, 허혈성 괴사 등의 조직소견이 미약하여 어느 정도 효과가 있음이 인정됨.

결론적으로 1차년도 연구에서는 초기에 많은 문헌연구와 약리학적 연구를 기본으로 한 후보물질을 예비 스크리닝하고 선별하였다. 여기에서 선별된 세 가지 정도의 후보물질에 대한 항균활성을 확인하였다. 그리고 식품공전에 수록이 된 오매와 오미자를 대상으로 마우스에 *S. typhimurium*을 공격 접종한 후 마우스 생존여부와 분변에서 *Salmonella*의 검출에 의한 약재효과측정실험을 하여 약재의 유효성을 입증하였다. 또한 상기 마우스 실험에서 약재의 안전성 조사를 조직소견으로 확인하여 안전함을 확인하였다.

2. 2차년도 실험결과(2차년도)

가. 한약재(오미자)의 제조, 분석, 항균 활성 측정

1차년도의 실험에서 우수한 효과를 보인 약재 중에 하나인 오미자의 성분을 분리 동정하는 것을 아래와 같이 진행하였다. 동정한 단일성분으로 항균활성실험을 진행하였다.

1) 한약재추출물의 제조 분리

가) 오미자 제조

(1) 오미자 조추출물의 제조

익산시 소재 대한한약국에서 구입한 건조된 오미자를 분쇄기를 이용하여 입자의 크기가 30메시(mesh) 이하가 되도록 분쇄하여 오미자 분말을 수득한 후, 상기에서 수득한 건조

된 오미자 분말(600 g) 질량의 3배에 해당하는 100% 에탄올 용액을 가하여 100℃에서 3시간 동안 환류 냉각 추출하고 여과한 후 여액을 감압농축한 다음 동결건조하여 113 g의 오미자 조추출물을 수득하였다.

(2) 오미자 극성용매 및 비극성용매 가용 추출물의 제조

상기 실시예 가)(1)에서 수득한 오미자 조추출물(113 g)을 증류수(1 ℓ)에 현탁하고 분액깔대기에 넣은 후, 여기에 헥산(800 ml), 디클로로메탄(800 ml) 및 부탄올(800 ml)을 각각 순차적으로 가한 다음 진탕하여 각각의 가용부를 감압농축기를 사용하여 농축하여 오미자의 헥산가용 추출물(4.5 g), 디클로로메탄 가용추출물(5 g), 부탄올 가용추출물(62 g) 및 물 가용추출물(40 g)을 수득하였다.

나) 오미자로부터 화합물의 분리

(1) 고미신 제이(gomisin J)의 분리

상기 실시예 가)(2)에서 수득한 오미자 디클로로메탄 가용추출물(5 g)을 실리카겔 컬럼에 걸고 디클로로메탄 : 메탄올(8 : 1(v/v))을 용출용매로 사용하여 크로마토그래피를 실시하여 박층 크로마토그래피에서 동일한 양상을 나타내는 것들을 합하고 농축하여 6개의 분획(A~F)으로 나누었으며, 첫 번째 분획물인 A(96 mg)를 YMC 컬럼에 걸고 메탄올:물(75 : 25(v/v))을 용출용매로 사용하여 크로마토그래피를 실시하여 화합물 1(11 mg)을 수득하였으며, 기기분석결과 하기 물성치를 갖는 고미신 제이(gomisin J)임을 확인하였다(Seo et al., *Nat. Prod. Sci.*, 10, pp.104-108, 2004).

무색 프리즘상(Colorless prisms)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) : 6.62 (2H, s, H-4, H-11), 3.92 (3H, s, 2- OCH_3), 3.91 (3H, s, 13- OCH_3), 3.51 (6H, s, 1- OCH_3 , 14- OCH_3), 2.54 (1H, dd, $J = 7.3, 13.7$ Hz, Hb-6), 2.45 (1H, dd, $J = 1.8, 13.7$ Hz, Ha-6), 2.23 (1H, dd, $J = 9.2, 12.8$ Hz, Hb-9), 2.01 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, Ha-9), 1.88 (1H, m, H-8), 1.79 (1H, m, H-7), 0.96 (3H, d, $J = 7.3$ Hz, 18- CH_3), 0.72 (3H, d, $J = 7.3$ Hz, 17- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) : 150.4 (C-1), 137.7 (C-2), 147.6 (C-3), 113.2 (C-4), 134.9 (C-5), 38.9 (C-6), 33.8 (C-7), 41.0 (C-8), 35.3 (C-9), 140.3 (C-10), 110.1 (C-11),

148.8 (C-12), 137.4 (C-13), 150.3 (C-14), 121.5 (C-15), 122.5 (C-16), 21.8 (C-17), 12.6 (C-18), 60.1 (1-OCH₃), 61.1 (2-OCH₃), 61.1 (13-OCH₃), 60.1 (14-OCH₃).

(2) 고미신 에이(gomisin A)의 분리

상기 실시예 나)(1)의 세 번째 분획물인 C(635 mg)를 YMC 컬럼에 걸고 메탄올:물(7 : 3(v/v))을 용출용매로 사용하여 크로마토그래피를 실시하여 박층 크로마토그래피에서 동일한 양상을 나타내는 것들을 합하고 농축하여 3개의 소분획(C1~C3)으로 나누었으며, 첫 번째 분획물인 C1(320 mg)을 헥산 : 아세톤(3 : 1(v/v))을 용출용매로 사용한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 화합물 2(49 mg)를 수득하였으며, 기기분석결과 하기 물성치를 갖는 고미신 에이(gomisin A)임을 확인하였다(Ikeya et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 27, pp.1383-1394, 1979).

무색 분말(Colorless powder); (-)-ESI-MS m/z 415 [M-H]⁻

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) : 6.62 (1H, s, H-4), 6.47 (1H, s, H-11), 5.96 (2H, s, -OCH₂O-), 3.90 (6H, s, 3-OCH₃, 12-OCH₃), 3.83 (3H, s, 2-OCH₃), 3.51 (3H, s, 1-OCH₃), 2.67 (1H, d, J = 13.5 Hz, Hb-6), 2.57 (1H, dd, J = 1.4, 14.2 Hz, Hb-9), 2.34 (1H, d, J = 13.5 Hz, Ha-6), 2.33 (1H, dd, J = 8.1, 14.2 Hz, Ha-9), 1.86 (1H, m, H-8), 1.25 (3H, s, 18-CH₃), 0.81 (3H, d, J = 7.3 Hz, 17-CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) : 152.2 (C-1), 140.8 (C-2), 152.4 (C-3), 110.4 (C-4), 132.1 (C-5), 40.6 (C-6), 71.7 (C-7), 42.1 (C-8), 33.8 (C-9), 132.6 (C-10), 106.0 (C-11), 148.0 (C-12), 135.0 (C-13), 141.3 (C-14), 121.9 (C-15), 124.2 (C-16), 15.9 (C-17), 30.2 (C-18), 60.7 (1-OCH₃), 61.1 (2-OCH₃), 56.0 (3-OCH₃), 59.7 (14-OCH₃), 100.9 (-OCH₂O-).

(3) 안젤로일 고미신 에이취(angeloyl gomisin H)의 분리

상기 실시예 나)(2)의 두 번째 소분획물인 C2(75 mg)를 헥산 : 아세톤(3 : 1(v/v))을 용출용매로 사용한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 화합물 3(26 mg)를 수득하였으며, 기기분석결과 하기 물성치를 갖는 안젤로일 고미신 에이취(angeloyl gomisin H)임을 확인하였다(Kim et al., *Kor. J. Pharmacogn.*, 33, pp.272-276, 2002; Tan et al., *Planta Med.*, 50, pp.414-417, 1984).

무색 프리즘상(Colorless prisms); (-)-ESI-MS m/z 499 [M-H]⁻

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) : 6.68 (1H, s, H-4), 6.55 (1H, s, H-11), 5.88 (1H, m, H-3'), 3.90 (3H, s, 13-OCH₃), 3.87 (3H, s, 12-OCH₃), 3.83 (6H, s, 2-OCH₃, 3-OCH₃), 3.54 (3H, s, 1-OCH₃), 2.73 (1H, d, J = 13.7 Hz, Hb-6), 2.69 (1H, dd, J = 1.4, 14.2 Hz, Hb-9), 2.41 (1H, dd, J = 7.8, 14.2 Hz, Ha-9), 2.33 (1H, d, J = 13.7 Hz, Ha-6), 1.88 (1H, m, H-8), 1.75 (6H, m, H-4', H-5'), 1.24 (1H, s, H-18), 0.84 (3H, d, J = 7.3 Hz, 18-CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) : 151.9 (C-1), 140.4 (C-2), 152.6 (C-3), 110.2 (C-4), 133.1 (C-5), 40.7 (C-6), 72.1 (C-7), 42.0 (C-8), 34.3 (C-9), 133.9 (C-10), 112.8 (C-11), 151.8 (C-12), 139.7 (C-13), 142.3 (C-14), 122.9 (C-15), 123.3 (C-16), 16.0 (C-17), 30.0 (C-18), 60.9 (1-OCH₃), 61.0 (2-OCH₃), 56.1 (3-OCH₃), 56.1 (12-OCH₃), 60.7 (13-OCH₃), 165.8 (C-1'), 127.7 (C-2'), 137.4 (C-3'), 15.4 (C-4'), 20.4 (C-5').

(4) 쉬잔드린(schizandrin)의 분리

상기 실시예 나)(1)의 여섯 번째 분획물인 F(840 mg)를 YMC 컬럼에 걸고 메탄올: 물(7 : 3(v/v))을 용출용매로 사용하여 크로마토그래피를 실시하여 화합물 4(41 mg)를 수득하였으며, 기기분석결과 하기 물성치를 갖는 쉬잔드린(schizandrin)임을 확인하였다(Kim et al., *Kor. J. Pharmacogn.*, **33**, pp.272-276, 2002; Ikeya et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, pp.3257-3260, 1978).

무색 분말(Colorless powder)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) : 6.60 (1H, s, H-4), 6.53 (1H, s, H-11), 3.90 (3H, s, 14-OCH₃), 3.88 (6H, s, 12-OCH₃, 13-OCH₃), 3.87 (3H, s, 3-OCH₃), 3.58 (3H, s, 2-OCH₃), 3.57 (3H, s, 1-OCH₃), 2.65 (1H, d, J = 13.5 Hz, Hb-6), 2.63 (1H, dd, J = 1.4, 14.2 Hz, Hb-9), 2.37 (1H, dd, J = 6.0, 14.2 Hz, Ha-9), 2.36 (1H, d, J = 13.5 Hz, Ha-6), 1.87 (1H, m, H-8), 1.25 (1H, s, 18-CH₃), 0.81 (3H, d, J = 7.3 Hz, 17-CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) : 151.9 (C-1), 140.8 (C-2), 152.5 (C-3), 110.5 (C-4), 131.9 (C-5), 40.9 (C-6), 71.9 (C-7), 41.9 (C-8), 34.3 (C-9), 133.9 (C-10), 110.0 (C-11), 152.1 (C-12), 140.2 (C-13), 151.6 (C-14), 122.8 (C-15), 124.3 (C-16), 15.9 (C-17), 29.9

(C-18), 60.7 (1-OCH₃), 61.0 (2-OCH₃), 56.0 (3-OCH₃), 56.0 (12-OCH₃), 61.0 (13-OCH₃), 60.7 (14-OCH₃).

2) 한약재추출물의 항균활성

가) 오미자 조추출물의 항균활성 측정

오미자 조추출물을 1 mg/ml 농도로 처리한 후, 디스크 확산법으로 항균력을 조사한 결과 하기 Table 8 에서 보여지는 바와 같이 *Vibrio cholerae* O1을 비롯한 6종의 세균에 감수성을 나타냈다.

Table 8. Growth inhibiting activities of extracts from medical herbs against bacteria

균주	오미자 조추출물 처리시 깨끗한 부분의 지름 (mm)
<i>Vibrio cholerae</i> O1 JOL375	8.5
<i>Vibrio cholerae</i> O139 JOL376	9
<i>Shigella dysenteriae</i> JOL377	9
<i>Shigella flexeneri</i> JOL378	10
<i>E. coli</i> O157 ATCC 43890	-
<i>Salmonella typhi</i> JOL380	-
<i>Salmonella paratyphi</i> A JOL381	7
MRSA 104 사람 분리주	-
MRSA 6 동물(닭) 분리주	6.5
<i>E. coli</i> O157 동물 분리주	-

나) 오미자 극성용매 및 비극성용매 가용추출물의 항균력 측정

상기 실시예 가)(2)로부터 얻은 오미자의 헥산, 디클로로메탄, 부탄올 및 물 가용추출물을 각각 1 mg/ml 농도로 처리한 후, 디스크 확산법으로 항균력을 조사한 결과 하기 표 3 에서 보여지는바와 같이 디클로로메탄 가용추출물과 부탄올 가용추출물이 시험 균주에 광범위한 감수성을 보였으며, 이 중 디클로로메탄 가용추출물이 상대적으로 강한 항균력을 나타내었다.(Table 9. 참조)

Table 9. Growth inhibiting activities of extracts from medical herbs against bacteria

균주	추출물 처리 시 inhibition length (mm)			
	hexan 가용추출물	디클로로메탄 가용추출물	부탄올 가용추출물	물 가용추출물
<i>Vibrio cholerae</i> O1 JOL375	8	11	10	-
<i>Vibrio cholerae</i> O139 JOL376	-	9	9	-
<i>Shigella dysenteriae</i> JOL377	-	10	9	-
<i>Shigella flexeneri</i> JOL378	-	9	7	-
<i>E. coli</i> O157 ATCC 43890	-	7	-	-
<i>Salmonella typhi</i> JOL380	-	9	7	-
<i>Salmonella paratyphi</i> A JOL381	-	8	7	-
MRSA 104 사람 분리	-	7	7	-
MRSA 6 동물(닭) 분리주	-	8	7	-
<i>E. coli</i> O157 동물 분리주	-	-	-	-

다) 분리된 화합물의 MIC 측정

상기 실시예 2에서 수득한 4종의 화합물(화합물 1 내지 4)의 18종의 시험 균주에 대한 최소 억제 농도 측정을 위하여 물러-힌톤 한천배지를 이용하였다. TSB에 증균된 균을 같은 배지를 이용하여 재증균 후 590nm에서 흡광도를 측정하여 CFU (개/ml)를 계산 후, 0.85% 생리식염수를 이용하여 1×10^5 개/ml로 희석하였다.

측정 농축물은 55~60°C의 물러-힌톤 브로스(broth)로 녹이고 희석된 균과 동량으로 넣어 37°C 항온기에서 24시간 배양하였다. 배양된 균을 멸균된 증류수를 이용하여 100배 희석한 후, 물러-힌톤 한천배지에 100 μ l 희석액을 도말하여 37°C 항온기에서 18시간 배양한 후, 육안으로 관찰하여 균집 수가 100개 미만인 농도를 최소 억제 농도로 결정하여 표 4에 나타내었다. 그 결과 상기 실시예 2에서 수득한 4종의 화합물(화합물 1~4)은 인수 공통 감염병을 유발하는 원인균 18종 모두에 대하여 각각 최소 억제 농도가 200~500 μ g/ml인 항균력을 나타내었다.(Table 10.참조)

Table 10. Growth inhibiting activities of extracts from medical herbs against bacteria

균주명	기원	항균활성 (최소발육농도: µg/ml)					
		화합물 1	화합물 2	화합물 3	화합물 4	P/S ^{a)}	K ^{b)}
<i>Vibrio cholerae</i> O1	JOL375	300	300	300	300	NA ^{c)}	10
<i>Vibrio cholerae</i> O139	JOL376	200	200	200	200	NA	10
<i>Shigella dysenteriae</i>	JOL377	200	200	200	200	NA	10
<i>Shigella flexeneri</i>	JOL378	200	200	200	200	NA	10
<i>E. coli</i> O157	ATCC 43890	200	300	200	300	NA	10
<i>Salmonella typhi</i>	JOL380	300	300	300	400	NA	10
<i>Salmonella paratyphi</i> A	JOL381	200	200	200	200	NA	10
MRSA 104	사람 분리주	400	300	400	400	NA	10
MRSA 6	동물(닭) 분리주	400	300	400	400	NA	10
<i>E. coli</i> O157	동물 분리주	200	200	200	200	NA	10
MRSA	ATCC 700698	400	300	400	300	1	NA
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 49557	500	400	500	500	NA	10
<i>Salmonella gallinarium</i>	수과연표준균주	300	200	300	200	NA	10
<i>E. coli</i> O157	ATCC 35150	300	200	300	200	NA	10
<i>Salmonella typhimurium</i>	수과연표준균주 (Sal-13)	300	200	300	200	NA	10
<i>Salmonella enteritidis</i>	수과연표준균주 (Sal-36)	300	200	300	200	NA	10
<i>E. coli</i> K99	수과연표준균주 (E-125)	300	200	300	200	NA	10
<i>E. coli</i> K88	수과연표준균주 (E-126)	300	200	300	200	NA	10

- a): 양성대조약물(페니실린/스트렙토마이신 동량 혼합물), b): 양성대조약물(카나마이신),
 c): 항균활성 없음

나. 오매와 오미자 투여 후 닭의 성장, 활동성 및 안전성 조사(2차년도)

1차년도의 실험에서 우수한 효과를 보인 약재인 오매와 오미자 추출액을 닭에게 투여한 후 성장, 활동성 및 안전성에 관한 실험을 진행하였다.

오매 (*Prunus mume*)는 한방에서 장미과 벚나무속에 속하는 매화나무의 과실인 털 익은 푸른 매실의 껍질을 벗겨 연기에 그슬려 말린 것을 말한다. 성분으로는 유기산인 citric acid, malic acid, succinic acid, tartaric acid가 다량 함유되어 있으며, terpenoid류로는 sitostrol과 oleanolic acid가 함유되어 있고, 무기성분으로는 K, P, Ca, Al, Na 및 Mg 등이 함유되어 있다(Kim 1997a). 가열처리하지 않은 성숙 매실로부터 분리된 성분은 citric acid (Nakauchi 1950)와 flavonoid로서 mumenin, naringenin (Hasegawa 1959) 등과 alcohol로서 amyl alcohol (Kameoka and Kitagawa 1976) 등이 있고 glucose, trehalose (Takizawa et al 1979)와 같은 당류도 보고된 바 있다. 매실의 효능에 관한 연구로는 매실 추출물이 당뇨병에 미치는 영향 (Ko 1996), 간장 장애에 미치는 영향 (Sheo et al 1990), 그리고 암세포 증식에 미치는 영향 (Kim 1997b) 등이 보고되고 있으며, 매실의 식중독 유발세균에 대한 항균효과도 보고되었고 (Bae and Kim 1999) 그 구성물에 대해서도 연구되었다 (Ina et al 2004). 또한 매실 추출물을 차로 음용하기도 하며 (Matsuda et al 2003) 감기나 피로 회복, 식욕 증진 등에 이용하였다. 그리고 해열, 지혈, 해독, 및 구충 등에 효과를 나타내는 한약재로 이용되어 왔으며 (Choi 1995; Lim et al 1987) 일본에서도 전통적으로 의학에 사용하였다 (Ina et al 2004).

오미자 (*Schizandra chinensis*)는 목련과에 속하는 자생목으로 현급, 회급, 수신, 금령자, 홍내소, 경저 등의 이름으로 불리어지고 우리나라를 비롯하여 중국, 일본, 대만, 만주 등지에 분포한다 (Jung et al 2000). 한방에서는 정신 육체적 피로 (Liu 1985), 지혈제 (Ko and Yiu 2001; Yim and Ko 1999), 기관지염, 기관지 천식 (Lee et al 2004), 저혈압, 영양실조, 궤양과 시력 증진, 진정, 해열 등의 중추억제 작용과 간 보호 (Nakagiri et al 2003), 알코올에 대한 해독작용 및 항산화효과 (Ip et al 1995; Mak et al 1996; Toda et al 1988) 등 많은 약리 기능으로 오미자가 사용되었다 (Jung et al 2000; Lee et al 2001). 현재까지 오미자 성분에 관한 연구로는 약리기능을 나타내는 주요 성분으로

알려진 lignan 화합물 (Shin et al 1989), 일반성분, 유기산, anthocyanin 색소 (Nakajima et al 1983; Yang et al 1982), 유리당, 지질 및 비휘발성 유기산 조성에 대한 연구(Lee and Lee 1989), 부위별 영양소 함량과 분획별 효과 등과 성분의 항염증작용 (Wang et al 1994)도 보고되어 있고 항균효과에 대해서도 보고되어 있다 (Li et al 2005).

따라서 본 연구는 오매와 오미자 열매를 가공하여 사료첨가제로 급여함으로써 닭의 성장, 활동성 그리고 안전성을 조사하여 이들의 이용 가능성을 알아보려고 하였다.

1) 재료 및 방법

가) 오매와 오미자 제조

이 실험에서 사용된 시료는 오매, 오미자의 열매를 이용하여 추출된 메탄올 추출물이 동결 건조되었다.

나) 실험동물 및 실험설계

본 실험에 사용된 hyline 병아리는 약 5일령으로 42~58 g이고 총 20마리가 실험군이 각각 6마리씩, 대조군 8마리로 나누어 약5주간에 걸쳐 실시하였다.

사료는 항생제가 포함되지 않은 것으로 제공되었으며 전체 시험기간동안 사료와 물을 자유로이 섭취하도록 하였고 약제는 동결 건조된 분말을 사료량의 1%로 첨가하여 제공하였다. 대조군은 항생제가 포함되지 않은 사료만 제공하였다.

2) 결과

가) 증체량과 사료 섭취량

오매에 대한 결과는 table 11에 오미자에 대한 결과는 table 12에 나타내었다. 시험사료 제공 후 특별히 높은 증체량의 차이를 나타내지는 않았으나, 대체적으로 실험군에서 더욱 좋은 경향을 나타내었다. 일일사료섭취량의 경우 실험군 중 오미자군은 390 g, 오매군은 360 g, 대조군은 260 g으로 대조군보다 실험군에서 더 높은 사료섭취량을 나타내었다.

나) 외관 징후

약제를 투여했던 군들에서 털의 윤기와 병아리들의 활동성 등이 대조군보다 확실히 좋았음을 볼 수 있었다. 또한 마지막까지 살아남은 실험군과 달리 대조군에서는 실험도중에 폐사되는 현상이 나타났다.

Table 11. Effects of *Prunus mume* for the growing promotion in chickens.

Group	Body weight (g) at week						Increased body weight (g)
	0	1	2	3	4	5	
C-1	54	63	111	210	271	340	286
C-2	53	71	123	221	Death	Death	-
C-3	51	62	95	178	273	325	274
C-4	49	49	69	117	170	196	147
C-5	44	57	99	174	246	275	231
C-6	50	58	97	Death	Death	Death	-
C-7	48	52	83	165	256	318	270
C-8	42	52	95	213	280	333	291
Average	49	58	97	183	249	298	250
E-1	47	49	78	153	237	256	209
E-2	50	51	78	155	263	290	240
E-3	48	56	93	195	340	414	366
E-4	49	60	108	236	317	302	253
E-5	58	62	100	183	255	311	253
E-6	49	60	108	184	246	298	249
Average	53	58	104	209	295	312	262

C; Control, E; Experiment of *P. mume*

Table 12. Effects of *Schizandra chinensis* for the growing promotion in chickens.

Group	Body weight (g) at week						Increased body weight (g)
	0	1	2	3	4	5	
C-1	54	63	111	210	271	340	286
C-2	53	71	123	221	Death	Death	-
C-3	51	62	95	178	273	325	274
C-4	49	49	69	117	170	196	147
C-5	44	57	99	174	246	275	231
C-6	50	58	97	Death	Death	Death	-
C-7	48	52	83	165	256	318	270
C-8	42	52	95	213	280	333	291
Average	49	58	97	183	249	298	250
E-1	52	60	114	198	248	249	197
E-2	57	56	100	244	395	453	396
E-3	47	57	99	168	213	238	191
E-4	59	63	115	243	368	406	347
E-5	51	53	102	217	312	368	317
E-6	53	56	91	182	236	284	231
Average	53	58	104	209	295	333	280

C; Control, E; Experiment of *S. chinensis*

다. 오매와 오미자 투여 후 *Salmonella gallinarum* 감염 닭의 치료효과 및 안전성 조사(2차년도)

1차년도의 실험에서 우수한 효과를 보인 약재인 오매와 오미자 추출액을 닭에게 투여한 후 성장, 활동성 및 안전성에 관한 실험을 진행하여 우수한 효과를 검증하였다. 이에 목적동물인 닭에게 *Salmonella gallinarum* 감염시켜 약제에 대한 항균효과를 필드스트디(field study)하였다.

살모넬라증은 우리나라의 세균성 질병 중 가장 많은 발병율을 보이는 것으로 특히 사람의 살모넬라증 발생에서 식품 매개가 대부분이다. 살모넬라균은 2,300여종이 넘는 혈청형이 보고되어 있으며 endotoxin, cytotoxin, enterotoxin 등 다양한 독소가 존재하고 있어 대개 급성장염, 고열, 패혈증 등 여러 가지의 임상 증상을 유발할 수 있다. 또한 이 병원균은 장내 상피세포를 투과하여 숙주세포에 침입할 수 있으며 거의 모든 포유동물에 감염되고 사람의 식중독을 일으키는 (Boonmar et al 1998) 병원균 중 가장 흔한 균이다.

Salmonella 속 중 *S. typhi*와 *S. paratyphi*는 사람에만 감염하는데 (Chiu et al 2005) 특히 *S. typhi*는 사람에게서 장티푸스의 원인이 된다 (Jones 2005). *S. dublin*은 대개 소에 감염되는데 사람에서도 발생된다 (Uzzau et al 2001). *S. choleraesuis*는 *S. enterica*의 serovar로 (Chiu et al 2005) 돼지에 감염되는 장티푸스성 질병인 돼지 파라티푸스와 폐렴을 포함하는 장내대장염과 패혈증 등 심각한 질병을 야기시킨다 (Straw et al 1999). 사람에서의 감염은 일반적인 박테리아증처럼 나타나고 침투성 감염으로도 나타난다 (Chiu et al 1999; Cohen et al 1987). *S. pullorum*와 *S. gallinarum*은 닭에서 각각 가금추백리와 가금티프스 등을 일으켜 양계산업에서 막대한 경제적 손실을 일으킨다 (Alshawabkeh and Yamani 1996; Barrow 1993). 그리고 *S. typhimurium*, *S. enteritidis*가 닭에서 감염빈도나 보균율이 높은 것으로도 보고되어 있으며 (Hopper and Mawer 1988 Shivapeasad et al 1990) 이 중 *S. typhimurium*은 가금에서 설사나 패혈증을 야기시킨다 (Esaki et al 2004). 또한, 특히 닭고기와 계란을 통한 식중독 발생이 주로 미국, 일본 및 유럽 등에서 *S. enteritidis*에 의해 급증하고 (Arakawa et al 1996; Limawongpranee et al 1999 Mason and Ebel 1992) 사람과 동물에 다양하게 감염되므로 닭에서의 Salmonella 감소대책이 공중보건상 중요한 과제로 남아 있다 (Eble et al 1992; Henzler et al 1994).

따라서 본 연구는 오매와 오미자 열매를 가공하여 사료첨가제로 급여함으로써 병아리의 세균성을 조사하여 이들의 이용 가능성을 알아보고자 한다.

1) 재료 및 방법

가) 오매와 오미자 제조

이 실험에서 사용된 시료는 오매, 오미자의 열매를 이용하여 메탄올로 추출한 추출액이다.

나) 실험동물 및 실험설계

본 실험에 사용된 병아리는 2주령 hyline 병아리 마리를 사용하였으며, 실험에 사용되기 전 *Salmonella*의 비감염임을 확인하기 위해 미생물학적 검사를 실시하여 음성 확인 후 실험에 사용하였다. 대조군 4마리, 오매와 오미자 약재 투여군 각각 5마리씩을 임의로 택하여 케이지에 분리 사육하였으며 3일간의 적응기간을 둔 후 실험을 실시하였다. 적응기간동안 음수로 물을 공급하였고, 사료에 0.5%의 메탄올 추출액의 상태의 약재를 섞은 후 충분히 공급해 준후 사육하였다. 사료는 항생제가 포함되지 않은 상태이다.

다) 병아리 접종실험 방법

실험은 총 3군으로 나누어 실시하였다. 대조군은 5×10^5 cfu/ml의 *S. gallinarum* (JOL 420)을 20% PBS 희석 sucrose와 함께 접종하였다. 약재투여군은 균을 접종하고 0.5%의 물에 녹인 메탄올 추출액을 사료에 섞어 제공하였다.

라) 마우스에서의 한약재추출물 치료효과 조사

병아리에 *Salmonella* 균 투여 후 약재의 치료 효과를 측정하기 위하여 병아리의 생존률을 조사하고 분변으로 배출되는 *Salmonella* 균수의 증감을 분석하였다. 균수 증감 분석은 각 군의 병아리로부터 분변을 균주 접종 전 1회, 접종 후 1일, 3일, 5일째에 각각 1회씩 모두 4회 각 군의 병아리에서 수집하였고, 0.85% 생리식염수로 십진 희석하여 *Salmonella Shigella* (Difco, Sparks, USA) agar에 $100 \mu\text{l}$ 희석액을 도말하여 37°C 항온기에서 24시간 배양한 다음 균수를 측정하였다.

2) 결과

가) 오매와 오미자 투여 후 salmonella gallinarum 감염 닭의 생존율과 닭의 분변에서 Salmonella의 검출을 Table 13과 Table 14에 각각 나타내었다. 5×10^5 cfu/ml의 S. gallinarum (JOL 420)을 접종한 후 병아리 분변으로 Salmonella의 수를 측정 한 결과 오매와 오미자가 투여된 병아리에서 균을 투여한 대조군에 비해 현저히 균수를 감소시켰고 생존율을 높였다. (Table 13 참조)

Table 13. Fecal shedding of *Salmonella*(cfu/g) after challenge with *S. gallinarum* and *P. mume* (100% methanolic extract)

Group	Days of fecal examination			
	0 day	1 day	3 day	5 day
C-1	0	0	3.0×10^3	Death
C-2	0	5.0×10^3	3.3×10^4	Death
C-3	0	2.7×10^5	Death	Death
C-4	0	>	5.0×10^4	4.8×10^5
E-1	0	1.2×10^4	0	0
E-2	0	1.0×10^5	5.0×10^3	0
E-3	0	2.0×10^5	8.0×10^3	2.5×10^2
E-4	0	9.0×10^5	5.0×10^6	3.0×10^3
E-5	0	4.0×10^5	2.3×10^4	0

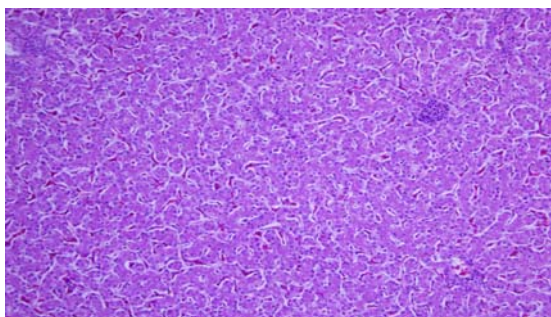
* C, Control mouse E, Experiment mouse

Table 14. Fecal shedding of *Salmonella* (cfu/g) after challenge with *S. gallinarum* and *S. chinensis* (100% methanolic extract)

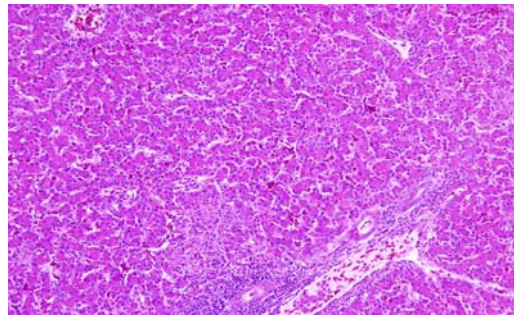
Group	Days of fecal examination			
	0 day	1 day	3 day	5 day
C-1	0	0	4.5×10^5	Death
C-2	0	3.0×10^4	Death	Death
C-3	0	2.5×10^4	3.0×10^5	Death
C-4	0	3.0×10^3	5.0×10^4	Death
E-1	0	2.5×10^4	0	3.3×10^2
E-2	0	1.0×10^5	5.6×10^4	1.5×10^3
E-3	0	>	1.0×10^5	0
E-4	0	5.0×10^4	5.0×10^4	2.7×10^2
E-5	0	8.0×10^5	3.0×10^4	0

* C, Control mouse; E, Experiment mouse

3) 조직학적 소견



대조군



약물 처리군

(가) Small intestine

Control은 장벽의 허혈성 괴사(ischemic necrosis)와 함께 장벽의 위축(atrophy)이 있으며 특히 Control III, Control II-5가 심함. 그러나 오매 또는 오미자 처리군에서는 뚜렷한 조직 소견이 없었으며 정상 조직과 큰차이가 없었음.

(나) Spleen

Control에서는 전반적으로 적색속질(red pulp)쪽에 울혈(congestion) 및 출혈(hemorrhage)이 심하고 그리고 일부에서는 괴사 소견까지 동반되었으며, 특히 2차 Control II-1, II-5에서는 더욱 심했음. 반면에 오매, 오미자 처리군에서는 울혈이 Control에 의해서 미약했으며, 오매 II-3, 오미자 II-2에서는 오매 또는 오미자 처리군내에서는 다른 것보다 심하였으나 Control 보다는 약했음

(다) Liver

Control에서는 2차 Control II-2를 제외하고는 중심정맥(central vein) 또는 문맥정맥(portal vein)에 울혈이 심했으나 오매, 오미자 처리군에서 상대적으로 울혈이 미약했음. 그러나 오매 I-1, 오미자 I-1에서는 Control에서 보이지 않던 육아종(granuloma)이 있고, 2차 오매 II-2에서는 육아종과 함께 여러곳에서 호중구(neutrophil)등의 염증세포의 침윤이 있었으며, 오미자 II-3에서도 부분적으로 염증세포침윤이 있었음.

참고) 오매, 오미자 처리군에서 나타나는 육아종 및 염증세포 침윤은 1)균에 의해서도 가능한 소견이나 2)약제 부작용, 그리고 3)원래 실험 실험동물이 가지고 있었던 자체의 문제일 수도 있다고 생각됨-감별위해 추가 실험이 요구됨.

(라) Kidney

2차 Control II-2를 제외한 Control군이 오매, 오미자 처리군에 비해서 혈관의 울혈이 심했음.

상기 실험에서 Control 군에 비해서 오매, 오미자 처리군에서 울혈, 허혈성 괴사 등의

조직소견이 미약했음을 알 수 있다.

병아리 실험 조직 판독간 뒤포

간(Liver): 대조군 1,2에서 염증세포가 운집되어 있는 것을 간혹 관찰 할 수 있었으며, 대조군 3,4에서는 대조군 1,2에서보다 약간 좀더 흔한 염증세포의 운집을 볼 수 있었음.

대조군 5,6,7에서는 상기처럼 염증세포의 침윤 소견과 함께 군데군데 간세포(hepatocyte)의 괴사소견이 관찰 되었음.

그러나 실험군 8,9,10,11,12,13에서는 대조군 5,6,7에 비해서 염증세포의 감소와 함께 간세포의 괴사 소견의 감소가 관찰되었음.

실험군 8-9와 10-13사이의 두 집단 사이에서는 큰 차이를 찾기 힘들었음.

장(Intestine) : 뚜렷한 차이 형태학적소견을 찾기 힘들어 비교하지 않았음.

결론적으로 2차년도 연구에서는 1차년도에서 선별된 식품공전에 수록이 된 오매와 오미자를 대상으로 마우스가 아닌 목적동물인 닭에 *Salmonella gallinarum* (JOL 420)을 접종한 후 병아리 분변으로 Salmonella의 수를 측정된 결과 오매와 오미자가 투여된 병아리에서 균을 투여한 대조군에 비해 현저히 균수를 감소시켰고 생존율을 높였다. 약제의 유효성을 입증하였다. 또한 상기 목적동물(닭)실험에서 *Salmonella gallinarum* 을 투여한 그룹에 비해 조직이 안전함을 조직소견으로 확인하여 안전함을 확인하였다.

라. 오미자의 함염증활성 측정

1) HMC-1세포에서 오미자 추출물의 세포독성의 영향

비만세포에서 오미자추출물의 독성을 알아보기 위해 MTT측정 방법으로 세포독성을 관찰하였다. 오미자 추출물을 1, 10, 100 μ g/mL 의 농도로 처리해 24시간 배양하였다. 그 결과 오미자 추출물 100 μ g/mL의 농도에서도 세포독성을 보이지 않았다(Fig.4).

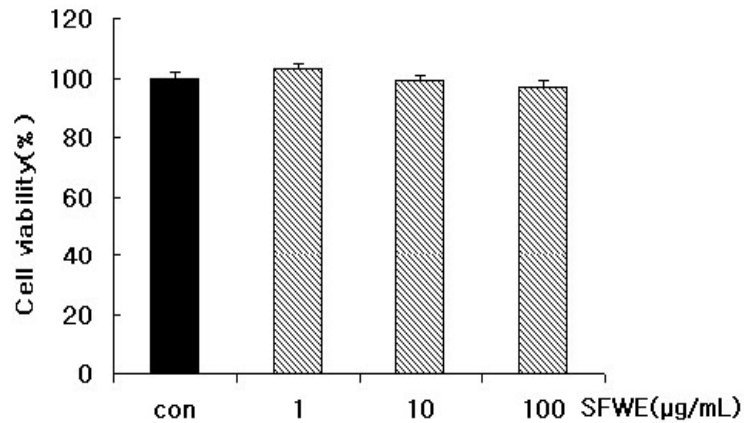


Fig.4. HMC-1세포에서 오미자 추출물의 세포독성의 영향.

HMC-1세포를 96well plate에 분주하여 오미자 추출물을 다양한 농도로 처리해 24시간 배양하였다.

2) HMC-1 세포에서 PMA와 A23187로 유도된 TNF- α 생성에 대한 오미자 추출물의 영향

TNF- α 는 조직 손상 및 충격에 중요한 매개물질이고, 고유의 면역 반응에서 한 역할을 할 것이다. 우리는 염증에 관한 오미자 추출물의 효과를 검증하기 위하여 PMA와 A23187로 유도된 TNF- α 의 발현에 관한 오미자 추출물의 효과를 연구하였다. TNF- α 의 생성은 24시간 동안 오미자 추출물이 함유되거나 혹은 함유되지 않은 PMA(50nM)와 A23187(1 μ M)로 배양되어진 HMC-1 세포 배양기에서 측정되어졌다. PMA(50nM)와 A23187(1 μ M)는 PMA(50nM)와 A23187(1 μ M)이 다루어지지 않은 세포들과 비교하여 TNF- α 分泌의 두드러진 증가를 유도하였다. 오미자 추출물 (10 and 100 μ g/mL)는 농도 의존적으로 억제되었다. 특히, 오미자 추출물은 100 μ g/mL의 농도에서 TNF- α 의 발현을 66 %억제하였다.

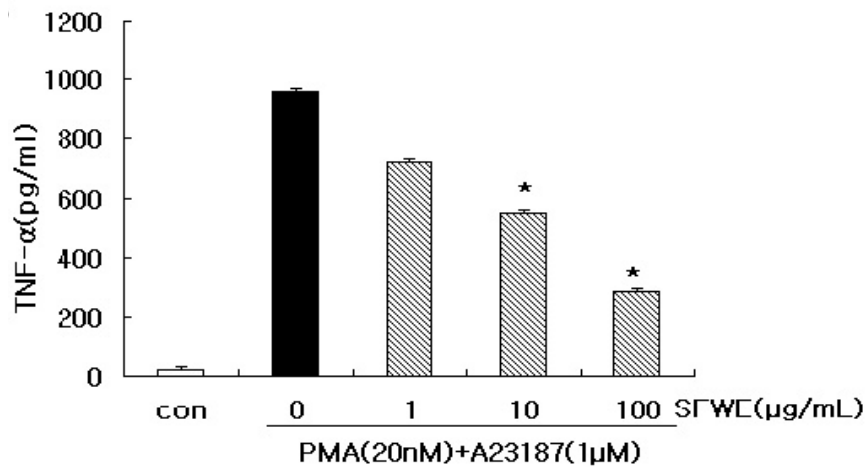


Fig.5. HMC-1세포에서 PMA와 A23187 유도된 TNF- α 생성에 대한 오미자 추출물의 효과. 세포들은 PMA(20nM)와 A23187(1 μ M)로 자극되어지기 전에 세 가지 농도 (1, 10, 그리고 100 μ g/mL)의 오미자 추출물로 먼저 배양되어졌다. TNF- α 의 생성은 ELISA로 측정되어졌다. 결과들은 mean \pm S.E이다. 통계적으로 유의함(*p<0.05).

3) HMC-1 세포에서 PMA와 A23187로 유도된 TNF- α mRNA 발현에 대한 오미자 추출물의 영향

TNF- α mRNA의 발현 결과는 RT-PCR에 의해 측정되어졌다. 오미자 추출물은 또한 PMA와 A23187에 의한 TNF- α mRNA의 증가도 억제하였다. 이러한 연구 결과들은 오미자 추출물에 의한 TNF- α 생성의 억제는 PMA와 A23187 유도성 TNF- α mRNA의 발현을 억제하기 때문이라는 것을 제시한다.

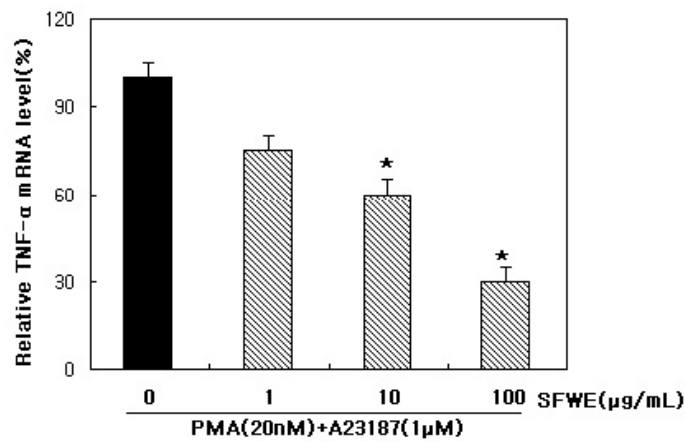
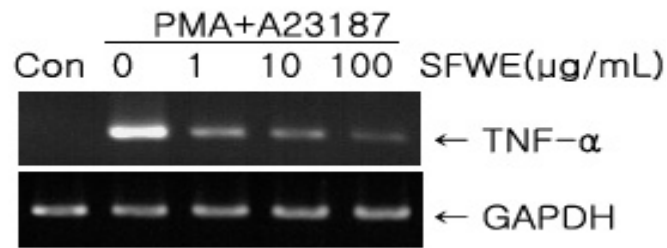


Fig.6. HMC-1세포에서PMA와 A23187 유도된 TNF-α mRNA 발현에 대한 오미자 추출물의 효과.

세포들은 PMA(20nM)와 A23187(1μM)로 자극되어지기 전에 세 가지 농도(1, 10, 그리고 100 μg/mL)의 오미자 추출물로 먼저 배양되어졌다. TNF-α mRNA의 발현은 RT-PCR을 이용해 수행하였다. TNF-α mRNA의 발현(위). TNF-α mRNA를 이미지 분석기를 이용해 정량화 하였다 (아래). 결과들은 mean±S.E이다. 통계적으로 유의함(*p<0.05).

4) HMC-1 세포에서의 PMA와 A23187로 유도된 IL-6 생성에 관한 오미자 추출물의 효과

우리는 HMC-1 세포들 안에서 PMA와 A23187 유도된 IL-6의 생성에 관해 오미자 추출물의 억제효과를 실험하였다. 상증액은 ELISA 방법에 의해 측정되어졌다.

오미자 추출물의 PMA와 A23187이 유도한 IL-6의 생성을 농도에 의존하여 억제되어진다는 것을 보여준다. 오미자 추출물은 고농도(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서는 IL-6 생성을 34% 억제하는 것을 보여주었다.

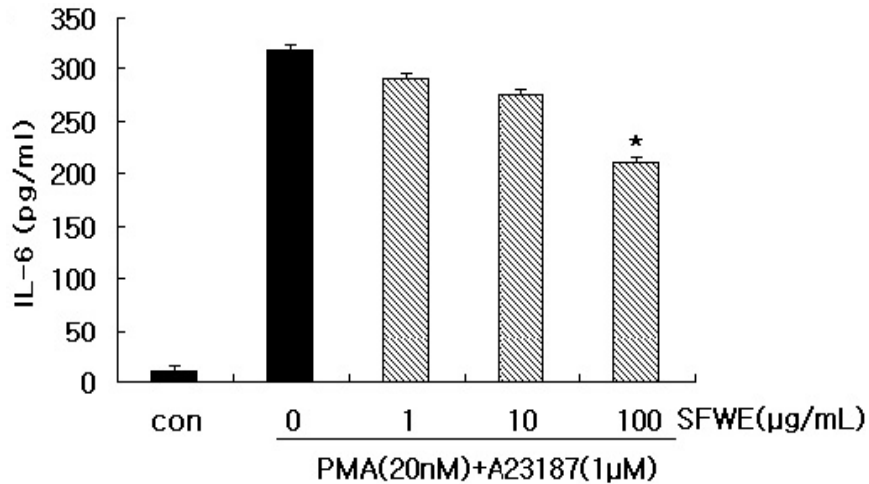


Fig.7. HMC-1세포에서 PMA와 A23187 유도된 IL-6 생성에 대한 오미자 추출물의 효과.

세포들은 PMA(20nM)와 A23187(1 μM)로 자극되어지기 전에 세 가지 농도(1, 10, 그리고 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 오미자 추출물로 먼저 배양되어졌다. IL-6 생성은 ELISA로 측정되어졌다. 결과들은 mean \pm S.E이다. 통계적으로 유의함(* p <0.05).

5) HMC-1 세포에서의 PMA와 A23187로 유도된 IL-6 mRNA발현에 관한 오미자 추출물의 효과

IL-6 mRNA 발현은 RT-PCR로 측정되어졌다. 오미자 추출물은 또한 PMA와 A23187에 의하여 유도된 IL-6 mRNA의 증가를 억제하였다. 특히, 오미자추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 IL-6 발현을 통계적으로 유의하게 억제하였다.

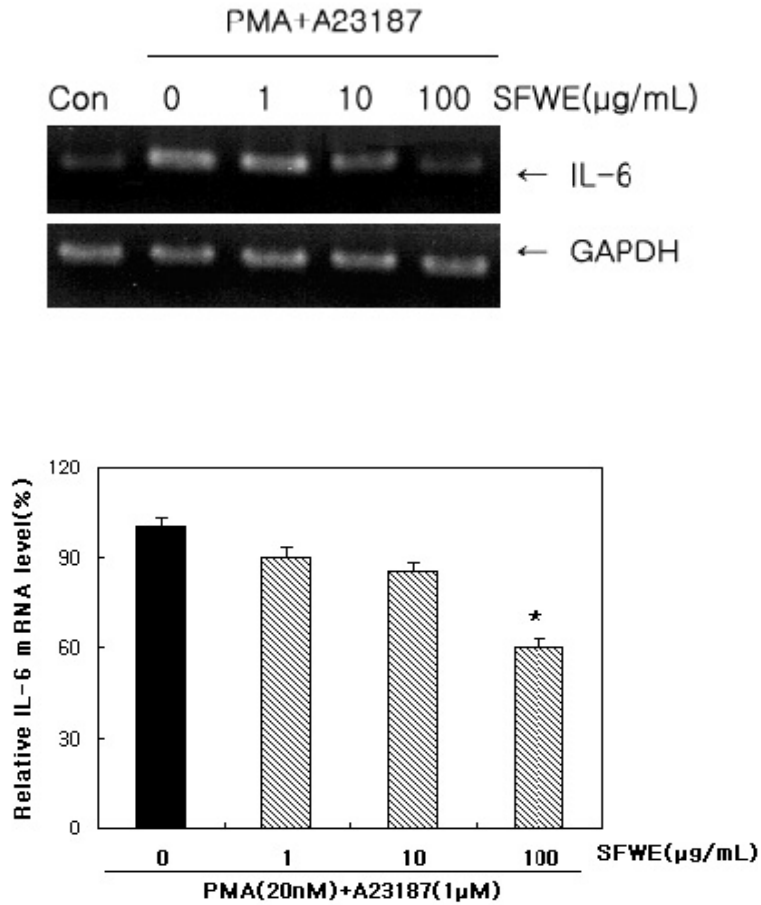


Fig.8. HMC-1세포에서PMA와 A23187 유도된 IL-6 mRNA 발현에 대한 오미자추출물의 효과.

세포들은 PMA(20nM)와 A23187(1 μM)로 자극되어지기 전에 세 가지 농도(1, 10, 그리고 100 $\mu\text{g/mL}$)의 오미자 추출물로 먼저 배양되어졌다. IL-6mRNA의 발현은 RT-PCR을 이용해 수행하였다. IL-6 mRNA의 발현(위). IL-6 mRNA를 이미지 분석기를 이용해 정량화 하였다 (아래). 결과들은 mean \pm S.E이다. 통계적으로 유의함(* $p<0.05$).

6. HMC-1 세포에서의 PMA와 A23187로 유도된 GM-CSF 생성에 대한 오미자 추출물의 효과

우리는 HMC-1 세포들 안에서 PMA와 A23187 유도된 GM-CSF의 생성에 관한 오미자 추

출물의 억제효과를 실험하였다. GM-CSF 단백질의 생성은 ELISA 방법으로 측정되어졌다. 오미자 추출물은 농도에 의존적으로 GM-CSF 단백질 생성을 억제한다.

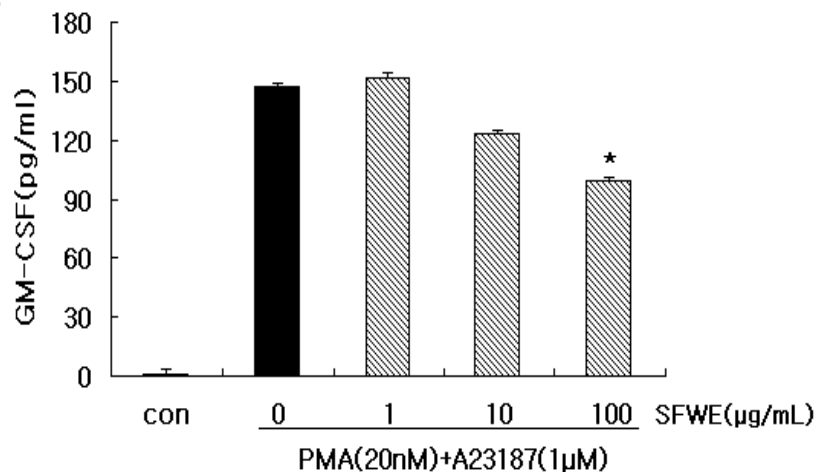


Fig.9. HMC-1세포에서 PMA와 A23187 유도된 GM-CSF 생성에 대한 오미자 추출물의 효과.

세포들은 PMA(20nM)와 A23187(1µM)로 자극되어지기 전에 세 가지 농도(1, 10, 그리고 100 µg/mL)의 오미자 추출물로 먼저 배양되어졌다. GM-CSF생성은 ELISA로 측정되어졌다. 결과들은 mean±S.E이다. 통계적으로 유의함(*p<0.05).

7) HMC-1 세포에서의 PMA와 A23187로 유도된 GM-CSF mRNA 발현에 대한 오미자 추출물의 효과

우리는 HMC-1 세포들 안에서 PMA와 A23187 유도된 GM-CSF mRNA 발현에 관한 오미자 추출물의 억제효과를 실험하였다. GM-CSF mRNA 발현정도와 GM-CSF mRNA의 발현은 RT-PCR로 측정되어졌다. 오미자 추출물은 농도에 의존적으로 방법으로 GM-CSF mRNA 발현을 억제한다.

이러한 결과들은 오미자 추출물에 의한 GM-CSF mRNA 발현 억제는 PMA와 A23187이 유도된 GM-CSF mRNA 발현의 억제에서 기인한다는 것을 보여준다

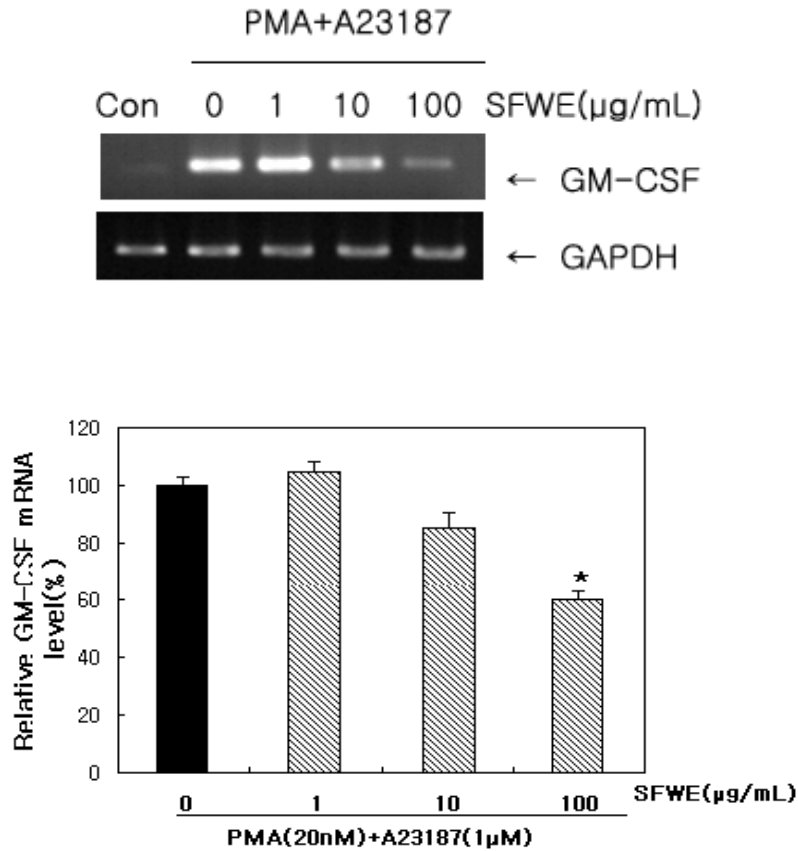


Fig.10. HMC-1細胞에서PMA와 A23187 유도된 IL-6 mRNA 발현에 대한 五味子抽出物の 효과.

세포들은 PMA(20nM)와 A23187(1 μM)로 자극되어지기 전에 세 가지 농도(1, 10, 그리고 100 $\mu\text{g/mL}$)의 오미자 추출물로 먼저 배양되어졌다. GM-CSFmRNA의 발현은 RT-PCR을 이용해 수행하였다. GM-CSF mRNA의 발현(위). GM-CSF mRNA를 이미지 분석기를 이용해 정량화 하였다 (아래). 결과들은 mean \pm S.E이다. 통계적으로 유의함(*p<0.05).

8) PMA와 A23187로 유도한 I κ B의 degradations와 NF- κ B의 activation관한 오미자 추출물의 효과

PMA와 A23187로 유도된 I κ B의 degradation과 NF- κ B 핵 전사에 관한 오미자 추출물의 효과를 연구하기 위하여, 전 처리된 HMC-1 세포들은 1시간동안 PMA와 A23187로 자극되어 졌다.

Cytoplasmic I κ B는 세포 핵 내에서 NF- κ B p65 subunit의 발현이 증가하는 부대상황과 함께, 1시간 동안 거의 완벽하게 사라졌다. PMA와 A23187로 유도된 I κ B의 degradation이五味子 추출물의 전처리에 의해 차단되어졌다는 것은, 오미자 추출물이 신호 통로에 있어 중요한 성분으로서 활약할 수 있다는 것을 알려준다. 더욱이 오미자 추출물은 농도에 의존적으로 NF- κ B가 세포 핵 속으로 전사되는 것을 저지한다. 이러한 결과들은 I κ B degradation과 NF- κ B p65의 핵 전사 모두 오미자 추출물에 의해 억제되어진다는 것을 보여준다.

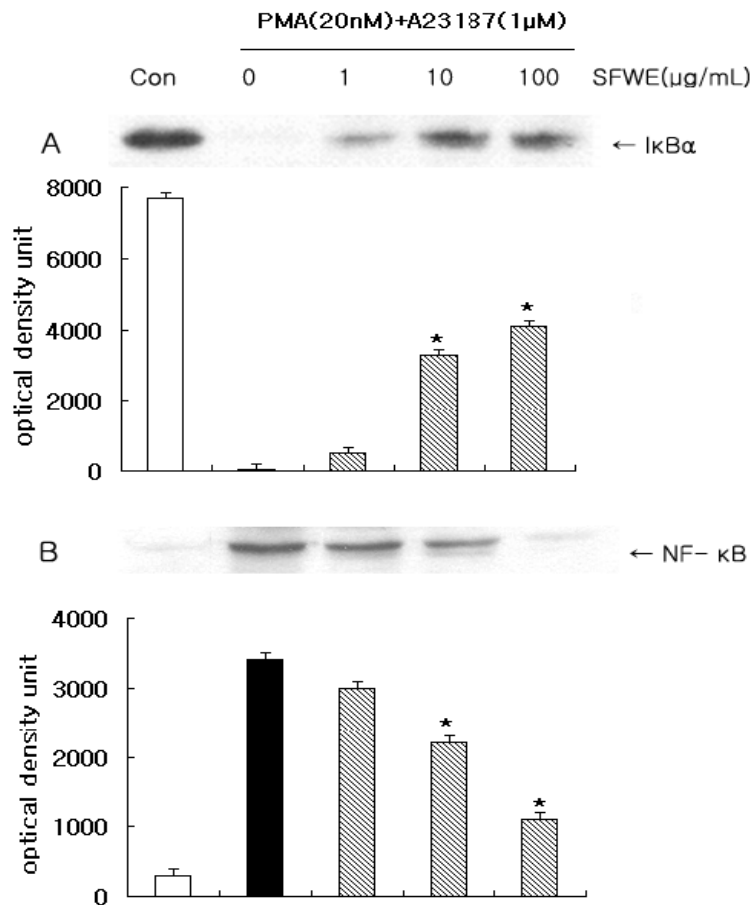


Fig. 11. HMC-1 세포에서 PMA와 A23187 유도된 IκB의 degradation과 NF-κB전사에 관한 오미자 추출물의 효과

세포들은 PMA(20nM)와 A23187(1μM)로 자극되어지기 전에 세 가지 농도(1, 10, 그리고 100 μg/mL)의 오미자 추출물로 먼저 배양되어졌다. 세포 리세이트 100 mg은 SDS-PAGE 와 IκBa(37kDa)에 대한 항체(A), NF-κB(65kDa)(B)에 대한 항체를 가지고 면역 이적법 (immunoblotted)에 의해 실험하였다. IκBa와 NF-κB의 발현 정도는 image 분석기에 의해 정량화 되어졌다. 결과들은 mean ±S.E이다. 통계적으로 유의함(*p<0.05).

3. 3차년도 실험결과(3차년도)

가. 한약재(오매)의 제조, 분석, 항균 활성 측정

2차년도의 실험에서 우수한 효과를 보인 약재 중에 하나인 오매의 성분을 분리 동정하는 것을 아래와 같이 진행하였다. 동정한 단일성분으로 항균활성실험을 진행하였다.

1) 한약재추출물(오매)의 제조 분리

가) 실험재료 - 본 실험에 사용한 오매(烏梅; Mume Fructus)는 익산시 대학한약국에서 구입하여 동정한 후 실험 재료로 사용하였으며, 표본은 원광대학교 약학대학 표본실에 보관 중이다.

나) 시약 및 기기

성분 분리를 위한 순상 컬럼 크로마토그래피용 실리카젤은 Kiesel gel 60(70-230 mesh, ASTM, Merck)을 사용하였고, 역상 크로마토그래피용 담체는 YMC gel(YMC사)를 사용하였다. 성분 확인용 TLC plate는 Kiesel gel 60F₂₅₄ (ART.5715, Merck)를 사용하였다. 추출 및 분획용 용매는 모두 특급 시약을 사용하였다. FT-NMR은 JEOL 500MHz를 사용하였다.

다) 추출 및 분리

건조된 오매 1.1 kg에 에탄올 3 L를 가하여 3시간 동안 2회 반복하여 초음파 추출하고 여과한 후 여액을 합하여 농축하여 에탄올 추출물 89.3 g을 얻었다. 얻어진 에탄올 추출물을 60% 수성 메탄올에 용해시킨 다음 헥산, 디클로로메탄, 에칠아세테이트 및 부탄올을 이

용하여 순차적으로 분획 후 농축하여 각각의 분획물 헥산 분획물(4.4 g), 디클로로메탄 분획물(6.6 g), 에칠아세테이트 분획물(8.6 g) 및 부탄올 분획물(44.2 g)을 얻었다. 분획물 중 우수한 항균활성을 나타낸 디클로로메탄 분획물을 CH₂Cl₂ : MeOH = 40 : 1의 용출 용매를 이용하여 실리카젤 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 7개의 소분획물(Fr. 1-7)을 얻었다. 이 중 Fr. 1 (870 mg)을 다시 CH₂Cl₂ : MeOH = 40 : 1의 용출 용매를 이용하여 실리카젤 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 4개의 소분획물(Fr. 11-14)을 얻었다. Fr. 13 (70 mg)을 *n*-hexane : acetone = 8:1의 용출 용매를 이용하여 실리카젤 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 화합물 1 (42.2 mg)을 얻었다. Fr. 2 (2.25 g)는 *n*-hexane : acetone = 8:1의 용출 용매를 이용하여 실리카젤 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 4개의 소분획물(Fr. 21-24)을 얻었다. Fr. 22 (950 mg)을 *n*-hexane : acetone = 10:1의 용출 용매를 이용하여 실리카젤 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 6개의 소분획물(Fr. 221-226)을 얻었으며, 이 중 Fr. 224 (500 mg)을 90% 수성 메탄올을 용출용매로 사용한 YMC 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 화합물 2 (280 mg)을 얻었다.

라) **Benzyl-β-D-glucopyranoside** (화합물 1) - Colorless amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} = -52^\circ$ (*c* 0.2, MeOH); ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 3.25 (1H, m, H-2'), 3.29~3.34 (3H, m, H-3'~5'), 3.68 (1H, dd, *J* = 11.9, 5.5 Hz, H-6'a), 3.89 (1H, dd, *J* = 11.9, 1.8 Hz, H-6'b), 4.35 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-1'), 4.66 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, H-7a), 4.93 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, H-7b), 7.24~7.41 (5H, m, H-2~6); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 137.75 (C-1), 127.96 (C-2, 6), 127.89 (C-3, 5), 127.38 (C-4), 101.97 (C-1'), 76.78 (C-3'), 76.70 (C-5'), 73.83 (C-2'), 70.38 (C-4'), 61.50 (C-6').

마) **Ursolic acid** (화합물 2) - White amorphous powder; (-)-ESI-MS *m/z* 455 [M-H]⁻, ¹H-NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅) δ: 5.49 (1H, t-like s, H-12), 3.46 (1H, dd, *J* = 6.0, 10.1 Hz, H-3α), 2.64 (1H, d, *J* = 11.4 Hz, H-18), 1.25 (3H, s, H-23), 1.23 (3H, s, H-27), 1.06 (3H, s, H-26), 1.03 (3H, s, H-24), 1.00 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-30), 0.95 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H-29), 0.89 (3H, s, H-25); ¹³C-NMR (125 MHz, pyridine-*d*₅) δ: 179.8 (C-28), 139.2 (C-13), 125.5 (C-12), 78.0 (C-3), 55.7 (C-5), 53.4 (C-18), 47.9 (C-9, 17), 42.4 (C-14), 39.9 (C-8), 39.4 (C-19), 39.3 (C-1, 4), 39.0 (C-20), 37.3 (C-10), 37.2 (C-22), 33.5 (C-7), 31.0 (C-21), 28.7 (C-15), 28.6 (C-23), 28.0 (C-2), 24.8 (C-16), 23.8 (C-11), 23.5 (C-27), 21.3 (C-29), 18.7 (C-6), 17.4 (C-30), 17.3 (C-26), 16.5 (C-25), 15.6 (C-24).

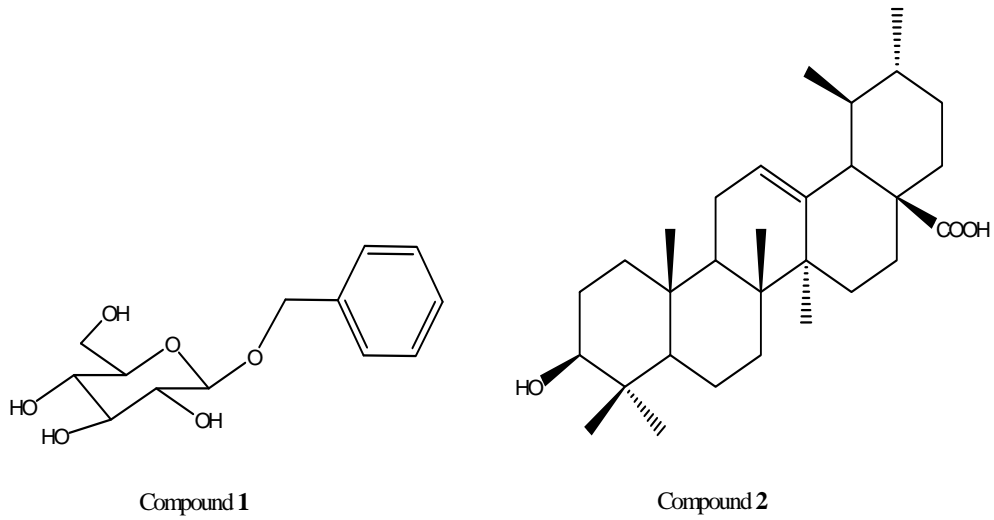


그림 2. 화합물 1과 2의 구조

2) 한약재추출물(오매)의 항균활성

화합물 1과 2의 항균활성 - 화합물 1과 2를 18종의 병원성 균주에 대한 항균활성을 검토하여 MIC치로 비교한 결과, 화합물 1 (benzyl-β-D-glucopyranoside)은 모든 시험 균주에 대하여 MIC치가 500 μg/ml 이상으로 유의한 항균활성을 나타내지 않았다. 반면, 화합물 2 (ursolic acid)는 18종의 시험균주에 대하여 100 ~ 500 μg/ml의 MIC치를 나타냈다 (Table. 15).

Table. 15. 화합물 2의 항균활성(MIC, μg/ml)

Strain	Origin	화합물 2	Kanamycin A	Penicillin G
<i>E. coli</i> O157	ATCC 43890	400	10	50
<i>E. coli</i> O157	ATCC 35150	300	10	50
<i>E. coli</i> O157	Cattle	200	ND ^a	ND

<i>E. coli</i> K88	E-126	300	50	100
<i>E. coli</i> K99	E-125	300	50	50
MRSA	ATCC 700698	100	ND	100
MRSA 6	Chicken	200	50	ND
MRSA 104	Human	100	ND	ND
<i>Salmonella enteritidis</i>	Sal-36	300	50	50
<i>S. gallinarum</i>	-	200	50	10
<i>S. paratyphi A</i>	JOL 381	200	ND	ND
<i>S. typhi</i>	JOL 380	400	50	ND
<i>S. typhimurium</i>	Sal-13	300	50	10
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 49557	500	ND	ND
<i>S. dysenteriae</i>	JOL 377	300	ND	ND
<i>S. flexneri</i>	JOL 378	200	10	ND
<i>Vibrio cholerae O1</i>	JOL 375	200	ND	ND
<i>V. cholerae O139</i>	JOL 376	200	50	1

^a No detected antibacterial activity at the concentration of 100 mg/ml.

나. 한약재의 항균활성실험

2차년도 실험에서 우수한 효과를 보인 약재인 오매, 황련 및 오미자를 아래와 같은 많은 조합으로 계획하여 아래와 같이 진행하였다. 사료제로 개발시에 경제성을 고려하여야 하는데 상기 약재의 가격(가격은 오매<황련<오미자 순으로 형성되어 있다)이 각기 다르기 때문에 이에 맞추어 다양한 경우의 수로 나누어 다양한 균주에 대한 항균활성실험을 진행하였다. 그 중에 경제성이 제일 우수한 오매: 황련: 오미자(5 : 3 : 2) 비율을 NP532로 명명하였다.

1) 디스크디퓨전실험

오매, 황련 및 오미자의 비율을 달리하여 항균활성을 측정하였다.(Table. 16 참조)

Table. 16. 오매, 황련 및 오미자의 비율을 달리하여 항균활성을 측정

번호	1	2	3	4	5	6	7	8
Strain	V.cholerae 01 JOL375	V.cholerae 0139 JOL376	Shigella dysenteriae JOL377	Shigella flexeneri JOL378	E.coli 0157 ATCC43890 JOL379:인체 분리주	Shigella typhi JOL380	Shigella paratyphi A JOL381	MRSA 104 동물분리 주(닭)
오매	14	16	12	12	14	8	12	9
오미자	15	17	12	12	10	9	12	9
오매+오미자 80%+10%	15	16	12	12	12	12	12	9
오매+오미자+황련 80%+10%+10%	18	18	13	15	17	9	12	9
오매+오미자+황련 70%+10%+20%	20	21	14	16	20	12	12	10
오매+오미자+황련 60%+10%+30%	25	21	14	17	25	12	13	12
오매+오미자+황련 70%+20%+10%	25	20	14	16	24	13	13	10
오매+오미자+황련 60%+20%+20%	25	19	13	16	26	12	14	10
오매+오미자+황련 50%+20%+30%	27	25	15	17	20	13	13	12
황련	30	28	22	16	27	14	12	18

번호	9	10	11	12	13	14	15	16
Strain	Salmonella gallinarum ATCC	E.coli 0157 JOL284 동물분리주	MRSA ATCC 700698	Shigella dysenteriae ATCC 49557	Salmonella gallinarum 수과연 표준 균주	E.coli 0157 ATCC35 150	Salmonella Typhimurium Sal-13 수과연 표준 균주	Salmonella Enneritidis Sal-36
오매	7	8	8	13	7	7	7	8
오미자	7	8	8	14	7	8	8	8
오매+오미자 80%+10%	7	8	10	13	7	9	8	8
오매+오미자+황련	7	8	10	13	7	9	8	8

80%+10%+10%								
오매+오미자+황련 70%+10%+20%	8	9	11	13	7	11	8	8
오매+오미자+황련 60%+10%+30%	8	14	9	14	8	12	7.5	9
오매+오미자+황련 70%+20%+10%	9	9	10	13	7	13	8	10
오매+오미자+황련 60%+20%+20%	8	8	11	14	10	14	10	11
오매+오미자+황련 50%+20%+30%	8	10	11	13	9	14	10	13
황련	9	15	19	19	9	15	8	11

번호	17	18	19	20	21	22	23	24
Strain	E.coli K99E-125 수과연 표준균주	E.coli K88 E-126	Salmonella choleraesuis ATCC 7001	S. typhi ATCC 10749	S london ATCC 8389	S newpert ATCC 27869	S. typhi ATCC 33459	S.typhimurium ATCC250 1 (DT104)
오매	10	10	9	8	8	11	7	8
오미자	10	10	10	9	8	12	7	8
오매+오미자 80%+10%	10	11	10	8	8	10	7	9
오매+오미자+황련 80%+10%+10%	11	11	9	9	10	11	7	8
오매+오미자+황련 70%+10%+20%	12	9	10	9	8	11	7	8
오매+오미자+황련 60%+10%+30%	11	11	9	7	8	11	8	7
오매+오미자+황련 70%+20%+10%	11	13	11	7	8	11	8	7
오매+오미자+황련 60%+20%+20%	11	11	7	10	8	9	9	7
오매+오미자+황련 50%+20%+30%	11	13	7	11	7	10	9	9
황련	13	11	8	9	7	10	8	8

번호	25	26	27	28	29	30	31	32
Strain	JOL 386 S. Enteritidis	JOL 387 S. typhimurium	JOL 388 S. typhimurium	JOL 389 S. typhimurium	JOL 407 S. Enteritidis	JOL 408 S. typhimurium	JOL 409 S. Dublin ATCC391	JOL 410 S. Derby ATCC696

	Chicken	m Cattle	Cattle	um Pig AM, C, G, S, TIC	Chicken	um Pig	84 Cattle	0 Pig
오매	9	12	10	9	9	11	7	8
오미자	8	10	12	8	9	8	8	11
오매+오미자 80%+10%	8	12	11	7.5	8	13	9	13
오매+오미자+황련 80%+10%+10%	11	11	10	9	10	13	11	11
오매+오미자+황련 70%+10%+20%	11	12	12	10	9	12	9	10
오매+오미자+황련 60%+10%+30%	10	11	11	9	8	8	10	10
오매+오미자+황련 70%+20%+10%	11	12	10	9	9	10	12	9
오매+오미자+황련 60%+20%+20%	11	12	10	8	9	9	10	8
오매+오미자+황련 50%+20%+30%	11	12	12	10	7	10	9	9
황련	11	13	12	7	7	10	8	8

번호	33	34	35	36	37	38
Strain	JOL 411 S. Choleraesuis ATCC7001 Pig,AM,SXT	JOL 419 S. Gallinarum Chicken CF,G,SXT	JOL 420 S. Gallinarum Chicken CJ,CIP,NA, NOR,S,SXT	JOL 421 S. Gallinarum Chicken G,NA,S	JOL 422 S. Gallinarum Chicken	JOL 423 S. Gallinarum ATCC9184 Chicken AM, AMC,C,G,S,TI C
오매	10	9	8	11	10	9
오미자	10	7	8	11	10	8
오매+오미자 80%+10%	12	11	10	12	12	8
오매+오미자+황련 80%+10%+10%	11	7	9	12	10	10
오매+오미자+황련 70%+10%+20%	12	9	8	12	11	9
오매+오미자+황련 60%+10%+30%	11	9	8	10	9	8
오매+오미자+황련 70%+20%+10%	11	9	9	13	11	9
오매+오미자+황련 60%+20%+20%	12	8	8	11	10	9

오매+오미자+황련 50%+20%+30%	12	9	10	12	10	9
황련	12	9	9	8	10	9

2) MIC test(*Salmonella spp.* 을 이용)

(가) MIC test 실험 방법

NP532 MIC 측정은 Muller-Hinton (MH; Difco, USA) agar를 이용하였다. TSB에 증균 후 590nm에서 흡광도를 측정하여 CFU (개/ml)를 계산 후, 0.85% 생리식염수를 이용하여 1×10^5 개/ml로 희석한다. 약제를 1% DMSO 에 1000mg/ml의 비율로 녹인 후, 1.5ml규격의 microcentrifuge tube에 0.85% saline을 이용하여 $(1/2)^{n-1}$ 로 1000mg/ml부터 0.49mg/ml까지 12계대 희석한다. 1×10^5 개/ml로 희석된 균을 희석된 약제와 1:1의 비율이 되도록 분주한 후, 잘 섞어주고 37°C 배양기에서 20시간동안 배양한다. 배양된 균을 각각 0.85% saline을 이용해 총량이 1ml가 되도록 1/100의 농도로 희석한다. 희석한 균은 MH agar에 100 μ l씩 분주하고 고르게 도말하여 37°C 배양기에서 20시간동안 배양한 후 집락수를 센다. 집락수 10개 이하가 나타난 약제농도를 MIC로 간주한다.

(나) MIC test 실험결과

Salmonella spp. 을 이용한 MIC test에서 NP532은 최저 0.49mg/ml에서 최고 7.8mg/ml의 억제농도를 나타내었다(Table 17 이 약제가 살모넬라에서 나타내는 최소성장 억제농도는 균주에 따라 차이가 있는 것으로 보인다. 이 실험을 바탕으로 tetracycline감수성이 확인된 JOL 420 *S. Gallinarum*을 선정하여 목적 동물인 닭에서의 생존률과 치료 효과를 관찰했다.

Table 17. MIC of NP532 against *Salmonella spp.*

Jol NO.	species	(mg/ml)	Jol NO.	species	(mg/ml)

표준균주	<i>Salmonella.spp</i>	3.9	403	<i>S.Typhimurium</i>	1.9
380	<i>S.Typhi</i>	1.9	404	<i>S.Typhimurium</i>	1.9
381	<i>S.Paratyphi</i>	0.49	405	<i>S.Enteritidis</i>	1.9
386	<i>S.Enteritidis</i>	3.9	407	<i>S.Enteritidis</i>	1.9
387	<i>S.Typhimurium</i>	1.9	408	<i>S.Typhimurium</i>	3.9
388	<i>S.Typhimurium</i>	1.9	409	<i>S.Dublin</i>	1.9
389	<i>S.Typhimurium</i>	1.9	410	<i>S.Derby</i>	0.49
394	<i>S.Gallinarum</i>	1.9	411	<i>S.Cholerasuis</i>	7.8
395	<i>S.Gallinarum</i>	3.9	419	<i>S.Gallinarum</i>	1.9
398	<i>S.Typhimurium</i>	1.9	420	<i>S.Gallinarum</i>	7.8
399	<i>S.Typhimurium</i>	1.9	421	<i>S.Gallinarum</i>	1.9
400	<i>S.Typhimurium</i>	7.8	422	<i>S.Gallinarum</i>	1.9
401	<i>S.Typhimurium</i>	1.9	423	<i>S.Gallinarum</i>	1.9
402	<i>S.Typhimurium</i>	1.9			

다. NP532의 *Salmonella* 감염증 치료 효과에 대한 연구

살모넬라는 자연계에 널리 분포하는 그람음성 통성혐기성 간균으로 종종 가축, 가금에서 중증의 설사, 패혈증을 일으킬 뿐 아니라 사람식중독의 원인균으로서 공중 위생학적으로도 문제가 되는 세균이다. 현재 가축전염병 예방법에서 *S. Pulloum*에 의한 추백리와 *S. Gallinaum*에 의한 가금티푸스가 제2종 가축 전염병으로 지정되어 있다.

살모넬라속(Genus *Salmonella*)의 균은 장내세균과(Family Enterobacteriaceae)에 속하고 DNA의 상동성에서 2군종 6아종으로 분류되고 있다. 또, 균체항원(O항원)과 편모항원(H항원)에 의한 분류에서 2500여종이 넘는 혈청형이 보고되어 있으며 이들이 마치 증명인 것처럼 사용된다. 살모넬라는 균체주위에 있는 편모에 의해 운동성을 나타내지만 *S. Pulloum*과 *S. Gallinaum*은 운동성을 갖지 않는다.

살모넬라는 가축에서 치명적인 질병을 일으키고 있다. 살모넬라가 소에 감염되면 설사, 패혈증을 주증으로 하는 급성 전염병을 일으키며 송아지가 이환되면 종종 유행적인 발생에 이른다. 소에 주로 감염되는 균은 *S. Typhimurium*과 *S. Dublin*인데 중증으로 감염될 경우 폐사에 이르며 임신후기의 소는 조산 또는 유산까지 일으킬 수 있다. 돼지의 살모넬라증은 급성 패혈증성 질환 또는 설사를 동반한 만성 장염으로 주로 이유후의 어린 돼지에서 나타난다. 우리나라에서의 발생은 비교적 적으나, 최근 미국에서 *S. Cholerasuis*, *S. Derby*등에 의한 집단 발생이 증가하고 있고, 비록 우리나라에서의 발생이 적을지라도 보균화가 진행하여 식육오염, 환경오염에 의한 공중보건학적인 문제가 될 수 있으므로 주의가 필요하다. 말의 파라티푸스의 원인균은 *S. Abortusequi*인데, 소화기 또는 생식기에 감염하여 성마에서는 전염성유산, 정소염, 관절염을 일으키며 망아지에서는 패혈증, 관절염, 건초염을 일으키며 그 예후가 불량하다. 닭의 추백리는 *S. Pullorum*에 의하여 초생추에서 감염되면 백색의 설사를 보이면서 고율로 폐사한다. 추백리는 2~3주령의 닭에서 가장 치사율이 높으며, 성계에서는 산란이 휴지하거나, 균을 보균한 채 지속적인 난계대감염을 일으키므로 보균계의 적발과 도태를 실시하며 치료는 하지 않는다. 가금티푸스는 *S. Gallinarum*에 의한 급성 패혈증 또는 성계의 만성질환으로 성계가 폐사하기도 한다. 사람 salmonellosis는 식품에 의한 매개가 많으며, endotoxin, cytotoxin, enterotoxin등 다양한 독소들이 있어 여러 다양한 임상증상을 유발할 수 있다.

본 연구는 축산업에 이용할 신개념 항생제를 개발할 목적으로 천연약재 식물에서 추출한 성분을 이용, 인수공통질환을 일으키는 살모넬라균을 모델로 치료제를 개발하기 위한 것으로써, NP532로 다양한 살모넬라균에 대하여 최소성장억제농도를 조사하였고, 사료에 첨가·급여하여 *Salmonella spp.*에 감염된 닭에 대해 이 약제가 치료 효과를 나타내는지를 알아보고자 하였다.

1) 재료 및 방법

가) 실험약제

본 실험은 NP532(오매50%+황련30%+오미자20%, 즉 오매, 황련 및 오미자로 구성되어 있고 그 배합비율이 5 : 3 : 2로 되어 있음)를 이용하였다.

나) 실험균주

본 실험에서 사용한 균주는 Table 18 같다.

Table 18 List of the *Salmonella spp* used in this study

균주번호	균주명	Source	비고
JOL380	<i>S. Typhi</i>	사람	
JOL381	<i>S. Paratyphi</i>	사람	
JOL386	<i>S. Enteritidis</i>	돼지	
JOL387	<i>S. Typhimurium</i>	돼지	
JOL388	<i>S. Typhimurium</i>	돼지	
JOL389	<i>S. Typhimurium</i>	돼지	
JOL394	<i>S. Gallinarum</i>	닭(비장)	
JOL395	<i>S. Gallinarum</i>	닭(간)	
JOL398	<i>S. Typhimurium</i>	돼지	
JOL399	<i>S. Typhimurium</i>	돼지	
JOL400	<i>S. Typhimurium</i>	돼지	
JOL401	<i>S. Typhimurium</i>	닭	
JOL402	<i>S. Typhimurium</i>	닭	
JOL403	<i>S. Typhimurium</i>	닭	
JOL404	<i>S. Typhimurium</i>	닭	
JOL405	<i>S. Enteritidis</i>	닭	
JOL407	<i>S. Enteritidis</i>	소	
JOL408	<i>S. Typhimurium</i>	소	
JOL409	<i>S. Dublin</i>	소	
JOL410	<i>S. Derby</i>	소	
JOL411	<i>S. Cholerasuis</i> ATCC 7001	돼지	
JOL419	<i>S. Gallinarum</i>	닭	
JOL420	<i>S. Gallinarum</i>	닭	
JOL421	<i>S. Gallinarum</i>	닭	
JOL422	<i>S. Gallinarum</i>	닭	
JOL423	<i>S. Gallinarum</i> ATCC 9184	닭	

2) 닭에서의 치료 효과 검증 실험

(가) 실험에 사용된 약제 및 사료

이 실험에서 사용된 약제는 NP532와 양성대조로서 tetracycline을 사용하였으며, 동물 사육에 사용한 사료는 항생제가 첨가되지 않은 것이다.

(나) 실험동물의 구성

본 실험에는 7~10일령의 삼계용 닭을 사용하였다. 실험에 사용하기 전 3일간의 적응기간을 두었다. 실험동물은 각 군당 30마리씩 총 3군으로 나누어 분리사육 하였다.

1군(test group) - NP532를 2%씩 사료에 첨가해 제공

2군(positive control) - tetracycline을 권장량인 0.05%씩 사료로 첨가해 제공

3군(negative control) - 사료만 제공

실험 전에 미생물학적 검사를 실시하여 *Salmonella spp.*에 감염되어 있지 않음을 확인하였다. 실험을 수행하는 기간 내내 충분한 양의 사료와 음수를 공급하였다. 또한 사육장내에서의 재감염을 줄이기 위해 매일 사료통과 물통 및 바닥등을 갈아주었다.

(다) *S. Gallinarum*의 접종

Tetracycline susceptible strain인 *S. Gallinarum* (JOL 420)을 Tryptic Soy broth (TSB; Difco, USA)에 접종하여 37°C shaking incubator에서 20시간 배양 후 2,500rpm에서 30분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 균체를 1X phosphate buffered saline(PBS)으로 1회 세척 후, 20% sucrose in 1X PBS에 재부유시켜 1×10^6 cfu/2ml씩 zondae를 이용하여 경구 접종하였다.

(라) 닭에서의 약제 치료효과 조사

닭에 *S. Gallinarum*을 투여한 후, 닭의 생존여부와 분변으로 배출되는 *Salmonella spp.*의 수를 조사하였다. 생존여부는 약제 투여 후 5일 동안 매일 조사하였고, 분변으로 배출되는 균수는 균 접종직전의 변을 통해 *Salmonella spp.*에 감염되어 있는지를 조사한 다음, 균 접종 후 1일, 3일, 5일째의 분변을 받아 1X PBS를 이용해 1×10^{-3} , 1×10^{-5} 으로 계대 희석하였다. 그리고 희석된 시료를 100 μ l씩 Salmonella & Shigella (Difco, Sparks, USA) agar에 접종하고 37°C incubator에서 18~20시간 배양한 후 균락 수를 조사하였다.

(마) 조직표본의 제작

NP532군의 병아리와 대조군에서 3마리씩 병아리를 부검하여 간, 비장, 신장을 formaline에 고정한 후, hamatoxylin & eosin(H&E) stain으로 조직표본을 제작현미경으로 관찰하였다.

3) 결과

균 투여 후, 분변에서 검출된 *Salmonella spp.*의 집락 수와 닭의 생존률을 조사하였다. Table 19 닭의 생존률을 조사한 결과이다. 분변을 통한 균락 수에서는 각 군에서 유의하게 차이를 보이지 않았다. 하지만 생존률에서는 균 투여 후 5일째 까지 NP532 공급군에서 30 마리 중 63% (19마리)가 살아남은 반면, tetracycline 투여군에서는 43% (13마리)가 살아남았고 대조군에서는 20% (6마리)만이 살아남았다. 또한 실험이 끝날 때까지 NP532 공급군 병아리들의 활동성은 매우 활발하고 건강해 보인 반면, 2군과 특히 3군은 매우 침울하며 기모역립등의 증상이 있었다. 따라서 NP532는 병아리의 생존률을 높이는데 탁월한 효과가 있는 것으로 보인다.

Table 19. Survival rate of chicken after infection of *S. Gallinarum*

Group	Number of dead chicken after <i>S. Gallinarum</i> infection						
	0 day	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	Total death
NP532				3	5	3	11
Tetracycline				4	6	7	17
Control			3	5	8	8	24

4) 병리 조직학적 관찰

병리조직학적 관찰을 통해 치료효과 조사한 후 다음과 같은 결과를 얻었다.

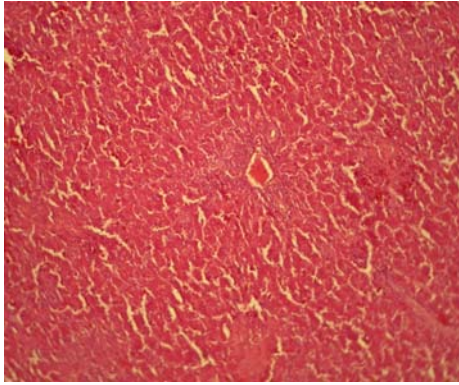


Figure 1-1. 황열복합체 투여군의 간(x100)

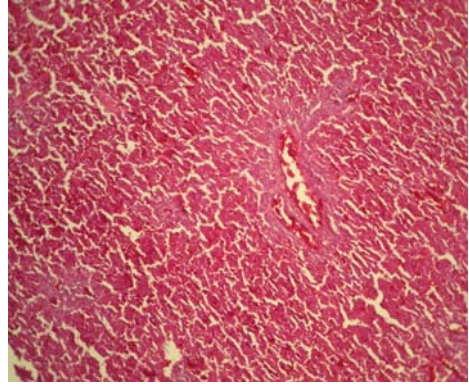


Figure 1-2. 대조군의 간(x100)

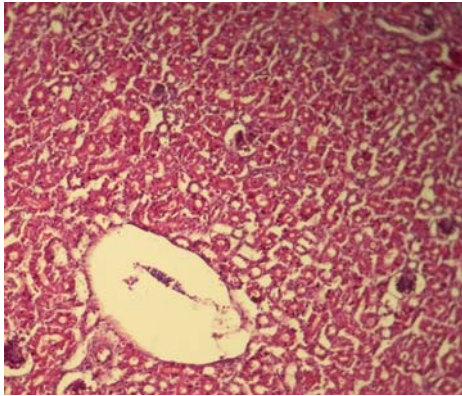


Figure 12-1. 황열복합체 투여군의 신장 (x100)

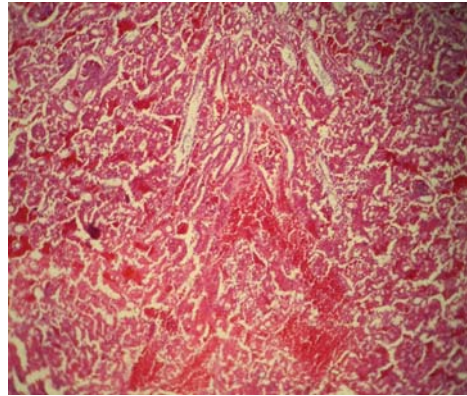


Figure 12-2. 대조군의 신장(x100)

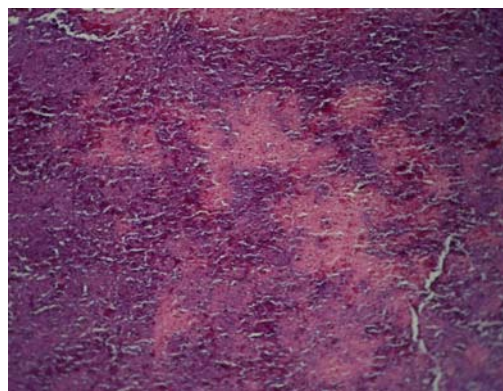
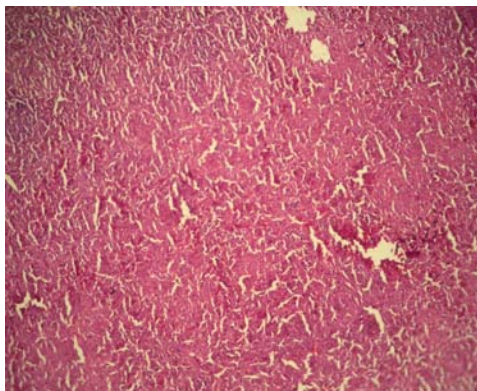


Figure 13-1. 황련복합제 투여군의 비장(x100) Figure 13-2. 대조군의 비장(x100)

(가) liver

NP532 투여군의 간은 정상소견을 보이고 있다. 정상적인 central vein과 그 주변의 sinusoid가 관찰된다(Figure 12-1). 대조군의 간은 동모양혈관에서 울혈이 관찰되며, 혈관 주변이 괴사(Figure 12-2)되어 있다.

(나) kidney

NP532 투여군의 신장은 정상소견(Figure 12-1)을 보이고 있으며 정상적인 intralobular vein과 renal corpuscle, convoluted tube 등이 보이고 있다. 하지만 대조군의 신장은 울혈과 괴사가 심하여 renal corpuscle과 convoluted tube의 관찰이 용이하지 않다. 특히 vein주변의 proximal convoluted tube의 괴사가 심하게 관찰된다(Figure 12-2).

(다) spleen

NP532 투여군은 정상소견(Figure 13-1)을 보이고 있으며 정상적인 적색수질과 백색수질, 림프절 등이 관찰된다. 대조군에서는 적색수질이 더 많이 관찰되어 적색수질의 울혈이 인정된다. (Figure 13-2). 또한 대조군에서는 적혈구가 더 많이 관찰되며 백색수질과 림프절도 더 뚜렷하게 보이는 것으로 보아 균 접종에 따른 염증반응이 강하게 이루어진 것 같다.

5) 결 론

NP532를 이용하여 살모넬라균에 대한 최소성장저해농도를 조사하였다. 이 실험을 통해 선택한 *S. Gallinarum* 을 7~10일령의 병아리에 인공감염 시킨 후, test group에는 NP532를 사료에 2%의 비율이 되도록 첨가하고, positive control group에는 tetracycline 을 권장량인 0.05%의 비율이 되도록 첨가하고, negative control group에는 약제 무첨가

사료를 제공하여, 분변을 통한 살모넬라의 배출량과 병아리의 생존 여부 및 병리조직학적 관찰을 통해 치료효과 또한 조사하였다.

(가) NP532를 이용한 살모넬라의 최소성장저해농도는 0.49~7.8mg/ml 이었다. 균주별로는 *S. Paratyphi*와 *S. Derby*가 0.49mg/ml에서 MIC를 보였고, *S. Dublin*과 *S. Thphi*가 1.9mg/ml에서 *S. Cholerassuis*는 7.8mg/ml에서 MIC를 나타내었다. *S. Enteritidis*는 1.9~3.8mg/ml에서 *S. Typhimurium*과 *S. Gallinarum*은 1.9~7.8mg/ml에서 MIC를 보였다. 목적동물인 닭을 이용한 실험을 위해 사용한 JOL420은 *S. Gallinarum*이며 7.8mg/ml의 MIC를 나타내었다.

(나) 닭에 살모넬라균을 투여한 후에 분변으로 배출되는 살모넬라의 균락수를 조사해 본 결과, 실험군과 대조군 사이에 그다지 유의성 있는 차이는 없었다. 병아리들의 분변을 SS agar에 도말하여 본 결과, 균락을 형성하지 않는 것이 대부분이었다. 하지만 생존률에서는 현격한 차이를 보였다. 균 투여 후 6일간 관찰하여 본 결과 NP532 투여군이 63%, positive control(tetracycline 투여)군이 43%, negative control(무약제투여) 군이 20%의 생존률을 보였다. 이를 통해 NP532 투여군이 negative control군 보다는 3배, 현 상용의 항생제인 tetracycline 공급군(positive control)보다는 약 1.5배 높은 생존률을 보인 것을 알 수 있다.

(다) NP532 투여군과 negative control군의 병아리를 부검하여 병리 조직학적인 관찰을 하였다. 그 결과 NP532 투여군은 정상과 다른 조직소견을 보였지만 대조군은 병리적으로 울혈과 괴사 그리고 염증반응의 소견을 보였다. 이는 NP532 투여가 생체 내에서 조직에 독성을 나타내지 않으면서도 균 방어에 효과적이었음을 나타내는 것이다.

라. 사양시험(육계와 산란계)

1) 사양시험

(가) 육계 사양시험

시험 1은 육계 1일령 코브 수컷(평균 44g)을 이용하여 5주간 사양시험을 진행하였다. 육계 사료에 한약재를 0, 0.25, 0.5, 1, 2% 수준으로 첨가하였고, 처리구당 4반복, 반복당 16수씩 총 320수를 공시하였다. 사료내 영양소 함량은 사육전기 2주와 후기 3주로 구분하여 각각 CP 22, 20%와 ME는 3,100kcal/kg 수준으로 하였고, 기타 영양소 함량은 NRC 사양표준(1994)에 의거하였다.

(나) 산란계 사양시험

시험 2에서는 강제환우 시킨 산란계 하이라인 갈색계(86주령)를 이용하여 4주간 사양실험을 시행하였다. 산란계 사료에 한약재를 0, 0.05, 0.1, 0.2% 수준으로 첨가하여 4개 처리구를 두었고, 처리구당 4반복, 반복당 18수씩, 총 288수를 공시하였다.

2) 조사항목

(가) 육계와 산란계의 생산성

육계의 체중, 사료섭취량, 사료요구율은 전기와 후기로 구분하여 측정하였으며, 사료요구율은 사료섭취량을 증체량으로 나누어 계산하였다.

산란계의 산란수와 난중은 매일 조사하였고, 사료섭취량은 시험 종료시 조사하였다. 산란율은 산란수와 사육수수로 나눈 값(헨데이 산란율)로 표시하였고, 평균 난중은 연란과 기형란을 제외하고 계산하였다. 1일 산란량은 1일 평균 산란율과 평균 난중을 곱하여 계산하였고, 사료요구율은 1일 평균 사료섭취량을 1일 산란량으로 나누어 계산하였다.

(나) 혈액의 정상

혈청 중 총 단백질, 알부민, 총콜레스테롤, 중성지방, HDL-cholesterol 등의 함량은 ADVIA 1650(JEOL, JAPAN)으로 측정하였다.

(다) 난각강도, 난각두께, 호유닛(Haugh unit), 난황색도

난각강도, 난각두께, 호유닛, 난황색도는 8주 간격으로 조사하였으며, 처리구당 30 반복으로 측정하였다. 난각강도는 난각강도계(FHK, Japan)를 이용하였고, 난각두께는 내부 난각막을 제거한 후 micrometer(FHK, Japan)로 측정하였다. 호유닛과 난황색도는 계란 품질측정기(QCM+, TSS, England)를 이용하여 측정하였다.

2) 병리 조직학적 검사

약제가 동물 신체에 미치는 독성 및 안전성을 조사하기 위하여 병리 조직검사를 실시하였다. NP532 0.2% 투여군과 약제비투여 대조군에서 3마리씩 닭을 부검하여 간, 신장을 formaline에 고정한 후, hamatoxylin & eosin(H&E) stain으로 조직표본을 제작·현미경으로 관찰하였다.

3) 시험결과

(가) 한약재의 급여가 육계의 생산성에 미치는 영향

육계에서 한약재 추출물을 수준별로 급여하였을 때, 증체량은 1-2, 3-5, 1-5주 기간별로 유의한 차이는 발견할 수 없었으나 한약재 추출물 0.25% 첨가구가 대조구에 비하여 증가하는 경향을 보였다.

사료섭취량의 경우, 한약재 추출물 2% 첨가구는 1-2주와 3-5주 기간 동안에서 차이가 없었으나 시험 전체기간(1-5주)으로 계산하였을 때에는 대조구와 비교하여 유의하게 감소하였다.

사료요구율에 있어서는 한약재 첨가구 전체에서 3-5주와 시험 전체기간(1-5주)에서 대조구보다 유의하게 개선되었다.(Table 20)

Table 20. 한약재의 급여가 육계의 생산성에 미치는 영향 (시험 1)

처리구 (%)	증체량(g)			사료섭취량(g)			사료요구율		
	1-2주	3-5주	전체	1-2주	3-5주	1-5주	1-2주	3-5주	1-5주
0	384	1,294	1,679	495	2,362	2,857 ^a	1.287	1.826 ^a	1.702 ^a
0.25	390	1,353	1,743	500	2,375	2,874 ^a	1.285	1.755 ^b	1.649 ^b
0.50	391	1,291	1,682	494	2,283	2,777 ^{ab}	1.266	1.767 ^b	1.651 ^b
1.00	382	1,277	1,659	501	2,229	2,731 ^{ab}	1.315	1.747 ^b	1.647 ^b
2.00	376	1,244	1,619	492	2,171	2,663 ^b	1.310	1.746 ^b	1.645 ^b
SEM	3.47	13.56	14.62	4.02	25.91	25.52	0.01	0.01	0.01

(나) 한약재의 급여가 육계의 혈액 성상에 미치는 영향

육계에서 한약재 추출물을 수준별로 급여하여 혈액의 성상을 조사한 결과, 혈중 총단백질, 알부민, 글루코스 농도에서는 대조구와 차이가 없었다. 그러나 콜레스테롤과 중성지방 농도는 한약재 추출물 1%와 2% 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 감소하였다.(Table 21.).

Table 21. 한약재의 급여가 육계의 혈액 성상에 미치는 영향 (시험 1)

처리구(%)	알부민	단백질	글루코스	콜레스테롤	중성지방
0	1.11	2.77	200.1	171.3 ^{ab}	20.3 ^a
0.25	1.18	2.90	217.9	182.0 ^a	20.3 ^a
0.50	1.18	2.84	219.7	182.9 ^a	20.9 ^a
1.00	1.13	2.81	211.9	153.3 ^c	15.3 ^b
2.00	1.10	2.65	212.3	159.6 ^{bc}	15.5 ^b
SEM	0.01	0.03	3.33	2.67	0.73

(다) 한약재의 급여가 산란계의 생산성에 미치는 영향

산란계에서 한약재 추출물을 수준별로 급여하여 생산성을 비교한 결과, 일반적으로 한약재 추출물 첨가구가 대조구에 비하여 개선되는 경향을 보였으나 유의적인 수준은 아니었다.

(Table 22.)

Table 22. 한약재의 급여가 산란계의 생산성에 미치는 영향 (시험 2)

처리구(%)	산란율	난중	산란량	사료섭취량	사료요구율 (feed/egg)
	(%, 헨데이)	(g)	(g/수/1일)	(g/1일)	
0	82.85	68.6	56.8	124.0	2.181
0.05	83.43	69.1	57.6	123.4	2.142
0.10	83.58	69.4	58.0	125.0	2.156
0.20	84.85	68.8	58.4	128.5	2.203
SEM	0.40	0.29	0.39	0.81	0.02

(라) 한약재의 급여가 산란계의 계란품질에 미치는 영향

산란계에서 한약재 추출물을 수준별로 급여하여 난품질을 비교한 결과, 일반적으로 한약재 추출물 첨가구가 대조구에 비하여 개선되는 경향을 보였으나 유의적인 수준은 아니었다. (Table 23.)

Table 23. 한약재의 급여가 산란계의 계란품질에 미치는 영향 (시험 2)

처리구(%)	난각강도	난각두께	난백고	호유닛	난황색도
	(kg/cm ²)	(μ m)	(mm)		
0	4.89	332	7.15	81.4	7.4
0.05	5.09	349	7.19	81.4	7.5
0.10	4.99	335	7.15	81.5	7.9
0.20	4.75	343	7.18	81.2	7.6
SEM	0.10	2.85	0.12	0.78	0.07

4) 병리 조직검사

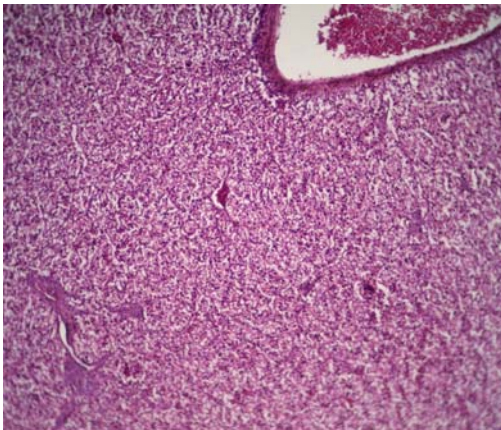


figure 14. control 간(x100)

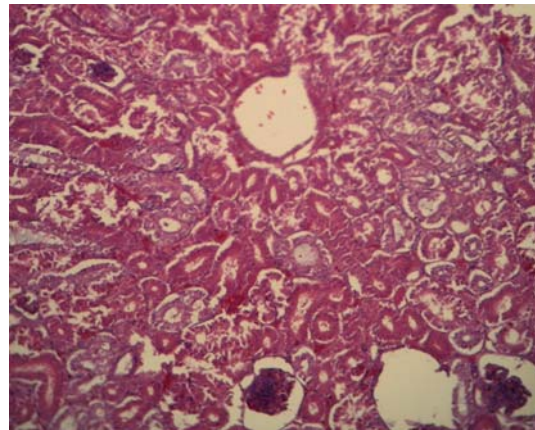


figure 14. control 신장(x100)

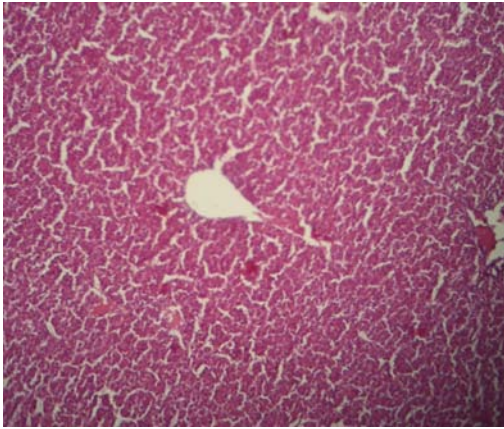


figure 14. 약물0.2% 사료의 닭의 간(x100)

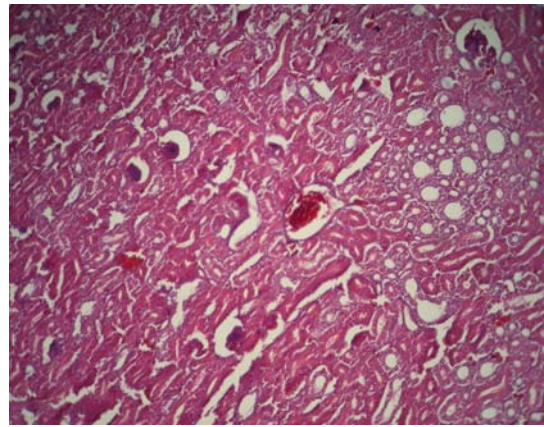


figure 14. 약물 0.2% 사료의 닭의 신장(x100)

약제 투여군과 비투여군에서 모두 이상조직소견이 발견되지 않음.

- 간의 central vein, portal vein 주변으로 괴사 소견 및 울혈 소견이 관찰되지 않음
- 신장의 vein주변의 근위곡세뇨관과 원위곡세뇨관이 정상적으로 관찰되며 figure 14.의 오른쪽으로 보이는 부분은 medullary cone로써 정상소견임. 중간 중간에 진하게 보이는 부분은 renal corpuscle로 이 또한 정상 소견임. 따라서 약제는 신체 장기에서 독성을 보이지 않는 안전한 조성인 것으로 보임.

5) 병리 조직검사

육계에서 한약재 추출물을 수준별로 급여하였을 때, 증체량은 1-2, 3-5, 1-5주 기간별로 유의한 차이는 발견할 수 없었으나 한약재 추출물 0.25% 첨가구가 대조구에 비하여 증가하는 경향을 보였다. 사료섭취량의 경우, 한약재 추출물 2% 첨가구는 1-2주와 3-5주 기간 동안에서 차이가 없었으나 시험 전체기간(1-5주)으로 계산하였을 때에는 대조구와 비교하여 유의하게 감소하였다. 사료요구율에 있어서는 한약재 첨가구 전체에서 3-5주와 시험 전체기간(1-5주)에서 대조구보다 유의하게 개선되었다. 육계에서 한약재 추출물을 수준별로 급여하여 혈액의 성상을 조사한 결과, 혈중 총단백질, 알부민, 글루코스 농도에서는 대조구와 차이가 없었다. 그러나 콜레스테롤과 중성지방 농도는 한약재 추출물 1%와 2% 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 감소하였다. 산란계에서 한약재 추출물을 수준별로 급여하여 생산

성과 난품질을 비교한 결과, 일반적으로 한약재 추출물 첨가구가 대조구에 비하여 개선되는 경향을 보였으나 유의적인 수준은 아니었다. 약재가 동물 신체에 미치는 독성 및 안전성을 조사하기 위하여 NP532 투여군과 비약재 투여군의 닭을 부검하여 간과 신장의 병리 조직학적인 관찰을 하였다. 그 결과 NP532 투여군은 비 약재 투여군처럼 정상과 다른없는 조직소견을 보였다. 이 결과를 토대로 천연약재인 NP532가 생체 내에서 조직에 독성을 나타내지 않고 안전한 약재인 것으로 사료된다

결론적으로 천연신약제 NP532는 살모넬라의 감염 치료에 탁월한 효과가 있음을 알 수 있었으며 매우 유효한 신개념의 항생제의 후보물질로 평가된다. 또한 사양시험에서 육계에서 한약재 추출물을 수준별로 급여하였을 때, 한약재 추출물 0.25% 첨가구가 대조구에 비하여 증가하는 경향을 보였다. 사료섭취량의 경우, 시험 전체기간(1-5주)으로 계산하였을 때에는 대조구와 비교하여 유의하게 감소하였다. 사료요구율에 있어서는 한약재 첨가구 전체에서 3-5주와 시험 전체기간(1-5주)에서 대조구보다 유의하게 개선되었다. 콜레스테롤과 중성지방 농도는 한약재 추출물 1%와 2% 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 감소하였다. 또한, NP532 투여군은 비 약재 투여군처럼 정상과 다른없는 조직소견을 보였다. 이 결과를 토대로 천연약재인 NP532가 생체 내에서 조직에 독성을 나타내지 않고 안전한 약재인 것으로 사료된다

마. 오매의 항염증활성 측정

1) 오매추출물이 세포생존율과 LPS로 유도한 NO와 PGE₂ expression에 미치는 영향

오매추출물이 LPS로 유도한 NO와 PGE₂ expression에 미치는 영향을 위해 RAW 264.7 cells의 cell culture media를 수확하고 nitrite와 PGE₂ levels을 측정하였다. 오매추출물은 LPS로 유도한 RAW 264.7 cells의 NO expression을 용량의존적으로 억제하였다. 오매추출물 고농도에서((1,000µg /mL)) NO expression을 약 77% 억제하였을뿐만아니라 저농도에서도 억제하였다(Fig. 15A). 오매추출물이 PGE₂ expression을 억제하는지를 살펴보기위해서, cells를 오매추출물과 30분간 pre-incubation하고 LPS (200ng/mL)로 24시간 활성화시켰다. Fig. 15B에서와 같이 오매추출물은 용량의존적으로 PGE₂ expressionin을 억제하였다. 오매추출물의 세포독성실험은 RAW 264.7 cells로 MTT assay로 실시하였으며 오매추출물 1,000µg/mL에서도 세포생존율에 영향이 없음을 알 수 있었다.

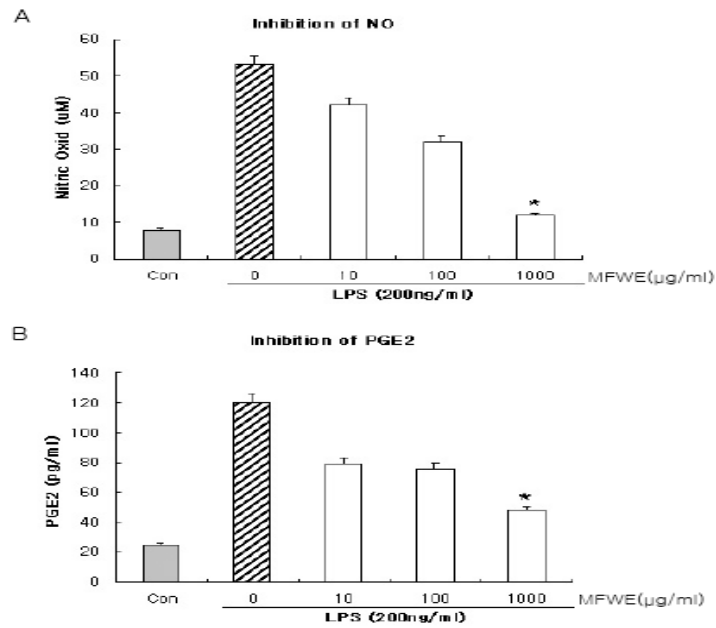


Fig. 15. Effect of MFWE on LPS-induced NO and PGE₂ in RAW 264.7 Cells.

(A) RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of MFWE for 30 min before being incubated with LPS (200ng/mL) for 24 hrs. The culture supernatants were subsequently isolated and analyzed for nitrite production. Control cells were incubated with the vehicle alone. (B) The conditions of sample treatment were identical to those described for Fig 1A. Results are mean \pm S.E. Statistical significance: * $p < 0.05$ vs. the LPS treated group; significances between treated groups were determined using the Student's *t*-test.

2) 오매추출물이 LPS로 유도한 iNOS와 COX-2 protein과 mRNA expressions에 미치는 영향
Western blot and RT-PCR analysis로 오매추출물의 pro-inflammatory mediators인 NO와 PGE₂의 억제효과 실험작용이 iNOS와 COX-2 expression의 modulation과 관련이 있는지를 살펴 보았다. 자극하지 않은 RAW 264.7에서는 iNOS protein과 mRNA는 검출되지 않았는데, LPS로 유도된 세포에서는 iNOS와 COX-2는 강하게 expression되었고, 오매추출물은 iNOS와 COX-2의 expression을 용량의존적으로 억제시킴을 관찰하였다(Fig. 16A). RT-PCR analysis은 iNOS와 COX-2 mRNA expressions이 protein levels과 관련됨을 알 수 있었다. (Fig. 16B).

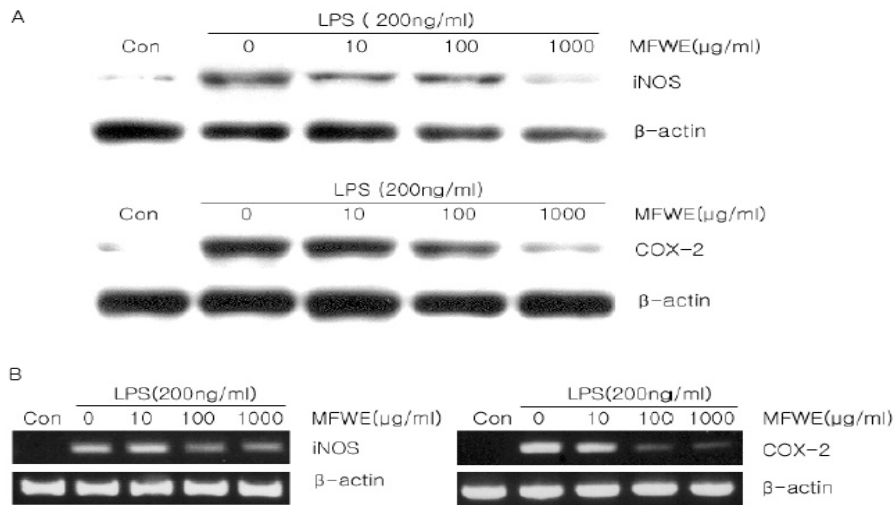


Fig. 16. Effect of MFWE on LPS-induced iNOS and COX-2 protein and mRNA expressions in RAW 264.7 Cells. (A) RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of MFWE for 30 min before being incubated with LPS (200ng/mL) for 24 hrs. Twenty micrograms of cell lysates was separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with iNOS and COX-2 antibodies. Equal loading of proteins was verified by β -actin. (B) iNOS and COX-2 mRNA were assessed by RT-PCR in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with the indicated concentrations of MFWE for 30min before being incubated with LPS (200ng/mL) for 24 hrs. PCR using housekeeping gene β -actin mRNA was carried out in parallel to confirm equivalency of cDNA preparation. The experiment was repeated three times and similar results were obtained.

3) 오매추출물이 LPS로 유도한 IL-6 production과 mRNA expression에 미치는 영향

오매추출물이 pro-inflammatory mediators를 억제하였기 때문에, 본 연구에서 오매추출물이 LPS로 유도한 IL-6 release를 Enzyme-linked immunosorbent assay and RT-PCR법으로 실시하였다. 오매추출물을 전처리하였을 때 IL-6 production을 억제시켰으며(Fig. 17A) mRNA expression도 용량의존적으로 억제하였다(Fig. 17B).

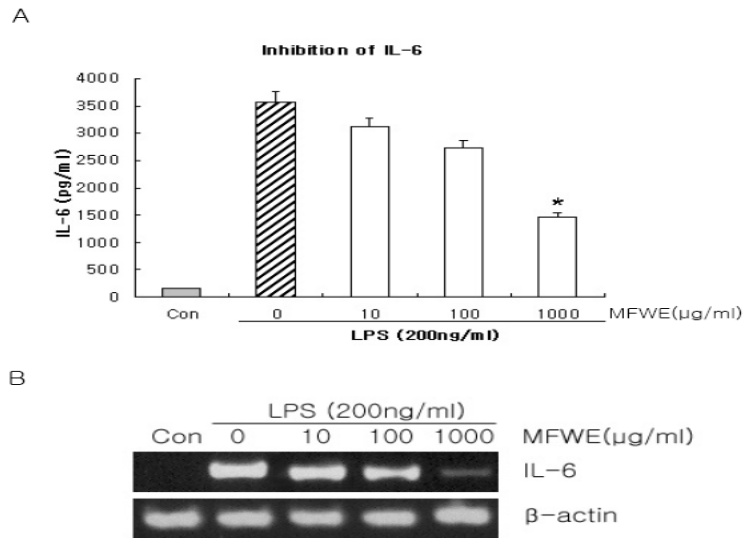


Fig. 17. Effect of MFWE on LPS-induced IL-6 production and mRNA expression. (A) RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of MFWE for 30 min before being incubated with LPS (200ng/mL) for 24 hrs. Production of IL-6 was measured by ELISA. (B) RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of MFWE for 30 min before being incubated with LPS (200ng/mL) for 6 hrs. IL-6 mRNA was assessed by RT-PCR in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with the indicated concentrations of MFWE for 30min before being incubated with LPS (200ng/ml) for 24hrs. PCR using housekeeping gene β -actin mRNA was carried out in parallel to confirm equivalency of cDNA preparation. The results presented are representative of three independent experiments. Results are mean \pm S.E. Statistical significance: * $p < 0.05$ vs. the LPS treated group; significances between treated groups were determined using the Student's *t*-test.

4) 오매추출물이 LPS로 유도한 I κ B α degradation과 NF- κ B nuclear translocation에 미치는 영향

Activation of NF- κ B의 활성화는 iNOS와 COX-2 gene의 induction에 필요하다. 따라서, 활성화된 NF- κ B의 중요 성분이 p65이므로 본 연구에서 Western blot analysis로 nuclear extract에 있는 p65를 측정하였다. RAW 264.7 cells은 LPS로 1시간 동안 오매추출물을 첨가한것과 첨가하지 않은 것으로 비교하였다. LPS로 유도한 p65의 nuclear translocation은 오매추출물의 존재시 용량의존적으로 억제되었다(Fig. 18A). Nuclear translocation inhibitory factor- κ B α (I κ B

a)의 degradation으로 진행된다. In order to determine whether the inhibition of by 오매추출물 에 의한 p65의 억제가 IκBα degradation과 관련이 있는지를 알아보기 위하여, IκBα의 cytoplasmic levels을 Western blot analysis로 측정하였다. Pretreatment of 오매추출물의 전 처리는 LPS로 유도한 IκBα degradation을 억제하였으며 이는 용량의존적이었다 (Fig. 18B).

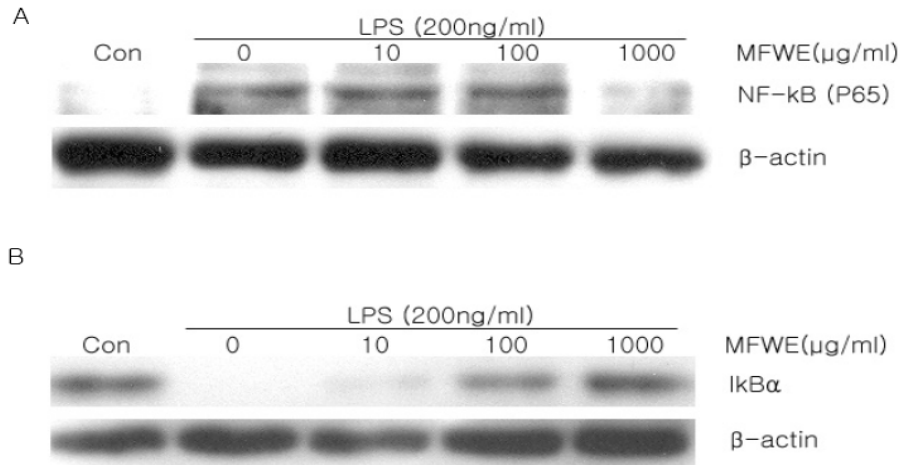


Fig. 18. Effect of MFWE on LPS-induced IκBα degradation and NF-κB nuclear translocation. RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of MFWE for 30 min before being incubated with LPS (200ng/mL) for 1hrs (NF-κB) or 30min (IκBα). Cell lysates were analyzed by Western blot using anti-NF-κB and anti-IκBα antibodies. The experiment was repeated three times and similar results were obtained.

5) 오매추출물이 LPS로 자극한 RAW 264.7 cell에 MAPKs phosphorylation에 미치는 영향

Mitogen-activated protein (MAP) kinases는 세포성장과 분화에 있어 결정적인 역할을 하고 cytokines and stresses의 cellular responses를 제어한다. 더욱이, 이것은 NF-κB의 활성화에 결정적인 역할을 한다. 오매추출물에 의한 NF-κB의 억제가 MAP kinase pathway를 경유하는지를 살펴보기 위해, 본 연구에서 오매추출물이 LPS로 유도한 ERK 1/2, JNK and p38 MAP kinase의 phosphorylation에 미치는 영향을 Western blot analysis로 살펴보았다. 오매추출물은 LPS로 유도한 activation of ERK 1/2, p38 MAP kinase의 활성을 용량의존적으로 억제하였다 (Fig. 19A,B). Non-phosphorylated ERK1/2 and p38 MAP kinase의 용량은 LPS나 오매추출물의

처리에 영향을 받지 않았다. 오매추출물은 ERK1/2과 p38 MAP kinase의 activation을 활성화하였지만 phosphorylation of JNK MAP kinase의 활성화는 오매추출물의 처리에 영향을 받지 않았다(Fig. 19C). 이러한 결과는 p38과 ERK1/2 MAP kinase의 phosphorylation은 involved in the inhibitory effect of 오매추출물이 LPS로 유도한 NF- κ B의 억제효과를 포함하고 있음을 알 수 있었다.

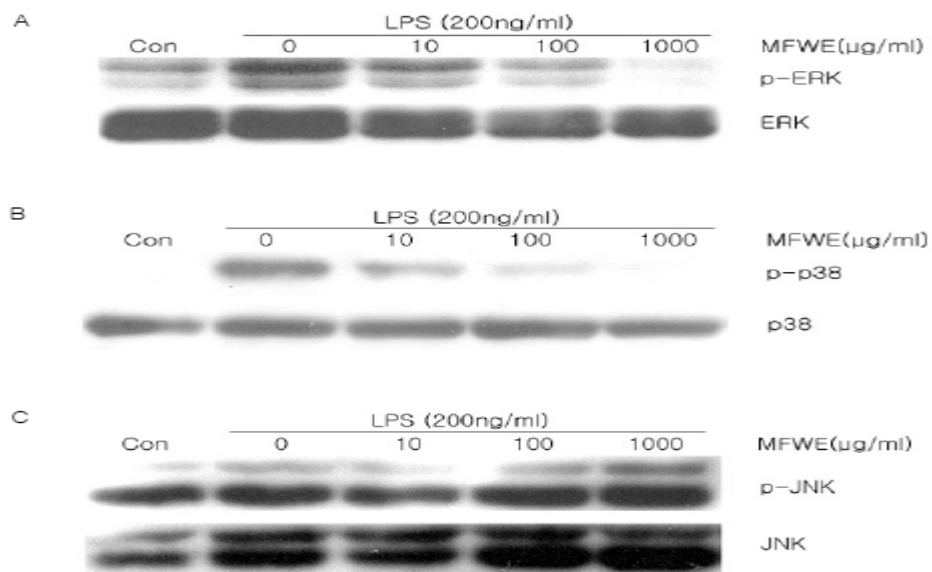


Fig. 19. Effect of MFWE on LPS-induced phosphorylation of MAPKs in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of MFWE for 30 min before being incubated with LPS (200ng/mL) for 30 min. Whole cell lysates were analyzed by Western blot analysis. The experiment was repeated three times and similar results were obtained.

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연구개발목표의 달성도

1. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
단일성분 분리 및 구조 동정	<ul style="list-style-type: none"> • 오미자 : gomisin J, gomisin A, angeloyl gomisin H, schizandrin 등의 4종 단일물질을 분리 및 동정 및 항균활성 측정 완료 • 오매 : Benzyl-β-D-glucopyranoside, Ursolic acid 등의 2종 단일물질을 분리 및 동정 및 항균활성 측정 완료
실험동물 모델 확립	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Sallmonella gallinarum</i> 감염 목적동물(닭)의 치료효과 모델을 확립 • <i>S. typhimurium</i>을 공격 접종한 실험동물(마우스)의 모델의 확립
약제의 항균효과 및 안전성 연구	<ul style="list-style-type: none"> • 디스크 실험 측정하여 항균후보물질 스크리닝 • MIC 측정하여 항균후보물질 스크리닝 • 오매, 오미자의 <i>S. gallinarum</i> 감염 목적동물(닭)과 <i>S. typhimurium</i>을 공격 접종한 실험동물(마우스)의 항균활성 측정 • 오매, 황련 및 오미자의 <i>S. gallinarum</i> 감염 목적동물(닭)의 항균활성 측정과 사양실험 완료

2. 연구개발 수행내용 및 목표달성도

가. 연구개발목표의 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
성분분리와 안전성연구	단일성분 분리 및 구조 동정	100
	실험동물 모델 확립	100
	약제의 항균효과 및 안전성 연구	100

3. 연구성과(※ 해당되는 경우 구체적으로 작성)

가. 논문게재 성과

게재연도 (미게재)	논문명	저자	학술지 명	Vol.(N o.)	국내 외 구분	SCI 구분	상태
2006.05	The anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of ethyl acetate fraction of cynanchi paniculati radix.	권동렬	B i o l Pharm Bull.	29(5):9 71-5.	국외	SCI	발간
2006.10	Antibacterial activity of medicinal herb extracts against Salmonella.	이준화	Int J Food Microbi ol.	1:111(3):270 -5.	국외	SCI	발간
2007.04	Ethyl acetate extract from Angelica Dahuricae Radix inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E(2) and tumor necrosis factor- α via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B in macrophages.	권동렬	Pharma c o l Res.	55(4):2 63-70.	국외	SCI	발간

나. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원 연도	특허명	출원인	출원 국	출원번호	등록 연도	특허 명	등록 인	등록 국	등록 번호
2005. 05.18	항균활성을 갖는 오미자 추출물을 함유하는 조성 물	원광대학교 산학협력단	한국	10-2005-0 041634					
2007. 04.23	오매, 황련 및 오미자를 포함하는 항균 활성이 있 는 동물 사료용첨가제조 성물 및 항균제	원광대학교 산학협력단	한국	10-2007-0 039150					

다. 인력활용

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
	1	5			4	2	4	1	1

제 2절 관련분야의 기술발전예의 기여도

본 연구는 학제간의 연구로 진행되었다. 분명한 경계를 결정할 수는 없지만 대략 아래와 같은 구분으로 진행되었다. 수의과부분의 연구는 목적동물과 실험동물에 대한 폭넓은 실험을 담당하였으며, 약학분야(한약포함)는 문헌과 약리활성부분의 연구를 담당하였으며, 의

학부분에서는 안전성검사와 항균활성에 관한 내용이 이루어졌다. 융합된 연구 자체가 하나의 관련분야에서의 기술발전이라 생각되며 향후 학제간의 벽 없는 연구가 심화되기를 기대한다.

각자의 전공분야에서 보이지 않는 사각지대를 연구분야로 끌어드림으로서 예상한 결과를 도출할 수 있었다.

제 5장 연구개발결과의 활용계획

시험된 효과성 물질을 축산 질병 치료 및 예방의 목적으로 활용하는데, 개발된 약제를 단독으로 사용하여 주 치료제로 사용하거나, 기존항생제와 병행하여 사용하여 보조제로 사용할 계획이며, 그 후 인체에 질병 치료 및 예방의 목적으로 활용할 계획이다.

단기적 계획으로는 상기 후보약재로 하여 사료개발 및 항균제개발에 박차를 가한다. 장기적 계획은 약효가 우수하여 현실적인 제품개발에 제한이 있는 약재의 연구로 사료개발 및 항균제개발에 활용할 계획이다.

제 1절 추가연구의 필요성

상기 실험의 내용은 새로운 후보물질에서 항균활성을 측정하여 우수한 항균사료제 개발을 목표로 하고 있다. 하지만 시간적인 여유(연구기간의 연장)와 경제적인 협조(연구비의 증액)가 이루어진다면 아래의 연구를 해 보고 싶다.

1. 더 많은 다양한 전통처방에서 항균활성물질의 효력을 갖는 사료제 개발을 목표로 한다.
2. 면역력을 증가시키는 한약재를 찾아서 자연스럽게 질병을 이겨내는 후보물질을 찾는다.
3. 동물용 항바이러스제를 개발한다.
4. 성장촉진 한약 사료를 개발한다.
5. 동물용 염증질환치료 사료를 개발한다.

제 2절 타연구에의 응용

본 연구를 기본으로하여 아래의 타 연구에 응용이 가능하리라 본다.

1. 단순한 동물용 항균사료뿐만 아니라 활성이 뛰어난 후보물질을 인체에 적용시키는 의약

품으로 개발이 가능하리라 본다.

2. 목적동물을 닭으로 한정하여 실험하였으나 돼지, 소, 개, 기타의 동물용 사료제로 개발이 가능하다.

제 3절 기업화 추진방안

상기 연구에 대한 특허를 이용하여 관련 회사(제약회사, 사료회사 등)와 윈윈(win-win) 전략으로 상품화를 시도할 계획이다. 상품화 과정에서 꿀벌, 사슴, 새우, 토끼 및 말 등의 사료제로 응용범위를 확대하여 상품화할 전략을 구상하고 있다.

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

중국에서의 다양한 약재로 사료에 사용하는 것을 수집하였다. 중국의 사료첨가제의 개념은 사료첨가제와 한약사료첨가제로 구분되어 있다. 이는 한약을 인체에만 적용하는 것이 아니라 모든 동물에게 한의학의 이론을 적용시키고 있는 것이다. 또한 중국인민공화국 수의약품조례에도 한약을 이용한 다양한 한 약제(단방 및 복합 처방)이 수록 되어 있다. 수의약품을 등록하는데도 다양한 한약제가 실려 있고 상품화되어 있다. 한약 사료첨가제의 범위가 넓고 다양한 목적동물을 상대로 한 사료가 개발되어 하기 받은 것을 알 수 있었다. 이에 관한 규정 연구를 통하여 보수적인 관점의 한약 사료첨가제 부분을 적극적이고 능동적으로 행정에 영향을 주기를 희망한다. 즉, 장기간 우수한 효과로 사용하여 온 한약재를 이용하여 사료를 개발하는 것을 자연스럽게 뒷받침하여 상품화하는 과정을 이끌어 가게 하는 것이다.

제 7장 참고문헌

1. Griffin, P. M. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, p.739-761. In M. J. Blaser, P. D. Smith, J. I. Ravdin, H. B. Greenberg, and R. L. Guerrant (ed), *Infections of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, N.Y.
2. Karmali, M. A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2:15-38.
3. Allerberger, F., D. Rosboth, M. P. Dierich, S. Aleksic, H. Schmidt, and H. Karch. 1996. Prevalence and clinical manifestations of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Austrian children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15:545-550.
4. Cordovez, A., V. Prado, L. Maggi, J. Cordero, J. Martinez, A. Misraji, R. Rios, G. Soza, A. Ojeda, and M. M. Levine. 1992. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with hemolytic-uremic syndrome in Chilean children. *J. Clin. Microbiol.* 30:2153-2157.
5. Huppertz, H.I., D. Busch, H. Schmidt, S. Aleksic, and H. Karch. 1996. Diarrhea in young children associated with *Escherichia coli* non-O157 organisms that produce Shiga-like toxin. *J. Pediatr.* 128:341-346.
6. Tamura, K., R. Sakazaki, M. Murase, and Y. Kosako. 1996. Serotyping and categorisation of *Escherichia coli* strains isolated between 1958 and 1992 from diarrhoeal diseases in Asia. *J. Med. Microbiol.* 45:353-358.
7. Year 2000 Data from Centers for Disease Control and Prevention, USA.

8. Hoyle, B. 2000. Renewed concerns over *E. coli* O157:H7 in Ground beef. ASM News. 66(6):331-332.
9. Laegreid W. W., R. O. Elder, J.E. Keen. 1999. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in range beef calves at weaning. Epidemiol Infect. 123:291-298.
10. Whipp S.C., M.A. Rasmussen, and W.C. Cray, Jr. 1994. Animals as a source of *Escherichia coli* pathogenic for human beings. J. Am. Vet. Med. Assoc. 204:1168-1175.
11. Dean-Nystrom, E. A., B.T. Bosworth, W. C. Cray Jr., and H. W. Moon. 1997. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. Infect. Immun. 65:1842-1848.
12. Synge, B.A. 2000. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a veterinary view. J. Appl. Microbiol. 88:31s-37s.
13. Knutton, S. 1994. Attaching and effacing *Escherichia coli*, p.567-591. *Escherichia coli* in Domestic animals and Humans. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
14. Wells, J. G., B.D. Davis, I. K. Wachsmuth, L. W. Riley, R. S. Remis, R. Sokolow, and G. K. Morris. 1983. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. J. Clin. Microbiol. 18:512-520.
15. Pijpers, A. P., van Setten, V. van Hinsberggh, L. Monnens, and L. van der Heuvel. 1997. Verocytotoxin-2(VT-2) induces apoptosis in human umbilical vein and glomerular microvascular endothelial cells. 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections.
16. Thomas, A., T. Cheasty, J.A. Frost, H. Chart, H. R. Smith, and B. Rowe. 1996. Vero

cytotoxin-producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O157, associated with human infections in England and Wales: 1992-4. *Epidemiol. Infect.* 117:1-10.

17. Year 1996 Data from Centers for Disease Control and Prevention, USA. 22 *E. coli* O157 outbreaks investigated by CDC during 1982 to 1993.

18. Riley, L. W., R.S. Remis, S.D. Helgerson, H.B. McGee, J.G. Wells, B.R. Davis, R.J. Hebert, E.S. Olcott, L.M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681-685.

19. Carter, A.O., A.A. Borczyk, J.A.K. Carlson, B. Hrvy, J.C. Hockin, M.A. Karmail, C. Krishnan, D.A. Korn, and H. Lior. 1987. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N. Engl. J. Med.* 317:1496-1500.

20. Takeda, T., M. Tanimura, K. Yoshino, K. Yamagata, E. Matsuda, H. Uchida, and N. Ikeda. 1997. Questionnaire-based clinical aspects of VTEC infection in Japan: 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin(Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* Infections.

21. Li, Y., E. Frey, A.M. Mackenzie, B. B. Finlay. 2000. Human response to *Escherichia coli* O157:H7 infection: antibodies to secreted virulence factors. *Infect. Immun.* 68:5090-5095.

22. Colan, J. W., R. KuLee, A. Webb, M.B. Perry. 1999. *Salmonella landau* as a live vaccine against *Escherichia coli* O157:H7 investigated in a mouse model of intestinal colonization. *Can. J. Microbiol.* 45:723-731.

23. Colan, J. W., R. KuoLee A. Webb, A. D. Cox, M.B. Perry. 2000. Oral immunization of mice with a glycoconjugate vaccine containing the O157 antigen of *Escherichia coli* O157:H7 admixed with cholera toxin fails to elicit protection against subsequent colonization by the pathogen. *Can. J. Microbiol.* 46:283-290.
24. Kim, Y. B., J. Okuda, C. Matsumoto, T. Morigaki, N. Asai, H. Watanabe, and M. Nichibuchi. 1998. Isolation of an *Escherichia coli* O157:H7 strain producing shiga toxin 1 but not shiga toxin 2 from patient with hemolytic uremic syndrome in Korea. *FEMS Microbiol.* 166:43-48.
25. 국립보건원, 1999. 99년 O157 첫환자 발생. 국립보건원 자료.
26. Cha, I. H., and Y. H. Kim. 1996. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from animal feces and biochemical characteristics of Verotoxin-2 produced by these strains. *Korean J. Vet. Res.* 36:371-378.
27. Lindgren, S.W., A.R.Melton, and A.D. O'Brien. 1993. Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. *Infect. Immun.* 61:3832-3842.
28. Tesh, V.L., J.A. Burris, J.W. Owens, V.M. Gordon, W.A. Wadolkowski, A.D. O'Brien, and J.E. Samuel. 1993. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect. Immun.* 61:3392-3402.
29. Kim, H.H., M. Samadpour, L. Grimm, C.R. Clausen, T.E. Besser, M. Baylor, J.M. Kobayashi, M.A. Neill, F.D. Schoenknecht, and P.I. Tarr 1994. Characteristics of antibiotics-resistant *Escherichia coli* O157:H7 in Washington state, 1984-1991. *J. Infect. Dis.* 170:1606-1609.

30. Tsuboi I., H. Ida, E. Yoshikawa, S. Hiyoshi, E. Yamaji, I. Nakayama, T. Nonomiya, F. Shigenobu, M. Shimizu, K. O'Hara, T. Sawai, and K. Mizuoka 1998. Antibiotic susceptibility of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolated from an outbreak in Japan in 1996. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42:431-432.
31. Kurioka T., Y. Yunou, H. Harada, E. Kita. 1999. Efficacy of antibiotic therapy for infection with shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in mice with protein-calorie malnutrition. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 18:561-571.
32. Murakami J., K. Kishi, K. Hirai, K. Hiramatsu, T. Yamasaki, M. Nasu. 2000. Macrolides and clindamycin suppress the release of shiga-like toxins from *Escherichia coli* O157:H7 in vitro. *International J Antimicrobial Agents*. 15:103-109.
33. el-Ziney M. G., J. M. Debevere. 1998. The effect of Reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. *J Food Prot* 61:1275-1280.
34. makino S., H. asahura, T. Obayashi, T. Shirahata, T. Ikeda, K. Takeshi. 1999. Molecular epidemiological study on tetracycline resistance R plasmids in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect* 123: 25-30.
35. Haarmann C., H. Karch, M. Frosch, H. Schmidt. 1998. A 3.3-kb plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is closely related to the core region of the *Salmonella typhimurium* antibiotic resistance plasmid NTP16. *Plasmid*. 39: 134-140.
36. Meng J., S. Zhao, M. P. Doyle, S. W. Joseph. 1998. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food, and humans. *J. Food prot*. 61:1511-1514.

37. Oie S., A. Kamiya, M. Tomita, S. Matsusaki, A. Katayama, A. Iwasaki. 1997. In vitro susceptibility of *Escherichia coli* O157 to several antimicrobial agents. *Biol Pharm Bull.* 20:584-585.
38. Johnson J. L., C. L. Brooke, S. J. Fritschel. 1998. Comparison of the BAX for screening *E. coli* O157:H7 method with conventional methods for detection of extremely low levels of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Applied and Environmental Microbiology.* 64:4390-4395.
39. Schmidt H., M. Bielaszewska, H. Karch. 1999. Transduction of enteric *Escherichia coli* isolated with a derivative of shiga toxin 2-encoding Bacteriophage Φ 3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7. 65:3855-3861.
40. Yoh M., E. K. Frimpong, T. Honda. 1997. Effect of antimicrobial agents, especially fosfomycin, on the production and release of Vero toxin by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 19: 57-64.
41. 김나영, 김재규, 김진호, 김학양, 김상우, 김재준, 노임환, 심재건, 안형식, 윤병철, 이상우, 이용찬, 정인식, 정훈용, 홍원선, 최규완, 서정기, 상부위장관 증상이 없는 한국인에서 *Helicobacter pylori* 감염의 혈청학적 유병률에 관한 전국적 역학조사. *대한내과학회지* 2000; 59: 388-397.
42. 김정목, 김주성, 정현채, 고은주, 송인성, 김정룡. *Helicobacter pylori* 병독인자에 의한 인체 위상피세포의 친염증성 cytokine 발현과 apoptosis 유도 및 임상 질환과의 관계. *대한소화기학회지* 2000; 36: 583-596.
43. 崔儒壽. 蔡淦逆轉胃癌前病變的經驗, *中醫雜誌*, 1999; 40: 398.
44. 董明國. 清開靈治療幽門螺旋菌相關性胃炎30例, *北京中醫藥大學學報*, 18; 1. 29.1995.

45. 胡定政,榮進剛.除幽湯治療幽門螺旋杆菌感染的臨床研究,時珍國藥研究. 9; 1. 15. 1998.
46. Kim JS, Kim JM, Jung HC, Song IS. Inhibition of apoptosis in human neutrophils by *Helicobacter pylori* water soluble proteins. Scandinavian Journal of Gastroenterology 2001; 36: 589-600.
47. Kim JS, Kim JM, Jung HC, Song IS. Caspase-3 activity and expression of Bcl-2 family in human neutrophils by *Helicobacter pylori* water-soluble proteins. *Helicobacter* 2001; 6: 207-215.
48. Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY. *Helicobacter pylori* water-soluble surface proteins activate human neutrophils and upregulate the expression of CXC chemokines. Dig Dis Sci 2000; 45: 83-92.
49. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 from cattle in Korea. (2006). International Journal of Food Microbiology.
50. Morphometric studies on the testies of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karpowi*) during the breeding and non-breeding seasons (2005). Veterinary Research Communications.
51. Antibacterial activity of medicinal herb extract against *Salmonella* (2006). International Journal of Food Microbiology.
52. Hydrolysis of agricultural residues and kraft pulps by xylanolytic enzymes from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain BK (2006). Journal of Microbiology and Biotechnology.
53. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O26 and O111 from cattle in Korea (2006). International Journal of Food Microbiology.

54. Isolation and characteristics of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 strains from cattle(2006). *Microbes and Infection*.
55. The anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of ethyl acetate fraction of *Cynanchi Paniculati Radix*(2006). *Biol. Pharm. Bull*.
56. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecRI* and *mecI* genes(2006). *Veterinary Microbiology*.
57. The effect of lectins on *Cryptosporidium parvum* oocyst in vitro attachment to host cells. (2006). *Journal of Parasitology*.
58. Prodomain processing of recombinant plasmepsin II and IV, the aspartic protease of *Plasmodium falciparum*, is auto- and trans-catalytic (2006). *Journal of Biochemistry*.
59. Comparative study of immune responses against *Clostridium perfringens* beta and epsilon toxoids in domestic and laboratory animals using neutralization(2005). *Indian Journal of Animal Sciences*.
60. Methicillin(oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans(2004). *Applied and Environmental microbiology*.
61. Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* o157 in calves associated with diarrhoea (2004). *Veterinary Microbiology*.
62. Cloning and Characterization of a new Cysteine proteinase Secreted By *Paragonimus westermani* Adults Worms. (2005). *American Journal of Tropical medicine and Hygiene*.

63. Prevalence and characteristics of *Esherichia coli* O157 from major food animals in Korea (2004). *International Journal of Food Microbiology*.

64. Evaluation of the Methicillin-resistant *S. aureus*(MRSA)-Screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin (2004). *Journal of Clinical Microbiology*.

주 의

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